

2019

## 使用 ALyS505NK-AC 和 ALyS505NK-EX 培养基进行 人类 NK 细胞培养之标准操作法

(\*非最后的确定版本, 随着研究的进步, 日后会继续更新)

### 【概述】

ALyS505NK(AC/EX)是专为细胞免疫治疗研究而开发, 不含动物蛋白质成分, 含有重组或医疗级人类蛋白质的无血清细胞培养基, 对人类外周血 NK 细胞具有高增值性, 适用于 NK 细胞体外诱导、活化与扩增, 是细胞免疫治疗用最佳培养基。

### 【实验材料】

- ① 培养基 ALyS505NK-AC (200ml)、ALyS505NK-EX (1,000ml) ;
- ② IL-2(美国诺华 Proleukin; 22x10<sup>6</sup> IU/vial 重组人类 IL-2);
- ③ Lymactin-NK(1ml/vial), NK Cell Culture Reagent (1 Test);
- ④ 灭活的人体血浆;
- ⑤ 悬浮培养专用的细胞培养瓶(75cm<sup>2</sup>、225 cm<sup>2</sup>);
- ⑥ 培养袋 A-1000N;
- ⑦ 一次性注射器 50ml, 洗细胞专用生理盐水或 PBS;
- ⑧ 淋巴细胞分离液;
- ⑨ 其它细胞培养用设备。

## 【操作方法】

\* 所有的工作必须在无菌室中进行，请遵守严格无菌的工作规范，使用无菌耗材。

### 1、培养瓶抗体包被

- (1) 在 T-75 cm<sup>2</sup> 悬浮培养瓶中，加入 4mlPBS 和 1ml Lymactin-NK；
- (2) 轻轻摇晃，使溶液在培养瓶瓶底扩散，铺满瓶底；
- (3) 室温下，静置 1h 或保存在 4℃ 直至使用前取出；
- (4) 移除包被溶液，用 10mlPBS 洗涤瓶底 1 次，洗过的培养瓶要立即使用。

### 2、血液分离

- (1) 将血液采集至含有肝素钠抗凝的离心管，其他抗凝剂对本方案有较大影响；
- (2) 在 15ml 淋巴细胞分离液上，小心地倒上 20-30ml 血液；
- (3) 室温下，800xg 离心 20min，慢升慢降，若血液储存超过 2 小时，请将离心时间增至 30min；
- (4) 离心后，血液被分为 4 层，由血浆(上层)、血浆和分离液之间的单个核细胞(第 2 层)、分离液(第 3 层)和红细胞层(底层)构成。

### 3、制备热灭活人类血浆

- (1) 用无菌吸管采集上层的血浆，收集至离心管，请勿误吸单个核细胞层；
- (2) 56℃ 加热血浆 30min；
- (3) 室温下，1200xg 离心 10min；
- (4) 用吸管将上清液采集至新的离心管，4℃ 保存，直至使用前取出。

#### 4、制备 PBMC

- (1) 用吸管将第 2 层单个核细胞收集至新的离心管；
- (2) 加入 PBS 35ml 稀释细胞悬液，500xg 离心 10min；
- (3) 移除上清液，加入 PBS 35ml 稀释细胞悬液，混匀，取 100ul 悬液细胞计数，余下悬液 500xg 离心 10min。

#### 5、NK 细胞增殖诱导

- (1) ACTM 培养基配制

ALyS505NK-AC 200ml + NK-B Reagent 1ml

- (2) 加入 18 ml ACTM 培养基，2ml 灭活血浆，1ml NK-A Reagent，使细胞密度多于  $1 \times 10^6$  cells/ml，重新悬浮 PBMC；
- (3) 在抗体已包被的培养瓶中，加入以上细胞悬液，动作需轻柔，移液管勿刮擦到瓶底，5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养 3 到 4 天。

#### 6、扩大培养

- (1) 按照下表叙述的培养程序，添加 ACTM 至培养瓶中；
- (2) 活化培养 7 天后，将培养瓶的细胞悬液移入培养袋，添加 EXPM 培养基，具体添加方法请参考下表；
- (3) EXPM 培养基配制

ALyS505NK-EX 1000ml + IL-2 1000IU/ml

- (4) 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 继续培养；
- (5) 培养至第 12-14 天，扩大培养成功后取样检测细胞表型、真菌、细菌、支原体、内毒素等指标。

天数	培养载体	数量	培养基	血浆 (ml)	添加培养基 (ml)	培养基总量(ml)	备注栏
-1	培养瓶 T-75	1	-	-	-	-	附着培养瓶
0	培养瓶 T-75	1	ACTM NK-A Reagent	2	18	20	开始培养 (>1x10 <sup>6</sup> cells/ml)
3	培养瓶 T-75	1	ACTM	-	40	60	
5	培养瓶 T-225	1	ACTM	10	140	200	加血浆不要超过 10ml
7	培养袋 A-1000N	2	EXPM	-	400	300/Bag	将细胞悬浮液转移至两个培养袋
9	培养袋 A-1000N	2	EXPM	-	700	650/Bag	
11	培养袋 A-1000N	2	EXPM	-	900	1,100/Bag	
14	培养袋 A-1000N	2		-	-	1,100/Bag	细胞收集

## 7、细胞收集

- (1) 经过 14 天的培养，将细胞悬浮液从培养袋，转入大型的离心瓶，用离心机以 680xg 离心 10min，分离细胞和培养基；
- (2) 小心地移去上清液，用含有 0.1%人类血清蛋白的生理盐水(0.1%HAS 生理盐水)，悬浮所有的细胞沉淀物，收集到一个离心瓶中。重复离心，清洗细胞 3 次；
- (3) 收集细胞，用适量含有 1%人类血清蛋白的生理盐水重悬细胞，通过一次性细胞筛过滤，收集并注入含有 1%人类血清蛋白的生理盐水回输液中，总量为 100 到 200ml。

## 【注意事项】

- (1) 非最后的确定版本，随着研究的进步，日后会继续更新；
- (2) 根据日本药事法执行管理咨询，培养基仅供研究使用；
- (3) 培养基请在标签上标示的效期之前使用；
- (4) 培养基含有临床等级的人类血液蛋白，操作时请特别小心；
- (5) 操作法中的培养基，不保证 NK 细胞可自行增殖，选择特定的体外 NK 细胞生长进剂是相当重要的；
- (6) 本操作法仅适用于 ALyS505NK-AC 和 ALyS505NK-EX 培养基，其它培养基不适用；
- (7) 本系列产品 ALyS505NK-EX 需要实验室在使用前 **按需自行添加 IL-2**；
- (8) 细胞培养袋的使用详细内容请参考其使用说明书。

## 【生产企业】

生产企业：日本细胞科学研究所

生产地址：日本国仙台市青叶区西花苑一丁目 16 番 16 号

电话：022-399-6608 FAX：022-399-6638

中国子公司：珠海贝索细胞科学技术有限公司

地址：珠海市吉大景园路 1 号 517

电话：0756-3324920 0756 -3324391

