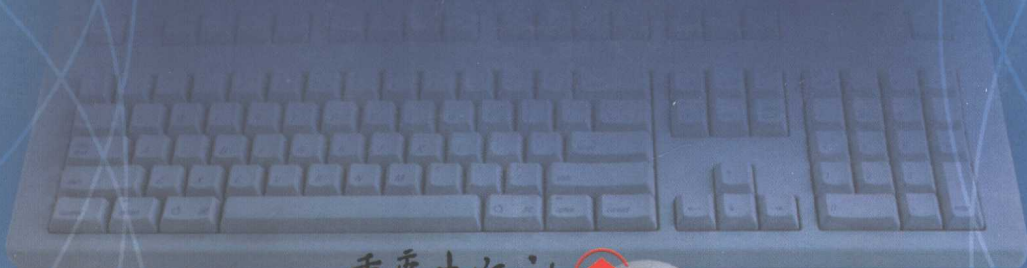


RENZHI SHENJING KEXUE YUANLI HE FANGFA



# 认知神经科学原理和方法

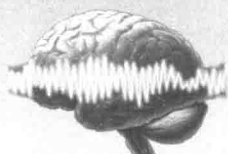
马原野 王建红 主编



重庆出版社



RENZHI SHENJING KEXUE YUANLI HE FANGFA




# 认知神经科学原理和方法

主 编 马原野 王建红

编著人 (以姓氏笔画为序)

Craig Evinger	马 成	马原野	王功伍	王建红	
王晓文	王晓燕	毛建斌	田少华	田绍文	刘 昌
刘文晓	刘立慧	齐 华	伍龙军	何宇红	苏彦捷
李东风	李朝翠	李 量	李新旺	余化霖	余嗣明
陈必义	陈南晖	陈郁初	汪茂华	汪萌芽	张世仪
张晓华	肖 鹏	杨建珍	杨炯炯	杨跃雄	杨智勇
杨 艳	郑永唐	郑佳威	金玫蕾	罗跃嘉	岳 琦
周启心	周昌乐	胡新天	钟 颖	赵欣如	赵新峰
骆清铭	柯晓兵	徐天乐	徐晓虹	贾富仓	翁旭初
袁 源	黄骁南	彭沿平	曹 军	舒小花	雷衍林
曾 涛	缪应达	蔡晷雷			

重庆出版社 

**图书在版编目 (CIP) 数据**

认知神经科学原理和方法/马原野, 王建红主编. 重庆: 重庆出版社, 2002

ISBN 7-5366-6018-9

I. 认... II. ①马... ②王... III. 认知—神经系统  
IV. R322.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 086550 号



**认知神经科学原理和方法**

马原野 王建红 主编

---

责任编辑 冯建华  
封面设计 吴庆渝 马原野  
技术设计 费晓瑜

---

重庆出版社出版、发行  
(重庆长江二路 205 号)  
新华书店经销  
四川外语学院印刷厂印刷

---

开本 787X1092 1/16 印张 28.375  
字数 662 千 插页 4  
2003 年 4 月第 1 版  
2003 年 4 月第 1 版第 1 次印刷  
印数: 1~1 000

---

ISBN 7-5366-6018-9/Q·24  
定价: 39.00 元

# 序言

鉴于我国的认知神经科学研究正处于炽热阶段,为了给我国广大的神经科学工作者和心理学工作者及相关领域的研究人员及学生提供一本关于认知神经科学实验技术方法和基本原理的参考书,我们邀请了国内外同行、专家撰写了本书。该书从构思到完成历时约一年,汇集了一些当今正在兴起的、已处于应用阶段或正待完善的崭新的研究技术,同时也收集了一些经典的、目前仍在神经科学研究领域中得到广泛应用的实验技术手段。我们真诚地希望这本书能给广大的认知科学研究工作者带来裨益。

在本书的策划过程中,中国科学院脑研究所陈郁初先生提供了建设性的意见,使本书得以顺利完成。

由于成书时间紧迫,故难免存在一些错误,望广大同仁提出宝贵意见。

本书承中国科学院知识创新工程、中国科学院脑智科学交叉前沿研究、国家 973 重大项目、云南省跨世纪中青年人才培引项目和国家基金委、云南省基金委的支持。

本书第 1 篇、第 5 篇第 1 章、第 8 篇、第 9 篇的导言由马原野撰写,第 2 篇、第 4 篇、第 6 篇的导言由陈南晖撰写,第 3 篇、第 5 篇第 2 章的导言由王建红撰写,第 7 篇的导言由张晓华撰写;在本书的编辑过程中还得到郑佳威、攸洁等同学的大力帮助,在此一并表示感谢。

编者

2003 年 1 月于昆明

# 目 录

## 序 言 / 1

## 第 1 篇 认知神经科学中电生理原理及技术 / 1

### 导 言 / 1

- 1.膜片钳技术原理及方法 / 2
- 2.学习后海马内突触传递效能的检测及其改变的机制 / 17
- 3.学习记忆的脑片细胞电生理研究技术 / 30
- 4.多道微电极和神经元多单位电活动细胞外记录的原理和技术 / 46
- 5.在自由活动动物中进行神经元单位放电记录的方法 / 53
- 6.微电极记录 Morris 水迷宫中自由游泳大鼠脑内神经元电活动技术 / 57
- 7.一种可用于自由活动动物上的慢性微电极推进器 / 64
- 8.神经元集群研究方法概论 / 67
- 9.事件相关电位研究方法 / 72
- 10.探测性诱发电位方法 / 90

## 第 2 篇 脑成像 / 97

### 导 言 / 97

- 1.脑功能成像原理和技术 / 98
- 2.近红外光学成像技术及其在神经科学中的应用 / 112

## 第 3 篇 脑内神经递质测定 / 127

### 导 言 / 127

- 1.神经递质微量分析的原理与方法 / 128
- 2.脑内微透析术结合反相高压液相法在体测定脑内神经递质 / 133
- 3.脑内神经化学物质变化的在位连续实时监测 / 149

## 第4篇 神经免疫组化 / 154

导言 / 154

- 1.神经系统的免疫学 / 155

## 第5篇 认知功能 / 166

第1章 学习记忆研究的有关进展 / 166

导言 / 166

- 1.钙离子与学习记忆 / 167
- 2.中枢神经系统中一氧化氮和一氧化氮合酶 / 178
- 3.抑制性氨基酸受体可塑性 / 185
- 4.长时记忆分子机制研究的新进展 / 203
- 5.人类工作记忆的神经生物学基础 / 211

第2章 认知神经科学行为检测 / 224

导言 / 224

第1节 灵长类动物 / 226

- 1.以猕猴作为实验对象的一些认知功能的行为学研究方法 / 226
- 2.触摸屏技术在神经行为学实验中的应用 / 232

第2节 啮齿类动物 / 235

- 1.小动物学习记忆行为检测模型 / 235  
附 常用增强记忆的药物筛选方法
- 2.Morris 水迷宫实验原理和方法 / 250
- 3.大白鼠操作式条件反射模型 / 254
- 4.异相睡眠及其剥夺模型 / 262

第3节 鸟类动物 / 270

- 1.鸟鸣的神经生物学 / 270
- 2.鸟类效鸣 / 282
- 3.鸽子的范畴形成与概念学习 / 289

## 第6篇 与精神分裂症相关的模型方法 / 301

导言 / 301

- 1.强迫观念与强迫行为障碍及其动物模型 / 302

2. 两种研究大鼠的感觉运动门控与感知觉编码交互作用的全自动化迷宫 / 310
3. 两种研究精神分裂症的方法——听刺激惊跳反射和听觉诱发电位早成分(P50)前抑制 / 317

## 第 7 篇 认知神经科学中基因水平研究 / 323

导 言 / 323

1. 微阵列(Microarray)技术及其数据分析 / 324
2. 微阵列(Microarray)技术与神经生物学 / 336  
附 实验设计和方法
3. 转基因技术在学习记忆研究中的应用 / 347
4. 神经系统基因功能行为学检测平台 / 357

## 第 8 篇 认知神经生物学实验常用技术及技巧 / 363

导 言 / 363

1. 眨眼的测量 / 365
2. 脑缺血动物模型 / 370
3. 啮齿类动物在 Morris 水迷宫中行为轨迹跟踪系统的软件 / 380  
附 Mouse Track Application 帮助文档
4. 神经细胞胞内钙离子浓度的测定方法 / 391
5. 麻醉药在临床和实验动物中的应用 / 398
6. 在室外自由活动动物脑上进行电刺激的方法 / 407
7. 生物电极中的离子化学问题 / 410
8. 神经信号放大器原理和设计 / 413
9. 计算机平行接口在神经行为学中的应用 / 419
10. VB 编写视频捕捉程序及其在实验自动化当中的应用 / 424
11. 简要介绍两种生物学实验数据实时传输的新方法 / 428

## 第 9 篇 认知神经科学有关问题 / 430

导 言 / 430

1. 认知神经科学实验设计、方法学 and 数据分析中的若干问题 / 431
2. 脑科学研究中的计算方法略举 / 436

附录一 常用实验动物生物学参数 / 443

附录二 常用实验动物麻醉剂量及方法 / 445

# 第 1 篇

## 认知神经科学中电生理 原理及技术

### 导 言

电生理学方法是脑研究中最常用的方法之一。本篇共有 10 篇文章,分别介绍了神经系统从离子通道水平到系统水平的电活动。《膜片钳技术原理及方法》具体描述了膜片钳的原理和应用,这是一项在分子水平上研究神经元功能最常用的电生理学技术。作者首先向我们介绍了离子通道的概念和研究意义,然后叙述了有关膜片钳研究的技术进展和各种模式,最后详细介绍了膜片钳原理和技术操作与技巧。通读全文,我们可以细致了解有关膜片钳的相关原理和实验技术。

《学习后海马内突触传递效能的检测及其改变的机制》和《学习记忆的脑片细胞电生理研究技术》则介绍了与海马学习记忆有关的电生理研究原理和方法。

《多道微电极和神经元多单位电活动细胞外记录的原理和技术》、《在自由活动动物中进行神经元单位放电记录的方法》、《微电极记录 Morris 水迷宫中自由游泳大鼠脑内神经元电活动技术》、《一种用于自由活动动物上的慢性微电极推进器》、《神经元集群研究方法概论》等 5 篇文章从细胞水平介绍了神经元单位电活动的记录方法和原理。前一篇文章阐述了神经元单位电活动胞外记录的基本原理。二、三、四篇文章则分别介绍了两种在自由活动动物上进行神经元电活动记录的方法。这些方法均是新近建立的、在认知神经科学研究中具有广泛用途的电生理学方法。最后一篇文章还特别介绍了神经元集群研究的方法。

在系统水平上,《事件相关电位研究方法》与《探测性诱发电位方法》介绍了诱发电位的原理和记录方法。这两篇文章着重探讨了诱发电位在认知科学研究中的应用。

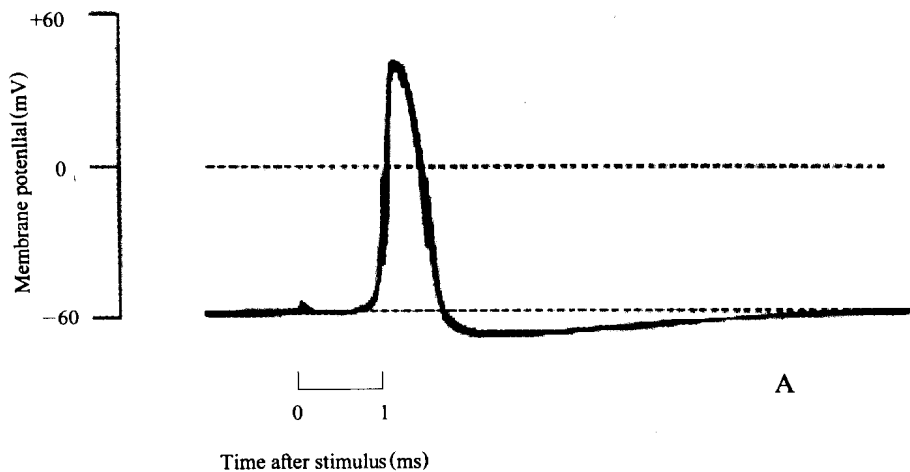
——马原野



# 膜片钳技术原理及方法

## 1 概述

静息状态时,神经元等可兴奋细胞的膜内外两侧存在电位差,称为静息电位(rest potential)。神经元静息电位是由细胞膜内外两侧离子分布差异( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Cl}^-$  等)及膜上离子通道对各种离子通透性不同产生的。但当神经元受到诸如机械、电或化学等刺激时,细胞膜内外两侧电位差发生急剧变化,细胞表现出兴奋,可传播的动作电位(冲动)形成并经轴突向下传导,并通过神经元间的突触(突触后电位)向下一级神经元进行传递。动作电位(action potential)主要由电压门控型  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子通道所通透的特定离子电流产生,突触后电位(synaptic potential)主要由配体门控离子通道所通透的特定离子电流产生。动作电位与钠离子通道关系见图 1。



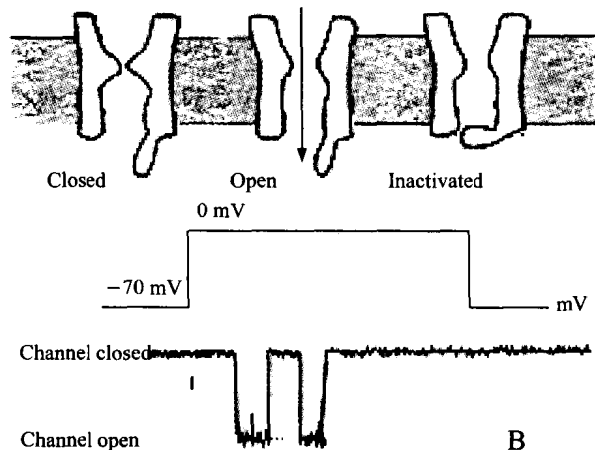


图1 动作电位与钠离子通道的关系(引自 Ashcroft FM,1999)

细胞膜静息时,静息膜电位 $-60\text{ mV}$ ;受到适宜刺激时,膜兴奋,产生动作电位。动作电位由上升相与下降相组成(图 1A),上升相至峰值主要是由钠离子跨膜内流形成(去极化),下降相主要由钾离子外流形成(复极化)。钠离子内流是在膜受到一定的去极化刺激时,电压型钠通道迅速打开所致,并快速关闭(图 1B)。与此同时,电压型钾通道和其它类型钾通道打开(未画出),钾离子外流,构成下降相,直至回复静息态( $-60\text{ mV}$ )。

可见,离子通道(ion channel)是神经、肌肉等组织细胞膜兴奋性的基础,也是生物电活动的基础。它们参与动作电位的产生与传播,也参与突触间的信号传递、整合等功能的完成。

离子通道是存在于细胞膜上的一种特殊跨膜蛋白,而非一般的离子载体蛋白,它含有能开或关的门控(gating)亲水孔道(pore)。在一定条件下,它能通透一些种类的离子。然而,离子通道对离子的通透性具选择性,如钠通道对钠离子有最大的通透性,而其它离子的通透性较低或不能通过。离子通道的门控机制也呈多样,如电压门控型和配体门控型等等。举例来说,当电压门控型钠离子通道受到一定阶跃电压方波刺激后,门控打开,钠离子流能以极快的速度顺着膜两侧的电化学梯度,通过孔道由胞外流入胞内。

离子通道在非兴奋性动物细胞、植物细胞、细菌、酵母菌及线粒体等细胞器中也广泛存在。它们是细胞完成正常生理功能的基础元件。离子通道研究的意义极为重大。激素分泌、学习与记忆、细胞分化和发育、感觉传导、细胞内水和电解质平衡、血压调节、植物细胞的抗逆性、病菌的致病性等诸多问题已被证实与离子通道有直接关系。反之,离子通道功能异常则会引发深刻的生理效应,产生离子通道疾病,如癫痫和心律失常等多种疾病[1]。

以上科学信息的获得极大地得益于德国Neher和Sakmann共同发明的膜片钳技术(patch clamp)。他俩于1976年第一次以膜片钳技术直接观测到单个离子通道电流。他们也因该项技术及其所给生物学领域带来的深刻变革而获1991年度诺贝尔生理学 and 医学奖。

目前,膜片钳技术已是一种生物学上通用技术,它能精确测量通过生物膜离子通道的离子电流。从而可对通道的类型、电导、动力学、药理学、通道调制等诸多特性以及其它生命科学问题开展深入研究。

应该说,作为比较先进的电生理学技术,膜片钳技术也是在原先的电压钳技术(voltage clamp)基础上逐步发展起来的。细胞内记录和电压钳技术首先由 Marmont 和 Cole 发明,然后 Hodgkin 和 Huxley 等将其大大改进。电压钳,顾名思义是将细胞膜电位钳制于某一固定电位后,测量全细胞的离子流,因此属于细胞内记录。它比较适合于测量直径较大的细胞。电压钳技术是细胞内记录。膜片钳实质上也是一种电压钳,然而其与电压钳不同的是,它主要用于研究膜片中的单个离子通道的电流。当然,亦可用于观测全细胞离子流(细胞直径不宜过大),等效于细胞内微电极记录,效果较佳。膜片钳技术业已发展成为电压钳(voltage clamp)和电流钳(current clamp)两种技术。然而,进行单个通道研究,须采用电压钳膜片钳技术;至于全细胞记录,电压钳和电流钳均可采用,关键在于实验要求。

膜片钳技术与其它技术相互结合,对研究生命科学问题也是极其有帮助的,如膜片钳与 Fura-2 显微荧光测钙技术、碳纤电极局部电化学微量检测技术和反转录 PCR 等分子生物学技术的结合等都是很好的例子[7]。技术交叉对研究工作的作用是不言而喻的。

膜片钳技术与场电位记录、单位放电记录不同。场电位记录方式:将玻璃或金属电极插入细胞群和突触中,记录一群细胞群体和突触后膜在自发状态或诱发刺激下的放电情况(分别叫作群峰电位和突触后膜电位)。所记录到的放电,自发状态下称为自发电位;而在诱发条件下,被称为诱发电位。单位放电技术:则是将玻璃或金属电极尽可能地靠近某个细胞,记录单个细胞在自发或诱发状态下的放电情况。相对来说,单位放电技术因其电极必须定位于单个细胞而较场电位技术难度大。场电位与单位放电记录自发或诱发电位。它们完全不必进行膜电位钳制。然而,膜片钳技术却是一种电钳制技术,利用直径达 1  $\mu\text{m}$  左右的充灌有电极液的玻璃微电极(不能用金属电极),通过其与细胞膜某一区域的紧密而坚固的贴附,玻璃与膜之间的封接电阻(seal resistance)可达数亿欧姆值。从而将电极管内的膜片(patch)从电学上与管外的其它区域细胞膜隔离绝缘开。在此基础上,根据实验需要,将膜电位或膜电流钳制于某一固定值,从而达到采集和记录电流或电压信号的目的。

膜片钳技术有四种基本记录模式:细胞无损贴附式(cell-attached patch)、膜片内面向外(inside-out patch)、膜片外面向外(outside-out patch)和全细胞记录模式(whole-cell recording)。在以上记录模式的基础上,后又发展出了其它记录模式,如 perforated patch recording、double patch recording、loose patch recording、giant patch recording、detector patch recording 和 tip-dip bilayer recording 等。本文仅介绍四种基本模式操作。其中细胞无损贴附式是所有记录模式的基础,故较好掌握细胞无损贴附式技术对于膜片钳技术的掌握是至关重要的。另外,细胞无损贴附式、膜片内面向外和膜片外面向外这三种专用于记录膜片的单个离子通道电流,而全细胞记录模式用于记录全细胞电流(所有离子通道的平均反应)[7]。

细胞无损贴附模式:即玻璃电极紧密贴附于一完整细胞之上,细胞始终保持完好。膜片始终是整个细胞的一部分,不会被扯离于细胞。膜片外面向着电极管内的内液,内面向着细胞质(图 2)。此模式是非侵入性的,可基本保持离子通道的生理环境。它可用于验证膜片分离(patch excise)后通道特性可能的改变;另外,也可用于判断某一离子通道是否为细胞内第二信使所控。玻璃电极内膜片上的离子通道与外界溶液隔离(封接特性之一,封接处化学物质不可透)。膜片内离子通道是不能被直接加入到细胞外液的受体激动剂所打开。但如果离

子通道活性发生改变,则是由于受体激动剂使细胞内产生了第二信使,第二信使再作用于膜片内离子通道。此种模式不便之处,一是膜的静息电位难以判断,二是膜片内外两侧的离子成分在实验期间不易改变或控制[7]。

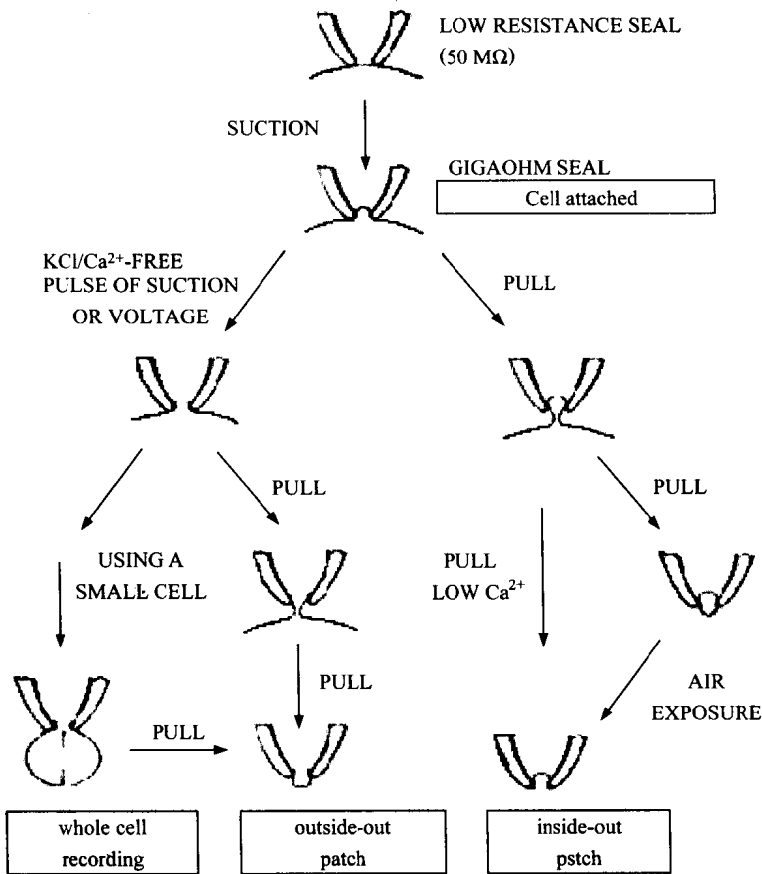


图2 膜片钳四种基本记录模式及相应操作顺序(引自 Hamill, 1981)

膜片内面向外模式:首先建立细胞无损贴附模式,然后将电极管内膜片与细胞完全分离。膜片完全游离出来,仅存在于管内。细胞质侧的膜内面向着外浴液(bath solution),膜外侧则向着电极管内的内液(图2)。此种模式比较容易改变膜内侧的离子成分(因为药物等可直接加入外浴液)。它是研究细胞内第二信使或其它信号分子对通道作用的最好方法。但是,在膜片分离时,必然导致细胞本身的细胞因子会大量丢失,从而影响实验。此外,在膜片分离时,电极管内常常不能形成平面膜片而仅能形成球囊,此点正是实验失败的表现[7]。

全细胞记录模式:首先建立细胞无损贴附式,然后吸破电极管内的膜片,从而电极内液与细胞内液形成低电阻电导通路(图2)。此种模式专用于记录整个细胞的离子电流,它是所有离子通道电流的平均反应,因而电流较大(nA级)。通过测量电容,也可用于研究分泌细胞的内吞或胞吐作用。然而,实验期间细胞内液与电极内液之间会发生快速交换,从而导致细胞

内环境变化,影响实验<sup>[6]</sup>,实验期间不能有目的地改变细胞内液成分<sup>[7]</sup>。

膜片外面向外模式:先建立细胞无损贴附模式,然后建立全细胞模式。在此基础上,再将膜片与细胞分离。膜片完全游离出来,膜片存在于电极管内。细胞质侧膜内面已经向着电极管内的内液,外面则向着外浴液(图2)。此种模式与膜片内面向外模式相反,容易改变膜外侧的离子成分(药物等直接加入外浴液)。此模式常用于研究受体激活的离子通道。膜片外面向外模式实验比较难做。因为要实现这一步,需经过细胞无损贴附式和全细胞两个步骤方可<sup>[7]</sup>。

## 2 膜片钳技术原理简论

在讨论膜片钳实用操作技术之前,将简单描述细胞膜电学原理和膜片钳设备工作原理。深刻理解它们两者之间的关系,对于高水平掌握实验技术是极其有帮助的。

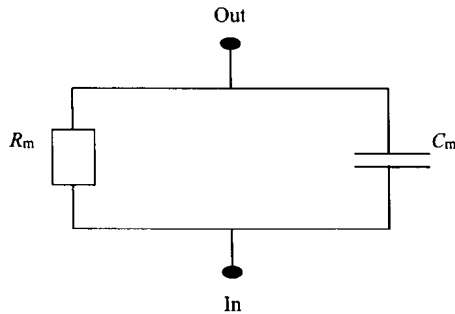


图3 细胞膜等效RC电路

从电学角度看,一方面,静息态时,细胞膜两侧存在电位差(膜内外离子分布呈较大梯度所致),并且膜电位在细胞兴奋时将发生很大变化(膜内外离子分布梯度发生变化);另一方面,由磷脂双分子层构建的细胞膜,尽管相当薄,但具有高电阻( $R_m$ )特性。不仅如此,类似两块平行板的细胞膜,本身将正负离子隔离开,故形成一个较好的电容器( $C_m$ )。然而,离子通道的存在使得细胞膜电容时常呈现“电容器漏电”状态。细胞膜电阻和膜电容并联共同组成一个等效RC电路(图3)。由于膜电容存在充电和放电过程,因此,膜电位将随时间发生变化,而不会固定于某一值。膜电位的时间常数 $\tau=C_m R_m$ 。但在膜片钳实验期间,假若膜片或全细胞不能及时而有效地将电位钳制于某一固定值,则细胞膜上离子通道电流或全细胞通道电流是无法精确测量的。故在膜片钳放大器电路设计时,必须考虑到细胞膜的电学特性,必须有相应的膜电容等补偿电路。此种电路一方面确保膜电位被钳制于某一固定值,另一方面,也保证了细胞膜在被给予电压阶跃波刺激后,仪器能快速做出反应,使膜电位迅速达到电压阶跃后的新值,避免信号失真。

膜片钳放大器由电流—电压转换器、频率提升电路、加法器、瞬时补偿电路和钳制电位放大器等电路组成。其中,高增益低噪音的电流—电压转换器是记录单通道电流和全细胞电流的关键部件。它决定总放大器的噪声。Ag/AgCl电极内的pA级微弱单通道电流,正是通过此

转换器被采集和放大。传统采集策略:将高输入阻抗场效应管(FET)和 Ag/AgCl 电极串联,然后再通过一个与 FET 并联的反馈电阻(50 GΩ)测量 FET 的电压降而得到单通道电流。其不足之处是高阻抗的 FET 和反馈电阻本身产生的热噪声较大。目前最先进的放大器(如 Axonpatch 200B)已开始利用电容反馈技术采集单通道电流,其优点不仅在于灵敏度有所增加,更重要的是其本底噪声有显著下降。但是,对于全细胞记录,电流值较大,噪声控制不是太大问题。故仍然采用反馈电阻设计。不过,为了避免大电流(nA 级)输入造成放大器饱和,反馈电阻应降低至 500 MΩ 左右。总之,为了保证微弱信号的真实采集、放大和输出,在电路中,增加抗电容噪声等多种抗噪音的电路、提升机器反应频率的电路和各种补偿电路是非常重要的[7]。

## 2.1 低噪音记录原理

膜片钳最大优点:能检出少于 1 pA( $10^{-12}$  A)的跨细胞膜离子流,且空间分辨率可小于 1 μm,时间分辨率达 3 μs。要达到如此高分辨率,信噪比提升和控制是至关重要的。故必须尽可能降低信号的背景噪声,提升仪器灵敏度和放大信号,以确保信号可采集到以及所采集到信号的完整性和真实性。放大器灵敏度的高低决定了能否采集到信号,这主要通过上述的电容反馈电路及其本底低噪声特性来实现。信号放大则通过放大器的放大电路来实现。低噪声的实现则取决于各方面的控制。

恰巧的是,玻璃电极能紧密贴附于细胞膜,从而使电极内外能形成 GΩ 级(one gigaohm seal =  $10^9$  Ω)封接电阻(seal resistance),此举大大降低了背景噪音水平。在电学上,膜与电极的高度封接导致电极内外是绝缘的;在化学上,电极内外是不可通透的;在机械上,膜与玻璃间的封接是坚固的。

Giga-seal 的形成是保证单通道低噪音记录的第一步。然而真正要得到单通道电流,还必须将 Johnson 噪音、Shot 噪音、Thermal 噪音、Dielectric 噪音、flicker 等噪音的值控制在一定范围内。需要注意的是,  $rms_T = \sqrt{rms_1^2 + rms_2^2 + \dots + rms_n^2}$ , 所以总噪音值  $rms_T$  是  $n$  个独立噪音源总方差。由此方程可知,膜片钳低噪音记录时,最大的噪音源决定了噪音水平大小,但其它噪音源也不可小视[7]。

一般来说,Johnson 噪音的大小取决于封接电阻的高低,封接电阻越高,其噪声值越低;Thermal 噪音值大小主要取决于电路当中场效应管(FET)的电压噪音和各种 RC 噪音等,其值的降低可通过电路的优化设计来达到;shot 噪音大小,一方面取决于 FET 的开关电流(实验人员无法控制),另一方面,则取决于膜片电极间封接程度。Shot 型噪声值的降低可通过提高封接电阻以及膜片内恰巧不存在电荷转运体来实现;Dielectric 噪音取决于电极 holder 和玻璃电极的物理化学性质,其值的降低可通过使用介电常数值较低的材料等方法来实现;flicker 噪音来源于两方面,一是源自于电极夹持装置(holder),该值的降低可通过保持其洁净和干燥来实现;二是来源于玻璃电极本身,如电极电容、电极电阻、贴于电极外表面的液膜、电极输入电阻和浸入液面后的电极尖端电容等等。通过控制玻璃电极的材质、控制参数、电极内的液面高低和防止液膜过多附着于电极外壁并沿着外壁向上爬升,可较好控制其引发的噪声。掌握噪声来源,无疑对实验期间控制噪音有很大帮助。值得一提的是,前置放大器的屏蔽和各种相关设备的适当接地相当重要,必须尽可能降低外界辐射等所带来的对信号干扰。

换句话说,外界辐射等干扰和本底噪声的控制是实现低噪声记录的基本条件<sup>[7]</sup>。

总之,这一切操作确保跨膜片离子电流信号能流入玻璃电极内并被采集、输入放大电路而后被输出。相对来说,低噪音记录的电学原理掌握的比较清楚,但迄今为止,人们对玻璃电极和细胞膜间 G $\Omega$ 级封接的本质仍很不清楚。

## 2.2 膜与玻璃电极封接本质

玻璃电极与细胞膜表面形成 G $\Omega$ 级封接的通常假说:负压抽吸导致细胞膜的部分区域被动流进玻璃电极尖端,从而形成“ $\Omega$ 型膜泡”。“膜泡”与玻璃尖端和内壁形成紧密并坚固的封接。有时候,封接的形成无需经过负压,电极一经接触细胞膜即可形成。贴附机制至今不清楚。也许“膜泡”排空了其本身与玻璃间的水分子和各种水合离子,再加上各种化学键的强大作用导致 gigaohm 密封。一旦形成 G 级封接,封接在机械上是坚固的<sup>[7]</sup>。这不但确保了离子和充电电荷仅能按电极内到细胞内或由细胞内向电极内方向通过,而且确保膜片不易脱落,保证实验的正常进行。

## 2.3 Ag/AgCl 电极与前置放大器通路

通过针头(pin)插入前置放大器,电极夹持装置(holder)与前置放大器形成连接(图 4)。电极夹持器内的银丝,一端与针头保持良好接触,另一端则伸出电极夹持器。伸出的这一端银丝必须被氯化,形成 Ag/AgCl 电极。银丝氯化处理的作用是将极化电位尽可能地降低。充灌有盐性溶液的玻璃电极通过氯化银丝被装入电极夹持装置并被固定,从而形成玻璃记录电极。与此同时,参考电极 Ag/AgCl 电极一端浸入记录槽中的外浴液(bath solution),另一端针头(pin)则被接入前置放大器的接地端。从而使得记录电极与参考电极之间形成电学通路。前置放大器正是由此通路,通过玻璃记录电极(Ag/AgCl 电极)采集细胞膜片离子流,并继续将此信号输入放大电路。最终信号及其相关数据储存于计算机供统计分析之用。

# 3 技术操作与技巧

## 3.1 膜片钳硬件配置

实验室内标准膜片钳配置并不存在,各实验室可依据不同需要进行配置。配置主要包括六大系统:平衡及振动控制系统、噪声控制系统、玻璃电极制造系统、记录槽—循环系统、可视显微推进系统和信号采集放大及统计分析系统。

(1)平衡及振动控制系统:主要通过平衡和振动隔离台来实现。其作用是尽量减少水平和垂直方向上的振动。轻微的振动或电极与细胞间的相对位移都会严重影响实验成功。

(2)噪声控制系统:主要通过屏蔽网和各个设备的适当接地来实现。其作用是屏蔽外界辐射、降低噪声。

(3)玻璃电极制造系统:由电极拉制仪、Sygard 镀仪和抛光仪等组成。其作用是制造出

适合于实验要求的玻璃电极。电极拉制器有水平和垂直两种类型。性能优良的拉制器能拉制出符合要求的锥度、杆长、尖端孔径的电极。

(4)记录槽—循环系统:由记录槽、培养液循环管和控温供氧等装置组成。其作用是控制细胞的实验条件,保持细胞的生理活性。

(5)可视显微推进系统:由显微镜等光学系统和电极显微推进器组成。显微推进器能以微米级方式精确控制电极定位、移动。目前已有步进距离达  $0.04\ \mu\text{m}$  的推进器,如美国 Sutter 公司生产的电控 MP-285 型。在工作期间,推进器不发生位移漂移是实验成功的关键,否则会丢失封接。商业上可用的推进器有机械、液压、电动等方式。原则上,这些均能用于膜片钳实验。借助于显微镜,便可对细小细胞结构(如树突等)进行准确定位,这在膜片钳技术中被称为可视法(Visual patching)。借助于解剖镜,仅能粗略进行定位(如海马 CA1 区胞体层)。此方法被称为盲法(Blind Patch)。应该说,这两种方法在封接成功率上无多大差异。

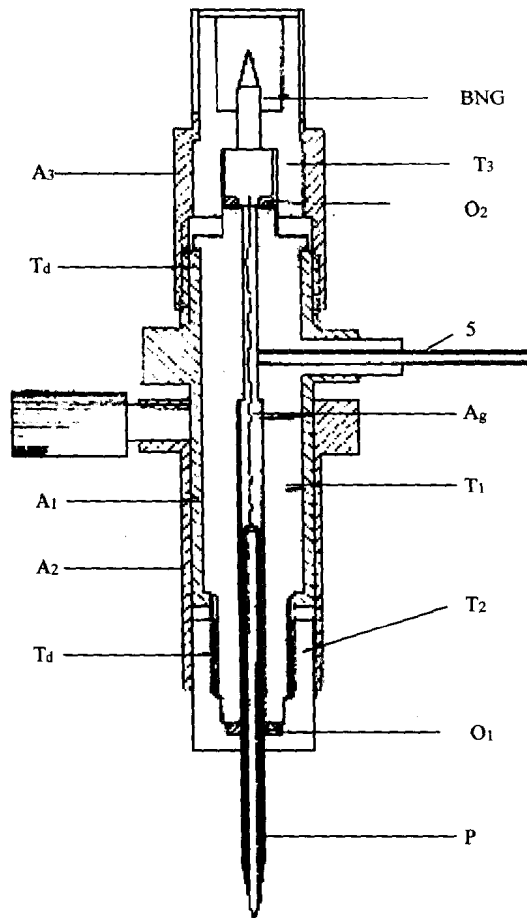


图4 电极夹持器及各组件(引自 Hamill,1981)

功能:将玻璃电极、Ag/AgCl 银丝和针头(BNC)成一整体,并通过针头与前置放大器紧密接触;为玻璃电极内施加负压提供支持;O<sub>1</sub>和O<sub>2</sub>是密封圈,对于稳固玻璃电极以及保证电极夹持器内部的气密性相当关键。



(6)信号采集放大及统计分析系统:主要由膜片钳专用放大器和与数据采集、统计分析相关的各类软硬件组成。美国和德国等多家公司专门生产此类放大器。美国产 Axopatch 200B 型放大器和相应的 clampex 8.0 版的软件包较为优良。

## 3.2 玻璃电极制作技术

### 3.2.1 玻璃的选择

膜片钳所需玻璃电极可选用不同材质制成。不同类型的玻璃即使采用同一制备,工作状态亦不尽相同,甚至有的无法形成封接。但任何玻璃类型制成的电极,在一定条件下,应该能利于细胞膜形成稳定的封接。玻璃主要分为软质玻璃和硬质玻璃两大类。软质玻璃结构较为松散且内部存在较多钠离子。在电场作用时,钠离子会穿越硅晶格而移动,产生电流,其双电常数为 7 左右,噪音较大,故一般在单通道记录时,不选用此材质玻璃。但软质玻璃熔点低,易于抛光,易拉制成串性电阻仅为 1~2 MΩ 的电极,锥度比较大。故在理论上,软质玻璃更适合于全细胞实验。硬质玻璃,如硼硅玻璃、铅玻璃、铝玻璃和石英玻璃,双电常数较低(4 左右),噪音较小,比较适合单通道记录,但其不足是熔点较高,拉制较难,拉制出的电极杆部一般较细长,锥度较小,对于全细胞实验并不是最佳选择。但随着拉制仪的发展,拉制基本不成问题。硬质玻璃在单通道和全细胞研究中均广为应用。但单通道记录用的硬质玻璃经过特殊处理,熔点比标准的硬质玻璃要低。单通道研究中选用厚壁硬质玻璃(1.5~2.0 OD, 0.8~1.5 ID)为最佳,全细胞研究中选用薄壁硬质玻璃最佳。全细胞研究中选用的硬质玻璃可以使用单通道专用的玻璃,也可使用标准的硬质玻璃。目前各实验室常用的硬质玻璃多为硅硼玻璃[7]。此外,应相当注意保持玻璃干净。

### 3.2.2 电极制作

电极制作可分三步[7]:电极拉制、sylgard 镀层和电极尖端热抛光。

电极拉制一般采用拉制仪,运用多步法,逐步拉制出杆长、锥度和孔径合适的电极。制好的电极,为防止实验期间由于液面爬上玻璃外壁产生电容噪声,电极杆部常涂上疏水性物质醛酮树脂(sylgard)。但电极尖端绝对不能沾有此物。它的作用仅是改善背景噪音。如果不镀上醛酮树脂涂层,单通道信号采集同样可进行,影响不会太大。

电极尖端抛光需在抛光仪上进行。利用长工作距离的显微镜,采用铂金进行短暂加热电极尖端。需要注意的是,铂金必须覆有熔化后的玻璃球,以防电极尖端被弄脏。在显微镜下,电极尖端发黑,则表明尖端周缘已被抛光。电极抛光并不是形成玻璃与膜封接的必要条件。当然,抛光后可能对封接有良性效应。

内有毛细管的电极的充灌一般较为简单。但无毛细管的电极和具醛酮树脂涂层的电极的充灌可能会比较困难。一般操作是,将电极在给正压的前提下,浸入电极液面下几秒钟,然后继续施予正压,将电极提出液面,再用充灌管对电极进行反向灌注。但所有的电极液必须用孔径小于 0.2 μm 的滤膜过滤。玻璃电极充灌完后,必须除去电极内的气泡。电极液必须用 0.2 μm 的针式过滤器滤过处理,确保电极不堵。

### 3.2.3 银丝氯化与玻璃电极安装技术

银丝制造出 Ag/AgCl 电极的基本方法:先用 HCl 清洗,漂白剂处理,再用去离子水清洁