

Ultra-pure NK Cell
Serum-Free Culture Kit

NK 细胞无血清培养套装超纯系列 (12L 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12L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 70 ~ 80mL 外周血或脐血的样本量，使用 12L 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	2 瓶, 200mL/ 瓶	2~8℃
NK 细胞无血清培养基	NC0102	NK 细胞体外培养	12 瓶, 1L/ 瓶	2~8℃
超纯 NK 试剂盒 (70/80mL)	AN0104.6	YC00A: 起始培养时包被培养瓶使用	2 支, 500μL/ 支	-20℃
		YC00B: 起始培养时添加	2 支, 500μL/ 支	
		YC00C: 激活培养基添加	2 支, 200μL/ 支	
		YC005: 扩增培养基添加	6 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°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（400mL）：将两支室温融化的 YC00C（400μL）加入 400mL 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（12L）：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，20 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。

12L 大体系的培养可以先分瓶再入袋，也可以先入袋再分袋，以先分瓶再入袋为例：

1. 第 0 天

T175 培养瓶包被：一个 TC 处理的 T175 瓶中加入 35mL DPBS 和 两支 YC00A（1mL），充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 35mL 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：T175 瓶中加入**激活培养基**、两支诱导因子 YC00B（1mL）、10% 比例的自体血浆（4mL）和 **1.4E8** 个单个核细胞，总体积 40mL。

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 T175 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

T175 瓶中补加 80mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆（4mL），动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时有一个 T175 瓶，总体积 120mL。

3. 第 5 天

将 T175 瓶中的 120mL 细胞轻轻晃动混匀（不要吹打）后分别取出 40mL 到第 2、第 3 个 T175 瓶，然后每个 T175 瓶补加 93mL **激活培养基** 和 5% 的自体血浆 (4.65mL)。此时有三个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 133mL，总体积 400mL。

4. 第 7 天

将三个 T175 瓶中的 133mL 细胞轻轻晃动混匀（不要吹打）后分别取出 66.5mL 到第 4、第 5、第 6 个 T175 瓶，然后每个 T175 瓶补加 66.5mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (0.7mL)。此时有六个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 133mL，总体积 800mL。

5. 第 9 天

每个 T175 瓶补加 66.5mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (0.7mL)。此时有六个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 200mL，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 $\geq 2E6/mL$ ，直接 1:1 补液、入袋。

②若细胞密度 $< 2E6/mL$ ，延迟一天 1:1 补液、入袋。

1:1 补液、入袋：将六个 T175 瓶中的 200mL 细胞分别转移至六个 FEP 培养袋 (2L)，再每袋补加 200mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (2mL)。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 400mL，总体积 2400mL。

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。
- 如有足量血浆，建议每次补液都持续添加 1% 比例血浆，直至血浆用完。

7. 第 13 天

每个培养袋中补加 400mL **扩增培养基**。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 800mL，总体积 4800mL。

8. 第 15 天

每个培养袋中补加 800mL **扩增培养基**。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 1600mL，总体积 9600mL。

9. 第 17 天

每个培养袋中补加 466mL **扩增培养基**。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 2066mL，总体积 12400mL。

10. 第 20 ~ 22 天

检测密度收获细胞。

【补液程序1】快补液程序——先分瓶后入袋

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*T175	激活培养基	40	40	10%	4
d3	1*T175	激活培养基	80	120	5%	4
d5	分瓶：一个 T175 瓶分为三个 T175 瓶，每瓶 40mL，再每瓶补 93mL					
	3*T175	激活培养基	3*93=280	3*133=400	5%	3*4.65
d7	分瓶：三个 T175 瓶分为六个 T175 瓶，每瓶 66.5mL，再每瓶补 66.5mL					
	6*T175	扩增培养基	6*66.5=400	6*133=800	1%	6*0.7
d9	6*T175	扩增培养基	6*66.5=400	6*200=1200	1%	6*0.7
d11	6*FEP-2L	扩增培养基	6*200=1200	6*400=2400	0%	0
d13	6*FEP-2L	扩增培养基	6*400=2400	6*800=4800	0%	0
d15	6*FEP-2L	扩增培养基	6*800=4800	6*1600=9600	0%	0
d17	6*FEP-2L	扩增培养基	6*466=2800	6*2066=12400	0%	0
d20 ~ d22	收获细胞					

【补液程序2】快补液程序——先入袋再分袋

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*T175	激活培养基	40	40	10%	4
d3	1*T175	激活培养基	80	120	5%	4
d5	1*FEP-2L	激活培养基	280	400	5%	14
d7	1*FEP-2L	扩增培养基	400	800	1%	4
d9	1*FEP-2L	扩增培养基	700	1500	1%	7
d11	分袋：1500mL 的细胞取出 1000mL 到第 2 个、第 3 个 FEP 袋，再每袋补液 500mL。					
	3*FEP-2L	扩增培养基	3*500=1500	3*1000=3000	0%	0
d13	3*FEP-2L	扩增培养基	3*1000=3000	3*2000=6000	0%	0
d15	分袋：三袋 2000mL 的细胞分别取出 1000mL 到第 4、第 5、第 6 个 FEP 袋，再每袋补液 500mL。					
	6*FEP-2L	扩增培养基	6*500=3000	6*1500=9000	0%	0
d17	6*FEP-2L	扩增培养基	6*566=3400	6*2066=12400	0%	0
d20 ~ d22	收获细胞					

【使用步骤二】

慢补液程序，培养结果稳定，成功率高，22 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% 以上的脐带血等。

12L 大体系的培养可以先分瓶再入袋，也可以先入袋再分袋，以先分瓶再入袋为例：

1. 第 0 天

T175 培养瓶包被：一个 TC 处理的 T175 瓶中加入 35mL DPBS 和 两支 YC00A (1mL)，充分混匀后，37°C 孵育 2h，弃去上清，并用 35mL 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：T175 瓶中加入**激活培养基**、两支诱导因子 YC00B (1mL)、10% 比例的自体血浆 (4mL) 和 **1.4E8** 个单个核细胞，总体积 40mL。

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°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

T175 瓶中补加 40mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (4mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时，有一个 T175 瓶，总体积 80mL。

3. 第 5 天

T175 瓶中补加 80mL **激活培养基** 和 10% 的自体血浆 (8mL)，动作轻柔、不可将贴壁细胞晃起。

此时，有一个 T75 瓶，总体积 160mL。

4. 第 7 天

将 T175 瓶中的 160mL 细胞轻轻晃动混匀（不要吹打）后分别取出 53mL 到第 2、第 3 个 T175 瓶，然后每个 T175 瓶补加 80mL **扩增培养基** 和 5% 的自体血浆 (4mL)。此时，有三个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 133mL，总体积 400mL。

5. 第 9 天

将三个 T175 瓶中的 133mL 细胞轻轻晃动混匀（不要吹打）后分别取出 66.5mL 到第 4、第 5、第 6 个 T175 瓶，然后每个 T175 瓶补加 66.5mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (0.7mL)。此时有六个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 133mL，总体积 800mL。

6. 第 11 天

每个 T175 瓶补加 66.5mL **扩增培养基** 和 1% 的自体血浆 (0.7mL)。此时有六个 T175 瓶，每个 T175 瓶体积 200mL，总体积 1200mL。

7. 第 13 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 1:1 补液、入袋。

②若细胞密度 $< 2E6/mL$ ，延迟一天 1:1 补液、入袋。

1:1 补液、入袋：将六个 T175 瓶中的 200mL 细胞分别转移至六个 FEP 培养袋 (2L)，再每袋补加 200mL 扩增培养基和 1% 的自体血浆 (2mL)。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 400mL，总体积 2400mL。

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。
- 如有足量血浆，建议每次补液都持续添加 1% 比例血浆，直至血浆用完。

8. 第 15 天

每个培养袋中补加 400mL 扩增培养基。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 800mL，总体积 4800mL。

9. 第 17 天

每个培养袋中补加 800mL 扩增培养基。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 1600mL，总体积 9600mL。

10. 第 19 天

每个培养袋中补加 426mL 扩增培养基。此时，有六个 FEP 培养袋，每袋体积 2026mL，总体积 12160mL。

11. 第 22 ~ 24 天

检测密度收获细胞。

【补液程序3】慢补液程序——先分瓶后入袋

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*T175	激活培养基	40	40	10%	4
d3	1*T175	激活培养基	40	80	10%	4
d5	1*T175	激活培养基	80	160	10%	8
d7	分瓶：一个 T175 瓶分为三个 T175 瓶，每瓶 53mL，再每瓶补 80mL					
	3*T175	扩增培养基	3*80=240	133*3=400	5%	3*4
d9	分瓶：三个 T175 瓶分为六个 T175 瓶，每瓶 66.5mL，再每瓶补 66.5mL					
	6*T175	扩增培养基	6*66.5=400	6*133=800	1%	6*0.7
d11	6*T175	扩增培养基	6*66.5=400	6*200=1200	1%	6*0.7
d13	6*FEP-2L	扩增培养基	6*200=1200	6*400=2400	0%	0
d15	6*FEP-2L	扩增培养基	6*400=2400	6*800=4800	0%	0
d17	6*FEP-2L	扩增培养基	6*800=4800	6*1600=9600	0%	0
d19	6*FEP-2L	扩增培养基	6*426=2800	6*2026=12160	0%	0
d22 ~ d24	收获细胞					

【补液程序4】慢补液程序——先入袋再分袋

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*T175	激活培养基	40	40	10%	4
d3	1*T175	激活培养基	40	80	10%	4
d5	1*T175	激活培养基	80	160	10%	8
d7	1*FEP-2L	扩增培养基	240	400	5%	12
d9	1*FEP-2L	扩增培养基	400	800	1%	4
d13	分袋：1500mL 细胞取出 1000mL 到第 2 个、第 3 个 FEP 袋，再每袋补液 500mL。					
	3*FEP-2L	扩增培养基	3*500=1500	3*1000=3000	0%	0
d15	3*FEP-2L	扩增培养基	3*1000=3000	3*2000=6000	0%	0
	分袋：三袋 2000mL 的细胞分别取出 1000mL 到第 4、第 5、第 6 个 FEP 袋，再每袋补液 500mL。					
d17	6*FEP-2L	扩增培养基	6*500=3000	6*1500=9000	0%	0
d19	6*FEP-2L	扩增培养基	6*526=3160	12160	0%	0
d22 ~ d24	收获细胞					

【特别说明】

1. 样本要求

采集后保存在 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

推荐接种 1.4×10^8 个单个核细胞， $1.3 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$ 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。

10. 培养基预温

(1) 每次补液用的培养基需预温至 37°C，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12月25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

