

HyCyte®NK 细胞无血清培养试剂盒

使用手册

一、 产品介绍

HyCyte®NK 细胞无血清培养试剂盒为 NK 细胞高效扩增专门研发，该试剂盒化学成分明确，不含任何外源性生长因子及不明确的添加成分，培养过程中仅需添加少量自体血清（血浆），即可为 NK 细胞扩增提供一个营养完全且平衡的体外环境。扩增体系采用药物级抗体诱导 T 细胞凋亡并特异性激活 NK 细胞增殖及增强 NK 细胞杀伤活性。

HyCyte® NK 细胞无血清培养试剂盒生产过程符合 cGMP 标准规范，严格按照 ISO9001 国际质量管理体系对产品质量进行控制，产品通过微生物（细菌、真菌及支原体等）、内毒素、pH 和渗透压等临床级要求检测标准。

二、 试剂盒成分

HyCyte®NK 细胞无血清培养试剂盒（货号：ICHX-F202-2.2 L）

试剂盒组分	规格	保存条件
NK cell-expanding serum free medium NK 细胞扩增无血清培养基（货号：ICHX-F202）	1000 mL×2	2 至 8°C
NK cell-activating serum free medium NK 细胞激活无血清培养基（货号：ICHX-F202-02）	200 mL	2 至 8°C
NK cell-activating antibody NK 细胞激活抗体（货号：ICHX-F202-03）	1.5 mL	2 至 8°C
NK cell maintenance factor NK 细胞维持因子（货号：ICHX-F202-04）	400 µL	2 至 8°C
NK cell-activating factor NK 细胞激活因子（货号：ICHX-F202-05）	100 µL	-20 至 -80°C
Interleukin-2 (IL-2) 白细胞介素-2（货号：ICHX-F202-06）	300 µg	-20 至 -80°C
Buffer（货号：ICHX-F202-07） 缓冲液	20 mL	室温

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



完全培养基配制方法

1. 溶解 IL-2 干粉

- 1) 在打开管盖前，请使用离心机短暂离心，以确保管内的所有内容物到达管壁底部后再进行溶解。
- 2) 用1.5 mL Buffer溶解IL-2（300 µg/管）。溶解后，IL-2储液浓度为0.2 mg/mL，效价为 2×10^6 IU/mL。

注意

 - ① 溶解过程中请勿漩涡振荡。
 - ② IL-2：用小鼠CTLL-2细胞依赖法测定生物活性。ED50小于0.1 ng/mL，对应的比活性为 $\geq 1 \times 10^7$ IU/mg。
- 3) 根据每次实验所需量进行分装，置于-20°C长期保存。**避免反复冻融。**

注意

IL-2冻干制品在2~8°C是稳定的，但置于-20°C保质期更长。使用Buffer溶解后，2~8°C可稳定存放一周。为了达到更长的保质期，建议溶解后按每次实验的工作体积进行分装，置于-20°C以下保存。

配制 NK 细胞激活完全培养基

NK cell-activating serum free medium NK 细胞激活无血清培养基	+	白细胞介素-2 (IL-2) (终浓度 2000 IU/mL)	+	NK cell maintenance factor NK 细胞维持因子 (2% vol)
200 mL/瓶		200 µL		400 µL

1 配制 NK 细胞扩增完全培养基

NK cell-expanding serum free medium NK 细胞扩增无血清培养基	+	白细胞介素-2 (IL-2) (终浓度 1000 IU/mL)
1000 mL/瓶		500 µL

产品稳定性及保存条件

- 1 所有产品避光保存。
- 2 配制完全培养基后，避光保存于2~8°C可存放2周。
- 3 于保质期内使用，超过保质期，请勿使用。
- 4 为了更好的使用效果，请勿对试剂盒中任何试剂进行反复冻融。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



安全信息

本试剂盒不含外源生长因子、人造细胞增殖刺激因子或不明成分的添加剂；不含蛋白激酶C刺激因子；仅用于科学研究。

操作流程

本试剂盒适用于 T75 培养瓶及以下体积起始的培养体系。以下过程以 T75 培养瓶起始体系为例介绍 NK 细胞培养操作流程，作为常规 NK 细胞培养的一般准则。后续 NK 细胞扩增如需在生物反应器或培养袋中高密度培养，应优化条件来确定最佳的培养条件。

实验应在局部百级洁净环境（如生物安全柜）中进行。

抗体包被

- 1) 将Buffer放入4°C冰箱预冷。
- 2) 包被液配制：将1.5 mL NK细胞激活抗体加入6 mL Buffer中充分混匀。

注意 如使用更小体积器皿，可参考表1进行抗体包被。

表1 不同容器包被面积的抗体参考使用量

孔板/培养瓶	抗体用量	Buffer 用量
6 孔板	0.25 mL	1 mL
T25 培养瓶	0.5 mL	2 mL
T75 培养瓶	1.5 mL	6 mL

- 3) 将7.5 mL包被液全部转入T75培养瓶，轻摇铺满整个瓶底。

注意 包被液需充分混匀且一定要均匀铺满整个培养器皿底面，避免由于抗体包被不均匀，影响激活效果。

- 4) 抗体4°C包被过夜。培养瓶水平放置，瓶口用封口膜缠绕后避光保存。

注意 ① 如样品需应急处理，也可采取室温/37°C包被抗体2 h的方法。为了获得更好的效果，强烈建议4°C包被抗体12~18 h。

② 培养瓶包被后，如果当天不使用，放置在4°C冰箱中避光保存。为避免抗体活性下降，建议尽快使用。最长保存时间不超过1周。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



5) 使用前吸出包被液，用7 mL Buffer洗涤一次包被瓶。

注意 | 添加Buffer洗涤包被瓶时，需把培养瓶竖起，从瓶底缓缓加入液体。不要吹打包被面，以免吹打对结合在瓶上的抗体造成损失。将培养瓶轻轻放倒，静置2 min后轻轻晃动包被瓶对未结合到瓶底的抗体进行洗脱，将洗涤液吸出。

分离血浆及血浆热灭活

1) 开启水浴锅，温度设置为56°C。

2) 抽取供者外周血50 mL~100 mL（10 mL用于血常规和传染病检测，40 mL~90 mL用于扩增NK细胞），将采集的血样转入50 mL 离心管。

注意 | 采血时建议使用肝素钠或者肝素锂抗凝；不建议使用EDTA和枸橼酸钠抗凝剂，可能会影响抗体包被效果。

3) 20°C，720×g 离心10 min（将离心机降速率降低一半可获得更好的离心效果）。

4) 用移液器吸取上层淡黄色血浆于一个新的 50 mL 离心管，标识。

注意 | （选做）如果分离的血浆有溶血，可2000×g以上高速离心10 min，取上清。经离心后血细胞会与部分纤维蛋白原一起沉淀在管底，血浆上清会变得比较澄清。

5) 将标识好的离心管用封口膜封口，放入56°C水浴锅中，热灭活30 min。

6) 从水浴锅中取出灭活后的血浆，即刻转入碎冰中冰浴 15~30 min，可更充分地去除血浆中的杂质。

7) 2000×g 以上高速离心10 min。吸取上清于新的离心管。

注意：

- ① 自体血浆中会带有部分血小板，镜下观察可见很多“小黑点”，是血浆灭活后的正常现象，可放心使用。
- ② 血浆质量会直接影响体系的激活及扩增，如果获得的供者血浆质量较差，建议使用商品化的病毒灭活血浆。
- ③ 血浆存放于 4°C 时，请勿超过一个月。

密度梯度离心法分离外周血单个核细胞（PBMC）

1) 用移液管将下层的血细胞与生理盐水 1:1 混匀，按 2:1（血细胞悬液：Ficoll）将血细胞悬液缓慢加入装有 Ficoll 的离心管。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



- 注意**
- ① Ficoll 推荐品牌：GE (Catalog No.: 17-1440-02)。
 - ② Ficoll 在使用前应先放置常温回温。
 - ③ 滴加用生理盐水混合后的血细胞悬液时，需要注意控制好滴加速度，不要扰乱液面分界，保持液面分层明显；如果因操作失误导致血细胞悬液混入 Ficoll 层，则先停止滴加，因与 Ficoll 层密度不同，待悬液层慢慢上浮分层后，再继续滴加。

- 2) 将离心机升降速调至最低，400×g 离心30 min;
- 3) 离心结束后，用移液管吸取中间白膜层置于新的50 mL离心管，并加入40 mL生理盐水350×g 离心10 min洗涤两次，以去除血小板等杂质。

注意 提取的 PBMC 最后一次洗涤可以用 40 mL NK 细胞扩增无血清培养基重悬后离心，以提高细胞的活力。

抗体特异性激活 NK 细胞

- 1) 提前配制NK细胞激活完全培养基，并预热至37°C备用。

注意 NK细胞对温度敏感，低于36.5°C会影响NK细胞的激活。NK细胞激活完全培养基需在37°C水浴锅中充分预热后再使用。

- 2) PBMC前处理 (**仅肝素抗凝体系适用，枸橼酸钠抗凝体系不适用**)

① 贴壁处理

- 🔄 复苏的 PBMC：建议用 NK 细胞激活无血清培养基（非完全培养液） 重悬后静置贴壁 5~24 h。

注意 建议采用新鲜分离的PBMC扩增NK细胞。经冻存后，细胞组份、NK细胞膜结构均有可能发生变化，细胞CD3⁺CD56⁺、CD16⁺、CD56⁺、NKG2D⁺比例将有所降低，细胞增殖能力亦会下降。

- 🔄 新鲜分离的 PBMC：建议用 NK 细胞激活无血清培养基 静置贴壁 2h。

- 🔄 循环机采集的 PBMC：一般将 PBMC 按 1×10^8 cells 添加 20 mL NK 细胞激活无血清培养基，重悬后静置贴壁 2 h。

② 贴壁处理后，收集细胞。

- 🔄 复苏或新鲜分离的 PBMC，收集细胞时，先将细胞悬液转移至离心管，再用少量新鲜 NK 细胞激活无血清培养基 轻轻敲打贴壁细胞，以尽量回收贴壁细胞。根据此时的细胞悬液总体积，补加 2000 IU/mL IL-2。

- 🔄 如为循环机采集的 PBMC，将未贴壁的 PBL（外周血淋巴细胞）收集到离心管后，用生理盐水洗涤 2 次培养瓶，将所有细胞悬液一并收集至离心管中，350 g 离心 10 min 后，弃去上清。

- 3) 用新鲜配制的 NK 细胞激活完全培养基重悬 PBMC，调整细胞密度为 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/mL。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



注意 接种密度低于 1×10^6 cells/mL时，细胞生长速度会滞后，推荐最佳接种密度为 1.5×10^6 cells/mL。

- 4) PBMC 加入 10% (容积比) 的热灭活人自体血浆，按比例 (培养基: 激活因子=1 mL: 2.5 μ L) 添加 NK 细胞激活因子，转移细胞到**抗体包被好的 T75 培养瓶**中，放入 37°C，5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。

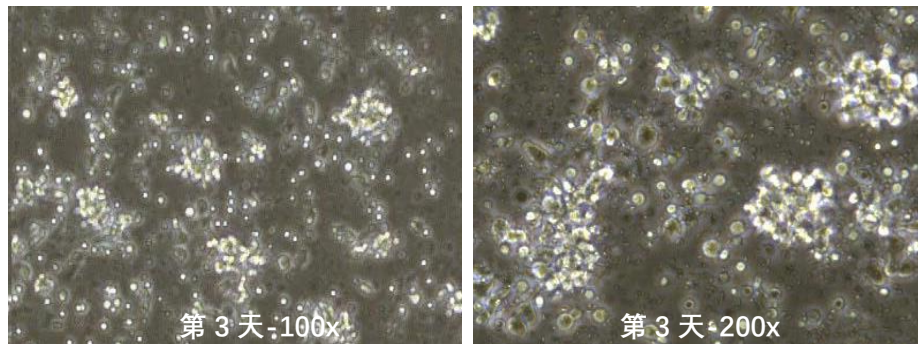
- 注意**
- ① 将细胞悬液轻轻吹匀后从抗体包被瓶的底部缓缓加入，不能吹打到包被面。
 - ② 不同容器，细胞接入体积 (培养基和血浆体积的总和) 参考如下：

表2 不同培养器皿起始培养接入体积

培养器皿	接入体积
6 孔板	1.5 mL
T25 培养瓶	4 mL
T75 培养瓶	15~20 mL

- 5) 第1~2天，因细胞与包被的抗体作用，镜下观察会发现较多贴壁细胞。
6) 第3天，根据细胞生长状态添加1~2倍体积新鲜配制的NK细胞激活完全培养基。

- 注意**
- ① 每次补液前需将培养基置于 37°C 水浴锅内充分预热。
 - ② 细胞培养前 3 天尽量不要去观察细胞状态，以减少在培养箱外的滞留时间。
 - ③ 第 3~4 天补液时不需要补加自体血浆。
 - ④ 体系前 3 天增殖并不明显，并伴有较多小团出现，此时为 T 细胞凋亡及 NK 细胞的激活期 (如下图所示)



- 7) 第4天，可根据细胞密度适量补加NK激活完全培养基。此时，细胞总体积不超过第0天细胞起始体积的3倍。

注意 由于来源样本存在差异，实际培养NK细胞时，应当根据细胞的生长状况来补液或者传代，不需完全按照本操作规程。

- 8) 第 5 天，将细胞悬液转入新的 50 mL 离心管，并用 10 mL 吸管吸取细胞培养液，轻轻冲洗培养瓶贴壁细胞，尽量回收贴壁细胞。

- 9) 合并细胞悬液并混匀，取少量计数。

- 10) **350×g 离心 5min，去除抗体和激活因子。**



为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



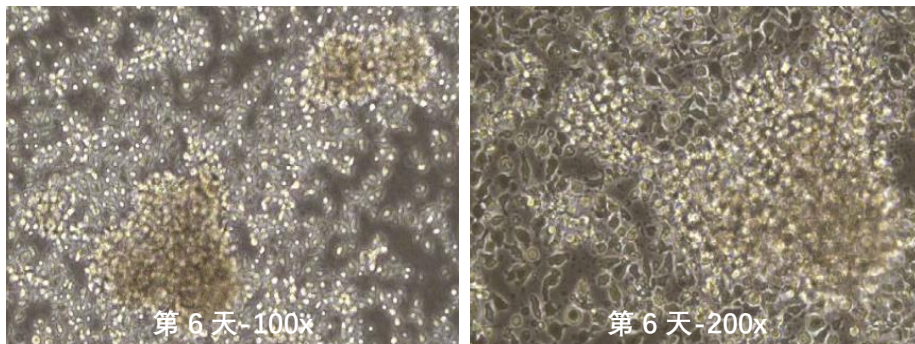
公众号二维码



注意 细胞培养 5 天后处于激活状态，如果不去除抗体和激活因子会导致细胞刺激过度，回输时容易引起机体产生免疫应激反应。

11) 用 NK 细胞激活完全培养基重悬，同时按照最终 5%~6% 的容积比添加热灭活的人自体血浆，此时如果培养体积超过 50 mL 则直接转入 T175 培养瓶，否则转入至 T75 培养瓶。

- 注意**
- ① NK 细胞激活完全培养基必须在 37°C 水浴锅中充分预热后再使用。
 - ② 培养过程中细胞会有半贴壁现象，转瓶时，注意用新鲜培养基轻轻冲洗培养瓶贴壁细胞 1~2 次，尽量回收贴壁细胞。
 - ③ 建议使用悬浮细胞专用培养板、培养瓶或培养袋，以减少转瓶或转袋时细胞的损失。
 - ④ 从第 5 天开始细胞增殖较明显，中大团变多且分裂相形态细胞居多（如下图所示）。



12) 若细胞增殖较快，第 6 天需要补液，可适量添加 NK 细胞激活完全培养基，同时按照补液量容积比 3%~6% 添加热灭活的人自体血浆。

定向扩增 NK 细胞

1) 第 7 天，细胞计数，添加新鲜配制的 NK 细胞扩增完全培养基继续培养，控制细胞密度在 1×10^6 cells/mL 以下，7 天以后不需再添加热灭活的自体血浆。

- 注意**
- ① 当培养液体积大于 200 mL 或细胞数量大于 2×10^8 cells 可以转移至培养瓶或培养袋中培养（转袋时气泡尽量排空，以免影响细胞生长）。
 - ② 如果细胞总量小于 2×10^8 cells 则可以推迟一天转袋。
 - ③ 如个别样品增殖缓慢，第 7 天时也可添加不超过 5% 的自体血浆。

2) 第 8~13 天（可根据实际需求培养至 21 天），每天镜下观察，根据细胞密度或培养基颜色补加新鲜配制的 NK 细胞扩增完全培养基，并控制细胞浓度在 1×10^6 cells/mL 以下。

为科研加速，为工业赋能！



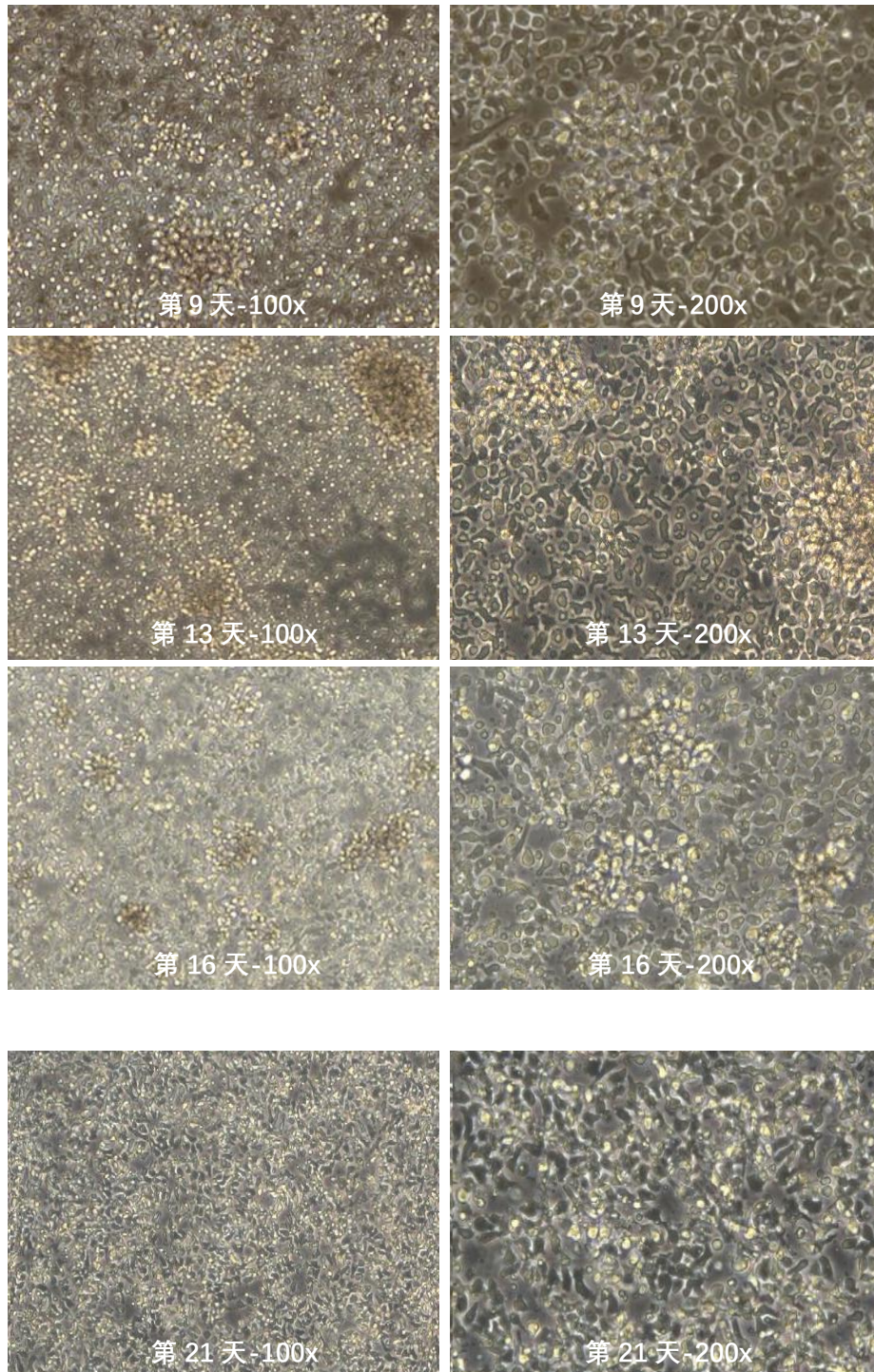
海星商城二维码



公众号二维码



注意 细胞生长后期，大的细胞团开始散落，散细胞增多，且仍以分裂相形态细胞居多（如下图所示）。



为科研加速，为工业赋能！

CRISPR/Cas9细胞基因编辑

载体构建/病毒包装 分子诊断标准品/突变基因标准品/融合基因标准品

稳转细胞株 HyCyte®干细胞/原代细胞/细胞系产品 HyCyte®细胞培养试剂



海星商城二维码



公众号二维码



收集 NK 细胞

培养 14 天后，细胞数量达到 2×10^9 cells 以上，则可根据需求待检测合格后安排使用。

注意：

- ① 细胞培养第 14 天，一般 $CD3^-CD56^+ > 50\%$ ， $CD56^+ > 60\%$ ， $CD16^+ > 60\%$ ，扩增倍数 > 200 倍；
细胞培养第 21 天，一般 $CD3^-CD56^+ > 70\%$ ， $CD56^+ > 80\%$ ， $CD16^+ > 80\%$ ，扩增倍数 > 500 倍。
- ② 由于不同样本存在差异，部分样品培养 14 天以上会提前出现细胞老化及凋亡现象，建议根据实际情况选择培养时间，收获细胞。

1.1 质量检测

1) 无菌检测	收获细胞前，取少量细胞悬液或上清进行细菌、真菌培养，并检测支原体及内毒素（标准：病原学检测阴性，内毒素 < 5 EU/mL）。
2) 细胞存活率检测	台盼蓝染色检测细胞存活率应高于 90%。
3) 表型分析	流式细胞仪检测细胞表面 CD3、CD56、CD16 等分子的表型。一般 $CD3^-CD56^+ > 50\%$ ， $CD56^+ > 60\%$ ， $CD16^+ > 60\%$ 。不同来源的样本最终获得的 NK 细胞表型比例存在差异。
4) 细胞杀伤实验	以 NK 细胞为效应细胞，以肿瘤细胞（可为原代肿瘤细胞或肿瘤细胞株）为靶细胞，将效应细胞与靶细胞按 10:1（数目比）的比例加入 96 孔 U 型板中，每孔含靶细胞 1×10^4 cells，终体积为 200 μ L，设 3 个复孔。培养 4 h，然后取培养上清，用乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (Promega; Catalog No.: G1780) 检测效应细胞对靶细胞的杀伤率。

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



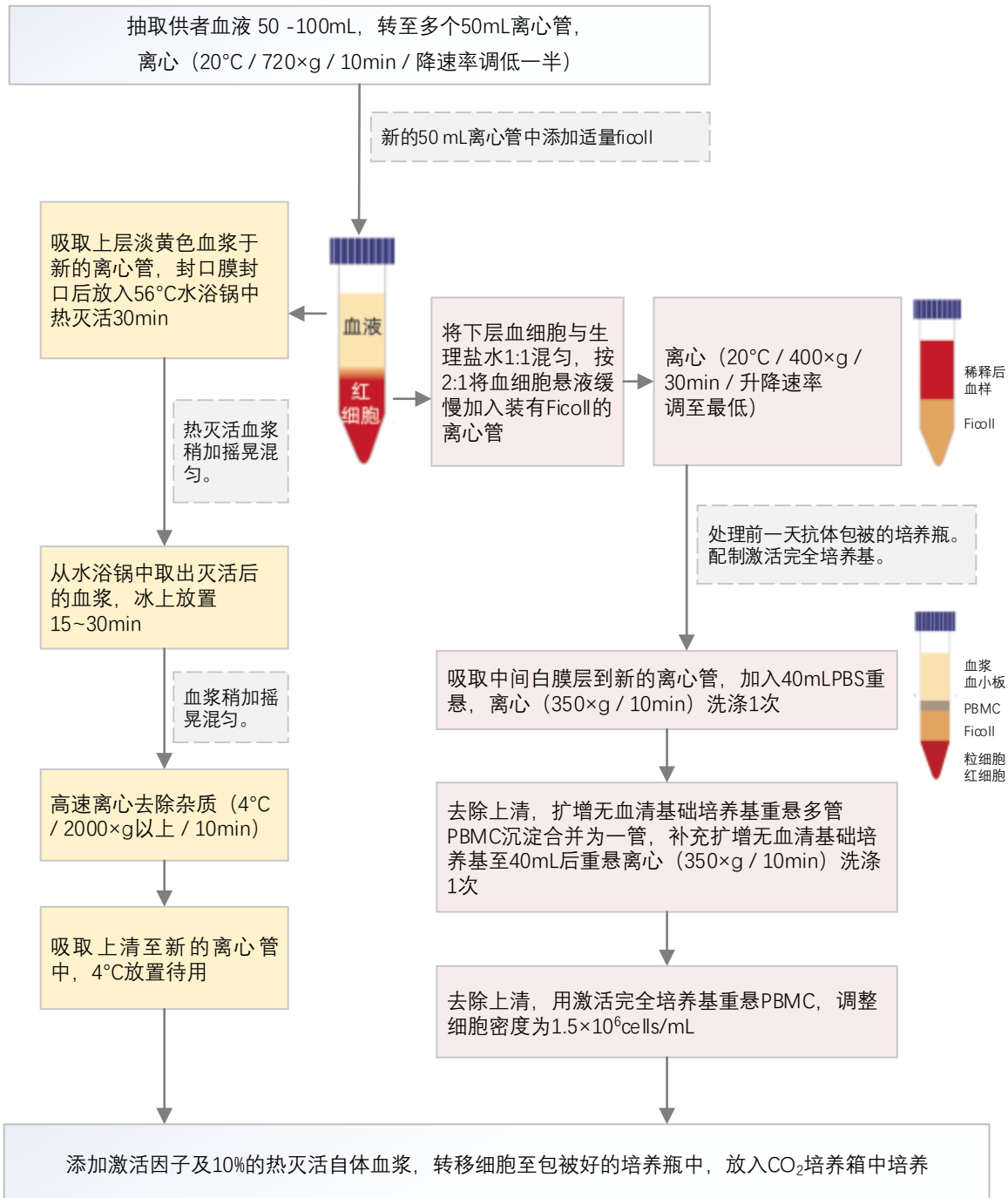
公众号二维码



附. 血浆分离和 PBMC 分离流程

准备工作:

准备冰盒待用; Ficoll提前放置在室温; 水浴锅设置为56°C预热
激活/扩增基础培养基37°C水浴锅预热待用



更多实验细节请见说明书。

为科研加速, 为工业赋能!



海星商城二维码



公众号二维码



附. 操作简述

时间	操作简述	培养体系	详情参见
-1 d	激活抗体包被培养瓶，4°C 避光过夜。	——	Page 3
0 d	离心分离血浆，密度梯度离心法分离 PBMC，培养基重悬后培养。	激活完全培养基 +10%热灭活自体血浆 +激活因子	Page 4~5
1~2 d	静置培养，避免观察。	——	——
3~4 d	镜下观察，根据细胞状态补液。	激活完全培养基	Page 5
5 d	收集细胞悬液，350×g 离心 5min 去除激活抗体与激活因子，培养基重悬后培养。 根据实际情况考虑是否需要转瓶。	激活完全培养基 +5%~6%热灭活自体血浆	Page 6
6 d	根据细胞状态补液。	激活完全培养基 +3%~6%热灭活自体血浆	Page 6
7 d	根据细胞状态补液。	扩增完全培养基	Page 7
8~21 d	镜下观察，根据细胞状态补液。	扩增完全培养基	Page 7
质量 检测	根据实际情况，在合适的时间进行NK细胞质量检测。	——	Page 8

为科研加速，为工业赋能！



海星商城二维码



公众号二维码



CRISPR/Cas9细胞基因编辑

载体构建/病毒包装 分子诊断标准品/突变基因标准品/融合基因标准品

稳转细胞株 HyCyte®干细胞/原代细胞/细胞系产品 HyCyte®细胞培养试剂