基因改造的 K562 滋养层细胞

使用说明书

目录

1. 产品简介.....3
2. 应用.....3
3. 产品规格.....3
4. 储存条件及有效期.....3
5. 需自行准备的设备/材料.....3
6. NK 细胞制备流程.....4
7. 故障排除.....6
8. 参考文献.....8
9. 联系方式.....8
10. 买方须知.....8

1. 产品简介

Hillgene 公司基因改造的 K562 滋养层细胞为经辐照灭活后表达 IL-21 等多种细胞因子的工程化 K562 细胞，搭配主流的免疫细胞培养基，在多种细胞因子协同信号作用下，体外培养的脐带血和外周血单个核细胞来源的 NK 细胞得到定向激活和大量扩增，且所获得的 NK 细胞纯度高。

2. 应用

适用于 PBMCs、CBMCs、iPSC 和基因改造后的 NK92 细胞系等来源的 NK 细胞扩增。

适用于 CAR-NK 免疫细胞的激活和大量扩增。

3. 产品规格

产品名称	货号	规格	体积	效期	储存条件
基因改造的 K562 滋养层细胞	HG-FEC002-RU-1	1 E7 Cells/Vial	约 0.5 mL	24 个月	≤-130℃
	HG-FEC002-GMP-2	2 E7 Cells/Vial	约 1 mL	24 个月	≤-130℃
	HG-FEC002-GMP-3	8 E7 Cells/Vial	约 4 mL	24 个月	≤-130℃
	HG-FEC002-GMP-4	1 E9 Cells/Bag	约 50 mL	24 个月	≤-130℃

△注意：在开始实验前，请仔细阅读说明书，并检查产品信息。

4. 储存条件及有效期

产品请按照说明书规定的储存条件保存，有效期详见产品标签显示的截止日期。基因改造的 K562 滋养层细胞以干冰或者液氮运输，**收到后应立即使用或存放在液氮中，不要使用-80℃ 冰箱进行长期保存。**

△注意：基因改造的 K562 滋养层细胞复融后建议一次使用完，避免反复冻融。

5. 需自行准备的设备/材料

表 1：NK 细胞扩增常用设备

设备名称	厂家	型号
A2 型生物安全柜	ESCO	AC2-4S8-CN
二氧化碳培养箱	ESCO	CLM-170B-8-CN
细胞计数仪	Chemometec	NC200
气相液氮罐	Thermo Fisher	CE8140
医用冷藏保存箱	中科都菱	MPC-5V315

设备名称	厂家	型号
医用低温保存箱	海尔	DW-25L262
医用超低温冰箱	海尔	DW-86L100J
台式冷冻离心机	Thermo Fisher	Sorvall ST4R Plus

表 2：NK 细胞扩增常用试剂/耗材

试剂&材料	品牌	货号
Corning® Lymphocyte Serum-free Medium, KBM 581	Corning	88-581-CM
Human IL-2 Recombinant Protein	Thermo Fisher	200-02-50UG
CTS™ 免疫细胞 SR	Thermo Fisher	A2596101
六孔板	Thermo Fisher	140675
T25 细胞培养瓶	Thermo Fisher	156367
T75 细胞培养瓶	Thermo Fisher	156499
T175 细胞培养瓶	Thermo Fisher	159910
GT-T610（B）淋巴细胞培养袋（0.3～1.8L）	Takara	FU0003
Viral E-hancer C(GMP)	Hillgene	HG-PTD001-C-G

6. NK 细胞制备流程

6.1. NK 细胞无血清完全培养基配制：

Serum free Medium+自体血浆/血小板裂解物/免疫细胞 SR（2%～5%）+ IL-2（200～500 IU/mL），现配现用。

△注意：为保证 NK 细胞扩增效果，每次使用前需 37℃预热配制好的 NK 细胞无血清完全培养基。

6.2. D0 初次激活：

根据使用细胞类型和 K562 滋养层细胞计数结果取相应体积的细胞和基因改造的 K562 滋养层细胞（添加比例参考表 3），将混匀后的细胞和基因改造的 K562 滋养层细胞转入合适培养容器，并补加完全培养基调整细胞密度至 **3～5E5 cells/mL**，于 37℃、5% CO_2 条件培养。

△注意：扩增细胞和 K562 滋养层细胞按照活细胞数进行细胞计数和按比例添加。

表 3：不同来源的细胞初次激活比例参考

激活细胞类型	激活比例（按照活细胞数进行计算）	调整细胞密度
PBMCs	PBMCs: K562 feeder=1:2	3～5E5 cells/mL
CBMCs	CBMCs: K562 feeder=1:2	3～5E5 cells/mL
NK 细胞（CD3-）	NK 细胞：K562feeder=1:2	3～5E5 cells/mL
NK 细胞（CD3-&CD56+）	NK 细胞：K562feeder=1:4	3～5E5 cells/mL
改造后 NK92 细胞系	改造后 NK92 细胞系：K562 feeder=1:4	3～5E5 cells/mL
iPSC-NK	IPSC-NK: K562 feeder=1:4	3～5E5 cells/mL

△注意：在细胞密度调整过程中，以待激活细胞的实际细胞数量作为密度计算依据。K562 滋养层细胞作为后续添加的辅助细胞，不计入待激活细胞的目标密度计算。

6.3. D4 观察补液

观察细胞，补加 D0 时等体积 NK 细胞完全培养基，随后置于 37°C、5% CO_2 条件培养。

6.4. D6 观察补液

观察细胞，吹打混匀后取样计数，根据细胞悬液颜色及显微镜下细胞状态补加 NK 细胞无血清完全培养液**并调整细胞密度至 3～5 E5 cells/mL**，于 37°C、5% CO_2 条件培养。

6.5. D7 观察、二次激活和补液

观察细胞，吹打混匀后取样计数。然后进行基因改造的 K562 滋养层细胞复苏、洗涤和取样计数，根据待激活的 NK 细胞数量和基因改造的 K562 滋养层细胞添加比例（**推荐 NK 细胞数量 ：K562 滋养层细胞数量=1:1**）取相应体积的基因改造的 K562 滋养层细胞，并补加 NK 细胞无血清完全培养液**调整细胞密度至 2.5 E5 cells/mL**，于 37°C、5% CO_2 条件培养。

△注意：K562 滋养层细胞按照活细胞数进行细胞计数和添加。

6.6. D10 观察换液

观察细胞，将细胞悬液转移至合适体积的离心管，400 g、10min 离心，弃上清，以 NK 细胞无血清完全培养液配制，调整**细胞密度至 5 E5 cells/mL**，并转入合适的培养容器，于 37 °C、5% CO_2 条件培养。

△注意：细胞吹打混匀过程中，操作应保持轻柔，防止因吹打力量过大造成细胞死亡比例过高。

6.7. D10～D14 观察补液

每隔两天观察细胞并取样计数，根据培养基颜色变化或细胞浓度补加 NK 细胞无血清完全培养液，调整**活细胞密度至 5-8 E5 cells/mL**，于 37°C、5% CO_2 条件培养。

6.8. D14～D17 细胞收获

观察细胞，取样计数，根据需要手工或以设备收获细胞，若因实验需要，可适当提前或推后收获细胞，收获洗涤后的细胞根据需要以合适的冻存液重悬至一定细胞密度，然后按照一定分装规格分装至冻存管或冻存袋，以程序降温盒或程序降温仪进行程序降温冻存，最后放于液氮罐储存。

△注意：细胞培养步骤仅作参考，由于样品个体差异、培养方式调整等因素，NK 细胞扩增培养状态可能存在差异性，此时对 NK 细胞生长状况观察分析后可进行适当调整

7. 故障排除

问题 1：细胞培养中发现比较明显的聚团现象，是否要干预?

回答：NK 细胞会特异性地结合 K562 细胞并被激活，宏观看就是细胞聚团生长，这是正常现象，标志着激活成功。正常在 Day7 左右，这种聚团生长开始缓解，细胞以小团开始生长，整个过程中，不建议吹打细胞，每天补液即可。

问题 2：为什么在 D10 进行细胞换液?

回答：（1）更换了新鲜的培养基，有助于细胞生长；（2）在 NK 细胞培养过程中加入了 K562 滋养层细胞，换液有助于清除这些添加物，降低后续细胞终产品的工艺杂质残留风险。

问题 3：如何判断基因改造的 K562 滋养层细胞的添加量?

回答：在进行 NK 激活实验时，基因改造的 K562 滋养层细胞的添加是按照活细胞的数量进行添加的，例如 K562 滋养层细胞复苏后，活率为 80%，密度为 2E7 cells/mL，体积为 1mL，K562 滋养层细胞的添加量为 1.6E7 细胞。

问题 4：如何进行基因改造的 K562 滋养层细胞复苏?

回答：取出液氮中保存的 K562 滋养层细胞，于干冰中传送到细胞制备实验室。待 37℃恒温电热水浴升至 37℃并稳定后，取 K562 滋养层细胞进行水浴复苏，轻轻摇晃冻存管，待冻存管内还有少量冰晶时停止水浴。用 75%消毒酒精擦拭冻存管表面，传入生物安全柜，用巴氏吸管将细胞转移至无菌离心管内，缓慢加入 10 倍体积已提前预热的无血清培养基（可选项：PBS 或生理盐水），充分保护解冻后的细胞，室温静置 1min。然后均 400g、10min 离心，弃上清，加入 5 mL 的完全培养基将细胞悬液混合均匀，400g、10min 离心，弃剩余上清，加入 1 mL 的完全培养基，取样计数。

△注意：K562 滋养层细胞不宜长时间暴露在常温环境，液氮取出后应在 2min 内进行复苏操作；操作过程应注意力度轻柔，避免造成细胞机械损伤。

问题 5：PBMCs 分离操作步骤?

回答:分离 PBMCs:等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀,缓缓地加到 Ficoll 层(稀释后的血细胞:Ficoll=2:1)上使分层保持清晰，室温下 800 g 离心 30min，升速 4、降速 3。然后小心吸取中间的白膜层，加生理盐水吹打混匀，室温下 400 g 离心 10min，弃上清，并再次重复洗涤一次 PBMCs，弃上清，用适量完全培养基重悬细胞后取样计数。

问题 6：冻存的单个核细胞复苏操作步骤?

回答：单个核细胞复苏：取出液氮中保存的单个核细胞，于干冰中传送到细胞制备实验室。待 37℃恒温电热水浴升至 37℃并稳定后，取单个核细胞进行水浴复苏，轻轻摇晃冻存管，待冻存管内还有少量冰晶时停

止水浴。用 75%消毒酒精擦拭冻存管表面，传入生物安全柜，用巴氏吸管将细胞转移至无菌离心管内，缓慢加入 10 倍体积已提前预热的无血清培养基（可选项：PBS 或生理盐水），充分保护解冻后的细胞，室温静置 1min。然后均 400g、10min 离心，弃上清，加入 5 mL 的完全培养基将细胞悬液混合均匀，400g、10min 离心，弃剩余上清，加入 1 mL 的完全培养基，取样计数。

问题 7：如何在 NK 细胞培养中，进行病毒转导?

回答：

D6 病毒转导：

取出初次激活培养后的细胞，取样计数，剩余细胞悬液室温 400g、离心 10min，弃去上清，根据计数结果，用 NK 细胞无血清完全培养液配制重悬沉淀，调整细胞密度至 2E6 cells/mL；

根据 MOI、细胞数量和病毒滴度计算所需量的病毒载体体积，向细胞悬液中加入病毒载体；（△**注意：NK 病毒转导的 MOI 建议在 5～20。**）

根据加入病毒载体后的细胞悬液总体积，按照病毒转导增强剂 C：细胞悬液的体积比 1:100 加入 Viral E-hancer C，缓慢吹打混匀；

将细胞、NK 细胞病毒转导增强剂和病毒混合物放置于 37°C和 5% CO_2 培养箱中继续培养 24±2h。

D8 观察、二次激活和补液

观察细胞，吹打混匀后取样计数。然后进行基因改造的 K562 滋养层细胞复苏、洗涤和取样计数，根据待激活的 NK 细胞数量和基因改造的 K562 滋养层细胞添加比例（**推荐 NK 细胞数量：K562 滋养层细胞数量=1:1**）取相应体积的基因改造的 K562 滋养层细胞，并补加 NK 细胞无血清完全培养液**调整细胞密度至 2.5 E5 cells/mL**，于 37°C、5% CO_2 条件培养。

△**注意：K562 滋养层细胞按照活细胞数进行细胞计数和添加。**

8. 参考文献

Srinivas S. Somanchi (ed.), Natural Killer Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1441, DOI 10.1007/978-1-4939-3684-7_14, © Springer Science+Business Media New York 2016.

9. 联系方式

- 地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号
- 邮编 Postal code：215104
- 联系电话 Tel：400-900-1882
- 邮箱 E-Mail：info@hillgene.com
- 网址 Website：https://www.hillgene.com

10. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

未经我们事先书面批准，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 https://www.hillgene.com 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 https://www.hillgene.com。

附件 1：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com）

产品名称	产品货号
血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒	HG-NA100
CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-CA001
BaEV 基因拷贝数检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-BA001
人干扰素γ（IFN-γ）ELISA 检测试剂盒	HG-IF002
Viral E-hancer C(GMP)	HG-PTD001-C-G
细胞杀伤检测试剂盒（悬浮靶细胞）	HG-CKK001
K562 feeder cell 残留检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-KF001