

## PEG法细胞融合 SOP

### 1.主要仪器

表1 实验所用主要仪器

所用仪器	仪器型号	公司
低速离心机	SC-3612	中佳
显微镜	XD-202	重庆澳浦
水浴锅	HHW21	TAISITE
CO2培养箱	MCO-18AC	Heal Force
超净工作台	SW-CJ-2FD	AIRTECH

### 2.主要试剂

表2 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	生产公司
PEG	P7181	SIGMA
1640	350-000-CL	WISENT
胎牛血清	E600001-0500	生工
HAT	H0262	SIGMA
HT	H0137	SIGMA

### 3.实验内容

(1) 将已进行加强免疫的Balb/c小鼠固定，摘除眼球取血。然后颈椎脱臼处死小鼠，置于75%的酒精中消毒至少30秒。

(2) 小鼠全血于室温下静置1小时，然后4°C过夜保存。次日将小鼠全血3000 rpm离心15 min，小心吸取上层血清做为杂交瘤筛选阳性对照，-20°C冰箱分装保存。

(3) 用大头针固定小鼠四肢，使其仰面朝上，用第一套镊子和剪刀剪开表皮，用第二套镊子和剪刀剪开腹壁肌肉层，第三套镊子和剪刀分离并取出脾脏。

(4) 分别取3个直径10 cm的培养皿，加入10 ml 1640基本培养基。在第一个培养皿中漂洗脾脏一次；在第二个培养皿中，用镊子去除脾脏表面残留结缔组织（注意不要撕破脾脏被膜）；在第三个培养皿中，用两个载玻片磨砂面轻轻碾磨，碾破脾脏被膜后，即可得到脾细胞。

(5) 用10 ml移液管吸取碾磨充分的脾细胞悬液经细胞筛过滤，转移到50 ml的无菌离心管中。

(6) 再次吸取10 ml 1640基本培养基反复冲洗培养皿2-3次后经细胞筛过滤，转移到(5)中50 ml无菌离心管，经1500 rpm离心6 min。

- (7) 弃去上清，用10 ml 1640基本培养基反复吹打10-15次，充分悬浮脾细胞沉淀，再添加30 ml 1640基本培养基反复吹打5次，混匀，经1500 rpm离心 6 min。
- (8) 重复步骤7一次。
- (9) 弃去上清，用5 ml 1640基本培养基反复吹打10-15次，重悬脾细胞沉淀。取出约0.2 ml 细胞悬液，经20-40倍稀释后进行脾细胞计数，融合之前室温放置。
- (10) 细胞离心间期，将sp2/0细胞收集在50 ml 无菌离心管中，经1000 rpm离心5 min。
- (11) 弃去上清，用10 ml 1640基本培养基反复吹打10-15次，悬浮骨髓瘤细胞沉淀，再添加30 ml 1640基本培养基反复吹打5次，混匀，经1000 rpm离心 5 min。
- (12) 重复步骤11一次。
- (13) 弃去上清，用5ml 1640基本培养基反复吹打10-15次重悬骨髓瘤细胞沉淀。取出约0.2 ml 细胞悬液，经10-20倍稀释后进行细胞计数，融合前室温放置。
- (14) 融合开始前，打开恒温水浴锅，将温度调到37°C。将PEG和1640基本培养基放在水浴锅中预热。
- (15) 根据细胞计数结果，将所需的脾细胞和骨髓瘤细胞分别混匀后按5: 1比例在50 ml 离心管中混合。
- (16) 1000 rpm离心5 min，弃去上清，轻弹离心管壁，松动细胞沉淀。
- (17) 将离心管置于37°C水浴中，向细胞沉淀内匀速加入已预热的PEG（1 min 内加入1 ml），加入PEG过程中，一边转动离心管一边用枪头的尖端温柔地搅拌，静止90s。  
匀速加入已预热的1640基本培养基（第一次）：1 min 内加入1 ml，边加边温柔地搅拌；  
匀速加入已预热的1640基本培养基（第二次）：1 min 内加入2 ml，边加边温柔地搅拌；  
匀速加入已预热的1640基本培养基（第三次）：3 min 内加入9 ml，边加边温柔地搅拌；  
匀速加入已预热的1640基本培养基，边加边温柔地搅拌直至40 ml，将离心管置于37°C水浴中静置3 min。
- (18) 已融合的细胞悬液经800 rpm离心5 min，去上清，松动细胞沉淀。
- (19) 加5 ml HAT培养基，温柔地吹打10次悬浮细胞沉淀，根据脾细胞数加入适量的HAT培养基，吹打混匀，接种到96孔细胞培养板。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白·抗体·噬菌体文库·诊断原料

武汉国家生物产业基地·光谷抗体发现与筛选公共服务平台