

# ExCell Bio

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

### User Manual

Catalog Number NE000-N022  
NE000-N021  
NE000-N021S



## I 产品概述

OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 是一款专为 NK 细胞培养而设计的无血清（Serum-Free）、无动物源成分的纯因子体外诱导扩增培养试剂盒，包括 NK 细胞扩增无血清培养基 P01、NK 无血清培养基添加组分、细胞因子 I、细胞因子 II 和细胞因子 III。OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 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。

## I 产品规格

货号	品名	规格	保存条件	有效期（暂定）
<b>NE000-N022</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 P01</b>	<b>1 kit</b>	-	-
NE000-N022 (1 of 5)	NK 细胞无血清基础培养基 P01	1000mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
NE000-N022 (2 of 5)	NK 无血清培养基添加组分	8mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
NE000-N022 (3 of 5)	细胞因子 I	45µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N022 (4 of 5)	细胞因子 II	150µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N022 (5 of 5)	细胞因子 III	310µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
<b>NE000-N021</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 P01</b>	<b>1 kit</b>	-	-
NE000-N021 (1 of 5)	NK 细胞无血清基础培养基 P01	500mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
NE000-N021 (2 of 5)	NK 无血清培养基添加组分	4mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
NE000-N021 (3 of 5)	细胞因子 I	22.5µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N021 (4 of 5)	细胞因子 II	75µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N021 (5 of 5)	细胞因子 III	155µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
<b>NE000-N021S</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 P01（试用装）</b>	<b>1 kit</b>	-	-
NE000-N021S (1 of 4)	NK 细胞无血清培养基 P01 <sup>c</sup>	100mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
NE000-N021S (2 of 4)	细胞因子 I	9µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N021S (3 of 4)	细胞因子 II	30µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
NE000-N021S (4 of 4)	细胞因子 III	31µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月

<sup>a</sup> 只需将培养基放于不透明的冰箱内避光，无需特殊避光措施。

<sup>b</sup> 收到时请确认盒子里有干冰，三管细胞因子处于冻存状态，收到后马上放于-20°C保存。

<sup>c</sup> 试用装的 NK 细胞无血清培养基 P01 已加入了添加组分，无需再加 NK 无血清培养基添加组分。

## I 使用方法

### 试剂与材料

- OptiVibro<sup>®</sup> NK 细胞扩增试剂盒 P01
- 外周血单个核细胞 (PBMC) 或脐带血单个核细胞
- 添加热灭活自体血浆 (也可用商业化人 AB 血清代替) 使用, 培养效果更好
- 培养板/培养瓶/培养袋
- 常用细胞培养试剂与材料, 如无菌 DPBS、离心管、移液管等

### NK 细胞扩增完全培养基配制

1. 取 NK 无血清培养基添加组分即 NE000-N02#(2 of 5), 用 75%酒精喷洒瓶身。在生物安全柜内打开 NK 细胞基础培养基即 NE000-N02#(1 of 5)与 NK 无血清培养基添加组分的盖子, 每 1000mL/500mL 基础培养基中加入 8mL/4mL 添加组分, 盖好基础培养基的盖子, 颠倒 3~5 次混匀, 可长期保存, 效期以基础培养基的效期为准, 添加细胞因子 III 后开始使用。(试用装的培养基中已经预加入了添加组分, 无需再加添加组分)。
2. 每 1000mL/500mL NK 细胞无血清培养基 P01(含有添加组分) 加入 1 支 310 $\mu$ L /155 $\mu$ L 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 冻融次数不超过三次。

### 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. 培养瓶预处理: 室温下融化细胞因子 I, 取 50mL 离心管, 加入 15mL DPBS, 吸取 45  $\mu$ L 细胞因子 I 至 DPBS 中 (若细胞因子 I 一次性用完, 建议吸取 50mL 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 75cm<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 $^{\circ}$ C活化过夜。若不马上使用, 可置于 4 $^{\circ}$ C冰箱储存, 建议 3 天内使用。
2. 第 0 天, 取出 4 $^{\circ}$ C活化过夜的培养瓶, 弃掉包被液, 使用 15mL NK 培养基 (可添加 10%的热灭活自体血浆) 重悬 PBMC 接种于 T75 瓶中 (推荐接种密度  $2 \times 10^6$  cells/mL), 添加细胞因子II 150 $\mu$ L, 前

后左右晃动，放入 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

- 第 3 天，沿培养瓶侧壁缓慢补加 15mL 的新鲜 NK 培养基（可添加 10% 的热灭活自体血浆），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。
- 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），调整细胞密度 1.0-1.5 × 10<sup>6</sup> cells/mL，根据细胞悬液体积进行扩瓶或转入细胞培养袋培养。
- 第 7 天后，每隔一天或两天取样计数补液，调整细胞密度 0.5-1.0 × 10<sup>6</sup> 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%。
- 培养至第 12-18 天收获细胞。
- OptiVibro<sup>®</sup> NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (NE000-N03#) 含有 NK 细胞无血清基础培养基 P01、添加组分以及细胞因子 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。

#### 注意：

- 培养基平衡至室温使用，细胞因子反复冻融次数不超过三次。
- 脐带血单个核细胞的培养方式与 PBMC 一致。
- 如果使用较小体系进行测试，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	45μL	15mL	150μL	1.5-2.5 × 10 <sup>6</sup> cells/mL	15mL
T25	15μL	5mL	50μL	1.5-2.5 × 10 <sup>6</sup> cells/mL	5mL
6 孔板（每孔）	6μL	2mL	20μL	1.5-2.5 × 10 <sup>6</sup> cells/mL	2mL
12 孔板（每孔）	3μL	1mL	10μL	1.5-2.5 × 10 <sup>6</sup> cells/mL	1mL

- 第 0 天的细胞接种密度可以在 1.5-2.5 × 10<sup>6</sup> cells/mL 范围内，如果是冻存的 PBMC，建议提前一天复苏，培养箱中过夜静息，建议接种密度为 2.0-3.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL。
- 接种密度低于 1.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL 可导致培养失败。
- 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 0.4-2.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL。