

NK细胞无血清培养套装5.0

全样本全场景培养方案

目录

一、产品特性..... P1

二、产品规格..... P1

三、版本选择..... P2

四、NK5.0套装培养技术方案..... P3

五、NK细胞培养形态..... P11

六、NK细胞杀伤能力检测..... P13

附录一 单个核细胞的分离与血浆提取..... P18

附录二 NK细胞质检方案..... P19

附录三 NK培养注意事项..... P19

附录四 常见问题解答..... P21

一、产品特性

NK 细胞又称自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK 细胞)，是机体内重要的免疫细胞，是除 T 细胞、B 细胞之外的第三大类淋巴细胞，是体内负责杀伤老化、受病毒感染、肿瘤等异常细胞的最主要“战士”。相较于 T 细胞，NK 细胞主要通过穿孔素 / 颗粒酶、Fas/FasL、ADCC、释放细胞因子等途径非特异性杀伤肿瘤细胞，这种天然杀伤活性既不需要抗原致敏，也不需要抗体参与，且无 MHC 限制。除了具有强大的杀伤功能外，还具有很强的免疫调节功能，能够与机体其他多种免疫细胞相互作用，调节机体的免疫状态和免疫功能。

友康 NK 细胞无血清培养套装 5.0 版是友康生物根据 NK 细胞培养痛点，经多个版本升级开发出的人 NK 细胞培养试剂套装。根据不同客户对 NK 细胞的需求，友康生物推出了 NK 细胞无血清培养基 5.0 标准版（货号 AN0107）、NK 细胞无血清培养基 5.0 高性能版（货号 AN0104）、单个核细胞专用冻存液三款产品，该产品有如下特色：

性能出色：标准版培养 14-16 天可获得 180 倍以上细胞扩增，50% 以上阳性率；高性能版培养 14-16 天可获得 200 倍以上细胞扩增，85% 以上阳性率。

全样本全场景培养：外周血和脐血来源的 NK 均可培养，新鲜样本与冻存样本均可培养，不同初始样本量均可培养。

程序化培养：培养方式简单易行，细胞状态基本统一，按照推荐流程补液，无需进行细胞计数。

二、产品规格

【标准版】

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	保存期限
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	1000mL/ 瓶	2-8℃	12 个月
NK 细胞 诱导因子试剂盒	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支	-20℃	
	YC00B: 起始培养时添加	1 支		
	YC00C: 培养基 B 添加	1 支		
	YC005: 添加至培养基使用	取决于基础培养基数量，每支 /1L		
	庆大霉素：添加至培养基使用，100μL/1L	1 支，300μL/ 支		

【高性能版】

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	保存期限
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	1000mL/ 瓶	2-8℃	12 个月
NK 细胞 诱导因子试剂盒	YC00A: 起始培养时包被 培养瓶使用	1 支, 500μL/ 支	-20℃	
	YC00B: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 支		
	YC00C: 激活培养基添加	1 支, 200μL/ 支		
	YC005: 扩增培养基添加	取决于基础培养基数量		
	庆大霉素：添加至培养基 使用, 100μL/1L	1 支, 300μL/ 支		

【单个核细胞专用冻存液】

产品名称	产品货号	产品规格	保存条件	使用方法
单个核细胞专用冻存液基础	NC1013	30mL/ 瓶	2-8℃	每瓶添加 3mL 自体血浆后使用

三、版本选择

版本类型	核心技术与特点	版本参考依据	样本适用类型			
标准版	多通道激活技术	1、培养前均能检测样本初始 NK 表型, 且初始阳性率在 10% 以上。 2、对超高阳性率没有强制需求 (90% 以上)。 3、可以接受有的特殊样本培养阳性率达不到 70% 以上。	新鲜 外周血	新鲜 脐带血	冻存的外周血 PBMC	冻存的脐带血 UCBMC
高性能版	增强型多通道激活技术	1、初始样本阳性率低, 或不检测初始样本阳性率。 2、对超高阳性率有很大需求 (90% 以上)。 3、追求超高培养成功率与容错率。	新鲜 外周血	新鲜 脐带血	冻存的外周血 PBMC	冻存的脐带血 UCBMC

四、NK5.0套装培养技术方案

【1L 培养体系】

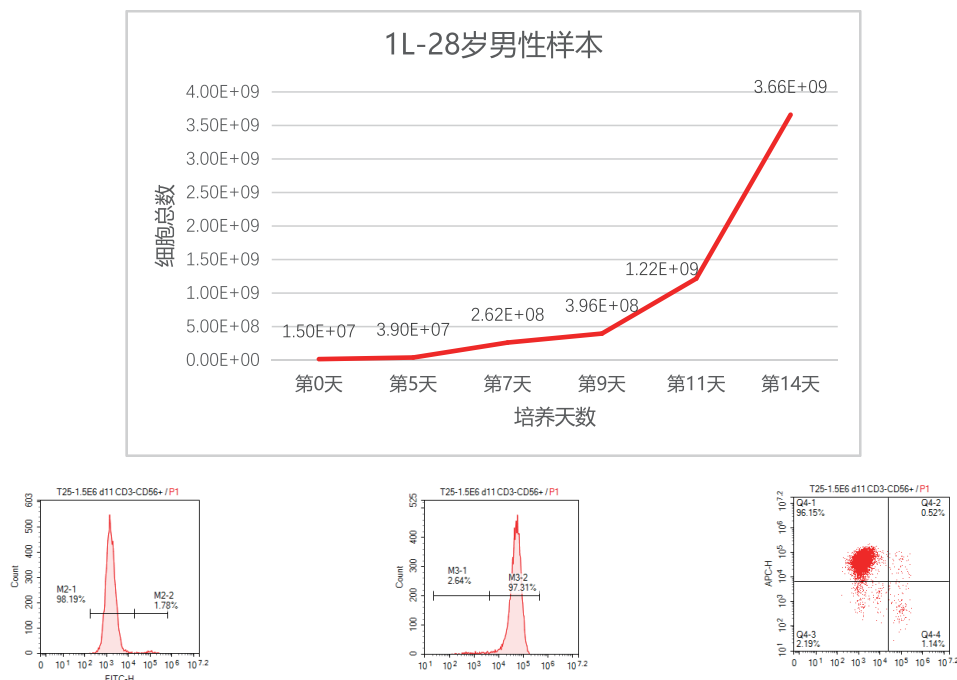
	标准版			高性能版		
	初始样本体积	接种密度	培养结果	初始样本体积	接种密度	培养结果
新鲜外周血	15-20mL	1.5E6/mL	至少 25 亿 细胞数, 65% 阳性率	15-20mL	1.5E6-2E6/mL	至少 25 亿 细胞数, 90% 阳性率
冻存 PBMC	17-27mL	2.0E6/mL	至少 25 亿 细胞数, 50% 阳性率	17-27mL	2.0E6/mL	至少 25 亿 细胞数, 80% 阳性率
新鲜脐带血	15-20mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 40 亿 细胞数, 80% 阳性率	15-20mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 40 亿 细胞数, 85% 阳性率
冻存 UCBMC	17-27mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 40 亿 细胞数, 80% 阳性率	17-27mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 40 亿 细胞数, 85% 阳性率

补液程序

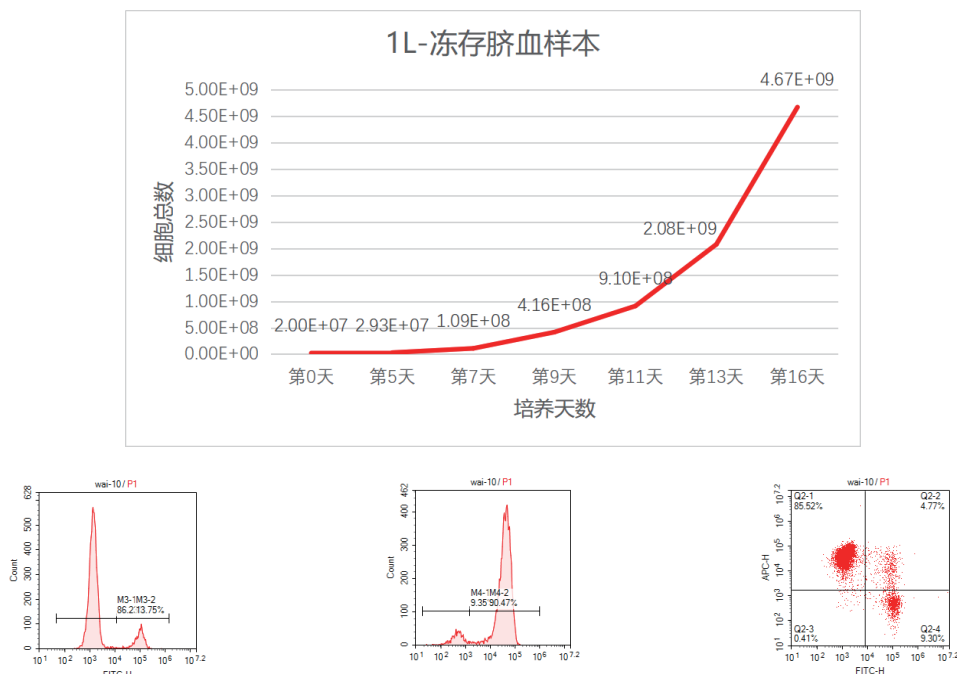
参考补液程序					
时间	培养耗材	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	T25	10	10	10%	1
d3	T25	20	30	5%	1
d5	T175	60	90	5%	3
d7	T175	90/180	180/270	1%	0.9/1.8
d9	1L 培养袋	180/270	360/540	0%	0
d11	1L 培养袋	360/460	720/1000	0%	0
d13	1L 培养袋	280	1000	0%	0

案例分享

(1) 二十八岁男性外周血样本，初始样本量 10mL，无异常情况，按照 1.5E6 细胞密度接种于一个 T-25 瓶中起始上样，培养至 14 天收获 36.6 亿细胞数，96.15% 阳性率。



(2) 于 2021.1.31，使用友康单个核细胞专用冻存液冻存的 UCBMC 样本，按照 2E6 细胞密度接种于一个 T-25 瓶起始上样，复苏后初期细胞激活较为缓慢，至第 5 天才有抱团迹象，前期扩增缓慢，后期恢复正常，培养至 16 天收获 46.7 亿细胞数，85.52% 阳性率。



【2L 培养体系】

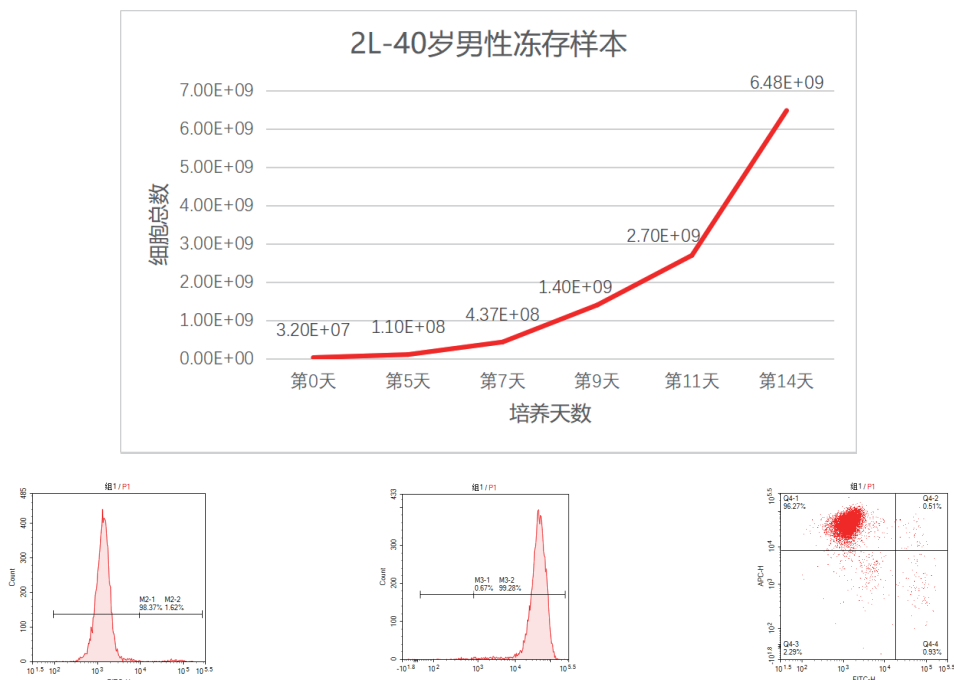
	标准版			高性能版		
	初始样本体积	接种密度	培养结果	初始样本体积	接种密度	培养结果
新鲜外周血	20-30mL	1.5E6/mL	至少 50 亿细胞, 65% 阳性率	20-30mL	1.5E6-2E6/mL	至少 50 亿细胞, 90% 阳性率
冻存 PBMC	34-54mL	2.0E6/mL	至少 50 亿细胞, 50% 阳性率	34-54mL	2.0E6/mL	至少 50 亿细胞, 80% 阳性率
新鲜脐带血	30-40mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 65 亿细胞, 80% 阳性率	30-40mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 65 亿细胞, 85% 阳性率
冻存 UCBMC	34-54mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 65 亿细胞, 80% 阳性率	34-54mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 65 亿细胞, 85% 阳性率

补液程序

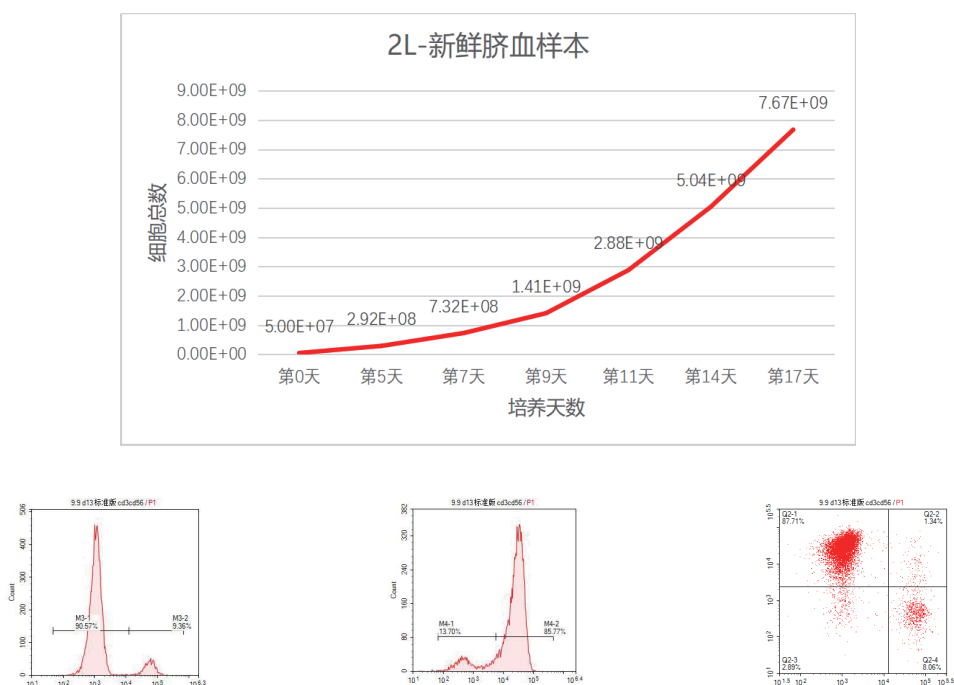
参考补液程序					
时间	培养耗材	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	2*T25	20	20	10%	2
d3	2*T25	40	60	5%	2
d5	T175	120	180	5%	6
d7	2L 培养袋	180/360	360/540	1%	1.8/3.6
d9	2L 培养袋	360/540	720/1080	0%	0
d11	2L 培养袋	720/920	1440/2000	0%	0
d13	2L 培养袋	560	2000	0%	0

案例分享

(1) 使用友康单个核细胞专用冻存液冻存的四十岁男性外周血 PBMC 样本，初始阳性率只有 5%，分别按照 1.6E6 细胞密度接种于两个 T-25 中起始上样，培养至 14 天收获 64.8 亿细胞数，96.27% 阳性率。



(2) 新鲜的脐带血样本，总体积 86mL 血样含 28mL 抗凝剂，取 30mL 血样分离的 UCBMC 按照 2.5E6 细胞密度接种于两个 T-25 瓶起始上样，中期培养状态完全正常，培养至 17 天收获 76.7 亿细胞数，87.71% 阳性率。



【3L 培养体系】

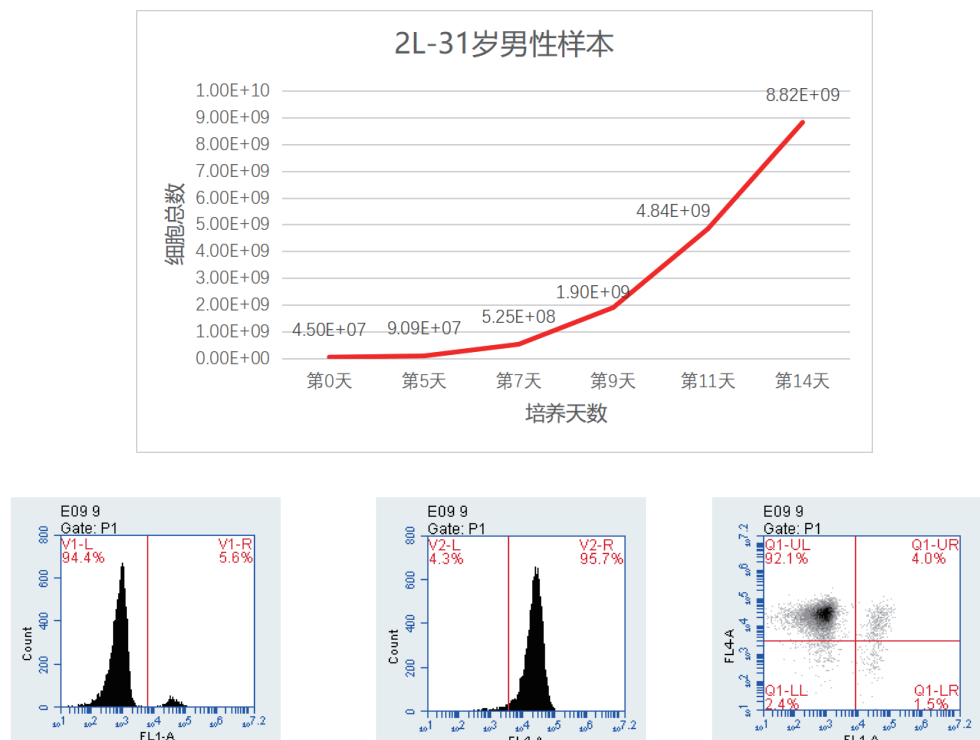
	标准版			高性能版		
	初始样本体积	接种密度	培养结果	初始样本体积	接种密度	培养结果
新鲜外周血	35-45mL	1.5E6/mL	至少 75 亿 细胞, 65% 阳性率	35-45mL	1.5E6-2E6/mL	至少 70 亿 细胞, 90% 阳性率
冻存 PBMC	50-81mL	2.0E6/mL	至少 75 亿 细胞, 50% 阳性率	50-81mL	2.0E6/mL	至少 75 亿 细胞, 80% 阳性率
新鲜脐带血	45-50mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 85 亿 细胞, 80% 阳性率	45-50mL (不含抗凝剂)	2.5E6-3E6/mL	至少 85 亿 细胞, 85% 阳性率
冻存 UCBMC	50-81mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 85 亿 细胞, 80% 阳性率	50-81mL (不含抗凝剂)	3E6/mL	至少 85 亿 细胞, 85% 阳性率

补液程序

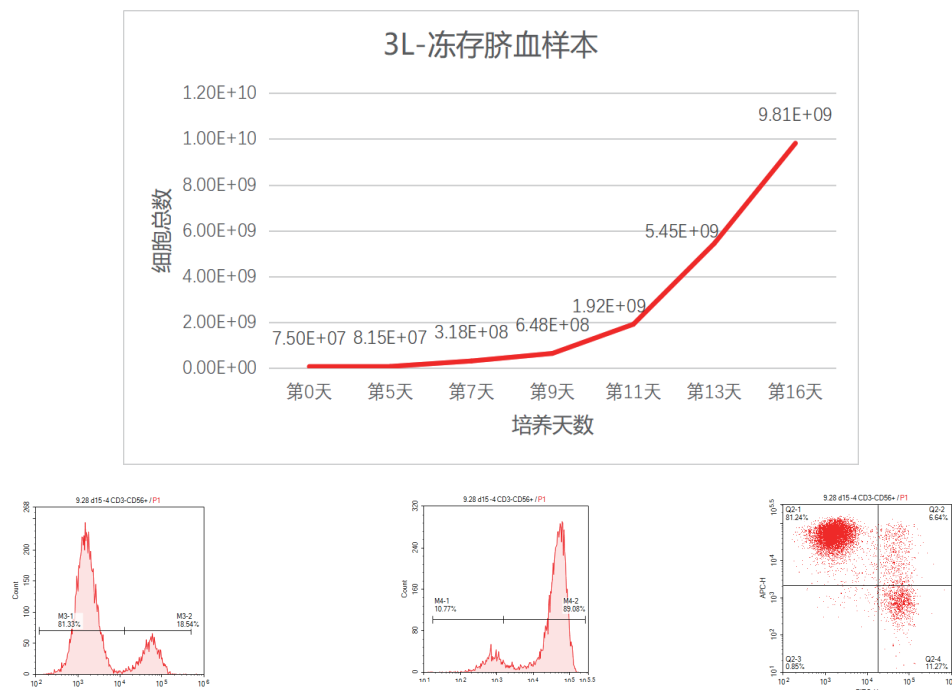
参考补液程序					
时间	培养耗材	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	3*T25	3*10	30	10%	3
d3	3*T25	3*20	90	5%	3
d5	2*T175	210	300	5%	10.5
d7	2*2L 培养袋	300/600	600/900	1%	3/6
d9	2*2L 培养袋	600/900	1200/1800	0%	0
d11	2*2L 培养袋	1200	2400/3000	0%	0
d13	2*2L 培养袋	600	3000	0%	0

案例分享

(1) 三十一岁男性外周血新鲜样本，初始阳性率只有 8%，分别按照 1.5E6 细胞密度接种于三个 T-25 中起始上样，培养至 14 天收获 88.2 亿细胞数，92.10% 阳性率。



(2) 新鲜的脐带血样本，总体积 86mL 血样含 28mL 抗凝剂，取 30mL 血样分离的 UCBMC 按照 2.5E6 细胞密度接种于三个 T-25 瓶起始上样，中期培养状态完全正常，培养至 16 天收获 98.1 亿细胞数，81.24% 阳性率。

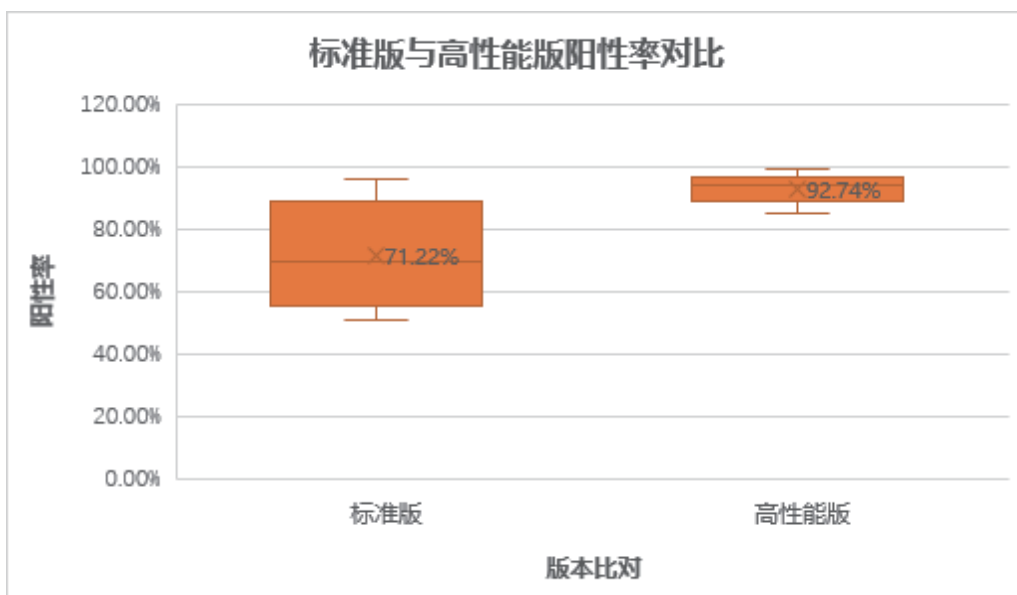


【友康 NK5.0 套装应用实例】

通过收集 10 份不同情况的样本，如溶血样本、新鲜样本、冻存样本，分别使用标准版套装与高性能版套装进行 NK 细胞培养，对比 14 天收获的细胞总数与阳性率。样本信息如下：

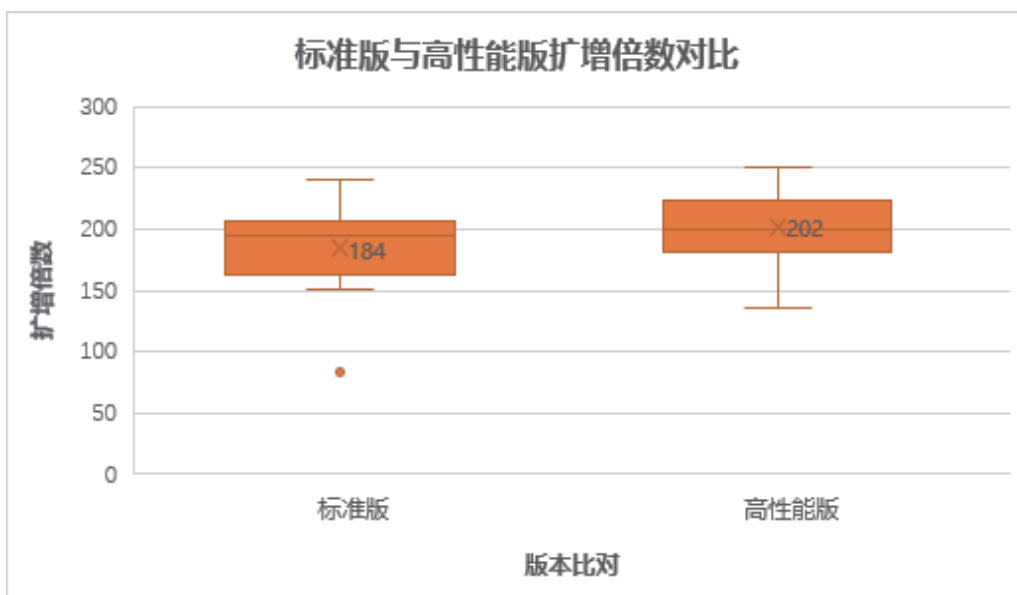
编号	样本信息	初始表型
样本 1	40 岁左右男性 (新鲜样本)	5.0%
	40 岁左右男性 (冻存样本)	
样本 2	31 岁男性 (新鲜样本)	8.0%
	31 岁男性 (冻存样本)	8.0%
样本 3	25 岁男性 (新鲜样本)	9.0%
样本 4	具体信息未知 (严重溶血)	10.0%
样本 5	40 岁左右女性 (新鲜样本)	12.3%
样本 6	28 岁男性 (新鲜样本)	12.9%
样本 7	39 岁男性 (新鲜样本)	13.0%
样本 8	52 岁男性 (冻存样本)	14.3%
样本 9	46 岁男性 (新鲜样本)	17.0%
样本 10	25 岁男性 (新鲜样本)	20.0%
	25 岁男性 (冻存样本)	20.0%

阳性率对比



上表可知标准版的平均阳性率在 71.22%，且波动幅度较大，而高性能版平均阳性率高达 92.74%，几乎没有受到初始样本水平的影响，波动幅度极低。

扩增倍数对比

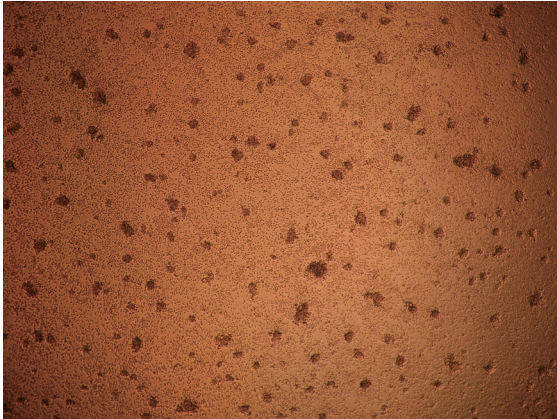


上表可知高性能版培养 14 天平均扩增倍数达到 202 倍，略高于标准版的 184 倍，但数据波动幅度总体上差距不大。

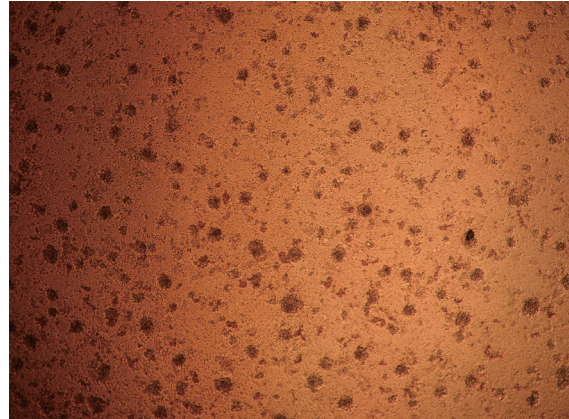
五、NK细胞培养形态

【外周血】

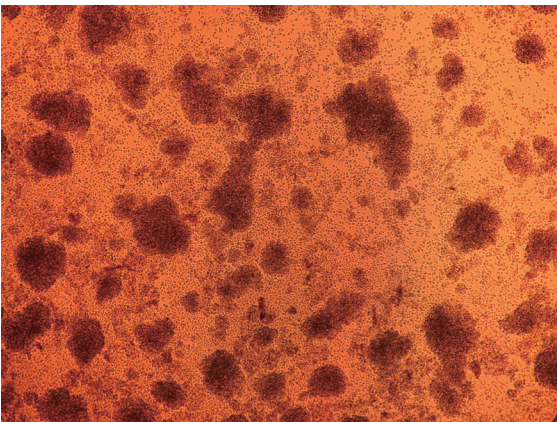
第 1 天



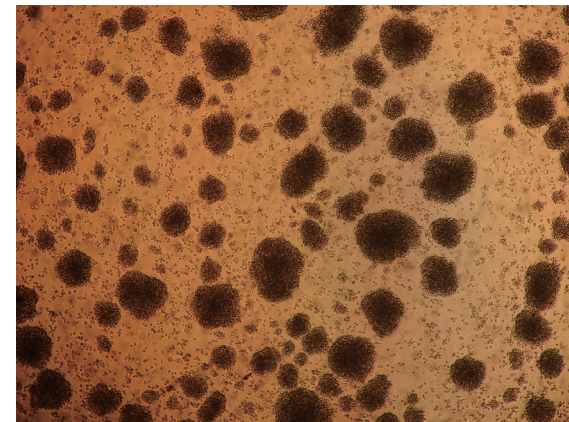
第 3 天



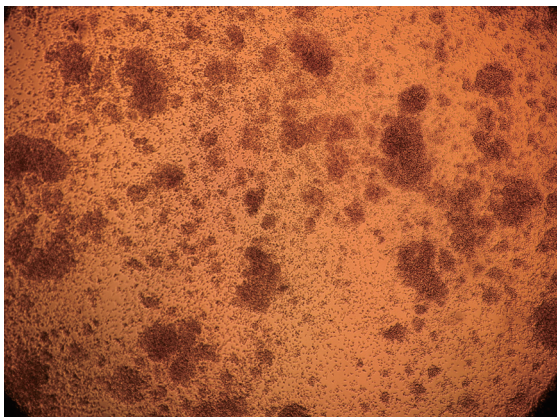
第 5 天



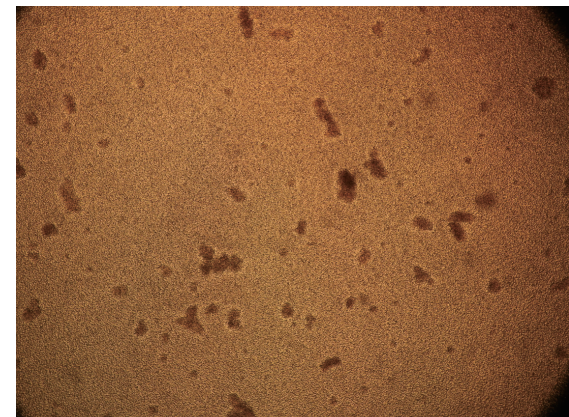
第 7 天



第 9 天



第 14 天 (袋中)

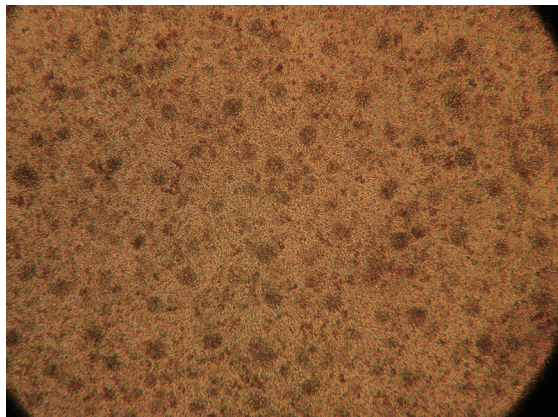


【脐带血】

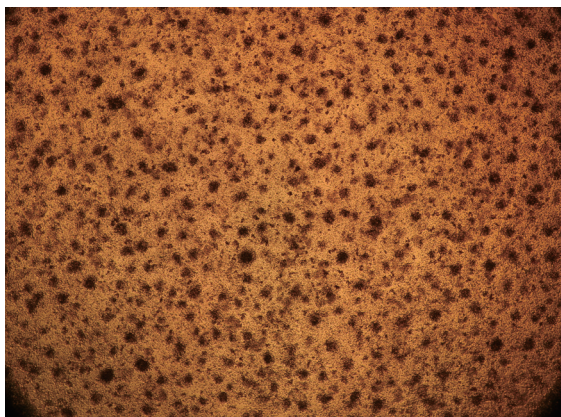
第 1 天



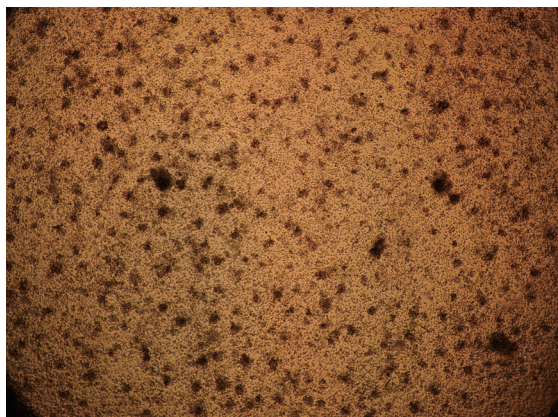
第 3 天



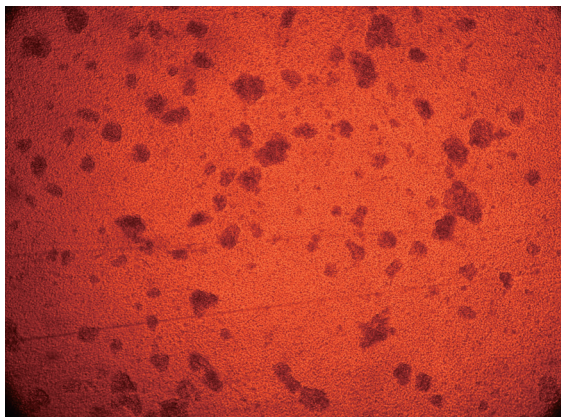
第 5 天



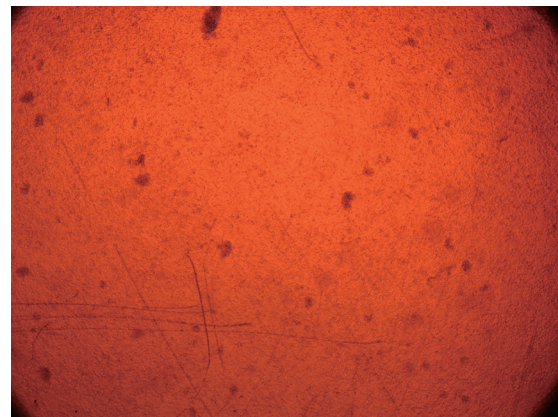
第 7 天



第 9 天 (袋中)



第 14 天 (袋中)



六、NK细胞杀伤能力检测

1.NK 细胞对 K562 的杀伤

检测方法

培养 14 天左右的 NK 细胞与 CFSE 染色的 K562 共孵育 4h，后检测 K562 凋亡率：

1. K562 用 0.5uM 的 CFSE 染色，37℃孵育 10min，完全培养基清洗两次。
2. 5E4 个 CFSE 染色的 K562 加入 96 孔板，以 0.5:1, 1:1, and 2:1 的效靶比混入 NK 细胞。
3. 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 4h。
4. 将 96 孔板中的细胞全部吸出，使用流式细胞仪计数。
5. K562 的杀伤率 = (接种 K562 细胞数 - 孵育 4h 后剩余的 K562 细胞) / 接种 K562 细胞数

检测结果

1. 镜下观察

共孵育 4h 后，镜下观察可见 K562 细胞形态发生明显变化：

样本一：



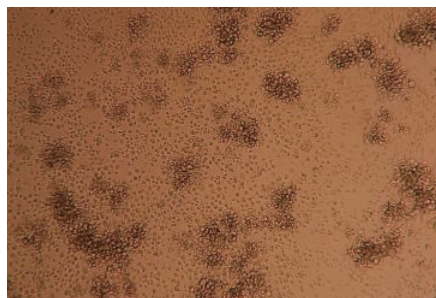
仅 K562 细胞



E:T=0.5:1



E:T=1:1

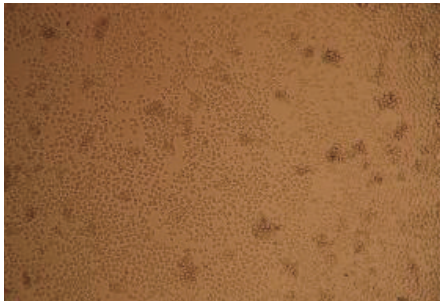


E:T=2:1

样本二：



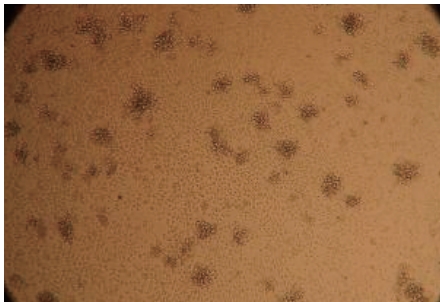
仅 K562 细胞



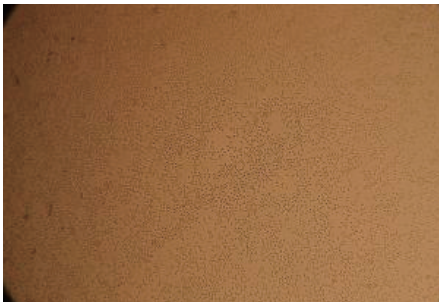
E:T=0.5:1



E:T=1:1



E:T=2:1



仅 NK 细胞

2. 流式检测结果

样本一：

分组	圈门	残余细胞数	K562 占比	K562 残余数	K562 接种数	K562 杀伤数	杀伤率
0：1	84.85%	1.16E+05	99.83%	1.16E+05	1.00E+05	/	/
0.5：1	28.50%	3.94E+04	62.59%	2.47E+04	5.00E+04	2.53E+04	51%
1：1	25.26%	7.22E+04	27.85%	2.01E+04	5.00E+04	2.99E+04	60%
2：1	27.56%	9.74E+04	11.22%	1.09E+04	5.00E+04	3.91E+04	78%

样本二：

分组	细胞密度	残余细胞数	K562 占比	K562 残余数	K562 接种数	K562 杀伤数	杀伤率	均值
0.5:1- 孔 1	4.75E+05	5.22E+04	72.50%	3.79E+04	5.00E+04	1.21E+04	24%	23%
0.5:1- 孔 2	4.80E+05	5.28E+04	73.15%	3.86E+04	5.00E+04	1.14E+04	23%	
0.5:1- 孔 3	4.87E+05	5.36E+04	72.10%	3.86E+04	5.00E+04	1.14E+04	23%	
1:1- 孔 1	5.43E+05	5.97E+04	51.35%	3.07E+04	5.00E+04	1.93E+04	39%	48%
1:1- 孔 2	4.88E+05	5.37E+04	48.60%	2.61E+04	5.00E+04	2.39E+04	48%	
1:1- 孔 3	4.21E+05	4.63E+04	45.35%	2.10E+04	5.00E+04	2.90E+04	58%	
2:1- 孔 1	6.70E+05	7.37E+04	18.99%	1.40E+04	5.00E+04	3.60E+04	72%	74%
2:1- 孔 2	6.99E+05	7.69E+04	18.29%	1.41E+04	5.00E+04	3.59E+04	72%	
2:1- 孔 3	6.40E+05	7.04E+04	15.93%	1.12E+04	5.00E+04	3.88E+04	78%	

2.NK 细胞脱颗粒能力检测

检测原理

NK 细胞被称为大颗粒淋巴细胞，其胞浆内含有高浓度以囊泡形式存在的细胞毒性颗粒。如穿孔素、颗粒酶等。NK 细胞杀伤靶细胞时，毒性颗粒将到达浆膜面并与细胞膜融合，引起颗粒内容物释放，最终导致靶细胞的死亡。随着脱颗粒的发生，CD107a 分子被转运到细胞膜表面，且 CD107a 分子的表达上调与穿孔素的分泌一致。因此，CD107a 分子阳性表达的 NK 细胞可代表具有杀伤活性的 NK 细胞。

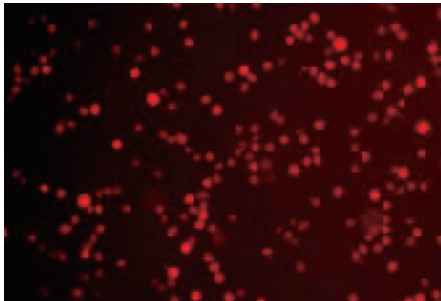
检测方法

1. K562 细胞 1200rpm，离心 5min，计数，用不含有 IL-2 和血浆的 NK 培养基重悬细胞，将浓度调整为 2E5/mL，每孔添加 100uL，每孔种 2E4 个细胞。
2. NK 细胞 1200rpm，离心 5min，计数，用不含有 IL-2 和血浆的 NK 培养基重悬细胞，将浓度调整为 6.7E6/mL，按照 E:T 为 2.5: 1、1: 1 分别每孔添加 7.5uL、3.75uL 的 NK 细胞，并用 NK 培养基将总体积调整为 200uL/ 孔。
3. 分别在 2H 和 4H 的时候进行荧光显微镜拍照、流式检测 CD107a 的表达量。
4. NK 细胞毒性的计算方法 = 加靶细胞刺激的 CD107a 阳性率 (%) - CD107a 自发表达率 (%)

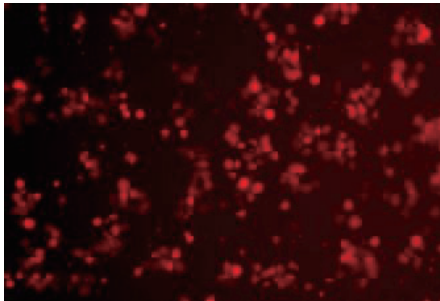
检测结果

1、镜下观察

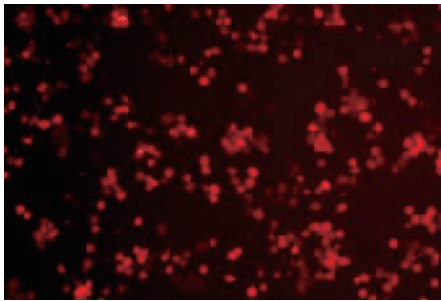
样本一：孵育 2h



仅 K562 细胞



E:T=2.5:1

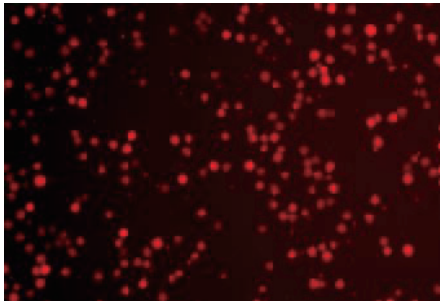


E:T=1:1

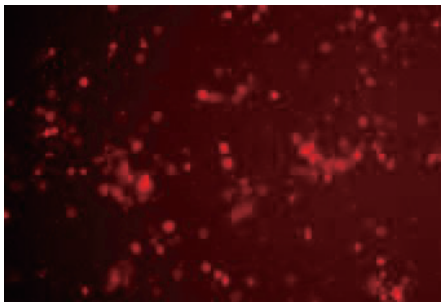


仅 NK 细胞

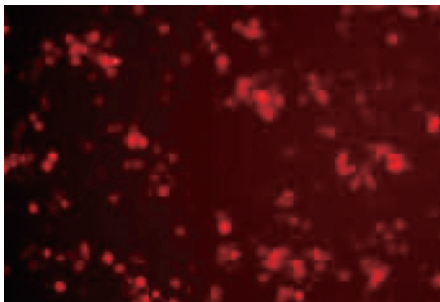
样本二： 孵育 4h



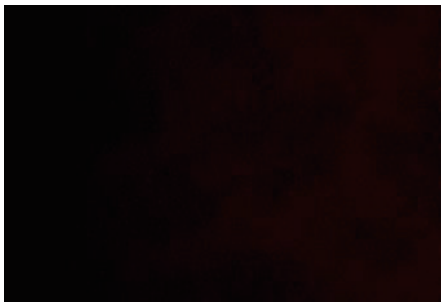
仅 K562 细胞



E:T=2.5:1



E:T=1:1



仅 NK 细胞

2、流式检测结果

样本一： 孵育 2h

E:T	CD3-CD56+CD107a	NK 细胞脱颗粒能力 %
2.5:1	15.52%	14.7%
1:1	36.91%	36.1%

样本二： 孵育 4h

E:T	CD3-CD56+CD107a	NK 细胞脱颗粒能力 %
2.5:1	53.64%	47.88%
1:1	64.57%	60.69%

3.NK 细胞活性检测——LDH 法

检测原理

细胞的胞浆内含有 LDH，正常情况下 LDH 不能透过细胞膜，当细胞受到 NK 细胞的杀伤后，LDH 释放到细胞外。LDH 可使乳酸脱氢酶，进而使 NAD 还原成 NADH，后者再经递氢体吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）还原碘硝基氯化四氮唑（INT），INT 接受 H⁺ 被还原成紫红色甲月赞类化合物，在酶标仪上用 490nm 比色测定。

检测方法

1. 靶细胞 K562 的准备：实验前 24h 将靶细胞进行传代培养，应用前用无血清培养基清洗 1 次，用无血清培养基调整细胞密度为 3E5/mL，每孔接种 3E4 细胞。
2. 效应细胞的准备：应用前用无血清培养基清洗 1 次，用无血清培养基调整细胞密度。
3. NK 细胞活性检测：取靶细胞和效应细胞按不同效靶比进行接种（接种图如下图所示），加入 U 型 96 孔培养板中，每项设置 3 个复孔，于 37 度，5%CO₂ 培养箱中孵育 4 小时。随后将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。LDH 释放剂的添加为原体积的 10%，加入释放剂后反复吹打细胞。
4. 分别取各孔上清液 120uL，加入到新的 96 孔板接种，每孔加入 60uL LDH 检测工作液。

检测次数	20 次	30 次
乳酸溶液	400uL	600uL
INT 溶液（1X）	400uL	600uL
酶溶液	400uL	600uL
总体积	1.2mL	1.8mL

5. 混匀，室温 25℃避光孵育 30min。然后在 490nm 处测定吸光度。可使用 600nm 或大于 600nm 的任意波长作为参考波长进行双波长测定。

6. NK 细胞活性（%）= [（反应孔 OD - 自然释放孔 OD） / （最大释放孔 OD - 自然释放孔 OD）] * 100%

检测结果

最大释放孔	自然释放孔	样本一反应孔	样本二反应孔
0.675	0.164	0.326	0.331
0.6	0.162	0.333	0.338
0.618	0.157	0.318	0.331
0.631	0.161	0.326	0.333
NK 活性（%）		35.04%	36.67%

附录一、单个核细胞的分离与血浆提取

血浆提取

全血以 700g 离心 15 分钟，取上层血浆，56℃灭活 30 分钟，900g 离心 10 分钟，取上清置于 -20℃，保存 15 分钟，再次 900g 离心 10 分钟后取得可用的血浆，如暂时不用，应保存在 4℃冰箱备用。

单个核细胞的分离

取血浆提取步骤中所得的下层红细胞，外周血样本用生理盐水按照 1:1 稀释，脐带血样本建议用生理盐水按照 1:2 稀释。将稀释后的液体 1:1 加入淋巴细胞分离液，于室温条件下 700g 离心 30 分钟（离心机调节升速 6，降速 4）。轻轻吸取单个核细胞（白膜层）并转移至新的 50mL 离心管内；加入等体积生理盐水，室温 700g 离心 10min。弃上清，再次用 40mL 生理盐水清洗细胞，200g 离心 10min，弃上清。用预温至 37℃的培养基重悬细胞，备用，同时取少量细胞悬液计数。（离心机升速均调节至 9，降速 9）。

完全培养基的配制

此处应注意，标准版和高性能版的完全培养基配制方式有所不同。

标准版：配置培养基 A（1 瓶）：添加 YC005，每支用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解后添加至 1L NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。配置培养基 B（1 瓶）：添加 YC005，每支用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解后添加至 1L NK 细胞无血清培养基中，将诱导因子 YC00C 溶解后添加至 1L 培养基中，混匀备用。

高性能版：激活培养基（200mL）：将融化的 YC00C（200μL）加入 200mL NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。
扩增培养基（1.8L）：每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解，以 1:1000 的比例添加至 NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。

附录二、NK细胞质检方案

项目	方法	标准
分离当天		
PBMC 基准表型	流式细胞术	初始 NK 应在 5%~10%，5% 以下可能影响最终表型，1% 以下成功率较低
血常规、血型	建议送第三方	乙肝全阴或抗体阳性可接受，乙肝抗原阳性、HIV 阳性等样品建议单独培养
制剂前 48~72 小时		
细菌真菌	接种平板、菌落 PCR、无菌瓶检测等	要求细菌真菌均为阴性
内毒素	鲎试剂检测	要求内毒素为阴性
支原体	Hoechst 染色或 PCR	要求支原体为阴性
表型	流式细胞仪	CD3-CD56+CD16+ 为常用 NK 表型标准，CD16 可能低表达，因人而异
分泌细胞因子	流式细胞仪	INF- γ 应有表达
杀伤能力	和肿瘤细胞共培养	对肿瘤应有杀伤能力，多用 K562 细胞系作为靶细胞
制剂当天		
细胞数	血球计数板、细胞计数仪、流式细胞仪等	
活率	方法较多，最常见为台盼蓝染色	应在 90% 以上。
NK 细胞总数	根据细胞数和 NK 阳性率计算得出	

附录三、NK培养注意事项

1. 样本要求

- (1) 如用采血袋采集血样，建议使用 100mL 容量的采血袋。如果采血时用 200mL 采血袋，建议取出 14mL 抗凝剂。根据样本采集量，抗凝剂占比可能在 10%-40%，抗凝剂占比低于 30% 时，使用自体血浆进行培养；抗凝剂占比高于 30% 时，血浆中的抗凝剂会抑制细胞生长，此时建议使用商品化的人 AB 血清替代自体血浆。
- (2) 因为 EDTA 会影响 NK 细胞的激活与扩增，采集血样时禁止使用 EDTA 抗凝的真空采样管，可以选用肝素钠抗凝的真空采血管。
- (3) 避免血样中出现凝血，否则会影响提取单个核细胞的收率。
- (4) 血样运输做好防护，保持 2-8℃ 运输，禁止冰袋与血样紧贴，运输过程中避免剧烈运动以及过冷导致溶血。

2. 培养瓶与培养袋

(1) 要求使用 TC 处理水平较高的贴壁细胞用培养瓶。

(2) 培养实例表明：不是所有品牌的细胞培养袋都适合 NK 细胞培养。这一点 NK 细胞培养与 CIK 细胞培养有很大的不同。细胞袋选择不当，会导致 NK 培养彻底失败。突出表现在细胞生长在 7 天后突然放缓甚至彻底停止。不适宜的细胞培养袋，由于其塑料材质选用原因，持续放置 37℃ 的培养环境，会缓慢释放且累积有毒物质，抑制 NK 的增殖。强烈要求用户咨询本公司，获取关于细胞培养袋选用的专业建议。

(3) 大的细胞培养袋培养小体积细胞悬液时，应将培养袋折叠，使用合适的底面积。

3. 分离单个核细胞

分离单个核细胞应特别注意两点，一是分离前样本及各试剂应室温预温至 20℃，室温离心；二是样本采集后应在 8h 内分离单个核细胞，最好是即采即提。

4. 单个核细胞计数

脐血单个核细胞中易混入大量红细胞，不建议使用细胞计数仪进行计数，易造成较大的偏差。

5. 接种密度

培养外周血样本推荐接种密度为 1.5E6/mL，培养脐血样本推荐接种密度为 2.5-3E6/mL，接种过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。

6. 培养基预温

每次添加的培养基需提前取出放置培养箱中预温至 37℃，禁止将整瓶培养基放置 37℃ 反复预温。

7. 细胞形态

单个核细胞接种后，第 1-3 天会形成悬浮的细胞小团，第 3-5 天绝大部分悬浮细胞团贴壁，不可将其晃起，第 5-7 天贴壁的细胞团变大、变多，此时细胞已经处于激活状态，后期可正常换瓶、入袋。正常样本的培养前期必然有细胞成团、贴壁的过程。

8. 贴壁细胞

脐血样本在培养过程中常有单个细胞贴壁，该贴壁细胞 70% 以上为 NK 细胞，且扩增能力较强，如果在培养过程中有大量贴壁细胞出现，一定不要丢弃贴壁的细胞，应该继续培养。如果将细胞转入细胞培养袋时，瓶中还存有大量贴壁细胞，不要用力吹打，要在原瓶中添加 50mL 新鲜培养基继续培养，2-3 天后可转移至培养袋一起培养。收获细胞时，在培养瓶中添加 15mL PBS，室温静置 10min，贴壁细胞就会自行脱落，再进行回收。

9. 试剂盒保存

试剂盒因子禁止反复冻融，分则会降低其活性，导致阳性率较低。如暂时不用，请置于 -20℃ 保存。已经融化的因子，如一周内使用，4℃ 保存即可。

10. 冻存的样本

(1) 冻存液性能严重影响 NK 细胞激活与扩增，应使用本公司推荐冻存液。

(2) 冻存的单个核细胞复苏后可使用自体血浆或人 AB 血清培养。

(3) 由于冻存导致单个核细胞受损，接种后有一定比例细胞凋亡，建议外周血样本接种密度提高至 2E6/mL，脐血样本接种密度提高至 3E6/mL。

附录四、常见问题解答

Q1: 血液样本应如何采集，采集后多久内可以正常培养 NK 细胞？

A: 建议使用肝素钠抗凝的采血管，或者枸橼酸钠抗凝的采血袋采集血样，避免使用 EDTA 抗凝的采血管。样本应 4℃ 保存，2h 内送至实验室分离样本，样本保存时间不应超过 8h。

若使用采血袋采集血样，建议使用 100mL 容量的采血袋。如果采血时用 200mL 采血袋，建议取出 14mL 抗凝剂。根据血样采集量，抗凝剂占比可能在 10%-40%，抗凝剂占比低于 30% 时，使用自体血浆进行培养；抗凝剂占比高于 30% 时，血浆中的抗凝剂会抑制细胞生长，此时建议使用商品化的人 AB 血清替代自体血浆。

Q2: 你们建议的外周血 PBMC 接种密度为 $1.5E6/mL$ ，脐血 PBMC 接种密度为 $2.5-3E6/mL$ ，我可以加大或减少细胞接种量吗？

A: 不建议。加大或减少细胞接种量可能导致试剂盒内的因子量不匹配，影响最终培养的细胞数量或阳性率。

Q3: 若使用其它品牌离心机，分血时升降速参数是多少？

A: 我们说明书的离心参数是以 Thermo ST-40R 离心机所写，使用其它品牌应将分血时升降速调节至最低。

Q4: 分离单个核细胞后细胞数量太多或太少怎么办？

A: 正常情况 50mL 纯血可分离一个亿以上的单个核细胞，细胞数量过多可考虑使用单个核细胞专用冻存液长期保存。细胞数量过少应考虑单个核细胞分离实验细节，是否完全收集全部的单个核细胞。

Q5: 脐血样本红细胞量较大，应尽可能减少红细胞干扰？

A: (1) 分离时下层血液应使用生理盐水或 DPBS 1:2 稀释。(2) 应 1:1 使用与稀释后的下层血液相同体积的淋巴细胞分离液，淋巴细胞分离液过少容易造成红细胞干扰。(3) 淋巴细胞分离液与样本使用前应平衡至室温。

Q6: 血浆颜色偏红是什么原因？

A: 可能是血液中红细胞破裂，有溶血现象。应注意样本运输过程中是否剧烈震荡、放置时间过长、保存过程中温度变化明显等原因。

Q7: 培养过程中如何正确计数？

A: 由于 NK 细胞结团生长的特性，计数时应轻微吹散细胞后才准确。使用友康 NK 培养试剂若正确把控初始细胞的条件，无需计数补液按照推荐流程操作即可。

Q8: 培养过程中如何处理贴壁细胞？

A: 有部分 NK 亚型呈现半贴壁生长的状态，这类 NK 亚型在贴壁细胞中所占比例很高，不应在培养过程中丢弃。建议分瓶入袋时尽可能收集，多使用培养基润洗贴壁细胞。若贴壁较为牢固，可以采取瓶中贴壁细胞与袋中悬浮细胞分开培养的方式，培养末期贴壁细胞会逐渐松散飘起与悬浮细胞一起收获。

Q9: 你们的 NK 培养试剂可以培养冻存单个核细胞吗？

A: 可以。尽量使用友康单个核细胞专用冻存液或其他品牌免疫细胞冻存液冻存细胞，且要保证复苏的单个核细胞活率在 90% 以上。建议冻存外周血样本接种密度 $2E6-2.5E6/mL$ ，冻存脐血样本接种密度 $3E6/mL$ 。



友康生物科技（北京）股份有限公司

总部地址：北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

网站：www.yocon.cn



友康生物公众号



友康生物小程序