



杂交瘤 3 号培养基（含血清）

产品编号：8103

杂交瘤 3 号培养基是在 Sigma-Aldrich DMEM 基础上添加适当营养成分和注射用水配制而成，含有胎牛血清、谷氨酰胺、丙酮酸钠、酚红、2-巯基乙醇、抗生素及促杂交瘤生长因子。

本产品经小鼠杂交瘤细胞制备测试，应用于细胞融合后加 HAT 选择培养前促进细胞的活力恢复。

试剂组成和规格

100ml/瓶

运输、储存和有效期

冷藏运输，-20°C 储存，在有效期内使用。正常储存条件下自生产之日起有效期 2 年。

使用方法

1. 用前从冷冻室取出，置于 15~20°C，或 2~8°C 过夜融化，混匀。不要置于 37°C 水浴融化。
2. 融化的培养基可在 2~8°C 储存至 1 个月，或分装后冻存于 -20°C，至有效期

细胞融合步骤

1. 将 10^8 脾细胞和 2×10^7 骨髓瘤细胞（分别悬浮在 25ml 杂交瘤 2 号培养基）混合。
2. 1000rpm (200-400g) 离心 5-10 分钟。
3. 彻底吸除上清，避免在后面的操作中稀释 PEG。
4. 轻轻敲击试管底部，打散细胞团，将试管放入 37°C 水浴中，融合过程在水浴中进行。
5. 用 1ml 吸管将 1ml 预热 37°C 的 50%PEG1500 加入到细胞团中，边加边用吸管头轻轻搅拌，1 分钟内加完。
6. 继续搅拌 50%PEG1500 中的细胞 1-2 分钟。
7. 缓慢加 1ml 预热 37°C 的杂交瘤 2 号培养基，边加边搅拌，1 分钟内加完。
8. 缓慢加 4ml 预热 37°C 的杂交瘤 2 号培养基，边加边搅拌，2 分钟内加完。
9. 缓慢加 10ml 预热 37°C 的杂交瘤 2 号培养基。
10. 37°C 孵育 5 分钟，。
11. 1000rpm (200-400g) 离心 5-10 分钟
12. 移去上清，将细胞悬浮于杂交瘤 3 号培养基 10ml 中，用粗口尖吸管轻轻吹散，在 37°C 5%CO₂ 条件下培养过夜（16~24 小时）。

一步法在 96 孔板中进行杂交瘤筛选和克隆

1. 将杂交瘤 4 号培养基 90ml (含 HAT 半固体培养基) 提前一天在 2~8°C 过夜融化。
2. 在细胞融合当天，烈摇动融化的杂交瘤选择培养基并预热到室温。
3. 将 10ml 前一天融合的细胞悬液与 90ml 杂交瘤 4 号培养基混合，轻轻翻转细胞瓶 6 次，静置 15 分钟。
4. 用多通道枪或滴管在 96 孔培养板中每孔加入 100 μ l。
5. 在 37°C 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中培养 8 天。
6. 每孔加 150 μ l 杂交瘤 5 号培养基。
7. 在 37°C 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中再培养 2~4 天。
8. 每孔取 50 μ l 培养上清，进行抗体检测。阳性孔检查克隆数，含有单个克隆的孔可用弯头滴管吸取细胞转移到每孔含有 200 μ l 杂交瘤 5 号培养基的 96 孔板中；如果含有 2 个或 3 个克隆，且距离足够远，不会互相混合生长，可分别将每个克隆单独转移到每孔含有 200 μ l



杂交瘤 5 号培养基的 96 孔板中；如果克隆之间不能分开，需要用传统方法克隆（如有限稀释法）。

参考文献

1. Köhler G, Milstein C: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
2. Harlow E, Lane D: *Monoclonal Antibodies*, Chapter 6 in: *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: ISBN 0-87969-314-2, 1988.
3. Melchers F, Potter M, Warner NL: *Lymphocyte hybridomas. Second workshop on "functional properties of tumors of T and B lymphocytes"*. Preface. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 81: IX-XXIII, 1978
4. Davis JM, Pennington JE, Kubler A-M, Conscience JF: A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 50: 161-171, 1982.
5. Goding JW: Antibody production by hybridomas. [Review]. *J Immunol Methods* 39: 285-308, 1980.
6. Sharon J, Morrison SL, Kabat EA: Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76: 1420-4, 1979.
7. Pearson TW, Pinder M, Roelants G, Kar S, Lundin L, Mayor-Whitney KS, Hewett RS: Methods for derivation and detection of anti-parasite monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 34: 141-154, 1980.
8. Kennett RH, McKearn TJ, Bechtol KB: *Monoclonal antibodies*. Plenum Press, New York, 1980.
9. Coligan JE: *Current Protocols in Immunology*, Unit 2.5: Production of Monoclonal Antibodies. John Wiley & Sons, Inc., USA, 2006

相关产品

产品编号	杂交瘤制备专用培养基	规格
8101	杂交瘤 1 号培养基（含血清），用于融合前骨髓瘤的培养	500 ml
8102	杂交瘤 2 号培养基（无血清），用于杂交瘤融合过程	500 ml
8104	杂交瘤 4 号培养基（半固体，含 HAT 和血清），用于杂交瘤选择性生长	90 ml
8105	杂交瘤 5 号培养基（含血清和 HT），用于杂交瘤增长	500 ml
8106-1	PEG 融合剂（PEG2000, 50%），过滤除菌，细胞融合检测合格	1.0mlx5
8106-10	PEG 融合剂（PEG2000, 50%），过滤除菌，细胞融合检测合格	10mlx5
8106-100	PEG 融合剂（PEG2000, 50%），过滤除菌，细胞融合检测合格	100 ml