

 国家自然科学基金研究专著
NATIONAL NATURAL SCIENCE FOUNDATION OF CHINA



膜片钳技术及其应用

康华光 等 编著

Information

科学出版社

(201
1201
 国家自然科学基金研究专著
NATIONAL NATURAL SCIENCE FOUNDATION OF CHINA



膜片钳技术及其应用

康华光 等 编著

科学出版社

内 容 简 介

本书由国家自然科学基金委员会优秀研究成果专著出版基金资助出版.它是作者在“膜片钳技术及其应用”领域所进行的研究工作的总结,同时也吸取了国际上的先进技术和新近的研究成果.内容包括:细胞电生理与膜片钳技术,膜片钳系统的组建及实验技术概要,膜片钳放大器原理与低噪声设计,单通道和全细胞电流记录技术,数据采集和分析,细胞分泌活动的膜电容监测技术和安培测量技术,细胞内钙离子浓度的测量及钙库特性,脑切片膜片钳技术,心肌细胞的药理特性和植物细胞的离子通道特性.同时还包含低噪声测量,信号的采集、分析与处理,荧光测量,细胞和组织成像技术等内容.这些内容涉及生命科学和信息科学的诸多领域,如生理学、药理学、细胞生物学、神经生物学、内分泌学、植物细胞生理学等.

书中的部分内容曾以讲义的形式在华中科技大学生物医学工程和生物物理专业的研究生教学中试用过多次,取得了较好的效果.

本书可作为大专院校、科研院所的研究生、高年级大学生的细胞电生理、生物物理及相关课程的教材,也可供从事科学研究的科技工作者参考.

图书在版编目(CIP)数据

膜片钳技术及其应用/康华光等编著. —北京:科学出版社,2003

ISBN 7-03-010886-8

I. 膜… II. 康… III. 质膜-生物技术 IV. Q241

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 072006 号

责任编辑:唐正必 / 责任校对:宋玲玲
责任印制:刘秀平 / 封面设计:王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年1月第一版 开本:B5(720×1000)

2003年1月第一次印刷 印张:16 插页:2

印数:1—2 500 字数:305 000

定价:40.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

序

欲知膜片钳技术的起源,先从一篇论文说起.

通常,一篇非常专业的科技论文公开发表后,若被其他的论文引用数次,其作者就可感到欣慰;假如被别的作者引用十次以上,就可称得上是一篇好论文;要是有幸被引用几十上百次,甚至几百次,那它无疑是一篇高质量的杰作,通常发表在权威的专业期刊或者是著名的科学杂志上,如“Nature”,“Science”,“Cell”和“Neuron”等.倘若有一篇论文发表后,竟然被引用一千次以上,那它的主要作者通常会被授予某项有名或不太有名的大奖.然而,你是否知道?有一篇论文,它的作者当时还不太有名,刊登的杂志也不算顶级,可是论文发表 20 年来,已神话般地被世界各地的科技工作者引用了一万二千余次,遍及生物医学的众多领域,而且近年来还在以平均每年约一千多篇的速度继续被引用,称此文为一奇迹也不算过分.它就是由 Hamill, Marty, Neher, Sakmann 和 Sigworth 等五人于 1981 年发表在《欧洲生理学杂志》(Pflügers Archiv.) 上的著名论文《Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-free Membrane Patches》.在此之前五年,身为德国科学家的 Neher 和 Sakmann 共同发明了这项被称之为膜片钳技术(1976),并于 15 年后共同荣获 1991 年诺贝尔生理学或医学奖.膜片钳技术的作用和影响由此可见一斑.前述论文的五位作者现在均已成为权威教授和著名科学家,任职于北美和欧洲各地,时有佳作发表.需要指出的是,膜片钳技术的创立是建立在前人所发明的电压钳和电流钳以及玻璃微电极的基础之上的. Hodgkin 和 Huxley 于 20 世纪 50 年代, Katz 于 60 年代由于用电压钳对神经突触传递和细胞膜离子通道学说的研究而分别获得了诺贝尔生理学或医学奖.

膜片钳技术的问世给细胞生物学的研究带来了一场革命.当前,这一技术已成为细胞电生理学的重要方法.为了开展膜片钳技术及其应用的研究,从 20 世纪 80 年代末开始,我们获得了国家自然科学基金委的四项课题、一项国家杰出青年基金课题的资助,教育部(原国家教委)的三项博士点基金课题资助,湖北省和武汉市科委的两项技术开发攻关项目以及其他经费的资助.这些项目涉及的学科有:膜片钳技术及细胞膜离子通道电流的检测,神经科学、内分泌学、药理学、钙信号及其调控机制等.为了完成上述课题,我们建立了生物物理与生物化学研究所及所属的细胞信息实验室,开展国内、国际交流与合作.结合研究工作,培养了一批硕士和博士.在国内外期刊上,发表了一批学术论文并研制成功具有国际先进水平的膜片钳放大器(PC I)及相关软件.现已形成了小批量生产,在全国推广应用.

本书内容是我们研究工作的总结,同时还吸收了国内外的先进技术.其主要特

点简述如下:

内容先进 包括了当今膜片钳技术及其应用的一系列的新方法,如低噪声设计、单通道和全细胞记录、膜电容和安培测量、胞内钙离子浓度测量和光电联合检测、脑切片和光学成像,以及植物细胞的制备及通道电流测量等技术。

突出概念 电生理学属于生命科学与信息科学的交叉学科,概念特别丰富,如离子和离子运动,浓度梯度和电位梯度,静息电位和动作电位,极化和去极化,膜片钳,电压钳和电流钳,高阻封接等。书中力图将这些基本概念阐述清楚,并在各章末列有重要概念小结,书末备有附录作为加深理解某些基本概念的参考资料。

实践性强 电生理学偏重于实验研究。本书第2章的内容是引导电生理实验工作者如何购置一套适合实验要求的膜片钳系统,如何进行实验设计等。离子通道电流,特别是单通道电流测量是一种低噪声测量,高阻封接是关键,牵涉的因素较多,如良好的电极、洁净的细胞和细心的操作等。需要进行多次探索,才能取得成功。

定量分析 生物实验的数据量大,需要进行筛选,如作滤波处理。而随机信号要作统计处理,以达到去伪存真的目的。从定性分析走向定量分析是整个生物医学研究的发展方向。

需要特别指出的是,膜片钳技术的应用将更多地与分子生物学和光学技术相结合来进行,尤其是荧光测量技术。例如利用 fura-2 作为荧光探针,对细胞内游离钙离子浓度进行实时测量;同时用膜片钳对细胞膜电容进行监测,可定量研究钙离子浓度与分泌之间的动态关系。其他如绿荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的应用,双光子激光扫描显微镜(two-photon laser scanning microscope)的应用等。

本书由康华光主编,负责全书的策划、组织和定稿,并编写1~6,11~12章和附录;康国新编写第7~10章。本书经华中科技大学同济医学院神经生物学系李之望教授审阅,对书稿提出了许多宝贵的意见和修改建议,在此表示衷心的感谢。

在课题研究的过程中,华中科技大学生物物理与生物化学研究所邹寿彬、瞿安连教授等对申请课题、协助指导博士生做了许多工作。原同济医科大学江明性、姚伟星、李之望三位教授和我们一起共同申请课题,共同进行研究,共同培养研究生,给予了热情的支持;北京大学医科部韩济生院士与我所合作,互派研究生进行研究和交流。在膜片钳技术研究启动初期,美国加州大学旧金山分校医学院 A. J. Hudspeth 教授(现为纽约 Rockefeller 大学教授)给予了学术上和物质上的帮助。我们与德国马-普生物物理化学研究所Neher教授合作多年,共同培养了多名研究生和博士后,得到了他高水平的指导和无私的援助。周专、徐涛、曹忠升、曾涛、牛小伟、涂欢、蔡东、陈良怡等博士和叶琴工程师在完成基金课题和技术开发项目期间付出了辛勤的劳动。

本书为国家自然科学基金委员会优秀研究成果专著出版基金资助项目,也得

到华中科技大学研究生院的教材基金的资助.

对以上国内外众多同行学者以及有关单位领导的支持和帮助,对所有关心本书出版并给予支持和帮助的人们,谨此一并致以谢忱.

由于时间仓促,书中不妥和错误之处在所难免,欢迎读者指正.

华中科技大学生物物理与生物化学研究所

康华光

2002年5月20日于武汉

目 录

序

1 细胞电生理与膜片钳技术	1
1.1 细胞的结构	1
1.2 细胞膜的化学组成	2
1.3 生物电信号的离子机制	2
1.3.1 细胞膜上的离子转运	3
1.3.2 细胞膜的静息电位和动作电位	6
1.4 生物电信号测量基础	9
1.4.1 电路中的几个基本定律	10
1.4.2 可兴奋细胞膜及其离子通道的等效电路	12
1.4.3 生物电信号测量中对仪器的要求	15
1.4.4 微电极与导电溶液	15
1.5 电生理实验中的基本方法	17
1.5.1 双电极电压钳技术	17
1.5.2 膜片钳技术	18
1.5.3 利用膜片钳技术记录离子通道电流	20
1.6 重要概念小结	20
2 膜片钳系统的组建及实验技术概要	22
2.1 细胞膜离子通道的分类和通道电流的记录模式	22
2.1.1 细胞膜离子通道的分类	22
2.1.2 通道电流的记录模式	23
2.2 膜片钳实验系统的组建	25
2.2.1 机械部件	25
2.2.2 光学部件	27
2.2.3 电子部件	27
2.2.4 微操纵器	29
2.3 系统接地	29
2.4 玻璃微电极控制工艺及设备	30
2.4.1 玻璃毛坏管	30
2.4.2 玻璃微电极拉制仪及拉制工艺	30
2.4.3 电极熔锻仪和优化处理	31

2.4.4	电极充灌	31
2.4.5	电极夹持器	32
2.4.6	浴池电极	32
2.5	实验技术概要	33
2.5.1	膜片钳的工作模式	33
2.5.2	实验前的准备工作	34
2.5.3	实验步骤	35
2.5.4	注意事项	37
2.6	重要概念小结	39
3	膜片钳放大器原理与设计	40
3.1	膜片钳放大器原理	40
3.1.1	膜片钳的定义	40
3.1.2	膜片钳放大器	40
3.1.3	前置放大电路的两种方案	41
3.2	I - V 变换器的背景噪声	43
3.2.1	反馈电阻的噪声	43
3.2.2	放大电路中的噪声	44
3.3	低噪声放大器设计举例	46
3.4	频率响应和带宽扩展	47
3.5	动态误差及其补偿技术	49
3.5.1	快电容暂态失真及其补偿	49
3.5.2	慢电容暂态失真及其补偿	50
3.5.3	串联电阻引起的钳位误差及其补偿	52
3.5.4	阻容补偿电路举例	55
3.6	PC-ⅡB 型膜片钳放大器设计	56
3.7	计算机控制的膜片钳放大器简介	58
3.8	重要概念小结	60
4	单通道电流记录技术	62
4.1	细胞贴附式记录模式	62
4.1.1	高阻封接	62
4.1.2	保证高阻封接的条件	63
4.1.3	单通道电流记录举例	64
4.2	离体膜片的单通道电流记录	64
4.2.1	膜内朝外式	65
4.2.2	膜外朝外式	65
4.3	离子通道的辨识	66

4.4	单一离子电流的记录数据	67
4.4.1	电压门控型单一离子电流	67
4.4.2	配体门控通道的单一离子电流	69
4.5	重要概念小结	69
5	全细胞记录技术	71
5.1	基本实验步骤	71
5.2	全细胞记录模式的电学分析法	72
5.2.1	电路模型及阻容参数补偿	72
5.2.2	噪声分析	73
5.2.3	复杂细胞的电路模型	73
5.3	全细胞记录模式的化学分析法	76
5.3.1	电极与细胞之间的扩散建模	76
5.3.2	两段模型的解	76
5.3.3	全细胞记录模式中的电极充灌	78
5.3.4	穿孔膜片钳技术	78
5.3.5	有效膜电位的变化——液结电位及其校正	81
5.4	全细胞记录技术的应用	82
5.5	重要概念小结	82
6	数据采集与分析	83
6.1	数据采集硬件系统	83
6.1.1	基本概念和术语	83
6.1.2	计算机系统	84
6.1.3	数据采集器	86
6.2	电生理学研究用软件	88
6.2.1	操作系统	88
6.2.2	电生理实验专用软件	89
6.3	数据分析	89
6.3.1	模拟信号预处理和数据采集参数的选择	89
6.3.2	单通道电流信号分析	90
6.4	重要概念小结	99
7	细胞分泌活动的膜电容监测技术	101
7.1	全细胞记录模式的电路模型	102
7.2	膜电容监测的时域法	103
7.3	膜电容监测的频域法	104
7.3.1	正弦加直流技术	104
7.3.2	分段线性技术	106

7.3.3	膜电容监测的虚拟仪器系统	109
7.4	膜电容监测实例	113
7.5	膜电容监测中应当注意的几个实际问题	114
7.5.1	选择一个合适的基础技术	114
7.5.2	膜电容测量的误差及其改进措施	115
7.6	重要概念小结	116
8	细胞分泌活动的安培测量技术	117
8.1	安培测量技术原理	117
8.1.1	细胞分泌物质的氧化还原过程	117
8.1.2	安培测量技术原理	118
8.1.3	定量电化学	119
8.2	测量仪器与设备	120
8.2.1	碳纤维电极	120
8.2.2	放大器及测量系统	122
8.3	实验数据示例	123
8.4	安培测量与膜电容监测的联合运用	126
8.4.1	记录模式	126
8.4.2	记录数据	126
8.4.3	结论与展望	128
8.5	重要概念小结	128
9	细胞内钙离子浓度的测量及钙库特性	130
9.1	细胞内钙离子浓度的自稳平衡	130
9.2	钙离子荧光染料的激发和发射光谱	133
9.2.1	荧光	133
9.2.2	激发光谱和发射光谱	133
9.3	细胞内钙离子浓度的测量	136
9.3.1	测量方法与钙离子浓度的计算	136
9.3.2	测量仪器与系统	136
9.3.3	测量结果举例	138
9.4	细胞内的钙库特性及钙诱发的钙释放	143
9.4.1	钙库特性	144
9.4.2	钙离子诱发的钙释放	145
9.5	锁定化合物的闪光分解	147
9.5.1	光照作用与光化学反应	147
9.5.2	锁定化合物的结构和特性	149
9.5.3	锁定化合物光解的应用举例	149

9.6	重要概念小结	150
10	脑切片膜片钳技术	152
10.1	脑切片	152
10.1.1	脑切片的制备与维护	152
10.1.2	从脑组织的不同部位制备切片	153
10.1.3	动物的品种和年龄	153
10.2	脑切片膜片钳记录技术	154
10.2.1	仪器设备	154
10.2.2	电极内液和外液的配制	155
10.2.3	切片上神经元和神经胶质细胞的辨识	156
10.2.4	记录前的准备工作	156
10.2.5	几种记录模式举例	159
10.3	脑切片膜片钳技术与其他方法的结合	161
10.3.1	常规成像技术	161
10.3.2	共聚焦成像技术	165
10.3.3	多光子成像	167
10.4	重要概念小结	170
11	心室肌细胞的药理特性	171
11.1	异喹啉类生物碱及其心血管电生理简介	171
11.2	心室肌细胞电压门控离子通道	172
11.2.1	心室肌细胞电压门控钾通道	172
11.2.2	心室肌细胞电压门控钙通道	173
11.3	心肌动作电位	174
11.4	豚鼠心室肌细胞的电生理特性	176
11.4.1	豚鼠心室肌的全细胞记录	176
11.4.2	豚鼠心室肌细胞的单通道记录	177
11.5	豚鼠心室肌细胞的药理特性	178
11.5.1	粉防己碱对心肌 Ca^{2+} 通道的影响	178
11.5.2	莲心碱对心肌钙通道的影响	181
11.6	重要概念小结	183
12	研究植物细胞离子通道特性的方法	185
12.1	植物为什么需要离子通道	186
12.1.1	溶质转运	186
12.1.2	非通道性的溶质转运	190
12.1.3	转运溶剂的水通道	190
12.2	植物细胞膜的制备	190

12.2.1	质膜	190
12.2.2	内膜	193
12.3	植物膜的膜片钳记录模式	196
12.4	重要概念小结	197
附录 A	细胞膜离子运动的物理描述和数学描述	198
A.1	支配离子运动的物理定律	198
A.1.1	扩散运动的费克(Fick)定律	198
A.1.2	漂移运动的欧姆定律	198
A.1.3	扩散与迁移之间的爱因斯坦关系	199
A.1.4	空间电荷呈中性(电荷分离原理)	199
A.2	离子运动的数学描述	199
A.2.1	能斯特-普朗克方程	199
A.2.2	能斯特方程	200
A.2.3	哥德门-霍奇金-卡兹(GHK)模型	201
附录 B	基本电学和电子电路	203
B.1	电学和电气测量的术语	203
B.2	电路中若干电学量的定义和单位	206
B.3	放大器	213
B.3.1	理想放大器	213
B.3.2	电压放大器	214
B.3.3	互阻放大器	214
B.3.4	电压跟随器	215
附录 C	细胞电生理学中的光学方法	216
C.1	若干定义和术语	216
C.2	显微镜	218
C.2.1	复合型显微镜	219
C.2.2	物镜	220
C.3	光成像方法	221
附录 D	细胞培养技术与实验用液	222
D.1	肾上腺嗜铬细胞	222
D.1.1	分离与培养用液	222
D.1.2	细胞分离与培养	222
D.1.3	实验用液	223
D.2	胰腺 β 细胞	223
D.2.1	试剂及分离、培养用液	223
D.2.2	胰岛的分离	223

D. 2. 3 单细胞的分离和培养	224
D. 2. 4 实验用试剂和溶液	224
D. 3 心室肌细胞	225
D. 3. 1 溶液成分	225
D. 3. 2 细胞分离	225
参考文献	226
索引(汉英对照)	234
符号、单位和物理常数表	239
作者简介	241
英文简明目录	242

1 细胞电生理与膜片钳技术

细胞是动物和人体的基本组成单元. 人体由亿万个细胞所组成, 它们是生命的基础. 细胞外围有一层薄膜, 细胞间彼此分离又互相联系. 细胞间和细胞内的通信, 是依靠其膜上的离子通道进行的. 离子和离子通道是细胞兴奋性的基础, 亦即产生生物电信号的基础. 生物电信号通常用电学或电子学方法进行测量, 形成了一门细胞电生理学(electrophysiology)学科, 用以揭示细胞的生理过程. 用电生理方法记录电活动, 可在电流钳条件下记录胞外的电位, 而早期的研究多使用双电极电压钳技术作胞内电活动的记录. 自从细胞膜和离子学说的建立(Hodgkin, et al., 1949), 细胞电活动的研究才逐渐深入. 在 1976~1981 年期间, 两位德国细胞生物学家 Erwin Neher 和 Bert Sakmann 所开创的膜片钳技术(patch clamp technique)为细胞生理学的研究带来了一场革命性的变化, 因而两位科学家于 1991 年荣获诺贝尔生理或医学奖.

膜片钳技术是以微弱电流信号测量为基础的, 利用玻璃微电极与细胞膜封接, 可测量多种膜通道电流, 其值可小到 pA(10^{-12} A)量级, 是一种典型的低噪声测量技术, 可以说达到当今电子测量的极限. 应当注意, 为了测量膜通道电流, 必须将膜钳制于某一固定的电位上.

膜片钳技术发展至今, 已成为现代细胞电生理研究的常规方法, 并在许多领域取得了丰硕的成果, 它不仅可以作为基础生物医学研究的工具, 而且在间接或直接为临床医学研究服务方面, 也正在产生积极的效果.

该技术不仅可以应用于动物和人体细胞, 而且还可以应用于植物细胞的生理过程的研究, 如农作物的实验室培养(玉米、蚕豆等), 对于我国的农业发展也必将起到促进作用.

1.1 细胞的结构

所有动物细胞都由一层薄膜所包围, 这就是细胞膜或称质膜(plasma membrane)(图 1.1). 可以想象, 细胞膜是一种具有特殊结构和功能的半透性膜. 它一方面允许某些物质有选择性地通过, 但又能较严格地保持细胞内物质成分的稳定. 细胞内部也存在着类似细胞膜的膜性结构, 它们构成胞内的细胞器, 如线粒体(mitochondria)、内质网(endoplasmic reticulum, ER)等. 这就形成细胞器之间、细胞器与胞浆(cytosol)之间有可能保持化学组成上的相对独立, 从而可进行不同的功能活动.

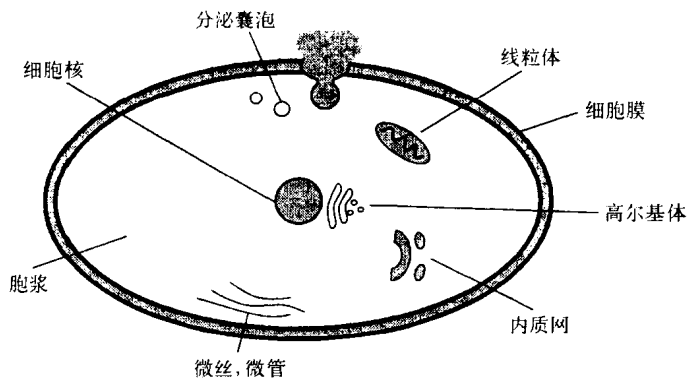


图 1.1 细胞的简化结构示意图

1.2 细胞膜的化学组成

电镜观察表明,多种细胞的膜都具有类似的结构,它可分为三层,即在膜的内外两侧各有一条厚约 2.5nm 的电子致密带,中间隔有一层厚约 2.5nm 的透明带,总厚度约为 7.5nm. 这种膜性结构在细胞膜和胞内细胞器上均可见到.

多种膜性结构的化学分析表明,膜的主要组成部分有脂质(lipid)、蛋白质(protein)和糖类(sugar)等,一般以脂质和蛋白质为主,糖类的含量很少. 膜性结构的共同特点是,以液态脂质双分子层(lipid bilayer)为基架,其中镶嵌着具有不同生理功能的蛋白质.

细胞膜所具有的各种功能与膜内所含的蛋白质密切相关. 蛋白质的功能主要是:让多种物质如离子和营养物质、代谢产物有选择地通过膜蛋白质、离子通道(ionic channel)、离子泵(ionic pump)等;蛋白质的另一个功能是,它们分布在细胞膜上,能辨认和接受细胞环境中特种化学刺激或信号,称之为受体(receptor),通过受体和膜结构中其他酶类物质的作用,能将胞外的信息传递到胞内,引发细胞功能的相应改变. 由此可见,细胞膜的脂质双分子层构成细胞的包被,而膜蛋白质则使细胞与周围环境进行物质、能量和信息的交换,藉以维持生命的延续,并协调周围细胞的相互联系.

1.3 生物电信号的离子机制

人体和动物中的电信号是由若干种游离的离子,如 K^+ , Na^+ , Cl^- 和 Ca^{2+} 所运载. 这些离子运载着正、负电荷,从活体的一处流动到另一处. 在可兴奋细胞上,离子的跨膜运动导致跨膜电位的变化,这些电位的变化就是原始的电信号,它们将生物信息从细胞的一部分转运到细胞的另一部分,从一个细胞转运到另一个细胞,从活体的一部分转运到另一部分.

生物系统中的离子分布是不均匀的,一部分的离子浓度与另一部分颇不一致。例如,多数动物细胞内的 K^+ 浓度较之胞外高得多。这种离子分布的差异在生物系统中会引起浓度梯度(concentration gradient)或化学梯度(chemical gradient)的变化。根据热力学原理,离子将从高浓度区向低浓度区流动,这种现象称为扩散(diffusion)。

由于游离的离子运载着电荷,因而它们的运动不仅要受浓度梯度的影响,而且也要受电场(电位梯度)的影响。在活体的大部分,生物分子的剩余电荷为零,换言之,在一定的容积内,正电荷数等于负电荷数,即空间电荷呈中性。但在单个细胞的膜内,这种中性的空间电荷属例外,因为多数细胞膜对某些离子可以通透,但对另外一些离子则不能通透,可见细胞膜起了隔离电荷的作用。这种离子隔离导致在细胞膜上产生跨膜电场,带正电荷的离子将顺着电场方向流动,这种现象称为漂移(drift)。扩散与漂移均将影响通过膜上的蛋白质孔道或离子通道的离子运动^①。关于离子通道在本章以及后续各章还要继续深入地讨论。

1.3.1 细胞膜上的离子转运

前已提及,生物系统中的离子分布是非均匀的,在大多数动物细胞中, Na^+ , Cl^- 和 Ca^{2+} 等离子,其胞内浓度比胞外低,而 K^+ 却相反,胞内浓度高于胞外浓度。这些跨膜离子浓度梯度驱使离子电流流过膜上开放的离子通道。换言之,离子浓度梯度起着类似于电路中的电动势(electromotive force, EMF)的作用,而且浓度梯度愈大,电流的值亦愈大。

大多数生物膜是可以让 K^+ 和 Cl^- 通透的,这就是说如果没有维持的机制,那么,胞内外这些离子的浓度将趋于一致,因为离子将从高浓度的一侧流向低浓度的一侧直至消除了浓度梯度为止。实际上,所有的活细胞力图维持它们的膜内外离子浓度梯度,虽然它们的膜是可以通透离子的。通常有两种类型的维持机制,现分述如下:

1. 离子的主动转运

大多数动物细胞膜上的蛋白质,可以逆着离子浓度梯度将离子从膜的一侧转运到另一侧。膜蛋白的这种功能通常需消耗能量,这种能量的来源可能有两方面:一是来自三磷酸腺苷(ATP)分子的水解作用;另一则是来自其他离子的化学驱动力。下面就其主要的离子转运器的基本性质作一简要的介绍。

Na^+-K^+ 泵 这种转运器是细胞膜上最为重要的,其转运所需的能量来自 ATP 的水解物,即 ATP 酶。每两个 K^+ 的泵入,相应地有三个 Na^+ 泵出,每次离子交换的剩余结果为一个阳离子。这种泵的作用可以用氰化物、脱氧核糖核蛋白(DNP)或哇巴因(ouabain)(强心药)所阻断。 Na^+-K^+ 泵在所有动物的细胞膜上普

^① 扩散、漂移和空间电荷呈中性的数学描述见附录 A. 1。

遍存在,它是跨膜 Na^+ 和 K^+ 浓度梯度存在的基本原因,其结果是: $[\text{Na}^+]_o > [\text{Na}^+]_i$ 和 $[\text{K}^+]_i > [\text{K}^+]_o$.

Na^+ - Ca^{2+} 交换器 在这种离子交换中,3 个 Na^+ 输入,相应地有 1 个 Ca^{2+} 输出.由于 Na^+ 的输入导致它的膜外浓度梯度降低,从而提供了交换所需的能量.可见,这种泵的作用不是直接由 ATP 所驱动,而是由 Na^+ 的浓度梯度变化所致,也就是由 ATP 所驱动的 Na^+ - K^+ 泵来维持.这种交换的主要功能是保持胞内钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 处于低水平.

Ca^{2+} 泵 这是位于内质网(endoplasmic reticulum, ER)和细胞膜上的 ATP 所驱动的泵,它需 Mg^{2+} 作为一种辅助因子,将 Ca^{2+} 驱入内质网储存起来,以及流出细胞膜,以保持细胞液内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 处于低水平.

碳酸氢盐- Cl^- 交换器 这种交换系由 Na^+ 内流所驱动.它将 HCO_3^- 泵入细胞膜内,而将 Cl^- 泵出.它的主要作用在于保持胞内的氯离子浓度 $[\text{Cl}^-]_i$ 处于低水平并使胞内具有高 pH 值.

Cl^- - Na^+ - K^+ 联合转运器 这种转运是由 Na^+ 内流所驱动并在转运 Na^+ (内向)、 K^+ (内向)和 Cl^- (内向)时,按 1 : 1 : 2 的比例进行.

以上介绍的所有离子的转运过程,在活细胞起着维持跨膜离子浓度梯度的作用.离子浓度梯度所以能得以保持是以消耗能量为代价的,故这种离子转运机制称之为主动转运(active transport).

2. 离子的被动转运和董南(Donnan)平衡

除以上所述转运以外,离子浓度梯度亦可借助细胞膜对不同离子的通透选择性来加以维持.如前所述,在静息状态时,多数细胞膜对 K^+ ,或 Cl^- 是可以通透的,但对于 Na^+ 和 Ca^{2+} 可通透的细胞膜则少得多.此外,许多不可通透的阴离子,例如 SO_4^{2-} 和小的被充电的蛋白质,却在胞内发现.根据空间电荷呈中性的原理,胞内阴离子吸引着较多的 K^+ 进入胞内,而将较多的 Cl^- 排斥出胞外.由于这种类型的离子分布不需要能量来驱动,故称为被动转运(passive transport).

若细胞膜对几种离子均是可以通透的,而且对于这些离子没有主动转运器存在,则这些离子处于被动分布.此时,称细胞膜电位为这些离子的平衡电位.细胞膜电位定义为

$$V_m = V_i - V_o, \quad (1.1)$$

式中, V_i 和 V_o 分别为细胞膜内、外的电位.

当由离子 i 所形成的跨膜电流为零时的跨膜电位称为平衡电位,即

$$E_i = V_m (I_i = 0) = V_i - V_o = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[C]_o}{[C]_i}. \quad (1.2)$$

式(1.2)就是能斯特方程(Nernst equation, NE)^①,它表明某一离子的平衡电位与

^① Nernst 方程的推导见附录 A. 2.