

# 动物细胞融合



# [目的要求]

1. 掌握细胞融合的概念及基本原理。
2. 初步掌握PEG诱导细胞融合技术。
3. 了解细胞融合技术的生物学和医学意义。

# [实验用品]

1. 器具：普通光学显微镜、普通离心机、恒温水浴箱、10 ml EP管、试管架、吸管、1ml注射器、载玻片等。
2. 材料：新鲜鸡血。
3. 试剂：肝素，50%PEG（现用现配），0.75%生理盐水，1640培养基，0.2%次甲基蓝染液。

# 细胞融合

- 定义：两个以上的细胞合并成为一个双核或多核细胞称为融合细胞。
- 同种细胞融合、种间细胞融合、动植物细胞间融合。

动物细胞：仙台病毒法、PEG法(聚乙二醇)、电融合法。

植物细胞：PEG法、电融合法。

微生物细胞：PEG法。

# [实验原理]

■ PEG是乙二醇的多聚化合物，存在一系列不同分子量的多聚体。PEG可与水分子借氢键结合，在高浓度(50%)的PEG溶液中自由水消失，导致细胞脱水而发生质膜结构的变化，引起细胞融合。为了发挥PEG促进细胞融合的效力，必须采用较高浓度的PEG溶液，但在高浓度PEG溶液下，细胞可能因脱水而受到显著的破坏。因此，选择合适的分子量、浓度及作用时间是PEG融合技术的关键。

**本实验材料为鸡红细胞，其核结构紧密，易于观察。**

# [实验步骤]

## (一) 50% PEG液的制备

称取一定量的PEG (MV=4000) 放入刻度离心管内，在酒精灯火焰上加热，使其熔化，待冷至50℃时，加入等体积并预热的0.75%生理盐水混匀，置之37℃水浴箱中保温待用。

## （二）鸡血细胞制备（这一步由教师做）

- 取肝素抗凝鸡血1ml，加4ml生理盐水保存备用。



## (三) 细胞融合操作:

1、取肝素抗凝的弃血清鸡血0.4ml, 加入8ml生理盐水。

将悬液移入离心管中, 2500rpm离心5min, 用吸管弃去上清液, 加入8ml生理盐水, 再次悬浮细胞, 离心洗涤一次, 倾去上清液后将离心管倒置于滤纸上, 尽量流尽剩余液体(这一步很重要, 因为残留液体会改变PEG的浓度)。

2. 用手指轻弹离心管底壁, 使沉淀物松散。吸取制备好的50%PEG 0.4ml, 在37°C水浴中, 于90s内逐滴加入离心管中, 边加边振摇离心管, 使之与细胞混匀, 然后加入8ml生理盐水, 轻轻吸打混匀, 在37°C水浴中静置5min以稀释PEG。2500rpm离心5min弃去上清液后, 加入2ml生理盐水, 在37°C水浴中温育30min。




3、融合过程观察：分别于温育5、10、20、30分钟，取细胞悬液一滴制成临时装片，以0.2%次甲基蓝一滴染液染色，在显微镜下观察细胞融合的不同阶段。



# [实验结果及分析]

1. 在显微镜下观察细胞融合情况，可看到不同融合状态的细胞：

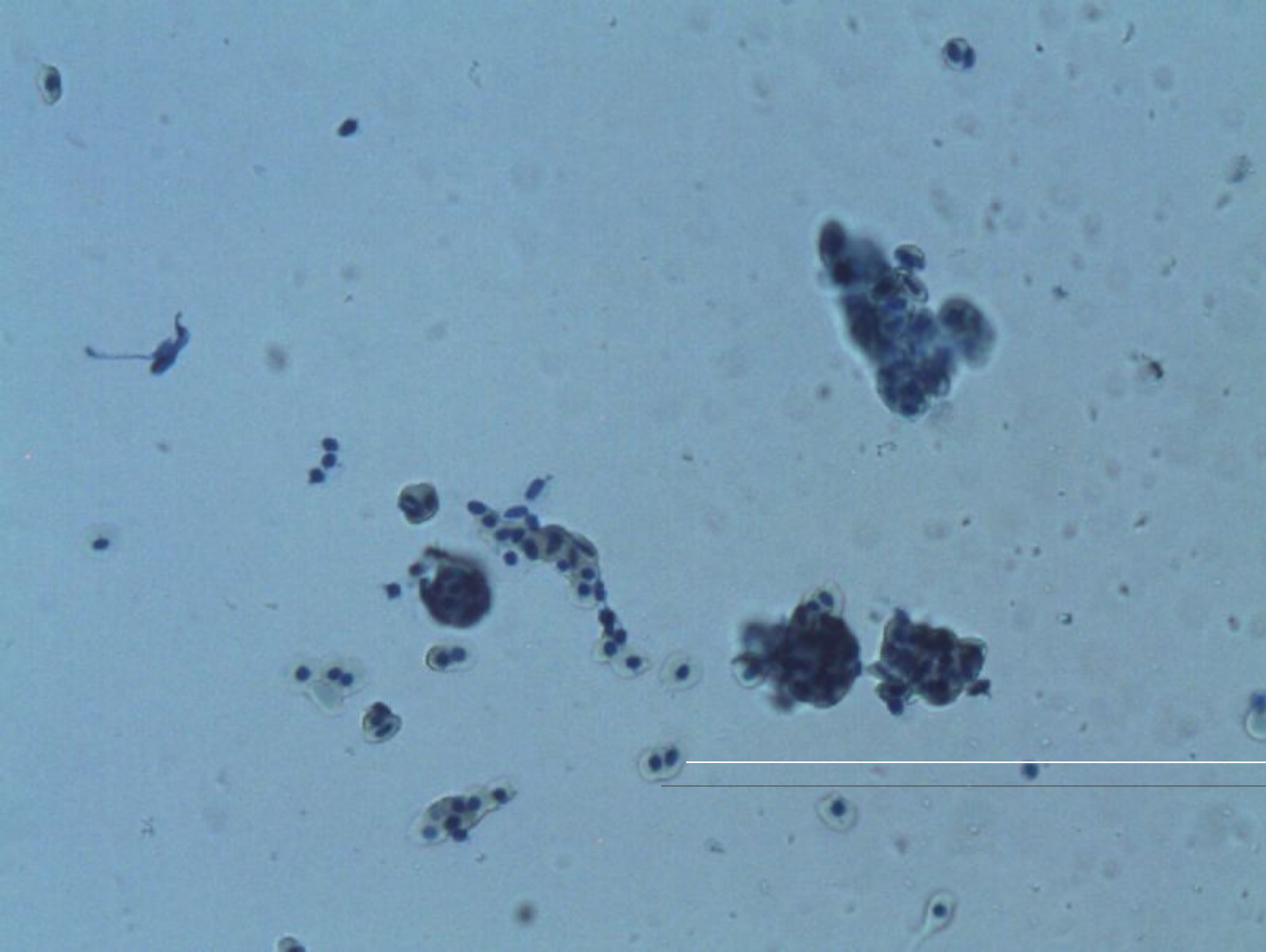
- 1、两细胞的细胞膜间相互接触、粘连；
  - 2、接触部位的细胞膜崩解，两细胞间的细胞质相通形成细胞质通道；
  - 3、通道扩大，两个细胞连成一体；
  - 4、细胞合并完成，形成一个含有两个或多个核的圆形细胞。
- 

2. 计算融合率：对孵育30min时制备的临时装片计算融合率。

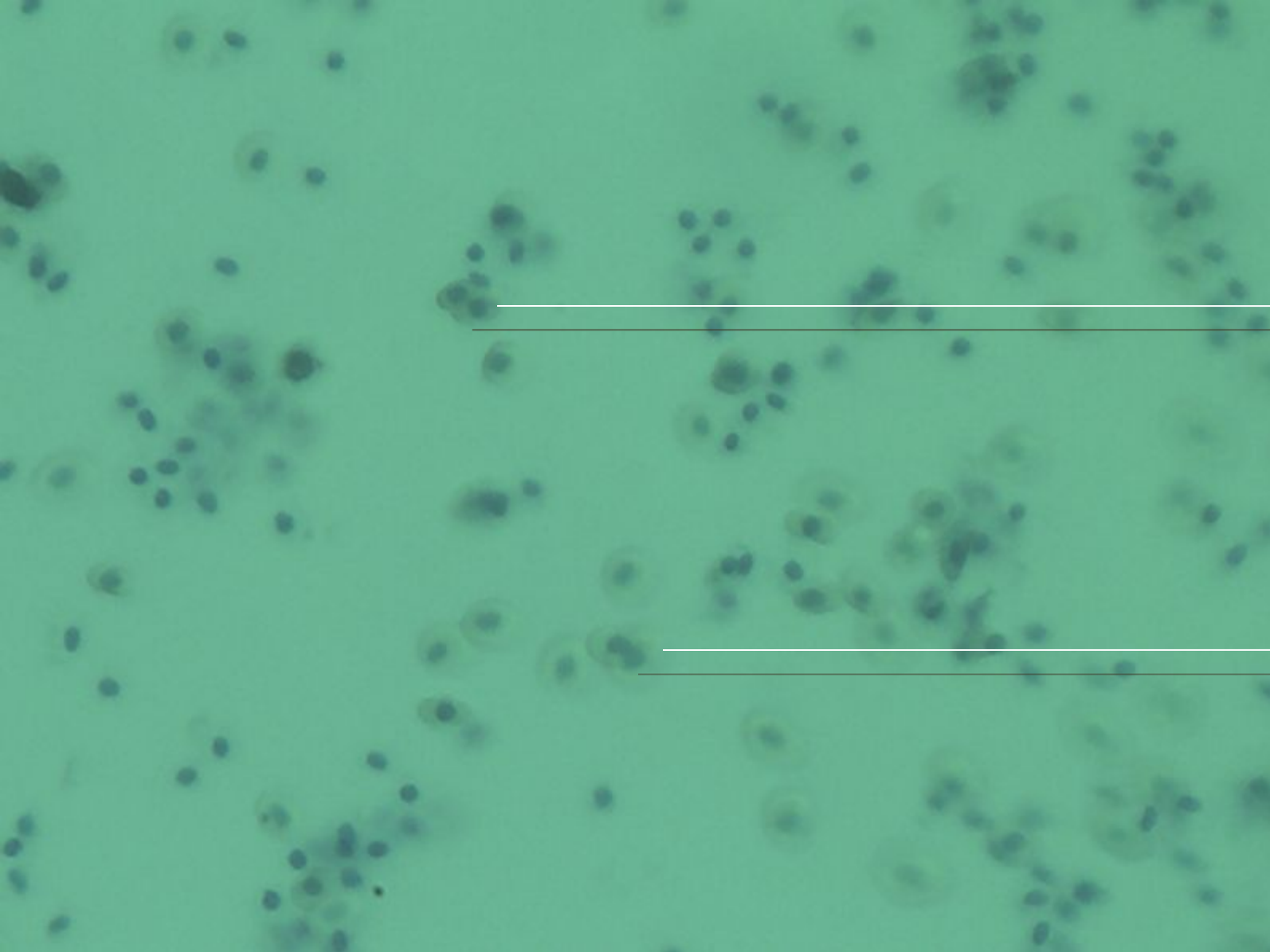
$$\text{融合率} = \frac{\text{融合的细胞核总数}}{\text{所有细胞核总数}} \times 100\%$$

# [注意事项]

- 1、制备的50%PEG一定要保温在于37℃水浴中，不能冷却后结晶析出。
- 2、在离心管中加PEG之前，一定要将离心管倒置滤纸上，流尽剩余液体，否则残留液会改变PEG的浓度。
- 3、滴加50%PEG时，应缓慢、逐滴加入，而且每加一滴应轻摇离心管以混匀，滴加完毕后可用滴管温和混匀。
- 4、因PEG对细胞有毒性，应严格控制作用时间于90s内，但本实验中融合后的细胞不继续培养，可将处理时间延长至5 min以达到最高融合率。



融合  
细胞



融合细胞

融合细胞



# [作 业]

- 写实验报告，计算细胞活力及融合率。
- 绘制细胞融合过程图

## 思考题

- 细胞活力测定常用方法有哪几种？

