

冻存单个核细胞来源 NK 细胞激活扩增说明书 KIT02

一、 实验前准备

- ① 耗材：T75 (**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 人单核细胞 NK 增强版激活扩增试剂盒（-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 冻存的 PBMC 或 CBMC 细胞，2E7/ml，共 6E7 细胞；

二、 d0 天复苏接种实验

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；

复苏冻存的 PBMC/CBMC：

- 取 30ml novaNK-20 基础培养基到 50ml 离心管，放置在 **37℃水浴锅预热后使用**；
- 取 6E7 冻存的 PBMC 或 CBMC，水浴锅解冻复苏，注意解冻最后留一小冰晶，1ml 移液枪轻轻吸取复苏液，勿吹打，转移到**预热**的基础培养基中，800rpm，8min 离心，缓升 8 缓降 6；
- 弃去上清，用 20ml novaNK-20 基础培养基重悬细胞。补加 20%血小板裂解物 4ml 和 400μl Stimulation Factor Cocktail 1 一支、200μl Stimulation Factor Cocktail 2 一支；

细胞接种：

- 包被好的 T75 培养瓶，弃去包被液备用，
- 将前步骤细胞悬液转移到 T75 培养瓶，加入时不要冲刷包被面；
- 置于 37℃ 二氧化碳培养箱静置培养 3-4 天；

三、 D3 or D4 T75 补液

- D3 或 d4，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 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 。
- T75, 加入 20ml 完全培养基, 补加 10%血小板裂解物 2ml =44ml
- 该步骤不吹散细胞, 不计数

四、 扩增培养

- 以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6$ /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%血小板裂解物, T175 培养瓶补液加 5%血小板裂解物, 全程保持入袋后 2%血小板裂解物的添加。
- 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。
- 补液后第二天显微镜下观察细胞密度和培养基颜色, 如果培养基颜色已变微黄, 细胞团块和数量也较多, 可以继续补液培养; 如果培养基颜色较红, 并且细胞数量和团块也不是很多, 可以间隔一天, 等细胞数量上来了, 再补液培养;
- 培养基需要预温到室温, 不可反复 37 度预热。当细胞扩增到一定数量可启动回输。
- 为获得更多的细胞数量, 最后一次补液后可以隔 48h 两天再进行细胞收获, 使细胞密度提升上来, 培养基营养充分利用。