**膜片钳系统简明操作规程**

1. **准备**

（1）相关液体：大部分细胞外液的pH为7.4，电极内液的pH为7.2-7.3；培养细胞的缓冲体系为HEPES，而急性分离细胞或者组织切片的缓冲体系多为碳酸盐体系；至于渗透压，细胞内应高于细胞外（如340mOsmd: 330mOsmd）使细胞微肿胀从而利于封接。所有液体均应用微孔滤膜过滤，ICS应冻存；如果采用碳酸盐体系，那么实验过程必须灌流。

（2）电极：所用电极控制在2-5MΩ，电阻值越大则tip越细，利于封接而不利于破膜，反之，电阻值越小则tip越粗，利于破膜而不利于封接（注意小细胞有时电极电阻也可大于5MΩ）；电极直径最好为5-10μm，即对于400倍的显微镜下2-4mm；电极末端可用火烧平，防止刮掉氯化银。

2**. 封接准备**

（1）打开Clampex的Membrane Test，设定封接测试脉冲电流方波的幅度和频率。

（2）在玻璃微电极内维持一定的正压，用微操作器使电极进入记录液，在Membrane Test中可见测试脉冲方波，观察电极电阻大小。

（3）关闭Membrane Test，用Auto调节Pipette Offset，使METER 中的I（pA）=0。如果I不显示为0，则可继续手工精确调节补偿的失调电位数值，直至I为0。

**3. 封接**

（1）打开Membrane Test，使玻璃微电极逐渐接触细胞，去除正压并轻轻给予负压以形成稳定封接。此时，封接测试脉冲消失，仅出现电极电容瞬变值。封接电阻在1GΩ以上。

（2）补偿电极电容：用Cp Fast和Cp Slow对电极电容进行补偿。可选Leak Subtraction去除漏电流。

**4. 破膜**

（1）继续给予负压活用Zap功能电击打破细胞膜。出现膜电容放电。缓慢撤除电机内负压。

（2）用Auto对膜电容进行补偿，必要时手工进行细微调节。

（3）进行串联电阻补偿：选上Rs Compensation和Disable if oscillation detected，增大Prediction和Compensation对串联电阻进行补偿。

**5. 记录**

破膜的两种方法：给负压和ZAP；注意在封接后期和破膜期，包括之后的补偿最好将钳制电位均调至-60mv，这不仅有助于封接，加固封接并阻止破膜后的突然去极化。

关闭Membrane Test。选择设定好的Clampex采样软件的 Protocol，开始记录细胞电信号。

**使用注意事项**

1. 本台仪器需要预约，使用者请与平台相关人员联系，请不要擅自使用仪器；
2. 定期清洗holder，用去离子水或者乙醇浸泡并超声，之后自然风干；
3. 定期电镀参比电极和记录电极的银丝，但是记录电极的尾端与金属接触，不应该氯化。