

CIK Cells Serum-free Medium

CIK 细胞无血清培养套装 (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®

CIK细胞无血清培养套装使用说明书——1L培养体系

【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】

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

产品名称	产品用途	产品用量	保存温度	产品货号
免疫细胞无血清培养基	CIK 细胞体外培养	1 瓶, 1L/ 瓶	2-8°C	NC0101
CIK 细胞诱导因子试剂盒 (外周血 1L 培养体系)	YC001: 起始培养时包被 培养瓶使用	1 支, 250µL/ 支	-20°C	AN0108-1
	YC002: 起始培养时添加	1 支, 250µL/ 支		
	YC005: 完全培养基添加	1 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°C，禁止将整瓶培养基放置 37°C 反复预温。

【外周血PBMC分离】

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°C。

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°C 灭活 30min。

(2) 900g 离心 10min，取上清，置于 -20°C，15min，再次 900g 离心 10min，取上清，置于 4°C 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: 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 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：一个 TC 处理的 T25 瓶中加入 5mL PBS 和 250uL YC001，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：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。

2. 第 3 天

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。

3. 第 5 天

补加 60mL 完全培养基和 5% 自体血浆（3mL），将 T25 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 瓶。

4. 第 7 天

补加 110mL 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 400mL 完全培养基至细胞培养袋中。

6. 第 11 天

补加 400mL 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	总体积	血浆比例	血浆量
d0	T25	10mL	10mL	10%	1mL
d3	T25	20mL	30mL	5%	1mL
d5	T175	60mL	90mL	5%	3mL
d7	培养袋	110mL	200mL	1%	1.1mL
d9	培养袋	400mL	600mL	0%	0mL
d11	培养袋	400mL	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°C，室温离心；二是血液采集后应在 8h 内分离 PBMC。

2. 接种密度

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07月18日

【版本号】 1.1.2

YOCON 友康[®]

文件版本号：2023 -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

电话：010-58711655 400-001-1266

网站：www.yocon.cn

