

ExCell Bio

## OptiVibro<sup>®</sup> NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红) 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

货 号

NE000-N052

NE000-N051

NE000-N051S



## 产品概述

OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清、无异源动物源成分的扩增培养试剂盒, 包括 OptiViro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)、OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01、OptiViro® 细胞因子 I、OptiViro® 细胞因子 II 和 OptiViro® 细胞因子 III。OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）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。OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红) 可以与 OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N062）配合使用，在 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）基础上支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

## 产品规格及储存、运输要求

货号	产品名称	规格	存储条件	运输条件	有效期
NE000-N052	OptiViro® NK细胞扩增试剂盒NE01（无酚红）	1000 mL kit	-	-	-
BA0142	OptiViro® NK细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）	1000 mL	2- 8 °C 遮光	< 25°C 遮光	12个月
BA0332	OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组 分UE01	8 mL	2- 8 °C 避光	< 25°C 避光	18个月
BA0112	OptiViro® 细胞因子I	45 µL	- 20 °C 遮光	< 0°C 遮光	12个月
BA0122	OptiViro® 细胞因子II	150 µL	- 20 °C 遮光	< 0°C 遮光	12个月
BA0132	OptiViro® 细胞因子III	310 µL	- 20 °C	< 0°C	12个月

			遮光	遮光	
NE000-N051	<b>OptiVibro® NK细胞扩增基础试剂盒NE01 (无酚红)</b>	500 mL kit	-	-	-
BA0141	OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)	500 mL	2- 8 °C 遮光	<25°C 遮光	12个月
BA0331	OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组 分UE01	4 mL	2- 8 °C 避光	<25°C 避光	18个月
BA0111	OptiVibro® 细胞因子I	22.5 µL	- 20 °C 遮光	<0°C 遮光	12个月
BA0121	OptiVibro® 细胞因子II	75 µL	- 20 °C 遮光	<0°C 遮光	12个月
BA0131	OptiVibro® 细胞因子III	155 µL	- 20 °C 遮光	<0°C 遮光	12个月
NE000-N051S	<b>OptiVibro® NK细胞扩增试剂盒NE01 (无 酚红)</b>	100 mL kit	-	-	-
BA0141S	OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)	100 mL	2- 8 °C 遮光	<25°C 遮光	12个月
BA0331S	OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组 分UE01	0.8 mL	2- 8 °C 避光	<25°C 避光	18个月
BA0111S	OptiVibro® 细胞因子I	9 µL	- 20 °C 遮光	<0°C 遮光	12个月
BA0121S	OptiVibro® 细胞因子II	30 µL	- 20 °C 遮光	<0°C 遮光	12个月

BA0131S	OptiVibro® 细胞因子III	31 $\mu$ L	- 20 °C 遮光	< 0°C 遮光	12个月
---------	--------------------	------------	---------------	-------------	------

## I 产品特点、应用与使用限制

1. 将培养基存放在遮光环境中保存，最好使用有色包装袋包装，以防止光线照射。
2. 在运输过程中，避免长时间暴露在灯光下，以防止变色。
3. 对于需运输到无菌区域后使用的情况，可使用消毒剂对瓶身和瓶口进行消毒，避免使用紫外线消毒。
4. 通过紫外线消毒窗口进行转移时，应提前关闭紫外线灯。
5. 可添加热灭活自体血浆、血清替代物（人血小板裂解物）或人AB血清使用，但是不可添加ICSR产品使用。

## I 操作说明

### 配制完全培养基

1. 将OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基NE01（无酚红）和OptiVibro® 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OptiVibro® NK细胞无血清培养基NE01（无酚红）加入1支310  $\mu$ L /155  $\mu$ L OptiVibro® 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OptiVibro® 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】

使用培养基前将添加组分和基础培养基分别置于室温 1-4 小时，恢复至室温后进行混合。基础培养基与添加组分混合后，可放于 2-8℃保存，建议两周内用完。添加组分在 2-8℃保存时可能有少量析出，为正常现象，不影响使用，放于室温 1-4 小时后，待所有成分溶解后使用。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 OptiVibro® 细胞因子 I，取 50 mL 离心管，加入 15 mL DPBS，吸取 45  $\mu$ L OptiVibro® 细胞因子 I 至 DPBS 中（若 OptiVibro® 细胞因子 I 一次性用完，建议吸取 50 mL 离心管内 1 mL DPBS 将 OptiVibro® 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 OptiVibro® 细胞因子 II、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℃，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 10min 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  $2-2.5 \times 10^6$  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  $3 \times 10^6$  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。

6. OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01 (无酚红) (NE000-N062) 含有 OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)、OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01 以及 OptiVibro® 细胞因子 III, 可以与本试剂盒配合使用, 在 NK 细胞激活后支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

## I 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 NE01

(无酚红) (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

1. 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;
2. 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。