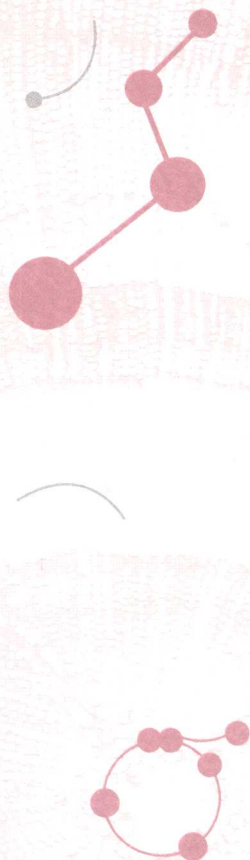


XIBAO DIANRONGHE JISHU

细胞电融合技术

赵志强 李章勇 著



重庆大学出版社
<http://www.cqup.com.cn>

细胞电融合技术

赵志强 李章勇 著

重庆大学出版社

细胞电融合技术

赵志强 李章勇 著

重庆大学出版社

内 容 简 介

本书在全面系统介绍各种细胞融合技术的发展背景、现状及应用前景的基础上,通过分析细胞电融合的过程,详细讨论了细胞电融合的排队过程,随后对细胞电融合的过程进行了理论建模及分析。这些研究对发展新型细胞融合技术提供了一定的指导,特别是对发展以 MEMS(微机电系统)技术为基础的新型细胞融合技术具有积极的理论与实践指导意义。

本书可供上述相关学科及生物医学工程、生物工程的科技工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞电融合技术/赵志强等著. —重庆:重庆大学出版社,2008.7

ISBN 978-7-5624-4580-7

I. 细… II. 赵… III. 细胞融合—生物技术 IV. Q813.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 098261 号

细胞电融合技术

赵志强 李章勇 著

责任编辑:王维朗 版式设计:王维朗

责任校对:任卓惠 责任印制:赵 晟

*

重庆大学出版社出版发行

出版人:张鸽盛

社址:重庆市沙坪坝正街 174 号重庆大学(A 区)内

邮编:400030

电话:(023) 65102378 65105781

传真:(023) 65103686 65105565

网址:<http://www.cqup.com.cn>

邮箱:fxk@cqup.com.cn (市场营销部)

全国新华书店经销

重庆升光电力印务有限公司印刷

*

开本:940×1360 16 开 印张:8 字数:115 千

2008 年 7 月第 1 版 2008 年 7 月第 1 次印刷

印数:1—2 000

ISBN 978-7-5624-4580-7 定价:20.00 元

本书如有印刷、装订等质量问题,本社负责调换

版权所有,请勿擅自翻印和用本书

制作各类出版物及配套用书,违者必究

前 言

细胞是组成生命结构和功能的基本单位,细胞融合技术正日益成为生物医药研究开发中的一项重要技术,利用它创建了一系列兼具亲本优良性状的生物和生物制品,并产生了良好的经济效益,促进了生物医药的产业化。本书在全面综述各种细胞融合技术的基础上,对细胞电融合技术做了较深入的理论和实验研究,这对发展新型细胞融合技术提供了积极的理论指导,特别是对发展以 MEMS(微机电系统)技术为基础的新型细胞融合技术具有积极的理论与实践指导意义,本书可为本领域的科研技术人员提供依据。同时本书全面介绍了细胞融合技术,也可供生物工程领域的科研技术人员参考。

全书共分为 5 章,在系统全面介绍各种细胞融合技术的发展背景、现状及应用前景的基础上,通过分析细胞电融合的过程,详细讨论了细胞电融合的排队过程,随后对细胞电融合的过程进行了理论建模及分析。在细胞电融合的理论建模部分,首先根据霍奇金-赫克利斯(Alan Hodgkin-Andrew Huxley)模型利用类比分析法构建起悬浮液细胞的物理模型,从电介质物理 Maxwell-Wagner 的界面极化理论出发,构建了“悬浮液细胞的电偶极子模型”,并进一步构建了细胞悬浮液中细胞的介电模型、单细胞电介质电泳效应模型和多细胞电介质电泳效应模型。

本书由以下人员编著。

赵志强	重庆邮电大学生物信息学院
代少升	重庆邮电大学通信与信息工程学院
钱 鹰	重庆邮电大学计算机科学与技术学院
赵德春	重庆邮电大学生物信息学院
曾重省	重庆邮电大学生物信息学院
王 伟	重庆邮电大学生物信息学院
李章勇	重庆邮电大学生物信息学院

本书的出版受到重庆市教委科学技术研究基金(编号:KJ080503)

和重庆邮电大学出版基金的资助。本书得到了重庆大学生物学院郑小林教授和彭承琳教授的悉心指导,得到了重庆邮电大学科技处及生物信息学院的大力支持,还得到了许多同事及朋友的无私帮助,本书在编著过程中,参阅了国内外的一些著作和专业网站资料,在此,对关心和帮助此书出版的所有人致以诚挚的谢意。

由于编著者水平有限,加之时间仓促,书中的缺点和错误在所难免,恳请读者批评指正。

赵志强
2008 年 6 月

量纲和单位

I . 通用 (General) 的量纲和单位

质量	m	铝环的质量	m_{Al}
水的密度	ρ_0	时间	t
高度	h	体积	V
速度	v	相对介电常数	ϵ_r

II . 与细胞悬浮液 (Cell Suspension) 相关的量纲和单位

细胞悬浮液的密度	ρ_s	细胞悬浮液的黏滞系数	η
缓冲液的相对介电常数	ϵ_{rcs}	电流在介质中所做的功	W
缓冲液的介电常数	ϵ_{cs}	缓冲液的复介电常数	ϵ_{cs}^*
缓冲液的电导率	σ_{cs}	缓冲液的复电导率	σ_{cs}^*
离子电导率	σ_i	离子极限当量电导率	σ_i^*

III . 与细胞 (Cell) 相关的量纲和单位

细胞电泳力	$\vec{F}_e$	细胞电泳的电位值	ξ
细胞中正、负电荷等效中心间距	$\vec{l}$	细胞电偶极子的电偶极矩	$\vec{p}$
细胞正电荷的等效中心	q_+	细胞负电荷的等效中心	q_-
球形细胞的内径	r	细胞的体积	V_c
球形细胞半径	a	细胞密度	ρ_c
细胞所受的重力	F_g	细胞在芯片内所受的黏滞力	F_η
细胞膜的电容	C_{ms}	细胞膜单位面积的膜电容	C_m
细胞膜的电导	G_{ms}	单位面积的膜电导	G_m

续表

细胞膜的膜厚	δ_m	细胞膜的单位面积膜电阻	R_m
细胞膜的相对介电常数	ϵ_{rm}	细胞膜的复介电常数	ϵ_m^*
细胞膜的介电常数	ϵ_m	细胞膜的复电导率	σ_m^*
细胞膜的电导率(膜电导率)	σ_m	细胞质的相对介电常数	ϵ_{cm}
细胞质的介电常数	ϵ_{cp}	细胞质的复介电常数	ϵ_{cp}^*
细胞质(细胞内液)的电导率	σ_{cp}	细胞质的复电导率	σ_{cp}^*
细胞的等效相对介电常数	ϵ_{reff}	细胞的等效相对复介电常数	$\epsilon_{reff}^*(\omega)$
细胞的等效介电常数	ϵ_{eff}	细胞的等效复介电常数	ϵ_{eff}^*
复介电常数 $\epsilon_{eff}^*(\omega)$ 的实部	$\epsilon_{eff}'(\omega)$	复介电常数 $\epsilon_{eff}^*(\omega)$ 的虚部	$\epsilon_{eff}''(\omega)$
细胞的等效电导率	σ_{eff}	细胞的等效复电导率	σ_{eff}^*
缓冲液的极化时间常数	τ_{cs}	细胞质的极化时间常数	τ_{cp}
细胞膜电介质的弛豫时间常数	τ'_m	细胞膜内壁的极化时间常数	τ_m
外电场频率对细胞的极化作用系数	K^*	外电场频率对悬浮液中细胞的极化作用常数	K_{eff}^*
细胞所受到的电介质电泳力	F_{DEP}	极化作用系数 K_{eff}^* 的实部	$R_e[K_{eff}^*(\omega)]$
弛豫频率	f_m	弛豫角频率	ω_m
细胞电介质小球内的电场强度	$\vec{E}_{in}$	电介质小球内的退极化场强	$\vec{E}'$
细胞在电场中的电势能	E_p	细胞融合率	κ_c
细胞的电介质电泳率	ζ_c	细胞的电介质电泳排队率	γ_c
外加的膜电位差	$\Delta\varphi$	诱导跨膜电势	U_m
引起膜结构重排的平均电场	$\vec{E}_m$	膜结构重排	$\Delta\xi$
扩散的离子通透选择性引起的自然电位差	$\Delta\varphi_m$	细胞膜表面固定电荷的不对称分布而引起的自然电位差	$\Delta\varphi_s$
跨膜电位的极大值	$\Delta\varphi_{cup}$	椭圆体细胞的半轴	a_j
椭圆体细胞在每个 a_j 方向上的跨膜电位稳定值	$\Delta\varphi_j$	椭圆体细胞的形状因子	F_j
细胞膜两端的最高膜电压	U_m	U_m 对膜所产生的压力	P_{um}
细胞膜的弹性常数	Y		

IV. 与电场 (Electrical Field) 相关的量纲和单位

金属平行板电容器真空中的电容值	C_0	真空条件下平板电极上的充电电荷	Q_0
两极板间距离 (cm)	d	真空条件下流过平板电极的电流	I_0
电容器平板面积 (cm ²)	S	填满绝缘材料两极板间的电容值	C_e
电压 (电势)	V	角频率	ω
有绝缘材料时外电路的电流	I_e	与电压同相位的电流分量	I_v
极板间介质的电导值 (率)	G	合成电流	$\vec{I}$
位移电流密度	$\vec{D}$	电流密度	$\vec{j}$
电场强度	E	电场强度矢量	$\vec{E}$
相对介电常数	ϵ_r	电阻率	$\rho(\Omega \cdot \text{cm})$
介质的介电常数	ϵ	介质的复介电常数	ϵ^*
介质的复介电常数的实部	$\epsilon'(\omega)$	介质的复介电常数的虚部	$\epsilon''(\omega)$
介质的电导率 σ	σ	介质的复电导率	σ^*
德拜 (Debye) 弛豫系统中电介质的极化时间常数	τ_p	细胞膜位点与外场 $\vec{E}$ 方向间的夹角	θ
外加交变电场的频率	f	电场梯度 (电场散度)	$\nabla \vec{E}$
正弦稳态非均匀交变电场	$\vec{E}(\vec{r}, t)$		

V. 书中的常量表

真空的介电常数	$\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$
细胞膜的厚度	$\delta_m \approx 7 \sim 10 \text{ } \mu\text{m}$
纯水的密度	$\rho_0 = 0.9982 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$
膜上脂类物质的电阻率	$10^{13} \sim 10^{14} \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
胞膜的单位面积膜电阻	$R_m \approx 10^5 \sim 10^9 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
细胞的膜电容	$C_m \approx 0.3 \sim 0.8 \text{ } \mu\text{F} \cdot \text{cm}^2$
细胞质的电阻率	$100 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
SMMC-7721 细胞平均半径的典型值	$a = 22.5 \text{ } \mu\text{m}$
SMMC-7721 细胞的膜厚	$\delta_m \approx 10 \text{ nm}$
SMMC-7721 细胞质的相对介电常数	$\epsilon_{cp}/\epsilon_0 = 50.0$
SMMC-7721 细胞膜的单位膜电容	$C_m = 0.4 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2$
SMMC-7721 细胞质电导率	$\sigma_{cp} = 6000.0 \text{ } \mu\text{S}/\text{cm} \text{ } (\sigma_{cp} \approx 10^{-2} \text{ S}/\text{cm})$
缓冲液的电导率	$\sigma_{cs} \approx 10^{-4} \text{ S}/\text{cm} \text{ } (\sigma_m \ll \sigma_{cs} \ll \sigma_{cp})$
细胞膜发生击穿的临界厚度	$\ln(\delta_c/\delta_m) = -1/2$

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 细胞融合的概念	1
1.2 国内外研究现状	3
1.3 细胞融合的研究意义	3
第 2 章 细胞融合技术	6
2.1 细胞融合生物诱导法	6
2.2 细胞融合化学诱导技术	9
2.3 细胞融合电场诱导法	10
2.4 细胞融合激光诱导法	14
2.5 空间细胞融合技术	17
2.6 基于微机电系统的细胞融合技术	18
2.7 对目前细胞融合技术的综合分析	19
第 3 章 关于细胞电融合技术中细胞排队方法的研究	22
3.1 细胞融合过程的分析	22
3.1.1 细胞相互接触(细胞排对)	22
3.1.2 细胞膜穿孔	23
3.1.3 质膜连接	24
3.1.4 问题的提出	25
3.2 基于微小室阵列的细胞电融合方法	25
3.2.1 微小室阵列细胞融合芯片的设计	25
3.2.2 微小室阵列细胞融合方案的微流路和微压力控制子 系统的设计	27
3.2.3 微小室阵列细胞融合芯片的设计方案的综合评价 ..	29
3.3 基于微电极阵列的细胞电融合方法	31



3.3.1	微电极阵列中悬浮细胞的电场效应	31
3.3.2	微电极阵列拟采用的电场效应	33
3.4	利用电极(阵列)实现细胞定向迁移的实验研究	34
3.4.1	实验目的	34
3.4.2	细胞的选取与培养操作	35
3.4.3	实验材料和仪器	36
3.4.4	计算	37
3.4.5	实验方法	39
3.4.6	实验一(SMMC-7721 细胞的定向迁移实验)的结果	40
3.4.7	实验二(HepG2 细胞的定向迁移实验)的结果	40
3.4.8	实验三(鱼卵细胞的定向迁移实验)的结果与讨论	41
3.4.9	实验讨论	42
3.5	本章小结	43
第4章	悬浮细胞在电场中的基本理论	45
4.1	引言	45
4.2	构建悬浮液细胞的电学模型	46
4.2.1	悬浮液细胞的电学基本模型	46
4.2.2	悬浮液细胞的电偶极子模型	49
4.3	碳纤维微电极小室的电场效应实验	53
4.3.1	微电极的制作	53
4.3.2	实验仪器和材料	54
4.3.3	计算	54
4.3.4	实验过程	56
4.4	实验结果及其分析	58
4.4.1	DC 作用下的实验结果及细胞的电泳效应分析.....	58
4.4.2	AC 作用下的实验结果及其初步分析.....	60
4.4.3	讨论	61
4.5	细胞悬浮液中细胞的介电模型	62
4.5.1	细胞的复介电系数和复电导率的定义及表达式推导	62

4.5.2 细胞悬浮液中细胞的介电特性	66
4.5.3 细胞悬浮液中细胞介电特性的德拜(Debye)表示 ...	67
4.6 本章小结	68
第5章 悬浮细胞的电介质电泳效应	70
5.1 细胞悬浮液的细胞电介质电泳效应模型	70
5.1.1 单细胞电介质电泳效应模型	70
5.1.2 多细胞电介质电泳效应模型	75
5.1.3 细胞悬浮液的电介质电泳频谱分析	80
5.2 碳纤维微电极小室实验中 AC 电场效应的分析	82
5.2.1 碳纤维微电极小室实验中细胞的介电特性	82
5.2.2 碳纤维微电极小室实验中细胞的电介质电泳频谱分析	86
5.2.3 极化作用系数与细胞悬浮液电导率的相关性研究 ...	89
5.3 细胞的定向迁移方式的比较与选择	90
5.4 本章小结	92
参考文献	94
专业名词中英对照	109

第 1 章

绪 论

1.1 细胞融合的概念

细胞融合 (cell fusion) 也称为细胞杂交 (cell hybridization)、原生质体融合 (protoplast fusion) 或体细胞杂交 (somatic hybridization), 是指细胞通过介导和培养, 在离体条件下用人工方法将原生质体 (除去细胞壁的不同种类的细胞) 通过无性方式融合 (合并) 成一个核或多核的杂合细胞的过程。细胞融合属于细胞整体水平的细胞工程。

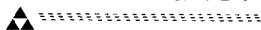
本书在此概念中提炼出如下关键部分, 可以加深对细胞融合的理解:

1) 离体条件: 是指将目标细胞从生物体中提取出来, 培养在人工环境中, 是区别于活体而言的;

2) 人工方法: 是指在外力 (病毒、诱导剂或促融剂、电场、磁场、超声、重力、激光等因素) 作用下;

3) 无性方式: 是区别于有性方式而言的, 在自然条件下, 生殖细胞卵子和精子相互接触会发生细胞融合的现象。细胞融合技术研究的对象是普通的细胞。

细胞融合不同于种内进行的有性的精卵结合或自然界偶然出现的远缘杂交现象, 体细胞的无性杂交才是真正意义上的细胞融合技



术,因此,细胞融合也称细胞杂交(cell hybridization)或体细胞杂交(somatic hybridization)。

体细胞融合则似细胞水平的无性杂交,用来融合的体细胞一般都是已分化的二倍体细胞,融合后形成四倍体或多倍体细胞,这种细胞是人类强制干预自然的结果。自然界的有性生殖过程确保了遗传物质的稳定和进步,因此物种间设置了各种障碍,而体细胞的融合是用人工的方法打破了生物界的各种界限和屏障,使科研人员能够按照自己的意志,把各种生物的不同组织类型的细胞融合在一起。细胞融合的最大优点是跨越了远缘杂交的障碍,使优良性状结合在一起,创造生物新类型。

同种细胞在培养时两个靠在一起的细胞自发合并,称自发融合;异种间的细胞必须经诱导处理才能融合,称诱发融合。同种细胞间的融合称为自体融合,不同种细胞间的融合称为异体融合。基因型相同的细胞融合成的杂交细胞称为同核体(homokaryon),来自不同基因型的杂交细胞则称为异核体(heterokaryon)。

细胞两两相互接触、黏连,其后的融合过程如下:接触部位的细胞膜破溃,两细胞之间胞质相通,即视为哑铃形或梅花形通道继而扩大,两个或多个细胞连成一体,形成双核或多核细胞。

另外,有些书中细胞杂交过程的示意图会产生一种错误印象:在各种诱导条件下,原生质体的融合是细胞膜、细胞质融合后,随即发生核融合。事实上,核的融合并没有立即发生。一种情况是:融合细胞中的2个核能发生同步有丝分裂或近同步有丝分裂,结果在第一次有丝分裂的后期形成含有1个异常大核的单核杂种细胞,其染色体数为正常数目的两倍,这些染色体是从原来2个核承袭而来的。一般亲源关系较近的细胞,融合后易发生这种情况,如烟草种间的细胞融合。另一种情况是:含有2个核的融合细胞分裂不同步,造成一方亲本的染色体将逐步丢失。亲源关系较远的细胞发生融合时,融合细胞常以一个细胞的核物质为主,只加入另一个细胞少量的遗传物质,如胡萝卜与羊角芹细胞的融合。科学家可以利用这种情况检测杂交细胞的某条染色体丢失同蛋白质种类减少的相应关系,来进行基因定位。

细胞可以发生融合的生物范围是很广的。到目前为止,已经在种间、属间、科间以及动植物两界之间都做过细胞融合的尝试,但只有体

细胞的无性杂交才是真正意义上的细胞融合技术。精子、卵子的结合虽然也是一种融合,但它是有性的,而且必须是在种内进行的。因此不属于本书所讨论的细胞融合范畴。不同生物的远缘杂交一般是要受到严格限制的。即使偶尔有远缘杂交出现,所产生杂种子代也是不育的。

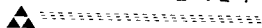
1.2 国内外研究现状

诱导细胞融合的方法基本上可分为生物法、化学法及物理法。生物法有仙台病毒法等,化学法主要是用聚乙二醇 PEG 结合高声、高钙离子法,物理法主要包括显微操作、电场刺激等。具体应用时要根据不同对象选择不同的细胞融合方法和条件。

1.3 细胞融合的研究意义

细胞融合利用现代科学技术,把来自于不同种类生物的单细胞融合成一个细胞,这个新细胞(杂合细胞)得到了来自两个细胞的遗传物质(包括细胞核的染色体组合和核外基因),具有新的遗传或生物特性,这个融合后的细胞可以培养成为新的物种、品系或成为新的细胞工程产品。

目前,细胞融合已成为细胞工程最基本的核心技术之一,已成为细胞工程研究的重要内容。细胞融合技术已逐步从动物细胞的融合扩展到植物细胞、微生物细胞,甚至真菌的融合,导致了细胞工程技术的新突破。细胞融合技术不仅为核质相互关系、基因调控、遗传互补、基因定位、细胞遗传,发育生理、细胞分化、细胞病理、衰老控制,生物进化,肿瘤发生、遗传学、发生生物学、免疫医学等领域的研究提供了有力的研究手段(细胞融合对学术研究的意义);而且在动植物远缘杂交育种以及医药、食品、农业等应用领域中都有广泛的应用价值(细胞融合对应用开发的意义)。现代生物学中一些最具创新性的技术,如在疾病诊断、治疗方面做出很大贡献的单抗制备技术中、哺乳动物的



克隆(比如著名的克隆羊多莉)以及抗癌疫苗的生产中,细胞融合是其中最为基本的步骤。

细胞融合技术正日益成为生物医药研究开发中的一项重要技术,利用它创建了一系列兼具亲本优良性状的生物和生物制品,并产生了良好的经济效益,促进了生物医药的产业化。原生质体融合技术在生物医药上的应用,主要集中在抗生素生产菌种改良、植物病害防治以及动物疾病防治上。展望未来,其应用前景必将更加广泛。

细胞是组成生命结构和功能的基本单位,是接近有机体原位的最小结构,有机体的生理功能和一切生命现象都是以细胞为基础表达的。随着人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)的完成,分子水平上的基因和蛋白质研究已不能满足人类对生命科学的原位探索,而细胞水平研究的核心优势在于实现原位检测,即在不破坏细胞形态结构的状况下,用生化的和物理的技术对细胞的生活状态做定性定量分析,研究其动态变化,了解细胞融合过程中的各种变化,因此细胞水平的研究必将成为后基因时代生命科学研究的核心理念。

目前,国内外正积极探索细胞融合机理和新型细胞融合技术。本书专门统计了在《中国期刊全文数据库(CNKI)》(如图 1.1 所示)和《Elsevier SDOS》(如图 1.2 所示)中关于“细胞融合”的文章。

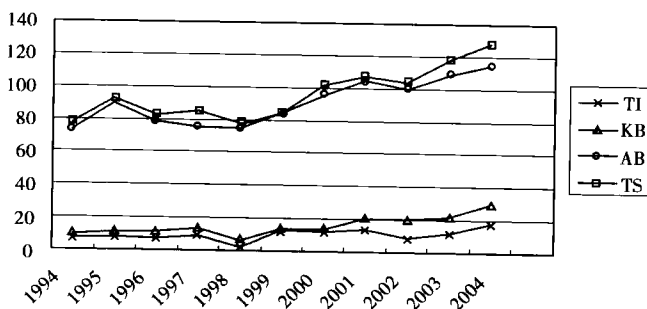


图 1.1 CNKI 中关于“细胞融合”文章的统计

图 1.1 和图 1.2 表明,“细胞融合”技术在生物科学研究中正起着越来越重要的作用,可见细胞融合技术的研究与应用呈逐年上升的趋势。可以预见,进一步深入研究和发 展细胞融合的相关理论和技术,将扩大对生物界的认识,为深入研究许多基础理论课题,改造生物、防

治人类遗传病和癌症做出重要的贡献。

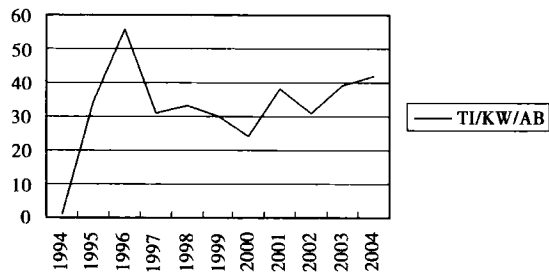


图 1.2 Elsevier SDOS 中关于“细胞融合”文章的统计

第 2 章

细胞融合技术



2.1 细胞融合生物诱导法

很多病毒都具有凝集细胞的能力,其原理大致如下:病毒的一边黏接在一个细胞表面,另外一边黏接在另一个细胞表面,从而使两个细胞在病毒的作用下靠近发生凝结。最早被采用的用来融合的病毒有疱疹病毒、天花病毒、副黏液病毒、冠状病毒、RNA 癌病毒,以副黏液病毒中的仙台病毒最为有效,使用最广。它是多形性颗粒,直径达 5 000 Å。被有两层磷脂组成的外膜、包裹着 RNA 和蛋白质的复合体,外膜上有两种糖蛋白质。细胞融合生物诱导法一般采用“细胞融合仙台病毒(HVJ)诱导法。仙台病毒(Sandal virus)也称日本血凝病毒 HVJ,属黏液病毒副流感类群,是 RNA 病毒,多型颗粒状,易在小鼠中蔓延。由于被感染细胞表面发生某些改变。使得这些细胞容易发生融合,甚至处死的 KVJ 病毒也具有促进细胞融合的作用。20 世纪 60 年代,日本仙台东北大学医学系的学者冈田(Okada)利用仙台病毒使两种不同的动物细胞之间发生凝集,进而融合成一体。在动物细胞融合中,仙台病毒(HVJ)已成为产生细胞杂种的标准融合剂。

仙台病毒具有促使凝结的细胞发生融合的能力,这是因为各种能被其作用的细胞均有相应受体的缘故。现已基本知道,其促进细胞融