

CIK Cells Serum-free Medium

CIK 细胞无血清培养套装

(50mL 脐带血培养体系)

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品(北京)有限公司

YOCON 友康®

CIK细胞无血清培养套装使用说明书——50mL脐带血培养体系

【适用范围】

用于脐血样本体外诱导扩增 CIK 细胞，不适用于外周血样本。

【产品组成】

适用于 50mL 脐血的样本量，使用 2~3L 培养基。

产品名称	产品用途	产品用量	保存温度	产品货号
免疫细胞修复培养基	CIK 细胞前期激活使用	1 瓶，200mL/ 瓶	2~8℃	NC0102.F
免疫细胞无血清培养基	CIK 细胞体外培养	2 瓶，1L/ 瓶	2~8℃	NC0101
CIK 细胞诱导扩增试剂盒 (50mL 脐带血样本)	YC001: 起始培养时添加	1 支，500μL/ 支	-20℃	AN0109-2
	YC002: 激活培养基添加	1 支，200μL/ 支		
	YC005: 扩增培养基添加	2 支		

注意：

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。

【单个核细胞的分离】

1. 试剂准备

分离单个核细胞前，应将血样、PBS（生理盐水）和淋巴细胞分离液室温平衡至 20℃。

2. 血浆提取（离心机型号 Thermo ST-40R）

(1) 将血样平均分装到 50 mL 离心管中，于室温下 700g 离心 15 min（离心机升速 8，降速 4），取上层淡黄色血浆至新的 50mL 离心管中（下层红色液体用于提取单个核细胞），于水浴锅中 56℃ 灭活 30min。

(2) 900g 离心 10min，取上清，置于 -20℃，15min，再次 900g 离心 10min，取上清，置于 4℃ 保存。（900g 离心时离心机的升降速均调至最高即可）

3. 单个核细胞的分离

(1) 取上一步血浆提取后得到的下层红色液体用生理盐水 1:1 稀释，混匀，备用。

(2) 另取 2 支新的 50mL 的离心管，根据稀释血液的体积，按照 1:1 的比例将稀释血液缓慢加到淋巴细胞分离液上层。（如 20mL 稀释血液，需要 20mL 分离液）使血液和淋巴细胞分离液形成一个明显的分层，注意不要将稀释血液混入到淋巴细胞分离液中，室温 700g 离心 30min。（离心机调节升速 6，降速 4）

(3) 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 700 g 离心 10 min。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°C 的激活培养基重悬细胞，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）

【试剂准备】

激活培养基（200mL）：将融化的 YC002（200μL）加入 200mL 免疫细胞修复培养基（货号 NC0102.F）中，混匀备用。

扩增培养基（2L）：每支 YC005 用 1mL 免疫无血清培养基（货号 NC0101）溶解，以 1：1000 的比例添加至免疫无血清培养基（货号 NC0101），混匀备用。

注意：前 5 天必须使用激活培养基，不可使用扩增培养基。

【使用步骤】：以接种30mL、终体积3L为例

1. 第 0 天

单个核细胞接种：T75 瓶中加入激活培养基、1 支诱导因子 YC001、10% 比例的自体血浆（3mL）和单个核细胞，总体积 30mL，接种密度 $2E6/mL$ 。

注意：因脐血单个核细胞中易掺入红细胞，计数结果常出现大的误差，这会导致接种密度出现偏差，应使用红细胞裂解液将红细胞裂解后再计数。

2. 第 3 天

1：1 比例补液，T75 瓶中补加 30mL 激活培养基和 5% 的自体血浆（1.5mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时总体积 60mL。

3. 第 5 天

补加 140mL 激活培养基和 5% 的自体血浆（7mL），将 T75 瓶中的培养基和细胞平均分至 2 个 T175 瓶。此时每个 T175 瓶中有细胞悬液 100mL，总体积 200mL。

注意：T175 瓶培养体积不宜过大，建议使用两个 T175。

4. 第 7 天

1：1 比例补液，补加 200mL 扩增培养基，此时总体积 400mL。添加 1% 血浆，若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。将培养基和细胞转移至 1 个细胞培养袋中。

注意：2L 规格的培养袋培养 400mL 体积需对折，使用 1/2 底面积。

5. 第 9 天

1：1 比例补液，从原有的细胞培养袋中取出 200mL 细胞悬液到第 2 个细胞培养袋，再向 2 个细胞培养袋中分别补加 200mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 400mL，总体积 800mL。

注意：2L 规格的培养袋培养 400mL 体积需对折，使用 1/2 底面积。

6. 第 11 天

1：1 比例补液，补加 800mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 800mL，总体积 1600mL。

7. 第 13 天

补加 1400mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1500mL，总体积 3000mL。

8. 第 16~18 天

检测密度收获细胞。

【补液程序1】：终体积2L

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	1×T75	激活培养基	30mL	30mL	10%	3mL
d3	1×T75	激活培养基	30mL	60mL	5%	1.5mL
d5	2×T175	激活培养基	140mL	200mL	5%	7mL
d7	1× 培养袋	扩增培养基	200mL	400mL	1%	2mL
d9	2× 培养袋	扩增培养基	400mL	800mL	0%	0mL
d11	2× 培养袋	扩增培养基	800mL	1600mL	0%	0mL
d13	2× 培养袋	扩增培养基	400mL	2000mL	0%	0mL
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

【补液程序2】：终体积3L

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	1×T75	激活培养基	30mL	30mL	10%	3mL
d3	1×T75	激活培养基	30mL	60mL	5%	1.5mL
d5	2×T175	激活培养基	140mL	200mL	5%	7mL
d7	1× 培养袋	扩增培养基	200mL	400mL	1%	2mL
d9	2× 培养袋	扩增培养基	400mL	800mL	0%	0mL
d11	2× 培养袋	扩增培养基	800mL	1600mL	0%	0mL
d13	2× 培养袋	扩增培养基	1400mL	3000mL	0%	0mL
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

【特别说明】**1. 分离单个核细胞**

分离单个核细胞应特别注意两点，一是分离单个核细胞前血液及各试剂应预温至 20℃，室温离心；二是血液采集后应在 8h 内分离单个核细胞。

2. 接种密度

新鲜脐带血单个核细胞推荐接种密度为 2E6/mL，冻存脐带血单个核细胞推荐接种密度为 3E6/mL，接种过低或过高对最终收获的细胞数和 CIK 纯度都会有影响。

3. 试剂保存

CIK 试剂盒因子禁止反复冻融，否则会降低其活性，导致阳性率较低。

【说明书核准日期】 2024年6月18日

【版本号】 3.3.3



文件版本号：2024 -V3.3.3

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

