

GenomONE™ - CF

比PEG方法更简便!

使用灭活仙台病毒 (HVJ-Envelope : HVJ-E) 将小鼠去核未受精的卵子融合到供体细胞, 然后进行核移植的实验方法。

【事前准备】

HVJ - E悬浮液的制备

用移液枪吸取 低温HVJ-E悬浮缓冲液0.26mL, 添加到冰冷的冻干HVJ-E制成悬浮液。

将HVJ-E悬浮液按5μL/管分装后, 置于-80°C保存备用。注意: 避免反复冻融, 已经冻结的HVJ-E只可解冻一次。

细胞融合缓冲的制备

根据HVJ-E的用量, 用无菌蒸馏水将细胞融合缓冲液 (×20) 20倍稀释。缓冲液稀释后冷藏保存。

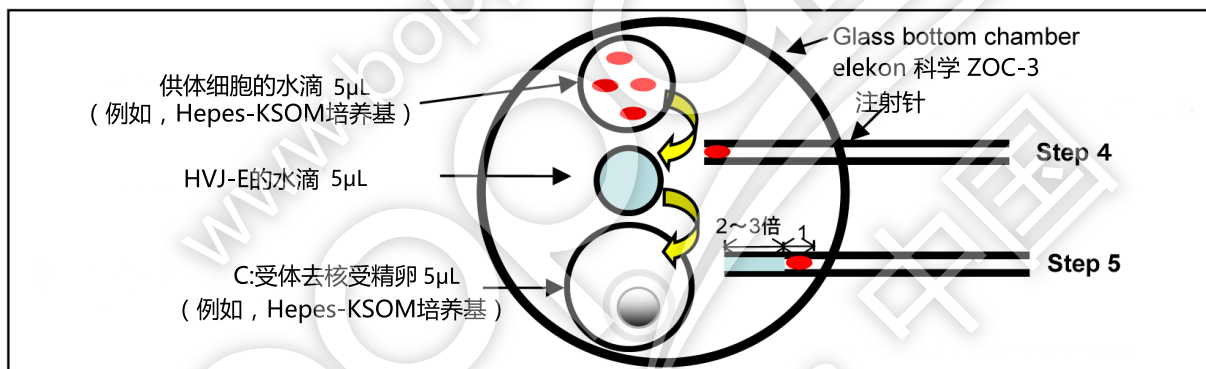
【核移植的实验步骤 (用卵细胞作为供体细胞为例)】

步骤1: 用在-80°C保存的HVJ-E缓冲液, 冰浴上融解 (缓冲液使用之前冷冻保存)

步骤2: 利用配制的细胞融合缓冲液, 根据供体细胞的种类, 稀释HVJ-E悬浮液。(现用现配, 稀释倍数参考以下)

步骤3: 图1显示的是供体细胞、HVJ-E、受体去核受精卵各滴的配置。

在熟练核移植操作之前, 受体去核受精卵数目在5-10数目较少时实验效率更好。



步骤4: 用注射针从水滴A中吸取一个供体细胞。

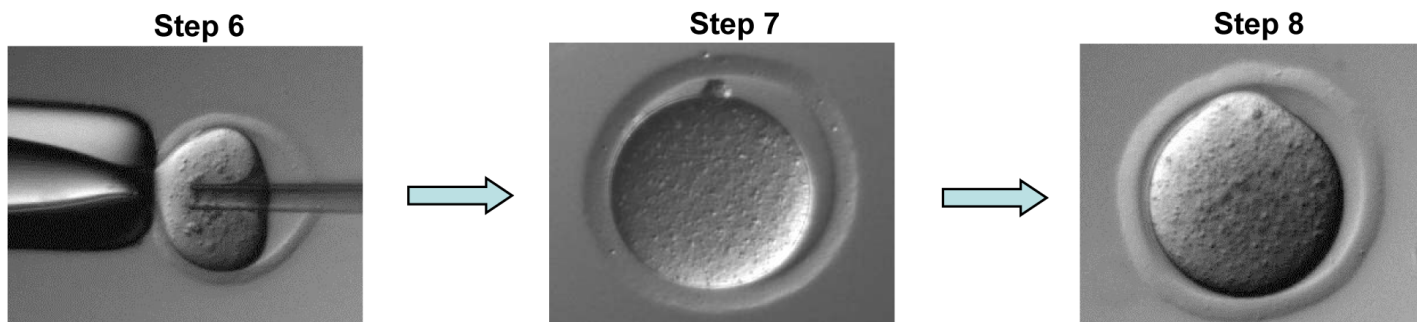
步骤5: 从水滴B中吸取约为供体细胞2-3倍容量的HVJ-E。

步骤6: 把供体细胞和HVJ-E共同挤压移植到C中的受体去核受精卵。

步骤7: 37°C, 在5%CO₂ 培养箱, 培养15至30分钟。

步骤8: 检测融合效果。

步骤9: 转移到活化刺激的培养基, 培养5-6小时。直到确认原核形成后, 转移到KSOM培养基培养至目的发生阶段。



把供体细胞移植到受体去核受精卵中

移植后
在受体去核受精卵的
上端附着供体细胞

移植15-30分钟后
完成细胞供体, HVJ-E
与受体去核受精卵的融合

参考文献:

SUETSUGU A, MATSUMOTO T, HASEGAWA K, et al. Color-coded Live Imaging of Heterokaryon Formation and Nuclear Fusion of Hybridizing Cancer Cells[J]. Anticancer Research, 2016, 36(8): 3827-3831.

Honma R, Fujii Y, Ogasawara S, et al. Critical epitope of anti-rabbit podoplanin monoclonal antibodies for immunohistochemical analysis[J]. Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy, 2016, 35(2): 65-72.

制造单克隆抗体的短期配制案例

我们将介绍已通过使用小鼠脾细胞只免疫一次细抗原（低分子量化合物）获得在短时间内产生抗体的杂交瘤的实验例。

抗原制备

抗原→CML[盐酸Nε-(羧甲基)赖氨酸]和BSA[牛血清白蛋白]的复合体。

一次免疫

抗原（CML - BSA复合体）0.1毫克和CFA（佐剂；Sigma F - 5881）一起注射到小鼠尾部内皮，2周后（无最终免疫期），切出小鼠脾脏。

细胞融合

切除的脾细胞（ 6×10^7 个）和小鼠骨髓瘤（X-63-Ag8.653, 1.2×10^7 ）使用GenomONE -CF融合。

确认杂交

融合后，将其悬浮在30ml培养基（10%FBS / RPM1640），取出其中15ml加入市售的supplement（HLCM：细胞科学实验室#0232，最终0.5-2%），三个96孔板点样。从第二天将培养液的一半更换成HAT培养基。之后更换培养基加入同样的HLCM。10天之后，集群的增长和上清液的抗体值进行评估（ELISA）。

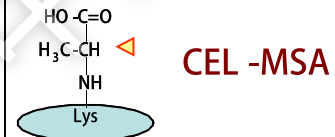
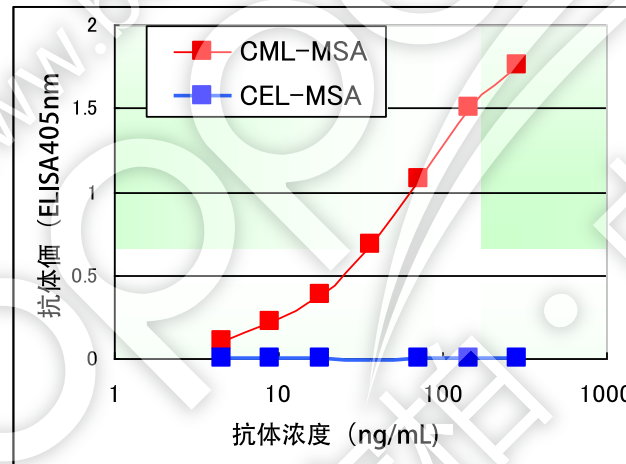
克隆

杂交瘤阳性孔的数目 (阳性率%)	CML抗体产生阳性孔的数目 (阳性率%)
285/288(99%)	9/288(3.1%)

1次克隆后，从具有各种特异性的图案的杂交瘤中建立CML特异性抗体产生株43-2C（和CEL结合性的比较）

特异性筛选

短期获得CML特异性抗体！



Nε-(carboxymethyl) lysineMaillard反应产物（AGE）的主要结构之一。在4次免疫后使用PEG进行融合的常规方法抗体不易获得。

上述结果是一个例子，根据抗原，骨髓瘤，supplemen的种类，优化实验条件是很有必要的。

CEL：与Nε-(carboxyethyl) lysineCML类似的AGE的主要结构

MSA：mouse serum albumin

产品列表

产品编号	产品名称	规格
ISK-CF-001-EX	GenomONE™ -CF EX 仙台病毒包膜（1只装）细胞融合试剂 GenomONE™ -CF EX SeV-E (HVJ-E) 1 vial Cell Fusion Reagents	1set
ISK-AB-001-EX	GenomONE™ Cab EX 抗体传送试剂 GenomONETM-CAb EX 1 vial Antibody Delivery Reagents	1set
ISK-AB-004-EX	GenomONE™ Cab EX 抗体传送试剂 GenomONETM-CAb EX 4 vials Antibody Delivery Reagents	1set

