

全国高等学校农林规划教材

Veterinary
Internal Medicine

兽医内科学

郭定宗 主编



高等教育出版社
Higher Education Press

全国高等学校农林规划教材

Veterinary Internal Medicine

兽医内科学

郭定宗 主编

高等教育出版社

内容简介

全书共分十三章, 共计177个疾病。编排以系统器官疾病为序。本书在详细介绍猪、马、牛、羊、禽疾病的同时, 将犬、猫等动物疾病纳入相关章节。在描述常见病、多发病的同时, 将新发生疾病作了适当介绍; 在发病机制和治疗上融入最新研究成果; 根据教学和兽医临床实践, 新增了相关疾病的鉴别诊断, 便于学生掌握每个疾病的诊断要点。在每章开始有内容提要, 介绍了该章重点、难点和要求掌握的内容, 章末有复习思考题, 便于学生复习和自测。本书是一本易教易懂、全新实用的教科书。

本书供动物医学专业本科生、高职生使用, 还可供兽医临床专业技术人员和相关专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

兽医内科学 / 郭定宗主编. —北京: 高等教育出版社, 2005. 8

ISBN 7-04-017544-4

I. 兽… II. 郭… III. 兽医学: 内科学 - 高等学校 - 教材 IV. S856

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 074630 号

项目总策划	吴雪梅	策划编辑	潘超	责任编辑	孙葵葵	封面设计	于文燕
责任绘图	朱静	版式设计	胡志萍	责任校对	康晓燕	责任印制	陈伟光

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000
经 销 北京蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京奥鑫印刷厂

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.com.cn>

开 本 787×1092 1/16
印 张 27.5
字 数 670 000

版 次 2005年8月第1版
印 次 2005年8月第1次印刷
定 价 32.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 17544-00

兽医内科学编审者

主 编 郭定宗 华中农业大学

副主编 黄克和 南京农业大学

唐兆新 华南农业大学

张乃生 吉林大学

夏兆飞 中国农业大学

主 审 史 言 东北农学院

李毓义 吉林大学

熊道焕 华中农业大学

编 者 (以姓氏笔画为序)

王捍东 扬州大学

王振勇 山东农业大学

邓俊良 四川农业大学

向瑞平 郑州牧业工程

高等专科学校

刘国文 内蒙古民族大学

朱连勤 莱阳农学院

李家奎 华中农业大学

李锦春 安徽农业大学

张才骏 青海大学

张乃生 吉林大学

郭定宗 华中农业大学

贺秀媛 河南农业大学

赵 圣 华中农业大学

夏兆飞 中国农业大学

夏 诚 黑龙江八一

农垦大学

唐兆新 华南农业大学

徐世文 东北农业大学

黄克和 南京农业大学

龚大春 长江大学

韩 敏 内蒙古农业大学

魏战勇 河南农业大学

前 言

《兽医内科学》是动物医学专业的主要专业课程之一,有着强烈的时代特征。我国加入世界贸易组织以后,经济发展突飞猛进,科学技术日新月异,为了紧跟科技前沿、追踪学科的最新进展和发展趋势,我们组织了华中农业大学、南京农业大学、华南农业大学、吉林大学、中国农业大学、扬州大学、东北农业大学等 17 所大学的一批优秀中青年专家编写本教材。

本教材在体现现代教学内容的同时,兼顾教材的系统性和完整性;在阐明单个疾病的同时,注重相关疾病的鉴别诊断;在描述传统动物(牛、马、猪、鸡)疾病的同时,增加了猫、犬等动物疾病;在介绍疾病诊疗的同时,简略介绍了现代兽医内科学的研究方法。

根据参编学校和广大教师的教学经验,对于相类似疾病,在每章(节)后附了相关疾病的鉴别诊断,力图使学生从众多类似疾病中,找出某一疾病的诊断要点,力求深入浅出、易教易懂。在编写内容取舍上,体现我国特色,以现阶段多发病、常发病为主,新增了犬、猫疾病和一些新出现的疾病(如肉鸡腹水综合征)。在编排上以传统的系统器官疾病为导引将相关动物疾病编入有关章节。全书共分十三章五十七节,共 177 个疾病。

在编写过程中,得到了史言教授、李毓义教授、熊道焕教授的大力指导,对编写大纲进行详细审定,提出了很多宝贵意见,并对初稿进行了修改。对老一辈学者忘我辛勤的劳动、严谨求实的学风、无私奉献的精神,我们表示崇高的敬意和衷心的感谢。

本教材在全体参编人员的共同努力下,历时一年半,力求内容翔实、编排完整、深入浅出、有所创新,为广大教师和学生提供易教易学的教科书。但由于时间较紧,水平有限,不免存在许多缺点和不足,诚恳希望广大师生提出宝贵意见,以便重印和再版时修改。

编 者

2004 年 12 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 兽医内科学的概念、内容	1
第二节 兽医内科学在兽医学中的地位	1
第三节 兽医内科学的发展趋势	2
第四节 兽医内科学的研究方法	3
第二章 消化器官疾病	11
第一节 概论	11
第二节 口腔、唾液腺、咽及食管疾病	12
口炎 唾液腺炎 咽炎 食管梗塞 喉囊卡他 喉囊阻塞	
附:动物流涎综合征鉴别诊断	
第三节 反刍动物前胃疾病	20
前胃弛缓 急性瘤胃臌气 慢性瘤胃臌气 瘤胃食滞 瘤胃酸中毒 瘤胃碱中毒	
创伤性网胃腹膜炎 瓣胃秘结	
第四节 反刍动物真胃疾病	39
真胃积食 真胃左方变位 真胃右方变位 真胃炎	
附:反刍动物前胃及真胃疾病的诊断要点	
第五节 马属动物胃肠疾病	50
急性胃扩张 肠阻塞 肠痉挛 肠变位 急性结肠炎	
附:马属动物胃肠疾病鉴别诊断要点	
第六节 猪胃肠疾病	73
肠便秘 肠套叠	
第七节 牛羊肠道疾病	76
胃肠炎 真菌性肠炎 幼畜消化不良	
第八节 犬猫胃肠疾病	83
胃肠炎 胃扩张-扭转综合征 犬急性肠梗阻	
第九节 肝与胰疾病	88
急性实质性肝炎 肝硬化	
第十节 腹膜疾病	91
腹膜炎 腹腔积液 卵黄性腹膜炎	
第三章 呼吸器官疾病	97
第一节 概论	97
第二节 上呼吸道疾病	101
鼻炎 喉炎 喉囊病 喘鸣症	
第三节 支气管疾病	105

II 目录

支气管炎 急性支气管炎 慢性支气管炎	
第四节 肺疾病.....	108
肺充血和肺水肿 肺泡气肿 小叶性肺炎 大叶性肺炎 真菌性肺炎	
第五节 胸膜疾病.....	118
胸膜炎 胸腔积液	
附:呼吸器官疾病鉴别诊断要点	
第四章 心血管器官疾病.....	123
第一节 概论.....	123
第二节 心脏血管功能不全.....	124
心力衰竭 循环虚脱	
第三节 心包疾病.....	131
心包炎	
第四节 心肌疾病.....	134
急性心肌炎 心脏扩张 心脏肥大 高山病	
第五节 心内膜疾病.....	140
急性心内膜炎 心脏瓣膜病	
附:心血管疾病鉴别诊断要点	
第五章 血液与造血器官疾病.....	147
第一节 概论.....	147
第二节 贫血.....	148
急性出血性贫血 慢性出血性贫血 溶血性贫血 仔猪缺铁性贫血 再生障碍性贫血	
附:贫血的鉴别诊断要点	
第六章 泌尿系统疾病.....	157
第一节 概论.....	157
第二节 肾疾病.....	159
肾炎 肾病	
第三节 尿路疾病.....	165
肾盂炎 膀胱炎 膀胱麻痹 尿道炎 尿结石	
第四节 其他疾病.....	173
猫泌尿系统综合征 红尿的鉴别诊断 血尿的鉴别诊断 少尿或无尿的鉴别诊断	
第七章 神经系统疾病.....	181
第一节 概论.....	181
第二节 脑及脑膜疾病.....	187
脑膜脑炎 日射病及热射病 脑震荡及脑挫伤	
附:脑及脑膜疾病的鉴别诊断要点	
第三节 脊髓疾病.....	196
脊髓炎及脊髓膜炎 脊髓挫伤及震荡	
第四节 癫痫及膈痉挛.....	201
癫痫 膈痉挛	

第八章 被皮系统疾病	206
第一节 概论.....	206
第二节 常见的动物皮肤病.....	208
脱毛症 皮炎 皮肤肿瘤	
第九章 内分泌系统疾病	214
第一节 概论.....	214
第二节 常见的内分泌系统疾病.....	215
应激综合征 糖尿病 甲状腺功能亢进 甲状腺功能减退 甲状旁腺功能亢进	
甲状旁腺功能减退 肾上腺皮质功能亢进 肾上腺皮质功能减退	
第十章 免疫性疾病	227
第一节 概论.....	227
第二节 常见免疫性疾病.....	230
过敏性休克 荨麻疹 血清病综合征 自身免疫性溶血性贫血 类风湿性关节炎	
第十一章 遗传性疾病	235
第一节 概论.....	235
第二节 常见的遗传性疾病.....	246
牛遗传性心肌病 光舌病 遗传性肾病 遗传性先天性皮肤缺失 牛小脑发育不全	
遗传性甲状腺肿	
第十二章 营养代谢性疾病	255
第一节 概论.....	255
第二节 糖、脂肪和蛋白质代谢障碍疾病.....	258
奶牛酮病 母牛肥胖综合征 低糖血症 脂肪肝综合征	
第三节 维生素缺乏.....	269
维生素 A 缺乏症 维生素 K 缺乏症 维生素 B ₁ 缺乏症 维生素 B ₂ 缺乏症 生物素缺乏症	
维生素 B ₁₂ 缺乏症 维生素 C 缺乏症	
第四节 矿物质代谢疾病.....	281
纤维性骨营养不良 青草搐搦 牛血红蛋白尿病 母牛卧卧不起综合征 佝偻病 骨软症	
犬产后低钙血症	
附: 钙磷代谢紊乱相关疾病鉴别诊断要点	
第五节 微量元素缺乏病.....	295
硒和维生素 E 缺乏症 铁缺乏症 铜缺乏症 锌缺乏症 钴缺乏症	
第六节 其他营养代谢病.....	315
肉鸡猝死综合征 肉鸡腹水症 胫骨软骨发育不良	
第十三章 中毒性疾病	327
第一节 概论.....	327
第二节 饲料毒物中毒.....	336
硝酸盐和亚硝酸盐中毒 氢氰酸中毒 菜籽饼粕中毒 棉籽饼粕中毒 马铃薯中毒	
酒糟中毒 粉渣中毒 感光过敏性中毒	
第三节 有毒植物中毒.....	359

IV 目录

	栎树叶中毒 蕨中毒 醉马草中毒 霉烂草木樨中毒 棘豆中毒 疯草中毒	
第四节	真菌毒素中毒.....	365
	黄曲霉毒素中毒 杂色曲霉毒素中毒 单端孢霉毒素中毒 玉米赤霉烯酮中毒 青霉毒素类中毒 赭曲霉毒素 A 中毒	
第五节	农药及鼠药中毒.....	382
	有机磷中毒 氨基甲酸酯类农药中毒 有机氟中毒 尿素中毒 氨中毒 毒鼠强中毒 抗凝血杀鼠药中毒	
第六节	矿物类物质中毒.....	397
	无机氟化物中毒 食盐中毒 铜中毒 汞中毒 砷中毒 钼中毒 镉中毒 铅中毒 硒中毒	
第七节	药物中毒.....	411
	克伦特罗中毒 唑乙醇中毒 伊维菌素中毒 血虫净中毒 马杜拉霉素中毒	
第八节	动物毒中毒.....	417
	蛇毒中毒 蜂毒中毒 蝎毒中毒 蜈蚣毒中毒	
第九节	其他中毒性疾病.....	421
	二噁英中毒 一氧化碳中毒	
中文索引	426

第一章 绪 论

内容提要 本章介绍了兽医内科学的概念、研究内容、兽医内科学的发展趋势和研究方法。要求重点掌握兽医内科学的概念和研究方法,特别是生物技术、现代分析技术、临床常用技术的原理和适用范围。

第一节 兽医内科学的概念、内容

一、兽医内科学的概念

兽医内科学(veterinary internal medicine)是研究动物器官、系统疾病的临床科学。它是兽医学科中一个重要的分支学科。兽医内科学是运用系统的理论和先进有效的诊疗技术,研究疾病的病因、发病机制、临床症状、病理变化、转归、诊断和防治(制)的临床学科。



如何学习兽医内科学

- 夯实理论,苦练基本功;
- 坚持理论与实践相结合;
- 善于总结,不断创新。

二、兽医内科学的研究内容

兽医内科学研究的内容包括:消化系统疾病、呼吸系统疾病、泌尿系统疾病、心血管疾病、血液及造血器官疾病、内分泌系统疾病、神经系统疾病、营养代谢病、中毒病、皮肤病等。

现代科学技术的发展和水平的提高,赋予了兽医内科学新的内涵。它除了包括上述内容外,还应包括遗传性疾病、免疫性疾病以及胚胎疾病。从研究的对象来看,除了从研究个体疾病发生、发展规律和诊断治疗技术外,还应注重群发病研究、动物保健与福利、动物性食品安全、环境保护等方面的内容研究;从研究动物的种类上,除传统畜禽外,还应注意对伴侣动物、观赏动物、野生动物、实验动物、经济动物、水生动物疾病的研究。值得一提的是,近年来由于家养犬、猫等小动物的迅速发展,犬、猫的内科疾病成为兽医内科学研究中备受关注的新领域,在国外开展已久的小动物内科学研究在我国也逐渐深入,正成为兽医内科学的重要研究内容之一。

(郭定宗)

第二节 兽医内科学在兽医学中的地位

兽医内科学是临床兽医学领域中的一门重要学科,它涉及面广,整体性强,在研究动物体各器官系统疾病的诊断和防治中,以诊治措施不具创伤性或仅有轻微的创伤性(介入性诊断和治疗)为其特色,它研究的症状学、临床病理学、治疗学同时又是各临床学科(包括传染病、寄生虫病)的基础。在目前六大群发病(动物营养代谢病、中毒性疾病、遗传性疾病、免疫性疾病、寄生虫病、传染病)中兽医内科学占据了前四种。随着工业化发展、环境污染日趋严重,环境性疾病也凸

现出来,动物源食品安全是现代兽医内科学研究中又一个新的领域,并越来越受到全社会的广泛关注。兽医内科学是研究动物疾病与健康的生命科学,而分子生物学是研究生命科学的基础。对分子生物学的研究,从20世纪80年代起已由静态进入到动态,从分子水平研究活体中的物质运输、能量转换、信息传递和加工等,它已渗透到细胞学、生理学、药理学、遗传学、发育学、神经学、免疫学、病理学、临床医学和兽医学等各个学科。

免疫学和微量分析技术的发展(高效液相色谱、气相色谱、放射免疫分析、酶联免疫吸附试验、聚合酶链反应和酶学检查等技术)使对体液中微量物质、免疫抗体、药物或微生物DNA和RNA的分析成为可能,为临床诊断、治疗和阐明疾病的发病机制提供了有效手段。

兽医内科学与生理学、生物化学、病理学、药理学、诊断学等学科有着密不可分的联系,这些学科的发展可以推动兽医内科学更快的发展,而兽医内科学的发展同时也为其他学科提供了发展的基础和空间。

(郭定宗)

第三节 兽医内科学的发展趋势

兽医内科学是一门探讨动物器官系统疾病的发生、发展规律、诊断和防治措施的学科。兽医内科学以基础兽医学、预防兽医学为基础,诊断和治疗手段多样,在兽医临床领域以其独特优势而迅速发展。近年来,随着生物学(分子生物学和细胞生物学)、化学、物理学、数学、信息科学和基础医学理论的快速发展,各学科的融合渗透,兽医内科学研究的内容和手段也在不断更新和深入,兽医内科学进入飞速发展的时期。

一、分子生物学手段广泛运用

分子生物学研究的迅速进展,使应用分子生物学技术对兽医内科疾病进行分子水平和基因水平的研究成为可能。传统的兽医内科疾病的发展机制,可以用分子生物学的方法,加以更深入、更明细的解释,也为临床治疗提供了理论依据。由于分子生物学技术日趋成熟和被广泛应用,目前已能从基因水平解释某些疾病的成因,并且从基因水平进行预防和治疗,如应激综合征、遗传性痛风。目前,我国大多数农业院校兽医临床已设立或正在设立分子生物学研究室,可以预测,今后5~10年内分子生物学在兽医内科学中的应用将逐渐普及,并将渗透到兽医内科学绝大多数领域。

二、逆环境性疾病和营养代谢性疾病备受重视

现代工业的发展、环境污染带来的人和动物的疾病日趋增多,如各种矿藏的开发带来汞、砷、铅、氟污染,工业噪声污染,以及大规模集约化生产带来各种应激性疾病、营养代谢性疾病的增多。除此之外,生产者在追求最大利润的前提下,人为地使动物生理负荷加大而导致各种疾病,如高产奶牛的酮病、钙磷代谢紊乱性疾病、肉鸡腹水综合征、禽痛风、维生素缺乏和矿物质缺乏等逆环境疾病和营养代谢病,这些已成为兽医内科学研究的重点。

此外,随着人民生活水平的提高,动物性食品安全将成为兽医内科学的一个重要研究领域,农药残留、重金属残留是现阶段不可避免的问题,这方面的内容本身就是兽医内科学的一个组成

部分,积极投入此项工作是兽医内科学界的义务和责任,目的是让人们吃得放心,吃得安全,提高我国畜产品在国际市场竞争力。

三、伴侣动物、小动物、经济动物疾病备受关注

传统的兽医内科学研究的动物对象主要为家畜、家禽如牛、马、猪、鸡、鸭等,随着农业结构调整,原有家畜的概念将不断进行调整,机械化在农村迅速推广,原本作为生产工具的牛、马将逐步退出农业生产或做他用,而随着城市发展和人均生活水平的提高,伴侣动物(犬和猫)、观赏动物(动物园动物)、经济动物(兔、貂、鸵鸟、大雁鹅、鹌鹑、海狸鼠、狐狸)、竞技动物(马、犬、狮子、老虎)疾病将受到关注。应当承认,我国在这方面的研究落后于发达国家,以前很少有人专门从事这一领域研究,但20世纪90年代以后,我国在这方面的研究有了突飞猛进的发展,医疗水平、医疗质量有了长足的进步。从另一方面看,这一领域的研究开发将是一个庞大的市场,在我们研究传统内科学疾病的前提下,也给兽医内科学的研究和发展开拓了一个崭新的领域。此外,动物福利和动物群发病也将得到重视和纳入研究范畴。

四、高新技术应用、多学科交叉势在必行

一个现代学科的发展离不开其他相关学科的发展,相关学科的发展也必将推动本学科的发展。要深入研究兽医内科学中亟待解决的问题,必须实施多学科交叉,利用新技术、新方法、新手段,如植物毒素中毒、真菌毒素中毒的诊断和治疗,可以通过现代免疫的方法加以解决;又如现代分析技术(高效液相色谱、质谱、气相色谱和原子吸收光谱)的不断完善,为兽医内科学的毒物分析、残留药物分析、残留重金属分析提供了实验保证,这些高新技术的广泛应用将会大大加速兽医内科学的发展步伐,丰富兽医内科学的内涵,提高兽医内科学的水平。

(郭定宗)

第四节 兽医内科学的研究方法

生物医学研究层面不同,研究方法和手段也各异。兽医内科学应当按自身的研究目的加以适当选择。一般而言,一个实验室要有一定的范围和层次。应当按照所研究的目标,建立具有各自特色的实验室。

现代兽医内科学研究的三大特点:一是深入性。利用现代生物学先进技术,在核酸、蛋白质等生物大分子水平上阐述疾病的本质,并且利用基因技术治疗某些内科病(如遗传病)。二是综合性。以往各学科单一的研究正在被跨学科的实验体系所取代,高水准的研究一般都是在整体、离体组织、细胞、分子水平等多种水平上证实一种论点。三是先进性。高新技术的采用,使得无损、非侵入式研究越来越被广泛采用。本节简要介绍当今兽医内科学常用的研究方法。

一、研究方法的类型

(一) 分子水平

生命体的最基本过程可以最终还原为物质和能量的新陈代谢,因此,西方的近代医学一开始就注重对生物分子的研究,研究范围包括从简单的乙酰胆碱等小分子,到核酸、蛋白质、多糖、生

物膜等大分子。对生物大分子的研究是现代兽医学科学中最基础和最有成效的领域,分子水平的研究将成为临床兽医学研究的主流。

(二) 细胞水平

生命体最基本的单元是细胞,各种生理、生化过程都由各种细胞和细胞群体完成,细胞水平的研究是最基本的实验模型。随着转基因、反义核酸技术、细胞功能定位、定性、定量研究技术的日趋成熟,细胞水平的研究仍将继续发展;针对细胞内不同信号转导途径间及不同细胞间交互作用的研究,将越来越受到重视,成为分子和细胞水平上整合功能的基本模型。

(三) 组织或器官水平

离体组织或器官保持相对完整的形态和细胞群,且切断了整体的神经、内分泌调节的影响,可以直接观察相应组织或器官的各种生理或生化特征。常用的观察指标有机体力、电活动、分泌活动、生物分子变化、结构改变等。该水平的研究是联系分子、细胞与整体水平研究的必要中间环节。

(四) 整体水平

整体动物实验反映的生理功能变化是体内各种生理过程的综合表现,是生命活动最终的表现形式;与临床实际情况较吻合。常用的整体动物实验有:①清醒动物。在保持中枢神经功能正常的情况下,观察动物各种生理、生化活动和行为的变化。清醒动物实验结果是基本功能和调节功能整合后的结果,能够较全面地反映功能变化,但难以分析精确的机制。实验环境、条件、动物生理或病理状态对实验结果有明显影响,因此,应当保持实验条件的始终一致,以减少实验误差。为分析不同器官的生化物质变化情况,可定位埋植微细导管进行微透析,在清醒状态下获得神经递质等动态变化数据。②麻醉动物。动物处于高度中枢抑制状态,可观察比较单纯的生理功能,可作为清醒动物的一种补充。在麻醉动物实验中应保持良好的生理状态,对体温、呼吸、血糖、血 O_2 和 CO_2 分压等生理参数进行必要的控制。

(五) 群体水平

群发病是动物疫病的研究重点,它不仅能反映某些疾病的危害程度、发病规律,帮助人类认知疾病的本质,而且在控制疫情、减少经济损失方面也具有重要意义。在兽医内科学领域里,中毒性疾病、营养代谢病、遗传性疾病、逆环境性疾病、免疫性疾病都离不开群体水平研究。它通过研究发病动物的种类、数量、年龄、性别、发病程度、病死率、治愈率以及症状学、治疗学等方面来阐明疾病的病因、发病机制、临床症状、剖检变化的相互内在联系,并找到有效的防治(制)办法。

生物医学研究,根据学科的属性,又可分为生理学方法、生物化学方法、形态学方法、免疫学方法,各层面的研究均可相机采用一种或多种方法。

二、常用的实验研究方法

(一) 分子生物学研究方法

1. 核酸研究方法 核酸(特别是脱氧核糖核酸 DNA)是生物遗传的物质基础,涉及生命本质和物种起源。核酸的研究包括 DNA、RNA、mRNA 等的提取、特定 DNA 序列克隆、核酸杂交等方法。

(1) DNA 克隆技术:克隆(cloning)技术是指通过无性繁殖方法产生一组遗传学与原型完全相同的细胞和生物体的过程;DNA 克隆(DNA cloning)指的是特异地扩增某一特定的 DNA

片段。经典的 DNA 克隆方法包括 4 个基本步骤:①重组 DNA(recombinant DNA)分子的构建;②转化(transformation),即将所构建的重组 DNA 分子导入宿主细胞(细菌或真菌),并在细胞内自主复制;③细胞克隆选择性扩增;④重组 DNA 的分离;收获扩增的细菌,分离重组 DNA。

(2) 核酸杂交:核酸分子杂交是指两条不同来源的核单链(标记的核酸探针和未标记的目的 DNA)混合时形成杂合双链的过程。双链 DNA 常采用加热或碱处理分开成单链,称为 DNA 变性或融解。在一定条件下,两种同源或异源单链混合时,若碱基互补便结合为双链,称 DNA 复性或退火。主要方法有:①Southern 印迹(blotting),这是一种 DNA-DNA 之间的杂交。②Northern 印迹,用于检测特异性 mRNA 的表达。本方法类似于 Southern 印迹,只是经分离转膜的样品是 mRNA 而不是 DNA,是一种 DNA-RNA 的杂交。③染色体原位杂交,用标记的 DNA 探针与原位变性的染色体 DNA 进行杂交,可在杂交前或杂交后对染色体进行分带,对探针识别的序列作出图谱定位。

(3) 聚合酶链反应:聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),能在体外快速及高效地从复杂 DNA 中特异地扩增目的 DNA 序列。将引物加入变性的 DNA 样品中,即能分别与各自互补的单链结合。在热稳定的 DNA 聚合酶和 DNA 前体物(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)俱在的条件下,启动新互补链的合成。

PCR 常用于疾病基因的克隆分析。疾病基因是指可以引起某种疾病,或在一定程度上与某种疾病相关的突变基因。基因突变包括:基因缺失、基因插入、单个碱基替换,以及移码突变。PCR 技术可为明确疾病的病因和分子发病机制提供重要依据,进而设计出有效的诊断试剂和治疗方法,包括新的药物。

2. 蛋白质研究方法 蛋白质作为细胞和组织的结构和功能的主要基础物质,对其研究的难度大于对核酸的研究,这是因为蛋白质有高度复杂的三维空间结构,其结构及活性容易受到多种因素的影响。该方法在兽医内科学上常用于酶、激素、受体、特殊病理产物的分析。

(1) 蛋白质分离纯化:蛋白质数量多、性质不一、结构各异,因此,应根据不同蛋白质的各自特性,用相应的方法分离纯化。蛋白质分离纯化的方法很多,可作如下分类。①利用溶解度差异的分离方法:用不同 pH 溶液沉淀蛋白质;用某些特殊的蛋白沉淀剂沉淀蛋白质;用不同盐浓度沉淀蛋白质;用有机溶剂沉淀蛋白质;以热变性去除不耐热蛋白质;用分配层析法(纸层析或薄层层析)分离蛋白质。以上方法只能粗提蛋白质,需用其他方法进一步加以分离。②利用分子大小不同的分离方法有:透析、超过滤、离心分离、凝胶过滤(分子筛层析)。③利用蛋白质带电性质不同的分离方法:电泳(聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳等)和离子交换层析(应用阳离子或阴离子的离子交换剂)。④利用蛋白质吸附性质不同的分离方法:以氧化铝、硅胶、硅酸镁、磷酸钙等吸附剂吸附蛋白质后用不同溶液加以洗脱。⑤利用蛋白特异性配体的亲和力层析法:将能与蛋白质结合的配体(如抗体、受体拮抗剂、酶的底物等)预先结合到固相不溶介质上,这些配体可特异地与待分离溶液中的蛋白质结合,滞留于分离柱内,在洗脱混合物后,通过改变溶液的 pH、离子强度或采用某些更强的结合物来置换分离出目的蛋白。

(2) 蛋白质的鉴定:对分离纯化的蛋白质可进一步对其相对分子质量、等电点、含量、特异性等作出鉴定。测定蛋白质相对分子质量的常用方法是十二烷基磺酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)或凝胶过滤,用已知相对分子质量大小的标准蛋白在相同条件下作标准曲线,确定相对分子质量。用等电点电泳确定蛋白质的等电点(pI)值。蛋白质定量方法有凯氏定氮

法、双缩脲法、Lowry 法、Folin 酚法、紫外分光光度法、考马斯亮蓝 G-250 法等。对目的蛋白的特异性检测方法常用蛋白印迹法(Western blot),先以 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,再将蛋白质转移至 PVDF 膜或硝酸纤维膜上,以特异性抗体与其结合,再用标记的第二抗体加以识别,特异性目的蛋白可呈显色反应。

3. 原位分子鉴定

(1) 免疫组织化学:免疫组织化学简称免疫组化(immunohistochemistry),是用特异性抗体显示组织化学成分的一种方法。抗原通常是一种多肽或蛋白质,有数量不等的抗原决定簇。抗原决定簇由暴露在表面的 3~8 个氨基酸组成。1 个抗原上可以有多个决定簇。因此,由此而产生的抗血清中可能含有针对不同决定簇的抗体,称为多克隆(polyclonal)抗体;用杂交瘤技术可以制成针对单个决定簇的单克隆(monoclonal)抗体。

免疫组化基本过程有固定、制片和反应 3 个环节。大多数情况下可采用 4%多聚甲醛溶液固定组织。制片一般可采用石蜡切片或冷冻切片。石蜡切片在包埋过程中对抗原有一定程度的破坏作用;冷冻切片对抗原的保存好,应用最广。免疫组化反应分直接法和间接法。直接法在抗体上结合一定的标志物,操作方便,一次反应即可,但灵敏性低,而且必须标记每一种抗体,因而很少应用。间接法先以针对抗原的第一抗体与组织起反应,然后用结合标志物的第二抗体显示第一抗体,灵敏度高于直接法。根据标记第二抗体方法的不同,有间接荧光法、PAP 法和 ABD 法等。

(2) 原位杂交术:原位杂交术(*in situ* hybridization)是一种核酸分子杂交技术,它是通过检测细胞内的 mRNA 和 DNA 序列片段,原位研究细胞合成某种多肽或蛋白质的基因表达。其基本原理是根据两条单链核苷酸互补碱基序列专一配对的特性,应用已知碱基序列并具有标志物的 RNA 或 DNA 片段,即核酸探针(probe),如组织切片或细胞内的待测核酸(RNA 或 DNA 片段)进行杂交,通过标志物的显示,观察目的 mRNA 或 DNA 的存在与定位。组织学上应用的原位杂交术,主要是染色体原位杂交和细胞原位杂交。前者用于研究遗传基因、抗原基因、受体基因、癌基因等在染色体上的定位与表达;后者用于研究细胞中某种蛋白质的基因转录物 mRNA 在胞质内的定位与表达。核酸分子杂交术有很高的敏感性和特异性,它可在免疫细胞化学的基础上,进一步从分子水平探讨细胞功能的表达及其调节机制,已成为当前细胞分子生物学研究的重要手段。

(二) 细胞生物学研究方法

动物细胞培养技术的建立,使人们可以直接对所培养细胞进行观察和适当处理,是细胞、细胞器结构和功能研究的重要手段。

1. 细胞培养 从活体组织分离出细胞直接置于含 10%小牛血清的适当培养基中培养,称为原代培养。原代培养的单细胞层经胰酶消化,取出部分细胞至新培养皿,重新增殖并形成单层细胞,称之为原代细胞株(primary cell strain)。原代培养细胞株的染色体构成均一,基因型一致,是遗传病分析的重要材料。

随着原代培养细胞株的不断传代其增殖能力逐渐降低,培养皿中细胞的密度也明显下降,因而使需要大量细胞的实验难以继续。解决这一问题,可采用病毒或致突变剂使细胞永生化。所采用的 SV40、腺病毒、乳头瘤病毒、EB 病毒等均为 DNA 病毒,可编码与抑癌基因 *p53* 产物结合的蛋白,从而抑制 *p53* 基因的功能,使细胞周期监视机制失去作用而达到细胞的永生化。这种

永生化的培养细胞称为细胞系(cell line)。用适当的筛选法可以从细胞系得到各种细胞突变株(mutant strain)。

2. 细胞融合 在生理条件下,细胞融合仅发生于受精和肌肉细胞融合等特殊例子。但在病毒和细菌感染时,可以观察到细胞的融合。

细胞融合技术的应用主要有:①互补检测。将2种具有相同缺陷表型的突变细胞融合,观察其表型是否改变,以检验这2个基因是否互补。②基因作图,人类遗传作图常采用人与小鼠的融合细胞,开始为异核体,之后开始有丝分裂,核包膜溶解,核合二为一。③单克隆抗体。采用免疫小鼠的脾淋巴细胞与小鼠的骨髓瘤细胞(*hprt*基因缺陷)融合,经选择培养和克隆筛选,可以得到产生免疫原特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞。特异的单克隆抗体具有重要的研究应用价值,用于抗原物质的纯化、定性、定量和分布的研究。

3. 大分子导入 蛋白质、RNA、DNA等大分子在生理条件下是不能透过细胞膜的。大分子的导入方法主要有3大类:①利用载体的方法,先把大分子物质包入血影细胞或脂质体,然后与细胞融合。该法导入的分子大,效率也较高,需要导入样本量大时选用该法。②直接法,显微注射法只能导入极小量样本,但优点是可以将样本直接导入细胞核。③利用辅助剂(如磷酸钙沉淀法)的方法,多用于导入DNA,优点是无需特别仪器,缺点是导入效率较低。

4. 细胞凋亡研究方法 细胞凋亡(apoptosis)又称程序性死亡(programmed death),是细胞生理性和病理性变化的一种结果。凋亡细胞除在光镜或电镜下显示有细胞缩小、核染色质浓缩、核裂解、凋亡小体形成等特点外,还可采用TUNEL法和核染色法进行检测。TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling)法利用凋亡细胞DNA断裂的特点,将生物素标记的dUTP结合到断裂末端,然后用卵白素-过氧化物酶与生物素结合,再以 H_2O_2 和DAB显色,可以灵敏地检出凋亡细胞。形态学方法可以直接对组织切片中的凋亡细胞进行定位定性检测。

细胞凋亡时染色质DNA断裂,形成50~300 kb的DNA片段或180~200 bp整数倍寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现梯形电泳图谱(DNA ladder)。

采用碘化丙啶(PI)和双苯并咪唑(Ho)染色后,在氩离子激光或高压汞灯激发下,根据荧光颜色不同,用流式细胞分析仪鉴定凋亡细胞。

(三) 免疫学研究方法

放射免疫(radioimmunoassay, RIA)方法不断发展和完善,已广泛地应用于动物医学和人类医学的各个领域,所能检测的物质种类繁多,包括蛋白质、酶、多肽激素、甾体激素、肿瘤相关抗原、药物、传染性疾病的抗原、抗体、细菌以及病毒等,还能用于检测血液、脑脊液、尿液、羊水、胸腔积液等各种体液以及组织提取液、培养液等。计算机软件的开发,使得RIA的数据处理分析更为方便。

1. 酶联免疫检测方法 自1971年Engvall等建立检测可溶性物质的酶联免疫吸附实验(简称ELISA)和1972年Rubenstein等建立均相酶免疫测定技术(即酶放大免疫实验,简称EMIT)以来,酶联免疫检测方法进展很快,目前已成为一类较为成熟的方法,并随着在各个领域的广泛应用而不断改进。酶联免疫检测方法具有微量、特异、高效、经济、方便和安全等特点,广泛应用于生物学和医学的许多领域,在理论研究和实际工作中都发挥了重要作用。

用于检测小分子半抗原:如激素和药物成分和某些酶类如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、溶菌酶、

苹果酸脱氢酶、真菌毒素等。

2. 荧光免疫技术 荧光免疫分析技术是以荧光物质作为标记的一种免疫分析技术,荧光物质的分子在特定条件下吸收激发光的能量后,呈激发态而极不稳定,当迅速回到基态时,释放出所有的光能,发射出波长较照射光长的荧光。荧光免疫分析技术可分为荧光免疫组织化学技术和荧光免疫测定两大类。荧光抗体技术属于前者,利用某些荧光素通过化学方法与特异性抗体结合制成荧光抗体,仍保持原抗体的免疫活性,然后使荧光抗体与被检抗原发生特异性结合,形成的免疫复合物在一定波长光的激发下产生荧光,最后借助荧光显微镜检测或定位被检抗原。根据所用的方法可分为直接荧光抗体法、间接荧光抗体法和补体荧光抗体法。

荧光抗体技术在临床检测中主要用于:①血液中 T 细胞、B 细胞及其亚群的鉴定;②血清中自身抗体的检测(如抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗线粒体抗体、抗甲状腺球蛋白抗体、抗胃壁细胞抗体等自身抗体);③组织中免疫球蛋白及补体组分的检测;④特异的组织固定抗体检测;⑤特殊染色体的鉴定;⑥激素和酶的局部组织定位;⑦恶变组织中肿瘤特异性抗原的检定;⑧细菌和病毒快速检定;⑨寄生虫的检定与研究(如血吸虫)。

目前已用于 IgE、HBsAg、HBsAb、AFP、CEA、铁蛋白、甲状腺素、促甲状腺素、卵泡激素、催乳激素、三碘甲状腺原氨酸、地高辛、氢化可的松等的检测。

3. 电子显微镜免疫细胞化学技术 电子显微镜免疫细胞化学技术是在保持抗体免疫性的前提下,把抗体用高电子密度的标志物(如铁蛋白、金等)或用经细胞化学方法处理电子密度能增高的标志物(如辣根过氧化物酶等酶类)标记后,与相应抗原结合,然后用电子显微镜观察的一种技术,简称免疫电镜技术。

免疫电镜能否成功主要依赖于以下几个因素:①细胞超微结构的保存;②能否保持组织的抗原性,并保持抗原于原位;③免疫试剂在组织中能否顺利穿透,并准确地识别、结合相应的抗原。在制定免疫电镜方法时要根据具体情况充分考虑以上 3 种因素。

(四) 原子吸收光谱与色谱技术

1. 原子吸收光谱法 原子吸收光谱法是 20 世纪 50 年代中期出现并在以后逐渐发展起来的一种新型仪器分析方法,是基于蒸气相中被测元素的基态原子对其原子共振辐射的吸收强度来进行定量分析的一种方法。其仪器装置如图所示:

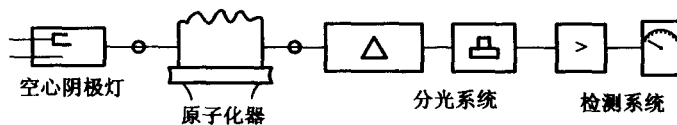


图 1-1 原子吸收分光光度计原理示意图

试样被喷射成雾状后进入原子化器,在高温中挥发并离解成基态原子。空心阴极灯作光源,它发射出的特征谱线光经过一定厚度的原子蒸气时,被选择性地吸收而减弱。在一定条件下,被吸收的程度与基态原子的数目成正比。通过分光系统和检测器测得特征性辐射被吸收的程度,从而测得被测元素的含量。

原子吸收光谱法可根据其原子化方式的不同,分为火焰法、电热原子化法(如石墨炉法)、氢化法和冷原子吸收法。