



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°C, 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：

a、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。

b、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。

c、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% 补加入血小板裂解物（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% 补加入血小板裂解物（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 2E7/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 1E8，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°C 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 $1 \times 10^6/ml$ ，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。