

2009.11.26

Axoclamp 900A

日本語マニュアル

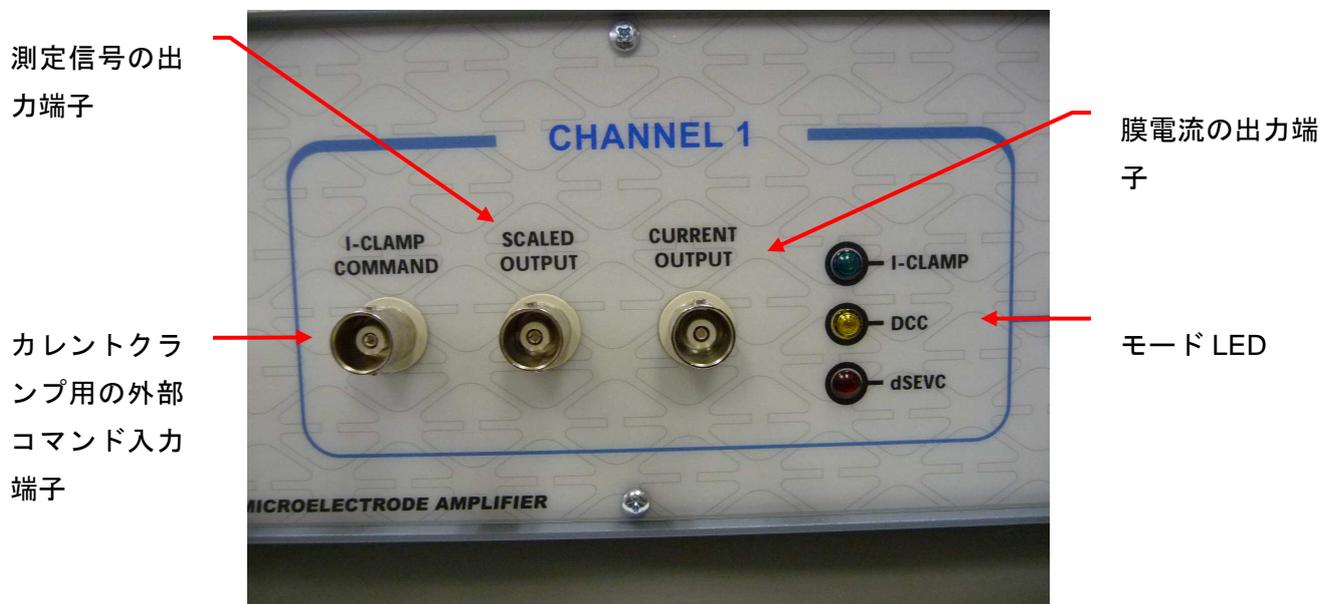
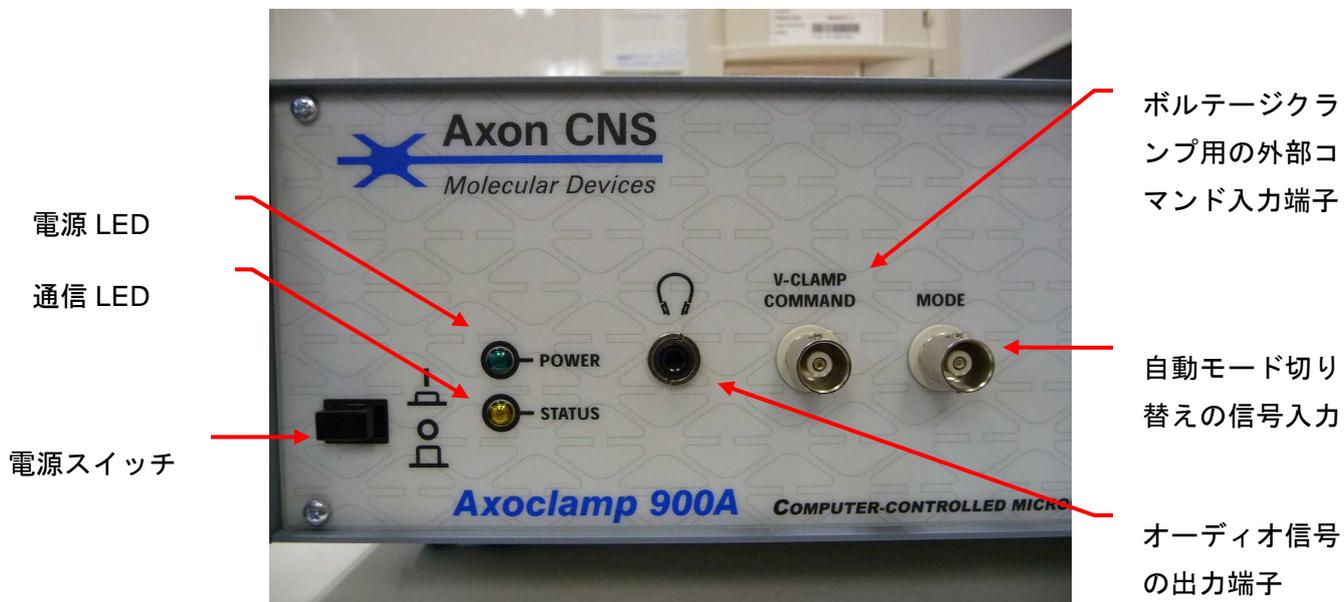
株式会社インターメディカル

## 目次

1. パネルの説明 .....	3
1.1. フロントパネル .....	3
1.2. リアパネル .....	5
2. Axoclamp Commander の説明.....	7
2.1. 画面の説明 .....	7
2.2. ツールボタン .....	8
2.3. Option ボタン.....	9
2.3.1. General タブ .....	9
2.3.2. Auto タブ .....	13
2.3.3. Audio タブ .....	15
2.3.4. Quick Select タブ .....	16
2.3.5. About タブ .....	17
2.4. メータ表示とモード選択 .....	18
2.5. 各モードの設定 .....	19
2.5.1. I=0 モードの設定 .....	19
2.5.2. IC モードの設定 .....	20
2.5.3. DCC モードの設定 .....	22
2.5.4. HVIC モードの設定 .....	23
2.5.5. dSEVC モードの設定 .....	24
2.5.6. TEVC モードの設定 .....	25
3. チュートリアル .....	26
3.1. チェックリスト.....	26
3.2. Axoclamp900A と Axoclamp Commander のセットアップ .....	27
3.3. Tutorial 1:Current Clamp (IC) .....	29
3.4. Tutorial 2:Discontenious Current Clamp (DCC).....	34
3.5. Tutorial 3:Discontenious Single Electrode Voltage Clamp (dSEVC).....	36
3.6. Tutorial 4:Two-Electrode Voltage Clamp (TEVC).....	39
3.6.1. I. CLAMP-1U モデルセルを使用する場合 .....	39
3.6.2. II. MCO-2U モデルセルと VG-9A Bath Clamp ヘッドステージを使用する.....	42
3.7. Tutorial 5:Auto Mode Switching .....	46
3.7.1. Example of Auto Mode Switching .....	46
3.7.2. Setup of Auto Mode.....	47
3.8. Tutorial 6:High-Voltage Current Clamp (HVIC) .....	50

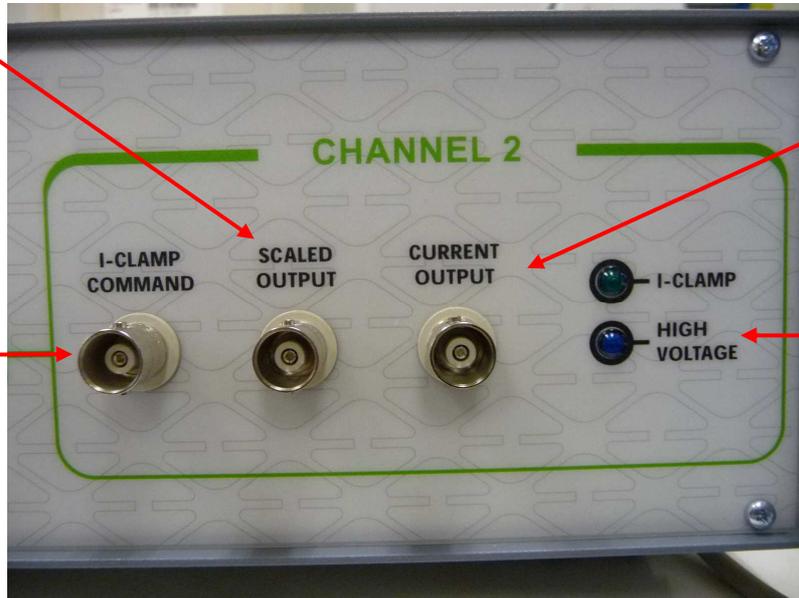
1. パネルの説明

1.1. フロントパネル



測定信号の出力端子

カレントクラ  
ンプ用の外部  
コマンド入力  
端子



膜電流の出力端子

モード LED

1.2. リアパネル

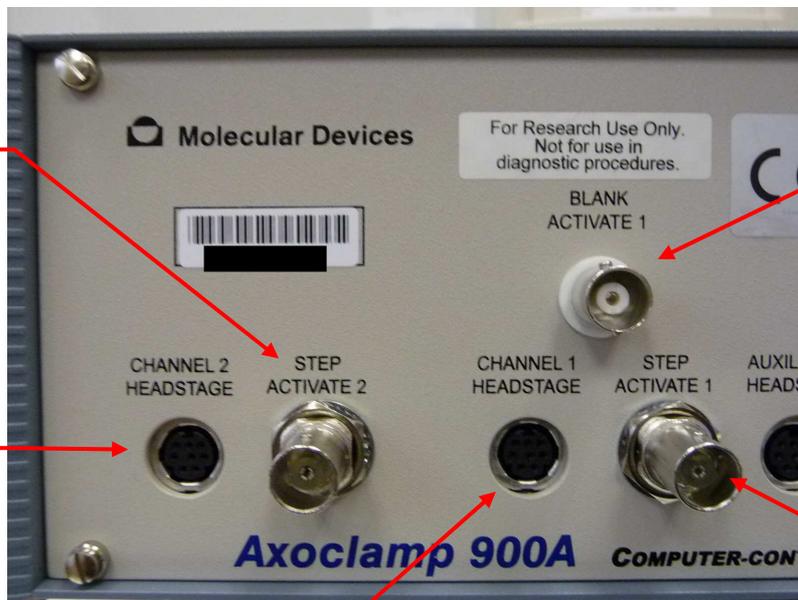
CH2 内部コマ  
ンドの有効/  
無効を制御す  
る信号を入力  
する端子。

CH2のヘッド  
ステージ接続  
コネクタ

CH1のヘッド  
ステージ接続  
コネクタ

CH1の電圧を  
保持する信号  
を入力する端  
子

CH1 内部コマ  
ンドの有効/  
無効を制御す  
る信号を入力  
する端子。



ケースグラ  
ンド端子

シグナルグラ  
ンド端子

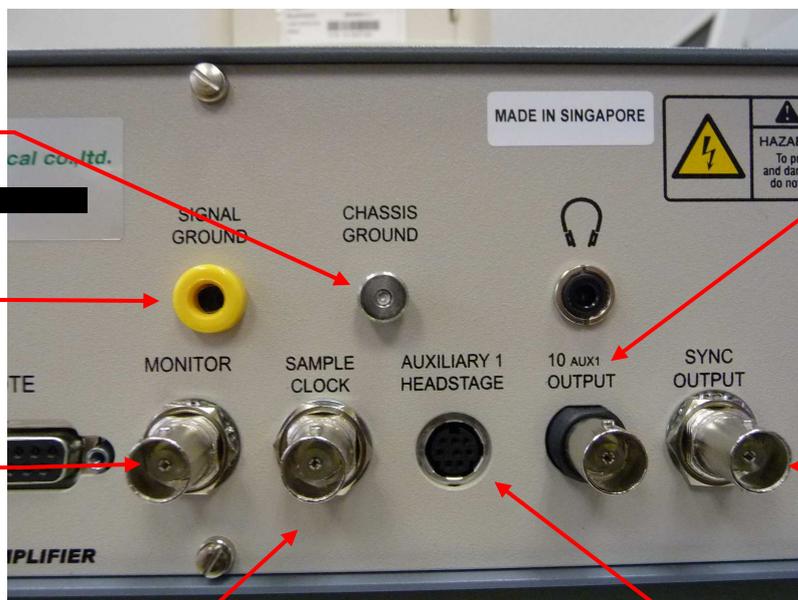
Monitor scope 波  
形の出力端子

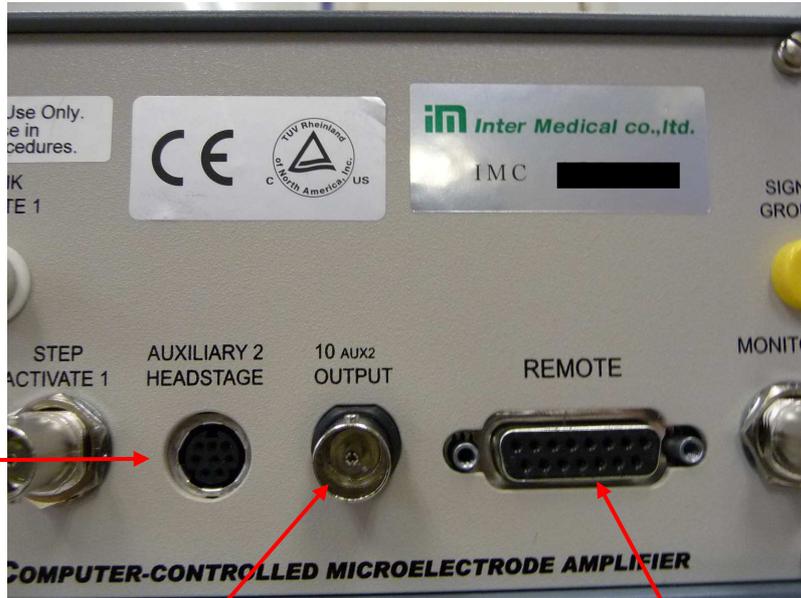
Monitor scope のトリ  
ガー信号

CH1 追加ヘッ  
ドステージの  
測定信号の出  
力端子

トリガー信号  
の出力端子

CH1 追加ヘッドステージを  
接続するコネクタ

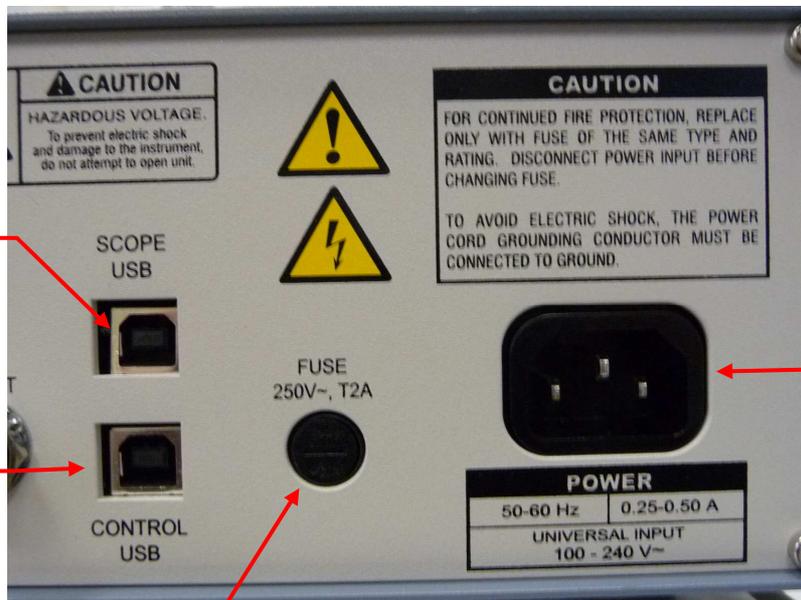




CH2 追加ヘッドステージを接続するコネクタ

CH2 追加ヘッドステージの測定信号の出力端子

REMOTE BUZZ スイッチの接続コネクタ



Monitor scope を使用するための USB コネクタ

Axoclamp900 A を制御する USB コネクタ

ヒューズホルダー

AC 電源コネクタ

## 2. Axoclamp Commander の説明

### 2.1. 画面の説明

The screenshot shows the Axoclamp 900A software interface. It features a menu bar at the top with icons for file operations, a toolbar, and two main data panels for Headstage 1 and Headstage 2. Below these are control panels for I-Clamp 1 and I-Clamp 2, and a Channel 1 Scaled Output section at the bottom. Red boxes highlight the toolbar, the data panels, the I-Clamp control panels, and the output section. Red arrows point from Japanese text labels to these highlighted areas.

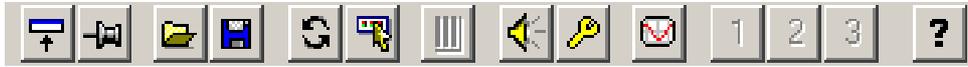
**ツールボタン** →

**メータ表示とモード設定のセクションです。** →

**コマンドや補正など、実験の設定をするセクションです。** →

**出力信号の設定をするセクションです。** →

## 2.2. ツールボタン



アイコン	メニュー名	ショート カットキー	機能
	Resize windows	F2	ウィンドウを小型化する。
	Always on Top	F3	常に他のウィンドウの手前に表示する。
	Load Configuration	F4	設定ファイルを開く。
	Save Configuration	F5	設定ファイルを保存する。
	Reset to Program Defaults	F6	デフォルト設定にする。
	Select Device	F7	Axoclamp 900A と Soft Panel を認識させる。
	Configure Soft Panel	F8	Soft Panel を設定する。
	Audio Options	F9	オーディオ機能を設定する。
	Options	F10	測定電流範囲など、各種項目を設定する。
	Monitor Scope	F11	Monitor Scope ウィンドウを表示する。
	Quick Select	—	保存した設定ファイルへのショートカット。
	Help	(F1)	ヘルプを開く。

## 2.3. Option ボタン

### 2.3.1. General タブ

外部コマンド、ローパスフィルタ、外部トリガーの設定と追加ヘッドステージの情報を表示するタブです。

**Options**

General | Auto | Audio | Quick Select | About

**External Command Sensitivity**

I-Clamp 1:  OFF,  10 nA/V

I-Clamp 2:  OFF,  1 nA/V

V-Clamp:  OFF,  20 mV/V

**Lowpass Filter Type**

Channel 1: I-Clamp: Bessel, V-Clamp: Bessel

Channel 2: I-Clamp: Bessel, V-Clamp: Bessel

**Sync Output**

Tuning or Seal Test on channel 1

Tuning or Seal Test on channel 2

Tuning or Seal Test on selected channel

Mode (logical HIGH is V-Clamp, LOW is I-Clamp)

**Auxiliary Headstage Information**

#1	Model: HS-9A x1	Gain: ( 10 mV/mV )
#2	Model: VG-9A x10	Gain: ( 0.01 V/nA )

Show monitor scope in DCC or dSEVC mode

Show warning when oscillation suppressed

Show advanced signals in scaled output tabs

Close

各チャンネル、各モードの外部コマンドを設定します。

各チャンネル、各モードのローパスフィルタを設定します。

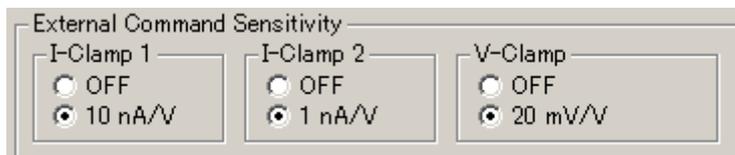
Sync Output 端子から出力する 5V TTL トリガー信号を選択します。

追加ヘッドステージの情報が表示されます。

警告メッセージの表示/非表示などを設定します。

### External Command Sensitivity

各チャンネル、各モードの外部コマンドを設定します。カレントクランプはヘッドステージのゲインによってスケージングが異なります。



### カレントクランプの外部コマンドのスケージング

モード	ヘッドステージ	スケージング	最大電流
IC	HS-9A x0.1	1 nA/V	max ±10nA
	HS-9A x1	10 nA/V	max ±100nA
	HS-9A x10	100 nA/V	max ±1000nA
HVIC	HS-9A x0.1	10 nA/V	max ±100nA
	HS-9A x1	100 nA/V	max ±1000nA
	HS-9A x10	1000 nA/V	max ±10000nA

### Lowpass Filter Type

各チャンネル、各モードのローパスフィルタを設定します。Bessel か Butterworth を選択できます。



フィルタの種類	特徴
Bessel	時間領域の解析に使用される。 位相差が少なく、波形のかたちを保つ。
Butterworth	周波数領域の解析に使用される。 Bessel と比較してノイズが少ない。 オーバーシュートが発生する。

時間領域の解析: 信号が時間と共にどう変化するか解析する。

周波数領域の解析: 信号にどれだけの周波数成分が含まれているか解析する。

### Sync Output

Sync Output 端子から出力する 5V TTL トリガー信号を選択します。

Sync Output

Tuning or Seal Test on channel 1  
 Tuning or Seal Test on channel 2  
 Tuning or Seal Test on selected channel  
 Mode (logical HIGH is V-Clamp, LOW is I-Clamp)

Sync Output の設定	出力するトリガー信号
Tuning or Seal Test in channel 1	チャンネル1の Tuning, Seal Test コマンドに同期した信号
Tuning or Seal Test in channel 2	チャンネル2の Tuning, Seal Test コマンドに同期した信号
Tuning or Seal Test in selected channel	タブで選択しているチャンネルの Tuning, Seal Test コマンドに同期した信号
Mode	モードに同期した信号

内部コマンドに同期した信号 : Seal Test, Turning, Pulse, Clear, Zap

モードに同期した信号 : VC(dSEVC)のとき HIGH, IC(I=0, IC, DCC, HVIC)のとき LOWs

### Auxiliary Headstage Information

AUXILIARY HEADSTAGE 1 と AUXILIARY HEADSTAGE 2 のコネクタに接続された、追加ヘッドステージの情報が表示されます。HS-9A, VG-9A, HS-2A, VG-2A のヘッドステージを使用できますが、HS-2A, VG-2A はアダプタケーブル (parts# 1-2100-0934) が必要になります。

Auxiliary Headstage Information

#1	Model: HS-9A x1	Gain: ( 10 mV/mV )
#2	Model: VG-9A x10	Gain: ( 0.01 V/nA )

## その他

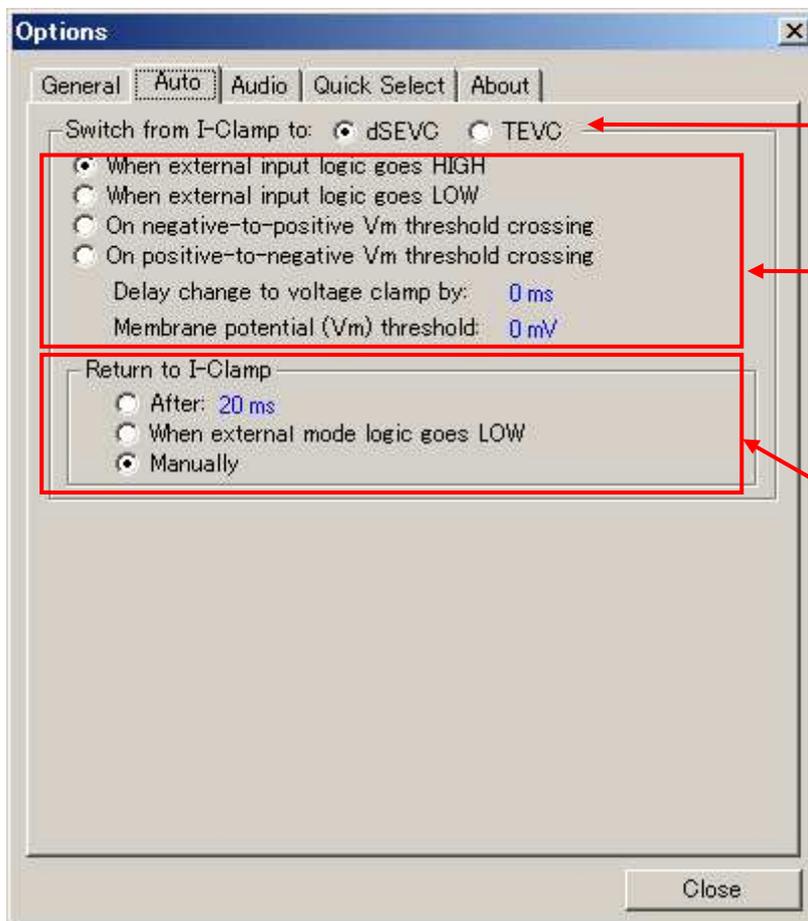
その他の機能について設定します。

<input checked="" type="checkbox"/>	Show monitor scope in DCC or dSEVC mode
<input checked="" type="checkbox"/>	Show warning when oscillation suppressed
<input type="checkbox"/>	Show advanced signals in scaled output tabs

チェックボックス	内容
Show monitor scope in DCC or dSEVC mode	DCC, dSEVC モードのときに monitor scope ウィンドウの表示/非表示を選択する。
Show warning when oscillation suppressed	発振検出メッセージの表示/非表示を選択する。
Show advanced signals in scaled output tabs	Scaled Output 端子からコマンド信号を出力できるようにする。

### 2.3.2. Auto タブ

自動モード変換機能の条件を設定するタブです。



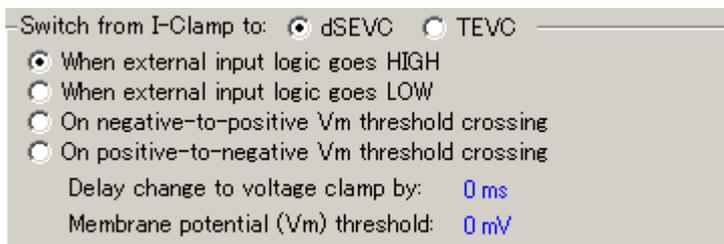
ICモードから切り替えるモードを選択します。

ICモードから dSEVC, TEVC モードに切り換わる条件を設定します。

dSEVC, TEVC モードから ICモードに戻る条件を設定します。

### Switch from I-Clamp to dSEVC or TEVC

IC モードから dSEVC, TEVC モードに切り換わる条件を設定します。



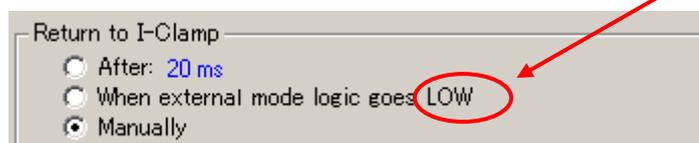
Switch to voltage clamp の設定	IC から VC へ切り換わる条件
When external mode logic goes HIGH	MODE 端子に入力されている信号が HIGH になったとき
When external mode logic goes LOW	MODE 端子に入力されている信号が LOW になったとき
On negative-to-positive Vm threshold crossing	測定電圧が閾値 Vm をマイナス方向からプラス方向へ変化したとき
On positive-to-negative Vm threshold crossing	測定電圧が閾値 Vm をプラス方向からマイナス方向へ変化したとき

Delay change to voltage clamp by: IC から VC へ切り換わるまでの待ち時間

Membrane potential (Vm) threshold: 閾値 Vm

### Return to I-Clamp

dSEVC, TEVC モードから IC モードに戻る条件を設定します。

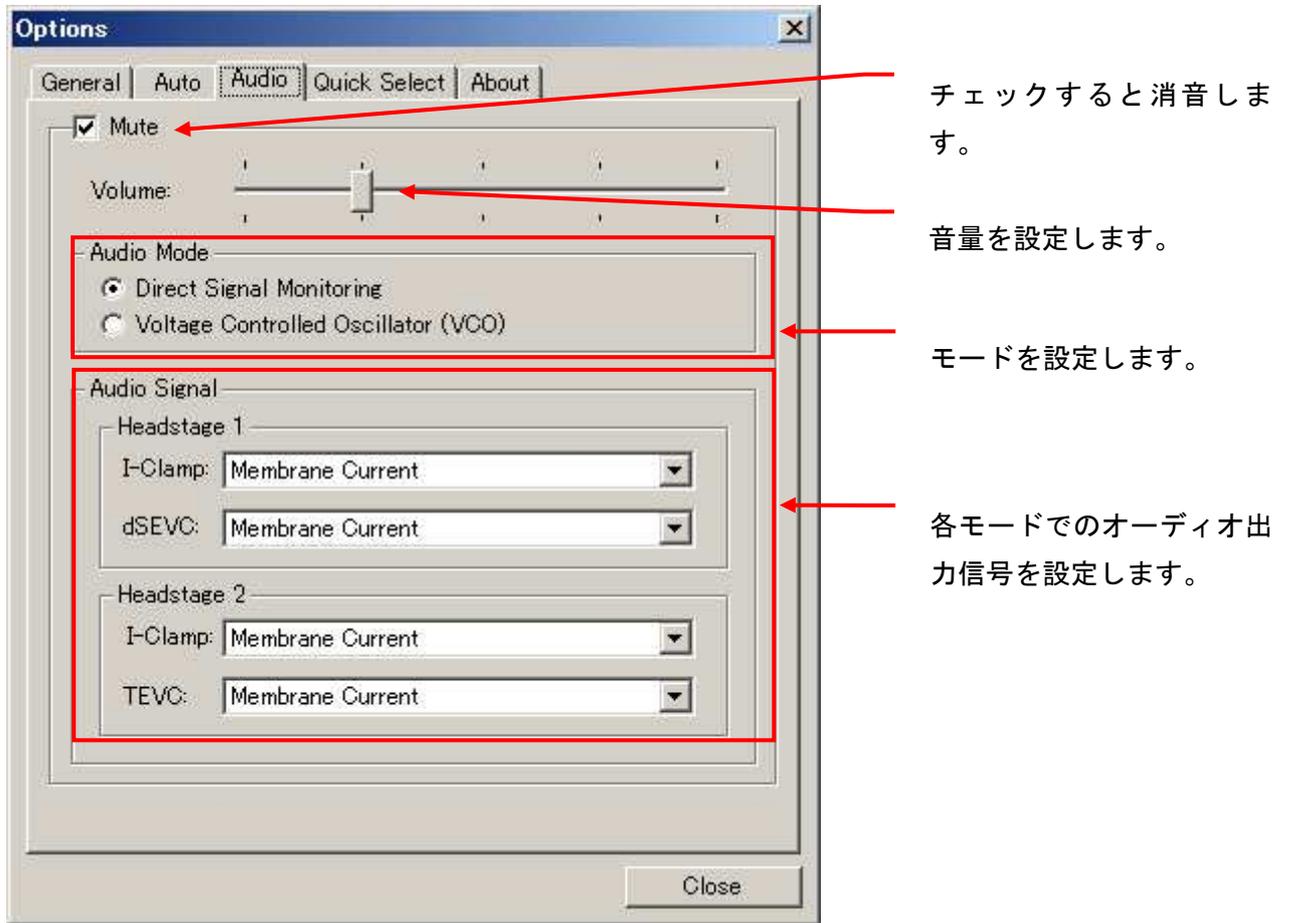


When external mode logic goes HIGH 以外のときは HIGH になります。

Return to current clamp の設定	VC から IC へ戻る条件
After xxms	設定した時間が経過したとき
When external mode logic goes LOW(HIGH)	MODE 端子に入力されている信号が LOW (HIGH)になったとき
Manually	手動で IC ボタンをクリックしたとき

2.3.3. Audio タブ

オーディオ機能を設定するタブです。



チェックすると消音します。

音量を設定します。

モードを設定します。

各モードでのオーディオ出力信号を設定します。

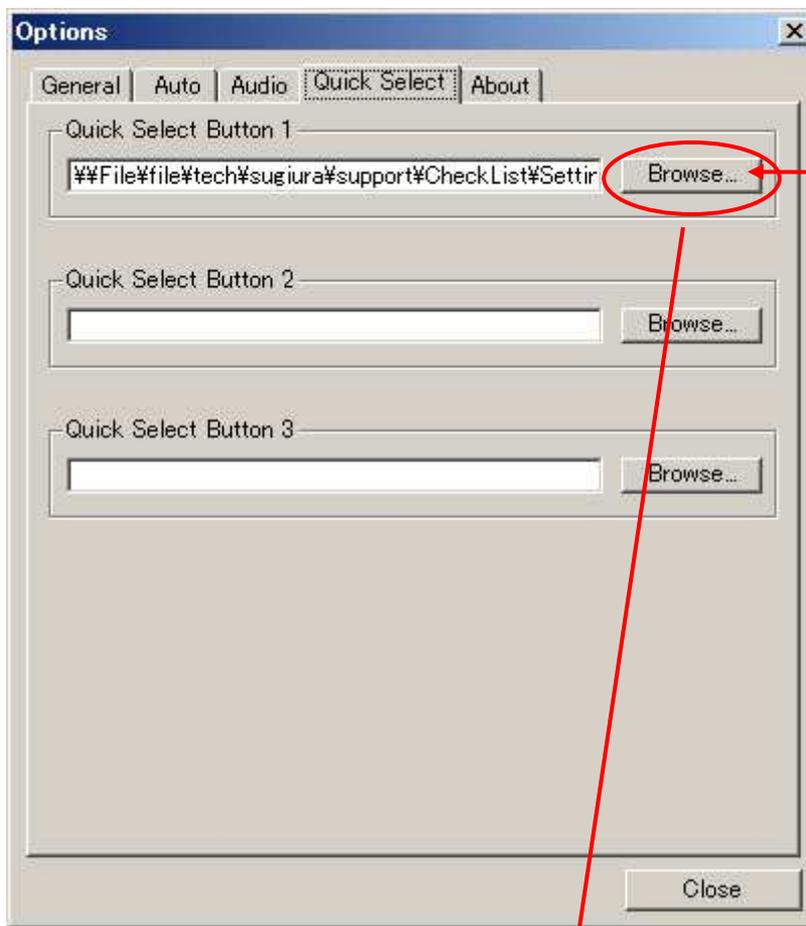
**Audio Mode**

Audio Mode の設定	動作
Direct Signal Monitoring	測定信号をダイレクトにスピーカで鳴らすモード 例) EMG, 中枢神経のレコーディング
Voltage Controlled Oscillator(VCO)	測定信号を周波数変換してスピーカで鳴らすモード 例) 細胞内記録(シールテスト、膜電位 DC モニター)

\* Axopatch 1D は VCO モードを使用しています。

### 2.3.4. Quick Select タブ

Quick Select ボタンに設定ファイルを指定するタブです。

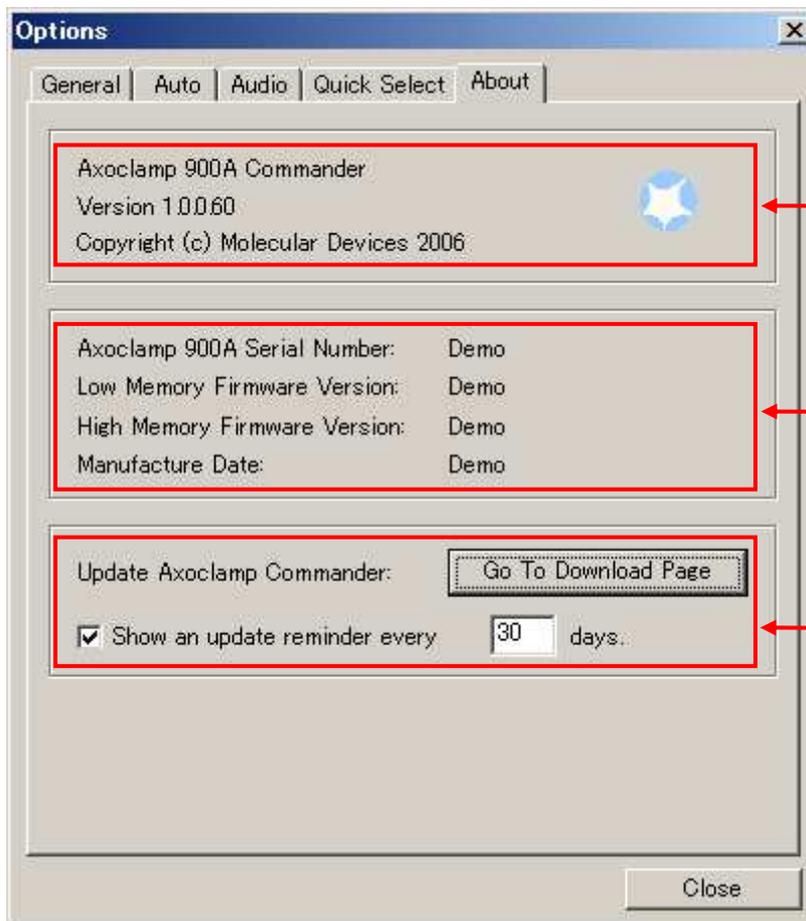


保存した設定ファイルを指定する。



クリックすると指定した設定ファイルが読み込まれる。

### 2.3.5. About タブ



ACC900A のバージョンを表示します。

Axoclamp900A のハードウェア情報を表示します。

ACC900A のアップデートを行います。また、定期的にアップデートを促すメッセージを表示することもできます。

2.4. メータ表示とモード選択

膜電位と膜電流を表示します。

ヘッドステージを認識して、電流注入抵抗を表示します。

モードを選択します。

トータル抵抗を表示します。

自動モード切替の有効 / 無効を設定します。

**電流注入抵抗**

ヘッドステージ	電流注入抵抗
HS-9A x0.1	100MΩ
HS-9A x1	10MΩ
HS-9A x10	1MΩ

**モード選択**

モード	名称
I=0	カレントクランプ(コマンドなし)
IC	カレントクランプ(コマンドあり)
DCC	非連続カレントクランプ
HVIC	ハイボルテージカレントクランプ
dSEVC	1電極非連続ボルテージクランプ
TEVC	2電極ボルテージクランプ

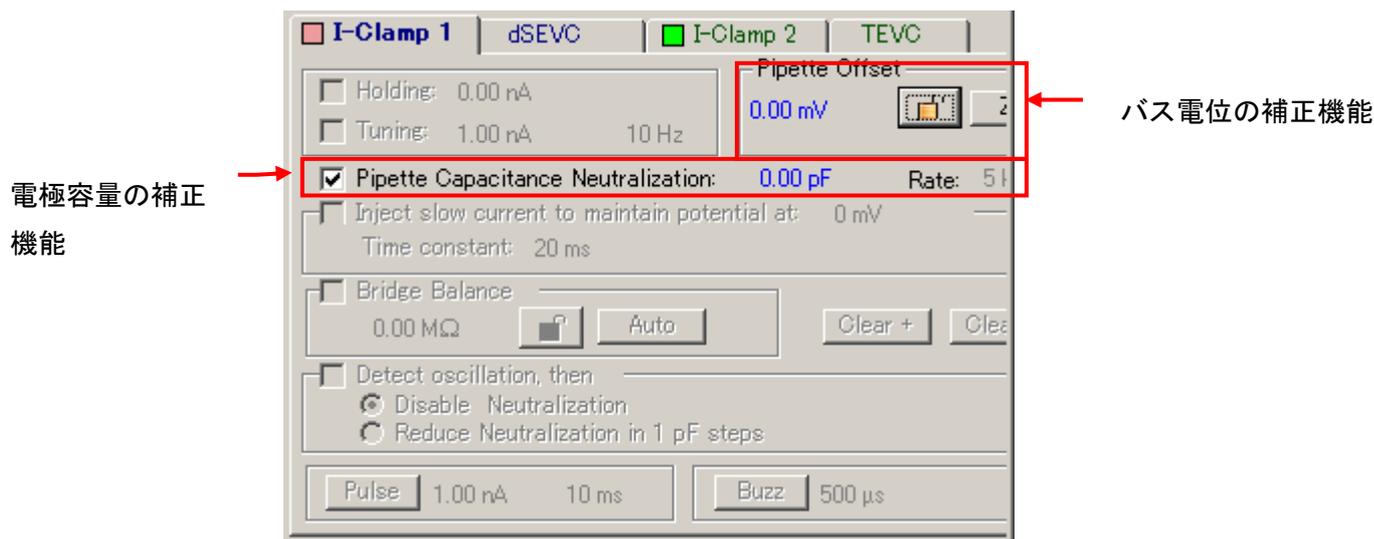
**トータル抵抗**

I=0 では使用できません。

2.5. 各モードの設定

2.5.1. I=0 モードの設定

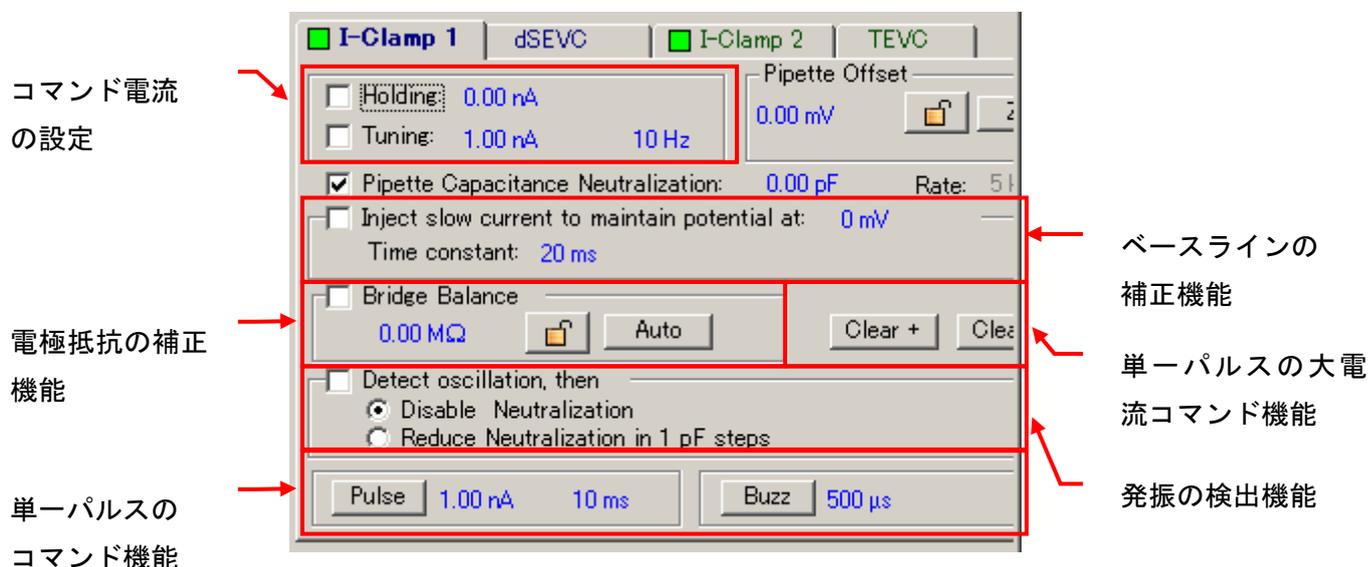
I=0 モードはコマンド機能が使用できないカレントクランプです。バス電位と電極容量を補正する機能のみ使用できます。また、チャンネル1と2の両方で使用することができます。



設定項目	機能
Pipette Offset	バス電位の補正機能 マニュアル±250mV, オート±200mV
Pipette Capacitance Neutralization	電極容量の補正機能 -10~35.5pF

### 2.5.2. IC モードの設定

IC モードはコマンド機能が使用できるカレントクランプです。I=0 モードと比較して、様々な機能が使用できます。また、チャンネル1と2の両方で使用することができます。

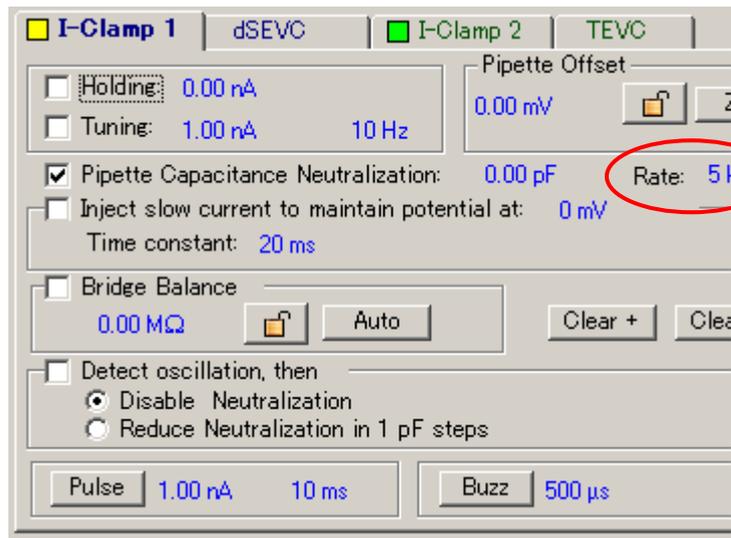


設定項目	機能
Holding	DC コマンド電流 x0.1: ±10nA, x1: ±100nA, x10: ±1000nA
Tuning	ステップコマンド電流 電流: x0.1: ±100nA, x1: ±1000nA, x10: ±10000nA 周波数: 2Hz – 5kHz
Inject slow current to Maintain potential at	ベースラインの補正機能(トラック機能) 電圧: ±1000mV 速度: 20ms, 60ms, 200ms, 600ms, 2s
Bridge Balance	電極抵抗の補正機能 10MΩ, 100MΩ, 1000MΩ
Clear +, Clear -	単一パルスの大電流コマンド 電流: x0.1: ±100nA, x1: ±1000nA, x10: ±10000nA 時間: 0.5s
Detect oscillation, then	発振の検出機能 Disable neutralization: 電極容量の補正を停止 Reduce Neutralization in 1pF Steps: 電極容量の補正值 1pF に変更する。

Pulse	単一パルスの電流コマンド 電流: x0.1: $\pm 100\text{nA}$ , x1: $\pm 1000\text{nA}$ , x10: $\pm 10000\text{nA}$ 時間: 100 $\mu$ 200 $\mu$ 500 $\mu$ ..., 100ms, 200ms, 500ms
Buzz	単一パルスの電圧コマンド 電圧: 2.5V 時間: 100 $\mu$ 200 $\mu$ 500 $\mu$ ..., 100ms, 200ms, 500ms

### 2.5.3. DCC モードの設定

DCC モードは非連続のカレントクランプです。非連続測定のスAMPLING速度を設定する必要があります。また、チャンネル1のみで使用することができ、同時にチャンネル2は I=0, IC モードで使用することができます。

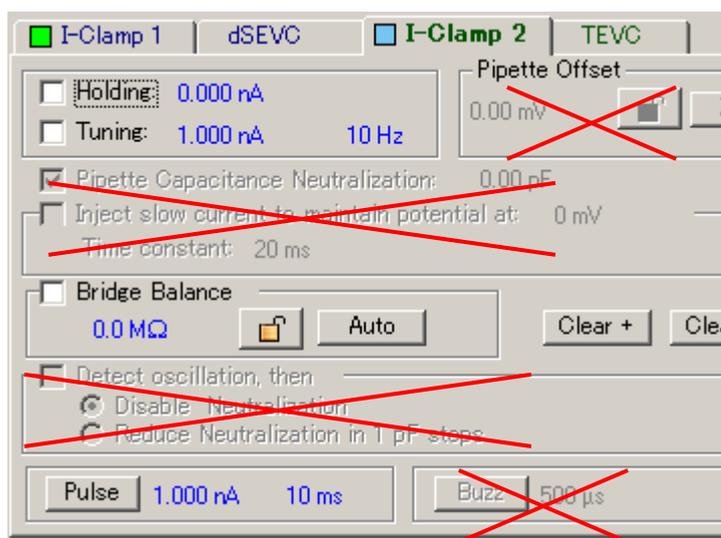


非連続測定のスAMPLING

設定項目	機能
Rate	非連続測定のスAMPLING速度 dSEVC モードと共通

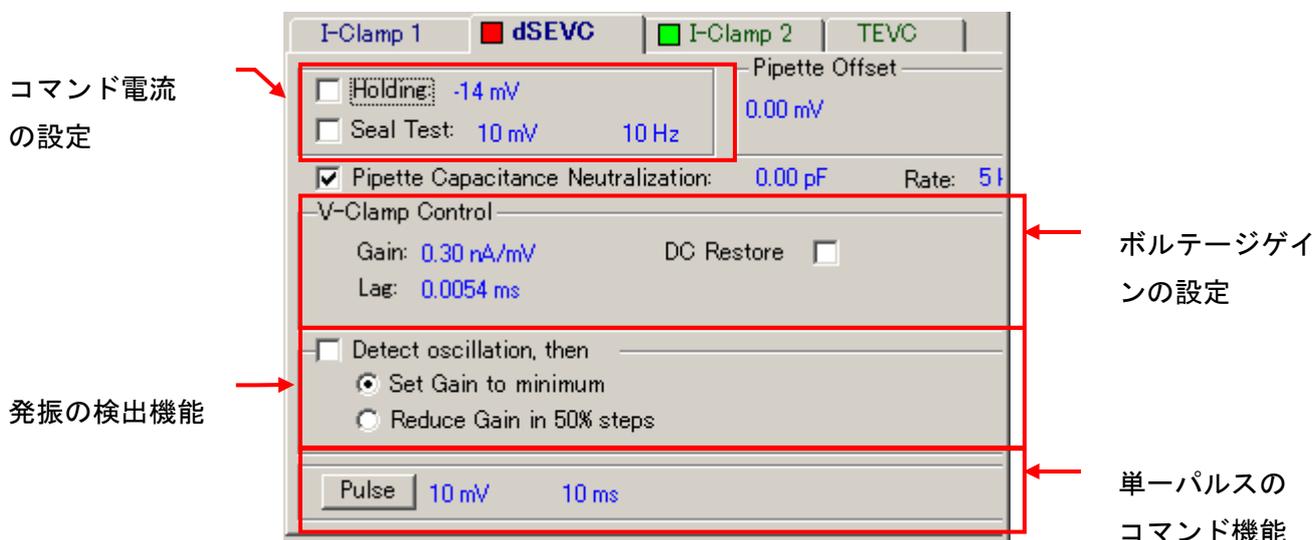
2.5.4. HVIC モードの設定

HVIC モードは大電流を流すことができるカレントクランプです。IC モードと比較して、10 倍の電流を流すことができますが、様々な機能に制限があります。また、チャンネル2のみで使用することができ、同時にチャンネル1は I=0, IC モードで使用することができます。



### 2.5.5. dSEVC モードの設定

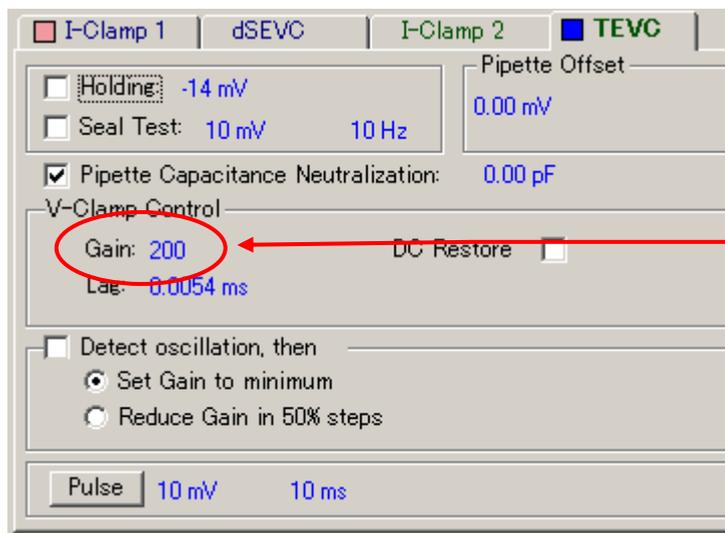
dSEVC は1電極非連続ボルテージクランプです。チャンネル1のみで使用することができ、同時にチャンネル2は I=0, I モードで使用することができます。



設定項目	機能
Holding	DC コマンド電圧 ±200mV
Seal Test	ステップコマンド電圧 電圧: ±1000mV 周波数: 2Hz – 5kHz
V-Clamp Control	電圧クランプするための設定を行います。 Gain: 電圧がクランプでき、発振しない程度に Gain を増加して下さい。 Lag: ノイズが大きい場合は増加して下さい。但し、レスポンスが悪くなるので注意して下さい。 DC Restore: 大電流測定などのとき、電圧がクランプできない場合はチェックして下さい。
Pulse	単一パルスの電流コマンド 電圧: ±1000mV 時間: 100 μ 200 μ 500 μ ..., 100ms, 200ms, 500ms

2.5.6. TEVC モードの設定

TEVC は2電極ボルテージクランプです。また、チャンネル2のみで使用することができ、同時にチャンネル1は I=0 に固定されます。Gain 以外は dSEVC と共通設定になっています。



ボルテージゲインの設定のみ、dSEVC と個別に設定します。

### 3. チュートリアル

#### 3.1. チェックリスト

セットアップとチュートリアルを確認するには以下のものがが必要です。

- Axoclamp 900A 本体
- 電源・電源ケーブル
- USB ケーブル(2 本)
- Axoclamp 900A Commander
- PC Windows 2000, XP
- 2チャンネルオシロスコープ
- BNC ケーブル(3本)
- ヘッドステージ(4つ)
  - HS-9A x0.1
  - HS-9A x1
  - HS-9A x10
  - VG-9A x100
- モデルセル2つ
  - CLAMP-1U
  - MCO-2U

VG-9A x100 ヘッドステージと MCO-2U モデルセルはオプションです。

### 3.2. Axoclamp900A と Axoclamp Commander のセットアップ

1. Axoclamp 900A に電源ケーブルを接続します。
2. Axoclamp 900A のリアパネルにある CONTROL USB ポートとコンピュータの USB ポートを USB ケーブルで接続します。
3. Axoclamp 900A のリアパネルにある SCOPE USB ポートとコンピュータの USB ポートを USB ケーブルで接続します。
4. コンピュータに Axoclamp 900A Commander をインストールします。

**Axoclamp 900A の電源がオンのとき、ヘッドステージを接続しても問題ありません。ですが、Axoclamp 900A Commander を起動するときはヘッドステージが接続されていなければなりません。**

5. HS-9A x0.1 ヘッドステージをリアパネルの CHANNEL 1 HEADSTAGE INPUT に接続します。
6. HS-9A x1 ヘッドステージをリアパネルの CHANNEL 2 HEADSTAGE INPUT に接続します。
7. ヘッドステージ1に CLMAP-1U モデルセルの ME1 を接続します。
8. ヘッドステージ1のシグナルグランドソケットとモデルセルのグランドソケットを接続し、モデルセルのスイッチを BATH に設定します。
9. 各ヘッドステージとモデルセルをシールドに入れ、シールドと Axoclamp900A のシグナルグランドを接続します。
10. Axoclamp 900A の電源をオンにします。ウィンドウズオペレーティングシステムが2つのデバイスを認識します。
11. Axoclamp 900A Commander を起動します。自動的に *Select Device* ダイアログが表示されます。

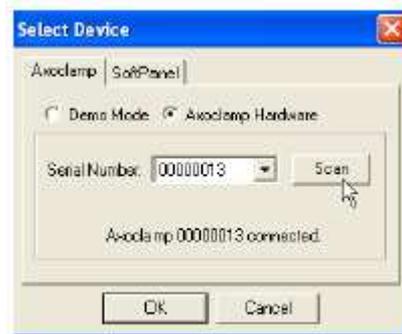


Figure 5. Select Device dialog box.

12. *Scan* ボタンをクリックすると Axoclamp 900A のシリアル番号が表示されます。Axoclamp900A に貼られてシリアル番号と一致していることを確認します。
13. *Reset to program Defaults* ボタン  を押すと警告メッセージが表示されます。”はい”を押して警告を承認します。



***Reset to program Defaults*** を行うと、細胞にトランジェントが印加されるので注意してください。

14. CHANNEL 1 SCALED OUTPUT とオシロスコープのチャンネル1を BNC ケーブルで接続します。
15. CHANNEL 2 SCALED OUTPUT とオシロスコープのチャンネル2を BNC ケーブルで接続します。
16. Axoclamp 900A のリアパネルにある SYNC OUTPUT BNC とオシロスコープの外部トリガーチャンネルを BNC ケーブルで接続します。

### 3.3. Tutorial 1:Current Clamp (IC)

1. リアパネルの CHANNEL 1 HEADSTAGE INPUT コネクタに HS-9A x0.1 ヘッドステージを接続します。
2. リアパネルの CHANNEL 2 HEADSTAGE INPUT コネクタに HS-9A x1 ヘッドステージを接続します。
3. ヘッドステージ1に CLAMP-1U モデルセルの ME1 を接続します。
4. ヘッドステージのシグナルグランドソケットと CLAMP-1U モデルセルのグランドを接続します。
5. ヘッドステージとモデルセルをシールドの中に入れ、シールドと Axoclamp900A のシグナルグランドを接続します。
6. Axoclamp 900A の電源を入れます。
7. Axoclamp 900A Commander を起動します。
8. *Reset to program Defaults* ボタン  を押すと警告メッセージが表示されます。”はい”を押して警告を承認します。



***Reset to program Defaults*** を行うと、細胞にトランジェントが印加されるので注意してください。

各ヘッドステージの電流注入抵抗が表示されます。例えば、HS-9A x0.1 ヘッドステージの場合は R0:100MΩ、HS-9A x1 ヘッドステージの場合は R0:10MΩと表示されます。

9. CLAMP-1U モデルセルのスイッチを BATH に設定し、I-CLAMP 1 タブの *Pipette*

Offset の Zero ボタンを押します。オフセット電圧は±10mV 未満に設定されます。



Figure 6. Pipette Offset controls.

10. Channel 1 Scaled Output を”Headstage 1, Membrane Potential(10mV/mV)”に設定します。

11. Tuning チェックボックスをチェックします。  Tuning: 1.000 nA

オシロスコープ1で 500mV, 10Hz の矩形波を確認できます。この電圧値はモデルセルの 50MΩ抵抗から計算できます。

計算式:  $1\text{nA} \times 50\text{M}\Omega \times (10\text{mV/mV}) = 500\text{mV}$

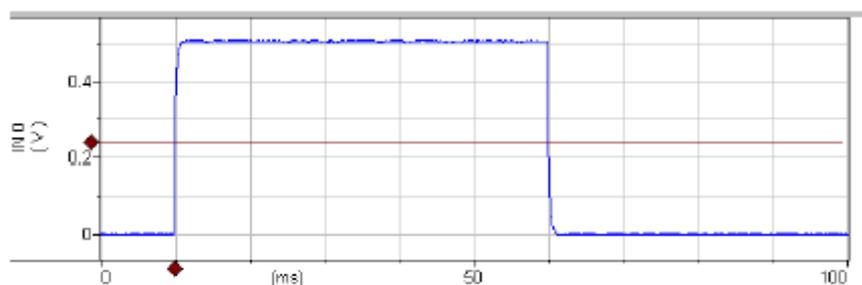


Figure 7. I-Clamp voltage measurement.

12. Bridge Balance セクションの Auto ボタンを押します。



Figure 8. Bridge Balance controls.

波形はゼロ付近まで減少して、Bridge resistance は 45-55MΩを表示します。再現されない場合は、Lock ボタンを押して、再度 Auto ボタンを押して下さい。また、Bridge resistance のフィールドをクリックすれば、bridge balance resistance がグリッド調整できるはずです。その他のフィールドについても数値をクリックしてグリッ

ド調整、直接入力ができます。数値を右クリックするとグリッド幅を設定できます。設定範囲は設定項目によって異なります。

**Note: Bridge Balance の Auto 機能は BATH 状態で使用して下さい。**

- 10Hz 波形のエッジに 1ms 幅のトランジェントが確認できます。このトランジェントは電極容量が原因です。

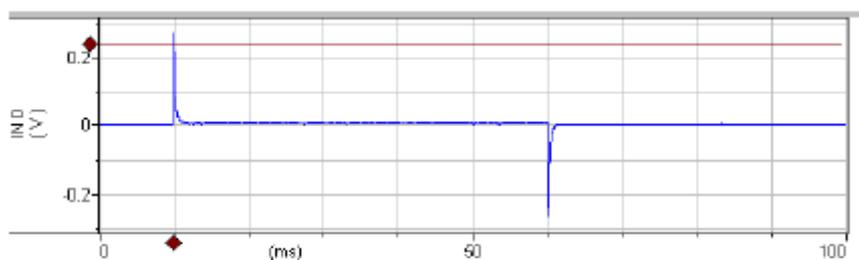


Figure 9. Bridge Balance of voltage signal in bath.

- Pipette Capacitance Neutralization チェックボックスをチェックします。容量トランジェントがゼロになるように数値を変更します。数値は 1-3pF の間になります。

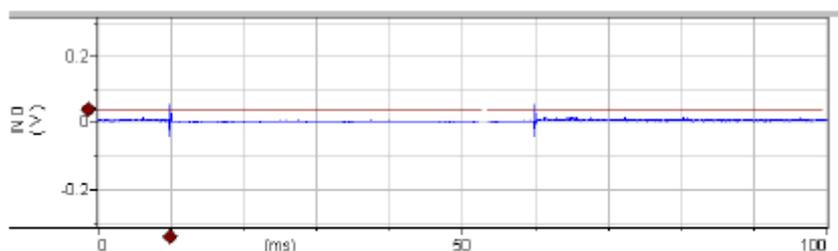


Figure 10. Pipette capacitance neutralized in bath.

- CLAMP-1U モデルセルのスイッチを CELL に設定します。約 400mVp-p の下図のような三角波(積分波形)を確認できます。

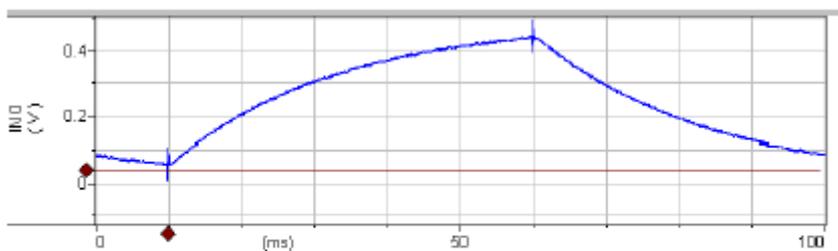


Figure 11. Compensated I-Clamp voltage signal.

## Oscillation Detection

16. *Detect oscillation* チェックボックスをチェックし、*Disable Neutralization* を選択します。

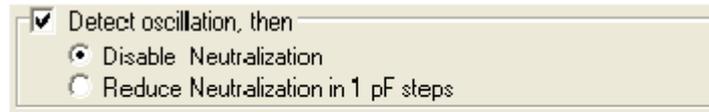


Figure 12. Oscillation detection controls for I-Clamp mode.

*Pipette Capacitance Neutralization* を 5pF に設定します。オシレーション(振動)が発生し、ポップアップダイアログが表示されます。



Figure 13. Oscillation detected message for I-Clamp mode.

*Pipette Capacitance Neutralization* のチェックボックスは無効になります。  
*Pipette Capacitance Neutralization* を前の数値 (2pF 以下) に戻し、再度 *Pipette Capacitance Neutralization* のチェックボックスをチェックします。

**Note:** **Oscillation Detection** 機能は IC, DCC, TEVC, dSEVC モードで使用できますが、HVIC モードでは使用できません。

Slow Current Injection

17. Slow current injection (track)

この機能は実験中の電極ドリフトで発生するオフセット対策として、I-Clamp モードにおける膜電位のベースラインを維持するのに使用します。

*Injection slow current to maintain potential at* を選択して、10mV に設定します。



Figure 14. Inject slow current controls.

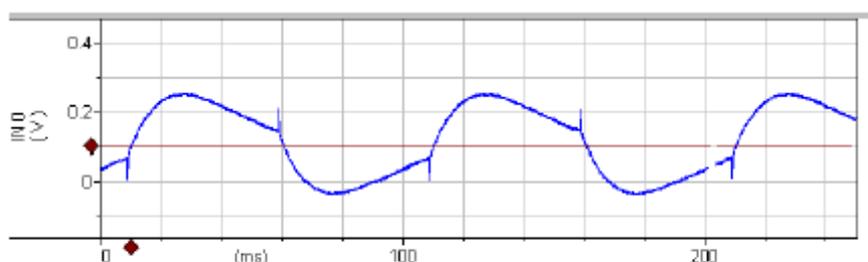


Figure 15. Slow current injection with short time constant.

波形の歪曲が確認され、手順15の波形と比較しても一致しません。これは“Slow Current”の時定数がテスト波形周波数より短いからです。また、図の赤線は平均値で、100mV(実際は 10mV)です。

*Time constant* を 2s に変更します。 *Injection slow current to maintain potential at* を再設定します。平均値が安定して、テスト波形の歪曲もなくなります。

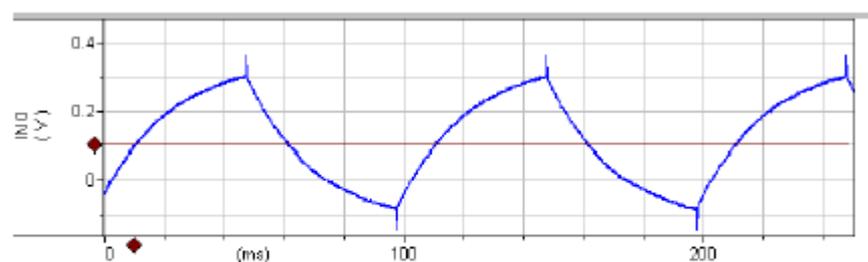


Figure 16. Slow current injection with long time constant.

### 3.4. Tutorial 2: Discontinuous Current Clamp (DCC)

Discontinuous current clamp(以下 DCC)モードは正確な電圧を測定し、特に実験中に発生する電極抵抗の微小な変化に有効です。DCC モードでは、CHANNEL 1 は電流を流すのに使用され、電圧も CHANNEL 1 で測定されます。電流注入の周期に合わせてサンプル・アンド・ホールド回路によって測定するので、トランジェントも減少します。よって、膜電位は IR(電極)電圧効果と独立して記録することができます。

DCC モードは Bridge Balance による I-CLAMP モードと比較して、電極抵抗の微小な変化に有効です。欠点は I-CLAMP モードよりノイズが多いことです。

準備するもの

- CLAMP-1U モデルセル
- HS-9A x0.1 ヘッドステージ
- HS-9A x1 ヘッドステージ

設定は Tutorial 1 手順15の状態にします。

1. Channel 1 を DCC モードに設定します。 I=0 IC DCC dSEVC
2. Rate を 10kHz に設定します。 Rate: 10 kHz

Note: DCC モードに設定すると Scope window が表示され、monitor 波形が自動的に表示されます。

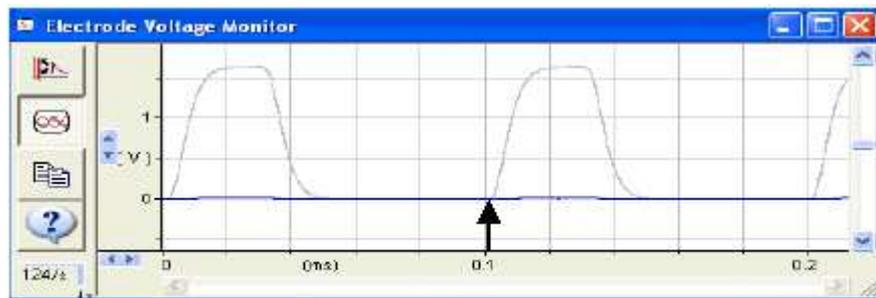
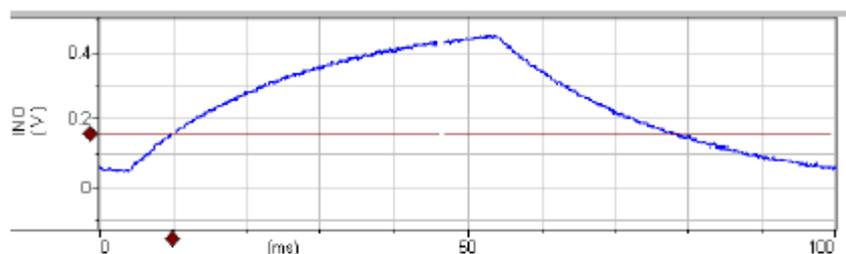


Figure 17. Monitor signal for DCC mode.

この monitor 波形の立ち上がり・立下り時間は 20  $\mu$ s 未満になります。ここで、ラン

ジェントが完全に減少されていることに注目して下さい。(Figure 17: 矢印のところ)

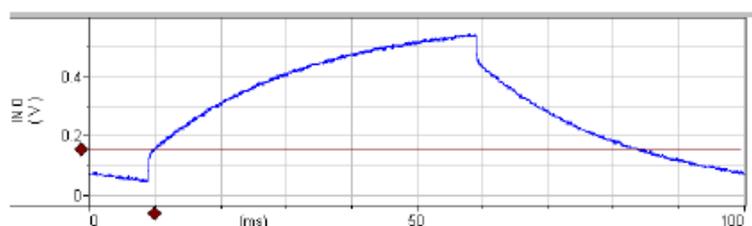
3. オシロスコープ1の波形は IC モードの波形とよく似ていて、ノイズは約2倍程度です。



**Figure 18.** Membrane potential signal in DCC mode.

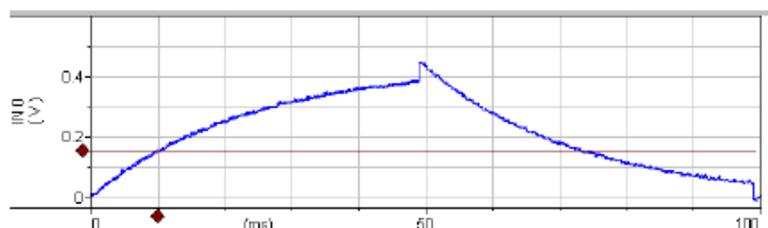
4. *I-Clamp* 1 タブの *Pipette Capacitance Neutralization* と *Rate* の数値を調整して、各数値の変化における波形の変化を観察して下さい。理想的な波形を得るにはできる限り高レートにします。そうしないと波形の断片が離れ離れになって、くずれてしまいます。

Neutralization set at 1.5 pF (under compensated):



**Figure 19.** Pipette Capacitance Neutralization under compensated in DCC mode.

Neutralization set at 3.0 pF (over compensated):



**Figure 20.** Pipette Capacitance Neutralization over compensated in DCC mode.

### 3.5. Tutorial 3: Discontinuous Single Electrode Voltage Clamp (dSEVC)

dSEVC モードは小さい細胞のボルテージクランプに使用し、2電極のインパラには使用できません。このモードは固有の大きな直列抵抗(電極抵抗など)を除去する機能があります。

準備するもの

- CLAMP-1U モデルセル
- HS-9A x0.1 ヘッドステージ
- HS-9A x1 ヘッドステージ

設定は Tutorial 1 手順15の状態にします。

1. Tutorial 2 の設定にして DCC モードを選択します。
2. Channel 1 を dSEVC モードに設定します。

**Note:** DCC モードと dSEVC モードを選択すると monitor 波形が自動的に表示されます。

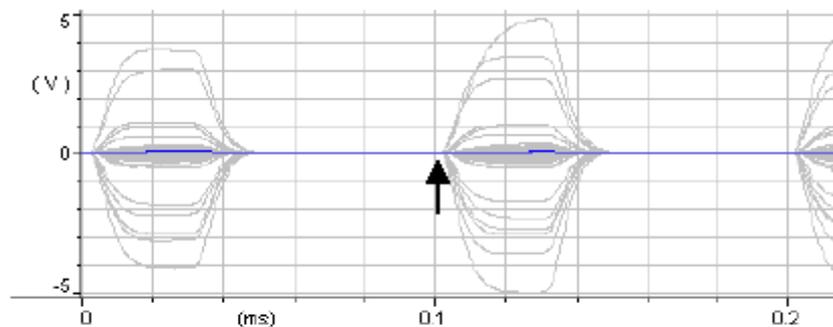
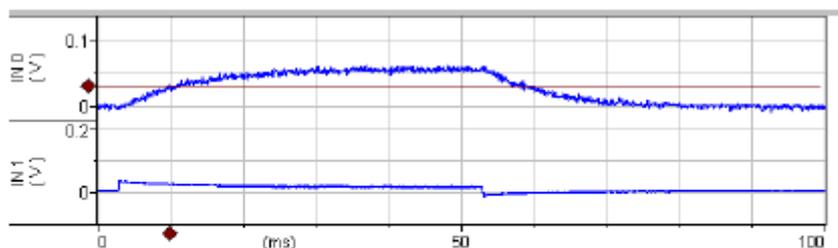


Figure 21. Monitor signal for dSEVC mode.

ここで、トランジェントが完全に減少されていることに注目して下さい。(矢印のところ) 最低でもスイッチング周波数(サンプリング)はトレースの2倍は必要です。

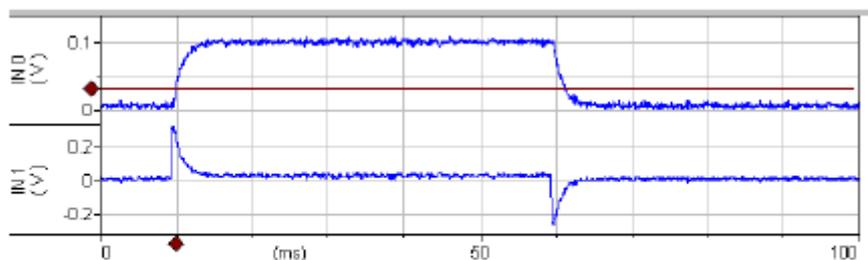
3. Seal Test チェックボックスをチェックする。
4. Channel 1 Scaled Output を”Headstage 1, Membrane Potential(10mV/mV)”に設定します。

5. *Channel 2 Scaled Output*を”Headstage 1, Membrane Current(0.1V/nA)”に設定します。



**Figure 22.** Voltage and current signals for dSEVC mode with low gain.

6. オシロスコープの膜電位の波形は、立ち上がり時間約20ms、60mVの矩形波を表示します。(実際には6mV)10mVの電圧をプログラミングしましたが、6mVまで下がっています。つまり、高ゲインが必要となります。電流波形(IN1)でも似た反応がみられます。dSEVCタブで、*Gain*を0.03nA/mVから約0.35nA/mVに設定します。オシロスコープに100mVの矩形波が確認できます。(実際には10mV)立ち上がり時間は約2msになります。



**Figure 23.** Voltage and current signals for dSEVC mode with increased gain.

7. 立ち上がりがスムーズになるように *Pipette Capacitance Neutralization*と *Rate*を調整します。*Gain*を増加させるとき、立ち上がりがオーバーシュートしないよう気をつけます。最適なのは、*Gain*が1.5nA/mVより大きく、立ち上がり時間が300 $\mu$ s未満で、ノイズが10mVp-p程度です。x軸のタイムスケールを広げると見やすくなります。

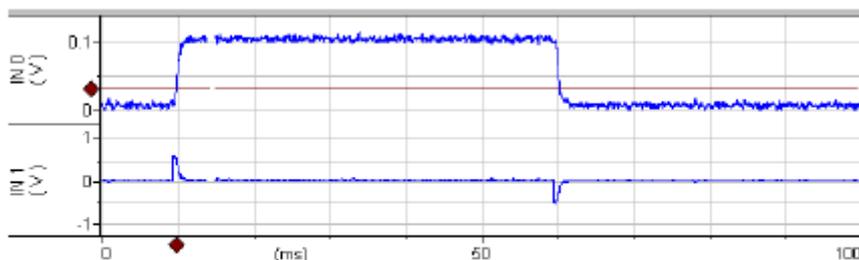


Figure 24. Voltage and current signals for dSEVC mode with further tuning.

8. 慣れてくると、もっと Gain を大きくして電流の立ち上がり時間を 0.5mS 未満になるように Pipette Capacitance Neutralization と Rate を調整することができます。

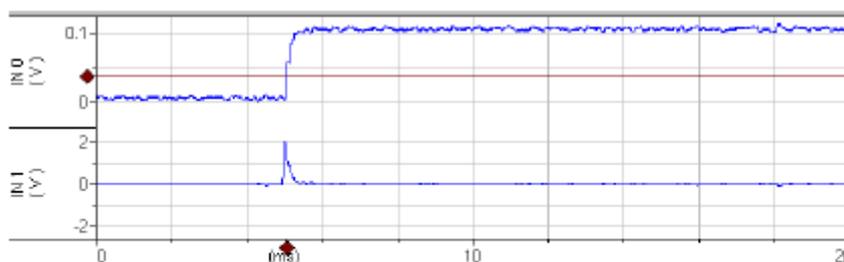


Figure 25. Voltage and current signals for dSEVC mode optimized.

9. ヘッドステージを CHANNEL 2 に接続し、CLAMP-1U モデルセルの ME2 に接続します。Channel 2 Scaled Output タブの Signal を”Headstage 2, Membrane Potential(10mV/mVp-p)”に設定します。ヘッドステージ2は細胞膜電位を測定します。Channel 2 Scaled Output と Channel 1 Scaled Output は下図のように 100mVp-p となり一致します。Channel 2 のスピードは容量成分の影響で少し遅くなります。これはヘッドステージ2の neutralization で最適な速度に調整できます。

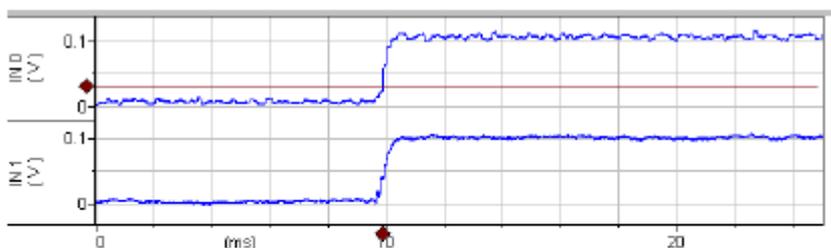


Figure 26. Monitoring the dSEVC voltage response with a second headstage. IN0 is the membrane voltage as measured by Headstage 1 (dSEVC mode). IN1 is the membrane voltage as measured by Headstage 2 with 2.5 pF Pipette Capacitance Neutralization.

### 3.6. Tutorial 4:Two-Electrode Voltage Clamp (TEVC)

#### 3.6.1. I. CLAMP-1U モデルセルを使用する場合

Two-Electrode Voltage Clamp は dSEVC より高速、低ノイズ、安定したボルテージクランプに適しています。しかし、細胞に2本電極を差し込む必要があり、小さな細胞では困難です。Headstage 1 は常に電圧クランプし、Headstage 2 は常に電流測定をします。

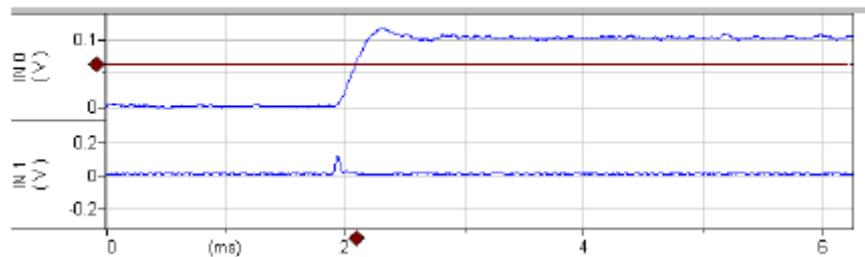
#### 準備するもの

- CLAMP-1U モデルセル
- HS-9A x0.1 ヘッドステージ(電圧クランプ)
- HS-9A x1 ヘッドステージ(電流測定)

#### 手順

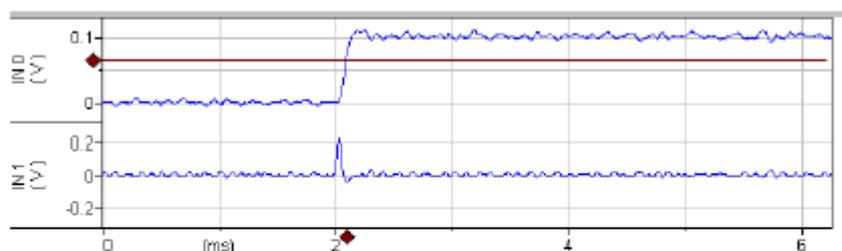
1. ヘッドステージをリアパネルのヘッドステージコネクタに接続します。
  - a. HS-9A x0.1 を CHANNEL 1 HEADSTAGE に接続します
  - b. HS-9A x1 を CHANNEL 2 HEADSTAGE に接続します。
2. 接続
  - a. Channel 1 SCALED OUTPUT をオシロスコープ1に接続します。
  - b. Channel 2 SCALED OUTPUT をオシロスコープ2に接続します。
3. *Reset to program Defaults* ボタンをクリックし、警告を承認します。
4. モデルセル
  - a. ヘッドステージ1に CLAMP-1U モデルセルの ME1 を接続します。
  - b. ヘッドステージ2に CLAMP-1U モデルセルの ME2 を接続します。
  - c. ヘッドステージのシグナルグランドソケットをモデルセルのグランドソケットに接続します。
5. CLAMP-1Uモデルセルを BATH に設定して、各チャンネル I-Clamp 1 と I-Clamp 2 タブの *Pipette Offset* を使って電圧をゼロに調整します。
6. I-Clamp 1 タブを選択して、電極容量を補正していきます。(I-CLAMP 1 のみ)
  - a. *Tuning* チェックボックスをチェックします。

- b. CLAMP-1U モデルセルを CELL に設定します。
  - c. *Pipette Capacitance Neutralization* チェックボックスをチェックします。
  - d. Channel 1 のエッジがオーバーシュートする直前まで neutralization の数値を調整します。
7. Channel 2 を TEVC モードに設定します。
  8. *Seal Test* のチェックボックスをチェックします。  Seal Test: 10 mV 10 Hz
  9. Scaled output の signal を設定します。
    - a. Channel 1" Headstage 1, Membrane Potential (10mV/mV)"
    - b. Channel 2" Headstage 2, 0.1 x Membrane Current (1V/ $\mu$ A)"
  10. *Gain* をオーバーシュート直前まで調整します。立ち上がり時間は約 200  $\mu$ s になります。



**Figure 27.** Voltage and current signals for TEVC mode. IN0 is the membrane potential ( $\times 10$ ). IN1 is the membrane current (1 V/ $\mu$ A). The voltage-clamp Gain is 200. Pipette Capacitance Neutralization is 2.5 pF.

11. 最適な立ち上がり時間にするために、*Pipette Capacitance Neutralization* を 1pF 単位で増加し、*Gain* も増加してオーバーシュートを除去します。オシレーションを起こしたら、*Pipette Capacitance Neutralization* と *Gain* を増加してはいけません。練習すれば、立ち上がりお時間を 100  $\mu$ s 未満にでき、*Gain* は約 350-400 になり、ノイズは 20mVp-p (細胞では 2mV) になります。オシロスコープ2の電流では、200  $\mu$ s 未満になります。



**Figure 28.** Optimizing TEVC mode. IN0 is the membrane potential ( $\times 10$ ). IN1 is the membrane current (1 V/ $\mu$ A). The voltage-clamp Gain is 388. Pipette Capacitance Neutralization is 3.5 pF.

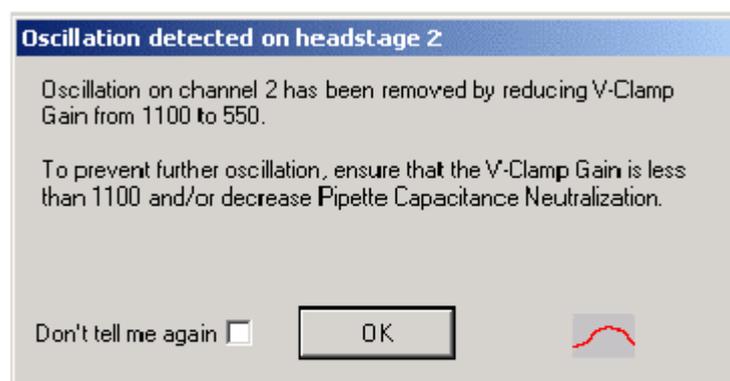
### Oscillation Detection

12. TEVC タブの *Detect oscillation* セクションで *Reduce gain 50% steps* か *Gain to minimum* を選択します。



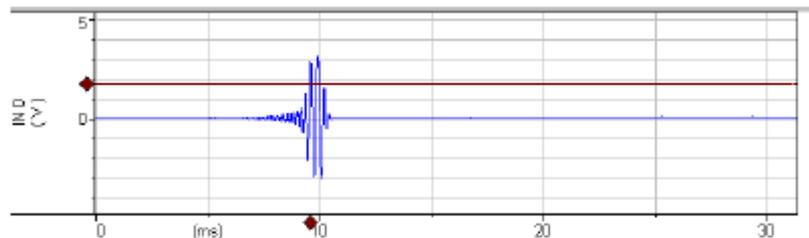
**Figure 29.** Oscillation detection settings for voltage-clamp modes (TEVC, dSEVC).

13. *Detect oscillation, then* チェックボックスをチェックします。
14. *Gain* をどんどん増加させるとオシレーションを起こします。オシレーションを検出するとメッセージが表示されます。例えば、TEVC モードでは 1000-2000 の間で発生します。



**Figure 30.** Oscillation detected message for voltage-clamp modes (TEVC, dSEVC).

15. 下図はオシレーションの例です。オシレーションを検出して約 2ms に戻されています。



**Figure 31.** Automated suppression of voltage signal oscillation in TEVC mode. IN0 is 10× the membrane voltage.

Note: Oscillation detection は IC (両チャンネル), DCC, dSEVC, TEVC モードで使用できます。I=0, HVIC モードでは使用できません。

### 3.6.2. II. MCO-2U モデルセルと VG-9A Bath Clamp ヘッドステージを使用する

オーサイトのイオンチャンネルでは電流が  $50 \mu\text{A}$  以上と非常に大きいです。電流が大きい場合、バス抵抗は通常は数  $\text{k}\Omega$  であり、測定誤差の大きな要因になります。例えば、バス抵抗が  $1\text{k}\Omega$  があると膜電位の測定誤差は  $1\text{mV}/\mu\text{A}$  となります。加えて、リガンド依存性チャンネルでは、膜抵抗が失われます。

大電流のボルテージクランプでは厳密な測定ができません。これらの問題の対策としてバーチャルグランドヘッドステージを使用します。

準備するもの

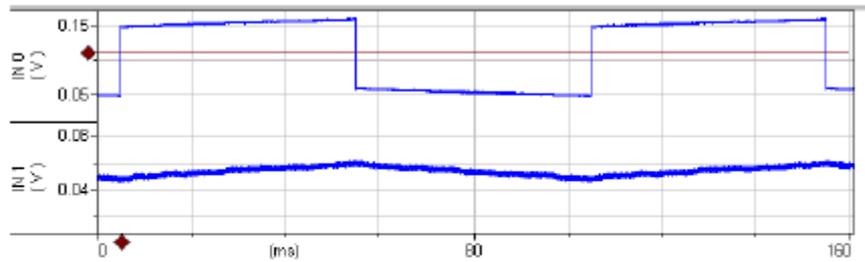
- MCO-2U モデルセル
- HS-9A x1 ヘッドステージ
- HS-9A x10 ヘッドステージ
- VG-9A x100 ヘッドステージ (バーチャルグランドヘッドステージ)

手順

1. ヘッドステージをリアパネルのヘッドステージコネクタに接続します。
  - a. HS-9A x1 を CHANNEL 1 HEADSTAGE に接続します。
  - b. HS-9A x10 を CHANNEL 2 HEADSTAGE に接続します。
  - c. VG-9A x100 を AUXILIARY HEADSTAGE 1 に接続します。

2. 接続
  - a. ヘッドステージ1に MCO-2U の E#1 を接続します。
  - b. ヘッドステージ2に MCO-2U の E#2 を接続します。
  - c. VG-9A ヘッドステージの red(sense), white(bath)ソケットと MCO-2U モデルセルの同色のターミナルを短めに接続します。(2mm ピンで接続できます)
3. MCO-2U スイッチが 1M $\Omega$ (膜抵抗)になっていることを確かめる。
4. Channel 1 と Channel 2 の SCALED OUTPUT BNC をオシロスコープのチャンネル1と2に接続し、リアパネルにある SYNC OUTPUT BNC をオシロスコープのトリガー端子に接続してトリガーとして使用する。
5. *Reset to program Defaults* ボタンをクリックして、警告を承認します。
6. Headstage 1 の R0 が 10M $\Omega$ 、Headstage 2 の R0 が 1M $\Omega$ であることを確認する。
7. Channel 1,2 の *Pipette Offset* をゼロに調整する。
8. Headstage 1 の *Tuning* を 10.0nA に設定してチェックボックスをチェックする。  

9. Scaled Output の signal を選択します。
  - a. Channel 1 は” Membrane Potential, 10mV/mV ”
  - b. Channel 2 は” Membrane Potential, 10mV/mV”
10. オシロスコープのチャンネル1には、+10mV のランプ波形による+100mV のステップ波形、-10mV のランプ波形による-100mV のステップ波形が確認できます。(実際には+10mV から-10mV)
11. ステップの立ち上がり時間は約 50  $\mu$ s になります。これは既に十分速いので、電極容量の補正は必要ありません。
12. 既に Headstage 2 にモデルセルの E#2 が接続されていて、オシロスコープのチャンネル2は 10mVp-p の三角波を確認できます。



**Figure 32.** IC mode with 10 nA Tuning pulse in channel 1. IN0 is 10× the membrane voltage in channel 1 and IN1 is 10× the membrane voltage in channel 2.

13. TEVC タブの Lag を約 0.2ms に設定します。 Lag 0.21 ms

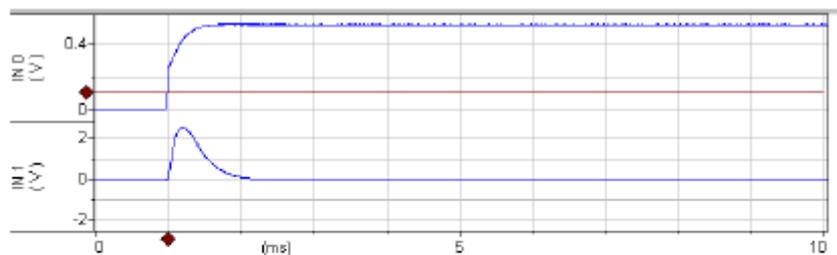
14. TEVC モードに設定します。 I-O IC HVIC TEVC

15. Scaled Output を選択します。

- a. Channel 1 は”Headstage 1, Membrane Potential, 10mV/mV”
- b. Channel 2 は”Headstage 2, 0.1 x Membrane Current, 0.1V/μA”

16. Seal Test をチェックして 50mV に設定します。  Seal Test 50 mV 10 Hz

17. オシロスコープチャンネル1の電圧波形のエッジをオーバーシュートする直前まで Gain を増加させます。約 3000-3500 程度になります。オシレイションしたら Gain の増加しないで下さい。下図のような波形がよいです。



**Figure 33.** TEVC mode with the MCO-2U model cell. IN0 is 10× the membrane voltage. IN1 is the membrane current (0.1 V/μA). The voltage-clamp gain is 4500.

18. MCO-2U スイッチを 10k $\Omega$ ポジションに変更します。オシロスコープチャンネル2では、電圧パルスを増加させると定常状態の電流が約 450mV(45  $\mu$ A)になります。これはボルテージクランプ電圧が 48mV まで下がってしまうのが原因です。この対策として DC Restore 機能があります。

#### DC Restore

DC Restore は大電流測定時に発生するステップ電圧不足を解消して、正確な電圧制御を提供します。例えば、リガンド依存性チャンネルの測定などに役立ちます。この機能は TEVC, dSEVC モードで使用できます。

1. DC Restore をデモするために *Seal Test* のチェックをはずし、*Holding* をチェックします。
2. MCO-2U スイッチを 1M $\Omega$ に変更します。
3. *Holding* を 50mV に設定すると、Headstage 1 のメータ" V "は 50mV を表示します。
4. MCO-2U スイッチを 10k $\Omega$ に変更します。
5. メータ" V "の表示は 47mV まで減少します。
6. *DC Restore* をチェックします。
7. メータ" V "は 50mV に戻ります。DC Restore は DC Gain を大きくします。(通常 1,000,000 以上)
8. (AC) *Gain* を 500 まで減少しても、メータ" V "は 50mV を維持します。AC *Gain* が低くても、高い DC *Gain* でクランプしているからです。
9. AC *Gain* が低いことを検証します。*DC Restore* のチェックをはずすと、メータ" V "は 40mV まで減少します。10mV 以上が不足分となります。

### 3.7. Tutorial 5:Auto Mode Switching

通常、モード切換えはマニュアル操作で行いますが、I-Clamp から V-Clamp に自動的に切換える(V-Clamp から I-Clamp に戻す)機能があります。この自動モード切換えには、I-Clamp から dSEVC や TEVC に切換えるときのパラメータを設定する必要があります。切換え条件は外部トリガーか、正負のスレッシュホールド  $V_m$  の判定に同期できます。

モード自動切換えを有効にするに前に

- I-Clamp モードを設定します。
- V-Clamp モードを設定します。

I-Clamp モードから V-Clamp モードに切換える方法は2つあります。

- MODE BNC に high(2-5V)か low(0-0.8V)を入力する。
- ヘッドステージ1がある一定の膜電位をクランプするときの方向で決めます。(正から負へ、または負から正へ)

\* 切り替え時間は 2-500ms の間で設定できます。

I-Clamp モードに戻す方法は3つあります。

- マニュアル操作で戻す
- MODE BNC に high(2-5V)か low(0-0.8V)を入力する。V-Clamp モードに切り替えたときが high なら、I-Clamp モードに戻すときは Low となります。
- 時間で戻す(2ms-500s の間で設定する)

#### 3.7.1. Example of Auto Mode Switching

ヘッドステージ1の膜電位が負から正の方向で+20mV に達すると、ヘッドステージ2が I-Clamp モードから TEVC モードに切換わる。500ms 間は 0-10mVp-p, 10Hz Seal Test を出力して TEVC を行い、I-Clamp に戻す。このサイクルを繰り返す。以下にこの設定をしていきます。

V-Clamp モードを設定するとき、V-Clamp タブの Oscillation Detection をチェックされていないことをよく確認して下さい。Reset to program Defaults ボタンをクリックし、警告を承認します。

1. Channel 1,2 を IC モードに設定します。
2. Scaled Output 1 signal を”Headstage 1, Membrane Potential (10mV/mV)”に設定します。
3. Scaled Output 2 signal を”Headstage 2, Membrane Potential (10mV/mV)”に設定します。
4. SCALED OUTPUT 1,2 をオシロスコープの1と2に接続します。
5. I-Clamp2 タブの *Tuning* をチェックします。
6. オシロスコープ1には、おおよそ 50-400mV の三角波が確認できます。
7. TEVC タブの *Seal test* をチェックします。

### 3.7.2. Setup of Auto Mode

1. *Options* ボタンを押します。 
2. *Auto* タブを選択します。

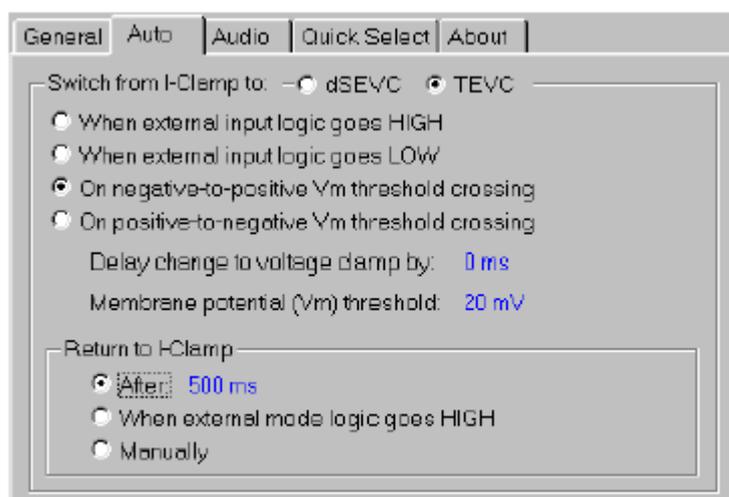


Figure 34. Settings dialog for Automatic Mode Switching.

3. *TEVC* を選択します。

4. *On negative to positive V<sub>m</sub> threshold crossing* を選択します。
5. *Membrane potential V<sub>m</sub> threshold* を +20mV に設定します。
6. *Return to I-Clamp* を 500ms に設定します。

モード自動切換えタイミングは SYNC BNC から出力されます。

7. *General* タブをクリックします。
8. *Sync Output* で *Mode* を選択します。これで、リアパネルの SYNC BNC からモード信号が出力されます。LOW は I-Clamp、HIGH は V-Clamp です。

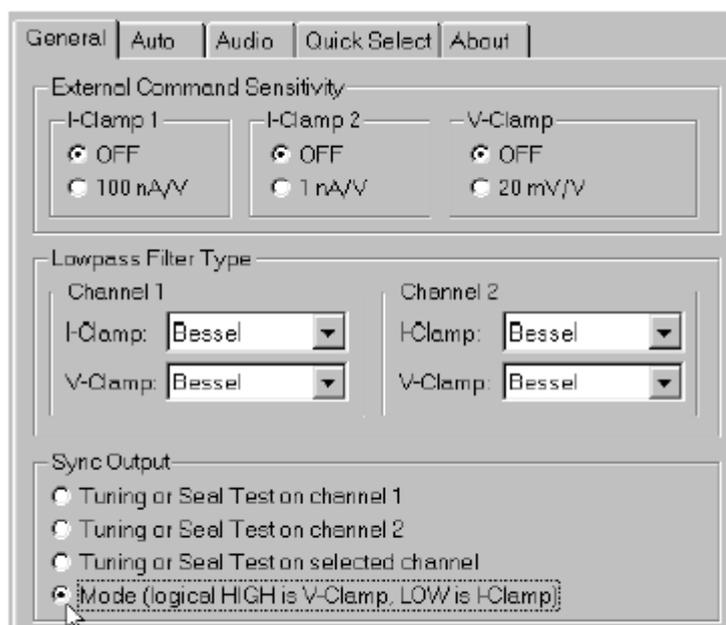
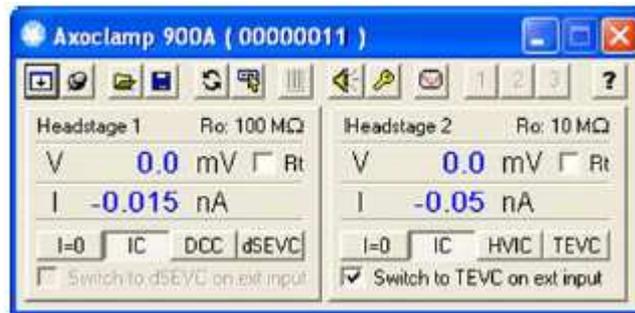


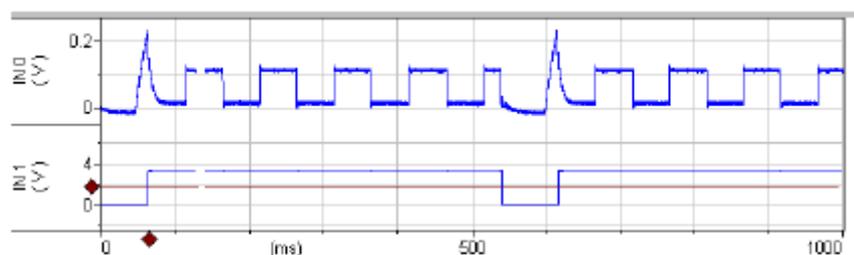
Figure 35. Setting up Sync Output.

9. ダイアログを閉じます。
10. オシロスコープ1を Headstage 1 SCALED OUTPUT に接続します。
11. オシロスコープ2を Headstage 2 SCALED OUTPUT に接続します。

12. headstage 2 のメータの下にある *Switch to TEVC on ext input* チェックボックスをチェックします。



下図は波形の結果です。



**Figure 36.** Automated Mode Switching signals. IN0 is 10× the membrane potential in Channel 1. IN1 is the Mode signal. HIGH is V-Clamp mode and LOW is I-Clamp mode.

波形の説明です。

- I-Clamp モードでは始めは膜電位がゼロになっています。
- Headstage 2 は 1nA の電流を注入しています
- Headstage 1 の電流波形の 50ms 付近に注目すると、立ち上がりの膜電位 (アクションポテンシャル) が見られます。
- 膜電位が 20mV に到達すると V-Clamp(TEVC)モードに切り替わります。
- 0-10mV, 10Hz の Seal Test が始まります。
- V-Clamp(TEVC)に切り替わった 500ms 後、I-Clamp モードに切り替わります。
- これを繰り返します。

### 3.8. Tutorial 6:High-Voltage Current Clamp (HVIC)

ハイボルテージカレントクランプ(HVIC)はヘッドステージ2のみで使用できます。HVICは大電流を必要とする細胞外イオン導入や、電極抵抗が大きいときなどに使用されます。例えば、1  $\mu$ A 電流を CLMAP-1U にモデルセルに導入したいなら、100V 以上のダイナミックレンジが必要となります。

欠点は、電極容量の補正ができず、通常のカレントクランプに比べて、スピードも遅く、ノイズも大きくなります。

**Note:**10nA 以下の電流を使用する場合は、オフセット電圧を確認が発生する場合があります。その場合は、ホールディング電流を使用して削除して下さい。

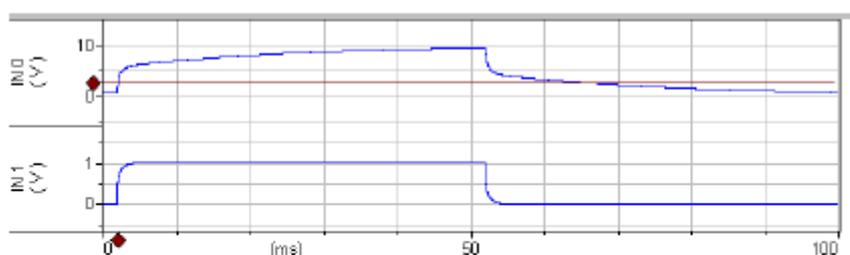
準備するもの

- CLAMP-1U モデルセル
- HS-9A x1 ヘッドステージ

手順

1. HS-9A x1 を HEADSTAGE 2 コネクタに接続します。
2. HEADSTAGE 1 には何も接続しません。
3. HS-9A x1 ヘッドステージに CLAMP-1U モデルセルを接続し、HS-9A ヘッドステージのシグナルグランドソケットと CLMAP-1U モデルセルのグランドソケットも接続します。
4. *Reset to program Defaults* ボタンをクリックし、警告を承認します。
5. Headstage 2 タブの HVIC モードを選択します。
6. I-CLAMP 2 タブにおいて、*Tuning* を 1000nA に設定してチェックボックスをチェックします。
7. オシロスコープ1と SCALED OUTPUT 1 を接続します。

8. Channel 1 SCALED OUTPUT signal を”Headstage 2, 0.1xMembran Potential” に設定します。
9. オシロスコープ2と SCALED OUTPUT 2 を接続します。
10. Channel 2 SCALED OUTPUT signal を”Headstage 2, 0.1xMembran Current” に設定します。



**Figure 37.** HVIC mode. IN0 is the headstage voltage  $\times 0.1$  (100 V<sub>p-p</sub>). IN1 is the membrane current (1 V/ $\mu$ A). The rise time of the current signal is about 1 ms.

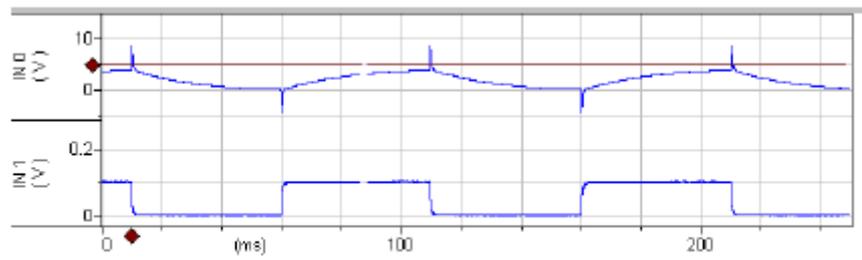
この波形の形は通常のカレントクランプとよく似ています。しかし、スピードも遅くなり、振幅は大きくなっています。(±180Vp-p)

11. signal が”Membrane Potential(1mV/mV)”のとき、膜電位が±10Vp-p 未満なら、*Bridge Balance* を使用できます。
12. *Tuning* を 100nA に設定します。
13. “Membrane Potential(1mV/mV)”を選択します。



**Figure 38.** Bridge Balance settings.

14. *Bridge Balance* チェックボックスをチェックして、50MΩ付近に設定します。



**Figure 39.** HVIC mode with Bridge Balance.

15. HVIC では Bridge Balance が  $50.1\text{M}\Omega$  になります。  
電圧トレースの 1ms スパイクは HVIC のレスポンス遅れが原因です。