

A decorative graphic consisting of a thin yellow circle on the left side and a horizontal yellow bar extending from the circle towards the right. The bar has a slight gradient and is framed by large black and yellow brackets.

细胞融合

动物细胞融合是细胞工程技术的重要手段之一，是研究细胞遗传、基因定位、细胞免疫、病毒和肿瘤的重要手段。

[实验目的]

- 了解体外细胞融合的基本方法。
- 通过**PEG**诱导鸡血细胞之间的融合实验的关键步骤。

实验原理

- **细胞融合** 又称体细胞杂交，是指用两个或两个以上的细胞通过细胞膜融合形成单个双核细胞或多核细胞的现象，可能自发，但多人工诱导。
- 亲本相同的细胞称为同核体，不同的称为异核体。
- 随后，融合细胞通过细胞有丝分裂进行核融合、最终形成单核的杂种细胞。

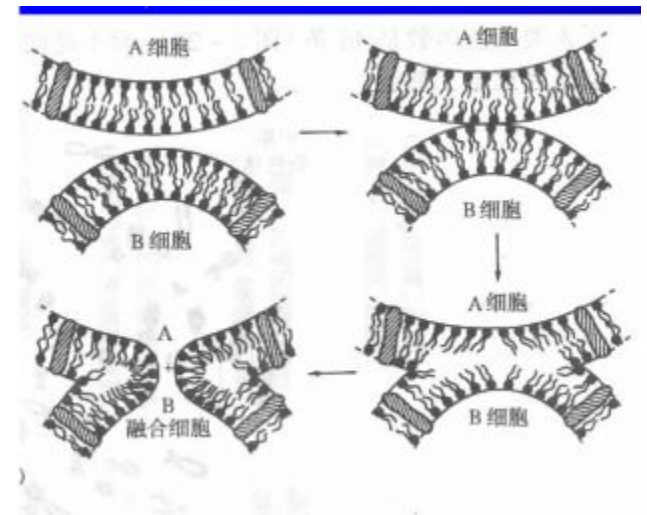
实验原理

- 依据融合过程采用的助融剂不同，细胞融合可分为：
 - 病毒诱导的细胞融合，如仙台病毒（HVJ）；
 - 化学因子诱导的细胞融合，如聚乙二醇（PEG）；
 - 电场诱导的细胞融合；
 - 激光诱导的细胞融合

实验原理

■ **PEG**是乙二醇的多聚化合物，可改变各类细胞的膜结构，使两细胞接触点处脂类分子发生疏散和重组，诱导产生细胞融合。

■ **影响因素：**分子量及浓度、pH、处理时间和温度



实验原理

- 一般**PEG_{4000~6000}**的溶液，能够产生高频率的细胞融合。
- **PEG**的pH值在**8.0~8.2**之间融合效果最好。
- **PEG**的处理时间：处理时间越长，融合效果越好，但对细胞的毒害也就越大。故一般将处理时间限制在**1分钟之内**。本实验中细胞融合后无需继续培养，故处理时间可适当放宽。
- 融合时的**温度**：由于生物膜膜的流动性与温度成正比，故细胞的融合效果也与温度成正比。因此，为了获得更好的融合效果，在细胞可能承受的温度范围内可适当提高处理的温度。对于哺乳动物的细胞，一般采用的温度为**38~40℃**。

实验步骤

(一) 50% PEG液的制备

称取一定量（0.5g）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生理盐水液混匀，置之37℃水浴箱中保温待用。

注意：如需灭菌，则先将PEG粉末灭菌，再加入无菌的液体稀释。

实验步骤

(二) 鸡血细胞储备液的制备

- 取鸡血，加入肝素（**100U/5ml全血**），制成抗凝全血，再按**1:4**比例，用生理盐水稀释，制成红细胞储备液。已完成。
- 冰箱保存，一般可保存一周

学生操作步骤

- 1、取鸡血储备液1ml，加入4ml生理盐水，混匀，1000转/分，离心4分钟，弃上清。
- 2、取5ml生理盐水重悬沉淀，重复离心操作一次，弃上清。
3. 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。如无法流尽，可用3000转/分，1分钟）。
4. 用手指轻弹离心管底壁，使沉淀物松散。

- [
- 5、然后吸取制备好的**50%PEG 0.4 ml**，在**37℃（38-40℃）**水浴中，于**90s**内逐滴加入离心管中，**请沿管壁流入离心管中**，边加边振摇离心管，使之与细胞混匀。
- 6、然后加入**5ml**生理盐水，轻轻吸打混匀，在**37℃**水浴中静置**5min**以稀释**PEG**。**1000rpm**离心**4min**弃去上清液后，加入**2ml**生理盐水，在**37℃**水浴中保温。
- 7、融合过程的观察：保温**5-30min**后（**请各组在这里做时间梯度**），分别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。

[

融合率的计算：对制备的临时装片计算融合率。

$$\text{融合率} = \frac{\text{融合的细胞核数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

实验报告中

实验结果：

- 1、画出观察到的细胞融合现象
- 2、选择融合时间不同的临时装片，计算融合率（如融合现象不明显，可不计算数据）

实验讨论：

- 根据自己的实验结果，分析在实验过程中影响融合率的主要步骤。