

NMT 快速应用指南

许越^{1,2,3,4,*}, 杲红建^{1,4}, 刘蕴琦^{1,3,4}, 叶斌^{1,2,4,*}, 巨肖宇^{1,4}

¹ 旭月（北京）科技有限公司，北京，中国 10080；² 旭月生物功能研究院，北京，中国，100080；³ 中关村旭月非损伤微测技术产业联盟，北京，中国，100080；⁴ 国际 NMT 联盟，19 Research Drive, Suite 6 Amherst, MA 01002, USA

生命即环境

“没有适宜环境，就没有生命！生命的本质在于与环境相互作用”

--- 许越，NMT 发明人

前言

“百年未有之大变局”正在深刻影响着人类发展的方方面面，在生命科学领域：

• 理念创新

与“天人合一”的东方哲学相契合的，从与环境相互作用的视角重新认识生命的创新理念，正引导着中国生命科学研究走向复兴和崛起。

• 历史机遇

尽管西方“零一文化”使其主导的生命科学研究在肆虐全球的新冠疫情面前尽显疲态，但其积累的异常丰富的各领域，特别是近些年各组学的丰硕成果，为人类提供了大量的生物体与其环境相互作用的科研线索。

• 技术支撑

NMT 技术通过检测跨膜离子分子转运，经过几十年大量科研人员科研实践，证明它是揭示生物体与环境相互作用机制的一种直接而高效的研究手段。

那么，如何将 NMT 快速地应用到自身的科研呢？

收稿日期：2023-07-02

* 通讯作者 E-mail: jeffxu@youngerusa.com, jeff@xuyue.net, yebin@xuyue.net

doi:10.5281/zenodo.10258481

指南介绍

图 1. 《NMT 快速应用指南》是在总结多年众多科研人员以及 NMT 技术工程师成功应用 NMT, 几百篇已发表的高水平文献中综合整理而来。

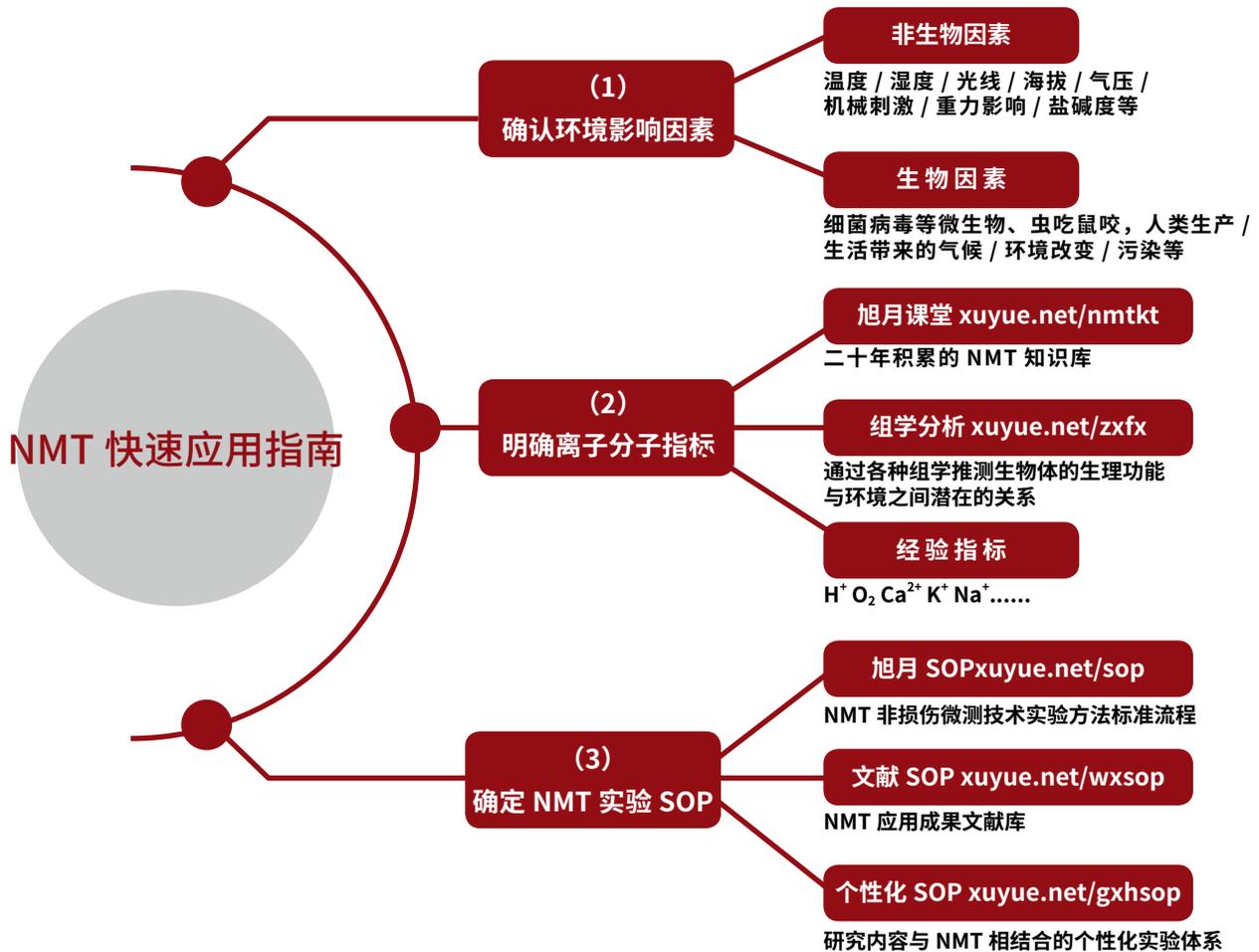


图 1. 《NMT 快速应用指南》图解

从图中可以看出, NMT 的快速应用主要包括三个步骤:

(1) 确认您的科研方向 / 内容 / 材料 / 目的等方面之中与环境影响密切相关的因素, 比如特定的基因 / 蛋白 / 代谢产物等等, 在生物因素和非生物因素影响下有着预期的相应变化。非生物因素包括温度 / 湿度 / 光线 / 海拔 / 气压 / 机械刺激 / 重力影响 / 盐碱度等等, 生物因素包含细菌病毒等微生物、虫吃鼠咬, 以及人类生产 / 生活带来的气候 / 环境改变 / 污染等等;

(2) 明确哪些离子分子的跨膜转运 / 浓度变化与您研究相关的基因表达 / 蛋白生成 / 代谢产物变化直接 / 间接关联。一方面, 国际 NMT 先驱旭月公司为您精心汇总了近二十年来, 在为全国科学家服务 NMT 过程中积累的, 适合各层级 / 阶段科研人员学习 / 领悟的《旭月 NMT 课堂》, 另一方面, 您可以通过现在各种丰富而功能强大的各种组学分析软件工具, 帮助您建立您的研究内容与环境离

子分子变化直接的关系。最后，如果您在探索一个空白领域，那么您可以直接从 $H^+/O_2/Ca^{2+}$ 等几个经验指标入手，大概率一定会有新的发现和斩获；

(3) 落实具体 NMT 实验的标准化操作步骤，既可以直接引用，经过国际 NMT 联盟认可的《旭月 SOP 汇编》中的推荐 SOP，也可以参考前人已发表文献中的方法学，最后，还可以求助中关村 NMT 联盟的专家工程师，如果您的实验需要个性化的实验体系设计。

指南内容

1 旭月 NMT 课堂 - 入门知识

非损伤微测技术 (NMT) 作为生命科学领域的关键核心技术，已帮助中国科研学者在包括 Cell、Nature、Science 等在内的各类学术期刊上发表各类文献超过 1200 篇，但由于 NMT 目前依然属于普及度不高的新技术，初次接触 NMT 的研究人员，需要花费较高的时间成本来收集 NMT 相关资料，以了解并学习 NMT 的使用。

为了能够让研究者们更系统、高效地学习 NMT，我们汇总了国内 NMT 领军企业旭月公司及超过 1000 位的中国科研学者和工程技术人员，在近二十年的时间里总结出的应用经验和体系视频资源，我们将把内容分为入门、初级、中级、高级分享给科研学者们。

1.1 非损伤微测技术 (NMT) 介绍



1.2 NMT 技术检测过程



1.3 NMT 技术应用报告

1.3.1 植物逆境

活体跨膜转运技术应用报告	
NMT 在非生物逆境、极性生长、器官发育等方向的应用	

1.3.4 植物免疫

NMT 在植物免疫上的应用	
内生吸水链霉菌 OsiSh-2 介导水稻生长与抗病平衡作用研究	

1.3.2 盐碱胁迫

NMT 在盐胁迫上的应用	
磷脂酸通过调控 SOS2 维持盐胁迫下拟南芥 Na ⁺ K ⁺ 平衡的新机制	

1.3.5 养分元素

NMT 在养分元素研究上的应用讲座	
NMT 在养分元素、病害及非生物盐胁迫上的应用	

1.3.3 重金属胁迫

NMT 在重金属领域的应用	
根表吸 Cd 与根茎内部 Cd 转运速率检测的差异	

1.4 NMT 技术文献汇总

NMT 文献资源汇总	
------------	---

2 如何利用组学数据明确 NMT 检测指标

当今生命科学各类组学数据浩如烟海，NMT 检测指标也是多种多样，那么如何才能尽快锁定和自身科研关系密切的离子分子呢？

下面，让我们以 NMT 发明人，许越教授早期在美国 NASA 的一个 NMT 实验为例加以说明。

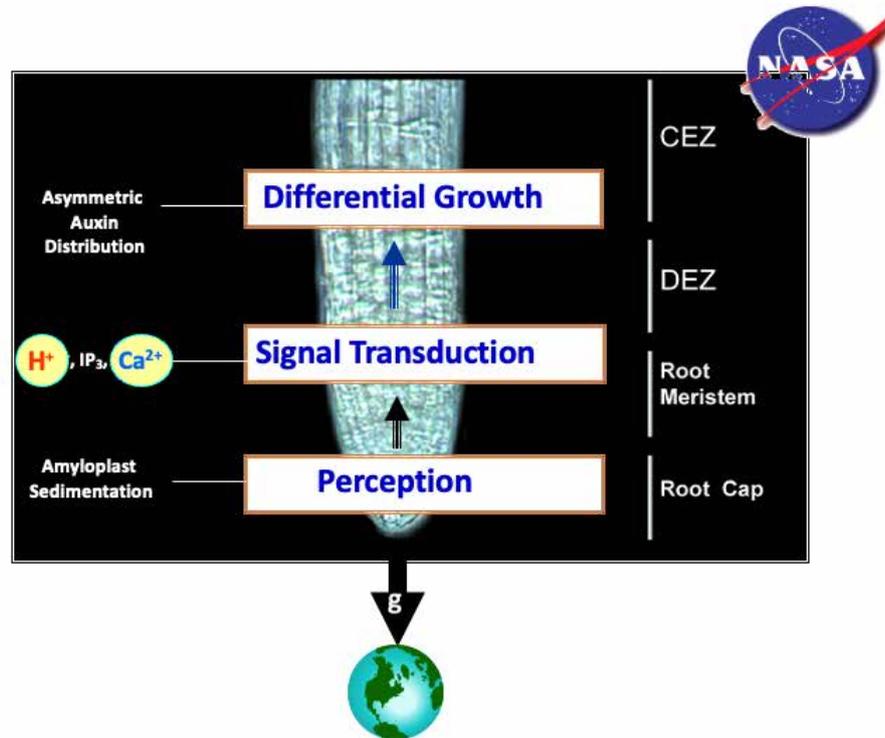


图 1. H^+ 和 Ca^{2+} 在植物根重力感受信号传导机制中均发挥作用。

这是当年 NASA 一个课题组面临的一个学术问题，当时国际上普遍认为参与植物根重力信号传导 / 感受的潜在信使离子 / 分子有 H^+ ， Ca^{2+} 和 IP_3 （见图 1.），而且大家更加看好的是 H^+ 和 Ca^{2+} ，因为，基因组学数据表明与 H^+/Ca^{2+} 跨膜转运的基因表达在重力变化过程中都有明显增加（图 2.）。

图 3. 是根据基因组学的数据提供的线索，成功检测到了 H^+/Ca^{2+} 两个离子在重力变化时，均做出了反应。直接证明了两者均参与了重力信号传导过程。



图 2. H⁺ 和 Ca²⁺ 跨膜转运相关基因在植物根重力变化影响下表达均有变化。

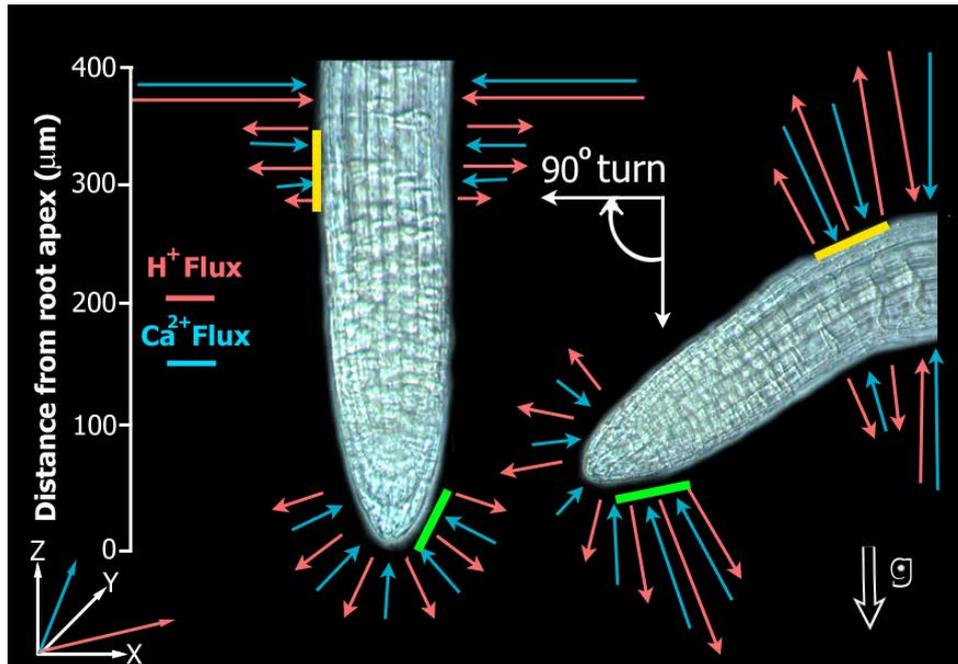


图 3. H⁺ 和 Ca²⁺ 流速在植物根重力变化影响下，在信号传导区域均表现出了不同的大小变化。根是培养了 72 小时的哥伦比亚野生型拟南芥。

3 NMT 技术检测指标如何确定

如果您目前是处于初步了解 NMT 技术的状态，不知道您的研究应该检测哪些指标，可以参考表 1 中的内容。

检测指标	植物相关生理功能
H ⁺	作为质子泵，控制细胞内环境 pH； 同时产生电化学梯度，促进离子及分子的运输 泌 H ⁺ 酸化细胞壁，促进细胞伸长生长 控制胞内 pH 变化打破种子休眠 参与根、根毛和花粉管的极性形成 酵母生长的限速因子
Ca ²⁺	细胞延伸 调节膜的渗透性 Ca ²⁺ 昼夜波动模型 Ca ²⁺ 通道激活调控损伤反应 Ca ²⁺ 振荡激活损伤基因 抵御胁迫 避免出现免疫反应 与 NH ₄ ⁺ 、H ⁺ 、Na ⁺ 等拮抗 低 Ca 引起植物生理病害 活化酶反应 信号传导
K ⁺	参与植物的氮代谢及脂肪代谢以及蛋白质合成，活化多种酶 促进糖的合成与转运 参与渗透调节、中和阴离子的负电荷，增进根系吸水 控制细胞膜的极化 促进光合作用及同化产物的运输 增强植物抗逆性（干旱、霜冻、水淹、病虫害、倒伏）、提高作物产量、改善作物品质 K ⁺ 通道：Shaker 家族、KCO(TPK) 通道 K ⁺ 转运体：KUP/HAK/KT、HKT 等
Na ⁺	增加原生质胶体的亲水性和溶胶作用 维持活力、增强抗性
Cl ⁻	促进 K ⁺ 、NH ₄ ⁺ 的吸收 调节细胞渗透压、平衡阳离子 活化光合作用相关酶类，促进水裂解、释放氧气 促进细胞分裂
NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻	氮素吸收转运、代谢 参与酶的构成，影响酶活性 影响光合作用（叶绿素含量、光合速率、暗反应、光呼吸） 影响其他元素的吸收，如 K ⁺ 、Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 、Cl ⁻ 等 与植物的呼吸过程相关 影响植物形态、产量等

检测指标	植物相关生理功能
Mg ²⁺	影响光合作用，叶绿素的组成成分、酶的活化剂 与糖代谢、氮代谢相关 影响核酸和蛋白质代谢 参与脂肪代谢、促进维生素合成
Cd ²⁺ Pb ²⁺ Cu ²⁺	重金属
O ₂	参与植物呼吸过程 光合作用产生氧气
H ₂ O ₂	诱导植物产生系统获得抗性、高度敏感抗性和热抗性 引起细胞衰老，诱导程序性死亡 参与 ABA 调控的气孔关闭 参与根的向地性、生长和不定根形成 细胞壁发育的信号分子 参与柱头和花粉粒的发育与相互作用 参与信号转导 调控基因表达
IAA	促进细胞伸长和细胞分化 刺激形成层细胞分裂，抑制根细胞生长、促进木质部、韧皮部细胞分化、调节愈伤组织形态建成

表 1. 各指标对应植物生理功能

4 确定 NMT 实验 SOP

非损伤微测技术(NMT)实验标准操作流程(SOP)针对不同的研究方向,提供了包括植物盐胁迫、重金属胁迫、植物营养、生殖发育、保卫细胞、质子泵和钙信号等具体 SOP 内容;还包括植物、动物、微生物、材料科学等文献支持的 SOP 内容;还包括基于特别样品,特别处理的个性化 SOP 内容,帮助 NMT 使用者高效建立实验方法,提高科研人员的实验效率,推动植物生理研究的进展。

4.1 《旭月 SOP 汇编》

盐胁迫实验 SOP:	
根 / 叶肉排 Na ⁺ 速率 /Na-H 逆向转运体活性 根 / 叶肉排 K ⁺ 速率 根 / 叶肉排 H ⁺ 速率 /H ⁺ -ATPase 活性 跨膜 Ca ²⁺ 吸收信号	

重金属胁迫实验 SOP	
根吸收重金属速率 根排 H ⁺ 速率 / H ⁺ -ATPase 活性	
养分元素实验 SOP	
根吸收铵硝速率 根排 H ⁺ 速率 / H ⁺ -ATPase 活性	
生殖发育实验 SOP	
花粉管 NMT 实验	
保卫细胞实验 SOP	
气孔打开过程离子 / 分子跨膜转运速率 气孔关闭过程离子 / 分子跨膜转运速率 保卫细胞离子 / 分子跨膜转运速率	
质子泵实验 SOP	
根排 H ⁺ 速率 / H ⁺ -ATPase 活性	
钙信号实验 SOP	
根 / 叶 Ca ²⁺ 转运速率	

4.2 文献 SOP

文献专辑

NMT 已有的文献包含的方向很多，针对研究较多的内容进行了专辑的汇总（见表 2），为科研人员更为方便的查询了解。

类别	专辑内容		
植物	重金属胁迫	盐碱胁迫	养分元素
	植物病虫害	温度胁迫	水旱胁迫
	生殖生长发育	植物 - 微生物互作	保卫细胞
	生物医学	毒理	斑马鱼
动物 / 医学	神经	骨骼	水生生物
	微生物 / 生物膜	藻类	人工生物材料
微生物 / 藻 / 材料	钙信号	质子泵	活性氧
指标	植物激素		

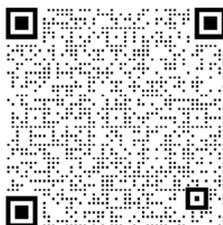
表 2. 文献专辑汇总表



扫码查看详细文献汇总专辑

综合文献

综合表格汇总了 NMT 国内外已发表的文献，对于精准筛选、查找文献提供高效方法。



扫码查看详细文献内容

4.2 个性化 SOP

每个个性化的实验都等于一次科研机遇，研究不同的样品，不同的处理方法，不同的检测位点，不同的测试环境，都可能在科研领域引领前行。



扫描申请个性化 SOP

举例说明

1.1. 新冠与老年痴呆（AD）研究

由于新冠病毒变异极快，基于分子生物学的疫苗，严格意义上已不能称其为‘疫苗’，而且其安全性仍备受人们本能的质疑。

而人类对于该病毒显得束手无策，主要原因之一是对其与环境之间的相互作用机制知之甚少！比如，我们知道此次新冠已不再受非生物环境因素 - 温度变化的制约，以往‘夏季自消’的规律已不复存在，但我们不知道为什么？

Ca^{2+} 是我们能够检索到的，为数极为有限的已发表文献，发现新冠病毒会引发 Ca^{2+} 异常活动。但是，与细胞抵抗机制相关的 H_2O_2 呢？与细胞能量代谢相关的 H^+ 和 O_2 呢？

而最为有效的群体免疫，实质上是新冠病毒与环境中生物因素，其它人体微生物群落之间，即：生物因素之间相互作用的结果。但我们对它们之间的相互作用机制，知之甚少！

有理由相信，当这些问题借助 NMT 技术有了一些进展之后，我们就一定能够有希望找出战胜新冠病毒的办法。

阿尔兹海默症（AD）则幸运地通过应用 NMT，已经初步确定 $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ 两个离子的活性比例可以代表 AD 的发展程度！而其成功很大程度上是基于过去多年研究所提供的，离子环境与 AD 之间相互作用的深度研究。

1.2. 植物抗逆研究

植物与动物最大的不同点之一，就是它们无法主动躲避外界环境所有非 / 生物因素的影响，因此抗逆研究对于深刻理解植物抗逆机制，特别是对于提高农作物的抗逆性能，实现稳产高产，具有重要的现实意义。

NMT 植物抗逆研究应用，是我国科学家应用 NMT 研究最为成功、获得国际领先成果最多的领域之一，业已积累了大量的教程 / 教材和数量众多并相当成熟的 SOPs 可以拿来就用！并且已有相应的《NMT 通讯》专刊出版，请大家参阅。

展望

人类对生命本质的认知，从细胞，到蛋白质，再到 DNA，从来没有停下过不断探索的热情和追求的脚步。

“没有适宜环境，就没有生命！生命的本质在于与环境相互作用”

这是基于中国‘天人合一’文化，重视环境对生命存在意义一种必然体现。也从文化环境的角度解释了“为什么 NMT 会在中国诞生、发芽、生根并茁壮成长！”

因此，我们有理由相信，利用《NMT 快速应用指南》这一面向所有生命科学及生物医学科研人员的，快速、可操作性、纲领性实操文件，大家将一定充满信心地将符合中国文化的 NMT 技术成功地应用于生命科学研究的各个领域，并为中华民族伟大复兴贡献自己的科技力量！

参考文献

- [1] 许越. 非损伤微测技术 —2022[J].NMT 通讯 ,2023(01):3-9.DOI:10.5281/zenodo.8227586.
- [2]Chen G, Xuan W, Zhao P, et al. OsTUB1 confers salt insensitivity by interacting with Kinesin13A to stabilize microtubules and ion transporters in rice [J]. *New Phytol.* 2022 Sep;235(5):1836-1852.
- [3].Li L, Mao D, Sun L, et al. CF1 reduces grain-Cd levels in rice (*Oryza sativa*). *Plant J.* 2022 Mar 16.
- [4].Liu B, Feng C, Fang X, et al. The anion channel SLAH3 interacts with potassium channels to regulate nitrogen-potassium homeostasis and the membrane potential in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2023 Jan 19:koad014
- [5]Meng JG, Liang L, Jia PF, et al. Integration of ovular signals and exocytosis of a Ca²⁺ channel by MLOs in pollen tube guidance. *Nat Plants.* 2020 Feb;6(2):143-153. doi: 10.1038/s41477-020-0599-1.
- [6] Pei D, Hua D, Deng J, et al. Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 by BAK1 is required for ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2022 Apr 11:koac106.
- [7] Fu L, Wu D, Zhang X, et al. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase HVP10 enhances salt tolerance via promoting Na⁺ translocation into root vacuoles. *Plant Physiol.* 2022 Feb 4;188(2):1248-1263. doi: 10.1093/plphys/kiab538.