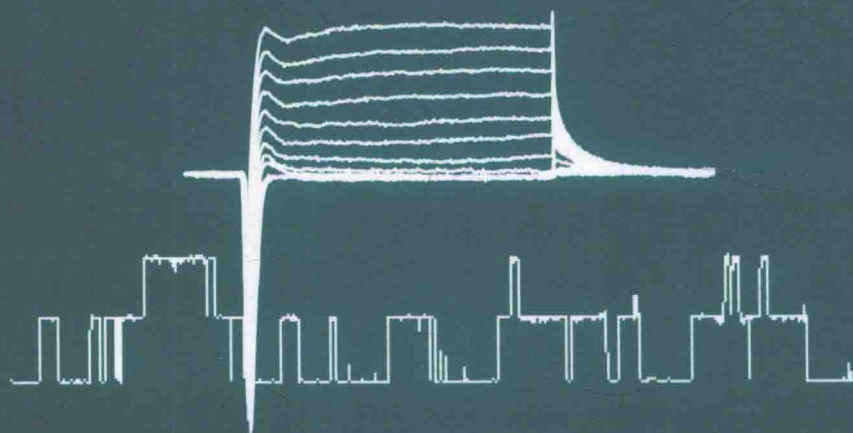


实用膜片钳技术

Practical Patch Clamp Techniques

(第二版)

刘振伟 编著



北京科学技术出版社

实用膜片钳技术

(第二版)

刘振伟 编著

 北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

实用膜片钳技术 (第二版) / 刘振伟编著. —北京: 北京科学技术出版社, 2016. 7

ISBN 978 - 7 - 5304 - 8425 - 8

I. ①实… II. ①刘… III. ①质膜 - 生物技术 IV. ①Q241

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 131194 号

实用膜片钳技术 (第二版)

作 者: 刘振伟

责任编辑: 王 藏 韩 晖

封面设计: 樊润琴

出 版 人: 曾庆宇

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100035

电话传真: 0086 - 10 - 66135495 (总编室) 0086 - 10 - 66113227 (发行部)

0086 - 10 - 66161952 (发行部传真)

电子邮箱: bjkjpress@163. com

网 址: www. bkydw. cn

经 销: 新华书店

印 刷: 廊坊市海涛印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 34. 25

版 次: 2016 年 7 月第 2 版

印 次: 2016 年 7 月第 1 次印刷

广告经营许可证号: 京西工商广字第 8084 号 (1 - 1)

ISBN 978 - 7 - 5304 - 8425 - 8/Q · 142

定 价: 98. 00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。
京科版图书, 印装差错, 负责退换。

前 言

自《实用膜片钳技术》第一版2006年5月出版至今已历经10年。这10年中,膜片钳技术有了许多发展,新思路、新设备、新方法不断出现,尤其是近年来全自动膜片技术的蓬勃发展,更是将膜片钳技术推向了发展的高峰。

膜片钳技术创建至今已40年,距1991年获得诺贝尔生理学或医学奖也已25年。单从时间上来说,该技术已非常成熟,不算是新技术了。然而膜片钳技术不断向前发展,其仪器设备也在不断地更新换代,软件功能也一直在趋于完善。因此,第一版书中的一些内容已经不能满足现时的科研实验需要,原有的一些内容需要补充,一些新内容需要添加。同时,来自一线的广大膜片钳技术工作者,尤其是新入门的技术人员,也迫切需要一本较新的、翔实的膜片钳技术实验指导用书。

《实用膜片钳技术》第二版全书共分5章,包括膜片钳技术基本概念、膜片钳实验室的建立、膜片钳技术实验方法、膜片钳放大器、膜片钳技术数据采集与分析软件。本书保留了第一版的基本理论、基本技术方法及对仍在使用的膜片钳放大器、软件的介绍,删除了一些已落伍的仪器和软件的内容,同时新增加了以下内容。

1. 膜片钳实验室的建立。鉴于膜片钳技术的日益普及,许多以前未涉足膜片钳技术的实验室新开展了膜片钳技术,每年都有新增的学生和工作人员步入膜片钳技术研究领域。因此,本书新增了膜片钳实验室相关内容,包括膜片钳实验室的基本要求、需要购置的膜片钳设备、实验前的准备以及膜片钳技术基本操作方法,希望新入门者能更快地了解和开展膜片钳技术实验,同时也帮助具有一定技术经验的科研人员在基础膜片钳技术方面有进一步的提高。

2. 全自动膜片钳技术。这是十几年来膜片钳技术的一个重大发展,不仅用于基础科学研究,还广泛用于药物筛选及药物安全性评价。因其具有高通量、高效率、自动化的优势,目前已逐步在我国的实验室展开。本书较为详细地介绍了全自动膜片钳技术发展的进程、工作原理、应用范围及仪器特点。

3. MultiClamp 700B 膜片钳放大器。这是目前较为常用的一款膜片钳放大器。本书详细介绍了该仪器的特点、应用范围及具体使用方法。

4. HEKA 公司的仪器设备及软件。本书较为详细地介绍了 EPC 10 放大器、Patchmaster 数据采集软件以及 Fitmaster 数据分析软件的使用。

笔者从事电生理学研究已近25年,走访过全国很多膜片钳及其他电生理技术实验室,了解膜片钳技术中存在的普遍问题,积累了丰富的膜片钳技术实践经验,同时还追踪查阅了大量的相关科研文献,这些工作为本书的写作打下了坚实的基础。第二版秉承了第一版侧重实用的特点,力图在书中运用通俗易懂的语言讲述膜片钳技术的实验方法、经验技巧及存在的一些常见问题,尽量使科研人员在实验中遇到问题时通过阅读本书就能自行解决问题,为科研节省宝贵的时间。同时,也希望大家在阅读和使用本书的过程中,能多提宝贵意见与建

议，笔者将在以后的授课与实验指导中予以采纳。

本书可作为实验室技术人员和学生的膜片钳实验指导参考书、膜片钳技术的授课与培训教材，也可作为实验室购置膜片钳设备的指导用书、经销膜片钳实验设备公司销售人员和工程师的学习用书。

在本书的编写过程中，得到德国 HEKA 公司 Martin Oberhofer 博士、美国加州大学 San Diego 分校 Hang Yao 博士的热心帮助，在此一并致谢！同时，还要感谢下列公司与单位对本书出版的大力支持：

瑞典百欧林科技有限公司 (Biolinscientific AB) 及其全资子公司丹麦 Sophion 公司；

金西盟 (北京) 仪器有限公司 (GOLD SIM (USA) GROUP)；

耐尼恩技术 (北京) 有限公司 (Nanion Technologies (Beijing) Co., Ltd.)；

北京先仪谱科技有限公司 (CIB)；

荣惠 (北京) 生物科技有限公司 (RH Biotech, Ltd.)；

HONG KONG PLEXON LIMITED；

军事医学科学院生化药理与军事毒理实验室。

随着我国整体科研水平的提升，近年来我国膜片钳技术也有了长足的进步与发展。希望本书的出版，不仅能让膜片钳技术的初学者轻松入门、迅速掌握膜片钳技术，更能对我国膜片钳技术的持续发展起到添砖加瓦的助力作用！

值此膜片钳技术创建 40 周年之际，谨以此书献给国内从事膜片钳技术的科研工作者！

刘振伟

2016 年 4 月完稿于北京

目 录

第一章 膜片钳技术基本概念	1
第一节 膜片钳技术概述	1
一、什么是膜片钳技术	1
二、膜片钳技术的发展概况	3
三、膜片钳技术的基本记录模式	5
四、膜片钳技术的应用	7
第二节 膜片钳记录系统中的电极	11
一、玻璃微电极	12
二、Ag/AgCl 电极	18
三、碳纤电极	20
第三节 膜片钳记录系统中的电压和电位	22
一、膜电位	22
二、平衡电位	25
三、命令电压	27
四、钳制电位	27
五、电极电压降	29
六、失调电位	29
七、浴池电位	32
第四节 膜片钳记录系统中的电流和电导	34
一、跨膜电流	34
二、离子通道电导	36
三、闸门电流	36
四、正电流与负电流	37
五、内向电流与外向电流	37
六、去极化电流与超极化电流	37
七、封接电流	38
八、输入漏电流	39
九、膜漏电流	39
第五节 膜片钳记录系统中的电阻	40
一、膜电阻与膜输入阻抗	40
二、电极电阻	40
三、封接电阻	41

四、串联电阻及接入电阻	41
五、浴池电阻	43
六、漏电阻	43
第六节 膜片钳记录系统中的电容	44
一、膜电容	44
二、分布电容	46
三、电极电容	47
四、快电容与慢电容	49
五、时间常数	49
第七节 膜片钳记录系统中的漏减功能	50
一、漏电流的概念与特点	50
二、Clampex 采样软件的 P/N 漏减功能	52
三、Clampex 采样软件的定标 P/N 漏减功能	57
四、膜片钳放大器漏减功能	60
五、Clampfit 处理软件的漏减功能	61
第八节 膜片钳记录系统中的噪声	64
一、噪声的测量指标	65
二、噪声的基本类型	65
三、膜片钳放大器噪声	68
四、电极夹持器噪声	69
五、电极噪声	69
六、干扰的来源	73
七、干扰的排除方法	76
八、量化噪声	81
九、混叠噪声	83
第九节 膜片钳记录系统中的信号滤波	84
一、有关滤波的几个基本概念	84
二、滤波器的基本类型	88
三、数码滤波器	90
四、采样频率与滤波频率的关系	91
五、电干扰滤波器	91
第二章 膜片钳实验室的建立	93
第一节 膜片钳实验室的基本要求	93
一、膜片钳实验室位置的选择	93
二、膜片钳实验室的基本配备	94
三、膜片钳实验室的基本要求	96
第二节 膜片钳实验的专用设备	99

一、单细胞膜片钳记录系统	99
二、脑片膜片钳记录系统	114
三、在体膜片钳记录系统	119
第三节 膜片钳实验的准备及基本操作方法	121
一、膜片钳实验前的准备	121
二、溶液配置	122
三、全细胞记录模式基本操作	125
四、单通道记录模式基本操作	130
第三章 膜片钳技术实验方法	133
第一节 全细胞记录技术及其数据分析	133
一、离子通道简介	133
二、全细胞记录要注意的问题	136
三、全细胞记录与其他记录技术的比较	137
四、电压门控性离子通道的动力学研究	137
五、配体门控性离子通道的动力学研究	146
第二节 单通道记录技术及其数据分析	152
一、单通道数据的采集	152
二、单通道数据分析中的几个基本概念	152
三、单通道数据分析前的处理	155
四、单通道事件的检测	156
五、单通道电流幅度(电导)的分析	157
六、单通道开关的动力学分析	159
七、通道开放概率的计算	162
八、膜片上通道数目的估算	163
九、其他分析	166
第三节 穿孔膜片钳记录技术	168
一、穿孔全细胞记录模式	168
二、穿孔囊泡记录模式	172
三、穿孔膜片钳记录模式的实验方法举例	173
第四节 巨膜片记录技术	174
一、巨膜片记录技术的概念	174
二、肌细胞标本制备	175
三、玻璃微电极制备	176
四、封接的形成	176
五、巨膜片电容的测定	177
六、巨膜片记录技术的局限	178
第五节 脂质体-压力钳记录技术	179

一、脂质体·····	179
二、压力钳技术·····	183
三、应用举例·····	189
第六节 脑片膜片钳记录技术·····	191
一、脑片标本简介·····	191
二、脑片膜片钳记录技术研究概况·····	192
三、脑片膜片钳记录技术方法·····	194
第七节 在体膜片钳记录技术·····	204
一、概述·····	204
二、实验准备·····	206
三、盲法·····	208
四、可视法·····	213
第八节 全自动膜片钳技术·····	218
一、概述·····	218
二、平面全自动膜片钳技术·····	222
三、平面全自动膜片钳设备·····	222
四、平面全自动膜片钳技术的评价·····	233
 第四章 膜片钳放大器·····	 237
第一节 Axopatch 200B 膜片钳放大器·····	237
一、探头·····	238
二、电极夹持器·····	240
三、模型细胞·····	241
四、前后面板·····	242
五、接地和交流噪声·····	254
六、电源·····	254
七、全细胞与单通道记录操作步骤·····	255
第二节 MultiClamp 700B 膜片钳放大器·····	257
一、探头·····	258
二、电极夹持器·····	259
三、模型细胞·····	259
四、仪器面板·····	259
五、Commander 软件面板·····	261
六、电源·····	276
七、全细胞与单通道记录操作步骤·····	276
第三节 EPC 10 USB 膜片钳放大器·····	280
一、探头·····	281
二、电极夹持器·····	282

三、模型细胞	283
四、仪器面板	284
五、Amplifier 窗口	286
六、EPC 10_USB 菜单	294
七、EPC 10 USB 膜片钳放大器的操作	295
第五章 膜片钳技术数据采集与分析软件	301
第一节 Clampex 10 数据采集软件	301
一、几个名词术语	302
二、Clampex 10 主要文件类型	304
三、Clampex 10 采样文件的命名	305
四、Clampex 10 的窗口	306
五、Protocol 编辑	312
六、Configure 设置	325
七、Lab Bench 设定	331
八、Membrane Test 窗口	333
九、液接电位的计算与钳制电位的校正	337
十、LTP 助手	342
第二节 Clampfit 10 数据处理分析软件	353
一、Clampfit 10 的窗口	353
二、Clampfit 10 文件类型	357
三、数据的基本处理功能	357
四、快速作图	360
五、文件的数学运算	362
六、拟合	365
七、统计分析	372
八、单通道数据分析	373
九、突触活动分析	392
十、Variance-mean 分析 (V-M 分析)	401
十一、阈值检测功能	405
第三节 Patchmaster 数据采集软件	408
一、示波窗口 (Oscilloscope)	408
二、控制窗口 (Control Window)	410
三、回放窗口 (Replay)	412
四、Patchmaster 文件类型、创建与保存	414
五、设置窗口 (Configuration)	415
六、脉冲发生器窗口 (Pulse Generator)	424
七、程序编辑器窗口 (Protocol Editor)	443

八、分析窗口 (Analysis)	447
九、数据输出	454
十、溶液库的使用	457
第四节 Fitmaster 数据处理分析软件	459
一、开启与关闭	459
二、Fit Configuration 设置	460
三、Trace Fit 功能	464
四、Series Fit 功能	467
五、基线调零	474
六、 $I-V$ 曲线制作	476
七、通道失活及通道恢复曲线的制作	479
八、Cyclic Analysis 功能	483
九、单通道电流幅度的测算	487
十、单通道开放事件的分析	490
十一、其他功能	493
第五节 Origin 数据分析与图形制作软件	500
一、如何将实验数据输入 Origin 软件中	500
二、如何赋予数据表中各组别的名称与特征	503
三、如何对数据表中的每列数据进行转换	504
四、做直条图时的几个问题	505
五、如何对数据进行直线回归	507
六、如何对坐标轴刻度标记进行调整	507
七、如何对坐标轴做断轴	511
八、如何将几个不同的图显示在同一页面上并进行处理	512
九、如何对所获数据进行曲线拟合	513
十、如何制作 Waveform 图形	516
十一、如何在 Origin 中剪切输入的采样图形	518
十二、如何去除坏点	518
十三、如何将制作好的图形输出	519
附 录	520
附录一 膜片钳技术常用单位及换算	520
附录二 膜片钳实验溶液中常用离子的化合价与迁移率	521
附录三 膜片钳技术相关专业常用名词术语	523
附录四 膜片钳技术相关设备公司简介	530

第一章 膜片钳技术基本概念

第一节 膜片钳技术概述

纵观生物科学的发展历史可以发现,生物科学的发展常常是由技术方法的进步推动的,膜片钳技术就是一个典型的例子。自1976年德国马普生物物理化学研究所 Erwin Neher 和 Bert Sakmann 创建膜片钳技术(patch clamp techniques)至今已40年,它给电生理学和细胞生物学的发展乃至整个生物学研究带来了一场革命,人们因此对离子通道本质的认识有了一个质的飞跃。现在,每年都有上千篇膜片钳技术方法及其应用方面的文献报道,该技术在生物学领域里的广泛应用已成为现代生物学的主要内容之一。从来没有一种方法像膜片钳技术那样能够活灵活现地观察到一个蛋白质分子的生理活动,膜片钳技术对离子通道的功能及细胞功能的调控研究起到了巨大的推动作用,为阐明离子通道病的发病机制并预示治疗的新途径提供了有效的研究方法。近年来,全自动膜片钳技术(automated patch clamp techniques, APC)的兴起与发展,使以离子通道作为药物靶标的大规模快速药物筛选变成现实。

一、什么是膜片钳技术

在解释什么是膜片钳技术之前,先简单地介绍一下什么是电流钳技术(current clamp techniques)和电压钳技术(voltage clamp techniques)。

简单地说,向细胞内注射恒定或变化的电流刺激,记录由此引起的膜电位的变化,这就是电流钳技术,即钳制电流,记录电压。实际上它模拟了细胞的真实自然情况,如神经冲动的传递过程中,神经递质的释放可引起神经元膜电位的去极化或超极化。在具体实验中,可通过给予细胞一系列电流脉冲刺激,诱发细胞产生电紧张电位和动作电位等。

电压钳技术是通过向细胞内注射变化的电流,抵消离子通道开放时所产生的离子流,从而将细胞膜电位固定在某一数值,即钳制电压、记录电流。由于注射电流的大小与离子流的大小相等、方向相反,因此它可以反映离子流的大小和方向。电压钳技术是一个负反馈系统,在双电极电压钳记录中,一根电极用于监测细胞膜电位,另外一根电极用于注射电流,当所监测的膜电位偏离钳制电位时,通过向细胞内注射电流可纠正这一偏差,从而维持细胞膜电位不变。在单电极电压钳记录中,监测电压与注射电流都采用同一根电极。

膜片钳技术与电流钳、电压钳技术在命名上并不完全一致,后两者是从电学概念的角度命名的,而“膜片钳”主要是从机械物理学的角度命名的。从字面上理解,膜片钳技术钳制的是“膜片”,是指采用尖端经过处理的玻璃微电极与细胞膜发生紧密接触,使尖端下的这片细胞膜在电学上与其他细胞膜分离,这大大降低了背景噪声,使单通道微弱的电流得以分辨出来。此外,膜片钳技术之所以能够记录到非常微弱的单通道离子电流,除了因为电极

与细胞膜之间形成的紧密接触外,还得益于特殊设计的低噪声膜片钳放大器。采用电压钳技术将这片膜的电位钳制在某一数值,可记录到单通道电流。从这点上看,膜片钳技术是特殊的电压钳技术,它可记录到流经单通道的电流。后来,随着膜片钳技术的发展,它已经不仅仅局限于“膜片”的概念,出现了全细胞记录模式等其他模式,而且也不仅仅采用电压钳技术,还常采用电流钳技术。时常有初学者对电流钳、电压钳和膜片钳的概念分不清楚,认为在使用膜片钳技术时,不需要使用电压钳和电流钳技术,这是错误的认识。在对膜片钳概念的理解上不能将膜片钳技术与电流钳、电压钳技术完全分割开,实际上在使用膜片钳技术时不可避免地要使用到电压钳或电流钳技术,膜片钳放大器也是电压钳/电流钳放大器。

膜片钳技术在最早出现时被称为“extracellular patch clamp technique”,指“细胞外膜片钳制技术”,因为最早采用的是细胞贴附记录模式,电极在细胞外,电极内液不与细胞内液相通。后来随着该技术的发展,出现了全细胞记录模式与内面向外记录模式,膜片钳技术始称为“patch clamp techniques”。对“patch clamp”这一名称,最初中文也有几种译法,现在都统一采用“膜片钳”这一名称。

综上所述,膜片钳技术是一种通过玻璃微电极与细胞膜之间形成紧密接触的方法,采用电压钳或电流钳技术对生物膜上离子通道的电活动(尤其是可对单通道电流)进行记录的微电极技术。广义上讲,虽然膜片钳技术的主要研究对象是细胞膜上各种各样的离子通道,但几乎任何跨越细胞膜的离子流动都可用膜片钳技术记录到并加以研究,这些电流还包括门电流、一些泵电流、交换体电流以及电容电流等。此外,随着该技术在各个领域中的不断应用,其概念的外延也已经远远超出了电生理学的范畴。

为了加深对膜片钳技术概念的理解,下面简单描述一下膜片钳技术的基本操作过程。首先,轻轻地将玻璃微电极接触在细胞膜表面(图1-1-1),给电极尖端施加负压,这样在玻璃电极壁与细胞膜之间就形成了紧密接触,术语叫作高阻(吉欧姆)封接(gigaohm seal, gigaseal),其电阻达 $10^9 \Omega$ ($1G\Omega$)以上,使离子不能从玻璃电极尖端与膜之间通过,只能从膜上的离子通道进出。如果轻轻地回撤电极,细胞膜可被撕下一片,能记录这小片膜的跨膜离子电流。若这片膜上只有一个离子通道,可获得单一通道电流。根据电极开口大小和细胞种类不同,电极下的膜片一般含有一个或几个通道不等。单通道电流幅度的大小反映通道电导,电流持续时间反映通道开放的时间,可通过计算开放概率来反映通道的开关特点。在形成高阻封接后可不将细胞膜撕下,而是打破这片膜从而将电极与细胞内沟通,形成全细胞记录。膜片钳技术还有许多其他的记录模式,详见第三章。

膜片钳实验揭示,绝大多数离子通道至少有开放与关闭两个状态;通道开放时间是变化的;通道电流大小随膜片的钳制电位不同而变化,但单通道电导基本上是恒定不变的。膜片的钳制电位不变时,通道电流幅度也不变(图1-1-2)。膜片钳实验还揭示,离子穿过通

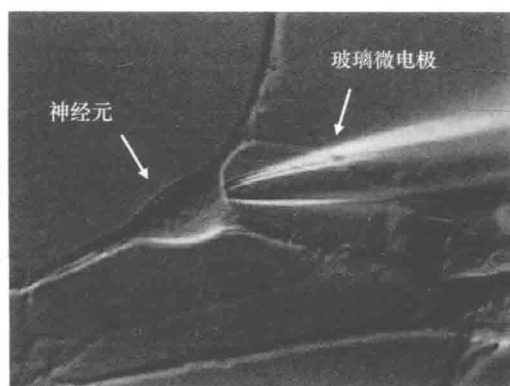


图1-1-1 玻璃微电极与细胞膜的接触
(引自 Patchmaster Reference Manual 2.90. HEKA, 2015.)

道的速度非常惊人,可高达每秒 100 万个,可以想象开放的离子通道是多么的繁忙。

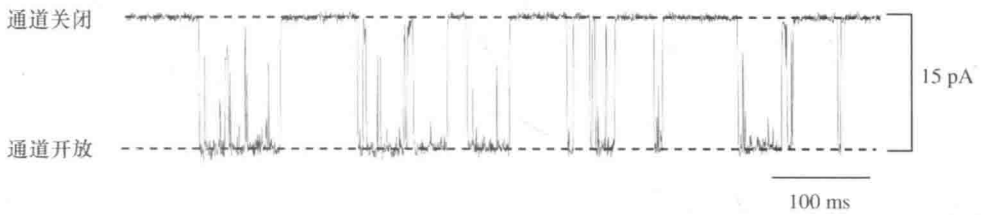


图 1-1-2 单通道电流

在膜片的钳制电位恒定不变的情况下,单通道电流幅度保持不变,但通道开放时间长短是变化的

二、膜片钳技术的发展概况

电生理学的核心技术是微电极技术,英国剑桥大学的科学家 Hodgkin 和 Huxley 在这方面做出了杰出的贡献。20 世纪 50 年代,他们采用微电极技术,创建了动作电位的钠学说,同时他们和澳大利亚科学家 Eccles 一起应用电压钳技术完成了一系列有关静息电位、动作电位、离子通道、神经冲动传导、中枢突触传递方面的重要研究。此外,英国科学家 Katz 在对神经末梢递质释放机制的研究中做出了重要贡献,并提出了递质释放的量子学说。这四位科学家的研究成果构成了近几十年来神经电生理学的主要内容,他们也因此分别获得了 1963 年和 1970 年的诺贝尔生理学或医学奖。

膜片钳技术是现代的微电极技术,是对传统微电极技术的重大发展。1976 年,德国马普生物物理化学研究所的年轻学者 Neher 和 Sakmann 在青蛙肌细胞上用双电极电压钳方法,将微电极内充灌乙酰胆碱,并将其与细胞膜密切接触,记录到乙酰胆碱激活的单通道离子电流,从而诞生了膜片钳技术。这是人类首次记录到单通道的离子电流,这一创造性结果发表在著名的 *Nature* 杂志上。根据现在的命名,当时形成的是细胞贴附式记录模式,电极与细胞膜之间所形成的封接电阻并不高,只有兆欧级水平。后来,美国 Yale 大学的 Sigworth 博士与 Neher 博士合作于 1980 年在记录电极内施加负压吸引,得到了细胞膜与微电极之间高达 $10 \sim 100 \text{ G}\Omega$ 的封接电阻,这就是常说的高阻封接,它大大降低了记录时的噪声水平,使十分微小的单通道电流 ($< 1 \text{ pA}$) 得以分辨出来。同年,美国 Yale 大学 Horn 等人记录到肌细胞游离膜片上的单通道电流。1981 年 Hamill、Marthy、Neher、Sakmann 和 Sigworth 等 5 人在总结膜片钳技术的基础上对其进行了重大改进,并完善了游离膜片技术和全细胞记录技术,从而使膜片钳技术走向成熟,他们的这一重要结果发表在后来著名的杂志《欧洲生理学杂志》(*Pflügers Archive*) 上。1983 年 10 月, Sakmann 和 Neher 主编的 *Single-Channel Recording* 一书问世,对当时的膜片钳技术进行了全面、系统的总结,成为膜片钳技术的里程碑。1991 年 10 月, Neher 和 Sakmann 因他们的创造性工作和对生理学的突出贡献,荣获诺贝尔生理学或医学奖,此时距他们 1976 年发表第一篇膜片钳技术文章已 15 年。当 Neher 得知自己获得诺贝尔奖时,他正在实验室准备下班,心情非常平静。像他这样一个能有办法“走进”微小离子通道进行细致观察的人,获得诺贝尔奖已经是他意料之中的事。

膜片钳记录技术自创立以来,经历了许多发展变化,简单介绍如下。

(1) 记录方式有很大变化。除了传统的单通道记录方式以及普通全细胞记录方式外,

又陆续发展了膜穿孔记录方式 (perforated patch clamp)、巨膜片记录方式 (giant membrane patch)、松散封接记录方式 (loose patch clamp) 等。近十几年来,全自动膜片钳技术 (APC) 的出现,彻底地改变了以玻璃电极进行记录的传统膜片钳记录模式,它采用微孔芯片阵列,大大提高了膜片钳技术的工作效率。

(2) 应用技术不断涌现。例如,为了更换电极内液和从电极内施加药物,发展了微电极内灌注技术 (micropipette perfusion technique); 在研究细胞间的缝隙连接 (gap junction) 通道时,发展了双膜片记录法 (double patch recording); 将富含神经递质受体的游离膜片靠近突触部位,可检测递质释放和突触活动,这一技术称为膜片探针技术 (detector-patch technique); 若将特异的膜片探针插入卵母细胞,可检测细胞内第二信使含量,此为膜片填塞技术 (patch cramming technique); 为研究细胞的胞吞与胞吐机制,发展了膜电容测定法 (membrane capacitance measurement)。此外还有很多膜片钳应用技术,而且一些新的技术正不断涌现,在此不一一列举。

(3) 使用的标本种类繁多。从最早的肌细胞 (心肌、平滑肌、骨骼肌)、神经元和内分泌细胞发展到血细胞、肝细胞、耳窝毛细胞、视网膜细胞、胃壁细胞、上皮细胞、内皮细胞、成骨细胞、免疫细胞、精母细胞、精子细胞、干细胞等多种细胞;从急性分散细胞和培养细胞 (包括细胞株) 发展到组织片 (如脑片、脊髓片) 乃至整体动物。使用的动物种类也越来越多,如昆虫、斑马鱼、果蝇、蜗牛、青蛙、蝾螈、爪蟾、鸡、大小鼠、(海)兔、猫甚至人的细胞等。从动物细胞又发展到细菌、真菌以及各种植物细胞。从细胞膜发展到细胞内器膜 (如线粒体膜、内质网膜等)。此外,膜片钳技术还广泛地应用到平面双分子层 (planar bilayer)、脂质体 (liposome) 等人工标本上。

(4) 研究对象已经不局限于离子通道。从对离子通道 (配体门控、电压门控、第二信使介导、机械敏感性离子通道等) 的研究发展到对离子泵、交换体以及可兴奋细胞的胞吞、胞吐机制的研究。

(5) 膜片钳电极已经不单单是传统意义上的电信号记录电极,它还作为其他研究方法的工具使用,如用于进行单细胞 PCR 技术时的细胞内容物抽吸工具。

(6) 应用范围日趋广泛。为满足解决实际问题的需要,膜片钳技术已经渗透到生物学领域的许多学科中,如分子生物学、药理学、免疫学、病理生理学、临床医学 (如脑科、神经科、心内科、麻醉科、骨科、康复科、临床药理学、中医中药学) 等,成为生物学和医学研究中的一种主要技术手段。

1995 年, *Single-Channel Recording* 一书再版,增添了大量膜片钳技术的新内容,当时国际上大多数知名膜片钳专家都参与了编写,成为目前膜片钳技术研究领域的经典著作。本书除增加了为初学膜片钳技术者准备的入门知识、对原有的各章节补充了新近研究内容外,主要还增添了如下新内容。

(1) 可检测到单分泌囊泡胞吐作用的膜电容测定技术。

(2) 用于检测单细胞中 mRNA 分子的单细胞 PCR 技术 (single-cell PCR measurement), 这是全细胞记录模式与分子生物学技术的结合应用。

(3) 脑片膜片钳全细胞记录技术及其与成像技术的结合应用。

(4) 用于检测细胞或膜片分子结构的原子力显微镜技术 (atomic force microscopy)。

(5) 蟾蜍卵母细胞的离子通道记录。

(6) 用于研究机械敏感性离子通道的压力钳技术 (pressure-clamp technique)。

(7) 植物细胞离子通道的研究。

除 *Single-Channel Recording* 一书外, 国外还有一些知名的有关膜片钳技术方面的重要著作。

(1) Academic Press 出版的杂志专刊 *Methods in Enzymology* 207 卷 (1992)、293 卷 (1998)。随后的一些卷里还有不少膜片钳技术方面的相关文章。

(2) 英国 John Wiley & Sons 公司出版的 *Patch clamping* (2003)。

(3) Wiley-Liss 公司出版的 *Practical Electrophysiological Methods* (1992)。

(4) 美国 MD 公司发行的 *The Axon Guide* 第三版 (2012)。

(5) 美国 Axon 公司发行的 *AxoBits* 小册子 (1985—2004)。其内含有大量膜片钳技术及应用方面的文章, 特点是实用性很强, 常有名家之作, 颇值得一读。

(6) 美国 Human Press 出版的 *Patch-Clamp Methods and Protocols* 第二版 (2014)。

此外, 国内还有一些离子通道与膜片钳技术方面的书籍可供读者查阅。

(1) 陈军. 膜片钳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001.

(2) 关兵才, 等. 细胞电生理学基础原理与膜片钳技术. 北京: 科学出版社, 2013.

(3) 李洪. 离子通道与膜片钳技术. 兰州: 甘肃文化出版社, 2001.

(4) 李洪, 程芮. 离子通道学. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2007.

(5) 刘泰捷. 心肌细胞离子通道和通道病. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

(6) 刘振伟. 实用膜片钳技术. 北京: 军事医学科学出版社, 2006.

(7) 杨宝峰. 离子通道药理学. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

三、膜片钳技术的基本记录模式

膜片钳技术共有四种基本记录模式, 其他记录模式都是在此基础上逐渐衍变而来的。这四种记录模式为: ①细胞贴附记录模式 (cell-attached recording 或 on cell recording); ②内面向外记录模式 (inside-out recording); ③外面向外记录模式 (outside-out recording); (4) 全细胞记录模式 (whole-cell recording)。

前三种为单通道记录模式, 其中内面向外和外面向外记录模式为游离膜片的记录模式 (excised patch recording)。文献中常见解释这四种记录模式如何形成的图解, 这是每个从事膜片钳技术的科研人员必须掌握的。在这里, 图 1-1-3 同样给出了这四种基本记录模式形成的图解, 并具体说明如下。

将电极接触细胞膜, 轻轻地给予负压吸引, 就形成了细胞贴附记录模式。将电极迅速提起, 脱离细胞, 因为细胞膜具有流动性, 黏着在电极尖端上的细胞膜会自动融合, 从而形成一个囊泡。当将电极提出溶液液面而短暂 (1~2s) 暴露在空气中时, 囊泡的外表面会破裂, 再次将电极放入溶液, 就形成了内面向外记录模式。另外, 如果将电极放入低钙溶液中, 囊泡的外表面也会破裂, 同样形成内面向外记录模式。

形成细胞贴附记录模式后, 采用继续施加负压或电击的方法打破细胞膜, 即形成了全细胞记录模式。在形成全细胞记录模式后, 将电极缓缓提起, 逐渐脱离细胞, 同样因为细胞膜具有流动性, 黏着在电极尖端上的细胞膜会自动融合, 这样细胞膜外面就朝向电极尖端外, 形成外膜向外记录模式。在具体操作中, 形成全细胞模式后, 不要对膜电容进行补偿, 将电

极缓慢提起，当电极脱离细胞时，膜电容瞬变值消失，记录噪声大幅度下降。如果进一步提升电极，使电极尖端与浴液表面非常接近，则记录噪声还会进一步下降。电极脱离细胞时所提升的距离有时并没有想象的那么短，可达 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 。

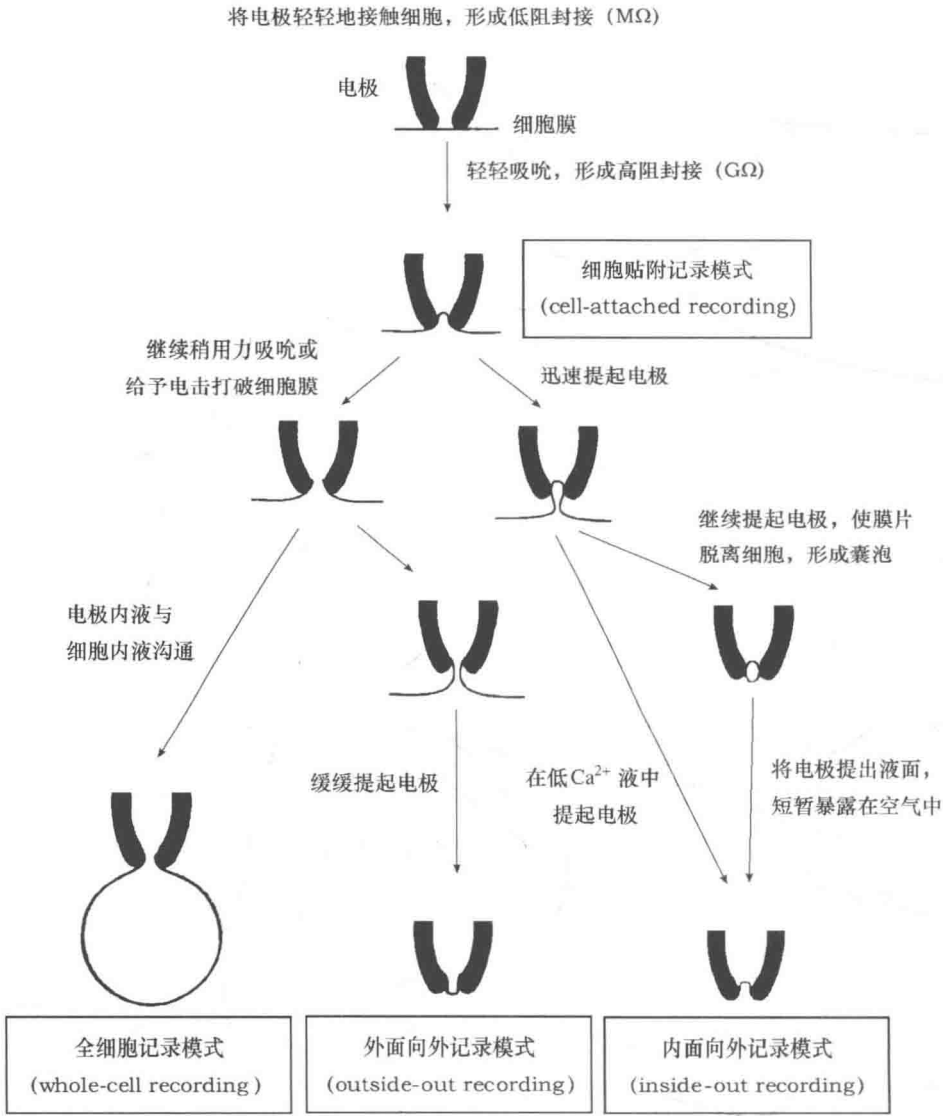


图 1-1-3 膜片钳技术四种基本记录模式形成图解
(引自 Hamill, et al. Pflügers Arch, 1981, 391: 85-100.)

在对这些记录模式的理解上，要注意如下几点。

(1) 初学者往往对内面向外记录模式与外面向外记录模式的形成不理解，原因主要是弄不清膜的方向性。在这两种记录模式的命名中，膜片方向都是指“朝向电极尖端外”而言，也即朝向浴液；另外，要记住内面向外记录模式是由细胞贴附式记录模式转化而来，而外面向外记录模式是由全细胞记录模式转化而来。为了便于记忆，可直接记住英文 inside-out 和 outside-out，也许更好理解。