

ExCell Bio

OptiViro® 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
Catalog Number	NE000-N051
Catalog Number	NE000-N051S



I 产品概述

OptiViro® 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扩增培养试剂盒, 包括 NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)、免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01、细胞因子 I、细胞因子 II 和细胞因子 III。OptiViro® 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。OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红) 可以与 OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01 (无酚红) (NE000-N06#) 配合使用, 在 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红) 基础上支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

I 产品规格及储存、运输要求

产品名称	货号	规格	存储条件	运输条件	有效期
OptiViro® NK细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红)	NE000-N052	1000 mL kit	2- 8 °C 遮光	-	12个月
OptiViro® NK细胞无血清基础 培养基NE01 (无酚红)	BA0142	1000 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月
OptiViro® 免疫细胞无血清培 养基添加组分UE01	BA0332	8 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子I	BA0112	45 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子II	BA0122	150 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子III	BA0132	310 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
OptiViro® NK细胞扩增试剂盒	NE000-N021	500 mL kit	2- 8 °C 遮光	-	12个月

NE01 (无酚红)					
OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基NE01 (无酚红)	BA0141	500 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月
OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分UE01	BA0331	4 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子I	BA0111	22.5 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子II	BA0121	75 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子III	BA0131	155 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
OptiVibro® NK细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红)	TE000-N021S	100 mL kit	2- 8 °C 遮光	-	12个月
OptiVibro® NK细胞无血清基础培养基NE01 (无酚红)	BA0141S	100 mL	2- 8 °C 遮光	小于25°C 遮光	12个月
OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分UE01	BA0331S	0.8 mL	2- 8 °C 避光	小于25°C 避光	18个月
细胞因子I	BA0111S	9 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子II	BA0121S	30 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月
细胞因子III	BA0131S	31 uL	- 20 °C 遮光	- 20 °C 遮光	12个月

I 产品特点、应用与使用限制

1. 本品仅供科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗。
2. 实验结果可能因供体细胞的不同而可能会出现一定的差异。
3. 本产品不含有血清及异源体成分，不含有抗生素，如有需要可额外添加。

4. 产品需要在有效期内使用。

I 实验材料和试剂

实验设备及材料（自备）

1. 外周血单个核细胞（PBMC）或脐带血单个核细胞；
2. 热灭活自体血浆（也可用商业化血清替代物或人 AB 血清代替）使用；
3. 培养板/培养瓶/培养袋；
4. 淋巴细胞分离液、DPBS 溶液或生理盐水、离心管、移液管、移液枪和枪头；
5. 二氧化碳细胞培养箱、离心机、细胞计数仪、倒置显微镜、水浴锅等。

I 操作方法

配制完全培养基

1. 将 OptiViro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）和 OptiViro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01 在室温下平衡 1-4 小时。在生物安全柜内打开基础培养基与添加组分的盖子，每 1L/500mL 基础培养基中添加 8mL/4mL 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。
2. 每 1000mL/500mL 完全的 OptiViro® NK 细胞无血清培养基 NE01(无酚红)加入 1 支 310μL /155μL 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 进行分装，根据比例减少完全培养基配制量，延长使用时间，细胞因子 III 冻融次数不超过 3 次。

【注意事项】

1. 细胞因子放于室温约 10 min 至融化后、瞬离后再开盖使用。

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. 第 0 天

T75 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 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 cm^2 的细胞培养瓶（T75）中，前后左右晃动，使液体分散在瓶底，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 紧急包被至少 2 小时。

PBMC 接种：取出活化过的 T75 培养瓶，弃掉包被液（不用 PBS 润洗培养瓶），在 T75 瓶中分别加入 NK 培养基、一支 150 μ L 细胞因子 II、10% 比例的自体血浆（1.5 mL）和种子细胞，总体积为 15 mL。前后左右晃动，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养。

【注意事项】

1. 过夜包被的培养瓶在细胞接种前 10min 取出弃掉包被液，不可过早取出。
2. PBMC 铺瓶的起始细胞密度建议 2-2.5E6 cells/mL，脐血初始 NK 比例较低时，可适当提高初始铺瓶细胞密度至 3E6 cells/mL。接种密度过低或过高对最终收获的细胞数和 NK 纯度都会有影响。
3. 接种细胞时，电动移液枪取细胞悬液打到非包被接触的瓶底，轻轻晃动瓶子铺匀，时间尽量短。

2. 第 3 天

沿培养瓶侧壁缓慢补加 13.5 mL 的 NK 培养基和 10% 的热灭活自体血浆（1.5 mL），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。

3. 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），建议调整细胞密度 1.0×10^6 cells/mL，将 T75 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 培养瓶。

4. 第 7 天及以后

每隔一天或两天取样计数补液，可以将细胞密度调整至 $0.5-1.0 \times 10^6$ 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%。

5. 第 14-18 天收获细胞。

6. OptiVibro® 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。

I 其他

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

2. 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, 也可以尝试提前一天复苏, 培养箱中过夜静息 (冻存会造成细胞膜损伤, 静息有利于细胞恢复), 接种密度可以为 $2.0-3.0 \times 10^6$ cells/mL。静息操作方法: 冻存样本细胞复苏后使用含有添加组分的 NK 细胞无血清基础培养基 P01 (不含细胞因子), 以密度 2×10^6 cells/mL 左右悬浮细胞, 加入培养瓶中, 放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中静息过夜, 16-18h 即可。

3. 接种密度低于 1.0×10^6 cells/mL 可导致培养失败。

4. 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。

I 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用, 实验者未按说明书指导操作, 本公司不对由此导致的产品性能偏

离承担责任;

2. 产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, 否则所产生的一切后果, 由实验者承担, 本公司概不负责。