

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装标准版

(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——标准版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 (标准版 50mL 血)	AN0107-2	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: 培养基 B 添加	1 支，1500μL/ 支	
		YC005: 添加至培养基使用	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. 配制培养基 A（200mL）：将室温融化的 YC00C 因子 300μL 加入 200mL 免疫细胞修复培养基（货号：NC0102.F）中，混匀备用。

2. 配制 YC005 溶液（2mL）：取 YC005 两支，分别加入 1mL NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102），完全溶解、混匀备用。

3. 配制培养基 B-1（1L）：取 YC005 溶液 1mL 和室温融化的 YC00C 因子 1200uL 加入 1L NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102）中，混匀备用。

4. 配制培养基 B-2（1L）：取 YC005 溶液 1mL 加入 1L NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102）中，混匀备用。

注意：前 5 天使用培养基 A，后续补液时，先将培养基 B-1 用完再用培养基 B-2。

【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。

单个核细胞接种：T75 瓶中加入培养基 A、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，外周血单个核细胞细胞密度 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ，脐带血单个核细胞密度 $2 \sim 3 \times 10^6/\text{mL}$ 。

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 培养基 A 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 A 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 培养基 B-1，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 培养基 B-1，总体积 1200mL。

6. 第 11 天

补加 1000mL 培养基 B-2，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（2L），终体积2.2L

时间	培养耗材	培养基	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	1×T75	培养基 A	30	30	10%	3
d3	1×T75	培养基 A	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	培养基 A	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	培养基 B-1	400	600	1%	4
d9	1× 培养袋	培养基 B-1	600	1200	0%	0
d11	1× 培养袋	培养基 B-2	1000	2200	0%	0
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 培养基 B-1，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。将全部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 培养基 B-1。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，每个培养袋中补加 400mL 培养基 B-1 和 400mL 培养基 B-2。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 1600mL 培养基 B-2。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1600mL，总体积 3200mL。

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 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	1×T75	培养基 A	30	30	10%	3
d3	1×T75	培养基 A	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	培养基 A	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	培养基 B-1	200	400	1%	2
d9	2× 培养袋	培养基 B-1	400	800	0%	0
d11	2× 培养袋	培养基 B-1 + 培养基 B-2	400+400=800	1600	0%	0
d13	2× 培养袋	培养基 B-2	600	2200	0%	0
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 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	1×T75	培养基 A	30	30	10%	3
d3	1×T75	培养基 A	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	培养基 A	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	培养基 B-1	200	400	1%	2
d9	2× 培养袋	培养基 B-1	400	800	0%	0
d11	2× 培养袋	培养基 B-1 + 培养基 B-2	400+400=800	1600	0%	0
d13	2× 培养袋	培养基 B-2	1600	3200	0%	0
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 培养基 B-1, 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 培养基 B-1。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 1200mL 培养基 B-2。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1200mL, 总体积 2400mL。

7. 第 13 天

补加 800mL 培养基 B-2。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1600mL, 总体积 3200mL。

8. 第 16~18 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 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	1×T75	培养基 A	30	30	10%	3
d3	1×T75	培养基 A	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	培养基 A	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	培养基 B-1	400	600	1%	4
d9	2× 培养袋	培养基 B-1	600	1200	0%	0
d11	2× 培养袋	培养基 B-2	1000	2200	0%	0
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 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	1×T75	培养基 A	30	30	10%	3
d3	1×T75	培养基 A	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	培养基 A	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	培养基 B-1	400	600	1%	4
d9	2× 培养袋	培养基 B-1	600	1200	0%	0
d11	2× 培养袋	培养基 B-2	1200	2400	0%	0
d13	2× 培养袋	培养基 B-2	800	3200	0%	0
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

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单个核细胞时，应将单个核细胞保存于 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。

【说明书核准日期】 2024年8月12日

【版本号】 6.3.7



文件版本号：2024 -V6.3.7

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

