

NK 细胞种子库建库及复苏再激活扩增说明书

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：20%HSA，DPBS，novaNK-20 培养基（4 度保存），hyperClone™ Human Fresh Blood NK Activation/Expansion Cocktail kit03 人新鲜血样来源 NK 高效版激活扩增试剂盒（-20 度保存）； hyperClone™ Human Cryopreserved NK seed Cells Activation/Expansion Cocktail 人冻存 NK 种子细胞**高效**激活扩增试剂盒 kit09（-20 度保存），人血小板裂解物，NK 细胞种子库冻存液（货号 StarSeed-02）
- 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 100ml/袋，或者采集前采集袋抽走 14ml 枸橼酸钠抗凝剂，抗凝剂的占比对脐血 NK 成功培养非常重要，请务必重视；**

二、 NK 细胞种子库建库

（1） d-1/d0 天 包被培养瓶：

- ① 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；
- ② 或放置于 37 度培养箱 2 小时以上，快速包被；

（2） d0 天血样分离 原代培养

准备工作：

- ① 新鲜采集外周血或脐带血 40-50ml；
- ② 配制稀释液 DPBS+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

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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

- ⑤ 细胞总数量在 $2-20 \times 10^6$ 之间都统一加入 10ml 分装预热的初始培养基, 轻轻吹打混匀, 加入 10% 灭活自体血浆, 加入一支 200ul Stimulation Factor Cocktail 1。培养箱静置培养 2-3 天。如细胞量较多 (大于 $1E7$), 则 d2 天观察以便确定是否可以扩瓶到 T75。

(3) d3 扩瓶到 T75

- 适度轻轻吹散转移到 T75;
- 配制扩增用完全培养基: Basic Medium Supplement 20ml 用 37°C 水浴锅融解, 添加到 1L novaNK-20 培养基, 并加入一支 Expansion Factor Cocktail 和一支 Stimulation Factor Cocktail 2; 形成扩增用完全培养基;

(4) d4 T175 培养瓶双倍补液

- T75 培养瓶中 30ml 细胞悬液转移到 T175 培养瓶, 补加新鲜扩增培养基 60ml, 补加 5% 自体血浆 3ml,
- 总体积 90ml
- 如有大团块, 可以摇晃培养瓶适当使其分散;

(5) d5 T175 培养瓶补液

- T175 培养瓶补新鲜扩增培养基 60ml, 补加 5% 自体血浆 3ml, 共 150ml;
- 总体积 150ml

➤ 如有大团块，可以摇晃培养瓶适当使其分散；

(6) d6 一个 T175 培养瓶扩瓶到两个 T175

- 轻轻吹打 T175 培养瓶中的 NK 细胞悬液，取 75ml 到一个新的 T175 培养瓶，两个瓶子都补充新鲜培养基 75ml，每瓶 150ml。每一瓶按照新补液体积的 5%补加人血小板裂解物（加 3.75ml 每瓶）
- 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，可以延迟一天，等细胞数量上来了，再补液培养；

(7) D7 两个 T175 培养瓶扩瓶到四个 T175

- 轻轻吹打 T175 培养瓶中的 NK 细胞悬液，取 75ml 到一个新的 T175 培养瓶，都补充新鲜培养基 75ml，每瓶 150ml。每一瓶按照新补液体积的 5%补加人血小板裂解物（加 3.75ml 每瓶）。四瓶共 600ml。

(8) D8-D9 细胞收获，冻存种子库

- a) 距上次扩瓶补液 24-48 小时，根据显微镜观察细胞数量状态和培养基颜色，决定细胞冻存收获时间。
- b) 种子库细胞收获冻存步骤：
- ① 取 3 只 250ml 离心管，四瓶 T175 中的细胞悬液平均分配到离心管中，1500rpm，10min 离心，
 - ② 弃上清，每管用 50ml 完全培养基重悬，吹打，过筛到 50ml 离心管，取样计数，
 - ③ 1000rpm，10min 离心，弃上清，
 - ④ 根据计数结果，按照 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 冻存浓度，加入预冷的 NK 细胞种子库冻存液（货号 StarSeed-02）；
 - ⑤ 每管冻存 1ml，放置在程序降温盒中，-80 度冰箱过夜，转移到液氮中。

三、 d0 天 NK 种子库复苏激活扩增

采用 hyperClone™ Human Cryopreserved NK seed Cells Activation/Expansion Cocktail 人冻存 NK 种子细胞高效激活扩增试剂盒 kit09

- 包被 T75 培养瓶：取 T75 培养瓶（TC treated），加入 5ml DPBS，加入一支 kit09 Coating Factor Cocktail，置于 37 度培养箱，快速包被 2h，备用；
- 准备稀释液：取完全培养基 30ml 37℃ 预热后备用；
- 取 3 支冻存的 NK 种子库细胞，水浴锅复苏，留一小冰晶，转移到生物安全柜，用移液

器轻轻吸取复苏的种子细胞，勿吹打，轻轻滴加到预热的稀释液上面，盖上盖子，轻轻颠倒混匀。500rpm，5min 离心，升8降6，弃上清。

- 用 20ml 完全培养基重悬细胞沉淀，轻轻吹散（勿用力）。洗涤一次包被的 T75 培养瓶，细胞沉淀转移到 T75 培养瓶。加入 20%人血小板裂解物 4ml，加入 kit09 Stimulation Factor Cocktail 1;

四、 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；
- 配制完全培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 kit09 Expansion Factor Cocktail；
- T75，加入 20ml 完全培养基，补加 10%血小板裂解物 2ml

五、 洗涤换液

T75 培养瓶补液到 50ml 以上，更换到 T175 培养瓶的时候，进行离心换液，去除死细胞。轻轻吹打细胞，培养液转移到 50ml 离心管，800rpm，8 分钟，弃去上清液，用新鲜培养基调整细胞密度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 进行 T175 培养瓶接种。

六、 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。