

实用生物技术丛书

细胞融合技术 与应用

罗立新 编著



化学工业出版社

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞融合技术与应用/罗立新编著. —北京: 化学工业出版社, 2003. 12

(实用生物技术丛书)

ISBN 7-5025-4986-2

I. 细… II. 罗… III. 细胞融合-生物技术 IV. Q813.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 117939 号

实用生物技术丛书
细胞融合技术与应用

罗立新 编著

责任编辑: 梁虹

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 顾淑云

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

北京市彩桥印刷厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 10½ 字数 245 千字

2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4986-2/Q·76

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《实用生物技术丛书》编委会

编委会主任：郭 勇

编委会委员：（以姓氏笔画为序）

杨汝德 华南理工大学 教授

赵树进 广州军区广州总医院 教授，博士生导师

郭 勇 华南理工大学 教授，博士生导师

梁世中 华南理工大学 教授，博士生导师

彭志英 华南理工大学 教授，博士生导师

序

生物技术 (biotechnology) 又称为生物工程, 是生物科学与工程技术相结合而形成的新学科, 是 20 世纪后半叶迅速发展起来的新技术。

回顾 20 世纪, 生物工程迅速崛起, 已在理论与应用领域取得举世瞩目的成果, 为新物种的形成和新物质的生产开辟了崭新的途径。

展望 21 世纪, 伴随着人类基因组计划取得划时代的成果、基因组学和蛋白质组学的诞生以及生物信息学的迅速发展, 生物工程可望以更快的速度腾飞, 将在世界科技与经济的发展中起支柱与骨干的作用。

生物工程主要包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。

一、基因工程

基因工程又称为重组 DNA 技术, 是通过人工操作, 在分子水平上进行基因重组、改造和转移, 以获得具有新的遗传特性的细胞, 合成人们所需物质的技术过程。1973 年, 科亨 (Cohen) 和波伊尔 (Boyer) 发明了克隆技术, 成功地将外源基因转入大肠杆菌细胞并得以表达, 宣告了基因工程的诞生。其后各种基因工程药物层出不穷, 转基因动物和转基因植物不断涌现, 取得了激荡人心的丰硕成果。

21 世纪基因工程的发展前沿是基因组和功能基因组的研究和开发。1990 年启动的“人类基因组计划”已经于 2003 年 4 月完成, 已经全部阐明了人类染色体 DNA 的约 30 亿对碱基的排列顺序, 接着将继续进行功能基因组的研究, 以阐明其中的 3 万多个基因的序列、位置及其功能。到时人们对疾病的诊断和治疗将在基因水平上进行, 这对提高人体素质、保障人体健康有着划时代的意义。同时还将逐步开展对其他物种的基因组研究, 这将使人们对物种的改良和对所需物质的生产提高到一个前所未有的高度。

二、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术过程。1975 年, 科勒 (Kohler) 和米尔斯坦 (Milstein) 首创杂交瘤技术, 开创了细胞工程的新纪元。细胞融合技术、植物组织培养技术、植物细胞培养技术、动物体细胞克隆技术、杂交瘤细胞培养技术、干细胞培养技术等都在世界范围内发出夺目的光彩。

21 世纪细胞工程发展的重点是动、植物细胞培养技术。动物细胞和植物细胞都可以如同微生物细胞那样, 在人工控制条件的生物反应器中培养, 以获得各种所需的产物。

动物细胞培养主要用于生产激素、疫苗、单克隆抗体、酶、多肽等功能性蛋白质以及皮肤、血管、心脏、大脑、肝、肾、胃、肠等组织器官。在医药工业和医学工程的发展中占有重要的地位。

植物细胞培养主要用于色素、香精、药物、酶等次级代谢物的生产。具有缩短周期、提高产率等显著特点, 不占用耕地, 并且可以不受地理环境和气候条件等的影响, 对于农业产品的工业化生产具有深远的意义。

三、酶工程

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。即是通过人工操作, 获得人们所需的酶, 并通过各

种方法使酶发挥其催化功能的技术过程。1969年,固定化氨基酰化酶首次在工业上成功地用于氨基酸的拆分,有力地推动了酶工程的发展。其后,酶分子修饰技术,酶、细胞、原生质体固定化技术,有机介质中酶的催化技术等的发展,为酶的生产和应用开辟了崭新的途径。

21世纪酶工程的发展焦点是新酶的研究与开发应用。随着生物工程的发展,被研究和开发的新酶将越来越多,其中最令人瞩目的有核酸类酶(ribozyme)、抗体酶(abzyme)和端粒酶(telomerase)等。此外,酶的优化生产和高效应用也将进一步发展到前所未有的水平。

四、发酵工程

发酵工程又称为微生物工程,是在人工控制的条件下,通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。1944年,青霉素液体深层发酵的成功,标志着现代发酵工程时代的到来。随后各种抗生素、氨基酸、核苷酸、维生素等的发酵生产蓬勃发展,使发酵工程进入了全盛时期。

21世纪发酵工程的发展策略是利用DNA重组技术获得更加符合人们需要的优良的微生物细胞,并进行全面的代谢调节控制。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要,21世纪用于发酵工程的微生物大多数都是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵,需要进行一系列的代谢调节控制,才能获得理想的发酵效果。故此,21世纪的发酵工程将根据代谢工程的理论对优良的工程菌进行全面的代谢调控,以获得人们需要的各种代谢产物。

由此可见,生物工程不仅对于物种的改良和进化具有极其重大的意义,而且在医药、食品、工业、农业、环保、能源等方面有重要的应用价值,将对人类的健康、长寿和世界科技、经济、社会的发展产生深远的影响。

为了加速我国生物工程的发展,使生物技术的研究成果尽快产业化,加速生物技术在各个领域的应用,特组织有关专家学者编写《实用生物技术丛书》。

本丛书的编写宗旨是以实用生物技术为特色,以生物技术在医药、食品、轻工、化工、环保、能源等领域的应用为主线,理论与实际紧密结合,推动生物技术的发展 and 产业化的进程。为此,本丛书不是面面俱到地介绍各种生物技术的基本理论和基本知识,而是有重点地选择介绍一些实用性强、前景看好,与产业化关系密切的生物技术的原理、方法及其应用的最新研究进展与发展趋势。本丛书由下列各分册组成:

- 《基因克隆技术在制药中的应用》
- 《细胞融合技术与应用》
- 《植物细胞培养技术与应用》
- 《动物细胞培养技术与应用》
- 《酶的生产与应用》
- 《固态发酵技术与应用》
- 《非热杀菌技术与应用》

各分册均由有实践经验的在职专家撰写,在简明介绍基本理论和基本知识的基础上,重点阐述技术的原理和方法及其应用的最新研究进展和发展趋势。期望本丛书的出版对我国生物技术研究、开发和产业化能够起到积极的推动作用。

郭 勇

2003年5月于广州

前 言

20 世纪, 生物学领域已在理论与应用领域取得举世瞩目的成就。伴随细胞生物学和分子生物学突飞猛进的发展, 20 世纪 70 年代末至 80 年代初出现了细胞工程这一新兴学科。作为细胞工程的核心基础技术之一的细胞融合技术已在农牧业、轻工、医药、环境保护等领域取得了许多具有开创性的研究成果, 如通过细胞融合技术形成的单克隆抗体已广泛用于临床治疗, 并显示出独特的疗效, 在人类的医疗保健中发挥越来越重要的作用。细胞融合技术在细胞遗传学、细胞核质关系、单克隆抗体及远缘杂交育种等方面的研究具有重要意义, 随着细胞融合技术研究的不断深入, 细胞融合技术的发展前景及其产生的影响将会日益地显示出来。

细胞融合技术避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作, 在技术和仪器设备上的要求不像基因工程那样复杂, 投资少, 有利于广泛开展研究和推广, 有着重大的实践意义, 正得到科学界的日益重视。

本书题材主要取自最新期刊文献, 其中微生物细胞拆合技术及脂质体介导基因转染技术等内容, 主要是参考编著者所在实验室的科研实践和成果。在内容编排上, 既考虑到系统性, 又尽量避免与本丛书介绍的其他相关技术重复。例如动、植物的细胞培养技术, 染色体工程技术, 胚胎工程技术, 转基因技术等因已在本丛书的其他分册中介绍, 故未列入本书。

本书以细胞融合技术的基本原理、操作程序、关键技术及应用为主线, 系统地介绍了该领域的研究历史和最新发展动态。可供生物工程领域的专业技术人员使用, 也可供大专院校相关专业师生参考。

本书的出版得到了华南理工大学生物工程系郭勇教授、杨汝德教授、林炜铁副教授、潘力副教授等的大力支持, 杨汝德教授百忙中审稿并提出宝贵意见, 对此诚致谢意。本书在编写过程中, 引用和参考了国内外众多专家学者的最新研究成果, 在此向所有作者表示衷心感谢。由于受篇幅所限, 在参考文献中没有一一列出所引注文章的作者, 在此向有关作者深表歉意。

本书在编写过程中, 得到了陶顺在插图制作和文字打印等方面的帮助, 在此一并致谢。

限于编者的学识和水平, 书中难免有不妥或错误之处, 敬请读者不吝指正。

编 者

2003 年 8 月

内 容 提 要

作为细胞工程的核心基础技术之一的细胞融合技术，在细胞遗传学、细胞核质关系、单克隆抗体及远缘杂交育种等方面的研究具有重要意义。随着细胞融合技术研究的不断深入，它的发展前景及其产生的影响将会日益地显示出来。

本书以细胞融合技术的基本原理、操作程序、关键技术及应用为主线，系统地介绍了该领域的研究历史和最新发展动态。在内容编排上，既考虑到系统性，又尽量避免与本丛书介绍的其他相关技术重复。

本书可供生物工程、医学领域的专业技术人员使用，也可供大专院校相关专业师生参考。

目 录

第一章 绪论	1
第一节 细胞融合技术的发展历史	1
第二节 细胞融合技术的目的和意义	4
一、细胞融合的概念	4
二、细胞融合的目的和意义	4
第三节 细胞融合技术的进展与展望	5
一、植物细胞遗传学和育种学的最新进展	5
二、人源化抗体的研制和生产	6
三、空间细胞电融合技术的发展	10
四、离子束细胞融合技术的应用	11
五、非对称细胞融合技术的应用	12
主要参考文献	12
第二章 细胞融合技术原理与方法	15
第一节 促进细胞融合的方法	15
一、病毒促进细胞融合	15
二、用化学融合剂促进细胞融合	15
三、电处理融合法	16
四、电融合技术的改进	18
第二节 细胞融合的影响因素	19
一、动物细胞融合	19
二、植物或微生物细胞融合	20
第三节 融合子的检出与鉴定	20
一、检出融合子的选择系统	20
二、融合子的鉴定方法	22
主要参考文献	24
第三章 动物细胞融合技术	25
第一节 动物细胞融合技术的应用	25
一、用于基因定位和绘制人类基因图谱	25
二、用于肿瘤免疫的研究	25
三、用于生产单克隆抗体	26
四、用于体细胞核移植培育新品种	26
第二节 杂交瘤技术	27
一、抗原和抗体	27
二、B淋巴细胞杂交瘤技术的原理和操作步骤	30
三、T淋巴细胞杂交瘤技术	36

四、人源化单克隆抗体技术及应用	37
五、杂交瘤技术的应用实例	39
主要参考文献	42
第四章 植物细胞融合技术	45
第一节 植物原生质体培养	45
一、原生质体的制备	45
二、原生质体鉴定与活力测定	48
三、原生质体培养及其技术关键	49
第二节 植物细胞融合	52
一、植物细胞融合的概念和意义	52
二、诱导细胞融合的方法及融合剂	53
三、植物细胞融合的程序	55
四、融合子的检出与鉴定	55
第三节 植物原生质体非对称融合技术	56
一、植物原生质体非对称融合的概念和意义	56
二、非对称杂种的获得	57
三、影响非对称融合的因素	57
四、非对称融合的具体应用及存在问题	59
五、应用实例——原生质体非对称融合获得胡萝卜种内胞质杂种	60
第四节 原生质体融合研究的扩展	64
一、原生质体摄取蓝细菌、绿藻、真菌或细菌	64
二、原生质体摄取各种细胞器	64
三、原生质体摄取病毒和 DNA 等大分子	64
第五节 植物细胞融合技术的应用实例	65
一、应用实例 1——黄瓜和南瓜原生质体融合研究	65
二、应用实例 2——普通小麦与玉米的体细胞杂交再生完整植株	67
主要参考文献	68
第五章 微生物细胞融合技术	70
第一节 微生物细胞融合技术在育种上的应用	70
第二节 原生质体的制备与再生	71
一、原生质体的制备工艺与再生条件	71
二、原生质体融合与融合子的鉴定方法	75
三、分离与杂种性质测定	78
第三节 灭活原生质体融合技术	79
一、灭活原生质体融合技术的原理	79
二、灭活原生质体融合技术的应用	79
三、应用实例——内孢霉酵母与酿酒酵母属间原生质体融合	80
第四节 微生物细胞融合技术的应用实例	84
一、酵母的原生质体融合	84
二、霉菌的原生质体融合	85

三、细菌的原生质体融合	86
四、放线菌的原生质体融合	88
五、微生物原生质体的其他应用	88
主要参考文献	89
第六章 细胞拆合技术	91
第一节 细胞拆合技术与细胞重组	91
一、细胞拆合技术的发展概况	91
二、细胞拆合与重组的概念和意义	91
第二节 细胞拆合的方法	92
一、物理拆合法	92
二、化学拆合法	93
第三节 各种重组细胞的制备	94
一、去核细胞(胞质体)的制备	94
二、核体的制备	95
三、微核体的制备	96
四、植物细胞核和无核原生质体的制备	96
五、去核细胞的性质	96
第四节 细胞的重组及其技术关键	97
一、动物的细胞重组及细胞质杂交	97
二、植物的细胞重组	98
三、向动物细胞内引入微核体	98
四、植物微核技术的原理与应用	98
五、微生物的细胞核与原生质体融合	100
六、细胞器与完整细胞的融合	100
七、生物大分子引入完整细胞	102
第五节 细胞拆合技术的应用实例——酵母细胞原生质体拆合技术的研究	103
一、研究背景和实验方案的设计	103
二、实验材料与方法	105
三、实验结果与讨论	107
主要参考文献	121
第七章 向细胞内引入大分子物质	122
第一节 红细胞血影法	122
一、红细胞血影在医药行业的应用	122
二、制备工艺	125
三、载体红细胞的形态与功能	126
四、红细胞血影和培养细胞融合	127
第二节 磷酸钙沉淀法	128
一、制备工艺	128
二、磷酸钙沉淀法的改进	130

第三节 脂质体法.....	130
一、基本原理.....	130
二、制备工艺.....	131
三、应用实例.....	134
主要参考文献.....	151

第一章 绪 论

第一节 细胞融合技术的发展历史

细胞融合技术起源于 20 世纪 50 年代末,并在以后的几十年间得到了迅猛发展,而且应用领域不断扩大。细胞融合技术不仅为核质关系、基因调控、遗传互补、细胞免疫、肿瘤发生、基因定位、衰老控制等理论领域的研究提供了有力的手段,而且被广泛应用于免疫、遗传学、发生生物学,特别是在单克隆抗体及动植物远缘杂交育种等方面具有十分重要的意义。细胞融合技术的发展历史可以追溯到 19 世纪,人们很早就发现在生物界中有“自发”的细胞融合现象。Muller (1838 年)是叙述脊椎动物多核细胞的第一人,他在肿瘤中观察到多核细胞。此后便陆续有报道发现多核细胞,例如在骨髓中、在结核病组织中、发炎组织中(天花脓疱的周围、受水痘损害的皮肤、在麻疹病人的扁桃腺中)都发现了多核细胞。1875 年 Lange 首先观察到脊椎动物(蛙类)血液细胞合并。继之又有一些研究者在无脊椎动物中也发现了融合细胞。上面所说的在发炎组织中所见到的融合细胞,可能是病毒作用的结果,但当时还没有人认识到这一点。

上述观察到的多核细胞是在自然条件中产生的。自从 Harrison (1907 年)进行组织培养以后,人们便开始注意组织培养中多核细胞的形成。第一个报告组织培养中细胞合并的是 Lambert (1912 年)。到了 1960 年,法国 Barski 首先在两种不同类型动物细胞的混合培养物中获得自发融合的细胞。但细胞在体外培养时,自发融合的频率是极低的。

1958~1960 年日本学者冈田善雄(Okada)把流感病毒的 NWS 株接种到患欧利希癌的小白鼠腹腔中时,腹腔中的癌细胞一天后全部死亡。为了对 HVJ 病毒(仙台病毒)和 NWS 病毒的杀癌能力进行比较,将 HVJ 注射到事先接种了欧利希腹水癌细胞(ETC)的小白鼠腹腔中,结果发现在取出的腹水中有无数巨大球形细胞。进一步在镜下观察发现巨大细胞是呈车轮状排列的几个以至几十个核的多核细胞。接种病毒后每隔一定时间取出腹水,会观察到这种多核细胞是由 ETC 融合形成的,并且发现这种巨大细胞形成的频率与接种病毒的量成一定比例。一系列的试验表明虽然 HVJ 病毒没有 NWS 病毒那样惊人的杀死癌细胞的能力,但却发现了其能引起细胞融合的现象。此后,冈田善雄又对 HVJ 在体外促进 ETC 的融合反应进行了研究。他将 1mL 浓度约为 10^7 个/mL 的 ETC 和约 1 万红细胞凝集单位/mL 的 HVJ 病毒 1mL 放在试管中边冷冻边混合,在添加病毒后立即发现 ETC 凝集,在 37°C 下经 5min,细胞开始相互融合,形成邻接细胞的细胞质可以交流的部位。融合反应完成后的细胞核排列成车轮状,线粒体集聚在中央,能清楚地看到高尔基体,细胞膜也和正常细胞无大差异。随后,他又对影响细胞融合现象的因子,如温度、氧气、钙离子、pH 值等对细胞融合的影响进行了比较深入的探讨,做了大量开创性工作。

1965 年,英国 Harris 等报告灭活病毒可以用来融合不同种动物的细胞,并且指出由此产生的杂交细胞可以存活。当时世界上许多报刊很快就对这一发现在生物学上的重要性作出了评价,认为这是在细胞融合研究中的又一次突破。他们的贡献在于证明了灭活的病毒可以作为一般方法用来在一定的条件下融合动物细胞,而且差异很大的动物种之间的细胞可以被

诱导融合，融合的细胞可以存活。同时 Littlefield (1964 年) 又利用焦磷酸酶缺失的 A3-1 细胞和胸腺激酶缺失的 B₃₄ 细胞以及 HAT 选择培养基相结合的方法，有效地把杂种细胞选择出来，进一步推动了融合细胞的实验工作。1967 年 Weise 和 Green 发现在人和鼠的融合细胞中，人的染色体优先丢失，并证明利用这一特点有可能对人染色体上的基因进行定位。同年 Watkins 和 Koprowski 等，又分别证明融合细胞能使缺陷型病毒复原。1970 年 Ruddle 等开始系统地用融合细胞作为实验系统来绘制人类基因图。1970 年 Ladda 又进一步发展了去核的小鼠成纤维细胞进行融合实验，开始了各种细胞重组的研究工作。

从发现病毒能够诱导细胞融合之后，动物细胞融合的研究工作迅速发展起来。然而，由于 HVJ 诱导细胞融合存在着病毒制备困难、操作复杂、灭活病毒的效价差异大等原因，人们一直试图发现一种替代物作介质诱导细胞融合。

植物细胞融合技术的发展可追溯到 1937 年，Michel 用 0.5mol/L 硝酸钠处理原生质体使之凝集、融合。但那时还不能用酶法大量分离原生质体，使实验受到原生质体数量的限制，因此植物细胞融合的起步比动物细胞融合要迟十年左右。直到 1960 年 Cocking 用酶法大量制备有活力的原生质体获得成功，才使植物原生质体的融合工作迅速发展起来。1972 年美国科学家 Carlson 等，将粉蓝烟草和郎氏烟草两个异种的体细胞融合成功，20 世纪 70 年代中，相继几十种细胞融合成功，有植物间、动物间、动植物间、甚至人体细胞与动植物细胞间的成功融合。加拿大华裔科学家高国楠等 (1974 年) 的研究取得重大突破，他发现高分子量的聚乙二醇 (PEG) 在 Ca²⁺ 存在时能促使植物原生质体融合，显著提高融合率，从而迅速推动了原生质体技术的基础研究和应用研究。

1975 年原生质体融合技术已扩展运用到微生物中，匈牙利的 Ferenczy 首先报道 PEG 促使真菌融合，以后的成功报道涉及酵母、霉菌、细菌、放线菌等多种微生物的种间以至属间，使细胞融合技术继动、植物之后，在微生物中也形成了实验体系。至此，应用原生质体和发展操纵它们的方法，已引起实验生物学的“无声革命”。同时，Pontecorvo (1975 年) 发现 PEG 能诱导哺乳动物细胞融合并产生杂交细胞。1976 年 Davidson 等对此作了进一步证实。以后的研究工作表明，PEG 不仅可以促使植物、动物、微生物的细胞融合，而且还能促使动物细胞与植物的原生质体发生融合，促使微生物原生质体与动物细胞融合，使植物原生质体摄入微生物。1975 年 AhKono 报道用 PEG 将母鸡的红血球细胞和酵母菌的原生质体融合成功。1976 年 Dudus 等报道人的细胞能和胡萝卜的原生质体发生融合。Davey (1972 年) 和 Vasil (1977 年) 用植物原生质体摄取了细菌细胞。

1975 年，在动物体细胞杂交技术的基础上又创立了淋巴细胞杂交瘤技术。同体细胞融合一样，杂交瘤工作早期使用的促融剂——灭活的仙台病毒，已逐渐为化学促融剂 PEG 所取代。Davidson 等于 1976 年建立的以 PEG 诱发哺乳类细胞融合的方法，也同样适用于淋巴细胞同瘤细胞的融合。由于淋巴细胞杂交瘤技术能制备纯度高、专一性强的抗体，适于由未纯化的抗原大量制备，因而在短短几年时间里，即已被广泛用于制备各种单克隆抗体。

20 世纪 70 年代初，细胞融合技术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，是长久以来受到重视的课题之一。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起着重要的作用。而产生去核细胞的大多数实验途径，长期都是倚仗显微外科手术进行的。用这种方法获得成功的去核细胞仅局限于一些原生动物和两栖类卵子或硬骨鱼的卵子等，这些都是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 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、细胞质基因的转移开创了新的途径。

由细胞核、质分离与细胞融合这两项技术汇合起来而建立的细胞重组技术, 可使胞质体与完整细胞融合, 构成胞质杂种细胞; 胞质体与核体融合, 构成重组细胞; 把微核化细胞导入完整细胞, 构成微细胞异核体。1982 年, Ferenczy 在真菌中应用这些技术, 使核与原生质体的融合取得成功。这项技术对于研究核与核、核与胞质之间的相互作用及微生物代谢产物的调控过程有重大意义, 也已成为育种工作的一条新途径。

细胞融合技术在生物科学各领域取得进展的同时, 从事细胞融合研究的科学工作者一直没有放弃寻找具有更高融合效率的方法。虽然用 PEG 作介质诱导细胞融合, 比 HVJ 简便、快速和高效, 且 PEG 液比病毒更易制备和控制, 活性稳定, 使用方便, 但 PEG 诱导细胞融合也存在一些内在的问题, 如 PEG 在有效的浓度范围内 (50%~55%) 对细胞毒性很大, 因此人们又试图寻找新的方法来替代 PEG 介导细胞融合法。20 世纪 80 年代产生了一种新的方法即电脉冲诱导细胞融合技术。德国的 Halfman 和 Zimmermann 等 (1982 年、1983 年) 发明的电融合法, 以双向电泳和电子击穿细胞质膜的联合作用为基础, 对哺乳动物细胞、植物和酵母原生质体的融合都有成功的结果。电融合技术的优点在于: 融合频率高, 是 PEG 的 100 倍; 操作简便, 快速; 对细胞无毒; 可在镜下观察融合过程。目前, 电融合技术已成为细胞融合的有效手段之一。

20 世纪 80 年代中期又发明了激光融合器, 迅速崛起的激光诱导细胞融合术是利用激光微束对相邻细胞接触区的细胞膜进行破坏 (或扰动), 可将两个不同特性、不同大小的细胞在显微镜下实现融合。即利用光镊捕捉并拖动一个细胞使之靠近另一个细胞并紧密接触, 然后对接触处进行脉冲激光束处理, 使质膜发生光击穿, 产生微米级的微孔。这样, 由于质膜上微孔的可逆性, 细胞开始变形融合, 最终成为一个细胞。1987 年和 1989 年德国海德堡理化研究所用准分子激光器使油菜原生质体融合, 从开始照射到完成融合仅需几秒钟, 对融合产物观测, 发现胞质仍在运动, 说明融合后的细胞仍能存活。Schierenberg 等用一种线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 作细胞融合。1988 年, 青岛海洋大学张闻迪等以泥鳅受精卵为材料, 激光诱导细胞融合率达 40%, 融合后泥鳅卵大都能进一步发育, 个别甚至能长成幼体。

激光微束融合法与以前的病毒法、PEG 法、电融合法相比较, 可选择任意两个细胞进行融合, 易于实现特异性细胞融合, 作用于细胞的应力小, 定时、定位性强, 损伤小, 参数易于控制, 操作方便, 可利用监控器清晰地观察整个融合过程, 实验重复性好, 无菌, 无毒性。但它只能逐一处理细胞, 不能像其他方法一样同时处理大量细胞。细胞间相互接触是实现细胞融合的前提, 目前, 最新颖的方法是利用激光光阱建立两细胞间接触, 即光镊 (optical tweezers) 利用激光高斯光束光场的梯度力把细胞从光束边缘拉向光束中间, 在光斑直径与光波波长尺度相比拟时, 指向束腰的轴向梯度力要大于沿光束方向的散射力, 该梯度力把细胞竖直地拉到激光束腰下方处, 从而实现对细胞的操作。1991 年, R. Wiegand 和 R. W. Steubing 等利用光镊将大鼠的 B-淋巴细胞与骨髓瘤细胞对连, 形成预杂种, 再用 UV 激光微束照射, 使分离它们的膜消失并完全融合, 形成杂交细胞。若鼠的淋巴细胞预先移入一种抗原作免疫, 就可使之产生抵抗这种抗原的抗体, 因这种细胞非自然产生, 用它与变质的长寿命癌细胞融合, 以生产治癌用的抗体。

经过长期反复研究和实践, 细胞融合技术逐步发展和完善起来, 已成为生物工程的基础

技术之一。特别是近 20 年来,从理论和实践两个方面,有力地推动了生物科学各个领域的发展。细胞融合方法得到了不断的更新,融合率也得到逐步的提高。现在一般采用将化学法、物理法结合起来进行,探讨许多化学试剂在各种方法中的作用和最适浓度,进一步提高融合率,如在电融合时采用加入一定量甘露醇、 CaCl_2 、 MgCl_2 ,有利于细胞的极化和聚集接触。细胞融合的方法和手段始终朝操作方便、简单,便于量化研究,同时融合率又能得到不断提高的方向发展。现已出现将磁、超声、机械等和激光、电相结合,同时添加化学剂的新型细胞融合方法。

第二节 细胞融合技术的目的和意义

一、细胞融合的概念

在外力(诱导剂或促融剂)作用下,两个或两个以上的异源(种、属间)细胞或原生质体相互接触,从而发生膜融合、胞质融合和核融合并形成杂种细胞的现象称为细胞融合(cell fusion)或细胞杂交(cell hybridization)。如取材为体细胞则称体细胞杂交(somatic hybridization)。细胞融合与两个性细胞的结合(受精)不同:性细胞是单倍体,结合后形成二倍体细胞;而体细胞融合后可形成四倍体或多倍体细胞,由此形成的杂交细胞,其特性会有很大的变化。

细胞在融合过程中会发生下列主要变化:呈致密状态的体细胞在促融剂的作用下,细胞膜的性质发生变化,首先出现细胞凝集现象,然后一部分凝集细胞之间的膜发生粘连,继而融合成为多核细胞,在培养过程中多核细胞又进行核的融合而成为单核的杂种细胞,而那些不能形成单核的融合细胞在培养过程中逐渐死亡。

二、细胞融合的目的和意义

细胞融合能把亲缘关系较远,甚至毫无亲缘关系的生物体细胞融合在一起,为远缘杂交架起了桥梁,是改造细胞遗传物质的有力手段。它的意义在于从此打破了仅仅依赖有性杂交重组基因创造新种的界限,扩大了遗传物质的重组范围。但融合后获得的杂种细胞具有染色体异倍性,致使细胞株的遗传性不稳定、植株不育性、畸形、生育迟缓等不符合育种要求的性状出现,直接利用杂种细胞作育种材料目前还有许多障碍。

动物细胞融合是从细胞水平来改变动物细胞的遗传性,用于生产单克隆抗体、核酸疫苗等特定的生物制品,培育动物新品种,使牲畜迅速实现良种化和应用于人类优生。在基础理论研究上,动物细胞融合技术对研究细胞分化、基因定位、肿瘤发生机制与诊治等方面都有重要意义。在实际应用方面,动物细胞融合技术在药物定向释放系统、基因治疗、细胞治疗以及组织工程等新的治疗方法中起到重要的作用,而且在疫苗的生产、基因工程和抗体工程的药物筛选、开发和生产中发挥了关键的作用。特别是将外源基因在哺乳动物的乳腺中特异表达的乳腺生物反应器技术的发展,更是将药用蛋白质的生产带到一个前所未有的高度,以转基因动物的乳腺组织生产药用蛋白,这是生产药用蛋白质的全新生产模式,已经成为生物工程领域发展的重要方向。

植物细胞融合技术目前主要是作为扩大变异的手段,同时也正朝着将抗药性和胞质雄性不育等细胞质基因导入另一个体细胞的方向发展,有可能形成新的核质杂种。如果获得了有用性状的细胞系,但还不能形成植株时,就可以通过快速大量繁殖细胞加以利用。在生产应用研究方面,植物细胞融合在育种上有重要的应用价值,通过诱导不同种间、属间甚至不同科间原生质体的融合,可能打破有性杂交不亲和性的界限,广泛地组合各种基因型,从而有

可能形成有性杂交方法所无法获得的新型杂种植株；另一方面又可将各种细胞器、DNA、质粒、病毒、细菌等外源遗传物质引入原生质体，从而有可能引起细胞遗传性的改变，为某些珍稀植物的快速繁殖、植物的复壮等提供了可行的方法，应用于植物育种、种质保存、无性系的快速繁殖和有用物质生产等。

微生物细胞融合技术是通过改变微生物细胞的遗传性进行育种。在基础理论方面，研究外源 DNA 转化、质粒转移、基因定位、病毒传递以及核与核、核与质之间的关系等已取得重大进展；在实际应用中，则主要用于改良微生物菌种特性、提高目的产物的产量、使菌种获得新的性状、合成新产物等。微生物细胞融合技术的一项突出应用是生物药品的生产，包括抗生素、生物活性物质、疫苗等，它适用于疾病的诊断、预防及治疗等。

细胞融合技术为携带外源遗传物质（信息）的大分子渗入细胞创造了条件，如携带抗病基因的载体（Ti, Ri）可渗入细胞，Ti 质粒的 T-DNA 经转移可将外源基因导入全部双子叶植物和水稻、玉米、吊兰、石刁柏、香蕉等部分单子叶植物中，可以整合到寄主染色体上，是一种天然的植物基因工程载体。或将细胞器（线粒体、叶绿体）渗入细胞，因为除壁后的原生质体，消除了核酸酶等对外源 DNA 的抵制作用，是植物细胞工程进行遗传操作、基因转移的良好材料。

第三节 细胞融合技术的进展与展望

作为现代生物技术核心基础之一的细胞融合技术在近半个世纪来突飞猛进，并已在农牧业、轻工、医药等领域取得了许多具有开创性的研究成果。如通过细胞融合技术形成的杂交瘤细胞生产的单克隆抗体已广泛用于临床治疗，并显示出独特的疗效，在人类的医疗保健中发挥越来越重要的作用。细胞融合技术在细胞遗传学、细胞核质关系、单克隆抗体及远缘杂交育种等方面的研究具有重要意义，随着细胞融合技术研究的不断深入，细胞融合技术的发展前景及其产生的影响将会日益地显示出来。

一、植物细胞遗传学和育种学的最新进展

植物细胞融合技术研究染色体数量变异和结构变异，能使细胞内遗传物质重新组合，获得杂种细胞，以便培养成新的植物体，它开辟了植物细胞遗传学的一个新领域。把这种技术应用于品种改良，原生质体融合可克服远缘杂交中的不亲和障碍，更加广泛地组合起各种植物的优良的遗传性状，创造自然界新物种，它在育种学方面开辟了新途径。当前，植物细胞融合研究主要在以下几个方面取得进展。

1. 基因组的不亲和性

各种不同的原生质体无论其亲缘关系远近，利用现在的技术一般都能被诱导融合，但在细胞周期中同步化程度却有巨大差异，染色体单向消失是不亲和性的标志。例如，烟草和马铃薯属间融合所形成的杂种愈伤组织，在其基因结构上就存在很大的变异。在细胞增殖过程中存在单方的染色体丢失现象。最近通过核基因组的分子生物学分析已证明了属间体细胞杂种性质和基因的不稳定性。因此，研究不亲和性引起的染色体丢失现象在植物育种中意义重大。

2. 非对称融合（asymmetrical fusion）

用 X 射线或 γ 射线处理融合亲本之一的原生质体，杀死细胞核，然后再同另外一方亲本的原生质体融合，这种部分与全部染色体结合的细胞融合称为非对称融合。这种体细胞不亲和性小的非对称融合，现在已成为一种采用比较多的细胞融合手段。非对称融合，施主染

染色体常常丢失，后代间有较大变异，一般都是三倍体、五倍体等非整倍体。例如，花椰菜和被 X 射线处理的油菜（施主）的种间融合，其 90% 杂种植物为非整倍体，据同工酶分析结果表明，施主的染色体一部分丢失，形态介于花椰菜与双亲的中间。因此，为了打破杂交不亲和性，结合非对称融合与适宜的选择法，将支配近缘野生种和远缘种核的有用抗病性基因导入栽培种；或采用花药培养所获得的有用性状的单倍体和二倍体的单倍体植物与同种或异种的单倍体及二倍体植物非对称融合，重建核基因，尽早培育出实用的二、三、四倍体杂种。将自单倍体植物的单倍体细胞、花粉细胞或异常减数分裂所得的部分染色体和基因组等应用于非对称融合是今后细胞融合的一个重要研究课题。

3. 胞质杂种

胞质杂种是去掉核后的细胞质与另外一个完整细胞融合形成的杂种。在育种中起重要作用的胞质基因有含线粒体的胞质雄性不育（cytoplasmic male sterile, CMS）基因、病原菌产生的抗毒素基因和含叶绿体的对阿特拉津等除草剂耐性基因。细胞融合往往使细胞质基因转化的可能性增加，但在获得胞质杂种的研究过程中，核与细胞质的不亲和性，即使远缘间组合，也未增加。这种现象需从外源细胞器基因和基因组的重组和互作等方面研究，以期获得胞质杂种的 CMS、抗病性、除草剂耐性、光合机能等有关的细胞质基因在短期内导入的优良系统，以及在胞质杂种形成过程中进行线粒体 DNA 重组和胞质细胞器重建，使细胞质的遗传组成多样化。利用远缘间的融合易获得雄性不育植物，在至今未得到 CMS 的作物中，获得其新的 CMS 基因。以有性生殖困难、不能杂交育种的作物和营养繁殖性作物作为育种的突破口，使远缘杂交育种的研究有一新进展。

二、人源化抗体的研制和生产

（一）人源化抗体的研究进展

动物细胞融合技术中最成熟的是淋巴细胞杂交瘤技术，动物细胞可通过产生特定抗体的 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合获得用于生产单克隆抗体的杂交瘤细胞。目前已培育了许多具有很高的实用价值的杂交瘤细胞株系，它们能分泌产生在诊断和治疗病症方面发挥重要作用的单克隆抗体。如用于器官移植治疗、可以抑制排斥反应的单克隆抗体 Orthoclone (OK-T3)，甲肝病毒单克隆抗体，抗人结肠癌杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体等。目前使用的单克隆抗体多为鼠源性抗体，但鼠源单抗应用于人体治疗时存在许多问题：首先，虽然鼠源单抗能特异识别抗原，但在人体中常不能有效激活补体和 Fc 受体相关的效应系统；其次，鼠源单抗用于人体时常被人免疫系统所识别，注入人体后会产生人抗鼠抗体（HAMA）或激发免疫反应；另外，外源抗体在人体循环系统中很快被清除。因此，根据抗体结构与功能之间的联系，在保持原单抗对特异抗原表位的高亲和力的基础上对其进行体外人源化改造，减少异源抗体的免疫原性成为改进单抗治疗的重点。目前已研究嵌合抗体技术、噬菌体抗体技术等基因工程抗体技术来解决人源化抗体问题。

抗体工程是解决治疗用单克隆抗体的有效途径。由于人源抗体和鼠源抗体在结构上非常相似，不仅恒定区可以相互替换，而且可变区的框架区（framework region, 简称 FR）也可以相互替换。因此，可以将鼠源单克隆抗体的恒定区甚至可变区中的框架区替换为人源抗体的序列，这种嵌合的或者人源化的单克隆抗体可以大大减少人体对它的反应。近年来由于抗体库技术的快速发展，纯粹的人源抗体也可以通过基因工程手段获得，这可能是未来治疗用单克隆抗体的主流。治疗用单克隆抗体主要使用完整抗体（除导向药物外），因为只有这种抗体才具有抗体的完整功能。目前已经有多种完整抗体正在进行临床试验。