

嗅觉传导机理及仿生嗅觉传感器的研究进展

吴春生 王丽江 刘清君 赵鲁杭^② 王平^{*}

(浙江大学生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027;
浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 杭州 310058. * 联系人, E-mail: cnpwang@zju.edu.cn)

摘要 嗅觉对所有动物而言都是一种极其重要的生理感觉. 近年来, 人们对嗅觉传导机理的研究取得了很大进展, 尤其是嗅觉受体基因超家族的突破性发现推动了国际上嗅觉研究的快速发展. 随着嗅觉传导机理研究的不断深入, 加上仿生嗅觉传感器具有潜在的商业价值和工业应用前景, 对仿生嗅觉传感器的研究也取得了很大进展. 同时, 该研究对于嗅觉传导机理的研究也具有促进作用. 本文综合评述了近年来国际上嗅觉传导机理和仿生嗅觉传感器研究的最新进展. 从嗅觉信号传导的神经通路、嗅神经元对气味分子信号的转导机制、嗅球对嗅觉信号的编码和处理、嗅皮层对嗅觉信号的感知以及仿生嗅觉传感器进行了综述. 最后也介绍了我们在仿生嗅觉传感器方面的研究进展.

关键词 嗅觉 嗅觉传导 仿生嗅觉传感器

嗅觉是动物5种基本生理感觉中的一种, 尽管嗅觉不如视觉与听觉用的频繁, 但不论是低等动物还是高等动物, 嗅觉都具有重要的作用. 2004年诺贝尔生理学或医学奖获得者Buck和Axel^[1]的研究使人们重新认识到嗅觉对于生命和健康的重要性. 他们首先克隆了嗅觉受体基因并发现了嗅觉受体基因超家族, 使嗅觉研究获得了重大突破.

嗅觉系统能识别和分辨大量不同的气味分子. 嗅觉起始于嗅神经元纤毛上的嗅觉受体与气味分子的相互作用. 嗅觉受体是一种G蛋白偶联受体(GPCRs)^[2], 它能转导嗅觉信号, 通过第二信使激活一系列生物化学级联反应, 使嗅神经元细胞膜去极化, 最终产生动作电位. 嗅神经元通过轴突把动作电位传导到大脑前端的嗅球, 嗅觉信号在嗅球中经过加工、修饰和编码后^[3], 通过嗅球的输出神经元僧帽细胞和丛状细胞的轴突投射传导到大脑皮层, 在那里嗅觉信号被解码以分辨不同的气味, 形成对气味的感知.

嗅觉系统识别和分辨大量不同气味分子的生物学机理是值得人们仿效的. 人们模仿嗅觉系统在体识别和分辨气味的机理, 以生物活性组分作为敏感元件, 结合各种二级传感器, 构建了多种仿生嗅觉传感器. 与生物嗅觉系统类似, 仿生嗅觉传感器具有灵敏度高、响应速度快、选择性好等特点, 可广泛应用于生物医学、环境监测、药物开发、植物保护、食品

和水源质量控制等诸多领域, 具有潜在的商业价值和工业应用前景. 同时仿生嗅觉传感器也为嗅觉传导机理的深入研究提供了新的技术手段, 如用于鉴定特异的嗅觉受体-配体对、研究嗅神经元对刺激的响应特性、细胞电生理等, 从而促进嗅觉传导机理的研究.

本文详细介绍了嗅觉信号的传导机理及其研究进展, 总结了国际上仿生嗅觉传感器研究的最新进展. 在此基础上, 结合我们当前的研究工作, 介绍了基于光寻址电位传感器(light addressable potentiometric sensor, LAPS)的仿生嗅觉传感器, 并提出了未来主要发展方向, 而以非生物材料为敏感元件的气体检测传感器不在本文讨论的范围内.

1 嗅觉的生物学基础

1.1 嗅觉信号传导的神经通路

嗅觉感受器是位于嗅上皮内的嗅神经元. 嗅上皮主要由3种类型的细胞组成^[4]: 嗅神经元、支持细胞和基底细胞, 其中基底细胞是在整个生命过程中产生嗅神经元的干细胞(图1). 嗅神经元是双极细胞, 它的树突伸向嗅上皮表面, 末端呈圆形膨大, 膨大部向嗅上皮表面的黏液中伸出许多纤毛, 纤毛的质膜内含有嗅觉受体, 是与气味分子发生相互作用的部位. 根据嗅神经元表达的嗅觉受体, 大鼠的嗅神经上皮被分成4个区域(区域1~4)(图2), 一种嗅觉受体只

表达于嗅上皮 4 个区域中的一个^[3,4]. 在一个给定的区域内, 表达不同类型嗅觉受体的嗅神经元相互混合, 具有高度分散的分布. 嗅神经元还发出一根轴突投射到嗅球, 与嗅球内的第二级神经元建立联系. 大鼠嗅神经元轴突的投射服从“区域到区域的投射”和“丝球小体的汇聚”两个基本原理^[4]: 在嗅上皮一个给定区域(区域 1~4)的嗅神经元投射到主嗅球上定位于对应区域(区域 I~IV)的丝球小体; 表达相同嗅觉受体的嗅神经元的轴突汇聚于少数几个确定的丝球小体上.

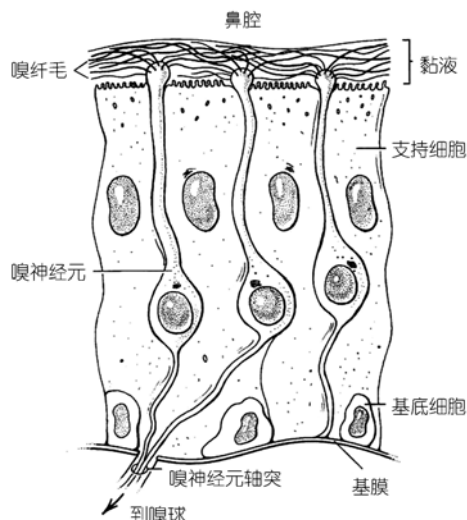


图 1 嗅上皮示意图
根据文献^[1], 略作修改

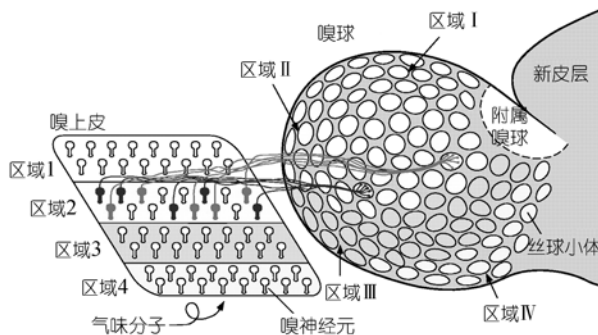


图 2 嗅上皮和主嗅球之间轴突连接的示意图
根据文献^[4], 略作修改

哺乳动物主嗅球的皮层结构相对简单(图 3), 含有上千个称为丝球小体的信号处理模块. 丝球小体是相对大的球形神经网络(直径大约 100~200 μm)^[4], 其内含有嗅神经元的轴突与嗅球输出神经元僧帽细胞和丛状细胞树突形成的兴奋性突触连接. 嗅球内

还含有两类中间神经元, 即颗粒细胞和水平细胞, 它们能和僧帽细胞及丛状细胞形成局部神经回路. 僧帽细胞和丛状细胞的轴突是嗅球的输出通路, 这些轴突投到皮层下和皮层区域, 在那里嗅觉信号获得更高水平的处理, 以形成对气味的识别和感知.

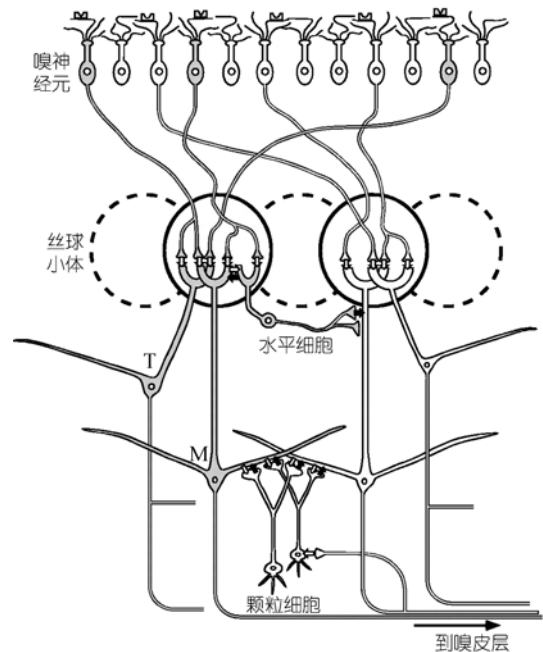


图 3 哺乳动物主嗅球突触组织结构的基本回路示意图
根据文献^[4], 略作修改. 两个丝球小体模块代表两种不同类型的嗅觉受体. M, 僧帽细胞; T, 丛状细胞; 短白箭头代表兴奋性突触; 短黑箭头代表抑制性突触

1.2 嗅神经元对气味分子信号转导的机制

嗅神经元能把感受到的气味分子的化学信号转换成电信号, 并把这个电信号传递到嗅球. 哺乳动物嗅觉系统的一个显著特征是每一个嗅神经元只表达成百上千种嗅觉受体基因中的一种^[5,6], 这种单表达机制保证来自不同嗅觉受体的响应能在不同的响应细胞间被分隔开, 使不同的气味信号获得初步的分辨. 嗅觉受体通过 GTP 结合蛋白和胞内第二信使与下游的效应分子相偶联, 受体被激活时, 引发一系列生物化学级联反应, 导致细胞膜电位发生改变^[7], 最终产生“全或无”的电信号, 即动作电位. 动作电位以一定的频率沿嗅神经元的轴突传到嗅球. 两种第二信使, 即环磷酸腺苷和三磷酸肌醇(IP_3)在嗅觉信号的转导过程中发挥作用^[5](图 4), 这两种信号转导途径对不同范围的物种起作用, 但单个嗅神经元是否同时使用了这两种信号转导途径仍不清楚.

图 4(a)为环磷酸腺苷信号转导途径的示意图. 气味分子和嗅觉受体(R)结合后, 通过嗅觉特异的Gs蛋白(G)激活腺苷酸环化酶(AC), 使细胞内cAMP水平升高. cAMP作用于嗅觉特异的环核苷酸门控离子通道(CNG), 这是一种非选择性阳离子通道, 激活后能升高细胞内的钙离子浓度, 随后钙离子激活钙离子调控的氯离子通道形成氯离子电流, 这个氯离子电流形成了大部分的转导电流 [5,8]. 图 4(b)为三磷酸肌醇信号转导途径的示意图. 气味分子和嗅觉受体蛋白(R)结合后, 通过Gq蛋白激活磷脂酶C (PLC)和磷酸肌醇 3-OH激酶(PI₃K), 它们催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)生成甘油二酯(DAG)、三磷酸肌醇(IP₃)和磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP₃). 其中IP₃与细胞质膜IP₃受体介导的细胞外钙离子内流有关, 这种受体表达于信号转导部位, 其效应分子是瞬间受体电位通道(transient receptor potential channel, TRPC), 这是一

种受钾离子和钙离子调控的非选择性阳离子通道, 它们形成了绝大部分的转导电流 [5].

1.3 嗅球对嗅觉信号的编码和处理

通常气味是由一系列的气味分子组成的, 气味分子中的某些化学基团作为配体与特异的嗅觉受体相结合, 因此一种气味分子可以兴奋几种不同的嗅觉受体, 而同一种嗅觉受体可以接受几种不同气味分子的刺激 [9]. 气味分子作用于各种嗅觉受体后产生一种时间上独特、空间上分布的综合效应, 这种综合效应通过嗅神经元的轴突传导到嗅球. 嗅神经元的轴突投射是高度有序的丝球小体汇聚模式: 嗅神经元能发现自己在主嗅球上的目标丝球小体, 表达相同类型嗅觉受体的神经元的轴突投射到主嗅球特定的少数几个丝球小体上 [4,10,11]. 因此, 在嗅上皮内一个给定区域的嗅神经元接收到的气味信号传导到主

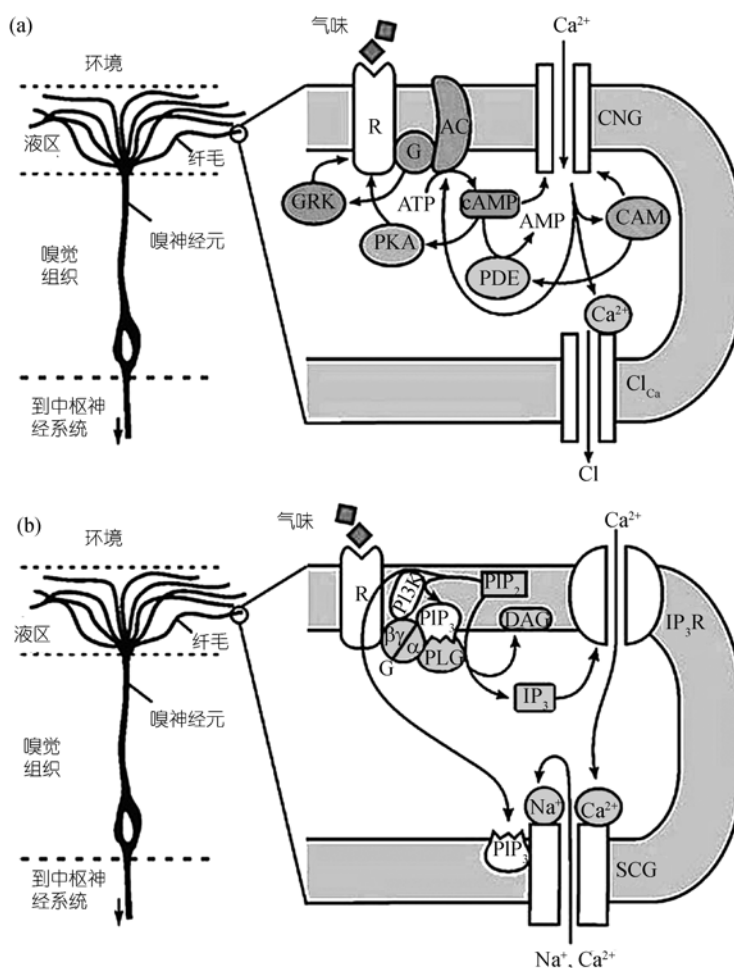


图 4 气味分子信号在嗅神经元内的转导机制

根据文献 [5], 略作修改. (a) 环磷酸腺苷信号转导途径示意图; (b) 三磷酸肌醇信号转导途径示意图

嗅球相对应区域上的丝球小体。嗅觉受体基因的差异表达形成的一个嗅神经元只表达一种嗅觉受体的机制和嗅神经元轴突高度有序的投射模式使得嗅觉系统能够在嗅球中形成一种气味特异的时间和空间编码^[12,13]。

嗅球是传导和处理嗅觉信号的初级中枢,主嗅球丝球小体模块间通过局部中间神经元形成的神经回路发生相互作用^[4,14](图3),嗅觉信号通过这些神经回路被修饰和处理,随后由僧帽细胞和丛状细胞的轴突传导到嗅皮层。僧帽细胞和丛状细胞能长距离投射它们的次级树突,并且和颗粒细胞的树突形成大量树突到树突的交互式突触连接。交互式突触的组成包括谷氨酸介导的僧帽细胞到颗粒细胞的兴奋性突触和 γ -氨基丁酸介导的颗粒细胞到僧帽细胞的抑制性突触。因此,僧帽细胞和丛状细胞的激活导致细胞的反馈抑制和相邻僧帽细胞和丛状细胞间的侧抑制^[15]。这种侧抑制能增加具有不同响应强度的丝球小体之间的信号对比度,并因此锐化单个僧帽细胞和丛状细胞对气味分子响应的特异性。僧帽细胞和丛状细胞也因此比嗅神经元能更加特异地调整成对特异的分子特征发生响应。僧帽细胞和丛状细胞的初级树突在丝球小体内和水平细胞形成树突到树突的交互突触连接。一些水平细胞发出抑制性投射到邻近僧帽细胞和丛状细胞的树突,说明水平细胞能介导僧帽细胞和丛状细胞的侧抑制。这种通过中间神经元介导的神经细胞之间的相互作用对嗅觉信号的修饰、加工以及编码发挥了极其重要的作用^[4]。此外,生理研究结果显示,局部神经回路有使僧帽细胞和丛状细胞产生同步振荡放电的可能性,从而使嗅皮层的嗅觉感知细胞对来自不同丝球小体模块的信号发挥整合作用,同步振荡放电被认为在昆虫的中枢嗅觉系统中发挥了重要作用^[4]。

1.4 嗅皮层对嗅觉信号的感知

各种特异的嗅觉感知最终是在嗅皮层中完成的,在嗅皮层嗅觉信号被解码以分辨不同的气味。气味是以一种受体组合的方式编码的^[16,17],而且多种气味混合产生的是一种新的嗅觉感知,而不是多种气味感知的简单叠加^[18]。

对大鼠的研究显示,两种气味的混合能激活这两种气味单独作用时没有响应的嗅皮层神经元,说明嗅皮层具有嗅球所缺少的信息整合能力^[18]。嗅皮

层的单个神经元可以接受来自不同嗅觉受体的信号的组合。如果每一种气味是被嗅觉受体的一种组合所编码,那么一个嗅皮层细胞的激活就需要来自多种嗅觉受体的输入。图5是嗅觉系统对混合气味感知的简单模型示意图^[18]。来自不同嗅觉受体的输入在嗅上皮和嗅球水平被分离,但在嗅皮层水平被整合到单个嗅皮层神经元上。在这个简单的模型中,嗅皮层神经元的激活需要来自两种嗅觉受体的输入。两种气味分子被不同的嗅觉受体组合所识别,并激活从这些嗅觉受体组合接收输入的嗅皮层神经元。两种气味分子的混和产生了新的嗅觉受体的组合输入并激活在这两种气味分子单独作用时不会被激活的嗅皮层神经元。在这个模型中,被混合气体激活而不被其单种组分所激活的嗅皮层神经元是那些接受新的嗅觉受体输入的组合,这些新的组合是由这两种气味受体编码的合并形成的。这代表了一种信息整合过程,由不同嗅觉受体的输入携带的气味的分解特征开始在单个皮层神经元的水平重建以产生独特的气味感知。这一模型也解释了为什么多种气味的混合产生的是一种新的嗅觉感知而不是多种气味感知的简单叠加。

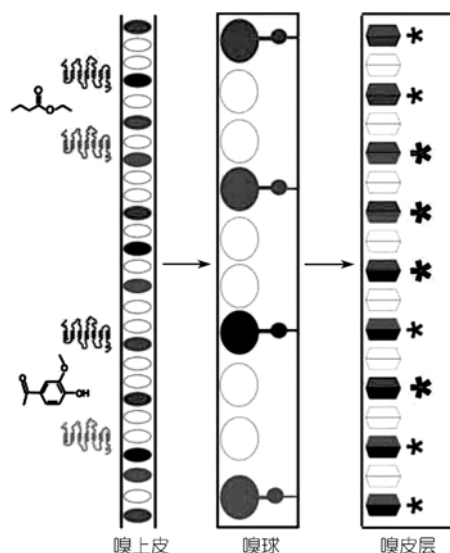


图5 嗅觉系统对混合气味感知的简单模型

根据文献^[18],略作修改

2 仿生嗅觉传感器研究进展

随着嗅觉传导机理研究的不断深入,人们模仿这一机理,以嗅觉相关生物活性组分,如嗅觉组织器

官、嗅神经元以及嗅觉受体等为敏感元件,在结合了诸如压电传感器、场效应管、微电极、表面等离子体共振技术及光可寻址电位传感器等二级传感器后,构建了多种仿生嗅觉传感器。

2.1 基于石英晶体器件的仿生嗅觉传感器

石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)依据的是压电晶体表面微小的压力变化会引起其振动谐振频率的改变这一原理,通过测量其谐振频率的变化来测定晶体表面压力的变化。根据这个原理,QCM能被用来测定其表面附着物质质量的变化,而且具有灵敏度高、响应速度快以及可以实时动态检测等优点,因此被广泛应用于检测气味分子和嗅觉受体的相互作用。当特异的分子(如气体)被固定于其表面的物质(如嗅觉受体)所吸收时,质量的改变将会引起石英晶体谐振频率的改变,而且频率的改变与质量的改变成正比,即 $\Delta F = K\Delta m$,其中 ΔF 为QCM频率的改变(Hz), Δm 为表面吸收物质质量的改变(g), K 为相关系数, $K = -F/(Art)$, F 为晶体的初始频率(MHz), A 为电极总的表面积(cm^2), r 为晶体的密度(g/cm^3), t 为晶体的厚度(cm)。在QCM的电极表面成膜后,两者仍然服从 $\Delta F \propto \Delta m$ 的关系,而相关系数 K 不仅由石英晶体的性质决定而且也与膜的特征相关^[19]。

Wu^[20]从牛蛙中提取出嗅觉受体蛋白(ORPs),并固定在QCM电极的表面作为敏感元件,构建了用于

检测不同气味的仿生嗅觉传感器系统。该系统对不同挥发性化合物,如羊脂酸、乙酸异戊酯、正癸醇、 β -紫罗兰酮、芳樟醇和癸酸乙酯等,具有迅速(大约400 s)、可逆和长期稳定(大于3个月)的响应。传感器的灵敏度达到 $10^{-6} \sim 10^{-7} \text{g}$ 。随后用凝胶过滤层析的方法把这些嗅觉受体蛋白分成5个分子量不同的部分,分别固定在5个QCM的电极表面,用于构建QCM传感器阵列,并用磷脂膜(FrCK)作对照(图6)。该系统对上述几种不同的化合物均具有响应并且对每一种化合物都能形成一个典型的指纹图(图7)。

嗅觉受体可以用基因工程的方法表达于不同的细胞系统,受体的功能可以用QCM的方法检测。Park等人^[21]把小鼠的嗅觉受体I7表达于人胚胎肾细胞(HEK-293)的质膜。把成功表达了嗅觉受体的HEK-293细胞固定于QCM的电极表面,用I7受体的特异性配体乙醛辛酯作为检测气体,结果显示,表达的I7受体能够和乙醛辛酯发生有效的相互作用,而其他一些被检测的气体则和I7受体不发生相互作用。随后,Park等人^[22]把线虫的嗅觉受体ODR-10表达于大肠杆菌,在证实该受体表达于大肠杆菌的质膜后,把含有该受体的质膜提取出来,然后固定在QCM的电极表面,以检测嗅觉受体和各种不同气味分子的相互作用。与其他气体分子相比,ODR-10受体能与其天然配体丁二酮发生最强的相互作用。

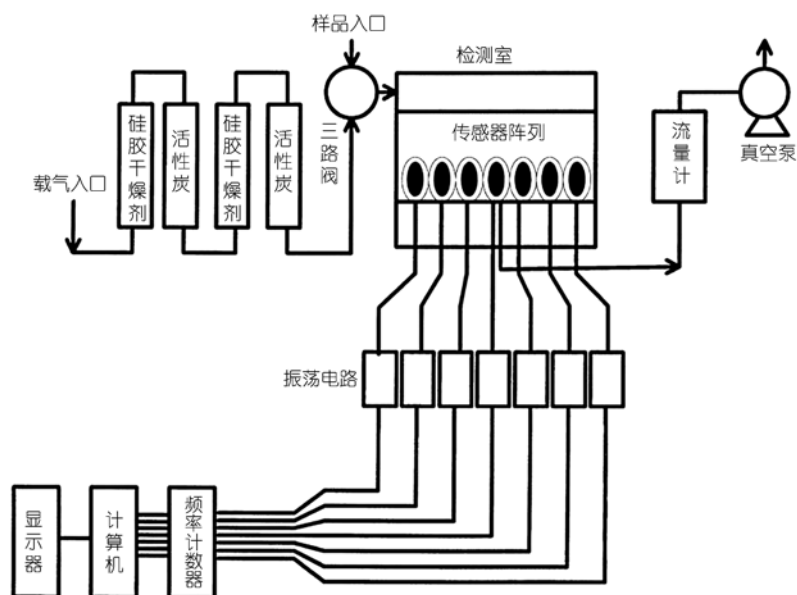


图6 基于QCM阵列的仿生嗅觉传感器的示意图

根据文献^[20],略作修改

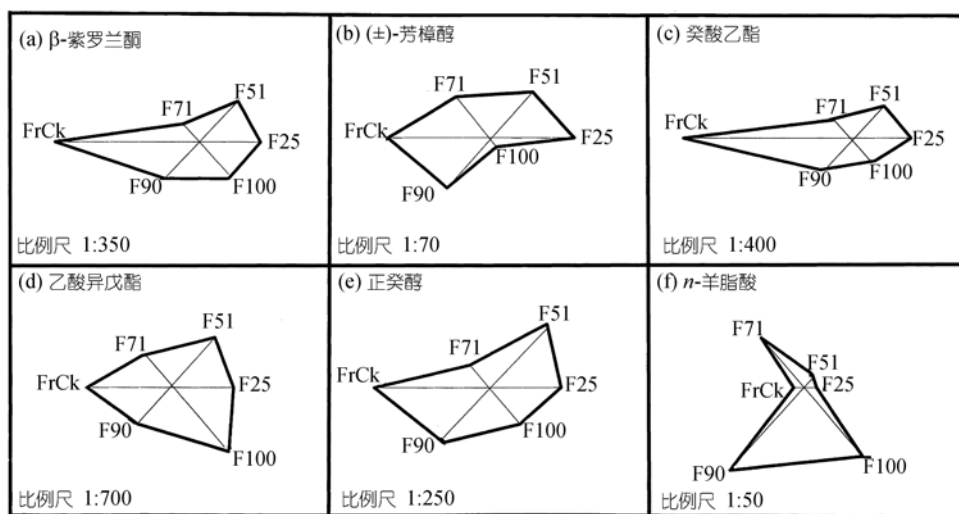


图 7 6 种化合物作用于 QCM 传感器阵列形成的指纹图

根据文献 [20], 略作修改

研究还表明, 这些嗅觉受体对其特异的气味分子的响应在一定范围内是剂量依赖的, 而且检测限很低. 因此基于 QCM 的仿生嗅觉传感器可以作为检测嗅觉受体与气味分子相互作用的一种有效手段.

2.2 基于场效应晶体管(field effect transistor, FET)器件的仿生嗅觉传感器

场效应晶体管是一种常用的半导体放大器件, 其基本原理是利用半导体的表面或内部电场效应对器件内多数载流子的运动进行控制. 1991年, Fromherz等人 [23]将单个神经元耦合在一个裸露(无金属栅)的FET上, 用体视显微镜和玻璃微吸管将细胞吸附到晶体管位置, 玻璃微电极插入到细胞内, 用来刺激细胞并记录细胞内电压. 这是最早将FET应用于细胞传感器的研究.

Schütz等人 [24]把科罗拉多马铃薯甲虫的触角和FET通过生物电子界面耦合, 构建仿生嗅觉传感器(图 8), 用于在真实条件下检测暖房内植物受到的损害. 结果显示, 这种仿生嗅觉传感器对植物受损害后发出的标志性挥发物顺-3-己烯醇具有较大的动态范围、很低的检测限和迅速的响应. 这个系统能够在植有 1000 株植物的暖房里区分出植物的破坏是由单一的机械力造成的还是由于甲虫破坏造成的. 这种仿生嗅觉传感器能够作为病原侵袭植物的指示器用于植物保护, 也能作为一种质量控制工具用于储存食物的保护.

2.3 基于微电极的仿生嗅觉传感器

昆虫的触角含有嗅神经元, 暴露于气体时, 气味

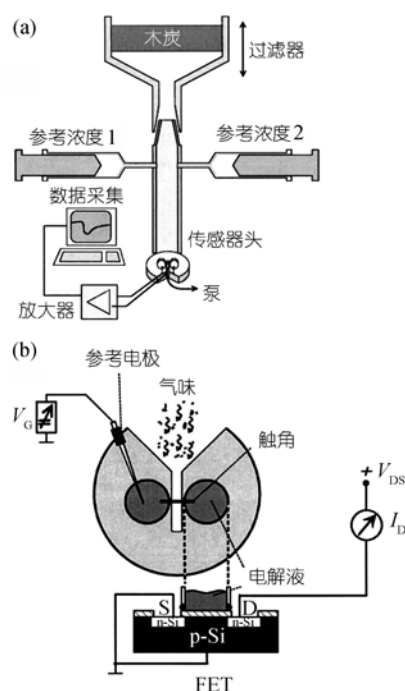


图 8 基于 FET 的仿生嗅觉传感器示意图

根据文献 [24], 略作修改. (a) 进样和测量系统; (b) 触角和 FET 器件的耦合

分子的刺激首先被嗅神经元接收, 随之被转导成一串沿嗅神经元轴突传导的动作电位. 接受刺激前后嗅神经元产生的动作电位的频率是不同的, 从接受刺激前的静息状态转变成受刺激后的兴奋状态, 动作电位的频率也相应地从大约 20 pps 上升到大约 300 pps, 而且频率大小与气体浓度相关 [25]. 因此, 通过

对动作电位频率的测量在一定程度上可以反映气体刺激的强度。

Huotari^[25]用微电极(microelectrode)记录丽蝇嗅觉神经元静息状态和兴奋状态下动作电位的频率(图9),用于估计作用于触角嗅觉神经元的气味的浓度。结果表明,丽蝇的嗅觉神经元对1,4-丁二胺(1,4-diaminobutane, 1,4-DAB)、己醇(1-hexanol, HX)和丁酸(butanoic acid, BA)3种气味分子均有较高的灵敏度和特异性,而对于其他被检测的气味分子不敏感。使嗅觉受体神经元的动作电位从静息状态转变成该系统可区分的兴奋状态的气体最低浓度分别为:1,4-DAB, 1 nL/L; HX, 8 μ L/L; BA, 20 μ L/L。当气体浓度高过一定程度时会导致嗅觉神经元停止产生动作电位,这可能是嗅觉神经元的适应和饱和造成的。结果表明,这种传感器适合用于气味的检测,并可用于研究嗅觉神经元对气味刺激的响应特性。

2.4 基于表面等离子体共振技术(surface plasmon resonance, SPR)的仿生嗅觉传感器

表面等离子体共振技术是一种光学技术,应用衰减波现象测量非常靠近传感器表面的物质折射率

的改变。基于SPR的生物传感器已经被用于研究生物分子的相互作用,它能够做到实时监测,并且能无损地检测到由于信号转导引起的细胞内分子组分的改变^[26]。这一技术能对受体结合配体的数量和生物分子结合率及脱离率进行高度精确,并且不需要标记的实时分析^[27]。

目前SPR系统已经被用于检测由于气味分子和嗅觉受体结合而引发的信号转导过程导致的细胞内分子组成的改变。当气味分子和嗅觉受体相互作用时,发生了由cAMP或IP₃介导的信号转导过程。随后,细胞内发生的组分改变,如离子的内流能够被SPR检测到(图10)。Park等人^[28]应用SPR技术构建基于细胞的仿生嗅觉传感器,用于检测气味分子。线虫的嗅觉受体ODR-10表达于HEK293细胞质膜,ODR-10能与丁二酮发生特异性的相互作用,当把这些细胞固定于传感器表面并暴露于0.1 mmol/L的丁二酮后,系统能检测到SPR信号,而在没有表达嗅觉受体的HEK293细胞则没有检测到SPR信号。并且信号的强度是依赖于丁二酮的浓度的,随着丁二酮浓度的增大而升高。根据这种方法,表达了不同类型嗅

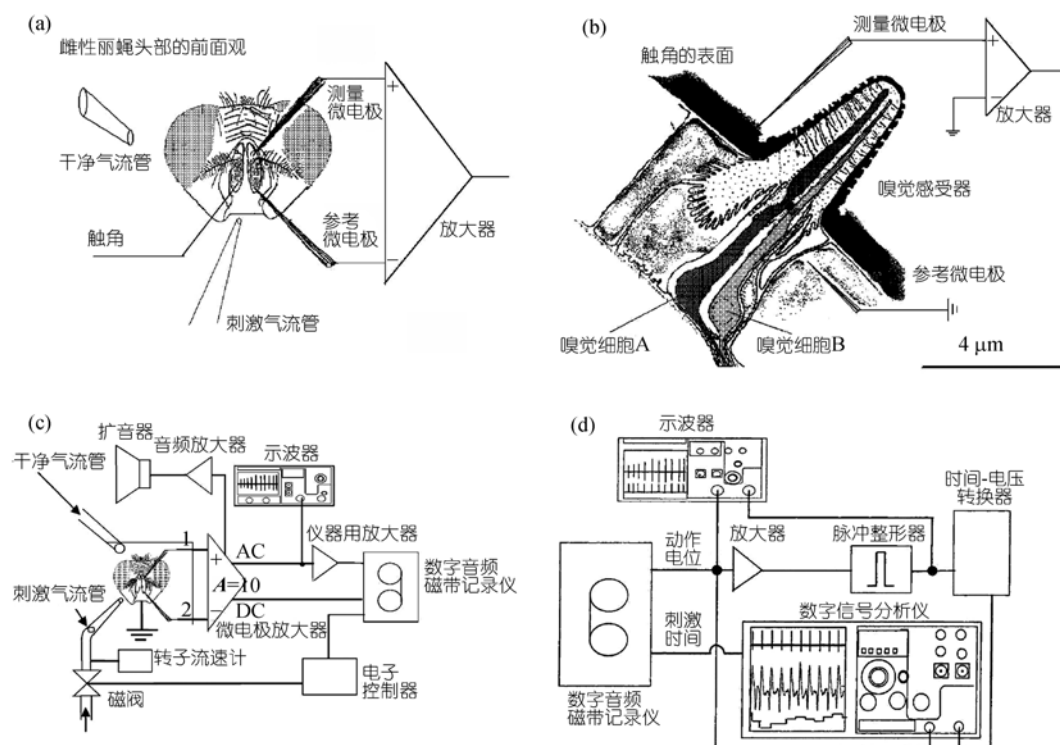


图9 基于微电极的仿生嗅觉传感器示意图

根据文献^[25], 略作修改。(a) 测量状态下雌性丽蝇头部的前面观。(b) 为(a)的局部放大。(c) 刺激和响应测量系统。1, 测量微电极; 2, 参考微电极。(d) 动作电位串的信号和响应分析系统

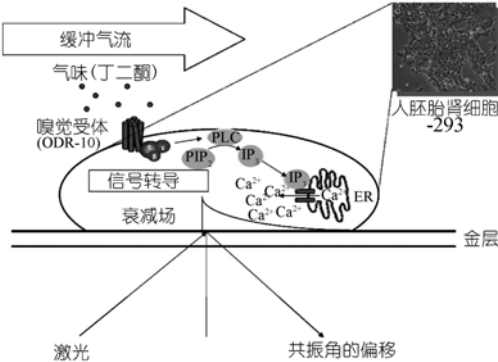


图 10 基于 SPR 技术的仿生嗅觉传感器检测气味分子的原理
根据文献 [28], 略作修改

觉受体的细胞和 SPR 技术相结合的复合系统, 能被用于鉴定每一种嗅觉受体的特异性配体.

2.5 基于光寻址电位传感器(light addressable potentiometric sensor, LAPS)的仿生嗅觉传感器

光寻址电位传感器是一种常用的半导体芯片.

许多研究已经证实, LAPS可以用于构建监测细胞外电位的细胞-半导体复合系统 [29,30]. 我们也用LAPS无损地监测了单个兴奋性细胞膜电位 [31]. LAPS技术有许多优点, 如LAPS的表面十分平滑以致很容易测量流动的液体、制作工艺非常简单、使用寿命较长、可以实现对芯片表面任意位置的寻址测量等.

LAPS是一种表面电压检测器, 利用了半导体的内光电效应 [32]. 当有适当的光照射于LAPS时, 半导体由于本征吸收导致电子-空穴对的产生. 在半导体与绝缘层接触的表面处于耗尽状态时, 在耗尽区强电场作用下, 通过扩散进入耗尽区的光生电子、空穴被分离, 分别聚在耗尽区两侧, 形成光电压. 由于照射光是被恒定调制的激光束, 所以光电压是交变的, 于是通过绝缘层电容, 在外电路会有交变电流通过. 在光照条件(光波长、功率)和硅基底的电阻率、硅片厚度、传感器芯片的几何尺寸等参数一定的情况下, 光电压的大小取决于耗尽层的厚度. 耗尽区越厚, 它

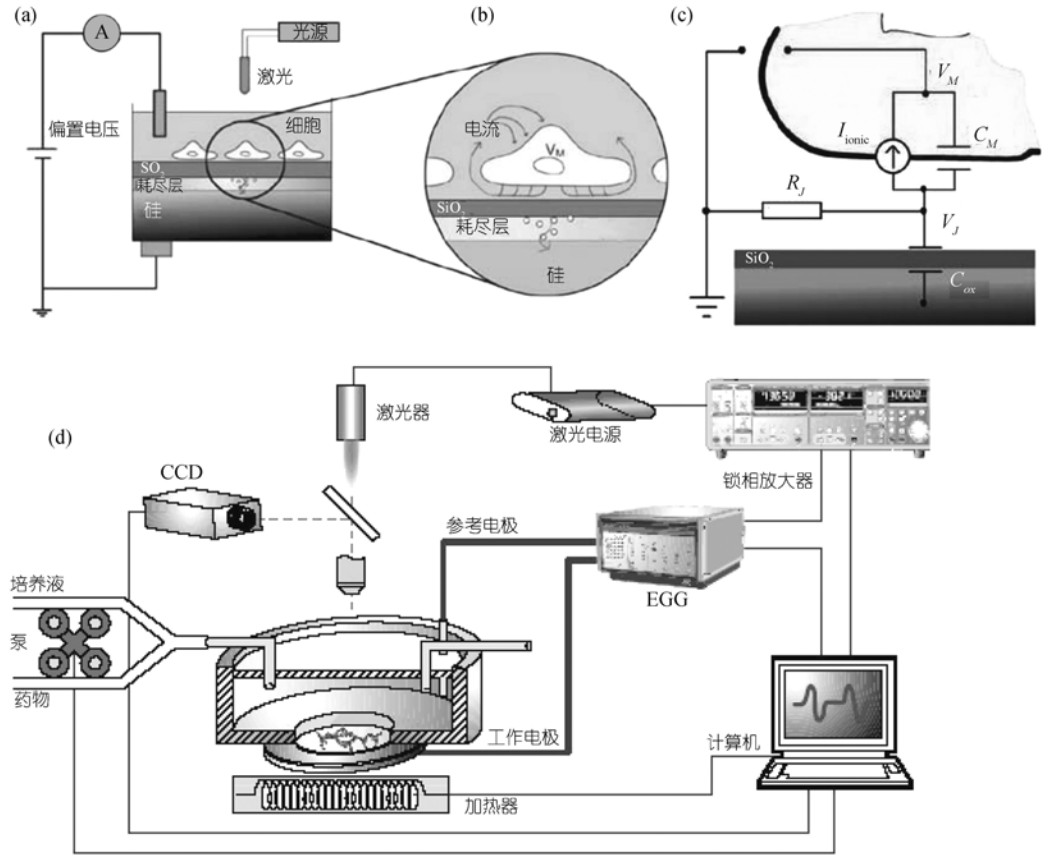


图 11 基于 LAPS 的仿生嗅觉传感器的原理和系统示意图
根据文献[32], 略作修改. (a) 使用LAPS技术的细胞生物传感器的原理; (b) 简化的细胞-半导体界面示意图; (c) 细胞-LAPS 复合系统界面的电路模型; (d) 测量系统示意图

能够收集到的光生载流子越多, 光电压越大. 理想情况下(不考虑界面态及氧化层中的电荷), 耗尽层厚度是由等效偏置唯一决定, 当外加偏置电压不变时, 则耗尽层厚度仅由耦合在其上的细胞外电位决定(图11(a)). 因此, 用聚焦光点于LAPS表面靶细胞的方法, 在光照区域测量局部表面电位就能记录到细胞外电位的改变. 当神经元培养于LAPS的氧化硅表面时(图11(b)), 细胞-LAPS复合系统的界面的电路模型如图11(c)所示.

基于LAPS, 我们以嗅觉感受细胞作为敏感元件构建了一种用于检测化学分子的仿生嗅觉传感器(图11(d))^[32]. 嗅神经元、僧帽细胞和丛状细胞有效地培养于半导体芯片上, 使用LAPS作为敏感芯片监测神经元的细胞外电位, 记录神经元在气味分子或神经递质, 如醋酸和谷氨酸等的刺激下的响应. 结果说明, 这种由LAPS和嗅觉感受细胞构成的复合系统对化学分子的刺激是敏感的, 作为一种新型的神经芯片用于开发检测气味的生物电子鼻具有很大的潜力(图12).

我们根据LAPS的发展趋势确定了未来工作的两个重点: 首先, 多光源寻址电位传感器(multilight addressable potentiometric sensor, MLAPS)^[33], 除了具有LAPS芯片的功能和诸多优点外, 还能做到多参数的并行检测和处理, 可用于构建细胞芯片^[34]. 其基本原理是用不同频率的调制光源对LAPS传感器表面的多个区域同时进行照射, 产生的光电流是所有局部光电流的叠加, 而局部光电流的频率和其相对应的光源频率一样. 对光电流的幅值进行傅立叶变换分析, 就可以同时得到每个照射区域的表面电位. 其次, 结合分子生物学技术, 克隆和表达各种特异的嗅觉受体, 用于构建含有特异嗅觉受体的细胞阵列和细胞网络, 主要用于研究不同受体对配体响应的组合以及嗅觉神经细胞网络^[35]内的信号传导、神经元之间的相互作用等.

3 结束语

人们已经从多层次、多角度对嗅觉传导机理进行了交叉综合的研究, 并取得了许多重大进展, 但是要完全揭示嗅觉传导机理仍然存在许多问题需要解决, 比如嗅觉受体的分离以及对它们的多样性、特异性和表达模式等特征的揭示, 嗅球对嗅觉信号的处理和编码规律, 气味的分子是如何被神经系统编码的以及各种特异的嗅觉感知是如何在嗅皮层完成的?

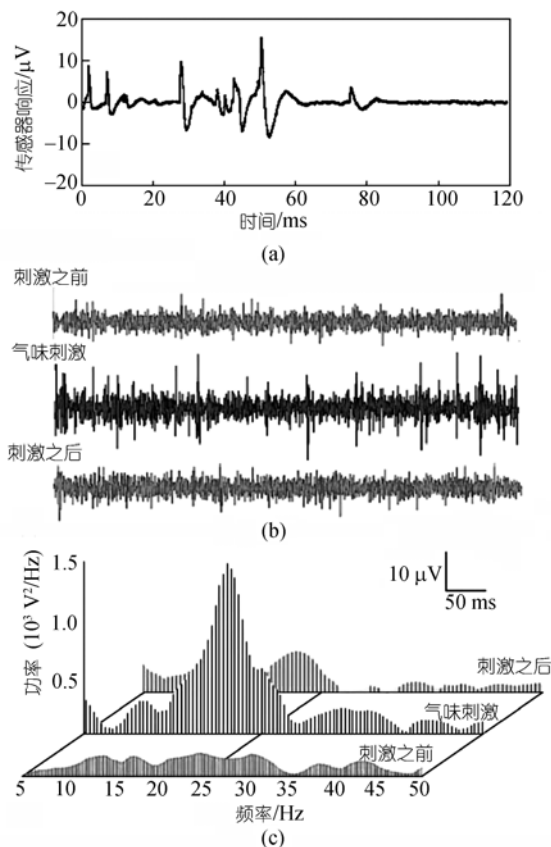


图12 嗅觉感受细胞的胞外电位记录

根据文献^[32], 略作修改. (a) 僧帽细胞在谷氨酸作用下的响应; (b) 嗅觉感受细胞对气味的响应; (c) 嗅觉感受细胞对气味响应的频谱特征, 在24 Hz处有特征性频率成分出现

这些问题也是未来嗅觉传导机理研究的主要方向, 它们的解决还有赖于生物、电子、信息、材料等多种学科和技术交叉应用于嗅觉传导机理的研究.

嗅觉传导机理和仿生嗅觉传感器的研究是相互促进、相互渗透的. 目前仿生嗅觉传感器的研究也取得了较快进展, 并展现出很大的发展潜力. 但是, 该研究也面临许多困难, 主要在于难以获得大量具有功能的嗅觉受体和缺乏能够高通量、多参数实时检测嗅觉受体和气味分子相互作用的有效手段, 传感器的灵敏度和特异性仍然受到限制, 影响了传感器的实际应用. 因此利用基因工程技术获得大量不同类型的功能性嗅觉受体, 并对结合于每一种嗅觉受体的配体进行鉴定, 构建含有不同类型嗅觉受体的传感器阵列, 制成嗅觉生物芯片, 实现动态、多参数、实时无损的检测, 并具有微型化、集成化和智能化等特点是仿生嗅觉传感器未来发展的主要趋势.

参 考 文 献

- 1 Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, 65: 175—187, doi:10.1016/0092-8674(91)90418-X
- 2 Dryer L, Berghard A. Odorant receptors: A plethora of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20: 413—417, doi:10.1016/S0165-6147(99)01381-4
- 3 Sullivan S L, Ressler K, Buck L B. Spatial patterning and information coding in the olfactory system. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5: 516—523, doi:10.1016/0959-437X(95)90057-N
- 4 Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: Coding and processing of odor molecule information. *Science*, 1999, 286: 711—715, DOI: 10.1126/science.286.5440.711
- 5 Ache B W, Young J M. Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 2005, 48: 417—430, doi:10.1016/j.neuron.2005.10.022
- 6 Lewcock J W, Reed R R. Ors rule the roost in the olfactory system. *Science*, 2003, 302: 2078—2079, doi: 10.1126/science.1093397
- 7 Nakamura T. Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp Biochem Physiol A: Physiol*, 2000, 126: 17—32, doi:10.1016/S1095-6433(00)00191-4
- 8 Reisert J, Lai J, Yau K W, et al. Mechanism of the excitatory Cl response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron*, 2005, 45: 553—561, doi:10.1016/j.neuron.2005.01.012
- 9 Ressler K J, Sullivan S L, Buck L B. Information coding in the olfactory system: Evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 1994, 79: 1245—1255, doi:10.1016/0092-8674(94)90015-9
- 10 Liedo P M, Gheusi G, Vincent J D. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*, 2005, 85: 281—317, doi:10.1152/physrev.00008.2004
- 11 Vosshall L B. Putting smell on the map. *Trends Neurosci*, 2003, 26: 169—170, doi:10.1016/S0166-2236(03)00037-7
- 12 Xu F Q. That's your left foot and.... *Trends Neurosci*, 2001, 24: 549—550, doi:10.1016/S0166-2236(00)01928-7
- 13 Carlson J R. Viewing odors in the mushroom body of the fly. *Trends Neurosci*, 2001, 24: 497—498, doi: 10.1016/S01662236(00)01895-6
- 14 Kay L M, Stopfer M. Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17: 433—442, doi:10.1016/j.semdb.2006.04.012
- 15 Aungst J L, Heyward P M, Puche A C, et al. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*, 2003, 426: 623—629, doi:10.1038/nature02187
- 16 Leon M, Johnson B A. Olfactory coding in the mammalian olfactory bulb. *Brain Res Rev*, 2003, 42: 23—32, doi: 10.1016/S0165-0173(03)00142-5
- 17 Hallem E A, Carlson J R. The odor coding system of *Drosophila*. *Trend Genet*, 2004, 20: 453—459, doi: 10.1016/j.tig.2004.06.015
- 18 Zhou Z H, Buck L B. Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science*, 2006, 311: 1477—1481, doi: 10.1126/science.1124755
- 19 Sun A, Yang Y, Jiang Y L, et al. Electro-mass olfactory multi-sensor (emms). *Sens Actuators B Chem*, 2000, 66: 88—93, doi: 10.1016/S0925-4005(00)00375-0
- 20 Wu T Z. A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: Electronic nose. *Biosens Bioelectron*, 1999, 14: 9—18, doi:10.1016/S0956-5663(98)00086-4
- 21 Ko H J, Park T H. Piezoelectric olfactory biosensor: Ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1327—1332, doi:10.1016/j.bios.2004.05.002
- 22 Sung J H, Ko H J, Park T H. Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1981—1986, doi:10.1016/j.bios.2005.10.002
- 23 Fromherz P, Offenhausser A, Vetter T, et al. A neuron-silicon junction: A Retzius cell of the leech on an insulated-gate field effect transistor. *Science*, 1991, 252: 1290—1293, doi: 10.1126/science.1925540
- 24 Schütz S, Schoning M J, Schroth P, et al. An insect-based biofet as a bioelectronic nose. *Sens Actuators B Chem*, 2000, 65: 291—295, doi:10.1016/S0925-4005(99)00325-1
- 25 Huotari M J. Biosensing by insect olfactory receptor neurons. *Sens Actuators B Chem*, 2000, 71: 212—222, doi:10.1016/S0925-4005(00)00619-5
- 26 Ivic L, Zhang C, Zhang X, et al. Intracellular trafficking of a targeted and functional mammalian olfactory receptor. *J Neurobiol*, 2002, 50: 56—68, doi: 10.1002/neu.10016
- 27 Rich R L, Myszka D G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11: 54—61, doi: 10.1016/S0958-1669(99)00054-3
- 28 Lee J Y, Ko H J, Park T H. Cell-based measurement of odorant molecules using surface plasmon resonance. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39: 375—380, doi:10.1016/j.enzmictec.2005.11.036
- 29 Ismail A B, Yoshinobu T, Iwasaki H, et al. Investigation on light-addressable potentiometric sensor as a possible cell-semiconductor hybrid. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 1509—1514, doi: 10.1016/S0956-5663(03)00129-5
- 30 Stein B, George M, Gaub H E, et al. Extracellular measurement of averaged ionic currents with the light-addressable potentiometric sensor (LAPS). *Sens Actuators B Chem*, 2004, 98: 299—304, doi: 10.1016/j.snb.2003.10.034
- 31 Xu G X, Ye X S, Qin L F, et al. Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1757—1763, doi:10.1016/j.bios.2004.06.037
- 32 Liu Q J, Cai H, Wang P, et al. Olfactory cell-based biosensor: A first step towards a neurochip of bioelectronic nose. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 318—322, doi:10.1016/j.bios.2006.01.016
- 33 王平. 人工嗅觉与人工味觉. 北京: 科学出版社, 2000
- 34 李燕, 刘清君, 徐莹, 等. 味觉传导机理及味觉芯片技术研究进展. *科学通报*, 2005, 50(14): 1425—1433
- 35 Wang P, Xu G X, Qin L F, et al. Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sens Actuators B Chem*, 2005, 108: 576—584, doi:10.1016/j.snb.2004.11.056