

微电极方法

——用于细胞内记录及离子电泳

〔英〕 R.D.Purves 著

刘克球译

刘秦槿校

北京大学出版社

微 电 极 方 法

——用于细胞内记录及离子电泳

〔英〕 R.D. Purves 著

刘克球 译 刘泰樾 校

责任编辑：李蕙兰

北京大学出版社出版

（北京大学校内）

北京大学印刷厂 印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

787×1092毫米 32开本 5.5印张 90千字

1985年12月第一版 1985年12月第一次印刷

印数：00001—5,000册

统一书号：13209·107 定价：1.15元

前 言

“静息电位为 -67.21mV ”，“用酒精清洗玻璃管”，“表面张力妨碍微电极的充灌”，“慢慢地将水汽吸走”，“玻璃纤维法太花钱”，“在插头处断开地线”，“使用陷波滤波器”，“插入细胞前先平衡桥路”，“释放是受法拉第定律支配”，“加长探头臂便于防震”……。

上面每一句话都指明在微电极细胞内记录传统中的一个错误，其中一句话可能会造成致命的危险，其他几句话可能会浪费时间和金钱，还有几句话仅意味着思考不周。我编写这本书的目的是想促进安全、有效以及有稳固基础的实践。途径是用概括这些方面所基于的原理（物理的、电化学的或电子学的）来指出每种方法的优劣。尽量给初学者和较有经验的微电极使用者多提一些建议。例如，详细论述克服电学和机械干扰的实际问题，给出许多电路图并对电子学理论的有关部分作初步介绍。我希望本书作为一本参考书将会对实验室工作有所帮助。

本书在准备过程中得到 Ian Hill-Smith、Don Jenkison、Barbara Pittam、Lutz Pott、Roger Thomas 和 Luca Turin 的帮助，对此表示感谢。

R.D.Purves

1981年1月

目 录

第一章 微电极引论.....	(1)
一、微电极的广泛应用	(2)
二、总论	(3)
(一) 微电极	(3)
(二) 无关电极	(4)
(三) 前置放大器	(5)
(四) 微动操纵器	(6)
(五) 输出装置	(6)
(六) 标本	(8)
(七) 怎样插入细胞	(8)
(八) 什么是静息电位	(9)
三、其他记录方法	(10)
(一) 细胞外记录	(10)
(二) 蔗糖间隙	(11)
(三) Kostyuk 氏法.....	(12)
(四) 电压敏感染料	(13)
第二章 微电极的制作和充灌	(14)
一、概述	(14)
二、玻璃	(14)
三、微玻璃管控制器	(15)
四、充灌液	(17)
五、充灌方法	(18)
(一) 管尖直接充灌法	(19)

(二) 管体直接充灌法	(20)
(三) 煮沸法	(21)
(四) 真空法	(22)
(五) 酒精法	(22)
(六) 预充灌法	(23)
(七) 离心法	(23)
(八) 压力法	(23)
(九) 蒸馏法	(23)
(十) 局部加热法	(24)
(十一) 振动法	(25)
(十二) 游动细丝法	(25)
(十三) 玻璃纤维法	(25)
六、弯曲、折断和斜切	(26)

第三章 微电极物理学

一、概述	(28)
二、尺寸和形状	(28)
三、力学性质	(30)
四、电阻	(30)
五、电容	(34)
六、尖端电位	(36)
七、非线性电学性质	(39)

第四章 记录电路

一、概述	(42)
二、前置放大器	(42)
(一) 技术指标的理解	(42)
(二) 内部结构	(46)
(三) 驱动屏蔽	(48)
(四) 负电容	(50)

三、将导线接到细胞	(53)
(一) 连接微电极	(53)
(二) 接到细胞外介质	(55)
四、失调电压的控制	(58)
五、接地和干扰	(59)
(一) 交变电场	(61)
(二) 交变磁场	(63)
(三) 地环	(64)
(四) 克服交流干扰	(67)
(五) 三种情况的交流干扰	(67)
(六) 刺激伪迹和脉冲干扰	(70)
六、噪声	(72)
七、微电极电阻的测量	(77)
八、低通滤波器	(78)
九、定标	(79)
十、检修和寻找故障	(80)
 第五章 电流注入	 (82)
一、概述	(82)
二、电流源	(82)
三、电流监视器	(85)
四、交替进行电流注入和电位测量	(88)
五、同时的电位测量	(88)
(一) 电子扣除式电流泵	(90)
(二) 直接抵消式电流泵	(91)
(三) 旧式桥路	(91)
(四) 两种方法的比较	(92)
(五) 怎样平衡桥路	(93)
(六) 误差和伪迹	(95)
(七) 多重法	(98)

第六章 离子电泳	(99)
一、概述	(99)
二、离子电泳的物理学	(99)
(一) 转运过程	(99)
(二) 电流和药物释放之间的关系	(102)
三、离子电泳实践	(106)
(一) 电路	(106)
(二) 细胞内应用	(108)
(三) 其他心得	(109)
四、药物应用的其他方法	(110)
第七章 震动控制	(112)
一、概述	(112)
二、抗震原理和实践	(112)
附录一 微电极使用者的电子学基础	(117)
一、欧姆定律和其他电路定理	(117)
二、电容	(120)
三、运算放大器	(123)
附录二 微电极电流和电压之间的关系	(127)
附录三 一种简单的前置放大器	(131)
附录四 具有电流注入的前置放大器	(136)
附录五 一种简单的电流泵	(143)
附录六 药物浓度和离子电泳的释放	(146)
参考文献	(149)

第一章 微电极引论

了解微电极的最好办法是在使用微电极的实验室里工作一段时间；其次是邀请一位有经验的人来帮助你建立自己的实验室；或者求助于一本书，例如本书。带着这种想法，以初级水平写成本书的若干部分，以便对初学者有所帮助。第一章的全部和第二、四章的大部应当很容易理解，但希望有经验的工作者不会觉得它们过于简单而令人乏味。第三、五、六章的内容较为特殊，初次阅读时可不予理睬。在第七章里，试图把某些理论渗入到一般认为是常识性的事物中去。是否有用，将取决于读者的兴趣。

有大量书籍和文章谈到细胞内微电极技术：Donaldson (1958)；Fatt(1961)；Nastuk(1964)；Bureš, Petrář 和 Zachar(1967)；Geddes(1972)；Dichter(1973)；Kuriyama 和 Ito(1975)；Thomas(1978)。其中有些内容已经过时，并且无一能全面说明现代微电极使用的理论和实践。然而，这些材料仍给人们以有价值的信息和启示。本书很少重复早期的材料，所以，读者应尽可能多地参考那些材料。

微电极使用者必须首先具备某些电学知识。懂得欧姆定律，熟悉交流电和直流电，知道电压放大器是干什么的，并且至少要了解一点电容是什么。解附录一中的习题有助于迅速暴露不足之处。认真地做完与此类似的习题，应该算是电生理学培训的一部分。没有多少教科书为刚开始微电极工作的使用者提供正确的解决办法，大多数纠缠在 PN 结和三极管的微观物理学上，这些论题对本书的用处不大。现代模拟

电子学中基本的有源器件是集成运算放大器。便宜的高性能运算放大器的问世,使电子学的设计变得很容易。即使不是专家,也能设计和制作各类模拟电路。建议参考 Smith (1971) 和 Young (1973) 的文章。由 Brown、Maxfield 和 Moraff (1973) 所著的《应用于神经生物学的电子学》一书,除了诱人的题目外,不适于作为入门书,虽然有些方面可能有参考价值。

初学微电极的人常常不懂电子学和数学。虽然数学看起来和电生理学实践没有多大联系,但有两本好书我必须推荐给读者: Riggs (1963) 的《生理学中的数学必备入门》和 Stark (1970) 的《数值计算方法入门》。这两位作者不只是叙述,而且教你弄懂。我还愿推荐 Bockris 和 Reddy (1970) 的电化学教科书,其理由也在于此。

一、微电极的广泛应用

用微电极作细胞内记录,通常认为始于 Ling 和 Gerard (1949) 测量蛙肌的静息电位,在此之前已有很多人想做,但未成功。例如 Hogg、Goss 和 Cole (1934) 从组织培养的心肌记录了振幅约为 5mV 的正向动作电位。Nastuk 和 Hodgkin (1950) 对动作电位的研究以及 Fatt 和 Katz (1951) 对神经肌肉突触传递的研究,有力地证明了细胞内微电极记录的分析能力。跨膜微电极记录很快成为最重要的、独一无二的电生理学方法,并一直沿用到今天。细胞内记录的原理依然未动地保留下来,只是近代的发展使之更为容易和更加方便了。

微电极除了用来测量膜电位外, Fatt 和 Katz (1951) 还用来将电流注入所插的肌细胞内,这种方法可用来刺激神经

和肌细胞，以确定细胞及细胞膜的被动电学性质；测量神经递质的“反转”电位（“reversal” potentials），并用于在电压箝制下控制膜电位等。

微电极的另一个重要用途是由 Nastuk(1953b)提出的，他描述“用电控微量涌流来瞬时施加乙酰胆碱”以引起肌细胞膜电位的变化。微量涌流产生于内含乙酰胆碱的微电极顶端，这种方法称为“离子透入”(ionophoresis)、“离子泳动”(iontophoresis)或“微电泳”(microelectrophoresis)。这是一种给细胞施加药物或化学递质的最快方法。

玻璃微电极的上述三种用途构成了本书的主题。顺便我们还可以注意微电极应用的其他方面，如细胞外的电记录；肾脏生理学中的微穿刺（micropuncture）；小血管内的压力记录；以及稍加修改后用来测量细胞内外的酸度和离子浓度（Thomas, 1978）。

二、总 论

图1表示一套用于细胞内记录的仪器。其中有些内容以后要详细讨论，这里只作简要介绍。

（一）微电极

按照 Thomas(1978) 的用法，细尖的锥形玻璃毛细管称为微玻管(micropipette)(图2)。当充以电解质溶液并用来测量电位时，微玻管就成为微电极(microelectrode)了。但严格地讲，这还不是电极，真正的电极是在微玻管管体或管口处的金属（通常为银）和电解质（通常为 KCl）之间的连接（见第四章，三）。微电极只是一个微小的盐桥，确切地说就是电化学家所称的“半桥”(half-bridge)。微电极最重

要的关键是它的尖端外径。凭经验，尖端外径需等于或小于待插入细胞直径的0.5%。因此，直径为100 μm 的细胞用尖端直径为0.5 μm 的微电极插入细胞不致造成多大损伤，这样的尖端直径刚刚足以在光学显微镜下进行鉴定。但多数细胞比较小，因此所使用的微电极的尖端在光学显微镜下看不到。电子显微镜特别是扫描电镜可以拍出尖端区的完美照片（见第三章，二）。

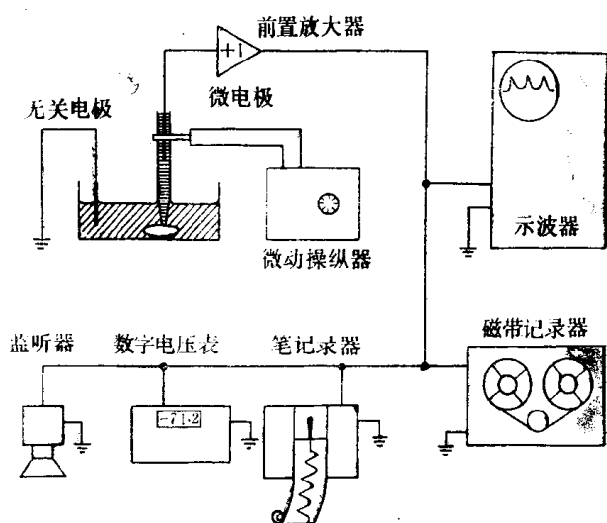


图1 细胞内电记录用的简单装置及部分输出设备



图2 微玻管的组成部分

（二）无关电极

用电压表测量两点间的电位差需要两根导线。细胞内记

录时，一根为微电极，另一根为无关电极。一般说来，无关电极为零电位或近似零电位。在图1中，无关电极接地。无关电极的另一个名称又叫做“浴槽电极”(bath electrode)，这对离体组织的研究来说是名符其实的，但对整体动物的研究则不甚恰当，因为在整体动物的研究中，无关电极可能是埋在肌肉中的银片。第四章三将讨论无关电极。

(三) 前置放大器

前置放大器有几项重要的作用，但不管其名称如何，电压放大不是其中所必需的。前置放大器的另一个名字叫“首级(head-stage)放大器”，有时也用“静电计(electrometer)放大器”这个名字，但这个别名没有正确的技术含义。

“阴极跟踪器(cathode follower)”曾经是表示前置放大器的一个较好的术语，但现在只是最不合潮流的实验里还使用真空管作输入装置。我回忆起当我刚开始电生理学工作的时期，在实验进行之前，两台ME1400仪器不得不预热一个小时。我还记得第一台市售的固体组件前置放大器一到，这两台仪器马上被束之高阁。说实话，也应承认当耐用和低噪声作为主要条件时，好的阴极跟踪器仍有一定的地位。

为什么要用前置放大器？显然，它可以把电压信号从微电极送到示波器而不改变信号的幅度(单位增益)，也可能机内具有放大作用(一般为 $\times 5$ 、 $\times 10$ 、或 $\times 100$)。阴极跟踪器的增益稍低于1，例如0.95左右。近代固体电路的增益相当稳定，在数周内乃至数年内的误差小于1%。

前置放大器的第二项作用是防止不可忽视的电流流过微电极。小小的神经元只需 0.1nA (10^{-10}A)的电流就能受刺激而兴奋。因此，前置放大器产生的漏电流必须远小于此值。此外，当用前置放大器记录细胞内电位时，不能从微电

极流过电流。如有电流流过，微电极电阻上就有电压降（欧姆定律），而前置放大器测得的电位就与微电极尖端所测的电位不一样。前置放大器在这方面的性能可由其输入电阻来表示。前置放大器将在第四章详细讨论。

（四）微动操纵器

关于如何挑选市场上大量提供的微动操纵器方面提不出什么有益的建议。技术熟练的人用粗制的微动操纵器可以做出精细的工作，技术不熟练的人或在小细胞上进行工作的人需要较好的设备，也许还应考虑用电子、气动或液动遥控的微动操纵器。直接操纵的微动操纵器必须造得坚实，螺丝上紧，否则会弯曲和晃动。

重要的是要确实保证你的微动操纵器有沿着微电极轴线方向运动的细调。如果微电极必须倾斜固定，考虑这一点就不要挑选那些只能使微电极作垂直推进的微动操纵器。

El-Badry (1963) 和 Kopac (1964) 讨论了微动操纵器的设计原理。

（五）输出装置

图1示出五种典型的输出装置，所有这些装置多半不会同时使用。其中最有用的是示波器。如果你的基金只够买一种输出装置，示波器应该是你首先要挑选的，除非你不想记录快变的信号。

1. 示波器 除了一个方面外，示波器的性能在各方面都要优于电生理学用的其他输出装置。选购时不会有失误之处，几乎各种型号都可使用。然而，比较简单的示波器扫描线很快消失，如果当时未拍照或用磁带记录器等仪器记录下来，显示的信号就会丢失。数年前 Tektronix 公司介绍的双稳定存贮示波器可以捕捉扫描线，然后从容地研究和拍照。

用过存贮示波器的工作者，都愿意用它做实验。能提供更大灵活性的最新革新产品是数字存贮器。

便宜的示波器或昂贵的示波器中廉价的插入部件，可能放大倍数不够，不足以显示像“微”突触电位那样的小信号。当然，得到一台较贵的示波器或者一台具有电压放大的前置放大器，这个问题就可解决。在前置放大器和示波器之间插入一个固定增益为 $\times 10$ 的运算放大器，也可解决这个问题，而且较为省钱。如果将要求讲清楚，电子车间在几小时内或几日内就可将此仪器生产出来。此外，电路的制作对实验者自己来说也可能成为电子学实践的入门之道（见附录一，习题20）。

2. 磁带记录器 尽管受到计算机数据存贮技术的冲击，FM磁带记录器仍然是保留实验结果以提供事后分析的一种非常有用的设备。FM即频率调制（Frequency modulation），是使磁带牺牲记录快变信号的能力来记录慢变信号的一种方法。普通家用磁带记录器仅适于记录40Hz以上的信号。但是细胞内记录的信号却包含低频信息，静息电位就是一例，因此需要相当昂贵的FM磁带记录器。

话音通道是一种合意的性能，可以在记录的数据旁边记录解说词，解脱实验者需作的大量书写笔记。

3. 笔记录器 和示波器不同，笔记录器可提供即时的“复制品”。要仔细区分普通的电流计型笔记录器和伺服控制的电位计型笔记录器的差别。电流计型记录器描记在窄纸上，测量误差常大于5%。伺服控制的电位计型记录器描记在宽纸上，测量误差约2%或更小，但频率响应要低得多。

4. 数字电压表 数字电压表（DVM）或用途并不广泛的同类产品数字面板计（DPM），从前是价格昂贵的奢

侈品，现在却很便宜，每个实验室都应有这种仪器。所谓三位半型数字电压表，最大读数为1999，对生理学工作可提供足够的精度，主要用来连续监视静息电位（见第四章，四）。

5. 监听器 监听器提供静息电位的音响指示，当微电极插入细胞时，让你凭耳朵作出判断。监听器基本上由电压控制的振荡器和扬声器所组成。插进细胞时，音调升高，这样设计的电路比较好，细胞的死亡和静息电位的跌落就会发出悲哀的音调下降信号。

（六） 标本

由于本书的目的是讲授有关细胞内记录的硬设备，特别是上面（一）、（二）和（三）的那些条目。对于组织标本的问题提得很少。但是，掌握好微电极的使用原理，可使你有更多时间去考虑标本及其生理学的问题而较少地考虑技术方面的问题。

不要认为标本就象在解剖镜里看到的那样，是一种毫无特色的模糊一片。请你在教科书里查阅一下它的组织学结构，研究一下它的电子显微镜照片。如果标本很薄，是否有使用复式显微镜的可能性。试一试明视野、暗视野、相差和干涉等各种光学显微镜。用适当的显微镜观察是否能做实验？如能做实验，那么你愿用倒置显微镜（物镜不会妨碍工作）呢？还是愿用直立显微镜（能较好地观察上层细胞）？无论哪种方法，都要用调节镜筒聚焦的显微镜。如果用调节载物台聚焦的显微镜，在调节时可能会折断微电极的尖端。

（七） 怎样插入细胞

用最简单的仪器在容易做的组织上进行练习，蛙的缝匠肌或鼠的膈肌是个好材料。当你测量静息电位碰到麻烦时，

可用一对金属丝放在肌肉上刺激肌肉，试记录动作电位。在这些容易的组织上进行了一两天工作后，会鼓励你大胆地在离体鼠心房那样的组织上进行试验。

如果是大细胞，微电极又尖锐，并且没有硬的结缔组织阻碍，就可以推进微电极直到记录到静息电位为止。稍等片刻，看看静息电位是否提高。如果不提高，小心地试着拉出或推进微电极，这样做有时会得到满意的结果。

在实验中，可用很多方法把电极突然插入细胞。当一只手推进微电极时，用另一只手的手指轻击底板。如果结缔组织较硬，可轻击微动操纵器或用改锥敲击底板。Brown 和 Flaming (1977) 讨论过推进微电极迅速穿过细胞膜的机械装置。如果你的前置放大器具有负电容，可把负电容控制钮转到最大，不到一秒钟放大器即产生振荡。当电极尖端压凹细胞表面时，振荡可以起微刻蚀作用，使电极插入细胞。此控制按钮可以装在放大器上以简化操作（附录三和四）。这一控制钮称为“zap”钮。

如果你必须在长时间内保持这种插入，就要特别注意装置的机械设计（第七章）。想出各种办法固定标本，离体组织须用大量昆虫针妥善固定在浴槽里。用2—4mm厚的一层硅塑胶作为浴槽的基底，既透明又能插牢昆虫针。

记录小细胞的静息电位时有一个共同问题：电极插好后静息电位却很快就变小。用其他办法未能奏效时，可把细胞外的钙离子浓度增至常用量的2—3倍，这样做有时对插入质量有惊人的效果。但难以得到可发表的结果。

（八）什么是静息电位

即使你用数字电压表显示细胞的瞬时静息电位值，也不能用例如 -71.28mV 这种不现实的精确度来报导静息电位

值。 -71.28mV 应读作 -71mV ，通常读作“ -70mV ”。每一两年读一读 Tasaki 和 Singer (1968) 的论文，以消除你自己认为静息电位可精确测量的想法。

静息电位是微电极置于细胞内和细胞外时测得的电位差。有各种理由可以认为这和实际的静息电位不符。由微电极造成的损伤是一个明显的误差来源。此外，当微电极插入细胞后，尖端的化学环境发生改变，由此而产生两个系统误差。第一个是微电极充灌液和微电极尖端外面电解质之间的液体接触电位的改变（第二章，四）。第二个是微电极尖端电位的改变（第三章，六）。

这些系统误差的数值很难估计出来。一般实验忽略液体接触电位的变化，因为如果微电极充以 3M KCl 溶液，此值应是极小的，虽然 Hironaka 和 Morimoto (1979) 的最新研究指出，误差可能为数毫伏。我们已经了解微电极作为一种盐桥，而根据 Ives 和 Janz (1961) 的报导，用盐桥作测量，绝对误差一般在 $1-2$ 毫伏。

这些苛求对测量膜电位来说是不必要的，在许多情况下，可以测得 $100\mu\text{V}$ 的膜电位变化来，而且是相关的。

三、其他记录方法

应记住，胞内微电极并非从细胞记录电信号的唯一方法。这里简要地讨论其他一些方法。

（一）细胞外记录

细胞外记录是补充细胞内记录的一种方法，这种方法易于记录但难于解释。图3 (a) 和 (b) 表示这两种方法的原理大体相同。该图还解释了细胞外记录的单相动作电位为什