

非损伤微测技术及其应用

李映

中国科学院华南植物园, 广州, 510650

摘要: 非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-teat Technique, NMT) 是一种超高灵敏度, 非接触方式、以流速为单位, 可用于实时测定活体外微环境中的离子或分子浓度及其梯度的技术。NMT 技术通过选择性微电极进行电信号的采集、图像的实时捕捉和电极的运动控制, 能够实现对活体样品离子或分子的三维运动分析, 被应用于基础生物学、植物生理学、基础医学、动物学、环境科学和微生物学等各大领域。基于 NMT 技术可用于活体检测的优势, 简要介绍了其在植物生理中的应用及工作量亮点, 并结合自身研究领域内容对 NMT 技术的应用前景进行了展望, 以期为日后的研究工作提供更多的研究思路和理论基础。

关键词: 非损伤微测技术, 离子浓度, Ca^{2+}

1. 非损伤微测技术及其原理

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-teat Technique, NMT) 由美国海洋生物学实验室神经科学家 Lionel F. Jaffe 发明, 并于 1990 年在测定细胞 Ca^{2+} 运动方向和流速的应用中获得成功后正式问世 (Li et al., 2021; 宋雪皎等, 2017), 是一种超高灵敏度, 非接触方式、以流速为单位, 可用于实时测定活体外微环境中的离子或分子浓度及其梯度的技术。该技术包括扫描离子选择性电极技术 (Scanning Ion-selective Electrode Technique, SIET)、微电极离子流技术 (Microelectrode ion flux estimation technique, MIFE) 等多种微电极技术 (宋雪皎等, 2017)。

NMT 集显微镜成像、信号放大及采集、屏蔽防震、马达驱动控制精密运动和视频转

换等设备于一体, 依托计算机软件对离子信号进行图像捕捉、数据处理和电极运动控制, 在不接触样品的情况下, 获得进出样品的各种分子 / 离子的浓度、流速及其三维运动方向的信息 (李静等, 2014)。NMT 技术的原理是通过选择性微电极和微传感器获取信号, 其中离子选择性微电极由玻璃微电极、Ag/AgCl 导线、电解质及液态离子交换剂 (Liquid Ion Exchanger, LIX) 组成。以已知中 dx 进行两点测量, 分别获得电压 V_1 和 V_2 。两点间的浓度差 dc 则可以从 V_1 和 V_2 及已知的该微电极的电压 / 浓度校正曲线计算获得。基于 Nernst 方程和 Fick's 第一扩散定律, D 表示离子的扩散常数, 代入公式 $J_0 = -D (dc/dx)$ 可计算离子的浓度和移动速度 (丁亚男和许越, 2007)。

收稿日期: 2022-12-09

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

选择性电极进行检测时,检测信号首先会被传输到前置放大器中,由信号处理器到达数据采集系统,通过计算机微测软件进行数据的记录、显示和处理,并可以显示和分析双通道及以上的数据;同时,光学显微镜和视频转换器可对待测样品和选择电极进行实时图像捕捉和监控;此外,运动控制器与位移传递架上的驱动器连接,可实现对选择电极的运动控制(宋雪皎等,2017)。

NMT 可检测的样品可以是细胞器、植物原生质体、单个或多个细胞、组织、器官甚至整个生物体, H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 O_2 、 H_2O_2 、IAA 等多种离子或分子均可被检测。与其他检测技术相比,具有独特的优势和实用性:(1) NMT 技术维持了待测样品的完整性和生理活性。在与样品实际生理条件相似的液体环境中进行一维、二维或三维运动检测,对活体内部的生理活动未造成任何干扰和破坏。

(2) NMT 技术具有较高的时空分辨率和灵敏度,其对离子和分子的空间分辨率分别可达 $0.5 \mu m$ 和 $2 \mu m$ 等(2017),能检测到的离子流速可达到 $10^{-12} mol \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ 。(3) NMT 技术可实时或长时间检测样品内离子或分子的动态运动过程,通过计算机软件的数据采集、实时图像捕捉和监控,可进一步分析离子/分子的浓度梯度,进而揭示离子或分子运动的方向。

近年来,NMT 技术的应用逐渐得到推广,其在基础生物学、植物生理学、神经生物学、基础医学、病理学、动物学、环境科学和微生物学等诸多领域的实验中取得了大量的科研成果和突破;国内各大学者基于

已有的研究结果总结了 NMT 技术在环境科学(季丹丹等,2015)、生物医学(丁亚男和许越,2007)、植物生理生态(贾代东等,2017)、植物抗逆生理(李静等,2014)等方面的应用,为开展离子动态平衡、揭示生物内部分子机制等研究提供研究思路 and 理论参考。

2.NMT 技术的应用及其工作亮点

得益于其高灵敏度和动态实时的监测功能,在各种植物中 NMT 技术的应用获得了较多突破性的研究成果,本文从植物抵抗冷害胁迫、调控气孔运动等方面简述部分学者具有代表性的研究成果。

2.1 NMT 技术验证植物保卫细胞 Ca^{2+} 内流和 K^+ 外排介导气孔关闭

植物褪黑素具有促进植物生长、生根诱导、促进种子萌发、优化光合效率、调节内部生物钟和成熟衰老过程等功能(Arno and Hernández-Ruiz, 2015),也可以作为内源性生物刺激物对抗非生物或生物应激源(Arno and Hernández-Ruiz, 2014; Arno and Hernández-Ruiz, 2018; Yanping et al, 2018)。 H_2O_2 和 Ca^{2+} 是植物生长发育、环境响应和气孔孔径的重要信号分子(Julia et al., 2003), H_2O_2 的产生由细胞膜定位的 NADPH 氧化酶介导(Kwak June M et al., 2003; Moshe and Robert, 2006), 激活 Ca^{2+} 通道并增强 Ca^{2+} 内流,导致内向钾电流失活,促进气孔关闭(Pei Z M et al., 2000; Yizhou

et al, 2013)。受 G 蛋白 α 亚基激活的 H_2O_2 参与了乙烯和油菜素内酯诱导的拟南芥气孔关闭。Zhang 等人 (Jian et al., 2018) 利用扫描离子选择性微电极技术, 测量拟南芥保卫细胞中的 K^+ 和 Ca^{2+} 通量, 揭示了褪黑素能刺激 Ca^{2+} 内流和增加 K^+ 外流, 并验证了 CAND2 是一种 G 蛋白偶联受体, 通过 $G\alpha$ 介导的 Ca^{2+} 信号感知促进气孔关闭及 K^+ 流出的植物褪黑素信号。褪黑素与 CAND2 受体结合, 从而激活 NADPH 氧化酶依赖的 H_2O_2 生产, 增强 Ca^{2+} 内流并促进 K^+ 外排 (Jian et al., 2018)。

同样的, 中国农科院王耀生团队利用 NMT 技术原位检测大麦叶片保卫细胞内 K^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 的流速, 对比了野生型 WT 和聚乙二醇 (PEG) 处理中三种离子的流速差异。结果显示 PEG 处理后的大麦叶片 ABA 浓度和 Ca^{2+} 浓度显著增加。该研究验证了干旱胁迫下, 叶片 ABA 浓度的增加与 K^+ 外排速率和 Ca^{2+} 内流速率的增加以及气孔导度的降低相一致 (Li et al, 2021), 为 ABA 介导保卫细胞离子转运从而调控大麦气孔运动提供了新的研究思路。

该研究利用 NMT 技术验证了受体蛋白或激素介导保卫细胞离子内流和外排的机制, 进而调控叶片气孔关闭, 不仅可以保持待测样品具有完整的细胞形状, 还能观察气孔开关的动态变化, 为日后研究气孔开关调控机制提供了新的思路和方法。

2.2 COLD1 激活 Ca^{2+} 通道和 GTP 酶活性赋予水稻耐寒性

植物细胞对温度差异的适应依赖于特定的分子细胞途径, 包括 Ca^{2+} 介导的信号转导。水稻 COLD1 (CHILLING TOLERANCE DIVERGENCE 1) 编码定位于质膜和内质网的 G 蛋白信号调节因子。它与 G 蛋白 α 亚基相互作用, 激活 Ca^{2+} 通道以感受低温并加速 G 蛋白 GTPase 活性。中国科学院植物研究所种康院士团队利用扫描离子选择电极技术, 检测水稻根系对冷凉刺激反应的 Ca^{2+} 通量, 进一步揭示 COLD1 介导了寒冷引起的 Ca^{2+} 内流和 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化 (Ma et al., 2015)。

NMT 技术的设备通过光学显微镜与计算机核心软件, 将活体生物中微小的离子和分子运动转换成可视化的形式, 一方面, 待测样品无需经过研磨冷冻等灭活处理, 也不需要染色或放射性同位素的附着, 保持了正常的生理活性, 为实验研究节省了大量的时间和成本; 另一方面, 能够对样品进行三维的长时间监测是普通实验技术所实现不了的。听取和阅读了各大学者将 NMT 技术应用于自己的研究课题之后, 让我看到了 NMT 技术在诸多研究领域特别是离子和分子动态变化方面有着很大的应用价值和发展前景。尽管这项技术在国外已经得到广泛应用并获得了较多的实验成果, 但在国内该技术仍属于创新技术, 可作为文章锦上添花的一部分, 因此仍需积极推广以及完善实验技术体系。

3. 对 NMT 技术应用于个人实验研究中的未来设想

经过直播课程及文献的学习, 结合自

己所研究的专业领域，对日后冷害胁迫下荔枝果皮褐变的实验设计了以下研究思路及设想。

果皮水分散失、病原菌侵染、果实自然衰老褐变等都是水果采后褐变的诱因，其褐变的机制主要是细胞中发生了酶促氧化反应。在衰老和逆境条件下，细胞膜的流动性和透过性发生改变，细胞区格化丧失，导致多酚氧化酶核过氧化物酶与酚类底物接触，将其氧化成醌，后者再进一步脱水缩合，最后形成黑褐色物质，导致果皮褐变（蒋跃明等，2002）。低温会导致氧化还原失衡而产生过量的活性氧（ROS），它能氧化不同细胞成分，导致膜脂质过氧化、蛋白质氧化和核酸受损（田世平，2013）。褪黑素本身作为一种强大的自由基清除剂，能够通过直接中和有毒 ROS 保护细胞免受氧化损伤（Arnao and Hernández-Ruiz, 2018; Tan et.al, 2015）。ATPase 活性的变化直接影响着细胞的能量代谢和质膜的功能，而 Ca^{2+} -ATPase 可以把细胞质内过多的 Ca^{2+} 转运到细胞外或细胞器内贮藏起来，以维持细胞内 Ca^{2+} 稳态，进而保持细胞膜的完整性，延缓果实衰老（Tran et.al, 2014）。

基于上述理论基础，本实验通过预实验观察不同浓度褪黑素处理荔枝并贮藏于 4°C 低温中，确定最佳褪黑素处理浓度。将各处理和对照组荔枝置于 4°C 冷库中，并记录 0d、2d、4d 和 6d 的呼吸强度、褐变指数等生理指标，分别取适量果皮样品，用于 NMT 设备检测细胞内外 Ca^{2+} 和 H^{+} 浓度等。另取适量果皮样品用液氮研磨成粉末，贮藏于 -80°C 冰箱，用于后续开展生理实验。利

用生物信息学的方法，筛选拟南芥和荔枝基因组中褪黑素受体的同源基因，结合分子生物学实验，对所选基因进行克隆和验证是否调控细胞膜 Ca^{2+} 浓度和 H^{+} 浓度变化，以调控果皮褐变。

NMT 技术在果蔬采后生理中的应有在国内鲜有报道，如何对果皮进行取样观察并保持荔枝果皮不被二次氧化是本实验中的难点之一，对 LIX 浓度的筛选和试验也是一大挑战，尽管如此，我们仍希望对此进行尝试，以期探索出对果皮细胞膜离子检测的完整的实验体系，并应用于后续更多的实验材料的检测中。

4. 未来展望与建议

NMT 技术是一种实时、动态、高灵敏度的综合性电生理技术，随着其自身硬件设施的完善、测量样品种类的增加、测量技术的成熟，它对现有的电生理技术（如膜片钳技术）做出了重要补充，是鉴定或验证某些生物膜运输系统功能的有力工具，未来发展潜力和应用范围都将会继续扩大。

尽管如此，NMT 技术仍有需要改进的不足之处：首先，LIX 与各种样品及离子 / 分子的适配度不够高，在实际应用中仍需自己配制 LIX 或进行优化；抑或是如何保证样品在 LIX 中保持原有的生理状态，如上述所提及的如何防止荔枝果皮在 LIX 中不被二次氧化。其次，自动化程度有待提高，在测量时仍需手动调整以接近样品，这样容易损害传感器；此外，电极的拉制手法过于精细，电极的好坏对接触样品后的封接效果有较大

的影响,但期间需要花费的时间较长。

NMT 技术在活体生理功能的研究中能够发挥巨大的作用,希望日后相关的配套设施能够进一步的更新和推广,加强与其他先进检测技术的综合应用,突出 NMT 的比较优势,助力现代生命科学科研平台的建设;加强系统平台和技术人员梯队建设,优化技术程序,突破“卡脖子技术”,拓展 NMT 技术的应用领域,推动各个学科的发展,取得更具创新性、研究性和突破性的研究成果。

参考文献:

- Arnao, M. B. and Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Science*, 19(12)
- Arnao M B, Hernández-Ruiz J. (2018). Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of botany*, 121(2)
- Arnao Marino B, Hernández-Ruiz Josefa (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of pineal research*, 59(2)
- Wei Jian, Li Dong-Xu, Zhang Jia-Rong, Shan Chi, Rengel Zed, Song Zhong-Bang, Chen Qi. (2018). Phytomelatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of pineal research*, 65(2)
- Foreman Julia, Demidchik Vadim, Bothwell John H F, Mylona Panagiota, Miedema Henk, Torres Miguel Angel, Linstead Paul, Costa Silvia, Brownlee Colin, Jones Jonathan D G, Davies Julia M, Dolan Liam. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930)
- Li Li, Xing Jiayi, Ma Haiyang, Liu Fulai, Wang Yaosheng. (2021). In situ determination of guard cell ion flux underpins the mechanism of ABA-mediated stomatal closure in barley plants exposed to PEG-induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*(prepublish)
- Li Lanxin, Verstraeten Inge, Roosjen Mark, Takahashi Koji, Rodriguez Lesia, Merrin Jack, Chen Jian, Shabala Lana, Smet Wouter, Ren Hong, Vanneste Steffen, Shabala Sergey, De Rybel Bert, Weijers Dolf, Kinoshita Toshinori, Gray William M., Friml Jiří (2021). Cell surface and intracellular auxin signalling for H⁺ fluxes in root growth. *Nature*, 599(7884), 273-277.
- Kwak June M, Mori Izumi C, Pei Zhen-Ming, Leonhardt Nathalie, Torres Miguel Angel, Dangel Jeffery L, Bloom Rachel E, Bodde Sara, Jones Jonathan D G, Schroeder Julian. (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 22(11)
- Pei Z M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen G J, Grill E, Schroeder J I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797)
- Ma Yun, Dai Xiaoyan, Xu Yunyuan, Luo Wei, Zheng Xiaoming, Zeng Dali, Pan Yajun, Xiao

- Jun, Chong Kang (2015). COLD1 Confers Chilling Tolerance in Rice. *Cell*, 160(6)
- Moshe, S., Robert, F. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141(2)
- Tan DunXian, Lucien C. Manchester, Eduardo Esteban-Zubero, Zhou Zhou, Russel J. Reiter. (2015). Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*, 20(10)
- Quang-Kim Tran, Michelle Burgard, Mark VerMeer, Jennifer Giles. (2014). The G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Regulates Endothelial Ca²⁺ efflux via the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. (LB568). *The FASEB Journal*, 28
- Wang Yanping, Reiter Russel J, Chan Zhulong (2018). Phytomelatonin: a universal abiotic stress regulator. *Journal of experimental botany*, 69(5)
- Wang Yizhou, Chen Zhong-Hua, Zhang Ben, Hills Adrian, Blatt Michael R.(2013). PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors regulate K⁺ and Cl⁻ channels through reactive oxygen species-mediated activation of Ca²⁺ channels at the plasma membrane of intact Arabidopsis guard cells. *Plant physiology*, 163(2)
- 丁亚男, 许越. (2007). 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. *物理* (07), 548-558
- 季丹丹, 魏树, 王嗣淇. (2015). 非损伤微测技术及其在环境科学领域的应用. *生态学杂志*, 34(10), 2951-2955
- 贾代东, 刘爱琴, 李惠通, 于洋洋, 魏志超, 王俊男, 周丽丽. (2017). 非损伤微测技术在植物生理生态学研究中的应用进展. *应用与环境生物学报*, 23(01), 175-182
- 蒋跃明, 傅家瑞, 徐礼根. (2002). 膜对采后园艺作物衰老的影响 (英文). *广西植物* (02), 160-166
- 李静, 韩庆庆, 段丽婕, 王沛, 李惠茹, 王锁民, 张金林. (2014). 非损伤微测技术在植物生理学研究中的应用及进展. *植物生理学报*, 50(10), 1445-1452
- 宋雪皎, 李岩, 张春庆. (2017). 非损伤微测技术及其应用. *分析仪器* (02), 78-83
- 田世平. (2013). 果实成熟和衰老的分子调控机制. *植物学报*, 48(05), 481-488

(责任编辑: 李雪霏)