

东乐自然基因生命科学公司

## 第十届膜片钳技术培训班讲义

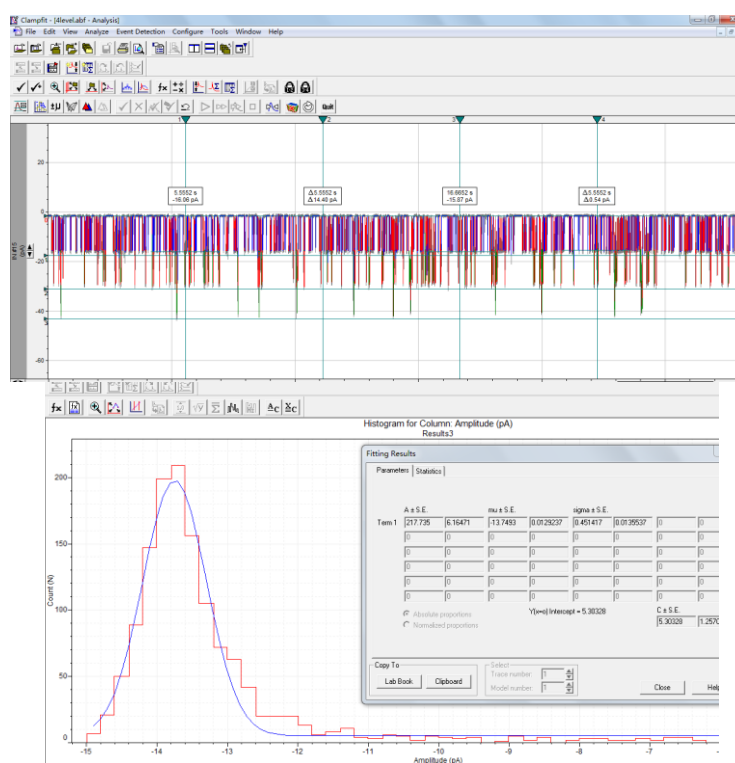
2014 年 4 月 23-25 日 杭州



# 东乐自然基因生命科学公司

## 第十届膜片钳技术培训班讲义

(膜片钳技术高级培训班)



2014 年 4 月 23-25 日 杭州

## 前 言

继 2012 年 11 月广州中山大学初级培训班和 2013 年 5 月合肥中国科学技术大学中级培训班之后，本次在杭州浙江大学举办的为该系列培训班中的高级培训班，也是东乐公司举办的第十届膜片钳技术培训班。自 2006 年的第一届到现在的第十届，我已主讲了东乐公司的十届膜片钳技术培训班：

- |                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| 第一届（北京大学医学部，2006）  | 第二届（山西医科大学，2007）  |
| 第三届（华中科技大学，2007）   | 第四届（东南大学，2008）    |
| 第五届（成都中医药大学，2008）  | 第六届（哈尔滨医科大学，2009） |
| 第七届（南昌大学，2010）     | 第八届（中山大学，2012）    |
| 第九届（中国科学技术大学，2013） | 第十届（浙江大学，2014）。   |

本次培训班主要讲述膜片钳实验数据的处理、分析、作图与统计，采用的分析软件为 pClamp 软件中的 Clampfit，适合于参加过初、中级两次培训班的学员，以及已经获得了膜片钳实验数据、需要掌握膜片钳技术实验数据的处理与分析方法的硕士生、博士生以及其他相关科研人员。

根据广大学员的需要，我将在以后的膜片钳培训班授课中，增加一些专题内容，如：（1）膜片钳系统中的漏减功能分析；（2）电流钳实验方法与动作电位分析；（3）脑片膜片钳技术方法；（4）穿孔膜片钳技术方法；（5）膜片钳实验中的给药方法；等等。此外，在以后的其他细胞电生理技术培训的授课中，我将陆续增设：（1）在体脑诱发电位记录技术（LTP/LTD、CSD 记录技术）；（2）离体脑片诱发电位记录技术（LTP/LTD、PPF/PPD 记录技术）；（3）卵母细胞双电极电压钳技术；（4）脂质体-压力钳技术；等等内容。

通过本系列膜片钳技术培训班的学习，广大学员应该能对膜片钳技术有一个较为系统的掌握，能够独立完成膜片钳实验的设计，掌握基本的实验操作方法与步骤，学会基本的膜片钳数据处理、分析、作图和统计方法。

欢迎大家对以上初、中、高三次培训班的授课以及三本膜片钳技术讲义的内容，提出您的宝贵意见与建议（E-mail: liu\_zw@126.com；WeChat/Mobile: 18600794266），也欢迎大家就各自实验中出现的问题与我共同探讨！

最后，祝大家学有所获，回到各自实验室后能顺利开展实验，多获结果，多发好文章！

刘振伟

2014 年 4 月 16 日于北京

# 目 录

膜片钳实验数据的处理 .....	(4)
一、基线的调零.....	(4)
二、坏点的去除.....	(6)
三、滤波.....	(6)
四、数据文件内部/之间的数学运算 .....	(9)
全细胞记录数据的分析 .....	(11)
一、离子通道的激活曲线 (Activation curve) .....	(11)
二、离子通道的 I-V 曲线 (Current-voltage curve) .....	(13)
三、离子通道的衰减 (Decay) .....	(15)
四、离子通道的失活曲线 (Inactivation curve) .....	(16)
五、量效曲线 (Dose-effect curve/Dose-response curve) .....	(17)
单通道记录数据的分析 .....	(23)
一、单通道电导的测算 .....	(23)
二、单通道开放概率的分析 .....	(26)
三、多通道开放概率的分析 .....	(30)
四、单通道 I-V 曲线 .....	(31)
五、单通道开放时间分布的直方图 .....	(33)
突触自发活动数据的分析 .....	(35)
一、突触自发活动的特点 .....	(35)
二、突触电流的检测 .....	(36)
三、突触电流的分析 .....	(39)

# 膜片钳实验数据的处理

在对采集的膜片钳实验数据进行分析、作图、列表和统计前，需要对这些数据进行基线调零、滤波、坏点去除等等处理。

## 一、基线的调零

基线的调零是准确测量、分析实验数据的基础，全细胞和单通道数据都需要进行基线调零。

### 1. 基线（Baseline）的定义

基线是指离子通道关闭时的电流值，理想状态下应该为零。

**（1）基线的确认：**全细胞记录时，通道开放的基线较易确认，但在单通道记录的数据中，由于通道的开放仅表现为矩形波，有时当单通道的开放时间较长、所记录的时间较短时，基线的位置往往难以确定。此时，要首先确定通道电流的上下方向，如果通道开放时电流的方向向上，则记录的数据中最负向的数据是基线位置（图1），反之亦然。当同时开放的通道数目较多且长时间持续开放时，基线的位置就更难确定，这必须在开始记录前明确好基线的零点位置，记录时要先记录一段基线，这样在记录过程中就不会对基线的位置发生混淆。

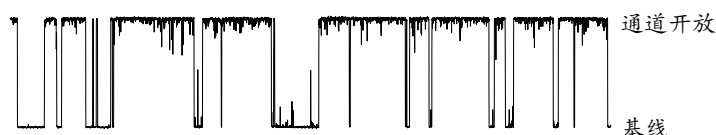


图 1. 单通道电流基线的确认

如果通道开放时电流向上，则基线在最下面的位置

**（2）基线的调零：**由于封接电阻改变、失调电位以及噪声的干扰等因素的存在，基线时常不为零。因此在记录前要对失调电位进行补偿、对噪声等进行控制，同时通过放大器和/或采样软件对基线进行调零。如果采集的数据存在基线不为零的情况，可用下面的Clampfit软件基线调零方法。

### 2. 基线调零方法

打开 Clampfit 菜单 Analyze/Adjust/Baseline 或点击快捷图标按钮 Adjust Baseline，开启 Baseline 对话框（图 2）。

基线调零方法有如下 4 种：

**（1）Subtract mean of（去除均值法）：**通过减去选择区域的平均值达到基线调零的目的，适用于去除直流漂移。例如，对于 Sweep 数据文件，去除 Epoch A 段数据的平均值将获得统一的基线，便于各个 Sweep 之间进行比较（图 3）。

**（2）Subtract slope of（去除斜率法）：**设坐标零点的斜率为 0，通过减去选择区域的斜率（使之成为 0）达到基线调零的目的（图 4）。适合于基线持续向一个方向线性漂移的数据。

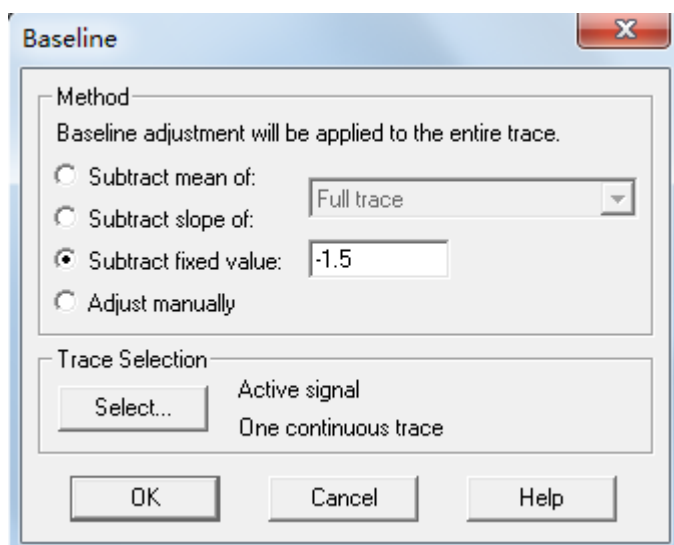


图 2. Baseline 对话框

(3) **Subtract fixed value (去除固定值法)**: 直接输入一个数值, Clampfit 将从所有选择范围的数据点中去除这一数值, 从而达到基线调零的目的。输入的数值为基线偏离零点的数值, 有方向性 (正负之分) (见图 5)。

(4) **Adjust manually (手工调零法)**: 手工调零基线, 可对任意数据点进行任意幅度的基线调零。选择此项后, 在数据图形上将出现一条线, 两端有方块形的“把手 (Handle)”, 在线上任何地方点击鼠标左键即可增加把手的数目。根据采样图形偏离基线的情况, 将把手用鼠标左键向任意方向拖至任意偏离 0 基线的幅度, 其与 0 点的距离即为要减去的幅度值。在插入框 Manual Baseline 中点击“OK”, 即完成基线调零 (图 6)。该方法适合于调节单通道电流的基线漂移或者基线漂移无规律的数据, 其调节效果非常好。

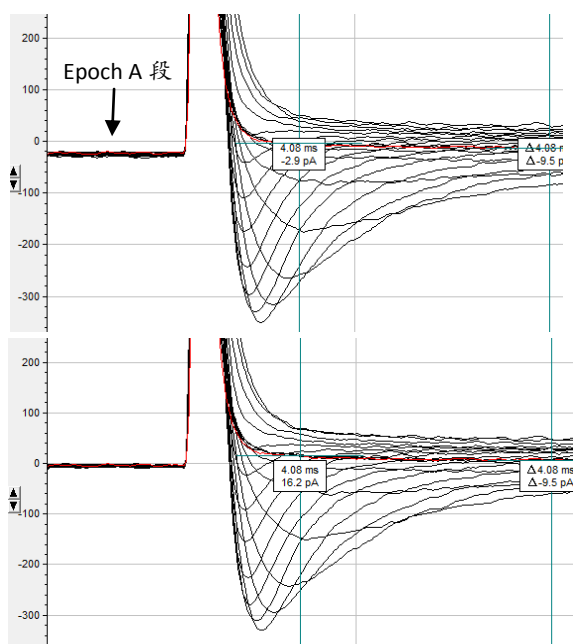


图 3. Clampfit 基线调零功能——去除均值法

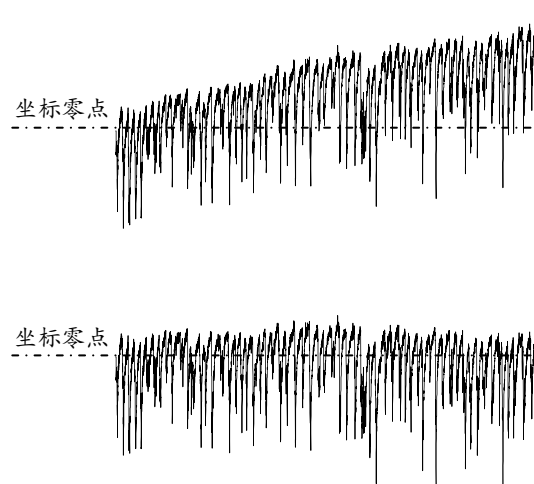


图 4. Clampfit 基线调零功能——去除斜率法

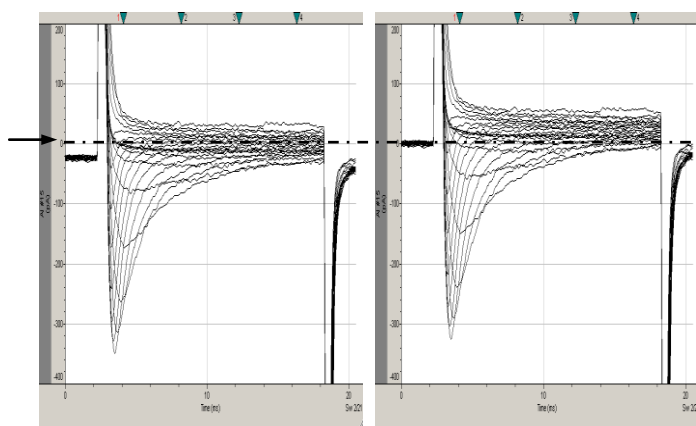


图 5. Clampfit 基线调零功能——去除固定值法

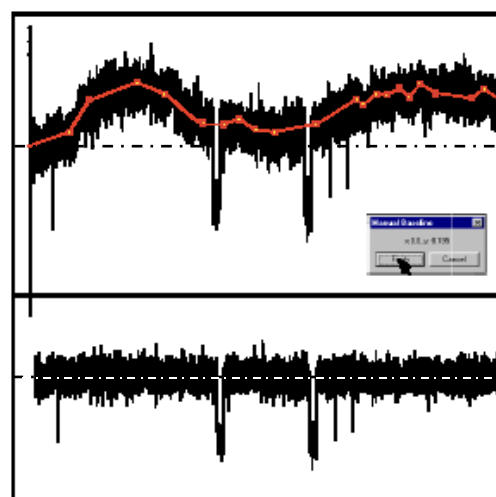


图 6. Clampfit 基线调零功能——手工调零法



### 3. 基线调零的注意事项

(1) 有些测量只要求得到相对值(如电流幅度的变化值), 可以不需要将基线调零。但多数情况是需要基线调零的, 所以建议大家都要进行基线调零。

(2) 对于基线变动复杂的数据, 基线调零可能会用到上述的几种方法。

(3) 对于某些基线变动, Clampfit中的基线调零方法可能也无法准确调零。因此建议最好在采集数据时就设法调整好基线。

## 二、坏点的去除

坏点(Bad point)是指数据中的一些偶发的一过性高频噪声、刺激伪迹、电容瞬变电流等不需要的假象信号。例如, 打开电源开关、冰箱/离心机等电器工作时, 都可能会产生瞬时脉冲干扰(Glitch), 并被记录到数据中。

这些坏点可在分析数据前去除, 方法是: 打开Clampfit菜单Analyze/Force values, 在出现的Force Values窗口(图7)中确定欲去除坏点的范围(如Cursor 1和2之间)、Trace条数、代替坏点的取值等。为使记录的电流不至于失真, 应选择性地对某一或某些Trace来去除假象。此项操作应在滤波前进行。代替坏点的取值有如下几项选择:

- (1) Data value at cursor 1: Cursor 1的数值。
- (2) Mean between cursor 1..2: Cursor 1-2之间均值。
- (3) Mean between cursor 3..4: Cursor 3-4之间均值。
- (4) Straight-line fit between cursor 1..2: Cursor 1-2之间的直线拟合值。
- (5) Fixed value(pA/mV): 输入一个固定的数值。

注意事项:

(1) 如果坏点太多, 则应该首先在记录前予以去除。例如, 如果Glitch在记录的数据中出现的频率太高, 则不宜用Clampfit来处理, 而应该在记录数据前想办法将Glitch去除。

(2) 一般坏点的持续时间范围很短, 如果出现持续时间较长的坏点, 则不宜通过Clampfit去除, 数据只能废弃。

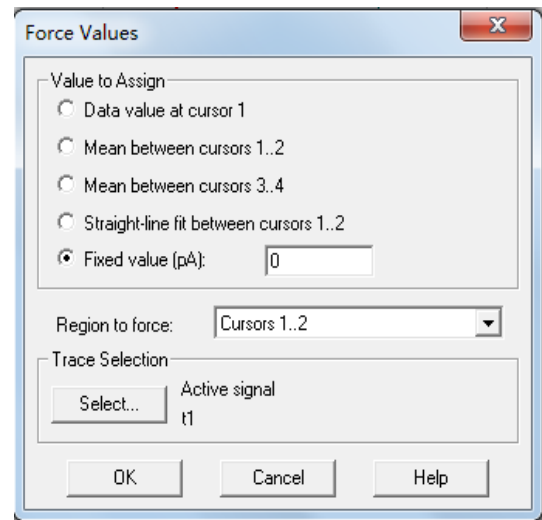


图 7. Clampfit 的 Force Values 窗口

## 三、滤波

打开 Clampfit 菜单 Analyze/Filter, 开启 Filter 对话框(图 8)。框中最上端显示数据的采样频率(Hz)和采样间隔( $\mu$ s)。对话框中的主要内容为 5 类滤波器的设定, 即 Bandpass(带通滤波器)、Highpass(高通滤波器)、Lowpass(低通滤波器)、Notch(带阻滤波器)、Electrical Interference(电干扰滤波器)。

### 1. Highpass

又称交流耦合(AC Coupling), 可削弱低频信号而通过高频信号, 其幅度响应曲线与低通滤波器的曲线成对称的镜像。这里提供了两种类型的高通滤波器: 8 极 Bessel 和单极 RC 滤波器。滤波的频率采用-3dB 截止频率( $f_{-3dB}$ ), Clampfit 根据采样频率和尼奎斯特定理自动计算出  $f_{-3dB}$  范围并显示在该框低部。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。

### 2. Lowpass

低通滤波可削弱高频信号而通过低频信号。这里提供了 7 种类型的低通滤波器。滤波的频率采用  $f_{-3dB}$ , Clampfit 根据采样频率与尼奎斯特定理自动计算出  $f_{-3dB}$  范围并显示在该框低部。低通滤波最常用。

(1) 8-pole Bessel: 无超射 (Overshoot) 和振铃 (Ringing), 具有全频滞后 (Group delay), 数据失真小, 普遍用于时域数据的分析。一般在采集数据时, 放大器或采样软件都有 4-pole Bessel 滤波器。

(2) Boxcar: 纯数码滤波器。我们将当前数据点以及其前后一些数据点的平均值赋予当前数据点, 起到低通滤波的作用。这里  $f_{-3dB}$  被滤波宽度 (即 Smoothing points) 所代替, Smoothing points 值越大, 数据幅度被削减的越大。用于时域数据的分析。注意, Smoothing points 的取值只能为 3-99 中的奇数。

(3) 8-pole Butterworth: 虽然阻带内衰减斜率大, 但其超射和振铃明显。用于频域数据的分析。

(4) 8-pole Chebyshev: 其特点与 Butterworth 滤波器相似, 但超射和振铃更明显, 阻带内衰减斜率更大。用于频域数据的分析。

(5) Gaussian: 同 Boxcar 一样, 为纯数码滤波器, 也是将当前数据点以及其前后一些数据点的平均值赋予当前数据点, 但其采用的是权重平均, 即当前数据点在平均值中所占的比例较大。

(6) RC(8-coincident-pole): 为连续执行 8 次单极 RC 滤波器功能, 但  $f_{-3dB}$  逐极增大。衰减斜率比单极 RC 更大, 用于时域数据的分析。

(7) RC( single-pole): 等同于单极 RC (电阻-电容) 滤波器。与 Bessel 滤波器特点相似, 阻带内衰减斜率更小, 用于时域数据 (如单通道电流等瞬变信号) 的分析。

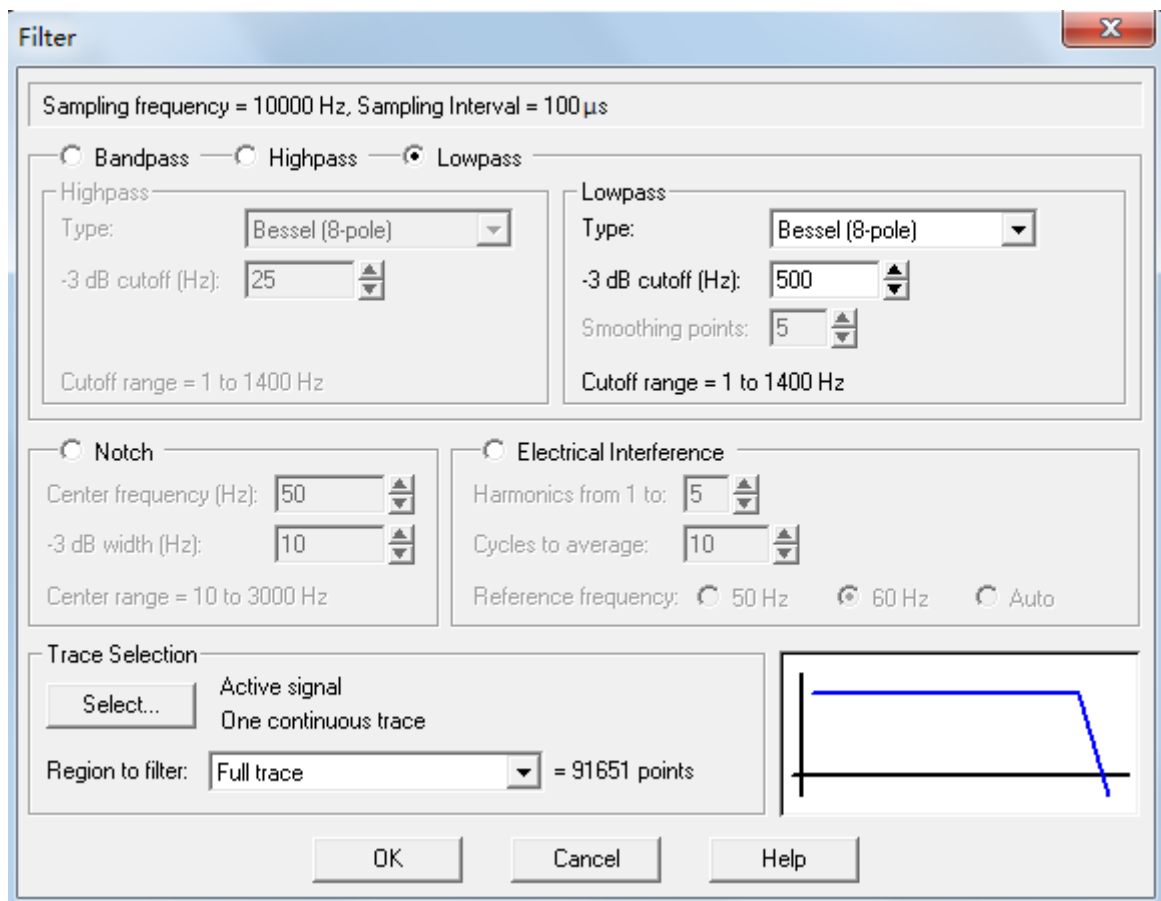


图 8. Clampfit 的 Filter 滤波窗口

### 3. Bandpass

带通滤波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。它相当于低通滤波与高通滤波的交叉, 需要同时设定高通滤波与低通滤波, 注意高通滤波的  $f_{-3dB}$  不能高于低通滤波的  $f_{-3dB}$ , 这样才能形成信号通过的频率区域。

带通滤波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。



#### 4. Notch

带阻滤波可削弱某一特定频率范围的信号（如 50 Hz 交流频率）。带阻滤波中心频率（Center frequency）范围为 10-3,000 Hz（一般选择 50 Hz）。-3dB 频率宽度（-3dB width）用于设定带阻滤波的频率宽度（图 9）。-3dB width 越窄，滤波需要的数据点就越多；另外，采样频率越高，滤波需要的数据点也越多。因此可通过增大 -3dB width 宽度以及增大滤波的数据点范围来完成滤波。

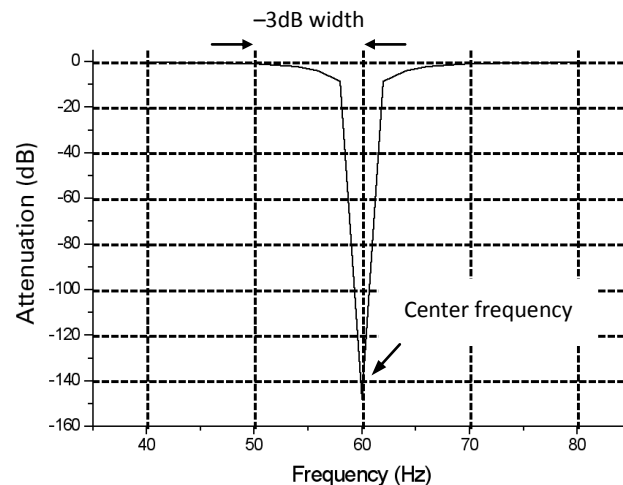


图 9. Notch 滤波器的幅度响应曲线

Center frequency: 60 Hz; -3 dB width: 10 Hz

#### 5. Electrical Interference (EI)

电干扰滤波器（Electrical interference filter, EI）为数码滤波器，用于去除所获信号中的交流噪声，与带阻滤波器不同的是，它可同时去除 50 Hz 及其谐波的交流噪声，因此可用于具有复杂交流噪声信号的滤波。其基本原理是：滤波器先检测出信号中所有频率的正弦波成分，然后据此产生一系列参考正弦波，通过反馈调节其幅度与位相使之与所检测的正弦波完美匹配，最后从信号中将其剪除。

Clampfit 中，电干扰滤波器可去除 50 Hz 及其谐波 100 Hz、150 Hz 等，最大到 1 kHz（即 Harmonics from 1 to 最大设定为 20）。另外，电干扰滤波器在滤波时需要足够数量的数据点来产生参考正弦波，所需要的最少数据点与采样频率有关，还与将多少个正弦波周期的数据点进行平均（即 Cycles to average 设定）来产生参考正弦波有关。所设定的 Cycles to average 数目越大，获得的滤波效果越好，但同时耗时也长。所需最少数据点的计算举例如下：

如果采样频率为 10 kHz（即采样间隔为 100  $\mu$ s），50 Hz 正弦波的周期为 20 ms，故一个正弦波周期的采样数据点数为 20 ms / 100  $\mu$ s = 200。此时若设定 Cycles to average = 10，则需要最少的采样点数为 2,000 点。因此，滤波器所需要的最少数据点 = （采样频率 / 50） $\times$  Cycles to average。采样数据点不够的话，将不能清除谐波干扰。

- **Harmonics from 1 to:** 用于设定欲去除的交流谐波的最高数目，最大数目为 20，一般去除第 1-3 个就够了。

- **Cycles to average:** 用于设定滤波器产生参考正弦波所需要测量的正弦波周期的数目，每个数字代表 20 ms（50 Hz 时），右侧显示了滤波的 -3dB 频率宽度（与 Notch 滤波器一样），所设定的数目越大，-3dB 频率宽度越窄，滤波效果越好，但所需时间越长。

**Reference frequency:** 选项同 Notch 滤波器中的中心频率一样，其中 Auto 项是让 Clampfit 自动寻找需要滤波的是 50 Hz 还是 60 Hz，一般不需要选它。

注意事项：

（1）电干扰滤波器适合对长时间（至少几秒钟）记录的数据进行滤波，因为它需要一段时间来稳定，

否则不能正常工作。

(2) 滤波时，任何频率与 50Hz 及其谐波接近的周期性信号都会受到一些影响。

(3) 短时脉冲类 (Spike) 信号可受滤波影响。如果其幅度远大于噪声时，经滤波后，短时脉冲信号将出现一些谐波伪迹，其持续时间为所设定的 Cycles to average 数目  $\times 20$  ms。

(4) 如果采样频率较高、采样时间较长，则数据量会比较大，此时用电干扰滤波器滤波时可能会很慢。解决的办法有两个：一是先设谐波数目 (Harmonics) 为 1，如果滤波效果不满意，再逐渐增加，一般选 3 就足够，过大会明显增大滤波时间，滤波效果也不会更好。二是降低 Cycles to average 的数目，减少过多计算，提高滤波速度。

(5) 滤波时如果交流噪声去除得不完全，可考虑提高谐波数目和/或增大 Cycles to average 的数目。

## 四、数据文件内部/之间的数学运算

### 1. Analyze/Average Traces

可将一个数据文件中的任意几条 Trace 进行平均，获得平均后的一条 Trace，也可同时获得标准差 Trace。当所有 Trace 都来自于相同的 Protocol 时，可用此功能进行平均，获得平均值。

这一功能还可用来降低信号中的噪声。当信号频率谱与噪声频率谱一致或有重叠时，如果用滤波器滤波会将信号一起滤掉，此时可用此处的平均功能。平均功能只适用于重复记录的信号，即采用 Sweep 方式记录的信号，同时信号出现的时间必须固定不变。具体地说，用 Clampex 软件的 Fixed-length events、Episodic stimulation 和 High-speed oscilloscope 模式采集的数据才能使用平均功能，因为平均是将数据中的所有 Trace 进行平均。平均功能的原理是：软件先将所有 N 条 Trace 累加在一起，此时信号幅度增大为原来的 N 倍，而由于每条 Trace 中的噪声之间无相关性，故噪声却只增大为原来的  $\sqrt{N}$  倍。然后再除以采集的 Trace 条数 N，最后得到的信号幅度基本不发生大的变化，而噪声幅度却降低为原来的  $1/\sqrt{N}$  (图 10)。

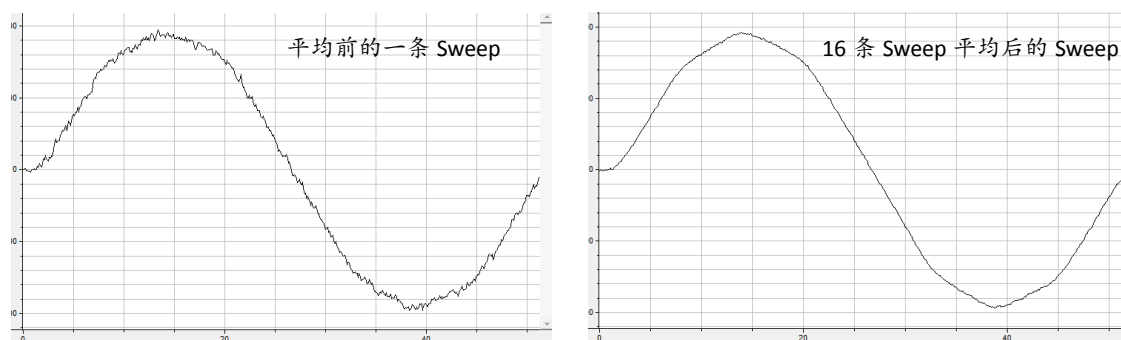


图 10. Analyze/Average Traces 功能可降低噪声

### 2. Analyze/Segmented Average

可对几个 Trace 中的某一相同时段 (如 Epoch A、First holding 或 Last holding) 或 Cursor 1-2 之间的时间段进行平均，平均后的文件通常用于 Analyze/Subtract Control 功能中的 Control File (见下)。

### 3. Analyze/Arithmetic

打开 Analyze/Arithmetic 命令，开启 Arithmetic 对话框，可对文件内的任何 Trace 进行加减乘除等运算，使原来的 Trace 得到新值。Results 窗口中的该功能可对不同 Column 的数据进行运算，得到新的 Column 的数值。

### 4. Edit/Modify Math Parameters

开启 Modify Math Parameters 对话框，可对同时采集的同一文件中的多导联信号间进行加减乘除运算，运算的结果以一个新信号的形式与原文件保存在一起。可用于荧光测量时对背景荧光的减除等。

## 5. Analyze/ Average Files

可对几个文件进行平均。例如在进行相同的实验时，需要将几个采样文件相应的每一个 Trace 进行平均。平均后的文件会自动生成，文件名为 Average000-999.abf。注意，Analyze/Average Files 命令仅适用于用 Episodic Stimulation 模式或 High-speed oscilloscope 模式采样所获得的数据文件，并且要求采样时编辑的 Protocol 设置必须一致，否则平均没有实际意义。

## 6. Analyze/ Subtract Control

两个文件中的 Trace 进行相减，其中被减的文件称为 Test file，要从被减的 Test file 中减去的文件称为 Control File。相减前，首先要打开并激活被减文件，然后打开 Clampex 软件 Analyze/Subtract Control (图 11)。

Multiply control traces by: 将 Control File 中的 Trace 乘以该倍数，然后再从 Test file 中减去。

该功能一般要求两个文件要采用相同的 Protocol 来采集，信号数目、Sweep 数目与长短、信号单位、采样频率等必须一致。

- 如果需要，可以用 Analyze/Data Reduction 或 Interpolation 功能使采样频率变为一致。

- 如果 Test file 中的 Signal (或 Sweep) 数目少于 Control file，后者中多余的 Signal (或 Sweep) 将不被使用。反之，如果 Test file 中的 Signal (或 Sweep) 数目大于 Control file，后者中最后一个 Signal (或 Sweep) 将被反复使用。

- 如果 Test file 中的 Sweep 长度小于 Control file，后者 Sweep 中多余的点将不被使用。反之，如果 Test file 中的 Sweep 长度大于 Control file，后者 Sweep 中最后一个点将被反复使用。

该功能可用于去除漏电流、从混合电流中分离某种通道的单一电流等。

## 7. Analyze/Concatenate Files

将在同一条件下获得的数据文件并成一个文件。同

一条件是指相同的采集模式、采样频率、采样时间和信号个数。连接后的文件会自动生成，文件名为 Concatenate000-999.abf。



图 11. Clampfit 的 Analyze/Subtract Control 对话框

# 全细胞记录数据的分析

## 一、离子通道的激活曲线（Activation curve）

电压门控性离子通道靠改变膜两侧的电压差来激活，常用激活曲线表示，反映通道开启的速度及难易程度。一般通过给予细胞一系列逐渐变化的脉冲电压来记录全细胞电流峰值的变化，以脉冲电压（Vm）为X轴，全细胞通道电导（g）为Y轴，作出通道的激活曲线。采用下面的Boltzmann方程对激活曲线进行拟合，得到通道激活50%时的脉冲电压和斜率因子。

$$\frac{g}{g_{max}} = \frac{1}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m)/k}}$$

式中，g为全细胞通道激活电导，gmax为全细胞通道最大激活电导，Vm为不同的去极化/超极化脉冲电压，V1/2为通道激活50%时的脉冲电压，k为斜率因子（反映激活速度的快慢，k越大，激活速度越慢）。

下面以Na<sup>+</sup>离子通道为例，详细讲解用Clampfit制作激活曲线的步骤。

1. 先对数据进行分析前的处理（如基线调零、滤波、选择用于分析的Sweep数目等）。图12所示为获得的电压门控性Na<sup>+</sup>离子通道电流及Waveform设置。膜钳制电位为-100 mV，以5 mV的步阶从-45 mV初始去极化至-15 mV。

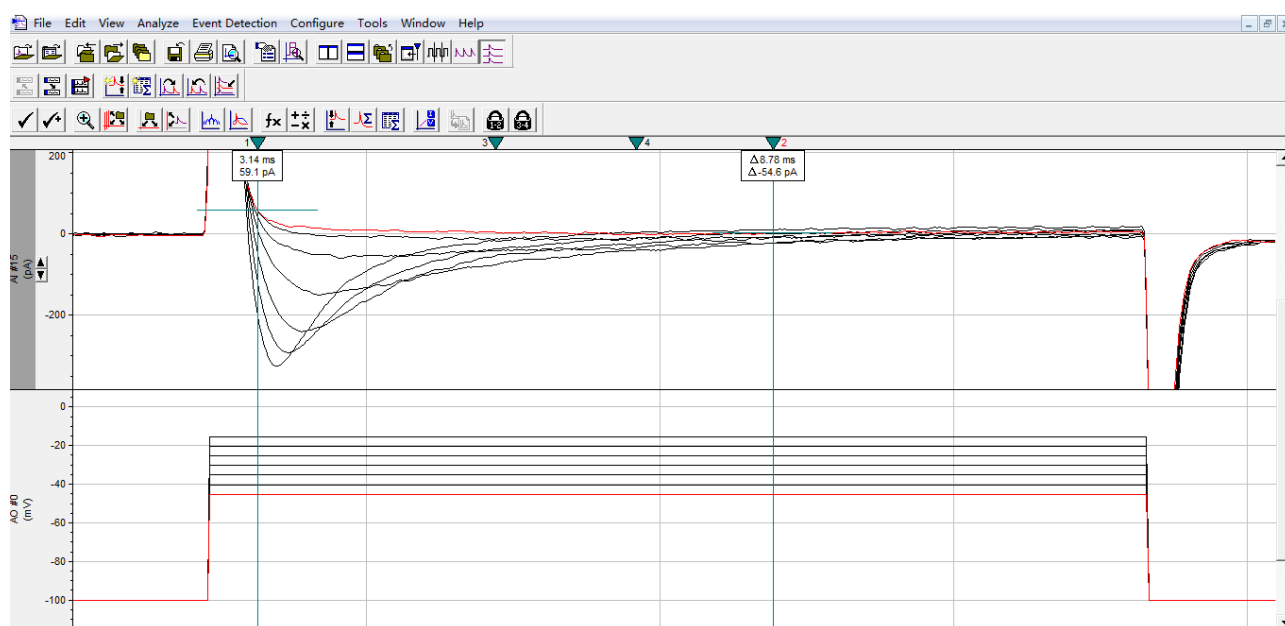
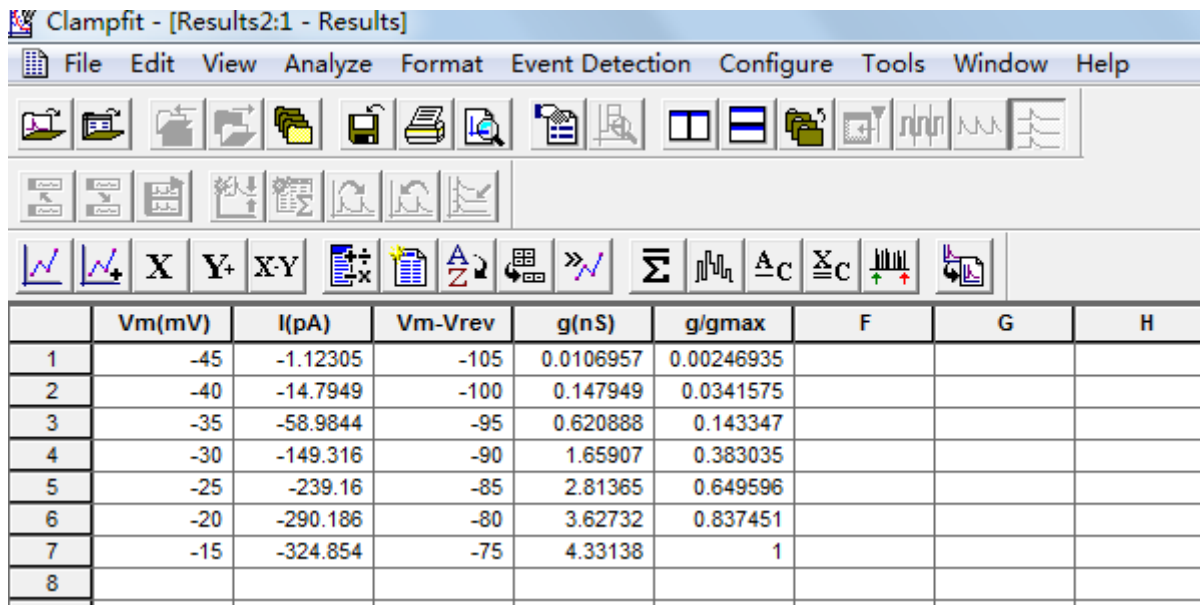


图12. 电压门控性Na<sup>+</sup>离子通道电流及Waveform设置

2. 测量不同去极化脉冲电压下全细胞电流的峰值I（pA）。设置好Cursor 1、2的位置，要囊括每条Sweep中Na<sup>+</sup>电流的峰值。打开Analyze/Quick Graph/I-V框（或直接点击IV Plot快捷按钮），设置好参数（X轴取值以Cursor 1为准，Y轴取值为Cursor 1、2之间的负向峰值），点击OK。打开Window菜单Results窗口，得到不同去极化电压下通道电流幅度的大小。分别将其命名为Vm(mV)和I(pA)，见图13。

3. 计算全细胞电导。在Results窗口中，再命名几个Column，分别是Vm-Vrev、g(nS)和g/gmax。可先计算Vm-Vrev，然后计算全细胞电导g（g=I / (Vm-Vrev)），Vm为去极化脉冲电压，Vrev为Na<sup>+</sup>离子通道的反转电位（+60 mV）。采用Analyze/Column arithmetic功能进行计算，结果见图13。

4. 对全细胞电导 $g$ 进行标化。当去极化达 $-15\text{mV}$ 时,  $I$ 最大,  $g$ 达 $g_{\text{max}}$ 。以 $g_{\text{max}}$ 为1, 求出 $g/g_{\text{max}}$ 。采用Analyze/Column arithmetic功能进行标化, 结果见图13。



	Vm(mV)	I(pA)	Vm-Vrev	g(nS)	g/gmax	F	G	H
1	-45	-1.12305	-105	0.0106957	0.00246935			
2	-40	-14.7949	-100	0.147949	0.0341575			
3	-35	-58.9844	-95	0.620888	0.143347			
4	-30	-149.316	-90	1.65907	0.383035			
5	-25	-239.16	-85	2.81365	0.649596			
6	-20	-290.186	-80	3.62732	0.837451			
7	-15	-324.854	-75	4.33138	1			
8								

图 13. 激活曲线所需数据的测量与计算

5. 作图。以 $V_m$ 为X轴（选择 $V_m$ , 点击快捷键X）,  $g/g_{\text{max}}$ 为Y轴（选择 $g/g_{\text{max}}$ , 点击快捷键Y+）, 点击快捷键Creat Graph, 作点图。

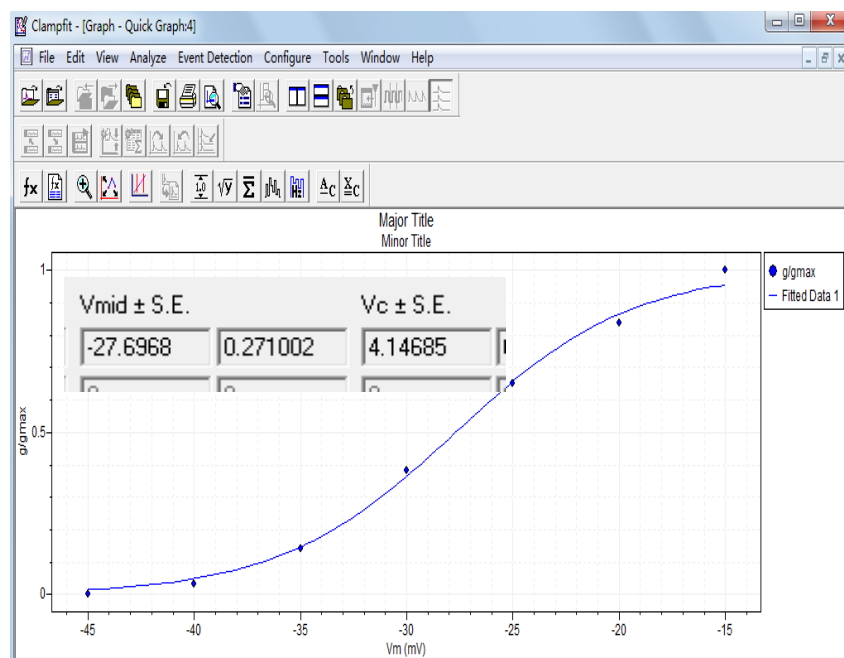


图 14. 拟合后获得的激活曲线及拟合结果

6. 最后用激活曲线方程对散点图进行拟合。在Clampfit中, 打开Analyze/Fit窗口, 选择“Boltzmann, charge-voltage”方程:



$$f(V) = \frac{I_{max}}{1 + e^{(V_{mid} - V)/V_c}} + C$$

该方程中，如果设 $f(V) = g$ ， $I_{max}=g_{max}=1$ ， $V_{mid}=V_{1/2}$ ， $V=V_m$ ， $V_c=k$ ， $C=0$ ，则即为前述的激活曲线方程。拟合时，要设定 $I_{max}=1$ ， $C=0$ ，可获得通道激活50%时的脉冲电压 $V_{1/2}$ 和斜率因子 $k$ （图14）。

通过激活曲线的左移或右移以及半激活电压 $V$ 等指标可以判断药物对通道开启过程的影响。上述例子仅表示一例细胞激活曲线的制作，若要反映一类通道的激活特点或对不同组数据进行比较，需要有细胞例数上的要求，要求出平均 $g/g_{max}$ 值与标准差，再作激活曲线。

## 二、离子通道的 I-V 曲线（Current-voltage curve）

离子通道电流-电压关系曲线（I-V曲线）是反映离子通道动力学性质的重要参数，可反映通道的激活过程、阈电位、反转电位、整流特性等等。为获得I-V曲线，需要给予连续变化的步阶脉冲电压，其设定方法与激活曲线的相似，但脉冲电压的范围要更大，若能跨越反转电位则更好。

测量出不同脉冲电压（ $V_m$ ）下的全细胞电流峰值（ $I$ ），以 $I$ 为Y轴、 $V_m$ 为X轴，即可作出I-V曲线。不同类型通道的I-V曲线形状不同，反映出不同通道的动力学特点。药物若对通道激活或衰减有影响，将会使I-V曲线形状发生改变。

### 1. 用Analyze/Quick Graph/I-V作I-V曲线

适用于脉冲电压为步阶（方波）形式的记录数据。以延迟整流 $K^+$ 离子通道（Delayed rectifier potassium channel，简称IK通道）为例，其I-V曲线的制作步骤如下：

（1）先对数据进行处理。调零基线、滤波等，必要时可能需要对每条Trace分别进行基线调零。

（2）设置好Cursor 1、2的位置。Cursor 1、2要放置在通道电流的稳态值。对于IK通道，一般给予的去极化脉冲要持续几百ms以上，可以获得相对稳定的幅度值，我们取这些稳定值的平均值作为Ik电流幅度。

（3）选择Analyze/Quick Graph/I-V，或者直接点击快捷键IV-Plot按钮，打开I-V曲线对话框进行参数设置。X轴取值以Cursor 1为准，Y轴取值为Cursor 1、2之间的平均值，点击OK，出现I-V曲线（图15、16）。

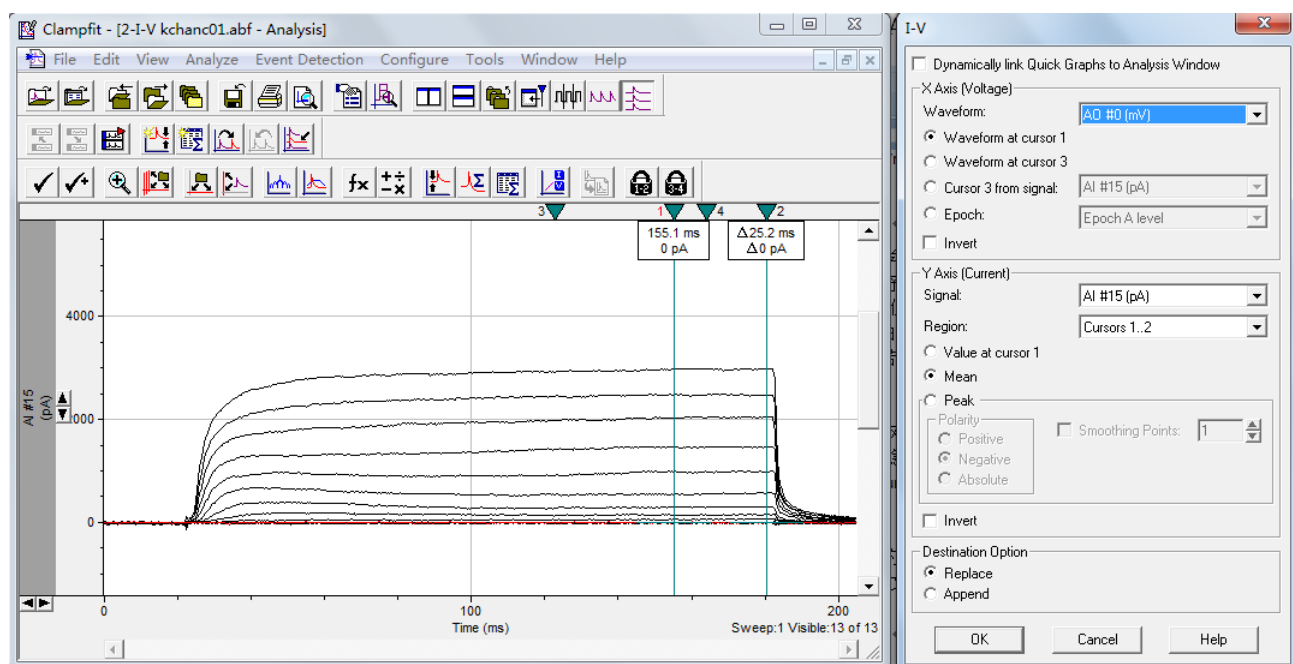


图15. I-V曲线的测量与参数设置



(4) 对I-V曲线进行修改。对图的坐标轴、背景以及标记说明做改动，获得满意的I-V曲线（图16），最后输出给其他软件或打印。

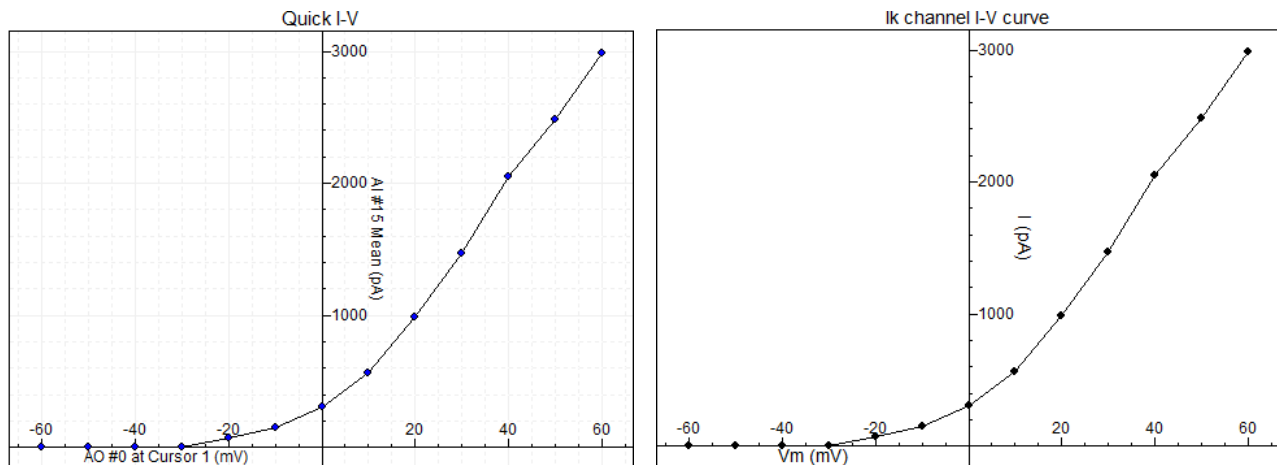


图16. I-V曲线（修改前后）

### 作I-V曲线时的注意：

(1) 通道未开放时，电流应该为零。因此要对基线进行细致的调零，可能要对每个Trace都进行基线调零。

(2) 若要在一个细胞上测量多次，可选择Clampex中Edit Protocol的Run功能，也可用Analyze/Average Files功能进行文件间的平均，得到某一个细胞的电流平均幅度值。

(3) 若要测量同一种类多个细胞的I-V曲线，首先需要对电流幅度进行标化。

由于不同大小的细胞，其某种离子通道电流幅度的大小不同，所以不能直接对不同细胞的电流进行平均。细胞大小与细胞膜电容Cm成正比，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（ $\mu\text{m}$ ）。例如，对于一个半径为10  $\mu\text{m}$ 的球形细胞，其膜电容Cm约为12 pF左右。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  $\text{pF}/\mu\text{m}^2$ ）。

我们用Cm对电流I进行标化，把I/Cm称为电流密度，用I/Cm代替电流幅度I，这样不同细胞的I/Cm比较接近，可以进行平均，获得I/Cm-V曲线。

Cm可通过封接过程施加给细胞的测试脉冲获得。要求在封接后对电极电容进行补偿，然后打破细胞膜后，即可直接测出Cm值。可以选择直接测量的Cm，也可采用Online Statistics窗口采集Cm，最后获得平均Cm值。

此外，也可用细胞最大电流来标化电流幅度，然后进行平均，获得I/Imax-V曲线。

(4) 如果从钳制电位开始去极化（或超极化），在I-V曲线上应不包含钳制电位这个数据点。

## 2. 用Analyze/Quick Graph/Trace vs. Trace作I-V曲线

当脉冲电压为斜坡（Ramp）变化时，可采用此功能制作I-V曲线。该功能可点对点地绘制图形，将所获数据X轴从时间轴（ms）转换为电压轴（mV），从而获得I-V曲线。

开启Trace vs. Trace对话框。默认的设定是X轴为电压（选择Waveform）、Y轴为电流（选择Signal），在图17的例子中，Region选为Cursor 1..2，这样就可绘制出I-V曲线。

用Trace vs. Trace功能作I-V曲线时，注意：

(1) Cursor 1、2的位置要放置准确，不要由于放置的误差导致出现错误。为了更好、更准确地放置Cursor，应该在采集时设计好Protocol。

(2) 可通过选择对话框中的Append，将两条I-V曲线作在一个图中。

(3) 可对I-V曲线进行与图16一样的修改。

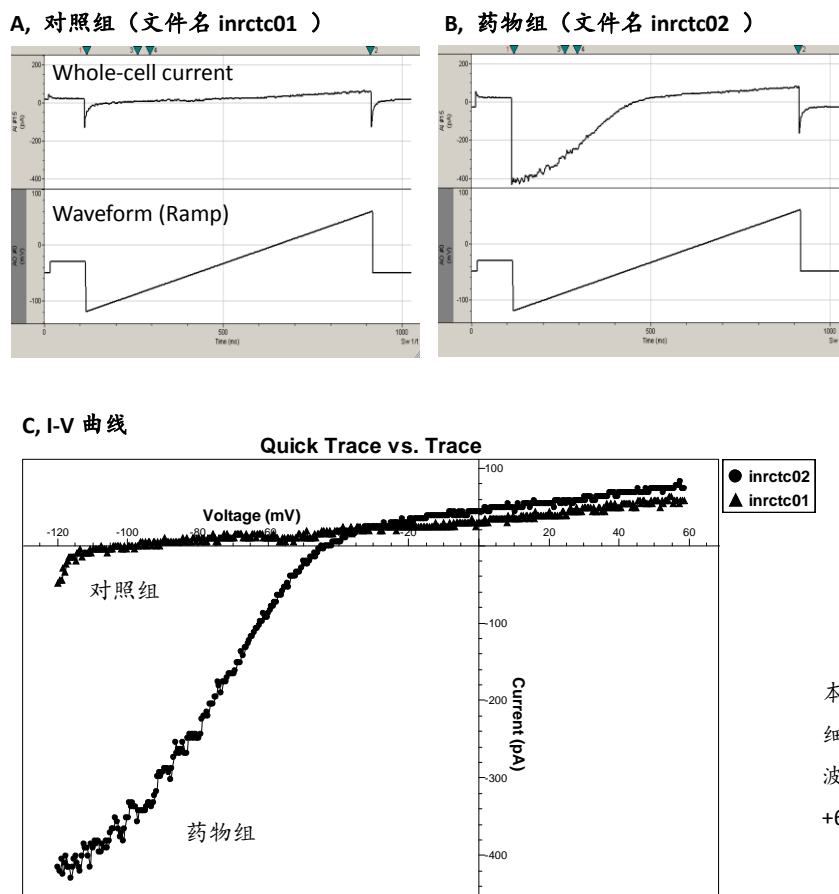


图 17. 采用 Trace vs. Trace 功能  
制作 I-V 曲线

本例数据记录的是内向整流性电流，  
细胞膜钳制电位为 -50 mV, 采用 Ramp  
波诱发电流，膜从 -120 mV 去极化到  
+60 mV.

### 三、离子通道的衰减 (Decay)

指通道在激活因素（一般为去极化）持续存在条件下的失活，全细胞电流的衰减反映通道的失活快慢，用衰减的时间常数或10-90%衰减时间来表示。

#### 1. 衰减的时间常数

根据衰减的特点，通道电流的衰减过程可用单指数方程或者双指数方程拟合，获得衰减的时间常数：

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

这是Clampfit软件中“Exponential, standard”指数拟合方程。式中， $\tau$ 为衰减的时间常数，这是我们要获得的参数。当 $i=2$ 时，为双指数方程，拟合后获得 $\tau_1$ 和 $\tau_2$ 两个时间常数值。

拟合步骤：

(1) 放置好Cursor 1和2的位置：Cursor 1放在电流衰减的起始点，Cursor 2放在电流衰减最终回到零点基线的位置。

(2) 打开Analyze/Fit窗口，选择拟合方程“Exponential, standard”，设Number of terms=1或2，让软件自动选择拟合方法。Data Options设定中，Seed Values设定中勾选上“Force time constant positive”（表示 $\tau$ 值必须为正值）。

(3) 打开Analyze/Fitting results窗口，可看到tau ( $\tau$ ) 值。

## 2. 10-90%衰减时间

也是反映衰减特性的一个指标。打开Analyze/Statistics窗口，除设置其他选项外，要在Measurement中勾上Rise time, From 10 To 90%。OK后，在Window/Results窗口中可查看到结果。

## 四、离子通道的失活曲线（Inactivation curve）

如果给予细胞膜一个电压刺激，持续一段时间后，开放了的通道会逐渐失活，再给予电压刺激时，失活的通道将不再开放，我们将这种失活称为稳态失活（Steady-state inactivation），它反映通道失活数目的电压依赖性，可用失活曲线（Inactivation curve）来反映。失活曲线采用双脉冲设置的Protocol来获得数据，前面的条件脉冲（Conditioning pulse）将细胞膜钳制在不同的电位水平，使相应的一部分通道处于完全失活状态，后面的测试脉冲（Test pulse）检测未失活通道的电流大小（见图18）。

以条件脉冲的电压数值为X轴，测试脉冲的电流大小为Y轴，先作出散点图，然后用下面的Boltzmann方程进行拟合，得到失活曲线及参数：

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{(V_m - V_{1/2})/k}}$$

式中，I和Imax分别为不同条件脉冲电压下测试脉冲诱发的电流大小和最大电流，V和V<sub>1/2</sub>分别为不同条件脉冲电压和通道失活50%时的条件脉冲电压，k为斜率因子。

失活曲线的制作步骤：

（1）在采集数据时，根据通道的失活特点设置双脉冲电压。图19A所示为用于获得电压门控性Na<sup>+</sup>离子通道失活曲线的去极化脉冲电压（V<sub>m</sub>）设置。膜钳制电位为-100 mV，条件脉冲以3 mV的步阶逐渐去极化，而测试脉冲维持在-10 mV不变。

（2）对数据进行分析前的处理，如基线调零、滤波等等。

（3）测量不同条件脉冲下的测试脉冲诱发的全细胞电流峰值（I），并标化。以测试脉冲的全细胞最大电流峰值（Imax）为1，对其它电流峰值进行标化处理，即计算出I/Imax。

（4）作图。以V<sub>m</sub>为X轴，I/Imax为Y轴，作点图。

（5）最后用失活曲线方程对散点图进行拟合。在Clampfit中打开Fit窗口，选择“Boltzmann, charge-voltage”方程：

$$f(V) = \frac{I_{max}}{1 + e^{(V_{mid} - V)/V_c}} + C$$

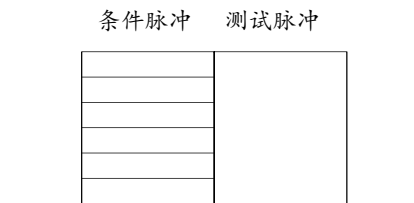


图 18. 失活曲线的脉冲电压设置

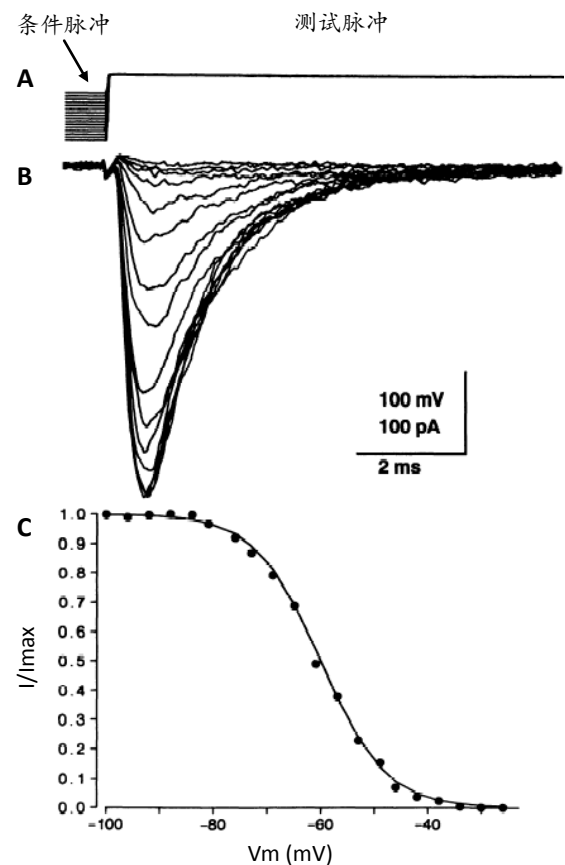


图 19. 离子通道的失活曲线

A, 用于制作 Na<sup>+</sup>通道失活曲线的脉冲电压设置。

B, 依上述双脉冲电压设置，测试脉冲诱发的胚胎大鼠皮层神经元全细胞 Na<sup>+</sup>通道电流。为清晰起见，图中没有显示出全部的电流线。

C, 以 V<sub>m</sub> 为 x 轴，I/Imax 为 y 轴作出的该例细胞 Na<sup>+</sup>通道激活曲线。拟合后获得 V<sub>1/2</sub> = -60mV, k = 6.1. (引自 Huguenard, et al. J Neurophysiol, 1988; 59: 778-795.)

该方程中，如果设 $f(V) = I$ ， $V_{mid} = V_{1/2}$ ， $V = V_m$ ， $V_c = k$ ， $I_{max} = -1$ ， $C = 1$ ，则即为失活曲线的Boltzmann方程，得到半失活电压 $V_{1/2}$ 和斜率因子 $k$ 。

通过失活曲线的左移或右移以及半失活电压的变化等指标可以判断药物对通道失活过程的影响。同通道激活曲线一样，若要比较不同组之间的差异，作失活曲线也需要有细胞例数（ $n$ ）上的要求，要求出平均 $I/I_{max}$ 值与标准差，再作失活曲线。

在作失活曲线时，脉冲电压的设定要注意：

（1）条件脉冲时间要设定得足够长，以使通道在某一去极化水平的失活达到完全，这需要根据通道的失活特点来设定。例如对于 $Na^+$ 离子通道，因其衰减非常快，所以20 ms宽的条件脉冲足以使其失活完全，而对于L型 $Ca^{2+}$ 离子通道来说，其衰减较为缓慢，条件脉冲的宽度常需要达十几秒甚至更长。

（2）条件脉冲与测试脉冲的间隔不能设定得过长，以防止失活的通道恢复，影响测试脉冲的测量。

## 五、量效曲线（Dose-effect curve/Dose-response curve）

### 1. 概念

以药理效应的强弱作为Y轴，药物剂量/浓度大小作为X轴可做出量效曲线。从量效曲线我们可以获得药物的如下参数指标：

- 最小有效剂量（Minimal effective dose）：药物引起效应的最小剂量/浓度，即阈剂量/浓度。
- 最大效能（Maximun efficacy）：药物所能产生的最大效应。随着药物剂量/浓度增加，效应相应增强，当效应达到一定程度后，再增加剂量/浓度效应不会再增强，这一效应的极限称为最大效能。
- 效价强度（Potency）：是指药效性质相同的几个药物能引起等效反应的剂量/浓度大小。其值越小，则表示效价强度越大。例如，10 mg吗啡和100 mg哌替啶的镇痛作用强度相当，我们说吗啡的效价强度为哌替啶的10倍。
- 半效剂量/浓度（ $EC_{50}$ ）和半抑制剂量/浓度（ $IC_{50}$ ）：指能引起50%最大效能的药物剂量/浓度。量效曲线在50%效应处的斜率最大，故常用 $EC_{50}$ 和 $IC_{50}$ 比较与计算药物的效价强度。

全细胞记录实验中，X轴为药物浓度，多采用对数坐标（用 $\log[X]$ 表示）；Y轴为药物效应，为便于不同细胞之间的比较，一般为标化后的效应指标（如 $I/I_{max}$ ）。可获得药物的最小有效浓度、最大效能（图20）。量效曲线经拟合后，可求出药物的 $EC_{50}$ 和 $h$ （Hill系数，反映药物在通道蛋白上结合位点的数目）。

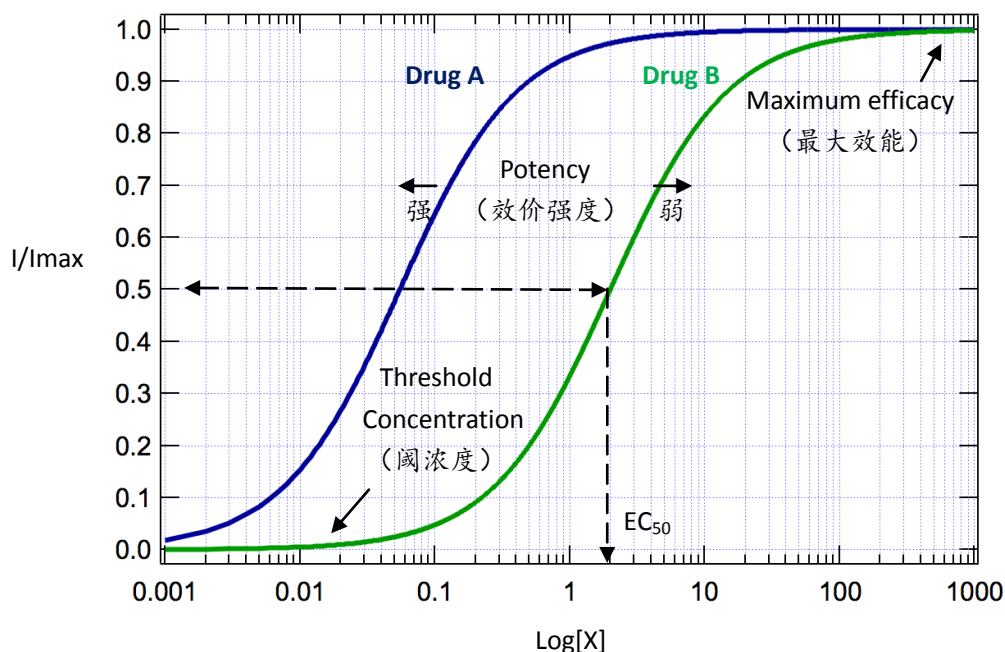


图 20. 量效曲线的参数指标

## 2. Hill方程

Clampfit软件提供如下的Hill (4 parameter logistic)方程来对量效曲线进行拟合:

$$f(x) = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + (C_{50}/[x])^h}$$

(1) 当欲观察药物对某种受体/通道电流的诱发/增强作用时,  $I_{max}$  为药物作用后通道的最大电流幅度,  $I_{min}$  为药物作用前 (相当于药物浓度为 0) 的电流幅度,  $C_{50}$  为半效浓度  $EC_{50}$ ,  $[X]$  为所施加的药物浓度,  $h$  为 Hill 系数。设通道电流的幅度为  $I$ , 将 Y 轴设为  $I/I_{max}$ , 拟合时, 设  $I_{max}=1$ 。若观察配体对受体通道诱发电流的情况, 则拟合后,  $I_{min}$  接近 0。

(2) 当欲观察药物对某种受体/通道电流的阻断作用时,  $I_{min}$  为药物作用前的电流幅度,  $I_{max}$  为最大浓度药物作用后的电流幅度,  $C_{50}$  为半抑制浓度  $IC_{50}$ ,  $[X]$  为所施加的药物浓度,  $h$  为 Hill 系数。设通道电流的幅度为  $I$ , 将 Y 轴设为  $I/I_{min}$ 。拟合时, 设  $I_{min}=1$ 。若药物对通道电流完全阻断, 拟合后,  $I_{max}$  接近 0。

当观察配体诱发受体通道的电流反应时, 由于配体施加前没有通道电流, 可采用 Clampfit 中的 “Hill, Langmuir” 方程 (下面左侧方程) 对量效曲线进行拟合:

$$f(x) = \sum_{i=1}^n \frac{I_{max_i} [x]^{h_i}}{C_{50_i}^{h_i} + [x]^{h_i}} + C \qquad f(x) = \frac{I_{max} [x]^h}{EC_{50}^h + [x]^h}$$

式中, 设置  $i=1$ ,  $C=0$ ,  $C_{50}$  为半效浓度  $EC_{50}$ , 则得到上面右侧的方程。

## 3. 例子

例 1. GABA 诱发的 GABA-A 受体电流的量效曲线制作。

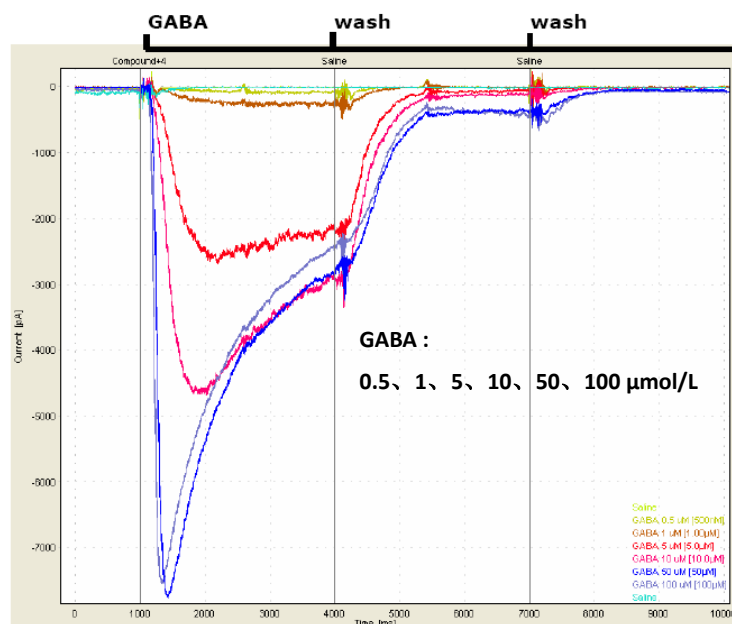


图 21. 不同浓度 GABA 诱发的 GABA-A ( $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ) 受体电流

(1) 打开 Clampfit, 将获得的数据 (GABA 浓度和电流幅度  $I$ ) (图 21) 拷贝在 Results 窗口数据表中, 分别命名数据栏为 GABA( $\mu\text{mol/L}$ )、 $I$ (pA), 并进行标化  $I/I_{max}$  (图 22)。



标化方法：打开 Analyze/Column Arithmetic 功能框（有快捷按钮），点击 Columns 选择 cC，再次点击 Column 选择 cB。然后再点击 Operator，选择除法运算符 (/)，手工输入最大电流值 7746，最终在 Expression 中完成表达式  $cC = cB/7746$ ，OK 后得到 I/Imax 的数值，完成标化。

(2) 选择 GABA ( $\mu\text{mol/L}$ ) 栏，点击快捷键 X，将 GABA ( $\mu\text{mol/L}$ ) 栏设为 X 轴，选择 I/Imax 栏，点击快捷键 Y+，将 I/Imax 栏设为 Y 轴，点击快捷键 Create Graph，作点图（图 22）。

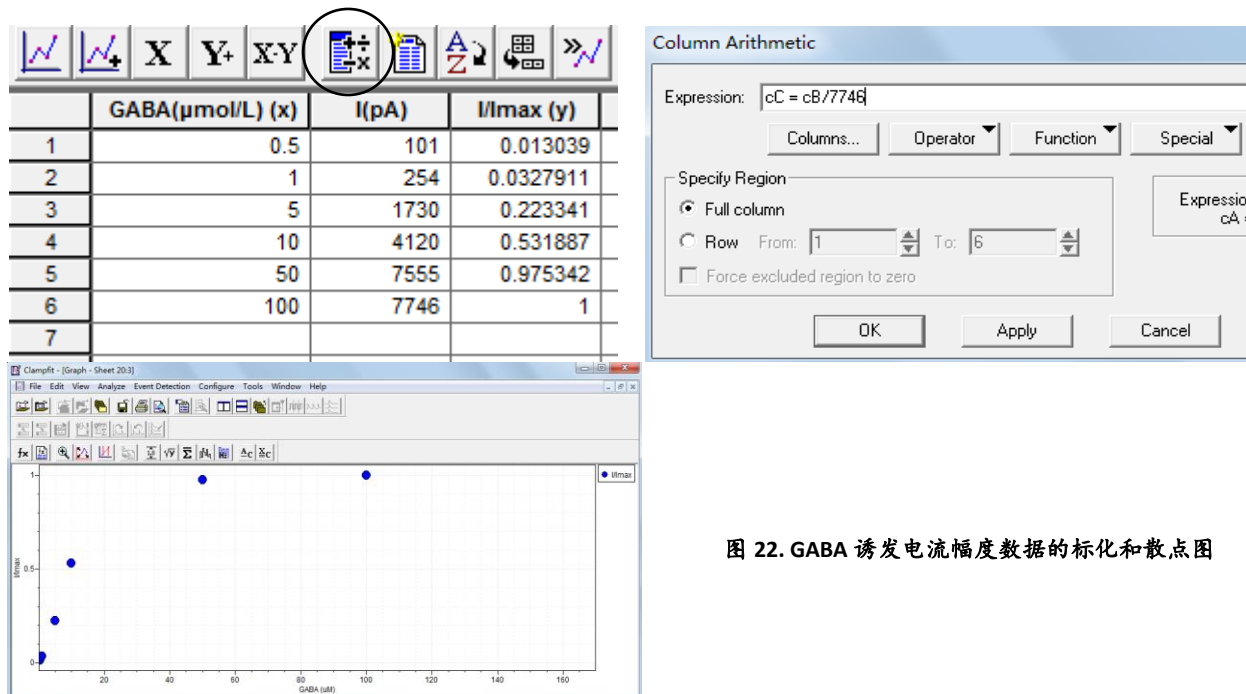


图 22. GABA 诱发电流幅度数据的标化和散点图

(3) 选择 View/Axis Type/Log-Linear，将 X 轴 GABA 浓度改为对数形式。

(4) 打开 Analyze/Fit 窗口，选择 Hill (4 parameter logistic) 方程，将 Imax 固定为 1，进行拟合，得到  $EC_{50}=9.5 \mu\text{mol/L}$  和  $h=2$ （图 23）。

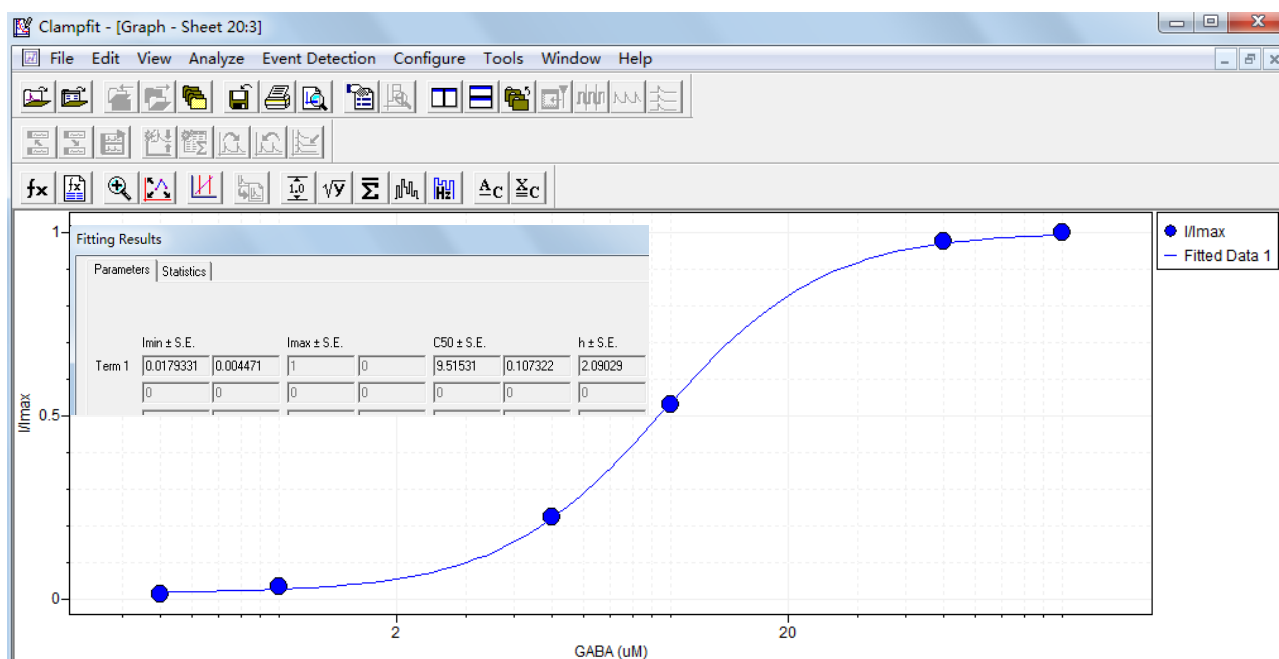


图 23. Clampfit 制作的 GABA 诱发电流的量效曲线



## 例 2. 荷包牡丹碱 Bicuculline 对 GABA-A 受体电流抑制作用的量效曲线制作

(1) 打开 Clampfit, 将获得的数据 (Bicuculline 浓度和电流幅度 I) (图 24) 拷贝在 Results 窗口数据表中, 分别命名数据栏为 Bicuculline( $\mu\text{mol/L}$ )、I(pA)、I/Imin, 并进行标化 (图 25)。

标化方法同例 1: 打开 Analyze/Column Arithmetic 功能框 (有快捷按钮), 点击 Columns 选择 cC 和 cB, 再点击 Operator, 选择除法运算符 (/), 最终在 Expression 中完成表达式  $cC = cB/11895$ , OK 后得到 I/Imin, 完成标化。

(2) 选择 Bicuculline ( $\mu\text{mol/L}$ ) 栏, 点击快捷键 X, 将 Bicuculline ( $\mu\text{mol/L}$ ) 设为 X 轴, 选择 I/Imin 栏, 点击快捷键 Y+, 将 I/Imin 栏设为 Y 轴, 点击快捷键 Create Graph, 作点图 (图 25)。

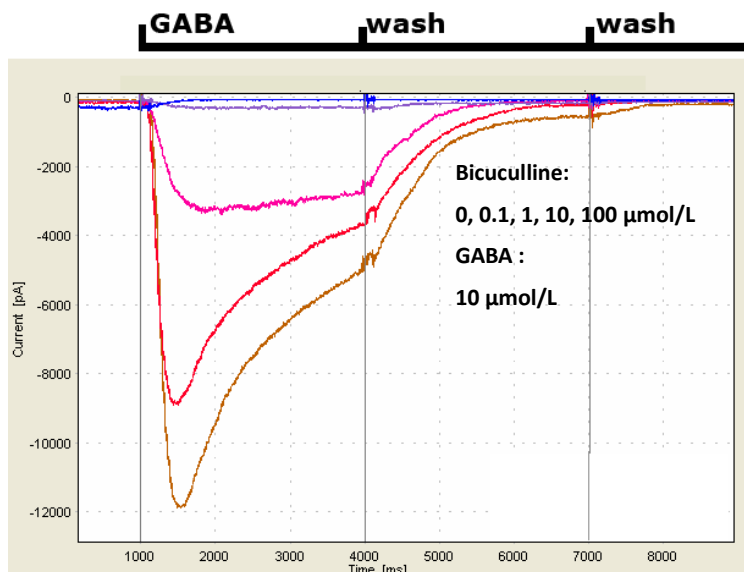


图 24. 不同浓度 Bicuculline 对 GABA 受体电流的阻断作用

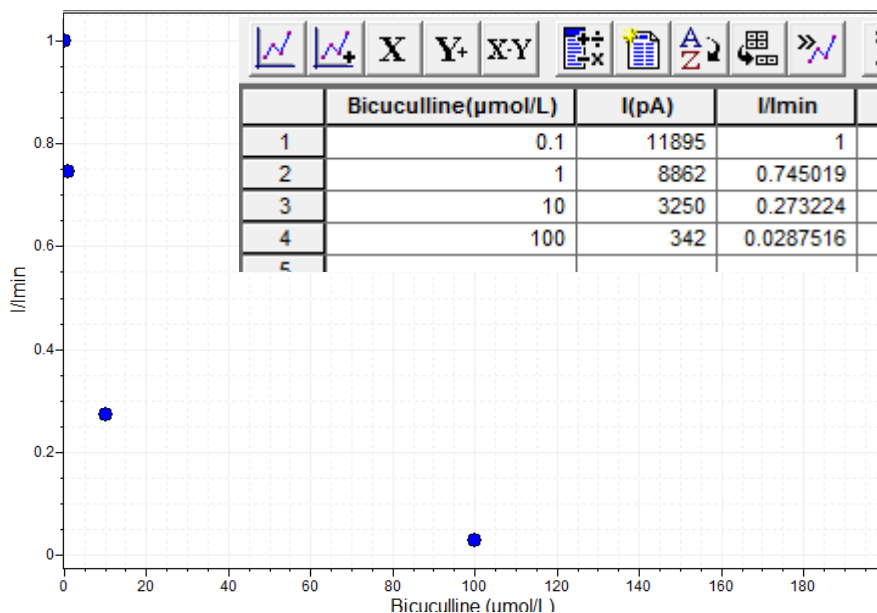


图 25. Bicuculline 抑制 GABA 电流幅度数据的标化和散点图

(3) 选择 View/Axis Type/Log-Linear, 将 X 轴 Bicuculline 浓度改为对数形式。

(4) 打开 Analyze/Fit 窗口, 选择 “Hill (4 parameter logistic)” 方程, 将 Imin 设为 1, 进行拟合, 得到  $IC_{50}=3.5 \mu\text{mol/L}$  和  $h=0.93$  (图 26)。

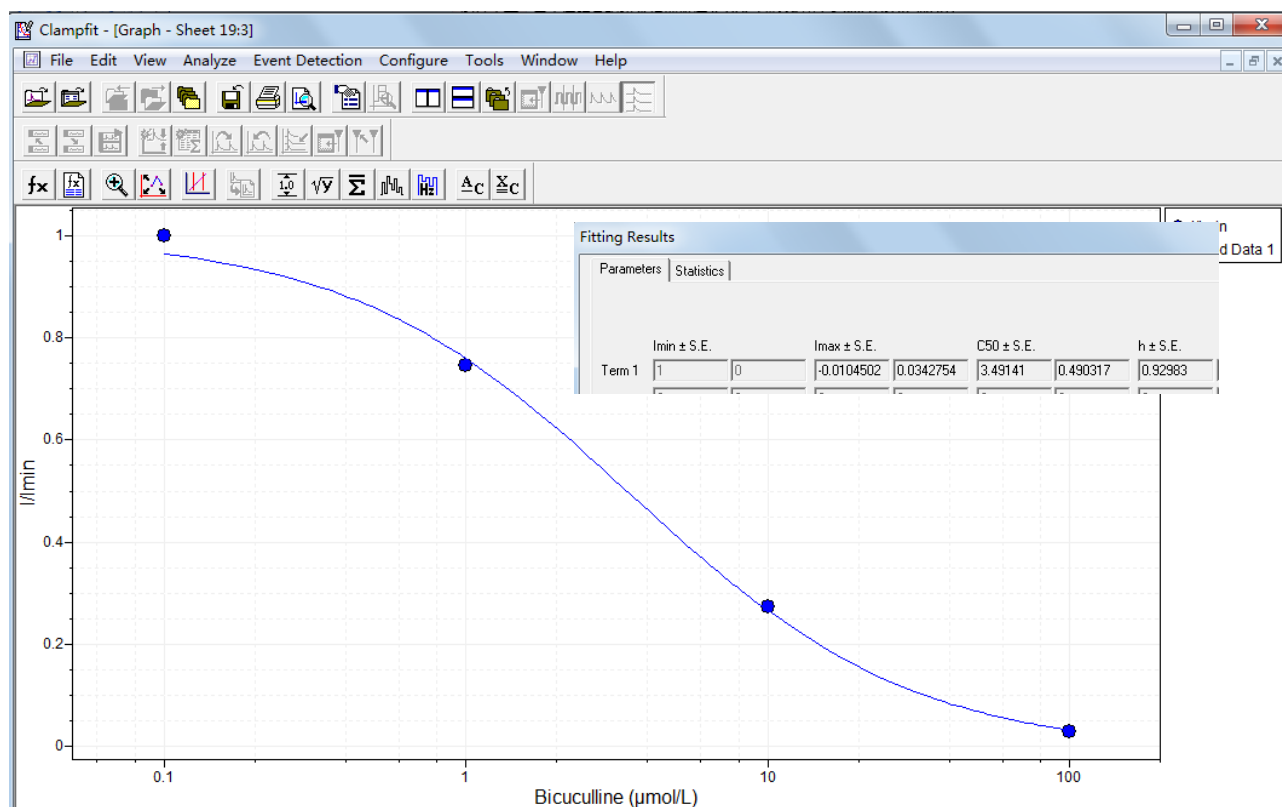


图 26. Clampfit 制作的 Bicuculline 抑制 GABA 电流的量效曲线

#### 4. 几点说明

(1) 药物浓度的选择上，需要含有阈浓度和最大效能浓度。药物浓度一般按一定的倍比关系来增加，如1、2、5、10、20、50、100等，这要根据具体药物作用情况而定。一般而言，采用上述原则而选择的浓度梯度越多，拟合后的效果就越好，可以有4-8个浓度，但不能低于4个浓度。

(2) 给药时，要按照从低浓度到高浓度的顺序施加。同时，在用浴槽（Chamber）灌流给药时要将前次药物冲洗掉，然后再给下一个浓度；在用培养皿（Petri dish）等难以灌流的情况下，每次施加的药量要尽可能少，以防药物累加，影响后续给药。

(3) 为了获得稳定的量效曲线，药物从低到高的几个浓度最好在同一个细胞上施加。因此要求有合适的给药装置和高质稳定的全细胞记录。给药装置和给药方法的选择要依据实验要求，一般的实验要求是：

- (a) 配体或通道激动剂的施加要求快速、微量。
- (b) 昂贵的药物一般不能采用灌流给药，而要采用压力喷射给药方法。
- (c) 观察受体拮抗剂的作用时，可以将拮抗剂与配体一起施加，也可以预先加入拮抗剂，这要依据这些药物的特点和实验目的来决定。
- (d) 细胞标本在培养皿里的实验，因灌流置换液体困难，要采用压力喷射给药方法。
- (e) 直接用加样枪向培养皿或浴槽内滴加药物的方法，只用于简单的药物定性。
- (f) 离子电泳的给药方法适合于能够离子化的药物。

(4) 正式实验前，需要先期做预实验来确定每个药物浓度的给药间隔时间，确保药物作用不受受体失敏的影响。

(5) Clampfit的作图效果并不理想，不适合正式发表文章。我们可以采用其他作图软件，如Origin，来制作量效曲线。例如，在用Origin制作量效曲线时，选择Analysis/Non-linear Curve Fit中的Logistic方程拟合，可获得适宜发表的量效曲线图。

(6) 实验一般要求有细胞的个数（n），获得平均值和标准差。标准差可用作图软件（如Origin软件）

显示出来（在数据表窗口，选择Column/Set as Y Error）。

（7）不同药物之间量效曲线的比较：要选择相同的浓度，同时兼顾阈浓度与最大效能浓度。可以用某种药物作用下的最大通道电流幅度来标化其他药物，如下面的例子（图27），以烟碱Nic诱发的最大电流为100%，乙酰胆碱ACh诱发电流与之比较。在Clampfit中，将两个量效曲线作在一起的方法是，在制作第二个量效曲线时，选择Analyze/Append to Graph功能来制作。在Origin软件中，采用在数据表直接输入数据的方法即可将几条量效曲线作在一个图中。

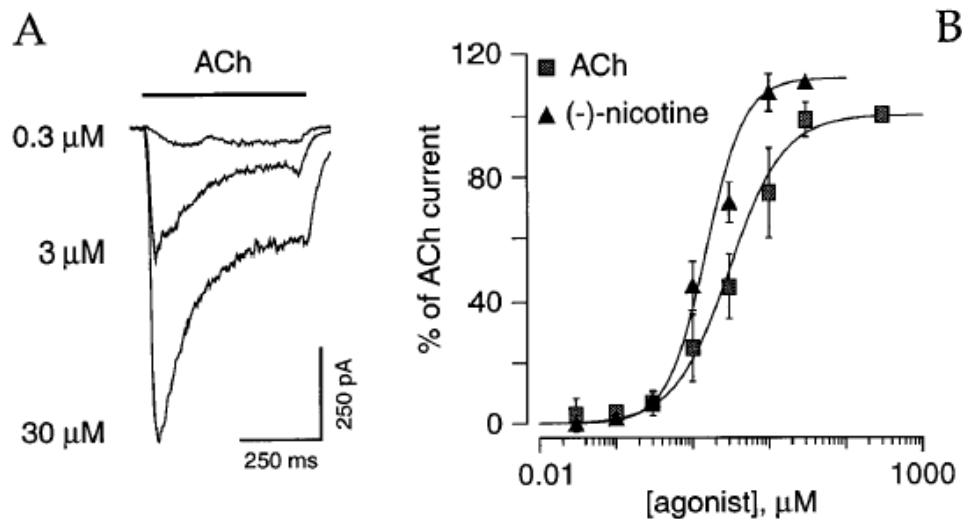


图 27. 乙酰胆碱 (ACh) 和烟碱 (Nic) 诱发烟碱受体电流的量效关系

A, 不同浓度 ACh 诱发的人神经元  $\alpha 4\beta 2$  烟碱受体电流, 脉冲给药 500 ms, 细胞膜钳制在 -100 mV.

B, ACh 和 Nic 诱发受体电流的量效曲线. 以 Nic 诱发电流的最大值为 100%, 经 Hill 方程拟合, EC<sub>50</sub> 和 Hill 系数分别为 3 μM 和 1.2 (ACh, n=5)、1.6 μM 和 1.3 (Nic, n=19).

(引自 Buisson, et al. *J Neurosci*, 1996; 16: 7880-7891.)

# 单通道记录数据的分析

## 一、单通道电导的测算

### 1. 单通道电导的概念

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

$$G = i / \Delta V$$

电导的单位是西门子 (Siemens,  $S$ ), 一般通道电导多为  $pS$  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  $\Delta V$  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分布符合高斯 (Gaussian) 分布的特点, 拟合出平均电流幅度, 最后求出单通道电导。

在记录的通道开放事件中, 经常能记录到通道的亚开放状态 (Substate) 和闪烁现象 (Flicking)。

(1) 亚开放状态: 电流幅度比单通道电流幅度小的开放事件, 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, 在排除所记录膜片上含有几种通道的情况下, 通道本身可能存在亚开放状态。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。此外, 人工纯化出来的通道蛋白突变体, 与野生型通道相比, 常常出现亚开放状态, 尤其是当通道持续开放时。

(2) 闪烁现象: 通道的高速开放、关闭导致通道开放或关闭的持续时间太短, 软件的采样频率设置即使再高也捕捉不到通道完全开放或关闭时的幅度, 这种所记录的不完整的开放或关闭事件就是通道的闪烁现象。闪烁现象既包括通道的高速短时开放, 也包括通道在开放状态时高速短时的关闭。

### 2. 单通道电导的计算方法

(1) 简单而粗略的方法是找到基线电流  $0 pA$  点, 观测单通道电流幅度峰值, 将其除以膜片两侧的电压差与反转电位的差值, 就得到单通道电导  $G$ 。如图 28, 膜两侧电压差 (钳制电位) 为  $30 mV$ , 反转电位为  $0 mV$ , 测得电流幅度为  $100 pA$ , 则单通道电导  $G = 100 pA / 30 mV = 3.33 nS$ 。该方法相对粗糙, 但可快速观察电导的大致变化。

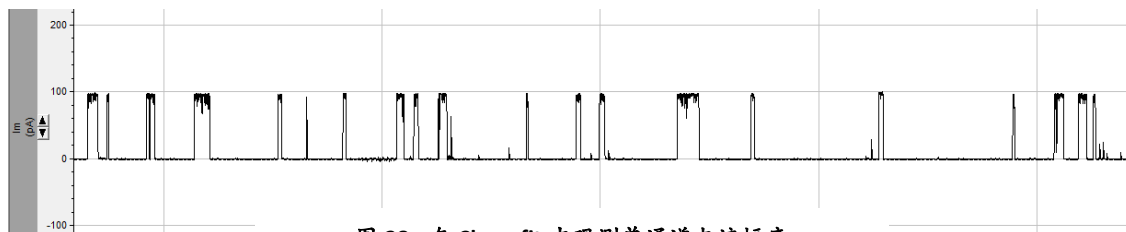


图 28. 在 Clampfit 中观测单通道电流幅度

(2) 斜率电导 (Slope conductance)。通过单通道  $I-V$  曲线求得 (见后)。

(3) 采用对电流幅度直方图拟合的方法计算出单通道平均电导。我们需要用高斯 (Gaussian) 方程对单通道电流幅度直方图进行拟合, 高斯方程如下:

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{e^{-(x-\mu_i)^2/2\sigma_i^2}}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} + C$$

式中，横轴 $x$ 为电流幅度的bin值，纵轴 $f(x)$ 为检测的事件数目，参数 $\mu$ 值是单通道电流幅度的平均值， $\sigma$ 为单通道电流幅度的标准差， $A$ 、 $C$ 为系数。显然，当 $x=\mu$ 时， $f(x)$ 值最大。根据 $\mu$ 值可计算出电导，这是比较精确的统计学计算方法。当采用一极高斯方程拟合时，式中 $i=1$ ，方程只有一项。

应用该法时要注意如下几个问题：

- 如果通道开放概率太低（只有很少的几个开放事件），则拟合会失真，此时需要延长采样记录时间以获得更多的开放事件。
- 如果记录的数据中有多个通道同时开放的情况，则会形成其它开放水平的峰值，若要对这些峰值都进行拟合，则需要采用多次拟合或采用多极高斯方程拟合。注意在测算单通道电导时应该选择单通道开放的峰值（一般为Level 1的峰值）。
- 记录的数据中，如果通道的亚开放状态较多，会在单通道电流幅度峰值与基线峰值之间形成亚开放状态的峰值，据此可以测算出通道亚开放状态的电导。
- 如果记录的数据中存在大量的闪烁现象，由于它们的幅度参差不齐，不能形成峰值，但却会使单通道电流幅度曲线峰值的左右不对称，影响电导的正确测算。此时，可升高检测事件的阈值使所检测的事件不包含闪烁现象，或对事件的持续时间进行限制，去除那些短时的闪烁现象。
- 如果记录的数据中都是闪烁现象，没有完全开放事件，则无法测算电导。在人工质膜实验中，这种情况多表明通道蛋白纯化过程有问题。

无论上述哪种方法，都需要先确定正确的基线，并对膜片漏电流进行去除，同时还要有一定的例数（膜片数）要求。

### 3. 用Clampfit中Histogram功能和高斯拟合测算单通道电导的步骤

（1）在 Clampfit 中打开所要分析的数据文件（\*.abf），点击激活欲测量的电流信号。

（2）对数据进行基线调零、坏点（如 Glitch）去除，根据情况进行滤波。

（3）用 Cursor 1..2 选择欲测量的区域。

（4）打开 Analyze/Histogram，开启 Histogram 设定框。选择如下：

Distribution——Conventional

Select Traces——Active signal

Bins——Width 选择范围 0.2-2，根据实际情况确认，Bin 越小，Y 轴事件数越少，反之越多

Data Range——Full

Region to process——Cursor 1..2

（5）点击 OK，出现直方图（图 29）。注意：如果电流幅度参差不齐，没有相对固定的幅度，则直方图形成不了峰值，这多发生于闪烁开放较多的情况。此时因其不符合高斯分布，无法用该法求得准确的平均电流幅度值。

（6）点击 Tools/Select Region，用此 Cursor 圈定单通道电流幅度直方图（图 29 中第二个峰）。

（7）在直方图窗口中，执行 Analyze/fit 功能，开启 Fit 设定框。在 Function/Method 中选择 Gaussian 为拟合方程、Number of terms 设 1、让 Clampfit 自动选拟合方法。Data/Options 和 Seed Values 中不作设定。

（8）点击 OK 作拟合曲线。高斯分布形态为钟形，其峰值所对应的 X 轴幅度值就是单通道开放的平均电流幅度值。

（9）点击 Analyze/Fitting Results，开启拟合结果框，可见峰值  $\mu$ （单通道开放的平均电流幅度值）。

（10）获得平均电流幅度后，根据所给予的钳制电位与该通道反转电位（后者取决于膜两侧的液体），就可求出单通道的电导。

$$G = \mu / (V_m - V_{rev})$$

$G$  为单通道电导（nS）， $\mu$  为单通道开放的平均电流幅度值（pA）， $V_m$  为钳制电位（mV）， $V_{rev}$  为该通道的反转电位（mV）。

（11）对其他数据进行如上操作，得到例数（膜片数） $n$ 、电导  $G$  的平均值以及标准差。



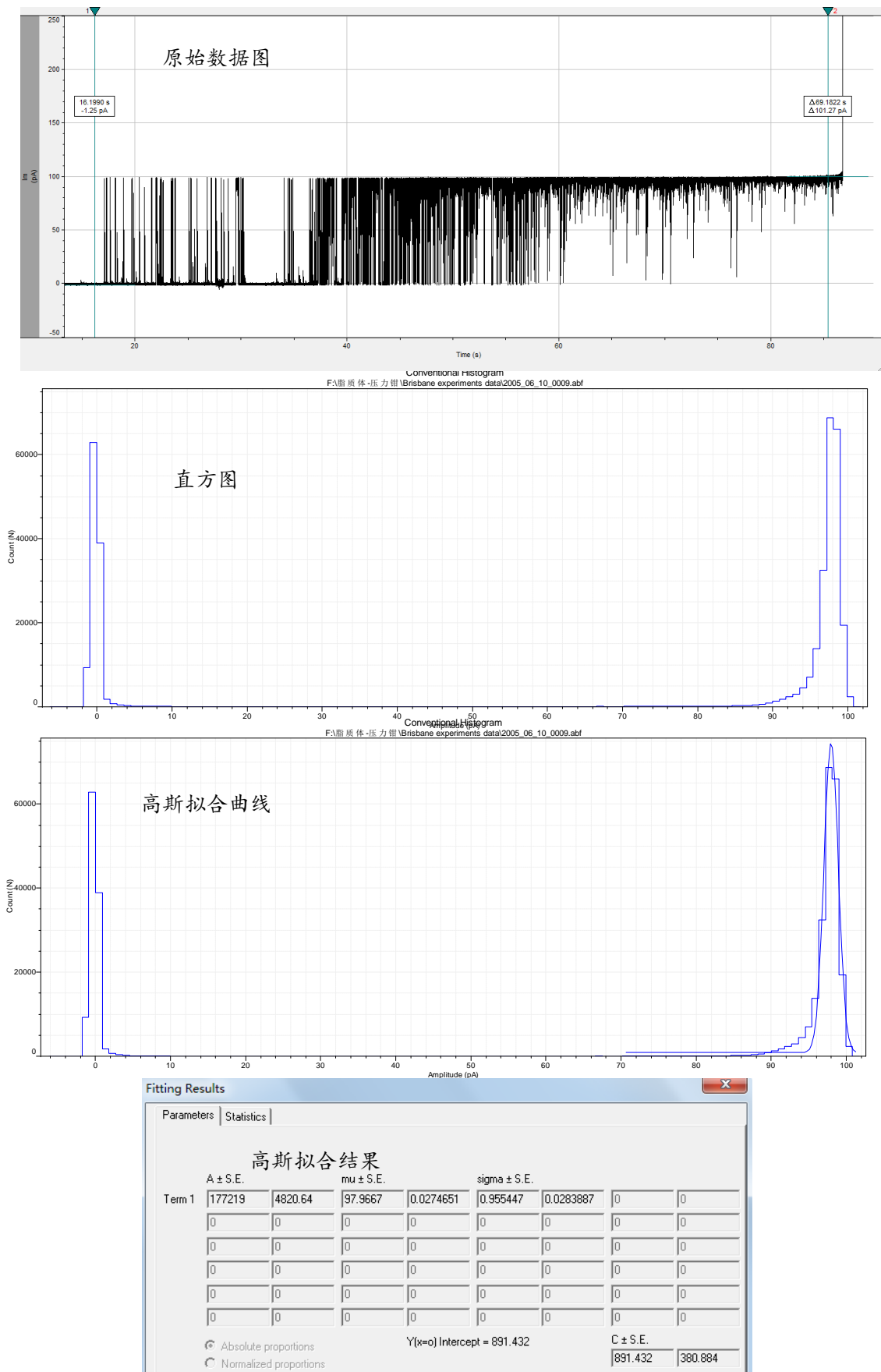


图 29. 用 Clampfit 中 Histogram 功能和高斯拟合测算单通道电导



## 二、单通道开放概率的分析

### 1. 单通道事件的检测

#### (1) 事件检测前的准备工作

打开所要分析的单通道数据文件 (\*.abf)，根据实际情况对数据进行基线调零、坏点（如 Glitch）去除、滤波等。

#### (2) 对检测参数进行设定

在 Clampfit 的 Analysis 窗口打开菜单 Event Detection/Single-Channel Search，开启 Single-Channel Search 设定框（图 30），需要设定如下内容：

- **Levels:** 设定检测的阈值水平。通过点击 Make 增加阈值水平，点击 Remove 去除阈值水平，点击 Bring 将所有的阈值水平标记线（Marker）显示在 Analysis 窗口。

- **Update levels automatically:** 该部分提供了在事件检测过程中对设定的基线进行调零的方法。若基线水平很稳定（或经过基线的调零变得很稳定）且事件幅度的变化也较为稳定，或者想在检测过程中通过手工进行基线及其它阈值水平的调节，则不需要选择此项。

- Update baseline, keep deltas:** 是根据数据基线的变化情况，随时更新基线水平，调节后的基线与其它任何阈值水平之间的相对幅度保持不变。例如，若设定的基线为 0，阈值水平为 10 pA，而现在的基线变为了 0.5 pA，则阈值水平将变为 10.5 pA，保持与基线的相对幅度 10 pA 不变。

- Update all levels independently:** 是根据数据幅值的变化情况，随时更新基线水平以及其它各个阈值水平。例如，若设定的基线为 0，阈值水平为 10 pA，而现在的基线变为了 0.5 pA，通道电流幅度变为 11 pA，则该功能此刻将以 0.5pA 为基线，阈值水平变为 11 pA，两者互相独立地进行变动。

- Level contribution (%):** 无论选择上面哪种方法，都必须设定此项，即下一个事件的阈值水平依赖于该事件的幅度与前一个事件阈值水平的程度。例如，如果设定阈值水平为 10 pA，Level contribution (%)为 10%，当下一个通道的开放幅度为 10.5 pA 时，新阈值水平为： $(90\% \times 10.0 \text{ pA}) + (10\% \times 10.5 \text{ pA}) = 10.05 \text{ pA}$ 。通常设定 Level contribution (%)为 10-20%，效果很好，较为常用。

- **Ignore short level changes:** 用于防止一些闪烁事件被检测。例如，如果在 Ignore duration 中输入 3 (ms)，则表示持续时间低于 3 ms 的事件将不被检测。实际测量中，输入的时间数值需要根据通道开放的特点来设定。还可通过设定 Ignore from level 来限制被忽略的短时程事件在哪个水平内。例如，如果选 1，则在阈值水平 1 处向基线方向以及向水平 2 方向的上述持续时间低于 3 ms 的事件将不被检测，而其它水平内的类似事件则不受影响。

- **Latency Mode:** 用于潜伏期的测量，适用于研究刺激（电刺激、化学药物如激动剂等）与通道反应之间潜伏期的分析。如果不选择此项，Clampfit 的检测是从第一个开放事件的出现开始，对这之前的基线部分不计算时间；同样对最后一个开放事件之后的基线部分，也不计算时间。这会影响到关闭时间和开

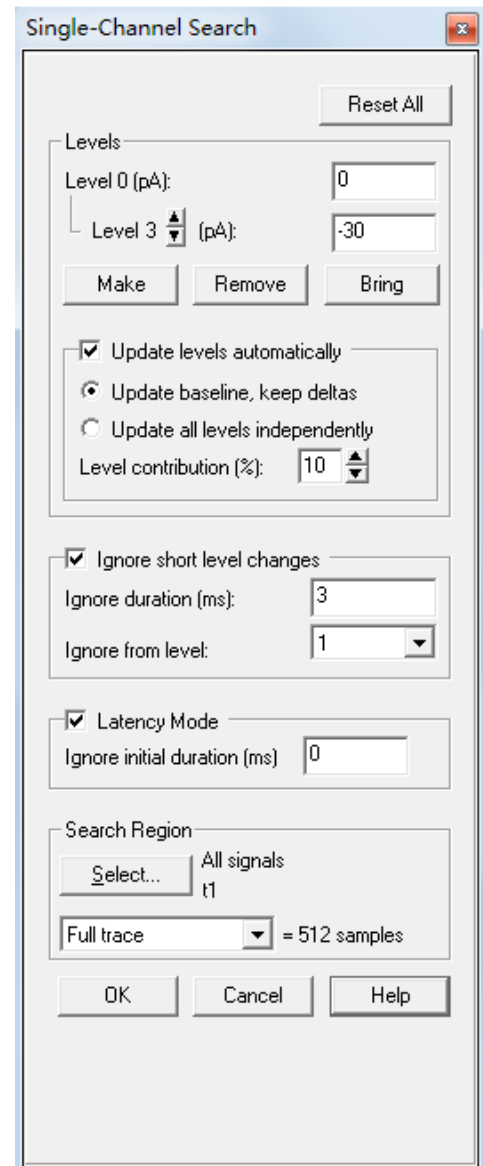


图 30. Single-Channel Search 设定框

放概率的计算。因此需要选择此项，并将 Ignore initial duration 设为 0ms。

- **Search Region:** 用于设定欲检测的数据区段，根据具体情况，常常选择 Cursor1、2 之间的区段进行检测。注意在检测前应事先放置好 Cursor 的位置。

上述这些设定完成后，点击 OK，即可准备检测。另外，上述这些设定可保存为\*.spf 文件 (Search protocol file)，在分析同类型但不同实验数据文件时，可省去重新设置的麻烦，只需要打开 Event Detection/Open Search Protocol，在 SearchParams 文件夹中选择所保存的\*.spf 文件即可。

### (3) 进行事件检测

根据所记录单通道数据的特点，可选择如下方式进行事件的检测：

- **自动检测：**选择 Nonstop，程序将按照 Single-Channel Search 设定框中检测参数的设定，自动检测所选区段的所有事件。该法适合于数据量较大、事件较多且确信基本没有需要剔除的不合格事件的情况。

- **手工检测：**选择 Accept、Reject、Suppress 手工逐一事件检测。适用于数据量较小、事件数相对较少的情况。对于事件量大的数据，如果检测前对数据中的一些噪声、干扰等异常事件等进行了事先处理，则还是采用 Nonstop 自动检测方式为宜。

- 检测的结果存放在 Results 窗口 Event 数据表中。

## 2. 单通道开放概率分析实例

以机械敏感性 MscL 通道为例，说明单通道开放概率  $P_o$  的计算过程。

### (1) 打开单通道数据文件

图 31A 显示为一段单通道记录，反映的是所施加在膜片上的不同压力（负压）对 MscL 通道开放概率的影响。图中的数字 1-6 表示给予的 6 段逐渐增大的压力。

### (2) 进行事件检测

由于不同压力下通道的开放概率要分别测量，所以事件的检测也要分段进行。将 Cursor1、2 分别放置在压力变化的起止点处，分别检测不同压力条件下的开放事件。该数据共给予膜片 6 个逐渐增大的压力，因此需要进行 6 次检测。注意：从第二次开始检测时，需要点击 Restart，程序会提示你是否删除先前的检测结果，要选择 No。检测结束后，打开 Results 窗口，可看到 Events 数据表中有 1-6 个 Search，表示有 6 次检测。

### (3) 计算 $P_o$

打开 Analyze/Event Analysis/P(open)选项框，选择如下（图 31B）：

- P(open) for level: All 因要计算的不是某一开放水平的概率，所以要选 All
- Number of ion channels in patch: 2 因膜片上通道总数为 2
- Destination Option: 选择 Replace results in graph and sheet
- Column: 选 Use trace 和 Use search，后者选 All，表示对 6 个 Search 全部计算
- 其它选项采用默认值
- 点击 OK，完成单通道开放概率  $P_o$  的计算

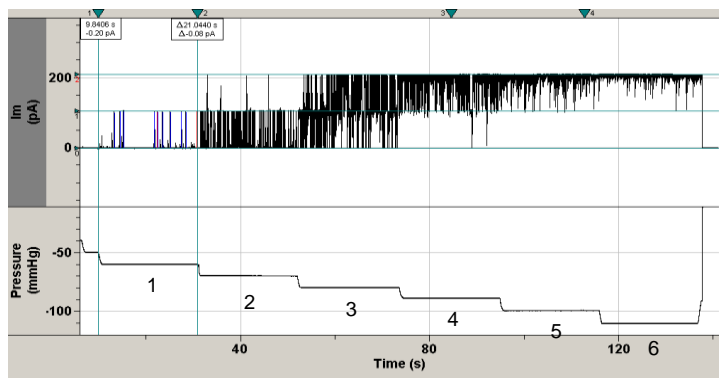
计算的结果显示在 Sheet 14 数据表中，其中的 P(o)即为单通道开放概率，共有 6 个，分别为 6 次测量的结果（图 31C）。

### (4) 作压力-单通道开放概率关系曲线

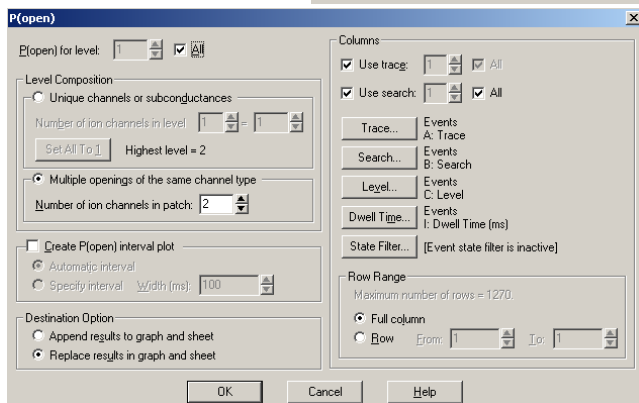
拷贝 P(o)数据，并粘贴到 Sheet 15 空白数据表 Column B 中，并命名为 P(o)，在 Column A 中输入压力值 (mmHg)，并命名为 Pressure (mmHg)（图 31D）。打开 Analyze/Assign Plots 设定框，做如下设定（图 31E）：

- Plot Type: Scatter
- Data Type: X-Y pairs
- Available columns: 选 A: Pressure(mmHg)为 X，选 B: P(o)为 Y
- Rows: All
- 点击 Add
- 点击 OK 作散点图

A, 单通道事件的检测



B, P(open)设定框



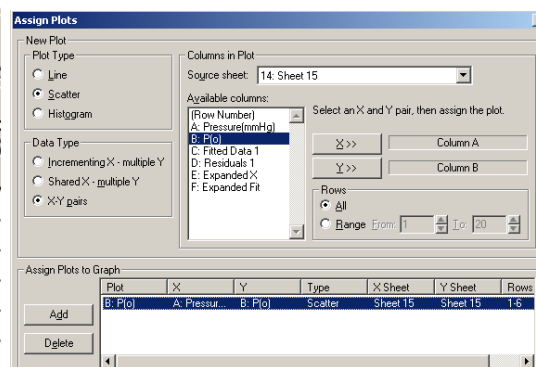
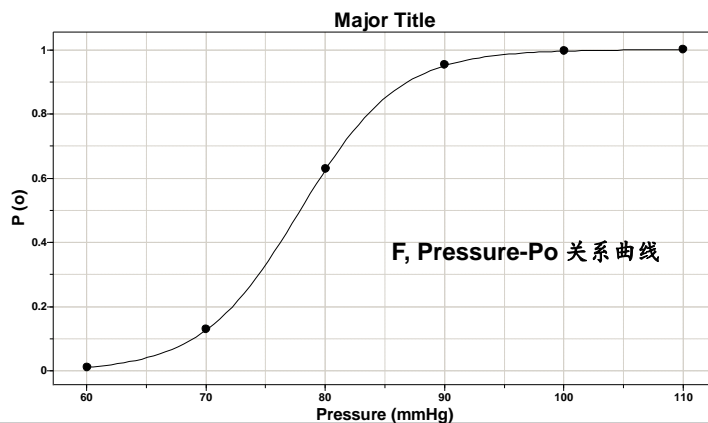
C, Sheet 14 数据表

	Search	Level	Total Time (s)	No. Events	No. Channels	P(o)	MP(o)
1	1	A11	20935.000	11	2	0.01076	0.02152
2	2	A11	20758.799	92	2	0.12920	0.25840
3	3	A11	21638.203	471	2	0.62836	1.25672
4	4	A11	21050.195	338	2	0.95276	1.90552
5	5	A11	21028.992	130	2	0.99542	1.99084
6	6	A11	20892.609	25	2	0.99926	1.99852

D, Sheet 15 数据表

	Pressure(mmHg)	P(o)
1	60	0.0107618
2	70	0.129198
3	80	0.62836
4	90	0.95276
5	100	0.995422
6	110	0.999258

E, Assign Plots 设定框

F, Pressure-Po 关系曲线

图 31. 单通道开放概率 (Po) 的计算过程

#### (5) 对压力-单通道开放概率关系曲线进行拟合

选择“Boltzmann, charge-voltage”方程进行拟合，在 Fit 窗口中要作如下设定：

- Function/Method：选“Boltzmann, charge-voltage”方程，拟合方法选择 Select fitting methods automatically，让 Clampfit 自动选择拟合方法。
- Data Option 中，只选择 Attempt refit on failure。
- Seed Values 中，将 I<sub>max</sub> 固定为 1，C 固定为 0。
- 点击 OK，可得到 Boltzmann 曲线（图 31F）。

#### (6) 对拟合结果进行分析

“Boltzmann, charge-voltage”方程为：

$$f(V) = \frac{I_{max}}{1 + e^{(V_{mid} - V)/V_c}} + C$$

我们需要对其进行一些参数转换：

f(V)=P<sub>o</sub>，单通道开放概率

V<sub>c</sub>=1/α，通道对负压的敏感度（mmHg），为拟合获得的重要指标

V=P，施加的负压值

V<sub>mid</sub>=P<sub>1/2</sub>，通道 50%开放时的压力值，为拟合获得的重要指标

I<sub>max</sub>=1，以通道 100%开放为 1

C=0，P<sub>o</sub> 的位移设为 0

转换后的方程（写在文章实验方法中的方程）为：

$$P_o = \frac{1}{1 + e^{\alpha(P_{1/2} - P)}}$$

用 Boltzmann 方程拟合后，获得的拟合结果见图 32。

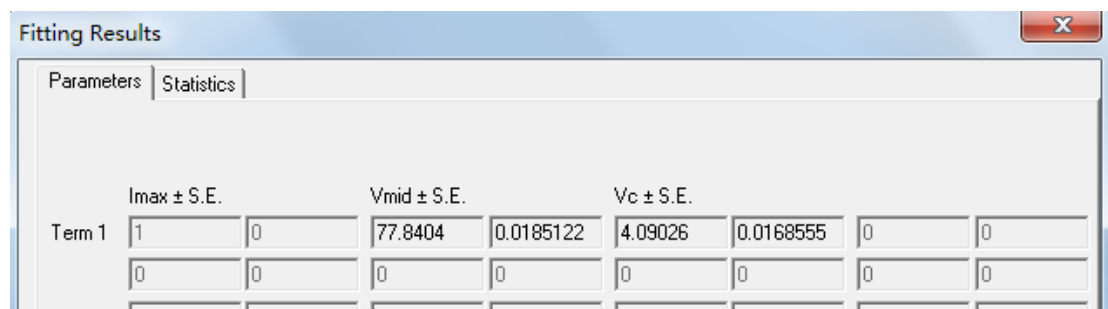


图 32. Boltzmann 方程的拟合结果

结果显示：

P<sub>1/2</sub> = 77.8 mmHg

1/α = 4.09 mmHg

### 3. 总结

(1) 单通道概率分析的前提是：能观察到膜片上的通道全部开放的情况，进而知道膜片上通道的最大数目。

(2) 单通道开放概率的分析过程可分为如下 5 个步骤：

- 对获得的单通道数据进行开放事件的检测；
- 计算不同刺激条件下（药物、电压、压力等）通道的开放概率  $P_o$ ；
- 作不同刺激条件（药物、电压、压力等）—开放概率关系曲线的散点图；
- 用 Boltzmann 方程对散点图进行拟合；
- 获得拟合参数并分析。

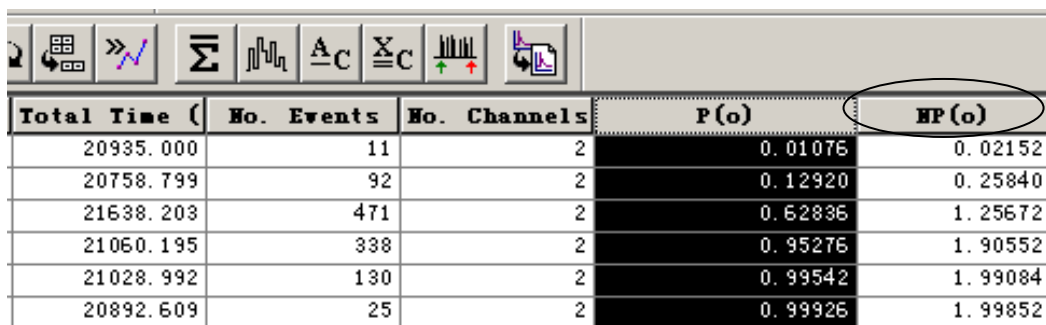
### 三、多通道开放概率的分析

#### 1. NPo 的概念

如果给予最大的刺激因素（如压力，直至膜片破裂）仍没使膜片上的通道全部开放，那么我们就无法知晓膜片上通道的总数  $N$ ， $P_o$  也就计算不出来，此时我们只能计算  $NP_o$ （多通道开放概率）。

前述实例中，在 Sheet 14 数据表也有  $NP_o$  数值（图 33 中以  $NP(o)$  显示），这 6 个  $NP_o$  同样对应于 6 个不同的负压，据此可获得压力- $NP_o$  关系曲线，并可用下面的 Boltzmann 方程进行拟合。

实际上， $P_o$  是在知道了通道最大数目  $N$  后，从  $P_o = NP_o / N$  得到的。



Total Time (s)	No. Events	No. Channels	P(o)	NP(o)
20935.000	11	2	0.01076	0.02152
20758.799	92	2	0.12920	0.25840
21638.203	471	2	0.62836	1.25672
21060.195	338	2	0.95276	1.90552
21028.992	130	2	0.99542	1.99084
20892.609	25	2	0.99926	1.99852

图 33. Sheet 14 数据表中显示的  $NP_o$

用于拟合压力- $NP_o$  曲线的 Boltzmann 方程：

$$NP_o = \frac{NP_{o_{\max}}}{1 + e^{\alpha(P_{1/2} - P)}}$$

式中， $NP_o$ ：多通道开放概率

$NP_{o_{\max}}$ ：观察到的所有开启通道的最大开放概率

$\alpha$ ：其倒数为通道对负压的敏感度（mmHg）。

$P$ ：施加的负压值。

$P_{1/2}$ ：通道 50% 开放时的压力值。

根据定义， $NP_{o_{\max}}$  的数值实际上就是开启的通道数目，我们可通过记录的数据直接观察出来。因此在拟合时，可将  $NP_{o_{\max}}$  设定为一个固定的数值。例如，如果在给予一系列负压的条件下，膜片上最多开放 5 个通道（我们不能确定膜片上是否只有 5 个通道），则该膜片的  $NP_{o_{\max}}$  为 5。用 Boltzmann 方程拟合后，可获得  $P_{1/2}$  和  $1/\alpha$ 。

#### 2. $NP_o$ 分析实例

图 34 中，钳制电位为 +10 mV，在施加压力 -68 mmHg 情况下，先记录一段通道的开放情况，获得开放概率  $NP_{o_{\text{control}}}$ ，然后在记录液中灌流给予糜蛋白酶（Chymotrypsin, 300  $\mu\text{g/ml}$ ），再观察通道开放情况，获得开放概率  $NP_{o_{\text{chymotrypsin}}}$ 。实验发现： $NP_{o_{\text{chymotrypsin}}}$  明显大于  $NP_{o_{\text{control}}}$ 。



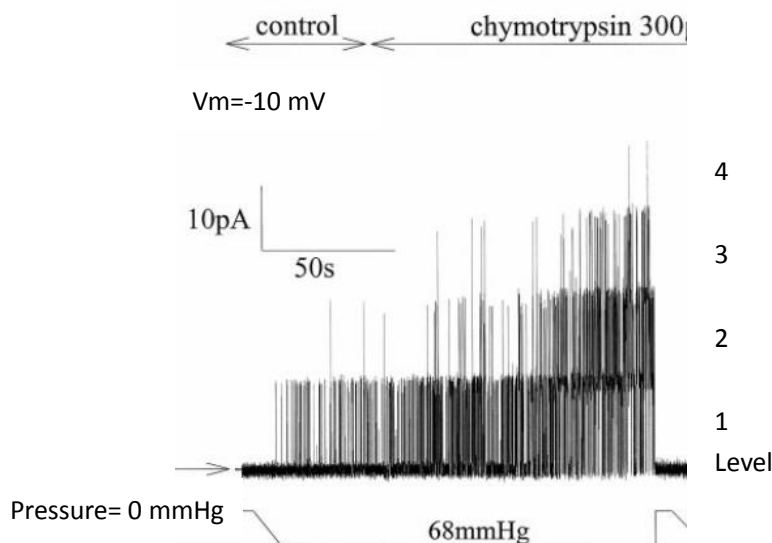


图 34. 糜蛋白酶对 MscL 通道开放概率的影响

不同膜片上离子通道的数目一般不容易相同，所以同一负压下，不同膜片的  $N_{Po}$  和  $N_{Po_{max}}$  都可能不会相同。为便于比较，应该用  $N_{Po_{max}}$ （如果给药前后两次记录中  $N_{Po_{max}}$  不同，要选择最大的  $N_{Po_{max}}$ ）进行标化（ $N_{Po} / N_{Po_{max}}$ ），这样同组不同膜片之间的  $N_{Po}$  可进行平均，这点与  $P_o$  不同。图 34 只是一例膜片的结果，将观察指标标化为（ $N_{Po_{control}} / N_{Po_{max}}$ ）和（ $N_{Po_{chymotrypsin}} / N_{Po_{max}}$ ），这样就便于将不同膜片上的  $N_{Po}$  进行平均，获得（ $N_{Po_{control}} / N_{Po_{max}}$ ）和（ $N_{Po_{chymotrypsin}} / N_{Po_{max}}$ ）的平均值与标准差，然后将两者进行统计学处理。注意本例中  $N_{Po_{max}}=4$ 。

如果要分析压力- $N_{Po}$  曲线，首先要获得不同负压条件下的  $N_{Po}$ ，继而得到药物（影响因素）施加前后的两条曲线。对这两条曲线进行 Boltzmann 拟合， $N_{Po_{max}}$  采用最大开放通道数（无论药物施加前后），则可获得  $P_{1/2}$  和  $1/\alpha$ 。

## 四、单通道 I-V 曲线

### 1. I-V 曲线的意义

在单通道记录中，通道电流大小与膜片两侧电压差大小（钳制电位）之间的关系曲线即为 I-V 曲线。它是反映通道特征的一个重要指标，可以反映通道的反转电位（Reversal potential）、斜率电导（Slope conductance）的大小。某些药物或其他因素可能会影响通道性质，继而改变 I-V 曲线的形状和位置。因此，I-V 曲线成为一个很重要的观察指标。

I-V 曲线受膜片两侧液体成分的影响，当膜片两侧的液体为同一液体（成分与浓度相同）时， $V_{rev}=0$  mV。

给予膜两侧不同的步阶电压（Voltage step），测量单通道电流幅度值，从而获得单通道 I-V 曲线，将 I-V 曲线进行直线回归可求得单通道斜率电导（图 35）。

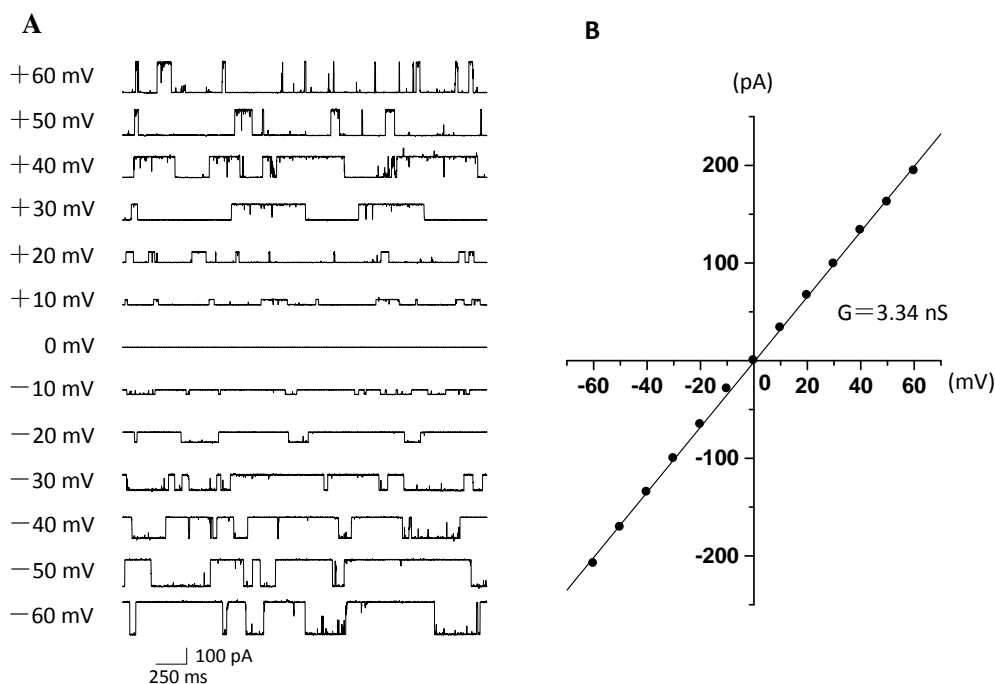
### 2. 用 Clampfit 制作 I-V 曲线的步骤

首先要在 Clampex 中获得给予不同步阶电压情况下的通道开放电流，并保存为数据文件（.abf），然后在 Clampfit 中打开该文件，开始制作 I-V 曲线：

（1）对数据进行基线调零、坏点（如 Glitch）去除，根据情况进行滤波。

（2）用 Histogram 功能和高斯拟合测算每个 Sweep 的单通道平均电流值。在图 35 的例子中，要测算出总共 13 条 Sweep 的 13 个单通道平均电流值，这些电流值分别对应于从 -60 到 60 mV（间隔 10 mV）的步阶电位（Vm）。





**图 35.单通道 I-V 曲线的制作**

**A**, 显示膜片在不同步阶电压下通道电流的变化。膜片两侧液体相同。

**B**, 为根据 A 图作出的 I-V 曲线, 反转电位为 0 mV, 经回归后求得单通道斜率电导  $G = 3.34 \text{ nS}$ 。

数据来自脂质体上构建的细菌机械敏感性 MscL 通道, 施加的负压稳定在 -70 mmHg。

(3) 将获得的 13 个单通道电流值 ( $I$ , pA) 与相应的 13 个步阶电压值 ( $V_m$ , mV) 输入到 Results 窗口空白表格中 (如 Sheet 20)。

(4) 选择步阶电压栏  $V_m$ , 点击快捷按钮 X, 将该栏设为 X 轴数据, 选择通道电流栏  $I$ , 点击快捷按钮 Y+, 将该栏设为 Y 轴数据。点击 Create Graph 作图。

(5) 执行 Analyze/fit 功能, 开启 Fit 设定框。在 Function/Method 中, 选择 “Straight line, standard” 作为回归方程、Number of terms 设 1、让 Clampfit 自动选择拟合方法。Data/Options 和 Seed Values 中不作设定。

(6) 点击 OK 作回归曲线, 点击 Analyze/Fitting Results, 开启拟合结果框, 可见斜率  $m$  (斜率电导) 和截距  $b$ 。

#### 注意如下几点:

- 如果膜片上含有不止一个通道, 而且通道的开放概率太高, 没有单个通道开放的情况出现, 则无法进行回归。此时, 如果标本是人工质膜, 应该降低通道蛋白嵌入量, 进而降低膜片上通道的数目; 如果观察的是配体门控性离子通道, 应该降低配体的使用浓度。
- 如果通道亚开放状态较多, 则所测量的平均电流幅度值会出现偏差, 此时需要人工选择所测量的开放事件, 避免亚开放状态被计入内。
- 如果通道存在一些闪烁开放现象, 可通过升高入检事件的阈值或者对入检事件的持续时间进行限制, 也可进行人工选择, 使所入检的事件中不包含闪烁现象。
- 通过测量多个膜片, 可获得样本量  $n$ , 求出平均的 I-V 曲线。由于膜片上单通道电流幅度的大小不受细胞大小的影响, 所以不用标化即可进行平均。

## 五、单通道开放时间分布的直方图

以 Clampfit 软件自带的文件 4level.abf 为例，说明单通道开放时间分布的直方图制作过程。

### 1. 单通道事件的检测

(1) 打开单通道数据文件 4level.abf。该文件共有 4 个开放水平（含基线），其基线稳定（但偏离零点线）、没有坏点、噪声小。对数据进行基线调零。

(2) 打开菜单 Event Detection/Single-Channel Search，设置如下：

- Levels: 点击 Make 增加阈值水平至 3 个，并将各个 Level 放置在各自通道电流幅度位置。
- Update levels automatically: 因该数据基线平稳，可不选此项。
- Ignore short level changes: 不选。
- Latency Mode: 勾上，并设为 0 ms。
- Search Region: 选择 Full trace。

(3) 选择 Nonstop，自动检测事件。检测的结果存放在 Results 窗口 Event 数据表中。

(4) 检查 Event 数据表中的数据，如果没有异常数据点，就可进行下一步。但之前，要选择 Event Detection/Quit Event detection，退出检测。因为只有先退出检测，后续的对直方图的 Y 轴开方 (Analyze/Square Root) 功能才能执行。

### 2. 用 Fast Graph 功能制作单通道开放时间分布的直方图

(1) 打开 Analyze/Event Analysis/Fast Graph，设定如下：

- Histogram 选择 Logarithmic 作对数直方图，Bin/decade 输入 60。
- 不选择 Condition。
- 选择 Use level，对开放水平 1 作图；同时通过 Level 按钮选 C: Level。
- X 轴选 I: Dwell Time (ms)。
- 对 X 轴数据不进行限制。
- 选 Full column。
- 选 Create new graph，建新图。
- 点击 OK 作图。

(2) 在直方图窗口中，执行 Analyze/Square Root 功能，将事件数目开方，这样纵坐标变成了 Square Root Count (N)。

(3) 执行 Analyze/Fit 功能，开启 Fit 设定框。

- Function/Method: 选择 “Exponential, log probability” 作为拟合方程（见下），Number of terms 设为 6，让 Clampfit 自动选择拟合方法。

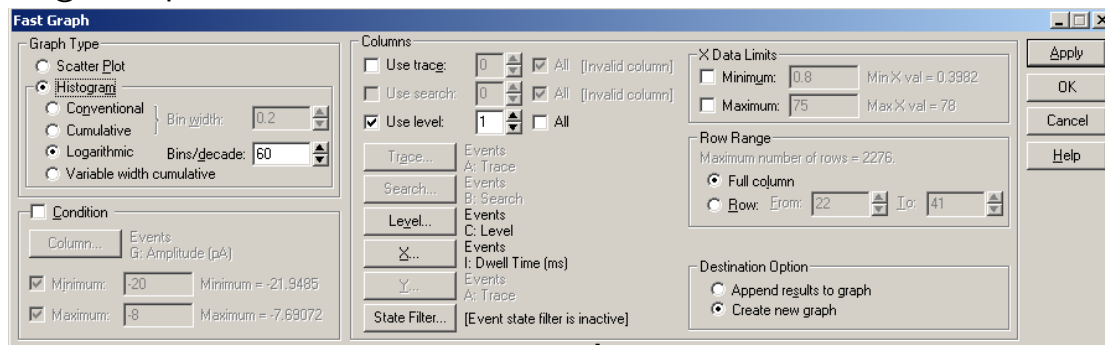
$$f(t) = \sum_{i=1}^n P_i e^{[\ln(t) - \ln(\tau_i)]} e^{\ln(t) - \ln(\tau_i)}$$

上式中， $\tau$  为单通道平均开放时间。

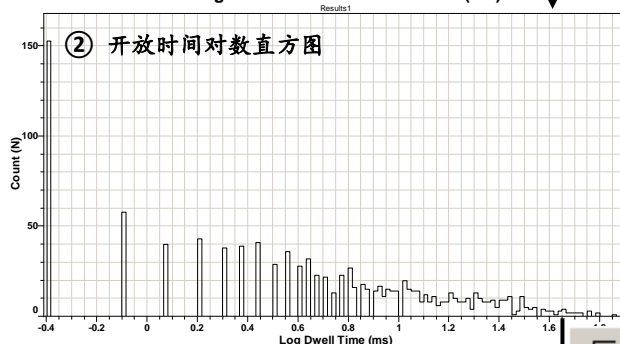
- Data/Options: 选择 Compare Models 和 Automatic。
- Seed Values: 不作设定。
- 点击 OK 作拟合曲线。

(4) 打开 Analyze/Fitting Results 拟合结果框，本例中可见时间常数  $\tau$  值（单通道平均开放时间）有两个，分别为 0.04 和 14.54ms，表明该通道开放时间长短多集中在这两个时间段。图 36 显示了单通道开放时间分布直方图制作的过程。

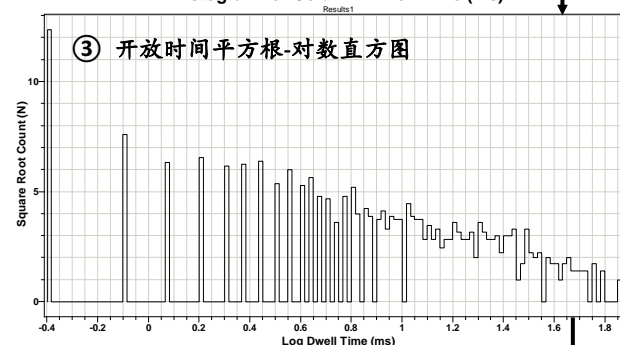
# ① Fast Graph 设定框



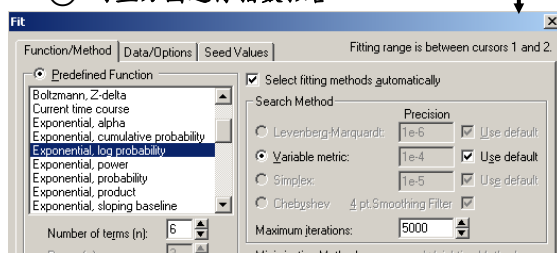
Histogram for Column: Dwell Time (ms)



Histogram for Column: Dwell Time (ms)

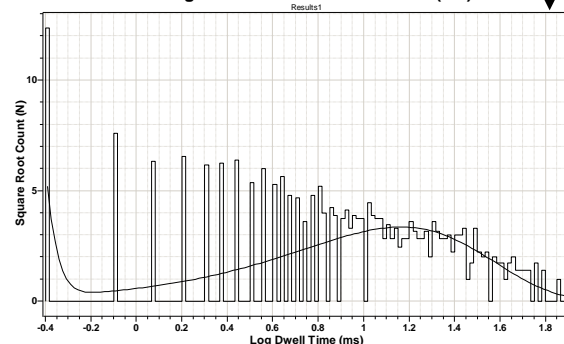


# ④ 对直方图进行指数拟合



# ⑤ 拟合曲线

Histogram for Column: Dwell Time (ms)



# ⑥ 拟合结果

Fitting Results				
Parameters		Statistics		
All parameters were forced positive by default.				
	P ± S.E.		tau ± S.E.	
Term 1	11075.9	55454.9	0.0405096	0.533411
Term 2	9.13654	0.736684	14.5386	0.114792

## 突触自发活动数据的分析

### 一、突触自发活动的特点

神经元的突触自发活动有兴奋性与抑制性突触活动。兴奋性突触活动包括：

(1) 微小兴奋性突触后电流 (mEPSC)：是突触前膜 Glu 随机量子释放引起的突触后膜反应。其频率增高反映 Glu 随机量子释放的频率增加，幅度增高反映同一时刻 Glu 量子释放数目的增加。它不受河豚毒素 (TTX) 的影响 (图 37B)。

(2) 自发兴奋性突触后电流 (sEPSC)：是突触前膜由自发动作电位诱发的 Glu 释放而引起的突触后膜反应 (图 37A)。它可被 TTX 完全抑制 (图 37B)。其频率增高反映诱发的 Glu 量子释放数目的增加，幅度增高反映同一时刻突触前递质释放总量的增加，也反映突触后膜受体的反应性增高和/或受体数目增多。

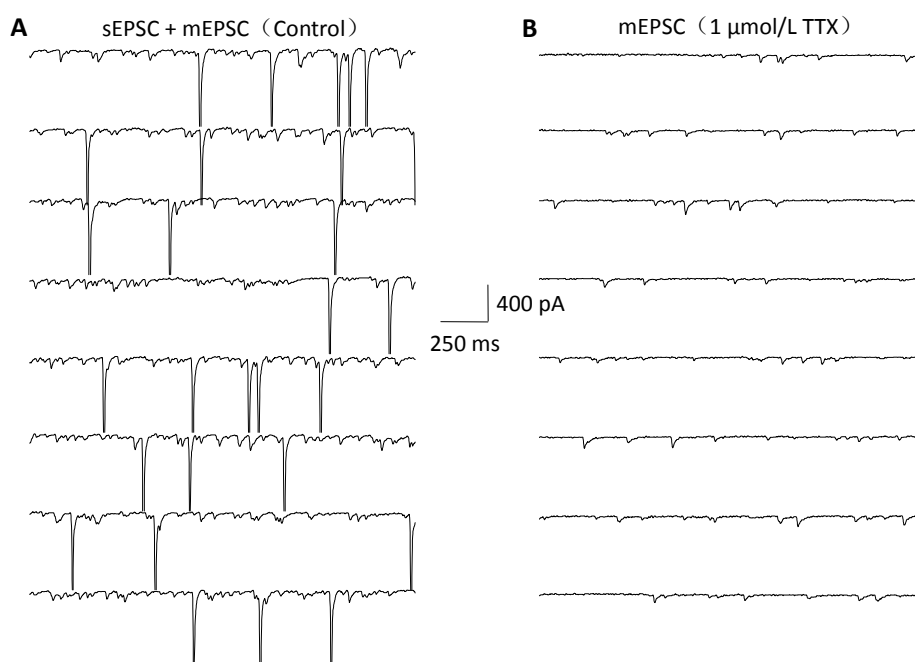


图 37. 突触自发兴奋性活动：sEPSC 和 mEPSC

(3) 自发动作电流 (Spontaneous action current, sAC)：当由突触前膜自发动作电位诱发的 Glu 量子释放达到较大数量时，突触后膜在产生的 sEPSC 基础上就引发了 sAC (图 38)，它可被 TTX 完全抑制。

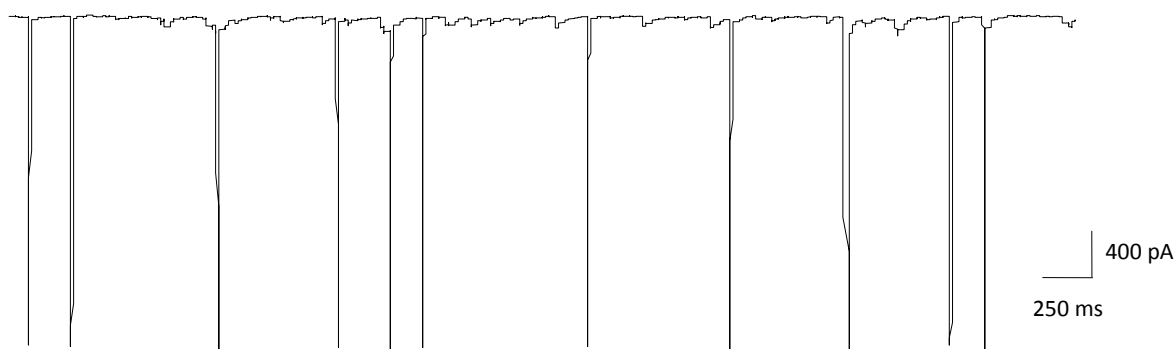


图 38. 突触自发兴奋性活动：mEPSC、sEPSC 和 sAC

抑制性突触活动包括微小抑制性突触后电流 (mIPSC) 和自发抑制性突触后电流 (sIPSC) (图 39)。两者产生机制分别与 mEPSC 和 sEPSC 一致, 并且 mIPSC 不受 TTX 影响, 而 sIPSC 也能被 TTX 阻断, 只是它们由 GABA 所介导。

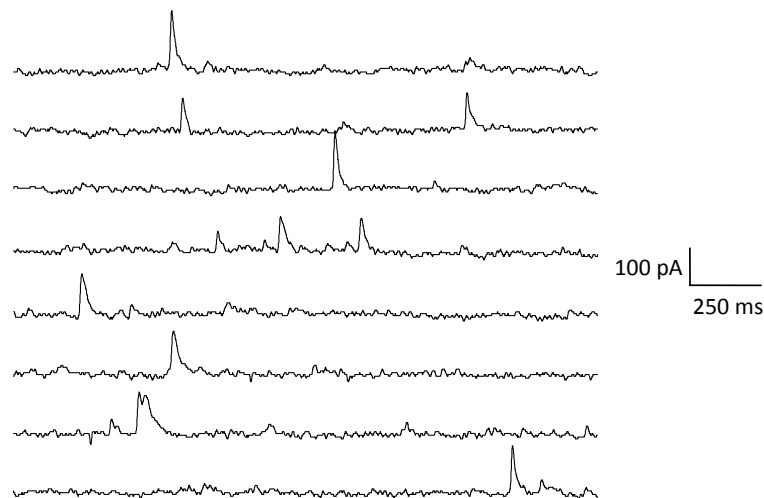


图 39. 突触自发抑制性活动: mIPSC 和 sIPSC

## 二、突触电流的检测

Clampfit 对突触自发活动电流的检测采用的是模板检测功能 (Template Search)。首先要创建一个模板, 然后按照创建的模板对突触电流进行检测。

### 1. 突触电流检测模板的创建

检测模板的创建在 Event Detection/Create Template 设定框中进行 (图 40)。具体创建方法如下:

#### (1) 打开数据文件进行数据处理

以 Clampfit 自带的数据文件 minis01.abf 为例。对基线进行调零, 可不用滤波, 没有坏点。

#### (2) 打开 Event Detection/Create Template 设定框

移动该框到合适位置, 使要测量的数据文件区段不被遮挡。

#### (3) 寻找作为模板的突触电流

移动 Cursor 1、2, 从数据中选择一个形状较为典型的突触电流, 此时 Create Template 设定框中的 Source 屏幕显示出该突触电流。

#### (4) 确定作为模板的突触电流

若对上述选择的突触电流满意, 则点击 Add, 此时 Source 屏幕中的突触电流作为模板显示在 Template 屏幕中, 同时 Cursor 1、2 被锁定在一起, 这样后面再寻找的模板将保持同一宽度不变。

此外注意:

- Find next after add 功能: 点击 Add 后, Cursor 自动移动到下一个突触电流处, 要勾上。
- 若对显示在 Source 屏幕的突触电流不满意, 可点击 Next, Cursor 会自动移动到下一个突触电流处。

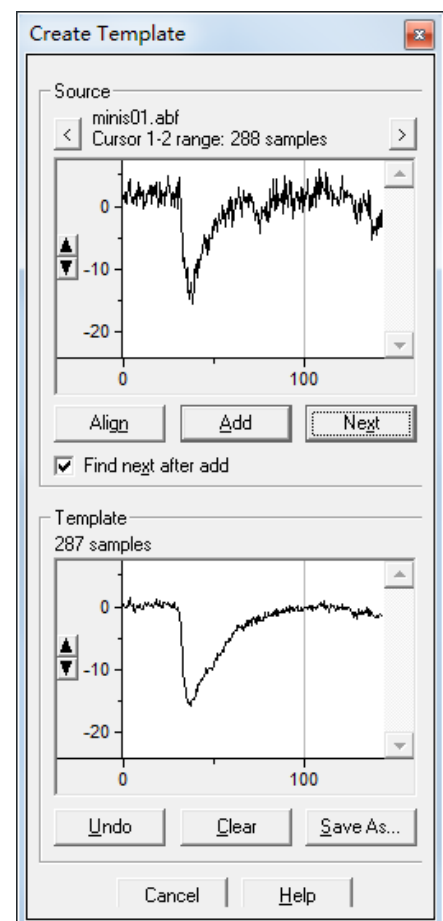


图 40. 突触电流检测模板的创建



#### (5) 持续寻找并确定作为模板的突触电流，直到电流的形状满意为止

若发现满意的下一个突触电流，再次点击 Add，则 Template 屏幕中显示的将是两次突触电流的权重平均值。连续进行这一步骤，直到模板的形状达到满意（大多数电流的形状）为止。

注意：

- 点击 Add 后，Cursor 1、2 会自动移动到下一个突触电流处，但这种自动功能有时并不准确，Cursor 1、2 移动的下一个突触电流很可能不是我们要用来做成模板的。因此，我们要有选择地点击 Add，以获得更为标准的模板。
- “Align” 表示“排齐、对齐”的意思。当 Cursor 自动找到下一个突触电流时，Align 已经自动执行了，即找到基线到突触电流峰值一半的那个点，使该点与 Template 中相应的那个点对齐。我们可以继续使用“<”或“>”按键做进一步的细微调节。
- 有时点击 Add 时，出现“This event cannot be aligned properly with the template. Ensure the rising edges are aligned before adding it”信息，表示 Align 功能不能自动正确执行。一般这种情况发生在找到的突触电流形状与 Template 中的相差较大时，点击 Next 即可。
- 若对刚刚入选的突触电流不满意，可用 Undo 取消。
- 若对已经确定的模板不满意，可点击 Clear，清除模板，再重新开始创建。此时若需要将 Cursor 1、2 解锁，可双击 Cursor 开启 Cursor Properties 设定框，在其右下角的 Cursor Properties 中取消 Lock to partner 选择即可。

#### (6) 将最终确定的模板保存为\*.atf 文件

该文件自动保存在 SearchParams 文件夹，可在检测同类突触电流时调用。

## 2. 突触电流的检测

打开 Event Detection/Template Search 设定框（图 41），设置如下：

#### (1) Category

● Category 的数目（本例 minis01.abf 文件设为 2 个）。由于自发突触活动的发放形式不尽相同，在检测时若只采用一个模板可能会导致突触电流事件的丢失。通过选择不同的检测类别，对应地选择不同的模板就可防止事件的丢失。设定多个 category 后，Clampfit 对检测到的突触电流采用不同颜色的标记以示区分。

● 兴奋性突触后电流的方向向下，选择 Negative-going。抑制性突触后电流的方向向上，应选择 Positive-going。

● 不选择 Allow multiple categories per event。如设了几个模板，有些突触电流可能同时符合几个模板的要求，电流检测时，一个电流可能被检测多次，选择 Allow multiple categories per event，则在 Results 窗口 Events 数据表中将出现多次重复检测的结果，突触电流的数目将比实际的多。如果不选择该项，在检测时没有重复。

#### (2) Template

● 点击 Template，选择所创建的合适模板。Template 屏幕上将显示所选模板电流的形状。

● 选择 Variable amplitude template，使不同幅度的突触电流都能被检测到。

● Set baseline：勾上 In template，表示在 Template 模板中设定基线。用鼠标移动 Template 屏幕中水平基线的标志线到零点位置，适用于采样数据的基线不是很稳定时。如果数据本身的基线非常稳定，也

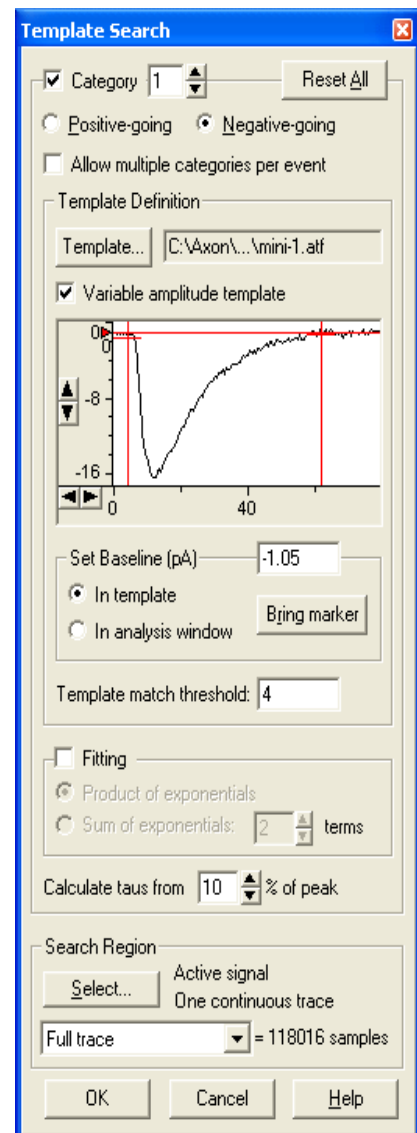


图 41. 用于突触电流检测的  
Template Search 设定框

可选 In analysis window。此外，点击 Bring marker，可显示出基线标记和 Template 的基线数值（pA）。

- **Template match threshold:** 输入 4。输入的数值表示检测的突触电流与模板的相近程度，该值越大，则漏检事件越多，反之，假象事件越多。默认值为 4，可使漏检事件与假象事件趋于平衡。进行检测时要根据具体的漏检情况设定。

### (3) Fitting

勾选 Fitting 表示通过指数拟合的方法检测突触电流，获得的有关电流的数据是拟合数据。

- 勾选 Product of exponentials，是指采用“Exponential, product”方程进行拟合，该方程在 Clampfit 中专门用于突触电流（电位）的拟合。

- Sum of exponentials: 指采用多阶指数方程进行拟合，可选择项数（terms）。

### (4) Calculate taus from [ ]% of peak

指 Clampfit 在计算上升与下降时间时所测量的范围。例如，若输入 10%，则在计算上升与下降时间时，测量的范围是从电流幅度的 10%到峰值。在不选择 Fitting 时，根据需要可输入百分数值；在选择了 Product of exponentials 时，因通过拟合可以求得上升时间常数和下降时间常数，故不需再对其进行设定。

### (5) Search Region

选择检测的 Sweep 或数据范围，本例选 Active signal 和 Full trace。

- 如果数据文件为 Sweep 形式，可以同时对所有 Sweep 进行检测，也可分别对每个 Sweep 进行检测，获得的结果通过 Events 数据表中不同的 Trace 来区分。

- 对于用 Gap-free 模式采集的连续型数据文件，若其含有对照组区段与不同的实验组区段，则可通过选择检测 Cursor 1、2 或 3、4 来对各段分别检测，获得的结果通过不同的 Search 来区分。若对照组与实验组来自不同的数据文件，则可采用 Analyze/Concatenate Files 功能将这些文件连接成一个文件。连接时要注意连接的顺序，为清晰起见，最好将对照组文件放在前面。

### (5) 设定完成后，点击 OK 开始检测

检测的方法同单通道事件检测一样，可以采用 Nonstop 自动检测，也可手工逐个检测。检测过程可通过 Event Monitor 或 Event Viewer 来观察而决定取舍。被检测的突触电流用符号标记在突触电流上（图 42）。

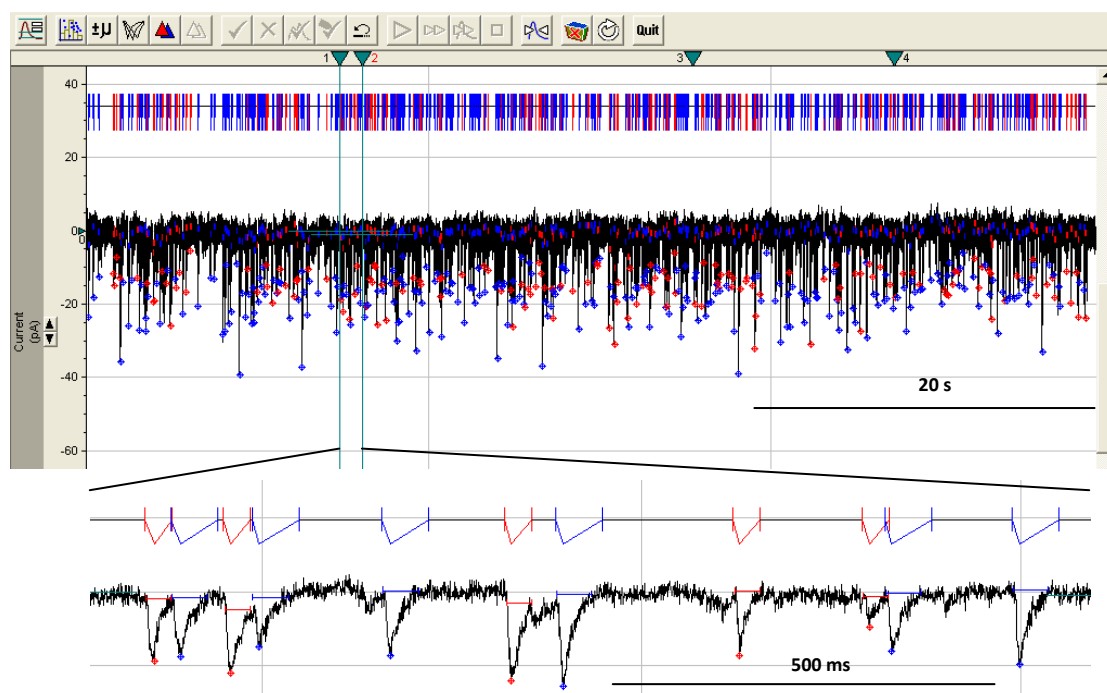


图 42. 用 Template Search 创建模板法对突触电流进行检测

下图为上图 Cursor 1 与 2 之间区域的放大

### 三、突触电流的分析

突触电流检测完成后,检测结果显示在 Results 窗口 Events 数据表中。同时检测的统计结果显示在 Event Detection/Event Statistics 信息框中(图 43)。对突触电流的分析主要包括电流发放频率和电流幅度的分析。

#### 1. 突触电流发放频率的分析

##### (1) 突触电流发放频率的计算

● 电流检测时只设定一个 category 时,可从 Event Statistics 信息框中看到电流发放频率数值(Instantaneous frequency)。

● 电流检测时设定了多个 category,则 Event Statistics 信息框将分别显示每个 category 的电流发放频率。若要计算所检测的全部电流发放频率,则需要到 Events 数据表中对电流发放频率一栏 Inst. Freq. (即 Instantaneous Frequency) 用 Analyze/Basic Statistics 进行统计分析,分析的结果显示在 Basic Stats 数据表中(平均值、标准差等)。

##### (2) 作电流发放频率直方图

以记录时间(选择 Events 数据表中的“Event Start Time”栏)为横轴,以突触电流发放个数(默认)为纵轴作直方图,可以看到对照区段与实验区段电流发放频率的变化(图 44A,C)。也可以突触电流发放频率(Interevent Interval)为横轴、突触电流发放个数(默认)为纵轴作直方图。

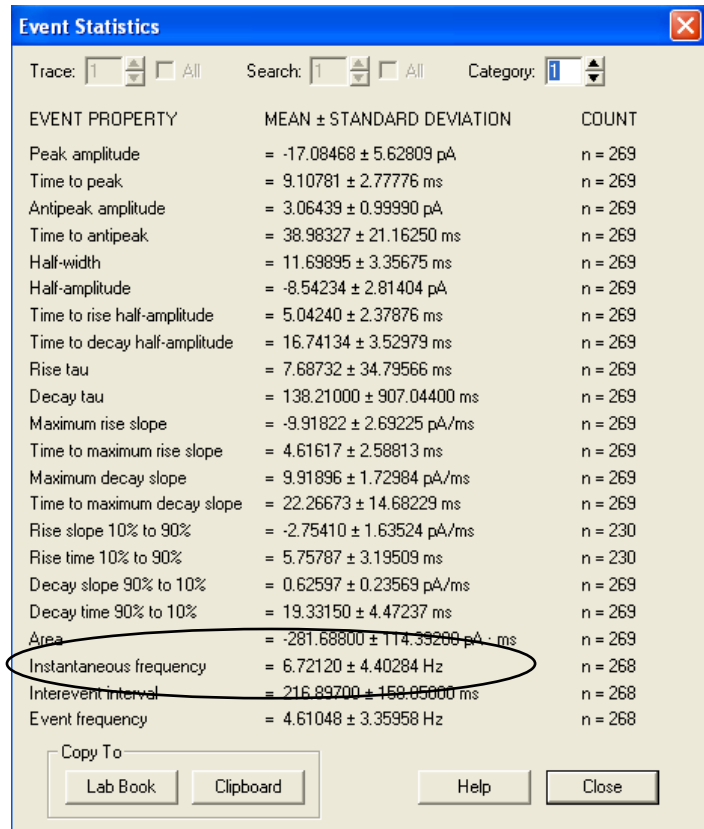


图 43. 突触电流检测结果: Event Statistics 信息框

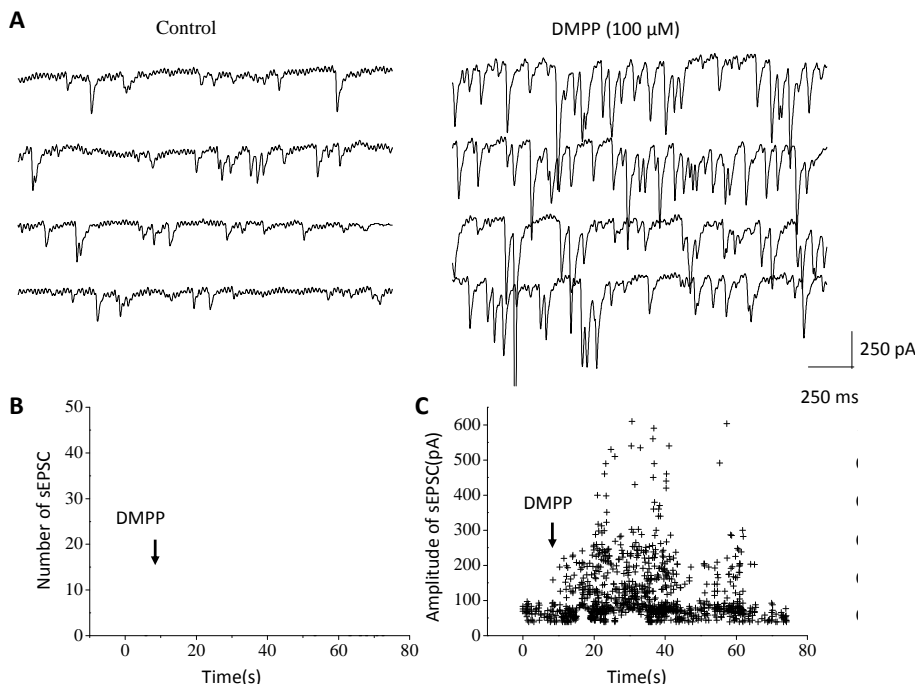


图 44. 烟碱受体激动剂 DMPP 对海马脑片 CA1 区锥体神经元 sEPSC 发放频率与幅度的影响。

A, 给予 DMPP 前后,记录的 sEPSC 频率与幅度的变化。  
B, sEPSC 频率随记录时间变化的直方图(Bin= 0.5 s)  
C, sEPSC 幅度随记录时间发生变化的散点图。

### (3) 统计检验

上述电流发放频率的结果仅是一例实验数据的结果，作统计检验需要一定的例数（如细胞数、脑片数等）。将每例实验数据所获得的电流发放频率保存在 Results 窗口空闲数据表（如 Sheet 14）中，采用 Student's t 检验（用于两组数据的比较）或方差分析（用于两组以上数据的比较）等统计学检验方法，比较对照组与实验组差别的显著性。检验结果记录在 System Lab Book 中。

注意：

- 在进行统计检验时，由于每例实验数据电流的发放频率差别可能较大，所以最好采用自身对照，对发放频率进行标准化（以对照区段的发放频率为 1）。
- 对于一些无法进行自身对照的实验，每次实验需要尽可能维持实验条件的稳定，同时实验例数也要大幅度增加，这样才能保证统计检验的可靠性。

#### 【打开 Analyze/F-Test and Student's t-Test 进行 t 检验】（图 45）

- F-Test：勾上。用于进行方差齐性检验。若检验结果是方差不齐（两组方差差异显著，即  $p$  值小于 0.05），则要选用独立方差不齐 t 检验（Unpaired (separate variance)）。如果方差齐（两组方差差异无显著性， $p$  值大于 0.05），则选择合并方差不齐 t 检验（Unpaired (pooled variance)）或配对 t 检验（Correlated paired groups）。
- Student's t-Test：获得 F-Test 的结果后，再勾上，并相应地选择 t 检验的类型。
- Select Column：选择要进行比较的两个 Column 数据。
- Row Range：选 Full Column。不勾 Perform Breakdown Analysis。
- 点击 OK，在 System Lab Book 中可看到统计结果。 $p$  值小于 0.01 或 0.05，说明两组数据的差异具有显著统计学意义。

#### 【打开 Analyze/Analysis of Variance 进行方差分析】（图 46）

- Method：有单因素方差分析（One-way ANOVA）与双因素方差分析（Two-way ANOVA）。
- Select Column：选择要进行比较的几个 Column 的数据。
- Row Range：选 Full Column。不勾 Perform Breakdown Analysis。
- 点击 OK，在 System Lab Book 中可看到统计结果。 $p$  值小于 0.01 或 0.05，说明组间数据有差异。具体是哪几个组间的数据有差异，需要进行多重比较（如采用 SNK、Tukey 法——Clampfit 软件中没有提供，可采用统计学专用软件如 SAS）。

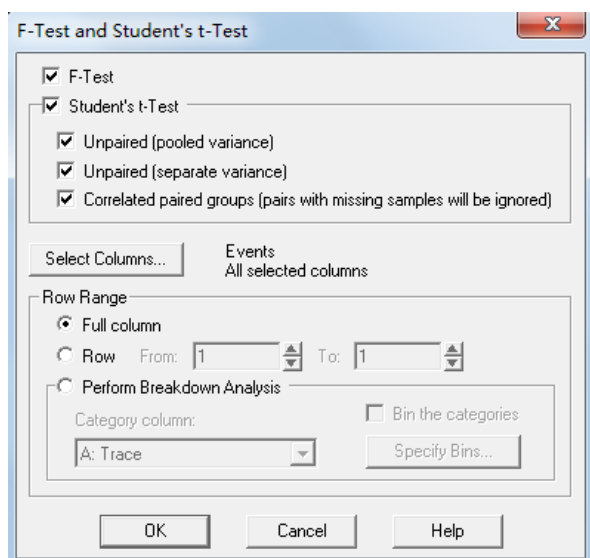


图 45. t 检验设置框

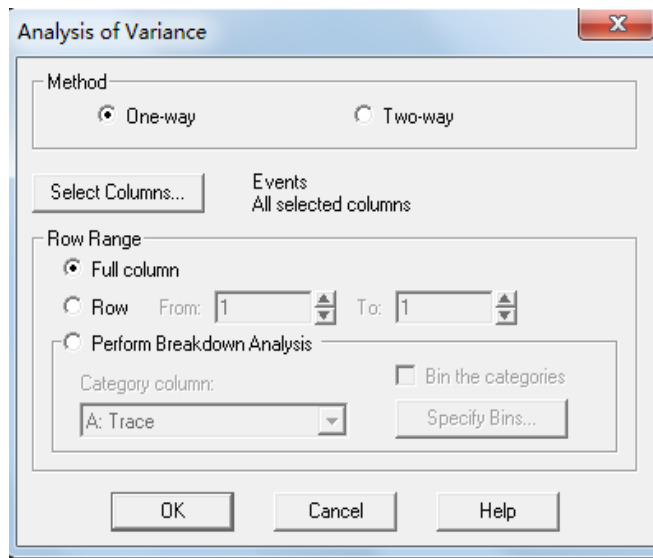


图 46. 方差分析设置框



## 2. 突触电流幅度的分析

由于突触电流幅度的分布不满足正态分布，不能采用平均幅度±标准差的形式表示，而是要采用累积概率分布图(Cumulative probability distribution)的形式表示，横轴为电流幅度(Events 数据表中的 Peak Amp 栏)，纵轴为突触电流发放个数的累积，并用最大值标化。对突触电流幅度的统计检验采用 Kolmogorov-Smirnov (K-S) 检验。

### (1) K-S 检验简介

K-S 检验是一种非参数统计方法，适用于数据不满足正态分布的情况。当进行两组（或更多组）K-S 检验时，它抛开函数的分布特征，只考察这两组函数之间的差别，据此判断它们是否属于同一个函数分布。

K-S 检验是以不同组数据累积函数之间的最大垂直距离(D)作为测量指标，然后以此计算两组数据属于同一分布的概率，判断这些函数彼此的相似性或差异性。其基本方法为：

- 将突触电流幅度值  $X_1, X_2, \dots, X_n$  由小到大排序，对应的突触电流频率数  $F_N(X_1), F_N(X_2), \dots, F_N(X_n)$  也随之排序。
- 依次将排序后的突触电流频率数进行累加，并以最后的累加值为 1，将频率数转换成相对累积频率，以突触电流幅度  $X$  为横坐标，以相对累积频率为纵坐标，作出累积概率（频率）分布图（图 47）。

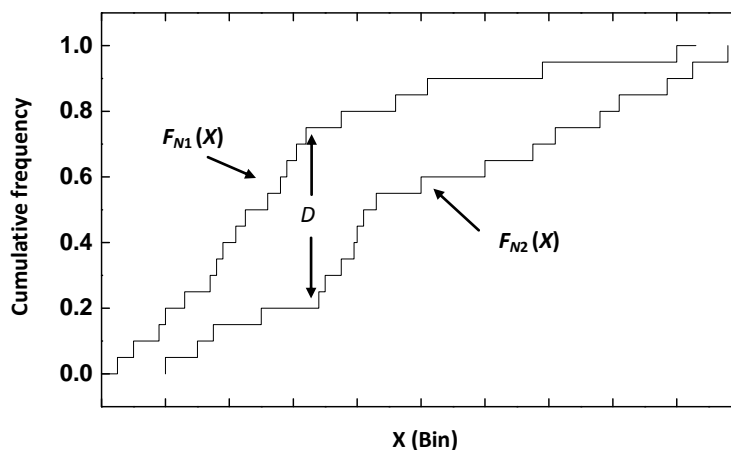


图 47. K-S 统计变量 D

$F_{N1}(X)$  和  $F_{N2}(X)$  分别为两组突触电流相对累积频率分布

- 依次求出两组突触电流相对累积频率之差，找出最大差值 D，即 K-S 统计变量（见下表）。
- 根据 D，可求出两组突触电流数据属于同一分布的概率  $p$ ，得出统计学结论，说明两组突触电流其幅度是否有显著性差异。

表. K-S 检验中相对累积频率的计算举例

X (pA) (Bin)	发放频率数 (对照组)	累积频率数 (对照组)	相对累积频率 $F_{N1}(X_1)$ (对照组)	发放频率数 (实验组)	累积频率数 (实验组)	相对累积频率 $F_{N2}(X_2)$ (实验组)	相对累积频率 的绝对差值
3	1	1	0.0256	4	4	0.0364	0.0108
6	2	3	0.0769	5	9	0.0818	0.0049
9	3	6	0.1538	5	14	0.1273	0.0265
12	12	18	0.4615	19	33	0.3000	<b>0.1615 (D)</b>
15	4	22	0.5641	23	56	0.5091	0.0550
18	5	27	0.6923	17	73	0.6636	0.0287
21	3	30	0.7692	16	89	0.8091	0.0399
24	2	32	0.8205	6	95	0.8636	0.0431
27	3	35	0.8974	8	103	0.9364	0.0390
30	4	<b>39 (<math>N_1</math>)</b>	1	7	<b>110 (<math>N_2</math>)</b>	1	0



## (2) Clampfit 作相对累积频率分布图和进行 K-S 检验的步骤

● 突触电流检测完成后，将 Results 窗口 Events 数据表 Peak Amp 栏的数据拷贝到一个空闲数据表（如 Sheet 14）中。这里有两种情况：

- 如果对照组与实验组不在同一个文件（分别采集得到两个或以上的文件），则需要分别进行检测，将检测结果分别拷贝、粘贴到同一空闲数据表不同的栏内。注意在检测下一个文件前，需要将拷贝的数据保存为\*.rlt 文件。
- 如果对照组与实验组的数据在同一个文件中，要利用 Cursor 分别进行检测，在检测结果中会看到有两个（或多个）Search，即表示两次（或多次）的检测结果。如果数据点少，可以直接将数据选中、拷贝和粘贴到空闲数据表中。如果数据点很多，可通过 Analyze/Extract Data Subset 功能分别将不同 Search 的数据抽取，放置在不同的栏内。具体方法是，打开 Analyze/Extract Data Subset，设置如下（图 48 左侧）：

- Source columns: Select---cH（即 Peak Amp 栏）；Row Range---Full Column
- Grouping: Column---B:Search；By category---依次选择 1、2....（Search 的数目）
- Destination: 选择存放数据的空闲数据表；选择 Append column to sheet
- 点击 OK，得到不同组的数据表（图 48 右侧）

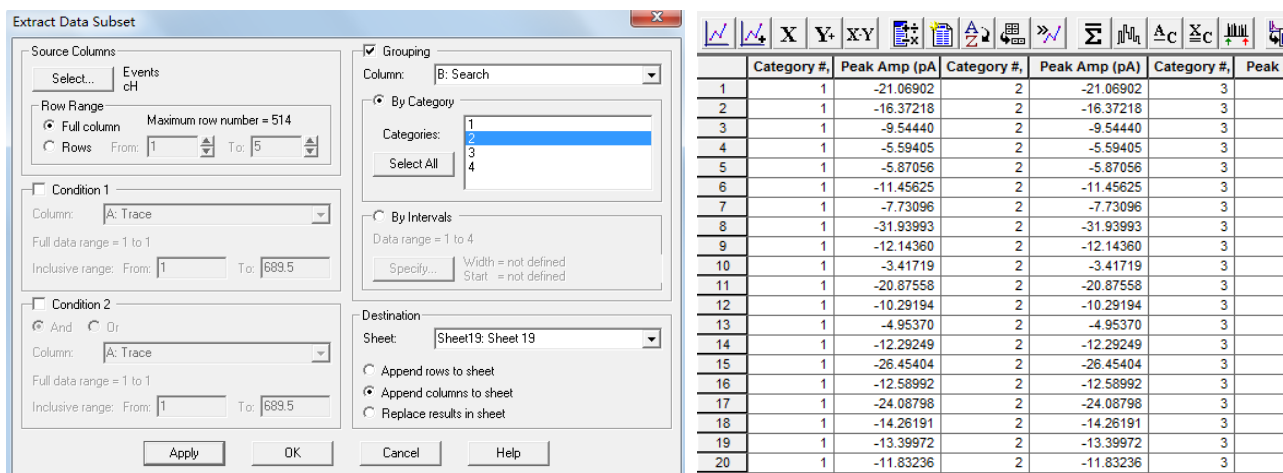


图 48. 左：Extract Data Subset 设置框。右：用 Extract Data Subset 功能将不同组的数据存放在数据表。

● 采用上述方法将所有采样文件中对照组和实验组 Peak Amp 栏数据全部拷贝到上述保存的\*.rlt 文件相应的栏内，这样就完成了数据的整理工作（图 49A）。

● 打开 Analyze/Kolmogorov-Smirnov Test 设定框（图 49B），对框中内容进行设定：

**Ascending sort:** 将电流幅度数据按逐渐增大的顺序排列，用于计算累积频率。选择该项只得到检验的结果，不能作出累积频率分布图。

**Cumulative binning:** 能得到检验的结果，还可作出累积频率分布图，幅度轴（X 轴）以电流幅度的 bin 宽来表示，累积频率（Y 轴）以 bin 内检测到的电流发放数目的累加值表示。Bin 宽的设定有两种选择，可根据数据本身的数值让 Clampfit 自动设定（选择 Variable width），或者自行输入（选择 Fixed width）。

**Data Limits 和 Row Range:** 这两项用于限制参与检验的数据。前者限制参与检验的数据幅度值大小，后者限制参与检验的数据行数范围。

**Select Columns:** 选择参与检验的组别（栏数）。必须选择两组或以上的数据参与检验。

● 点击 OK，可看到累积频率分布图，用 Analyze/Normalize 进行标化，以便于比较（图 49D）。同时，统计检验结果存放在 Basit Stats 数据表内（图 49C）。结果中的 Probability 为检验的概率  $p$ ，即两组突触电流数据属于同一分布的概率，若  $p$  值小于 0.05，表明两组的差异有显著性意义。

A, 突触电流幅度数据表

Results1 - Results		
	Control	Treat
303	-16.4891	-14.9842
304	-19.2946	-13.0102
305	-15.7722	-11.8847
306	-12.8531	-17.0967
307	-15.6225	-13.2983
308	-20.1683	-13.682
309	-17.4889	-14.1934
310	-14.9273	-14.9273
311	-14.7631	-14.7631
312	-10.3335	-10.3335
313	-18.6896	-18.6896
314	-9.47107	-9.47107
315	-31.1062	-31.1062
316	-14.9009	-14.9009
317	-9.68247	-9.68247
318	-11.9096	-11.9096
319	-11.9893	-11.9893
320	-18.3545	-18.3545
321	-18.415	-18.415

B, K-S 检验设定框

**Kolmogorov-Smirnov Test**

Preprocessing  
☐ Ascending sort  
☒ Cumulative binning  
☒ Variable width  
☐ Fixed width: 1

Data Limits  
☒ Full  
☐ Fixed From: 0 To: 1

Select Columns... Sheet 20  
All selected columns

Row Range  
☒ Full column  
☐ Row From: 1 To: 368

Destination Option  
☐ Append results to sheet and graph  
☒ Replace results in sheet and graph

OK Cancel Help

C, K-S 统计检验结果

Results1:1 - Results							
	Source Columns	n1	n2	K-S Statistic	Probability	Num Bins 1	Num Bins 2
1	Control vs. Treat	331	368	0.16260	0.00057	331	368
2							
3							
4							

D, 突触电流幅度的累积频率分布图

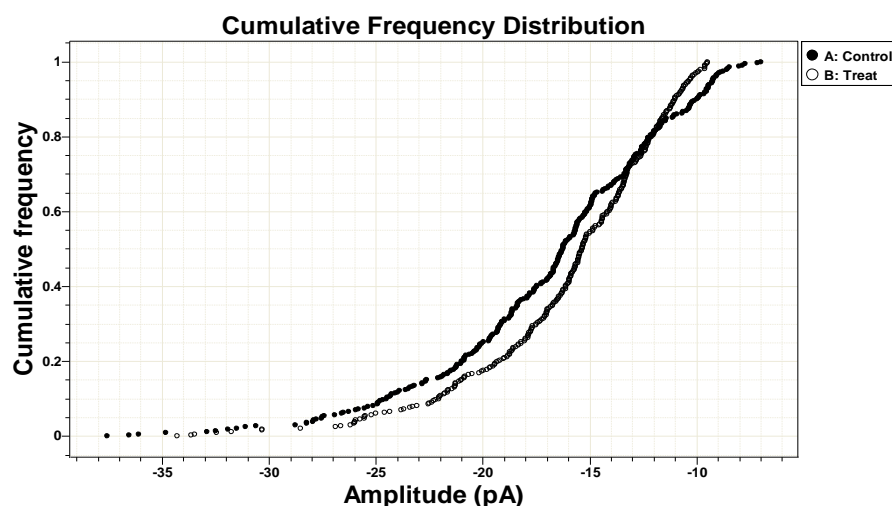


图 49. 用 K-S 检验对突触电流幅度进行统计分析的过程

(完)