

膜片钳实验指导 1

Beck Zheng
Field Service Engineer
DL Naturegene Life Science Inc.
beck.zheng@dlnaturegene.com

膜片钳技术是什么？

膜片钳实际上涉及了 2 种技术

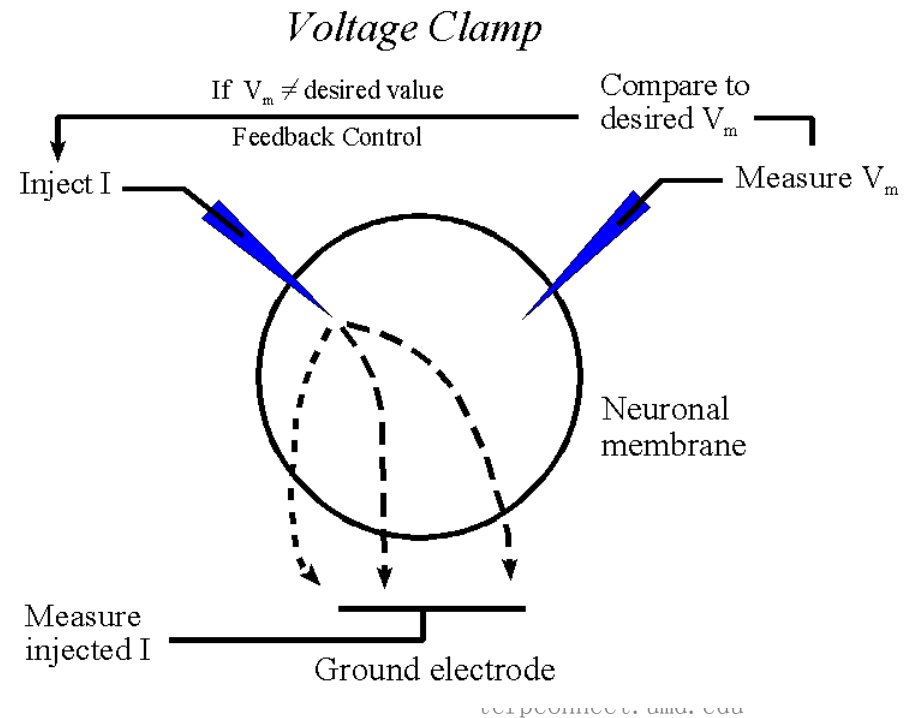
1. 电压钳技术 Voltage Clamp Techniques

电压钳可用来测量通过细胞膜的离子电流，测量的细胞通常为可兴奋细胞，如：神经元。

电压钳通过向胞内注入电流的方式将细胞膜内的电压钳制 (clamp) 在一个恒定的电压下，这时流入细胞内的电流 = 流出细胞的电流。

可兴奋细胞的细胞膜含有许多不同种类的离子通道，其中一些是电压门控的。

通过记录细胞膜通过的电流，可研究电压与电流的关系。



膜片钳技术是什么？

2. 电流钳技术 Current Clamp Techniques

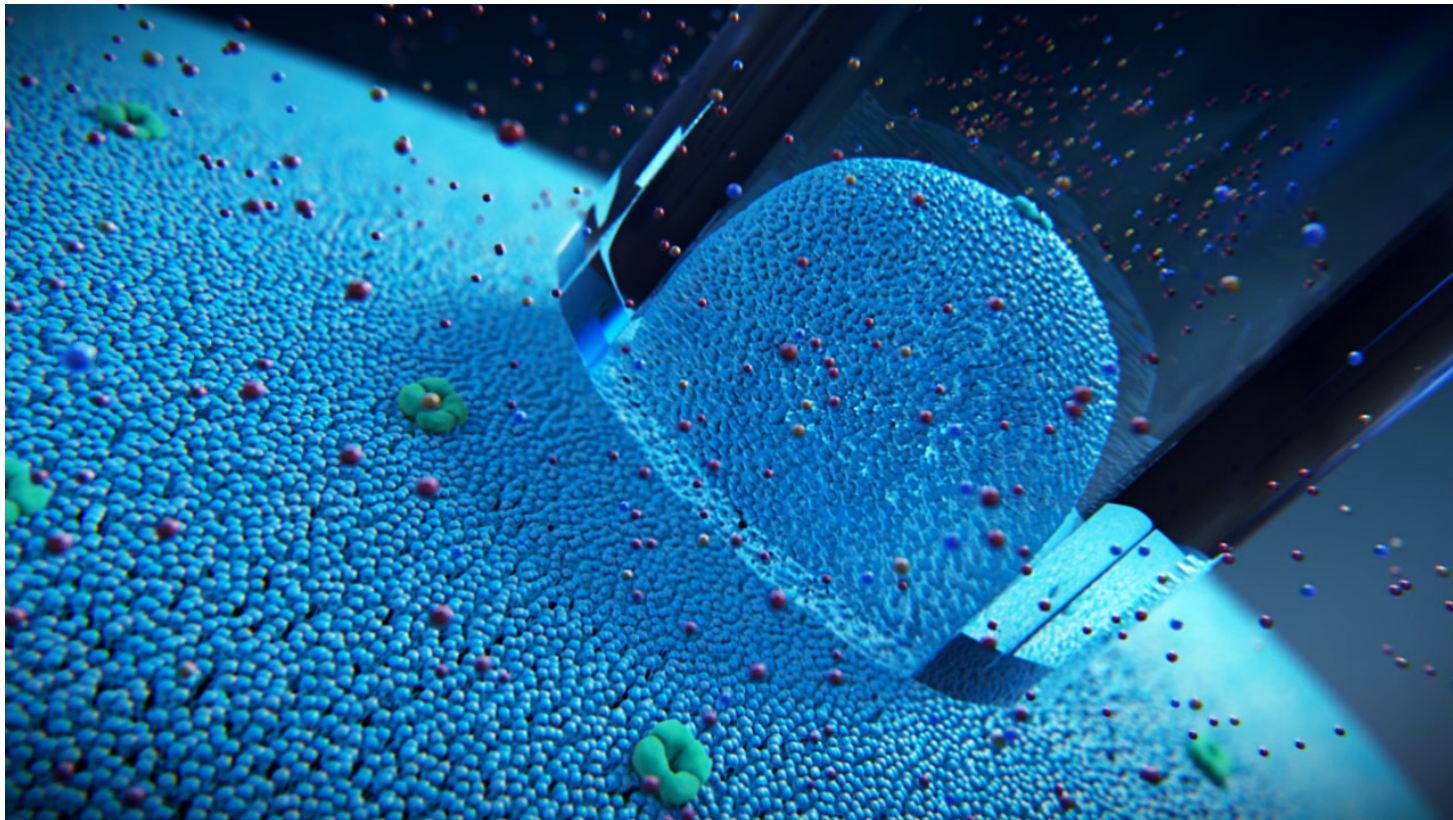
向细胞内注射恒定或变化的电流刺激，记录由此引起的膜电位的变化。

使用电流钳技术可以用来理解神经元如何被激发，或膜电位的行为。

膜片钳技术是什么？

3. 膜片钳技术 Patch Clamp Techniques

膜片钳改进了前面的 2 种方法的记录方式，通过玻璃微电极与细胞膜形成紧密的接触，再采用电压钳或电流钳技术原理实现对生物膜上的离子通道的电活动进行精确的记录。



膜片钳技术是什么？

3. 膜片钳技术 Patch Clamp Techniques

由于与玻璃微电极接触的细胞膜只是细胞膜上的一小片 (patch)，还可以显现对单一离子通道的电活动进行记录。

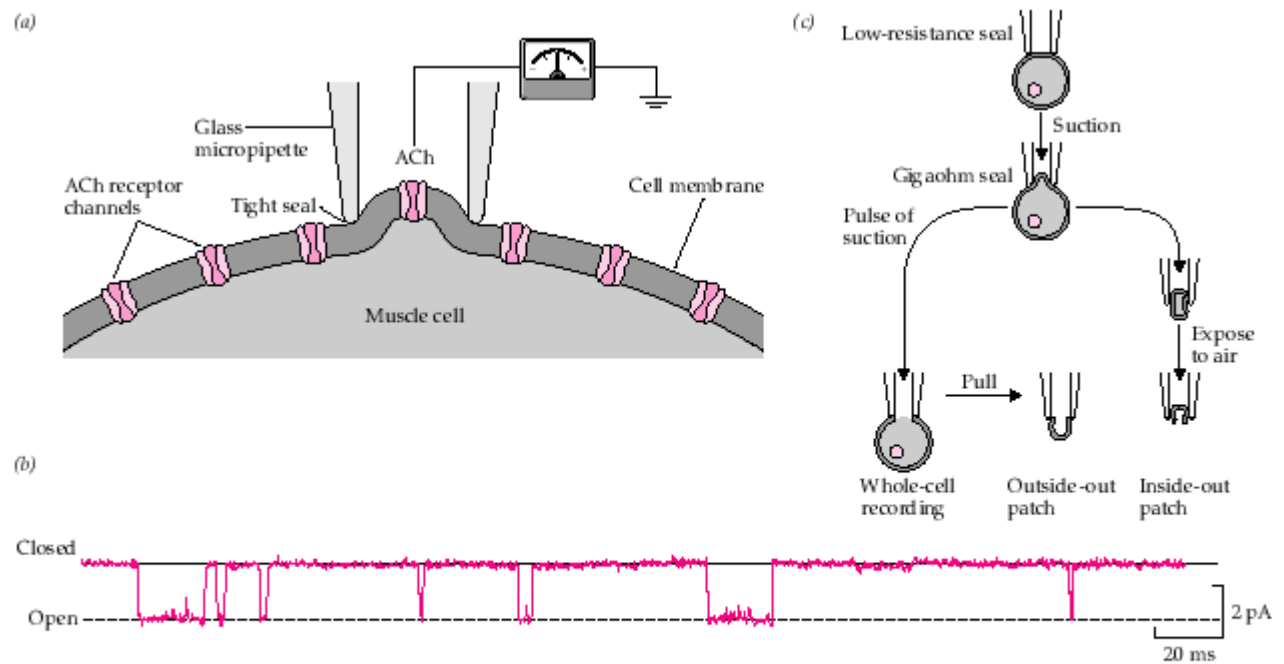
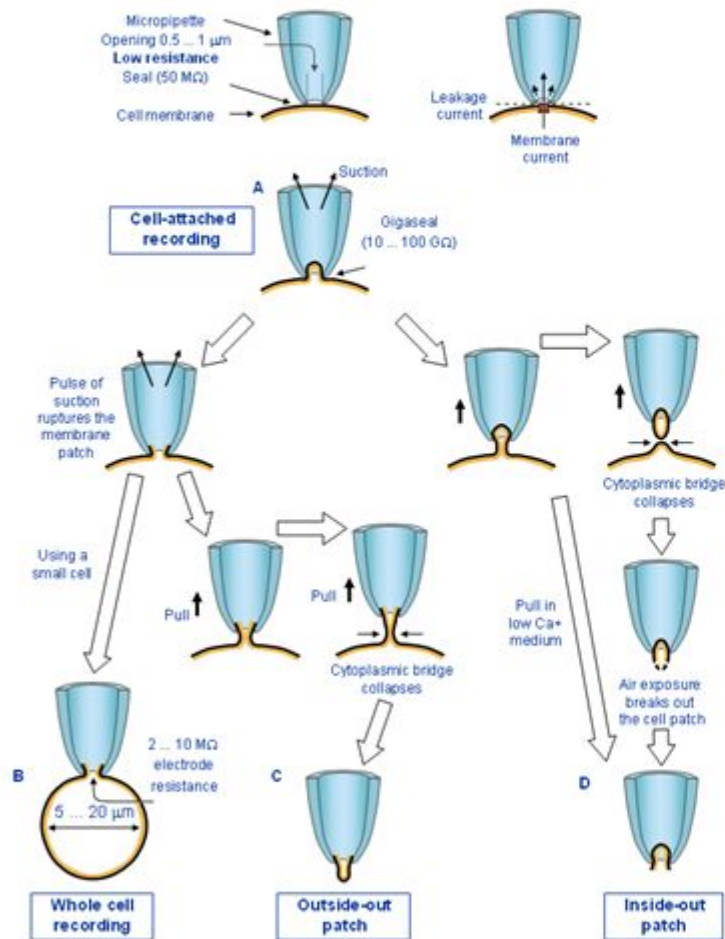


Fig 5.2 A patch Clamp Setup

Sinauer Associates, Inc.
Feldman
*Fundamentals of
Neurophysiology*
Fig. 5-2

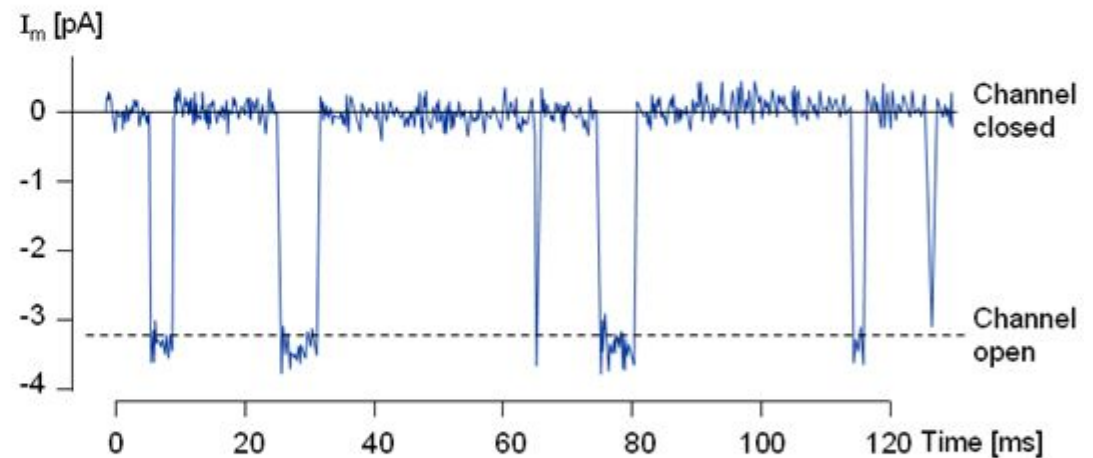
膜片钳记录方法

Patch clamp recording



Hamill et al., 1981

Single channel recording



Sakmann and Neher, 1984

膜片钳技术的应用：可用来做什么？

1. 对离子通道（以及泵和转运体）的研究

观察药物对离子通道的影响，分析药物在靶离子通道或受体上的作用位点等。常用于对活性药物进行筛选。

2. 对细胞分泌的研究

测量膜电容的细微变化，可检测到单个分泌囊泡与细胞膜融合时引起膜电容的胞吐过程。研究细胞对某些物质进行吞噬的胞吞过程。

3. 膜片钳技术与光学技术的结合

电压钳荧光测量技术（Voltage clamp fluorometry, VCF）

膜片钳荧光测量技术（Patch clamp fluorometry, PCF）

Ca²⁺ 成像技术等。

膜片钳技术的应用：可用来做什么？

4. 与分子生物学技术联合应用

如：通过向卵母细胞内注射离子通道或受体的 mRNA/cRNA，使它们在卵母细胞中表达这对研究特定离子通道的结构与生物学功能起到很大作用....

5. 膜片钳技术与光遗传学的联合

通过在某些神经元上表达对光敏感的通道蛋白，在光刺激下，通过膜片钳技术可以看到被激活的神经元的活动。结合在体活体实验，可观察到动物整体行为上的变化。

6. 高通量药物筛选

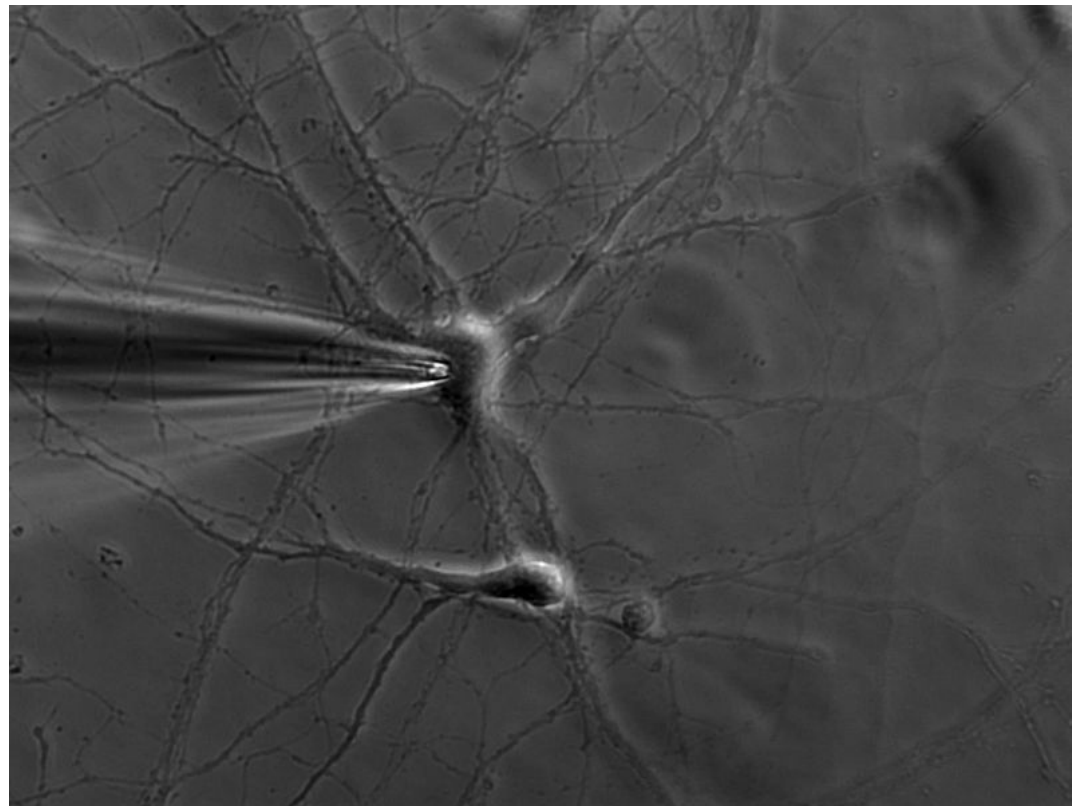
全自动膜片钳，可实现大规模药物筛选。

膜片钳技术的应用：可用来做什么？

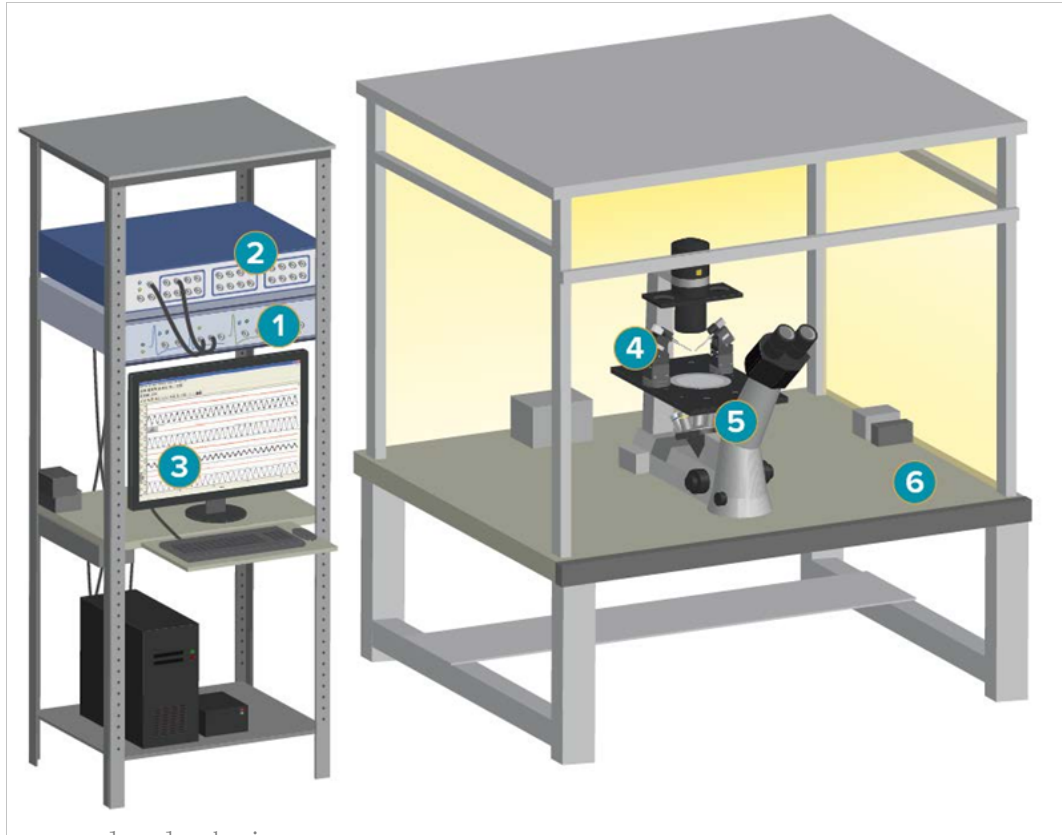
7. 生物、固态纳米孔研究

利用膜片钳技术可研究纳米级孔道的特性，人工合成制作出纳米级别的孔道。可记录一些分子如 DNA, RNA 或蛋白穿越这些纳米孔时产生的电流。如：对 DNA 进行测序。

8. 离子通道病



膜片钳系统的主要构成部分：是什么？



1：放大器

4：微操作器

2：数模转换器

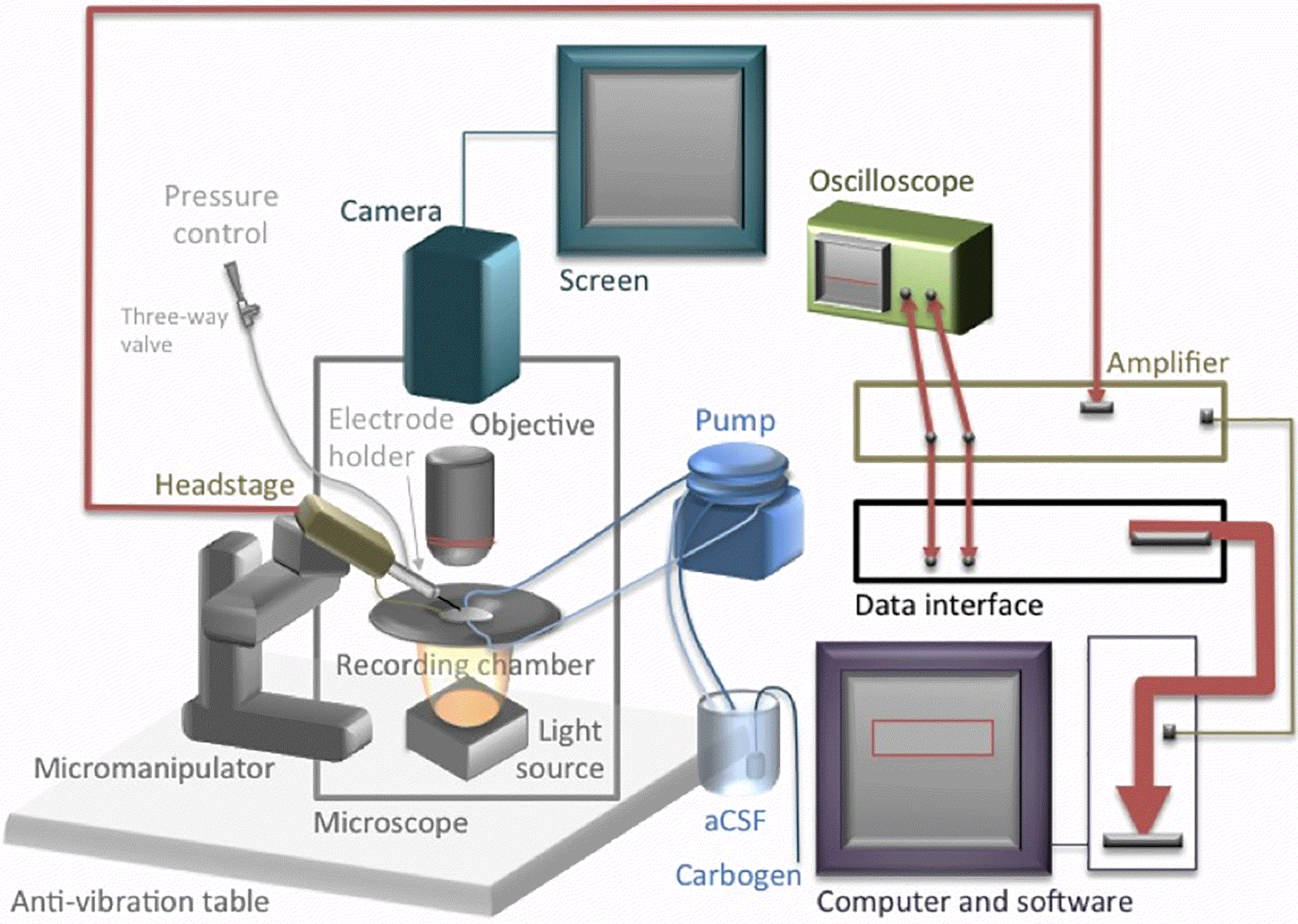
5：显微镜

3：电脑

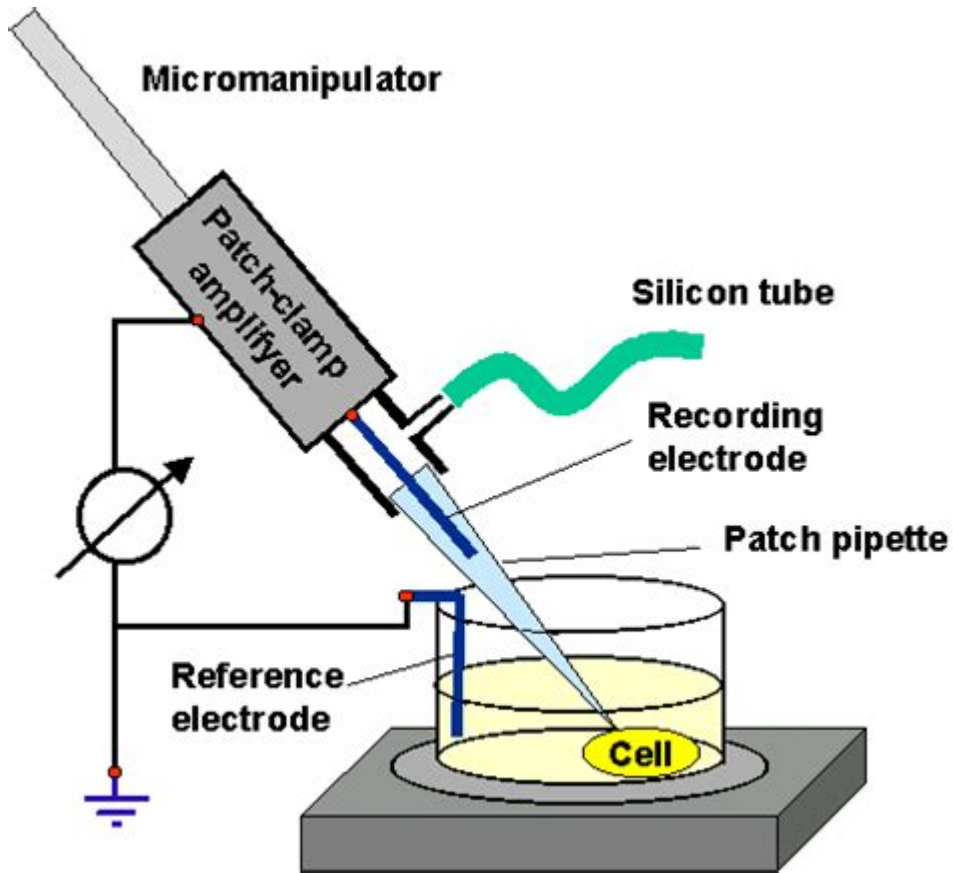
6：防震台

根据实际实验应用会衍生出多种配置，不限于以上几种仪器。以上示意图只列出了系统主要组成部分，根据具体实验需求有可能还会配置拉针仪、切片机、给药系统、渗透压仪、CCD摄像机、刺激器（结合隔离器使用）、蠕动泵、屏蔽笼、仪器柜、对应的记录和分析软件等。

最终系统的组成根据用户实验需求组成不同配置，具体配置情况以采购清单或采购合同为准。



各组件的说明：电极

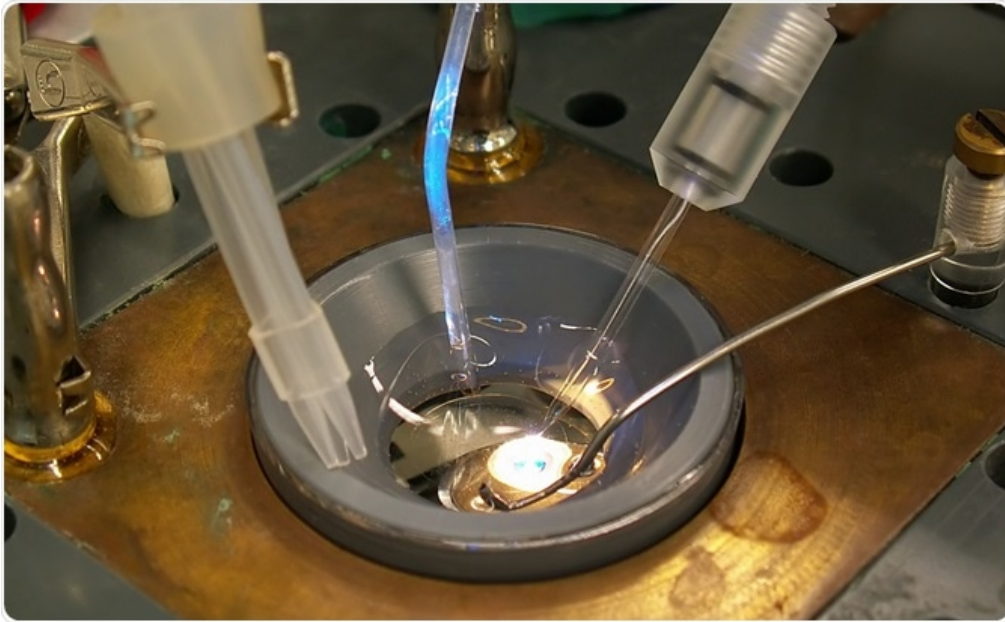


膜片钳使用中使用的电极实际上是由 2 个部分组成：

1. Ag/AgCl 丝
2. 玻璃微电极

将 Ag/AgCl 丝（导电）插入到灌注内液（导电）的玻璃微电极（头部开孔）中形成了一个记录电极。

各组件的说明：Ag / AgCl 电极



<https://www.news-medical.net/life-sciences/Patch-Clamp-Technique.aspx>

记录电极中的 Ag/AgCl 电极是由银丝镀上一层 AgCl 制作而成的。

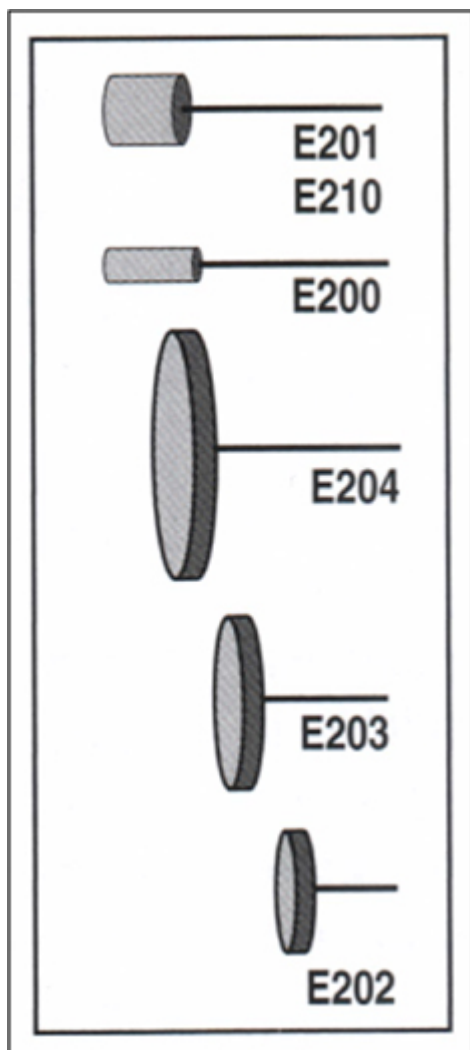
通常银丝剪成一段一段的泡入 84（次氯酸钠）溶液中制作。

在浸泡前首先将银丝打磨，以去除表面氧化层。大约 10-20min 银丝表面变为灰黑色，请在实验开始前提前制备。

如整根都浸泡，在使用时将尾端的 AgCl 涂层刮掉，安装入 Holder 中。

Ag/AgCl 电极必须在有 Cl⁻ 离子的溶液中才能良好的发挥导电性。

各组件的说明：Ag / AgCl 参比电极



Ag/AgCl 参比电极用于连接探头的接地插口，用于跟记录电极形成记录通路。

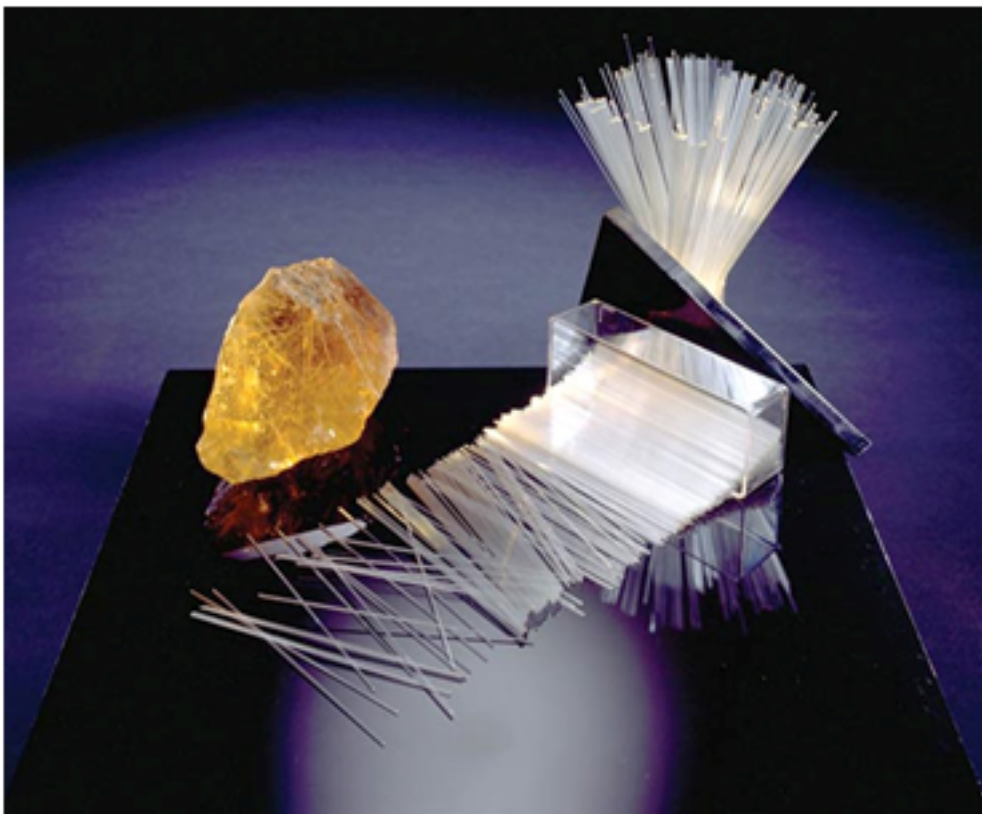
可以使用银丝自己制作，跟记录电极的制作方式类似。

也可以采购厂商生产的成品。

成品的参比电极避免了反复镀 AgCl 的过程，一个可以使用好几年。

其结构通常是一根银丝的尖端有一小段更粗的 AgCl 块。通常是柱状，圆盘状。

各组件的说明：玻璃微电极

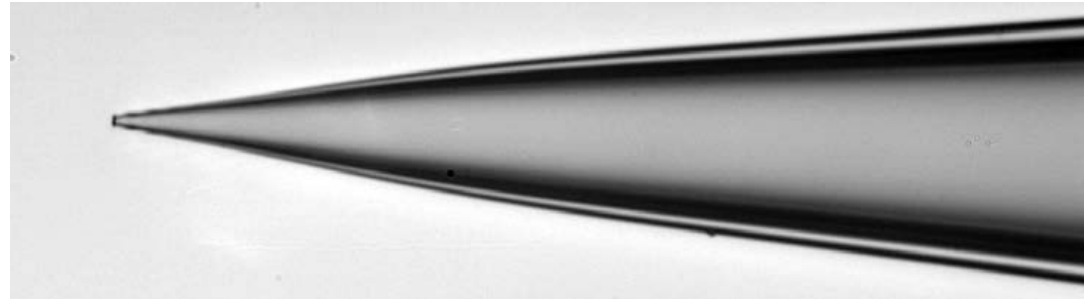


Www.sutter.com

记录用的微电极 (microelectrode) 的材质通常为硼硅酸盐玻璃、铝硅酸盐玻璃、石英。使用上述材质制作成毛细管，将该毛细管固定在拉制仪的拉杆上，通过使用铂金片加热中间位置，拉制成 2 段具有极细尖端的微电极。

玻璃管通常分为有芯和无芯的
建议使用有芯玻璃管，加注内液更方便快捷，不容易产生气泡。

各组件的说明：玻璃微电极



膜片钳使用的玻璃电极通常尖端长 3-4mm，开孔直径 1-3 μm 。

通常它是由专门的拉制仪拉制出来的。

各组件的说明：拉制仪

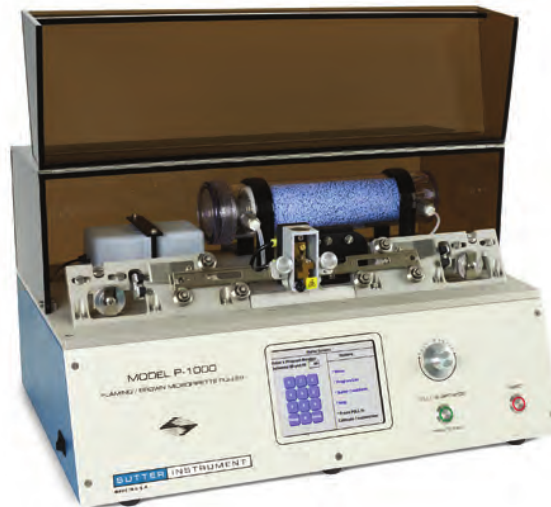
拉制仪又称作拉针仪，它是用来制作实验用的记录微电极的。

常见的拉制仪有 sutter 生产的 P97、P1000，和 Narishige 生产的 PC100。

其原理就是通过一个加热片或加热丝对玻璃管进行加热，再通过拉杆将玻璃管拉成 2 段。

P97、P1000 采用水平拉制方法，通过多步拉制（通常 4-5）步，拉制出 2 段形状和长度都一样的玻璃微电极。

PC100 通过重力拉制，最多实现 2 步拉制，同时拉出的 2 段形状和长度不一致，往往只能有一根可以使用。



各组件的说明：锻针仪 和 涂胶仪

锻针仪可以改变玻璃电极尖端的开口形状，使电极更有利于对细胞的封接。

其原理是通过一个加热丝对电极尖端进行烘烤，导致电极尖端变形。

CMP-2 是一款可以实现锻针和涂胶的仪器，通过对电极的涂胶，实现降低电极电容。

其原理是吹出热风，将涂抹与玻璃电极表面的硅脂固化，增加了电极内壁与溶液的距离，实现降低电极电容。

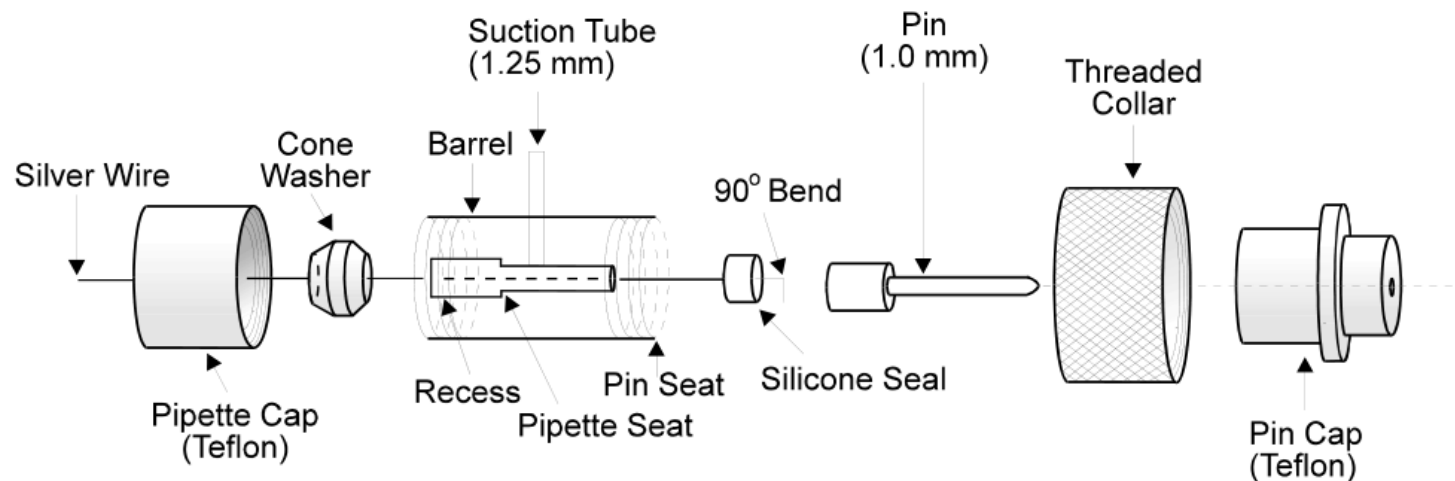


各组件的说明：电极的 Holder

电极 Holder 有 3 个功能：

1. 固定电极
2. 提供压力接口，通过改变 Holder 内部的压力，间接的控制电极内部的压力。以实现电极尖端对细胞膜的吸允，实现封接。
3. 连接电极与探头，使电极记录到的信号传输到探头内。

注意观察 Holder 内部各个部件的组成，在实验中可能经常会由于更换 Ag/AgCl 丝而拆卸 Holder，里面的任何部件都不要丢失。



各组件的说明：探头 Headstage

放大器的探头用于接收电极记录到的信号，并传输回放大器。
在放大器的后端有用于连接参比电极的接口。



各组件的说明：微操 Micromanipulator

将探头固定在微操的机械臂上，然后使用微操的操作器来对探头的位置进行精准的控制。

这种控制的优势主要体现在：通过微操可对电极进行微米（ μm ）级的移动。



各组件的说明：微操的控制方式 ROE

机械臂的移动主要是通过 ROE 来实现的，ROE 除了可以实现控制机械臂在 3 个维度的移动之外。还可以实现：

控制机械臂移动的速度和精度。

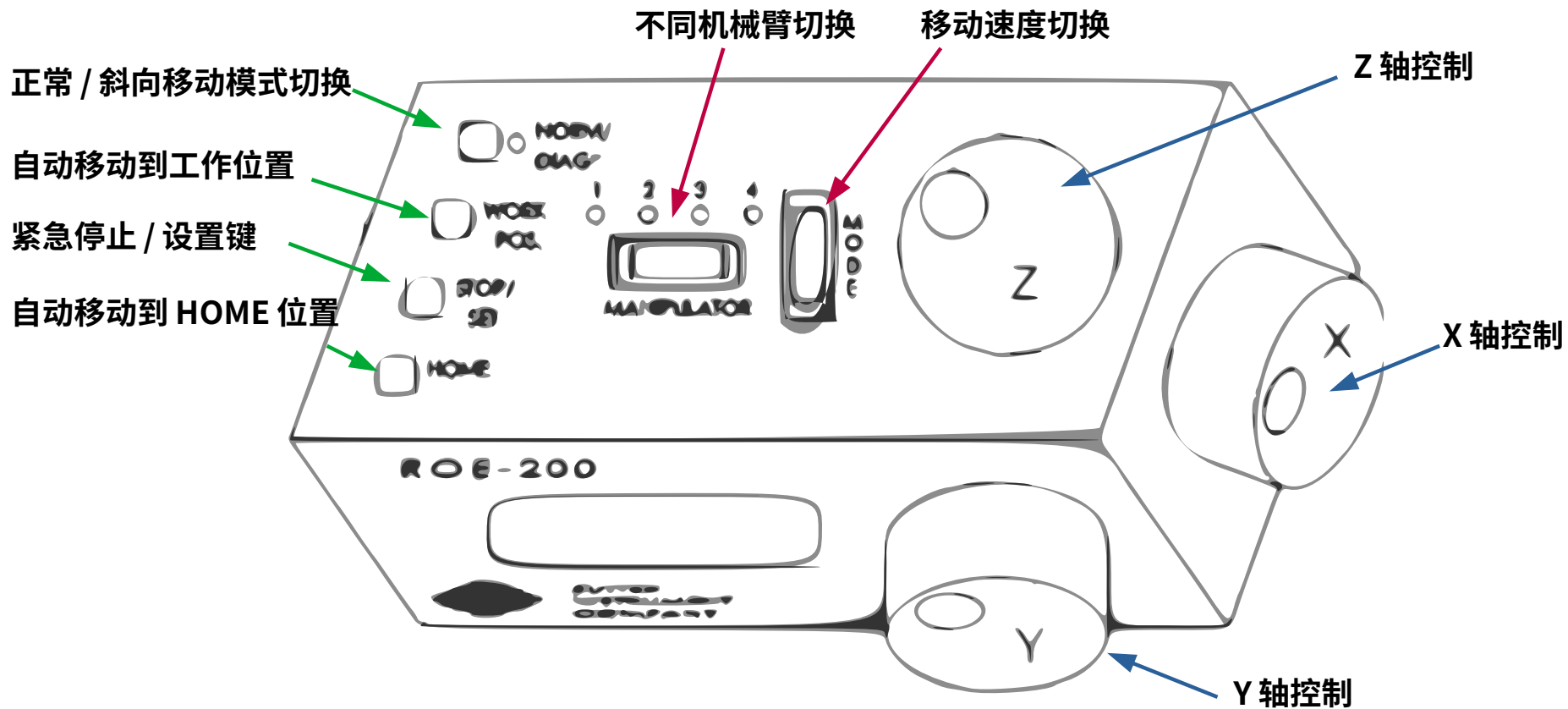
位置记忆功能。

不同机械臂之间的切换。

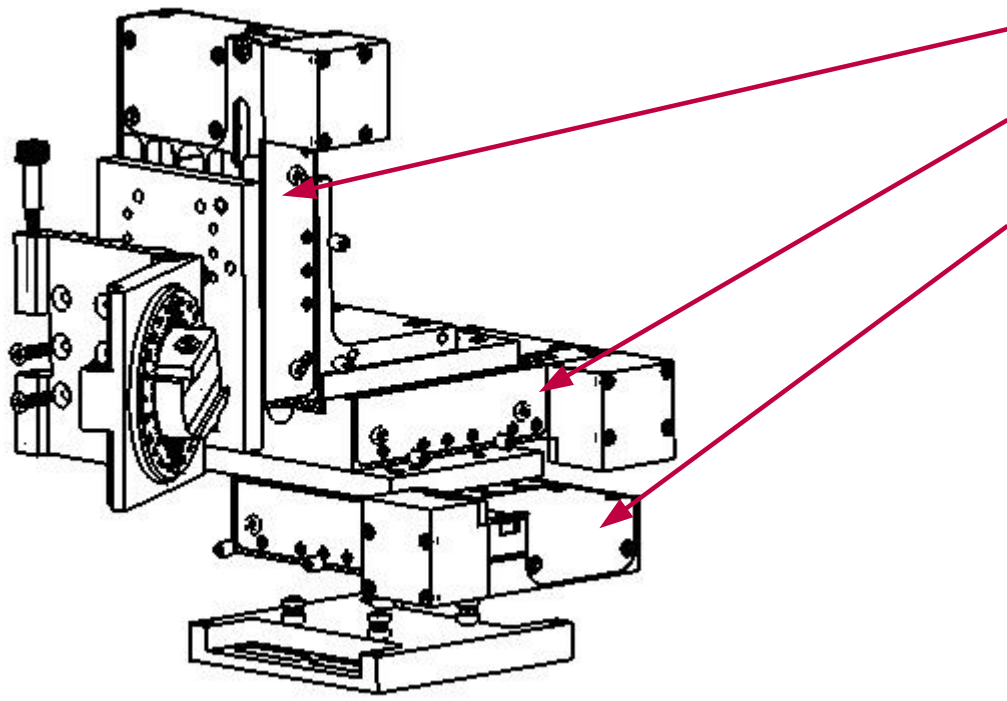
斜向移动模式等。



各组件的说明：ROE 的操作简介

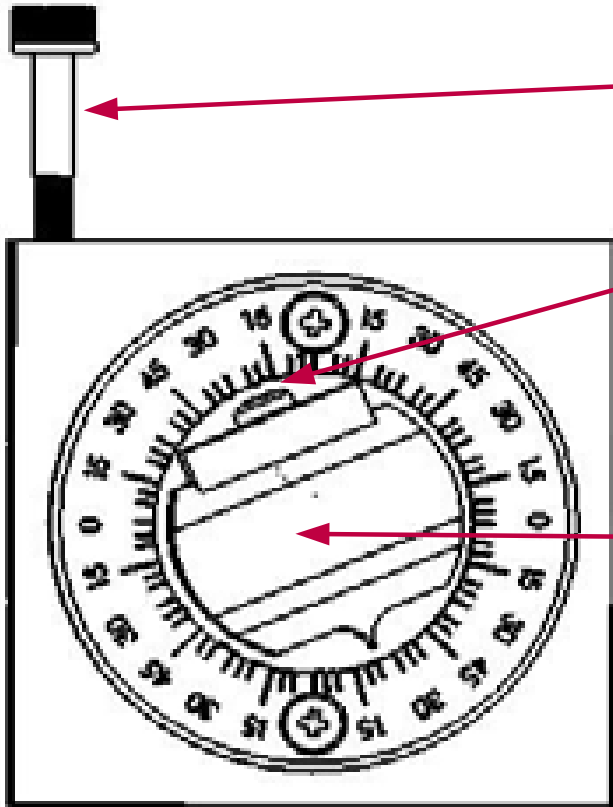


各组件的说明：机械臂的组成



- Z 轴上下移动
- Y 轴前后移动
- Z 轴左右移动

各组件的说明：探头的固定方式，及角度调节



- 小门开关螺丝 手拧
- 探头固定螺丝 十字螺丝刀
- 角度固定螺丝，使用附赠的内六角螺丝刀松开一些，调整好角度后再重新拧紧。
- 固定探头的槽可以旋转，以调节探头的角度

各组件的说明： Chamber 浴槽 、 记录槽

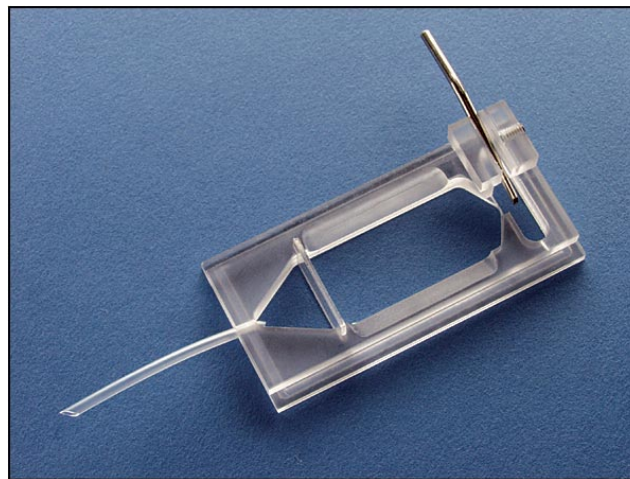
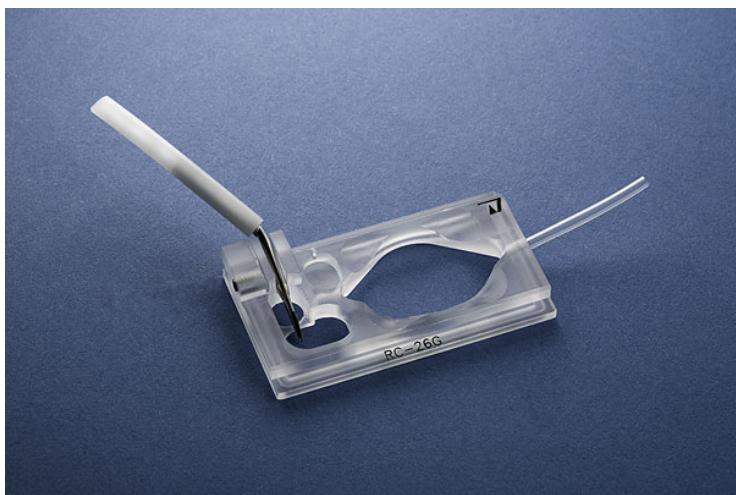
Chamber 用于放置记录的样本，不同的样本也需要不同的 Chamber.

Chamber 可自己制作，通常会使用厂商生产的成品。

厂商生产的成品 Chamber 除了用于放置样本，还区分了不同的区域（样本区，排液区，温控探头插口，参比电极盐桥插孔）用于流入，流出细胞外液。通过调节出液口的角度可以实现对 Chamber 内部液面精确的空中。

通过跟温控设备的组合还可以实现对 Chamber 的直接加热，控制温度。

Chamber 还配有各种小配件，如脑片的盖网等。



各组件的说明：温控仪

温控仪可对 Chamber 实现温度控制，方式分预加热和直加热 2 种。

下图为温控的控制主机，主要是用于设置和检测温度，及实现对加热配件的控制。



各组件的说明：加热棒，预加热情况。

温控仪对液体直加热的方法：将下面加热棒连接到温控仪的控制主机。

通过把流通液体的管路连接到下图的加热棒上，液体经加热棒内部流过被加热，加热棒的出口流出的就是加热后的液体。

再将出液口连接到 Chamber 的入液口， Chamber 内的液体也就是热的了。

这种加热方式通常适用于对温度控制精度要求不高的环境，因为液体流过管路会造成失温。



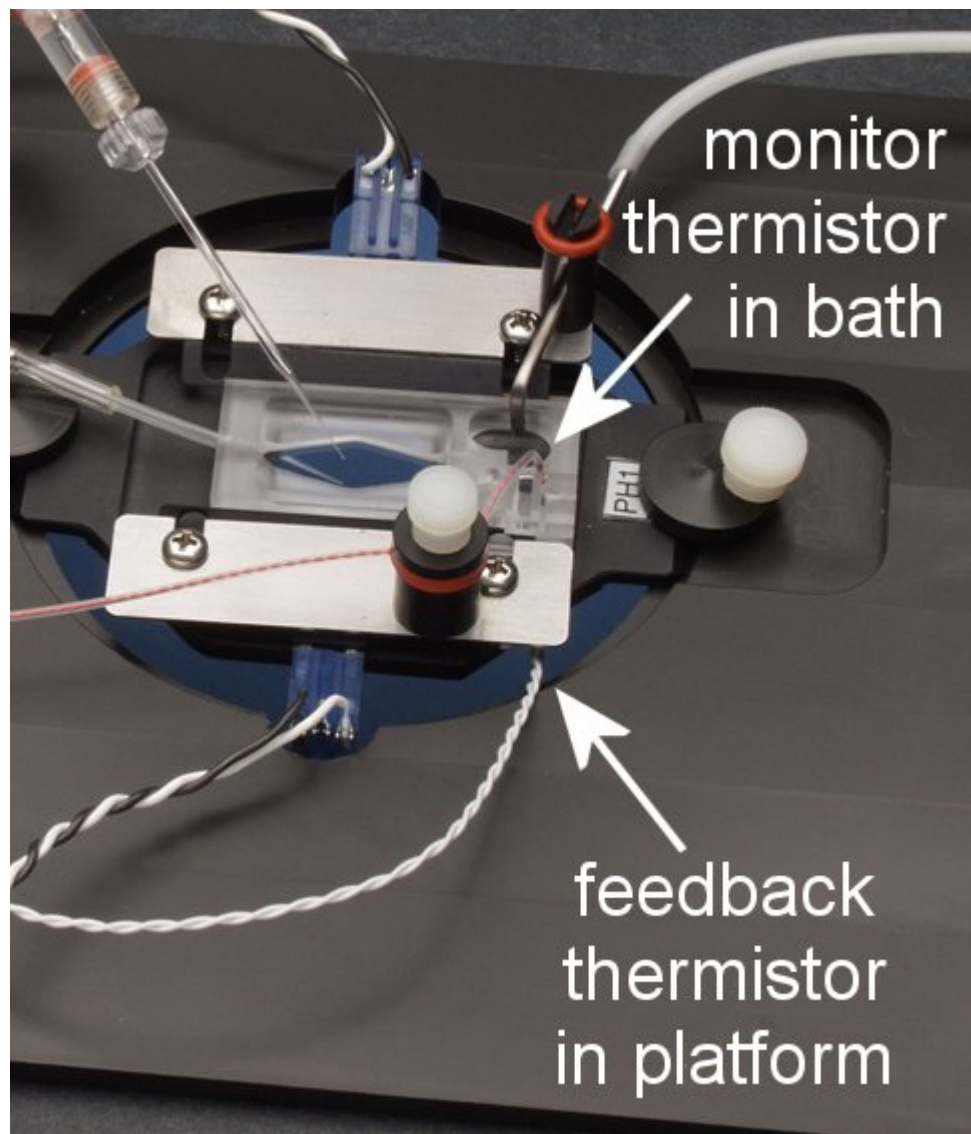
温度检测热敏电阻



各组件的说明：直加热情况。

直加热部件直接安装在 Chamber 的底部，结合预加热棒，可实现对温度的精确控制。

通过导线将加热器和温控仪主机连接，实现对温度的检测和加热。



各组件的说明：放大器 Axopatch 200B Amplifier

放大器将探头记录到的信号进行处理：如加工，放大，滤波等。
膜片钳的放大器还带有各种补偿功能。



各组件的说明：放大器 MultiClamp 700B Amplifier

放大器将探头记录到的信号进行处理：如加工，放大，滤波等。

膜片钳的放大器还带有各种补偿功能。



各组件的说明：数模转换器 Axon Digidata 1550B

放大器采集到的信号为模拟信号，数模转换器将这个模拟信号转换为电脑可以识别的数字信号。

数模转换器可接收模拟信号，输出数字信号和模拟信号。



各组件的说明：数模、放大器、记录软件

