

ExCell Bio

OptiVitro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 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-N032
NE000-N031
NE000-N031S



I 产品概述

OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (OptiViro® NK Cell Expansion Serum-free Basic Kit P01) 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 P01、NK 无血清培养基添加组分和细胞因子 III。OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 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 细胞扩增基础试剂盒 P01 (NE000-N03#) 可以与 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 (NE000-N02#) 配合使用, 在 OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 (NE000-N02#) 基础上支持更大批量的 NK 细胞扩增需求。

I 产品规格

货号	品名	规格	保存条件	有效期 (暂定)
NE000-N032	NK 细胞扩增基础试剂盒 P01	1 kit	-	-
BA0092	NK 细胞无血清基础培养基 P01	1000 mL	2-8 °C 避光 ^a	12 个月
BA0102	NK 无血清培养基添加组分	8 mL	2-8 °C 避光 ^a	18 个月
BA0132	细胞因子 III	310 µL	-20 °C ^b	12 个月
NE000-N031	NK 细胞扩增基础试剂盒 P01	1 kit	-	-
BA0091	NK 细胞无血清基础培养基 P01	500 mL	2-8 °C 避光 ^a	12 个月
BA0101	NK 无血清培养基添加组分	4 mL	2-8 °C 避光 ^a	18 个月
BA0131	细胞因子 III	155 µL	-20 °C ^b	12 个月
NE000-N031S	NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (试用装)	1 kit	-	-
BA0091S	NK 细胞无血清基础培养基 P01 (试用装)	100 mL	2-8 °C 避光 ^a	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 ^a	18 个月
BA0131S	细胞因子 III (试用装)	31 µL	-20 °C ^b	12 个月

^a 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。

^b 收到时请确认盒子里有干冰, 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

- OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 (NE000-N02#)
- OptiViro® NK 细胞扩增基础试剂盒 P01 (NE000-N03#)
- 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 P01 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 P01 (已加入添加组分) 加入 1 支 155 μ L /310 μ 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 (OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 NE000-N02#), 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 cm² 的细胞培养瓶 (T75) 中, 前后左右晃动, 使液体分散在瓶底, 4°C 活化过夜。若不马上使用, 可置于 4°C 冰箱储存, 建议 3 天内使用。
2. 第 0 天, 取出 4°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 2×10^6 cells/mL), 添加细胞因子 II (OptiViro® NK 细胞扩增试剂盒 P01 NE000-N02#) 150 μ L, 前后左右晃动, 放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。
3. 第 3 天, 沿培养瓶侧壁缓慢补加 15 mL 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。

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	15 mL	150 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	15 mL
T25	15 μ L	5 mL	50 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	5 mL
6 孔板（每孔）	6 μ L	2 mL	20 μ L	$1.5-2.5 \times 10^6$ cells/mL	2 mL
12 孔板（每孔）	3 μ L	1 mL	10 μ 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 1.0×10^6 cells/mL 可能导致培养失败。
- 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。