

hyperClone® Human Fresh Blood NK Activation/Expansion Cocktail**新鲜血样来源 NK 细胞增强版激活扩增说明书 KIT05****一、 实验前准备**

- ① 耗材：T25 培养瓶（TC treated），T75、T175 培养瓶，细胞培养袋等耗材；
- ② 试剂：生理盐水、DPBS，novaNK-20 培养基（4 度保存），kit05 试剂盒（-20 度保存）；
- ③ 设备：迷你离心机，大容量离心机，水浴锅，培养箱等；
- ④ 40-50ml 新鲜外周血或者脐带血，

二、 d-1/d0 天 包被培养瓶：

- 取 T25 培养瓶一个，加入 5ml DPBS，取 Coating Factor Cocktail 一支融解，融解后用瞬时离心机离心，以便减少粘壁损失，加入到 DPBS 中混匀，封口膜封口后置于 4°C 冰箱，静置包被 16h 以上，第二天使用；
- 或放置于 37 度培养箱 2 小时以上，快速包被；

三、 d0 天血样分离、原代培养**准备工作：**

- 新鲜采集外周血或脐带血 50ml；

分离制备自体灭活血浆：

- ① 离心：取抗凝血 50ml 转移到 50ml 离心管，全血以 1000g，离心 15 min，升 8 降 2；
- ② 灭活：水浴锅 56°C，30min 灭活血浆；
- ③ 离心备用：灭活后，置于 -20°C 存放 15min；再次离心 2100g，30min，取上层血浆至离心管，4°C 保存备用。扩瓶培养使用前可以再次离心一次，去除沉淀。

Ficoll 离心浓缩纯化 NK 细胞

- ④ 将血浆提取步骤中所得的下层细胞样本用生理盐水或 DPBS 稀释到 45ml，轻轻吹打混匀（25ml 移液管），加入一支 Purification Factor Cocktail，轻轻颠倒混匀，室温孵育 20min 后，再用生理盐水或 DPBS 重悬到 90ml（分两个 50ml 离心管），轻轻颠倒混匀，不可吹打，防止吹打开已经形成的细胞团簇。
- ⑤ 取 50ml 离心管，各加入 15ml 的 Ficoll 溶液，按照 2:1 的比例将血液小心加入到

Ficoll 层上。1200g 离心 20min, 缓升缓降, 缓升为 1, 缓降为 0。

⑥ NK 细胞分离制备: 小心吸取白膜层到预加 DPBS 20ml 的 50ml 离心管, 300g, 离心 10min (缓升 8, 缓降 6); 弃上清, 用 10ml novaNK-20 基础培养基重悬细胞, 取样计数。

⑦ 准备培养瓶: 取预先包被的 T25 培养瓶, 倒掉包被液后用 DPBS 洗一遍备用。

NK 细胞接种 D0 天激活

⑧ 接种细胞总数量控制 $2E6-2E7$ 之间, 都统一加入 10ml novaNK-20 基础培养基, 轻轻吹打混匀, 加入 10% 自体血浆, 加入一支 Stimulation Factor Cocktail。置于培养箱静置培养 2 到 3 天。

四、d3 扩瓶到 T75 并补液

- 适度轻轻吹散转移到 T75;
- 配制扩增用完全培养基: 1L novaNK-20 基础培养基, 加入一支 Expansion Factor Cocktail; 形成完全培养基;
- T25 瓶中如有较多贴壁细胞, 首先将细胞悬液转移到 T75 培养瓶后, 拍打T25培养瓶瓶身, 使其脱落 (显微镜观察脱落情况) 而用移液管很难吹打下来; 确认脱落后, 用20ml完全培养基洗涤T25瓶, 加入到T75中,
- 10ml细胞悬液, 加20ml新鲜培养基, 加10%自体血浆2ml, T75瓶终体积为30ml。

五、d4 T75补液20ml

- 向T75培养瓶中加入20ml新鲜完全培养基, 并补加10%自体血浆 2ml。

六、d5 转移到T175并补液

- 适度轻轻吹散转移到 T175;
- 50ml细胞悬液, 加50ml新鲜完全培养基, 加5%自体血浆2.5ml, T175瓶终体积为100ml。

七、d6 T175补液50ml

- 适度轻轻吹散大的细胞团块;
- 100ml细胞悬液, 加50ml新鲜完全培养基, 加5%自体血浆2.5ml, T175瓶终体积为150ml。

八、d7 转移到培养袋

- 适度轻轻吹散大的细胞团块, 并转移到细胞培养袋中;
- 150ml细胞悬液, 加150ml新鲜完全培养基, 加2%自体血浆3ml, 培养袋终体积为300ml;

- 培养袋折叠三分之一培养。

注：如果需要千亿级大规模培养 NK 细胞，推荐先用细胞培养瓶 T175 进行扩瓶培养，扩瓶后再一对一入袋培养。

九、d9 培养袋等量补液300ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 300ml细胞悬液，加300ml新鲜完全培养基，加2%自体血浆6ml，培养袋终体积为600ml；
- 如自体血浆用完可以不用再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；
- 培养袋折叠一半培养。

十、d11 培养袋等量补液600ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 600ml细胞悬液，加600ml新鲜完全培养基，培养袋终体积为1200ml；
- 如自体血浆用完可以不用再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；
- 培养袋打开培养。

十一、d13 培养袋补液600ml

- 轻轻拍打培养袋，使细胞团块分散；
- 1200ml细胞悬液，加600ml新鲜完全培养基，培养袋终体积为1800ml，最多到2L；
- 如自体血浆用完可以不用再添加，如需大规模培养则继续添加1-2%血小板裂解物；

十二、d15/d16 细胞收获

- 最后一次补液间隔一天至两天，细胞密度大于 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 或者更高密度，进行细胞收获。
- 如需放大培养则隔天进行1:1扩袋，如自体细胞需要回输，则择机可以收获细胞。
- 如需收获细胞则充分拍打细胞培养袋，使贴壁细胞脱落；
- 计数并进行流式检测，杀伤实验等后续应用；
- 收获计数时建议采用AOPI染色计数，细胞计数仪对于成熟杆状的 NK 细胞容易漏计；
- 为获得更多的细胞数量，最后一次补液后可以隔两天再进行细胞收获。

十四、 如需继续大规模培养

- 脐带血不建议用自体血浆，全程用血替代，如果要大量培养整个培养过程都建议后期维持1-2%的血替添加量。
- d20天前入袋，隔天补液细胞密度调整至补液后 $1-1.2 \times 10^6$ ；d20天之后间隔2天补液一次，或细胞密度调整至补液后 $1.3-1.5 \times 10^6$
- 补液前需要计数，使得补液后细胞密度不低于 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。视细胞增殖状况进行补液，一般等量补液，细胞增殖旺盛也可以双倍补液。
- 如果要培养多袋细胞，则先各扩增到T175或225培养瓶，然后再各自入袋培养。如果细胞数量少，可以延迟一到两天扩袋，务必使扩袋前培养瓶中细胞数量较多。