



Живые клетки покрыты мембраной, структурную основу которой составляет двойной слой липидов, слабо проницаемый для воды и практически непроницаемый для ионов. Каждая клетка должна обмениваться с внешней средой различными веществами и, в частности, ионами. Перенос ионов через мембрану играет важную роль в процессах возбуждения клетки и передачи сигналов. Ионы проникают в клетку и выходят из неё через встроенные в мембрану белки — каналы.

Каналы — это белки, которые выполняют функцию мембранных пор, так как формируют отверстия, сквозь которые могут проходить ионы. Мембранные каналы селективны — проницаемы только для определённых веществ. Селективность обусловлена радиусом пор и распределением заряженных функциональных групп в них. Существуют каналы, селективно пропускающие ионы натрия (натриевые каналы), а также калиевые, кальциевые и хлорные каналы. (см. рис 1.)

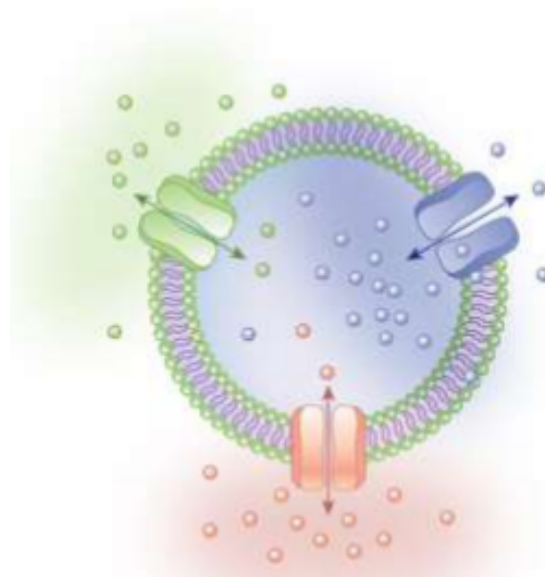


Рисунок 1. Клетка с каналами, проницаемыми для разных веществ

Часть A. Single channel & Whole cell patch clamp

Бывают светочувствительные ионные каналы – каналные родопсины. Эти каналы переходят из закрытого состояния, в котором они непроницаемы для ионов, в открытое, поглощая фотоны определённой длины волны (см. рис. 2).

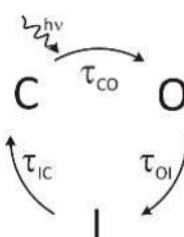


Рисунок 2. Фотоцикл канального родопсина, состоящий из трёх состояний

Далее белок проходит через несколько промежуточных состояний, чтобы вернуться из открытого состояния в закрытое (в дальнейшем мы будем считать, что в промежуточных состояниях канал также непроницаем для любых ионов). Все эти состояния вместе называются фотоциклом (см. рис 3., на котором показан фотоцикл, в котором одно промежуточное состояние I , C и O – закрытое и открытое состояния соответственно). Переходы между этими состояниями происходят с некоторой вероятностью.

Переход из закрытого состояния в открытое невозможен без поглощения света. При наличии света этот переход также происходит с некоторой вероятностью.

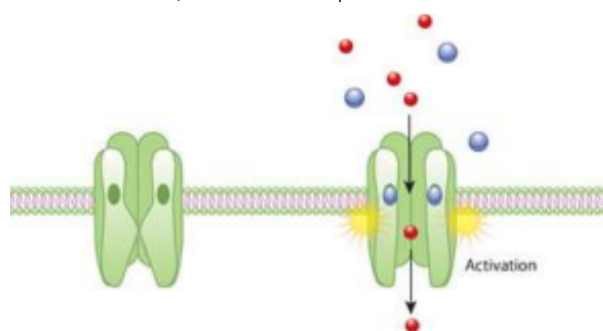


Рисунок 3. Закрытое и открытое состояния канала

Вероятность перехода между двумя состояниями A и B описывается величиной τ – характерное время перехода из A в B . Это время определяется, как обратная производная вероятности перехода по времени: $\tau_{AB} = \left(\frac{dp}{dt} \right)^{-1}$ (то есть вероятность перехода за время dt равна dp).

A1 0.50

Рассмотрим белок, у которого возможны только два состояния A и B . Пусть возможен прямой переход из состояния A в состояние B с известным характерным временем τ_{AB} , а обратный переход не происходит (фактически это означает, что $\tau_{BA} \rightarrow \infty$). Рассмотрим образец, в котором находится N таких белков. Пусть в начальный момент все они находятся в состоянии A . Найдите зависимость количества белков в каждом из состояний в зависимости от времени $N_A(t)$ и $N_B(t)$. Ответы выразите через τ_{AB} и N .

Благодаря свободному пропусканию заряженных частиц (ионов) каналы в открытом состоянии эффективно увеличивают электрическую проводимость клеточной мембраны. Для изучения электрических свойств мембраны и изучения свойств ионных каналов существует метод локальной фиксации потенциала (Patch-clamp). Метод заключается в том, что стеклянная пипетка образует с клеточной мембраной контакт с сопротивлением в несколько гигаом – это так называемый гигаомный контакт. В пипетку, заполненную электролитом, помещается электрод, второй электрод помещается внеклеточно, в омывающей жидкости

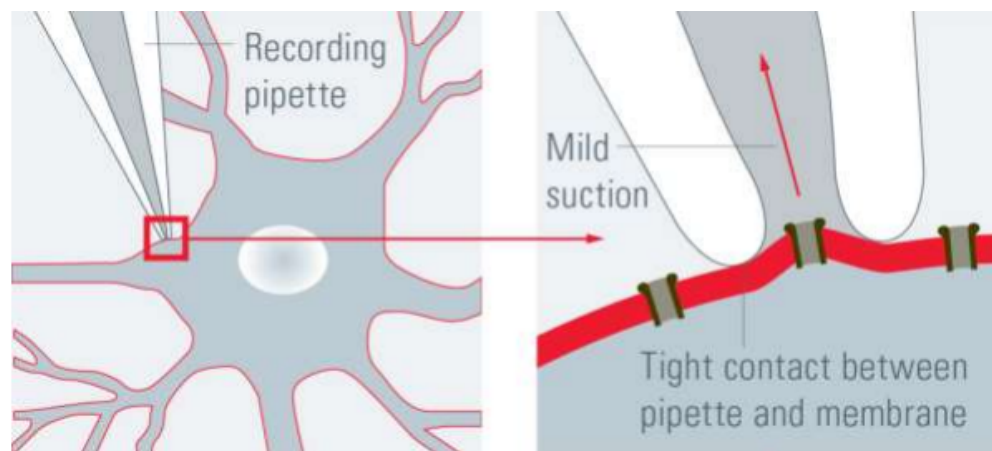


Рисунок 4. Метод Patch-clamp. Образование гигаомного контакта

Для измерения проводимостей одиночных каналов пипетку вместе с фрагментом клеточной мембраны, который находится внутри неё, открепляют от остальной клетки. В узком кончике пипетки остаётся настолько маленькая часть мембраны, что в ней может быть встроено не более одного канала. В случае со светочувствительными белками измеряется сила тока, протекающего через фрагмент мембраны: скачки силы тока при включении света говорят об открытии светочувствительного канала. Этот метод называется Single Channel Patch Clamp. (см.рис 5. получение фрагмента мембраны, правая картинка – выделенный фрагмент с одним каналом).

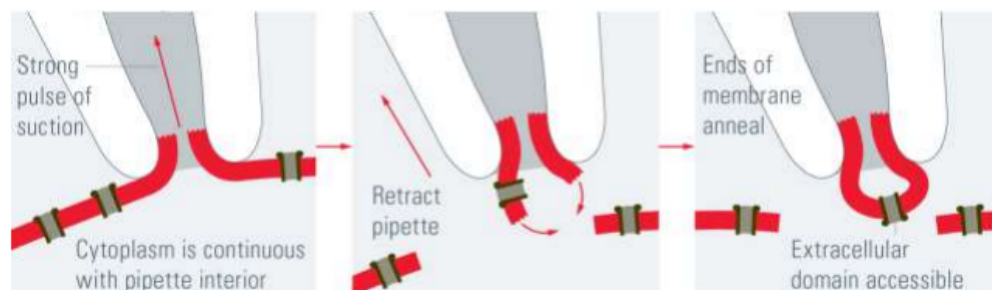
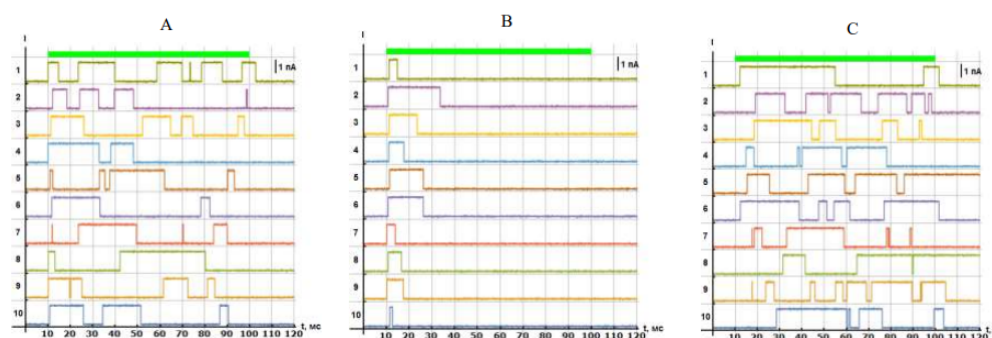


Рисунок 5. Следующие после рис.4 шаги для получения фрагмента мембраны на пипетке. Левый рисунок - метод Whole cell (целая клетка прикреплена к пипетке), правый рисунок - метод Single channel.

Рассмотрим измерения методом Single Channel Patch Clamp для трёх каналов. Все три канала имеют фотоциклы, состоящие из трёх состояний: C (closed – закрытое), O (opened – открытое) и I (intermediate – промежуточное). Каналы имеют следующие характерные времена переходов:

1. $\tau_{CO} = 10$ мс, $\tau_{OI} = 10$ мс, $\tau_{IC} = 0,1$ мс
2. $\tau_{CO} = 1$ мс, $\tau_{OI} = 10$ мс, $\tau_{IC} = 30$ мс
3. $\tau_{CO} = 1$ мс, $\tau_{OI} = 10$ мс, $\tau_{IC} = 1000$ мс.

На графиках показано по 10 снятых зависимостей тока от времени для каждого из каналов (зелёная линия показывает время, когда свет включен).



A2 0.50

Укажите, какие относятся к какому из каналов? Высота ступеньки везде одинаковая и равна $I = 1.4$ пА.

При измерении проводимости одиночных каналов, сила тока очень мала и сложно детектируется. Для того, чтобы избежать этих сложностей используют метод, в котором фрагмент мембраны, находящийся внутри пипетки пробивается избыточным давлением, а клетка остаётся прикреплённой к пипетке. Таким образом получается, что электрод внутри пипетки отделён от электрода в омывающей жидкости полной мембраной клетки. При этом раствор внутри клетки становится таким, который был налит внутрь пипетки. Такой метод называется Whole Cell Patch Clamp (см. рис 5, на левом рисунке получен Whole Cell контакт, см. рис 6, на котором показана клетка целиком) и он позволяет измерять токи, вызванные проводимостью всех каналов, находящихся в клеточной мембране, вместе.

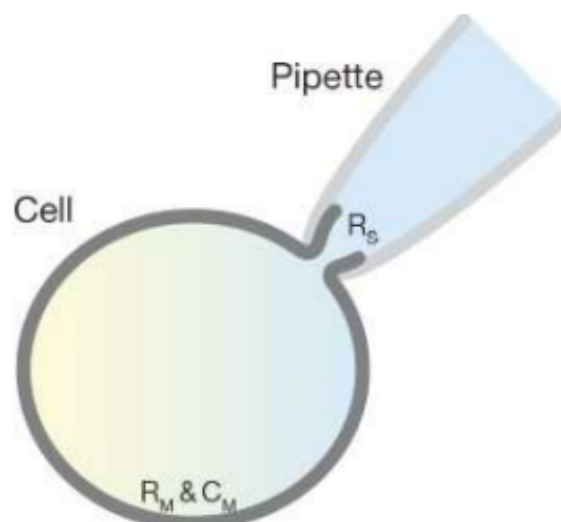


Рисунок 6. Whole-cell подключение.

A3 1.00

Рассмотрим 3 клетки, в мембраны которых встроены каналы, описанные в предыдущем пункте.

В мембране каждой клетки находится много ($\gg 1$) каналов и все одного типа. Производятся измерения методом Whole Cell Patch Clamp. Включается свет и во всех трёх случаях дожидаются установления показаний силы тока, после чего свет выключается.

Изобразите качественно зависимости силы тока от времени для всех трёх клеток. Чему равна установившаяся сила тока для каждой из клеток, если напряжение поданное между электродами и растворы в пипетке и в омывающей жидкости оставили без изменений после эксперимента в пункте A2. Ответы выразите через количество каналов в клетке $N = 1000$, τ_{CO} , τ_{OI} и τ_{IC} .

Часть В. Уравнение Нернста-Планка

При открытии канала ионы могут проходить через него как под действием внешнего электрического поля, так и в результате тепловой диффузии.

В1 2.00 Найдите полный поток ионов калия J , через селективный калиевый канал. Ответ выразите, через коэффициент диффузии D , молярную концентрацию калия снаружи клетки c и её производную вдоль канала $\frac{dc}{dx}$, подвижность ионов калия μ , элементарный заряд e и напряжённость электрического поля E .

Примечание: подвижностью называется коэффициент пропорциональности между скоростью дрейфового движения частиц и силой, действующей на них: $\mu F = v$.

Связь между коэффициентом диффузии D , подвижностью μ и температурой T была открыта при изучении броуновского движения частиц независимо Эйнштейном и Смолуховским. Соотношение Эйнштена-Смолуховского:

$$D = \mu kT,$$

где k – постоянная Больцмана.

В2 2.00 Найдите, при каком напряжении U_{rev} на клеточной мембране (мембранный потенциал) поток через открытый калиевый канал становится равным нулю при температуре $T = 20^\circ\text{C}$. Ответ выразите через T , $c_{out} = 4$ ммоль/л и $c_{in} = 155$ ммоль/л – концентрации калия снаружи клетки и внутри неё, и фундаментальные физические константы.

Примечание: Мембранный потенциал считается положительным, если плюс находится на внутренней поверхности мембраны клетки.

Часть С. Нормировка и определение селективности канала

При проведении настоящего электрофизиологического эксперимента нужно накопление статистики, поэтому измеряют зависимость силы тока от времени для разных напряжений, поданных на клетку, а также повторяют эксперимент на других клетках с такими же каналами в мембране. Но все клетки имеют разный размер, из-за чего разное количество каналов попадает в их мембрану. Поэтому снятые показания для силы тока нормируют на величину пропорциональную количеству белков в клеточной мембране. В электрофизиологии принято нормировать силу тока на электрическую ёмкость клетки (потому что ёмкость пропорциональна площади мембраны $C \propto S \propto N$).

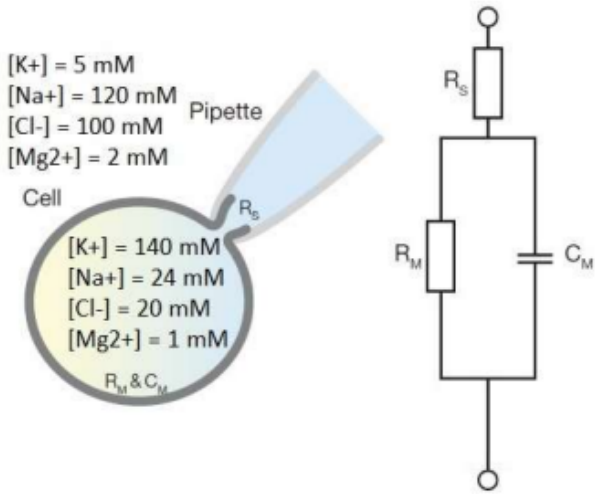
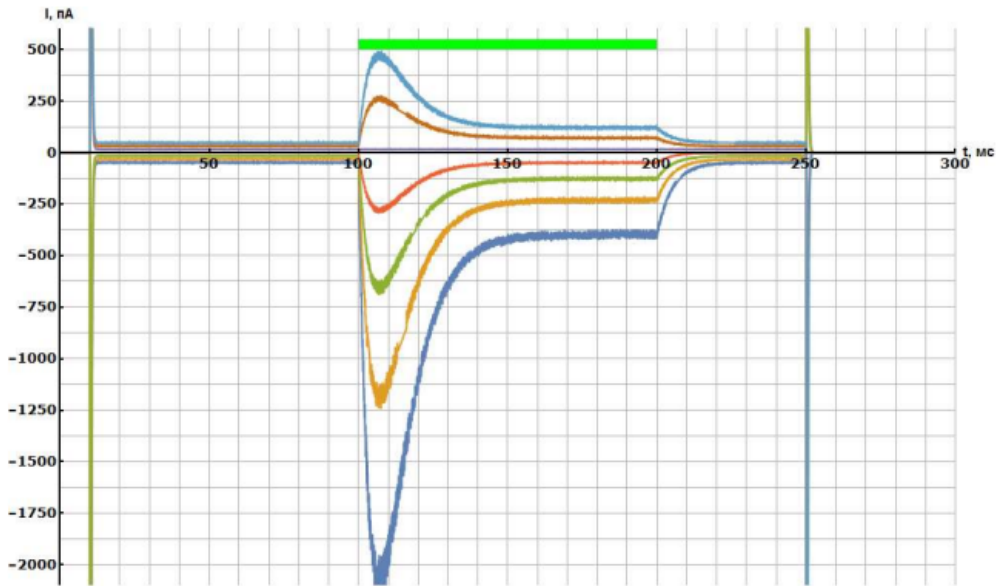
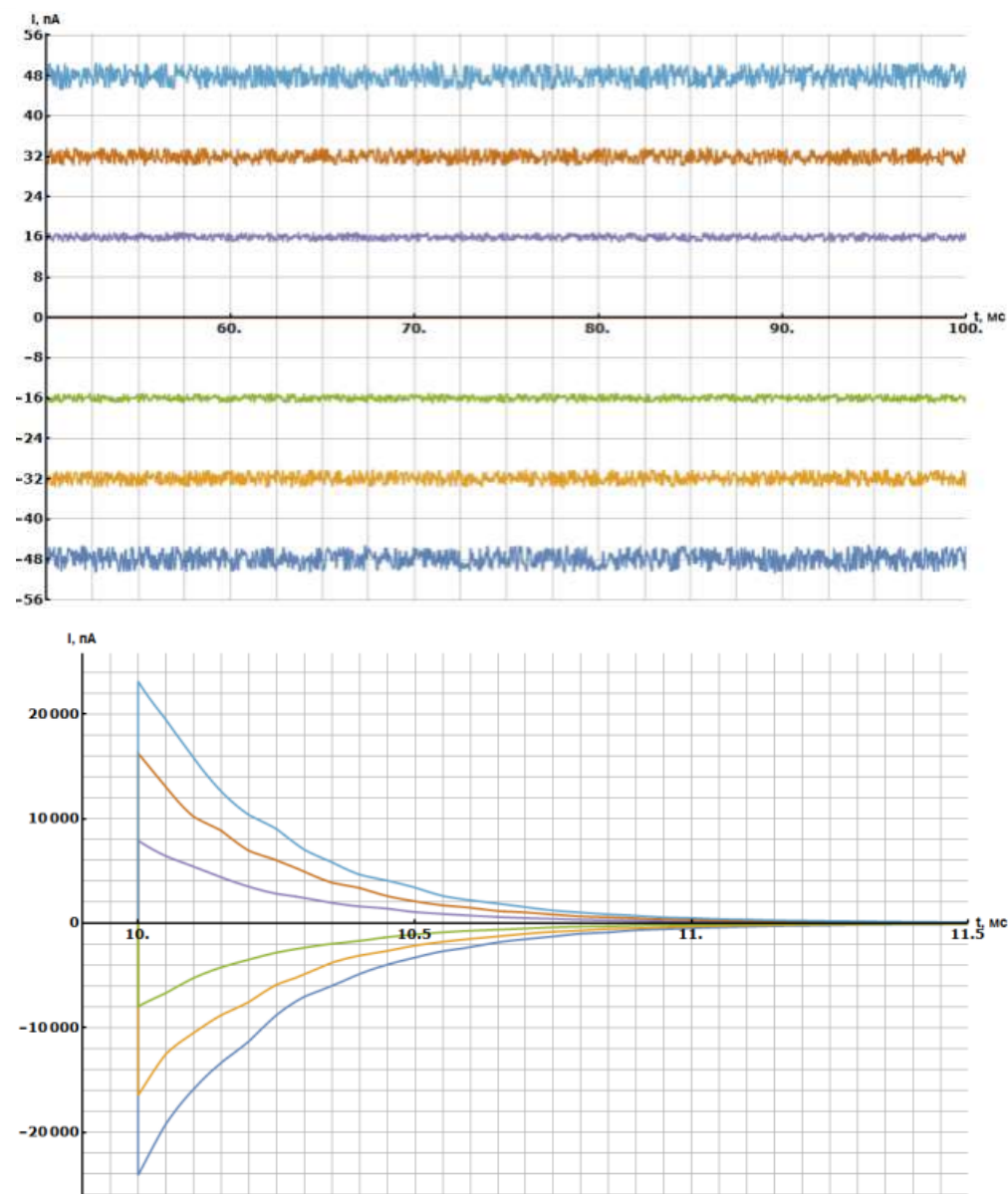


Рисунок 7. Whole-cell соединение и эквивалентная схема клетки.

Другие электрические характеристики клетки (R_M – электрическое сопротивление клеточной мембраны (когда все каналы закрыты), R_S – так называемое сопротивление «доступа» к клетке) также влияют на сигнал, который снимается при whole-cell patch clamp измерениях. Эквивалентная схема клетки показана на рисунке 7.

С1 3.00 По данным, изображенным на графиках, определите электрические характеристики мембраны клетки: R_M , R_S , C_M . Все три графика отражают зависимость тока через клеточную мембрану от времени для одной и той же точки (это всё один эксперимент, показаны разные участки по времени). Разные линии снизу вверх соответствуют напряжениям, поданным на мембрану: -120 мВ, -80 мВ, -40 мВ, 0 мВ, 40 мВ, 80 мВ, 120 мВ. Зелёная линия сверху указывает на время, когда включен свет.





C2^{1.00} Определите, какой ион свободно проходит через канал, встроенный в мембрану этой клетки?
Концентрации всех ионов в растворах пипетки и омывающем указаны на рисунке 7.

[Т](#) [Цепи](#) [Расчет цепей](#) [2019](#) [Сборы XY](#) [Y](#) [XXI век](#) [Биофизика](#)

 Website in English

2020 — Мы те, кого должны превзойти.