

电诱导细胞融合试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

产品简介：

细胞融合(cell fusion)是两个或两个以上细胞融合并形成一个新的细胞过程。在自然情况下，体内、体外发生的细胞融合的现象称为自然融合；体外培养的细胞可用人工方法诱导相同或者不同细胞间发生融合，称为人工诱导融合。体外培养的单层贴壁细胞或悬浮细胞均可以做融合，但成功概率较大的是单层贴壁细胞。电诱导细胞融合试剂盒(Electrofusion of cell)是 20 世纪 80 年代发展起来的一项生物工程技术，其作用原理是先使细胞在电场中极化成偶极子，并沿电力线成串排列，用高强度、短程的电脉冲击穿细胞膜，促使细胞发生融合。该细胞融合方法具有无毒、融合频率高、易控制等优点。该试剂盒有效成分经严格无菌处理，仅用于科研领域，不用于临床诊断或治疗。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件	说明书	有效期
电诱导细胞融合试剂盒	20T	RT	1 份	6 个月
试剂(A): PM 脉冲缓冲液	500ml	RT	1 份	6 个月
试剂(B): PMF 融合后液	100ml	RT	1 份	6 个月

自备材料：

- 1、 BALB/C 小鼠、SP2/O 骨髓瘤细胞
- 2、离心管
- 3、离心机
- 4、RPMI 1640 培养基、胎牛血清
- 5、200 目细胞筛
- 6、显微镜
- 7、细胞电融合仪
- 8、CO₂ 培养箱
- 9、96 孔、24 孔培养板

操作步骤(仅供参考)：

1、准备细胞：

(1)SP2/0 骨髓瘤细胞：融合前，提前 1 天将 SP2/0 骨髓瘤细胞传代，培养至其处于对数生长期。将该细胞收集于无菌离心管中，1000g 离心 8~10min，弃上清液。加入 10ml 无血清 RPMI 1640 培养基，将细胞沉淀悬浮起来备用。

(2)淋巴细胞：融合前，取经 3 次用目的抗原免疫的 BALB/C 小鼠脾脏，每次免疫间隔 2~3 周，最后一次免疫后 3~4 天处死小鼠，取出脾脏，加入 10ml 无血清 RPMI 1640 培养基，将细胞沉淀悬浮起来备用。

(3)饲养细胞 融合前，收集健康的 BALB/C 小鼠腹腔中的腹水，将腹水（巨噬细胞悬液） 1000g 离心 8~10min，弃上清液。加入 25ml HAT 选择培养液（按 HAT Media Supplement：含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基=1: 49 配制），混匀，接种到 96 孔或 24 孔培养板。经培养形成的饲养层细胞，可以辅助新的融合细胞的生长。

2、细胞融合：

(1)将骨髓瘤细胞和淋巴细胞按 5: 1 比例混合，细胞密度为 1.5×10^7 个/ml，细胞悬液以 1000g 离心 8~10min，弃上清液。

(2)将细胞沉淀加入 5ml PM 脉冲缓冲液，1000g 离心 8~10min，弃上清液。重复 1 次该步骤。

(3)用少量 PM 脉冲缓冲液重悬细胞沉淀，一般细胞浓度应达到 2×10^6 个/ml，注入细胞电融合仪的电极小池或融合槽。注意：应根据不同体积的电极小池或融合槽加入细胞悬液，大多数细胞电融合仪的融合容积在 20~4000 μ l 之间。按如下条件电泳：交流电场频率 1MHz，振幅 250V/cm，时间 30s。在显微镜下观察，看到 80%的细胞已经形成珠串时，立即加穿孔电脉冲，其条件为：脉冲幅度 5kV/cm，时间常数 20ms，脉冲个数 5，间隔 1s。

(4)1000g 离心 8~10min，弃上清液。向细胞沉淀加入 25ml HAT 选择培养液，混匀，接种到 96 孔或 24 孔培养板，37℃ 5%CO₂ 培养 12~24h。

3、筛选：细胞融合后 12~24h，将细胞接种到 HAT 选择培养液中，细胞密度达到 60~80% 汇合率之间，容许细胞进一步生长，进行异核体筛选，4~14 天后可观察到大集落的杂交瘤细胞克隆。

结果：一般培养 3~5 天后即可见小克隆出现，杂交细胞较大，呈圆形且透明，其他细胞透光性差并逐渐死亡。当培养 8~12 天后，克隆可长至孔底面积的 30~50%，此时可取培养上清液进行抗体检测。一旦检测到分泌预定抗体的克隆，应及时将阳性克隆转种 24 孔培养板进行扩大培养。

注意事项：

1、应注意无菌操作，避免被微生物污染。

2、如需 HAT 选择系列产品，可选择 A Media Supplement(50×)、HT Media Supplement(50×)、HAT Media Supplement(50×)。