

文章编号: 2095-4980(2013)05-0812-10

基于光学标测技术和 MEA 技术的植物电研究概述

赵东杰¹, 黄 岚¹, 刘 安¹, 薛 琳^{1,2}, 秦 杨¹, 王忠义¹

(1. 中国农业大学 信息与电气工程学院, 北京 100083; 2. 北京联合大学 信息学院, 北京 100101)

摘 要: 植物电信号的研究进展很大程度上依赖于测量技术的发展。目前对于微电极等测量技术而言, 多方面因素的限制使得同时测量 2 个以上细胞的电活动基本无法实现, 因此对植物群体细胞电活动规律的研究进展较小。本文介绍了 2 种可以同时测量植物群体细胞电活动并具有空间分辨率的测量技术——依赖于电压敏感染料的光学标测技术和微电极阵列技术。分别介绍了光学标测技术的测量原理、电压敏感染料的特性、系统构成、信号提取方法等内容, 并列举了在植物细胞电信号测量方面的应用实例, 概述了影响植物电信号光学标测的因素; 阐述了微电极阵列技术的系统组成、阵列微电极的特征、测量依据及模型、影响测量的因素, 并对阵列微电极在玉米幼根测量中的应用做了简要介绍。最后对这 2 种测量技术在植物电信号测量中存在的一些问题进行了讨论。

关键词: 植物电信号; 光学标测技术; 微电极阵列技术

中图分类号: TN911.23; Q61; TM938.84 **文献标识码:** A **doi:** 10.11805/TKYDA201305.0812

New approaches to study electrical signal in plant: optical recording method and Multi-Electrode Array technique

ZHAO Dong-Jie¹, HUANG Lan¹, LIU An^{1,2}, XUE Lin^{1,2}, QIN Yang¹, WANG Zhong-Yi¹

(1. College of Information and Electrical Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Information Technology, Beijing Union University, Beijing 100101, China)

Abstract: Significant progress in the investigation of spatiotemporal dynamics electrical activity in plant has been enabled by recently developed electrophysiological techniques. The optical recording using Voltage-Sensitive Dyes(VSD) and Multi-Electrode Array(MEA) are the two techniques with higher spatial-temporal resolution which can observe the electrical activity from large numbers of cells simultaneously by now. In this review, the optical recording is introduced with regard to the measuring principle, the characteristics of VSD, construction of system, signal processing methods and the application in plants. Meanwhile, the intrinsic characteristics of MEA system including system composition, characteristics of electrodes, recording basis and factors involved in signal recording are presented. For the application of MEA system in the plant, there is only one case report for the electrical network activity in plant. In the future, some new scientific discoveries of spatial-temporal feature for electrical signal of plant cells population will be expected by using both advanced techniques.

Key words: electrical signal in plant; optical mapping; Multi-Electrode Array

植物电信号的研究可以追溯到 1873 年, Sanderson 首次记录到捕蝇草的电活动^[1]。此后, 不少学者以各种不同的植物为研究对象, 对植物电信号做了大量研究^[2-5], 研究表明, 生物电活动在植物体内是普遍存在的。电信号对植物的许多生理活动都会产生重要影响, 细胞间通过电信号传导信息是植物信息传导的基本方式之一^[2]。植物电的研究应属生物电子学的研究内容之一。

植物电信号活动规律的研究很大程度上依赖于测量方法的发展。目前比较成熟的植物电信号测量技术有微电极细胞内(外)测量、膜片钳测量技术、宏电极细胞外测量等。微电极细胞内测量一般用尖端直径小于 1 μm 的玻

收稿日期: 2013-03-21; 修回日期: 2013-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61072016); 中国农业大学研究生科研创新专项基金资助项目(2012YJ114)

璃微电极刺入植物细胞,测量的是单个细胞的电活动。微电极胞外测量则是将电极刺入细胞间隙或放置在胞外空间,测量电极周围几个细胞的胞外电活动^[2],这种测量方法需要借助微电极操纵器和显微镜来进行操作^[6]。膜片钳测量技术是1976年Neher和Sakmann创建的一种通过记录流经离子通道的离子电流来反映细胞膜单一的或更多的离子通道分子活动的技术^[7],主要有4种记录方式,分别为贴附式记录模式、内膜向外记录模式、外膜向外记录模式、全细胞记录模式,记录对象为单个细胞,测量植物细胞时需要做去细胞壁处理^[8-9]。宏电极胞外测量一般用金属电极或表面电极与被测植物相接触^[2-5],检测的是多个细胞电信号时空叠加,此方法适合对植物整体进行测量,不具有空间分辨特征。

以上测量技术由于测量电极等因素的限制,同时测量2个以上细胞的电活动基本无法实现。而对于植物群体细胞电活动规律,植物电信号的传导路径和传播机理等内容研究则需要具有较高时空分辨率的检测方法以同步记录多个细胞的电活动。本文将介绍2种能够同时测量植物群体细胞电活动的技术,即依赖于电压敏感染料的光学标测技术和多电极微阵列(MEA)技术。

1 基于电压敏感染料的光学标测方法简介

1.1 光学标测技术的基本原理

光学标测技术的基本原理是利用电压敏感染料(VSD)将细胞膜电信号的变化转化为荧光信号,通过检测荧光信号的变化来反映电信号的变化。膜电位的提取是通过计算荧光图像序列荧光强度的变化实现,如图1所示,A是荧光图像序列的某一位点,每一幅图像的A点对应一个荧光强度值,同时对应一个膜电位值,将所有图像A点荧光强度计算出后,就可以获得荧光强度变化曲线 $\Delta F/F$ (ΔF 为荧光强度的变化量, F 为荧光强度基值),进一步处理后可以获得膜电位变化曲线。

1.2 光学标测技术系统的构成

构成光学标测技术的基本模块有激发光源模块、电压敏感染料、光学平台、可检测微弱荧光的CCD相机、CMOS相机或光电二极管阵列^[10-11]。激发光源一般由高压汞灯构成,配合发射光滤光片可提供绿光、蓝光、紫光、紫外光等不同波长的激发光,可根据不同染料的激发特性选择激发光波段。根据实验要求不同,光学平台可以采用商用平台或自行搭建,目前可用的商用平台较多,包括共聚焦显微镜、体式荧光显微镜、倒置荧光显微镜等,这些平台可以精确定位到细胞层级,根据显微镜放大倍数的不同,检测区域直径可从数百微米到一千微米以上,如果要求用光学标测方法对植物进行整体性测量,检测区域为毫米或厘米级别,一般采用自行搭建平台办法。

图2是作者所在研究组设计的2种植物电信号光学标测检测系统。图2(a)系统的检测目标为细胞层级,光学平台采用了倒置荧光显微镜(XSP-63XD,上海光学仪器厂)。整套系统的基本组成包括激发光源、激发光滤光片、倒置荧光显微镜平台(控制光路的光学器件主要有物镜、半透半反镜、反射镜、可移动的分束镜)、发射光滤光片、冷CCD(TCC-1.4CHICE,福州图森图像技术有限公司)、计算机。图中蓝色光路为激发光光路,根据染料不同的激发特性,选择合适的激发光源对染料进行激发,染料受激发后会发射出荧光,发射荧光强度的变化会反应细胞膜电位的变化;暗绿色光路为染料的发射荧光光路,由于既有光谱迁移型染料又有荧光强度增强或减弱型染料,图2(a)的系统采用了既可以单通道测量又可以双通道测量的设计,由于植物叶片或茎秆中有叶绿体,而叶绿体受到激发光照射后也会产生荧光,另外为了去除激发光的影响,发射光必须经过发射光滤光片后才能被CCD检测,信号经CCD采集后荧光图像可用控制软件采集、存储。图2(b)系统标示的检测区域为叶片的一部分,相比图2(a)系统的微米级检测区域,图2(b)为厘米级,基本的组成单元有激发光源、激发光滤光片、聚焦透镜、发射光滤光片、CCD、计算机,由于检测的区域增大,对激发光源的要求进一步提高,提供足够强的激发光源才能保证染料的发射荧光有一定强度,满足信噪比的要求,同时对CCD应该满足能够检测到微弱荧光的条件^[12]。

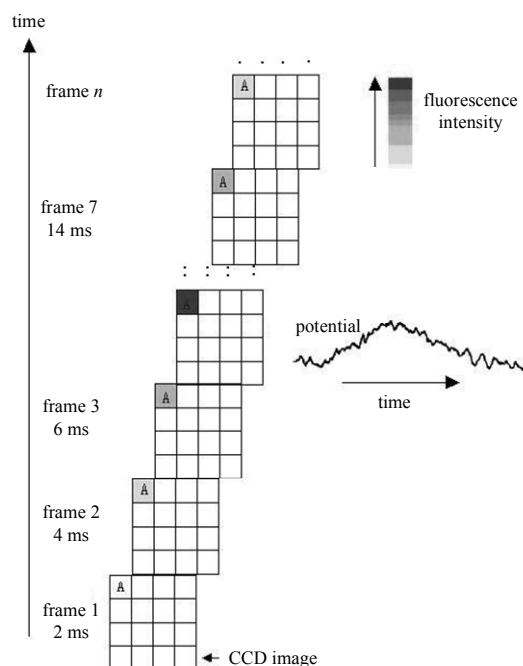


Fig.1 Transform of fluorescence signal to electrical signal

图1 荧光信号与电信号的对应关系

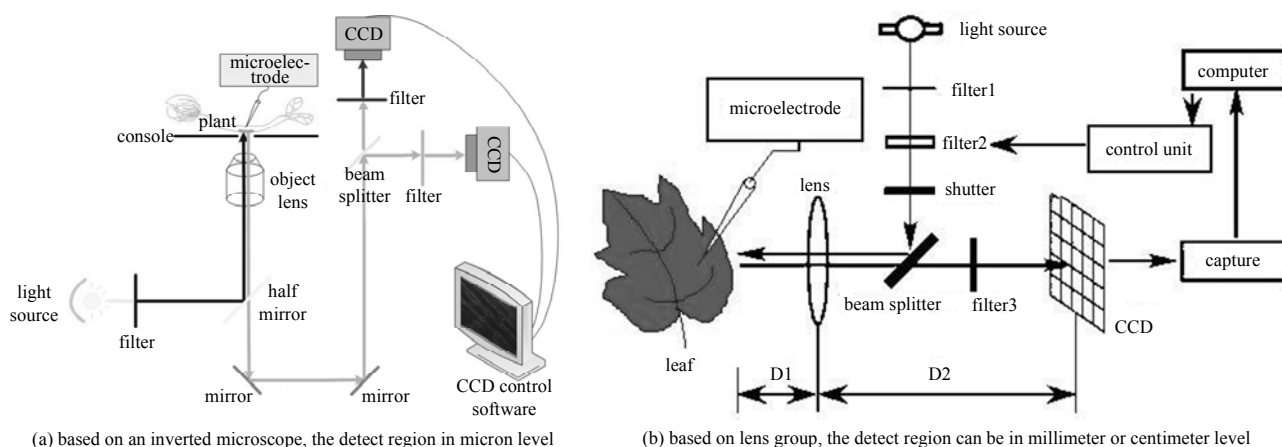


Fig.2 Optical mapping system
图 2 植物电信号光学标测系统

1.3 电压敏感染料

光学标测技术中电压敏感染料是能否将电信号转化为光信号的关键,随着电压敏感染料的不断研制,其种类已有多种,但并非每种染料都是理想的信号转化载体,目前报道的在植物电信号测量方面应用的电压敏感染料有 Pyridinium, 4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-, hydroxide, inner salt(di-4-ANEPPS), Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol(DIBAC₄(3))等^[13-15],染料的化学结构如图 3 所示。这 2 种染料荧光强度随膜电压变化的机理有所差异,其中 di-4-ANEPPS 的发射光谱会随膜电压的变化而发生迁移,当膜电压增大时荧光光谱会向波长减小的方向移动,当膜电压减小时会向波长增加的方向移动^[16-17],如图 4 所示;DIBAC₄(3)与细胞结合后,膜电位的增加会让荧光强度增加,膜电位减小后荧光强度减弱^[13](如图 5 所示)。

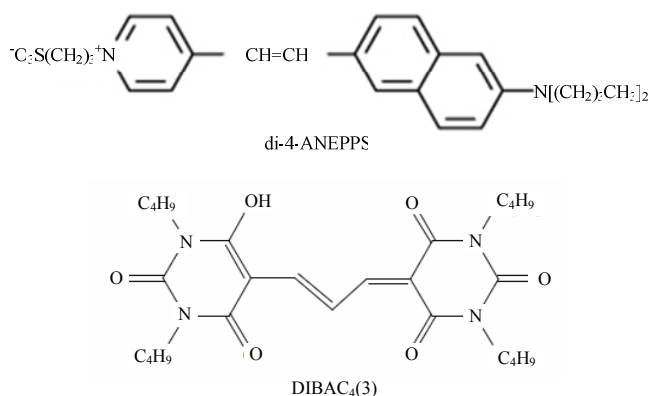


Fig.3 The chemical structure of di-4-ANEPPS and DIBAC₄(3)
图 3 荧光染料 di-4-ANEPPS 和 DIBAC₄(3)的化学结构

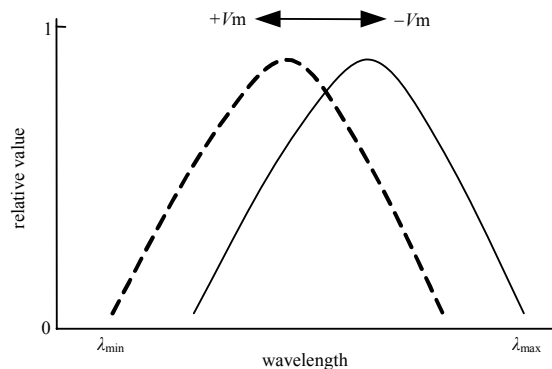
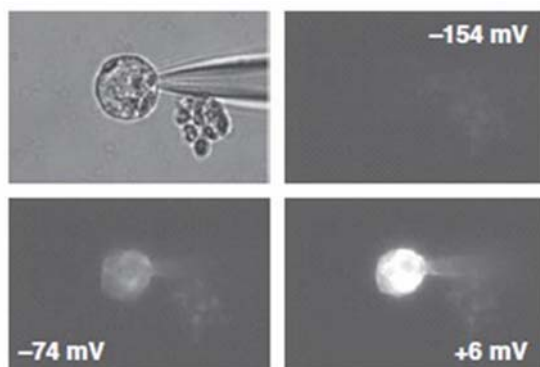
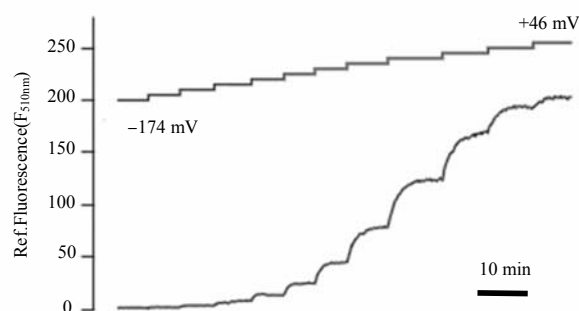


Fig.4 The migration of di-4-ANEPPS emission spectrum induced by changing membrane potential
图 4 di-4-ANEPPS 随膜电压变化产生发射光谱迁移示意图



(a)



(b)

Fig.5 The emissntntof DIBA C₄(3) has a direct ratio with the membrane potential
图 5 DIBA C₄(3)荧光染料细胞膜电压升高, 荧光强度增强

1.4 信号提取

光学标测技术中荧光染料在激发光照射下有淬灭现象^[18-20],也就是荧光染料的发光强度会随着激发光的照射时间增长而不断衰减。在植物电信号测量中,膜电位的去极化、复极化时程较长,一般为秒级或分钟级,这样长的时间下荧光染料自身会有明显的淬灭现象,如图6所示。在光学标测方法检测中,为了消除淬灭的影响,得到准确的荧光强度变化曲线,可以采用比率测量^[20-22]或测量值减去拟合值后再比较的方法^[12,15,23-24],如图7^[25]和图8^[12]所示。图7采用的是比率测量方法,测量2个波段下的荧光信号,通过比率校正因光漂白引起的光衰减;当测量采用单个波段时,可以采用图8中拟合校正的方法。比率方法需要测量2个不同波段的荧光信号,因此电压敏感染料应当具有随电压变化发生光谱迁移的特性,而拟合校正的方法则对所有染料都适合。

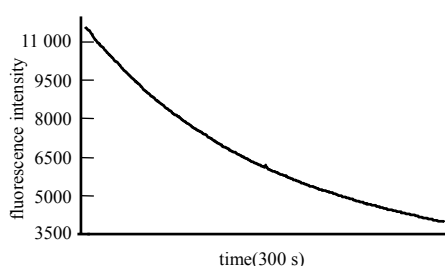


Fig.6 The quenching of di-4-ANEPPS
图6 测到的 di-4-ANEPPS 的淬灭现象

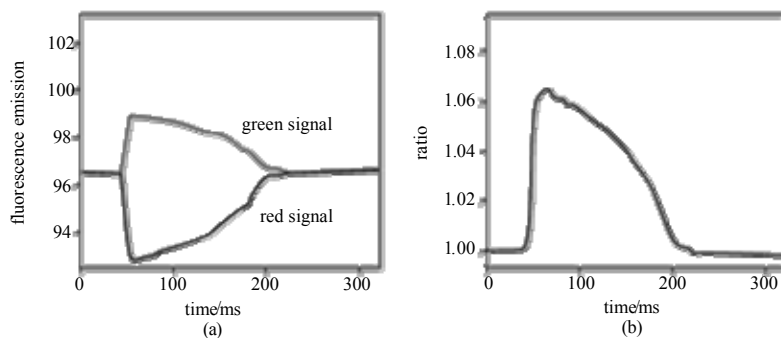


Fig.7 The ratio method of calculating fluorescence signal
图7 应用比率方法获得荧光信号变化曲线

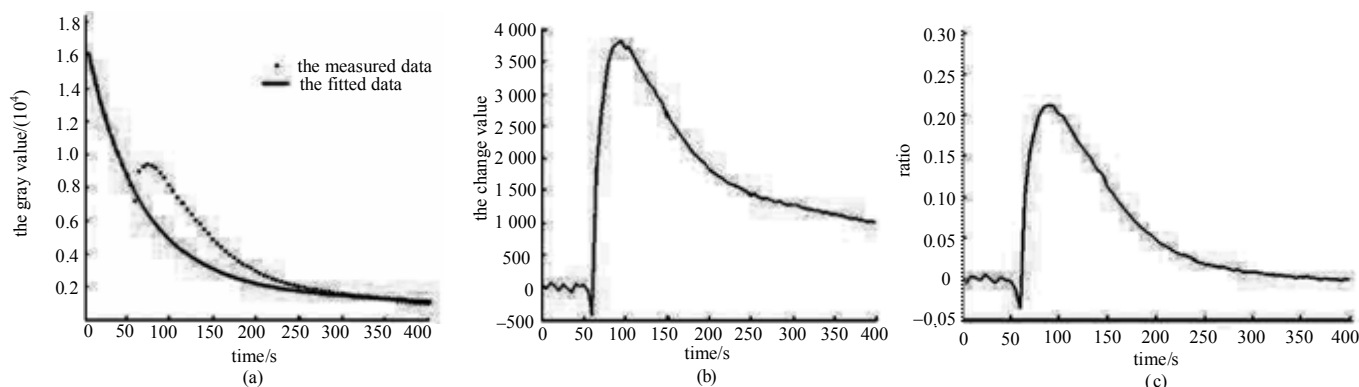


Fig.8 The fitting method of calculating fluorescence signal
图8 应用拟合校正的方法获得荧光信号变化曲线

2 多电极微阵列(MEA)技术

2.1 MEA 的测量基础

MEA 的测量依据是细胞膜电位的变化会产生胞外电场,并伴有胞外电压产生^[26-35]。细胞膜产生电位变化的实质是离子的跨膜运动,在此过程中会有膜电流产生,描述这一过程的经典模型为 H-H 方程^[36],H-H 方程适合描述动物细胞,在植物细胞方面也有人做了探索研究,给出了修正的 H-H 方程^[37]。细胞外电压与膜电流的关系可简单描述为方程(1)^[35]。图9给出了 MEA 系统进行测量的简化电路模型^[38]。

$$\varphi \propto I_m \propto \frac{dV_m}{dt} \quad (1)$$

2.2 MEA 系统组成

MEA 系统的组成除电极部分外还包括信号滤波、放大部分,数据采集部分以及配套的记录、控制软件,如图10(a)所示^[39]。大多数

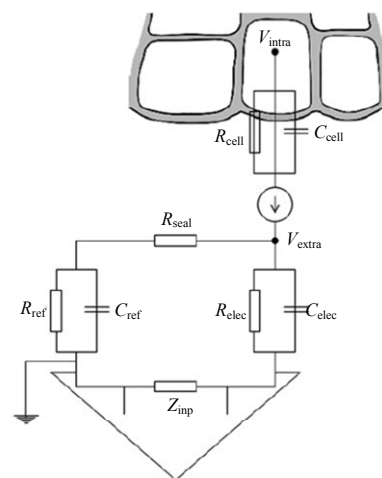


Fig.9 Simplified model circuit for an electrogenic cell on top of a microelectrode
图9 MEA 单个电极测量简化模型

MEA 系统的电极阵列部分有 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 大小的透明基底, 之所以透明是为了方便用显微镜观察操作。标准的 MEA 系统一般在基底上排列着 8×8 或 6×10 个电极, 电极直径为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 或者 $30\text{ }\mu\text{m}$, 电极间距 $100\text{ }\mu\text{m}$ 到 $500\text{ }\mu\text{m}$ 之间, 记录的区域为 0.25 mm^2 到 12.25 mm^2 。图 10(b) 为 6×10 阵列电极^[39]。由于 MEA 系统是胞外测量, 而根据胞外电压与细胞膜电流的关系可知, 胞外电压的幅度为微伏级。MEA 系统信噪比要求为能检测 $10\text{ }\mu\text{V} \sim 100\text{ }\mu\text{V}$ 的胞外信号, 检测如此小的电压信号对电极提出了很高的要求, 电极必须具有低阻抗的特性; 另一方面, MEA 系统的电极不仅可以作为测量电极, 同时也可以作为刺激电极, 即电极可以对外施加刺激电压, 这就要求电极为刺激电极时瞬时的刺激电压不能击穿介质。考虑以上因素, MEA 系统的电极采用的是铂黑金电极, 即对金电极进行了铂处理^[39-40]。

3 在植物电信号测量中的应用及影响测量的主要因素

3.1 光学标测技术在植物电信号检测领域的应用

光学标测方法最早的应用领域在神经生理方面, 较早的实验记录可追溯到 1968 年, Cohen 等用染料灌注神经, 受激后染料的荧光强度会发生变化^[26]。随后光学标测技术被广泛应用于动物神经电生理^[27-30]、心脏电生理^[22,31-34]等领域的研究中。但在植物电生理研究中, 应用光学标测方法的报道较少。图 11 是作者所在研究组用光学标测的双波段比率方法测到的蚕豆表皮细胞等在温度刺激下的膜电位变化。图 12 和图 13 是有关光学标测技术在植物电生理领域应用的报道。图 12(a) 中研究者以蚕豆表皮为材料, 经含有 $5\text{ }\mu\text{M}$ 电压敏感染料 di-4-ANEPPS 的测试液浸染后, 在荧光显微镜下拍摄荧光图像序列, 并用温度刺激的方法诱导蚕豆表皮细胞和保卫细胞膜电位产生变化, 以拟合校正的方法计算了选定区域的荧光强度的变化, 并与微电极记录到的电位变化进行了对比, 为了显示整个图像内荧光强度的变化, 给出了电位变化的伪彩图(图 12(b))^[15]。图 13 中采用电压敏感染料 DIBAC4(3) 记录了 ABA 引起的 119 个蚕豆保卫细胞原生质膜的去极化的过程, 显示了光学标测技术的优点之一, 可以同时测量多个位点^[13]。

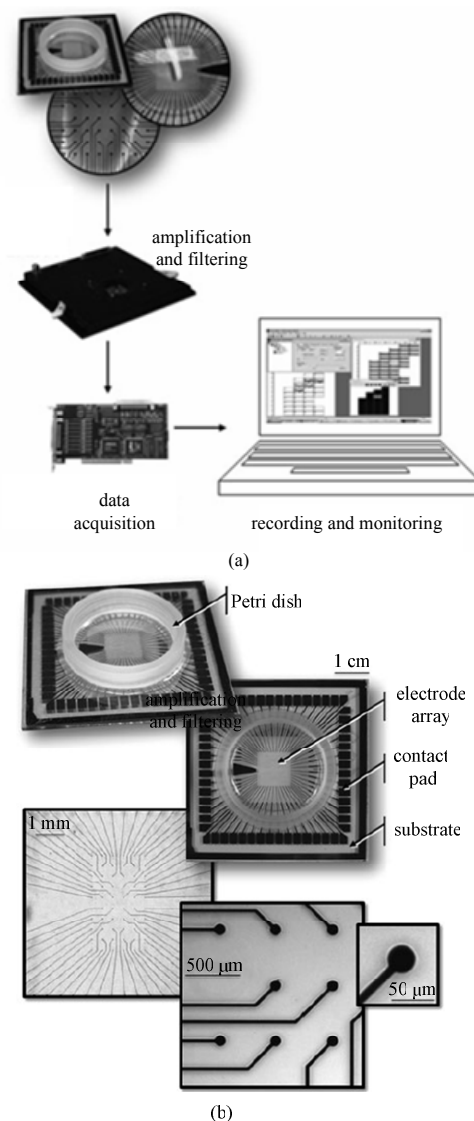


Fig.10 (a) MEA system and (b) MEA array electrode
图 10 (a) MEA 系统的组成^[41]和(b) MEA 阵列电极结构

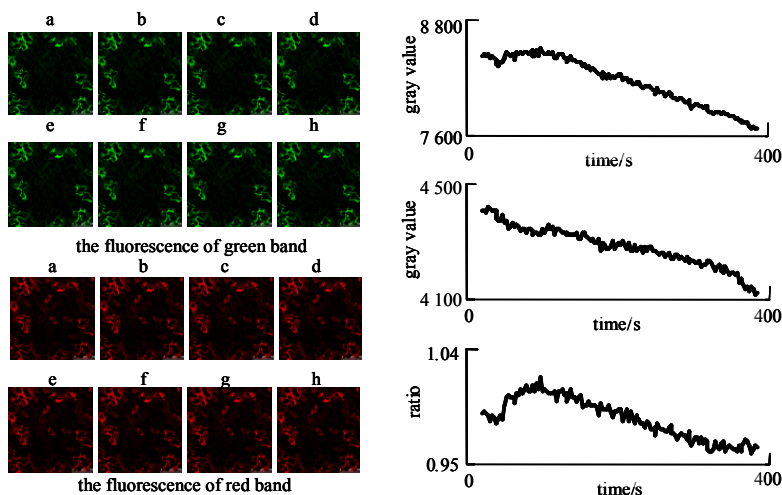


Fig.11 Detected membrane potential of guard and epidermal cells in leaf of *Vicia faba* immersed in di-4-ANEPPS using ratio method
图 11 以 di-4-ANEPPS 浸染蚕豆叶片, 用双波段比率方法测到的温度刺激引起的蚕豆表皮、保卫细胞膜电位变化

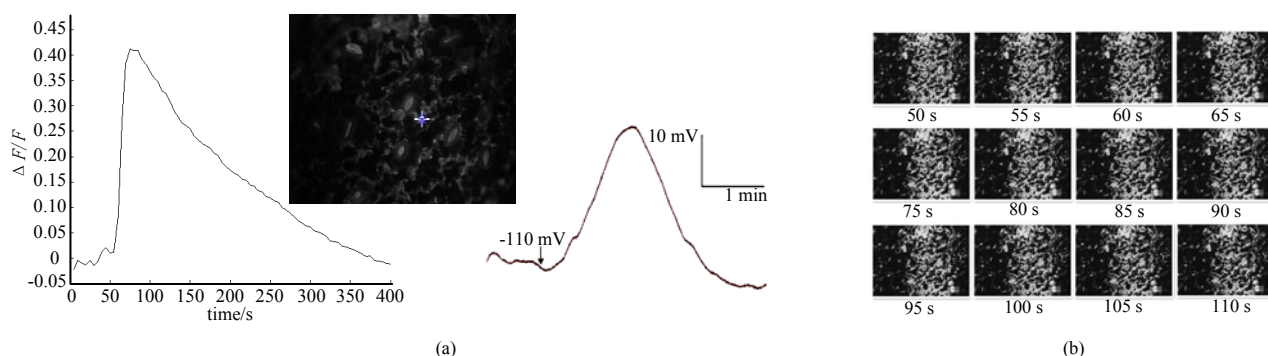


Fig.12 Detected membrane potential of guard and epidermal cells in leaf of *Vicia faba* immersed in di-4-ANEPPS using fitting method
图 12 以 di-4-ANEPPS 浸染蚕豆叶片,应用单波段拟合校正方法测量温度刺激诱导蚕豆表皮细胞、保卫细胞膜电位变化和信号传导

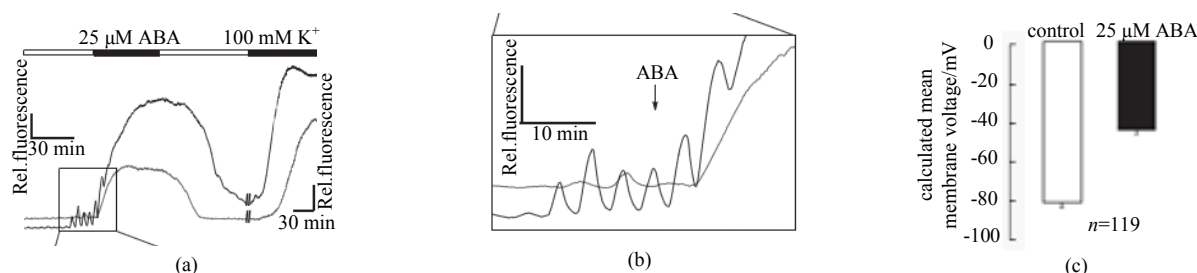


Fig.13 Recorded ABA-induced potential changing of guard cell protoplasts in *Vicia faba* using voltage-sensitive dye DIBAC₄(3)
图 13 应用电压敏感染料 DIBAC₄(3)记录测量 ABA 诱导的蚕豆保卫细胞原生质体膜电位变化

3.2 影响光学标测技术在植物电信号测量中的主要因素

植物细胞本身的生理结构(具有细胞壁)、电压敏感染料的选择、激发光强度的设置、发射荧光收集效率以及检测器的性能是影响光学标测技术在植物电信号检测领域应用的主要因素。

由于植物细胞具有细胞壁,电压敏感染料与细胞膜的结合增加了一层障碍。做去壁处理是解决染料与细胞膜结合的方法之一。文献[13]采用去壁的方法获得保卫细胞原生质体,染料可以直接与原生质体膜结合,获得了理想的染色效果。但细胞去壁后会失去彼此之间的联系,成为独立的个体,因此这种方法适合研究单个细胞的电活动,而不能获得电信号在细胞间传递的信息。文献[15]采用方法没有对细胞做去壁处理,而是将表皮条浸染在含有电压敏感染料的培养液中,这种方法染料会透过细胞壁最终与细胞膜结合,但需要较长的染色时间(大于 0.5 h);不去壁的染色方法可以使细胞之间的连接不受破坏,进而使光学标测对电信号的传递测量成为可能。

电压敏感染料一般分为快染料和慢染料,快染料和慢染料的区别主要在于荧光信号对膜电压变化响应的快慢,快染料对膜电压变化的影响一般在毫秒级,慢染料一般为百毫秒级或秒级。虽然快染料的影响时间较短,但荧光强度随电压的变化却较低,快染料 Di-4-ANEPPS 每 100 mV 电压变化只有 10%荧光强度变化,而慢染料 DIBAC₄(3)每 10 mV 电压变化就有 10%荧光强度变化。植物电信号的周期一般为秒级或分钟级,对于如此缓慢的电位变化,慢染料不会产生记录失真而且能得到较高的信噪比;但如果记录电信号在微小尺度(微米级)内的传递,慢染料则存在反应滞后的问题,可以尝试应用快染料记录,前提是电压变化的幅度足够大,能够引起荧光强度的明显变化,否则无法检测到电信号的产生。

由于敏感染料受激发后才能产生荧光,因此激发光强度会影响荧光强度。一般而言,激发光越强,染料受激发后所产生荧光会越强。本研究小组实验表明相同波段的激发光源,130 W 汞灯光源产生荧光的强度大于 100 W 汞灯光源所产生荧光的强度。但并非激发光源越强,实验效果越好,因为电压敏感染料存在不可避免的淬灭现象,特别是记录植物周期为分钟级的植物电信号,淬灭现象更加明显,如图 6 所示;而淬灭速率与激发光强度成正比,因此选择激发光时应折中考虑,既能得到比较强的发射荧光,又能满足一定的发射时间来保证信号的完整记录。

若用自行搭建的光学系统进行光学标测记录,光路的合理设计成为有效收集发射荧光的关键;确定激发光源与被测物的合适距离,合理地应用透镜组将散射荧光重新聚焦,检测器与被测物角度的合理设置都会提高荧光的收集效率。若用商用光学平台(体式显微镜、倒置荧光显微镜、共聚焦显微镜等),物镜的选用会直接影响荧光的收集效率。一般而言,低倍物镜能够获得更大的视场,但荧光较弱;高倍物镜视场有限,但荧光较强。而实验者往往希望既能获得大的视场,又能测量到较强的荧光信号,这就需要根据实验目的折中选择。若普通物镜不能满

足条件, 可选用长距离物镜。由于荧光信号是微弱的光信号, 因此需要荧光冷 CCD 或光电二极管阵列作为检测器。增益和曝光时间的合理设置有助于提高信噪比, 一般而言若拍摄帧速较低, 可以设置较长的曝光时间, 较低的增益; 若拍摄帧速较高, 则可以增大增益。

3.3 MEA 在植物电信号测量中的应用

MEA 最早的应用历史可以追溯到 1972 年 Thomas 等应用 MEA 系统记录到了心肌细胞自发收缩中场电位^[41], 但 MEA 技术在植物电信号研究中的报道, 目前仅有 2009 年 Masi 等对玉米幼根电活动的记录^[39]。作者将截取的玉米幼根固定在 MEA 阵列电极上(图 14(b)), 在不施加任何刺激的情况下测量幼根细胞的电活动, 为了尽量做到紧密接触, 实验中用透明胶带将幼根和阵列电极粘附在一起, 测到了自发的电信号(图 14 h)。对于这一结果, 一些植物电生理学家认为: 植物动作电位的持续时间大于 1 s, 为 mV 级, 这种记录方法要求严谨地设置实验条件, 进行深入研究。

3.4 影响 MEA 测量的因素

MEA 系统自出现以来主要应用领域为神经电生理、脑电等动物领域^[41-44], 而在植物领域内的应用少见报道, 之所以这样是因为影响 MEA 系统测量的因素有很多, 而且植物细胞具有细胞壁, 使得 MEA 系统测量植物细胞更加具有不确定性。目前为止 MEA 记录的胞外信号与信号源之间的关系还没有准确的计算方法, 主要是因为有很多参数难以量化, 包括细胞-电极之间距离的差异, 细胞覆盖电极的面积, 细胞膜上离子通道的密度等^[38]。图 15 列出了 MEA 的信号通路以及每一步的影响因素^[45]。由于胞外电压会随着与电流源距离的增加而指数减小, 因此 MEA 测量成功的关键因素是测量细胞与电极要紧密接触, 如图 16 所示, 电极与细胞膜之间的距离越小, 越有利于提高信噪比^[38]。但由于植物细胞具有细胞壁, 即使电极与细胞壁相接触, 与细胞膜之间依然有一定距离。

另外, 图 16 显示, MEA 的电极与细胞并非一一对应, 因此在解释记录到的信号时要考虑几方面的因素, 包括细胞大小、电极大小、电极间距、细胞的层数等。例如, 当记录单个细胞时, 细胞可能部分地与电极接触, 这种情况下记录到的信号幅度正比于细胞接触电极的面积与电极总面积的比值^[45]。记录组

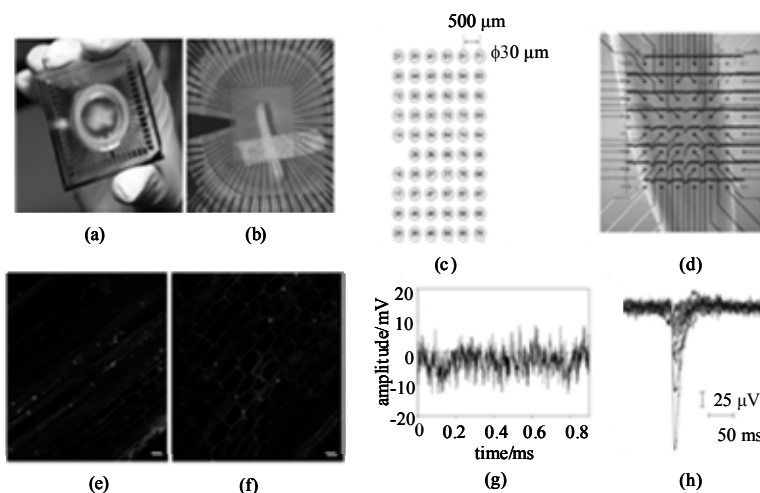


Fig.14 General characteristics of the MEA system: (a) Overview of a 60 electrodes MEA device, external dimensions 5 cm × 5 cm; (b) Longitudinal section of root apex fixed onto the MEA using adhesive water permeable and water resistant tape; (c) Matrix of the array of microelectrodes reporting the number of each single channel; (d) Magnified view of the recording site with the single traces superimposed; (e), (f) Confocal images of maize root cells prestained with propidium iodide 5 μg/mL for 10 min; (g) Background noise of the MEA system. (h) Recordings of spontaneous spikes. Fifteen traces are superimposed to illustrate the typical shape and size. Data were digitized at 20 kHz.

图 14 MEA 测量玉米幼根自发电活动

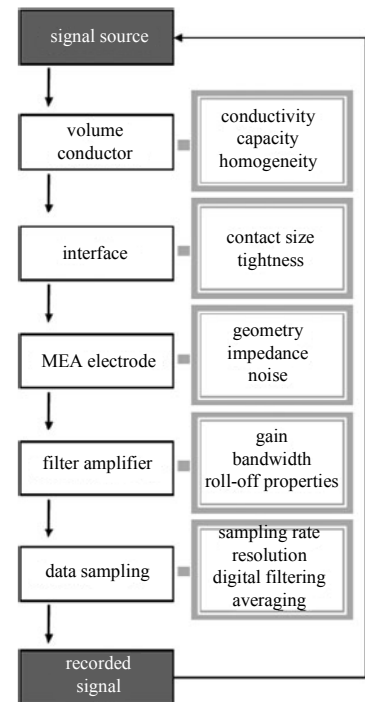


Fig.15 Pathway showing factors and parameters involved in signal recording with an MEA system

图 15 MEA 的信号测量路径和影响测量的因素

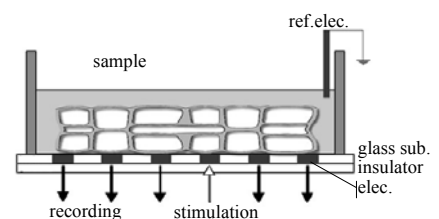


Fig.16 Recording of electrical activity with MEA system, the cells and electrodes contacted closely

图 16 MEA 的测量示意图, 测量电极与细胞紧密接触

织时,产生场电位的信号源为各个细胞,各个细胞的电活动会在胞外形成一个与空间、时间相关的场电位。实际上MEA系统每个电极在胞外空间记录到的信号都是所有电流源产生的胞外信号的叠加^[46-47]。

4 结论

胞外测量技术、微电极测量技术、膜片钳技术等由于电极的限制而无法做到同时测量多个植物细胞的电活动。光学标测技术与MEA技术由于分别采用多像素的荧光图像获取装置和多电极阵列而可以实现多位点的同时监测,因此可以实现对群体细胞电活动的同时获取。由于光学标测技术将细胞电信号转换为荧光信号进行测量,因此测量是非接触方式的,这使得测量相对容易操作。MEA技术是胞外测量方式,同样对植物细胞没有直接伤害,与微电极胞内测量只能持续几分钟到几十分钟相比,MEA可以长时间测量植物细胞的电活动。目前为止光学标测技术的应用依然有一些限制因素,电压敏感染料是信号转换的关键,而绝大多数电压敏感染料具有一定毒性,会对细胞的生命活性造成一定伤害,因此光学标测技术的长时间测量受到一定限制;另一方面与传统测量方式相比,光学标测技术在信噪比、信号采集速度等方面有一定差距。MEA系统由于是胞外测量,与细胞膜的距离成为测量的关键因素,而植物组织细胞并非规整的平面排列,而且细胞具有细胞壁,这些因素对MEA在植物细胞电信号的测量应用上造成很大的影响。但总体而言这2种技术在植物电信号测量领域已开始应用,随着技术的发展和实验手段的提升,会为研究植物多细胞之间电信号的传递途径和传导机理等提供更加有效的技术支持。

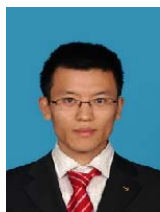
参考文献:

- [1] Sanderson J B. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*[J]. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1872,21(139-147):495-496.
- [2] Fromm J,Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants[J]. *Plant,Cell & Environment*, 2007, 30(3):249-257.
- [3] Lan H,Zhongyi W,Zhilong X,et al. Design of Multi-channel Monitoring System for Electrical Signals in Plants[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2006(4):10.
- [4] Wang Z,Leng Q,Huang L,et al. Monitoring system for electrical signals in plants in the greenhouse and its applications[J]. *Biosystems Engineering*, 2009,103(1):1-11.
- [5] Davies E. Electrical signals in plants: facts and hypotheses[M]// A G Volkov ed. *Plant Electrophysiology—Theory and Methods*. Berlin Heidelberg:Springer, 2006.
- [6] 赵东杰,王忠义,李军,等. 基于模型及实验的植物电信号胞外测量关键问题研究[J]. *中国科学:信息科学*, 2010, 40(suppl):133-142. (ZHAO Dongjie,WANG Zhongyi,LI Jun,et al. Research on key issue in extracellular recording in plant based modeling and experiment[J]. *Science China: Information Sciences*, 2010,40(suppl):133-142.)
- [7] Neher E,Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres[M]// A century of Nature:twenty-one discoveries that changed science and the world. Chicago:University of Chicago Press, 2010:224.
- [8] Becker D,Zeilinger C,Lohse G,et al. Identification and biochemical characterization of the plasma-membrane H^+ -ATPase in guard cells of *Vicia faba* L[J]. *Planta*, 1993,190(1):44-50.
- [9] Lohse G,Hedrich R. Characterization of the plasma-membrane H^+ -ATPase from *Vicia faba* guard cells[J]. *Planta*, 1992,188(2):206-214.
- [10] Baker B J,Kosmidis E K,Vucinic D,et al. Imaging brain activity with voltage-and calcium-sensitive dyes[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2005,25(2):245-282.
- [11] Zochowski M,Wachowiak M,Falk C X,et al. Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes[J]. *The Biological Bulletin*, 2000,198(1):1-21.
- [12] 刘安. 基于光标测技术的植物细胞电信号检测方法的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2011. (LIU An. Detection method of electrical signals in plant cells based on optical recording[D]. Beijing:China Agriculture University, 2011.)
- [13] Konrad K R,Hedrich R. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential—ABA triggered membrane depolarization in guard cells[J]. *The Plant Journal*, 2008,55(1):161-173.
- [14] Flickinger B,Berghöfer T,Hohenberger P,et al. Transmembrane potential measurements on plant cells using the voltage-sensitive dye ANNINE-6[J]. *Protoplasma*, 2010,247(1-2):3-12.
- [15] Qin Y,Huang L,Liu A,et al. Visualization of synchronous propagation of plant electrical signals using an optical recording method[J]. *Mathematical and Computer Modeling*, 2013,58(3-4):661-669.
- [16] Rosenbaum D S,Jalife J. Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias[M]. New York:Futura Armonk, 2001.

- [17] Bullen A, Saggau P. High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76(4): 2272–2287.
- [18] Kanaporis G, Martišienė I, Jurevičius J, et al. Optical mapping at increased illumination intensities[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(9): 960071–960078.
- [19] Cowan A E, Olivastro E M, Koppel D E, et al. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(20): 7733–7738.
- [20] Lloyd D, Harris J C, Biagini G A, et al. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress[J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1183–1190.
- [21] Montana V, Farkas D L, Loew L M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential[J]. *Biochemistry*, 1989, 28(11): 4536–4539.
- [22] Dumas Iii J H, Kinisley S B. Two-photon excitation of di-4-ANEPPS for optical recording of action potentials in rabbit heart[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2005, 33(12): 1802–1807.
- [23] Galizia C G, Küttner A, Joerges J, et al. Odour representation in honeybee olfactory glomeruli shows slow temporal dynamics: an optical recording study using a voltage-sensitive dye[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2000, 46(6): 877–886.
- [24] Girouard S D, Rosenbaum D S. Unique Properties of Cardiac Action Potentials Recorded with Voltage-Sensitive Dyes[J]. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 1996, 7(11): 1024–1038.
- [25] Knisley S B, Justice R K, Kong W, et al. Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2000, 279(3): H1421–H1433.
- [26] Cohen L B, Keynes R D, Hille B. Light scattering and birefringence changes during nerve activity[J]. *Nature*, 1968, 218: 438–441.
- [27] Gleichmann M, Collis L P, Smith P J, et al. Simultaneous single neuron recording of O_2 consumption, $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial membrane potential in glutamate toxicity[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2009, 109(2): 644–655.
- [28] Grinvald A. Real-time optical mapping of neuronal activity: from single growth cones to the intact mammalian brain[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1985, 8(1): 263–305.
- [29] Orbach H S, Cohen L B, Grinvald A. Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1985, 5(7): 1886–1895.
- [30] Michelson G, Schmauss B. Two dimensional mapping of the perfusion of the retina and optic nerve head[J]. *British Journal of Ophthalmology*, 1995, 79(12): 1126–1132.
- [31] Arora R, Das M K, Zipes D P, et al. Optical mapping of cardiac arrhythmias[J]. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*, 2003, 3(4): 187.
- [32] Laurita K R, Girouard S D, Rosenbaum D S. Modulation of Ventricular Repolarization by a Premature Stimulus Role of Epicardial Dispersion of Repolarization Kinetics Demonstrated by Optical Mapping of the Intact Guinea Pig Heart[J]. *Circulation Research*, 1996, 79(3): 493–503.
- [33] Lang D, Sulkin M, Lou Q, et al. Optical mapping of action potentials and calcium transients in the mouse heart[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2011(55): 3275.
- [34] 张虹, 张镇西, 徐正红, 等. 电压敏感染料膜电位光学标测技术[J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(3): 665–668. (ZHANG Hong, ZHANG Zhenxi, XU Zhenghong, et al. Optical mapping of the membrane potential with voltage-sensitive dyes[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2006, 23(3): 665–668.)
- [35] Horsch K W, Dhillon G S. *Neuroprosthetics: theory and practice*[M]. Singapore: World Scientific, 2004.
- [36] Hodgkin A L, Huxley A F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*[J]. *The Journal of Physiology*, 1952, 116(4): 449.
- [37] 颜小飞. 植物细胞电信号机理模型与仿真研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2009. (YAN Xiaofei. Modeling and simulation of electrical signals in plants[D]. Beijing: China Agricultural University, 2009.)
- [38] Masi E, Azzarello E, Mancuso S. *Multielectrode Array: A New Approach to Plant Electrophysiology*[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2012: 187–204.
- [39] Masi E, Ciszak M, Stefano G, et al. Spatiotemporal dynamics of the electrical network activity in the root apex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(10): 4048–4053.
- [40] 宋轶琳, 林楠森, 姜红, 等. 纳米铂黑修饰微电极阵列在神经电生理检测中的应用研究[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2011, 30(1): 29–32. (SONG Yilin, LIN Nansen, JIANG Hong, et al. Application of microelectrode arrays with nano platinum black deposition on neural electrophysiological recording[J]. *Journal of Southeast University: Medical Science Edition*, 2011, 30(1): 29–32.)

- [41] Thomas C A, Springer P A, Loeb G E, et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1972, 74(1):61–66.
- [42] Regehr W G, Pine J, Cohan C S, et al. Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1989, 30(2):91–106.
- [43] Gross G W. Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1979, BME-26(5):273–279.
- [44] Gross G W, Rhoades B K, Reust D L, et al. Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1993, 50(2):131–143.
- [45] Fejtł M, Stett A, Nisch W, et al. On micro-electrode array revival: its development, sophistication of recording, and stimulation[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2006:24–37.
- [46] Egert U, Knott T, Schwarz C, et al. MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MATLAB[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, 117(1):33–42.
- [47] Halbach M D, Egert U, Hescheler J, et al. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2003, 13(5):271–284.

作者简介:



赵东杰(1988–), 男, 山东省潍坊市人, 在读博士研究生, 研究方向为生物电子学、自动检测与控制技术。email:wdfzz@126.com.

秦 杨(1985–), 男, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 硕士, 主要研究方向为自动检测与控制技术。

王忠义(1968–), 男, 吉林省梅河口市人, 博士, 教授, 主要研究方向为生物电子学、自动检测与控制技术。

黄 岚(1968–), 女, 北京市人, 博士, 教授, 主要研究方向为生物信息检测, 嵌入式系统及应用。

刘 安(1985–), 男, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 硕士, 主要研究方向为自动检测与控制技术。

薛 琳(1979–), 女, 河南省濮阳市人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为生物电子学、自动检测与控制技术。