

# I. 细胞杂交研究的一些进展

沈鼎武 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

## 一、引言

细胞杂交是近廿年来崛起的一项细胞工程技术。六十年代初, Barski 研究组<sup>(1)</sup>首先在两种不同类型的细胞的混合培养物中获得自发的融合细胞。嗣后, Ephrussi 等证实了他们的工作。在差不多同一时期内, 冈田善雄 (Okada)<sup>(2)</sup>意外地发现仙台病毒可以诱发体内艾氏腹水瘤细胞彼此互融, 并作了系统实验, 从而为人工诱发体细胞杂交奠定了方法学基础。Harris<sup>(3)</sup>和 Klein<sup>(4)</sup>等研究组进一步发展了冈田的工作, 广泛研究了由灭活仙台病毒介导融合的杂种细胞, 取得了显著成绩。童弟周<sup>(5'6)</sup>在国内率先开展了这方面的研究, 并证明肿瘤杂交细胞具有抗癌免疫效应。在不到20年的时间里, 通过各国有关实验室的相继努力, 细胞杂交研究的报道与日俱增, 成为当今细胞生物学中十分活跃的领域之一。方法学上不断革新, 融合因子已朝向多样化、化学化发展。技术上已能构成所谓种内、种间的杂种细胞, 甚至也打破了植物界与动物界之间的疆域。植物细胞的原生质体与人的宫颈癌Hela细胞杂交亦获得了成功。应用范围已广及生物学的各个分支学科以及医学中的肿瘤学、免疫学、病毒学、老年学等, 特别是在绘制人类基因图方面出现了令人鼓舞的进展。诚然, 目前细胞杂交研究虽大多尚属理论生物学范畴, 但在实际应用方面也已开始出现重大突破, 例如应用杂交瘤细胞为制造单一抗体开拓了新的途径。本文仅就细胞杂交研究所取得的某些成果作一简介。

## 二、细胞杂交技术

### I. 融合因子

细胞杂交实验中, 采用的融合因子一般可分三类: 病毒、化学品和生物提取物(表1)。病毒类是研究得最早、最多的, 其中尤以仙台病毒仍为目前常用的融合因子之一。本实验室采用鸡新城疫病毒介导融合人体肝癌系细胞亦

表1 一些能诱导细胞融合的因子

病毒类	含 DNA 的病毒
	疱疹病毒: 水痘、疱疹
	天花病毒: 兔天花
	含 RNA 的病毒
	副粘液病毒: 腮腺炎; 新城鸡瘟病毒;
	副流感型, 如仙台HVJ, SV5;
	麻疹
	呼吸道合胞体
	RNA 致癌病毒
	Rous 肉瘤病毒
Visna 病毒	
生物制剂	冠状病毒
	禽类感染性气管炎病毒
化学物	水溶性
	聚乙二醇; 二甲亚砜; 山梨糖醇; 刀豆球蛋白A
	脂溶性
溶血卵磷脂; 磷脂酰丝氨酸	
生物制剂	昆虫 <i>Paederus fuscipes</i> 的提取物

获得相当高的融合指数。由于仙台病毒的毒力低、对人的危害小, 且易被紫外线或β-丙炔内脂所灭活, 故为一些研究者沿用至今。现已了解, 应用病毒类介导的细胞杂交实验, 除了宿主细胞与病毒两者本身的特性外, 合适浓度的钙离子(约1.27—1.80mM)、较高的pH值(7.8—8.0)乃是十分重要的因素。Poste等<sup>(7)</sup>

于1976年发现植物血球凝集素 PHA 可增强病毒诱发细胞融合的比率。

第二类的化合物融合因子中,聚乙二醇(PEG)起初由 Kao和 Michaylnk<sup>(8)</sup>用于植物细胞的杂交研究。嗣后证实这种化合物也能介导哺乳类细胞融合。晚近这一方法有所发展,并发现 PEG若与二甲亚砜(DMSO)并用,可提高细胞融合指数。其它的化合物对细胞融合似都有一定效果。溶血卵磷脂对细胞的毒性作用可由白蛋白所缓解。目前,化学品融合剂似乎有逐渐取代病毒类因子的趋势,这不仅是化学品来源易,融合率较稳定,更可深入探讨细胞融合的分子机理。

关于第三类生物提取物,仅见 Levine<sup>(9)</sup>于1974年所报道。诱发细胞融合率达40—60%。

## II. 杂种细胞的选择

在上述任何一种融合因子的介导下,均可产生杂种细胞。前期的实验多半采用细胞悬液法;单层细胞法则为现今所常用。这是因为后者较为简便、稳定,特别是PEG在悬液法时融合率只有6%,而取单层法时就可提高至7—30%,平均为15—20%<sup>(10)</sup>。细胞融合过程有快缓,快者在5分钟内就可完成,也有部分细胞在延续培养至十几小时后才开始并合。细胞杂交实验的一个重要关键是筛选出真正的杂种细胞。起初这是颇感困难的,一则亲本细胞的生长速度有时会比杂种细胞快得多,因而不易把杂种细胞分离出来;再则机械分离的几率小而工作量大。1964年, Littlefield<sup>(11)</sup>及以后的工作者,根据微生物学的选种原理,利用两种具有不同生化缺陷的双亲细胞进行杂交。借助 HAT选择性培养液杀死其中的双亲细胞,选择杂种细胞(图1)。这一方法与原理已成为细胞杂交中的一个常用手段。Kao和Puck<sup>(12)</sup>从中国仓鼠卵细胞CHO系中成功地分离出许多个营养突变亚系,从而有利于进行遗传分析并应用于杂交细胞的选择。而且,现在已可直接从患有先天性遗传缺陷的病人取得皮肤活检标本,进行体外培养与杂交实验,大大地促进了

对该种表型缺陷的基因定位和基因互补研究。

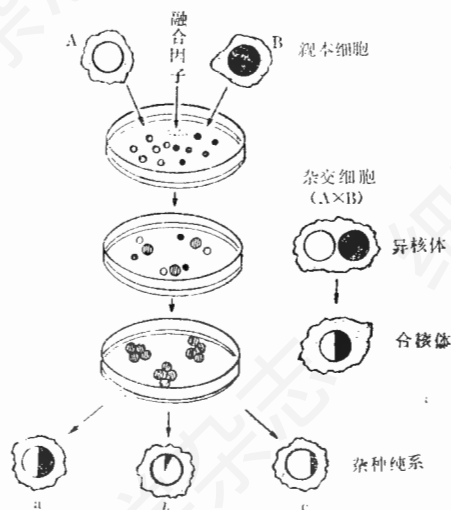


图1 简图示杂种细胞的分离过程

## III. 融合机理

关于细胞融合的分子机理,曾进行了多方面的探讨。虽然不同的融合因子可能涉及不同的分子机理,然而,细胞融合必定与质膜的脂类物质有密切关系。病毒因子的融合能力与其外壳的磷脂组成有关,而与病毒的核酸活力无关。已经证明,仙台病毒即使暴露于紫外线下1分钟之内感染性下降至零,但其融合艾氏腹水癌细胞的能力在经紫外线照射2分钟后仍保持为百分之百;若用乙醚处理仙台病毒或以磷酸脂酶A处理鸡新城疫病毒时,则就丧失融合细胞的能力。因此在一般情况下,采用灭活病毒,既保持了介导融合细胞的能力,又不致遭受感染之危险。一些化学品融合因子能引起细胞表面膜中磷脂的酰键及极性基团两者在结构上发生重排。也有人认为是膜内脂肪的羟键活动增加了,或者是诱发膜内颗粒集聚,在空气与水的界面上使磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺单层的表面电位显著降低<sup>(13)</sup>。此外,细胞融合现象之发生,尚与不同融合因子的细胞凝集作用强弱有关。例如,仙台病毒和PEG本身就具有细胞凝集效应。再者,有工作指出,凝集素本身在无病毒因子的存在下,也能成功地诱导细胞彼此互融。看来不管采用何种融合手段,

只有在细胞相互紧密接触时，始能发生表面膜中脂类分子物理构型重排，打开质膜，细胞并合。细胞融合过程中溶酶体内含物的释放、能量(ATP)的需求，以及微管(microtubules)和微丝(microfilaments)这两种细胞内的骨架系统均具有重要作用。

### 三、细胞杂交的应用

#### I. 绘制人类基因图

体细胞杂交为人类基因图的绘制提供了极有价值的工具。晚近已了解到人类约有3000种分子病是与遗传有关的。这些遗传上的缺陷必定涉及染色体基因调控之失常。若能把所有控制特异大分子合成的基因位点都在染色体上标定出来，无疑将会有助于对基因活动规律之了解以及对人类遗传病和其它疾病的防治。据1977年的统计资料<sup>(14)</sup>表明，人染色体上已绘制出的基因位点为210个以上。100个基因位于X染色体；110个基因定位于各条常染色体上。每条染色体至少已标定了1个以上的基因。细胞杂交术问世以来，就近几年间，在人类染色体图的绘制中，已至少标出60个以上的基因位点。其中有10个基因定位于1号染色体；在X染色体上证实了5个基因位点，详见表2，这样，细胞杂交法所得结果占已绘制的人类基因图的三分之一到四分之一。再者，通过人工诱发杂种细胞内染色体的断裂、交换、早熟态的染色体凝集(PCC)等，并借助染色体分带技术，当可把基因位点更精确地标定于染色体的某一个区域上。晚近，Goss和Harris<sup>(15)</sup>在体细胞杂交系统中进一步借助辐射和统计学方法测绘了人X染色体上的4个基因位点和1号染色体上的8个基因位点排列的空间顺序。Lao和Kao<sup>(16)</sup>应用5-BrdU结合近可见光或X-线处理杂种细胞，证明TPI、GAPD、PepB、LDH<sub>B</sub>和SHMT均位于第12号染色体上。对染色体的区域定位于SHMT在该号染色体的着丝点与位PepB点之间，TPI和GAPD的序列则为12pter-TPI-GAPD-SHMT。

表2 用细胞杂交法标定的人类染色体上的基因位点

染色体号	基因符号	标 志	现状*
1	AK-2	腺苷酸激酶-2	C
	FH	富马酸水化酶	C
	GUK <sub>1</sub>	鸟苷酸激酶	C
	Pep-C	肽酶C	C
	PGD	磷酸葡萄糖脱氢酶	C
	PGM <sub>1</sub>	葡萄糖磷酸变位酶1	C
	PPH	磷酸丙酮酸水合酶	C
	UGPP	尿苷酸二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶	P
	UK	尿苷激酶	P
	UMPK	尿苷酸激酶	C
2	Gal <sup>±</sup> -Act	半乳糖酶激活剂	P
	Gal-1-PT	半乳糖-1-磷酸转移酶 (也见3号染色体)	I
	IDH-1	异柠檬酸脱氢酶(胞质型)	C
	If <sub>1</sub>	干扰素-1	P
	MDH-1	苹果酸脱氢酶	P
3	ACO	乌头酸酶	I
	Gal-1-PT	(见2号染色体)	I
4	PGM <sub>2</sub>	葡萄糖磷酸变位酶2	P
4或5	Ade <sup>+</sup> B	人基因互补中国仓鼠腺嘌呤B营养缺陷型(甲酰甘氨酸胺核苷酸胺基转移酶)	P
	E	中国仓鼠酯酶的激活基因	P
5	DTS	Diphtheria 毒素敏感性	P
	HexB	己糖胺酶 B	C
	If <sub>2</sub>	干扰素-2	P
6	LA	HL-A抗原	C
	P	P血型	C
	ME-1	苹果酸酶	C
	PGM <sub>3</sub>	葡萄糖磷酸变位酶-3	C
	SoD-2	超氧化物歧化酶(线粒体的)	C
7	MDH-2	苹果酸脱氢酶(线粒体的)	P
	Sr40-T	Sv40病毒整合位置(T-抗原基因)	P
8	GR	谷胱甘肽还原酶	P
9	AK-1	腺苷酸激酶	P
	B-Glu	葡萄糖苷酸酶	P
10	GOT-1	谷草转氨酶	C
11	ACP <sub>2</sub>	酸性磷酸酶(溶酶体的)	P
	ES-A <sub>4</sub>	酯酶-A <sub>4</sub>	C
	LDH-A	乳酸脱氢酶-A	C
	AL	种系抗原1(致死抗原)	C

续表2

染色体号	基因符号	标	志	现状*
12	CS	柠檬酸合成酶(线粒体的)		P
	LDH-B	乳酸脱氢酶 B		C
	Pep-B	肽酶 B		C
	TPI	磷酸丙糖异构酶		C
	Gly <sup>+</sup> A	丝氨酸羟甲基转移酶(互补 GlyA <sup>+</sup> )		P
13	ES-D	酯酶-D		C
14	PNP	嘌呤核苷磷酸化酶		C
15	B <sub>2</sub> M	B <sub>2</sub> -小球蛋白		P
	Hex-A	己糖胺酶-A		P
	Hex-C	己糖胺酶-C		P
	MPI	甘露糖磷酸异构酶		P
	PK-3	丙酮酸激酶		P
16	APRT	腺嘌呤磷酸核糖苷转移酶		C
17	GaK	半乳糖激酶		C
	TK	胸腺嘧啶核苷激酶		C
18	Pep-A	肽酶-A		C
19	GPI	磷酸葡萄糖异构酶		C
	PVS	脊髓灰质类病毒敏感性		P
20	ADA	腺苷脱氢酶		P
	DCE	demesterol 胆固醇转化酶		P
21	IFS	干扰素敏感性		C
	SOD-1	超氧化物歧化酶(胞质的)		C
22		细胞杂交法未标出		
X	2-GalA	半乳糖苷酶		C
	G6PD	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶		C
	PGK	磷酸甘油酸激酶		C
	HGPRT	次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖苷转移酶		C
	TATr	酪氨酸转氨酶调节因子		P
Y		细胞杂交法未标出		

\* 基因定位的现状分为三类: C, 确定的; P, 暂定的; I, 有争论的。

## II. 遗传缺陷的基因互补

人类先天性遗传病既然与基因缺陷有关, 遗传工程学者提出了“基因治疗”, 能否进行? 体细胞杂交研究从细胞水平上证实了这种可能性。

目前在杂种细胞内已能辨别两种类型的基因互补作用 (gene complementation): 基因间的互补作用和基因内 (等位基因间) 的互补

作用。基因间的互补作用系指在一个杂种细胞内两个不同的亲本基因组之间的相互作用。例如把HGPRT<sup>-</sup>细胞与TK<sup>+</sup>细胞杂交, 或者反过来, 把HGPRT<sup>+</sup>细胞与TK<sup>-</sup>细胞杂交, 这两类杂种细胞即能产生HGPRT<sup>+</sup>和TK<sup>+</sup>。Silagi等证明, 乳清酸尿症患者的缺失乳清酸核苷-5-单磷酸 (OMP) 脱羧酶和OMP-焦磷酸化酶的细胞与缺失HGPRT的细胞融合后, 杂种细胞能产生上述三种酶, 酶活力为其双亲细胞的中间型水平。Ruddle等指出, 小鼠肝癌细胞 (能分泌小鼠型的白蛋白) 与人白细胞 (不能分泌白蛋白) 融合的杂种细胞, 既能分泌小鼠型的白蛋白, 亦能合成人型的白蛋白。Peterson等亦获得类似结果, 大鼠肝癌细胞与小鼠3T3成纤维细胞形成的杂种能够产生大鼠型与小鼠型的白蛋白。这些实验证据表明了基因间的激活作用<sup>(17)</sup>。并且提示, 某些细胞即使在功能上已明显地分化为特化细胞时, 只要在合适的外源因子诱导下, 原来“关闭”的基因组会被重新“打开”, 成为活跃的基因组。

关于基因内的互补作用, Nabler曾报道, 在7个不同的半乳糖尿症患者的细胞中, 1个患者的细胞会互补另外6个患者的遗传缺陷, 于后, Sekiuchi及其同事也发现不同的HGPRT<sup>-</sup>细胞系之间的互补作用。晚近, 对各个着色性干皮病患者的细胞进行相互杂交, 能修复由紫外线辐射引起的DNA损伤。而且当典型的着色性干皮病患者的细胞与该类疾病中另一种尚涉及神经与智力缺陷的患者 (De Sanctis-Caccione症) 细胞融合时, 该类杂种细胞比各自相互融合形成的杂种细胞, 它们修复DNA损伤的能力要强得多。现在已了解到, DNA修复涉及4个不同的互补基因, 换言之, 至少有4个突变可以诱发缺损的DNA修复。详见Cox<sup>(9)</sup>的述评。

## III. 肿瘤恶性行为的阻遏

正常细胞如何癌变? 其恶性行为受哪些基因或基因组控制? 能否从基因水平上加以调节和纠正? 这些问题是肿瘤生物学中极感兴趣的。

利用恶性细胞或病毒转化细胞与正常的二倍体细胞融合产生的杂种系统,为阐明上述诸问题提供了一些有意义的资料。迄今所做的工作,获得三类颇不相同的结果,现择要简介于下。

Barski研究组从两种具有不同致癌力的细胞系N1(高度恶性)和N2(低度恶性)混合培养物中分离得到15个杂种纯系。其中14个杂种纯系的致癌能力与N1亲本细胞雷同。只有1个杂种纯系接种至动物体内时不长肿瘤。其它的一些实验室也报道,若把一个高度恶性的肿瘤细胞与另一个正常细胞融合,得到的杂种细胞甚至比其恶性的亲本细胞更为恶性。Croce研究了SV<sub>40</sub>转化的人细胞与正常的小鼠巨噬细胞杂交的纯系,结果与上述相吻合,并且进一步证明,转化表型的表达与人的7号染色体有关,这意味着转化表型是受到整合在7号染色体上的病毒基因组所控制的。

然而,一些工作者指出,在某些情况下,恶性表型能被阻遏,癌细胞在异种接种时产生肿瘤的能力由于与其它细胞融合而有明显降低、乃至完全抑制的迹象。最近Shkolnik和Sachs证明髓性白血病细胞与正常巨噬细胞杂交后,前者的恶性也受到抑制。Klein<sup>(4)</sup>在晚近的报道中综述了这类工作,应用低度恶性的小鼠A9细胞系,它可以抑制下列各类高度恶性的腹水瘤细胞的恶性行为:艾氏瘤、甲基胆蒽诱发的MSWBS肉瘤、多瘤病毒诱发的SEWA肉瘤以及Molony病毒诱发的2个淋巴瘤亚系(YAC和YACIR)。若用小鼠L细胞的另一个衍生系B82,和另一个A9的逆转系A9R1,这两种低度恶性的细胞亦能阻遏高度恶性的艾氏瘤之恶性表达。他进一步指出,恶性表型的抑制明显地与杂种细胞内非恶性细胞的一个或几个特殊染色体有密切关系。当杂种细胞丢失了某些起关键作用的染色体时,恶性表型再表达出来。这些起关键作用的染色体很可能携带着互补基因。因而,有些作者认为恶性乃是一种遗传缺陷,系基因调控失常的结果。杂种细胞内正常染色体可以弥补或纠正这

种缺陷。这些研究成果是富有意义的,有理由相信,它对恶性表型的基因定位,对癌症进行基因治疗和预防,带来了希望。

#### IV. 细胞分裂的调控

Mazia指出,在细胞周期的各个过渡阶段中,有两个是最重要的。一个是从G<sub>1</sub>期过渡到S期,此时染色体复制;另一个是从G<sub>2</sub>期过渡到M期,此时染色体凝聚并开始进行有丝分裂。细胞从这一时相过渡到下一时相,是否存在“开关”?能否人为地予以启动或关闭?这对衰老研究、恶性肿瘤的控制以及生物的生长发育等课题,无疑是至关重要的。六十年代末就已证明了细胞周期各个阶段的细胞都可以在病毒的介导下彼此互融,从而为研究细胞周期的规律提供了一个新的途径。若把S期细胞与G<sub>1</sub>期细胞融合,会促使G<sub>1</sub>期细胞核合成DNA,比其在正常状态下所进行的要快得多。这一结果提示,S期细胞含有某些能激发DNA合成的物质。晚近通过去核细胞<sup>(18)</sup>的研究,业已证明,S期细胞内这种诱导物质存在于胞质之中,可能属于蛋白质类。G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>期细胞则没有这种诱导物质,而且也没有能抑制S期细胞DNA合成的因子。

十分有意义的是,细胞一旦进入S期,融合细胞内的各种核均按各亲本细胞自己所特有的复制时间表和复制程序进行。显然,S期的启动信号不能控制一旦开始后所发生的变化,而是每种生物所特有的复制程序必定存在于该种生物的核内。

用M期细胞与其它各个时相的细胞杂交,则发现下列三种现象:1)与G<sub>1</sub>期细胞融合,它可以诱发G<sub>1</sub>核里的染色体在复制之前就发生凝聚现象,现已称为早熟态的染色体凝聚(PCC);2)与G<sub>2</sub>期细胞融合,同样也会使G<sub>2</sub>核的染色体提前凝聚,进入分裂期;3)与S期细胞融合,却迫使S期核内染色体小片段地凝聚,形成所谓“粉末化”现象。这些结果表明,M期细胞内有一种迫使染色体凝聚的物质。并且已证明这种物质没有种属特异性。亲缘关系很

## 第一卷第一期

远的两种细胞,如人和蟾蜍融合形成的杂种细胞,结果亦同。上述研究为细胞生长分裂的调节控制,提供了理论上的依据。进一步应用生物化学和分子生物学方法将有可能把细胞周期中的启动因子和关闭因子的物质基础寻找出来。

### V. 单株抗体的无性繁殖

应用体细胞杂交术为制造单一抗体开辟了新的道路。Milstein和Köhler首先使小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合,建立了能产生单株抗体(monoclonal antibody)的杂交瘤细胞。这类能产生特定抗体的杂种细胞几乎是“永生”的,在深低温下保存4年后,其功能仍处于良好状态。这类杂交瘤细胞在100毫升培养液中约可产生50毫克的抗体。若把这些杂交瘤细胞种入动物体内,则可从1,000毫升渗出液中提取到约20克的抗体,数量极为可观。

由于单株抗体具有专一性、敏感度高等优点,可用来检测表面膜的微细变化,这对于研究胚胎发育过程中细胞膜分子组成与结构之演化、病毒外壳蛋白之变化、以及肿瘤免疫学与细胞遗传学等提供了一个有用的手段,并可能在诸如器官移植、诊断和监测白血病、测定神经系统的微细变化、组织细胞的分型与血型分析等方面具有实际意义。

### VI. 其它

以上仅列举了细胞杂交在生物科学领域内应用的几个方面的一些成果及其意义。实际上,在其它方面也有很大进展,诸如:衰老、已分化核的再激活、DNA和RNA的合成、表面抗原的表达、各种免疫球蛋白的分泌、激素的效应、对药物的抗性、以及病毒的分离等,均在不同程度上取得富有意义的成果。

## 四、结 语

体细胞杂交系统建立以来的20年中,技术上已日臻完善,应用面也愈趋广阔,已成为细胞生物学中十分有用的工具之一。技术上的突破,推动了学科的迅速发展,随着学科水平的不断提高,反过来也对方法学提出了新的要

求。细胞工程学也在前进中。继细胞杂交工程之后,在七十年代中又建立了细胞拆合工程。目前不仅能把完整细胞的核与质在生活状态下拆开<sup>(19)</sup>,并借助细胞融合的知识完成了两者的重组,重新构成活的、有分化能力的完整细胞。晚近的进展表明,应用只含少数乃至一个染色体的微细胞、甚至从中期分裂细胞直接分离染色体并导入到无核的胞质体内,也已成为可能。人工膜囊——脂质体业已制备成功,可以进行细胞内的“注射”。所有这些,均使细胞工程学大放异彩。可以预期,进一步发展和运用细胞工程技术,将可扩大对生物界的认识,为深入研究许多基础理论课题,并为改造生物品种、防治人类遗传病和癌症等疾病以及有害生物等这些在生产和临床实际中急待解决的问题,作出有益的贡献。

## 参 考 资 料

- (1) Barski G. et al., 1961. J. Nat. Cancer Inst., 26: 1269.
- (2) Okada. Y., 1962. Exp. Cell Res., 26: 98.
- (3) Harris H., 1970. "Cell Fusion" Clarendon Press, Oxford.
- (4) Klein G., 1977. in "Medical Genetics" (G. Szabc', Z. Papp. eds.), P. 811, Amsterdam-Oxford.
- (5) 童弟周, 1973. 动物学报, 19: 76.
- (6) 童弟周、叶毓芬等, 1976. 动物学报, 22: 308.
- (7) Poste G. et al., 1976. in "Methods in Cell Biology" 14: 1.
- (8) Kao K. N., Michaylnk N. R., 1974. Planta, 115: 355.
- (9) Cox R. P., 1975. Intern. Rev. Cytol., 43: 282.
- (10) Davidson R. L., Gerald P. S., 1977. in "Methods in Cell Biology" 15: 325.
- (11) Littlefield J. W., 1964. Science, 145: 709.
- (12) Kao F. T., Puck T. T., 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 3273.
- (13) Lucy J. A., 1977. Trends in Biochemical Science. 2: 17.
- (14) Mckusick V. A., Ruddle F. H., 1977. Science 196: 390.
- (15) Goss S. J., Harris H., 1977. J. Cell Sci., 25: 39.
- (16) Lao M. L., Kao F. T., 1978. Somatic Cell Genetics, 4: 465.
- (17) Ringertz N. R., Savage R. E., 1976 "Cell Hybrids" Academic Press. New York.
- (18) 沈鼎武 陈瑞铭, 1978. 生物科学杂志 4: 10.
- (19) 陈瑞铭 沈鼎武 杨正洪, 1979. 实验生物学报, 12: 115.