

东乐自然基因生命科学公司

第八届膜片钳技术培训班讲义

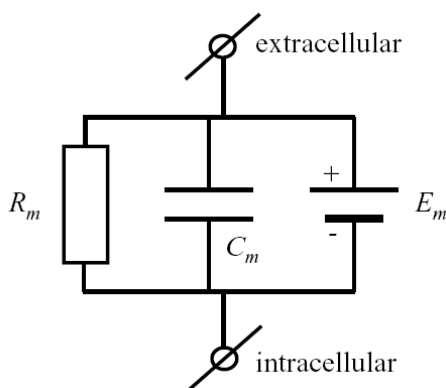
2012 年 11 月 25-27 日 广州



东乐自然基因生命科学公司

第八届膜片钳技术培训班讲义

(膜片钳技术初级培训班班)



2012 年 11 月 25-27 日 广州

前 言

——致广大学员

东乐自然基因生命科学公司 (DL Naturegene Life Sciences, Inc.) 成立于 2011 年 11 月, 为原东乐科技有限公司与原香港自然基因生命科学有限公司联合组成。从 2006 年开始, 公司已在北京 (2006 年)、太原 (2007 年)、武汉 (2007 年)、南京 (2008 年)、成都 (2008 年)、哈尔滨 (2009 年)、南昌 (2010 年) 等地共举办了七届膜片钳技术培训班, 本届在广州 (2012 年) 举办, 为第八届。

培训班举办城市的选择兼顾了中国的地域差异, 授课内容兼顾了不同层次的学员要求。参加培训的学员主要是国内各大学、研究所、医院、药物外包企业以及其他科研单位的本科生、硕博研究生、教师等科研人员, 以及相关仪器代理/销售公司的销售人员和技术工程师。培训班授课内容、实验的演示与操作、实验疑难问题的解答涉及到膜片钳技术的方方面面, 对我国膜片钳技术的发展起到了一定的促进作用, 受到了广大学员的欢迎。在此我们非常感谢北京大学医学部、山西医科大学、华中科技大学、东南大学、成都中医药大学、哈尔滨医科大学、南昌大学、中山大学, 以及国内膜片钳技术的科研人员、美国 Molecular Devices (MD) 公司对我们培训班的大力支持和帮助!

另外, 我们将在明年 (2013 年) 陆续举办中级、高级膜片钳技术培训班。同时, 我公司拟将在 2013 年在北京成立单细胞膜片钳实验室, 将常年为广大学员提供膜片钳技术培训, 并承接各种膜片钳实验项目。此外, 我们还将不定期与美国 MD 公司联合举办 Axon 膜片钳专题讲座, 满足不同层次学员的需求。请大家及时关注我们的网站通知 (www.dlnaturegene.com), 获得膜片钳技术培训班的相关信息。

欢迎广大学员对我们的膜片钳培训班, 以及本讲义提出您的宝贵意见与建议 (联系方式: info@dlnaturegene.com), 以便使我们的膜片钳培训班更加完善, 更好地服务于大家。

能让我们做得更好, 也有您的贡献, 非常感谢!

刘振伟

东乐自然基因生命科学公司

2012 年 11 月 19 日

第八届膜片钳技术培训班授课内容及活动安排

2012 年 11 月 25-27 日

时 间	授课内容及活动安排	主讲人
11 月 25 日 (周日)		
上午 (8:00-9:00)	● 报到 报到与讲课地点: 中山大学本校区贺丹青堂 1 楼会议室	刘振伟
(9:00-12:00)	● 膜片钳技术概述	
下午 (13:30-17:30)	● 膜片钳技术基本概念和方法 (1)	
晚上 (18:00-20:30)	● 欢迎晚宴	
11 月 26 日 (周一)		
上午 (9:00-12:00)	● 膜片钳技术基本概念和方法 (2)	
下午 (13:30-17:30)	● 膜片钳技术基本概念和方法 (3)	
11 月 27 日 (周二)		
上午 (9:00-12:00)	● 膜片钳技术基本记录方法 ● 膜片钳实验问题解答	
下午 (13:30-17:30)	● 膜片钳操作方法样机演示	

目 录

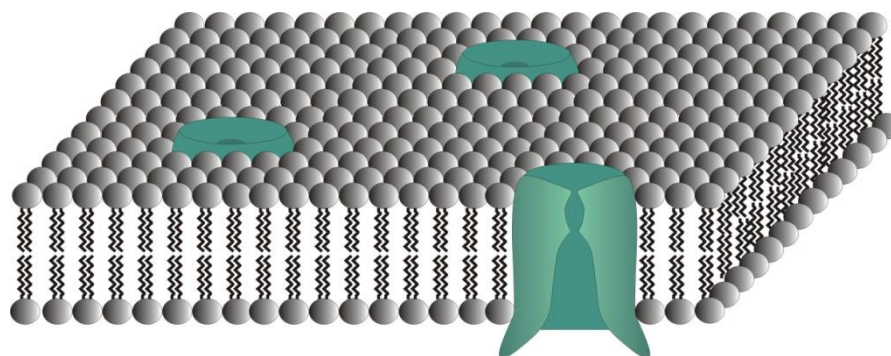
膜片钳技术概述.....	(1)
一、离子通道简介.....	(2)
二、微电极技术.....	(7)
三、膜片钳技术.....	(8)
膜片钳技术基本概念与方法.....	(12)
一、电极.....	(12)
二、电位.....	(14)
三、电流.....	(18)
四、电阻.....	(19)
五、电容.....	(20)
六、滤波.....	(22)
膜片钳技术基本记录方法.....	(26)
一、膜片钳技术的基本记录模式.....	(26)
二、全细胞记录.....	(28)
三、单通道记录.....	(32)

膜片钳技术概述

一、离子通道简介

1. 离子通道的功能

离子通道 (Ion channel) 是镶嵌在动物、植物细胞膜上的一类特殊蛋白质 (下图), 当激活因素存在时, 离子通道会在中央形成一个孔道, 允许某一类或某些类离子进出细胞。



离子通道负责转运细胞膜内外的各种离子, 参与各种细胞功能, 这些功能主要包括:

- 维持细胞静息膜电位, 产生动作电位, 从而调节细胞的兴奋性、不应性和传导性。细胞膜内外两侧存在的电位差称为跨膜电位, 简称膜电位 (Membrane potential, V_m)。细胞在未受刺激时的非兴奋状态下的膜电位, 称为静息膜电位 (Resting membrane potential, RMP)。静息时, 细胞膜只对 K^+ 离子通透, K^+ 离子通道是形成并维持静息膜电位的基础。 Na^+ 、 K^+ 以及 Ca^{2+} 离子通道参与动作电位 (Action potential) 的形成。
- 调节细胞内 Ca^{2+} 、cAMP、cGMP 等第二信使的浓度, 触发肌肉收缩、腺体分泌、基因表达等一系列细胞生理反应;
- 参与神经元的突触传递。神经元产生兴奋和传导兴奋都依赖于离子通道的功能活动。
- 维持细胞的正常体积。离子通道和转运系统的激活使钠、氯和水分进出细胞从而调节细胞体积大小。

2. 离子通道的特点

- 离子选择性。大多数离子通道只允许某一种离子进出, 这是离子通道多以所运输离子的名称来命名的原因, 如 K^+ 离子通道。
- 开启与关闭受不同的门控机制控制。如电压门控性离子通道、配体门控性离子通道、机械敏感性离子通道等。
- 大多数离子通道至少具有开放、关闭、失活等几种状态。当离子通道开放时, 能被通透的离子可经通道流动, 流动的方向取决于跨膜的电化学差, 流动的速度不仅受跨膜电化学差的影响, 还受通道对该离子通透性大小的影响。药物可能通过作用于离子通道的不同状态来影响通道功能。

3. 离子通道的种类

离子通道种类繁多, 细胞膜上至少有400种不同类型的离子通道, 目前只有大约100多种离子通道被克隆出来并进行了通道功能的研究。离子通道的分类方法也很多, 很难找到统一的分类方法, 目前大体上分为如下几大类:

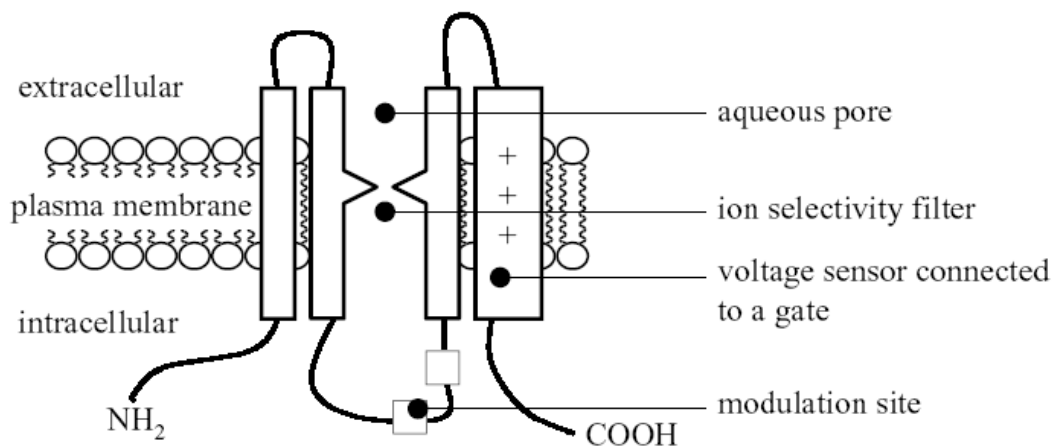
(1) 电压门控性离子通道 (Voltage-gated channels)

这是一类得到广泛研究的离子通道，大量存在于可兴奋细胞膜上。通道的开放和关闭受控于细胞膜电位的变化。常用其选择性通透的离子来命名，如电压门控性 Na^+ 通道、 K^+ 通道、 Ca^{2+} 通道等。

电压门控性 Na^+ 通道分布在可兴奋细胞膜上，主要在神经元、肌细胞、内分泌细胞上，起收缩、兴奋、传导兴奋等作用。

电压门控性 K^+ 通道广泛存在于细胞膜上，种类繁多，构成一个大家庭。如，内向整流钾离子通道、延迟外向整流钾通道、瞬时外向钾通道等。

电压门控性 Ca^{2+} 通道一般分为 L 型、N 型、T 型和 P/Q 等亚型。L 型电导较大、失活慢、需要强的去极化才能激活，在心血管、内分泌和神经等多种组织的细胞中表达，参与收缩耦联和调控代谢。T 型电导小、失活快、弱去极化电流激活，主要分布在心脏和血管平滑肌，触发起搏活动。N 型失活较快、需强去极化电流激活，主要触发神经递质的释放。P 型是在哺乳动物小脑浦肯野神经元上、Q 型是在大鼠小脑颗粒细胞上发现的，它们具有相同的 $\alpha 1$ 亚单位 ($\alpha 1A$)，故统称为 P/Q 型钙通道，其在神经递质释放过程中起重要作用。



(2) 配体门控性离子通道 (Ligand-gated channels)

可分为细胞外配体门控性离子通道和细胞内配体门控性离子通道。前者的内源性配体为神经递质，这类离子通道包括烟碱受体 (nAChR)、 γ -氨基丁酸受体 (GABA_A 和 GABA_C 受体)、甘氨酸受体 (GlyR)、谷氨酸受体 (GluR) 以及 5-羟色胺受体 (5-HT_3 受体) 等等。后者的内源性配体为环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、 Ca^{2+} 、G 蛋白、三磷酸肌醇 (IP_3)、甘油二酯 (DG) 等，这类离子通道又称为第二信使门控通道 (Second messenger-gated channel)。如环核苷酸门控通道 (Cyclic nucleotide-gated channel) (分布于视网膜和嗅球，感受光和气味的刺激)、乙酰胆碱 M 受体通道、肾上腺素受体通道，还有如 ATP 敏感性 K^+ 离子通道、 Ca^{2+} 激活 Cl^- 离子通道等等。

(3) 机械敏感性离子通道 (Mechanosensitive channels)

是一类感受细胞膜表面张力变化的离子通道，可将细胞外的牵张力、摩擦力、压力、重力、剪切力以及渗透压变化等信息转化为电化学信号传入细胞。其种类繁多，大体上可分为牵张门控的离子通道和剪切力门控的离子通道，多分布在血管内皮细胞、心肌细胞、感受器等。近十几年发现的瞬时受体电位离子通道 (Transient receptor potential channel, TRPC) 在多种感觉功能中起重要作用。

(4) 细胞内膜离子通道 (Intracellular membrane channels)

如广泛分布于哺乳动物线粒体膜上的电压依赖性阴离子通道 (Voltage dependent anion channel, VDAC)、位于肌浆网膜上的肉桂碱受体通道 (Ryanodine receptor) 以及 IP_3 受体通道等等。

(5) 质子门控离子通道 (Proton-gated channels)

能感受细胞外 pH 值的变化，低 pH 值开启通道，通透 H^+ 、 Ca^{2+} 离子等。神经系统中广泛分布。常称为酸感受离子通道。

(6) 其他

如：缝管连接离子通道（Gap junction channels），为两个细胞胞浆之间的连接通道，起传递信号使细胞功能相互耦联的作用，对发育中的神经系统非常重要；细胞容积敏感性钾通道，在细胞肿胀时开放；钠激活钾通道。

4. 离子通道病

人类的很多疾病，如囊性纤维化（Cystic fibrosis）、癫痫（Epilepsy）、青春晚期糖尿病（MODY）、长QT综合征（Long QT syndrome）以及多种神经、肌肉疾病，都是由于离子通道功能缺陷所致。这类疾病被称为离子通道病（Channelopathy）。

离子通道病可由编码离子通道基因的突变引起，也可由编码调节离子通道的一些蛋白的基因突变引起。离子通道重要的生理作用以及众多离子通道病的存在，使离子通道成为新药的热门作用靶点。

二、微电极技术

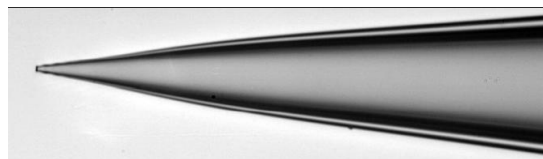
1. 微电极技术的概念

微电极技术（Microelectrode technique）属于电生理学技术，是一种采用微小尖端的玻璃电极研究细胞电活动的技术。玻璃微电极（下图）是目前最常用的微电极，主要用于细胞外记录、细胞内记录、膜片钳记录等电生理记录，还用于细胞内、核内微注射等。

目前最常用的玻璃为硼硅酸盐玻璃（Borosilicate glass），其熔点较高（700-850℃），拉制后颈部较长，电阻较高。但其电学性能优越（电导率低、噪声小）。

2. 微电极技术的发展史

微电极技术出现在上世纪30年代，英国科学家Hodgkin、Huxley在微电极技术的发展上作出了杰出的贡献。上世纪50年代，Hodgkin和Huxley创建了动作电位的钠学说，同时他们应用电压钳技术完成了一系列有关静息电位、动作电位、离子通道等方面的重要研究。此外，



澳大利亚科学家Eccles在中枢突触传递方面取得了重大进展，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，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年诺贝尔奖。几个重大事件：

- 1937年，美国科学家Renshaw用直径为10微米的玻璃微电极记录了脊髓中间神经元的电活动，首次将微电极应用于中枢神经系统的研究。
- 1939年，英国剑桥大学Hodgkin和Huxley用玻璃微电极刺入枪乌贼的巨轴突，直接测量到膜内外电位差，并发现动作电位大于静息电位。
- 1949年，Hodgkin和Huxley在一系列工作基础上提出膜电位离子假说，认为细胞膜动作电位的发生是膜对Na⁺离子通透性快速而特异性地增加，称为“钠学说”。
- 1946年到1949年，Graham、Ling和Gerard采用尖端直径为2-5微米的玻璃管电极将微电极刺入单个骨骼肌细胞，测定了蛙肌细胞膜电位。
- 1946年，Walter用微电极测定了心肌细胞的动作电位。
- 1951年，Eccles采用尖端在1微米以下的超微电极，对脊髓前角运动神经元的兴奋和抑制进行了深入研究，提出了EPSP和IPSP的概念。
- 1949年，Cole和Marmont设计了电压钳（Voltage clamp）方法。
- 1952年，Hodgkin和Huxley用电压钳技术在枪乌贼巨神经轴突上对细胞膜的离子电流和电导进行了细致地定量研究，首次提出了离子通道的概念。

- 1975年, Meech和Standen采用电压钳技术, 对卵母细胞进行了双电极电压钳记录。
- 1976年, 德国Neher和Sakmann在青蛙肌细胞上用双电极钳制膜电位的同时, 记录到ACh激活的单通道离子电流, 从而产生了膜片钳 (Patch clamp) 技术。二人获1991年诺贝尔奖。

3. 微电极技术的应用

(1) 细胞外记录 (Extracellular recording)

神经细胞膜上产生的自发或诱发电位可引起其周围组织产生电流, 形成电压降。将微电极放置在神经组织表面或附近即可记录到神经元上述自发或诱发的电活动。目前应用较多的是神经元场电位的记录以及在离体脑片或麻醉动物上进行神经元突触活动长时程增强或抑制 (LTP或LTD) 的研究。细胞外记录技术的优点主要是微电极不需要刺入细胞, 对细胞不会造成损伤。其缺点是所记录的往往不是一个神经元而是多个神经元的集体电活动, 因而对其结果的解释较为复杂。

(2) 细胞内记录 (Intracellular recording)

将微电极插入细胞记录单个细胞的电活动。由于膜内到膜外的电阻非常大, 不象细胞外记录那样存在低阻细胞外液的分流, 因此其所记录的电信号幅度较大, 以几十mV计。细胞内记录可精确测定膜电位的数值、兴奋性突触后电位 (Excitatory post-synaptic potential, EPSP) 和抑制性突触后电位 (Inhibitory post-synaptic potential, IPSP) 及动作电位 (Action potential, AP) 等, 是研究神经元基本生物物理特性以及药物作用的分子机制的有力手段。但随着膜片钳技术的出现, 很多标本的细胞内记录逐渐成为历史。

(3) 电压钳 (Voltage clamp) 和膜片钳记录

(后面详述!)

(4) 玻璃微电极的其他应用

玻璃微电极已经不单单是传统意义上的电信号记录电极, 它还作为其它研究方法的工具使用, 如用于进行细胞内容物的抽吸、细胞内或核内注射等等。

三、膜片钳技术

1. 电压钳技术 (Voltage clamp techniques)

电压钳技术是在细胞内记录的基础上发展起来的, 通过负反馈电路维持细胞跨膜电位在某一固定数值, 同时观察跨膜电流的变化情况, 而跨膜电流反映了细胞膜上离子通道的活动。细胞膜内外存在电压差, 膜上有离子通道, 当这些离子通道开放时, 会有离子的跨膜运动, 膜内外电压差就会改变, 如果将膜电位人为地固定在某一数值, 当有一定量离子流动时, 为使膜电位保持不变, 就必须向细胞内注射相同数量且方向相反的电荷, 这一电荷可被测定并通过分析确定流动离子的种类。

具体方法: 通过插入细胞内的一根微电极向细胞内输入电流, 使膜电位固定在某一数值, 如-70 mV。当细胞受到电刺激或药物作用引起离子通道开放而产生跨膜电流时, 为维持膜电位就必须向细胞内补充电流, 补充电流的大小恰等于跨膜电流, 但方向相反。只要测定出所补充的电流, 就知道了跨膜电流的大小。

双微电极电压钳技术是采用一根电极监测跨膜电位, 采用另一根电极向细胞内注入电流使膜电位得以钳制。用于大细胞, 如非洲爪蟾卵母细胞。在小细胞上 (如一般的神经元) 同时插入两根微电极不仅非常困难而且严重损伤细胞。

单微电极电压钳技术采用一根微电极, 同时监测膜电位和向细胞内注射电流, 使膜电位得以钳制。其记录与切换速度很高。缺点是存在空间钳位问题 (后述)。

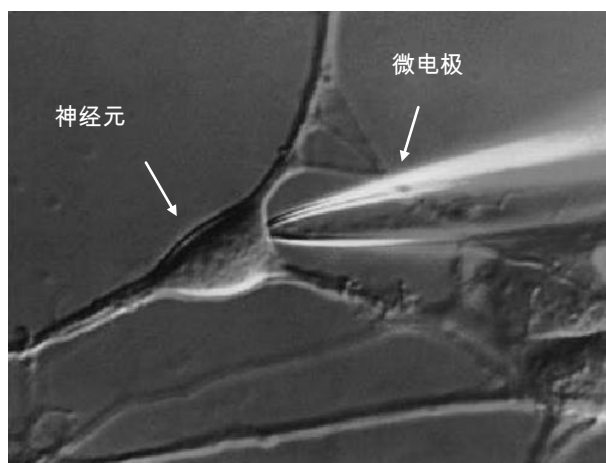
2. 电流钳技术 (Current clamp techniques)

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。

3. 膜片钳技术 (Patch clamp techniques)

早期的膜片钳技术是指：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进行记录的微电极技术（左图）。随着膜片钳技术的发展，不仅对离子通道电流进行记录，还可对转运体、离子泵等电流进行记录；此外，还可进行细胞内注射、细胞内容物抽取等等。

膜片钳技术的基本原理是，轻轻地将玻璃微电极接触在细胞膜表面，给电极尖端施加负压，这样在玻璃电极尖端与膜之间就形成了紧密接触，即高阻封接（Gigaohm Seal），其电阻达 $10^9\Omega$ （1G Ω ）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。这样通过膜片钳放大器就可将电流信号捕捉到，并记录到计算机中。



4. 膜片钳技术的发展历程

- 1976年德国马普生物物理化学研究所Neher和Sakmann首次在青蛙肌细胞上记录到ACh激活的单通道离子电流，从而产生了膜片钳技术。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。
- 1980年Sigworth等在记录电极内施加5-50 cm H₂O的负压吸引，得到10-100G Ω 的高阻封接，大大降低了记录时的噪声，实现了单根电极既钳制膜片电位又记录单通道电流的突破。
- 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。
- 1989年，美国Stanford大学Blanton等人采用盲法对龟大脑皮层和大鼠海马脑片进行了膜片钳研究。脑片盲法膜片钳技术创立。
- 1990年，德国马普研究院Dodt等人将红外微分干涉相差（Infrared differential interference contrast, IR-DIC）显微镜应用于脑片，清晰地观察到了脑片上的神经元及其突起。
- 1991年，德国马普研究所Pei和Volgushev等人在麻醉猫视觉皮层上进行了膜片钳全细胞记录，开创了在体膜片钳的研究。
- 1991年，膜片钳技术创始人、德国马普生物物理化学研究所的科学家Neher和Sakmann获得诺贝尔医学或生理学奖。
- 1993年，德国马普研究院Stuart等人在Edwards和Dodt等人的基础上，将IR-DIC技术应用于海马脑片，并成功地进行了全细胞记录，记录到树突的动作电位，开创了脑片膜片钳可视法。
- 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。
- 2003年，Margrie等人采用双光子显微镜，对用荧光标记的小鼠脑皮层特定神经元在可视条件下进行了全细胞记录，创立了“双光子定位膜片钳技术（Two-Photon Targeted Patching, TPTP）”。在体膜片钳可视法技术创立。
- 1998年，由NeuroSerach和Pfizer公司合作开发出NeuroPatch自动膜片钳设备，可对哺乳动物细胞进行自动化膜片钳操作，全自动膜片钳技术初见端倪。
- 2000年到2008年，平面芯片式全自动膜片钳技术普及。

5. 膜片钳技术的记录模式

除了传统的单通道记录方式以及普通全细胞记录方式外，还有膜穿孔记录方式（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。与其他技术结合又产生很多种技术方法（见后）。

6. 膜片钳技术使用的标本

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等可兴奋细胞发展到血细胞、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、蝶蛹、爪蟾卵母细胞发展到昆虫细胞、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脂双层（Planar bilayer）、脂质体（Liposome）等人工标本上。

7. 膜片钳技术的应用

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，与其它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。

- 膜片钳技术与钙离子成像技术相结合：光电联合检测技术。在记录离子通道电流的同时，对细胞内钙含量进行测量。
- 膜片钳技术与碳纤电极的结合：电化学微量检测技术。用于检测分泌物质的种类与含量。
- 膜片钳技术与PCR技术的结合：单细胞PCR技术。1991年，Eberwine和Yeh等首先用全细胞膜片钳技术记录离子通道电流，然后将细胞内容物收集到微电极吸管内，将其中的mRNA反转录成cDNA，用PCR扩增，扩增产物通过凝胶电泳和DNA序列进行分析。这样在观察通道功能的同时，又分析了有关基因表达改变的情况对通道功能的影响。
- 膜片钳技术与基因工程技术的结合：采用基因敲除或基因重组等技术手段，改变离子通道某个特定亚单位，对其进行膜片钳研究，可探讨离子通道各个亚单位的具体功能，对研究离子通道病以及新药研发有重要意义。
- 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）。

8. 全自动膜片钳技术的崛起

传统膜片钳技术（Traditional patch-clamp technique）的局限：

- 传统膜片钳实验中，通常每天可获得3-5个成功的记录，有时一天中也可能没有一个成功记录，满足不了需要观察大量细胞的实验，也不适合短期获得结果的实验需要，这使得膜片钳实验成为非常耗时耗力的一件工作。
- 不仅如此，随着人们对离子通道药物靶标的研究，越来越多的化合物需要用膜片钳技术来筛选，传统膜片钳技术的低效率（即通量低）和需要熟练掌握该技术的所谓熟手，成了限制该技术发展的瓶颈。

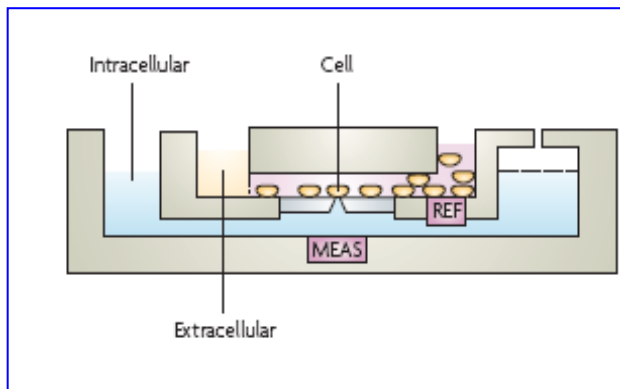
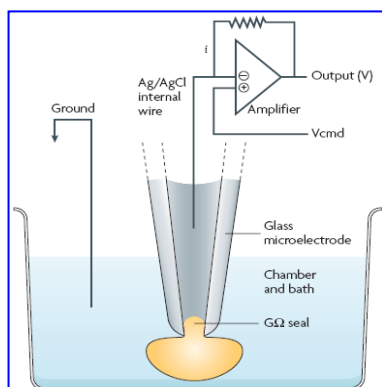
全自动膜片钳技术的出现在很大程度上解决了这些问题，它不仅通量高，一次能记录几个甚至几十个细胞，而且记录质量均已、稳定。此外，从找细胞、形成封接、破膜等整个实验操作实现了自动化，免除了这些操作的复杂与困难。这些优点使得膜片钳技术的工作效率大大提高了！

1998年，由NeuroSerach和Pfizer公司合作开发出NeuroPatch自动膜片钳设备，可对哺乳动物细胞进行自动化膜片钳操作。从本世纪初到现在，随着研究的不断深入，陆续出现了多种全自动膜片钳系统（下图），全自动膜片钳技术日益完善：

德国Flyion公司的Flyscreen 8500、PatchBox以及iPatch（采用Flip-Tip翻转技术，为全自动膜片钳的早期技术）
德国Cytocentrics公司的CytoPatch（传统记录模式）
美国MD公司的PatchXpress 7000A和IonWorks系列（采用平面芯片技术）
丹麦Sophion公司的QPatch系列（采用平面芯片技术）
德国Nanion公司的Patchliner系列和Port-a-Patch（采用平面芯片技术）
美国Fluxion公司的Ion flux 16, 48（采用芯片技术）

全自动膜片钳主要应用于：

- （1）检测药物对人心脏hERG通道的毒性作用，即进行hERG通道的药物安全性评价；
- （2）先导化合物的药物筛选：高通量筛选有效的离子通道靶标药物，可明显缩短临床前的试验时间；
- （3）基础科学研究：与常规的传统膜片钳一致。



全自动膜片钳技术具有如下优势：

- （1）通量高。这是全自动平面膜片钳的最突出的优点，目前的最高通量是48，每天获得的数据量比传统膜片钳要高1,000到10,000倍。
- （2）自动化。找细胞、形成封接、破膜等整个实验操作全部是自动化，实验人员不再项耗时耗力了。
- （3）传统膜片钳技术中所需要的显微镜、微操纵器、微电极拉制仪、防震台/屏蔽网、灌流/给药系统、浴槽系统等等全部不需要了。
- （4）获得数据的均一性高，人为影响因素少。

(5) 数据分析处理软件的自动化程度高，可迅速获得离子通道的I-V曲线以及化合物的量效曲线与EC50/IC50值。

全自动膜片钳技术的局限：

(1) 成功率只有60-80%，仍然不够高。其中的主要原因来自于细胞。

(2) 采用的标本必须是分散的悬浮细胞（目前多为细胞株），而诸如原代培养的神经元、脑片、心肌这类标本目前尚无法采用。

(3) 只能进行全细胞记录模式、穿孔膜片钳记录模式、细胞贴附式单通道记录模式，而不能进行其他模式的记录。

(4) 相比传统膜片钳系统，它的仪器价格昂贵，芯片耗材仅能一次性使用，也增加了它的费用。

膜片钳技术基本概念与方法

一、电极

1. 玻璃微电极

(1) 概述

微电极 (Microelectrode) 原指细胞内、外记录技术中的玻璃微电极, 膜片钳技术出现后, 多用“微吸管 (Micropipette)”来表示膜片钳实验中的玻璃微电极, 而Microelectrode指金属电极。

膜片钳记录系统中最常用的电极是Ag/AgCl电极和Pt电极。我们通常所说的玻璃微电极实际上并不是真正的电极, 而是Ag/AgCl电极的依托, 在电化学上相当于液体盐桥。我们采用玻璃微电极是要借助其尖端与细胞膜之间形成高电阻紧密封接, 为记录微弱的离子通道电流提供先决条件。

由于离子通道电流非常微弱, 膜片钳技术对背景噪声的要求极高, 而玻璃微电极是噪声的主要来源之一, 因此, 玻璃微电极从材料的选择、电极的拉制、抛光和充灌等过程在膜片钳技术中都是非常讲究的。

一般要求拉制微电极用的玻璃毛胚外径在1.3-1.7 mm, 内径在1.0-1.2 mm, 壁厚在0.2 mm以上。管壁越厚, 拉制出的电极尖端管壁也越厚, 电极的跨壁电容就越小, 噪声也就越低。

(2) 拉制

电极拉制前, 一般要对玻璃毛胚进行清洁。有些公司的玻璃毛胚预先已经过清洁处理, 可直接拉制。但如果做单通道记录, 最好对玻璃毛胚进行清洁, 这样有可能降低噪声。清洁的方法有几种, 一般用无水乙醇浸泡玻璃毛胚, 经超声波处理10 min, 再用蒸馏水清洗, 最后置于200℃烤箱内烘干备用。注意, 一定不能市售的洗涤剂清洗玻璃毛胚, 以防止降低电极内液的表面张力而影响充灌。

对于膜片钳实验用的玻璃微电极来说, 由于不需要电极刺入细胞, 电极尖端不要求很尖。而一步拉制很难使电极颈部变短、尖成钝尖, 因此多需要两步 (甚至多步) 拉制。第一步拉制使玻璃软化, 并拉开一个距离, 形成一个细管, 即拉制电极的颈部; 第二步拉制使用较低的热量, 拉断细管部, 成为两个基本相同的玻璃微电极, 此步控制电极的尖部。一般拉制出的玻璃微电极尖端直径为1-5 μm , 充灌Ringer氏液后电极电阻为1-5 M Ω 。用膜片钳放大器可以测量玻璃微电极的电阻。

由于玻璃微电极尖端易于粘附灰尘, 因此要求现用现拉制。而盛放玻璃微电极的电极罐、电极盒及电极玻璃皿等, 只能用来暂时存放玻璃微电极, 不能过夜存放。

用于拉制玻璃微电极的拉制仪有很多种, 有垂直式的, 也有水平式的, 有的还配备有抛光系统。生产厂家主要有美国的Sutter公司 (产品有P-97、P-1000、P-2000)、日本的Narishige公司 (产品如PC-10)。

对于使用铂金片来控制电极的拉制仪 (如 Sutter 公司的 P-97、P-1000 型) 来说, 要注意如下事项:

(1) 拉制前仪器最好预热 30 min。

(2) 一定要注意在拉制电极时不要触动加热用的铂金片, 否则拉制参数均要重新设定, 铂金片也可能需要重新更换。

(3) 铂金片在长时间使用后会老化, 电极电阻有变化时要及时更换铂金片, 并重新调整拉制仪参数。

(4) 在更换铂金片时, 绝对不能直接用镊子触碰铂金片, 这样会大大缩短其使用寿命。

(5) 拉制过程中不要一次连续拉制很多根电极, 否则虽然拉制仪参数没变, 但拉制出的电极彼此之间可能会有较大差异。

(6) 拉制仪的冷却系统吹出的空气需要经干燥剂干燥, 如果长时间使用后干燥剂变成了粉色或白色, 则需要更换或进行加热处理使其变成蓝色后再用。

(7) 拉制仪参数确定后, 不要对其随意更改, 如果根据实验确需要改动参数, 请将原有参数记录下来, 或选择其它频道进行设定。

(3) 涂胶

为了优化拉制出的玻璃微电极, 将疏水性物质涂在玻璃微电极尖端附近表面, 这就是涂胶。涂胶的目

的是：

- (1) 防止溶液沿玻璃尖端外管壁向上蔓延，从而减小了电极的跨壁电容，降低了噪声；
- (2) 加厚尖端玻璃管壁，同样减小了跨壁电容；
- (3) 改善微电极的电学性能，降低玻璃微电极的电学噪声。

目前，最优秀的疏水性涂料为硅酮树脂Sylgard #184，它是美国Dow Corning公司的产品，比大多数玻璃具有良好的电学性能（电导率低，损耗因子小，介电常数低）。一般在体视显微镜或抛光仪显微镜下进行涂胶，胶涂得离尖端越近越好，如果细心些的话，可以将胶涂至距电极尖端几十 μm 处。涂胶的问题，注意如下几点：

- 树脂胶和硬化剂必须充分混合，否则树脂胶硬度可能不够，在涂胶时它会沿电极蔓延至尖端。
- 在记录电流时，玻璃微电极不能浸入溶液太深，否则会增大跨壁电容。一般浸入1 mm会增加约1-2 pF电容，但涂上Sylgard后，浸液4 mm所产生的8 pF电容可减至1 pF。
- 涂胶的范围不能太窄，要涂满整个颈部，肩部以及部分杆部，以防电极浸入溶液较深时淹没涂胶部位。
- 涂胶过程要先于抛光过程，抛光可将涂胶后残留在尖端的Sylgard去除。
- 在做全细胞记录时或记录的单通道电导较大时，可不用涂胶。

(4) 抛光

抛光是指将玻璃微电极尖端靠近加热的铂丝，从而使电极尖端变光滑的过程。抛光的目如下：

- (1) 使玻璃微电极尖端变得光滑，利于封接，更使封接稳定，延长电信号的记录时间。
- (2) 防止玻璃微电极刺入细胞而形成细胞内记录方式。有些用硬质玻璃拉制出的玻璃微电极颈部较长、尖端较细，可能会刺穿细胞，经抛光后可避免这种情况发生。
- (3) 可烧去涂胶时粘附在电极尖端的残留树脂，防止其影响封接。
- (4) 使用软质玻璃拉制微电极时，抛光可使电极尖端成子弹头形的钝尖。

对抛光仪一般有如下要求：

- (1) 加热铂丝一般直径为100 μm 左右，多弯成“V”字型。在抛光时，将微电极尖端对准“V”字尖，这样可使灼烧程度易于控制。为防止在加热时铂原子气化到微电极尖端上，铂丝上常外被一层高熔点玻璃。
- (2) 体视显微镜的放大倍数（目镜 \times 物镜）至少为600倍，否则不易观察到抛光时微电极尖端的较细微变化，无法判断抛光效果。体视显微镜目镜中一般配备有测微尺（Micrometer），可显示出微电极尖端开口直径的大小。
- (3) 最好配备空气冷却装置，通过向微电极尖端吹拂氮气，可迅速终结抛光过程。

(5) 内液充灌

充灌前，微电极充灌液（电极内液）必须用微孔滤膜（0.2 μm ）进行过滤。

膜片钳实验中常用的充灌方法有尖端抽吸法（Tip drawing）和尾部灌注法（Back filling）。对于电极尖端较细的玻璃微电极，一般都是先采用尖端抽吸法充灌尖端，再采用尾部灌注法充灌尾部。对于电极尖端口径较大或有芯的玻璃微电极，一般可直接采用尾部充灌法，然后将气泡弹出即可。

在玻璃微电极充灌过程中，要注意如下几点：

- (1) 一般用于充灌尖端的电极内液容器都非常小，在充灌时电极尖端容易触到容器壁而折断。因此，在充灌时，要保持电极尖端的稳定，持握电极的手要有稳定的支撑点，在给予电极负压或撤除负压时防止手发生移动；同时也不要使盛电极内液的容器太小。一般电极尖端的充灌时间为几秒至十几秒。
- (2) 微电极尾端充灌时，只充灌距电极尖端处1 cm左右高度即可（但Ag/AgCl电极丝必须达到能与电极内液相接触的长度）。过多充灌电极内液会带来如下两个问题：一是过多的电极内液可能会溢出污染电极夹持器，从而增大记录噪声。二是过多的电极内液会使电极电容增加，同样会增大记录噪声。
- (3) 微电极尾端充灌时，还要防止电极尾端残留有电极内液而污染电极夹持器。可用滤纸吸干残留电极内液。
- (4) 排除充灌完成后残留在尖端的气泡时，一般要用手指轻弹电极杆部数次。

(6) 内液

不同的实验目的以及不同的膜片钳记录模式对电极内液成分的要求不尽相同。例如，欲记录神经元电压门控性钙离子通道电流，电极内液中应含有CsCl，以代替常用的KCl，用来阻断电压门控性钾离子通道电流。再如，采用贴附式或内面向外记录模式时，电极内液实际上成了细胞外液。另外，配制电极内液时，还要考虑到如下几个问题：

(1) 电极内液的pH值和渗透压要与浴液尽量一致，以防细胞功能（包括离子通道功能）的改变，除非欲研究pH或渗透压的影响。

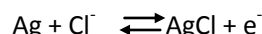
(2) 电极内液存在 SO_4^{2-} 或 CO_3^{2-} 离子时，要注意二价离子有可能产生沉淀，从而达不到所配置的浓度，对浓度产生错误的估算。

(3) 电极内液存在ATP、GTP或其它嘌呤类物质时，在封接过程中渗漏的嘌呤类物质会作用到细胞膜上含有的嘌呤类受体，启动信号转导系统。这种在封接前对嘌呤类受体的激活显然对以后通道电流的记录会产生影响。电极内液中含有谷氨酸时也存在同样的情况。解决的办法是在封接形成后静等上一会儿，让细胞逐渐恢复正常，同时最好更换含有渗漏的嘌呤类物质（或谷氨酸等）的浴液，而后再形成全细胞记录模式。

2. Ag/AgCl电极

(1) Ag/AgCl电极导电时的化学反应

在银丝上镀上一层AgCl即成为Ag/AgCl电极，它在导电时发生的化学反应为：



当电子从溶液中流向Ag/AgCl电极时，AgCl中的 Ag^+ 离子吸收电子成为Ag原子， Cl^- 离子进入溶液；反过来，当电子从Ag/AgCl电极流向溶液时，Ag原子将变为 Ag^+ 离子并与溶液中的 Cl^- 离子结合成AgCl附着在银丝表面。

(2) Ag/AgCl电极的特点

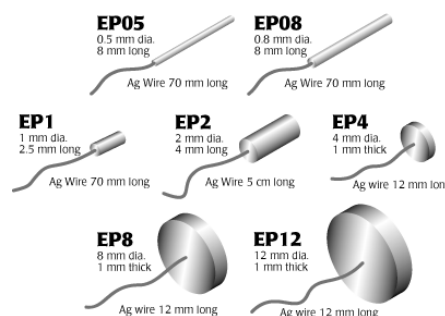
(1) 可逆性：根据电极导电时的化学反应可知，Ag/AgCl可双向导通电流。

(2) 消耗性：长时间导通电流（尤其是大电流）时，AgCl会消耗掉，因此要定期镀AgCl。

(3) Cl^- 依赖性：Ag/AgCl电极必须在含 Cl^- 离子（至少10mM）的溶液中才能良好地发挥导电性能。

(3) Ag/AgCl电极的电镀

首先要用细砂纸打磨或用刀片刮一下Ag丝，使金属Ag裸露，然后浸入含 Cl^- 的溶液（如100mM KCl）中，接上电池进行电镀，待Ag丝表面均匀变灰黑为止。更简单的方法是直接将Ag丝放入次氯酸钠（Clorox）溶液中浸泡。由于Ag/AgCl电极为消耗性电极，因此应定期电镀AgCl。另外，对玻璃微电极锋利的尾端进行烧灼，可防止在插入Ag/AgCl丝时AgCl被刮掉，从而减少电镀的次数。右图是已经镀好AgCl的成品电极。



二、电位

1. 膜电位

细胞膜内外两侧存在的电位差称为膜电位（Membrane potential, V_m ）。细胞在未受刺激时的非兴奋状态下的膜电位，称为静息膜电位（Resting membrane potential, RMP）。一般将细胞膜外的电位设为0mV，静息膜电位为负值。如果静息膜电位变得更负，则称膜发生了超极化（Hyperpolarization），反之，为去极化（Depolarization）。一般对于可兴奋细胞（神经元、肌细胞和分泌细胞），膜去极化可使细胞产生兴奋，超极化可使细胞抑制（但也有例外）。

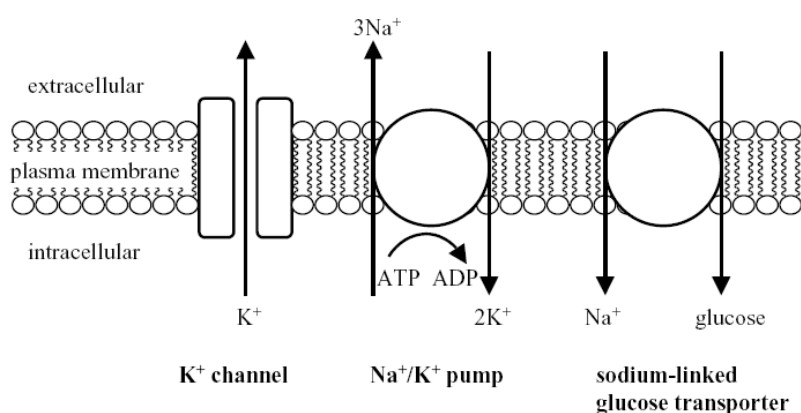
膜电位的形成是由于膜两侧离子分布的不均匀造成的，这归因于膜上的离子泵和交换体，它们对维持

这种不均匀的离子分布起重要作用。细胞在静息状态时，细胞膜主要对K⁺离子通透，因此静息膜电位接近于K⁺离子的平衡电位。

哺乳动物细胞膜内外液体离子成分的差异

Ion	Intracellular range (mM)	Extracellular range (mM)
Na ⁺	5–20	130–160
K ⁺	130–160	4–8
Ca ²⁺	50–1000 nM ^a	1.2–4
Mg ²⁺	10–20	1–5
Cl ⁻	1–60	100–140
HCO ₃ ⁻	1–3	20–30

^a Given as nanomolar rather than millimolar.



细胞膜上的 Na-K 泵、Ca 泵以及 Cl 泵等工作时会产生跨膜电流。如 Na-K 泵（即 Na⁺-K⁺ATP 酶）每水解一个 ATP 分子可将 3 个 Na⁺离子泵出细胞，同时泵入 2 个 K⁺离子，正常生理条件下产生的泵电流（用 I_{Na-K} 表示）为 1 个正电荷的外向电流。在神经元中，Na-K 泵的主要功能是将动作电位产生时进入细胞的 Na⁺泵出，用于此功能的 ATP 大约占细胞 ATP 总量的 70%，可见其功能的重要。细胞膜上的交换体（如 Na-Ca 交换体）工作时产生的跨膜电流。例如，Na-Ca 交换体在正常生理条件下可转运 3 个 Na⁺离子进入细胞，同时转运 1 个 Ca²⁺离子到细胞外，交换电流 I_{Na-Ca} 为 2 个正电荷的内向电流，其功能是维持细胞内游离 Ca²⁺离子浓度的稳定。细胞膜上还有转运体，如 Na-葡萄糖转运体，在转运 Na⁺离子进细胞同时，将葡萄糖分子带入细胞内。

2. 平衡电位

平衡电位（Equilibrium potential）是指当某种离子跨膜流动的净电荷为0时的膜电位。由于当膜电位越过平衡电位时，跨膜离子将朝相反的方向流动，所以平衡电位又称反转电位（Reversal potential, V_{rev}）。1888 年德国物理化学家Walter Nernst提出了Nernst方程，用于计算平衡电位。对于离子S，其平衡电位为：

$$E_s = \frac{RT}{z_s F} \ln \frac{[S]_o}{[S]_i}$$

式中，E_s为离子S的平衡电位，R为气体常数（8.314 V·C·K⁻¹·mol⁻¹），T为绝对温度（273+℃），F为法拉第常数（9.648×10⁴ C·mol⁻¹），z_s为离子价，[S]_o为细胞膜外S离子浓度，[S]_i为细胞膜内S离子浓度。

Nernst方程在计算某离子的平衡电位时并不需要知道膜对该离子的通透性以及电导大小如何。平衡电

位意味着，如果膜对该离子通透，细胞膜电位达到该离子平衡电位时，该离子的跨膜净电流将为0。

Nernst方程计算的是某单一离子的平衡电位，而实际情况下，膜对 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 离子都有通透，此时膜电位的大小不仅取决于这些离子的细胞内外浓度，还与这些离子通过细胞膜的难易程度，即通透性（Permeability）有关。此时可用Goldman-Hodgkin-Katz方程（GHK方程）来计算膜电位：

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{\text{Na}}[\text{Na}]_o + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_i}{P_K[K]_i + P_{\text{Na}}[\text{Na}]_i + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_o}$$

式中，P为相对通透力（Relative permeability）。对于神经元， P_K 一般为 P_{Na} 的50倍，即 $P_K : P_{\text{Na}} = 1 : 0.02$ ，一般设膜对 K^+ 离子的通透力为1，则在静息状态下， $P_K : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 0.02 : 0.45$ 。例如，若哺乳动物神经元 $[\text{K}^+]_o = 3\text{mM}$ ， $[\text{Na}^+]_o = 145\text{mM}$ ， $[\text{Cl}^-]_o = 120\text{mM}$ ； $[\text{K}^+]_i = 135\text{mM}$ ， $[\text{Na}^+]_i = 18\text{mM}$ ， $[\text{Cl}^-]_i = 7\text{mM}$ ，则25℃时神经元的静息膜电位靠近 K^+ 离子平衡电位： $V_m = -78.2\text{mV}$ 。在动作电位达峰值时， $P_K : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 20 : 0.45$ ，通透的离子多为 Na^+ 离子，此时动作电位的幅度靠近 Na^+ 离子平衡电位： $V_m = +42.8\text{mV}$ 。

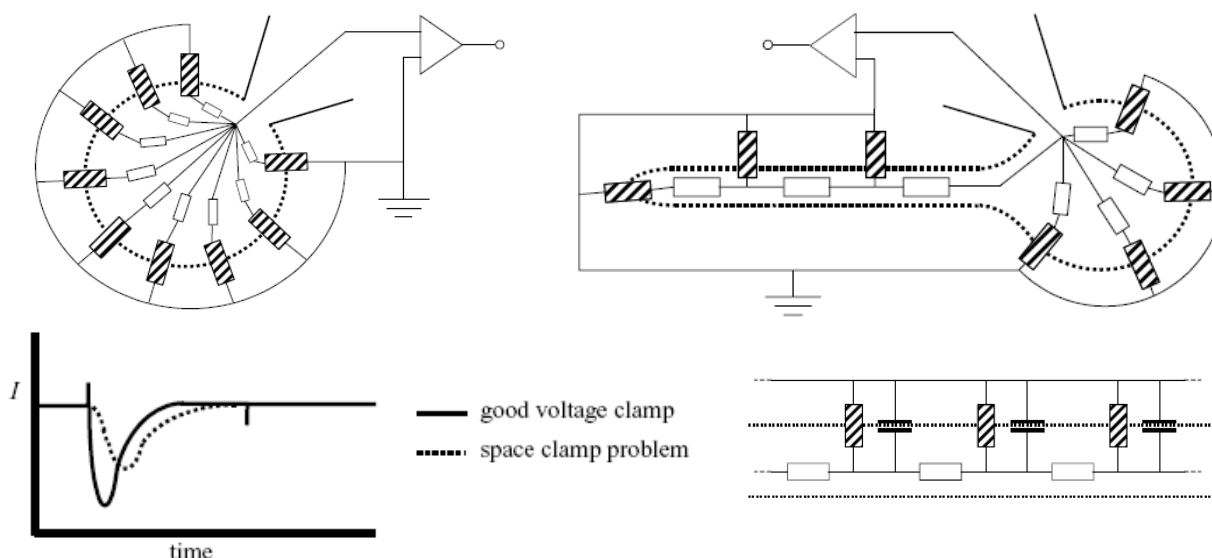
3. 钳制电位

通过膜片钳放大器或膜片钳技术信号采集软件，人为地将跨膜电位固定在某一数值，从而记录跨膜电流的变化，这一数值即为钳制电位（Holding potential, V_h ）。

实验中一般将细胞膜钳制在静息膜电位附近，如可将神经元静息膜电位钳制在-70mV左右。通过将膜电位钳制或短暂钳制在不同的水平，可进行通道激活、衰减及失活特性等的研究，对不同离子通道电流进行分离。钳制电位可通过膜片钳技术信号采集软件输出，也可利用膜片钳放大器的钳制功能施加。

另外，在对全细胞进行膜电位钳制时，还要注意空间钳位（Space clamp）问题（下图）。如果细胞各个部分的细胞膜到电极尖端之间的串联电阻不一致，将会导致各个部位细胞膜的钳制电位不均一，尤其当细胞直径较大或有很多突起、伪足时，空间钳位问题就更严重，即使胞体部位钳制得很好，但突起等部位也不能得到有效钳制。在这种情况下，空间钳位不良所带来的实际问题是软件或膜片钳放大器输出的钳制电位将与实际的跨膜电位 V_m 不同，据此所记录的细胞电流（尤其是突触电流）以及离子通道平衡电位的计算都可能被严重歪曲。

通过对串联电阻进行补偿可以解决部分空间钳位问题。另外，在具体实验中可通过采取一些其它方法来避免出现严重的空间钳位问题，例如可通过限制研究标本为球形细胞、限制在微电极附近的细胞区域进行电流测量，以及采用巨膜片记录技术记录较大片膜上的电流而不是全细胞电流等等办法，来避免空间钳位问题带来的误差。



4. 液接电位

液接电位 (Liquid junction potential, LJP) 是接触电位 (Junction potential, JP) 的一种。接触电位指不同的导体相接触的界面产生的微小电位差。在膜片钳记录系统中, 当电极丝 (银丝) 与玻璃微电极内液接触时会产生接触电位, 即电极电位 (EP) (见下)。微电极内液与浴液之间、电极内液与细胞内液之间产生的接触电位为 LJP。广义上讲 LJP 是指两种不同的盐溶液在相接触的界面处产生的电位差。

5. 电极电位

电极电位 (Electrode potential, EP) 是指固体电极与其接触的溶液之间产生的电位差, 又叫半电池电位 (Half-cell potential)。常用的 Ag/AgCl 记录电极与电极内液接触, 而 Ag/AgCl 参比电极与浴液接触, 如果两溶液的 Cl^- 离子浓度不同, 则两电极之间将有很大的电位差, 最大可到 200mV 左右。对于饱和的 KCl 溶液, 在 25℃ 时, Ag/AgCl 电极的电极电位为 +0.297 V。电极电位的计算公式是:

$$V_{\text{Ag}} = V_0 - (RT/F) \ln a_{\text{Cl}}$$

式中, V_{Ag} 指 Ag/AgCl 电极电位, V_0 指 Ag/AgCl 标准电极电位, a_{Cl} 指 Ag/AgCl 电极附近的 Cl^- 浓度。从式中可见, Ag/AgCl 参比电极的电极电位对溶液中的 Cl^- 离子浓度十分敏感, 如果溶液中 Cl^- 离子浓度发生改变, 电极电位就发生很大变化, 因此在细胞封接形成后对钳制电位 (膜电位) 的校正中, 除了考虑液接电位的因素外, 还需考虑电极电位的影响。例如, 对于细胞贴附式记录模式, 膜钳制电位的校正公式为:

$$V_m = (V_c - V_p) - V_L' - V_{\text{Ag}}^{21}$$

式中, V_m 为实际的膜钳制电位 (跨膜电压), V_c 为细胞静息膜电位 (RMP), V_p 为钳位命令电压, V_L' 为放大器对液接电位的补偿电位, V_{Ag}^{21} 为溶液变化后的电极电位 (V_{Ag}^{21}) 与溶液变化前的电极电位 (V_{Ag}^{11}) 的差值, 即 $V_{\text{Ag}}^{21} = V_{\text{Ag}}^{21} - V_{\text{Ag}}^{11}$ 。由于存在这个原因, 所以一般不大主张将 Ag/AgCl 参比电极直接与浴液接触, 而是采用盐桥来过渡, 避免了浴液离子浓度的变化对电极电位的影响。

6. 浴池电位

一般情况下, 浴液通过参比电极 (通常为 Ag/AgCl 电极) 接入探头地, 所有测量的电信号均为相对于此探头地的电位或电流。为真实地反映测量的电信号, 理论上要求浴液与探头地之间的电位差——浴池电位 (Bath potential, V_b) 为 0。但实际实验中, 由于有浴池电阻 (Bath resistance, R_b) 的存在, V_b 通常不为 0。一般情况下 V_b 很小, 对电信号的影响可忽略不计, 但在下列情况下, V_b 可变得很大, 离子通道信号会产生较大偏差:

- (1) 溶液中 Cl^- 离子浓度发生较大的变化 (通常产生于灌流给药时), 产生 AgCl 电极电位的直流漂移。
- (2) 溶液温度发生较大的变化。

(3) 在对卵母细胞等大细胞进行钳制时, 因全细胞离子通道电流较大 (常达 μA 级甚至 mA 级), V_b 也较大, 所记录的 V_m 就不准确了。例如, 如果记录的离子通道电流 (钳制电流) 为 $I = 5\mu\text{A}$, 而 $R_b = 2\text{k}\Omega$, 则 $V_b = 10\text{mV}$ 。

为消除 V_b 对记录的电信号的影响, 主要的措施有:

- (1) 最佳的办法是减小 R_b (见下)。
- (2) 用另外的放大器探头将 V_b 钳制为 0。
- (3) 用单独的放大器探头测量 V_b 并从所记录的电压中减除。
- (4) 采用串联电阻补偿方法抵消 V_b 。

浴池电阻 R_b 主要有三个来源, 详细情况如下 (下页图):

● 细胞膜表面与参比电极之间的溶液接入电阻 (R_a)

$R_a = \rho/4\pi r$ (Ω)。 ρ 为溶液的电阻率, 20% 时 Ringer 氏液的电阻率为 $80\ \Omega\text{cm}$; r 为细胞半径 (cm)。显然, 细胞越大, R_a 越小。对于 $r = 0.5\text{ mm}$ 的卵母细胞, 当 $\rho = 80\ \Omega\text{cm}$ 时, $R_a = 127\ \Omega$ 。一般对于直径为 1 mm 左右的卵母细胞, 其在 Ringer 氏液中的 R_a 大约在 150-200 Ω 左右。在特定的实验条件下, R_a 一般是无法降低的, 所幸的是其值通常较小, 我们可对它忽略不计!

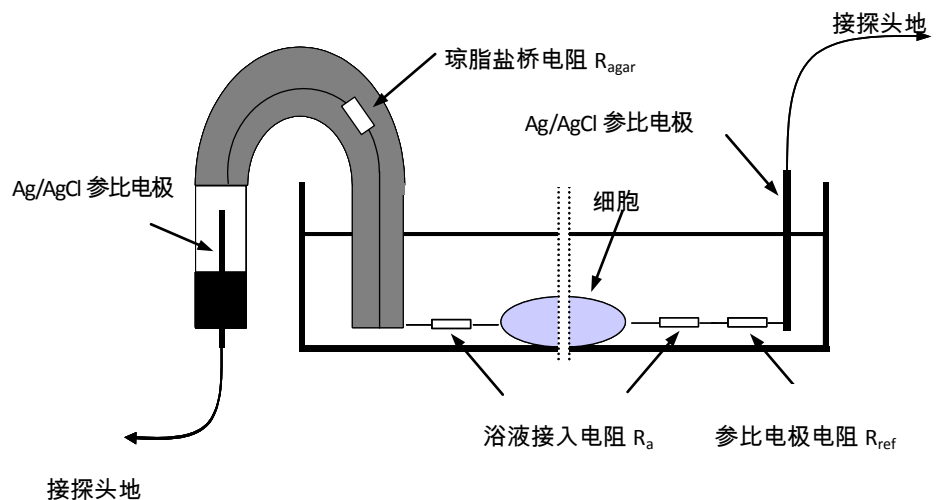
- 琼脂盐桥电阻 (R_{agar})

琼脂盐桥的电阻与盐桥的长度、直径以及与盐桥内液的成分有关: $R_{\text{agar}} = \rho L / S$ 。 ρ 为盐桥内液电阻率 (Ωcm), L 为盐桥长度 (cm), S 为盐桥的横截面积 (cm^2)。如果盐桥半径为 1 mm , 长 1 cm , 当盐桥内充 Ringer 氏液时, $\rho = 80\ \Omega\text{cm}$, 故 $R_{\text{agar}} = 2.55\text{ k}\Omega$; 当盐桥内充 3 M KCl 溶液时, 则 ρ 比 Ringer 氏液小 20 倍, 即 $\rho = 4\ \Omega\text{cm}$, 此时 $R_{\text{agar}} = 127.5\ \Omega$ 。可见用 3 M KCl 做盐桥内液时, R_{agar} 大大减小。

- 参比电极电阻 (R_{ref})

根据接地方式不同, R_{ref} 的电阻可高达 $10\text{ k}\Omega$, 但采用一定方法可将其控制在低于 $1\text{ k}\Omega$ 的水平。当 Ag/AgCl 电极直接与溶液接触时, R_{ref} 的大小与溶液成分、 Ag/AgCl 丝/球与溶液的接触面积有关。 1 mm 直径的 Ag/AgCl 球在 Ringer 氏液中的电阻约为 $300\text{--}600\ \Omega$, 接触面积越大, R_{ref} 越小。

根据上述浴池电阻 R_b 的来源及特点可见, 减小 R_b 最好的方法是: 不使用盐桥, 将参比电极 Ag/AgCl 球直接与溶液接触, 并且 Ag/AgCl 球与溶液的接触面积要尽可能地大。但要注意, 如果实验中改变浴液成分, 溶液中 Cl^- 离子浓度发生较大的变化, 则会产生 AgCl 电极电位的直流漂移, 此时以使用盐桥为好。



为了克服盐桥电阻,

可尽量缩短盐桥的长度、增大盐桥的直径, 如果不考虑盐桥中 KCl 的渗漏问题, 盐桥内液还可用 3 M KCl 代替 Ringer 氏液。

三、电流

1. 离子通道电流

离子通道开启时离子进出通道产生的电流。离子的流动方向取决于细胞膜内外离子的浓度差和电学梯度, 如果细胞膜内外某离子的浓度相同, 且膜两侧电压差为 0 mV , 则即使该离子通道开放, 也将记录不到任何电流。

全细胞记录时, 跨膜电流常称为全细胞电流 (Whole-cell current)。由于细胞直径大小的不同, 总的离子通道数目也不相同, 全细胞电流的大小也就不一致。因此为便于不同细胞间的比较, 常采用电流密度 (Current density, I_d) 这一概念。电流密度是指单位细胞膜面积的通道电流大小。在进行全细胞电流记录时, 由于细胞膜大小与膜电容的大小成正比 ($C_m = \pi d^2 / 100$, d 为细胞直径), 所以, 常用跨膜电流除以膜电容来计算电流密度, 即电流密度 $I_d = I_m / C_m$ (pA/pF)。

单通道记录时, 跨膜电流称为单通道电流 (Single-channel current), 但常用单通道电导来表示 (见后)。

2. 内向电流与外向电流

从细胞外进入细胞内的正离子 (如 Na^+) 电流或从细胞内流向细胞外的负离子 (如 Cl^-) 电流为内向电流 (Inward current), 在显示器或示波器的显示屏幕上一般采用向下的方向表示。从细胞内流向细胞外的正离子 (如 K^+) 电流或从细胞外流向细胞内的负离子 (如 Cl^-) 电流为外向电流 (Outward current), 在显示器或示波器屏幕上一般采用向上的方向表示。

3. 去极化电流与超极化电流

在全细胞记录模式，去极化电流（Depolarizing current）是指从微电极尖端流入细胞内的正电流，它使得细胞膜电位变得更正。而超极化电流（Hyperpolarizing current）是指从微电极尖端流入细胞内的负电流，它使得细胞膜电位变得更负。

3. 封接电流（漏电流）

封接电流（Seal current, I_{seal} ）指微电极与细胞的封接处产生的电流，封接电流常称为“漏电流（Leak current）”，表示从封接处漏掉的电流。当封接质量不高，封接电阻 R_{seal} （ R_{leak} ）不大时， I_{seal} 增大，不仅通道电流有丢失，噪声也随之增大。减小 I_{seal} 的方法主要是改善微电极尖端的形状以及使细胞膜表面光滑，使两者能达到高阻封接。

4. 膜被动反应电流（膜漏电流）

当细胞膜内外电压差发生改变时，除离子通道电流，根据欧姆定律，膜电阻会有电流通过，此为电阻电流。同时膜电容会有充放电反应，产生电容电流，电阻电流与电容电流就是膜被动反应电流（膜漏电流）（Membrane passive current），也为漏电流的一种。

四、电阻

1. 膜电阻

膜电阻（Membrane resistance, R_m ）是指电流通过细胞膜时所遇到的阻力。在细胞静息状态下， R_m 主要来自脂质双分子层的电阻，在膜上离子通道开放后， R_m 大大降低，此时 R_m 的大小决定于离子通道的电导与开放的通道数目。通过给予细胞膜在静息电位附近的超极化或去极化，可以对膜电阻进行测量。

2. 电极电阻

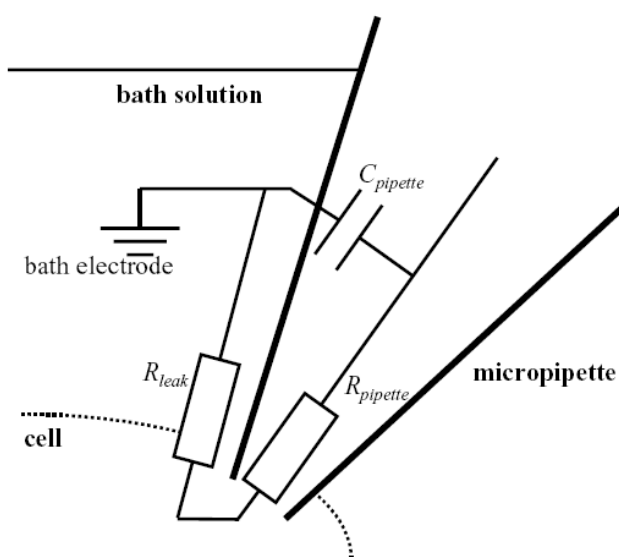
电极电阻（Pipette resistance, R_p ）是玻璃微电极本身的电阻，为串联电阻的主要成分。其大小与玻璃电极形状、开口大小以及电极内液有关。可以利用 R_p 的大小来判断拉制出的玻璃微电极合适与否。不同类型与大小的细胞以及不同的膜片钳记录模式对玻璃微电极尖端的要求不同，对 R_p 大小的要求也不同。 R_p 的测定非常简单，可直接用膜片钳放大器测量。

3. 封接电阻

当电极尖端与细胞膜片之间形成高阻封接时，通过微电极的电流几乎为0，形成的电流阻抗非常大，这就是封接电阻（Seal resistance, R_{seal} 或 R_{leak} ）。膜片钳实验中，一般要求在全细胞记录时 R_{seal} 至少要达到GΩ以上，实验中有时可达几百GΩ甚或更大，此时细胞膜与微电极尖端之间可达到小于1nm的间隙。如果封接不良， R_{seal} 较低，则会产生较大的封接电流（ I_{seal} ），影响跨膜通道电流的记录。封接的好坏与玻璃微电极、细胞膜表面都有关。

4. 串联电阻及接入电阻

串联电阻（Series resistance, R_s ）是指从微电极到信号地之间电流流过时所遇到的除了膜电阻以外的任何电阻。当将微电极放入溶液中时， R_s 主要是电极电阻 R_p ；全细胞记录模式形成后， R_s 包括电极电阻 R_p 、



破裂细胞膜的残余膜片电阻、细胞内部电阻。后两者统称为接入电阻（Access resistance, R_a ），破裂细胞膜的残余膜片电阻占 R_a 的主要成分。由于这些电阻在电学上与细胞膜电阻是串联在一起的，故称串联电阻。

全细胞记录时， R_s 引起的问题有如下 3 个方面，对其补偿的目的就是要消除这些问题，使所记录的通道电流更为准确：

● 膜电位对命令电压的反应时间延迟

膜对脉冲刺激反应的时间常数为 $\tau = R_s C_m$ 。 R_s 补偿后， $\tau = R_s (1 - C\%) C_m$ ， $C\%$ 为补偿的百分数。若 $R_s = 10 \text{ M}\Omega$ ， $C_m = 5 \text{ pF}$ ， $C\%$ 分别为 0、50、90 时，则 τ 分别为 50、25、5 μs 。可见 R_s 补偿后，明显加快了膜电位对命令电压的反应时间。

● 串联电阻产生电压降，严重影响膜钳制电位的数值

电极电压降 $V_{\text{drop}} = R_s I_m$ ， I_m 为膜离子通道电流。在全细胞记录模式，如果 $I_m = 5 \text{ nA}$ ， $R_s = 2 \text{ M}\Omega$ ，则 $V_{\text{drop}} = 10 \text{ mV}$ ，表明膜电位将偏离钳制电位 10 mV，这会导致所记录的电流产生严重误差。

● 串联电阻与膜电容形成了一个单极 RC 滤波器，限制了摄取电流信号的频带宽

单极 RC 滤波器对电流幅度无影响，但滤波器的角频率（-3dB） $f = 1/(2\pi R_s C_m)$ 对信号的带宽有影响。当 $R_s = 10 \text{ M}\Omega$ ， $C_m = 50 \text{ pF}$ 时， $f = 320 \text{ Hz}$ ，即此滤波器将信号的带宽限制为 320 Hz 左右。串联电阻补偿达 90% 时，则 $R_s = 1 \text{ M}\Omega$ ，信号带宽由原来的 320 Hz 增加了 10 倍，为 3.2 KHz。

补偿（Compensation）是膜片钳放大器的一个功能，可将串联电阻、电极电容、膜电容带来的负面影响去除，更好地记录到离子通道电流。串联电阻的补偿是采用膜片钳放大器的串联电阻补偿功能来完成的。

五、电容

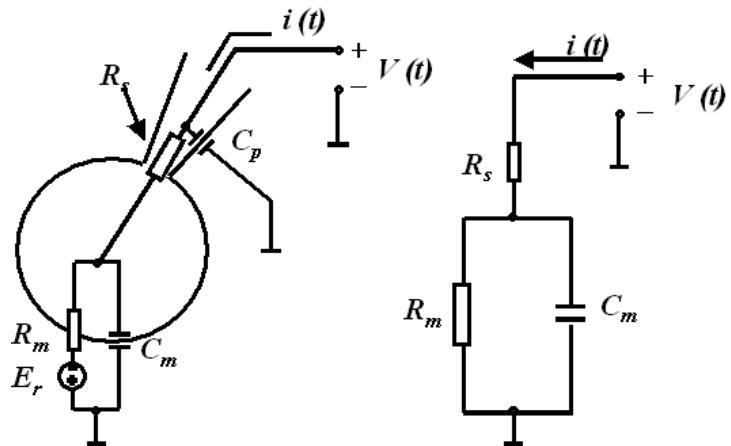
一般来说，两个被绝缘体（介质）隔开的导体（极板）就构成了电容（器）。

电容的几个特性：（1）具有储存电荷的能力；（2）几个电容串联后其总电容值变小，而并联后则变大；（3）能通过交流电而隔断直流电；（4）存在位相偏移，在交流电路中使电流超前电压 90 度。

1. 膜电容

细胞膜的脂质双分子层是电的不良导体，因而由细胞外液-脂质双分子层-细胞内液就构成了细胞膜电容（Membrane capacitance, C_m ）。 C_m 的大小与细胞膜表面积成正比，与脂双分子层的厚度成反比。脂双分子层的厚度一般是较为固定的。因此，对于一个球形细胞，膜电容的计算公式为 $C_m = \pi d^2 / 100 \text{ (pF)}$ 。式中， d 为细胞直径（ μm ）。例如，对于一个半径为 10 μm 的球形细胞，其膜电容 C_m 约为 12 pF 左右。实际上由于有细胞膜内折的存在， C_m 为此数值的 1.5-3 倍不等。一般情况下，生物膜的电容大体都是 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ （即 $0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ ）。

细胞膜具有电缆特性，其上的膜电容和膜电阻是并联的，右图是细胞膜的简单电学等价回路，其中还考虑到实际情况下串联电阻（ R_s ）的存在。



在打破细胞膜形成全细胞记录后，给予

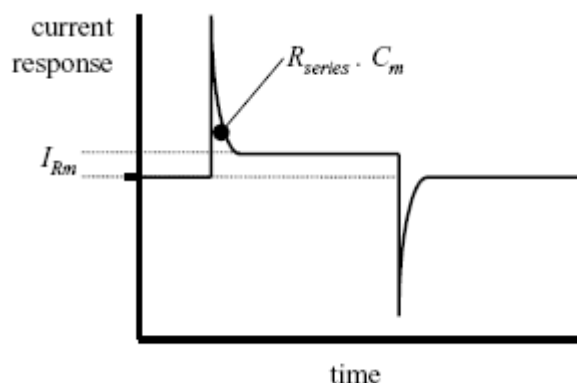
细胞膜阈下去极化刺激脉冲时， C_m 出现充放电反应（下页图），同时，流经膜电阻的电流（ I_{Rm} ）表现为恒定稳态电流。

膜电容的充放电反应可以作为全细胞记录时打破细胞膜的标志，其大小可通过膜片钳采样软件来测量。采用膜电容分析法可对膜电容的微小变化进行检测，适用于研究细胞的胞吞与胞吐现象。

膜电容带来的问题:

- 当给予细胞电压命令时, 膜电容的充放电可能会影响离子通道电流的观察。
- 膜电容充放电可能会使放大器电路饱和。
- 若不对膜电容进行补偿, 则会影响串联电阻的补偿。

膜电容的补偿是采用膜片钳放大器的膜电容补偿功能来完成的。

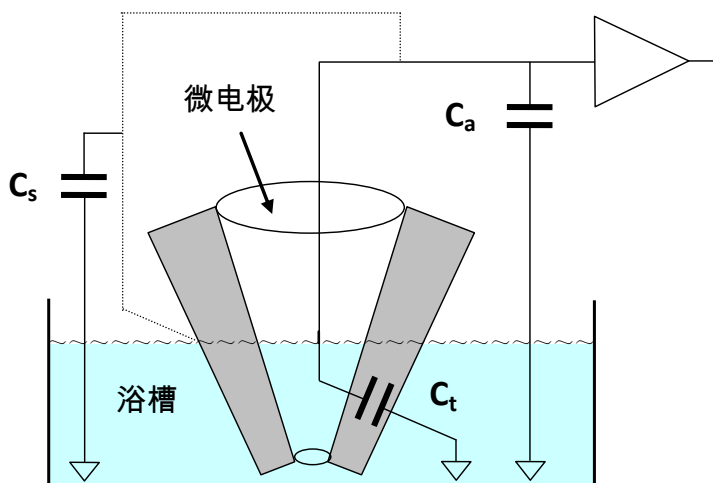


2. 电极电容

电极电容 (Pipette capacitance, C_p) 包括电极浸液部分电极内液与浴液之间所形成的跨壁电容 (C_t)、电极非浸液部分与邻近地表形成的漂浮电容 (C_s) (下图)。

膜片钳实验中, 电极电容 C_p 可产生如下几个问题:

- 电极尖端的电压由于电极电容的充电而变化缓慢, 快速激活的离子通道电流因而可受到歪曲。
- 由于有电极电容的存在, 将不能区分电极电容与膜电容, 导致在计算膜电容时其被过高估计。
- 电极电容参与形成多种电极噪声, 如分布性 RC 噪声、薄膜噪声等。
- 串联电阻补偿电路的稳定性会受到电极电容的影响, 同时过大的电容电流瞬变值可引起放大器输入饱和。
- 电极电容的充放电电流掺杂在离子通道电流中, 显得不美观。



跨壁电容 C_t 为相对浴液 (细胞外液) 的电容, 它的介质为浸入浴液的玻璃电极壁。在膜片钳实验中 C_t 为电极电容的主要部分, 一般电极浸液深 1 mm 会产生 1 pF 或更大一些的跨壁电容。计算公式为:

$$C_t = \epsilon_0 \epsilon \frac{2\pi l}{\ln(d_o/d_i)}$$

式中, ϵ_0 为真空的介电常数, ϵ 为玻璃的介电常数, l 为电极浸入浴液的深度, d_o 为电极尖端的外径, d_i 为电极尖端的内径。从公式中可知, 减小 l 可显著地降低 C_t ; 同时, C_t 的大小并不依赖于电极尖端的特殊形状, 而是依赖于 d_o/d_i 的比值, 如果增大 d_o/d_i 也可有效降低 C_t 。减小 C_t 的方法:

- 加厚电极管壁: 采用厚壁玻璃毛坯拉制电极, 或在电极浸液部分外部涂以硅胶树脂 (Sylgard)、指甲油等疏水性物质。
- 减小电极浸液深度: 浸液部分越短, C_t 越小。另外, 因液体存在表面张力, 浴液会沿着电极外管壁向上爬行而形成液膜, 它与电极内液将产生显著的电容。避免形成液膜的方法是将电极浸液部分外部涂以硅胶树脂等疏水性物质。
- 补偿功能: 即使采取了以上机械物理上的措施, 仍会有残余的跨壁电容存在。因此可进一步采用膜片钳放大器电容补偿功能进行补偿, 以求使 C_t 的影响减小到满意的程度。

3. 快电容与慢电容

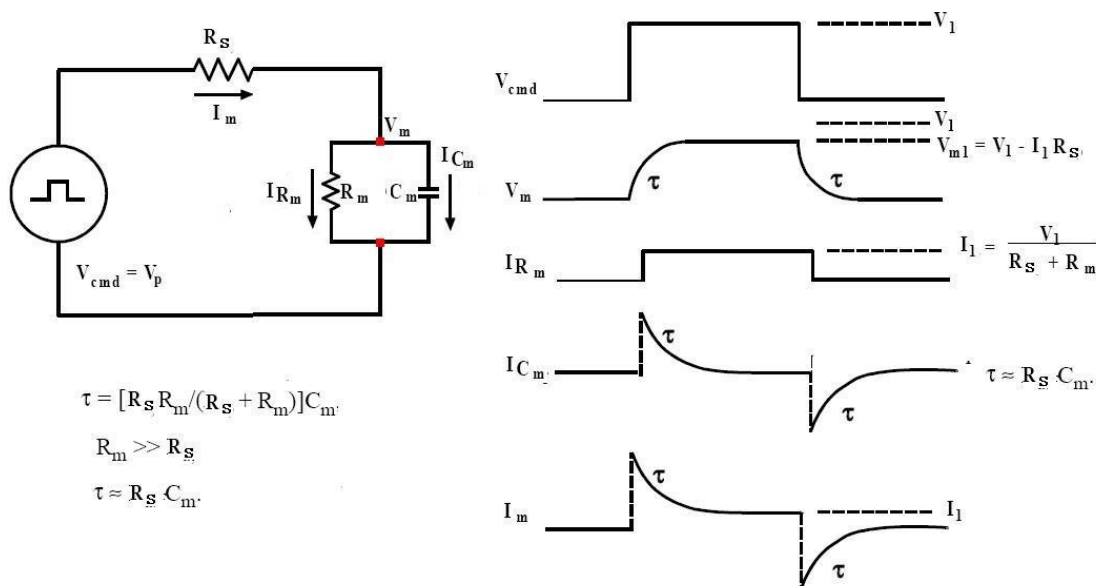
快电容 (Fast capacitance, C_{fast}) 直接与放大器输入相连, 几乎是瞬间被充电的 ($\tau=0.5-5 \mu s$), 电容最大也仅有几个 pF, 高阻封接形成后, 快电容主要为电极电容。

慢电容 (Slow capacitance, C_{slow}) 与串联电阻相连, 需经电极电阻来充电, 充电较慢, 电容可达几十个 pF。打破细胞膜形成全细胞记录模式后, 慢电容即细胞膜电容。

4. 时间常数

时间常数 (Time constant, τ) 是指随时间变化的指数分布变量, 当其从最大值变化到原来的 37% 或从 0 变化到最大值的 63% 时所需要的时间。对于膜电容充电过程, 电容瞬变值衰减到原来的 37% 时所需要的时间或膜电位增大到最大值的 63% 所需要的时间即为膜对脉冲电压反应的时间常数 (下页图)。

其大小为 $\tau=R_s \times C_m$, R_s 为串联电阻, C_m 为膜电容。如果 $R_s=10 \text{ M}\Omega$, $C_m=33 \text{ pF}$, 则膜对脉冲电压反应的时间常数 $\tau=330 \mu s$ 。对于膜电容的充电过程, 一般经 3-4 个时间常数的时间后, 充电过程基本结束。



六、滤波

滤波 (Filtering) 是降低噪声的有力手段, 执行滤波功能的仪器为滤波器 (Filter), 它是由电子元件组成的电路, 当信号通过时, 可以将所选择频率的信号去除, 从而留下所需要频率的信号, 提高信噪比, 使信号变得清晰、易于分辨。生物信号多为低频信号, 而其电噪声除了 50Hz 交流噪声外以高频成分居多, 因此膜片钳技术中最常用的是低通滤波, 即去除高频噪声信号而留下低频生物信号。

1. 基本概念

(1) 分贝和-3dB 频率

分贝 (Decibel, dB) 的定义是滤波器输出电压 (V_{out}) 与输入电压 (V_{in}) 比值的常用对数的 20 倍, 或输出功率 (P_{out}) 与输入功率 (P_{in}) 比值的常用对数的 10 倍, 即:

$$dB = 20 \log \frac{V_{out}}{V_{in}} \quad \text{或} \quad dB = 10 \log \frac{P_{out}}{P_{in}}$$

如果滤波器输出的电压信号幅度为 -20dB, 则 $V_{out}/V_{in}=0.1$, 表明其输出电压比输入电压降低了 10 倍。

如果滤波器输出的电压信号幅度为-3dB, 则 $V_{out}/V_{in}=v(1/2)$, 表明其输出电压降低为输入电压的 $v(1/2)$ (即0.7071), 这时的滤波频率就叫-3dB频率 (-3dB frequency, f_{-3dB} 或 f_{-3})。具体地说, 在 f_{-3dB} 上, 滤波器的输出电压衰减为输入信号电压的 $v(1/2)$, 输出功率衰减为输入信号功率的一半。 f_{-3dB} 常又称为信号带宽的角频率 (Corner frequency, f_c) 或截止频率 (Cutoff frequency, f_c)。滤波器上所标注的滤波频率一般都是以 f_{-3dB} 表示的, 如Axopatch 200B膜片钳放大器配备的4极低通Bessel滤波器的滤波频率范围为1-100kHz, 指的就是 f_{-3dB} 。对于低通滤波器而言, 低于 f_{-3dB} 的信号为滤波器要保留下来的生物信号, 而高于 f_{-3dB} 的信号为滤波器要去除的噪声信号。滤波器的 f_{-3dB} 范围是反映滤波器特点的重要指标。

滤波器对信号幅度的衰减特性常用幅度响应曲线 (Amplitude response curve) 来表示, 其纵坐标为衰减幅度 (dB), 横坐标为信号频率, 采用对数坐标, 多用信号频率 (f) 除以 f_{-3dB} 后的标准化频率表示, 这样, f_{-3dB} 就为1。

(2) 通带和阻带

能通过滤波器的信号频率范围为通带 (Pass band), 不能通过的则为阻带 (Stop band), 通带与到阻带的交界频率即为截止频率。通带是低于 f_{-3dB} 的频率范围 (从直流到 f_{-3dB}), 理想的滤波器通带内不应该有衰减, 但实际上, 通带内的信号也有小幅度的衰减, 在信号频率达 f_{-3dB} 时, 幅度衰减到-3dB。阻带是高于 f_{-3dB} 的频率范围, 在阻带内信号幅度逐渐衰减至无穷小。

(3) 衰减斜率

衰减斜率 (Attenuation slope) 是指滤波器对信号幅度的削减能力。从通带过渡到阻带时 (在 f_{-3dB} 附近), 幅度衰减的斜率越大越好。一般要求滤波器对通带内信号的衰减要小, 而对阻带内的衰减要大, 这样才能起到滤波作用而较小影响生物信号。

(4) 八倍频和十倍频

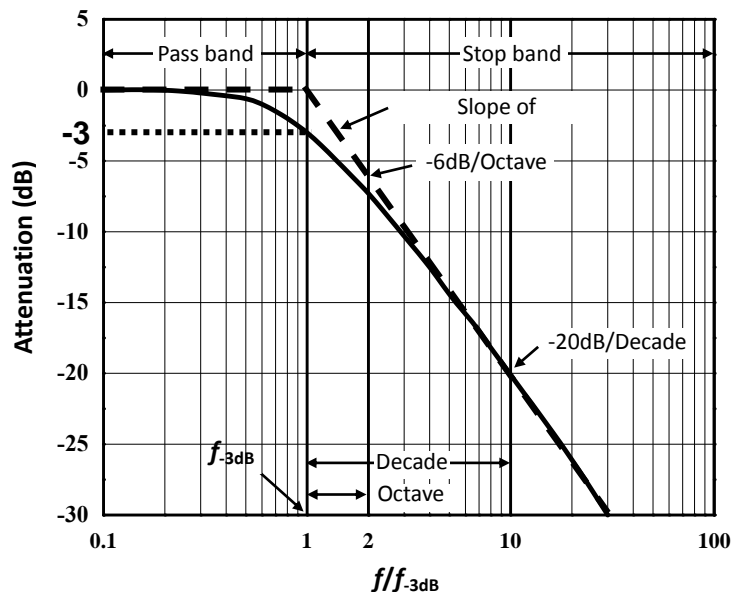
它们是指一个信号频率段, 在这个频率内, 八倍频 (Octave) 的最高频率为最低频率的两倍, 而十倍频 (Decade) 的最高频率为最低频率的 10 倍。通常用它们来反映滤波器对阻带内信号的衰减斜率大小, 如斜率为-80dB/Decade (也可不用“-”表示), 表示滤波器对在每个十倍频内的信号进行衰减的幅度为 80dB。 f/f_{-3dB} 从 1 到 2 以及 10 到 20 的范围均为八倍频, 而从 1 到 10、10 到 100 均为十倍频。理论上单极低通滤波器的衰减斜率为-6dB/Octave 或-20dB/Decade。

(5) 极数

如果滤波器中只有一个电阻与电容, 则称该滤波器为单极滤波器 (Single-pole filter)。滤波器电路中若使用多个电容, 则为多极 (如4极和8极) 滤波器。与单极滤波器相比, 多级滤波器的极越高, 衰减斜率越大。一般情况下, 对绝大多数生物信号多采用4极滤波器。

(6) 时域分析和频域分析

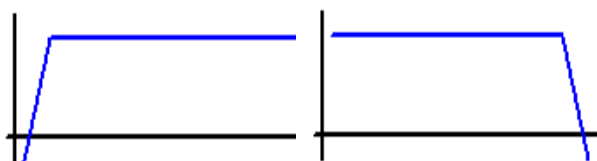
生物信号采集的数据通常纵坐标为电压或电流的幅度, 横坐标为时间, 反映生物信号随时间变化的情况。对这种数据进行的分析称为时域分析 (Time domain analysis)。此外, 若纵坐标为信号电压、电流或功率在某一频率上的强度, 横坐标为信号的频率, 反映信号的频率成分。对这种数据进行的分析称为频域分析 (Frequency domain analysis), 适合于分析噪声的成分。在进行时域分析与频域分析时, 对滤波器的选择是不同的。



2. 滤波器的基本类型

(1) 按滤波频率分类

● **低通滤波器 (Low-pass filter):** 通过低频信号, 去除滤波器 f_{3dB} 以上的高频信号。由于生物信号为低频信号, 因而低通滤波是最常用的一种滤波, 常用于降低离子通道信号的背景高频噪声, 适用于膜片钳单通道与全细胞记录, 一般 f_{3dB} 选1-10kHz, 表明对高于该频率的信号进行滤波。



● **高通滤波器 (High-pass filter):** 又称交流耦合, 通过高频信号, 去除滤波器 f_{3dB} 以下的低频信号, 其幅度响应曲线与低通滤波器的成对称的镜像。最常见的是在神经元上进行细胞内记录时使用高通滤波器, 它可降低膜电位的低频振荡对突触电流的干扰。



● **带阻滤波器 (Band-reject filter或Notch filter):** 去除信号中某一或某一段频率的信号成分, 相当于低通与高通滤波的合并, 非常适合于去除50Hz交流干扰。

● **带通滤波器 (Band-pass filter):** 仅对信号中某一或某一段频率的信号成分进行保留, 其它成分均被衰减, 相当于低通滤波与高通滤波的交叉。用于欲记录的信号频率较为单一和固定时对其它频率的噪声进行滤波。在设定时注意高通滤波的 f_{3dB} 不能高于低通滤波的 f_{3dB} 。

(2) 按处理信号的形式分类

● **模拟滤波器 (Analog filter):** 对模拟信号进行滤波。按照采用的电子元件不同又分为: 无源滤波器 (由电阻、电容和电感组成滤波电路, 又分为RC滤波器与LC滤波器)、有源滤波器 (由运算放大器、电阻和电容组成滤波电路)、开关电容滤波器 (计时数据采集系统)。三种滤波器各有优缺点, 目前较多使用的是有源滤波器。

● **数码滤波器 (Digital filter):** 对数字信号进行滤波, 为采样软件 (如Clampex) 和分析软件 (如Clampfit) 中的滤波转换函数, 包含一系列的数学计算过程, 对信号采集时以及采集后的文件数据信号进行滤波。

(3) 按滤波函数分类

滤波器可利用很多种函数进行滤波。有源滤波器根据采用的函数不同可以有Butterworth、Bessel、Chebyshev、RC和Elliptic滤波器等, 它们都可以执行低通、高通、带阻和带通滤波的功能。此外, 还有一些专门的函数用于数码滤波器, 如Gaussian滤波器、Boxcar smoothing滤波器等。

● **Butterworth滤波器:** 优点是低频的通带内很平坦, 衰减小且没有波动, 阻带内衰减斜率大。缺点是超射明显, 故不适合对单通道电流、动作电位、突触电位等进行滤波。可用于分析噪声频谱。

● **Bessel滤波器:** 虽然其阻带内的衰减斜率没有Butterworth滤波器的陡直, 但其最大优点是具有全频滞后, 其所有频率内的信号经滤波后都表现出平滑的反应, 无波动, 对瞬变信号几乎没有超射 (<1%) 和振铃, 信号失真小, 所以适合于对单通道电流等瞬变信号进行滤波。Bessel滤波最适合在时域分析 (绝大多数膜片钳实验数据的分析为时域分析) 中使用。

3. 采样定理和过频采样

采样频率 (f_s) 至少要为滤波频率 (f_{3dB}) 率的 2 倍, 这样才不至于使信号失真, 这一原理叫做尼奎斯特采样定理。例如, 如果设定滤波器的 f_{3dB} 为 5kHz, 那么 f_s 至少要为 10kHz。因此, 滤波器最大 f_{3dB} 不能超过 f_s 的一半, 即 $f_{3dB}/f_s \leq 0.5$, 如果 $f_{3dB}/f_s > 0.5$, 将会产生混叠噪声。

在具体实验中, 通常我们会将采样频率 f_s 设定为滤波频率 f_{3dB} 的 5-10 倍, 即过频采样 (Over sampling)。例如, 若滤波频率 f_{3dB} 为 2kHz, 则采样频率 f_s 应为 10kHz 到 20kHz, 对应的采样点间隔为 100 和 50 μ s。过频采样在时域分析中最常用到, 可使信号失真最小。

4. 交流耦合与直流耦合

交流耦合（AC Coupling）电路是高通滤波器，主要用来持续地去除信号中的直流成分，防止信号的直流漂移。一般具有交流耦合的膜片钳放大器，其交流耦合功能都是单极滤波器，利用电容“通交流、隔直流”的特性来完成滤掉直流的目的。注意，在采用交流耦合去除信号中直流成分时，随着耦合频率 f_{-3dB} 的增大，所记录的生物信号会受到影响。因此，在记录一些非常慢的信号时，交流耦合引起的信号失真较大，此时可采用直流耦合。

直流耦合（DC Coupling）电路也用来去除信号中的直流成分。它是先将在没有信号出现的基线部位测量的直流漂移值记录下来，然后在记录的信号数据中持续地将其去除。一些膜片钳实验仪器，如 Axopatch 1D、MultiClamp 700B 膜片钳放大器，具有一种叫做“Autozero”的功能，可对输出信号进行基线归零，它利用的就是直流耦合功能。

膜片钳技术基本记录方法

一、膜片钳技术的基本记录模式

膜片钳技术经典的记录模式见下页图，主要有4种。

1. 细胞贴附式记录模式 (Cell-attached recording或On cell recording)

〈优点〉

- (1) 对细胞的损伤最小，离子通道基本处于细胞的生理状态下；
- (2) 配体门控性与电压门控性离子通道均可在正常离子环境中研究；
- (3) 可确定特定离子通道是否由细胞内可扩散的第二信使门控。被电极钳住的膜片不与浴液接触，若浴液中加入受体激动剂能引起膜片上离子通道活性改变，则说明一些细胞内信使参与了通道的门控；
- (4) 由于不需要打破细胞膜， Ca^{2+} 离子等通道电流不会发生Rundown现象。

〈缺点〉

- (1) 对工作台的机械稳定性要求较高，维持长时间记录难度较大；
- (2) 无法测知细胞静息膜电位的大小；
- (3) 更换内外液比较困难。

2. 内面向外记录模式 (Inside-out recording)

〈优点〉便于更换细胞内液，适合于研究离子通道的细胞内成分的效应，尤其适合于研究第二信使介导的离子通道的门控机制。

〈缺点〉在形成该模式过程中，常常在电极尖端获得囊泡而不是单层膜片，往往需要将电极提出液面，短暂暴露在空气中，这样囊泡会破裂而形成单层膜片。

3. 外面向外记录模式 (Outside-out recording)

〈优点〉便于更换细胞外液，常用于研究配体门控性离子通道。

〈缺点〉

- (1) 通道的细胞内环境丢失，高质量稳定的记录比较难于获得。
- (2) 为获得该记录模式，细胞一般需要贴附（紧密或轻附）在记录浴槽底部，因为漂浮的细胞很难将膜片撕下。

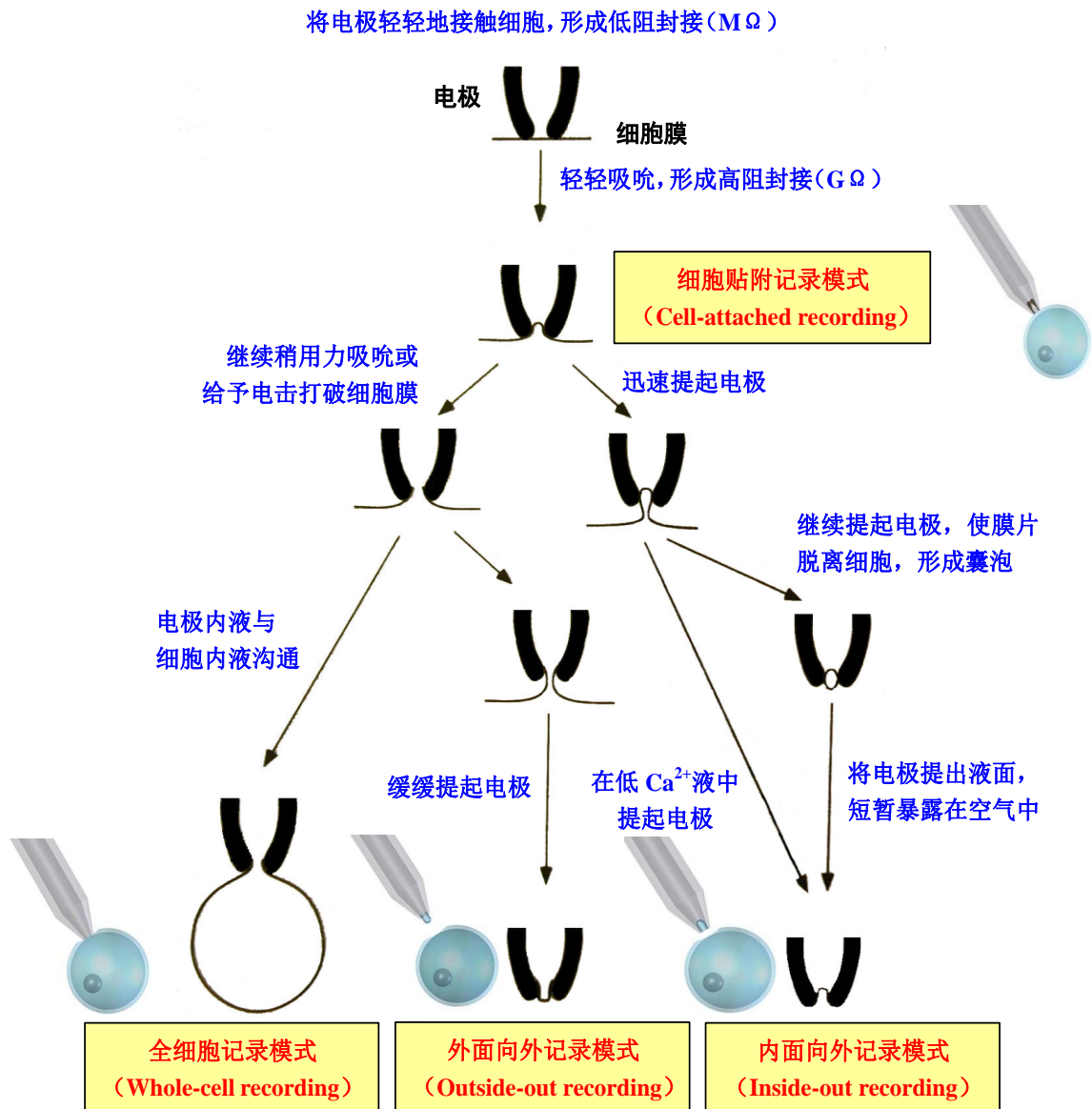
4. 全细胞记录模式 (Whole-cell recording)

〈优点〉

- (1) 便于更换细胞外液，可用于研究电压和配体门控性离子通道（以及泵电流、交换体电流等），适合离子通道药理学研究；
- (2) 可进行细胞内灌注，如灌注药物、信使物质、荧光染料等；
- (3) 可进行细胞内容物的抽吸，如抽取mRNA等；
- (4) 可研究细胞胞吞、胞吐机制。

〈缺点〉

- (1) 对工作台的机械稳定性要求较高，维持长时间记录难度较大；
- (2) 破裂的细胞膜残片易堵塞电极口，导致记录的不稳定；
- (3) 存在Rundown现象；
- (4) 大细胞存在空间钳制问题；
- (5) 存在液接电位的校正问题；
- (6) 存在串联电阻补偿问题。



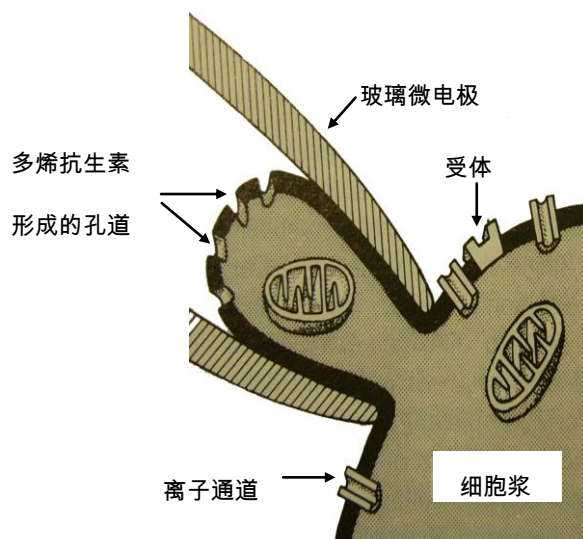
5. 穿孔膜记录模式 (Perforated recording)

该记录模式也比较常用，有时也被认为是经典的记录模式。根据记录方式不同，可将穿孔膜片钳记录技术分为穿孔全细胞记录模式 (Perforated whole-cell recording) 和穿孔囊泡记录模式 (Perforated vesicle recording)。

● 穿孔全细胞记录模式

全细胞记录模式中，由于电极内液与细胞内液相通，细胞内容物被电极内液稀释，甚至被吸到电极内而导致细胞内容物丢失。 Ca^{2+} 通道电流随记录时间逐渐减弱的现象 (Rundown 现象) 就是这种缺陷造成的典型后果。为弥补这一缺陷，可向电极内液中加入 ATP 和一些信号转导必需物质，如 cAMP、GTP、cGMP、一些蛋白激酶等等。但要彻底解决这一问题就要采用穿孔全细胞记录模式。通过多烯抗生素制霉菌素 (Nystatin) 和两性霉素 B (Amphotericin B) 对细胞膜的穿孔作用，在膜上形成一些孔道，这些孔道能允许单价阳离子和 Cl^- 离子通过，而对多价离子 (如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 和分子量大于 200 以上的物质均不能通过。因而在细胞贴附式形成时，电极内液通过这些孔道与细胞内液在电学上是相通的，且不影响细胞内物质的

浓度，保持了细胞功能。实验证明，穿孔膜片钳法能有效地防止 Rundown 现象的产生。



穿孔全细胞记录模式的优点：

- (1) 不会使细胞内容物稀释或丢失，明显减弱离子通道电流的 Rundown 现象，对信号转导和离子通道调节机制的研究得以实现。
- (2) 对细胞损伤小、记录持续时间长。另外，因为不需要打破细胞膜，防止了因吸吮或电击破膜可能对封接产生的破坏，因此封接不容易丧失。
- (3) 由于细胞内二价离子不能通透孔道，因而在全细胞记录电流的同时，用荧光技术进行细胞内钙的测定将不会受到影响。
- (4) 与全细胞记录模式相比，穿孔记录模式的串联电阻 R_s 非常稳定，补偿后准确性很好。

● 穿孔囊泡记录模式

在穿孔囊泡记录模式中，由于在形成外面向外记录模式时，电极内囊泡的膜片不发生破裂，靠穿孔物质形成的孔道与囊泡内沟通，避免了囊泡内液大部分物质的丢失。囊泡相当于一个小细胞，囊泡内含有对离子通道具有调节作用的信号转导物质系统。囊泡朝浴液的一侧膜片上含有离子通道与受体，可被记录到单通道电流。

二、全细胞记录

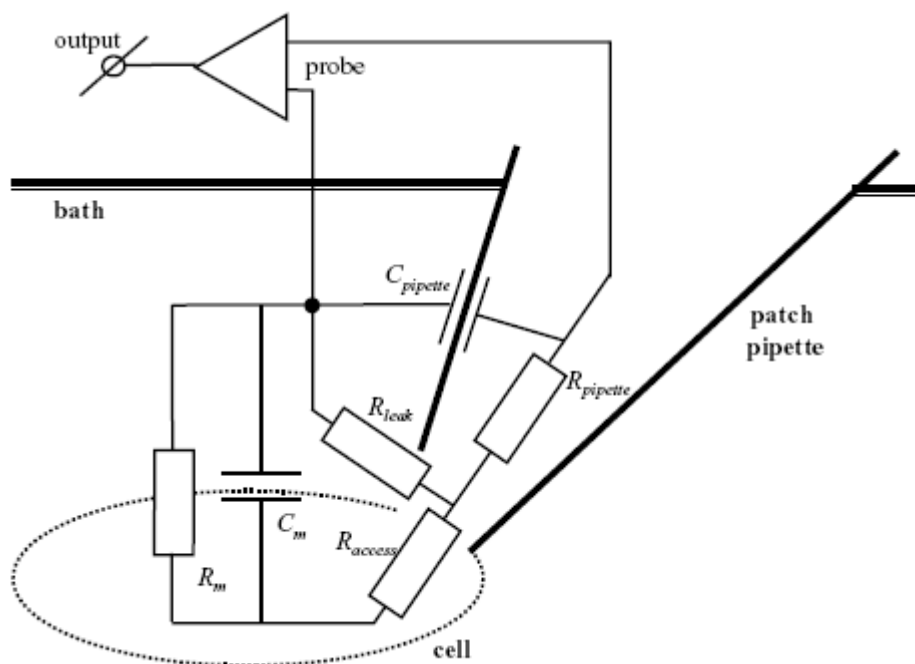
全细胞记录 (Whole-cell recording) 是目前膜片钳技术中最常规的实验方法，其应用范围非常广泛，如各种离子通道的动力学研究、细胞内灌注 (灌注药物、信使物质、荧光染料等)、细胞内容物的抽吸 (抽取细胞 mRNA 等)、细胞胞吞、胞吐机制研究等等。

1. 全细胞记录模式等效电路

全细胞记录模式需要打破细胞膜，使电极内液与细胞内液沟通，并在电学上导通。电路上的电阻有：电极电阻 (R_{pipette})，接入电阻 (R_{access})，膜电阻 (R_m)。前两者加在一起成为串联电阻 (R_s)， R_m 是最大的电阻，要观察的电流就是流经整个细胞膜 R_m 的全细胞离子通道电流。

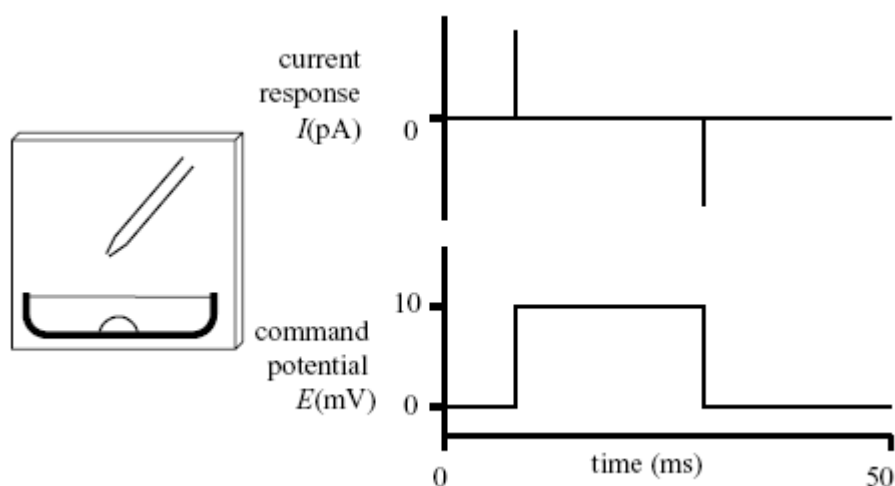
封接电阻即漏电阻 (R_{leak}) 要足够大 ($1G\Omega$ 及以上)，这样漏电流就不会大。

下页图中， C_{pipette} 是电极电容， C_m 是膜电容。

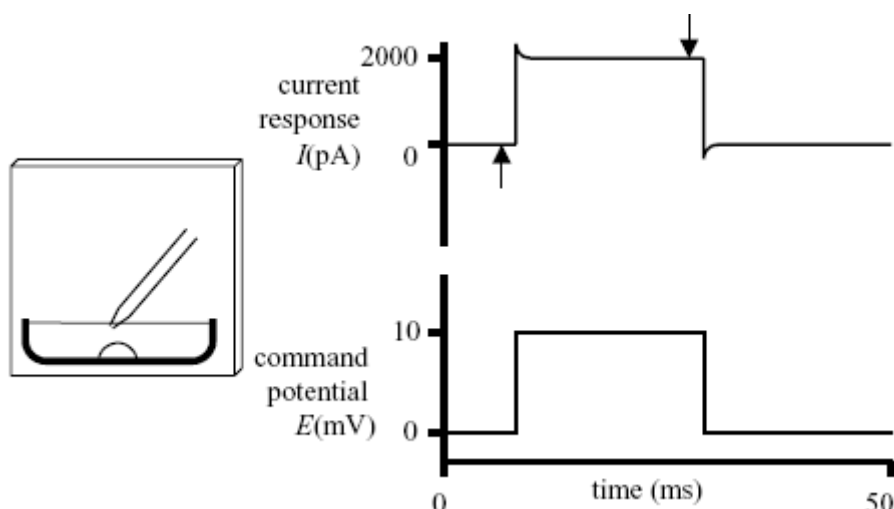


2. 全细胞记录模式基本操作过程

(1) 给电极内施加一个轻微的正压（10 cm水柱，过大会吹跑细胞），轻轻地将玻璃微电极插入浴液。给予正压的目的是防止电极尖端被浴液中的污染物污染，这些污染物通常漂浮在浴液表面，所以正压一定要在电极入浴液前给予。通过软件/膜片钳放大器（目前都是通过膜片钳数据采集软件，如pClamp）给细胞一个去极化（或超极化）方波刺激，作为测试脉冲，监视整个封接、破膜过程中电流的变化。在电极入浴液前，电路中的电阻无穷大，通过电极的电流为0，脉冲起始与结尾处的短刺是探头内的漂浮电容引起的充放电反应。



(2) 通过微操纵器将电极插入浴液，并逐渐接近细胞。此时可看到电流方波，可计算出电极电阻（一般软件会自动计算出）。电极电阻越大，电流方波幅度就越小。下图显示，如果要自己计算电极电阻，在测量电流幅度时一定要避开电容反应，要从箭头处测量。经测量与计算，电极电阻为5 MΩ（10 mV/2 nA=5 MΩ）。



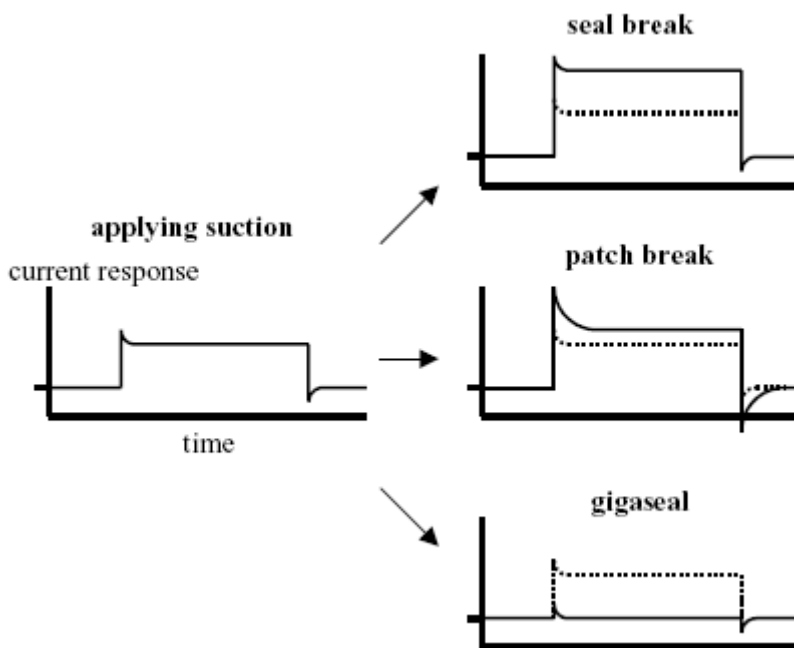
可能出现的情况:

- 无电流方波出现: 参比电极没接。
- 电流方波过大: 电极尖端断了。
- 电流方波与电极未入液前一样: 电极内液未接触到银丝或者电极尖端内有气泡。
- 出现电流方波, 但随即又消失: 电极内有污染物并被正压吹至电极尖端。

(3) 通过微操纵器将电极接近目标细胞, 当接触到细胞时, 因电极尖端阻力增加, 电流方波幅度将会降低。撤除正压, 方波幅度会进一步降低, 在电极尖端施加小的负压 (通常用嘴吸的力量就够!), 在玻璃电极尖端与膜之间就可形成紧密接触, 即高阻封接 (Gigaohm Seal), 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。此即细胞贴附记录模式。

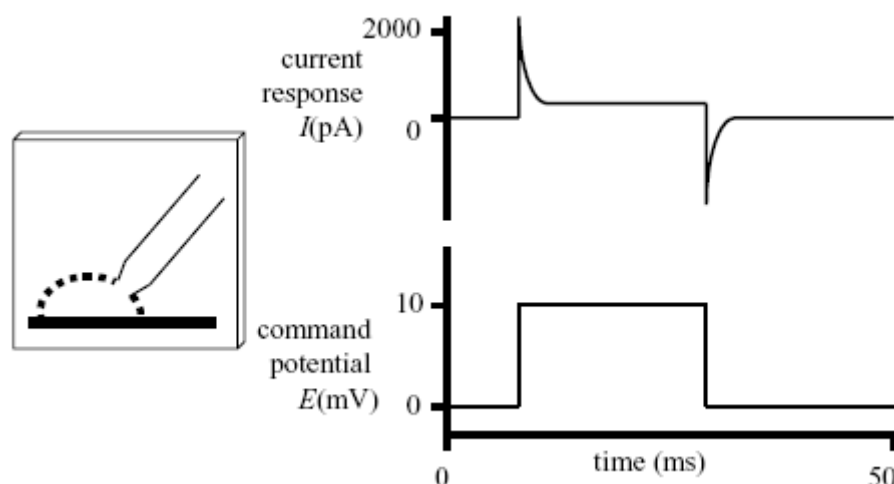
在此过程中, 可能出现如下情况:

- 电流方波幅度增加 (Seal break): 电极尖端吸进了细胞物质, 高阻封接不再有机会了, 此时要更换电极, 重新开始。
- 出现膜电容充放电反应: 电极尖端下的膜片破裂 (Patch break)。需要更换电极重新来!



(4) 打破细胞膜：进一步在电极尖端施加负压或用电击（ZAP）的方法，打破细胞膜破，出现大的膜电容的充放电反应（瞬时电流）以及小的膜的稳态被动反应电流。

负压的方法：需要试验中摸索负压施加方式与大小。对于开口大的电极（低于2 M Ω ），因其覆盖的膜片大，只需要很小的负压破膜；对于开口小的电极，需要给予大的负压脉冲或持续增加负压（破膜后即刻停止负压）；对于更小开口的电极（如大于7 M Ω ），一般只能采用电击的方法破膜。一般的膜片钳放大器都具有破膜用的ZAP功能。



3. 全细胞记录模式注意事项

全细胞记录过程中，要注意如下几个问题：

(1) 封接问题

封接的好坏对于已经能熟练操作的技术人员来说，主要取决于标本细胞。

(2) 串联电阻补偿问题

在全细胞记录下，由于有串联电阻（ R_s ）的存在，软件输出的钳制电压命令并不能完全施加给细胞。同时 R_s 还带来其它一些问题，因此必须要尽量减小 R_s （一般要小于20 M Ω ），并对其进行补偿。

(3) 电极电容及细胞膜电容补偿问题

电容补偿问题是全细胞记录中存在的一个重要问题。全细胞记录中经常要采用电压钳方法改变细胞膜电位，这会引起电极电容与膜电容的充放电，这些充放电现象会影响通道电流的观察，所以应尽量减小电极电容与膜电容，同时要对其进行补偿。

(4) 漏电流问题

在全细胞记录中，如果要改变细胞膜电位（这是经常需要的），就会存在膜漏电流问题。实际上不仅仅是全细胞记录，只要改变膜两侧的电位差，单通道记录也一样存在膜（片）漏电流问题。膜漏电流的存在会影响离子通道电流的记录，因此要予以去除。

(5) 液接电位的校正问题

一般在进行细胞封接前都要对液接电位进行调零。然而存在的问题是，当形成全细胞记录后，细胞内液与电极内液相通，液接电位消失，而先前对液接电位调零时所给予电极尖端的电压却一直存在。如果这一电压较大，则需要进行液接电位的校正。

(6) 空间钳位问题

在全细胞记录模式下，软件输出的命令电压不等于细胞跨膜电位的情况还有另外一个原因，这就是空间钳位问题。全细胞记录适合于直径在5-20 μm 的细胞，直径小于5 μm 的细胞不易进行封接，而且因破掉的膜面积较大，所记录的很难认为是全细胞电流；而直径大于20 μm 的细胞则存在空间钳位问题。另外，对于神经元和其它有突起的细胞，钳制电位是不可能达到突起部位的。

(7) 细胞内容物被电极内液稀释问题

稀释的速度取决于串联电阻的大小，串联电阻越大，稀释的速度越小，一般小于 $10\text{M}\Omega$ 的串联电阻，细胞内液在几分钟之内被稀释。形成高阻封接后，若不及时撤去封接时给予的负压，细胞内液被稀释的速度更快。细胞内液被稀释可使细胞内容物丢失，细胞功能因而发生改变，这方面典型的例子就是全细胞电流幅度随记录时间而发生的Rundown现象。而另一方面，人们利用全细胞记录的这一特点，可向细胞内灌注一些物质，用于分析细胞内信息传递系统的功能；也可通过电极向细胞内注射染料进行细胞示踪。另外还可通过细胞内容物的抽吸提取mRNA，然后进行PCR扩增，可用于分析细胞的基因表达。

(8) 电极内液的成分问题

根据实验目的不同，电极内液的成分也不同，但基本原则是：

(1) 要尽可能与细胞内液在离子强度、渗透压、pH值上保持一致；

(2) 要求高 K^+ 、低 Na^+ （或无 Na^+ ）；

(3) 适当补充能量物质（如MgATP）。一般要求电极内液与细胞内液等渗（ 300mOsm 左右），但许多人使用低渗（低10%）内液，认为可改善全细胞记录的稳定性，从而获得较长时间的记录。典型的全细胞记录（以及外面向外记录模式）的电极内液成分为（mM）：KCl 150，NaCl 5，Hepes 10，EGTA 10， CaCl_2 1.0， MgCl_2 1.0。EGTA（可用BAPTA代替）与 Ca^{2+} 的结合使电极内游离 Ca^{2+} 浓度接近生理情况，但注意，在游离 Ca^{2+} 浓度低于 100 nM 时，细胞的一些反应可能观察不到。Hepes用于调节pH，使电极内液保持在7.2-7.4左右。

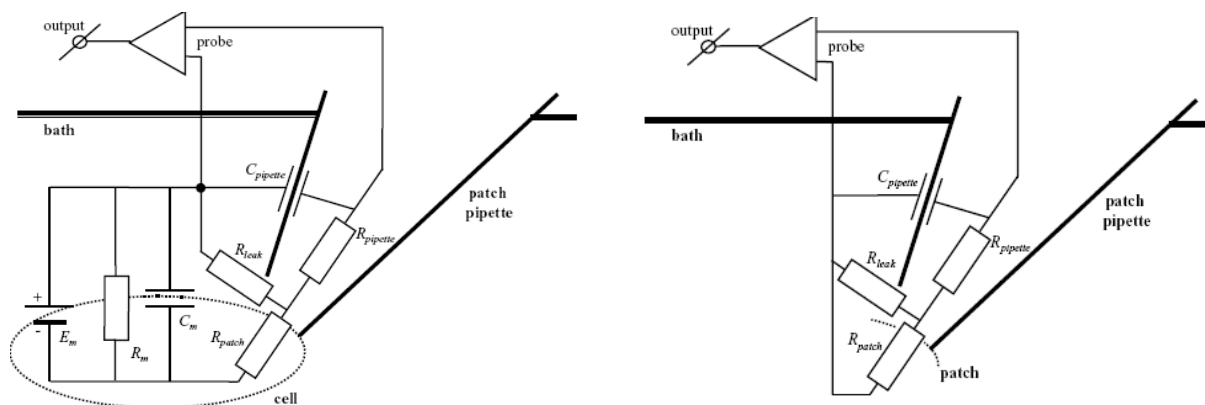
(4) 此外，根据实验目的，可对电极内液成分进行改变，如可用 Cs^+ 离子代替 K^+ 离子、用葡萄糖酸根代替 Cl^- 离子等；还可在电极内液中加入一些通道阻断剂、信使类物质等。

二、单通道记录

1. 三种单通道记录模式的等效电路

单通道记录技术包括如下三种基本记录模式：

- 细胞贴附式（Cell-attached recording 或 On-cell recording）
- 内面向外式（Inside-out recording）
- 外面向外式（Outside-out recording）



细胞贴附式的等效电路见左上图，而其他两种模式的等效电路相同（右上图）。

(1) 在细胞贴附式模式中，最重要的电阻为膜片电阻（ R_{patch} ），我们要记录的通道电流要从该电阻上观察。封接电阻（ R_{leak} ）要求比全细胞模式还要高，为了能低噪声记录到膜片上离子通道的电流， R_{leak} 还要比探头反馈电阻要大。一般说来， R_{leak} 至少要达到 $10\text{ G}\Omega$ 。

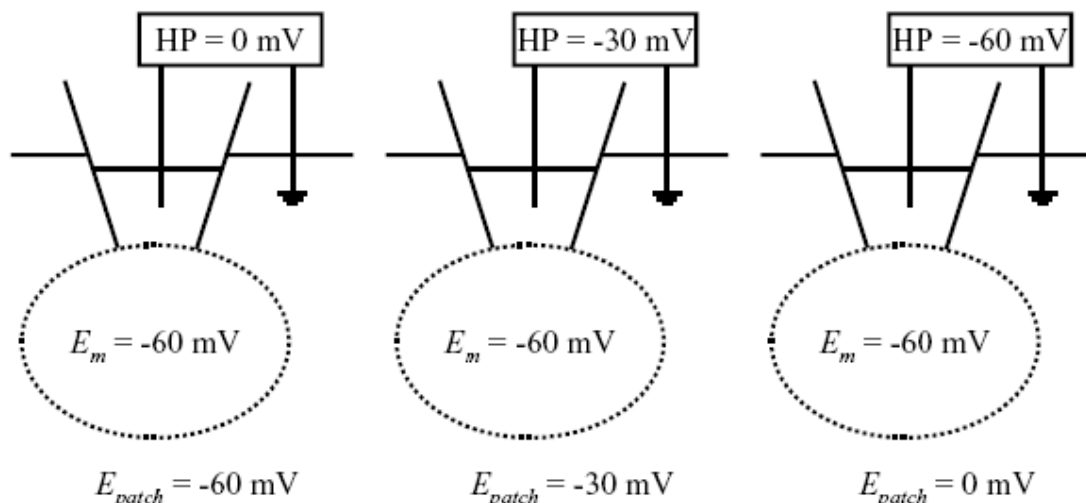
电路中的电容有电极电容（ C_{pipette} ）、膜电容（ C_m ）和膜片电容。膜片电容很小，可忽略不计。膜电容

C_m 在此模式下因膜电阻 R_m 比膜片电阻 (R_{patch}) 小得多, 而被短路。电极电容 $C_{pipette}$ 也很小但需要补偿。

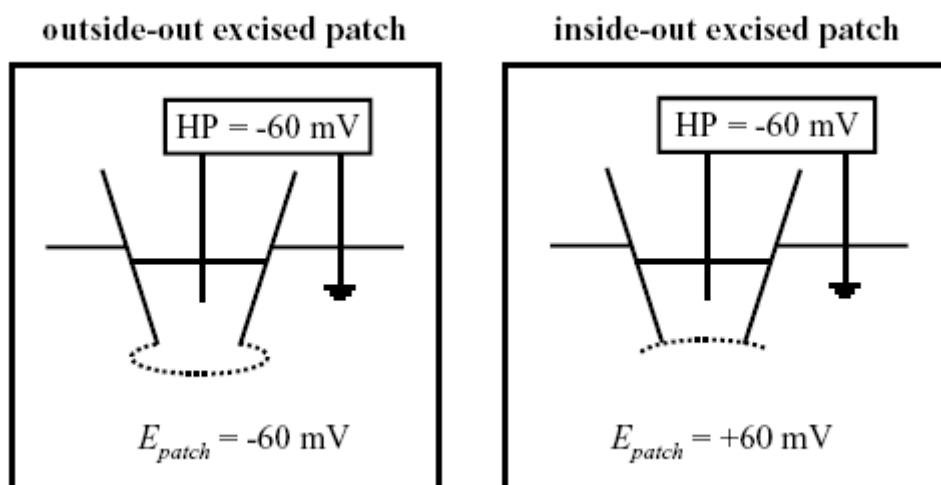
细胞贴附式存在的一个问题是, 不能直接知道膜电位是多少。不过我们可以通过如下办法间接获得膜电位的数值:

- 用细胞内记录或全细胞记录获得平均膜电位。
- 实验结束时, 打破细胞膜可直接测量出膜电位。
- 通过该通道的 I-V 曲线, 再加上其他单通道的数据, 可以获得膜电位的信息。

下图反映了为使细胞膜钳制电位达到 -60 mV (假设膜静息膜电位为 -60 mV), 需要施加给膜片上钳制命令的大小。



(2) 在内面向外和外面向外记录模式 (游离膜片记录模式), 同细胞贴附式一样, 最重要的电阻为膜片电阻 R_{patch} , 通道电流要从该电阻上观察, 封接电阻 R_{leak} 同样要求很高。在缺少细胞的情况下, 外面向外记录模式中, 施加的钳制电位与全细胞记录模式一样, 而在内面向外记录模式, 情况恰好相反。



2. 单通道电导

电导 (Conductance, G) 为电阻 (R) 的倒数。根据欧姆定律:

$$G = I / V$$

式中, 电导 G 的单位是西门子 (Siemens, S)。 I 为通过电阻的电流 (A), V 为电阻两端的电压差 (V)。

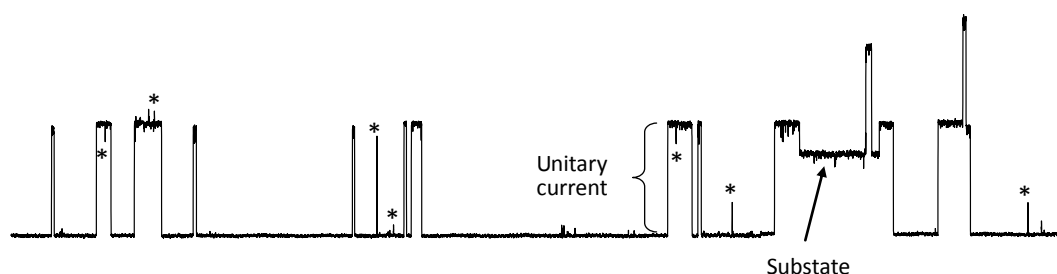
单通道电导是指通道完全开放 (Full opening) 时, 流经单通道的电流 i 与通道两侧电压差 (钳制电位与通道反转电位的差值 ΔV) 的比值, 即:

$$G = i / \Delta V$$

一般的通道电导多为 pS 级, 少数通道电导较大, 可达 nS 级 ($1,000 pS$ ($1 nS$) = $1 pA/mV$)。

单通道电导是单通道数据分析中的重要参数, 不同类型的通道以及不同的通道亚单位构成, 其单通道电导都不同。就某一种通道而言, 单通道电流是随 ΔV 变化的, 但单通道电导则非常恒定。通过单通道的电压-电流关系曲线 (I - V 曲线) 可求得单通道的斜率电导, 更为准确的测量方法是根据单通道开放的电流幅度符合高斯分布的特点, 拟合出平均电流幅度, 最后求出单通道电导。

通道的开放还常常表现为亚开放状态 (Substate), 指电流幅度比单通道电流幅度小的开放, 其电导称为亚电导 (Subconductance)。在单通道记录中时常出现超过一个电导水平的情况, 一个很可能的原因是所记录膜片的上含有几种通道, 或通道存在异质性 (多在通道持续开放时出现), 再一个原因就是通道本身存在亚开放状态。一些通道很少有亚开放状态, 而另一些通道则存在不止一个开放状态, 例如谷氨酸 NMDA 受体总是表现出两个开放状态, 一个是电导为 $50 pS$ 的主要开放状态, 另一个是短暂出现的电导为 $40 pS$ 的亚开放状态。



3. 单通道记录模式注意事项

(1) 单通道电流幅度多数都很小 (有的甚至仅为 1 个或不到 1 个 pA), 易埋在噪声中不易区分, 所以记录时需要尽可能地减小背景噪声, 这是比全细胞记录要求更高的地方。

(2) 如果通道的开放需要给予电压脉冲, 则要对电压脉冲引起的电容瞬变值进行补偿, 以防止过大的电容瞬变值引起放大器或 A/D 转换器输入饱和。

(3) 注意对膜片漏电流进行去除, 采样中自动执行这一功能的方法有 P/N 漏减方法。对于持续给予膜钳制电位的情况, 则不存在这个问题。

(4) 不同于全细胞记录模式, 为获得含有足够信息量的单通道开放事件, 单通道记录需要的时间往往较长, 所以对基线的稳定性要求较高。对于细胞贴附式, 产生于工作台的机械震动、细胞与电极之间的相互移动, 可使封接电阻下降, 基线因而发生漂移。因此, 在实验前要求工作台的防震性能要好, 显微镜载物台与微操纵器之间不能有相对运动。

(5) 如果所采用的记录浴槽容量较小, 长时间记录会引起明显的溶液蒸发, 不仅导致记录溶液浓度变高, 同时液面的下降也产生基线漂移问题。解决的办法是在液面上覆盖一层硅油, 可防止溶液蒸发。如果采用灌流浴槽的方法则不存在这个问题。