

CIK Cells Serum-free Medium

CIK 细胞无血清培养套装

(脐带血培养体系)

/ 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®

CIK细胞无血清培养套装使用说明——脐带血

【适用范围】

用于脐血样本体外诱导扩增 CIK 细胞，不适用于外周血样本。

【产品组成】

适用于 50mL 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
免疫细胞无血清培养基	NC0101	CIK 细胞体外培养	2 瓶, 1L/ 瓶	2 ~ 8℃
脐血 CIK 诱导扩增试剂盒	AN0109-2	YC001: 起始培养时添加	1 支, 200μL/ 支	-20℃
		YC002: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 支	
		YC003: 激活培养基添加	1 支, 200μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	2 支	

注意：每次添加的培养基需提前取出预温至 37℃，禁止将整瓶培养基放置 37℃反复预温。

【单个核细胞的分离】

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℃。

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℃ 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 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℃ 的激活培养基重悬细胞，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. 激活培养基 (200mL)：将融化的 200μL YC003 加入 200mL 免疫细胞无血清培养基 (货号 NC0101) 中，混匀备用。

2. 扩增培养基 (1800mL)：每支 YC005 用 1mL 免疫细胞无血清培养基 (货号 NC0101) 溶解，以 1: 1000 的比例添加至免疫细胞无血清培养基 (货号 NC0101)，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

单个核细胞接种：T75 瓶中加入激活培养基、1 支诱导因子 YC001、1 支诱导因子 YC002、10% 比例的自体血浆 (3mL) 和单个核细胞，总体积 30mL，接种密度 2×10^6 /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。

● 本试剂盒提供的因子适用于 30mL 接种体积，若提取的单个核细胞不够接种 30mL，可以降低接种体积至 20mL，此时只需取用 134μL YC001 因子和 334μL YC002 因子。

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。

4. 第 7 天：取样计数，若细胞密度 $< 1.5 \times 10^6$ /mL

1: 1 比例补液，补加 200mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆 (2mL)，此时总体积 400mL。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 400mL 体积需对折，使用 1/2 底面积。

5. 第 9 天

1: 1 比例补液，补加 400mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆 (4mL)，若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。此时总体积 800mL。

注意：2L 规格的培养袋培养 800mL 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 800mL 扩增培养基。此时总体积 1600mL。

7. 第 13 天

补加 400mL 扩增培养基。此时总体积 2000mL。

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	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	200	400	1%	2
d9	1× 培养袋	扩增培养基	400	800	1%	4
d11	1× 培养袋	扩增培养基	800	1600	0%	0
d13	1× 培养袋	扩增培养基	400	2000	0%	0
d16 ~ d18	1× 培养袋	收获细胞				

【补液程序2】：第7天密度 < 1.5E6/mL，终体积3L

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	1× 培养袋	扩增培养基	400mL	800mL	1%	4mL
d11	1× 培养袋	扩增培养基	800mL	1600mL	0%	0mL
d13	2× 培养袋	扩增培养基	1400mL	3000mL	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 $\geq 1.5E6/mL$

1: 2 比例补液，补加 400mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆（4mL），此时总体积 600mL。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，补加 600mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆（6mL），若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。此时总体积 1200mL。

6. 第 11 天

1: 1 比例补液，补加 800mL 扩增培养基。此时总体积 2000mL。

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	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d9	1× 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d11	1× 培养袋	扩增培养基	800	2000	0%	0
d14 ~ d16	1× 培养袋	收获细胞				

【补液程序4】：第7天密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，终体积3L

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	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d9	1× 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d11	2× 培养袋	扩增培养基	1200	2400	0%	0
d13	2× 培养袋	扩增培养基	600	3000	0%	0
d16 ~ d18	2× 培养袋	收获细胞				

【特别说明】**1. 样本要求**

采集后保存时间在 24h 以内的脐血。

使用采血袋采集的血样，要求抗凝剂在 30% 以下（即含 28mL 抗凝剂时总体积 95mL 以上，含 14mL 抗凝剂时总体积 50mL 以上）。抗凝剂比例超过 30% 的，建议使用商品化血替。

2. 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，最好现采现提，保存时间越短，分离效果越好。

3. 接种密度

新鲜脐带血单个核细胞推荐接种密度为 2E6/mL，冻存脐带血单个核细胞推荐接种密度为 3E6/mL，接种密度过低或过高对最终收获的细胞数和 CIK 纯度都会有影响。

4. 试剂保存

CIK 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。

5. 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。

6. 培养终体积

最后一次补液至 2L 后，培养 2 ~ 3 天，细胞密度实现翻倍，说明细胞仍有扩增能力，此时可以继续补液至 3L。

7. 红细胞裂解液的使用

一份脐带血提取所得的单个核细胞，用 5mL 培养基重悬。① 20μL 单个核细胞悬液加入 200μL DPBS（11x 稀释）；② 取单个核细胞 11x 稀释液 100μL 加入 200μL 红细胞裂解液（货号：RS0019），此时为 33x 稀释；③ 室温孵育 5 ~ 15 分钟后计数，孵育时间不可超过 15 分钟。

33x 稀释后密度在 1E6/mL 以下，可以确保红细胞裂解完全，若密度在 1E6/mL 以上，建议将单个核细胞悬液进一步稀释后再加红细胞裂解液。

【说明书核准日期】 2025年9月1日

【版本号】 4.4.4



文件版本号：2025 -V4.4.4

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

