

# 细胞电穿孔 电融合 电刺激 ——原理技术及应用

主编 汪和睦 谢廷栋

校外 汪和睦

贈書



A0993872

天津科学技术出版社

**图书在版编目(CIP)数据**

细胞电穿孔电融合电刺激原理技术及应用/汪和睦主  
编. - 天津:天津科学技术出版社,2000.8  
ISBN 7-5308-2244-6

I. 细… II. 汪… III. 细胞融合-研究  
IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 40549 号

责任编辑:李运通 张虹霞  
版式设计:雒桂芬  
责任印制:张军利

天津科学技术出版社出版

出版人:王树泽

天津市张自忠路 189 号 邮编 300020 电话(022)27306314

天津新华印刷二厂印刷

新华书店天津发行所发行

\*

开本 787×1092 1/16 印张 20.75 字数 501 000

2000 年 8 月第 1 版

2000 年 8 月第 1 次印刷

定价:30.00 元

# 前 言

郑天佑 (Tian Yow Tsong)

香港科技大学生化系 美国明尼苏达大学生物科学院生化系

出版一本有关电穿孔及电融合的中文专著具有很重要的意义。首先,它表明自发明创造以来的短短的 20 年里,电穿孔和电融合已成为一成熟的科学学科,得到世界的广泛认识。近几年,已发表了数百篇有关电穿孔和电融合的基本化学机理及其在医学、分子生物学、生物技术学等方面应用的科学论文,并且这些论文正以惊人的速度增加。其次,在追赶各学科研究前沿上,其中包括这一高度专门化的研究前沿,我们的中国科学界同事们已经取得长足进展。我很荣幸地应南开大学汪和睦教授和他的同事谢廷栋的邀请作为一名作者写此前言,简单地介绍一下该学科的历史进程及目前发展状况。汪和谢在这个领域里做出了积极的贡献,并且都是中国电穿孔研究的活跃推动者,我与谢多年来有许多合作。电穿孔的细节及相关性质将在正文中讨论。以下将简单地介绍其基本概况及近(年)期取得的成果。

悬浮细胞在脉冲电场下(场强:1~10kV/cm,时间:毫秒至微秒级)将受到不同效应的影响:电流或热效应、电势效应。此外还有一些次级效应,如阳离子运动产生的电渗透;温度急剧跳跃所产生的冲击波压力;静电相互吸引或细胞周围畸变电力线所产生的机械力等等。在研究的早期,尽管人们还不能确认究竟是哪些效应使细胞发生变化,但已报道了这些效应造成的细胞变化。例如,对膜电导的可逆变化,一种解释为原生质膜介电击穿的结果,另一种解释为脂类介质热致流动的结果,而现在,我们相信这是电位引起膜通道的开启或脂质有序结构的缺损造成的。所以 Coster 称之为穿孔。虽然在多数情况下,使用的电脉冲很高,但 DNA 及其它大分子向介质释放电荷很可能是一种次级效应——细胞的胶体渗透溶解造成的。同时,细胞膜完全的电致破裂也导致细胞内物质的泄漏。细胞膜通透性的不可逆变化可以相信是由脂双层或蛋白质通道产生了电击穿,以及随后在通透孔周围局部热作用造成的。这样,这些分子产生不可逆变性。热变性常常伴随着易氧化分子及功能团的氧化过程。用交变电场时,还将产生一些其它的化学效应,例如细胞的旋转及运动。另一有趣的效应是跨膜酶或输运蛋白吸收电能并将其转化成化学功。由脉冲电场的不同效应导致的化学反应总结于表 0-1 中。

不论是平板形(BLM)还是微囊形的脂双层膜,都能在毫秒级的时间间隔内承

受 200 ~ 500mV 的跨膜电压。如果跨膜电压高于此值,膜将会发生一些结构变化,而导致对离子和分子的膜传导性增大。通透性或传导性的增加是由于含水孔洞的形成引起的。由直径为 40 $\mu$ m 的脂质体的荧光光谱成像可知,这些孔洞的直径可大至微米级。且这些孔洞可能是可逆的,也可能是不可逆的,它取决于类脂的类型及使脂双层有序排列瓦解的刺激强度。细胞膜中可能还有其它一些受影响的成分。特别是当跨膜电位达到阈电位(典型值低于 100mV)时,电压门控蛋白通道将开放或关闭。因此,人们预料在脂双层被刺穿之前,这些通道都会受到外加电场的影响。由于一个细胞的离子通道数目有限,这种膜电导的增加不足阻止外场诱导电势的持续上升,直至导致类脂通透屏障的击穿。因此脉冲电场的原初效应是产生一个使细胞膜难以承受的跨膜电压。大多数电穿孔实验是在样品温度变化很小的范围(小于 10 $^{\circ}$ C)内进行的,即除去电穿孔周围,温度效应相对地较小,不是穿孔的主要因素。观察电穿孔引起的细胞性质的特别变化应注意这一点。

表 0-1 电场对化学反应的一些效应

	对所有系统的共同效应	对悬浮细胞的特定效应
电场效应	电泳现象 分子的定向 维恩效应或离子对解离 电构象变化 $\Delta K/K = \Delta M \cdot \Delta E/RT$	电场诱导跨膜电位 对球形细胞,细胞膜内 $1.5R_{cell}/d$ 的放大 共性效应 大的跨膜电流 膜的电致压缩 膜的机械变形
恒定交流电场	电介质电泳 能量和信号传导中强迫构象振动	电渗 细胞膜中放大共同效应 膜的机械变形
电流的热效应 $\Delta T = i^2 r \Delta t / (4 \cdot 18 C_p)$	焓效应 $\Delta K/K = (\Delta H/RT^2) \Delta T$ 溶剂的膨胀或冲击波 $\Delta p = (\alpha/k) \Delta T$	由于跨膜电流的放大共同的热渗效应 $\Delta \pi = (Q/\sigma T) \Delta T$ 综合的效应 $\Delta \pi = OR \Delta T$

符号意义:  $R_{cell}$ , 细胞的半径;  $\Delta T$ , 温度的变化;  $r$ , 溶液的电阻率;  $C_p$ , 溶液的热容率;  $c$ , 溶剂浓度;  $K$ , 平衡常数;  $\Delta M$ , 摩尔电矩的变化;  $\Delta H$ , 反应的焓变;  $\Delta p$  冲击波产生的压力;  $\alpha$ , 溶剂的热膨胀系数;  $k$ , 溶剂的压缩系数;  $Q$ , 跨细胞膜的水传导热量;  $d$ , 膜的厚度;  $i$ , 电流;  $\Delta t$ , 电场暴露时间;  $\Delta \pi$ , 渗透压变化;  $R$ , 气体常数;  $\Delta k$ , 平衡常数的变化;  $\Delta E$ , 有效电场强度;  $K$ , 开尔文温度;  $\sigma$ , 溶剂的偏摩尔体积。

有许多次级效应是电穿孔引起的原生质膜结构改变的结果。细胞的电融合及细胞的电转染是脉冲电场次级效应的主要例子。当用足够强的脉冲电场处理两个相互靠近的细胞时,细胞通过原生质膜接触区的融合而成一个大细胞。这个过程中涉及的膜融合的形态变化的细节已相当清楚了,但相关的分子仍信息不足。为了获得一个杂交细胞,除了脂双层合并,显然还需要两个细胞骨架网络系统的相互交织。但两个细胞的网络系统是如何在新的杂交细胞中相互交织成稳定的、能成活的网络系统还不清楚。与此类似,电转染也是个使人困惑的现象。

一个 DNA 质粒的分子量通常为数百万道尔顿,任何一个多水微孔,如果大到可以容纳这样大的分子时,都将引起细胞质严重泄漏,而导致细胞死亡。因此,使这样的大分子进入细胞,同时不让细胞的细胞质大分子内含物流出仍是一个富有挑战性的问题。近来,从一些实验室的研究工作可以找到部分答案,即 DNA 进入细胞大多数是由于细胞表面结合的 DNA 的电泳作用。这个过程出现非常迅速,而且除了脉冲电场过强的情况之外,任何其它膜改变的后果都是温和可逆的。 $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$  是两种非常有效的增强 DNA 表面结合力的试剂。

自细胞膜的电穿孔、电融合的方法发现以来,已经有了广泛的应用。除了重要的基因定位及杂交细胞产生外,在以下几方面的应用还有着巨大的潜力。首先,将膜蛋白电镶嵌到细胞中将有助于研究膜蛋白的重组。其次,将一细胞系和人体组织融合能够构建一动物模型。这种方法可以用于组织移植。第三,PEF 将在医疗的限定区域帮助药物加强效力,这将巨大地增强化学治疗的效果。第四,电融合在胚胎学上的应用有产生大量无性繁殖系的可能。第五,电融合和电穿孔已是临床治疗电击和烧伤的主要奋斗目标。对创伤面的处理策略就是利用电、热的损伤效应。近几年来,已经报道了一些关于用表面活性剂促进膜重新封闭的进展。最后,由脉冲电场方法分展出来的酶活性和细胞功能的电刺激方法使在这个领域里展现了一个全新的前景。这里提出的许多现象和应用将在各具体的章节中详细讨论。相应的参考书自可在这些章节里找到。然而,我们期望的是未来。在电穿孔及其相关技术方面将不断地有新发现,并且找到新的应用。然而,重要的是要记住在任一科学领域里,应用只是取得的初步效益,不是主要目标。一旦发现了更好的方法,任一项应用都将失去它原有的价值。但是关于自然现象的基础知识则是科学大厦的建筑砖块,它的价值将没有时间限制。

## 参 考 文 献

- [1] Cole, K.S. 1972. "Membrane, Ions and Impulses" (University of California Press, Berkeley).
- [2] Tien, H.T. 1974. "Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice" (Marcel Dekker, New York).
- [3] Chang, K.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A. and Sowers, A.E., Editors. 1992. "Guide to Electroporation and Electrofusion" (Academic Press, San Diego).
- [4] Neumann, E., Sowers, A.E., and Jordan, C.A. Editors. 1989. "Electroporation And Electrofusion in Cell Biology" (Plenum Press, New York).
- [5] Kinosita, K. and Tsong, T.Y. 1977. Hemolysis of Human Erythrocytes by A Transient Electric Field. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:1923 - 1927.
- [6] Kinosita, K. and Tsong, T.Y. 1977. Formation And Resealing of Pores of Controlled Sizes in Human Erythrocyte Membranes. Nature (London), 268:438 - 441.
- [7] Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of Cell Membranes. Biophys. J., 60:297 - 306

(乔珊珊译,汪和睦校)

# 目 录

## 第一篇 细胞电穿孔、电融合和电刺激 的基本原理及发展

- 1 细胞膜电穿孔及其在生物学和生物技术中的应用 ..... E. Neumann L. Chang(3)
- 2 细胞电穿孔和电融合的原理和基本过程 ..... 许锡云(S. W. Hui)(20)
- 3 低频电磁场下的电刺激细胞生物学 ..... H. Berg L. Chang(30)
- 4 细胞电穿孔、电融合、电刺激的机理与应用 ..... 汪和睦(45)
- 5 细胞电穿孔与电融合技术的发展、机制与模型 ..... 谢廷栋(52)

## 第二篇 细胞电穿孔与电融合技术的实验研究

- 6 用快速冰冻电子显微镜技术研究细胞电穿孔的结构和动力学特征  
..... 张东才(D. C. Chang)(85)
- 7 单细胞漂浮电介质电泳频谱研究 ..... 汪和睦(95)
- 8 细胞电融合过程中的细胞骨架 ..... 蔡国平 吴逸 赵南明(116)
- 9 特异选择桥联媒接细胞电融合 ..... 谢廷栋 郑天佑 M. Tomita(123)
- 10 运用振荡电场进行细胞穿孔与细胞融合 ..... 张东才(D. C. Chang)(133)
- 11 交流电场和旋转电场中的细胞电穿孔 ..... P. Marzalek J. Gimsa 郑天佑(147)
- 12 细胞电融合及电穿孔的物理学与实用电子学 ..... G. A. Hofmann(162)

## 第三篇 细胞电穿孔和电融合技术的应用

- 13 细胞电穿孔技术应用概论 ..... 谢廷栋(183)
- 14 细胞杂交新技术——电融合 ..... 汪和睦(205)
- 15 植物细胞的电击基因转移 ..... 蔡国平 赵南明(236)
- 16 植物和食用菌原生质体的电融合 ..... 夏镇奥 王辅德 倪迪安(252)
- 17 大肠杆菌电穿孔诱导基因转移 ..... 谢廷栋 郑天佑(260)
- 18 细胞电穿孔实验设计 ..... 谢廷栋(275)
- 19 细胞电穿孔技术在微生物中的应用 ..... 王岳五(287)
- 附录 1 常用试剂制备 ..... 谢廷栋(298)
- 附录 2 英汉名词对照 ..... 谢廷栋(304)



# 1

## 细胞膜电穿孔及其在生物学和生物技术中的应用

E. Neumann\* , L. Zhang<sup>+</sup> (张蕾)

\* Faculty of chemistry, University of Bielefeld, P. O. Box 100131, D - 4800 Bielefeld 1, Germany. + Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Molecular Biotechnology, Beutenbergstr. 11, D - 6900 Jena, Germany, On leave from the Dept. Of Physics, Univ. of Nankai, 300071 Tianjin, P. R. china.

生物细胞和细胞组织的电操作在生物物理和细胞生物学,尤其是在分子遗传学、生物技术和医学等方面,已成为广泛使用的方法<sup>[1-3]</sup>。在不同的电穿孔方法中施加的电场强度  $E$  和脉冲时程  $\Delta t$  应根据细胞大小、细胞种类和悬浮液条件来选择;选择电场参数还应考虑细胞壁或胞外基质结构和内膜微丝系统的存在。电场参数的范围为  $E = 0.2 \sim 30 \text{ kV/cm}$ ,  $\Delta t = 0.01 \sim 30 \text{ ms}$ 。

当选定的脉冲参量、溶液离子强度和温度等合适时,电穿孔作用将引起细胞膜两极区瞬时可逆的透过性变化(非损伤)<sup>[4-7]</sup>。这种电透过化可以用于细胞组分的人为释放,以及外源物质的摄取<sup>[8,9]</sup>;电穿孔作用的另一重要结果是相互接触的细胞融合提供了条件,电穿孔已被证实是细胞和细胞器电融合很好的方法<sup>[9-14]</sup>;电穿孔技术的一种更近的应用是将外源糖蛋白电嵌入血细胞膜中<sup>[15]</sup>。

就分子生物学、遗传工程和基因治疗而言,人们的普遍兴趣是 DNA 经电穿孔直接转移<sup>[16]</sup>,或将其它的核酸、蛋白引入受体细胞、微生物和组织中<sup>[17]</sup>。电穿孔基因转移的主要优点在于完整的、未经化学处理的细胞物质可被高效地转化<sup>[18-20]</sup>。完整的细菌、酵母和植物细胞的稳定电转化具有极大的生物技术潜力<sup>[1,3,21]</sup>。

尽管电穿孔作用已有大量应用,但各种电穿孔操作中的分子机制尚未很好地揭示出来。因此,数据分析和优化策略一般地仍是经验的。定量的模型计算仅限于某些方面,如电性质<sup>[1-3]</sup>。毫无疑问,电穿孔方法在细胞生物学、生物技术和医学中有目的应用的进一步发展,将非常有益于对膜电穿孔分子机制的深入了解。

在第一篇报道电穿孔基因转移导致细胞转化的文献中,已经给出了基因传递的一般性实践指南<sup>[16,22]</sup>。对许多特殊情况下的详细技术要求也已有文献可查<sup>[23]</sup>。

在本章中有关电穿孔实现基因转化的讨论,重点突出了细胞和膜,特别是作为多聚电解质



结构的 DNA 等电场效应的物理化学原理。根据对脉冲强度-时程曲线,细胞电敏感性,以及作为细胞、DNA 浓度函数的转化率等所做出的检测和分析,将有助于更深入地了解电穿孔的物理化学原理。对细胞电转化原始工作的初步总结,已经提出了不同目标最优化策略的各种概念和建议。文献[24]给出了细胞电场效应的关键性观察及发展过程的历史回顾。

## 1.1 电穿孔的滞后作用和化学反应

膜电穿孔是生物物理化学的一个新领域。为此,需要按照物理概念对观察结果进行分类,建立明确的物理化学术语。到目前为止,所有的电穿孔实验数据表明,可逆的原初过程与不可逆的次级过程是可以区分的,详见表 1-1。

表 1-1 膜电穿孔的基本过程

物理化学过程	电学术语
<b>I. 可逆的初级过程</b>	
<b>初级电活动</b>	
电偶极子的诱导和取向	电介质极化
膜-溶液界面相的离子重新分布,包括:	离子界面极化 (Maxwell - Nagner 效应, $\beta$ 色散)
a) 离子氛迁移	
b) 效应剂 ( $H^+$ 或 $Ca^{2+}$ 离子) 局部活性变化	
<b>结构重排</b>	
蛋白和类脂分子构象变化	电穿孔作用
类脂区相转变导致孔洞,火山口(经过孔洞结合)和渗透	电孔洞,电火山口,电渗透
<b>退火和重新封蔽过程(孔洞关闭)</b>	
构象变化周期中能量转移	电构象耦联
代谢的非平衡分布	电泵
<b>II. 不可逆的物质交换</b>	
<b>瞬态物质交换</b>	
细胞组分的释放,即溶血或 pDNA	电致透过化
胞外物质即药物、蛋白(抗体)的摄取	电释放,电治疗
基因物质即 DNA, mRNA, 类病毒……的转移	电结合
用于稳定的细胞转化(外源基因插入宿主基因组)	电转染
细胞生长和增殖	电转化 电穿孔基因转移
<b>膜重组</b>	
细胞融合(若细胞膜相互接触)	电刺激
小泡形成(发芽)	电融合
电致机械破裂	电致小泡,电致发芽
蛋白质插入膜中	介电击穿
三级效应	电插入
由于耗能过程导致温度增高	焦耳热,介电损失
金属电极释放金属离子	电注入
电解质表面产生氢气、氧气	电解

注:由文献[24,25]中表格修改而成。

### 1.1.1 电穿孔的滞后作用

瞬间的膜电穿孔过程可被视为膜电化学活动的一个周期。在外电场存在的条件下,最初形成孔结构是经路线  $O \rightarrow A$ ; 随后,当脉冲结束时 ( $E = 0$ ),孔开始恢复,经路线  $B \rightarrow O$  (如图 1-1 所示)。因此,状态周期  $O \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow O$  表明了恢复滞后作用<sup>[23,25]</sup>。由电镜<sup>[26]</sup>观测到的火山口结构<sup>[24]</sup>即属于电场后效应,它也包含了渗透过程。

通常用穿孔度  $\xi_p$  来描述与电穿孔滞后作用相关的结构变化。自由焓的贡献  $\tilde{G}(r, E)$ , 即电界面极化做的可逆功所产生的结构变化可用平均孔径  $r$  和外电场强度  $E$  来表示。图 1-1 即  $\tilde{G}(r, E)$  与滞后作用相关的  $\xi_p(E)$  的变化周期示意图。

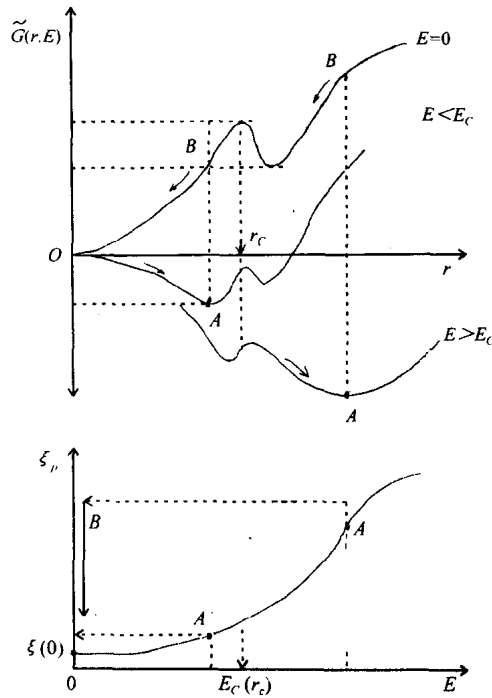


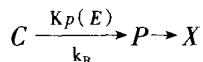
图 1-1 电穿孔滞后作用的热力学

上一幅图表示了电功和表面功相关的自由焓  $\tilde{G}(r, E)$  与孔洞半径  $r$  的函数关系; 下一幅图表示作为电场强度  $E$  函数的穿孔度  $\xi_p$  在孔洞形成一再封闭周期中变化。在 Chizmadzhev 等人的模型中(1979 年), 临界孔径  $r_c$  时产生的膜结构变化包含了由疏水孔到亲水孔的转变;  $r_c$  与达到临界  $E_c$  时的临界  $\xi_{p,c}$  相对应, 仅在将糖蛋白电嵌入细胞器的条件下, 需用低电场强度, 以增加疏水孔, 这时有  $E \leq E_c$ 。而大多数情况下, 状态顺序变化  $O \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow O$ , 经历了超临界 ( $E \geq E_c$ ) 的电穿孔一再封闭周期, 已经得到证明。

Chizmadzhev 等人提出的电穿孔模型<sup>[27,28]</sup>, 假设在孔结构形成期间, 达到临界孔径  $r_c$ , 则膜结构将发生由疏水孔(HO)到亲水孔(HI)的瞬间变化<sup>[29~31]</sup>。由图 1-1 可见  $r_c$  相应于滞后分支的临界穿孔度  $\xi_{p,c}$ 。然而, 关于脂类化合物在穿孔膜的分子重排细节尚不清楚。

### 1.1.2 电穿孔的化学过程示意图

不同的电穿孔现象可由一个通常的化学反应式来描述<sup>[32,33]</sup>。



在反应式(1)中,  $C$  表示无外电场时的膜初始状态,  $P$  表示一组不同寿命的、可渗透并可融合状态的集合;  $K_P(E)$  和  $K_R$  分别表示总的电穿孔速率常数和恢复常数。如果电穿孔滞后作用与其它过程相耦联例如物质释放与摄取, 细胞溶解, 膜融合或蛋白嵌入, 则状态  $X$  将得到明确的说明。

通透—恢复周期的滞后特性可分别调节  $C \rightarrow P$ ,  $P \rightarrow C$  和  $P \rightarrow X$  的各个重排过程, 其中  $P \rightarrow X$  是一单方向(不可逆)的过程。通常逆反应  $P \rightarrow C$  和某些  $P \rightarrow X$  过程在  $E = 0$  时发生; 因此, 它们表示脉冲后效应。已经证明,  $DNA$  穿过电穿孔膜的运输过程也包含了纯粹扩散性质的脉冲后时相<sup>[16,24]</sup>。

## 1.2 电穿孔的热力学处理

在电穿孔一再封闭周期内, 对电场引起的膜结构重排的力能学, 可用不依赖于任何特殊机制的热力学方法来处理。

由完整脂双层到孔结构形成的转换过程中, 特征反应自由焓  $\Delta_r G(E)$  可由下式给出

$$\Delta_r G(E) = \Delta_r G - \int_0^E \Delta_r M dE_m \quad (2)$$

其中,  $E_m$  由式(3)和(4)给出,  $\Delta_r G$  表示无外场  $E$  时的反应自由焓<sup>[34,35]</sup>。

$$E_m \simeq -V_m/d \quad (3)$$

$$V_m \simeq -\Delta\phi_m \frac{\cos\delta}{\cos\delta} - \frac{3}{2} f(\lambda) E a |\cos\delta| \quad (4)$$

显然地, 在  $E = 0$  时, 孔形成在能量上是不利的; 因此,  $\Delta_r G > 0$ 。

反应过程中偶极矩改变  $\Delta_r M$  表示孔中注入水的偶极矩与相同大小脂双层的偶极矩  $M_m$  之间的差值。

应用连续电介质模型, 偶极矩(真空条件下)可表示为

$$M = \epsilon_0 (\epsilon - 1) v E_m \quad (5)$$

其中  $\epsilon_0$  是真空介电系数,  $\epsilon$  是溶液的相对介电系数,  $v$  是被穿孔的膜体积。

接近孔洞边缘处的水的极化( $\epsilon_w \approx 80$ )与等体积脂双层的极化( $\epsilon_m \approx 2$ )相比, 在能量上更有利(其系数约为 40)。由于  $\Delta_r M_i = N_A (M_w - M_m)$ , 其中  $N_A$  为阿佛加德罗常数, 我们容易得出

$$\Delta_r M = N_A \epsilon_0 (\epsilon_w - \epsilon_m) v(\delta) E_m \quad (6)$$

假如  $d \ll a$ , 则电穿孔的膜体积为  $v(\delta) \approx 4\pi a^2 d (1 - |\cos\delta|)$ , 式中受超临界电场影响的球形膜壳部分的系数  $(1 - |\cos\delta|) = 1 - Ec/E$  (见图 1-2)。

由方程(6)可见, 由于  $\epsilon_w > \epsilon_m$ , 可得  $\Delta_r M > 0$ , 由于  $\int \Delta_r M dE_m > \Delta_r G$ , 显然与单方向电穿孔过程相关的  $\Delta_r G(E) < 0$  [见方程式(2)]。同理, 单方向孔洞重新封闭过程的驱动力可由下式给出:  $\Delta_r G_{res} = -|\Delta_r G(E)|$ 。

从亚稳态开始的单方向转变过程中, 一般地可以给出结构重排度  $\xi$  的速率方程

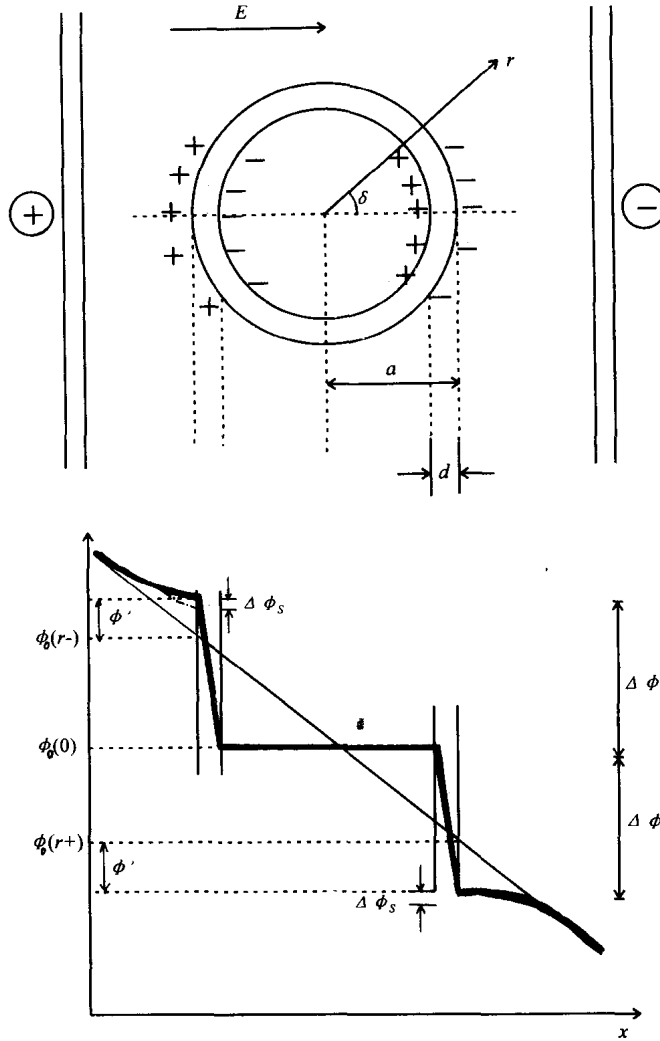
$$d\xi_i/dt = k_{ij} \cdot \xi_j - k_{ji} (1 - \xi_i) \quad (7)$$

由于不可逆性, 反向过程可以忽略, 上式简化为

$$d\xi_i/dt = k_{ig} \cdot \xi_i \quad (8)$$

速率常数  $k_{ig}$  为全部元反应步  $j$  对模式  $i$  的贡献的速率常数  $k_j$  的组合。同理, 弛豫时间  $\tau_j$  为  $k_{ij}$

和  $k'_{ij}$  的组合。



$$\Delta \phi_m = - \left[ \frac{3}{2} f(\lambda) E_a + \frac{\Delta \phi_M - \Delta \phi_s}{\cos \delta} \right] |\cos \delta|$$

图 1-2 处于恒定外电场  $\vec{E}$  中, 外半径为  $a$ , 非导电壳层厚为  $d$  的球形细胞的界面极化

公式给定了矢径  $\vec{r}$  与  $\vec{\epsilon}$  夹角处的稳定膜电势, 细胞导电内部的恒定参考电势  $\varphi = 0$ 。  $\Delta \varphi$  是固定离子和吸附离子不存在时界面诱导的跨膜电势差; 为吸附离子贡献的表面电势  $\Delta \varphi$ 。图中折线表示有固定表面负电荷存在时的电势变化(见正文)

速率常数  $k_j$  对电场的依赖性可描述为

$$K_j(E) = k_j(0) \cdot e^{\int \Delta r M_j^* dE / RT} \quad (9)$$

式中  $\Delta r M_j^*$  为活化状态的转移偶极矩,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度,  $k_j(0)$  为  $E = 0$  时的值。

上述推导为按照弛豫滞后作用机制, 对电穿孔和电融合过程作热力学和动力学的分析, 它提供了一般性理论框架的清楚表示。

# 1.3 电场作用下的膜脂重排

## 1.3.1 火山口模型

膜与溶液界面的离子—电介质极化和膜的结构重排基本上是可逆过程。物质交换与融合过程是被动的、单方向地出现的不可逆性弛豫现象,实验数据表明,电场对膜结构的直接影响是次要的,界面极化导致的强跨膜电场(放大的)实际上诱导了主要的结构重排。

无疑瞬时通透性增加表明了膜的瞬时开放的孔洞和火山口,它们在脉冲结束后重新封闭起来。当用电穿孔程度来描述通透性增、减周期,则孔洞形成一再封闭的周期表示出细胞膜结构的周期性局部变化。另外,孔边缘的局部变形可导致火山口——孔结构的形成。

## 1.3.2 亚稳状态与单方向转变

阈值电场强度  $E_c$  对脉冲时程的明显依赖性,表明膜具有特殊的临界阈值  $\xi_c$ , 达此值时,电穿孔过程被触发。随后的过程是单向性的,也就是在  $E > E_c$  时,过程不可逆地持续下去。因此,在电穿孔过程启动之前,膜状态应是亚稳态的。电穿孔前 ( $\xi_0 < \xi < \xi_c$ ), 小的结构重排明显是可逆地出现在亚稳态水平上。

在短脉冲时程 ( $\Delta t < \Delta t_r$ ) 下,如未达到破裂阈值  $\xi_r$ , 由于具有较少的孔结构,已穿孔或融合膜仍处于亚稳态。在  $0 < E < E_c$  下,孔洞的重新封闭过程也是单方向的,也就是不可逆地持续下去,直到完整的双层结构重新恢复。

在这一意义上,膜电穿孔显示了一个结构重排周期(见图 1-3),其中,退火过程的中间状态大概不同于外电场存在下的电穿孔过程的中间状态。

周期出现的可逆亚稳态和不可逆单方向转变称为滞后作用<sup>[39]</sup>。故此,电穿孔一再封闭周期可以根据弛豫滞后作用来分析和解释。

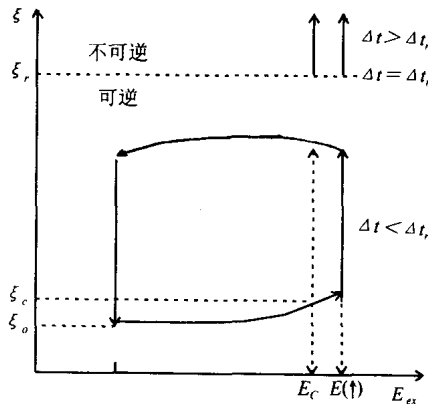


图 1-3 膜电穿孔的弛豫滞后作用

结构重排程度  $\xi$  (在  $E > E_c$  和  $\Delta t(E) < \Delta t_r$ ) 作为外电场 ( $E_{ex}$  函数的周期性变化,此周期包含可逆与不可逆部分。 $\xi$  在  $\xi_c$  与  $\xi_0$  ( $E < E_c$ ) 间的亚临界变化是可逆的;在超临界电场强度  $E(\uparrow)$  ( $E_c$ ) 时,与电穿孔过程相关结构重排是单向性的,即不可逆的,如果脉冲时程比断裂阈值 ( $\Delta t_r$ ) 长,则膜破裂;当电脉冲在  $\Delta t < \Delta t_r$  时消失,则又回到可逆电穿孔区域。在  $E = 0$  时从曲线上支区域缓慢回到  $\xi = \xi_0$  的过程是单向性的,再封闭或退火过程是不可逆的,使膜弛豫至初始态  $\xi_0$

## 1.4 细胞群体的电敏感性

细胞、细菌和其它微生物的电转化宜在合适的低电导率溶液中进行。细胞膜表面的电场效应受到离子界面极化的调节,因此需要适宜的盐溶液浓度。在低离子强度下,焦耳热和其它三级效应(见表 1-1)较小,但焦耳热能促进基因转化<sup>[20]</sup>。对低电导溶液下电穿孔数据的解释需要根据溶液电导率来扩展分析的框架<sup>[24,32,33]</sup>。

### 1.4.1 透过性与恢复

在正式进行电转化实验之前,应在无外源 DNA 条件下,对细胞的电敏感性进行试验,并测定细胞存活或恢复曲线<sup>[39]</sup>。其中包括已恢复的(存活的)细胞数  $R$  占总细胞数  $C_T$  的分数  $f(R) = R/C_T$ ,或表示为百分率  $R(\%) = 10^2 f(R)$ ;在给定脉冲时程  $\Delta t(E)$  下,测定  $R(\%)$  作为电场强度的函数曲线,或在给定电场强度下,测定  $R(\%)$  作为  $\Delta t(E)$  的函数曲线。

实验前确定  $f(R)$  的另一个变量是脉冲个数。在一列脉冲中单个脉冲通常是不等效的,因为脉冲诱导的膜斑结构变化的寿命为数秒到数分的时间,而短的脉冲时程只有 0.02 ~ 30 毫秒。第二个脉冲抵达时,膜斑仍未重新封闭,同时,旋转扩散将使细胞或杆菌相对电场矢量的位置发生改变。对一系列脉冲引起的电穿孔效应的分析是相当困难的。

在任何情况下, $f(R)$  与电场的关系都将依赖于电穿孔溶液的组成和温度,这也是在实验之前需要搞清楚的。

有些电穿孔的细胞可以用染色来测量,例如绿色藻类细胞(*Ch. reinh*),在加脉冲时和脉冲结束后不同时间,根据细胞染色情况可以确定有透过性的细胞数目  $P_0$ 。这是一种特别有效的寻找电穿孔或其它电操作的最佳条件的方法<sup>[31,32]</sup>。

脉冲后的染色程序不仅可确定  $P_0$ ,而且也可确定死的透过化细胞数  $P_\infty$ 。当给定  $t_p(E)$  时, $P_0$  和  $P_\infty$  都是电场  $E$  的函数;给定  $E$  时,则都是  $t_p(E)$  的函数。当脉冲数目、脉冲时程、离子强度和温度等电穿孔条件改变后,电场范围  $\Delta E_0$  将平移。显然对每一特定细胞,都必须研究其相应的  $\Delta E_0$  和  $\Delta G$ 。原来用作估计电穿孔细胞成活状态的定性染色方法,如今已定量地用来获取高效率的、有理论指导性的细胞电操作最佳条件的有用信息。

生物细胞在细胞大小、生长状态和代谢条件等方面通常是非均匀的。非球形细胞,如杆状细菌,在溶液中最初相对于外电场方向具有不同的位置。由于细胞壁表面的负电性,离子氛极化(产生一强偶极矩)将使杆的长轴旋转至外电场的方向<sup>[40]</sup>。旋转的杆状细菌和多聚电解质 DNA 将以不同速率沿着电力线方向作电泳迁移。所有这些因素导致一临界场强度  $E_c$  的分布,在  $E_c$  作用下可使细胞开始摄取特殊染料或 DNA 分子,当细胞紧密接触时也可产生细胞融合。对于与膜电穿孔相关的不同的细胞操作, $E_c$  的大小不必等同。注意  $E_c$  曾在前文图 1-1 中讨论过,它涉及一种特定的膜结构变化。

比较复杂的细胞群体可能需要一个以上的高斯参量。在任何情况下,都应避免  $\bar{E}_c$  和  $\bar{a}$  等作为平均值与实际确定的作为整个群体的最低  $E_c$  值的阈电场强度的混淆。由于实验的分散性,通常只可能获得阈值的一个范围  $\Delta E_{th}$ ,而不可能得到一个精确的阈值  $E_{th}$ 。

### 1.4.2 强度—时程关系

前面讨论了阈电场强度,而更具有重大实际意义的是电场强度—时程关系。由于实验阈

值  $E_{th}$  的不确定性,而且由于电敏感曲线反映的分布关系,与细胞群体的最小阈值  $E_{th}$  相比,平均值  $\bar{E}_c \pm \Delta E_c$  是一个更有效的参量。

对于低电导率溶液和大细胞,其界面极化的弛豫时间  $\tau_p$  与脉冲时程  $t_p$  具有同量级,因此做理论分析时须计算有效时间  $t_{p,eff}$ 。[可见方程(26)和(27)]。目前尚不清楚是否由于在长脉冲区间 ( $t_p = \Delta t \geq 5ms$ ) 必须考虑电场力导致细胞变形<sup>[41~43]</sup>和/或渗透压效应,或者随  $t_p$  值增大,  $\bar{E}_c$  达到一饱和值,此时  $\bar{E}_c$  不再与  $t_p$  相关。

无论怎样,在给定单脉冲时程的条件下,临界场强(阈值)是一个相当有用的参数。如果在长时间内施加多个脉冲,或者使用的重复脉冲是脉冲串形式,则电穿孔所需阈值可能很低,参阅文献[44]。

## 1.5 膜极化与电导率

迄今的讨论仅涉及外加电场强度  $E$ ,但膜的电穿孔是一非直接的电场效应。电场  $E$  对膜结构的作用受界面离子极化调节;简言之,电穿孔的实验数据,都表明电场效应是下述顺序性事件的结果。

$$E \rightarrow \Delta\varphi \rightarrow \Delta\xi \quad (12)$$

外电场  $E$  引起跨膜电位变化  $\Delta\varphi$ ,而  $\Delta\varphi$  在膜相形成的  $\bar{E}_m$ ,成为引起膜结构重排  $\Delta\xi$  的平均电场力。

### 1.5.1 界面极化

在方脉冲情况下,建立起随时间而变的诱导跨膜电势可用一线性微分方程来描述,积分后可得

$$\Delta\varphi(t) = \Delta\varphi(E)[1 - \exp(-t/\tau_p)] \quad (13)$$

式中  $\Delta\varphi(E)$  是与时间无关的振幅,  $\tau_p$  为极化时间常数。

对一半径为  $a$  的球形细胞,  $\tau_p$  可由溶液电导率  $\lambda_0$ 、膜电导率  $\lambda_m$  和细胞内液电导率  $\lambda_i$  按照下式来估计<sup>[45]</sup>:

$$\tau_p = a \cdot C_m \cdot (\lambda_i + 2\lambda_0) / [2\lambda_i\lambda_0 + \lambda_m(\lambda_i + 2\lambda_0)] \quad (14)$$

式中  $C_m \approx \mu F cm^{-2}$  为膜电容率,而  $\lambda_m = a \cdot G_m$  是膜电导率,其中  $G_m$  为膜电导率。在跨膜离子流开始前,  $\lambda_m \ll \lambda_0$  的不等式通常成立。由于  $\lambda_i \approx 10^{-2} S \cdot cm^{-1}$ ,在低电导溶液 ( $\lambda_0 \leq 10^{-4} S \cdot cm^{-1}$ ) 下,有  $\lambda_0 \ll \lambda_i$ ,在这种情况下,方程(14)可简化为:

$$\tau_p = a \cdot C_m (2\lambda_0)^{-1} \quad (15)$$

它表明  $\tau_p$  与  $\lambda_0$  成反比关系。如果不存在大的维恩(Wien)效应,我们可以应用近似值  $\tau = \tau(E=0)$  和低电场值  $\lambda_0(0)$ 。在许多电穿孔实验中,有  $\tau_p \ll \tau_p(E)$ ,因此我们能够应用稳态恒定值  $\Delta\varphi(E)$ 。

### 1.5.2 跨膜电位与细胞形状、大小的关系

当半径为  $a$  的球形细胞  $a \gg d$  ( $d$  为膜厚度)时,则产生的跨膜电位变化的稳定值可表示为<sup>[24]</sup>

$$\Delta\varphi(E) = -\frac{3}{2} f(\lambda) a E \cdot |\cos\delta| \quad (16)$$

其中,  $\delta$  为所研究的膜位点与外场  $E$  方向间的夹角; 电导率因子  $f(\lambda)$  是  $\lambda_o, \lambda_i, \lambda_m$  和比率  $d/a$  的显函数, 当  $\lambda_i, \lambda_o \gg \lambda_m$  时,  $f(\lambda) = 1$ 。值得注意的是, 根据 Maxwell 定义 ( $E = -\nabla\varphi$ ) 电位降表示正离子沿外场方向的移动 (图 1-2) 方程(16)应加“-”号。

生物膜具有自然电位差 ( $\Delta\phi_m$ ) 和 ( $\Delta\phi_s$ ), 前者由于扩散的离子通透选择性引起, 后者由于膜表面固定电荷的不对称分布而引起。图 1-2 给出了在外电场存在时跨膜的总电位差  $\Delta\phi_m$ 。

在球形细胞的极斑处, 即  $\delta = 0^\circ$  和平  $180^\circ$ ,  $\cos\delta = \pm 1$ , 此时产生跨膜电位极大值。此极值由下式给出:

$$\Delta\varphi_{\text{cap}} = -\frac{3}{2}f(\lambda)E \cdot a \quad (17)$$

考虑到除球形细胞外的其它细胞形状, 我们可用椭圆体的半轴  $a_j$  来计算<sup>[46]</sup>。对于每个半轴  $a_j$ , 可写出变形的 Fricke 方程, 从而可得在每个  $a_j$  方向上的跨膜电位稳定值为

$$\Delta\varphi_j = -F_j \cdot f_j(\lambda) a_j E \cdot |\cos\delta| \quad (18)$$

其中,  $F_j$  为形状因子。对球形细胞,  $F_j = F = 1.5$ , 且  $a_j = a$  (球半径)。

对于长度为  $L$ , 半径为  $b$  的杆状细菌细胞, 我们可应用长度极限  $L \gg b$ 。当杆状细菌沿外场  $E$  方向绕其长轴旋转时 ( $a_L = L/2$ ), 则形状因子可近似为  $F_L = 1.0$ <sup>[46]</sup>。由此, 在细胞极斑区域,

$$\Delta\varphi_{\text{cap}}(L) = -\frac{1}{2}LE \quad (19)$$

*E. coli* 细菌细胞的平均杆长  $L = 3.5\mu\text{m}$ , 方脉冲时程  $t_p = 1\text{ms}$ , 平均  $\bar{E}_c = 2\text{kV/cm}^{-1}$ , 由[44]的数据可进行估算, 将此  $\bar{E}_c$  值代入方程(19), 得  $\Delta\varphi = -0.35\text{V}$  (当  $t_p = 1\text{ms}$ )。对于上述平均大小并已取向的细菌来说,  $0.35\text{V}$  已达到开始摄取 DNA 的临界跨膜电压。对于更长的脉冲时程和多个脉冲,  $|\Delta\varphi|$  和  $\bar{E}_c$  可以取更小的值。任何情况下,  $|\Delta\varphi| = 0.35\text{V}$  已处于长脉冲所预期的  $0.2 \sim 0.4\text{V}$  范围内; 对于短脉冲 ( $t_p \approx 0.01 \sim 0.1\text{ms}$ ), 则需有  $|\Delta\varphi| \approx 1\text{V}$ <sup>[47]</sup>。

### 1.5.3 膜电导率

如果不等式  $\lambda_m \ll \lambda_i, \lambda_o$  成立, 则球形细胞的  $f(\lambda)$  因子可由下式给出<sup>[24]</sup>:

$$f(\lambda) = \frac{\lambda_o \lambda_i \cdot 2d/a}{(2\lambda_o + \lambda_i)\lambda_m + (2d/a)\lambda_o \lambda_i} \quad (20)$$

对于低电导率溶液,  $\lambda_o \ll \lambda_i$ , 则方程(20)化简为

$$f(\lambda)^{-1} = 1 + [\lambda_m \cdot a/(2d)]\lambda_o^{-1} \quad (21)$$

将式(21)代入式(17)可得  $\bar{E}_c$  与  $\lambda_o^{-1}$  的表达式

$$\bar{E}_c = -\frac{2\Delta\varphi_c}{3a} \left(1 + \frac{\lambda_m a}{2d\lambda_o}\right) \quad (22)$$

由上述方式我们可简单估计如下极小值:  $(\bar{E}_c)_o = -2\bar{\Delta\varphi}_c/3a$  和  $\bar{\Delta\varphi}_c = -\frac{3}{2}(\bar{E}_c)_o a$ 。同时可计算膜电导率  $\lambda_m$ 。对于 *Ch. reinh* 细胞电穿孔实验数据来说  $\bar{E}_c (f(\lambda) = 1) = 1.7\text{kVcm}^{-1}$ ,  $(\lambda_o^{-1})_o = -1.3 \times 10^4 \text{S}^{-1}\text{cm}$ , 最可几细胞半径  $a = 3.5\mu\text{m}$ , 膜厚  $d = 10^{-6}\text{cm}$ , 代入可得

$$\bar{\Delta\phi}_c = -0.9\text{V}, \lambda_m = 4.4 \times 10^{-7} \text{Scm}^{-1}。$$

电致孔的形成受界面极化作用的调节, 电场对膜结构的影响为非直接电场效应。此外, 在



低电导率溶液条件下,我们不能忽略  $\lambda_m$ ,此时必须用方程(2)来代替  $f(\lambda) = 1$ 。

## 1.6 脉冲形状与数据比较

通常细胞电穿孔的数据是由不同脉冲形状得到的,欲作恰当比较,则需要对膜极化过程的细节有深入的了解。在细胞两极的膜界面离子积累可以用界面“极化电流” $I_p$ 和界面“极化电导” $G_p$ 来描述。在诱导跨膜电压  $\Delta\phi$ 及孔洞形成过程中,外电场所做的可逆功  $W_p$ 或自由焓变可以表示为

$$W_p = \int_0^t I_p |\Delta\phi| dt \quad (23)$$

在适用欧姆定律的范围内,  $I_p = G_p(-\Delta\phi)$ 中的  $G_p$ 是常量,可得

$$W_p = G_p \int_0^t (\Delta\phi)^2 dt \quad (24)$$

### 1.6.1 方波脉冲

如果脉冲时程  $t_p$ 和极化时间常数  $\tau_p$ 大小可以比较,则  $W_p$ 是  $\tau_p$ 和  $t_p$ 两者的函数。将方和(13)代入方程(24),并后  $t=0$ 和  $t=t_p$ 之间进行积分,得

$$W_p = G_p [\Delta\phi(E)]^2 t_{p,eff} \quad (25)$$

其中,有效脉冲时程  $t_{p,eff}$ 由下式给定

$$t_{p,eff} = t_p - \frac{\tau_p}{2} [3 + e^{-2t_p/\tau_p} + 4e^{-t_p/\tau_p}] \quad (26)$$

在通常的细胞大小和离子浓度下,满足  $\tau_p \ll t_p$ 的条件,在此极限下,  $t_{p,eff} = t_p$ ,且

$$W_p = G_p [\Delta\phi(E)]^2 \cdot t_p$$

在球形细胞的两极区域,方程(17)成立,细胞分布为  $\bar{a} \pm a$ 的群体平均极化能量  $\bar{W}_{p,c}$ 由下式给出:

$$\bar{W}_{p,c} = G_p \left[ \frac{3\bar{a}}{2} f(\lambda) \right]^2 \bar{E}_c^2 t_p \quad (27)$$

### 1.6.2 电容放电脉冲:QR脉冲和CD脉冲

对指数脉冲(CD)强度的准确分析更为复杂。电容放电脉冲的形式为

$$E(t) = E_0 e^{-t/\tau_E} \quad (28)$$

式中  $\tau_E = R'C'$ ,  $R'$ 和  $C'$ 分别为放电回路中的电阻和电容<sup>[24]</sup>,诱导的跨膜电位差为

$$\Delta\phi(t) = \Delta\phi(E_0) \cdot \frac{\tau_E}{\tau_E - \tau_p} \cdot (e^{-t/\tau_E} - e^{-t/\tau_p}) \quad (29)$$

假如  $\tau_p$ 不依赖于电场(详见[24]),则将方程(29)代入(16)式可得

$$W_p = G_p [\Delta\phi(E_0)]^2 \left( \frac{\tau_E}{\tau_E - \tau_p} \right)^2 X \quad (30)$$

式中

$$X = -\frac{\tau_E}{2} (e^{-2t/\tau_E} - 1) - \frac{\tau_p}{2} (e^{-2t/\tau_p} - 1) + \frac{2\tau_E\tau_p}{\tau_E - \tau_p} (e^{-t(\tau_E + \tau_p)/\tau_E\tau_p} - 1) \quad (31)$$