

膜片钳实验指导 2

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

膜片钳实验中的软件

pClamp 记录与分析软件套装一共包含 3 个软件：AxoScope、Clampex（记录数据）、Clampfit（数据分析）。

除了记录与分析软件套装 pClamp 外，700B、900A 放大器也可以通过软件进行控制，其控制软件名称为：

MultiClamp 700B Commander、AxoClamp 900A Commander.

使用时双击桌面图标即可打开软件。

200B 放大器是通过仪器前面板上旋钮、开关进行控制。



记录软件 Clampex 常用功能介绍

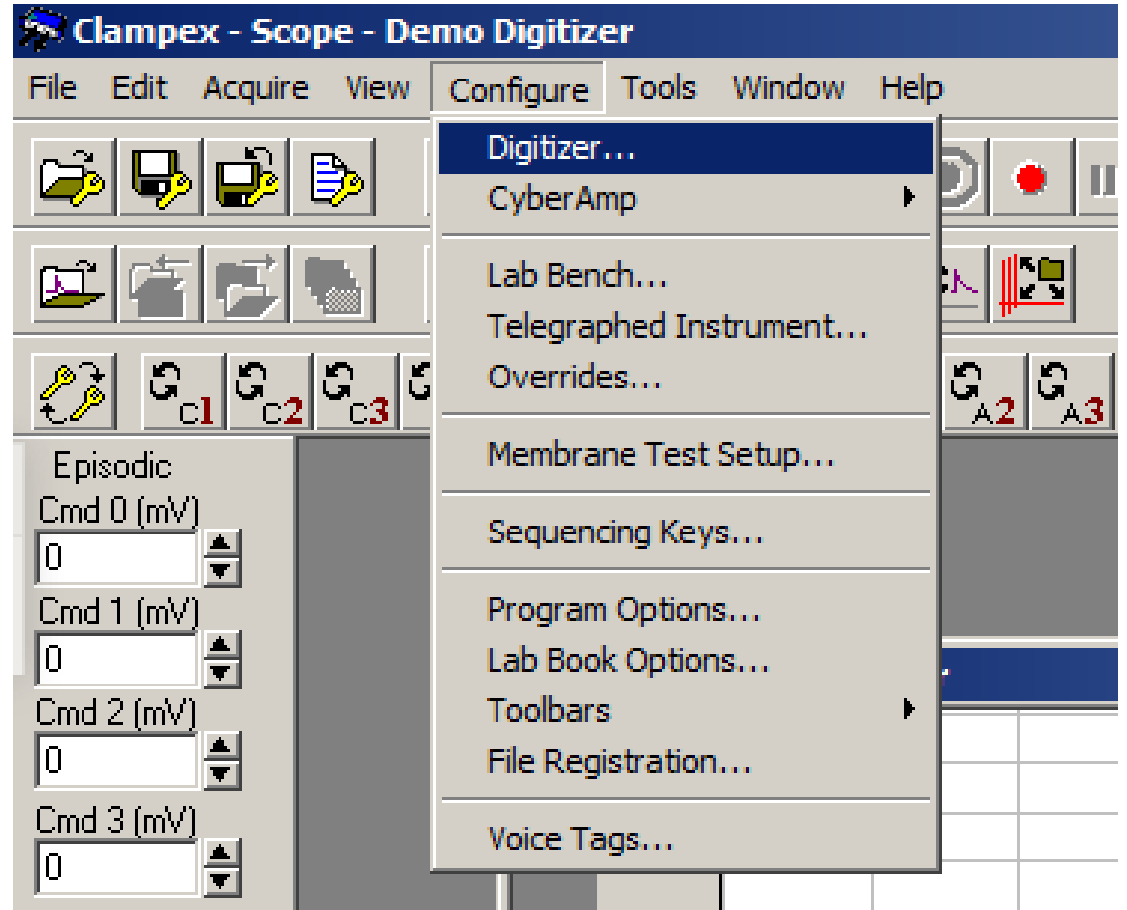


Demo 模式与数模设置

软件启动后首先应检查软件是否为 Demo 模式，在软件的最上方会显示：Demo Digitizer 字样。如果是 Demo 模式则说明软件现在目前只处于试用模式下，所有操作都是虚拟的。

当软件处于这种模式时，首先应检查：**数模是否开机**，用于连接到电脑上的 **USB 数据线** 是否完好的插入到电脑上的 USB 接口之上。

同时还要检查**加密狗**是否插入到电脑的 USB 接口上。



记录软件 Clampex 常用功能介绍



加密狗

加密狗也称为

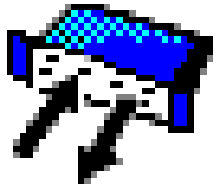
Safe key、Dongle。

请妥善保管，如果丢失，软件将无法使用。需重新购买软件。

右侧为不同形状的加密狗



记录软件 Clampex 常用功能介绍



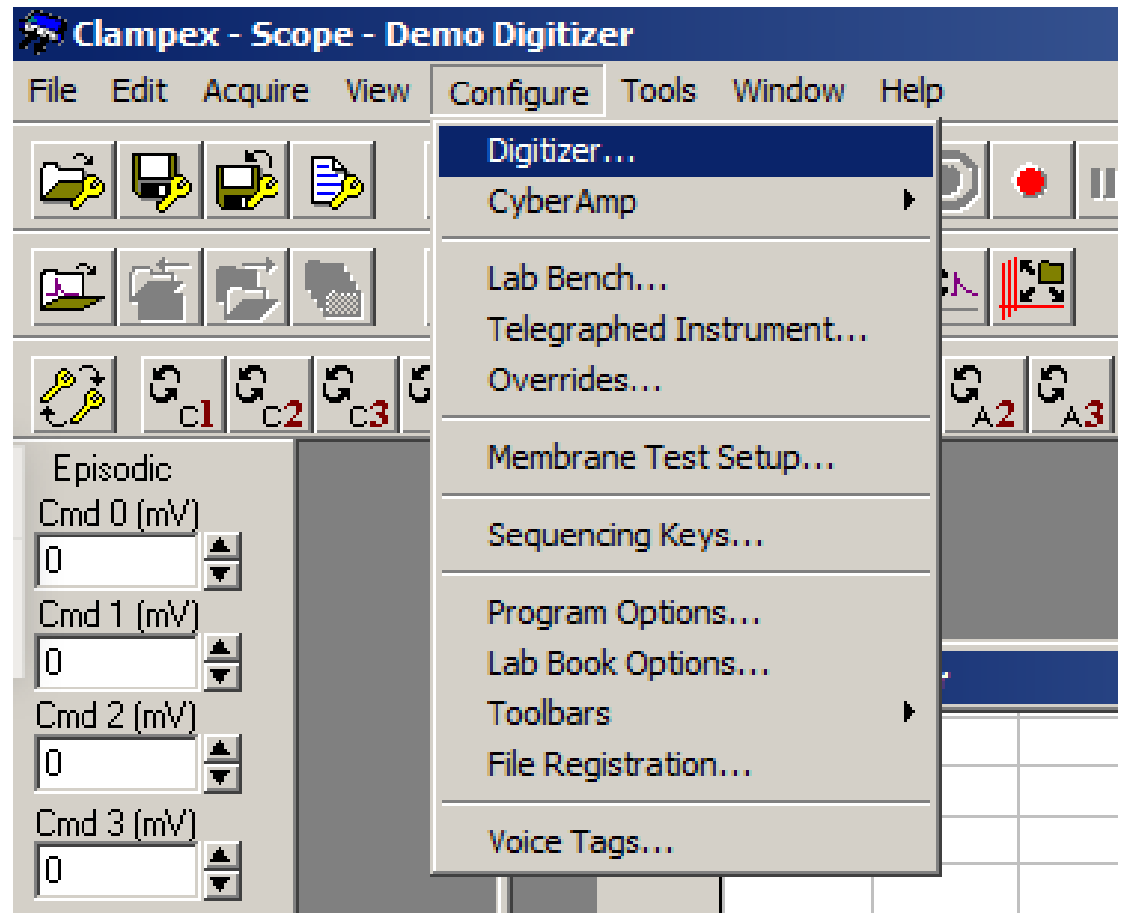
数模的设置

下面开始一步步的设置数模转换器与软件的通信。将数模连接到软件上。

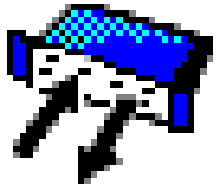
1. 点击软件最上方菜单中

Configure 菜单

点击 Digitizer, 打开数模设置窗口。



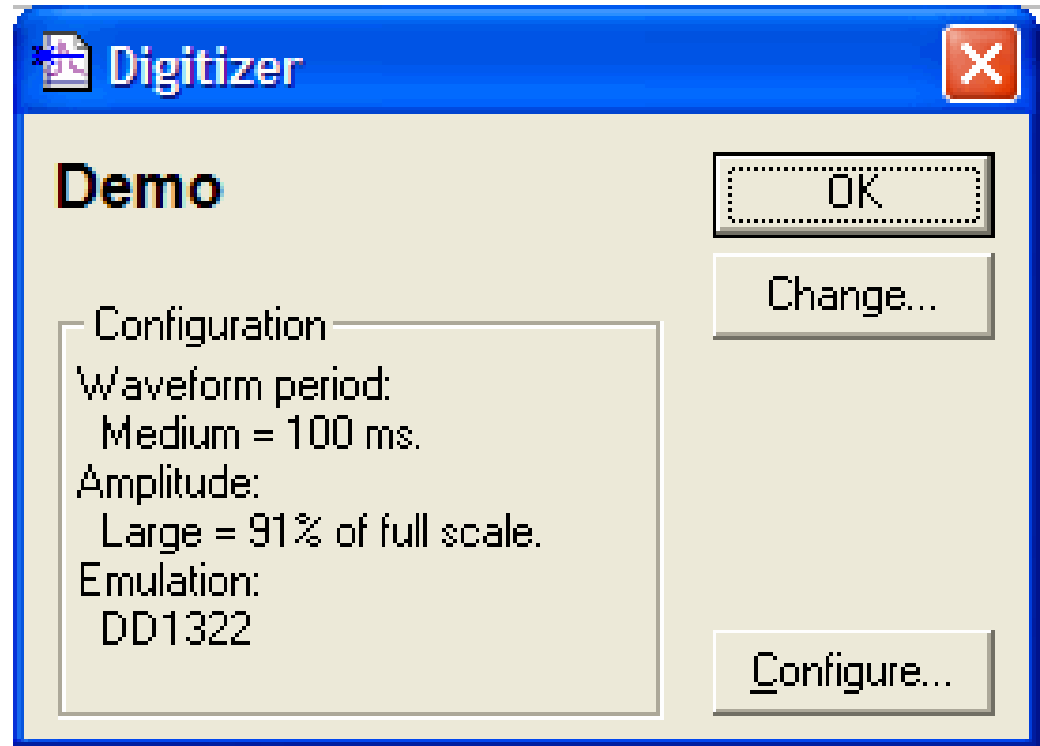
记录软件 Clampex 常用功能介绍



数模的设置

打开数模设置窗口后左侧显示的信息当前模式为 Demo 模式。

点击 Change 按钮，修改 Digitizer 的信息。



记录软件 Clampex 常用功能介绍



数模的设置

在 Digitizer Type 列表中找到 Digidate 1550B Series，选中后点击右侧 Scan 按键。

如果数模已经开启电源。

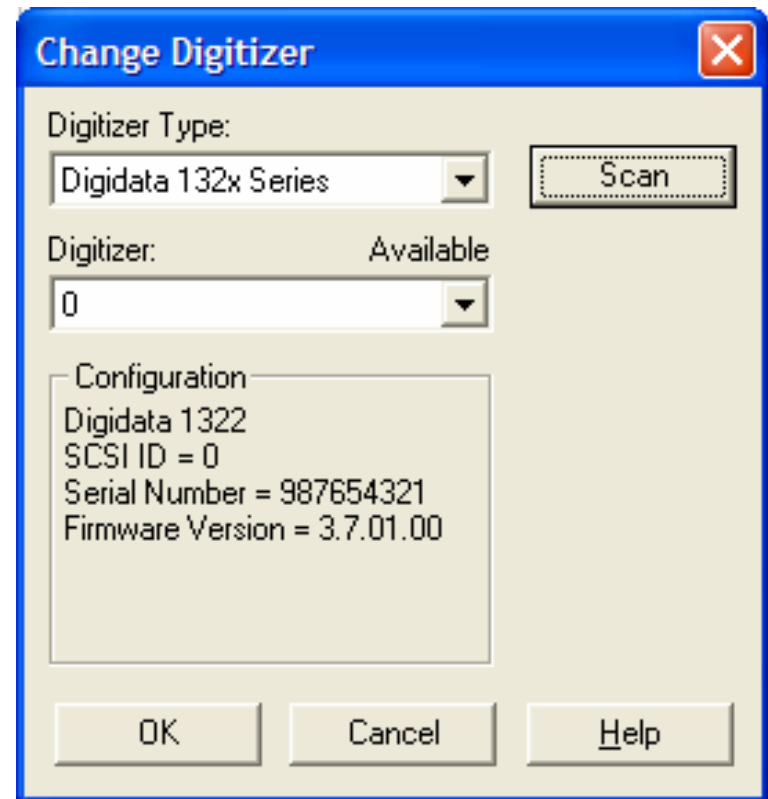
且通过 USB 数据线正确的连接到电脑的 USB 接口上。

同时加密狗已经正确的插入到电脑的 USB 接口上。

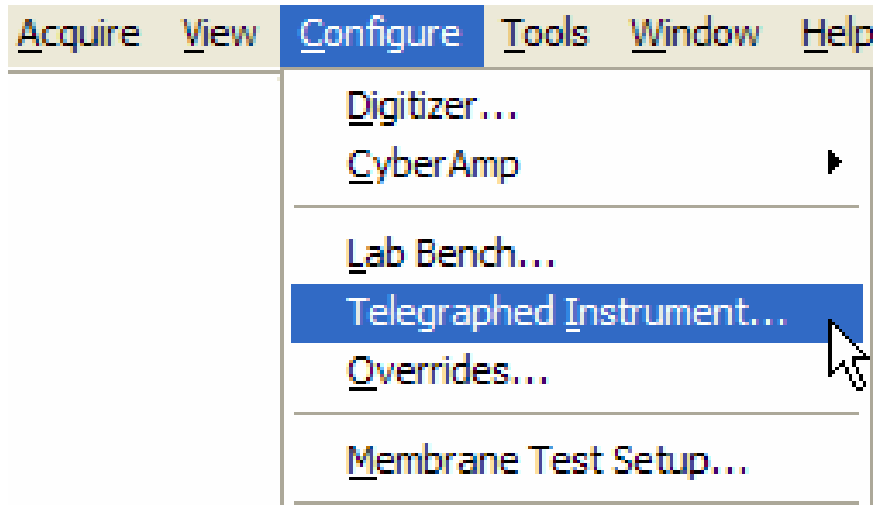
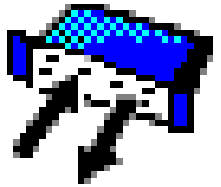
点击 Scan 键后软件就会成功连接到数模，并在下方的 Configuration 信息栏显示数模的所有信息。

如不显示再点击 1 次。

成功后点击 OK 键，关闭这个窗口后发现软件最上方的 Demo 标志已经消失。



记录软件 Clampex 常用功能介绍

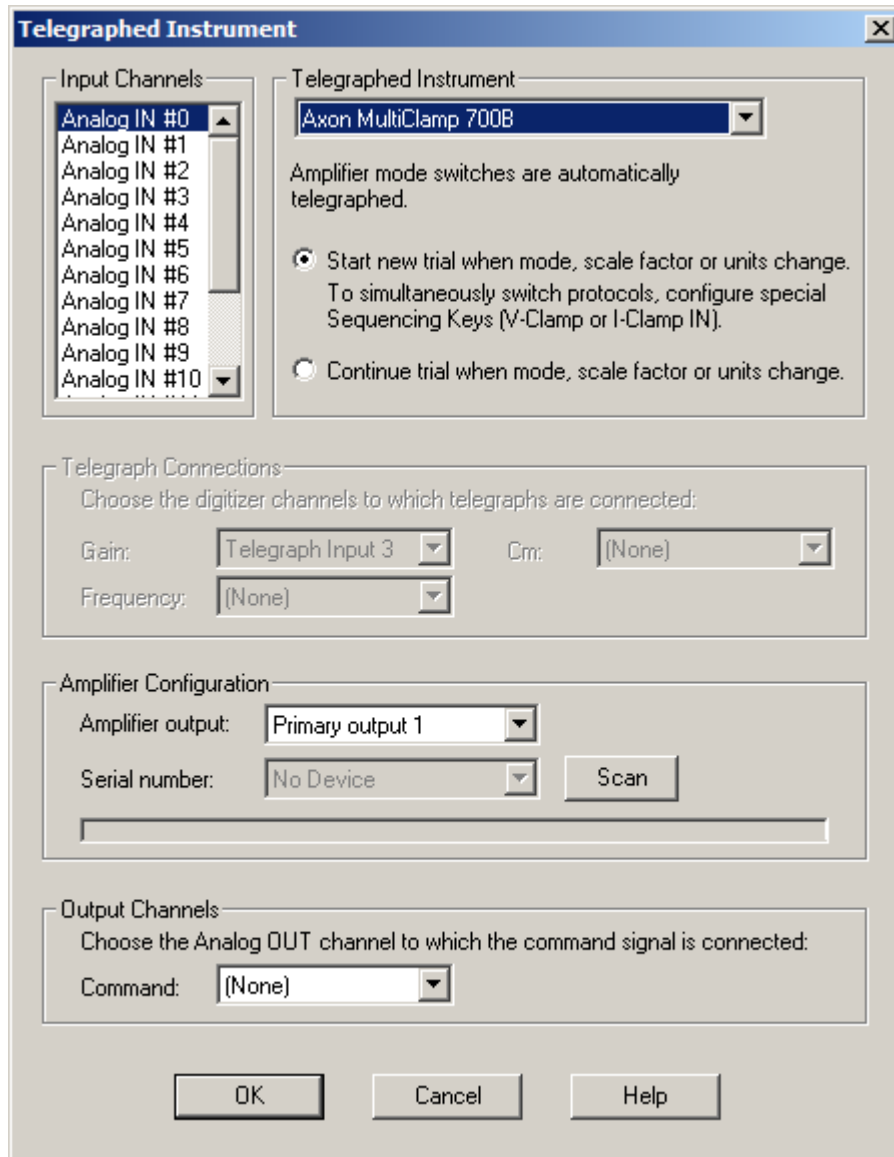
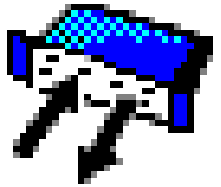


放大器的设置

下面开始一步步的设置放大器与软件的通信。将放大器连接到软件上。

在软件主窗口的菜单栏点击 Configure，接着点击 Telegraphed Instrument，打开放大器的设置窗口。

记录软件 Clampex 常用功能介绍

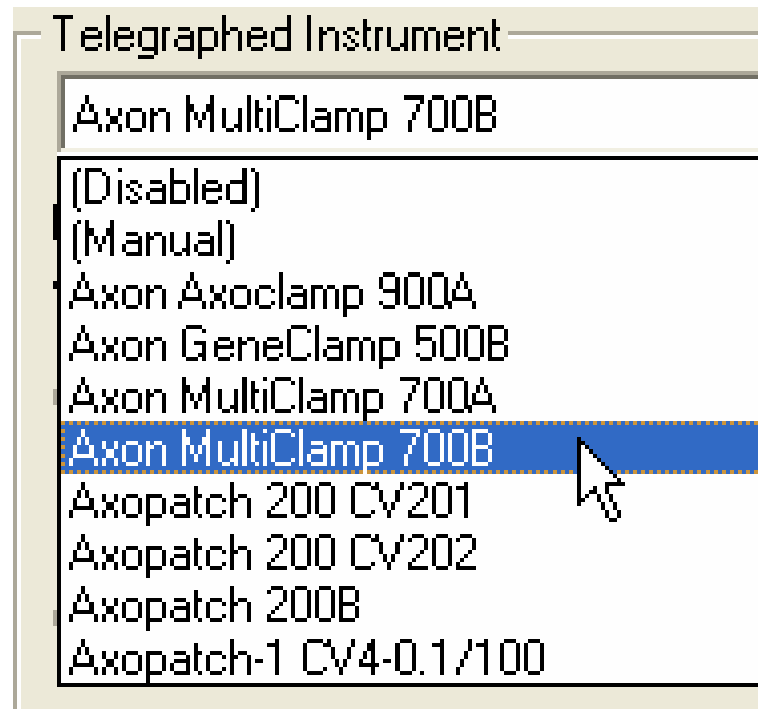
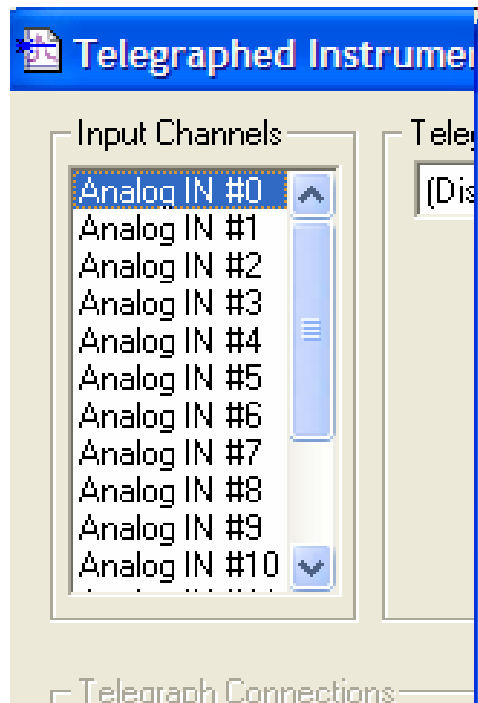
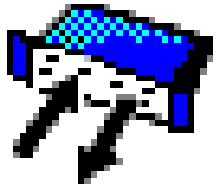


放大器的设置

该窗口主要可设置：

1. 选中某个通道，该通道与数模的物理连接方式是对应的（通过 BNC 线）。
2. 对该连接到该通道上的放大器型号进行选择 and 设置（通过列表选择）。
3. Telegraph Connections 的设置与放大器和数模物理连接方式项对应，用于同步 Gain、Cm、Frequency 数据。
4. 放大器输出接口的连接设置。
5. 设置数模的模拟输出通道，这个通道输出模拟信号如命令，到放大器。

700B 的设置



1. 首先在左侧列表中选中要设置的输入通道，这个通道对应真实的模拟信号输入接口。
2. 接着在右侧下拉列表中选中 Axon MultiClamp 700B

700B 的设置



Amplifier Configuration

Amplifier output: Primary output 1

Serial number: 00102318

Scan

Output Channels

Choose the Analog OUT channel to which

Command: Analog OUT #0

3. 在 Amplifier Configuration 区域点击 Scan 键，软件会自动的搜索连接到对应的放大器，并显示出放大器的输出通道和序列号。
4. 在下方选中数模 - 放大器的输出端口为 Analog OUT #0。
5. 其它的设置软件会自动完成，点击窗口的 OK 键关闭当前窗口，设置完毕。

数据的存储位置



数据的默认存储位置

My Documents\Molecular Devices\pCLAMP\Data

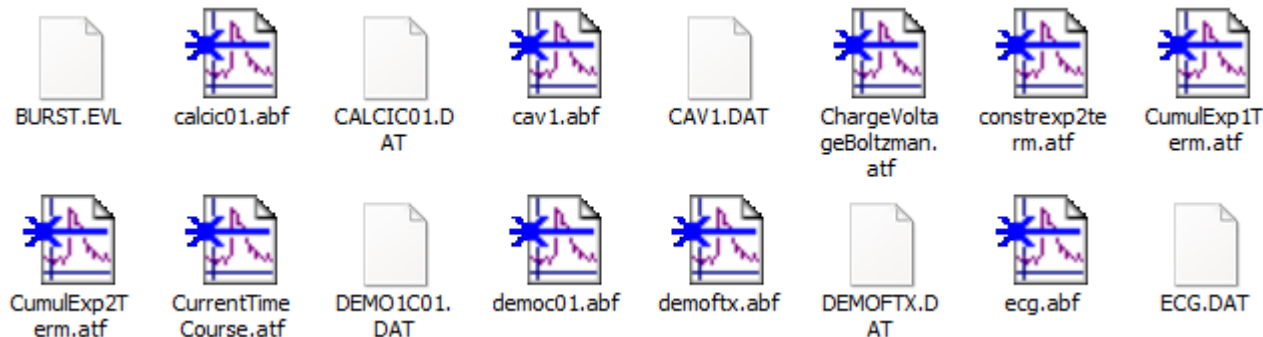
My Documents 中文名称为“我的文档”文件夹

Data 也是一个文件夹

此外，在软件的安装文件夹中还有一个文件夹用来存储“范例数据”，可以打开它用于学习软件的操作，其位置为：

安装的磁盘如 C:\Program Files (x86)\Molecular Devices\pCLAMP10.7\Sample Data

数据的文件格式为 abf 格式，在系统中显示如下：

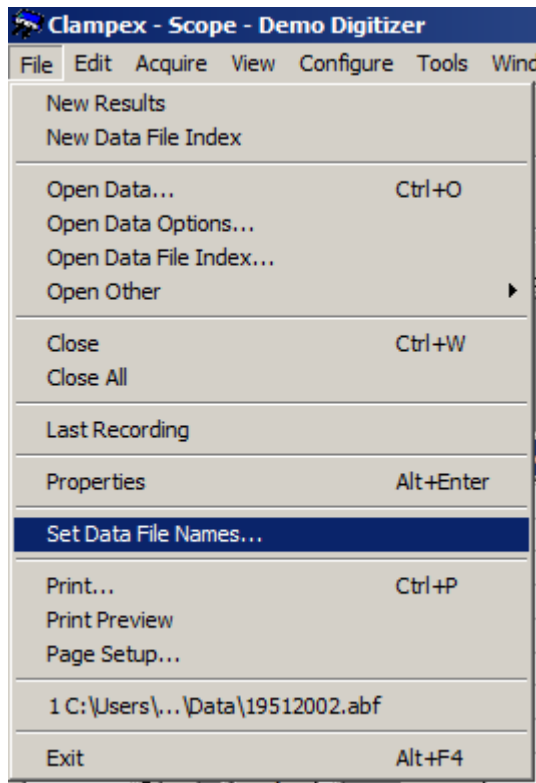


数据的存储位置

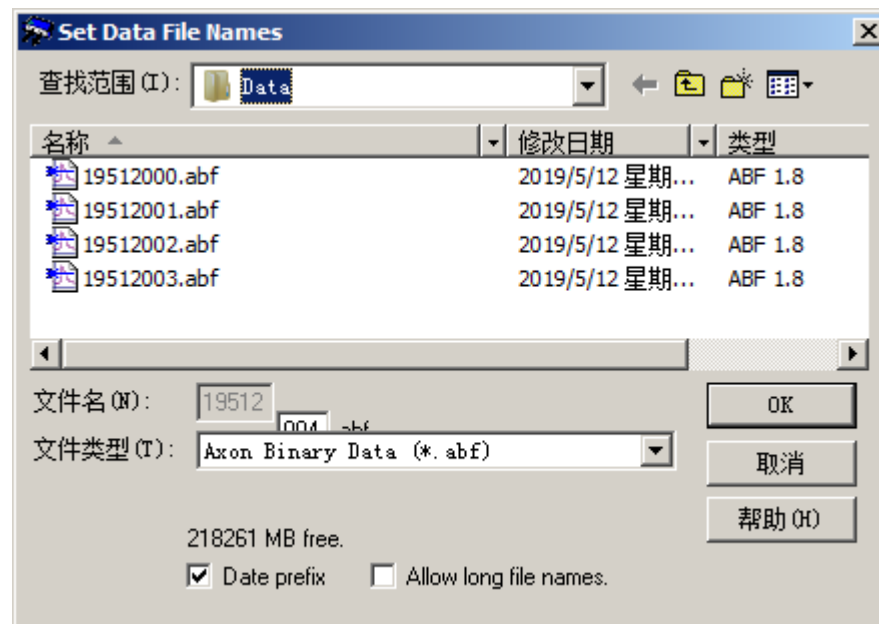


可修改数据的存储位置

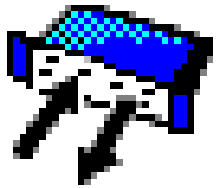
软件主菜单中 File 菜单 Set Data File Names 选项



在弹出的 Set Data File Names 中可以重新选择数据的存放位置。
数据会按照当前日期自动生成名称一个数据名。
当然也可以手动制定覆盖一个之前的数据。



数据的获取方法



软件主菜单中 Acquire 子菜单用于控制实验数据的获取方案。

New Protocol：新建方案

Open Protocol：打开方案

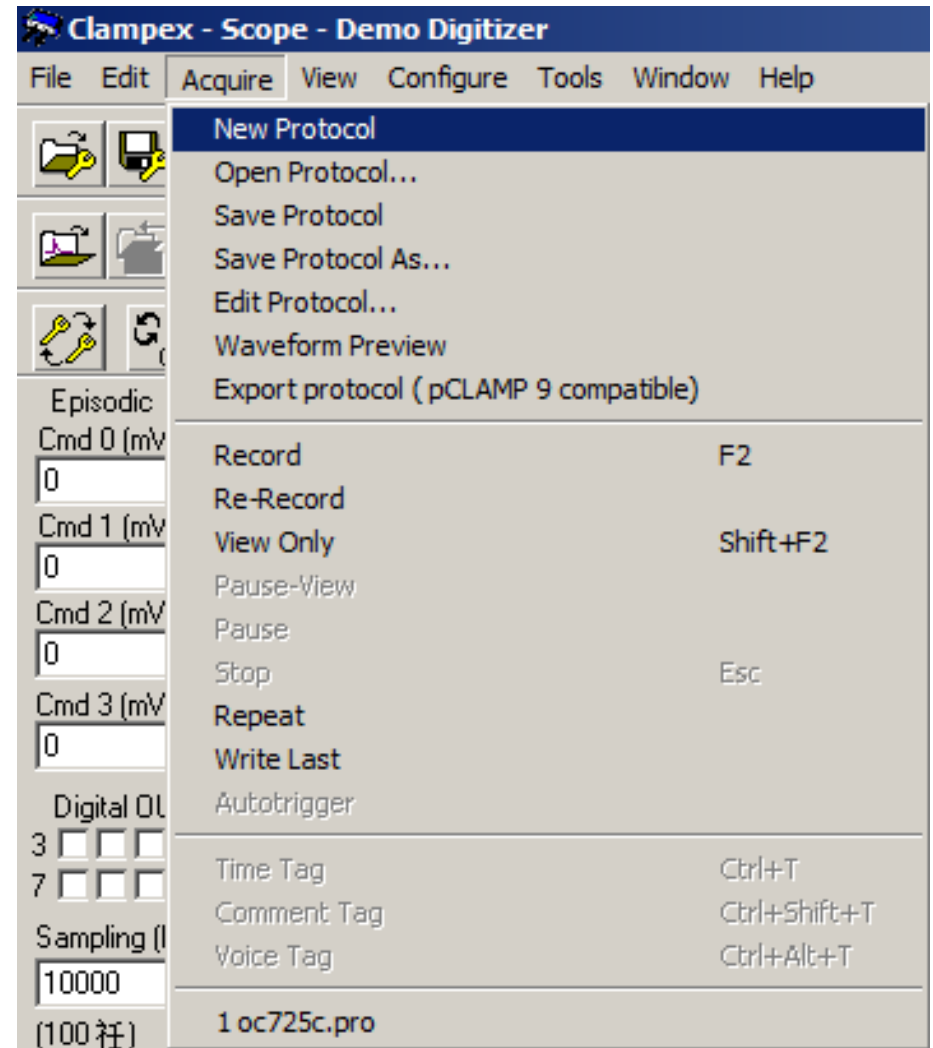
Save Protocol：保存方案

Edit Protocol：编辑方案

获取方案的默认保存位置：My Documents\
Molecular Devices\pCLAMP\Params\
My Documents 在中文环境下是“我的文档”
文件夹

Params 是一个文件夹

方案文件的格式是 .pro



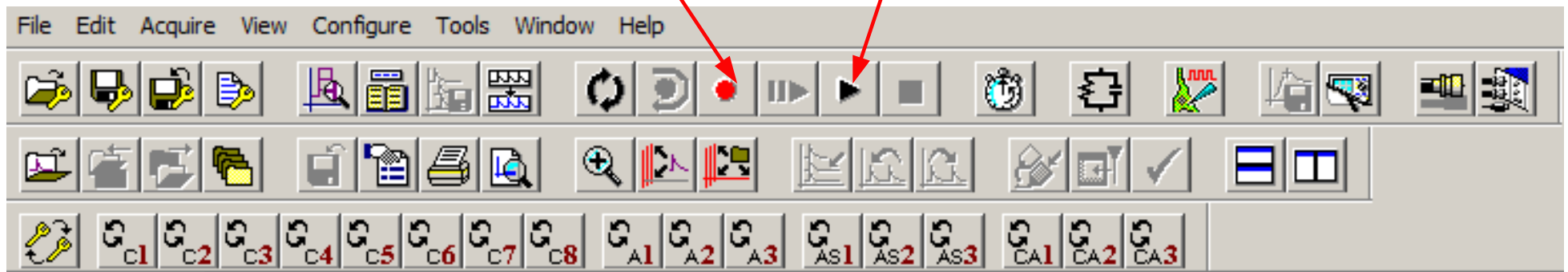
开始记录数据



软件主窗口快捷工具栏上有开始记录数据的按键

获取并保存数据
快捷键 F2

获取不保存数据，只观察
快捷键 Shift+F2



Membrane Test 功能



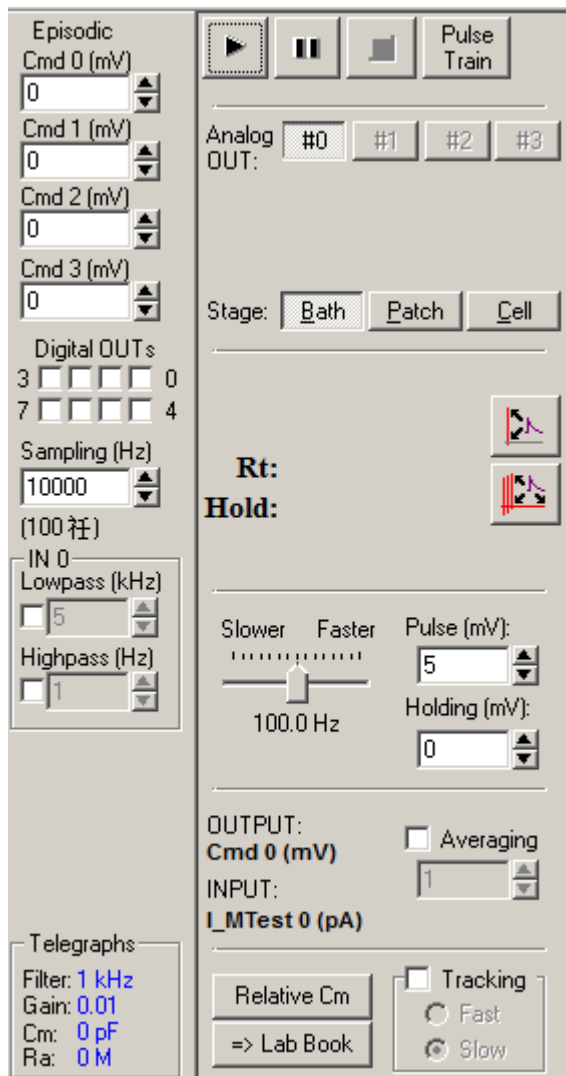
Membrane Test button

The screenshot shows the Clampex software interface. The title bar reads "Clampex - [Membrane Test - Demo Digitizer]". The menu bar includes File, Edit, Acquire, View, Configure, Tools, Window, and Help. The toolbar contains various icons for file operations and acquisition. A red arrow points to the Membrane Test button, which is represented by a square icon with a stylized membrane structure. Below the toolbar is a row of channel selection buttons labeled C1 through C8, A1 through A3, and CA1 through CA3. The main window is divided into a control panel on the left and a signal display area on the right. The control panel includes sections for Episodic commands (Cmd 0-3), Analog OUT, Digital OUTs, Sampling rate (10000 Hz), Lowpass and Highpass filters, and Pulse Train settings (Slower/Faster, Pulse/Holding). The signal display area shows a graph with the y-axis labeled "I_MTest 0 (pA)" ranging from -5000 to 5000 and the x-axis labeled "(ms)" ranging from 0 to 20. The text "信号显示区域" (Signal Display Area) is overlaid on the graph. The status bar at the bottom shows "For Help, press F1", "Disk = 1382218 Sw (untitled)", and "12:08:15 (00:19:09)".

控制区

信号显示区域

Membrane Test 功能



Membrane Test 功能是 Clampex 软件中非常常用和强大的一个功能。

它给入液、封接到破膜的过程提供了对应的图形，数值参考，如：

- 入液时的电极电阻
- 输出测试脉冲
- 输出钳制电压
- 串联电阻
- 膜电容
- 膜电阻等，使得封接非常方便。

另外，还可以使用它来进行噪声的检测，用它观察起来更方便。

信号特点

膜片钳实验的过程

假设所有准备工作都已做好。

1. 提前将各个仪器开机机型预热 30–60min。
2. 将处理好的样本放入到 Chamber 中。
3. 安装上电极，移动电极开始进行封接过程。
4. 简单来讲实现封接需经过 3 个过程。

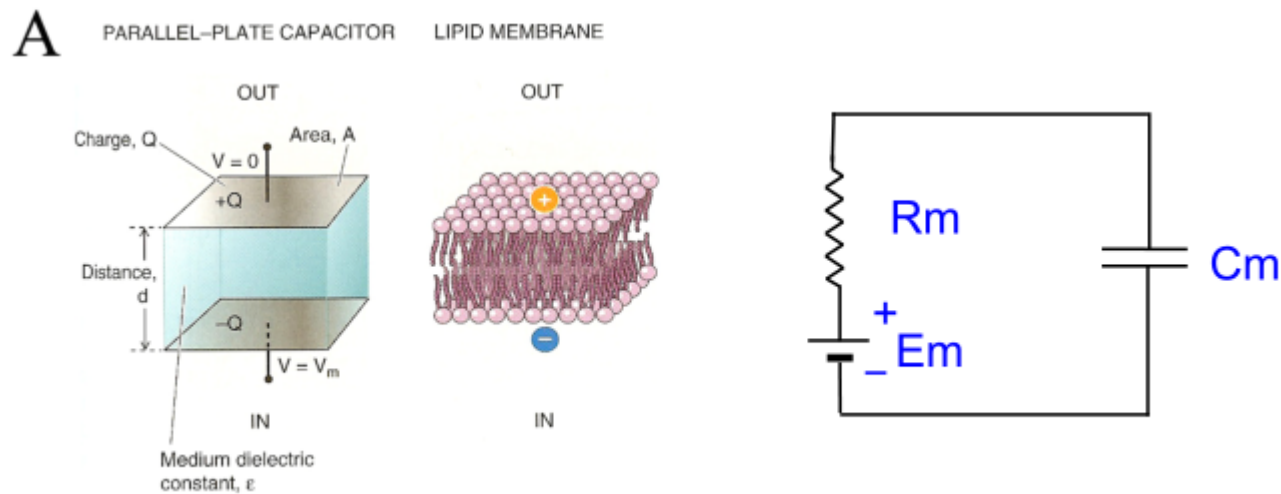
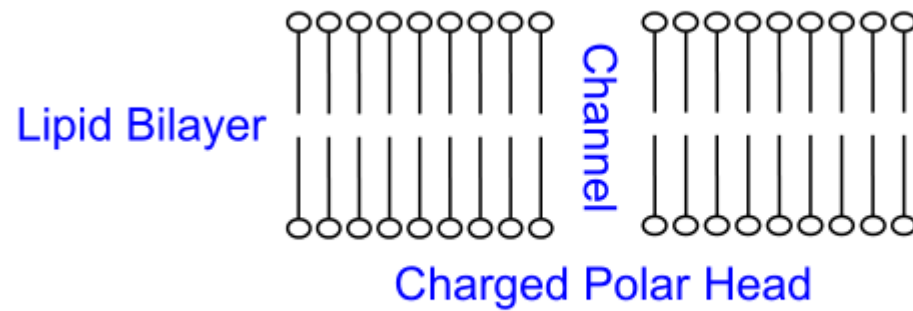
BATH：电极进入到浴槽浴液中。

PATCH：电极贴附到了细胞膜表面。

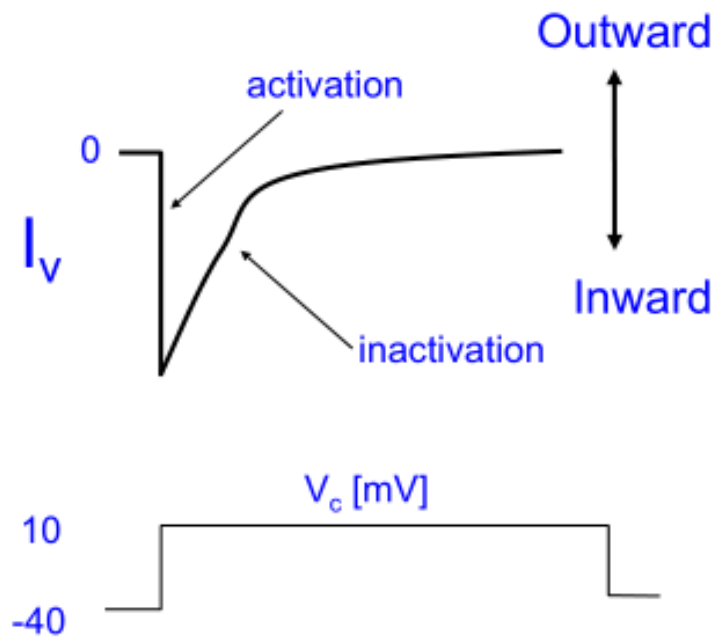
CELL：电极吸破细胞膜形成全细胞记录。

Clampex 软件中的 Membrane Test 集成了测试步骤，可对实验的封接状况进行检测。

电路知识 - 电阻和电容

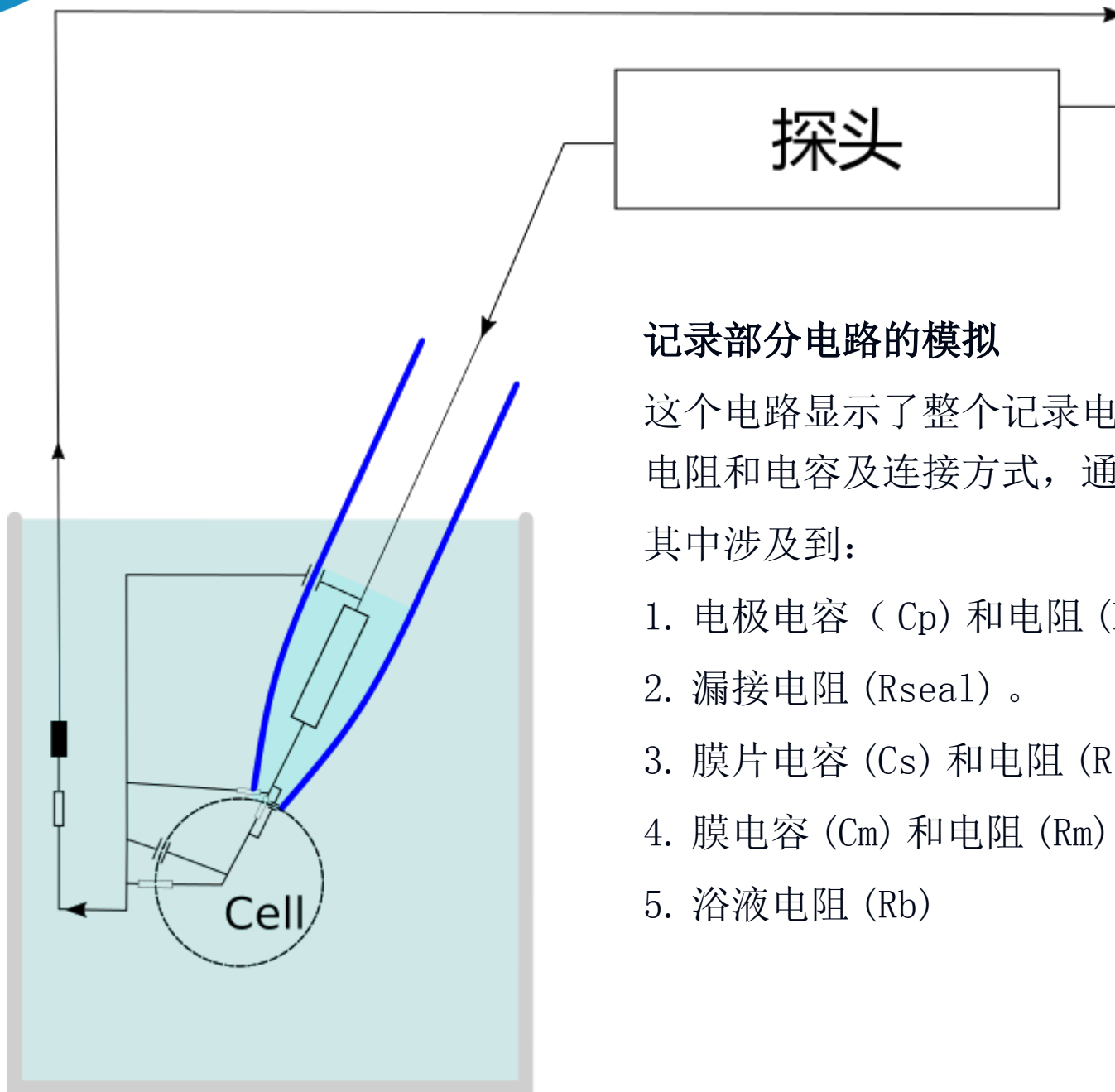


电路知识 - 电流方向



向上的外向电流
从电极到细胞外流出

向下的内向电流
从溶液经细胞到电极



探头

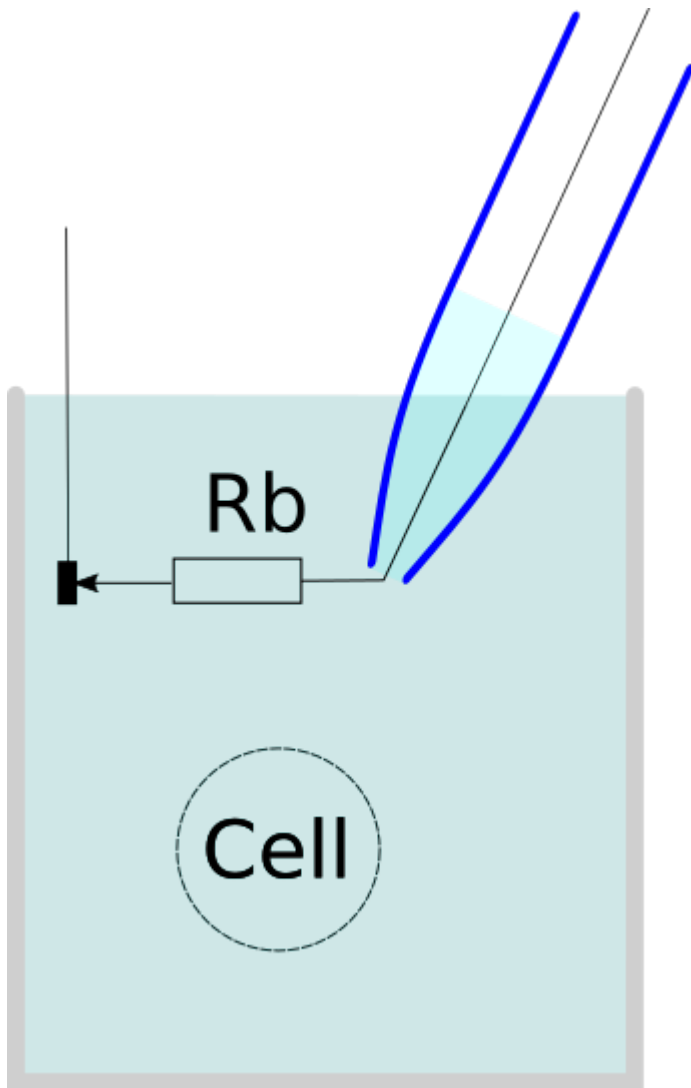
记录部分电路的模拟

这个电路显示了整个记录电路中各个位置的，电阻和电容及连接方式，通路。

其中涉及到：

1. 电极电容 (C_p) 和电阻 (R_p) 。
2. 漏接电阻 (R_{seal}) 。
3. 膜片电容 (C_s) 和电阻 (R_s) 。
4. 膜电容 (C_m) 和电阻 (R_m)
5. 浴液电阻 (R_b)

入液的过程 Bath 阶段



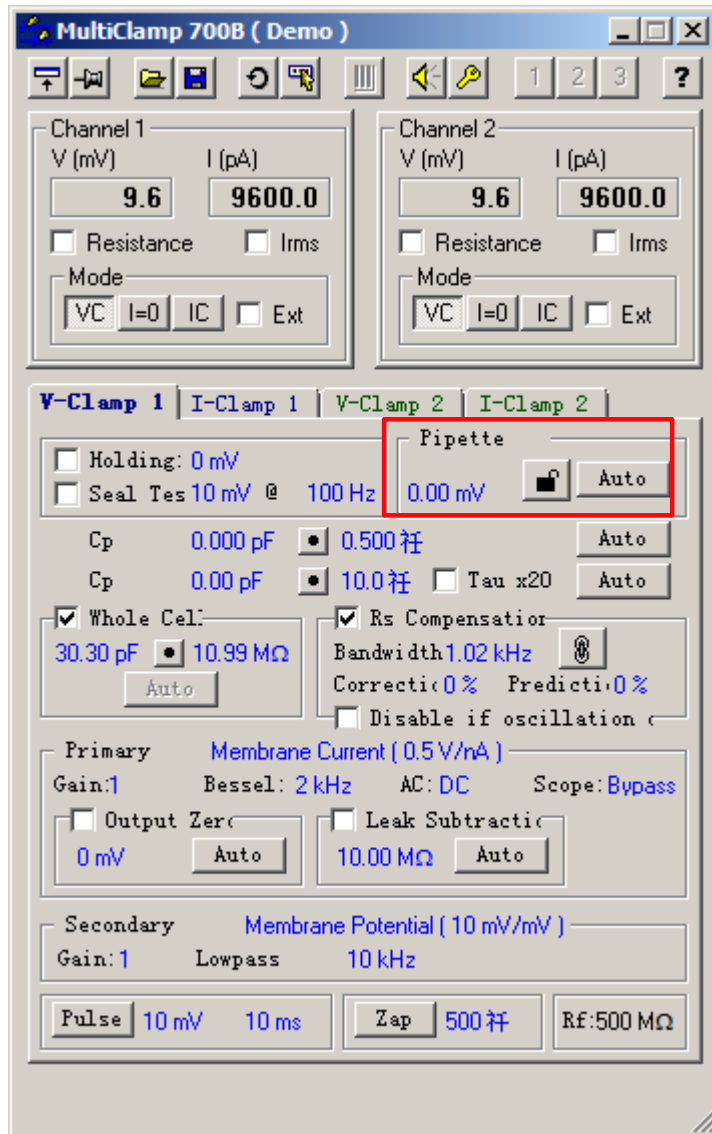
电极入液的操作

1. 入液前要给电极内部一个正气压。
2. 电流经电极尖端开孔传导到参比电极。
3. R_b 为浴液电阻。
4. 入液后由于电极内液和浴液产生了电位差，产生的信号，基线不在 0 的位置。

因此需要执行**调零功能**。

这个需要调节放大器上的 Pipette Offset 功能，调节信号的基线位于 0 位置。

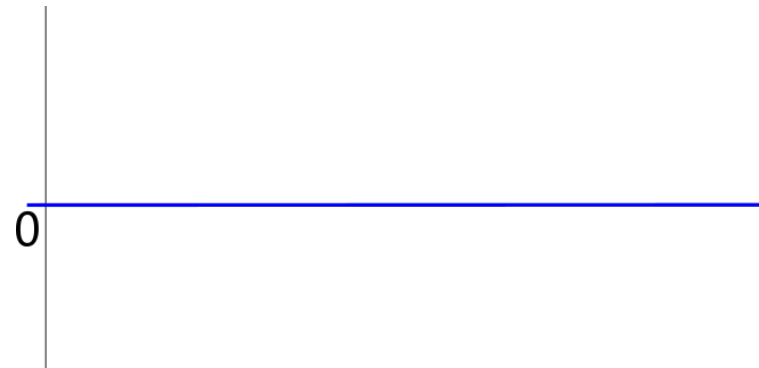
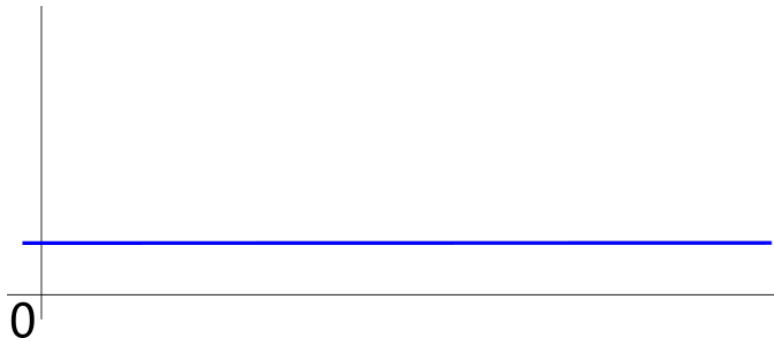
入液的过程 Bath 阶段 - 基线调零



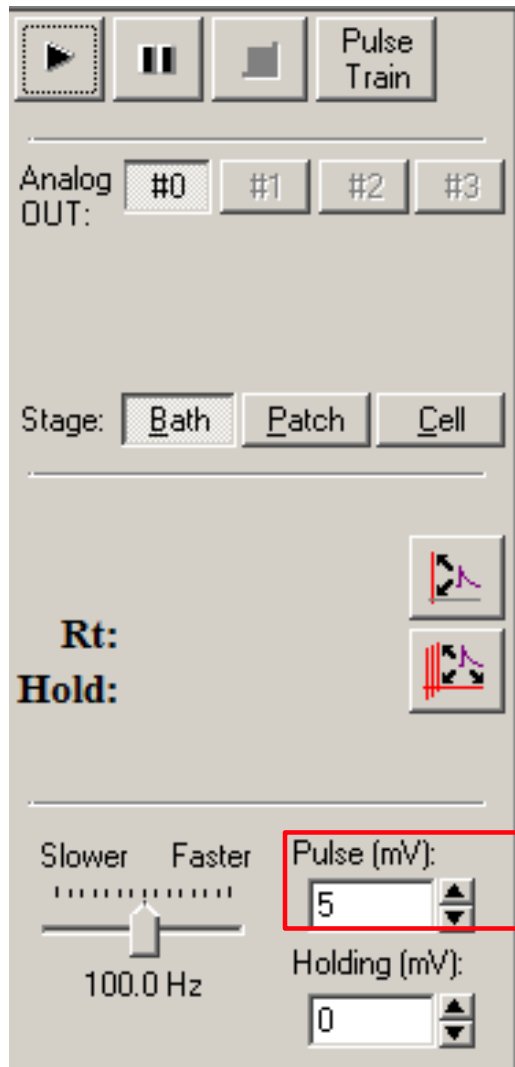
700B 中调零功能可通过直接电极 Auto 实现
(如旁边按钮为锁定状态, 先点击一下解锁)
自动基线调零功能。

入液的过程 Bath 阶段

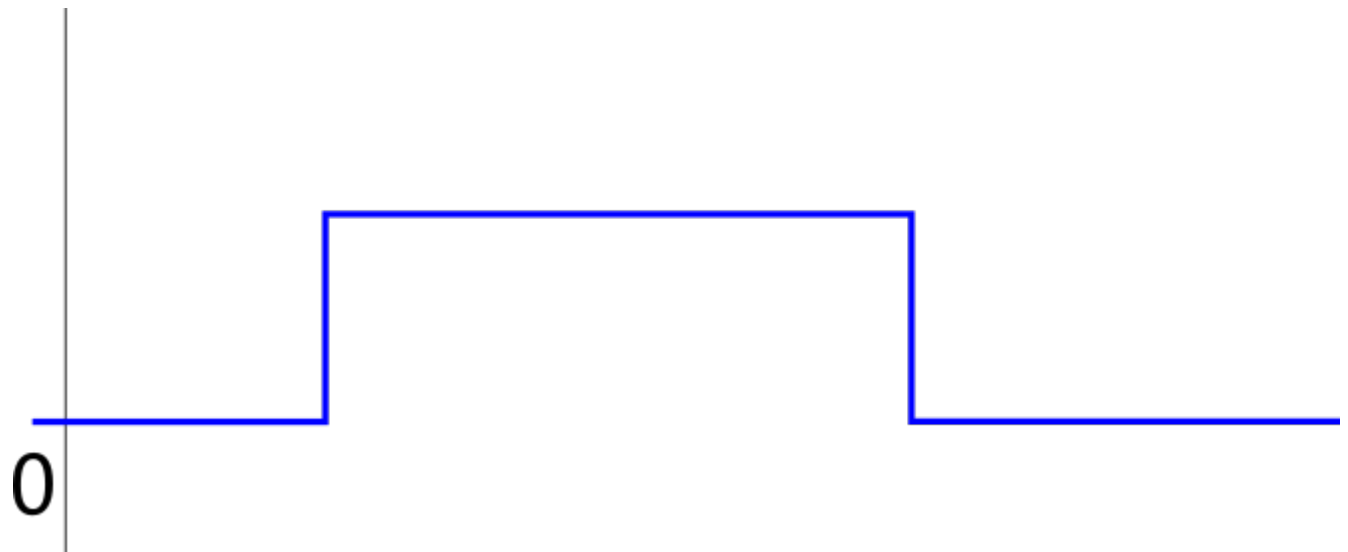
失调电位使信号的基线没有处于 0 的位置，修正后信号基线返回到 0 位置。



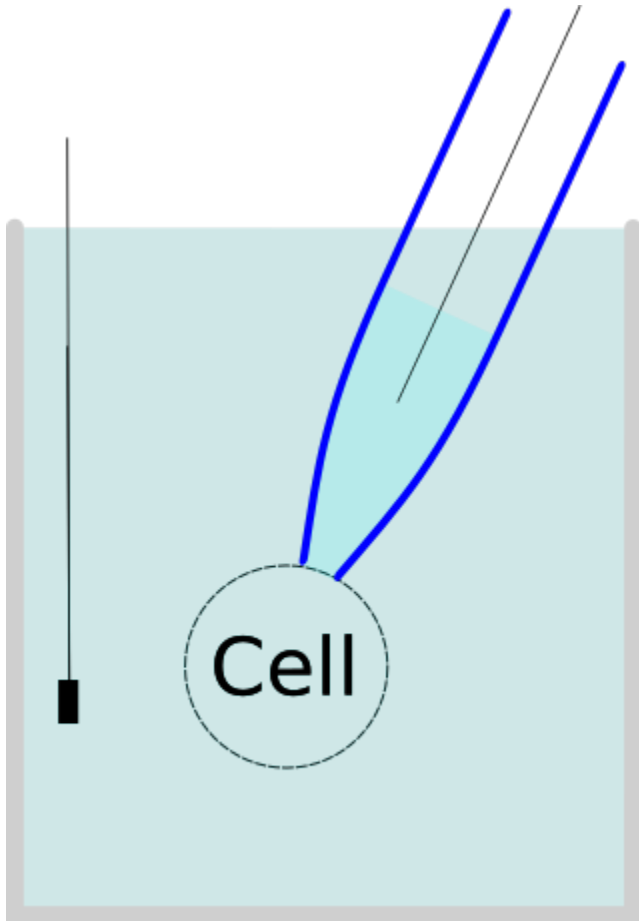
入液的过程 Bath 阶段 -Membrane Test



1. 打开 Clampex 中的 Membrane Test 界面
2. 在左侧的控制区域选中期望的输出端口如 Analog#0，点击后即可选中，没有开启的通道显示为灰色。
3. 选中 Stage 阶段为 Bath，点击后选中。
4. 在 Pulse (mV) 中填入一个 5mV 的测试电压。
5. Rt 这时显示电极电阻，一般为 3-10M Ω 。
6. 右侧信号输出窗口呈现一个方波。

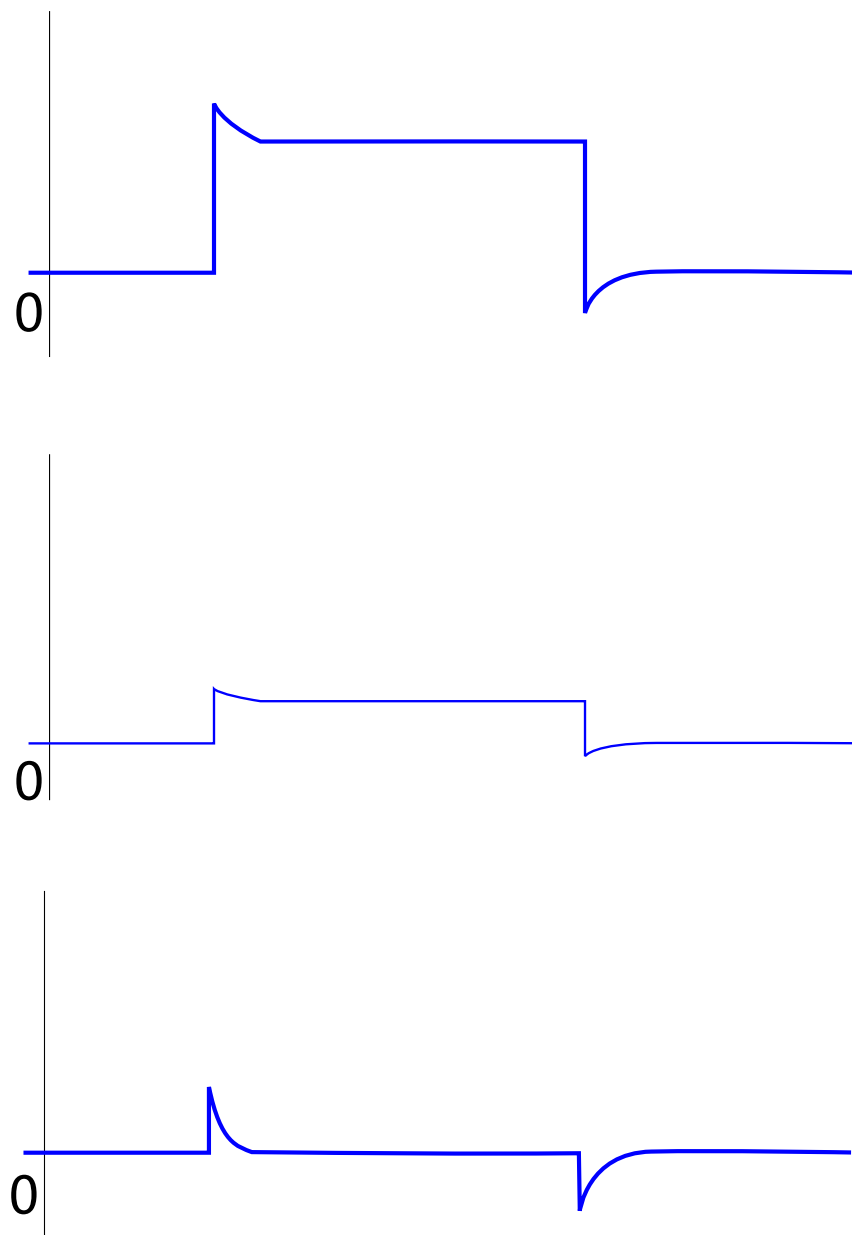


封接的过程 Patch 阶段

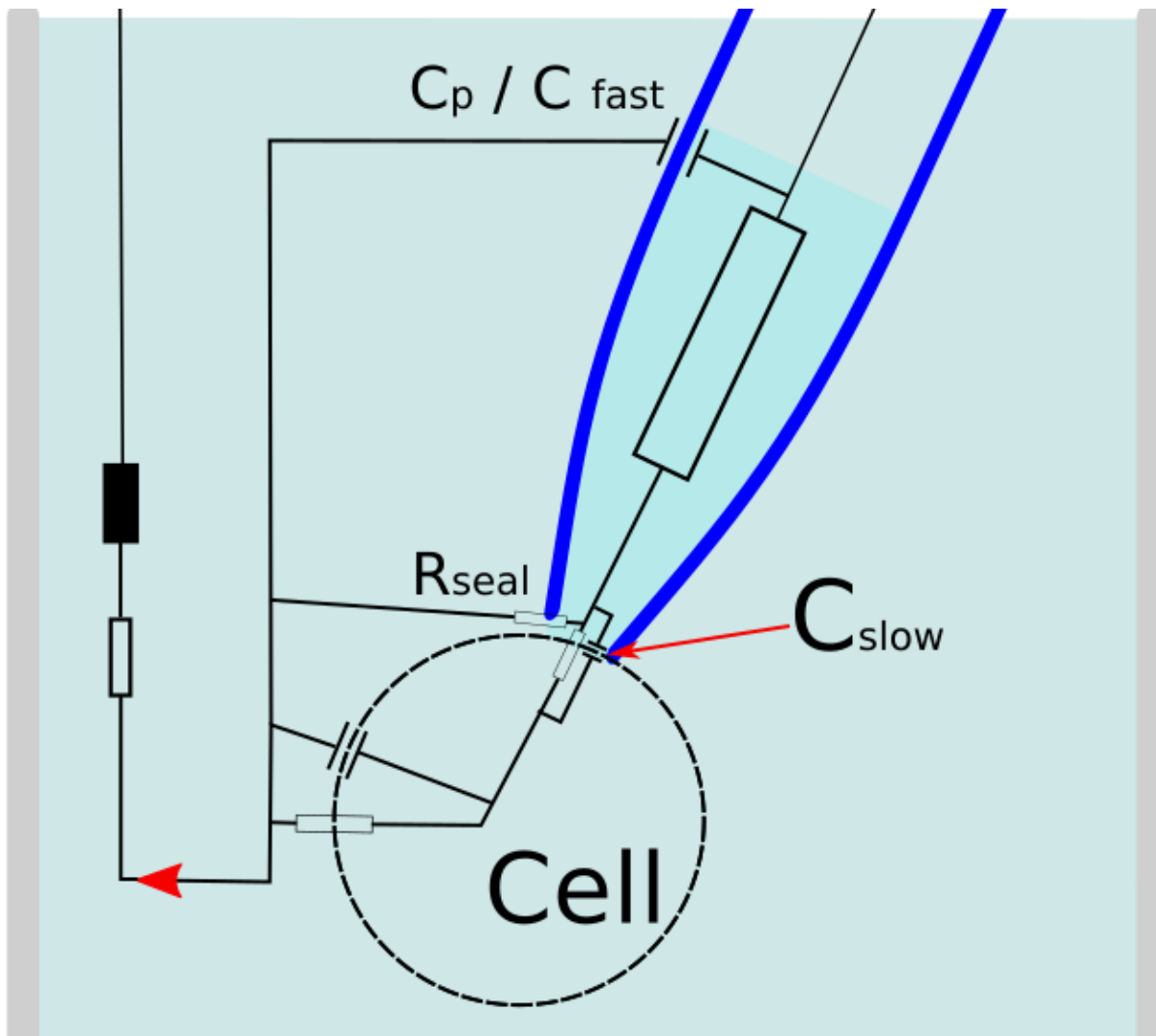


1. 使用微操将电极慢慢接近细胞，直到接触到细胞表面。
2. 接触到细胞表面后会发现方波越来越低。
3. 随着继续更紧密的接触细胞，方波的两头形成2个尖，这个是由于电极的内、外壁形成了一个电容电路，产生了充电效应。
4. 接着给电极负气压轻轻吸允细胞，开始形成封接。
5. 接着会观察到测试脉冲消失，只剩下电极电容的充电效应。
6. 观察封接电阻大小，一般全细胞封接阻值需要达到 $1G\Omega$ 以上，具体根据实际情况改变。
7. 补偿掉这个电极电容 C_p 。

封接时的波形变化



封接时的电路状态



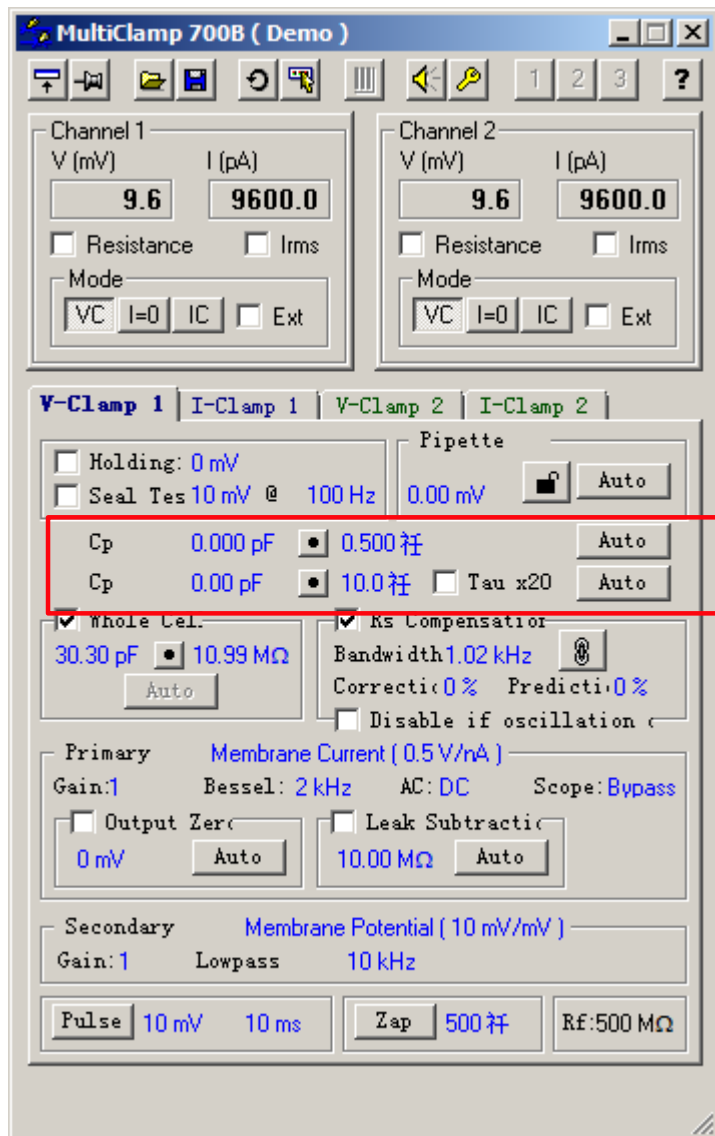
1. C_p / C_{fast} : 快电容, 电极电容。

它的充电效应在信号上形成了一个上下的尖段。

2. C_{slow} : 慢电容, 这时的慢电容为与电极接触的膜片电容, 比较小, 几乎科技忽略。

3. R_{seal} : 封接电阻, 通过观察它来实现高阻封接。

Patch 阶段的补偿

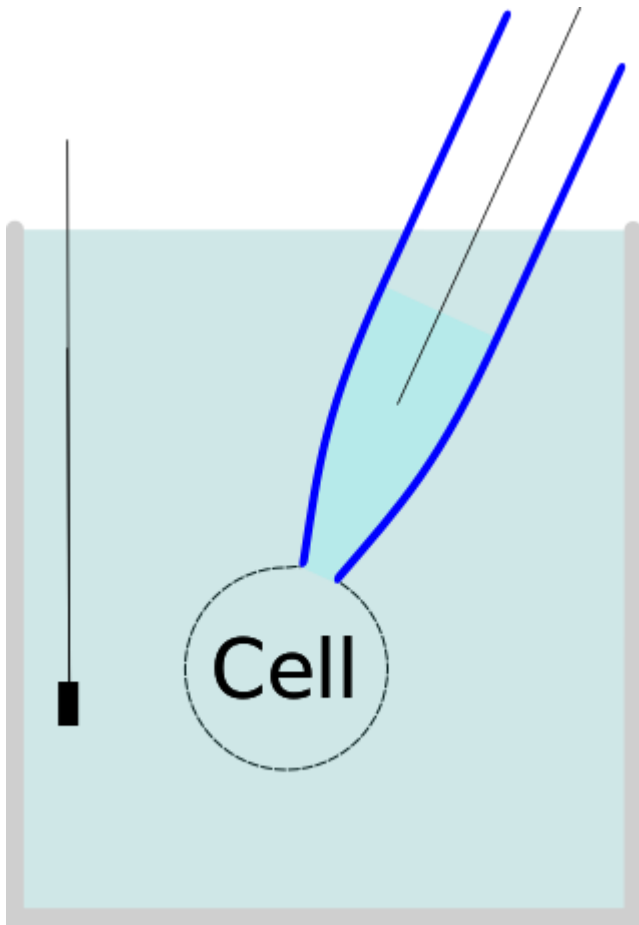


快电容和慢电容的补偿在 700B 中很简单的就可以实现：

通过电极面板上对应的 Auto 键就可以实现对电容的补偿。

补偿完毕后，会发现信号变为一条直线，如果这时想进行 On-cell 记录方式记录，就可以关闭到 Membrane Test 窗口，选择好获取方案，开始实验。

破膜后的全细胞阶段



在 Patch 阶段如果记录吮吸细胞膜或者通过 ZIP 电击打破细胞膜就形成了全细胞记录模式。

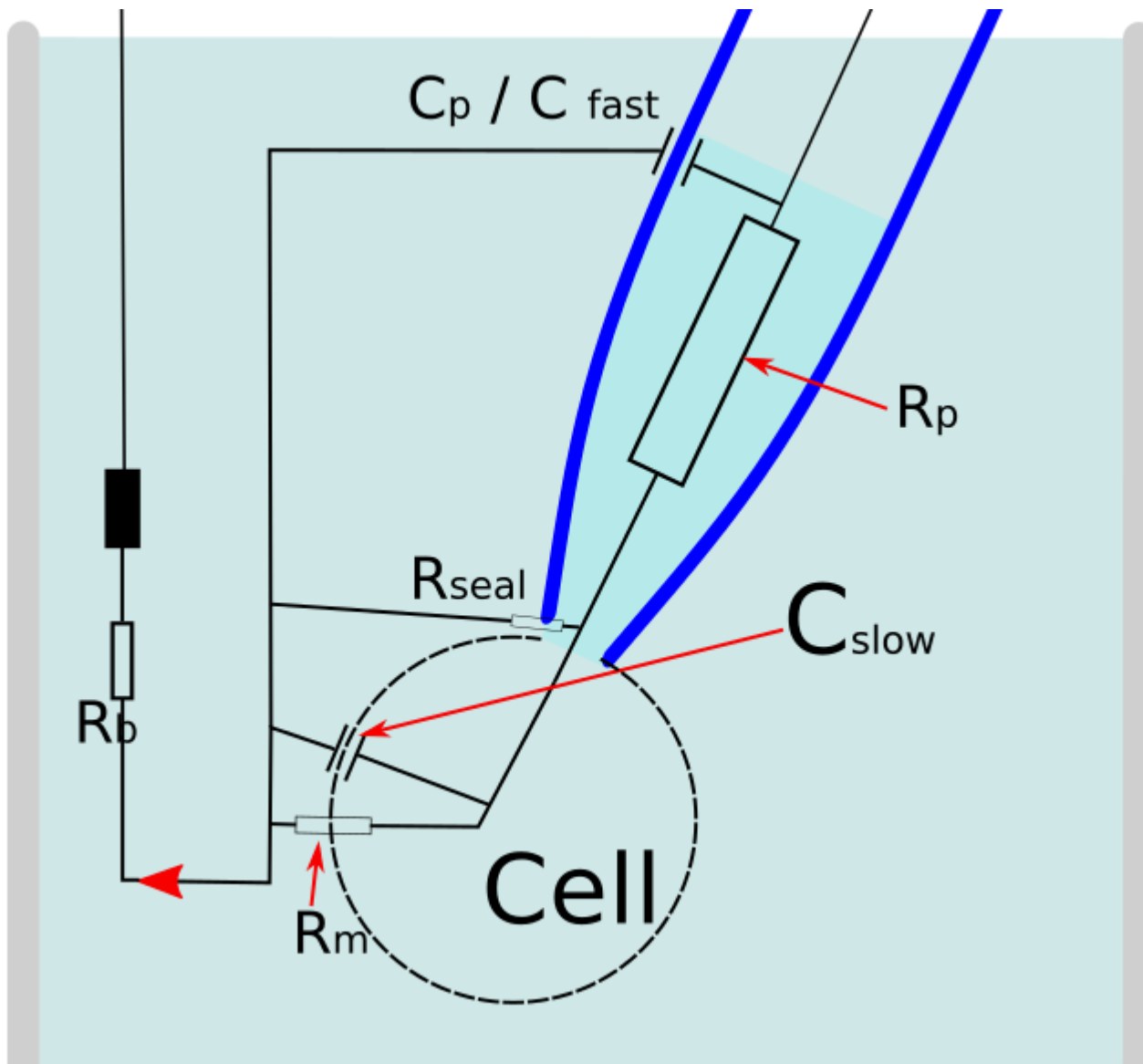
破膜成功后缓缓降低负压。

破膜后会基线上形成 2 个更大的尖，这时由于细胞膜充电的效应。

这时需要进行：

1. 全细胞电容补偿
2. 串联电阻的补偿

破膜后的全细胞记录



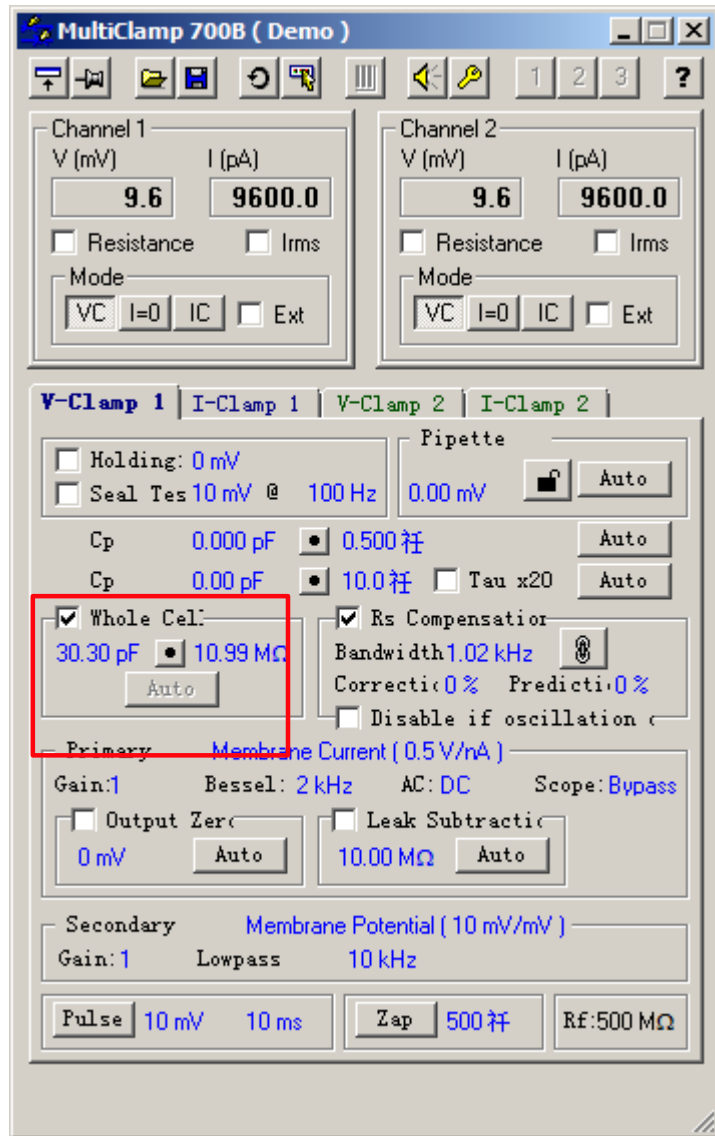
1. 慢电容 C_{slow} 由原来的膜片位置变为了整个细胞膜。

当前图中 C_{slow} 实际上代表的是整个细胞壁。

2. 串联电阻问题

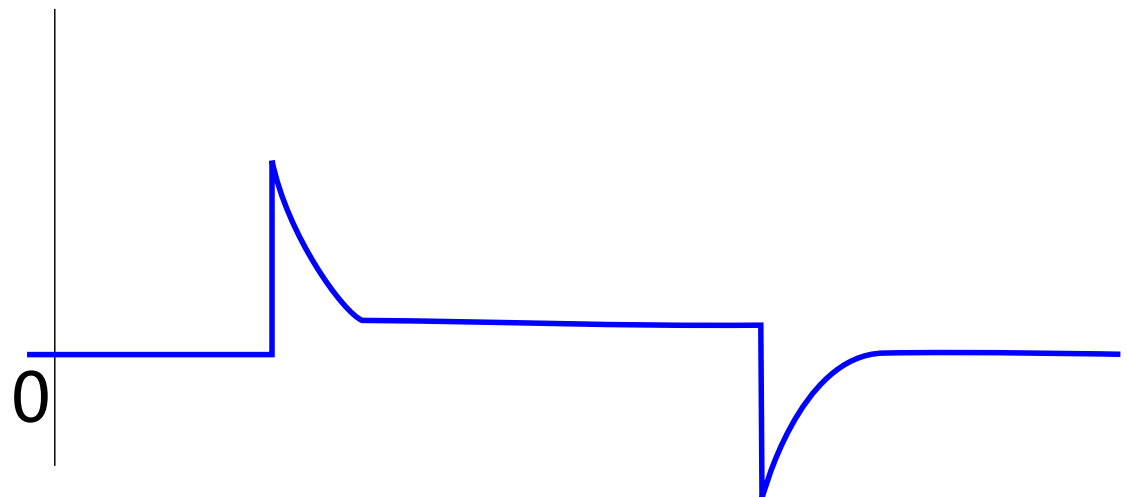
串联电阻 = 电极电阻 R_p +
膜电阻 R_m + 浴液电阻 R_b

全细胞电容补偿

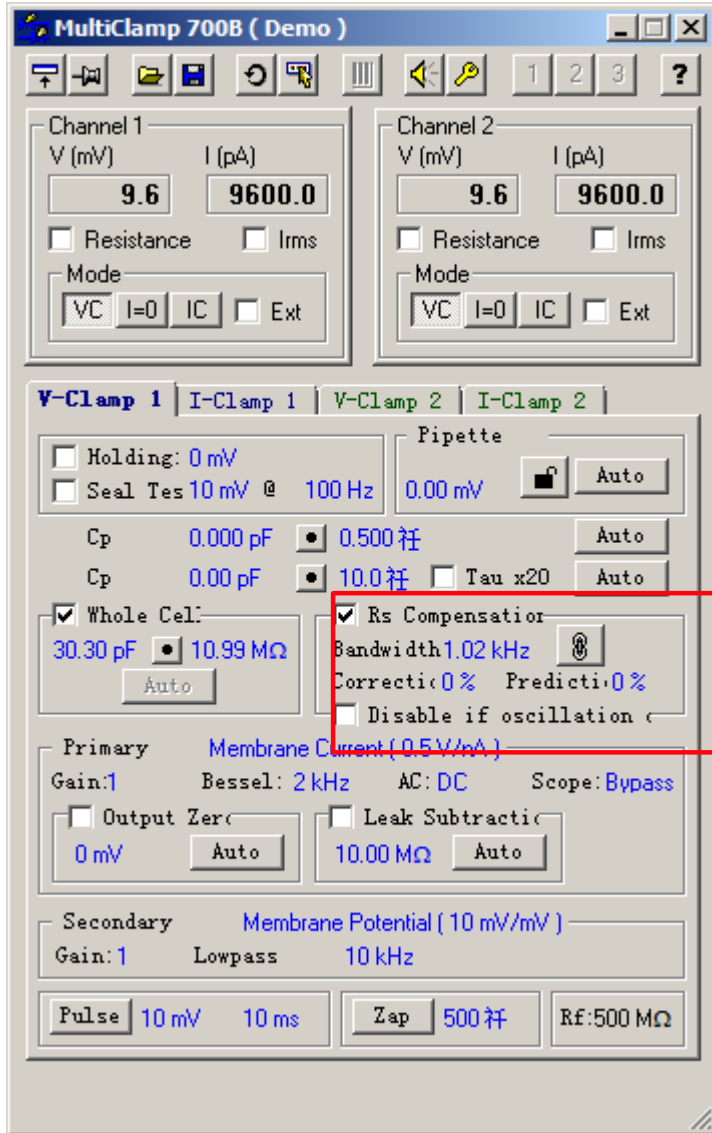


从上一页可知，慢电容 C_{slow} 由于变成了整个细胞膜，因此需要更多的充放电。

这时需要在放大器面板上勾选上全细胞电容补偿 WholeCell ，然后点击 Auto 按键。



串联电阻补偿



串联电阻是由于细胞的状态形成的一个干扰因素，主要带来以下问题：

1. 降低了钳制电位的响应、命令电压反映延迟。
2. 造成测量的电压不准
3. 串联电路形成了一个 RC 滤波器，限制了摄取电流信号的频带宽。

在进行上一步全细胞电容补偿后，开始对串联电阻进行补偿。勾选 Rs Compensation。

调节 Correction Prediction。