

## NK-92MI 人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞

### 培养说明书

名称	NK-92MI 人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞
种属	人类
组织来源	外周血
生长特性	悬浮细胞
细胞形态	淋巴母细胞样
背景描述	<p>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。</p>
培养体系	MEM $\alpha$ + 0.2mM Inositol + 0.1mM $\beta$ -mercaptoethanol + 0.02mM Folic Acid + 12.5% HS + 12.5% FBS + 1% P/S
传代比例	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/mL
换液频率	2~3 次/周
冻存条件	冻存液：55% 基础培养基 + 40% FBS + 5% DMSO 温度：液氮
培养条件	95% Air; 5% CO <sub>2</sub> ; 37° C
备注	建议收到细胞后，尽快更换新的培养液或传代

\*本库的细胞系（株）仅用于科研工作，未经许可不得用于其他目的。

### 复苏细胞接收后如何处理

1. 收到细胞后，请及时检查并拍照记录是否瓶身破损或有无漏液，培养液是否混浊等，如有请及时反馈。
2. 用 75%酒精消毒瓶身，放 37℃培养箱中静置 2-4h 后，显微镜下观察细胞状态并拍照记录（所拍照片将作为后续售后依据）。
3. 若细胞生长密度超过 80%以上，可直接消化传代；若密度低于 80%时，移除细胞培养瓶内培养基，预留 8-10ml 原瓶培养基继续培养，直到细胞密度 80%左右再进行传代操作，注意拧松瓶盖或更换透气瓶盖。
4. 若有贴壁细胞漂浮的，可收集上清离心，将沉淀用新的培养基接种至新的培养瓶或培养皿中。
5. 建议收到当天不要消化处理，如果细胞长满 90%，可选择传代处理。
6. 若收到细胞异常时，请及时与我们联系，对于细胞培养操作及培养注意事项有疑问的，可跟我们的技术支持交流。

### 冻存细胞接收后如何处理

1. 干冰运输，收到细胞后立即转入-80℃冰箱短暂中转或直接复苏；
2. 收到细胞后，若发现干冰已经完全挥发、冻存管瓶盖破裂脱落，请及时拍照后与我们联系。

### 细胞培养基本步骤

1. 细胞传代：细胞密度达到 80-90%时即可传代培养
  - ①弃去培养上清，用 PBS 或生理盐水清洗 1-2 次；
  - ②加入 1-2ml 0.25%胰酶（T25 瓶），使胰酶覆盖整个瓶或皿，盖好放入 37℃培养箱消化；
  - ③1-2min 后，显微镜下观察细胞，若大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打下确认消化情况后加入完全培养基终止消化；若细胞还是贴壁，放回培养箱继续消化至可以轻轻吹打下为止；
  - ④将细胞悬液 1000RPM 左右条件下离心 4min，弃上清；
  - ⑤用新鲜培养基重悬后加入培养瓶或皿中，T25 培养瓶加 6-8ml 培养基；
  - ⑥悬浮细胞直接离心收集，细胞沉淀重悬后分到新培养瓶中。
2. 细胞复苏：
  - ①将冻存管在 37℃温水中快速摇晃融化，时间 1min 左右，加入 4-5ml 培养基混匀。
  - ②在 1000RPM 左右条件下离心 4min，弃上清，加 1-2ml 培养基吹匀，将细胞悬液加入培养瓶中，补加适量培养基。
3. 细胞冻存：待细胞生长状态良好时进行细胞冻存保种
  - ①弃去培养上清，用 PBS 或生理盐水清洗 1-2 次，加入 1ml 0.25%胰蛋白酶（T25 瓶）
  - ②1-2min 后，显微镜下观察细胞，大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打下确认消化情况后加入完全培养基终止消化；
  - ③将细胞悬液 1000RPM 左右条件下离心 4min，弃上清，加 1ml 冻存液重悬细胞；
  - ④将冻存管放入程序降温盒，放入-80℃冰箱，4 小时后将冻存管转入液氮罐储存。