

【适用范围】

用于外周血或脐带血体外诱导扩增CIK细胞

【产品组成】

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

产品名称	产品用途	产品规格	保存温度	产品货号
免疫细胞无血清培养基	CIK细胞体外培养	1000mL/瓶x2	2-8℃	NC0101
CIK诱导扩增试剂盒 2.0标准版（2L体系）	YC001: 起始培养时包被培养瓶使用	1支, 500uL/支	-20℃	AN0108
	YC002:起始培养时添加	1支, 500uL/支		
	YC005:完全培养基添加	2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。

【单个核细胞的分离】

1.试剂准备

分离单个核细胞前，应将血样、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)将血样平均分装到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)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℃的完全培养基重悬细胞，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】

完全培养基配制：每支YC005用1mL免疫细胞无血清培养基溶解，以1:1000的比例添加至免疫细胞无血清培养基中，混匀备用。

【使用步骤】

1.第0天

T25培养瓶包被：两个T25瓶中分别加入5mL PBS和250uL YC001，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瓶中分别加入完全培养基、250uL诱导因子YC002、10%比例的自体血浆（1mL）和种子细胞，总体积10mL，细胞密度2E6/mL。

注意：脐血样本不需要包被T25瓶，接种时每个T25直接添加250uL诱导因子YC001。

2.第3天

每个T25瓶中补加19mL完全培养基和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120mL完全培养基和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

补加220mL完全培养基，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

补加800mL完全培养基至细胞培养袋中。

6.第11天

补加800mL完全培养基至细胞培养袋中。

7.第14-16天检测密度收获细胞。

【参考补液程序】

时间	培养耗材	补液体积ml	总体积ml	血浆比例	血浆量ml
d0	2*T25	20	20	10%	2
d3	2*T25	40	60	5%	2
d5	T175	120	180	5%	6
d7	培养袋	220	400	1%	2.2
d9	培养袋	800	1200	0%	0
d11	培养袋	800	2000	0%	0

【特别说明】

1.分离单个核细胞

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内分离单个核细胞。

2.接种密度

样本推荐接种密度为2E6/mL，接种过低或过高对最终收获的细胞数和CIK纯度都会有影响。

【说明书核准日期】2023年4月28日

【版本号】1.1.2

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

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业、国家高新技术企业

电话：010-58711655 网址：www.yocon.cn

