

hyperClone

NK细胞高效实验手册



Description

HUACHEN hyperclone NK kit 整合了NK细胞活化与扩增所必需的重要信号通路因子，以及维持和延长NK细胞活性的关键细胞因子，因此能够高效扩增并活化高纯度的NK细胞，是纯蛋白因子方法大量制备具有高肿瘤杀伤活性的NK细胞的强大工具。

hyperClone NK kit采用纯蛋白因子体外扩增NK细胞，无需feeder cell，可高效高纯度扩增NK细胞，满足自体或异体NK细胞应用，化学成分明确，符合GMP标准，可以支持NK细胞药品申报。

采用HUACHEN NK扩增试剂盒，体外培养14-21天，可获得>10万倍NK细胞扩增倍数，大多数情况下可获得>95% CD3⁺CD56⁺NK细胞纯度，及<2%CD3⁺细胞，可满足异体NK细胞移植要求。更难能可贵的是终产品NK细胞>90%CD16⁺CD56⁺，结合治疗性抗体药物更易发挥NK细胞ADCC效应，获得理想临床疗效。

hyperClone NK Activation/Expansion Cocktail Protocol

Coating:

Step 1: 取Coating Factor Cocktail一支，放在4°C冰箱进行解冻，用迷你离心机瞬时离心，将因子集中到离心管底部。T25培养瓶（推荐: Corning 430639）加入5ml DPBS，再加入200ul Coating Factor Cocktail，于4°C冰箱包被过夜16小时以上，1周内使用；快速包被37°C培养箱2h以上。

Step 2: 取新鲜外周血或脐带血40-50ml，不适于冻存PBMC。

Step 3: 自体灭活血浆制备：抗凝血40-50ml转移到50ml离心管，全血以1000g离心15 min，离心完毕，吸取上层血浆到50ml离心管；血浆再以2100g，10min离心，离心完毕丢弃沉淀吸取上清；血浴锅56°C，30min灭活血浆，每隔10分钟晃动一下离心管；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。

Purification:

Step 4: NK细胞分离纯化：①分离前样本及各试剂应室温预温至20°C，15-25°C室温离心。②样品采集后应在8h内分离NK细胞，最好是即采即提。③将血浆提取步骤中所得的下层细胞样本用DPBS+5%HSA(HSA20%含量)按照1:1稀释，轻轻吹打，加入一支1.5ml **Purification Factor Cocktail**，轻轻混匀，室温孵育20min，用等量的稀释液(DPBS+5%HSA)进行重悬，轻轻混匀。另取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中。1200g离心20min，缓升缓降，缓升为1，缓降为0。

Step 5: PBMC制备：配洗液(DPBS+5%HSA)；小心吸取白膜层到预加洗液20ml的50ml离心管，300g，10min，缓降6；弃上清，重复如上步骤再洗涤一次；用预温至37°C的培养基(分装10ml nova NK-20专用培养基，培养箱预温，原代接种用该分装的培养基)重悬细胞，取样细胞计数，离心后上清留样做无菌检测。

Step 6: 取预先包被的T25培养瓶，用洗液(含HSA)洗涤两次包被面，注意用移液管先加到对面，勿直接冲刷包被面，倒掉DPBS后备用。

Stimulation:

Step 7: d0天激活：按照0.2-2×10⁶/ml加入分装预热的初始培养基(即使细胞总量为2×10⁶，也加入10ml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**。稍待细胞沉降，显微镜下观察并拍照(40x、100x、200x)。

Expansion:

Step 8: 配制扩增培养基：novaNK-20培养基一瓶，添加20ml **Basal Medium Supplement**一支，添加1.5ml **Expansion Factor Cocktail**一支，混匀待用。如果初始细胞总量<1×10⁷，则前三天静止培养，无需观察，待d3天转移细胞到T75培养瓶，并双倍补液(补20ml)。如果初始细胞总量>1×10⁷，则d2天将细胞转移到T75培养瓶，并双倍补液。T75和T175培养过程中，按照1000X补充**Stimulation Factor Cocktail 2**。T75瓶培养过程中补充10%自体血浆，T175培养过程中补充5%自体血浆，入培养袋后补充1%自体血浆。每天观察细胞生长状况和培养基颜色变化，切勿延迟补液，T75和T175每天按照1:2补液，入培养袋后隔天1:1补液。

Step 9: 观察细胞，根据培养基颜色适时添加培养基，如果在培养过程中有大量贴壁细胞出现，一定不要丢弃贴壁的细胞，应该用力拍打培养瓶使其脱落，转移到下一步继续培养，切勿培养基颜色过黄，营养耗竭将会严重影响NK扩增和活率。

Step 10: 培养到14-21天，根据细胞扩增情况，培养到所需数量时，提前三天做质控(支原体、无菌)，适时收获细胞。该培养体系可以支持NK细胞高密度长时间培养，培养袋体系中至少可以持续扩增到28天。客户可以根据终制剂所需NK细胞数量决定扩增终止时间，额外补充的扩增培养基套组需要单独提前订购。

订购信息

产品名称	产品规格	产品货号	备注
人NK细胞高效扩增试剂盒 hyperClone Human NK Activation/Expansion Cocktail	1kit	hyperCloneNK-HCkit03	配制完全培养基两周内使用
NK细胞无血清培养基 Basal Medium Supplyment	1000ml/bottle 20ml/bottle	novaNK-20 HC-01-S	基础培养基补充剂和扩增因子组合需与novaNK-20培养基联合使用
Expansion Factor Cocktail	1.5ml/tube	HC-02-E	