

## 激光诱导泥鳅卵细胞融合—— 一种新的细胞融合方法

张闻迪 赵 白 王 秋 葛国昌 李忠平 邹建华

(青岛海洋大学, 青岛)

本文提出了一种新的细胞融合方法——激光诱导细胞融合, 并以泥鳅受精卵为材料进行了细胞融合实验, 获得成功。激光融合的优点是无毒, 无损伤, 融合后成活率高。实验中融合的泥鳅卵大都能继续卵裂发育, 有的经卵裂、囊胚、原肠到器官形成, 直至幼体。

**关键词** 细胞融合; 激光; 卵细胞

人工诱导细胞融合的研究是60年代初首先由日本岡田善雄发现灭活的仙台病毒能使细胞融合开始的<sup>[1]</sup>。70年代 Kao 等使用聚乙二醇(PEG)、钙离子等化学诱导因子也能导致细胞融合, 从而提出了化学融合方法<sup>[2]</sup>。病毒的和化学的融合方法近年来取得了一些进展, 融合率由10%提高到30%<sup>[3,4]</sup>。主要的缺点是病毒引起感染和化学药品的毒性以及它们在融合过程中不可控的作用方式<sup>[5]</sup>。80年代初, 联邦德国的Zimmermann 发展了以高压脉冲电场诱导细胞融合的电融合技术, 在相当大程度上克服了上述方法的缺点, 使融合率提高到60%以上<sup>[6]</sup>。但用于动物生殖细胞时卵裂不能正常进行<sup>[7]</sup>。这可能是由于电融合时贯穿整个细胞的高压电脉冲造成细胞内含物损伤的缘故。

激光微束技术的发展, 特别是对单个活细胞进行亚细胞水平上的显微外科手术的成功<sup>[8]</sup>, 预示了微束激光作为细胞工程有力手段的优势。正是由于充分利用了微束激光的单色性、高功率密度、短脉宽和极小的作用范围等特点, 使得活细胞在进行亚细胞水平手术后仍可存活。微束激

光的这种显著特点使其有可能发展成为一种“无毒”的细胞融合方法。我们仔细地研究了这种可能性, 并对泥鳅受精卵进行了融合试验, 获得了成功。这种利用微束激光对两个离体细胞进行融合的方法, 还未有过报道。我们的实验结果说明, 激光可以诱导细胞融合, 融合后的细胞可以存活发育, 经卵裂期、囊胚期、原肠期、孵化期, 直至幼鱼。

### 实验装置

基本设备是激光微束系统。高峰值功率密度、短脉冲 YAG 激光器作为激光系统的基本光源。通过二倍频产生的 $0.53\mu\text{m}$ 激光以及由它泵浦染料产生的 $0.59\mu\text{m}$ 激光是我们用作融合的工作激光。另置一 He-Ne 激光作光学系统的调准和激光照射瞄准用。激光经显微镜聚焦对样品进行照射, 样品上产生光致效应的范围由显微镜物镜和激光能量来控制。实验样品既可通过显微镜观察, 又可同时由电视摄像监视

本文于1987年9月8日收到。

器观察和进行照相记录。

## 材 料 与 方 法

选用成熟泥鳅鱼, 经人工催情处理后挤出成熟鱼卵, 放入1/10 Holtfreter培养液中, 并进行人工授精。融合前除去卵膜, 方法是: 受精后约1—2min, 待卵膜举起时, 将卵放入浓度为2mg/ml的胰蛋白酶溶液中, 约5min后, 卵膜脱落成为裸卵。用Holtfreter液清洗3次, 待用。然后挑选大小基本相同的圆形卵, 将卵细心地排在特制的有机玻璃槽中, 槽的宽度和深度略大于卵的直径, 以使卵能单层紧密地在槽中排成一行。槽中盛有Holtfreter液。有机玻璃槽的厚度应使它置于载物台上时, 激光能方便地聚焦于其中的受精卵上。

将排好的卵置于显微镜下, 用He-Ne激光仔细瞄准两个紧贴在—起的裸卵接触处。开启工作激光, 在与卵排列相垂直的方向上进行照射。调整物镜和激光能量, 使照射到细胞质膜上的能量密度控制在仅能使质膜产生可恢复性微孔范围内, 以便使两个细胞的内含物通过激光照射部位进行混合从而达到融合的目的, 但又不致外溢。过大的能量密度将使质膜产生永久性

微孔, 造成细胞内含物外溢而死亡。对泥鳅受精卵实测结果, 能量密度以 $10\mu\text{J}/(\mu\text{m})^2$ 为宜。激光照射后在显微镜下仔细检查融合情况, 将融合的细胞置于Holtfreter液中培养, 观察记录其发育情况。

## 结 果

### (一) 融合率

“两个以上的细胞合并成为一个细胞或一个多核细胞称为融合细胞”(童第周, 1973)<sup>[8]</sup>。细胞融合的最基本特征是细胞相互之间的质膜消失, 细胞的内含物包括细胞核、细胞质及卵黄颗粒等相互混合。泥鳅鱼卵为端黄卵, 两个紧贴的卵经激光辐照处理后呈哑铃状。随着两个卵细胞胚盘的出现和分别在各自胚盘处卵裂, 哑铃状逐渐变化, 约经5h (24℃) 后变为椭球或圆球形。两个卵之间的质膜消失, 卵体积约为正常卵细胞的两倍, 两个卵明显地融合为一体(图1)。我们初步进行的三次实验中共照射120对卵, 发生融合的有37对。考虑到对照组卵裂率约为90%, 故融合率约为40%。如果进一步优选激光辐照参数, 严格控制实验材料的生理条件, 改进排卵, 取卵条件, 融合率还可进

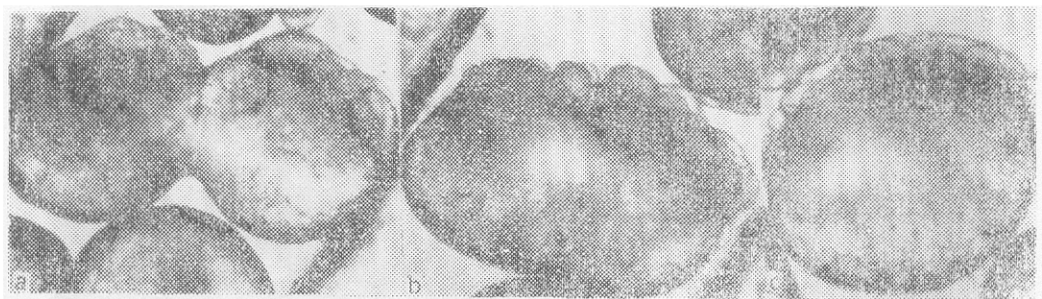


图1 融合过程

Fig. 1 Fusing process( $\times 40$ )

a—c: 激光照射后由哑铃状变为球状(5h)过程

a—c the eggs appeared as a dumbbell to spheroid 5h after irradiation

一步提高。

(二) 融合细胞的发育

融合细胞大都能继续卵裂发育。其早期发育的时序与对照组一致，有的稍慢。但也有的融合后，细胞呈球形，无明显卵裂，存活48h最后解体死亡。

融合细胞进一步发育的表观形态多种多样。根据初步观察，融合细胞的发育与两个细胞胚盘形成的相对位置关系很大。

基本上可以分为两类：

第一类：两个胚盘相距较远，卵裂过程中胚盘部分不能连成一体（图2）。这类胚胎发育受阻，较多的是到囊胚期即停止发育。少数继续发育的，可以发育为两个原肠胚，甚至幼体（图3），也有在两个胚盘分别卵裂至某一阶段后，其中一个胚盘停止发育，另一个继续发育经囊胚期原肠期，以至器官形成，并可看到体节。



图 2 融合卵两个胚盘的不同排列情况  
Fig. 2 The various arrangements of two blastodisc in fused egg ( $\times 40$ )

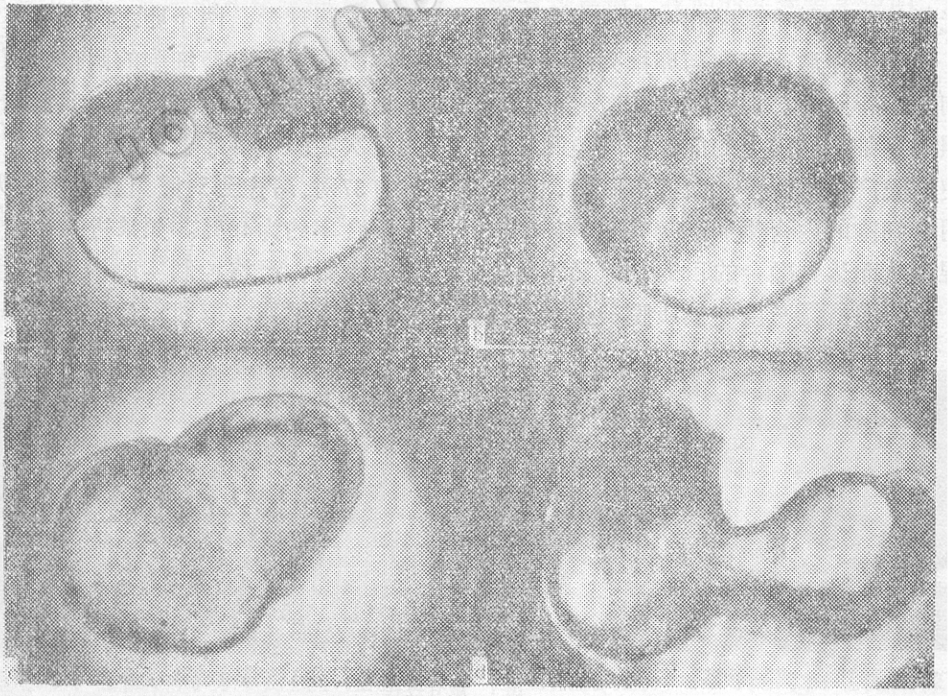


图 3 融合卵两个胚盘分别独立发育的过程  
Fig. 3 Two blastodiscs separately developmental process ( $\times 40$ )  
a, 囊胚期 Blastula b, 原肠期 Gastrula c, 肌节期 Myocel d, 幼体 Larva

第二类：两个胚盘并列在一起，相距较近(图4a)。这类细胞开始时各自分别进行卵裂，但随着分裂球逐渐增多，分裂球相遇连成一体形成一个大的单一胚胎，它们能发育为一个大的囊胚、原肠；有的可发育至幼体。图4所示的一例，清楚地表明了由融合经卵裂，囊胚，原肠至幼体的全过程。

在幼体期可见肌节的收缩运动，心脏跳动，听囊，耳石，色素细胞等。

以上两类情况中，融合卵达到不同发育期的胚胎数如表1所示。

我们在探索辐照条件时，曾对融合槽中排成一串的泥鳅受精卵的每一接触处都进行激光照射，结果还得到两例4个受精卵融合为一个球形胚胎，其体积为正常卵

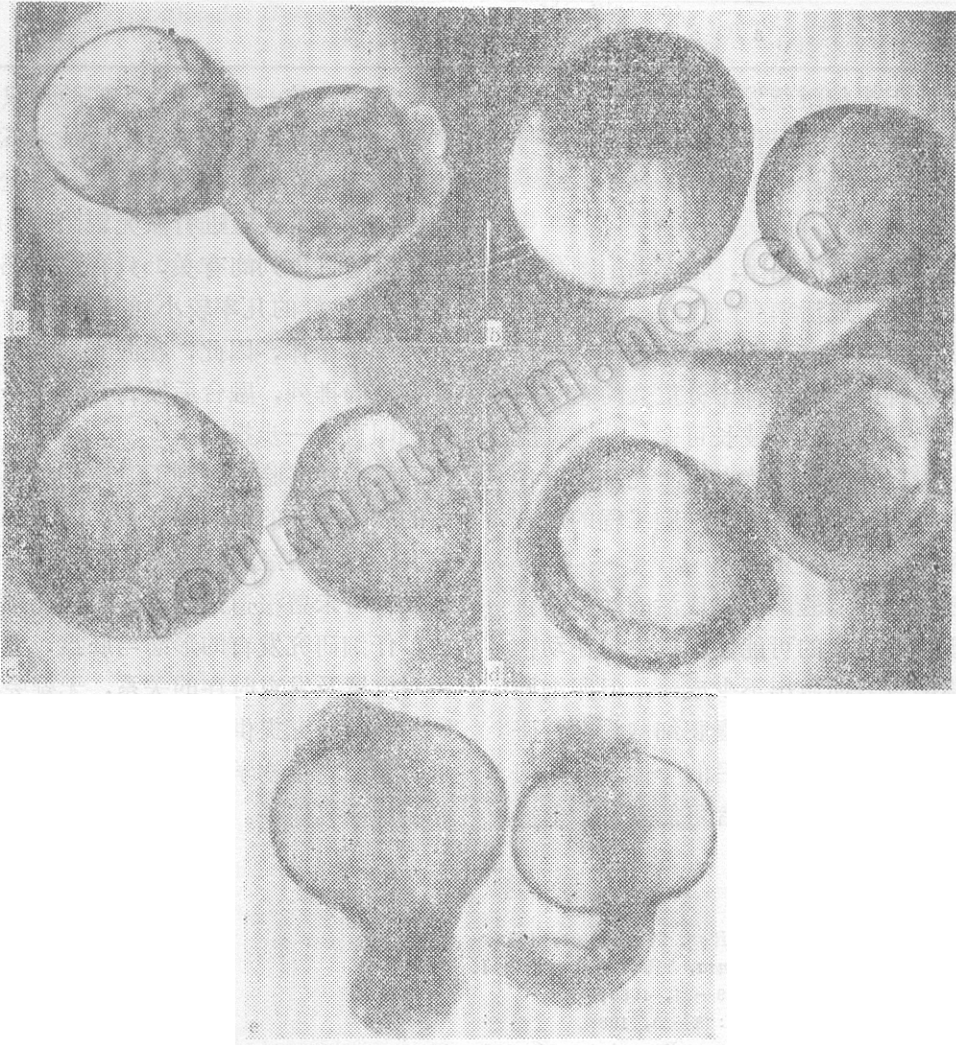


图4 融合后形成一个大胚胎的发育过程

Fig.4 The process of two blastodiscs developed to form single embryos (×40)

- a. 哑铃状融合卵 Dumbbells shape
- b. 发育为一个大囊胚(左) Developed to form one large blastula(left), 对照(右) Normal (right)
- c. 原肠期(左) Gastrula (left), 对照(右) Normal (right)
- d. 肌节期(左) Myocoel(left), 对照(右) Normal(right)
- e. 幼体(左) Newly-hatched larva(left), 对照(右) Normal(right)

表1 泥鳅受精卵融合后胚胎发育的统计

Table 1. Number of Loach embryos developing to various stages

类别 Type	各发育阶段的胚胎数 Number of embryos					幼体 Larva
	卵裂 Cleavage	囊 胚 Blastula		原 肠 Gastrula		
		单 Single	双 Double	单 Single	双 Double	
第一类 Type 1	27	9		5		1
			4	1	3	1
第二类 Type 2	8	5		3		2

的4倍,但未能继续发育下去。

## 讨 论

与已有的方法相比,激光细胞融合法具有毒性小、成活率高的优点。这对于融合方法本身的研究及新品种培育,特别是动物新品种的培育都有十分重大的意义。另外,激光微束具有波长可变,脉冲宽度窄,照射区域微小等特点。激光细胞融合可望发展为实用和有效的细胞工程的新技术,和定向融合技术。

我们初步实验即获得成活的幼体,首先展现出卵融合的可能性。过去虽在动物体细胞融合方面做出不少成绩,但卵细胞与体细胞的融合或鱼类囊胚细胞的融合研究却一直未能得到融合后的个体。我们的实验表明,激光细胞融合可能发展为创造

动物新品种的一种方法。本实验虽只有几例发育为幼体,这除了与实验技术不够熟练,培养条件掌握欠佳有关外,更重要的原因估计与本实验进行激光辐照时,细胞方位是随机排列的有关,只有那些胚盘比较靠近(这样的几率较小)的融合卵才能发育为单个个体,因此,在激光融合前若能使卵定向排列,融合后发育为单个个体的比例即可进一步提高。

我们在实验中得到了泥鳅受精卵融合后的多种多样的卵裂和发育。这些形态的发展过程是用经典发育生物学方法研究细胞发育时未曾报道过的。利用激光融合方法,仔细研究发育的形态与胚盘,卵黄的相对位置及发育时序的关系,无疑会给核质关系的研究提供大量新的事例和实验资料,为发育生物学、细胞生物学的研究开辟新的研究途径。

## 参 考 文 献

- [1] Okada, Y.: *Exp. Cell Res.* 26:98—107, 1962.
- [2] Kao, K.N. et al.: *Planta*, 115:355—367, 1974.
- [3] 阎康等: 遗传, 6(6):19—21, 1980.
- [4] 郑瑞珍等: 遗传, 8(3):28—30, 1986.
- [5] Honda, K. et al.: *Polym. Preprints*, 29:1385, 1980.
- [6] Zimmermann, U. et al.: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7:553—574, 1980.
- [7] Richer, H.P. et al.: *Develop. Growth Differ.*, 23:479—486, 1981.
- [8] Bern, M. W.: *Science*, 213:505—513, 1981.
- [9] 童第周: 动物学报, 19(1):76—91, 1973.

## LASER INDUCING CELL FUSION OF FERTILIZED LOACH EGGS——A STUDY OF NEW METHOD OF CELL FUSION

Zhang Wendi    Zhao Bai    Wang Qu  
Ge Guochang    Li Zhongping    Zou Jianhua  
(Qingdao University of Oceanography, Qingdao)

A new method is presented to fuse cell with laser microbeam and first applied to fuse fertilized Loach eggs successfully. The outstanding advantages over existing methods are nondamage and high viability rate. In our experiments most of the fused eggs have cleaved and developed. A few of them have even developed to newly-hatched larvae.

### Key words

Cell fusion; laser; egg