

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装高性能版 (3L 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

友康生物科技（北京）股份有限公司

YOCOON 友康®

NK细胞无血清培养套装高性能版使用说明书——3L培养体系

【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】

3L 培养体系套装：适用于 40 ~ 50mL 外周血或脐血的样本量，使用 3L 培养基

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	产品货号
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	1 瓶, 1L/ 瓶	2-8℃	NC0102
NK 细胞诱导因子试剂盒 (1L 培养体系)	YC00A: 起始培养时包被 培养瓶使用	1 支, 250μL/ 支	-20℃	AN0104-1
	YC00B: 起始培养时添加	1 支, 250μL/ 支		
	YC00C: 激活培养基添加	1 支, 100μL/ 支		
	YC005: 扩增培养基添加	1 支		
	庆大霉素: 添加至培养基 使用, 100μL/1L	1 支, 300μL/ 支		

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	产品货号
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	2 瓶, 1L/ 瓶	2-8℃	NC0102
NK 细胞诱导因子试剂盒 (2L 培养体系)	YC00A: 起始培养时包被 培养瓶使用	1 支, 500μL/ 支	-20℃	AN0104
	YC00B: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 支		
	YC00C: 激活培养基添加	1 支, 200μL/ 支		
	YC005: 扩增培养基添加	2 支		
	庆大霉素: 添加至培养基 使用, 100μL/1L	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°C，禁止将整瓶培养基放置 37°C 反复预温。

【单个核细胞分离：以外周血为例】**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°C。

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°C 灭活 30min。

(2) 900g 离心 10min，取上清，置于 -20°C，15min，再次 900g 离心 10min，取上清，置于 4°C 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（300mL）：将融化的 YC00C（300μL）加入 300mL NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。

2. 扩增培养基（2.7L）：每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解，以 1：1000 的比例添加至 NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。

注意：提取 PBMC、第 0 天接种和第 3/5 天补液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**

T25 培养瓶包被：3 个 TC 处理的 T25 瓶中分别加入 5mL PBS 和 250μL YC00A，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 5mL PBS 清洗一次，注意不要冲刷培养瓶底部，弃清洗液后备用。

PBMC 接种：每个 T25 瓶中分别加入激活培养基、250μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1mL）和种子细胞，总体积 10mL，外周血单个核细胞细胞密度 $1.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ /mL，脐带血单个核细胞密度 3×10^6 /mL。

2. 第 3 天

每个 T25 瓶中分别补加 19mL 激活培养基和 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 210mL 激活培养基和 5% 的自体血浆（10.5mL），将 3 个 T25 瓶中的培养基和细胞混合后平均转入两个 T175 瓶。

4. 第 7 天

取样计数，密度在 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 以上时，1:2 补液，补加 600mL 扩增培养基；密度在 $1 \sim 1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 时，1:1 补液，补加 300mL 扩增培养基；将两个 T175 瓶中的培养基和细胞转入两个培养袋中；添加 1% 血浆，若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。

5. 第 9 天

1:1 补液，补加扩增培养基至细胞培养袋中。

6. 第 11 天

1:1 补液，补加扩增培养基至细胞培养袋中。

7. 第 13 天

将剩余的扩增培养基添加至细胞培养袋中。

8. 第 14-16 天

检测密度收获细胞。

【参考补液程序】

时间	培养耗材	培养基	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	3×T25	激活培养基	30mL	30mL	10%	3mL
d3	3×T25	激活培养基	60mL	90mL	5%	3mL
d5	2×T175	激活培养基	210mL	300mL	5%	10.5mL
d7	2×2L 培养袋	扩增培养基	300mL 或 600mL	600mL 或 900mL	1%	3mL 或 6mL
d9	2×2L 培养袋	扩增培养基	600mL 或 900mL	1200mL 或 1800mL	0%	0mL
d11	2×2L 培养袋	扩增培养基	1200mL	2400mL 或 3000mL	0%	0mL
d13	2×2L 培养袋	扩增培养基	600mL	3000mL	0%	0mL

【特别说明】

1. 分离 PBMC

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 PBMC。

2. 接种密度

外周血样本推荐接种密度为 $1.5E6 \sim 2E6/mL$ ，脐血样本推荐接种密度为 $3E6/mL$ ，接种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。

【说明书核准日期】 2023年02月09日

【版本号】 4.1.5



文件版本号：2023 -V4.1.5

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康生物科技（北京）股份有限公司

地址：北京市海淀区丰贤中路7号3号楼

电话：010-58711655 400-001-1266

网站：www.yocon.cn

