

NK Cell Serum-free
Culture Kit 5.0

NK 细胞无血清培养套装标准版 (1L 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

YOCON 友康®

NK细胞无血清培养套装标准版使用说明书——1L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】

1L 培养体系套装：适用于 15 ~ 20mL 外周血或脐血的样本量，使用 1L 培养基

产品名称	产品用途	产品用量	保存温度	保存期限
NK 细胞无血清培养基	NK 细胞体外培养	1 瓶, 1L/ 瓶	2-8℃	12 个月
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℃	12 个月
	YC00B: 起始培养时添加	1 支, 250μL/ 支		
	YC00C: 培养基 B 添加	1 支, 750μL/ 支		
	YC005: 添加至培养基使 用, 每支 /1L	1 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℃，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. 配制培养基 A（1L）：添加 YC005，每支用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解后添加至 1L NK 细胞无血清培养基中，混匀备用。

2. 配制培养基 B（500mL）：从培养基 A 中取出 500mL，添加 1 支诱导因子 YC00C，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—外周血】

1. 第 0 天

T25 培养瓶包被：T25 瓶中加入 5mL PBS 和 250uL 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：T25 瓶中分别加入培养基 A、250uL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1mL）和种子细胞，总体积 10mL，细胞密度 1.5E6/mL。

2. 第 3 天

T25 瓶中补加 19mL 培养基 B 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 60mL 培养基 B 和 5% 自体血浆（1mL），将 T25 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 瓶。

4. 第 7 天

取样计数，密度在 1.5E6/mL 以上时，1:2 补液，补加 180mL 培养基 B；分两个 T175 瓶培养；密度在 1~1.5E6/mL 时，1:1 补液，补加 90mL 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，补加剩余的培养基 B 和培养基 A，将细胞转移至培养袋中。若 T175 瓶底部剩余大量单个贴壁细胞，不用过度吹打，添加 50mL 培养基 A 继续培养，后续转移到细胞培养袋中。

6. 第 11 天

1:1 补液，补加培养基 A。

7. 第 13 天

将剩余的培养基 A 添加至细胞培养袋中。

8. 第 14-16 天

检测密度收获细胞。

【使用步骤—脐血】

1. 第 0 天

T25 培养瓶包被：T25 瓶中加入 5mL PBS 和 250uL 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：T25 瓶中分别加入培养基 A、250uL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1mL）和种子细胞，总体积 10mL，细胞密度 2~3E6/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。正常提取单个核细胞的情况下，15mL 纯血（除去抗凝剂）接种 10mL 体系，密度约为 2-3E6/mL。

2. 第 3 天

T25 瓶中补加 19mL 培养基 B 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 60mL 培养基 B 和 5% 自体血浆（1mL），将 T25 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 瓶。若 T25 瓶底部剩余大量单个贴壁细胞，不用过度吹打，添加 5mL 培养基 A 继续培养，后续转移到细胞培养袋中。

4. 第 7 天

取样计数，密度在 1.5E6/mL 以上时，1:2 补液，补加 180mL 培养基 B；分两个 T175 瓶培养；密度在 1~1.5E6/mL 时，1:1 补液，补加 90mL 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，补加剩余的培养基 B 和培养基 A，将细胞转移至培养袋中。若 T175 瓶底部剩余大量单个贴壁细胞，不用过度吹打，添加 50mL 培养基 A 继续培养，后续转移到细胞培养袋中。

6. 第 11 天

1:1 补液，补加培养基 A 至细胞培养袋中。

7. 第 13 天

将剩余的培养基 A 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	T25	培养基 A	10mL	10mL	10%	1mL
d3	T25	培养基 B	20mL	30mL	5%	1mL
d5	T175	培养基 B	60mL	90mL	5%	3mL
d7	T175	培养基 B	90mL 或 180mL	180mL 或 270mL	1%	0.9mL 或 1.8mL
d9	培养袋	培养基 B	180mL 或 270mL	360mL 或 540mL	0%	0mL
d11	培养袋	培养基 A	360mL 或 460mL	720mL 或 1000mL	0%	0mL
d13	培养袋	培养基 A	280mL	1000mL	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/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。

【说明书核准日期】 2022年09月20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

