

神经科学研究尖端 技术手册

—分子组织化学

[日] 远山正弥 主编

22.8-62

科学出版社

内 容 简 介

本书共分9章,系统全面地介绍了神经科学研究中组织材料的处理,免疫组织化学、原位分子杂交、放射自显影、分子神经生物学、神经细胞培养等技术的基本原理、操作步骤和注意事项。文字叙述细致,条理清楚,并配有图解和照片,容易阅读和理解。适用于从事神经科学和使用上述技术的有关学科研究的所有人员,在实验中作为案头书使用。

图书在版编目(CIP)数据

神经科学研究尖端技术手册:分子组织化学/(日)远山正弥主编;饶志仁译.-2版.-北京:科学出版社,1997
ISBN 7-03-005638-8

I. 神… II. ①远… ②饶… III. ①神经系统-科学研究-技术手册②分子结构:生物结构-组织化学-人体组织学-研究-技术手册 IV. R322.8-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 19730 号

科学出版社出版

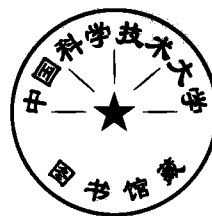
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1997 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/32
1997 年 6 月第一次印刷 印张:6 1/4
印数:1-900 字数:131 000

定 价:18.50 元



序一

由于饶志仁教授的努力,《神经科学研究尖端技术手册——分子组织化学》得以出版,深感喜悦。当今神经科学被称之为“21 世纪的科学”,体现了人们的期望。

本书在中国的出版,标志着日中两国携手向神经科学研究迈进的开始。本书如能对研究工作者,特别是肩负着未来的青年研究者有所帮助,将深感荣幸。

现有“21 世纪神经科学之曙光从亚洲升起”之说,我以为其中最重要的是日中两国合作,进行学术交流,加深友谊,而本书将起到桥梁作用。

最后向为本书出版而努力的,我多年的朋友饶志仁教授表示衷心的感谢。



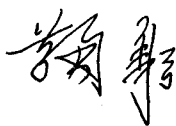
1996 年 2 月 28 日

序二

我也算是我国老一辈的神经科学家了,40余年来亲历沧桑。欣喜的是见到了近年来我国神经科学的发展,一大批有作为的青年人正在成长。

经常有人向我提起,希望有一本能够反映现代水平的神经组织化学的实用手册。饶志仁教授翻译的《神经科学尖端技术手册——分子组织化学》一书正符合了这种需要。原书著者们的多年研究实际及高深的理论造诣赢得了国际盛誉,也使他们能以自己的经验为基础,从理论及实践角度来撰写这本书。

饶志仁教授和原书著者有多年交往,他萌生译书的想法正是他在大阪远山正弥教授实验室中工作期间。相信此译著的问世,将促进我国神经科学研究的发展。



1996年3月于西安

编者的话(第一版)

21 世纪被视为神经科学的时代。这对于我们专门从事神经科学研究的人来说,既感到自豪,也深感责任之重大。研究中最重要的是以高瞻远瞩之目光着眼于现实并展望将来的发展,而发展的支柱是技术方法。历来神经科学按所使用的技术方法,明确划分为神经解剖学、神经生理学、神经药理学等。但科学之道路原本就不是以方法定目标,而是为达到某一目标选择其手段。事实上,前面所说的学科划分,目前虽正在逐渐消除,但尚不充分。尤其有的在培养研究工作者之中,以“研究手段”来定课题,尽管是少数,也应防微杜渐。从这一观点出发,本书的基本目的是使对现代神经科学尖端技术即使不熟悉的研究者,也能使用这些技术。人们对各种技术有的已掌握,有的尚未掌握,如能从本书获得敢于涉足至今尚未涉及的技术之勇气,我们深感荣幸。本书是以形态学的最新技术为中心,由大阪大学医学部生物医学教育研究中心神经解剖学部门盐坡贞夫^①副教授负责编集。

众所周知,神经系统是由许多特性不同的复杂的细胞集团所构成,对蛋白质和遗传基因进行局部定位和动态分析的形态学,不仅在神经科学乃至在细胞生物学领域,在探明细胞内特有物质的机能上是最重要的手段。特别是脑内的生理活性物质和受体尽管只是微量存在,却发挥着很大的作用,这就

^① 现任奈良先端科学技术大学院大学教授。——译者注

要求有高度敏感的技术,将不同细胞集团互相接近的脑内每一个神经元中的微量蛋白质和遗传基因显示出来。本书就若干这些技术作了详细的叙述,给人以亲临其境之感。本书曾是(财)千里生命科学振兴财团主办的“神经科学最尖端技术讲习会 I”使用的教材。在此出版之际,谨向财团及本讲习会的有关各位表示谢意。

(财)千里生命科学振兴财团 评议员 远山 正弥
大阪大学医学部解剖学第2讲座 教授

再版说明

本书作为神经科学研究的尖端技术方法(第一册)于1991年问世以来,尽管有许多不足之处,在长达2年的时间内,得到众多读者的支持;书也销售一空,我们作为编者感到非常高兴,但并不满足。在此,特向给予我们真诚支持的诸位读者、赐稿的各位著者以及厚生社的谷口社长、编辑部的蒲池君、太田君表示衷心感谢。同时,为了尽可能适应新的技术发展,重新校正各不足之处,我们决定对本书作全面充实和修订,并得到编辑部的通力合作。各位著者对原稿作了补充和修改,增添了新的项目,其中之一是请加拿大不列颠哥伦比亚大学的金承业教授撰写的有关神经细胞培养最新方法的一章。此外,为了便于理解,对内容作了重新编排,增加了新的照片,删去陈旧的内容,增添新的情报,有的部分完全重写。为便于各位进行有关仪器、材料和试剂的购置或咨询,本书列入了有关企业的联络地址,也刊登了部分企业的广告(中译本已删除——译者)。

本书的修订再版,如能得到更大的支持,并成为实验者的案头书,我们将感到由衷的高兴。

大阪大学医学部第2解剖学 远山 正弥

奈良先端科学技术大学院大学细胞构造学 盐坂 贞夫

大阪大学医学部神经解剖学 木山 博资

1994年1月30日

• v •

执笔者及单位

- 远山 正弥 大阪大学医学部解剖学第二讲座 教授
- 盐坡 贞夫 奈良先端科学技术大学院大学 细胞构造部门
教授
- 仙波惠美子 和歌山县立医科大学解剖学第二讲座 教授
- 木山 博资 大阪大学医学部生物医学教育研究中心
神经机能解剖学部门 教授
- 和中 明生 福岛医科大学生物医学科学研究所 细胞科学
研究室 教授
- 岩田 弘 田边制药株式会社生物研究所 研究员
- 稻垣 忍 大阪大学医学部短期大学部 教授
- 吉田 成孝 奈良先端科学技术大学院大学 细胞构造部门
副教授
- 高木 宏 大阪市立大学医学部 解剖学第一讲座 教授
- 加藤 启子 奈良先端科学技术大学院大学 细胞构造部门
助教
- 佐藤 真 大阪市立大学医学部 解剖学第一讲座 副教授
- 宫本 泰豪 大阪大学医学部内科学第一讲座
- 今泉 和则 大阪大学医学部分子脑机构讲座
- 高木 勉 大阪大学医学部分子脑机构讲座 副教授
- 金 承业 加拿大不列颠哥伦比亚大学
医学部神经学 教授

目 录

序一

序二

编者的话(第一版)

再版说明

执笔者及单位

第一章 组织材料的处理 盐坡 贞夫 1

一、前言 1

二、小动物的非固定取材 2

三、小动物的灌流固定 5

四、冰冻切片的制作 6

五、非冰冻切片的制作 12

六、冰冻切片与石蜡切片的比较 13

七、组织材料处理必要试剂的特性和配制方法 14

八、明胶化载片及硅化载片的制作 17

九、有关原位分子杂交组织化学、免疫组织化学用的切片制作

方法小结 18

第二章 原位分子杂交组织化学 21

一、前言 盐坡 贞夫 21

二、原位分子杂交组织化学简介 盐坡 贞夫 21

三、在原位分子杂交组织化学使用的标记探针 盐坡 贞夫 22

四、使用同位素标记的合成探针的原位分子杂交法

..... 仙波美惠子 24

(一) 合成探针的制备 24

(二) 组织切片的制作	28
(三) 杂交前处理	28
(四) 杂交反应	31
(五) 反应的显示	35
五、用非放射性物质标记合成探针的原位分子杂交法	
..... 木山 博资	38
(一) 探针的制备	39
(二) 杂交反应	43
(三) 原位分子杂交的对照实验	49
(四) 在消化管等内源性 AP 活性高的组织进行原位分子 杂交	51
(五) 同时证明二种 mRNA 的方法	51
六、使用同位素标记的 cRNA 探针的原位分子杂交法	
..... 和中 明生	53
(一) 探针的制备	53
(二) 组织切片制作	62
(三) 组织切片的杂交前处理	63
(四) 杂交反应	65
(五) 反应的显示——放射自显影	68
七、用非放射性物质标记 cRNA 探针的原位分子杂交法	
..... 岩田 弘、盐坡 贞夫	70
(一) 探针的制备	71
(二) 组织切片的杂交前处理	76
(三) 杂交反应的操作步骤	76
(四) 抗原-抗体反应及显色反应	77
八、放射自显影法	79
(一) 宏观放射自显影	80
(二) 微观放射自显影	84
(三) 电镜放射自显影	88
第三章 免疫组织化学	盐坡 贞夫 92

一、前言	92
二、抗血清、抗体	93
三、可视标记物的种类	94
四、免疫染色法的种类及操作步骤	95
五、免疫组织化学的注意事项	101
第四章 免疫电镜法	高木 宏 103
一、前言	103
二、免疫电镜法的原理	103
三、标记物的选择	104
四、组织的固定	105
五、包埋前染色法	106
六、包埋后染色法	111
七、冰冻超薄切片法	115
(一) 冰冻超薄切片法(包埋前染色)的特点	115
(二) 冰冻超薄切片的操作步骤	116
八、免疫电镜在神经科学上的应用	118
(一) 双重或多重标记法	119
(二) 免疫电镜法与其他方法的并用	120
第五章 Northern 杂交法	加藤 启子、佐藤 真 125
一、总 RNA、mRNA 纯化	125
(一) 总 RNA 纯化	125
(二) mRNA 纯化	129
(三) RNA 纯度标准	133
二、Northern 杂交	133
(一) RNA 的电泳	133
(二) 转移吸附	136
(三) 探针的制作方法	138
(四) 杂交反应	140
第六章 Western 印迹法	加藤 启子 143

一、前言	143
二、抗原的提取法	144
(一) 所用器具和溶液	144
(二) 操作步骤	145
(三) 蛋白质定量	146
三、凝胶电泳	147
(一) 所用器具和溶液	147
(二) 操作步骤	149
四、转膜吸附	150
(一) 所用器具和溶液	150
(二) 操作步骤	151
五、膜的封闭	152
六、抗原抗体反应	153
(一) 第一抗体与抗原反应	153
(二) 标记的第二抗体与第一抗体的反应	153
(三) 膜的洗涤	156
七、呈色反应	156
第七章 免疫沉淀法	官本 泰豪、盐坂 贞夫 157
一、前言	157
二、蛋白质的标记	157
(一) 用 ¹²⁵ I 进行表面标记	157
(二) 用 ³² S 进行生物合成标记	158
三、可溶化	158
四、免疫沉淀	159
第八章 蛋白质标记法	今泉 和则、高木 勉 161
一、前言	161
二、放射性碘的蛋白质标记法	161
(一) 原理	162
(二) 所用试剂	162

(三) 标记法步骤	163
三、非放射性物质的蛋白质标记法	166
(一) 原理	166
(二) 所用试剂	168
(三) 标记步骤	169
第九章 神经细胞培养法	金承业 170
一、前言	170
二、大鼠脊神经节神经细胞的培养	172
(一) 所需物品	173
(二) 操作步骤	174
三、大鼠大脑皮质神经细胞的培养	177
(一) 所需物品	178
(二) 操作步骤	178
四、用免疫细胞化学方法对神经细胞的确认	181
译者后记	184

第一章 组织材料的处理

盐坡 贞夫

一、前言

历来组织化学的主体是酶组织化学和免疫组织化学,前者对组织内的酶进行活性染色,后者使用抗体进行抗原抗体反应,由于这些方法主要是确定蛋白质在组织内的分布,因此用固定液将这些蛋白质固定在组织内是不可缺少的。最近,原位分子杂交组织化学的开展,从而有可能特异地确定组织内的核酸。组织内核酸的固定方法与组织内蛋白质和肽类的固定方法有某些不同。

进行免疫组织化学反应时,由于蛋白质或肽类在体内易分解,并容易从活体存在的部位流出,而必须尽可能在接近活体的状态下,在尽可能短的时间内固定那些物质,所以往往采用灌流固定的方法。此时,必须选择既能满足对蛋白质、肽类抗原性(和抗体的反应性)的保存,又能满足对组织固定这二个互相抵触要求的良好固定剂。

进行原位分子杂交组织化学的组织处理时,要很好了解核酸的性质。蛋白质、肽类和核酸的性质有很大不同,前者不耐热、容易变性;相反,后者遇热则非常稳定。因此,对组织或切片进行某种程度的加热,对核酸毫无影响。对蛋白质、肽类用比较强的固定液(如醛类固定剂)效果好;反之,原位分子杂

交组织化学则多数使用比较弱的固定液。其理由之一是核酸的分子相当巨大,很难从细胞内溶出。事实上用完全未固定的冰冻切片,也能染出好的结果。

原位分子杂交法另一个必须注意之点是核糖核酸酶(RNase)的影响。使用原位杂交显示组织内 mRNA 的方法,虽不像用 Northern 杂交法处理 mRNA 时那样严格,但多数也能得到好的反应。一般认为用 Northern 杂交法处理的是裸体的 mRNA,相反,在组织切片的 mRNA 被细胞的膜结构等保护着;此外 RNase 本身也可能被固定,失去活性。从多次用 RNase 进行杂交前处理而阳性结果消失的对照实验,就清楚地了解在所使用的反应液中混入了 RNase 将使实验失败。因此,所用试剂必须是无 RNase 的。

二、小动物的非固定取材

(一) 组织内可残留血液者

1. 所用的器具和溶液

事先准备麻醉药(如 4mg/ml 的戊巴比妥钠液)、注射器、

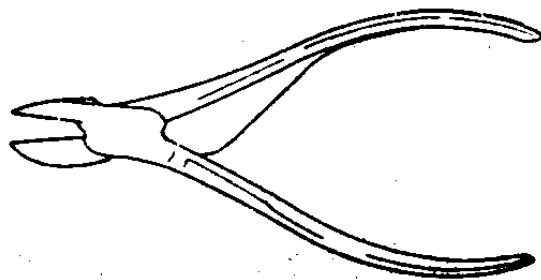


图 1-1 小型骨剪

解剖盘、大、小镊子、剪刀或断头器、小型骨剪(图 1-1)等。

2. 操作步骤

(1) 麻醉动物:在无需特别考虑麻醉药影响的情况下,可深麻动物,用镊子夹其尾无反应者为麻醉充分。

(2) 断头放血:用剪刀或断头器将动物断头处死放血。

(3) 开颅取脑:用小骨剪开颅取脑(图 1-2)。



图 1-2 用骨剪开颅,剪的平坦面向脑面,
用尖端剪骨,将骨片向上掀起,剪断。

(二) 组织内不可残留血液者

1. 所用的器具和溶液

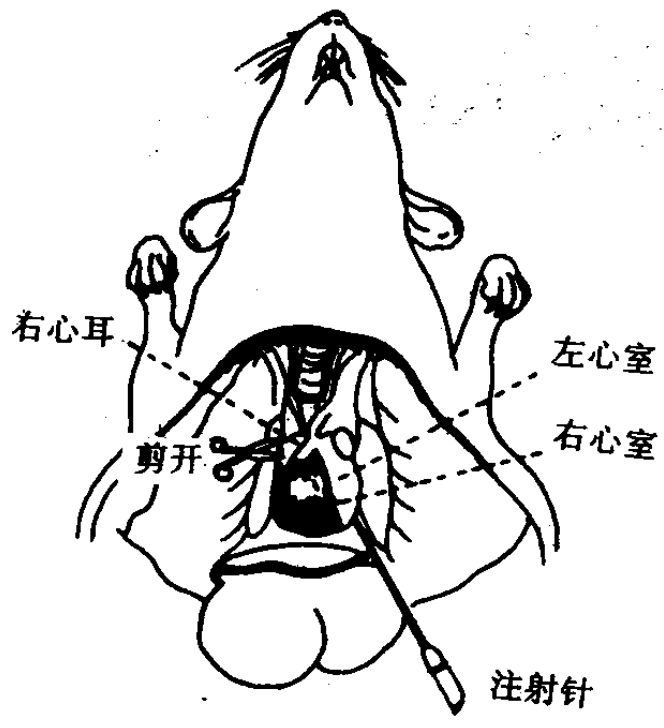
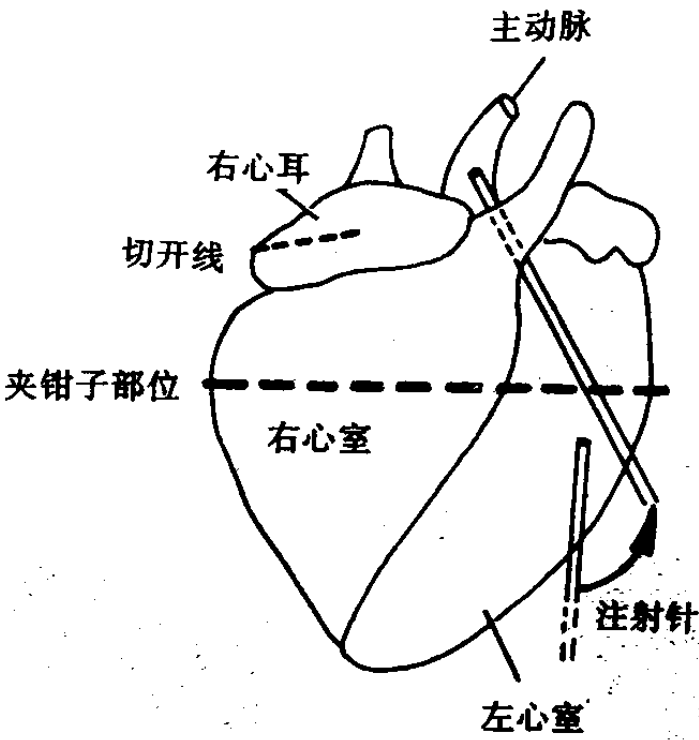
在上述物品的基础上增加灌流泵(或输液瓶)、输液管、注射针头和生理盐水。事先用生理盐水充满输液管。

2. 操作步骤

(1) 麻醉动物。

(2) 用剪刀剪开胸壁,露出心脏。

(3) 将注射针头插入左心室,剪开右心耳(图 1-3)。



流速 5~10ml/min

图 1-3 大鼠的灌注法

在不伤及脏器的情况下开胸。剪开右心耳,将注射针插入左心室,注入生理盐水。再将针缓慢地插入主动脉(上图),在确定针尖在主动脉内后,用钳子将心脏和针一起夹住。