

NMT 非损伤微测技术

谭定权

重庆传媒职业学院 重庆铜梁 402560

摘要：通过非损伤微测技术研修班的培训以及前期研究生阶段涉及到 NMT 实验，初步掌握 NMT 的基本概念，NMT 技术在生物领域中的应用以及 NMT 在中国的发展历程。NMT 在中国科研教育的应用，在深化、拓展科研领域 NMT 应用的同时，也正加速 NMT 向高等教育领域稳步推进。培训期间通过听取不同专家的授课内容，对以后如何将 NMT 应用到自己的科研、学习以及工作中都有很大的启发，也知道 NMT 对于我们科研工作者的的重要性，利用好 NMT 非损伤微测技术我们可以很大程度上提升论文质量，同时在一些科学研究中可以为我们的提供不一样的思路。

关键词：非损伤，电生理，植物逆境

非损伤微测技术（Non-invasive Microtest Technology, NMT）及其命名，是前美国航空航天局高级研究院、美国扬格公司和北京旭月公司创始人许越教授，在匡廷云院士、杨福愉院士、林克椿教授的启发和帮助下，以美国科学家 Lionel F.Jaffe 离子振荡电极技术为理论基础，经过 20 多年的不懈努力，经过模块化、自动化、专业化、智能化、标准化的技术创新，商品化、商业化、产业化、国产化、国际化的应用创新，以及‘活体功能组学’提出的理论创新，成功创建自主知识产权的 NMT 技术，并于 2021 年通过科技部‘世界领先’评审。探究不同植物响应外界环境的策略以及植物体内部能量、物质的综合循环转运过程能够直观剖析植物在长期演化进程中的生理生化机制和生态学特性。而传统研究植物生理生态学过程需破

坏植物体后测定植株的各项生理生化指标，无法实时反映植物体在演化进程中各项生命活动指标的动态变化规律。NMT 以其特有的无损测量方式，检测离子 / 分子种类的多样化，成为研究不同参试植物样品结构与功能的重要途径。目前，国内外学者利用 NMT 在植物生理生态学领域内进行了大量研究，为有效开展植物活体 / 动态离子 / 分子组学研究夯实了理论基础。国内学者也有总结 NMT 在环境科学、植物抗逆生理、植

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

物根系生长发育研究等方面的应用，但甚少综合论述 NMT 在植物生理生态研究领域内的应用。它是实时测定进出活体材料的离子和分子流速的新技术，在近年的科研中崭露头角，做出了世界前沿的工作，2011 年的《科学》以封面的形式刊登了使用非损伤微测技术研究细胞 Ca^{2+} 流速的文章。

1. 非损伤微测技术

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，能检测分子 / 离子进出生物活体的三维流速 ($\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 信息的技术。它通过测定进出材料的离子或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 [1]。1990 年，美国科学家 Kührtreiber 和 Jaffe 首次提出扫描微电极技术并成功测量出了 Ca^{2+} 进出细胞的流速，从而开创了由生物活体静态测量到动态测量转变的先河。可测样品种类繁多，小到细菌、单细胞、液泡，大到组织、器官、整体都可检测。研究人员基于 NMT 能够建立自己独有的 Me-Only 研究平台，从而获得极具创新的研究成果。基于 NMT 商业化的设备统称为非损伤微测系统。扬格 / 旭月的非损伤微测系统包含 BIO 系列、CONFLUX 系列 (共聚焦 / 荧光 NMT)、NMT100 系列、NMT200 系列、NMT100S 系列、NMT200S 系列、NMT150 系列、NMT 活体工作站系列、NMTPhysiolyzer[®] 系列等，已发展至第八代自动化智能产品。扬格 / 旭月的 NMT 系统

全部采用从美国扬格 (旭月北京) 研发中心自主研发的 imFluxes 智能操作软件，将十余年的 NMT 应用大数据与设备实现完美结合，并且在产品一体化、自动化、智能化、扩展升级等诸多方面都有大幅提升。

以非损伤微测技术测量细胞外的 Na^{+} 浓度梯度为例简述其基本的工作原理。 Na^{+} 微传感器通过前端灌充的液态离子交换剂 (Liquid Ion eXchanger, LIX) 实现 Na^{+} 的选择性检测 [2]。该微传感器尖端开口通常为 1-5 微米，在 Na^{+} 浓度梯度中以已知距离 dx 进行 0.3Hz 频率的两点往复测量，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 、 V_2 及已知的该微传感器的电压 / 浓度校正曲线 (基于 Nernst 方程) 计算获得。 D 是 Na^{+} 离子的扩散常数 (单位: $\text{cm}\cdot\text{sec}$)，将它们代入 Fick 第一扩散定律公式 $J=-D\cdot dc/dx$ ，可获得该离子的流动速率， $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，即：每秒钟通过每平方厘米的该离子分子的摩尔数。

2. NMT 在植物中的应用

2.1 非损伤技术在植物抗逆中的应用

植物遭遇逆境时会产生一系列的生理生化反应，从而表现出各种特有的响应和调节机制。细胞膜透性和功能的改变是植物对逆境条件最为直接和快速的响应，其次是在细胞器或细胞质中进行的同化、代谢等生理过程。因此，从逆境条件下植物与外界环境之间的界面反应着眼，探索界面上特征离子或关键离子的流动速度和方向变化，对研究植物的逆境生理具有极为重要的意义。因此

在植物抗逆生理过程中进行渗透调节会伴随着 H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Cl^- 、 Na^+ 、等离子 / 分子流入或流出植物液泡或细胞 [4]。非损伤微测技术的试验结果直接反映的是离子流速，从吸收或外排的离子动态变化角度可以体现植物细胞的渗透调节，表现出植物的抗逆能力。中国科学院遗传与发育研究所的于菲菲为了研究 VPS23A 是否影响植物细胞向质外体分泌 Na^+ 的过程这一问题，使用 NMT 检测了拟南芥根尖 Na^+ 的外排速率；杭州师范大学的李春阳采用非损伤微测技术 (NMT) 监测青杨根系 Cd^{2+} 的吸收流速。同时在此次培训中王耀生研究员讲授的干旱胁迫下 ABA 介导保卫细胞离子转运对大麦气孔运动的调控机制，罗志斌研究员讲述的林木修复重金属污染土壤的应用基础研究等都是基于逆境胁迫 (干旱、重金属等) 对植物的研究，在整个研究中结合 NMT 的研究方法来探讨其具体机制。

2.2 在植物营养调控研究中的应用

在复杂的生长发育过程中，植物需要从周围环境大量吸收 N、P 和 K 等营养元素，这些营养元素常常以 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 K^+ 等离子形式流入到根内，为保证植物正常吸收营养离子， Ca^{2+} 、 H^+ 等离子往往要流入或流出根部进行调节 [5]。NMT 是植物营养研究与检测的新系统，它可以研究作物营养吸收的机理和规律以及调控机理，寻找调节营养吸收的物质，能够采集植物生长过程中 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及 H^+ 等离子流的变化情况 [6]，绘制营养吸收曲线，筛选优良的作物品种，评价肥料的效果，指导合理施

肥，这是对植物营养吸收过程最直接反映，为评价作物的营养供应提供了非常可靠的证据。山东大学的夏光敏通过非损伤微测技术 (NMT) 对小麦根部净 NO_3^- 流速进行检测，结果表明施加外源 ABA 主要影响净硝酸盐内流，尤其是在根尖成熟区，但不影响硝酸盐外排；中国烟草总公司郑州烟草研究院的谢剑平利用非损伤微测技术 (NMT) 测定 CNPs 处理下净 K^+ 流速的情况，进一步了解促进 BY-2 细胞钾积累的机制。阮丽研究员关于茶树养分吸收与耐贫瘠早期鉴定技术研究以及许卫峰教授关于植物乡土水性与根鞘营养等报告，设计 NMT 在植物营养调控中的应用。

2.3 在植物抗盐碱研究中的应用

盐渍化会对植物造成各种各样不利的影 响，例如离子毒害、渗透胁迫、营养元素失衡等，最终抑制植物的生长从而严重制约农业生产。大量的研究表明，保持 K^+/Na^+ 平衡对于植物适应高盐环境至关重要 [7]。北京林业大学陈少良研究组使用 NMT 研究了抗盐的胡杨 (*Populus euphratica*) 和盐敏感的群众杨 (*P. popularis*) 根部和根原生质体在盐胁迫下的 Na^+ 、 H^+ 和 Cl^- 流的变化情况，发现胡杨抗盐的机制在于其根部质膜上具有高活性的 Na^+/H^+ 逆向蛋白和较强的离子转运能力；中国农业大学蒋才富为了进一步确定 ZmNSA1 是如何调节根 Na^+ 含量的，使用 NMT 测定了在 100 mM NaCl (pH8.0) 处理 24h 后的玉米幼苗根分生区 Na^+ 流速，观察到 ZmNSA1 UFMu 和 ZMNAS1 过表达植株的根 Na^+ 外排速率大于野生型植株，

而 ZMNAS1 过表达植株的根系 Na^+ 外排速率明显低于野生型植株。张金林教授讲述的 NMT 在禾本科牧草耐盐机制研究和耐盐种质筛选中的应用就是从盐胁迫这一块出发对植株进行研究，其中利用 NMT 技术对其具体机制的探讨值得我们去学习讨论借鉴。

3 实验设计

实验：不同黄瓜品种（中农 8 号、秋棚 1 号）根系部位对重金属离子吸收的比较

实验目的：判断重金属处理后，中农 8 号、秋棚 1 号黄瓜根系对重金属离子吸收的差异

实验材料以及药品：检测样品：中农 8 号、秋棚 1 号黄瓜根系

检测仪器：非损伤微测系统（科研平台）或非损伤微测系统（研发平台）

使用耗材：NMT 专用固体 Cd^{2+} 流速传感器

所需药品：0.05mM CaCl_2 、pH6.0

用具：培养皿、滤纸、样品固定专用树脂块

实验原理：重金属是一种生物毒性很强的金属元素，同时也是植物生长与发育的非必需元素。当植物体内积累一定的重金属 Cd 就会表现出各种“得病”的症状，同时对重金属抗性较强的植物通常会表现较轻的症状，抗性较差的植株会表现较严重的症状。

实验步骤：

1. 将培养一周的黄瓜幼苗取出，放入测试液（含 0.05mM 的镉）中平衡 30min。
2. 将测试液吸出，重新加入 5 毫升的测试液。
3. 将样品放入 NMT 系统中检测根部不同区域（根冠、成熟区）的表面 Cd^{2+} 流速。

实验报告：

根据实验结果，解释哪个黄瓜品种对镉离子吸收较强，哪一个黄瓜品种吸镉能力较弱。

4 NMT 展望

非损伤微测技术的非损伤性、高的空间和时间分辨率、以及同时测量几个离子流量的特点，使它成为研究植物在环境胁迫下的离子流、信号传递、功能基因的一个非常有用的工具。当与其它先进的实验工具一起使用时，非损伤微测技术的作用会提高许多倍。非损伤微测技术在植物根系研究中的应用前景植物根系的生物学研究意义重大，目前，根系的相关研究技术已经成熟，还需要加强的重要研究力度之一是植物根系对水分、养分、盐分胁迫信号感受转导与其它信号途径的互作关系的研究，非损伤微测技术是一种理想的研究方法。总之，非损伤微测技术不但能及时准确地监测到植物对某种离子的吸收情况，而且还可以用于研究植物处于盐、水涝、温度逆境胁迫下时，进出植物细胞的离子流变化程度，可以为研究植物抗逆机理提供最直观、最准确的数据；还可以用于功能基因组学中未知的或者人工表达的蛋白质功能的鉴定等。

参考文献

1. 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 36 (7): 548 - 558.
2. 吕杰，苗璐，蔡蕊，武慧，徐洪伟，周晓馥 (2013). 非损伤微测技术在植物根系生

长发育研究中的应用. 生物技术 23(1):89 - 94.

3. 贾代东, 刘爱琴, 李惠通 (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(1):175-182.

4. 季丹丹, 魏树和, 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.

5. 张淼, Ang SS, Nguyen VC(2009). 基于离子选择性电极的硝酸盐快速检测系统. 农业工程学报 25(S2):235-239.

6. Sergey SN(2006) — invasive microelectrode ion flux measurements in plant stress physiology. In: Volkov AG, ed, Plant Electrophysiology - Theory and Methods. Springer - Verlag, Berlin/Heidelberg:35 -71.

7. 李静, 韩庆庆, 段丽婕 (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.

8. 许越. 非损伤微测技术—2022[J]. NMT 通讯, 2022(01):11-17.

(责任编辑: 李雪霏)