

膜片钳 实验技术

陈军编 李继硕校

BIO TECH SERIES



科学出版社

膜片钳实验技术

陈 军 编

李继硕 校

科 学 出 版 社

2001

内 容 简 介

膜片钳实验技术是对细胞和分子水平的生理学研究方法的一次革命,该技术的两位建立者(Neher 和 Sakmann)曾获 1991 年诺贝尔奖。本书系统而全面地介绍了该技术的基本原理、实验步骤、实际应用等,包括:膜片钳技术基本原理和操作、全细胞记录法、泵电流和运输电流的分析、细胞内灌流法、巨大切割膜片钳法、组织切片膜片钳技术、脑干脊髓标本膜片钳法、Caged 化合物的应用、钙荧光测光和膜片钳相结合的同时测定技术,以及离子通道噪声分析、单离子通道记录数据的分析、膜电容测定、应用于离子通道研究中的脂质平面膜法等 13 个主题。文字中不乏经验的介绍、技巧的揭示等等,图文并茂,内容实用。本书可供生理学、神经科学、细胞生物学等相关专业的人士作为掌握膜片钳技术的入门读物和工作参考书。

图书在版编目(CIP)数据

膜片钳实验技术/陈军编. -北京:科学出版社,2001.9

ISBN 7-03-008820-4

I. 膜… II. 陈… III. 电生理学-实验-技术 IV. Q424

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 69903 号

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>

丽源印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 9 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

2001 年 9 月第一次印刷 印张:9 1/8

印数:1—2 500 字数:234 000

定价:20.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

祝贺《膜片钳实验技术》出版

在自然科学发展过程中,每逢技术方法上出现一次革命性变化,必然将该学科领域推向一个更高的阶段。这种发展一旦达到新的高度,必然又会引起人们向新的革命性变化的方向思考和探索,于是,又将迎来一个新的发展阶段。这样波浪式的前进,是人类在认识无穷的宇宙现象的经历中的动力,其中蕴藏着无数科学事业中执著奉献的先驱者的心血。他们的共同理想是将世界变为可知。

Neher 和 Sakmann 于 1976 年创建了“膜片钳技术”,这对生理学和神经科学都是一次有重大意义的变革。这是一种以记录通过离子通道的离子电流来反映细胞膜单一的(或多个的)离子通道分子活动的技术。此技术的出现自然将细胞水平和分子水平的生理学研究联系在一起,同时又将神经科学的不同分野必然地融汇在一起,改变了既往各个分野互不联系、互不渗透,阻碍人们全面认识能力的弊端。正如本书第 1 章的前言中所说的:这一技术的发现“和基因克隆技术并驾齐驱,给生命科学研究带来了巨大的前进动力”。

20 世纪 80 年代以来,特别是 1991 年 Neher 和 Sakmann 以此发现而获得诺贝尔生理学或医学奖以来,对膜片钳技术的开展和应用如风起云涌,成为推动神经科学发展的重要动力。20 世纪 90 年代介绍和推广膜片钳技术曾经是当时世界上神经科学界的时尚。日本生理学会为此举办了膜片钳技术的系统讲座,共 13 个部分,《日本生理学杂志》连续刊载,对膜片钳技术的有关的内容作了较全面的介绍,对在日本推广此技术起到了积极的作用。本书的编者陈军教授当时正在日本从事电生理学科研工作,利用工作之余的夜间时间,以“三更灯火五更鸡”的勤奋精神,逐一翻译了该讲

座的每一部分。征得《日本生理学杂志》主编金子章道教授和这个讲座材料主编日本冈崎国立生理研究所冈田泰伸教授的支持,将全部译文连续在《神经解剖学杂志》转载。比较系统地向我国神经科学界介绍了膜片钳新技术。1999年11月中国解剖学会、中国神经科学学会的神经解剖学专业委员会和第四军医大学梁铨琚脑研究中心联合在西安第四军医大学举办“膜片钳和脑片膜片钳实验技术讲习班”将此译文作为教材,得到了与会人员的高度评价。笔者因工作关系参加了一些译文文字加工工作,得以先睹为快。对陈军教授为发展祖国科学事业的勤奋精神十分钦佩;对金子章道教授和冈田泰伸教授的友好态度,对科学出版社的慷慨出版,表示敬意。值此书即将出版之际,谨略草俚言,作为纪念和表示祝贺之意。

李继硕 谨识
第四军医大学教授
第四军医大学校专家组组长
《神经解剖学杂志》主编
2001年3月10日

序 言

前两年获知在《日本生理学杂志》连载的《膜片钳实验技术系列讲座》被翻译成中文并连续刊登在中国《神经解剖学杂志》上,获得广大学者和学生的好评和爱读,已是一喜。今又得知此材料已被编辑成书即将出版,心中更是万分高兴。这部实验系列讲座是基于每年一度在日本冈崎生理研究所举行的《膜片钳技术基本原理和实验操作培训班》所使用的教程而编制的。参编的每位成员都是日本国内膜片钳技术的开拓者和推动者,更因为他们亲身工作在第一线,所以可以对各种膜片钳实验技术法的实际技巧和改良法进行深入浅出地讲解。值得一提的是,连载刊登不久,由于很多生理学以外的学科领域的同人们希望能将此材料出版一部书供广大读者使用,所以我担任主编在重新增加了5篇新内容的基础上形成一部《膜片钳实验技术法》,并由吉冈书店于1996年在日本公开出版发行。目前这本书仍然是日本广大年轻研究者和学生们的一部久读不衰的参考工具书。虽然才公开发行5年,已经销售一空。近来,随着技术和仪器的不断更新和发展,由此方法派生出来的新领域不断增多。因此,今年正准备重新修订再版这部书。

如果此部实验技术讲座材料能够作为膜片钳实验技术初学的研究者和学生们的入门教材并被广泛阅读,而且对那些已经开展膜片钳实验技术的研究也能起到一点推动作用,那么我们这些原著作者就感到特别荣幸了。

最后,特别感谢为翻译和出版此部讲座而辛苦工作的陈军和李继硕两位教授。

冈田泰伸

日本冈崎国立生理研究所教授

2001年2月14日

编者按

《膜片钳实验技术》一书是在《神经解剖学杂志》(1994 年的第 10 卷 4 期至 1997 年第 13 卷 3 期)上连载的《膜片钳实验技术系列讲座》译文的基础上编写而成的。正如前面两篇序言中所提到的那样,这本书凝结着中日两国学者的心血,是中日两国神经科学和生理科学学界友好交流和往来的历史佐证。同时她也可以作为我个人到日本留学和工作(1992 年 10 月至 1997 年 3 月)的纪念作品。借此机会我首先要衷心地感谢中日两位恩师:李继硕教授和横田敏胜教授对我在学业上成长的深刻影响和无私关怀。没有他们热爱祖国、忘我工作和不懈追求事业的精神影响,我不可能用在日本时的宝贵业余时间去完成这么一本既耗时又耗精力的译著。我还要衷心地感谢日本生理学会常务理事会、《日本生理学杂志》主编金子章道教授和担任日文《膜片钳实验法系列讲座》主编的冈田泰伸教授,没有他们的无私支持和免费提供版权,本书的出版是不可能的。此外,我要专门介绍一下参加本书日文原著编写的 16 位日本学者,以示感谢。他们是冈田泰伸、小原正裕、木村纯子、高桥智幸、真锅俊也、八尾宽、丸山芳夫、堀江稔、鬼丸洋、光家保、大森治纪、野间昭典、榎木浩一、古屋喜四夫、老木成稔和曾我部正博先生。

根据膜片钳实验技术方法应用的范畴和特点,本书在不脱离原著主要内容的基础上,在构成上作了重组。主要分为三个大部分:第一部分介绍了膜片钳技术的原理和操作;第二部分介绍了全细胞电流记录法及其在应用中的各种改良法(包括:全细胞记录法和穿孔膜片钳法、泵电流和运输电流的分析法、细胞内灌流法和巨大切割膜片钳法、用油隔绝法进行细胞内灌流的膜电流记录法、组织切片膜片钳技术、在新生大鼠离体脑干脊髓标本上建立的膜片

钳法及其应用、Caged 化合物及药物瞬间投与法、钙荧光测光和膜片钳相结合的同时测定技术八个部分);第三部分介绍了膜离子通道的记录及其分析法(包括:离子通道噪声的分析法、离子单通道记录数据的分析法、膜电容测定法和应用于离子通道研究中的脂质平面膜法四个部分)。本书的一个突出特点是在每个技术方法的最后部分都列出参考文献,这对于初学者来说意义很大,因为读者可以借此查找到各种方法的原始文献。此外为了方便读者,编译者在最后还加入了专业术语的英中文索引,这有助于读者查找专业术语的英文原文。

最后需要提的是,在本书的编译过程中,还得到原中国科学院上海生理研究所的朱培阁研究员和清华大学谢佐平教授的亲切指导,在此也谨向他们表示衷心的感谢。最后感谢科学出版社策划编辑马学海博士和有关同志为本书的面世所付出的辛勤努力。

陈 军

第四军医大学教授

2001 年 3 月 15 日

目 录

1. 膜片钳技术的原理和操作	(1)
前言	(1)
什么是膜片钳技术?	(1)
膜片钳技术的操作步骤	(7)
参考文献	(20)

全细胞电流记录法及其在应用中的各种改良法

2. 全细胞记录法和穿孔膜片钳法	(25)
全细胞记录法	(25)
全细胞记录法的应用	(33)
穿孔膜片钳记录法	(54)
参考文献	(59)
3. 泵电流和运输电流的分析法	(69)
前言	(69)
钠-钙交换电流	(69)
钠-钾泵电流	(74)
结语	(76)
参考文献	(76)
4. 细胞内灌流法和巨大切割膜片钳法	(78)
前言	(78)
细胞内灌流法	(79)
细胞内灌流的操作实例	(84)
巨大切割膜片钳法	(86)
结语	(88)
参考文献	(88)
5. 用油隔绝法进行细胞内灌流的膜电流记录法	(93)
前言	(93)

油隔绝法及其应用	(94)
讨论	(101)
参考文献	(102)
6. 组织切片膜片钳技术	(103)
前言	(103)
薄切组织切片膜片钳记录法	(103)
盲膜片钳记录法	(109)
结语	(113)
参考文献	(113)
7. 在新生大鼠离体脑干-脊髓标本上建立的膜片钳法及其 应用	(115)
前言	(115)
标本的制作	(116)
记录	(119)
组织	(127)
讨论	(130)
参考文献	(131)
8. Caged 化合物及药物瞬间投与法	(135)
前言	(135)
实验装置	(137)
实验举例	(138)
结语	(142)
参考文献	(143)
9. 钙荧光测光和膜片钳相结合的同时测定技术	(145)
前言	(145)
设备条件	(146)
各种问题及其对策	(150)
测定的准备工作	(154)
测定的实际操作	(155)
关于程序软件 MiCa	(158)

结语	(158)
参考文献	(159)

膜离子单通道的记录及其分析法

10. 离子通道噪声的分析法	(163)
前言	(163)
发生于细胞膜上的电背景噪声	(164)
噪声分析	(166)
噪声分析法中的注意事项	(179)
参考文献	(182)
11. 离子单通道记录数据的分析法	(184)
前言	(184)
实验技术和分析方法	(185)
结语	(204)
参考文献	(205)
12. 膜电容测定法	(206)
前言	(206)
膜电容及其测定技术	(206)
参考文献	(217)
13. 应用于离子通道研究中的脂质平面膜法	(219)
前言	(219)
脂质平面膜法	(221)
脂质平面膜的物理化学	(231)
膜蛋白融合嵌入法	(235)
平面膜系统的电子学	(246)
高分辨率记录法	(251)
记录离子单通道电流	(258)
展望	(267)
参考文献	(267)
英、中文名词对照	(275)

膜片钳技术的原理和操作

前言

1976年 Neher 和 Sakmann^[1]建立了膜片钳技术(patch clamp recording technique)。这是一种以记录通过离子通道的离子电流来反映细胞膜上单一的(或多个的)离子通道分子活动的技术。以后由于吉欧姆阻抗封接(gigaohm seal, $10^9\Omega$)方法的确立和几种方法^[2,3]的创建,1980年以来,此技术已可用于很多细胞系的研究^[3-5]。因而,这种技术点燃了细胞和分子水平的生理学研究的革命之火,它和基因克隆技术(gene cloning)并驾齐驱,给生命科学研究带来了巨大的前进动力。这一伟大的贡献,使 Neher 和 Sakmann 获得 1991 年度的诺贝尔生理学或医学奖(图 1.1)。

什么是膜片钳技术?

1. 膜片钳技术的原理

膜片钳技术是用微玻管电极(膜片电极或膜片吸管)接触细胞膜,以吉欧姆($G\Omega$)以上的阻抗使之封接,使与电极尖开口处相接的细胞膜的小区域(膜片)与其周围在电学上绝缘,在此基础上固定电位,对此膜片上的离子通道的离子电流(pA 级)进行监测记录的方法(图 1.2)。

用场效应管运算放大器(图 1.2-A₁)构成的 I—V 转换器[converter,即膜片钳放大器的前级探头(head stage)]是这个测量



It was a great experience to receive messages from all around the globe, which unanimously expressed joy and approval. Many stated, that the decision of the Nobel Assembly will be beneficial to all research on ion channels. I would like to add, that it was the use of the patch clamp technique in so many laboratories which ultimately caused this decision.

Thank You,

E. Neher

*With the very best wishes for a
happy 1992!*

图 1.1 Neher 博士荣获诺贝尔奖之后向世界各国友人贺词的致谢辞。

回路的核心部分(图 1.2)。场效应管运算放大器的正负输入端子为等电位,向正输入端子施加指令电位(command voltage, V_{CMD})时,经过短路负端子可以使膜片等电位,达到电位钳制的目的。当

膜片微电极尖端与膜片之间形成 $10\text{G}\Omega(10^{10}\Omega)$ 以上封接时, 其间的分流电流达到最小, 横跨膜片的电流(I)可 100% 做为来自膜片电极的记录电流(I_p)而被测量出来(图 1.2)。

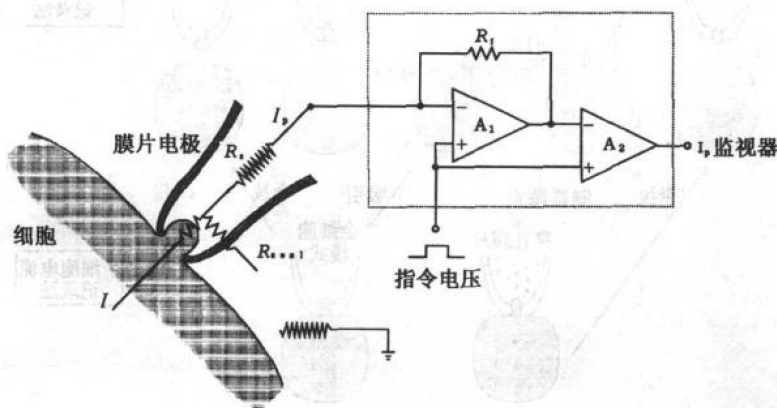


图 1.2 膜片钳技术的原理图。 R_s 是与膜片阻抗相串联的局部串联电阻(或称输入阻抗), R_{seal} 是封接阻抗。 R_s 通常为 $1\sim 5\text{M}\Omega$, 如果 R_{seal} 高达 $10\text{G}\Omega(10^{10}\Omega)$ 以上时, $I_p/I = R_{seal}/(R_s + R_{seal}) - 1$ 。此 I_p 可做为在 $I-V$ 转换器(点线)内的高阻抗负反馈电阻(R_f)的电压降而被检测出。实际上这时场效应管运算放大器(A_1)的输出中包括着膜电阻成分, 这部分将在通过第二级场效应管运算放大器(A_2)时被减掉。

2. 膜片钳法的各种模式

图 1.3 是表示膜片钳法各种模式(mode)的模式图。首先建立的单通道记录法(single channel recording)是细胞吸附式(cell-attached mode)^[1], 其后又建立了膜内面向外(inside-out)和膜外面面向外(outside-out)的模式^[2]。最近, 又分别建立了开放的细胞吸附式膜内面向外(open cell-attached inside-out mode)^[6]和穿孔囊泡膜外面面向外(perforated vesicle outside-out mode)^[7]的模式。全细胞记录法是指在常规方法^[2]的基础上, 附加穿孔膜片(perforated

patch mode)的模式^[8]。

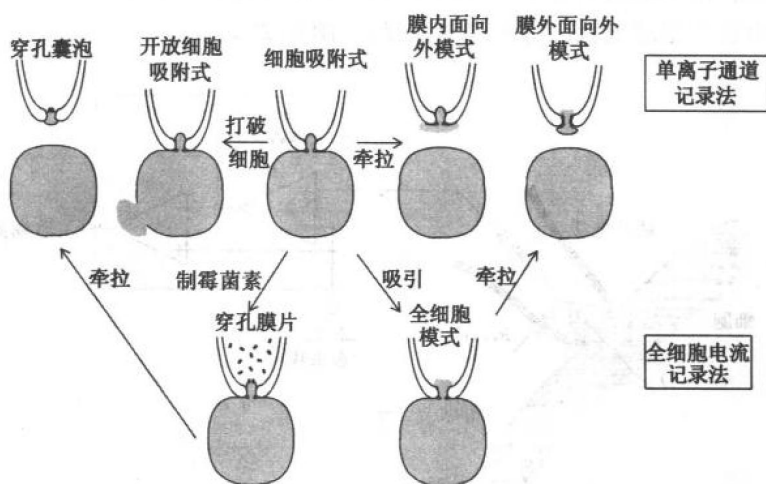


图 1.3 膜片钳法的各种模式。

2.1 细胞吸附模式 (cell-attached mode 或 on-cell mode)

这是一种将膜片微电极吸附在细胞膜上对单离子通道电流进行记录的模式。其优点是在细胞内环境保持正常的条件下可以对离子通道活动进行观察记录。但是,由于不能人为直接地控制细胞内环境条件,也不能确切地判明细胞内电位,所以其缺点是不清楚膜片上的实效电位。此外,另一个缺点是即使在浴液中加入刺激物质,也不能到达与电极内液接触的膜片的细胞外面。相反地,如果膜片离子通道对浴液中的刺激物质有反应,则可以说明这种刺激物质是经过某些细胞内第二信使的介导间接地起作用,使缺点转为优点。

2.2 膜内面向外模式 (inside-out mode)

从细胞吸附模式将已形成巨阻抗封接的膜片微电极向上提起

时,则膜片即从细胞体上被切割分隔下来,得到分离的膜片,形成膜内面向外的模式。此种模式,可直接且自由地经浴液介导而调控细胞内液的条件,并可在和细胞活动无关的形式下观察单一离子通道的活动。但是,由于细胞质出现漏渗(washout)现象,所以如果在此处存在某种离子通道调控因子,则应注意,此实验可能丢失某种调控因子。但也可以利用这种胞质漏渗从反面提示离子通道调控因子的存在。在细胞吸附膜式,很清楚地观察到(或未确切地观察到)离子通道活动在膜片脱离细胞之后逐渐消失(或者变为活跃),这叫做 run down(或 run-up)现象。如果出现此现象,则提示细胞内存在有维持和激活离子通道的因子(或抑制因子)。

2.3 膜外面向外模式(outside-out mode)

从后述的全细胞模式将膜片微电极向上提起可得到切割分离的膜片,由于它的细胞膜外侧面对膜片微电极腔内液、膜外面自然封闭而对外,所以这个模式被称为膜外面向外模式。用这个模式,可以在自由改变细胞外液的情况下,记录单一离子通道的电流活动。当然,在这种情况下也不该忘记细胞质因子丢失的可能性。

2.4 开放细胞吸附膜内面向外模式(open cell-attached inside-out mode)

将细胞吸附模式的膜片以外的某部位的胞膜进行机械地破坏,经破坏孔调控细胞内液并在细胞吸附状态下进行内面向外的单一离子通道记录。这种方法的细胞体积越大,破坏部位离被吸附膜片越远或破坏孔越小,都可导致细胞质因子外流变慢。

2.5 穿孔囊泡膜外面向外模式(perforated vesicle outside-out mode)

从后述的穿孔膜片模式将膜片微电极向上提起,便在微电极尖端处形成一个膜囊泡(膜内面向外膜片断端融合封闭而成)。如果条件较好,此膜囊泡内不仅有细胞质因子还可有线粒体等细胞器存在。所以在有比较接近正常的细胞内信号传递条件和代谢条

件的基础上,可能记录到膜外面向外模式的单一离子通道。

2.6 常规全细胞模式 (conventional whole-cell mode 或 hole cell mode)

在细胞吸附模式上将膜片打穿成孔,记录膜片以外部位的全细胞膜的离子电流,这是全细胞模式。最近,在 whole cell mode 前冠以 conventional 或改称为孔细胞模式 (hole cell mode) 的目的是为了与后述 perforated patch mode 相区别。通过这个孔可以用电极腔内液对细胞内进行透析,所以可借此控制细胞内环境。但是,此时胞内可动小分子可从细胞内漏渗到膜片微电极腔内液中,这是它的不足之处。这个模式也可在电流钳制 (current clamp) 之下测定细胞内电位。

2.7 穿孔膜片模式 (perforated patch mode) (或称缓慢全细胞模式 slow whole-cell mode)

为克服常规全细胞模式的胞质漏渗问题, Horn 和 Marty^[8]将与离子亲和的制霉菌素 (nystatin) (或二性霉素 B, amphotericin B) 经膜片微电极灌流到含类甾醇的细胞膜片上,形成只允许一价离子通过的孔,用此法在膜片上形成很多导电性孔道借此对全细胞膜电流进行记录,这个方法被称为穿孔膜片模式 (或制霉菌素膜片模式, nystatin-patch mode)。此外,因为此模式的胞质渗漏极为缓慢,局部串联阻抗 (R_s , series resistance, 图 1.2) 较常规全细胞模式高,所以钳制速度很慢,故也称为缓慢全细胞模式。

3. 膜片钳技术的优缺点

膜片钳技术的最主要优点在于巨阻抗封接形成的结果使漏出电流极少,所以能正确地进行电压固定。然而不足的是,在形成巨阻抗封接时,由于腔内负压的作用使膜片被吸入微电极腔内,形成所谓的“ Ω ”形膜片,从而造成不可避免的机械性刺激。