



细胞拆合研究的一些进展

沈鼎武 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

70年代初,细胞工程进入了一个崭新的阶段,诞生了细胞拆合工程。

真核细胞的核、质相互关系是长期以来受到重视的课题之一。人们曾作了相当大的努力从事真核细胞内这两个主要部分的各自独立又相互协调的研究。去核细胞与核移植实验在提供细胞内的基因表达与调控方面的资料无疑占有独特的地位。但以往这些实验大多是倚仗显微外科手术进行的,局限于一些如原生动物和两栖类的卵母细胞等体积较大的细胞类型,在较小的哺乳类体细胞进行实验,则收效甚微。

Carter^[2]于1967年发现细胞松弛素B (Cytochalasin B, 简称CB)能诱发体外培养的小鼠L细胞的排核作用。Prescott等^[3]于1972年首先应用离心术结合CB分离哺乳类细胞的胞质体获得成功,为研究哺乳类细胞的核、质相互关系、细胞质基因的转移等开创了新的实验途径。目前制备哺乳类细胞的胞质体的方法日渐完善^[4-6]。据报道, CB与离心术并用,获得胞质体的纯度为90%以上,在某些啮齿类细胞中可高达99%^[7]。在制备胞质体过程中所收获的核体(也称小细胞)部分,其纯化技术也已发展^[8]。

近四、五年由于细胞的核、质分离技术与细胞融合术的发展,已使细胞工程中这两项技术汇合起来,建立了细胞重组技术。该项技术由Veomett等^[9]以及Ege和Ringertz等^[5]所创建。在融合因子的介导下,可使胞质体与完整细胞并合,构成胞质杂种细胞;胞质体与核体并合,称为重组细胞。最近,应用秋水仙素抑制分裂中期细胞,诱发行成微核化细胞,再经CB与离心术处理,可以制备只含少数染色体的

微细胞。在融合因子介导下可将其导入完整细胞,构成微细胞异核体。细胞拆合术的这些成就推动了细胞生物学的进展。本文仅概述其方法学及其应用。

细胞拆合技术

I. 胞质体的制备 制备胞质体的基本过程是使细胞在CB作用下排核,继以离心力使排出的核体与胞质体分离,见图1。目前制备

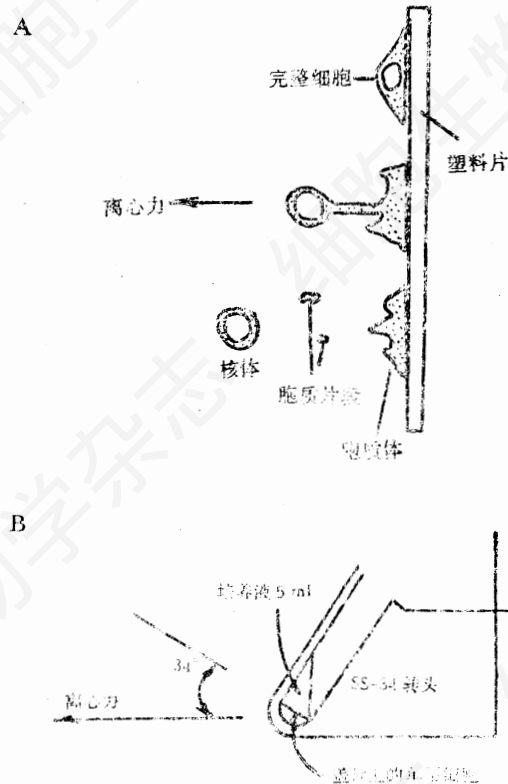


图1. (A)示生长于塑料片上的细胞,在CB与离心力作用下,核体与胞质体的分离过程;(B)示塑料片在离心管与转头内的位置、角度以及离心力。

胞质体的方法大致有:玻璃盖片法、塑料片

法、载玻片法、离心管法、培养皿法、培养瓶法以及悬液法等。简之，凡可用作细胞培养的器皿几乎均可用以制备胞质体。但无论采用那种方法，要获得纯度高、收率多的胞质体，均应按实验须用的细胞类型，摸索出合适的细胞密度、CB剂量以及离心速度与时间，特别是离心时的温度（30—37℃）。陈瑞铭

等^[10]采用塑料片法制备人体肝癌细胞BEL-7404系^[11]、人宫颈癌HeLa细胞以及小鼠A9/28DKS系细胞等的胞质体，其制备条件与纯度见表1。适当增加培养液内的血清含量，可防止BEL-7404系细胞在CB与离心力并合作用下大片脱落，并提高去核率。

II. 核体的制备 核体的制备方法，基本

表1 胞质体的制备条件与纯度

细胞系	去核条件				去核率(%) (胞质体纯度)
	培养液内血清浓度(%)	CB浓度(微克/毫升)	离心速度(转/分)	离心时间(分钟)	
BEL-7404	30	10	14,000	40	93.2
HeLa	10	5	14,000	40	97.4
A9/28DKS	10	10	14,000	40	98.8

上是按上述去核过程进行的，但为了产生大量的核体，一般须采用培养瓶、皿等容积较大的器皿。Lucas和Kates^[8]等设计了核体的纯化技术，以防止夹杂完整细胞与胞质体。通过去核前作预离心，可去除贴壁不牢的完整细胞；也可在去核处理后把从离心管底部收集的标本接种于培养皿内温育1—2小时。这样，残留的完整细胞已粘附于培养皿的表面，而核体的贴壁率仅为4%。其悬液部分，即为较纯净的核体样品，若重复一次上述步骤，则能获得更纯的核体。标本中夹杂的胞质体可于1—6%非可液中梯度自然沉降分层后予以排除。

III. 微细胞的制备 秋水仙素能干扰微管的合成、装配，从而阻抑细胞分裂于中期。Ege和Ringertz^[12]于1974年应用秋水仙素诱发体外培养细胞微核化获得成功。微核化细胞的形成过程见图2。在秋水仙素的作用下，产

生微核化细胞的比例，随处理时间的延长而递增，可达70—90%^[13,14]。再经CB与离心术即可制得微细胞。若经牛血清白蛋白梯度重力沉淀，微细胞样品即可纯化。台盼蓝染色证明这些微细胞是活的。细胞分光光度计测定表明，微细胞内含的DNA量仅相当于几个甚至一个染色体的量。

IV. 胞质体与完整细胞的融合——胞质杂种 有关胞质杂种的研究，最早是由Ladda和Estenson^[15]于1970年所进行的。他们用灭活仙台病毒使鸡红血球与L细胞融合，继以CB诱发L细胞排核，构成胞质杂种细胞。然而，这样产生的胞质杂种的机率是很低的。由于CB与离心术并用去核技术的建立，Bunn等^[16]于1974年应用病毒使一个亲本细胞的胞质体与另一个亲本的完整细胞并合，从而为研究细胞质基因的转移提供了一个有用的实验途径。

V. 微细胞与完整细胞的融合——微细胞异核体 Ege和Ringertz^[7]曾证明微细胞在仙台病毒介导下也能被导入完整细胞。这是因为微细胞的外周仍包绕有一层质膜，在方法学上产生微细胞异核体并不困难。因微细胞只含少量的染色体，在杂种细胞内易被排斥，故该

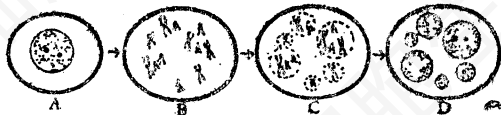


图2. 示微核化细胞形成的假设机制

(A) 间期细胞，在秋水仙素作用下细胞分裂阻抑于中期(B)；由于微管系统的紊乱，染色体运动中止，在单个染色体或染色体群之周缘重现核膜(C)；染色体介聚，回复至间期状态，形成微核化细胞(D)。

项技术在基因转移、基因定位方面具有重要意义。

VI. 核体与胞质体的融合——重组细胞 核体与胞质体外周围均有质膜，故能在病毒类融合因子的介导下使两者并合，构成重组细胞。这一工作首先由 Veomett 等^[9]所完成。为了鉴别是否是真正的重组细胞，而不是标本中夹杂的完整细胞，一些工作者^[18]设计了双重标记法，采用两个具有不同缺陷型的细胞供作核标志，并使其吞食不同大小的乳胶颗粒作为胞质标志物。经过遗传选择并在光学镜下辨别乳胶颗粒的大小及数量即可判断是否为重组细胞。另一种鉴别方法是采用³H-胸腺嘧啶核苷参入作核标志。³H-亮氨酸参入作胞质标志，或者综合以上两法分别用³H与乳胶颗粒作核与质的标志物，见图3。

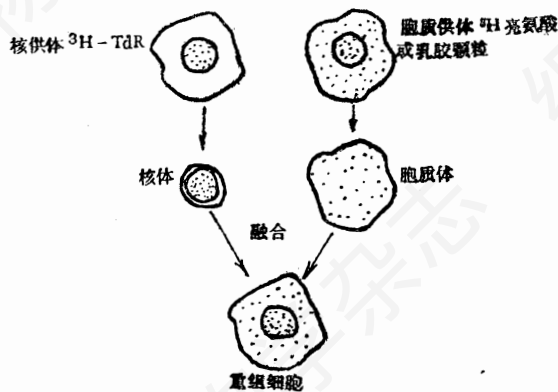


图3. 示鉴别重组细胞的标记步骤。核供体细胞以³H-TdR 标记，胞质供体以³H-亮氨酸或乳胶颗粒标记。经去核与融合后，在构成的重组细胞内，核具放射性标志，胞质中为乳胶颗粒或放射性标志。

细胞拆合的应用

I. 胞质体

1. 特征 无核状态下细胞的形态结构，蛋白质合成乃至其行为的研究，本身就富有重要意义。大量工作表明，这些胞质体至少能在体外培养条件下存活16—36小时。应用透射电镜技术揭示胞质体内仍具有与完整细胞同样的细胞器，如内质网、线粒体、溶酶体以及细胞内骨架

系统微丝和微管等。饮液囊之存在提示有胞饮作用。高尔基体与中心粒仍位于原来靠核的区域。令人惊讶的是，通过显微缩时电影术证明胞质体内的颗粒与线粒体的运动十分活跃，胞质体尚具有贴壁、铺展以及运动等行为特征。Goldman等^[19]进一步分析了正常的3T3细胞与病毒转化的Py3T3细胞两者的胞质体的行为特征。发现正常的3T3胞质体一旦与邻近的胞质体相接触，膜运动立即中断，呈现接触抑制；而Py3T3胞质体则呈堆叠样排列。这一结果清楚地显示，去核后的正常胞质体，其质膜仍具有“识别”能力；而转化细胞的胞质体的质膜也具有与完整细胞相似的行为特征。

胞质体内的DNA合成，如所预期的那样并不存在，RNA合成为完整细胞值的2%，但蛋白质合成则在去核后的一段时间内持续着。胞质体的³H-亮氨酸参入率，去核后3小时为正常值的65%，12小时下降至30%^[5]。最近McCormick^[20]与Clark^[21]分别证明，小鼠L929和3T3细胞的胞质体，在去核后3—8小时内，其鸟氨酸脱羧酶的活力仍为对照完整细胞的30—40%水平。这些结果对进一步研究胞质内蛋白质特异的mRNA的半衰期，蛋白质的翻译水平和tRNA的转运能力等具有重要的价值。此外，胞质内一些细胞器，如线粒体，中心粒及植物细胞中的叶绿体等所含有的DNA自主性复制程度及其与核DNA之间基因信息的传递关系如何？这是人们所关心的课题之一。已有工作初步表明，去核细胞内的线粒体可以进行有限的DNA复制，但活力低于正常的有核细胞。应用分子生物学技术进一步比较分析两者的依存关系，定能增进我们的认识。

2. 病毒学研究 应用去核细胞在研究动物病毒中的价值，早已被认识到。但早期的工作大都因局限于显微外科术所制备的少量的胞质片段而不能进行深入的分析。Prescott等^[22]应用细胞去核技术，证明去壳的牛痘病毒与病毒特异性DNA合成的起始两者均能在L929细胞的胞质体内发生。Croce和Koprowski^[23]

也同样证明了 CV—1 胞质体能使 SV40 基因组拯救出来。类似的工作表明, BSC—1 猴细胞的胞质体经灰质炎病毒感染后, 仍能合成所感染的病毒。因此可以认为, 就上述这些病毒的复制、转录, 翻译乃至其装配说来, 胞质起着关键性的作用, 细胞核并不是必须的。

II. 胞质杂种

1. 关于核质关系的研究 细胞杂交研究证明杂种细胞内两个亲本细胞之间具有遗传信息的传递与激活作用。但应用该种技术尚不能明确区分核与质各自起什么作用。细胞拆合技术的发展为研究胞质因子在细胞分化, 衰老等方面的调节作用创造了有利条件。

某些脊椎动物与哺乳动物的细胞, 在分化过程中不同程度地丧失了合成 DNA 与 RNA 的能力。导入外源胞质因子能否使其核酸代谢重现? 70 年代初已发现 L 细胞的胞质体能诱发鸡红血球的核发生膨胀, 且能参与 RNA 的前身物^[15]。嗣后, 一些工作者应用 HeLa 细胞的胞质体与鸡红血球融合形成的胞质杂种内, 亦获得类似结果。Dupuq—Coin 等^[24]观察了大鼠胚肺细胞或 L6 成肌细胞的胞质体与鸡红血球构成的胞质杂种, 在分析了 1,282 个细胞的 3,000 张电镜照片后, 发现鸡红血球核在与大鼠细胞的胞质体并合后, 6 小时内染色质开始解聚, 至 60 和 120 小时后, 染色质高度解聚, 核仁显现。在这样的胞质杂种细胞内, 鸡红血球的核几乎已辨认不出了。此外, 胞质杂种研究证实, L 细胞的处于 S 期的胞质体可使在正常情况下处于 G₀—G₁ 期的巨噬细胞的核进入 S 期, 而且只有 S 期的胞质体才具有这种效应。上述一些实验结果提供了胞质因子在调节核 DNA 复制与转录方面从失活状态转成激活状态的例证。

过去曾认为, 脊椎动物细胞本身是可以永生的, Hayflick 等于 1961 年首次证明体外培养的正常人胚肺成纤维细胞的增殖力是有限的, 细胞群体的倍增为 50 ± 10 次, 于后即停止增殖并趋衰老。历来关于正常细胞衰老的假说一般可分为三类, 归因于细胞核, 认为衰老是有序的

基因活动, 或为特异的“衰老基因”之表达, 或是由于所用基因的最终消耗; 归因于胞质, 认为衰老是胞质内细胞器的进行性和累积性毁坏的结果; 或归因于大分子信息的误差, 即在转录与转译某些有关蛋白质时发生杂乱误差的逐渐累积所引起的“误差性灾难 (Error catastrophe)”。胞质杂种在验证上述理论时具有独到之处。Wright 和 Hayflick^[25]应用碘醋酸选择法试验年青细胞的胞质体是否能拯救在几代后将正常地停止分裂的衰老细胞。所得的负结果提示, 在体外控制细胞衰老过程中, 是核而不是质起着决定性作用, 从而支持了衰老是一个有序的基因事件之表达的理论。当然, 从核质相互作用的辩证关系来理解, 胞质大分子物质的误差性累积和胞质内细胞器之退化, 仍可对核的基因表达具有某种程度的反馈调节作用。

2. 关于胞质基因的研究 胞质杂种系统在研究胞质的遗传性方面取得令人鼓舞的进展。Bunn 等^[16]把携带氯霉素耐受 (简称 CAP^R) 的线粒体基因的小鼠 A9 细胞的胞质体在融合因子介导下融合到对氯霉素敏感 (CAP^S) 但对 BUdR 耐受的核基因的同种亚系细胞内, 产生的胞质杂种细胞是 CAP^R, 因而能在含有 CAP 和 BUdR 这两种药物的选择性培养液内存活。提示 CAP^R 是该种小鼠细胞系的胞质内固有的遗传特征, 而与 CAP 敏感细胞的核基因无关, 这一实验系统在 HeLa 细胞以及 VA2—B 细胞的 CAP^R 胞质杂种中也得到证实^[26]。

Bunn 等^[27]晚近指出, CAP^R 的线粒体基因的转移只能在同系的两个突变种细胞之间进行, 当被导入至另一品系, 甚至是同为小鼠细胞但不同组织来源的细胞内, CAP^R 水平急剧下降。Watanabe 等^[28]则成功地应用畸胎瘤的实验系统, 获得了在不同品系及不同类型细胞之间 CAP^R 线粒体编码的突变基因的转移。CAP^R 黑色素瘤细胞的胞质体与 CAP^S 畸胎瘤细胞构成的胞质杂种细胞, 与其亲本畸胎瘤细胞不同, 线粒体蛋白合成水平不受 CAP 的影响。若把这样的胞质杂种细胞作动物皮下接种, 产

生的实体瘤细胞再定期地回种至动物体内并在体外进行CAP^R分析,证明CAP^R能力可在体内稳定地保持16周之久。更有意义的是,通过显微注射术把上述胞质杂种细胞注入另一纯系动物的胚泡内,并导入“养母”子宫内进行养

育,获得了对CAP^R的基因镶嵌型小鼠。这一结果极漂亮地提供了CAP^R系统在体内成功地正常分化的例证 见图4。

3. 恶性表达的调控 Howell和Sager²⁹观察了小鼠和仓鼠细胞系的种内胞质杂种,发

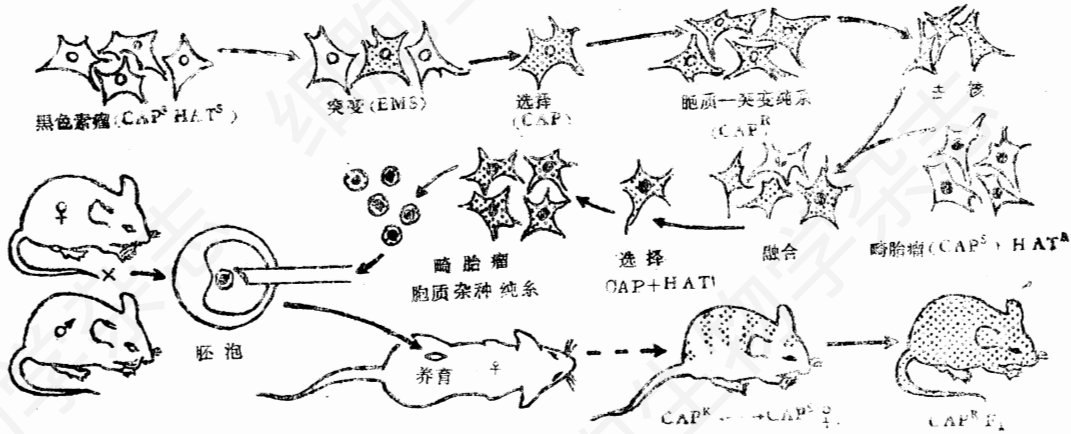


图4. 示CAP^R线粒体基因标志导入胚泡,产生基因镶嵌型小鼠实验系统。说明见正文。简写表示: HAT^S =HAT 选择培养基敏感; HAT^R =HAT 选择培养基耐受; EMS=2-甲基甲烷。

现非恶性的小鼠3T3细胞的胞质体与SV40转化的SVT2细胞融合构成的胞质杂种细胞,仍有产生肿瘤的能力;反之,SVT2细胞的胞质体与3T3细胞并合,所形成的胞质杂种则在动物体内不长肿瘤。提示在此实验系统内,恶性细胞形成肿瘤的能力并非由胞质所传递,而且非恶性细胞的胞质亦未阻遏另一细胞的恶性表达。在仓鼠细胞系统内,除进一步证实恶性表达受核决定外,正常CHEF/18细胞的胞质体部分抑制自发转化的CHEF/16细胞产生肿瘤的能力,似乎胞质因子对恶性表达起一定的调控作用。在另一品系的小鼠胞质杂种研究中,也注意到正常细胞的胞质因子虽不能在本质上影响恶性细胞在体内产生肿瘤的能力,但在体外可影响其生长的饱和密度³⁰。最近,Ringertz实验室³¹藉双向凝胶电泳术发现L6J1成肌细胞的胞质体对来自畸胎瘤的胚胎瘤细胞(EC)的多肽图谱没有明显的影响。上述工作对进一步阐明胞质因子在肿瘤细胞恶性调控中的作用,无疑是良好的开端。

III. 微细胞异核体

微细胞的制备成功,并藉融合术导入完整细胞¹⁷,这在基因转移工程中具有潜在价值。不仅因微细胞只含相当于几个乃至一个染色体的量,而且在杂种细胞内可以被优先排斥,这对基因定位将带来方便。微核被导入完整细胞以后仍显示RNA合成。因而微核编码的基因信息将会在微细胞异核体内表达出来。再者,微细胞异核体可以进行分裂³⁰。最近,Eournier和Rudale³¹证明,小鼠的微细胞确实可被导入另一品系的小鼠或仓鼠以及人的HeLa细胞。荧光染色反应表明这些微细胞异核体有小鼠的染色体组分;染色体分析示其染色体数目比其亲本完整细胞有相应增加;电泳检测显示存在着小鼠基因型的大分子物质,如脂酶D,嘌呤核苷磷酸化酶和肽酶B。脂酶D和嘌呤核苷磷酸化酶的结构基因已被定位于小鼠的第14号染色体上。因此,这一事实反过来也提示小鼠的该号染色体已被转移到微细胞异核体内。

IV. 重组细胞

1974年以来一些工作组^[10, 18]报道了小鼠与大鼠细胞的核体与胞质体在灭活仙台病毒介导下重组完整细胞, 并发现其中有些细胞处于有丝分裂的各个阶段, 提示这些重组细胞是有增殖力的, 大鼠L6成肌细胞的核体与小鼠A9细胞的胞质体构成的重组细胞的子代能形成集落, 并可再培养几个月甚至更久^[12, 32]。Ringertz和Kron Dahl^[33]最近进一步分析了重组细胞的基因表达, 特别是观察成肌细胞的核在非生肌细胞的胞质中是否仍保持其生肌分化的顺序, 结果表明, 由大鼠L6成肌细胞的核体与小鼠A9成纤维细胞的胞质体融合构成的重组细胞的集落经纯系分离培养后, 其子系能分化形成肌小管, 产生肌球蛋白, 并发育成骨骼肌典型的横纹图谱。这一实验结果证明了大鼠成肌细胞核的生肌表型即使经去核与重组等步骤仍能保持, 并不受外源胞质因子所改变。更重要的是, 他们的工作将对应用重组细胞分析核质在调节各种特异表型表达方面之作用, 产生深远的影响。

结 语

细胞拆合工程已成为细胞工程领域内的一个重要组成部分。核体与胞质体的制备成功为研究胞质大分子物质的合成能力, 信使RNA的寿命, 核、质之间的信息传递与物质交换及其相互影响, 特别是胞质在病毒复制中的作用等, 提供了一个极有价值的实验模型。胞质杂种系统的建立, 已在有关胞质基因的研究方面取得了令人鼓舞的进展, 并已开始探讨胞质因子对恶性表达调控的可能性。微细胞异核体与重组细胞的方法尚待进一步完善, 但已在基因转移, 细胞分化等方面有了可喜的成绩。这些都为生物学各个方面的研究增添了新的手段。预期随着细胞拆合工程的发展, 细胞杂交术在对核、质相互作用以及特异的细胞功能之表达与调控方面所取得的成就将更为扩大和深化; 在生物育种, 人类疾病与衰老的防治等方面, 亦具有十分广阔的远景。

参 考 文 献

- [1] 沈鼎武 陈瑞铭, 1979. 细胞生物学杂志, 1: 44.
- [2] Carter S. B., 1967. Nature(London) New Biol., 213: 261.
- [3] Prescott D. M. et al., 1972. Exptl. Cell Res., 71: 480.
- [4] Poste G., 1972. Exptl. Cell Res., 73: 273.
- [5] Ringertz N. R. & Savage R. E., 1976. "Cell Hybrids" Academ. Press. New York.
- [6] Wigler M. H. & Weinstein I. B., 1975. Biochem. Biophys. Res. Commun., 63: 669.
- [7] Ringertz N. R. & Ege T., 1977. in "Growth Kinetics & Biochemical Regulation of Normal & Malignant Cells" (eds. B. Drewinko & R. M. Humphrey). The Williams & Walkins Company. p. 199.
- [8] Lucas J. J. & Kates J. R., 1976. Cell 7: 397.
- [9] Veomett G. et al., 1974. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. 71: 1999.
- [10] 陈瑞铭等, 1979. 实验生物学报, 12: 115.
- [11] 陈瑞铭等, 1979. 中国科学.
- [12] Ege T. & Ringertz N. R., 1974. Exptl. Cell Res., 87: 378.
- [13] Hecht F. et al., 1975. Fed. Proc., 34: 995.
- [14] Sekiguchi T. et al., 1978. Exptl. Cell Res., 113: 247.
- [15] Ladda K. L. & Estenson R. D., 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 67: 1528.
- [16] Bunn C. L. et al., 1974. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71: 1681.
- [17] Ege T. et al., 1974. Exptl. Cell Res., 88: 428.
- [18] Ege T. & Ringertz N. R., 1975. Exptl. Cell Res., 94: 469.
- [19] Goldman R. D. & Pollack R., 1974. Methods in Cell Biol., 8: 123.
- [20] McCormick F., 1977. J. Cell Physiol., 93: 285.
- [21] Clark J. L. & Greenspan S., 1979. Exptl. Cell Res., 118: 253.
- [22] Prescott D. M. et al., 1973. Methods in Cell Biol., 7: 189.
- [23] Croce C. M. & Koprowski H., 1973. Virology 50: 227.
- [24] Dupuy-Coin A. M. et al., 1976. Exptl. Cell Res., 101: 355.
- [25] Wright W. E. & Hayflick Ly 1975. Exptl. Cell Res., 96: 113.

以纯化,取得了与亲本质粒具有相同电泳行为的纯质粒 DNA,而且它们同样能将大肠杆菌 C600 分别转化成为抗氨基青霉素——四环素、抗四环素及抗卡那霉素的细菌(见表 2)。说明用琼脂糖凝胶电泳纯化的质粒 DNA 具有生物学转化活性。

参 考 资 料

- [1] Bauer, W and J. Vinograd, 1968. *J. Mol. Biol.* 33: 141—171.
- [2] Freifelder, D. 1971. *Methods in Enzymology.* Vol. XXI, part D, 153—163.
- [3] Guerry, P. et al., 1973. *J. Bacteriol.*, 116: 1064—1066.
- [4] Humphreys, G. O et al., 1975. *Biochem. Biophys. Acta.*, 383: 457—463.
- [5] Ohlsson, R. et al., 1978. *Nucleic Acids Research.*, 5: 583—590.
- [6] Zaslloff, M. et al., 1978. *Nucleic Acids Resear-ch.* 5: 1139.
- [7] Tanaka, T. et al., 1977. *J. Bacteriol.*, 129: 1487—1494.
- [8] Tanaka, T. and B. Weisblum, 1975. *J. Bacteriol.*, 121: 354—362
- [9] Cohen, S. N, et al., 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 69: 2110—2114.
- [10] Aaij, C and P. Borst. 1972. *Biochem. Biophys. Acta.*, 269: 192—200
- [11] Sharp, P. A. et al., 1973. *Biochemistry.*, 12: 3055.
- [12] Strongin, A. Y, et al. 1977. *Anal. Biochem.*, 79: 1—10.

武汉大学生物系微生物专业 75 级毕业生冯新元和伏晓敏两位同学在我组实习期间参加了部分实验工作。

文章内的全部电泳照片均由我所钟逸新、许海滨两位同志拍摄,特此致谢。



哺乳动物细胞杂交中降低聚乙二醇毒性的简易方法

聚乙二醇(PEG)对某些细胞系具有高度毒性。作者将两个仓鼠细胞的温度敏感突变株 AF8 和 K12 细胞接种于平皿内,在贴壁、伸展后,加入 50% 的 PEG 溶液诱导细胞融合。所用的 PEG 有二种: 1. Baker PEG, 2. Koch-Light PEG, 分子量均为 1000。PEG 作用 30 秒钟后洗去,加入生长培养液,置于温度敏感突变株的许可温度 34℃ 下培养 16—24 小时,再移至非许可温度 40.6℃ 下培养二周,其间每隔 3—4 天更换一次。上述部分材料在 34℃ 培养后,以胰酶消化,用生长培养液 1:20 稀释后再接种于平皿内,于 40.6℃ 培养。12—15 天后染色,计算集落数。同时在缺钙的培养液内用 PEG 诱导细胞融合,比较产生的杂种细胞集落数。

实验表明:用 PEG 在缺钙的培养液内诱导细胞融合,至少保持 15 分钟以上,可使杂种细胞的集落数大为增加。在缺 Ca⁺⁺ 的培养液中 Baker PEG 诱导细胞融合的能力比 Koch-Light PEG 更为明显。並证明了杂种细胞集落数的增加是由于 PEG 的毒性的降低,而非融合效率的增高。

此法可用于各种细胞系,也适用于悬液中的细胞。有助于对 PEG 毒性极敏感的细胞系进行细胞杂交的研究。

蔡静妍摘自 *Somat. Cell Genet.*
Vol. 5 No. 2 263—269 1979

上接封三

- [26] Mitchell, C. H. & Attard G., 1978. *Somatic Cell Genet.*, 4: 737.
- [27] Bunn C. L. et al., 1977. *Somatic Cell Genet.*, 3: 71
- [28] Watanabe T. et al., 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci. S.*, 75: 5113.
- [29] Howell A. N. & Sager R., 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 75: 2358.
- [30] Schor S. et al., 1975. *J. Cell Sci.*, 19: 281.
- [31] Fournier R. E. K. & Ruddle F. H., 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 74: 319.
- [32] Krondahl U. et al., 1977. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 74: 604.
- [33] Ringertz N. R. et al., 1978. *Exptl. Cell Res.*, 113: 233.
- [34] Linder S. et al., 1979. *Exptl. Cell Res.*, 120: 1—14.