



多通道记录 (MR) 及其与气相色谱联用技术 (GC-MR) 在昆虫嗅觉生理上的应用*

万新龙** 钱 凯 杜永均***

(温州医科大学, 温州 325035)

摘 要 多通道电生理记录 (Multiunit recording, MR) 和气相色谱 (Gas chromatography, GC)-多通道电生理记录 (GC-MR) 是昆虫化学生态学中研究昆虫对气味化合物神经元反应非常重要和前沿的电生理技术, 在研究昆虫对植物气味和性信息素的嗅觉反应机制以及高灵敏性筛选活性化合物等方面具有非常重要的作用。本文介绍这一技术的基本原理、操作步骤和应用实例, 并详尽说明了使用中应该注意的事项。

关键词 多通道电生理记录 (MR), 气相色谱-多通道电生理记录 (GC-MR), 原理, 操作步骤

Use of computer visualization to evaluate the influence of light intensity on the body colour of *Prodenia litura* (Fabricius) larvae

WAN Xin-Long** QIAN Kai DU Yong-Jun***

(Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Multiunit Recording (MR) and Gas Chromatography-MR (GC-MR) are very important and cutting-edge electrophysiological techniques to study insect neuronal responses to odorants in chemical ecology, playing a role key in studying the mechanisms of insect olfactory reaction to plant volatiles and sex pheromones and in sensitively selecting bioactive compounds. This paper introduced the basic principles, experimental protocols and examples of the two techniques, and further, illustrated the attentions in the applications.

Key words Multiunit Recording (MR); Gas Chromatography-MR (GC-MR); principle; experimental protocol

昆虫对气味分子的识别由触角周缘神经系统和脑部的中枢神经系统触角叶完成。在触角上的周缘神经系统分布着成千上万个嗅觉受体细胞 (Olfactory receptor cells, ORCs) 接收到气味分子, 经过昆虫嗅觉系统的第一级中枢—触角叶 (Antennal lobe, AL) 传导、编码、加工、整合、最后经过投射神经元 (Projection neurons, PNs) 投射到更高级的脑部嗅觉中枢, 之后再整合其他通道, 最后产生嗅觉行为 (Hansson *et al.*, 1994; Christensen and Hildebrand, 2002) (图 1)。嗅觉

受体细胞一般分为对化合物反应谱窄的专一型 (Specialists) (Christensen and Hildebrand, 2002) 和反应谱宽的广谱型 Generalists (Bargmann, 2006)。昆虫, 乃至哺乳动物的嗅觉系统正是利用嗅觉受体的过滤和中枢神经系统的整合来识别自然界中种类繁多的气味分子。多道电生理记录 (Multiunit recording, MR) 是现代神经生物学领域中一种研究动物脑部嗅觉系统的重要手段, 属于细胞外记录范畴。近年来, MR 技术因其记录的高稳定性、实时性和在记录神经元数量

* 资助项目 Supported projects: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203036)

**第一作者 First author, E-mail: wanxl_20@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dyj@wzmc.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-01-07, 接受日期 Accepted: 2015-02-04

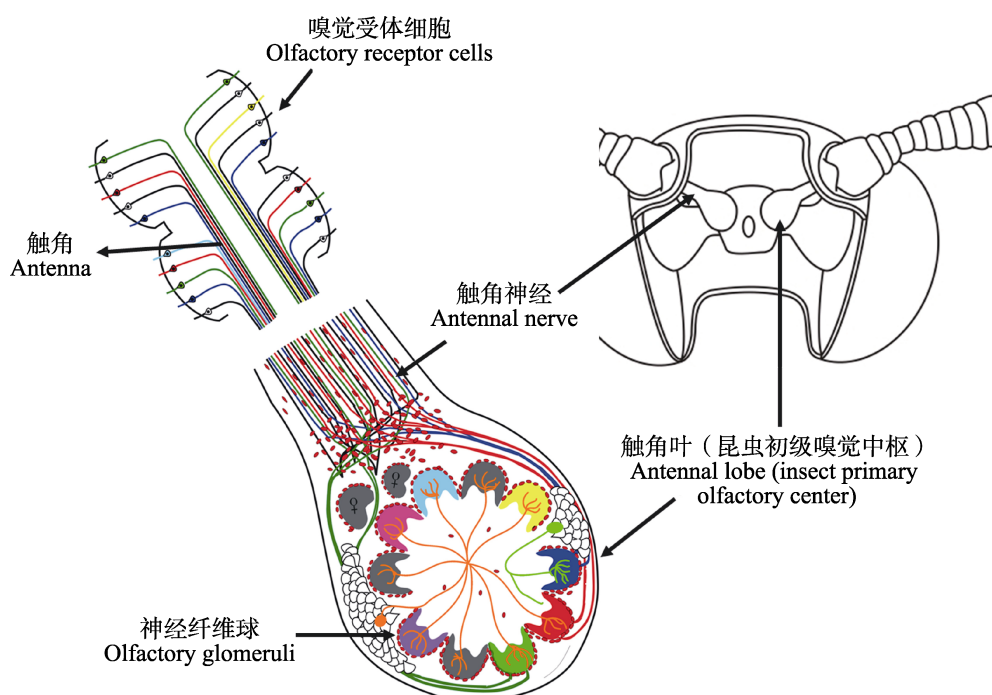


图 1 昆虫周围神经系统和脑部一级嗅觉中枢示意图 (由 Higgins 和 Tolbert 提供)

Fig. 1 Schematic diagram of insect peripheral nervous system and primary olfactory center (courtesy of Higgins and Tolbert)

上的优势, 受到了越来越多神经生物学家的青睐 (Mcnaughton *et al.*, 1983; Jansen and Maat, 1992; Csicsvari *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2013)。MR 技术最早是由英国科学家 Adrian 与他的同事于 1925 年发明的, 他们使用一根简单的金属电极插进青蛙的肌肉里首次记录到了单根肌纤维的电脉冲, 这就是多道电生理的雏形 (Adrian and Zotterman, 1926)。在 MR 发展之初, 主要还是应用在老鼠等动物脑部听觉、嗅觉的基础研究上, 涉及到动作电位、诱发电位与场电位的测定 (Kovacs *et al.*, 1994; Owens *et al.*, 1994), 而在昆虫方面的应用却并不多。Pickard 和 Welberry (1976) 分别将 4 个和 8 个通道的简易电极插进意大利斜纹夜蛾 *Apis mellifera* 的原脑中记录到信号, Christensen 等 (2000) 用 16 多通道电极检测到烟草天蛾 *Manduca sexta* 在受到气味刺激之后触角叶中各个神经纤维球之间的相互作用动态; Saha 等 (2013) 用 16 通道的电极检测到了蝗虫 *Schistocerca americana* 触角叶内神经纤维球之间的相互作用和反应动态。

MR 与气相色谱 (Gas chromatography, GC) 的联用技术 (GC-MR) 是一种将 MR 系统和 GC 仪连接在一起用来鉴定某个混合物中活性物质的技术。GC-MR 最早是 Katz 实验室应用于从哺乳动物尿液中鉴定引诱老鼠的活性化合物 (Lin *et al.*, 2005), 后来 Hildebrand 实验室利用该技术结合风洞试验从植物花气味中鉴定出只要 3 个基本化合物组成的混合物就可以达到花气味一样的引诱作用, 显示了研究植物气味嗅觉调控机制的极大潜力和应用前景 (Riffell *et al.*, 2009)。Byers 等 (2013) 采用 GC-MR 技术鉴定出蜜蜂 *Bombus impatiens* 寄主植物彩艳龙头 *Mimulus lewisii* 花提取液中的活性物质。随着电生理技术的日臻成熟, MR 和 GC-MR 技术将会被越来越多地运用到动物神经元编码机制研究和气味活性物质的鉴定中。本文将以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 为例分别来介绍这两种技术的实验过程和操作要点。

2 MR 和 GC-MR 技术原理

MR 技术的原理是当神经细胞静息电位时,

由于不同离子在细胞膜内外分布差异,膜外电势比膜内高,膜外带正电荷,膜外电势差为零。局部兴奋之后,由于短暂地去极化,改变膜内外的通透性,也改变离子分布,造成部分膜外带负电荷,部分膜内带正电荷,膜外兴奋部位与非兴奋部位就产生了电势差,这样放置于神经元细胞表面的电极就会记录出两者之间所产生的电位差 (Schwarz and Renttner, 2003)。

GC-MR 技术的原理是从气相色谱毛细柱末端分离的气体被三通阀分离器分成等比例的两支气流,一分支进入气相色谱检测仪(常使用氢焰离子化检测器),另一分支经加热到适当温度后(为防止柱流出物凝结,需将接口装置加热到 GC 柱终温),汇入持续供应的清洁气流中并吹向昆虫触角。这样,由于气流和两个支路长度相等,气相色谱的波峰就 MR 的脉冲同时记录并可以对应起来,收集的化学混合物中具有活性峰的物质就会迅速被筛选出来。

3 MR 实验过程

3.1 实验准备

3.1.1 实验昆虫 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 用人工饲料持续饲养于人工气候室(温度 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%~70%,

14L:10D) 内,化蛹之后将雌雄分开羽化。每天收集羽化的成虫,并转至另外一个由纱网制成的小笼中,用 10% (m/m) 的葡萄糖饲养。2~4 d 的成虫用于试验。

3.1.2 多通道记录仪 我们以 Tucker-Davis Technologies (TDT) 公司 16 通道电生理记录仪(图 1) 为例。该记录仪主要由电极、前置放大器、数模转换器、神经信号处理器、台式电脑、光纤数据线等组成。高阻抗 16 通道电极(型号 A16, NeuronNexus Technologies 公司产品)两个针脚,间隔 $150\ \mu\text{m}$,每个针脚上有 8 个通道。根据不同实验对象选择不同的电极。电极固定在 Headstage (型号 RA16AC) 上。前置放大器(型号 RA16PA) 采用直流电源供电,以减少噪音干扰,最大采样率 25 kHz。前置放大器是整个系统核心部分,主要完成对微弱电信号的放大,将噪声和干扰减至最低。数模转换器(型号 RA8GA) 最大采样率 25 kHz。神经信号处理器(型号 RX5BA-2) 具有 4 个数字信号处理器 (Digital signal processor, DSP), 最大采样率 50 kHz。电脑 (Dell T3400) 为 Core™ 2 平台, Windows XP 操作系统, 双屏。上述仪器之间用光纤数据线连接,以降低系统噪音。该系统可以将 16 通道的个体反应结果以棘波 (Spike waveforms) 连续显示在电脑上,并自带多个系统软件 (OpenSort,

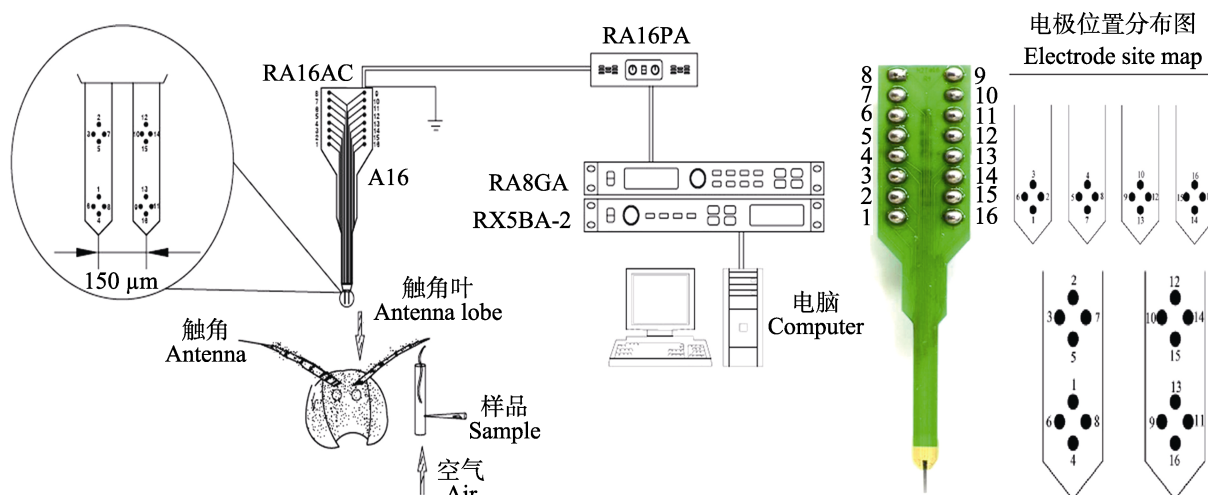


图 2 多通道电生理记录技术流程和 16 通道电极分布图 (引自 TDT 操作手册)
Fig. 2 The scheme of multi-unit recording and the distributional array of the 16 channel electrodes
(cited from TDT's manual guide)

OpenEX, Openexplorer)。

此系统的优点表现在: 系统采样率大 (高达 25 kHz), 连接简单, 操作简易, 系统噪音小, 模拟信号可以转变成简单的数字信号, 易于观察, 可实时记录 16 通道全部通道的信号, 可根据需要修改电路。可以导出多种类型的文件 (.NEX、ACSII、.PLX 等), 兼容 Matlab, NeuroExplorer 等后续的数据分析软件。

3.1.3 气流刺激系统 气流刺激系统分持续气流与刺激气流。持续气流就是通过一个空气泵产生一个恒定的气流 (1.2 L/min), 经过活性炭过滤, 再通过装有蒸馏水的水瓶稳定流速, 由 (内径 (ID) 为 7 mm) 管子垂直吹向触角。刺激气流就是储存于钢瓶的高纯空气通过一个由矩形波 (方波) 脉冲分时控制的电磁气阀, 再通到持续气流玻璃管中。而方波的幅度、波宽和频率都可以分别进行调节。

3.1.4 生理盐水 生理盐水配方: 150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L CaCl₂, 3 mmol/L KCl, 10 mmol/L TES, pH 6.9 和 25 mmol/L 蔗糖 (Lei *et al.*, 2009)。TES (N-三 (羟甲基) 甲基-2-氨基乙磺酸) 为 Sigma 产品, 蔗糖购于汕头市西陇化工厂有限公司 (AR 级), 其余的试剂购于宜兴市第二化学试剂厂 (AR 级)。

3.1.5 刺激化合物配制 配制一定浓度的刺激化合物溶液, 取 10 μ L 的刺激样品和溶剂 (对照), 滴在滤纸条 (1 cm $\times$ 5 cm) 上, 放进巴斯德管内备用。

3.2 MR 记录实验

3.2.1 斜纹夜蛾触角叶解剖 ①麻醉: 把斜纹夜蛾装到小试管中, 用 CO₂ 麻醉。

②固定: 将 1 mL 枪头管中切成 2 cm 左右, 将斜纹夜蛾装入枪头管中使其头部正好露出管外, 下端用纸巾或棉花塞住, 头部和复眼则用 Wax 蜡封牢, 特别是眼睛要固定住。触角用钨丝扣住, 冰箱中放 10 min, 固定在用 Wax 蜡制成的平皿上。这一步是解剖成功的关键。

③吸毛: 用昆虫针把毛弄下来, 用泵吸走, 在显微镜下用镊子把多余的毛拔光。

④解剖: 首先用剪刀将斜纹夜蛾的喙剪下来, 然后用解剖刀从前到后, 由深到浅切开脑壳, 并用尖头镊子揭开脑壳, 最后小心去除触角叶上的肌肉组织和白色网状组织, 直至整个触角叶清晰地显露出来。解剖过程中注意适时滴加生理盐水, 然后用吸水纸吸干, 以保持脑部干净, 利于后面的操作。

3.2.2 插电极 ①固定: 将解剖好的斜纹夜蛾用 Wax 固定在 MR 系统的桌台上, 调节显微镜焦距, 使其能清晰地观察到整个触角叶。

②搭建生理盐水: 在实验台上方用固定架固定一个注射针筒 (去掉注射塞), 下端出口连接一个可以调节流量的细管, 细管的另一端则连接一根注射针。向注射针筒中倒入适量的生理盐水, 然后将医用棉花拧成一根粗细适当的棉条, 从注射针头处搭到斜纹的背部 (近后脑揭开处), 打开细管上的控制阀门, 控制生理盐水从针筒中流出的速度为 20 mL/h 左右。最后在斜纹夜蛾脑前部也搭建一根棉条, 将其脑中的生理盐水引流出来, 以防止脑中积留过多的盐水, 影响观察。

③搭电极: 将 16 通道的电极装在探头 (Headstage) 上, 将参比电极接入探头上方的孔中, 接地线则接入右边的孔中。随后将参比电极的钨丝插入斜纹夜蛾复眼或其它身体部位中。

④插电极: 关闭生理盐水, 待脑中触角叶清晰可见后, 调节显微操作仪, 缓慢地将测定电极插到触角叶中。打开生理盐水, 控制流速为 20 mL/h 左右 (注意保护电极)。

⑤打开 TDT16 通道电生理记录仪: 关掉冷光源的电源, 打开放大器, 放下隔噪铜网罩, 依次打开 RABGA 与 RX-5 的电源。

3.2.3 打开软件 ①双击桌面上的 Openproject $\rightarrow$ 左击 Openproject $\rightarrow$ 选择 C: Documents and Settings / Administration/Desktop/LoRes16ChArray3StimRX5_TDT_HL2/LoRes16ChArray3StimRX5_TDT_HL/LoRes16ChArray3StimRX5_TDT_HL.WSP (软件安装时自动生成)。

②单击 WorkBench $\rightarrow$ 选择 File $\rightarrow$ 选择 Data tank $\rightarrow$ 选择 Creat new tank $\rightarrow$ 选择存储路径 Path $\rightarrow$ 创建文件名 (如 090429) $\rightarrow$ 单击 OK $\rightarrow$ 选

择所创建的 Tank→右击选择 Register Tank→再次右击选择 Test Tank (会出现 Tank test passed)→点击 OK。

③单击 Scope→选择所创建的 Tank→右击选择 Test Tank (会出现 Tank test passed)→OK。

④单击 SpikeView→选择红色叹号→出现通道信号→观察所有的通道信号 (按住 Shift 键, 拖动鼠标可以控制波形的大小)→观察信号 15 min, 待信号稳定后, 给信号设定一个 Threshold (阈值), 以去除杂信号及噪音 (图 3)。

3.2.4 标样刺激和信号记录 ①将装有药剂滤纸条的巴斯德管放在距离斜纹夜蛾触角 1 cm 左右。

②点击 WorkBench 选择 Record 按钮, 化合物对斜纹夜蛾触角刺激和神经元对化合物刺激反应的信号记录开始。

③记录完毕, 退出软件。

3.3 数据处理和分析

MR 某一通道的原始信号可能是来自于几个神经元脉冲 (Spikes) 的混合信号。这样的信号必须经过分类 (Sorting) 才能分辨单个神经元的反应。由于不同神经细胞放电频率不一致, 根据与记录电极之间的距离长短表现出来 Spike 的高度也不一致, 因此要对该通道的 Spike 设定适当的阈值 (Threshold)。超过这个阈值的 Spike 就会被软件自动挑选出来, 未超过这个阈值的 Spike 就会被放弃。被挑选出来的 Spike 可以用多种参数来定量描述, 比如峰高、峰宽、波形上升时间、波形回落时间以及各个参数之间的比例等。除此之外, 这些 Spikes 还可以用一些多维统计参数 (如主成分分析参数) 来描述 (Haddad *et al.*, 2010)。每一个参数可以被视为一个维度。波形分类这一步的主要目的是把每一个记录

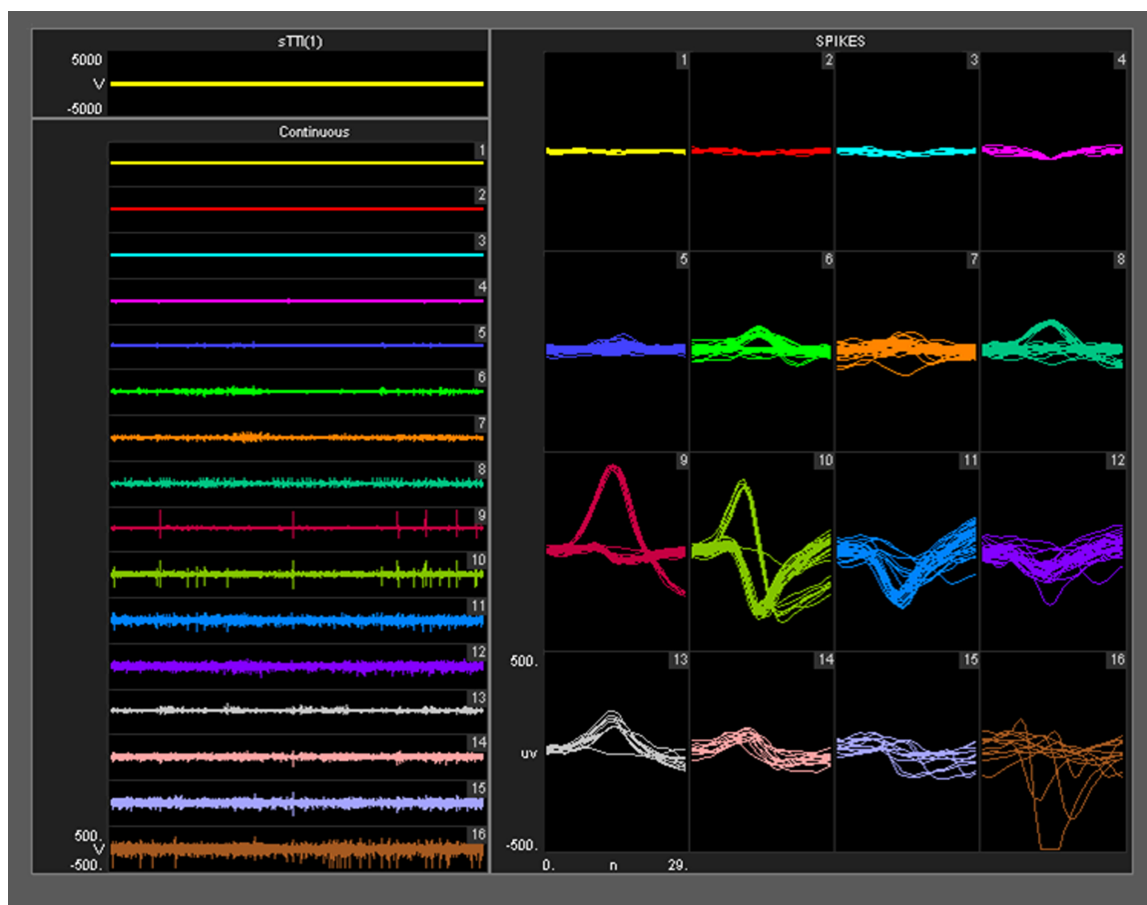


图 3 16 通道电极插入斜纹夜蛾触角叶之后 16 通道显示的信号

Fig. 3 The signals in 16 channels after the electrode inserted into *Spodoptera litura* antennal lobe (AL)

的波形放在一个多维空间里进行比较, 并把相似的波形聚为一类。实际操作时只能有选择性的取 3 个参数来构建一个立体坐标系统, 每个 Spike 以一个点的形式表现在三维坐标轴上。相同相似的 Spike 就会聚集在相同或相近的空间, 差异很大的 Spike 就会出现在不同的位置。然后通过不同的统计方法如 K-Means、Bayesian, Closest Centers (均包含在随 TDT 系统而来的 Open Sorter 软件里) 进行 Sorting, 这样就可以把一个通道内的不同神经元区分出来 (Pawłowski *et al.*, 2005)。再使用 Matlab 或 Neuroexplorer 等软件进行后续分析 (注意: 阈值的设定很关键, 涉及到通道中神经元的个数及后续的 Sorting 过程)。

3.3.1 数据分类和保存 OpenSorter 软件是美国 TDT 公司开发的一款神经元分类软件, 一般用于处理多通道记录系统采集得到的原始数据 (数据文件后缀名为 “.plx” 和 “.nex”)。该软件有交互式的可视化界面, 既可查看每个记录通道上的每个动作电位波形, 也可对它们的归类属性进行即时操作。同时, 软件还提供了多种基于动作电位波形特征的神经元聚类方法, 且聚类结果可实时显示在二维或三维的视图窗口中。该软件的具体操作可参考软件使用说明书, 这里我

们主要介绍一般的操作流程和注意要点。

- ①打开 Opensort 软件
- ②点击 Browse Tank
- ③选择要进行分类的 Tank 数据
- ④依次点击 Tank 文件下的 block, Tanksort 和通道 (ch1, ch2...ch16)
- ⑤去除噪音, 对齐波形, 然后点击工具栏中的 Sort→选择 Select active algorithm→Bayesian 算法命令
- ⑥再次点击工具栏中的 Sort→选择 Run active algorithm
- ⑦点击工具栏中的 Save 命令, 保存分类的数据到原来存储的 Tank 文件中 (图 4)。

在数据分类过程中应注意以下要点:

(1) 对齐波形: 多通道记录技术采用的是阈值触发采样技术, 采集的每个动作电位波形在阈值点对齐, 这会给主成分的计算带来一定的影响。因此, 为了获得最佳的主成分计算效果, 需对动作电位波形进行对齐处理 (Align waveforms)。操作时一般选择在动作电位波形的最大或最小值处对齐波形。

(2) OpenSorter 软件提供手动和自动两种神经元聚类方法。手动方法有波形划分和边界划

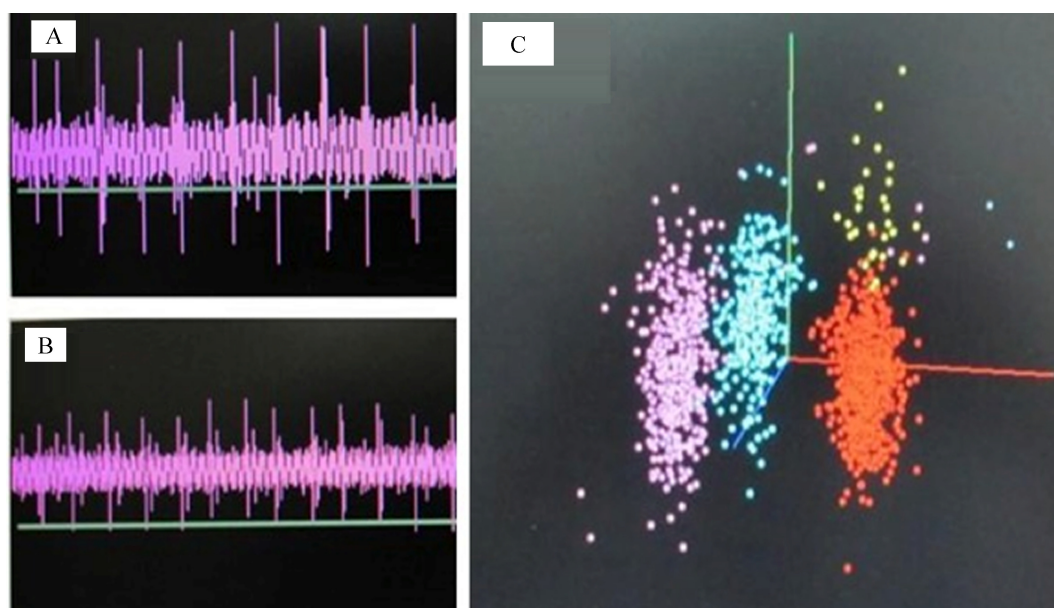


图 4 神经元脉冲 (A, B) 与分类 (C)
Fig. 4 Neuronal spike (A, B) and sorting (C)

分两种,自动聚类则有 K 平均法、Bayesian 法和 Closest centers 法等。自动聚类方法虽方便,但在自动聚类完成后,仍需实验者检查分析的结果,并加以手动修订。

(3) 理论上,一个单神经元的放电时间序列,其所有放电时间间隔(Interspike interval, ISI)不应短于该神经元的不应期(1~2 ms)。但在实际操作中,一般允许有 0.5%~1% 的污染率,也即时程小于不应期的 ISI 在所有 ISI 中的占比不得超过 1% (Lewicki, 1998; Takekawa, 2010)。

3.3.2 数据导出 ①打开 Openproject

②单击 Browser→右击 Tank 的白框,选择所需导出的 Tank→依次右击选择 Block→选择 Event→Time→Chan 自选

③单击 Openproject 的 File→选择 Export Current Row→File Type 选择.PLX/.NEX→打开 Output File name→选择存储的路径与文件名→点击 Export→点击 OK。

④退出软件

3.3.3 数据分析 多通道记录的原始放电数据经初步处理后,得到多个单神经元的放电时间序列和不同频段的场电位信号,需使用 NeuroExplorer 或 Matlab 等软件进行进一步的数据分析,常用的分析方法包括放电频率分析、放电间隔分析、自相关和互相关分析、事件相关分析、频谱分析和位置细胞分析等。我们对数据分析主要采用放电间隔分析。

放电间隔分析考察单神经元放电序列中,所有相邻动作电位放电间隔的分布情况,并以间隔时间为 X 轴,以放电频率为 Y 轴,用直方图的形式表现出来。由于可以记录到刺激之前神经元的放电频率,因此 X 轴有负值和正值。具体计算时,首先设一时间窗(Bin),并将第一个时间窗口记为[IntMin, IntMin+bin],第二个时间窗口则记为[IntMin+bin, IntMin+bin*2],以此类推。大于时间窗左侧时标的放电间隔被计在该时间窗中,而大于右侧时标的则不计入该时间窗内。最后,对每一个时间窗,计算整个单神经元放电序列中放电间隔落在该时间窗内的总放电个数。放电间隔分析可以反映不同的放电间隔在该神

经元所有放电间隔中出现的频度和整体分布情况。不同神经元的放电模式一般会有不同的放电间隔分布特征(图 5)。

4 GC-MR 实验过程

4.1 实验准备

除 MR 实验需要准备的试剂和实验材料之外,还需要准备好斜纹夜蛾寄主植物提取液,GC 与 MR 的连接及调试,包括以下三个方面:

(1) 柱流出物转接件的安装,包括卸下柱箱内壁的不锈钢预切割片、插入柱流出物转接件,安装三通阀,安装混流管、加热器、连续气流供应管等;

(2) 根据操作说明书安装数据采集放大/控制器硬件和软件;

(3) 调试系统是否运行正常,尤其是检查 GC 的升温程序是否运行正常(图 6)。

4.2 GC-MR 操作过程

①首先如 MR 操作步骤一样,打开 MR 记录系统和 GC 仪,解剖好斜纹夜蛾触角叶,并插入电极,观察信号 15 min 左右至信号稳定,并设定阈值,排除噪音和杂信号。

②迅速转向 GC 操作平台,准备注射斜纹夜蛾寄主植物提取物。在注射之前,确保 GC 的升温程序运行正常。我们通常采用的升温程序是:50℃保持 4 min,以 10℃/min 的速率升至 220℃,保持 6 min。进样口不分流,进样口温度 220℃,离子检测器(Flame ionization detector, FID) 温度设置为 230℃,载气为流速 1 mL/min 的 99.999% 氮气。

③将植物提取物注射进 GC 的进样口(3 μ L),释放被吸附的挥发物进入 GC 柱中。流出的气体通过 Y 形玻璃管按照 1:1 的比例分流进入 FID 和吹向斜纹夜蛾触角。随后开始记录斜纹夜蛾触角叶神经元对刺激化合物的反应(图 7)。

④记录结束,退出软件,关闭所有仪器和电源。

4.3 GC-MR 数据处理和分析

①如 MR 数据处理和分析一样,将所有的神

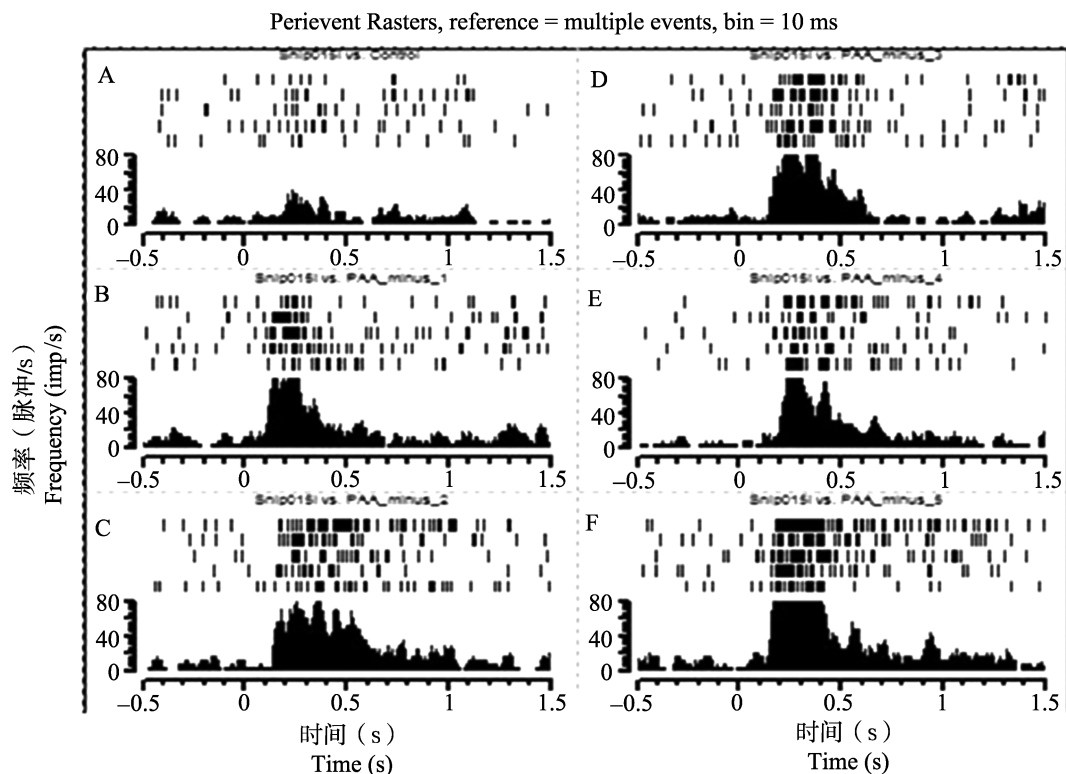


图 5 斜纹夜蛾对苯乙醛的 MR 反应 (Neuroexplorer: PerieventRasters)

Fig. 5 *Spodoptera litura* MR responses to phenylacetaldehyde (Neuroexplorer: PerieventRasters)

X 轴表示时间, Y 轴代表放电 (脉冲/s), 组方图上方的短线表示对 5 次气味刺激的脉冲反应, 气味刺激从 0 s 开始, 持续 500 ms, 反应有约 100 ms 的时滞。

X-axis indicates time (s) and Y-axis indicates firing frequency. The vertical bars above the figure represent five stimulus responses, which started from 0 second, lasting 500 ms and lagging 100 ms.

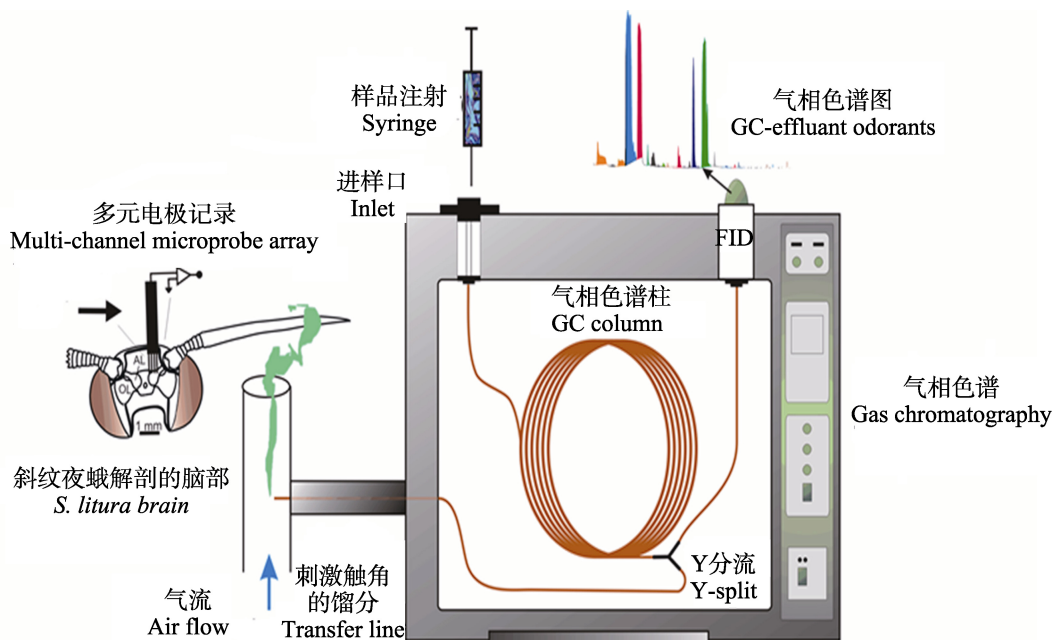


图 6 GC-MR 实验工作示意图 (改自 Byers 等, 2013)

Fig. 6 Diagram of GC-MR workflow of experimental setup (revised from Byers *et al.*, 2013)

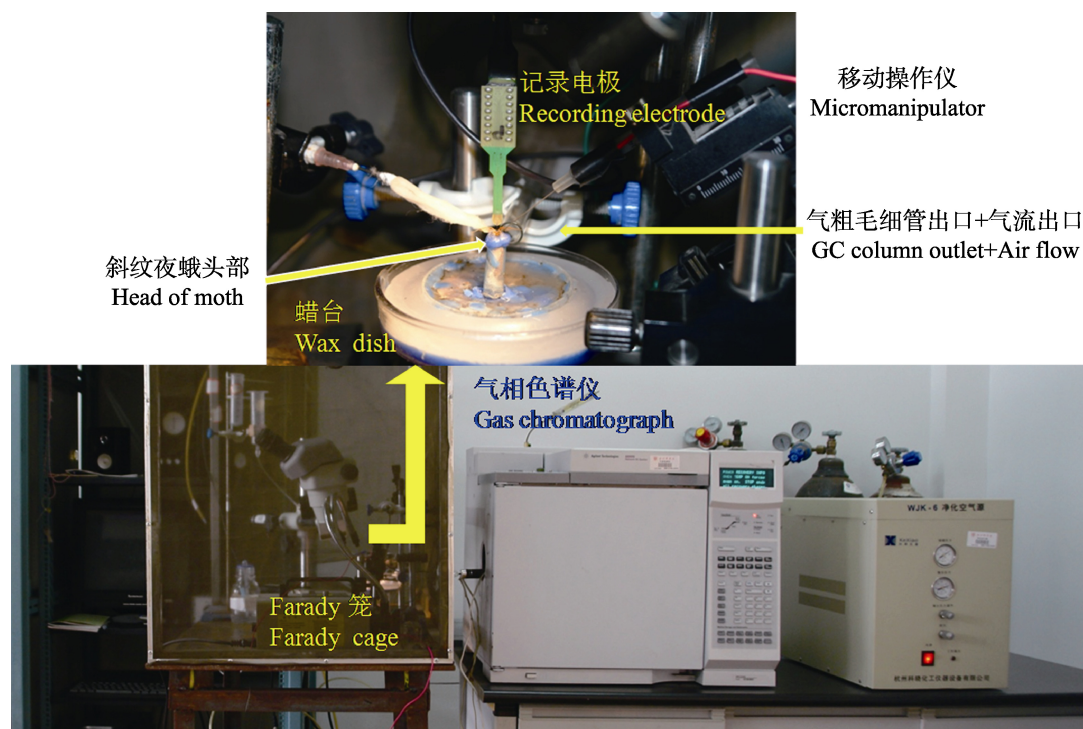


图 7 GC-MR 操作实例
Fig. 7 Example of GC-MR equipment

经反应信号进行分类, 并做出神经元类型分布和放电频率反应图。

②运用 GC 实时同步记录的数据鉴定气流滞留时间(由色谱图峰值的顶端决定), 并根据气流滞留时间检测同一时间点的 MR 反应(图 8)。

5 讨论

昆虫的嗅觉与寻找食物、配偶、栖息地与产卵地方等行为息息相关, 其触角叶结构较哺乳动物嗅球简单, 易于解剖; 而且蛾类昆虫具有性信息素组成简单, 行为反应专一、强烈, 视觉信息的影响明显、性信息素与植物气味结构、调控的行为的差异明显等特点, 因此利用 MR 和 GC-MR 技术容易揭示神经活性与行为之间的关系。

气相色谱-触角电位联用技术 (Gas chromatography-electroantennographic detection, GC-EAD) 和气相色谱-单细胞记录联用技术 (Gas chromatography-coupled single sensillum recordings, GC-SSR) 是近 40 多年来普遍采用的化学信息素活性物质鉴定方法 (Du *et al.*, 1997; Du and Millar, 1999; Pellegrino *et al.*, 2010)。

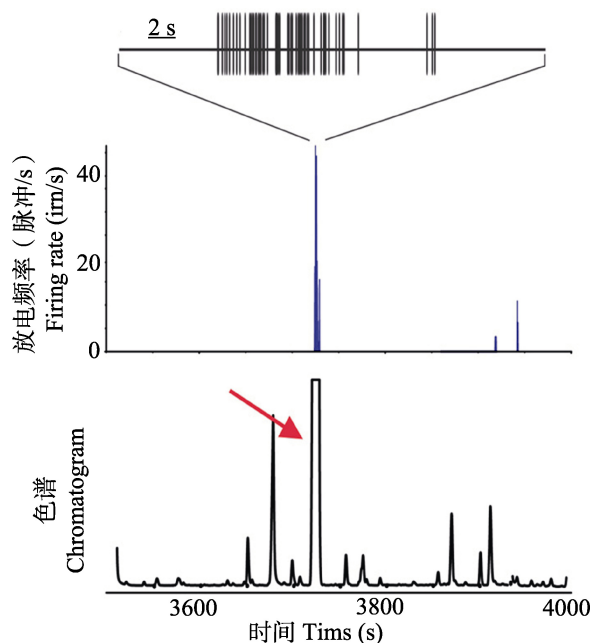


图 8 植物提取物 MR 反应以及 GC 同步记录的色谱图
(改自 Byers *et al.*, 2013)

Fig. 8 Firing rate histograms of unit responses to the eluting plant extracts (revised from Byers *et al.*, 2013).

某种特定的气味(如红箭头所示)能激起显著性的神经元反应。

Certain odorants (red arrow) evoke significant responses in units.

但是, 其生物信号 (EAG) 受多种因素的影响, 其中包括气流带来机械刺激, 而且灵敏度也不高。如果某种挥发性化合物的浓度太低, 即使该物质具有生物活性, 但 EAG 可能反映不出来。如芋艿叶对斜纹夜蛾的引诱作用很强, 但气味浓度很低, 利用 GC-EAD 就无法鉴定出完整的活性化合物 (杜永均, 未发表资料)。如果从触角叶记录生物信号, 这个问题则可以得到解决。一项荣获 2004 年诺贝尔医学奖的研究成果表明, 在多数情况下, 表达同一种受体蛋白的嗅觉受体神经元的轴突合并到触角叶内某一个神经纤维小球 (Ressler *et al.*, 1994)。由于这种合并作用, 触角受体神经元的电信号在神经纤维小球内被自然地放大了 100~1 000 倍 (Hartlieb *et al.*, 1997)。显然, 在触角叶内做记录不仅可以提高检测植物气味物质生物活性的灵敏度, 还可以探测到气味物质在昆虫脑内的作用模式 (Byers *et al.*, 2013)。

MR 和 GC-MR 实验时除了对仪器设备的要求之外, 操作时还应注意以下几个方面: (1) 触角叶的解剖, 解剖时千万不能损伤到触角叶, 这直接关系到信号的好坏。(2) 在实验过程中要把神经元所在脑部结构始终浸没在生理盐水中, 以保持实验材料的正常活性, 否则神经细胞会很快死亡。生理盐水的流速要适当, 不适又会干扰信号。(3) 观察用的光学显微镜的放大倍数要满足需要, 这样有利于准确观察电极插到触角叶中的位置。(4) 微动操纵仪的性能要好, 能保持微电极定位平稳, 在插入细胞后电极不颤动。(5) 整个装置均应保持良好接地并注意屏蔽外界干扰信号 (如大功率电器的电磁辐射), 或将其置于法拉第屏蔽笼内。(6) 适当调节吹过触角的气流速度, 包括持续气流与刺激气流。如果太大, 触角就会颤动, 从而增加噪音, 影响记录信号。(7) MR 的刺激时间间隔可以自己设置和调节, 但是 GC-MR 的刺激时间间隔是由气相色谱仪 FID 出现峰的时间决定的, 不能够自己调节刺激间隔。因此, 需要选择合适的毛细管柱, 并采用最佳的 GC 升温程序, 使关键峰之间能明显地分离开来。

除此之外, 在数据处理和分析方面, 注意在单神经元放电信号的甄别与处理过程中, 要尽可能地避免犯两类错误, 一类是把两个或多个神经元的放电信号混淆成一个单神经元的放电活动; 另一类则是把单个神经元的放电活动拆分成两个或多个神经元的活动。尽管 MR 和 GC-MR 技术具有在研究昆虫神经反应机制方面具有很多其它电生理技术无法比拟的优点, 但是它的数据分析却非常耗费时间和精力, 对实验者的逻辑分析能力提出了更高的要求。另外, 由于是胞外记录, MR 和 GC-MR 也无法鉴定检测到的神经元是投射神经元 (Projection neuron, PN) 还是局部神经元 (Local neuron, LN)。但是, Lei (2011) 在利用 MR 技术记录烟草天蛾 *Manduca sexta* 触角叶神经元反应时, 通过神经元的自发放电模式鉴定出了 PN 和 LN。

本文主要介绍了针对 GC 和 GC-MR 技术的基本操作步骤和初步数据处理方法, 进一步的数据分析需要实验者结合具体的实验设计要求, 应用多种数学分析方法去实现。

参考文献 (References)

- Adrian ED, Zotterman Y, 1926. The impulses produced by sensory nerve endings. Part II. The response of a single end organ. *Journal of Physiology*, 61(2): 151-171.
- Bargmann CI, 2006. Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 444 (7117): 295-301.
- Byers KJRP, Sanders E, Riffell JA, 2013. Identification of olfactory volatiles using gas chromatography-multi-unit recordings (GCMR) in the insect antennal lobe. *Journal of Visualized Experiments*, 2013(72): e4381.
- Christensen TA, Hildebrand JG, 2002. Pheromoneal and host-odor processing in the insect antennal lobe: how different? *Current Opinion in Neurobiology*, 12(4): 393-399.
- Christensen TA, Pawlowski VM, Lei H, Hildebrand JG, 2000. Multi-unit recordings reveal context-dependent modulation of synchrony in odor-specific neural ensembles. *Nature Neuroscience*, 3(9): 927-931.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Mamiya A, Buzsaki G, 1999. Oscillator coupling of hippocampal pyramidal cells and interneuron in the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, 19(1): 274-287.
- Du YJ, Poppy GM, Pickett JA, Powell W, Wadhams LJ, Woodcock CM, 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of*

- Chemical Ecology*, 24(8): 1355–1368.
- Du YJ, Millar JG, 1999. Electroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to chemicals in odors from Bermuda Grass Infusions. *Journal of Medical Entomology*, 36(2): 158–166.
- Haddad R, Weiss T, Khan R, Nadler B, Mandairon N, Bensafi M, Schneidman E, Sobel N, 2010. Global features of neural activity in the olfactory system form a parallel code that predicts olfactory behavior and perception. *The Journal of Neuroscience*, 30(27): 9017–9026.
- Hansson BS, Anton S, Christensen TA, 1994. Structure and function of antennal lobe interneurons in the male turnip moth, *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 175(5): 547–562.
- Hartlieb E, Anton S, Hansson BS, 1997. Dose-dependent response characteristics of antennal lobe neurons in the male moth *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 181(5): 469–476.
- Jansen RF, TerMaat A, 1992. Automatic wave form classification of extracellular multineuron recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, 41(2): 123–132.
- Kovacs GTA, Stormont CW, Halks-Miller M, Belczynski CR, Santana CCD, Lewis ER, Maluf NI, 1994. Silicon-substrate microelectrode arrays for parallel recording of neural activity in peripheral and cranial nerves. *Biomedical Engineering*, 41(6): 567–577.
- Lei H, Reisenman CE, Wilson CH, Gabbur P, Hildebrand JG, 2011. Spiking patterns and their functional implications in the antennal lobe of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *PLoS ONE*, 6(8): e23382.
- Lewicki MS, 1998. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network*, 9(4): R53–R78.
- Lin DY, Zhang SZ, Block E, Lawrence C, Katz LC, 2005. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*, 434(7032): 470–477.
- McNaughton BL, Okeefe J, Barnes CA, 1983. The stereotrode—a new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous-system from multiple unit records. *Journal of Neuroscience Methods*, 8(4): 391–397.
- Owens AL, Denison TJ, Versnel H, Rebbert M, Peckerar M, Shamma SA, 1995. Multi-electrode array for measuring evoked potentials from surface of ferret primary auditory cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 58(1/2): 209–220.
- Pawlowski VM, Christensen TA, Lei H, Hildebrand JG, 2005. A primer on multichannel neural ensemble recording in insects // Christensen TA (ed.). *Methods in Insect Sensory Neuroscience* CRC Press. 393–415.
- Pellegrino M, Nakagawa T, Vosshall LB, 2010. Single sensillum recordings in the insects *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae*. *Journal of Visualized Experiments*, 2010(36): e1725.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB, 1994. Information coding in the olfactory system - evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory-bulb. *Cell*, 79(7): 1245–1255.
- Riffell JA, Lei H, Christensen TA, Hildebrand JG, 2009. Characterization and coding of behaviorally significant odor mixtures. *Current Biology*, 19(4): 335–340.
- Pickard RS, Welberry TR, 1976. Printed circuit microelectrodes and their application to honeybee brain. *The Journal of Experimental Biology*, 64(1): 39–44.
- Saha D, Leong K, Katta N, Raman B, 2013. Multi-unit recording methods to characterize neural activity in the locust (*Schistocerca Americana*) olfactory circuits. *Journal of Visualized Experiments*, 71: e50139.
- Schwarz W, Renttner J, 2003. Foundations of electrophysiology. Master dissertation. Germany: Shaker Verlag GmbH.
- Takekawa T, Isomura Y, Fukai T, 2010. Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *European Journal of Neuroscience*, 31(2): 263–272.