

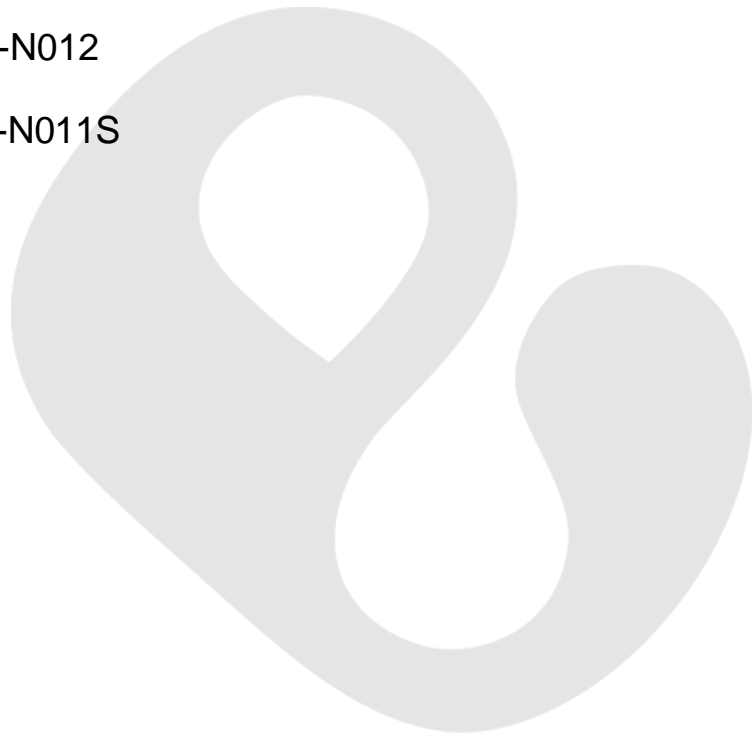
ExCell Bio

OptiVibro® T 细胞无血清培养基说明书

Catalog Number TE000-N011

TE000-N012

TE000-N011S



产品概述

OptiViro® T 细胞无血清培养基（OptiViro® T Cell Medium SF， OptiViro® T-SFM）是一款专为 T 细胞培养而设计的无血清（Serum-Free）、无异种成分（Xeno-Free）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，并且避免了血清中的不明确成分可能导致的 T 细胞过度激活，从而可以更好的扩增 T 细胞并保持其潜能，有利于进行临床及大规模转化。经严格实验室验证，OptiViro® T-SFM 适合用于扩增人外周血单个核细胞（PBMC）中的 T 细胞，也适合于 T 细胞的重激活扩增培养。

产品规格

货号	规格	保存条件	保质期
TE000-N011S	100 mL	2-8 °C 避光	6 个月内为最佳使用期
TE000-N011	500 mL	2-8 °C 避光	6 个月内为最佳使用期
TE000-N012	1000 mL	2-8 °C 避光	6 个月内为最佳使用期

实验流程

一. PBMC 中 T 细胞的激活和扩增

1. Day -1（T 细胞激活前 1 天）：复苏 PBMC

- 1) 提前设计好实验条件，检查所需的试剂和耗材，确定需复苏的 PBMC 细胞在液氮罐中的位置；
- 2) 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 OptiViro® T-SFM 备用；
- 3) 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；
- 4) 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；

- 5) 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 T-SFM 培养基中，吸取消管内 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）；
- 6) 盖好离心管盖，轻轻颠倒 4-5 次混匀；
- 7) 400 g 离心 5 分钟沉淀细胞，去除上清，以 2 mL OptiVibro® T-SFM 重悬细胞，计数，并记录活细胞数和存活率；
- 8) 根据计数结果的活细胞数，以不超过 2×10^6 活细胞/mL 将 PBMC 接种于 6 孔板内，每孔 2 mL OptiVibro® T-SFM（即每孔不超过 4×10^6 活细胞），放入 37°C 二氧化碳培养箱内继续培养 16-24 小时（此步骤为 T 细胞激活前的静息期）；
- 9) 准备用于 T 细胞激活的 anti-human CD3/CD28 抗体包被的培养板：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 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，按 6 孔板每孔 1 mL 的体积将上述抗体混合液加入待用的培养板孔内，保证液体覆盖整个孔底，用 parafilm 封好后 4 °C 静置过夜备用。

2. Day 0: T 细胞的激活

- 1) 从 4 °C 冰箱中取出抗体包被的 6 孔板，生物安全柜内吸去抗体混合液，每孔加入 2 mL OptiVibro® T-SFM（或根据实验设计加入相应体积），向每孔中加入终浓度为 100 IU/mL 的 IL2，放入培养箱备用；
- 2) 从培养箱内取出复苏并静息一天（16-24 小时）的 PBMC 显微镜观察并拍照；
- 3) 用 1 mL 移液器轻吹板底，收取全部细胞，400 g 离心 5 分钟；
- 4) 以适当体积重悬细胞，计数，记录活细胞数和存活率；
- 5) 从培养箱内取出 1) 中准备好的 CD3/CD28 抗体包被的培养板，根据细胞计数结果，按 1×10^5 活细胞/mL 将 PBMC 接种于相应的孔内，放入培养箱继续培养。

3. Day 3: 补充培液（或换液）

观察细胞形态，拍照，向每孔内补充 1 mL 添加了终浓度 100 IU/mL IL2 的新鲜 OptiVibro® T-SFM。

注意：上述步骤也可离心沉淀细胞并完全更换为 2 mL 新鲜 OptiVibro® T-SFM；同样的，以下 4、5 步骤，研究者可根据自身实验情况选择完全换液。

4. Day 4: 补充培液（或换液）

观察细胞形态，拍照，向每孔内补充 1 mL 添加了终浓度 100 IU/mL IL2 的新鲜 OptiVibro® T-SFM。 5.

Day 5: 补充培养液（或换液）

观察细胞形态，拍照，向每孔内补充 2 mL 添加了终浓度为 100 IU/mL IL2 的新鲜 OptiVibro® T-SFM。

6. Day 6: 细胞计数、表型分析、分盘

观察细胞形态，拍照，计数，流式分析细胞表型，并按 1×10^5 活细胞/mL 将细胞重新接种于新的 6 孔板内，每孔培养液为 2 mL 添加了终浓度 100 IU/mL IL2 的新鲜 OptiVibro® T-SFM。

7. Day 8 : 根据实验需要继续观察培养，重复上述 3-6 步骤；或收获细胞用于下游实验，

二. T 细胞的重激活扩增培养

1. Day -1 (T 细胞重激活前 1 天)：准备抗体包被的培养板

- 1) 提前设计好实验条件，检查所需的试剂和耗材，确定需要重激活培养的 T 细胞处于良好生长状态；
- 2) 准备用于 T 细胞激活的 anti-human CD3/CD28 抗体包被的培养板：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 $1 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ，按 6 孔板每孔 1 mL 的体积将上述抗体混合液加入待用的培养板孔内，保证液体覆盖整个孔底，用 parafilm 封好后 4°C 静置过夜备用。

2. Day 0: T 细胞的重激活

- 1) 从 4°C 冰箱中取出抗体包被的 6 孔板，生物安全柜内吸去抗体混合液，每孔加入 2 mL OptiVibro® T-SFM（或根据实验设计加入相应体积），向每孔中加入终浓度为 100 IU/mL 的 IL2，放入培养箱备用；
- 2) 收取需要重新激活的 T 细胞， 400 g 离心 5 分钟；
- 3) 以适当体积重悬细胞，计数，记录活细胞数和存活率；
- 4) 从培养箱内取出 1) 中准备好的 CD3/CD28 抗体包被的培养板，根据细胞计数结果，按 1×10^5 活细胞/mL 将需要重新激活的 T 细胞接种于相应的孔内，放入培养箱继续培养。

3. Day 3: 后续培养

观察细胞形态，拍照，每 2-3 天向每孔内补充（或完全更换）2 mL 添加了终浓度为 100 IU/mL IL2 的新鲜 OptiVibro® T-SFM，根据实验需要继续培养，重复补液（换液）或分盘步骤。