

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装标准版

(24 孔板培养体系)

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标准版使用说明书——24孔板培养体系

【适用范围】

用于外周血体外诱导扩增 NK 细胞

【产品组成】

24 孔板培养体系：适用起始接种 1mL 的培养体系，使用 100mL 培养基

产品名称	产品用途	产品用量	保存温度	产品货号
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	100mL	2-8℃	NC0102
NK 细胞诱导因子试剂盒 (24 孔板培养体系)	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	25μL	-20℃	AN0107 或 AN0107-1
	YC00B: 起始培养时添加	25μL		
	YC00C: 培养基 B 添加	75μL		
	YC005: 添加至培养基使用	0.1 支		
	庆大霉素：添加至培养基使用	10μL		

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：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℃。

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。（离心机调节转速 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。（离心机转速均调节至 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（100mL）：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。

2. 配制培养基 B（50mL）：取 50mL 培养基 A，将融化的 YC00C（75μL）加入 50mL 培养基 A 中，混匀备用。

注意：第 0 天接种时用培养基 A，后续补液时，先将培养基 B 用完再用培养基 A。

【使用步骤】

1. 第 0 天

24 孔板包被：TC 处理的 24 孔板其中一个孔中加入 0.5mL PBS 和 25μL YC00A，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 0.5mL PBS 清洗一次，注意不要冲刷孔板底部，弃清洗液后备用。

PBMC 接种：包被有 A 因子的孔中加入培养基 A、25μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（0.1mL）和种子细胞，总体积 1mL，外周血单个核细胞细胞密度 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

注意：24 孔板体系不适用于脐血样本的培养。

2. 第 3 天

补加 2mL 培养基 B 和 5% 的自体血浆（0.1mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

3. 第 5 天

补加 6mL 培养基 B 和 5% 的自体血浆（0.3mL），将 24 孔板中的培养基和细胞转移至 T25。

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 18mL 培养基 B，密度在 $1 \sim 1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 时，1:1 补液，补加 9mL 培养基 B；原瓶培养，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，补加剩余培养基 B 和培养基 A，将细胞转移至 T175 瓶中。

6. 第 11 天

1:1 补液，补加培养基 A 至 T175 中。

7. 第 13 天

将剩余的培养基 A 添加至 T175 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	24 孔板	培养基 A	1mL	1mL	10%	0.1mL
d3	24 孔板	培养基 B	2mL	3mL	5%	0.1mL
d5	T25	培养基 B	6mL	9mL	5%	0.3mL
d7	T25	培养基 B	9mL 或 18mL	18mL 或 27mL	1%	0.09mL 或 0.18mL
d9	T175	培养基 B	18mL 或 27mL	36mL 或 54mL	0%	0mL
d11	T175	培养基 A	36mL 或 46mL	72mL 或 100mL	0%	0mL
d13	T175	培养基 A	28mL	100mL	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 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ，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09月07日

【版本号】 3.1.4



文件版本号：2023 -V3.1.4

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

