

58.176
547

微电极研究技术

P. M. 梅舍尔斯基 著

譚 德 培 譯

徐 科 校

2463 60

人民卫生出版社

一九六三年·北京

內 容 提 要

本書是苏联梅舍尔斯基所著“微电极研究技术”的中譯本,系根据1960年版譯出的。內容較新,为目前比較缺乏的显微生理学参考書。書內除系統地闡述有关制备微电极的操作方法外,并順序討論了运用微电极进行实验研究的一系列問題。書末附有文献來源,以便讀者查閱。可供医学、神經生理学、生物学等科研人員进行显微生理学研究工作的参考。

Р. М. МЕШЕРСКИЙ
МЕТОДИКА
МИКРОЭЛЕКТРОДНОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ
МЕДГИЗ—1960—МОСКВА

微电极研究技术

开本: 787×1092/32 印張: 6⁸/₁₆ 字数: 141 千字

譚 德 培 譯

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京審判出版業營業許可証出字第〇四六號)

• 北京崇文區錢子胡同三十六號 •

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 • 各地新华书店經售

統一書号: 14048·2885

1963年10月第1版—第1次印刷

定 价: 1. 0 0 元

印 • 数: 1—2,500

64-110

目 录

前言	1
第一章 微电极	4
第二章 用微电极进行研究	67
第三章 神经元的判定	95
第四章 微电极位置的组织学判定	108
第五章 放大与记录装置	120
结语	164
文献	166
作者索引	198

06640

前 言

显微镜研究方法的发展，使我们能获得有关机体各组织的精细结构及肌纤维、网膜感受器、周围及中枢神经系统神经元等这些基本组织的形态学方面的精确资料。但不久以前还没有足够理想的显微生理学研究方法，使我们有可能直接地研究这些组成复杂有机体的基本单位的生命活动，它们在安静状态时的机能表现，以及对各种适宜刺激和损害性因素作用发生的反应。

在出现微电极技术之前，研究可兴奋组织的电过程时，都应用比较大的电极。这样大的电极只能记录许多细胞兴奋的、综合的、平均的总体效应。

单个细胞的活动，只能根据记录总体效应时所获得的间接资料或在解剖学上或机能上分离一些个别细胞及纤维后所获得的资料来判断。后一方法不仅要求精巧的实验技能，并且还限于在数量不多的、适于用这种方法的研究材料上进行。如果说，由于具有足够的经验和耐性能在无脊椎动物周围组织中分离出单个巨神经元或从蟾蜍神经中分离出一根单纤维，那末要从高等动物大脑皮质下核中获得单神经元的离体标本却是一个不现实的课题。

在生理学实验的实际中，采用比较简单的工具——微玻

管,这为新的、十分迅速发展的生理学部门——可兴奋组织的显微生理学奠下了开端。

最初的显微生理学工作是在单细胞有机体或较大的离体细胞上进行的。以后在较小的位于表面的细胞上进行实验,因为这样便于触及这些细胞,并可以在显微镜观察下进行操作。现在,显微生理学研究方法改进得如此完善,以致有可能不仅研究位于高等动物器官深部的有机体的最小细胞的活动,而且能研究这些细胞各个部分的活动。所有的可兴奋组织:肌纤维、无脊椎动物及脊椎动物的各种感受器细胞、种族发育各个阶段动物的周围及中枢神经系统神经元的轴突、细胞体、树突以及人大脑的神经元,都是显微生理学的研究对象。

显微生理学的“分辨力”与光学及电子显微镜的分辨力是同一水平的。显微生理学和组织学研究方法的结合具有十分远大的前途,因为这为最精细地研究有机体基本装置的结构和机能提供了一切必需的条件。

现在,绝大多数显微生理学的工作都是研究高等脊椎动物中枢神经系统单个神经元的活动。如果说,对研究中枢神经系统及其各部分的整合活动已有周密设计的研究方法(如条件反射法、脑电图描记、摘除、凝结及刺激),则分析地研究个别神经元及神经元的各部分,现时还只有借助于显微生理学的方法。比较小的微电极可以记录神经元各部分兴奋时发生的局部电位。必要时可以把微电极穿过细胞膜插入细胞体

内部。这不仅可以研究神经元或其他可兴奋细胞各部分兴奋波发生及扩布的规律,还能研究膜的理化特性,揭露直接、顺向、逆向刺激及微量药物刺激细胞的规律性。

书中将讨论与作微电极实验有关的一系列问题。主要的注意力集中在方法上最复杂的研究对象——高等脊椎动物中枢神经系统的神经元上。也要讨论在肌纤维、交感神经节神经元、巨神经元及其他材料上工作时遇到的一些微电极记录技术的特殊问题。

材料的叙述基本上按照实验进行的顺序:微电极制备,实验动物的准备,向组织插入微电极,单个细胞活动的判定及微电极定位的组织学检查。最后一章讨论进行微电极工作时对放大及记录装置提出的一些特殊要求。

由于本书篇幅有限,作者不可能详细地阐明某些与所述材料无直接关系的问题。但书中援引了主要的文献来源,读者利用它们可以获得一些有兴趣的资料。

作者对 А. Л. Бызов, В. А. Кожевников, Г. А. Курелла, И. И. Лосев, Р. Н. Лурье, Е. И. Попова 及 Л. С. Седлович 致以谢意,感谢他们在准备本手稿的付印上所给予的帮助。

第一章 微 电 极

对可兴奋组织进行显微生理学研究时，可应用灌以电解质溶液的液体(玻璃毛细管)微电极，或应用复盖着绝缘层(除电极尖端外)的金属微电极。图 1 示出为引导单个神经元生物电位的这种电极的尺寸与被试神经细胞尺寸的比较。

液体微电极的主要优点在于：灌微电极的电解质在细胞质或细胞间液与联向放大器输入的金属导线间造成可靠的接触，这保证了微电极的电学稳定性。应该选择这样的金属及电解质，使通过它们接触处的小的直流电不致改变系统的电特性。如在微电极粗的一端插入一根拧成螺旋状的导线，即可大大增加电解质与金属之间的接触面。这样，通过金属电极接触面的电流密度即大大减小。在电解质和金属之间可加入一乏极化小桥，在最简单的场合下即加一 Ag-AgCl 系统，这样可同时记录恒定的膜电位及快速的动作电位。

液体微电极的缺点为其欧姆电阻高，离子可能从灌充微电极的电解质中弥散到细胞质内，以及机械的性能不强。

金属微电极的欧姆电阻较低，对长时间的慢性或半慢性实验来讲，它比玻璃微电极更为适宜，它比较坚固及有韧性，因此可以被多次应用。

金属微电极最大的缺点是甚至很小的栅极电流也可使其

极化，这就导致微电极的电阻增大及在其尖端出现不稳定的直流电位。金属微电极主要用来进行峰电位的细胞外记录。

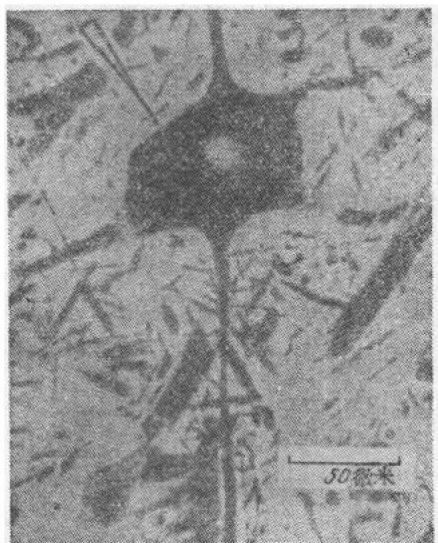


图1 猫脊髓运动神经元的显微照象
在神经元体附近(图的左上角), 模式地以同样放大倍数示出
插入脑组织并紧靠细胞膜的微电极的尖端; 右下角为标尺
(Brock, Coombs a. Eccles, 1952)

液体微电极的制备

液体微电极由微玻璃管及灌充它的电解质组成。

液体微电极的微玻璃管有二种形状: (1)厚壁的, 尖端有微孔; (2)薄壁的。

厚壁微玻管

为制备这种微玻管可应用厚壁毛细管，其外径为 50~200 微米，一端呈锥体状逐渐狭小(一般是熔化成的)。

小心地在磨石上磨熔化的一端，即可在尖顶处垂直毛细管轴磨开一小孔 (Pratt, 1917)。继续磨时，孔的内径可增大。也可用钻石在相应处切断毛细管来代替磨(А. Л. БЫЗОВ, 1957)。

用这种微玻管制成的微电极可作电位的细胞外记录，若用它在表面组织或离体组织上工作时，则更为相宜，因为为了触及这些细胞，微电极不必穿过周围组织。

薄壁微玻管

在无脊椎动物离体巨神经元上工作时，应用薄壁微玻管，其外径可达 50~60 微米。用这种微玻管制成的微电极，可由切断端插入神经纤维内。

为了细胞外记录深在成分的活动，如大小不超过 10~70 微米的中枢神经系统神经元的活动，可应用外径为 1~4 微米的微电极。这种微电极很容易插入所需深度的组织中而不引起显著的损伤。在某些场合下，为作深在的细胞外记录还可以应用较粗的微电极。

当把微电极穿透细胞膜作电位的细胞内记录时，微电极尖端的直径应小于 0.5 微米。同时微电极应具有足够坚固性，

以便在穿入组织时不被折断。这种微电极尖端的直径已经超出普通光学显微镜的分辨能力。因此，直径小于0.5微米的微电极，有时称为“超微电极”。

为制备薄壁微玻管应用下述方法：(1)手工法；(2)用半自动装置(“微拉制仪”)拉制；(3)用特殊的自动装置拉制。

手工制备法 该方法(Ling a. Gerard, 1949)为：在一般的火焰上，或最好在专门的微喷灯上加温毛坯的一定部位，这种毛坯为一直径0.5~1毫米的玻璃管(Peterfi, 1928; Shereshevsky, 1928; Viegas a. Hildebrand, 1956)。

当玻璃烧软时，把毛坯自火焰中取出，用手拉制。拉制可以分阶段进行：先拉到直径0.3毫米，然后(在最小加热下快拉)才达到0.2~1微米。

在拉之前最好能在热硫酸溶液中洗涤玻璃毛坯，再仔细地在蒸馏水中冲洗及烘干。

不要用重铬酸钾洗毛细管，因为铬盐要吸附在玻璃的表面。

如果没有标准的毛坯，则第一步工作是在喷灯(用氧气送风的喷灯为宜)火焰上烧制粗玻璃管并拉成毛细管。

原玻璃管的内径应为外径的 $\frac{1}{2}$ 左右。在最适宜的加热下拉制成的玻管内外径的比率，仍保存着原有情况。中等度加热下迅速拉制，可获得壁较薄的毛细管；如缓慢地拉显著软化的玻管，则获得壁较厚的毛细管。玻璃软化的程度是根据加热时管子弯曲的程度及玻璃的颜色来判断的。

用手工制备微电极,要有相当的技巧、耐心和时间。在显微镜检查下,所制出的微玻管尖端的内外径、尖端的斜度及拉长部分的长度等有所不同。在严格的选择下,仅5%的微玻管实际上合用。在手工方法下要根据事先提出的参数来制备微玻管是不可能的。

用半自动装置拉制 为了简化微玻管的制备及使其标准化,应用一种常称为微拉制仪的简单装置。这个装置包括有固定玻璃毛细管的夹子及加热于毛细管一定部位的螺旋状电热丝或微喷灯(Shereshefsky, 1928; Weale, 1951a; Templeton, 1955; Г. А. Курелла, 1958; Л. В. Латманизова 及 Л. Г. Находкина, 1958)。固定在毛细管末端的负荷把毛坯拉成所需要的直径。用显微镜观察微玻管的制备过程。

在苏联科学院高级神经活动研究所内制成了为制备微玻管用的这种型式的操纵器。该仪器(图2)的基础为一普通显微镜。用孟氏胶或专门的弹簧把玻璃毛细管1固定在仪器的垂直齿条3上。固定在U形架子8上的垂直及水平齿条4可把毛坯的加热及拉长部分放到显微镜光轴上。用垂直5及平行6的旋转小台把白金圈2套在毛细管的这部分。如纵向移动白金圈,可用显微镜聚光器的移动机构7。白金圈固定在可替换的夹子9内,后者由螺钉10固定在垂直的转动小台上,这就可以在必要的时候把这一白金圈迅速换成另一种形状或直径的白金圈。城市交流电经变阻器降压后通向夹子。电压取决于白金圈的欧姆电阻,并由经验根据白金圈加热的

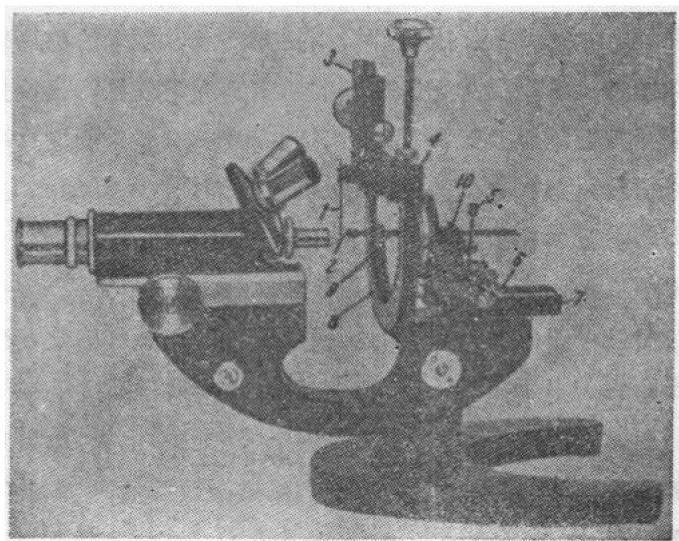


图 2 制备微电极的操纵器

程度而决定之。

Fonbrune(1949, 1951) 微拉制仪是用来拉制微玻管的较复杂而完善的仪器，它也能为制备其他微小器械进行一系列的操作。

由于玻璃毛坯的加热程度及拉的力量都可以事先规定及精确调节，所以在用微拉制仪工作时，一切操作都可以是自动化的。这就可能制备任何形状及大小的微玻管。

微拉制仪的基本部件是电热丝，这最好用白金丝或白金和钛合金做成。电热丝或呈V型，一端是尖的，后者靠近毛细管；或呈圆形，毛细管插在中央。如用外径为2~3毫米的粗

毛坯加工时,可用粗细为 200~500 微米的电热丝;而用较细的毛坯(0.5~1 毫米)加工时,则用 50~100 微米的电热丝;如为制备尖端直径小于 1 微米的非常细的微玻管,或拉长的尖端非常短的微玻管,则应用粗细为 10~20 微米的电热丝。也可用较粗的代替细的电热丝,但工作部位应为扁的或尖的。如需要增加加热的表面,在烧红的电热丝上加一直径为 1~3 毫米的玻璃滴。

用机械钳、或用熔化的蜡、或用孟氏胶把毛坯固定在微拉制仪的夹子中。在后一情况下要注意不使胶质落进毛细管里面。选择毛坯长度时,要考虑使整个未来的微电极(包括其粗的部分在内)须超出夹子的范围。制成微玻管后,把多余的毛坯部分切去。

垂直拉微玻管是较方便而有效的。为调整垂直度,可在毛坯下面挂一重 1~5 克的负荷。加热的部位稍高于将来把多余的毛坯从微玻管切去的地方。加热部位稍为变窄,就足以使毛坯下部采取严格垂直的位置。用孟氏胶把负荷粘在毛坯的下端,或毛坯下端弯曲呈钩状,钩上挂一带负荷的小圈。负荷重心应该与垂直位的毛细管轴相适合,否则在拉时毛细管会弯曲的。

在加热及拉毛细管时应注意,随着温度的升高,玻璃从固态转为液态时,要通过几个时相,而各时相中玻璃伸展的能力是不同的。

为防止耗损毛坯必须先白金丝低温时就开始拉毛细

管，逐渐地才使其达到适合的溫度。

把加热到鲜红色的白金圈固定在离预定要拉的部位若干距离。最好这个部位选在带负荷的钩上面 20~30 毫米。这样可以同时获得两根微玻管。下面微玻管的尖端较长较倾斜，而上面的较短，较陡。在拉制时必须注意使毛细管慢慢地变细。如毛细管变细得很快，应减低加热白金絲的程度（当负荷不超过 5 克时），或增加白金絲与玻璃之间的距离（当负荷较大时）。整个工作应该在实验室内无空气流动的条件下进行。

当管子的直径达到临界值时（这对该类玻璃相当恒定），毛细管就在稍低于白金絲的水平断裂。此时必须立即把微玻管拿出加热区，以免尖端熔化或弯曲。

在高温下拉毛细管可使微玻管增厚。

对每一种玻璃来说，微玻管的外径是拉微玻管时的负荷重量的函数。选择相应的负荷，即可得到预定直径的微玻管。

图 3 示出微玻管直径与负荷重量间相互关系的曲线作为例子。

用一次拉制的方法很容易获得直径为 3 微米以内的微玻管。

为获得非常细（1 微米以下）而短的微玻管应该分段拉制毛坯，每次相应地降低负荷重量，并应用比较细的电热絲（Brock, Coombs a. Eccles, 1952）。

如用易熔化的玻璃，则在同样负荷重量下可获得较细的微玻管，尖端呈截断的锥体形；而用难熔化的玻璃（Pyrex）

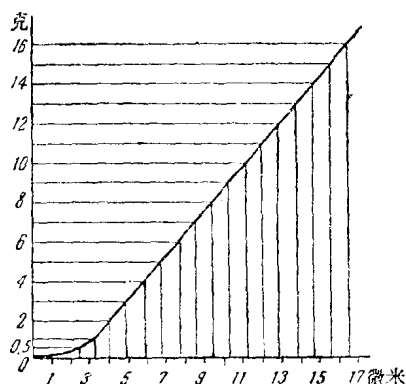


图3 在同样温度下拉制微玻管时,其直径与拉制所用力之间的依从关系曲线

横坐标——微玻管尖端的直径(微米) 纵坐标——负荷重量(克) (Comandon et Fonbrune, 1934b)

时,在同等的拉制条件下微玻管的直径较大,尖端带有锐的边缘。为制备直径为几分之一微米的微电极,一般应用 Pyrax 玻璃,它具有许多优点。Pyrax 是足够坚固的,电阻较高,呈化学中性(Morey, 1938)。

Pyrax 的介电常数可以比钠玻璃高好几倍。

如拉出的尖端有缺口,则可把微玻管放在 48% 氟氢酸蒸汽上 1~2 秒钟即可使其平整 (Tobias a. Bryant, 1955)。此时玻璃在尖端处溶解,微玻管的断面就平整了。应立刻用蒸馏水洗涤微玻管。

如果微玻管的拉长部分需要长一点,则应该升高白金丝的温度或增加它与毛坯间的距离,或用较粗的白金丝,或在白

金圈上放一玻璃滴而增加其加热面。

为了使微玻管的拉长部分短一点，应该在微玻管的拉制过程中一次次的减小负荷重量(至 30 毫克)，应用白金的最低加热温度，并使白金圈尽可能靠近毛坯；在最后拉制阶段应用较细(10 微米以下)的白金圈。拉制时对毛坯吹气也可减小拉长部分的长度。

为获得非常细而短的微玻管也可以应用较复杂的接触拉制法(Fonbrune, 1951)。此时最先用普通的方法制备直径约 20 微米的毛细管。切断毛细管，只剩下短短的拉长部分的一端。以后用复有玻璃层的微热的白金圈在其尖端稍高处触到毛细管。增加白金圈的温度，直到毛细管开始贴在白金圈上为止。当缓缓的降下白金圈时，即拉成了短(30~50 微米)而细(直径 1 微米以下)的微玻管。有时微玻管的末端形成一根丝，应该用白金圈触到它并向下拉把丝摘去。

在用接触法拉制时，应该由经验确定白金丝加热时的适宜温度及拉长毛细管的速度。

为获得直径较大的微电极，可以应用普通的细微玻管(如果有的话)，简单地折断其尖端。为此把微玻管固定在操纵器上，在显微镜观察下，降下微玻管使其接触一硬的表面或用它戳穿滤纸。为折断已灌充电解质的微玻管尖端，可应用火花放电。这是在微电极及靠近微电极尖端的导线上加高压电(从感应圈供应)而发生的，但用这种方法时，可能在微电极壁上发生裂缝。为增加微电极尖端开孔的直径，也可以用下述

方法：把其尖端在氟氢酸内溶解或在小的磨石上磨。如把微玻管尖端多次插入混有细磨粉的琼脂内可获得良好的效果。

Bishop 及同事们 (Bishop, Field, Hennessy a. Smith, 1958) 用专门的微断头器来切断微电极的尖端 (Belkin, 1928)。

为切断直径为 2~150 微米的毛细管,可用下述方法:把复有烧至暗红色的熔化玻璃层的白金丝放在预计要切断的地方,并稍稍(无压迫)接触毛细管壁。此时白金丝的方向应该沿着毛细管的轴。以后,慢慢地增加白金丝的温度,当玻璃刚刚在接触白金丝的地方开始熔化时,即截断电流。此时毛细管应该在与白金丝融合处横断,这是因为白金丝在冷却时缩短及毛细管弯曲,当毛细管弯曲时,正好处于初热位相,此时玻璃内的结合力是减弱的(Fonbrune, 1951)。

制备微玻管的自动仪 为大批制备标准的微玻管,可应用自动装置进行加热及一次或多次拉毛坯的全部工序 (Du Bois, 1931; Benedetti-Pichler a. Rachele, 1940; Bennett, Ware, Dunn a. McIntyre, 1953; Müller-Limmroth u. Güth, 1956; Crain, 1956; Burkhardt, 1959)。

图 4 示出结构简单的自动仪模式图作为例子。玻璃毛细管 1 固定在钳形夹子 3 的尖端 2 上,由于橡皮带 4 的张力牵引而在它的臂上加力。以微喷灯 5 的火焰加热毛细管。玻璃软化时夹子拉长毛细管,这使转盘 7 转动,从而微喷灯自动地离开毛细管。