

OriCell®

细胞产品手册

OriCell® NK-92
人恶性非霍奇金淋巴瘤患者
自然杀伤细胞系

产品货号：H3-1001



We help you discover life

产品介绍

人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞（NK-92）是从一位患有急性非霍奇金淋巴瘤的 50 岁白人男性外周血单核细胞衍生的一株 IL-2 依赖型 NK 细胞株。NK-92 细胞表达高水平的颗粒酶 B 和穿孔素，因此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。

NK-92 细胞对广泛的肿瘤靶标有效。早期研究证明 NK-92 在体外对血液起源的恶性细胞具有细胞溶解活性。严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠临床前研究显示 NK-92 在 T 急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、骨髓瘤、黑色素瘤异种移植等模型上有效。这些研究表明，在临床前环境中，NK-92 具有抗肿瘤活性。

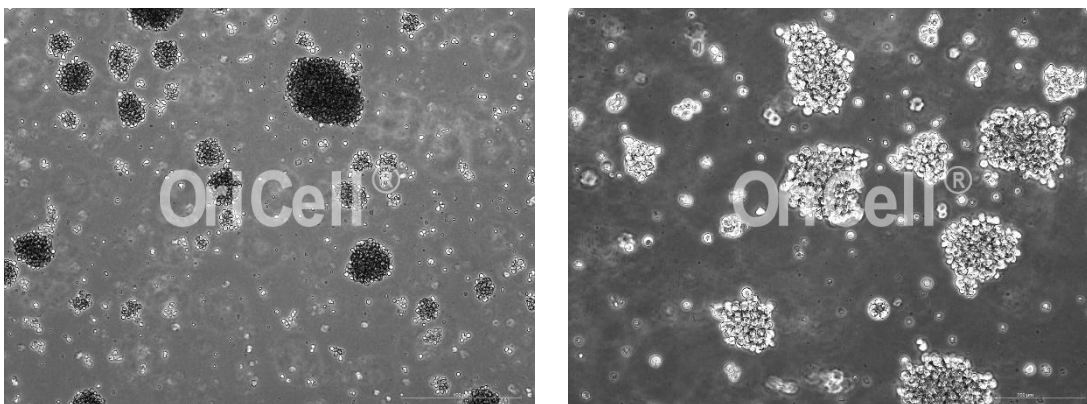
注意：本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

产品信息

产品名称	人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞系
简称	NK-92
货号	H3-1001
规格	1×10 ⁶ 个/管 或 1×10 ⁶ 个/瓶
组织来源	人外周血
细胞特性	淋巴母细胞样；悬浮生长
培养条件	95%空气；5% CO ₂ ；37°C
培养基	MEMα + 12.5%HS + 12.5%FBS + 0.2mM Inositol + 0.02mM Folic Acid + 0.1mM β-mercaptoethanol + 200U/ml recombinant IL-2
倍增时间	36~48 h
生物安全等级	2
保存条件	液氮 (-196°C)

注意：本产品在生产过程中严格控制无菌。在后续培养过程中，请根据实际情况决定是否在培养基中添加抗生素。

OriCell® NK-92 细胞系在倒置相差显微镜下的形态



质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>90%。
- 通过 STR 检测。

处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合悬浮细胞生长的培养容器，不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。
4. 冻存细胞复苏后最开始状态会较差，一般培养 1-2 代后会恢复正常。
5. NK-92 属于**悬浮抱团生长**的细胞，细胞复苏和传代时需要保证一定的密度。
6. 细胞培养过程中，培养皿底部会出现颗粒物和细胞碎片，属于正常现象，如若怀疑污染请仔细辨别，不要轻易丢弃细胞。

7. **换液或传代之前切勿直接吹打**，否则极易导致细胞死亡。可以直接将细胞原液吸取至离心管中，离心后去除上清，用新鲜的完全培养基轻柔吹打均匀即可。
8. 细胞传代时，注意传代时机，细胞团不宜过大或过小，当显微镜视野中部分团块**中心区域开始泛黄**时，即可传代。
9. 细胞培养建议使用配套的 OriCell® NK-92 完全培养基，配制好的完全培养基建议每隔 4~5 周根据培养基配方浓度补充添加物 IL-2（货号：RHIL-10302）。

冻存细胞复苏和培养

所需材料

- OriCell® NK-92 细胞
- OriCell® NK-92 细胞完全培养基（货号：CMH3-1001）

操作步骤

注意：收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80°C冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80°C，让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37°C预热。
2. 完全培养基温浴到 37°C。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
4. 从-80°C冰箱中取出细胞，放入 37°C水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

注意：1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染；

3) 冻存液融化至一个约 2 mm 直径的冰晶时，停止水浴，继续晃动冻存管，至冰晶融化。

5. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
7. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
8. 细胞悬液以 $140\times g$ ，离心 5 min。

注意：请以公式 $a=\omega^2r$ (a :向心加速度； ω :旋转角速度， $\omega=\pi n/30$ ； r :转子半径) 计算相应转速。

9. 离心后去除上清，加入 3 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
10. 将一支冻存管 (1×10^6 个/管) 的细胞接种到 1 个 6 cm 的培养皿中。
11. 摇匀细胞，放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中。

12. 复苏后第一天，不要对细胞采取任何处理，若要观察细胞状态，最好在短时间内完成，尽量减少晃动。
13. 复苏后第二天，观察细胞状态、密度，根据情况进行换液或传代操作。
14. 细胞恢复正常状态后，每隔 36~48 h 进行传代或更换新鲜的完全培养基。

注意：本产品冻存液中含有 DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。

常温细胞接收处理

所需材料

- OriCell® NK-92 细胞
- OriCell® NK-92 细胞完全培养基（货号：CMH3-1001）
- 75%医用酒精
- 数个无菌的 EP 管
- 两个无菌的 50 mL 离心管

注意：收到常温运输的细胞，取出细胞培养瓶后请仔细核对标签信息；检查培养基是否浑浊；瓶身有无裂痕；瓶口有无培养基渗漏。

操作步骤

1. 用 75%医用酒精全面喷洒擦拭细胞培养瓶，转移入超净工作台。
2. 去除瓶口封口膜，再用蘸有 75%医用酒精的洁净无纺布擦拭瓶口。
3. 镜下观察细胞，检查是否出现大量死细胞。
4. 若无异常，在超净工作台中打开培养瓶，将细胞悬液均分，转移到两个 50 mL 离心管内。
5. 细胞悬液以 $140\times g$ 离心 5 min。

注意：请以公式 $a=\omega^2r$ (a :向心加速度； ω :旋转角速度， $\omega=\pi n/30$ ； r :转子半径) 计算相应转速。

6. 吸取至少 2 份 1 mL 离心上清至无菌的 EP 管中，妥善保存，以备检测。

注意：留样的细胞培养基请放置 4°C 冰箱保存。若细胞短期内出现污染，请取其中 1 份做微生物检测；若直到细胞第二次传代没有任何异常，则可丢弃样品。

7. 去除多余上清，在两个 50 mL 离心管内，各加入 1 mL 完全培养基，轻柔吹散细胞沉淀，将两管细胞收集到一起，轻柔混匀。
8. 将细胞按 $(6\sim 8)\times 10^5$ 个活细胞/mL 接种至适宜的培养容器内。
9. 摇匀细胞，放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中。
10. 第二天观察细胞状态，之后，每隔 36~48 h 进行传代或更换新鲜的完全培养基。

细胞传代

所需材料

- Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) (货号: PBS-10001, 以下简称 PBS)
- OriCell®NK-92 细胞完全培养基 (货号: CMH3-1001)

操作步骤

1. 将完全培养基预热至 37°C。
2. 用巴氏吸管将细胞悬液转移至离心管, 用 PBS 洗涤容器 1 次, 收集残留细胞。
3. 收集的所有细胞悬液以 140×g 离心 5 min。
4. 离心后去除上清。加入 1mL 完全培养基, 轻柔吹打细胞沉淀, 充分吹散、混匀。
5. 将细胞按 $(6\sim 8) \times 10^5$ 个活细胞/mL 接种至适宜的培养容器内, 例: 6 cm 培养皿中, 3 mL 完全培养基 $(1\sim 2) \times 10^6$ 个活细胞。

注意: 我们建议有条件且计数效率较高的情况下, 进行手工计数, 以期获得精准的细胞浓度指导接种; 在没有精确计数条件的情况下, 按照适宜比例传代是更好的方法。通常 OriCell®NK-92 细胞传代比例为 1:2~1:3, 48 h 生长至可传代密度。请根据细胞实际生长情况调整传代比例。

6. 摇匀细胞, 放入 37°C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中。

细胞冻存

所需材料

- OriCell® 通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）

操作步骤

1. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。
2. 细胞收集请参考 OriCell® NK-92 细胞的传代操作步骤 1~3。
3. 离心后去除上清，用适量 OriCell® 通用无蛋白非程序冻存液均匀重悬细胞（也可按血清：DMSO=9:1 的比例配制冻存液）。
4. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

注意：在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4°C 冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。

5. 直接将冻存管直立且分散地放入 -80°C 冰箱中。

注意：细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4 h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。

6. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。

注意：细胞不可长期保存在 -80°C 冰箱中。我们建议在 -80°C 冰箱中的保存时间不要超过 48 h。

赛业（广州）生物科技有限公司保留 OriCell® 细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。