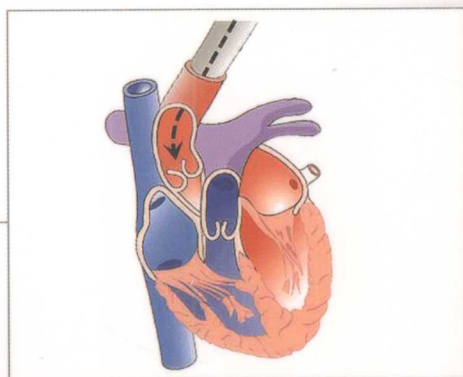
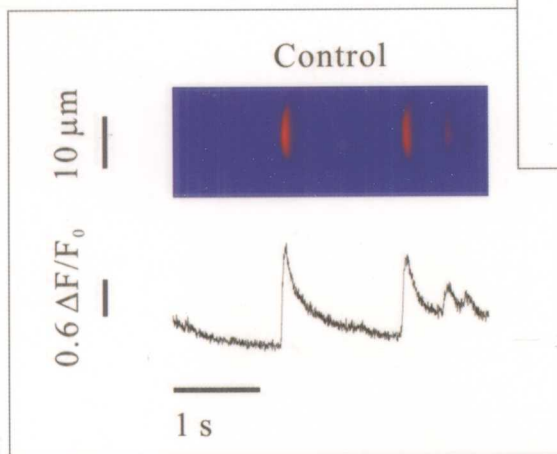


“十一五”国家重点图书出版规划项目

生理学实验技术丛书

心血管肾脏生理学 实验技术方法及其进展

主编 朱妙章 吴博威 裴建明 曾晓荣

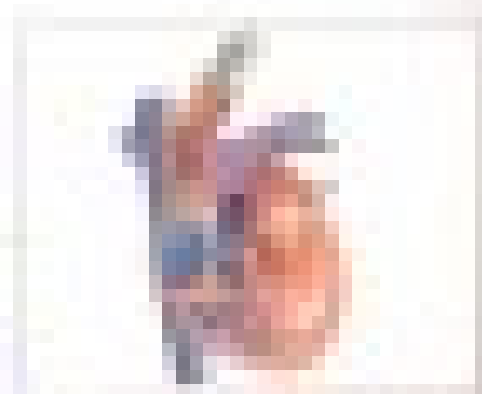


“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

教育部高等学校医学门类教学指导委员会推荐教材

心血管肾脏生理学 实验技术方法及其进展

主编 王德明 副主编 王德明 王德明 王德明



中国医药出版社

“十一五”国家重点图书出版规划项目

生理学实验技术丛书

心血管肾脏生理学实验 技术方法及其进展

主 编	朱妙章	吕博盛	裴建明	曾晓荣
副主编	郭海涛	王跃民	姜春玲	朱肖星
	孟 华	余志斌	夏 强	于 军
	王会平	陶 凌		
编 委	王文清	朱国庆	任东青	刘 军
	刘慧荣	孙纪元	严晓红	杨文清
	李志超	谷瑞民	张海锋	钮伟真
	徐 晖	徐 琳	郭 军	唐发宽
	黄晓峰	董明清		

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

心血管肾脏生理学实验技术方法及其进展/朱妙章等主编. —西安:第四军医大学出版社,2010.1

ISBN 978 - 7 - 81086 - 736 - 8

I. 心… II. 朱… III. 心血管系统 - 人体生理学 - 实验 - 研究生 - 教材; 肾 - 人体生理学 - 实验 - 研究生 - 教材 IV. R33 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 215653 号

心血管肾脏生理学实验技术方法及其进展

主 编 朱妙章 吴博威 裴建明 曾晓荣
责任编辑 马元怡
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)
电 话 029 - 84776765
传 真 029 - 84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 人民日报社西安印务中心
版 次 2010 年 1 月第 1 版 2010 年 1 月第 1 次印刷
开 本 787 × 1092 1/16
印 张 20.75 彩 0.5
字 数 500 千字
书 号 ISBN 978 - 7 - 81086 - 736 - 8/R · 627
定 价 80.00 元

(版权所有 盗版必究)

编 者

于 军	马 恒	王 文	王 会	王 志	王 丽	王 春	王 亮
王 跃	王 敏	王 静	牛 龙	孔 淑	田 巧	付 兆	付 锋
邢 文	毕 辉	朱 肖	朱 妙	朱 国	任 东	刘 少	刘 东
刘 亚	刘 军	刘 星	刘 静	刘 慧	孙 纪	孙 新	严 晓
苏 慧	杨 文	杨 昭	杨 黄	杨 琳	李 文	李 志	李 晓
李 娟	李 嘉	吴 博	何 争	余 斌	谷 瑞	沙 建	宋 宏
张 权	张 明	张 荣	张 恒	张 海	张 海	陈 丽	陈 宝
陈 定	武 冬	苟 伟	罗 晓	周 士	周 君	周 晓	郎 海
孟 华	封 启	赵 正	赵 海	胡 三	胡 浩	钮 伟	姜 春
姚 齐	夏 强	顾 建	钱 令	徐 晖	徐 琳	高 尔	高 峰
高 峻	高 瞻	郭 军	郭 海	唐 发	陶 凌	黄 晓	董 明
董 玲	韩 勇	曾 丽	曾 晓	谢 安	蓝 庭	臧 伟	裴 建
谭 秋	燕 子	魏 华					

前 言

《生理学技术与方法》在 20 世纪 80 年代由科学出版社出版,该书的出版对推动生理科学的发展起了重要作用。时隔 20 多年,随着生命科学和医学的发展,生理学与分子生物学、生物医学工程的相互渗透,相关基因的表达和基因芯片技术的应用,信号转导和细胞因子作用的认识不断深化,体内新的活性物质和离子通道不断被发现,分子生物学的发展,使得人们从分子水平逐渐认识某些生命现象和疾病的本质,也使临床对疾病的实验室诊断发生了革命性的变化,推动了生命科学和医学的进步。概念不断更新,新理论、新观点和新信息不断涌现,生理学出现新的分支和生长点,丰富了生理学的内容;生理学研究从整体、离体器官水平不断向细胞水平和分子水平深入,每一项理论的重要进展都与新技术、新方法的应用密切相关,每项技术创新都使我们对生理学相关理论的认识向前迈进。新技术、新方法和新仪器的应用孕育了新的机遇,它们是指导科技工作者迈向成功的工具与武器。因此,有必要出版一本介绍生理科学近二十几年来使用的实验方法与技术。这些新的技术、方法都分散在不同的期刊和书籍中,许多研究生和读者苦于寻找实验技术与方法的书刊,尤其是近年来,众多先进的研究手段不断问世与发展,如单细胞研究方法,膜片钳技术在心肌细胞、血管平滑肌细胞和肾小管髓袢升支粗段研究中的应用,心肌细胞收缩力的测定,制备小鼠缺血模型的新方法等,学习和掌握这些技术与方法,对选择合适的科研手段与科研设计有重要帮助。

本书从分子、细胞、离体器官、整体动物等不同水平,主要撰写了心血管、肾脏生理学实验技术方法,介绍了作者自己的经验和技巧,并适当地阐述了方法的理论基础,有利于研究生和科学工作者应用这些技术方法去证明自己的假设和研究设想。科技创新靠实验来求证,生理学也可以说是一门实验科学。通常给研究对象施加某种刺激,观察其反应,从反应中推断分析某器官或细胞的功能,并揭示其内在的联系。换言之,生理学就是研究刺激与反应间的规律,同时要在

实验中去发现、开阔思路和启迪思维。科研目的就是揭示生命科学的规律和认识世界,它靠我们的头脑去分析,也靠我们的感官去观察和发现,还要借助显微镜和电子显微镜等工具去扩大感官的能力,看到肉眼不能见到的微观世界。先进的设备和仪器是科研的手段和武器。

在生理学科研中,要出高水平的科研成果,在应用生理学技术方法时,要注意多方面的结合,如功能的研究要和形态、代谢的研究相结合;器官、细胞、分子水平应和整体水平的研究相结合;不同层次的技术各有其作用与意义,需要互相结合补充,而不是互相替代与贬斥;还应注意生理学技术和生物工程、理工技术的结合,单靠生理学技术不能解决所有的医学问题,因为学科的分门别类是人为地划分的,促进各学科的相互渗透和融合很重要,研究的对象涉及两门或两门以上的学科(即边缘学科),需要多学科的合作;本书也少量搜集与生理学相关学科的实验技术,供读者参考。在从事科学实验研究时,研究生和年轻的科技工作者要注意以下几点:①要仔细观察。因为任何发明都始于观察,并能结合所用的方法和条件,分析实验条件和结果之间的因果关系。②要有强烈的好奇心。随时记录与预期不一致的现象与结果,分析和研究其可能的原因,好奇心会促使你观察并进行试探,这往往可能带来智慧的“奇花异果”。③要不怕失败。实验材料都是有生命的东西,可因各种条件不同而变化,实验还常会失败,创造性实验更会遇到失败。失败是成功之母,要不怕受挫折,意志和毅力是十分重要的。④要发现问题,要多动脑筋。书中介绍的实验技术方法基本是成熟的,但不一定是最好方法,当实验技术应用到不同种系动物、不同器官和不同细胞或不同仪器时,或处于不同实验环境时,改进或改变技术方法是必要的。我们很希望研究生在使用本书时,能创造出更高技术方法的实验设计与构思,这是编者的目的之一,提出新设想,这是创造性思维过程的起点和动力。

参加本书编写的有第四军医大学、哈尔滨医科大学、西安交通大学医学院、浙江大学医学院、上海交通大学医学院、四川大学华西医学中心、武汉大学医学院、大连大学医学院、第二军医大学、山西医科大学、大连医科大学、首都医科大学、南京医科大学、辽宁医学院、泸州医学院、包头医学院、黑龙江中医药大学、浙江嘉兴学院、空军总医院、309 总医院、内蒙古自治区医院、中国科学院上海生命科学研究院和中国医学科学院药物研究所等 23 个单位,其中有造诣较深、有特长、经验丰富的教授和学者参加撰写或审修,对保证文稿的科学性、先进性和实用性起重要作用。希望研究生从现有理论和技术方法中,去摸索和领悟科研课

题的设计与研究思路。本书在写作方法上,侧重于实验方法与技术的描写,力求使研究生、教师和医生读后能操作实施,本书对从事基础医学、临床医学和生命科学工作者也有较大的参考价值。书中的彩图集中排在书末,图序号与文中相同。

本书为“十一五”国家重点图书,以分册形式出版,先出版《心血管肾脏生理学技术方法及其进展》和《内分泌生殖生理学实验技术方法及其进展》。作者按实验技术方法的编写要求撰稿,其与教材编写不同,实验技术较零散,写作方法和深浅程度不易掌握,主编和刘亚莉、郭海涛博士对书稿作了多次修改,第四军医大学出版社的马元怡硕士作了编辑加工,在此对他(她)们的辛勤劳动表示衷心感谢,但书稿中肯定会有错漏,恳请大家批评指正。两个分册出版后,希望能听到读者的意见和建议,以便把后续的几个分册写好。

朱妙章 吴博威 裴建明 曾晓荣

2009 年 8 月

目 录

上篇 心脏生理学实验技术与方法

第一章 分子生物学和心肌细胞实验技术

第1节	分子生物学技术在心血管研究中的应用	(1)
第2节	分子生物学技术在离子通道研究中的应用	(10)
第3节	电压钳制技术	(15)
第4节	膜片钳制技术原理和方法	(22)
第5节	小鼠窦房结细胞的分离	(38)
第6节	新生大鼠心肌细胞的原代培养	(40)
第7节	细胞低氧技术	(41)
第8节	细胞内钙的测定	(44)
第9节	心肌细胞收缩/舒张功能及胞内钙离子浓度的测定	(61)
第10节	心肌细胞模拟缺血/再灌注模型和同步收缩与钙信号的记录分析	(70)
第11节	一种实用方便的细胞内灌流技术	(74)
第12节	心肌线粒体渗透转换孔开放程度评价	(76)
第13节	心肌细胞凋亡检测	(81)
第14节	心肌闰盘连接间隙的观测方法	(86)

第二章 离体心脏、组织实验技术或模型

第1节	离体心脏灌流方法	(88)
第2节	小鼠心脏心室动力学测定	(91)
第3节	离体心房不应期电场刺激——一种研究心脏交感神经突触前受体功能的有效方法	(95)

第4节	离体心肌(乳头肌)收缩力的测定	(99)
第5节	经冠状动脉灌注兔左心室楔形组织块标本的制备	(102)
第6节	Langendorff 离体心脏灌流法	(106)
第7节	离体心脏泵功能的测量方法	(110)
第8节	小动物离体灌流心脏电信号记录方法	(120)
第9节	电压敏感性光标测实验技术及其在心脏电生理研究中的应用	(124)

第三章 心脏的整体动物实验或模型

第1节	犬颈部神经、迷走-交感干分离技术与方法	(128)
第2节	鼠、兔和犬血流动力学的测定方法	(130)
第3节	心肌缺血方法、心肌缺血模型与梗死范围的测定	(134)
第4节	心肌缺血/再灌注损伤动物模型的制备	(141)
第5节	小鼠心脏缺血模型制备的新方法(小鼠冠状动脉结扎制备心肌梗死模型更为高效的新方法及其与经典方法的比较)	(146)
第6节	心力衰竭模型的制备	(149)
第7节	心律失常模型的制备	(154)
第8节	缺血期高血糖大鼠模型制备的实验方法	(160)
第9节	瘢痕染色法——测量心肌梗死面积	(161)
第10节	采集心肌缺血区局部静脉血的方法——犬心大静脉与右心房搭桥术 ...	(164)
第11节	在体冠状动脉定量急性缺血模型	(166)
第12节	在体心脏电-机械活动记录方法	(168)
第13节	采集和记录电生理信号的一些基本原理	(171)
第14节	应用自制心导管电极研究在体心脏电活动	(180)

中篇 血管生理学实验技术与方法

第四章 血管内皮细胞、平滑肌细胞的实验技术

第1节	主动脉与脑皮层微血管血管内皮细胞培养	(183)
第2节	微血管内皮细胞 HSP70 蛋白表达测定	(186)
第3节	血管内皮细胞酶活性的测定	(189)

第4节	血浆和血管内皮细胞 cAMP 和 cGMP 含量的测定	(196)
第5节	一氧化氮的检测方法	(199)
第6节	血管平滑肌细胞的急性分离技术	(205)
第7节	血管平滑肌细胞大电导钙激活钾通道(BKca)电流的记录	(206)
第8节	小鼠脑动脉血管平滑肌细胞的分离方法	(212)
第9节	双光子及多光子激光扫描共聚焦显微镜技术在心血管中的应用	(214)
第10节	血管活性物质检测	(219)
第11节	血清和微血管 SOD 活性和 MDA 含量的测定	(225)

第五章 离体血管实验技术

第1节	离体血管舒缩功能的测定	(227)
第2节	离体颈动脉窦压力感受器活动的研究方法	(232)
第3节	急性缺氧性肺血管收缩实验	(235)

第六章 血管的整体动物实验或模型

第1节	高血压动物模型	(237)
第2节	动脉粥样硬化模型的制备	(244)
第3节	肺动脉高压的动物模型	(247)
第4节	低压低氧性大鼠肺动脉高压模型的建立	(252)
第5节	大鼠尾动脉压测量方法	(256)
第6节	脑血管血栓形成动物模型的制备	(258)
第7节	大鼠实验性血栓模型的建立及其评价	(261)
第8节	一种新的体内血栓形成的动物模型	(264)

下篇 肾脏生理学实验技术与方法

第七章 肾脏的分子生物学和细胞培养技术

第1节	肾组织蛋白的提取及 Western Blot 印迹	(268)
第2节	常用肾脏细胞的培养技术	(271)
一、	肾小管上皮细胞	(271)
二、	肾小球系膜细胞	(273)

三、肾小球内皮细胞	(274)
四、注意事项	(275)
第 3 节 肾脏髓袢升支粗段钾离子通道电流的观察	(278)
第 4 节 肾脏的灌流与免疫组织化学实验	(282)
第 5 节 水钠平衡相关脑区的免疫组织化学实验	(286)

第八章 肾脏的整体实验及检测

第 1 节 大鼠血压记录、尿液收集和肾排钠功能测定	(288)
第 2 节 脑内侧脑室给药的方法	(290)
第 3 节 肾小球滤过功能的检查	(292)
第 4 节 肾小管功能的检查	(298)
第 5 节 肾血浆流量的测定	(302)
第 6 节 肾脏内分泌功能的检查	(304)
第 7 节 肾动脉狭窄的超声检测	(307)

第九章 氧化应激相关指标检测

一、丙二醛的测定——硫代巴比妥酸法	(310)
二、谷胱甘肽的测定	(312)
三、一氧化氮的测定——硝酸还原酶法	(314)
四、蛋白含量的测定——考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒	(316)
全书参考文献	(318)

上篇 心脏生理学实验技术与方法

第一章 分子生物学和心肌细胞实验技术

第 1 节 分子生物学技术在心血管研究中的应用

1953 年, Watson 和 Crick 关于 DNA 双螺旋模型的建立标志着分子生物学的创立。多年来分子生物学迅速发展, 并渗透到生命科学的各个领域。随着分子生物学技术在心血管研究中的广泛深入应用, 心血管疾病的分子机制得以部分阐明。近年来, 在分子水平上对心血管系统的正常生理调控和病理过程(如心肌细胞信号转导、心肌电-收缩耦联机制、肾素-血管紧张素-醛固酮系统、缺血缺氧所致的基因表达改变、心血管疾病中的细胞凋亡、癌基因和抗癌基因在不同心血管疾病中的差异表达、先天性心脏病的基因缺陷以及遗传性心肌病的遗传基础等)的阐述, 为探讨心血管疾病的防治提供了翔实的分子水平的资料, 并为从根本上治愈一些心血管疾病开辟了崭新的局面。

分子生物学可用于心血管研究的方法很多, 如广泛应用于基因组中特定基因序列的定量和定性分析、基因突变检测和疾病诊断等的核酸分子杂交技术、能够快速特异地扩增目的基因或 DNA 片段的聚合酶链反应、有助于深入探索基因与心血管疾病的关系和对 DNA 一级结构检测的核酸序列分析、利用基因重组技术构建转基因动物模型以试验不同的生理和病理条件下特殊的目的基因的表达以及利于研究特定基因功能的基因打靶技术、基因表达研究技术、转录调控研究技术、反义寡核苷酸技术、RNA 干预(RNAi)技术、蛋白质组学技术等。随着基因组学和蛋白质组学研究的兴起, 后续转录组、代谢组、化学基因组等“组学”计划的实施, 生物信息学与系统生物学也取得突飞猛进的发展, 这些学科对心血管疾病的研究有着深远影响。

一、核酸的分子杂交

核酸分子杂交(nucleic acid hybridization)是指具有一定同源性的两条核酸单链在一定的条件下按碱基互补原则复性形成双链的过程。核酸分子杂交技术是分子生物学中最常用的基本技术之一, 被广泛应用于基因组中特定基因序列的定量和定性分析、基因突变检测和疾病诊断等, 基因芯片就是该技术与高通量技术及计算机技术结合的产物。分子杂交不仅可发生在 DNA 链之间, 而且也可发生在具有互补碱基的 DNA 与 RNA 片段之间、RNA 与 RNA 片段之间。杂交过程是有高度特异性的。杂交的双方是探针和待测核酸序列。用于

检测的已知核酸序列称为探针。为了便于示踪,探针需进行标记。常用的标志物有放射性核素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 等)及非放射性标志物(如生物素、地高辛等)。待测的核酸序列可以是克隆的基因片段,也可以是克隆的基因组 DNA 和细胞总 RNA。将核酸从细胞中分离纯化后可在体外与探针进行膜上印迹杂交,也可直接进行原位杂交。

(一) 探针的种类

探针的种类可分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、单链 cRNA 探针和合成的寡核苷酸探针等。探针选择的正确与否直接影响杂交结果。选择探针的基本原则是探针是否具有高度特异性。

1. 基因组 DNA 探针 选择此类探针时要特别注意真核生物基因组中存在的高度重复序列,如人类基因组中的 Alu 序列,并尽可能地使用基因的编码序列作为探针,避免使用内含子和其他非编码序列。

2. cDNA 探针 cDNA 探针不存在内含子和其他高度重复序列,可认为是一种较为理想的核酸探针,但是其制备较为困难,不易获得。

3. cRNA 探针 cRNA 探针可以 cDNA 为模板在体外转录获得。其优点有:①RNA-RNA 和 RNA-DNA 杂交体的稳定性较 DNA-DNA 为高,因而杂交温度可提高 10°C 左右,杂交特异性更高。②RNA 中不存在高度重复序列,非特异性杂交少。③杂交体不受 RNase 的影响,故杂交后用 RNase 处理,可消化未杂交的探针,从而降低本底。其缺点是制备过程复杂,易被环境中的 RNase 降解。

4. 寡核苷酸探针 寡核苷酸探针可在 DNA 合成仪上人工合成,长度只有 $15 \sim 30\text{bp}$,即使只有一个碱基不配对也会显著影响其 T_m 值,因此特别适合于基因点突变分析。探针小,组织穿透性好,杂交所需的时间也较短。另外,因合成的寡核苷酸探针实质上是脱氧核苷酸,对 RNase 不敏感,稳定性好。其缺点是探针小,所携带的标志物较少,尤其是非放射性标记时,灵敏度较低;其与 mRNA 形成的杂交体不如 RNA-RNA 稳定。

(二) 标志物的选择

理想的核酸探针标志物应具备以下几个特性:①高灵敏性;②探针与标记分子结合后不影响探针与待测特异序列结合的碱基配对特异性;③标记后不应影响探针的主要理化性质,尤其是杂交体的特异性和稳定性,不改变杂交体的 T_m 值;④应用酶促法标记时应对酶的活性及调节酶的活性无影响;⑤检测标志物还应具有高度的特异性,尽量降低假阳性率;⑥有较高的化学稳定性,利于长时间保存;⑦标记与检测方法简单,对人体无危害,对环境无污染,同时价格低廉。

核酸探针标志物分为放射性核素与非放射性标志物两大类。放射性核素是一种高度灵敏的示踪物,所标记的探针可检出 $1 \sim 10\mu\text{g}$ 的基因组 DNA 中的单拷贝基因。常用的放射性标志物有 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 等,在 Southern 印迹杂交中常用 ^{32}P 。另外不同的标记方法应选择相应标记方位的核素,如大多数标记方法使用 α - ^{32}P ,而 $5'$ -末端标记则需用 γ - ^{32}P 。非放射性标志物又可分为半抗原(如目前普遍应用的生物素和地高辛)、配体、荧光素(如异硫氰酸荧光素和罗丹明)及化学发光探针、光密度或电子密度标志物(如金、银)等。

探针标记法可分为酶促反应法和化学反应法两大类,其中以酶促反应法较为常用。酶促反应标记法包括有切口平移法、随机引物法、末端标记法和体外转录法等。因目前大多采用已标记好的探针或试剂盒,在此就不作介绍。

(三) 分子杂交的基本方法

1. Southern 杂交 Southern 杂交是 DNA 特定序列定位技术,是 1975 年由 Southern 提出

并以其名字命名的。由于该方法具有特异性强、灵敏度高和应用广泛等优点,已成为 DNA 分析,特别是基因组 DNA 分析中的最常用的手段之一。Southern 杂交的基本过程如图 1-1 所示,①提取 DNA,通常是从组织或培养细胞中获得全部的基因组 DNA;②限制性酶切,即以 一种或多种限制性核酸内切酶对 DNA 进行消化;③待测 DNA 样品的电泳分离,通过琼脂糖凝胶电泳可按分子量大小分离酶切所得到的片段;④凝胶中核酸变性;⑤Southern 转膜,将凝胶上电泳分离所得到的原位变性后的 DNA 片段,转移到另一种固相支持物(如硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上),主要有毛细管虹吸印迹法、电转印法、真空转移法,以毛细管虹吸印迹法为常用,转膜时应注意保持各个 DNA 片段的相对位置不变;⑥Southern 杂交,即用已标记的 DNA 或 RNA 探针与固着于固相支持物上的 DNA 杂交,在杂交前必须进行预杂交以封闭非特异性吸附位点;⑦检测与分析,经放射自显影或化学显色的方法可确定与探针互补的电泳条带的位置,从而达到检测和分析的目的。

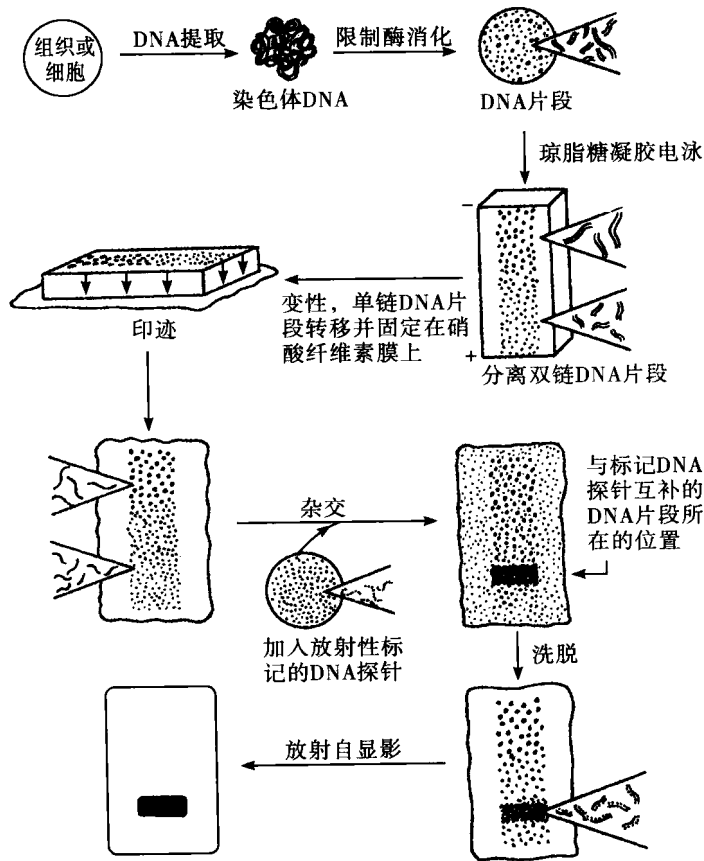


图 1-1 Southern 杂交的基本原理

2. Northern 杂交 Southern 分析的主要局限性在于它无法证明目的基因是否表达,只是了解目的基因是否存在及其相关信息。1977 年 Alwine 等提出了一种与 Southern 杂交法类似的方法,可用于分析细胞总 RNA 或含 PolyA 尾的 RNA 样品中特定的 mRNA 分子大小和丰度的分子杂交技术。为了与 Southern 杂交名相对应而定名为 Northern 杂交。Northern 杂

交原理和方法与 Southern 杂交基本相同,所不同的是 RNA 无须进行酶切而是以 RNA 分子的形式存在,可直接应用于电泳;由于碱性溶液可使 RNA 水解,因此不能进行碱变性,而是采用甲醛、乙二醛、甲基氢氧化汞等进行变性电泳;电泳后无需再进行变性和中和,可直接转膜。

3. 斑点印迹杂交 将 DNA(需经变性处理)或 RNA 点样于硝酸纤维膜或尼龙膜上,然后用标记探针杂交,所以称斑点印迹(dot blot)或斑点杂交。杂交呈点状或线状。这是一种简单的杂交方法,它能迅速测定样品中特定的 DNA 或 RNA。既可用于 RNA-DNA 杂交、DNA-DNA 杂交,亦可用于 RNA-RNA 杂交。该方法与 Southern 和 Northern 印迹法相比,其优点是简单、迅速;而且可在同一张膜上同时进行多个样品的检测,适用于粗提核酸样品,效果较好。缺点是不能测定分子量,特异性不高,有一定比例的假阳性出现。

4. 原位杂交 核酸保持在细胞或组织切片中,经适当的方法处理细胞或组织后,将标记的核酸探针与细胞或组织中的核酸进行杂交,称为原位杂交(in situ hybridization, ISH)。原位杂交是在核酸杂交技术的基础上发展起来的一种比较理想的特定序列核酸鉴定方法。

原位杂交具有许多优点,主要包括:①原位杂交可进行单细胞分析,从而证实某细胞基因的活化或病毒感染的存在;②不需要从细胞或组织中提取核酸,对组织中含量极低的靶序列有较高的灵敏度,并可完整地保持细胞或组织的形态,准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态;③允许在单细胞内同时检测两种物质(双标),如两个不同的基因或病毒,或一个基因一种病毒;④原位杂交所需的标本和试剂量少;⑤可用档案材料如病理蜡块进行回顾性研究。

原位杂交的基本步骤包括组织或细胞的固定、预杂交、杂交、冲洗及杂交结果检测等。其中的注意事项有:

(1)组织或细胞载片的处理 原位杂交是在载片上进行的,因此载片必须保持清洁且不能有任何核酸酶的污染。

(2)组织或细胞的固定 核酸原位杂交理想的固定液应具备以下几个特点:①能很好地保持组织细胞的形态;②对核酸无抽提、修饰和降解的作用;③不改变核酸在组织细胞内的定位;④不能对核酸与探针的杂交过程有阻碍作用;⑤固定液对杂交信号无遮蔽作用;⑥理化性质稳定,价格低廉。

(3)湿盒 因杂交的温度变化较大,从 37℃~62℃,每张标本所用的杂交液量少,为了防止杂交液中液体蒸发后造成杂交液浓缩甚至干燥,必须使用密闭的湿盒,湿盒底部所加液体须与杂交液中盐的浓度相同,还要防止湿盒盖顶部的水流入玻片。为防止杂交液蒸发,还可在杂交液上加盖一个硅化盖片,其边缘用橡胶水泥或石蜡封闭。

(4)组织细胞杂交前的预处理 原位杂交时,组织细胞中的核酸都与蛋白质结合,固定液的交联作用使细胞内的各种生物大分子形成网络,影响探针的穿透力,阻碍杂交体的形成。因此,必须使用去垢剂和(或)蛋白酶对组织细胞进行部分消化酶解,以去除核酸表面的蛋白质,使探针在细胞基质中获得较大的穿透力,从而易于与靶核酸进行杂交。

(5)探针的选择与标记 参见核酸杂交之探针的种类及标记。小分子的探针穿透力较大分子探针强,但大分子探针可在组织细胞中形成网络,从而加强杂交信号,同时本底增高。用于细胞的原位杂交常选用较短的探针,一般为 50~300bp,而用于细胞染色体原位杂交则常用较长的探针以增加杂交信号。

(6)杂交条件 原位杂交的一个主要优点就是,其杂交反应的特异性可通过调节反应条件而进行精确的控制。碱基的错配可经过控制严格的杂交条件而排除,在严格的条件下,探

针只能与同高度同源的靶序列杂交。杂交液的体积应尽量缩小。为提高探针的相对浓度还应用 10% 硫酸葡聚糖。一般温度范围在 37℃ ~ 60℃。冲洗时温度不能高于 50℃, 否则易导致组织细胞结构的破坏及组织细胞从切片上脱落, 使实验失败。但石蜡切片也可耐受 100℃ 高温。cDNA 探针和 RNA 探针在原位杂交中的最佳温度约为 50℃, 低于解链温度 20℃ ~ 25℃。DNA 探针的杂交可在 2 ~ 4h 内完成, 而 RNA 探针则应杂交过夜。DNA 杂交时应将切片加热至 95℃, 加热 5 ~ 15min, 以使靶 DNA 变性。总之杂交时及杂交后的处理对结果都有极大的影响, 必须准确使用各种方法以获得最佳效果。

二、聚合酶链反应技术

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是 1985 年由 Mullis 等首创的体外 DNA 扩增技术, 使人们能够通过试管内的数小时反应将特定的 DNA 片段扩增数百万倍。由于 PCR 能够快速特异地扩增目的基因或 DNA 片段, 并很容易使皮克 (pg) 或更低水平的起始物达到纳克 (ng) 水平以上的量, 因此不仅可用于基因分离、克隆和核酸序列分析, 还可用于突变体或重组体的构建和基因表达调控的研究、基因多态性分析、遗传病和传染病的诊断、心血管疾病发病机制的研究等方面。

PCR 的主要特点有: 操作简便, 应用耐高温的 Taq DNA 聚合酶, 并且在电脑控制的 DNA 扩增仪中进行扩增时, 只需把全部材料混合均匀后置入仪器内, 其反应便会依照所输入的程序自动进行; 效率极高, PCR 每一周期仅需数分钟, 所以一般常取 25 ~ 30 个周期就能使目的 DNA 达数百万倍扩增的反应, 在数小时内即可完成; 灵敏度高, PCR 产物的生成是以指数方式增加的, 可将皮克 (pg) 量级的起始物扩增至微克 (μg) 水平或放大真核细胞单拷贝基因, PCR 还可用于单个细胞 DNA 定型; 特异性强, Taq DNA 聚合酶耐高温的性质使得反应中引物与模板退火步骤可以在高温下进行, 结合的特异性大大增加, 被扩增的片段也能保持很高的正确程度。因此, PCR 在心血管的分子生物学研究中发挥了巨大的作用。

(一) 基本原理

PCR 是一种体外酶促合成特异 DNA 片段的方法, 其原理为在高温下将待扩增的双链模板 DNA 解链成为单链模板; 再在低温条件下使人工合成的两个特异的寡核苷酸引物分别与目的片段两侧的两条链互补结合; 然后于 72℃ 左右在耐热 DNA 聚合酶作用下将单核苷酸从引物 3' 端开始掺入, 沿模板 5' → 3' 方向延伸, 合成 DNA 新段。上述三个步骤为一个周期, 分别被称之为变性 (denature)、退火 (annealing) 和延伸 (extension)。① 变性: 加热至 95℃ 左右, DNA 双链的氢键断裂, 形成单链 DNA, 作为反应的模板; ② 退火: 将温度降至引物的 T_m 值左右或以下时, 引物与 DNA 模板互补区结合, 形成杂交链; ③ 延伸: 当反应体系温度升至 72℃ 左右时, Taq DNA 聚合酶催化以引物为起点的 5' → 3' 方向 DNA 链的延伸, 形成新生的 DNA 链。由于每一周期所产生的 DNA 均能成为下一次循环的模板, 所以 PCR 产物以指数方式增加, 经过 25 ~ 30 次周期之后, 理论上可增加至 2^{30} 个拷贝, 约 10^9 个分子。

(二) 典型的 PCR 反应体系

1. 耐热的 DNA 聚合酶 耐热的 DNA 聚合酶包括有 Taq DNA 聚合酶、Tth DNA 聚合酶、Vent DNA 聚合酶、Sac DNA 聚合酶等。其中以 Taq DNA 聚合酶最为常用。该酶是从水栖嗜热菌 *Thermus aquaticus* YT-1 中分离纯化而来, 是 Mg^{2+} 依赖性酶, 其活性与 Mg^{2+} 浓度相关, 在 75℃ ~ 80℃ 活性最高, 每个酶分子每秒可延伸约 150 个核苷酸, 温度超过 80℃, 合成速度则明显下降, 这可能与引物和模板结合稳定性遭到破坏有关; 具有较好的热稳定性, 其半衰