

# ExCell Bio

## OptiVibro<sup>®</sup> NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

### User Manual

Catalog Number	NE000-N032
Catalog Number	NE000-N031
Catalog Number	NE000-N031S



## I 产品概述

OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清（Serum-Free）、无异源动物源成分的扩增培养试剂盒，包括 NK 细胞无血清基础培养基 P01、免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01 和细胞因子 III。OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 适用于从人外周血单个核细胞（PBMC）、脐带血单个核细胞中选择性扩增 NK 细胞。OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 可以与 OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 P01（NE000-N02#）配合使用，在 OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 P01（NE000-N02#）基础上支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

## I 产品规格及储存、运输要求

产品名称	货号	规格	存储条件	运输条件	有效期
OptiVibro® NK细胞扩增基础试剂盒P01	NE000-N032	1000 mL kit	2- 8 °C 遮光	-	12个月
OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基P01	BA0092	1000 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月
OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01	BA0332	8 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子III	BA0132	310 uL	- 20 °C	- 20 °C 遮光	12个月
OptiVibro® NK细胞扩增基础试剂盒P01	NE000-N031	500 mL kit	2- 8 °C 遮光	-	12个月
OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基P01	BA0091	500 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月

血清基础培养基P01					
OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01	BA0331	4 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子III	BA0131	155 uL	- 20 °C	- 20 °C 遮光	12个月
<b>OptiViro® NK细胞扩增基础试剂盒P01</b>	<b>TE000-N021S</b>	<b>100 mL kit</b>	<b>2- 8 °C 遮光</b>	<b>-</b>	<b>12个月</b>
OptiViro® NK细胞无血清基础培养基P01	BA0031S	100 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月
OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01	BA0331S	0.8 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子III	BA0131S	31 uL	- 20 °C	- 20 °C 遮光	12个月

## I 产品特点、应用与使用限制

1. 本品仅供科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗。
2. 实验结果可能因供体细胞的不同而可能会出现一定的差异。
3. 本产品不含有血清及异源体成分，不含有抗生素，如有需要可额外添加。
4. 产品需要在有效期内使用。

## I 实验材料和试剂

### 实验设备及材料（自备）

1. 外周血单个核细胞（PBMC）或脐带血单个核细胞
2. 热灭活自体血浆（也可用商业化血清替代物或人 AB 血清代替）使用
3. 培养板/培养瓶/培养袋
4. 淋巴细胞分离液、DPBS 溶液或生理盐水、离心管、移液管、移液枪和枪头；
5. 二氧化碳细胞培养箱、离心机、细胞计数仪、倒置显微镜、水浴锅等。

## I 操作方法

### 配制完全培养基

1. 将 OptiViro® NK 细胞无血清基础培养基 P01 和 OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01 在室温下平衡 1-4 小时。在生物安全柜内打开基础培养基与添加组分的盖子，每 1L/500mL 基础培养基中添加 8mL/4mL 添加组分，盖好基础培养基的盖子，颠倒 3~5 次混匀，即得到完全培养基。
2. 每 1000mL/500mL 完全的 OptiViro® NK 细胞无血清培养基 P01 加入 1 支 310μL /155μL 细胞因子Ⅲ，为 NK 细胞扩增完全培养基（以下简称 NK 培养基），配制后有效期为 3 周，也可将细胞因子Ⅲ进行分装，根据比例减少完全培养基配制量，延长使用时间，细胞因子Ⅲ冻融次数不超过 3 次。

### 【注意事项】

1. 细胞因子放于室温约 10 min 至融化后、瞬离后再开盖使用。

### PBMC 中 NK 细胞的激活和扩增培养

以新鲜 PBMC、T75 培养瓶、添加热灭活自体血浆培养为例

#### 1. 第 0 天

T75 培养瓶预处理：室温下融化细胞因子 I (OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (NE000-N022))，取 50 mL 离心管，加入 15 mL DPBS，吸取 45 μL 细胞因子 I 至 DPBS 中（若细胞因子 I 一次性用完，建议吸取 50 mL 离心管内 1 mL DPBS 将细胞因子 I 管冲洗 1 次并加回离心管内），上下颠倒混匀，加入底面积 75 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶（T75）中，前后左右晃动，使液体分散在瓶底，4℃包被过夜或 37℃紧急包被

至少 2 小时。

PBMC 接种：取出活化过的 T75 培养瓶，弃掉包被液（不用 PBS 润洗培养瓶），在 T75 瓶中分别加入 NK 培养基、一支 150  $\mu$ L 细胞因子 II (OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (NE000-N022) )、10% 比例的自体血浆（1.5 mL）和种子细胞，总体积为 15 mL。前后左右晃动，放入 37  $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 【注意事项】

1. 过夜包被的培养瓶在细胞接种前 10 min 取出弃掉包被液，不可过早取出。
2. PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 2-2.5E6 cells/mL，脐血初始 NK 比例较低时，可适当提高初始铺瓶细胞密度至 3E6 cells/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。
3. 接种细胞时，电动移液枪取细胞悬液打到非包被接触的瓶底，轻轻晃动瓶子铺匀，时间尽量短。

#### 2. 第 3 天

沿培养瓶侧壁缓慢补加 13.5 mL 的 NK 培养基和 10% 的热灭活自体血浆（1.5 mL），注意不要碰到培养瓶底部，切勿吹打细胞，尽量减少计数、观察等操作，避免影响细胞初期生长。

#### 3. 第 5 天

取样计数，补加新鲜 NK 培养基（可添加 5% 的热灭活自体血浆），建议调整细胞密度  $1.0 \times 10^6$  cells/mL，将 T75 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 培养瓶。

#### 4. 第 7 天及以后

每隔一天或两天取样计数补液，可以将细胞密度调整至  $0.5-1.0 \times 10^6$  cells/mL，根据细胞悬液体积进行扩瓶或转入细胞培养袋培养，从第 7 天开始，可将补加的新鲜 NK 培养基中的热灭活自体血浆含量降至 1%。

#### 5. 第 14-18 天收获细胞。

## | 其他

1. 如果使用较小体系进行测试，细胞激活的细胞因子使用量可参考如下表格：

规格	细胞因子I	包被体积	细胞因子II	接种PBMC密度	接种体积
T75	45 $\mu$ L	15 mL	150 $\mu$ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	15 mL
T25	15 $\mu$ L	5 mL	50 $\mu$ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	5 mL
6孔板 (每孔)	6 $\mu$ L	2 mL	20 $\mu$ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	2 mL
12孔板 (每孔)	3 $\mu$ L	1 mL	10 $\mu$ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	1 mL

2. 第0天的细胞接种密度可以在  $1.5-2.5 \times 10^6$  cells/mL 范围内，如果是冻存的 PBMC，也可以尝试提前一天复苏，培养箱中过夜静息（冻存会造成细胞膜损伤，静息有利于细胞恢复），接种密度可以为  $2.0-3.0 \times 10^6$  cells/mL。静息操作方法：冻存样本细胞复苏后使用含有添加组分的 NK 细胞无血清基础培养基 P01（不含细胞因子），以密度  $2 \times 10^6$  cells/mL 左右悬浮细胞，加入培养瓶中，放入  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱中静息过夜，16-18h 即可。

3. 接种密度低于  $1.0 \times 10^6$  cells/mL 可导致培养失败。

4. 如果从 PBMC 分选 NK 后再开始培养，可适当降低接种密度，推荐接种密度为  $1.0-2.0 \times 10^6$  cells/mL。

## | 免责声明

- 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
- 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。