



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112680415 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(21) 申请号 202110145009.1

(22) 申请日 2021.02.02

(71) 申请人 杭州原生生物科技有限公司
地址 310000 浙江省杭州市萧山区传化科
创大厦1幢萧山科技城214-59室

(72) 发明人 曹哲厚 杨翅春 林晓杰 曾琪
张扬

(74) 专利代理机构 杭州橙知果专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33261

代理人 杜放

(51) Int. Cl.
C12N 5/0783 (2010.01)

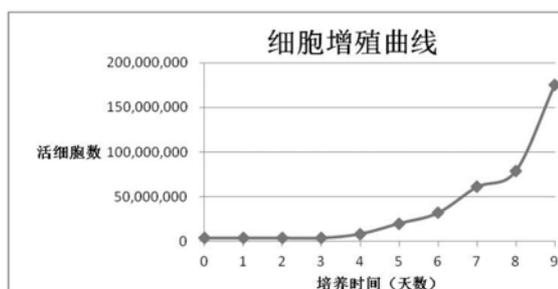
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种NK培养基及其扩增培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种NK培养基及其扩增培养方法,包括NK细胞培养基;所述培养基包括无血清培养基、IL-2、IL-21、IL-15和人自体血清。本发明不需要使用胎牛血清,可以避免使用外源血清带来的风险;不需要使用流式细胞仪或免疫磁珠技术进行分选纯化;扩增效率高,9天就能获得较高纯度NK细胞,CD3-CD56+的比例大于50%,扩增倍数为121倍。



1. 一种NK培养基,其特征在于,包括NK细胞培养基;
所述培养基包括无血清培养基、IL-2、IL-21、IL-15和人自体血清。
2. 根据权利要求1所述的一种NK培养基,其特征在于,所述无血清培养基为康宁KBM581淋巴细胞无血清培养基。
3. 根据权利要求1所述的一种NK培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基中,IL-2的浓度为500~1500U/mL。
4. 根据权利要求3所述的一种NK培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基中,IL-2的浓度优选800U/mL。
5. 根据权利要求1所述的一种NK培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基中,IL-21的浓度为5~15ng/mL,IL-15的浓度为5~15ng/mL。
6. 根据权利要求5所述的一种NK培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基中,IL-21的浓度优选10ng/mL、IL-15的浓度优选5ng/mL。
7. 根据权利要求1所述的一种NK培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基中,所述人血清的体积分数为5~15%。
8. 根据权利要求7所述的一种NK培养基,其特征在于,所述培养基NK细胞培养基中,所述人血清的体积分数优选10%。
9. 一种具有权利要求1~8任一项所述的NK培养基的NK细胞培养方法,其特征在于,
步骤1:从人脐血中分离出脐血单个核细胞;
步骤2:将步骤1所得到的脐血单个核细胞接种到NK细胞培养基上进行培养,接种密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL;
步骤3:每2~3天添加上述NK细胞培养基,使细胞的密度维持在 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL;
步骤4:扩增到9~14天之后收集NK细胞。
10. 根据权利要求9所述的一种NK培养基及其扩增培养方法,其特征在于,所述步骤2具体操作如下,
将脐血单个核细胞用NK细胞培养基进行重悬,重悬后细胞的密度为 1×10^6 个/mL,将细胞接种在低吸附培养瓶中,并置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。

一种NK培养基及其扩增培养方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗技术领域,尤其是涉及一种NK培养基及其扩增培养方法。

背景技术

[0002] 专利号CN104593324A的文件中提到一种自然杀伤细胞的培养基及其培养方法,培养基成分包括无血清培养基、人血清、IL-2、IL-21、IL-15和OKT-3,该方法的主要步骤是:先将分离出来的PBMC进行流式分选,分选前NK细胞(CD3-CD56+)的比例为11.2%,分选后NK细胞(CD3-CD56+)的比例为95.4%;然后将分选出来的NK细胞进行扩增,利用上述的培养基,可以在培养14天后,NK细胞的纯度达97.2%,细胞增长了将近1000倍。

[0003] 该方法存在的缺陷是分离出来的PBMC需要先进行流式分选,才能进行后续操作。流式分选的仪器相对昂贵,不少实验室并不具备该仪器。我们利用专利号CN104593324A的方法对没有进行流式分选的脐血单个核细胞进行扩增,扩增14天后,扩增出来细胞主要是T细胞,NK细胞的纯度极低。因此有必要对该配方进行改造,使其能够在未进行流式分选的脐血单个核细胞中扩增NK细胞。

发明内容

[0004] 本发明为了克服现有技术的不足,提供一种NK培养基及其扩增培养方法。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的第一个目的,提供一种NK培养基,包括

[0006] NK细胞培养基;

[0007] 所述培养基包括无血清培养基、IL-2、IL-21、IL-15和人自体血清。

[0008] 优选的,所述无血清培养基为康宁KBM581淋巴细胞无血清培养基。

[0009] 优选的,所述NK细胞培养基中,IL-2的浓度为500~1500U/mL。

[0010] 优选的,所述NK细胞培养基中,IL-2的浓度优选800U/mL

[0011] 优选的,所述NK细胞培养基中,IL-21的浓度为5~15ng/mL,IL-15的浓度为5~15ng/mL。

[0012] 优选的,所述NK细胞培养基中,IL-21的浓度优选10ng/mL、IL-15的浓度优选5ng/mL。

[0013] 优选的,所述NK细胞培养基中,所述人血清的体积分数为5~15%。

[0014] 优选的,所述培养基NK细胞培养基中,所述人血清的体积分数优选为10%。

[0015] 本发明的第二个目的还提供一种NK细胞培养方法,包括

[0016] 步骤1:从人脐血中分离出脐血单个核细胞;

[0017] 步骤2:将步骤1所得到的脐血单个核细胞接种到NK细胞培养基上进行培养,接种密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL;

[0018] 步骤3:每2~3天添加上述NK细胞培养基,使细胞的密度维持在 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL;

[0019] 步骤4:扩增到9~14天之后收集NK细胞。

[0020] 优选的,所述步骤2具体操作如下,将脐血单个核细胞用NK细胞培养基进行重悬,重悬后细胞的密度为 1×10^6 个/mL,将细胞接种在低吸附培养瓶中,并置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养。

[0021] 综上所述,本发明不需要使用胎牛血清,可以避免使用外源血清带来的风险;不需要使用流式细胞仪或免疫磁珠技术进行分选纯化;扩增效率高,9天能获得较高纯度NK细胞,CD3-CD56+的比例大于 50% ,扩增倍数为121倍。

附图说明

[0022] 图1为利用本发明的NK细胞培养基获得的细胞的增殖曲线。

[0023] 图2为利用本发明NK细胞培养基培养9天获得的细胞的流式检测结果。流式抗体为CD3-FITC、CD56-PE-Cy7。

[0024] 图3为利用对照培养基培养9天获得的细胞的流式检测结果。流式抗体为CD3-FITC、CD56-PE-Cy7、CD4-APC、CD8-PE。

具体实施方式

[0025] 为了使本技术领域的人员更好的理解本发明方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述。

[0026] 实施例1:培养基的配制

[0027] 一种NK培养基包括,无血清培养基、IL-2、IL-21、IL-15、人自体血清;所述无血清培养基为康宁KBM581淋巴细胞无血清培养基;所述IL-2的浓度为 $500 \sim 1500 \text{U/mL}$ 之间,具体的,在本实施例中,IL-2的浓度优选 800U/mL 。所述IL-21的浓度为 $5 \sim 15 \text{ng/mL}$,IL-15的浓度为 $1 \sim 10 \text{ng/mL}$ 。在本实施例中,所述IL-21的浓度优选 10ng/mL 、IL-15的浓度优选 5ng/mL 。其中所述人自体血清的体积为 $5 \sim 15\%$,在本实施例中,人自体血清的体积优选 10% 。

[0028] 对照培养基为:康宁KBM581淋巴细胞无血清培养基、IL-2 (800U/mL)、IL-21 (10ng/mL)、IL-15 (5ng/mL)、 10% 自体血浆,OKT-3 (5ng/mL);

[0029] 实施例2:脐血单个核细胞的获得

[0030] A. 获得脐血 50mL ;

[0031] B. 制备血清:将脐血 800g ,离心 10min ,吸取上层血浆转至新的 50mL 离心管内,置于 56°C 水浴锅中灭活 30min ,然后在 -20°C 冷却 30min ,然后 1200g 离心 10min 。取上层血清 $15 \sim 20 \text{mL}$,后期按 5% 加入培养体系,供培养细胞时使用。

[0032] C. 吸取血浆后用生理盐水将的标本还原至 30mL 并充分混匀,缓慢加入在人淋巴细胞分离液Ficoll液面上, 700g ,室温离心 20min 。

[0033] D. 离心完毕后吸弃上层上清,小心吸取单个核细胞白膜层,移至两支 50mL 离心管中每管生理盐水 50mL ,每支分离管对应一个 50mL 离心管,并充分混匀。离心 800g , 10min 。

[0034] E. 弃上清,生理盐水重悬细胞并定容至 50mL 。

[0035] F. 将洗涤好的单个核细胞用细胞培养液重悬,同时接种在T25培养瓶中,用细胞培养液定容至 8mL ,细胞接种浓度为 2×10^6 个/mL,并加入人自体血清,使其终浓度为 5% 。将T25培养瓶中细胞置于饱和湿度、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中静置培养。

[0036] 实施例3:本发明提供方法扩增培养NK细胞

[0037] 取实施例2制备的脐血单个核细胞,以实施例1制备的培养基重悬,重悬后细胞的密度为 2×10^6 个/mL,将细胞接种在低吸附培养瓶中,并置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养,流式检测显示初始的脐血单个核细胞中CD3-CD56+的比例约为10%。每2~3天补充实施例1制备的培养基,使细胞的密度保持为 2×10^6 个/mL,连续培养9天,定时记录细胞数量。该实验中,在本发明的NK培养基中生长的细胞保持良好的增长态势,培养至第9天,取细胞进行流式检测,发现CD3-CD56+的比例约为51.62%,经过计算,总细胞的扩增倍数为47倍,NK细胞的扩增倍数为121倍。实验结果表明:本发明提供的培养基和方法能够高效地扩增出纯度较高的NK细胞。

[0038] 在其他实验条件完全一致的情况下,我们利用对照培养基培养实施例2制备的脐血单个核细胞,培养至第9天,取细胞进行流式检测,发现CD3-CD56+的比例为1.61%,CD3+CD8+的比例为70.35%,CD3+CD4+的比例为29.73%,表明扩增出来的细胞不是NK细胞,而是T细胞。对照培养基和本发明的NK培养基相比,差别是前者含有OKT3抗体,表明该抗体容易导致脐血单个核细胞中T细胞的扩增,而不利于NK细胞的扩增。

[0039] 显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

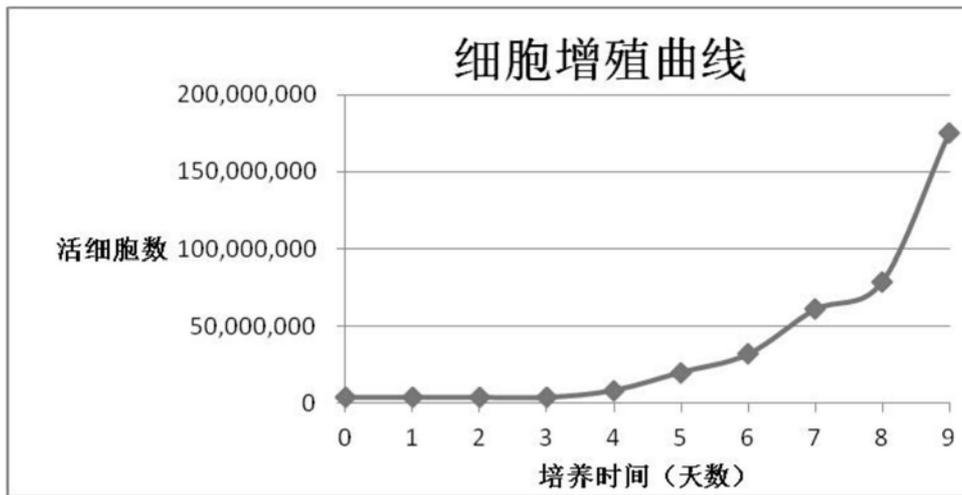


图1

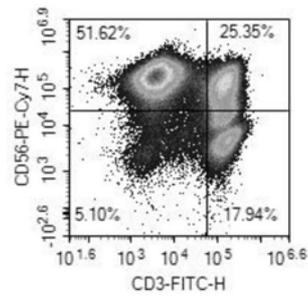


图2

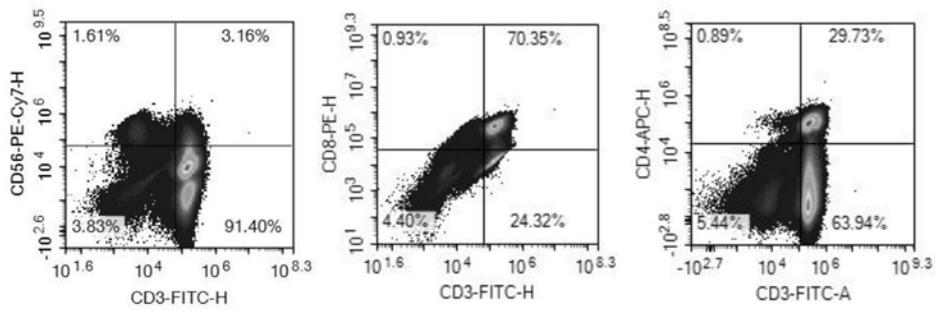


图3