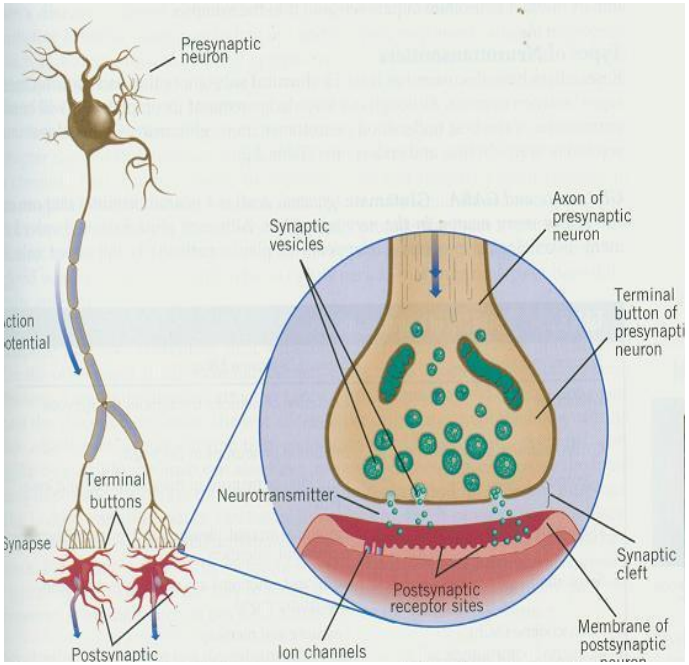
膜片钳技术在
海马脑片长时程增强（LTP）研究中的应用

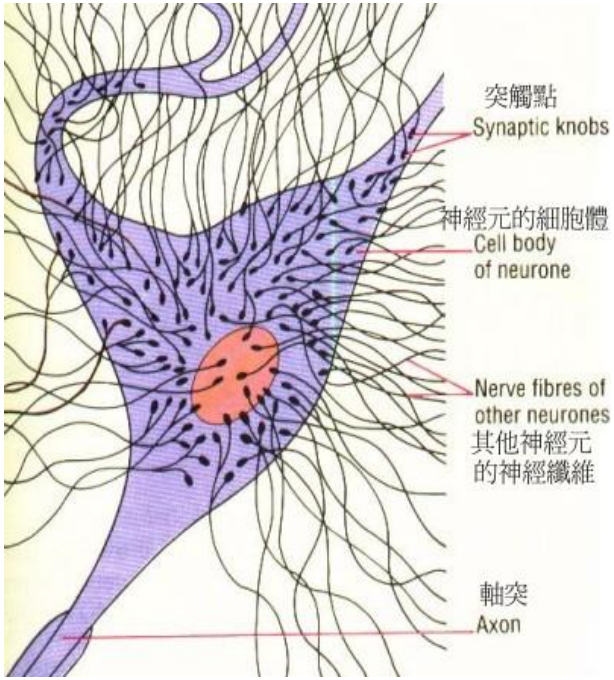
主要内容

一．LTP简介
二．LTP实验系统
三．海马脑片LTP记录技术

一．LTP简介

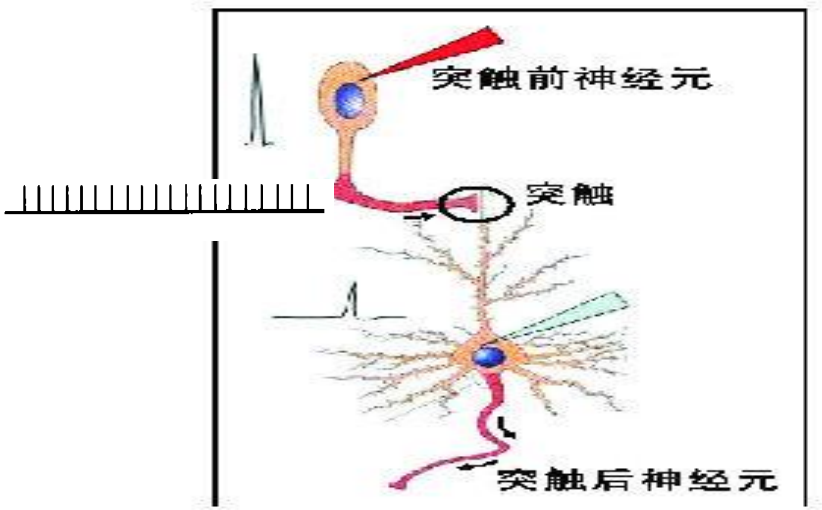
- 突触：一个神经元与另一个神经元接触并进行信息传递的部位。
- 突触可塑：突触在结构和功能上的改变称为突触可塑。
- 突触可塑性是学习记忆的神经生物学基础。



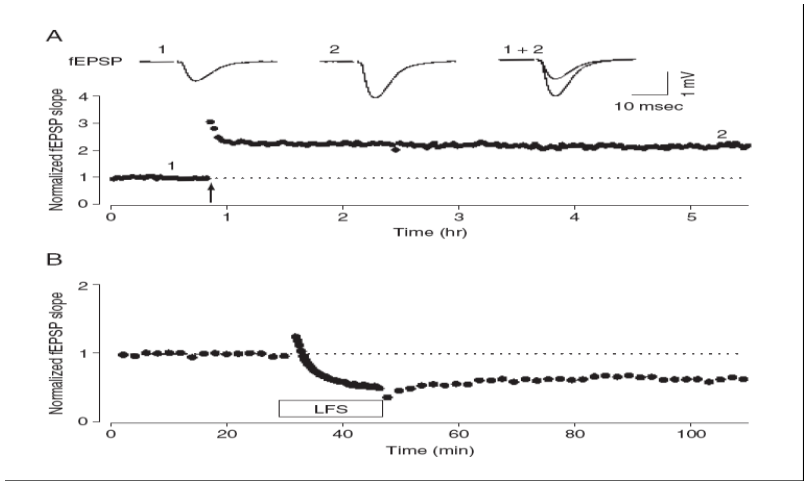


LTP

- ✓ 长时程增强（Long-term potentiation， LTP）：是指突触传递效能的长时间增强。
- ✓ LTP是突触功能可塑性的重要表现形式。也是研究学习与记忆的重要的细胞模型。
- ✓ 在电生理学上表现为在突触前给予高频电刺激后，随后的单个刺激引起的突触后诱发电位的幅度(或斜率）显著增大，诱发电位的潜伏期缩短，这种现象可持续很长时间，在活体动物可持续几天到几个星期，在离体标本可持续几个小时，这就是LTP现象。



前后两个神经元突触之间信息传递。



LTP形成的机制

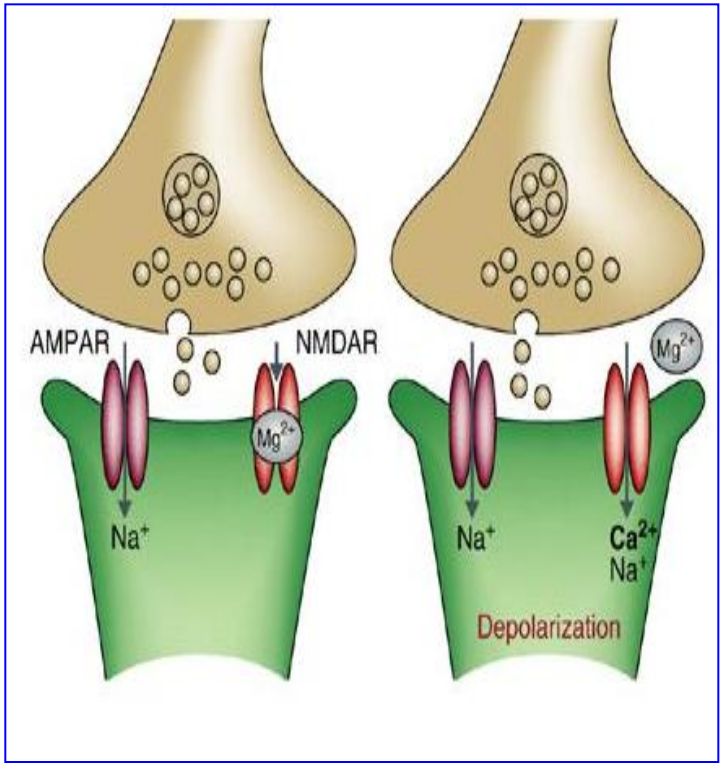
- LTP 的全过程包括诱导和维持两个阶段：
- 诱导期是指强直刺激后诱发反应逐渐增大直至达最大值的发展过程；
- 维持期是指诱发反应达最大值之后的持续过程。
- LTP 的诱导期与维持期有着不同的形成机制。

- LTP诱导：突触后机制，主要包括

1. 突触后膜去极化；
2. NMDA受体的激活；
3. Ca^{2+}内流。

- LTP的维持：突触前和突触后共同参与，包括

1. 突触前膜递质释放增加；
2. 突触后膜递质与受体作用效应增加；
3. 突触后膜PSD区AMPA受体数量增加；
4. 逆向信使向突触前释放。



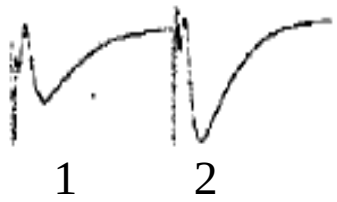
LTP与膜片钳：膜片钳全细胞记录技术

1.双脉冲易化(PPF)

2.高频易化

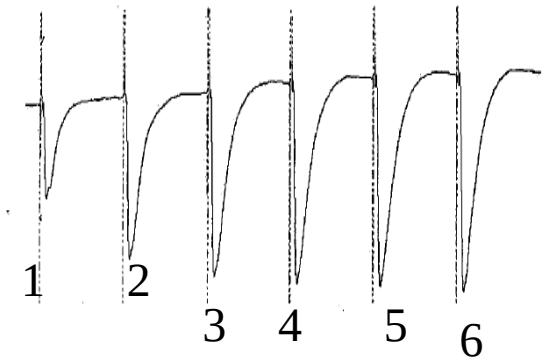
3. mEPSc

4.外源性神经递质诱导的突触后电流变化



双脉冲易化(PPF)

Ratio值=幅度2/幅度1

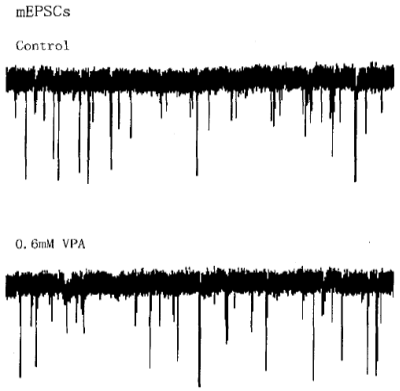


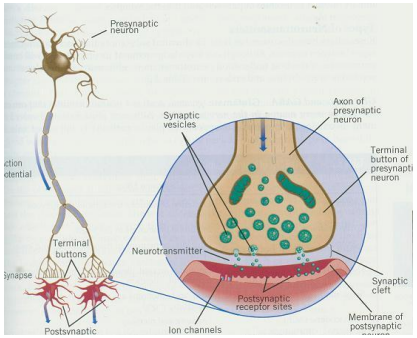
高频易化

Ratio值=幅度6/幅度1

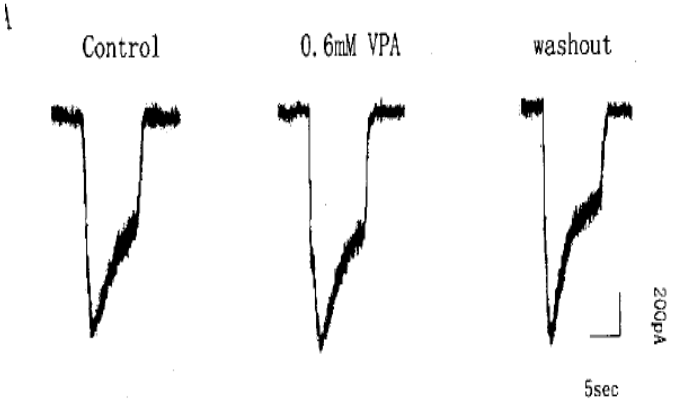
Ratio值>1

突触前递质释放特性的敏感参数





mEPSc：频率的改变反映突触前可塑性变化；幅度反映突触后可塑性的变化.



外源性神经递质诱导的突触后电流变化，反映突触后受体功能改变.

小结

- 突触
- 突触可塑性
- LTP
- LTP的两个阶段
- LTP的电生理表现
- 膜片钳技术在LTP机制研究中的应用

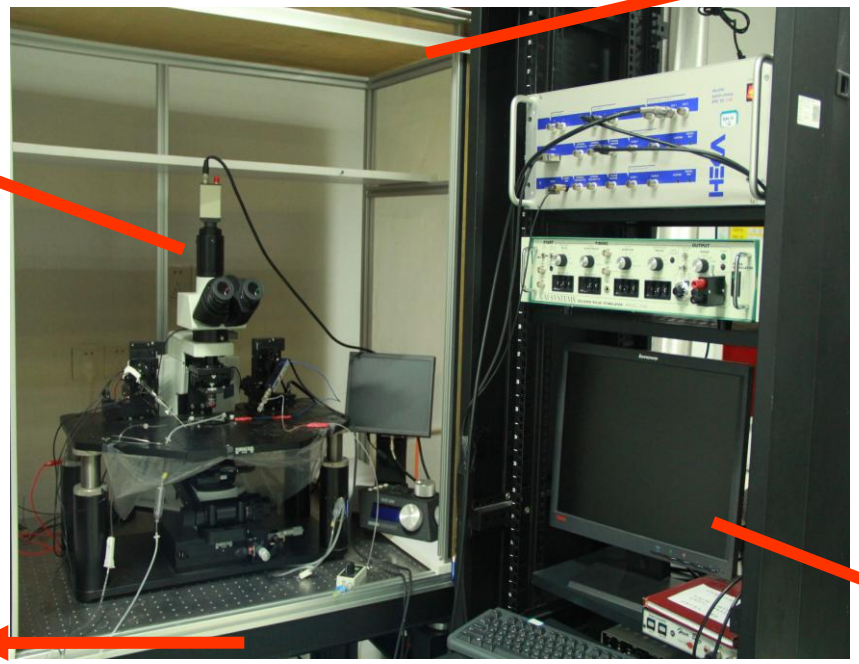
二．LTP实验设备

1.微电极放大器
2.数模/模数转换器
3.数据采集分析软件
4.计算机（液晶屏、键盘、鼠标）
5.振动切片机
6.微电极拉制仪（拉制玻璃电极）
7.解剖显微镜（目镜X10，物镜X1-4）
8.脑片记录槽系统（记录槽、加热板）
9.脑片孵育槽（选配）
10.95%O_2/5%CO_2混合气瓶（自备）
11.水浴锅（用于孵育脑片）
12. 温控装置（控制脑片记录温度，选配）手动微操纵器2个（含磁力表座2个）
13. 冷光源
14. 蠕动泵/真空泵
15. 给药系统：灌流/注射/离子电泳
16. 刺激器与隔离器
17. 防震台和屏蔽网
18. 氮气瓶（为防震台充气，自备）
19. 仪器架
20. 玻璃电极和金属电极
21. 其他：pH计、电子天平、渗透压仪、磁力搅拌器，其他实验室常用设备

传统膜片钳设备的组成

光学部分

- 荧光显微镜
- CCD照相机
- 监视器
- 激光器等



辅助部分

- 信号屏蔽罩
- 微电极拉制仪
- 药物灌流设备
- 温度控制器

机械部分

- 防震台，气压泵或气瓶
- 高精密微电极操作器
- 灌流操作器
- 显微镜移动平台

电学部分

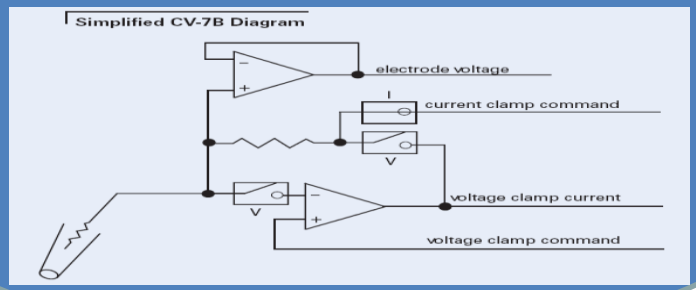
- 信号放大器
- 数据采集卡
- PC
- 周边设备控制器等

电学部分

Amplifies bioelectrical signals

HeadStage





Sends out clamp signals to cell via the "electrode" and amplifies the cell's response



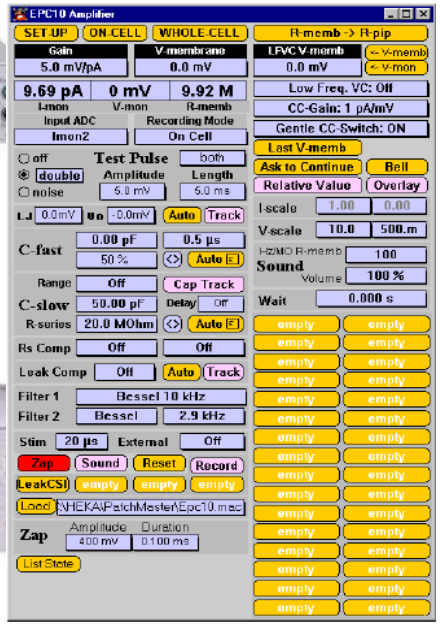
HEKA



InstruTECH LIH 8+8



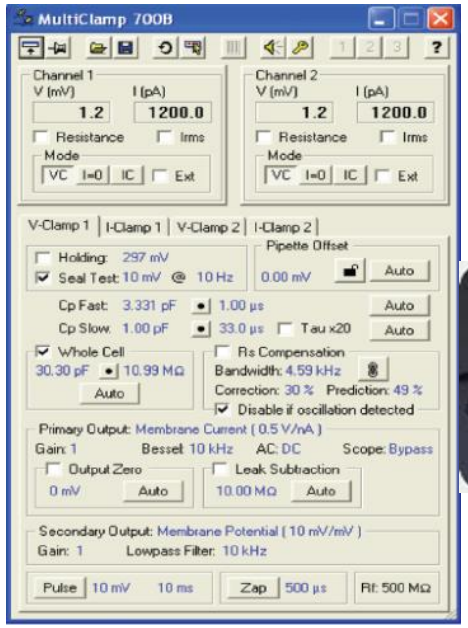
EPC 10 USB



MDC



DigiData 1440A





700B



200B

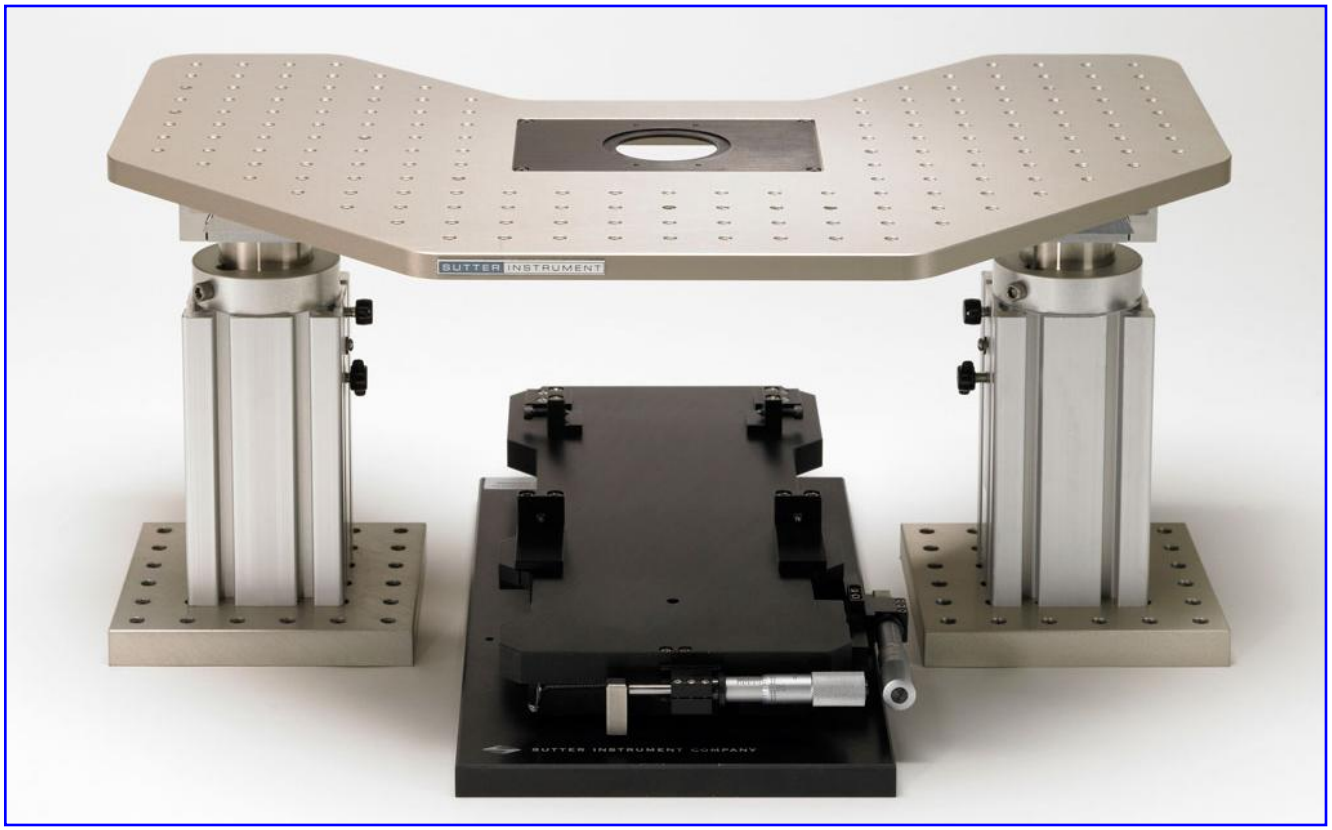
光学部分



显微镜 Best For Brain Slice



Provides a close view of target cells

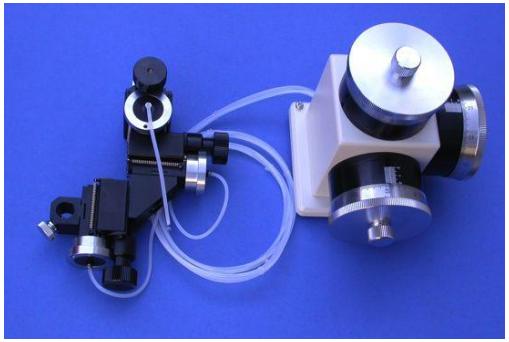


显微镜显微镜X-Y移动台与支撑平台
美国Sutter公司的新产品MT-1078/N65

机械部分



Vibration Isolation Table





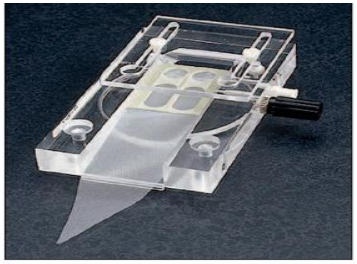
Produces a superior， ultra-quiet，shake-free environment

辅助设备



Leica VT 1200S

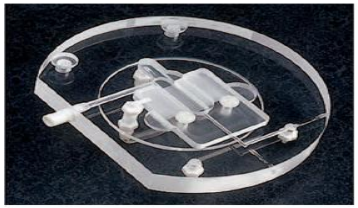
切片机



BSC–HT



BSC–BU



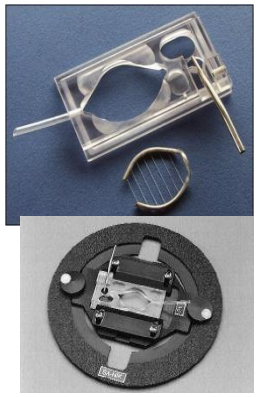
BSC–ZT



BSC–BU/BSC–HT/TC–202A

脑片孵育槽





灌流槽及温控器



微电极拉制仪

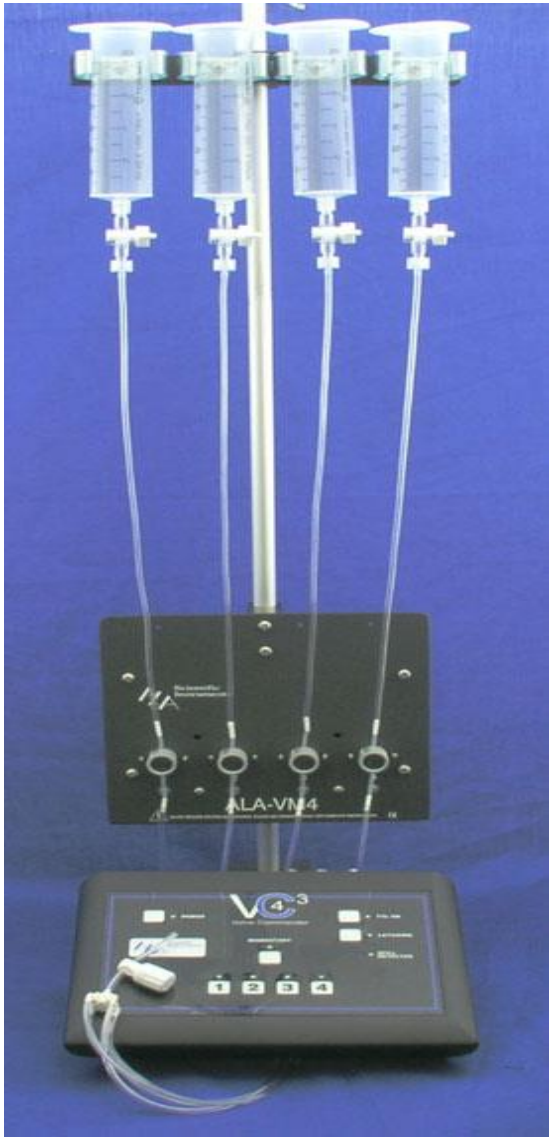


蠕动泵



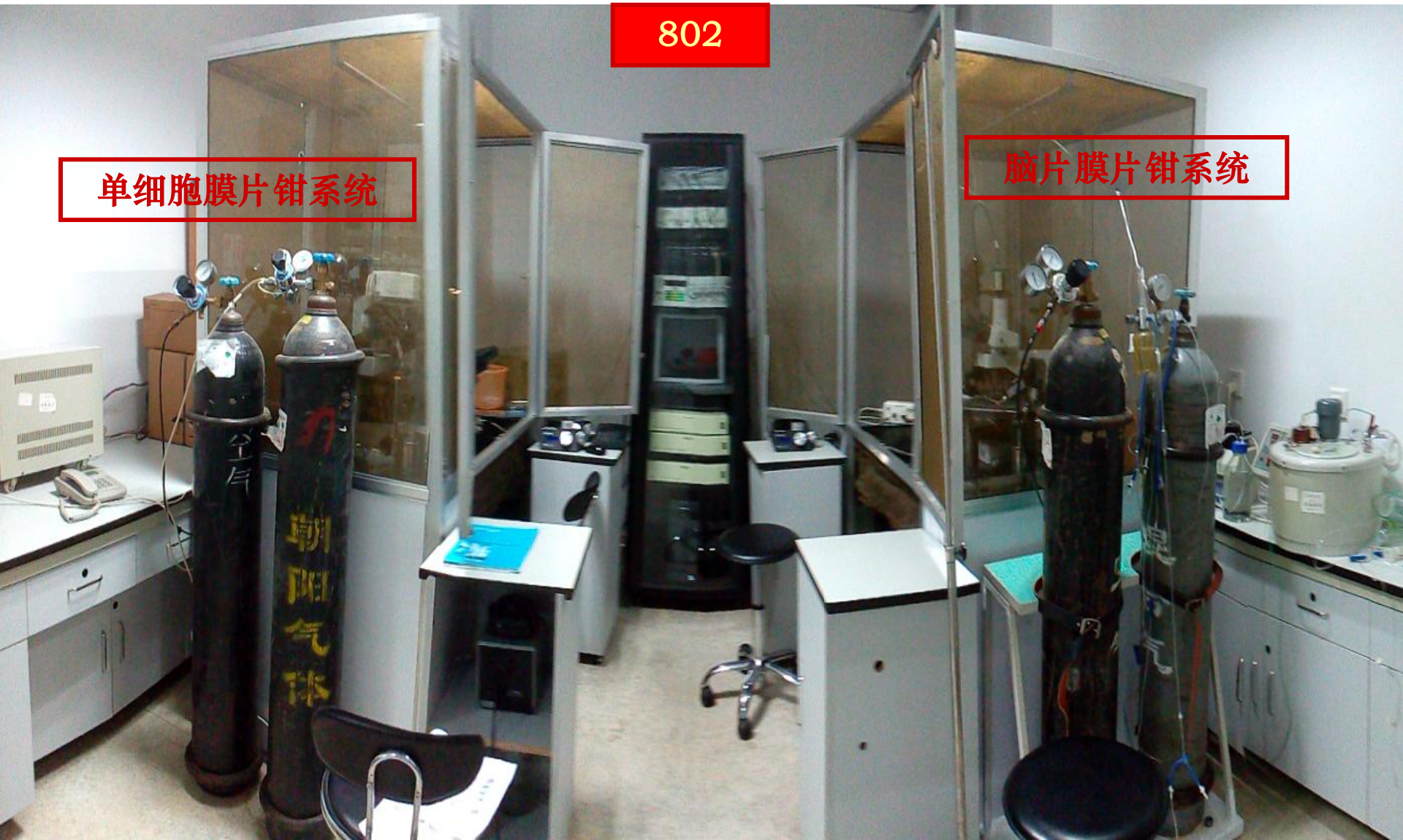


刺激隔离器



灌流给药系统

膜片钳平台

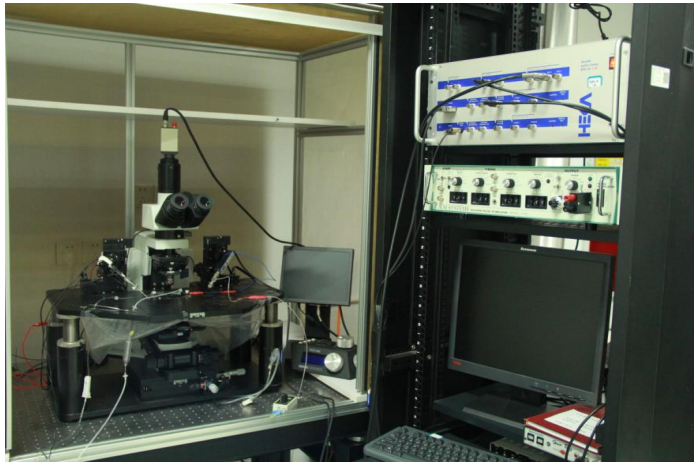


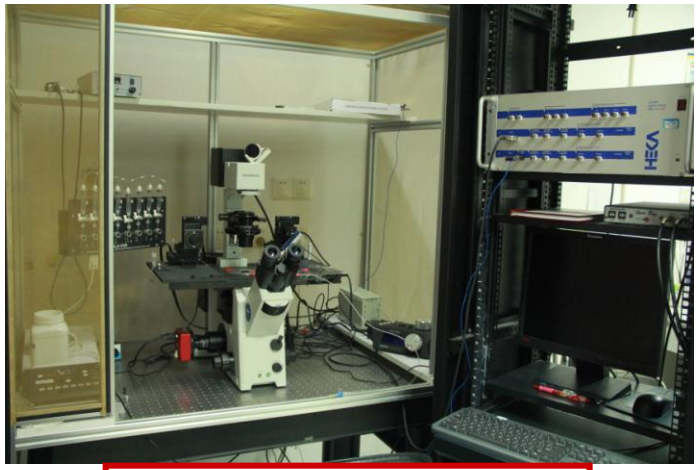
619



膜片钳系统

脑片膜片钳系统

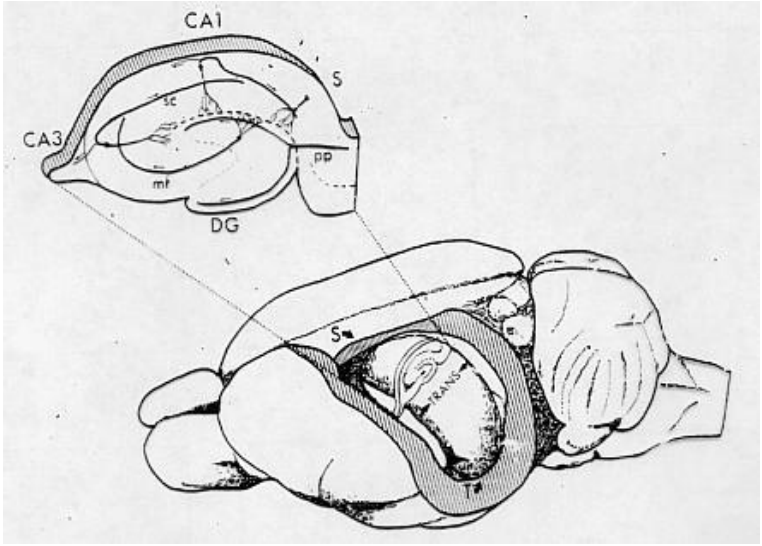


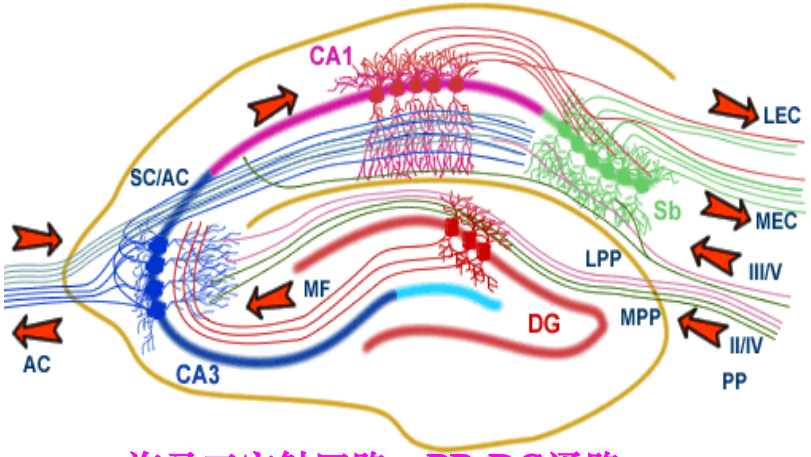


单细胞膜片钳系统

三、海马脑片LTP记录技术

- 场电位（fEPSP)不是单细胞的放电，而主要由许多突触后电位总和而成。它可以反映突触功能的可塑性变化。
- 海马脑片由于形态结构整齐，层次分明，可清楚，直视下安放刺激和记录电极；神经环路明确（著名的三突触回路），场电位幅度大且电位的起源好解释，因此多利用海马脑片fEPSP记录来研究LTP。





海马三突触回路：PP-DG通路

MF-CA3通路

Schaffer通路

实验步骤

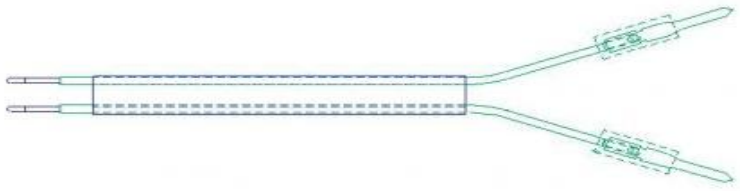
Step 1：制备电极

- 刺激电极制备

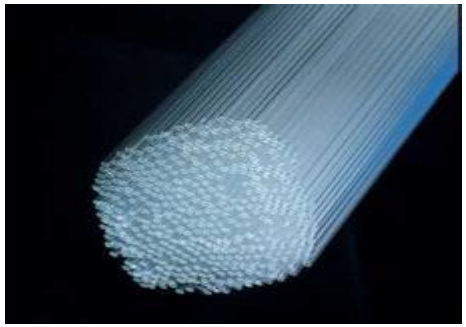
  刺激电极一般采用双股缠绕的绝缘铂丝（直径50-80μm，间距10um）尖端裸露导电。

- 记录电极制备

  记录电极一般选择硬质玻璃电极。选用外径1.5 mm，内径0.85-0.89 mm，长度8-10 cm的带芯玻璃电极毛胚，拉制成尖端开口2~3μm、充满电极内液时电阻为3~5 MΩ的微电极。成分：4mol/L NaCl或ACSF， 于4℃保存备用.



刺激电极





记录电极

Step 2：配制切片液和孵育液

Cutting Solutions _改良ACSF
（pH 7.4， 295－305 mosM）0-4℃

名称	浓度 (mM)	分子量	称量(g/L)	称量(g/0.5L)
KCl	3	74.56	0.223	0.11
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.25	156.01	0.195	0.097
$NaHCO_3$	26	84.01	2.184	1.092
vitamin C	0.4	176.13	0.07	0.035
Pyruvate-Na	2	110.04	0.22	0.11
lactate-Na	2	112.06	0.22	0.11
D-glucose	10	180.16	1.80	0.9
sucrose	220	342.3	75.3	37.6
$CaCl_2$	0.1	110.99	0.1ml	0.05ml
$MgCl_2$	2		2ml	1ml
$MgSO_4.7H_2O$	4	246.47	4ml	2ml
Kynurenic acid	1	189.17	0.189	0.09

Recording and pipette Solutions --ACSF
（pH 7.4， 295 mOsmol）

名称	浓度 (mM)	分子量	称量(g/L)
NaCl	124	58.44	7.25
KCl	2.8	74.56	0.21
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.25	156.01	0.195
$NaHCO_3$	26	84.01	2.184
vitamin C	0.4	176.13	0.07
Pyruvate-Na	2	110.04	0.22
lactate-Na	2	112.06	0.22
D-glucose	10	180.16	1.80
$CaCl_2$	2	110.99	2ml
$MgSO_4.7H_2O$	1.2	246.47	1.2ml

注意事项：Ca^{2+}；Mg^{2+}临用前加。

切片液三高：高糖；高镁；高渗透压。 两低：低钙，低钠。 预冷至0-4℃。

Step 3：脑片制备



麻醉



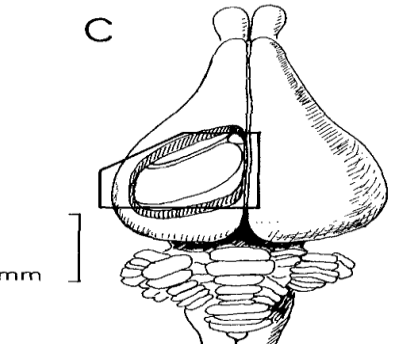
开胸



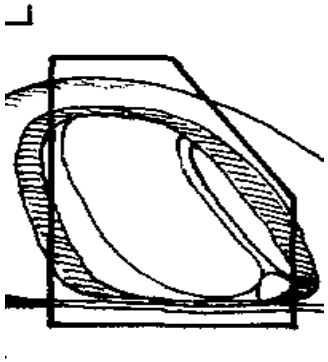
心脏灌注



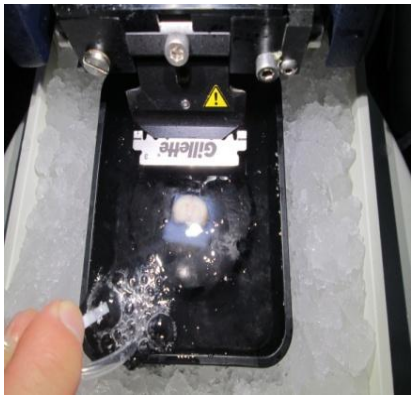
断头取脑



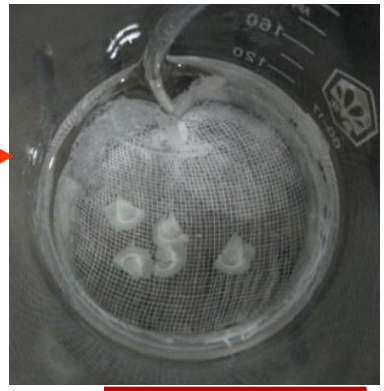
修块



粘贴标本



切片



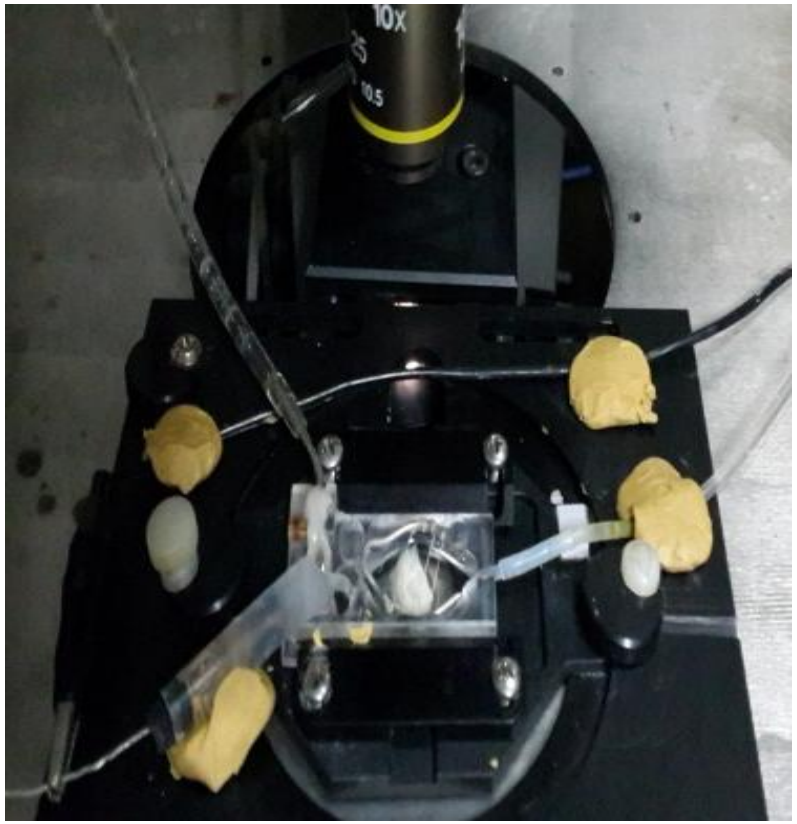
孵育

注意事项：动作迅速，轻柔，严禁挤压脑组织，整个过程时间控制在15-20分钟内。

Step 4：上机检测



打开各个仪器电源



将脑片放入灌流槽并压好并调节好灌流液流速

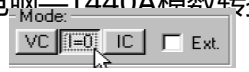
Step4 .1：仪器设置

1. 打开稳压电源
2. 依次开启总电源插板和分电源插板。
3. 依次打开显示器—微操控制器—显微镜—蠕动泵—1440A—放大器—电脑。
4. 打开放大器控制软件MultiClamp 700B和采集软件Clampex 。
5. 打开防震台气瓶。
6. 连接好灌流液并调节好流速，使灌流液流入和流出的速度平衡。并将95%的混合气通入灌流瓶中。
7. 选取一脑片放入灌流槽并用盖网压住脑片。
8. 将双极刺激电极安放到CA2-CA1交界的放射层。并压在脑片表面。
9. 安放好充灌有ACSF的记录电极并给予少量正压（约0.1ml注射器）。
10. 打开采集软件的封接电阻检测，在微操的控制下缓缓将记录电极下降到灌流槽，当电极进入液体中时可得到电极电阻。
11. 点击放大器控制软件“Pipette Offset”按钮 补偿失调电位。
12. 将记录电极安放入记录脑片的CA1区的放射层，深度为脑片表面下100—150um；
13. 点击放大器面板控制软件的"I=0"按钮， 将放大器转入电流钳模式。
14. 调出记录软件Clampex中的Baseline方案进行LTP记录。

记录结束的操作步骤：

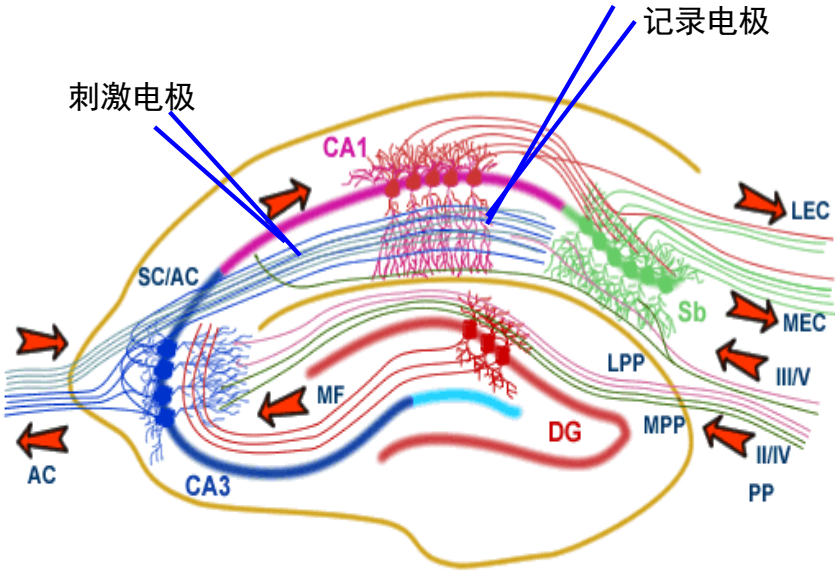
1. 撤掉刺激和记录电极及灌流液并清洗灌流槽。

瓶。
2. 按 将放大器的设置调回到缺损设置。
3. 依次关闭放大器控制软件—采集软件—电脑—1440A模数转换器—放大器—各种外设—稳压电源。

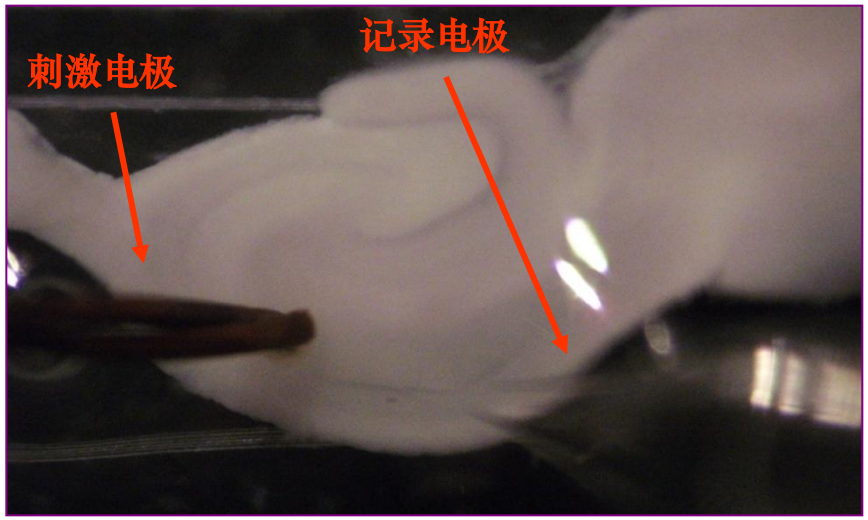




Step 4.2：刺激、记录电极放置



The Hippocampal Network: The hippocampus forms a principally uni-directional network, with input from the Entorhinal Cortex (EC) that forms connections with the Dentate Gyrus (DG) and CA3 pyramidal neurons via the Perforant Path (PP - split into lateral and medial). CA3 neurons also receive input from the DG via the mossy fibres (MF). They send axons to CA1 pyramidal cells via the Schaffer Collateral Pathway (SC), as well as to CA1 cells in the contralateral hippocampus via the Associational Commissural pathway (AC). CA1 neurons also receive input directly from the Perforant Path and send axons to the Subiculum (Sb). These neuron in turn send the main hippocampal output back to the EC, forming a loop.

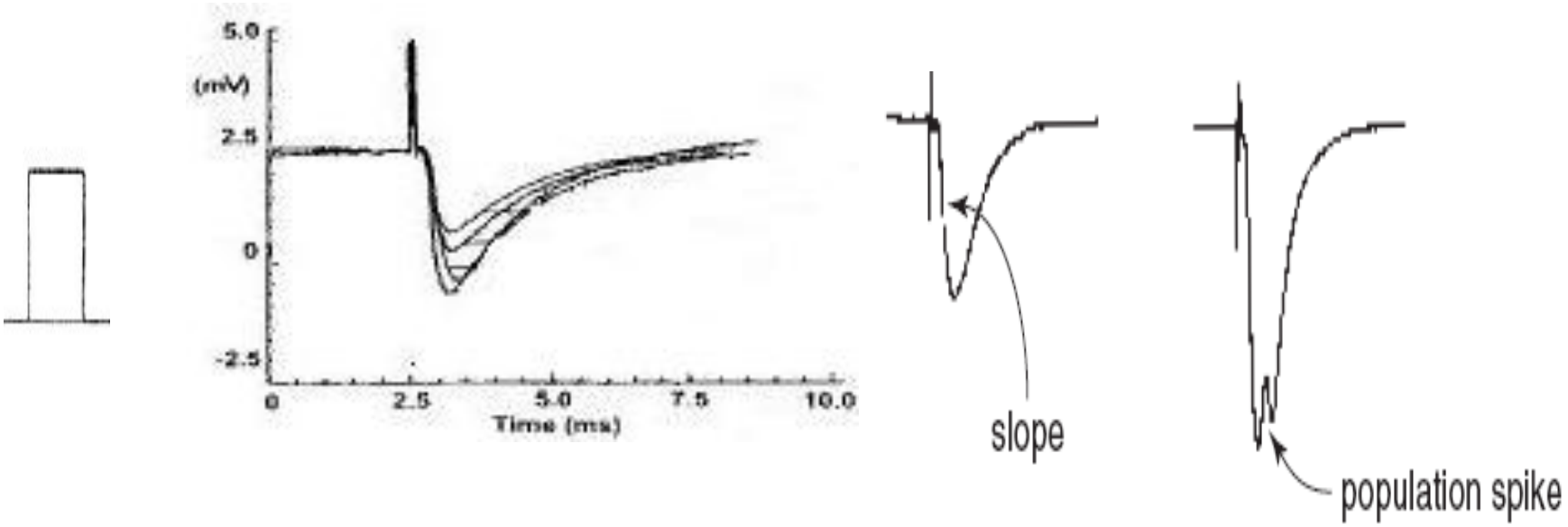


刺激电极压在脑片表面，记录电极插入脑片100-150 um，
刺激与记录电极间距100-500 um。

Step 4.3：记录基础突触（ baseline ）反应

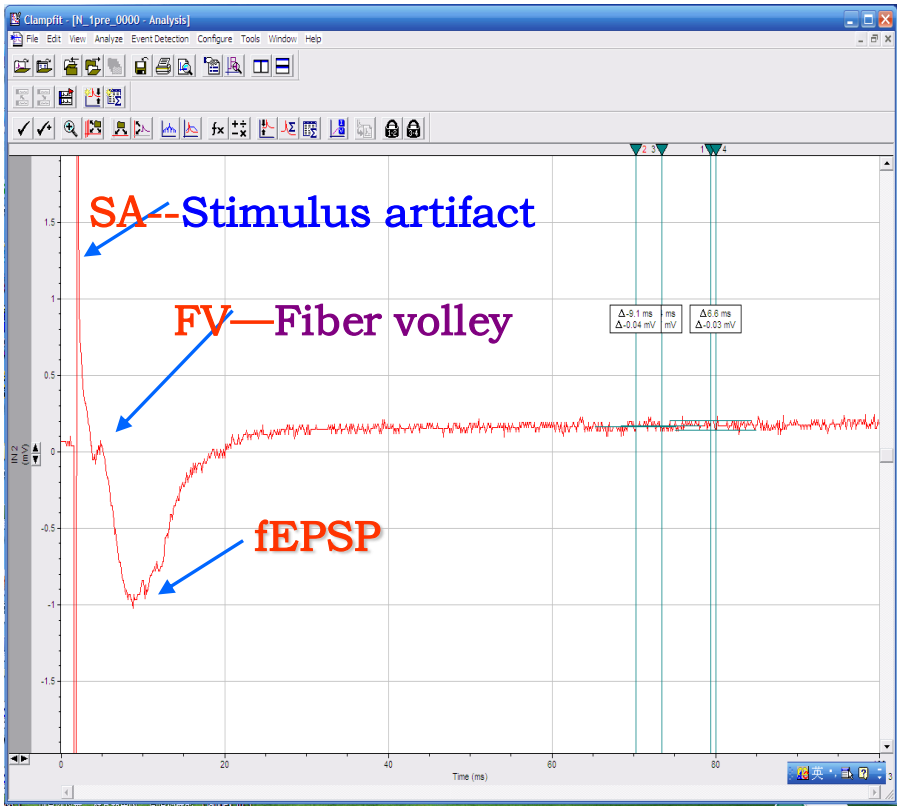
刺激参数：

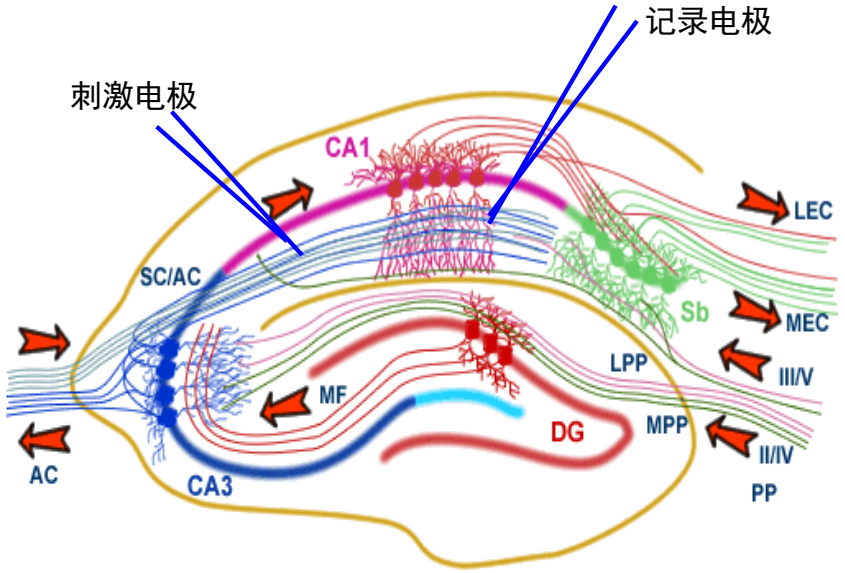
- 波宽：0.1-0.2 ms
- 强度：fEPSP最大反应的刺激量的50%或刚出现PS的50%刺激量。



注意：刺激频率0.067-0.033 Hz，稳定记录至少30 min。

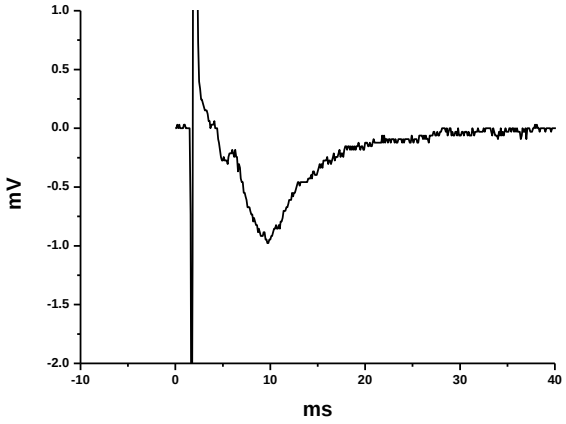
海马脑片Scheaffer通路baseline的特征及各成分起源

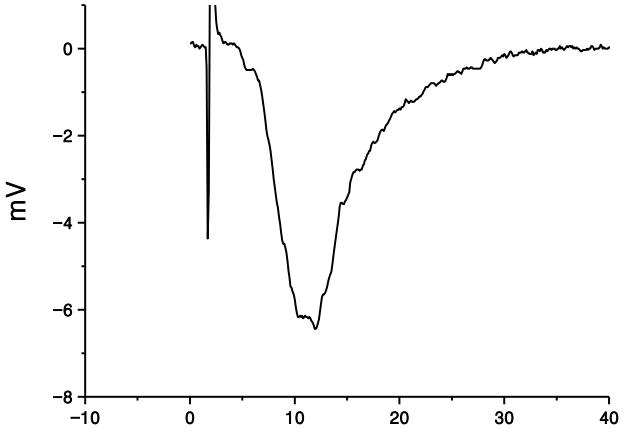


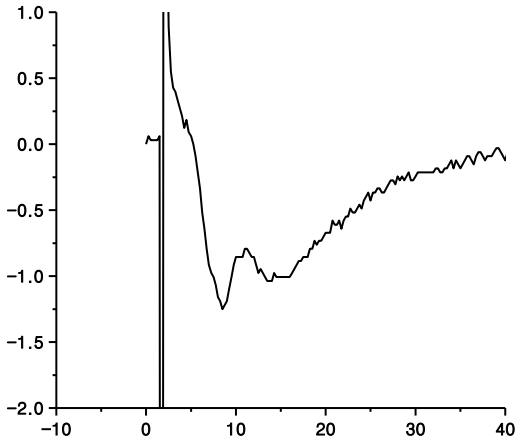


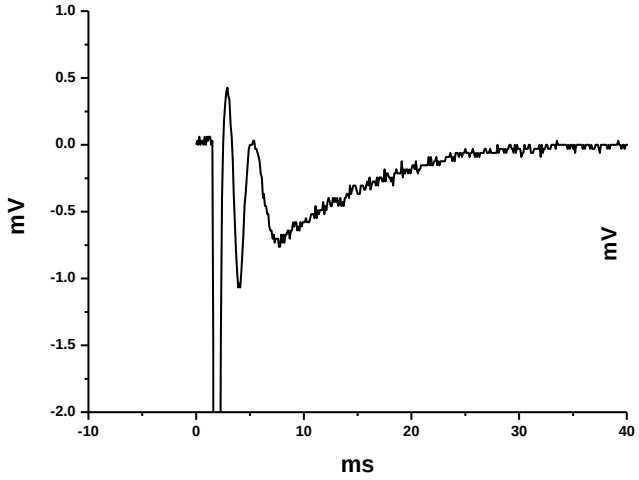
The Hippocampal Network: The hippocampus forms a principally uni-directional network, with input from the Entorhinal Cortex (EC) that forms connections with the Dentate Gyrus (DG) and CA3 pyramidal neurons via the Perforant Path (PP - split into lateral and medial). CA3 neurons also receive input from the DG via the mossy fibres (MF). They send axons to CA1 pyramidal cells via the Schaffer Collateral Pathway (SC), as well as to CA1 cells in the contralateral hippocampus via the Associational Commissural pathway (AC). CA1 neurons also receive input directly from the Perforant Path and send axons to the Subiculum (Sb). These neuron in turn send the main hippocampal output back to the EC, forming a loop.

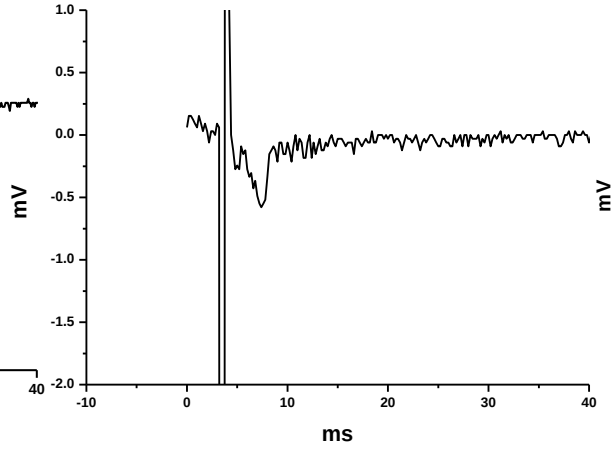
记录图形的识别

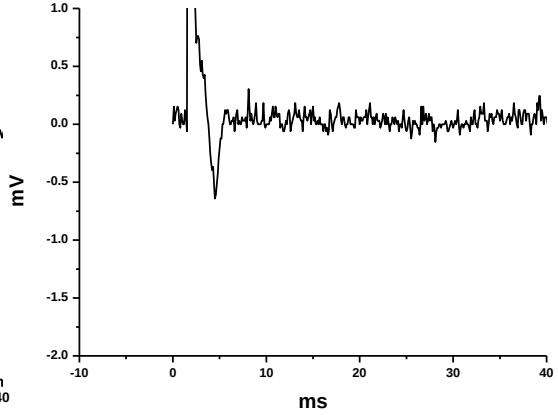






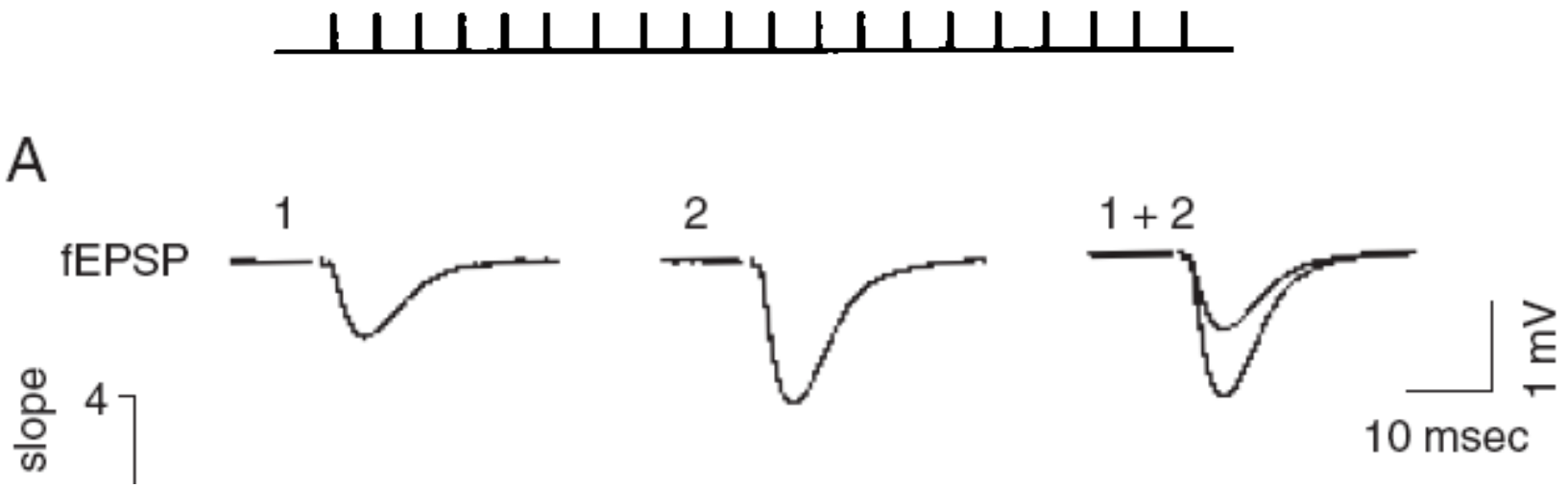






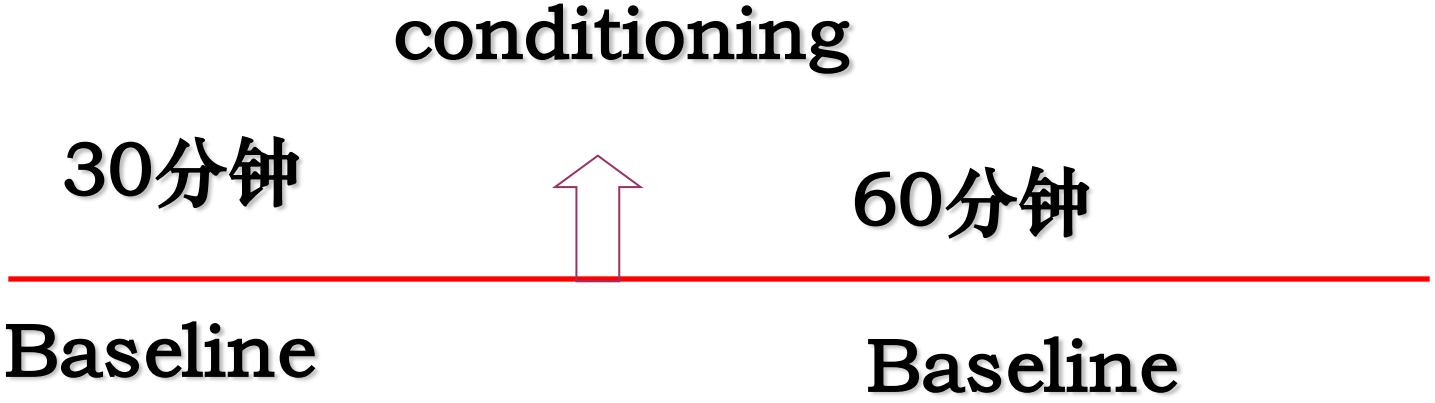
Step 4.4：高频刺激（conditioning）诱发LTP

To induce LTP， deliver a high-frequency tetanus (100 stimuli at 100 Hz) at baseline stimulation intensity.

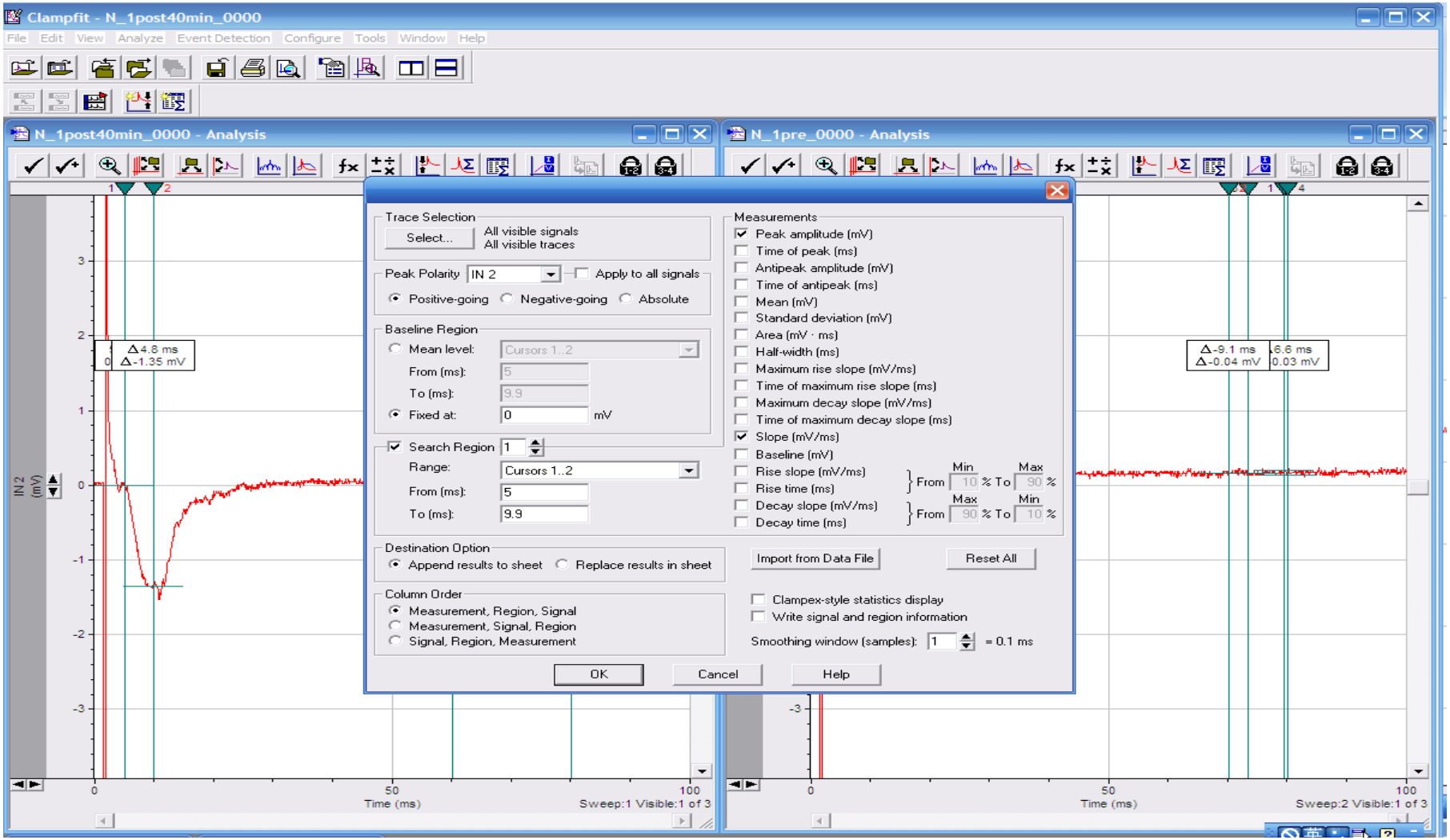


如果fEPSP幅度增加，则继续记录30-60 min；
fEPSP幅度不足1 mV或20 min内不稳定者弃去。

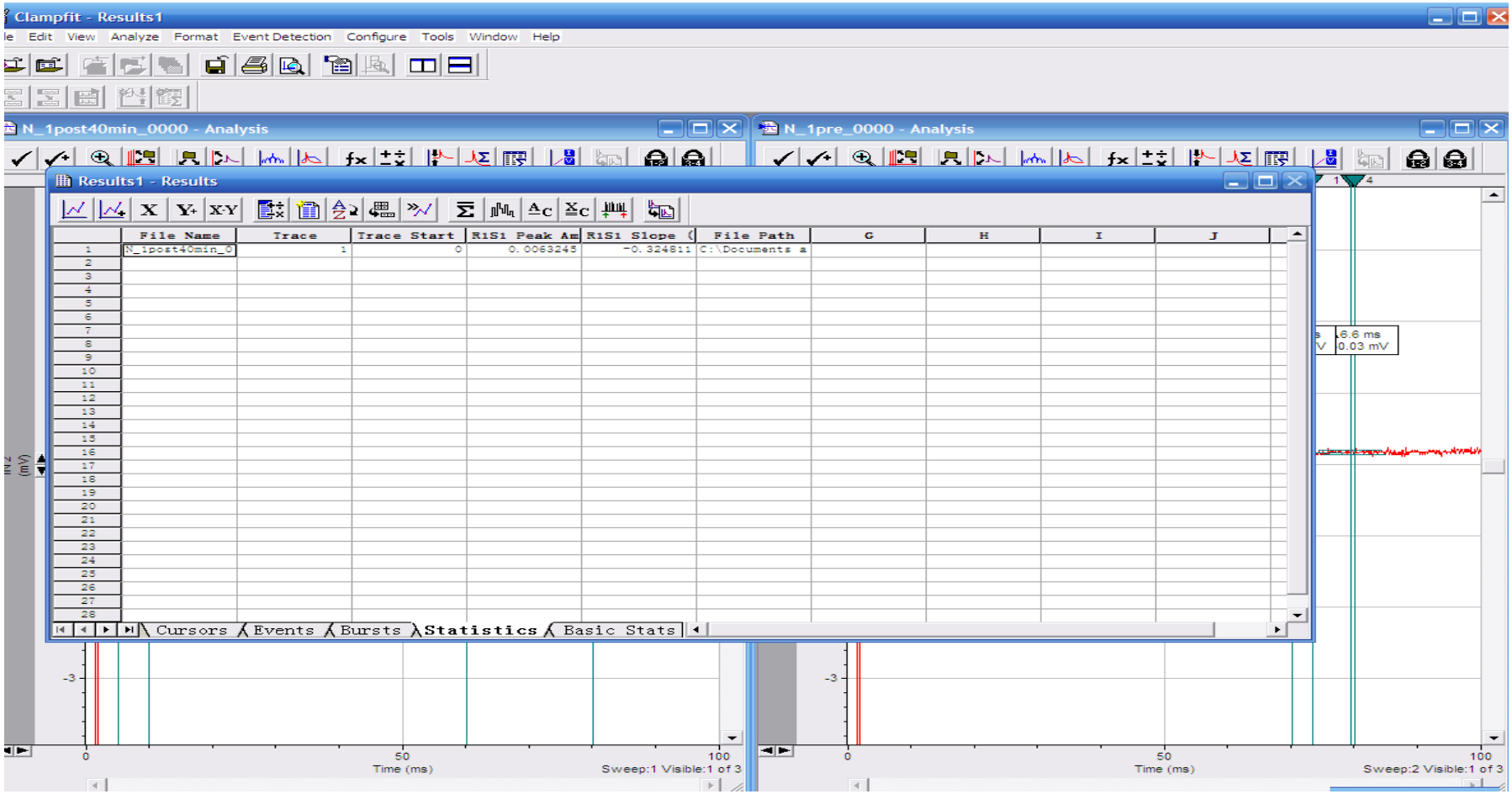
LTP记录时间分配



Step 5：数据采集和分析

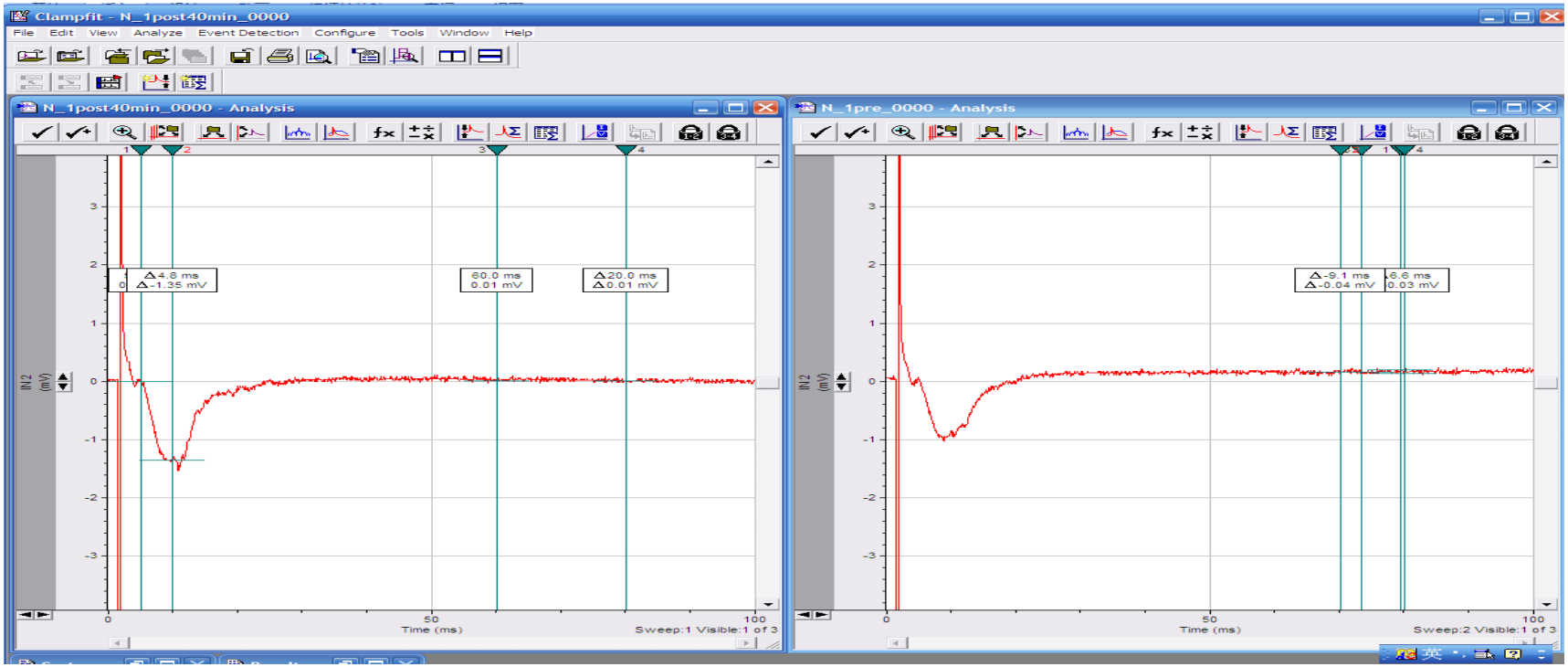


脑片LTP实验主要观察指标与测量方法

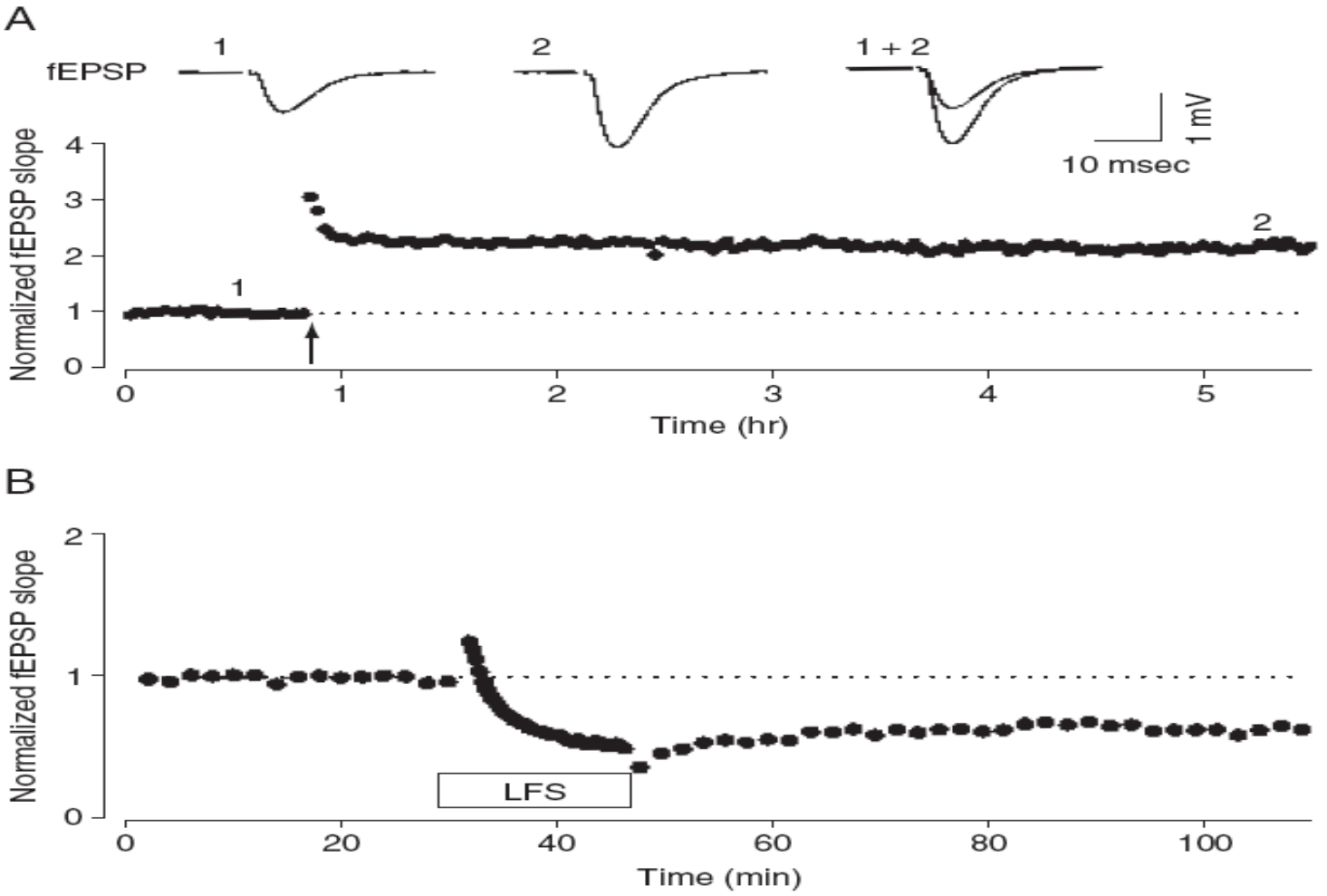

Clampfit - Results1
Edit View Analyze Format Event Detection Configure Tools Window Help
N_1post40min_0000 - Analysis
N_1pre_0000 - Analysis
Results1 - Results
File Name Trace Trace Start R1S1 Peak Am R1S1 Slope (File Path G H I J
1 N_1post40min_0 1 0 0.0063245 -0.324811 C:\Documents a
Cursors Events Bursts Statistics Basic Stats
6.6 ms
0.03 mV
-3
0
50
100
Time (ms)
Sweep:1 Visible:1 of 3
Sweep:2 Visible:1 of 3

检测结果

$$\text{fEPSP斜率变化率} = \frac{\text{高频刺激后的fEPSP斜率—高频刺激前的fEPSP斜率}}{\text{高频刺激前的fEPSP斜率}} \times 100\%$$



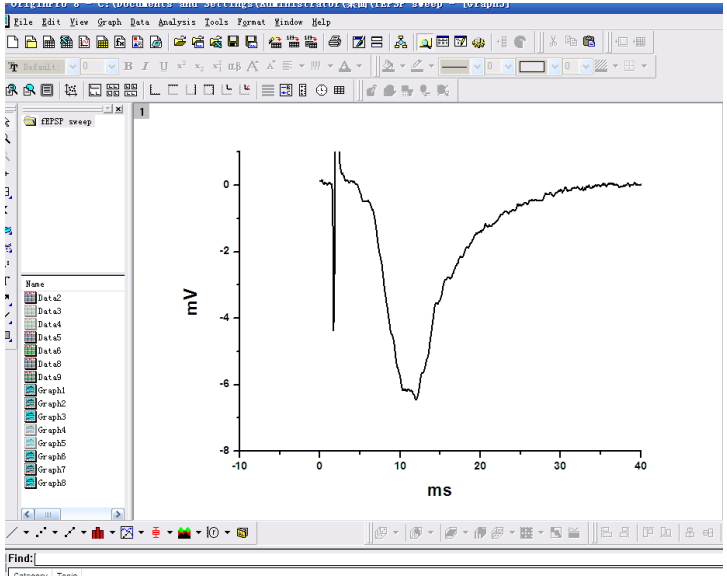
LTP成功诱发的标准：fEPSP斜率增加≥30%，维持时间≥30 min



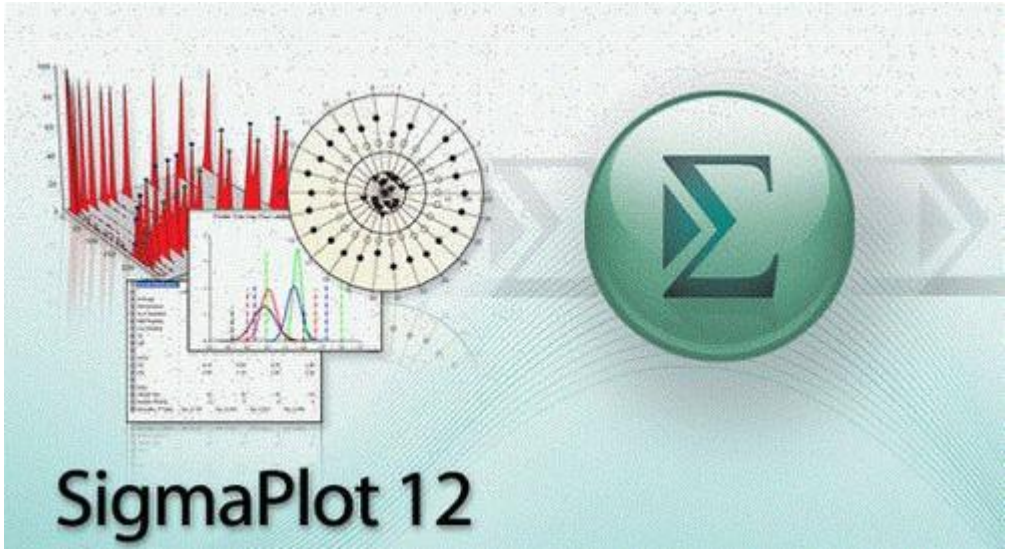
原始图， LTP时效曲线，统计图表。

LTP后期图形处理软件

- Origin 9.0
- Sigmaplot 12.2



Origin 9.0



Sigmaplot 12.2

LTP记录失败常见原因



麻醉过量，呼吸停止。



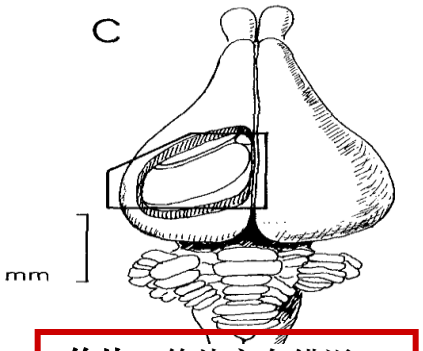
开胸：损伤肺，心脏，暴露时间过长。



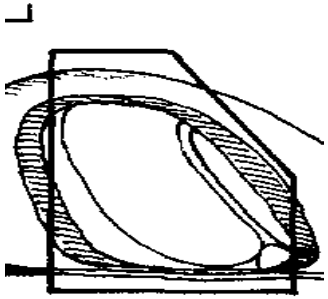
心脏灌注：插管位置不对，液体温度过高。



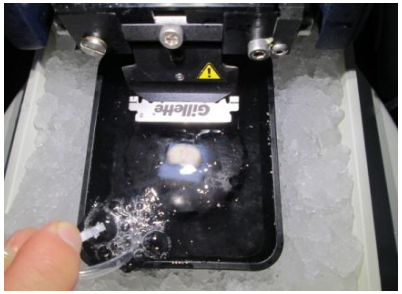
断头取脑：挤压，损伤脑组织。



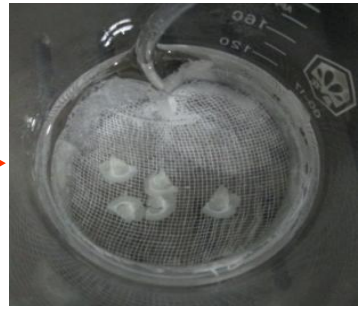
修块：修块方向错误。



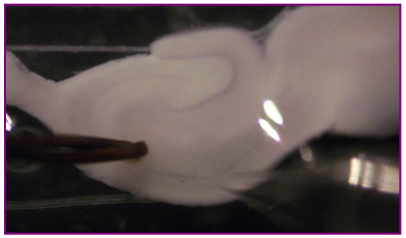
粘贴标本：粘贴不牢，无琼脂块支撑，方向错误。



切片：刀片清洗，每次更换，安放角度，震动频率，切片速度，液体温度。



孵育：液体温度，通气，不重叠，无气泡。



记录或刺激电极位置不对，刺激电极未压紧，记录电极深度不够。

Thanks for your attention !

