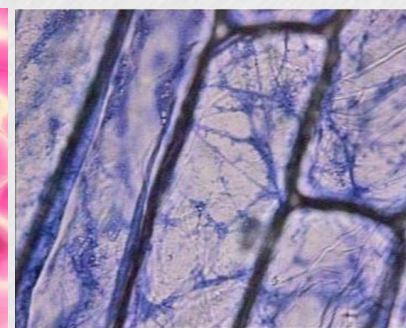
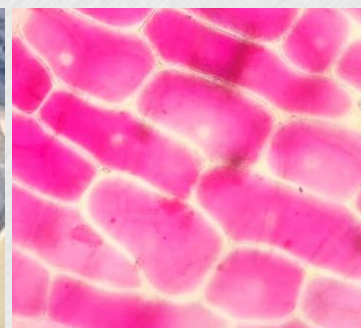
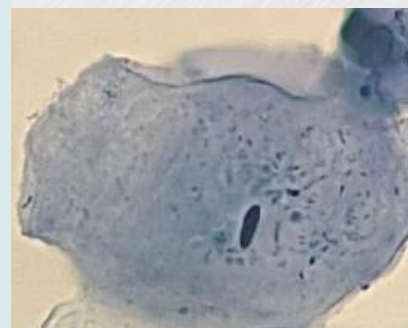


# 回顾

1. 显微镜的“专业”操作。
2. 标准的生物科研绘图。
3. 暗视野下神奇的世界。
4. 实验设计：单盲、双盲、阳性对照、阴性对照。
5. 误差的产生、组内重复、组间差异和组内差异。
6. 染色：
  - ①詹纳斯绿B染色
  - ②中性红染色
  - ③考马斯亮蓝染色









## 传统技艺：嫁接

“葫芦秧上结西瓜”、“南瓜秧上结西瓜”、葡萄柚、柠檬、橙子、苹果梨、菠萝莓等等。









## “一次性解决薯条和番茄酱的问题”

(1) 1978年，德国科学家Georg Melchers等人，就利用番茄和土豆的细胞进行了细胞融合的实验，最终获得了4株被鉴定为是土豆-番茄杂合的植株。

(2) 英国人保罗·汉索经过15年反复试验，终于成功培育出一种“一藤双生”植物——番土豆（TomTato）。

(3) 生产番土豆的Thompson-Morgan公司网上对番土豆的定价是15英镑一棵，可以买二送一。一株价值10英镑的番土豆，能否生产出价值超过10英镑的番茄和土豆。





1983年，英国著名科学杂志《新科学家》：


德国汉堡大学两位科学家将番茄和牛的细胞融合，研制成功了一个“**动植物杂交的新品种**”——“**牛番茄**”

“表面好似牛皮，里面含有大量的维生素C，并且蛋白质比普通西红柿高数十倍。”



吃货们在兴奋之余却忽略了一点——报道刊发的日子是四月一日。  
这只是一个愚人节玩笑而已。



A decorative background featuring a large, stylized blue flower on the left side and several smaller, light blue leaves scattered on the right side. The text is centered in a dark blue, bold font.

# 实验五 植物原生质体 的分离与诱导融合



# 预习问题

- 什么叫细胞融合？
- 如何获得植物（动物）的单个细胞？
- 植物细胞细胞壁成分，如何去除植物细胞壁？
- 细胞（原生质体）可以彼此融合，缘于细胞膜的哪种特质？
- 细胞融合的基本方法？（拓展学习原理）。
- 如果使用细胞A与细胞B融合，实验结果中会获得多少种融合细胞。



# 一. 实验目的

- (1) 掌握获得植物单细胞的**两种基本方法**；
- (2) 学会**酶解法**制备植物原生质体；
- (3) 组内协作完成**PEG诱导**的植物原生质体诱导融合；
- (4) 文献调研了解细胞融合技术的**前沿应用进展**；



## 二. 实验原理

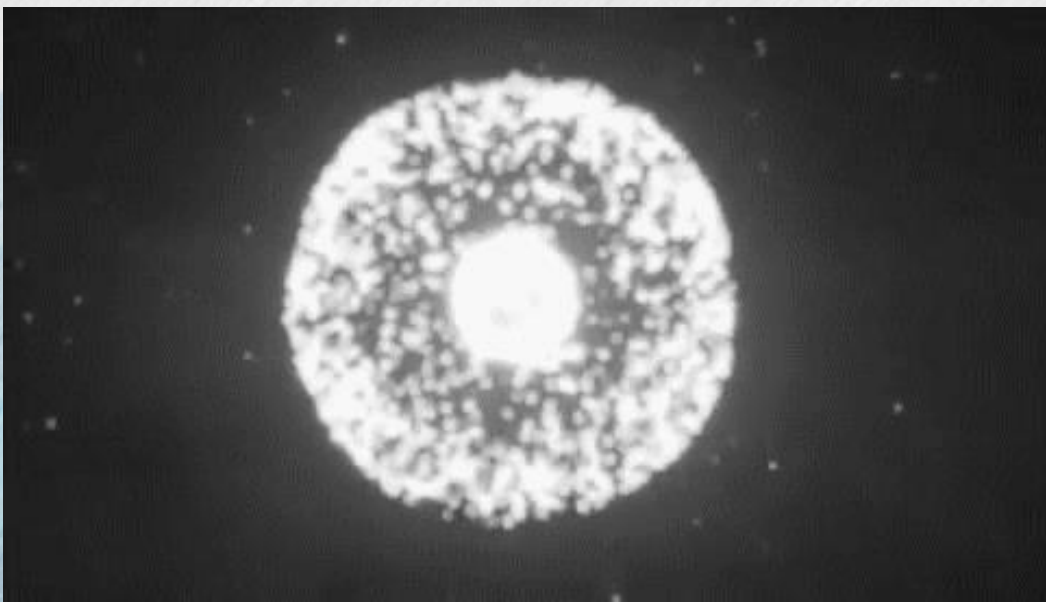
### 1. 细胞融合 (cell fusion)

在**诱导剂**的作用下，两个或两个以上的**同源或异源**的细胞相互接触，从而发生**膜融合、胞质融合、核融合并有丝分裂**，形成**杂种细胞**的现象。

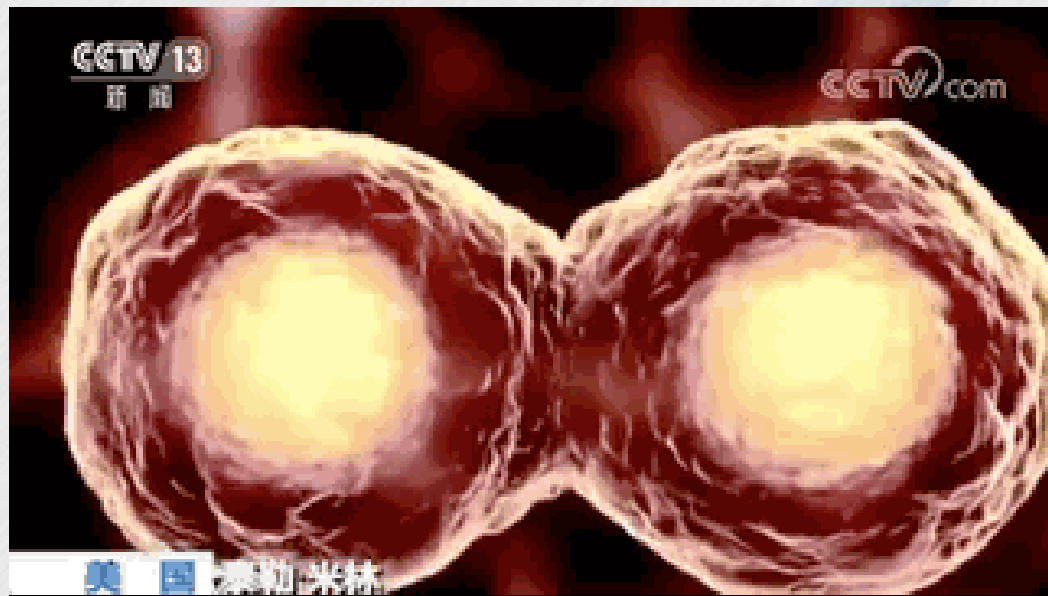
- ① 细胞工程学的重要研究内容；
- ② 无菌操作下开展的实验；
- ③ 活的、完整的过程；

今天，我们只是模拟一部分实验：胞质融合





看了好多细胞分裂



看看细胞融合

自发细胞融合 (spontaneous cell fusion)  
诱导细胞融合 (induced cell fusion)



细胞融合+细胞分裂

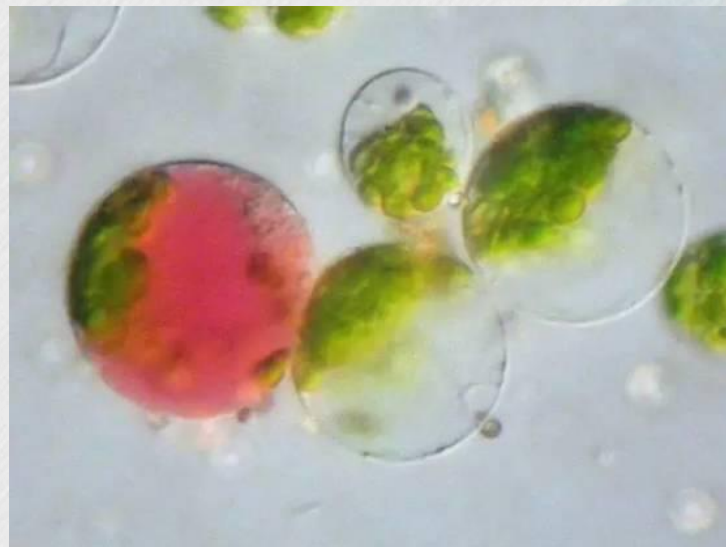


# 成功的案例

苔 蓝 & 青 菜  
大 豆 & 马唐草  
矮牵牛 & 龙面花  
大 麦 & 花 生  
大 麦 & 大 豆  
小 麦 & 矮牵牛  
油 菜 & 大 豆  
玉 米 & 大 豆  
大 豆 & 野豌豆  
大 麦 & 蚕 豆  
大 豆 & 香木犀  
大 豆 & 烟 草  
大 豆 & 秋水仙  
番 茄 & 马铃薯

鸡 & 酵母菌  
人 & 胡萝卜  
原生质体 & 血红细胞  
腹水癌细胞 & 原生质体  
人纤维肉瘤细胞 & 鼠畸胎瘤细胞

只有想不到，没有做不到 的跨界



一个含有叶绿体的叶肉细胞和  
一个含有红色液泡的花瓣细胞  
融合而来

图片：Wikimedia Commons



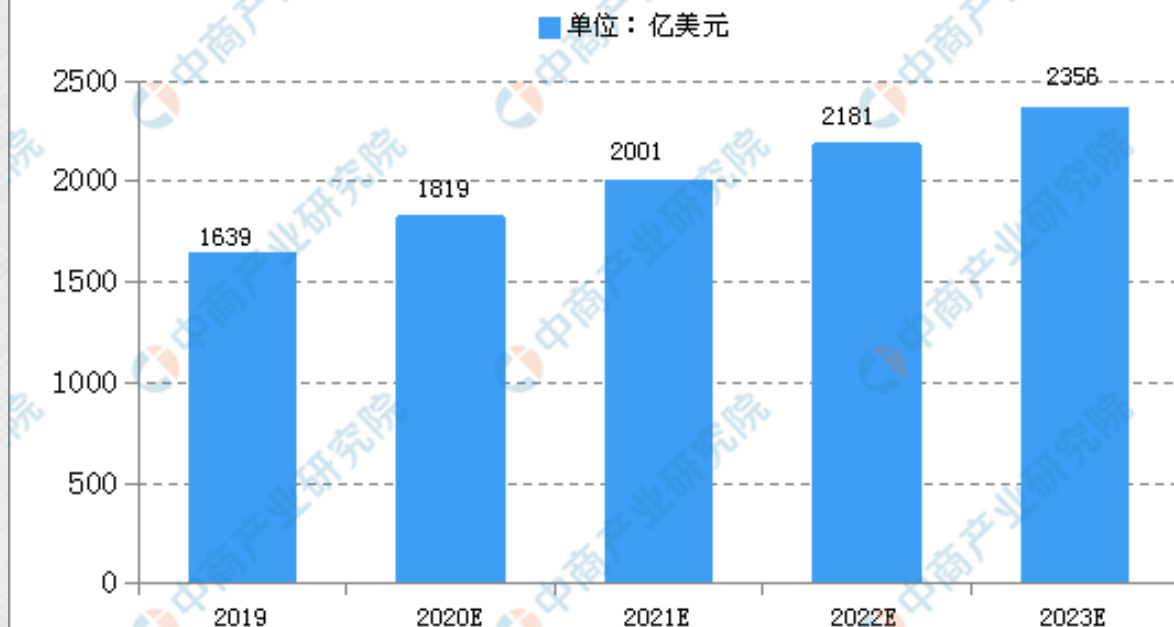
## 经典应用：

- ① 单克隆抗体药物
- ② 疫苗
- ③ 靶向治疗等等

细胞工程里价值不菲的一项技术！

序号	中文名称/英文名称	国内获批适应症	抗体种类	靶分子	企业	国内获批时间
1	利妥昔单抗 Rituximab	非霍奇金淋巴瘤	嵌合抗体	CD20	基因泰克	2000年
2	曲妥珠单抗 Trastuzumab	HER2 阳性早期乳腺癌，转移性乳腺癌、HER2阳性的转移性胃腺癌或胃食管交界腺癌	人源化抗体	HER2	基因泰克	2002年
3	西妥昔单抗 Cetuximab	转移性结直肠癌	嵌合抗体	EGFR	ImClone公司	2006年
4	贝伐珠单抗 Bevacizumab	转移性结直肠癌、非小细胞肺癌	人源化抗体	VEGFR	基因泰克	2010年
5	帕博利珠单抗 Pembrolizumab	黑色素瘤	人源化抗体	PD-1	默沙东	2018年
6	纳武利尤单抗 Nivolumab	非小细胞肺癌	全人源抗体	PD-1	百时美施贵宝	2018年
7	碘[131I]美妥昔单抗 Iodine[131I]Metuximab	不能手术切除或术后复发的原发性肝癌	人源化抗体	HA18G	成都华神生物	2006年
8	尼妥珠单抗 Nimotuzumab	鼻咽癌	人源化抗体	EGFR	百泰生物药业	2008年

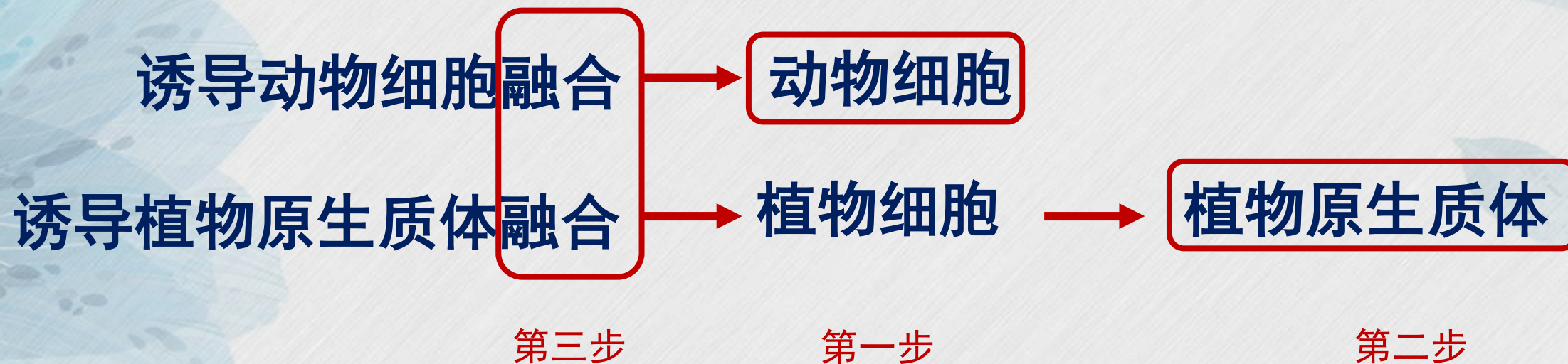
2019-2023年全球单克隆抗体市场规模情况及预测



制图：中商情报网(www.askci.com)



## 我们的实验目的：





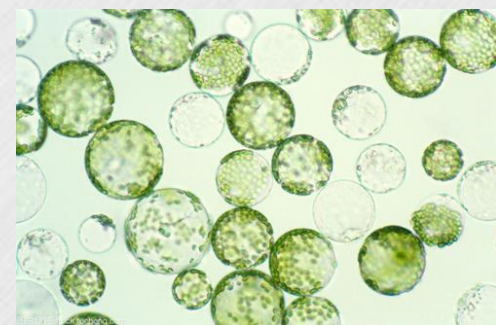
# 第一步：单细胞（原生质体）的获得



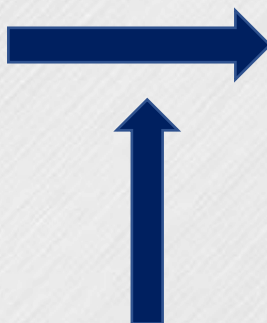
剪碎  
研磨



(1) 物理的方法：机械法-力  
缺点：伤害性强，获得率低



原生质体



(2) 化学方法：酶解法“溶解掉”  
细胞与细胞之间的连接和细胞壁。

组合酶：果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶一步法，直接获得原生质体；

优点：获得率高；

缺点：混入了相关酶类。



物理方法：🔪 切开，使劲挣脱  
化学方法：有机溶剂溶解

这时候两根手指已经被粘住了



# 以此类推获得动物细胞



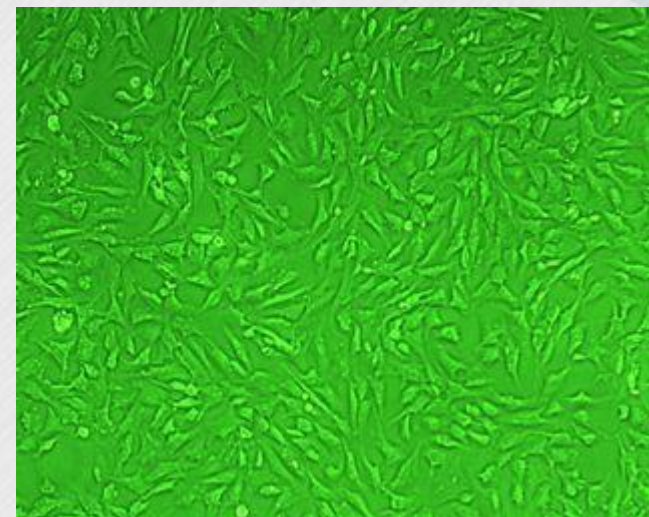
动物新鲜组织

剪碎  
→

机械法



酶解  
→

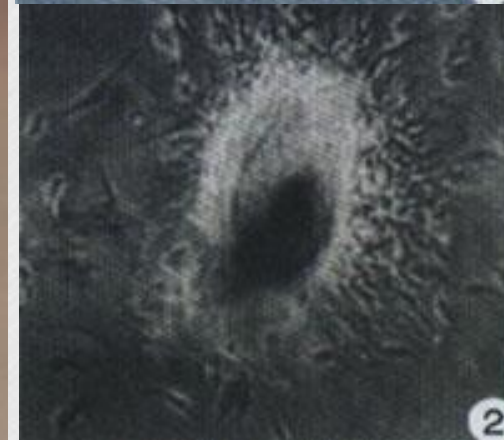
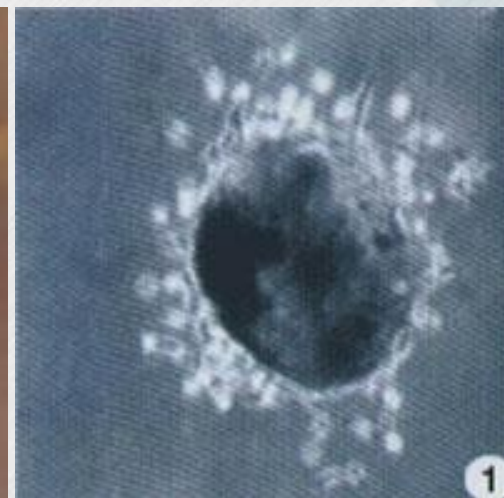


酶解法：采用什么酶呢？

动物细胞与动物细胞之间：多为胶原和蛋白，所以采用**胶原酶**和**胰蛋白酶**分解动物组织块，获得动物细胞。



拓展：伤口部位的新细胞从哪里来的？



生物的方法：组织块法



## 拓展概念：原代培养与传代培养

- 原代培养是指由体内取出组织或细胞进行的首次培养，也叫初代培养。
- 原代培养离体时间短，遗传性状和体内细胞相似，适于做细胞形态、功能和分化等研究。
- 较为严格地，成功**传代之前的培养**，此时的细胞保持原有细胞的基本性质，如果是正常细胞，仍然保留二倍体数。但实际上，通常把第一代至第十代以内的培养细胞统称为原代细胞培养。



## 第二步 人工诱导细胞融合

- 病毒诱导（灭活的仙台病毒）
- 聚乙二醇诱导(PEG)：最广谱
- 电融合诱导：最干净

原理：细胞（原生质体）能够融合缘于细胞膜的流动性！

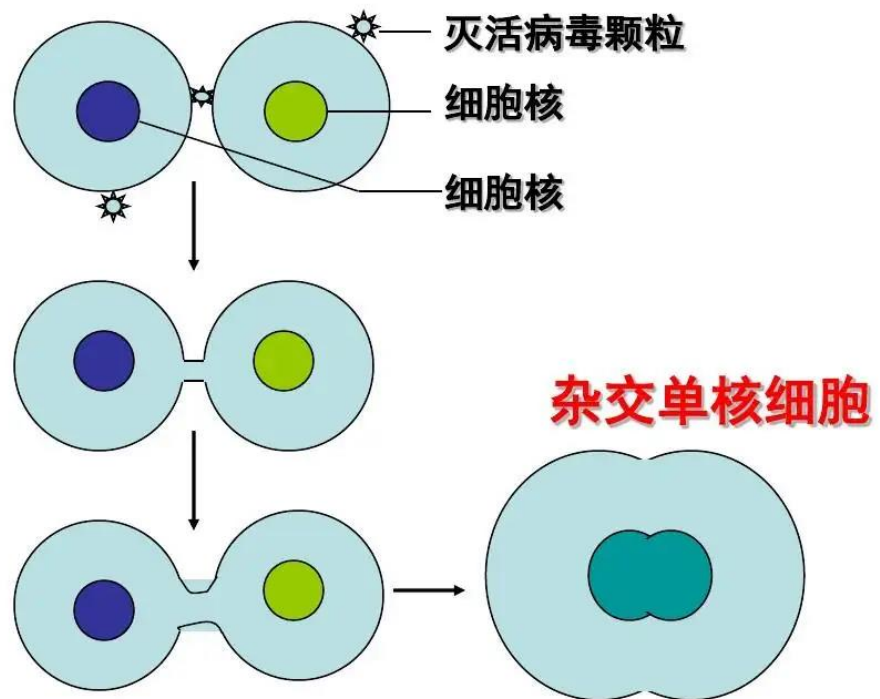
如何理解流动性：



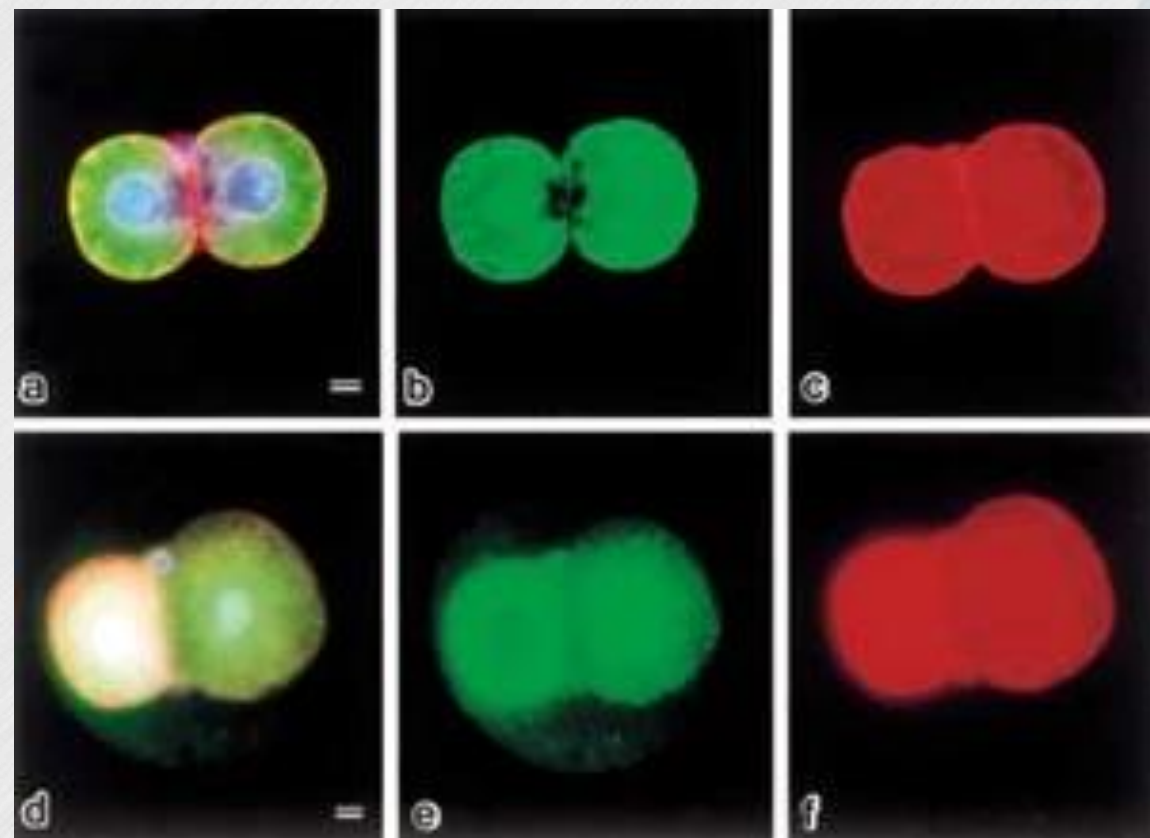
貌似密不透风，实质具有很强的可塑性。



## 用灭活的病毒诱导动物细胞融合过程：



请观赏电融合视频





## 三、实验材料及试剂

1. 实验材料： 芥蓝或菠菜（1片叶即可）

2. 实验器械：

低速离心机、显微镜、恒温水浴锅、500目铜网、离心管、小烧杯、剪刀

3. 实验试剂：

13% W/V甘露醇、酶液（果胶酶、纤维素酶与甘露醇混合液）、聚乙二醇（PEG）



## 四、实验步骤

### A. 酶解法获得植物原生质体：

1. 将撕去表皮的植物叶片**剪碎**，**室温**酶解0.5h。
2. 用500目铜网**缓慢**过滤，除去残渣。
3. 1000rpm, 离心5min, 滴管弃上清液。
4. 加入**4ml**甘露醇洗液，**吹打**均匀后，相同条件下再离心一次，弃上清。

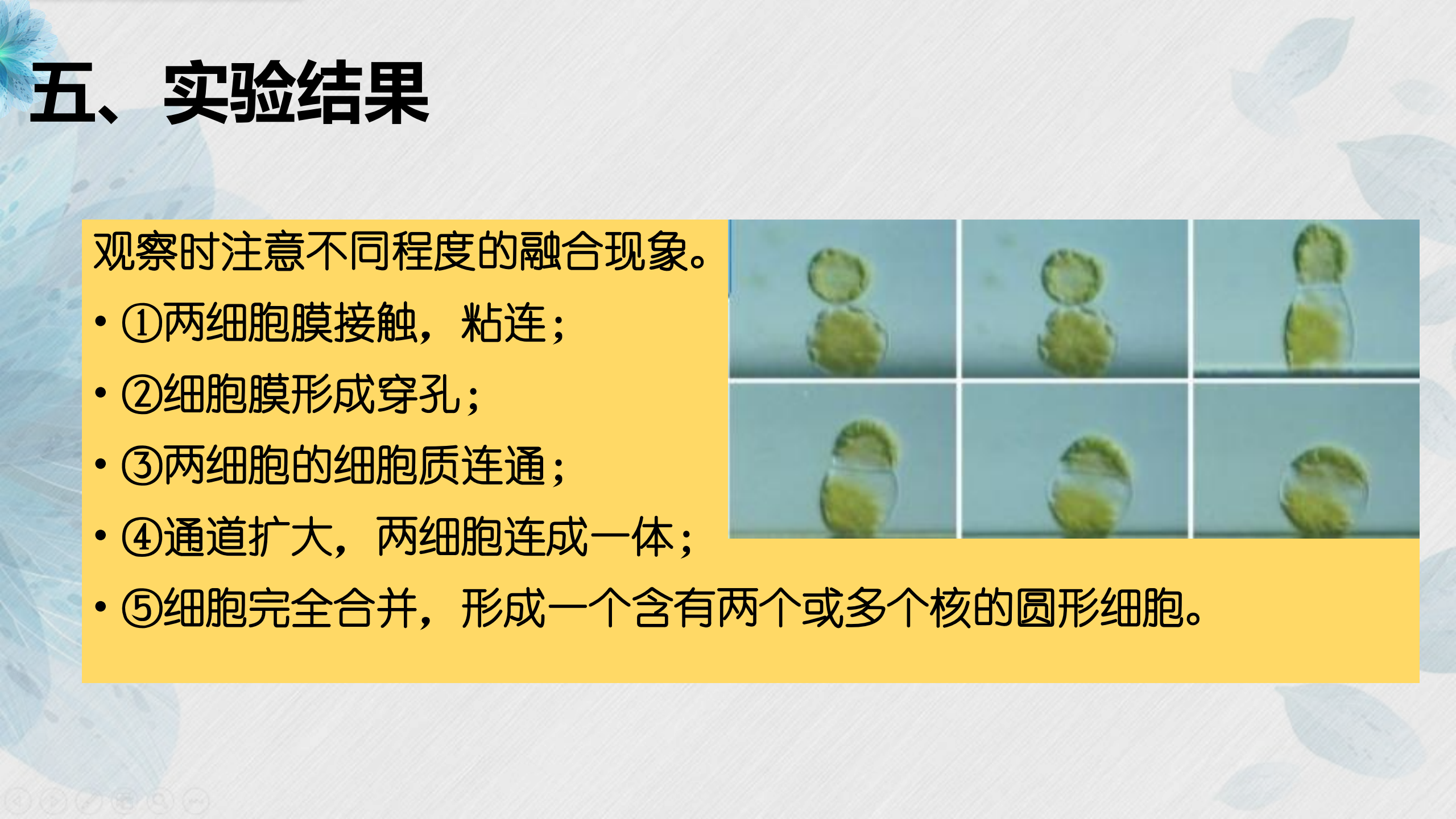




## B 诱导植物原生质体融合

1. 原生质体与PEG溶液2：1体积比混匀；
2. 37℃水浴避光温浴10min，**不要吹打晃动**；
3. 融合液一滴于载玻片上，轻轻盖上盖玻片，显微镜观察。
4. 隔2min，在盖玻片一端缓慢滴加甘露醇清洗液，另一端用吸水纸吸取液体，观察融合过程(可不做)。

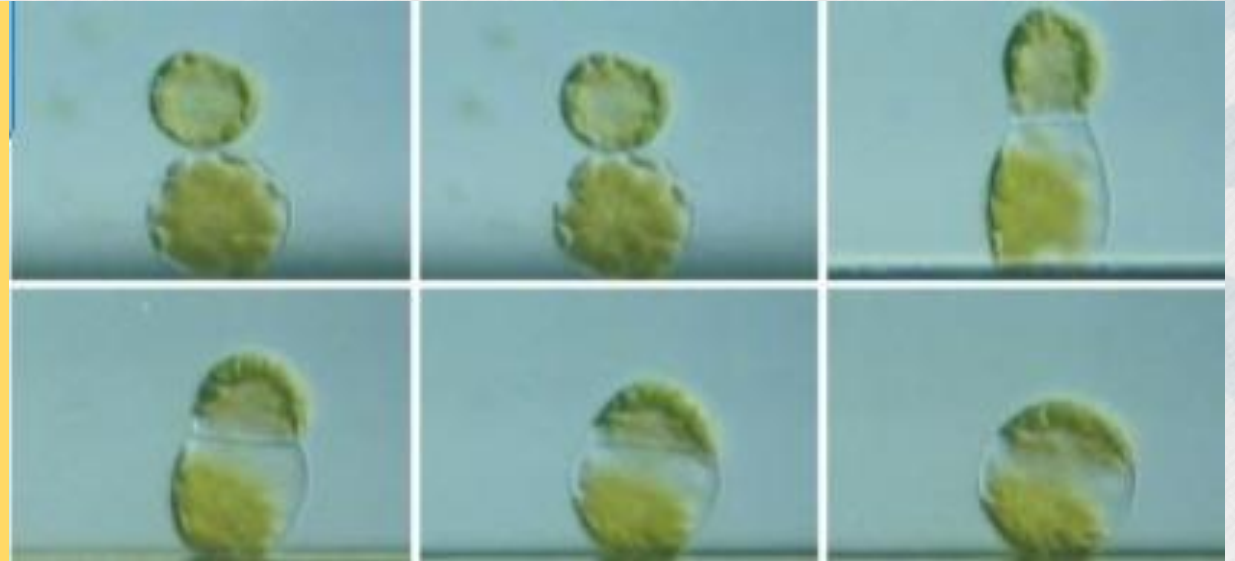




# 五、实验结果

观察时注意不同程度的融合现象。

- ①两细胞膜接触，粘连；
- ②细胞膜形成穿孔；
- ③两细胞的细胞质连通；
- ④通道扩大，两细胞连成一体；
- ⑤细胞完全合并，形成一个含有两个或多个核的圆形细胞。





绘图:你所观察到的植物细胞的融合状态, 讨论并分析实验结果。



## 六、注意事项

- 离心前，**离心管要配平，勿用水；**
- 离心后，**彻底弃去上清液时，要用吸管吸取，不要将下层沉淀物吸出；**
- 观察时，**盖玻片，不能干片，切记！**
- **试验结束，滴管等玻璃器皿、铜网及小烧杯清洗干净！**



视频声音不是很好，请认真看字幕

边播边录

小窗口

设置

 **南京大学**  
NANJING UNIVERSITY

 中国大学MOOC

推荐课程

20小时

精通

《高数·上》



高分必备-20小时精通高数上

猴博士

27333人参加

2小时

讲完

《高数·上》



高数不挂科-2小时学完高等数学/微积分·上

猴博士

110069人参加







# 思维导图

