

enhancedClone™ Human Fresh Blood NK Activation/Expansion Cocktail**新鲜血样来源 NK 细胞激活扩增说明书 KIT05****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 Fresh Blood NK Activation/Expansion Cocktail (kit05) 人新鲜血样来源 NK 增强版激活扩增试剂盒 kit05 (-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°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;
- 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°C, 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°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。

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配制的稀释液(DPBS+5%HSA)按照 1:1 稀释,

轻轻吹打混匀(25ml 移液管), 加入一支 Purification Factor Cocktail, 轻轻颠倒混匀 5 次, 室温孵育 20min 后, 再用等量的稀释液(DPBS+5%HSA) 进行稀释到 90ml, 轻轻颠倒混匀, 不可吹打。

- 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; 用基础培养基 (分装 20ml nova NK-20 基础培养基) 重悬细胞, 取样细胞计数。
- ⑦ 准备培养瓶: 取预先包被的 T75 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在 $1E7$ - $5E7$ 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。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;
- 配制完全培养基: novaNK-20 基础培养基 1L, 加入一支 Expansion Factor Cocktail 1, 形成完全培养基;

五、 扩增培养

以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至 $1-2 \times 10^6$ /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。

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。