

离子通道研究技术的最新进展——全自动膜片钳技术

曹小于¹ 郑婉云² 鲁燕滨³ 黄超¹

(1. 达科为生物技术有限公司 深圳 518054)

(2. 厦门大学生命科学学院分子细胞神经科学实验室 厦门 361005)

(3. 南京善康医药科技发展公司 南京 210013)

摘要 全自动膜片钳技术是离子通道检测技术的最新进展,它具有直接性、高信息量及高精确性的特点。近来在多个方面作出新的突破,如高的实验通量表现,较高的自动化程度、良好的封接质量、微量加样等。目前,该技术在以离子通道为靶标的药物研发,药物毒理测试以及虚拟药筛等方面有广阔的应用前景。本文对全自动膜片钳仪器的原理和技术细节作全面介绍。

关键词 全自动膜片钳 高通量药筛 hERG 检测 虚拟筛选

引言

细胞是通过细胞膜与外界隔离的,在细胞膜上有很多离子通道,细胞通过这些通道与外界进行离子交换。离子通道在许多细胞活动中都起关键作用,它是生物电活动的基础,在细胞内和细胞间信号传递中起着重要作用。随着基因组测序工作的完成,更多的离子通道基因被鉴定出来,离子通道基因约占1.5%,至少有400个基因编码离子通道。相应的由于离子通道功能改变所引起的中枢及外周疾病也越来越受到重视。以离子通道作为靶标的药物现占总靶标的5%,而潜在的离子通道靶标药物将占总靶标的25%,因此开发离子通道为靶标的药物将具有广阔的市场前景。已知与离子通道有关的疾

病主要有:癫痫(epilepsy)、心律失常(Cardiac arrhythmia)、糖尿病(diabetes)、高血压(hypertension)、舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森症(Parkinson's disease)……。

离子通道的实验研究最初主要来源于生理学实验。1949~1952年,Hodgkin等发展的“电压钳技术”为离子通透性的研究提供技术条件。60年代中期,一些特异性通道抑制剂的发现为离子通道的研究提供有力武器。1976年Neher和Sakmann发展的膜片钳技术直接记录离子单通道电流,为从分子水平上研究离子通道提供直接手段。80年代中期,生化技术的进步,分子生物学以及基因重组技术的发展,使人们能够分离纯化许多不同的通道蛋白,直接研究离子通道的结构与功能关系(见表1)。

表1 传统膜片钳技术主要优缺点总结

优点	缺点
A 高信息量:能改变细胞膜电位,单细胞记录	A 需要受过良好训练的电生理学专家
B 高灵敏性:能记录到pA级电流变化和单通道开关状态	B 通量很低,一天的实验数据量不超过10
C 灵活性好:可以控制改变细胞膜内外的溶液成分	C 劳动力投入密集,试验操作过程复杂
D 应用范围广:可以分析检测所有的离子通道类型	D 不适合药物粗筛/二次筛选
E 相对于荧光标记和放射性标记等手段具有更高权威性和精确性 ^[1]	E 技术自动化非常困难,且不能进行平行检测

1 多款全自动膜片钳系统分析

1.1 技术实现原理

Nanon公司的PatchLiner NPC-16, Molecular Devices公司的Ionworks HT和PatchXpress 7000A全部采用的是平板微阵列技术。其技术特点如下:在平板电极上打磨或者使用金属离子轰击成孔,每

孔都是大小均一的直径约1~2 μm的小孔,每个小孔下面有电极连接到放大器,可对实验过程中的电流变化进行记录。将细胞悬浮液加载到平板玻璃孔上,通过调节压力和吸力,一个细胞便可以自动定位在小孔上(相当于微管电极的尖端),自动进行封接,自动判断封接并进一步施加负压破膜以进行全细胞模式实验^[4,5]。

Flyion 公司采用的是翻转膜片钳技术 (FLIP-THE-TIP), 全部操作过程由软件设定机器人完成。流程如下: 机器人自动将细胞注入 Flip tip 微管 (Flyion 公司专利技术), 然后自动把细胞冲洗到管尖底部, 在负压的吸引下形成传统的吉欧封接。自动判断封接形成是否良好并自动破膜形成全细胞模式。随后, 药物化合物等可以被自动应用到管内进行全细胞模式实验。这种方式形成的膜片钳完全排除显微镜和显微操作, 从而革命性的实现膜片钳技术的全自动化^[7,8]。各自的膜片钳实现原理 (见图 1)。

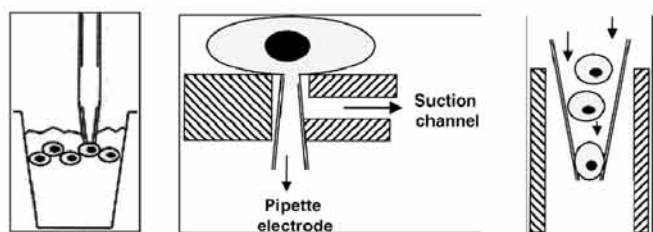


图 1 多种膜片钳技术实现的原理及过程图示^[8]

(a) 传统膜片钳: 移动玻璃微电极至选定的细胞膜上; (b) 平板微阵列膜片钳: 通过负压的作用把自动细胞摆放在微电极记录尖端; (c) 翻转膜片钳: 细胞从管顶端注入微管内部并被冲到管底。

1.2 封接的质量问题

一般而言, 能达到 $1\text{G}\Omega$ 以上的封接都能够满足当前研究需要。Flyion 公司的全自动膜片钳机器人所采用的 Flip tip 微管技术在试验中封接数值一般分布在 $1\sim 10\text{G}\Omega$ 范围内, 封接的成功率在 $70\%\sim 90\%$ 并且对近 20 个细胞系有效 (如 CHO, L929, Jurkat, HL, LTK, HEK293)。较高的成功率和封接质量源于使用玻璃管式的微管技术, 因为传统的玻璃管在烧熔过程中具有超洁净、超光滑、高阻抗和低成本的特性, 至今还没有任何材料可以替代。

PatchLiner NPC-16 和 PatchXpress 7000A 都采用的是 16 孔玻璃平板微阵列技术, 在通常的情况下也对多个细胞系达到吉欧封接, 一般地实验成功率在 $60\%\sim 80\%$ 左右。但是 Ionworks HT 在封接质量上面表现有待提高, 它采用的是 384 孔的塑料平板微阵列技术, 试验中平均封接阻值一般在 $100\sim 200\text{M}\Omega$ 左右。但由于其采用 PPC (Population Patch Clamp) 技术, 即同时对多个细胞进行膜片钳试验然后取均值作为一个细胞的实验结果, 这样达到较高的实验成功率 (最高可达 90% 左右), 但是却以更高的消耗为代价^[8]。

1.3 通量表现

调查显示, 大部分用户希望能够获得 20000 数据点/天 (8h 工作日时间)。目前的制药公司在进行

药物粗筛时, 一般要达到 $50\sim 100$ 万数据点/天, 而且在未来 5 年内这一数值还会进一步提高。根据目前的全自动膜片钳系统通量来看, 其主要适合于小规模或者中等规模的药物筛选。目前市场上通量表现最高的膜片钳仪器为 3000 数据点/天 (Ionworks HT)。其他的几款仪器通量分别为: Flyscreen 8500 $300\sim 1000$ /天, PatchLiner NPC-16 250 /天, PatchXpress 7000A 1000 /天。

1.4 对电压门控通道和配体门控通道研究的兼容性

这四款仪器都能完成对电压门控通道的电流变化进行记录的任务。相对而言电压门控通道是科研学者和制药公司研究的宠儿, 但是也有大约 29% 的专业人员希望能对配体门控通道进行研究^[8]。所以仪器同时具备分析电压门控通道和配体门控通道的能力将会在市场份额的竞争中取得优势。相对来说, 研究配体门控通道对快速换液的技术要求更高 (一般要求控制在 50ms 之内)。PatchLiner NPC-16 和 Flyscreen 8500 能够快速换液和同步进行电流变化记录 (换液时间小于 50ms); PatchXpress 7000A 能够同步记录到电流变化, 但是在快速换液方面还有待提高 (大约在 100ms 左右); 至于 Ionworks HT, 由于其特殊的记录系统设计, 所以目前只能对反应速度最慢的配体通道进行分析检测^[8]。

1.5 平均每个数据点的花费

在进行药物粗筛时, 通常制药公司会选择投入 $10\sim 20$ 万欧元以完成一百万个化合物的测试。而在进行第二次药物化合物筛选和药物安全性测试中 (如 hERG 早期安全性测试), 为尽早得到药物的药理和毒理相关的高质量的数据, 用户愿意投入 $5\sim 10$ 欧元/数据点。目前而言, 使用 Flyion 公司 Flyscreen 8500 的耗材价格相对比较便宜, 平均每获得一个数据点大约需要投入 5 欧元左右。其他几个公司分别为: Nanion 公司的 PatchLiner NPC-16 需要花费 10 欧元以上/数据点; Molecular Devices 公司的 Ionworks HT 和 PatchXpress 7000A 也分别需要投入 10 欧元左右以获得一个数据点。

1.6 各款仪器的其它优点

除上述共同特征之外, 这四款仪器还有各自的优点。Flyscreen 8500 在药物微量加样方面表现非常优秀, 每次加样体积最低可以控制在 $5\mu\text{L}$ 左右, 极大的有利于节省珍贵或者稀有药物; 其膜片钳的工作方式除全细胞膜片钳方式外, 还有穿孔膜片钳方式, 且能稳定工作约 30min 左右; Flip tip 微管采用统一化的标准工业生产, 管尖电阻值稳定在 $0.9\pm$

0.1 M Ω 左右,并且阻值大小和微管形状能够根据客户的意愿进行定制^[7]。Patchliner NPC-16 在快速换液和微量加药方面同样表现很突出,膜片钳的工作方式是全细胞膜片钳,该系统在易用性上表现良好。但是该仪器在试验中所使用的耗材玻璃平板芯片需要每隔一小段时间进行手工替换,因此在全自动的性能表现方面还需要提高。Ionworks HT 是目前市场上高通量表现最高的仪器,且由于其独特的“PPC”技术,在实验的成功率方面表现也很优秀。PatchXpress 7000A 的通量表现和实验数据质量方面也是表现良好。

2 应用与分析

全自动膜片钳技术一个重要的应用方向是检测早期药物化合物对 hERG 的毒副作用。hERG (human ether-a-go-go related gene) 通道产生的电流是心室复极中最重要的电流。通道被药物后抑制直接导致 Long QT 综合症,很可能演变成尖端扭转型室性心动过速,心室纤颤,直至猝死。目前发现几乎所有的临床药物所至的 LQT 或者 TdP 都作用于 hERG,且导致 hERG 抑制的药物在化学结构上没有明显的共性,从而很难预测,仅有通过实验的方式给予解决^[8]。2004 年,ICH 和美国 FDA 都颁布关于非临床检测 Ikr(其中主要是 hERG)的规章,要求药物上市时必须提供作用于离子通道的电流变化数据。同时,根据该规章的要求美国 FDA 撤除由于致 QT 间期延长的处方药,约为全部从市场撤除处方药的 40%。为此,新的早期药物安全评测方式需要引入制药研发过程中,以便及早发现候选化合物潜在的心脏毒性,尽可能减少新药研发的投资与风险,而采用全自动膜片钳技术正是解决该问题的最佳选择。下面表 2 给出的数据是使用 Flyscreen 8500 进行多种药物作用于 hERG 的 IC₅₀ 测试的结果并与传统手动膜片钳数据作比较。

表 2 采用 Flyscreen 8500 对多种药物作用于 hERG 的 IC₅₀ 测试,并把结果与传统手动膜片钳数据作比较

药物化合物	Flyscreen8500		传统膜片钳实验数据	
	IC ₅₀ (nM)	亲和作用 排名	IC ₅₀ (nM)	亲和作用 排名
E-4031	41	1	34	1
Terfenadine	84	2	35	2
Verapamil	548	3	378	3
Propafenone	660	4	400	4
Quinidine	889	5	915	5

事实上,制药企业还可以利用当前新兴药物虚

拟筛选技术进行初筛,把初筛结果再结合全自动膜片钳技术进行实验上的验证。虚拟筛选技术^[9],即把已经测定三维结构的小分子化合物或者是多肽化合物与已经测定三维结构的生物大分子靶标(如离子通道),通过分子对接软件进行计算机模拟,最后得到小分子-受体复合物的三维结构,而进行筛选研究。虚拟筛选的目的同样是从数十万到数百万化合物库中筛选出可能的小分子化合物,再进一步进行实验研究。把全自动膜片钳技术结合以离子通道为靶标的高通量虚拟筛选研究技术,无疑将会极大的缩短研究时间和节省大量的研究经费。

3 总结与展望

总而言之,全自动膜片钳技术具有如下的优点:效率高,是传统膜片钳效率的 20~300 倍;不需要专业电生理人员,简单易用,所有的操作可以在电脑软件控制的界面下完成,无须显微防震系统;大部分仪器的封接质量在 1 G Ω 以上;部分仪器同时适用于研究配体门控通道和电压门控通道;主要应用于药物药理和毒理测试;在药物微量加样设计方面表现优秀;仪器主要工作方式全细胞膜片钳方式。缺点:仪器仅适用于悬浮细胞实验。

无疑地,随着基因组测序的完成和蛋白质组学的兴起,离子通道在未来的细胞与药物方面研究将会变得越来越重要。与此同时,作为离子通道研究的最佳伴侣-全自动膜片钳,由于其独特的优点也必定在这一领域大展身手。假如能妥善的解决当前的全自动膜片钳仪器的 2 个缺陷——提高通量和降低耗材价格,将会进一步延伸其应用领域和范围。

致谢:本文最终的完成是集体力量和智慧结合,尤其要感谢朱义鑫博士,徐向华工程师,谷万港工程师等给予学术方面的建议。

参考文献

- 1 Wei Zheng, Robert H. Spencer, Laszlo Kiss. High Throughput Assay Technologies for Ion Channel Drug Discovery (J). ASSAY and Drug Development Technologies, 2004, 2 (5) 543~552
- 2 Femi ni B. and Fossa, A. A. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development (J). Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2 439~447
- 3 LI HongLin, SHEN JianHua, LUO XiaoMin, et al Virtual screening and new drug discovery (J). Chinese Bulletin of Life Sciences 2005, 17 (2) 125~131
- 4 Xiaobo Wang and Min Li. Automated Electrophysiology: High Throughput of Art (J). ASSAY and Drug Development Technologies, 2003, 1 (5) 695~708

- 5 Pete Moore. Ion channels and stem cells (J). NATURE, 2005, 438: 699~702
- 6 Michael Fejt, Uwe Czubayko, Alexander Hummer, et al. Automating True Manual Patch Clamping (J). Genetic Engineering News, 2005, 25 (14) :
- 7 Lepple-Wienhues A, Ferlinz K, Seeger A, Schafer A. Flip the tip: an automated, high quality, cost-effective patch clamp screen (J). Receptors and Channels, 2003, 9 (1) :13~17
- 8 John Comley. Patchers vs Screeners divergent opinion on high throughput electro-physiology (J). Drug Discovery World, 2003, 47~57
- 9 John Comley. automated patch clamping setting a new standard for early hERG (J). Drug Discovery World, 2005, 6:62~79

Advancement in ion channel research—automation patch clamp technology

Cao Xiaoyu¹ Zheng Wanyun² Lu Yanbin³ Huang Chao¹

(1. Dakewe Biotech Co., Ltd, Guangdong 518054)

(2. Laboratory of Molecular and Cellular Neuroscience, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 36100)

(3. nanjing shankang medicine development company, Nanjing 210013)

Abstract Automation Patch clamping is widely recognized as the definitive 'Gold Standard' method for studying ion channels since it is of the features of direct test, high information content and high sensitivity. Automation patch-clamping technologies is also the latest achievements of science and technology for its milestone breakthrough in high throughput, highly automated operation, excellent quality of Giga-seal, and micro-volume compound solution application. So, this novel technology is perfectly compatible with the process of pharmaceutical screening, toxicological assay and Virtual Screening. This article reviews the brief history of these emerging technologies and discusses the technical details.

Key words Automation patch clamp High throughput pharmaceutical screening hERG assay Virtual screening

(上接第 46 页)

- 2 刘琰, 李辉, 顾亮等. I²C 接口时钟芯片 DS1307 在坦克半主动悬挂电控单元中的应用, 国外电子元器件, 2002, 5:9~12
- 3 胡建波. LCM 12864ZK 图形液晶显示模块并行实用技术, 信息技术与信息化, 2006, 1: 67~69
- 4 沁恒电子有限公司. 基于 CH375 设计的 U 盘读写模块的使用说明, 南京沁恒电子有限公司, 2004
- 5 张齐, 杜群贵. 单片机应用系统设计技术——基于 C 语言编程, 北京: 电子工业出版社, 2004
- 6 谢桑, 毕监勃. 无纸记录仪技术的现状及发展趋势, 四川: 自动化与仪器仪表, 2001

Design and realization of a new kind of paperless recorder

Zhao Junying Zhao Quanming Su Yanmang LiLi

(Hebei University of Technology Tianjin 300130)

Abstract A new kind of mini-paperless recorder was introduced to be used in the industrial anneal. Taking AT89C52 as the microprocessor, it can record the time when the temperature reached, the material was put in and the alert happened. The records can be deleted, stored in memory, looked up and displayed on the LCD screen.

Key words Paperless recorder I²C Bus LCD USB interface

(下接第 60 页)

且在多个领域发挥着越来越多的作用。目前, 隶属生命科学学院的 MALDI-TOF 质谱仪, 作为厦门大学测试中心的主力仪器设备之一, 在全校大型仪器设备共享平台上发挥着十分重要的作用。一支训练有素、颇具使用和管理经验的技术队伍, 为其正常、高效运转提供了保障。2004 年, 在厦门大学测试中心计量认证现场评审过程中, 该仪器呈现出优良的检测性能, 送检盲样的检测指标全部合格, 得到专家组的高度评价。当然, 当 MALDI-TOF 质谱仪等大型仪

器设备逐步成为许多交叉学科发展不可或缺的重要仪器时, 许多新的有关大型仪器设备维护、保养、使用等问题还需要不断的探索、创新。

参考文献

- 1 祝立群. MALDI-TOF 分析多肽指纹图谱的进展与应用, 生命科学仪器, 2004, 6(3): 10~13
- 2 赵晓光, 薛燕, 刘炳玉. MALDI-TOF 质谱仪关键技术及进展, 现代仪器, 2003, 4: 17~20