

人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞 (NK92)

细胞介绍:

NK-92 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白细胞介素-2 依赖型 NK 细胞株。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 和 Daudi 细胞。NK-92 细胞(经过照射以防止增殖)可以有效地用于血液中白血病的体外免疫清扫而不危及血细胞的功能。NK-92 细胞有以下特征：CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54 表面标记阳性, CD56 亮; CD1, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20, CD23, CD34 和 HLA-DR 表面标记阴性。

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： $>5 \times 10^5$ 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。

一. 培养基及培养冻存条件准备:

- 1) 准备 MEM α 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) +100-200U/mL recombinant IL-2 白介素+12.5% HS(马血清) +12.5% FBS 特级胎牛血清+1% P/S 双抗。

a 该细胞为悬浮细胞，根据培养经验以及客户的反馈，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。同时，您在收到细胞后，请不要通过离心的方式收集细胞，可以直接向培养瓶中添加等体积的新鲜培养液，然后将细胞吹打均匀后移入两个新的 T25 培养瓶中继续培养即可。

- 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 7 号楼 1 单元 4011 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。

