

TC4-SOP 1-4 篩選融合細胞 I (簡易版)

名稱: _____

MATERIALS:

- Hybridomas 分三盤 (96-well plate) 共 288 wells
- 10% DMEMX-HT
- 10% DMEMX (without HT)
- ELISA Plate
- 96-well culture plate
- 十二爪分注器

METHODS:

- F Day 0** : fusion 當天為 Fusion Day 0。(plate 3 盤)
- F Day 10** : 在顯微鏡下檢查圈選有穩定細胞叢的 wells (40X 放大倍率較易觀察), 計算 fusion ratio (survival wells/ total wells) 及每孔平均存活 clony 數目, **全部更換 10% DMEMX-HT 培養液**。
- F Day 14** : 大部分有存活細胞的 well 的培養液變黃後, 吸取 100 μ L 培養液 (可稀釋 2~5 倍) 至已事先 coating 抗原的 ELISA plates 中進行 ELISA 效價測試 (**若抗原為表現蛋白, 需設計 ELISA counter screening**), 補 100 μ L 10% DMEMX (with HT) 回 culture plates 中。ELISA 效價測試結果 S/N value 大於 2 者, 拷貝一份至 24 well plate 後冷凍保存, 並儘快在一週內進行單株化*, 若 clony 長太快或無法馬上進行單株化, 可酌量減少其細胞數。
*若 Positive 的孔數過多, 建議挑選 **counter screening** 中 Top 10 negative wells 進行單株化。
- F Day 21** : 在 96 孔盤中, 直接將 positive wells 的融合細胞沖下後進行單株化 (limit dilution), 如此較不會浪費融合細胞, 挑到 positive clone 的機率也比較高。
- S Day 0** : 單株化 (limit dilution) 當天為 Subclone Day 0。
- S Day 7** : 顯微鏡下檢視圈選單一 clone, 單株化後一週才鏡檢的原因是此時的 clone 較大較容易分辨, 且較不會形成假的 clone (原本在同一個 clone, 移動 plate 時細胞震脫出原本的 clone 後繼續形成新 clone)。非單一 clone 的 wells 吸光其培養液, **將所有單一 clone 移至新的 96 孔盤中培養**。
- S Day 14**: 大部分培養液變黃後, 吸取 100 μ L 培養液 (稀釋 2~5 倍) 至已事先 coating 抗原並 blocking 的 ELISA plates 中進行 ELISA 效價測試。效價測試應儘快完成。
- S Day 21** : 有效價之細胞株轉移至 24 孔培養盤, 3~4 天後轉至 T25 或 T75 flasks, 再過一個禮拜即可長滿 Flask。另拷貝細胞至另一 24 孔盤培養, 取變黃的培養液進行 Western-blot 效價測試。
- 細胞冷凍** : T25 分裝為 2~3 個冷凍小管, T75 分裝成 5~6 個冷凍小管。

日期	操作者	QC