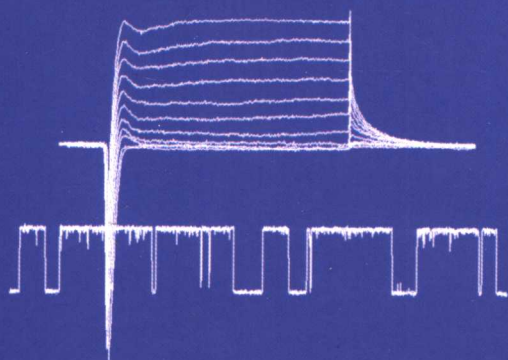


实用膜片钳技术

Practical Patch Clamp Techniques

刘振伟 编著



军事医学科学出版社

P
A
T
C
H
C
L
A
M
P

实用膜片钳技术

编 著 刘振伟

审 阅 郑建全
李 锦

军事医学科学出版社
· 北 京 ·

内 容 提 要

本书从实际应用的角度出发,具体介绍了膜片钳技术的基本概念、方法及实验技巧,同时还详细介绍了美国 Axon 公司(现 Molecular Devices 公司)生产的膜片钳实验仪器与采样软件 pClamp 的使用方法,对膜片钳实验中常见的一些问题也进行了细致解答。本书共计 5 章,包括膜片钳技术基本概念、膜片钳技术实验方法、脑片膜片钳记录技术、膜片钳放大器及数模/模数转换器、膜片钳技术应用软件。此外在附录中还介绍了目前膜片钳放大器的常用类型及性能特点。本书的一大特色是内容侧重经验性、技巧性的介绍,实用性很强。

本书非常适合作为从事膜片钳技术的科技工作者(包括实验室技术人员、大专院校和科研院所的硕士、博士研究生等)的实验指导参考书,也可作为膜片钳技术的培训教材,还可作为生理学、神经科学、细胞生物学等相关专业的科研人员学习膜片钳技术的入门书籍。另外,本书还可为实验室购买膜片钳放大器提供参考,对从事膜片钳实验设备的市场营销人员也具有一定的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

实用膜片钳技术/刘振伟编著.

—北京:军事医学科学出版社,2006

ISBN 7-80121-777-2

I. 实… II. 刘… III. 质膜-生物技术
IV. Q241

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 017542 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)63801284

63800294

编辑部:(010)66884418;66884402 转 6210,6216,6213

传 真:(010)63801284

网 站:<http://www.mmsp.cn>

印 装:京南印装厂

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:28.5

字 数:711 千字

版 次:2006 年 5 月第 1 版

印 次:2006 年 5 月第 1 次

定 价:85.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,由本社发行部负责调换

前言

2001年,受军事医学科学院张永祥教授的大力推荐,我有幸在中国药理学会举办的“神经药理学研讨班”中作了题为“脑片膜片钳记录技术及其研究概况”的讲座。当时,我在讲座中提到当前我国尚缺乏膜片钳实用技术方面的书籍,得到不少学员的认同。尤其对于膜片钳技术的初学者,他们往往在实验中遇到大量的问题,又苦于找不到合适的参考书而感到一筹莫展。因此,一些学员问我能否编写一本有关膜片钳技术方面的书,介绍一些膜片钳理论方面的基本概念以及如何使用膜片钳放大器与采样软件,能够地开展膜片钳实验有具体的指导作用。在教学与科研实践中,也经常有一些同行或学生问我一些有关膜片钳实验技术方面的问题,我也常常遇到一些实验和理论问题需要向专家、教授请教。有鉴于此,我对在教学和科研实验中积累的一些经验和膜片钳技术方面的资料进行了总结,并尝试着写了一些零散的稿子。2003年,我到澳大利亚西澳大学(后在昆士兰大学)工作,工作之余阅读了大量国外膜片钳技术方面的文献资料,也接触到了一些新技术、新观念,从此正式开始了本书的编写工作。

从德国马普生物物理化学研究所 Neher 和 Sakmann 两人在 1976 年发表第一篇有关膜片钳技术的文章至今,已经整整三十年了。这三十年中,膜片钳技术得到了不断发展,新观念、新方法不断涌现,该技术与其他学科方法的融合已经成为现代生物学研究领域的重要发展方向。目前,国外许多大学与研究所都很需要掌握膜片钳技术的科技人员,每年都有大量这方面的职位提供。我国的膜片钳技术在近十几年中发展得很快,越来越多的大学、科研院所以及临床医院具备了膜片钳技术设备,还有不少单位正积极准备筹建膜片钳技术平台。可以预见,未来我国膜片钳技术将会有更大的发展,研究领域将会更宽。

编写本书的主要目的是为广大一线工作的科技工作者提供一本膜片钳技术的实验参考书,为初学膜片钳技术的科技人员提供一本入门书籍。基于此目的,本书侧重介绍一些具体的膜片钳实验方法和经验技巧,同时对实验中必须要掌握的膜片钳放大器与相关采样软件的使用等进行了详细的说明,而对膜片钳放大器的工作原理等电子物理学知识不作介绍,也尽量避免出现生物物理学中繁琐复杂的数学公式及其推导过程。

本书共分五章:第一章介绍了膜片钳技术的发展概况与一些基本概念。第二章介绍了膜片钳技术的一些主要技术方法。由于数据处理是科研实验中重要的一环,本章对膜片钳实验中常用的单通道、全细胞记录模式数据处理方法进行了详细介绍。除全细胞与单通道记录模式外,还针对穿孔膜片钳记录技术、巨膜片记录技术以及其他一些常用的膜片钳技术方法进行了介绍。第三章介绍了脑片的膜片钳技术方法,重点对海马脑片的盲法膜片钳技术进行了介绍。第四章主要是对美国 Axon 公司(现 Molecular Devices 公司)的几种膜片钳放大器与模数/数模信号转换器进行了介绍,包括这些仪器的性能特点、与其他仪器的配套连接以及使用方法。由于不同类型的膜片钳放大器其基本功能都是一致的,因此本书对使用其他类型膜片钳放大器(如德国 HEKA 公司的 EPC 系列膜片钳放大器)的读者也有参考价值。第五章详细介绍了常用的膜片钳技术采样与分析软件 pClamp(第 8 和 9 版)的使用,此外,对 Origin 数据分析与图形制作软件也进行了简单介绍。

在本书部分章节中,针对膜片钳技术实验中的一些常见问题进行了解答,希望能帮助读者解决一些实验中所遇到的具体问题。本书每节后面均附有参考文献,便于读者参考查阅。此外,在附录中对目前膜片钳放大器的常用类型及其生产厂家、性能特点等也进行了详细介绍,可供实验室筹建膜片钳技术平台时参考。

本书的顺利完成也得益于许多专家的支持和帮助。军事医学科学院毒物药物研究所郑建全教授在膜片钳技术与理论上曾给予诸多方面的指导,他也是我步入膜片钳技术研究领域的启蒙老师。军事医学科学院李立君博士在有关膜片钳漏减功能等方面提出了很多宝贵意见。另外,在本书编写过程中,还得到美国 Axon 公司的鼎力相助,尤其是 Toni Figl 博士在 pClamp 9 的功能使用上给予了大力帮助。此外,澳大利亚生物物理学会主席、昆士兰大学教授 Boris Martinac 在分子生物学和脂质体制备技术上、澳大利亚新南威尔士大学 Peter Barry 教授在液接电位的校正上、美国得克萨斯大学 Owen Hamill 教授在压力钳技术理论上给予了热忱指导。借本书出版之际,谨向以上单位与诸位专家表示衷心的感谢!

经过两年多的艰辛编写,本书终于与广大读者见面了。殷切地希望本书能为广大读者提供一些膜片钳技术和理论上的帮助,同时能吸引更多的科研人员,尤其是青年科研工作者加入到膜片钳技术的研究队伍中,为我国膜片钳技术领域的研究做出贡献。若能如此,作者将甚感欣慰!

在本书编写过程中,作者查阅了大量中外文献,并通过亲自实验获得第一手详尽的数据资料;同时,还对膜片器放大器和 pClamp 采样与分析软件程序中的各项功能进行了反复多次的运行操作,力求使所介绍的内容翔实、准确。但由于当前膜片钳技术发展得很快,其涉及的应用领域越来越广泛,本书介绍的内容仅是基本的膜片钳理论概念和技术方法;而且由于作者理论水平 and 具体实验经验有限,书中难免有不妥和错误之处,恳请广大读者予以批评指正。

刘振伟

2005 年 12 月完稿于布里斯班昆士兰大学

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	(5)
第二节 膜片钳记录系统中的电极	(11)
一、玻璃微电极	(11)
二、Ag/AgCl 电极	(17)
三、Pt 电极	(18)
四、碳纤电极	(19)
五、常见问题	(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	(24)
三、命令电压	(25)
四、钳制电位	(26)
五、电极电压降	(27)
六、失调电位	(27)
七、浴池电位	(29)
八、常见问题	(31)
第四节 膜片钳记录系统中的电流和电导	(33)
一、跨膜电流	(33)
二、离子通道电导	(34)
三、闸门电流	(34)
四、正电流与负电流	(34)
五、内向电流与外向电流	(35)
六、去极化电流与超极化电流	(35)
七、封接电流	(35)
八、输入漏电流	(36)
九、膜漏电流	(36)
第五节 膜片钳记录系统中的电阻	(36)
一、膜电阻与膜输入阻抗	(36)
二、电极电阻	(37)

三、封接电阻	(37)
四、串联电阻及接入电阻	(38)
五、浴池电阻	(39)
六、漏电阻	(40)
第六节 膜片钳记录系统中的电容	(40)
一、膜电容	(40)
二、分布电容	(43)
三、电极电容	(43)
四、快电容与慢电容	(45)
五、时间常数	(45)
第七节 膜片钳记录系统中的漏减功能	(47)
一、漏电流的概念与特点	(47)
二、Clampex 采样软件的 P/N 漏减功能	(48)
三、Clampex 采样软件的定标 P/N 漏减功能	(54)
四、膜片钳放大器漏减功能	(56)
五、Clampfit 处理软件的漏减功能	(57)
六、常见问题	(60)
第八节 膜片钳记录系统中的噪声	(61)
一、噪声的测量指标	(62)
二、噪声的基本类型	(62)
三、膜片钳放大器噪声	(64)
四、电极夹持器噪声	(65)
五、电极噪声	(65)
六、干扰的来源	(69)
七、干扰的排除方法	(71)
八、量化噪声	(76)
九、混叠噪声	(77)
十、常见问题	(78)
第九节 膜片钳记录系统中的信号滤波	(80)
一、有关滤波的几个基本概念	(80)
二、滤波器的基本类型	(83)
三、数码滤波器	(85)
四、采样频率与滤波频率的关系	(86)
五、电干扰滤波器	(86)
六、常见问题	(87)
第二章 膜片钳技术实验方法	(90)
第一节 全细胞记录技术	(90)
一、离子通道简介	(90)
二、全细胞记录要注意的问题	(91)

三、全细胞记录与其他记录技术的比较	(92)
四、电压门控性离子通道的动力学研究	(93)
五、配体门控性离子通道的动力学研究	(100)
第二节 单通道记录技术及其数据分析	(104)
一、单通道记录模式	(104)
二、单通道数据的采集	(105)
三、单通道数据分析中的几个基本概念	(105)
四、单通道数据分析前的处理	(108)
五、单通道事件的检测	(109)
六、单通道电流幅度(电导)的分析	(110)
七、单通道开关的动力学分析	(113)
八、通道开放概率的计算	(115)
九、膜片上通道数目的估算	(116)
十、其他分析	(119)
第三节 穿孔膜片钳记录技术	(120)
一、穿孔全细胞记录模式	(120)
二、穿孔囊泡记录模式	(124)
三、穿孔膜片钳记录模式的实验方法及注意事项	(125)
第四节 巨膜片记录技术	(126)
一、巨膜片记录技术的概念	(126)
二、肌细胞标本制备	(127)
三、玻璃微电极制备	(128)
四、封接的形成	(128)
五、巨膜片电容的测定	(129)
六、巨膜片记录技术的局限	(129)
第五节 其他膜片钳技术方法	(130)
一、膜电容测定法	(130)
二、松散封接记录技术	(132)
三、脂质体记录技术	(134)
四、细胞内膜离子通道记录技术	(137)
五、细胞内灌注与抽吸技术	(137)
六、压力钳技术	(139)
七、在体膜片钳记录技术	(142)
第三章 脑片膜片钳记录技术	(148)
第一节 脑片膜片钳技术研究概况	(148)
一、脑片标本介绍	(148)
二、脑片膜片钳技术研究概况	(149)
第二节 脑片培养技术	(153)
一、脑片培养技术简介	(153)

二、脑片培养方法	(153)
三、培养海马脑片的特点	(157)
四、培养脑片的应用	(158)
第三节 海马的结构	(160)
一、海马的概念	(160)
二、海马结构的细胞构筑	(162)
三、海马结构的主要传出纤维	(165)
四、海马结构的主要传入纤维	(166)
五、海马结构的内部纤维联系	(166)
第四节 脑片振动切片机	(168)
一、脑片切片方法简介	(168)
二、NVSLM1 型振动切片机	(169)
第五节 海马脑片盲法膜片钳记录技术	(171)
一、实验设备	(171)
二、溶液配制	(172)
三、海马脑片制备	(173)
四、脑片孵育槽	(174)
五、脑片记录浴槽	(175)
六、玻璃微电极制备	(175)
七、脑片盲法全细胞记录	(176)
第四章 膜片钳放大器及数模/模数转换器	(181)
第一节 Axoclamp 2B 微电极放大器	(181)
一、探头	(181)
二、电极夹持器	(183)
三、模型细胞	(183)
四、前后面板	(184)
五、浴池电位的去除	(191)
六、记录模式	(192)
七、接地和交流噪声	(202)
八、电源	(203)
九、常见问题	(203)
第二节 Axopatch 1D 膜片钳放大器	(206)
一、探头	(206)
二、电极夹持器	(210)
三、模型细胞	(211)
四、前后面板	(211)
五、噪声	(220)
六、电源	(221)
七、仪器的基本连线	(222)

八、全细胞与单通道记录操作步骤	(223)
九、常见问题	(226)
第三节 Axopatch 200B 膜片钳放大器	(229)
一、探头	(229)
二、电极夹持器	(231)
三、模型细胞	(231)
四、前后面板	(232)
五、接地和交流噪声	(244)
六、电源	(245)
七、全细胞与单通道记录操作步骤	(245)
八、常见问题	(247)
第四节 Digidata 1200 系列数模/模数转换器	(250)
一、Digidata 1200 系列转换器之间的差别	(251)
二、Digidata 1200B 前后面板	(251)
三、安装	(253)
四、pClamp 采样软件对 Digidata 1200 系列转换器的确认	(254)
第五节 Digidata 132x 系列数模/模数转换器	(258)
一、Digidata 132x 系列转换器之间的差别	(259)
二、所需计算机配置	(259)
三、前后面板	(259)
四、安装	(261)
五、pClamp 采样软件对 Digidata 1200 系列转换器的确认	(263)
六、常见问题	(264)
[附] 什么是 SCSI?	(265)
第五章 膜片钳技术数据采集和处理软件	(267)
第一节 pClamp 数据采集和处理软件概述	(267)
一、pClamp 简介	(267)
二、pClamp 的构成	(268)
三、pClamp 的安装和运行	(269)
第二节 Clampex 8 数据采集软件	(271)
一、几个名词术语	(271)
二、Clampex 8 主要文件类型	(273)
三、Clampex 8 采样文件的命名	(274)
四、Clampex 8 的窗口	(275)
五、Protocol 编辑	(282)
六、Configure 设置	(293)
七、Lab Bench 设定	(301)
八、Seal Test 功能	(306)
九、Membrane Test 功能	(308)

十、液接电位的计算与钳制电位的校正	(311)
十一、常见问题	(315)
第三节 Clampfit 8 数据处理分析软件	(318)
一、Clampfit 8 的窗口	(318)
二、Clampfit 8 文件类型	(320)
三、数据的基本处理功能	(321)
四、Stimulus Waveform 调节	(325)
五、快速作图	(325)
六、文件的数学运算	(327)
七、拟合	(328)
八、统计分析	(336)
九、常见问题	(338)
第四节 Clampex 9 数据采集软件	(339)
一、Clampex 9 采样及分析窗口	(339)
二、Protocol 编辑	(340)
三、Resistance Test 功能	(341)
四、LTP 助手(LTP Assistant)	(344)
五、Telegraphed Instrument 设置	(356)
六、常见问题	(357)
第五节 Clampfit 9 数据处理分析软件	(358)
一、Clampfit 9 的窗口	(358)
二、Clampfit 9 文件的数学运算	(359)
三、Clampfit 9 的单通道数据分析功能	(361)
四、Clampfit 9 的自发突触活动分析	(382)
五、Variance - mean 分析(V - M 分析)	(388)
六、Clampfit 9 的阈值检测功能	(394)
七、常见问题	(396)
第六节 Origin 数据分析与图形制作软件	(398)
一、如何将 pClamp 采样数据输入到 Origin 软件进行处理	(398)
二、如何赋予数据表中各组别的名称与特征	(398)
三、如何对数据表中的数据进行转换	(400)
四、作直条图时的几个问题	(400)
五、如何对数据进行直线回归	(401)
六、如何对坐标轴进行调整	(401)
七、如何对坐标轴做断轴	(403)
八、如何将几个不同的图显示在同一页面上并进行处理	(404)
九、如何对所获数据进行曲线拟合	(406)
十、如何制作 Waveform 图形	(409)
十一、如何在 Origin 中剪切输入的采样图形	(410)

十二、如何去除坏点	(411)
十三、如何将制作好的图形输出	(411)
附录	(413)
附录一 膜片钳技术常用单位及换算	(413)
附录二 膜片钳实验溶液中常用离子的化合价与迁移率	(414)
附录三 膜片钳放大器的主要类型及生产厂家	(415)
附录四 膜片钳技术推荐参考书	(425)
图题与表题	(426)
一、图题	(426)
二、表题	(433)
索引	(435)
一、中文索引	(435)
二、英文索引	(439)

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技术方法的进步所推动的,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 博士创建膜片钳技术(patch-clamp techniques)以来,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,每年都有几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,其为阐明离子通道病的发病机理并预示治疗的新途径提供了有效的研究方法。

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和电压钳技术。

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。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、动作电位等。

电压钳技术是通过向细胞内注射一定的电流,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。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压钳制在某一数值,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。常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。我们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”。对这一名称,最初中文也有几种译法,如“膜片钳”、“斑片钳”、“片膜钳”,甚至还有译成“片膜夹子”的。另外,其中的“钳”字偶尔还写为“箝”字,后者为前者的异体字。目前,绝大多数学者都采用“膜片钳”这一名称,本书也不例外。

综上所述,膜片钳技术是一种通过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,其概念的外延已经远超出了电生理学的范畴。

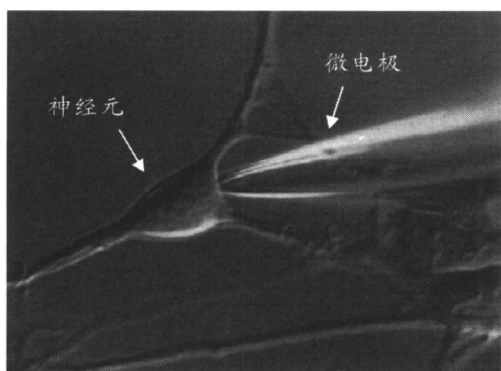


图 1-1-1 膜片钳电极与细胞的接触
(引自 PulseFit 8.0 用户指南,德国 HEKA 公司)

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(直径常为 $1 \sim 5 \mu\text{m}$)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膜之间就形成了紧密接触,术语叫做高阻封接(Gigaohm Seal),其电阻达 $10^9 \Omega$ ($1 \text{ G}\Omega$) 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。如果运气好的话,这片膜上也许只有一个离子通道,可获得单通道电流。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 1 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。在形成高阻封接后还可不将细胞膜撕下,而是打破这片膜让电极与细胞内沟通,形成全细胞记录。膜片钳技术还有许多其他的记录模式,详见第二章的相关内容。

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(图 1-1-2)。膜片钳实验还揭示,离子穿过通道的速度非常惊人,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!

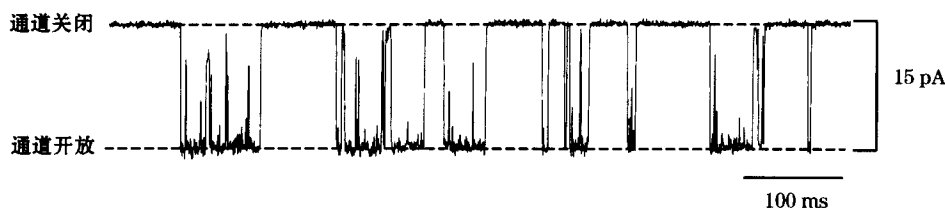


图 1-1-2 单通道电流

图中可见,在膜片钳制电位恒定不变的情况下,单通道电流幅度基本保持不变,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 在这方面作出了杰出的贡献。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,同时他们与澳大利亚科学家 Eccles 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作出了重要贡献,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 年诺贝尔医学和生理学奖。

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人 Neher 和 Sakmann 博士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 $M\Omega$ 级水平。后来, 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 $10 \sim 100 G\Omega$ 的封接电阻,这就是我们常说的高阻封接,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 ($<1 pA$) 得以分辨出来。同年, 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 等五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的著名杂志“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,从此奠定了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,荣获当年诺贝尔医学和生理学奖,此时与他们 1976 年发表的第一篇膜片钳技术文章相距 15 年。当 Neher 得知自己获得诺贝尔奖时,他在实验室正准备下班,心情非常平静,实际上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,膜片钳技术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)等等。

(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,膜片钳技术可以说是日新月异。在此笔者不一一例举,部分技术在本书第二章第五节中进行了简单介绍。

(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、胃壁细胞、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、精母细胞等多种细胞;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;从蜗牛、青蛙、蝾螈、爪蟾卵母细胞发展到鸡细胞、大鼠细胞、人细胞等等;从动物细胞发展到细菌、真菌以及植物细胞。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(配体门控性、电压门控性、第二信使介导的离子通道、机械敏感性离子通道以及缝隙连接通道等等)的研究发展到对离子泵、交换体以及可兴奋细胞的胞吞、胞吐机制的研究等。

(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、免疫学等等,成为生物学研究中的一种主要技术手段,与其他生物学技术的结合应用已经成为膜片钳技术的主要发展趋势。

1995 年,《Single-Channel Recording》一书再版,增添了大量膜片钳技术的新内容,几乎当时国际上所有的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最经典著作。该书第二版中,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,还主要增添了如下新内容:

(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,还有几本知名的膜片钳技术方面的重要著作,它们是:Academic Press 出版的杂志专刊《Methods in Enzymology》207 卷(1992 年)和 293 卷(1998 年)、Biologists 公司出版的《Plymouth Workshop Handbook》(1994 年第二版)、Wiley-Liss

公司出版的《Practical Electrophysiological Methods》(1992 年)以及美国 Axon 公司发行的《The Axon Guide》(1993 年)。此外, Axon 公司发行的 AxoBits 小册子亦含有大量膜片钳技术及应用方面的文章,其特点是实用性很强,常有名家之作,颇值得一读。

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发展衍变而来的。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,粘着在电极尖端上的细胞膜会自动融合,从而形成一个囊泡。当将电极提出浴液液面而短暂(~ 2 s)暴露在空气中时,囊泡的外表面会破裂,再次将电极放入浴液,就形成了内面向外记录模式。另外,如果将电极放入低钙浴液中,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,粘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,它可达 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 。

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,原因之一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。

另外,要弄清内面向外记录模式由细胞贴附记录模式转化而来,而外面向外记录模式由全细胞记录模式转化而来。

(2)电极内液的成分与记录模式有关,对于全细胞和外面向外记录模式,电极内液为细胞内液,浴液为细胞外液;对于贴附式和内面向外记录模式,电极内液为细胞外液,浴液变成了细胞内液。

(3)钳制电位的方向在各记录模式中是不同的,详见本章第三节。

(4)实验中选择何种记录模式与欲解决的问题和离子通道的类型有关,每种记录模式都有其独特的优点与缺点(详见第二章第一、二节)。

四、膜片钳技术的应用

膜片钳技术是一个应用范围非常广泛的电生理学技术,它不仅能用来记录离子通道的电