



## PEG 融合剂（50%PEG2000）

### 产品编号：8106

50%PEG2000 溶解于 75mM HEPES, pH8.0, 0.2 μ m 过滤，直接使用。

本产品经小鼠杂交瘤细胞制备测试，用于杂交瘤细胞的制备。

### 试剂组成和规格

1.0ml/瓶, 10ml/瓶, 100ml/瓶

### 运输、储存和有效期

冷藏运输，-20℃ 储存，避光，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℃，或 2~8℃ 过夜融化，混匀。不要置于 37℃ 水浴融化。
2. 细胞融合过程中避免使用含血清的培养基

### 细胞融合步骤

1. 将  $10^8$  脾细胞和  $2 \times 10^7$  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℃ 水浴中，融合过程在水浴中进行。
5. 用 1ml 吸管将 1ml 预热 37℃ 的 50%PEG2000 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%PEG2000 中的细胞 1-2 分钟。
7. 缓慢加 1ml 预热 37℃ 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℃ 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℃ 的杂交瘤 2 号培养基。
10. 37℃ 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℃ 5%CO<sub>2</sub> 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℃ 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℃ 5%CO<sub>2</sub> 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℃ 5%CO<sub>2</sub> 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 200ul 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 200ul 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
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
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
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