

NK 细胞高效培养注意事项

NK cells activation/expansion trouble shooting

一、 实验前准备

- ① 耗材：T25 培养瓶，推荐 Corning 430639，务必使用 TC treated T25 培养瓶进行因子包被；T75、T175 培养瓶，移液管、离心管等耗材，Takara GT-T610 (A) 细胞培养袋（或毒性和溶出更小的培养袋，如果用国产培养袋务必确认对 NK 细胞没有毒性）；
- ② 试剂：20%HSA，Ficoll 1.077，DPBS（无钙镁的 PBS）
- ③ 设备：迷你离心机（需要配置，瞬时离心因子，减少损失），大容量离心机，水浴锅，电动移液器，细胞计数仪，带拍照功能显微镜；

二、 d-1 天 实验准备注意事项

- ① 收到试剂盒，将试剂盒中各因子置于-20℃保存，基础培养基存放于4℃保存；
- ② 取 T25 培养瓶一个，加入 5ml DPBS，取 Coating Factor Cocktail (200μl) 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℃冰箱，静置 16h 以上，第二天使用；

三、 d0 天实验注意事项

- ① 原料（脐带血、外周血）的质量标准：
 - ✧ I、外周血用肝素钠抗凝采血管，采集 5-6 管，共 40-50ml，12 小时内分离。
 - II、外周血个体差异性较大，PBMC 中 NK 含量 > 5% 的客户较容易培养成功，如果外周血中 PBMC NK 含量 < 5%，则可能起始的 NK 细胞数量较少，根据细胞增长情况控制补液量，d3 天可以补充一倍体积。
 - ✧ I、脐带血采血袋一般采用枸橼酸钠抗凝剂，含 28ml 枸橼酸钠抗凝剂，枸橼酸钠抗凝剂对 NK 细胞有毒性作用，脐血采集时间超过 12 小时对 NK 细胞有毒性作用，会影响后续扩增，需尽快处理。
 - II、脐血采集量尽可能超过 90ml，即抗凝剂占总血量小于三分之一体积比，否则自体血浆不可用，脐带血不建议使用自体血浆，请用血小板裂解物或者 AB 血清替代。
 - III、需注意脐血中有核红细胞原代培养时会代入到培养体系，随着培养时间增加而崩解。

- ✧ 如果细胞量比较少，比如总量少于 5E6，也不用紧张，置于 37 度培养箱静置培养 3 天，3 天内可不用进行观察以便细胞成团生长，d3 天你会发现细胞已经成团很多；
- ② Ficoll 分离液如果从冰箱取出，**请务必复温到室温**，以便恢复准确密度；
 - ③ 配制稀释液 DPBS+5%HAS (**体积比**)，如：47.5ml DPBS+2.5ml HSA (20%浓度)；
 - ④ 取血浆后的血细胞用上述稀释液重悬后，**用 25ml 移液管 (不用 10ml 的)** 轻轻吹打 3-5 次，加入 Purificaton Factor Cocktail (1.5ml) 之后，轻轻**上下颠倒** 5 次左右混匀，**静置 20min**，再用稀释液稀释后也同样颠倒混匀，**此时不可吹打**；
 - ⑤ 如供者血细胞中 NK 含量较少 (<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，以尽可能多收细胞；
 - ⑥ 如 Ficoll 层吸取较多，则需要尽可能多的稀释液稀释，以便使细胞能离心下来；原则：吸取的白膜层和 Ficoll 层的总体积占稀释后总体积小于三分之一；比如取白膜层和 ficoll 层液体共 15ml，则需要离心管补加 30ml 稀释液到 45ml 再离心。
 - ⑦ 取 10ml novaNK-20 **基础培养基** (**此时没有添加 supplyment 和 expansion Factor Cocktail**)，放置培养箱预热到 37 度，重悬第二次离心弃去上清的细胞。
- 🔊**注意** 如果细胞量非常少，此时也加入 10ml 培养基，0.2-2 E6/ml 都可以加入 10ml 培养基，**d0 天需要补加 10%自体灭活血浆 (或用等体积的血小板裂解物或 AB 血清替代)** 和加入 **Stimulation Factor Cocktail 1 一支**；
- ⑧ 为了排除红细胞影响，推进人工计数为准；
 - ⑨ 如细胞量较多，> 1E7，则 d2 天观察以便确定是否可以 d2 天扩瓶到 T75

四、 d3 扩瓶到 T75 注意事项

- ① 适度轻轻拍打 T25 培养瓶转移到 T75，此时不计数不做流式检测；
- ② 配制扩增用完全培养基：Basic Medium Supplyment 20ml 用 37°C 水浴锅融解 (**溶解时无水浴锅放置时间过长, 最好保留一个小冰晶**)，添加到 1L 的 novaNK-20 培养基，并加入一支 1.5ml 的 Expansion Factor Cocktail；形成扩增用完全培养基；
- ③ 取一支 Stimulation Factor Cocktail 2，融解后置于 4°C，按照每次补液体积的 1000X 使用，1 周内用完；
- ④ 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，T25 培养瓶中没有培养基的时候再用力拍打瓶身，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，补加 10%

自体血浆 2ml+20 μ l Stimulation Factor Cocktail 2 (1000X) =30ml

五、 d4 T75 转移到 T175

- ① 30ml 补加 60ml, **总量 90ml**, 贴壁细胞拍下来如上操作,
T175 培养瓶 补加 5% 自体血浆 3ml+60 μ l Stimulation Factor Cocktail 2,

六、 d5 补液, 取样 3ml 计数并做流式检测 NK 含量 CD3CD16CD56

- ① T175 培养瓶补液 60ml, 补加 5% 自体血浆 3ml+60 μ l Stimulation Factor Cocktail 2,
共 150ml

七、 d6 T175 转到 T610 (A) 袋子

- ① T175 培养瓶中的 150ml 细胞悬液+300ml 新鲜完全培养基, **双倍补液**, 将瓶子中贴壁的细胞拍打下来, 洗涤后加入袋子。

补加 1% 自体血浆 3ml, **共 450ml**; 剩余**血浆 (或血小板裂解物)** 按照 **1%**进行补液时添加, 直至用完;

🔊注意: 折叠培养袋一半面积进行培养。

八、 d8 补液

- ① 450ml 细胞液再**补加 450ml** 新鲜完全培养基 (**入培养袋后, 一比一补液**), 注意培养基需要预温到室温, 不可反复 37 度预热, **=900ml**
- ② 入袋后第一次等量补液可以在 d7 天或者 d8 天, 如果细胞增殖旺盛, 细胞培养基偏黄, 可以在 d7 天等量补液; 如果感觉细胞增殖量还不够, 细胞密度没达到 2e6/ml 以上, 可以考虑推迟一天补液 d8 天补液。
- ③ **自入袋后, 可以考虑按照细胞密度进行补液, d20 天之前可以按照隔天补液方案, 按照补液后细胞密度 1e6-1.2e6/ml 进行补液; d20 天之后按照间隔两天补液方案, 按照补液后细胞密度 1.2-1.5e6/ml 进行补液。**
- ④ **建议一个培养袋总培养体积不要超过 1.5L**

九、 d10 之后, 隔天等量补液, 补液前取样计数做流式检测 NK 纯度

- ① 第一瓶培养基用完, 重新配制第二瓶完全培养基 novaNK-20+20ml Basic Medium supplyment + Expansion Factor Cocktail 一支;
- ② 建议重新取一 610(A)培养袋, 从第一个培养袋中转移到新的培养袋, 两个培养袋各等量补液;

十一、根据客户需要的细胞数量, 继续培养或者收获细胞

- ① 如需收获细胞则充分拍打细胞培养袋，使贴壁细胞脱落，建议用 PBS 50ml 洗涤培养袋；
- ② 计数并进行流式检测，杀伤实验等后续应用；
- ③ 收获计数时建议手工计数为主，细胞计数仪对于成熟杆状的 NK 细胞容易漏计。
- ④ 为获得更多的细胞数量，最后一次补液后可以隔两天再进行细胞收获。如需要在 d15 天收获细胞，d12 天最后一次补液后就不再处理细胞，待到 d15 进行细胞收获。
- ⑤ 此工艺培养的 NK 细胞因为可以持续培养到 d28 天，如果要异体使用，建议培养到 d16 天定为可以收获的起始时间，而随着细胞培养时间增加 NK 细胞杀伤能力增强，d21 天为最佳收获时间。

十二、更优选择是用 WAVE 系统进行培养，灌流以获得更大细胞培养密度。

十三、注：流式圈门设定原则

首先根据前向角散射光信号(FSC) 和侧向角散射光信号(SSC)设门圈出目标细胞分群 1, 然后根据同型对照组荧光强度，在分群 1 的基础上标记出阳性细胞群 2, 排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。

抗体同型对照作为阴性对照，根据 CD3- CD45- CD56+ 可界定 NK 细胞群，随后从 NK 细胞中分析 CD107a、颗粒酶 B、穿孔素的阳性比例。进一步检测 CD16+CD56+比例。具体步骤可参考 NK 细胞团体标准。

Trouble Shooting :

T：客户外周血 PBMC 中 NK 含量较低，低于 5%正常值；

S：纯化后的 NK 细胞较少，Ficoll 离心之后会发现白膜层较少，有时候不容易分辨出白膜层，这时候按照经验值，红细胞上方有 15ml Ficoll 层，Ficoll 层交界处即为白膜层，用记号笔进行标记，然后进行吸取白膜层，适当多吸取一些 Ficoll 层，以便获得更多的 NK 细胞量；

T：有些客户 NK 细胞激活不够充分，于 d8 天变得生长迟缓；

S：可以适当延迟补液时间，减少补液数量，适当添加 5% 血小板裂解物会提高细胞扩增速度。

T：脐带血中有核红细胞 Ficoll 离心后会有较多残留在白膜层，在原代细胞培养中有较多红细胞；

S：随着培养时间增长，红细胞会崩解，对培养体系影响不大。

T：细胞补液原则是什么？

S：一般转移到 T175 培养瓶之前最好不进行吹打分散细胞，以免影响成团扩增趋势；入袋后可以考虑按照细胞密度进行补液，d20 天之前可以按照隔天补液方案，按照补液后细胞密度 $1\text{e}6\text{-}1.2\text{e}6/\text{ml}$ 进行补液；d20 天之后按照间隔两天补液方案，按照补液后细胞密度 $1.2\text{-}1.5\text{e}6/\text{ml}$ 进行补液。建议一个培养袋总培养体积不要超过 1.5L。

T：细胞收获时需要多大量的细胞洗涤体积；

S：NK 细胞培养体积较大，回输前需要充分洗涤 NK 细胞，防止培养基残留，一般推荐洗涤液体积不少于细胞悬液总体积。

T：100ml 细胞回输袋可以灌装多少细胞数量

S：一般建议 100ml 回输液中不超过 50 亿细胞数量，以避免细胞成团和引起输液反应，如果需要更多细胞回输量建议用更多的体积或回输袋。