

PC2C 膜片钳放大器 使用手册



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

Rev.1

目 录

1 简介	1
2 探头和主机面板	2
2.1 探头	2
2.2 主机面板	2
2.2.1 主机前面板	3
2.2.2 主机后面板	6
3 安装	7
3.1 初始检查	7
3.1.1 检查包装内的部件	7
3.1.2 初始测试	7
3.2 膜片钳实验系统的安装	9
3.2.1 安装探头	9
3.2.2 接地	9
3.2.3 连接其他仪器设备	10
3.2.4 电极夹持器和电极银丝的处理	11
3.2.5 浴池参考电极	12
4 工作模式	13
4.1 电压钳模式 (VC)	13
4.2 电流钳模式 (CC 和 CC+COMM)	13
4.3 测试模式 (TEST)	14
4.4 搜索模式 (SEARCH)	15
5 实验中的参数补偿	16
5.1 快电容补偿	16
5.2 慢电容补偿	17
5.3 串连电阻补偿	18
5.4 电极电位偏移补偿	20
6 膜片钳实验	22
6.1 玻璃微电极的拉制、抛光和充灌溶液	22
6.2 形成封接	22
6.2.1 系统的初始设置	22
6.2.2 电极进入浴池	23
6.2.3 GΩ 封接的形成	23
6.3 细胞贴附式记录	23
6.4 全细胞记录	24
6.5 电流钳记录	26
7 主要技术参数	28
附录 A 玻璃微电极的制备	29
附录 B 噪声分析	31
参考文献	33
保修和维修	35
请与我们联系	35

1 简介

1976年,德国人 Erwin Neher 和 Bert Sakman 首次在蛙胸皮肌细胞膜上记录到 AchR 单通道电流,其分辨率高达 pA 级,从而使得电生理研究从细胞水平进入了分子水平。1981年,Neher 等继而发明了 GΩ (吉欧)封接技术,使得记录背景噪声降低了一个数量级。同年,Hamill 等发表了有关膜片钳改进技术的论文,这标志着离子通道记录技术的成熟。上世纪 80 年代以来,膜片钳记录方法取得了显著的进步,一些商品化的膜片钳放大器出现在市场上。

PC2C 是华中科大仪博生命科学仪器有限公司最新开发的膜片钳放大器(电阻反馈放大器),是华中科技大学生物物理与生物化学研究所以前研制的几种膜片钳放大器的改进型。

作为第二代膜片钳放大器,它突出的技术优点在于切实考虑到膜片钳实验的要求,探头内部运用自举技术和超低漏电流的电子开关对 50GΩ 和 0.5GΩ 反馈电阻进行切换(专利申请号:02279113.2),可以通过面板开关控制,自动设置为单通道记录状态和全细胞记录状态。

对于较大的细胞,由于其膜电容和通道电流较大,从而产生空间钳位的问题。设计中扩展了电路钳位的能力,将慢电容补偿扩展到 1000pF,同时选择 20nA 作为测量最大通道电流的上限,这是在串联电阻补偿条件下,不导致严重电压钳位误差所允许的最大电流。

仪器中包含一个自动稳零积分电路,在 TEST 工作模式下,实验者可以从 STIM. IN 输入端(刺激信号输入端)加入任意一种测试信号 脉冲波形、正弦波形或其他信号,经内部电路变换,向探头注入与输入信号同样波形、幅值成比例的校准电流。这样,可使整机频率响应的校准和评价变得很容易。

仪器面板上设计了 HOLDING COMMAND (保持命令)控制区,用户可以通过开关直接向微电极给出阶跃命令电压(STEP COMMAND),命令电压值可以为-100mV、-80mV、-50mV、-20mV、-10mV、0、+10mV、+20mV、+50mV、+80mV、+100mV。保持电位亦可通过十圈电位器在±200mV 范围内连续、精确地调整(刻度旋钮指示 5.00 对应 0mV,0.00 对应-200mV,10.00 对应+200mV),并可通过面板上的电压表直接读出 mV 数。

仪器特别设计了 ZAP 功能,以便于实现全细胞构型实验的电穿孔。穿孔电压固定为 1.2V,而穿孔时间可根据要求调整十圈电位器来设定,范围在 10μs 至 10ms 之间选择,电位器每圈对应变化 1ms,从刻度旋钮上可直接读出时间值。

仪器在放大器末端输出前设计有可调带宽 4 阶 Bessel 低通滤波器,用户可根据所需要的信号带宽设置为 1kHz、2kHz、5kHz、10kHz、100kHz,以滤去信号带宽之外的噪声。

膜片钳放大器是一种测量微弱电流的精密仪器,只有熟练掌握仪器的操作方法和必要的实验技巧才能够完全发挥仪器的功能。这本手册希望达到两方面目的:一方面是介绍本仪器的电路原理和操作,另一方面则提供必要的实验操作技巧的引导,以便用户能够更快地深入到研究工作中去。

2 探头和主机面板

2.1 探头

PC2C 的探头装配在一个小的封闭金属壳体中，探头可根据用户所使用的微操纵器，通过本公司提供的有机玻璃绝缘垫块安装，一般需要在绝缘垫块的适当位置打孔，然后用螺钉固定探头。探头的前端可以直接与本公司提供的电极夹持器扣接，电极夹持器与记录微电极实现电连接，取得膜片钳信号，并将其输入到探头内部的前置放大器。探头内部包括实现电流 - 电压转换的高灵敏度前置放大器，实现 $50\text{G}\Omega/0.5\text{G}\Omega$ 电控切换的电子开关，以及向放大器注入补偿、测试信号的元件。在探头上有以下电连接器：

1. 输入插座 (Input connector): 这是一个聚四氟乙烯 (Teflon) 绝缘的标准 Q9 型 (与国际 BNC 型兼容) 插座，本公司提供的 H1 型电极夹持器 (中国专利号: ZL 01 2 12489.3) 可直接插入该插座。芯线为放大器信号输入线，屏蔽层接命令电压 V_p 。

注意: 应避免手指直接接触探头的输入端芯线，因为人体所带静电可能会损害探头的输入电路。

2. 命令电压输出插座 (REF. Output): 这是一个带有 1mm 内径镀金插孔的红色塑料插座，与命令电压 V_p 相连。该命令电压同时驱动探头的屏蔽外壳。

注意: V_p 信号的输出电阻为 90Ω ，过重的负载 (过小的负载电阻) 会使命令电压衰减过大，也就使电极电压过小。一般不能将此信号接于低于 $10\text{k}\Omega$ 的负载电阻上，否则电极电压将明显低于主机电压表显示的电压值。特别需要注意，探头外壳不能与周边设备 (如: 微操纵器的探头安装平面等) 有电接触，否则 V_p 将会对地短路。

3. 地线插座 (GND connector): 这是一个带有 1mm 内径镀金插孔的黑色塑料插座，与整个放大器高质量的信号地线直接相连。该地线插座可用于连接浴池参考电极接地线和附近装置的屏蔽，这样连接不会形成地线环路，从而避免地线环流对放大信号产生的干扰。第 3 章将对接地有详细说明。

注意: 探头内部及电缆已经良好屏蔽，用户无需再对它做任何其他屏蔽。探头外壳的屏蔽并未与地线相连，而是与命令电压 V_p 相连。

2.2 主机面板

PC2C 的主机中包括电源、信号处理电路和所有的控制电路。所有的校正调整部分均在主机内，包括那些与探头内元件特性相关的校正调整部分。因此，除非经过全面的严格校正，否则不同 PC2C 的主机与探头之间是不能互换的。

主机前面板分为 12 个控制功能区，自左至右分别是：1. 电极电位偏置调整 (PIPETTE OFFSET)，2. 工作模式选择 (MODE)，3. 慢电容补偿 (SLOW CAPACITANCE COMPENSATION)，4. 快电容补偿 (FAST CAPACITANCE COMPENSATION)，5. 串联电阻补偿 (SERIES- RESISTANCE COMPENSATION)，6. 数字电压表显示 ($V_{\text{COMM}}/\text{NOISE}$)，7. 刺激信号定标 (STIMULUS SCALING)，8. 电穿孔 (ZAP)，9. 保持电压控制 (HOLDING COMMAND/ V_{HOLD})，10. 电流输出定标 (SCALED OUTPUT)，11. 贝塞尔低通滤波器带宽选择 (LOW PASS BESSEL FILTER)，12. 电源开关 (POWER)。

主机后面板上自右至左是：1. 探头电缆插座 (PROBE)，2. 信号地线插座 (SIGNAL GND)，3. 电流监测输出插座 (CURRENT MONITOR)，4. 电压监测输出插座 (VOLTAGE MONITOR)，5. 刺激信号输入插座 (STIM. IN)，6. 电源输入插座 (AC 220V)，7. 电源保险丝座 (FUSE 0.5A)。

2.2.1 主机前面板

1. 电极电位偏置调整 (PIPETTE OFFSET):

这是命令电压处理的最后一步,通过电极电位偏置调整,可产生一个偏置电压叠加在命令电压上,以补偿电极偏移电势。电极电位偏置的范围是 $\pm 200\text{mV}$,刻度旋钮上的 5.00 对应于 0mV 偏置,0.00 对应于 -200mV 偏置,10.00 对应于 $+200\text{mV}$ 偏置。

2. 工作模式选择 (MODE):

在第 4 章中将详细描述仪器的各种工作模式,这里只作简单介绍:VC (Voltage Clamp)——电压钳模式,这是最常用的一种工作模式,当用命令信号控制电极电位时,可以记录到通过电极的电流;CC (Current Clamp)——电流钳模式,将电极电流保持在零,测量电极电位(细胞内静息电位);CC+COMM——电流钳加命令模式,将电极电流置为命令信号值状态,测量电极电位;SEARCH——搜索模式,与 VC 模式相似,只是有一个反馈环缓慢地作用于电路,使电极入水后的封接建立过程中,电流信号不漂移出满量程。TEST——测试模式,在该模式下刺激信号输入端 (STIM. IN) 的电压信号转换成电流信号 (100pA/V),并作为测试信号注入探头输入端。

3. 慢电容补偿 (SLOW CAPACITANCE COMPENSATION)

慢电容补偿电路用于全细胞记录时消除因钳位电压突变而产生的较慢速的瞬态电流伪差,这种瞬态电流是细胞膜电容充放电造成的。本手册将在第 5 章中详细讨论其原理和补偿方法。慢电容补偿功能区包括如下 3 个调整旋钮:范围 (RANGE)、慢电容 (C-SLOW)、串联电导 (G-SERIES)。

(1) 范围 (RANGE)

选择由 C-SLOW 和 G-SERIES 旋钮所控制的慢电容补偿范围,分为关闭 (OFF)、 10pF 、 100pF 、 1000pF 四档。当开关置于关闭 (OFF) 状态时,膜电容补偿电路断开,适用于单通道记录或进行快电容补偿;选择 10pF 范围时,用于全细胞记录中补偿不超过 10pF 的膜电容,适用于体积较小的细胞;选择 100pF 范围,用于补偿全细胞记录中不超过 100pF 的膜电容,适用于中等体积的细胞;选择 1000pF 范围,则用于全细胞记录中较大体积细胞的膜电容补偿。

(2) 慢电容 (C-SLOW)

PC2C 用一个十圈电位器来调整慢电容的补偿值,实际补偿值与范围 (RANGE) 的设定相关。当 RANGE 置为 10pF ,且旋钮指示 0.00 时,所补偿的慢电容为 0.1pF ;旋钮指示 1.00 时,补偿量为 1pF ;此后,旋钮顺时针方向每旋转一圈,补偿电容增加 1pF 。设定为其他范围时情况类推:范围为 100pF 时,旋钮指示为每圈 10pF , 1000pF 时为每圈 100pF 。在全细胞记录中,同时调整 G-SERIES 和 C-SLOW 旋钮,直到慢电容伪迹减小到最小,此时在旋钮上可以读出膜电容的值。

(3) 串联电导 (G-SERIES)

调整串联电阻 R_s 补偿值大小的也是一个十圈电位器,它与C-SLOW一起消除电流伪迹。这里,所补偿的串联电阻 R_s 以电阻的倒数——电导来计量,单位为 μS (S:西门子,为电导的国际标准单位, $S=1/\Omega$, $\mu\text{S}=1/\text{M}\Omega$)。十圈电位器旋钮指示的电导值越小,表示补偿的串联电阻值越大。当旋钮置为 0.00 时,所补偿的串联电导值为 $0.01\mu\text{S}$ (相应的串联电阻值为 $100\text{M}\Omega$);置为 1.00 时,电导为 $0.1\mu\text{S}$ (电阻为 $10\text{M}\Omega$);此后,旋钮顺时针方向每旋转一圈,电导值增加 $0.1\mu\text{S}$,所能补偿的最大串联电导为 $1\mu\text{S}$ (最小串联电阻为 $1\text{M}\Omega$)。联调 C-SLOW和G-SERIES旋钮,可把膜电容伪迹减少到最小。这时,从G-SERIES旋钮上可读出串联电导值。

4. 快电容补偿 (FAST CAPACITANCE COMPENSATION)

快电容补偿电路用于消除记录时由于电极电容和其它杂散电容等充放电引起的快速衰

减的瞬态电流。本手册将在第 5 章中讨论其原理及补偿方法。快电容补偿功能区包括以下两个调整旋钮：快电容 (C-FAST) 和滞后 (τ -FAST)。

(1) 快电容 (C-FAST):

调整该旋钮可消除电极和其它杂散电容的充放电电流伪迹。它也是一个十圈电位器控制旋钮，顺时针方向每旋转一圈，补偿电容增加 1pF，其满度补偿值为 10pF。探头输入端悬空时（盖屏蔽罩），补偿值约为 3pF 左右，这是探头输入端引线对地的分布电容。

(2) 滞后 (τ -FAST):

调整 C-FAST 补偿的滞后时间常数，使其与伪迹电流在相位上达到最佳匹配值，从而达到最佳的快电容补偿效果。

5. 串联电阻补偿 (SERIES-RESISTANCE COMPENSATION)

串联电阻 (R_S) 补偿用于消除全细胞记录中，从电极开始到细胞内部区域的导通电阻而引起的膜电位钳位误差，在第 5 章中将详细讨论它的原理和补偿方法。串联电阻补偿功能区包括：串联电阻补偿指示灯 (COMP. ON)，快、慢补偿及关断选择开关 (FAST/OFF/SLOW) 补偿百分比调整旋钮 (%-COMP)。

(1) 补偿指示灯 (COMP. ON)

为一绿色发光二极管，当 R_S 补偿起作用时该发光二极管会亮。

(2) 快、慢补偿及关断选择开关 (FAST/OFF/SLOW)

该开关在 OFF 位置时关断串联电阻补偿电路；其他两个位置接通补偿电路并选择补偿的速度。选择 FAST 时，需要更精细地调整，但能保证最快的电压钳位速度；选择 SLOW 则相反。

(3) 补偿百分比调整旋钮 (%-COMP)

可以控制 R_S 补偿的百分比，最高可达检测值的 90%。

6. 数字电压表显示 ($V_{COMM}/NOISE$)

数字电压表用来显示命令电压或噪声水平，由一个 $V_{COMM}/NOISE$ 选择开关控制显示内容，显示单位固定为 mV。

当开关置于 V_{COMM} 时，在电压钳模式下，数字电压表显示实际命令电压值，即 V_{HOLD} 与输入刺激信号定标后的叠加值。例如， V_{HOLD} 为 -80mV ，STIM. IN 输入为 1000mV ，STIMULUS SCALING 为 $\times 0.02$ 时， $V_{COMM} = -80\text{mV} + 1000\text{mV} \times 0.02 = -60\text{mV}$ ，即显示值。在电流钳模式下，数字电压表显示电极电位而不是命令电流值。数字电压表采样时间在百 ms 量级，其显示值变化较慢，对于快速变化的信号只能检测其平均值。

当开关置于 NOISE 时，数字电压表显示 300Hz 至输出滤波器 (LOW PASS BESSEL FILTER) 设定带宽范围内电流监视输出插座 (CURRENT MONITOR) 输出信号的均方根 (Root Mean Square, RMS) 电压值，最小显示单位为 0.1mV ，当 GAIN 设置在 100mV/pA 时， 0.1mV 等于 1fA (RMS) 输入电流，这个功能可用于检查单通道电流记录的噪声水平。

7. 刺激信号定标 (STIMULUS SCALING)

该开关可选择外部刺激信号的衰减倍率。对输入的刺激信号进行衰减可降低命令电压 (即刺激信号) 中的噪声电平。在电极入水后与细胞封接前，通过施加测试脉冲的方法可测量电极电阻，这时常采用大衰减倍率 (0.02 即 20mV/V) 对测试脉冲进行衰减，以提高电阻测量的准确性。

8. 电穿孔 (ZAP)

当电极与细胞形成 $G\Omega$ 封接之后，欲构成全细胞膜片钳测量模式时，可用本仪器提供的电穿孔功能对细胞膜穿孔。穿孔脉冲电压固定为 1.2V ，而穿孔脉冲的延续时间可根据要求在 $10\mu\text{s}$ 至 10ms 之间任意设置。

(1) 时间设置电位器 (TIME)

穿孔脉冲的延续时间是通过调整十圈电位器设置的，电位器每圈对应变化 1ms，从刻度旋钮可直接读出穿孔脉冲延续时间值。应用时应首先设定穿孔脉冲的延续时间。

(2) 脉冲产生按钮 (PULSE)

按下脉冲产生 (PULSE) 按钮，在电极上立即产生幅值为 1.2V，延续时间为设定值的电脉冲。这时可同时施加刺激脉冲信号，如果输出产生较慢速的瞬态电流，则说明穿孔成功，可以进行全细胞膜片钳实验；如果输出没有变化，则说明穿孔脉冲延续时间不足，需要适当调整十圈电位器延长脉冲延续时间，再次进行电穿孔操作。

9. 保持电压控制 (HOLDING COMMAND/ V_{HOLD})

保持电压控制功能区可使一个稳定的直流电压叠加于外部刺激信号(由 STIM. IN 输入，STIMULUS SCALING 控制衰减率)上形成命令信号。在 VC 模式下该命令信号决定了电极电压，在 CC+COMM 模式下该命令信号决定了电极电流。虽然它是为 VC 工作模式以电压标度的，但在 CC+COMM 模式下，只要按照 1pA/mV 的简单关系即可换算为电流。

(1) 阶跃命令 (STEP COMMAND)

在 VC 模式下使用这个开关，可以直接给出常用的电极保持电位，选择的固定值为 -100mV、-80mV、-50mV、-20mV、-10mV、0mV、+10mV、+20mV、+50mV、+80mV、+100mV。当旋转开关时，可顺序产生上述阶跃命令电压。当开关顺时针旋到底时，该电压则由开关下方的 V_{HOLD} 控制电位器连续调整。

(2) V_{HOLD} 控制电位器

为一十圈电位器，其调整范围是 $\pm 200\text{mV}$ 。当旋钮置于 5.00 时，保持电位等于 0mV；置于 0.00 时为 -200mV；10.00 时为 +200mV。

10. 电流输出定标 (SCALED OUTPUT)

该功能区包括过载指示灯显示和增益调整开关

(1) 过载指示灯 (OVERLOAD)

当电流测量通路中的放大器饱和时，红色过载指示灯会点燃。该指示灯主要用于电压钳实验，这种实验需要去除电容性伪差，只有在不发生饱和的情况下，去除伪差的工作才能正常进行。这时过载指示灯可以作为一个简单的监视器指示是否发生饱和现象。当内部放大电路已经饱和，但由于滤波器的作用，输出电压却没有饱和，指示灯也照样能指示出来。

(2) 增益调整开关 (GAIN)

它为电流输出 (CURRENT MONITOR) 信号定标，并自动控制切换探头内的电流测量电阻。当 GAIN 置于 0.5~20mV/pA 范围 (低增益范围) 时，电流测量电阻为 0.5G Ω 。较小的测量电阻值意味着背景噪声相对较大，但可以达到 100kHz 的带宽，并记录最高至 20nA 的电流信号。这个测量范围主要用于全细胞记录，因而具备一些特殊功能，如 10~1000pF 的膜电容补偿、串联电阻补偿以及电流钳模式。当 GAIN 置于 50~1000mV/pA 范围 (高增益范围) 时，电流测量电阻为 50G Ω ，用于记录单通道信号。它具有相当低的噪声水平，但测量的最大电流仅为 200pA，最大带宽只有 20kHz，并且不具备上述低增益范围的一些特殊功能。

11. 贝塞尔低通滤波器带宽选择 (LOW PASS BESSEL FILTER)

仪器内置的贝塞尔低通滤波器主要用于减小电流输出 (CURRENT MONITOR) 的高频噪声。其带宽选择开关用于控制内置 4 阶低通贝塞尔滤波器的高频截止频率，这里，高频截止频率定义为信号衰减到 -3dB 时的频率。滤波输出信号从后面板的 CURRENT MONITOR 输出。对于大多数膜片钳实验，带宽应置于 10kHz 或以下，这一点将在第 6 章进行讨论。

12. 电源开关 (POWER)

应当在实验开始前接通仪器电源，开关内的指示灯会指示出仪器电源已接通。在记录过程中请不要切断电源，否则突然断电产生的瞬间电压冲激有可能杀伤细胞。

注意：由于仪器中的放大器是在充分预热后校准的，所以至少应在实验开始 20 分钟前打开电源，使仪器充分预热达到最佳状态后，再正式开始进行实验数据的记录。

在电源开关下边设置了机壳接线插座（CHAS），它与本仪器的交流电源插座的安全地线相连，这一点与大多数仪器相同。机壳接线插座与位于主机后面板的高质量信号地线插座（SIGNAL GND）之间接有 10Ω 电阻，经验证明，这样做可以避免地线环流，降低干扰。

2.2.2 主机后面板

1. 探头电缆插座（PROBE）

仪器安装时将探头电缆插头插入该 12 芯 DIN 插座上，请确认插头外壳已与插座旋紧，以保证探头电缆的可靠连接。切勿用力旋转电缆线，这样做会导致电缆内部断线或探头损坏。

注意：必须在关闭电源时进行探头电缆插头的安装。

2. 信号地线插座（SIGNAL GND）

这个 4mm 单极插孔是高质量的信号地线连接点，在必要时可用于实验装置的其它部分接地。

3. 电流监测输出插座（CURRENT MONITOR）

该 Q9（BNC）插座输出与电极电流信号成比例的电压信号，输出电阻为 50Ω ，正极性电压对应流出电极的电流。一般将输出信号输入一台示波器和/或数据记录仪（如计算机控制的数据采集装置、FM 磁带记录仪、PCM 装置/视频记录仪）以记录信号和监测实验的进行。

4. 电压监测输出插座（VOLTAGE MONITOR）

在电压钳模式，该 Q9（BNC）插座输出经过 10 倍放大的命令电压信号（ $10 \times V_{\text{COMM}}$ ）；在电流钳模式，输出经过 10 倍放大的膜电位信号（ $10 \times V_p$ ），可以在电流钳实验中进行记录。其输出电阻为 50Ω 。

5. 刺激信号输入插座（STIM. IN）

这也是个 Q9（BNC）插座，外刺激信号源产生的信号由此输入，输入电阻约为 $8.5k\Omega$ 。

6. 电源输入插座（AC 220V）

220V 电源线插座。因为 PC2C 的机壳与三芯电源线的安全地线相连，所以一定要确认供电线路的安全地线良好。

注意：在将本仪器的电源线插头插入供电电源插座之前，必须首先确认供电电源插座上的安全地线确实接地良好，否则使用者的生命安全将得不到保障！！

8. 保险丝座（FUSE 0.5A）

如意外导致保险丝熔断，请安装 1A 保险丝，安装不正确的保险丝可能使仪器产生永久性损坏。

3 安装

3.1 初始检查

当您收到 PC2C 型膜片钳放大器时，应首先进行初始检查，保证仪器的功能正常。尽管所有的部件在出厂之前都经过了严格测试，但是在运输过程中仍然可能出现问题。如果您发现仪器的任何问题，请直接与我们联系。

3.1.1 检查包装内的部件

PC2C 型膜片钳放大器包装箱内至少应包括以下部件：

1. PC2C 型膜片钳放大器主机	1
2. PC2C 型探头（带屏蔽罩、绝缘安装板）	1
3. 电源线	1
4. H1 型电极夹持器	1
5. CM1 型细胞模型电路	1
6. Q9 (BNC) 型双接头	1
7. 带有黑色 1mm 插头的浴池地线	1
8. 带有黑色 4mm 插头的接地线	1
9. PC2C 型膜片钳放大器用户手册	1
供货合同中包含的其他部件	

3.1.2 初始测试

1. 测试仪器准备：

刺激信号发生器（低频信号发生器或函数信号发生器亦可）	1 台
示波器	1 台

2. 在所有仪器的电源开关关断的条件下顺序进行如下准备工作：

- (1) 将 PC2C 放大器的探头电缆连接好，并将屏蔽罩正确扣合在探头输入插座上。
- (2) 连接电源线。

注意：直接在中国销售的 PC2C 型膜片钳放大器，电源电压固定为~220V，在将仪器电源线插入电源插座之前，请先确认您的实验室的交流供电电源在~220V±10%以内。

(3) 用适当电缆线将刺激信号发生器输出端连接到 PC2C 后面板的 STIM. IN 输入端上。

(4) 用适当电缆线将 PC2C 后面板的 CURRENT MONITOR 输出端连接到示波器的 Y 轴输入信号端上。

(5) 将 PC2C 的前面板的旋钮和开关调整如下：

PIPETTE OFFSET	5.00
MODE	TEST
SLOW CAPACITANCE COMPENSATION	
G-SERIES	1.00
C-SLOW	0.00
SLOW RANGE	OFF
FAST CAPACITANCE COMPENSATION	
τ-FAST	左旋到底
C-FAST	0.00
SERIES RESISTANCE COMPENSATION	

%-COMP	0	
FAST/OFF/SLOW		OFF
STIMULUS SCALING		OFF
ZAP		任意
HOLDING COMMAND		
STEP COMMAND	0	
V_{HOLD}	5.00	
SCALED OUTPUT		
GAIN	10mV/pA	
LOW-PASS BESSEL FILTER	5kHz	

3. 打开 PC2C、刺激信号发生器以及示波器电源开关，调整刺激信号发生器输出峰峰值约 1V、重复频率在 30~1kHz 之间的任意波形，在示波器上应显示与输入同样幅值、同样波形的信号。

注意：

(1) 为避免干扰窜入，在上述测试中必须将探头的输入端屏蔽，即在输入端子上加一个金属屏蔽罩（已作为附件提供给用户）。

(2) 在 TEST 模式下，测试电流的注入实质上是通过交流耦合方式送到输入端的，这意味着宽脉冲（脉宽>50ms，即直流成份丰富）或低频（<10Hz）输入信号将会引起注入电流波形形状的畸变。此外，幅度过大的低频输入也会引起电流注入电路的饱和。

切换仪器的贝塞尔低通滤波器的带宽，可以观察到背景噪声电平以及波形的瞬态响应（输入方波信号时）的变化。当增益（GAIN）置为 50mV/pA 或以上，即选择 50GΩ 测量电阻时，将会观察到信噪比较 0.5GΩ 各档有明显提高。如果信号源是一个正弦波发生器，可以通过改变信号源频率直接检测到整个膜片钳放大器的频率响应。

4. 将探头输入端通过一个“头对头（plug to plug）”的 Q9（BNC）适配器与 CM1 型细胞模型电路连接，并将黑色 1mm 插头插入探头的黑色（GND）插孔，则可进行膜片钳仿真实验。

注意：应避免直接用手接触探头的输入端，因为静电可能会损害探头的输入电路。如果必须要接触探头（例如插入玻璃微电极到电极加持器时），请首先将手接触接地良好的金属表面，以消除操作者本身所带的静电。在气候非常干燥的地区，最安全的办法是在手腕上戴一枚接地金属镯。

CM1 型细胞模型电路如图 3.1 所示。

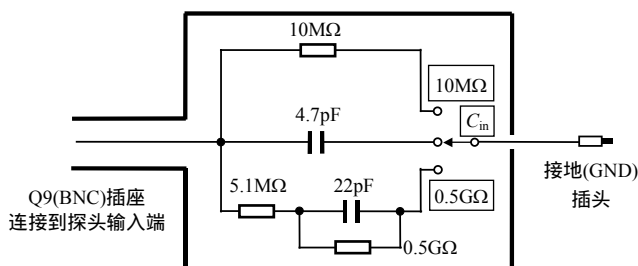


图 3.1 CM1 型细胞模型电路图

该细胞模型电路的开关有三档，分为 10MΩ、 C_{in} 和 0.5GΩ。

(1) 当开关拨到 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，这时在 STIM. IN 输入微小幅度的方波脉冲，在 CURRENT MONITOR 端接示波器可以观察到相应的方波脉冲电流信号。

(2) 当开关的位置位于 C_{in} (中间位置) 时, 探头输入端只有一个 4.7pF 的电容接地, 此时电路模拟了 $G\Omega$ 封接的情况。在 STIM. IN 输入一定幅度的方波脉冲, 输出端则可检出电容性尖峰电流。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 7pF 附近, 比内部实际所接电容值大的原因是由于引线存在着分布电容。

注意: 由于内部开关的电介质特性较差, 细胞模型电路会产生比实际细胞 $G\Omega$ 封接情况下更大的随机噪声。

(3) 在电压钳模式下, 将仪器的增益调整到 0.5~20mV/pA 的任一位置 (探头内部接 0.5G Ω 电阻), 细胞模型电路的开关置于 0.5G Ω 位置, 此时模拟细胞膜吸破后形成全细胞构型时的状态, 出现了较大的电容性充放电电流尖峰。将范围 (RANGE) 开关拨到 100pF, 调整仪器前面板上的 C-SLOW 和 G-SERIES 旋钮, 将电流尖峰减少至最低, 并可以读出慢电容和串联电导 (电阻的倒数) 值 (C-SLOW 为 22pF 左右, 串联电导为 0.2 μ S, 即 5M Ω 左右)。如果将工作模式开关拨到 CC+COMM, 细胞模型电路的开关仍置于 0.5G Ω , 则可以模拟演示电流钳操作过程。

注意: 该“细胞模型电路”有较长的“膜时间常数”(大约 10ms)。

当 PC2C 膜片钳放大器经过以上测试后, 即可认为其电路工作基本正常, 能完成封接、快慢电容补偿等一系列操作。

3.2 膜片钳实验系统的安装

3.2.1 安装探头

为了降低噪声, 电极夹持器必须通过其上的 Q9 (BNC) 插头座与 PC2C 探头直接相连, 中间不能接入任何同轴电缆。一般情况下, 探头可通过所附绝缘安装板直接安装在三轴微操纵器的安装平面上。为了使玻璃微电极在实验中保持机械稳定, 探头与微操纵器之间一般不要另外再用直径较小的金属或绝缘棒连接。安装前需要将绝缘安装板从探头上拆下, 根据微操纵器安装平面上螺丝孔的大小和位置, 在板上钻 2~4 个小孔, 然后先将探头装回安装板, 再将安装板用适当的小螺钉紧固在微操纵器上。此外, 绝缘安装板还在探头外壳与微操纵器之间起电绝缘作用。需要记住, 探头外壳并不与参考地线 (GND) 相连, 而是与命令电压 V_p 相连的, 因而探头外壳不能与金属微操纵器有任何接触, 也不能与周边仪器有任何接触或电连接, 否则 V_p 信号将会对地 (GND) 短路。

3.2.2 接地

1. 浴池与电极附近金属物体的接地

因为 PC2C 具有极高的灵敏度, 因此为使工频干扰降低到最小, 必须特别注意那些探头输入端附近金属物体的接地。在探头附近, 即使 1mV 的交流电压也会通过接地线所形成的环路感应很大的工频干扰。探头上的 GND 端子提供了高质量的接地端, 它通过探头电缆直接与主机后面板上的 SIGNAL GND 连接, 以用于浴池参考电极的接地或玻璃微电极附近金属物体 (如显微镜) 的接地。带有 1mm 单极插头的浴池接地线作为附件之一提供给用户。

2. 屏蔽笼内其他设备的接地

主机后面板的 SIGNAL GND 插孔是高质量接地端, 可用一条单独地线 (带有 4mm 单极插头的接地线作为附件之一提供给用户) 与本公司产品: 地线集线器相连, 这条地线最好与探头电缆捆扎在一起引向仪器后面板, 以尽量减小该接地线与接地的探头电缆屏蔽层所形成的地线环路的面积。工频交变磁场若进入这个地线环路, 会在地线上形成工频干扰电流, 地线环路面积越大, 干扰电流则越强。而所有大的金属装置, 如实验台、屏蔽笼等都应单独用较粗的铜导线 (导电截面积 $> 0.5\text{mm}^2$) 与地线集线器相连。

注意: 主机前面板右下角的机壳接线插座 (CHAS) 是与机壳相连的, 并与 220V 交流

电源插座的安全地线相连，是安全地线插孔，与上述高质量信号地线并不是一回事。在仪器内部，它们之间以 10Ω 电阻隔离，可有效阻断安全地线上的噪声进入信号地线。一般情况下，该插孔不要与主机后面板上的信号地线相连，更不要将该插孔连向实验台上的任何金属装置，这样做都会引入附加干扰。当实验室装有良好的大地地线时，应将该插孔接大地地线。

除了 50Hz 工频干扰之外，计算机若使用电磁偏转式显示器 (CRT)，其内部偏转线圈所产生的交变电磁场干扰也不可忽视，其频率约在 30~100kHz。该信号极易被地线环路拾取，当 PC2C 内部的贝塞尔低通滤波器置于较宽频带时，用示波器经常可在 CURRENT MONITOR 输出端观察到上述频率的波形。当示波器未与这种周期性干扰信号同步时，将在基线上看到一条扫描亮带。通常，通过改变接地线相对于探头的方向和距离是很难消除这种干扰的，对于极易遭受干扰的膜片钳实验，最好选用液晶显示屏作计算机的监视器。

3. 显微镜接地

膜片钳实验一般都要使用显微镜，显微镜及其平台就成为最靠近微电极和夹持器的导体，一个接地良好的显微镜可以起到很好的屏蔽作用。

(1) 应确保显微镜上各部件的电学导通，尤其是显微镜支架、加宽平台和聚光透镜之间要保持电接触并接地良好，因为它们通常是最接近微电极的大金属部件。电气悬浮 (未与地线连通) 的金属表面可以看成是“天线”，它可以拾取工频信号并将其耦合至电极。

(2) 应确保显微镜照明灯的外壳体接地良好，最好选用直流供电照明的显微镜，如果是交流供电照明的显微镜，必须对照明灯的外壳及其电源线进行屏蔽，并且牢靠接地。

4. 外部屏蔽

大多数膜片钳实验室都在实验台上安装一种前部装有可开合门的屏蔽笼，所有的电缆 (如显微镜照明灯电缆、探头电缆、冷却系统电缆，地线等) 都通过屏蔽笼上的孔引出到外部架装的仪器设备上。如果在实验操作中需要将屏蔽笼前门打开，那么在电极夹持器旁边放置一个小的金属接地网会起到很好的屏蔽作用。

3.2.3 连接其他仪器设备

1. 不使用计算机的膜片钳记录系统

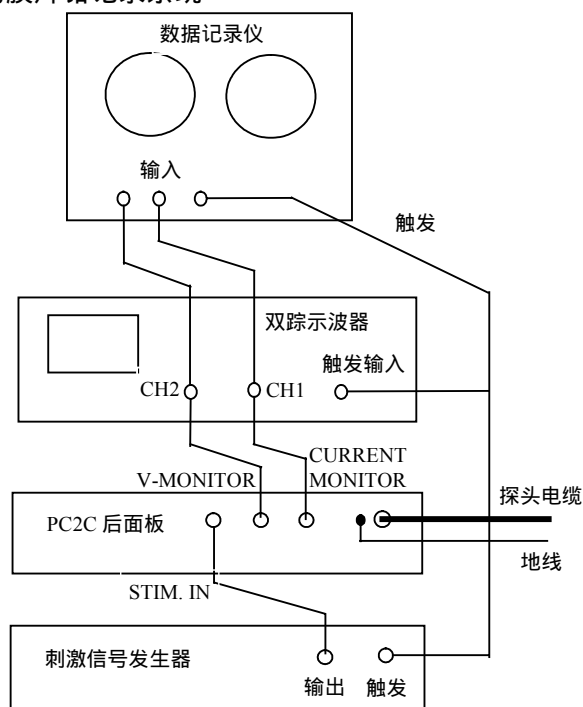


图 3.2 膜片钳实验记录系统之一

图 3.2 示出一套典型记录设备的连接方式。图中，以一个刺激信号发生器提供电压脉冲用于检测电极电阻和提供刺激。PC2C 的信号输出到一台示波器上进行观察，同时也输出到数据记录仪上（一般是数字化采集装置、FM 磁带记录仪或 PCM 调制的视频记录系统）。

为了在实验过程中更清楚地观察通道活动，有时需要在示波器和 CURRENT MONITOR 输出之间再插入一个可调带宽滤波器（如本公司产品 F1000 可调带宽 4 阶 Bessel 滤波器）。通常，在记录仪器的输出端监视电流、电压测量信号，比直接从膜片钳放大器输出端观测要方便一些。在记录仪输出端监视这些信号，实验者可以确信数据已被正确地记录下来。

2. 使用计算机的膜片钳记录系统

刺激信号发生器和数据记录仪的功能完全可以用一台具备模拟信号输入、输出接口的计算机系统实现，如图 3.3 所示。计算机中应装入膜片钳实验所需的刺激信号产生和数据采集的相应硬件和软件。

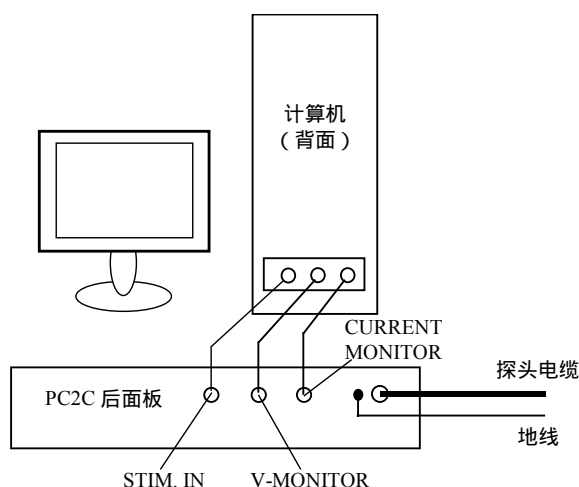


图 3.3 膜片钳实验记录系统之二

3.2.4 电极夹持器和电极银丝的处理

本公司生产的 H1 型玻璃微电极夹持器是专为 PC2C 配套设计的，是中国专利产品（专利号：ZL 01 2 12489.3），它具有如下特点：

- (1) 在焊接银丝后，可先装配成一体化结构，然后再安装在 Q9（BNC）插头上；
- (2) 用双 O 型密封胶圈固定玻璃微电极，大大提高了电极的机械稳定性（在实验中电极不会漂移）；
- (3) 在气道前、后均用 O 型密封圈密闭，具有极佳的气密性，十分有利于电极的入水和封接操作。

H1 型玻璃微电极夹持器亦可安装在德国 HEKA 公司所有型号的膜片钳放大器的探头上。

H1 型电极夹持器中的银丝长约 7cm，公司发货前已将银丝焊接在镀金插针上（该插针将插入探头的 Q9 连接器上）。用户第一次使用前，应将银丝浸入电极内液的部分镀一层氯化银。由于更换玻璃微电极时有可能刮掉银丝外的氯化层，所以在以后的实验中应经常重新氯化，一般为每月一次。

有两种氯化方法：

- (1) 将待氯化的银丝和另一根银丝或铂丝插入含氯的溶液中（如 100mM KCl 溶液或生理盐水），通过一定电流（如 1mA），电流方向是将溶液中的 Cl^- 离子吸引到待氯化的电极丝上，形成一层灰色的涂层。

- (2) 将约 3g 的氯化银置于小陶瓷坩埚中，用气体火焰（gas flame）加热，直至融化

成棕黑色液体，然后将银丝浸入融化的氯化银中，从而完成氯化过程。

夹持器中的银丝使用过久可能折断或与插针分离，这时需要更换银丝并将其重新焊接在插针上。可先将夹持器全部拆散，取出插针进行焊接，然后再按与拆散相反的次序安装到 Q9 插头上。安装时要注意各密封圈是否完好，若有变形，应及时更换新的密封圈。配套的密封圈亦可从本公司购买。

3.2.5 浴池参考电极

对浴池参考电极的主要要求是要有稳定的电极电位，而且在通电后不会扰乱浴池溶液的组分。虽然只有某些细胞可以忍受 Ag^+ 离子，如肌肉细胞，但裸露的氯化银丝可作为很好的浴池参考电极。另一种很好用的参考电极是琼脂盐桥电极，其结构如图 3.4 所示。将一个 10ml 塑料注射器去掉针头，加热并拉制成一个小小的弯曲尖端，将氯化银丝与活塞一起插入充灌了液体的注射器腔内，稍稍向后拉动活塞，把热琼脂吸入尖端。充灌的溶液可以是浴池溶液或其他类似的溶液，如 150mM NaCl 溶液。一般不需要更高浓度的盐溶液，因为高浓度的盐溶液会漏泄到浴池，从而改变浴液的成分。

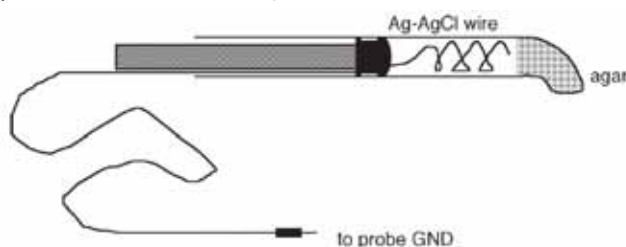


图 3.4 琼脂盐桥参考电极

引自 EPC-10 膜片钳放大器用户手册 (EPC10 Patch Clamp Amplifier Manual 8.6) pp.57

4 工作模式

PC2C 的基本功能是测量细胞离子通道的电流,探头中的电流-电压转换器将流过离子通道的微弱电流转换成一定比例关系的电压在 CURRENT MONITOR 端口输出,可供显示或记录装置记录。在记录电极电流的同时,还可以控制电极电位,向细胞施加刺激信号或保持胞内静息电位。PC2C 几种工作模式的不同之处主要表现为控制电极电位的方式不同。

4.1 电压钳模式 (VC)

电压钳模式是一种基本的膜片钳实验模式,其基本电路原理如图 4.1 所示。由刺激信号输入 (STIM. IN) 端口输入的信号,叠加上由保持电位 (V_{HOLD}) 设定的直流电位。这两个电压的总和即是 V_{COMM} , 可从 VOLTAGE MONITOR 端输出; 当 $V_{\text{COMM}}/\text{NOISE}$ 选择开关置于 V_{COMM} 时, 则数字电压表显示该电压值。然后 V_{COMM} 再叠加上电极电位偏置 (PIPETTE OFFSET) 电压形成 V_p , 最后到达玻璃微电极上。电极电位偏置的调整主要是为了消除电极本身的失调电位。

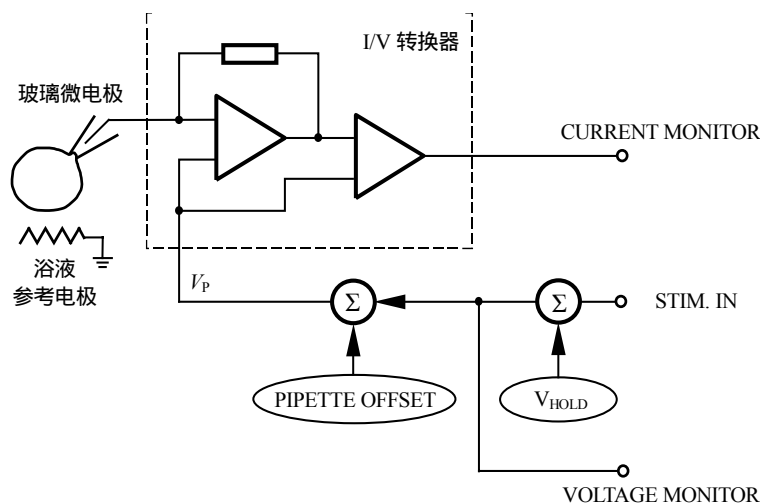


图 4.1 电压钳模式

4.2 电流钳模式 (CC 和 CC+COMM)

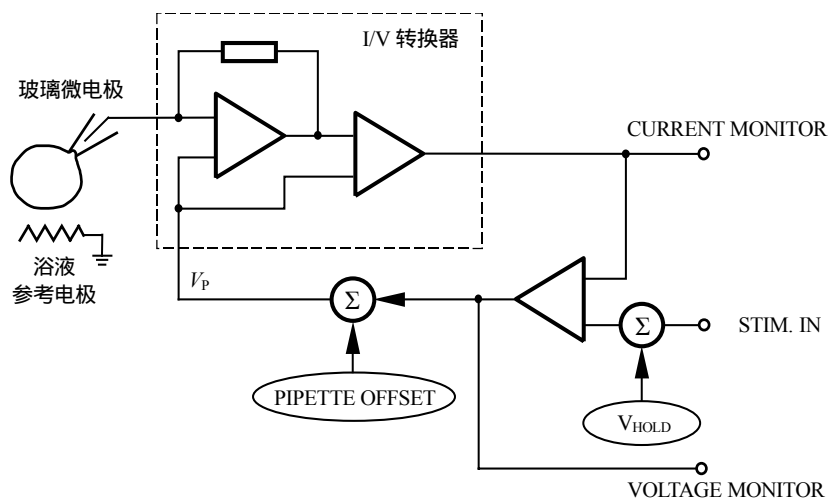


图 4.2 电流钳模式

在电流钳模式下，CURRENT MONITOR和玻璃微电极之间构成负反馈回路（示于图 4.2），快速的负反馈作用（时间常数约 $30\mu\text{s}$ ）使电极电压 V_p 适当改变，从而使电极电流保持为零。在这种模式下，实际上是构成一个高阻抗的电压跟随器，在VOLTAGE MONITOR输出端得到电压输出。在全细胞记录时，可以用电流钳模式测量静息电位或记录自动动作电位，并从VOLTAGE MONITOR端得到输出信号。当 $V_{\text{COMM}}/\text{NOISE}$ 选择开关置于 V_{COMM} 时，膜电位会在数字表上显示。在 $\text{CC}+\text{COMM}$ 模式下，可以测量注入命令电流情况下的电极电压。这时，命令电流由 STIM. IN 信号和 V_{HOLD} 电压之和确定，在仪器内部定标为 $1\text{pA}/\text{mV}$ ，即当电压钳模式下 V_p 有 1mV 的变化，相当于在电流钳模式下有 1pA 的变化。例如，若在 STIM. IN 输入 1V 的脉冲，且 STIMULUS SCALING 设定于 0.1 ，则会产生 100pA 的命令电流脉冲。这里， $1\text{pA}/\text{mV}$ 的比例关系与增益调整开关（GAIN）的设定位置无关。电流的方向定义为：在 STIM. IN 输入正电压，将导致电流流出电极。

注意：在电流钳模式下，GAIN 永远应设置在低增益范围，即 $0.5\sim 20\text{mV}/\text{pA}$ 范围。

4.3 测试模式（TEST）

测试模式的电路原理如图 4.3 所示。这种模式与电压钳模式非常相似，不同之处在于 STIM. IN 信号不用于确定电极电位（仅 V_{HOLD} 可以控制电极电位），而是将小的测试电流注入到 I/V 转换器的输入端。注入电流的定标系数固定为 $100\text{pA}/\text{V}$ ，即在 STIM. IN 输入 1V ，注入电流为 100pA 。这个定标系数在生产时已校准，可以对电流监测电路提供定量的测试（但不够准确）。在测试模式下，输入 STIM. IN 的不能是直流信号，只有频率高于 10Hz 、脉宽大于 30ms 的方波信号或频率高于 1Hz 的正弦波信号才能在 CURRENT MONITOR 端原样复原。为了精确测量频率响应并避免 I-V 转换器的灵敏度下降，测试电流是通过一个小电容（而不是电阻）注入探头输入端的。 STIM. IN 信号经过一个自动归零积分器积分后才输出到注入电容上。当加到 STIM. IN 信号中有直流量时，归零积分器可能需要几秒钟的回零恢复时间。

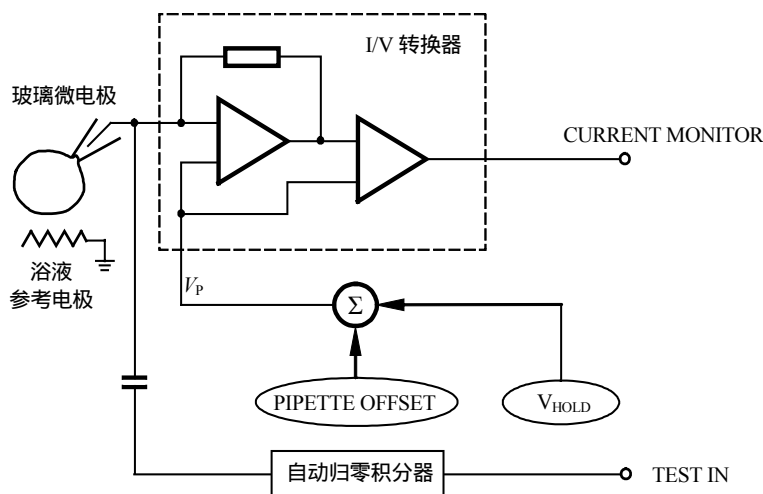


图 4.3 测试模式

TEST 模式可用于测量整个系统的阶跃响应，阶跃响应是高分辨率离子通道分析中的关键性能（参考 Colquhoun 和 Sigworth，1983）。当 GAIN 在高增益范围（ $50\sim 1000\text{mV}/\text{pA}$ ）时，该电流注入电路具有高于 100kHz 的带宽，可用于定量测试系统的阶跃响应。然而 GAIN 在低增益范围（ $20\sim 50\text{mV}/\text{pA}$ ）时， 50kHz 以上的响应就会有明显畸变，若需对电流测量通道响应进行严格的测试，必须使用外部信号源（例如用一个高线性度的三角波发生器，将其输出通过靠近电极夹持器的绕线，与探头输入实现电容性耦合）。TEST 内部电路的失真是由于少量 STIM. IN 信号直接馈通到电流注入电容而产生的。无论 GAIN 设置在高增益范围还

是低增益范围，将 STIMULUS SCALING 开关置于 OFF，可以减小这种馈通。

4.4 搜索模式 (SEARCH)

图 4.4 示出搜索模式的电路原理。它与电压钳模式的工作原理基本相同，不同之处只是 V_{COMM} 同时还接收搜索积分器的输出信号。搜索积分器在 CURRENT MONITOR 到微电极之间构成一个极慢速的负反馈通路，它可以缓慢地调整电极电压 V_P ，使电极电流 I_P 的平均值为零。在电极进入浴液对细胞实现封接前，电极与浴液间的电阻较小 ($<10M\Omega$)，极小的电极电位偏移都会产生很大的电极电流，使 CURRENT MONITOR 输出迅速饱和，信号轨迹跳出观察视野范围之外。在这种情况下应使用搜索模式，电路的负反馈作用可补偿电极电位偏移。反馈的时间常数与电极到浴液间的电阻成正比，在电阻为 $10M\Omega$ 时，时间常数约为 1 秒。当 $G\Omega$ 封接形成以后，虽然负反馈的时间常数很大，但 V_P 仍在作缓慢调整。为避免电流测量时 V_P 的漂移，请不要忘记在正式开始记录离子通道的电流之前把工作模式开关从搜索模式切换到电压钳模式。

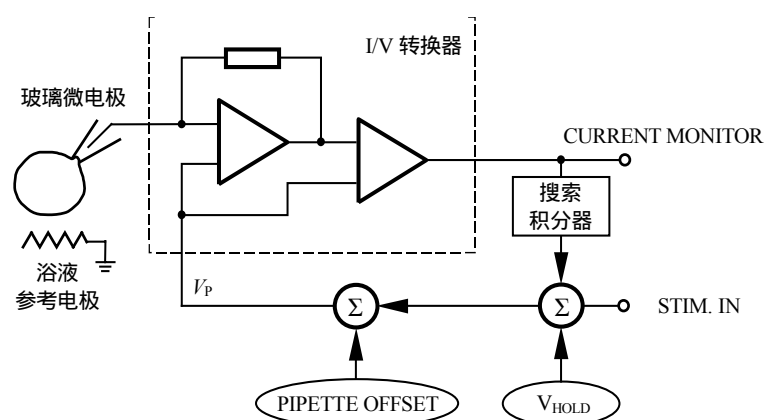


图 4.4 搜索模式

5 实验中的参数补偿

5.1 快电容补偿

玻璃微电极内导体通过绝缘材料玻璃与浴液(和参考电极电气相连)形成以分布形式存在的电容,此外,探头中的电极连线对地也存在杂散的分布电容,如图 5.1 所示。当在 STIM.IN 输入阶跃脉冲刺激信号时,在 CURRENT MONITOR 可以观察到如图 5.2 所示对上述分布电容充电的电流伪差信号,这将妨碍离子通道电流的正确记录,其幅度之大,有时会使放大器进入非线性的饱和区,记录中必须将其消除。通过适当调整快电容(C-FAST)旋钮和滞后(τ -FAST)旋钮,可以消除大部分电容充电作用引起的电流伪差信号。由于这种分布电容引起的充电时间常数很小,故称为快电容补偿。

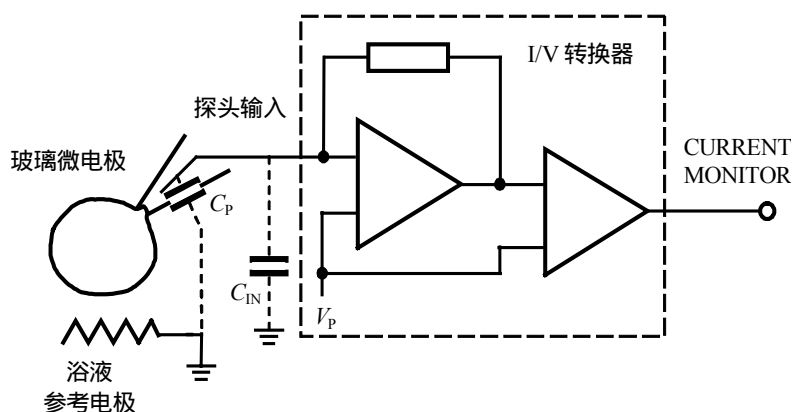


图 5.1 探头输入电路的分布电容

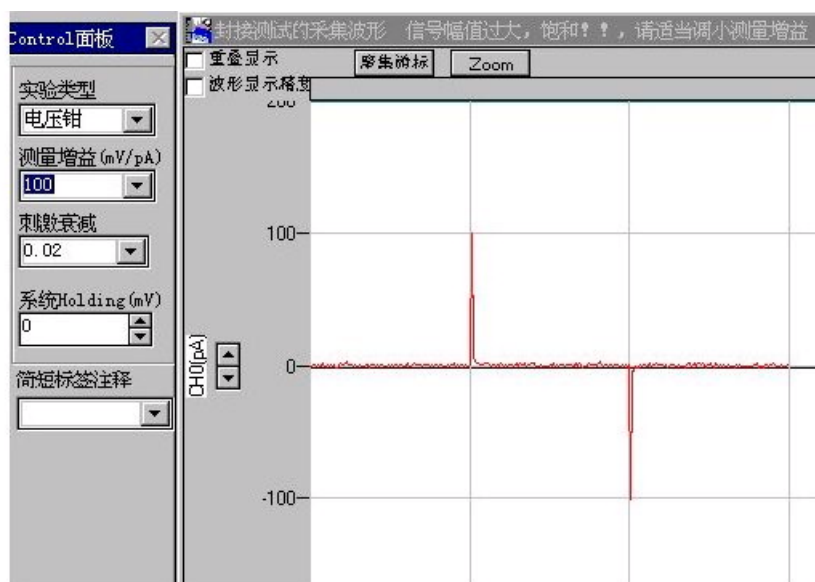


图 5.2 快电容伪差信号

实际实验中经常还会存在一种较缓慢的瞬态分量(时间常数为 $100\mu\text{s}\sim 1\text{ms}$),用 C-FAST 和 τ -FAST 消除不掉。有部分原因是由于电极电容是沿电极长度方向分布存在的,若将其分解,每一个电容微元都有不同大小的电阻与之串联,因此,单一的 τ -FAST 是不可能提供精确补偿的。另外部分原因是制作夹持器的塑料材料和电极玻璃的介电弛豫特性引起的,介电

弛豫效应造成的瞬态过程不是简单的指数形式，其维持时间大约在 1ms 左右。如果使用介电损耗低的电极玻璃（例如铝硅酸盐玻璃）或者在电极上涂敷一层树脂，而且一直涂敷到电极尖端附近，那么介电弛豫效应将会减弱一些。也可以用调整慢电容补偿（SLOW CAPACITANCE COMPENSATION）的方法来部分消除这种较缓慢的弛豫效应。方法是将慢电容补偿的范围（RANGE）设置到 10pF，先调整串联电导（G-SERIES）旋钮，使伪差电流的起始幅值降为零，然后再调整慢电容（C-SLOW）旋钮，使伪差电流的后端降下来，成为平坦直线，从而消除伪差电流。

5.2 慢电容补偿

在全细胞构型的实验中，当GΩ封接形成后，首先应进行快电容补偿，然后再将膜片破碎，这个破口提供了通向细胞内的电通路，于是，细胞内部与电极实现了电气连通。因为这个通路的电阻是与微电极串联构成的，故称为串联电阻 R_S ，其倒数即串联电导 G_S 。电极本身的电阻构成串联电阻的一部分，而主要部分通常是膜片破口处的电阻。实验证明，将该串联电阻减小到两倍于电极电阻值以下是不可能的。这时的双层脂质细胞膜可以看成是电学上的电容，其单位面积的电容值大约为 $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 。膜电容 C_M 和串联电导 G_S 与放大电路连接后的电路示意图如图 5.3 所示。

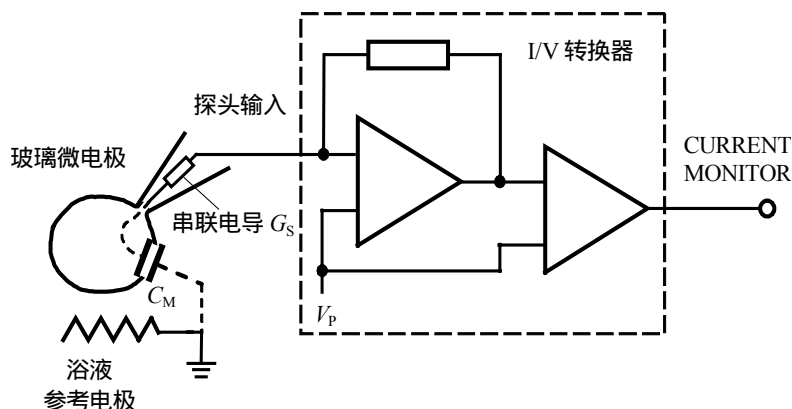


图 5.3 输入电路的分布电容

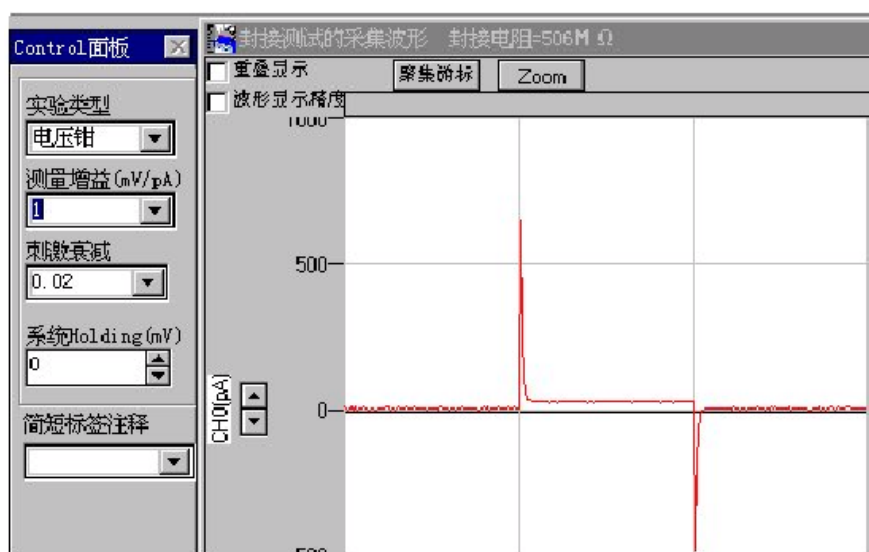


图 5.4 慢电容伪差信号

当 STIM. IN 输入阶跃脉冲刺激信号时，阶跃电压施加在玻璃微电极上， R_S 会对细胞膜电

容 C_M 的充电电流形成阻力，从而减慢膜电压的钳位速度。充电的时间常数为

$$\tau_u = R_S C_M$$

在 CURRENT MONITOR 输出端可以观察到如图 5.4 所示对膜电容充电的电流伪差信号。若设典型值 $R_S=5M\Omega$, $C_M=20pF$, 则时间常数为 $100\mu s$ 。对于研究快速的电压门控通道电流（如神经细胞中的 Na^+ 电流）来说，这个时间常数就太大了，所产生的电流伪差信号将会完全淹没响应速度较快的离子通道电流信号。伪差信号的幅度同样会使放大器进入非线性的饱和区。所以在对全细胞膜片钳电流记录之前必须将其消除。因为膜电容和串联电阻值均较大，充放电时间常数大，故将这种补偿称为慢电容补偿。

进行慢电容补偿时，为了以高时间分辨率观察快速变化的瞬态波形，贝塞尔低通滤波器（LOW PASS BESSEL FILTER）带宽最好选择在 $10kHz$ ，这样才容易观察到调整串联电导（G-SERIES）旋钮时 CURRENT MONITOR 输出波形变化的结果。慢电容补偿用的 G-SERIES 旋钮可调整电流瞬态过程的起始幅度，而 C-SLOW 旋钮则可调整瞬态走向衰减部分的面积。

慢电容补偿的步骤如下：

(1) 选择适当的膜电容范围(RANGE): $10pF$ 档适用于直径 $10\mu m$ 以下的小细胞; $100pF$ 档适用于直径为 $10\mu m$ 至几十 μm 的细胞, $1000pF$ 档适用于更大的细胞。

(2) 在 STIM. IN 输入端输入适当幅值的矩形脉冲信号。

(3) 调整 G-SERIES 旋钮，如果瞬态过程不是很快，可以在 CURRENT MONITOR 输出信号中看到其初始值的改变。将波形的上冲或下冲调整为零，使瞬态波形成分中不含有初始过冲。

(4) 调整 C-SLOW 旋钮，尽量减小瞬态伪差电流，使输出波形尽量接近于矩形。

(5) 反复调整 G-SERIES 和 C-SLOW 旋钮一两次后，应可将瞬态过冲削减到只有原来幅度的百分之几。

注意：如果细胞的形状不规则，例如长圆柱形细胞或细胞上有长梢，则细胞的电容性瞬态电流不是单指数型，其伪差是很难彻底消除的。

5.3 串连电阻补偿

在全细胞电压钳记录中，细胞膜电位由施加在电极上的电压来控制。这种电位控制不能完全达到理想的要求，误差随电极与细胞内部之间的通路电阻而变化，并且随流经该电阻的电流大小而改变。

在实际记录条件下，串联电阻造成两方面不良影响。一方面如 5.2 节所述，当阶跃电压施加在电极上时， R_S 会对细胞膜电容的充电电流形成阻力，从而减慢膜电压的钳位速度。另一方面的不良影响是，当有较大的膜电流流过串联电阻时，会产生膜电压的钳位误差。例如在 $R_S=5M\Omega$ 的情况下， $2nA$ 的电流将使钳位电压误差上升到 $10mV$ ，这对于电压门控通道电流的研究来说是相当大的误差，而实际实验所允许的误差值必须保持在约 $2mV$ 以下。

从 Hodgkin-Huxley 时代起，在电压钳系统中就广泛应用电子学方法补偿串联电阻。膜片钳放大器中串联电阻补偿的原理是将电流测量信号的一部分按一定比例叠加到命令电压上，如图 5.5 中的校正通路所示。当电流 I_P 流经电极时， V_P 亦随之改变，在一定程度上补偿了 I_P 在串联电阻上的电压降。由于这个校正通路构成正反馈，因此，过度补偿可能导致电路的不稳定。

PC2C 设计了 R_S 补偿与电容补偿的一体化电路（见 Sigworth, Chapter 4 in Single Channel Recording）。预测环电路示于图 5.5 下部，当输入阶跃电压命令时，在电极上会产生超强瞬态电压加速对膜电容的充电（有时称为“过充电”）。本来，对膜电容充电电流引起的电极电压变化应当单独由校正环路来产生超强瞬态电压，然而，充电电流已被此前的慢电容补偿电

路所消除。预测环电路的作用是在进行慢电容补偿时就事先预测出慢电容补偿对串联电阻补偿的影响，尔后进行串联电阻补偿时再将这种影响计算进去。

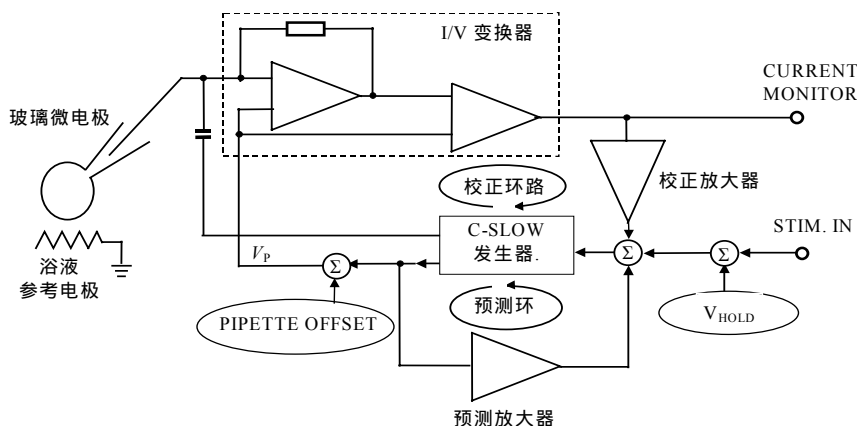


图 5.5 串联电阻补偿原理

PC2C 的两部分 R_S 补偿电路结合在一起，可以将串联电阻 R_S 对膜电压的钳位速度和钳位精度的影响降低。补偿后，膜电容充电速度加快，充电时间常数变为

$$\tau_c = (1-\alpha)\tau_u$$

这里， $\alpha < 1$ ， τ_u 是未补偿时的时间常数。同样，由膜电流而引起的电压误差也减小到 $1-\alpha$ 。 α 由前面板上的补偿百分比（%-COMP）旋钮的设定值来确定。为达到正确的补偿量，串联电阻校正电路需要估计校正环路的串联电阻值，而膜电容补偿电路（C-SLOW）需要同时知道串联电阻和膜电容二者的值。在 PC2C 中，串联电阻的估计是与膜电容补偿结合在一起进行的，用串联电阻 R_S 的倒数即电导 G_S 作刻度，使 G-SERIES 旋钮的控制产生双重作用：既影响膜电容补偿的动力性能，又影响串联电阻补偿电路的反馈信号幅度。也就是说，在实验中，串联电阻的估计已包含在用 C-SLOW 和 G-SERIES 旋钮进行膜电容补偿的操作中。一旦这一操作完成， R_S 补偿的百分比就可以由 %-COMP 旋钮来调整。

理论上，串联电阻有多大就应当补偿多少，即应该有 100% 补偿率才是理想的。实际上，当补偿程度高于 90% 时会引发很大的技术难题，而在某些记录条件下低于 90% 的补偿才是可取的。为了解释这个技术难题，可以设想施加 100mV 的命令电压变化，并施予 90% 补偿率。这意味着细胞膜电容的充电速度比正常状态快 10 倍。为了实现这快速充电过程，在补偿电路中必须使电极电位达到 1V 的瞬态值，才能导致产生相应的大电流进行充电，使膜电容达到最终的 100mV。一般情况下，若电压阶跃命令为 ΔV ，必需向电极施加 $\Delta V/(1-\alpha)$ 的最初瞬间电压，才能得到补偿率为 α 的补偿效果。PC2C 中可能向电极施加的最大电压幅值为 $\pm 1.4V$ ，90% 的补偿率可用于幅值在 $\pm 140mV$ 以内的阶跃命令。施加阶跃幅值更大的命令电压，若不同时降低 %-COMP 的设定，则会导致放大器过载。

R_S 的补偿率同时还受到稳定性的限制。在进行 R_S 补偿之前，应当先正确补偿快电容。当串联电阻较大，例如 10MΩ 或更大时，快电容调整不当极易引起振荡。在这种情况下，应当将 R_S 补偿速度开关（FAST/OFF/SLOW）置于 SLOW 档，通过降低电路反馈的速度以使补偿不易产生高频振荡。而当 R_S 相对较小时，因为受到补偿电路反馈速度的限制，有时不可能使用全部 90% 补偿率。当时间常数 τ_u 小于 100μs 时将出现这个问题，原因是补偿后的膜时间常数 τ_c 不可能比 R_S 补偿反馈电路自身的时间常数值还小，也就是说，补偿电路的响应速度限制了膜充电速度的进一步提高。如果这时调高 %-COMP，以图达到更小的 τ_c ，将会由于膜电压的过冲而在 CURRENT MONITOR 信号输出端观察到过冲或振铃现象。 τ_c 的最小值近似为

$$\tau_{c(\min)} = \sqrt{\tau_u - \tau_f}$$

式中， τ_f 是反馈环的有效时间常数。在 R_S 补偿速度开关置于FAST时， τ_f 为 $2\mu\text{s}$ ，置于SLOW时为 $6\mu\text{s}$ 。相应的 α 最大值为

$$\alpha_{(\text{max})} = 1 - \sqrt{\tau_f/\tau_u}$$

表 5.1 给出，当补偿速度开关置于FAST时，对应于未补偿的时间常数 τ_u ，其可能补偿的 α 最大值（即%-COMP的最大设定值）及其相应的 τ_c 值。

表 5.1

τ_u (μs)	α	τ_c (μs)
90	0.85	13
50	0.80	10
30	0.75	8
22	0.70	7
13	0.60	5
8	0.50	4

当选择SLOW设置时，全部 90%的补偿率只有在时间常数 τ_u 大于 $500\mu\text{s}$ 时才可能达到。在实验中，可以根据C-SLOW和G-SERIES旋钮调整后的读数来估计 τ_u 的值。例如，C-SLOW调整在 10pF （范围置于 100pF ，旋钮指示在 1.00 处），G-SERIES调整在 $0.1\mu\text{S}$ （旋钮指示在 1.00 处），则时间常数为 $10\text{pF}/0.1\mu\text{S}=100\mu\text{s}$ 。

R_S 补偿过程可总结如下：首先调整电容补偿（C-SLOW、G-SERIES、C-FAST、 τ -FAST），最大程度地消除加入阶跃电压脉冲时的电容充电电流，这时，实际上将串联电阻补偿也置于正确位置。然后将补偿速度开关置于FAST或SLOW 进行串联电阻补偿，即从 0 增大%-COMP 到所需要的值。任一电容补偿的失调都能在串联电阻补偿后表现得更加明显，这是由于未消除的瞬态过程都将会被 R_S 补偿的正反馈所“放大”。

5.4 电极电位偏移补偿

在各种构型的膜片钳实验中，有一些引起电极电位偏移的因素必须予以考虑，其中包括放大器失调（+/-30mV）、电极电位（+/-200mV，取决于电极内 Cl^- 浓度及参考电极）、液结电位以及膜电位等。其中有些电位偏移在实验中是固定的，如放大器失调和电极电位偏移，而另外有一些是变化的。

通常的做法是在实验开始时进行参照测量来消除固定偏移的影响。例如可将放大器失调调至零电流输出，如果没有其他偏移电压的变化，那么放大器给出的命令电压将等于膜电位的大小。对于全细胞或外面向外构型的命令电压应当是一种极性，而细胞贴附式或内面向外构型的命令电压极性则相反。在细胞贴附式实验中，由于细胞的静息电位的存在而会出现附加的偏移。当改变溶液成分后或电极内液与浴池溶液不同时，液结电位可能在测量期间出现或消失（见 Barry & Lynch, 1991; Neher, 1992; Neher, 1995 的论文），这可在离线分析时通过施加适当的反向校正来解决。对潜在的偏移问题及其出现原因的分析请参见 Neher 1995 年的论文。

在 Neher 1992 年的论文中已讨论了测量液结电位的过程。计算液结电位离子迁移率的方法则可在 Barry & Lynch 1991 年的论文中找到。表 5.2 列出了一些典型溶液相对于生理盐水（主要为盐： 140mM NaCl ）的液结电位值。极性则按 Barry & Lynch 的约定，即生理盐水相对于所给溶液。

表 5.2

溶 液	液结电位
-----	------

145 K-glutamate, 8 NaCl, 1 MgCl ₂ , 0.5 ATP, 10 NaOH-HEPES	10mV
145 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl ₂ , 0.5 ATP, 10 NaOH-HEPES	3mV
60 Cs-citrate, 10 CsCl, 8 NaCl, 1 MgCl ₂ , 0.5 ATP, 20 CsOH-HEPES	12mV
32 NaCl, 108 Tris-Cl, 2.8 KCl, 2 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 10 NaOH-HEPES	-3mV
70 Na ₂ SO ₄ , 70 sorbitol, 2.8 KCl, 2 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 10 NaOH-HEPES	6mV

6 膜片钳实验

本章将简要描述建立封接和进行单通道记录或全细胞记录的主要过程

6.1 玻璃微电极的拉制、抛光和充灌溶液

实验中所用的玻璃微电极是用两步拉制法得到的。在记录单个离子通道电流时，电极与细胞外液间的分布电容噪声 C_S 是最大的噪声来源。在微电极的尖端表面涂敷一层具有疏水特性且不导电的物质，将有效减少 C_S 噪声。通常使用硅酮树脂Sylgard(Dow Corning Corp. USA)进行涂敷。

拉制和涂敷后的电极尖端往往不太平整，必须抛光后使用。一般的电极抛光设备用铂金丝作为加热金属丝，经过抛光处理后，微电极尖端的表面变得光滑，而黏附于电极尖端附近的 Sylgard 的溶剂也会在抛光加热过程中被去除，从而保证封接操作的顺利进行。有关电极制备的更详尽情况请参见附录 A。

电极充灌内液时，首先将电极尖端浸于溶液中，利用毛细现象充灌电极尖，再用注射针或聚乙烯的塑料管从电极尾部反向充灌溶液。

注意：电极内液不要灌得太满，否则不仅会增加噪声，而且浪费溶液。

6.2 形成封接

膜片钳实验的第一步，是将玻璃微电极对细胞实现 $G\Omega$ 封接。只有封接获得成功，才能将膜片钳实验继续进行下去，封接的质量直接影响着实验的成功和记录数据的噪声水平。对于膜片钳实验的初学者来说，掌握封接技术是他们要跨越的第一道难关。

6.2.1 系统的初始设置

在形成封接的过程中，需要连续测量封接电阻。方法是向电极施加已知幅值的电压方波脉冲，在示波器上测量 CURRENT MONITOR 端脉冲信号的幅值，即测量流过玻璃微电极到参考电极的电流脉冲幅值，根据公式 $R = \Delta V / \Delta I$ (欧姆定律)，则可推算出电极的封接电阻。从电极入水到贴附在细胞膜上形成封接的过程，会导致电极电流急剧减小，电阻急剧增大。当电阻到达 $G\Omega$ 量级时，则标志封接获得成功。

可以计算出，当 2mV 脉冲加在电极上，若引起 1nA 电流脉冲，则电极电阻为 $2M\Omega$ 。若测量到的电流脉冲仅为 2pA 左右，电极电阻已升高到 $1G\Omega$ 左右时，则证明封接成功。

在封接过程中，建议将刺激信号设置如下：

命令电压脉冲幅值：2mV，若刺激信号定标 (STIMULUS SCALING) 设置于 0.02，则 STIM. IN 应输入幅值为 100mV 的矩形波脉冲信号；

命令电压脉冲频率：5Hz

命令电压脉冲宽度：10ms

建议将 PC2C 设置如下：

MODE：SEARCH

V_{HOLD} ：0

LOW PASS BESSEL FILTER：1kHz 或 2kHz

%-COMP：OFF

RANGE：OFF

GAIN：根据示波器显示的幅值情况随时调整，开始可置于 1mV/pA，随着电极电阻升高，应将 GAIN 开关右旋；为了观察清楚，在过载指示灯 (OVERLOAD) 不发光 (或闪光) 的前提下，应尽量提高 GAIN 的灵敏度。

6.2.2 电极进入浴池

电极进入浴池前，除了很小的电容（电极和电极夹持器对地的分布电容）性尖峰以外，示波器显示的电流轨线应该是基本平坦的。

浴液表面经常有灰尘等污染物，所以在将电极尖端移入浴液之前，应对电极内部施以小的正气压，使电极内液略涨出电极尖端，从而避免电极在穿过空气与浴液界面时被污物污染。此外，在形成封接前应极力避免让电极尖端多次穿越气-液界面。当玻璃尖端进入溶液后，电流基线可能会跃至示波器屏幕之外，SEARCH 功能会使它在几秒钟之内回到零。这时，从电压脉冲引起的电流响应的大小可计算出电极电阻。

注意：SEARCH反馈的速度与电极电阻成反比，当电极电阻为 10MΩ时，回零时间约为 1s。对于低电阻电极，SEARCH的反馈作用会对 V_p 电压调整过快（原理电路见图 4.4），使电流脉冲发生畸变。由于正式开始实验记录时，模式开关肯定要脱离SEARCH档，从而会切断反馈回路，这种畸变就不会再出现了。

如果进入浴液后，示波器屏幕上的电流轨迹没有变化，则说明电极没有在浴池中形成回路，那么需要检查：

- (1) 玻璃电极内有无气泡，电极内 Ag/AgCl 丝下端存在气泡会阻断微电极的电通路；
- (2) 探头输入端与夹持器相连的 Q9 (BNC) 插头、座是否连接好（将夹持器插上后应旋转一个角度直到感觉卡好为止）；
- (3) 浴池参考电极是否已连接到 PC2C 探头的地线插孔上。

电极入水后，在玻璃微电极和浴池参考电极之间总存在一个小的失调电压，利用仪器中的电极电位偏置电路可将这个失调电压抵消。方法是在SEARCH模式下，调整电极电位偏置（PIPETTE OFFSET）旋钮，使示波器显示的电压监测输出（VOLTAGE MONITOR）（即 $10 \times V_{COMM}$ ）的电压回到 0 电平。

6.2.3 GΩ 封接的形成

在显微镜下观察到电极压到细胞上时，电流脉冲会因为封接电阻增加而略微减小。这时应释放电极内所加的正气压，电阻跟着相应增大。当电阻增大到 1.5 倍（即电流脉冲幅值减小到大约 2/3）时，轻轻施加负压，电阻会进一步增大，最终形成 GΩ 封接。这个过程有时是逐渐变化的，时间甚至超过 30s 钟；有时则在瞬间形成。GΩ 封接形成的特征是示波器上的电流轨线重新恢复平坦（与进入浴池之前的电流波形一样）。在电极上施加 -40—60mV 电压有时有助于 GΩ 封接的形成。为证实 GΩ 封接确已形成，可将增益转到大约 50mV/pA，这时除了在电压脉冲的起始和终止处有电容性“尖峰”以外，电流轨线仍应平直。可以用 C-FAST 和 τ -FAST 使尖刺减至最小。首先调整 C-FAST 以减小电流尖峰的幅度，再调节 τ -FAST 以消减残余的双相分量。

注意：

(1) 不同类型的细胞其膜的特性也是不同的，封接时所施加负气压的大小也应不同。如肌肉或卵母细胞，可以承受较大的负气压，而神经细胞相对较脆弱，因此封接时就必须十分小心。

(2) 操纵微操纵器贴近细胞时，要使电极的运动十分平滑。贴附细胞后在施加负气压形成封接的过程中一般不要再调整电极的位置，否则 GΩ 封接的成功率会减小。

(3) 电极贴向细胞的角度一般与水平成 45 度角，其大小会影响对细胞贴附时所形成的压力，但它并不是非常重要的因素。

6.3 细胞贴附式记录

1. 切换模式开关

完成封接后，可将MODE开关转向VC（电压钳）。这时电极电压将变为事先设定的保持电压（HOLDING COMMAND/ V_{HOLD} ）值（最好一开始将 V_{HOLD} 设置为 0，或是相应的保持

值电压值，如 -70mV)。

注意：由于SEARCH模式和VC模式在功能上相似，因此很容易忘记把开关从SEARCH切换到VC。请务必在封接完成后进行模式切换，否则电极电压在SEARCH模式下会随时间缓慢漂移，这种漂移可在 V_{COMM} 显示上看到。

2. 快电容补偿

如果在记录中无需施加电压跳变，请将刺激信号发生器关闭，并将 STIMULUS SCALING 开关置于 OFF，以避免引入噪声和产生伪迹。如果实验中需要施加电压脉冲，可选择 STIMULUS SCALING 开关的位置，以在电极上施加适当幅值的脉冲电压，并将 GAIN 和 LOW PASS BESSEL FILTER 设置在适当的档位。这时在示波器上将可以观察到电容充放电的电流伪迹，适当调整 C-FAST 和 τ -FAST 旋钮可完成快电容补偿（见 5.1 节）

3. 记录

为得到低噪声的贴附式纪录，必须将 GAIN 设置于 50mV/pA 或以上档位，这时探头内部的测量电阻将切换到 $50\text{G}\Omega$ ，仪器系统将有更低的噪声输出。而 LOW PASS BESSEL FILTER 则置于 10kHz 以下的某一挡（除非确实需要更大的带宽），若滤波器带宽设置过大，强大的高频噪声会使 CURRENT MONITOR 输出放大器或记录仪的输入放大器饱和。如果必须要用到全带宽，就应当避免将 GAIN 设置到 100mV/pA 以上。

应当尽可能在实验时消除电容瞬态电流，以避免放大器、记录仪或数字化采集装置饱和。为了保证真实、准确地记录信号，最好是在 CURRENT MONITOR 输出端直接观察信号波形，并且在记录中应随时注意观察过载指示灯（OVERLOAD）是否闪烁。如果过载指示灯闪烁，则说明 PC2C 的探头或放大器已经出现饱和。出现这种情况必须重新进行快电容补偿，否则记录将存在非线性。

注意：对于细胞贴附式或内面向外式（inside-out）构型，在微电极上施加正电压或正脉冲（即 STIM. IN 加入正电压或正极性脉冲）将导致细胞膜片的超极化，这时的内向膜电流在 CURRENT MONITOR 输出端呈现正信号。反之，全细胞或外面向外式（outside-out）构型，电极上加正电压将导致去极化，外向膜电流在 CURRENT MONITOR 输出正信号。表 6.1 列出四种记录构型的记录极性。

表 6.1

记录构型	正刺激电压导致	外向膜电流在 CURRENT MONITOR 端的极性
细胞贴附式	超极化	-
内面向外	超极化	-
外面向外	去极化	+
全细胞记录	去极化	+

6.4 全细胞记录

1. 破碎膜片

$\text{G}\Omega$ 封接形成后，可以通过施加爆破式负压吸破微电极尖端封接的那一小片细胞膜，对于某些细胞，也可以应用 PC2C 特别提供的电穿孔（ZAP）功能破碎膜片。

电穿孔功能：当 ZAP 功能启动时，仪器内部将高电压脉冲施加在微电极上，利用电击穿将细胞膜破碎。PC2C 内部施加在电极上的脉冲电压幅度固定为 $+1.2\text{V}$ ，脉冲延续时间可用时间设置电位器（TIME）旋钮在 $0.1\sim 10\text{ms}$ 之间调整，不同类型的细胞要通过实验确定。电位器每圈对应变化 1ms ，从刻度旋钮可直接读出 ZAP 脉冲延续的时间值。应用时应首先设定穿孔脉冲的延续时间，然后按下脉冲产生（PULSE）按钮，在电极上会立即产生幅值

为 1.2V，延续时间为设定值的电脉冲。电穿孔操作时可同时施加刺激脉冲信号，如果 CURENT MONITOR 输出产生较慢速的瞬态电流，则说明穿孔成功，可以继续全细胞膜片钳实验；如果输出没有变化，则说明穿孔脉冲延续时间可能不足，需要适当调整十圈电位器，延长脉冲延续时间，再次进行电穿孔操作。

膜片破碎过程中，应从 STIM. IN 端连续输入测试脉冲施加在微电极上。当 CURENT MONITOR 信号轨迹上的电容充电的瞬态电流波形突然增大时，说明微电极已同细胞内部实现了电接通。同时，示波器上显示的电流基线也会有所偏移，偏移量的大小则与细胞破口处的接触电阻（通路电阻）有关。增加吸力（负压）有时能降低接触电阻，使电容充放电的瞬态电流幅度变大而时间常数变小。如第 5 章所述，较小的接触电阻（串联电阻 R_S ）有利于膜电容和串联电阻的补偿。此外，当进行串联电阻补偿时， R_S 阻值的稳定性也是至关重要的，高 Ca^{2+} 缓冲容量的电极内液（如加入了 10mM EGTA）能防止破碎的膜片堵住电极而使接触电阻自然变大。

2. 慢电容补偿

如果在膜片破碎之前，已进行过快电容补偿，那么下面的工作是对细胞膜电容造成的慢电容瞬态分量进行补偿。适当调整 G-SERIES 和 C-SLOW 两旋钮可以进行慢电容的补偿，具体操作方法请参见 5.2 节。在实现慢电容补偿的同时，也完成了对串联电阻的预测工作，为下一步串联电阻补偿做好了准备。

3. 串联电阻补偿

如 5.3 节所讨论的，当膜电容较大或离子通道电流较大而引起较大的电压钳位误差时，串联电阻补偿就十分重要。在进行 R_S 补偿之前，必须先进行慢电容补偿，有时对 C-FAST 和 τ -FAST 也要进行适当微调，以获得尽可能好的补偿。之所以对快电容再次进行微调，是因为当膜片破碎实现全细胞膜片钳构型以后，电极尖端及细胞膜破口处的分布电容与贴附式相比会稍有变化。串联电阻补偿的第一步是按 5.3 节所述条件将快、慢补偿及关断选择开关（FAST/OFF/SLOW）拨向 FAST 或 SLOW，这时绿色指示灯将点燃，表示串联电阻补偿环路已接通。然后将补偿百分比调整旋钮（%-COMP）调至所需要的补偿率，补偿率的确定亦请参见 5.3 节。 R_S 补偿后，未消尽的残余瞬态量会被放大并有可能引起振荡，所以在进行串联电阻补偿的第一步之前，重复检查 C-FAST、 τ -FAST、C-SLOW、G-SERIES 的状况并再适当进行一次统一的微调是必要的。

注意：G-SERIES 是与 %-COMP 一同确定补偿环路的正反馈量的。在进行慢电容补偿时应小心调整 G-SERIES 旋钮，若将 G-SERIES 值设置过大，在进行 %-COMP 调整时则会导致过补偿（即补偿环路会产生大于期望的正反馈量），也就是说，%-COMP 旋钮尚未调整到所希望的指示值时，补偿环路的实际补偿量已超过期望值而可能引起振荡。电路振荡时，施加在电极上的大幅度振荡电压有可能损伤被记录的细胞。

R_S 补偿依赖于未补偿时膜充电时间常数 τ_u ， τ_u 可由 C-SLOW 和 G-SERIES 的比值大致计算出来，例如：假定 C-SLOW 读数为 20pF，G-SERIES 的读数为 0.1 μ S，那么 $\tau_u = 20\text{pF}/0.1\mu\text{S} = 200\mu\text{s}$ 。如果 τ_u 小于 500 μs ，应将快、慢补偿选择（FAST/OFF/SLOW）开关置于 FAST 档，以满足快速补偿的要求。否则应置于 SLOW 档，因为 SLOW 档容许一定的调整偏差而不易引起高频振荡。最大补偿率的确定也取决于 τ_u 。如果 τ_u 大于 100 μs ，高达 90% 的补偿率也不会使电压钳位响应出现严重的过冲或振铃（命令电压跃变时产生的衰减振荡）。而对较小的 τ_u 值，%-COMP 的设置必须在电流波形出现振铃的那一点以下，或按 5.3 节给出的值设置。

4. 全细胞记录中的滤波和电压/电流极性

和贴附式记录一样，在全细胞记录中也很少使用 100kHz 全带宽。这是因为典型的细胞膜充电时间常数远比 16 μs （即 10kHz 带宽的时间常数）长得多，即使在 R_S 补偿以后也是如此，因而 CURRENT MONITOR 信号在 10kHz 带宽之外没有什么有用信息。

在全细胞记录中，因为电极是与细胞内电连通的，所以正的电压命令导致去极化，外向膜电流为正值，电压和电流信号的极性如表 6.1 所示。

5. 全细胞实验调整过程的波形

图 6.1 为全细胞电压钳实验调整过程的波形。图A部分是当电极施加幅值为 20mV，脉宽为 4ms的连续去极化电压脉冲后，调整慢电容补偿和 R_S 补偿时的电流波形。因为所施加的脉冲幅度足够小，不会诱发细胞膜的动作电流，因而可以观察到膜电容充放电电流和膜电阻漏电流，波形 1 是在垂直尺度较大条件下观察到的未补偿电流波形，这时膜充电时间常数很大，约 200 μ s；波形 2 为RANGE置于 100pF，膜充电电流被部分补偿的情况，此时G-SERIES和C-SLOW都设置得过小。波形 3 中，G-SERIES设置过大，导致电流脉冲出现过冲；波形 4 为G-SIERIES初步调整好时的波形，这时已看不见脉冲初始时的“跳跃”现象。波形 5 是适当调整了C-SLOW以后的情况，仅剩余小脉冲电流波形，其上升沿和下降沿都较圆滑，这是细胞膜以较慢速度充放电时（超过 200 μ s）流过膜电导的电流波形。波形 6 是打开 R_S 补偿开关并置于FAST，然后调整%-COMP旋钮的结果，电流曲线上出现了较大噪声，瞬态伪迹幅度变大，但波形的上升和下降速度却更快了。此时可再次微调G-SERIES和C-SLOW以尽量减小伪迹。图 6.1 中图B部分是用较大的去极化脉冲（50mV）诱发的Na电流波形（已用 Cs^+ 阻断了绝大部分K电流）。波形 7 是在与波形 5 相同条件下（G-SIERIES和C-SLOW补偿已调整好，但没有进行 R_S 的%-COMP补偿）记录到的电流波形，其中，Na电流发生了严重畸变。波形 8 是当串联电阻补偿开关打开并进行了%-COMP补偿后记录到的电流波形，所诱发的Na电流得到正确记录。波形 9 是施加更大的去极化电压（+70mV）并更仔细地调整了G-SIERIES、C-SLOW和C-FAST以后得到的电流记录。

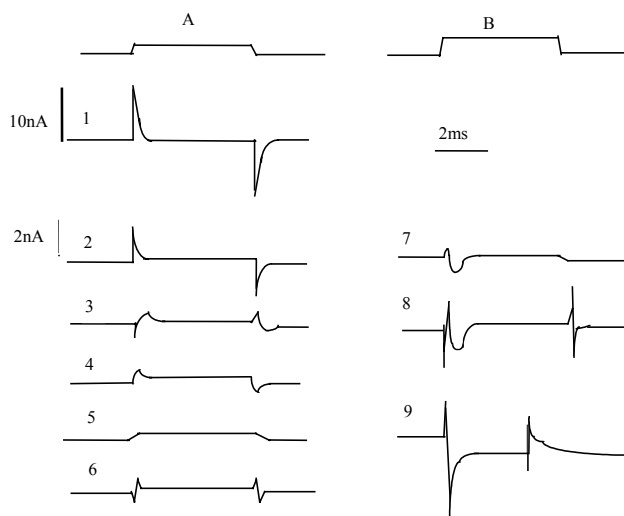


图 6.1 全细胞实验调整过程的波形

6.5 电流钳记录

将 MODE 开关切换到 CC，仪器则进入电流钳记录模式，该模式用于记录细胞膜电位，在 VOLTAGE MONITOR 输出并将电压值显示在前面板的数字电压表上。

当 MODE 置向 CC 时，PC2C 内部放大器的一个滤波器已强制置为 10kHz（面板上的贝塞尔低通滤波器带宽仍由用户选择），C-FAST、C-SLOW 和%-COMP 均被禁止。这样做是为了电流钳记录操作简单和稳定。在 CC 模式下，必须将 GAIN 设置在低增益范围(0.5G Ω)，CURRENT MONITOR 输出才会有正确的标度。

当切换到CC+CCOMM模式后，可以用 V_{HOLD} 去设置保持电流，并且可以通过STIM. IN 端施加刺激脉冲。CC+COMM模式下的电流刺激标度规则很容易记忆：STIM. IN信号与STIMULUS SCALING相乘，然后和 V_{HOLD} 相加，如果在电压钳模式下可产生 1mV的电压刺

激，那么在CC+COMM模式下是 1pA的电流刺激。

7 主要技术参数

探头

电流测量电阻	50GΩ/0.5GΩ, 由 GAIN 的设定值自动切换
最大测量电流	200pA (50GΩ范围); 20nA (0.5GΩ范围)
输入插座 (Input connector)	Q9 (BNC)
命令电压输出插座 (REF. Output)	标准 1mm (红)
地线插座 (GND connector)	标准 1mm (黑)
噪声 (等效电流输入噪声, 外接巴特沃斯或贝塞尔 4 阶滤波器测量, 50GΩ范围, rms)	
DC~1kHz	<60fA
DC~2kHz	<130fA
DC~5kHz	<350fA
DC~10kHz	<700fA
电流测量通道	
增益	0.5~1000mV/pA
带宽	100kHz (0.5GΩ范围)
内部滤波器 (3dB 高频截止频率)	1kHz/2kHz/5kHz/10kHz 四阶贝塞尔特性
电容补偿	
快电容补偿范围	0-10pF, 0.5~5μs 时间常数
慢电容补偿范围	0.2~10pF, 2~100pF, 2~1000pF
串联电导调节	0.01-1μS
串联电阻补偿	
R _s 值确定	由慢电容补偿调节自动确定
补偿范围	0~90%
电极电压控制	
保持电压范围	+/-200mV 范围连续可调, 或开关选择: +100mV/+80mV/+50mV/+20mV/+10mV/0/ -10mV/-20mV/-50mV/-80mV/-100mV
刺激信号定标	0.1/OFF/0.02
电极电位偏置调整	+/-200mV 范围连续可调
电位测量输出倍率	×10
电流钳模式	
保持电流范围	+/-200pA
命令电流输入倍率	100pA/V, 20pA/V
噪声显示	
频率带宽	300Hz~内部贝塞尔低通滤波器设置带宽
显示范围	0~199.9mV (rms)
电源	交流 220V/50Hz
尺寸	
探头	44×20×13mm
主机	440×84×320 mm (W×H×D)

附录 A 玻璃微电极的制备

玻璃微电极的制备方法在 Hamill 的论文中有详细的讨论，这里只概述电极制备的基本步骤和要点。制备玻璃微电极的关键是形成一个圆滑的尖端，使之易于形成封接且不伤害细胞膜。此外，对玻璃微电极适当涂敷绝缘的树脂材料是减小记录背景噪声的关键。

1. 玻璃毛细管

膜片钳用玻璃微电极可用不同化学成分的玻璃毛细管来制备，不同化学成分的玻璃电极适用于不同类型的细胞或不同的实验。玻璃毛细管分为软质玻璃（如碳酸钠玻璃，火石玻璃）和硬质玻璃（如硼硅酸盐玻璃、铝硅酸盐玻璃）。表附录 A.1 列出几种玻璃毛细管的型号及供应商。

表附录 A.1

软质玻璃	外径 (mm)
Non-heparinized hematocrit tubing <i>Any scientific supplier</i>	1.3
Drummond Microcaps ^R <i>Drummond Scientific, Bloomall, PA, U.S.A.</i>	1.4
硬质玻璃	外径 (mm)
Kimax 51 <i>Kimble Products, Vineland, NJ, U.S.A.</i>	1.7
Boralec 100 <i>Rochester Sientific, Rochester, NY, U.S.A.</i>	1.7
Corning Sealing Glass(#7052, #7040) <i>Dow Corning, Midland,MI, U.S.A.</i>	1.6
GCASS 150-4(aluminum glass) <i>A-M Systems, Everett,WA, U.S.A.</i>	1.5

注：该表引自 EPC-10 膜片钳放大器用户手册（EPC10 Patch Clamp Amplifier Manual 8.6）pp. 58

软质玻璃毛细管熔点较低（约 800°C）易于抛光，能拉制成 1~2MΩ 电阻的电极。用它制备的电极经常用于全细胞记录，因为在全细胞记录中，串联电阻的大小是更重要的因素而噪声特性相对是次要的。软质玻璃具有较大的介电弛豫效应，用它制备电极，实验时会有额外的电容性瞬态成分出现，这给慢电容补偿带来困难。硬质玻璃拉制后的尖端部分一般都较狭长，从而电极电阻较大，但它具有更好的噪声特性和介电弛豫特性，在更看重介电损耗参数时应用。介电损耗参数表现为对交流信号的电导率，虽然大多数玻璃的直流电导率都很低，但软质玻璃在 1kHz 左右的交流电导率相当高，已成为膜片钳实验记录中的主要热噪声来源。对于全细胞记录来说，使用 Kimax 玻璃制备电极是较好兼顾各方面特性的折衷选择。

硼硅酸盐和铝硅酸盐玻璃具有较低的介电损耗，特别是后者，对于实现低噪声记录是非常理想的材料（Rae 和 Levis, 1984），但这两种玻璃电极不易形成优良的封接，原因可能是在高温拉制和热抛光过程中有金属挥发到玻璃表面。

2. 拉制

电极的拉制分为两步：第一步把玻璃中段拉细，在大约 7-10mm 长的区域内形成直径 200-400μm 细管；第二步是将玻璃毛细管拉断，形成两个相同的断口整齐、对称的电极。这两个电极都可用作实验。第一步拉制的长度和第二步拉制的温度是决定电极尖端直径的主要控制参数。

有许多厂家生产的拉制仪可用来制备电极。为了使所制备的电极具有良好的重复特性，加热线圈的供电电流最好是可调控的，并要用一个机械止位装置来设定第一步拉制的长度。

3. 涂敷

用绝缘材料对电极尖端进行涂敷,可以减小电极内液与浴池之间的分布电容以及玻璃介电损耗所产生的噪声。典型的涂敷材料如Sylgard(Dow Corning Corp., Midland, MI, U.S.A.)。Sylgard在使用前需将树脂与催化油混合,处理之后在室温下放置几个小时才会开始变稠硬化,甚至在50 °C的温度下也能放置20分钟。建议调好后将其置于-18 °C冰箱中以备随时使用,这样可以保存若干个星期。将Sylgard涂敷到距离电极尖端几个mm至10~20 μ m处,然后迅速用热吹风机或加热线圈将其烘干固化。应该在对电极进行热抛光之前进行涂敷,这样,可以利用热抛光的热效应将涂敷过程中的残留物烧灼、挥发掉。

4. 热抛光

热抛光可使玻璃电极的尖端变圆滑,并除去涂敷时残留的杂质。玻璃电极抛光需要在显微抛光仪或其它类似设备上,在显微镜下,可以将电极尖端放大400~800倍进行观察。热源通常用铂丝或铂-铱丝来产生,为了防止金属蒸发到玻璃电极上,通常在靠近玻璃电极部位的热丝上涂敷一层玻璃。在热丝附近造成陡峭的温度梯度将有助于电极尖端的尖锐部分聚缩,向热丝上吹风可形成这种温度梯度。加热热丝的电流大小必需按玻璃毛细管的型号不同通过实验来确定,开始时的电流最好是刚好使热丝发红。热抛光操作开始,先将热丝电流接通,然后将热丝移向玻璃电极(显微抛光仪上的玻璃电极是固定的,并保持在焦点内)。由于玻璃电极尖端开口的大小通常在观察分辨率的极限尺度,因此可能看不到电极尖端形状的改变,而仅仅看到尖端变暗。若要了解电极尖端是否被熔融堵塞,或者想知道尖端直径的大致情况,可以用一只小注射器产生空气压力,通过微电极向甲醇溶液中吹气,观察电极尖端气泡冒出的状况。

5. 玻璃电极的使用

即使保存在有盖的容器内,电极也必须在制备后2~3小时内使用,空气中的微小尘埃很容易粘在玻璃上而妨碍封接。但对某些易封接的细胞即使使用前一天制备的电极也能完成实验。向电极内充灌的溶液必须先经过过滤(可使用0.2 μ m注射过滤器)。灌注电极内液时,须先将电极尖端浸入装有电极内液的烧杯,并保持数秒,利用毛细现象从尖端吸入少量溶液,或者用5ml注射器从电极尾端施加负压吸入溶液,然后再从电极尾端进行充灌。充灌时要注意电极不能灌满,只要能与电极丝接触就行。电极夹持器内必须保持干燥,切不可沾有溶液。过量充灌的电极其内液容易溢出到夹持器内,打湿夹持器的内表面并形成液膜,从而引发热噪声,极大地增强记录的背景噪声。充灌后遗留在电极内的气泡可以通过轻轻弹击电极外壁来消除。

为实现低噪声记录,每次实验前都必须用甲醇冲洗电极夹持器,再用氮气吹干。把电极插入夹持器之前,最好将手与实验装置的金属表面接触,以释放人体身上感应的静电。安装电极时要将电极夹持器拧紧,以确保封接吸气时电极不会晃动(1 μ m幅度以内)。实验中更换电极时,可用仪器提供的噪声测试功能检查空电极夹持器的噪声水平,如果噪声增大,说明溶液可能已经溢出到夹持器内,此时必须再次清洗并彻底吹干电极夹持器。

附录 B 噪声分析

PC2C 放大器具有极低的背景噪声水平，由于其它来源的噪声在总噪声中占了更大的比重，所以在大多数实验条件下可以忽略放大器产生的噪声。噪声分为随机噪声和同步噪声，随机噪声从根本上来说是由电子和离子热运动产生的，而同步噪声则来源于工频干扰、计算机的 CRT 监视器和高频开关电源、TV 摄像头等。同步噪声很容易在示波器上分辨出来，因为它一般是周期性的，所以只要用适当的信号源触发示波器（如工频触发），这种噪声就会在示波器上显示稳定的周期性波形。用户只要将全部实验装置都良好接地和屏蔽，是可以消除各种来源的同步噪声的，接地和屏蔽方法在第 3 章中已讨论过，下面主要着重于分析随机噪声。

运用 PC2C 前面板数字电压表的 NOISE 显示功能，用户可以很容易地分析噪声的来源。当数字电压表的显示选择开关置于 NOISE 时，它的输入直接连接在 CURRENT MONITOR 输出端，可以测量噪声的均方根值 (Root Mean Square, rms) 电压，最小显示单位为 0.1mV(rms)。为了在测量随机噪声时最大限度地消除工频干扰，仪器在均方根电压测量电路前插入了一级 300Hz 高通滤波器。于是，噪声测量的频带下限为 300Hz，而上限则取决于所选贝塞尔低通滤波器 (LOW PASS BESSEL FILTER) 的上限频率。为了对仪器的随机噪声评估有一个前后一致的标准并便于计算，建议将 LOW PASS BESSEL FILTER 置于 2kHz，GAIN 置于 100mV/pA 进行随机噪声的测量，其最小显示单位为 1fA(rms) ($0.1\text{mV}/100\text{mV/pA} = 10^{-3}\text{pA} = 1\text{fA}$)，噪声测量带宽为 300Hz~2kHz。当探头置于一个良好接地屏蔽的封闭金属盒内，且输入端扣好屏蔽罩时，PC2C 的噪声显示值应在 140fA 以下。如果读到的值偏高，首先检查 G-SERIES 旋钮是否没有置于最小值，而是约 1.00 或更高，因为即使慢电容补偿已经关闭，电路也注入了少量噪声到输入端。第二，试着调一下 C-FAST，如果在 COMMAND INPUT 上有一个含较大噪声的刺激源，它引入的电流噪声会随 C-FAST 的调整而变化，当 C-FAST 置于 3~4pF 时噪声最小。如果出现这种噪声变化，请考虑换一个低噪声的刺激器。

当电极和电极夹持器安装后，可以观测到噪声水平的增加。当电极进入浴池与细胞形成封接后，噪声又有增加。通过分析噪声的增加量，可以了解为降低全系统噪声应该对哪个噪声源加以处理。由于膜片钳放大器、玻璃电极、电极夹持器和细胞膜片这几个噪声源所产生的噪声在统计上是独立的，所以它们对总噪声的形成不是简单的线性相加，而是方差 (标准差的平方) 相加，即 PC2C 面板数字表上读出的噪声值是对来源于各独立噪声源的均方根值 (rms) 求平方和后的平方根。于是，可以算出放大器、电极夹持器、电极浸浴和膜片封接这三个噪声源对总噪声形成的相对比重。

1. 电极夹持器

保持电极夹持器的清洁和干燥是十分重要的。各种溶液尤其是电极内液，容易溢出到电极夹持器上形成薄膜，液膜中离子的热运动会产生噪声并被耦合进入电极。如果在电极的吸管气路上安装一个阀，当更换电极时把干燥空气或氮气吹入吸管中，迅速吹干溶液薄膜，将对保持低噪声记录有很大帮助。

2. 电极

液膜和玻璃材料的介电弛豫特性是玻璃电极产生噪声的主要原因。在电极尖端涂敷一层 Sylgard 可以降低电极的噪声，这是因为 Sylgard 具有疏水性，并且有良好的介电特性。涂敷层有助于降低电极内部和浴池之间的电容，从而减少了玻璃的介电噪声耦合。很明显，增厚涂层 (尤其在电极尖端区域) 并尽可能涂敷到接近尖端，对降低电极噪声有利。铝硅酸盐玻璃的介电弛豫较软玻璃小一个数量级左右，因而具有较好的噪声特性，但在拉制时要求较高的温度，而且不易形成最佳的 GΩ 封接。此外，在电极插入夹持器之前擦干电极外表面的液体和指印对提高噪声性能也是有帮助的。

3. 记录过程

电极进入浴池的长度短一些，噪声会低一些，这同样是因为降低了玻璃电极内外间的电容对热噪声的耦合程度。相当大的噪声来自封接的膜片，只有提高封接电阻来降低这种噪声。

4. 滤波

低噪声记录通常要求有较高的时间分辨率。如果噪声电平较低，可以用较大的滤波带宽来观察给定幅值的单通道事件。仔细选取滤波器带宽可以提高单通道分析的时间分辨率。例如，如果用 50% 阈值分析法分析通道打开和关闭的时间，最佳滤波带宽的选择原则应是使背景噪声的均方根值约等于通道电流幅度的 1/10。由于进行实验时很难有时间选择最优带宽，因此最好在较宽的频带下记录数据，以后进行数据分析时再用模拟或数字滤波器作必要的滤波。

5. 全细胞记录时的噪声

在全细胞记录中，主要噪声来自串联电阻 R_S 和细胞膜电容 C_M 的共同作用。在高于 1kHz 范围，该噪声电流的方差 σ^2 随 R_S 和 C_M 的值而增加：

$$\sigma^2 = \alpha R_S C_M$$

因此要获得低噪声记录，必须尽可能减小 R_S ，更重要的是选择体积较小的细胞以减小 C_M ，详细的论述可参阅 Marty 和 Neher 的著作（1983）以及其他有关全细胞记录的精辟论述。

参考文献

经典论文

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.

Magistretti, J., Mantegazza, M., Guatteo, E. & Wanke, E. (1996) Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine? *TINS* 19, 530-534.

Neher, E. (1981) Unit conductance studies in biological membranes. In: *Techniques in Cellular Physiology* (P. F. Baker, ed.) Elsevier/North Holland.

Neher, E. & Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 779-802.

Rae, J. & Levis, R. (1984) Patch clamp recordings from the epithelium of the lens obtained using glasses selected for low noise and improved sealing properties. *Biophys. J.* 45, 144-146.

Barry, P. H. & Lynch, J. W. (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Memb. Biol.* 121, 101-117.

Sigworth, F. J., Affolter, H. & Neher, E. (1995) Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software. *J. Neurosci. Methods* 56, 203-221.

名著中的有关章节

Penner, R. (1995) Chapter 1: A practical guide to patch clamping. In: *Single-Channel Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Marty, A. & Neher, E. (1995) Chapter 2: Tight-seal whole-cell recording. In: *Single-Channel Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Heinemann, S. H. (1995) Chapter 3: Guide to data acquisition and analysis. In: *Single-Channel Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Sigworth, F. J. (1995) Chapter 4: Electronic design of the patch clamp. In: *Single Channel-Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Neher, E. (1995) Chapter 6: Voltage offsets in patch-clamp experiments. In: *Single Channel-Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Colquhoun, D. & Sigworth, F. J. (1995) Chapter 19: Fitting and statistical analysis of single-channel records. In: *Single-Channel Recording* (B. Sakmann & E. Neher, eds.) Plenum Press, New York.

Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In: *Methods in Enzymology* 207, 123-131, Academic Press, New York.

中国科学家的有关论著以及使用 PC2 型膜片钳放大器作出的成果

康华光. 膜片钳技术及其应用. 北京, 科学出版社. 2003.

陈军. 膜片钳实验技术. 北京, 科学出版社. 2001.

周专, 康华光. 国产膜片钳仪研制成功. 生物化学与生物物理进展, 1990,11(2):128~137.

周专. 膜片钳实验系统及其实验方法研究. 博士论文, 华中科技大学图书馆, 1990.

周专, 康华光. 膜片钳仪系统的噪声分析. 中国生物医学工程学报, 1992, 11(2): 128~137.

曹忠升, 康华光, 邹寿彬, 周专. 应用膜片钳技术研究细胞分泌. 生物化学和生物物理进展, 1992, 19:14-19.

周专, 康华光, 周小萍, 李之望. 大鼠背根神经节 DRG 细胞的单通道记录技术, 华中理工大学学报. 1990, 8:115-122.

周专, 康华光. 膜片钳系统的低噪声设计. 华中理工大学学报, 1990, 8:123-130.

吴政星, 周专, 徐涛. 单通道和全细胞记录技术. 中国医疗器械杂志, 2001, 24(4): 221-226.

Hu HZ and Li ZW. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons. Brain Res, 1996. 739:163~168.

Hu HZ, Li ZW and Si JQ. Evidence for the existence of substance P autoreceptor in the membrane of rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience, 1997. 77:535~541.

Hu HZ and Li ZW. Modulation by adenosine of GABA-activated current in rat dorsal root ganglion neurons. J Physiol, 1997. 501:67~75.

Si JQ, Li ZW, Hu HZ, Zhou XP and Guan BC. Inhibitory effect of baclofen on GABA-induced depolarization and GABA-activated current in primary sensory neurons. Neuroscience, 1997. 81:821~827.

Hu HZ and Li ZW. Modulation of nACh-, GABAA- and 5-HT₃-receptors function by external H-7, a protein kinase inhibitor, in rat sensory neurons. Br J Pharmacol, 1997. 122:1195~1201.

Hu HZ, Shao M and Li ZW. Enhancement of GABA-activated current by muscarine in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience, 1999. 89:883~890.

Si JQ and Li ZW. Inhibition by baclofen of NMDA-activated current in rat dorsal root ganglion neurons. Acta Pharmacol Sin, 1999. 20:324~328.

Zhang C, Zhou Z. Related Articles Ca²⁺-independent but voltage-dependent decretion in mammalian dorsal root ganglion neurons. Nat Neurosci. 2002. 5(5):425-30.

Xuelin Lou, Xiao Yu, Xiao-Ke Chen, Liming He, Kai-Lai Duan, Anlian Qu, Tao Xu and Zhuan Zhou. Na channel inactivation: a comparison study between pancreatic islet β -cells and adrenal chromaffin cells in rat. J. Physiol. 2003.

Hongliang Zhu, Bertil Hille, and Tao Xu. Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. PNAS. 2002. 99(26): 17055~17059.

保修和维修

在用户收到 PC2C 膜片钳放大器的 12 个月内如果出现质量问题或非人为故障，本公司将免费修理或替换不正常工作的部件。如果仪器在 12 个月保修期外发生故障，本公司可予以维修，只收取成本费用。另外，本公司还可应用户要求对仪器进行校准。

由于非正常使用、擅自打开探头和机箱或其他意外事故造成的仪器损坏，本公司不予保修但可给予收费修理。

请与我们联系

您在使用 PC2C 中有任何问题、意见或改进建议，请及时与我们联系，我们将尽可能帮助您解决。如果您使用 PC2C 在科学研究中取得了成果，发表了论文，也不要忘记告诉我们，仪博公司将酌情给予您奖励，并将您的成果或论文题目列入以后的 PC2C 膜片钳放大器使用手册中。

我们的联系地址如下：

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

技术负责人：瞿安连 华中科技大学 生命科学与技术学院 教授