

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00286

## 中华乌塘鳢纤毛嗅觉神经元的分离及其电生理

赖晓健<sup>1</sup>, 洪万树<sup>2</sup>, 杨薇<sup>2</sup>

1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021;
2. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005

**摘要:** 应用酶消化和机械吹打相结合的方法, 快速分离出中华乌塘鳢(*Bostrychys sinensis*)嗅囊中纤毛嗅觉感受神经元。再应用全细胞膜片钳技术记录中华乌塘鳢纤毛嗅觉感受神经元的静息电位、动作电位及电压门控离子通道电流等电生理学特征。结果表明, 中华乌塘鳢纤毛嗅觉感受神经元具有典型的双级神经元结构特征, 包括细胞体、轴突、树突以及树突顶端的嗅结和纤毛。嗅觉感受神经元静息电位为 $(-57 \pm 6.37)$  mV, 动作电位峰值为 $(38.30 \pm 0.95)$  mV。在 $-60 \sim +80$  mV的阶梯去极化脉冲刺激中, 内向电流在 $-60 \sim -40$  mV激活,  $-20 \sim 0$  mV达到最大值, 内向电流峰值为 $(-69.08 \pm 44.15)$  pA。外向电流在 $+40$  mV时达最大值, 峰值为 $(267.55 \pm 73.67)$  pA。本研究结果为纤毛嗅觉感受神经元上性信息素受体感受性信息素的电生理机制以及性信息素的应用提供了方法和理论基础。

**关键词:** 中华乌塘鳢; 嗅觉感受神经元; 膜片钳; 电生理学

中图分类号: S91

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0286-07

硬骨鱼类嗅上皮嗅觉感受神经元(ORNs)上存在性信息素受体, 能与水中的性信息素物质结合从而引发ORN某些离子通道的开启, 产生去极化电位, 传递到脑产生嗅觉信息。其作用的机理是气味作用于G蛋白偶联受体后, 细胞内cAMP浓度增加, cAMP可激活环核苷酸门控(CNG)开启, 引起 $Ca^{2+}$ 内流, 使细胞膜去极化并产生动作电位; 同时 $Ca^{2+}$ 内流激活 $Cl^-$ 通道, 引起 $Cl^-$ 外流, 使细胞膜进一步去极化<sup>[1]</sup>。产生的嗅感受电位经感觉神经将信息传至中枢神经系统, 通过下丘脑-脑垂体-性腺轴的反馈调控作用于鱼的生殖生理过程<sup>[2]</sup>。膜片钳技术(patch clamp)是由Neher和Sakmann<sup>[3]</sup>发明的, 发展至今已成为细胞生物学研究的一种标准方法, 并派生出许多生物物理和生物化学技术。该技术通过对跨细胞膜电流的测量、鉴定和性质分析, 广泛应用于细胞膜通透性、选择性、细胞的分泌吸收、第二信使和信号传导、

激素作用于细胞膜行为等方面的研究, 对细胞生物学、神经科学、病理生理学和药理学等诸多学科的发展起了积极的推动作用。目前膜片钳技术在海洋生物研究中已得到初步应用<sup>[4-6]</sup>。中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis* (Lacépède))是中国东南沿海河口和港湾等半咸淡水域中的一种营穴居生活的经济鱼类<sup>[7]</sup>。行为学和生理学研究表明,  $17\alpha$ -羟基孕酮( $17\alpha$ -P)、 $17\alpha, 20\beta$ 双羟孕酮( $17\alpha, 20\beta$ -P)和前列腺素 $E_2$  ( $PGE_2$ )是中华乌塘鳢的主要性信息素<sup>[8]</sup>; 嗅电图(EOG)方法检测到中华乌塘鳢嗅上皮对 $PGE_2$ 、前列腺素 $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ )、 $17\alpha$ -P、 $17\alpha, 20\beta$ -P的刺激均产生明显的嗅电反应<sup>[9]</sup>。作者曾采用免疫细胞化学方法发现中华乌塘鳢嗅觉系统上存在 $17\alpha$ -P和 $17\alpha, 20\beta$ -P受体(progesterone receptor, PR)<sup>[10]</sup>和 $PGE_2$ 受体亚型 $EP_{1-4}$ <sup>[11]</sup>, 本研究中, 作者对中华乌塘鳢(*Bostrychys sinensis*)纤毛ORN(cORN)电压门控通道离子电流和电生理特

收稿日期: 2012-07-23; 修订日期: 2012-08-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41276129; 40776080); 福建省农业科技重大项目(2012N5011).

作者简介: 赖晓健, (1984-), 男, 助理研究员, 从事鱼类病害防治和生理学研究. E-mail: laixj@jmu.edu.cn.

通信作者: 洪万树, 教授. E-mail: wshong@xmu.edu.cn

点进行研究,为进一步研究性信息素受体的作用机制和信号通路打好基础。这对于在膜生物学层面认识鱼类的性信息素作用机理和调控机制都有着重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验鱼

中华乌塘鳢购自厦门市农贸市场,全长 16.49~17.31 cm, 体质量 51.5~76.6 g, 暂养于室内遮光且连续充气的塑料水槽中。实验水温度为 26~30℃, 盐度 15。

### 1.2 溶液的配制

**1.2.1 Fish Ringer 细胞外液** 各成分浓度(mmol/L)分别为: NaCl 150, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 5, Glucose 10。NaOH 溶液调节 pH 至 7.4。

**1.2.2 无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 细胞外液** 各成分浓度(mmol/L)分别为: NaCl 150, KCl 3, HEPES 5, Glucose 10, EDTA 1。NaOH 溶液调节 pH 至 7.4。

**1.2.3 电极内液** 各成分浓度(mmol/L)分别为: KCl 130, CaCl<sub>2</sub> 0.1, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, EGTA 1.1, Na<sub>2</sub>ATP 2。KOH 溶液调节 7.5, 经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

**1.2.4 加入两性霉素 B 的电极内液** 避光条件下称取 5 mg 两性霉素 B, 加入 30 μL DMSO, 应用超声振荡加速溶解至其呈现澄清透明的橘黄色液体, 然后取适量加入到配好的电极内液中定容到 20 mL, 使两性霉素 B 的终质量浓度为 250 μg·mL<sup>-1</sup>, 经滤膜过滤后, 避光保存在-20℃备用。

### 1.3 实验仪器

膜片钳放大器系统(EPC 10, HEAK), 倒置显微镜 (IX70, Olympus), 微电极拉制仪 (P-87, SUTTER), 渗透压仪 (osmometer STY-1, 天精), 精密 pH 计 (delta 320, Mettler-Toledo), 电热恒温振荡水槽 (DKZ-2, 精宏)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 cORN 的急性分离方法

(1)无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 法 取活泼的实验鱼 3~4 尾, 剪断脊椎并取出双侧嗅囊, 迅速放

入 0~4 的 Fish Ringer 中。待所有的嗅囊收集完毕, 用无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 洗去血液, 剪碎后再次用无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 洗至悬液不浑浊。然后将剪碎的嗅囊转移到含有 10 mg 木瓜酶、10 mg BSA、2.5 mg L-半胱氨酸的 15 mL 无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 中, 在 28℃下酶解 20 min 至发白膨松。然后在 Fish Ringer 中洗 3 次, 用烧边吸管轻轻吹打 20 次成细胞悬浊液。细胞悬浊液由 350 目(44 μm)尼龙滤网过滤两次以消除残留的组织块。用 0.4%台酚蓝检验 cORN 成活率, 细胞分离后存放于 4℃。选取有树突和嗅结的 cORN 用于实验。

(2) Fish Ringer 法 步骤同无 Ca<sup>2+</sup>无 Mg<sup>2+</sup> Fish Ringer 法, 使用的细胞外液均为 Fish Ringer。

(3) 机械分离法 将解剖出的嗅囊用 Fish Ringer 洗净后, 用烧边吸管轻轻吹打 100 次成细胞悬浊液。经 350 目(44 μm)尼龙滤网过滤两次倒置显微镜后观察。不同分离实验分别重复 3 次。

**1.4.2 cORN 的贴壁** 用相对分子质量 150 000~300 000 的多聚赖氨酸(PLL)配置 0.17 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 4℃下将盖玻片在该溶液内浸泡 24 h 后, 在蒸馏水中浸泡 2 h, 用双蒸水洗去游离的 PLL, 烘干备用。根据细胞悬液的浓度将其与 Fish Ringer 混合, 将混合液滴至盖玻片上, 放在倒置显微镜台上静置 20 min 贴壁。

**1.4.3 拉制电极和灌注电极液** 使用电极拉制仪将外径 1.5 mm、内径 1.17 mm 的硼硅酸玻璃毛细管拉制成玻璃微电极, 并用抛光仪进行电极抛光, 使电极尖端平滑, 易于封接。尖端直径开口小于 1 μm, 电阻为 8~15 MΩ。

拉制好的电极先在不含两性霉素 B 的电极内液中浸 10 s 左右, 然后从电极尾部用 1 mL 针管反向充灌含两性霉素 B 的电极内液, 用手指轻弹电极中部排除尖端气泡。

**1.4.4 膜片钳操作** 将预先处理的实验标本置于显微镜载物台上的灌流槽内, 把充灌好的电极装入记录电极头, 慢慢降下电极, 在电极进入溶液之前给电极尾部通过注射器施加正压, 以防止溶液

气液界面上积聚的灰尘或溶液中的某些离子附着在电极尖端而阻止高阻封接的形成。在倒置显微镜监视下,边施加正压边使微电极靠近细胞,当电极尖端刚刚接触到细胞膜时,去掉微电极内的正压并稍加负压,使玻璃微电极与细胞膜之间形成稳定的高阻封接。

**1.4.5 静息电位和动作电位的测定** 全细胞情况下将电压钳模式调成电流钳模式,并把钳制膜电流设成 0 A,这时显示的电位为静息电位,然后给予一个 700 pA, 2 ms 的阈上电流单刺激,引出动作电位,采样频率 4 kHz。

**1.4.6 电压门控通道电流的测定** 利用膜片钳放大器 EPC 10 (HEKA)进行全细胞膜片钳记录,实验参数设置、数据的采集和刺激方式施加均通过 HEKA PULSE 软件来控制,当电极与细胞膜之间形成高阻封接(>1G)后,立即进行快电容补偿,然后调至全细胞模式,5 min 左右后,两性霉素 B 穿孔破膜。破膜后,电极内液与细胞内液相通,再进行慢电容和串联电阻补偿,形成全细胞记录模式。

全细胞电压钳模式下,膜电位钳制在 -60 mV,给予 -60 ~ +80 mV 的阶梯去极化脉冲刺激,阶跃 20 mV,刺激波宽 50 ms,采样频率为 20 kHz,应用 HEKA PULSE 软件记录不同电压条件下细胞离子通道电流的变化情况。取各电压刺激下,内向电流和外向电流的峰值,绘出电流-电压线(I-V)。每次实验选取 3 个以上 cORN 用于膜片钳操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤毛嗅觉感受神经元(cORN)的形态

急性分离出纤毛嗅觉感受神经元,在倒置显

显微镜下对分离出的细胞形态和存活情况进行观察。cORN 的细胞体直径约 4  $\mu\text{m}$ ,细胞体上有长 6~15  $\mu\text{m}$ 、直径 2  $\mu\text{m}$  左右的树突,且树突的顶端膨大成嗅结,有些细胞甚至可以看到完整的轴突。有些神经元的嗅结上可清晰的看到纤毛(图 1)。选取表面光滑、折光性好的 cORN 细胞用于膜片钳实验。细胞的活性可以在 25 $^{\circ}\text{C}$ 室温下维持 5~8 h。

### 2.2 中华乌塘鳢血浆渗透压和 pH

使用渗透压仪测得中华乌塘鳢血浆的渗透压为  $316 \pm 10.5$  ( $n=5$ )。用精密 pH 计测得中华乌塘鳢血浆的 pH 分别为  $7.36 \pm 0.04$  ( $n=10$ )。

### 2.3 3 种方法急性分离的细胞数及存活率

将嗅囊组织采用不同的方法急性分离,分别是剪碎后放入无  $\text{Ca}^{2+}$  无  $\text{Mg}^{2+}$  的 Fish Ringer 中酶解、剪碎后放入正常的 Fish Ringer 中酶解和机械吹打以及直接剪碎进行机械分离 3 种分离方法。在显微镜下每种方法观察六组细胞密度、cORN 比率以及计算死亡率等,结果如表 1 所示。采用酶解法结合机械吹打得到的细胞数量少于直接机械分离法,但是直接机械分离法获得的 cORN 很少。采用无  $\text{Ca}^{2+}$  无  $\text{Mg}^{2+}$  的 Fish Ringer 得到的 cORN 多于正常的 Fish Ringer。实验采用无  $\text{Ca}^{2+}$  无  $\text{Mg}^{2+}$  的 Fish Ringer 和酶解结合机械吹打的方法急性分离 cORN。

### 2.4 静息电位和动作电位

静息电位和动作电位如图 2 所示。电流钳模式下电流为 0 时显示的静息电位为  $(-57 \pm 6.37)$  mV ( $n=10$ )。给予 2 ms 的刺激后,引发内向电流,迅

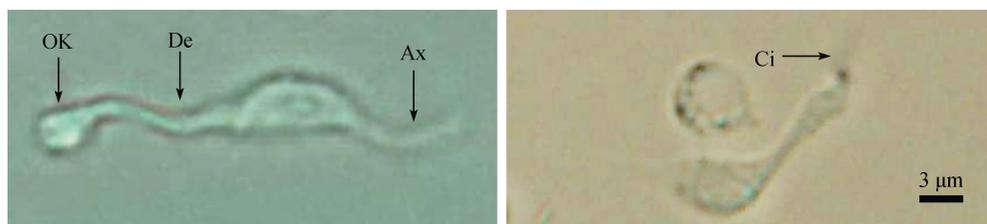


图 1 中华乌塘鳢纤毛嗅觉感受神经元(cORN)

Ax, 轴突; Ci, 纤毛; De, 树突; OK, 嗅结。

Fig. 1 Ciliated olfactory receptor neuron (cORN)

Ax, axon; Ci, cilia; De, dendritic; OK, olfactory knob.

表 1 3 种方法急性分离纤毛嗅觉感受神经元结果比较  
Tab. 1 Results of cORNs isolation using the three fast methods

方法 method	细胞密度/ $\text{mL}^{-1}$ cell density	cORN 占总细胞比率/% percentage of cORN	cORN 死亡率/% cORN mortality
无 $\text{Ca}^{2+}$ 无 $\text{Mg}^{2+}$ FR FR without $\text{Ca}^{2+}$ nor $\text{Mg}^{2+}$	$2.70 \times 10^5$	2.33	11.63
FR	$0.67 \times 10^5$	0.01	15.38
机械分离 physiological separation	$3.71 \times 10^5$	0.34	12.36

注: FR - Fish Ringer.

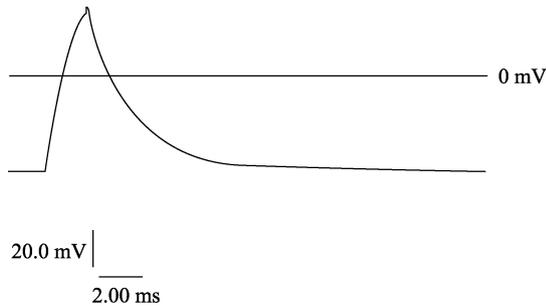


图 2 一个 cORN 的静息电位(-51.9 mV)和动作电位峰值电位(37.63mV)

Fig. 2 The resting potential (-51.9 mV) and peak action potential (37.63mV) of a cORN

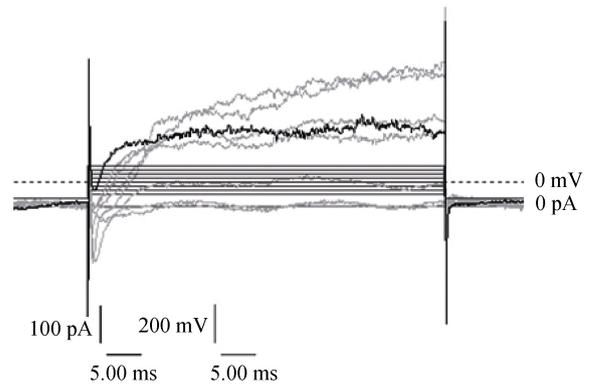


图 3 一个 cORN 的电压门控通道离子电流  
Fig. 3 Voltage-gated current of a cORN

速产生动作电位, 动作电位峰值为( $38.30 \pm 0.95$ ) mV ( $n=3$ )。

### 2.5 电压门控通道电流

膜电位钳制在 -60 mV, 给予 -60~+80 mV 的阶梯去极化脉冲刺激, 阶跃 20 mV, 刺激波宽 50 ms, 刺激频率 20 Hz。记录下细胞离子通道的电流图后, 用 PULSE 软件去除电流图的漏电流同时施加漏减校正。得到 cORN 的电压门控通道电流的图像(图 3)。在 -60~+80 mV 的电位刺激下, cORN 先释放出内向的电流, 接着再释放一个外向的电流。测得 6 个 cORN 的电压门控通道电流后进行分析, 取各电压刺激下, 内向电流和外向电流的峰值, 获得电流-电压线(I-V)(图 4)。由图 4 中 I-V 曲线可以看出内向电流在 -60~-40 mV 激活, -20~0 mV 达最大值, 内流电流峰值为( $-69.08 \pm 44.15$ ) pA。外向电流的峰值振幅在 +40 mV 左右达最大值, 外流电流峰值为( $267.55 \pm 73.67$ ) pA, 并在 +60~+80 mV 时趋向平稳。

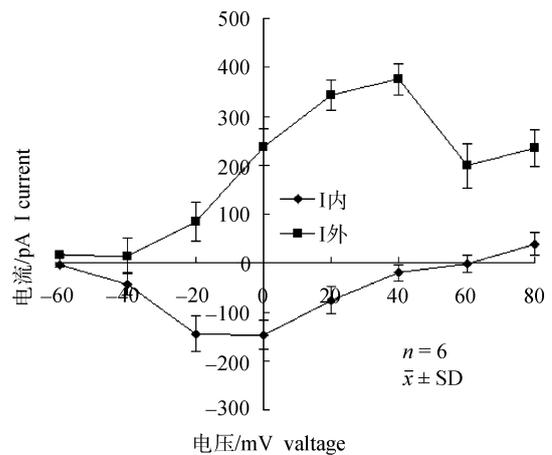


图 4 cORN 电压门控离子通道电流的电流-电压线  
Fig. 4 I-V curve of voltage-gated current of cORNs

## 3 讨论

### 3.1 cORN 的电生理特征

静息膜电位是衡量细胞未受严重损伤的一

个重要指标, 因此测定 cORN 的静息电位可筛选出生理状态良好的细胞用于电生理实验。Miyamoto 等<sup>[12]</sup>采用全细胞膜片钳技术研究表明斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) ORN 的静息电位为( $-45 \pm 11$ ) mV, Imanaka 等<sup>[13]</sup>测定牛蛙(*Rana catesbeiana*)ORN 的静息电位为( $-53.2 \pm 12.1$ ) mV, Corotto 等<sup>[14]</sup>研究发现龙虾(*Panulirus argus*)ORN 的静息电位在 -60~-76 mV 范围内。本

次实验测得中华乌塘鳢 cORN 的静息电位为(-57 ± 6.37) mV, 实验结果表明这些物种 ORN 的静息电位较接近。

I-V 曲线表明, 不同的刺激电压下, 内向电流与外向电流均呈非线性变化, 说明二者均是有电压依赖性的电流, 同时可以观察到, 内向电流比外向电流被激活的稍早。近似的结果也在斑马鱼 (*Danio rerio*)(图 5)和斑点叉尾鲷(图 6)嗅觉感觉神经元的全细胞离子通道电流中获得。对斑点叉尾鲷 ORN 的全细胞离子通道电流研究的结果表明, 瞬间的内向电流在-70~-50 mV 间被激活, 在-20

mV 达到峰值, 并快速失活; 延迟的外向电流在 -60~-50 mV 间被激活, 同时在 50 ms 的刺激时间内几乎没有失活<sup>[12]</sup>。斑马鱼 ORN 的全细胞离子通道电流也呈现类似的变化趋势, 瞬间的内向电流在-74~-64 mV 间被激活, 在进一步的去极化中电流振幅持续增大直到 20 mV 左右开始减小, 外向电流在-44 mV 时被激活<sup>[15]</sup>。其结果与中华乌塘鳢的基本相似。但在具体数值上, 中华乌塘鳢 ORN 的内向和外向电流峰值与斑马鱼比较相似, 与斑点叉尾鲷相差的比较大, 其原因可能是不同种类之间的差别。

### 3.2 应用膜片钳技术研究 cORN 上性信息素受体的作用机制

目前, 对鱼类嗅觉生理的研究主要通过两种电生理研究方法: 嗅电图(EOG)和膜片钳。它们的优缺点和偏重不同, 前者在活体上进行实验, 可以较宏观地了解个体的嗅觉或是嗅上皮某个区域对气味的敏感性, 能够了解生物体本身的生命活动, 因而广泛用于性信息素的识别; 而後者的对象为体外细胞, 体外实验的结果可能和生物体本身的生命过程有差异, 仅仅体外实验不能让人信服, 但是从微观的单个 cORN 入手, 能够了解仅表达一种嗅觉受体的 cORN 在感受气味物质时的电生理过程, 从而探明这个嗅觉受体的作用机制和信号传导路径, 这点是其他方法所不能代替的。

膜片钳技术在海洋生物研究中已有初步应用。Rabe 等<sup>[4]</sup>通过膜片钳结合 RT-PCR 技术研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)视觉星型神经胶质细胞, 发现几乎所有的该种细胞都具有电压门控内向的 Na<sup>+</sup>通道。Henne 等<sup>[5]</sup>用全细胞膜片钳结合 RT-PCR 技术, 分析刚成熟虹鳟的视网膜神经节细胞, 鉴定出 1 种 TTX-敏感的 Na<sup>+</sup>通道和 3 种电压门控的 K<sup>+</sup>通道。Wang 等<sup>[6]</sup>研究了斑马鱼终神经(TN)的电生理特点, 发现 TN 上有谷氨酸盐受体, 结合绿色荧光蛋白(GFP)标记方法, 提出了 TN 调节动物生理活动的可能作用机制。

以往的研究发现哺乳动物 PGE<sub>2</sub> 受体亚型 EP<sub>1</sub> 是通过激活细胞内 Ca<sup>2+</sup>和 IP<sub>3</sub> 信号系统来传递 PGE<sub>2</sub> 信息的<sup>[16]</sup>。在鱼类中, 对 4 种 PGE<sub>2</sub> 受体

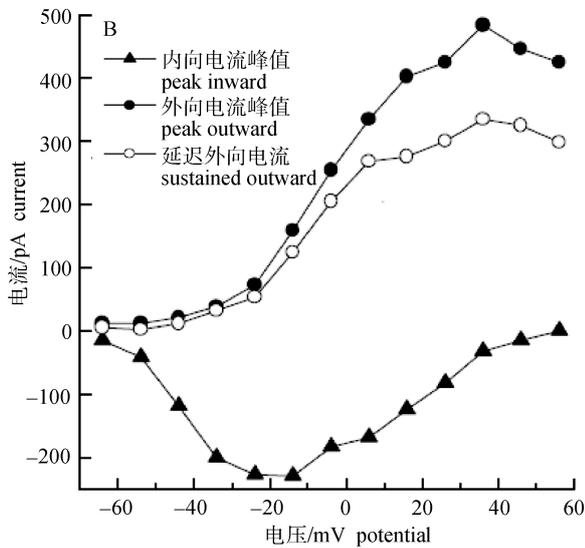


图 5 斑马鱼 ORN 电压门控通道电流的电流-电压线<sup>[15]</sup>  
Fig. 5 I-V curve of voltage-gated current of zebrafish ORN<sup>[15]</sup>

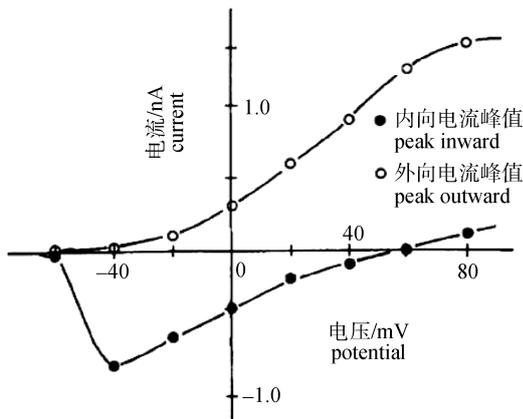


图 6 斑点叉尾鲷 ORN 电压门控通道电流 I-V 线<sup>[12]</sup>  
Fig. 6 I-V curve of voltage-gated current of channel catfish ORN<sup>[12]</sup>

(EP<sub>1-4</sub>)的作用机制还没有系统的研究。已有的研究表明, 鱼类 EP 的作用机制可能和哺乳类的不同<sup>[17-18]</sup>。作者以前的研究发现 EP<sub>1</sub> 可能作为中华乌塘鳢性信息素 PGE<sub>2</sub> 的受体, 今后的研究可以把 EP<sub>1</sub> 表达在一些体外培养的细胞系中, 如 HEK 293, 再利用膜片钳技术研究其作用机制和信号传导通路。把 RT-PCR 和膜片钳技术结合起来, 才能更深入地研究 EP<sub>1</sub> 作为性信息素 PGE<sub>2</sub> 受体的功能特性, 为人工诱导鱼类产卵技术的创新奠定理论基础。

#### 参考文献:

- [1] de Souza F M S, Antunes G. Biophysics of olfaction [J]. Rep Prog Phys, 2007, 70: 451-491.
- [2] Reed R R. The molecular basis of signal transduction in olfactory sensory neurons [J]. J Gen Physiol, 1992, 99: 54-60.
- [3] 陈军. 膜片钳实验技术系列讲座[J]. 神经解剖学杂志, 1994, 10(4): 360-369.
- [4] Rabe H, Koschorek E, Nona S N, et al. Voltage-gated sodium and potassium channels in radial glial cells of trout optic tectum studied by patch clamp analysis and single cell RT-PCR [J]. Glia, 1999, 2(3): 221-232.
- [5] Henne J, Pottering S, Jeserich G. Voltage-gated potassium channels in retinal ganglion cells of trout: A combined biophysical, pharmacological, and single-cell RT-PCR approach [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(5): 629-637.
- [6] Wang X K, Huang L X, Li Y, et al. Characterization of GFP-tagged GnRH-containing terminalis neurons in transgenic zebrafish [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(3): 608-615.
- [7] 马细兰, 洪万树, 张其永, 等. 中华乌塘鳢嗅觉器官的形态结构[J]. 中国水产科学, 2005, (12)5: 525-532.
- [8] 洪万树, 赵卫红, 马细兰, 等. 性外激素诱发中华乌塘鳢产卵的初步研究[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 225-230.
- [9] 马细兰, 洪万树, 柴敏娟, 等. 中华乌塘鳢对性外激素电反应的比较[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(6): 781-786.
- [10] 赖晓健, 洪万树, 王桂忠, 等. 中华乌塘鳢嗅觉系统孕酮受体的免疫细胞化学[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1043-1050.
- [11] Lai X J, Hong W S. Variation with reproductive status of PGE<sub>2</sub> receptor immunoreactivities in the *Bostrichthys sinensis* olfactory system [J]. J Fish Biol, 2010, 77: 1542-1551.
- [12] Miyamoto T, Restrepo D, Teeter A H. Voltage-dependent and odorant-regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish [J]. J Gen Physiol, 1992, 99(4): 505-529.
- [13] Imanaka Y, Takeuchi H. Spiking properties of olfactory receptor cells in the slice preparation [J]. Chem Sens, 2001, 26 (8): 1023-1027.
- [14] Corotto F S, Michel W C. A hyperpolarization-activated cation conductance in lobster olfactory receptor neurons [J]. J Neuro Physiol, 1994, 72: 360-365.
- [15] Corotto F S, Davi D R, Pipe R, et al. Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-gated currents in zebrafish olfactory receptor [J]. J Exp Biol, 1996, 199: 1115-1126.
- [16] Ichikawa A, Sugimoto Y, Negishi M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors [J]. J Lipid Mediat Cell Signal, 1996, 14: 83-87.
- [17] Busby E R, Cooper G A, Mommsen T P. Novel role for prostaglandin E-2 in fish hepatocytes-regulation of glucose metabolism [J]. J Endocrinol, 2002, 174: 137-146.
- [18] Cha Y I, Kim S, Sepich D, et al. Cyclooxygenase-1-derived PGE<sub>2</sub> promotes cell motility via the G-protein-coupled EP<sub>4</sub> receptor during vertebrate gastrulation [J]. Gene Dev, 2006, 20: 77-86.

## Separation and electrophysiology of ciliated olfactory receptor neurons in *Bostrychus sinensis*

LAI Xiaojian<sup>1</sup>, HONG Wanshu<sup>2</sup>, YANG Wei<sup>2</sup>

1. College of Fishery, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** The ciliated olfactory receptor neurons (cORNs) in the olfactory sac were dissociated from *Bostrichthys sinensis* by enzymatic and mechanical methods. The whole-cell patch-clamp technique was used to determine the resting potential, action potential and voltage-gated ion channel current. The results showed that the *B. sinensis* cORN was a bipolar neuron, containing cell body, axon and dendrites with olfactory knobs and cilia. The resting and action potential peaks of ciliated olfactory receptor neurons were  $(-57 \pm 6.37)$  mV and  $(38.30 \pm 0.95)$  mV, respectively. In response to depolarizing voltage steps pulse stimulation from  $-60 \sim +80$  mV, the transient inward current was activated between  $-60$  mV and  $-40$  mV, and reached a peak averaging  $(-69.08 \pm 44.15)$  pA at  $-20$  to  $0$  mV; the outward current reached a peak averaging  $(267.55 \pm 73.67)$  pA at  $+40$  mV. The present study provides a base theory for research in the electrophysiological mechanisms of sex pheromones with their receptors and the application of sex pheromones.

**Key words:** *Bostrichthys sinensis*; olfactory receptor neurons; patch clamp; electrophysiology

**Corresponding author:** HONG Wanshu. E-mail: wshong@xmu.edu.cn