

# 非损伤微测技术高级研修班培训收获

王瑶

中国农业大学，北京 100193

**摘要：**本次研修班是在植物领域使用非损伤微测技术的学术交流与经验分享活动。对非损伤微测技术的适用范围以及价值有着清晰而全面的讲述。内容涉及了植物逆境、植物生长发育、植物营养以及非损伤微测技术的具体应用等多个方面。本篇论文首先总结了非损伤微测技术在植物领域的应用概况，包括盐碱胁迫、重金属研究和养分元素研究。其次是非损伤微测技术在新兴的植物纳米生物学中的应用，主要是在纳米抗逆方面对于早期胁迫响应的瞬时、持续的检测。最后是在其在植物逆境上的一些具体应用，包括不同胁迫下应用的植物种类、检测指标以及检测目的。随后对自己课题中与非损伤微测技术应用相关的内容进行了实验方案设计。

**关键词：**非损伤微测技术，逆境胁迫，纳米材料，钙信号

## 1. 非损伤微测技术简介

### 1.1 定义

非损伤微测技术 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。

### 1.2 在植物学中的应用

1. 植物抗盐等逆境研究
2. 蛋白功能研究
3. 植物发育调控
4. 光合 / 呼吸作用研究
5. 植物营养研究
6. 植物与微生物相互作用
7. 植物发育调节机制研究
8. 重金属污染与治理研究

### 1.3 发展历程

2001 年，许越先生在美国马萨诸塞州创立美国扬格公司（Younger USA LLC），标志着现代 NMT 商业化的开端。2002-2005 年，美国扬格公司携非损伤微测技术，以其优越的技术性能，服务于美国航空航天局的专业研究培训中心（NASA Specialized Center of Research and Training, NSCORT），参与植物重力研究项目。2005 年，旭月（北京）科技有限公司在北京中关村正式成立，并成为美国扬格公司的战略合作伙伴，正式宣布

收稿日期：2023-03-22  
编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

将中国纳入世界 NMT 商业化版图。时至今日，中国已当之无愧地成为 NMT 商业化最为成功的地域。

在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的战略指导下，旭月（北京）科技有限公司（下称“旭月公司”）于 2005 年在北京中关村科技园成立，标志着 NMT 正式进入中国，并邀请 Lionel F.Jaffe 担任公司非损伤微测技术顾问。2007 年，美国扬格（旭月北京）非损伤技术中心成立，NMT 正式地服务于中国的科研人员。

旭月公司成立后，在与美国扬格公司的共同努力下，顺利完成了非损伤微测技术及系统的商业化，并且建立了完善的售后服务体系。随后，为了降低设备价格，双方又联手推出了在中国组装的非损伤微测系统，继续不遗余力的推动非损伤微测技术在中国的应用和普及。

2011 年非损伤微测技术及生物传感器国际研讨会在北京召开。2014 年第二届非损伤微测技术研讨会在北京召开，大会宣布“NMT 国际标准化委员会”的成立。2015 年旭月（北京）生物功能研究院在京成立，专注于 NMT 技术创新、科研应用、民生应用。同年，由旭月牵头的“中关村 NMT 非损伤微测技术产业联盟”成立，致力于 NMT 的产业化发展，目前已有数十家科研院校及企业加盟。十年间，经过对 NMT 的引进、消化、吸收、再创新，旭月公司获批的直接和相关技术专利已超过 20 项，形成了完善的知识产权保护体系，为非损伤微测技术在中国的未来发展奠定了法律基础。此外，旭月公司

自成立以来，由美国扬格公司授权在大陆地区进行技术服务、推广达 10 年之久。目前，已为系统上报及采购客户配备个性化 VIP 顾问组服务，在售前、售中、售后的不同阶段，从学术、技术、商务三方面提供“三对一”式的全程服务。

## 2 培训内容与感想

### 2.1 NMT 在植物科学领域的应用概况

非损伤微测技术在植物学领域的以下三个方向有着最广泛的应用。主要包括：1. 盐碱胁迫中 SOS1、NHX1 活性指数，耐盐保钾指数， $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度，GORK 耐盐贡献指数， $\text{Ca}^{2+}$  信号转导。2. 重金属研究中 Cd/Cu/Pb 的吸收、转运、分布， $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  爆发， $\text{H}^+/\text{O}_2$  调节根际 pH、氧化电位。3. 养分元素研究中氮钾养分吸收，铵硝钾代谢突变株的验证，铵根 / 硝酸根 / 钾内稳态，铵硝酸盐胁迫。此外还有一些常见的应用领域，包括温度胁迫下对  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  信号的检测；植物免疫也是近年来非损伤微测技术应用的一个大方向，例如气孔免疫、免疫原受体及免疫信号、根际免疫和质外体免疫等。

### 2.2 NMT 在植物纳米生物学中的应用

随着科技的进步，植物纳米生物技术发展迅猛，可以利用纳米材料进行基因的传递、沉默。基于纳米材料的杀虫剂、生长调节剂、肥料等都运用到了农业生产中。本次主要的总结的内容是江苏师范大学孙健教授关于纳米材料调控甘薯抗逆性的相关研究。生物质衍生的碳点（CDs）是一种典型的零维的碳

基纳米材料，具有荧光特性，用于叶片中可促进光合电子传递链的效率、促进光反应的效率，从而使植物的光合作用提升；通过清除活性氧提高植物的抗逆性。植物抗逆的过程与钙信号息息相关，植物钙信号的形成依赖于质外体活性氧的爆发，植物遭受逆境胁迫之后，植物活性氧爆发来激活质膜的钙通道，从而形成 ROS-Ca<sup>2+</sup> hub 来放大钙信号。由于 CDs 具有活性氧清除能力，结合植物钙信号转导的特点，由此提出 CDs 如何在清除活性氧之后不影响 ROS-Ca<sup>2+</sup> hub 来提高植物抗逆性这个问题。首先 DCF 染色显示 CDs 处理显著降低了甘薯根中 ROS，从而证实了其在植物中强大的 ROS 清除活性，并利用 NMT 检测了 CDs 处理后甘薯根的钙信号变化，CDs 处理 30 min 后监测到一个显著的钙离子内流趋势，同时伴随着细胞膜的超极化，说明 CDs 诱导甘薯根细胞超极化和不依赖于 ROS 的 Ca<sup>2+</sup> 内流。NMT 这种可以进行长时间动态监测的特性，成就了这一发现。同样 CDs 也可以诱导多种植物的钙离子内流。之后对 CDs 的相关官能基团进行屏蔽，通过 NMT 检测钙离子内流变化，发现碳点表面羟基和羧基官能团是诱导 Ca<sup>2+</sup> 内流所必需的。进一步通过根系转基因技术结合遗传编码的 Ca<sup>2+</sup>senser 发现碳点引起甘薯根细胞质 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加。然后进一步探究了是哪一类通道接到了 CDs 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 吸收，通过对 K<sup>+</sup> 流速的测定，发现 CDs 激活的通道是超极化激活的非选择性阳离子通道，之后定位到环化核苷酸，用甘薯作为实验对象，用荧光编码的 senser 和 NMT 结合证明了 CDs 是通过促进 cGMP、cAMP 的升

高来诱导 Ca<sup>2+</sup> 内流，然后在拟南芥环化核苷酸相关突变体上进行了 Ca<sup>2+</sup> 流速的测试 Ca<sup>2+</sup> 荧光成像实验，发现有些突变体 CDs 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 内流和 [Ca<sup>2+</sup>]cyt 的升高都发生了缺失，说明 CNGC2/4/19/20 介导碳点诱导的拟南芥根细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流和细胞质 Ca<sup>2+</sup> 增加。由于 CNGC 是介导 Ca<sup>2+</sup> 内流的重要通道，在植物响应病原的过程中被激活，是否是因为 CNGC 将直径很小的纳米材料错认为病原激活了 CNGC，所以进一步研究了拟南芥凝集素受体激酶 lore 和 lecrk-I.8 突变体，发现 lore 和 lecrk-I.8 突变体中 CDs 诱导的 Ca<sup>2+</sup> 内流速率和 [Ca<sup>2+</sup>]cyt 显著降低，由此说明 CDs 诱导拟南芥 Ca<sup>2+</sup> 内流依赖于凝集素受体激酶 LORE 和 LERCK-I.8。接下来进一步去探究 CDs 是否能够通过增强钙信号来提高甘薯的抗逆性，结果显示 CDs 水培施用增强盐胁迫下甘薯根伸长区细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号和 Na<sup>+</sup> 外流，抑制 Na<sup>+</sup> 吸收并降低根成熟区细胞和整株水平 Na<sup>+</sup> 积累。随后又观察了低钾和低铁早期响应过程中 Ca<sup>2+</sup> 的浓度和流速的变化，发现 CDs 增强低钾和低铁胁迫下甘薯根细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号 (Li Y et al., 2022)。

### 2.3 NMT 在植物逆境中的应用

植物逆境主要包括盐碱胁迫、水旱胁迫、低温高温胁迫、重金属胁迫。其中盐胁迫和重金属胁迫较为广泛的使用 NMT 技术，样品涉及多种植物。

盐胁迫条件下，主要检测指标有 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 H<sup>+</sup>，也可以检测 Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。检测部位主要是根，也

可以检测叶、茎、愈伤组织、下胚轴和胚芽鞘。盐胁迫实验设计：测  $\text{Na}^+$  外排时，在高浓度  $\text{NaCl}$  处理 24 h 后，置于 0.5 mM  $\text{NaCl}$  溶液中浸泡 20 min 后，立即检测根部伸长区  $\text{Na}^+$  外排速率；测  $\text{K}^+$  吸收时，在高浓度  $\text{NaCl}$  处理 24 h 后，直接在高浓度  $\text{NaCl}$  测试液中，检测根伸长区  $\text{K}^+$  外排速率。

重金属胁迫下，主要检测指标有  $\text{Cd}^{2+}$ ，也可以检测  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{O}_2$ 。

低温胁迫下，检测指标主要有  $\text{Ca}^{2+}$ ，也可以检测  $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ 。检测部位主要是根。

高温胁迫下，检测指标主要有  $\text{Ca}^{2+}$ ，也可以检测  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。检测部位主要是根、叶和胚芽鞘。

干旱胁迫下，检测指标主要有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{H}^+$ ，也可以检测  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$  和 IAA。检测部位主要是根、保卫细胞、叶肉细胞、胚芽鞘和转化细胞。

水淹胁迫下，检测指标有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{H}^+$ ，检测部位主要是根和胚芽鞘。

碱胁迫下，检测指标有  $\text{H}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ 。检测部位主要是根、种子和叶肉细胞。

生物胁迫下，检测指标有 IAA、 $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 。检测部位主要是根。

## 2.4 感想

非损伤微测技术是一项揭示生命语言的技术（杨明，2012），是实时、动态测定活体材料的技术，通过测定进出材料的离子和分子的流速反映生命活动的规律，是生理功

能研究的最佳工具之一。非损伤微测技术可以探知传统电极技术无法检测到的信息，是研究活体生命功能必不可少的技术之一。在植物的抗逆、生长发育和一些生理生化功能上有着难以替代的应用。对于早期的、瞬时的逆境响应检测有着重要的应用。未来基于非损伤微测技术的研究也将越来越多。可以预见，非损伤微测技术将对科技发展和社会进步起到越来越重要的作用，逐步成为大家在实验过程中常用的手段之一。

## 3 应用与实验设计

### 纳米颗粒对棉花耐旱性的影响

#### 一、实验目的

观察施用纳米材料后干旱胁迫对棉花钙离子信号的变化。

#### 二、材料用具及仪器药品

检测样品：棉花

检测仪器：非损伤微测系统（科研平台）

使用耗材：NMT 专用固体  $\text{Ca}^{2+}$  流速传感器

所需药品：0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.01 mM  $\text{CaCl}_2$ 、

0.05 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 6.0

干旱处理装置用具：培养皿、滤纸、样品固定专用树脂块、15% PEG 测试液

#### 三、原理

钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 作为第二信使在植物响应不同逆境胁迫中起重要作用。当植物细胞受到干旱胁迫刺激后，胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度迅速增加，引发  $\text{Ca}^{2+}$  信号。胞质内的  $\text{Ca}^{2+}$  水平变化经  $\text{Ca}^{2+}$  传感器进行信号传递和级联放

大。CBLs 与  $\text{Ca}^{2+}$  结合发生构象变化后，与 CBL 互作蛋白激酶 CIPK 结合 (Saito, 2020; Tang et al., 2020)，形成 CBL/CIPK 复合体来调控多种非生物胁迫 (Kim, 2013)。

#### 四、方法步骤

- 1、将棉花样品取出，固定在培养皿中，加入正常测试液后平衡 30min。
- 2、将平衡好的棉花样品更换至含有 15% PEG 的测试液后，放入 NMT 系统中检测根部分生区的  $\text{Ca}^{2+}$  流速，检测 15 min。
- 3、比较用纳米颗粒处理后的样品钙离子流速的变化。

#### 五、实验报告

根据实验结果，解释干旱胁迫后纳米颗粒处理之后棉花根部的生理情况。

#### 六、预期结果

纳米颗粒处理后的棉花幼苗根部，干旱胁迫下钙离子内流增大。

#### 参考文献

- Li Y, Tang Z, Pan Z, et al. Calcium-Mobilizing Properties of Salvia miltiorrhiza-Derived Carbon Dots Confer Enhanced Environmental Adaptability in Plants[J]. ACS nano, 2022, 16(3): 4357-4370.
- 杨明. 非损伤微测技术——揭示生命的语言 [J]. 生命世界, 2012(12):1.
- Saito S, Uozumi N. Calcium-regulated phosphorylation systems controlling uptake and balance of plant nutrients[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 44.
- Tang RJ, Wang C, Li K, et al. The CBL–CIPK calcium signaling network: Unified paradigm from 20 years of discoveries[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(6): 604-617.
- Kim KN. Stress responses mediated by the CBL calcium sensors in plants[J]. Plant biotechnology reports, 2013, 7(1): 1-8.
- 许越. 非损伤微测技术—2022[J].NMT 通讯, 2022(01):11-17.

#### 注释

- i “非损伤微测技术”，英文名称为 “Non-invasive Micro-test Technology”，简称 “NMT”
- ii “SOS1”， $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白
- iii “NHX1”， $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运蛋白
- iv “GORK”，外向整流型钾离子通道
- v “CDs”，生物质衍生的碳点
- vi “活性氧”，英文名称为 “reactive oxygen species”，简称 “ROS”
- vii H2DCFDA 是活性氧 (ROS) 的细胞渗透性指示剂，本身无荧光，但在细胞内，可在 ROS 存在下被酯酶氧化去除其醋酸基团，生成具有荧光活性的 DCF
- viii “CNGC”，环状核苷酸化离子通道
- ix “CBLs”，英文名称为 “Calcineurin B-like proteins”，一种钙离子感受器