

仪器设备

研究可兴奋膜离子通道电压箝位仪的一些进展

周新良

(中国科学院上海脑研究所)

近年来对可兴奋细胞膜离子通道特性的研究进展很快。与此同时,研究此类问题的新技术不断得到开发,各种商品化的实验系统正在被迅速推向市场,从而大大促进了研究工作的进一步深入。电压箝位仪在生理、药理、细胞生物、生物物理等领域中的应用很广泛。本文就目前国际市场上各种电压箝位仪的设计原理、性能、用途等及其新进展作一些介绍。

电压箝位技术在神经生理学研究中的应用已有很长的历史,从1949年美国著名生理学家K. S. Cole 首先在乌贼神经大纤维上使用这一方法,至今一直被认为是研究电兴奋膜和化学兴奋膜的一种有效的手段^[1]。电压箝位的方法有多种,特别是在七十年代初,由于电子技术及微电极技术的突飞猛进,促进了微电极型电压箝位技术的发展。许多著名的实验室,如日本A. Takeuchi 和 N. Takeuchi,最初在肌纤维上实现微电极电压箝位。美国国立卫生研究院Karl Frank 在海兔神经元上用微电极电压箝位做了很多工作。此后又有不少实验室开展了这方面的研究。在这种情形下,一些厂商不失时机地将实验室装置定型、生产,使其商品化投放市场。因此可以说电压箝位仪的雏形大多来自一些著名的实验室。

目前看到的国外市场上的电压箝位仪产品,根据功能可分为两大类:微电极型(Microelectrode voltage clamp)和膜片箝位型(Patch clamp)。前一类代表性型号有:美国Dagon公司的Dagon 8500型、Axon Instrument公司的Axoclamp-2A型、日本光电公司的CEZ-1100型(需配置Model-7101微电极放大器)。

膜片箝位型号有:西德List-Electric公司的L/M-EPC-5型膜片箝位仪及称为第二代的L/M-EPC-7型膜片箝位仪、Dagon公司的Dagon 8900型膜片箝位仪、WPI公司的S-7040A型膜片箝位仪等。

一、微电极型电压箝位仪

1 两微电极型

两微电极型电压箝位仪是采用独立的电压电极(R_v)和电流电极(R_s),利用高速、高增益负反馈闭环电路设计的。图1为其工作原理示意图。

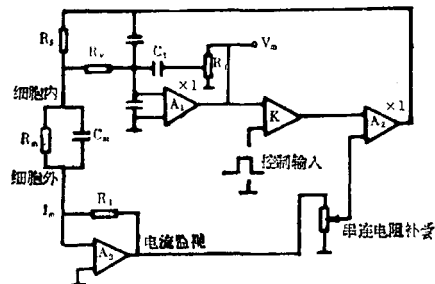


图1 两微电极电压箝位仪工作原理示意图

$R_m // C_m$ 代表膜模型, R_s 为电流电极, R_v 为电压电极, K 为高增益放大器。

图中可看出,电位达到稳定时(暂不考虑串联电阻补偿),

$$\frac{R_m}{R_s + R_m} \cdot K \cdot (V_c - V_m) = V_m,$$

即

$$V_c - V_m = \frac{V_m}{K} \left(\frac{R_s}{R_m} + 1 \right),$$

当 K 足够大时, $V_m \approx V_c$, 即膜电位受到控制电位的控制。

从瞬态过程分析,采用这一工作原理,仪器系统处在闭环状态,必须考虑系统的稳定性^[3]。从理论上讲,这是一个二阶闭环系统, Katz 和 Schwartz^[2] 曾作过分析,求得了传递函数方程的临界阻尼值,并得出如下结论:要获得理想箝位(即阻尼系数 $\eta = 1$),实验标本的时间常数和仪器系统的时间常数有一定关系:定义膜时间常数为 $\tau_m(\tau_m = R_m C_m)$, 仪器系统时间常数为 τ_i , 负荷时间常数为 $\tau_l(\tau_l = \tau_m \tau_s / \tau_m + \tau_s)$, $\tau_s = R_s C_m$, 其中 R_m 、 C_m 、 R_s 分别代表膜电阻、膜电容、电流电极阻抗。不产生振荡的条件是 τ_l 和 τ_i 必须足够分离,即满足

$$\left(\frac{1}{\tau_l} - \frac{1}{\tau_i}\right)^2 = \frac{4K}{\tau_i \tau_s},$$

K 为系统增益,一般至少一千倍以上。有两种情形, $\tau_l \gg \tau_i$ 或 $\tau_i \gg \tau_l$, 可实现上述要求。对一般生物标本,如神经肌肉接头,其时间常数大于 1.5×10^{-3} s, 容易做到 $\tau_l \gg \tau_i$ 达到理想箝位。但对于某些生物标本,如组织培养鼠脊髓神经元,其 C_m 非常小,仅 10^{-10} f, 而仪器系统受频响限制,不可能使 $\tau_l \gg \tau_i$, 因此,此类生物标本用两微电极型系统箝制峰形电位是很困难的。

为保证系统稳定,一般均采用相移网络、带宽控制及增益可调等措施。在理论上用 Nyquist 判据对电路作了分析。为有足够电流输出,驱动电压高达 ± 100 V, 系统工作模式有虚地(Virtual)和接地(Chassis)两种。前者有利于提高箝位速度,但易引入干扰。两种工作模式根据实验要求确定。从仪器性能来看,各型号都有各自的一些特点, Dagon 8500 型在电路结构上前级增加了桥电路,扩大了该仪器的功能,可用作电流箝位、微电泳及膜电阻、膜电容测量、电极监视等。日本光电公司与 CEZ-1100 型相配的 MEZ-7101 型差分探头的两个输入端均可作负电容补偿,有利于提高整机系统的频响。 Axo-Clamp 2A 型不仅能作两微电极电压箝位(TEVC),还可用作开关型非连续单微电极电压箝位(dsEVC),连续单微电极全细胞电压箝位(cSEVC)、非连续电流箝位

(DCC),在内部还设置了双电桥放大器,具有自动膜电位箝制、伪迹抑制、电极清洗等功能。该系统前级探头采用自举电源^[9],使其具有较大的动态范围和极小的输入电容、高速、低噪声等特点,并提高了系统响应。当模拟细胞为 $10\text{M}\Omega$ 平行 1nF , 电极阻抗 $10\text{M}\Omega$, 上升 10mV 时,非连续单微电极电压箝位的上升时间可小于 $100\mu\text{s}$, 两微电极电压箝位的上升时间可小于 $30\mu\text{s}$ 。该系统面板有四个数字计,分别显示二路膜电流、电压及取样时钟等。开启“Clear”开关可输出超极或去极大电流,此开关可用于清洗电极尖端。打开“Buzz”开关可引起振荡,有助于电极插入细胞。详细性能指标,可参阅表 1。

2 单微电极型

开关型单微电极系统最先由美国 Durham 癫痫研究中心的 W. A. Wilson^[3] 根据 Brennecker 和 Linderman^[4] 提出的原理设计的,其工作原理如图 2。

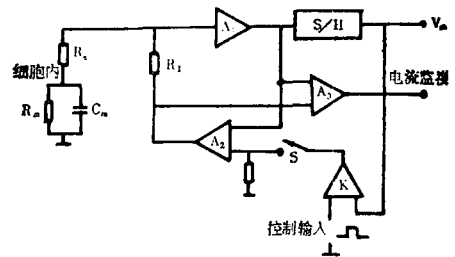


图 2 单微电极电压箝位仪工作原理示意图

R_m/C_m 代表膜模型, R_v 为电压微电极、电流微电极, S/H 为取样保持电路, K 为高增益放大器。

代表产品有 Dagon 8100 型单微电极电压箝位仪, Axo clamp-2A 型也可用作单微电极电压箝位。工作原理是利用高速转换开关,使记录与电流注入通过同一根电极进行。经理论分析表明,定义膜特性频率 $f_c = \frac{1}{2\pi\tau_m}$, 若开关频率大于 f_c 的十倍以上,即一般至少 20KHz , 可达到箝位的目的。但这对于高阻前放来说是极为困难的,因此单微电极型系统在前放电路中都作了特别的安排。另一方面,要求使用者在实验时采取一些措施,尽可能减小输入分布电容。由于采用非连续电流箝位,单微电极电

表1 两微电极型电压钳位仪性能比较

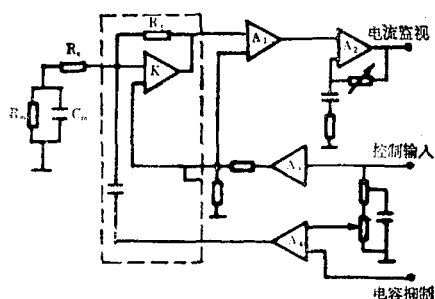
型 号 性 能	Dagon 8500	光电 CEZ-1100	Axoclamp-2A
输入阻抗	$5 \times 10^{11} \Omega$	$> 10^9 \Omega$	$> 10^{10} - 10^{14} \Omega$ (五档, 随前电流增益H改变)
输入栅流	$1 \times 10^{-12} \text{A}$ (可调至0)	$< 10^{-11} \text{A}$	可调至0。温度影响 $10 \text{pA}/^\circ\text{C}$ - $10 \text{fA}/^\circ\text{C}$ (与电流增益H有关)
探头频响	$7 \mu\text{s}$ (输入电阻 $22 \text{M}\Omega$)	DC-100KHz (上升时间 $< 3.5 \mu\text{s}$) 源阻抗 $R_s = 0$	采用自举电源, 高速
输入负电容补偿	0—30pf	0—30pf	放大器 1: HS-2L 1-7pf HS-2M 2-20pf 放大器 2: 加倍
噪 声		带宽 DC-30KHz, $< 100 \mu\text{V}$ (p-p) ($R_s = 0$) 带宽 30KHz, $< 800 \mu\text{V}$ (p-p) ($R_s = 20 \text{M}\Omega$)	带宽 10KHz $5 \mu\text{V RMS}$, $R_s = 0$ 带宽 10KHz $51 \mu\text{V RMS}$, $R_s = 10 \text{M}\Omega$ 带宽 1KHz $47 \mu\text{VRMS}$, $R_s = 100 \text{M}\Omega$ (HS-2L 探头)
直流电平补偿	$\pm 1000 \text{mV}$	$\pm 1000 \text{mV}$	$\pm 500 \text{mV}$
电极阻抗校正	$1 \text{mV}/1 \text{M}\Omega$ 或桥电路数字拨盘 0—99.9M Ω	$1 \text{mV}/1 \text{M}\Omega$	桥电路 (10 圈电位器) $10 \div \text{H M}\Omega/\text{圈}$ cSEVC 方式 $1 \div \text{H M}\Omega/\text{圈}$
细胞内电泳	0— $\pm 99.9 \text{nA}$		最大电泳 $I = 1000 \times \text{HnA}$
系统增益	0—25000 倍	100—10000 倍 (外加前置放大 10 倍)	dSEVC $100 \times \text{H nA/mV}$ cSEVC $1000 \times \text{H nA/mV}$ TEVC $10000 \times \text{H mV/mV}$
系统带宽	1KHz—100KHz	当 $R_s \cdot C_m = 10^{-12} \text{s}$ 时 (R_s 为电流电极阻抗, C_m 膜电容, 上升时间 $T < 100 \mu\text{s}$)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30KHz
膜电位控制	保持 (Holding): 0— $\pm 999 \text{mV}$ 控制 (Command): 0— $\pm 999 \text{mV}$ (输入 10V)	保持 (Holding): 0— $\pm 1 \text{V}$ 控制 (Command): 调刺激 器输出, 衰减 1 或 0.1)	保持 (Holding) 0— $\pm 200 \text{mV}$ 控制 (Command) 内部: 0— $\pm 199.9 \text{mV}$ 外部: 20mV/V 最大输入 $\pm 30 \text{V}$
输出驱动电压	$\pm 90 \text{V}$	$> \pm 100 \text{V}$	$\pm 30 \text{V}$
膜电流监视	接地 $10 \text{nA/V} - 10 \mu\text{A/V}$ 四档 浮置 $100 \text{nA/V} - 100 \mu\text{A/V}$ 四档	$10^{-8} \text{A/V} - 10^{-5} \text{A/V}$ 四档	$10 \div \text{H mV/nA}$
电流放大器带宽	30Hz, 300Hz, 3kHz, 30KHz,	30Hz, 300Hz, 3KHz, 30KHz, OFF	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30KHz
相位调节	超前连续调节	超前六档, 迟后六档	超前时间常数 0—400ms 迟后时间常数 0—200ms
响应时间	电流电极, 电压电极均为 $1 \text{M}\Omega$ 膜模型 $1 \text{M}\Omega$ 平行 $0.005 \mu\text{F}$ 响应时间 $< 30 \mu\text{s}$		电流电极, 电压电极均为 $10 \text{M}\Omega$, 膜模型 10M 平行 1nF dSEVC $100 \mu\text{s}$ TSEVC $30 \mu\text{s}$

压钳位存在着严重的问题, 即事实上不可能真正做到钳位, 使 $dV/dt \approx 0$, 也就达不到电压钳位分离电导电流和电容电流的基本目的, 因此这种技术虽然有一定的应用价值, 但已有文献报道认为单微电极系统只适宜作定性的研究, 而不能用作定量的分析。

二、膜片钳位仪

膜片钳位是近年来“十亿欧姆封接”(giga-seal) 技术的突破发展起来的仪器系统^[7,8], 即可在细胞贴附构形上作细胞外记录, 也可在“内面向外”、“外面向外”膜片构形上以及常规微电极

膜片箝位技术虽然是八十年代发展起来的新技术,但相应的仪器装置,市场上已有出售。图3表示此类仪器工作原理示意图。



R_m/C_m 代表膜模型。 R_e 为膜片箝位电极, K 为高增益放大器, 虚线表示探头外壳。

L/M-EPC-7 型是 L/M-EPC-5 型的改进型。改进的依据是电生理研究在以下几方面的进展: (1) 全细胞记录和箝位技术对研究许多种类细胞如培养神经元和心肌细胞变得愈来愈重要; (2) 全细胞记录和单通道记录互为补充, 即使研究的目的是分析单通道电流, 在同一细胞上全细胞记录获取的数据有助于分析, 并可简化实验过程; (3) 由于膜片电极的改进, 记录

Dagon 8900 型膜片箴位系统的电流分辨率可达 10^{-12} A, 其噪声水平为 250Hz 带宽 0.03pA RMS, 1KHz 带宽 0.10pA RMS, 3KHz 带宽 0.20pA, 10KHz 带宽 0.60pA。8900 系统配有三个探头, 可通过面板开关控制选择。三个探头有不同用途: 用于测量单通道电流的 8930 小电流膜片探头; 用于测量较大膜片的 8920 大电流膜片探头及用于测量小细胞全离子电流的 8910 全细胞探头。三个探头最大记录电流分别为 1nA、10nA、100nA。该仪器电容瞬态抑制采用三级可调电容网络, 能更好地抵消膜片电极电容效应, 其时间常数分别为 0—5 μ s、0—2ms、0—10ms。

• 67 •

表 2 膜片钳位性能比较

型 号 性 能	Dagon 8900	L/M-EPC-5	L/M-EPC-7
系统噪声	250Hz 带宽 0.03pA RMS 1KHz 带宽 0.10pA RMS 3KHz 带宽 0.20pA RMS 10KHz 带宽 0.60pA RMS	1KHz 带宽 <0.1pA RMS 3KHz 带宽 <0.4pA RMS	1KHz 带宽 0.05pA RMS 3KHz 带宽 0.1pA RMS 10KHz 带宽 0.30pA RMS
膜电流监视	8930 探头: 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000mV/pA 8920 探头: 为 8930 十分之一 8910 探头: 为 8930 百分之一 二价有源滤波: 1KHz, 10KHz, off	5—100mV/pA (开关分档选择) 内部滤波: 0.3—10KHz 2价贝塞尔响应	0.5—1000mV/pA (开关分档选择) 内部滤波: 10KHz 或 3KHz 3 价贝塞尔响应 最高带宽 100KHz
电容补偿 (瞬态抑制)	快时间常数: 0—5 μ s 一般时间常数: 0—2ms 慢时间常数: 0—10ms	快时间常数: 0.5—5 μ s 慢时间常数: 0.2—10ms 电容抵消范围: 0—10pf	快时间常数: 0.5—5 μ s 快电容抵消范围: 0—10pf 慢电容抵消范围: 0.2—10pf 2—100pf 串连电导校正 0.01—1 μ s
串连电阻补偿	0—100M Ω (10 圈数字拨盘)		0—100M Ω (R, 由瞬态消除电路自动确定)
保持电平 (Holding)	电压箱: 0— $\pm$ 200mV 电流箱: 0— $\pm$ 2nA	电压箱: 0— $\pm$ 200mV 电流箱: $\pm$ 20pA— $\pm$ 400pA	电压箱: 0— $\pm$ 200mV 电流箱: 0— $\pm$ 200pA
控制电平 (Command)	电压箱: 10mV/mV 或 20mV/mV (10:1 或 20:1) 电流箱: 1V/nA 或 2V/nA (输入阻抗 10K, 最大输入 10V)	电压箱: 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 —0.1, off 电流箱: 10—200pA/V (由增益开关设定)	电压箱: 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 —0.05, —0.1, off 电流箱: 10—100pA/V
探 头	最大可测电流: 8930 (低电流型) 1nA 8920 (高电流型) 10nA 8910 (全细胞型) 100nA		0—20nA (500M Ω) 0—200pA (50G Ω) (50M Ω 或 50G Ω 可遥控控制)
脉冲监测	内部: 100mV 用于测“十亿 欧姆封接 1mV 用于测斑片电极 外部: 电压箱 10V/mV 电流箱 1V/pA 电流箱: 1nA 或 10pA		自动调零积分器使电流监视 输出对输入直接响应 频响: 0.5Hz—1MHz 转换率: 100PA/V
调零补偿	0— $\pm$ 100mV	0— $\pm$ 20mV	0— $\pm$ 50mV

综上所述, 目前国外研究离子通道的仪器型号不少, 其性能、用途各具特点, 因此必须根据各自的实验要求作出选择。

参 考 文 献

- [1] Moore, J. W.: in *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes* (Ed. Adelman, W. J.), Van Nostrand Reinhold, New York, 1971.
- [2] Katz, G. M. et al.: *J. Membrane Biol.*, **17**, 275, 1974.
- [3] Smith, T. G. et al.: *J. Neurosci Methods*, **3**, 105,

- 1980.
- [4] Lindlmann, B. et al.: *Rev. Sci. Instrum.*, **45**, 656, 1974.
- [5] Wilson, W. A. et al.: *J. Neurobiol.*, **6**, 411, 1975.
- [6] Sigworth, F. J.: *J. Physiol.*, **307**, 97, 1980.
- [7] Neher, E. et al.: *Pflugers Arch.*, **375**, 219, 1978.
- [8] Neher, E. et al.: *Nature*, **260**, 799, 1976.
- [9] Christian, G.: *IEEE Medical Electronics Monographs*, 1974.
- [10] Hamill, O. P. et al.: *Pflugers Arch.*, **391**, 85, 1981.

[本文于 1985 年 7 月 8 日收到]