

实验技术

基于扫描离子电导显微镜负反馈扫描控制技术的高分辨率膜片钳技术

杨茜¹, 刘晓¹, 张晓帆¹, 卢虎杰¹, 张彦军^{1,2,*}

¹ 国家纳米技术与工程研究院, 天津 300457; ² 天津国家生物防护装备工程技术研究中心, 天津 300161

摘要: 细胞膜表面精细结构中的离子通道具有重要的生理功能。为了克服目前利用光学显微镜进行微电极定位的传统膜片钳技术分辨率的不足, 本实验室将扫描离子电导显微镜技术(scanning ion conductance microscopy, SICM)与商用膜片钳技术相结合, 构建了基于 SICM 负反馈扫描控制技术的高分辨率膜片钳技术。我们首先运用 SICM 负反馈技术控制纳米尺度玻璃微探针进行活体细胞表面的非接触扫描, 获得细胞膜表面微结构的高分辨率成像, 而后运用 SICM 负反馈控制技术操控该微探针在细胞膜表面非接触地移动并将其精确定位于扫描成像中感兴趣的膜表面纳米尺度微结构上方, 最后利用该微探针作为膜片钳记录电极实现对此微结构的高分辨率电生理信号记录。为了检验该技术实现高分辨率离子通道记录的能力, 分别在活体单层膜犬肾上皮(MDCK)细胞膜的微绒毛、细胞间的紧密连接等纳米尺度微结构上进行了细胞贴附式离子通道记录, 结果显示 MDCK 细胞膜微绒毛的离子通道在钳制电压(pipette holding potential)为 -100、-60、-40、0、+40、+60、+100 mV 条件下处于开放状态, 而 MDCK 细胞间的紧密连接处在钳制电压为 -100、-40、0、+40、+100 mV 条件下未检出有离子通道开放动作。结果提示, 我们构建的高分辨率膜片钳技术实现了微探针的准确定位及特定纳米尺度微结构上的高分辨率膜片钳记录, 为活体生物样品表面离子通道的空间分布及其功能研究提供了一种有效的工具。

关键词: 高分辨率膜片钳; 扫描离子电导显微镜; 离子通道; 犬肾上皮细胞

中图分类号: Q25

High-resolution patch-clamp technique based on feedback control of scanning ion conductance microscopy

YANG Xi¹, LIU Xiao¹, ZHANG Xiao-Fan¹, LU Hu-Jie¹, ZHANG Yan-Jun^{1,2,*}

¹China National Academy of Nanotechnology and Engineering, Tianjin 300457, China; ²Tianjin National Bio-Protection Engineering Center, Tianjin 300161, China

Abstract: The ion channels located on the cell fine structures play an important role in the physiological functions of cell membrane. However, it is impossible to achieve precise positioning on the nanometer scale cellular microstructures by conventional patch-clamp technique, due to the 200 nm resolution limit of optical microscope. To solve this problem, we have established a high-resolution patch-clamp technique, which combined commercial scanning ion conductance microscopy (SICM) and patch-clamp recording through a nanopipette probe, based on SICM feedback control. MDCK cells were used as observation object to test the capability of the technique. Firstly, a feedback controlled SICM nanopipette (~150 M Ω) non-contactly scanned over a selected area of living MDCK cells monolayer to obtain high-resolution topographic images of microvilli and tight-junction microstructures on the MDCK cells monolayer. Secondly, the same nanopipette was non-contactly moved and precisely positioned over the microvilli or tight-junction microstructure under SICM feedback control. Finally, the SICM feedback control was switched off, the nanopipette slowly contacted with the cell membrane to get a patch-clamp giga-ohm sealing in the cell-attached patch-clamp configuration, and then performed ion channel recording as a normal patch-clamp electrode. The ion channel recordings showed that ion channels of microvilli microstructure

Received 2010-02-03 Accepted 2010-05-07

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30971184) and Tianjin Natural Science Foundation of China (No. 08JCYBJC26500).

*Corresponding author. Tel: +86-22-62002900-1139; Fax: +86-22-62002984; E-mail: yanjun_zhang@cnane.com.cn

opened at pipette holding potential of -100, -60, -40, 0, +40, +60, +100 mV ($n=11$). However, the opening of ion channels of tight-junction microstructure was not detected at pipette holding potential of -100, -40, 0, +40, +100 mV ($n=9$). These results suggest that our high-resolution patch-clamp technique can achieve accurate nanopipette positioning and nanometer scale high-resolution patch-clamp recording, which may provide a powerful tool to study the spatial distribution and functions of ion channel in the nanometer scale microstructures of living biological samples.

Key words: high-resolution patch-clamp; scanning ion conductance microscopy; ion channel; MDCK cells

细胞膜上的离子通道通常分布于细胞膜表面的特有微观结构中且分布不均匀, 而离子通道的这种非均一分布往往与细胞局部特征性膜结构的特定生理功能紧密相连。肾上皮细胞具有保钠排钾功能, 其控制 Na^+ 重吸收的阿米洛利敏感的上皮 Na^+ 通道局限分布于细胞膜的顶膜面, 而调控排 K^+ 的 K^+ 通道多分布于顶膜面的微绒毛上^[1,2]; 在神经肌肉接头处, 密集分布的电压门控 Na^+ 通道与乙酰胆碱受体共定位于此, 有利于激活化学信号的转导^[3]。由于离子通道在细胞膜的功能中扮演着重要角色, 因此研究细胞膜离子通道在微观结构中的分布规律及其与特定生理功能的关系有重要的意义。

70年代德国马普研究所 Neher 和 Sakmann 创建了膜片钳技术^[4,5], 此技术逐渐发展成为获得活细胞离子通道的特性和分布信息的主要实验方法, 它使人们对离子通道本质的认识有了质的飞跃。但是, 传统膜片钳技术须先借助光学显微镜来实现玻璃微电极针尖在细胞膜表面的定位, 之后再行离子通道的记录, 由于受制于光学衍射极限, 光学显微镜的最高分辨率仅为 200 nm, 因此探针定位不能实现对细胞膜表面 200 nm 以下尺度的特定研究区域的准确选取。传统膜片钳技术空间分辨率的不足限制了其在研究离子通道生理功能与特定微结构关系方面的广泛应用。

为了解决这一问题, 需要将传统膜片钳技术与高分辨率的扫描离子电导显微镜技术(scanning ion conductance microscopy, SICM)相结合来构建高分辨率膜片钳技术^[6,7]。SICM 技术是 1989 年加州大学的 Hansma 在扫描隧道显微镜基础上设计而成的^[8], 1997 年经伦敦帝国理工学院的 Korchev 教授改进负反馈控制后^[9], SICM 技术真正实现了对活体生物样品非接触的高分辨率探测, 如对细胞膜的纳米尺度微结构进行成像, 包括树突突触结构、上皮细胞微绒毛和心肌细胞表面微结构等^[10,11,7]。目前, SICM 技术已成为纳米生物学研究领域一种先进的扫描探针显微镜技术。由于 SICM 的玻璃微探针与膜片

钳玻璃电极相同, 且都在电解液中工作, 所以 SICM 不仅适用于高分辨率观察活体生物样品的表面形貌, 而且也可被用来研究生物样品的电生理特性。Gu 等^[7]利用类似高分辨率膜片钳技术系统研究了心肌细胞膜表面横管部位的离子通道分布与表面特定微观结构的关系; Gorelik 等^[12]也利用此种高分辨率膜片钳技术在异爪蛙肾上皮细胞微绒毛上同时记录到 K^+ 和 Cl^- 等通道活动。

本研究构建了基于 SICM 负反馈扫描控制技术的高分辨率膜片钳技术, 并利用该技术对犬肾上皮细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)表面微结构进行高分辨率扫描成像, 继而对细胞单层膜上的微绒毛、细胞间的紧密连接等特定纳米尺度微结构进行高分辨率膜片钳离子通道记录, 以期对该技术的效能进行检验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株 犬肾上皮细胞株(MDCK 细胞), 购自天津赛尔生物技术有限公司。

1.1.2 实验药品及仪器 RPMI 1640 培养基、胎牛血清、链霉素、青霉素、谷氨酰胺、胰蛋白酶, 均购自美国 Gibco 公司。扫描成像及高分辨率膜片钳用玻璃微探针为硼硅酸盐微电极玻璃毛细管(外径: 1.00 mm, 内径: 0.59 mm, 长度: 90 mm, 武汉滨川科学仪器)。扫描离子电导显微镜(ICnano SICM)购自英国 Ionscope 有限公司, MultiClamp 700B、Digidata 1440A 购自美国 Axon 公司, TiU 倒置显微镜购自日本 Nikon 公司, P-2000/G 型程控水平激光微电极控制仪购自美国 Sutter Instrument 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDCK 细胞的培养基选用 RPMI 1640 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100 U/mL 青霉素和 10% 胎牛血清), 细胞均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气、饱和湿度的 CO_2 孵育箱(Thermo Scientific, 美国)中培养。每 2~3 d 更换一次新鲜培养基, 当细胞长至

80%~90% 融合时, 分瓶传代。实验所用细胞以 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL 浓度接种于 35 mm 培养皿 (Corning, 美国) 中, 每 2~3 d 更换一次新鲜培养基, 取培养 3~5 d 长成紧密单层细胞膜时的细胞进行后续 SICM 扫描观测与高分辨率膜片钳实验。

1.2.2 采用 SICM 技术对成膜 MDCK 细胞进行扫描成像

扫描用玻璃微探针由 P-2000/G 型程控水平激光电极拉制仪拉制而成, 拉制得到的玻璃微探针尖端内壁直径 ~50 nm, 向玻璃微探针内充灌电极内液后通过商用膜片钳电阻测量软件测得该探针电阻为 ~150 M Ω ^[13]。

SICM 基本原理如图 1A 所示, 以 SICM 放大器 (SICM ion current amplifier) 监控电流变化, 通过负反馈控制 (feedback control) 使得纳米尺度玻璃微探针 (nanopipette) 与样品之间保持恒定的距离 d , 通过非接触扫描得到样品表面的三维拓扑结构。以膜片钳记录细胞外液作为扫描活体细胞时的样品浴液, 以上述玻璃微探针作为扫描所用纳米尺度微探针并充灌膜片钳记录电极内液, 运用负反馈控制的 SICM 技术对细胞进行高分辨率扫描成像。关于 SICM 详尽的负反馈工作原理及玻璃微探针内半径与针尖-样品间距离 d 的关系请参考我们前期的研究成果^[13,14], 此处不再赘述。

膜片钳记录细胞外液 (mmol/L): NaCl 140, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, HEPES 10, Glucose 10, pH 7.4; 膜片钳记录电极内液 (mmol/L): KCl 140, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 10, Mg-ATP 1, pH 7.3; 膜片钳记录内、外液均用孔径为 0.22 μm 的无菌滤器 (Membrana, 德国) 过滤后使用。

1.2.3 采用高分辨率膜片钳技术对 MDCK 细胞微结构离子通道电流进行记录

高分辨率膜片钳技术是融合传统膜片钳技术与负反馈控制 SICM 技术后构建而成的新型膜片钳技术。该技术的基本构成与操作原理如图 1B 所示, 在 SICM 的玻璃微探针夹持器上添加了压力端口 (pressure port), 并采用商用膜片钳系统的前置放大器 (patch-clamp ion current amplifier) 替代了 SICM 自有放大器, 即扫描成像与膜片钳记录共用同一商用膜片钳放大器, 这使得纳米尺度玻璃微探针既可以作为 SICM 的扫描探针, 又可作为膜片钳电生理记录的玻璃微电极。其具体操作原理如图 1C 所示, 通过 SICM 负反馈系统控制垂直置于样品上方的纳米尺度玻璃微探针靠近细胞表面, 并控制使其与细胞表面保持恒定距离 d (图 1C 上图) 非

接触地进行扫描, 以获得细胞表面微结构的高分辨率三维拓扑图像, 而后由 SICM 负反馈控制技术操控该纳米尺度玻璃微探针在细胞膜表面非接触地移动并将其精确定位于成像区域中感兴趣的膜表面纳米尺度微结构 (fine structure) 上方 (图 1C 中图), 关闭负反馈控制系统, 下调玻璃微探针接近目标结构, 再利用该玻璃微探针作为膜片钳记录电极在负压作用下最终与微结构处细胞膜表面形成高阻封接 (图 1C 下图), 最后便可通过常规膜片钳方法实现对该微结构处离子通道活性的电生理信号记录。

本实验中所使用的玻璃微探针同 1.2.2 中的纳米尺度扫描玻璃微探针, 微探针尖端内壁直径 ~50 nm, 电阻为 ~150 M Ω 。膜片钳记录用细胞外液、电极内液与 1.2.2 中一致。扫描完成后, 将玻璃微探针准确定位于感兴趣的实验部位, 通过扫描软件控制关闭 SICM 的负反馈, 然后手动控制玻璃微探针以 Z 方向逐步接近 MDCK 细胞膜表面的精细结构, 接近过程中连续观测 Clampex 10.2 软件 (Axon Instruments/Molecular Devices, 美国) 中的电阻变化, 直至电阻达到 G Ω 高阻抗封接。对该纳米尺度玻璃微探针接近膜表面时产生的快电容和慢电容进行补偿, 去除伪差, 便可以对 MDCK 细胞膜表面精细结构的离子通道电流进行膜片钳记录。实验中保持电压为 -70 mV, 采样频率为 10 kHz, 低通滤波频率为 2 kHz, 信号均由 Clampex 10.2 软件采集。

1.2.4 数据处理和分析 由负反馈控制的 SICM 技术扫描得到的成像结果由 SICM 系统自带的图像处理软件 SICM Image Viewer (Ionscope Ltd., 英国) 进行分析处理; 高分辨率膜片钳实验数据采用 Clampfit 10.2 (Axon Instruments/Molecular Devices, 美国) 和 Origin 8.0 软件 (Microcal Software Inc., 美国) 进行分析处理。所有实验均在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 条件下进行。

2 结果

2.1 活体 MDCK 细胞的普通光学显微镜与 SICM 成像

先采用普通光学显微镜对活体 MDCK 细胞单层膜进行图像采集 (图 2A), 图像结果显示细胞紧密成膜生长, 但无法清晰地观测到细胞膜表面的三维精细结构。为了观测到 MDCK 细胞单层膜清晰的三维拓扑形貌, 在生理液态培养条件下, 利用负反馈

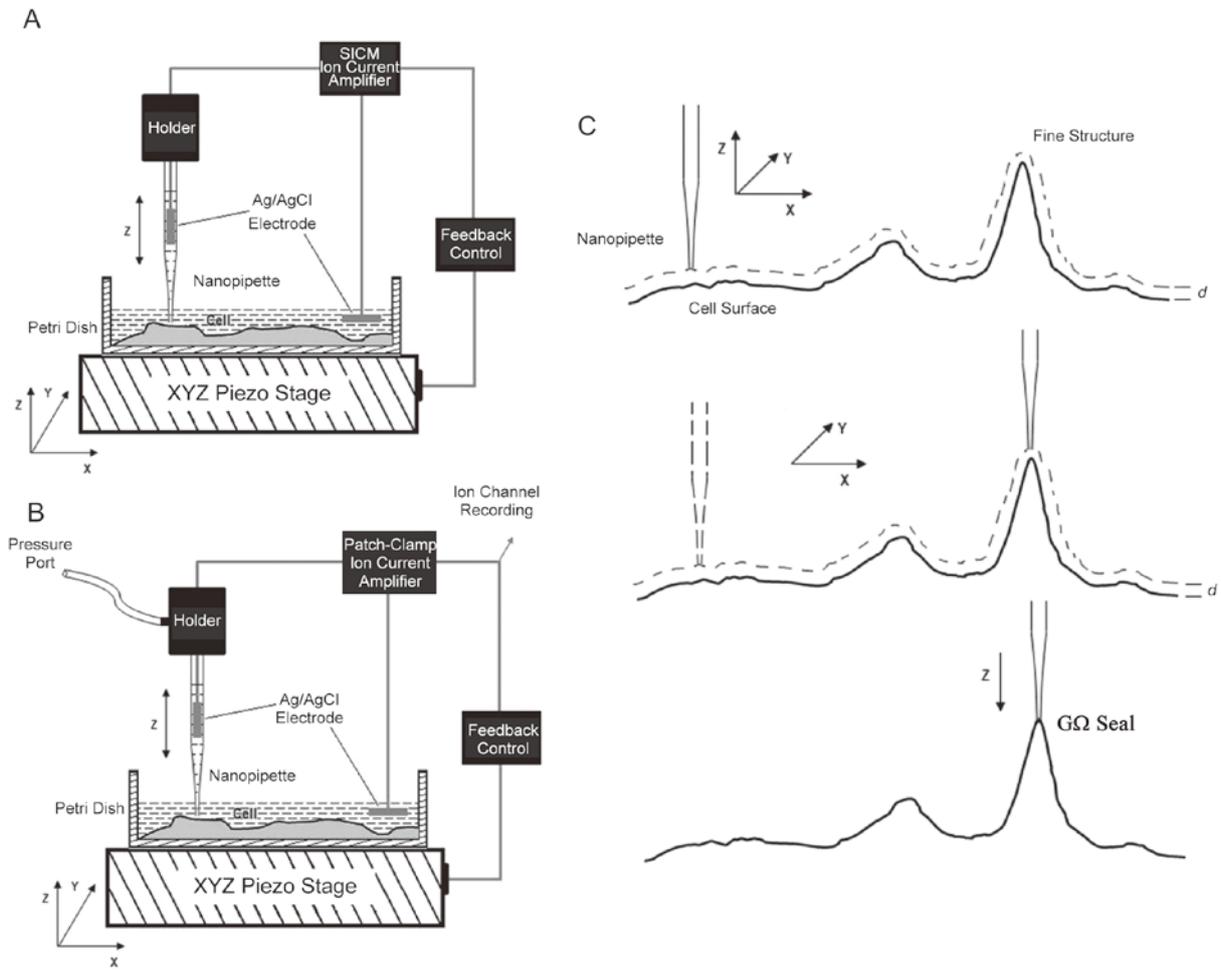


图 1. 基于扫描离子电导显微镜(SICM)负反馈扫描控制技术的高分辨率膜片钳技术
 Fig. 1. High-resolution patch-clamp technique is constructed based on the feedback control of scanning ion conductance microscopy (SICM). A: The scheme of SICM. B: The scheme of high-resolution patch-clamp. C: The operational process of high-resolution patch-clamp.

控制的SICM技术对MDCK细胞单层膜(图2A中黑色虚线方框所包围的40 μm×40 μm区域)进行了高分辨率扫描成像。在该成膜的MDCK细胞表面的SICM三维拓扑形貌成像(图2B)中,可以清晰地分辨出紧密的肾上皮细胞单层膜所具有的特有微观结构,包括其表面的微绒毛结构(microvilli)及细胞之间形成的紧密连接结构(tight-junction)。

2.2 活体 MDCK 细胞的高分辨率 SICM 成像

为了更加清楚地研究MDCK细胞单层膜的表面精细结构,在40 μm×40 μm扫描图(图3A)的基础上,选取20 μm×20 μm区域的MDCK细胞单层膜(图3A中黑色虚线方框所示区域)进行了高分辨率三维扫描成像(图3B)。图中可清晰地分辨出黑色虚线圆圈处三个相邻细胞形成的紧密连接部位的结构,与图3A黑色虚线圆圈处的单层膜结构一致。

为了深入观测纳米尺度分辨率下MDCK细胞的细胞膜形态与膜上微结构的特征,我们进一步选取10 μm×10 μm区域的MDCK细胞单层膜(图3B黑色虚线方框所示区域)进行了高分辨率三维扫描成像(图3C)。在成像结果中MDCK细胞表面的微绒毛和紧密连接结构更加清晰。此外,图中黑色虚线圆圈处三个相邻细胞形成的紧密连接结合部位的结构与图3A、B圆圈处扫描区域中的结合部位的微观结构保持一致。接着又进一步选取图3C中的黑色虚线方框区域进行了5 μm×5 μm的高分辨率扫描成像(图3D),除观测到细胞膜表面被覆多个微绒毛及清晰的紧密连接结构(图3D中左侧实箭头所示)外,还观测到其中一些由多个微绒毛聚集而成的“脊”状结构微绒毛(ridge-like microvilli,图3D中右侧虚箭头所示)。

2.3 MDCK 细胞微绒毛结构的高分辨率膜片钳记录

从已有的微绒毛结构动态特征研究成果^[15]可知，活体MDCK细胞膜上的微绒毛结构处于动态变

化中，其中呈“脊”状微绒毛结构与单个微绒毛结构相比具有更高的稳定性。因此，为了提高SICM定位的准确性和可靠性，本研究选用呈

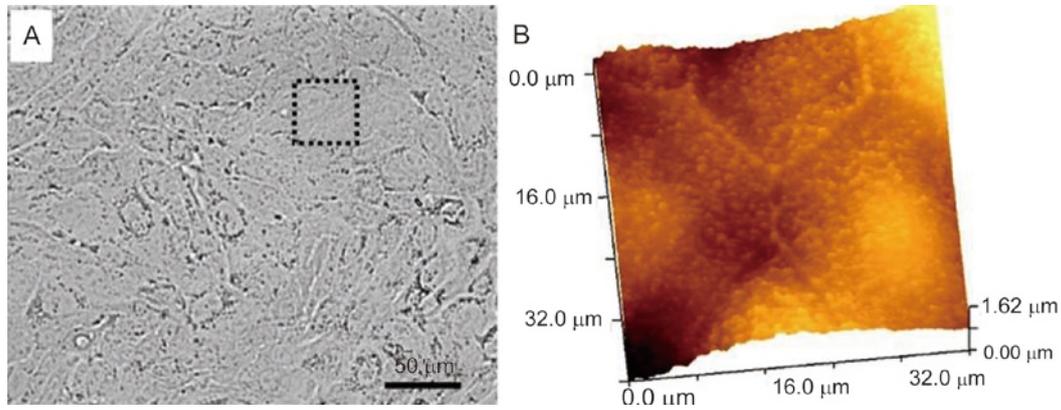


图 2. 活体MDCK细胞单层细胞膜的光学显微镜及扫描离子电导显微镜成像
 Fig. 2. Light microscope and SICM images of living MDCK cell monolayer. A: A typical light microscope image of living MDCK cells. Scale bar, 50 μm . B: A SICM image of living MDCK cell monolayer (from black dotted square of inset A, 40 μm \times 40 μm).

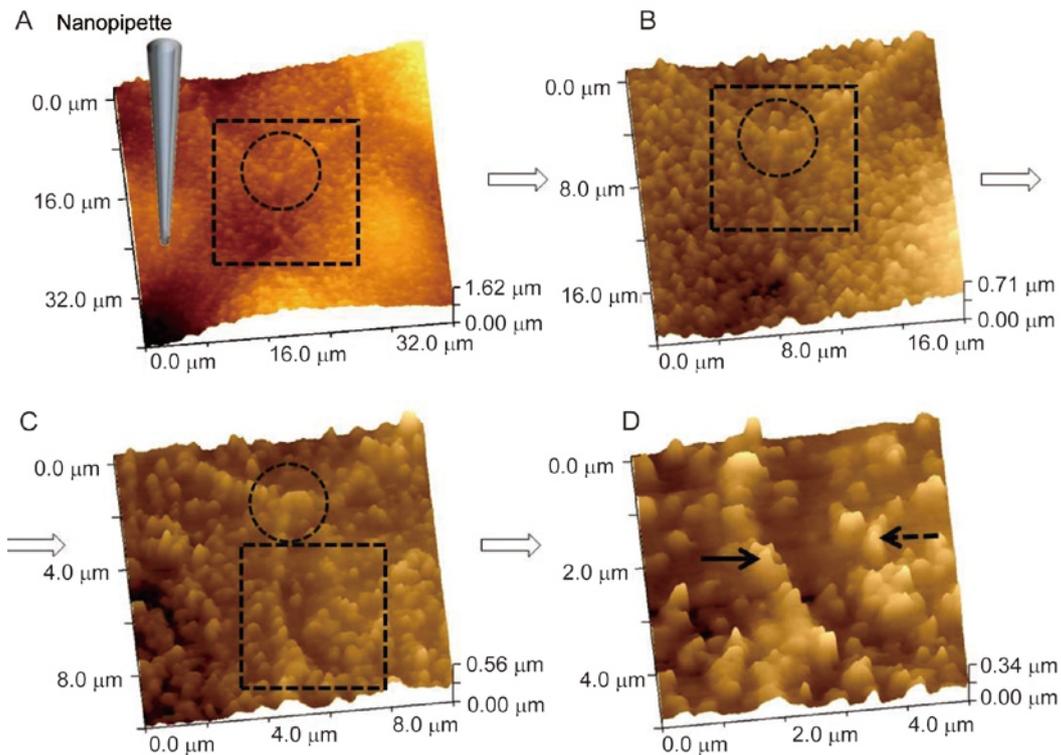


图 3. 逐步放大的活体MDCK细胞单层膜精细结构的扫描离子电导显微镜成像
 Fig. 3. Gradually enlarged SICM images of fine structures of living MDCK cell monolayer. A: A 40 μm \times 40 μm SICM image of MDCK cell monolayer scanned by a SICM nanopipette. B: A 20 μm \times 20 μm high-resolution SICM image of MDCK cell monolayer (from the black dotted square of inset A). C: A 10 μm \times 10 μm high-resolution SICM image of MDCK cell surface (from the black dotted square of inset B). The black dotted circles of inset A/B/C represent the same tight-junction-joint structure among three MDCK cells. D: A further 5 μm \times 5 μm high-resolution SICM image of MDCK cell monolayer (from the black dotted square of inset C). The left solid arrow demonstrates the tight-junction between MDCK cells, and the right dotted arrow indicates the ridge-like microvilli.

“脊”状的微绒毛结构进行高分辨率膜片钳记录。通过扫描控制软件将扫描所用的纳米尺度玻璃微探针准确定位于呈“脊”状的微绒毛结构上(图4A),而后进行高阻封接,在形成 $G\Omega$ 封接后,给予不同的钳制电压,记录不同电压下的离子通道电流的情况。图4B中纳米玻璃微探针的扫描轨迹所示“脊”状的微绒毛结构的宽度约为50 nm,显示我们构建的高分辨率膜片钳技术可以实现纳米尺度微结构的离子通道记录。

在对微绒毛结构进行高分辨率膜片钳记录的过程中,保持电压于-70 mV,分别给予100 mV、60 mV、40 mV、0 mV、-40 mV、-60 mV、-100 mV的钳制电压(pipette holding potential),记录到11例

不同钳制电压下离子通道的开放情况,图4C为其中1例。如图4C所示,在不同的钳制电压下,记录到的离子通道电流幅度有随钳制电压的增加而增大的趋势,在100 mV、-100 mV时电流幅值达8 pA,与报道中的 K^+ 通道电流变化类似^[11],但开放频率偏低。这可能是由于本实验所用细胞株及培养方法与文献不同而引起的。为了更清晰地观察离子通道的开放状态,我们将图4C中0 mV时记录的离子通道电流进行了局部放大(图4D),放大的电流图清晰显示了通道的开放状态,通道开放电流幅值在0.5~1 pA,且存在二级开放(即Level 2,图中Level 0为基线),类似文献报道中的上皮 Na^+ 通道^[16,17]。

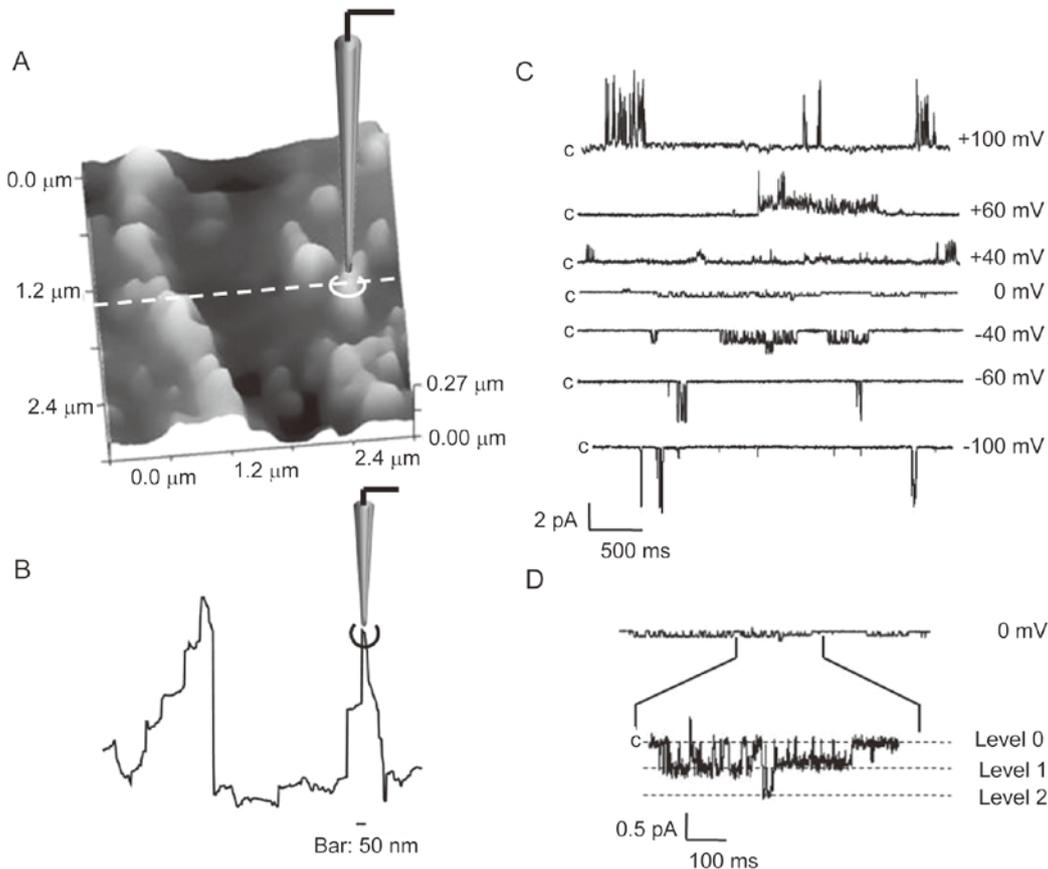


图 4. 活体 MDCK 细胞微绒毛结构的高分辨率膜片钳离子通道记录

Fig. 4. Ion channel currents were recorded at the top of ridge-like microvilli in cell-attached configuration by high-resolution patch-clamp technique. *A*: A high-resolution SICM image of microvilli on living MDCK cell ($3\ \mu\text{m}\times 3\ \mu\text{m}$). For ion channel recording, the nanopipette of high-resolution patch-clamp was carefully moved and positioned over the ridge-like microvilli (white circle). *B*: The scanning profile was derived from the image indicated by the dashed line on inset *A* (Scale bar, 50 nm). *C*: Cell-attached ion channel currents were recorded when nanopipette voltage was held at +100, +60, +40, 0, -40, -60, -100 mV. *D*: An enlarged image of ion channel currents recorded at 0 mV of inset *C*. Letter “c” indicates the closing level, which is corresponding to level 0. Level 1 and 2 respectively indicate the ion channel opening level one and two.

2.4 MDCK 细胞紧密连接结构的高分辨率膜片钳记录

肾上皮细胞紧密连接结构具有维持细胞极性和通透性等重要生理功能^[18]，且该微结构中有离子通道存在的可能^[19]。通过扫描软件将纳米尺度玻璃微探针准确定位于紧密连接结构上(图 5A)，形成 G Ω 封接后，给予不同的钳制电压，记录不同电压下的离子通道电流的情况。图 5A 所示紧密连接结构的

宽度约为 90 nm，再次证明了我们构建的高分辨率膜片钳技术实现纳米尺度微结构高分辨率离子通道记录的能力。

在对紧密连接结构进行高分辨率膜片钳记录的过程中，保持电压于 -70 mV，分别给予 100 mV、40 mV、0 mV、-40 mV、-100 mV 的钳制电压，在 9 例成功的离子通道记录中均未能发现离子通道的开放(图 5B)。

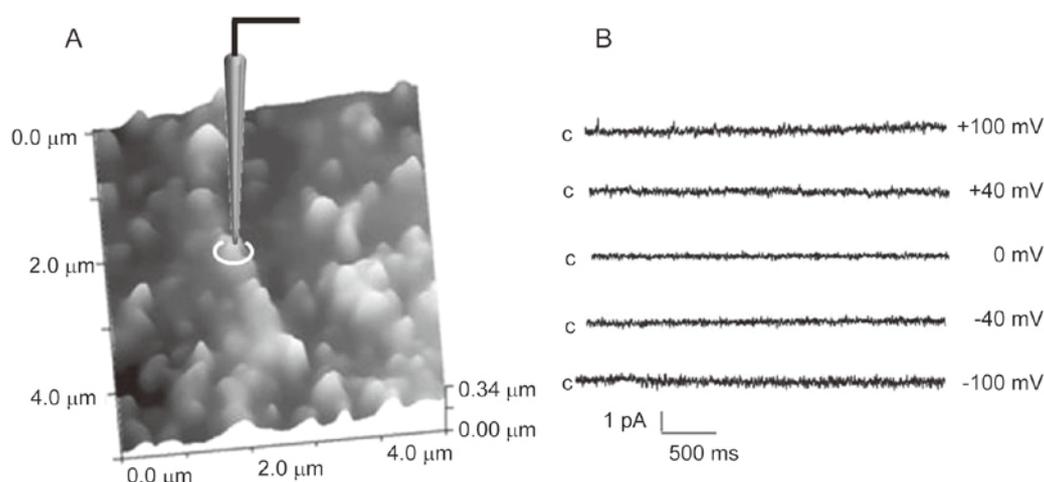


图 5. MDCK 细胞紧密连接结构的高分辨率膜片钳离子通道记录

Fig. 5. Ion channel currents were recorded at the top of tight-junction in cell-attached configuration by high-resolution patch-clamp technique. A: A SICM image of tight-junction on MDCK cell surface (5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$). For ion channel recording, the nanopipette of high-resolution patch-clamp carefully moved and was placed over tight-junction (white circle). B: Cell-attached ion channel currents were recorded when nanopipette voltage was held at +100, +40, 0, -40, -100 mV. Letter “c” indicates the closing level of channel.

3 讨论

本研究结合现有商用膜片钳技术及商用 SICM 技术，构建了基于 SICM 负反馈扫描控制技术的高分辨率膜片钳技术，克服了传统膜片钳技术在研究离子通道生理功能与特定微结构关系时空间分辨率的不足，并采用该技术以哺乳动物细胞——单层膜 MDCK 为模型实现了对活体生物样品的高分辨率扫描成像和对成像区域内生物样品表面纳米尺度微结构的膜片钳记录。

肾上皮细胞的 Na⁺ 和 K⁺ 通道多分布在其膜表面的特定精细结构中，这些通道在细胞生理功能调控中具有重要作用，因此研究细胞膜表面精细结构中离子通道的电生理特性具有重要意义。已知肾上皮钠重吸收是通过 Na⁺ 通道进行精细调节，从而最终决定人体钠代谢的平衡^[20,21]，盐皮质激素醛固酮通过对肾上皮细胞 Na⁺ 和 K⁺ 通道的调节，保证了肾上

皮保钠排钾的生理功能^[22]。在活体 MDCK 细胞膜上，我们采用高分辨率膜片钳技术以细胞贴附式对其顶膜表面纳米尺度微绒毛结构进行了离子通道电流记录，记录到的通道类似报道中的上皮 K⁺、Na⁺ 通道，而在其紧密连接结构中未能观测到离子通道的开放，但目前的研究成果并不能完全否定 MDCK 细胞膜的紧密连接结构上有离子通道存在的可能。本实验结果提示 MDCK 细胞膜上不同微结构中离子通道的分布及其生理功能可能有着密切联系，但其具体联系有待进一步的研究。

我们构建的高分辨率膜片钳技术是基于 SICM 的负反馈控制技术构建而成，其优势在于：(1) 利用 SICM 技术我们得到了高分辨率的活体 MDCK 细胞膜成像，并将玻璃微探针精确定位于感兴趣的特有精细结构，提高了膜片钳记录的空间分辨率。目前 SICM 的水平分辨率已低于微探针内半径尺寸^[23,24]，

可被用来更准确地研究活体生物样品表面离子通道的微观分布及其与特定生理功能的关系。我们构建的高分辨率膜片钳技术可清晰地观察到肾上皮细胞特有的两种表面微结构——微绒毛与紧密连接,水平分辨率可达 50 nm; (2)在利用负反馈控制的 SICM 技术进行扫描的过程中,纳米尺度玻璃微探针与样品保持非接触状态,同时通过压力端口施以正压,避免了微探针在移动和定位过程中因意外触碰所导致的针尖污染。此外,由于纳米玻璃微探针受控于超纳米精度的压电陶瓷精密位移平台,更易于实时控制探针针尖与细胞膜形成兆欧姆封接; (3)利用传统膜片钳技术很难实现对半透明或非透明样品(如生长于非透明基质上的组织或细胞)的准确定位,尽管可用“盲插”的方式实现,但无法提供记录位点细胞结构的位置或类型的信息,利用高分辨率膜片钳技术可使纳米尺度微探针准确定位于膜表面精细结构上进行离子通道记录,大大拓展了膜片钳技术的应用范畴。

综上所述,基于 SICM 负反馈控制的高分辨率膜片钳技术,利用纳米尺度微探针不仅可以对活体细胞膜进行高分辨率扫描成像获得细胞表面微结构形貌,而且可确保微探针精确定位于微结构并对该微结构进行电生理信号的膜片钳记录。因此,该技术可用来研究活体细胞膜上纳米尺度微结构中离子通道的“开”、“闭”动力学、离子通透性及选择性,并具备研究活体细胞膜表面离子通道蛋白的分布的能力^[24]。该高分辨率膜片钳技术还可以通过纳米尺度微探针给细胞表面比较小的特定区域输送特定的化学、电或机械力等刺激,研究配体门控、机械力敏感离子通道等,因此,高分辨率膜片钳技术将为纳米生物学研究,特别是细胞膜表面纳米尺度微观结构与特定生理功能的关系研究提供全新的技术手段。

参考文献

- Tousson A, Alley CD, Sorscher EJ, Brinkley BR, Benos DJ. Immunochemical localization of amiloride-sensitive sodium channels in sodium-transporting epithelia. *J Cell Sci* 1989; 93 (Pt 2): 349-362.
- Reinhardt J, Golenhofen N, Pongs O, Oberleithner H, Schwab A. Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(9): 5378-5382.
- Angelides KJ. Fluorescently labeled Na⁺ channels are localized and immobilized to synapses of innervated muscle fibres. *Nature* 1986; 321(6065): 63-66.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260 (5554): 799-802.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391(2): 85-100.
- Korchev YE, Negulyaev YA, Edwards CR, Vodyanoy I, Lab MJ. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(9): 616-619.
- Gu Y, Gorelik J, Spohr HA, Shevchuk A, Lab MJ, Harding SE, Vodyanoy I, Klenerman D, Korchev YE. High-resolution scanning patch-clamp: new insights into cell function. *FASEB J* 2002; 16(7): 748-750.
- Hansma PK, Drake B, Marti O, Gould SA, Prater CB. The scanning ion-conductance microscope. *Science* 1989; 243 (4891): 641-643.
- Korchev YE, Bashford CL, Milovanovic M, Vodyanoy I, Lab MJ. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys J* 1997; 73(2): 653-658.
- Sánchez D, Anand U, Gorelik J, Benham CD, Bountra C, Lab M, Klenerman D, Birch R, Anand P, Korchev Y. Localized and non-contact mechanical stimulation of dorsal root ganglion sensory neurons using scanning ion conductance microscopy. *J Neurosci Methods* 2007; 159(1): 26-34.
- Gorelik J, Zhang Y, Shevchuk AI, Frolenkov GI, Sánchez D, Lab MJ, Vodyanoy I, Edwards CR, Klenerman D, Korchev YE. The use of scanning ion conductance microscopy to image A6 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217(1-2): 101-108.
- Gorelik J, Gu Y, Spohr HA, Shevchuk AI, Lab MJ, Harding SE, Edwards CR, Whitaker M, Moss GW, Benton DC, Sánchez D, Darszon A, Vodyanoy I, Klenerman D, Korchev YE. Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a smart patch-clamp system. *Biophys J* 2002; 83(6): 3296-3303.
- Yang X (杨茜), Liu X, Ma LY, Li CF, Bao YM, Gao RL, Zhang XZ, Zhang YJ. Non-contact scanning ion conductance microscopy for high-resolution morphological imaging of live cells. *J Chin Electron Microscopy Soc (电子显微学报)* 2009; 28(5): 489-494 (Chinese, English abstract).
- Zhang YJ (张彦军). Scanning ion conductance microscopy and its applications in nanobiology. *Mod Instruments (现代仪器)* 2008; 3: 1-3 (Chinese, English abstract).
- Gorelik J, Shevchuk AI, Frolenkov GI, Diakonov IA, Lab MJ, Kros CJ, Richardson GP, Vodyanoy I, Edwards CR, Klenerman D, Korchev YE. Dynamic assembly of surface structures in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (10): 5819-5822.
- Gorelik J, Zhang Y, Sánchez D, Shevchuk A, Frolenkov G, Lab

- M, Klenerman D, Edwards C, Korchev Y. Aldosterone acts via an ATP autocrine/paracrine system: the Edelman ATP hypothesis revisited. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(42): 15000-15005.
- 17 Gu Y. Effects of $[Ca^{2+}]_i$ and pH on epithelial Na^+ channel activity of cultured mouse cortical collecting ducts. *J Exp Biol* 2008; 211(Pt 19): 3167-3173.
- 18 Zhang L, Caplan MJ. Transport protein sorting in polarized epithelial cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2007; 59(4): 505-511.
- 19 Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003; 84(3): 1660-1673.
- 20 Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104(4): 545-556.
- 21 Thomas W, McEneaney V, Harvey BJ. Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. *Steroids* 2008; 73(9-10): 979-984.
- 22 Zhou ZH, Buben JK. Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(4): 1118-1130.
- 23 Novak P, Li C, Shevchuk AI, Stepanyan R, Caldwell M, Hughes S, Smart TG, Gorelik J, Ostanin VP, Lab MJ, Moss GW, Frolenkov GI, Klenerman D, Korchev YE. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat Methods* 2009; 6(4): 279-281.
- 24 Shevchuk AI, Frolenkov GI, Sánchez D, James PS, Freedman N, Lab MJ, Jones R, Klenerman D, Korchev YE. Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006; 45(14): 2212-2216.