

新鲜血样来源 NK 细胞激活扩增说明书 KIT02

一、 实验前准备

- ① 耗材：T75 培养瓶 (**TC treated**)，T175 培养瓶，细胞培养袋，移液管、离心管等耗材；
- ② 试剂：20%HSA，DPBS，novaNK-20 培养基 (4 度保存)，enhancedClone™ Human Mononuclear Cells NK Activation/Expansion Cocktail (KIT02) (-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，
脐带血要求采集量大于 90ml/袋，或者采集前采集袋抽走 14ml 枸橼酸钠抗凝剂，抗凝剂的占比和离体运输时间对脐血 NK 成功培养非常重要，请务必重视；

二、 d-1/d0 天 包被培养瓶：

- 取 T75 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℃ 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；
- 配制稀释液 DPBS 或生理盐水+5%HSA，如：47.5ml DPBS+2.5ml HSA (20%浓度)

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；
- ② 灭活：水浴锅 56℃，30min 灭活血浆，每隔 10 分钟晃动一下离心管；
- ③ 离心备用：灭活后，置于 -20℃ 存放 15min；再次离心 2100g，30min，取上层血浆至离心管，4℃ 保存备用。

新鲜血样 NK 细胞分离纯化：

- a、 **外周血样本：**将血浆提取步骤中所得的下层细胞样本用配制的稀释液按照 1:1 稀释；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 用 25ml 移液管铺层。1200g 离心 20min，缓升缓降，缓升为 1，缓降为 0。
- b、 **脐带血样本：**脐带血不使用自体血浆，直接跳过血浆制备步骤。用稀释液按照 1:2 稀释血液（血液 1 稀释液 2）。取 50ml 离心管，各加入 20ml 的 Ficoll 溶液，按照 1:1 的比例将稀释后的血液小心加入到 Ficoll 层。1200g 离心 20min，缓升缓降，缓升为 1，缓降为 0。

NK 细胞分离制备：

小心吸取白膜层到预加洗液 20ml 的 50ml 离心管，300g，离心 10min（缓升 8，缓降 6）；弃上清，重复如上步骤再洗涤一次；用预温至 37°C 的基础培养基（分装 20ml nova NK-20 基础培养基，培养箱预温）重悬细胞，取样细胞计数。

NK 细胞接种 D0 天激活

- 准备培养瓶：取预先包被的 T75 培养瓶，弃掉包被液。
- 接种细胞总数量控制在 1E7-10E7 之间，都统一加入 20ml 分装的基础培养基，轻轻吹打混匀，加入 10%自体血浆，加入一支 Stimulation Factor Cocktail 1和 Stimulation Factor Cocktail 2。置于培养箱静置培养 2 到 3 天。

四、 d2 或 d3 补液

- d2 或 d3，显微镜观察细胞状态，如细胞融合度超过 50%，有中等以上细胞团块较多，则进行等量补液完全培养基。注意培养基颜色千万不可变的太黄；培养基颜色微黄时需要及时补液；
- 配制激活培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 Expansion Factor Cocktail 1 和一支 Stimulation Factor Cocktail 3。激活培养基 1L 用完后用完全培养基。
完全培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 Expansion Factor Cocktail 1。

五、 扩增培养

以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，适时进行扩瓶，扩瓶时细胞融合度要大于 80%。

T75 培养瓶补液加 10%血浆，T175 培养瓶补液加 5%血浆，全程保持入袋后 2%血浆或血小板裂解物的添加，自体血浆用完可以用血小板裂解物。

脐带血不建议用自体血浆，直接用血小板裂解物替代。

视细胞增殖状况进行补液和扩瓶，一般等量补液，细胞增殖旺盛也可以双倍补液。

当细胞扩增到一定数量可启动回输。

质控点：回输前 3 天，检测无菌，支原体。

最后一次补液，间隔两天再收获细胞，使细胞密度提升上来，培养基营养充分利用。