

## NK 细胞增强版扩增试剂盒说明书 (91-02-0186-H)

### 一、实验前准备

- 1.1 耗材:T75(TC treated)、T175 培养瓶, 细胞培养袋, 移液管、离心管等耗材;
- 1.2 试剂: 试剂:20%HSA, DPBS, 无血清 **NK** 基础培养基(4 度保存), 人单个核细胞 NK 增强版激活扩增试剂盒(-20 度保存)
- 1.3 设备: 迷你离心机, 大容量离心机, 水浴锅, 培养箱等;
- 1.4 冻存的 PBMC 或 CBMC 细胞, 2E7/mL, 共 6E7 细胞。

### 二、d0 天复苏接种实验

#### 包被培养瓶:

- 2.1 取 T75 培养瓶一个, 加入 5mL DPBS, 取 包被因子一支融解, 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, 封口膜封口后置干 4°C 冰箱, 静置包被 16h 以上, 第二天使用;
- 2.2 或放置于 37 度培养箱 2 小时以上, 快速包被;

#### 复苏冻存的 PBMC/CBMC:

- 2.3 取 30mL 无血清 **NK** 基础培养基到 50ml 离心管, 放置在 37°C 水浴锅预热后使用;
- 2.4 取 6E7 冻存的 PBMC 或 CBMC, 水浴锅解冻复苏, 注意解冻最后留一小冰晶, 1ml 移液枪轻轻吸取复苏液, 勿吹打, 转移到预热的基础培养基中, 800rpm, 8min 离心, 缓升 8 缓降 6;
- 2.5 弃去上清, 用 20mL 无血清 **NK** 基础培养基基重悬细胞。补加 20%血小板裂解物 4mL 和 400uL 刺激因子 1 一支、200ul 刺激因子 2 一支。

### 细胞接种:

2.6 包被好的 T75 培养瓶，弃去包被液备用（注：建议至少 DPBS 清洗培养瓶底面 1 次，注意勿直接冲刷包被面）；

2.7 将前步骤细胞悬液转移到 T75 培养瓶，加入时不要冲刷包被面；

2.8 置于 37℃二氧化碳培养箱静置培养 3-4 天。

### 三、D3 or D4 T75 补液

3.1 配制激活培养基：无血清 NK 基础培养基 1L，加入一支 扩增因子 1 和一支 刺激因子 3。激活培养基 1L 用完后用完全培养基。完全培养基：无血清 NK 基础培养基 1L，加入一支 扩增因子 1；

3.2 D3 或 D4，显微镜观察细胞状态，如细胞融合度超过 50%，有中等以上细胞团块较多则进行等量补液激活培养基。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；

3.3 T75，加入 20mL 完全培养基，补加 10%血小板裂解物 2mL=46mL；

3.4 该步骤不吹散细胞，不计数。

### 四、扩增培养

4.1 以后隔天用完全培养液调整细胞浓度至  $1-2 \times 10^6/\text{mL}$ ，适时进行扩瓶，扩瓶时细胞融合度要大于 80%；

4.2 T75 培养瓶补液加 10%血小板裂解物，T175 培养瓶补液加 5%血小板裂解物，全程保持入袋后 2%血小板裂解物的添加；

4.3 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；

4.4 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;

4.5 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后即可根据需要进行应用;

4.6 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。