

# TC4-SOP 1-3

## 細胞融合

名稱: \_\_\_\_\_

### MATERIALS:

- DMEM (HyClone SH30022.02) 200 mL
- DMEMX (15% FBS) 50 mL with 50X HAT (Sigma H-0262) 1 mL
- Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500) (Roche 783 641) 0.7 mL
- Myeloma cell (SP2/0-Ag14) Flask T80 約 7~8 成，細胞數  $10^7$  以上
- 50 mL tube ×4
- 保麗龍板 ×1
- 大頭針 ×5
- Timer ×1
- 針筒 26 GX1/2" ×2
- Petri dishes ×3
- 96 Well Plate ×3
- 500 mL 燒杯
- 滅菌手術用具組 ×1
- 十二爪分注器

### METHODS:

**操作前準備：**

- 前一天 Myeloma 依狀況換掉 1/2~1/3 medium (日期 \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 時間 \_\_\_:\_\_\_)。
- 一小時前檢查所需器具是否足夠並開 UV overnight。
- 30 分鐘前，500 mL 燒杯裝 Q 水、DMEM 及 50 mL DMEMX (15% FBS) with HAT 回溫。
- 1 分鐘前，在無菌操作台中放置 3 個 petri dishes，倒入已回溫之 DMEM。

- 以 CO<sub>2</sub> 將小鼠犧牲**，噴 75% 酒精至毛微濕，移入 laminar flow，以大頭針大字型固定在包覆鋁箔之保麗龍解剖台上。
- 工字型剪開腹腔**，先剪表皮，固定後再剪開真皮 (勤換鑷剪，小心勿污染)，剪開胸腔可見心臟仍在跳動，**以針筒直接刺入心臟採集全血** (約可採得 0.5 mL 以上)。
- 由根部剪下脾臟** (位於左腹深褐色長條囊狀物，勿剪破!)，以 3 個 petri dishes 的 DMEM 洗淨 (洗時盡量去除白色組織)。
- 最後 petri dish 中，**以針頭密集刺脾臟，針筒抽 DMEM 注入脾臟內沖洗**，直至脾臟扁掉顏色變淡。將沖洗後之 DMEM 倒入 50 mL 離心管，置於 CO<sub>2</sub> Incubator 靜置 5 min 使組織碎片沉降 (此時取出 T75 沖下 Myeloma cell)，倒入新離心管，補 DMEM 至 30 mL 後與 Myeloma 同時離心 (300 rcf, 10 min)。
- 倒掉上清液，沉澱以指側輕敲餘液打散後加入新 DMEM，此步驟重複二次。(利用空檔，PEG 置於 CO<sub>2</sub> Incubator 回溫，並以血球計數器計算脾臟細胞與 Myeloma 數目)
  - 脾臟細胞 (5/6): \_\_\_\_\_ X 10<sup>4</sup> cell; Myeloma (1/6): \_\_\_\_\_ X 10<sup>4</sup> cell
- 混合 Myeloma 與脾臟細胞，補 DMEM 至 33 mL 以 300 rcf 離心 10 min，後儘量倒掉上清液，沉澱以指側輕敲餘液打散。
- 於溫水上 1 min 內加入 0.7 mL PEG (邊加邊搖晃 tube)，**用力搖晃 1 min**，2 min 內緩慢加入 2 mL DMEM (由快至慢搖晃)，加入 8 mL DMEM (慢慢搖晃)。馬上以 200 rcf 離心 8 min，儘量倒掉上清液，沉澱以指側輕敲打散後補餘下之 DMEM。
- 以 200 rcf 再次離心 8 min，沉澱以指側輕敲打散後加入 50 mL DMEMX-HAT。
- 以無菌塑膠滴管或十二爪分注器分裝至 3~10 盤 96 well plate (每 well 3 滴共 150  $\mu$ L，邊加邊搖晃)。融合細胞置 37°C CO<sub>2</sub> Incubator 培養。

日期	操作者	QC