

NK 细胞高效扩增试剂盒说明书 (91-02-0135-H)

一、实验前准备

1.1 耗材：T25 培养瓶（TC 处理培养瓶，如 Corning 430639）；T75、T175 培养瓶，移液管、离心管等耗材，Takara GT-T610 (A) 细胞培养袋；

1.2 试剂：20%HSA，Ficoll 分离液，DPBS，NK 试剂盒；

1.3 设备：迷你离心机，大容量离心机，水浴锅；

1.4 样本筛选：如果需要大规模扩增 NK 细胞，需要进行前期样本种子筛选。外周血 NK 含量大于 15%，脐带血采集量大于 100mL，确保离体运输时间控制在 8 小时之内。如果做自体 NK 细胞培养，可以不参考样本筛选要求。

二、d0 天实验注意事项

货号	试剂名称	试剂类型	试剂规格	数量	单独购买货号	图片	全套图片
91-02-0135-H	包被因子	试剂盒内容物	200ul/支	1	N/A		
	纯化因子	试剂盒内容物	1.5mL/支	1			
	刺激因子1	试剂盒内容物	200ul/支	1			
	刺激因子2	试剂盒内容物	150ul/支	1			
	基础培养基添加物	试剂盒内容物	20mL/瓶	2	91-02-0135-H-factor		
	扩增因子	试剂盒内容物	1.5mL/支	2			
	无血清NK基础培养基	基础培养基	1000mL/瓶	2			

1 收到试剂盒，将因子和基础培养基添加物 放置于-20℃保存，培养基存放于 4℃；

2.2 取 T25 培养瓶一个，加入 5mL DPBS，取 **包被因子** 一支融解，融解后用迷你离心机瞬时离心（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，或者置于 37℃ 培养箱中快速包被 2h 以上。

三、d0 天 NK 细胞制备分离、激活

3.1 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，剩余的可以 Ficoll 分离后冻存单个核细胞；

3.2 Ficoll 分离液，如从冰箱取出，务必复温到室温；

3.3 配制洗液 DPBS+5%HSA，如：237.5mL DPBS+62.5mL HSA（20%浓度）；

3.4 自体灭活血浆制备：取抗凝血 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；水浴锅 56℃，30min 灭活血浆；灭活后，置于 -20℃ 存放 15min，再次离心 2100g，离心 30min，取上层血浆至离心管，4℃ 保存备用。

注：如果脐带血上层血浆有较多红细胞，则血浆再以 2100g，10min 离心，离心完毕吸取上清；如脐带血和外周血用于大量培养体系，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 AB 血清或血替替代，则本血浆制备步骤跳过；如脐带血采集量小于 90mL，则不使用自体血浆用血替替代，跳过血浆制备步骤。

3.5 NK 细胞分离纯化：

a、分离前样本及各试剂应室温预温至 20℃，15-25℃ 室温离心。

b、样品采集后应在 8h 内分离 NK 细胞，最好是即采即提。脐带血采集袋中含有枸橼酸钠，长期保存对 NK 细胞有毒性，离体运输时间过长容易导致培养失败。

c、将血浆提取步骤中所得的下层细胞样本用配制的洗液按照 1:1 稀释，轻轻吹打混匀，加入一支 1.5mL 纯化因子，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)进行重悬，轻轻颠倒混匀，不可吹打。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 上层，注意保持液面分层，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，然后离心。

3.6 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，离心后上清留样做无菌检测；

用预温至 37°C 的培养基（分装 10mL 无血清 NK 基础培养基，培养箱预温，原代接种用该分装的培养基）重悬细胞，取样进行细胞计数。

如供者血细胞中 NK 含量较少（<10%）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；

关键质控点：取 Ficoll 分离后的细胞，做流式检测，分析 CD3-CD16+CD56+细胞占比；

3.7 取预先包被的 T25 培养瓶，倒掉包被液后备用。（建议 5mL 洗液清洗包被面。注意：加液时不要冲刷包被面）

3.8 D0 天激活：细胞总数量在 2-20E6 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 刺激因子 1。（在离心管混匀后，将细胞悬液移入包被好的 T25 瓶中，注意加液时不要冲洗包被面）稍待细胞沉降，显微镜下观察并拍照。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。

注：脐带血或者外周血如果 Ficoll 分离后细胞量比较多，则最多 10mL 初始培养基只需要接种最多 $2E7$ 的细胞，剩余细胞可以冻存备用。接种细胞数量过多，则容易导致细胞死亡成团。

四、d3 扩瓶到 T75

4.1 适度轻轻吹散细胞转移到 T75，此时不计数不做流式检测；

4.2 配制扩增用完全培养基：**基础培养基添加物** 20mL 用 37°C 水浴锅融解，添加到 1L NK **基础培养基**，并加入一支**扩增因子**，形成扩增用完全培养基；

4.3 取一支**刺激因子 2**，融解后置于 4°C ，按 1000X 比例加入到细胞中（如 1mL 培养液中加入 1ul）；

4.4 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，拍打瓶身 T25 培养瓶，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，补加 10%自体血浆 2mL+20 μl **刺激因子 2**，至此 T75 瓶终体积为 30mL。

五、d4 T75 转移到 T175

将 T75 瓶中的 30mL 细胞转至 T175 中（用 25mL 移液管轻轻吹打，分散大的克隆团），将贴壁细胞拍下来，如上 T25 操作，再补加 60mL，加 5%自体血浆 3mL+60 μl **刺激因子 2**，至此 T175 的终体积为 93mL。

六、d5 补液

T175 培养瓶补液 60mL，补加 5%自体血浆 3mL+60 μl **刺激因子 2**，共 150mL。关键质控点：取样 3mL 计数并做流式检测 NK 含量 CD3-CD16+CD56+；

七、d6 T175 一扩二

轻轻吹打 T175 细胞悬液，吸取 75mL 细胞悬液到新的 T175 培养瓶，各补加 75mL 新鲜培养基，并补充 5%自体血浆。需待培养基颜色微黄再扩袋，这样细胞密度较为合适。如果细胞数量少，可以延迟一到两天扩袋。

八、d7 两瓶 T175 转到 610 (A) 培养袋

两瓶 T175 共 300mL 细胞悬液+新鲜培养基 300mL，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，共 600mL(折叠培养)；剩余血浆按照 1%进行补液时添加，直至用完；

注：如果需要大量培养 NK 细胞，推荐先用悬浮细胞培养瓶 T225（每瓶最多 250mL）进行扩瓶培养，扩瓶后再一对一入袋培养。

九、d9 补液

600mL 原细胞液再补加 600mL 新鲜完全培养基，注意培养基需要预温到室温，不可反复 37°C 预热，补液后细胞液体积为 1200mL。

注意：补液前需要计数细胞数量，使得补液后细胞密度不低于 $1E6/mL$ 。

十、d10 补液

补液 300mL 到 1500mL。

十一、d11 等量扩袋，取样计数做流式检测 NK 纯度

补液前取样进行细胞计数和流式检测 NK 细胞纯度，建议重新取一 610(A)培养袋，从第一个培养袋中转移 750mL 到新的培养袋，两个培养袋各等量补液 750mL，每袋 1500mL；

十二、d13 隔天等量补液

如需放大培养则隔天进行 1:1 扩袋，如自体细胞需要回输，则 d14 天可以收获细胞。

十三、 d14 根据客户需要的细胞数量，继续培养或者收获细胞

13.1 如需收获细胞则充分拍打细胞培养袋，使沉底细胞脱落；

13.2 计数并进行流式检测、杀伤实验等；

13.3 收获计数时建议采用 AOPI 染色计数，细胞计数仪对于成熟杆状的 NK 细胞容易漏计；

13.4 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。

十四、 如需继续大规模培养，则建议每隔一天等量补液，可以扩增到新的培养袋中，以便扩大培养体积，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。

1、外周血自体血浆用完后可以不用再添加血替；

2、脐带血全程用血替，如果要大量培养整个培养过程都建议后期维持 1%的血替添加量；

3、如果要测试长期扩增效果，可以从 d14 天之后，取 75mL 细胞悬液到 T175 悬浮培养瓶，模拟长时间大规模培养的效果，进行换算得到 d28 天的数据；

4、d20 天之前入袋后，隔天补液细胞密度调整至补液后 $1-1.2E6/mL$ ；d20 天之后间隔 2 天补液一次，或细胞密度调整至补液后 $1.3-1.5E6/mL$ ；

5、根据细胞需求量，可以持续培养到 d28 天。自 d14 天之后到 d28 天，每天可以根据客户细胞需求情况决定是否部分收获细胞，满足客户即时需求，无需等待。

十五、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。