



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104024839 A

(43) 申请公布日 2014.09.03

(21) 申请号 201280063562.X

代理人 吴秋明

(22) 申请日 2012.12.05

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 27/28 (2006.01)

2011-278445 2011.12.20 JP

C12M 1/34 (2006.01)

2012-181786 2012.08.20 JP

G12Q 1/02 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 27/00 (2006.01)

2014.06.20

G01N 27/416 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/081556 2012.12.05

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2013/094418 JA 2013.06.27

(71) 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 宇理须恒雄 王志宏 宇野秀隆

森蒂尔·库马尔·奥布里拉吉

长冈靖崇

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

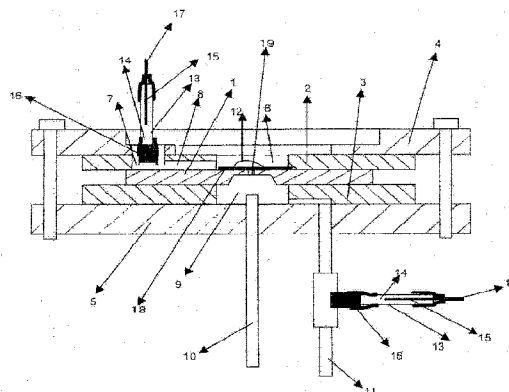
权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

平面膜片钳装置、该装置用电极部及细胞离子通道电流测量方法

(57) 摘要

本发明提供一种平面膜片钳装置,在电绝缘性基板设置1个以上微细的贯通孔,贯通孔的两侧的表面设置保持导电性液体的贮液槽部和能够向该贮液槽部通电的电极部,这些电极部具备:(a)容器壁的一部分由无机多孔材料构成的电极容器;(b)在贵金属Nm的表层部形成了其氯化物NmCl层的电极;和(c)以饱和浓度溶解了NmCl及碱金属氯化物的电极溶液。由此能抑制平面膜片钳装置中的施加膜电位的变动并使噪声电流降低,从而使离子通道电流的准确测量成为可能。



1. 一种平面膜片钳装置,其特征在于,

(1) 在电绝缘性基板设置 1 个以上微细的贯通孔,该贯通孔使电绝缘性基板两侧的表面连通且尽管不会使细胞通过但能使液体通过,(2) 在所述贯通孔的第一表面侧与第二表面侧分别设置:用于保持导电性液体的贮液槽部;和被配置成能对该贮液槽部的导电性液体通电的电极部,(3) 第一表面侧的贮液槽部被作为细胞配置用的贮液槽部,进一步(4) 所述第一表面侧及第二表面侧的电极部具备以下的(a)~(c)要素:

(a) 电极容器,在向所述贮液槽部导入了导电性液体时与该导电性液体相接的容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成;

(b) 电极,其被收纳在所电极容器内且在贵金属 Nm 的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层;以及

(c) 电极溶液,其被填充在所述电极容器内且以饱和浓度溶解了所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物。

2. 根据权利要求 1 所述的平面膜片钳装置,其特征在于,

所述第一表面侧贮液槽部由第 1 贮液槽、第 2 贮液槽和使这些主贮液槽及副贮液槽连通的狭窄的通液路径构成,该第 1 贮液槽由不透光性的材料构成且用于配置细胞,第 2 贮液槽配置了第一表面侧的电极部。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的平面膜片钳装置,其特征在于,

所述第二表面侧的贮液槽部和用于将导电性液体导入及排出的通液路径连通,且在该通液路径中配置了第二表面侧的电极部。

4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的平面膜片钳装置,其特征在于,

在所述第一表面侧设置多个贮液槽部,在这些贮液槽部形成有具有比神经细胞的细胞体大的宽度和能够阻止培养状态的细胞体的移动的深度的凹部。

5. 根据权利要求 1~4 中任一项所述的平面膜片钳装置,其特征在于,

所述平面膜片钳装置具备以下的(A)及/或(B)的构成:

(A) 第二表面侧的贮液槽部与液体吸引设备相连接,通过该液体吸引设备能够对第二表面侧的贮液槽部施加负压;

(B) 使具有细胞固定力的细胞外基质形成物质附着在基板的贯通孔中的第一表面侧的开口部周缘。

6. 一种平面膜片钳装置用电极部,其特征在于,

具备以下的(a')~(c')的要素:

(a') 容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成的电极容器;

(b') 被收纳于上述电极容器内且在贵金属 Nm 的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层的电极;和

(c') 被填充于上述电极容器内且以饱和浓度溶解了所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物的电极溶液。

7. 根据权利要求 6 所述的平面膜片钳装置用电极部,其特征在于,

构成所述容器壁的至少一部分的无机多孔材料是多孔玻璃或多孔陶瓷。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的平面膜片钳装置用电极部,其特征在于,

所述贵金属 Nm 为银 Ag 或铂 Pt,

所述碱金属氯化物为氯化钾 KCl。

9. 根据权利要求 6 ~ 8 中任一项所述的平面膜片钳装置用电极部,其特征在於,所述电极为以下的 (C) 或 (D):

(C) 是向电极容器内部突出的棒状电极,在由贵金属 Nm 构成的芯材的表层部形成有贵金属氯化物 NmCl 层,

(D) 是在电极容器的壁部的内周面形成的筒状电极,容器壁部侧的底层为贵金属 Nm 的蒸镀层,与电极溶液相接的表面层为贵金属氯化物 NmCl 的蒸镀层。

10. 一种细胞离子通道电流测量方法,其特征在於,

向权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的平面膜片钳装置的第二表面侧的贮液槽部导入导电性液体,并且向第一表面侧的贮液槽部导入使作为测量对象的细胞分散的导电性液体,使第一表面侧的贮液槽部与第二表面侧的贮液槽部以导电的方式连通,将所述细胞配置在第一表面侧的贮液槽部的规定位置,在此基础上向第一表面侧及第二表面侧的电极部的电极间施加电压,由此对作为测量对象的细胞的离子通道电流进行测量。

11. 根据权利要求 10 所述的细胞离子通道电流测量方法,其特征在於,

在所述平面膜片钳装置的基板的第一表面侧设置多个具有权利要求 4 所述的构成的贮液槽部,

作为测量对象的细胞为神经细胞,

导电性液体为所述神经细胞的细胞培养液。

12. 根据权利要求 11 所述的细胞离子通道电流测量方法,其特征在於,

向所述神经细胞预先导入用于 Ca 成像的 Ca 探针,

至少通过包括 Ca 成像的手段来测量该细胞离子通道电流,该 Ca 成像是观察发生细胞活动电位时或传播活动电位时所产生的荧光。

13. 根据权利要求 12 所述的细胞离子通道电流测量方法,其特征在於,

在所述平面膜片钳装置的第一表面侧配置多个甚至更多个导入了所述 Ca 探针的神经细胞,并且形成这些神经细胞的神经键相互连接而成的神经细胞网,向这些神经细胞内的单个的神经细胞进行电流注入或电压施加,由此来进行所述多个甚至更多个神经细胞中的基于所述 Ca 成像的测量。

平面膜片钳装置、该装置用电极部及细胞离子通道电流测量方法

技术领域

[0001] 本发明涉及平面膜片钳装置 (planar patch clamp device)、该装置用电极部及细胞离子通道电流测量方法。

[0002] 更详细的是,本发明涉及:平面膜片钳装置,其是能够进行多点测量的平面基板型且具有细胞培养功能,能够有效地抑制离子通道电流测量时的噪声电流并实现细胞的稳定定位;用于组装入该装置的平面膜片钳装置用电极部;以及使用该平面膜片钳装置进行的细胞离子通道电流测量方法。

背景技术

[0003] 在构成生命体的细胞的表面配置有各种膜蛋白质,通过化学物质(配位基等的信号传递物质)向细胞表面的特定部位的结合、电或光的刺激(控制门触发器),作为膜蛋白质的开口部的通道开闭,由此细胞膜的外侧与内侧之间的离子或化学物质的输送被控制。进行该控制的离子通道是与生物系的信号传递相关的重要的膜蛋白质,在其功能测量或与功能关联的药品的发展中,要求测量通道蛋白质的电气的变化、即离子通道电流。

[0004] 针对该要求,迄今为止正在开发移液管膜片钳或平面膜片钳等的技术。移液管膜片钳存在无法应用于采用多点测量的高通量筛选 (high-throughput screening) 的弱点。与此相对,平面膜片钳在硅芯片这样的固体基板上构成多个膜片钳装置,由此能够进行多点测量,在各膜片钳装置的细胞配置部位分别设置有用测量离子通道电流的微小的贯通孔。

[0005] 例如在下述的专利文献 1 中,记载了由用于利用多个膜片钳细胞来实施膜片钳记录的多个电极构成的平面的膜片钳电极排列。再有,下述的专利文献 2 中公开了一种平面型膜片钳装置,其在硅基板的上下表面设置电极,在 2 个电极之间贯通用于电气地连通的孔,以便测量放置于贯通孔的入口处的细胞的电气变化。

[0006] 在先技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1:JP 特表 2003-511668 号公报

[0009] 专利文献 2:JP 特表 2005-536751 号公报

[0010] 专利文献 3:JP 特开 2009-204407 号公报

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献 1:Tsuneo Urisu et al, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391 (2008) 2703-2709

发明内容

[0013] - 发明所要解决的技术问题 -

[0014] 可是,以往的平面膜片钳装置并不具有细胞培养的功能,因此存在无法适用于神

经细胞这样的需要培养的细胞等问题。即,由于成为测量对象的细胞的寿命在非培养条件下短至 1 小时乃至 30 分钟以下,故只能进行药物研发筛选等被限制的应用,向灵活使用移液管膜片钳的细胞功能分析等的应用较为困难。进一步,将细胞顺畅地输送至设置于基板上的微细的贯通孔的部位并进行捕获较为困难。

[0015] 宇理须及宇野在上述的专利文献 3(申请号:JP 特愿 2008-046145) 及非专利文献 1 中提出了解决以上问题的平面膜片钳装置。该装置的特征性构成为:使具有细胞固定力的细胞外基质形成物质(骨胶原、纤维连接蛋白等)附着在设置于基板上的微细的贯通孔中的细胞固定用开口部的周缘,且在基板中的贯通孔两侧的表面部设置能够向电极通电的贮液槽部,在该贮液槽部内填充了导电性液体(例如细胞培养液)。根据该平面膜片钳装置,可以利用细胞外基质形成物质而容易在微细贯通孔的位置捕获细胞,而且在细胞的培养条件下可以花费足够的时间进行离子通道活性的测量。

[0016] 但是,进一步进行研究的結果,判明了上述方案涉及的平面膜片钳装置中存在以下的 1)、2) 的课题。

[0017] 1) 由于使细胞外基质形成物质附着在测量离子通道电流的微细贯通孔的周缘,故被捕获到的细胞的细胞膜与微细贯通孔周缘的基板表面之间产生少许的间隙,所谓的封接电阻(seal resistance)降低。流过该间隙的电流作为漏电流而向离子通道电流叠加,若其产生变动,则作为噪声起作用。因此,在封接电阻已降低的状态下,即便对于少许的施加膜电位的变动来说噪声电流也会变大,离子通道电流的准确测量变得困难起来。

[0018] 针对该课题,仅仅是放弃细胞外基质形成物质的利用,微细贯通孔的位置处容易捕获细胞这一优点也被无视。另一方面,作为上述的噪声电流对策,除了增大封接电阻以外,抑制电极侧的施加膜电位的变动也是有效的。再有,在本来封接电阻就不低的情况下,实现离子通道电流的更准确的测量,而且实施基于施加膜电位的变动抑制的噪声电流对策也是有效的。

[0019] 2) 在微细贯通孔的位置处被捕获到的细胞在培养状态下每每会向从微细贯通孔脱离的位置移动。因为这种细胞的移动,无法测量离子通道电流。

[0020] 因而,本发明应该解决的第 1 课题是:抑制平面膜片钳装置中的施加膜电位的变动从而使噪声电流降低,由此使离子通道电流的准确测量成为可能。

[0021] 进一步,本发明应该解决的第 2 课题是:开发登峰造极的技术,以使在微细贯通孔的位置处被捕获到的培养状态的细胞不会从其位置移动。

[0022] - 用于解决技术问题的方案 -

[0023] (第 1 发明的构成)

[0024] 用于解决上述课题的第 1 发明的构成是一种平面膜片钳装置,(1) 在电绝缘性基板设置 1 个以上微细的贯通孔,该贯通孔使电绝缘性基板两侧的表面连通且具有虽然不会使细胞通过但能使液体通过的内径,(2) 在所述贯通孔的第一表面侧与第二表面侧分别设置:用于保持导电性液体的贮液槽部;和被配置成能对该贮液槽部的导电性液体通电的电极部,(3) 第一表面侧的贮液槽部被作为细胞配置用的贮液槽部,进一步(4) 所述第一表面侧及第二表面侧的电极部具备以下的(a)~(c)要素。

[0025] (a) 在向所述贮液槽部导入了导电性液体之际与该导电性液体相接的容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成的电极容器。

[0026] (b) 被收纳在上述电极容器内且在贵金属（标记为“Nm”）的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层的电极。

[0027] (c) 被填充在上述电极容器内且以饱和浓度溶解了所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物的电极溶液。

[0028] （第 2 发明的构成）

[0029] 用于解决上述课题的第 2 发明的构成是在所述第 1 发明涉及的平面膜片钳装置的基础上，其中第一表面侧贮液槽部由第 1 贮液槽、第 2 贮液槽和使这些主贮液槽及副贮液槽连通的狭窄的通液路径构成，该第 1 贮液槽由不透光性的材料构成且用于配置细胞，第 2 贮液槽配置了第一表面侧的电极部。

[0030] （第 3 发明的构成）

[0031] 用于解决上述课题的第 3 发明的构成是在所述第 1 发明或第 2 发明涉及的平面膜片钳装置的基础上，其中第二表面侧的贮液槽部和用于将导电性液体导入及排出的通液路径连通，且在该通液路径中配置着第二表面侧的电极部。

[0032] （第 4 发明的构成）

[0033] 用于解决上述课题的第 4 发明的构成是在所述第 1 发明～第 3 发明中任一项涉及的平面膜片钳装置的基础上，其中在第一表面侧设置多个贮液槽部，在这些贮液槽部形成有具有比神经细胞的细胞体大的宽度和可阻止培养状态的细胞体的移动的深度的凹部。

[0034] （第 5 发明的构成）

[0035] 用于解决上述课题的第 5 发明的构成是在所述第 1 发明～第 4 发明中任一项涉及的平面膜片钳装置的基础上，其具备以下的 (A) 及 / 或 (B) 的构成。

[0036] (A) 第二表面侧的贮液槽部与液体吸引设备相连接，通过该液体吸引设备使第二表面侧的贮液槽部形成负压；

[0037] (B) 使具有细胞固定力的细胞外基质形成物质附着在基板的贯通孔中的第一表面侧的开口部周缘。

[0038] （第 6 发明的构成）

[0039] 用于解决上述课题的第 6 发明的构成是一种平面膜片钳装置用电极部，其具备以下的 (a') ~ (c') 要素。

[0040] (a') 容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成的电极容器。

[0041] (b') 被收纳于上述电极容器内且在贵金属 Nm 的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层的电极。

[0042] (c') 被填充于上述电极容器内且以饱和浓度溶解了所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物的电极溶液。

[0043] （第 7 发明的构成）

[0044] 用于解决上述课题的第 7 发明的构成是在所述第 6 发明涉及的平面膜片钳装置用电极部的基础上，其中构成容器壁的至少一部分的无机多孔材料为多孔玻璃或多孔陶瓷。

[0045] （第 8 发明的构成）

[0046] 用于解决上述课题的第 8 发明的构成是在所述第 6 发明或第 7 发明涉及的平面膜片钳装置用电极部的基础上，其中贵金属 Nm 为银 Ag 或铂 Pt，碱金属氯化物为氯化钾 KCl。

[0047] （第 9 发明的构成）

[0048] 用于解决上述课题的第 9 发明的构成是在所述第 6 发明～第 8 发明中任一项涉及的平面膜片钳装置用电极部的基础上,其中电极为以下 (C) 或 (D)。

[0049] (C) 是向电极容器内部突出的棒状电极,在由贵金属 Nm 构成的芯材的表层部形成有贵金属氯化物 NmCl 层。

[0050] (D) 是在电极容器的壁部的内周面形成的筒状电极,容器壁部侧的底层为贵金属 Nm 的蒸镀层,与电极溶液相接的表面层为贵金属氯化物 NmCl 的蒸镀层。

[0051] (第 10 发明的构成)

[0052] 用于解决上述课题的第 10 发明的构成是一种细胞离子通道电流测量方法,向所述第 1 发明～第 5 发明中任一项所述的平面膜片钳装置的第二表面侧的贮液槽部导入导电性液体,并且向第一表面侧的贮液槽部导入使作为测量对象的细胞分散的导电性液体,使第一表面侧的贮液槽部与第二表面侧的贮液槽部以导电的方式连通,将所述细胞配置到第一表面侧的贮液槽部的规定位置,在此基础上向第一表面侧及第二表面侧的电极部的电极间施加电压,由此对作为测量对象的细胞的离子通道电流进行测量。

[0053] (第 11 发明的构成)

[0054] 用于解决上述课题的第 11 发明的构成是在所述第 10 发明涉及的细胞离子通道电流测量方法的基础上,其中在平面膜片钳装置的基板的第一表面侧设置多个具有第 1 发明所记载的构成的贮液槽部,作为测量对象的细胞为神经细胞,导电性液体为所述神经细胞的细胞培养液。

[0055] (第 12 发明的构成)

[0056] 用于解决上述课题的第 12 发明的构成是在所述第 11 发明涉及的细胞离子通道电流测量方法的基础上,其中向所述神经细胞预先导入用于 Ca 成像的 Ca 探针,至少通过包括产生细胞活动电位时或传播活动电位时产生的荧光的观察、即 Ca 成像的手段来测量该细胞离子通道电流。

[0057] (第 13 发明的构成)

[0058] 用于解决上述课题的第 13 发明的构成是在所述第 12 发明涉及的细胞离子通道电流测量方法的基础上,其中在所述平面膜片钳装置的第一表面侧配置多个乃至更多个所述 Ca 探针已被导入的神经细胞,并且形成这些神经细胞的神经键相互连接而成的神经细胞网,向这些神经细胞内的单个的神经细胞进行电流注入或电压施加,由此来进行所述多个乃至更多个神经细胞中的基于所述 Ca 成像的测量。

[0059] - 发明效果 -

[0060] 根据第 1 发明,除了能够实现平面膜片钳装置中一般性的、基于多点测量的高通量筛选以外,还能抑制平面膜片钳装置中的施加膜电位的变动从而使噪声电流降低,因此使离子通道电流的准确测量成为可能。

[0061] 在实现细胞的离子通道电流的准确测量的基础上,在平面膜片钳装置的封接电阻低的情况下是理所当然的,即便在封接电阻并不低的情况下实施噪声电流对策也是有效且重要的。作为噪声电流对策,除了封接电阻的增大以外对抑制电极侧的施加膜电位的变动也是有效的。

[0062] 作为平面膜片钳装置的电极,在使用在贵金属 Nm(例如银 Ag)的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层(例如 AgCl 层)的电极的情况下,如上述的施加膜电位的变动主

要因 AgCl/Ag 电极的表面与包围电极的溶液之间的界面电位的变动、或液-液界面电位的变动而产生。

[0063] 因而,如第 1 发明那样,若在电极部的电极容器内将 AgCl/Ag 电极浸入 AgCl 及碱金属氯化物(例如 KCl)的饱和溶液、即电极溶液中,使它们经由无机多孔材料构成的容器壁而与细胞培养液等导电性液体(KCl 浓度为几毫摩尔左右)接触,则电极容器的内部与外部成为电气地导通的状态。但是,液体本身无法过度地通过无机多孔材料的细孔,因此电极容器内部的电极溶液与电极容器外部的导电性液体的混合小到可忽视。结果,电极容器的内部与外部中的 KCl 的大的浓度差被保持恒定,AgCl/Ag 电极的界面电位或液-液界面电位变得恒定,不会引起施加膜电位的变动。

[0064] 根据第 2 发明,在使用发现了以光打开通道的离子通道的细胞并通过光来控制通道电流的情况下,即便向第一表面侧的贮液槽部中的用于配置细胞的主贮液槽照射光,照射光实质上也不能到达经由狭窄的通液路径而与主贮液槽连通的副贮液槽,因此可防止照射光照射第一表面侧的电极部所引起的不良情况。除了这一点以外,从电极部的电极容器稍微漏出的电极溶液因狭窄的通液路径成为阻挡层,从而也几乎不会到达配置在主贮液槽内的细胞的周围。因此,对于第 1 发明,上述的施加膜电位的变动进一步彻底地被防止。若考虑到这一点,则特别优选使主贮液槽与副贮液槽连通的通液路径例如为 1mm 以下的内径。

[0065] 根据第 3 发明,不仅能容易且可靠地进行导电性液体相对于第二表面侧的贮液槽部的导入及排出,在使用发现了以光打开通道的离子通道的细胞并通过光来控制通道电流的情况下,即便向第一表面侧的主贮液槽照射光,因为第二表面侧的电极部被配置于从第二表面侧的贮液槽部隔离开的通液路径,所以也可防止照射光照射第二表面侧的电极部所引起的不良情况。

[0066] 根据第 4 发明,因为具有比神经细胞的细胞体大的宽度与可阻止培养状态的细胞体的移动的深度的凹部作为细胞体设置区域而形成,所以一旦在该凹部内配置神经细胞,则在培养状态内也无法自其位置移动。

[0067] 另外,在第 4 发明中,也能够进一步用比细胞体小的宽度的沟槽来相互连接多个凹部。该情况下,培养状态的多个神经细胞可以沿着宽度小的沟槽相互形成二维的网。结果,能以较高的时间/空间分辨率测量形成了二维的网的各神经细胞的离子通道电流。更优选的是,能够同时多点地进行该测量。

[0068] 在具备第 5 发明的(A)的构成的平面膜片钳装置中,使用液体吸引设备将第二表面侧的贮液槽部抽成负压,由此通过基板的微细的贯通孔可从第一表面侧的贮液槽部吸引导电性液体。因此,除了能将已分散到该导电性液体中的细胞固定于贯通孔的开口部以外,细胞膜与细胞外基质 18 涂敷表面的密接性提高,且封接电阻提高。另外,在具备第 5 发明的(B)的构成的平面膜片钳装置中,通过细胞外基质形成物质可以将已分散到第一表面侧的导电性液体中的细胞固定于贯通孔的开口部。该情况下,在平面膜片钳装置的规定位置捕获细胞的工序中,无需附加能影响细胞的离子通道活性的压力。

[0069] 在第 5 发明的平面膜片钳装置中,既可以具备(A)的构成,或也可以具备(B)的构成,但还可以同时具备(A)的构成与(B)的构成。

[0070] 根据第 6 发明,提供一种用于组装入第 1 发明~第 5 发明涉及的平面膜片钳装置

的新颖且有用的平面膜片钳装置用电极部。其效果如针对第 1 发明所描述的。

[0071] 根据第 7 发明,提供构成平面膜片钳装置用电极部的电极容器壁的至少一部分的无机多孔材料的优选的实施方式。

[0072] 根据第 8 发明,针对平面膜片钳装置用电极部的电极所使用的贵金属提供优选的实施方式。

[0073] 根据第 9 发明,关于平面膜片钳装置用电极部的电极的形状及构造,提供优选的实施方式。

[0074] 根据第 10 发明,提供一种使用第 1 发明~第 5 发明中任一项所述的平面膜片钳装置的新颖的细胞离子通道电流测量方法。该方法的效果如针对第 1 发明~第 5 发明所描述的,但总之在抑制平面膜片钳装置中的施加膜电位的变动从而使噪声电流降低、由此使离子通道电流的准确测量成为可能这一点上具有最大的效果。

[0075] 根据第 11 发明,提供了在第 10 发明涉及的细胞离子通道电流测量方法中使用了神经细胞的情况下的优越的离子通道电流测量方法,特别是能以较高的时间/空间分辨率测量已形成二维的网的各神经细胞的离子通道电流,进一步还能同时多点地进行该测量。

[0076] 根据第 12 发明,除了第 10 发明、第 11 发明的离子通道电流的准确测量以外,还能获得以下大的优点:利用平面膜片钳装置的基板上的空间,可以进行对神经细胞或神经细胞网的功能分析重要的 Ca 成像。

[0077] 根据第 13 发明,可以借助 Ca 成像测量以下形态:通过电流注入或电压施加来刺激位于平面膜片钳装置的基板的微细的贯通孔上的单个的神经细胞(第 1 神经细胞),使活动电位产生,同时该活动电位通过神经细胞网向邻接的周围的神经细胞(第 2 神经细胞)传播,进一步从第 2 神经细胞向与其邻接的第 3 神经细胞传播。作为现有技术,例如有电极刺激法,但在该方法的情况下,有选择地刺激单个的神经细胞较为困难,分析变得复杂。再有,在作为其他现有技术的基于微细移液管电极的刺激中,虽然能有选择地刺激单个的神经细胞,但高通量筛选所需的多通道化较为困难,然而根据第 13 发明,因为能使测量部非常小型,所以多通道化较为容易。

附图说明

[0078] 图 1 表示第 1 实施例涉及的平面膜片钳装置的剖视图。

[0079] 图 2 将噪声电流与离子通道电流作为封接电阻与膜电位的变动电压 ΔV_m 的函数来表示。

[0080] 图 3 用剖视图来表示第 1 实施例涉及的电极部的详细构造。

[0081] 图 4 表示第 1 实施例中实际制作出的电极部的照片。

[0082] 图 5 表示使用了以往的 AgCl/Ag 电极(标记为“Normal AgCl/Ag electrode”)的情况下和使用了本发明的电极部(标记为“Stable AgCl/Ag electrode”)的情况下的、施加电压 0mV 处的电流变动的测量结果。

[0083] 图 6(a) 表示第 2 实施例涉及的平面膜片钳装置的主要部分剖视图,图 6(b) 表示多个圆形的凹部 24 和将这些相互连接的细的沟槽的俯视图。

[0084] 图 7 表示第 3 实施例中的离子通道电流的测量结果。

[0085] 图 8 图示神经细胞网的 Ca 成像相关的第 4 实施例。

- [0086] - 符号说明 -
- [0087] 1 基板
- [0088] 2、3 隔离物
- [0089] 4、5 平板
- [0090] 6 主贮液槽
- [0091] 7 副贮液槽
- [0092] 8 通液路径
- [0093] 9 贮液槽部
- [0094] 10 导入用通液路径
- [0095] 11 排出用通液路径
- [0096] 12 细胞
- [0097] 12a 第 1 神经细胞
- [0098] 12b 第 2 神经细胞
- [0099] 13 电极容器
- [0100] 14 电极溶液
- [0101] 15 AgCl/Ag 电极
- [0102] 16 无机多孔材料
- [0103] 17 电极管脚
- [0104] 18 细胞外基质形成物质
- [0105] 19 贯通孔
- [0106] 20 密封材料
- [0107] 21 吸引管
- [0108] 22 负压测量压力计
- [0109] 23 吸引泵
- [0110] 24 凹部

具体实施方式

[0111] 接着,包括本发明实施方式的最佳的方式,对本发明的实施方式进行说明。本发明的技术范围并不是由这些实施方式来限定的。

[0112] (平面膜片钳装置)

[0113] 本发明涉及的平面膜片钳装置中,设置有使其电绝缘性的基板中的两侧表面、即第一表面侧(配置细胞的表面侧)和第二表面侧连通的微细的贯通孔。另外,在实施例中表示使基板沿水平方向排列的纵横放置型的平面膜片钳装置,但使基板沿其他方向排列的结构、例如将基板设置于垂直方向的纵向放置型的平面膜片钳装置也包含于本发明。

[0114] 作为电绝缘性的基板,可以优选使用玻璃制、陶瓷制、塑料制等的基板。作为一例,在使用硅基板的情况下,优选具有第一表面侧的硅层、中间的氧化硅层和第二表面侧的硅层被顺次地层叠的构造的硅基板(SOI 基板)。这种层叠构造的硅基板中,绝缘性极高的中间层存在于 2 个硅层间,因此在测量对象细胞的离子通道关闭时可确立高电阻状态,可降低背景的噪声。

[0115] 设置于基板的贯通孔的个数并未被限定,虽然 1 个也可以,但特别优选为多个~更多个(例如 2 个~几十个、或其以上)。微细的贯通孔的内径优选为虽然可使液体通过、但不会使细胞通过的程度的内径(例如 1~3 μm 左右),但并未限定于这些内径。

[0116] 再有,本发明涉及的平面膜片钳装置中,在所述贯通孔的第一表面侧与第二表面侧分别设置:用于保持导电性液体的贮液槽部;和能对该贮液槽部的导电性液体通电地配置的电极部。

[0117] 贮液槽部的构成只要能满足“可保持导电性液体、且相对于导电性液体将电极部配置成能通电”这样要求,就未对构成进行限定,但例如如实施例所示,可以通过使隔离物部件或平板部件与基板的第一表面侧及第二表面侧分别重合并在隔离物部件的与基板的贯通孔对应的位置处设置切口部而形成。

[0118] 虽然并非一定要进行限定,但第一表面侧的隔离物部件及平板部件优选由不透光性的材料构成,第二表面侧的隔离物部件及平板部件优选由透光性的材料构成。

[0119] 贮液槽部具备其自身液密地构成、并且用于导入或排出导电性液体(或使细胞分散的导电性液体)的通液路径或能够开闭的开口部。在平面膜片钳装置为使基板沿水平方向排列的横向放置型的情况下,基板的第一表面侧的贮液槽部也可以用防护玻璃罩这样的盖用部件来堵塞该贮液槽部的上部,根据需要取下盖用部件,以使贮液槽部开口。

[0120] 本发明涉及的平面膜片钳装置中,在第一表面侧及第二表面侧虽然具备新颖构成的电极部,但这一点在“平面膜片钳装置用电极部”的项目中后述。

[0121] 进一步,本发明涉及的平面膜片钳装置中,所述第一表面侧的贮液槽部也优选采取由主贮液槽、副贮液槽和通液路径组成的结构,该主贮液槽由不透光性的材料构成,且用于配置细胞,该副贮液槽配置有第一表面侧的电极部,该通液路径是狭窄的,使这些贮液槽连通。另外,所述第二表面侧的贮液槽部也优选采取以下结构:和用于将导电性液体导入及排出的通液路径连通,且在该通液路径配置有第二表面侧的电极部。特别优选,在所述第一表面侧设置多个贮液槽部,由此在这些贮液槽部可以形成具有比神经细胞的细胞体大的宽度与可阻止培养状态的细胞体的移动的深度的凹部。进一步,也能通过宽度比细胞体小的沟槽将这些多个凹部相互连接。此外,也优选使平面膜片钳装置具备以下的(A)及/或(B)的构成。

[0122] (A) 第二表面侧的贮液槽部与液体吸引设备连接,通过该液体吸引设备可将第二表面侧的贮液槽部抽成负压。

[0123] (B) 使具有细胞固定力的细胞外基质形成物质附着在基板的贯通孔中的第一表面侧的开口部周缘。

[0124] 作为上述的细胞外基质形成物质的构成材料,可例示多胺素(polylysine)、骨胶原(collagen)(I型、II型、IV型)、蛋白聚糖、纤维连接蛋白、昆布氨酸、骨胶原、蛋白聚糖(多能蛋白聚糖、脱氢胆酸等)、蛋白聚糖(蛋白多聚糖)、连接蛋白质、巢蛋白、生腱蛋白、蛋白聚糖(硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(基底膜聚糖等)、硫酸角质素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖)、透明质酸(粘多糖的一种)、弹性蛋白、纤维蛋白等。

[0125] (平面膜片钳装置用电极部)

[0126] 进一步,本发明涉及的平面膜片钳装置用电极部具备以下(a')~(c')的要素,且被设置于第一表面侧及第二表面侧。

[0127] (a') 容器壁的至少一部分由无机多孔材料构成的电极容器。

[0128] (b') 被收纳于上述的电极容器内且在贵金属 Nm 的表层部形成了该贵金属的氯化物 NmCl 层的电极。

[0129] (c') 被填充于上述的电极容器内且所述贵金属的氯化物 NmCl 及碱金属氯化物以饱和浓度溶解的电极溶液。

[0130] 虽然上述的贵金属 Nm 的种类并未被限定,但优选银 Ag 及铂 Pt,特别优选银 Ag。因此,即便作为贵金属的氯化物 NmCl,也优选银的氯化物 AgCl 及铂的氯化物 AgCl,特别优选银的氯化物 AgCl。再有,作为碱金属氯化物虽然并未被限定,但优选为氯化钾 KCl。构成容器壁的至少一部分的无机多孔材料优选为多孔的玻璃或多孔的陶瓷。

[0131] 进一步,也优选所述电极部中的电极为以下 (C) 或 (D)。

[0132] (C) 是向电极容器内部突出的棒状电极,且在由贵金属 Nm 构成的芯材的表层部形成有贵金属氯化物 NmCl 层。

[0133] (D) 是形成在电极容器的壁部的内周面的筒状电极,且容器壁部侧的底层为贵金属 Nm 的蒸镀层,与电极溶液相接的表面层为贵金属氯化物 NmCl 的蒸镀层。

[0134] (细胞离子通道电流测量方法)

[0135] 本发明涉及的细胞离子通道电流测量方法使用上述各种方式涉及的平面膜片钳装置,将导电性液体导入其第二表面侧的贮液槽部,并且将使作为测量对象的细胞分散的导电性液体导入第一表面侧的贮液槽部,使第一表面侧的贮液槽部与第二表面侧的贮液槽部以导电的方式连通,将所述细胞配置到第一表面侧的贮液槽部的规定位置,在此基础上向第一表面侧及第二表面侧的电极部的电极间施加电压,由此对作为测量对象的细胞的离子通道电流进行测量。

[0136] 该情况下,在平面膜片钳装置的基板的第一表面侧设置多个贮液槽部且作为测量对象的细胞为神经细胞、且导电性液体为所述神经细胞的细胞培养液的情形尤其是特征性的实施方式。

[0137] (Ca 成像)

[0138] 对细胞的离子通道电流进行测量的手段或系统并未特别限定,例如可以进行通常的电流测量,但作为更优选的手段,可列举 Ca 成像(钙成像)。Ca 成像尤其在多个乃至更多的神经细胞网的分析中是有效的。

[0139] 如公知的,Ca 成像是指以下方法:向细胞内导入与 Ca 离子结合而发出荧光的色素(被称为“Ca 荧光指示剂”或“Ca 探针”),将神经细胞产生了活动电位时 Ca 离子流入细胞体的现象作为荧光来捕捉。

[0140] 关于在细胞、特别是神经细胞的离子通道电流的测量中 Ca 成像是有效的理由,如在上述“发明效果”的项目中针对第 12 发明及第 13 发明所描述的。

[0141] 实施例

[0142] 接着对本发明的实施例进行说明。本发明的技术范围并不是由以下的实施例来限定。

[0143] (第 1 实施例)

[0144] 在图 1 中表示本实施例涉及的平面膜片钳装置。该装置是作为离子通道生物传感器起作用的培养型的平面膜片钳装置。

[0145] 作为平面膜片钳装置中的电绝缘性的基板 1, 使用硅基板 (非专利文献 1)。在图 1 中, 虽然在基板 1 构成单个的平面膜片钳装置, 但也可以使用更大面积的基板 1 来构成更多的平面膜片钳装置。

[0146] 在基板 1 设置有使其第一表面侧 (图的上侧) 与第二表面侧 (图的下侧) 连通且直径为 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的微细的贯通孔 19。在图 1 中, 在基板 1 的中央设置 1 个贯通孔 19, 但也可以使用更大的基板来设置更多的贯通孔 19, 针对各个贯通孔 19 分别如以下所述地构成。贯通孔 19 的第一表面侧的开口部上配置有细胞 12。

[0147] 基板 1 用一对隔离物 2、3 夹持着其第一表面侧与第二表面侧。隔离物 2、3 的构成材料并未被限定。但是, 对于第一表面侧的隔离物 2 来说, 优选可以使用有弹性的不透光性的材料、例如硅橡胶或 PDMS (polydimethylsiloxane) 等。另一方面, 对于第二表面侧的隔离物 3 来说, 优选可以使用透光性的材料。

[0148] 在隔离物 2 中的上述细胞 12 的配置部分设置例如圆形的切口部, 在该切口部配置细胞 12。在隔离物 3 中, 也在与隔离物 2 对应的部分设置例如圆形的切口部, 贯通孔 19 中的第二表面侧的开口部向该切口部开口。

[0149] 而且, 上述的基板 1 及一对隔离物 2、3 整体成为被一对结实的平板 4、5 紧固的构造。作为平板 4、5 的材料只要是能耐得住 120°C 左右的高压灭菌器灭菌的材料, 就并未特殊地限定。但是, 对于第一表面侧的平板 4 来说, 优选可以使用不透光性的材料。另一方面, 对于第二表面侧的平板 5 来说优选可以使用透光性的材料。

[0150] 在以上的构成中, 也可以在第一表面侧的平板 4 的中央部, 与第一表面侧的隔离物 2 的上述切口部对应地, 在同样位置设置同样大小的、例如圆形的切口部。在设置于平板 4 的中央部的切口部周缘形成平板的厚度薄的凹部状的台阶部, 通过在该台阶部设置防护玻璃罩等盖用部件 (省略图示), 从而构成为能够对上述隔离物 2 中的切口部的开口进行开闭。如此, 在第一表面侧构成主贮液槽 6。

[0151] 另外, 通过用平板 5 来堵塞第二表面侧的隔离物 3 中的切口部的开口, 从而形成第二表面侧的贮液槽部 9。设置于第一表面侧的主贮液槽 6 和第二表面侧的贮液槽部 9 经由贯通孔 19 而连通。

[0152] 主贮液槽 6 构成第一表面侧的贮液槽部的第 1 区域, 将经由设置于隔离物 2 的狭窄的通液路径 8 而与该主贮液槽 6 连通的空间作为构成第一表面侧的贮液槽部的第 2 区域的副贮液槽 7。副贮液槽 7 通过共同设置于隔离物 2 及平板 4 的孔洞而形成。在副贮液槽 7 配置后述的第一表面侧的电极部。

[0153] 在由主贮液槽 6、通液路径 8 及副贮液槽 7 构成的第一表面侧的贮液槽部导入并保持导电性液体。可以使作为测量对象的细胞分散至该导电性液体中。作为被导入的导电性液体, 可使用 140mM NaCl , 3mM KCl , $10\text{mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)}$, 2.5mM CaCl_2 , 1.25mM MgCl_2 及 $10\text{mM glucose at pH7.4 (with HCl)}$ 等的缓冲溶液、或添加了 $10\% \text{ (v/v) FBS}$, $1\% \text{ (v/v) GlutamaxTM (Gibco)}$ 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Sigma) 的细胞培养的培养基等。这些导电性液体的组成可根据细胞的种类酌情变更。

[0154] 向第二表面侧的贮液槽部 9 导入 40mM CsCl , $80\text{mM CsCH}_3\text{SO}_4$, 1mM MgCl_2 , 10mM HEPES , 2.5mM MgATP , $0.2\text{mM Na}_2\text{EGTA}$, (pH7.4) 等被称为移液管溶液的缓冲溶液、或细胞培养

的培养基等。导电性液体向贮液槽部 9 的导入是通过管状的导入用通液路径 10 而进行的,其排出是通过排出用通液路径 11 而进行的。在本实施例中,作为导入用通液路径 10 及排出用通液路径 11,使用了外径 1mm、内径 0.5mm 的 PEEK 制的管,但对于这些通液路径的构成材料而言,只要是能耐得住 120℃ 左右的高压灭菌器灭菌的材料,也可以使用其他材料。

[0155] 在排出用通液路径 11,设置与第一表面侧的电极部同样地构成的第二表面侧的电极部。通常,第一表面侧的电极部的电极被接地,向第二表面侧的电极部的电极施加膜电压。

[0156] 在将可使细胞 12 分散的导电性液体导入主贮液槽 6 中的情况下,为了使细胞 12 配置于图 1 所示的贯通孔 19 的开口位置,例如如第 2 实施例后述的那样,如果利用与第二表面侧的贮液槽部 9 连接的液体吸引设备来吸引贮液槽部 9 的导电性液体,则通过贯通孔 19,主贮液槽 6 的导电性液体也会被吸引,因此细胞 12 被配置在上述的位置。进一步,该情况下,可以借助吸引压在与贯通孔 19 相接的部分的细胞 12 的细胞膜形成微细的孔洞。为了在细胞膜形成这种孔洞,除此以外还有将溶解了 nystatin 或 amphotericin B 等细胞膜穿孔性的抗生素的溶液从导入用通液路径 10 导入第二表面侧的贮液槽部 9 这样的方法。若在细胞膜形成这种孔洞,则细胞内与第二表面侧的贮液槽部 9 成为电气地导通的状态(非专利文献 1)。

[0157] 另一方面,在培养型的平面膜片钳装置的情况下,作为使细胞 12 配置于图 1 所示的贯通孔 19 的开口位置的手段,也可以使具有细胞固定力的细胞外基质形成物质 18 附着在基板 1 的贯通孔 19 中的第一表面侧的开口部周缘。

[0158] 以上的构成中,在细胞 12 发现了规定的离子通道,若向第一表面侧的贮液槽部添加将该离子通道打开的刺激物质,则离子通道打开,在第一表面侧的电极部与第二表面侧的电极部间流过与施加电压相应的通道电流。此时,若在细胞 12 的细胞膜与基板 1 之间有间隙,则封接电阻降低,漏电流叠加于通道电流。

[0159] 膜电位在实际施加于电极间的电压上叠加空间存在的电磁波产生的感应电压、或电极金属表面与包围住该电极金属表面的缓冲溶液之间的界面电位、或液/液界面电位,因此漏电流因感应噪声或界面电位的变动而与之对应地变动。为此,相对于离子通道电流,表现为基线的变动这样的噪声。将这些基线变动噪声电流、及离子通道电流作为封接电阻与膜电位的变动电压 DV_m 的函数而示于图 2 中。

[0160] 根据图 2 可以明确知道:在容易获得千兆欧姆以上的封接电阻的移液管膜片钳中,即便膜电位的变动 DV_m 较大,基线变动噪声的影响也会小到可忽视的程度,但在封接电阻较小的($\sim 10M\Omega$)培养型平面膜片钳中,需要减小该膜电位的变动 DV_m 。本发明提供一种平面膜片钳技术,即:开发膜电位的变动且稳定的电极,大幅度地减小 DV_m ,即便封接电阻小,也能将噪声电流抑制得较小地进行测量。

[0161] 将第一表面侧及第二表面侧的电极部的详细构造示于图 3。由内径 1mm 的派热克斯(注册商标)玻璃构成的筒状的电极容器 13 的内部充满着以饱和浓度溶解了 KCl 与 AgCl 的电极溶液 14。KCl 浓度为 3.3M/L、AgCl 添加约 1.1mM/L。另外,在 KCl 的情况下,饱和浓度在常温约为 3.3M/L。在被收纳于电极容器 13 内的 AgCl/Ag 电极 15 中,在银线的表面涂敷 AgCl。这种 AgCl/Ag 电极 15 可在银线的表面涂敷 AgCl 粉末而形成,或可将银线浸于包括次氯酸钠的漂白剂等来制作。此外,也可通过 KCl 溶液内的电镀来制作。

[0162] 用多孔的玻璃或多孔的陶瓷等无机多孔材料 16 来堵塞电极容器 13 的前端部。作为无机多孔材料 16, 实际使用的是维克玻璃 (VYCOR glass, 高硼硅酸耐热玻璃) (康宁公司)。这样, 构成电极容器 13 的容器壁的一部分的无机多孔材料 16 的前端被浸渍在导电性液体 (细胞培养液或缓冲溶液) 中。导电性液体中的 KCl 浓度为几毫摩尔, 但因该无机多孔材料 16 的效果, 电极容器 13 的容器内与容器外成为电气地导通的状态, 同时电极溶液 14 与容器外的导电性液体的混合小到可忽视的程度, 因此容器内与容器外的大的 KCl 浓度差被保持恒定, 由此 AgCl/Ag 电极 15 的界面电位或液 / 液界面电位保持恒定。电极容器 13 的基端部被密封材料 20 密封, 电极管脚 17 从此处突出。

[0163] 将实际制作出的电极部的照片示于图 4。图 4 上侧的照片是第二表面侧的电极部, 是组装了与图 1 所示的排出用通液路径 11 的连接用管接头的状态, 无机多孔材料 16 在管接头的管路内露出。图 4 下侧的照片是第一表面侧的电极部, 如图 1 所示, 被设置在副贮液槽 7。

[0164] 使用发现了以光来打开通道的离子通道的细胞, 来控制通道电流的情况下, 如果将第一表面侧及第二表面侧的电极部如上述地配置, 则第一表面侧的贮液槽部由不透光性的隔离物 2 或平板 4 形成, 因此被照射至主贮液槽 6 的照射光不会照射第一表面侧及第二表面侧的电极部的 AgCl/Ag 电极。再有, 因为在主贮液槽 6 设置有细胞, 且细胞外部的导电性液体的钾离子浓度小到几 mM 左右, 所以可称之为微量, 期待抑制从电极部漏出的 KCl 的影响, 为此对于第一表面侧的贮液槽部而言, 在主贮液槽 6 的基础上还制作副贮液槽 7, 用宽度 1mm 以下的狭窄的通液路径 8 来连结这些主贮液槽 6 及副贮液槽 7。

[0165] 为了调查本发明涉及的平面膜片钳装置用电极部的效果, 在图 5 中表示对以往使用了通常的 AgCl/Ag 电极的情况下、和使用了本发明的电极部的情况下的施加电压 0mV 处的电流变动进行比较后的结果。将贯通孔 9 的直径约为 $2\mu\text{m}$ 的硅基板设置于图 1 的平面膜片钳装置, 在未设置细胞 12 的状态下, 以施加电压 0mV 对电流变动进行了测量。贯通孔 19 的电阻约为 $2\text{M}\Omega$, 因此在以往的 AgCl/Ag 电极中, 有约 0.5mV 的平稳的界面电位变动, 界面电位变动大, 使得基线变动, 相对于此, 本发明的电极部中, 界面电位变动小到可忽视的程度。测量是利用 Axopatch200B (Molecular Devices 社) 而进行的。图 5 的括弧内表示进行了测量时的 Axopatch200B 的低通滤波器的频率。如图所示, 本发明的电极的稳定化效果极大。

[0166] (第 2 实施例)

[0167] 在图 6(a) 中表示第 2 实施例涉及的平面膜片钳装置的主要部分。装置的构成基本上与图 1 相同, 但只有基板 1 的微细的贯通孔 19 附近的构造不同。即, 在基板 1 的贯通孔 19 中的第一表面侧的开口部, 具有比细胞体更大的宽度与可阻止培养状态的细胞体的移动的深度的凹部 24 作为细胞体配置区域形成。

[0168] 培养型的平面型膜片钳装置中, 即便将细胞设置于贯通孔之上, 在培养中也每每引起细胞移动, 封接电阻发生变动, 或者细胞从孔逃离, 传感器动作本身变得不起作用。在本实施例中, 在贯通孔 19 的开口部形成比细胞的尺寸稍大的凹部 24, 成为将细胞设置于该凹部 24 时在培养中细胞也无法移动的构造。通常的细胞大小, 其长径为 $10\sim 30\mu\text{m}$ 左右, 因此作为凹部 24 的尺寸, 虽然会根据细胞的种类而有所不同, 但只要是与细胞的长径相比直径大到 $10\sim 30\mu\text{m}$ 左右的圆形或矩形的平面形状即可。凹部的深度也根据细胞的大小

而有所不同,但通常只要是 $5 \sim 12 \mu\text{m}$ 左右,就能足够达到目的。也优选在凹部 24 的底部涂敷具有细胞固定力的细胞外基质形成物质 18。

[0169] 作为细胞外基质形成物质 18,聚 L-赖氨酸或聚 D-赖氨酸、昆布氨酸等适合于神经细胞或 PC12 细胞,或者骨胶原 IV 或纤维连接蛋白 (fibronectin) 适合于 HEK293 细胞。

[0170] 在形成上述凹部 24 的图案的过程中,在基板 1 为 Si 或玻璃、陶瓷的情况下,用旋转器涂敷厚度与凹部 24 的深度相当的光致抗蚀剂,使用规定的光致掩模进行曝光显影,由此可容易地形成。再有,基板 1 为塑料的情况下可以通过热模压加工或注塑成型容易地形成。

[0171] 在作为测量对象的细胞 12 为神经细胞的情况下,除了圆形或矩形的凹部 24 以外,特别优选将轴突 (axon) 或树状突起可伸长的这种细的沟槽形成为从凹部 24 起延长的状态 (例如将凹部 24 作为中心,呈放射状地延伸设置多条细的沟槽)。进一步,在将神经细胞作为测量对象的情况下,有时也特别优选在基板 1 设置多个凹部 24,并且利用上述细的沟槽将这些多个凹部 24 间相互连接,由此在培养中形成神经细胞的网。

[0172] 本实施例中,具有以下构造:在将细胞设置凹部 24 之际,经过与第二表面侧的贮液槽部 9 连通的吸引管 21,由吸引泵 23 吸引,可以将第二表面侧的贮液槽部 9 抽成负压的。在吸引管 21 的规定部分设置有用于测量该负压的负压测量压力计 22。该吸引管 21 也能兼作第 1 实施例所描述过的排出用通液路径 11。虽然设置这种吸引装置并不是不可或缺的,但在设置吸引装置的情况下,适于吸引的负压在考虑细胞的种类的前提下通常设为 0.01 气压 \sim 0.5 气压左右。

[0173] 在图 6(b) 中表示也包括上述细的沟槽在内而形成了凹部 24 的例子。该情况下,利用在细的沟槽的交点具有直径 $30 \sim 50 \mu\text{m}$ 的圆形图案的方格状图案的镍模具,通过热模压形成了凹部 24 与细的沟槽。

[0174] 实际上,用吸引泵 23 吸引 HEK293 细胞来到贯通孔 19 的部位,将第二表面侧的贮液槽部 9 抽成 -0.2 气压 ~ -0.5 气压的负压,同时播种了细胞。此时,虽然在凹部 24 以外的部位也播种细胞,但这种情形从细胞培养的观点来说是优选的。这样,根据形成了凹部 24 的本实施例,可以测量非常稳定的离子通道电流。另外,凹部 24 的目的在于防止细胞的移动,因此作为其形状,并未限定于图 6(a) 所示的底面与侧壁部成直角的矩形的剖面形状,也可以是剖面为半圆形或半椭圆形的 (例如碗状物) 剖面形状。

[0175] 此外,设置吸引泵 23 的效果在播种细胞时以外的情况下也存在。即,在通道电流测量时进行吸引,对第二表面侧的贮液槽部 9 施加负压,由此作为细胞经过微细的贯通孔 19 而被贮液槽部 9 拉拽的结果,细胞膜与细胞外基质 18 的涂敷表面的密接性提高,封接电阻提高。即,具有可降低测量离子通道电流过程中的噪声的效果。该效果的提高程度根据细胞的大小或贯通孔 19 的位置与细胞的位置的相对关系而各种不同,大体上负压的适当值为 0.01 \sim 0.5 气压,由此可达成封接电阻的 2 倍 \sim 10 倍的提高。

[0176] (第 3 实施例)

[0177] 如上所述,使用以下结构的培养型平面膜片钳装置,测量了细胞的离子通道电流,该培养型平面膜片钳装置使用具备了凹部 24 的基板 1,在基板 1 的第二表面侧的贮液槽部 9 具备与该贮液槽部 9 连通的液体负压施加用的吸引机构,其他点采取图 1 所示的构成。作为基板 1,使用了与图 5 所示的用于测量的构成相同的硅基板。作为细胞使用了:(a) 发现

了通道视紫红质 2(ChR2) 的 C2C12 细胞、(b) 发现了通道视紫红质宽径接收器 (ChR-WR) 的 HEK293 细胞。公知这些离子通道借助蓝色的光而打开通道 (ChR2 :Philipp Schoenenberger et al, Brain Cell Biology36(2008) 119, ChR-WR :Hongxia Wang, et al, J. Biol. Chem. , 284(2009) 5685)。

[0178] 作为刺激用的光源,使用了波长 473nm 的激光器。在 (a)、(b) 的情况下施加膜电位均从下起为 -60、-30、-20、-10、20、30、50 及 70mV。照射激光器功率约为 2mW、激光聚光成直径约 50 μ m。测量结果如图 7 所示,在 (a)、(b) 的任一情况下,基于本发明涉及的电极部的效果,无论封接电阻是否低至 10M Ω ,都能成功地以良好的 S/N 比进行通道电流的测量。

[0179] (第 4 实施例)

[0180] 基于图 8 来说明本发明的第 4 实施例。图 8(a) 是平面膜片钳装置的正面剖视图,在图的中央表示剖面的基板上,图示左侧的第 1 神经细胞 12a 与右侧的第 2 神经细胞 12b。这些神经细胞 12a、12b 实际上被配置在所述凹部 24 中,凹部 24 间通过细窄的沟槽而被连接在一起,但为了方便图示,省略凹部 24 或细的沟槽的图示。而且,通过省略图示的细的沟槽,第 1 神经细胞 12a 与第 2 神经细胞 12b 由神经轴突与神经键连接。

[0181] 从本发明的作为 AgCl/Ag 稳定电极的下部电极(第 2 表面侧的电极)施加电压,向被设置于微细的贯通孔上的第 1 神经细胞 12a 注入电流,由此使神经细胞 12a 产生活动电位。该活动电位在神经轴突中传播,诱发:神经键中的神经传递物质的释放、还有由神经键后膜表面的受体蛋白接受神经传递物质而引起的离子的流入、由此引起的邻接的第 2 神经细胞 12b 处的活动电位产生。由此,可观察到 Ca 离子向邻接的第 2 神经细胞 12b 的流入、预先导入了神经细胞的 Ca 探针的荧光的脉冲状发光等一连串的经过。

[0182] 即,系统构成的应用实施例为,使用本发明的装置,在第 1 神经细胞 12a 产生活动电位,经由神经轴突与神经键,在邻接的第 2 神经细胞 12b 接收该活动电位的传播。

[0183] 作为平面膜片钳装置的基板,使用了表面具有直径 2 微米的微细贯通孔的聚甲基丙烯酸酯 (PMMA) 基板。用作为细胞外基质的聚 L 赖氨酸涂敷基板表面,在该表面以 $3 \times 10^2 \sim 6 \times 10^3/\text{mm}^2$ 的密度播种从鼠大脑皮层采集的神经细胞,由此形成了神经细胞网。在形成网之前,用神经细胞的培养基充满基板的上部及下部的贮液槽,向神经细胞导入 Ca 探针,在从微细的贯通孔进行电流注入的时间点,上部下部分别更换了细胞外液、细胞内液的缓冲溶液。

[0184] 本实施例中,如图 8(a) 所示需要将某一个神经细胞 12a 配置于微细的贯通孔之上。其他例如图示的神经细胞 12b 等并非需要配置于微细的贯通孔上,但只要不进行电流注入或电压施加,被配置在微细的贯通孔上也是可以的。作为由本发明的基本构成容易地类推的结构,在神经细胞 12b 也被配置于微细的贯通孔上的构成中,在此如果将本发明的稳定电极以与神经细胞 12a 侧的贮液槽部电气绝缘的形态配置于神经细胞 12b 附近的基板的上部(第一表面侧)与下部(第二表面侧),则因到达神经细胞 12b 的活动电位的影响,其会产生离子通道电流,因此不仅能容易地对该电流进行 Ca 成像,同时作为神经细胞 12b 的离子通道电流进行测量的动作也容易地达成。

[0185] 该神经细胞网被设定成可用荧光显微镜进行观测,还被设定成可用 CCD 照相机来观测通过显微镜观察到的像。在该设定中,向下部侧的电极施加脉冲宽度短的电流脉冲或电压脉冲。