

METHODS IN  
MOLECULAR BIOLOGY

Genecome protocols



# Electrophysiological Experiment of Patch Clamp Technical Manual

膜片钳电生理实验技术手册

GENECOME  
TECHNOLOGY

## 目录

一. 技术背景介绍.....	2
二. 材料与方法.....	2
1. 需要的实验仪器.....	2
2. 配置的试剂.....	3
3. 实验动物材料.....	3
三. 实验步骤.....	3
四. 疑难解决.....	5
五. 常见问题.....	5

# 膜片钳电生理实验

## 一. 技术背景介绍

在1976年由Neher和Sakmann及其同事发明的膜片钳方法，对阐明膜通道的功能作用做出了卓越的贡献。膜片钳技术是一种用于了解离子通道行为的通用型电生理学工具。每个细胞都存在离子通道，通过膜片钳技术进行研究的最常见细胞包括肌纤维、神经细胞、心肌细胞和高表达单一离子通道的卵母细胞。为了评估单个离子通道的传导性，微电极与细胞膜会形成高电阻封接，并移除包含目标离子通道的细胞膜片。或者，当微电极密封至细胞膜上时，此细胞膜片会破裂，从而使电极能够与整个细胞进行电学上的连通；之后施加电压，形成电压钳，并测量膜电流。电流钳也可用于测量细胞膜内外电压(称为膜电位)的变化。可以通过添加化合物阻断或激活通道来改变细胞膜内的电压或电流变化。这些技术使研究人员能够了解离子通道在正常和疾病状态下如何表现，以及不同的药物、离子或其他分析物如何改变这些状态。如下是一份标准的盲法膜片钳流程。

## 二. 材料与方 法

### 1. 需要的实验仪器

膜片钳装置、振动切片机、膜片钳放大器。

膜片钳装置。注意：所有与细胞接触的溶液和设备必需是无菌的。

- |              |               |
|--------------|---------------|
| 1) 膜片钳放大器    | 2) 电极内插式吸管    |
| 3) 注射器       | 4) 装尼龙线的U型铂金网 |
| 5) 电脑，模拟器及软件 | 6) 显微镜及光纤光源   |
| 7) 防震台       | 8) 微电极        |
| 9) 微电极夹持器    | 10) 电极拉制仪     |
| 11) 记录槽      | 12) 灌药系统      |
| 13) 微操纵器     |               |

振动式切片机主要供应商：Leica, Campden Instrument, Dosaka

膜片钳放大器的主要供应商：Molecular Devices/Axon Instruments(型号：AxoPatch 200B, Digidata 1322A, Digidata 1440A, MultiClamp 700B), Warner, Dagan Corporation, Heka Elektronik EPC-10

## 2. 配置的试剂

### 2.1 人工脑脊液 (ACSF)

1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM葡萄糖, pH 7.4。

▲ **重要:** 渗透压应为305-315 mosm, 混匀后通入95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>混合气。

### 2.2 电极内液

全细胞膜片钳适用: 5 mM NaCl, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 130 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES 和11 mM EGTA, pH 7.3。

▲ **重要:** 渗透压应为260-2800 mosm, 用2 μm滤网过滤后储存于4 °C。

## 3. 实验动物材料

实验动物、麻醉剂、解剖盘、其它用于样本解剖处理所需的材料。

## 三. 实验步骤

1. 准备溶液: 配置内液和外液。调整渗透压和pH值。
2. 准备细胞或脑片: 急性分离脑片/培养细胞/酶消化细胞室温下浸没于持续通5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>的ACSF/细胞外液中, 记录前至少孵育2小时。
3. 依次打开无间断电源、电脑、荧光倒置显微镜、恒流泵、微操纵仪、数模转换器和放大器等设备预热, 最后打开放大器软件(如Multiclamp 700B)和记录软件(如Clampex 10.6), 以及图像采集软件; 并设置好当天的文件保存路径。
4. 拉制并抛光玻璃微电极: 拉制玻璃毛细管并抛光电极尖端, 拉制记录电极至输入电阻为5-8 MΩ。

### ▲ 关键步骤

5. 设置灌注系统: 设置灌流系统速度1-2 ml/min。放入脑片/细胞。确保系统处于屏蔽状态。装灌电极内液。
6. 如果需要一定的细胞形态, 可选择在电极内液中加入细胞内染液, 如Lucifer yellow, Cell Tracker, biocytin, Alexa biocytin, neurobiotin等。
7. 钳制细胞: 将微电极放上夹持器, 用10 ml注射器施加1 ml作用正压。

### ▲ 关键步骤

8. 设置放大器至电压钳模式并应用5-10 msec 20 mV的测试脉冲。将电极缓慢接近感兴趣区域直至测试脉冲幅度可见明显的变化。

9. 当微电极电阻出现明显且稳定的变化时，迅速去掉正压。

▲ 关键步骤

10. 自动获得GΩ封接，或通过嘴短暂轻吸直至电阻达到至少1 GΩ。

11. 一旦形成GΩ封接，运用相应的膜片钳构型方案。

**A 细胞贴附型:** 当达到GΩ封接时即进行实验。在此构型下，电极液应与细胞外液成分类似；

**B 内面向外型:** 达到GΩ封接后，缓慢将电极拉离细胞，最终一小片细胞膜将与细胞表面分离并保持GΩ封接。在此构型下电极液也应与细胞外液成分类似；

**C 全细胞模型:** 在此构型下，电极液应与细胞内液离子组分类似；记录全细胞模型需将钳制电压调至与细胞静息电位相近的负电压(如星形胶质细胞-60 mV)并校正快电容，通过嘴持续轻吸直至电容和测试脉冲电流的改变显示破膜 (关键步骤)；如用穿孔膜片钳记录，在微电极前端灌注不含抗生素的电极液，后端灌注含抗生素的电极液。达到GΩ封接后，设置钳制电压与静息电位相近，等待阻抗缓慢降低并稳定。

**D 外面向外型:** 达到全细胞构型后，缓慢将电极退后至阻抗剧增，显示膜片“气泡”形成。

12. 信号记录和放大：对信号进行放大。为了获取最佳结果，请使用正确类型的放大器进行研究。

13. 信号数字化：模拟信号数字化，以便对信号进行分析。

14. 数据采集和分析：使用pCLAMP 11软件套件，可编程更长和更复杂的实验步骤以实现更快的数据分析和精确测定。

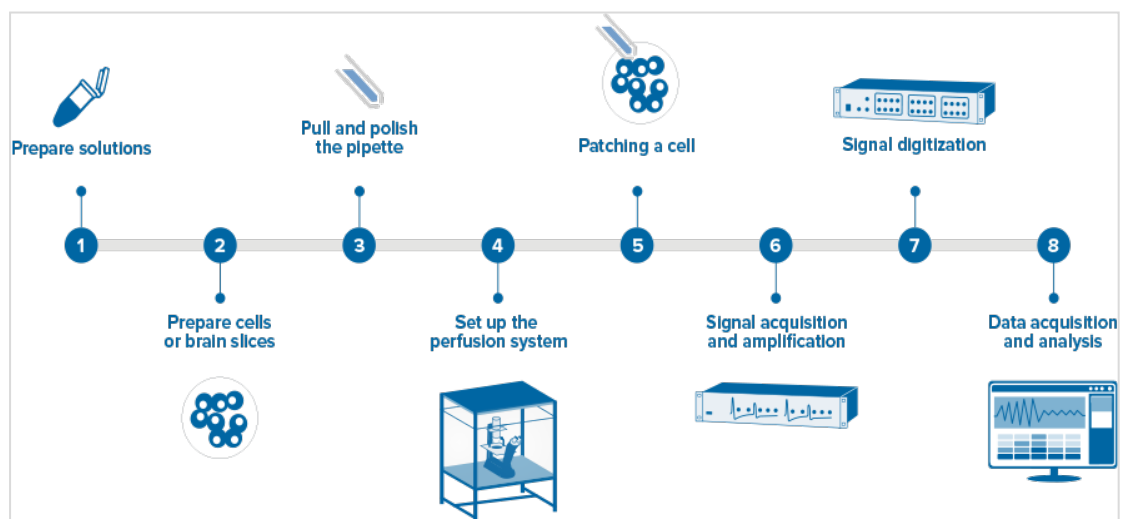


图1 实验步骤(以Molecular Devices设备为参照)

## 四. 疑难解决

### A 无法形成GΩ封接

1. 确认样本活性良好且一直通氧；检查ACSF和电极内液的pH和渗透压。
2. 清洁微电极，确认手拿时没有污染油污。
3. 确认电极放置于细胞密度高的区域。
4. 检查电极尖端的形状，阻抗保持在正确范围(成熟细胞4-6 MΩ，小细胞8-12 MΩ)。
5. 检查微电极夹持器的压力管道是否漏气。

### B 能形成GΩ封接，但尝试破膜时失去封接，无法破膜

1. 换用不同电极，降低阻抗也许有帮助。
2. 检查微电极夹持器的压力管道是否漏气或堵塞。
3. 尝试放大器的“zap”功能。

### C 封接无法持续很长时间

1. 检查溶液渗透压。
2. 确认样本活性良好。
3. 当形成全细胞构型，施加轻微正压。
4. 确认ACSF浴液和灌药系统没有气泡。
5. 检查微电极尖端形状。
6. 确认操作台或微电极夹持器没有振动。

### D 不确定是否钳制到正确的细胞类型

1. 熟知感兴趣细胞类型的基本电学特性。
2. 确认样本活性良好。
3. 电极液加入染料以显示细胞形态。

### E 不确定样本是否活性良好

对代表性样本使用荧光标记物如碘化丙啶(标记死细胞)和Syto-11(标记活细胞)进行快速细胞死亡和存活分析。

## 五. 常见问题

### A 细胞代数是否有影响?

是，P12前的细胞可以持久钳制，P12后的细胞越来越难钳制。

**B**我的电极可见电容大于 $50M\Omega$ ，怎么办？

电极尖端有气泡，拿出电极并轻敲几次。

**C**我的电极入液阻抗 $7M\Omega$ ，但加压后升至 $15M\Omega$ ，还应该用吗？

不，电极内液中的灰尘堵塞了电极尖端。如果这种情况重复了3次，重新过滤电极液。

**D**我常常钳制树突，但boss需要胞体记录。

控制尖端更大的电极(如 $4-6M\Omega$ )，电极下压起始在脑部更深的位置(如2/3层)。

**E**电极穿透的角度是否有影响？

一般来说有， $45$ 度或更小的角度更利于形成 $G\Omega$ 封接。

**F**什么是理想的电极阻抗？

视情况而定。如只是钳制并建立电流钳记录则可能选择 $5M\Omega$ 。尖端更小(或阻抗更高)较容易形成封接但更难破膜，且通道电阻更大。尖端更大(或阻抗更低)可钳制胞体且利于电压钳，但封接较难。使用阻抗小于 $3M\Omega$ 的电极从未能够成功封接。

**G**怎样氯化电极银丝？

将银丝放入漂白剂 $15-30min$ 。

在 $150-300mM NaCl$ 盐溶液， $5-10V$ 电压中电解。

**H**为什么无法施加压力/轻吸？

检查三通管/T型管。

**I**电极内液中应该加入多少抗生素？

视情况而定。通常 $0.5\%-2\%$  (w/v)足够。注意溶液渗透压应在 $290-310$ 。

**J**电压显示缓慢的DC漂移，特别是启动步阶电位程序时，我该怎么做？

有可能你的电极(记录或参比电极均有可能)未氯化完全，将银线放入漂白剂大约 $15$ 分钟。