

## 【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】

2L培养体系套装：适用于20-30mL外周血或脐血的样本量，使用2L培养基。

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	保存期限
NK细胞无血清培养基	NK细胞体外培养	1000mL/瓶x2	2-8℃	12个月
NK细胞 诱导因子试剂盒 (2L体系)	YC00A:起始培养时包被培养瓶使用	1支, 500uL/支	-20℃	12个月
	YC00B:起始培养时添加	1支, 500uL/支		
	YC00C:培养基B添加	1支, 1.5mL/支		
	YC005:添加至培养基使用, 每支/1L	2支		
	庆大霉素:添加至培养基使用, 100uL/1L	1支, 300uL/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50mL离心管中，于室温下700g离心15min（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) 然后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节至最高即可）

## 3. 单个核细胞的分离

(1) 取上一步血浆提取中得到的下层红色液体用生理盐水1:1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700g离心10min。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）

## 【试剂准备】

1. 配置培养基A（1瓶）：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. 配置培养基B（1瓶）：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，将诱导因子YC00C溶解后添加至1L培养基中，混匀备用。

## 【使用步骤—外周血】

## 1. 第0天

T25培养瓶包被:两个T25瓶中分别加入5mL PBS和250uL YC00A，充分混匀后，37℃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

每个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120mL培养基B和5%的自体血浆（6mL），将2个T25瓶中的培养基和细胞转移至T175。

## 4. 第7天

取样计数，密度在1.5E6/mL以上时，1:2补液，补加360mL培养基B；密度在1-1.5E6/mL时，1:1补液，补加180mL培养基B；添加1%血浆，若血浆不足1%则将剩余血浆全部添加进去。将培养基和细胞转移至细胞培养袋中。

## 5. 第9天

1:1补液，补加剩余的培养基B和培养基A至细胞培养袋中。

## 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:两个T25瓶中分别加入5mL PBS和250uL YC00A, 充分混匀后, 37℃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。

CB-MNC接种: 每个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

每个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120mL培养基B和5%的自体血浆 (6mL), 将2个T25瓶中的培养基和细胞转移至T175。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360mL培养基B; 密度在 $1-1.5E6/mL$ 时, 1:1补液, 补加180mL培养基B; 添加1%血浆, 若血浆不足1%则将剩余血浆全部添加进去。将培养基和细胞转移至细胞培养袋中。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。

## 5. 第9天

1:1补液, 补加剩余的培养基B和培养基A至细胞培养袋中。

## 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】

参考补液程序					
时间	培养耗材	补液体积	总体积	血浆比例	血浆量
d0	2*T25	20	20	10%	2
d3	2*T25	40	60	5%	2
d5	T175	120	180	5%	6
d7	培养袋	180/360	360/540	1%	1.8/3.6
d9	培养袋	360/540	720/1080	0%	0
d11	培养袋	720/920	1440/2000	0%	0
d13	培养袋	560	2000	0%	0

## 【特别说明】

## 1. 分离PBMC

分离PBMC应特别注意两点, 一是分离PBMC前外周血及各试剂应预温至 $20^{\circ}C$ , 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 $2-3E6/mL$ , 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

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A座三层、B座一层

网址: www.yocon.cn 电话: 010-58711655



ISO9001、ISO13485质量体系认证企业 国家高新技术企业