

膜片钳技术原理和应用

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: 020-8767 9617, 8767 9631 Fax: 020-8767 9635

<http://www.mapusci.com> E-mail: info@mapusci.com

第一部分 膜片钳技术研究概况

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, $10^9 \Omega$)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。

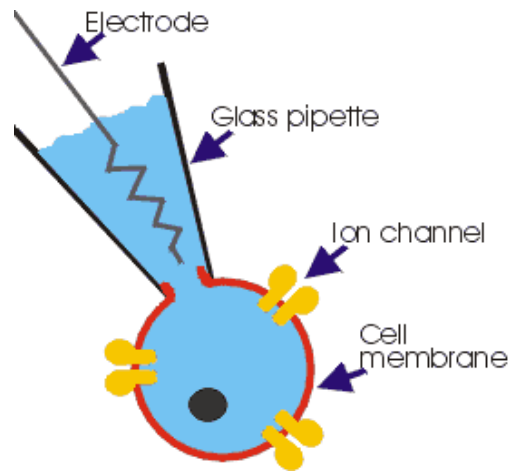
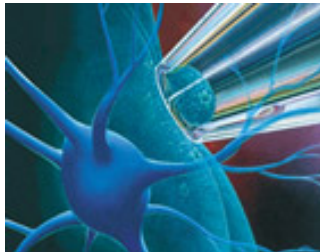
这一伟大的贡献，使Neher和Sakmann获得1991年度的诺贝尔生理学与医学奖。

一、膜片钳技术发展历史

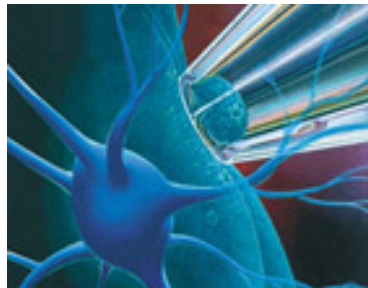
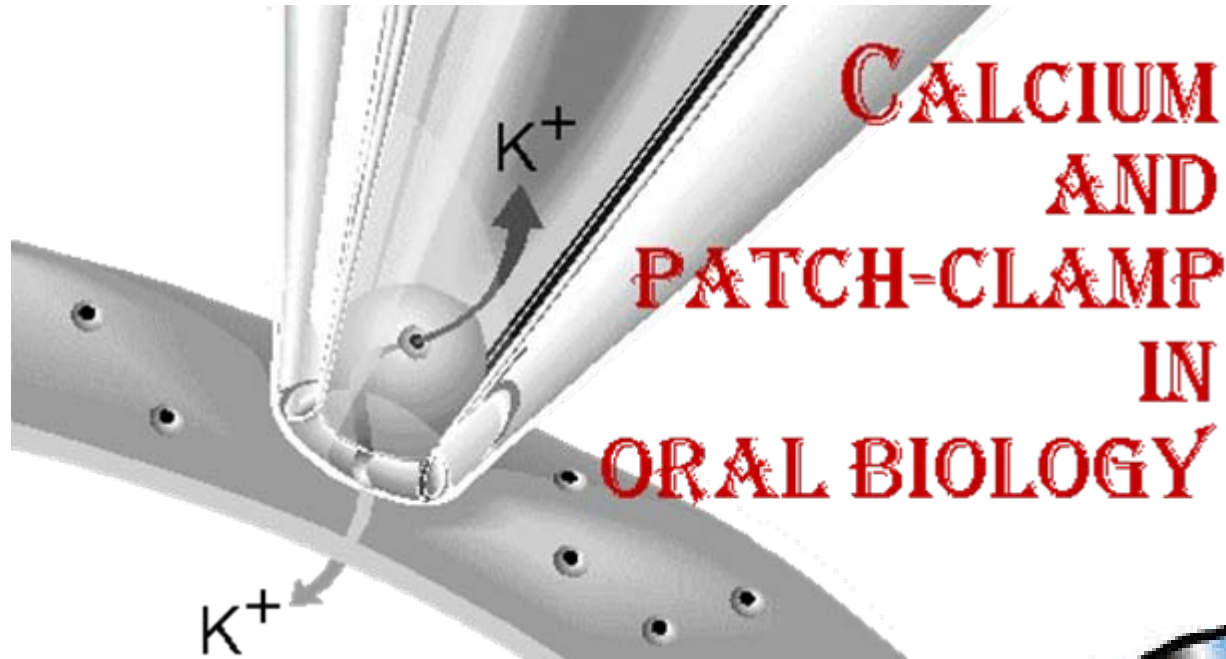
- 1976年德国马普生物物理化学研究所Neher和Sakmann首次在青蛙肌细胞上用双电极钳制膜电位的同时，记录到ACh激活的单通道离子电流，从而产生了膜片钳技术。
- 1980年Sigworth等在记录电极内施加5-50 cmH₂O的负压吸引，得到10-100G Ω的高阻封接（Giga-seal），大大降低了记录时的噪声实现了单根电极既钳制膜片电位又记录单通道电流的突破。
- 1981年Hamill和Neher等对该技术进行了改进，引进了膜片游离技术和全细胞记录技术，从而使该技术更趋完善，具有1pA的电流灵敏度、1 μ m的空间分辨率和10 μ s的时间分辨率。
- 1983年10月，《Single-Channel 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

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，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，该电流强度就代表单一离子通道电流。



膜片钳技术原



三：膜片钳技术的意义

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。

第二部分 膜片钳技术的应用

一：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。

二：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、蝾螈、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。

三：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。

四：应用举例：

1.膜片钳技术在通道研究中的重要作

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

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

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

将膜片钳技术与单细胞逆转录多聚酶链是反应技术结合，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

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

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Sadmman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、微量化技术相结合，产生了自动化膜片钳等一些新技术。