

2019

ALyS505NK-KIT

NK 细胞培养试剂盒之标准操作法

(*非最后的确定版本, 随着研究的进步, 日后会继续更新)

【实验材料】

- (1) ALyS505NK-A(1ml)、ALyS505NK-B (1ml)、ALyS505NK-C (1ml)、ALyS505NK-EX;
- (2) IL-2(Proleukin ; 18x10⁶ IU/vial 重组人类 IL-2);
- (3) 灭活的自体血浆;
- (4) 悬浮培养专用细胞培养瓶(75cm²、175cm²);
- (5) 一次性注射器 50ml, 洗细胞专用生理盐水或林格氏液;
- (6) 淋巴细胞分离液;
- (7) 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, 请遵守无菌室工作规范, 使用灭菌过的设备。

1、培养瓶抗体包被

- (1) 在 T-75 cm² 培养瓶中, 加入 8ml PBS 和 1ml ALyS505NK-A 包被液;
- (2) 轻轻摇晃培养瓶, 让混合液在培养瓶表面均匀分布;
- (3) 在室温下, 放置 30-40min 或者 4℃ 保存直到使用前取出, 移除包被液;
- (4) 用 10ml PBS 清洗培养瓶一次, 洗过的培养瓶要立即使用, 注意清洗时, 勿刮擦到已包被好的瓶底。

2、制备热灭活人类血浆、血液分离

- ① 将 40ml 血液采集至 50ml 离心管，3000rpm、10min，取上层血浆移到新的离心管，56℃、30min 灭活，3000rpm 离心 10min，用吸管将上清液采集至灭菌过的试管，保存在冰箱中，直到使用前取出；
- ② 余下的细胞加 PBS 若干量，稀释细胞至 50ml，混合均匀，缓慢移入两个装有 15ml 淋巴分离液的离心管内；
- ③ 室温下(大约 20℃)，1600rpm 离心 30min（缓慢加速，缓慢减速）；
- ④ 离心后，血液被分为 4 层，由血浆(少量)、血浆和分离液之间的单个核细胞(第 2 层)、Lymphoprep(第 3 层)和红细胞层(底层)构成。

3、制备 PBMC

- (1) 用吸管将第 2 层单个核细胞收集至新的离心管中；
- (2) 加入 30ml PBS 稀释收集细胞，1200rpm 离心 5min，沉淀细胞；
- (3) 移除上清液，40ml PBS 重悬细胞，取样进行细胞计数，1200rpm 离心 5min,收集细胞。

4、培养基的配制

4.1 高效诱导液的配制

在 40ml ALyS505NK-EX 培养基内加入 1ml ALyS505NK-B,均匀混合后放置 2-8℃ 保存，备用；

4.2 活化培养基的配制

在 500ml ALyS505NK-EX 培养基内加入 1ml ALyS505NK-C，均匀混合后放置 2-8℃ 保存，备用；

4.3 扩增培养基的配制

ALyS505NK-EX 内加入 IL-2 (700IU/ml)，均匀混合后放置 2-8℃ 保存，备用。

5、NK 细胞增殖诱导

5.1 PBS 清洗后单个核细胞加入 40ml 高效诱导液和 2ml 自体灭活血浆，使细胞密度 $>1 \times 10^6$ cells/ml，重新悬浮 PBMC；

5.2 在抗体已附着的 T-75cm² 培养瓶中加入细胞悬浮液，细胞平铺培养瓶，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育。

6、细胞活化与扩增培养

6.1 3Days，将培养瓶中的细胞液移至 50ml 离心管中，取 200-300μl 细胞液进行细胞计数；离心管中的细胞 1200rpm 离心 5min；移除上清液，收集细胞；

※注【1、培养瓶中若有贴壁细胞残留，可直接添加活化培养基 20ml 和自体灭活血浆 1ml，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育； 2、D5、D7 根据细胞生长的状况及颜色添加活化培养基，直至 D9 天转移至细胞培养袋扩大培养。】

6.2 根据细胞计数结果，添加活化培养基（约 40ml），并添加 10% 的自体灭活血浆（约 4ml），使细胞密度保持在 1×10^6 cells/ml，重悬至 T-175cm² 培养瓶中，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育；

6.3 5Days，取细胞培养物进行细胞计数，根据细胞数量、增殖生长、颜色变化情况添加活化培养基（约 100ml）和灭活自体血浆（约 5ml），在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育；

6.4 7Days，取细胞培养物进行细胞计数，根据细胞数量、增殖生长、颜色变化情况添加活化培养基（约 340ml）和灭活自体血浆（约 5ml），分别置于 2 个细胞袋培养，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育；

6.5 9Days，取细胞培养物进行细胞计数，根据细胞数量、增殖生长、颜色变化情况分别添加扩增培养基（约 700-900ml）平均加入 2 个细胞袋中，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育；

注：【原来 D0 天培养瓶贴壁的细胞培养至 9Days 平均转入 2 个细胞袋中继续扩大培养】

6.6 11 Days，取细胞培养物进行细胞计数，根据细胞数量、增殖生长、颜色变化情况分别添加扩增培养基（约 800-900ml）平均加入 2 个细胞袋中，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育；

6.7 13Days，取细胞培养物进行细胞计数，根据细胞数量、增殖生长、颜色变化情况分别添加 扩增培养基（约 500ml）平均加入 2 个细胞袋中，在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 孵育。

【细胞检测】

培养到 14/15Days 取少量培养细胞进行细胞计数、细胞活性、细胞表型、细菌培养、真菌培养、支原体检测及内毒素检测。

【细胞收集】

- (1) 经过 14/15Days 的培养，将所有细胞悬浮液收集至无菌离心瓶中，1200rpm 离心 5min，沉淀细胞；
- (2) 用林格氏液清洗两次，并且重复离心；
- (3) 用含有 1% 人类血清白蛋白的林格氏液或生理盐水重新悬浮细胞。

【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) 严禁将这个培养基直接注射至人体；
- (4) 培养基请在标签上标示的效期之前使用；
- (5) 培养基含有临床等级的人类血液蛋白，操作时请特别小心；
- (6) 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；
- (7) 本操作法仅适用于 ALyS505NK-KIT 与 ALyS505NK-EX 培养基配合使用，其它培养基不适用；
- (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 F A X : 0 7 5 6 - 3 3 2 4 3 9 1



ALyS505NK-KIT

NK 细胞培养试剂盒之操作流程表

天数	培养载体	数量	培养基	自体血浆 (ml)	添加培养基(ml)	培养基总量(ml)
-1	培养瓶 T-75	1	-	-	-	-
0	培养瓶 T-75	1	高效诱导液	2	40	42
3	培养瓶 T-175	1	活化培养基	4	40	44
5	培养瓶 T-175	1	活化培养基	5	100	149
7	培养袋 A-1000N	2	活化培养基	5	340	247/Bag
9	培养袋 A-1000N	2	扩增培养基	-	700	597/Bag
11	培养袋 A-1000N	2	扩增培养基	-	800	997/Bag
13	培养袋 A-1000N	2	扩增培养基	-	500	1,247/Bag
14	培养袋 A-1000N	2	-	-	-	1,247/Bag