

CIK Cells Serum-free Medium

CIK 细胞无血清培养套装

(外周血 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®

CIK细胞无血清培养套装使用说明书——外周血2L

【适用范围】

用于外周血样本体外诱导扩增 CIK 细胞，不适用于脐带血样本。

【产品组成】

适用于 50mL 外周血的样本量，使用 2 ~ 3L 培养基。

产品名称	产品货号	产品用途	产品规格	保存温度
免疫细胞无血清培养基	NC0101	CIK 细胞体外培养	2 瓶, 1L/ 瓶	2 ~ 8℃
CIK 试剂盒 (外周血 50mL)	AN0109.1	YC001: 起始培养时包被培养瓶使用	1 支, 200μL/ 支	-20℃
		YC002: 起始培养时添加	1 支, 500μL/ 支	
		YC003: 激活培养基添加	1 支, 200μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	2 支	

注意：每次添加的培养基需提前取出预温至 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，应将外周血、PBS（或生理盐水）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 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) 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 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 **激活培养基** 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. 激活培养基：将融化的 200 μ L YC003 加入 200mL 免疫细胞无血清培养基（货号 NC0101）中，混匀备用。

2. 扩增培养基：每支 YC005 用 1mL 免疫细胞无血清培养基（货号 NC0101）溶解，以 1:1000 的比例添加至免疫细胞无血清培养基（货号 NC0101），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】：以接种30mL、终体积3L为例

1. 第 0 天

T75 培养瓶包被：T75 瓶中加入 10mL DPBS 和 1 支 YC001，充分混匀后，37°C 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：T75 瓶中加入**激活培养基**、1 支诱导因子 YC002、10% 比例的自体血浆（3mL）和单个核细胞，总体积 30mL，接种密度 $2E6/mL$ 。

2. 第 3 天

1:1 比例补液，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。此时总体积 60mL。

3. 第 5 天

补加 140mL **激活培养基**和 5% 的自体血浆（7mL），将 T75 瓶中的培养基和细胞平均分至 2 个 T175 瓶。此时每个 T175 瓶中有细胞悬液 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，若细胞密度 $< 1.5E6/mL$

1:1 比例补液，补加 200mL **扩增培养基**，此时总体积 400mL。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 1 个细胞培养袋中。

注意：2L 规格的培养袋培养 400mL 体积需对折，使用 1/2 底面积。

5. 第 9 天

1:1 比例补液，从原有的细胞培养袋中取出 200mL 细胞悬液到第 2 个细胞培养袋，再向 2 个细胞培养袋中分别补加 200mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 400mL，总体积 800mL。

注意：2L 规格的培养袋培养 400mL 体积需对折，使用 1/2 底面积。

6. 第 11 天

1:1 比例补液，补加 800mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 800mL，总体积 1600mL。

7. 第 13 天

补加 1400mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1500mL，总体积 3000mL。

8. 第 16 ~ 18 天

检测密度收获细胞。

【补液程序1】：第7天密度 < 1.5E6/mL，终体积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	1×T75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	200	400	1%	2
d9	1× 培养袋	扩增培养基	400	800	0%	0
d11	1× 培养袋	扩增培养基	800	1600	0%	0
d13	1× 培养袋	扩增培养基	400	2000	0%	0
d16 ~ d18	1× 培养袋	收获细胞				

【补液程序2】：第7天密度 < 1.5E6/mL，终体积3L

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	1×T75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	200	400	1%	2
d9	2× 培养袋	扩增培养基	400	800	0%	0
d11	2× 培养袋	扩增培养基	800	1600	0%	0
d13	2× 培养袋	扩增培养基	1400	3000	0%	0
d16~18	2× 培养袋	收获细胞				

4. 第 7 天：取样计数，若细胞密度 ≥ 1.5E6/mL

1:2 比例补液，补加 400mL **扩增培养基**，此时总体积 600mL。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 1 个细胞培养袋中。

注意：2L 规格的培养袋培养 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

5. 第 9 天

1:1 比例补液，从原有的细胞培养袋中取出 300mL 细胞悬液到第 2 个细胞培养袋，再向 2 个细胞培养袋中分别补加 300mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 600mL，总体积 1200mL。

注意：2L 规格的培养袋培养 600mL 体积不需对折，使用全部底面积。

6. 第 11 天

1:1 比例补液，补加 1200mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1200mL，总体积 2400mL。

7. 第 13 天

补加 600mL **扩增培养基**。此时每个细胞培养袋中有细胞悬液 1500mL，总体积 3000mL。

8. 第 16 ~ 18 天

检测密度收获细胞。

【补液程序3】：第7天密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，终体积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	1×T75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d9	1× 培养袋	扩增培养基	600	1200	0%	0
d11	1× 培养袋	扩增培养基	800	2000	0%	0
d14 ~ d16	1× 培养袋	收获细胞				

【补液程序4】：第7天密度 $\geq 1.5E6/mL$ ，终体积3L

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	1×T75	激活培养基	30	30	10%	3
d3	1×T75	激活培养基	30	60	5%	1.5
d5	2×T175	激活培养基	140	200	5%	7
d7	1× 培养袋	扩增培养基	400	600	1%	4
d9	2× 培养袋	扩增培养基	600	1200	0%	0
d11	2× 培养袋	扩增培养基	1200	2400	0%	0
d13	2× 培养袋	扩增培养基	600	3000	0%	0
d16 ~ d18	2× 培养袋	收获细胞				

【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，一是分离前血液及各试剂应预温至 20℃，室温离心；二是样本采集后应在 8h 内分离单个核细胞，最好是即采即提。

2. 接种密度

培养外周血样本推荐接种密度为 $1.5E6/mL \sim 2E6/mL$ ，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。

3. 试剂保存

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，请优先置于 -80℃ 保存。

4. 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。

5. YC001 包被后清洗

包被有 YC001 的培养瓶，清洗前应提前将 PBMC、YC002、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。

6. 更换培养容器的注意事项

CIK 细胞培养过程中更换培养容器时（比如一个 T75 瓶分为 2 个 T175 瓶、T175 瓶的细胞入袋），CIK 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。

7. 细胞形态

单个核细胞接种后，第 1-3 天会形成悬浮的细胞小团，第 3-5 天绝大部分悬浮细胞团贴壁，不可将其晃起，第 5-7 天贴壁的细胞团变大、变多，此时细胞已经处于激活状态，后期可正常换瓶、入袋。正常样本的培养前期必然有细胞成团、贴壁的过程。

8. 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℃ 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℃ 然后再添加 YC005。即每支 YC005 用 1mL 免疫细胞无血清培养基溶解，置于冻存管中 2~8℃ 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℃ 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℃。

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

【说明书核准日期】 2025年10月11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

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

