



NK 细胞培养操作规程

1. 样本：外周血或脐带血 60-10ml（首选肝素钠抗凝）。
2. 试剂耗材：NK 细胞无血清培养基套装、PBS 缓冲液、T75 培养瓶（TC）、T175 培养瓶、细胞培养袋、生理盐水、样本密度分离液、移液管、50ml 离心管、EP 管。
3. 仪器设备：超净工作台、离心机、二氧化碳培养箱、显微镜、电动移液器、计数仪。
4. 操作步骤

4.1 试剂组成 (GT650115 Gactoo 盖图 NK 试剂盒扩增套装 (2L))

| 套装内容 | 数量 | 单位 | 保存条件 | 产品性状 |
|------------------------|----|----|------|------|
| NK Cell Culture Medium | 2 | 瓶 | 2-8℃ | 液体 |
| NK-A | 1 | 支 | -20℃ | 液体 |
| NK-B | 1 | 支 | -20℃ | 液体 |
| NK-C | 1 | 支 | -20℃ | 液体 |
| NK-D | 1 | 支 | -20℃ | 液体 |
| NK-E | 2 | 支 | -20℃ | 冻干粉 |

注：每次添加的培养基需提前取出恢复至室温，如有必要试剂需分装，禁止将整瓶培养基反复预温。

4.2 样本确认：技术人员需检查样本采集时间，运输箱是否的破损、温度是否在 8~25℃ 范围内，箱内样本外包装袋是否破损等，喷洒 75%酒精对外包装进行消毒，传入洁净室。

4.3 设备试剂准备：超净工作台开启紫外灯照射 30min；试剂从冰箱取出，洁净区内放置 30min 后使用。

4.4 样本准备：取出采血袋喷洒 75%酒精消毒，放入超净工作台内。

4.5 试剂配制和准备：每瓶培养基加入一支 NK-E 混匀配制成完全培养基，每次使用前恢复至室温，**时间不宜过长，切勿强光及紫外长期照射。**

4.6 T75 培养瓶（TC 表面）包被

4.6.1 在 T75 养瓶中加入 8ml 生理盐水和 1 支 NK-A；



4.6.2 轻轻摇晃培养瓶，让包被液在培养瓶表面均匀分布；

4.6.3 置于二氧化碳培养箱中避光放置 **150-180min**，时间不宜过长或过短，取出后轻拿轻放，切勿晃动已包被好的培养瓶（如超过 180min 未能使用，轻轻取出放置平整且无振动的桌面上，用干净无菌布盖好避光，建议在一个小时内使用）；

4.6.4 用移液管吸出包被液，不可冲刷晃动培养瓶包被面，取出后立即使用。

4.7 血浆提取

4.7.1 将血液样本平均分至 50ml 离心管中，**每管分装 30ml**（方便血浆离心，分装太满满会导致血浆含有少量红细胞），2800rpm，8min；

4.7.2 取上层血浆转移至新的离心中（取样作传染病复核），**56°C, 30min 灭活**；

4.7.3 **灭活血浆 4°C 静置 20min**（让血浆温度下降，以免加入后高温使细胞死亡），3000rpm，10min；

4.7.4 用吸管将上清血浆转移至新的离心管中，如冻存 PBMC 未使用，则血浆置于 -20°C 保存，使用前取出恢复至室温使用。

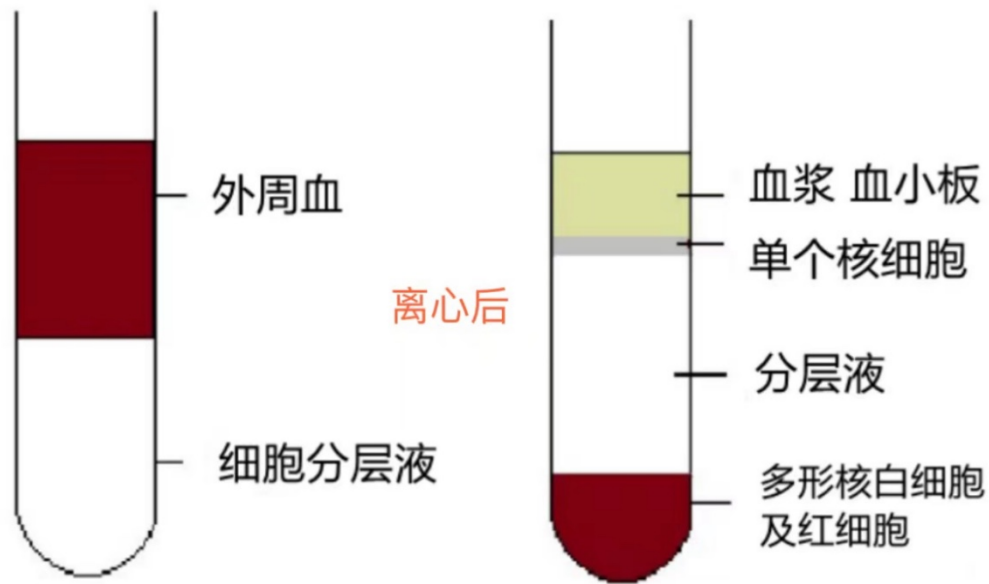
4.8 PBMC（单个核细胞）的分离

4.8.1 血浆提取后的红细胞用 PBS 1:1 稀释，混匀备用；

4.8.2 根据稀释血液的体积，取 2~4 支 50ml 离心管分别加入 15ml 样本密度分离液；

4.8.3 用移液管吸取 30ml 稀释红细胞缓慢加到样本密度分离液上层，使血液和淋巴细胞分离液形成一个明显的分层，**1800rpm, 30min**；

4.8.4 离心后可看见管内分为三层，上层为血浆和 PBS，下层主要为红细胞和粒细胞，中层为样本密度分离液。在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带，为单个核细胞，包括淋巴细胞与单核细胞，还含有血小板（如下图所示）；



4.8.5 轻轻吸取各离心管中间层 PBMC（白膜层）转移至新的 50mL 离心管内，加入 PBS 缓冲液至 45ml，1600rpm，8min,弃上清；

4.8.6 加入适量 PBS 重悬细胞后加 PBS 至 45ml，充分混匀，取样计数；1400rpm，10min 收集 PBMC，弃上清。

4.9 细胞接种扩增

4.9.1 D0: 取包被瓶去掉包被液，取 45ml 已预温至室温的完全培养基，加入 NK-B 和 5ml 自体血浆混匀，重悬 PBMC，**细胞密度 $(1.6-2.4) \times 10^6$ cell/ml(8000 万-1.2 亿)**，混匀后的细胞悬液转移至包被瓶中，置于二氧化碳培养箱中培养；

4.9.2 D3: **镜下可见有较多克隆团出现，即可补液，如有大量较大的克隆团，可适当打散(下同)**，转移细胞至 T175 培养瓶中，补加 45ml 完全培养基 (含 NK-E)、NK-C 和 5ml 自体血浆混匀；

4.9.3 D5: 补加 100ml 完全培养基 (含 NK-E)，加入 NK-D 和 10ml 自体血浆，混匀；

4.9.4 D7: 补加 200ml 完全培养基 (含 NK-E) 和 10ml 自体血浆 (**自体血浆不够用血替或血清代替**)，混匀，转入细胞培养袋中；**因培养袋体积大，此时细胞密度小，转袋后把培养袋对半折起来，缩小培养袋的体积利于细胞生长 (若细胞生长缓慢，则减半补液并增加补液密度，下同)**；

4.9.5 D9: 补加 400ml 完全培养基 (含 NK-E) 和 20ml 胎牛血清或血替；



4.9.6 D11: 补加 800ml 完全培养基 (含 NK-E) 和 40ml 胎牛血清或血替;

4.9.7 D13: 补加 400ml 完全培养基 (含 NK-E) 和 20ml 胎牛血清或血替, 并取样作无菌检测和传染病复核;

4.9.8 D14-18: 收获细胞, 可根据细胞实际生长情况, 适当延长细胞生长周期。

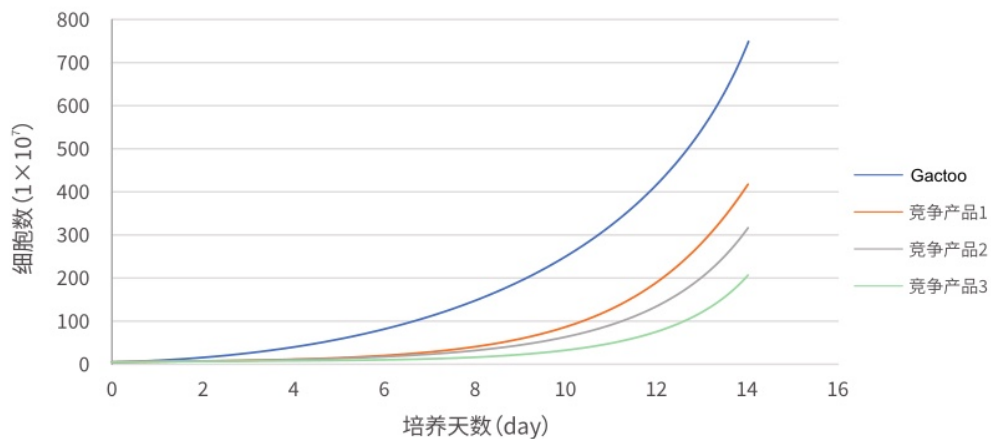
4.10 注意事项

4.10.1 **分离 PBMC 前血液及试剂应预温至 20~25°C**, 室温离心; 血液采集后应在 8h 内分离 PBMC;

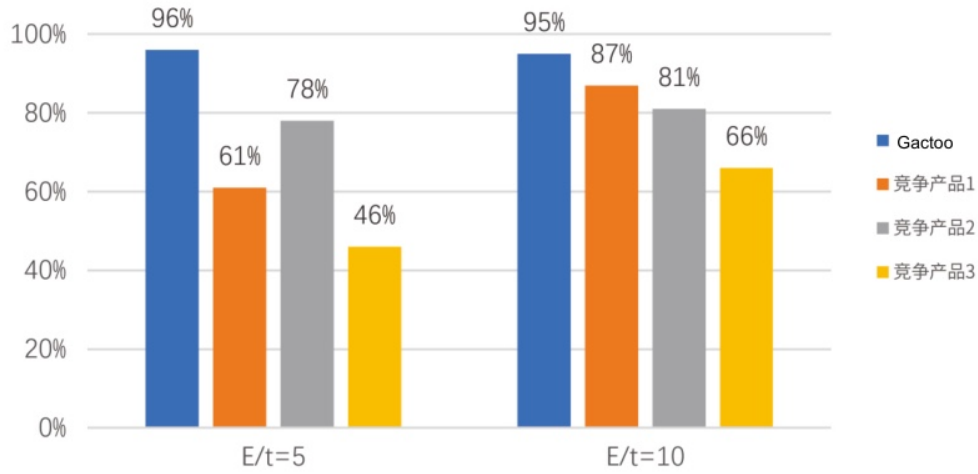
4.10.2 接种密度为 $(1.6-2.4) \times 10^6$ cell/ml (8000 万-1.2 亿), 密度过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度均有影响;

4.10.3 **补液流程非固定操作, 需根据细胞生长的实际情况作相应的调整, 如生长良好需提前补液。**

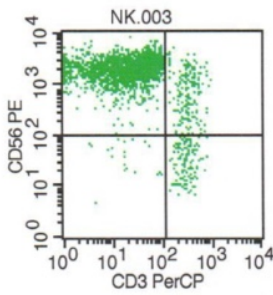
NK细胞扩增数量



NK细胞杀伤活性

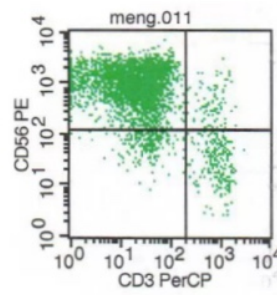


流式数据



File: NK.003
Quad Location: 118, 98

| Quad | % Gated |
|------|---------|
| UL | 88.19 |
| UR | 6.83 |
| LL | 0.67 |
| LR | 4.31 |



File: meng.011
Quad Location: 211, 125

| Quad | % Gated |
|------|---------|
| UL | 85.03 |
| UR | 2.21 |
| LL | 6.61 |
| LR | 6.15 |