

膜片钳记录和分析技术

介 绍

细胞是动物和人体的基本组成单元，细胞与细胞内的通信,是依靠其膜上的离子通道进行的，离子和离子通道是细胞兴奋的基础，亦即产生生物电信号的基础，生物电信号通常用电学或电子学方法进行测量。由此形成了一门细胞学科—**电生理学**（electrophysiology），即是用电生理的方法来记录和分析细胞产生电的大小和规律的科学。

早期的研究多使用双电极电压钳技术作细胞内电活动的记录。现代膜片钳技术是在电压钳技术的基础上发展起来的。

1976年德国**马普**生物物理研究所Neher和Sakmann创建了**膜片钳技术**（patch clamp recording technique）。这是一种以记录通过离子通道的离子电流来反映细胞膜单一的（或多个的离子通道分子活动的技术）。以后由于吉欧姆阻抗封接(gigaohm seal, 10⁹Ω)方法的确立和几种方法的创建。这种技术点燃了细胞和分子水平的生理学研究的革命之火，它和基因克隆技术（gene cloning）并驾齐驱，给生命科学研究带来了巨大的前进动力。

这一伟大的贡献，使Neher和Sakmann获得1991年度的诺贝尔生理学及医学奖。

一、膜片钳技术发展历史

1976年德国**马普**生物物理化学研究所Neher和Sakmann首次在青蛙肌细胞上用双电极钳制膜电位的同时，记录到ACh激活的单通道离子电流，从而产生了膜片钳技术。

1980年Sigworth等在记录电极内施加5-50 cmH₂O的负压吸引，得到10-100GΩ的高阻封接（Giga-seal），大大降低了记录时的噪声实现了单根电极既钳制膜片电位又记录单通道电流的突破。

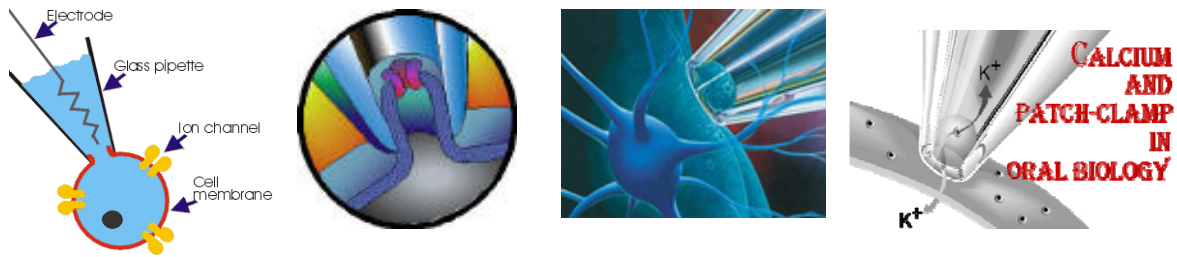
1981年Hamill和Neher等对该技术进行了改进，引进了膜片游离技术和全细胞记录技术，从而使该技术更趋完善，具有1pA的电流灵敏度、1μm的空间分辨率和10μs的时间分辨率。

1983年10月，《Single-Channel Recording》一书问世，奠定了膜片钳技术的里程碑。Sakmann 和Neher也因其杰出的工作和突出贡献，荣获1991年诺贝尔医学和生理学奖。

二：膜片钳技术原理

膜片钳技术是用玻璃微电极吸管把只含1-3个离子通道、面积为几个平方微米的细胞膜通过负压吸引封接起来（见下图），由于电极尖端与细胞膜的高阻封接，在电极尖端

笼罩下的那片膜事实上与膜的其他部分从电学上隔离，因此，此片膜内开放所产生的电流流进玻璃吸管，用一个极为敏感的电流监视器（膜片钳放大器）测量此电流强度，就代表单一离子通道电流。



膜片钳技术的建立，对生物学科学特别是神经科学是一资有重大意义的变革。这是一种以记录通过离子通道的离子电流来反映细胞膜单一的（或多个的离子通道分子活动的技术。些技术的出现自然将细胞水平和分子水平的生理学研究联系在一起，同时又将神经科学的不同分野必然地融汇在一起，改变了既往各个分野互不联系、互不渗透，阻碍人们全面认识能力的弊端。

这一技术的发现和基因克隆技术并架齐驱，给生命科学研究带来了巨大的前进动力。

三：全自动膜片钳技术

膜片钳技术被称为研究离子通道的“金标准”。是研究离子通道的最重要的技术。目前膜片钳技术已从**常规膜片钳技术**（Conventional patch clamp technique）发展到**全自动膜片钳技术**（Automated patch clamp technique）。

传统膜片钳技术每次只能记录一个细胞（或一对细胞），对实验人员来说是一项耗时耗力的工作，它不适合在药物开发初期和中期进行大量化合物的筛选，也不适合需要记录大量细胞的基础实验研究。全自动膜片钳技术的出现在很大程度上解决了这些问题，它不仅通量高，一次能记录几个甚至几十个细胞，而且从找细胞、形成封接、破膜等整个实验操作实现了自动化，免除了这些操作的复杂与困难。这两个优点使得膜片钳技术的工作效率大大提高了！鉴于全自动膜片钳技术的这些优点，目前已经广泛的用于药物筛选。

四：膜片钳技术的应用

1. 应用学科

膜片钳技术发展至今，已经成为现代细胞电生理的常规方法，它不仅可以作为基础生物医学研究的工具，而且直接或间接为临床医学研究服务，

目前膜片钳技术广泛应用于神经（脑）科学、心血管科学、药理学、细胞生物学、病理生理学、中医药学、植物细胞生理学、运动生理等多学科领域研究。

随着全自动膜片钳技术（Automatic patch clamp technology）的出现，膜片钳技术因其具有的自动化、高通量特性，在药物研发、药物筛选中显示了强劲的生命力。

2. 应用的标本种类

使用的标本种类繁多。从最早的肌细胞（心肌、平滑肌、骨骼肌）、神经元和内分泌细胞发展到血细胞、肝细胞、耳窝毛细胞、胃壁细胞、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、精母细胞等多种细胞；从急性分散细胞和培养细胞（包括细胞株）发展到组织片（如脑片、脊髓片）乃至整体动物；从蜗牛、青蛙、蝶螈、爪蟾卵母细胞发展到鸡细胞、大鼠细胞、人细胞等等；从动物细胞发展到细菌、真菌以及植物细胞。此外，膜片钳技术还广泛地应用到平面双分子层（Planar bilayer）、脂质体（Liposome）等人工标本上。

3. 研究对象

研究对象已经不局限于离子通道。从对离子通道（配体门控性、电压门控性、第二信使介导的离子通道、机械敏感性离子通道以及缝隙连接通道等等）的研究发展到对离子泵、交换体以及可兴奋细胞的胞吞、胞吐机制的研究等。

4. 应用举例：

(1). 膜片钳技术在通道研究中的重要作用

应用膜片钳技术可以直接观察和分辨单离子通道电流及其开闭时程、区分离子通道的离子选择性、同时可发现新的离子通道及亚型，并能在记录单细胞电流和全细胞电流的基础上进一步计算出细胞膜上的通道数和开放概率，还可以用以研究某些胞内或胞外物质对离子通道开闭及通道电流的影响等。同时用于研究细胞信号的跨膜转导和细胞分泌机制。结合分子克隆和定点突变技术，膜片钳技术可用于离子通道分子结构与生物学功能关系的研究。

利用膜片钳技术还可以用于药物在其靶受体上作用位点的分析。如神经元烟碱受体为配体门控性离子通道，膜片钳全细胞记录技术通过记录烟碱诱发电流，可直观地反映出神经元烟碱受体活动的全过程，包括受体与其激动剂和拮抗剂的亲和力，离子通道开放、关闭的动力学特征及受体的失敏等活动。使用膜片钳全细胞记录技术观察拮抗剂对烟碱受体激动剂量效曲线的影响，来确定其作用的动力学特征。然后根据分析拮抗剂对受体失敏的影响，拮抗剂的作用是否有电压依赖性、使用依赖性等特点，可从功能上区分拮抗剂在烟碱受体上的不同作用位点，即判断拮抗剂是作用在受体的激动剂识别位点，离子通道抑或

是其它的变构位点上。

(2).与药物作用有关的心肌离子通道

心肌细胞通过各种离子通道对膜电位和动作电位稳态的维持而保持正常的功能。近年来，国外学者在人类心肌细胞离子通道特性的研究中取得了许多进展，使得心肌药理学实验由动物细胞模型向人心肌细胞成为可能。

(3).对离子通道生理与病理情况下作用机制的研究

通过对各种生理或病理情况下细胞膜某种离子通道特性的研究，了解该离子的生理意义及其在疾病过程中的作用机制。如对钙离子在脑缺血神经细胞损害中作用机制的研究表明，缺血性脑损害过程中， Ca^{2+} 介导现象起非常重要的作用，缺血缺氧使 Ca^{2+} 通道开放，过多的 Ca^{2+} 进入细胞内就出现 Ca^{2+} 超载，导致神经元及细胞膜损害，膜转运功能障碍，严重的可使神经元坏死

(4).对单细胞形态与功能关系的研究

将膜片钳技术与单细胞逆转录多聚酶链式反应技术结合，在全细胞膜片钳记录下，将单细胞内容物或整个细胞（包括细胞膜）吸入电极中，将细胞内存在的各种mRNA全部快速逆转录成cDNA，再经常规PCR扩增及待检的特异mRNA的检测，借此可对形态相似而电活动不同的结果做出分子水平的解释或为单细胞逆转录多聚酶链式反应提供标本，为同一结构中形态非常相似但功能不同的事实提供分子水平的解释。目前国际上掌握此技术的实验室较少，我国北京大学神经科学研究所于1994年在国内率先开展。

(5).对药物作用机制的研究

在通道电流记录中，可分别于不同时间、不同部位（膜内或膜外）施加各种浓度的药物，研究它们对通道功能的可能影响，了解那些选择性作用于通道的药物影响人和动物生理功能的分子机理。这是目前膜片钳技术应用最广泛的领域，既有对西药药物机制的探讨，也广泛用在重要药理的研究上。如开丽等报道细胞贴附式膜片钳单通道记录法观测到人参二醇组皂苷可抑制正常和“缺血”诱导的大鼠大脑皮层神经元L-型钙通道的开放，从而减少钙内流，对缺血细胞可能有保护作用。陈龙等报道采用细胞贴附式单通道记录法发现乌头碱对培养的Wistar大鼠心室肌细胞L-型钙通道有阻滞作用。

(6).在心血管药理研究中的应用

随着膜片钳技术在心血管方面的广泛应用，对血管疾病和药物作用的认识不仅得到了不断更新，而且在其病因学与药理学方面还形成了许多新的观点。正如诺贝尔基金会在颁奖时所说：“Neher和Sadmamnn的贡献有利于了解不同疾病机理，为研制新的更为特效的药

物开辟了道路”。

(7). 创新药物研究与高通量筛选

目前在离子通道高通量筛选中主要是进行样品量大、筛选速度占优势、信息量要求不太高的初级筛选。最近几年，分别形成了以膜片钳和荧光探针为基础的两大主流技术市场。将电生理研究信息量大、灵敏度高等特点与自动化、微量技术相结合，产生了自动化膜片钳等一些新技术。

五：厂家简介

膜片钳技术的核心部分是膜片钳放大器系统，包括：**膜片钳放大器（Amplifier）、数模/模数转换器（Digitizer）和数据采样和分析软件（Software）**三个部分，共同完成离子通道电流的采集、处理和分析。由于离子通道电流的大小通常是在 pA 到 nA 范围内，要记录如此微弱的通道电流信号，就需要特殊电路设计的膜片钳放大器和高精度、低噪声的数模/模数转换器。

在膜片放大器系统领域，美国 MDC 公司生产的 **AXON** 系列膜片钳放大器系统占有主导地位，无论从产品的技术含量还是从产品的应用领域上来看，在膜片钳技术中始终处于领先的地位，代表着膜片钳技术发展的方向，是国内外膜片钳实验室首选实验仪器，这可以从下面几个方面得到体现：

1. 专业的生产厂家

AXON 是最早生产膜片钳放大器的厂家，从早期的 1D 到 200A，200B，700A，700B 等传统膜片钳放大器，到今天的全自动膜片钳系统的开发和应用，始终引领着膜片钳技术的发展方向。其 pClamp10 记录分析软件是一款功能全面强大的软件，可以满足膜片钳和电生理所有的需要。系列的膜片钳放大器系统被认为是膜片钳技术应用的标准系统。

2. 产品种类齐全

AXON 系列放大器（传统的膜片钳放大器，全自动膜片钳系统）覆盖了膜片钳技术上所需的所有放大器种类，产品丰富。

3. 应用广泛

AXON 既有应用于传统的膜片钳技术的放大器系统外，也有应用于高通量药物筛选的全自动膜片钳系统，应用面广。

4. 客户最多

无论是在国内还是在国外，超过 80%的用户使用 AXON 系列产品。Axon 被很多实验室选用。

5. 完善的售后服务体系

AXON 在上海设有办事处，提供强大的技术支持和售后服务。

马普科学仪器有限公司

广州寺右新马路 4 号长城大厦 1419 室 (邮编: 510600)

Tel: 020-87679617, 87679631; Fax: 020-87679635

<http://www.mapusci.com>

E-mail: info@mapusci.com