

非损伤高级研修班学习心得及个人经验总结

张满仓*

河南大学作物逆境适应与改良国家重点实验室, 475000

摘要: 非损伤微测是电生理研究的一项重要技术, 可通过无损的方式获取样品的实时生理生态信息, 对于研究生命活动规律及环境影响具有重要的生物学意义。本人在学习非损伤技术后进行了许多相关实验, 检测了多种样品, 有一些自己的经验和理解, 恰逢旭月公司举办了非损伤微测技术应用高级研修班, 邀请了多位名师讲解非损伤技术的应用。因此本文简单介绍了非损伤微测技术及其在中国的发展, 在研修班当中的学习心得以及自己在非损伤实验中的个人经验。

关键词: 非损伤, 电生理, 植物逆境

一、非损伤微测技术简介及在中国发展历程

非损伤微测技术 (Non-invasive Microtest Technology, NMT) 于 1974 年由美国伍兹霍尔海洋生物学实验室的神经科学家 Lionel F. Jaffe 提出, 非损伤微测技术是由扫描离子选择性传感器技术 (SIET)、微传感器离子流技术 (MIFE)、自参比极谱传感器技术 (SERP)、扫描极谱传感器技术 (SPET) 扫描振动传感器技术 (SVET)、自参比离子选择性传感器技术 (SERIS) 等技术共同组成的。它是一种研究活体材料生理功能的技术, 可在不损伤样品的前提下检测分子 / 离子进出生物活体的流速 (流动速率和方向), 单位是 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 称为流速 (Flux)。是一种超高灵敏度的非接触方式。因其活体检测、非损伤性、高分辨率和动态实时等特点, 常用于探索其它技术难以

测得的生理特征, 是目前生理功能研究的最佳工具之一, 并已广泛运用于医学、植物学、动物学、微生物学、农业科学、药理学、环境科学等领域。同时, NMT 还是动态分离离子组学 (imOmics) 的技术基础。在历经多年的发展后, 现已成为一项成熟的实验体系。在国际顶尖杂志《Science》、《Nature》、《PNAS》、《Plant Cell》、《Environmental Science & Technology》等发表了大量相关科研成果。非损伤微测技术的活体、动态和实时的测量方式, 以及高分辨率和高灵敏度, 帮助人类进行生理功能领域的研究, 并在多个学科中均有应用。

NMT 技术在中国已有多年发展, 自 2001 年许越先生在美国萨诸塞洲创立美国杨格公司起, NMT 开始步入商业化阶段。

收稿日期: 2022-12-04

* 通讯作者: 龙雨 E-mail: ly11385@hotmail.com

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

2005年旭月(北京)科技有限公司在北京中关村成立,由中科院植物所匡廷云院士、中科院生物物理所杨福愉院士、北京大学林克椿教授组成学术专家顾问组,并与美国扬格公司成为战略合作伙伴,NMT正式进入中国。2014年,“第二届非损伤微测技术研讨会”在北京召开,成立“NMT国际标准化委员会”。2015年,旭月(北京)生物功能研究院在北京成立。2015年,由旭月(北京)生物功能研究院成立了“中关村非损伤微测技术产业联盟”。联盟致力于NMT的产业化发展,目前已有二十多家科研院校及企业加盟。

二、研修班学习心得

研修班多位老师分享了自己NMT相关的实验研究,令我受益匪浅,以下分享我自己的学习心得:

卓仁英教授主要讲授了伴矿景天镉富集关键基因筛选与功能分析。实验使用酵母转化体系筛选了48个与重金属镉耐受相关的基因。预测这些基因可能参与MAPKs介导的信号转导、钙离子信号、活性氧信号和激素信号。其中的SaHsfA4ch基因可以提高酵母菌株 $\Delta ycf1$ 的镉离子耐受性。使用非损伤微测检测到过表达SaHsfA4ch与对照相比,镉离子内流增大,促进了植物对镉离子的吸收,增强拟南芥镉离子耐受性,提高了活性氧清除酶的活性。SaHsfA4ch基因主要在维管组织、花和茎中表达,且在镉胁迫下有显著诱导。之后找到SaHsfA4ch基因调控的三个下游基因:SpPDR12、SpPCS2和

SpHsfA4c。通过EMSA和LUC活性检测发现SaHsfA4ch可结合在SpAPX2基因启动子的HSE元件上。SaHsfA4ch基因显著提高了转基因东南景天的镉耐受性。卓教授的研究找到了景天当中的镉离子耐受基因,研究了其主要功能作用,并结合实际运用到了重金属防治,是一项十分有意义的工作。

孙健教授主要讲解了碳点调控甘薯抗逆性的分子机制。碳点具有促进电子传递、光合作用和ROS清除的能力。实验利用丹参粉合成的碳点可以诱导甘薯根细胞膜超极化和不依赖于ROS的钙离子内流,并且在拟南芥、烟草、水稻等多种作物中有相同的效果。研究发现碳点诱导钙离子内流是通过表面的羟基和羧基官能基团。碳点引起根细胞钾离子和铵离子内流增加证明碳点激活了超极化的非选择阳离子通道,推测为环化核苷酸通道。然后检测到碳点有提高甘薯根细胞cAMP和cGMP含量。之后在拟南芥中发现CNGC2/4/19/20介导碳点诱导的拟南芥根细胞钙离子内流和细胞质钙离子增加。碳点诱导拟南芥钙离子内流依赖于凝集素受体激酶LORE和LERCK-1.8。将碳点施加在水培幼苗可以增强盐胁迫下甘薯根细胞钙离子和钠离子外流。碳点提高盐胁迫下拟南芥根钠离子外流依赖于CNGC2。碳点可以抑制钠离子吸收并降低根成熟区细胞和整株水平钠离子积累。碳点提高根钙离子信号相关基因表达和甘薯营养胁迫耐受性。孙老师研究了纳米材料在甘薯抗逆中的作用,纳米技术作为新兴技术具有很好的发展前景,研究中使用NMT检测了甘薯在施加碳点后的离子流速,获得了直观清晰的实验数据,可以很好地反

应处理效果。研究内容比较深入，找到了碳点的官能基团和作用通道，对甘薯抗逆研究具有重要作用。

张金林教授主要研究 NMT 在禾本科牧草耐盐机制研究和耐盐种质筛选中的应用。研究发现四翅滨藜茎和叶表面密布的盐囊泡对抗盐和抗旱性有重要作用。选取多种植物检测其土壤中钠钾离子比例，发现大面积碱茅钠钾比最高。通过比较碱茅与小麦，发现小麦钠离子含量显著高于碱茅，而钾离子含量显著低于碱茅。这说明碱茅大量吸收了钾离子，而减少了钠离子的吸收。使用洗液实验测定了叶片表面分泌盐分的量，发现泌盐不是碱茅耐盐性的主要原因。之后使用同位素标记法发现碱茅根系钠离子内流速率低于小麦。在钾离子饥饿，高浓度钠离子情况下钠离子外排，氢离子外排降低。表明钠氢反向转运蛋白消耗了更多的氢。接着研究了钠离子转运相关基因，发现在钾饥饿情况下，AKT1 基因表达量较高，参与了高亲和性钾离子的吸收；在高盐和钾饥饿的情况下，HKT1:4 和 HKT1:5 在木质部薄壁细胞中表达，通过共质体途径排出钠离子。张老师研究了耐盐植物碱茅的耐盐机理并寻找到钠离子转运的相关基因，研究了它们在钠离子转运中的功能，植物耐盐性作为植物逆境生存的重要功能具有重要的研究意义，可以有效改善植物在高盐碱地难以存活状况。

三、非损伤个人经验及实验方案设置

我在使用非损伤系统进行实验过程逐渐领略到了这项技术的便捷，可以快速测定样

品的离子流速，同时也有一些个人经验如下：

1. 溶液配置需要精准。测试液，校准液，灌充液在实验过程中都具有非常重要的作用，而测试液和校准液的离子浓度都很低，因此需要先配置母液，母液可配置 50 ml，称量粉末大于 0.1 g，这样会比较精准，在稀释时可 1 次稀释 10 倍或 100 倍，如果一次稀释倍数过高也会造成离子浓度不准。测试液的配置参考 NISC 测试液标准，可适当调整其中的离子浓度，但应满足一些必要条件：测试液中要含有待测离子；测试液离子浓度不能过高或过低，否则会影响检测的灵敏度；测试液需要维持一定的 PH 值以维持样品的稳定性（细胞样品还需要调节渗透压）；高浓度校准液和低浓度校准液只有待测离子浓度不同，其余均与测试液一致，待测离子浓度差 10 倍为宜；调节 PH 值时不能使用含有待测离子的溶液调节，可使用 Tris 和 MES。

2. 非损伤可检测的样品种类众多，植物样品使用水培，土培，培养基培养均可进行检测，但最适宜的是水培，这样表面干净，使用土培和培养基培养时最好使用细毛笔轻轻在检测部位刷一刷，将表面的杂质去掉，然后在平衡液中浸泡后进行测试。

3. 流速传感器的制作。首先取 1 支传感器，注入 1cm 的灌充液，位置不要离尖端太远，否则不容易将灌充液挤压到开口处。然后将传感器连接到三通阀上，推动注射器使灌充液上升到尖端并流出 1 滴，用嘴对着传感器轻轻吹掉流出的液滴。用 LIX holder 蘸取 LIX 后固定在显微操作台，慢慢推动压力调节装置使 LIX holder 形成 1 个凸面并

调整焦距使画面清晰，然后慢慢调整传感器位置使传感器尖端插入 LIX holder 凸液面使 LIX 流入传感器，轻轻推动三通阀往返几次之后将 LIX 液柱调整到合适长度，将流速传感器与 LIX 液面分离。

4. 流速传感器调整时要手动自动结合。测试时流速传感器尖端要浸入液面，不能只浸入一点，会影响检测效果，同时也不能浸入液面过深，有可能碰到培养皿的底部导致尖端碰破。因此在调整传感器位置时最好先将传感器放下至液面或接近液面，然后旋转 Z 轴旋钮使传感器慢慢下降，待尖端浸入液面后再适当调整 X 轴和 Y 轴使传感器尖端处于画面正中间。最后打开自动开关，使用自动调整使尖端清晰显像，观察尖端是否完整没有破碎。在校准时可按照高浓度校准液、低浓度校准液、测试液的顺序进行校准，每次校准都需要稳定后才能更换下一个校准液。

5. 校准液校准出错的一些原因：（1）3 个溶液检测值都很低，没有什么差别，这可能是机器没有开机，检查开关按钮是否打开；（2）3 个溶液检测值都很高，远高于正常值，这可能是电路没有闭合，检测参比电极是否放入液面；（3）3 个溶液检测值在合理范围内且 3 个浓度存在梯度差异，但是斜率不对，这可能是校准液配置有问题，可以先将高浓度校准液稀释 10 倍进行检测，若可以校准，说明用母液稀释时不准确，若不可以校准，说明存在其他问题，如在检测钠离子时加入了过多的钾离子影响了检测。

实验方案的设计是 NMT 测试的重要一环，以下是我自己曾做过的一些实验方案：

1. 植物在盐胁迫下钾离子的流动。钾离子是植物生长必须的大量元素，在植物营养、膨压调节和渗透平衡等方面都有着重要作用。高盐碱环境会形成高渗透压，使植物失水，影响植物的正常生长。检测样品使用拟南芥，取生长 7 天，长势相似的植株，放入 100 mM NaCl 溶液中处理 24 小时，对照使用不含 NaCl 的溶液。将处理好的材料放入测试液浸泡 30 min，然后更换新的测试液，并用滤纸条和树脂块将样品固定。流速传感器检测根尖的钾离子流速。

2. 植物根在低温处理下钙离子流速的变化。钙是植物信号传递的第二信使，在信号转导和植物生长发育调节中都有重要作用。水稻受到低温冷害会影响正常发育，导致减产，因此研究水稻在低温下钙离子传输的变化对与低温刺激的研究具有重要意义。实验时先将水稻样品放入测试液平衡 30 min，平衡好后更换新的测试液检测 5 min，待数据稳定后，在外侧培养皿加入碎冰创造低温条件，检测低温处理时钙离子的流动。

3. 重金属处理后植物根部的吸收情况。镉元素是一种毒性很强的重金属元素，属于 1 类致癌物，如果植物体内积累一定浓度的镉元素，就会影响植物的生长和发育。镉胁迫通常起到低浓度下刺激植物幼苗生长，高浓度下抑制幼苗生长的效果。使用拟南芥为研究材料放入含有 0.05 mM 镉的测试液中平衡 30 min。更换新的测试液，固定样品，检测根部镉离子流速。

非损伤微测技术历经多年发展，已成为电生理实验中的一种重要方法，有着其它实验不可替代的优点，非损伤微测技术的应用

大大促进了离子分子流速信号的研究进展。对于旭月公司筹办研修班，推广非损伤微测技术的社会责任感感到由衷的钦佩，也十分荣幸参与到本次研修班的学习中，让我学习到了许多 NMT 相关知识。希望非损伤技术今后可以推广到更多科研机构，服务于科研工作当中。

参考文献

1. 许越 (2022), 植物生理及生态 NMT 实验指南, 中关村 NMT 产业联盟.
2. 许越, NMT101 问, 中关村 NMT 产业联盟.
3. Wang J, Cai C, Geng P, Tan F, Yang Q, Wang R, Shen W(2022). A New Discovery of Argon Functioning in Plants: Regulation of Salinity Tolerance. *Antioxidants*.
4. Li Y, Tang Z, Pan Z, Wang R, Wang X, Zhao P, Liu M, Zhu Y, Liu C, Wang W, Liang Q, Gao J, Yu Y, Li Z, Lei B, Sun J(2022). Calcium-Mobilizing Properties of *Salvia miltiorrhiza*-Derived Carbon Dots Confer Enhanced Environmental Adaptability in Plants. *ACS Nano*.
5. Fu L, Wu D, Zhang X, Xu Y, Kuang L, Cai S, Zhang G, Shen Q(2015). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase HVP10 enhances salt tolerance via promoting Na⁺ translocation into root vacuoles. *Plant Physiol*.
6. Ma Y(2015). COLD1 Confers Chilling Tolerance in Rice. *Cell*.
7. Wang J , Ren Y , Liu X(2020). Transcriptional Activation and Phosphorylation of OsCNGC9 Confer Enhanced Chilling Tolerance in Rice[J]. *Molecular Plant*.
8. Yan Yan, Sun Mintao, Ma Si, Feng Qian, Wang Yijia, Di Qinghua, Zhou Mengdi, He Chaoxing, Li Yansu, Gao Lihong, Yu Xianchang(2022), Mechanism of CsGPA1 in regulating cold tolerance of cucumber, *Horticulture Research*.
9. Li L, Mao D, Sun L, Wang R, Tan L, Zhu Y, Huang H, Peng C, Zhao Y, Wang J, Huang D, Chen C(2022). CF1 reduces grain-Cd levels in rice (*Oryza sativa*). *Plant J*.
10. Niu M, Bao C, Zhan J, Yue X, Zou J, Su N, Cui J(2021). Plasma membrane localized protein BcHIPP16 promotes the uptake of copper and cadmium in planta. *Ecotoxicol Environ Saf*.
11. Xue Wu, Nana Su, Xiaomeng Yue, Bo Fang, Jianwen Zou, Yahua Chen, Zhenguo Shen and Jin Cui(2020), IRT1 and ZIP2 were involved in exogenous hydrogen-rich water-reduced cadmium accumulation in *Brassicachinensis* and *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Hazardous Materials*.
12. He JL(2015). Overexpression of bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase mediates changes in cadmium influx, allocation and detoxification in poplar. *New phytologist*.

(责任编辑: 李雪霏)