

Automatic Immune Cell
Culture Workstation

全自动免疫细胞培养工作站接种操作

(脐血操作流程)

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



YOCON

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®

全自动免疫细胞培养工作站接种操作说明书（脐血操作流程）

【适用范围】

用于脐血单个核细胞体外诱导扩增 NK 细胞。

【产品组成】

1. 试剂

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（袋装）	NC0111.B-100mL	NK 细胞前期激活	1 袋, 100mL/ 袋	2 ~ 8℃
免疫细胞修复培养基（无酚红）	NC0111	NK 细胞前期激活	1 瓶, 200mL/ 瓶	2 ~ 8℃
免疫细胞无血清培养基 （重组人白、无酚红）袋装	NC0112.B04-1L	NK 细胞体外培养	2 袋, 1L/ 袋	2 ~ 8℃
全自动工作站专用 NK 试剂盒 （脐血专用）	AAN0104-2	YC00A: 用于包被袋的包被	1 支, 500μL/ 支	-20℃
		YC00B: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 支	
		YC00C: 激活培养基添加	1 支, 250μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	2 支	
		庆大霉素: 添加至培养基使用	1 支, 300μL/ 支	

2. 耗材

A 系列 FEP 全封闭管路系统（脐带血专用）（FP0005）由三部分组成：FP0003-1、FP0005-2、FP0003-3。

产品名称	产品货号
A 系列 FEP 全封闭管路系统（脐带血专用）	FP0005
A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-1	FP0003-1
A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2(脐血专用)	FP0005-2
A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-3	FP0003-3

【单个核细胞分离】

1. 试剂准备

分离单个核细胞前，应将脐血、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) 将脐血平均分装到 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) 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℃ 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. 配制激活培养基（100mL/ 袋，共 1 袋）

(1) 取一袋免疫细胞修复培养基（袋装）（货号：NC0111.B-100mL）置于超净台，备用。

(2) 取 1 支无菌的 50mL 离心管，加入灭活血浆 10mL（**血浆提取步骤所得灭活血浆需预留出 3mL 用于接种、再预留出 10mL 加入第 1 袋扩增培养基**），再加入 100μL 室温融化的 YC00C 因子。

(3) 用 50mL 注射器将上述灭活血浆与 YC00C 混合物注入免疫细胞修复培养基（袋装）（货号：NC0111.B-100mL），抽吸两次确保血浆和 YC00C 全部加入免疫细胞修复培养基（袋装）（货号：NC0111.B-100mL），轻轻晃动混匀。

(4) 确认免疫细胞修复培养基（袋装）（货号：NC0111.B-100mL）所有夹管阀关闭，备用。

2. 配制扩增培养基（1L/ 袋，共 2 袋）

(1) 取两袋免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）袋装（货号：NC0112.B04-1L）置于超净台，备用。

(2) 取 2 支 YC005 因子，去除西林瓶胶塞，分别加入 1mL DPBS 或免疫细胞修复培养基（无酚红）（货号：NC0111），轻轻吹打 5 ~ 10 次使 YC005 因子完全溶解，得到 YC005 因子溶液共 2mL。

(3) 用 10mL 注射器依次将 1mL YC005 因子溶液注入一袋免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）袋装（货号：NC0112.B04-1L），抽吸两次确保 YC005 因子溶液全部加入免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）袋装（货号：NC0112.B04-1L），轻轻晃动混匀。

(4) 用注射器将 10~20mL 灭活血浆注入免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）（第 1 袋、长管路连接），抽吸两次确保灭活血浆全部加入免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）（第 1 袋、长管路连接），轻轻晃动混匀，第 2 袋扩增培养基（短管路连接）不需要添加血浆。

(5) 确认免疫细胞无血清培养基（重组人白、无酚红）袋装（货号：NC0112.B04-1L）所有夹管阀关闭，备用。

3. 配制包被液 (20mL)

取 1 支无菌的 50mL 离心管, 加入 DPBS 19.5mL 和室温融化的 YC00A 因子 500μL, 拧紧盖子、轻轻颠倒混匀 3 ~ 5 次, 备用。

4. 配制种子细胞

(1) 1 支无菌的 50mL 离心管, 加入 30mL 免疫细胞修复培养基 (无酚红) (货号: NC0111), 37°C 培养箱中或 37°C 水浴锅中预温至 37°C。

(2) 根据细胞计数结果计算 UCBMC 种子细胞所需体积 (取 9E7 个单个核细胞)。

(3) 取 1 支无菌的 50mL 离心管, 加入 UCBMC 种子细胞、预温好的免疫细胞修复培养基 (无酚红) (货号: NC0111)、室温融化的 YC00B 因子 500μL、室温融化的 YC00C 因子 30μL 和血浆 3mL, 总体积 30mL。例如: UCBMC 种子细胞 2mL, 则免疫细胞修复培养基加入 24.5mL。配制好后不必吹吸混匀, 备用。

注意: 1. 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. 上述激活培养基、扩增培养基、包被液配制完成后, 在使用前需置于 2~8°C 冰箱保存; 种子细胞需置于 37°C 培养箱中保存。

【使用步骤】

1. 连接管路

(1) 取出配制好的激活培养基 (100mL/ 袋, 共 1 袋) 和扩增培养基 (1L/ 袋, 共 2 袋), 按照标识将 3 袋培养基依次挂在培养基支架上, 贴有蓝色和青色标识的管路朝外、固定到支架的凹槽里。

注意: 确保 3 袋培养基所有夹管阀处于关闭状态。

(2) 在超净台中取出无菌的 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-1 (含长管路), 按照不同颜色标识与上述 3 袋培养基进行连接, 共 3 个接头, 即蓝色标识的连接管应与蓝色标识的培养基连接, 青色标识的连接管应与青色标识的培养基连接。

(3) 在超净台中取出无菌的 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2 (脐血专用) (含接种袋、包被袋、废液袋), 按照不同颜色标识将其与 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-1 (含长管路) 进行连接, 共 1 个接头, 即两个红色标识的连接管相互连接。

(4) 在超净台中取出 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-3 (含 2L 培养袋), 按照颜色标识将其与 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2 (脐血专用) (含接种袋、包被袋、废液袋) 进行连接, 共 1 个接头, 两个黄色标识的连接管相互连接。

(5) 根据标识提示将 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2 (脐血专用) (含接种袋、包被袋、废液袋) 中包被袋的两个出口和接种袋的一个出口用片夹夹住, 共 3 处需要夹住, 即 3 个紫色标识处。

注意: 为避免下一步操作包被液和种子细胞误流入别的袋子, 请务必保证三个出口已经夹紧。

2. 包被与接种

(1) 打开 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2 (脐血专用) 中包被袋入口管路的盖子, 取 1 个无菌的 50mL 注射器去除针头和活塞并与包被袋入口管路连接, 将配制好的包被液 (20mL) 倒入注射器使之进入包被袋, 轻轻挤压包被袋排出包被袋内气体, 使包被液完全覆盖包被袋底部, 去除注射器、拧紧包被袋入口管路的盖子。

(2) 打开 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2 (脐血专用) 中接种袋入口管路的盖子, 取 1 个无菌的 50mL 注射器去除针头和活塞并与接种袋入口管路连接, 将配制好的种子细胞 (30mL) 倒入注射器使之进入接种袋 (种子细胞若长时间放置, 倒之前需拧紧盖子轻轻上下颠倒混匀), 去除注射器、接种袋内自然保留空气, 拧紧接种袋入口管路的盖子。

3. 装机培养

(1) 将连接好的三袋培养基（含 2 袋 1L 扩增培养基和 1 袋激活培养基）、A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-1（含长管路）、A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2（脐血专用）（含接种袋、包被袋、废液袋）及 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-3（含 2L 培养袋）转移至全自动免疫细胞培养工作站。

(2) 将三袋培养基放入全自动免疫细胞培养工作站试剂保存区，贴有蓝色和青色标识的**管路朝外**。

(3) A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-1（含长管路）与三袋培养基连接的三条管路分别经**三个夹管阀夹紧**，根据全自动免疫细胞培养工作站上的提示卡入各凹槽，三条管路汇总为一条的管路经蠕动泵后缠绕**培养基加热模块**，最后进入二氧化碳培养箱。

(4) 将 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-2（脐血专用）（含接种袋、包被袋、废液袋）置于上层小摆台，①包被袋固定在小摆台中间，与 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-3（含 2L 培养袋）连接的出口管路经**夹管阀**夹紧，②接种袋悬挂于前方支架，接种袋出口管路经**夹管阀**夹紧，③废液袋入口管路卡入蠕动泵、废液袋自然悬挂于培养箱内部后方。

(5) 将 A 系列 FEP 全封闭管路系统 3-3（含 2L 培养袋）置于下层大摆台，左侧密度测量接口插入密度测量模块、2L 培养袋平铺于大摆台上，盖上防护罩并固定。

(6) 确定 5 个夹管阀处于关闭状态且相应管路均完全卡入，打开包被袋两个出口**片夹**（2 个），打开接种袋出口**片夹**（1 个），打开三袋培养基出口**管路夹**（3 个）。

(7) 装机完成，根据提示运行全自动免疫细胞培养工作站开始 NK 细胞的培养。

特别注意：（1）悬挂种子细胞袋时，注意悬挂的角度，确保出口处无弯折、液体可畅通无阻；（2）在 2h 包被程序结束前 10 分钟内（此时细胞未流进包被袋），需轻轻拍打震荡细胞袋中悬液使沉降在底部的细胞充分混匀至悬液内，防止后续培养过程中细胞在细胞袋中有残留量过多导致激活失败。

【特别说明】

1. 分离 UCBMC

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 UCBMC。

2. 接种密度

脐带血单个核细胞推荐接种密度为 $3E6 \sim 3.5E6 / mL$ ，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，应将单个核细胞保存于 37℃ 培养箱，避免受凉。

5、提前拍打震荡细胞袋

应特别注意，在 2h 包被程序结束前 10 分钟内（此时细胞未流进包被袋），需轻轻拍打细胞袋中悬液使细胞充分混匀，防止后续培养过程中细胞在细胞袋中有残留量过多导致激活失败。

【说明书核准日期】 2025年4月16日

【版本号】 1.1.2



文件版本号：2025 -V1.1.2

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

