

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装高性能版

(接种血量 50mL 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®

NK细胞无血清培养套装使用说明书——高性能版50mL血

【适用范围】

用于外周血或脐血体外诱导扩增 NK 细胞

【产品组成】

适用于 50mL 外周血或脐血的样本量，使用 2~3L 培养基

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	1 瓶，200mL/ 瓶	2~8℃
NK 细胞无血清培养基	NC0102	NK 细胞体外培养	2 瓶，1L/ 瓶	2~8℃
NK 细胞诱导扩增试剂盒 (高性能版)	AN0104-2	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	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℃，禁止将整瓶培养基放置 37℃ 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) 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（200mL）：将一支室温融化的 YC00C（200μL）加入 200mL 免疫细胞修复培养基（货号：NC0102.F）中，混匀备用。

2. 扩增培养基（2L）：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】

1. 第 0 天

T75 培养瓶包被：TC 处理的 T75 瓶中加入 10mL DPBS 和 1 支 YC00A，充分混匀后，37°C 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。

PBMC 接种：T75 瓶中加入激活培养基、1 支诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（3mL）和单个核细胞，总体积 30mL，外周血单个核细胞密度 2E6/mL，脐带血单个核细胞密度 3E6/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。

YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 T75 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

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。

<一>若使用友康FEP培养袋，参考以下内容：

4. 第 7 天：若使用友康 FEP 材质细胞培养袋

取样计数：

①外周血样本，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。

②脐带血样本，若细胞密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，直接 1：2 补液，若细胞密度 $< 1.5E6$ ，延迟一天 1：2 补液。

1：2 比例补液，补加 400mL 扩增培养基，此时总体积 600mL。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 FEP 培养袋中（货号 FP0002-2）。

注意：友康 FEP 培养袋（2L）培养 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

5. 第 9 天

1：1 比例补液，补加 600mL 扩增培养基，总体积 1200mL。

6. 第 11 天

补加 1000mL 扩增培养基，总体积 2200mL。

7. 第 14~16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序】——使用友康FEP培养袋，终体积2.2L

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	400mL	600mL	1%	4mL
d9	1× 培养袋	扩增培养基	600mL	1200mL	0%	0mL
d11	1× 培养袋	扩增培养基	1000mL	2200mL	0%	0mL
d14~16	1× 培养袋	收获细胞				

<二>若未使用友康FEP培养袋，参考以下内容：

4. 第 7 天：取样计数，若细胞密度 < 1.5E6/mL

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。将培养基和细胞全部转移至 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 600mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1100mL，总体积 2200mL。

8. 第 16~18 天

检测密度收获细胞。

【补液程序1】——第7天密度 < 1.5E6/mL，终体积2.2L

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	600mL	2200mL	0%	0mL
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

【补液程序2】——第7天密度 < 1.5E6/mL，终体积3.2L

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	1600mL	3200mL	0%	0mL
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

4. 第 7 天：取样计数，若细胞密度 ≥ 1.5E6/mL

1: 2 比例补液, 补加 400mL 扩增培养基, 此时总体积 600mL。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 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

5. 第 9 天

1: 1 比例补液, 从原有的细胞培养袋中取出 300mL 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 300mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 600mL, 总体积 1200mL。

注意：2L 规格的培养袋培养 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

6. 第 11 天

1: 1 比例补液, 补加 1000mL 扩增培养基。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1100mL, 总体积 2200mL。

7. 第 14~16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序3】——第7天密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，终体积2.2L

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	400mL	600mL	1%	4mL
d9	2× 培养袋	扩增培养基	600mL	1200mL	0%	0mL
d11	2× 培养袋	扩增培养基	1000mL	2200mL	0%	0mL
d14~16	2× 培养袋	收获细胞				

【补液程序4】——第7天密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，终体积3.2L

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	400mL	600mL	1%	4mL
d9	2× 培养袋	扩增培养基	600mL	1200mL	0%	0mL
d11	2× 培养袋	扩增培养基	1200mL	2400mL	0%	0mL
d13	2× 培养袋	扩增培养基	800mL	3200mL	0%	0mL
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

【特别说明】**1. 分离 PBMC**

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 2E6/mL，新鲜脐带血单个核细胞推荐接种密度为 3E6/mL，冻存脐带血单个核细胞推荐接种密度为 3.5E6/mL，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℃ 保存。已经融化的因子，如一周内使用，4℃ 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 PBMC 时，应将 PBMC 保存于 37℃ 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 PBMC、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。

【说明书核准日期】 2024年6月18日

【版本号】 5.3.7



文件版本号：2023 -V5.3.7

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

