

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106033069 A

(43) 申请公布日 2016. 10. 19

(21) 申请号 201510104564. 4

(22) 申请日 2015. 03. 10

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 陈培华 孙坚原 申雪峰 戴金叶  
张树利

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 27/22(2006. 01)

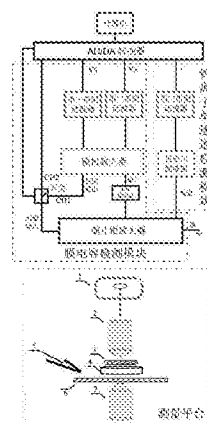
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

### (54) 发明名称

单个囊泡融合和回收及其与钙离子通道耦合的膜片钳检测装置

### (57) 摘要

本发明公开了一种单个囊泡融合和回收及其与钙离子通道耦合的膜片钳检测装置,属于神经生物学研究检测仪器领域。其技术方案要点是电脑程序控制下包括膜电容检测模块、钙离子单通道电流检测模块和测量平台。本发明的用途是为检测单个囊泡融合与回收的动力学特性、钙离子单通道电流特性以及单个囊泡融合和回收与钙离子通道的耦合的动力学特性提供了一种直接、定量、实时以及高时间分辨率、高信噪比、高精度的检测装置。



1. 一种膜片钳检测装置,所述装置包括膜电容检测模块、钙离子单通道电流检测模块和测量平台,其中所述膜电容检测模块包括安装电容校准按钮的膜片钳放大器 EPC-8、锁相放大器、第一带阻滤波器和第二带阻滤波器;所述钙离子单通道电流信号检测模块包括膜片钳放大器 EPC-10、第三带阻滤波器、贝塞尔滤波器;所述测量平台包括光学显微镜、高精度样本操作平台、计算机工作站与 AD/DA 数据交换接口和红外相机以及灌流浴槽。

2. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述膜片钳放大器 EPC-8 的参数设置为慢电容补偿(C-slow):10pF range;慢电容补偿数值:0.2pF;串联电阻补偿:off;串联电导补偿数值:0.2 $\mu$ S;增益:20-50mV/pA;滤波器:Full;刺激比例因子:0.1;TR:2 $\mu$ S。

3. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述锁相放大器的参数设置为时间常数:1ms,24dB;信号输入:input:A, couple:AC,地(ground):Float;灵敏度:1Vr.m.s.;滤波:Line&2\*Line;通道 1:输出(Output):X, Offset:Off, Ration:Off, Expand:1;通道 2:输出(Output):X, Offset:Off, Ration:Off, Expand:1;正弦波频率 20KHz;正弦波幅度:150mV-200mV;Harm:1;Trig:Sine;Source:Internal。

4. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述膜片钳放大器 EPC-10 的参数设置为记录模式:电压钳模式;增益:50mV/pA;低通滤波 filter1:30kHz;低通滤波 filter2:2.9-5kHz,记录模式:On Cell。

5. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述贝塞尔滤波器的频率设置为 500Hz-1kHz。

6. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述光学显微镜为倒置显微镜,且物镜采用长工作距离。

7. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述的灌流浴槽的面积约为 75mm<sup>2</sup>,优选当使用脑片作为制备时,面积不大于 75mm<sup>2</sup>,当使用培养细胞或是急性分离细胞作为制备时,面积可以大于 75mm<sup>2</sup>。

8. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述的灌流浴槽的形状为圆形。

9. 根据权利要求 1 所述的膜片钳检测装置,其中所述膜片钳放大器 EPC-8、锁相放大器、第一带阻滤波器和第二带阻滤波器,所述膜片钳放大器 EPC-10、第三带阻滤波器、贝塞尔滤波器,所述光学显微镜、微操纵器的机箱外壳和红外相机均将外壳做接地处理。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的膜片钳检测装置用于研究单个突触囊泡胞吐和胞吞的动力学过程及其与钙离子通道的耦合。

## 单个囊泡融合和回收及其与钙离子通道耦合的膜片钳检测装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于科学仪器领域,具体涉及一种用于研究单个囊泡与突触前膜融合与回收的动力学、钙离子单通道电流的动力学,单个囊泡的融合和回收及其与钙离子通道耦合的高精度检测装置。尤其涉及一种用于神经突触传递领域研究以及突触相关神经疾病研究的电生理检测系统。

### 背景技术

[0002] 万亿个神经元构成了一个有序而动态的神经网络。神经突触的联接形成神经信息处理的结构基础,突触神经递质的释放成为神经信息传递的生理基础。当突触前膜去极化或是产生动作电位, $\text{Ca}^{2+}$ 通过电压门控的钙离子通道流入,与相应的 $\text{Ca}^{2+}$ 感应器结合而触发突触囊泡与突触前膜发生融合形成囊泡的胞吐,神经递质继而释放并与突触后受体结合从而引发突触后神经元的后续电活动,从而完成神经信息的传递和处理,而突触囊泡通过胞吞方式再次回收利用。神经系统完成复杂的功能有赖于其基本单元——神经元之间的高度精确和有效的信息传递。神经递质释放动力学的改变可引起神经网络紊乱并可能导致神经系统疾病的发生。Thomas C. Sudhof 发现了 $\text{Ca}^{2+}$ 通过电压门控的钙离子通道流入后与相应的 $\text{Ca}^{2+}$ 感应器 synaptogamin 结合并触发囊泡融合,从而揭示了囊泡释放被运输物的时间精确性,从而于 2013 年被授予了诺贝尔奖医学奖。目前为止研究者提出了两种主要的囊泡胞吐和胞吞的方式:全融合方式(full-collapse)和快速胞吐-胞吞(kiss-and-run)方式。

[0003] 一般认为胞吐发生在活性带区域(active zone),胞吞发生在内吞区(endocytotic zone),而钙离子是调控突触囊泡胞吐和胞吞的关键信使。因此,钙离子通道与囊泡释放位点的耦合对囊泡的融合至关重要。从某种意义上说,钙通道与囊泡的距离决定了突触传递的动力学特性。利用冷冻断裂技术(freeze-fracture),并结合电子显微镜或原子力显微镜技术对活性带区域的结构分析,从而对囊泡融合位点与钙离子通道的空间分布估算显示:钙离子通道呈簇状分布,且与囊泡的距离小于 20nm,显示两者之间的高度耦合关系。

[0004] 检测突触前囊泡胞吐和胞吞的方法主要有电子显微图像、光学显微荧光成像、膜片钳突触后电流间接推测方法和全细胞膜电容测量法。其中,膜片钳全细胞膜电容测量技术是通过检测全细胞膜电容,得到细胞膜面积的改变,观测囊泡与细胞膜融合以及囊泡回收的现象。具有直接、定量和实时显示的优势。然而这种方法受突触终末的电学性质的局限很大。在早期,这一技术主要用于对嗜铬细胞、肥大细胞和颗粒细胞等分泌细胞的单个囊泡与细胞膜融合时产生的膜电容进行检测。之后通过提高信噪比成功地对神经胶质瘤细胞中单个囊泡与细胞膜的融合进行电容检测。近年来,这一技术已成功用于观察中枢神经分泌和神经突触,实现了毫秒级时间分辨率精度上对中枢神经细胞突触前终末进行突触囊泡释放和回收相关的全细胞膜电容记录。但是它的实现是通过检测 270 万个自发性突触

后电流进行叠加后计算得到单个囊泡的膜电容,虽然提高了检测精度,但是它是一种间接的手段。近年来用细胞贴附式膜电容检测技术将膜电容记录精度提高到观测单个突触囊泡的水平,并且可以对 kiss-and-run 和全融合方式的胞吞胞吐进行区分,但是其检测精度难以应用于对中枢神经系统单个囊泡进行检测。关键点在于信噪比,只有将信噪比提高,将噪声峰峰值水平降低到 50aF 以下才有可能检测到中枢神经系统单个囊泡的活动。

[0005] 钙离子内流驱动突触囊泡释放神经递质的动力学,即钙离子通道与单个囊泡胞吐胞吞的耦合是神经科学领域具有挑战性且引起广泛兴趣的一个重要问题。对于理解局部钙信号传递和突触的生理过程,解释突触可塑性的机制以及钙缓冲剂的作用,揭示大脑中信息的处理和编码的机理至关重要。目前对这个问题的研究主要有两种方法。第一种是通过对神经递质释放的速率和突触前终扣钙通道电流之间对数-对数的关系进行分析,得到的斜率被称为钙电流与囊泡融合的协同 (cooperativity)。它间接的提供了钙离子通道与囊泡胞吐的耦合关系以及活性带的形态特征。通过这种分析方法得到在大鼠的 calyx 突触中,不同类型的钙离子通道电流 N、P/Q 和 R 型具有不同的协同作用。其中 P/Q 型高于 N 和 R 型,表明 P/Q 型钙离子通道与囊泡间的距离小于另外两种类型。随着发育,囊泡融合速率明显加快而所需开放的钙离子通道数目减少,表明成熟突触的钙通道与钙感受器的耦合更加紧密。在神经肌肉接头上,人们曾用建模仿真技术推测,  $Ca^{2+}$  可以通过一个或是两个钙离子通道驱动单个囊泡融合。通过突触前终扣内注入钙离子螯合剂 BAPTA 和 EGTA 后进行的突触传递动力学分析提供了另一种,可以分析钙通道与  $Ca^{2+}$  感受器耦合的方法。在幼龄动物 (出生后 ~ 8-10 天) 的 calyx of Held 突触中,  $Ca^{2+}$  与钙感应器的平均耦合距离小于 100nm。而在成熟 (出生后 ~ 16-18 天) 的 calyx of Held 突触中,耦合距离小于 20nm。

[0006] 上述两种方法基于全细胞记录进行检测,通过间接的方式得到钙通道与囊泡释放的耦合关系。其缺点是难以确认参与囊泡融合耦合的部分钙通道,且难以区分 full collapse 和 kiss-and-run 两种融合回收方式。

## 发明内容

[0007] 本发明优化了现有的细胞贴附式膜片钳膜电容检测方法,降低了系统噪声,将细胞贴附式膜片钳电容检测方法拓展到应用于中枢神经系统单个囊泡融合和回收的检测,并在检测单个囊泡活动的同时对钙通道电流进行检测,为研究单个突触囊泡及其与钙离子通道的耦合提供了一种直接的、高精度的,高分辨率的检测系统。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供了以下方面:

[0009] 本发明的第一方面提供一种膜片钳检测装置,所述装置包括膜电容检测模块、钙离子单通道电流检测模块和测量平台,其中所述膜电容检测模块包括膜片钳放大器 EPC-8 (安装电容校准按钮的 EPC-8, HEKA)、锁相放大器 (SR850, Stanford Research Instrument, U. S. A.)、第一带阻滤波器 (Quest Scientific Instruments) 和第二带阻滤波器;所述钙离子单通道电流信号检测模块包括膜片钳放大器 EPC-10、第三带阻滤波器、贝塞尔滤波器 (Frequency Devices INC., Tunable active filter900);所述测量平台包括光学显微镜 (Olympus Corporation) (带有物镜和目镜) 与高精度样本操作平台 (Sutter Instrument, ROE-200) (包括微操纵器和载物台),计算机工作站与 AD/DA 数据交换接口 (BNC-2090, National Instruments, U. S. A) 和红外相机 (DVC Company, 710M-00-FW) 以及

灌流浴槽。

[0010] 在一个优选的实施方案中,其中所述膜片钳放大器 EPC-8 的参数设置为慢电容补偿 (C-slow):10pF range;慢电容补偿数值:0.2pF;串联电阻补偿:off;串联电导补偿数值:0.2 $\mu$ S;增益:20-50mV/pA;滤波器:Full;刺激比例因子:0.1;TR:2 $\mu$ S。

[0011] 在一个优选的实施方案中,其中所述锁相放大器的参数设置为时间常数:1ms,24dB;信号输入:input:A, couple:AC, ground:Float;灵敏度:1Vr.m.s.;滤波:Line&2\*Line;通道1:Output:X, Offset:Off, Ration:Off, Expand:1;通道2:Output:X, Offset:Off, Ration:Off, Expand:1;正弦波频率 20KHz;正弦波幅度:150mV-200mV;Harm:1;Trig:Sine;Source:Internal。

[0012] 在一个优选的实施方案中,其中所述膜片钳放大器 EPC-10 的参数设置为记录模式:电压钳模式;增益:50mV/pA;低通滤波 filter1:30kHz;低通滤波 filter2:2.9-5kHz,记录模式:On Cell。

[0013] 在一个优选的实施方案中,其中所述贝塞尔滤波器的频率设置为 500Hz-1kHz。

[0014] 在一个优选的实施方案中,其中所述光学显微镜为倒置显微镜,且物镜采用长工作距离。

[0015] 在一个优选的实施方案中,其中所述的灌流浴槽的面积约为 75mm<sup>2</sup>,优选当使用脑片作为制备时,面积不大于 75mm<sup>2</sup>,当使用培养细胞或是急性分离细胞作为制备时,面积可以大于 75mm<sup>2</sup>。

[0016] 在一个优选的实施方案中,其中所述的灌流浴槽的形状为圆形。

[0017] 在一个优选的实施方案中,其中所述膜片钳放大器 EPC-8、锁相放大器、第一带阻滤波器和第二带阻滤波器,所述膜片钳放大器 EPC-10、第三带阻滤波器、贝塞尔滤波器,所述光学显微镜、微操纵器的机箱外壳和红外相机均将外壳做接地处理。

[0018] 本发明的第二个方面提供本发明第一个方面所述的膜片钳检测装置用于研究单个突触囊泡胞吐和胞吞动力学过程及其与钙离子通道的耦合。

[0019] 具体的,所述的膜电容检测模块的功能是检测单个囊泡与细胞膜融合或回收时,产生的膜电容的改变。其中的膜片钳放大器 EPC-8 用于提供膜电压控制电位,测量被测细胞膜上的膜电流,对电极电容以及膜片电容进行补偿;锁相放大器 SR850 功能是产生正弦波,并将记录到的膜电流信号转换为膜电容改变 Y2 和膜电导改变 Y1 两路信号,并输出;第一和第二带阻滤波器的功能是将工频噪声 50Hz 滤掉。

[0020] 在所述的膜电容检测模块中,数据通过 16 位的模拟数字转换器 (AD/DA 转换器) 进行数字采集;并通过 igor 软件编写的程序控制计算机的 RS-232 数据采集串口 (National Instruments, PCI-MIO-16XE-10) 对锁相放大器进行控制;锁相放大器产生的正弦波通过开关控制是否叠加在膜片钳放大器中所设置的控制电位 (holding potential) 上;两路模拟数字转换输出口 CH1 和 CH2;CH1 为锁相放大器产生的正弦波输出,CH2 提供电压钳控制电位和电压脉冲,用于做膜片钳细胞封接;开关将两路模拟信号进行选择或是叠加,输出的 TTL 信号决定是输出控制电位信号,还是输出控制电位信号叠加正弦信号;开关的输出接入膜片钳放大器的刺激输入端;膜片钳放大器的电流输出进入锁相放大器的信号输入端,经过信号分离,得到 Y1(实部)和 Y2(虚部)两路信号,通过带阻滤波器将 50Hz 工频干扰噪声滤掉,最后经 AD/DA 转换器由电脑记录信号;

[0021] 进一步地,在钙离子单通道电流信号检测模块中,膜片钳放大器 EPC-10 的功能是对钙离子通道在各个膜电压下的单通道电流进行记录;第三带阻滤波器用于将记录的单通道电流中的工频干扰成分滤掉;贝塞尔滤波器用于对记录的单通道电流进行低通滤波。

[0022] 在所述的钙离子单通道电流信号检测模块中,EPC-10 记录到单个钙离子通道电流信号输入贝塞尔滤波器,采用低通滤波器进行硬件低通滤波;滤波后的电流输入第三带阻滤波器,滤掉 50Hz 工频干扰。

[0023] 上述钙离子单通道电流信号检测模块中,当单独采用 EPC-10 膜片钳放大器对钙离子单通道电流记录时的设置为:记录模式:电压钳模式;增益:50mV/pA;低通滤波 500-1kHz。当膜电容与通道电流进行同时记录时不采用 EPC-10,而直接采用 EPC-8 进行记录,参数设置如上所述。

[0024] 进一步地,在所述的测量平台中采用倒置显微镜,物镜采用长工作距离(40×/0.8w, OLYMPUS)以减小寄生电容(stray capacitance)。如果采用短工作距离的物镜,物镜与浴池溶液间的寄生电容难以被补偿。

[0025] 在所述的测量平台中采用样本操作平台,对被视样本进行前后左右四个方向的移动,使得被测细胞的位置移动到视野范围内。

[0026] 在所述的测量平台中采用微操纵器,将玻璃微电极进行入液,移动到视野范围内,将电极深入到细胞上方一系列微操作,调整电极位置使得电极能进行 GΩ 封接操作。

[0027] 在所述的测量平台中采用红外相机结合微分干涉对比 DIC 偏振片(Nikon),使被测细胞或组织更加立体清晰,将光学显微镜所观察到的图像在电脑屏幕上进行可视化。使得操作玻璃微电极时的微操作步骤都能在电脑屏幕上进行可视化。

[0028] 在所述的测量平台中采用 AD/DA 数据交换接口,数据通过 16 位的模拟数字转换器进行数字采集。膜电容变化 Y2,膜电导变化 Y1,和单通道电流 I 分别通过 AD/DA 数据交换接口输入,并将数据输出通过软件程序读入。

[0029] 在所述测量平台中,设计灌流浴槽的面积约为 75mm<sup>2</sup>,形状不限制于圆形。当使用脑片作为制备时,面积不大于 75mm<sup>2</sup>,当使用培养细胞或是急性分离细胞作为制备时,面积可以大于 75mm<sup>2</sup>。

[0030] 本发明涉及的检测装置和检测技术方案产生的有益效果是:(1) 信噪比高,噪声水平低。各个模块的系统噪声为:膜电容噪声 ≤ 10aF,膜电导噪声 1pS,单通道电流噪声 ≤ 0.1pA。在体记录时,膜电容噪声 ≤ 50aF,膜电导噪声 10pS,单通道电流噪声 ≤ 0.3pA;(2) 检测精度提高,拓展了该系统的应用范围,适用于分泌细胞如嗜铬细胞、肥大细胞、PC12 和颗粒细胞等的检测,以及中枢神经系统中突触尺寸较大的细胞如 Calyx of Held;(3) 在检测单个囊泡的融合和回收的同时能检测钙通道电流活动。

## 附图说明

[0031] 图 1、细胞贴附式膜电容测量和离子通道电流偶联检测装置

[0032] 其中 1 表示红外相机,2 表示物镜,3 表示被测样本,4 表示灌流浴槽,5 表示微操纵器,6 表示载物台,7 表示目镜

[0033] 图 2、细胞贴附式膜电容检测装置

[0034] 图 3、离子通道单通道电流检测装置

[0035] 图 4、测量平台

[0036] 图 5、单个囊泡胞吐 (A) 和胞吞 (B) 的膜电容变化

[0037] 图 6、Calyx of Held 突触前终末神经递质释放面钙离子单通道电流 (A) 及统计结果 (B)

### 具体实施方式

[0038] 本系统的特征及技术内容,参阅以下有关本发明的详细说明与附图,所附附图仅提供参考和说明用,并非对本发明加以限制。

[0039] 根据本发明,整个检测装置包括膜电容检测模块(左虚线框)、钙离子单通道电流检测模块(右虚线框)和测量平台(下虚线框),如图 1 所示。在记录膜电容变化 Y1 和膜电导变化 Y2 的同时,记录离子通道电流 I。

[0040] 在膜电容检测模块中,如图 2 所示,膜片钳放大器提供膜电位控制电压,以及在信号记录时对快电容和慢电容进行补偿,并记录膜片电流。记录的电流输入到锁相放大器中,锁相放大器在信号记录过程中提供一定频率和一定幅度的正弦波,并将膜片钳放大器记录到的膜片电流分成膜电导变化 Y1 和膜电容变化 Y2 两个信号通路进行输出。两路信号分别使用带阻滤波器将工频噪声滤掉后,信号输入 AD/DA 转换器,然后输入电脑。

[0041] 在钙离子单通道电流检测模块中,如图 3 所示。电流放大器通过提供电压控制电位以及对电极电容进行补偿,通过高增益 50mV/pA,记录膜片上的单个或是多个离子通道电流,电流通过贝塞尔滤波器滤除高频成分后,通过带阻滤波器将工频成分滤掉,最后信号输入电脑记录。

[0042] 在测量平台中,如图 4 所示,将被测样本 (3) 放在灌流浴槽 (4) 中,通过进水管出水管以一定的速度进行灌流,将灌流浴槽放在载物台 (6) 上,通过样本操作平台,对被测样本进行前后左右四个方向的移动,使得被测细胞的位置移动到视野范围内。其中通过显微镜放大被视,采用倒置显微镜,物镜 (2) 采用长工作距离 (40×/0.8w, OLYMPUS) 以减小寄生电容 (stray capacitance)。如果采用短工作距离的物镜,物镜与浴池溶液间的寄生电容难以被补偿。在实验过程中,采用微操纵器 (5),将玻璃微电极进行入液,移动到视野范围内,将电极深入到细胞上方一系列微操作,调整电极位置使得电极能进行 GΩ 封接操作。以上操作均通过红外相机 (1),并将光学显微镜所观察到的图像在电脑屏幕上进行可视化。使得操作玻璃微电极时的微操作步骤都能在电脑屏幕上进行可视化,并且操作更容易。

[0043] 与现有装置相比,膜电容、膜电导信噪比均有提高,膜电容检测精度由检测单个分泌细胞囊泡(约 200nm) 提高到检测中枢神经系统单个突触囊泡(约 50nm)。有研究组利用细胞贴附式膜电容检测系统,检测嗜铬细胞中单个囊泡回收时产生的膜电容变化 (Henkel, et. al., 2001)。本发明中在中枢神经系统 Calyx of Held 突触上,对突触前终末神经递质释放面做 GΩ 封接,测量到中枢神经单个突触囊泡膜电容约为 74pF,直径约为 50nm,如图 5 所示。单通道电流噪声减小到可检测单个钙离子通道电流,同样对突触前终末神经递质释放面做细胞贴附式检测,如图 6 所示为记录的静息状态下在不同胞外钙浓度下钙离子单通道电流,可记录到在正常生理状态下 (2mM 胞外钙浓度,静息膜电位),钙离子单通道电流约为 0.28pA。

[0044] 参考文献:

---

[0045] Henkel, A W, Horstmann, H, Kerstin, M. Direct observation of membrane retrieval in chromaffin cells by capacitance measurements. FEBS Letters 505 (2001): 414-418



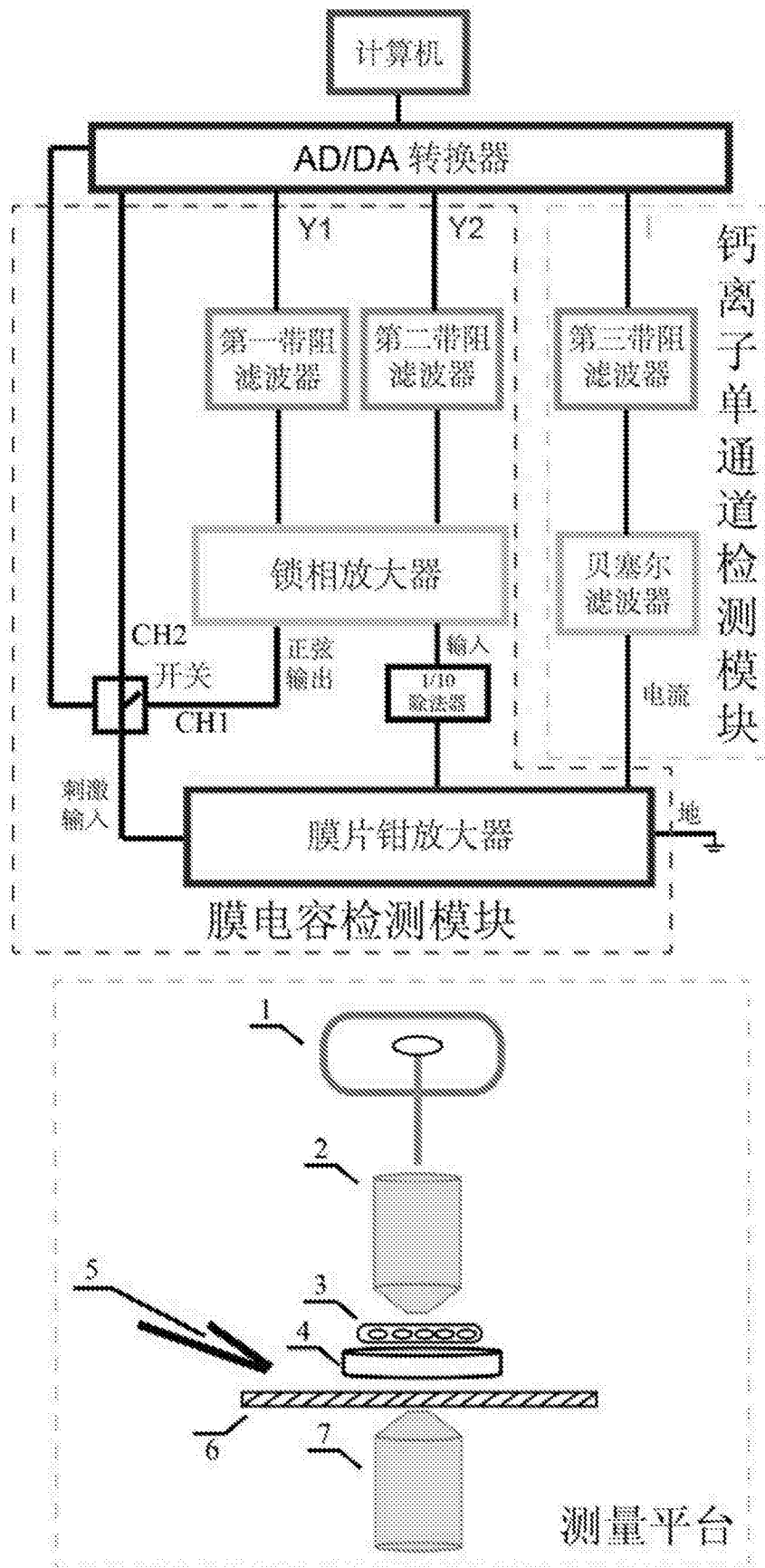


图 1

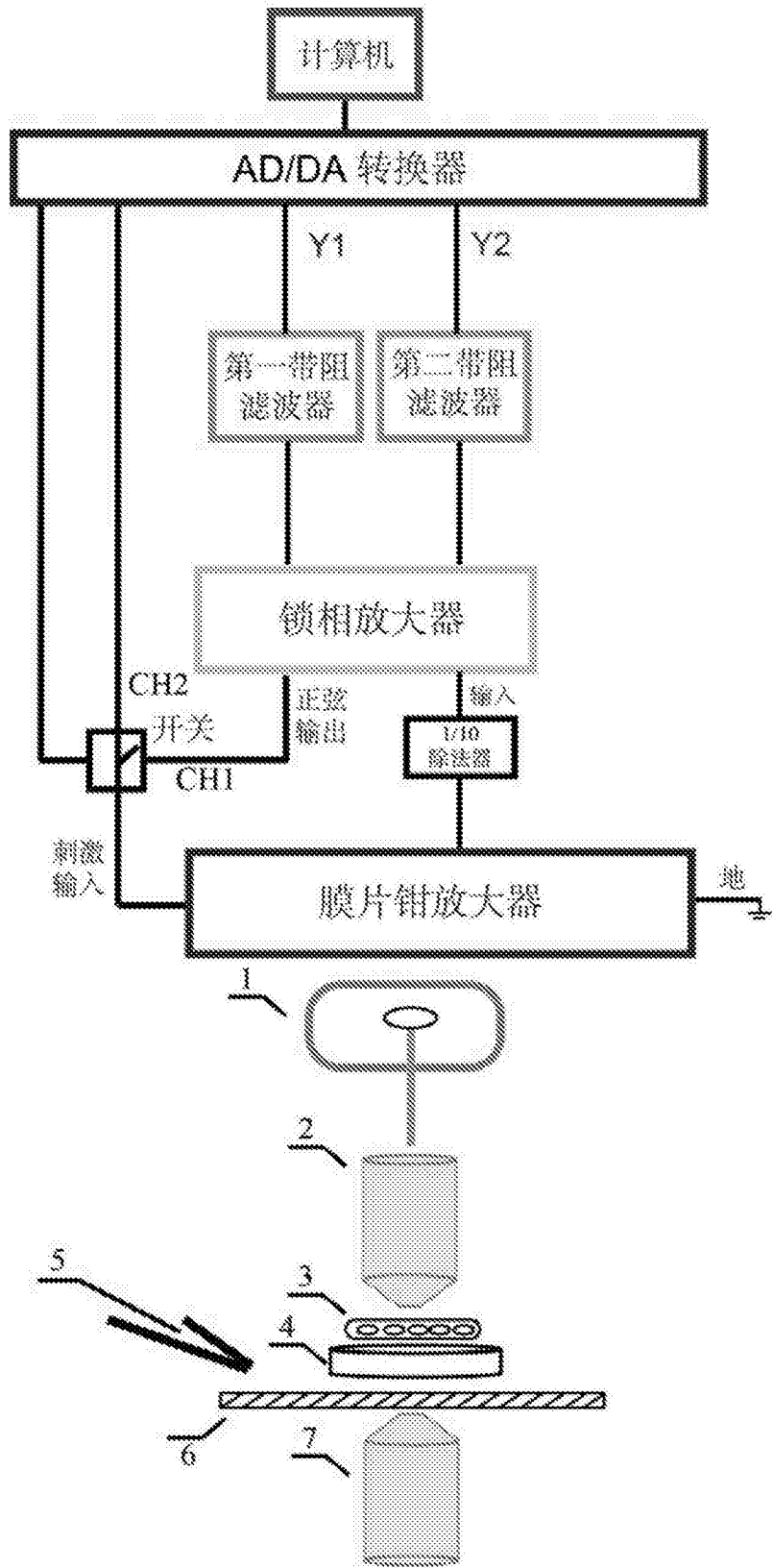


图 2

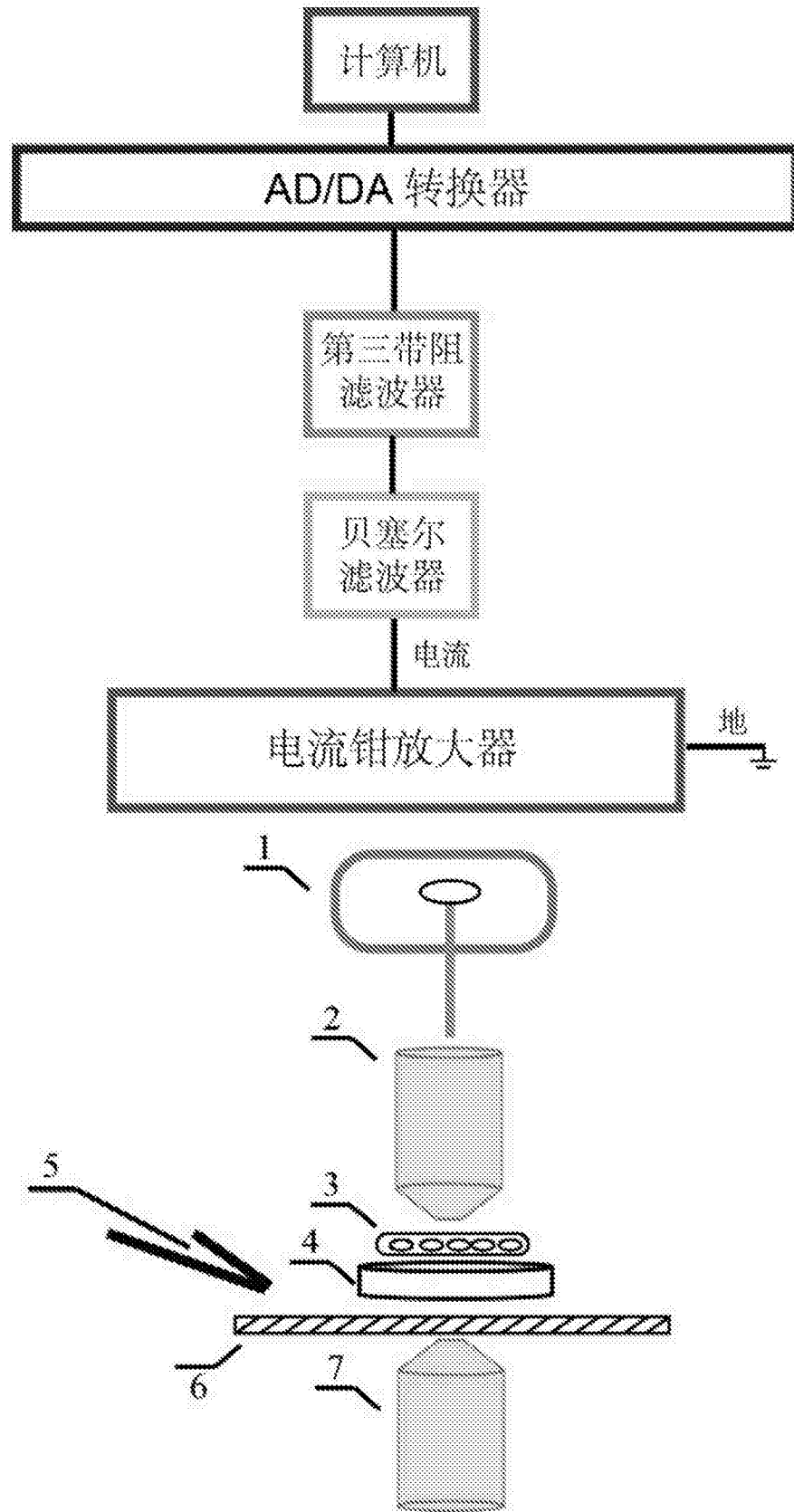


图 3

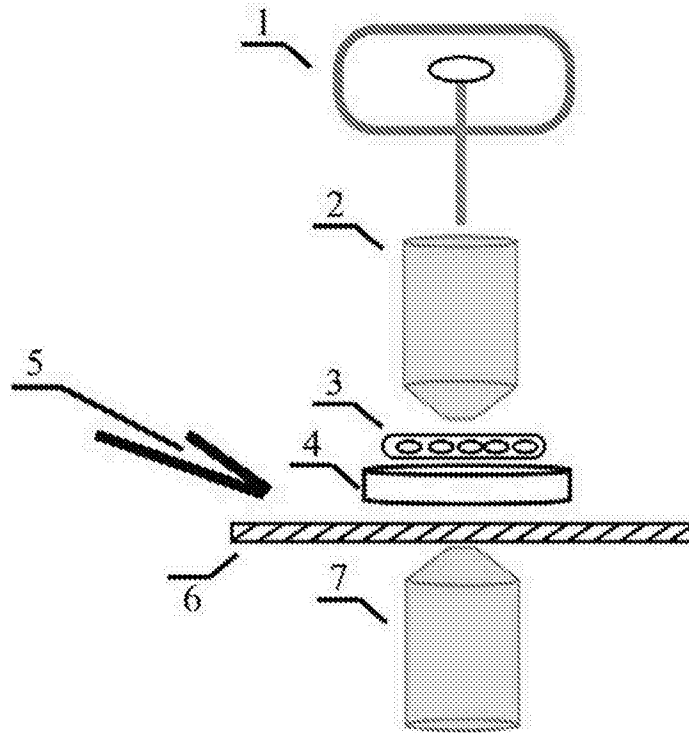


图 4

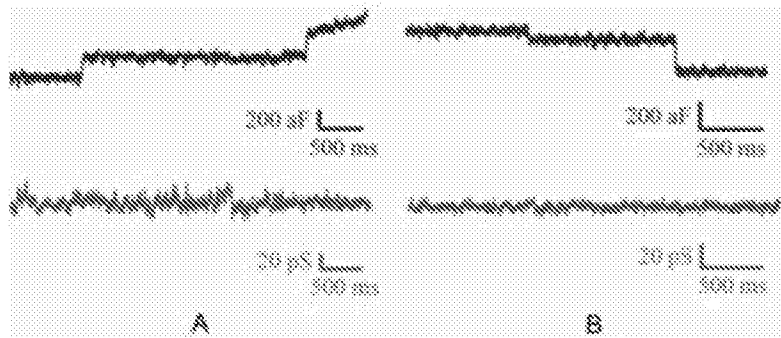


图 5

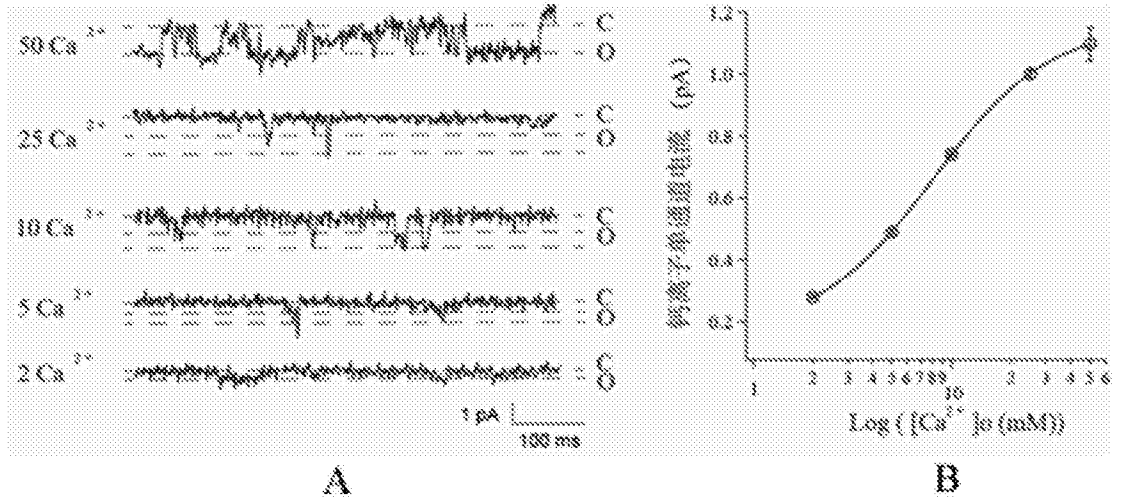


图 6