

Z47

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ELEKTROFIZJOLOGICZNYCH BŁON KOMÓRKOWYCH

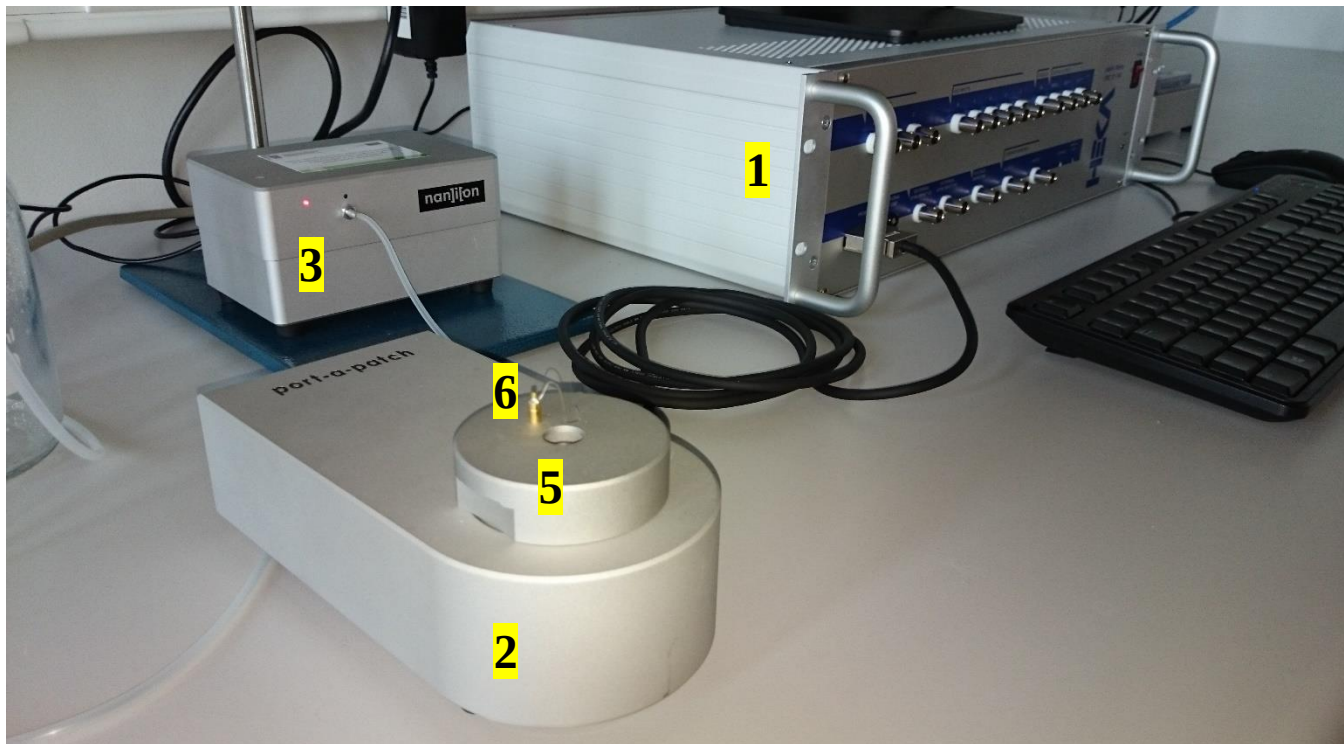
I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawową wiedzą na temat pomiarów elektrofizjologicznych żywych komórek metodą Patch Clamp. Podczas wykonywania ćwiczenia studenci poznają mechanizmy jonowe zachodzące w komórce oraz zaobserwują niektóre z nich przy pomocy prostych pomiarów techniką Patch Clamp. Podczas przeprowadzania eksperymentu uczestnicy ćwiczenia powinni zidentyfikować występujące w komórce typy kanałów jonowych oraz zaobserwować wpływ specyficznych blokerów na ich aktywność

II. Informacje potrzebne do wykonania ćwiczenia

1. Budowa komórki roślinnej i zwierzęcej
2. Skład i funkcjonowanie błony komórkowej
3. Funkcje i rodzaje kanałów jonowych
4. Podstawy pomiarów techniką Patch Clamp
5. Istotne parametry przy pomiarach elektrofizjologicznych

III. Aparatura pomiarowa



1. WZMACNIACZ
PRZETWORNIK AC/DC
2. JEDNOSTKA GŁÓWNA PORT-A-PATCH
3. POMPKA PODCIŚNIENIA
4. ZESTAW DO PERFUZJI
5. KLATKA FARADAYA
6. ELEKTRODA ODNIESIENIA (GND)

IV. Wykonanie pomiarów

1. Zapoznanie się z wszystkimi elementami zestawu pomiarowego
2. Uruchomienie oprogramowania na komputerze
3. Zapoznanie się z funkcjonalnością poszczególnych wskaźników i okien funkcyjnych dostępnych z poziomu komputera
4. Przeprowadzenie próbnego pomiaru „na sucho” – opanowanie trybów pracy i dostępnych funkcji aparatury
5. Pomiar z użyciem żywych komórek
 - wyznaczenie krzywej IV dla badanych komórek
 - pomiary od hiperpolaryzacji do depolaryzacji błony (szeroki zakres pomiarów w trybie Current Clamp)
 - wykorzystanie zestawu do automatycznej perfuzji (aplikacja specyficznego blokera)

V. Opracowanie wyników

Sprawozdanie po wykonaniu ćwiczenia powinno zawierać:

1. Opis aparatury wraz z schematem
2. Informacje na temat metody Patch Clamp takie jak:
 - opis metody
 - schematy pomiarowe
 - możliwe konfiguracje pomiaru
 - informacje na temat kanałów jonowych
 - zebrane krzywe IV wraz z interpretacją
 - wyniki ze wszystkich pozostałych etapów pomiarów wraz z komentarzem

Student w sprawozdaniu, na podstawie wskazówek prowadzącego oraz dostarczonych przez niego materiałów oraz polecanej literatury, powinien zidentyfikować typy kanałów jonowych jakie jego zdaniem występują w komórkach.

Swoje wnioski powinien potwierdzić analizując dane z pomiaru przed i po podaniu specyficznego blokera kanałów.

VI. Zalecana literatura

1. Podstawy Biologii Komórki –*Bruce Alberts, Dennis Bray, PWN 2009*
2. Krótkie wykłady Neurobiologia –*Alan Longstaff, PWN 2006*
3. Wykłady i materiały udostępnione przez prowadzącego
4. Publikacje dostępne w internecie związane z tematyką:
 - kanały jonowe (*ion channels**)
 - Patch Clamp
 - badania elektrofizjologiczne (*electrophysiology**)
 - biologia komórki (*cell biology**)

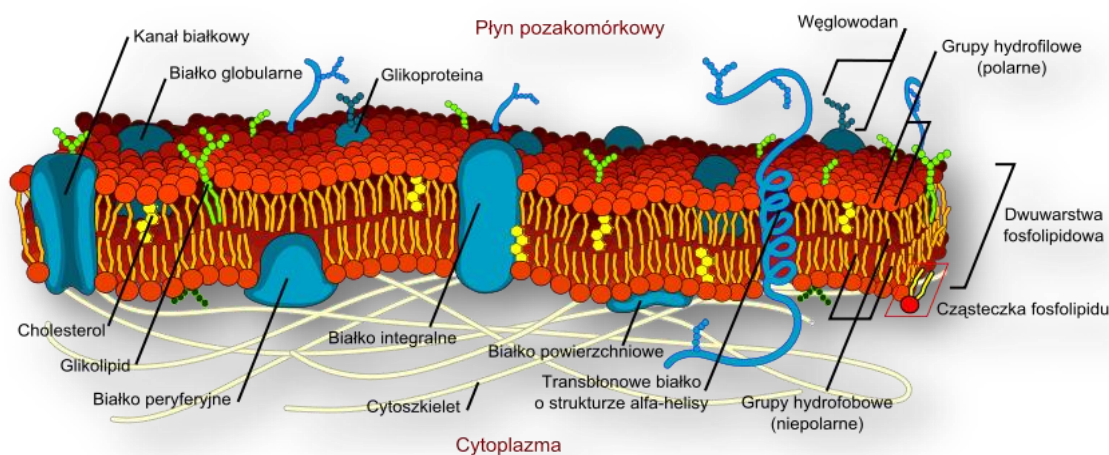
* w nawiasach podano terminy będące przydatne przy wyszukiwaniu anglojęzycznych publikacji przy pomocy specjalistycznych wyszukiwarek np. pubmed

VII. Materiały dydaktyczne

1. Podstawowe różnice między komórką zwierzęcą a roślinną

Składnik komórki	Komórka zwierzęca	Komórka roślinna
ściana komórkowa	-	+
blona komórkowa	+	+
cytoplazma	+	+
jądro komórkowe	+	+
mitochondria	+	+
wodniczki	dużo małych	jedna lub kilka dużych
plastydy	-	+
organelle ruchu	+	-(wyj. gamety, glony)
siateczka śródplazmatyczna	+	+

2. Błona komórkowa – podstawowe informacje



- konsystencja półpłynna
- zbudowana z białek i dwóch warstw fosfolipidów
- struktura półprzepuszczalna
- pełni istotne funkcje dla każdej żywej komórki

3. Białka błonowe

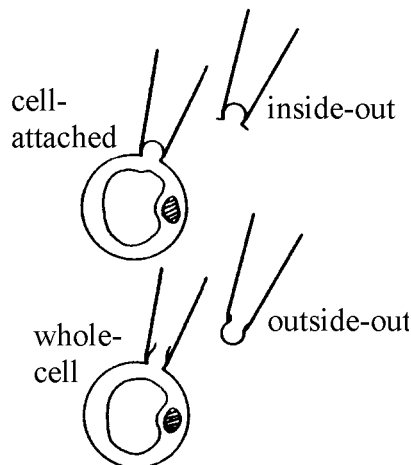
- związane ze strukturą błony komórkowej
- mogą występować w roli:
 - receptorów
 - enzymów
 - białek wiążących
 - transporterów
- rozróżniamy 3 podstawowe typy białek błonowych

4. Kanały jonowe

- ze względu na drogę aktywacji wyróżniamy:
 - napięciowo zależne
 - aktywowane ligandem
 - aktywowane naprężeniem mechanicznym
- kanały jonowe pełnią wiele istotnych ról w podstawowych procesach fizjologicznych organizmów żywych

5. Technika Patch Clamp

- umożliwia obserwację aktywności pojedynczych kanałów jonowych
- zapewnia wysoką rozdzielczość czasową oraz czułość pomiarów
- pomiarów można dokonywać w 4 podstawowych konfiguracjach
 - whole cell
 - cell attached
 - inside out
 - outside out



6. Parametry i równania istotne przy pomiarach elektrofizjologicznych

- równanie Nernsta

- pozwala wyznaczyć potencjał błonowy
- wartość potencjału Nernsta odpowiada wartości tzw „potencjału odwrócenia”

$$E_s = \frac{RT}{Z_s \cdot F} \ln \frac{[S_2]}{[S_1]}$$

R - stała gazowa

T - temperatura [K]

Z_s - ładunek jonu „S”

F - stała Faradaya

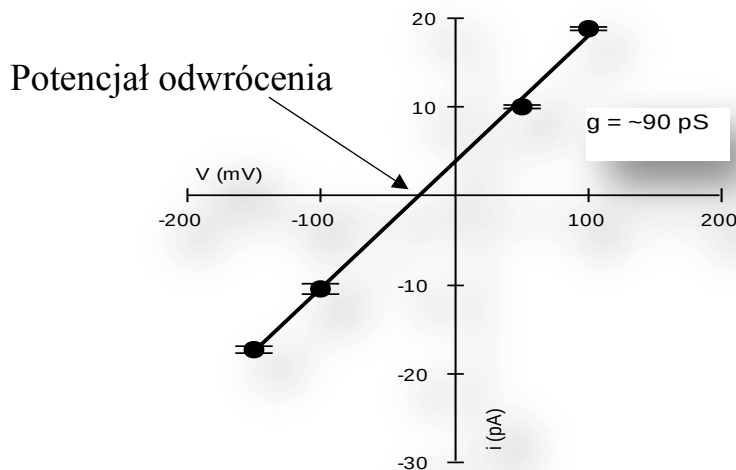
E_s - potencjał błonowy dla jonu „S”

S₁ - stężenie jonu „S” po stronie wewnętrznej błony

S₂ - stężenie jonu „S” po stronie zewnętrznej błony

- potencjał odwrócenia

- wartość potencjału powyżej którego kierunek prądu przepływającego przez kanał ulega zmianie



- potencjał równowagi
- potencjał spoczynkowy
- potencjał progowy
- potencjał czynnościowy
- równanie Goldmana-Hodgkina-Katza

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_z}{P_K[K^+]_w} + \frac{P_{Na}[Na^+]_z}{P_{Na}[Na^+]_w} + \frac{P_{Cl}[Cl^-]_w}{P_{Cl}[Cl^-]_z}$$

R - stała gazowa, T - temperatura [K], F - stała Faradaya

P_x - względna przepuszczalność dla jonu x

[X]_{z/w} - stężenie jonu X po zewnętrznej i wewnętrznej stronie błony

7. Błona komórkowa jako układ elektryczny

- prosty układ RC
- składowa pojemnościowa pochodzi od dwuwarstwy lipidowej
- składowa przewodnościowa ($G=1/R$) wynika z obecności kanałów jonowych

