DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.060

常用制备T-载体的方法有两种:(1)将载体用平端内切酶切出平端,在缺乏dATP及存在过量dTTP的情况下,用Taq DNA聚合酶催化,在3'末端加上dT[3]。(2)用脱氧核苷酸末端转移酶(TDT)在线性化载体的3'末端加上双脱氧胸腺嘧啶核苷酸(ddTTP)[4]。这两种方法存在明显缺点:一是不能保证100%的载体分子末端都能加上dT,二是难以控制加上去的正好是1个dT。本研究根据文献报道采用*Xcm* Ⅰ接头盒构建T-载体,有以下明显的优越性:(1)通过构建重组质粒,转化宿主菌,纯化质粒,*Xcm* Ⅰ酶切获得T-载体分子,制备十分快捷、成本低、且可大量获得、易于商品化。(2)"间隔DNA"的插入作为制备T-载体分子的质量控制指标:只需电泳显示间隔DNA片段已切出来,即表明载体分子两端都具有悬垂dT,而且只有1个dT,这保证了所制备T-载体分子的质量。(3)pSK Ⅱ(+)载体是一个功能性很强的载体,它的多克隆位点上含有较多的限制性酶切位点,而且它在大肠杆菌中具有很高的拷贝数,易于分离制备,故而本研究选用pSK Ⅱ(+)作为构建T-载体的基础载体。所构建T-载体保留了原载体的一切功能:①可用于直接克隆PCR扩增产物。同时,由于接头盒插在pSK多克隆位点的*EcoR* Ⅴ位置,其插入使得原多克隆位点仅仅丢失了*EcoR* Ⅴ酶切位点,因此可以方便地利用接头盒两侧的酶切位点对插入片段进行亚克隆。②插入的接头盒含42个碱基,为3的整数倍,从而保留了原载体的兰/白菌落筛选功能。③利用T3或T7启动子可通过试管内转录(*In vitro* transcription)制备RNA,利用丝状噬菌体复制原点可以制备供测序用的单链DNA。④有学者采用不同的PCR产物来检测其可用性,数据显示其连接效率为常规方法的3~5倍,并能成功地用于长度为数百至数千bp的PCR产物的直接克隆[1,5,6]。

关键词:T-载体;构建;*Xcm* Ⅰ;PCR
中图法分类号:R394-33 文献标识码:B

参考文献:

[1] Testori A, Listowsky I, Sollitti P. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site[J]. Gene, 1994, 143(1): 151-152.
[2] Gray G L, Smith D H, Baldridge J S, *et al*. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *pseudomonas aeruginosa*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81(9): 2 645-2 649.
[3] Marchuk D. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 19(5): 1 154-1 155.
[4] Holton T A, Graham M W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 19(5): 1 156.
[5] Ichihara Y, Kurosawa Y. Construction of new T-vectors for direct cloning of PCR products[J]. Gene, 1993, 130(1): 153-154.
[6] Cha J, Bishai W, Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products[J]. Gene, 1993, 136(S1-2): 369-370.

(编辑 潘式文)

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)05-0610-02

建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术

Establishment of patch-clamp whole-cell recording technique in rat visual cortex

涂娅莉[1],闵正勤[1],刘应兵[2] ([1]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;[2]华西医科大学生理学教研室,成都 610041)

提 要:目的 建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术。方法 利用盲法获得膜片记录,即根据电极进入溶液中到获得全细胞膜片的过程中,测试方波脉冲的变化来寻找细胞。结果 能成功地进行视皮层全细胞记录。结论 本法操作简便,所需仪器简单,易于推广应用。

由于中枢神经系统的网络特性,并由此产生的极为复杂的调控功能,脑片膜片钳法逐渐由对单个分离细胞的研究转为在具有简单网络系统的脑片(Brain slice)上进行。目前,视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术已成为当今国际上视觉系统电生理研究的主要技术之一,但在我国尚未广泛开展,仅为极少数实验室所采用。由于视皮层细胞对缺氧更为敏感,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。为此,我们结合国内研究实际情况和在实验工作中的体会,建立了视皮层脑片膜片钳技术,并使其易于推广应用。

作者简介:涂娅莉(1972-),女,重庆市人,硕士,医师。电话:(023)68754000-73097
收稿日期:2000-12-20;修回日期:2001-03-22

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

1　材料和方法

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-Dawley 大白鼠, 雌雄不限, 年龄为出生后 4～30 d。

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。

1.3　试剂及溶液

人工脑脊液(Artificial cerebral spinal flind, ACSF)中各种成分及其浓度(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% O_2 和 5% CO_2 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 232.4, $MgCl_2$ 2, HEPES 5, EGTA 0.5, ATP 2。

1.4　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 300～500 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。

1.5　记录电极的制备

应用电极拉制器拉制玻璃毛细管微电极。拉制好的电极阻抗为 5～10 MΩ, 尖端直径约 1～2 μm, 尖端至开口形成一定角度的渐细过程度。

1.6　视皮层脑片膜片钳全细胞电生理记录

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)置于脑片皮层下方的白质中。在解剖显微镜下, 用微操纵器将微电极插入脑片的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 pClamp 软件中的 Clampex 采集数据。

2　结果

在电极接触脑片组织以前, 给予电极内持续正压以阻止细胞碎片沾染或阻塞电极尖端是十分重要的。当电极接近细胞时, 所给予的测试方波电脉冲会因电阻增大产生相应变化(见图 1"接近细胞"组)。此时再给予短暂负压吸引, 如果细胞健康, 电极也好, 电极与膜之间的电阻会迅速增大至 giga 欧姆(10^9 Ω)水平以上, 膜与电极之间形成在机械和电学上都非常稳固的紧密封闭(见图 1"封闭膜片"组)。此时的电极与膜形成了所谓的"连接细胞的膜片"(Cell-attached patch), 再给予负压吸引或/和 0.5～5 ms 时程的电脉冲, 则可打破电极尖端内的细胞膜, 使细胞内液与电极内液相通, 形成所谓的"全细胞膜片"[1]。

一般的膜片钳放大器具有的功能之一是电压钳(Voltage clamp)。在得到全细胞膜片以后, 通过放大器特定的反馈放大环路, 设置可调的钳位电压(Clamping voltage), 从而将细胞膜两侧电位差固定在钳位电压, 以记录跨膜电流的变化。

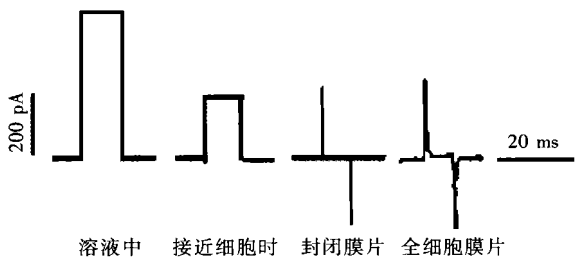


图 1　记录电极分别在溶液中, 接近细胞, 形成封闭膜片时和建立全细胞膜片钳时的测试方波变化曲线

3　讨论

本实验中所建立的视皮层脑片膜片钳技术, 是利用盲法获得膜片记录, 即根据电极进入溶液中到得到全细胞膜片的过程中, 测试方波脉冲的变化来寻找细胞。其最大的优点是实验中不需要昂贵的特殊显微镜, 而且还避免了脑片受物理破坏或酶处理因素的影响。在实验中, 只需一套标准的细胞内记录装置和一台适宜的膜片钳放大器, 即使是用二步或三步法电极拉制器和手动振片机也同样可以进行膜片钳记录。我们将全细胞记录与电压钳技术结合起来, 可以研究哺乳类视皮层神经元的突触特性和膜特性, 还可以进行多个脑区和不同发育阶段的神经元的记录。随着细胞内标记物特别是生物素(Biocytin)的广泛应用, 应用脑片膜片钳技术研究同一细胞的生理学和形态学已成为当今国际上普遍关注的课题[2]。视皮层脑片膜片钳技术的建立, 为国内视皮层的相关研究开辟了一个新的领域。

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

参考文献:

[1] 张　莉. 脑片膜片钳法——改进的盲法和离子孔道法[J]. 华西医科大学学报, 1998, 29(3): 338－342.
[2] Hestrin S, Armstrong W E. Morphology and physiology of cortical neurons in layⅠ[J]. J Neurosci, 1996, 16(17): 5 290－5 300.

(编辑　汪勤俭)

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