γδT Cell Induction and
Expansion Kit Set

γδT 细胞诱导扩增试剂盒套装

（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®

γδT细胞诱导扩增试剂盒套装使用说明书——接种血量50mL培养体系

【适用范围】

用于外周血体外诱导扩增 γδT 细胞。

产品名称	产品货号	产品用途	产品规格	保存温度
NK 细胞无血清培养基	NC0102	γδT 细胞体外培养	2 瓶，1L/ 瓶	2~8℃
γδT 细胞诱导扩增试剂盒	AN0110	YC00T: 起始培养时添加	1 支，200μL/ 支	-20℃
		YC005: 添加至培养基使用	2 支，冻干粉	

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) 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 700g 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. 培养基 A（30mL）：取出 30mL NK 细胞无血清培养基，不添加任何因子、备用。

2. 培养基 B（ 1970mL ）：每一瓶 NK 细胞无血清培养基中加入一支 YC005。

注意：d0 接种时使用不添加任何因子的培养基 A，此后补液使用添加有 YC005 的培养基 B。

【使用步骤】 以初始接种30mL为例

1. 第 0 天

单个核细胞接种: T75 瓶中分别加入培养基A、200μL 诱导因子 YC00T、10% 比例的自体血浆(3mL)和 6E7 个单个核细胞，总体积 30mL。单个核细胞推荐接种密度 2E6/mL。

注意 :d0 接种时必须使用不添加任何因子的培养基 A；YC00T 添加时需将其充分吹匀。

2. 第 3 天

1：1 比例补液，T75 瓶中补加 30mL 培养基 B 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 培养基 B 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

若细胞密度≥ 1.5E6/mL，直接 1：2 补液，若细胞密度 < 1.5E6/mL，延迟一天 1：2 补液。

1：2 比例补液，补加 400mL 培养基 B，添加 1% 血浆。将培养基和细胞转移至 1 个细胞培养袋中。此时总体积 600mL。

5. 第 9 天

1：1 比例补液，补加 600mL 培养基 B。此时总体积 1200mL。

6. 第 11 天

补加 800mL 培养基 B。总体积 2000mL。

7. 第 14 ~ 16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序】

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	培养基 A	30mL	30mL	10%	3mL
d3	1×T75	培养基 B	30mL	60mL	5%	1.5mL
d5	2×T175	培养基 B	140mL	200mL	5%	7mL
d7	1× 培养袋	培养基 B	400mL	600mL	1%	4mL
d9	1× 培养袋	培养基 B	600mL	1200mL	0%	0
d11	1× 培养袋	培养基 B	800mL	2000mL	0%	0
d14 ~ 16	1× 培养袋	收获细胞				

【使用步骤】以初始接种20mL为例

1. 第 0 天

单个核细胞接种：两个 T25 瓶中分别加入培养基 A、67μL 诱导因子 YC00T、10% 比例的自体血浆（1mL）和 2E7 个单个核细胞，每个 T25 瓶中体积为 10mL，总体积 20mL。单个核细胞推荐接种密度 2E6/mL。

注意：

d0 接种时必须使用不添加任何因子的培养基 A；YC00T 添加时需将其充分吹匀。

本试剂盒提供的 YC00T 因子适用于 30mL 接种体积，若接种体积降低至 20mL，只需取用 134uL YC00T 因子。

2. 第 3 天

每个 T25 瓶中补加 20mL 培养基 B 和 5% 的自体血浆 (1mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时每个 T25 瓶中体积 30mL，总体积 60mL。

注意：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。

3. 第 5 天

补加 140mL 培养基 B 和 5% 的自体血浆 (7mL)，将两个 T25 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

若细胞密度≥ 1.5E6/mL，直接 1：2 补液，若细胞密度 < 1.5E6/mL，延迟一天 1：2 补液。

1：2 比例补液，补加 400mL 培养基 B，添加 1% 血浆。将培养基和细胞转移至 1 个细胞培养袋中。此时总体积 600mL。

5. 第 9 天

1：1 比例补液，补加 600mL 培养基 B。此时总体积 1200mL。

6. 第 11 天

补加 800mL 培养基 B。总体积 2000mL。

7. 第 14 ~ 16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	2×T25	培养基 A	20mL	20mL	10%	2mL
d3	2×T25	培养基 B	40mL	60mL	5%	2mL
d5	2×T175	培养基 B	140mL	200mL	5%	7mL
d7	1× 培养袋	培养基 B	400mL	600mL	1%	4mL
d9	1× 培养袋	培养基 B	600mL	1200mL	0%	0
d11	1× 培养袋	培养基 B	800mL	2000mL	0%	0
d14 ~ 16	1× 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

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

3. 试剂保存

γδT 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。请将试剂盒于 -20℃保存，若有条件可优先置于 -80℃。

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℃培养箱，避免受凉。

【说明书核准日期】2025年02月08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

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