

# **MEMBRANPOTENTIAL OCH JONKANALER**

**Laborationshandledning**

## 1. BAKGRUND OCH TEORI

### MEMBRANPOTENTIAL

Diffunderande joner kan ~~kan~~ ge upphov till en elektriska potentialer. Om ett stationärt tillstånd inställer sig talar vi om jämviktpotentialer. I annat fall kallas potentialen för en diffusionspotential. I detta fall utjämnas så småningom koncentrationsskillnaderna hos de diffunderande jonerna om inte andra transportprocesser kan utnyttjas för att motverka utjämnningen. I levande celler upprätthålls koncentrationsgradienterna med hjälp av aktiv transport (jonpumpar).

Potentialen över plasmamembranet i en levande cell utgörs huvudsakligen av en diffusionspotential tillsammans med ett litet bidrag från elektrogena jonpumpar. De membranpotentialer som kommer att behandlas inom ramen för denna laboration är av typen diffusionspotentialer.

#### Villkor för uppkomsten av en membranpotential

För att en membranpotential skall uppkomma genom diffusion av joner krävs dels en koncentrationsskillnad över membranet, dels att membranet har olika permeabilitet för de olika slagen av joner. Hos en levande cell härrör permeabiliteterna från jonselektiva kanaler i membranet. I laborationsövningarna är situationen i princip densamma om än något enklare. För bägge övningarna utnyttjas tvåkammersystem med möjlighet att välja två oberoende lösningar av joner. I det första momentet (membranpotentialmätning) används ett sk dialysmembran, som har förhållandevis stora porer, betydligt större än de jonkanaler som normalt förekommer i biologiska system. Dialysmembranet är därför inte selektivt permeabelt för något jonslag. Den selektivitet i jontransporten som ändock föreligger härrör från jonernas olika rörlighet i lösningen. I det följande laborationsmomentet (registrering från jonkanaler) utnyttjas ett artificiellt lipidmembran med en enkel typ av jonkanal, som är selektivt permeabel för envärda katjoner.

#### Elektrokemisk jämvikt

Generellt påverkas joner av två krafter nämligen koncentrationsskillnaden (kemisk potentialskillnad) som ger upphov till diffusion samt spänningen (elektrisk potentialskillnad) som ger upphov till elektroforetisk jonvandring. När summan av diffusionsflödet och den elektroforetiska jonvandringen är lika med noll för en viss jon råder sk elektrokemisk jämvikt för denna jon. Den elektrokemiska jämviktpotentialen (egentligen potentialskillnaden) ges av Nernsts ekvation (se avsnittet membranbiofysik), som i förenklad form har följande utseende vid rumstemperatur:

$$U_2 - U_1 = \frac{1}{z} \cdot 58 \cdot \lg \frac{c_1}{c_2}$$

där  $U_1$  och  $U_2$  är potentialerna och  $c_1$  och  $c_2$  är koncentrationerna i de bägge kamrarna (numrerade 1 respektive 2). Konstanten 58 har sorten millivolt;  $z$  betecknar jonens valens. Elektrokemisk jämvikt uppkommer om membranet är selektivt permeabelt för enbart en viss jon men kan också uppkomma om flera joner är permeabla, förutsatt att jonkoncentrationerna

uppfyller vissa inbördes relationer (sk Donnanjämvikt). Om membranpotentialen från början är noll kommer diffusionen av joner att inom några millisekunder ge upphov till en asymmetrisk laddningsfördelning som leder till uppkomsten av en membranpotential. Denna potential är lika med den permeabla jonens jämviktspotential.

Som framgår av ekvationen varierar jämviktspotentialen logaritmiskt med koncentrationsförhållandet. En potential med detta koncentrationsberoende benämnes Nernstpotential och utgör ett viktigt och praktiskt användbart kriterium på jämviktsfördelning av joner i biologiska och kemiska system. Koncentrationsberoendet har viktig medicinsk konsekvens nämligen att varje form av elektrolytrubbning också avspeglas i form av ändrade bioelektriska potentialer.

### Diffusionspotential

Om flera jonslag, såväl katjoner som anjoner, kan röra sig men diffunderar olika snabbt uppstår också efter en kort tid en separation av positiva och negativa laddningar. Situationen har likheter med hur en jämviktspotential uppkommer men skiljer sig genom att ett statiskt jämviktstillstånd inte uppnås. Så småningom sker därför en fullständig koncentrationsutjämning. Vi kan emellertid betrakta de båda kamrarna i experimentsystemen som mycket stora och under den tid vi observerar potentialen förblir då systemet i stort sett oförändrat.

Vi tänker oss att bägge kamrarna är fyllda med en lösning innehållande envärda kat- och anjoner. Som tidigare betecknar  $c_1$  och  $c_2$  jonkoncentrationerna i de bägge kamrarna (lika för katjoner och anjoner på grund av elektroneutralitetsvillkoret). Om membranet självt är oselektivt bestäms diffusionen av jonernas rörligheter (mobiliteter) som vi betecknar med  $u$  respektive  $v$ . För att härleda den membranpotential som inställer sig i detta system när mobiliteterna har godtyckliga värden kan vi först betrakta extremfallen, d v s att enbart en av jonerna har en mobilitet skild från noll.

Om enbart den positiva jonen är rörlig blir membranpotentialen lika med den elektrokemiska jämviktspotentialen för jonen ifråga, som ges av Nernsts ekvation (se ovan). Om vi utnyttjar att jonens valens är lika med +1 får vi uttrycket:

$$U_2 - U_1 = + 58 \cdot \lg \frac{c_1}{c_2}$$

Om å andra sidan enbart den negativa jonen är rörlig så blir membranpotentialen på liknande sätt:

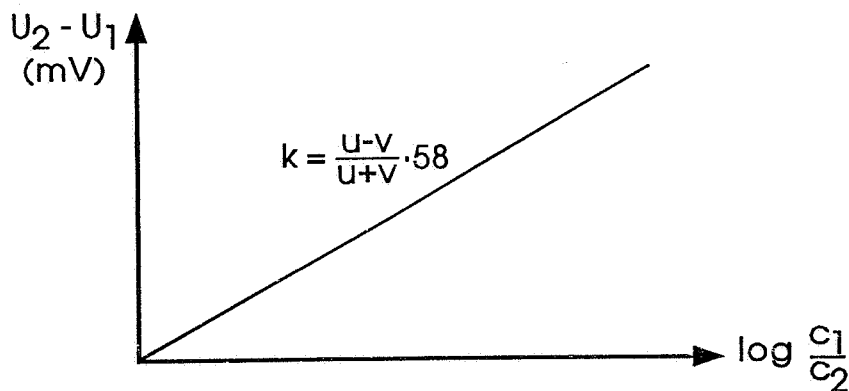
$$U_2 - U_1 = - 58 \cdot \lg \frac{c_1}{c_2}$$

där vi har utnyttjat att valensen är lika med -1. Om nu bägge jonerna är rörliga kommer membranpotentialen att anta ett värde mellan de två ytterligheter som ges av ovanstående ekvationer. Man kan visa att detta "kompromissvärde" ges av formeln:

$$U_2 - U_1 = \frac{u - v}{u + v} \cdot 58 \cdot \lg \frac{c_1}{c_2}$$

Av uttrycket framgår att ingen diffusionspotential erhålls då mobiliteterna är lika för katjoner och anjoner ( $u = v$ ). Om å andra sidan membranet är impermeabelt för någon av jonerna ( $u = 0$  eller  $v = 0$ ) så reduceras uttrycket till det som motsvarar en ren jämviktspotential. Det senare är förhållandet i glaselektroder, som är helt impermeabla för anjoner och som således kan utnyttjas för elektrisk mätning av katjonkoncentrationer. Observera att diffusionspotentialen beror av såväl jonkoncentrationer som jonpermeabiliteter (i detta fall jonmobiliteter). Permeabilitetsändringar i membran kan därför ge uphov till ändringar i membranpotentialer och utgör den fundamentala mekanismen för uppkomsten av bioelektriska impulser.

Det logaritmiska sambandet mellan diffusionspotentialen och koncentrationsförhållandet kan åskådliggöras i ett diagram genom att avsätta potentialdifferensen som funktion av logaritmen för koncentrationsförhållandet. Därvid erhålls en rät linje (Figur 1). Linjens lutning (k-värde) kan identifieras som koefficienten framför logaritmuttrycket i ovanstående ekvation. Ur ett experimentellt bestämt värde på k (se membranpotentialmätning) kan förhållandet mellan jonernas mobiliteter ( $u/v$ ) beräknas.



Figur 1. Diffusionspotentialen är linjärt beroende av koncentrationsförhållandets logaritm. Linjens lutning beror av de ingående jonernas mobiliteter.

## 2. MÄTNING AV MEMBRANPOTENTIAL

*Avsikten med denna övning är att mäta membranpotentialen i ett tvåkammersystem som funktion av koncentrationsförhållandet. Sambandet mellan dessa variabler är teoretiskt en modifierad Nernstekvation. Mätningarna ger besked om förhållandet mellan jonernas mobiliteter (rörligheter). Varje laborationsgrupp använder en "egen" lösning. Därigenom erhålls mobilitetsdata för ett flertal joner.*

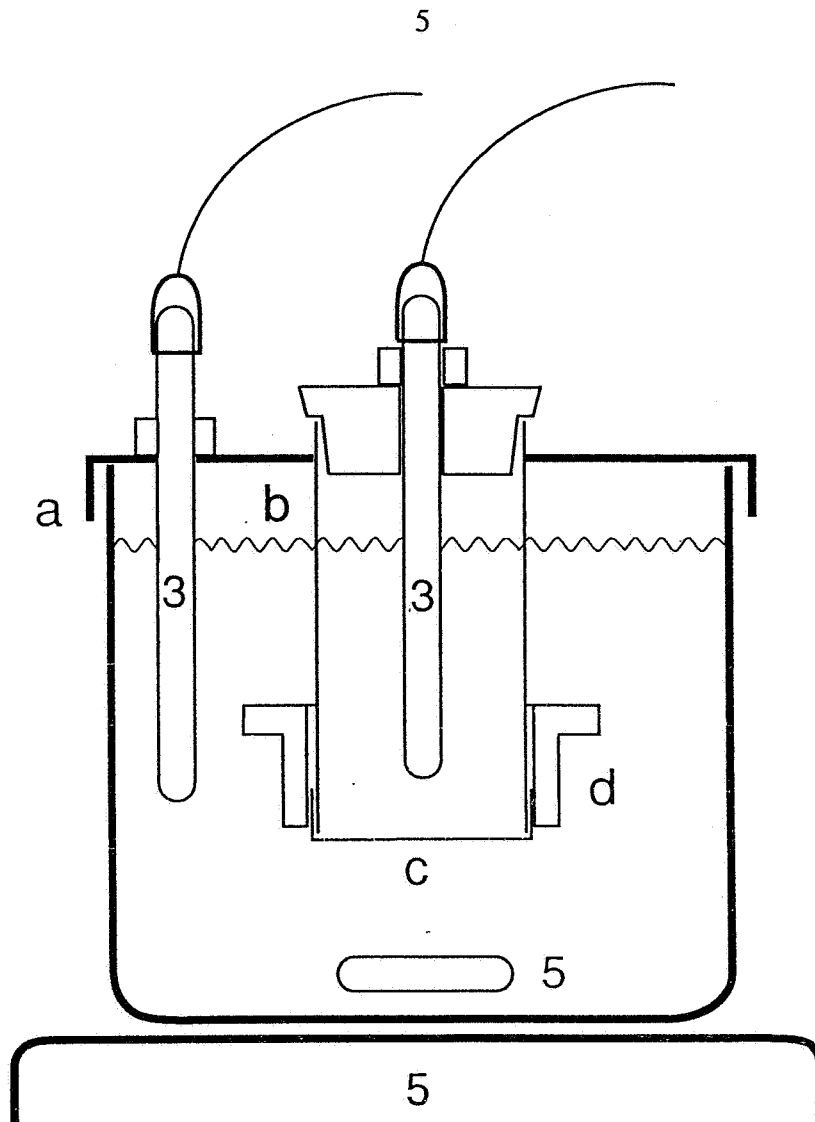
### Apparatur

Följande utrustning används för övningen:










1. Experimentkammare bestående av
  - a) Ytterburk med lock
  - b) Innerburk med lock
  - c) Dialysmembran
  - d) Ring för fastsättning av membran
2. Avställningsburk
3. Kalomelelektroder, 2 st
4. Mätinstrument, typ multimeter
5. Magnetomrörare (drivenhet + lös magnet)
6. Sprutflaska
7. Mätglas 100 ml
8. Mätkolv 150 ml
9. Bägare 400 ml
10. Engångs-plastpipetter
11. Pincett

### Utförande

*Fastsättning av membranet.* Membranet, som är ett s k dialysmembran, levereras i form av ett tillplattat rör. Blöt membranet med vatten och låt det ligga och dra en stund. Klipp upp röret i ena kanten och vik ut membranet. Sätt fast membranet på innerkammarens ända genom att trä över silikongummiringen. Håll vatten i innerkammaren och kontrollera att den håller tätt. I annat fall måste proceduren göras om.



Figur 5. Experimentkammaren består av en ytter- och en innerkammare som kan fyllas med olika lösningar. Två kalomelektroder är anslutna till var sin kammare. Delarnas beteckningar hänför sig till apparaturlistan.

	Måttligt hälsoskadlig		Mycket giftig Giftig		Explosiva varor
	Hälsoskadlig irriterande		Brandfarliga vätskor		Oxiderande varor
	Frätande		Mycket brandfarliga varor		Miljöfarlig

Figur 6. Förteckning över varningskoder för kemikalier.

**Förberedelser.** Mät upp 150 ml av den koncentrerade lösningen i mätkolven och häll i ytterkammaren. Skölj innerkammaren med litet av den koncentrerade lösningen och fyll den därefter med 20 ml av denna lösning. Sätt ihop kamrarna och kontrollera att vätskenivåerna står lika högt (justera innerkammarens nivå om så behövs). Skölj elektroderna med destillerat vatten från sprutflaskan och sätt dem på sina platser i det yttre och det inre locket. Anslut elektroderna till mätinstrumentet. Instrumentets minusanslutning (märkt Com för "Common") skall vara förbunden med den inre kammaren ("1") och plusanslutningen (märkt V för "Volt") med den yttre kammaren ("2"). Lägg en omrörarmagnet i ytterkammaren och placera hela kammaren på omröraraggregatet.

**Mätning.** Mätinstrumentet skall vara inställt på det känsligaste området (200 mV). Kör omröraren under ca 1 minut och stäng sedan av. Läs av instrumentet när värdet är någorlunda stabilt. Glöm inte att notera tecknet. Om mätvärdet inte är stabilt, vilket kan inträffa för de större spädningsarna, kan det hjälpa att köra omröraren hela tiden. Om värdet ändå driver kan detta bero på att membranet är skadat. Det måste då bytas ut. Efter mätning av membranpotentialen lyfts burkloppet med innerkammare och elektroder av. Skölj membranet och fasthållningsringen samt den yttre elektroden med destillerat vatten från sprutflaskan. Observera att stamlösningen skall vara kvar i innerkammaren under hela försöket. Placera burkloppet med innerkammare och elektroder på avställningsburken (märkt "membranställ").

**Spädning.** Du har i utgångsläget samma koncentration i bägge kamrarna (koncentrationsförhållande 1:1) och skall därför, teoretiskt sett, inte mäta någon membranpotential. Oavsett detta skall Du göra en mätning av membranpotentialen i utgångsläget. Därefter späder Du lösningen i ytterkammaren upprepade gånger och mäter membranpotentialen för varje ny spädning enligt beskrivningen ovan. Spädningen utförs genom att hälla lämplig mängd av ytterkammarens lösning i mätglaset, överföra till mätkolven och späda till full volym (150 ml). Resterande lösning i ytterburken hålls bort och burken sköljs med destillerat vatten från sprutflaskan (använd pincetten för att ta tillvara omrörarmagneten). Fyll därefter ytterkammaren på nytt med 150 ml av den (nya) spädda lösningen från mätkolven. Genom att varje gång späda antingen 2 eller 2.5 gånger kan Du åstadkomma koncentrationerna 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 M i ytterkammaren (för HCl är koncentrationerna en tiopotens lägre), vilket ger koncentrationsförhållandena 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100.

### Redovisning

För in värdena i tabellen på redovisningsformuläret. Rita in punkterna på linlogpapper. Anpassa en rät linje till punkterna. Bestäm linjens lutning ( $k$ ) och redovisa värdet. Härled ett uttryck för  $u/v$  som funktion av  $k$ . Beräkna härur  $u/v$  och redovisa värdet.

### Besvara följande frågor:

(1) Diskutera likheter resp. skillnader mellan situationen i laborationen och den i en verklig cell (om innerkammaren motsvarar cellen och ytterkammaren extracellulärrummet), dels allmänt - dels med utgångspunkt från de erhållna mätvärdena.

(2) Man kan visa att rörligheten är relaterad till jonens Stokes-radie (ett mått på den hydratiserade jonens storlek) på så sätt att större radie ger mindre rörlighet. Vilken av de två ingående jonerna har störst Stokes-radie? Är den tyngsta jonen den största (allmänt resp. i detta speciella fall).

REDOGÖRELSEN LÄMNAS IN EFTER LABORATIONEN (SAMMA DAG!)