

ExCell Bio

OptiVitro[®] T 细胞无血清培养基

User Manual

Catalog Number TE000-N011

TE000-N012

TE000-N011S



产品概述

OptiVibro® T 细胞无血清培养基（OptiVibro® T Cell Medium SF， OptiVibro® 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。经严格的实验室验证，OptiVibro® 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。

产品性能

- OptiVibro® T-SFM 培养的 T 细胞维持其典型的激活形态和细胞表型；
- OptiVibro® T-SFM 培养的 T 细胞保持快速增殖能力和高活力；
- OptiVibro® T-SFM 维持 T 细胞的潜能；
- OptiVibro® T-SFM 支持 T 细胞的重激活；

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
TE000-N011	500 ml	2-8 °C 避光	6 个月
TE000-N012	1000 ml	2-8 °C 避光	6 个月

实验材料和试剂

1. 实验设备及材料

1) 外周血单个核细胞 (PBMC)； anti-human CD3 抗体和 anti-human CD28 抗体； PBS 1X； 六孔板； 细胞培养瓶或根据研究者的需要准备培养瓶或培养袋； 15 mL 离心管； 移液管； 移液枪和枪头； 37℃， 5% CO₂ 细胞培养箱； 离心机； 细胞计数器， 或血球计数板； 倒置显微镜； 水浴锅等。

2) 准备 OptiViro® T-SFM 预热至室温（可每次使用前分出所需体积， 放于室温或 37℃ 预热）。

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℃ 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 OptiViro® 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 2×10⁶ 活细胞/ml 将 PBMC 接种于 6 孔板内， 每孔 2 ml OptiViro® T-SFM（即每孔不超过 4×10⁶ 活细胞）， 放入 37℃ 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 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜备用。

2. Day 0: T 细胞的激活

1) 从 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 1ml 移液器轻吹板底，收取全部细胞，400 \times 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 2×10^5 - 3×10^5 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 2ml 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 2 ml 添加了终浓度 100 IU/ml IL2 的新鲜 OptiVibro[®] T-SFM。

5. Day 5: 补充培液（或换液）

观察细胞形态，拍照，计数，向每孔内补充添加了终浓度为 100 IU/ml IL2 的新鲜 OptiVibro[®] T-SFM，调整细胞密度为 3×10^5 个/ml，根据细胞培养悬液体积选择扩瓶或者继续在 6 孔板内培养（建议 6 孔板内培养体积不超过 5 ml）。

6. Day 6: 细胞计数、表型分析、扩瓶或分盘

观察细胞形态，拍照，计数，流式分析细胞表型，并补充添加了终浓度为 100 IU/ml IL2 的新鲜 OptiVibro[®] T-SFM，调整细胞密度为 3×10^5 个/ml，根据细胞培养悬液体积进行扩瓶培养或按 2×10^5 - 3×10^5 活细胞/ml 将细胞重新接种于新的 6 孔板内，每孔培液为 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, $400\times\text{g}$ 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 $2\times 10^5\text{-}3\times 10^5$ 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。



注意事项

- 本产品的保存条件为 4°C 避光保存 (说明: 只需正常放入冰箱内避光即可, 无需特殊避光措施);
- 不可冻融;
- 不可反复放置于室温或 37°C 预热。如需预热, 可于每次使用前分出所需体积, 放于室温或 37°C 预热, 剩余体积及时放回 4°C 冰箱保存;
- 收到后如发现包装破损、培养基结冰、析出沉淀、浑浊、颜色异常等现象, 请不要使用并及时联系供应商。

相关数据

一：静置培养时的 T 细胞增殖和存活情况 (3 个不同健康人 Donor 的统计数据)

Day 6

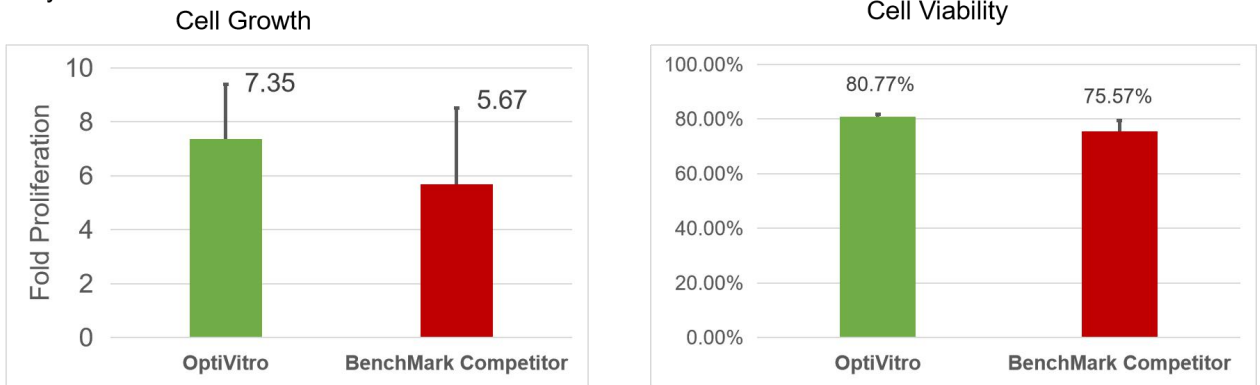


图 1: PBMC 中的 T 细胞在 anti-human CD3/CD28 抗体单次激活后在 OptiVtro® T 细胞无血清培养基中持续增殖, 第 6 天时平均扩增倍数 > 7 倍, 平均细胞存活率 > 80%, 性能表现优于竞品培养基, Donor 间差异小于竞品。

二：T 细胞无血清培养基摇瓶培养测试实验

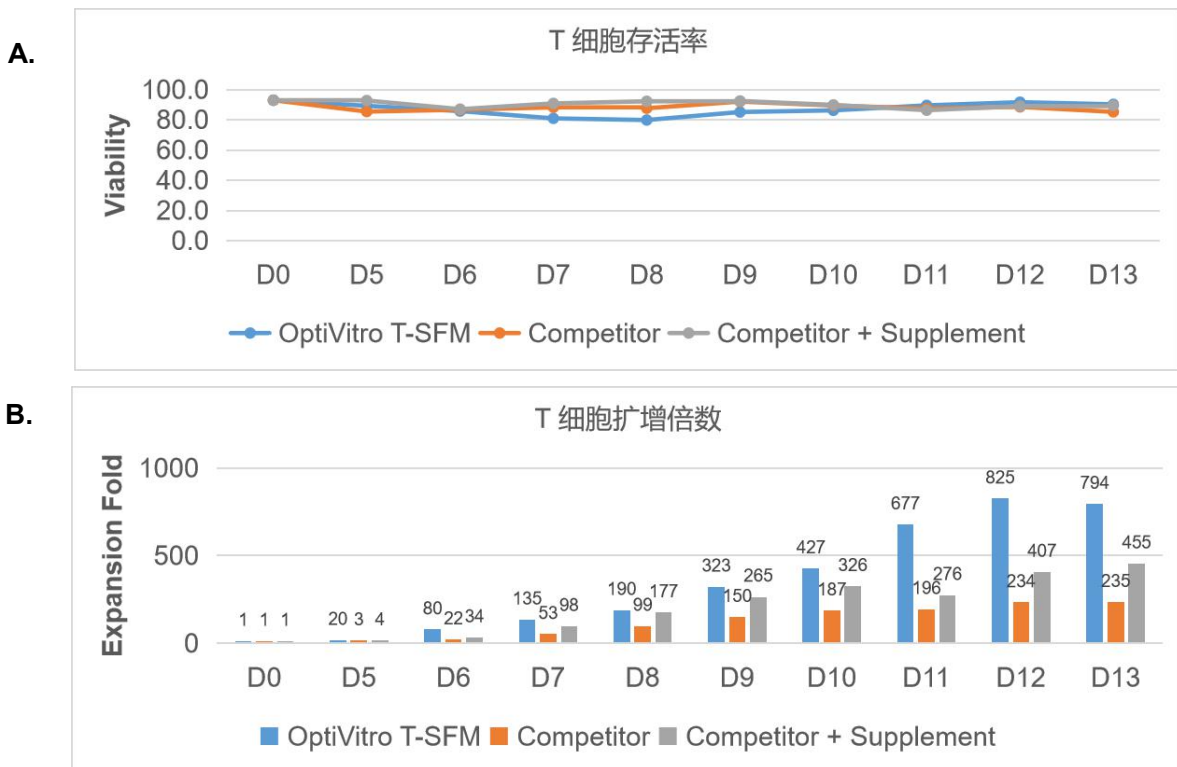


图 2: A: OptiVtro® T-SFM 培养基 T 细胞存活率与竞品相当 (>90%), 最高活细胞密度达 1.3×10^7 个/ml (约为竞品 2 倍); B: OptiVtro® T-SFM 培养基中 T 细胞 12 天扩增 825 倍, 扩增倍数显著优于竞品培养基, 并且显著优于竞品培养基 + OpTmizer 添加物;

三：T 细胞扩增前后的 CD4 和 CD8 比例

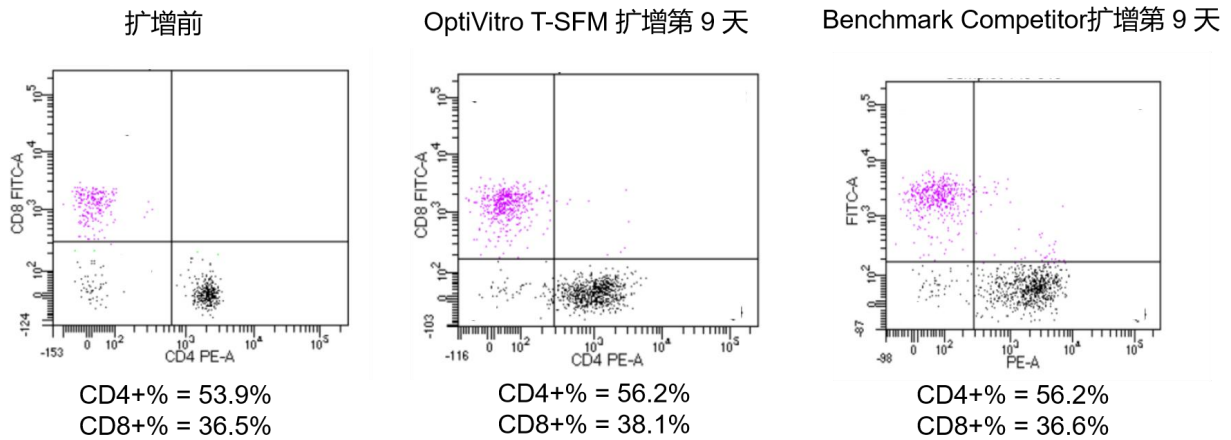


图 3: 不同 Donor 来源的 T 细胞激活后在 OptiViro® T 细胞无血清培养基中扩增培养 6 天, 流式检测发现 CD4 阳性 T 细胞和 CD8 阳性 T 细胞的比例仍与激活前相同, 说明其在维持 T 细胞表型方面的性能优异。(图中 FITC 通道为 CD8 信号, PE 通道为 CD4 信号)

四：扩增第 9 天的 T 细胞中有相当比例的 CD45RA+CD62L+T 细胞

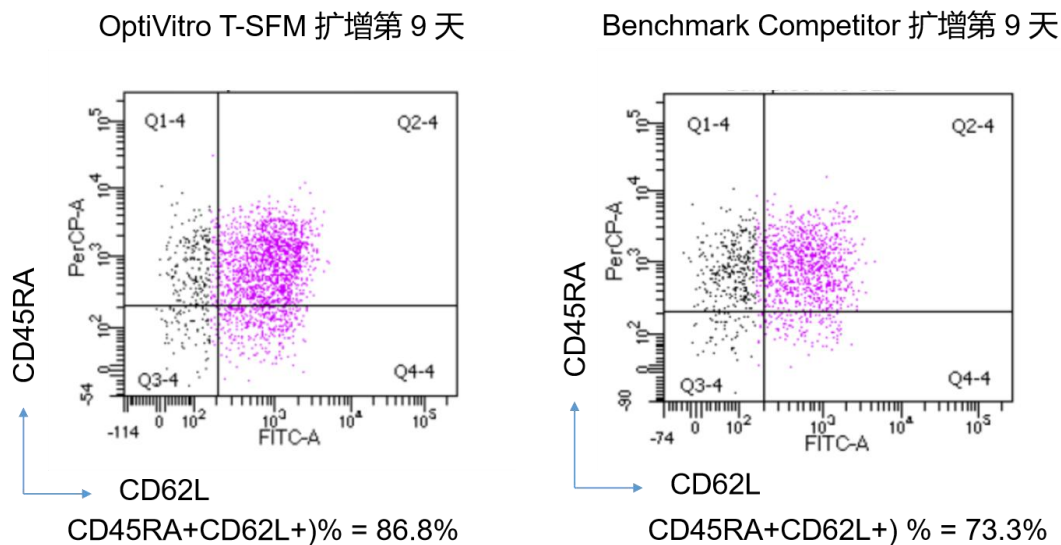


图 4: T 细胞激活后在 OptiViro® T 细胞无血清培养基中扩增培养 9 天, 流式检测发现 CD45RA+CD62L+T 细胞比例达 86.8%, 高于竞品培养基的 73.3%, 说明其在维持 T 细胞的未分化潜能方面性能优越。(图中 FITC 通道为 CD8 信号, PE 通道为 CD4 信号)