

# 高灵敏和高特异性生物嗅觉传感系统研究

庄柳静<sup>1</sup>, 郭添添<sup>1</sup>, 胡 宁<sup>1</sup>, 许科帝<sup>1,2</sup>, 郑筱祥<sup>1,2</sup>, 王 平<sup>1</sup>

(1. 浙江大学生物医学工程教育部重点实验室 杭州 310027; 2. 浙江大学求是高等研究院 杭州 310027)

**【摘要】**利用微电极植入技术,提出了一种新型的生物嗅觉传感系统,将多通道植入式微电极包埋于大鼠嗅球中,提取出嗅球神经元的气味响应信息。通过分析神经元响应活动从而进行气味检测与区分,发现该系统能够长期稳定地用于气味检测,且灵敏度达到 $10^{-10}$  mol/L。在单分子气味或自然气味检测中,该系统都具有很高的特异性。因此,该系统在实际气味检测(如肺癌呼出气体标志物检测、食品新鲜度检测、爆炸物搜索等)领域具有广泛的应用前景。

**关键词** 植入式电极; 生物嗅觉传感系统; 哺乳动物; 气体检测; 嗅球

中图分类号 Q424

文献标志码 A

doi:10.3969/j.issn.1001-0548.2014.06.025

## A Study of Olfactory Biosensing System High-Sensitive and Specific

ZHUANG Liu-jing<sup>1</sup>, GUO Tian-tian<sup>1</sup>, HU Ning<sup>1</sup>, XU Ke-di<sup>1,2</sup>, ZHENG Xiao-xiang<sup>1,2</sup>, and WANG Ping<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Biomedical Engineering of Education Ministry, Zhejiang University Hangzhou 310027;

2 Qiushi Academy for Advanced Studies, Zhejiang University Hangzhou 310027)

**Abstract** Mammalian olfactory system can accurately identify odorants with high specificity and sensitivity. Taking advantage of multiple microelectrode implant technology, we developed a novel in vivo biosensing system for odor detection. The odorant information from conscious rats' olfactory bulb (OB) is extracted by using microelectrode array. High-quality mitral/tufted (M/T) cell activity evoked by odorants could be obtained for at least three weeks. The responses of M/T cell carry sufficient information to discriminate presented odorants. In addition, we found the concentration detection limit of rat is below  $10^{-10}$  mol/L for carvone. These results demonstrate that in vivo biosensing system has the characteristics of high sensitivity, continuous recording, and specificity, which presents a promising platform for specific trace odorant detection in many fields.

**Key words** implanted microelectrode; in vivo biosensing system; mammal; odor detection; olfactory bulb

嗅觉是动物最古老原始的感觉,一些哺乳动物的嗅觉系统具有非常高的灵敏度和特异性,不仅能够检测到空气中的痕量气味分子,而且能够辨别和记忆约一万种不同的气味。其嗅觉系统由嗅上皮、嗅球、嗅皮层三部分组成,气味信息通过神经元活动的形式进行传导。当空气中的气体分子与嗅上皮的气味受体结合后,受体被激活,并将嗅觉信息以电化学形式传递给嗅球,嗅球对信息进行编码并传递到大脑皮层形成嗅觉感知<sup>[1]</sup>。嗅球是传递嗅觉信息的中转站,研究发现,哺乳动物受气味刺激后嗅球中的僧帽/丛状神经元会产生特定的电生理活动,其神经信号携带了大量用于区分气味的信息<sup>[2]</sup>。

气味检测在食品安全控制、环境检测、缉毒、炸药搜索等社会安全防范方面起到重要的作用。仿

照动物嗅觉系统,文献[3]提出了具有气体分析、检测、识别功能的仿生“电子鼻”。这种电子鼻包括具有选择性的气体传感器阵列和相应模式识别装置两部分,传感器阵列吸附特定化学结构的气体分子,其输出信号经算法分析后,可实现气味的区分和识别<sup>[4]</sup>。尽管仿生“电子鼻”的提出在气味探测方面实现了重大突破,经过多年发展,目前已被广泛应用,但其灵敏度和特异性依然远不如生物系统。

近年来,随着细胞培养技术和微加工工艺不断发展,国内外研究者提出了一种新型的嗅觉生物传感器。将对气味敏感的嗅觉细胞<sup>[5]</sup>/组织<sup>[6]</sup>培养在生物芯片表面,通过记录分析细胞响应来实现气体检测。这种离体生物传感器能够实时、快速地检测到气体,具有较好的灵敏度和特异性。但是,由于离

收稿日期: 2013-12-10; 修回日期: 2014-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(81027003), 国家973项目(2009CB320303)

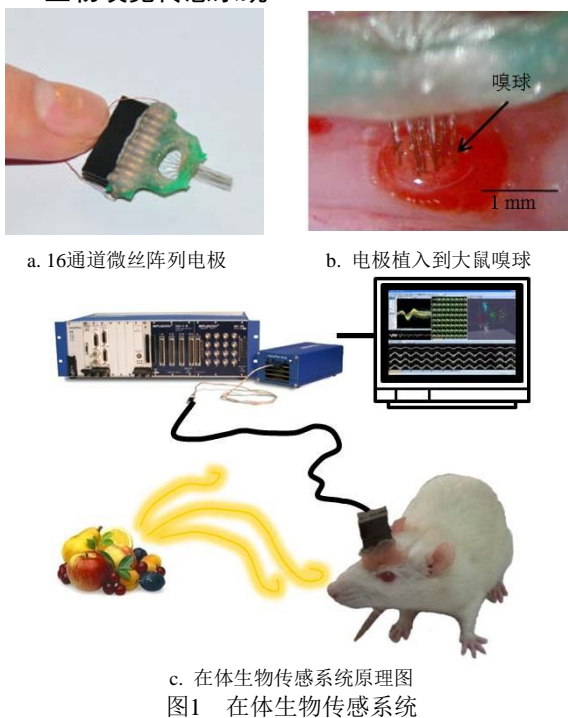
作者简介: 庄柳静(1989-), 女, 博士生, 主要从事动物嗅觉神经电生理、生物传感器等方面的研究。

体细胞的存活时间较短,并且体外环境与体内环境差异较大,这种传感器的使用寿命较短<sup>[7]</sup>,并且离体细胞的气体响应模式不能完全等同于在体细胞。

利用脑-机接口技术,本文提出了一种新型的生物嗅觉传感系统。将多通道植入式微电极包埋于大鼠嗅球中,电极与多通道神经信息采集系统(Plexon, Inc., Dallas, TX)连接后,可实时监测并记录神经元电活动。这种微创技术保证了嗅觉系统的完整性,使得生物传感系统的灵敏度和特异性与哺乳动物保持一致,同时可实现长期检测<sup>[8]</sup>。为了评价生物传感系统用于气味检测的可行性,本文对其检测时间,灵敏度,特异性分别进行了分析。

## 1 实验方法

### 1.1 生物嗅觉传感系统



c. 在体生物传感系统原理图  
图1 在体生物传感系统

为了同步记录多个嗅球区域的神经元信号,本文设计制作了16通道微丝阵列电极,如图1a所示。电极包含两排平行的镍铬合金微丝(AM system, WA; #762000, 直径 $65\ \mu\text{m}$ ),每行各8根,每根电极丝间距为 $200\sim 400\ \mu\text{m}$ 。利用开颅手术将电极包埋于嗅球后,经过一周的恢复,大鼠即可用于气味检测。信号记录过程中需将电极上通过转接口与神经信号采集系统连接。图1c所示为在体生物传感系统原理图,用气味刺激大鼠,多通道电极记录到的神经元信号经过数据采集系统放大滤波后存储在电脑中。神经信号的采样频率为 $40\ \text{Hz}$ ,放大倍数为 $1\ 000$ 倍,滤波范围为 $0.5\sim 8\ 000\ \text{Hz}$ 。原始信号保存于电脑中。

### 1.2 实验动物和手术

选取重 $200\sim 230\ \text{g}$ 的雄性SD大鼠,从腹腔注射 $10\%$ 水合氯醛(注射量 $0.4\ \text{ml}/100\ \text{g}$ )麻醉后,固定于立体定位仪上。手术在无菌条件下进行,利用开颅手术移去嗅球上方覆盖的头骨,暴露出嗅球背部,实验过程中大鼠体温需维持在正常水平。随后用液压微推进器将电极缓慢植入到僧帽细胞层,如图1b所示。手术过程中,将电极连接到信号采集系统进行实时监测,当电极记录到明显spike时<sup>[9]</sup>,认为电极尖端已进入僧帽细胞层,同时停止电极植入,用牙科水泥对电极进行包埋。手术后大鼠需休养一周。

### 1.3 气味刺激

实验选取了6种单分子气体(香芹酮,柠檬醛,乙酸异戊酯,异丁醇,丁二酮,苯甲醚)和自然气体(香蕉)进行刺激。单分子气体用无色无味的矿物油进行稀释,浓度为 $10^{-1}\sim 10^{-15}\ \text{mol/L}$ 。实验时,将大鼠放于有机玻璃笼子(长 $30\ \text{cm}$ ,宽 $25\ \text{cm}$ ,高 $30\ \text{cm}$ )中,将滴有 $0.1\ \text{mL}$ 单分子气体的滤纸放于大鼠鼻腔旁,停留 $5\ \text{s}$ ,采气的时间取决于大鼠。得到气味响应后,向笼子中通入新鲜空气,并等待 $5\ \text{min}$ 。自然气体同样采用手动方式,切取 $5\ \text{g}$ 香蕉,放于大鼠鼻腔旁,其余操作同上。

### 1.4 数据分析

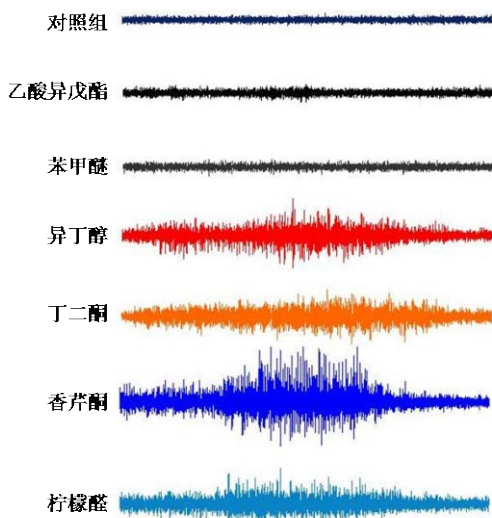
原始信号利用MATLAB进行离线分析,从中分别提取出spike( $200\sim 4\ 000\ \text{Hz}$ )与LFP(local field potential,  $1\sim 100\ \text{Hz}$ )信号。Spike信号是由单个神经元产生的动作电位,代表了单个神经元的响应,而LFP又称局部场电位,是由一个区域的神经元产生的综合响应,代表了局部嗅球组织的神经元响应。利用阈值检测法提取出spike信号中的峰电位,记录每个电位的发放时间,用于计算发放频率。神经元通过动作电位叠加进行区分,形状相似的动作电位认为由一个神经元产生。另外,用频谱分析等方法对LFP进行了分析。

## 2 结果与分析

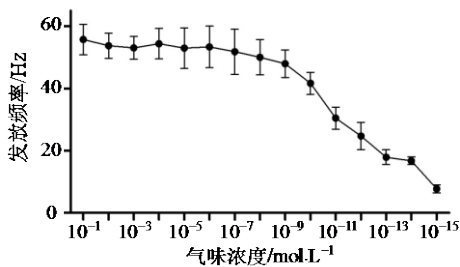
为了探索在体生物传感系统用于气味检测的可行性,本文分别从使用寿命,特异性,灵敏度三方面对其进行分析。尽管利用细胞培养技术和芯片技术,用于体外检测的生物芯片能够用于气味检测,但是体外环境使细胞的寿命大大缩短,这种生物芯片不能实现长时、重复检测<sup>[7]</sup>。而在体记录神经信号的方法克服了这种不足,将检测时间大大提高。稳定、高质量的spike信号至少能连续记录三周<sup>[10]</sup>,

之后由于生物排异反应, 嗅球中胶质细胞将电极尖端包裹住, 使得spike信号质量降低。

为了确定生物传感系统的特异性, 本文分析了其受6种单分子气味刺激时的spike信号。发现从同一大鼠记录到的嗅球信号具有非常高的特异性, 如图2a所示, 不同气味诱发的spike发放模式, 神经元兴奋种类不同。此外, 本文还逐步降低气味浓度, 以香芹酮为例, 其浓度在 $10^{-1} \sim 10^{-9}$  mol/L之间时, spike发放频率几乎不变, 而一旦低于 $10^{-9}$  mol/L, 频率迅速降低, 并且spike的幅值也大大降低, 如图2b所示。实验结果表明, 生物嗅觉传感系统具有非常高的灵敏度。



a. 生物传感系统的特异性分析, 同一通道电极记录到的神经元spike响应具有气味特异性



b. 生物传感系统的灵敏度分析, 神经元受不同浓度的香芹酮刺激时的发放频率变化

图2 生物传感系统特异性及灵敏度分析

利用单分子气味, 初步表明生物嗅觉传感系统可用于气味检测。而在实际应用中, 环境中的气体往往含有多种成分, 并且其浓度较低。为了进一步验证这种系统能够用于检测自然气味, 本文分析了其受水果气味刺激时的spike和LFP信号。由于香蕉和乙酸异戊酯具有类似气味, 对这两种的神经信号进行了比较, 发现香蕉和乙酸异戊酯能够引发相似的LFP信号, 而spike信号却不同, 如图3所示。在图

3a中, 上方图片显示神经元spike发放栅状图, 每个点表示一个spike, 下方图片显示每个时刻对应的spike平均发放频率。由于LFP代表了局部神经元的群体发放模式, 而spike仅代表单个神经元信息。从这一结果分析, 尽管这两种气味能够在较大区域引发相似的神经元活动, 而在单个神经节点上, 每种气味引发的活动不尽相似。这为研究嗅球神经元进行气味区分的机理提供了实验依据; 同时, 证明了这种系统能够用于检测自然气味。为了进一步将生物传感系统应用于肺癌呼出气体标志物检测、食品新鲜度检测、爆炸物搜索<sup>[11]</sup>等提供了研究基础。

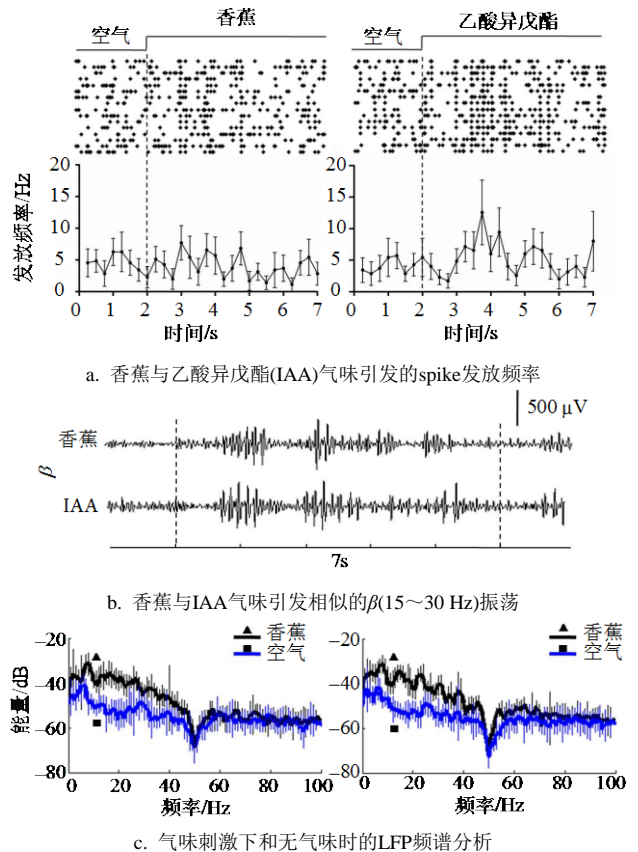


图3 香蕉与乙酸异戊酯引发的spike和LFP信号

### 3 结论和展望

本文提出了一种用于识别和检测特殊气体的、基于植入式微电极阵列的在体生物嗅觉传感系统。通过16通道微电极提取, 并分析清醒大鼠嗅球对气味刺激的响应信号, 从而对气味进行检测和区分。实验结果表明, 这种在体生物传感系统能够长期稳定地用于气味检测, 且灵敏度达到 $10^{-10}$  mol/L。在单分子气味或自然气味检测中, 这种系统都具有非常高的特异性。因此, 在微量复杂气味检测领域具有广泛的应用价值。目前, 这种传感系统在实际应用中仍面临巨大挑战: 由于大鼠间存在差异, 以及

不同大鼠的电极植入位点不一致, 不同大鼠对同一气味的响应信号具有差异性。因此, 建立气味检测模型需要大量的数据和有效的神经解码算法。在进一步的研究中, 期望通过在大鼠嗅球区对大鼠嗅觉信息的进行采集提取和解码, 解析大鼠对特殊气味的神经信号编码方式, 并利用大鼠的嗅觉信息编解码来辅助控制大鼠的运动状态, 增强大鼠对外界气味的感知能力, 实现嗅觉信息辅助的大鼠导航。

### 参 考 文 献

- [1] LLEDO P M, GHEUSI G, VINCENT J D. Information processing in the mammalian olfactory system[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 281-317.
- [2] RUBIN B D, KATZ L C. Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb[J]. *Nature Neuroscience*, 2001, 4(4): 355-356.
- [3] PERSAUD K, DODD G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose[J]. *Nature*, 1982, 299(5881): 352-355.
- [4] KERMANI B G, SCHIFFMAN S S, NAGLE H T. Using neural networks and genetic algorithms to enhance performance in an electronic nose[J]. *IEEE Transactions on, Biomedical Engineering*, 1999, 46(4): 429-439.
- [5] DU L, WU C, PENG H, et al. Bioengineered olfactory sensory neuron-based biosensor for specific odorant detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 40(1): 401-406.
- [6] LIU Q, YE W, YU H, et al. Olfactory mucosa tissue-based biosensor: A bioelectronic nose with receptor cells in intact olfactory epithelium[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 146(2): 527-533.
- [7] DU L, WU C, LIU Q, et al. Recent advances in olfactory receptor-based biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012(42): 570-580.
- [8] NICOLELIS M A L, DIMITROV D, CARMENA J M, et al. Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(19): 11041-11046.
- [9] KAY L M, LAURENT G. Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats[J]. *Nature Neuroscience*, 1999, 2(11): 1003-1009.
- [10] ZHUANG L, HU N, DONG Q, et al. A high sensitive in vivo biosensing detection for odors by multiunit in rat olfactory bulb[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013(186): 308-314.
- [11] 庄柳静, 周俊, 王平, 等. 利用动物嗅觉诊断癌症技术的研究进展[J]. *科学通报*, 2013, 58(15): 1369-1378.  
ZHUANG Liu-jing, ZHOU Jun, WANG Ping, et al. The research progress of using the mammalian olfaction for cancer diagnosis[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(15): 1369-1378.

编辑 黄 莘