

非损伤微测系统 用户手册（版本 V2.0）

美国扬格公司

北京林业大学

目 录

使用方法.....	4
1. 离子选择性微电极的制作.....	5
1.1 电解液和 LIX 的灌装.....	5
1.2 氯化银丝.....	8
2. 开机准备.....	9
2.1 系统开机.....	9
2.2 安装微电极.....	9
2.3 运动控制器的启动.....	9
2.4 imFlux 软件的启动.....	10
3. 离子选择性微电极校正.....	10
3.1 离子选择性微电极的能斯特斜率.....	10
3.2 校正液知识.....	10
3.3 校正电极的步骤.....	10
4. 样品固定及观察.....	12
5. 微电极定位.....	13
5.1 手动调节.....	13
5.2 运动控制栏简介.....	13
5.3 键盘操作.....	14
6. 开始测量.....	14
6.1 特定采样规则的测量模式.....	14
6.2 实时监测.....	15
6.3 扫描测量.....	16
7. 结束测量.....	17
8. 输出数据.....	17
9. 附录.....	18
离子选择性微电极组成.....	18

使用方法

本章主要介绍非损伤微测系统的基本使用方法。以离子测量为例重点介绍以下内容：

- 离子选择性微电极的制作
- 开机准备
- 离子选择性微电极的校正
- 样品固定及观察
- 微电极定位
- 开始测量
- 结束测量
- 输出数据

1. 离子选择性微电极的制作

使用非损伤微测系统的第一步是离子选择性微电极的制作。为保证实验结果的稳定性和可靠性，建议使用美国扬格公司为本系统专门配置的非损伤玻璃微电极，不需要任何处理，只需进行电解液和液态离子交换剂（Liquid Ion Exchanger, LIX）的灌充即可。

1.1 电解液和 LIX 的灌充

要得到离子选择性微电极必须正确灌充相应的电解液（又称：灌充液）和 LIX 到非损伤微电极（下文简称：电极）尖端。灌装灌充液和 LIX 的步骤则随所测离子种类不同而稍有不同，都可以使用离子选择性微电极制备装置完成。

※注：由于组装配件不同，实际系统中具体部件细节可能与下面图中所示略有出入，以实际系统为准。操作方法基本相同。



图 2.1 离子选择性微电极制作装置



图 2.2 LIX 载体

- (1) 用 LIX 载体（图 2.2），在装有 LIX 的试剂瓶中迅速蘸一下，使尖端充满即可。
- (2) 将 LIX 载体和压力控制器（图 2.3）的接头用软管连接起来，调节三通使两者连通，同时注意两者的连接需保持气密性。

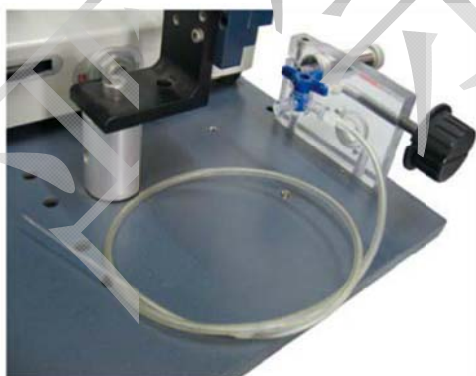


图 2.3 螺旋压力控制器

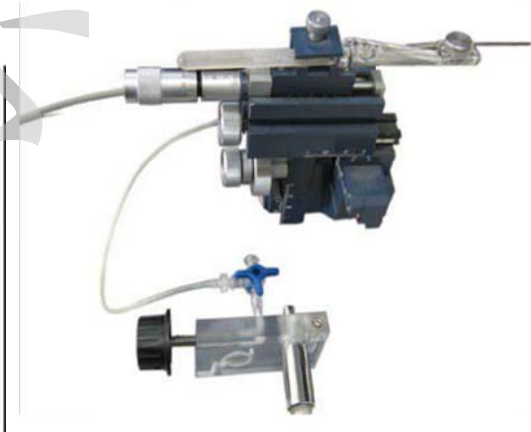


图 2.4 安装 LIX 载体

- (3) 安装 LIX 载体（图 2.4）：将 LIX 载体放在固定器上，并安装在一个三维操纵器上。调整尖端的位置使其接近显微镜的视野。
- (4) 用螺旋压力控制器对 LIX 载体施以微小压力，使尖端形成一个 LIX 的凸面（图 2.5），并聚焦在这个凸面的顶点。

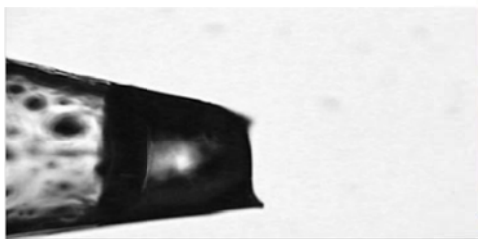


图 2.5 LIX 载体的凸起液面



图 2.6 玻璃微电极

- (5) 取一支玻璃微电极(图 2.6), 用电解液灌注注射器(图 2.7) 从后端注入电解液, 产生 10 mm 的液柱。若电解液柱过长, 会增大整个微电极的电容, 进而阻抗增加, 导致噪音增强。



图 2.7 电解液灌注注射器

- (6) 将玻璃微电极装在电极压力调节装置(图 2.8) 的固定器上, 并固定于显微镜载物台上。调节三通阀(图 2.9), 使注射器与微电极固定器相通, 但与外界隔绝。上述的连接同样需要保持气密性, 并且注射器应该置于量程中部。

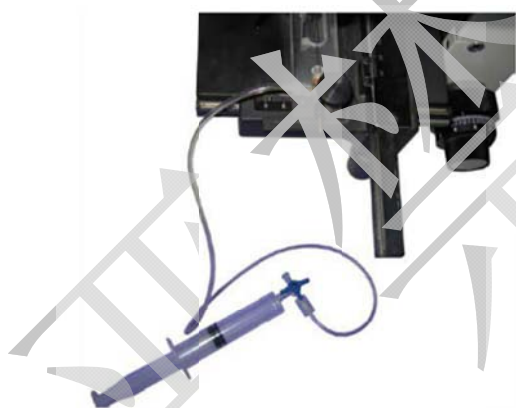


图 2.8 安装玻璃微电极及电极压力调节装置



图 2.9 电极压力调节装置上的三通阀

- (7) 控制显微镜的三维操纵器, 和第一个操纵器相对放置, 使微电极尖端与 LIX 载体尖端在同一水平面上相对。两个尖端均调整到显微镜的视野内(图 2.10)。



- (8) 用显微镜观察，并轻轻推动注射器，使电解液逐渐充满玻璃微电极尖端。推动过程中可以将微电极与 LIX 载体远离，防止微电极移动位置造成的损坏。然后立即小心地将微电极尖端与 LIX 的凸液面相接触（图 2.11），如果延时过长，可能造成电解液蒸发，结晶堵塞尖端。

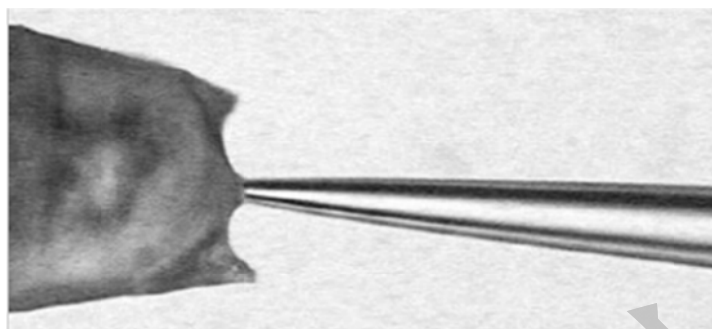


图 2.11 微电极灌注过程

- (9) 由于毛细作用，LIX 进入离子选择性微电极，通过推拉电极压力调节装置的注射器可以调整 LIX 的长度。
- (10) 使 LIX 反复进出 3-4 次，避免完全推出。
- (11) 用注射器将离子选择性微电极中的 LIX 液柱调整到合适长度（图 2.12，附录 1）。

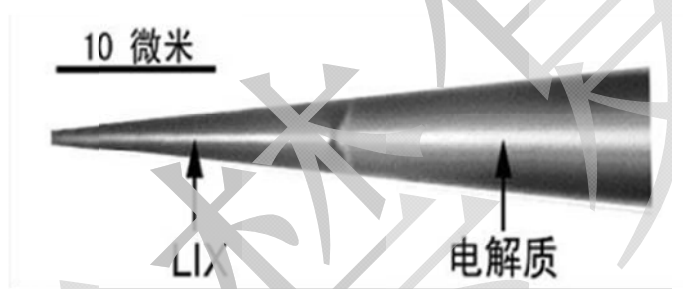


图 2.12 离子选择性微电极尖端示意图

- (12) 调节三通阀（图 2.9），使固定器上的离子选择性微电极与外界相通，以释放微电极上的压力。从固定器上小心取下微电极即可。

注意事项：

- (1) 整个过程中不能触摸微电极的前端！
- (2) 灌充电极所用灌充液必须灭菌、无杂质且经过过滤！
- (3) 当灌充电极时，确认灌充液柱中没有气泡或气柱。
- (4) 给灌充液柱施加压力并从尖端推出一两滴后，要通大气，避免把灌充液充入 LIX 载体中。
- (5) 若电极尖端的灌充液不能用注射器加压推出，可能是尖端被堵塞，可使尖端先与 LIX 接触，吸入一小段 LIX 后，再尝试推出液滴。
- (6) 给 LIX 加压时，不要使液面过于突起，防止压力过大 LIX 被挤出，只要液体把 LIX 载体尖端覆盖即可。
- (7) 若电极尖端接触 LIX 后未发生倒吸，可向外拉注射器施加负压，使倒吸发生。
- (8) 调整好 LIX 长度后，需释放注射器压力，否则电极可能在高压推动下从固定器中射出而损坏，甚至扎伤操作人！
- (9) 电极中未装 LIX、灌充液被气泡隔断或电极尖端碰断，校正会异常，可重新装 LIX 或重做电极。

1.2 氯化银丝

得到微电极后，需要一个微电极固定架(见图 2.14) 将微电极与前置放大器连通，即将微电极固定架上的银丝氯化后，将离子选择性电极内的盐桥(电解液) 连接到前置放大器。需氯化的银丝是微电极固定架上的一部分，银丝氯化前要用细砂纸(颗粒度 600grit) 将银丝打磨干净，注意不要把银丝弄断，可使用 0.1M 的盐酸或 0.1M 的氯盐溶液(如 KCl)。建议这一步骤在每个实验日开始时都进行。为了保证氯化效果的一致性和稳定性，推荐使用电生理银丝氯化装置(见图 2.13)，使用步骤如下：

※注：由于配件不同，实际装置具体部件可能与下图中所示略有出入，以实际装置为准。操作方法基本相同。

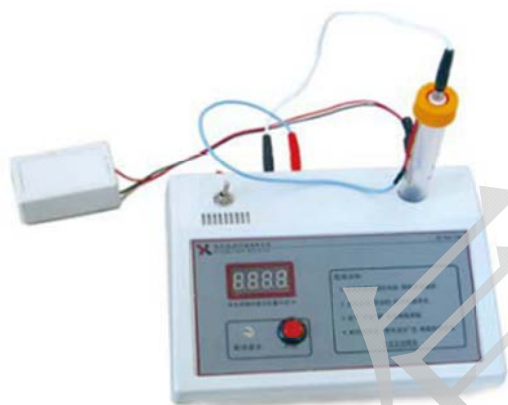


图 2.13 银丝氯化装置

- (1) 用细砂纸将电极固定架上的银丝打磨干净。注意不要把银丝弄断。

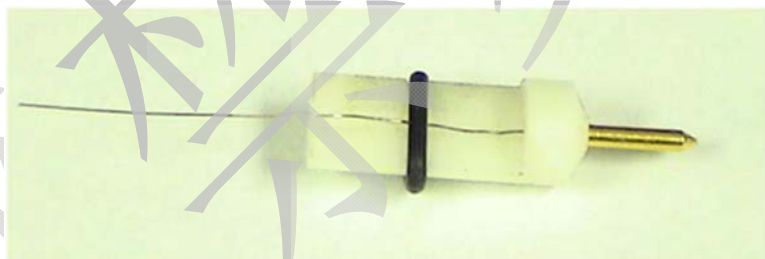
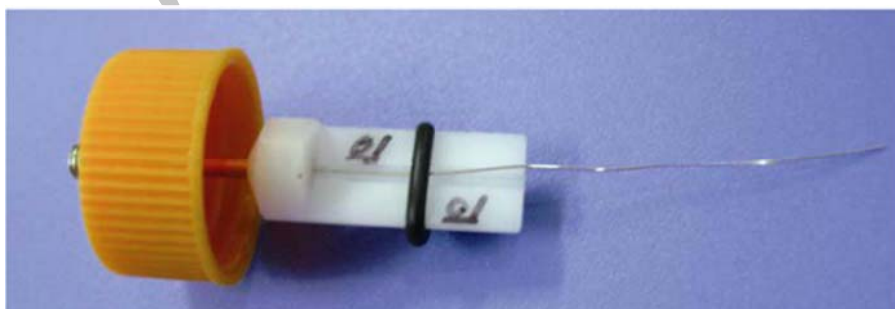


图 2.14 电极固定架

- (2) 在银丝氯化装置塑料容器内倒入 0.1M HCl。
- (3) 将电极固定架的铜针一端固定在塑料容器的盖子上。图 2.15 固定在塑料容器盖上的电极固定架 调整盖子松紧程度，使银丝浸入 HCl 溶液中约 1cm。



- (4) 选择自动档位，按下“开始”键，银丝氯化装置会自动进行 20 秒的氯化。氯化结束，取出电极固定架即可使用。容器中的 KCl 可以回收，以便再次使用。

注意：

- (1) 当没有银丝氯化装置时，可以使用低浓度次氯酸钠溶液（或以次氯酸盐为主要成分的消毒液）浸泡过夜，基本可以达到氯化效果。
- (2) 银丝必须打磨光亮后才可用于氯化，否则容易造成氯化层表面不平，易引入噪音。

2. 开机准备

2.1 系统开机

打开系统控制盒、信号处理器、运动控制器、显微成像装置等电源，确保防震工作台充气正常。

2.2 安装微电极

- (1) 将氯化好的银丝从已灌充电解液和 LIX 的微电极后端插入，直至微电极后端与电极固定架接触。此时银丝应浸入电解液中但与微电极尖端保持一定距离（图 2.16）。

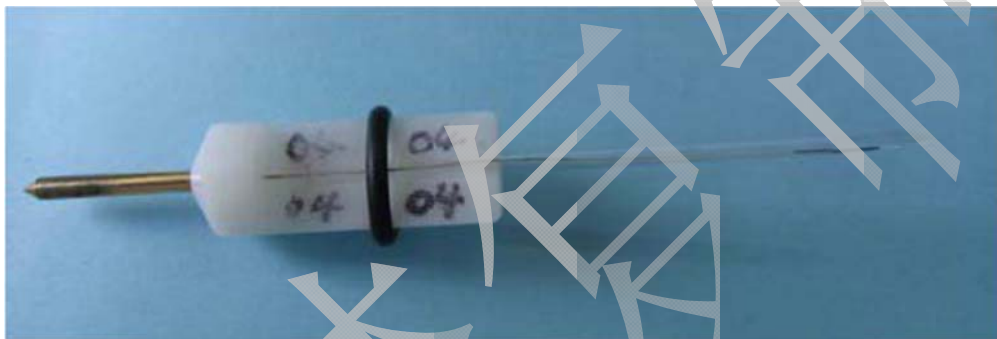


图 2.16 安装好的离子选择性微电极

- (2) 佩戴好防静电手腕，将安装好的微电极与前置放大器相连接（图 2.17）。

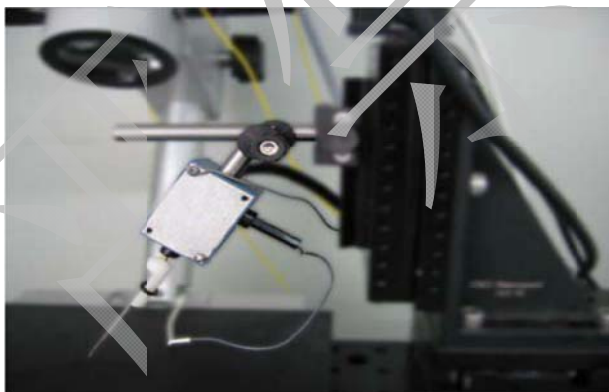


图 2.17 微电极与前置放大器的连接

2.3 运动控制器的启动

打开运动控制器电源（Power）；按下 Enable（开）按钮后，方可从键盘控制微电极进行三维运动；手动调整驱动器的旋钮时，则需再次按下 Enable（开）按钮，使其成 Disable（关）状态，否则易造成驱动器损坏。（图 2.18）



图 2.18 运动控制器面板- 运动控制电机

2.4 imFlux 软件的启动

非损伤微测系统的操作需要在 imFlux 软件界面下完成。

双击桌面上的快捷方式，或单击快捷启动栏中的快捷方式即可启动 imFlux 软件。启动 imFlux 软件时，会看到如下对话框（图 2.19），可以选择新建 VPO 文件，点击“New File”，或打开已有的 VPO 文件，点击“Open File”。

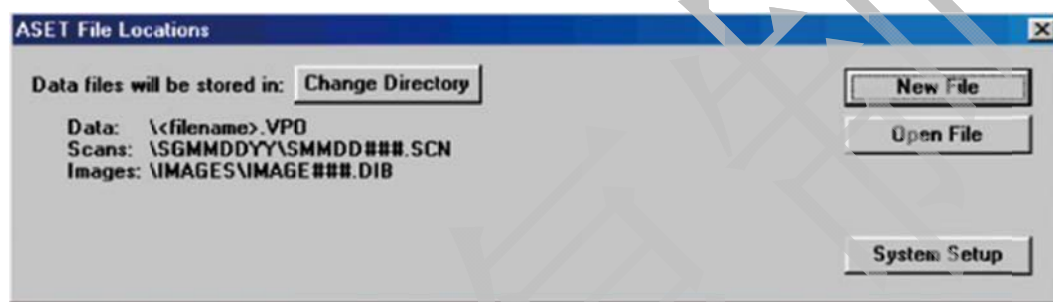


图 2.19 imFlux 软件界面-imFlux 文件定位

3. 离子选择性微电极校正

3.1 离子选择性微电极的能斯特斜率

为了测试离子选择性电极是否正常工作，首先要了解它在不同的被测离子浓度下的反应。在待测范围内以 10 为倍数改变浓度作为常规背景浓度。将离子选择性电极和参比电极一起放入校正液中，使用 imFlux 软件中“校正”程序。

各种离子选择性微电极校正理论值能斯特斜率如下：

- 一价正离子 58 mv/decade
- 一价负离子 -58 mv/decade
- 二价正离子 29 mv/decade

※注：由于某些因素干扰，校正后的能斯特斜率往往不能达到理论值，但只要在一定范围内即可。（一价正离子 58 ± 5 mv/decade；一价负离子 -58 ± 5 mv/decade；二价正离子 29 ± 3 mv/decade）

3.2 校正液知识

使用至少两种浓度的溶液来校正。可以调节两个校正液中的待测离子浓度分别高于和低于测试液中该离子浓度，以确保较好的两点校正，推荐浓度差为 10 的倍数。

例如：测试液 Ca^{2+} 浓度为 0.2mM。

则两个校正液浓度可以是 0.1 mM 和 1mM；也可以是 0.1 mM 和 0.5mM。

注：软件还支持三点校正，确定电极斜率时更加可靠。

3.3 校正电极的步骤

- (1) 将配制好的校正液放入两个培养皿中；
- (2) 将盛有校正液的培养皿放到载物台上，将参比电极冲洗干净，插入浓度高的校正液 1 (solution 1) 中，随后电极插入同一溶液中。

注意：(1) 电极不要碰底部，但最好深入液面较深处；参比电极和离子电极的距离要保持相对固定，

不要忽远忽近。

(2) 在更换校正液之前冲洗参比电极。

(3) 开始校正

a) 点“Ion-Molecule”下的“Select”，从菜单中选择一个合适的采样规则（关于采样规则详见附录 4）：

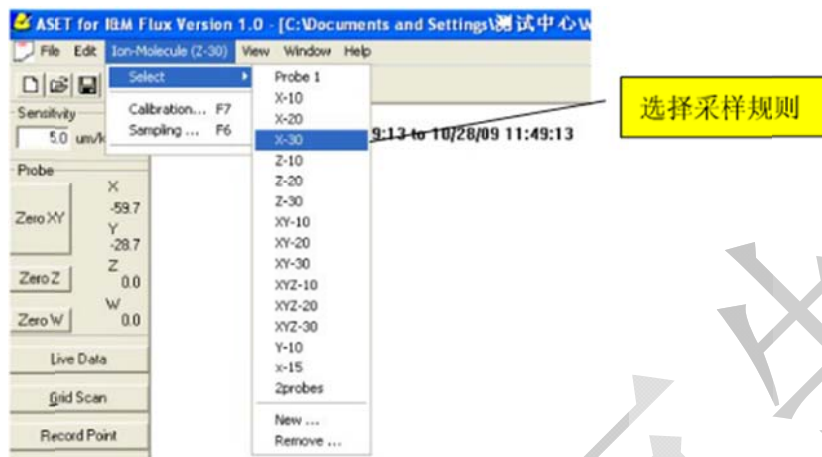


图 2.20 imFlux-采样规则的选择

b) 点击“Calibration”进入 Calibration 界面，读取校正液的读数。

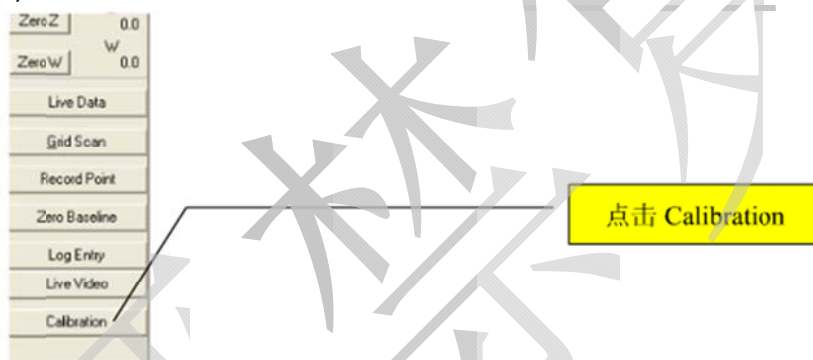


图 2.21 Calibration 操作快捷键

c) 进入 Calibration 界面：

c) 进入 Calibration 界面：

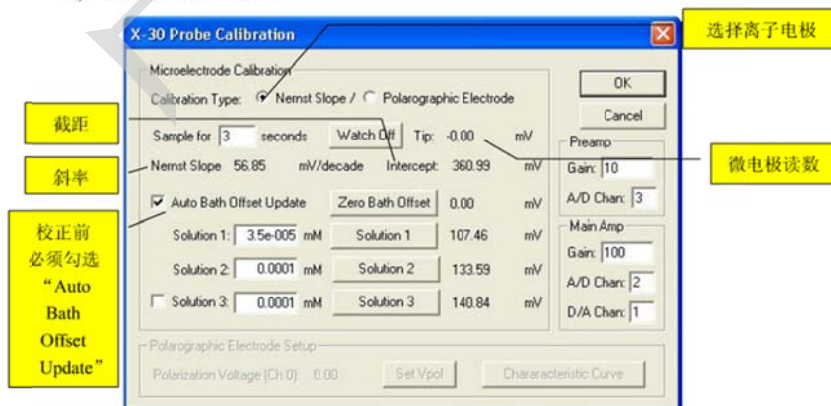


图 2.22 Calibration 界面

确认“Calibration Type”：离子电极选择 Nernst Slope；
Sample for 为校正采样时间，建议最少 3 秒；

确认已勾选“Auto Bath Offset Update”；填入校正液 1(Solution 1) 和校正液 2(Solution2) 的浓度（如需要三点校正，勾选“Solution 3”，填入 Solution 3 的浓度）；

检查前置放大器和主放大器通道设置：

项目	细项	Channel 1	Channel 2
Preamp（前置放大器）	A/D Chan	1	3
Main Amp（主放大器）	A/D Chan	0	2
	D/A Chan	0	1

表 1 前置放大器和主放大器通道设置

这时电极和参比电极都在校正液 1 (Solution 1) 中，观察“tip”读数，若变化不大（ ± 1 mV），即可点击“Solution 1”按钮，读取校正液 1 的电压读数。如读数波动明显，或稳定时间过长（大于 10 分钟），则需要对可能影响校正值的因素进行逐一排查；

d) 将参比电极取出，用去离子水冲洗干净；

e) 将电极和参比电极换到校正液 2 (Solution 2) 中，同样点击“Solution 2”按钮，读取校正液 2 的电压读数，如需三点校正，校正液 3 (Solution 3) 的操作相同；

f) 此时界面中便获得了 Nernst Slope (斜率) 和 intercept (截距) 的数值，如果 Nernst Slope (斜率) 在正常范围内（请见 3.1），点击“OK”，保存此校正结果。

注意：

(1) 校正液的配制一定要精确，且要灭菌保存，否则校正结果易有偏差。

(2) 设计校正液时，要把所有含有待测离子的成分都算在内，如待测离子为 Cl^- ，校正液中如同时有 KCl 和 NaCl 成分，那么校正液中 Cl^- 的浓度应为两种成分中 Cl^- 浓度的总和。

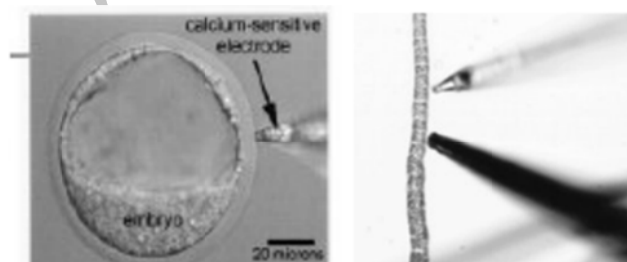
(3) 校正液如需调节 pH，注意不要使用含有待测离子的化学试剂来调节，否则待测离子难以定量，该校正液无法使用。

(4) 第一次校正时，当读取 solution 1 的电压数据后，如果 solution 2 中没有数据，solution 1 的数据无法保存，需先点击“solution 2”，任意读取一个电压数据后，才能保存。

4. 样品固定及观察

将样品固定于培养皿中，使之不受干扰与移动。通常组织样品可以用机械方法固定；单细胞如贴壁生长则无需再次固定，如悬浮生长可使用多聚赖氨酸固定或显微操作方法固定。

加入适量测试液，使液面没过样品 5mm。将培养皿置于显微镜视野下，打开显微成像装置，先在低倍镜下找到样品，然后调整到合适的放大倍数，使样品可以在显示器适中显示。如微电极位于右侧，则样品稍偏左可以更加方便实验，反之亦然。



5. 微电极定位

5.1 手动调节

- 1) 首先，调整前置放大器角度，在肉眼观察下微电极接近样品上方，通过滑块（图 2.23）降低前置放大器的位置使微电极没入溶液中；
- 2) 手动调整驱动器的旋钮，配合滑块的调整，先在低倍镜下寻找微电极；
- 3) 当微电极接近视野中央后，切换显微镜物镜镜头，调整到合适的放大倍数；
- 4) 当显示器上可以看到微电极尖端时，即可关闭屏蔽罩，利用 ASET 软件中的微电极位置调节功能使其接近待测点。

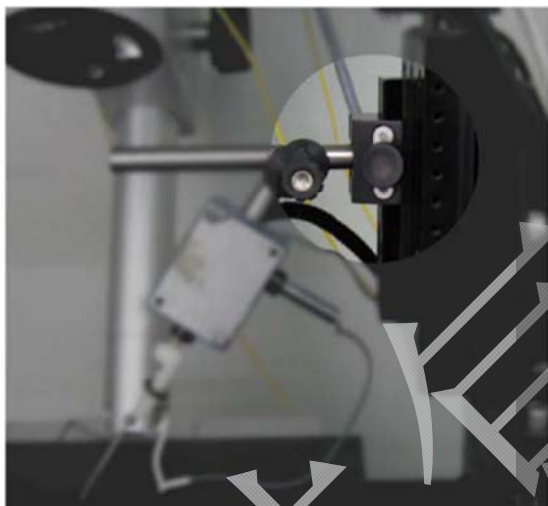


图2.23 连接位移传递架和前置放大器的滑块

手动调节注意事项：

- (1) 手动调节时，务必确认控制面板上的 Motion（电机运动）控制杆已拨至 Disable（关），否则易造成驱动器损坏。
- (2) 开始控制电极运动和定位前，首先要确认位移传递架处于螺杆中间位置，以便留出充分的移动空间。
- (3) 进行双电极测试时，注意避免前置放大器碰到其它物体，而破坏双电极之间的固定间距。

5.2 运动控制栏简介

启动 ASET 软件后，查看屏幕左边运动控制栏界面（图 2.24），本窗口的惯例是按钮按下时执行其显示的功能，以下介绍常用的几项内容：

将运动控制栏 Sensivity（灵敏度）区域的 $\mu\text{m}/\text{Keyhit}$ （微米/键）格，调整在 100 左右；

Probe（微电极）区域 X、Y、Z、W 下分别对应电极各轴向的坐标，点击各轴向的“Zero”键，可以将坐标归零。

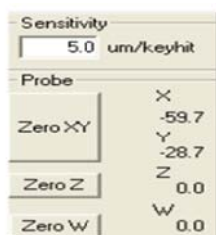


图 2.24 ASET 软件界面- 运动控制栏

5.3 键盘操作

在显微镜下找到微电极后，可切换到监视器，控制面板上的 Motion（电机运动）控制杆拨至 Enable（开）后，即可通过键盘控制微电极运动和定位：

- 1) 左右上下四个方向键来分别控制微电极沿 X、Y 方向运动。
- 2) 通过 Home/End 键控制微电极沿 Z 方向运动。
- 3) 如果安装了电机控制焦距系统，Page up/Page down 键用来控制焦距上下移动（W 方向）。
- 4) 每按一下方向键，微电极移动的距离由 Sensivity 设定，这个数值既可以在“ $\mu\text{m}/\text{Keykit}$ ”格里直接输入，也可以用小键盘的+/-键来加倍或者减半。

注意：

- (1) 当使用键盘输入文本时，避免使用键盘方向键，否则程序会理解为控制电极运动，极易造成电极损坏。上述警告适用于整个程序一切界面的文字或数字输入，包括后面会提到的 Watch 模式。
- (2) 尽量避免用键盘控制电极长距离运动，以防位移传递架达到螺杆末端，损耗驱动器。
- (3) 在不碰触样品的前提下，尽量靠近样品，尽量和样品保持在一个电极直径的距离内。

6. 开始测量

当电极经过校正，定位于待测样品的待测位点后，即可开始测量。以下软件功能经常会用到：

“Log Entry”：点击 Edit-Log Entry 或工具栏中的“文件夹”并输入文字，为实验方案做记录，这一功能键在“Watch”界面也可方便的使用。

6.1 特定采样规则的测量模式

当需要读取电压梯度（Voltage Gradient）时，首先针对样品情况设定或选择一个合适的采样规则，“Ion-Molecule”下一般有预先设置的常用采样规则，字母代表维度，数字代表两点间距离（见图 2.25）。如，采样规则“x-10”表示电极沿 X 一个维度测量相距 $10\ \mu\text{m}$ 的两点间的电压梯度；采样规则“xyz-20”表示电极分别沿 X、Y、Z 三个维度测量相距 $20\ \mu\text{m}$ 的两点间电压梯度。

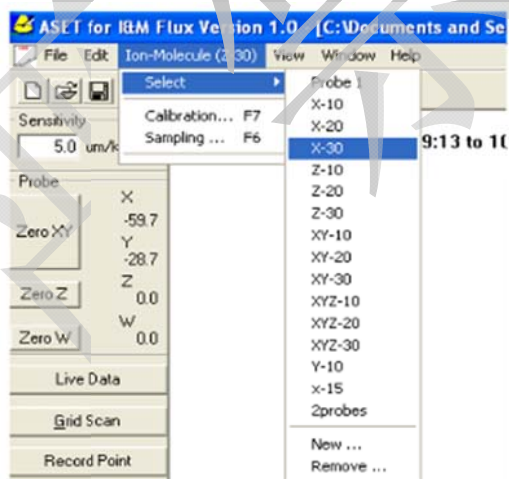


图2.25 采样规则界面

根据样品大小，从 10 选到 30，样品越大相应数值越大

根据需要测定的方向，选择 X、Y、Z、XY.....

选中采用规则后，点击“Ion-Molecule—Sampling”或点击 F6 键，确认采样规则各项设置无误（参考附录 4）。

6.2 实时监测

如需要进行实时监测，选择软件界面左侧的 Live Data 进入观察模式（图 2.26），首先出现如下对话框：



图2.26 ASET 软件界面

按 OK 确定，出现以下窗口：

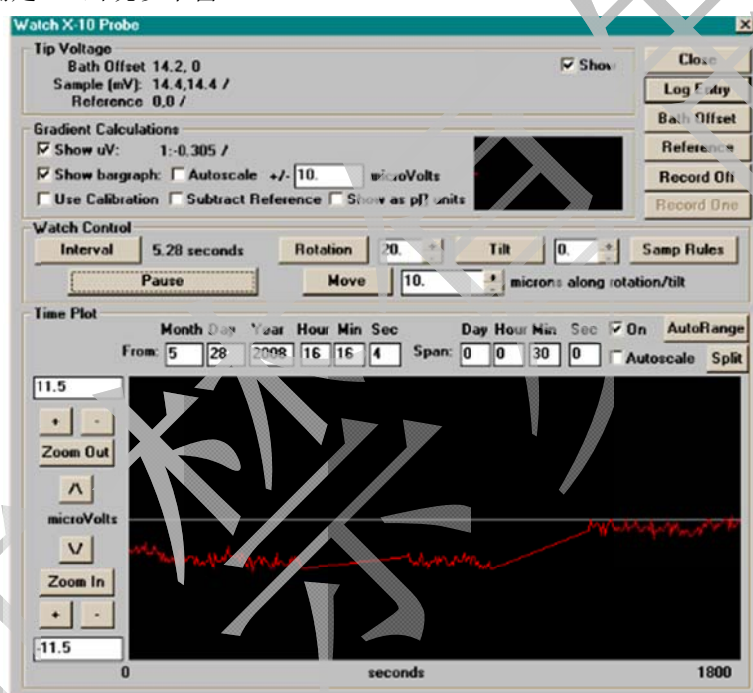


图2.27 ASET 软件界面-观察模式

主要的测量功能可以在该观察模式下实现，对该窗口的使用介绍如下：

- 该窗口中的曲线表示微电极按采样规则测量到的电压梯度（microVolts）随时间的变化。
- “Pause”键可以控制暂停测量，点击后按键变为“Resume”，点击“Resume”可恢复测量。
- “Record”键控制持续记录数据，点击后按键变为“Record Off”；“Record One”则只记录下一个数据。当不点击“Record”或“Record One”时，测量结果会显示在窗口中，但并不记录在文件里。
- “Reference”用于读取背景电压梯度（Voltage Gradient），详见附录 4。
- “Span: Day Hour Min Sec”为窗口显示时间尺度的设置，即横坐标的范围，必须勾选“On”后，窗口中才显示电位值。
- 窗口左侧的输入框和按键（“+”、“-”、“Zoom Out”、“Zoom In”）均为数据显示范围的设置，即纵坐标（Volts）的范围；点击“0”键即可将中轴线回零。
- 右上方的“Join”按钮可将三条曲线合并在一个界面中，同时按钮变为“Split”，可再次

点击恢复为“图 6.62”的模式。

h. “Tip Voltage”中显示微电极测量电压梯度(Voltage Gradient)时所获得的电压值(Voltage), 单位是 mV。

i. “Gradient Calculations”中显示微电极测量到的电压梯度(Voltage Gradient), 单位是 μ V。

j. “Watch Control”中: Interval 为完成一次采用规则测量需要的时间, 即测量频率的倒数; Rotation 和 Tilt 的使用参考附录 5; Samp Rules 的设置参考附录 4。

k. 另外在测量时的暂停状态下也可以点击“Log Entry”添加文字记录。

l. 测量过程中如需要在培养皿中加入药品, 先点击“Pause”暂停, 然后须将微电极移离样品数百微米, 以免打开屏蔽罩时的震动造成微电极或样品的损坏; 加药结束后回到原测量点, 点击“Resume”继续测量; 如有需要应在暂停期间点击“Log Entry”添加 Log 文字。

注意:

(1) 当有必要时, 可以测量背景梯度以去除背景电位的影响。注意在背景中的同一位置读取背景梯度, 然后减去背景梯度。

(2) 当你使用一个新电极, 或是一天的第一次使用, 可能会遇到增强的噪音和瞬时人工信号。如果电极是好的, 只要让电极在介质中运行一个 Sample Rules 路线几分钟, 它就会稳定下来。如果半个小时后还未稳定, 请更换一支新电极。

6.3 扫描测量

软件具有自动扫描功能, 这种“栅格”扫描可以根据需要扫描一个大区域内的任意多个点, 并可根据需要进行多次扫描。

栅格扫描 Grid Scan

a. 点击“Scan”, 进入次级菜单“Grid”。

b. 点击“Show”或“Move To”给出扫描起点。

c. 点击“END”然后点击“Show”和“Move To”给出终点。

d. 定义 X, Y, Z, W 方向的步幅。例: 3 3 1 1 表示 3 个 X 点、3 Y 点、1 Z 点和 1 W 点 (3x3x1x1 栅格)。

e. 选择“Save (ion)”并将选框中的离子靠近它。

f. 确保“Start Time (开始时间)”比扫描时间长。

g. 点击“OK”, 开始扫描。

矢量扫描

支持用户在选定的连续路线中挑出任意点。这种扫描也可根据需要挑出多个点, 并可自动重复多次。对于不规则形状样品, 十分便捷。

扫描测量注意事项:

(1) 采样规则路线和扫描路线不同, 采样规则路线将在一次扫描中的每个点分别执行, 或者在进行测量的每一个点和每一个背景梯度上分别执行。

(2) 设置扫描时, 确保每一次扫描持续时间不要超过“Start every”时间。点击“Cal”计算和完成一次扫描的时间, 如有必要, 改变“Start every”的时间。

(3) 当扫描时, 会有一个“Terminate Scan”次级菜单出现。但只有处于复合扫描的两个扫描之间时(没有运动或收集数据), 这个操作才有效。

(4) 进行栅格扫描(Grid Scan)需至少设定一个点。

(5) 使用栅格扫描(Grid Scan), 在设置“show origin”选项时, 调整 X、Y 坐标为 0 后, 切记把 W、Z 的值清零; 设置取样平面时, 注意起始的坐标点, 避免电极碰到样品。

(6) 栅格扫描(Grid Scan)扫描离子源外围 xyz 轴的空间点, 扫描区域为至少 3×3×3 个点的正方

9. 附录

离子选择性微电极组成

1. 离子选择性微电极组成

项目 离子	灌充液/介质成分	玻璃微电极型号	离子交换剂	LIX 灌充 长度 (μm)
H^+	15 mM NaCl + 40mM KH_2PO_4 (pH 7.0)	XY-H-01(H^+)	XY-SJ-H	35-50
Ca^{2+}	100 mM CaCl_2	XY-Ca-02(Ca^{2+})	XY-SJ-Ca	35-50
K^+	100 mM KCl	XY-K-03(K^+)	XY-SJ-K	180
Na^+	250 mM NaCl	XY-Na-04(Na^+)	XY-SJ-Na	35-50
Cl^-	100 mM KCl	XY-Cl-05(Cl^-)	XY-SJ-Cl	35-50
NH_4^+	100 mM NH_4Cl	XY-NH ₄ -06(NH_4^+)	XY-SJ-NH ₄	35-50
NO_3^-	10 mM KNO_3	XY-NO ₃ -07(NO_3^-)	XY-SJ-NO ₃	35-50
Cd^{2+}	10mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2+0.1\text{mM KCl}$	XY-Cd-08(Cd^{2+})	XY-SJ-Cd	35-50
Mg^{2+}	500mM MgCl_2	XY-Mg-09(Mg^{2+})	XY-SJ-Mg	35-50