

电脉冲介导鱼类细胞融合的初步研究

杨慧一 曹明丹

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

1980年 U. Zimmermann 首先报道了电融合的新技术^[1,2], 近年来, 这一技术发展很快, 应用范围极广, 它是利用 RC 放电脉冲使紧密接触的细胞膜产生瞬时可逆电穿孔^[3,4], 细胞随电脉冲同步而进行融合。

本实验用电脉冲介导的方法, 在同种和异种的金鱼囊胚细胞之间诱导融合, 并研究了在融合前用稀释的凝集素^[5,6]使相邻细胞间的膜紧密接触, 而不用交变电场使细胞极化, 为融合细胞少受交变电场的损伤而提高其生活力, 还通过实验研制改进了细胞电融合仪。

本文报告是在1986年用电脉冲介导的融合技术研究的初步结果。

材料和方法

试验材料为金鱼自然产的卵, 经人工授精, 将受精卵置于24—26℃室温下, 进行分裂, 发育到囊胚期, 把囊胚期卵去膜并吸入缺钙含 EDTA 的霍氏分离液中, 持玻璃针的弯头切下囊胚细胞, 经细直的玻璃小吸管轻轻吹打, 囊胚细胞即分散成单个细胞。

实验装置用长35×宽16×深3mm的有机玻璃框, 取凡士林粘固密封在1mm厚的载玻片上即成一电融合小槽, 电极用直径为0.5mm的铂丝, 一端磨尖, 另一端连接在自制的电脉冲细胞融合仪上(图1)并

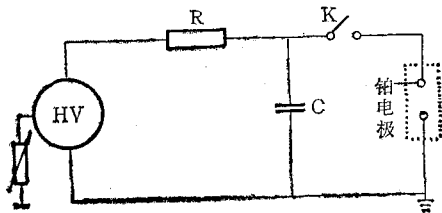


图1 电脉冲装置原理图

把二根电极安装在显微操作仪两旁的二个操纵器上, 能左右、前后、上下自由调节电极的位置, 将配制好0.1mmol/L的氯化钙溶液注入电融合槽, 取悬浮的囊胚分散细胞于电融合槽内, 并在细胞附近加稀释10倍左右的凝集素2滴, 在解剖镜下观察到细胞逐渐自行迁移相互紧密贴近, 选择已紧贴的细胞对, 移动两旁操

纵器上的电极尖端靠近细胞膜外侧, 将电脉冲施加在电极上并导致细胞融合。

实验结果

实验所用的电脉冲电压幅度为80—150V, 电场时间常数为70μs左右, 相对电场强度为800—1500V/cm, 单脉冲电量为0.8—1.5×10⁻⁶库仑。当加电脉冲后, 在解剖镜下观察发现细胞先受压挤(图2a, 见图版III), 渐次局部细胞膜紧贴区进一步增大接触面积(图2b, 见图版III), 在电场的作用下, 使细胞膜瞬时穿孔迅速融合, 在满足以上所述的技术条件后, 进行选择性的细胞配对, 我们在156对细胞中融合142次, 融合成功率达90%以上(图2c, 见图版III), 细胞核没有立即融合, 而是延长4—5分钟后, 才见细胞核开始融合(图2d, 见图版III), 在实验过程中可以任意调整以上的物理参数来触发细胞融合, 但重要的是融合后细胞的活力。将融合细胞收集在霍氏溶液中培养, 能存活一周, 甚至更长时间。对融合细胞活力的检定方法是: 1. 培养融合后细胞的形态稳定, 无不规则状现象出现, 细胞核与细胞质彼此分明清晰。2. 细胞膜饱满, 有张力, 无皱缩, 表示细胞膜完整。根据以上初步观察检定表明, 在自制细胞融合仪的电场条件下, 是能够获得具活力的融合细胞的, 当然, 以上的试验仅是从形态、活细胞的表面特征来证明的, 对其能否继续生长, 尤其对融合后的卵细胞能否进行分化、发育, 尚有待进一步试验来确定。

参考文献

- [1] Zimmermann, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 694, 227.
- [2] Zimmermann, U., et al.: *Bioelectricchem. Bioenerg.*, 1980, 7, 553.
- [3] 钱进<生物科学动态>, 1985, 3: 7.
- [4] 汪和睦鲁玉瓦: 《生物化学与生物物理进展》1985, 3: 52.
- [5] Mercer, W. E.: *Exp. Cell Res.*, 1979, 120, 417.
- [6] 喻致祥: 《生物科学动态》1985, 3: 16.

[本文于1988年4月15日收到]

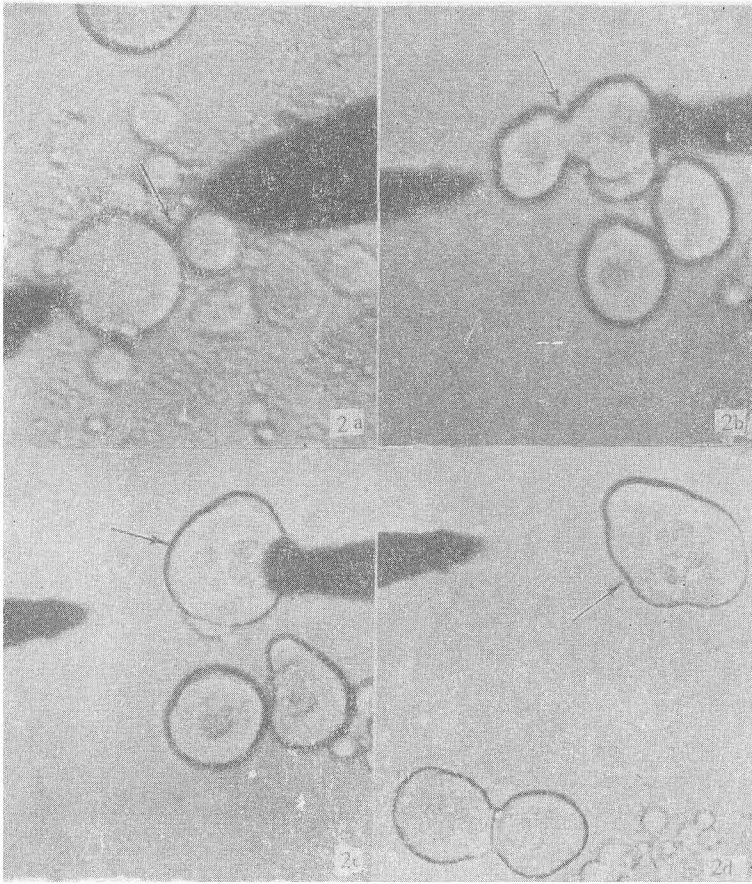


图 2 两个金鱼囊胚细胞电融合的过程

(a) 示两个细胞紧贴挤压；(b) 细胞膜紧贴面积增大 (c) 加脉冲后瞬时穿孔融合，示细胞核尚未融合；
(d) 示细胞核渐次融合

照片是在 olympus 双筒解剖镜下拍摄，物镜 20×，相机 2.5×=50× 底片囊胚细胞直径为 2mm，照片囊胚细胞直径为 1.5cm，放大 7.5 倍，照片囊胚细胞直径放大为 375 倍

周源太等：“小鼠淋巴细胞杂交瘤的电融合”一文的图 2 与图 3

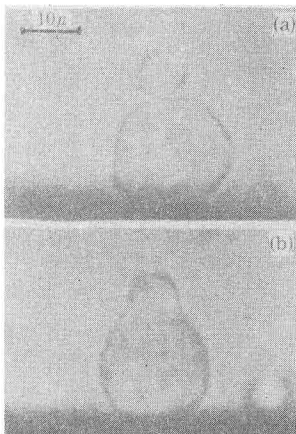


图 2 SP2/0 细胞与脾细胞的电融合过程
(a) 融合前；(b) 融合后

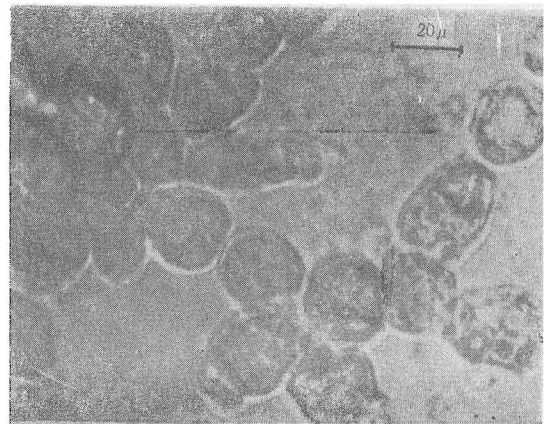


图 3 生长之中的杂交细胞(融合后 21 天)