

Ultra-pure NK Cell
Serum-Free Culture Kit

超纯 NK 细胞无血清培养套装

(超小规模)

/ 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®

超纯NK细胞无血清培养套装使用说明书——超小规模

【适用范围】

用于外周血或脐带血体外诱导扩增 NK 细胞。

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 2.0 (rHSA)	NC0113-1	NK 细胞前期激活使用	1 瓶, 50mL/ 瓶	2~8℃
NK 细胞无血清培养基 5.0	NC0102	NK 细胞体外培养	1 瓶, 1L/ 瓶	2~8℃
超纯 NK 试剂盒 (5mL)	AN0104.3	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支, 100μL/ 支	-20℃
		YC00B: 起始培养时添加	1 支, 100μL/ 支	
		YC00C: 激活培养基添加	1 支, 50μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	1 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**: 取室温融化的 YC00C 因子以 1:1000 的比例加入免疫细胞修复培养基 2.0 (rHSA) (货号: NC0113-1) 中, 混匀备用。

2. **扩增培养基**: 每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基 5.0(货号: NC0102) 溶解, 以 1:1000 的比例添加至免疫细胞无血清培养基 5.0(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。

○ 外周血样本和脐带血样本的激活培养基使用量不同, 外周血样本使用 40mL, 脐带血样本使用 20mL。

【使用步骤-外周血样本】

1. 第 0 天

6 孔板包被: 6 孔板的一个孔中加入 2mL DPBS 和 **100μL YC00A**, 充分混匀后, 37°C 孵育 2h, 弃去上清, 并用 2mL DPBS 清洗一次, 注意不要冲刷孔板底部, 弃清洗液后备用。

单个核细胞接种: 6 孔板包被有 YC00A 的那个孔中加入**激活培养基**、**100μL 诱导因子 YC00B**、10% 比例的自体血浆 (0.4mL) 和 8E6 个单个核细胞, 总体积 4mL。外周血单个核细胞接种密度 2E6/mL。

注意: YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时, 将含有 YC00A 包被液的 6 孔板转移到 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

6 孔板中补加 8mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆 (0.4mL), 动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

3. 第 5 天

补加 28mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆 (1.4mL), 将 6 孔板中的培养基和细胞转移至 T175。此时总体积 40mL。

4. 第 7 天

若细胞密度 $\geq 1E6/mL$, 直接 1:2 补液;

若细胞密度 $< 1E6/mL$, 延迟一天 1:2 补液。

1:2 比例补液, 补加 80mL **扩增培养基**, 添加 1% 血浆 (0.8mL)。此时总体积 120mL。

注意: 第 7 天及此后补液使用扩增培养基。

5. 第 9 天

补加 180mL **扩增培养基**, 将培养基和细胞转移至 1 个 FEP-1L 细胞培养袋中。此时总体积 300mL。

注意: 友康 FEP 培养袋 (1L) 培养 300mL 体积需折叠, 使用 2/3 底面积。

6. 第 11 天

补加 300mL **扩增培养基**，此时总体积 600mL。

注意：

友康 FEP 培养袋 (1L) 培养 600mL 体积不需折叠，使用全部底面积。

7. 第 13 天

补加 440mL **扩增培养基**，此时总体积 1040mL。

8. 第 16 ~ 17 天

检测密度收获细胞。

【补液程序-外周血样本】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	6 孔板	激活培养基	4mL	4mL	10%	0.4mL
d3	6 孔板	激活培养基	8mL	12mL	5%	0.4mL
d5	T175	激活培养基	28mL	40mL	5%	1.4mL
d7	T175	扩增培养基	80mL	120mL	1%	0.8mL
d9	FEP-1L	扩增培养基	180mL	300mL	0%	0mL
d11	FEP-1L	扩增培养基	300mL	600mL	0%	0mL
d13	FEP-1L	扩增培养基	440mL	1040mL	0%	0mL
d16~17	收获细胞					

【使用步骤-脐带血样本】

1. 第 0 天

6 孔板包被：6 孔板的一个孔中加入 2mL DPBS 和 **100μL YC00A**，充分混匀后，37℃孵育 2h，弃去上清，并用 2mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷孔板底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：6 孔板包被有 YC00A 的那个孔中加入**激活培养基**、**50μL 诱导因子 YC00B**、10% 比例的自体血浆 (0.2mL) 和 8E6 个单个核细胞，总体积 2mL。脐带血单个核细胞接种密度 4E6/mL。

注意：

○ 本试剂盒中 YC00B 因子装量为 100μL，培养外周血样本初始接种 4mL 需添加 YC00B 因子 100μL，培养脐带血样本初始接种体积 2mL 则 YC00B 因子添加 50μL 即可。

○ YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 6 孔板转移到 2~8℃冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2~8℃ 冰箱中可保存 12h。

○ 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。

2. 第 3 天

6 孔板中补加 4mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (0.4mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

3. 第 5 天

补加 14mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (1.4mL)，将 6 孔板中的培养基和细胞转移至 T75。此时总体积 20mL。

4. 第 7 天

T75 瓶中补加 20mL **扩增培养基** 和 5% 的自体血浆 (1.0mL)。此时总体积 40mL。

注意：

培养外周血样本初始接种 4mL 需使用 40mL 激活培养基，培养脐带血样本初始接种体积 2mL 则激活培养基使用 20mL 即可，第 7 天及此后补液使用扩增培养基。

5. 第 9 天

补加 40mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (0.4mL)，将 T75 瓶中的细胞和培养基转入 T175 瓶。此时总体积 80mL。

注意：

友康 FEP 培养袋 (1L) 培养 240mL 体积需折叠，使用 2/3 底面积。

6. 第 11 天

T175 瓶中补加 80mL **扩增培养基**。此时总体积 160mL。

7. 第 13 天

若细胞密度 $\geq 2E6/mL$ ，直接补液；

若细胞密度 $< 2E6/mL$ ，延迟一天补液。

补加 160mL **扩增培养基**，将培养基和细胞转移至 1 个 FEP-1L 细胞培养袋中，此时总体积 320mL。

注意：

○ 友康 FEP 培养袋 (1L) 培养 320mL 体积需折叠，使用 2/3 底面积。

○ 若延迟一天仍密度 $< 2E6/mL$ ，则原 T175 瓶中补加 40mL 扩增培养基、下次补液再入袋。

8. 第 15 天

补加 320mL **扩增培养基**，此时总体积 640mL。

注意：友康 FEP 培养袋 (1L) 培养 640mL 体积不需折叠，使用全部底面积。

9. 第 17 天

补加 380mL **扩增培养基**，此时总体积 1020mL。

10. 第 20 ~ 21 天

检测密度收获细胞。

【补液程序-脐带血样本】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	6 孔板	激活培养基	2mL	2mL	10%	0.2mL
d3	6 孔板	激活培养基	4mL	6mL	10%	0.4mL
d5	T75	激活培养基	14mL	20mL	10%	1.4mL
d7	T75	扩增培养基	20mL	40mL	5%	1.0mL
d9	T175	扩增培养基	40mL	80mL	1%	0.4mL
d11	T175	扩增培养基	80mL	160mL	0%	0mL
d13	FEP-1L	扩增培养基	160mL	320mL	0%	0mL
d15	FEP-1L	扩增培养基	320mL	640mL	0%	0mL
d17	FEP-1L	扩增培养基	380mL	1020mL	0%	0mL
d20~21	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 24h 内分离单个核细胞。

2. 单个核细胞接种

外周血单个核细胞推荐接种密度为 2E6/mL，接种 4mL/ 孔，脐带血单个核细胞推荐接种密度为 4E6/mL，接种 2mL/ 孔。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 的孔板，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。

6. 脐带血血样要求

适用于运输时间 24h 以内、抗凝剂比例 $\leq 30\%$ 的脐带血样本。

抗凝剂比例不符合要求的样本不建议使用自体血浆。

7. 补液程序

第 3 天、第 5 天请严格按照说明书要求补液并添加相应比例的血浆，第 7 天后可以根据细胞状态酌情补液。

8. 不同样本的因子及激活培养基用量

因子	YC00A	YC00B	YC00C	激活培养基
外周血样本	100 μ L	100 μ L	40 μ L	40mL
脐带血样本	100 μ L	50 μ L	20 μ L	20mL

【说明书核准日期】 2025年8月20日

【版本号】 1.0.1



文件版本号：2025 -V1.0.1

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

