

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装高性能版

(6 孔板培养体系)

使用说明书

— Instruction manual —



使用前请仔细阅读本操作说明

友康生物科技（北京）股份有限公司

YOCON 友康®

NK细胞无血清培养套装高性能版使用说明书——6孔板培养体系

【适用范围】

用于外周血或脐带血体外诱导扩增 NK 细胞。

【产品组成】

产品名称	产品货号	产品用途	产品规格	保存温度
免疫细胞修复培养基	NC0102.F	NK 细胞前期激活使用	200mL/ 瓶	2 ~ 8°C
NK 细胞无血清培养基	NC0102	NK 细胞体外培养	1L/ 瓶	2 ~ 8°C
NK 细胞诱导扩增试剂盒 (高性能版)	AN0104	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支, 500μL/ 支	-20°C
		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	2 支	
		庆大霉素: 添加至培养基使用	1 支, 300μL/ 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°C，禁止将整瓶培养基放置 37°C 反复预温。

【单个核细胞分离】

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°C。

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°C 灭活 30min。

(2) 900g 离心 10min，取上清，置于 -20°C，15min，再次 900g 离心 10min，取上清，置于 4°C 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) 外周血：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。

脐带血：取上一步血浆提取后得到的下层红色液体用生理盐水 1:2 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）

注意：脐带血单个核细胞计数前应使用红细胞裂解液裂解红细胞。

【试剂准备】

1. 激活培养基：取室温融化的 YC00C 因子以 1: 1000 的比例加入免疫细胞修复培养基（货号：NC0102.F）中，混匀备用。

2. 扩增培养基：每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102）溶解，以 1:1000 的比例添加至 NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102）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-外周血样本】

1. 第 0 天

6 孔板包被：6 孔板中加入 2mL DPBS 和 **100μL YC00A**，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 2mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷孔板底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：6 孔板中加入**激活培养基**、**100μL 诱导因子 YC00B**、10% 比例的自体血浆（0.4mL）和 8E6 个单个核细胞，总体积 4mL。外周血单个核细胞接种密度 2E6/mL。

注意：

* 该版本说明书适用于货号为 AN0104 和 AN0104-1 的 NK 试剂盒，若使用货号为 AN0104-2 的 NK 试剂盒，YC00A 因子取用 67μL 即可，YC00B 和 YC00C 使用量相同。

* YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 6 孔板瓶转移到 2 ~ 8°C 冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8°C 冰箱中可保存 12h。

2. 第 3 天

6 孔板中补加 8mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆（0.4mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

3. 第 5 天

补加 28mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆（1.4mL），将 6 孔板中的培养基和细胞转移至 T175。

4. 第 7 天

若细胞密度 $\geq 1E6/mL$ ，直接 1: 2 补液；若细胞密度 $< 1E6$ ，延迟一天 1: 2 补液。

1: 2 比例补液，补加 80mL **扩增培养基**，添加 1% 血浆（0.8mL）。

5. 第 9 天

补加 120mL **扩增培养基**，此时总体积 240mL，取出 120mL 细胞悬液到第 2 个 T175 瓶中。

6. 第 11 天

补加 160mL **扩增培养基**，每瓶 T175 补液 80mL。

注意：

一般第 9 天新用的 T175 瓶中的细胞密度会低于旧 T175 瓶，建议将两瓶 T175 中的细胞再次混匀、分瓶。

7. 第 14-16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序-外周血样本】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	6 孔板	激活培养基	4mL	4mL	10%	0.4mL
d3	6 孔板	激活培养基	8mL	12mL	5%	0.4mL
d5	T175	激活培养基	28mL	40mL	5%	1.4mL
d7	T175	扩增培养基	80mL	120mL	1%	0.8mL
d9	2×T175	扩增培养基	120mL	240mL	0%	0mL
d11	2×T175	扩增培养基	160mL	400mL	0%	0mL
d14~16	收获细胞					

【使用步骤-脐带血样本】

1. 第 0 天

6 孔板包被：6 孔板中加入 2mL DPBS 和 **100μL YC00A**，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 2mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷孔板底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：6 孔板中加入**激活培养基**、**50μL 诱导因子 YC00B**、10% 比例的自体血浆（0.2mL）和 8E6 个单个核细胞，总体积 2mL。脐带血单个核细胞接种密度 4E6/mL。

注意：

* 该版本说明书适用于货号为 AN0104 和 AN0104-1 的 NK 试剂盒，若使用货号为 AN0104-2 的 NK 试剂盒，YC00A 因子取用 67μL 即可，YC00B 和 YC00C 使用量相同。

* YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 6 孔板瓶转移到 2 ~ 8°C 冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8°C 冰箱中可保存 12h。

* 因脐带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。

* 冻存的脐带血单个核细胞或运输时间 8h 以上的脐带血提取的单个核细胞，需要“先修复再培养”，将获取的单个核细胞置于免疫修复培养基中孵育 8 ~ 24h、细胞状态恢复后再接种。

2. 第 3 天

6 孔板中补加 2mL 激活培养基和 10% 的自体血浆 (0.2mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

3. 第 5 天

6 孔板中补加 4mL 激活培养基和 10% 的自体血浆 (0.4mL)，此时总体积 8mL。

4. 第 7 天

补加 12mL 扩增培养基和 5% 的自体血浆 (0.6mL)，将 6 孔板中的细胞和培养基转入 T75 瓶。此时总体积 20mL。

5. 第 9 天

T75 瓶中补加 20mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆 (0.2mL)。此时总体积 40mL。

6. 第 11 天

补加 40mL 扩增培养基，将 T75 瓶中的细胞和培养基转入 T175 瓶。此时总体积 80mL。

7. 第 13 天

T175 瓶中补加 80mL 扩增培养基，此时总体积 160mL。

8. 第 15 天

T175 瓶中补加 40mL 扩增培养基，此时总体积 200mL。

9. 第 18 ~ 20 天

检测密度收获细胞。

【补液程序-脐带血样本】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	6 孔板	激活培养基	2mL	2mL	10%	0.2mL
d3	6 孔板	激活培养基	2mL	4mL	10%	0.2mL
d5	6 孔板	激活培养基	4mL	8mL	10%	0.4mL
d7	T75	扩增培养基	12mL	20mL	5%	0.6mL
d9	T75	扩增培养基	20mL	40mL	1%	0.2mL
d11	T175	扩增培养基	40mL	80mL	0%	0mL
d13	T175	扩增培养基	80mL	160mL	0%	0mL
d15	T175	扩增培养基	40mL	200mL	0%	0mL
d18 ~ d20	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°C，室温离心；二是血液采集后应在 24h 内分离单个核细胞。

2. 单个核细胞接种

外周血单个核细胞推荐接种密度为 2E6/mL，接种 4mL/ 六孔板孔，脐带血单个核细胞推荐接种密度为 4E6/mL，接种 2mL/ 六孔板孔。接种密度过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。

3. 试剂保存

NK 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。如暂时不用，请置于 -20°C 保存。已经融化的因子，如一周内使用，4°C 保存即可。

4. 单个核细胞的保存

计数、预温培养基、等待因子融化等暂时不使用单个核细胞时，应将单个核细胞保存于 37°C 培养箱，避免受凉。

5. YC00A 包被后清洗

包被有 YC00A 的培养瓶，清洗前应提前将单个核细胞、YC00B、血浆、激活培养基准备好，清洗后立即接种。不要清洗后加入培养基长时间放置、或清洗后干燥放置。

6. 脐带血血样要求

适用于运输时间 8h 以内、抗凝剂比例 ≤ 28% 的脐带血样本和运输时间 24h 以内、抗凝剂比例 ≤ 25% 的脐带血样本。抗凝剂比例不符合要求的样本不建议使用自体血浆。

7. 补液程序

第 3 天、第 5 天请严格按照说明书要求补液并添加相应比例的血浆，第 7 天后可以根据细胞状态酌情补液。

8. 不同版本 NK 试剂盒因子用量

外周血样本（接种 4mL/ 孔）				脐带血样本（接种 2mL/ 孔）			
货号	YC00A	YC00B	YC00C	货号	YC00A	YC00B	YC00C
AN0104-1	100uL	100uL	1: 1000 的比例 配制激活培养基	AN0104-1	100uL	50uL	1: 1000 的比例 配制激活培养基
AN0104	100uL	100uL		AN0104	100uL	50uL	
AN0104-2	67uL	67uL		AN0104-2	67uL	34uL	

【说明书核准日期】 2025年2月25日

【版本号】 1.0.0

YOCON 友康[®]

文件版本号：2025 -V1.0.0

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

友康生物科技（北京）股份有限公司 友康厚德生物制品（北京）有限公司

研发生产基地：北京市密云区科技路6号

总部地址：北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号

华东分区：上海市普陀区真如街道天汇广场706室

华中分区：武汉市东湖高新技术开发区光谷大道58号光谷总部国际2栋1210

华南分区：广东省广州市海珠区新港东路1068号中洲中心北塔901

联系电话：0086-400-001-1266 0086-010-58711655

官方网站：www.yocon.cn

