

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 30mL 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30mL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】

2L 培养体系套装：适用于 20~30mL 外周血或脐血的样本量，使用 2L 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 细胞诱导因子试剂盒<br>(标准版 2L 培养体系) | AN0107   | 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 1200μL 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

T25 培养瓶包被：两个 TC 处理的 T25 瓶中分别加入 5mL DPBS 和 250μL YC00A，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 5mL 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：每个 T25 瓶中分别加入培养基 A、250μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1mL）和单个核细胞，总体积 10mL，外周血单个核细胞细胞密度  $1.5E6/mL$ ，脐带血单个核细胞密度  $2\sim3E6/mL$ 。

**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 T25 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

每个 T25 瓶中补加 19mL 培养基 A 和 5% 的自体血浆（1mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

**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 A 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。**

## <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     | 2×T25  | 培养基 A   | 20        | 20       | 10%  | 2        |
| d3     | 2×T25  | 培养基 A   | 40        | 60       | 5%   | 2        |
| 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

①若细胞密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，1: 2 补液，补加 400mL 培养基 B-1；

②若细胞密度在  $1\sim 1.5E6/mL$  之间，1: 1 补液，补加 200mL 培养基 B-1。

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；培养 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

### 5. 第 9 天

1: 1 补液，补加培养基 B-1 至培养袋中。

### 6. 第 11 天

1: 1 补液，补加剩余的培养基 B-1 和培养基 B-2。

### 7. 第 13 天

将剩余的培养基 B-2 添加至培养袋中。

### 8. 第 14~16 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     | 2×T25  | 培养基 A                | 20          | 20       | 10%  | 2        |
| d3     | 2×T25  | 培养基 A                | 40          | 60       | 5%   | 2        |
| 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<br>+ 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 $\geq 1.5E6/mL$ ，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     | 2×T25  | 培养基 A   | 20        | 20       | 10%  | 2        |
| d3     | 2×T25  | 培养基 A   | 40        | 60       | 5%   | 2        |
| 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    |           |          |      |          |

**【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 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】** 3.3.5



文件版本号：2024 -V3.3.5

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](http://www.yocon.cn)

