

CIK Cells Serum-free Medium

CIK 细胞无血清培养套装

(50mL 外周血培养体系)

/ 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外周血培养体系

【适用范围】

用于外周血样本体外诱导扩增 CIK 细胞

【产品组成】

适用于 50mL 外周血的样本量，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 外周血样本)	YC001: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支, 500μL/ 支	-20℃	AN0108-2
	YC002: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 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, 应将外周血、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) 将外周血平均分装到 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℃ 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】

1. 配制 YC005 溶液（2mL）：取 YC005 两支，分别加入 1mL 免疫细胞无血清培养基（货号：NC0101），完全溶解、混匀备用。
 2. 配制激活培养基（200mL）：取 200uL YC005 溶液加入 200mL 免疫细胞修复培养基（货号：NC0102.F）中，混匀备用。
 3. 配制扩增培养基（1.8L）：取 1800uL YC005 溶液加入 1.8L 免疫细胞无血清培养基（货号：NC0101）中，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

T75 培养瓶包被：TC 处理的 T75 瓶中加入 10mL DPBS 和 1 支 YC001，充分混匀后，37℃ 孵育 2h，弃去上清，并用 10mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷培养瓶底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：T75 瓶中加入激活培养基、1 支诱导因子 YC002、10% 比例的自体血浆（3mL）和单个核细胞，总体积 30mL，接种密度 $2E6/mL$ 。

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 完全培养。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 PBMC。

2. 接种密度

外周血单个核细胞推荐接种密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，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】 2.2.3



文件版本号：2024 -V2.2.3

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

