**人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞**

**(NK92MI)**

**细胞介绍：**

NK-92细胞是从一位患有急进性非霍奇金淋巴瘤的50岁白人男性外周血单核细胞衍生来的一株IL-2依赖型NK细胞株。NK-92MI细胞是转染得到的源自NK-92细胞的IL-2非依赖的NK细胞株。亲本细胞NK-92通过微粒体基因转化法用逆转录病毒MFG-hIL-2载体携带的人IL-2cDNA进行转化。可能由于载体整合到基因组DNA中，转化是稳定的。

这株细胞对很多恶性细胞有细胞毒性；铬释放试验显示它能杀死K562细胞和Daudi细胞。NK-92细胞有以下特征：CD2、CD7、CD11a、CD28、CD45、CD54表面标记阳性；CD1、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD14、CD16、CD19、CD20、CD23、CD34和HLA-DR表面标记阴性。

其亲本IL-2依赖的细胞株NK-92细胞及另一株同样来源于NK-92细胞株的IL-2非依赖的细胞株NK-92CI都可从ATCC得到。NK-92MI细胞和NK-92CI细胞这两个变种都包含、表达并合成hIL-2cDNA。NK-92MI细胞合成的IL-2水平比NK-92CI高，而亲本细胞不合成表达。1998年9月提交到ATCC的培养物污染了支原体，其后代通过BM细胞周期蛋白处理21天消除支原体。处理后6周，用Hoechst染色、PCR和标准培养测试进行支原体检测，结果都呈阴性。

**细胞特性**

1. **来源：**恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞
2. **形态：**淋巴母细胞样 悬浮生长
3. **含量：**>5x10^5细胞数
4. **规格：**T25瓶或者1mL冻存管包装
5. **用途：**仅供科研使用。

**运输和保存：**干冰运输及复苏好存活细胞：（1）1mL冻存管包装干冰运输，收到后-80度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。（2）T25瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

**细胞接收后的处理：**

1） 收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将T25瓶置于37℃培养箱放置约2-3h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。

2）请在4或5X显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各2-3张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

3） 悬浮细胞：T25瓶置于37℃培养箱放置约2-3h，然后抽出瓶中的培养基和细胞1000rpm离心5分钟，弃去上清重悬后接种到新的培养瓶中（加入按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基）。

4）备注：运输用的培养基（灌液培养基）不能再用来培养细胞，请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。  收到细胞后第一次传代建议T25培养瓶1：2传代 。

**一．培养基及培养冻存条件准备：**

1. 准备MEMα基础培养基+0.2mM Inositol（肌醇） +0.1mM β-mercaptoethanol （β巯基乙醇）β+0.02mM Folic Acid（叶酸）+12.5% HS(马血清）+12.5% FBS优质胎牛血清+1% P/S双抗。
2. 培养条件：气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37摄氏度，培养箱湿度为70%-80%。
3. 冻存液：无血清细胞冻存液。
4. **细胞处理：**

**细胞刚复苏或密度较低时可以把培养瓶立起来培养，以提高细胞密度，促进细胞聚团。当细胞聚团正常生长后，建议平躺着培养该细胞，以增大空气交换面积，且液体高度最好不要超过3mm，一般T25培养瓶加6-8mL培养基，T75培养瓶加15mL左右培养基即可。培养基尽量现配，配好的培养基最好两周内用完，因为叶酸和IL-2不稳定易分解。**

**一般情况下细胞2-3天换液一次，即使培养基没有变黄。换液时轻轻侧过培养瓶/皿，不要使细胞飘起来，用巴氏吸管轻轻吸取部分上清弃去，补加等体积的新鲜培养基继续培养。或者将全部培养液转移至离心管中，1000rpm,离心5min，吸去上清后用新鲜培养轻轻重悬后重新种瓶，重悬时不可吹打过度。细胞对离心和吹打比较敏感，离心和反复吹打会影响细胞状态，建议只在细胞产生大量碎片时才离心清洗。平常换液建议半换，传代可直接补加足够新鲜的培养基后直接分瓶。**

**细胞团长至肉眼可见，且T25瓶子有几十上百个小团时，细胞数量已经比较多，此时应该2天换液一次。当一个20倍视野有4-5个大细胞团时应该进行传代。传代时加入两倍体积的新鲜培养基后，轻轻吹打细胞团，将大的细胞团打散成小团，但不要剧烈吹打成单细胞悬液，因为单个的细胞是基本没有增殖活力的细胞，然后将混匀的细胞悬液转移至新的培养瓶中。或者将细胞悬液转移至离心管中，1000rpm离心5min后，弃去上清，加入三倍体积的新鲜培养基轻轻重悬后转移至三个新的培养瓶中。**

1. **冻存细胞的复苏**：：

将含有1mL细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入到含4-6mL完全培养基的离心管中混合均匀。在1000RPM条件下离心3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含6-8ml完全培养基的培养瓶（或皿）中37℃培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

1. **细胞传代**：如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。

对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

悬浮状态下生长的细胞，可以通过向培养瓶中添加完全培养基来维持细胞的生长状态，一般情况下细胞密度维持在1×105~1×106个/mL（不同细胞对密度要求不同，）可以维持细胞的正常生长。如需分瓶可以将细胞悬液收集到离心管中1000rpm，离心5min，弃去上清，补加1-2mL培养液后重悬混匀后将细胞悬液按1：2的比例分到新T25瓶中，添加6-8ml按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按1:2~1:5的比例进行。

1. **细胞冻存:** 收到细胞后建议在培养前3代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面T25瓶为例；
2. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为1×106~1×107个活细胞/ml.
3. 1000rpm离心3-5min，去掉上清。用无血清细胞冻存液重悬细胞 ，按每1ml冻存液含1×106~1×107个活细胞/ml分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。
4. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

**注意事项：**

1. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。