

ExCell Bio

OptiVitro[®] NK 细胞扩增基础试剂盒 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

User Manual

Catalog Number NE000-N062

NE000-N061

NE000-N061S



I 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（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 NE01（无酚红）、NK 无血清培养基添加组分和细胞因子 III。OptiViro® 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。OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N06#）可以与 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N05#）配合使用，在 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N05#）基础上支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

I 产品规格

货号	品名	规格	保存条件	有效期（暂定）
NE000-N062	NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）	1 kit	-	-
BA0142	NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）	1000 mL	2-8 °C 避光 ^a	12 个月
BA0102	NK 无血清培养基添加组分	8 mL	2-8 °C 避光 ^a	18 个月
BA0132	细胞因子 III	310 µL	-20 °C ^b	12 个月
NE000-N061	NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）	1 kit	-	-
BA0141	NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）	500 mL	2-8 °C 避光 ^a	12 个月
BA0101	NK 无血清培养基添加组分	4 mL	2-8 °C 避光 ^a	18 个月
BA0131	细胞因子 III	155 µL	-20 °C ^b	12 个月
NE000-N061S	NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（试用装）	1 kit	-	-
BA0141S	NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）（试用装）	100 mL	2-8 °C 避光 ^a	12 个月
BA0101S	NK 无血清培养基添加组分（试用装）	0.8 mL	2-8 °C 避光 ^a	18 个月
BA0131S	细胞因子 III（试用装）	31 µL	-20 °C ^b	12 个月

^a 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。

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

I 使用方法

试剂与材料

- OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N05#）
- OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N06#）
- 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、商业化人 AB 血清或商业化血清替代物使用，培养效果更好
- 常用细胞培养试剂与材料，如 DPBS、培养板、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，用 75%酒精喷洒瓶身。在生物安全柜内打开 NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）与 NK 无血清培养基添加组分的盖子，每 500 mL/1000 mL 基础培养基中加入 4 mL/8 mL 添加组分，盖好基础培养基的盖子，颠倒 3~5 次混匀，混合后的培养基建议一个月内使用。
2. 每 500 mL/1000 mL NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）（已加入添加组分）加入 1 支 155 μ L /310 μ 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（冻融次数不超过 3 次）进行分装，根据比例减少完全培养基配制量，延长使用时间。

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（OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红），NE000-N05#），取 50 mL 离心管，加入 15 mL DPBS，吸取 45 μ L 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 cm² 的细胞培养瓶（T75）中，前后左右晃动，使液体分散在瓶底，4°C 活化过夜。若不马上使用，可置于 4°C 冰箱储存，建议 3 天内使用。
2. 第 0 天，取出 4°C 活化过夜的培养瓶，弃掉包被液，使用 15 mL 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 2×10^6 cells/mL), 添加细胞因子II (OptiViro[®] NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红), NE000-N05#) 150 μ L, 前后左右晃动, 放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

- 第 3 天, 沿培养瓶侧壁缓慢补加 15 mL 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 $1.0-1.5 \times 10^6$ cells/mL, 根据细胞悬液体积进行扩瓶或转入细胞培养袋培养。
- 第 7 天后, 每隔一天或两天取样计数补液, 调整细胞密度 $0.5-1.0 \times 10^6$ 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%。
- 培养至第 12-18 天收获细胞。

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 μ L	15 mL	150 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	15 mL
T25	15 μ L	5 mL	50 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	5 mL
6 孔板 (每孔)	6 μ L	2 mL	20 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	2 mL
12 孔板 (每孔)	3 μ L	1 mL	10 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	1 mL

- 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, 建议提前一天复苏, 培养箱中过夜静息, 建议接种密度为 $2.0-3.0 \times 10^6$ cells/mL。
- 接种密度低于 1.0×10^6 cells/mL 可能导致培养失败。
- 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 $1.0-2.0 \times 10^6$ cells/mL。