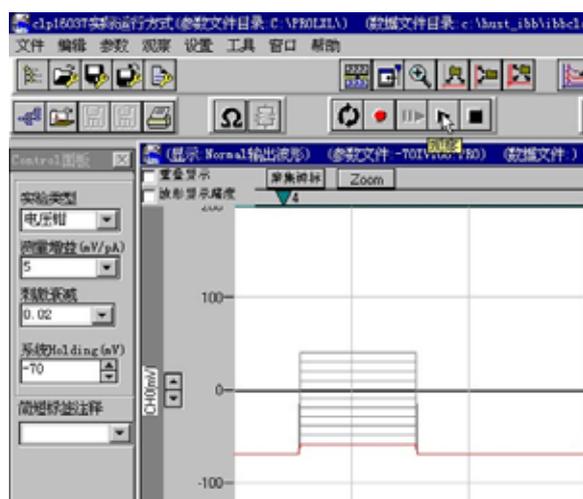


## PC2C 应用程序入门



### 华中科大仪博生命科学仪器有限公司

地址：武汉市洪山区珞瑜路 1137 号华中科技大学内

邮政编码：430074

电话：027-87548911 027-87464502

传真：027-87548911

网址：<http://www.yibo.cn>

Email: [inbio@inbio.com.cn](mailto:inbio@inbio.com.cn)

Rev.1

## 目录

<b>1 安装</b> .....	<b>1</b>
1.1 安装 PC2C 软件.....	1
1.2 连接 PC2C 信号电缆.....	2
1.3 进入 IBCLAMP 程序.....	2
1.4 系统软件功能测试.....	3
<b>2 膜片钳实验软件应用入门</b> .....	<b>6</b>
2.1 单通道记录.....	6
2.2 全细胞记录.....	8
2.3 漏电流减除.....	10

## 1 安装

### 1.1 安装 PC2C 软件

1. 关闭计算机，打开机箱，将 ACL-8312 卡安装于空闲的 EISA 插槽内。

2. 打开计算机，将光盘插入光驱，找到并执行 setup.exe 程序，安装 IBBCLAMP 软件，它会自动设置硬件接口卡的中断请求号(IRQ)和 I/O 地址。

注意：安装时，请在“控制面板”中的“系统选项”中，先点击“设备管理器”，然后选择“属性”，再选择“查看资源”，检查计算机的中断请求 5 和 I/O 地址 220 是否为空闲，参见图 1.1 和图 1.2。它们是 ACL-8312 接口卡在计算机中所占资源，如果被其他硬件占用，则 IBBCLAMP 软件不能够正常工作。解决办法是请将相应的硬件移到别的中断端口和地址去，并用“保留资源”的命令将这两个资源保留起来，参见图 1.3。



图 1.1

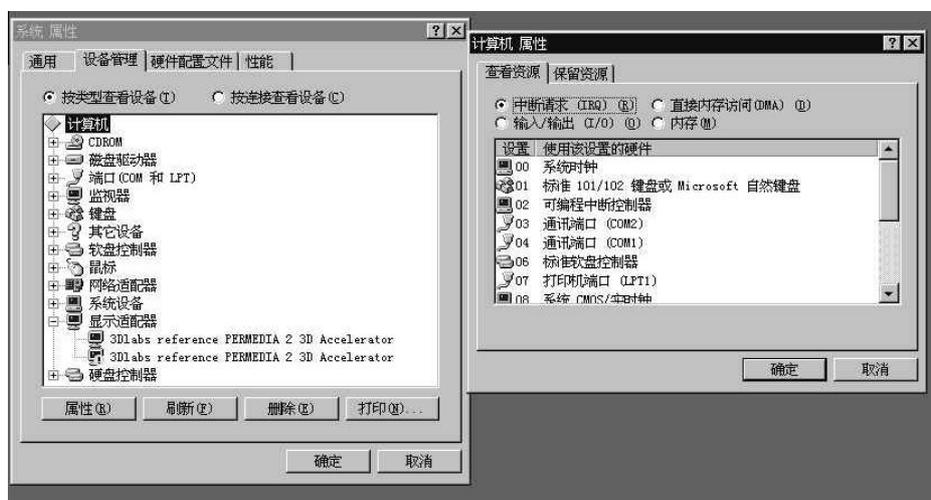


图 1.2



图 1.3

### 1.2 连接 PC2C 信号电缆

在电源关闭的条件下，将附带的连接电缆 37 线插头一端接计算机中的接口卡，另一端带红色标记的 Q9 插头接 PC2C 的 CURRENT MONITOR 插座，带黄色标记的 Q9 插头接 VOLTAGE MONITOR 插座，不带标记的 Q9 插头接 STIM. IN 插座。

### 1.3 进入 IBBCLAMP 程序

将 PC2C 放大器主机连接 220V 交流电源。打开电源开关，从程序组中执行 IBBCLAMP，如果硬件接口卡安装正确，则会弹出对话框，如图 1.4 所示。



图 1.4

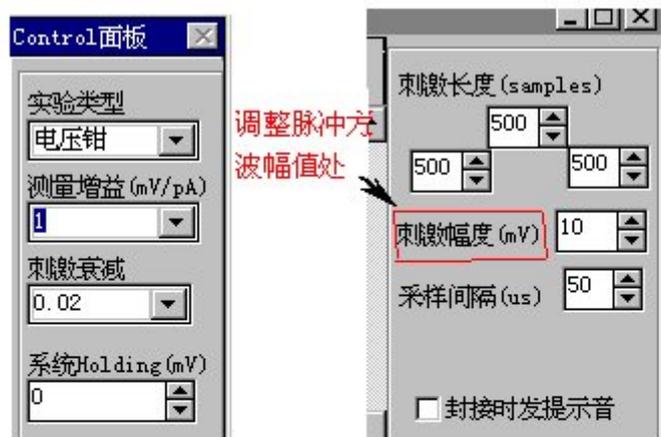
如果接口卡或程序安装不正确，则会弹出对话框如图 1.5 所示。这时，请按 1.1 节“注意”所述修改硬件资源。



图 1.5

### 1.4 系统软件功能测试

1. 进入 IBCLAMP 程序后，将屏幕上 Control 面板中的实验类型选定为“电压钳”，测量增益选定为 1mV/pA，刺激衰减选定为 0.02，系统 holding 选择为 0mV。同时将 PC2C 面板上的模式选择拨向 VC，GAIN 设定为 1mV/pA，STIMULUS SCALING 设定为 0.02，HOLDING COMMAND 设为 0mV。用鼠标按下屏幕上的封接测试( $\Omega$  的符号)的按钮，软件将给予 +5mV 或+10mV 的电压(可以自由调整)刺激信号。



Control 面板上的参数请与 PC2C 主机前面板的相应参数对应  
 电压钳=VC  
 测量增益=GAIN  
 刺激衰减= STIMULUS SCALING  
 系统 holding 控制探头的钳位电压，可以通过数字显示表显示出来

图 1.6

**注意：**调节屏幕上控制面板中的各项选择时，必须与 PC2C 面板的控制旋钮和开关一起联动调整，否则记录的信号也会发生错误。

2. 将探头与细胞模型电路通过一个 Q9 plug to plug 适配器连接，并将 1mm 插头插入探头的 GND 插孔。

**注意：**避免直接接触探头的输入端，因为静电可能会损害探头的输入电路。如果必须接触探头(例如插入玻璃微电极到电极加持器时)，请首先接触接地良好的金属表面来消除操作者本身所带的静电。在气候非常干燥的地区，最好戴一枚接地镯。

细胞模型的电路如图 1.7 所示。

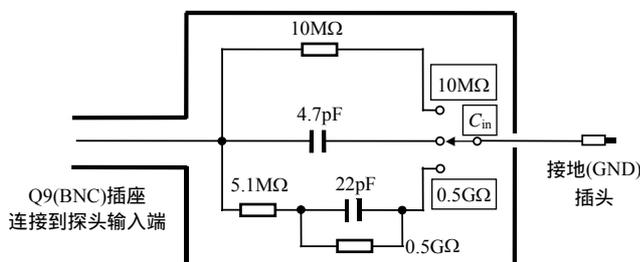


图 1.7

细胞模型的开关有三档，分为 10MΩ、 $C_{in}$ 和 0.5GΩ。

3. 将细胞模型的开关拨到 10MΩ档时，电路模拟电极进入浴池溶液时情况。在 SEARCH 方式下，可以检验电流的自动归零操作；在 VC 条件下，调节 PIPETTE OFFSET，使电流回到基线，这时可以观察到方波电流信号，如图 1.8 所示。

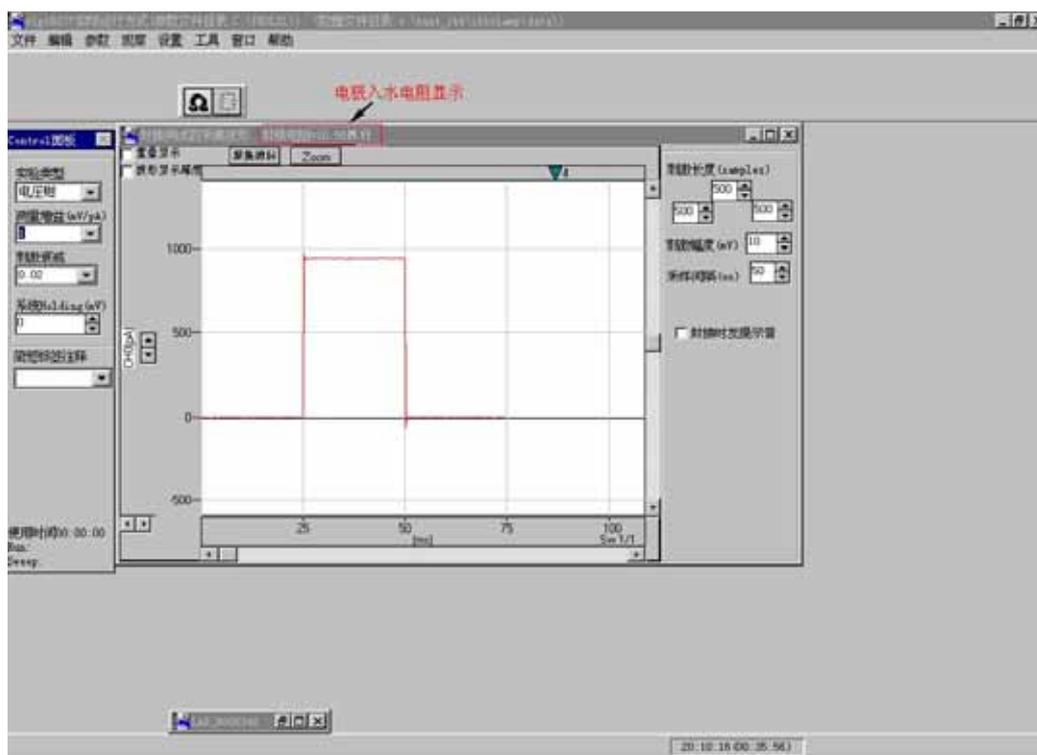


图 1.8

4. 当开关的位置位于 $C_{in}$ 时，细胞模型电路内接  $4.7\text{pF}$  电容，此时电路模拟了 $G\Omega$ （吉欧）封接的情况，出现电容性尖峰电流。将PC2C主机面板上的GAIN调整为  $100\text{mV/pA}$ ，同时将IBBCLAMP软件的Control面板上的测量增益部分也相应调整到  $100\text{mV/pA}$  的位置。仔细调节C-FAST可消除刺激脉冲引起的电容性尖峰电流，此时C-FAST的补偿值应该位于  $7\text{pF}$  附近，参见图 1.9。补偿电容之所以比实际内接电容大，是因为电路中存在着分布电容。

**注意：**由于内部开关较差的介电特性，模型电路会产生高于实际吉欧封接情况下的随机噪声。

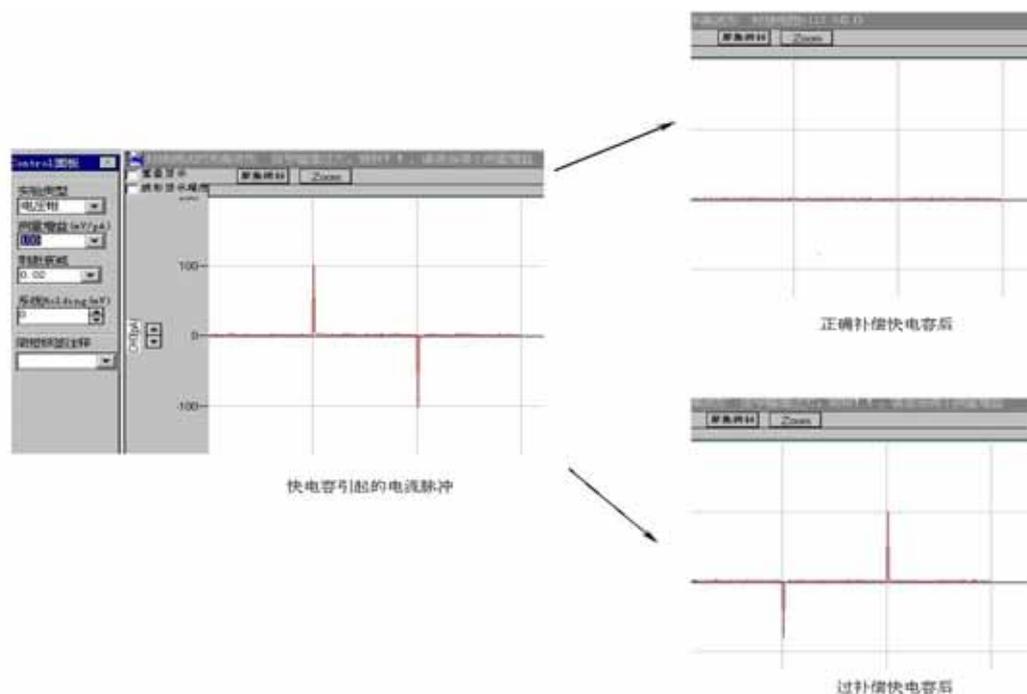


图 1.9

5. 将 PC2C 和屏幕控制面板相应的测量增益部分调整到 1mV/pA 的位置。PC2C 探头内接 0.5GΩ 测量电阻, 此时模拟吸破后形成全细胞模式时的状态, 出现了较大的电容性冲放电电流尖峰。调整仪器面板上的 C-SLOW 和 G-SERIES, 将电流尖峰降至最低, 并可以读出慢电容和串联电阻值 (C-SLOW 为 22pF 左右, G-SERIES 为 0.2μS 左右)。在 CC+COMM 方式下可以进行电流钳操作。注意, 这个“细胞模型”有一个较长的“膜时间常数”(大约 10ms)。

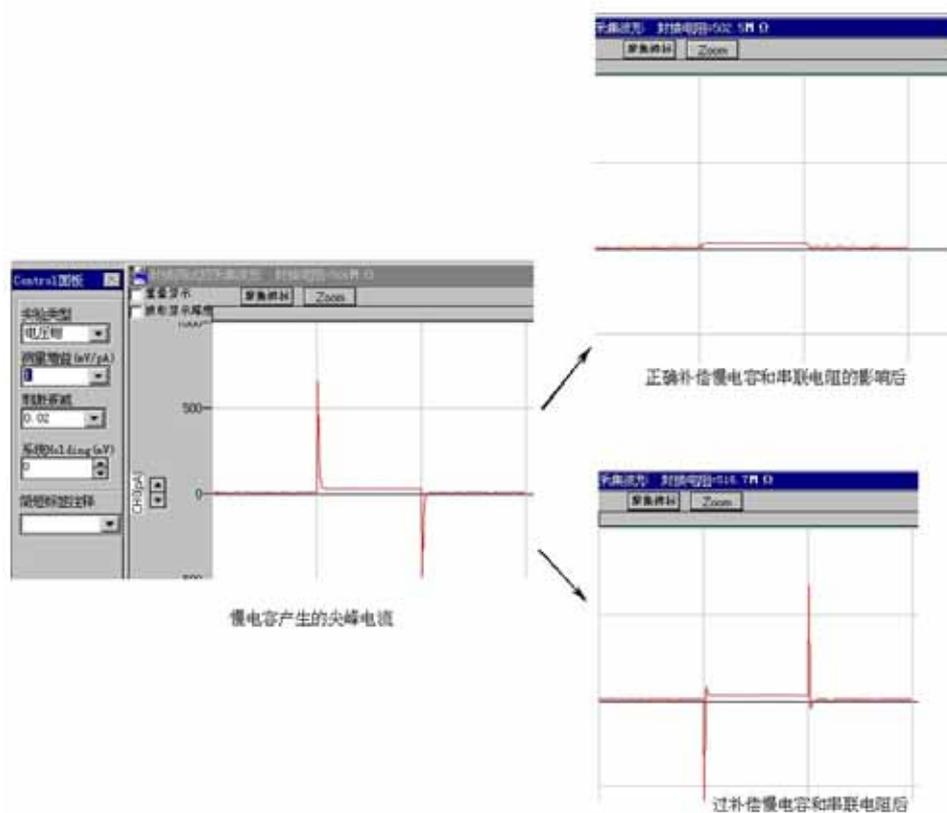


图 1.10

经过上述测试后, 即可以证明所装入的软件工作正常, 且该 PC2C 膜片钳放大器主机也工作正常, 可以完成封接、快慢电容补偿等一系列的实验。

## 2 膜片钳实验软件应用入门

膜片钳实验步骤和方法在 PC2C 膜片钳放大器使用手册中已有较详细的介绍,本章着重讨论膜片钳实验中应用 IBBCLAMP 软件用计算机记录数据的方法。

### 2.1 单通道记录

IBBCLAMP 软件记录时,所有的数据以.abf 的文件格式存储在硬盘上(.abf 的格式即是 Axon Binary Format, Axon 公司的膜片钳数据格式)。

单通道记录时,常常使用的记录模式是 Gap-Free Mode (无间隙模式),如图 2.3 所示。该模式为被动模式,被动地记录数据或被动地等待触发事件引起记录,适合于记录单通道膜片钳数据或联合检测数据,在整个时间段上有统一的记录行为。此模式类似于磁带记录仪,进行连续采集数据,且所有数据均显示在屏幕上。如果需要存盘,则所有数据均存盘,用户只需指定采样率和记录长度。图 2.1 到 2.5 显示了单通道记录的完整过程。概括起来有如下几个步骤:

1. 新建一个参数文件;
2. 编辑参数文件;
3. 选择 Gap-free mode 记录方式;
4. 按下“观察”按钮“▶”,记录单通道电流;
5. 记录结束时,按下“停止”按钮;
6. 保存数据文件。



图 2.1 新建一个参数文件



图 2.2 编辑参数文件

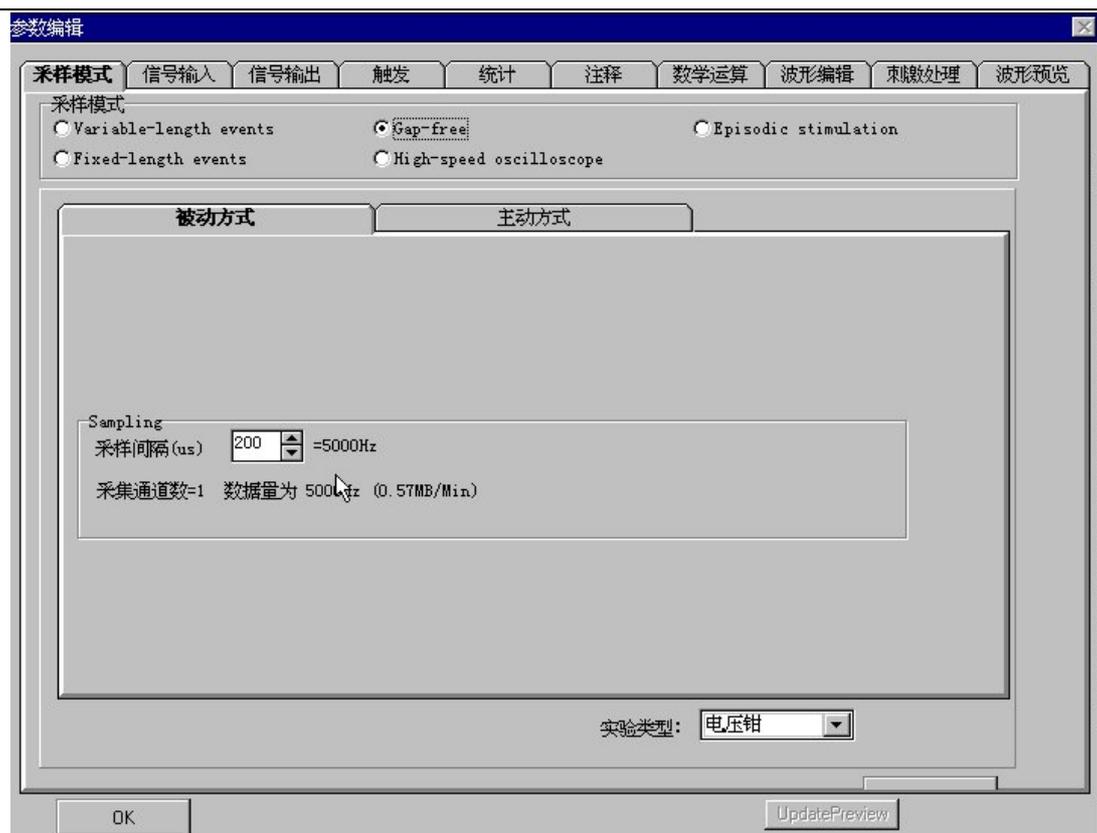


图 2.3 选择 Gap-free mode 记录方式

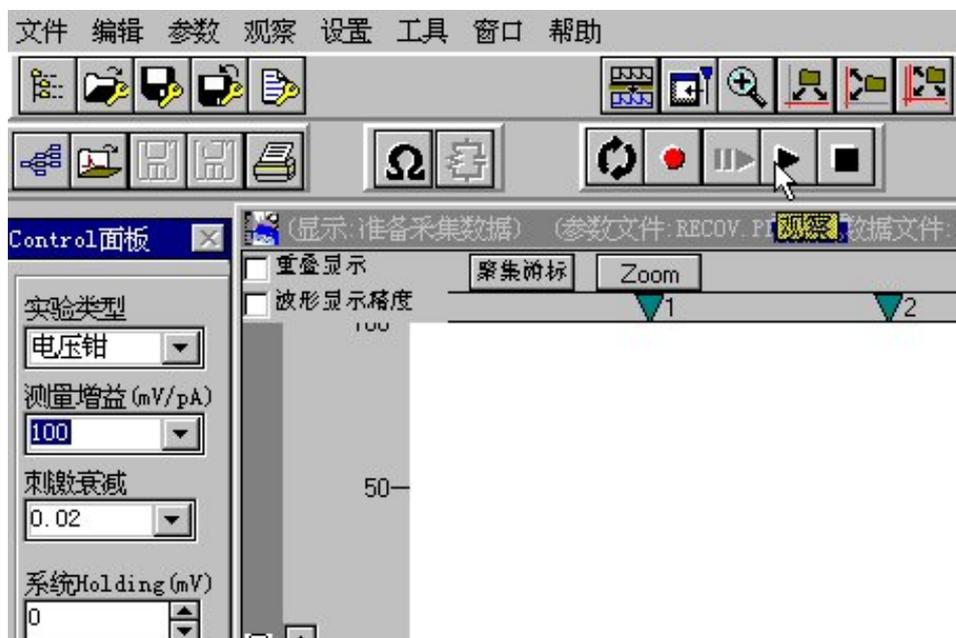


图 2.4 按下“观察”按钮“▶”，记录膜片保持电位为 0mV 的单通道电流；  
当记录结束时，按下“停止”按钮”



图 2.5 用菜单上的命令保存数据文件

## 2.2 全细胞记录

全细胞记录时，常常使用的记录模式是 Episodic Stimulation Mode ( 间断刺激模式 )，如图 2.6 所示。该模式为主动模式，使用它可以给实验提供刺激，同时以固定长度段 (sweeps) 显示和记录细胞对刺激的响应。典型应用为全细胞电流/电压响应测量，程序设置和记录过程如图 2.6~2.9 所示。主要过程如下。

1. 在“采样模式”栏中点击“Episodic Stimulation”，以选择 Episodic Stimulation Mode 记录方式，见图 2.6。



图 2.6 选择 Episodic Stimulation Mode 记录方式

2. 在“波形编辑”栏中编辑刺激波形，见图 2.7。该图数据显示为一典型的全细胞记录

刺激波形的编辑结果，可产生通道电流的 I-V 曲线。其中，细胞内的保持电位为-70mV。刺激电压脉冲从 -60mV 开始，以 10mV 递增，直到+40mV，刺激时间为 100ms。

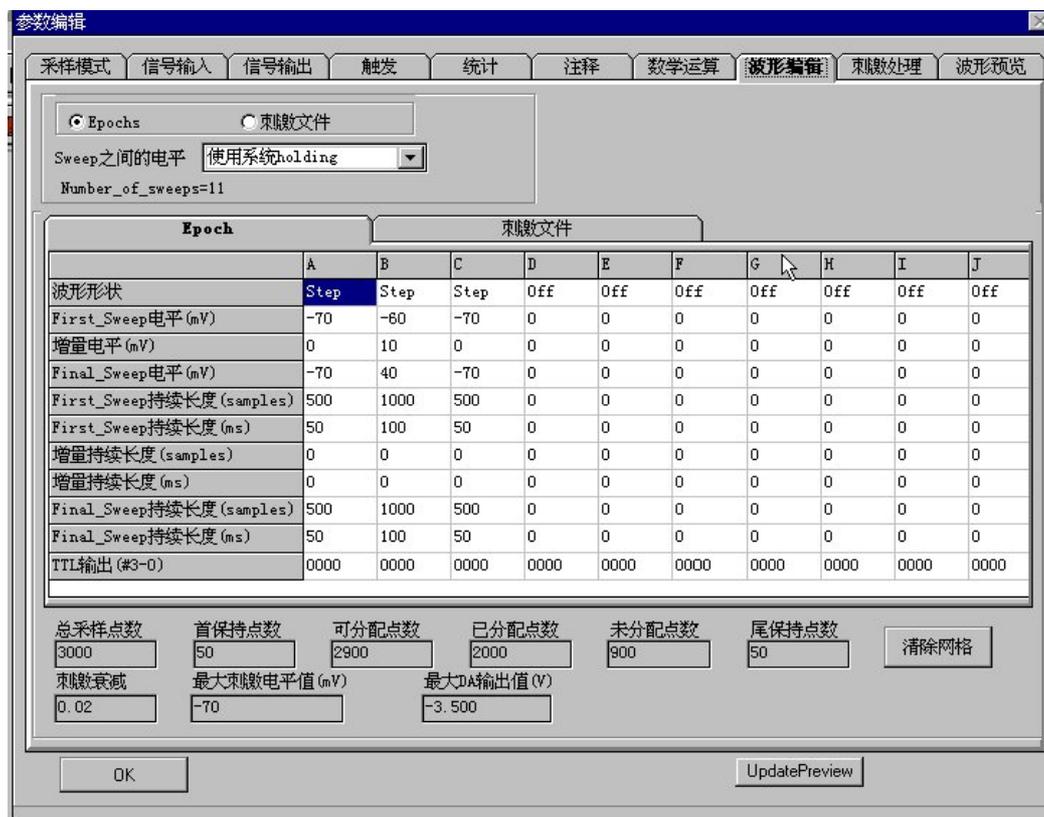


图 2.7 编辑刺激波形

3. 在“刺激处理”栏设置 P/n 算法，消除漏电流和电容性电流伪迹，见图 2.8。有关 P/n 算法的论述请参见“Single-Channel Recording(2nd ed. ,B. Sakmann & E. Neher, eds.)”pp76~77 和有关论文 (Armstrong & Bezanilla, 1974) 及 2.3 节的简要说明。



图 2.8 选择 P/n 算法消除漏电流和电容性电流伪迹

4. 进入记录的界面，预览刺激波形，如图 2.9 所示。

5. 按 PC2C 使用手册所述，开始全细胞膜片钳实验，数据记录、存储等操作与 2.1 节中单通道记录相同。

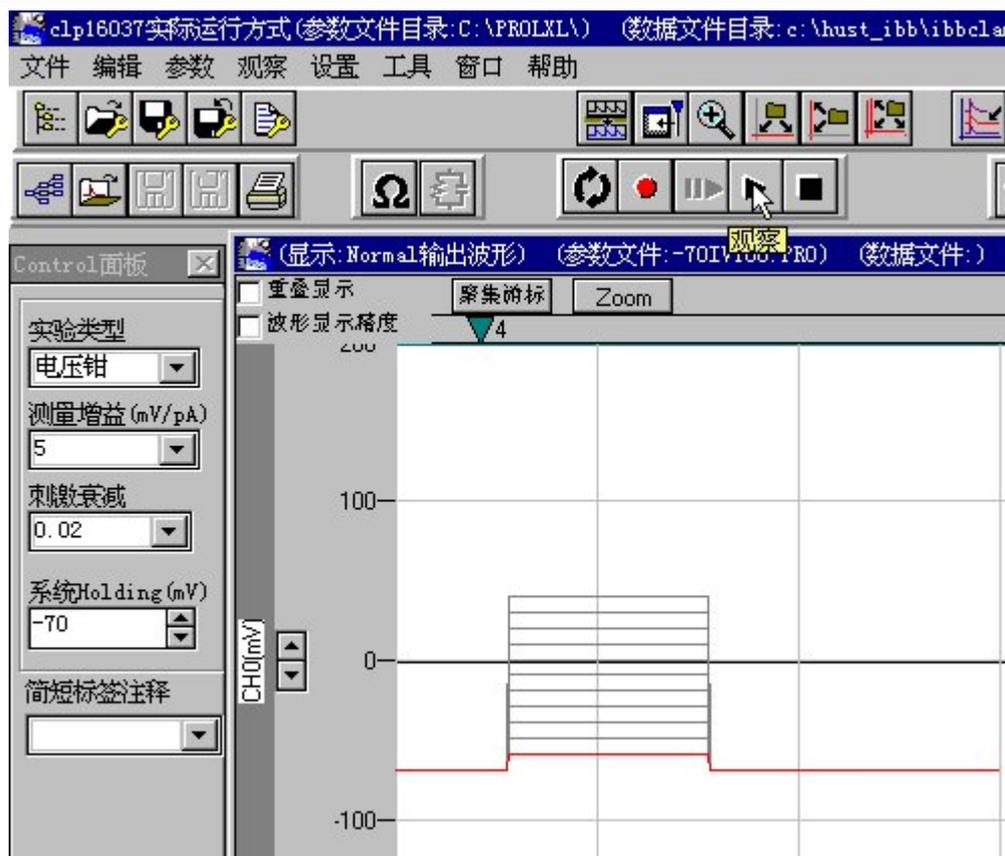


图 2.9 进入记录界面预览刺激波形

### 2.3 漏电流减除

全细胞膜片钳实验记录中总会存在或大或小的漏电流,这时记录到的电流波形实际为通道电流与漏电流的迭加。只要它不超过一定限度且维持稳定,便可用漏电流减除法(Leak Substraction)来消除。它的基本思路如下:细胞膜电位处于超极化状态时,所有的离子通道都处于关闭状态;利用这一特性,在正常的刺激脉冲之前或其后,施加一系列在超极化电平之内的小幅度脉冲对漏电流进行检测,然后在数据处理时,将漏电流从正常刺激所产生的膜电流中减除。这种方法不但可以消除膜电导漏电流,而且还可以消除快、慢电容未完全补偿的部分,习惯上将其称为P/n法。图2.10是在正常刺激脉冲P之前加入漏电流测试脉冲P<sub>1</sub>~P<sub>4</sub>的实际波形,图中,所有脉冲的宽度都是相等的。

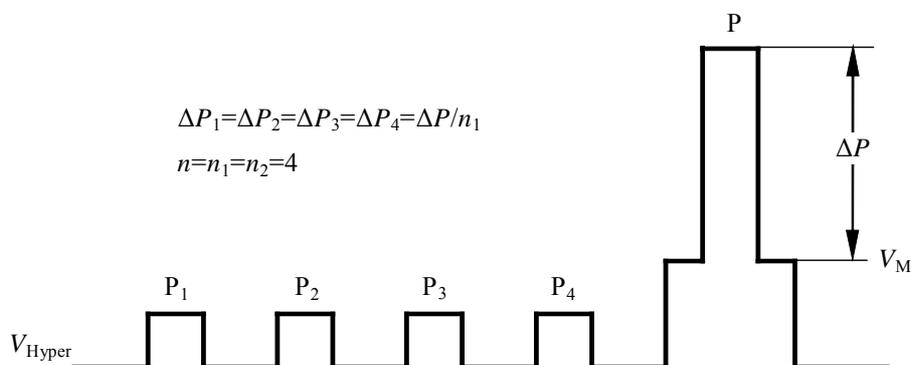


图2.10 应用P/n法的刺激波形

当不考虑膜通道电流时，全细胞构型的等效电路为线性无源网络。幅度为 $\Delta P$ 的刺激脉冲产生的变化电流 $\Delta I_p$ 与 $n_2$ 个幅度均为 $\Delta P/n_1$ 的脉冲产生的变化电流 $\Delta I_{P_i}$  ( $i = 1, \dots, n_2$ ) 满足线性关系，即

$$\Delta I_{P_i} = \frac{\Delta I_p}{n_1}$$

若考虑膜通道电流，施加刺激脉冲 $P$ 所产生的电流变化 $\Delta I'_p$  为通道电流 $I_{ch}$ 和漏电流变化 $\Delta I_{Leak}$ 之和，而 $\Delta I_{Leak}$ 应当等于 $\Delta I_p$ ，即

$$\Delta I'_p = I_{ch} + \Delta I_{Leak}$$

$$\Delta I_{Leak} = \Delta I_p$$

若将 $n_2$ 次测试漏电流求和，则

$$\Delta I_{sum} = \sum_{i=1}^{n_2} \Delta I_{P_i} = \frac{n_2}{n_1} \Delta I_p = \frac{n_2}{n_1} \Delta I_{Leak}$$

于是得到

$$I_{ch} = \Delta I'_p - \Delta I_{Leak} = \Delta I'_p - \frac{n_1}{n_2} \Delta I_{sum}$$

为了简化计算，一般取 $n = n_1 = n_2$ 。实验中，在正式刺激脉冲到来之前或之后，将膜电位钳制在使细胞膜超级化的电平 $V_{hyper}$ 上。 $V_{hyper}$ 与 $n$ 要满足当膜电位为 $(V_{hyper} + \Delta P/n)$ 时没有任何离子通道被激活的条件。根据正式刺激脉冲的幅值 $\Delta P$ ，以 $V_{hyper}$ 为基线施加 $n$ 次幅值为 $\Delta P/n$ 的脉冲电压，然后测量计算出 $\Delta I_{sum}$ 。从正式刺激时记录到的电流 $\Delta I'_p$ 中减去 $\Delta I_{sum}$ 即可得到真正的离子通道电流分量。由于 $\Delta I_{sum}$ 是 $P_1 \sim P_n$ 各脉冲持续时间内各相应记录电流采样点的分别求和，所以得到的是一段 $\Delta I_{sum}$ 电流曲线，当然也包含由于膜电容产生的漏电流。只要正式刺激脉冲 $\Delta P$ 产生的记录电流 $\Delta I'_p$ 保持在放大器的线性范围内，任何漏电流伪差都可用 $P/n$ 法消除，包括膜电容充电的伪差电流。这里，PC2C膜片钳放大器中的快、慢电容补偿操作仍是必不可少的，它可以避免因强大的瞬态充电电流使放大器进入非线性状态，从而保证“事后” $P/n$ 法补偿的线性要求。同时也可以看出，实验中采用 $P/n$ 法，如果不考虑串联电阻补偿的稳定性，对快、慢电容的补偿可作不太严格的要求，只要将测量电流信号调整到线性放大范围内即可，标志是记录过程中PC2C面板上的过载指示灯(OVERLOAD)始终保持熄灭状态，该指示灯一旦发光，应用 $P/n$ 法就有可能得到错误的结果。

IBBCLAMP软件已具备 $P/n$ 法漏电流减除功能，其设置如图2.8所示。用鼠标点击“刺激处理”菜单中的 $P/N$  leak subtraction方框，方框中出现“√”号即激活此项功能。菜单中的各项参数是：

sub-sweep holding level 为 $V_{hyper}$ 设置；

number of sub-sweep 确定 $P/n$ 算法中 $n$ 的取值，即测试脉冲 $\Delta P/n$ 的个数。

Execution(before/after) 确定测试脉冲 $\Delta P/n$ 施加在正式刺激之前还是之后；

Polarity 表示施加的测试脉冲 $\Delta P/n$ 的电压变化方向是与正式刺激脉冲的电压变化方向相同还是相反。

一次实验完成后，立即选择“观察”菜单下“ $P/N$ 修正后的采集波形”的选项，可以看到用 $P/n$ 算法去除漏电流后的电流信号。

**注意：**一般记录时，仅仅保存未经 $P/n$ 处理的电流记录。如果想要保存经 $P/n$ 处理后的

记录，请先选择“观察”菜单下的“PN 修正后的采集波形”的选项，看到用 P/n 算法去除漏电流的信号后，再用“自动命名保存 ABF 数据文件”或是“用户命名保存 ABF 数据文件”的命令来保存 P/n 处理后的数据文件。