应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2014, 51(2): 579–585. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2014.068

昆虫触角电位（EAG）及其与气谱联用（GC-EAD）技术*

黄翠虹[1] 李静静[2] 周 琳[2] 闫凤鸣[2**]

（1. 顺德职业技术学院，广东 528333；2. 河南农业大学植物保护学院，郑州 450002）

摘 要 昆虫触角电位（EAG）和气相色谱-触角电位（GC-EAD）是昆虫化学生态学中最重要的电生理技术，在研究昆虫对信息化学物质的感受机理、筛选活性信息素成分或植物次生物质等方面发挥关键作用。本文介绍这两种技术的基本原理、操作步骤和应用实例等，并对使用中应该注意的事项进行了详尽讨论。

关键词 昆虫触角电位技术，EAG，气相色谱-触角电位技术，GC-EAD，原理，操作步骤

EAG and GC-EAD techniques

HUANG Cui-Hong[1] LI Jing-Jing[2] ZHOU Lin[2] YAN Feng-Ming[2**]

(1. Shunde Polytechnic College, Guangdong 528333, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Electroantennography (EAG) and gas chromatography-electroantennographic detection (GC-EAD), two of the most important techniques in insect chemical ecology, play key roles in the study of insect chemoreception mechanisms, the screening of bioactive components of insect pheromones or plant allelochemicals, and so on. This paper describes technical principles, detailed operational procedures and examples of EAG and GC-EAD techniques, and discusses some key points in the application of these two techniques.

Key words electroantennography, EAG, gas chromatography-electroantennographic detection, GC-EAD, principle, operation procedure

对于昆虫化学生态学研究工作而言，电生理技术是最核心的技术之一。昆虫对于化学物质的感受，可以分为嗅觉和味觉两类。触角电位技术（Electroantennography，EAG）和气相色谱-触角电位联用技术（Gas chromatography-electroantennographic detection，GC-EAD）是研究昆虫对挥发性化学物质（植物气味物质和昆虫信息素）感受的有效手段，而单细胞记录（Single sensilium recording，SSR）则可以对昆虫的嗅觉和味觉感受进行测定。EAG 主要用于已知化合物的测定，而 GC-EAD 可以用于对于混合物进行有效筛选。本文重点介绍 EAG 和 GC-EAD 技术。

1 触角电位技术（EAG）

1.1 引言

触角电位是直接检测昆虫对化学信号物质反应的电生理技术(Schneider, 1957)。在信息素和挥发性植物次生物质的研究中，触角电位技术法可以鉴定昆虫对化学信号的感受通道，因而可以从一系列的化学物质中筛选出昆虫有生理反应的部分化合物，大大简化了后来的工作。EAG 可用于筛选生物活性物质、粗提物纯化、活性层

* 资助项目：国家公益性行业（农业）科研专项（201203036）

**通讯作者，E-mail: fmyan@henau.edu.cn

收稿日期：2014-01-20，接受日期：2014-03-06

析物鉴定、活性合成化合物选择、气味浓度野外监测，也可作为气谱的生物检测器。

1.2 EAG 原理

昆虫触角是其嗅觉感受器官，每个嗅觉感受细胞可看作一个电阻（R）和一个电源（V）的结合体。整根触角形成系列电源和电阻组成的串联电路。当一股气流吹到触角上时，就可以记录到触角端部和基部间电位的变化。如果触角感器被激活，其累加的电信号是一个大约 1~20 mV 的平缓的去极化（Depolarization）的直流信号。所记录的并不是累加的活动电位，而是无数个感受神经元累积的电位变化。因此，EAG 电位是许多化学感受器被气体分子激活的一种相对量度。触角电位反应的振幅随刺激物浓度的增加而增加，直至达到饱和。

触角与放大器输入终端连接形成一个闭合回路，由下列部分组成：1）感受器细胞去极化产生的电压；2）触角阻抗；3）放大器输入阻抗。由欧姆定律知，触角两端电压和放大器电阻两端的电压大小取决于二者电阻之比。换言之，放大器输入阻抗越高则电压越高，而这正是我们要测量的。放大器输入阻抗远大于触角阻抗才能精确测量触角电压（$>10^{12}\ \Omega$）。

1.3 EAG 操作步骤

1.3.1 试验准备

（1）制备电极

制备玻璃毛细管：一般采用电极拉制仪自动拉制玻璃毛细管（外径 1~2.5 mm），无条件的情况下也可采用酒精喷灯手工拉制，灌装标准生理盐水的金属电极氧-还电位较高，会带来噪声，最好不用。在体视显微镜下用镊子小心夹碎玻璃毛细管尖端，使其内径可容纳离体触角。

灌装电极缓冲液：玻璃毛细管要灌装可导电的溶液，常用 0.1 mol/L 的 KCl 液，也常使用更复杂的 Ringer 生理盐水或 Kaissling 溶液（见本文文末配方）。为避免玻璃毛细管端部水分挥发形成 KCl 晶体，氯化钾溶液中可加入 1%~5%体积比的聚乙烯吡咯烷酮（PVP），摇匀后静置直到溶液澄清，要现配现用。注意在触角切下后马上灌装，要从玻璃毛细管尖端灌入，离尖端 10~15 mm 即可而不要灌满，否则不平整的操作台会导致电极缓冲液流入与 Ag-AgCl 金属丝相连的电路（这是很常见的误操作）。更换触角时，微电极需清洗，如在电极缓冲液中加入了 PVP，建议每根触角均更换新制备的电极。

（2）丝状触角接入电极的方法

有许多方法将触角固定在 2 根玻璃毛细管尖端之间。丝状触角最适用的方法是把触角末端插入玻璃毛细管的尖端。步骤如下：1）用解剖剪或剃须刀片切下触角，并放在体视显微镜下；2）将微电极尖端接触触角；用小镊子夹碎玻璃电极尖端少许，使玻璃毛细管内径稍大于触角基部外径；3）将离体触角放在载玻片上，使触角基部位于载玻片之外，然后手持载玻片小心将触角基部插入玻璃毛细管（千万不要用镊子夹触角）；4）切下触角端部数节（越短越好，因为这是感受气味最灵敏的部分）；5）在体视显微镜下，在触角与玻璃毛细管尖端接合处滴一小滴电极缓冲液；6）用解剖针将触角尖端拨入生理盐水中润湿，将控制触角的电极插入电极控制器；7）移动微动操作仪手柄使之相互靠近，使触角尖端接近记录微电极尖端开口，用解剖针小心将触角尖端插入，检查玻璃毛细管中有无气泡存在，如有气泡则重新操作；8）观察记录设备：如果触角与电极接触良好，应能看到一条相对稳定的基线。

（3）触角接入电极的其它方法（图 1）

根据触角形态的不同，触角接入电极的方法可以相应改进。非常小的棒状触角很难完整从头上取下，可切去昆虫头部而保留触角，搭在微电极尖端，触角尖端放在记录电极末端而不切下任何节。

可以利用昆虫整体：离体触角寿命约几分钟至一两个小时。如果昆虫数量有限，或者在 GC-EAD 试验需要长时间记录的情况下，可使触角留在昆虫身体上进行试验。在接触角之前需要麻醉昆虫，虫体可置于小平台上并用橡皮泥和细铜丝固定；还可以将昆虫固定在尖端切除一部分的移液器枪头内，下部用玻璃棉填充。

使用导电胶：导电胶可用来代替 KCL 生理盐水，也可在金属电极表面使用。可避免水性电极缓冲液排斥憎水性触角的问题，触角末端很容易推入与金属电极(银或不锈钢)相连的胶滴中。高质量的胶（如 Parker 公司的 Spectra 360 导电胶）不会干扰 EAG 反应，能保持 1 h 以上的时间不干燥。一般情况下，购置一管高质量的导电胶可以使用很长时间，但经常使用需要补充购买，目前国内市场上可以买到导电胶，但多是工业用途，主要用于替代锡焊，种类也很多，导电性能、稳定性和粘结效果会有差异，有些可以用于 EAD 连接触角用。

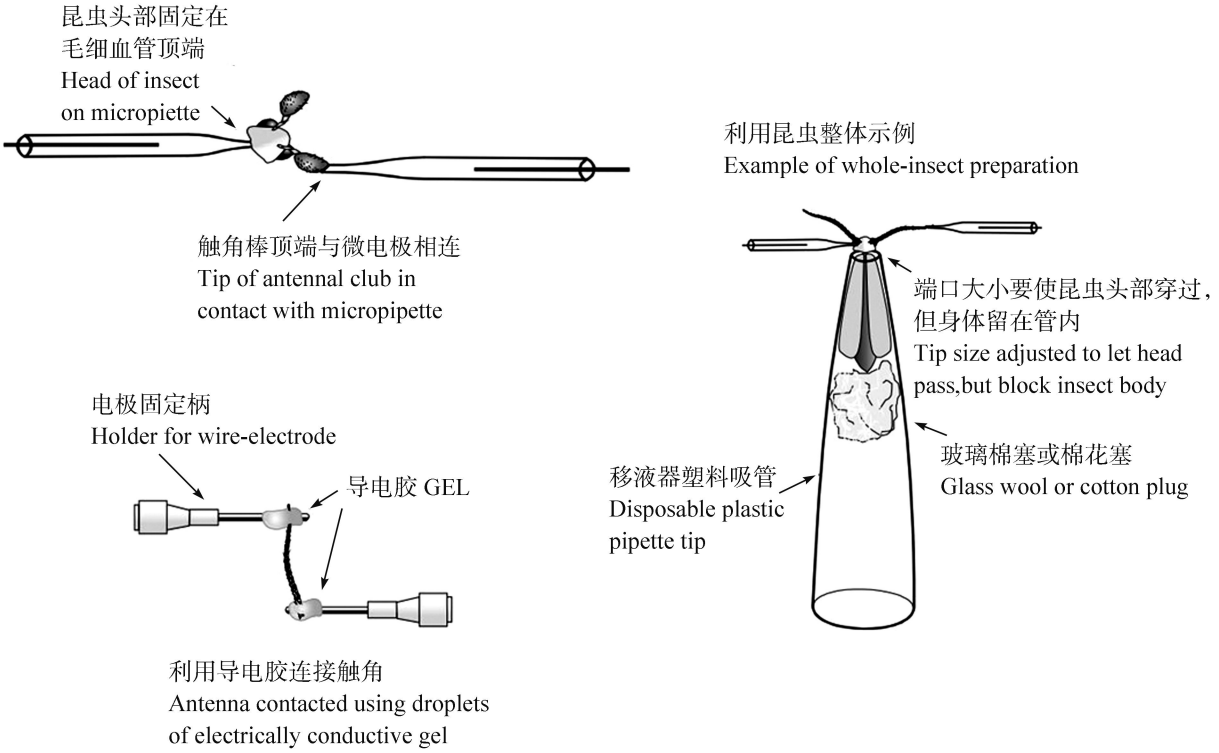

图 1　触角的各种与电极连接的方式（引自 Syntech，2009）
Fig. 1　Connection types of antenna to the probes (from Syntech, 2009)

（4）刺激物制备

1）将滤纸剪成 1 cm×5 cm 细条，纵折成“V ”字形，部分插入巴斯德进样管广口端；

2）将供试化合物用有机溶剂（性信息素一般用色谱纯正己烷，植物源气味一般用石蜡油，溶解性很差的可以使用混合溶剂，但溶剂空白需相应增加）配制成一定浓度（例如，1∶10、1∶100、1∶1 000 体积比），纯刺激物的量可表示成 pg 等(1 pg=10^{-12} g，1 ng =10^{-9} g，1 μg =10^{-6} g)。事先计算配制浓度，使刺激物与溶剂组成的样品的量在每根滤纸条上加 10~100 μL（一般取 20 μL），可采用梯度稀释法精确定量。然后，用移液器吸取滴在滤纸上；

3）室温下放置约 3 min 使溶剂挥发。非挥发性溶剂可免去该步骤；

4）将滤纸条完全推进巴斯德进样管，小心不要污染进样管内壁；

5）用打价纸写上样品信息贴在巴斯德进样管外壁上，不用时（例如刺激间隔）需要用胶头滴管橡胶帽堵上进样管广口端。

（5）对照设置

可以设置 3 种对照方式：1）洁净巴斯德进样管。检查是否有污染（用超声波批量清洗的进

样管，可免去该步）；2）仅含滤纸的进样管。检查滤纸污染，在性信息素测定中非常必要；3）滤纸+溶剂的进样管。检查溶剂是否污染，溶剂空白对照可用于扣除本底。

（6）参照化合物

EAG 记录中触角灵敏度逐渐下降。为监控这种衰减，需用参照化合物以恒定间隔进样，用于标准化数据。参照化合物可为任何能激发 EAG 信号的物质（植物源气味常选用绿叶气味的代表 E-2-己烯醛或顺-3-己烯醇）。

（7）刺激气流控制器的调试

连续气流常用线速度(cm/s)表示，刺激气流表示为单位时间的气流体积（mL/s）。最佳流速（10～50 cm/s，最常用 25～50 cm/s）取决于连接管的直径，最好用新鲜触角反复调试最佳流速。

安装刺激进样管并把尖端插入混流管侧孔中，同时按压“ START ”按钮或踩下脚踏板开关，定时供应脉冲气流，液晶屏上显示；观察显示器上的 EAG 信号，在预实验中调好有关参数，记录期间不要改动。

1.3.2 EAG 试验过程

（1）样品测试顺序

除了参照化合物，供试样品（纯化合物或粗提物，包括溶剂空白）最好随机抽取进行测定，而且要尽量使各样品在每根触角上测试的机会均等，每种化合物至少在 6 根触角上重复测定以克服个体误差。先用参照刺激，相隔固定时间，或与供试样品交替使用参照化合物刺激（注意：参照的进样频次远高于其他样品，挥发损失较多，应及时更新参照化合物进样管）。为了避免触角的疲劳或适应现象，两次脉冲刺激间隔时间最低 30 s（屏幕上基线走过大约 6 个屏幕的距离）。

（2）剂量反应

为探索某一化合物的活性浓度，需要制备梯度稀释的样品（一般是 10 的整数次方逐渐递减浓度）。从剂量反应曲线上可以获得某化合物的电生理感受阈值和饱和感受阈值信息。

（3）EAG 反应值的标准化

为补偿记录中触角灵敏度下降，常将 EAG 绝对值换算为与参照化合物相比较的标准化值。在标准化换算中，参照被设为 100%。每个供试刺激测定前后应分别插入 1 次参照物测定，然后采用线性内插法矫正其他刺激的 EAG 值（Syntech EAG 软件可自动计算标准化值）。计算同一根触角上同一化合物若干次测定的均值，将不同触角上的测定看作重复，采用单因素方差分析判断样品之间 EAG 反应值之间的差异。

1.4 EAG 的噪音控制

触角反应取决于许多因素：昆虫的种类、性别或生理状态，刺激物理化性质和浓度，触角生理状态，离体触角寿命，已接受刺激的量和强度，放大器输入信号的质量，温湿度状况等。有时 EAG 记录系统容易受到内部或外部噪声的干扰，从而降低记录信号的质量，因此，控制噪声对于保证高水平的记录就显得尤为重要。

EAG 记录系统的噪声来源主要有以下几个方面：1）触角和放大器输入阻抗噪声；2）触角“ 生物噪声 ”；3）外部电路噪声；4）漂移。

第 1 种噪声现代放大器可以克服，触角阻抗噪声只能采用来自高质量的昆虫群体的新鲜制备的触角才能降低；“ 生物噪声 ” 非常不规则，可能由触角肌肉活动引起，要针对不同类型的触角选择最适方法。

外部电路噪声来自供电系统电磁辐射，可用法拉第屏蔽网或电子滤波器；漂移现象在未与 GC 联机时不常见（GC-EAD 设备中带有自动基线控制功能），需操作者随时重置基线。其他噪声还有气流（机械感器接受）、化纤静电、操作员走动、光强变化、湿度突变（如空调），应小心避免。

此外，记录电极不能接地，和内置于探针（PROBE）中的前置放大器输出端连接形成保护电路，可有效地屏蔽噪声干扰，消除输入端口的泄漏电流效应。

2　触角电位-气谱联用仪

2.1　原理

气相色谱使用毛细管柱，其优势在于能从复杂混合物中分离微量组分，但理化检测器对活性成分无选择性；触角则具有高度选择性。EAG 通常和气相色谱（GC）一起使用，称为触角电位-气谱联用仪（GC-EAD）（Arn *et al.*，1975）。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股气流，一股进入气相色谱检测仪（常使用氢焰离子化检测器），另一股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，气相色谱的波峰就和 EAG 的波峰同时记录并可以对应起来。收集的化学混合物可以被迅速筛选，不必对每一部分化学成分都进行详细分析，那些没有 EAG 反应的成分就可以不予考虑（闫凤鸣，2011）。

2.2　GC-EAD 操作要点

GC 与 EAG 的连接及调试　（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）数据采集放大/控制器硬件和软件的安装（根据说明书操作，这里不再赘述）；（3）调试。

GC-EAD 记录

（1）触角准备等步骤同 EAG；（2）启动气谱，充分预热；打开记录程序，设定升温程序等；（3）从 GC 进样口进样，记录开始。

注意要点（Bjostad，1998）

（1）必须防止洗脱出的成分进入冷的毛细管内而凝结，因此吹到触角的化学物质出口必须加热；（2）气体出口到触角之间的距离必须很短（几个厘米），以减少样品的散失和出口管壁对样品的吸附；（3）测量气体出口处空气的温度，如果大于 25℃，有必要使气流冷却，以防止触角干燥；（4）GC-EAD 一般要连续运行 30~60 min，通常会出现基线漂移的问题，这可以通过使用高通量的过滤器配合软件的自动基线控制功能来解决。

2.3　GC-EAD 应用实例

亚洲玉米螟对其幼虫为害玉米挥发性气味的电生理反应（黄翠虹，2006；Huang *et al.*，2009）

研究背景：研究亚洲玉米螟雌性和雄性成虫对其幼虫取食后玉米挥发物的电生理和行为反应。玉米植株的处理分成幼虫（3 龄）取食组（LDP），机械损伤组（MDP）和健康组（UDP）3 组。利用吸附剂法收集挥发性化学成分，淋洗后用于试验。

GC-EAD 研究方法：从 LDP 组玉米植株收集到的挥发性次生代谢物混合样品用气相色谱-触角电位联用仪（GC-EAD）进行分析，该系统由装有 SGE AC5（30 m × 0.25 mm i.d.，filmthickness 0.25 μm，SGE international Pty. Ltd.，Australia）色谱柱和 FID 检测器的气相色谱（Angilent 5890 Ⅱ）和触角电位仪（Syntech，Hilversum，the Netherlands）组成。每次进样量为 2 μL，进样口温度 220℃，检测器温度 250℃，载气为流速 1 mL/min 的 99.999% N_2，不分流进样，升温程序：40℃保持 3 min，以 5℃/min 的速率升至 220℃，保持 3 min。将羽化后 2 d 且交配过的成虫触角剪下后，通过灌满电极液的玻璃电极接到触角电位仪上。

研究结果：亚洲玉米螟雌雄成虫都能对昆虫取食诱导挥发气味物质（HIPVs）中的某些成分作出反应。其中雌虫对(*E*)-2-己烯醛 [(E)-2-hexenal]、(*Z*)-3-己烯-1-醇 [(Z)-3-hexen-1-ol]、壬醛（nonanal）和两种未知物质有电生理反应（图 2，上）；雄虫仅对 (*E*)-2-己烯醛 [(E)-2-hexenal]、壬醛（nonanal）和一种未知物质有电生理反应（图 2，下）。萜烯类 HIPVs 虽然含量很高，但是雌雄玉米螟成虫均无触角电位反应。

3　EAG 及 GC-EAD 应用注意事项

单纯的 EAG 试验中，刺激间隔期一般是 30

s，而在 GC-EAD 试验操作中，刺激时间间隔是由气相色谱仪 FID 出峰决定的，不能够自己调节刺激间隔。因此，选择具有合适长度、内径和涂层的毛细管柱是很重要的，另外就是要探索 GC 程序升温的最佳方式。使关键峰之间的分离度至少为 1.5（即做到基线分离）。

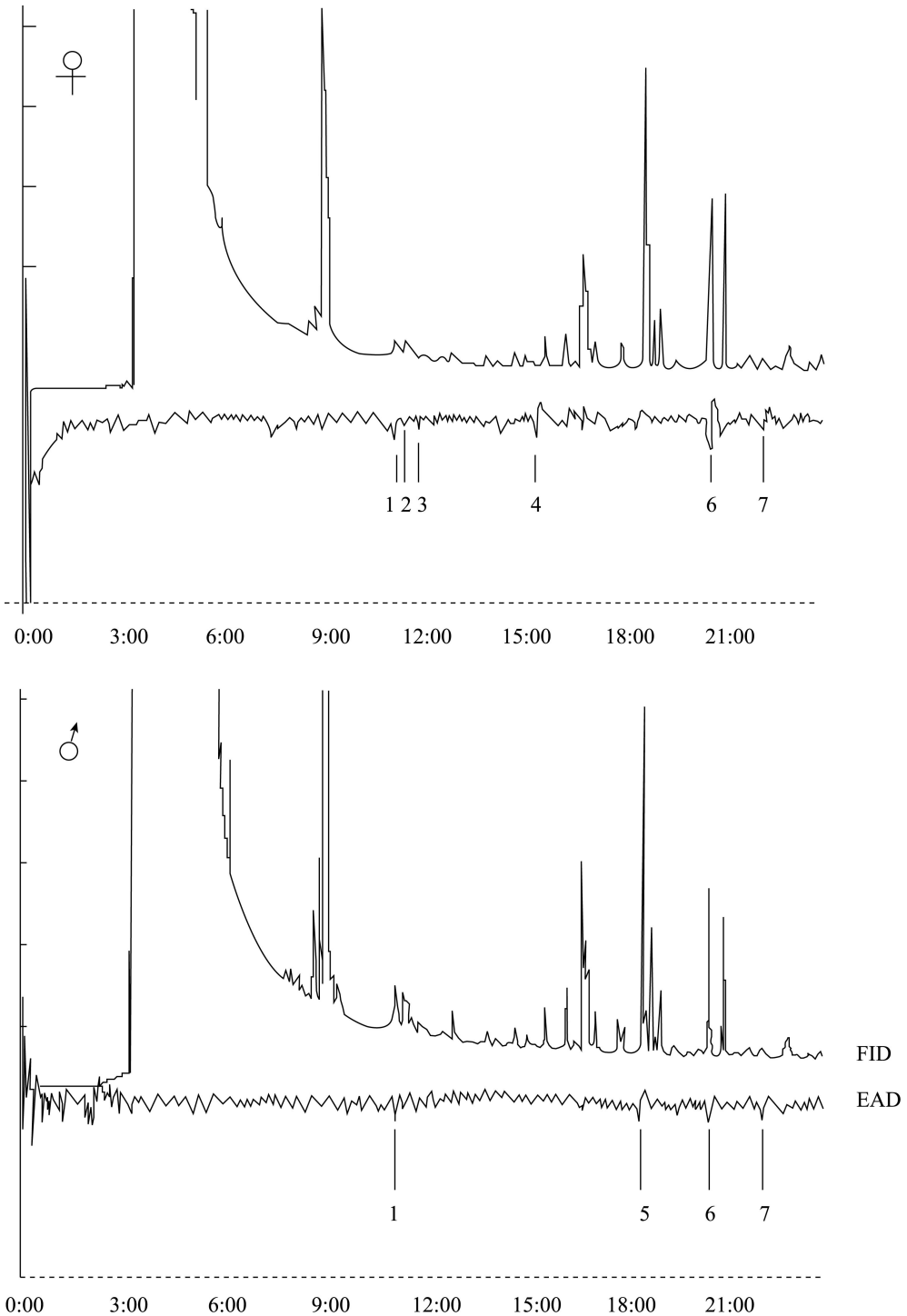

图 2　亚洲玉米螟雌性（上）和雄性（下）成虫对幼虫取食后玉米挥发性化学物质的 GC-EAD 反应（引自 Huang 等，2009）

Fig. 2　Gas chromatograph-electroantennographic detection responses of female (top) and male (bottom) Asian corn

borer (ACB) (*Ostrinia furnacalis*) antennae to larvae-damaged plant volatiles (from Huang *et al*., 2009)

FID：气谱波峰；EAD：触角电位反应；1：(*E*)-2-己烯醛；2：(*Z*)-3-己烯-1-醇；3：未知化合物；4：未知化合物；5：未知化合物；6：壬醛；7：未知化合物。

1: (*E*)-2-hexenal; 2: (*Z*)-3-hexen-1-ol; 3: Unknown; 4: Unknown; 5: Unknown; 6: Nonanal; 7: Unknown.

GC-EAD 中，作为刺激源的每种柱流出组分的量是不相同的（在 EAG 试验中可以用精密移液器精确进行配制）。因此，有可能会出现有行为活性的组分仅因为在样品中含量太低而没有触角电位反应，或者有很低活性的组分在样品中含量很高而具备了生物活性。所以，该技术在性信息素的研究中非常具备优势，而针对“特异性”并不强的植物来源的气味物质，需要慎重对待这些结果。

GC 要求很小的进样量，通常是 1 μL，设置较大的分流比，才能减少峰展宽与拖尾现象；但 EAG 的要求相反，挥发物成分量较大对于产生显著 EAG 反应是有帮助的，这就构成了一对尖锐的技术矛盾。通常先考虑后者的要求，采用 8 μL 进样量，无分流，在色谱再解析软件中再调整色谱显示属性。另外，还可以在待分析的粗提物进样之前适当浓缩，也有利于减轻上述矛盾。

GC-EAD 是精密的联用设备，操作中最困难的地方是连接触角。因此，总体试验的顺序应是先连好仪器，配制电极缓冲液，制备电极，打开软件，使气谱进入待机状态；然后花费较大的精力接触角，然后色谱进样，点击 record 记录波形。

GC-EAD 数据目前处于直观定性阶段，论文中一般显示图谱即可，不涉及统计分析问题。下一步的工作应当是在相同的色谱条件下（仅减小进样量或增大分流比）做 GC-MS 试验，对生物活性成分进行定性。

EAG 峰形不能作为唯一依据，根据笔者的经验，保留时间与常用有机溶剂差别不大的组分一般是无效的，与绿叶气味（六碳化合物，如 Z-3-己烯醇等）保留时间接近，或者小于绿叶气味的，在野外往往也是无效的；保留时间大于或等于棕榈酸、十六醇及多数长链烷烃成分也不予考虑。单萜类、倍半萜类、芳香族化合物、短链酯类则应给予充分重视。

作为 GC-EAG 的前导步骤，最好用 Florisil 填装的色谱柱对各种粗提物做生物测定追踪的柱层析分离，这样有助于避免色谱出峰过于密集、触角来不及恢复的问题，而且可以大大减少用来做行为验证试验的试剂种类。

电极缓冲液的作用是：避免金属电极与触角直接接触引起机械刺激；延长离体触角的存活寿命；许多电解质的加入增强溶液导电能力。两种常用的电极缓冲液配方如下：

Ringer’s 溶液：20% NaCl 32.5 mL；10% KCl 1.4 mL；10% $CaCl_2$ 1.2 mL；5% $NaCO_3$ 4.0 mL；1% NaH_2PO_4 1.0 mL；葡萄糖 2 g; 蒸馏水加至 1 000 mL。

Kaissling 溶液：KCl 6.4 mmol；KH2PO4 20.0 mmol；$MgCl_2$ 12.0 mmol；$CaCl_2$ 1.0 mmol；NaCl 12.0 mmol；KOH 9.6 mmol；葡萄糖 354 mmol；蒸馏水加至 1 000 mL。

参考文献 (References)

Arn H, Sätdler E, Raucher S, 1975. The electroantennographic detector —a selective and sensitive tool in gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Z. Naturforsch*., 30c: 722–725.

Bjostad LB, 1998. Electrophysiological methods// Millar JG, Haynes KF(eds.). Methods in Chemical Ecology—Chemical Methods. Chapman & Hall. 339–374.

Huang CH, Yan FM, Byers J, Wang RJ, Xu CR, 2009. Volatiles induced by the larvae of the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) in maize plants affect behavior of conspecific larvae and female adults. *Insect Science*, 16(4): 311–320.

Schneider D, 1957. Elektrophysiologische untersuchungen von chemo-und mechanorezeptoren der antenne des seidenspinners *Bombyx mori* L. *Z. Vergl. Physiol*., 40: 8–41.

Syntech, 2009. Electroantennography—a practical introduction. http://www.syntech.nl/

黄翠虹, 2006. 亚洲玉米螟取食对玉米次生代谢物质的诱导研究. 博士学位论文. 北京: 北京大学.

闫凤鸣(主编), 2011. 化学生态学(第二版). 北京: 科学出版社. 377–387.