

Ultra-pure NK Cell
Serum-Free Culture Kit

超纯 NK 细胞无血清培养套装

(30mL/2L 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30mL/2L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 30mL 外周血或脐血的样本量，使用 2L 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 5.0	NC0102	NK 细胞体外培养	2 瓶, 1L/ 瓶	2~8℃
超纯 NK 试剂盒 (30mL)	AN0104	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支, 500μL/ 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	2 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 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. 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（2L）：每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基 5.0（货号：NC0102）溶解，以 1:1000 的比例添加至免疫细胞无血清培养基 5.0（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，14 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

T25 培养瓶包被：两个 TC 处理的 T25 瓶中分别加入 5mL DPBS 和 250μL YC00A，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 5mL 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：包被了 YC00A 的两个 T25 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（1mL）和单个核细胞，总体积 10mL。每个 T25 瓶接种 10mL，两个 T25 瓶总体积 20mL。外周血单个核细胞密度 2×10^6 /mL，脐带血单个核细胞密度 3×10^6 /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，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 T25 瓶转移到 2 ~ 8°C 冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8°C 冰箱中可保存 12h。

2. 第 3 天

1:2 比例补液，每个 T25 瓶中补加 20mL **激活培养基**和 5% 的自体血浆（1mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时有两个 T25 瓶，每瓶 30mL，总体积 60mL。

注意：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。瓶盖不用拧太紧，确保气体交换、供氧充足。

3. 第 5 天

补加 140mL **激活培养基**和 5% 的自体血浆 (7mL), 将两个 T25 瓶中的培养基和细胞平均分入两个 T175 瓶。此时有两个 T175 瓶, 每瓶 100mL, 总体积 200mL。

注意: T175 瓶培养体积不宜过大, 建议使用两个 T175。

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 $\geq 2E6/mL$, 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**和 1% 比例血浆, 若血浆不足 1% 则将剩余血浆全部添加进去。此时总体积 1200mL。

6. 第 11 天

培养袋中补加 1000mL **扩增培养基**。此时总体积 2200mL。

7. 第 14 ~ 16 天

检测密度收获细胞。

【补液程序一】：快补液程序, 终体积2.2L

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	2xT25	激活培养基	20	20	10%	2
d3	2xT25	激活培养基	40	60	5%	2
d5	2xT175	激活培养基	140	200	5%	7
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	1x 培养袋	扩增培养基	1000	2200	0%	0
d14 ~ d16	收获细胞					

【使用步骤二】

慢补液程序，培养结果稳定，成功率高，16 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

T25 培养瓶包被：两个 TC 处理的 T25 瓶中分别加入 5mL DPBS 和 250 μ L YC00A，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 5mL 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：包被了 YC00A 的两个 T25 瓶中分别加入**激活培养基**、250 μ L 诱导因子 YC00B、10% 比例的自体血浆（1mL）和单个核细胞，总体积 10mL。每个 T25 瓶接种 10mL，两个 T25 瓶总体积 20mL。外周血单个核细胞密度 2E6/mL，脐带血单个核细胞密度 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，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 T25 瓶转移到 2 ~ 8°C 冰箱保存、不要剧烈晃动，接种前取出清洗即可。2 ~ 8°C 冰箱中可保存 12h。

2. 第 3 天

1:1 比例补液，每个 T25 瓶中补加 10mL **激活培养基**和 10% 的自体血浆（1mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时有两个 T25 瓶，每瓶 20mL，总体积 40mL。

注意：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。若所用品牌的 T25 瓶培养 20mL 体积水平放置时液体不会溢出沾湿瓶盖，此时可以水平放置。瓶盖不用拧太紧，确保气体交换、供氧充足。

3. 第 5 天

补加 60mL **激活培养基**和 10% 的自体血浆（6mL），将两个 T25 瓶中的培养基和细胞转入一个 T175 瓶。此时总体积 100mL。

4. 第 7 天

T175 瓶中补加 100mL **扩增培养基**和 5% 自体血浆（5mL），此时总体积 200mL。

注意：T175 瓶的瓶盖不用拧太紧，确保气体交换、供氧充足。

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 $\geq$ 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。此时总体积 600mL。

注意：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。

6. 第 11 天

培养袋中补加 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。此时总体积 1200mL。

7. 第 13 天

培养袋中补加 900mL **扩增培养基**。此时总体积 2100mL。

8. 第 16 ~ 18 天

检测密度收获细胞。

【补液程序二】慢补液程序，终体积2.1L

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	2xT25	激活培养基	20	20	10%	2
d3	2xT25	激活培养基	20	40	10%	2
d5	1xT175	激活培养基	60	100	10%	6
d7	1xT175	扩增培养基	100	200	5%	5
d9	1x 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d11	1x 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d13	1x 培养袋	扩增培养基	900	2100	0%	0
d16 ~ d18	收获细胞					

【使用步骤三】

脐带血样本，分离或复苏所得单个核细胞数不足 6E7，此时建议使用该培养程序，接种细胞数 4E7。

1. 第 0 天

T25 培养瓶包被：两个 TC 处理的 T25 瓶中分别加入 5mL DPBS 和 250μL YC00A，充分混匀后，37℃孵育 2h，弃去上清，并用 5mL 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：包被了 YC00A 的两个 T25 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（0.5mL）和 **2E7** 个脐带血单个核细胞，总体积 **5mL**。每个 T25 瓶接种 5mL，两个 T25 瓶总体积 10mL。

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 T25 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

1:1 比例补液，T25 瓶中补加 5mL **激活培养基**和 10% 的自体血浆（0.5mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时有两个 T25 瓶，每瓶 10mL，总体积 20mL。

3. 第 5 天

1:1 比例补液，T25 瓶中补加 10mL **激活培养基**和 10% 的自体血浆（1mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。此时有两个 T25 瓶，每瓶 20mL，总体积 40mL。

注意：T25 瓶略微倾斜放置，避免液体溢出瓶口。若所用品牌的 T25 瓶培养 20mL 体积水平放置时液体不会溢出沾湿瓶盖，此时可以水平放置。瓶盖不用拧太紧，确保气体交换、供氧充足。

4. 第 7 天

补加 60mL **扩增培养基**和 5% 的自体血浆（3mL），将 T25 瓶中的培养基和细胞转移至一个 T175 瓶。此时，总体积 100mL。

5. 第 9 天

T175 瓶中补加 100mL **扩增培养基**和 1% 的自体血浆（1mL）。此时总体积 200mL。

注意：T175 瓶的瓶盖不用拧太紧，确保气体交换、供氧充足。

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 $\geq 2E6/mL$ ，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。此时总体积 600mL。

注意：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。

7. 第 13 天

培养袋中补加 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，总体积 1200mL。

8. 第 15 天

培养袋中补加 900mL **扩增培养基**。此时总体积 2100mL。

9. 第 18 ~ 20 天

检测密度收获细胞。

【补液程序三】接种4E7个种子细胞的慢补液程序，终体积2.04L

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	2xT25	激活培养基	10	10	10%	1
d3	2xT25	激活培养基	10	20	10%	1
d5	2xT25	激活培养基	20	40	10%	2
d7	1xT175	扩增培养基	60	100	5%	3
d9	1xT175	扩增培养基	100	200	1%	1
d11	1x 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d13	1x 培养袋	扩增培养基	600	1200	1%	6
d15	1x 培养袋	扩增培养基	840	2040	0%	0
d18 ~ d20	收获细胞					

【特别说明】

1. 样本要求

采集后保存时间在 24h 以内的外周血或脐血。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 24h 内分离 PBMC，最好现采现提，保存时间越短，分离效果越好。

3. 接种密度

外周血单个核细胞推荐接种密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，新鲜脐带血单个核细胞推荐接种密度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$ ，冻存脐带血单个核细胞推荐接种密度为 $3.5 \times 10^6/\text{mL}$ ，接种密度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 PBMC 时，应将 PBMC 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 PBMC、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. 培养终体积

最后一次补液至 2L 后，培养 2 ~ 3 天，细胞密度实现翻倍，说明细胞仍有较强的扩增能力，此时可以继续补液至 3L。

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 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 以下，可以确保红细胞裂解完全，若密度在 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 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。

10. 培养基预温

(1) 每次补液用的培养基需预温至 37℃，用多少取多少，禁止将整瓶培养基反复预温。

(2) 尚未添加 YC005 的扩增培养基，可以在 37°C 水浴锅预温 1h 不影响其性能。如条件允许，可以先将培养基预温至 37°C 然后再添加 YC005。即每支 YC005 用 1mL NK 细胞无血清培养基溶解，置于冻存管中 2 ~ 8°C 保存，每次补液时根据培养基用量以 1:1000 的比例现用现加。

(3) 已经添加 YC005 的扩增培养基，37°C 条件下长时间预温可能会导致 YC005 因子失效，因此使用水浴锅预温培养基时，根据培养基体积不同，需严格限定预温时间，具体操作如下：

- ① 将水浴锅打开，温度上升至 37°C。
- ② 取所需培养基加入预温容器，置于水浴锅中预温，预温时长参考下表。

补液体积	预温容器	预温时长
5 ~ 10mL	15mL 离心管	5 分钟
20mL	50mL 离心管	10 分钟
30mL	50mL 离心管	15 分钟
50mL	50mL 离心管	25 分钟
200mL	250mL 离心杯	30 分钟
500mL	500mL 离心杯	30 分钟
1L	培养基原瓶	30 ~ 45 分钟

预温时长下限：用手触摸培养基，培养基温度不低于手指温度。（避免温度太低导致细胞应激）

预温时长上限：培养基温度达到 37°C 后再持续预温 30min。（避免长时间预温导致 YC005 因子失效）

- ③ 预温时间到，将培养基取出，预温容器外表面擦干水分、喷 75% 酒精，开始补液。

【说明书核准日期】 2025年9月26日

【版本号】 1.0.0



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

