

# ExCell Bio

## OptiVitro<sup>®</sup> T 细胞无血清培养基 (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 TE000-N032

TE000-N031

TE000-N031S

TE000-N071

TE000-N072

TE000-N073



## 产品概述

OptiVibro® T 细胞无血清培养基（无酚红）（OptiVibro® T Cell Serum-free Medium (phenol red-free)）是一款专为 T 细胞培养而设计的无血清（Serum-Free）、无异源动物源成分、无外源生长因子、无酚红的 T 细胞维持和扩增培养基。和传统的含血清培养基相比，无血清、无异种成分的设计大大降低了在 T 细胞培养过程中引入异源感染物的风险，提高了培养基批次间的一致性，有利于进行临床及大规模转化。经严格实验室验证，OptiVibro® T 细胞无血清培养基（无酚红）适合用于扩增人外周血单个核细胞（PBMC）中的 T 细胞。

## 产品规格

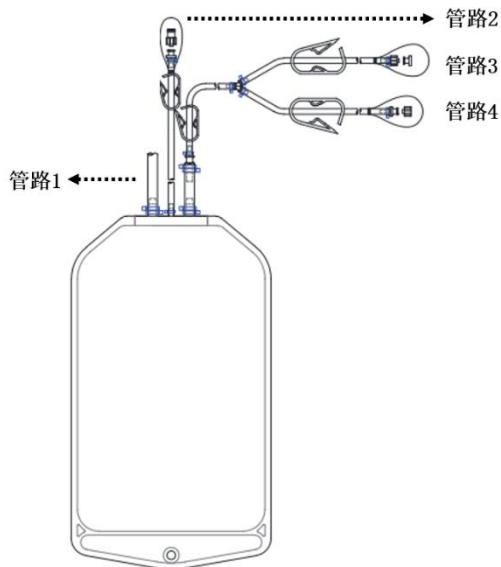
货号	品名	规格	保存条件	有效期 (暂定)
<b>TE000-N032</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）</b>	<b>1 kit</b>	-	-
BA0042	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）	1000 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0052	T 细胞无血清培养基添加组分	8 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
<b>TE000-N031</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）</b>	<b>1 kit</b>	-	-
BA0041	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）	500 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0051	T 细胞无血清培养基添加组分	4 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
<b>TE000-N031S</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）（试用装）</b>	<b>1 kit</b>	-	-
BA0041S	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）（试用装）	100 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0051S	T 细胞无血清培养基添加组分（试用装）	0.8 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
<b>TE000-N071</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）</b>	<b>1L 袋装</b>	-	-
BA0161	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）	1 L	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0171	T 细胞无血清培养基添加组分	8 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
<b>TE000-N072</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）</b>	<b>2L 袋装</b>	-	-
BA0162	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）	2 L	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0172	T 细胞无血清培养基添加组分	16 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
<b>TE000-N073</b>	<b>T 细胞无血清培养基（无酚红）</b>	<b>5L 袋装</b>	-	-
BA0163	T 细胞无血清基础培养基（无酚红）	5 L	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0173	T 细胞无血清培养基添加组分	40 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 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。

## I 使用方法

### 配制完全培养基

- **瓶装培养基使用说明：**在生物安全柜内打开基础培养基与添加组分的盖子，每 500 mL/1000 mL 基础培养基中添加 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，即得到完全培养基，混合后的培养基建议一个月内使用。
- **袋装培养基使用说明：**在生物安全柜内打开培养袋最中间管路上的止液夹，然后打开无菌取样/进样口的外包装，然后取掉添加组分西林瓶的蓝盖，使用无菌注射器插进胶塞进入西林瓶吸取添加组分 8 mL/16 mL/40 mL，将添加组分通过基础培养基袋的无菌取样/进样口加入袋子中，进液完毕后，直接拔出无菌注射器，关闭管路中的止液夹，轻轻摇晃培养袋，使其充分混匀，即得到完全培养基，可以开始使用，混合后的培养基建议一个月内使用。如果需要，培养基可进一步补充细胞因子和/或抗生素，步骤同上。袋装培养基管路结构如右图，



说明如下：

	管材	管路长度	管上结构	用途
管路 1	热塑管	约 10cm	/	培养基灌装管路，已密封
管路 2	硅胶管	约 5cm	止液夹、针刺取样/进样口	无菌取样/进样用
管路 3	PVC 3.1/4.1mm	约 40cm	止液夹、母鲁尔堵头	可根据需要使用接头连接培养袋，或通过 PVC 接管方式连接培养袋。
管路 4	PVC 3.1/4.1mm	约 40cm	止液夹、公鲁尔堵头	

## PBMC 中 T 细胞的激活和扩增培养

### 以冻存 PBMC 复苏培养为例

1. 复苏 PBMC: 在生物安全柜内准备一支 15 mL 离心管, 向其中加入 9 mL 预热至室温的完全培养基(以下简称培养基)备用。将 PBMC 冻存管从液氮中取出, 迅速放入 37°C 水浴中, 不断摇动冻存管并观察其中的冰块解冻情况。当冻存管中的冰块即将完全融化(约需要 1 分钟)时, 将冻存管从水浴中移出并继续晃动使冰晶完全消失;
2. 将冻存管内的 PBMC 细胞悬液全部加入准备好的 15 mL 离心管内的 9 mL 预热至室温的培养基中, 吸取管内 1 mL 液体将冻存管冲洗 1 次并加回管内(此步骤为避免细胞损失)。盖好离心管盖, 轻轻颠倒 4-5 次混匀。400×g 离心 5 分钟沉淀细胞, 去除上清, 以 1mL 或其他适量体积的培养基重悬细胞, 计数;
3. 根据计数结果的活细胞数, 以不超过  $2 \times 10^6$  cells/mL 密度将 PBMC 接种于 6 孔板内, 每孔 2 mL 培养基, 放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 16-24 小时(此步骤为 T 细胞激活前的静息期, 但不是必须步骤, 可不做);
4. T 细胞的激活: 本产品适用抗体包被培养瓶进行激活, 也适用商业化包被了 anti-human CD3/CD28 抗体的偶联磁珠激活, 以下以抗体包板培养为例:
5. 激活前一天, 准备用于 T 细胞激活的 anti-human CD3/CD28 抗体包被的培养瓶: 用 PBS 配制 anti-human CD3 抗体和 anti-human CD28 抗体的混合液, 使得 anti-human CD3 抗体和 anti-human CD28 抗体的终浓度分别为 1 µg/mL 和 0.5 µg/mL (不同来源的抗体适宜使用浓度可能不同, 应根据实际情况先做抗体浓度梯度测试, 建议测试范围 0.5-5 µg/mL, 选择激活效果最好的抗体浓度), 将抗体混合液加入待用的培养瓶内, 保证液体覆盖整个孔底, 用封口膜封好后 4 °C 静置过夜备用。
6. 从 4 °C 冰箱中取出抗体包被培养瓶, 生物安全柜内吸去抗体混合液, 加入适量体积的培养基, 加入终浓度为 300 IU/mL 的 IL-2 (不同来源的 IL-2 适宜使用浓度可能不同, 应根据实际情况先做 IL-2 浓度梯度测试, 建议测试范围 100-500 IU/mL, 选择细胞增殖效果最好的 IL-2 浓度), 放入培养箱备用;

7. 从培养箱内取出复苏并静息过夜（16-24 小时）的 PBMC，在生物安全柜中用 1mL 移液器轻吹板底，收取全部细胞，400×g 离心 5 分钟，以适当体积重悬细胞并计数；
8. 从培养箱内取出准备好的 CD3/CD28 抗体包被的培养瓶，根据细胞计数结果，按  $0.5-1 \times 10^6$  cells/mL 密度将 PBMC 接种于培养瓶内，放入培养箱继续培养；
9. 补液或换液：可从激活后 72h 开始，观察细胞形态并计数，每 2-3 天适当补充添加了 IL-2 的新鲜培养基，将细胞密度调整在  $0.5-1 \times 10^6$  cells/mL 范围。也可离心沉淀细胞并完全更换为添加了 IL-2 的新鲜培养基，研究者可根据自身实验情况选择补液或者全部换液；
10. 转入摇瓶或反应器培养：细胞激活后第 5 天至第 7 天（Day5-Day7）适宜将静置培养的 T 细胞转入摇瓶或者反应器培养，每 2-3 天适当补充添加了 IL-2 的新鲜培养基，将细胞密度调整在  $0.5-1 \times 10^6$  cells/mL 范围，培养体积达到目标体积之后可进行部分换液或灌流。

**注意：**

培养基平衡至室温再使用。