

Fusion 前注意:

免疫數次已有效價之老鼠，Fusion 前 3~5 天再注射一次未加佐劑之抗原(若抗原有毒性可省略)
準備一個 T75 指數生長期之 SP2，2 天前長到全滿，1 天前換掉 1/2 DMEMX，當天長到 7~8 成滿(細胞總數 ~10⁷，約 30~50 × 10⁴/mL)
1 週前確定藥品及 medium 存量，3 天前檢查滅菌鑷剪是否足夠，1 天前開 UV overnight

取脾臟

回溫 DMEM 與 0.5 L H₂O
DMEMX+HAT 回溫

以 CO₂ 將 mouse 犧牲
(約 3 min，眼睛由紅變白)

噴 75% EtOH 至毛微濕
(消毒及避免毛亂飛)

移入 Laminar flow，
以大頭針大字型固定在解剖台上

剪開胸腔，以針頭刺入心臟採全血
(先剪表皮，撕開表皮後再剪開肌肉層，由遠離心臟處剪開胸腔，露出心臟後以針筒採集全血。)

取脾臟，稱重，以 DMEM 洗淨
(位於左腹，長條囊狀深褐色，免疫多次後較腫大。小心由根部剪下，勿剪破。稱重後以 DMEM 洗淨)

以針筒抽 DMEM 注入脾臟沖洗或直接磨洗
(於最後 Petri dish 中，以針頭密集刺脾臟後以針筒抽 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
(過 100 mm Cell Strainer 將組織碎片濾掉)

洗細胞

1 離心 (300 rcf, 10 min)

將上清液倒掉，拍散 pellet 加 RBC lysis buffer 2 mL，反應 1 min 後補 DMEM 至 50 mL

2 離心 (300 rcf, 10 min)

取出 12 mL 計算脾臟細胞數(5/6)

倒掉上清液沉澱以指側輕拍回溶補 DMEM 至 40 mL

3 離心 (300 rcf, 10 min)

倒掉上清液沉澱以指側輕拍拍散

清洗鑷剪與處理小鼠

PEG 回溫

倒入輕搖混合

取兩個 T75，以新 DMEM 搖晃將死細胞盪起，倒掉後加入新 DMEM 盡量沖下 SP2，倒入新 50 mL 離心管後補 DMEM 至 40 mL

取出 12 mL 計算 SP2 細胞數(1/6)

離心 (300 rcf, 10 min)

倒掉上清液沉澱以指側輕拍回溶補 DMEM 至 40 mL

Mix

細胞融合

細胞融合

Mix

4 離心 (300 rcf, 10 min)

溫水與器材就位

倒掉上清液，沉澱以指側輕拍回溶

1 min 加完 0.7 mL PEG
(邊加邊搖晃，先慢後快)

黃金六分鐘

1 min 搖晃
(先快後慢)

2 min 加完
2 mL DMEM

2 min 加完
8 mL DMEM

5 Mix (10.7 mL) 離心
(200 rcf, 8 min)

倒掉上清液，餘液打散，
加入 45 mL DMEMX-HAT

於 37 °C Incubator 培養 2 hr (可省略)

分裝至 96 well plate 三盤
(搖晃均勻，以 12 爪 pipette 每 well 加 150 μL，於 37 °C Incubator 培養)

FDay 0 ⇨ 單株抗體篩選

器材清單:

- 離心管 50 mL x4
- 保麗龍板 x1
- 滅菌手術用具組 x2
- 大頭針 x6
- Timer x1
- 針筒 x2
- 96 Well Plate x3
- Petri dishes x3
- 500 mL beaker x1
- 12-channel pipette x1

藥品清單:

- DMEM 250 mL
- DMEMX+HAT (15% FBS) 45 mL
- PEG 0.7 mL