

# ExCell Bio

## OptiVitro<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

### User Manual

Catalog Number NE000-N052  
NE000-N051  
NE000-N051S



## I 产品概述

OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 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纯因子体外诱导扩增培养试剂盒,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、细胞因子 I、细胞因子 II 和细胞因子 III。OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 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。

## I 产品规格

货号	品名	规格	保存条件	有效期(暂定)
<b>NE000-N052</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 NE01(无酚红)</b>	<b>1 kit</b>	-	-
BA0142	NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)	1000 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0102	NK 无血清培养基添加组分	8 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
BA0112	细胞因子 I	45 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0122	细胞因子 II	150 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0132	细胞因子 III	310 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
<b>NE000-N051</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 NE01(无酚红)</b>	<b>1 kit</b>	-	-
BA0141	NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)	500 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	12 个月
BA0101	NK 无血清培养基添加组分	4 mL	2-8 °C 避光 <sup>a</sup>	18 个月
BA0111	细胞因子 I	22.5 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0121	细胞因子 II	75 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0131	细胞因子 III	155 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
<b>NE000-N051S</b>	<b>NK 细胞扩增试剂盒 NE01(无酚红) (试用装)</b>	<b>1 kit</b>	-	-
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 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	18 个月
BA0111S	细胞因子 I(试用装)	9 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0121S	细胞因子 II(试用装)	30 µL	-20 °C <sup>b</sup>	12 个月
BA0131S	细胞因子 III(试用装)	31 µL	-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。

## I 使用方法

### 试剂与材料

- OptiVibro<sup>®</sup> NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）
- 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  $\mu$ L /310  $\mu$ 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（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，取 50 mL 离心管，加入 15 mL 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 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 $^{\circ}$ 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 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  $2 \times 10^6$  cells/mL），添加细胞因子 II 150  $\mu$ L，前后左右晃动，放入 37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

3. 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。
4. 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。
5. 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%。
6. 培养至第 12-18 天收获细胞。
7. OptiViro<sup>®</sup> NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N06#）含有 NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）、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	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

- 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  $1.0 \times 10^6$  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  $1.0-2.0 \times 10^6$  cells/mL。