

非损伤微测技术及其应用

杨艺慧

北京农学院，北京 102206

一、非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology)

非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology: NMT) 是 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，可在不损伤样品的前提下，以流速为单位，检测材料外部分子或离子浓度及其梯度的技术。其在细胞器，细胞，组织，器官和个体均可进行检测。

NMT 技术由许越教授经过国外技术原理的学习和对理论技术的创新而发明出来。在三位国内老先生的鼓励和帮助下，此项技术最终 2005 年在中国诞生。在中国 17 年的发展中 NMT 技术应用到许多领域，同时自身技术也逐渐在改善和发展。在 2008 年技术应用生态上，对水上浒苔进行检测，预测其爆发时期，为奥运会的水上项目准备提供帮助。2009 年应用到农林方面，对于如何合理施氮肥进行了技术上的帮助。2011 年召开了非损伤微测技术及生物传感器研讨会，进行了技术上的交流。2015 年应用到了医药方面，对乳腺癌的治疗结合技术进行了研究。2017 年开发了 IAA Physiolyzer 活体生理检测仪和工作站，登上了 Science 的封面。2019 年进军到欧洲，销售到了瑞士苏黎世大学。2021 年得到国家科技处的认可，被认可为国际领先。

二、NMT 技术植物领域应用

孙健老师利用 NMT 技术，检测了解除盐胁迫后在低盐环境下钠离子的释放，可以说明 Na^+/H^+ 转运的活性，从而揭示在盐胁迫下胡杨耐盐的响应机制是把盐排出体外，防止钠离子带来的毒害作用。

在甘薯方面，甘薯产业遇到的问题是性状改良的理论基础和关键技术的缺乏。理论基础就是甘薯的基因组还没有完全被揭示，GWAS 和一些分子调控网络尚不清楚，理论方面较欠缺。技术方面的比如基因编辑和从头驯化在甘薯中还缺少研究。

孙老师现在主要是在分子技术，生理调控技术和技术的示范应用方面进行研究。在不同倍性甘薯近缘野生种耐盐性差异的生理基础研究中，孙老师团队利用 NMT 技术研究了 2 倍体和 6 倍体甘薯根细胞的钾，钠和氢等相关离子的运输，结果显示 6 倍体根细胞的伸长区的钠离子外排速率强于 2 倍体的甘薯，进而得出多倍化之后，耐盐性的形成是与根部伸长区钠离子外排和钾离子外流是相关的。在栽培种甘薯耐盐性差异形成的生

收稿日期：2023-03-22

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

理基础的研究中，利用非损伤微测技术，对 200 多种栽培种的甘薯的根尖伸长区，分生区和成熟区的钾钠离子的情况进行测定，得出耐盐性与钾离子没有相应的关系，而与根部伸长区的钠离子外流呈现正相关，也就是根部伸长区的钠离子外流越强， Na^+/H^+ 转运的活性越强，甘薯的耐盐性越强。在甘薯基因功能快速研究系统的根系转基因技术中也利用了此项技术对根部钠离子进行检测，从而帮助揭示甘薯的基因功能。在甘薯的生理机制方面，利用 NMT 技术，检测出盐胁迫下铵根离子的外流幅度较强，再进行外源施加铵肥进行研究，发现外源施加铵肥可以缓解盐胁迫对甘薯的伤害。还有内源小分子代谢物调控甘薯耐盐性中，施加褪黑素等，利用 NMT 技术检测离子的外排情况，从而得出其在甘薯耐盐性的调控作用。在研究碳点调控甘薯抗逆性的分子机制中，也用到了 NMT 技术。由于胁迫下产生活性氧，激活钙信号，钙信号激活下游相关的信号转导途径，从而使植物的抗逆性提升，形成 ROS- Ca^{2+} 信号枢纽调控胁迫响应。而碳点促进电子传递、光合作用和 ROS 清除能力。主要基于这两点，孙老师进行了后边的丹参碳点和 Ca^{2+} 运输的探索。在验证盐胁迫下碳点对拟南芥和甘薯钙离子，钠离子和一些营养相关的离子运输情况的影响时，均运用到了 NMT 技术。

在听完孙健老师精彩的试验研究汇报后，受益匪浅，收获颇多。孙老师首先利用 NMT 技术做了许多关于甘薯的研究，取得了许多显著性的结果和成果。随着植物纳米生物技术的发展，孙老师又在这个方面进

行了实验的研究。从丹参碳点的制作，再逆境响应机制下一些离子的转运过程探索，最后到揭示碳点对甘薯在盐胁迫下的调控响应机制。中间的探索过程非常严谨缜密，一步紧接着一步的探索和研究。可谓突破重重阻碍，解开谜底，勇往向前。试验设计思路非常清晰，环环相扣，非常值得学习和参考。试验过程中需要研究钙离子，钠离子等一些胁迫相关的离子的运输和浓度情况来判断响应过程和研究内在的机制。孙老师提到过，之前这部分是难点，因为之前没有很好检测这方面的相关仪器。但是现在有了 NMT 技术后，非常方便就可以进行相关指标的检测。尤其其中的一点很打动我，就是孙老师在使用 NMT 仪器进行碳点处理后钙离子浓度的变化时，本应该瞬时就检测出变化的钙离子却在相应的时间内没有发生变化，但是因为 NMT 仪器的长时间监测的优点，在大家想放弃的时候给予了希望，才能让辛苦研究的大家没有白费力气，又重回轨道，进行了之后精彩的研究，取得了不错的成果。可以说 NMT 在相关的试验研究中，既是雪中送炭，也是使整体试验锦上添花。听完之后就觉得一个试验的设计和技术的利用真的是相辅相成，共同组合才能形成一个完整的整体。

张金林老师讲到植物对盐胁迫的反应可以分为避盐和耐盐，而避盐植物中又可以分为拒盐植物，泌盐植物和稀盐植物。它们对盐的响应是通过把盐相关的钠离子以某种形式化解，最后达到自身防御，防止毒害的目的。张老师说在一篇知名植物学家的文章中写到，大多数植物都是通过把盐排出去的方式而保护自身，否则就会从根部运输到叶子，

进一步迫害。综上，张老师认为如果我们理解了或者我们阐明了单子叶盐生植物的耐盐机理，那对农作物在盐胁迫下的改良和对农作物耐盐机制的探究有很大的帮助。张老师的试验是去样地采集小花碱茅，回去后检测钠钾离子，结果发现有大量小花碱茅的钠钾比是最高的。小花碱茅和小麦相比，在同样的盐浓度的下，小花碱茅的钠离子浓度比小麦的低，而钾离子的浓度是高于小麦。在生长了 4 周后的小花碱茅进行钾离子饥饿 3 天，然后 0 和 1mMKCl 下分别施加 0、25、300mM 的 NaCl 溶液处理 12 小时和 24 小时，发现不管是 1mM 还是 0mMKCl 下的根到茎的 ST value 差异都不是很明显。于是利用 NMT 检测根冠附近的离子变化，发现 12h, 0mM 的 KCl 下钠离子随着盐浓度的增加而外排浓度增加，对应的氢离子浓度呈现相反的趋势，钾离子都呈现内流。96h 长期处理后趋势和 12h 一样。钾吸收的时候，需要钾离子的转运蛋白，钾离子浓度比较高的时候需要低亲和性的转运蛋白，在钾离子浓度比较低的时候，需要高亲和性的转运蛋白，吸收的时候也需要跨膜质子驱动力。钠离子排出的机制是，钠离子增多引起钙离子内流，激活 SOS3，再激活 SOS2，然后它俩形成复合体之后，磷酸化 SOS1，激活后将钠离子排出来。还有位蒋中浩博士，为了探究 NaCl 怎么激活钙离子内流，发现了 *mocal* 突变体，结果显示 *mocal* 的突变体不会导致钙离子内流增加，也没有 SOS 途径，反向转运蛋白活性也是缺失的。张老师团队的实验表明，在钾饥饿情况下，不同的盐处理 12h 都会引起钙离子的内流，长期 96 小

时处理后，钙离子内流不明显，甚至出现外排，说明钙离子是早期的信号，也可以说明 SOS 途径。张老师又进一步验证，小花碱茅的钠离子外排和其他植物有什么区别。做了 SOS1 的亚细胞定位，又做了拟南芥和小花碱茅的酵母实验，发现小花碱茅和拟南芥结合的酵母比只有拟南芥的长的好，然后测定钠离子浓度，也是低于拟南芥，说明外排钠离子浓度强于拟南芥。然后又测定了 HKT 基因的克隆，功能分析和共表达分析，在钾饥饿，高浓度盐处理下，表达量比较高。通过一系列的实验验证了在盐处理下，SOS1 及钠离子的变化。

张老师围绕 SOS 途径，对小花碱茅展开了一系列的研究。内容非常充实完整。开始比较早的实验没有 NMT 时用的是同位素定位法，用起来比较复杂困难的。而后来听说有 NMT 后，就充分利用起来，做了很多盐胁迫下钾离子，钠离子和钙离子的浓度测定，便捷操作的仪器和准确测定出的数据，为后续的实验提供了很多帮助。小花碱茅也叫星星草，采用星星草治理碱斑地可以改善土壤的理化特性和增加腐殖质的作用，促进牧草的生长发育，提高牧草的产草量，也为草食家畜提供了很好的食物。所以说研究小花碱茅的耐盐性机制也是对小花碱茅的改良和种植提供了科学的依据和帮助。

阮丽老师给大家分享的是茶树的养分吸收与耐贫瘠早期鉴定技术的研究，从发掘根系的养分吸收潜力出发。因为茶树是叶用植物，对氮的需求比较高，就从硝态氮，氨态氮和它俩的混合态氮进行研究，结果表明茶树根表铵根离子吸收速率大于硝酸根离子，

茶树根系呈现喜铵特性，而混合态氮对氮的吸收速率比单一氮源大，也通过实验发现硝态氮对铵态氮吸收有抑制作用，而相反铵态氮对硝态氮的吸收有促进作用。氮饥饿后氮回补的实验中，利用 NMT 里检测了一段时间内，铵态氮和硝态氮的吸收速率，又用同位素标记做了氮的转运分配，发现氮高效品种吸收氮和转运速度比较优秀。探究茶树根系钾的吸收的实验中，通过人工杂交授粉，F1 代筛选，进行水培，来得到吸收钾能力不同的株系，然后利用 NMT 测定了根系中钾内流的速率，分出了吸收钾的能力。根系会对钾多的地方有趋向性，耐低钾的茶树会在富钾的一侧发育更多的根系。对于耐贫瘠的茶树育种早期鉴定技术进行研究，进行了相关基因的筛选和分析，然后进行氮早期吸收率的鉴定，通过方法的综合比较，运用了 NMT 对茶树养分离子进行检测，不仅可以实时监测，而且稳定性和重复性都比较高，还可以实现样品的无损伤以便后期研究。

通过阮丽老师的分享，我了解到茶树对氮的需求比较高，而通过对铵态氮和硝态氮的研究，得知茶树根系对它们吸收速率的大小，也探究了两者之间的作用关系，获得了其中的原理，对茶树养分的吸收有了更多的认识。在耐贫瘠品种早期鉴定技术的探索中，阮丽老师分析耗竭法和同位素法都有一些缺点，仅可测定一段时间的指标，而且不利于样品的保留进行后续的研究。而 NMT 就可以实现非损伤实时的检测，数据稳定性和重复性都很高，不仅操作便捷而且样品可保证其完整性，便于后续的试验。阮丽老师的分享让我对茶树和 NMT 都有了进一步的认识。

三、NMT 试验设计

我的实验是研究紫丁香盐胁迫后的分子机制，所以利用 NMT 设计的思路可以参考分享汇报的相关方面老师的。然后我的实验思路是：对紫丁香进行 0、100、200、300mM 的盐胁迫处理，每 5 天浇灌一次，分别在第 0、2、4、11、16d 利用 NMT 进行钠离子的检测，分析在盐胁迫前和处理一段时间内植物体内钠离子的变化，再结合表型和一些生理指标的测定，选取一个盐处理浓度，进行更细致化的实验。如选取出 200mM 浓度的处理，再重新进行盐胁迫，检测 0、2、5、10、24、48h 和 4、7、15d 的植物体内外钠离子的浓度变化，测定相应的生理指标，进行转录组的测定。然后再配合着做相应时间段相关基因表达和功能验证的分析，最后揭示盐胁迫后紫丁香的分子机制。