

# 融合系统 pH 值对杂交细胞集落形成率的影响

颜永杉

(中国科学院遗传研究所,北京)

在发现用灭活的仙台病毒为媒介可获得能传代的杂交体细胞以后,体细胞杂交就成为细胞生物学、遗传学、发育生物学、肿瘤学和病毒学等领域一个很有用的研究手段,它被广泛地应用于体细胞种内或种间遗传物质的转移、基因定位、基因表达过程中的核质关系、细胞重组、真核细胞基因的调节以及单克隆抗体等研究。多年来,对于那些可能影响细胞融合率及杂交细胞形成的物理、化学和生物因素,例如,病毒本身的质量<sup>[1]</sup>、改变两亲本细胞的比例或融合前两亲本细胞的混合培养<sup>[3,8]</sup>、融合过程的温度<sup>[4,5]</sup>、加入植物凝集素<sup>[14]</sup>等,均已有过报道。

Croce 等(1972)报道过 pH 对细胞融合率的影响<sup>[2]</sup>。然而,在这些融合细胞中,异型核融合细胞实际上只占其中的一小部分。一般认为只有异型核双核细胞(di-heterokaryocytes)才有可能形成杂交细胞<sup>[5,6]</sup>。因此,提高异型核双核细胞的比例和杂交细胞的集落形成率是体细胞杂交成功与否的关键问题。由于溶液 pH 的改变可能引起细胞膜结构的改变<sup>[15]</sup>,而细胞膜结构的改变也许正是成功地进行细胞融合的重要条件之一<sup>[7]</sup>。因此本实验用氘化胸腺嘧啶核苷标记一个亲本细胞的细胞核,用乳胶微粒标记另一个亲本细胞的细胞质,研究在细胞融合时溶液 pH 值对杂交细胞集落形成率的影响。

## 材料与方 法

**1. 细胞株** 亲本细胞 B82HTQ<sub>2</sub>(TK<sup>-</sup>)<sup>[11]</sup> 和 PG19 (HGPR<sup>-</sup>)<sup>[12]</sup> 分别来源于小鼠的 L-细胞株和 C<sub>3</sub>H/BL 黑瘤细胞。两者在含有 10% 小牛血清的 Eagle 基础培养基 (MEM) 中均生

长良好,但都不能在 HAT 选择培养基<sup>[10]</sup>里生长。

**2. 同位素标记** 当 PG19 细胞在培养基里生长 24 小时后,在其培养基里加入氘化胸腺嘧啶核苷(比活为 5 居里/毫克分子, Sigma),最终浓度为 1 微居里/毫升,然后继续在 37°C 培养 36—40 小时。

**3. 乳胶微粒标记** 采用 Levine (1978) 的方法<sup>[9]</sup>,即取 0.1 毫升(直径为 0.6 μm)的乳胶微粒贮存液,加 MEM 到 100 毫升,最终浓度为 5—6 × 10<sup>6</sup> 个乳胶粒/毫升。B82HTQ<sub>2</sub> 细胞在上述培养基里生长 2 天(37°C),此时每个细胞含有 50 个以上的乳胶微粒。在细胞融合前,先用 Hanks' 液洗去未被细胞吸入的多余乳胶微粒。

**4. 实验组合** 根据融合系统 pH 值的不同,本实验分为 pH5.4、6.8、7.0 和 7.9 等 4 组,进行细胞杂交实验。为了探讨细胞融合过程对细胞存活率的影响,我们还设有相应 pH 值的对照组,即除了不加仙台病毒外,其他处理与实验组同。

**生理盐水缓冲液的制备** 溶液 A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.91 克, NaCl 8.0 克, KCl 0.2 克, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.13 克, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.11 克,加蒸馏水至 1 升。溶液 B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.10 克, NaCl 8.0 克, KCl 0.2 克, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.13 克, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1 克,加蒸馏水至 1 升。此时溶液 A 和溶液 B 的 pH 值分别为 8.0 和 4.4。取适当体积的溶液 A 和溶液 B 混合,用 pH 计测定

Yan Yongshan: Influence of pH in Fusion System on Plating Efficiency of Hybrid Cells

制备出 pH 分别为 5.4, 6.8, 7.0 和 7.9 的生理盐水缓冲液, 供以下的细胞杂交用。

**5. 细胞杂交** 在 Harris 方法<sup>[6]</sup>的基础上作了一些改进。仙台病毒在紫外灯下灭活 25 分钟 (不断搅拌)。两亲本细胞在 0.25% 胰酶液 (Difco.) 消化后, 用上述的生理盐水缓冲液 (pH 分别为 5.4, 6.8, 7.0 和 7.9) 连续离心洗涤 2 次。每组分别取两亲本细胞悬浮各 2 毫升 ( $5 \times 10^5$  个细胞/毫升), 混合后离心沉淀。然后将细胞分别悬浮在上述不同 pH 的生理盐水缓冲液 (0.5 毫升) 里, 再加入 0.13 毫升灭活的仙台病毒 (1300 HAU, 对照组不加病毒), 摇匀后在 4°C 放置 20 分钟, 然后在 37°C 温育 30 分钟。最后, 各组分别加入 10 毫升含有 10% 小牛血清的 MEM, 取少量融合细胞混合液供存活率测定。为了保证杂交细胞集落的适宜密度, 我们小心地把这些稀释后的融合细胞按每瓶  $2.1 - 2.8 \times 10^5$  个细胞的量接种到 9 个培养瓶里, 同时将余下的细胞加到含有盖玻片的培养碟里, 在 37°C 继续培养。16—18 小时以后, 用生理盐水洗涤这些盖玻片上的融合细胞, 再用冷甲醇固定半小时, 供同位素自显影用。待融合细胞在培养瓶里生长 24 小时后, 将其培养基改为 HAT 选择培养基, 让细胞在静止的条件下继续生长 18—20 天 (中间只换一次液), 最后统计每个培养瓶中的杂交细胞集落数。

**6. 融合细胞的活力检测** 在细胞融合后, 用 0.5% 台盼蓝染料排斥试验测定细胞的活力, 即染料不能进入的细胞为活细胞。在 200 倍显微镜下观察 40 个视野, 约 1000 个细胞。

**7. 同位素自显影** 为了操作方便, 将上述带有固定细胞的盖玻片粘在载玻片上, 用 5% 三氯醋酸处理半小时 (4°C)。经水洗、干燥后, 片子用浸人法<sup>[4]</sup>裹上一薄层乳胶 K<sub>5</sub>, 在完全黑暗的低温条件下让乳胶曝光 2—3 天, 最后用 D<sub>19</sub> 显影, Giemsa 液染色。

**8. 差异的显著性检验** 对在双核细胞中异型核细胞与同型核细胞 (di-homokaryocytes) 的比例的统计学分析, 我们采用如下的公式:

$$\frac{|p - P|}{\sigma_p} = \frac{|p - P|}{\sqrt{\frac{PQ}{N}}}$$

对于细胞融合率、杂交细胞集落形成率、双核细胞的百分率, 以及异型双核细胞的百分率等, 我们采用如下的两个样品率差异的显著性测验公式:

$$\frac{|P_1 - P_2|}{S_{P_1 - P_2}} = \frac{|P_1 - P_2|}{\sqrt{PQ \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

## 结 果

当融合系统的 pH 为 5.4 时, 细胞融合率最低, 仅为 32.8%, 与其他组相比有非常显著的差异 ( $0.001 < P < 0.01$ )。pH 6.8, 7.0 以及 7.9 组的细胞融合率相近, 无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

对 pH 7.9 组来说, 不仅双核细胞 (包括同型核和异型核) 的融合率明显地高于其他各组 ( $0.001 < P < 0.01$ ), 而且异型核双核细胞的融合率也明显地提高, 约为其他各组的 1.6 倍。而 pH 5.4, 6.8, 和 7.0 组不论是双核细胞融合率还是异型核双核细胞融合率都很相近 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

在用氚标记结合乳胶微粒标记的实验中, 我们从未发现任何一个氚和乳胶微粒同时都标记上的单核细胞。

从表 2 可看出, 在细胞融合过程中, 细胞存活率与融合时溶液 pH 有关。在 pH 为 6.8 和 7.0 时, 细胞存活率最高, pH 为 5.4 时最低, 仅为 30.9%。在不加病毒的对照实验中, 不同 pH 各组的细胞存活率都比相应 pH 值的加病毒实验组高。其中, 以 pH 5.4 和 7.9 最显著, 加病毒后细胞的存活率分别降低为相应对照组的 41% 和 53%。

在细胞融合后的第 14—18 天, 在培养瓶壁上就出现直径约 0.2—0.5 厘米的杂交细胞集落, 各组平均每瓶所得到的杂交细胞集落数如表 2 所示。统计分析表明, pH 6.8 和 7.0 组的杂交细胞集落形成率明显地高于 pH 5.4 组和

表1 融合系统 pH 值对细胞融合率和异型核双核细胞形成的影响

实验组	pH	观察的细胞数								细胞融合率 (%)	2n细胞的融合率 (%)		异型核2n细胞数与同型核2n细胞数之比	
		总数	1n <sup>1)</sup>	2n		3n	4n	5n	6n		≥7n	总数 <sup>2)</sup>		异型核 <sup>4)</sup>
				异型核	同型核									
I	5.4	795	663	27	76	14	7	4	2	2	32.8	20.8	5.4	1:2.8
II	6.8	3168	2435	112	380	108	55	27	21	30	46.0	21.8	5.0	1:3.4
III	7.0	1381	1066	50	144	36	40	12	13	20	48.1	18.8	4.8	1:2.9
IV	7.9	3298	2504	173	416	126	43	20	10	6	43.5	26.6	7.8	1:2.4

- 1) 1n, 2n 分别为单核细胞、双核细胞, 3n...等以此类推;
- 2) 细胞融合率 =  $\frac{\text{融合细胞中细胞核总数}}{\text{观察的细胞核总数}} \times 100\%$ ;
- 3) 2n 细胞的融合率 =  $\frac{\text{双核细胞的细胞核总数}}{\text{观察的细胞核总数}} \times 100\%$ ;
- 4) 异型核 2n 细胞的融合率 =  $\frac{\text{异型核双核细胞的细胞核总数}}{\text{观察的细胞核总数}} \times 100\%$ 。

pH7.9 组 ( $P < 0.001$ ), pH6.8 和 7.0 组的杂交细胞集落形成率很相近 ( $P > 0.05$ )。其中, pH 5.4 组的杂交细胞集落形成率最低, 与 pH7.9 组相比也有显著差异 ( $0.001 < P < 0.01$ )。

## 讨 论

用氘标记结合乳胶微粒标记的方法, 我们

能够清楚地把异型核双核细胞(图 1) 与同型核双核细胞区别开, 因而能够确定在融合细胞中异型核双核细胞与同型核双核细胞之间的比例。由于我们从未发现任何一个氘和乳胶微粒同时都标记上的单核细胞, 这说明了在细胞融合后 18 小时内没有核融合发生。因此, 我们所统计的细胞融合率和异型核双核细胞数是可信

表2 融合系统 pH 值对细胞存活率和杂交细胞集落形成率的影响

实验组	pH	细胞存活率 (%)		接种的细胞数/瓶	杂交细胞集落数/瓶	杂交细胞集落形成率 (%) <sup>1)</sup>
		加病毒	不加病毒 <sup>1)</sup>			
1	5.4	30.9	76.3	$2.8 \times 10^5$	4.2	0.18
2	6.8	73.8	90.5	$2.8 \times 10^5$	120.8	2.34
3	7.0	82.1	95.2	$2.1 \times 10^5$	112.5	2.70
4	7.9	45.5	86.0	$2.8 \times 10^5$	22.7	0.46

- 1) 除了不加仙台病毒外, 其他步骤与标准的细胞融合过程相同。
- 2) 杂交细胞集落形成率 =  $\frac{\text{杂交细胞集落的平均数}}{\text{接种的细胞总数} \times \text{存活率} \times \text{异型核 2n 细胞的融合率} \div 2} \times 100\%$ 。

的。在这种悬浮的细胞融合系统中, 如果细胞融合取决于两亲本细胞随机碰在一起的机率, 那么在双核细胞中异型核双核细胞数与同型核双核细胞数的比例应为 1:2。然而, 我们的结果(表 1) 表明, 除了 pH5.4 组外, 其他各组的这种比例都显然低于上述的比例, 这种差异是显著的 ( $0.01 < P < 0.05$ )。这反映了细胞融合并不是单纯取决于两亲本细胞随机相遇的机率, 而与亲本细胞的膜表面特性有关, 这与郑瑞

珍等报道的仙台病毒的融合效力对不同的细胞组合明显不同<sup>[1]</sup>基本上是一致的。

我们的结果还表明, 当融合系统 pH 偏酸性时, 细胞融合率低, pH 为中性或偏碱性 (pH 6.8—7.9) 则有利于细胞融合。本文报道的异型核双核细胞的百分率 (2.4—2.7%) 比过去报道的<sup>[5]</sup>高。很明显, pH 为 7.9 有利于双核融合细胞和异型核双核细胞的形成。

由于在加入 HAT 选择培养基后一直到统

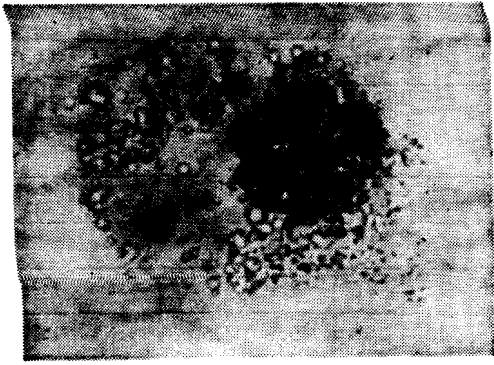


图1 异型核双核细胞

PG19 细胞的细胞核被氟标记(右); B82HTQ<sub>2</sub> 细胞的细胞质被乳胶微粒标记,细胞核内有一个核仁(左),

计杂交细胞集落数之前只小心地换一次培养基,因此可避免因摇动使某些杂交细胞从原来的集落中扩散出来而导致集落数不准确的危险。

尽管许多实验工作试图提高杂交细胞集落形成率,但至今所报道的资料表明,绝大多数杂交细胞由于未能完成在细胞融合后的第一次或以后的有丝分裂而相继死亡,只有极少数可生长形成集落。我们的结果(表2)表明,杂交细胞集落数显然与融合时溶液的 pH 值有关。当 pH 为 6.8 和 7.0 时,杂交细胞集落形成率分别比 pH7.9 和 pH5.4 组高 4 倍和 13 倍。可见,虽然在细胞融合后杂交细胞就在良好的培养环境里生长,但融合时溶液的 pH 值对杂交细胞以后的生长仍有相当深刻的影响,pH 在弱酸性或碱性都会降低杂交细胞集落的形成率。

关于细胞融合过程所引起的细胞损伤,国外曾有些报道<sup>[12,18,19]</sup>,但未涉及到这种损伤与融合时溶液 pH 值的关系。本文结果表明,由于细胞在胰酶消化后到细胞融合结束,需先后经过 4°C 和 37°C 的相当长时间(约 1 小时)的处理,这导致许多双亲细胞和融合细胞受到不同程度的损伤。融合时溶液 pH 为 5.4 或 7.9 时,这种细胞损伤相当严重;而 pH 为 6.8—7.0 时,这损伤可明显地减少。因此,我们认为,在细胞

融合过程中所引起的细胞损伤与融合时溶液 pH 值有着密切的关系。尽管 pH7.9 是异型核双核细胞百分比较高的理想 pH 值,但由于 pH7.9 会引起融合细胞较严重的损伤,所以杂交细胞集落形成率仍非常低。与此相反,溶液 pH6.8 和 7.0 对细胞的损伤小,因此可明显地提高杂交细胞集落形成率。

总之,融合系统 pH 值不仅对细胞的存活率,而且对杂交细胞的集落形成率都有明显的影响,对于不同的细胞组合,其最佳 pH 值可能会略有不同。因此,根据不同的细胞,选择其最佳 pH 值并严格控制融合系统 pH,能有效地提高杂交细胞集落的形成率,这也是成功地进行体细胞杂交和遗传物质转移的关键之一。

### 参 考 文 献

- [1] 郑瑞珍、王素敏、张玉廉: 1977. 动物学报, 23 (1): 4
- [2] Croce, C. et al.: 1972: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69: 1953.
- [3] Davidsion, R. L., et al.: 1970. *Exp. Cell Res.*, 61: 222.
- [4] Dornner, L. et al.: 1976. *Somatic Cell Genetics*, 2: 77.
- [5] Featherstone, M. S. et al.: 1981. *ibid.*, 7: 205.
- [6] Harris, H. et al: 1965. *Nature*, 205: 640.
- [7] Hitchcock, G.: 1971. *Exp. Cell Res.*, 67: 463.
- [8] Klebe, R. J. et al.: 1970. *J. Cell Biol.*, 45: 74.
- [9] Levine, M. R. et al.: 1978. *Somatic Cell Genetics*, 4: 507.
- [10] Littlefield, J. W.: 1964. *Science*, 145: 709.
- [11] ———: 1966. *Exp. Cell Res.*, 41: 190.
- [12] ———: 1977. *J. Cell Sci.*, 24: 217.
- [13] Lloyd, C. O. 1976. *Methods in Cell Biology XIV*: 11.
- [14] Post, G. et al.: 1976. *ibid.* XIV: 1.
- [15] Richard, L. et al.: 1976. *Somatic Cell Genetics*, 2: 165.
- [16] Ringertz, N. R. et al.: 1976. *Cell Hybrids*, New York/London, p. 147.
- [17] Rogers, A. W.: 1973. *Technique of Autoradiography*. 2nd ed. Amsterdam/New York/Oxford, p. 298.
- [18] Toister Z.: 1973. *J. Biol. Chem.*, 248: 422.
- [19] Ward, M. et al.: 1979. *Somatic Cell Genetics*, 5 (4): 529.