

非损伤微测技术 测试服务手册

(用户版 V3.0)

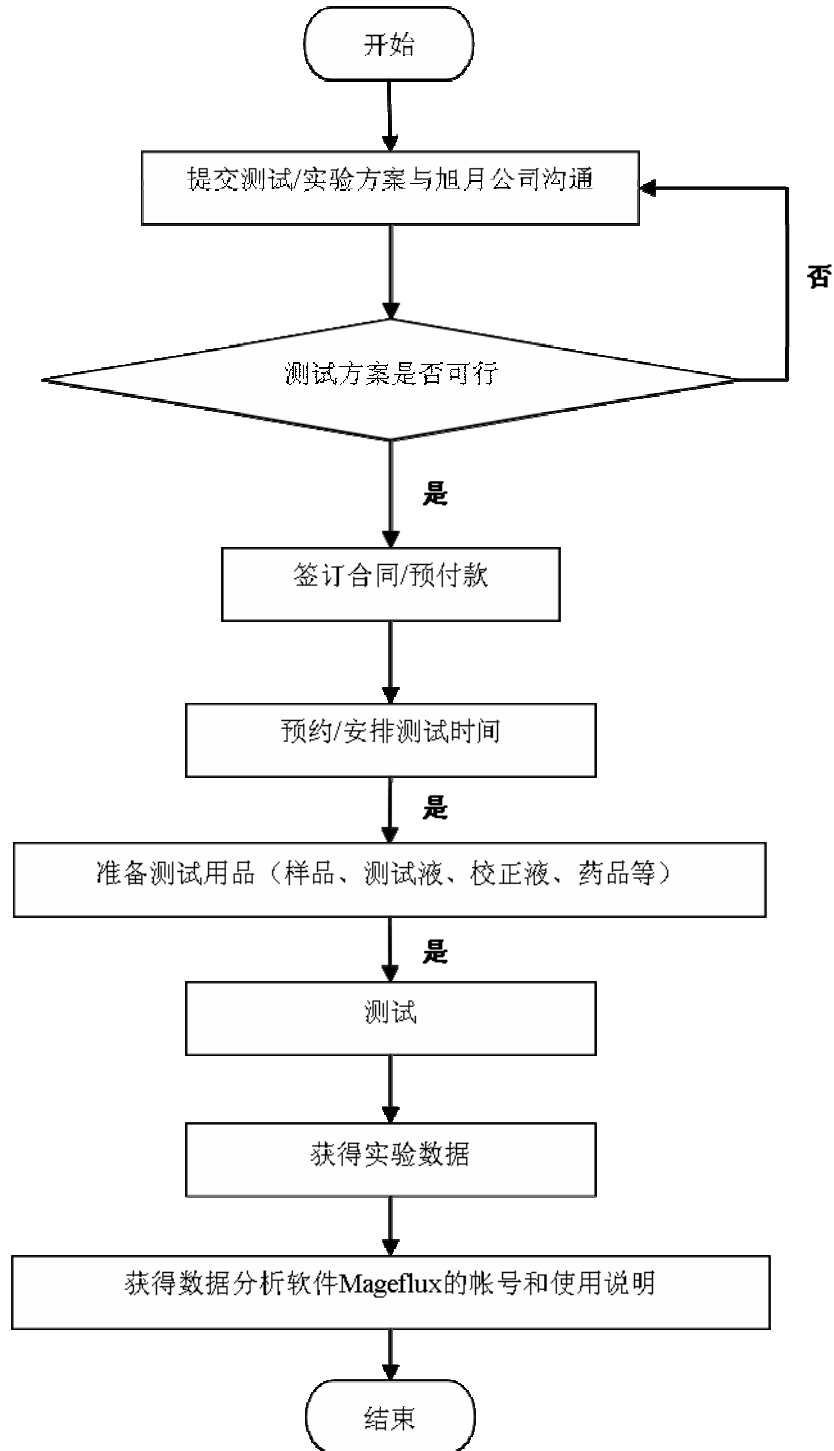
美国扬格非损伤技术中心
旭月(北京)科技有限公司

2010年12月14日

目 录

测试服务简明流程	3
一、技术介绍	4
1. 诞生	4
2. 原理	4
3. 经典应用	4
4. 技术特色	5
5. 涵盖技术	5
6. 应用领域	5
7. 应用方向	5
二、测试常见问题 (FAQ)	7
1. 通过非损伤微测技术 (NMT) 可以获得什么信息?	7
2. NMT为什么测定的是样品表面的离子/分子信息而不是测样品内部的离子/分子信息?	7
3. 测试中所用的测试液和校正液是什么?	7
4. 测试液和校正液配方的设计需要遵循哪些原则?	7
5. 测试中所用的溶液需要灭菌处理吗?	7
6. 为何测试液和校正液需要客户自己配制? 公司可以储备一些标准测试液和校正液吗?	8
7. 样品如何准备?	8
8. 实验中典型的数据是什么样子? 它们的含义是什么?	8
9. 如果数据不够理想, 一般是什么原因造成的? 如何发现问题?	9
10. 测试所获得的数据如何分析?	9
三、测试用户注意事项.....	10
1. 测试流程	10
2. 测试流程注解	11
四、数据的分析和呈现.....	12
(一) 离子电极	12
(二) 极谱电极	15
(三) 光纤电极	16
五、参考文献	17
六、应用实例	20
七、特色服务	21
1. 实验设计与改进	21
2. 数据分析	21
3. 培训及出国进修推荐	21
4. 其他研发项目	21
八、附录	22
附 1: 各种离子测试液及校正液 (仅作参考)	22
附 2: 常见离子扩散常数 (参考)	24
附 3: 测试中心地点	24
九、支持与联系	25

测试服务简明流程



一、技术介绍

1. 诞生

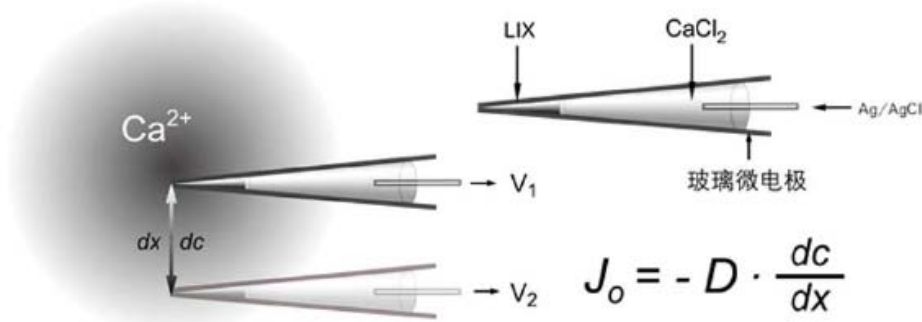
非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technique, NMT）起源于美国 MBL 实验室。

1990 年 MBL 的科学家 Kührtreiber 和 Jaffe 使用非损伤微电极测量了进出细胞的 Ca^{2+} 流速和运动方向，开创了生物活体静态测量到动态测量转变的先河。

1995 年 MBL 的科学家在《Nature》发表文章阐明了非损伤微测技术的数学、物理学基础以及应用方式，进一步完善了非损伤微测技术，从此非损伤微测技术进入各研究领域并发挥着越来越重要的作用。

注：MBL, Marine Biology Laboratory, 海洋生物学实验室。2008 年诺贝尔化学奖得主下村修（Osamu Shimomura）因发现了荧光蛋白，成为 MBL 第 56 位诺贝尔获奖者。

2. 原理



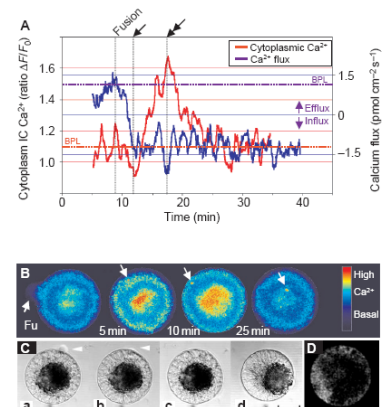
以 Ca^{2+} 离子选择性微电极为例说明非损伤微测技术的工作原理。

Ca^{2+} 离子选择性微电极通过前端灌充液体离子交换剂（Liquid Ion Exchanger, LIX）实现选择性。该电极在待测离子浓度梯度中以已知距离 dx 进行两点测量，获得电压 V_1 和 V_2 ，两点间的浓度差 dc 通过 V_1 和 V_2 及已知的该电极的电压/浓度校正曲线计算获得，将它们带入 Ficks 第一扩散定律 $J_0 = -D \cdot dc/dx$ ($10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 获得该离子的流速和运动方向。D 是离子扩散常数（常见的离子扩散常数见附表 3）。

注：荧光染料/光纤、纳米碳丝、金属/合金等材料均可作为选择或特异性的离子/分子电极。

3. 经典应用

葡萄牙生物学家 Feijó 使用非损伤微测技术结合激光共聚焦显微镜研究了玉米卵细胞和配子融合的过程。在细胞融合时测得卵细胞外一个明显的 Ca^{2+} 内流，同时测到卵细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加，直接验证了胞内 Ca^{2+} 的增加是由于吸收胞外的 Ca^{2+} 而非内源的 Ca^{2+} 释放所引起的这一科学问题。（Antoine AF *et al.* Nature cell biology, 2001, 3: 1120）



4. 技术特色

测量信息：离子/分子的电流、电压、绝对浓度、流速、三维运动方向

测量特色：非损伤性、活体、动态、实时、长时间、多维扫描与测量……

测量对象：Ca²⁺、H⁺、K⁺、Na⁺、NH₄⁺、Mg²⁺、Cd²⁺、Cl⁻、NO₃⁻、O₂、H₂O₂……

测量材料：整体→器官→组织→细胞层→单细胞→细胞器（富集）

5. 涵盖技术

非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technique, NMT）是一大类微电极技术的统称。

非损伤微测技术所涵盖的技术包括：

扫描离子选择性电极技术（Scanning Ion-selective Electrode Technique, SIET）

扫描振动电极技术（Scanning Vibrating Electrode Technique, SVET）

扫描极谱电极技术（Scanning Polarographic Electrode Technique, SPET）

自参比离子选择性电极技术（Self-reference Ion Selective Electrode Technique, SERIS）

自参比极谱电极技术（Self-reference Polarographic Electrode Technique, SERP）

自参比酶辅助电极技术（Self-reference Enzyme Assisted Electrode Technique, SERE）

扫描参比微电极技术（Scanning Reference Electrode Technique, SRET）

微电极离子流技术（Microelectrode Ion Flux Estimation Technique, MIFE）

其中 SIET、SERIS、MIFE 技术主要测量离子的浓度、流动速率、流动方向等信息。

SPET、SERP 技术主要测量小分子的浓度、流动速率、流动方向等信息，SERE 技术主要测量生物大分子的浓度、流动速率、流动方向等信息，SRET 技术主要测量局部区域的电位分布和电压值变化，SVET 技术主要测量局部区域的电流分布和变化情况。

这些技术的共同特点一是测量时微电极不接触被测样品，不会对样品造成任何损伤；二是空间分辨率高，可以实现微米级的测量；三是测量数据精度高，对离子、分子流动速率的测量可达到 10⁻¹²数量级，对电流的测量可达到pA量级。综合这些特点，故把这些技术统称为“非损伤微测技术”。

6. 应用领域

非损伤微测技术已经应用于科学研究的许多领域，如生命科学、医学、药理学、药理学、环境科学、农业科学等诸多领域。

7. 应用方向

Ca²⁺振荡

离子流研究

细胞活性与凋亡的评价

上皮及内皮细胞研究中的关键离子

代谢与内分泌中的离子变化

气体分子: NO、O₂

肿瘤研究及其药物的评价

重要疾病的发生发展机制

感觉及神经系统中的关键离子流

胚胎发育的研究

生殖健康的应用

伤口愈合方面的应用

细胞极性生长

细胞的融合

植物与微生物的关系

植物发育的标记

植物盐胁迫及其耐盐性评价

机械损伤与生物损伤下的离子流研究

营养吸收与利用的研究

重金属毒理学研究

环境监测

渗透调控的研究

水生植物的光合作用

.....

二、测试常见问答 (FAQ)

1. 通过非损伤微测技术 (NMT) 可以获得什么信息?

非损伤微测技术 (NMT) 获得的是**进出样品 (跨膜)** 以及**外部**的离子/分子的电流、电压、浓度、流速和运动方向的信息。

2. NMT 为什么测定的是样品表面的离子/分子信息而不是测样品内部的离子/分子信息?

由于微电极测量的特点, 如测量样品内部, 则会对样品产生破坏, 因此无法达到非损伤地测量, 使得测试数据不能反映样品的真实生理状态。随着荧光技术逐步成为测量样品内部离子/分子信息的主流方法, NMT 便专注于样品外微环境离子/分子信息的测量。

荧光技术和非损伤微测技术有很大的互补性, 可以实现对样品离子/分子信息的内外兼测, 获取的数据有非常强的说服力。

3. 测试中所用的测试液和校正液是什么?

测试液是指测试时样品所处的液体环境。

校正液是指用来校正电极的溶液, 原则上尽量和测试液相似, 高浓度校正液和低浓度校正液的待测离子浓度范围应该包含测试液中待测离子的浓度, 高低校正液浓度一般相差 10 倍 (一些分子除外)。

注意: 测试液中的离子浓度是指溶液所有成分中同一种离子的浓度总和。

测试液和校正液 pH 的调节需注意, 不能用含有待测离子的酸或碱调节, 如测定 Na^+ 时调节 pH 值不能用 NaOH, 否则就使溶液中的 Na^+ 含量增加, 可用较少量的 KOH 调节, 最好用氯化胆碱或 Tris。

4. 测试液和校正液配方的设计需要遵循哪些原则?

(1) 测试液尽量和样品的培养液一致, 使样品保持自身的活性。

(2) 测定的离子含量在测试液中不宜过高, 尽量维持一个较低的水平。

(3) 测试液中应该含有所测定的离子 (特殊的研究, 如先用没有所测定离子的溶液, 然后再加入此种离子的实验情况除外)。

(4) 测试液尽量维持一定的渗透压和 pH 值, 以保证样品的活性。

(5) 不同的校正液之间的浓度一般相差 10 倍 (特殊的分子除外)。

(6) 测试液和校正液最好用相应成分的母液 (例如: 100 倍的母液) 稀释进行配制, 避免直接称量误差较大, 导致浓度不准确, 影响校正和测试。

5. 测试中所用的溶液需要灭菌处理吗?

严格讲所有溶液均需灭菌, 特别是当溶液中含有糖类等容易滋生细菌的物质时, 不灭菌会对测试结果产生影响。但为了实验的方便, 当溶液中仅含无机盐且被测样品对细菌不是非常敏感时, 可不作灭菌处理。

6. 为何测试液和校正液需要客户自己配制？公司可以储备一些标准测试液和校正液吗？

为保证测试数据的最佳质量，被测样品要处于最佳活性状态。测试样品尤其是生物样品的活性受多种因素的影响，其所处环境是最重要影响因素之一。客户的样品已经适应了客户的试剂环境，在该试剂环境中容易达到最佳活性状态。如果更换试剂环境，可能引入一些不可预测和不可控制的因素，使样品不在最佳活性状态，不利于产出最佳数据。所以测试液应由客户自行配制。为保证校正的准确性，校正液和测试液的试剂环境应当一致，所以校正液也请客户自行配制。

另外，对于不同测试样品，测试液的成分差别很大，具有很强的个体性，不存在适用于多种样品的所谓标准测试液。校正液同样也很难做到通用。为达到最佳测试效果，一般应使用新鲜溶液，不建议使用长期储存的溶液。

7. 样品如何准备？

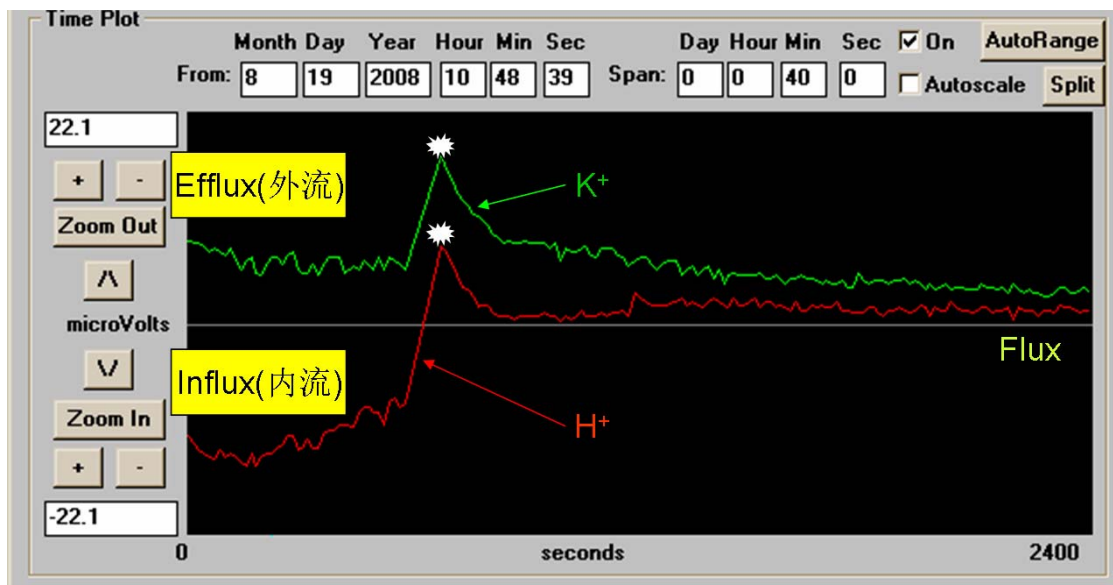
尽量使所测定样品的部位保持完好无损，使样品保持正常的生理状态。

考虑到测试过程是在液体环境中，植物样品最理想实验条件是水培或者是土培后再进行水培发根。这种培养条件下样品表面干净，表面附着的物质可以通过在测试液中平衡处理去除，保证测试数据的稳定、准确。

测定时，把所要测定的部位进行固定，例如细胞贴壁、或者用多聚赖氨酸把悬浮细胞固定在培养皿底部。较大一点的组织，如植物的根，用滤纸条和树脂块轻轻压住，使样品基本保持固定。

8. 实验中典型的数据是什么样子？它们的含义是什么？

如下图所示，通过NMT同时测定植物根的 K^+ 和 H^+ 的流速。



如上图，红色的线代表 H^+ ，绿色的线代表 K^+ ，所记录数据为样品离子的流速或者是距样品两点间的电压差 ΔV (μV) (纵坐标)，横坐标为记录的时间，在零线上方（正值）的曲线是指离子外流（Efflux），零线下方的曲线是指离子内流（Influx），白色点是指进行了一个刺激处理，当受到刺激处理后， H^+ 和 K^+ 的外流增加。

9. 如果数据不够理想，一般是什么原因造成的？如何发现问题？

数据不够理想的最可能原因是被测样品的活性状态不佳，其次是配制的测试液存在问题。当然也可能是测试系统本身存在故障，但这种可能性很小，而且很容易及时发现和纠正。

例如，为确认测试中问题产生的原因，可进行人工离子源实验。在去离子水中进行人工离子源实验，若能观察到正常浓度梯度反应曲线则基本可以排除系统故障的可能性。

注意：样品间某些离子可能存在个体间的差异，因此测试时会出现重复性不好的情况，这种情况需要从样品和测试液本身入手寻求解决的办法。

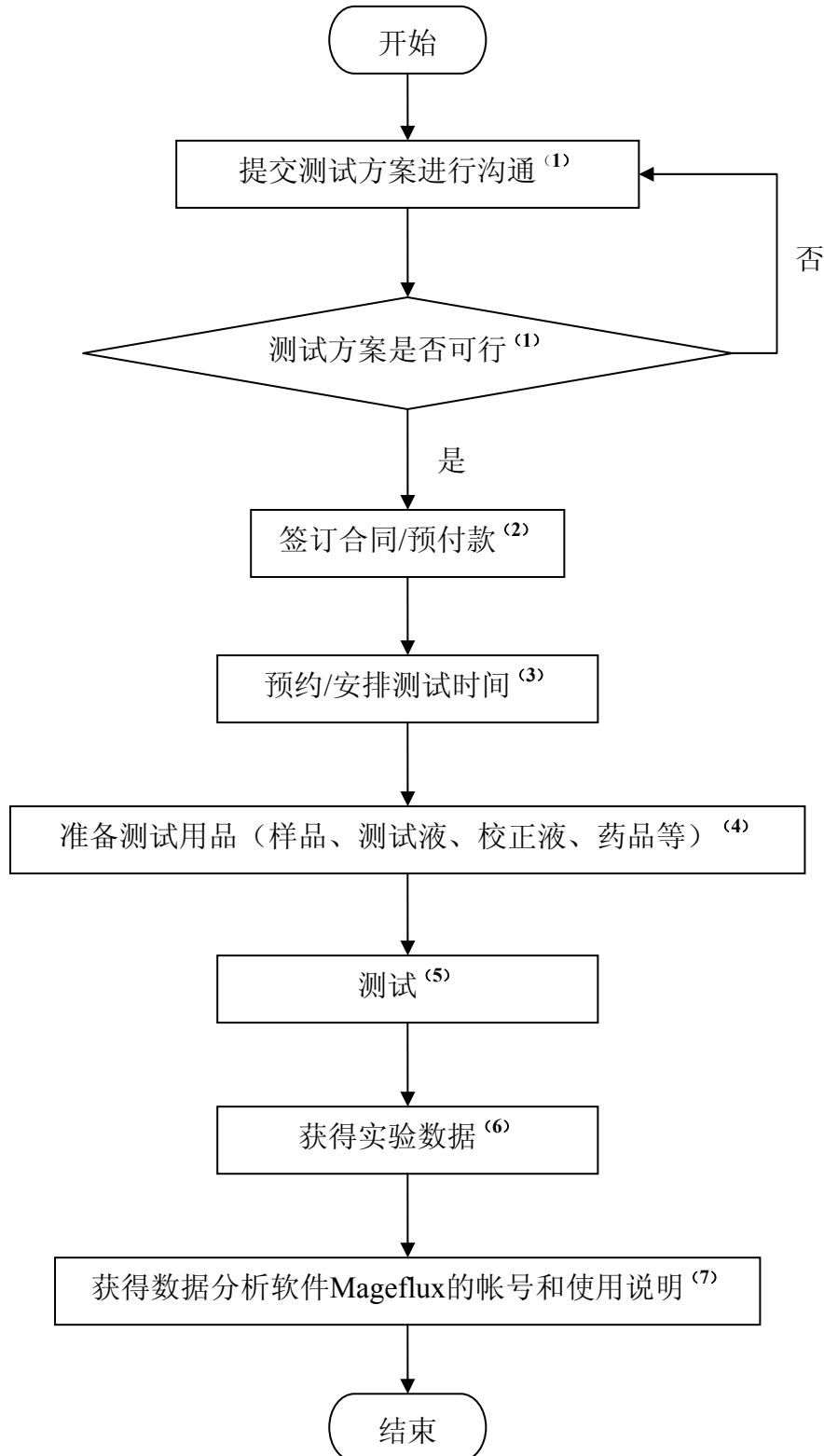
10. 测试所获得的数据如何分析？

原始数据可通过专门的在线数据分析软件——Mageflux 进行换算。该软件完全免费，使用也很方便。旭月公司向客户提供 Mageflux 的使用说明并为客户开通专用帐号。

三、测试用户注意事项

1. 测试流程

请用户严格按照以下流程进行“非损伤微测技术”测试：



2. 测试流程注解

- (1) 当测试用户写出一个较为完整的测试方案后，与旭月（北京）科技有限公司学术部的专家和美国扬格非损伤技术中心的工程师进行探讨，着重于技术本身在科学研究中是否可行、实验可否操作等问题进行相互沟通。可通过电话、Email 交流，或者约定时间面谈。

测试方案是否可行主要注意以下几点：

- A. 实验思路是否合理。
 - B. 样品是否可操作，主要是样品的大小和可否固定。
 - C. 在配制的测试液中是否能够测到离子的变化。
 - D. 测定的离子或者分子在外加药物时是否能够继续准确测定。
- (2) 与旭月公司签订技术服务合同。合同一式三份，需要负责人签字，盖实验组、系（研究中心）、学院或者学校（研究所）任一级的公章。合同的签订与旭月公司测试中心联系，细节和付款等问题与测试中心人员进一步沟通。
- (3) 与旭月公司测试中心预约测试时间。双方商议后，测试中心安排测试时间。
- (4) 测试前确认测试方案和所要携带的物品，一般的实验所带物品见如下列表：

物品号	携带物品名称	数量/体积以及注解
1	样品（实验的材料）	根据实验量确定样品数量，尽量多准备
2	测试液	根据样品的大小确定，一般一个小样品需要 3ml
3	校正液 1	低浓度的校正液≥50ml
4	校正液 2	高浓度的校正液≥50ml
5	培养皿（塑料）	根据样品大小和数量确定培养皿的大小和数量
6	处理的药品（可选）	如离子通道抑制剂、盐溶液、样品固定物质多聚赖氨酸等
7	辅助的器具（可选）	如镊子、离心管等

- (5) 在约定的时间里带好实验所需物品到旭月公司测试中心进行实验。在实验中用户需要准备好样品，告知测试工程师样品的编号，并协助做一些准备工作，如取样、固定样品、调节溶液的 pH 值等，其他的工作由测试工程师完成。在测试过程中，用户还可以和工程师或者学术部的专家沟通，增强对技术的理解，为后续的数据分析和解释打下良好的基础。
- (6) 测试的数据包括原始的电压差（对应于每个数据点的时间）、校正斜率和截距、样品和电极的坐标等大量数据，主要文件有原始数据 vpo 文件和 txt 文件、数据抓图和样品抓图（用户可选）。数据通过信息共享平台或者 Email 不晚于第二个工作日（包括第二个工作日）送给用户。
- (7) 原始数据通过旭月（北京）科技有限公司开发的在线软件 Mageflux 转换成流速。旭月公司为用户免费开通独立的帐号，并发送软件的使用说明。在软件的使用过程中，有任何问题与扬格测试中心工程师或学术部专家联系。

注：当客户获得数据和 Mageflux 之后，整个测试过程全部结束。

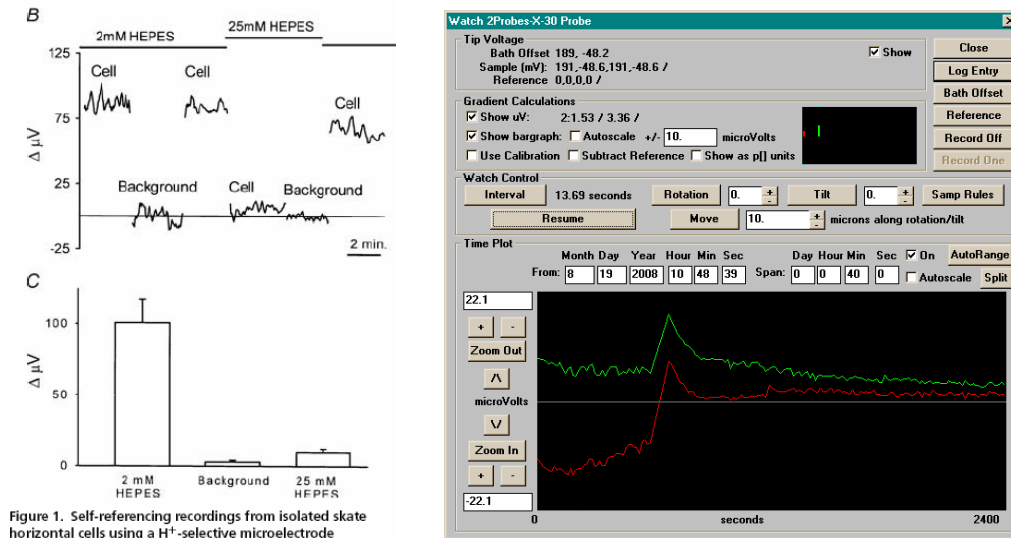
四、数据的分析和呈现

(一) 离子电极

1. 电压差、浓度、流速

(1) 电压差 ($\Delta\mu\text{V}$)

即用 imFlux 软件记录的原始数据来表示。如下图所示：



左图：鳐鱼神经细胞 H^+ 的电压差

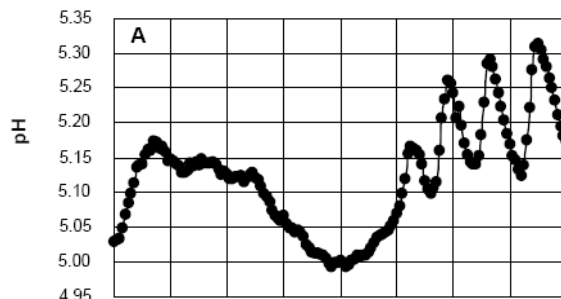
来源：Anthony JA, *et al.* Neurotransmitter modulation of extracellular H^+ fluxes from isolated retinal horizontal cells of the skate. **Journal of Physiology**, 2004, 560: 639-657

右图：植物根在盐胁迫下 H^+ 、 K^+ 电位差

来源：美国扬格非损伤技术中心

(2) 浓度 (pH、摩尔浓度)

用pH值表示小麦根表面环境中 H^+ 浓度变化，该变化是由小麦根对 H^+ 的吸收或释放所引起。

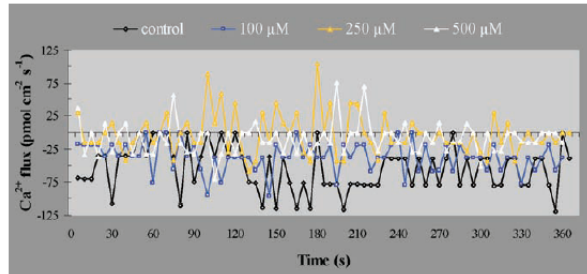


上图：小麦根部 pH 值慢速和快速的振荡过程。

来源：Shabala S, *et al.* Rhythmic patterns of nutrient acquisition by wheat roots. **Functional Plant Biology**, 2002, 29: 595-605

(3) 流速 ($\text{pmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

如下图所示，用 Ca^{2+} 流速表示花粉管表面单位时间、单位面积释放或吸收 Ca^{2+} 的摩尔数。流速的换算，请参见Mageflux (www.xuyue.net/mageflux) 软件的使用。



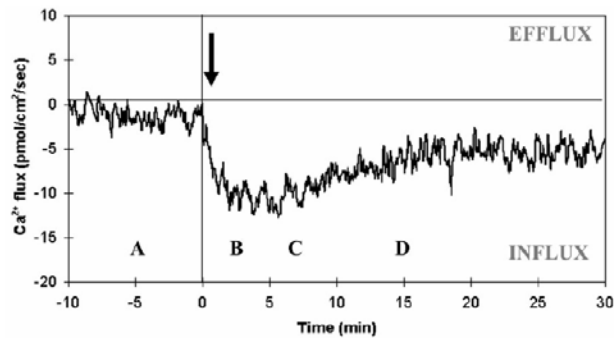
上图：花粉管尖端 Ca^{2+} 的振荡内流

来源：Wu XQ, *et al.* Integrative proteomic and cytological analysis of the effects of extracellular Ca^{2+} influx on *Pinus bungeana* pollen tube development. *Journal of proteome research*. 2008, 7: 4299-4312.

2. 结果分析和表示

(1) 动态变化过程

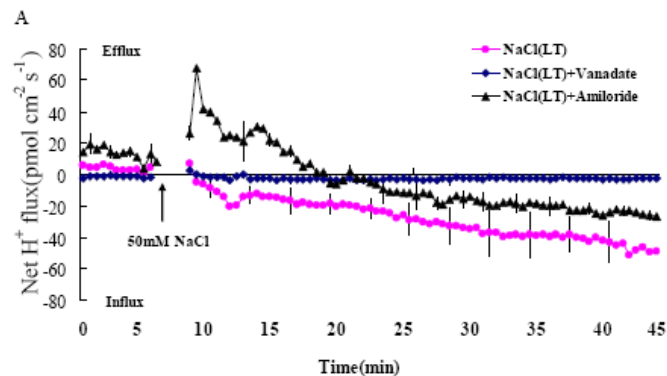
A 选择一个具有代表性样品的数据



上图：玉米卵细胞和配子融合后的 Ca^{2+} 流速

来源：Antoine AF, *et al.* A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wave front during in vitro fertilization of flowering plants. *PNAS*, 2000, 97: 10643-10648

B 取数个样品的数据的平均值

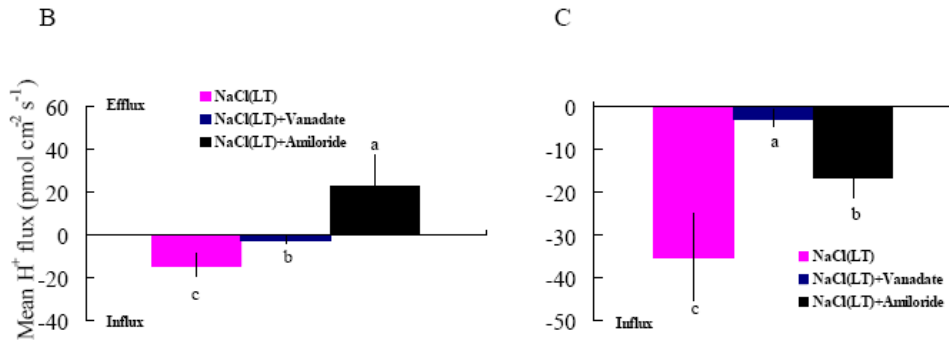


上图：胡杨根原生质体NaCl和加抑制剂处理下的 H^+ 流速，其中每个数据为 5-6 个原生质体的平均值。

来源: Sun J, *et al.* NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. **Plant Physiology**, 2009, 149: 1141-1153.

(2) 流速的平均值

将一段时间内的流速数据进行平均, 以一个平均值表示一段时间内的流速:

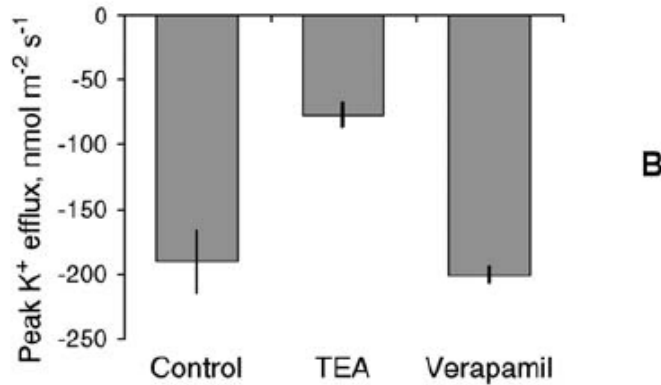


上图: 胡杨根部在NaCl和加抑制剂处理下的H⁺流速, B图中的柱形图为处理后 0-10min的流速平均值, C图中的柱形图为处理后 10-35min的流速平均值。

来源: Sun J, *et al.* NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. **Plant Physiology**, 2009, 149: 1141-1153.

(3) 最大值比较

在加不同处理(如加胁迫, 药物等)后流速最大值的比较。



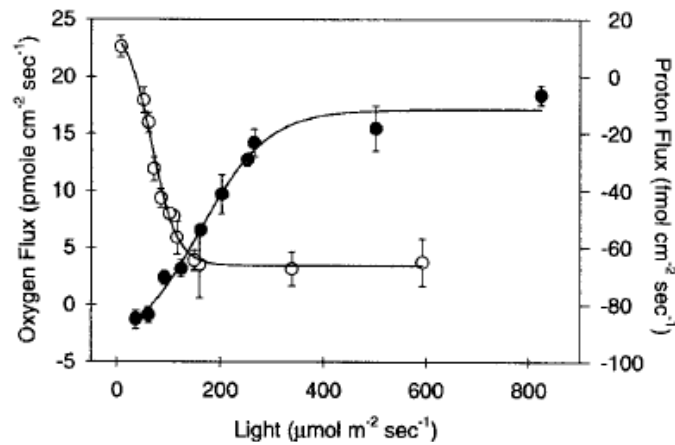
上图: 拟南芥根部在不同处理下的K⁺流速最大值的比较

来源: Shabala S, *et al.* Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. **Plant Physiology**, 2006, 141: 1653-1665

(二) 极谱电极

以O₂电极为例说明，其数据分析和呈现方法与离子电极类似，但不同的是，电极所获得的原始数据为电流值。若不需要得到O₂流速绝对数值的大小，只需要比对相对流速的大小，如比较实验组和对照组是否存在统计显著性差异等情况，可以直接采用原始数据电流差(ΔpA)来代表氧流速。若需要得到O₂流速绝对数值的大小，可用Mageflux进行计算。流速值数据的呈现方法与离子电极相同。

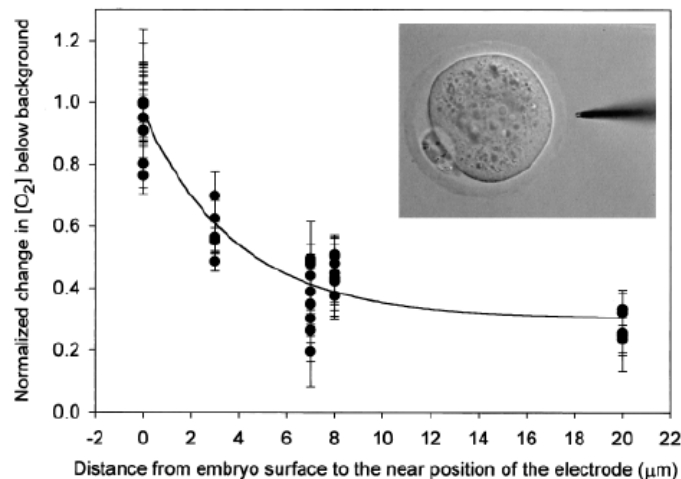
1. O₂流速的表示：使用flux(pmol·cm⁻²·s⁻¹)表示O₂在不同条件和处理下的变化情况，如下图所示。



上图：不同光照强度下螺旋藻H⁺和O₂的变化

来源：Porterfield DM, *et al.* Single-cell, real-time measurements of extracellular oxygen and proton fluxes from *Spirogyra grevilleana*. **Protoplasma**, 2000, 212: 80-88

2. O₂浓度的表示：使用[O₂]来表示样品耗氧的情况，如下图所示。



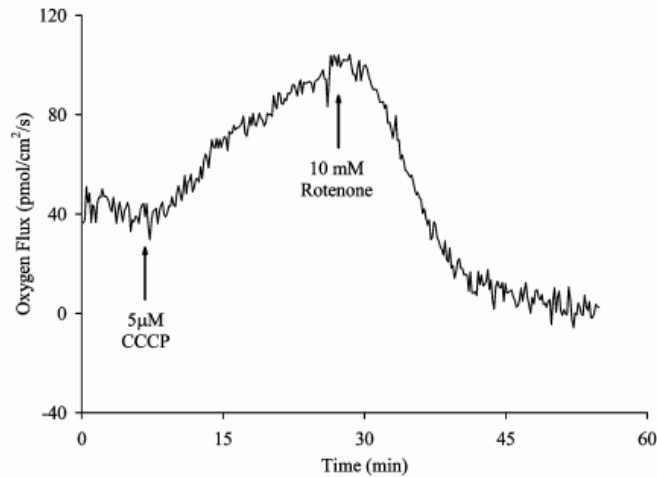
上图：小鼠胚胎表面的耗氧

来源：Trimarchi JR, *et al.* Oxidative phosphorylation-dependent and-independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. **Biology of reproduction**, 2000, 62, 1866-1874

(三) 光纤电极

以氧电极为例，其数据分析和呈现方法与离子、极谱电极类似，但光纤电极采集到的原始信号是光信号，通过光电转换成电信号并进行记录。通过 Mageflux 软件换算可以得到氧流速及氧浓度。

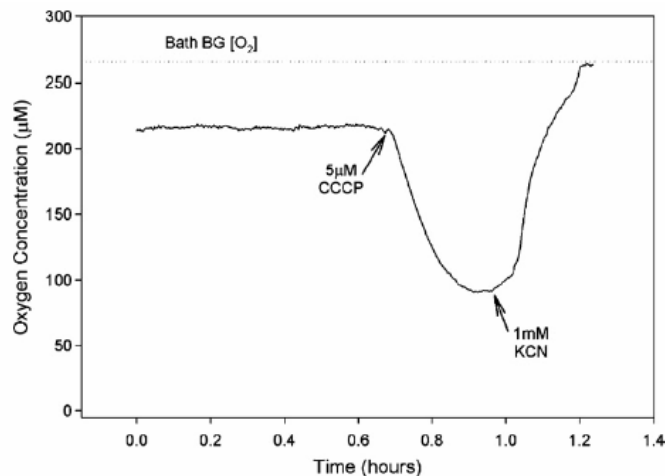
1. O_2 流速的表示：使用flux ($\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)表示 O_2 在不同条件和处理下的变化情况，如下图所示。



上图：鱼胚胎在不同处理条件下的耗氧速率变化

来源：Sabchez BC, *et al.* Oxygen flux as an indicator of physiological stress in fathead Minnow (*Pimephales promelas*) embryos: A real-time biomonitoring system of water quality. **Environmental Science & Technology**, 2008, 42, 7010 - 7017.

2. O_2 浓度的表示：使用 $[O_2]$ 来表示样品耗氧的情况，如下图所示。



上图：大鼠肿瘤组织在不同试剂处理下的耗氧变化

来源：Chatni MR, *et al.* Evaluation of microparticle materials for enhancing the performance of fluorescence lifetime based optrodes. **Sensors and Actuators B**, 2009, 141: 471 - 477.

五、参考文献

非损伤微测技术广泛应用于生命科学，如植物逆境、营养运输、生长发育、信号转导、药物筛选、动物（人体）生理、毒理学、神经生物学、环境监测等方面。国内应用非损伤微测技术的研究成果已经在《Plant cell》、《Plant Physiology》、《Journal of Proteome Research》等国际著名杂志发表，主要参考文献如下：

1. 植物学

(1) 蛋白功能研究

分子伴侣通过蛋白激酶调控质膜 H^+ -ATPase的活性

北京生命科学研究所的郭岩研究组使用非损伤微测技术对拟南芥根部的 H^+ 流进行了原位活体测量，证实了分子伴侣J3、蛋白激酶PKS5及质膜 H^+ -ATP酶相互作用对植物适应逆境的影响，文章发表于植物学最高水平杂志《Plant Cell》。文中提到的MIFE技术是非损伤微测技术的一种。

Yang YQ, *et al.* **Plant Cell**, 2010, 22: 1313 - 1332.

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=660&extra=page%3D1>

(2) 植物逆境研究

离子流的转换对胡杨抗盐起到关键作用

北京林业大学陈少良研究组使用非损伤微测技术研究了胡杨（抗盐品种）和群众杨（盐敏感品种）根部和根原生质体在盐胁迫下的 Na^+ 、 H^+ 、 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。

Sun J, *et al.* **Plant Physiology**, 2009, 149: 1141 - 1153.

全文下载:

[http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=484&highlight=NaCl induced%20alternations%20of%20cellular](http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=484&highlight=NaCl%20induced%20alternations%20of%20cellular)

(3) 植物发育研究

钙调素引发 Ca^{2+} 的内流

中国科学院植物研究所林金星研究组使用非损伤微测技术研究了白苧花粉管的 Ca^{2+} 流，发现白苧花粉管生长过程中对钙调素（ Ca^{2+} -calmodulin）分子的抑制会引发 Ca^{2+} 内流的改变，进而改变胞内 Ca^{2+} 浓度导致花粉管的畸形。这是对钙调素分子功能的全新认识。

Chen T, *et al.* **Plant Physiology**, 2009, 149: 1111 - 1126.

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=493&highlight=Ca2%20-calmodulin>

2. 动物学

青鳉幼鱼线粒体富集细胞 NH_4^+ 的吸收依赖于 Na^+ 的吸收

中国台湾的科学家使用非损伤微测技术对青鳉幼鱼皮肤表面线粒体富集细胞（MRCs）的 H^+ 、 Na^+ 和 NH_4^+ 的流速进行了测定，发现 Na^+/H^+ 交换器（NHE）与 Na^+ 和 NH_3/NH_4^+ 的转运相关，提高胞外的 NH_4^+ 浓度显著抑制

$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 的分泌和 Na^+ 的吸收。相反，提高溶液的酸性可增强细胞对 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 的吸收和 Na^+ 的分泌。 Na^+ 的吸收与 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 的外排是通过淡水鱼的MRCs实现，也说明了与斑马鱼通过HRCs细胞对 Na^+ 的吸收作用机制不同。

Wu SC, *et al.* **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2010, 298: C237 - C250.

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=651&highlight=MRCs>

3. 医学

(1) 骨骼研究

骨骼作为离子交换的器官

《Bone》杂志报道了几位科学家使用非损伤微测技术测定生理状态下骨骼的 Ca^{2+} 流，发现 Ca^{2+} 在EFC溶液中出现内流，在无 Ca^{2+} 的ECF溶液中出现外流，这种内外流的转变在整个实验期间都非常稳定。当添加10mM的NaCN时，10min之内 Ca^{2+} 外流消失，说明这种外流具有细胞依赖性。这项研究为我们理解 Ca^{2+} 在骨骼和胞浆中的平衡提供了依据，可以据此为人体补钙。

Marenzana M., *et al.* **Bone**, 2005, 37: 545 - 554.

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=407&highlight=Bone>

(2) 伤口愈合

电流激活伤口愈合的信号通路

加州大学的赵敏实验室使用非损伤微测技术研究了内生伤口的电流，测定了 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 电流，发现电信号通过激活特定的酶，可以调控伤口愈合过程中细胞的迁移，并选择性地激活信号通路。

Zhao M, *et al.* **Nature**, 2006, 442: 457 - 460.

全文下载:

<http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=380&highlight=Electrical%2Bsignals%2Bcontrol%2Bwound%2Bhealing%2Bthrough%2Bphosphatidylinositol-3-OH%2Bkinase-%A6%C3%2BPTEN>

4. 微生物学

菌根化过程的信号转导机制

葡萄牙的Feijó实验室使用非损伤微测技术研究了离子流在菌根生长过程中的作用，发现真菌侵染主要作用于根部伸长区，离子运动及根部酸化发生了剧烈变化，且离子流变化呈现周期性。通过这项研究他们构建模型解释了植物养分吸收和生长加速是通过侵染真菌所介导，依赖于pH的变化，发现 Ca^{2+} 在这一过程中发挥了重要的作用，这为揭开植物和真菌共生互作提供了证据和模型。

Ramos AC, *et al.* **New Phytologist**, 2009, 181: 448 - 462.

全文下载:

<http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=625&highlight=A%2BpH%2Bsignaling%2Bmechanism%2Binvolved>

5. 环境科学

鱼胚胎耗氧作为环境监测的指标

普渡大学的科学家使用非损伤微测技术检测了鱼胚胎的O₂流，发现在微量有机污染物作用下，鱼类胚胎O₂内流量会显著降低。这是真正意义上的环境污染生物学监测手段，表明污染物的作用可能比原先预计要严重的多。这项技术可用于其他有机生命体，如果将胚胎鱼结合使用于瘤细胞，能够检测到潜在的致癌药物，或帮助发现新的治疗目标。这项研究非常令人欣慰，它能够成为保护人类健康的一项潜在应用工具。该研究采用非损伤微测技术来监测环境毒物的存在，为水质监测提供了新的思路和方法。

Sanchez BC, et al. **Environmental Science & Technology**, 2008, 42: 7010 - 7017

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/attachment.php?aid=93>

6. 非损伤微测技术与其他技术的结合

(1) 与膜片钳技术的结合

离子通道调节细胞凋亡早期的K⁺外流

墨西哥和澳大利亚的科学家使用非损伤微测技术和膜片钳技术研究了细胞凋亡，发现 1μM STS（十字孢碱）会快速引起K⁺外流，同时记录到K_{bg}通道的电流增加，伴随着膜去极化的急剧下降。K_{bg}通道调节早期的K⁺外流，Kv1.3 通道在后期起到主要作用。这一研究为认识细胞凋亡的内在机制提供了新的证据，这种实时和便于操作的研究手段有望在临床等实际应用领域诊断或检测凋亡细胞。

Valencia-Cruz G, et al. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2009, 297: C1544 - C1553

全文下载: <http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=639&extra=page%3D1>

(2) 与荧光/激光共聚焦技术的结合

胞内Ca²⁺的增加来源于胞外的Ca²⁺内流

葡萄牙的Feijó实验室使用激光共聚焦显微镜技术测定了细胞内Ca²⁺的同时结合使用非损伤微测技术测量了进出细胞的Ca²⁺流。细胞融合一旦发生，使用非损伤微测技术测得一个显著的Ca²⁺内流，直接验证了胞内Ca²⁺的增加是由于吸收胞外Ca²⁺而非内源钙库释放引起的这一科学问题。

Antoine AF, et al. **Nature Cell Biology**, 2001, 3: 1120 – 1123

全文下载:

<http://www.xuyue.net/xylt/viewthread.php?tid=492&highlight=Differential%2Bcontribution%2Bof%2Bcytoplasmic%2BCa%2Band%2BCa%2B%2Binflux%2Bto%2Bgamete%2Bfusion%2Begg%2Bactivation%2Bin%2Bmaize>

更多的参考文献请登录:

旭月公司网站 www.xuyue.net 中的技术介绍。

旭月公司技术论坛 <http://www.xuyue.net/xylt/>，可以免费下载非损伤微测技术应用相关的文献。

六、应用实例

北京林业大学生物科学与技术学院陈少良教授应用“非损伤微测技术”获得科研成果《NaCl-Induced Alternations of Cellular and Tissue Ion Fluxes in Roots of Salt-Resistant and Salt-Sensitive Poplar》在国际知名植物学杂志《[plant physiology](#)》(2007IF6.367)发表。此次陈少良教授与旭月公司携手，以“非损伤微测技术”为主要实验手段对木本植物抗盐的生理机制进行了研究，取得了积极成果。这是国内近期利用“非损伤微测技术”取得的高水平成果之一。

目前，土壤的盐碱化引起了诸多农业生产和环境问题。盐胁迫对植物生长的影响在过去进行了大量研究，例如水稻、拟南芥等的盐胁迫，然而，木本植物的盐胁迫以及抗盐研究，不但难度大，而且对于机理的认识停滞不前。

这项工作使用“非损伤微测技术”中的SIET技术测定了抗盐品种胡杨和盐敏感型品种群众杨根和原生质体中的 H^+ 、 Na^+ 和 Cl^- 流。比较了短期处理（50 mM NaCl, 24 h）和长期处理（100 mM NaCl, 15d）两个品种间排钠的能力。LT胁迫的根原生质体，促进了 Na^+ 的外流，增加了 H^+ 的内流。这种NaCl诱导的 Na^+ / H^+ 交换被氨基吡嗪脒或原钒酸钠所抑制，说明胁迫后胡杨 Na^+ 的排出是 Na^+ / H^+ 反向转运体主动跨膜的结果。相比较而言， Na^+ / H^+ 反向转运体在盐胁迫后的群众杨根组织和细胞水平都缺乏排钠的能力，盐胁迫的胡杨根中保留着比群众杨更高的排 Cl^- 能力。胡杨根中NaCl诱导的 H^+ 、 Na^+ 和 Cl^- 流与等渗甘露醇所引起的离子流不同，表明NaCl诱导的根中离子流的转变主要是由离子效应所引起。

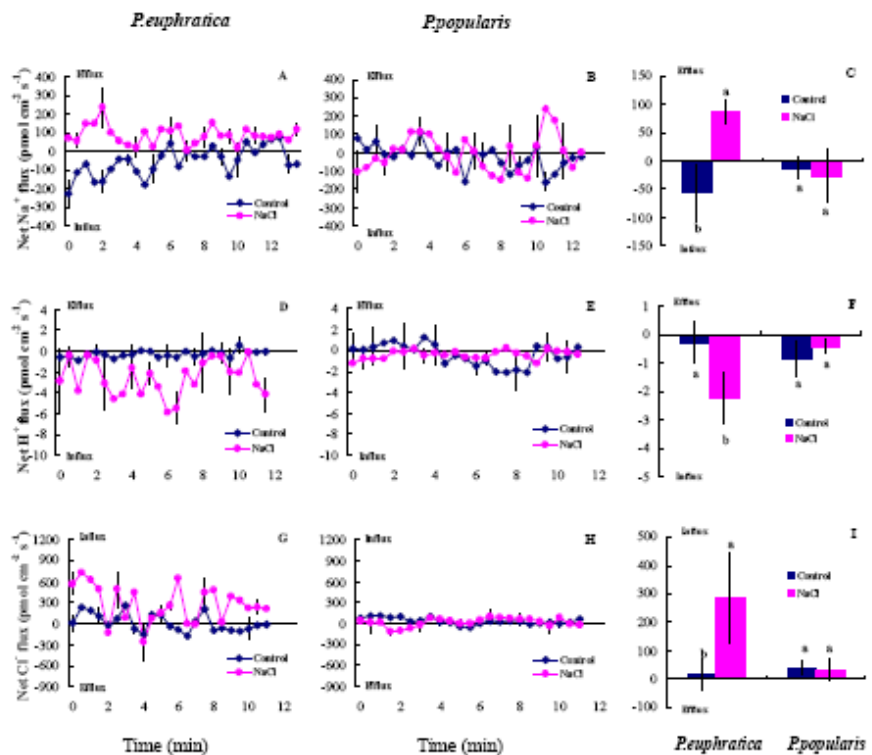


Figure 2. Net fluxes of Na^+ (A, B), H^+ (D, E) and Cl^- (G, H) in protoplasts isolated from control and LT-stressed roots of *P. euphratica* and *P. popularis*. A continuous flux recording of 10 to 12 min was conducted for each protoplast in corresponding measuring solutions (pH 6.0). Each point represents the mean of 5 to 6 individual protoplasts and bars represent the standard error of the mean. The mean fluxes of Na^+ , H^+ and Cl^- within the measuring periods are shown (C, F, I). Columns labeled with different letters (a, b) are significantly different at $p < 0.05$.

七、特色服务

1. 实验设计与改进

基于“非损伤微测技术”为您设计离子/分子测量的实验平台，建立个体化实验体系；将“非损伤微测技术”与荧光显像技术、膜片钳技术、分子生物学技术等结合，为您的实验设备提供改进服务。

2. 数据分析

通过基于非损伤微测技术的软件 Mageflux 为您提供数据的转换和简单分析。

3. 培训及出国进修推荐

美国扬格科技公司与旭月（北京）科技有限公司联合在京举办“非损伤微测技术”培训班，培训班采取小班授课、旭月公司专业工程师讲解以及“非损伤微测技术测试中心”实地观摩与操作的形式，以达到如下不同的培训目标：

A. 学员掌握这一世界先进技术的技术原理、特点及应用领域，并由工程师协助学员设计实验方案；

B. 学员了解“非损伤微测系统”的基本使用，并在工程师的辅助下完成学员样品的测量；

C. 学员达到较高的操作水平，可以独立、有效、安全地使用“非损伤微测系统”进行实验，培训合格后，将颁发由美国扬格科技公司和旭月（北京）科技有限公司联合认证的培训证书，成绩优秀者还可推荐出国到相关研究领域实验室进修。

4. 其他研发项目

承接各种离子/分子选择性微电极，相关研究领域的研发项目和工作。

美国扬格非损伤技术中心
旭月（北京）科技有限公司

八、附录

附 1：各种离子测试液及校正液（仅作参考）

H^+ (pH6.0) :

测试液成分:

0.1mM KCl, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.5mM NaCl, 0.2mM Na₂SO₄, 0.3mM MES, pH 6.0

注：1) H^+ 的测试液可与样品的培养液一致（培养液中没有过多的有机成分）；

2) 测试液的 pH 以培养环境的 pH 为参考。

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：pH 6.5，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：pH 5.5，其它成分和测试液相同。

Ca^{2+} (0.1mM) :

测试液成分:

0.1mM KCl, **0.1mM CaCl₂**, 0.1mM MgCl₂, 0.5mM NaCl, 0.2mM Na₂SO₄, 0.3mM MES, pH 6.0

注：测试液中被测离子 Ca^{2+} 的浓度应维持在一个较低的水平，由于不同二价阳离子之间会有竞争，所以其余二价阳离子（比如： Mg^{2+} ）的浓度也不宜过高，最好不要超过 Ca^{2+} 的浓度。

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：**0.05mM CaCl₂**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM CaCl₂**，其它成分和测试液相同。

Na^+ (0.9mM) :

测试液成分:

0.1mM KCl, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, **0.5mM NaCl**, **0.2mM Na₂SO₄**, 0.3mM MES, pH 6.0

注：1) 由于 K^+ 对 Na^+ 有一定影响，所以测试液中 K^+ 的浓度不宜过高，最好不要高于 Na^+ 的浓度；

2) pH最好用Tris（或氯化胆碱）和HCl来调，不要使用NaOH或KOH，否则引起溶液的 K^+ 和 Na^+ 浓度改变。

校正液成分:

校正液 1（低浓度 **0.5mM Na⁺**）：0.1mM NaCl，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度 **5mM Na⁺**）：4.6mM NaCl，其它成分和测试液相同。

K^+ (0.1mM) :

测试液成分:

0.1mM KCl, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.5mM NaCl, 0.2mM Na₂SO₄, 0.3mM MES, pH 6.0

注：pH最好用 Tris（或氯化胆碱）和 HCl 来调，不要使用 NaOH 或 KOH。

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：**0.05mM KCl**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM KCl**，其它成分和测试液相同。

Mg²⁺ (0.1mM) :

测试液成分:

0.1mM KCl, 0.1mM MgCl₂, 0.3mM MES, pH 6.0

注：1) Mg²⁺的测量易受其它离子的影响，所以测试液的成分不宜太复杂。

2) Ca²⁺和Mg²⁺具有明显的竞争作用，所以测试液中最好不要含有Ca²⁺。

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：**0.05mM MgCl₂**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM MgCl₂**，其它成分和测试液相同。

Cl⁻ (0.9mM) :

测试液成分:

0.1mM KCl, 0.05mM CaCl₂, 0.05mM MgCl₂, 0.6mM NaCl, 0.2mM Na₂SO₄, 0.3mM MES, pH 6.0

校正液成分:

校正液 1（低浓度 **0.5mM Cl⁻**）：**0.2mM NaCl**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度 **5mM Cl⁻**）：**4.7mM NaCl**，其它成分和测试液相同。

NH₄⁺ (0.1mM) :

测试液成分:

0.1mM NH₄Cl, 0.1mM KCl, 0.1mM CaCl₂, pH 6.0

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：**0.05mM NH₄Cl**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM NH₄Cl**，其它成分和测试液相同。

NO₃⁻ (0.1mM)

测试液成分:

0.1mM KNO₃, 0.1mM KCl, 0.1mM CaCl₂, pH 6.0

校正液成分:

校正液 1（低浓度）：**0.05mM KNO₃**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM KNO₃**，其它成分和测试液相同。

Cd²⁺ (0.1mM)

测试液成分:

0.1mM CdCl₂, 0.1mM KCl, 0.5mM NaCl, 0.2mM Na₂SO₄, 0.3mM MES, pH 6.0

注：由于二价阳离子之间会有竞争，所以测试液中最好不要含其他二价阳离子，或者二价阳离子（比如：Ca²⁺）的浓度不宜过高，最好不要高于Cd²⁺的浓度。

校正液成分：

校正液 1（低浓度）：**0.05mM CdCl₂**，其它成分和测试液相同。

校正液 2（高浓度）：**0.5mM CdCl₂**，其它成分和测试液相同。

O₂

可直接使用培养液作为测试液和校正液。

注释：

1. 如果需要调节渗透势，可视情况在测试液中加入 0.1%蔗糖(器官) 或 0.1%甘露醇(细胞)，或加入其他可调节渗透势的试剂（如：山梨醇）。由于这些药品浓度过高可能会改变水相，所以建议所加试剂的最高浓度分别是：蔗糖不宜超过 10%，甘露醇不宜超过 10%，山梨醇不宜超过 1%。
2. 测试液和校正液的成分仅供参考。如果培养液中被测离子的浓度比较低且其他成分不会对该离子的测量产生影响，可直接将培养液作为测试液使用；测试液的 pH 以平时培养环境的 pH 为参考，即尽量与平时培养环境的 pH 一致。
3. 测试液中被测离子的浓度包含于两个校正液的被测离子浓度梯度中。如：Ca²⁺的测试液中Ca²⁺的浓度为 0.1mM，两个校正液中Ca²⁺的浓度分别为 0.05mM和 0.5mM。
4. MES(Morpholineethanesulfonic acid): 吗啉乙磺酸，是一种 pH 缓冲液，适合 pH5.5-6.8 范围的缓冲。

附 2：常见离子扩散常数（参考）

离子种类	H ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Cd ²⁺	Mg ²⁺	O ₂
扩散常数 (D) (单位: ×10 ⁻⁵ cm ² /s) 25°C	9.37	0.79	2.86	1.96	2.03	2.089	2.044	0.72	0.71	2.51

附 3：测试中心地点

测试中心名称	测试中心地址
美国扬格非损伤技术中心 旭月公司测试中心	旭月（北京）科技有限公司，北京市海淀区苏州街 49-3 盈智大厦 601

九、支持与联系

如有问题请与美国扬格非损伤技术中心，旭月（北京）科技有限公司的工程师联系。

美国扬格非损伤技术中心

旭月（北京）科技有限公司测试中心

旭月（北京）科技有限公司

地址：北京海淀区苏州街 49-3 盈智大厦 601

邮编：100080

电话：(010)8262 2628，8262 2629

传真：(010)8262 2629

Email: lihua@xu-yue.com ; liuye@xu-yue.com ; pub@xu-yue.com ;

haolihua601@gmail.com ; liuye601@gmail.com