

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-92MI 细胞(Natural killer-92MI cells)是由亲本细胞 NK-92 转染 MFG-hIL-2 载体得到的 IL-2 非依赖的 NK 细胞株,而 NK-92 最初是从一名 50 岁男性非霍奇金淋巴瘤患者的外周血中分离建立而来,且细胞生长依赖于 IL-2。

NK-92MI 细胞悬浮生长、呈现聚团状,广泛应用于 NK 细胞杀伤活性、杀伤机制以及抗肿瘤治疗和药物筛选等研究

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: $>5 \times 10^5$ 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。

悬浮细胞到货处理:

NK92MI 该细胞为悬浮细胞,我们发货是用的离心管装的,不是 T25 瓶装,方便老师操作。传代时使用【半换液法】对细胞状态有利,因此我库建议您使用【半换液法】进行传代。

您在收到细胞后,不需要通过离心的方式收集细胞,可以将离心管上下混匀数次,后移入 2 个 T25 培养瓶中继续培养即可。【即 2 管离心管分到 4 个 T25 瓶中】

静置后可以观察下细胞形态,拍照。

一. 培养基及培养冻存条件准备:

- 1) 准备 α -MEM 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 特级胎牛血清+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。

二. 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液轻轻重悬后重新种瓶,重悬时不可吹打过度。细胞对离

上海葵赛生物科技有限公司

中国(上海)自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话: 13636346891

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。

2) 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 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 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。

3) 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;

1. 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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个活细胞/ml.
2. 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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 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。
3. 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。