

细胞电融合的原理和应用

细胞融合的意义

在现代生物学研究中，细胞电融合是单克隆抗体制备、哺乳动物克隆以及抗肿瘤疫苗制备等最新方法中的一个基本步骤。与通过聚乙二醇（PEG）诱导细胞融合的化学方法相比，细胞电融合是一种更高效的方法。

Zimmermann 教授于 1978 年创立了细胞电融合的方法。从那以后，他一直致力于进一步发展该技术。

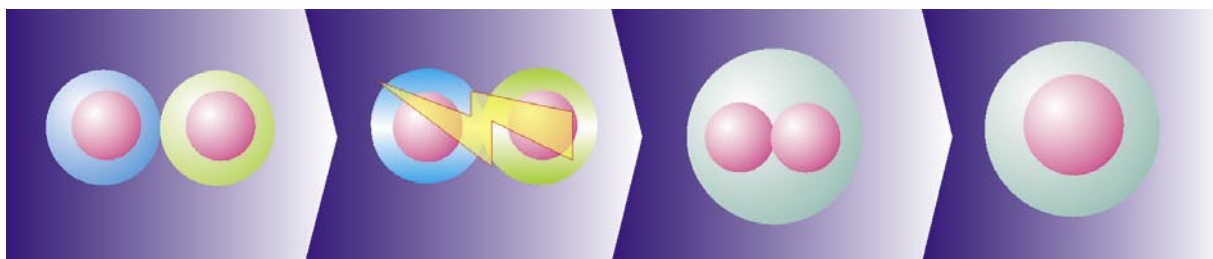
细胞电融合的原理

首先，通过双向电泳使细胞间的接触变得非常紧密。普通电泳采用直流电来移动分子，双向电泳则与之不同，采用了高频交流电。在活细胞等微粒的内部，诱导去极化，引起细胞聚集，排列成串珠状，互相紧密接触。

然后给予短暂的高压脉冲，引起细胞膜的穿透，随后细胞膜发生结合导

致细胞融合。为了稳定这个过程，在短期内需要施加交流电压。

刚完成电融合的融合细胞可称为异核体，因为尽管表面的细胞膜已经发生了融合，细胞内仍可以看到两个或两个以上的细胞核。随后，细胞核也会在细胞内部发生融合。在多数情况下，该过程会导致核中的染色体数量急剧下降。



A. 聚集

通过双向电泳，细胞互相紧密接触。

B. 融合脉冲

采用仅仅 15 微秒的方波脉冲穿透细胞膜，细胞膜随后发生融合。

C. 异核体期

细胞膜完全融合，细胞质也完全混合。只有细胞核仍然保持分离状态。

D. 完全融合产物

现在细胞核也发生了融合。根据常识，染色体数量下降。

图 1：细胞融合相

单克隆抗体制备

G.Kohler 和 C.Milstein 将能产生特异性抗体的原代 B 淋巴细胞与肿瘤细胞进行融合，创立了单克隆抗体制备这种革命性的制备抗体的方法。

无数的融合产物经分离和筛选后，将符合要求的单个细胞作为克隆进行扩增，这就是使用“单克隆”一词的原因。

这种融合产物被称为杂交瘤，它有两个突出的特点：1. 分泌特异性抗体；2. 几乎可以无限复制培养。该技术的出现使得特异性抗体的大规模生产成为可能。

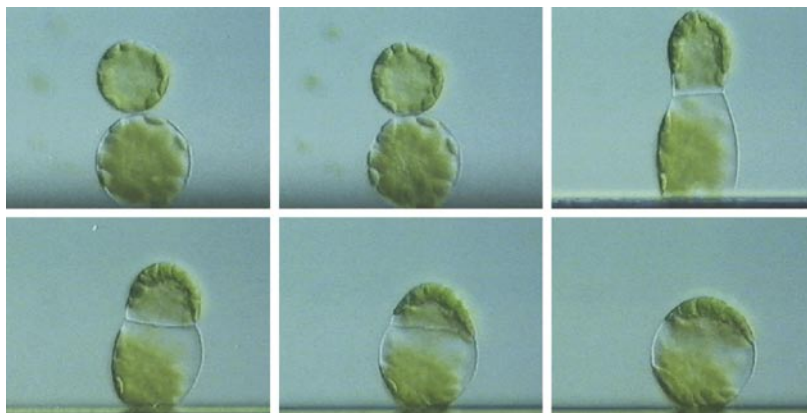


图 1.1：燕麦原生质体的融合相。感谢 Zimmermann 教授提供了燕麦原生质体的融合图像。

因为这些杰出贡献，G.Köhler, C.Milstein 和 N.K. Jerne 共同获得了 1984 年的诺贝尔医学奖。



图 2：抗体

哺乳动物克隆

如果没有细胞融合技术，著名的克隆羊——多利可能就无法诞生。克隆哺乳动物的第一步是将细胞核从卵母细胞中去除。然后将去核的卵母细胞与体细胞（如从结缔组织中分离的体细胞）进行融合。因为细胞电融合技术是获得这种预期结果的唯一有效方法，所以融合过程一般都采用电融合的方法。随后融合产物被植入“代孕母亲”的子宫，然后完成整个妊娠过程。

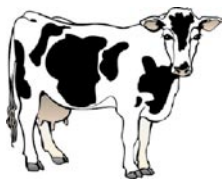


图 3：二十世纪 80 年代末，细胞电融合技术被用于从胚胎细胞克隆哺乳动物。

上世纪 80 年代末就已经开始进行从胚胎细胞克隆哺乳动物的研究，当时并未引起大众的广泛兴趣。

抗肿瘤疫苗

细胞融合技术的出现直接导致了最近广受关注的抗肿瘤疫苗的出现。在抗肿瘤疫苗构建的过程中，将来自患者的肿瘤细胞与树突状细胞融合。树突状细胞是免疫系统的一种抗原递呈细胞（APC）。它们的功能是激活 T 细胞，从而产生针对肿瘤细胞的特异性免疫反应。

肿瘤细胞与树突状细胞的融合产物经照射后能够存活但不能分裂。将处理后的融合细胞注射给患者。通过这种方式激活患者自身的 T 细胞。T 细胞对转移灶进行攻击，在很多情况下，引起转移灶的瓦解、缩小或者停止生长。

Eppendorf 多功能电转仪—Multiporator 现在具有了细胞融合的功能

Eppendorf 的多功能电转仪——Multiporator 现在将细胞电融合功能作为一个选配功能。该产品是与电融合技术的创立者 U. Zimmermann 教授合作开发的。适用于真核细胞和植物细胞的电融合。

根据客户选择的配置，Multiporator 还可以用于原核细胞、酵母的电转化和真核细胞的电转染。新的融合模块包括：微融合杯和螺旋融合杯。



图 4



图 5-1

微融合杯

微融合杯（图 4）用于优化细胞聚集和融合脉冲的参数。可以通过显微镜直接对聚集和融合的情况进行观察。少量的细胞（20–50 μ l）可以用微融合杯直接进行融合。

螺旋融合杯

大量的细胞（最多可达 250 μ l）可以在螺旋融合杯（图 5）中进行融合。通过微融合杯摸索得到的参数可以直接用于螺旋融合杯。因此该系统具有独一无二的直接放大反应体积的特性。



图 5-2：带有螺旋融合杯的多功能电转仪

参考文献：

- [1] Zimmermann, U., Pilwat, G. The relevance of electric field induced changes in the membrane structure to basic membraneresearch and clinical therapeutics and diagnosis. In Abstract IV-19-(H) of the, 6th International Biophysics Congress Kyoto, Japan, 140, 1978.
- [2] Zimmermann, U., Vienken, J., Scheurich, P., Electric field induced fusion of biological cells. Biophys. Struct. Mech 1980, 6 (Suppl.), 86
- [3] Zimmermann, U., Vienken, J., Pilwat, G., Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes. Bioelectrochem. Bioenerg 1980, 7, 553.
- [4] Kohler, G., Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, Aug 7; Nature 256 (5517): 495-497.
- [5] Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, Feb 27; 385 (6619): 810-813.
- [6] Willadsen, S.M., Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 1986, 320, 63.
- [7] Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H., First, N.L., Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte, ., 1987, 37, 859.
- [8] Barnes, F.L., Prather, R.S., Robl, J.M., First, N.L., Multiplication of bovine embryos, ., 1987, 27, 209.
- [9] McLaughlin, K.J., Davies, L., Seamark, R.F., embryo culture in the production of identical merino lambs by nuclear transplantation,.. 1990, 2, 619.
- [10] Todorov, J., Todorova, T., Zimmermann, U., Arnold, W.M., Leiding, C., Hahn, R., Hahn, J., Geklontes Kalb in Neustadt geboren, ., 1992, 27, 307.
- [11] Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G.A., Ringert, R.-H., Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids, ., 2000, Vol.6, No.3, 332-336. Nature Nature Biol. Reprod Theriogenology In vitro Reprod. Fertil. Dev Reprod. Dom. Anim Nature Medicine.

作者 Kurt Lucas, Eppendorf AG