

非损伤微测高研班学习引发的思考

胡雪菲

东北农业大学, 666303

摘要: 非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology: NMT) 是测量活体材料外部离子流速的重要技术, 对植物生命科学有着重大意义。自非损伤微测技术引入我国, 我国的科学家们已广泛的进行应用, 已取得了大量的科研成果。许卫峰教授在非损伤微测技术的帮助下, 获得了节水、节碳的水稻株系; 张金林教授将其深入应用在耐盐草种的选择上; 非损伤微测技术在种业也有一定的价值。结合实践经验以及所学知识, 本实验室将计划利用非损伤微测技术, 验证 LcOSCA1.5 基因对碱胁迫下转基因水稻气孔的影响以及该基因对渗透胁迫的感知。文章最后提出实验过程中所遇到的问题。

关键词: 非损伤微测技术 钙离子 OSCA 碱胁迫

一、非损伤微测技术简介及发展历程

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology: NMT) 是一种超高灵敏度, 非接触方式、以流速为单位, 检测材料外部离子分子浓度及其梯度的技术。目前可测离子分子有: H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、IAA、 O_2 、 H_2O_2 、膜电势。主要应用于生命科学和材料科学两个领域。具有活体检测、实时 / 长时间检测、无需任何荧光或放射性标记、1 维, 2 维, 3 维测量、精准可控材料外部微环境、不受材料大小尺寸的限制、揭示离子分子运动的大小和方向、多离子多分子自由组合同时检测、人工智能与高通量自动化检测等诸多优势, 对科研领域有着重大意义。

以植物生命科学为例, 离子和分子稳

态是所有生命的共同基本特征之一, 且是一种动态平衡。离子和分子流动状态高度反映了植物在各种环境下的生命状态。非损伤微测技术则通过检测这些跨膜运动离子分子形成的浓度梯度, 揭示活体材料的离子分子稳态这一生命基本特征, 及其相关的生理功能与机制。有助于发现不同条件对离子分子稳态的影响、阐明与各项生理机制及功能之间的关系、发掘生理水平生物标志物的有效手段、揭示与外界环境进行物质和信息交换的过程、是连接各组学的生理功能的桥梁。

非损伤微测技术 (NMT) 自从 1974 年美国海洋生物学实验室 (MBL, Marine Biological Laboratory) 的神经科学家 Lionel F. Jaffe 提出原初概念, 到 1990 年成功应用于

收稿日期: 2022-12-05
编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

测定细胞的 Ca^{2+} 流速，已经解决了众多科学问题。今天，非损伤微测技术在生命科学、环境科学、材料科学等领域广泛应用，在国际顶尖杂志《Science》（封面）、《Nature》、《PNAS》、《Plant Cell》、《Environmental Science & Technology》等发表了大量科研成果。2011年，美国扬格公司推出了在中国组装的非损伤微测系统，推动了非损伤微测技术在中国的普及。我国中科院大学、中国农业大学等诸多科研院所已安装投入使用该仪器多年，非损伤微测技术，已成为不可或缺的植物生理分析仪器。

二、非损伤微测技术植物生命领域应用实例

非损伤微测技术基于活体离子分子流速检测手段，有效突破了植物生命领域多个研究方面的技术瓶颈。植物领域科研工作者们利用非损伤微测技术验证转运体基因功能、探究盐碱胁迫下钠钾离子稳态、解读生物与非生物胁迫下植物的钙信号传导、监测重金属抗性与富集转基因植物的重金属流速变化等等。中关村 NMT 产业联盟的高级工程师以及非损伤微测技术应用的科研前辈在实验设计以及技术应用方面给予了我们许多启示。

福建农林大学的许卫峰教授，以第一作者与通讯作者 Nature Communications、Plant Physiology、Plant Cell and Environment、New Phytologist、Trends in Plant Science、ISME、Cell Reporter、Science Advances 等高影响学术文章 50 余篇，利用非损伤微测

技术鉴定了 AHA 基因功能，进一步研究了其与向水性与根鞘形成的关系，获得了可节水、减少甲烷排放水稻株系，为我国农业和生态环境做了巨大贡献。

兰州大学的张金林教授，在 Plant and Soil、Journal of Plant Physiology、Functional Plant Biology、Journal of Plant Nutrition and Soil Science、Crop and Pasture Science、Biological Trace Element Research、Acta Physiologiae Plantarum、Journal of Rangeland Science、Sarhad Journal of Agriculture、Journal of the Chemical Society of Pakistan 等期刊发表论文 170 篇，为我们讲述了盐胁迫钠离子毒害、钾离子亏缺等对植物的危害，讲述了如何借助非损伤微测技术筛选保钾排钠的优质耐盐草种，一定程度上揭示了牧草耐盐机理，为盐胁迫研究提供了新的思路。

种子是重要的农业生产的基本生资料，种子活力是种子重要的品质。选择生活力强的种子，有助于提高出苗率、抵御不良环境、提升竞争能力、增强作物产量、提高耐藏性。以往的红四氮唑 (TTC) 染色法、靛红染色法、碘化钾反应法，都会对种子有一定程度的损伤。马跃工程师向我们介绍了如何用非损伤微测技术测定种子活力。实验结果表明高活力种子的 H^+ 外流平缓，变化幅度小，而低活力种子的 H^+ 外流剧烈，变化幅度大；高活力种子的 O_2 活性表现平缓，变化幅度小，而低活力种子的 O_2 活性表现剧烈，变化幅度大。因此 NMT 为活力的检测提供了新方法，也为生产实践、种质资源的保护、种子的检验检疫提供了新手段。

三、非损伤微测技术应用设想

随着对非损伤微测技术不断深入的了解，结合自己科研方向，我有一个初步的实验设想。

我们在苏打盐碱地的优势草种 -- 羊草中，筛选出了一系列特异耐碱基因，其中一个基因名为 *LcOSCA1.5*，为拟南芥 *AtOSCA1.5* 的同源基因，*AtOSCA1.5* 已报道为新型机械力敏感的钙离子通道。*OSCA* 家族蛋白可感受环境渗透压的改变，打开通道，使得钙离子迅速进入胞质。钙离子作为第二信使，对植物的生长发育以及外界信号响应具有重要调控作用。当植物受到生物与非生物胁迫伤害时，细胞内钙离子浓度迅速增加，诱发钙信号，完成膜外信号传递进膜内的过程 [1]。这些钙信号由细胞内钙离子感受器解码，继而引起细胞内各级复杂的防御调控机制，从而减少胁迫所带来的伤害。我们为了探究 *LcOSCA1.5* 基因功能，将该基因转入到模式植物水稻中，通过野生型和过表达水稻的比较，进行进一步的实验。

参照 *AtOSCA* 基因家族的研究成果，该基因家族在盐胁迫下所感受的是机械压力而非钠离子；*AtOSCA1.3* 基因通过影响保卫细胞钾、钙离子流动，影响保卫细胞开合，从而影响突变体拟南芥的光合作用。我们做了以下猜想，*LcOSCA1.5* 在羊草碱胁迫应答中，是不是受到的也只是机械渗透压力，这种压力与外界渗透压强度有怎样的关系，过表达 *LcOSCA1.5* 会不会通过影响转基因水稻气孔运动，提高水稻的光合能力。所以我们将研究以下几个实验内容：首先探究同渗透压

强度的甘露醇、山梨醇、NaCl、NaHCO₃ 处理的野生型与转基因水稻钙离子流速的变化程度，分析该基因对这四种处理的响应异同，解析 *LcOSCA1.5* 是否只与渗透压强度相关；接着采用不同渗透压强度的甘露醇处理野生型与转基因水稻钙离子流速变化，探究该基因与渗透压强度的关系；再比较转基因和野生型水稻保卫细胞钙离子、钾离子流速，分析该基因对保卫细胞开闭的影响。从而解析 *LcOSCA1.5* 的功能以及作用特点。为我们研究碱胁迫下的信号转导过程及应答提供了一个新的思路。

四、实验过程中的问题

目前我参与过三次杨树抗重金属基因验证的非损伤微测实验、参与过两次拟南芥耐碱机理的非损伤微测实验、一次拟南芥 ABA 信号应答基因的非损伤微测实验、参与过团体标准《基于非损伤微测技术的拟南芥根毛细胞硝态氮和铵态氮吸收检测方法》的起草，但我的实验设计仍有待完善。由于我常认为分生区是植物根系最活跃的部位，每次实验，我都选择在根部分生区进行测量，幸运的是，每次都会有一定程度的差异。但就实验材料测量部位的选择上，我总有些疑惑。各物种、离子是否有一定的规范或规律性，确定测量部位是否有一定的试验规范步骤。

还有就是，通常实验需要，我可能会改变规定测试液的成分，我将如何确定更改的测试液是否符合测试标准。

最后，离体根系测量是否会影响实验结果，如果一定时间内不会受到影响，这个时间又该如何界定，每个根系的离体时间是否需要完全一致。

希望在我不断地实验，不断地学习，以及在非损伤微测技术产业联盟的帮助下，我可以更加规范的实验，更好地发挥非损伤微测技术功能。

参考文献：

1. 许越等，NMT 实验指南，2022 年 9 月。
2. Li J, et al. The fluxes of H₂O₂ and O₂ can be used to evaluate seed germination and vigor of *Caragana korshinskii*. *Planta*, 2014, 239(6): 1363-1373.
3. 包玲玲，张汉马，南文斌，钙信号与植物低温响应研究进展，*中国农学通报*，2016,32(13):103-109。
4. Swetha E Murthy et al. OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *Structural Biology and Molecular Biophysics* 2018;7:e41844.

（责任编辑：李雪霏）