



Methodenpraktikum WS 2007/2008 Messtechnikeinführung

Wolfgang Stein | WS 2007/2008 | Intrazelluläre Ableitmethoden.

© Wolfgang Stein 2007, Institut für Neurobiologie, Universität Ulm, www.neurobio.de
www.neurobiologie.de



Allgemeines

Klassische intrazelluläre Ableitung

Dynamic Clamp Ableitung

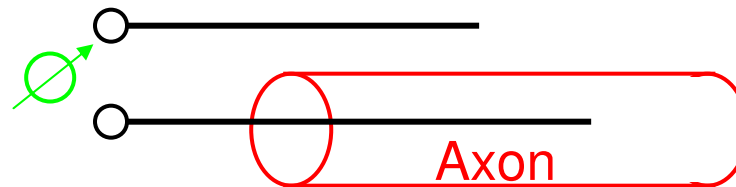
Patch-Clamp Ableitung

Allgemeines

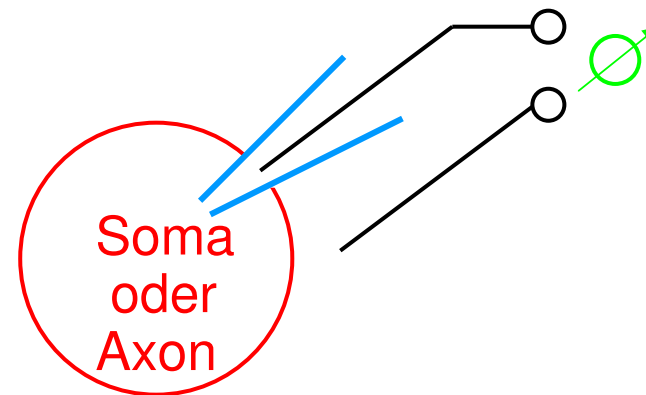
Klassische intrazelluläre Ableitung

Zugang zum Inneren einer Nervenzelle durch

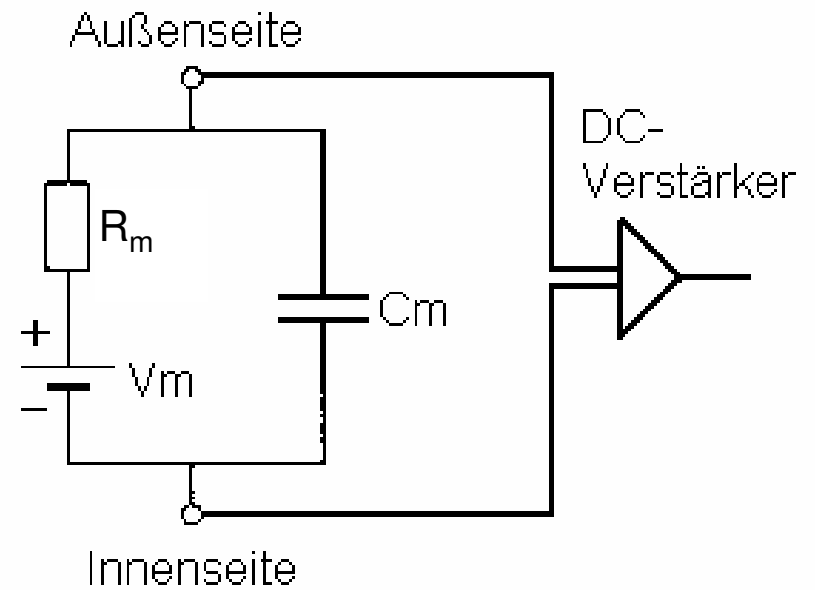
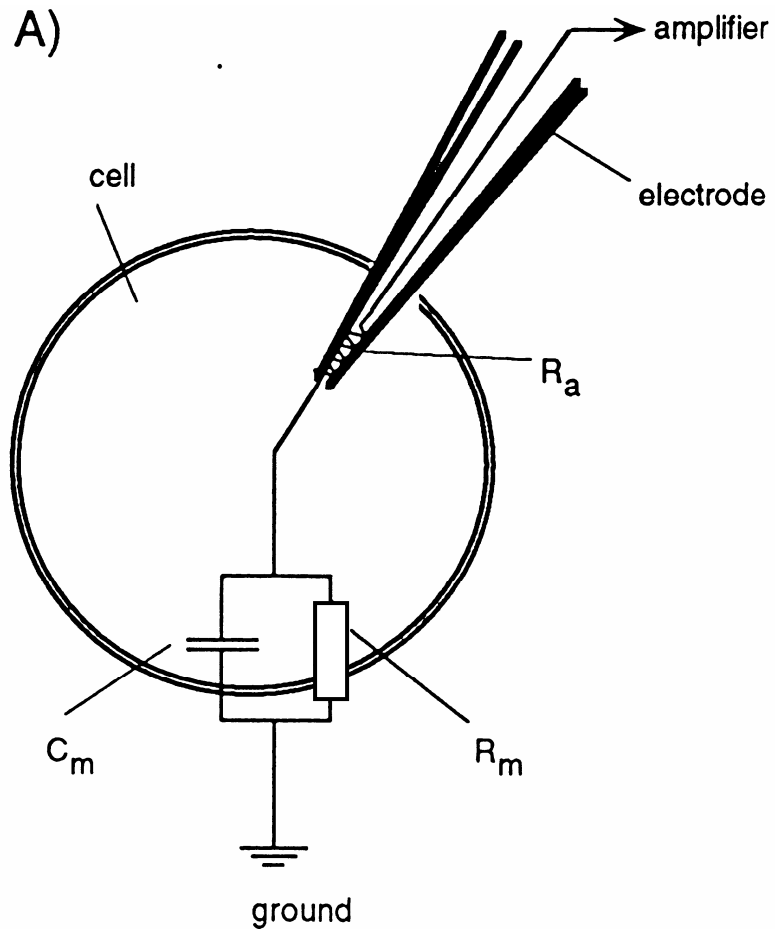
Draht



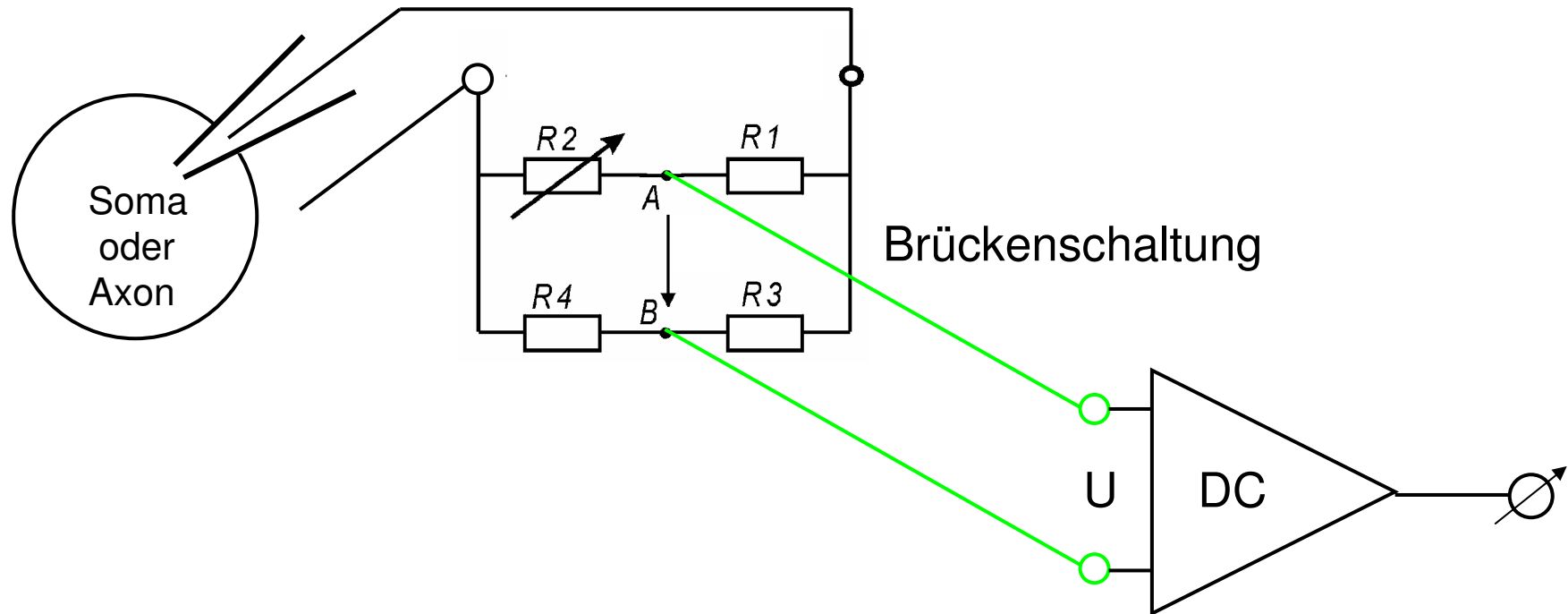
Glasmikroelektrode



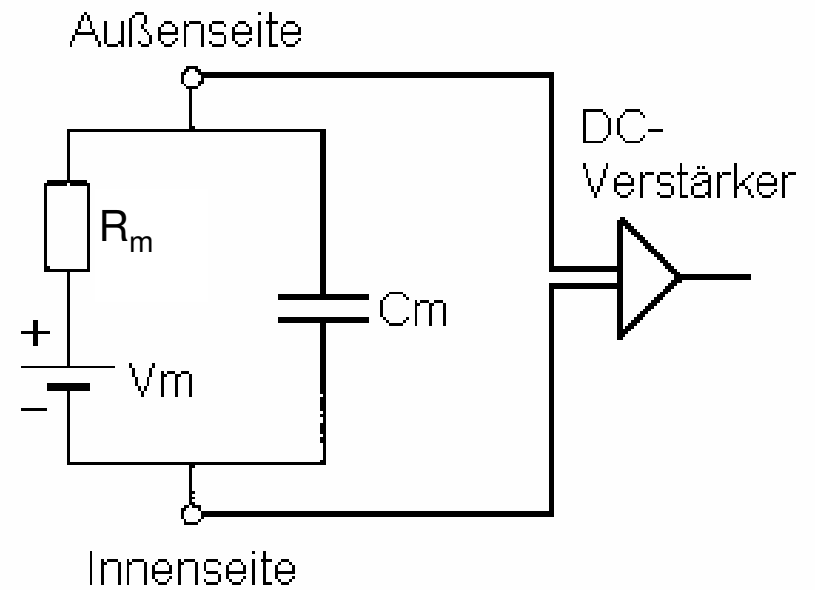
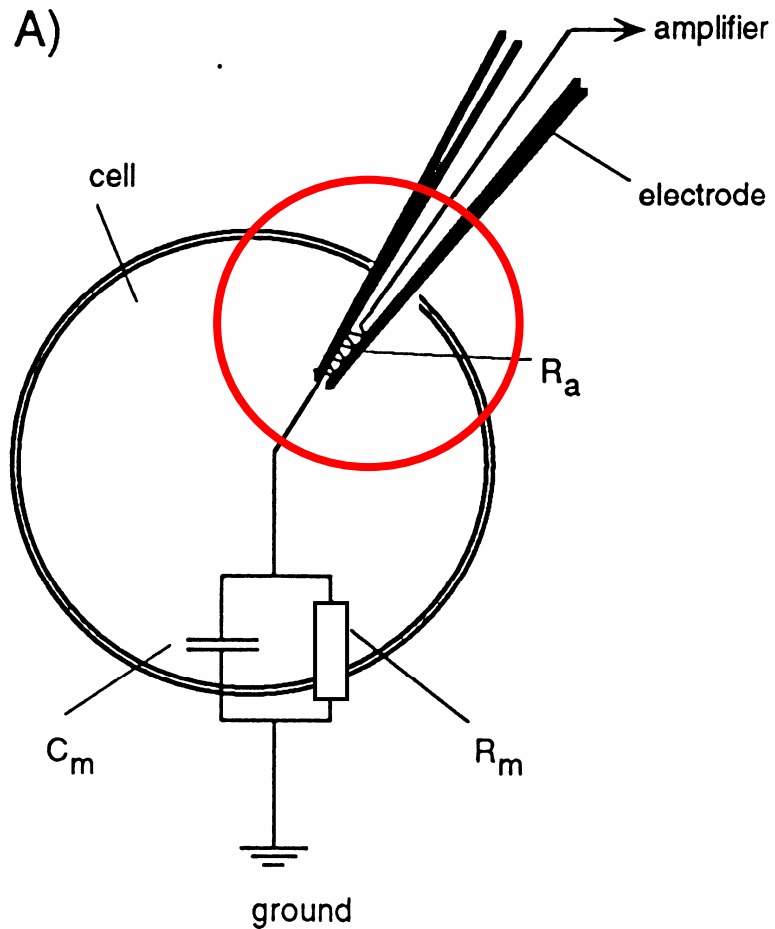
Klassische intrazelluläre Ableitung



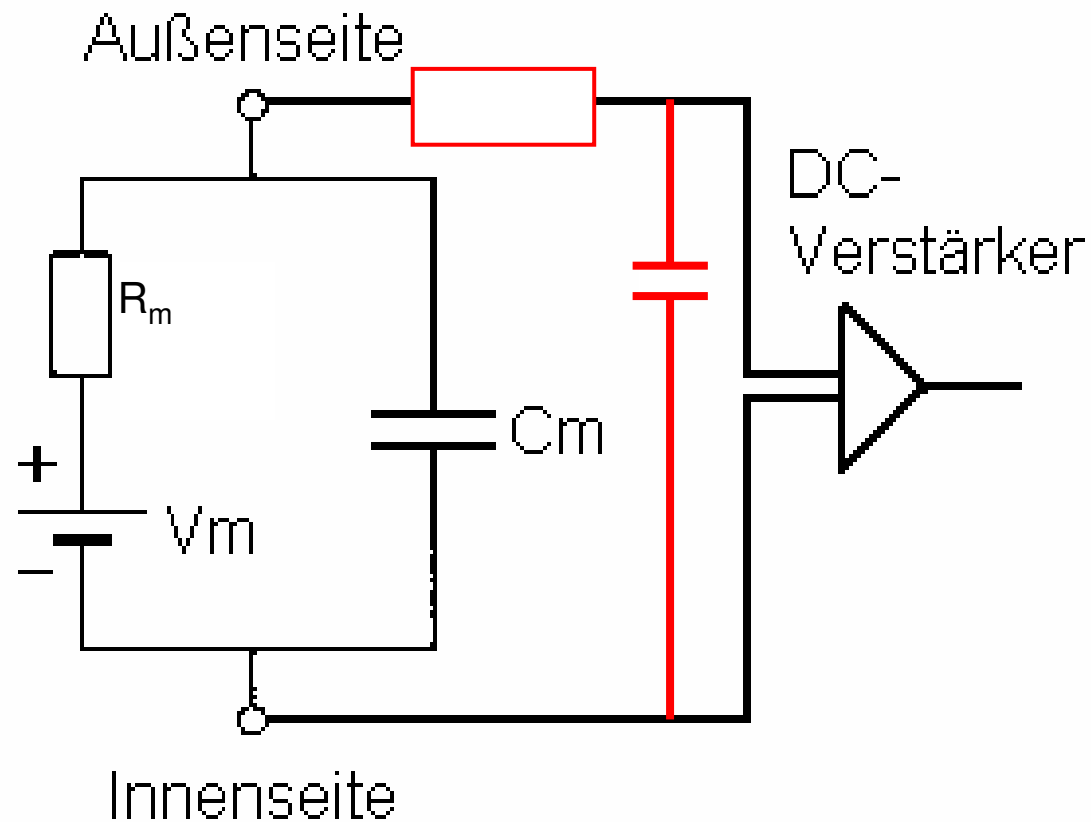
Klassische intrazelluläre Ableitung



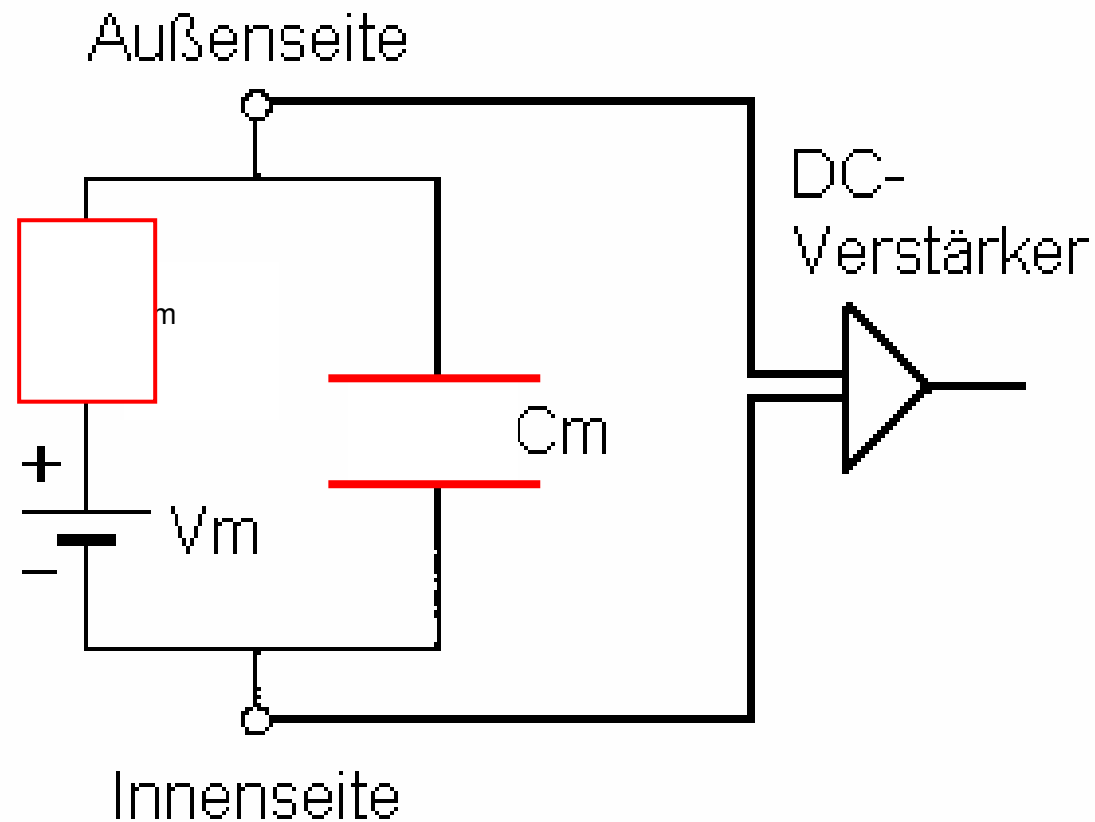
Klassische intrazelluläre Ableitung



Klassische intrazelluläre Ableitung

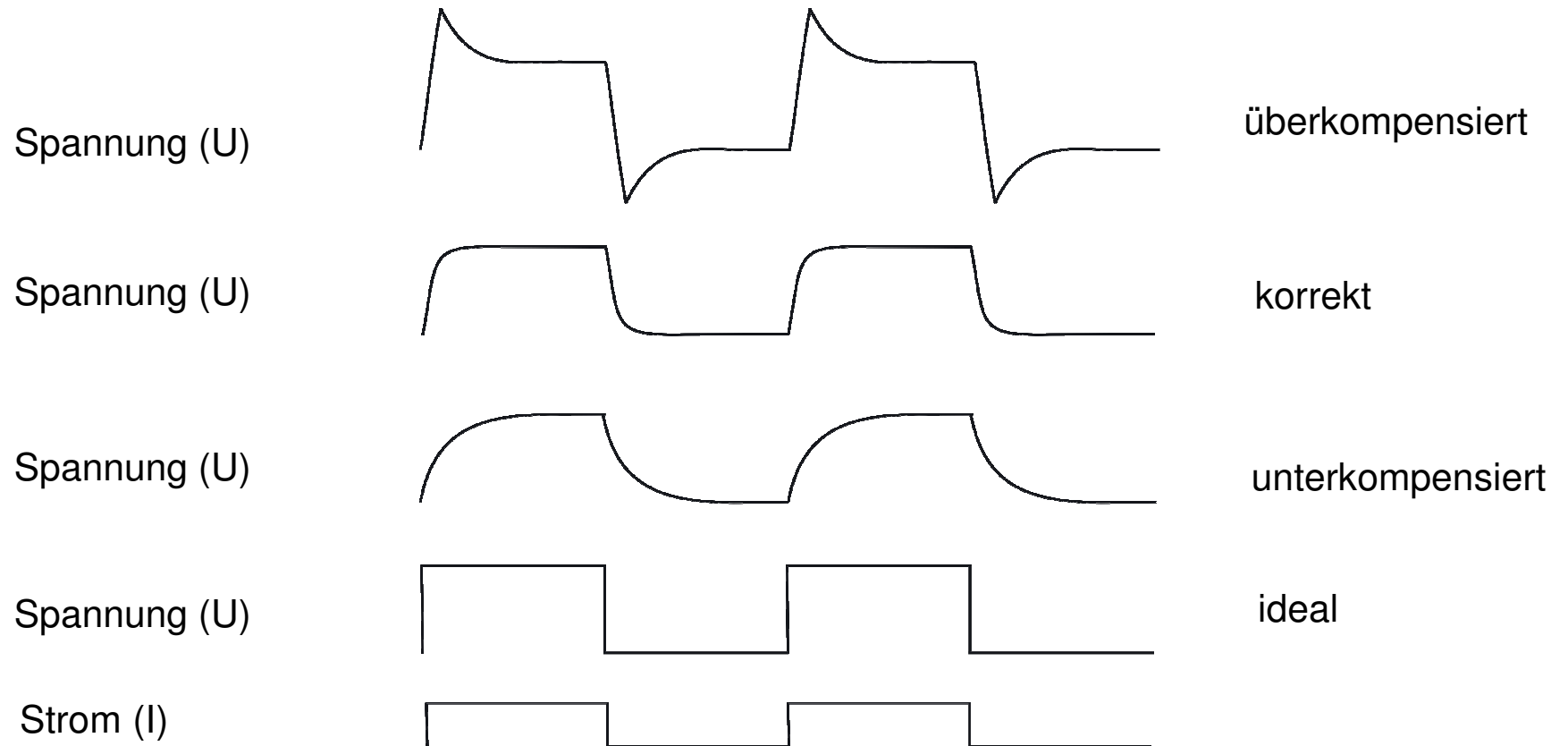


Klassische intrazelluläre Ableitung



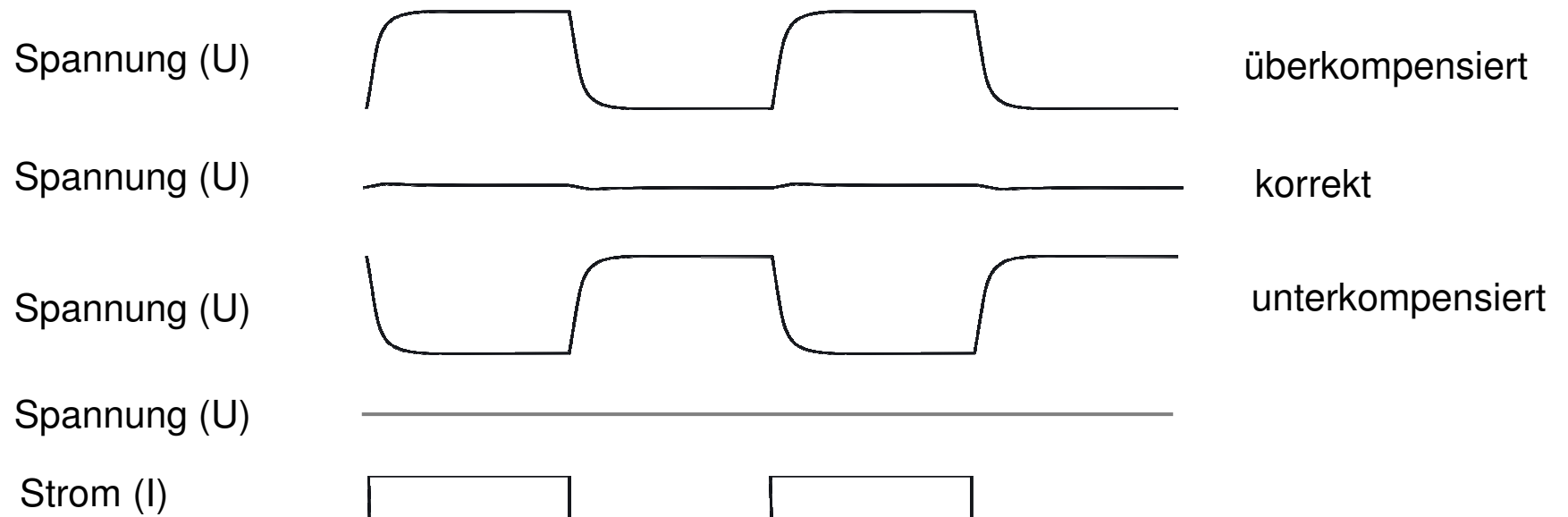
Klassische intrazelluläre Ableitung

Kapazitätsabgleich

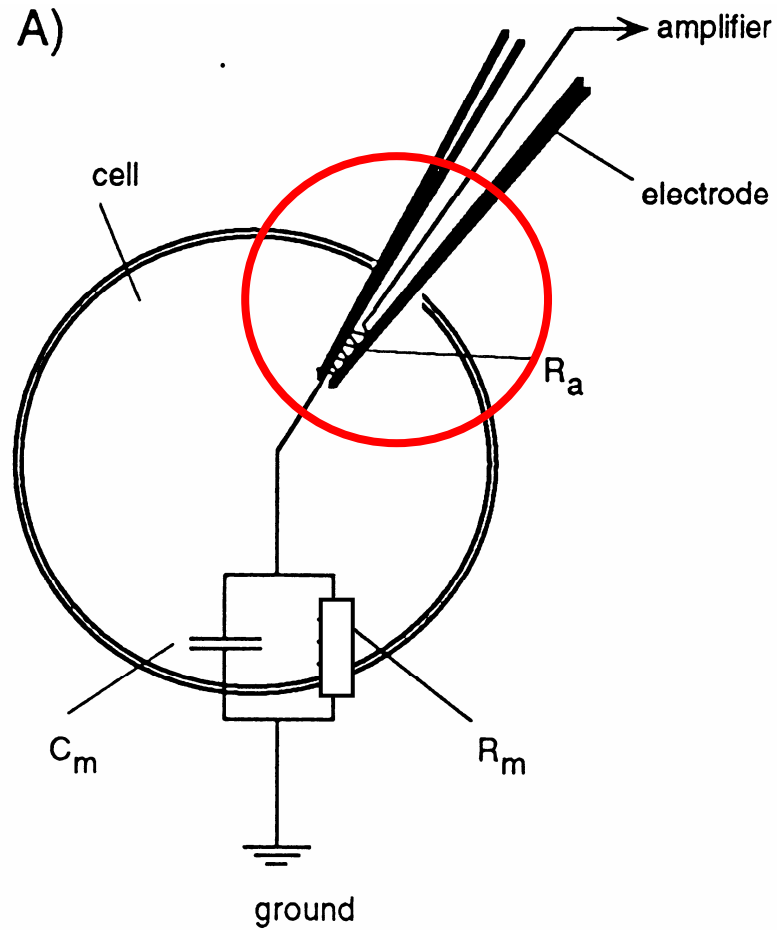


Klassische intrazelluläre Ableitung

Brückenabgleich (außerhalb der Zelle)



Klassische intrazelluläre Ableitung





Glasmikroelektroden (differente Elektrode)

Öffnung im μm Bereich

Widerstände zwischen 5 und 100 $\text{M}\Omega$

Referenzelektroden (indifferente Elektrode)

nichtpolarisierbare Metalldrähte z.B. Ag/AgCl Drähte

(bei unedlen Metallen lösen sich negative Ionen im Wasser und die Elektrode depolarisiert. Je unedler, desto stärker polarisiert die Elektrode. Effekt verstärkt sich bei Strominjektion über diese Elektrode).



Messung des Membranpotentials V_m

Das Membranpotential einer Zelle kann aus der Goldman-Gleichung errechnet werden (vereinfacht auf 3 Ionentypen):

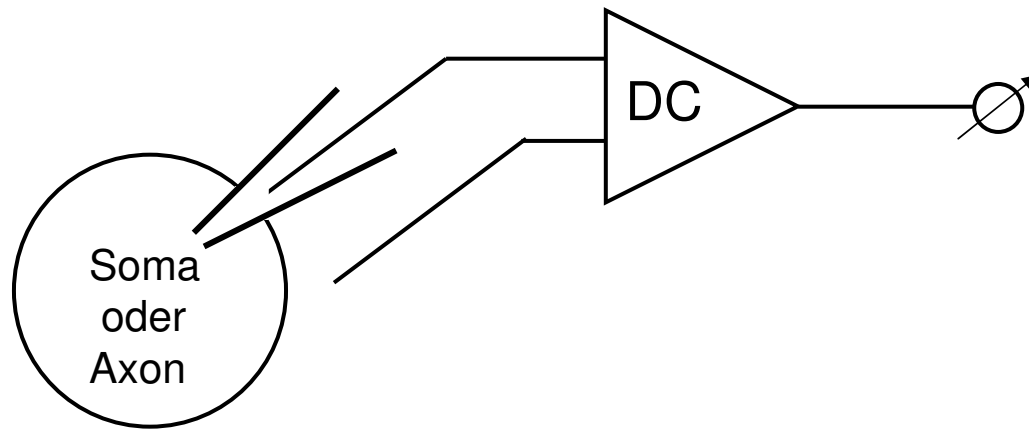
$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} * \ln\left(\frac{PK[K^+]_o + PNa[Na^+]_o + PCl[Cl^-]_i}{PK[K^+]_i + PNa[Na^+]_i + PCl[Cl^-]_o}\right)$$

P stellt dabei die Gesamtpermeabilitäten der jeweiligen Ionen dar. o = außen, i = innen.

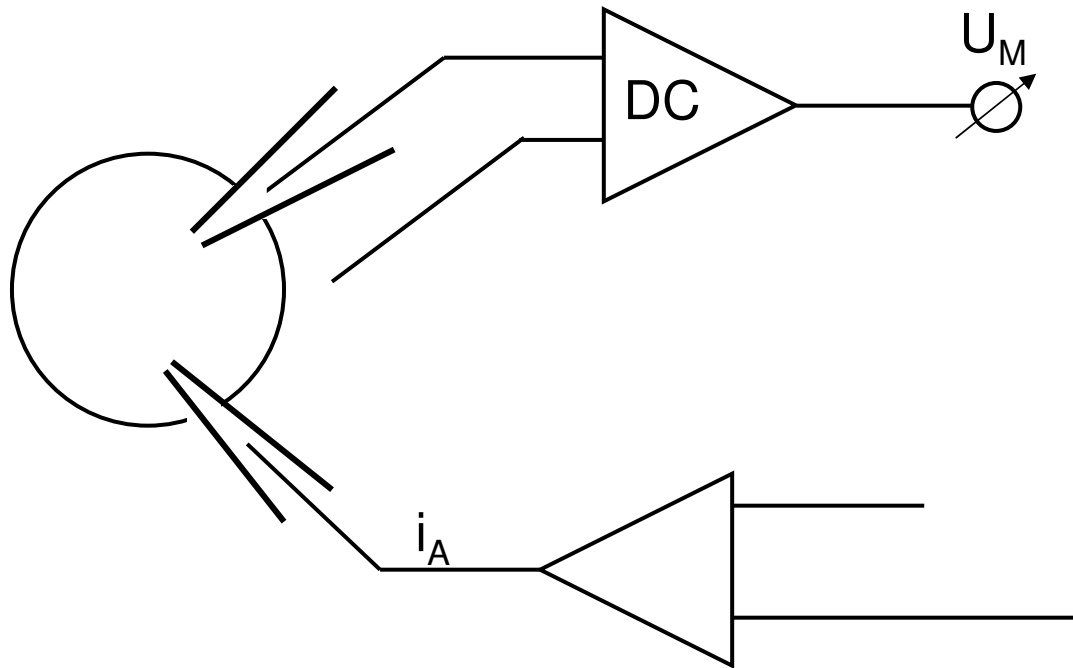
Vereinfacht auf eine Ionenart erhält man die Nernstgleichung, die das Gleichgewichtspotential (E_{ion}) dieses Ions angibt, also das Membranpotential, welches erreicht wird, wenn nur Ionen dieser Art fließen (d.h. dort fließt kein Nettostrom).

$$V_m = E_{ion} = -58mV * \log\left(\frac{[ion]_o}{[ion]_i}\right)$$

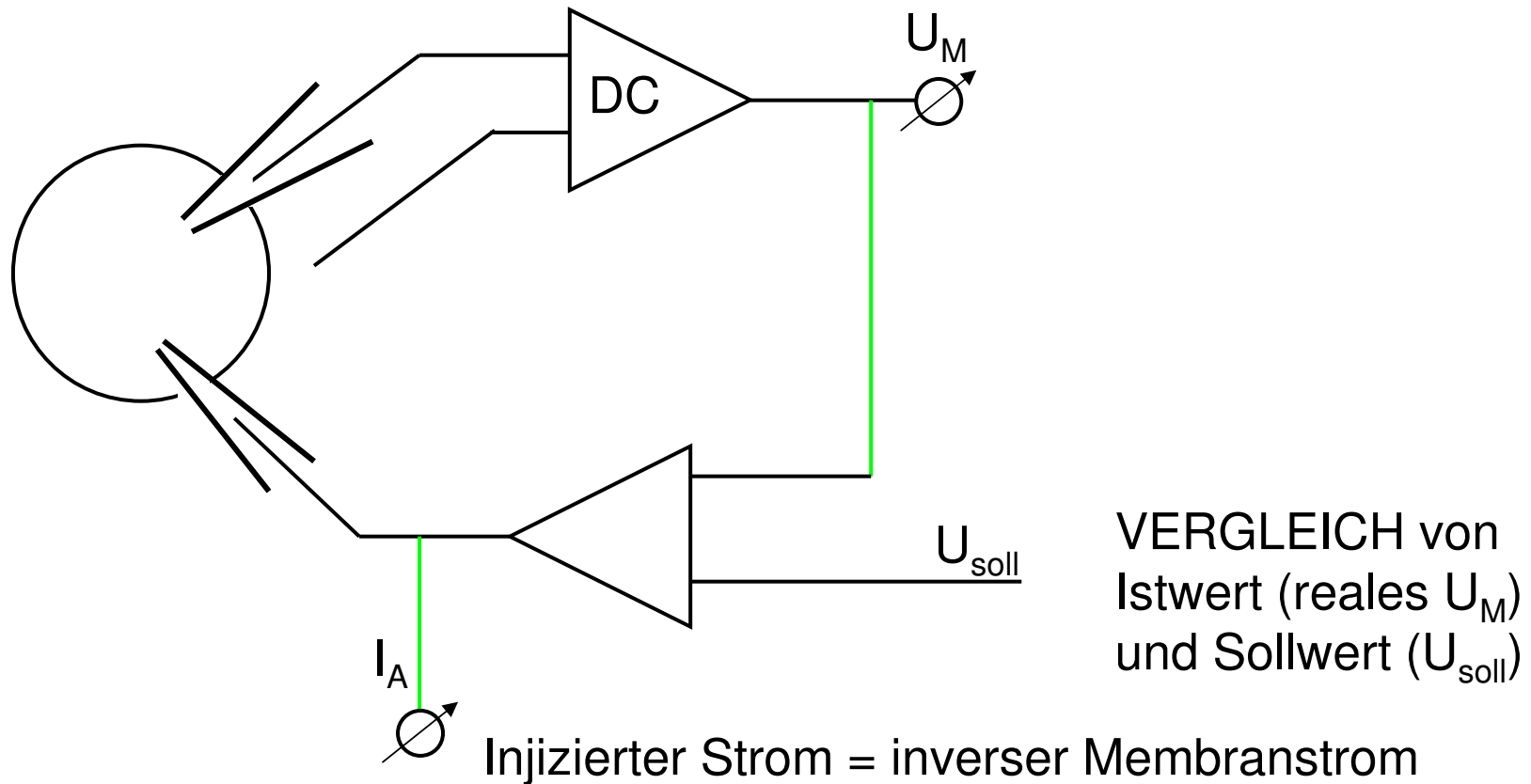
Klassische intrazelluläre Ableitung



2-Elektroden-Ableitung

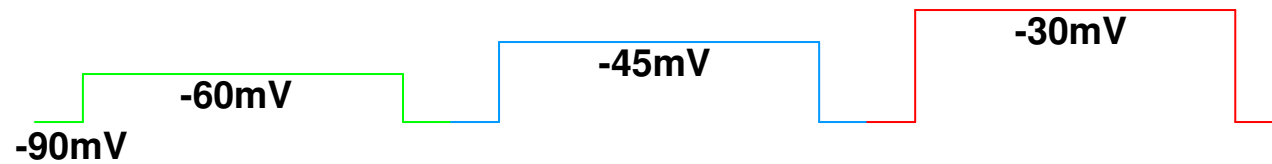
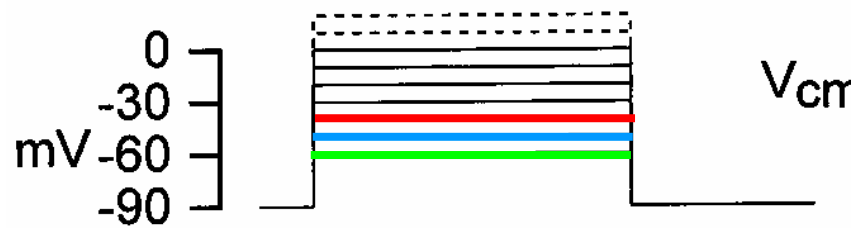


Voltage-Clamp Anordnung

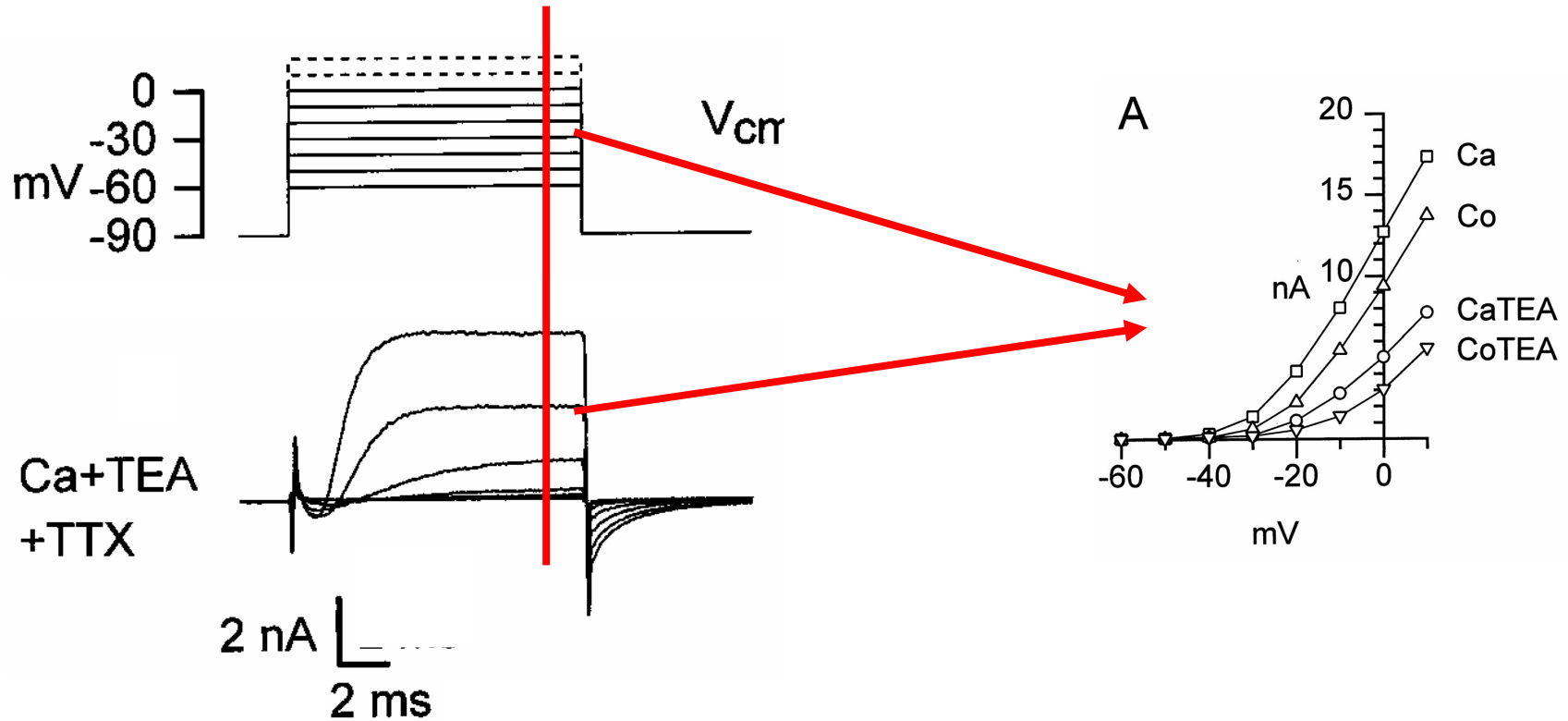


Messung von MembranSTRÖMEN

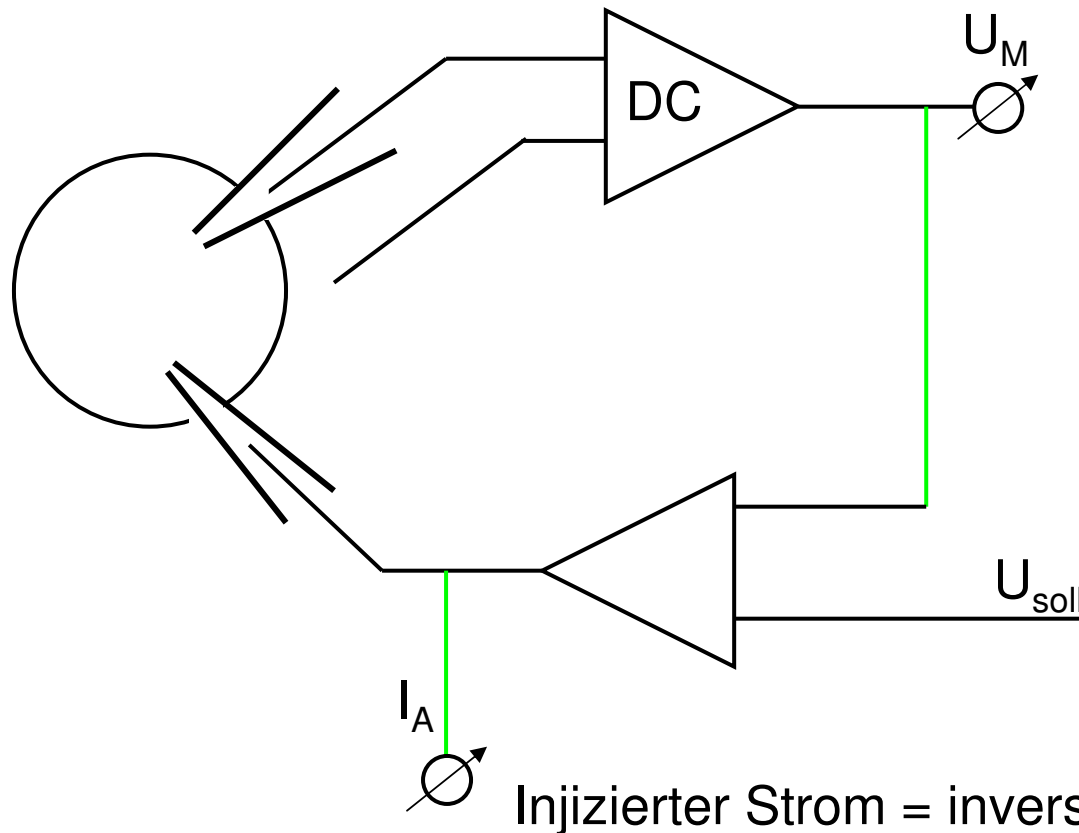
Voltage-Clamp Anordnung



Voltage-Clamp Anordnung



Voltage-Clamp Anordnung



VERGLEICH von
Istwert (reales U_M)
und Sollwert (U_{soll})

Messung von MembranSTRÖMEN

Discontinuous Voltage oder Current Clamp

= Single-Electrode Voltage oder Current Clamp

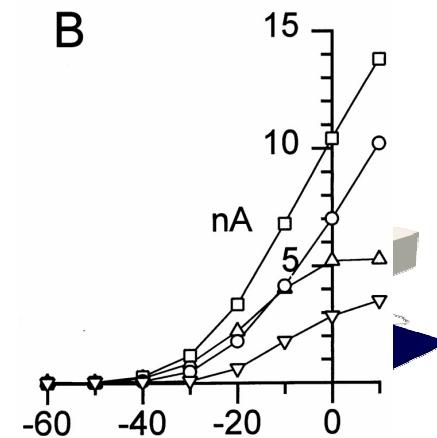
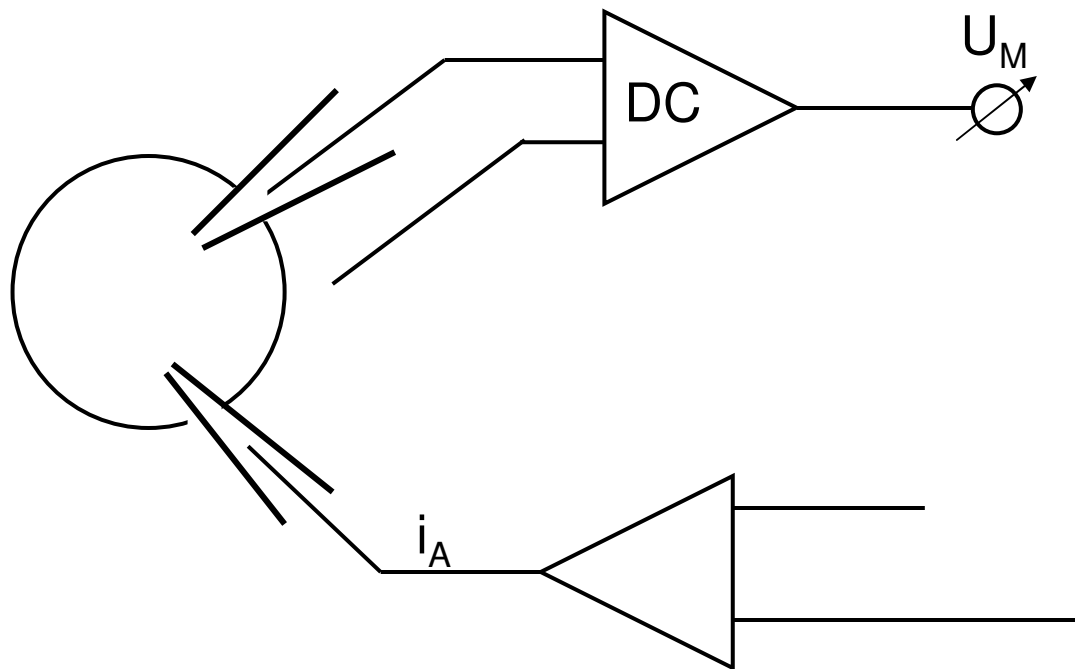
Schnelles Abwechseln zwischen Strom/Spannungsmessung und Strominjektion
(mindestens 1500 mal pro Sekunde = 1,5 kHz)

Elektroden und Verstärker müssen 'tauglich' sein



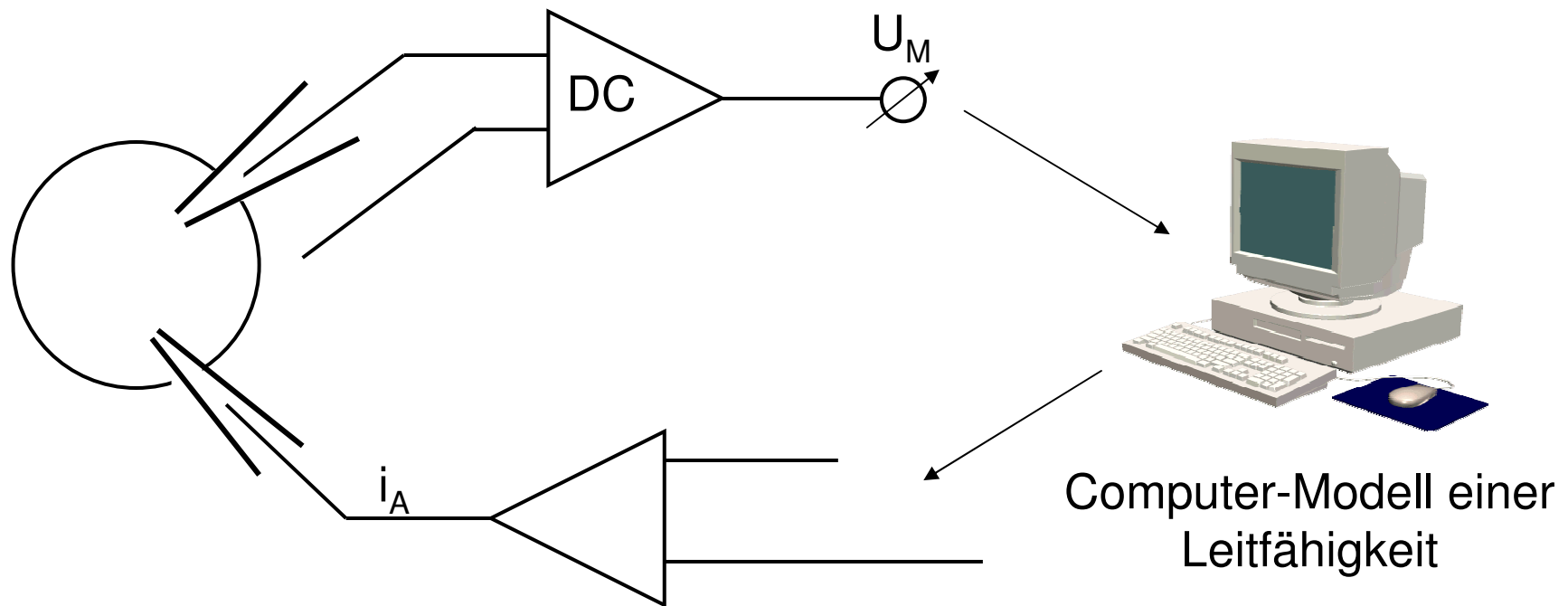
Dynamic clamp

(Einbau von künstlichen Leitfähigkeiten in Neurone)

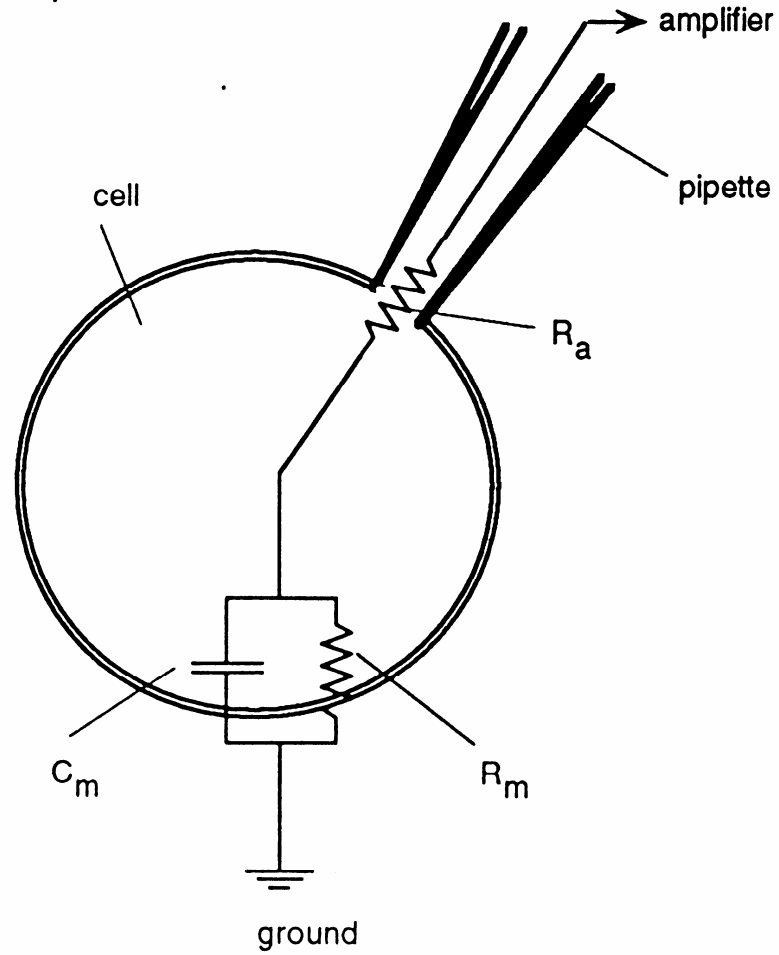


Dynamic clamp

(Einbau von künstlichen Leitfähigkeiten in Neurone)

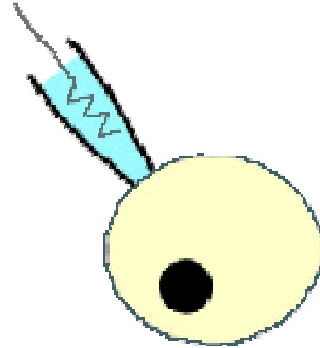


Patch Clamp Anordnung

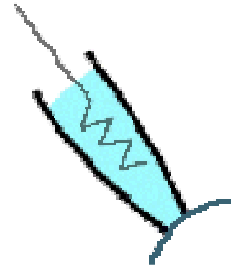


Patch Clamp Anordnung

cell-attached



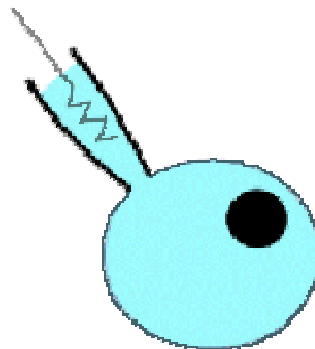
inside-out



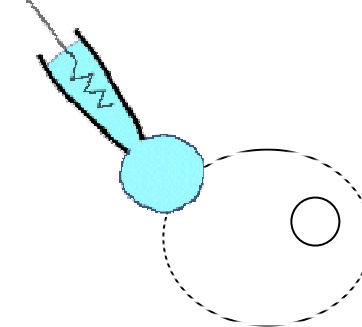
ziehen
→

↓ Unterdruck

whole-cell



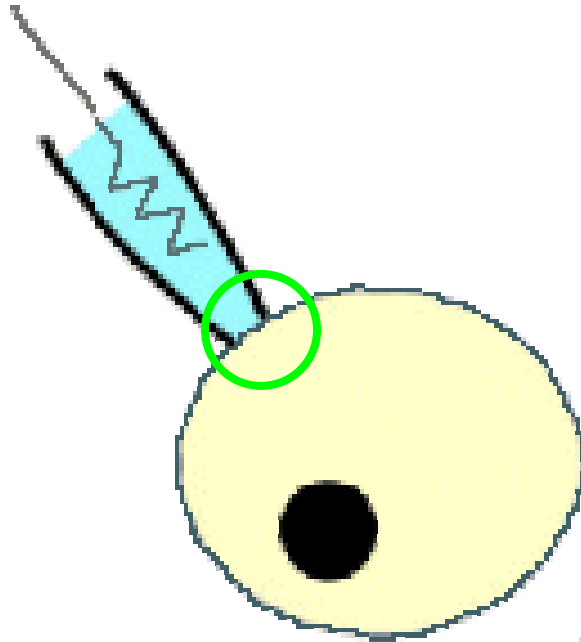
outside-out



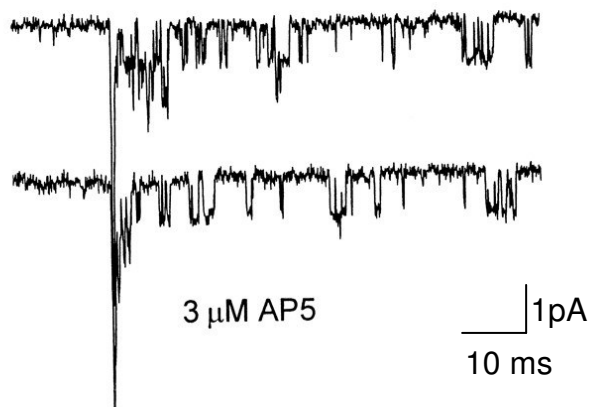
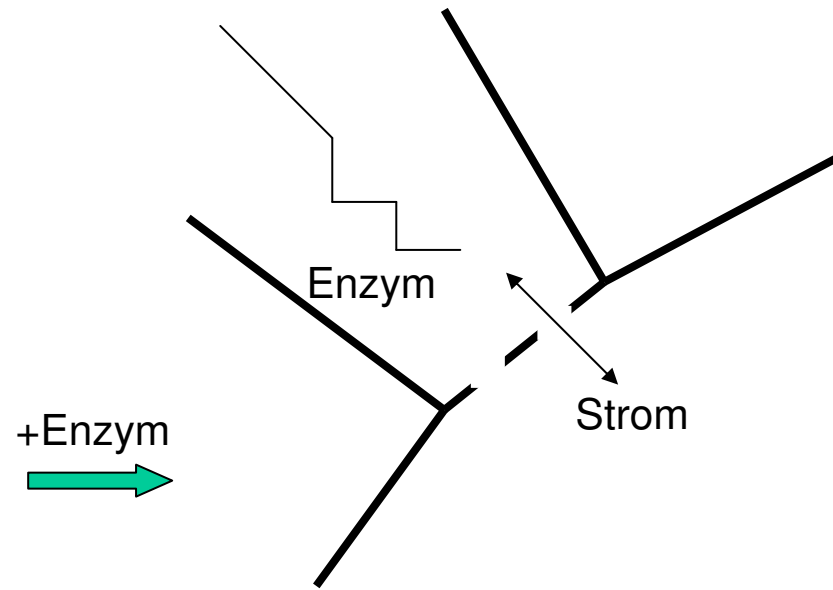
ziehen
→

Patch Clamp Anordnung

cell-attached



perforated patch





Aufzeichnen der Daten

Analog: Tonbandgerät

manche Schreiber

Vorteil: kein Verlust beim Aufzeichnen

Nachteil: Verluste beim Kopieren

Tonbänder sehr anfällig

internes Rauschen

Digital: DAT Rekorder

manche Schreiber

CD / DVD Rekorder

PC Software

manche Tonbandgeräte

Vorteil: kein Verlust beim Kopieren

einfache Datensicherung

einfacher Zugriff

Nachteil: Verluste beim Aufzeichnen

(AD Wandlung)



AD (Analog-Digital) Wandlung

analoges Signal  A/D Wandler  digitales Signal

tritt zu einem Zeitpunkt
auf und besitzt
bestimmten Wert

ordnet jedem Wert eine
diskrete Zahl zu

besteht aus zugeordnetem
X und Y Wert

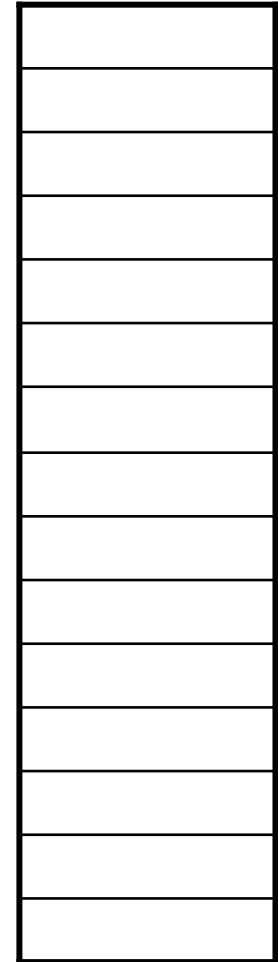
die Aufnahmespanne (Y Wert, z.B. Volt) wird, je
nach BITrate in eine feste Anzahl Punkte aufgeteilt

abhängig von der Samplingrate wird nach einem
Zeitintervall (X Wert, Zeit) das analoge Singal
gemessen und in einen Y Wert umgewandelt.

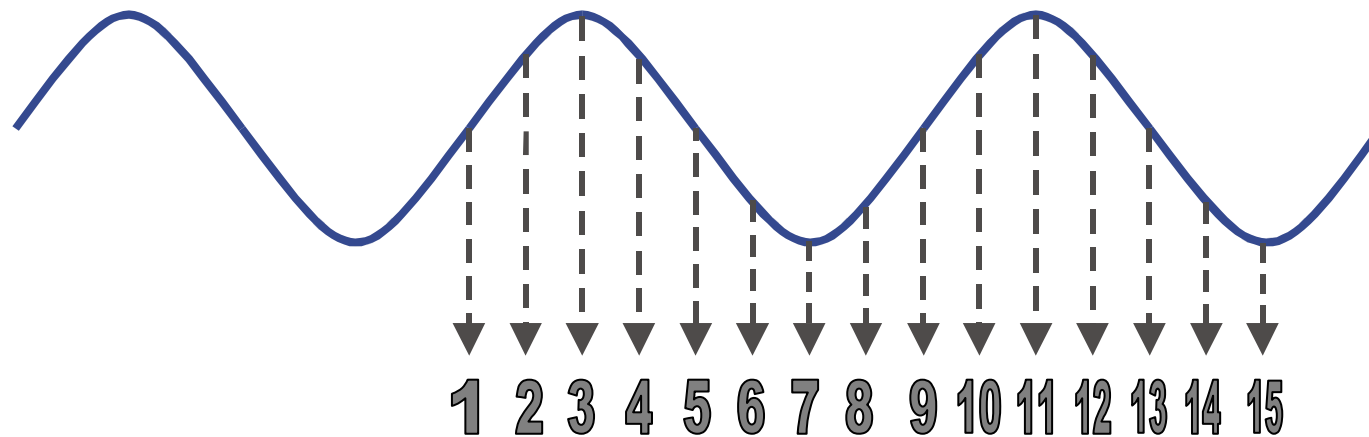
X und Y Wert werden gespeichert

Analog-Digital-Wandler

ein **Analog/Digital-Wandler** ist ein Gerät, das **analoge** Spannungen in diskrete **Bitmuster** (**digitale** Werte) übersetzt, die vom Rechner verarbeitet werden können.



Analog-Digital-Wandler



200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV



Analog-Digital-Wandler

Rekonstruktion des gemessenen Signals

200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV



Analog-Digital-Wandler



200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



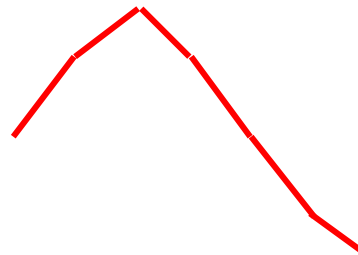
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



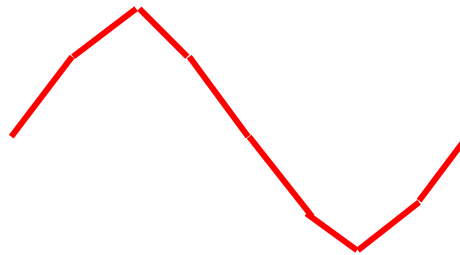
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



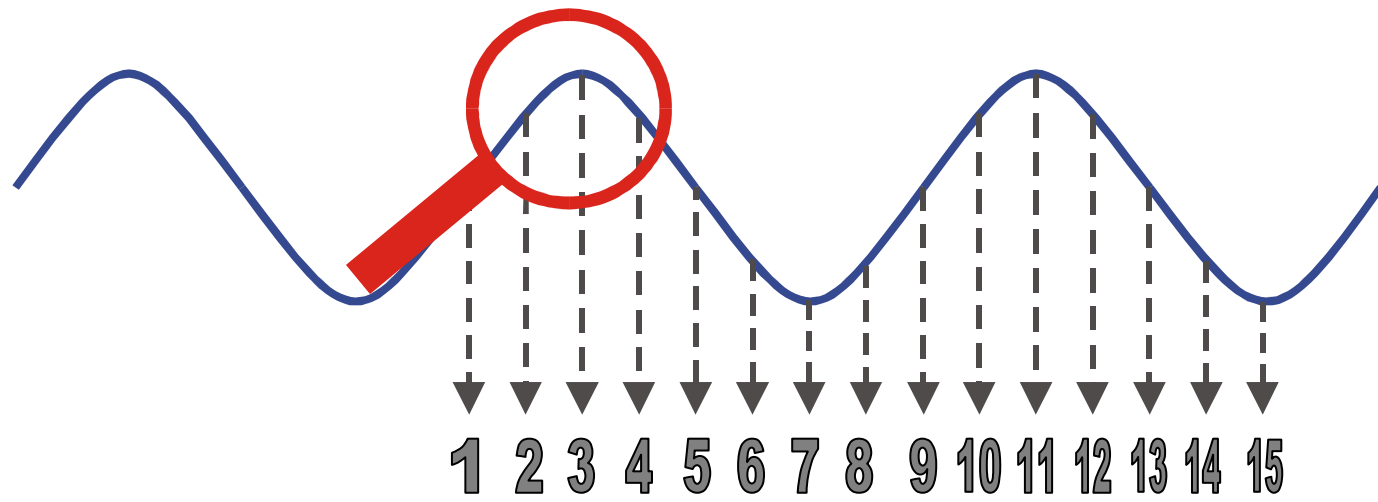
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



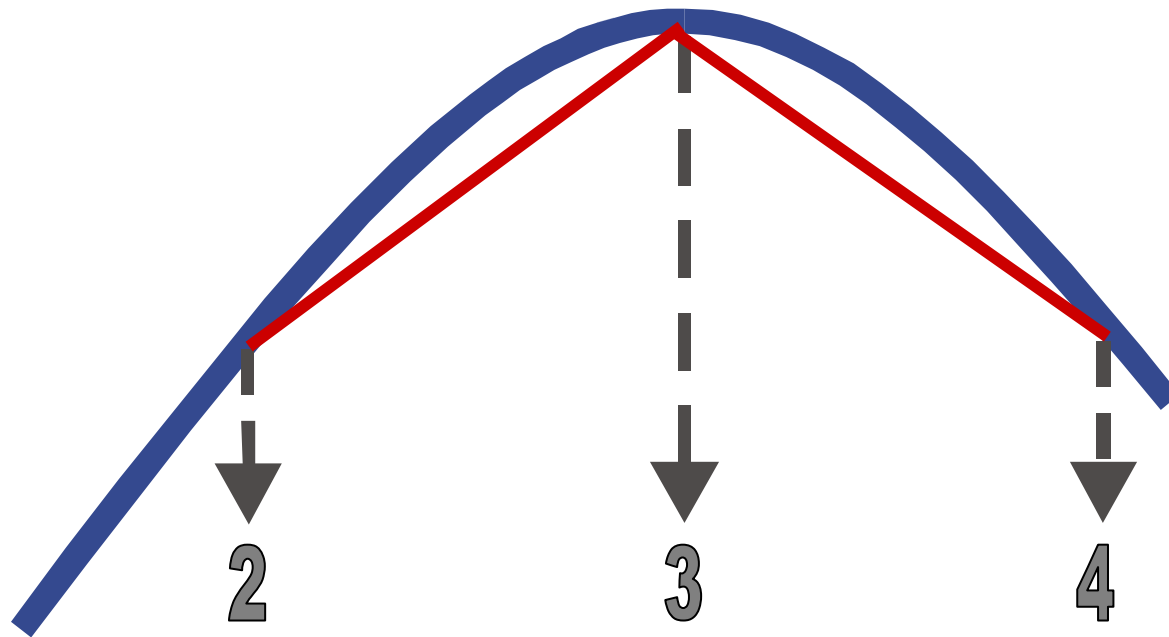
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler



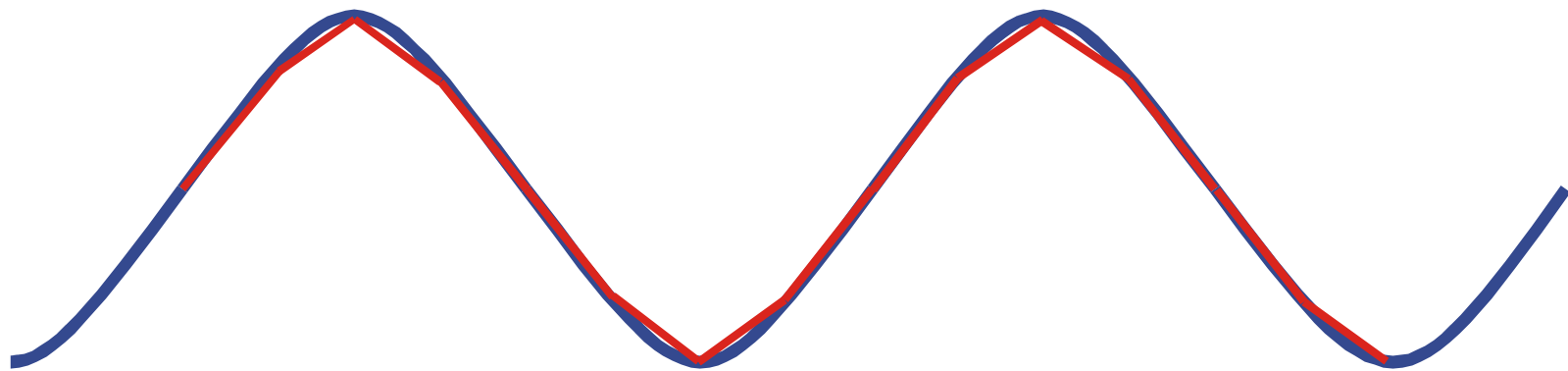
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV
130 mV
200 mV
270 mV
300 mV
270 mV
200 mV
130 mV
100 mV

Analog-Digital-Wandler





Analog-Digital-Wandler

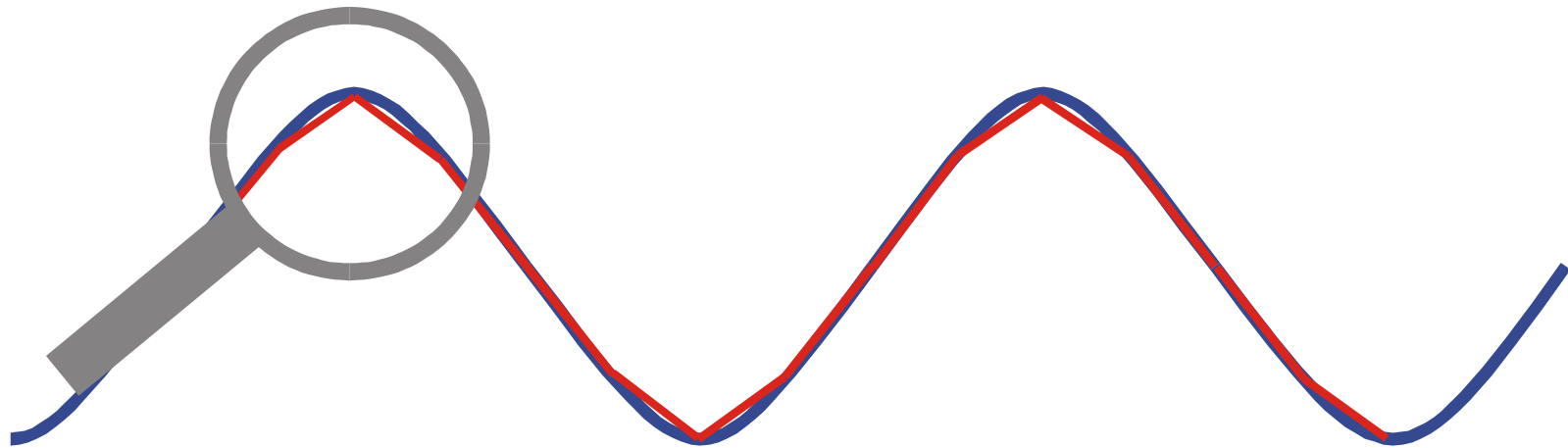




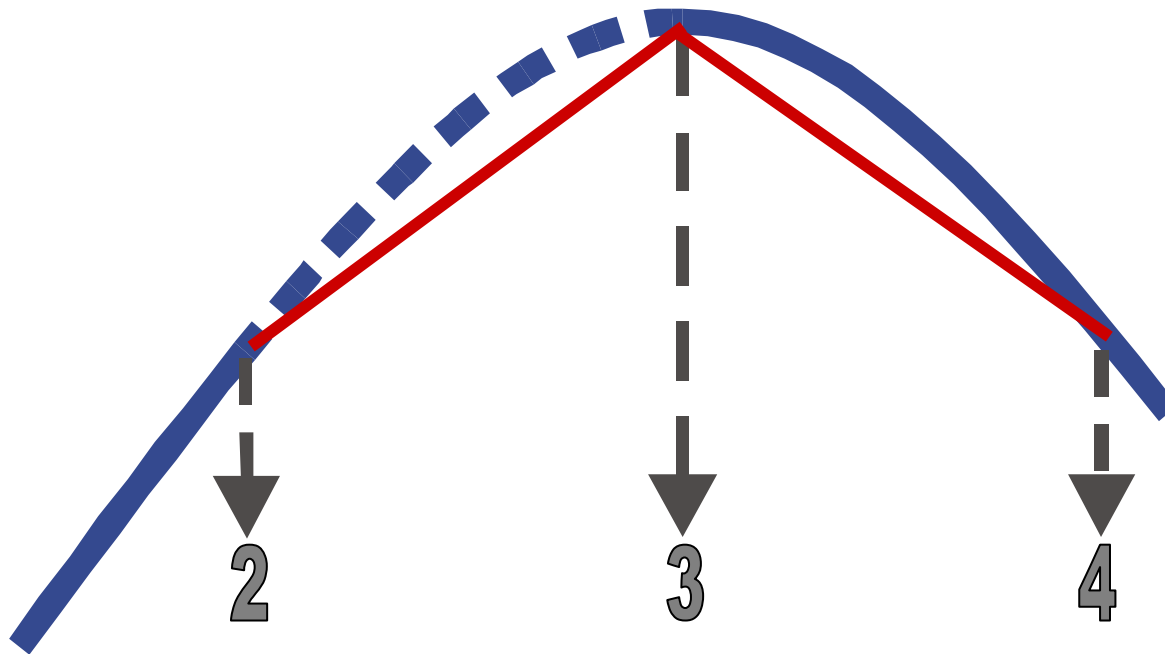
Analog-Digital-Wandler



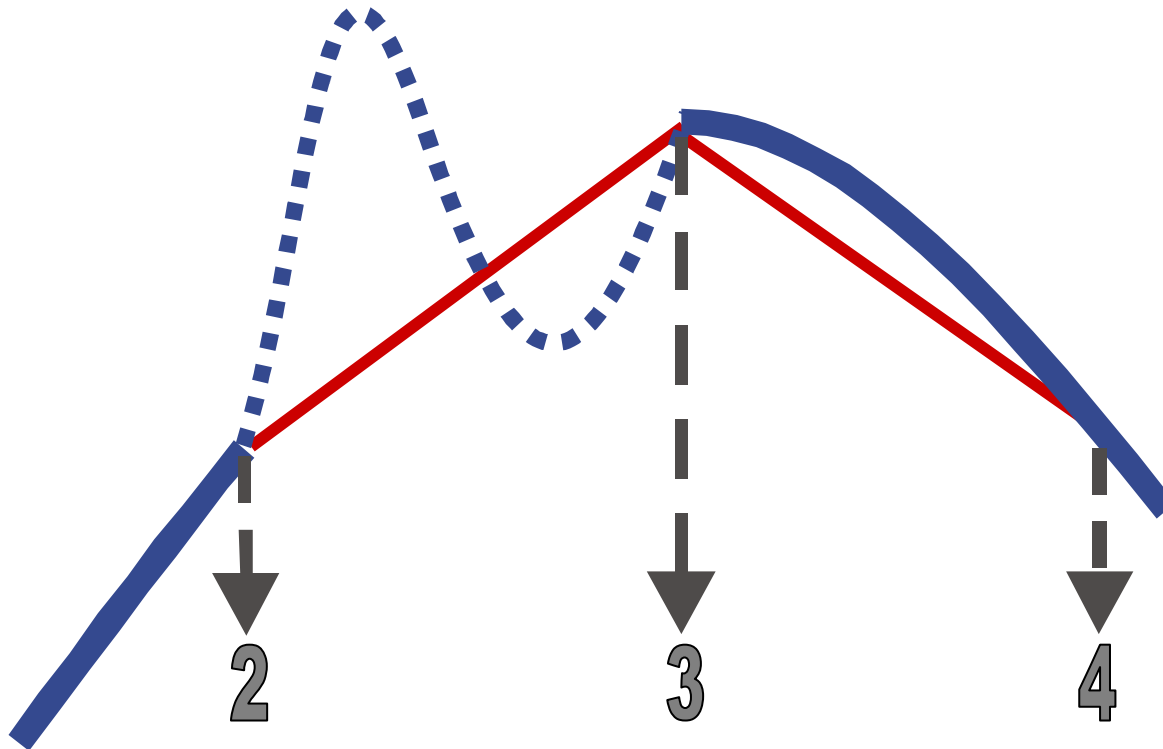
Analog-Digital-Wandler



Analog-Digital-Wandler



Analog-Digital-Wandler



Analog-Digital-Wandler

Aliasing (Signalverfälschung)



200 mV
200 mV
200 mV
200 mV

Shannon-Sampling-Theorem (sinngemäß):

Ein Signal kann ohne Verluste rekonstruiert werden, wenn das Original-Signal keine Frequenzen größer als die halbe Wandlungs-Rate enthält. Das Signal muß also analog band-limitiert (tiefpaß-gefiltert) sein.



Analog-Digital-Wandler

Die zeitliche Auflösung des gemessenen Signals wird durch den Abstand der einzelnen Wandlungen (**Wandlungs-Rate** oder **Sampling-Rate**) bestimmt.

Die Auflösung der Amplitude des Signals ergibt sich aus der Anzahl von Bits, die bei einer Wandlung beeinflusst werden (**Wandlungsbreite**)

3,15984 Volt zum
Zeitpunkt 0

Bei einer **Samplingrate von 1kHz** und einer **16 BIT Wandlung** bei einem Aufnahmebereich von -5V bis +5V (d.h. der **10V Aufnahmebereich** wird in 65536 Punkte aufgeteilt und jede 1ms wird aufgezeichnet) wird zum Zeitpunkt **1ms** dem Wert 3,15984 der Wert **53476** zugeordnet bei einer **Genauigkeit von 0,15mV**, d.h. die letzten beiden Stellen werden gerundet.

Digitaler Wert:

X=1

Y=53476

Genauigkeit: 1ms

0,15mV



Analog-Digital-Wandler

Zusammenfassung

je höher die Samplingrate, desto genauer die zeitliche Auflösung des Signals.

je höher die BITrate, desto besser die Amplitudenauflösung des Signals

aber:

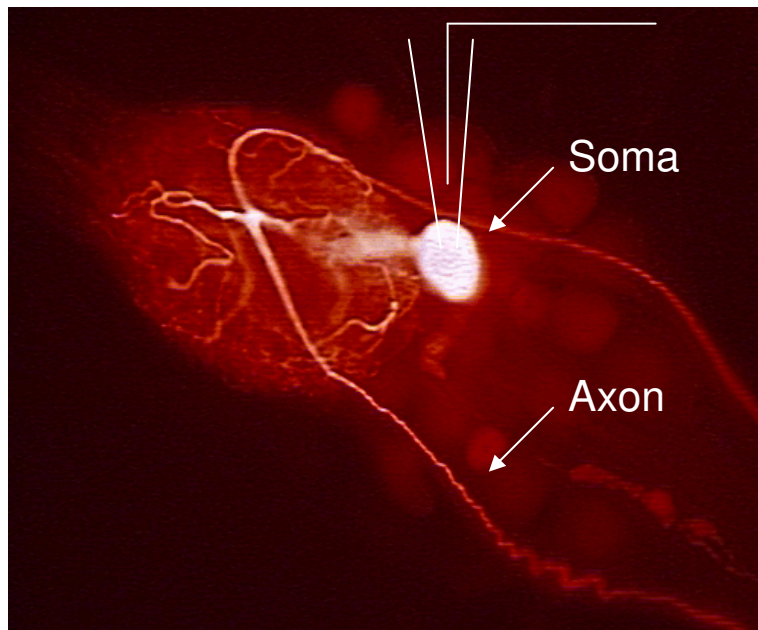
mit beiden Parametern steigt auch die Menge der gespeicherten Daten und die Anforderungen an das Gerät.

Bei einer Samplingrate von 5kHz (Standard für intrazelluläre Ableitungen) fallen pro Sekunde z.B. 5000 Bite = 5 kb pro aufgezeichnetem Kanal an, d.h. $3\text{Mb} \times 16 \text{ BIT} = 48 \text{ Mb}$ in 10 Minuten. Bei einem Standardexperiment können bei insgesamt 6 verschiedenen Kanälen (Reiz, intrazelluläre Ableitung, Strommonitor, 3 extrazelluläre Ableitungen) über 288 Mb in 10 Minuten anfallen.

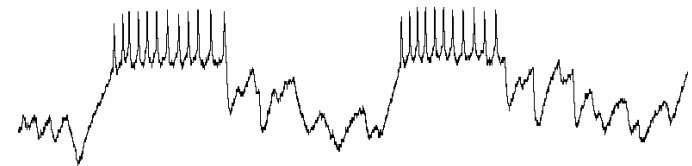
Intrazelluläre Ableitung

(Beispiel)

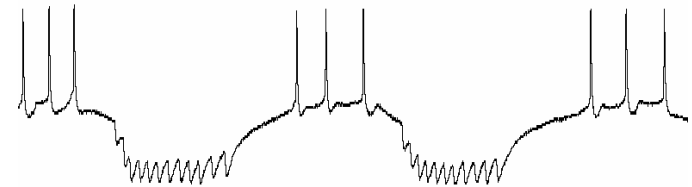
Invertebratenneuron



intrazelluläre
Ableitung



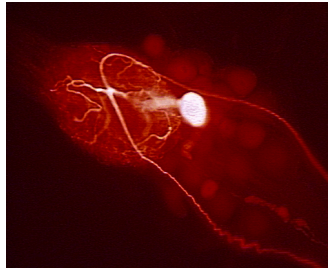
intrazelluläre
Ableitung



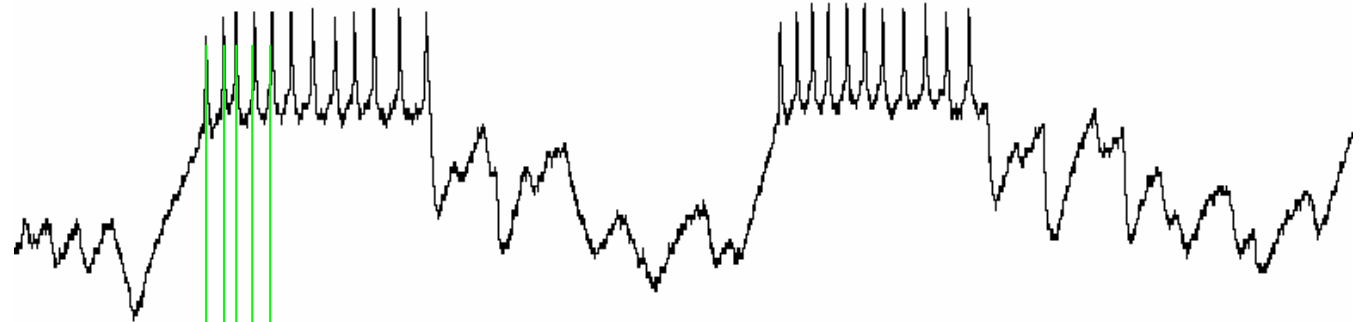
extrazelluläre
Ableitung



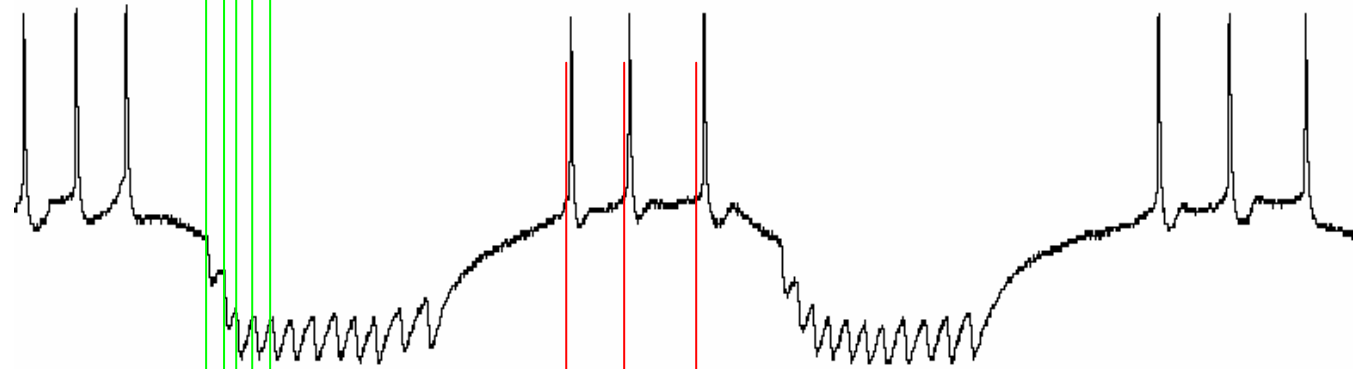
0.2s



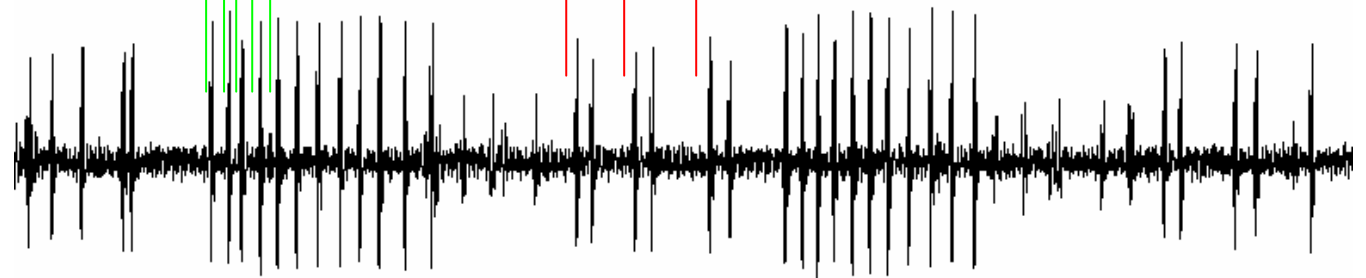
intrazelluläre
Ableitung **1**



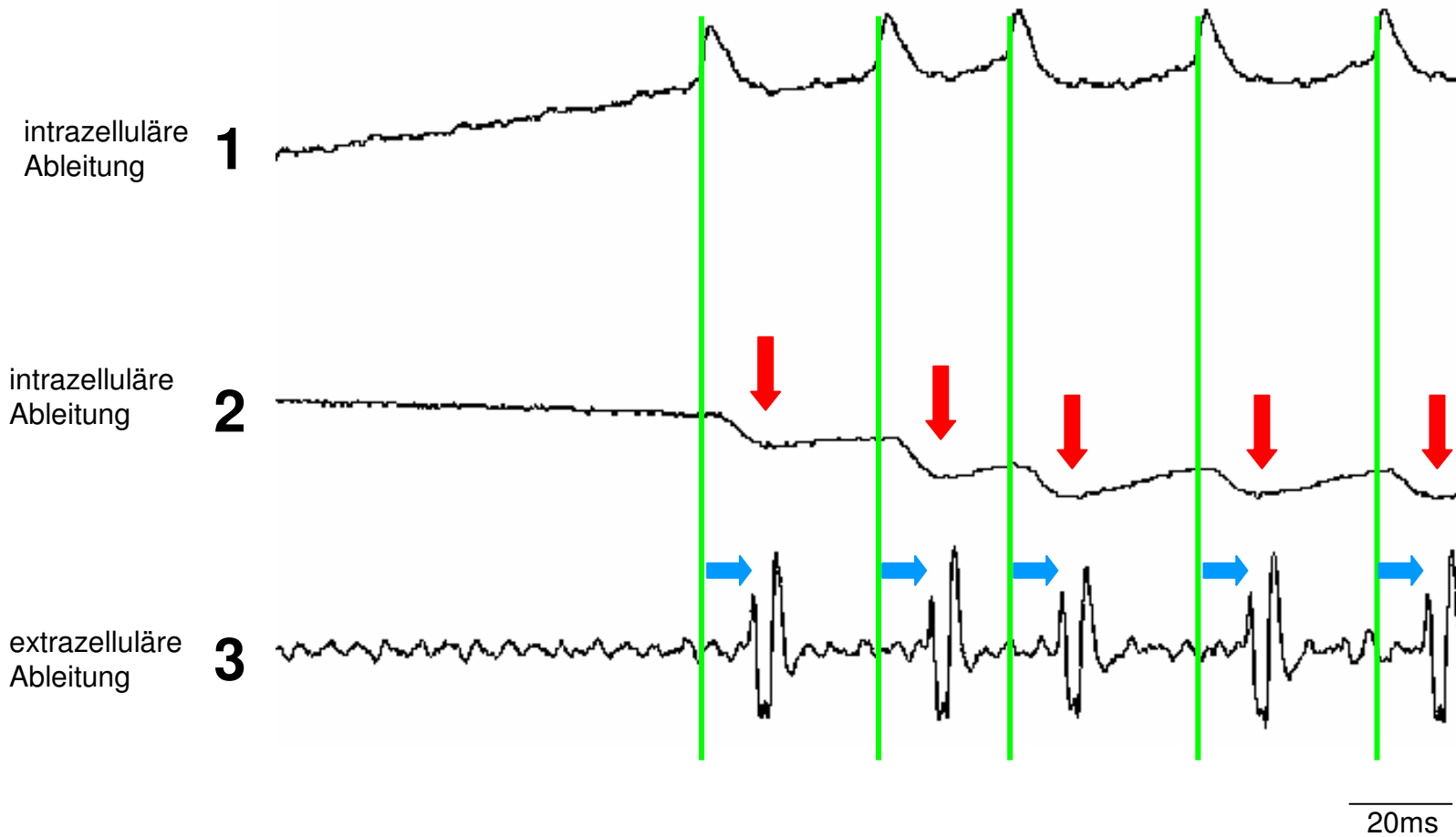
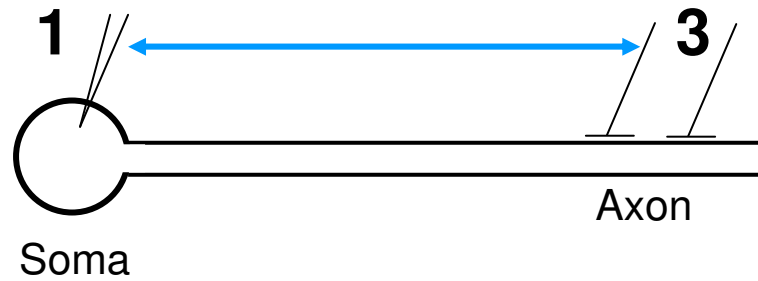
intrazelluläre
Ableitung **2**

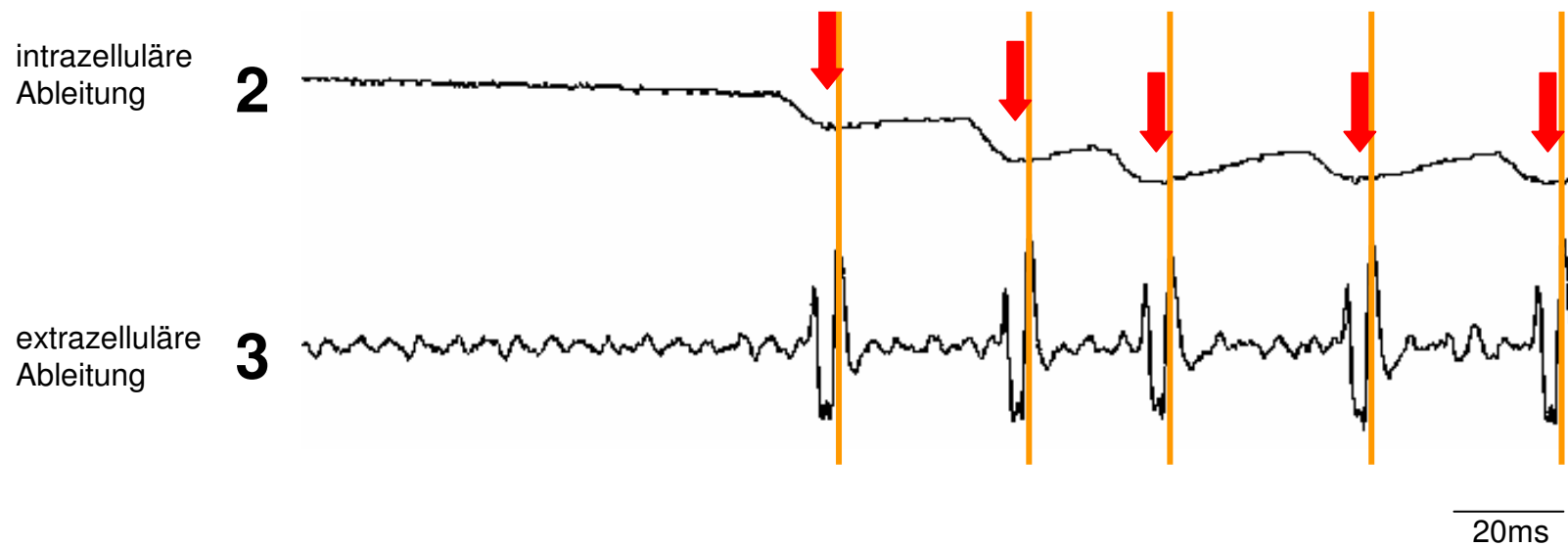


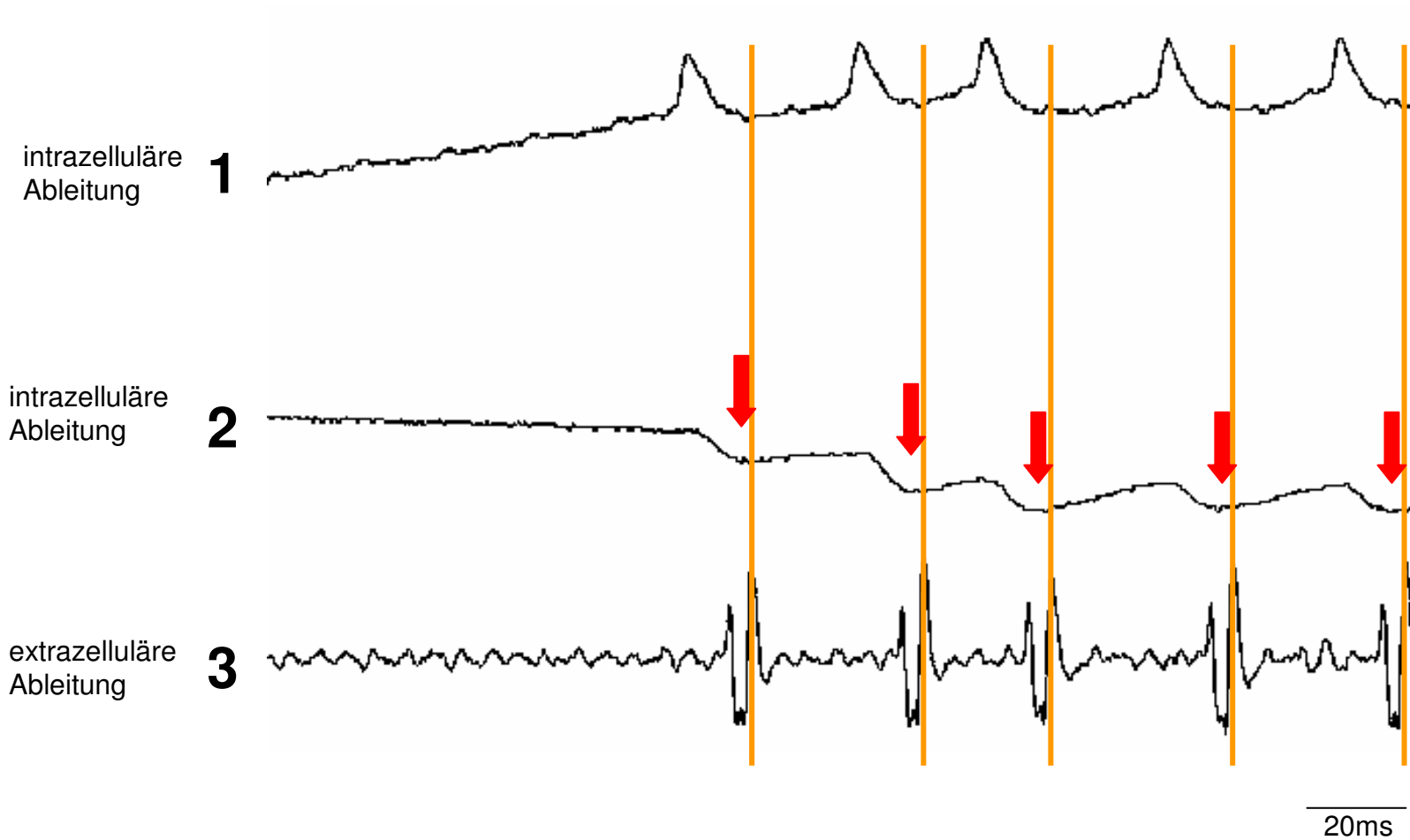
extrazelluläre
Ableitung **3**



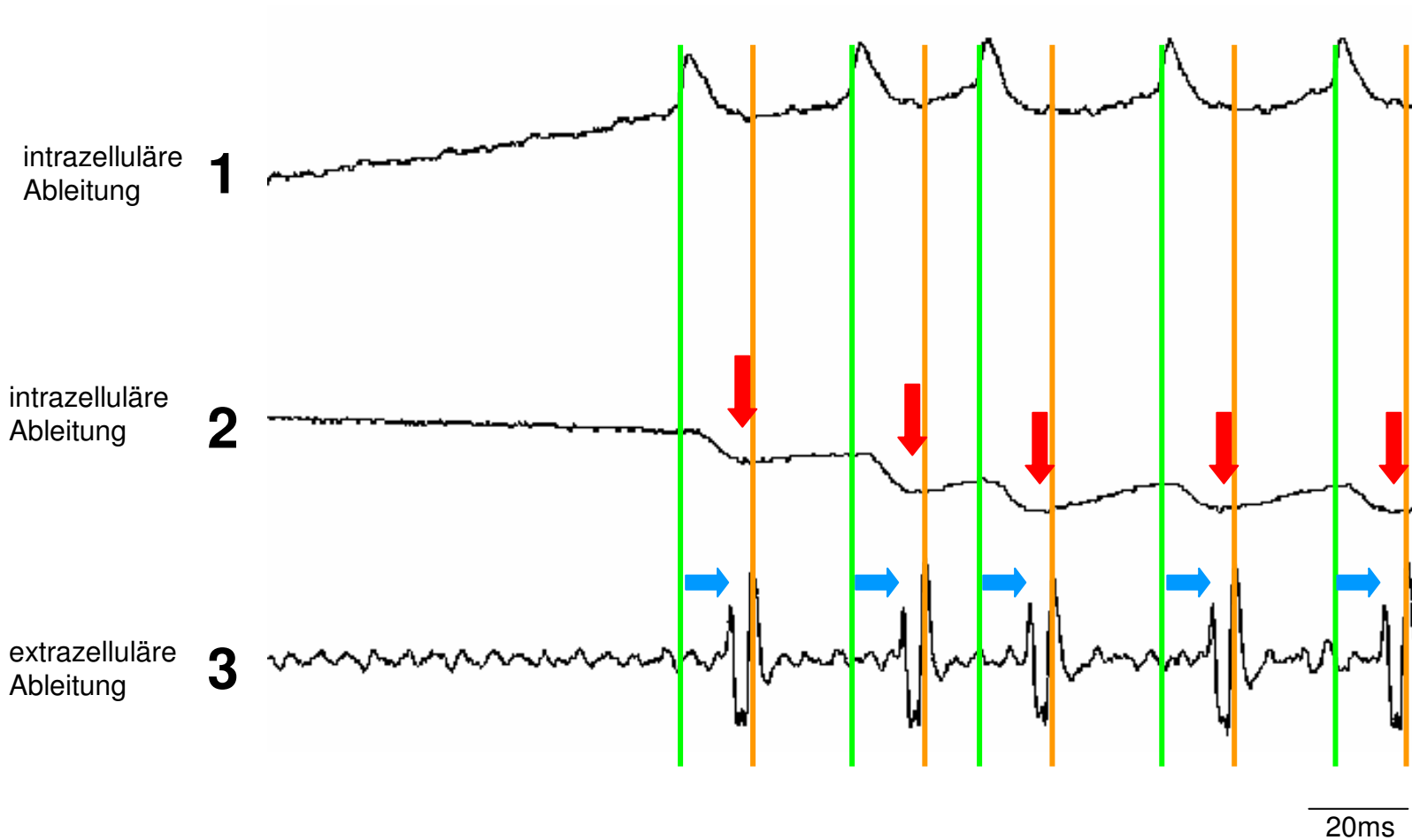
—
0.1s







also Vorsicht vor schnellen Schlüssen!



Viel Spaß beim Ableiten

