BlueKit®
Powered by Hillgene

Ver202412

细胞杀伤检测试剂盒
（贴壁靶细胞）说明书

Cat.No. HG-CKK002

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

BlueKit®
Powered by Hillgene

目录 | CONTENTS

1. 产品简介 1
2. 应用 1
3. 试剂盒规格 1
4. 试剂盒组分 1
5. 储存条件及有效期 1
6. 需自行准备的材料 2
7. 检测流程图及试剂准备 2
8. 靶细胞准备 2
9. Day1 效应细胞和靶细胞共培养 2
10. Day2 流式检测 4
11. 流式分析 4
12. 单阳管准备及流式细胞仪电压和补偿调节 5
13. 示例图 6
14. 故障排除 6
15. 参考文献 7
16. 联系方式 7
17. 买方须知 7
附件 1：安全注意事项 8
附件 2：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com） 9

1. 产品简介

细胞杀伤是免疫细胞治疗产品（如 NK 细胞、CAR-NK 细胞、Tm 细胞、CAR-T 或者 TCR-T 细胞等）发挥生物学活性的关键质量属性（CQA），是产品质量研究和质量控制的重要内容。相比乳酸脱氢酶（LDH）法、51Cr 释放测定法、荧光素酶报告基因法、RTCA 法等细胞杀伤方法，通过流式细胞术检测 CFSE 和 7-AAD 标记的细胞杀伤方法更加安全、方便、快捷和稳定。

通用型流式法细胞杀伤检测试剂盒 (贴壁靶细胞) 用于测定效应细胞对相关靶细胞的细胞毒性，适用于贴壁培养的靶细胞杀伤检测。它由 CFSE（Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester，羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯，一种可穿透细胞膜的绿色荧光染料，用于识别混合细胞群中的靶细胞）、7-AAD（7- 氨基放线菌素 D，可与膜损伤细胞的 DNA 结合，用于标记死亡细胞）、培养基 B 和 Assay Buffer 组成。

免疫效应细胞与 CFSE 标记的靶细胞共培养一定时间后，使用 7-AAD 标记，由于 CFSE 和 7-AAD 具有不同的光谱，因此可以通过流式细胞术将靶细胞和效应细胞分开，并识别活细胞和死亡细胞。细胞群体分为四类：$CFSE^{-}7\text{-}AAD^{-}$ 代表活效应细胞，$CFSE^{-}7\text{-}AAD^{+}$ 代表死亡效应细胞，$CFSE^{+}7\text{-}AAD^{-}$ 代表活靶细胞，$CFSE^{+}7\text{-}AAD^{+}$ 代表死亡靶细胞，从而在单细胞水平上对免疫细胞的杀伤活性进行评估。

2. 应用

适用于 NK 细胞、CAR-NK 细胞、CAR-T 细胞、TCR-T 细胞、Tm 细胞等免疫细胞产品对不同肿瘤细胞系（贴壁靶细胞）的杀伤功能评估。

3. 试剂盒规格

1 Kit

4. 试剂盒组分

货号	组分名称	规格	储存温度	储存位置
HG-MD002	培养基 B	100 mL	2~8°C	Kit I
HG-FW001	Assay Buffer	100 mL	2~8°C	
HG-CFSE	CFSE	1 vial	-20°C	Kit II
HG-7-AAD	7-AAD	1 vial	-20°C	

5. 储存条件及有效期

试剂盒各组分按照对应的储存温度保存，产品有效期12个月，具体效期详见试剂盒外包装的截止日期。

⚠ 注意：CFSE 和 7-AAD 染料复融后建议一次使用完，避免反复冻融。

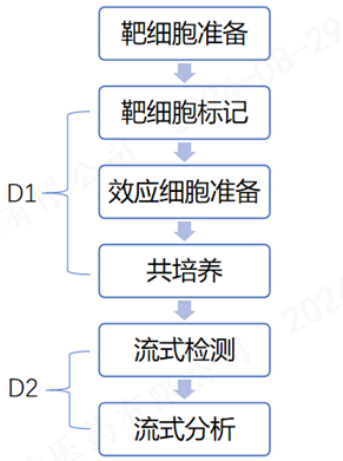
江苏谱新生物医药有限公司 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼 T.400 900 1882 W.www.hillgene.com

6. 需自行准备的材料

(1) 流式细胞仪（至少配备 488nm 激发光）
(2) 二氧化碳培养箱
(3) 离心机（96 孔板）
(4) 水浴锅
(5) 移液器及吸头
(6) 96 孔平底板和 U 底板
(7) 流式管
(8) 锡纸
(9) 无菌加样槽
(10) 去离子水
(11) 效应细胞和靶细胞
(12) 靶细胞完全培养基
(13) 0.25% 胰酶
(14) 1×PBS

7. 检测流程图及试剂准备

7.1. 检测流程图



7.2. CFSE 染色工作液配制：使用试剂盒中的 Assay Buffer 将 CFSE 储备液（绿色盖，货号：HG-CFSE）按 1:500 稀释成 1×CFSE，现配现用，避免反复冻融。

⚠ *注意：若 CFSE 荧光信号比较高或者比较低，可增加或者减小 CFSE 染色工作液的稀释比例，根据不同细胞类型摸索较合适的稀释比例。*

7.3. 7-AAD 染色工作液配制：使用 Assay Buffer 将 7-AAD 储备液（红色盖，货号：HG-7-AAD）按 1:1000 稀释成 1×7-AAD，现配现用。

8. 靶细胞准备

8.1. 根据不同靶细胞生长速度，应至少提前一周复苏靶细胞，靶细胞复苏后正常传代培养 2-3 次。

8.2. 靶细胞铺板前 1-2 天应传代一次，铺板时确保靶细胞活率≥ 90% 且数量充足。

9. Day1 效应细胞和靶细胞共培养

9.1. 靶细胞标记

9.1.1 提前打开生物安全柜并紫外辐照 30 分钟，同时打开水浴锅使水温稳定在 37°C。

9.1.2. 准备工作完成后，从二氧化碳培养箱取出靶细胞（以 T75 培养瓶为例），转移至生物安全柜中。弃去培养瓶中的培养基，加入 10 ~15 mL 1×PBS 洗涤一次后弃去上清。

9.1.3. 培养瓶中加入 2 mL 0.25% 胰酶，将培养瓶置于 37.0±1°C、5.0±0.5 % 的二氧化碳培养箱中进行细胞消化 3~5 分钟。在显微镜观察贴壁细胞，多半呈沙状移动，即判断其消化完全。

9.1.4. 待细胞消化完全后，加入 10 mL 靶细胞完全培养基终止消化，使用电动移液器吹打混匀细胞，转移至 15 mL 离心管中。

⚠ *注意：靶细胞吹打混匀过程中，操作应保持轻柔，防止因吹打力量过大造成对照组靶细胞死亡比例过高。*

9.1.5. 将 15 mL 离心管放入离心机中，400 g 离心 5 分钟。

9.1.6. 弃上清，加入 10 mL 靶细胞完全培养基，吹打混匀后取少量细胞悬液进行计数。

9.1.7. 根据细胞计数结果，取 1E6~3E6 细胞（需要定量，细胞量根据用于铺板的靶细胞量确定）至 15 mL 离心管中，400 g 离心 5 分钟。

9.1.8. 弃上清，向细胞沉淀中加入 10 mL Assay Buffer 重悬混匀，400 g 离心 5 分钟。

9.1.9. 弃上清，向细胞沉淀中加入 10 mL Assay Buffer 重悬混匀，400 g 离心 5 分钟。

9.1.10. 弃上清，向细胞沉淀中加入 1~3 mL（具体体积根据 9.1.7 中的细胞量，如细胞量为 1E6，则加入 1 mL 染色工作液）配制好的 1×CFSE 染色工作液，使染色时细胞密度控制在 1E6 cells/mL 左右，用移液器轻轻吹打混匀。

9.1.11. 用锡纸将离心管包裹并置于 37°C水浴中孵育 15 分钟，每隔 5 分钟左右晃动离心管底部，使细胞染色均匀。CFSE 染色不均会影响杀伤结果。

9.1.12. 孵育结束后，用 75% 酒精将离心管擦拭消毒后转移至生物安全柜中。打开离心管盖，加入 10 mL 的培养基 B，轻轻吹打混匀。

9.1.13. 将离心管置于离心机中，400 g 离心 5 分钟。

9.1.14. 弃上清，加入适量的培养基 B 重悬细胞沉淀，并将细胞密度调整至 2E5 cells/mL。

9.1.15. 准备一块 96 孔平底板，将细胞悬液转移至无菌的加样槽中，实验组和对照组分别加入 100 µL 靶细胞，靶细胞铺板量为 2E4 cells/ 孔。每个组别至少设置 2 个平行孔，若实验组存在多个效靶比，对照组设置一组即可。

9.1.16 靶细胞铺板结束后，将 96 孔平底板暂放于 37.0±1°C、5.0±0.5 % 的二氧化碳培养箱中。

9.2. 效应细胞准备和共培养

9.2.1. 复苏效应细胞或者直接使用新鲜的效应细胞悬液。

⚠ *注意：效应细胞和靶细胞复苏应在 37°C水浴锅中快速解冻（解冻时间控制在 2 分钟内），细胞在 37°C水浴锅中时间过长，会导致细胞活力下降。*

9.2.2. 取适量效应细胞悬液至离心管中，加入 2~10 倍悬液体积的培养基 B 混合均匀。置于离心机中，400 g 离心 5 分钟。

9.2.3. 弃上清，加入 10 mL 培养基 B 重悬细胞沉淀，轻轻吹打混匀后重新置于离心机中，400 g 离心 5 分钟。

9.2.4. 弃上清，用少量培养基 B 重悬细胞沉淀（为了方便调整效应细胞密度，此步可先预估效应细胞量，确保此步的密度要大于最高效靶比的效应细胞密度），取适量细胞悬液进行细胞计数。

⚠ *注意：效应细胞的活率对杀伤结果有一定的影响，铺板时确保效应细胞活率≥ 70%。*

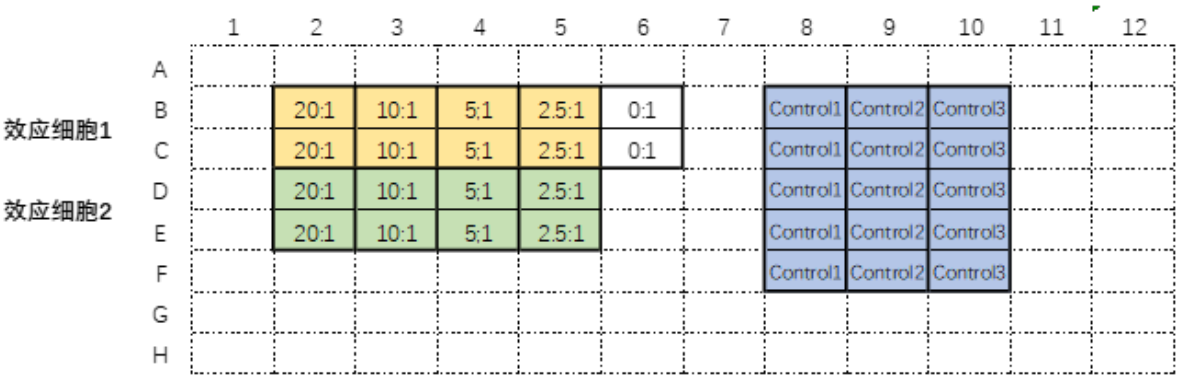
9.2.5. 根据计数结果将有效的活细胞密度（NK、CAR+ 或 TCR+ 细胞密度）调整至 4E6 cells/mL(按效靶比 20:1，具体可根据实际需求进行调整）。

9.2.6. 使用培养基 B 将上述效应细胞进行梯度稀释，根据实际需要设置多组效靶比。

9.2.7. 按下表进行效应细胞加样，实验组每孔加入 100 µL 效应细胞，有效的效应细胞铺板量为 4E5 cells/ 孔（以效靶比 20:1 为例）。实验组为每孔加入 100 µL 靶细胞和 100 µL 效应细胞；对照组为每孔加入 100 µL 培养基 B 和 100 µL 靶细胞。

组别	实验组 (以效靶比 20:1 为例)	对照组 (0:1)
靶细胞	100 µL	100 µL
效应细胞	100 µL	/
培养基 B	/	100 µL

9.2.8. 参考板布局（板布局以 20:1、10:1、5:1 和 2.5:1 的效靶比为例，具体可根据实验情况进行调整。）



9.2.9. 细胞加样完成后，轻轻晃动或拍打 96 孔平底板（不要过度晃动，防止孔内细胞悬液溅出），以使每孔内细胞分布均匀。

9.2.10. 96 孔平底板置于 37.0±1°C、5.0±0.5 % 的二氧化碳培养箱中培养，共培养时间建议在 20 小时（实际共培养时间可根据不同的靶细胞和效应细胞进行摸索）。

10.Day2 流式检测

10.1. 共培养结束后，从二氧化碳培养箱取出 96 孔平底板，置于离心机中。400 g 离心 5 分钟。

10.2. 快速倒扣 96 孔平底板弃去上清，或者使用排枪吸取上清（注意不要触碰到底部细胞沉淀）。

10.3. 每孔加入 200 µL 1×PBS，重新置于离心机中，400 g 离心 5 分钟。

10.4. 弃上清，每孔加入 50 µL 0.25% 胰酶，置于二氧化碳箱中消化 3~5 分钟。

10.5. 显微镜下观察到靶细胞完全消化后，每孔加入 200 µL 培养基 B，轻轻吹打混匀后转移至 96 孔 U 底板或者流式管中，400 g 离心 5 分钟。

⚠ ***注意：加入胰酶后需要及时观察靶细胞的消化情况，待靶细胞完全消化后方可进行终止消化操作，不可使用移液器强行吹下已贴壁的靶细胞。***

10.6. 弃上清，每孔 / 每管加入 200 µL 1×7-AAD 染色工作液，吹打混匀后置于 2~8°C冰箱避光孵育 15 分钟。

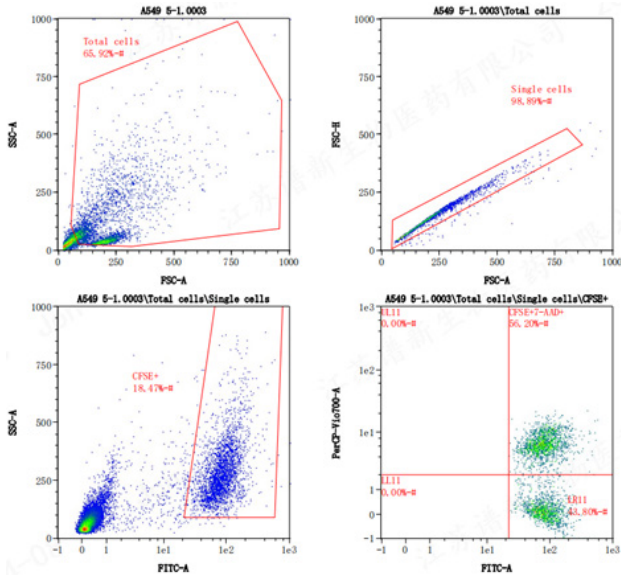
10.7. 孵育结束后立刻进行流式上机检测，设置在 $CFSE^+$ 圈门下至少收集 5000 个 Events。

11. 流式分析

11.1. 使用 FSC-A 和 SSC-A 圈出总细胞（Total cells）。通过 FSC-A 和 FSC-H 从总细胞里圈出单个细胞群（Single cells），用于排除黏连细胞群对结果的影响。

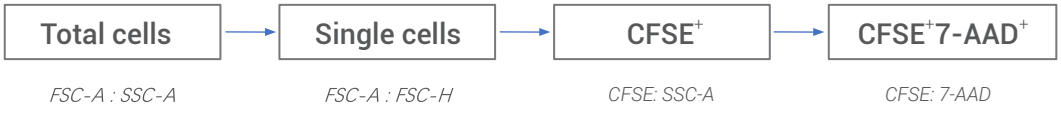
11.2. 利用 CFSE（FL-1）和 SSC-A 从单个细胞群里圈出 CFSE 标记的靶细胞，再通过 CFSE（FL-1）和 7-AAD（FL-3）从靶细胞群里圈出 7-AAD 标记的死细胞，该死细胞群体的比例即为 $CFSE^+7\text{-}AAD^+$ 比例。

11.3. 圈门示意图：



⚠ *注意：示意图所使用流式仪型号为美天旎 MQ10，其他机器参考各操作说明书进行圈门。*

11.4. 圈门逻辑如下：



11.5. 计算公式

细胞杀伤率 (%)= 实验组 $CFSE^{+}7\text{-}AAD^{+}$ 比例 (%)- 对照组 $CFSE^{+}7\text{-}AAD^{+}$ 比例 (%)

12. 单阳管准备及流式细胞仪电压和补偿调节

12.1.Control 1（CFSE 单阳管）：按照 D1 对照组的处理方式进行 CFSE 标记靶细胞的铺板。收样检测时使用 Assay Buffer 重悬细胞，该组用于 CFSE（FL-1）通道的电压调节及对 FL-3 通道的补偿调节。

⚠ *注意：Control 1 组靶细胞只有 CFSE 标记，无 7-AAD 染色。*

12.2.Control 2（7-AAD 单阳管）：按照 D1 对照组的处理方式进行未标记 CFSE 靶细胞的铺板。收样时，将细胞消化后转移至 1.5 mL 离心管中，置于 70°C水浴锅（或金属浴）中孵育 5 分钟。孵育结束后 400 g 离心 5 分钟。细胞沉淀使用 200 µL 1×7-AAD 染色工作液重悬。该组用于 7-AAD（FL-3）通道的电压调节及对 FL-1 通道的补偿调节。

⚠ *注意：Control 2 组靶细胞无 CFSE 标记，只有 7-AAD 染色。*

12.3.Control 3（空白管）：按照 D1 对照组的处理方式进行未标记 CFSE 靶细胞的铺板。，，收样检测时使用 200 µL Assay Buffer 重悬细胞。

⚠ *注意：Control 3 组靶细胞无 CFSE 标记，无 7-AAD 染色。*

12.4. 使用 Control 1、Control 2 和 Control 3 组细胞进行流式细胞仪电压和补偿的调节。

⚠ *注意：为保证有足够样品进行流式仪参数调整，建议每个 Control 组准备 3~5 个复孔。*

13. 示例图

A

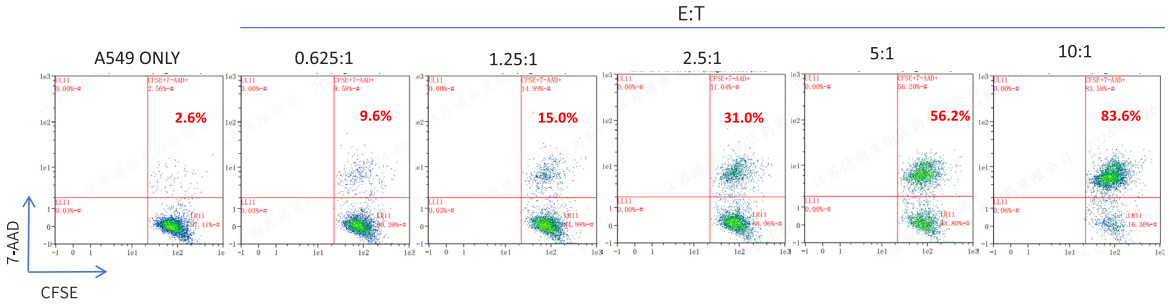


图 A 流式细胞术分析 NK 细胞对 CFSE 标记的 A549 靶细胞的杀伤率

B

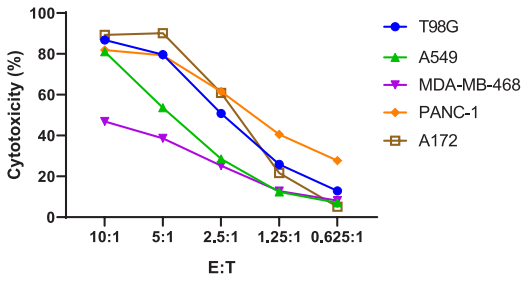


图 B 流式细胞术分析 NK 细胞对 CFSE 标记的不同实体瘤靶细胞的杀伤率

图 A 为 CFSE 标记的 A549 细胞与 NK 细胞以不同效靶比共培养 20 小时，并用 7-AAD 染色 15 分钟后的细胞杀伤流式图。$CFSE^{+}7\text{-}AAD^{+}$ 代表死亡的靶细胞。随着效靶比增加，NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用随之增强。

图 B CFSE 标记的不同实体瘤靶细胞与 NK 细胞以不同效靶比共培养 20 小时，并用 7-AAD 染色 15 分钟后的细胞杀伤流式图。随着效靶比增加，NK 细胞对不同肿瘤细胞的杀伤作用随之增强。

备注：E:T（Effector:Target）为有效的效应细胞 : 靶细胞。

14. 故障排除

问题	可能的原因	解决办法
$CFSE^{+}$ 群体处于散点图边缘或者超出 FL-1 通道最大范围	CFSE 浓度过高	增加 CFSE 工作液稀释倍数
	FL-1 坐标轴参数设置不合适	调整 FL-1 坐标轴参数，使细胞群体全部显示。
不同效靶比的效应细胞杀伤结果无差异	靶细胞和 / 或效应细胞状态较差导致	重新复苏靶细胞或效应细胞，注意实验操作，保证细胞活率；
	效应细胞对靶细胞不产生细胞毒性	更换具有特异性杀伤毒性的效应细胞进行实验。

问题	可能的原因	解决办法
对照组 $CFSE^+7\text{-}AAD^+$ 比例较高	靶细胞标记处理不当或者铺板时间过长	仔细阅读说明书，注意各项实验操作，快速完成铺板。
	收样时胰酶消化时间不足或吹打过度	延长胰酶消化时间，显微镜观察到完全消化方可进行下一步操作，所有吹打操作应轻柔。
	培养基 B 不适用于该靶细胞培养	寻求谱新技术支持

15. 参考文献

Russell, J. H. , and T. J. Ley. "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." Annual Review of Immunology 20.6(2002):323-370.

16. 联系方式

地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号

邮编 Postal code：215104

联系电话 Tel：400-900-1882

邮箱 E-Mail：info@hillgene.com

网址 Website：https://www.hillgene.com

17. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

未经我们事先书面批准，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 https://www.hillgene.com 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 https://www.hillgene.com。

附件 1：安全注意事项

● 一般说明

用户未按本说明书说明方式使用本产品可能会导致人身伤害或仪器或设备损坏。确保使用本产品的人员已接受实验室一般安全操作说明和本文档中提供的安全信息。

（1）在使用仪器或设备之前，请阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中的安全信息。

（2）在处理化学品之前，请阅读并理解所有适用的安全数据表 (SDS)，并使用适当的个人防护设备（手套、防护服、护目镜等）。

●潜在生物危害

（1）7-AAD 是一种潜在的致癌物。为了您的安全和健康，操作时请穿实验服、戴手套、做好眼睛及面部防护，避免 7-AAD 接触皮肤及眼睛。如果本产品发生吸入、吞食、接触皮肤、眼睛或者衣服，请立即处理并彻底清洗

（2）根据本方法使用的样品，其实验过程中接触的样品可能被视为生物危害。在处理生物危害时，请使用适当的危废处理方法。

●生物危险

（1）生物样本，如人和其他动物的组织、体液、传染性病原体和血液，有传播传染病的可能。在配备适当安全设备（如生物安全柜）的设施中进行所有工作。安全设备还包括个人防护用品，如手套、外套、工作服、鞋套、靴子、呼吸器、面罩、安全眼镜或护目镜。

（2）在使用可能具有生物危害性的材料之前，个人应根据当地的法规和公司 / 机构要求接受培训。

●危险废物（来自仪器）

仪器产生的废物具有潜在危险性。请遵守前述 “生物危险”警告中的指导原则。

附件 2：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com）

类别	产品名称	产品货号
分析检测	细胞杀伤检测试剂盒（悬浮靶细胞）	HG-CKK001
	人干扰素 γ（IFN-γ）ELISA 检测试剂盒	HG-IF001
	HIV-1 p24 ELISA 检测试剂盒	HG-P001
	CAR/TCR 基因拷贝数检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-CA001
	RCL(VSVG) 基因拷贝数检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）	HG-RC001
	支原体 DNA 检测试剂盒 (qPCR- 荧光探针法)	HG-ZY002
助转染剂	Viral E-hancer B	HG-PTD001-B
	Viral E-hancer C（ROU）	HG-PTD001-C-R
	Viral E-hancer C（GMP）	HG-PTD001-C-G

让细胞药物
谱写生命新篇章
/
CELL THERAPY
INNOVATION INSPIRED

BlueKit®
Powered by Hillgene

关注公众账号
获取更多咨询

欢迎订购

江苏谱新生物医药有限公司

地　址：苏州市吴中大道1463号越旺智慧谷4号楼
电　话：400-900-1882
邮　箱：info@hillgene.com
网　址：www.hillgene.com

经销商：

© Hillgene 2024
2412