



杂交瘤 4 号培养基（半固体，含血清）

产品编号：8104

杂交瘤 4 号培养基是在 Sigma-Aldrich DMEM 基础上添加适当营养成分、甲基纤维素、HAT 和注射用水配制而成的半固体培养基，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，应用于杂交瘤细胞融合后一步法筛选克隆。单个杂交瘤细胞在半固体培养基中生长形成克隆，避免在液体培养基中快速生长的细胞克隆致使慢生长细胞克隆的丢失。半固体培养基使容易挑选单克隆，一步法筛选克隆省时，克隆效率高。

试剂组成和规格

90ml/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）。

一步法在培养皿或 6 孔培养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，剧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. 培养皿中加入混合后的细胞悬液，加入量占培养皿容积的 1/3 到 1/2 。
5. 在 37°C 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中培养 8-10 天，当肉眼可见细胞克隆团时，即可以挑取细



胞克隆。

- 96 孔板中提前加入 5 号培养基(含 HT)300u1, 使用可吸取 10u1 的移液器, 吸取单个的细胞克隆团, 打入 96 孔板中, 每吸取一个细胞克隆更换一个新的枪头。
- 在 37℃ 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中再培养 5-7 天。
- 每孔取 50 μl 培养上清, 进行抗体检测, 如检测结果为阳性即可移入 24 孔板中扩大培养。

一步法在 96 孔板中进行杂交瘤筛选和克隆

- 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℃ 过夜融化。
- 在细胞融合当天, 剧烈摇动融化的杂交瘤选择培养基并预热到室温。
- 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。
- 用多通道枪或滴管在 96 孔培养板中每孔加入 100 μl。
- 在 37℃ 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中培养 8 天。
- 每孔加 150 μl 杂交瘤 5 号培养基。
- 在 37℃ 5%CO₂ 二氧化碳培养箱中再培养 2~4 天。
- 每孔取 50 μl 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 200u1 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 200u1 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)。

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
8103	杂交瘤 3 号培养基 (含血清), 用于细胞融合后筛选前细胞的活力恢复	100 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 (PEG1500, 50%), 过滤除菌, 细胞融合检测合格	1.0mlx5
8106-10	PEG 融合剂 (PEG1500, 50%), 过滤除菌, 细胞融合检测合格	10mlx5
8106-100	PEG 融合剂 (PEG1500, 50%), 过滤除菌, 细胞融合检测合格	100 ml