

# 简明神经生物学

## 实验技术手册

---

主编 李云庆 吕国蔚



人民卫生出版社

# 简明神经生物学

## 实验技术手册

---

主 编 李云庆 吕国蔚

编 者 (以姓氏笔画为序)

冯宇鹏 吕国蔚

李云庆 张 勇

人民卫生出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

简明神经生物学实验技术手册/李云庆,吕国蔚主编. —北京:人民卫生出版社,2017

ISBN 978-7-117-24249-3

I. ①简… II. ①李…②吕… III. ①人体生理学-神经生物学-实验-技术手册 IV. ①R338-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 055127 号

人卫智网	<a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a>	医学教育、学术、考试、健康, 购书智慧智能综合服务平台
人卫官网	<a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>	人卫官方资讯发布平台

版权所有,侵权必究!

## 简明神经生物学实验技术手册

主 编:李云庆 吕国蔚

出版发行:人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址:北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编:100021

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线:010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷:北京铭成印刷有限公司

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/32 印张:4 插页:2

字 数:86 千字

版 次:2017 年 5 月第 1 版 2017 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 978-7-117-24249-3/R·24250

定 价:25.00 元

打击盗版举报电话:010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

# 前 言

我国有一句古语总结得很好：“工欲善其事，必先利其器”。此处的“器”是指工具和方法，意思是强调工具和方法的重要性，磨刀不误砍柴工。纵观人类社会的科学发展历史，每当一种新方法和（或）设备诞生的时候，也就是该方法和（或）设备所服务学科蓬勃发展的大好时机，方法和设备的创新，是科学进步的主要推动力之一。对于神经生物学研究来说，方法的重要性也是如此。

神经生物学是近年来发展最快的生命科学领域之一。它的任务是揭示神经系统结构和工作的奥秘。20世纪以来，人们开始从各个不同的水平对神经系统进行综合探索，寻找答案。但由于揭示脑的奥秘研究的复杂性，对其研究的方法不断地提出了更高的要求，新方法也如雨后春笋般地层出不穷。熟练掌握该学科的研究方法和操作，对实验室人员和初学者来说就成了基本要求，但目前尚缺乏一册易于携带、益于学习、适于寻找、利于操作和便于掌控神经生物学研究方法的袖珍宝典。

为了满足上述需要，本书作者用简洁的文字、公式和图表，言简意赅地将生物学领域常用研究方法的原理、应用、步骤、配方、结果分析等内容编写成为袖珍使用手册。本手册的内容按照研究领域分成六个部分，分别简要介绍神经生理学、神经化学、神经组织免疫细胞化学、神经形态学、分子神经生物学和神经行为学实验方法。正是由于具备了这些

特点，本手册既可供初学者学习和指导其实际操作，也可供高级技术人员参考，尤其是对那些没有神经生物学实验条件或不能全面开展实验教学单位的学生来说，通过阅读本手册的内容，便可基本了解实验过程、见到类似的实验结果、弥补教学内容和环节上的缺陷，对其学习神经生物学知识将大有裨益。

本手册中所列入的内容，均是作者们长期从事科研工作的结晶，而不是沿用他人已有的成果或著作，这更是本手册的鲜明特色。尽管如此，囿于作者的知识、水平，本手册的编写肯定存在错误和不足，恳请各位专家、同道、使用者和读者批评指正，以便使其不断完善，为促进我国神经生物学研究的发展、普及脑的知识、增强全民素质和健康水平做出贡献。

编 者

2017年1月

# 目 录

一、神经生理学实验 .....	1
(一) 复合动作电位记录 .....	1
(二) 体感诱发电位记录 (大脑皮质) .....	2
(三) 在体神经元动作电位的细胞内记录 (脊神经节) .....	5
(四) 细胞外记录——丘脑腹后外侧核的电活动 .....	8
(五) 全细胞记录——缺氧预适应脑提取液对 ATP 敏感性钾电流的作用 .....	10
(六) 光遗传学实验——利用光遗传学技术调控小鼠大脑皮层桶状区 S1BF 神经元的兴奋变化 .....	16
(七) fMRI 实验——前爪刺激引起大鼠大脑皮层血氧水平依赖的改变 .....	20
二、神经化学实验 .....	25
(一) 微透析法——脑内腺苷的测定 .....	25
(二) 突触体——缺氧对大脑皮质突触体乳酸脱氢酶透出率的影响 .....	26
三、神经组织免疫细胞化学实验 .....	30
(一) 免疫细胞化学染色法——面口部注射甲醛溶液后大鼠延髓背角内的 FOS 样阳性神经元观察 .....	30

(二) 免疫细胞化学双标染色法——大鼠中缝核簇内 5-羟色胺样阳性神经元表达 FOS 蛋白 .....	33
(三) 免疫荧光细胞化学双重标记染色法——大鼠三叉 神经节内阿片 $\mu$ 受体与降钙素基因相关肽共存的 阳性神经元 .....	37
(四) 放射性核素标记的原位杂交组织化学法—— 大鼠三叉神经节内钙结合素 mRNA 阳性 神经元的分布 .....	41
(五) 包埋前免疫电镜双标记法——大鼠延髓背角内 $\gamma$ -氨基丁酸能神经元与 P 物质能纤维终末的 突触联系 .....	47
(六) 包埋前与包埋后免疫电镜双标记法——大鼠孤 束核内 $\gamma$ -氨基丁酸能纤维终末与 P 物质受体样 阳性神经元的突触联系 .....	52
<b>四、神经形态学实验 .....</b>	<b>58</b>
(一) 辣根过氧化物酶逆行示踪法——大鼠脊髓灰质向 孤束核的投射 .....	58
(二) 荧光金逆行追踪——延髓背角内 P 物质受体样 阳性神经元向丘脑胶状质核投射 .....	60
(三) 植物凝集素 (PHA-L) 顺行示踪法——大鼠三叉 神经脊束核吻侧亚核向三叉神经运动核的投射 .....	65
(四) 生物素葡聚糖胺顺行示踪法——延髓背角浅层向 臂旁外侧核及丘脑腹后内侧核的投射 .....	71
<b>五、分子神经生物学实验 .....</b>	<b>76</b>
(一) 总 RNA 的提取及 cDNA 的制备 (三叉神 经节) .....	76

---

(二) PCR 检测 mRNA 的含量 (5-HT <sub>3</sub> 受体) .....	79
(三) 重组质粒 DNA (pGEM-ChAT) 的制备及限制性酶 切分析 .....	84
(四) 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 .....	90
(五) Western 印迹法检测乙酰胆碱转移酶 .....	95
<b>六、神经行为学实验 .....</b>	<b>100</b>
(一) 甲醛溶液致炎大鼠疼痛行为的观察 .....	100
(二) 大鼠脊髓横断及半横断模型的复制 .....	101
(三) 慢性束缚应激对大鼠空间学习记忆能力的影响 ...	104
(四) 创伤后应激障碍模型大鼠的自发活动和焦虑 水平检测 .....	113
(五) 急性缺氧预适应对小鼠缺氧耐受性的影响 .....	116



---

# 一、神经生理学实验

---

## (一) 复合动作电位记录

1. 原理 神经干由许多直径不同、兴奋性不同和传导速度不同的神经纤维组成。对神经干施加最大刺激而使神经干中全部神经纤维兴奋时，可用粗电极记录到由不同纤维的动作电位共同组成的复合动作电位。当刺激电极与记录电极之间的距离足够大时，可以分辨出一系列在时间上先后不同的波峰。

### 2. 目的

- (1) 辨认刺激伪迹与生物信号。
- (2) 识别与区分复合动作电位波形。
- (3) 记录与测量复合动作电位参数。

### 3. 步骤

(1) 麻醉：选择健康成年大鼠，4% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 麻醉，待动物麻醉后固定。

(2) 手术：按常规手术方法进行颈部手术，暴露出气管，行气管插管，必要时进行人工呼吸。然后分离一侧腓神经、坐骨神经，分别安放刺激电极和记录电极。

#### (3) 调整仪器

1) 刺激器：延迟 1 ms；波宽 0.3 ~ 0.5 ms；频率 2 ~ 5 Hz；强度根据需要调节。

2) 诱发反应记录仪：灵敏度 100 ~ 200  $\mu\text{V}/\text{cm}$ ；高频衰减 1 kHz；低频衰减 2 Hz；扫描速度 20 ms/cm；叠加次

数 32；实验中可随时根据情况进行调整。

### (4) 实验观察

1) 记录复合动作电位：由弱渐强调节刺激强度，观察复合动作电位各波的变化。在最大刺激强度下，记录复合动作电位波形。

“刺激强度”一般包括两种含义：一是刺激参数（绝对强度尺度）本身；二是用生物学指标指示的刺激效应（相对强度尺度或生物标准）。在电生理实验中，我们常用生物标准来表示刺激强度，即用刺激所引起的生物效应作为刺激强度的相对尺度，通常将引起刚可发现的（电）生理反应定为 1 T，用以表示相对的生物阈值。更强的强度即以 1 T 的倍数表示。如果把外周神经干中的 A 类纤维动作电位 A 波中的  $A\alpha$  波的出现定为 1 T，调节刺激强度，可以记录并计算  $A\beta$ 、 $A\gamma$  和 C 波的 T 值。

### 2) 测量复合动作电位中各波的参数

a. 潜伏期：首先分辨清楚刺激伪迹与动作电位波形，然后根据示波器的时间基线计算出从刺激伪迹到该波起始点之间的时间，即为潜伏期。亦可计算出从刺激伪迹到该波峰顶之间的时间，称峰-峰潜伏期。

b. 振幅：自该波起始点到最高顶点之间的幅度，即振幅。

c. 持续期：根据示波器上的时间基线，计算出从该波起始点至终止点之间的时间，即持续期。

### 4. 结果示例 见图 1。

## (二) 体感诱发电位记录（大脑皮质）

1. 原理 凡是外加一种特定的刺激作用于感觉系统

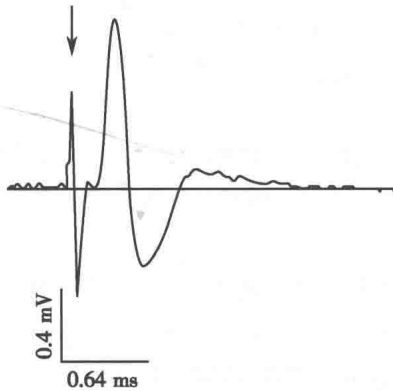


图1 大鼠坐骨神经复合电位记录  
(张勇等供图)

或脑的某一部位，在给予或除去刺激时，引起中枢神经系统中产生可测出的任何电位变化都可以称为诱发电位 (evoked potential, EP)。诱发电位是慢的电变化，在文献中有时也称为场电位，它不是单细胞放电，而主要由许多突触后电位总和而成。体感诱发电位 (somatosensory evoked potential, SEP) 系指给予皮肤或末梢神经刺激，在刺激的对侧头皮上记录到的大脑皮层电位活动。皮质体感诱发电位主要分为两大部分：“初发反应”，亦称“主反应”，其潜伏期较短、幅度较低，波形呈先正后负的电位变化；在主反应之后是一个潜伏期较长、幅度较高的正电位变化的“次发反应”，亦称“次反应”。有时在出现主反应或次反应之后，还会出现后发放或缓慢的电位变化。

## 2. 目的

- (1) 观察大脑皮质 SEP 的记录过程。
- (2) 辨认大脑皮质自发电位与诱发电位。

(3) 识别与区分 SEP 各波形。

(4) 记录与测量 SEP 各参数。

### 3. 步骤

(1) 麻醉：选择健康成年家兔，经耳缘静脉注射 4% 戊巴比妥钠（40 mg/kg 体重），待动物麻醉后固定。

#### (2) 手术

1) 选定记录部位：头顶部正中切开皮肤，暴露颅骨。在顶骨矢状缝左侧旁开 0.3 cm、冠状缝后 0.5 cm 处安放一个针形记录电极，在距记录电极 2 ~ 3 cm 处安放一个针形参考电极，分别用牙托粉固定。

2) 按常规手术方法行气管插管术，暴露右侧腓神经，安放刺激电极。

3) 将气管插管的一端与呼吸机相连，经耳缘静脉注入 1% 筒箭毒（0.1 ml/kg 体重）制动，进行人工呼吸。

4) 诱发反应记录仪开机预热 5 min。①按 ERASE 键清除幕上的波形。②按 CHANNELSELECT 1 键及 2 键，选择所使用的输入通道。③按 ELEC 和 MANNUL 程序选择键，选择调整参数。灵敏度：200  $\mu\text{V}$ /小格；高频衰减：1 kHz；低频衰减：2 Hz；扫描时间：20 ms/小格；叠加次数：32 次。实验中可随时根据情况进行调整。

5) 实验观察：①按 MON 键，此时屏幕上显示监视的输入波形，即自发脑电活动。②按 STIM START 键，选择刺激触发扫描状态。③按 ANALYSIS START 键，如果刺激触发选择为内触发时，则即刻开始叠加。如果选择外触发，则需按刺激器的触发开关。④叠加完毕，按 STORE 键保留，在贮存该电位前后或叠加期间均可随时按 POSITION 的  $\uparrow$  或  $\downarrow$  键，及 SENS 键，调整基线位置及电位幅度。

### 6) 测量 SEP 各参数

a. 潜伏期：按 LATENCY CURSOR 开关键，将屏幕上显示出两条纵向游标，分别移至待测定的两点（伪迹及待测波的波峰），两条游标之间所经历的时间即为潜伏期数值。如果需测定多个潜伏期，则按 RESET 键，这时在屏幕的右下方呈现一标记，说明该数值已被贮存。最多可贮存 4 个数据。

b. 振幅：按 AMPLITUDE CURSOR 开关键，将屏幕上显示出两条横向游标，分别移到待测波形的起始和最高点，屏幕上即显示出两条游标之间的数值，即该波振幅。

c. 持续期：按 LATENCY CURSOR 开关键，将两条纵向游标移至待测波的起始点和终止点，屏幕上即显示出两条游标之间的数值，即该波持续期。测量按 RECORD 键将 SEP 记录下来。

### 4. 结果示例 见图 2。

## （三）在体神经元动作电位的细胞内记录（脊神经节）

1. 原理 应用细胞内记录技术可获得静息膜电位、动作电位等一系列反映单一细胞电生理学特征的参数，并对之进行研究。细胞内记录通常是用由硬质玻璃管控制的玻璃微管来进行的。玻璃微管尖端直径一般等于或小于  $1\ \mu\text{m}$ ，其中充以  $3\ \text{mol/L KCl}$ ，阻抗约  $50\sim 100\ \text{M}\Omega$ 。进行在体细胞胞内记录时，通常需将穿刺部位表面的软脑（脊）膜去掉一小块；对于坚韧的脊神经节结缔组织鞘膜性结构，有时需用胰蛋白酶或透明质酸处理，使鞘膜软化透明后，始能进行微电极穿刺。

2. 实验背景 脊神经节神经元属假单极神经元，从胞

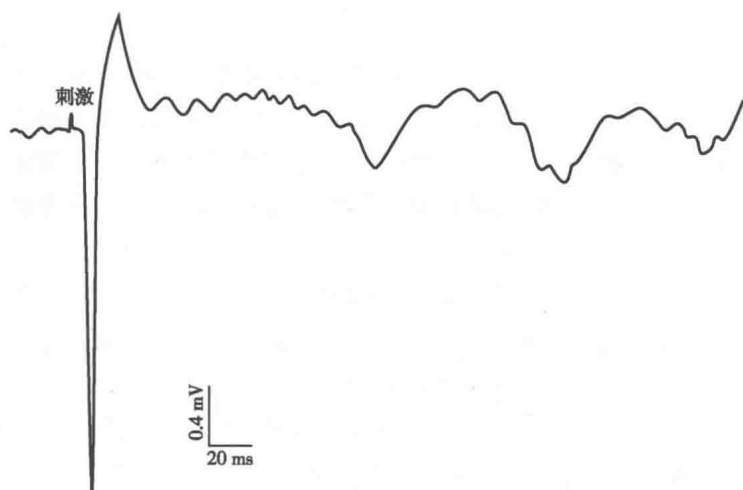


图2 家兔大脑皮质躯体感觉诱发电位（张勇供图）

体发出一个突起，在胞体附近盘曲然后呈“T”形分支，一支走向中枢（中枢突），另一支分布到外周组织（周围突），末梢形成感受器。研究表明，脊神经节神经元的周围突或中枢突上传导的神经冲动进入或通过胞体，因此，刺激中枢突或周围突引起的动作电位可以在脊神经节神经元胞体记录到。本实验用玻璃微电极记录电刺激外周神经和自然刺激感受野引起的脊神经节神经元的动作电位。

### 3. 目的

- (1) 学习用玻璃微电极进行细胞内记录的方法。
- (2) 了解自然刺激感受野的方法。
- (3) 观察脊神经节神经元的动作电位。
- (4) 了解脊神经节神经元对躯体与内脏刺激的反应。

### 4. 步骤

- (1) 麻醉与手术

1) 选用健康成年 Wistar 大鼠，性别不限。4% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉，行气管插管术。

2) 暴露  $S_1 \sim S_2$  脊神经节和同侧阴部神经、盆神经。暴露的脊神经节及外周神经周围滴加温液状石蜡。

3) 腹腔注射 0.1% 筒箭毒 (2 mg/kg 体重)，接呼吸机，进行人工呼吸。

4) 用脊髓固定夹固定腰骶髓。

### (2) 调试仪器与安放电极

1) 将刺激器、微电极放大器、示波器、x-y 记录仪开机预热。示波器灵敏度：20 mV/cm，扫描速度：5 ms/cm 或 10 ms/cm。

2) 将刺激电极分别置于阴部神经和盆神经，记录用的玻璃微电极 (尖端直径  $< 1 \mu\text{m}$ ，内充 3 mol/L KCl 溶液，电阻 20 ~ 40 M $\Omega$ ) 固定在电极架上，参考电极刺入腰部肌肉。

3) 用油丝镊子小心、仔细地剥离脊神经节表面的被膜，将微电极缓慢推至脊神经节表面，连接好刺激系统与记录系统，调节微电极放大器的高频补偿，测量电极电阻。

## 5. 实验观察

(1) 脊神经节神经元对外周神经电刺激的反应：以强度为 2 T、波宽 0.3 ms、频率为 1 Hz 的电脉冲分别刺激阴部神经和盆神经。用步进微电极推进器将记录电极由脊神经节表面以  $1 \mu\text{m}/\text{步}$  的步幅向下推进，最深到脊神经节表面下 100  $\mu\text{m}$ ，寻找被激动的脊神经节神经元，观察其动作电位波形，并测其潜伏期、阈值、传导速度。

(2) 脊神经节神经元对感受野自然刺激的反应：刺激电极置于感受野，以 1 Hz、0.3 ms、2 T 的电刺激感受野，寻找有诱发反应的神经元，观察到反应后，停止电刺

激。对感受野区域分别用毛刷轻刷毛发、无齿镊子和有齿镊子夹皮肤进行自然刺激，观察脊神经节神经元的反应。

### 6. 注意事项

(1) 手术过程中尽量减少对神经的损伤，剥离脊神经节被膜时避免损伤神经元（神经元聚集于脊神经节的表面）。

(2) 记录过程中，用温液状石蜡保护好脊神经节及神经表面；注意动物的呼吸情况。

7. 结果示例 见图 3。

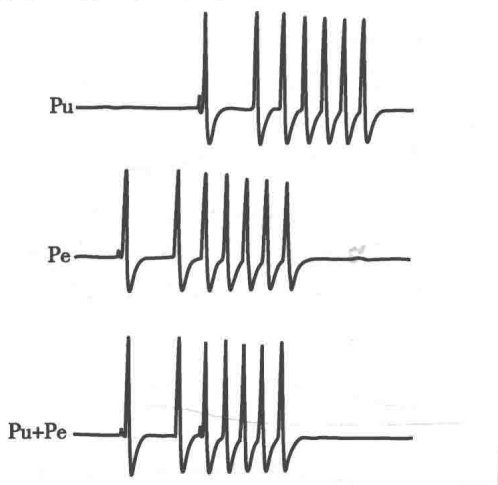


图 3 大鼠脊神经节神经元对单脉冲电刺激阴部神经和盆神经的多发反应

Pu: 阴部神经; Pe: 盆神经;

校正: 10 ms, 20 mV (Lu and Liu, 1996)

### (四) 细胞外记录——丘脑腹后外侧核的电活动

1. 原理 细胞放电产生细胞外电流，从膜的静息区流向活动区，用细胞外电极能记录到这种间质性电流。神



神经元发放的幅度是微电极尖端离活动神经元距离的函数。细胞外记录时，一般约为  $0.1 \sim 20 \text{ mV}$ ，变化不超过  $\pm 5\%$ 。锋电位的形状和极性取决于微电极与活动神经元之间的距离、微电极与神经元各部分的相对位置，以及微电极的直径。持续时间  $1.0 \sim 1.5 \text{ ms}$  的锋电位与胞体的兴奋有关；而持续  $0.5 \text{ ms}$  者则与轴突兴奋有关，持续时间更长的、达到  $15 \sim 20 \text{ ms}$  的电位一般视为树突电位。

**2. 实验背景** 丘脑内侧部分在感觉整合中的作用，已得到了深入的研究，而丘脑外侧部分，特别是特异性体感核对痛信号与制痛信号的整合作用还缺乏系统性的研究。本实验应用玻璃微电极记录丘脑腹后外侧核（nucleus ventralis posteriolateralis, VPL）神经元单位电活动，观察外周不同传入纤维兴奋对该神经元的影响。

### 3. 目的

- (1) 观察 VPL 的自发、诱发电活动。
- (2) 不同类别神经纤维兴奋对 VPL 电活动的影响。

### 4. 步骤

(1) 手术：选用  $2.5 \sim 3.5 \text{ kg}$  的健康家兔，性别不限，用  $1\%$  氨基甲酸乙酯和  $1\%$  氯醛糖混合液经耳缘静脉轻度麻醉（ $5 \text{ ml/kg}$  体重）。暴露大脑皮质的有关区域，做气管插管、一侧颈静脉插管术。暴露一侧下肢腓神经，注射肌松剂，行人工呼吸。兔头固定于定位仪上，按照 Sawyer 图谱，标定 VPL 坐标。剪开硬脑膜，用琼脂封盖。

(2) 安放电极：将充灌好  $3 \text{ mol/L}$  KCl 溶液的玻璃微电极进行尖端处理，并固定在电极移动架上。轻轻推进微电极，使其尖端接触在琼脂表面。将参考电极刺入皮肤切