

# ExCell Bio

## OptiVitro® 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

货 号

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、无异源动物源成分的扩增培养试剂盒，包括 OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）、OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01、OptiVibro® 细胞因子 I、OptiVibro® 细胞因子 II 和 OptiVibro® 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（PBMCs）、脐带血单个核细胞（CBMCs）中选择性扩增 NK 细胞。OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）可以与 OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N062）配合使用，在 OptiVibro® 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
<b>OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）</b>	<b>NE000-N052</b>	<b>1000 mL kit</b>	-	-	-
OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）	BA0142	1000 mL	2-8°C 遮光	< 25°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01	BA0332	8 mL	2-8°C 避光	< 25°C 避光	18 个月
OptiVibro® 细胞因子 I	BA0112	45 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 II	BA0122	150 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 III	BA0132	310 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
<b>OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01（无酚红）</b>	<b>NE000-N051</b>	<b>500 mL kit</b>	-	-	-
OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）	BA0141	500 mL	2-8°C 遮光	< 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	< 25°C 避光	18 个月

OptiVibro® 细胞因子 I	BA0111	22.5 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 II	BA0121	75 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 III	BA0131	155 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
<b>OptiVibro® NK 细胞扩增试剂盒 NE01 (无酚红)</b>	<b>NE000-N051S</b>	<b>100 mL kit</b>	-	-	-
OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01 (无酚红)	BA0141S	100 mL	2-8°C 遮光	< 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	< 25°C 避光	18 个月
OptiVibro® 细胞因子 I	BA0111S	9 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 II	BA0121S	30 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月
OptiVibro® 细胞因子 III	BA0131S	31 µL	-20°C 遮光	< 0°C 遮光	12 个月

## 产品注意事项

1. 产品存储过程中需要遮光，避免日光灯或其他灯光照射，在冰箱或仓库储存时建议使用有色包装袋。
2. 产品运输过程中需要遮光运输，避免日光或其他灯光照射对产品的外观产生影响导致外观变色。
3. 产品在使用过程中需要转运至洁净区内时，灭菌方式只能采用消毒剂擦拭灭菌，不能使用紫外灭菌。

【注意】在经过带有紫外的传递窗时，需要主动关闭传递窗内的紫外灯。

4. 建议添加热灭活自体血浆、血清替代物（人血小板裂解物）或人 AB 血清使用，但是不可添加 ICSR 产品使用。

## 操作方法

### 配制完全培养基

1. 将 OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）和 OptiVibro® 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 1000 mL/500 mL

基础培养基中添加 8 mL/4 mL 添加组分，盖好基础培养基的盖子，颠倒 3-5 次混匀，即得到完全的 OptiVibro® NK 细胞无血清培养基 NE01（无酚红）。

2. 每 1000 mL/500 mL 完全的 OptiVibro® NK 细胞无血清培养基 NE01（无酚红）加入 1 支 310  $\mu$ L/155  $\mu$ L OptiVibro® 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 2 周，也可将 OptiVibro® 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，OptiVibro® 细胞因子 III 冻融次数不超过 3 次。

【注意】使用培养基前将添加组分和基础培养基分别置于室温 1-4 小时，恢复至室温后进行混合。基础培养基与添加组分混合后，可放于 2-8°C 遮光保存，建议两周内用完。添加组分在 2-8°C 保存时可能有少量析出，为正常现象，不影响使用，放于室温 1-4 小时后，待所有成分溶解后使用。细胞因子放于室温约 10 min 至融化后、瞬离后再开盖使用。

## PBMCs 中 NK 细胞的激活和扩增培养

### 第 0 天

T75 培养瓶预处理：室温下融化 OptiVibro® 细胞因子 I，取 50 mL 离心管，加入 15 mL DPBS，吸取 45  $\mu$ L OptiVibro® 细胞因子 I 至 DPBS 中（若 OptiVibro® 细胞因子 I 一次性用完，建议吸取 50 mL 离心管内 1 mL DPBS 将 OptiVibro® 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°C 包被过夜或 37°C 紧急包被至少 2 小时。

PBMCs 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  $\mu$ L OptiVibro® 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°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 【注意】

- 1) 过夜包被的培养瓶在细胞接种前 10 min 取出弃掉包被液，不可过早取出。
- 2) PBMCs 铺瓶的起始细胞密度建议 2.0-2.5 $\times 10^6$  cells/mL，脐血初始 NK 比例较低时，可适当提高起始细胞密度至 3.0 $\times 10^6$  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。

### 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。

### 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  $1.0 \times 10^6$  cells/mL，将 T75 瓶中的培养基和细胞转移至 T175 培养瓶。

### 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%。

### 细胞收获

第 14-18 天收获细胞。

【注意】OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N062）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。OptiVibro® NK 细胞扩增基础试剂盒 NE01（无酚红）（NE000-N062）含有 OptiVibro® NK 细胞无血清基础培养基 NE01（无酚红）、OptiVibro® 免疫细胞无血清培养基添加组分 UE01 以及 OptiVibro® 细胞因子 III。

## I 其他

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 PBMCs 密度	接种体积
T75	45 $\mu$ L	15 mL	150 $\mu$ L	$2.0-2.5 \times 10^6$ cells/mL	15 mL
T25	15 $\mu$ L	5 mL	50 $\mu$ L	$2.0-2.5 \times 10^6$ cells/mL	5 mL
6 孔板 (每孔)	6 $\mu$ L	2 mL	20 $\mu$ L	$2.0-2.5 \times 10^6$ cells/mL	2 mL
12 孔板 (每孔)	3 $\mu$ L	1 mL	10 $\mu$ L	$2.0-2.5 \times 10^6$ cells/mL	1 mL

#### 【注意】

- 1) 第 0 天的细胞接种密度一般在  $2.0-2.5 \times 10^6$  cells/mL 范围内，如果是冻存的 PBMCs，接种密度可以为  $2.0-3.0 \times 10^6$  cells/mL。
- 2) 接种密度低于  $1.0 \times 10^6$  cells/mL 可导致培养失败。
- 3) 如果从 PBMCs 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。

## | 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。