DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.030
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0075-02

技术方法

与视皮层脑片膜片钳全细胞记录相结合的生物素标记技术

The technique of biocytin staining combined with patch-clamp whole cell recording of visual cortex

涂娅莉[1],刘应兵[2],阴正勤[1],胡志安[3] ([1]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;[2]四川大学华西医学院生理教研室,成都 610041;[3]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 在视皮层脑片膜片钳全细胞记录的同时,建立神经元的生物胞素标记技术。方法 利用盲法获得视皮层脑片膜片钳全细胞记录,在电生理记录的同时,Biocytin通过记录电极尖端灌注到所记录的细胞内,标记成功后再进行组织学染色。结果 能观察视皮层同一细胞的电生理和形态学特性及神经元之间的染色耦合。结论 本法操作简便,细胞标记成功率高,易于推广使用。

荧光黄(Lucifer yellow CH, LY)和辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)是两种用于研究哺乳类神经元的标记物,二者都具有细胞内标记物所需的特点,包括水溶性、稳定性、扩散快及高度的可视性,但在应用上仍有不少缺点。随着生物胞素(Biocytin)的广泛应用,应用脑片膜片钳研究同一细胞的生理和形态学已成为当今国际上普遍关注的课题。由于视皮层细胞对缺氧更敏感,神经元较小,分布较稀疏,进行全细胞记录的难度比海马回等皮层下结构大,在脑片膜片钳全细胞记录的同时进行生物胞素标记则更为困难。为此,我们结合国内研究实际状况和在实验工作中的体会,建立了视皮层脑片膜片钳全细胞记录下的生物胞素标记技术,并使其易于推广使用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用第三军医大学实验动物中心提供的正常Sprague-Dawleg大白鼠57只,雌雄不限,年龄为出生后4~30 d。

1.1.2 主要仪器 解剖显微镜、膜片钳放大器、微操作器、定向推进器、刺激器、隔离器、振动切片机、电极拉制器、A/D转换器、荧光显微镜、恒温孵箱。

1.1.3 主要试剂 Biocytin(美国,Sigma公司)、Triton(福州迈新公司)、ABC复合物(Avidin-biotin-HRP complex,德国Vector公司)。

1.1.4 主要溶液 人工脑脊液(Artificial cerebral spinal fluid, ACSF)中各种离子成分及其浓度(mmol/L)为:$CaCl_2$ 2.4, NaCl 124, KCl 3, NaH_2PO_4 1.25, $MgSO_4$ 1.3, $NaHCO_3$ 26, 葡萄糖 16.6。在95%氧气和5%二氧化碳的充灌下pH值为7.4。

电极内液成分及其浓度(mmol/L)为:葡萄糖酸钾117.5, $MgCl_2$ 2, HEPES 5, EGTA 0.5, ATP 2,并灌入0.5%生物素(Biocytin)。

1.2 方法

1.2.1 视皮层脑片的制备 乙醚麻醉动物,快速断头,打开颅骨,取出脑组织,切出一侧大脑半球的枕叶;中间切面用瞬间粘合剂粘固到振动切片机的平台上。浸入0 ℃氧饱和的人工脑脊液,在冠状平面上将脑块切成厚度为400 μm的薄片。切下的脑片移入氧饱和的ACSF中,室温下(18~25 ℃)孵育1 h备用。

1.2.2 记录电极的制备 应用电极拉制器拉制玻璃毛细管微电极。拉制好的电极尖端直径约1~2 μm,阻抗为5~10 MΩ。

1.2.3 视皮层脑片膜片钳全细胞电生理记录[1] 取一片备用的脑片,放入脑片槽中。脑片槽为全浸式,用室温下氧饱和的ACSF循环灌流(3~4 ml/min)。脑片上盖一片尼龙网,以克服灌流液的流动对胞内记录稳定性的影响。用双极刺激电极(尖端直径小于10 μm,两根电极尖端之间距离100 μm)插入脑片皮层下方的白质中。在解剖显微镜下,将微电极用微操纵器插入脑片的II~VI层中,利用特定的测试方波电脉冲以寻找细胞,进而获得膜片记录。细胞反应由膜片钳放大器放大后通过A/D转换器转换成数据化数据,并送入计算机,应用Axon公司的pClamp6软件中的Clampex采集数据。

1.2.4 视皮层神经元生物素染色 在视皮层脑片膜片钳电生理记录的同时,Biocytin通过记录电极尖端灌注所记录的细胞内,染色5~20 min后,极其缓慢地将记录电极旋出,即刻将脑片转移至固定液中,置于4 ℃冰箱中过夜,次日进行组织学染色。

1.2.5 组织学染色 ①0.01 mol/L PBS漂洗,5 min/次,3次;②0.5% Triton-X(PBS)中放置0.5~1 h;③0.01 mol/L PBS漂洗:5 min/次,3次;④切片入ABC复合物(Avidin-biotin-HRP complex),37 ℃ 1 h;⑤0.01 mol/L PBS漂洗:5 min/次,3次;⑥显色:将切片浸入0.05% DAB/过氧化氢的0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.6)缓冲液中1~10 min,观察显色适宜,0.01 mol/L PBS漂洗,终止显色反应。⑦将切片晾干,系列乙醇脱水,二甲苯透明,DPX封片。

2 结果

2.1 对同一细胞进行电生理和形态学观察

刺激视皮层白质,在II~VI层记录到40个神经元的突触后电

作者简介:涂娅莉(1972—),女,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事视觉发育电生理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754000-73097

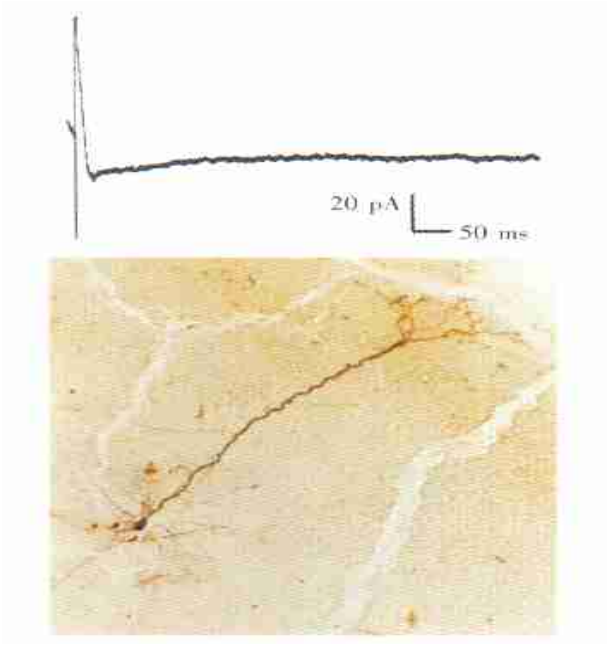
收稿日期:2002-05-10;修稿日期:2002-08-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

流(Post synaptic currents, PSCs),成功染色24个神经元,成功率为60%。图1为一个12天龄位于视皮层V层的锥体细胞的生物素染色照片,其树突分枝较分散,分布范围广,除主树突向浅层走行,与浅层的神经元建立轴突联系外,水平方向的树突又与邻近细胞柱的神经元之间形成广泛的侧枝联系。图上方为该细胞在刺激强度为0.4 mA,钳制电压为-70 mV时的PSCs曲线。

2.2 视皮层神经元之间的染色耦合

在24个染色成功的神经元中可观察到两个神经元的染色耦合现象,如图2,该细胞是从13天龄动物的脑片中获得。耦合细胞数为2个,细胞均位于同一层次。



上:PSCs曲线;下:PSCs生物胞素染色 (ABC×200)

图1 视皮层神经元 位于视皮层V层的12天龄成熟型细胞,其轴突发出广泛的侧枝,与各层神经元建立突触联系



图2 视皮层神经元染色耦合,箭头所指为两个染色耦合细胞生物胞素染色 (ABC×140)

3 讨论

Biocytin分子量为372.5,结构为$C_{16}H_{28}N_4O_4S$,具有高度水溶性。其中65%的成分为Biotin,它与蛋白分子之间有高度亲和力。Biocytin用来作细胞内标记的主要优点是小分子、高水溶性、与卵白素(Avidin)有亲和力。前两个优点使它能在微电极尖端作细胞内记录期间易于注射,与卵白素之间的高亲和力使它成为利用光吸收或光发送标记物进行观察的一种有效的标记方法。另外,用Biocytin作标记也能满足其他细胞内标记物[2]所需的普遍要求,如在细胞内快速扩散、低毒性、低胞外漏及组织学过程的稳定性。与生物素相比,HRP的主要优点是稳定、在简单组化反应后在光电镜下形成永久、不透明的图像,很容易观察超微结构保存得很好的神经元,但由于其分子量太大,不能通过突触间隙,限制了它在染色耦合中的应用。LY的分子量很小(457),足以通过突触间隙,它不需要进一步的组化过程,因而被广泛用于研究耦联现象,它所形成的荧光素图像具有一过性。由于充有LY的电极在注射期间比充有Biocytin的电极更易堵塞,因而大大地限制了它在膜片钳中的应用。

在本研究中,电极内液中含有0.5% Biocytin。在电极尖端与视皮层神经细胞之间形成全细胞膜片时,含有Biocytin的电极内液迅速置换胞内液,记录5~15 min便可染色成功。充灌Biocytin电极的性质研究表明:它并不显著增加电极阻抗[3],因此在用Biocytin作电极内液成分时,不会影响应用膜片钳技术寻找细胞的成功率。在膜片钳电生理记录的同时进行生物素标记,可直观地观察不同电生理学特性的细胞所具有的形态学特征。另外,由于染色耦合是一种比较可靠的观察神经元之间是否存在电突触(缝隙连接)的间接方法,近年来神经科学家利用生物素能够穿过缝隙连接的特性,用染色耦合的方法来间接观察电突触的存在[4]。

在全细胞记录中电极尖端只是吸附起细胞,Biocytin不会漏到记录细胞以外而使背景染色,避免了细胞的假阳性染色,在研究染色耦合时有很高的真实性。

关键词:视皮层;脑片;膜片钳;全细胞记录;生物素
中图法分类号:R33-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] 涂娅莉,阴正勤,刘应兵. 建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术[J]. 第三军医大学学报,2001,23(5):610-611.

[2] Yoshitani N, Mori E, Takasaki S. Detection of carbohydrate recognition molecules on the plasma membrane of boar sperm by dextran-based multivalent oligosaccharide probes[J]. Glycobiology, 2001, 11(4): 313-320.

[3] Horikawa K, Armstrong W E. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates[J]. J Neurosci Methods, 1988, 25(1): 1-11.

[4] Le A-CN, Musil L S. A novel role for FGF and extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated intercellular communication in the lens [J]. J Cell Biology, 2001, 154(1): 197-216

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net