

به نام خدا

4.4 The Patch-Clamp Technique

درس: الکتروفیزیولوژی

استاد: دکتر مالکی

دانشجویان: مهدیه قزوینی، فاطمه طاهری

تابستان ۱۴۰۵

فهرست مطالب

۱. نسخه‌های مختلف پچ کلمپ

۲. مزایای شکل‌گیری‌های مختلف پچ

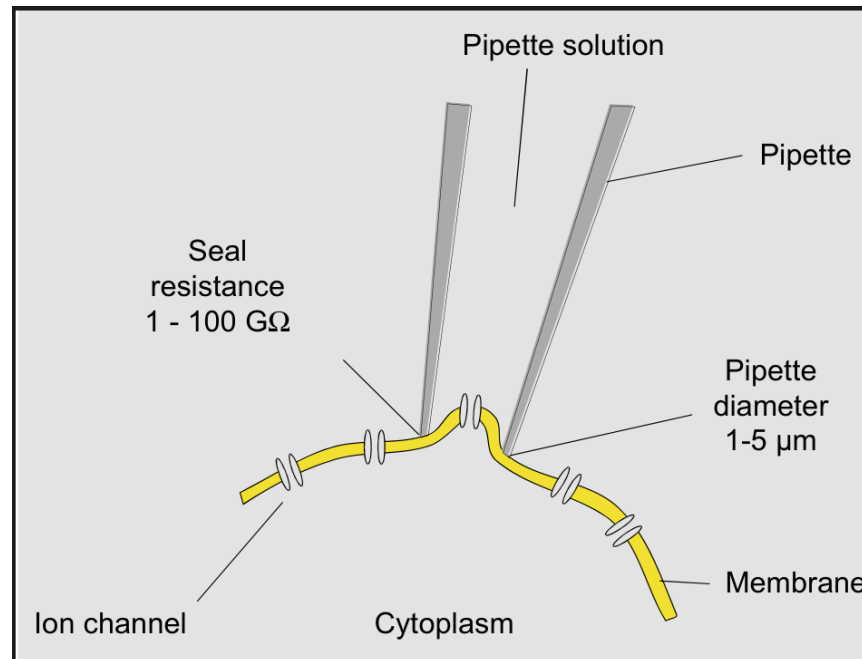
۳. جریان تک‌کاناله و رسانایی تک‌کاناله

۴. روش Sniffer-Patch

۴.۴.۱ نسخه‌های مختلف پیچ کلمپ

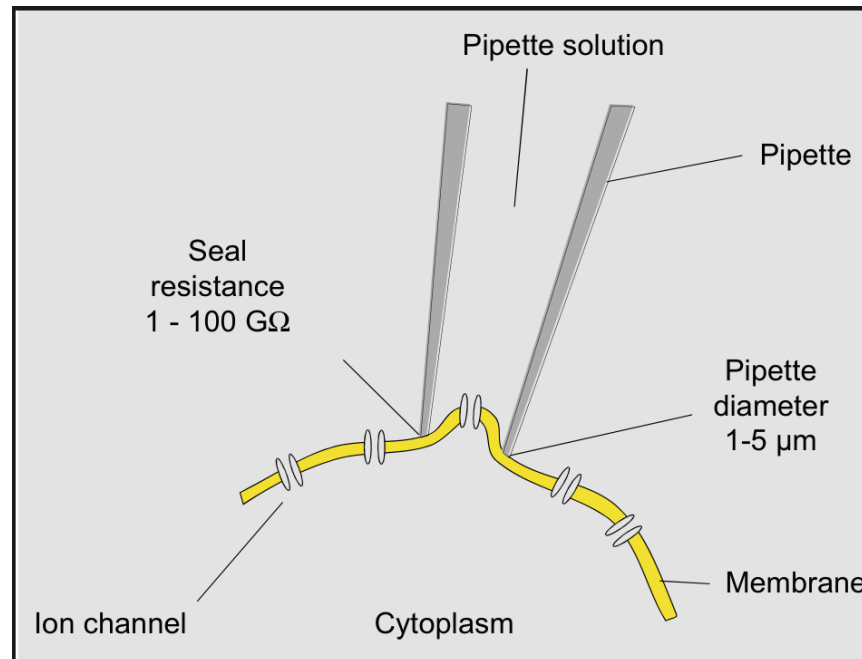
Patch-clamp

- روشی تکامل یافته از ولتاژ کلپ است که به دانشمندان اجازه می‌دهد جریان‌های الکتریکی بسیار کوچک را که از پروتئین‌های خاصی (به نام کانال‌های یونی) در غشای سلول عبور می‌کنند، اندازه بگیرند.



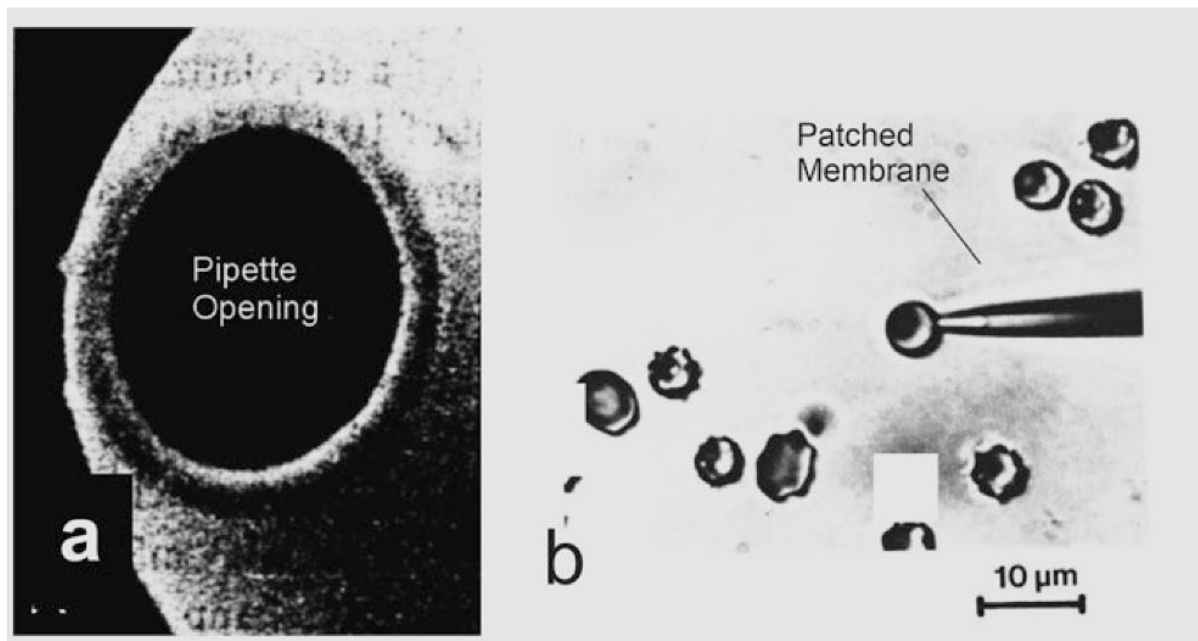
Patch-clamp

- نکته طلایی این تکنیک، ایجاد یک تماس بسیار محکم و نزدیک بین لبه‌ی یک لوله‌ی شیشه‌ای بسیار نازک (پپت) و سطح سلول است.
- این تماس باعث ایجاد یک **مقاومت الکتریکی بسیار بالا** (در حد گیگااهم) می‌شود. که امکان ثبت جریان‌های غشایی در محدوده **پیکوآمپر** را فراهم می‌کند

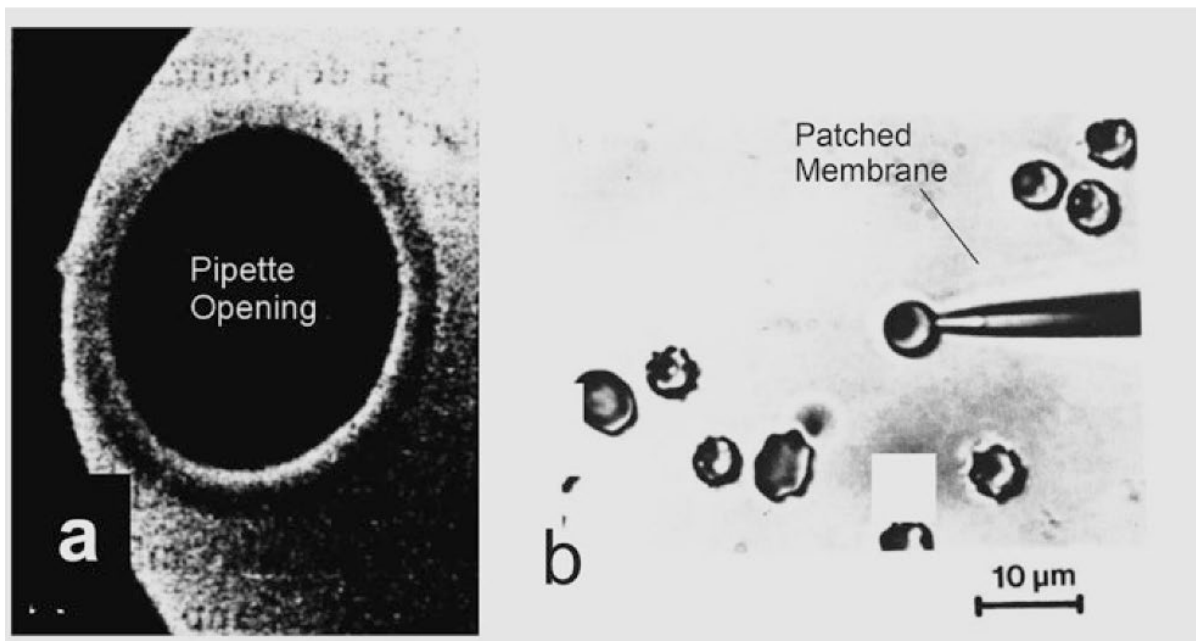


Patch-clamp

- برای اینکه این روش درست کار کند، باید لبه‌ی پیت کاملاً صاف و تمیز باشد و فشار منفی کمی به داخل آن اعمال شود تا غشای سلول به لبه‌ی شیشه بچسبد. مقاومتی بین ۱ تا ۱۰۰ گیگا اهم به طور خودبه‌خودی شکل می‌گیرند. (که حتی میتوان جریان حاصل از یک پروتئین کانال باز منفرد را ضبط کرد)



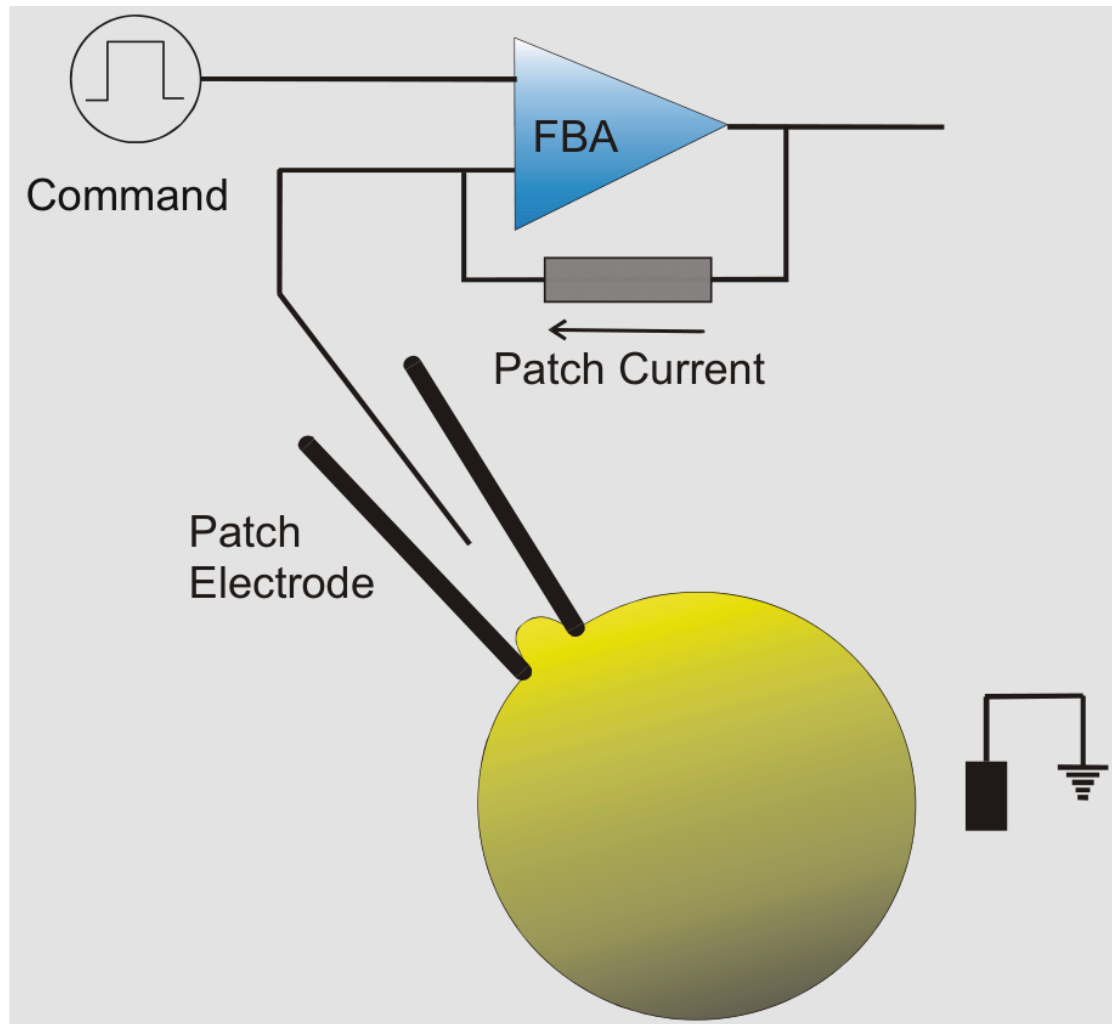
- این مقاومت بالا نتیجه تعاملات مستقیم بین سطح شیشه‌ای پیپت و غشای سلول در مقیاس اتمی است. احتمالاً این تعاملات شامل پل‌های نمکی بین یون‌های مثبت و منفی در سطح شیشه و غشا می‌شود.



- بارهای منفی روی سطح شیشه و غشا توسط کاتیون‌های دوظرفیتی و پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های اکسیژن در سطح شیشه و فسفولیپیدهای سازنده غشا، و همچنین تعاملات وان‌دروالس، واسطه‌گری می‌شوند.

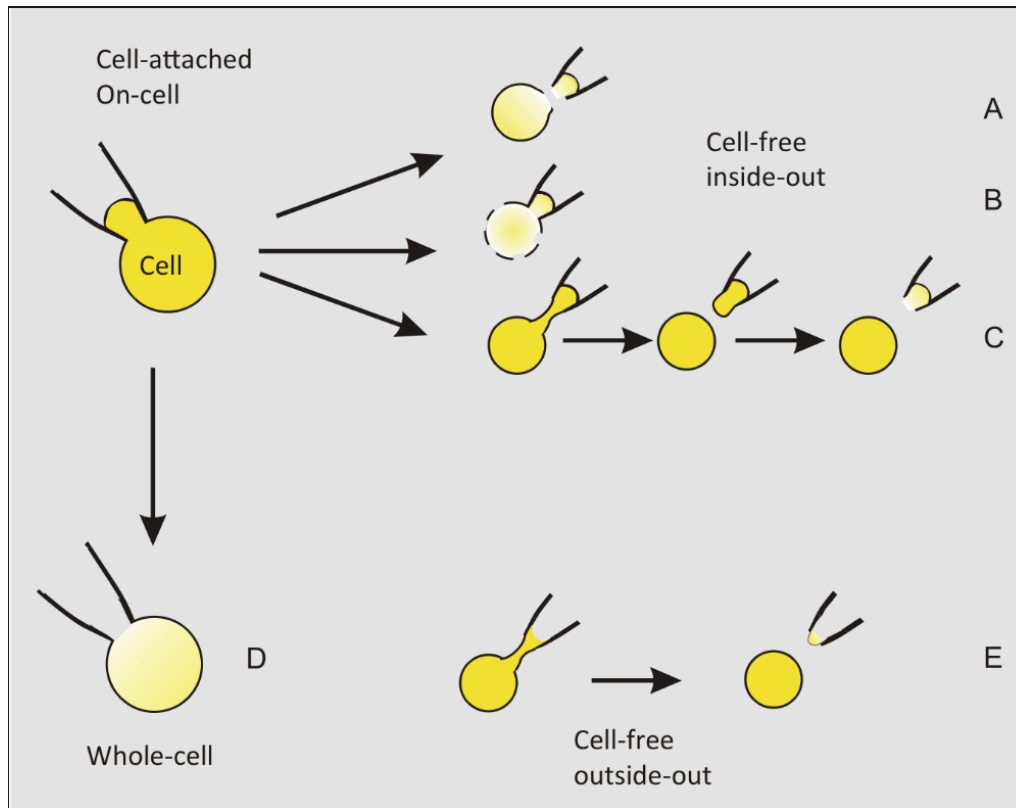
بسته به اندازه پیپت، نوع سلول و تراکم کانال‌ها، قطعه غشای جدا شده از نظر الکتریکی ممکن است حاوی یک یا چند پروتئین کانال باشد. باز و بسته شدن این کانال‌ها باعث ایجاد تغییرات ناگهانی در جریان می‌شود که می‌توان آن را با استفاده از voltage clamp ثبت کرد.

تقویت کننده بازخورد (FBA)



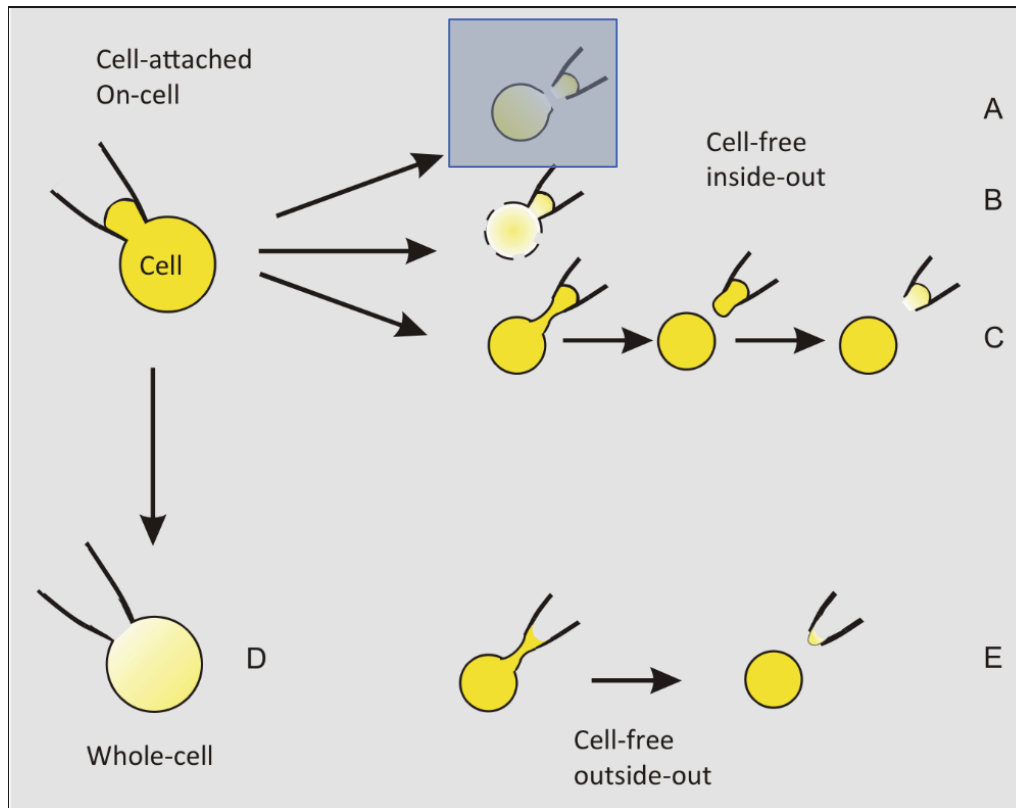
انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

- به دلیل مقاومت بالا، تعامل شیشه-غشاء نیز از ثبات مکانیکی بالایی برخوردار است. این امر امکان کار با قطعات غشاء کاملاً جدا شده را فراهم می‌کند.



انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

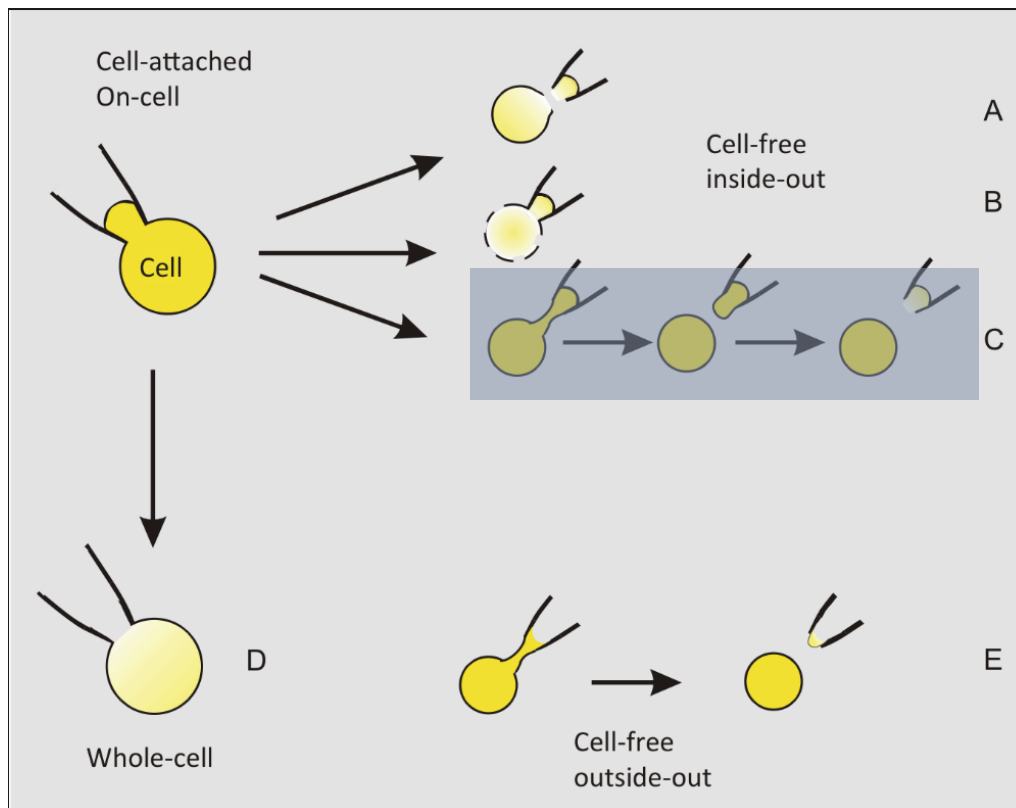
- قطعات غشاء داخل-برعکس می‌توانند به روش‌های متنوعی تشکیل شوند: پس از ایجاد مهر و موم گیگا اهم، پیپت را از سلول جدا می‌کنیم.



در نبود یون کلسیم کاتیون‌های دو الکترون باعث تضعیف یکپارچگی غشاء می‌شود در محیط حمام، قطعه غشاء جدا شده‌ای به دست می‌آید.

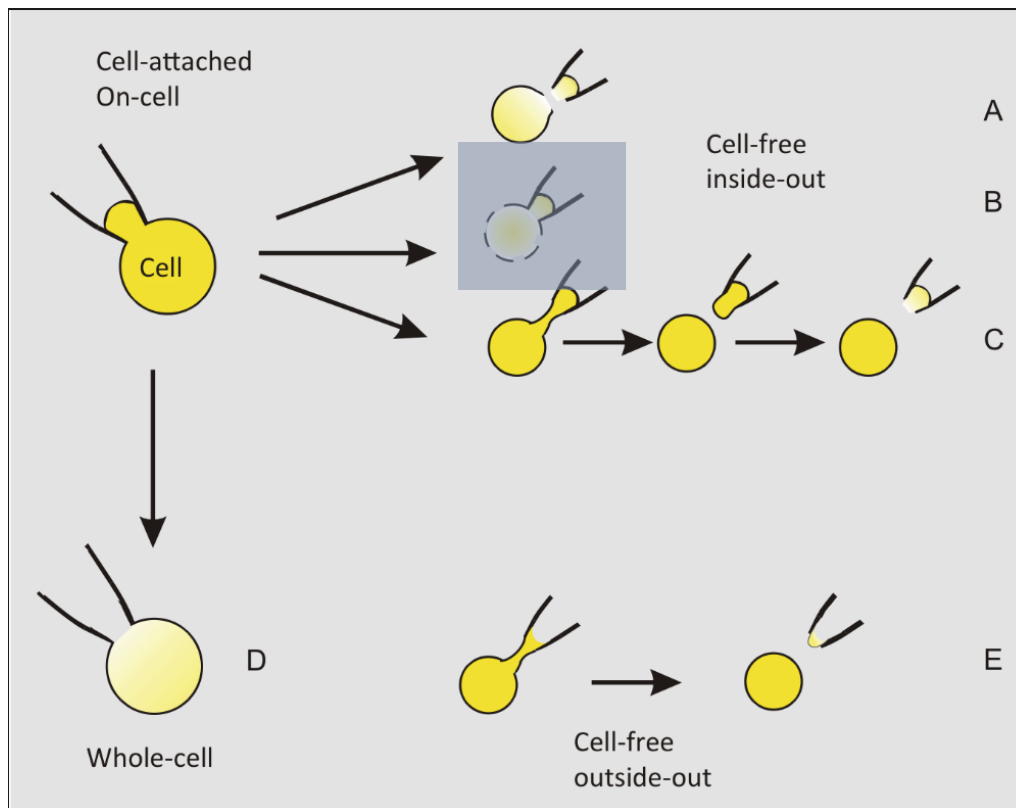
انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

- در حضور Ca^{2+} ، یک وزیکول تشکیل می‌شود.



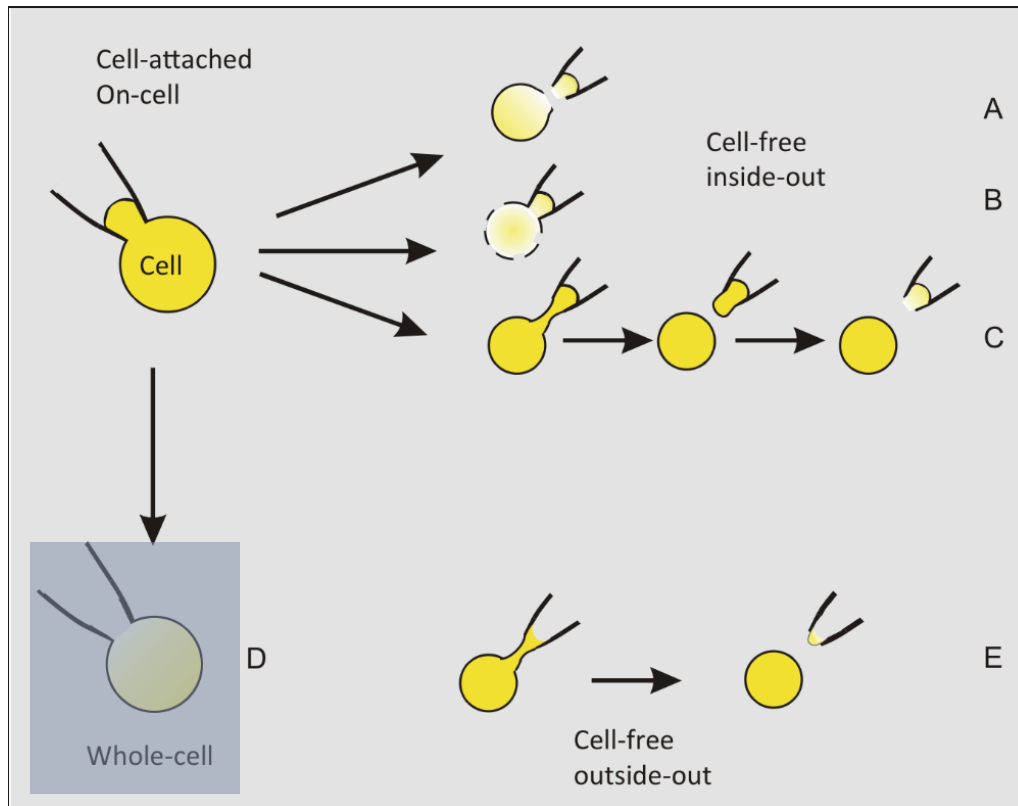
انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

- اما سطحی که رو به حمام است، می‌تواند به صورت مکانیکی یا شیمیایی مختل شود. این کار حتی با کل سلول نیز امکان‌پذیر است.



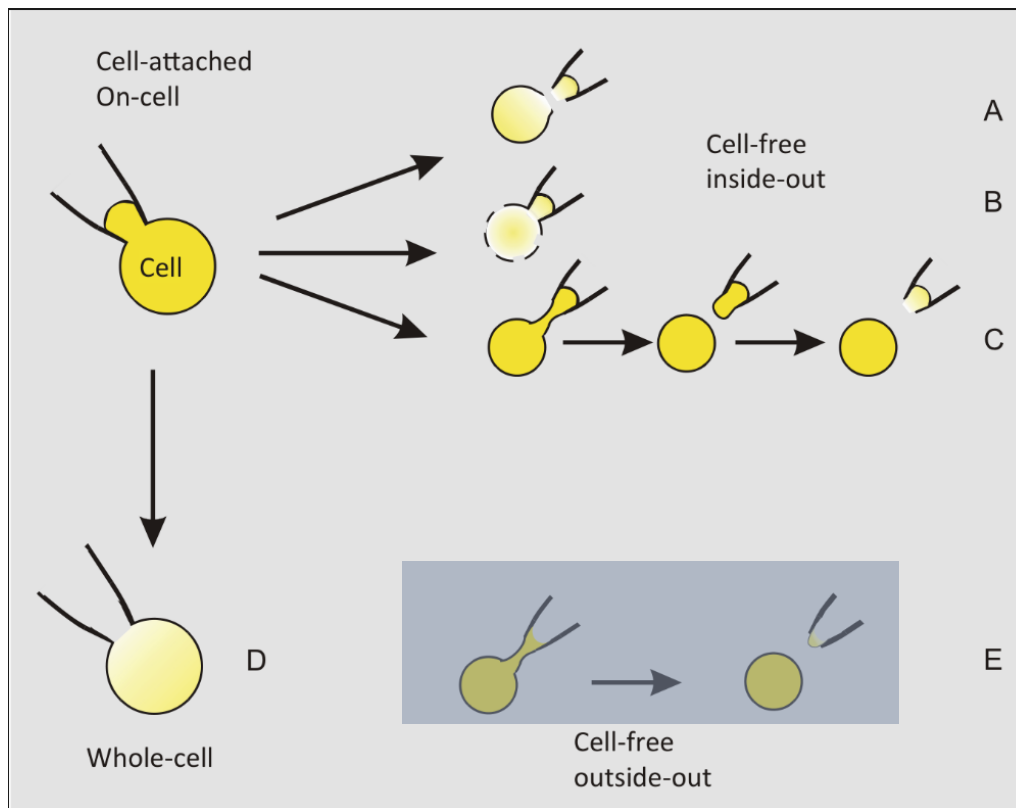
انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

- برای تشکیل قطعه غشاء خارج-برعکس (outside-out)، غشاء متصل شده ابتدا با اعمال فشار منفی ملایم در پیپت یا پالس ولتاژ قوی شکسته می‌شود، یا می‌توان آن را به صورت شیمیایی سوراخ کرد.



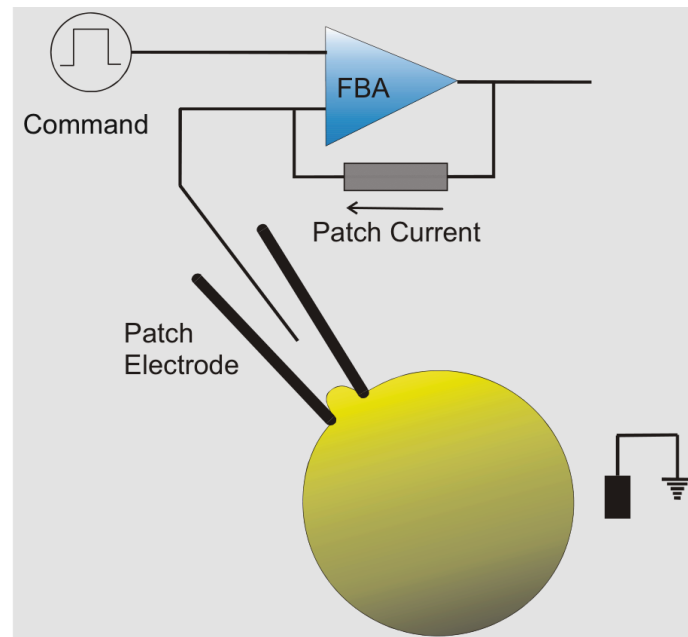
انواع پیکربندی در پیچ کلمپ

- این فرایند منجر به پیکربندی کل-سلول (whole-cell) می‌گردد. پس از جداسازی پیپت در محیط حاوی Ca^{2+} ، قطعه خارج-برعکس تشکیل می‌شود.



۴.۴.۲ مزایای شکل‌گیری‌های مختلف پیچ

- خصوصیات کانال‌های تک‌واحد در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی. محلول پیت، ترکیب یون‌های خارجی را شبیه‌سازی می‌کند (تبادل محلول از طریق نگهدارنده‌های ویژه پیت امکان‌پذیر است). یکی از معایب این پیکربندی، ناشناخته بودن پتانسیل دقیق عرضی غشای متصل به سلول است، زیرا پتانسیل استراحت سلول سالم بر پتانسیل ثابت‌شده سوار می‌شود.

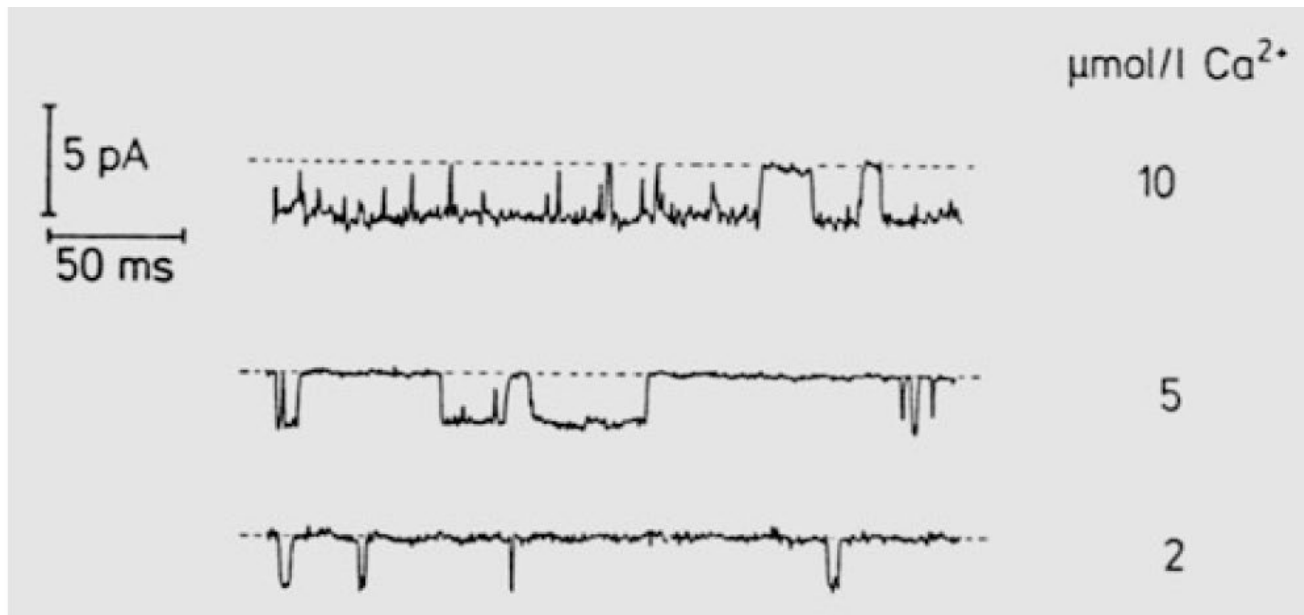


Inside out- without cell

دسترسی به سطح داخلی غشا از طریق محلول حمام.

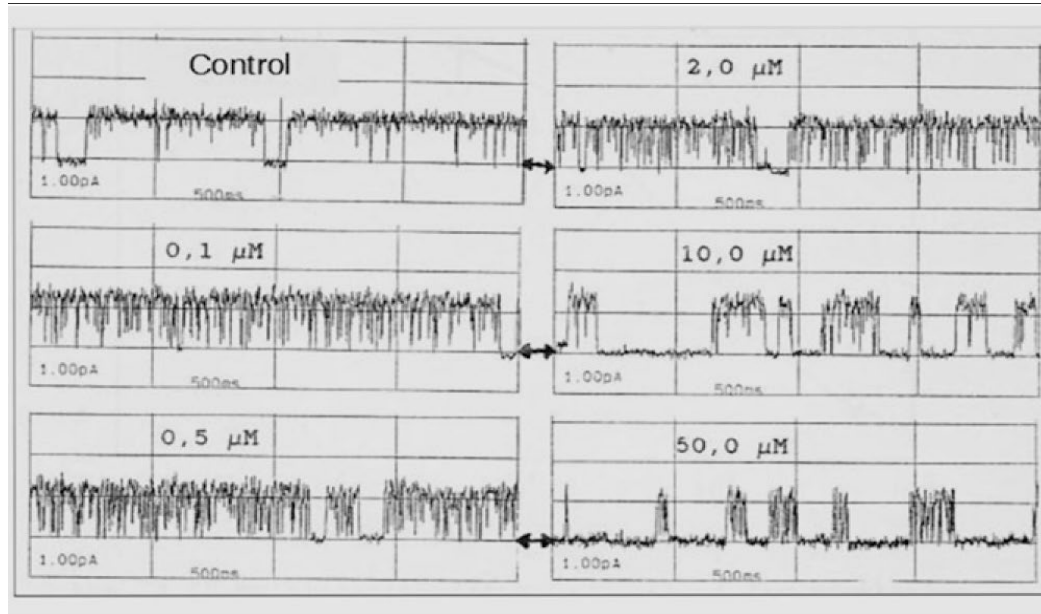
مثال: کانال پتاسیم K^+ فعال شده با Ca^{2+} در گلبول‌های قرمز

ممکن است نبود یک ماده داخلی ضروری و نامعلوم در محلول حمام، مشکل ساز شود.



Outside out- without cell

- دسترسی به سطح خارجی غشا از طریق محلول حمام.
- مثال: مهار کانال‌های انتخابی کلرید (Cl^-) در سلول‌های K562 توسط ۱۵ H2DIDS
- در این پیکربندی نیز ممکن است نبود یک ماده سلولی ضروری و نامعلوم در محلول پیپت، مشکل‌آفرین باشد.



ویژگی‌های پیکربندی‌های مختلف پچ (patch)

حامل‌ها	تک کانال	چندگانه کانال	ویژگی‌ها	محل حمام	محل پیپت	
						شکل ساختاری
خیر	بله	(بله)	شرایط فیزیولوژیک مشکل: پتانسیل غشاء (E_m) هم‌پوشانی		خارجی	روی سلول
خیر	بله	(بله)	تغییر محلول داخلی (کلسیم، پیام‌رسان‌های درون‌سلولی)	داخلی	خارجی	داخل به بیرون (کانال‌های فعال‌شده با کلسیم)
خیر	بله	(بله)	تغییر محلول خارجی (ناقل‌ها، داروها، سموم)	خارجی	داخلی	خارج به داخل (مهار خارجی)
بله	(بله)	بله	تغییر محلول خارجی سوراخ‌کردن با نیستاتین	خارجی	داخلی	کل سلول (حامل‌ها یا کانال‌های کمرسانا)
بله	(بله)	بله	همه‌ی انواع ممکن به‌جز کل سلول بزرگ		بسته به حالت	وصله‌ی غول‌پیکر

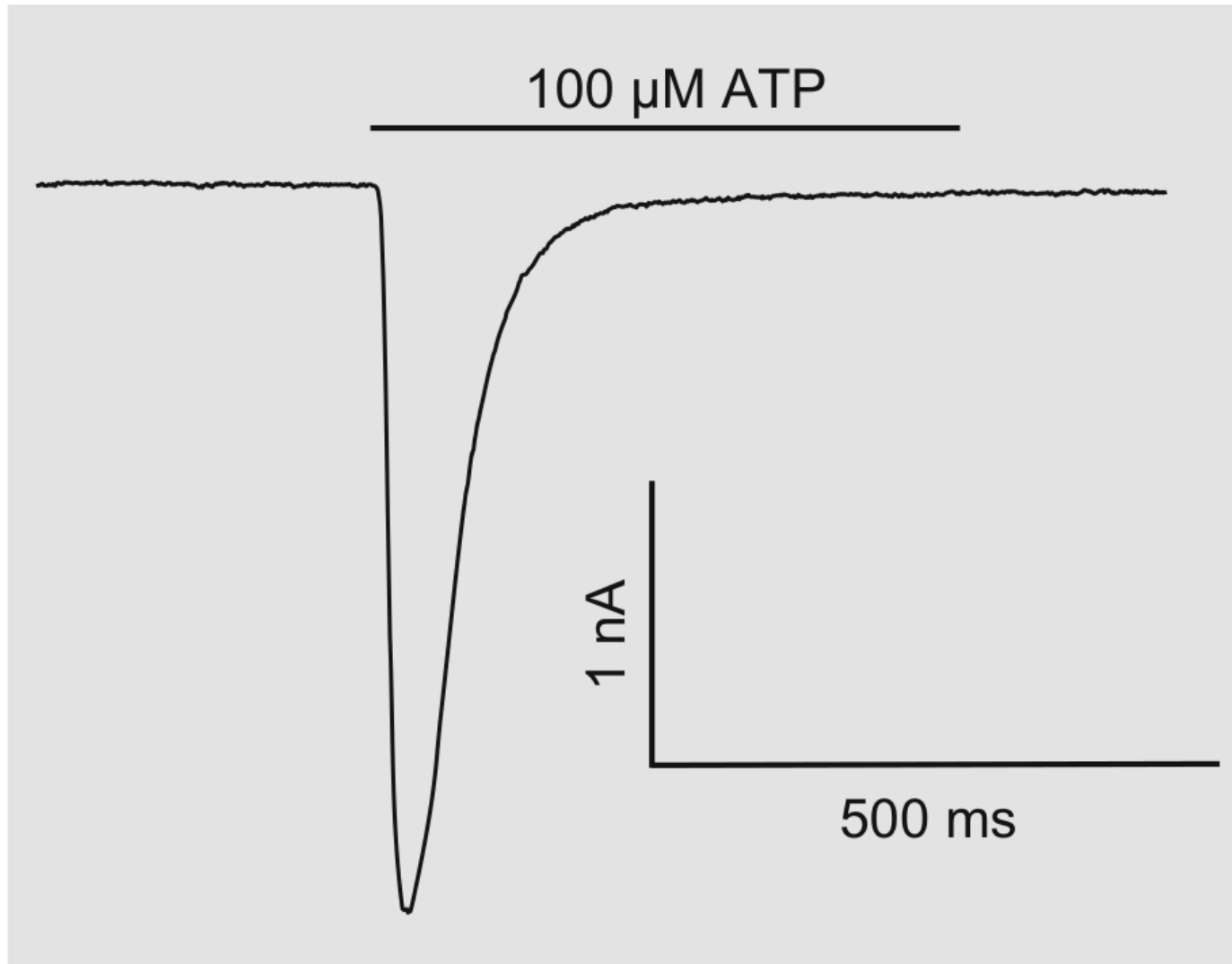
حالت های مختلف Patch Clamp

Whole-cell •

Giant Patch •

- با ایجاد قابلیت نفوذ غشاء در پیت وصله‌زنی فقط برای یون‌های کوچک، به طور مثال با استفاده از نیستاتین (وصله سوراخ‌دار، که از اتلاف اجزای حیاتی سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند) یا تخریب کامل غشاء، می‌توان رفتار سلول کامل همراه با تمام محتوای سیتوپلاسمیک آن را بررسی کرد.
- تبادل جزئی محلول سیتوپلاسم از طریق محلول پیت امکان‌پذیر است. این روش فقط برای سلول‌های کوچک کاربرد دارد، اما اجازه می‌دهد جریان‌هایی که توسط حامل‌ها یا کانال‌های یونی ماکروسکوپی (ترکیب گیتینگ تعداد زیادی کانال، شکل ۴.۱۶) تولید می‌شوند را اندازه‌گیری کنیم.

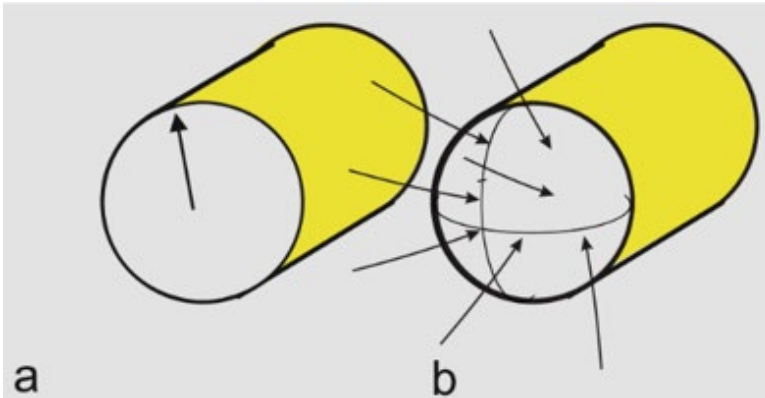
- قطر نوک پیپت‌های وصله‌زنی معمولی بین ۱ تا ۲ میکرومتر است. برای تحلیل پدیده‌های چندکاناله (مانند جریان‌های گیتینگ، بخش ۴.۳)، می‌توان قطر پیپت را به ۵ میکرومتر افزایش داد (وصله ماکرو). با اعمال روش‌های خاص روی نوک پیپت (مثلاً روش رتینگر و همکاران، ۱۹۹۴)، می‌توان مهرهای امپدانس گیگااهمی با پیپت‌هایی با قطر تا ۵۰ میکرومتر (وصله غول‌پیکر) ایجاد کرد.
- این تکنیک تشخیص جریان‌های ناشی از پمپ‌های یونی و سایر حامل‌ها در وصله‌های غشایی جدا شده را ممکن می‌سازد. پیکربندی‌های متصل به سلول، درون‌به‌بیرون و بیرون‌به‌درون را می‌توان با پیپت‌های غول‌پیکر ایجاد نمود.



۴.۴.۳ جریان تک کاناله و رسانایی تک کاناله

۱. تخمین جریان تک کاناله

- جریان عبوری در صورت نبود گرادیان پتانسیل الکتریکی اضافی ($E_m = 0$)



$$J = -zFAD \frac{dc}{dx} = -zF\pi r^2 D \frac{c}{l}$$

z : بار یون
 F : ثابت فارادی
 D : ضریب نفوذ
 c : اختلاف غلظت
 $A = \pi r^2$: سطح مقطع منفذ
 l : طول منفذ

- محاسبه رسانایی تک کاناله (فعالیت یون‌ها در دو طرف منفذ C_1 و C_2)

$$J \approx 1.3 \times 10^{-16} \text{ mol/s} \approx 7.7 \times 10^7 \text{ ions/s} \approx 12 \text{ pA}$$

$$r = 3 \times 10^{-8} \text{ cm (0.3 nm)} \quad l = 5 \times 10^{-8} \text{ cm (0.5 nm)} \quad D = 1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

$$c_1 = 0 \quad c_2 = 150 \text{ mM}$$

۱. تخمین جریان تک کاناله

- رابطه مقاومت (Access resistance) برای یک منفذ استوانه‌ای

$$R = \rho \left(\frac{l}{\pi r^2} \left| 2 \int_a^\infty \frac{dr}{2\pi r^2} \right. \right) = \frac{\rho}{\pi r^2} (l + r)$$

- اصلاح دقیق‌تر مدل

$$R = \frac{\rho}{\pi r^2} \left(l \left| \frac{2}{\pi} r \right. \right)$$

- apparent length

$$l^* = l + \frac{\pi r}{2}$$

- با استفاده از طول مؤثر، جریان تک کاناله کاهش یافته

$$J \approx 4 \times 10^7 \text{ ions/s} \approx 6 \text{ pA}$$

نکته مهم: نرخ انتقال یک حامل معمولی در محدوده تنها ۱-۱۰۰ جابجایی در ثانیه است.

۲. تخمین رسانایی تک کاناله

- مقاومت یک کانال منفرد

$$R = \frac{\rho l}{\pi r^2} = 1.8 \text{ } G\Omega$$

$$\rho = 100 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$$

- اثر مقاومت دسترسی

$$R \approx 3.5 \text{ } G\Omega$$

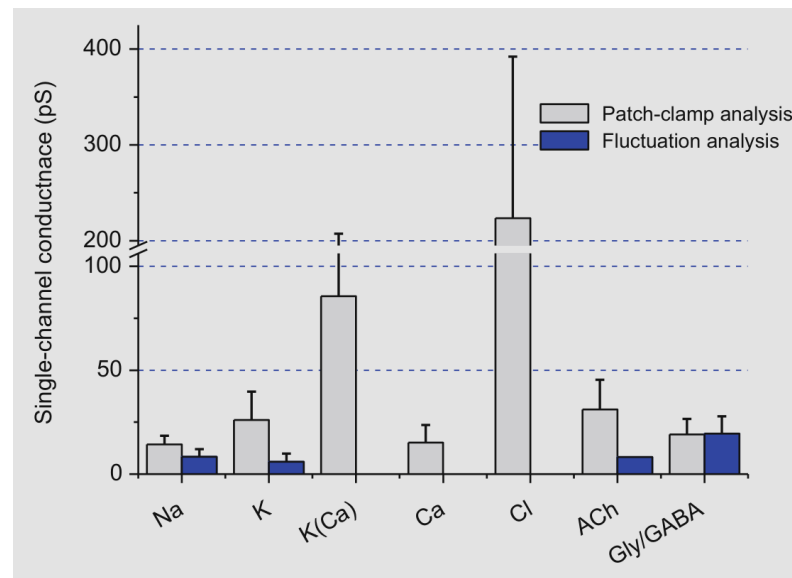
- رسانایی تک کاناله

$$\gamma = \frac{1}{R} \approx 300 \text{ } pS$$

(a) امکان طبقه‌بندی انواع مختلف کانال‌ها

(b) تغییرات رسانایی می‌تواند اطلاعاتی درباره مکانیسم اثر داروها ارائه دهد.

(c) تغییرات رسانایی ناشی از جهش‌ها (mutations) می‌تواند برای بررسی روابط ساختار-عملکرد و همچنین اختلالات فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.



۳. مکانیزم گیتینگ (The gating mechanism)

- برای تحلیل ویژگی‌های گیتینگ (باز و بسته شدن کانال)، می‌توان هیستوگرام‌هایی از زمان ماندگاری (dwell time) کانال در حالت باز یا بسته محاسبه کرد. این فرایندها از آمار مارکوفی (Markovian statistis) پیروی می‌کنند، این هیستوگرام‌ها را می‌توان با توابع نمایی توصیف کرد:

$$N = \sum A_i e^{-t/\tau_i}$$

N : تعداد دفعاتی که کانال به مدت t باز (یا بسته) مانده

A_i : ضریب تعیین کننده ارتفاع نمودار

τ_i : میانگین زمان ماندگاری کانال در یک حالت مشخص

۳. مکانیزم گیتینگ (The gating mechanism)

- در نبود vanadate

توزیع زمان‌های باز و بسته با یک نمایی ساده توصیف می‌شود:

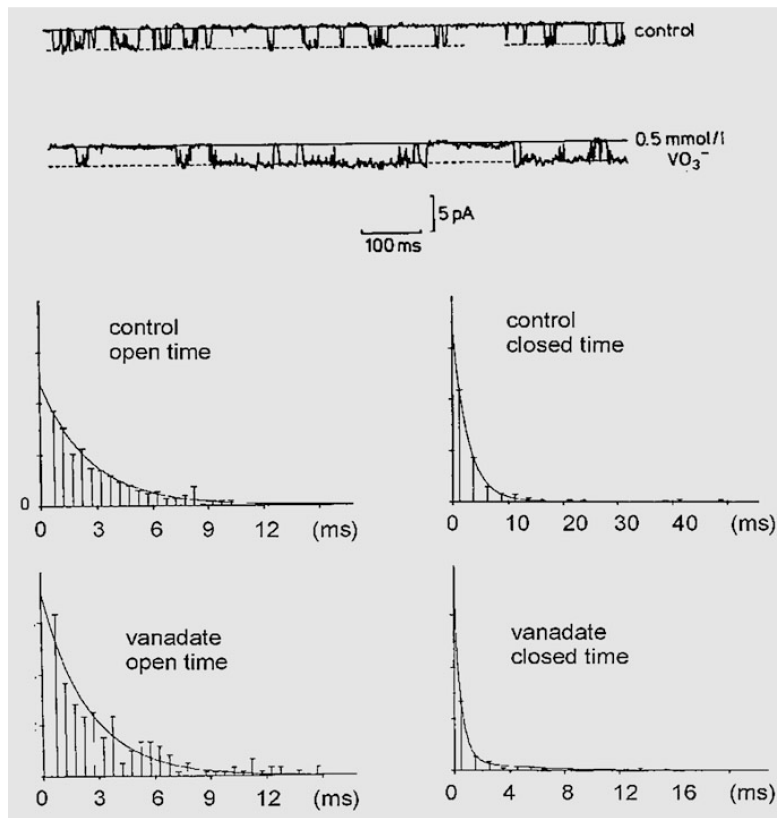
$$\tau_o \approx \tau_c \approx 5 \text{ ms}$$

- در حضور vanadate

τ_o تغییر نمی‌کند.

توزیع زمان بسته به دو ثابت زمانی نیاز دارد:

$$\tau_{c1} \approx 1 \text{ ms}, \tau_{c2} \approx 10 \text{ ms}$$

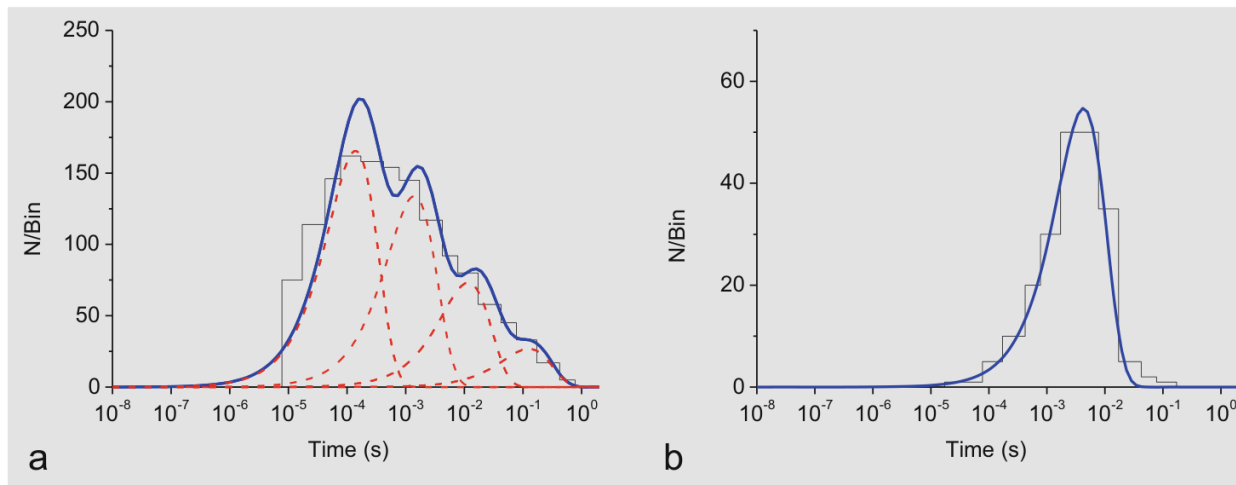


کاربردهای هیستوگرام‌های گیتینگ

- رسم دیاگرام‌های واکنشی (reaction diagrams) بین حالت‌های مختلف کانال
- بررسی مکانیسم اثر پیام‌رسان‌های ثانویه، داروها و سموم
- تحلیل رابطه ساختار-عملکرد با مقایسه جهش‌ها و کانال‌های طبیعی
- نمایش پیشرفت داده‌ها

نمایش پیشرفت داده‌ها

- توزیع زمان‌های باز و بسته همچنین می‌تواند با استفاده از هیستوگرام‌هایی با بازه‌های لگاریتمی نمایش داده شود. این روش، تابع چگالی احتمال (pdf) را به صورت دقیق‌تری نشان می‌دهد.
- در این نمایش قله‌های توزیع در $t = \tau_i$ ظاهر می‌شوند و هر قله متناظر با یک حالت گیتینگ است.



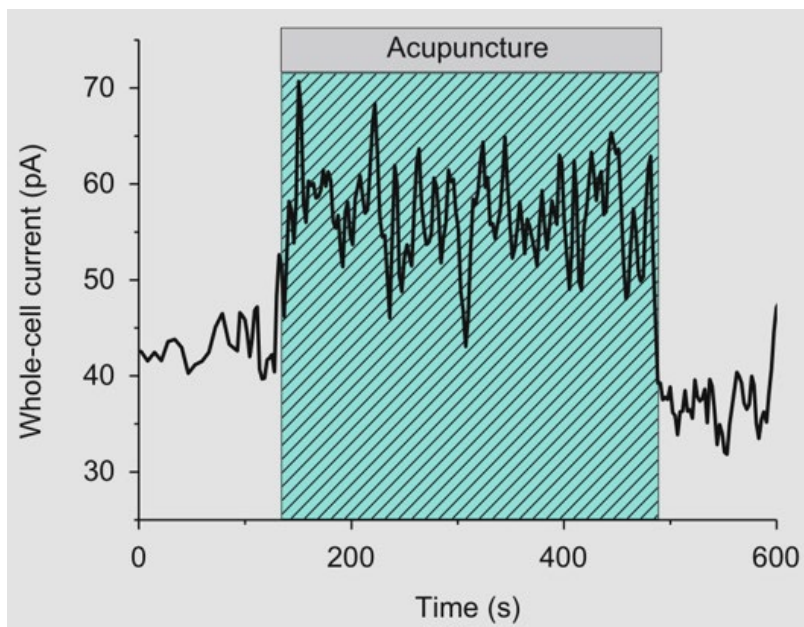
Sniffer-Patch روش ۴.۴.۴

۱. روش Sniffer-Patch

- استفاده از فیبر کربنی برای تشخیص مقادیر بسیار کم داروها از طریق واکنش‌های اکسایش-کاهش
- امکان تشخیص سریع و بسیار حساس مولکول‌هایی که به عنوان انتقال‌دهنده آزاد می‌شوند را فراهم می‌کنند.
- به دلیل وجود مقادیر بالای آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط فیزیولوژیک، معمولاً اعمال پتانسیل‌های مثبت در نوک فیبر کربنی باعث اکسید شدن واسطه (mediator) مربوطه می‌شود.
- شرط اصلی استفاده از این روش این است که مولکول بتواند به راحتی بین حالت اکسیدشده و کاهش‌یافته در نوک فیبر کربنی تبدیل شود.
- حساسیت بالای تکنیک patch-clamp این امکان را فراهم می‌کند که از تکه‌های غشایی سلول‌هایی با گیرنده‌های بیش‌بیان‌شده (over-expressed receptors) استفاده شود؛ گیرنده‌هایی که برای تشخیص مولکول‌های خاص بسیار اختصاصی هستند. تعامل پروتئین گیرنده با هورمون‌ها، ناقل‌های عصبی یا سایر واسطه‌های خارج‌سلولی که از سلول دیگری آزاد می‌شوند، نقش مهمی در این فرایند دارد.
- در روش Sniffer-patch، امکان آشکارسازی تنها چند مولکول با استفاده از پاسخ کانال‌های یونی وابسته به لیگاند در قطعات غشایی فراهم می‌شود. سیگنال‌های جریان کالبره‌شده که از فعال شدن این «کانال‌های یونی آشکارساز» حاصل می‌شوند، پاسخ‌هایی بسیار حساس و سریع ایجاد می‌کنند.

۱. روش Sniffer-Patch

- اگرچه این روش دارای وضوح مکانی و زمانی بالایی است، اما دامنه غلظت‌های قابل اندازه‌گیری محدود بوده و معمولاً در حوالی مقدار ظاهری (K_m) گیرنده-کانال قرار دارد.



- آزادسازی واسطه‌ها از سلول‌های کشت‌شده، یا از سلول‌های موجود در برش‌های بافتی، یا حتی آزادسازی ناشی از نور در مولکول‌های قفل‌شده نوری (caged molecules) قابل آشکارسازی است. همچنین تغییرات واسطه‌ها در مایعات میکرودیالیز نیز قابل پایش است.

جریان کل سلولی (Whole-cell current) در یک سلول ماست انسانی (HMC-1) در پتانسیل $+100 \text{ mV}$ در طی superfusion سلول با مایکرودیالیزات (microdialysate) موشی که در حین آزمایش به مدت ۵ دقیقه تحت طب سوزنی (acupuncture) قرار گرفته بود (این بازه با نوار خاکستری مشخص شده است).



با تشکر از توجه شما