Ultra-pure NK Cell
Serum-Free Culture Kit

NK 细胞无血清培养套装超纯系列

（6L 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

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCON 友康®

NK细胞无血清培养套装使用说明书——超纯系列6L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】

适用于 60mL 外周血或脐血的样本量，使用 6L 培养基

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 2.0（rHSA）	NC0113-3	NK 细胞前期激活使用	1 瓶，200mL/ 瓶	2~8℃
NK 细胞无血清培养基	NC0102	NK 细胞体外培养	6 瓶，1L/ 瓶	2~8℃
超纯 NK 试剂盒 (60mL)	AN0104.5	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支，1mL/ 支	-20℃
		YC00B: 起始培养时添加	1 支，500μL/ 支	
		YC00C: 激活培养基添加	1 支，200μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	3 支	
		庆大霉素：添加至培养基使用	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】

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℃ 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. 激活培养基（200mL）：将一支室温融化的 YC00C（200μL）加入 200mL 免疫细胞修复培养基 2.0（rHSA）（货号：NC0113-3）中，混匀备用。

2. 扩增培养基（6L）：每支 YC005 用 2mL NK 细胞无血清培养基（货号：NC0102）溶解，以 1：1000 的比例添加至 NK 细胞无血清培养基 (货号：NC0102) 中，混匀备用。

注意：前 5 天必须使用激活培养基，不可使用扩增培养基。

【使用步骤一】

快补液程序，培养周期短，19 天左右收获细胞。

适用于质量较好的样本，如保存时长 8h 以内的外周血、保存时长 8h 以内且抗凝剂比例 20% 以内的脐带血。

1. 第 0 天

T75 培养瓶包被: 两个 TC 处理的 T75 瓶中分别加入 10mL DPBS 和 500μL YC00A,充分混匀后,37℃孵育 2h,弃去上清，并用 10mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷培养瓶底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：每个 T75 瓶中分别加入**激活培养基**、250μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1.5mL）和 6E7 个单个核细胞，终体积 15mL。接种两个 T75 瓶，每个 T75 瓶接种 15mL，总体积 30mL，接种单个核细胞总数 1.2E8。

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，应使用红细胞裂解液将红细胞裂解后再计数。

● YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 T75 瓶转移到 2 ~ 8℃冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8℃ 冰箱中可保存 12h。

2. 第 3 天

每个 T75 瓶中补加 30mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆 (1.5mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时，有两个 T75 瓶，每个 T75 瓶中体积 45mL，总体积 90mL。

3. 第 5 天

将 T75 瓶中的细胞转移至 T175，再补加 55mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆 (2.75mL)。

此时，有两个 T175 瓶，每个 T175 瓶中体积 100mL，总体积 200mL。

4. 第 7 天

取样计数，确定细胞数是否足以入袋：

①若细胞密度≥ 2E6/mL，直接 1:2 补液。

②若细胞密度＜ 2E6/mL，延迟一天 1:2 补液。

1：2 比例补液，补加 400mL **扩增培养基**，添加 1% 血浆（4mL）。将培养基和细胞转移至 1 个细胞培养袋中。此时，有一个 FEP 培养袋，总体积 600mL。

注意：

- 脐带血样本培养至第 7 天仍有很多红细胞，使用红细胞裂解液将红细胞裂解后再计数。
- 友康 FEP 培养袋 (2L) 培养 4E8 个细胞需折叠，使用 1/2 底面积，确保每平方厘米有足够的细胞数。

5. 第 9 天

培养袋中补加 600mL **扩增培养基**， 添加 1% 血浆（6mL）。 此时，有一个 FEP 培养袋，总体积 1200mL。

6. 第 11 天

取样计数，确定细胞数是否足以入袋：

①若细胞密度≥ 2E6/mL，直接 1：1 补液、分袋。

②若细胞密度＜ 2E6/mL，延迟一天 1：1 补液、分袋。

1：1 比例补液，将 FEP 培养袋中的细胞取出 600mL 转移至另一个 FEP 培养袋中，两个 FEP 培养袋再分别补加 600mL **扩增培养基**和 1% 比例血浆，若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。此时，有两个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 1200mL，总体积 2400mL。

7. 第 13 天

将两个 FEP 培养袋中的细胞各取出 400mL 合并为 800mL 转移至第 3 个 FEP 培养袋中，再向三个 FEP 培养袋分别补加 800mL **扩增培养基**。此时，有三个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 1600mL，总体积 4800mL。

8. 第 16 天 （间隔 3 天）

每个 FEP 培养袋补加 466mL 扩增培养基。此时，有三个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 2066mL，总体积 6200mL。

9. 第 19 ~ 20 天

检测密度收获细胞。

【补液程序1】

时间	培养耗材	培养基	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	2xT75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	2xT75	激活培养基	60	90	5%	3
d5	2xT175	激活培养基	110	200	5%	5.5
d7	1x 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d9	1x 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d11	2x 培养袋	扩增培养基	1200	2400	1%	12
d13	3x 培养袋	扩增培养基	2400	4800	0%	0
d16	3x 培养袋	扩增培养基	1400	6200	0%	0
d19 ~ d20	收获细胞	收获细胞				

【使用步骤二】

慢补液程序，培养结果稳定，成功率高，24 天左右收获细胞。

适用于质量较差的样本，比如冻存效果不佳的单个核细胞，保存时长 8h 以上的血样，抗凝剂比例 20% 以上的脐带血。

1. 第 0 天

T75 培养瓶包被：两个 TC 处理的 T75 瓶中分别加入 10mL DPBS 和 500μL YC00A，充分混匀后，37℃孵育 2h，弃去上清，并用 10mL DPBS 清洗一次，注意不要冲刷培养瓶底部，弃清洗液后备用。

单个核细胞接种：每个 T75 瓶中分别加入**激活培养基**、250μL 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1.5mL）和 6E7 个单个核细胞，终体积 15mL。接种两个 T75 瓶，每个 T75 瓶接种 15mL，总体积 30mL，接种单个核细胞总数 1.2E8。

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，应使用红细胞裂解液将红细胞裂解后再计数。

● YC00A 包被 2h 仍无法接种细胞时，将含有 YC00A 包被液的 T75 瓶转移到 2 ~ 8℃冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8℃ 冰箱中可保存 12h。

2. 第 3 天

每个 T75 瓶中补加 15mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (1.5mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时，有两个 T75 瓶，每个 T75 瓶中体积 30mL，总体积 60mL。

3. 第 5 天

每个 T75 瓶中补加 30mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (3mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时，有两个 T75 瓶，每个 T75 瓶中体积 60mL，总体积 120mL。

4. 第 7 天

将 T75 瓶中的细胞转移至 T175，再补加 90mL **扩增培养基**和 5% 血浆（4.5mL）。

此时，有两个 T175 瓶，每个 T175 瓶中体积 150mL，总体积 300mL。

5. 第 9 天

取样计数，确定细胞数是否足以入袋：

①若细胞密度≥ 2E6/mL，直接 1:1 补液。

②若细胞密度＜ 2E6/mL，延迟一天 1:1 补液。

1：1 比例补液，补加 300mL **扩增培养基**，添加 1% 血浆（3mL）。将培养基和细胞转移至 1 个细胞培养袋中。此时，有一个 FEP 培养袋，总体积 600mL。

6. 第 11 天

培养袋中补加 600mL **扩增培养基**。 如有血浆，可继续添加 1% 血浆（6mL）。此时，有一个 FEP 培养袋，总体积 1200mL。

7. 第 13 天

取样计数，确定细胞数是否足以分袋：

①若细胞密度≥ 2E6/mL，直接 1：1 补液、分袋。

②若细胞密度＜ 2E6，延迟一天 1：1 补液、分袋。

1：1 比例补液，将 FEP 培养袋中的细胞取出 600mL 转移至另一个 FEP 培养袋中，两个 FEP 培养袋再分别补加 600mL **扩增培养基**。此时，有两个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 1200mL，总体积 2400mL。

8. 第 16 天 （间隔 3 天）

每个 FEP 培养袋补加 600mL **扩增培养基**。此时，有两个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 1800mL，总体积 3600mL。

9. 第 19 天（间隔 3 天）

将两个 FEP 培养袋中的细胞各取出 600mL 合并为 1200mL 转移至第 3 个 FEP 培养袋中，再向三个 FEP 培养袋分别补加 600mL **扩增培养基**。此时，有三个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 1800mL，总体积 5400mL。

10. 第 21 天

每个 FEP 培养袋补加 240mL **扩增培养基**。此时，有三个 FEP 培养袋，每个 FEP 培养袋中体积 2040mL，总体积 6120mL。

11. 第 24 ~ 25 天

检测密度收获细胞。

【补液程序2】

时间	培养耗材	培养基	补液体积 (mL)	总体积 (mL)	血浆比例	血浆量 (mL)
d0	2xT75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	2xT75	激活培养基	30	60	10%	3
d5	2xT75	激活培养基	60	120	10%	6
d7	2xT175	扩增培养基	180	300	5%	9
d9	1x 培养袋	扩增培养基	300	600	1%	3
d11	1x 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d13	2x 培养袋	扩增培养基	1200	2400	0%	0
d16	2x 培养袋	扩增培养基	1200	3600	0%	0
d19	3x 培养袋	扩增培养基	1800	5400	0%	0
d21	3x 培养袋	扩增培养基	720	6120	0%	0
d24 ~ d25	收获细胞	收获细胞				

【特别说明】

1. 样本要求

采集后保存时间在 24h 以内的脐血或外周血。

使用采血袋采集的血样，要求抗凝剂在 30% 以下 (即含 28mL 抗凝剂时总体积 95mL 以上，含 14mL 抗凝剂时总体积 50mL 以上)，抗凝剂比例越低，培养效果越好。抗凝剂比例超过 30% 的，建议使用商品化血替。

2. 分离 PBMC

分离单个核细胞应特别注意两点，一是分离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 24h 内分离单个核细胞，最好现采现提，保存时间越短，分离效果越好。

3. 单个核细胞接种数

每个 T75 瓶推荐接种 6E7 个单个核细胞，5E7 ~ 7E7 的接种数是可接受范围。接种数过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。

4. 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。

5. 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。

6.YC00A 包被后清洗

包被有 YC00A 的培养瓶，清洗前应提前将单个核细胞、YC00B、血浆、激活培养基准备好，清洗后立即接种。不要清洗后加入培养基长时间放置、或清洗后干燥放置。

7. 补液程序

第 3 天、第 5 天请严格按照说明书要求补液并添加相应比例的血浆，第 7 天后可以根据细胞状态酌情补液。

8. 红细胞裂解液的使用

一份脐带血提取所得的单个核细胞，用 5mL 培养基重悬。① 20μL 单个核细胞悬液加入 200μL DPBS（11x 稀释）；② 取单个核细胞 11x 稀释液 100μL 加入 200μL 红细胞裂解液（货号：RS0019），此时为 33x 稀释；③室温孵育 5 ~ 15 分钟后计数，孵育时间不可超过 15 分钟。

33x 稀释后密度在 1E6/mL 以下，可以确保红细胞裂解完全，若密度在 1E6/mL 以上，建议将单个核细胞悬液进一步稀释后再加红细胞裂解液。

9. 更换培养容器的注意事项

NK 细胞培养过程中更换培养容器时 (比如一个 T175 瓶分为 2 个 T175 瓶、T175 瓶的细胞入袋),NK 细胞会在新容器中贴壁、形成一层“滋养层细胞”, 如果细胞少且新容器底面积大，会导致大量细胞贴壁、短时间内细胞密度严重降低、细胞间无法相互作用，可能会导致培养失败。更换新的培养容器时一定要确保足够细胞数 (若补液后两天细胞数不足以分瓶或入袋，则延长培养时间至 3 天。若间隔 3 天细胞数仍不足，可以在原培养容器小体积补液再培养 2 ~ 3 天。每次补液可以维持细胞生长 3 天，不可延迟到第 4 天补液), 并根据要求折叠培养袋。

【说明书核准日期】2025年8月20日

【版本号】1.0.0

YOCON 友康®

文件版本号：2025 -V1.0.0

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

地址：北京市密云区科技路6号

电话：010-58711655 400-001-1266

网站：www.yocon.cn