

# 细胞膜上生物物理虚拟仿真实验

## —基于激光共聚焦显微镜与膜片钳的离子通道门控状态检测仿真实验

<b>实验目的</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 了解激光共聚焦显微镜 (LSCM) 与膜片钳的工作原理、实验过程和在科研工作中的应用;</li><li>2. 在虚拟环境下完成 TMEM16A 离子通道门控状态检测仿真实验;</li><li>3. 通过实验加深理解激发光、荧光、电流放大器与膜电阻、膜电位、跨膜电流等概念。</li></ol>
<b>实验仪器</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. 激光共聚焦显微镜包括: 显微镜及控制面板、计算机及显示设备、激光器、汞灯等;</li><li>2. 膜片钳系统包括: 膜片钳放大器、数模转换器、倒置显微镜、测量探头、微操作器、计算机数据采集及分析系统等。</li></ol>
<b>实验原理</b>	<p>本实验是基于激光共聚焦显微镜与膜片钳的离子通道门控状态检测虚拟仿真实验, 以钙激活氯离子通道为例, 观测不同情况下, 细胞荧光信号的变化以及膜电流随阶跃电压的变化。</p> <p>钙激活氯离子通道 CaCCs/TMEM16A 参与多种重要细胞进程, 例如跨膜离子运输、调节电兴奋性、调节细胞体积和离子内环境稳态, 其功能障碍会导致癌症、高血压、胃肠动力学障碍等疾病。因此, 氯离子通道是药物研发的重要靶点。</p> <h3>1、激光共聚焦显微镜</h3> <p>激光共聚焦显微镜是用激光作为光源, 在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置, 并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察、分析和输出系统。激光共聚焦显微镜是一种高敏感度与高分辨率的显微镜, 它不仅可观察固定的细胞、组织切片, 还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态地观察和检测。激光共聚焦显微技术已用于细胞形态定位、立体结构重组、动态变化过程等研究, 并提供定量荧光测定、定量图像分析等实用研究手段, 结合其他相关生物技术, 在生命科学领域的组织、细胞和分子水平研究中的应用十分广泛。</p> <h4>1.1、 激光共聚焦显微镜的基本原理</h4> <p>激光共聚焦显微镜是在显微镜基础上配置多种波长的激光光源, 扫描步进马达, 共轭聚焦装置和检测系统, 整套仪器由计算机自动控制, 专用软件监控和执行各组件之间的切换。</p> <p>如图 1, 光源发出的一束激光经过小孔射在半透的分光镜上, 反射后经过透镜聚焦至样品。经激光照射的样品发射荧光, 荧光先后穿过透镜和分光镜, 经过检测针孔到达检测器 (常用光电倍增管—PMT 或者快速 CCD 图像传感器)。检测器获得的信号传至计算机, 同时得到样品的荧光信息。不在焦点的探针荧光不会聚焦于小孔, 也就不</p>

会被检测器接受，计算机不会得到其图像。在 LSCM 的载物台上安装有微量步进马达，可以驱动载物台在 z 轴方向步进移动，从而使得物镜聚焦在样品不同的层面上，同时计算机得到了不同层面上的光学图像。这些层面叫做“切面”。由此，LSCM 利用计算机可以实现样品的立体结构和图像的三维重建，故称“显微 CT”。另外 LSCM 还可以通过间歇性的扫面某一切面进行实时监测。

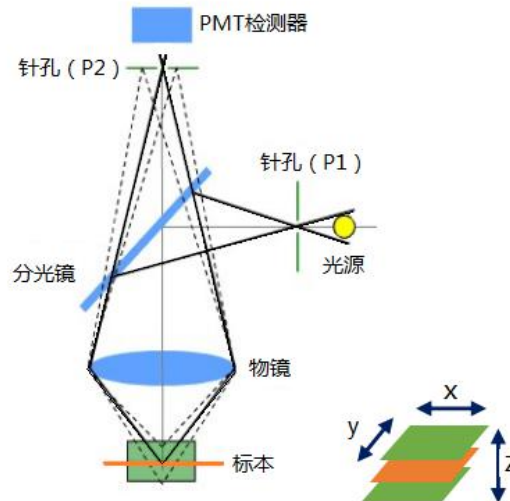


图 1 激光共聚焦工作原理图

### 1.2、 激光光源、荧光与荧光探针

激光共聚焦显微镜采用激光光源，激光具有单色性好、方向性好、亮度高、相干性好的特点。

激光共聚焦显微镜所配备的激光波长为：Ar（氩激光）：351 nm、364 nm、458 nm、476 nm、488 nm、496 nm 和 514 nm；HeNe（氦氖激光）：543 nm、633 nm；Kr（氪激光）：568 nm、647 nm 等。这些激光器的功率均可调，能满足探针所需的各种强度的激光。

荧光分为自发荧光和诱发荧光。自发荧光是在短波长的光源照射下自行发射的荧光，如动物组织中的蛋白质和脂类在紫外光照射下发出淡蓝色的荧光；诱发荧光是组织与荧光色素结合后，经短波长的光源照射后发出的荧光。这里的荧光色素又叫荧光染料或者荧光探针。

荧光探针的选取和使用需要依照其激发光谱和发射光谱。发射光谱反映的是发射荧光中各种波长组份的强度，可以根据发射光谱的峰值来选择检测发射光波长。

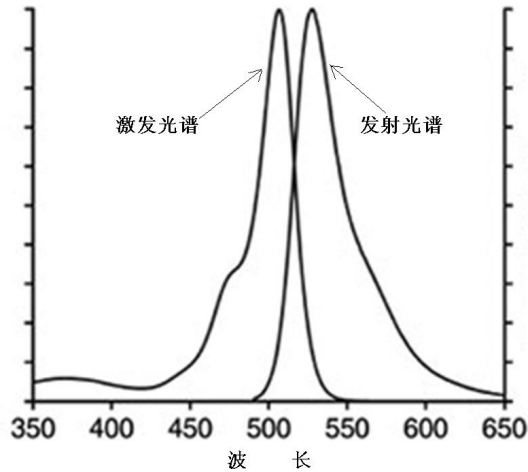


图 2 激发光谱和发射光谱

### 1.3 离子通道门控状态检测

基于激光共聚焦显微镜平台,设计黄色荧光蛋白 (YFP) 荧光淬灭实验,以初步发现 TMEM16A 通道的调节剂。因为 TMEM16A 通道为氯离子通道,可透过碘离子,因此碘化物可以作为氯化物的替代品。激活后,氯离子通道打开,碘化物顺浓度梯度流入细胞内,使在细胞内表达的 YFP 荧光淬灭。如图 3 所示: YFP 荧光的减少与离子流量成正比,因此相对荧光强度反映了氯离子通道的门控状态。

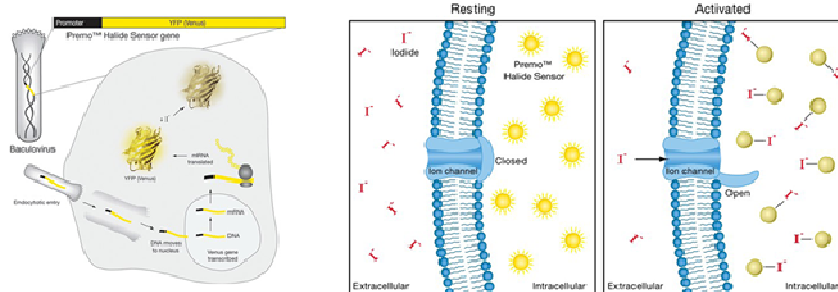


图 3 黄色荧光蛋白荧光淬灭实验示意图

## 2、膜片钳

膜片钳技术是一种基于电工学和电化学原理的分析手段,可以通过检测细胞的电信号(电生理性质)来研究化学物质、电、机械力等刺激因素对细胞功能的影响,从而帮助揭示细胞在生命活动中的化学和生物学机制。Neher 和 Sakmann 在 1976 年发明了可用于检测细胞电生理特性的膜片钳技术,经过四十多年的发展,膜片钳技术不但在细胞电生理研究领域得到了广泛应用,而且在技术上也得到了显著提升,比如出现了全自动膜片钳系统和膜片钳与其他现代生物检测技术结合应用的设备。

### 2.1、膜片钳的原理

膜片钳技术是用玻璃微电极探头吸管,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,见图 4。由于电极尖端与细胞膜的高阻封接,

在电极尖端笼罩下的膜片事实上与膜的其他部分从电学上已隔离。将膜片内开放所产生的电流流进玻璃吸管，用一个膜片钳放大器测量电流强度，就得到单一离子通道电流。

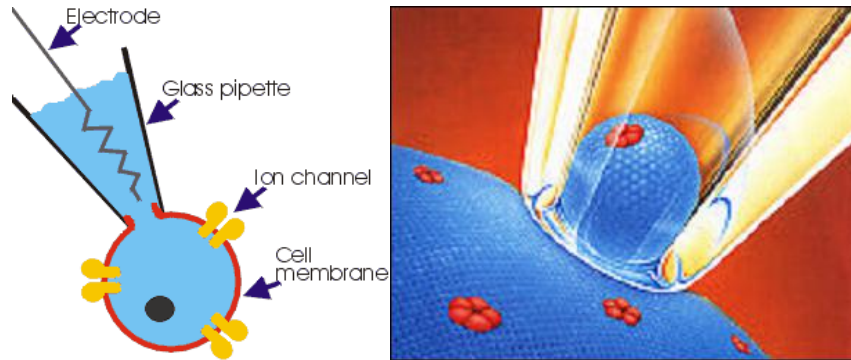


图4 玻璃微电极探头

根据细胞膜片与电极之间的相对性位置关系，膜片钳共有四种基本记录模式，分别为：细胞贴附记录模式、全细胞记录模式、膜内向外记录模式、膜外向外记录模式。

## 2.2、膜片钳主要工作模式——电压钳技术原理

**电压钳模式**工作原理是用命令电压钳制细胞膜电位，使其和命令电压的变化保持一致，并在此条件下检测细胞跨膜电流信号  $I_m$ ，如图5(a)所示。

由于细胞跨膜电流  $I_m$  一般很微弱，通常为  $\text{pA} \sim \text{nA}$  量级，所以在电压钳制模式中利用两个运算放大器  $A_1$ 、 $A_2$  和负反馈电路构成的  $I$ - $V$  转换器对信号进行处理，最终将  $I_m$  转换成电压  $V_2$ ，实现信号的放大输出。

$$V_2 \approx kR_{f1}I_m \quad (1)$$

其中， $k$  为差分放大器  $A_2$  放大倍数， $R_{f1}$  为反馈电阻。由式(1)可知，电流信号被  $I$ - $V$  电路放大，检测最终输出  $V_2$  就可获得  $I_m$  的变化情况。

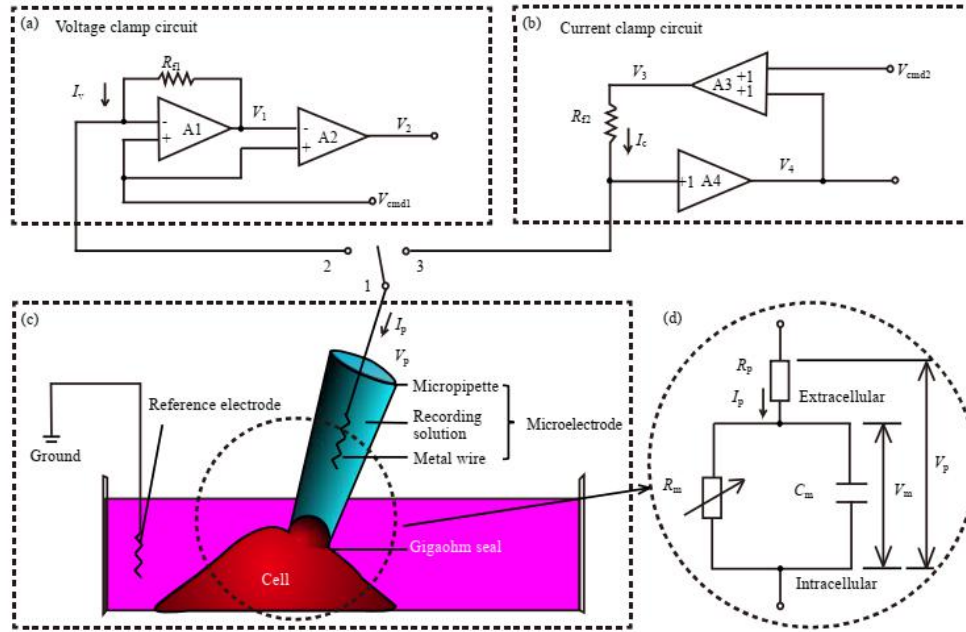


图5 膜片钳技术原理示意图

### 2.3、细胞膜上离子通道的非线性电学性质

离子通道是细胞膜上一种成孔蛋白，它由细胞产生的特殊蛋白质构成，这些蛋白质聚集起来并镶嵌在细胞膜上，中间形成水分子占据的孔隙，这些孔隙就是各种无机离子等水溶性物质快速进出细胞的通道。离子通道的开放和关闭，称为门控。每种通道都对一种或几种离子有较高的通透能力，而对其他离子的通透性很小或不通透，这种性质称为选择通透性，按照离子通道的选择通透性可以将离子通道分为钾离子通道、钠离子通道、钙离子通道、氯离子通道等。

离子通道能够选择性地让某一种特定的离子通过通道，从而形成通道电流，从电学功能来讲离子通道就是一个非线性电阻元件，通道两端的膜电压  $V_m$  和孔道通透的离子电流  $I_m$  可以用我们大家非常熟悉的欧姆定律来描写。

$$I_m \propto g_m (V_m - V_0) \quad (2)$$

其中  $g_m$  为单（或多个）通道的电导， $V_0$  为由于特定离子在细胞膜内外的浓度不同，而产生的电学梯度势， $V_0$  可以利用细胞内外该通道通透的离子浓度来计算。

### 2.4、离子通道门控状态检测

本仿真实验以离子通道开关过程中电流变化为依托，采用全细胞模式及内向外模式选择  $-80\text{mV}$  到  $+80\text{mV}$  的阶跃电压记录通道电流，分别测定在无钙外液、 $600\text{nM}$  钙离子外液、离子通道抑制剂这三种情况下的离子通道电流。通过记录 TMEM16A 通道抑制剂处理前后该通道电流变化，完成 TMEM16A 氯离子通道门控状态检测，为进行靶向 TMEM16A 调节剂的确定提供数据支持。

实验步骤

### 1、基于激光共聚焦显微镜的细胞膜离子通道物理性质表征实验

实验步骤:

- (1) 打开空调, 四季均为制冷模式, 维持室内温度为 25℃, 并查看设备;
- (2) 按顺序打开开关, 根据操作说明逐步打开仪器;
- (3) 向后推动显微镜上部后, 把样品培养板放入样品槽中, 对准需要观测的样品孔;
- (4) 打开仪器左下方照明开关, 在显微镜明场下, 鼠标左键点击显微镜调焦螺旋, 将界面左边显微镜视场中的值调为“0”, 在显微镜下聚焦到细胞上, 点击确定调焦;
- (5) 荧光类型列表将展示多种荧光类型, 选择 YFP 荧光类型, 将倒数第三个颜色调至最大, 点击“save”, 选择操作面板中的“live”。在荧光场中, 为了更加清晰地看到转染荧光的样品, 需继续调节焦距使荧光清晰, 并前后左右调节载物台使视野中细胞处于合适位置, 点击“确定位置”;
- (6) 调节焦距使荧光清晰, 并前后左右调节载物台使视野中细胞处于合适位置(-200 到-270);
- (7) 选择 XYt 的记录模式, 设置照片质量和个数, 点击“start”, 开始记录荧光变化, 并等待 30s;
- (8) 向样本中加入离子通道 GRb1 调节剂, 并观察荧光变化;
- (9) 点击圆圈按钮, 选择不同的细胞, 分析荧光随时间的变化, 并作图;
- (10) 重复步骤 6—9, 完成三种情况下的实验;
- (11) 开机至少一个小时方可关机; 将物镜调至 10+, 并调至最低; 根据操作说明逐步关闭仪器;
- (12) 收拾实验台;
- (13) 关闭空调, 退出系统, 结束实验。

### 2、基于膜片钳系统的细胞膜离子通道物理性质表征实验

- (1) 从拉制仪中取出制作好的玻璃电极; 从培养箱中取出细胞爬片, 将含有不同调节剂的细胞外液灌注在灌流系统中;
- (2) 根据闪烁框提示依次打开电脑、显微镜、显示器、微操作器、放大器开关, 最后打开软件;
- (3) 将细胞爬片放置在浴槽当中, 调节显微镜粗准焦螺旋和细准准焦螺旋, 在显微镜下聚焦到细胞上;
- (4) 将电极中注入电极内液, 轻弹后甩几下以祛除气泡;
- (5) 通过注射器给电极一定的正压, 使用微操作器将玻璃微电极进入浴液, 点击“SET\_UP”按钮, 观测电极电阻是否处于 1~3MΩ, 若不处于此区间则更换电极并重复此步, 若电阻值正确则进行后续操作;
- (6) 调节微操作器使电极尖端向待测细胞接近, 当电极尖端接触并轻轻压紧细胞, 释放正压, 点击“SET\_UP”按钮, 进入下一步;
- (7) 加大微电极内的负压将细胞膜吸破, 此时可见时间常数较大的全细胞电容电流的出现, 以及方波电流的轻微加大;
- (8) 点击“WHOLE CELL”, 调节全细胞膜电容补偿模块中的 Cm 和 Rs 进行膜电容电流的补偿, 使输出电流信号中细胞膜电容电流成分消失。
- (9) 选择-80mV 到+80mV 的阶跃电压记录通道电流, 分别测定在无钙外液、600nM

	<p>钙离子外液、抑制剂这三种情况下的离子通道电流，统计离子通道的电流特性（慢激活、电压依赖性及外向整流特性），并绘图保存；</p> <p>(10) 操纵微操作器，使电极快速离开细胞，但不能离开液面，此时观察封接电阻变化，若电阻大于 <math>1G\Omega</math>，继续下一步；若电阻低于 <math>1G\Omega</math>，应弃掉电极，重新测定；</p> <p>(11) 选择 <math>-80mV</math> 到 <math>+80mV</math> 的阶跃电压记录通道电流，分别测定在<b>无钙外液、600nM 钙离子外液、抑制剂</b>这三种情况下的离子通道电流，统计离子通道的电流特性（慢激活、电压依赖性及外向整流特性），并绘图保存；</p> <p>(12) 点击 “In Out”，重复执行步骤 8—11；</p> <p>(13) 根据操作说明依次关闭仪器；</p> <p>(14) 将试验台收拾整洁，退出系统，结束实验。</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">数据记录</p>	<p>1.激光共聚焦显微镜实验的测量结果：</p> <p>三种情况下荧光强度随时间的变化</p> <p>2. 膜片钳实验的测量结果</p> <p>1) 膜片钳系统的阶跃电压取 <math>-80mV\sim+80mV</math> 时 I - t 曲线：</p> <p>① 全细胞模式无钙外液</p> <p>② 全细胞模式 600nM 钙离子外液</p> <p>③ 全细胞模式离子通道抑制剂</p> <p>④ 内向外模式无钙外液</p> <p>⑤ 内向外模式 600nM 钙离子外液</p> <p>⑥ 内向外模式离子通道抑制剂</p> <p>2) 不同情况下阶跃电压 <math>-80mV\sim+80mV</math> 时的 I-V 曲线：</p> <p>① 全细胞模式</p> <p>② 内向外模式</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">实验总结</p>	

分析与讨论

1. 荧光的发射波长比激发波长大还是小？为什么？
2. 什么是荧光探针？你知道哪些荧光探针？
3. 激光共聚焦显微镜如何实现对样品某一层的荧光信息进行扫描？
4. 膜片钳技术有哪些特点？有几种细胞电流记录方式？
5. 离子通道具有哪些特点？离子通道对离子的通透是否具有整流性？
6. 通过仿真实验，你有何收获？你希望该仿真实验系统在哪些方面进行改进或完善？