膜片钳实验技术

——实践篇

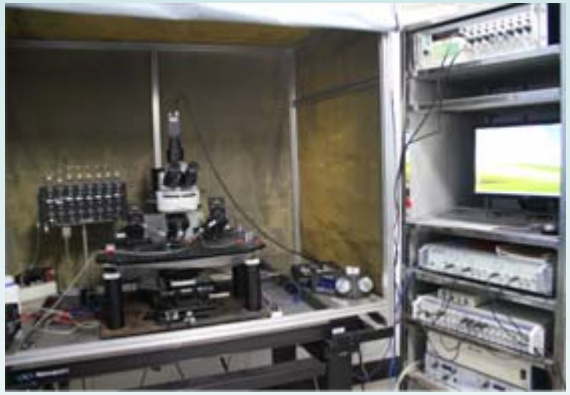
提　纲

- 实验准备
- 数据采集
- 实验数据分析
- 生理病理意义解析

膜片钳实验系统检查与调试

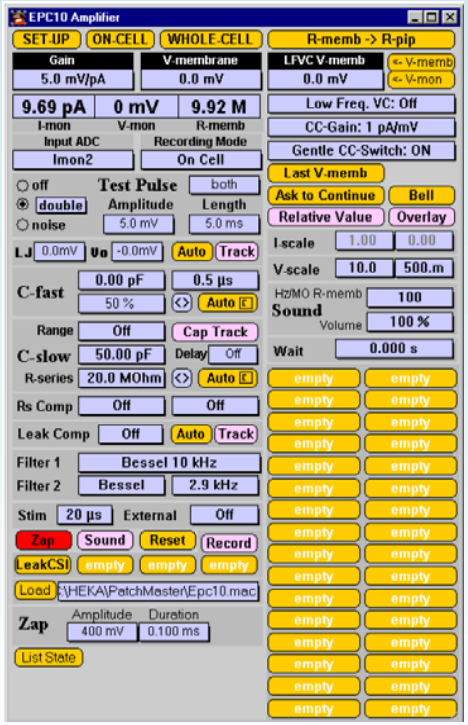
- **硬件系统：**放大器、A/D转换器、工作站、刺激器、成像系统、微操纵器、防震台、加热系统、灌流、给药系统…

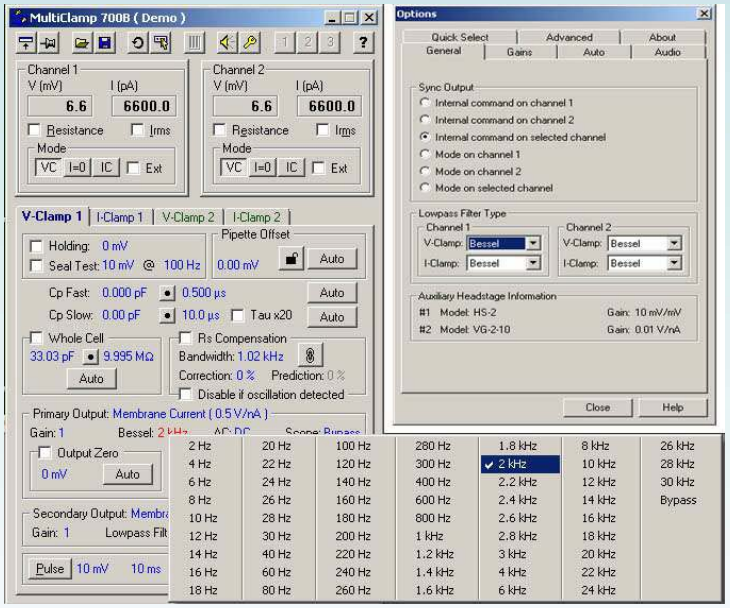


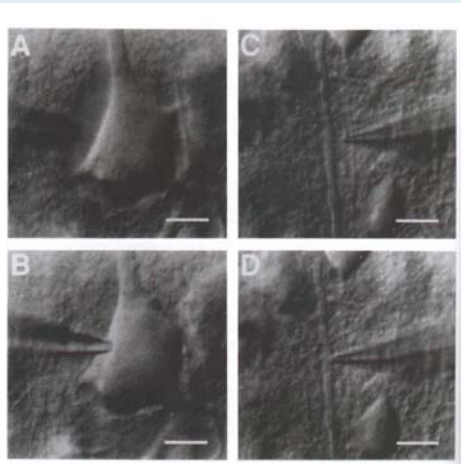




软件系统：Pulse\Patch-Master\pClamp Imaging…







引自 G.J. Augustine,2003

- 外围设备：切片机、渗透压仪、拉制仪等





液体准备





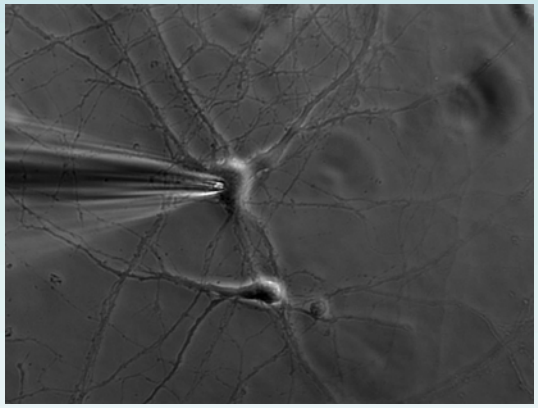


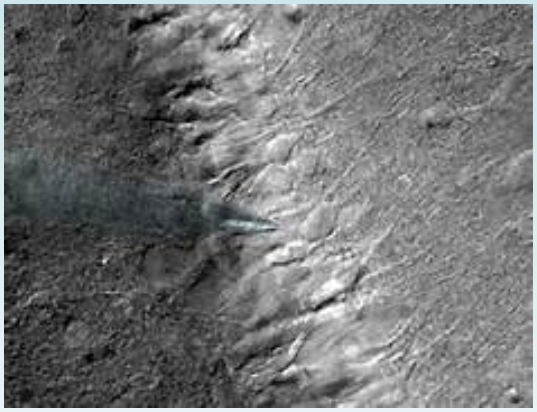




标本制备技术

- 好的标本是膜片钳实验的关键





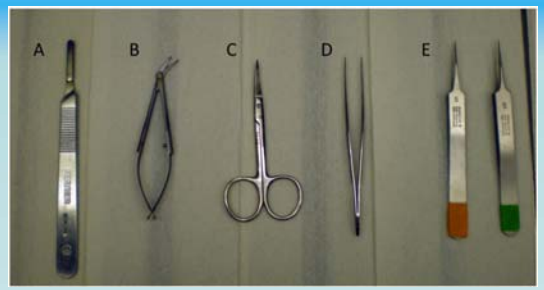
膜片钳的成功80%在于标本的制备。

- 急性DRG神经元分离培养
- 急性DRG神经节分离培养
- 小鼠脑片标本制备
- 脊髓薄片标本制备

动物麻醉

- 动物选择：品系，性别，年龄，体重等
- 麻醉剂：25%乌拉坦、1%戊巴比妥钠、乙醚、CO_2、溴化双哌雄酯等
- 注意事项：抓捕动物时避免不必要的应激，麻醉剂量适中。

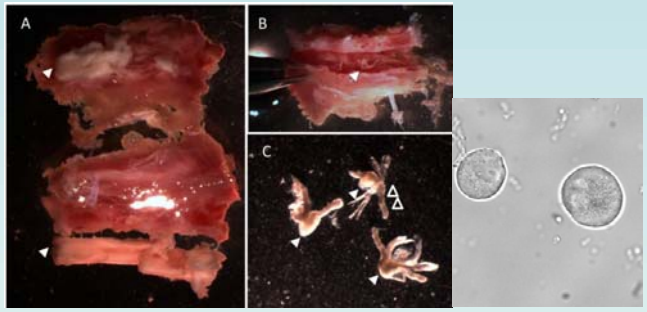
急性DRG神经元分离培养



- 器材： 剪刀、尖镊等
- 取材： 快、准、柔
- 酶： 种类、效价
- 温度： 37°C (水浴)
- 溶液： ACSF

引自Lee, S. I ,2013





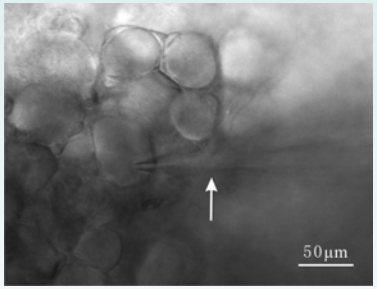
- 酶解时间： 依所用酶的种类、动物年龄、样本多少以及组织剪碎程度适当调整(90min)。
- 消化方式： e.g. 胶原酶(1.25mg/ml)+分散酶（2.4U/ml）90min,然后胰蛋白酶（2.5mg/ml）8min 37°C。
- Collagenase IV(Roche, 0.5mg/ml), Dispase II (3mg/ml) 90min, 37°C

急性DRG神经节分离培养

- 组织块的优势：神经元的突起相对完好，细胞连接大多仍然存在、生理指标更接近在体。
- 麻醉、取材等同前
- 解剖镜下仔细去除节上的包膜

（注意：禁用镊子直接夹节体）

- 酶消化：胶原酶(0.8mg/ml),蛋白酶(0.5mg/ml), 37°C水浴,40-45min。



引自Xie, 2009

小鼠伏核脑片标本制备

- 麻醉（同前）
- 断头、取脑 （3min内 ）
- 冰水混合ACSF (0-4^{o}C,且需5%O^{2},95% CO_{2}饱和)
- 脑片
- 注意事项:（1）忌挤压脑组织
  （2）冰水混合
  （3）氧持续饱和、气泡小而密
  （4）进刀速度(S)、振动频率(F)

34^{o}C孵育30min,室温或者37^{o}C孵育1.5h备用。

脑片活性判断方法：

（1）颜色：淡黄色或粉红色

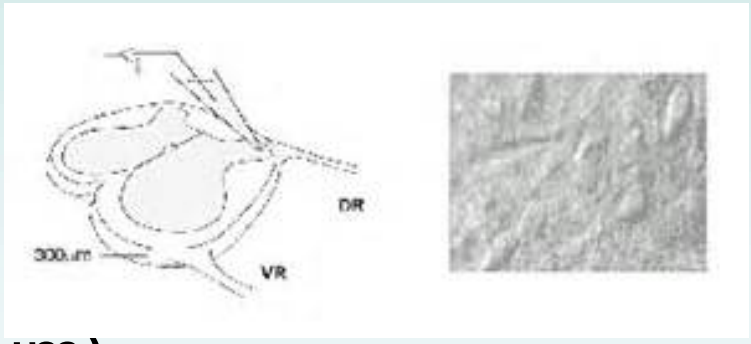
（2）韧性好、易舒展

（3）神经元表面光滑、轮廓清晰、有立体感，突触结构清楚 。



脊髓薄片标本制备

- 麻醉：复合麻醉剂或者1%戊巴比妥钠
- 器材：弯头小梁剪（加）
- 溶液：Sucrose-ACSF
- 手术取材：
  - （1）椎板切除
  - （2）取脊髓
  - （3）剥离软脊膜
  - （4）切片(400-500um)



34°C孵育30min,室温或者37°C孵育1.5h备用。

Data Recording…

实验数据采集过程中的注意事项：

（1）持续的氧饱和ACSF灌流
（2）防震台的开启
（3）依据不同实验目的拉制合适的记录电极
（4）滤波和采集频率的选择（低通2kHz,采集5k Hz以上）

数据采集的原则

- 准确、高效、张弛有度。
- 采集什么数据？
- 细胞膜电位？膜电容？通道动力学特征？



膜电位（I-clamp）

RMP、spontaneous firing、evoked firing、EPSP、IPSP etc.

I=0，

注入电流I为方波、斜波、三角波、正/余弦函数波形或外加刺激等方式。

膜上通道电流（V-clamp）

电压敏感的离子通道电流（如：钠通道、钾通道、钙通道等）

配体门控（各种谷氨酸能、胆碱能、GABA等门控通道）

实施方式：（1）指令电压钳制

（2）电场刺激

（3）多道钳制及记录

（4）光刺激

（5）药物刺激

数据文件命名

规范化、易读、信息全

如：R_160908mPFC_mEPSC_Cap10uM_a

实验记录：录入实验动物的状况（种系、年龄、体重、性别、处理方式等）记录下对应的电子数据文档名称。

全细胞膜片钳实验数据分析

膜电位特征分析

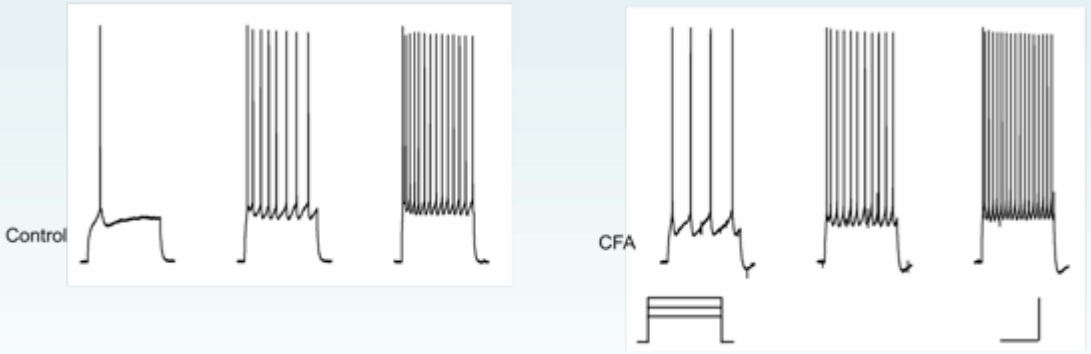
通道动力学分析

膜电位特征分析

常见分析参数：RMP、Rm、Cm、etc.

动作电位（AP）：Rise/decay slope、Rise/decay time、Half-wide for AP、
$V_{threshold}$、AHP、ADP

动作电位（APs）：Number、Mean Frequency、Instaneous Frequency、Time of Latency(relative to the current injection time)



通道动力学分析

离子通道的I-V曲线

离子通道的激活曲线

离子通道的失活曲线

剂量效应曲线

钠通道电流

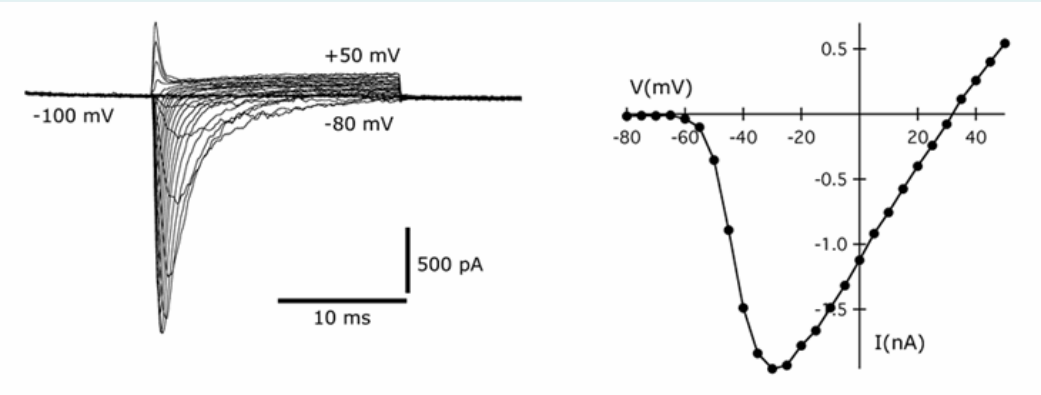
离子通道I-V曲线：

反映通道：激活过程、阈电位、反转电位、整流特性

给予连续变化的步阶/斜坡脉冲电压V_m（范围大，最好跨越反转电位），测通道电流大小I，作I-V曲线：

X轴：V_m　　Y轴：I

疾病、药物可影响通道激活或衰减，改变I-V曲线的形状。



激活曲线

给予细胞一系列阶跃电压记录全细胞电流，作通道的激活曲线：

X轴:脉冲电压Vm

Y轴:全细胞通道电导g/gmax

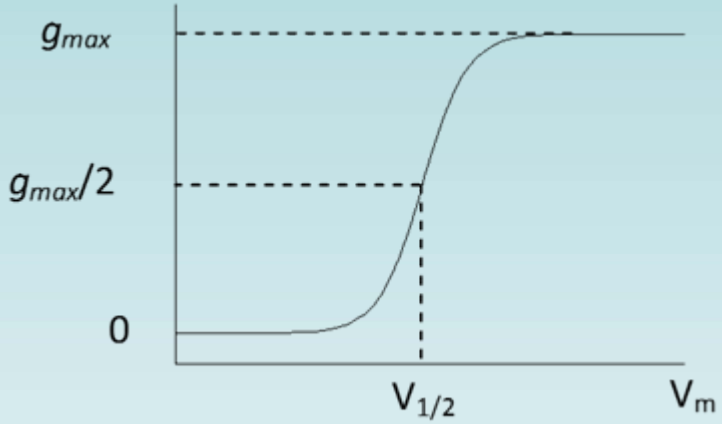
Boltzmann方程拟合

$g = I / (V_m - V_{rev})$

标化：g / g_{max}，$g_{max} = I_{max} / (V_m - V_{rev})$

Boltzmann方程

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



g：全细胞通道激活电导

g_{max}：全细胞通道最大激活电导

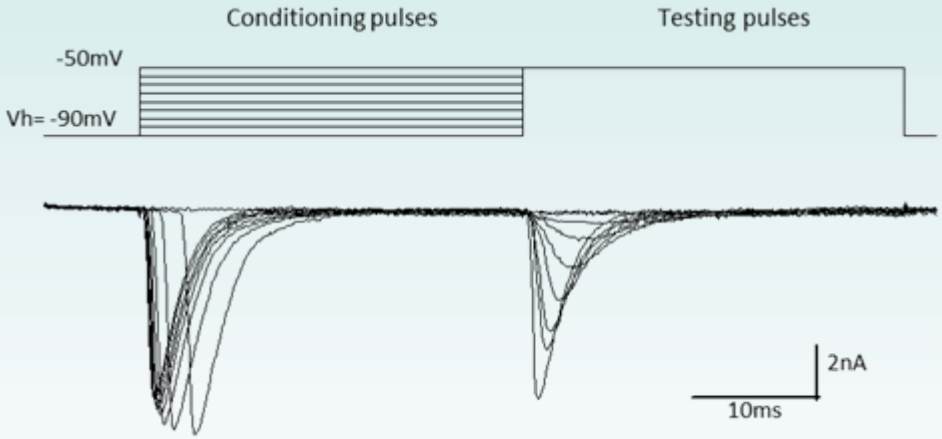
V_m：不同的去极化（或超极化）脉冲电压

$V_{1/2}$：通道激活50%时的脉冲电压

k：斜率因子（反映激活速度快慢，k越大，激活速度越慢）

稳态失活曲线

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——稳态失活（Steady-state inactivation）。用失活曲线反映。



失活曲线制作

失活曲线采用双脉冲设置的Protocol来获得数据

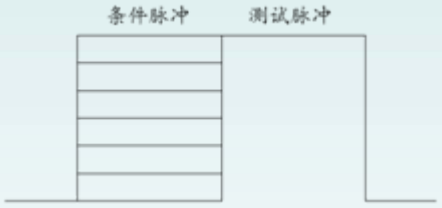
条件脉冲：将细胞钳制在不同的电位水平，使相应的部分通道处于完全失活状态。

测试脉冲：检测未失活通道的电流大小。

X轴：条件脉冲的电压值

Y轴：测试脉冲的电流大小

Boltzmann方程拟合



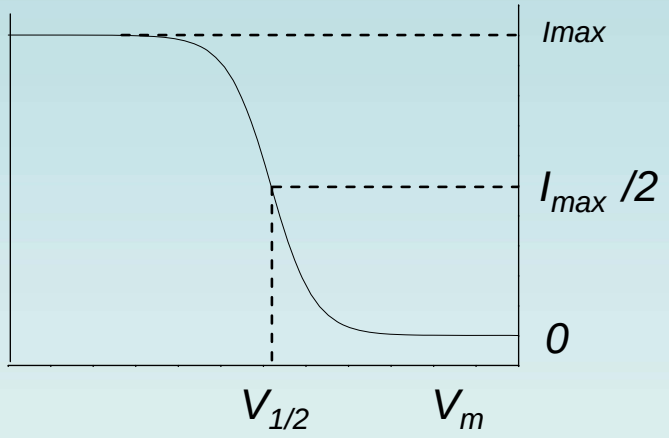
脉冲电压的设定要注意：

（1）条件脉冲时间要设定得足够长，能使通道在某一去极化水平完全失活；

（2）条件脉冲与测试脉冲的间隔不能设定得过长。

Boltzmann方程

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



I：不同条件脉冲电压下测试脉冲诱发的电流大小

I_{max}：不同条件脉冲电压下测试脉冲诱发的最大电流

V_m：不同条件脉冲电压

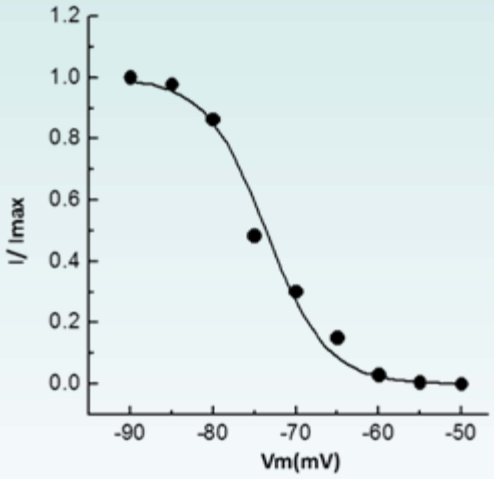
$V_{1/2}$：通道失活50%时的条件脉冲电压

k：斜率因子（反映失活速度快慢，k越大，失活速度越慢）

失活曲线制作

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。
以测试脉冲的全细胞最大电流峰值Imax为1，对其它电流标化，计算出I/Imax。

x轴：Vm，y轴：I/Imax为曲线方程拟合。



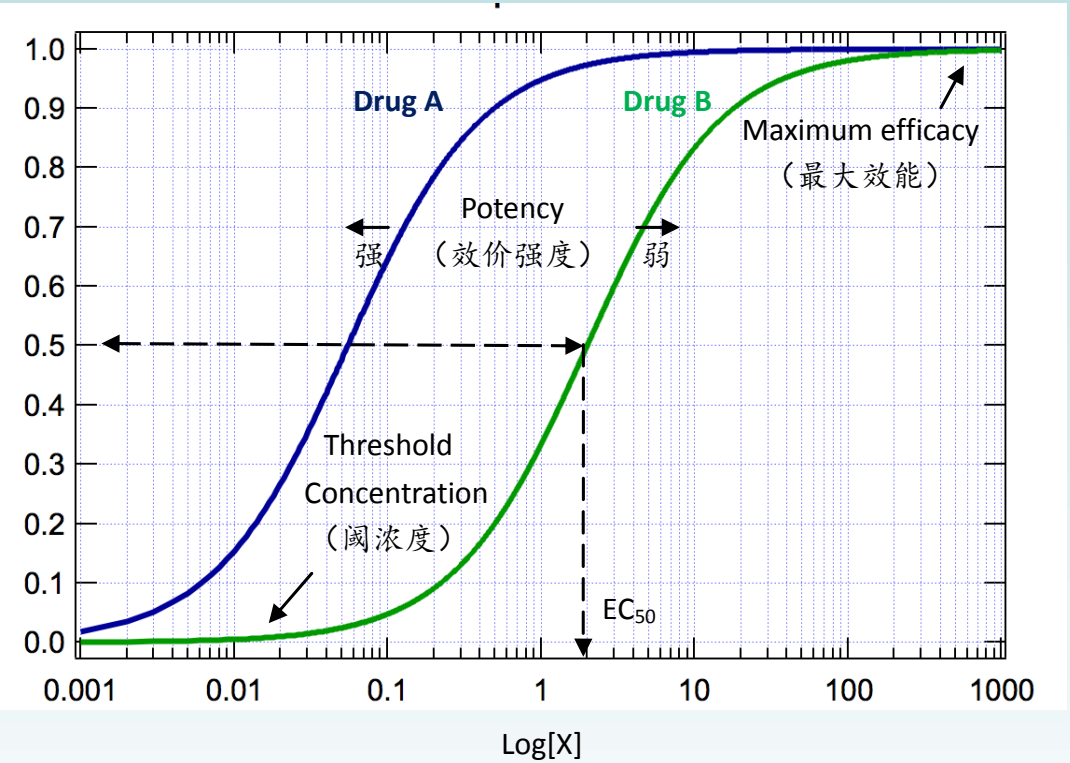
实验记录中注意事项：

（1）细胞封接良好；
（2）补偿串联电阻；
（3）漏减；
（4）分离其他不需要的电流。

剂量效应曲线

量效曲线：
X轴：药物剂量/浓度大小
Y轴：药理效应强弱

（1）阈浓度
（2）半效浓度EC50
（3）最大效能
（4）效价强度



药物对通道电流的阻断作用

Hill 方程：

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

I_{max}：最大浓度药物作用后的电流幅度

I_{min}：药物作用前的电流幅度

C_{50}：半抑制浓度IC_{50}

$[X]$：所施加的药物浓度

h：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。

药物对通道电流的增强作用

Hill 方程：

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

I_{max}：药物作用后通道的最大电流幅度
I_{min}：药物作用前的电流幅度
C_{50}：半效浓度EC_{50}
$[X]$：所施加的药物浓度
h：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$I_{max}=1$。
若观察药物对通道电流的影响，拟合后，Imin接近0。

实验中注意事项：

药物浓度的选择：

（1）要含有阈浓度和最大效能浓度；
（2）按一定倍比关系：如1、2、5、10、20、50、100等；
（3）至少4个浓度。

加药原则：

（1）按照从低到高浓度的顺序施加；

（2）合适的给药装置和高质稳定的全细胞记录；

（3）根据具体实验选择合适的加药间隔时间，防止药物作用脱敏。

给药方法：

（1）配体或通道的激动剂的给药要快、量微；

（2）贵的药物多以压力喷射为主；

（3）受体拮抗剂需注意其作用时间；

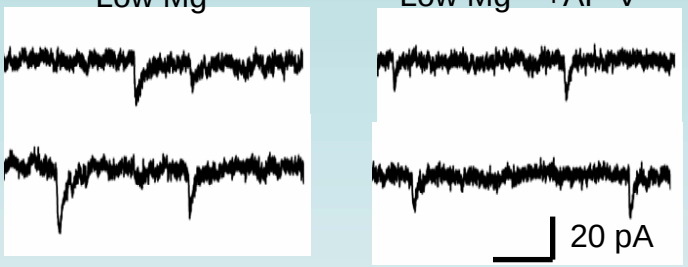
（4）用培养皿时，因灌流置换液体困难，要采用压力喷射给药方法；

配体门控通道动力学分析

mEPSC

Low Mg^{2+}

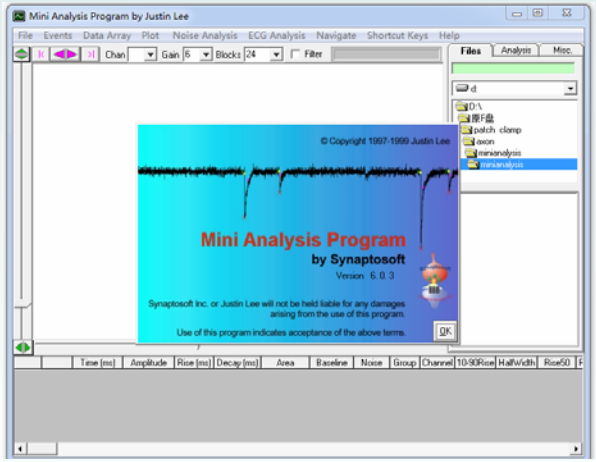
Low Mg^{2+} +AP-V

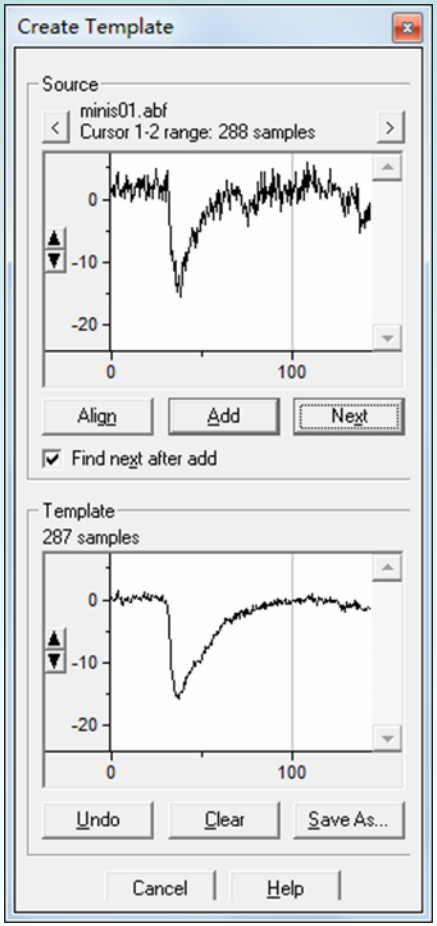


Frequency

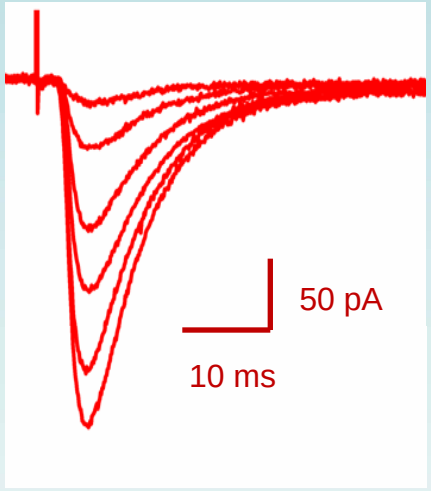
Amplitude

Mini analysis

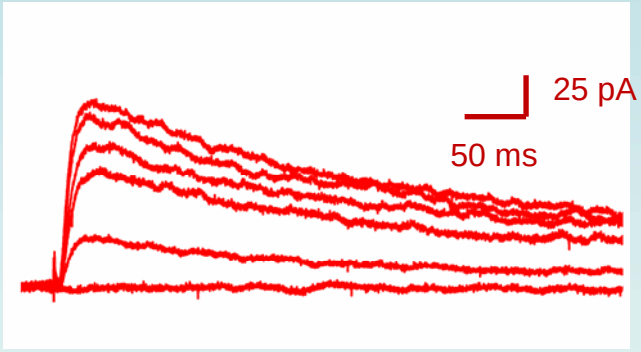


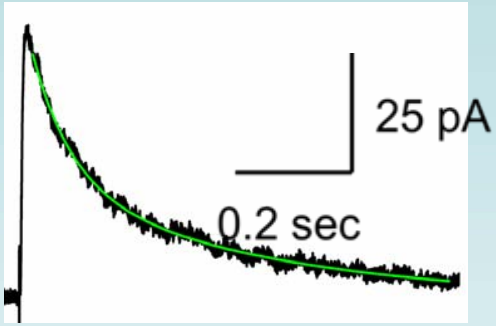


刺激诱发的AMPA受体介导的电流



诱发的NMDA受体介导的电流



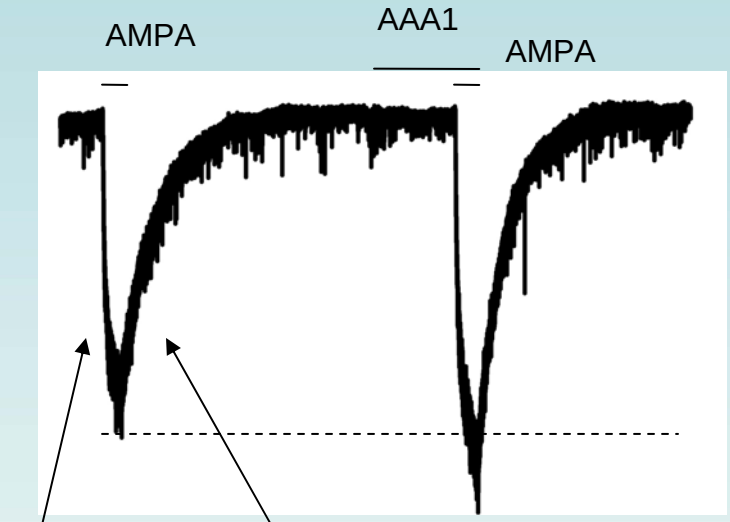


衰减的时间常数(τ):

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。

$$F(t) = A1 * \exp(-t/tau1) + A2 * \exp(-t/tau2)$$

AMPA receptor mediated currents



So easy!
Let's do it…