



汕頭大學

SHANTOU UNIVERSITY

# 实验九：细胞融合

主讲：姚德福

助教：张慧敏 刘奕棋

Email: [dfyao@stu.edu.cn](mailto:dfyao@stu.edu.cn); 电话: 13623037981; 办公地点: 高水平楼A401



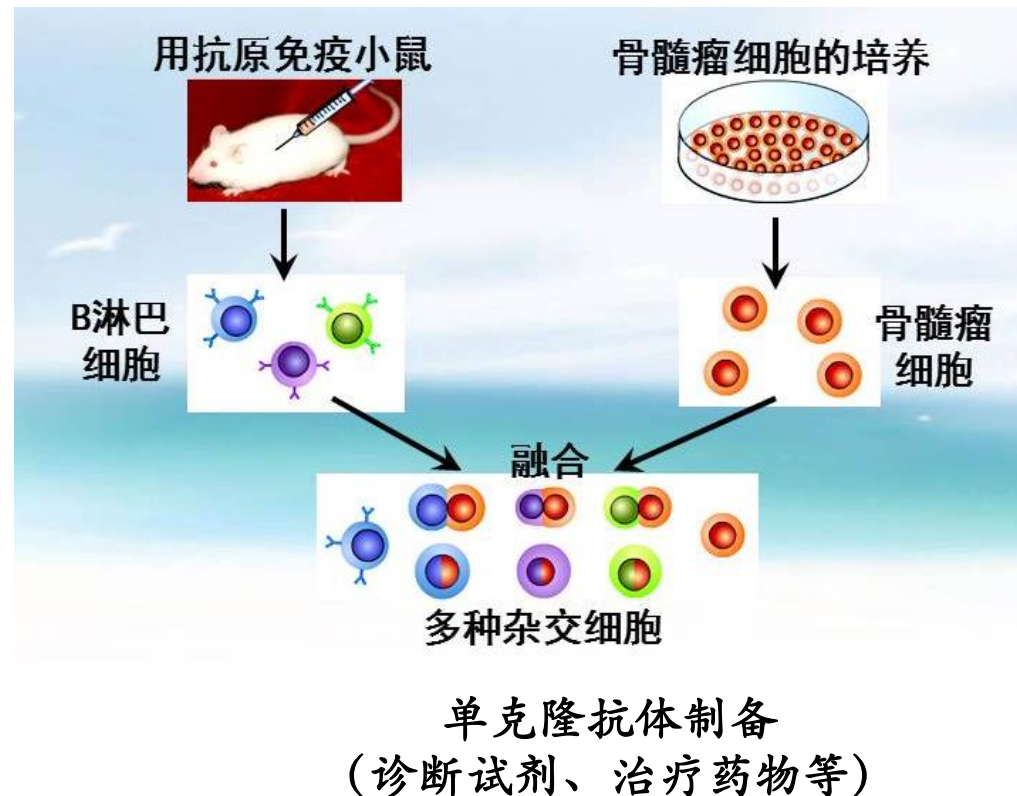
# 一、实验目的

- ◆ 了解聚乙二醇 (PEG) 诱导细胞融合的基本原理
- ◆ 掌握细胞融合的基本方法



## 二、实验原理

- ◆ **细胞融合 (Cell fusion)**，又称细胞杂交 (cell hybridization)，是在自然条件下或利用人工法 (生物的、物理的、化学的)，使两个或两个以上的细胞合并成一个具有双核或多核细胞的过程。
- ◆ 人工诱导细胞融合始于 20 世纪 50 年代，不仅同种细胞可以融合，种间远缘细胞也能融合，甚至于动植细胞之间也能融合。





## 二、实验原理

- ◆ 常用细胞融合技术主要有：仙台病毒法、**聚乙二醇法 (PEG)** 和电融合法。
- ◆ PEG法是目前应用最广泛的细胞融合技术，它使用方便、活性稳定，且融合制备和控制。
- ◆ **PEG的促融机制尚不完全清楚**，一般认为 PEG 含有非常丰富的羟基，亲水性非常好，能引起细胞膜上脂质分子的酯键与极性基团的重排，使两细胞接触点处脂类分子发生疏散和重组，从而使细胞发生融合。



## 二、实验原理

### PEG介导细胞融合的影响因素：

- 1) **PEG相对分子质量与浓度**：细胞融合效果与PEG相对分子质量与浓度呈正比，但相对分子量越大、浓度越高，对细胞毒性越大。因此，通常采用PEG相对分子量为1000-4000，浓度一般为40-60%。
- 2) **PEG处理时间**：处理时间越长，融合效果越好，但对细胞的毒害也越大，一般2-10 min。
- 3) **融合温度**：由于生物膜的流动性与温度成正比，因此细胞融合效果与温度也成正比，一般37℃左右。



### 三、实验试剂与材料

- 材料：鲫鱼外周血
- 试剂：抗凝剂（3.8% 柠檬酸钠，pH7.4）、生理盐水（0.85% NaCl）、GKN溶液、50% PEG溶液、詹姆斯绿染色液等。
- 器材：离心机、离心管、凹面载玻片、显微镜、水浴锅等。

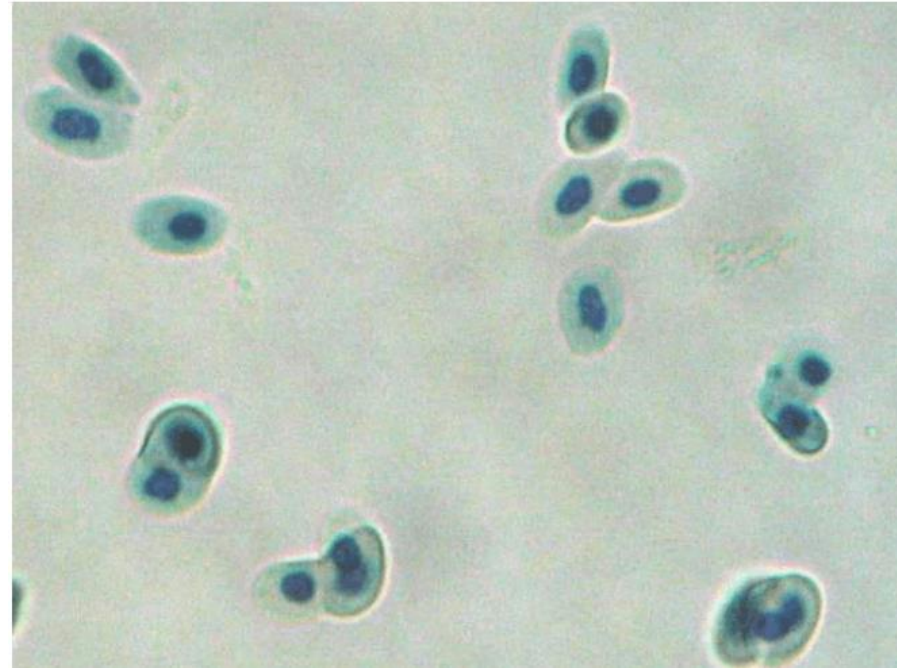
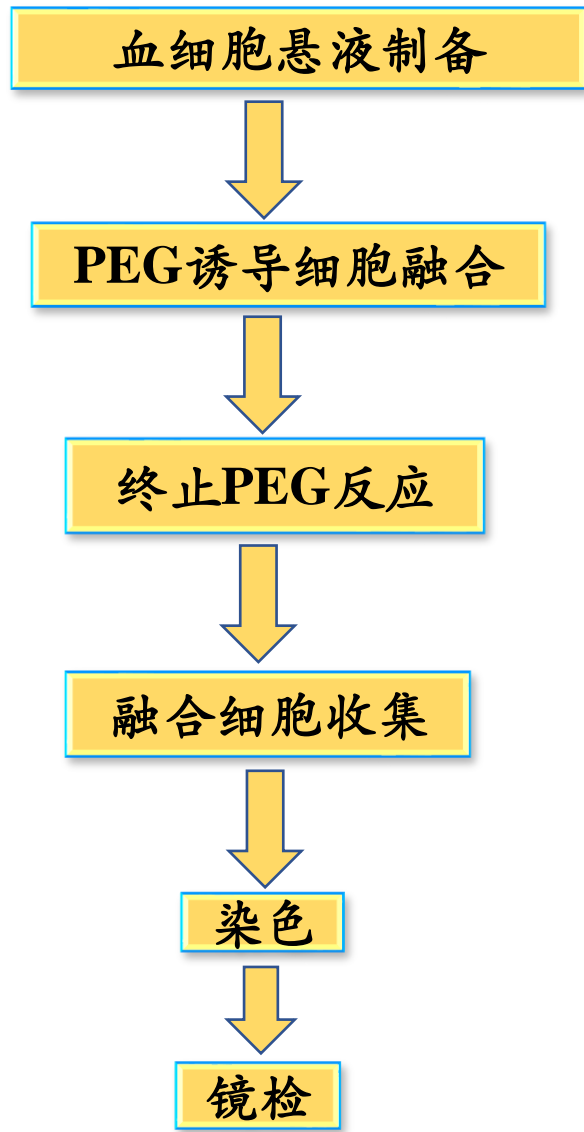


## 四、试剂配制

- ◆ **生理盐水 (0.85% NaCl)** : 0.85 g NaCl, 加蒸馏水定容至 100 mL。
- ◆ **抗凝剂 (3.8%柠檬酸钠)** : 3.8 g 柠檬酸钠, 0.85 g NaCl, 加蒸馏水定容至 100 ml, pH 7.4 。
- ◆ **GKN溶液**: NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.77 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  0.69 g, 葡萄糖 2.0 g, 溶于 1000 ml 双蒸水中。
- ◆ **50% PEG溶液 (m/V)** : 称取 5 g PEG (MV=4000) 放入 15 ml 离心管中, 沸水浴加热, 使之熔化, 待冷却至 50-60 °C 时, 加入 5 ml 的 GKN 溶液 (**置于 50-60 °C 预热 5 min**) , 混匀, 置 37 °C 备用。



# 五、实验流程



细胞融合



### 一、血细胞悬液制备

- ① 在注射器中预装 5 ml 抗凝剂，从鱼尾椎静脉采血 5 ml；
- ② 转移至 15 ml 离心管中，迅速混匀，置于冰上；
- ③ 4°C，1000 rpm 离心 5 min；
- ④ 吸弃血浆，加入 10 ml 0.85% 生理盐水，用移液枪将血细胞轻轻吹散；
- ⑤ 混匀后，1000 rpm 离心 5 min；
- ⑥ 弃上清，加入 10 ml 0.85% 生理盐水，按上述条件再洗涤血细胞 2 次；
- ⑦ 1000 rpm 离心 5 min，弃去上清；
- ⑧ 加入 GKN 溶液（体积比=1:9），制成 10% 的鱼血细胞悬液。



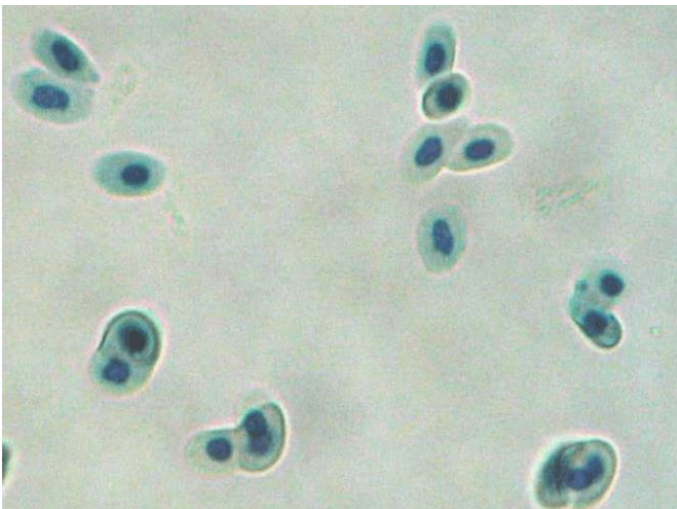
## 二、PEG诱导血细胞融合

- ① 取鱼血细胞悬液 1 ml 于 15 ml 离心管中，置于 37 °C 水浴锅中**预热** 5 min；
- ② 向上述血细胞悬液中**逐滴**加入 0.5 ml **预热**的 50% PEG 溶液；
- ③ 用移液枪轻轻吹打均匀，置于 37 °C 水浴锅静置孵育 10 min ；
- ④ 加入 37 °C 预热的 GKN 溶液 5 ml ，轻轻吹打混匀， 37 °C 孵育 5 min。



### 三、染色、镜检与计数

- ① 取上述细胞悬液 100  $\mu\text{l}$  至 1.5 ml 离心管中，加 1  $\mu\text{l}$  1% 詹纳斯绿染液（终浓度为 0.01%），用移液枪轻轻混匀；
- ② 染色 3 min 后，吸取 40  $\mu\text{l}$  加入凹面载玻片中，盖上盖玻片，镜检（拍照）；
- ③ 计数：对视野内发生融合的细胞以及所有细胞进行计数，计算融合率（融合率=视野内发生融合的细胞/视野内所有细胞的总数）。



统计三个视野，每个视野  
统计约 100 个细胞。



## 七、注意事項

- 滴加 50% PEG 时，应缓慢、逐滴加入，期间最好轻弹试管底部，滴加完毕后用移液枪充分混匀；
- 镜检时要注意区分融合细胞与重叠细胞；



# 八、实验结果

