

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：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；

NK 细胞种子库建库 kit03

二、 d-1/d0 天 包被培养瓶

- 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；
- 或放置于37度培养箱2小时以上，快速包被；

三、 d0天NK细胞分离制备、激活

准备工作：

- ① 新鲜采集外周血或脐带血 40ml— 50ml；

注意：脐带血推荐采集总量>90ml（含28ml抗凝剂），只需要取50ml用于本体系培养，试剂盒只适配50ml起始血量。多余的可以Ficoll分离后冻存单个核细胞。

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 缓升 8 缓降 2；
- ② 灭活：水浴锅 56℃，30min 灭活血浆；

- 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。扩瓶培养使用前可以再次离心一次，去除沉淀。

如采用脐带血，为避免血小板污染和血浆的其他影响因素，则不使用自体血浆，直接用血小板裂解物替代。则血浆制备步骤跳过。

新鲜血样 NK 细胞分离纯化：

- 将血浆提取步骤中所得的下层细胞用生理盐水或DPBS稀释到45ml，轻轻吹打混匀（25ml移液管），加入一支 Purification Factor Cocktail，轻轻颠倒混匀，室温孵育20min后，用等量的生理盐水或DPBS重悬到90ml（分两个50ml离心管），轻轻颠倒混匀，不可吹打，防止吹打开已经形成的细胞团簇。
- 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铺层。
- 1200g离心20min，缓升缓降，缓升为1，缓降为0。

注：脐带血中含有较多未成熟红细胞，容易在Ficoll分离时离心不下来。建议50ml离心管加入20ml Ficoll，按照1:1的比例加入20ml稀释后的血液离心。

NK 细胞分离制备：

小心吸取白膜层到预加DPBS 20ml的50ml离心管，300g，离心10min（缓升8，缓降6）；弃上清，用10ml novaNK-20基础培养基重悬细胞，取样细胞计数。如供者血细胞中NK含量较少（如<5%）则得到的白膜层细胞会较少，注意区分白膜层位置并标记，上下都多留多吸一些液体，可多吸一些Ficoll层，以尽可能多吸取细胞；

准备T25培养瓶：

洗涤培养瓶：取预先包被的 T25 培养瓶，用 DPBS 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。

NK 细胞接种 D0 天激活

细胞总数量在2E6-2E7之间都统一加入10ml novaNK-20基础培养基，轻轻吹打混匀，加入10%灭活自体血浆，加入一支 Stimulation Factor Cocktail 1。置于培养箱静置培养三天。3天内可不用进行观察以便细胞成团生长，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。

四、 d3 扩瓶到 T75 并补液

- 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 基础培养基, 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;
- T25 瓶中如有较多贴壁细胞, 首先将细胞悬液转移到 T75 培养瓶后, 拍打T25培养瓶瓶身, 使其脱落(显微镜观察脱落情况)而用移液管很难吹打下来; 确认脱落后, 用20ml完全培养基洗涤T25瓶, 加入到T75中,
- 10ml细胞悬液, 加20ml新鲜培养基, 加10%自体血浆2ml, T75瓶终体积为30ml;

五、 d4 T75补液20ml

- 向T75培养瓶中加入20ml新鲜完全培养基, 并补加5%自体血浆 1ml。

六、 d5 转移到T175并补液

- 适度轻轻吹散转移到 T175;
- 50ml细胞悬液, 加100ml新鲜完全培养基, 加5%自体血浆5ml, T175瓶终体积为150ml。

七、 d7一个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完全培养基 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;

八、 d8 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。

九、 d9 四个 T175 培养瓶扩瓶到 8 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）。八瓶共 1200ml。

十、 d10 细胞收获，冻存种子库

- a) 距上次扩瓶补液 24 小时，一定是最后一次扩瓶补液后 24 小时细胞增殖最旺盛的时候进行细胞冻存；
- b) 种子库细胞收获冻存步骤：
 - ① 取 250ml 离心管，八瓶 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 5ml，每管细胞数量 1×10^8 ，放置在程序降温盒中，-80 度冰箱过夜，转移到液氮中。

种子库复苏扩增 kit09

一、 d0 天 NK 种子库复苏扩增

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 T175 培养瓶：取 T175 培养瓶（TC treated），加入 20ml DPBS，加入一支 kit09 包被因子 A Coating Factor Cocktail，置于 37 度培养箱，快速包被 2h，备用；
- 配制完全培养基：novaNK-20 基础培养基 1L，加入一支 kit09 扩增因子 C Expansion Factor Cocktail；
- 准备稀释液：取完全培养基 40ml 37℃ 预热后备用；
- 取 1 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。800rpm，8min 离心，升 8 降 6，弃上清。
- 用 50ml 完全培养基重悬细胞沉淀，轻轻吹散（勿用力），DPBS 洗涤一次包被的 T175 培养瓶，细胞沉淀转移到 T175 培养瓶。加入 20%人血小板裂解物 10ml，加入一支 kit09 刺激因子 B Stimulation Factor Cocktail；

二、 d2 T175 补液

- D2, 显微镜观察细胞状态, 有中等以上细胞团块较多, 则补液 90ml 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;
- T175, 加入 90ml 完全培养基, 补加 10%血小板裂解物 9ml;

三、 D3 T175 培养瓶转培养袋

150ml 细胞悬液+300ml 新鲜完全培养基+2%血替 6ml, 折叠一半培养袋培养。

四、 D5 培养袋补液

450ml 细胞悬液+550ml 新鲜完全培养基+2%血替 11ml, 培养袋铺开培养。

五、 D7 培养袋补液

1000ml 细胞悬液+800ml 新鲜完全培养基

八、 D9/D10 细胞收获

- 补液后细胞密度不低于 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 适时进行扩瓶, 扩瓶时细胞融合度要大于 80%。
- 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。