

(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 106568929 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 19

(21) 申请号 201510657463. X

(22) 申请日 2015. 10. 13

(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 戴金叶 孙坚原 陈培华 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 33/483(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

微小单突触神经元的电活动记录方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微小单突触神经元的电活动记录方法,属于神经生物学研究领域。针对现有膜片钳技术只能从突触后神经元记录其所有微小突触前输入的电信号,却无法分辨出各个微小突触前输入的电信号,因此我们提出本发明。本发明的要点是结合松膜片钳(loose-patch)和全细胞膜片钳(whole-cell)技术,可以极其简单地在生理状态下的脑片上实现对微小单突触电活动的记录。本发明的用途是为检测单突触的囊泡自发释放和诱发释放的动力学特性,为单突触囊泡释放的动力学特性以及突触可塑性提供了一种直接、定量、实时以及高时间分辨率的检测方法。

1. 一种测量脑中微小单突触前神经元细胞电活动的测量装置,所述装置包括:
 - 光学显微镜:用于观察神经元细胞;
 - 微操纵仪:用于前后左右四方位移动光镜,从而观察神经元细胞;
 - 计算机工作站:用于收集成像数据和实际记录数据;
 - AD/DA 转换器:用于数据信号和模拟信号之间的转换,并且给予膜片钳放大器信号以及接收来自膜片钳放大器的信号;
 - 膜片钳放大器:用于收集神经元细胞的电活动信号,并且接收 AD/DA 转换器给予的信号;
 - 带阻滤波器:用于滤掉膜片钳放大器中记录信号的 50Hz 工频噪音,并且传输到 AD/DA 转换器;
 - 红外相机:用于将收集的成像结果输入到电脑里。
2. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述显微镜为正置显微镜,且所述显微镜的物镜为 $60\times/1.00w$ 水潜镜。
3. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述膜片钳放大器为 MultiClamp 700B 膜片钳放大器。
4. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述膜片钳放大器、带阻滤波器、光学显微镜、微操纵仪的机箱外壳和红外相机均将外壳做接地处理。
5. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述显微镜采用微分干涉对比 DIC 偏振片。
6. 一种记录脑中微小单突触神经元电活动的方法,所述方法包括以下基本步骤:
 - 1) 制备脑片;
 - 2) 用权利要求 1-5 任一项所述的装置进行全细胞 (whole-cell) 钳制;
 - 3) 用权利要求 1-5 任一项所述的装置进行松膜片钳 (loose-patch) 钳制;
 - 4) 用权利要求 1-5 任一项所述的装置进行数据记录。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述膜片钳放大器的参数设置为记录模式:电压钳模式;增益:10mV/pA;低通滤波:1kHz;记录模式:0n-cell 和 Whole-cell。
8. 根据权利要求 6 所述的方法,所述微小单突触神经元来自脑干的 MNTB (medial nucleus of the trapezoid body) 区域。
9. 权利要求 1-5 任一项所述的装置或权利要求 6-8 任一项所述的方法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用途。

微小单突触神经元的电活动记录方法

技术领域

[0001] 本发明属于科学技术方法领域,具体涉及一种用于研究生理条件下单突触前囊泡释放的动力学特性以及为单突触可塑性提供了一种直接、定量、实时以及高时间分辨率的检测方法。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方法。

背景技术

[0002] 早在 20 世纪 50 年代, Paul Fatt 和 Bernard Katz 在研究蛙的神经-肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 时发现,即使神经元不被激活产生动作电位,却也能从肌肉细胞上记录到自发性质的微小终板电位 (spontaneous miniature endplate potential, mEPP)。此后,这种自发性质的微小电位在其他神经元上也得到证实。因此,突触囊泡在缺乏动作电位时所产生的神经递质释放称之为突触囊泡自发释放。通过对 mEPP 幅值的分析,他们惊讶地发现每一次神经递质的释放都是以一个固定的大小进行的,因此他们提出了神经递质传递的量子化理论。其中的基本单位是突触囊泡。

[0003] 目前,膜片钳技术在神经科学领域得到广泛的应用。最为广泛的是对突触后细胞的全细胞记录,此项技术可同时记录一个胞体上来自所有突触前神经元的电信号。在神经系统中,一般每个神经元都有很多的输入。我们在突触后胞体上记录到的 mini (miniature spontaneous release) 来自很多的活性带 (active zone) 的单个囊泡释放。但是其中一个很大的缺点是没法分辨出各个微小突触前细胞的电信号。比如海马 CA1 神经元到 CA3 神经元的输入。单个 CA3 神经元的树突上会有很多的树突棘 (dendritic spine) 用来接收化学递质信号,与之相耦合的是来自 CA1 神经元的输入,称为突触结 (bouton)。由于电生理技术的局限性,研究人员只能记录 CA3 神经元胞体上的自发电活动,或者刺激整个 CA1 神经元区域来记录 CA3 神经元胞体上的电活动。因此,这种条件下记录到的突触后电流包含了成百上千个突触结所释放的囊泡信息。如今随着对神经递质传递的研究越来越深入,研究者们开始关注单个微小突触前细胞的电活动有着怎样的特点。因此,我们的这项技术正是从根本上解决并准确地对单个微小突触前细胞进行实时地记录,并且这项技术简单易行,对神经科学领域的基础研究有着非常重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明从根本上解决并准确地对单个微小突触前细胞进行实时的记录,并且这项技术简单易行,为单突触囊泡释放的动力学特性提供了一种直接、定量、实时的检测方法。本发明在松膜片钳模式下所记录到的电信号能在突触后全细胞记录上得到相应的囊泡自发释放电信号,此项技术可以从突触后胞体上所记录到的电信号中选出来自特定单突触神经元的电活动。并且在松膜片钳模式下,可以对单突触神经元进行电刺激,在突触后胞体上所记录到突触前激发的囊泡释放,从而研究单突触囊泡诱发释放的动力学特性以及单突触可塑性。这也体现出这项技术的重要性和创新性。

- [0005] 为了实现上述目的,本发明提供了以下各项:
- [0006] 1. 一种测量脑中微小单突触前神经元细胞电活动的测量装置,所述装置包括:
- [0007] 光学显微镜:用于观察神经元细胞;
- [0008] 微操纵仪:用于前后左右四方位移动光镜,从而观察神经元细胞;
- [0009] 计算机工作站:用于收集成像数据和实际记录数据;
- [0010] AD/DA 转换器:用于数据信号和模拟信号之间的转换,并且给予膜片钳放大器信号以及接收来自膜片钳放大器的信号;
- [0011] 膜片钳放大器:用于收集神经元细胞的电活动信号,并且接收 AD/DA 转换器给予的信号;
- [0012] 带阻滤波器:用于滤掉膜片钳放大器中记录信号的 50Hz 工频噪音,并且传输到 AD/DA 转换器;
- [0013] 红外相机:用于将收集的成像结果输入到电脑里。
- [0014] 2. 根据第 1 项所述的装置,其中所述显微镜为正置显微镜,且所述显微镜的物镜为 $60\times/1.00w$ 水潜镜。
- [0015] 3. 根据第 1 项所述的装置,其中所述膜片钳放大器为 MultiClamp 700B 膜片钳放大器。
- [0016] 4. 根据第 1 项所述的装置,其中所述膜片钳放大器、带阻滤波器、光学显微镜、微操纵仪的机箱外壳和红外相机均将外壳做接地处理。
- [0017] 5. 根据第 1 项所述的装置,其中所述显微镜采用微分干涉对比 DIC 偏振片。
- [0018] 6. 一种记录脑中微小单突触神经元电活动的方法,所述方法包括以下基本步骤:
- [0019] 1) 制备脑片;
- [0020] 2) 用 1-5 任一项所述的装置进行全细胞 (whole-cell) 钳制;
- [0021] 3) 用 1-5 任一项所述的装置进行松膜片钳 (loose-patch) 钳制;
- [0022] 4) 用 1-5 任一项所述的装置进行数据记录。
- [0023] 7. 根据第 6 项所述的方法,其中所述膜片钳放大器的参数设置为:记录模式:电压钳模式;增益:10mV/pA;低通滤波:1kHz;记录模式:On-cell 和 Whole-cell。
- [0024] 8. 根据第 6 项所述的方法,所述微小单突触神经元来自脑干的 MNTB (medial nucleus of the trapezoid body) 区域。
- [0025] 9. 第 1-5 任一项所述的装置或第 6-8 任一项所述的方法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用途。
- [0026] 具体而言,本发明的第一个方面提供一种微小单突触前神经元细胞的简单识别和观察装置,所述装置包括 IR/DIC 光学显微镜 (带有物镜和目镜) (Olympus Corporation) 和红外相机 (DVC Company, 710M-00-FW) (如图 1b 所示)。其特征是:基于以往利用荧光来识别单突触前神经元的方法,我们采用发育前期的 MNTB 区域,可以在 IR/DIC 光镜下直接对单突触前神经元 (calyx of Held) 进行识别;对于荧光来识别单突触前神经元的方法,需要在培养的细胞中得到较高的信噪比,但培养的细胞并不是生理状态的细胞,因此不具备观察生理状态下的神经电活动。
- [0027] 在一个优选的实施方案中,其中所述 IR/DIC 光学显微镜,其功能主要是让成像呈现浮雕的效果。其特征是:正置显微镜,采用 IR/DIC 技术,物镜采用 $60\times/1.00w$ 水潜镜

(OLYMPUS) (如图 1b 所示)。

[0028] 在一个优选的实施方案中,其中所述物镜采用 $60\times/1.00w$ 水潜镜 (OLYMPUS),其功能主要是进一步放大神经元,使突触前神经元得以更好的辨别。相比于 $40\times/0.8w$ 的物镜,我们采用的 $60\times/1.00w$ 物镜对微小单突触前神经元的观察具有更高的分辨率,易于识别。并且在此水潜镜的工作距离下可以顺利地进行电生理实验。

[0029] 在一个优选的实施方案中,其中所述红外相机,其功能主要是收集成像结果并输入到电脑里 (如图 1b 所示)。

[0030] 本发明的第二个方面提供一种记录微小单突触前神经元细胞中电活动的方法,所述方法利用本发明第一方面的装置,通过松膜片钳制与全细胞钳制的结合模式来实现。其装置包括光学显微镜 (带有物镜和目镜) (Olympus Corporation)、微操纵仪 (Sutter Instrument, ROE-200)、计算机工作站与 AD/DA 转换器 (Digidata 1440A)、膜片钳放大器 (Axopatch 700B)、红外相机 (DVC Company, 710M-00-FW) 以及膜片钳放大器所需的不同口径大小的玻璃微电极 (武汉微探科学有限公司) (如图 1a, b 所示)。

[0031] 在一个优选的实施方案中,其中所述膜片钳放大器 MultiClamp 700B 膜片钳放大器的功能通过以下方式实现:一个探头对微小突触前胞体进行松膜片钳制,其参数设置为:记录模式:电压钳模式;增益: 10mV/pA ;低通滤波: 1kHz ;记录模式: $0n\text{-Cell}$ 。另一个探头对突触后胞体进行全细胞钳制,其参数设置为:记录模式:电压钳模式;增益: 10mV/pA ;低通滤波: 1kHz ;记录模式: Whole-Cell 。通过此种方式,信噪比高。

[0032] 在一个优选的实施方案中,其中膜片钳放大器的探头中所需玻璃微电极的口径大小根据模式不同而不同:对于松膜片钳,口径 $1\text{-}2\ \mu\text{m}$, 入液电阻 $1\text{-}2\text{M}\Omega$;对于全细胞膜片钳,口径 $0.5\text{-}1\ \mu\text{m}$, 入液电阻 $2\text{-}4\text{M}\Omega$ 。

[0033] 在一个优选的实施方案中,其中所述带阻滤波器的频率为 50Hz 。

[0034] 在一个优选的实施方案中,其中所述光学显微镜为正置显微镜,且物镜采用 $60\times/1.00w$ 水潜镜 (OLYMPUS)。

[0035] 在一个优选的实施方案中,其中所述膜片钳放大器、带阻滤波器、光学显微镜、微操纵仪的机箱外壳和红外相机均将外壳做接地处理。

[0036] 本发明中采用的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。

[0037] 在所述的装置中采用微操纵仪,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进行一系列微操作,调整电极位置使得电极能进行封接操作。

[0038] 在所述的装置中采用红外相机结合微分干涉对比 DIC 偏振片,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。

附图说明

[0039] 图 1a、方案实施过程中数据采集模式图。

[0040] 图 1b、方案实施过程中膜片钳操作模式图。

[0041] 图 2a、通过 IR/DIC 显微镜所拍摄的微小单突触以及对应的 calyx of Held 神经元。

[0042] 图 2b、对于图 2a 的示意图。

[0043] 图 2c、在图 2a 中的松膜片和全细胞模式下所记录的电信号，下图乃上图矩形内的放大图。

[0044] 图 2d、对图 2c 中类似数据的分析结果，显示了松膜片钳记录模式下的正向电信号幅值与全细胞记录中所对应的某些 mEPSC 幅值的关系，并且它们呈线性相关。

具体实施方式

[0045] 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。

[0046] 实施例 1：脑片的制备：

[0047] 手术器具准备好后，将 P2-3（小鼠出生后 2 天到 3 天）的小鼠断头，用手术剪、眼科剪、手术刀和镊子取出脑干，这个过程要时不时地浸入 Slicing 溶液（125 氯化钠，25 碳酸氢钠，3 肌醇，2 丙酮酸钠，2.5 氯化钾，1.25 磷酸二氢钠，0.4 抗坏血酸，25 葡萄糖，0.1 氯化钙，3 氯化镁（mM, sigma），pH 7.4，通有 95% 氧气和 5% 二氧化碳）中。然后将组织粘到切片盘（Slicing chamber）上，用切片机切取 200 μ M 厚度的脑片。根据小鼠的年龄，我们可以切取 1-3 片包含 Medial Nucleus of the Trapezoid Body (MNTB) 的脑片，切取脑片过程也在这种 slicing 溶液中进行，整个过程的切片溶液（Slicing solution）要置于冰中。脑片制备过程处于低 Ca^{2+} 和低温的条件下，这有助于降低新陈代谢和避免因缺氧而损伤神经元细胞。切好的脑片应立即放到包含 2mM Ca^{2+} 浓度的 Bath 溶液（125 氯化钠，25 碳酸氢钠，3 肌醇，2 丙酮酸钠，2.5 氯化钾，1.25 磷酸二氢钠，0.4 抗坏血酸，25 葡萄糖，2 氯化钙，1 氯化镁（mM, sigma），pH 7.4，通有 95% 氧气和 5% 二氧化碳）中，在 $\sim 37^{\circ}C$ 下预热 30 分钟。脑片制备的整个过程都通有 95% 氧气和 5% 二氧化碳混合的二元气，使得细胞进行正常的有氧呼吸，保证它们健康的生理状态。

[0048] 实施例 2：全细胞（whole-cell）钳制

[0049] 等到脑片孵育后，将一张脑片迅速放到载玻片上，用一个以铂金质地的 U 型板上缠绕着均匀等距的尼龙线（Johnson&Johnson REACH）来压盖脑片，使得脑片在载玻片上不会移动。在整个实验过程中，这个脑片都有细胞外液（Bath 溶液）的灌流，其速率为 1 毫升 / 分。同时确保这个载玻片以上的空间不会使细胞外液溢出。然后用显微镜进行观察，先用 5 \times 低倍镜找到 calyx of Held 突触及突触后胞体，之后用 60 \times 的水潜镜进行观察。找到有微小单突触前细胞的胞体后，用一边的玻璃微电极对此进行全细胞钳制，之后的记录模式由 MultiClamp 700B 放大器来执行。

[0050] 实施例 3：松膜片钳（loose-patch）钳制

[0051] 等全细胞模式形成后，用另一边的玻璃微电极对观察到的微小单突触前细胞进行 loose-patch，整个过程要非常轻缓（如图 2a, b 所示）。此后即可对松膜片钳通道和全细胞通道同时进行记录。如图 2c 所示，上图的信号分别来自松膜片钳通道和全细胞通道，其中包含微小突触后电流（mEPSC）信号；下图的信号是上图方框内信号的放大图，显示了松膜片钳记录模式下的正向电信号只与全细胞记录中的某些 mEPSC 呈高度的时间和幅度相关（如图 2d 所示），这显示了所记录的 mEPSC 信号来自该微小单突触结。

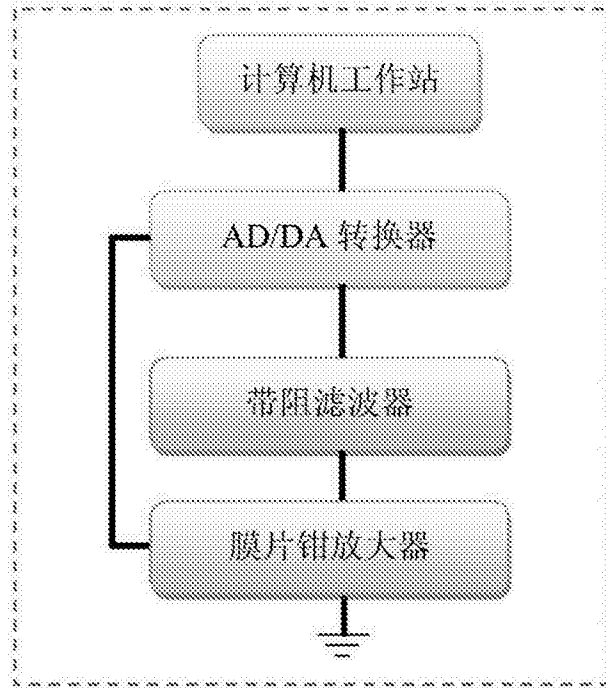


图 1a

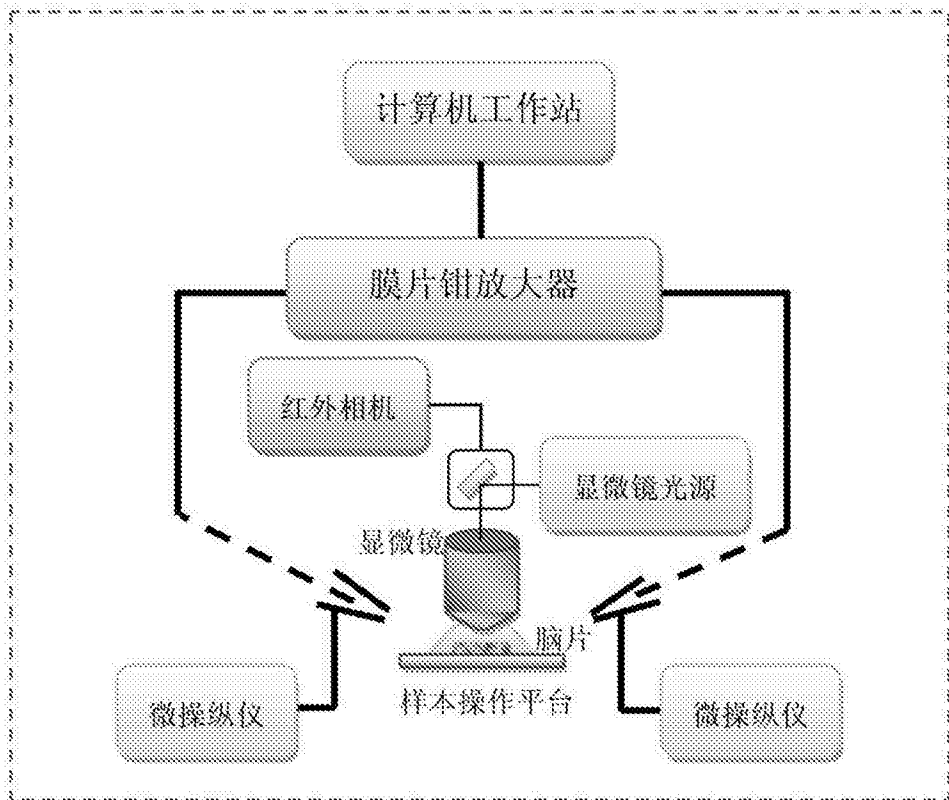


图 1b

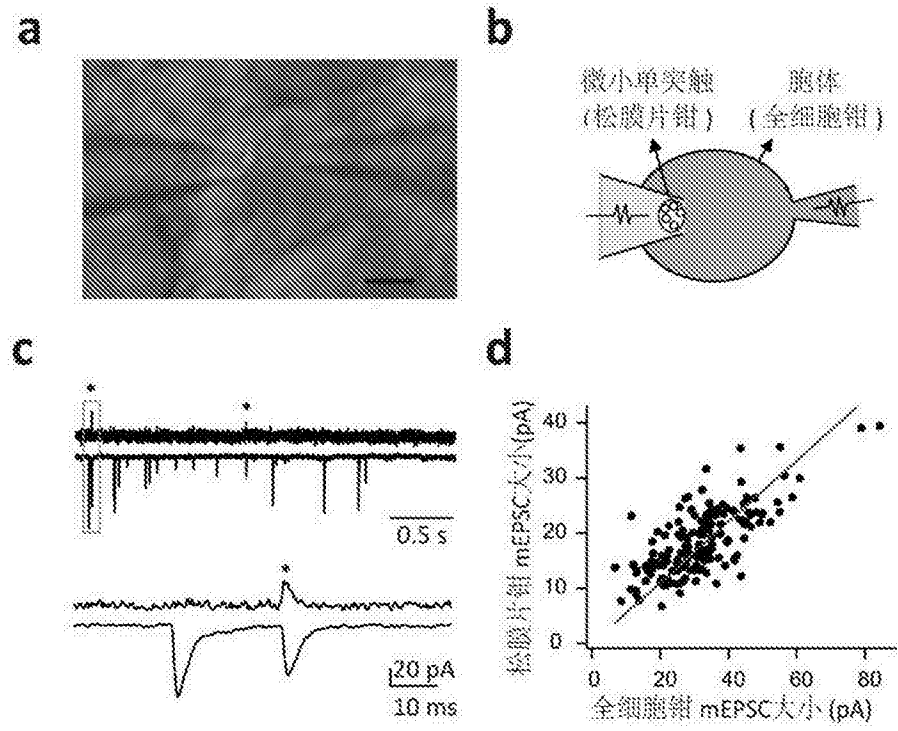


图 2