电生理研究技术

徐春 chun.xu@ion.ac.cn

**一、什么是电生理学**

电生理学：以作用于生物体的电作用和生物体所发生的电现象为主要对象的生理学的一个分支领域。

电生理技术：是指以多种形式的能量(电、声等)刺激生物体，测量、记录和分析生物体发生的电现象(生物电)和生物体的电特性的技术，是电生理学研究的主要技术。

**二、电生理基础**

（1）生物电

【定义】生物的器官、组织和细胞在生命活动过程中发生的电位和极性变化。它是生命活动过程中的一类物理、物理一化学变化，是正常生理活动的表现，也是生物活组织的一个基本特征。

生物电的基础：细胞内外的电势差（与细胞膜两侧的离子浓度差有关，由细胞膜上的离子泵（钠钾泵）和电压门控离子通道等其他离子通道的开放关闭状态有关）

（2）细胞膜的电学特性

（3）突触结构

突触是指一个神经元的冲动传到另一个神经元或传到另一细胞间的相互接触的结构。

突触前细胞借助化学信号，即递质(见神经递质)，将信息转送到突触后细胞者，称化学突触，借助于电信号传递信息者，称电突触。



**三、电生理的研究方法**

**（一）细胞外记录**

使用两个尖端是碳纤的特殊电极，1 个电极放在细胞上，另一个电极放在远端（如皮下组织），作为参考电极。测出2 个电极之间电压差，从而知道细胞外电位的变化。电极的碳纤放在中间，周围包裹了一些像玻璃管一样的东西，当记录到细胞的膜电位后，通过细胞周围这些玻璃管往局部的组织内给予一些药物，如一些受体的阻断剂，观察记录神经元的反应。

1.metal electrode 金属电极

2.glass micropipette玻璃微管

1. **细胞内记录**

**1.patch-clamp recording 膜片钳**

膜片钳又称单通道电流记录技术，用特制的玻璃微吸管吸附于细胞表面，使之形成10~100 的密封(giga-seal)，又称巨阻封接，被孤立的小膜片面积为μm 量级，内中仅有少数离子通道。然后对该膜片实行电压钳位，可测量单个离子通道开放产生的pA(10 的负12 次方安培)量级的电流，这种通道开放是一种随机过程。

【原理】取一个玻璃的吸液管,上面有一个非常小的孔,让这个小孔非常的紧密接触神经元细胞膜的表面. 当它与膜非常紧密的连接时,没有离子能在它们之间穿过. 因此所有的离子都只有在神经元细胞膜上某一个离子通道打开的时候进入管子中.这样的话, 产生的微小电流就可以被连接在管上的超敏感的电子放大器检测到了。

【模式】

（1）voltage clamp电压钳 excitatory post-synaptic current（EPSC） 兴奋的突触后膜电流

电压钳(voltage clamp)技术是通过插入细胞内的一根微电极向胞内补充电流，补充的电流量

正好等于跨膜流出的反向离子流，这样即使膜通透性发生改变时，也能控制膜电位数值不变。

【缺点】电压钳技术目前主要用于巨大细胞的全细胞电流研究，特别在分子克隆的卵母细胞表达电流的鉴定中发挥其它技术不能替代的作用。但也有其致命的弱点:

①微电极需刺破细胞膜进入细胞，以致造成细胞浆流失，破坏了细胞生理功能的完整性;

②不能测定单一通道电流。因为电压钳制的膜面积很大，包含着大量随机开放和关闭着的通道，而且背景噪音大，往往掩盖了单一通道的电流。

③对体积小的细胞(如哺乳类中枢神经元，直径在10-30μm 之间)进行电压钳实验，技术上有更大的困难。由于电极需插入细胞，不得不将微电极的尖端做得很细，如此细的尖端致使电极阻抗很大，常常是60~8OMΩ 或120~150MΩ(取决于不同的充灌液)。这样大的电极阻抗不利于作细胞内电流钳或电压钳记录时在短时间(0.1μs)内向细胞内注入电流，达到钳制膜电压或膜电流之目的。再者，在小细胞上插入的两根电极可产生电容而降低测量电压电极的反应能力.

（2）Current clamp电流钳 excitatory post-synaptic potential（EPSP） 兴奋的突触后膜电压

钳式电流表是电流表的一种，用来测量电路中的电流值，简称电流钳。在电气和电子工程中， 电流钳(或称电流探头)是有两个可打开的钳式探头，用于夹紧电气设备周围的电导体，并且探头无需与设备导电部分接触，即无需断开设备导线用于探针插入，来测量电流在导体的属性。通常用普通电流表测量电流时，需要将电路切断后才能将电流表接入进行测量，这是很麻烦的，有时正常运行的电动机不允许这样做。此时，使用钳式电流表就显得方便多了，可以在不切断电路的情况下来测量电流。

（3）cell-attached patch细胞吸附式记录

电极向细胞靠近时，给一个正压，使电极往外“吹”，当靠近细胞后去掉正压，使得细胞膜与玻璃之间形成一个非常紧密的高阻抗封接，使从缝隙外泄的电流非常小（电阻非常大）。在细胞膜表面隔离出一小片膜,即通过微管电极对膜片进行电压钳制, 从而测量膜电流。

可在电极液中加入药物等物质，研究其对膜上离子通道（如配体门控通道）的作用，缺陷在于1次patch只能测定1种物质浓度对膜细胞外侧上通道的作用。

（4）Inside-out patch膜内面向外模式

cell-attached 后高阻封接形成, 将微管电极轻轻提起, 使其与细胞分离, 电极端形成密封小泡, 在空气中短暂暴露几秒钟后, 小泡破裂再回到溶液中, 使小泡的外半部分破裂得到一小片膜，且膜的细胞外的这一面对的是电极液，而细胞内的这一面对的是细胞外溶液，就是inside-out patch。

由于细胞膜的内面朝向外部溶液，可以调节细胞外溶液中的成分来研究改变膜上离子通道的细胞内环境对膜造成的影响，如研究一种配体在细胞内与受体连接激活膜上离子通道，研究其不同浓度对通道的激活作用。但无法研究细胞外环境改变对膜上通道的影响。

（5）Outside-out patch膜外面向内模式

阻封接形成后, 继续以负压抽吸, 膜片破裂, 再将玻管慢慢从细胞表面提起, 断端游离部分自行融合成脂质双层而得到。膜的细胞外的这一面对的是细胞外液，形成outside-out patch与细胞吸附式记录的区别为细胞吸附式记录不能改变电极液中加入药物的浓度，1 次patch 只能实现单一膜外物质浓度对通道影响的记录。而outside-out patch可更换细胞外溶液， 1 次patch 可实现膜外物质的多种不同浓度对通道影响的记录。

（6）Whole-cell patch常规全细胞模式

形成高阻抗封接后，给予一个非常短促的负压，使膜被吸破，电极内的溶液和细胞里的溶液导通，就能记录到细胞膜电位的变化，为全细胞记录。

全细胞记录模式可应用于记录：

神经元上某些通道和受体的电信号

神经元突触后电流（电压钳）

神经元突触后电位（电流钳）

神经元动作电位、静息电位（电流钳）

（7）开放细胞吸附膜内面向外模式

将细胞吸附模式的膜片以外的某部位的胞膜进行机械地破坏，经破坏孔调控细胞内液并在细胞吸附状态下进行内面向外的单一离子通道记录。

（8）穿孔囊泡膜外面向外模式

从穿孔膜片模式[4]将膜片微电极向上提起，便在微电极尖端处形成一个膜囊泡，如果条件较好，此膜囊泡内不仅有细胞质因子还可有线粒体等细胞器存在。

2.cut-open oocyte recording 卵母细胞破开记录

3.two-electrode recording 双电极记录

**【优缺点】**

（1）细胞外记录

①记录群体或单细胞的电活动。

1. 容易得到信号，机械稳定性要求低。
2. 电极粗大，对组织损伤大。

（2）细胞内记录

①记录单个神经元，电位变化精确可控，可进行电压钳、电流钳实验。

②电极尖端很小，大分子无法进入细胞，对细胞内过程影响小。

1. 只能记录细胞胞体，机械稳定性要求高。

（3）全细胞记录

①记录单个神经元，电位变化精确可控，可进行电压钳、电流钳实验，对亚细胞

结构进行记录。

②机械稳定性要求低。

③电极大，电极内的物质进入细胞内，对细胞内过程影响大（除穿孔全细胞记录，

用抗生素打孔，可防止大分子进入，影响相对小）。

**四、电生理发展趋势**

①通道数量增加（Increase channel count）：多电极同时记录。

②电极（electrode）改良：更加稳定、更具生物组织友好性。现用的人体内长

时间记录电极最多使用半年，生物友好性电极的研究在不断深入。其硬度大

大降低，从而增强生物友好性。

③无线化（Wireless）。无线记录电生理信号。

④光学成像（Optical imaging）：传统钙离子成像是利用单光子激发荧光探针。

而双光子钙成像是用两个能量较低的光子代替能量较高的光进行激发。双光

子成像最大的优点是避免了非特异性的激发（out-of-focus excitation），只在聚

焦点而非整个光路上激发，降低了光漂白。此外双光子技术也降低了光毒性，

即降低光激发样本产生有毒物质带来的损伤。双光子成像对针孔的要求也较

低。

⑤钙离子成像+光遗传学（光遗传学其主要原理是首先采用基因操作技术将光感

基因(如ChR2，eBR，NaHR3.0，Arch 或OptoXR 等)转入到神经系统中特

定类型的细胞中进行特殊离子通道或GPCR 的表达。光感离子通道在不同波

长的光照刺激下会分别对阳离子或者阴离子的通过产生选择性，从而造成细

胞膜两边的膜电位发生变化，达到对细胞选择性地兴奋或者抑制的目的。）

⑥电压敏感染色

⑦微型示波器

**例题：结合自身的研究背景，举例说明膜片钳技术在生命科学研究中的应用。**

膜片钳技术被称为研究离子通道的“金标准”。是研究离子通道的最重要的技术。目前膜片钳技术已从常规膜片钳技术（Conventional patch clamp technique）发展到全自动膜片钳技术（Automated patch clamp technique）。

1. 应用学科

膜片钳技术发展至今，已经成为现代细胞电生理的常规方法，它不仅可以作为基础生物医学研究的工具，而且直接或间接为临床医学研究服务，目前膜片钳技术广泛应用于神经（脑）科学、心血管科学、药理学、细胞生物学、病理生理学、中医药学、植物细胞生理学、运动生理等多学科领域研究。随着全自动膜片钳技术（Automatic patch clamp technology）的出现，膜片钳技术因其具有的自动化、高通量特性，在药物研发、药物筛选中显示了强劲的生命力。

2. 应用的标本种类

使用的标本种类繁多。从最早的肌细胞（心肌、平滑肌、骨骼肌）、神经元和内分泌细胞发展到血细胞、肝细胞、耳窝毛细胞、胃壁细胞、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、精母细胞等多种细胞；从急性分散细胞和培养细胞（包括细胞株）发展到组织片（如脑片、脊髓片）乃至整体动物；从蜗牛、青蛙、蝾螈、爪蟾卵母细胞发展到鸡细胞、大鼠细胞、人细胞等等；从动物细胞发展到细菌、真菌以及植物细胞。此外，膜片钳技术还广泛地应用到平面双分子层（Planar bilayer）、脂质体（Liposome）等人工标本上。

3. 研究对象

研究对象已经不局限于离子通道。从对离子通道（配体门控性、电压门控性、第二信使介导的离子通道、机械敏感性离子通道以及缝隙连接通道等等）的研究发展到对离子泵、交换体以及可兴奋细胞的胞吞、胞吐机制的研究等。

4. 应用举例：

(1). 膜片钳技术在通道研究中的重要作用

应用膜片钳技术可以直接观察和分辨单离子通道电流及其开闭时程、区分离子通道的离子选择性、同时可发现新的离子通道及亚型，并能在记录单细胞电流和全细胞电流的基础上进一步计算出细胞膜上的通道数和开放概率，还可以用以研究某些胞内或胞外物质对离子通道开闭及通道电流的影响等。同时用于研究细胞信号的跨膜转导和细胞分泌机制。结合分子克隆和定点突变技术，膜片钳技术可用于离子通道分子结构与生物学功能关系的研究。利用膜片钳技术还可以用于药物在其靶受体上作用位点的分析。如神经元烟碱受体为配体门控性离子通道，膜片钳全细胞记录技术通过记录烟碱诱发电流，可直观地反映出神经元烟碱受体活动的全过程，包括受体与其激动剂和拮抗剂的亲和力，离子通道开放、关闭的动力学特征及受体的失敏等活动。使用膜片钳全细胞记录技术观察拮抗剂对烟碱受体激动剂量效曲线的影响，来确定其作用的动力学特征。然后根据分析拮抗剂对受体失敏的影响，拮抗剂的作用是否有电压依赖性、使用依赖性等特点，可从功能上区分拮抗剂在烟碱受体上的不同作用位点，即判断拮抗剂是作用在受体的激动剂识别位点，离子通道抑或是其它的变构位点上。

(2).与药物作用有关的心肌离子通道

心肌细胞通过各种离子通道对膜电位和动作电位稳态的维持而保持正常的功能。近年来，国外学者在人类心肌细胞离子通道特性的研究中取得了许多进展，使得心肌药理学实验由动物细胞模型向人心肌细胞成为可能。

(3).对离子通道生理与病理情况下作用机制的研究

通过对各种生理或病理情况下细胞膜某种离子通道特性的研究，了解该离子的生理意义及其在疾病过程中的作用机制。如对钙离子在脑缺血神经细胞损害中作用机制的研究表明，缺血性脑损害过程中，Ca2+ 介导现象起非常重要的作用，缺血缺氧使Ca2+通道开放，过多的Ca2+进入细胞内就出现Ca2+超载，导致神经元及细胞膜损害，膜转运功能障碍，严重的可使神经元坏死。

(4).对单细胞形态与功能关系的研究

将膜片钳技术与单细胞逆转录多聚酶链是反应技术结合，在全细胞膜片钳记录下，将单细胞内容物或整个细胞（包括细胞膜）吸入电极中，将细胞内存在的各种mRNA 全部快速逆转录成cDNA，再经常规PCR 扩增及待检的特异mRNA 的检测，借此可对形态相似而电活动不同的结果做出分子水平的解释或为单细胞逆转录多聚酶链式反应提供标本，为同一结构中形态非常相似但功能不同的事实提供分子水平的解释。目前国际上掌握此技术的实验室较少，我国北京大学神经科学研究所于1994 年在国内率先开展。

(5).对药物作用机制的研究

在通道电流记录中，可分别于不同时间、不同部位（膜内或膜外）施加各种浓度的药物，研究它们对通道功能的可能影响，了解那些选择性作用于通道的药物影响人和动物生理功能的分子机理。这是目前膜片钳技术应用最广泛的领域，既有对西药药物机制的探讨，也广泛用在重要药理的研究上。如开丽等报道细胞贴附式膜片钳单通道记录法观测到人参二醇组皂苷可抑制正常和“缺血”诱导的大鼠大脑皮层神经元L-型钙通道的开放，从而减少钙内流，对缺血细胞可能有保护作用。陈龙等报道采用细胞贴附式单通道记录法发现乌头碱对培养的Wistar 大鼠心室肌细胞L-型钙通道有阻滞作用。

(6). 在心血管药理研究中的应用

随着膜片钳技术在心血管方面的广泛应用，对血管疾病和药物作用的认识不仅得到了不断更新，而且在其病因学与药理学方面还形成了许多新的观点。正如诺贝尔基金会在颁奖时所说：“Neher 和Sadmann 的贡献有利于了解不同疾病机理，为研制新的更为特效的药开辟了道路”。

(7). 创新药物研究与高通量筛选

目前在离子通道高通量筛选中主要是进行样品量大、筛选速度占优势、信息量要求不太高的初级筛选。最近几年，分别形成了以膜片钳和荧光探针为基础的两大主流技术市场。将电生理研究信息量大、灵敏度高等特点与自动化、微量化技术相结合，产生了自动化膜片钳等一些新技术。