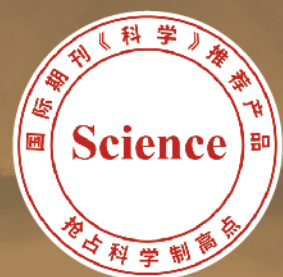
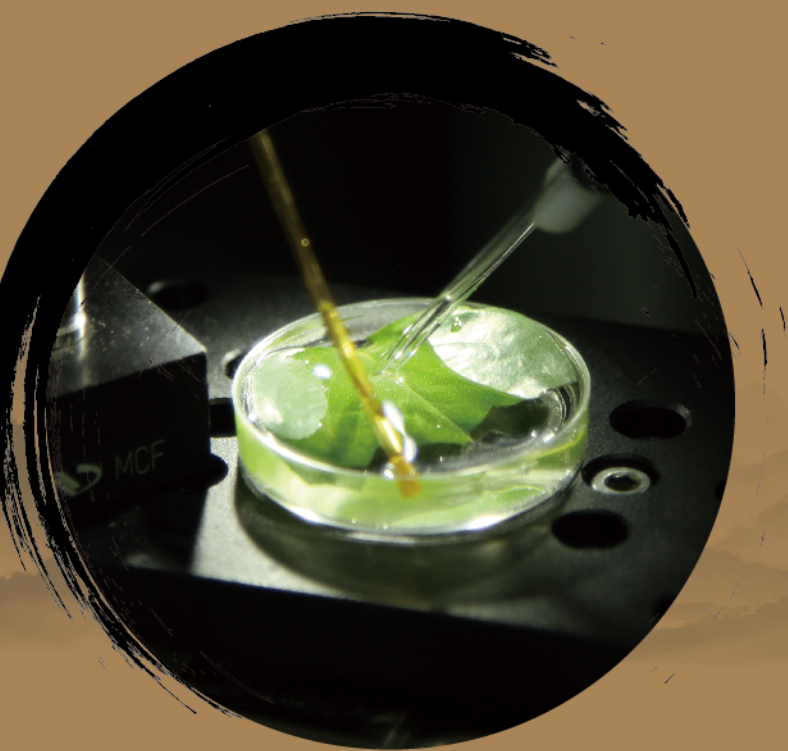


全国高等中医药院校教材项目
‘一带一路’科研带及转化路配套工程

范例专家参考版

NMT快速入门

— 中医药科研及成果转化指南 —



顾问及编委

顾问

匡廷云 院士（中国科学院植物研究所）

杨福愉 院士（中国科学院生物物理研究所）

林克椿 教授（北京大学医学部）

。 。 。 。

主 编

许越（NMT国际联盟）

。 。 。 。

副主编

刘蕴琦（中关村NMT产业联盟）

潘彦舒（北京中医药大学）

。 。 。 。

编 委

。 。 。 。 。

目 录

前言	11
第一章 非损伤微测技术 (NMT) 概述	12
一、简介	12
1. 定义:	12
2. 举例说明:	12
3. 技术特色:	13
二、应用	13
1. 生命科学:	13
2. 材料科学:	14
3. 地球化学:	14
4. 民生应用:	15
三、NMT特色	15
1. 活体/非损伤	15
2. 原位	15
3. 无需任何荧光或放射性标记	15
4. 实时/长时间检测	15
5. 1维, 2维, 3维测量	15
6. 实时/长时间检测	18
7. 精准可控材料外部微环境	18
8. 几乎不受材料大小尺寸的限制	18
9. 揭示离子分子运动的大小和方向	18
10. 多离子多分子自由组合同时检测	18
11. 人工智能与高通量自动化检测	18
四、系统组成	19
1. 硬件	19
2. 软件	19
3. NMT微传感器	19
1) 材质:	19
2) 种类:	19
五、起源及发展	20

1. 理论起源	20
2. 非损伤微测技术的诞生	20
3. NMT中国的机遇	20
1) NMT的中国特色	20
2) 科研应用现状	21
3) 技术现状	23
4) 未来趋势	23
六. 社会组织团体	24
1) NMT国际标准委员会	24
2) NMT产业联盟	24
3) NMT国际联盟	24
4) 创服中心网络	25
5) NMT认证机构	25
七、工作原理	26
第二章 NMT与中医药创新	27
一、从NMT看中医药走向世界的瓶颈	27
1. 西方科技研究中医药的瓶颈	27
2. 中医药研究自身发展的瓶颈	28
二、NMT技术实质与中医药研究	28
1. NMT实质是研究生物内（微）环境的技术	28
2. 从NMT看中医药研究的实质	28
3. 为中医药研究而生的NMT技术	29
三、应用NMT创新策略与实战举例	30
1. NMT中医药创新策略	30
2. NMT在中医药方面的研究进展	30
1) 石斛与Sebacina sp. 共生期间DoCCaMK的鉴定与表达	30
2) NMT用于甘草抗逆生理研究	31
3. 利用NMT实施中医药标准化	31
第三章 与其他相关技术比较优势及联合应用	32
一、NMT相比传统离子分子微电极（传感器）的优势	32
二、从膜片钳PC到非损伤微测技术NMT	33
1. 愿望与挑战	33
1) 选择性/特异性离子/分子传感器（物质）的研发	34

2) 传感器的反应速度及其电学漂移	35
3) 细胞内部及外部的化学及非化学物质的干扰	35
2. 时间与空间	36
1) 时间	36
2) 空间	37
3) 引发的其它联想	39
i. 生物体是多维的立体空间结构, 生命活动和生理现象发生在不同的时间尺度	39
ii. 每一项技术都有其时间分辨率和空间分辨率上的特色或极限	39
3. 现状与未来	40
i. 零'电流问题	41
ii. 其它离子运输载体和方式的研究	41
iii. 其它离子运输载体和方式的研究	41
iv. 物理机械损伤	41
5) 寄语	42
三、NMT 如何与激光共聚焦结合使用?	44
1. 什么是激光共聚焦技术?	44
2. NMT 相比激光共聚焦技术有何优势?	44
3. NMT 同激光共聚焦联用: 胞外Ca ²⁺ 参与了玉米生殖细胞融合过程	45
四、NMT 与 SVET、RTCA技术	45
1. 本质区别	45
2. 差异总结	45
3. 多技术联用	45
五、NMT 与 原子吸收、同位素示踪、CT/NMR	45
六、NMT 与 海马Seahorse的区别	45
第四章 NMT科研应用范例	47
一、利用NMT如何开题?	47
1. 生命科学发展机遇	47
2. NMT技术优势	48
二、开题范例	50
1. NMT 在太空生物学中的应用	50
2. NMT 在转基因研究中的应用	58
3. NMT 在植物逆境研究中有哪些具体应用案例?	59
4. NMT 在植物营养研究中的应用	60

5. NMT 在植物信号转导研究中的应用	61
6. NMT 在植物发育研究中的应用	62
6. NMT 在植物光合作用研究中的应用	63
8. NMT 在重金属相关研究中的应用	64
9. NMT 在神经研究中的应用	65
10. NMT 在活体肿瘤研究中的应用	66
11. 应用NMT进行药物筛选	67
12. NMT 在糖尿病病研究中的应用	68
12. NMT 在细胞凋亡研究中的应用	69
三、常问解答	70
1. NMT在环境领域的应用，目前文献很少，能否直接告诉我，NMT可以帮我做什么？	70
2. 将细胞器分离出来，将植物根切下来的研究，还能称得上是“非损伤”吗？ ...	70
3. 放到土里培养的植物可以检测吗？重复性能保障吗？	70
4. 我的植物材料必须土培，NMT能做吗？重复性能保障吗？	71
5. 听说想获得重复性好的活体生理数据，特别不容易，NMT也是这样吗？ ...	71
6. 我是研究环境生态的，比较宏观，能用得上NMT吗？	71
第五章 功能组学 (imOmics) 与中医药	72
一、 NMT活体功能组学	72
1. 起源及定义	72
1) 起源	72
2) 定义	72
2. 软硬件要求	73
3. 研究场景举例	73
4. 未来发展愿景	73
第六章 NMT实验设计	74
一、 NMT活体功能组学	74
二、 测试液与校正液	74
1. NMT测试液	74
2. 测试液和校正液设计时需要遵循的原则	74
1) 一般性原则	74
2) 测试液缓冲成份的选取原则	75

3) 测试液的配制贮存原则	75
三、NMT 对植物样品的要求	75
1. 培养条件	75
2. 样品状态	75
3. 样品选取	75
4. 前期处理	76
5. 样品固定	76
第七章 NMT 数据特点与分析	77
一、NMT数据是什么样的数据?	77
二、NMT数据重复性的挑战	79
三、挑战后面隐藏的机遇	79
1. ‘飘忽不定’的规律	79
2. “随机”的数据就是正确的结果	81
四、常用工具	82
1. iFluxes软件数据处理	82
2. 流速云	82
3. Paint Shop Pro抓图软件应用	82
4. 流速换算	82
5. imFluxes-NMT3D数据可视化	82
第八章 NMT 文献发表	83
一、NMT 方法学的撰写	83
二、NMT 数据篇幅	83
三、接收和发表 NMT 流速数据成果的 SCI 期刊	83
第九章 NMT文章审稿意见回复	84
一、如何确定 NMT 传感器测到的流速值为样品真实信号?	84
1.如何简单说明NMT离子分子传感器的选择性/特异性定性问题?	84
2.如何说明所测到的离子分子流速概念?	86
3. 背景信号的重要价值	87
4. 人工信号源: NMT人的法宝	87
二、NMT 检测到的分子、离子流速趋势与预期不符, 如何解释?	88
1. 前期培养	88
2. 样品处理	88
3. 取样方法	88

4. 测试液成份	88
5. 检测位点	88
三、营养研究时检测到根部 NH^+ 、 NO^- 信号为外排，如何调整实验体系？	88
四、离体组织（切除的根、撕下的叶片）离子流与真实条件下的信号是否有差异？	88
五、测试液成份与生长环境有差异会对流速结果造成影响吗？	89
第十章 NMT在教学中的应用	89
一、教学版NMT系统	89
二、国内NMT教材	91
三、与 NMT相关的文献资源	91
1. 英文论著	91
2. NMT 中英文综述	92
3. 中文论著	93
四、NMT教学版与科研版对比	93
第十一章 NMT科研成果转化	96
一、前言	96
二、NMT科研成果转化经验	97
三、民生NMT成果转化范例	99
1. 《公共场所空气恐怖攻击（含新冠病毒）报警系统》	99
2. 《冷链运输有害微生物（含新冠病毒）快速检测仪》	99
3. 精准化疗个体化用药	99
4. 老年痴呆风险评估	99
5. 水健康指数	99
附录	100
附录一 NMT技术常用单位及换算	100
附录二 NMT领域常用词语及词汇	100
附录三 流速换算表	100
附录四 实验方案体系标准	100
一.盐胁迫 Na^+ 吸收实验体系标准	100
二、重金属胁迫测Cd实验体系标准	101
三、植物营养 NH_4^+ 、 NO_3^- 实验体系标准	102
四、植物免疫 Ca^{2+} 流（测叶肉细胞）实验体系标准	103
五、植物免疫 Ca^{2+} 流（测根）实验体系标准	104
附录五 NMT 知识库算	104
附录六 NMT产品系列	104

前言

习近平主席指出：“中医药是中华文明的一个瑰宝，凝聚着中国人民和中华民族的博大智慧。要遵循中医药发展规律，传承精华，守正创新，加快推进中医药现代化、产业化，坚持中西医并重，推动中医药和西医药相互补充、协调发展，推动中医药事业和产业高质量发展，推动中医药走向世界。”

那么，什么样的研究方法和手段能够帮助中医药现代化呢？

‘天人合一’和‘阴阳平衡’既是中华文明的精髓，也是中医药重要的理论基础和实践指南。但是人体究竟如何与外界环境做到协调统一？‘阴阳平衡’的生物学基础又是什么？始终缺少现代科学数据的有效支撑。

非损伤微测技术（NMT: Non-invasive Micro-test Technology）是目前世界上先进的，揭示活体材料与外界环境进行物质和信息交换的一种技术。也是研究生物体微环境离子分子动态平衡的一种手段。

因此，NMT必将在中医药机理的阐明和中医药实践过程中发挥不可或缺的积极推动作用。

《NMT快速入门》中医药科研及成果转化指南，是《中关村NMT产业联盟》贯彻国家科教兴国战略的具体举措之一，旨在汇集中医药各领域专家学者的智慧，结合非损伤微测技术的多年研发成果，搭建中医药学者与NMT技术专家的沟通平台，探索中医药应用NMT进行理论创新和实践创新的有效方法，开启用现代生物科技阐明传统中医中药作用机理的历史新征程，为中医药走向世界，为中华文明的伟大复兴贡献我们的力量。

许越
NMT创始人
北京，2022年7月

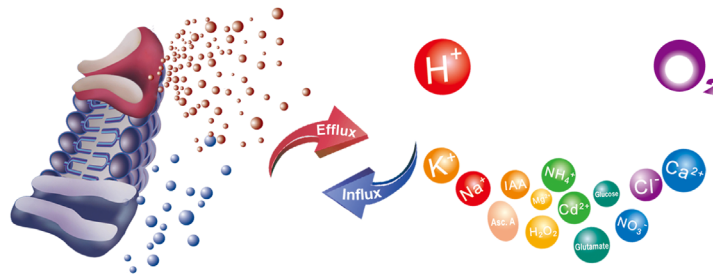
第一章 非损伤微测技术（NMT）概述

一、简介

1. 定义：

非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology: NMT）是一种超高灵敏度，非接触、流速为单位，检测材料外部离子分子浓度及其梯度的技术。

NMT不但揭示活体材料与外界环境进行的物质和信息交换，而且也是研究生物体微环境离子分子稳态及其动态平衡的一种手段。



2. 举例说明：

如同DNA测序技术通过检测脱氧核糖核酸揭示遗传信息一样，NMT技术通过检测离子分子流速来揭示生物活体生理功能。

	DNA测序仪 (基因序列分析仪)	非损伤微测系统 (NMT活体生理功能检测仪)
检测	脱氧核糖核酸	离子分子流速
揭示	遗传信息	生理功能
举例	AAA和AAG (编码赖氨酸)	O ₂ (? 升/厘米 ² /秒)
组学	Genomics 基因组学	imOmics 动态分离子组学

3. 技术特色：

非损伤微测技术特色一览表	
技术特色	活体、动态、实时、定量、快速、原位、液态环境、无需标记、多指标同时检测
材料优势	微生物→细胞器→单细胞→细胞层→组织→器官→整体
NMT检测指标	H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 O_2 、 H_2O_2 、IAA
应用举例	Ca^{2+} 与信号传递和细胞凋亡等生理功能相关； O_2 与能量代谢和呼吸代谢等生理功能相关；

注：目前，重金属 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 也可以检测。

二、应用

主要有科研领域和民生领域。科研领域有生命科学和材料科学两个领域。

1. 生命科学：

离子和分子稳态是所有生命的共同基本特征之一，且是一种动态平衡。它不断微调以响应细胞器、细胞、组织、器官和整个生物体的内部和外部环境变化。该动态平衡是通过维持各类生物膜两侧的离子和分子浓度梯度来实现的。非损伤微测技术则通过检测这些跨膜运动离子分子形成的浓度梯度，揭示活体材料的离子分子稳态这一生命基本特征，及其相关的生理功能与机制。

- 1) 植物
 - i. 农业
 - ii. 林业
- 2) 动物
- 3) 微生物
- 4) 医学
- 5) 生态环境
- 6) 中医中药

离子和分子稳态平衡是所有生命的共同基本特征之一，且是一种动态平衡。它不断微调以响应细胞器、细胞、组织、器官和整个生物体的内部和外部环境变化。该动态平衡是通过维持各类生物膜两侧的离子和分子浓度梯度来实现的。非损伤微测技术则通过检测这些跨膜运动离子分子形成的浓度梯度，揭示活体材料的离子分子稳态这一生命基本特征，及其相关的生理功能与机制。

2. 材料科学：

离子分子不仅是构成材料的基本元素，同时也是它们与外界环境进行物质及信息交换的重要载体。这种交换过程会在材料表面形成离子分子浓度梯度，非损伤微测技术就是通过检测这些离子分子浓度梯度，揭示金属材料的腐蚀机制，以及生物材料的生物相容性机理。

- 1) 金属腐蚀
- 2) 医学材料

3. 地球化学：

地球化学是研究地球的化学组成、化学作用和化学演化的科学。

NMT高灵敏度检测各种离子分子的能力，在揭示它们的迁移、富集和分散规律，研究地球乃至天体的化学演化，各种岩类以及各种地质体中这些离子分子的动态平衡、在时间和空间上的变化规律，将发挥重要作用。

- 1) 生物选矿

利用微生物，动植物对不同矿藏的选择性、特异性生理反应，提高选矿成功概率。

NMT正是可以解析这些微生物和动植物的这些反应，从而为选矿提供可量化的（大）数据。

- 2) 环境地球化学

环境地球化学的是以保护人类健康为原则，研究化学元素在人与自然界交换的过程，并利用其研究成果为人类服务。

NMT揭示被测物质与环境之间的离子分子交换的特点，为研究这些化学元素在自然界内部各个组份间的交换机制提供了技术基础。

- 3) 高温高压对物质的影响

高温高压环境对物质的影响，可以通过NMT的离子分子检测反映出来。

- 4) 月球与太空研究

在月球等太空环境下，生命物质及非生命物质如何与外界环境进行物质和信息交换，NMT可以提供必须的检测手段。

- 5) 生态环境与资源利用

保护好生态环境和利用好生态资源的前提是深度了解生态环境和资源，而NMT通过检测离子分子，让我们能够将生态环境和资源进行量化研究，并探知其内部相互关系。也已证明NMT在土壤重金属研究与治理等方面可以发挥重要作用。

4. 民生应用：

随着NMT技术在生命科学和材料科学中的应用持续深入，各种离子分子所参与的功能和机制不断被阐明，相关的民生应用开始加速涌现。比如：医疗精准用药、空气/水微生物（含新冠病毒）污染检测、高通量种子活力生理检测、老年痴呆快速评估、生殖组织细胞活性快速检测、个性化农作物经济施肥评估等等。

三、NMT特色

1. 活体/非损伤

不言而喻，活体研究对于生物医学的理论阐明和实际应用都具有十分重要的意义，因为它最为贴近生物体的真实生理状态。这也是NMT对生命科学工作者吸引力最大的技术特色之一。

2. 原位

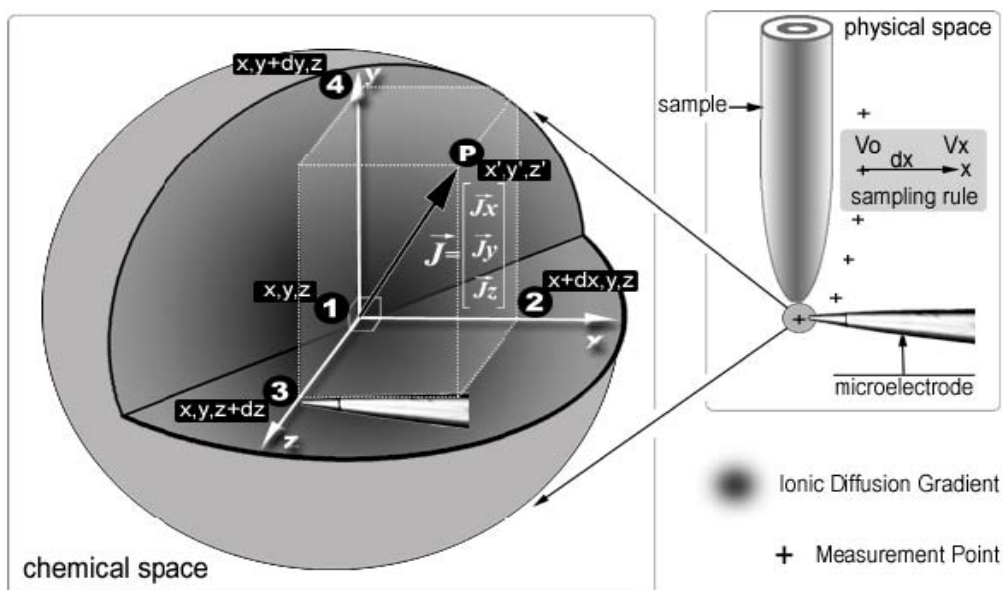
NMT微米级的空间分辨率，可以对被测材料进行精确定位检测，从而揭示不同部位、不同区域的离子分子进出变化。

3. 无需任何荧光或放射性标记

4. 实时/长时间检测

5. 1维，2维，3维测量

1) 3D组织NMT研究：下一个科研热点？！

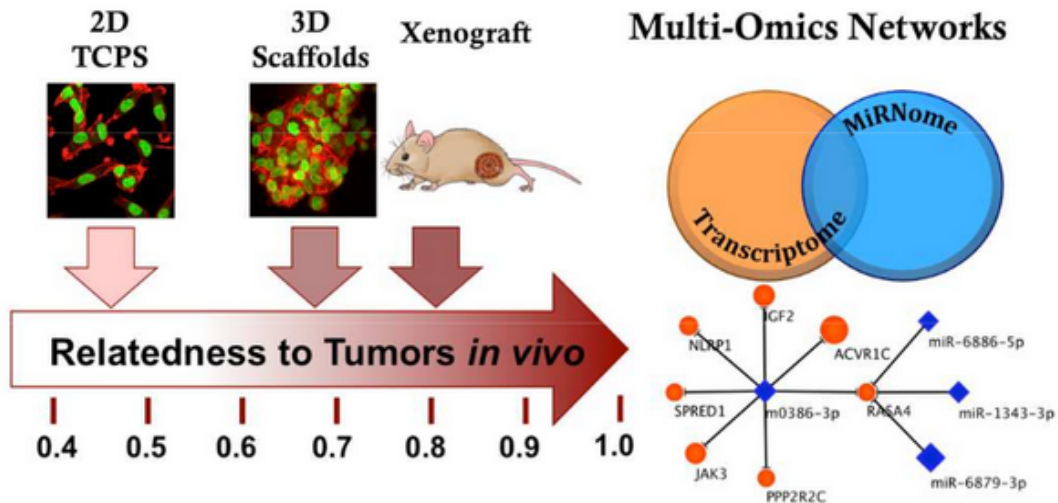


活体组织Ca²⁺流3D检测

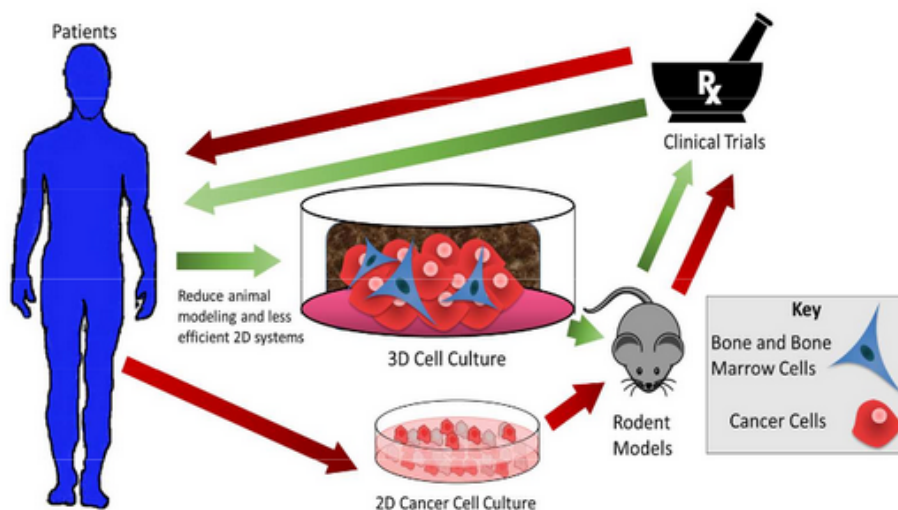
尽管NMT的3D功能技术发展远远超前于科学界多年，但进入2018年，世界范围内的生命科学工作者，尤其是动物医学研究人员，不约而同地把各自的研究兴趣放到了人体/动物活体组织的三维（3D）立体研究上。

笔者发现，仅就美国化学社团（American Chemical Society: ACS）今年就连发了两篇相关文章。

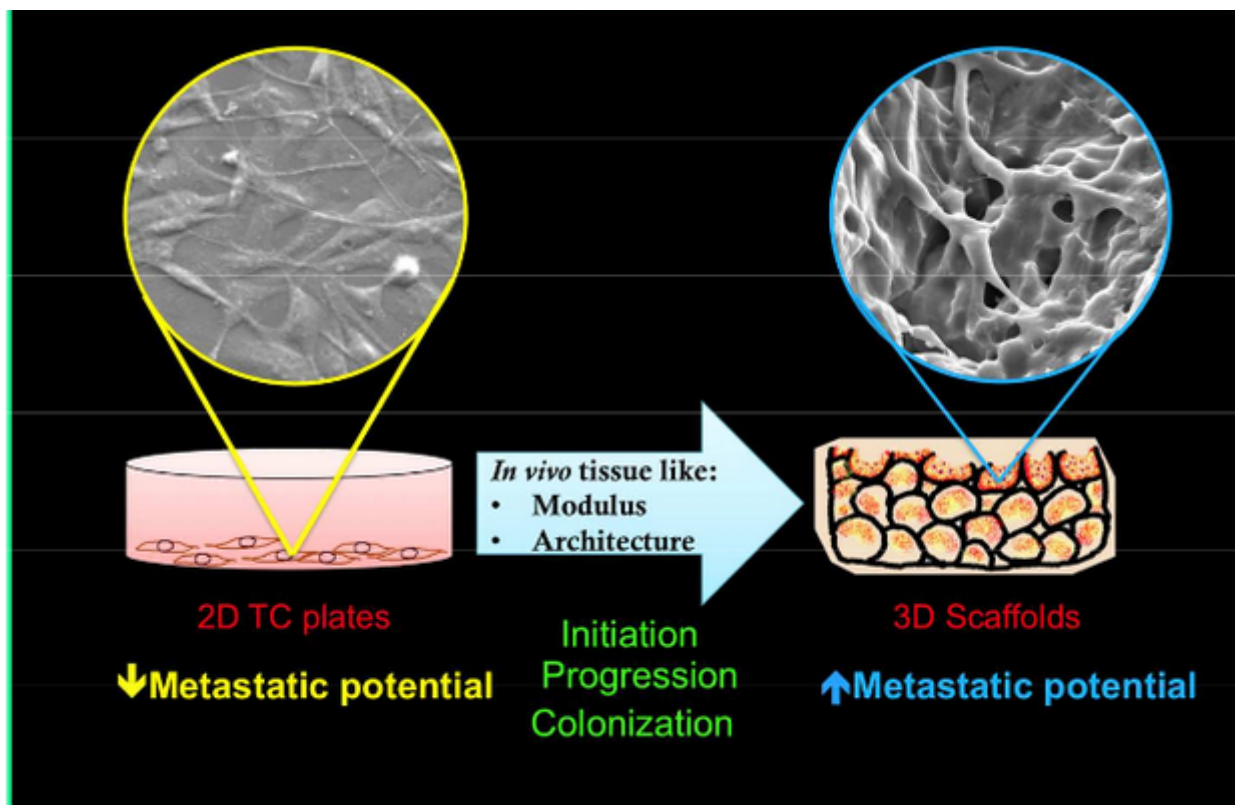
其中一篇基于组织工程的三维（3D）模具不仅可以模拟体内组织，而且具备一些传统二维（2D）培养没有的几个优势。其中最大的优势就是在3D模型条件下，提供了过去从未能够研究过的，相关基因表达转录后的微调信号及其网络。在这项研究中，通过使用新一代测序（NGS）来分析在3D支架上培养的MDA-MB-231乳腺癌细胞中转录后调节的变化，确定了几种关键的miRNA-mRNA相互作用，这些相互作用可能有助于预判乳腺癌的转移。



另一篇是骨癌生物3D模型的建立，该模型为研究接近体内环境条件下，过去通常因为过于复杂而无法研究的细胞互作或蛋白质互作提供了可能。这篇综述还深入描述了组织工程3D骨骼和癌症模型，并与2D模型进行了比较。描述了使用的生物材料和细胞类型，并且提出了组织工程化骨癌模型领域的未来方向。



另一篇2015的ACS文章则是一种三维（3D）支架系统的研发，它可以更好地模拟乳腺肿瘤的立体形貌和机械特性，从而在体外重建肿瘤微环境以研究乳腺癌转移。比较基因表达分析显示，与在常规2D组织培养聚苯乙烯中生长的细胞相比，在3D支架中生长的细胞表达与转移的三个主要事件（即，起始，进展和位点特异性定植）相关的基因水平均有所增加，说明该系统可作为一个综合的体外模型来研究乳腺癌转移的多种机制。



参考文献:

- Application of Non-invasive Microsensing System to Simultaneously Measure Both H⁺ and O₂ Fluxes Around the Pollen Tube
Journal of Integrative Plant Biology 2006, 48 (7): 823–831
- MiRNomics Reveals Breast Cancer Cells Cultured on 3D Scaffolds Better Mimic Tumors in Vivo than Conventional 2D Culture
ACS Biomater. Sci. Eng., 2018, 4 (1), pp 116–127
DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00694
- 3D Tissue Engineered in Vitro Models of Cancer in Bone
ACS Biomater. Sci. Eng., 2018, 4 (2), pp 324–336
DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00097
- Enhanced Metastatic Potential in a 3D Tissue Scaffold toward a Comprehensive in Vitro Model for Breast Cancer Metastasis
ACS Appl. Mater. Interfaces, 2015, 7 (50), pp 27810–27822
DOI: 10.1021/acsam.5b09064

6. 实时/长时间检测
7. 精准可控材料外部微环境
8. 几乎不受材料大小尺寸的限制
9. 揭示离子分子运动的大小和方向
10. 多离子多分子自由组合同时检测
11. 人工智能与高通量自动化检测

四、系统组成

1. 硬件

- 1) 信号采集模块
- 2) 运动控制模块
- 3) 光学成像模块
- 4) 辅助设备
 - i. 光学防震装置 (Anti-Vibration Table)
 - ii. 法拉第电磁信号屏蔽装置 (Farady Cage)
 - iii. 人工智能自动化NMT传感器制备装置 (aiNSM)
 - iv. 环境参数NMT数据同步记录仪 (PEP)
 - v. 温度胁迫NMT实验装置 (TIA)
 - vi. 电源净化及不间断电源 (UPS)

2. 软件

3. NMT微传感器

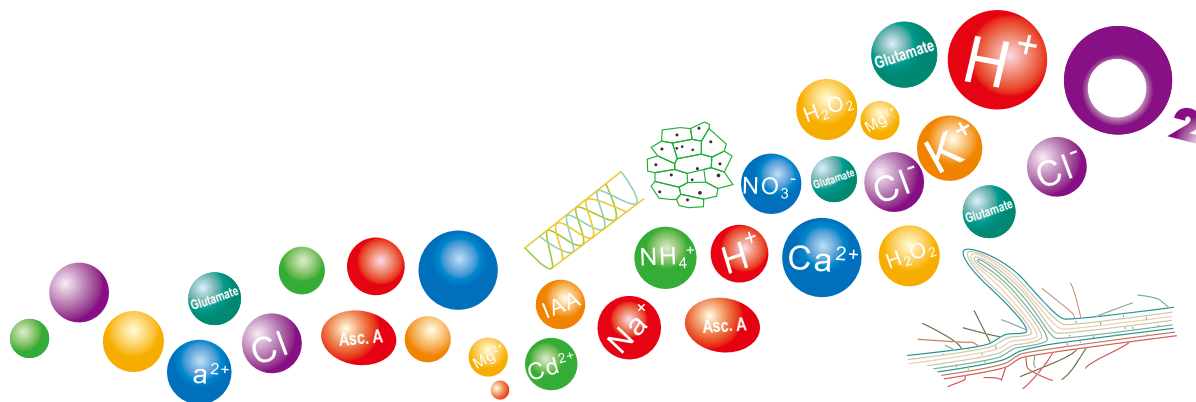
NMT微传感器是满足非损伤微测技术规格及标准的微型传感器。

1) 材质:

荧光染料/光纤、纳米碳丝、酶电极、金属/合金等。

2) 种类:

Ca^{2+} 、 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 、 Ar^+ 、 Cs^+ 、 Tl^+ 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 HPO_4^{2-} 、 O_2 、IAA、 H_2O_2 、葡萄糖、抗坏血酸、谷氨酸、水杨酸、尿素等。



五、起源及发展

1. 理论起源

美国科学家Lionel Jaffe于1974年提出钙离子振荡电极技术（Vibrating Probe: VP）。

2. 非损伤微测技术的诞生

非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology: NMT）的诞生及其命名，是许越教授与匡廷云院士、杨福愉院士、林克椿教授等科学家一道，在振荡电极技术基础上，以2005年创立的旭月（北京）科技有限公司为技术支持和商业后盾，经过分子离子种类扩增，测量精度的大幅提升，测量方式的模块化、自动化、专业化、智能化、标准化改进，以及3D立体数据采集及动画演示等新功能的成功研发而成。目前，非损伤微测技术已成为世界上同类型VP技术商业化产品，比如澳洲：MIFE，美国：SIET、SERIS等品牌中的一员，并于2021年通过科技部世界领先评审。

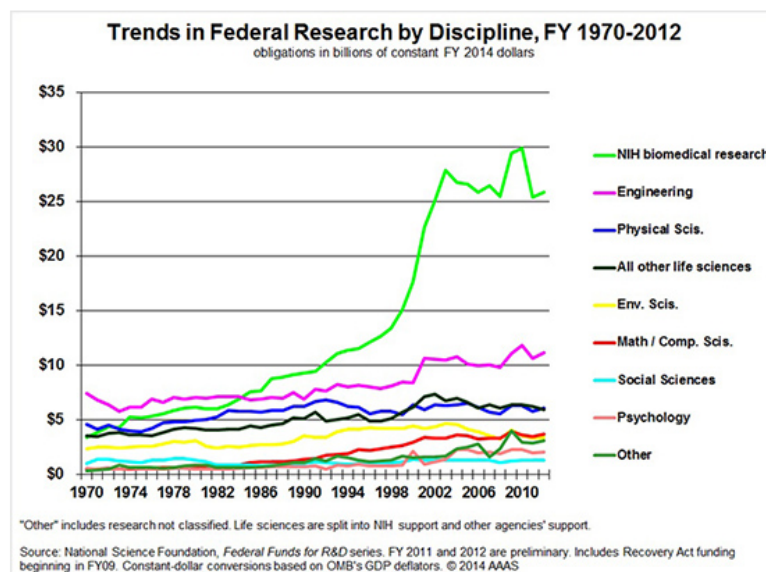


3. NMT中国的机遇

随着中国的经济崛起和综合国力的不断增强。中国目前是世界上，拥有非损伤微测系统实验室数量最多的国家，也是非损伤微测技术从研发到技术支持专业人员最多的国度。而且十几年来积累了一批这方面的专家，教授和学生群体。因此，无论在技术还是人才方面，中国都有着傲视世界的先发优势。

1) NMT的中国特色

大家知道，各个国家对动物医学研究的投入通常要远远高于对其它研究领域的投入。下图是美国在医疗健康上面的投入是其它领域的5-10倍，在中国动物医学方面的投入大概是植物学研究的6倍左右（来自于个人通讯）。



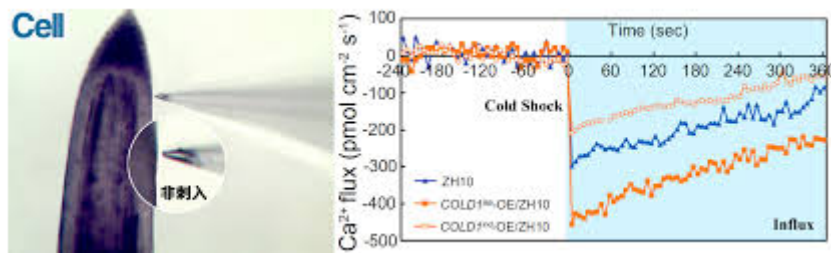
（来自于网络）

因此，在绝大多数情况下，很多生命科学的新技术，新思路，新突破，都是来自于动物医学领域，然后传导到其它科研领域，正如在本文的第一部分“<http://blog.sciencenet.cn/blog-705-1109417.html>”中所叙述的那样，膜片钳技术诞生于动物神经细胞单通道离子电流（烟碱乙酰胆碱受体）的研究，90年代进入中国后，也被首先应用于动物医学研究。

然而，非损伤微测技术在生命研究领域的发展，却划出了一个自己较为独特的发展轨迹。

首先，大家去问问用膜片钳搞植物研究的科研人员，他们有多么羡慕用膜片钳进行动物医学研究的同行们，因为植物有细胞壁，研究植物的人必须要先用各种消化酶去除细胞壁后，才可以形成膜片钳技术必须的玻璃电极与细胞膜之间的高阻封接。

那么，大家可以想象，不用去除细胞壁就可以研究植物与外界环境的离子/分子交换信息，这对于搞植物研究的人该有多么大的吸引力呀！姑且不说，细胞壁作为植物细胞完整结构的一部分，在功能上更是不可或缺的重要环节，将其人为去除后，其结果的理论价值必然大打折扣外，单就技术上给植物学家们带来的简单、便捷和快速，就让大家兴奋不已。



因此，在国际上自从NMT诞生之日起，植物研究学者们对它的追求从来没有逊色于动物医学研究的同行们。而中国自身为农业国，在植物领域的研究底子好，投入又大。可能也加之旭月公司创始人自身的植物研究出身的背景，使得非损伤微测技术在中国的发展一路走来，在植物领域的发展要远远胜于在动物医学的发展，数据显示，在中国科学家至今发表的200多篇NMT应用已发表文献里，80%以上是来自植物领域的研究（数据来自<http://nmtia.org.cn>）。

2) 科研应用现状

膜片钳技术在这二十几年的发展使其已经深深地融入了全世界生命科研活动的各个方面。在中国也不例外，这些年我国科研人员利用该技术取得了丰硕的科研成果，尤其是植物研究领域，以武维华、种康、刘春明等为代表的科研人员利用膜片钳技术在植物生理生化方面取得了系列世界级的成果。

我国的动物医学研究方面，以周专、徐涛、王世强、王立伟、陈丽新、祁金顺等科学家为代表在诸多领域也已处于世界科技前沿。

但就我个人在国外多年的所见所闻来看，我国在动物医学方面没有比现在发展的更快更好一些的一个重要原因是中国这方面的人才流失比较严重。我在哈佛、耶鲁等大学见到很多国内培养的膜片钳高手。即：国内培养出来后，在就要出成果的时候，却来到国外为国外的课题所用了。想必周专老师他们对这点肯定有更深更多的感受吧。

非损伤微测技术在中国的普及应用，相比膜片钳技术有两个先天不足。一是进入中国要晚近10年的

时间；二是没有膜片钳那样一开始便伴随着诺贝尔奖的耀眼光环。

但是，非损伤微测技术也有其自身的优势，其一是进入中国适逢国家对基础科研的投入要远远大于90年代膜片钳进入时期；二是有匡廷云、杨福愉、林克椿、叶鑫生、高荣孚、尹伟伦、赵微平、邱泽生等老一辈科学家的鼎力支持。



（上图来自于网络）

所以，尽管非损伤微测技术进入中国时间不长，但是发展十分迅速，不但以印丽萍、陈少良、沈应柏、许卫峰、罗志斌等中青年科学家，利用非损伤微测技术快速将自身科研提升至世界水平，刚才所列的武维华、王立伟等国内膜片钳技术专家也已利用NMT，并结合膜片钳技术做出了世界一流的科研成果。

3) 技术现状

全自动膜片钳虽然已于近年面市，但是传统的膜片钳技术仍然在生理、相关基因功能验证等基础研究领域，发挥着不可替代的作用。而全自动膜片钳虽然提高了数据的单位产出量，但似乎更多地被应用于药物研发、药效评价等应用领域，其对科研基础理论的贡献和潜力还有待于观察。



智能化的NMT传感器制备装置，已经于2016年在中国市场有售，标志着非损伤微测技术开启了追赶膜片钳自动化的步伐。

尽管数据的单位时间产出量，即：高通量并不是非损伤微测技术的优势，但是，鉴于该技术的长处之一就在于它的实时测量，即在正常生理时间尺度内，揭示生物的活体生理功能。

相反，将非损伤微测技术与膜片钳技术相比，比较容易一叶障目的误区就是把非损伤微测技术的应用限制在了只是生物膜的层面。其所谓‘成也萧何，败也萧何！’，膜片钳的高阻封接成就了它的单通道测量，但同时也制约了它的测量材料的灵活性。而反观非损伤微测技术，因为不接触被测材料，所以在材料的选择上就有了极大的自由度。

特别是近年的科学发现表明，如我在（2）时间和空间里所述，人类的各种疾病的答案，不在基因层面（半个多世纪寻找癌症基因努力的失败就是例证），甚至不在细胞层面，这就给组织层面的研究打开了广阔的新天地。当我们环顾实验室四周，能够帮助我们研究活体组织的技术凤毛麟角，而像非损伤微测技术这样完全近乎无损的技术更是难觅。

加之进一步的研究表明，比如癌症的发生发展是和其组织微环境的改变密切相关，那么，还有什么技术比非损伤微测技术，这一能够在活体状况下检测微环境中各种离子分子活性的技术更合适的呢！

山西医科大学的祁金顺教授，利用非损伤微测技术建立起的脑切片组织生理检测试验体系，就是这方面的一个很好的例证（具体描述请浏览：<http://e.vhall.com/133934064> 或 http://xbi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=516&Itemid=907&lang=cn）。

4) 未来趋势

六. 社会组织团体

1) NMT国际标准委员会



2) NMT产业联盟



《中关村旭日非损伤微测技术产业联盟》（简称“中关村NMT联盟”），创始于2015年9月，是由北京中关村示范区内国家高新技术企业和知名高等院校科研院所自愿联合发起成立的，北京市社会团体登记管理机关核准登记并监督运行的非营利性社会团体。

中关村NMT联盟的宗旨是配合国家科技创新发展战略，应对日益激烈的国际科技竞争，发挥制度优势、先发优势、区域优势，打造具有世界影响力的，先进NMT技术产业集群。联盟将利用过去十几年来，中国在NMT技术创新、产品研发、科研应用及产业化方面所积累的世界领先优势，搭建中国NMT技术的公共服务平台，一方面通过拓展NMT科研应用领域，进一步确立中国在NMT领域的领先地位，努力扩大在全球的影响力；另一方面通过鼓励产学研合作，加速NMT的科技成果转化和产业化进程。

联盟主要发起单位，有中国NMT技术及产业化先驱者和领军者——旭日（北京）科技有限公司，其他代表性会员单位：北京医院、中科院烟台海岸带研究所、中国农业大学、北京农业信息技术研究中心、山东显微科学仪器有限公司、北京师范大学等单位会员36家，其中高校15家；科研院所13家；企业8家。

3) NMT国际联盟



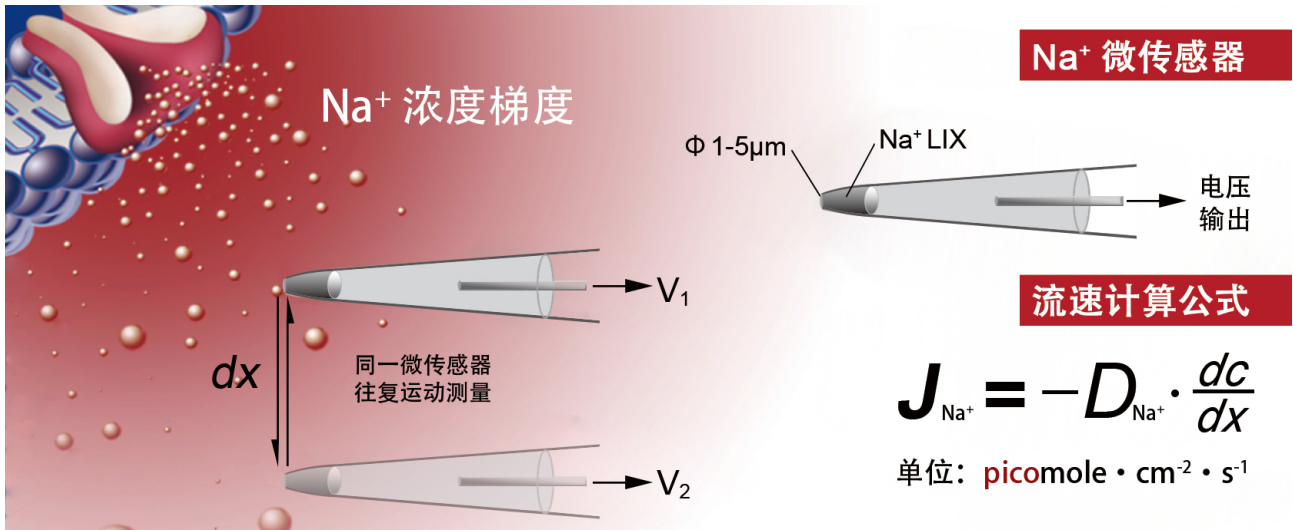
4) 创服中心网络

5) NMT认证机构



七、工作原理

以测量细胞外的Na⁺浓度梯度为例，说明其基本的工作原理。



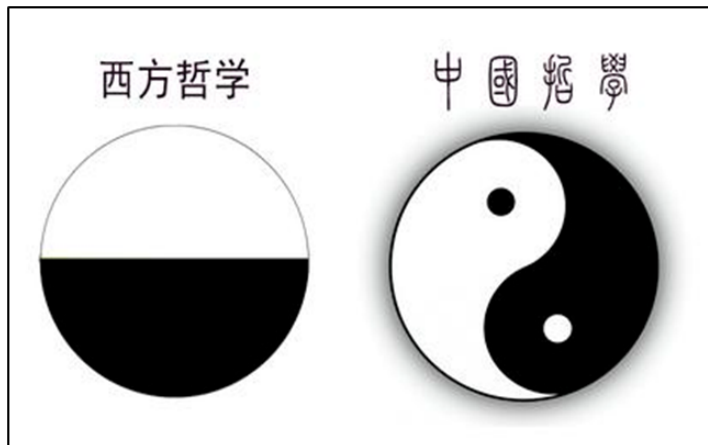
Na⁺微传感器通过前端灌充的液态离子交换剂（Liquid Ion eXchanger, LIX）实现Na⁺的选择性检测。该微传感器尖端开口通常为1-5微米，在Na⁺浓度梯度中以已知距离 dx 进行0.3Hz频率的两点往复测量，分别获得电压 V_1 和 V_2 。两点间的浓度差 dc 则可以从 V_1 、 V_2 及已知的该微传感器的电压/浓度校正曲线(基于Nernst方程)计算获得。 D 是Na⁺离子的扩散常数(单位: cm·sec)，将它们代入Fick第一扩散定律公式 $J = -D \cdot dc/dx$ ，可获得该离子的流动速率，mol·cm·s，即：每秒钟通过每平方厘米的该离子分子的摩尔数。

第二章 NMT与中医药创新

一、从NMT看中医药走向世界的瓶颈

1. 西方科技研究中医药的瓶颈

与西方的0/1文化和丛林哲学不同，中华文化的包容与天人合一的哲学理念是中医药赖以生存和发展的沃土。而现代西方文化/科技/经济等方面呈现的疲态及全方位发展放缓，甚至有些领域陷入危机，实质上是它哲学发展的停滞和僵化思想的瓶颈所致。达尔文与拉马克不同的进化论不但是西方这种零和文化在科学上的具体表现，而且随后百年来的停滞不前，更彰显了西方文明的强弩之态。



(来自于互联网)

虽然不可否认的是，从列文·虎克发现细胞到人类基因组计划，西方生命科学一路走来，依托工业革命所提供的众多技术革新，使人类对生命现象本质的认识有了长足的进步。但是，以攻克癌症的努力为例，人类半个多世纪来，主要以西方医学为主导的，寻找癌症等重大疾病开关/关键基因努力的失败，也是西方医学在其文化和哲学影响和指导下的必然结果。

因此，在2000年以后，在Nautre等期刊上开始出现应该重视对肿瘤微环境 (<https://www.nature.com/articles/35077241>) 的研究的观点，而且在2018年诺贝尔生理医学奖(<https://www.nature.com/collections/gqznlfnkz>)颁发给癌症免疫治疗方法之后，马上有Nature文章指出，将肿瘤微环境(<https://www.nature.com/articles/s41591-018-0014-x>)搞清楚才是免疫治疗成功之关键。即：要想解决医学问题，只关注细胞，DNA这些绝对物质是不行的，必须要联系它们所处的外部环境，才能够真正和彻底地解决问题。



(来自于互联网)

实际上，现在很多人都感觉到，现在西方医学的观点怎么越来越有些像中医药的观点了，即：不再把所有疾病（尤其是重大疾病）单纯地看作是人体某一单一成份/结构/组份的失常所致，而是与人体内环境/细胞及组织外的微环境相互作用所致。

但是，如果细读他们的文章，您会发现，他们的微环境与中华文化/哲学里的对微环境的理解还是有些不同的，而这种不同是西方医学的天然的与生俱来的短板，但是将人与环境统筹考虑却恰恰是中医药的优势。

因此，西方科学研究中医药的瓶颈，不是来自于技术层面。而是他们的非此即彼的‘零和’文化的束缚，以及哲学上固步自封思想带来的局限。这大概也是为什么近来随着中国的崛起和中华文化影响力的逐步扩大，一些西方医药公司把研发的目光投向了中国的中医药。比如法国Pharnext生物技术公司和中国制药企业的合作(<http://health.people.com.cn/n1/2017/0510/c412436-29266477.html>)，就是西方医学寻求突破其发展瓶颈的一种尝试。

2. 中医药研究自身发展的瓶颈

中医药研究发展的瓶颈主要来自于研究理念的滞后和研究手段的匮乏。

从哲学和文化的角度来讲，科学与技术是哲学思想和文化特征的延伸和提现。但由于近代中华文明的衰落，其哲学思想和文化特质也必然落后和凋零，也必然导致科学和技术的落后，这自然包括中医药科学及其研究方法。

二、NMT技术实质与中医药研究

1. NMT实质是研究生物内（微）环境的技术

中医强调的是、关注的是病的这个人，因为我们坚信人是与环境统一的一个整体。占身体50%以上的都是水，都是液态的电解质，但是它们不重要吗？因此，咱们中华文明里的天人合一的理念，以及中医所倡导的环境与人同等重要的这种天人合一的理念，在世界的文明里边是非常突出，也是非常优秀的。也因此，我们中医的理论的基础是非常坚实和有前瞻性的。比如说像肿瘤，我前两次说的半个多世纪的寻找癌症开关基因的这种努力的失败，以及现今在这种防疫工作中的被动和挫败，充分体现了我们中国的哲学、中国的文化完全要优于西方哲学所代表的文化和文明，所以这一点上是毋庸置疑的。

2. 从NMT看中医药研究的实质

如何用NMT开题-3

中医西医化的机会

- * 用中医的哲学思想去研究中医
- * 技术没有中西医之分



《旭日晨报》



中医西医化以后，给我们提供的巨大的机会。中医应该用中医的理论，用中华文明的天人合一的哲学去研究中医。但是，近些年中医的研究，确是用西方医学或是自然科学的方法，套用到中医研究上，导致中医研究方向的偏差，或者进展缓慢，所给我们留下的，用用中华文明的天人合一的哲学去研究中医，这个正确的规定上，将给我们留下无尽的可能。这里我要强调的两点是，用中医的哲学思想去研究中医。这样就需要有像NMT这类的技术，给研究提供技术支撑。另外一点是，技术没有中西医之分，NMT技术诞生在美国，蓬勃发展在中国。谁用得好，就要从自己的理念，和哲学思想去思考。



西药中医化的同时也给我们提供了广阔的空白领域。假定我们有候选的药物，从中医的角度是，这个药物，经过几千年临床的数据，或者说实践后，人们是认可这个药物的。目前，西医也有中医化的趋势，西医取得候选药物后，会直接到第三世界国家直接获取数据，拿到这些临床数据后，自然就可以上市了。西医研发药物的成本极高，为了追逐利润，他们省略了生理机制方面的研究。因为，如果再研究药物的生理机制，成本会更高，还有由于西方医学的研究过于迷信基因、分子生物学，因此，他们省略了对于生理机制的研究。在形式上，是类似于中医的，也是靠临床数据说话。从而导致了药物的生理机制并不完全清楚。在美国，当在电视上，听到某种新药的广告时，你会发现在最后三分之一的时间里，用极快的语速，基本是告知，吃此种药物，你要注意你的心脏、心血管、肾脏、皮肤等方面的副作用。但这些问题，他们也基本不管。在西方现代文明开始走下坡路的时候，在医学研究领域严谨的态度也相应发生了动摇，但这也反而给我们的科研提供了机会。因为以非损伤微测技术为代表，可以很好研究各种药物生理机制过程，生理指标，相对也是空白。

3. 为中医药研究而生的NMT技术

中华文化的包容与天人合一的哲学理念是中医药赖以生存和发展的沃土。

而当今西方文化/科技/经济等方面全方位发展放缓，甚至有些领域陷入危机，实质上是它哲学发展的停滞和固有文化的瓶颈所致。

“天人合一”实质上就是“人与环境的和谐统一”。

达尔文与拉马克不同的进化论就是西方这种零和文化在科学上的具体表现。

从列文.虎克发现细胞到人类基因组计划，西方生命科学一路走来，依托工业革命所提供的众多技术革新，使人类对生命现象本质的认识有了长足的进步。

但是人类半个多世纪来，主要以西方医学为主导的，寻找癌症等重大疾病开关/关键基因努力的失败，也是西方医学在其文化和哲学影响和指导下的必然结果。

因此，在2000年以后，在Nautre等期刊上开始出现应该重视对肿瘤微环境的研究的观点，而且在2018年诺贝尔生理医学奖颁发给癌症免疫治疗方法之后，马上有Nature文章指出，将肿瘤微环境搞清楚才是免疫治疗成功之关键。

<https://www.nature.com/articles/35077241>

https://www.researchgate.net/profile/Lance_Liotta/publication/11981127_Liotta_LA_Kohn_EC_The_microenvironment_of_the_tumor-host_interface_Nature_2001/links/00b4951dc6200eb62a000000/Liotta-LA-Kohn-EC-The-microenvironment-of-the-tumor-host-interface-Nature-2001.pdf

大多数人都感觉，现在西方医学的观点怎么越来越有些像中医药的观点了，即：不再把所有疾病（尤其是重大疾病）单纯地看作是人体某一单一成份/结构/组份的失常所致，而是与人体内环境/细胞及组织外的微环境相互作用所致。

但是，如果细读他们的文章，您会发现，他们的微环境与中华文化/哲学里的对微环境的理解还是有些不同的，而这种不同是西方医学的天然短板，却恰恰是中医药的优势。

三、应用NMT创新策略与实战举例

1. NMT中医药创新策略

人们对常说的“病从口入”通常是没有争议的。同样，中医常说的生病吃药是需要忌口的，似乎西方医学慢慢也找到了这种感觉。

在本周的《科学》癌症代谢部分刊登了一篇题为《营养环境影响治疗》的文章（“The nutrient environment affects therapy” By Alexander Muir, Matthew G. Vander Heiden, Science 01 Jun 2018 : 962-963）

该文主要分享了一些最新的相关研究成果：

- 1) 不同类型的肿瘤对于微环境中的营养类型的偏好是不同的；
- 2) 不同的微环境可以决定癌细胞不同的代谢类型；
- 3) 微环境对于抗肿瘤药物的药效具有决定性影响。

2. NMT在中医药方面的研究进展

1) 石斛与*Sebacina* sp. 共生期间DoCCaMK的鉴定与表达

在中国，铁皮石斛是一种珍贵的药用植物。其种子与幼苗均可与菌根真菌*Sebacina* sp.共生栽培。基于前期SSH研究结果，我们首次从铁皮石斛中克隆得到CCaMK基因，并对DoCCaMK与其他植物的CCaMKs进行了系统发育分析。利用基因枪技术将构建的瞬时表达载体转化到洋葱表皮细胞中，观

测DoCCaMK在细胞中的定位分布情况。利用qRT-PCR和western blot分析加菌组与非加菌组以及添加抑制剂KN-93组的DoCCaMK组织表达情况。采用非损伤微测技术（NMT）实时测定铁皮石斛种子萌发中的Ca²⁺流速，同时测定了铁皮石斛种子萌发过程中CCaMK的活性。研究发现，DoCCaMK与Liliumlongiflorum CCaMK的亲缘关系最近，DoCCaMK-GFP蛋白定位于细胞核与细胞膜。加菌组中CCaMK表达上调，KN-93作为CCaMK的抑制剂能够抑制石斛种子萌发。在SGS组，Ca²⁺吸收与CCaMK活性明显强于不含Sebacina sp.的对照组(UGS)以及添加了CCaMK抑制剂组(KN-93)。

研究使用平台：NMT植物-微生物互作创新科研平台

标题：Identification and expression of DoCCaMK during Sebacina sp. symbiosis of Dendrobium officinale

作者：中国医学科学院药用植物研究所邢咏梅，赵明明，郭力城，李兵，陈娟，郭顺星

检测离子/分子指标:Ca²⁺

检测样品:铁皮石斛种子

2) NMT用于甘草抗逆生理研究

3. 利用NMT实施中医药标准化

第三章 与其他相关技术比较优势及联合应用

一、NMT相比传统离子分子微电极（传感器）的优势

非损伤微测技术相比于传统微电极技术，优势之一在于高灵敏度，两者相差约6个数量级。NMT系统可以获得动态的生理变化的过程曲线（红线），而浓度测定设备测到的是无任何变化的直线（蓝线），错过了生命科学家最为关心的诸多重要生理过程。另外，NMT较传统微电极技术时间分辨率要更高。

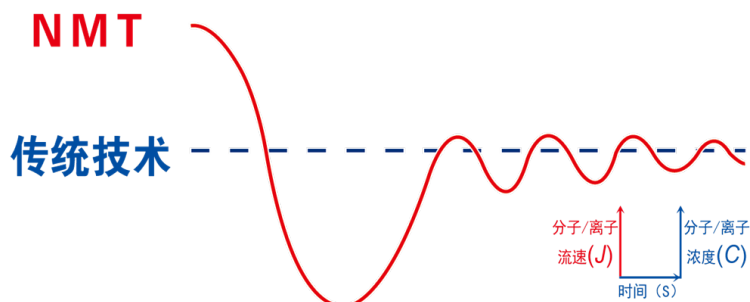


图 非损伤微测技术与传统微电极技术对比

技术名称	非损伤微测技术	传统微电极技术
检测方式	活体，原位，非损伤	离体
检测环境	贴近生理环境	脱离生理环境
空间分辨率	1 μm	需要一定量的溶液
获得的信息	流速（大小和方向）	浓度（无方向信息）
灵敏度	$10^{-12} \sim 10^{-15} \text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$10^{-6} \sim 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
对样品的要求	从细胞器到生物整体均可	匀浆
样品是否需要提取	不需要	需要
检测环境	活体检测	脱离生物环境检测

表 非损伤微测技术与传统微电极技术的差异

在静态浓度测量方面，NMT的液态选择性离子电极的检测灵敏度大部分在 μM 级（ 10^{-6} M ），个别电极可以到 nM 级（ 10^{-9} M ），这与市场上一些固体离子电极没有太大的区别，但是它们的反应时间（ <3 秒）比固体电极（通常 >30 秒）要快接近10倍以上。而正是这反应时间10倍的差别，导致NMT的检测灵敏度比传统电极高1000倍以上。

当然，每位老师也都有这样的实验室经历，拿最常使用的 pH 计- H^+ 电极来讲，您不但需要耐心等待几十秒以上才能够读取一个相对稳定的数值，而且如果您过一段时间再测，数值还会有变化，这种变化主要来自于电子放大设备固有的‘电学漂移’现象。

那么‘电学漂移’对我们生物学家意味着什么呢？

假如您现在想用市场上最灵敏的 Ca^{2+} 计/电极，来检测一个神经元细胞的 Ca^{2+} 的进出情况，或许您能够读取到一点 Ca^{2+} 浓度的电信号数据，但是根据您使用 pH 计的经验，您一定会对这些数据产生疑问，即：此时的读数变化是这个神经元细胞自身生理变化产生的，还是 Ca^{2+} 计设备的‘电学漂移’导致的呢？！

答案就是，对您有价值的进出这个神经元细胞 Ca^{2+} 的真实电信号，被这些大得很多的‘电学漂移’信号淹没了。

因此，NMT技术的创新之处就在于它利用‘一个电极两点检测’的流速测量方式，克服了‘电学漂移’这一技术瓶颈，为生命科学家们提供了可靠的、可验证的，进出活体生物材料离子分子信息。并因此提升了人类感知世界的的能力，丰富了科学家的研究手段。

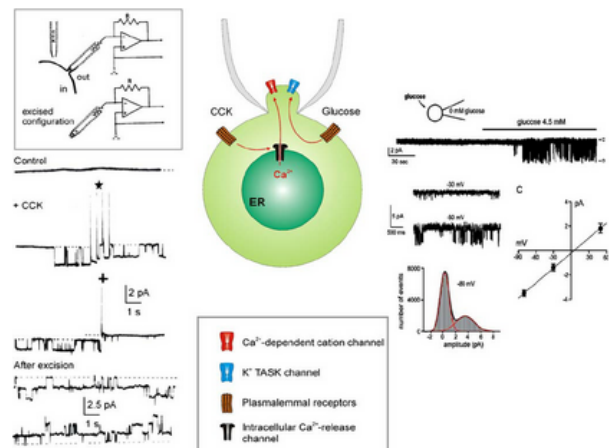
二、从膜片钳PC到非损伤微测技术NMT

1. 愿望与挑战

在活体状态下进行研究，是生命科学家追求的最佳方法和始终不渝的愿望。

能够检测到活体细胞单离子通道电信号的膜片钳（PC:Patch Clamp）技术，于1990年获得诺贝尔奖之后，迅速传入中国（周专等1990，许越等1993）。几乎在同一时期诞生的非损伤微测技术（NMT:Non-invasive Micro-test Technology），这一能够检测从细菌到整条斑马鱼各种大小活体材料的离子分子进出流速的技术，于2005年落地中国大陆（印莉萍等2006，丁亚男等2007）。

从某种意义上讲，膜片钳技术是一种间接的离子传感器技术，它需要后续通过能斯特公式的计算，告诉我们它所检测到的电流究竟是哪种离子产生的。非损伤微测技术从一开始追求的就是一种能够直接检测离子甚至分子的技术，就如同实验室的 pH 计和 O_2 浓度计一样，通过选择性/特异性的离子/分子传感器，直接告诉我们所测活体材料内部或外部离子分子的变化。



（膜片钳技术原理及其举例说明。来源于网络）

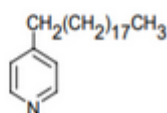
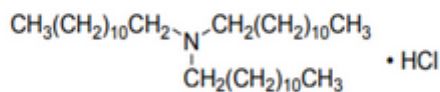
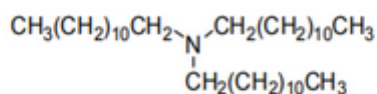
但是，可以想像这种美好愿望必定道路坎坷崎岖，主要有下面三大挑战：

1) 选择性/特异性离子/分子传感器（物质）的研发

这类传感器的研发始终就不是一件十分容易的事情。以玻璃电极pH计为例，从德国科学家Fritz Haber 1909年开始研发，直到1934年才由美国科学家Arnold Beckman发明现代意义上的pH计，经历了20多年的努力。

随后人们又尝试着用其它物质，如高分子化合物，和其它技术，如荧光技术，纳米技术，电化学技术等等来实现离子/分子的选择性/特异性测定。直到1981年（Schulthess等，1981），人们才发现了一种中性载体的高分子液态化合物，它可以和H⁺进行高选择性的结合，并使其电学性质发生改变，比如引起该液态化合物的两侧电压产生变化。

Hydrogen



(H⁺的中性载体分子结构式。来源于网络)

这里有一个容易混淆的概念，就是离子/分子传感器与离子/分子指示剂的区别。传感器是可以随着被测环境里的离子/分子浓度的变化而产生相应化学和电学变化的技术，而指示剂（比如pH试纸）是对被测环境里的某一时刻的离子/分子浓度做出的一次性的化学或电学反应。两者最大的区别在于，传感器的反应是双向可逆的，而指示剂反应是单向不可逆的。这也是为什么传感器的研发更具挑战性的原因。

2) 传感器的反应速度及其电学漂移

我们都有这样的体验，就是在实验室里使用pH计的时候，要想获得一个稳定的读数，就必须耐心地等上一会儿，少则十几秒，多则几分钟。这就是我们常说的传感器的反应时间。这是因为一定浓度的 H^+ 与固体传感器（这里可能是玻璃）之间形成一个稳定的动态平衡是需要一定时间的。

那么，自然而然大家会想到，如果我们使用液态传感器是不是就可以缩短等待时间，提高传感器的反应速度了？的确是这样，这也是为什么非损伤微测技术使用的是液态离子交换剂（其主要成份就是上面提到的中性载体高分子化合物），从而将反应时间缩短到几秒以内。

但是，事情还没有完。我们都知道尽管拿到了一个相对稳定的读数，但当我们把pH计放到那里一会儿，读数还是多少会有所变化，这就是电学或电子漂移。就是这个漂移，尽管人们可以把传感器（电极）做得非常小（市场上现在有不少这样的微电极），但我们仍无法研究活体生物，无论是体内还是体外的离子/分子浓度的细微变化。

这也是膜片钳和非损伤微测技术的伟大之处，就是它们用各自不同的方法，在能够告诉科学家所测的是什么离子（NMT还有分子）的同时，还能够克服这些电漂移准确地告诉我们这些离子/分子的大小（NMT还能告诉我们方向）。

3) 细胞内部及外部的化学及非化学物质的干扰

离子/分子选择性/特异性传感器最初的研发者们，总会抑制不住本能的冲动将这些传感器插入活体生物材料，想看看能不能直接读取这些材料体内的离子/分子浓度信息。然而，无论这些传感器能够做到多小，一个微米甚至以下，还是定位技术多么高超，细胞内的各种离子，蛋白质，多糖，高分子化合物等等，将这些传感器尖端部位团团包围，很快使其信号失去可信度。

然而膜片钳通过置换玻璃电极，甚至细胞内外的环境溶液，巧妙地解决了来自于细胞内部及外部的各种干扰，因此其信号的可信性是无可挑剔的。

参考文献：

- 周专, 康华光. 国产膜片钳仪研制成功. 生物化学与生物物理进展, 1990,11(2): 128~137
- Journal of Integrative Plant Biology 2006, 48 (7): 823-831
- 许越, 邱泽生. 膜片钳技术及其在高等植物细胞研究中的应用与展望. 植物生理学通讯 1993, 29(3): 169~174
- 印莉萍, 上官宇, 许越. 非损伤性扫描离子选择电极技术及其在高等植物研究中的应用. 自然科学进展. 2006, 16(3):262-266.
- 丁亚男, 许越. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. 物理. 2007, 36(7): 548-558.
- pH计的发明历史: <https://www.wonkeedonkeetools.co.uk/soil-ph-meters/a-brief-history-of-the-ph-meter>
- P. Schulthess, Y. Shijo, H.V. Pham, E. Pretsch, D. Ammann, W. Simon, A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecylamine as neutral carrier. Anal. Chim. Acta 131, 111 (1981).
- Kühtreiber WM1, Jaffe LF. Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. J Cell Biol. 1990 May;110(5):1565-73.

2. 时间与空间

时间分辨率和空间分辨率，指的是一个检测技术能够在时间和空间上提供的最小分辨单位或数值。列文虎克(Anthony Von Leeuwenhoek)发明的能够看到活细胞的显微镜，就是在人类观察世界的空间分辨率上的一次大的提升。

膜片钳技术之所以能够在90年代获得诺贝尔奖，一个很重要的原因就是它将人类对世界的感知能力，在时间分辨率上提升到毫秒级别，在空间分辨率上细小到微米级以下（请见下表），而且是对生物活体进行检测。

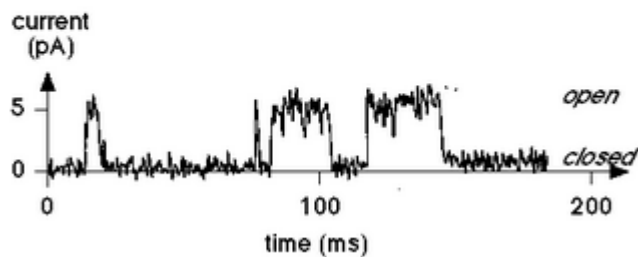
时间分辨率： 毫秒	秒	分	小时
空间分辨率： 纳米	微米	厘米	分米
非损伤微测技术			
膜片钳技术		化学分析方法	

图 5 选择性微电极和非损伤微测技术的时间和空间分辨率分布

(非损伤微测技术与膜片钳及荧光等化学技术在时间空间分辨率上的区别。来源于旭月研究院 <http://xbi.org>)

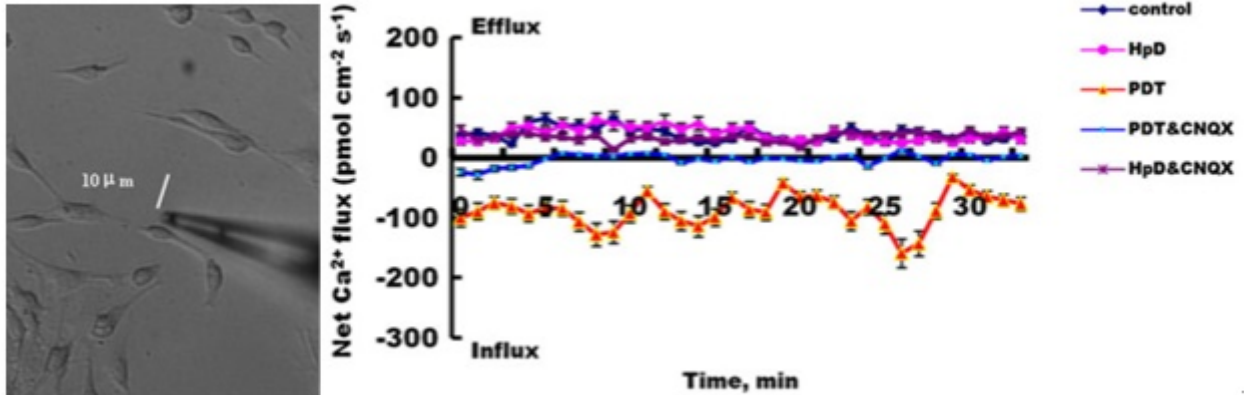
1) 时间

Patch Clamp



(膜片钳技术典型数据图。来源于网络)

膜片钳技术可以轻而易举地捉捕到毫秒级（ms）的离子通道的开放和关闭。这点让依靠反应时间最快也需要秒级的NMT离子分子传感器的非损伤微测技术望尘莫及。即使有的NMT分子传感器，比如O₂传感器反应速度可以达到0.8秒（800ms），但面对离子通道的开关研究也无能为力。

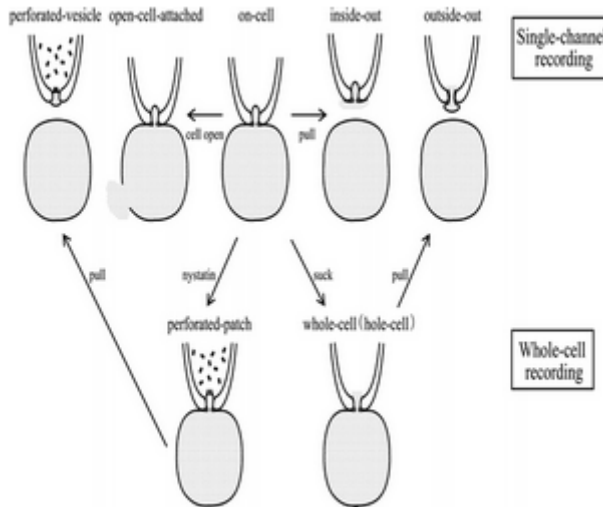


(非损伤微测技术典型数据图。来源于网络)

然而，如果我们的科研需要几十分钟，几小时，甚至几十小时地跟踪研究活体材料的离子/分子活动，非损伤微测技术的时间方面的优势就体现了出来。因为只要科研人员有办法保持样品的活性，由于NMT传感器不和被测材料进行接触，所以时间上对非损伤微测技术就不是一个制约因素。有时即使NMT流速传感器在实验过程中失效了，或不小心损坏了，没有关系，马上换上一个好的传感器就是了，只要你的样品还正常就没有问题。

2) 空间

膜片钳技术通过全细胞等多种灵活的记录方式（见下图），极大地丰富了膜片钳与被测材料之间的空间关系，但是由于该技术对玻璃电极与材料之间高阻封接的必须要求，使得膜片钳技术对于大于微米材料的操作显得力不从心。



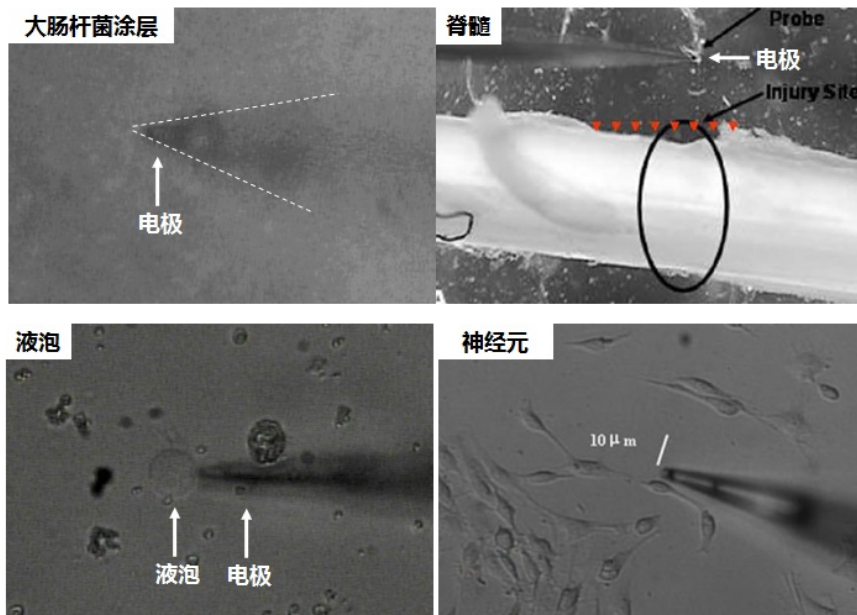
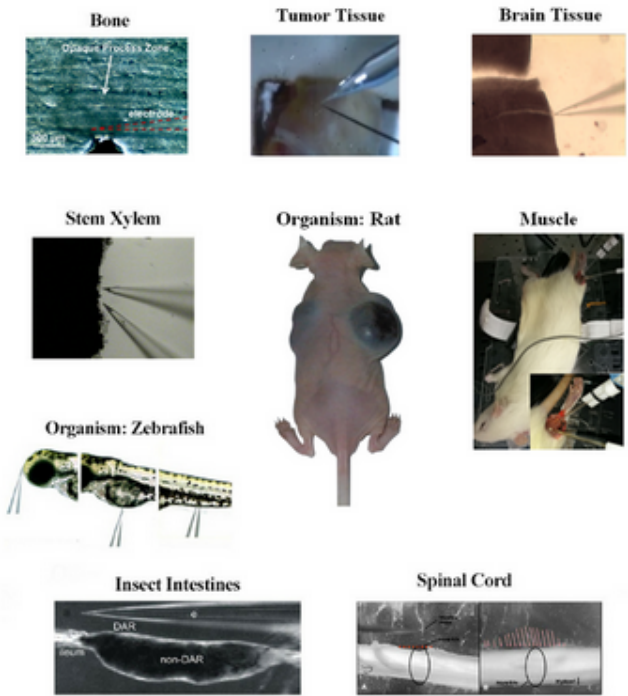
(膜片钳技术的多种测量构形。来源于网络)

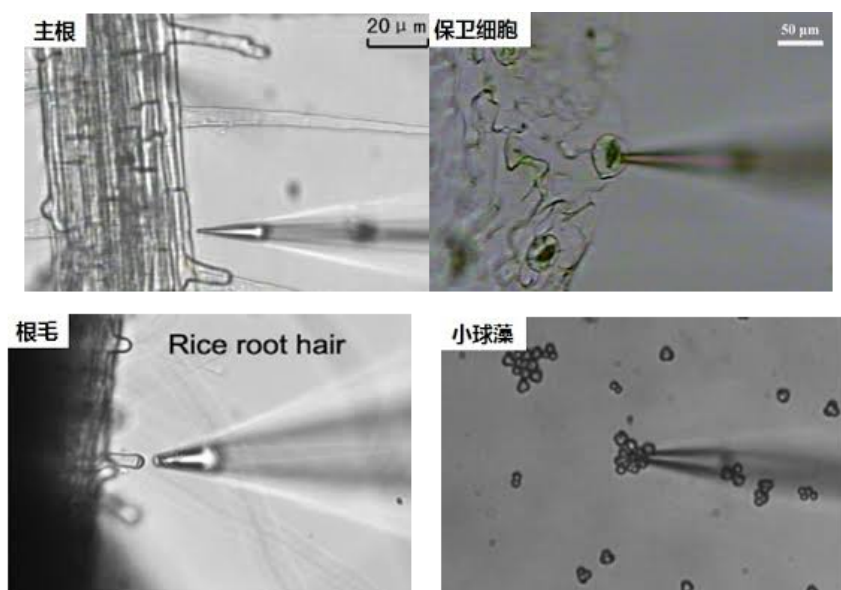
非损伤微测技术由于不需要接触被测材料，因此在被测材料的选择，特别是材料大小上面，相比膜片钳就有了非常大的自由度（见下图）。比如，最近面市的‘NMT活体生理检测仪’可以检测从微生物群体，一直到小型个体（如斑马鱼）的各种大小材料离子/分子的进出情况。

· 微生物
· 细胞器
· 细胞
· 组织
· 器官
· 个体

NMT 活体生理检测仪

YoungerUSA
美国扬格公司·揭示活体功能





(非损伤微测技术可以测试的各种活体材料举例。来源于旭月研究院 <http://xbi.org>)

膜片钳与非损伤微测技术在时间和空间分辨率上面各有千秋，可以根据科研需要进行合理选择。有时也可以联合应用则能够更加说明问题，不但两者在时间和空间上可以相互印证，而且非损伤微测技术所测得的离子信号是除离子通道在内，还包含有离子载体和转运体等多种离子运输载体的共同贡献。同时还有多糖吸附，细胞或组织表面的电化学作用，以及各种离子分子相互影响的物理，生物和化学的综合作用的结果。因此也是更加贴近真实的生理状态的结果。

还有就是我们可以人为设计这些样品的检测环境，使其更加接近它们真正的活体状态。别忘了，毕竟您手中握有的是非损伤微测技术！

3) 引发的其它联想

i. 生物体是多维的立体空间结构，生命活动和生理现象发生在不同的时间尺度

随着60年代DNA概念的提出，80年代生物化学的迅速崛起，90年代分子生物学的风靡全球，到近些年各种组学的盛行，科学界一部分人似乎认为只要搞定生命的各种组成成份，就可以解决人类的生老病死等一切问题了。

然而，半个世纪之后，人们终于承认人类寻找癌症等病魔的开关基因是不存在的。前一段时间，某些企业想通过基因序列为社会提供疾病/健康预测的服务尝试，也被以美国FDA为首的各国医药管理部门叫停，原因就是这些静态成份数据不足以支持建立基因组成与各种疾病之间的必然联系。

也就是说，忽视生物体的在时间和空间上多维度的特点，所得到的结果也必然不能够反映生命活动的根本真实面目，其衍生的各类实际应用也必然是空中楼阁。

ii. 每一项技术都有其时间分辨率和空间分辨率上的特色或极限

也正是由于相当一段时间以来，以生物化学，分子生物学和现在的各种组学为代表的，在生物体成份研究为主导的学科教育和科研大环境下，使得很多从事生命科学研究工作的朋友们，对于某一项技术的时间和空间分辨率定位不是很敏感。

现实是，如图5所示，当NMT非损伤微测技术告诉你，它所涵盖的时间和空间分辨率既不同于膜片钳技术，也有别于其它荧光和放射性物质技术的时候，你的眼睛是否豁然一亮，因为在你面前出现了一个崭新的、宽阔无垠的科研蓝海！道理很简单，就是你将揭示前人从未涉足的生命现象领域，就像当年的列文虎克一样。

参考文献：

- 旭月研究院网站 <http://xbi.org.cn>
- 美国扬格公司网站：<http://youngerusa.com>
- 印莉萍, 上官宇, 许越. 非损伤性扫描离子选择电极技术及其在高等植物研究中的应用. 自然科学进展. 2006, 16(3):262-266.
- 丁亚男, 许越. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. 物理. 2007, 36(7): 548-558.

3. 现状与未来

PC膜片钳与NMT非损伤微测技术虽然几乎诞生在同一历史时期，但是它们的发展和普及过程却大相径庭。非损伤微测技术采集的是化学信号，即浓度梯度，而膜片钳直接采集电信号，两者有本质上的区别。

非损伤微测技术在检测前，即已确定检测指标。膜片钳检测到的是电信号，需计算后才可确定具体是某种离子通道的信号变化。

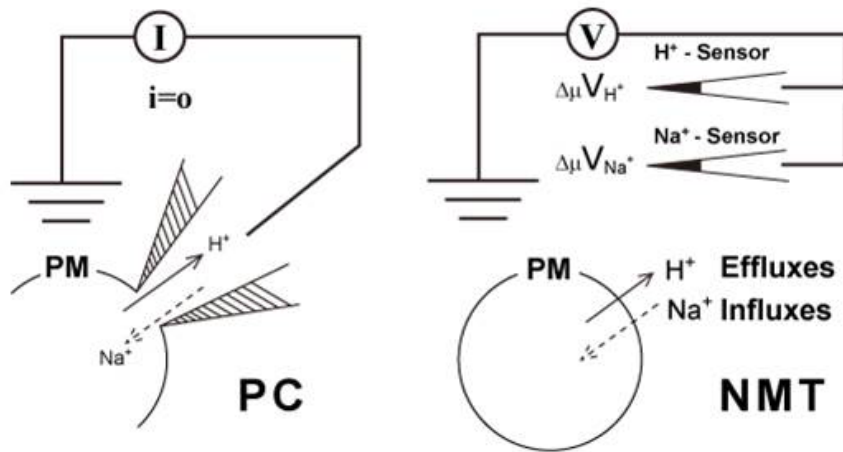
如下图所示，阴阳离子同向运输或同种电荷离子反向运输导致的电流微弱之情况，膜片钳爱莫能助。但非损伤微测技术可以分别准确检测出每一种离子的流动信号，在离子反向转运蛋白及其它类似研究上大有作为。此外，非损伤微测技术可以检测电中性小分子 O_2 、 H_2O_2 等。

图 4-1 非损伤微测技术可以检测到如 Na^+-H^+ 逆向交换的电中性过程

表 4-2 非损伤微测技术与膜片钳技术的异同及结合

每个技术都有它自己的特色，很难完全取代对方。因此，利用各自优势，膜片钳与非损伤微测技术配合使用将是一个趋势。这里已经有一些尝试，大家可以参考一下相关文献 (<http://xbi.org>)。

下面我就几个非损伤微测技术可以弥补膜片钳技术局限的地方跟大家分享一下，以便大家更好地结合两者使用。



非损伤微测技术可以检测到如 Na^+-H^+ 逆向交换的电中性过程

i. 零’ 电流问题

如上图所示，当有等电荷的两种离子进出同一片细胞膜的时候，膜片钳技术将检测不到电流。而此刻科研人员可以利用非损伤微测技术的多传感器同时测量优势进行研究。

ii. 其它离子运输载体和方式的研究

我们知道除了离子通道，生物细胞还有其它多种离子转运方式，它们与离子通道一起，共同担负着维持细胞和乃至整个生物体活性的各种生理功能。正如在（2）时间与空间中所述，将PC与NMT这两个跨越不同时间和空间的技术相结合使用，对于我们更加全面的了解生物现象的本质，有着不可替代的作用。

iii. 其它离子运输载体和方式的研究

毫无疑问，NMT非损伤微测技术在 O_2 ， H_2O_2 ，葡萄糖，乙酰胆碱等与生命活动密切相关的小分子，大分子跨膜运输方面，将极大补充PC技术在这方面的不足。

iv. 物理机械损伤

尽管‘高阻封接’成就了PC的单通道测量，但是其巨大的机械损伤，被证明不但是的确存在的，而且的确会产生错误的结果。那么，有另外一个相对独立的技术对PC进行验证，对科学研究的准确性无疑是个巨大利好。

广州暨南大学的王立伟，陈丽新教授，利用NMT与PC结合，发现并推翻了PC过去错误的结论的故事很好地诠释了这一点。（具体描述请浏览：<http://e.vhall.com/133934064> 或 http://xbi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=516&Itemid=907&lang=cn）

肿瘤细胞迁移的离子流动机制（NISC 文献编号 C2012-018）

细胞体积调控是各种细胞功能的基础，例如细胞迁移、细胞凋亡、细胞增殖等，这些过程都需要细胞体积的变化和跨膜离子的参与。体积变化激活的 K^+ 和 Cl^- 通道已经用膜片钳进行了广泛的研究，发现在调控体积减小（RVD）过程中 K^+ 和 Cl^- 紧密偶联。

2012年5月，暨南大学医学院王立伟教授研究组的成果发表在国际药理学刊物 *Biochemical Pharmacology* 上。实验发现低渗降低了胞内的 pH 值（ pH_i ），激活了依赖于质子泵的 H^+ 外流，导致胞外 pH 值（ pH_o ）下降， pH_o 的适度减小抑制了体积激活的 K^+ 外流和 RVD，但是没有 Cl^- 外流，当 H^+ 外流被抑制或者 pH_o 的缓冲能力增加时促进了 K^+ 外流和 RVD。这个结果说明在 RVD 过程中 K^+ 通道的动力学与 Cl^- 通道不同，是由于 K^+ 和 Cl^- 通道对 pH_o 的敏感性不同。

这是第一次发现在低渗诱导的 RVD 过程中 K^+ 和 Cl^- 的转运不偶联（解偶联），而且 H^+ 外流在细胞体积调控中扮演着重要作用。结论指出，全细胞膜片钳破坏了细胞内液环境，导致细胞膜内外环境的 pH 值固定不变，凡涉及 pH 介导的离子通道调控，膜片钳的检测结果还需要通过其它无损方法，如非损伤微测技术进一步验证，才能获得更加真实的生理学结论。

图 6-14 鼻咽癌细胞进入低渗环境后， H^+ 、 K^+ 、 Cl^- 三种离子的流速变化。 H^+ 外排增加， K^+ 外排减小趋近于零， Cl^- 外排增加

5) 寄语



（上图来自于网络）

在一次社会名流的聚会上，当有人用略带轻蔑的口吻对发现美洲新大陆的哥伦布说到：“你发现美洲没有什么了不起的，只不过是你的运气比别人好些罢了！”。哥伦布没有马上说什么，而是让人拿来一个鸡蛋向在场的所有人发出挑战，看谁能够把这个鸡蛋立在桌子上。读者们中很多人知道这个故事的结局，就是在这些人费了九牛二虎之力失败之后，哥伦布‘啪’的一声将鸡蛋的一端击碎后立在了桌子上。

Neher和Sakmann发明膜片钳“不过”是在前人电生理的基础上，略微地在玻璃电极与细胞膜接触时施加了一点点负压形成‘高阻封接’而已。同样NMT非损伤微测技术的诞生，Jaffe和Newman他们“也无非”就是让离子/分子传感器动了起来，进行‘两点测量’而已！

但就是这一看似细微的‘高阻封接’，这一看似平常的‘两点测量’，让科学家能够检测到pA（ 10^{-12} ）级的微弱单离子通道电流，让科学家能够检测到单个细胞离子（比如 Ca^{2+} ）分子（比如 O_2 ）的 10^{-15} 级进出流速。

他们就是科学界的哥伦布，帮助科学家们发现了科学世界的新大陆！

同学们，老师们，朋友们，现在非损伤微测技术已经来到了你的身边，中国人在一些领域已经实现了弯道超车，能否先于他人把这个‘蛋’矗立在你们各自的研究领域，即是摆在你们面前的挑战，大家准备好了吗？！

参考文献：

- 美国对不同研究领域的投入
- Verkhatsky, Alexei & Parpura, Vladimir. (2014). History of Electrophysiology and the Patch Clamp. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1183. 1-19. 10.1007/978-1-4939-1096-0_1.
- Uncoupling of K^+ and Cl^- transport across the cell membrane in the process of regulatory volume decrease. Linjie Yang, Linyan Zhu, Yue Xu, Haifeng Zhang, Wencai Ye, Jianwen Mao, Lixin Chen, Liwei Wang. *Biochemical pharmacology* 84 (3), 292-302
- 非损伤微测技术实时检测海马脑片跨膜钙离子流。《生理学报》2017年 第4期 | 李甜 原丽 张军 焦娟娟 祁金顺
- 文中相关文献可以到中关村NMT联盟网站下载：<http://nmtia.org.cn>

三、NMT 如何与激光共聚焦结合使用？

1. 什么是激光共聚焦技术？

激光扫描共聚焦荧光显微镜 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 是一种利用计算机、激光和图像处理技术获得生物样品三维数据、目前较先进的分子细胞生物学的分析仪器。主要用于观察活细胞结构及特定分子、离子的生物学变化, 定量分析, 以及实时定量测定等。其不仅可以得到非常清晰的荧光图像, 进行多重荧光标记的定位和定量分析, 还具有图像三维重建、荧光共振能量转移谱测定, 甚至膜电位测定等功能, 成为生命科学研究的重要技术手段。

2. NMT 相比激光共聚焦技术有何优势？

随着激光共聚焦技术应用范围的扩大, 其在研究中的局限性也逐渐突显。激光共聚焦技术主要采集的是生物样品内部的离子分子信息, 这些离子分子信息的改变既可能源于样品内部离子 / 分子源的变化, 也可能源于样品内外的离子 / 分子交换。这两种离子 / 分子变化过程是由完全不同的生命机制引发的。这要求研究者必须通过其它实验结果, 才能得出相对准确的结论。若单纯用激光共聚焦数据作为检测或诊断标准, 往往面临较大的假阳性风险。将激光共聚焦技术与非损伤微测技术的结合, 可以克服上述问题, 实现全面获得被测样品内外的离子 / 分子流动信息。

技术名称	非损伤微测技术	激光共聚焦技术
相同点	实时	
	动态	
	数据可视化	
	测定游离的离子	
区别	使用电极或者传感器	使用染料和激光光源
	无需标记	需要标记
	电极或者传感器稳定	荧光易发生淬灭
	测量时间可短, 可长	测量时间短
	近似活体或者完全活体 (测定无损伤)	半活体 (有损伤)
	检测跨膜的离子流速以及外部的离子浓度	检测内部的离子浓度变化
	测定种类多, 可测 Na^+ , K^+ , NO_3^- , O_2 等	测定种类较少, 依赖于染料
	测量材料不限, 从细胞到整体都可以测量	测量材料不能太大, 以细胞为主
	可以同时测定两种离子	只能同时测定一种离子
结合	共同使用, 实现内外兼测	

表：非损伤微测技术与激光共聚焦的异同及结合

3. NMT 同激光共聚焦联用：胞外Ca²⁺参与了玉米生殖细胞融合过程

葡萄牙学者 Feijó 使用激光共聚焦显微镜技术测定了细胞内Ca²⁺，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，直接验证了胞外的Ca²⁺的参与了胞内Ca²⁺的升高这一生理过程。

四、NMT 与 SVET、RTCA技术

1. 本质区别

非损伤微测技术（NMT）检测的是具体分子 / 离子的变化，研究的是生理机制。而 RTCA（实时无标记动态细胞分析技术）、SVET（扫描振动电极技术）检测的电阻、电流属于生理变化的表象。

Gleize V. (Glia, 2012, 60:1004-12.) 检测了神经胶质瘤细胞的电阻，以反映其迁移与侵袭的表观情况。而暨南大学王立伟教授（NISC 文献编号 C2012-018）利用NMT 研究发现，肿瘤细胞迁移过程的重要内在机制：Ca²⁺、K⁺、Cl⁻ 的流动，这可能是引起肿瘤细胞电阻变化的重要原因。

2007 年，加州大学赵敏教授研究发现，角膜伤口在愈合过程中会产生明显的电流（Nat Protoc, 2007, 2: 661-9.）。2011 年，其再次利用 NMT 进行研究，发现这一电流产生的机理是 K⁺、Ca²⁺、Na⁺、Cl⁻ 等流动的结果（NISC 文献编号 F2011-011）。

2. 差异总结

电阻、电流的检测的确可以获得组织细胞生理变化的整体描述，但要进行更加深入的机理研究，提升研究层次，NMT 必不可少。

3. 多技术联用

五、NMT 与 原子吸收、同位素示踪、CT/NMR

六、NMT与海马Seahorse的区别

产品名称	智能高通量非损伤微测系统	NMT细胞/组织能量代谢仪	Seahorse细胞能量代谢分析仪
产品型号	AINMT-300	NMT-TEM	XFe24
产地	美国进口/中国制造	美国进口/中国制造	美国
升级	可升级	可升级	不可升级
研究领域	细胞生理、免疫研究、癌症研究、神经系统研究、生殖系统研究等	细胞生理、免疫研究、癌症研究、神经系统研究、生殖系统研究等	细胞代谢、免疫代谢、癌症代谢
检测指标种类	H ⁺ 、Ca ²⁺ 、K ⁺ 、Na ⁺ 、Cd ²⁺ 、Cl ⁻ 、NH ₄ ⁺ 、NO ₃ ⁻ 、Mg ²⁺ 、Pb ²⁺ 、Cu ²⁺ 、O ₂ 、H ₂ O ₂ 、IAA	H ⁺ 、O ₂	H ⁺ 、O ₂
占地面积	较大	较小	较小
价格	较贵	适中	适中
应用方向	能量代谢、细胞凋亡、细胞迁移、信号传导等	能量代谢、细胞凋亡、细胞迁移、信号传导等	能量代谢
检测样品	线粒体、活细胞、斑马鱼、胰岛、脑片、卵巢组织、在体肿瘤等	线粒体、活细胞、斑马鱼、胰岛、脑片、卵巢组织、在体肿瘤等	活细胞
检测方式	在体、离体	在体、离体	离体
检测指标	耗氧率、酸化率以及数百种生理指数	耗氧率、酸化率，以及与H ⁺ 、O ₂ 相关的数十种生理指标	耗氧率、酸化率
检测精度	10 ⁻¹² -10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹² -10 ⁻¹⁵	0.001%
同时检测离子数量	2~8	2	2
同时检测样品数量	24	12	24
操作方式	一维/二维/三维	一维	一维
检测时间	5-10分钟	5分钟	几分钟

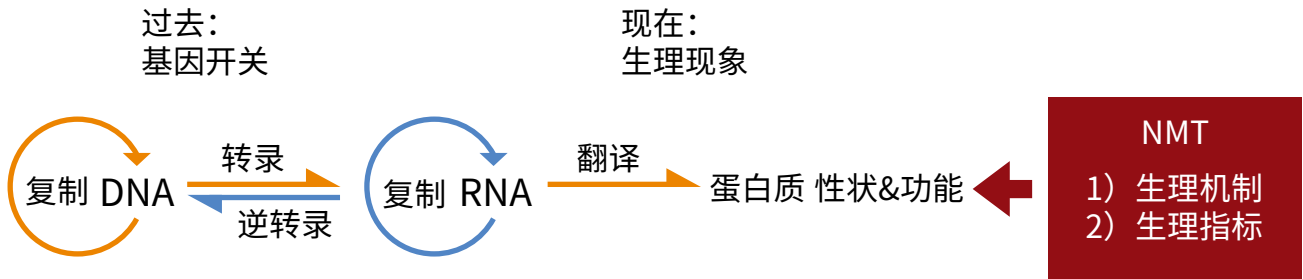
表:

第四章 NMT科研应用范例

中医药研究中，相当一部分实际上是植物研究，另一部分是中药的病理研究。因此，植物学领域和生物医学领域的先期NMT应用，对中医药领域的NMT应用具有很强的示范作用。

一、利用NMT如何开题？

1. 生命科学发展机遇



图：

NMT技术为科研提供了一个新的处女地。有关非损伤微测技术大家可以从本书其他章节了解。它最终揭示的是被测材料与外界物质及信息交换的动态过程。

从DNA, RNA 到蛋白质是生命科学研究离不开的一条线，过去的半个多世纪，以西方为代表的科学家们，想用分子生物学解决一切疾病、健康、农业、林业等所有问题的努力是失败的，除非一些基因方面的遗传病，有些特例。但总体上，人们过于偏重分子生物学基因方面的工作，从而忽略了在生理层面的一些工作。但是近来人们发现还是需要回到生理层面。比如现在肿瘤治疗方面，比较热门的瓦式效应，实际是说，肿瘤发生时的一种生理现象，80%以上肿瘤表现出一种强烈的泌氢的现象。由于泌氢，揭示出了有消耗葡萄糖的另外一种机制，所以导致了泌氢，因此，人们现在想从生理角度去治疗它。包括现在的免疫治疗方法，实际也是在生理水平，特别是膜蛋白运输、转运，比如质子泵抑制剂，但依然没有把生理研究透。因此，非损伤微测技术研究的是活体材料，而且研究所是他们的生理机制和生理指标。这就是为什么说，现在人们研究生物医学的脉络和历程来看，这我们面前，是一片广阔的处女地。是实现科研弯道超车的绝佳机会。

除了理论上，脉络上看是一大片处女地，从非损伤微测技术本身还提供了另外一个维度的空白领域。这些离子分子他们后面代表的是各种生理过程，代谢途径，调控，基因。根据各自课题的需求，老师们委托旭月团队去开发特殊的离子分子，比如葡萄糖，在瓦式效应中，除了氢氧的活性以外，还消耗葡萄糖跟正常组织不同。如果有一个葡萄糖的传感器，那更是如虎添翼了。比如铅离子，作为一种重金属，儿童会有油漆里面铅中毒的现象。铜离子作为一些酶的反应的辅酶等等，具体它的特殊的生理作用。实

际上，每一种传感器给科研人员带来的是空白的研究领域。如果原来的DNA，RNA是一个横向的发展历程，那么相当于在一个纵向的坐标轴上，又开辟出一条新的研究领域。

当前，使用微观研究手段来研究揭示宏观科学问题似乎是一个潮流。原因是在知道了宏观如何变化之后，要想改变宏观效应，还是要从微观处入手。比如，有科学家想通过筛选高二氧化碳固定效率的藻类来消除温室效应。下面就习惯了宏观研究思路的老师，在使用非损伤微测技术NMT初期遇到的一些常见问题进行分析和解答。


2. NMT技术优势

图：

以一篇文章为例，用纳米的荧光材料，利用瓦式效应肿瘤泌氢的现象去指导手术。但其中荧光技术的不足是存在的，主要是源于荧光技术对于材料的缓冲而带来的干扰效应，主要是对组织细胞生理活性的干扰。其次荧光寿命较短。我要介绍的是发表在Science的文章，证明了发光的肿瘤标记物，会干扰到肿瘤发生发展和迁移，因而造成不同的实验室，难以重复彼此间的实验。原本他们想标记小鼠肿瘤的迁移过程，但应用了荧光材料后，预期的迁移效应没有发生。当然这里也有个好的现象就是，发现了一个抑制迁移的机制，同时给大家的启示就是，荧光技术固有的不足，特别在临床时要引起重视。因此，NMT技术的无损优势就很明显了。

如何用NMT开题-5

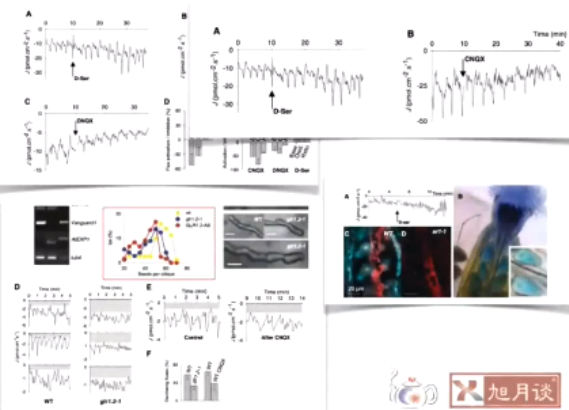
动物到植物




Glutamate Receptor-Like Genes Form Ca²⁺ Channels in Pollen Tubes and Are Regulated by Pistil D-Serine


Erwan Michard,^{1*} Pedro T. Lima,¹ Filipe Borges,¹ Ana Catarina Silva,² Maria Teresa Portes,³ João E. Carvalho,⁴ Matthew Gillham,¹ Lai-Hua Liu,⁵ Gerhard Obermeyer,⁶ José A. Feljó^{1,2,†}

一种新的植物信号传导机制，类似于动物神经系统中常见的氨基酸介导的通讯





《旭月晨'抱'》



图：

在动物上有的系统，是否可以移植到植物上？例如这篇Science文章中提到的，2011年文章作者Jocy（葡萄牙NMT植物学专家）利用非损伤微测技术，发现了在植物信号传导机制中，也有类似于动物的神经系统中常见的氨基酸介导的通讯。而且文章的80%数据是来自非损伤技术的数据，因为这个技术可以直接检测到谷氨酸介导的钙离子信号传导，直接加。。。然后再去测。。。还有一点，现在大家都知道钙离子是信号传导，而且还进一步知道，钙离子是震荡型的传导。因为震荡型有振幅有频率，这里面蕴藏着不同的信号。所以，这里就可以利用非损伤微测技术，我们就可以把一些动物的系统，看看在植物中提供了一个广阔的空间。

如何用NMT开题-6

植物到动物

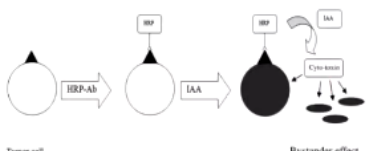
Cancer Medicine

ORIGINAL RESEARCH

Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment

Günther Bonifert¹, Lisa Folkes², Christoph Gmeiner¹, Gabi Dachs³ & Oliver Spadiut¹

¹Research Area Biochemical Engineering, Institute of Chemical Engineering, Vienna University of Technology, Vienna, Austria
²Department of Oncology, Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford, Northwood, Middlesbrough, U.K.
³Mechanics Cancer Research Group, Department of Pathology, University of Otago, Christchurch, New Zealand



Tumor cell Bystander effect

Indole-3-acetic acid (吲哚-3-乙酸)

植物生长素


CC(=O)O[C@@H]1C=CN2C=CC=CC12

Current Pharmaceutical Design, 2002, 8, 1363-1374 1363


Indole-3-Acetic Acids and Horseradish Peroxidase: A New Prodrug/Enzyme Combination for Targeted Cancer Therapy

Peter Wardman*

Gray Cancer Institute, PO Box 100, Mount Vernon Hospital, Northwood, Middlesex HA6 2JR, UK



《旭月晨'抱'》

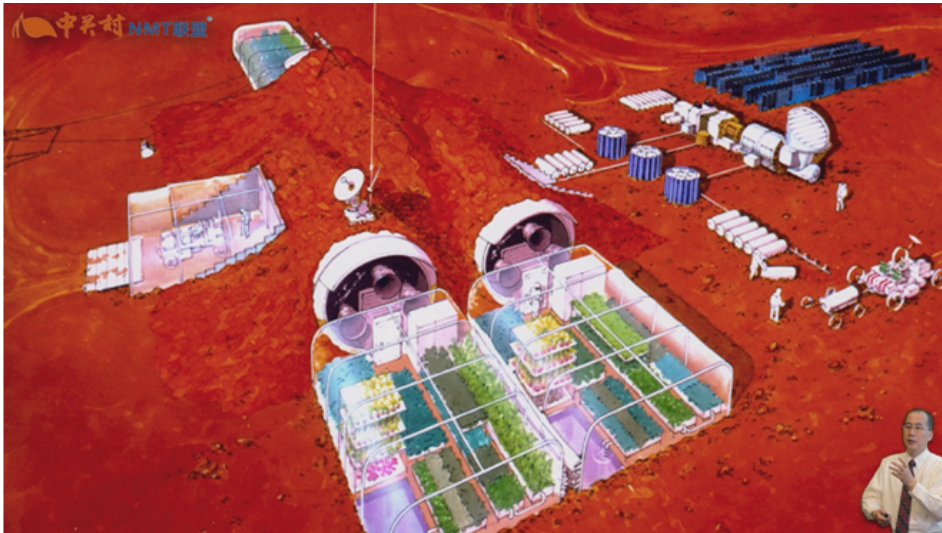


图：

植物中的某些物质，比如吲哚乙酸（IAA）是植物生长素，那么在动物体内会有什么作用呢？现在，有人已经开始打破这种动物植物的界限，开始研究发现某些情况下，植物生长素会在癌症治疗中，起到一定的作用，而且这个工作还在不断地深入。往往人为上动物植物的分类，反而禁锢了我们的思路，因此，这里的核心是，打破人为所设定的思想的分离，我们的科研就会有更广阔的天地。

二、开题范例

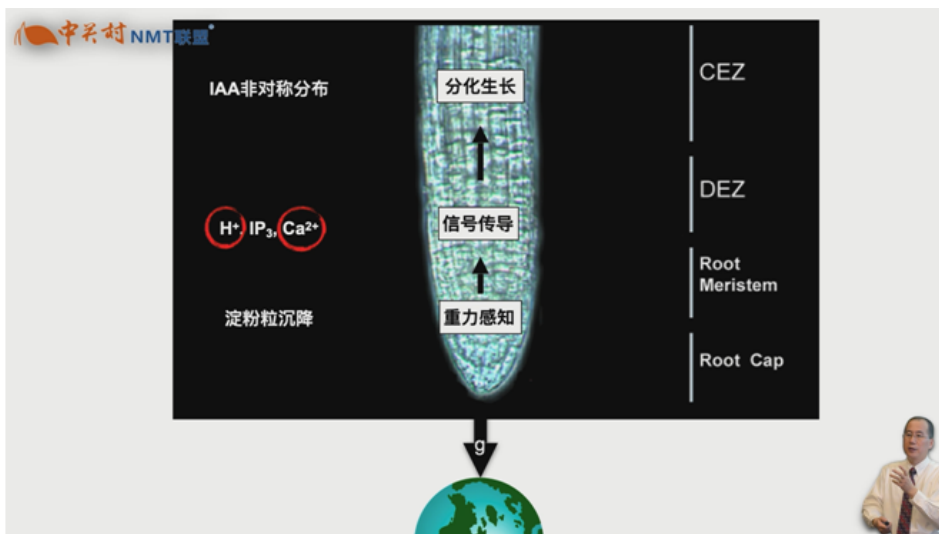
1. NMT 在太空生物学中的应用



图：

随着我们国家嫦娥五号的顺利升空着陆和返回，引发了国人极大的探索太空的热情，也重新燃起了世界各国人民征服太空的想象，同样的非损伤微测技术联盟也受到很大的鼓舞，所以今天我在这里想跟大家分享一下非损伤微测技术过去以及未来将如何用于植物的微重力研究，希望对大家有所启发，因为我们知道，在人类征服太空的旅程里，建立太空站，建立人们可以居住的太空站绝对离不开植物的参与，因为它不仅提供给人们食物，还提供给人们诸如氧气等其他的生活，必须的物质条件，因此非常有必要去探索植物在太空的无重力或者微重力的环境下，它们的反应如何，生理的变化如何，它们是如何和环境进行信息交换的过程，因此今天我就来和大家分享一下，过去我们曾经尝试过的一些实验和数据，希望对大家有所启发。

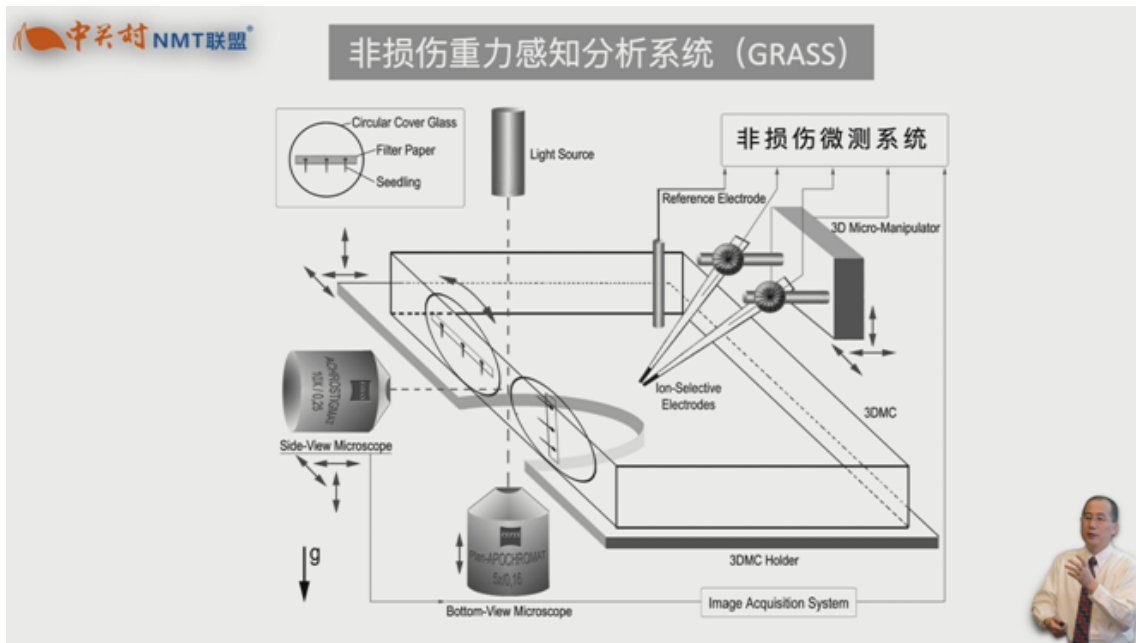
首先让我们来看一个好看视频里的植物生长的情况，让我们先切身的感受一下植物，尤其是根部，它们感受重力引力的神奇现象。



图：

我们知道万物皆有引力，那我们生活的地球时刻存在着引力，这些植物的根，我们都知道它要向地心方向去生长，而且我们也知道，现在实际上人们的研究已经清楚的知道，它的重力感知是在meristem部分，也就是分生区部分，然后通过重力感知，把信号通过信号传导到后面的分生区，从而实现向地生长，我们同样已经知道的是通过分生区里面的淀粉粒沉降，拉伸细胞的骨架，从而使得植物，尤其是这个部分感受到重力的变化，从而产生相应的信号，我们同样知道了氢质子和钙离子在信号传导中起着非常重要的信使作用，那后部如何产生分化，从达尔文基本上就知道了，就是说由于IAA生长素的非对称分布，有一侧分泌得多，另一侧分泌得少，从而使它产生弯曲，从而让它向地生长。

曾经有一度人们对于氢质子和钙离子，哪个离子是首先感知到重力的变化，也就是说淀粉粒的沉降，它是trigger，它是引发了哪个离子，哪个信使，哪个信号首先发生变化，从而导致后续的生理变化，不同的实验室有不同的争论，有的实验室认为是以氢质子为主，或者说它是先感知的，有的实验室认为是钙离子，那么同时检测这两种离子在重力影响下植物弯曲的整个过程，特别是起始的过程，就是回答这个问题的一个根本途径，为了回答这个问题，我们知道非损伤微测技术，它可以探测活体根的氢离子和钙离子的变化。



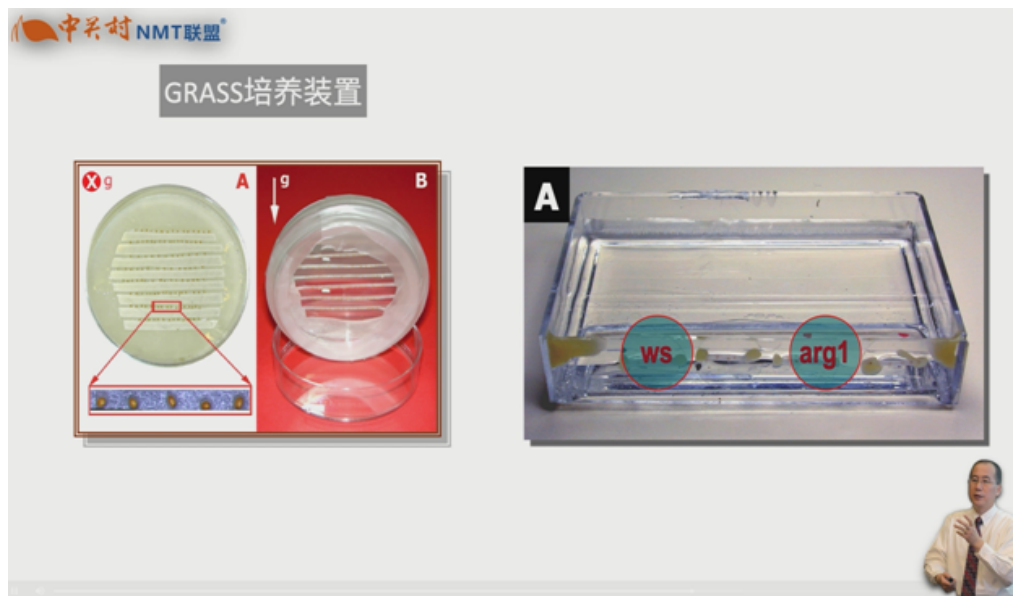
图：

下面我们就需要设计一个系统来完成这个工作，那这个系统我们管它叫做重力感知的非损伤分析系统，这里为了符合中国人的习惯，把它叫做非损伤重力感知分析系统，就是gravity response analysis super NMT system grass，简称GRASS系统。

这个系统的核心围绕的本身是非损伤微测系统，它探知这些类的，比如氢离子，钙离子氧气，过氧化氢，钾，钠所有这些离子，它的变化，那材料必然是要让它像这上面的材料，它是要正常生长的，然后还有必要让它旋转，从而给它施加以重力的影响。

而且在这个过程中，我们还要能够实时的跟随受影响的，尤其是meristem分生区的区域或者其他的区域，从而掌握它在受重力影响的整个过程里，它的各种信号，传导的离子或者分子，随着时间的实时的变化，这块就是little chamber，就是个小的测量室。

这是非损伤微测系统所特有的三维的操控系统，这是参比电极，把电信号要形成回路，这个自然是光源，这是它比较有特色的地方，就是除了倒置的显微镜从下面能够看到材料以外，因为我们把材料给它九十度旋转，等于是给竖起来了，因为植物都是直上直下的，一般我们的实验都让它躺在培养皿里，那做这个实验肯定要让它竖着，而且还要能转动，所以为此我们必须设置一个侧向的视频系统或者是侧向的显微系统，让我们能够看到电极和整个根弯曲的情况，我们现在有了一个检测活体的非损伤重力感知分析系统，下面我们就要培养材料了，培养材料大家知道培养材料也很关键，因为材料培养的好坏最后会直接影响到测试的数据质量。



图：

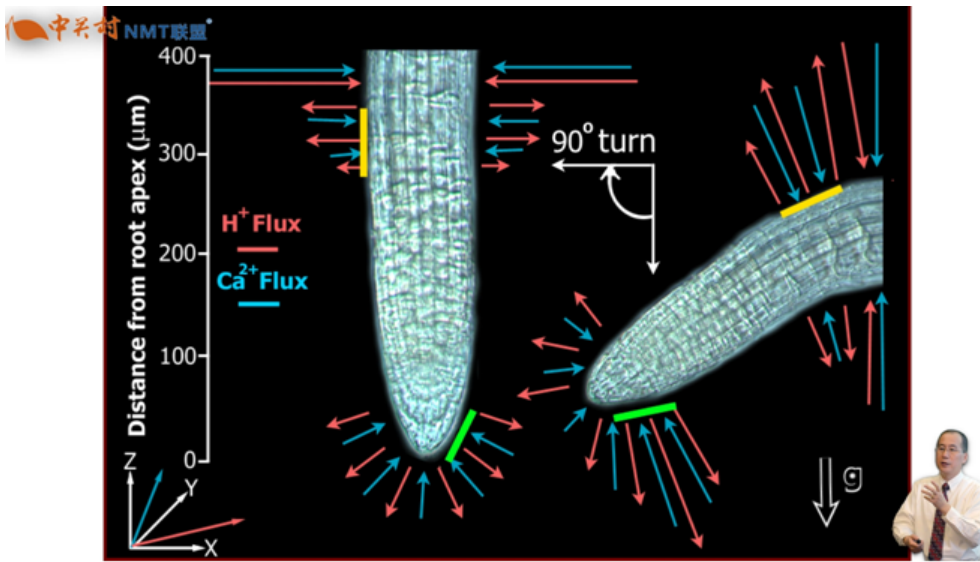
为此，我们设计的用于GRASS系统的培养装置，是我们用滤纸切成了一条一条的滤纸条，然后把拟南芥的种子，我们用的是拟南芥的种子，把它放到滤纸条上，滤纸条我们选择的是表面比较粗糙的那种滤纸，这样的话，实际上大部分种子的种皮就可以和滤纸条形成比较紧密的接触，这个接触使得我们可以把培养皿。

当然除了前期的消毒等等，这些是必须的，防止污染，然后把它竖起来放在培养箱里进行垂直的培养，因为这样要模拟它真正的在大自然里面，垂直生长的施以重力的环境，作为测量的chamber，就是小的容器，这个小的容器是由特殊的材质透明度较好的材质构成，然后我们在它的前边，粘上一条parafilm，然后用parafilm作为一个槽，然后把培养的种子转移到一个circular，就是一个圆形的透明的，显微上用的圆形玻璃片，然后把种子放在上面，同样的，实际上是把切下的这一条滤纸，然后把它粘到圆形的cover slip上，然后把它放到系统上进行检测。

检测的过程就是这个小的容器，然后这部分就是已经萌发了的拟南芥幼苗，这一段带着滤纸把它固定在圆形的玻璃片上，非常薄的玻璃片上，然后我们手动，或者后续我们还研发了自动化的给它旋转的装置，就是电脑控制的自动化的装置，然后给它旋转到我们希望的任意的角度，那在这，我们是给它旋转了45度，并且让它持续的生长，关键的时刻或者时期，进行检测的时期，就是在给它旋转一定角度，然后马上把钙离子传感器和氢离子传感器，或者其他任何大家感兴趣的离子或者分子传感器放到它根的两侧，对我们所关心的区域进行实时的检测。

我们看这个图，是底部的显微镜往上照所照到的情形，因为我们从下面往上看，看到的就是一个跟尖，然后这部分是它长出了以后弯曲下来的结果，那这两个传感器一个是钙离子传感器，一个是氢离子传感器，在这里面，由于现在智能化的发展，之所以这个系统能够很好的用于回答氢离子和钙离子，这两个离子到底哪个离子是最先对植物的，它对重力的感知，先感知到的到底是哪个离子，必须要两个离子同时进行监测。

那么两个离子同时进行监测，就需要一个高度准确的机械的操作系统，并且要和信号的采集系统密切配合，因此GRASS系统在设计的时候就考虑到在变化中它反应的时间，植物对外界的反应时间以及它的生长速率都要考虑进去，而且在空间的分辨率上，要能够足够的识别，在这个过程中它是根尖反应的多还是说分生区还是在后面的延长区等等，因此当我们有了一个可以检测植物重力变化的的信号的时候，我们就有了一个非常有力的工具来进行这方面的研究。



图：

有了这个系统，之前也和给大家介绍过如何为GRASS系统设计相应的培养装置，因为我们要测活体的，比如说拟南芥对重力变化而产生的生理变化，就是必须在培养的时候垂直，这是适合GRASS系统的测量装置，在这部分我们可以看到滤纸上生长的拟南芥幼苗刚生出根，我们把它放到系统上，然后旋转45度，之后在它生长的过程中，或者说在刚弯曲的时候就对其进行检测，然后我们就通过氢离子和钙离子分析它怎样去传递信号，今天我们来看看获得的结果是怎样的。

首先左边的坐标表示根从零微米到后边的四百微米的距离之中，分别检测以红色为代表的氢质子和蓝色为代表的钙离子，获得的数据是有关流速的，流速的数据和传统的数据概念不太一样，它既有大小又有方向，稍后，我会就非损伤微测技术的数据特点和大家进行一个详细的沟通。回到这里，重点是想请大家看绿色区域和黄色区域的内容。绿色区域代表的是根冠部位，它是以氢质子外排和钙离子内流为特征，而且这两个离子的内流和外排大小几乎是一样的，在后边的区域，应该是分生区之后，也就是延长区的地方，有显著的氢质子外排和钙离子内流，并且呈现梯度变化。在它之后又有一个明显的氢质子的内流，同时还有钙离子的大内流，这和其它区域是不尽相同的。当我们把根横向旋转九十度的时候，自然在它的肩部会有重力变化的影响。

通过前面的介绍，我们知道蛋白淀粉粒沉淀以后会引发细胞骨架的变化，进而导致氢离子和钙离子

的流速变化，而且在下侧区域和上侧区域，也就是绿色线条对应的上面的区域的大小是不一样的，在黄色的区域，也就是弯曲的地方的钙离子和氢质子的流速方向相反，但是大小要显著的比对应的下部区域大，就是说它流速的值，即单位时间内通过的钙离子和氢质子的量是有显著不同的，因此，我们通过GRASS系统对野生型的拟南芥根部在其正常的垂直情况下，以及测量的旋转过九十度以后的相关区域的变化有了活体状态下的清晰记录。

下面，因为很多同学和老师，特别是第一次接触非损伤微测技术数据的朋友们都会有一个疑问，或者说困惑的地方就是非损伤微测技术的数据和传统的数据不太一样，特别是它在测量的时候，直接会告诉是什么离子，这一点稍后会详细解释，但是最让大家不太习惯的就是此数据有两个属性，一个是大小，就是单位时间所流过的离子数量是不一样的，数值大小有差异，同时还有另外一个属性，就是方向到底是进材料还是出材料，它会在同一时间告诉我们，这是比较独特的地方，这点在这些年的技术应用过程中还是理解上的一个小难点。

通过这个就是想让大家熟悉一下，非损伤微测技术的流速的大小和方向的这两个属性。

下面来讨论一下种类，就是说离子和分子的种类，化学课大家都上过，会给一种化学试剂或溶液，然后要回答溶液里面都有哪些离子和分子，这是搞生命科学的人非常关注的问题，但是我们知道，这个问题从来都不那么容易回答。

直到有了非损伤微测技术，稍后会讲原因。那这个溶液，如果是传统的方法，比如最早的曾经有用放射性同位素标记某离子或分子，然后要想知道它的种类，上大学课的时候都知道有火焰色光光度计或者原子吸收光度计来告诉我们有哪些元素，有哪些离子，但基本上，要么材料死了，要么溶液被烧掉，我们就失去了这个溶液和材料，还有后期的用化学染色的办法，放入化学试剂反应，比如PH试纸就是一种染色，根据它就知道这里的氢质子的含量是多是少，根据颜色就可以判断出来，但是毕竟在活体中，对整个试验系统不造成任何损伤的测量方式还是比较少的，大家熟悉的比如PH剂，那如果有个玻璃放进去，不用对材料和溶液造成破坏和损伤就可以知道溶液的氢质子浓度有多少，当然也有比如钙离子剂和氢离子剂，钾离子剂这些去探测。

中关村 NMT 联盟

如何看懂 NMT 数据？

1. 种类 (无需标记, 活体)

2. 大小

3. 方向

(生理活性)

Ca²⁺ K⁺ H⁺ Na⁺ NO₃⁻ Mg²⁺

Cl⁻ Cu²⁺ Pb²⁺ Cd²⁺ NH₄⁺

H₂O₂ IAA O₂

Electrolyte

NMT 传感

图：

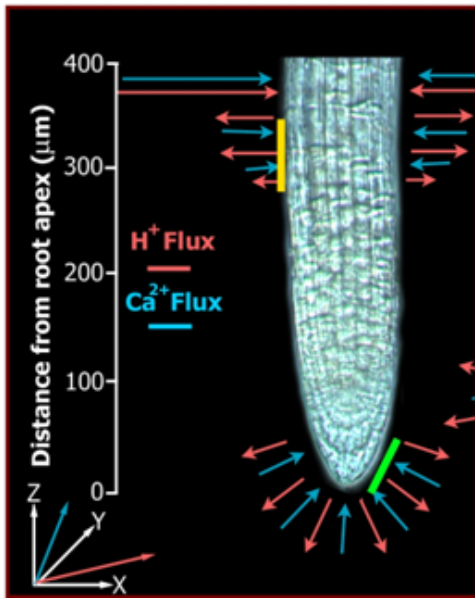
非损伤微测技术就是在这个方向上往前迈了一小步，这一小步是什么，就是用高分子化学的技术设计小一点的传感器，类似于实验室的PH剂，但是它要小的多，而且要灵敏的多，而且它所覆盖的离子比较多，它除了氢钙钾钠这些常见的，还有最新研发出来的铜铅，比如说植物上比较常见的，也是大家最关心的氮磷钾，基本上都有，磷现在也在接近成功研发的道路上，现在大部分人用氢质子来间接的测磷，当然下面的这块还展示了 H_2O_2 ，IAA和 O_2 ，这些分子甚至是大分子像IAA植物生长素这些，它用的不是演示的这种电极的形状，但是大致原理就是快速的，可以从液态环境里探知离子和分子的存在。尤其是比如最近由我们中关村NMT联盟的会员单位，旭月研究院成功研发的世界首个商业化的IAA的电极，很多老师利用这个技术进行了有益的研究上的探索和新的发现。

另外，非损伤微测技术用比较独特的测量方式，不仅能够让我们知道溶液里有哪些离子，更重要的它还能让我们知道我们所感兴趣的离子，比如样品植物苗中的离子，它是被吸收进去，还是释放出离子，特别是它能够同时告知大小和方向，这对于生命科学工作者是具有非常特殊的意义的，所以我们对于非损伤微测技术的数据，它在鉴别和告诉离子甚至分子的种类上非常的简单直接，用不同的NMT的传感器，比如说NMT镉传感器，直接测到的就是镉离子，我们知道测的肯定是镉离子，所以不用去做其它的标记等等，其他都不用，然后还可以知道测的植物是吸收镉离子还是没有吸收的能力，现在国内很多老师都已经利用非损伤微测技术取得了比较好的科研成果。

比如前些日子罗志斌老师利用镉电极做的研究就发现了新的植物富集镉离子的机制，这对于将来国家利用此研究成果进行环境里的镉离子污染的清理具有非常重要的现实意义，当然其他的例子，全国各地的很多老师都有非常好的科研进展，希望朋友们多关注NMT联盟的直播，从这些朋友们已有的工作里可以汲取很大的研究养分并得到启发。



如何看懂NMT数据？



1. 种类 (无需标记, 活体)
2. 大小 (生理活性)
3. 方向



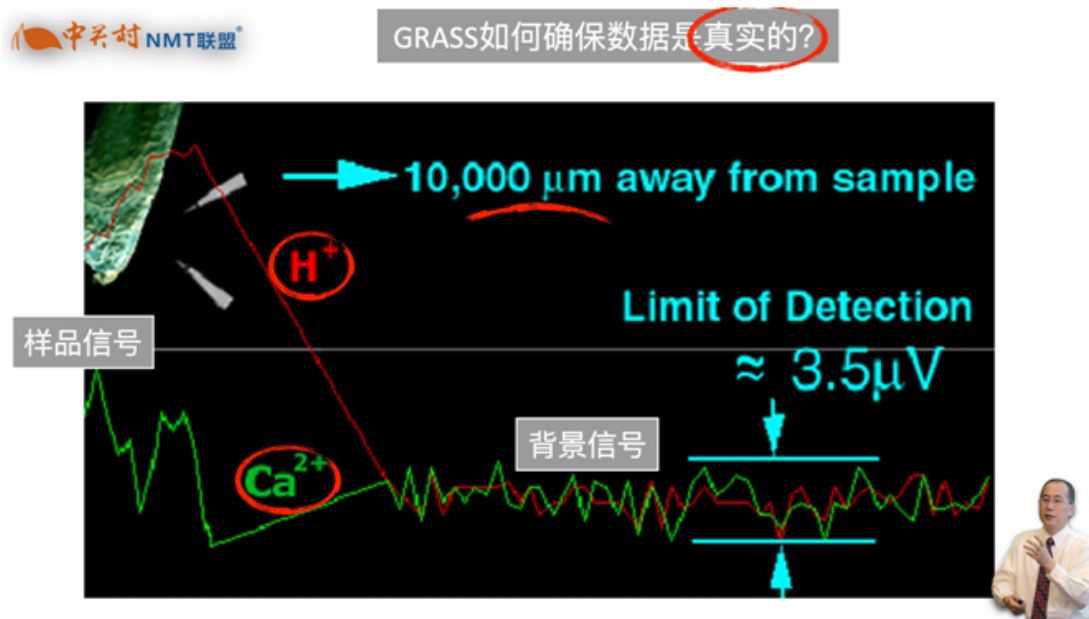
图：

因此，总结一下NMT数据的特点就是它标记，染色等等都不用，所以完全可以对活体进行检测，对我们更重要的是，它具有告知离子是进是出，而且速度是大是小，单位时间内流进的是多还是少，这对搞生命科学来讲最有益，我们再看一下刚才分享的数据就知道了，首先一眼就知道测的是什么离子，然后是进是出，多大或者多小，再一次看图，心里就更加清楚。

图：

为了让大家更容易理解非损伤微测技术的数据，我给大家从NMT数据的三个特点分析了一下，第一，它是通过NMT各类专业的传感器可以直接的，不用像过去传统技术的物理或者化学标记那样，可以直接快速的在正常生物的生理条件下，测到外部环境溶液中各种跟生命活动非常相关的离子和分子。

它是通过比较小的传感器测量从单细胞一直到组织甚至器官的，甚至小的个体外部环境的各种离子和分子的活动，它另外两个特点分别是具有大小和方向两个属性，而这两个属性对于揭示活体生物的生理活性非常关键，为了让大家更容易理解NMT数据的方向和大小这两项特点，我特意借用嫦娥五号降落月球表面的过程说明在自然界之中，具有方向和大小的数据是十分普遍也是非常有用的。



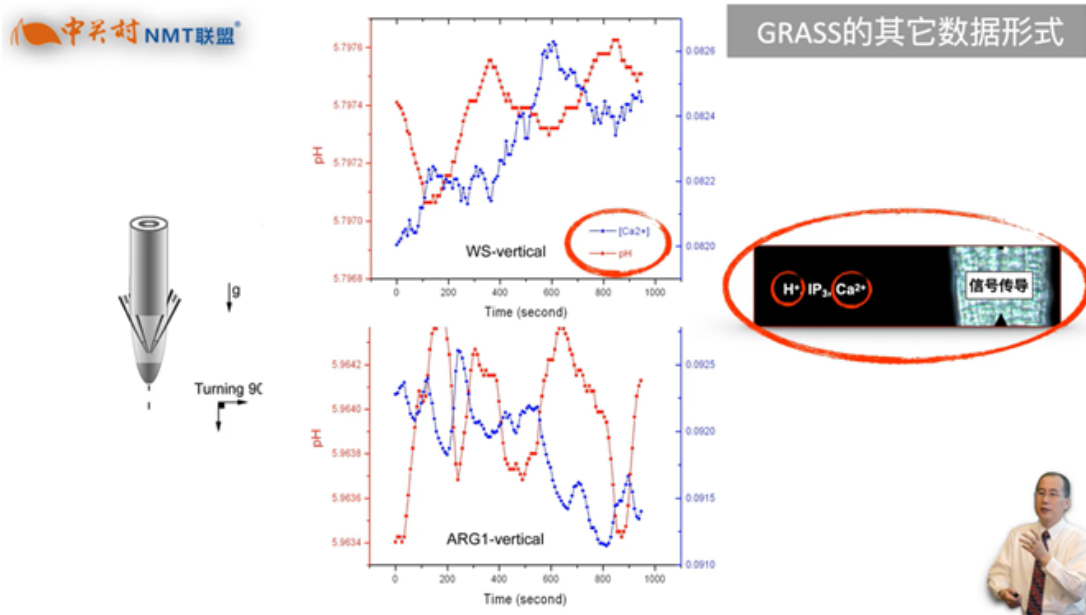
图：

另外一个问题，也是老师们，尤其是对生理结果等不是特别熟悉的老师常常会有疑问，就是我们怎样保证运用非损伤微测技术测试样品后的数据是真实的，而其他的数据或者说信号是其他的因素。

那我这边给老师介绍一个背景或者窍门，这样老师可以相对的对技术有更深一步的了解，也可以更好的去应用技术，此图的横坐标是时间，纵坐标是氢质子和钙离子流速的过程，这是一个实时测量的过程，方法就是简单的把传感器从被测材料，比如说左边的就是拟南芥的根尖，这是我们正在测量的区域，给它拉到远远的背景里，在这里我们给它拉到一万微米，实际上一般来说，三五百微米就足够了，但是为确保旁边没有任何的信号源，没有任何可以干扰的东西。我们来看这一部分是它的背景信号，不是材料的信

号，再退回去到待测样品的旁边，又测到了信号，自然就知道信号就是材料发射出来的，或者说它生理的变化产生的信号，因此就知道数据是真实的。

为了让大家更好的理解和认识NMT技术，特别是看懂NMT非损伤微测技术所产生的数据，我们特意以这次嫦娥五号降落月球表面为例，向大家重点介绍NMT数据具有大小和方向这两个属性的特点，同时给大家介绍了，基于NMT的不同离子分子种类的传感器，而赋予我们的这种直接的无需标记的，最方便的研究活体的一种方法，由于我们有了上述三种属性，NMT数据的三种属性，也就是直接知道是某种离子和分子，并且知道它是进还是出，还有大小是多少，使得我们有了非常有力的去研究基因生理功能和活性的有力工具。



图：

恐怕今天我们仍然没有机会去回答最开始要想了解的问题，在信号传导过程中,植物的根感受重力的信号传导过程中,氢质子和钙离子哪一个更重要这个问题。

正因为如此，它是作为我们了解和研究生命世界的最基本的工具，因此非损伤微测技术，我们认为它是非常底层的，但是又是非常核心的一种技术，特别是它可以帮助我们研究的过程中，既帮我们了解发生了什么，以及为什么发生这两个非常基本的，底层的问题，会给我们提供非常直接的和有力的工具。

相较其它的技术而言，非损伤微测技术，它的活体研究，实时研究，原位检测能力，特别是它为我们生命科学工作者提供了难能可贵的定量研究的手段，因为我们知道生命科学工作者历来饱受其它学科不满的地方，就是说生命科学工作者更多的是一个定性，很难拿出数据来说明问题，因为没有数据的比较就很难再返回来指导实践。

而非损伤微测技术，刚才我们看到了它是非常灵敏的检测技术，而且可以把各种生理变化通过流速或者浓度的数值加以量化，并且和基因的功能，和生理的变化把它们进行量化，而这种量化就会上升到，上帝用来描述整个宇宙的语言的数学的高度，从而为我们人类，为中国人，为整个的人类征服宇宙和揭示很多生命科学的奥秘，提供不可或缺的，不可多得的一种工具。

2. NMT 在转基因研究中的应用

基因研究能够告诉我们可能发生什么，而 NMT 告诉我们是不是真的发生了，是对基因功能的验证。所以 NMT 是基因研究的落脚点，自然在转基因研究上具备先天优势。

14-3-3 蛋白在植物适应低磷胁迫中的作用（NISC 文献编号 C2013-024）

14-3-3 蛋白质是一个大的蛋白质家族，但是他们的成员在植物应对非生物胁迫的作用还不清楚，特别是在营养缺乏的条件下。

2012 年 6 月，中国科学院南京土壤研究所施卫明实验室与香港中文大学张建华实验室联合发表了题为“TFT6 and TFT7, two different members of tomato 14-3-3 gene family, play distinct roles in plant adaption to low phosphorus stress”的文章，发现了 14-3-3 蛋白家族中的 TFT6 和 TFT7 具有调节植物忍耐低磷（LP）胁迫的作用，阐述了这种调节作用的机理。

这项工作使用旭日非损伤微测技术测定了拟南芥根部的 H^+ 流速，发现 TFT 超表达的植物在 LP 胁迫下增加 H^+ 的流速和质膜 H^+ -ATPase 的活性。结果表明 TFT6 和 TFT7 在植物适应 LP 中起着不同的作用，TFT6 主要在叶片中通过调节叶片碳的固定和增加韧皮部蔗糖的运输促进根的生长进而参与对 LP 的系统反应，TFT7 通过激活根部质膜 H^+ -ATPase 的活性促进拟

拟南芥在 LP 下释放更多的 H^+ ，从而使植物适应低磷环境。

这篇文章是使用旭日非损伤微测技术研究植物应对非生物胁迫的范例，即从基因到蛋白，再到生理功能的一系列工作，清晰地阐明了基因的功能。

扫描回复文献编号下载全文

图 6-2 不同基因型的拟南芥在 pH 5.8/7.8 条件下，根部各位点 H^+ 流速。正值表示外排

3. NMT 在植物逆境研究中有哪些具体应用案例？

自然界中，植物分布及其广泛，生长环境十分复杂。许多特殊环境对植物生存与生长存在不利影响，这些环境成为逆境，主要包括干旱、寒冷、高温、涝害、盐碱、病虫害和化学污染物等。多数植物能够通过自身生理机能的调节对抗逆境。植物的生理调节过程往往伴随着 H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 O 等离子、分子流入或流出植物体的过程，离子 / 分子流的研究能够从全新角度阐述植物抗逆机制，获得常规方法难以获得的全新发现。

非损伤微测系统直接在根、细胞等活体植物样品上原位获得离子 / 分子流速，不仅能够研究逆境对植物的生理生化影响和损伤机理、描述植物对逆境的生理响应，以及逆境信号的转导过程，而且能够通过离子 / 分子流，快速、准确地筛选具备优良性状的生物品种。

目前，逆境胁迫是非损伤微测技术最擅长，也是研究成果最为丰硕的研究领域。最具代表性的成果当属 2015 年，中国科学院植物研究所种康研究员发表在 Cell 上的水稻低温胁迫文章。研究者使用旭月非损伤微测技术，检测了水稻根部在低温胁迫、盐胁迫下， Ca^{2+} 流信号的特征。旭月公司推出的 NMT 逆境研究工作站，专门针对植物逆境研究研发，标配可测 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 H^+ 、 Cl^- 等分子、离子指标均可升级。

水稻感知冷害的分子机制（NISC 文献编号 C2015-005）

研究人员发现数量性状基因座（QTL）*COLD1* 基因及其人工驯化选择的 SNP 对于粳稻的抗寒性非常重要。过表达 *COLD1* 基因能够显著增强水稻的耐寒能力，而功能缺失突变体 *COLD1-1* 或反义基因株系却对低温非常敏感。

本文通过研究发现，冷胁迫时 *COLD1* 与 G 蛋白 α 亚基相互作用激活 Ca^{2+} 通道，触发下游耐寒的防御反应，而后加速 G 蛋白 GTP 酶活性，最终揭示了通过驯化得到的 *COLD1* 等位基因和特异 SNP 赋予水稻耐寒性的新机制。文中利用旭月 NMT 检测了不同水稻品种在低温及盐胁迫下 Ca^{2+} 的流速，为水稻冷胁迫下 Ca^{2+} 通道的激活提供了直接的依据。

这是种康课题组运用旭月 NMT 技术发表的第二篇文章，更是国内学者利用 NMT 首次在世界顶尖杂志上发表的研究成果，对于耐寒水稻品种的培育具有非常重要的指导意义。

图 6-3 不同品种、基因型水稻在低温胁迫下，根部 Ca^{2+} 的流速

4. NMT 在植物营养研究中的应用

植物生长过程中，需要从周围环境大量吸收 N、P 和 K 等营养物质，这些营养元素常以 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ 、 H_2PO_4^- 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。因此，离子流的检测能够在微观尺度上研究植物吸收营养这一动态过程。

目前，营养研究是规模与成果仅次于逆境研究的另一重要领域。三大常量元素中，氮（ NH_4^+ 、 NO_3^- ），钾（ K^+ ）已经实现直接检测，磷（ H_2PO_4^- ）研发已经取得了关键性突破，短时间内即可实现商业化检测。旭月公司针对这一领域，已推出 NMT 营养研究工作站，标配 NH_4^+ 、 NO_3^- ，可升级 Ca^{2+} 、 H^+ 、 Cl^- 等离子、分子指标。

植物吸收氮营养过程的微观机制（NISC 文献编号 C2013-010）氮（N）是蛋白质、核酸、叶绿素的重要成份，也是许多植物的次生代谢产物，在植物生长过程参与着众多的生理环节，因此氮素是植物生长所需的大量主要营养元素。像大部分的木本植物一样，群众杨也是通过添加氮肥来提高它的产量。众所周知，铵盐（ NH_4^+ ）和硝酸盐（ NO_3^- ）是植物从土壤中吸收氮营养时的两种形式，群众杨也不例外。但是群众杨在吸收氮营养时， NH_4^+ 、 NO_3^- 的关系以及与伴随在吸收过程中的 H^+ 的依存关系，之前的报道没有深入研究过。

在这篇文章中，研究组通过旭月非损伤微测技术（NMT），直接检测了群众杨根的 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 H^+ 的流速信息。研究了群众杨根吸收氮营养的空间特性，发现根部不同的区域，吸收氮营养的特性不同。其中铵态氮和硝态氮吸收最大的区域分别为距离根尖 10 mm 和 15 mm 处。当环境中两种状态的离子都存在时，根在吸收这两种离子时存在着一定的协同和竞争的关系，而这一过程又受到了质膜 ATPase 的调控。通过加入质膜 ATPase 的抑制剂钒酸钠之后发现，促进了 H^+ 的吸收，抑制了群众杨对两种氮源的吸收。

这篇文章通篇仅使用了旭月非损伤微测技术（NMT）一种技术，全面深入的研究了群众杨在吸收营养过程中的 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 H^+ 的关系，并首次证明了这三者在此过程中存在着协同关系，揭示了群众杨营养吸收的微观机制。

图 6-4 群众杨根部各位点的 NH_4^+ 流速。正值表示内流

5. NMT 在植物信号转导研究中的应用

NO 通过调节 Ca^{2+} 流速影响花粉管发育 (NISC 文献编号 C2009-002)

一氧化氮 (NO) 在植物的生长发育过程中具有非常重要的作用。近日, 中科院植物所林金星研究组深入研究了裸子植物白皮松花粉管生长过程中, NO 对 Ca^{2+} 、微丝骨架、囊泡转运和细胞壁构建的调节作用。

NO 作为重要的信号分子, 参与调控花粉管极性生长。通过应用显微注射、旭日非损伤微测、免疫荧光标记等技术发现 NO 释放剂促进花粉萌发和花粉管伸长, 并且具有浓度效应, 而抑制剂则抑制花粉萌发和花粉管生长, 同时使花粉管顶端膨大, 丧失极性; NO 释放剂促进胞外 Ca^{2+} 内流, 顶端 Ca^{2+} 浓度梯度增加, NO 抑制剂抑制胞外 Ca^{2+} 内流, 顶端 Ca^{2+} 浓度梯度降低。此外, NO 释放剂促进囊泡运输, 使花粉管顶端微丝束解聚, NO 抑制剂具有相反的作用, 同时 NO 使花粉管顶端酯化果胶增加而酸性果胶降低。

在白皮松花粉管中, NO 促进胞外 Ca^{2+} 内流, 从而维持胞内 Ca^{2+} 浓度梯度, 进而影响花粉管顶端微丝骨架的组装, 促进囊泡运输, 使花粉管顶端酯化果胶累积, 最终促进花粉管的正常生长。通过 Ca^{2+} 流和细胞学实验结果, 全面地认识了 NO 在花粉管中极性生长中的功能。

[扫描回复文献编号下载全文](#)

图 6-5 NO 供体 (SNAP) 处理后, 花粉管尖端 Ca^{2+} 流速及含量变化图。正值表示外排, 负值表示吸收。

6. NMT 在植物发育研究中的应用

植物的生长发育是一个极其复杂的过程，它在各种物质代谢的基础上，表现为种子发芽、生根、长叶、植物体长大成熟、开花、结果，最后衰老、死亡。

植物的一生始于受精卵的形成，受精卵形成就意味着新一代生命的开始。在以后的生长过程中，无论是营养生长还是生殖生长，时刻都受到各种内外因子的影响和调控。在这些调控过程中，往往伴随着 H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、 O 等离子 / 分子流入或流出植物体。通过离子 / 分子流研究植物生长发育，能够发现全新的生命现象。而且，非损伤微测技术可检测贯穿于植物生长发育各个时期的样品，具体请查看“042 NMT 可以检测哪些样品？”。

NMT 植物生长发育文献成果

棉花早期纤维发育的 Ca^{2+} 相关调节机制 (NISC 文献编号 C2014-003)

Ca^{2+} 因为其功能广泛，在植物细胞发育中扮演着重要角色。在棉花中，很多表达谱的数据表明 Ca^{2+} 相关基因参与了纤维发育，但是相关的实验证据还很缺乏。

该研究从纤维 cDNA 文库中挑选到了一个在纤维快速伸长期优势表达的 Ca^{2+} 受体基因 GhCaM7。通过旭日非损伤微测技术 (NMT) 检测不同发育时期纤维顶端 Ca^{2+} 流动发现，在纤维发育过程中， Ca^{2+} 一直处于吸收状态，在纤维的快速伸长期 (10-15 DPA) Ca^{2+} 的吸收速度达到高峰。结合 Ca^{2+} 通道抑制剂的处理实验表明， Ca^{2+} 的内流是纤维正常发育所必需的，而 Ca^{2+} 的内流速度变化与 GhCaM7 表达丰度的变化存在一致性，这说明，GhCaM7 可能通过感受 Ca^{2+} 内流从而在纤维发育中扮演重要角色。进一步通过转基因，细胞生物学等手段发现该基因通过调节细胞内活性氧的水平在早期纤维发育中发挥重要作用。

图 6-6 不同发育时期的棉花纤维，顶端 Ca^{2+} 流速图。负值表示内流

扫描回复文献编号下载全文

6. NMT 在植物光合作用研究中的应用

目前，光能利用率和光合效率的研究主要集中在探讨光合机构的运转与调节机制、外界因素对二者的影响方面，对广泛存在于植物组织、细胞、亚细胞结构中的离子分子交换现象则鲜有报道。此外，NMT 在植物非生物逆境领域的应用已较为成熟并初具体系，而非生物胁迫例如干旱、盐、重金属能够诱导活性氧的增加从而限制植物体光合成的能力，利用旭日 NMT 间接进行植物光合研究已具备大量的基础工作。探索光质、盐、重金属、干旱和低温等因素影响光合作用的机理，筛选能够高效利用光能、有效抵抗逆境的植物品种，成为光合研究的目的所在。2017 年初，非损伤微测系统已经正式入驻中科院植物所光生物学重点实验室，旭日公司也针对植物光合领域，推出了 NMT 光合研究工作站，标配 H^+ 、 O ，可升级 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子、分子指标。

镁供应量对光诱导下各离子通道的影响 (NISC 文献编号 F2005-007)

Mg 作为组成叶绿素的重要成份，其在膜转运以及不同 Mg 供应量对转运过程产生影响的分离机制并不明确。本研究利用非损伤微测技术，检测了蚕豆叶肉细胞中，Mg 对质膜 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 转运体活性所起到的效用。通过非损伤微测系统检测离子流速发现，至少 Mg^{2+} 的跨膜吸收至少与两种机制相关，一种是可透过 K^+ 、 Ca^{2+} 的非选择性阳离子通道，另一种是当 Mg^{2+} 低于 $30 \mu M$ 时启动，推测为 H^+ / Mg^{2+} 交换体。实验发现，在蚕豆叶肉细胞中，不同水平的 Mg 显著地影响了质膜上的 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 转运体。研究论述了 Mg 诱导的叶片响应光照的电生理变化及此过程中的离子机制的生理意义。

研究首次展示了叶肉细胞 Mg^{2+} 的实时跨膜流速及其对光信号响应后产生的变化。实验发现，缺 Mg 时，叶肉细胞 K^+ 对光信号变化的反应最明显，而 50 mM Mg 条件下 K^+ 流动最不明显。这表明，光诱导的 K^+ 流动与 Mg 供应量没有相关性，证明了光诱导的 K^+ 流动与细胞肿胀即叶片扩展生长没有直接联系，而光诱导的 K^+ 流动很可能只是用于调节电荷平衡。

图 6-7 0.01-100 mM Mg 处理蚕豆叶肉细胞后， Ca^{2+} 外排速率的变化。正值表示内流

8. NMT 在重金属相关研究中的应用

人类对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造活动日益增多，造成多种重金属如铅、汞、镉、钴等进入水、土壤和生物圈中，引起严重的环境污染。部分植物对重金属离子（如 Cd^{2+} ）有明显的耐受性，并能够对其进行富集，这为重金属污染的生物修复提供了可能。大部分动物对重金属呈敏感性，其生命活动尤其是呼吸作用，在重金属存在的情况下呈现出显著的变化。

重金属往往要流入到生物体内才能产生毒性，而生物体通过生理调节对抗重金属毒性，往往涉及 H^+ 和 O_2 等离子 / 分子的流入流出。因此，对上述重金属离子及相关的 H^+ 和 O_2 等离子 / 分子流的探索，能够更深入地研究重金属的危害及相应的修复机制。

非损伤微测技术以完全活体的方式，原位采集动植物在重金属环境中 Cd^{2+} 、 H^+ 及 O_2 等离子 / 分子流的变化情况。这是对重金属污染最直观的体现，可为重金属污染的监测及高效富集重金属植物的筛选提供依据。

旭月公司针对重金属研究领域，推出了 NMT 重金属研究工作站，标配 Cd^{2+} 、 H^+ ，可升级 O_2 、 Ca^{2+} 等分子、离子指标。此外，旭月公司一直在与中科院烟台海岸带研究所等单位合作，不断地研发新指标，旭月公司正在研发的 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 也已经取得了关键性突破，不久即可实现商业化检测。

菌根提升植物镉耐受力的新机制（NISC 文献编号 C2013-015）

外生菌根是寄主根部与某些真菌形成的共生组织，并可以增强寄主植物对 Cd^{2+} 的耐受能力，但其生理学和分子学机制尚不明确。

本研究以卷缘桩菇菌与银灰杨根部形成的外生菌根为研究对象，揭示木本植物的外生菌根对寄主镉耐受能力的影响。有菌根银灰杨与无菌根银灰杨经过镉处理 5min 后对比，通过旭月非损伤微测技术（NMT）检测发现，前者根尖有更多的 Cd^{2+} 内流且 H^+ 外排更强， H^+ -ATP 抑制剂处理后，后者 Cd^{2+} 吸收趋于消失，而有菌根银灰杨根尖对 Cd^{2+} 吸收下降较少。

实验结合气体交换测量、基因转录水平检测，证明外生菌根提升了寄主对 Cd^{2+} 的吸收能力，可能与增加了根部体积以及与 Cd^{2+} 吸收、运输相关基因的超表达有关，此外通过提升镉解毒能力、营养与碳水化合物水平，从而提高了银灰杨对 Cd^{2+} 的耐受能力，这为植物修复提供了新思路。

图 6-8 -/+ 菌根、-/+ CdSO_4 处理时，银灰杨根尖各位点 Cd^{2+} 的流速。正值表示内流

9. NMT 在神经研究中的应用

在神经研究中有哪些具体应用案例？

阿尔茨海默症治疗新思路：金属硫蛋白螯合疗法（NISC 文献编号 F2010-021）阿尔茨海默病（Alzheimer 病，AD）是引起老年痴呆的重要疾病，AD 的主要病理学特征是胞外不溶性 β 淀粉粒（ $A\beta$ ）空斑的沉积。研究表明 $A\beta$ 的聚集受金属锌及铜的催化。金属硫蛋白（MT）是脑内主要的锌和铜的内源结合蛋白，MT 与 AD 的病理生理学相关。鉴于 MT 较强的金属结合能力，研究人员推测 MT 可能参与调控金属结合调控及 $A\beta$ 聚集。

2010 年，澳大利亚及爱沙尼亚的科学家以大鼠皮质神经元细胞为材料，通过电喷雾离子阱质谱（ESI-MS）、等离子体质谱（ICP-MS）、神经元毒性试验、非损伤微测技术等手段研究了金属硫蛋白亚型 MT-2A 与锌 / 铜的结合状态以及不同处理条件下神经元细胞的活力、 Ca^{2+} 、 K^+ 离子流信息等。研究发现，MT-2A 可以保护皮质神经元细胞免受 $A\beta$ 聚集引起的毒性，主要是由于 Zn7MT-2A 与 Cu(II)- $A\beta$ 之间的锌铜交换并形成 Zn 结合的 $A\beta$ ，而 Zn 结合的 $A\beta$ 只能形成可溶性的蛋白聚集。神经元毒性试验表明 Cu(II)- $A\beta$ 具有神经元毒性，可诱导产生类似氧化胁迫的不利影响。通过非损伤微测技术检测 Cu(II)- $A\beta$ 处理下神经元离子动态平衡的改变，发现 Cu(II)- $A\beta$ 引起 K^+ 的外流， Ca^{2+} 的内流，而加入 $5\mu M$ 的 Zn7MT-2A 会阻止 Cu(II)- $A\beta$ 引起的 K^+ 和 Ca^{2+} 流的改变，证实了 Zn7MT-2A 可阻止 Cu(II)- $A\beta$ 诱导氧化胁迫引起的不利影响。

目前比较普遍的 AD 疗法是金属螯合疗法，但是被螯合掉金属离子的 $A\beta$ 容易重新与金属离子结合，而 MT 与 $A\beta$ 进行金属交换后留下的是活性低的结合了 Zn 的 $A\beta$ 。该研究结果提供了一种更为可行的 AD 金属螯合疗法。

图 6-9 -/+ $5\mu M$ Zn7MT-2A 时，Cu(II)- $A\beta$ 处理前后，神经元 K^+ 、 Ca^{2+} 流速
NMT 重金属研究文献成果

10. NMT 在活体肿瘤研究中的应用

早在 100 多年以前，Stephen Paget 基于乳腺癌的器官特异性转移中的临床观察，提出了著名的“种子与土壤”的概念。然而，这一假说在当时并未受到足够的重视，将治疗思路仅仅局限于肿瘤细胞本身，导致人类的抗击肿瘤之路走得异常艰难。直到今天，才有越来越多的科学家开始意识到肿瘤与肿瘤微环境是一个不可分割的整体。而非损伤微测技术正是用于肿瘤细胞、肿瘤组织微环境变化的一类技术。

在肿瘤发生机制研究中，目前对于物理、化学、生物、遗传等致癌因素对正常活体组织或细胞生理功能，尤其是分子离子进出情况影响的研究还比较少，而分子离子进出细胞膜的速率和方向实时表征了该活体组织或细胞的大部分生理活动，对于研究各种致癌因素对人体不同部位正常活体的组织或细胞的影响机制具有重要意义；非损伤微测技术不但能够实时监测一种或多种致癌因素对特定组织或细胞分子离子流速的短时间或长时间影响，进行相关机理研究，而且能够通过正常与癌变的活体组织或细胞的分子离子流速的对比，来绘制癌变的组织细胞分离离子流速谱图，以此为依据指导临床研究。

旭月公司针对肿瘤研究领域，推出了 NMT 肿瘤研究工作站，检测对象包括肿瘤细胞及组织，标配 H^+ 、 K^+ ，可升级 O 、 H_2O 、 Ca^{2+} 等分子、离子指标。

NMT 在肿瘤研究中有哪些具体应用案例？

肿瘤细胞 H^+ 流速与其耐药性相关（NISC 文献编号 F2008-001）

无论是正常细胞还是肿瘤细胞，细胞内 pH（pHi）都是维持细胞各种生理功能的重要参数。实体瘤的重要特点之一是细胞间质呈酸性。调节药物进入细胞的重要机制之一是细胞内外的 pH 梯度差。因此，肿瘤的酸性 pHe 将有效地阻断药物进入细胞或中和药物，以及将药物隔绝在酸性的细胞囊泡中以阻止到达它们细胞内的作用靶点，从而降低其对肿瘤细胞的杀伤作用。

使用非损伤微测技术建立了药物抗性研究方法（drug resistance study method, DRSM），该方法可用于研究器官、组织、细胞外离子、分子活性与肿瘤细胞耐药性之间的相互关系。结果表明存在一个持续的并以固有振荡形式出现的胞外 H^+ 流现象。耐药株 H^+ 流在加 ADR（阿霉素）前趋近于零，而敏感株 H^+ 呈明显内流。敏感株和耐药株加 ADR 后 H^+ 均呈外流，但耐药株的 H^+ 外流为敏感株 5 倍。与 H^+ 流速结果相一致的是胞外的 pH 也产生了相应的改变。本研究为胞外 H^+ 活性与肿瘤耐药性的相互关联提供了直接证据。

图 6-10 ADR（阿霉素）处理前后乳腺癌细胞 H^+ 净流速。正值表示外排，负值表示内流。·耐药株 MCF-7/R，□敏感株 MCF-7/S

[扫描回复文献编号下载全文](#)

[NMT 神经研究文献成果](#)

11. 应用NMT进行药物筛选

药物发挥作用的重要方式是干扰或破坏病理细胞、组织的生理活动。而病理细胞、组织对抗药物（产生耐药性）的重要方式，也是改变或加强自身的某些生理活动。生理活动常常伴随着 Ca^{2+} 、 H^+ 、 O 等离子 / 分子流入或流出细胞、组织等样品，这些离子 / 分子流入流出的速率可以作为生理活动的特征性定量指标，从而也成为药理机制研究及药物作用效果评价的定量指标。

非损伤微测技术可在完全不损伤样品的条件下，采集活体病理样品在药物作用下， Ca^{2+} 、 H^+ 、 O 等离子 / 分子流的变化情况。非损伤微测技术获得的离子 / 分子流用于药理研究及药效评价，操作方法简单，数据直观易于理解，能够将分子生物学的结果和生理学结果很好的结合，使它们相互验证，极大地提高了研究成果的准确性和可靠性。

12. NMT 在糖尿病研究中的应用

进行代谢病研究的优势是什么？

代谢病中最常见的当属糖尿病。糖尿病除了其本身严重威胁人类健康外，还会诱发大量的并发症，成为导致死亡的重要原因。糖尿病的发病机制非常复杂，生理调控过程的异常是其重要诱因，这涉及 Ca^{2+} 、 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 O 等诸多离子 / 分子。 Ca^{2+} 、 H^+ 等离子以一定的节律流入流出胰岛，维持胰岛的正常功能。这些节律被破坏引发胰岛素分泌的异常。糖尿病的许多并发症也与生理行为的异常密切相关。

非损伤微测技术在不损伤样品的前提下，能够得到细胞、组织、器官等样品生理调控过程中， Ca^{2+} 、 H^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 O 等离子 / 分子流的变化情况。其结果简单直观，易于理解，既能单独使用，又能很好地结合分子生物学或其它生理研究结果，相互验证，极大地提高了研究的准确性和可靠性。

在离子 / 分子流速研究领域，最早被学者利用旭日非损伤微测技术（NMT）进行研究的代谢疾病也是糖尿病。2012 年，旭日研究院同国内学者合作，发表了小鼠的胰腺 β 细胞的研究成果。除了细胞外，NMT 研究者还以小鼠胚胎作为研究对象，发现母体糖尿病导致胚胎的氧代谢偏弱，可以诱发胚胎神经管缺陷。

NMT 在糖尿病研究中有哪些具体应用案例？

糖尿病个体胰腺细胞的生理特征—— Ca^{2+} 流紊乱（NISC 文献编号 C2012-011）

胰腺 β 细胞的胰岛素分泌异常是 type2 糖尿病的主要缺陷。以前在患有糖尿病的人和动物模型的研究中发现线粒体功能受损和 Ca^{2+} 内流异常，本研究是为了研究线粒体功能、 Ca^{2+} 内流和胰岛素分泌之间的关系。

2012 年，旭日研究院同清华大学合作，使用患有糖尿病的 KK-Ay 小鼠和正常的 C57BL/6J 小鼠的胰腺 β 细胞研究了线粒体的功能和形态， Ca^{2+} 通道，并且使用旭日非损伤微测技术（NMT）测定了葡萄糖诱导的 Ca^{2+} 内流。实验发现，葡萄糖诱导正常胰腺 β 细胞的 Ca^{2+} 内流增加，但是 KK-Ay 的 Ca^{2+} 并没有发生明显变化，当加入 genipin 后，能够恢复 KK-Ay 小鼠胰腺 β 细胞的 Ca^{2+} 内流。

因此，在患有糖尿病小鼠的胰岛 β 细胞中，缺失线粒体功能是改变 Ca^{2+} 内流导致的胰岛素分泌异常的重要因素。胰岛组织（Islet）是非常适合用于非损伤微测技术测定的材料，具有稳定而明显的 Ca^{2+} 、 H^+ 和 K^+ 的流速，这为研究糖尿病的机理提供了重要的活体手段。2010 年，普渡大学官网在对清华大学的介绍中特别提及了此项研究成果。

图 6-11 胰岛细胞检测示意图

12. NMT 在细胞凋亡研究中的应用

离子 / 分子流是生命体活性的基本特征。细胞需要通过物质交换来维持正常的生理状态，离子的交换是其中的一种形式。而且当细胞生理状态发生变化的时候，也伴随着离子的流动发生改变。当细胞发生凋亡时， K^+ 、 H^+ 等离子会发生相应的变化。因此，离子流的检测能够从微观尺度上研究细胞凋亡这一动态过程，伴随着这个过程，同时也表征了细胞的状态。

非损伤微测技术可在完全不损伤样品的前提下，获得活细胞 K^+ 、 H^+ 等离子的流动信息，是细胞凋亡过程的最直接反映，为评价细胞生理变化提供了非常可靠的证据。

O_2 、 Ca^{2+} 流速成为癌细胞凋亡新指标 (NISC 文献编号 C2015-014)

当前，世界范围内的口腔鳞状细胞癌发病率居高不下，每年新患病者达 389000 人，十年生存率不超过 50%。目前，化疗、放疗法均有较大的副作用，而光动力疗法 (PDT) 作为一种微损伤的治疗手段逐渐地进入人们的视野。光动力治疗能够引起诸如坏死 / 凋亡导致的细胞死亡，本研究探讨了 O_2 以及 Ca^{2+} 流速作为光动力治疗诱导的口腔鳞状癌细胞凋亡指标的可行性。

研究以口腔鳞状癌细胞 (OSCC) 作为研究对象，经 PDT 处理后，观察实验组与对照组在活性氧自由基 (ROS) 含量、细胞凋亡率、凋亡因子表达水平上的差异，发现 OSCC 经 PDT 处理后，各项指标均降低。通过非损伤微测技术 (NMT) 检测 O_2 及 Ca^{2+} 流速，结果显示，PDT 处理 2h 后， O_2 、 Ca^{2+} 流速开始发生明显变化，其中 O_2 内流逐渐增加， Ca^{2+} 外排速率也明显高于未处理组。

这一研究结果表明， O_2 及 Ca^{2+} 流速变化是 PDT 诱导的细胞凋亡的早期信号，并且这一信号的变化受到胞内 ROS 的直接调控。本研究中，NMT 实现了长达 24h 的活体检测，为研究的顺利进展提供了必要的技术支持。

图 6-12 光动力疗法处理后的口腔鳞状癌细胞 O_2 流速

扫描回复文献编号下载全文

三、常问解答

1. NMT在环境领域的应用，目前文献很少，能否直接告诉我，NMT可以帮我做什么？

非损伤微测技术NMT是一个通过离子分子流速检测，揭示活体生物与外界环境进行信息交换的工具。

那么NMT可以帮助环境科学工作者做如下工作：

- 1) 研究环境中有毒有害物质对生物活体状态下的各方面生理功能的影响；
- 2) 基于研究1) 探索形成基于活体生物生理功能的‘环境污染生物评价方法’；
- 3) 研究环境中营养物质对生物活体状态下的各方面生理功能的影响；
- 4) 各种生物膜过滤性能的优化；
- 5) 重金属高积累植物筛选；
- 6) 藻类与微生物共生体的目标生理功能优化；
- 7) 水体富营养化的修复植物的筛选；
- 8) 环境固体污染物（比如淤泥）的物理特征（比如O₂分布）研究；
- 9) 基于活体生物信号的水质监测方法研究；
- 10) 纳米等环境修复或复合植物抗污染能力的评价和研究；
- 11) 基于生物生理活性的生物燃料电池等性能的优化和评价研究；

目前文献少，正是科学家在各自领域抢占世界科研高地的良机！

2. 将细胞器分离出来，将植物根切下来的研究，还能称得上是“非损伤”吗？

非损伤微测技术根据科研人员对被测材料的不同处理，分绝对非损伤和相对非损伤。

比如，当把一个3，4天的拟南芥幼苗或几个毫米长的线虫放到NMT系统里，并为它们提供最适的外部环境，这就是一个绝对的非损伤。如果把拟南芥的根切下来，或把线虫的肌肉组织分离出来，再进行NMT检测，就是相对非损伤。

3. 放到土里培养的植物可以检测吗？重复性能保障吗？

要想利用好一种新技术，首先要对它的特点进行了解，才能充分利用好它。不会犯在医院带着戒指项链进行核磁检查的错误。

NMT的特点是，不接触被测材料，但必须在液体环境里才能够工作。因此，要想方便快捷用好NMT，并获得重复性较好的数据，显然科研人员需要将他们的材料从土培方法过渡到水培，才能更好地利用NMT的优势。否则数据的重复性很难保证。

中国NMT科学家第一批先行者之一的，北京林业大学陈少良教授，就花费了半年的时间将过去的土培杨树根变成沙培和水培，为后续的NMT数据快速产出打下了基础。

4. 我的植物材料必须土培，NMT能做吗？重复性能保障吗？

能做！

这里的关键是如何既保持植物的土培环境，同时又提供一个NMT可以工作的液体环境。比如，研究人员可以在欲检测的土培材料部位设计一个装置，既能够将被测部位暴露出来，又可以放入测试液进行NMT检测。

NMT的不接触被测材料的非损伤特点，给科研人员提供了非常大的，个性化的实验设计空间，自然也为科研创新提供了难得的契机。

5. 听说想获得重复性好的活体生理数据，特别不容易，NMT也是这样吗？

同任何其它技术一样，要想获得好的数据，实验设计和材料的准备是关键。简言之，无论NMT有多么简便和快速，想靠NMT来弥补基因方面工作的不足是不切实际的。

我们的经验是，先利用NMT快速定性的特点（药物处理等实验），把自己实验材料的‘脾气秉性’先摸清楚，然后再进行批量的数据定量工作。

其它详细解读，请查阅笔者另一博文<http://blog.sciencenet.cn/home.php?mod=space&uid=705&do=blog&id=1116329>

6. 我是研究环境生态的，比较宏观，能用得上NMT吗？

应用微观数据解释和研究宏观生态现象和问题，已经成为近年的一个潮流。

袁隆平院士的杂交水稻在带来粮食高产的同时，也带来了化肥过度使用的环境污染和水质富营养化等生态问题。旭月的NMT曾帮助袁隆平院士他们回答一个问题，就是他们的杂交水稻实施多少化肥就刚好够了，从而减少环境问题。

对已有的环境问题，如何从微观了解其成因，并从微观入手寻找解决问题的办法，NMT将会大有用武之地！

第五章 功能组学 (imOmics) 与中医药

一、NMT活体功能组学

1. 起源及定义

1) 起源

动态分离离子组学 (imOmics) 是继基因组学、蛋白质组学和代谢组学之后最新发展起来的一门科学, 与上述三大组学既一脉相承又泾渭分明, 可以说是三大组学的最终落脚点: 基因编码蛋白, 蛋白控制代谢, 代谢体现功能, 而 imOmics 研究的正是活体生理功能的最直接、最客观的体现。imOmics 是在 NMT 扎根中国后不久被中国科学家率先提出的, 之后得到迅速发展并渗透到多项领域, 如生物膜功能、高效农业、种子安全、生物质能源、民生安全等。

动态分离离子组学 (imOmics) 是现代多学科交叉的产物, 除技术核心——NMT 外, 生物信息学、分子生物学、应用信息学、基因 / 转录 / 蛋白质 / 代谢组学、统计学等都有机融合在 imOmics 中。imOmics 的最终目标, 是建立与基因 / 转录 / 蛋白质 / 代谢组学等组学相偶联的生物活体离子、分子数据库, 构建活体生物生理功能网络图, 最后与其他组学科学家们一起, 建立基因 - 蛋白 - 代谢 - 功能综合指标体系, 实现生命密码的全面数据化, 迎接生命科学大数据时代的到来。

2) 定义

动态分离离子组学 (imOmics), 是研究活体生物细胞、组织或者个体, 以离子、分子流速的方式, 与外界环境进行信息交换的过程。非损伤微测技术是动态分离离子组学研究的基本方法。

图 7-1 动态分离离子组学

2. 软硬件要求

3. 研究场景举例

4. 未来发展愿景

由于对基因检测可靠性的担心，美国 FDA 于 2013 年发函停止加州一基因检测公司为普通消费者“基于个性化基因检测结果提供医学建议”的服务。因为从基因层面到生物外在的生理功能，有太多的影响因素和不确定性。

具体来讲，当前基因、蛋白质、代谢等组学的研究手段以“离体检测”为主，即得到的检测结果反映的是失去生物活性的样品的特征，而矛盾的是，我们要拿这些“死样品的数据”来表示“活体生物”的特征，甚至要形成一套完备的体系，这在逻辑上形成了一个悖论。

非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology, NMT）的出现为解开此悖论提供了强有力的工具，同时也催生了 imOmics。NMT 是实时测定进出活体材料离子和小分子流速的技术，是生理功能研究的最佳工具之一。NMT 能够在零额外刺激（不接触活体材料）的情况下长时间实时监测生活在正常生长环境中的样品，并以离子和小分子流速的方式输出数据结果，真正从“生命活性”的层面上定量化阐述生理过程，实现了从静态（浓度）到动态（流速），从成份（分析）到活体（研究）两个质的飞跃。

所以，活体、生理研究相比于基因研究告诉我们可能会发生什么，NMT 可以确切地告诉我们真的发生了什么。

图 7-2 动态分离子组学是科研发展的趋势

第六章 NMT实验设计

一、NMT活体功能组学

NMT 实验中，选择与课题研究最相关的离子或分子作为检测指标，至关重要。为了方便初次接触非损伤微测技术的人员，按照自己的科研方向找到适合离子或分子种类，在这里列出 12 种离子 / 分子及其对应的相关生理过程作为参考。

表 8-1 各离子 / 分子指标对应的相关植物生理过程

二、测试液与校正液

1. NMT测试液

测试液指样品检测过程中所处的液体环境，成份以无机盐为主，贴近样品的培养环境。目的是检测过程中维持样品的正常生理活性。什么是符合要求的测试液？

*测试液可以保证非损伤微测系统正常工作；

*测试液尽量维持一定的渗透压和 pH 值，以保证样品的活性。

测试液成份可以自行决定吗？

NMT 实验中所使用的测试液成份是开放性的，完全可以根据自己的课题进行设计。在正式上机检测之前，需要通过技术判断溶液的可行性，即测试液是否符合技术要求。如果不符合要求，则可通过调整溶液的成份，直至既满足实验课题要求，又符合技术要求。

2. 测试液和校正液设计时需要遵循的原则

1) 一般性原则

测试液在保证传感器正常工作状态的条件下可尽量和样品的培养液一致，保证样品的活性。

*测试液中必须含有待测离子（特殊情况除外）。

*测试液中待测离子的浓度不宜过高。

*测试液尽量维持一定的渗透压和 pH 值，以保证样品的活性。

*不同的校正液之间的浓度一般相差 10 倍（个别分子除外）。

*调节测试液和校正液 pH 值时，不能用含有待测离子的酸或碱调节，如检测Na⁺ 时，调节 pH 值不能用 NaOH，可用较少量的 KOH 调节，最好用氯化胆碱或Tris。

*测试液中各待测离子 / 分子的推荐浓度。

表 8-2 测试液中待测指标的建议浓度范围

由于溶液本身不具有抵御外来酸碱及稀释影响 pH 变化的能力，为了保证测试过程中样品处于相对稳定的酸碱度环境中，建议加入缓冲成份以使溶液体系更加稳定。

2) 测试液缓冲成份的选取原则

选取缓冲成份时需满足以下条件：

*所选用的缓冲溶液不能与反应物、生成物发生作用。

如选择药用缓冲液时，要考虑到缓冲对物质不能与主药发生配伍禁忌。

*在加温灭菌和贮存期内要稳定，不能有毒性。

表 8-3 各缓冲成分对应的缓冲范围及缓冲能力最大值

3) 测试液的配制贮存原则

严格说所有溶液均需灭菌，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。当溶液中仅含无机盐时，可不作灭菌处理。溶液需放至 4℃冰箱保存，使用前请恢复至室温。

请参见附录1《非损伤微测技术测试液配方表》

三、NMT 对植物样品的要求

1. 培养条件

由于测试过程是在液体环境中，样品的最理想培养条件为水培或者是土培后再进行水培发根。这样培养样品表面干净，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性和准确性。此外，如果检测根毛区，但是样品根毛并不多，可向培养液中充气，促进植物根毛的生长。

2. 样品状态

活体样品信号非常灵敏，前期的样品准备很重要。不论是培养条件、环境，还是处理条件，都要把握的十分精确，只有这样，得出可用结果的概率才会高。

3. 样品选取

*根据研究需要

选择状态良好还是具有某些特征的样品，需根据课题的需求。

*组内样品，形态状态越一致越好

不论是选状态良好的，还是具有某些特征的，一定要注意，同一组的不同重复之间，从外观到各个特征，尽量一致。同时，挑选未受到明显损伤的样品。

4. 前期处理

对于研究植物营养方面的实验，若想观察实验材料对某种离子的吸收情况，大部分情况不需要前期处理。但有小部分样品需要在测试前进行饥饿处理，饥饿处理时间根据实际情况确定。

5. 样品固定

*可使用树脂块、双面胶、胶带、金属网格、生物胶等辅助物品固定。在使用物品固定时要进行对照实验，保证用于固定的物品不会对样品信号产生影响。

*固定后要保证检测部位充分暴露，以使传感器能够顺利定位检测。请注意，使用倒置显微镜时，测试部位处上下方，不能有其它遮挡物阻碍光线，否则传感器无法进行定位。

*固定好后，加入测试液并放置一段时间，确保稳定固定。

第七章 NMT 数据特点与分析

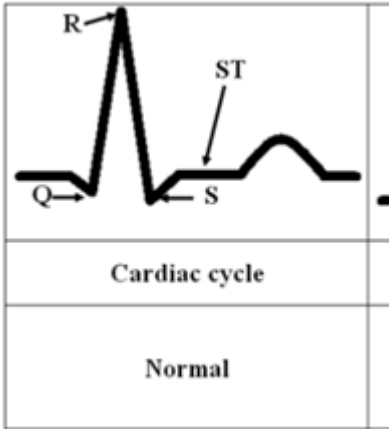
NMT非损伤微测技术作为目前优秀的活体生理指标检测技术之一，极大地提升了生命科学各个学科和领域研究的理论水平和科研效率。

但是，由于大多数科学家对于活体生理数据的相对陌生，在大家兴奋地拿到NMT实时、原位的离子分子流速数据时，如何合理解读和正确使用这些数据？成为大家目前迫切想了解的知识之一。

一、NMT数据是什么样的数据？

NMT非损伤微测技术作为目前优秀的活体生理指标检测技术之一，极大地提升了生命科学各个学科和领域研究的理论水平和科研效率。

但是，由于大多数科学家对于活体生理数据的相对陌生，在大家兴奋地拿到NMT实时、原位的离子分子流速数据时，如何合理解读和正确使用这些数据？成为大家目前迫切想了解的知识之一。

人体部分正常生理指标	对NMT数据解读的启发
温度用腋下测量正常是36—37摄氏度	NMT-TEM
心率正常是60—100次/分钟	美国进口/中国制造
血压正常不高于140/90mmHg，不低于90/60mmHg	可升级
凝血时间:(毛细管法)3--7min(玻片法)2--8min(试管法)4--12min	不同的检测方法（材料不同，测试液不同）所得生理指标可以不同，但都是可以接受的，或者说是正常的。
胆固醇:2.8--6.0mmol/L(110--230mg/dl)	范围值最大与最小值可以相差一倍以上
肺总量男5.02L女3.46L	性别不同，指标不同
生长激素(GH)血浓度成人<3ug/L(<3ng/ml),儿童5ug/l(5ng/ml)	年龄不同，指标不同
<p>心电图：</p>  <p>Cardiac cycle</p> <p>Normal</p>	非线性数据，比如有规律的振荡（波动）可能蕴藏着十分重要的生理信息

二、NMT数据重复性的挑战

从上面这些例子和解读可以看出，NMT的活体生理数据（或未来的生理指标）与大家比较熟悉的传统生命科学数据有较大的不同。以至于很多第一次拿到NMT数据的老师和同学，看到这些大的大，小的小，或者‘飘忽不定’的数据时，当初对NMT技术的美好憧憬，顷刻间化作了眉间的愁云。

尤其是NMT进入中国初期，大家都没有什么太多经验，很多老师同学在摸索的时候，也不太清楚所测的离子分子的生理学意义，就把材料不分‘男女老少’，也不管‘强壮羸弱’，通通交给NMT去检测。如同我们总发现在计算机面前，出错的多半是我们自己一样！NMT系统会忠实地把真实数据反馈给我们。

因此，NMT数据重复性的挑战，主要来自于两个方面。一是生理指标（即：离子分子种类）的选择，二是材料的筛选。

A) 离子分子种类的选择通常比较直截了当，大家都知道自己想要的是什么。但是常常忽视的一点是，尤其在摸索初期，最好能够找一个你自己相对比较熟悉，几乎可以预期的第二个，或可以用作参比/参照的另一个离子/分子，这样做的好处是，打个比方，当你用体温作为一个参照，如果某一‘样本’的体温极不正常的时候，你就知道了，你正在研究的未知生理指标的数据也是不正常的。

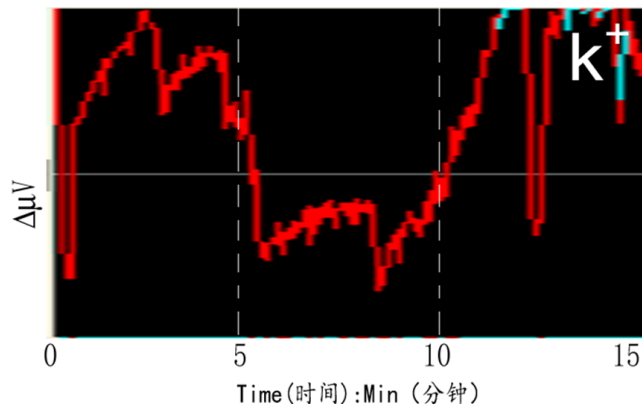
B) 材料的筛选在大家注意了‘男女有别’‘年龄各异’之外，一个比较容易忽视的地方是‘强弱不同’的甄别，还有老师同学们这个时候固执地认为要保证实验材料的科学性，就必须保证‘强弱’都有，忘记了本文前面所述“生理学是研究活体生物及其各组成部分的正常功能的学科”。那么，‘正常功能’应该是指‘强者（健康者）’吧。

因此，NMT数据重复性的挑战，本质上是对NMT技术使用者生理学知识和实验材料准备工作水平的双重考验。

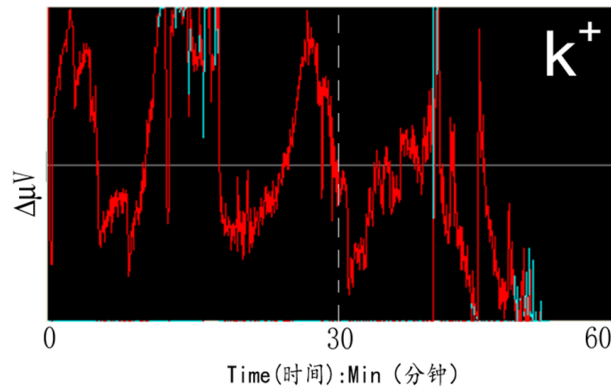
三、挑战后面隐藏的机遇

1. ‘飘忽不定’的规律

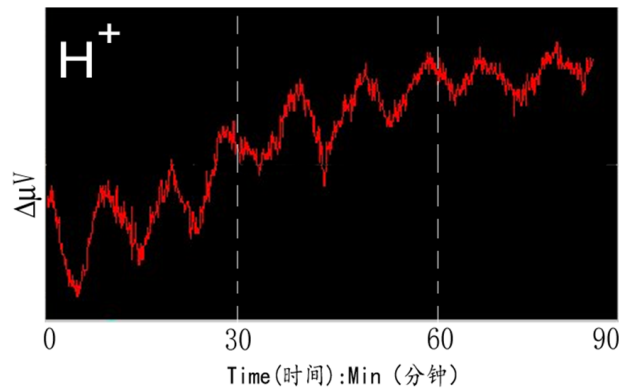
下面是一位水稻科研人员多年前在旭日测得的数据



下面是老师和旭日工程师一起出去吃午饭，无意中记录下的数据。有什么规律吗？




下面是另外一位老师转基因水稻，H⁺的NMT数据。是我们的工程师无意间记录下来的，因为老师当时自己没有设备，所带材料又多，无法这样长时间检测。




让我们在来回顾一下，人类心电图是怎么发现，Willem Einthoven是怎么因此获得1924年诺贝尔医学奖的吧。

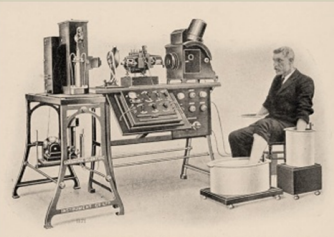
THE HISTORY OF ECG MACHINE



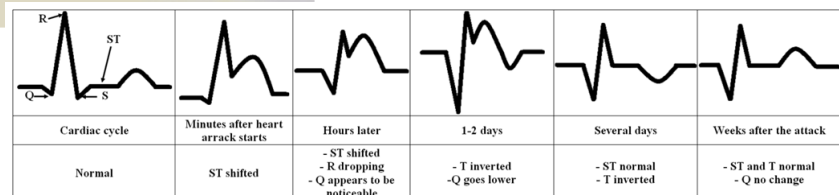
1903
Willem Einthoven
A Dutch doctor and physiologist. He invented the first practical electrocardiogram and received the Nobel Prize in Medicine in 1924 for it

NOW
Modern ECG machine
has evolved into compact electronic systems that often include computerized interpretation of the electrocardiogram.





Photograph of a Complete Electrocardiograph, Showing the Machine in which the Experiments are Attached to the Patient. In 1903 Einthoven and his First Biographer in Jans of Self-Portrait.



现在，摆在已经走在世界NMT应用前列的中国科学家面前的问题是，我们如何从这些“飘忽不定”的NMT活体生理数据里找到诺贝尔奖的线索，不是吗？！

2. “随机”的数据就是正确的结果

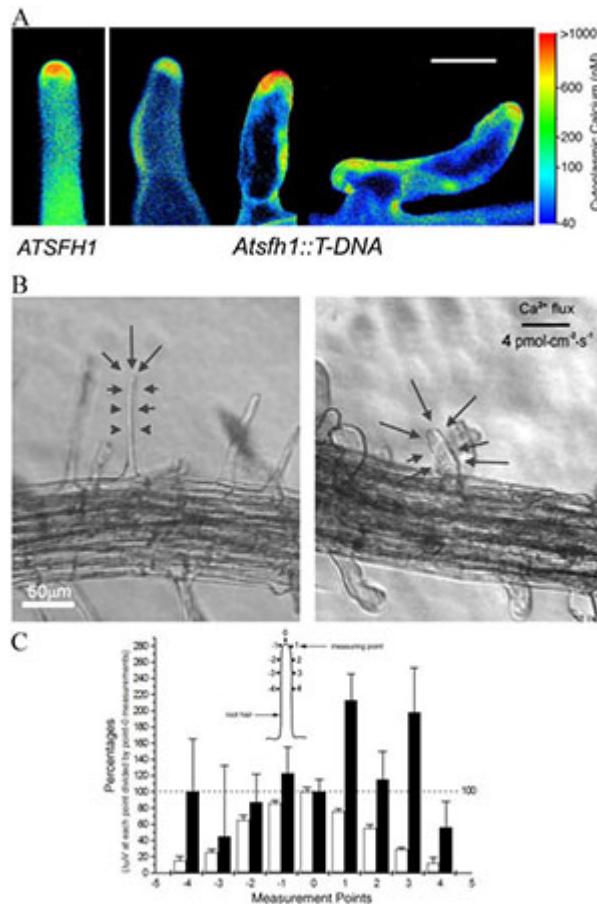
接触NMT不长时间的科学家，常常感叹到“我们得到的流速数据根本看不出什么规律，怎么回事儿啊？！”

当按照科学的方法，排除了因材料准备，实验设计，溶液配制，以及设备运行等人为因素造成的数据错误可能性之后，您就要认真思考一下，这些看似没有什么规律可循的数据后面有没有对您科研有价值的信息，甚至隐藏着某些科学上的重大发现，也未可知。

下面给大家举一个文献例子《Sec14p磷脂酰肌醇转移蛋白参与拟南芥根毛质膜极化生长》

(Vincent, P., Chua, M., Nogue, F., Fairbrother, A., Mekheel, H., Xu, Y., Allen, N., Bibikova, T.N., Gilroy, S., and Bankaitis, V.A. 2005. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of Arabidopsis root hairs. Journal of Cell Biology 168: 801-812.)

AtSfh1p是一个大型且未鉴定的拟南芥Sec14p-结节蛋白域家族的成员，它沿着根毛质膜定位，决定了根毛细胞的极性生长以及Ca²⁺的极性运输。



插图A左图显示的是AtSfh1p在野生型根毛内顶端极性分布的激光共聚焦实验结果。

插图B左图则是野生型根毛NMT的Ca²⁺流速结果，呈现明显的极性特征。

插图A右图显示的是AtSfh1p无效（转基因）型根毛细胞非极性分布的激光共聚焦3个实验结果。

插图B右图则是该转基因拟南芥根毛NMT的Ca²⁺流速结果，无明显的极性特征。

值得一提的是，当时这是两组科研人员分别进行的激光共聚焦实验和NMT实验，所有材料都是盲测，最后才汇总分析。因此，只要确信自己的材料和设备没有问题，那么您必定会为您的科研数据寻找合理，甚至是创新的完美解释。

四、常用工具

1. iFluxes软件数据处理

2. 流速云

3. Paint Shop Pro抓图软件应用

4. 流速换算

5. imFluxes-NMT3D数据可视化

第八章 NMT 文献发表

一、NMT 方法学的撰写

请前往中关村非损伤微测技术产业联盟网站 (nmtia.org)，进入首页 >> 会员服务>> 资料下载，即可下载最新版《应用非损伤微测技术 (NMT) 撰写文章的参考资料》，进行参考。

二、NMT 数据篇幅

根据研究需要，有通篇只使用 NMT 一种技术的研究成果，也有用 NMT 结果作为研究成果一部分的文章。

1. 2009 年，北京林业大学陈少良教授发表在 Plant Physiology 上的杨树盐胁迫文章，通篇使用 NMT 流速数据 (NISC 文献编号 C2009-004)；

2. 2015 年，中科院植物所种康研究员发表在 Plant Cell 上的水稻低温胁迫文章，将低温及盐胁迫条件下，水稻根部的 Ca^{2+} 流速数据作为文章整体的一部分 (NISC 文献编号 C2015-005)。

三、接收和发表 NMT 流速数据成果的 SCI 期刊

表 11-3 国内学者 NMT 文章发表期刊统计

注：只选取植物研究领域期刊，并且排除了 PLoS ONE, Scientific Reports

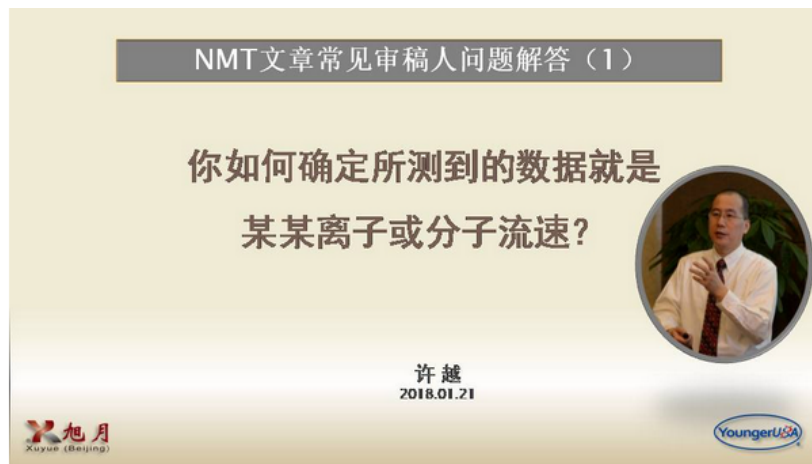
表 11-4 国外学者 NMT 文章发表期刊统计

注：只选取植物研究领域期刊，并且排除了 PLoS ONE, Scientific Reports

第九章 NMT文章审稿意见回复

一、如何确定 NMT 传感器测到的流速值为样品真实信号？

尽管NMT：非损伤微测技术在中国生物学界几乎已经家喻户晓，但是在世界范围内对于很大一部分科学家，仍属于阳春白雪。那么当我们的科学家向国际期刊投递了应用了NMT的科研论文的时候，面临着过去很少遇到的一个棘手问题就是，这些国际期刊审稿人对于NMT并不像大家所期望的那样熟悉，此时的老师和同学们在惊讶之余，多少也感受到了一些‘高处不胜寒’的滋味儿。也就是说，来自于先进技术的实验数据固然是个优势，但是如何回答这些不熟悉NMT的审稿人的有关NMT的一些细节方面的问题，还是有一定难度的，因为毕竟大家的兴趣所在是NMT产出的数据，而非其技术本身。这既是一个可理解的客观事实，但也暴露了我们实现弯道超车时，对于技术细节理解的欠缺和不够扎实。因此，我认为有必要在这里和大家分享一下这方面的知识和经验，让大家更有信心去冲击各自学术领域的理论高峰！



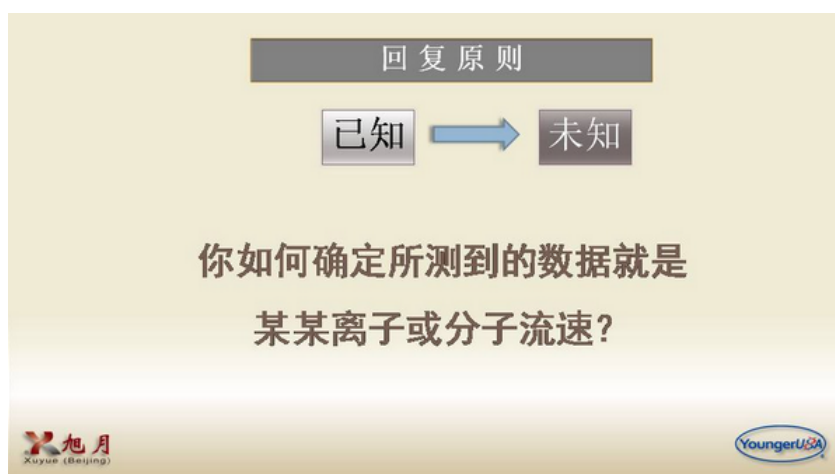
“如何确定所测到的数据是某某离子或分子的流速？”，是NMT文章审稿人的高频问题之首。这个问题的棘手之处在于它实际上包含了生命科学家不是很擅长的非生物学问题，一是离子分子的选择性/特异性定性问题，二是流速的概念和定量问题。下面分别说明。

1.如何简单说明NMT离子分子传感器的选择性/特异性定性问题？

或许是近些年，特异性/选择性的离子分子传感器/电极技术发展的过于迅猛，很多科研人员对于这一点似乎还没有反应过来和充分的认识，没有从过去传统的化学/荧光/光度计/放射性标记等方法中跳出来。尤其是像我们有些多年使用膜片钳技术的老师们，根本不能相信一个长得和膜片钳玻璃电极长得几乎一样的东西，前面灌冲了几微米的化学物质就可以直接告诉科学家此时检测到的是什么离子啦？！特别是略知一些膜片钳技术的学者都知道，膜片钳是要通过置换电极内外溶液，电压钳位，后续计算等复

杂步骤才能够确定所测得的电信号是哪种离子（详情请见笔者博文<http://blog.sciencenet.cn/blog-705-1109417.html>）。

有一些极端的例子，是我们和应用膜片钳技术多年的老师沟通NMT时，要花费老师非常多的时间，甚至是勇气来认识到NMT是可以这么简便快速地检测离子，甚至分子的。这说明我们大家先入为主的思维定势是多么的厉害！但是，也正因为如此，我们也完全理解了老师和同学们在面对审稿人的某些问题时的无助与无奈！除了我们必须有极大的耐心之外，我们还是应该在如何能给别人讲明白里面的道理上多下些功夫！下面就是我们过去积累的一些尝试，和大家一方面在这里分享，一方面希望能够抛砖引玉，因为我们自己何尝不是身在NMT的庐山中。



“从已知到未知”一直以来似乎是人们比较容易接受新鲜知识的有效途径。



这里我们不妨就用科学家，尤其是生命科学家都熟悉不过的pH计为例来说明NMT离子分子（电极）传感器的特征。pH计本质上就是H⁺传感器，随溶液环境里的H⁺浓度而变化，通过校正就可以知道未知溶液的pH值。NMT的H⁺传感器则是小型化了的，通过尖端LIX（液态离子交换剂）实现对H⁺进行选择性的测量的装置。

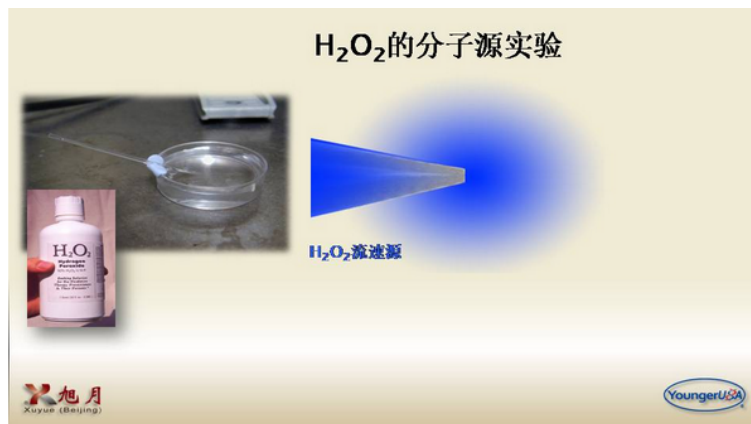
那么，NMT分子传感器则是利用电化学/荧光染料/碳纳米等技术，实现的对某种分子的选择性或特异性检测。通常我们给审稿人们解释到这里就可以了，把省下的解释交给前人的技术文献去完成即可。

2.如何说明所测到的离子分子流速概念？

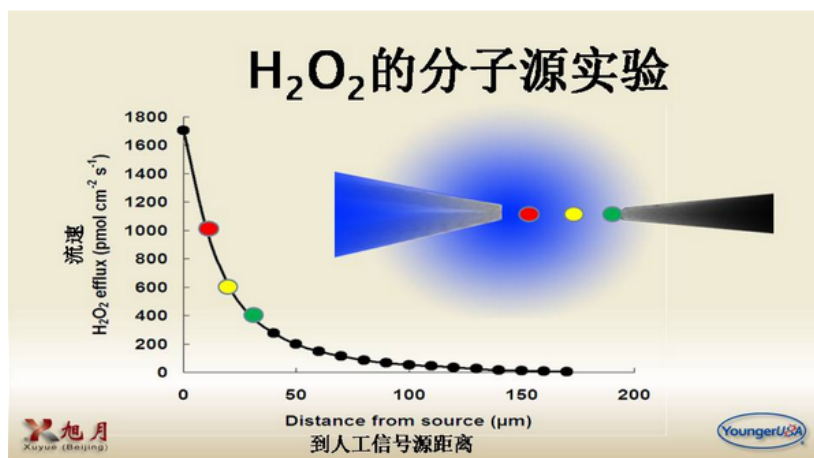
这里我们以NMT-H₂O₂分子传感器为例，说明如何设计和实施一个实验，一举两得地向审稿人同时证明在测量的是什么离子/分子，以及检测到的是它们流速，而不是其它假象。不必紧张，通常这个工作可以委托国内的NMT专业测试中心来完成，不必自己动手。

我们把这类实验叫做，NMT（人工）流速信号源实验，有时也会根据具体的离子/分子进行称呼，比如这里的实验是围绕着H₂O₂，因此，我们也可以称它为‘NMT-H₂O₂流速信号源实验’。

信号源实验非常简单，就以H₂O₂的实验为例，将较高浓度的H₂O₂灌冲到一个开口约为几个微米的玻璃毛细管中，将其固定在一个乘有实验测试液的培养皿的边缘（如下图所示），静置30分钟后，在玻璃毛细管尖端的周边液体里就会形成一个H₂O₂的分子浓度梯度。换个角度理解，就是我们制作了一个人工H₂O₂流速信号源，或H₂O₂流速源。



下面我们引入H₂O₂流速传感器，对这个刚刚制作的人工H₂O₂流速源进行检测。将H₂O₂传感器在红黄绿三点进行依次测量后，如果这些流速值满足Ficks'第一扩散定律公式，那么我们就一次验证了两个问题，一是测到的是H₂O₂，二是的确有一个H₂O₂流速源存在。



至此，我们利用‘从已知到未知’的原则，既解释了离子分子传感器是什么，又说明了所得流速数据和这些NMT流速传感器不容置疑的必然联系。当然，有时审稿人仍不满足这些介绍，会有其它各式各样的问题，我们将随后把我们帮助老师同学们的作答分享给大家！

3. 背景信号的重要价值

实验中，可采用传感器远离样品一定距离后所采集的信号，同样品信号进行对比，以确定检测结果是样品真实信号，还是背景信号的干扰。

图 12-1 神经元 Ca^{2+} 流速折线图（NISC 文献编号 F2011-005）

如上图所示，在第 150 s 时，将 Ca^{2+} 传感器远离神经元 200 μm ，此时测得的流速数据不受样品信号影响，即为背景值。结果显示，背景值在 0 线上下小幅波动，表明背景信号弱，其对样品流速信号的影响有限，可认为此时的样品信号接近于真实信号。对于其它样品，均可采用此法。

4. 人工信号源：NMT人的法宝

正如生命科学领域的其它实验一样，非损伤微测实验也有“标准品”。使用玻璃微传感器制作的人工离子、分子信号源，可以模拟样品的外排、吸收信号。而且，人工信号源的流速信号稳定，广泛地用于非损伤微测系统、传感器的研发。

图 12-2 人工信号源实验

如上图所示，右侧为 K^+ 传感器，左侧为 K^+ 信号源。当传感器靠近信号源时，信号越来越大，反之越来越小，直至消失，则证明 K^+ 传感器可以准确地检测到样品发出的真实信号。

图注 12-3 K^+ 传感器采集到的 K^+ 外排信号源（红色）与吸收信号源（蓝色）的流速信号。Blank 代表 K^+ 传感器远离信号源 1cm 后接收到的溶液背景信号

二、NMT 检测到的分子、离子流速趋势与预期不符，如何解释？

NMT 作为活体检测技术，可反映样品的实时生理状态。而分子、离子的实时流动情况会受到诸多因素的影响：

1. 前期培养

2. 样品处理

3. 取样方法

4. 测试液成份

5. 检测位点

找到适合自己课题研究的实验体系，才能更加顺利的完成 NMT 实验。

三、营养研究时检测到根部 NH^+ 、 NO^- 信号为外排，如何调整实验体系？

分享几位旭日非损伤微测系统用户对于此问题的经验及看法：

1) 中国农业科学院茶叶所某研究人员

a 做 NH^+ 、 NO^- 吸收动力学实验时（用测浓度技术），茶树苗一般会饥饿一周后进行检测。如果饥饿时间短，无法测到吸收也属正常情况；

b NH^+ 较 NO^- 容易测到吸收，因为植物对 NH^+ 浓度比较敏感，高 NH^+ 浓度对植物有毒害作用，所以植物吸收 NH^+ 后，会将其转化为其它物质，保持体内较低的 NH^+ 浓度，而 NO^- 则无此机制，植物体内的 NO^- 浓度较 NH^+ 高，不易测到吸收。

2) 西北农林科技大学某研究人员

a 样品使用幼苗，苗龄不宜太长，切忌为了多长一些根，以便扩大样品挑选空间而错过最佳检测时间；

b 扩大根部检测的范围，寻找吸收位点；

c 尽量避免长途运输，否则样品状态会受到较大影响。

3) 海南大学某研究人员

使用琼脂培养基培养的木薯，N 饥饿一周，依然无法检测到 NO^- 吸收。虽然根毛稀少，但部分根毛可以检测到 NO^- 的吸收。

四、离体组织（切除的根、撕下的叶片）离子流与真实条件下的信号是否有差异？

“无损”是相对的，非损伤微测技术也不例外。为了符合非损伤微测技术的检测要求，有时需要采用切、剖等方式，将样品暴露出来。最常见的是将植物的根切下来后再进行检测。

1) 诸多的研究成果已经侧面表明，对离体根进行检测，依然可以得到科学的结论。

2) 旭月公司 NMT 顾问 Sergey, 对比离体前后, 不同植物根部各个离子流速的差异。结果表明, 将松树、豌豆、大豆等植物的地上部分切断, 在之后的 80 分钟内, 并没有导致其根部 H^+ , NH_4^+ , NO_3^- 流速产生显著的变化。

图 12-4 在体花旗松根与离体花旗松根, 根部 H^+ , NH_4^+ , NO_3^- 流速的对比 (NISC 文献编号 F2012-004)

五、测试液成份与生长环境有差异会对流速结果造成影响吗?

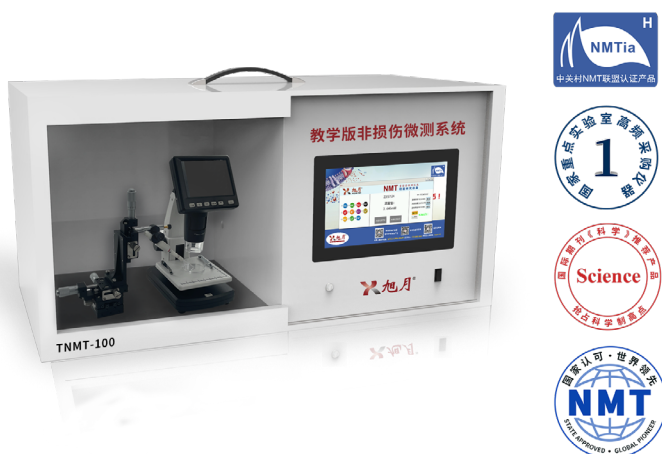
测试液 (参见“073 什么是测试液?”) 因其成份及各成份的浓度确定, 使 NMT 实现了对活体样品检测环境的已知和可控。测试液确定的原则是: 既满足课题研究需求, 又符合非损伤微测技术的要求。

测试液成份的设计是开放性的, 研究者可以根据自己的课题需求进行设计。在正式检测前, 通过非损伤微测系统判断溶液成份是否会影响到传感器, 从而导致流速结果的准确性受影响。如果符合技术要求, 可直接使用此测试液上机检测; 如不符合技术要求, 则需调整溶液的成份再判断是否符合技术要求。总而言之, 测试液成份的确定过程, 即是在科研需求与技术要求之间, 寻找一个最佳的平衡点。

作为研究者, 对于“样品检测时测试液环境并非正常生长时的培养环境, 从而无法反映正常生理状态下的流速结果”这一问题, 大可不必担心。从对现有的数百篇非损伤微测技术文献统计来看, 测试液成份同培养液成份相同的情况, 并不多见, 但这依然不能阻止非损伤微测技术研究的发展。

第十章 NMT在教学中的应用

一、教学版NMT系统



教学版NMT介绍（型号：TNMT-100）

1. 针对NMT实验课设计
2. 检测指标可选
3. 配备精密三维操作台，X轴电动操作，Y、Z轴手动操作
4. 实时显示被测样品图像
5. 实时显示动态流速数据图
6. 配置触摸显示屏，操作便捷
7. 占用空间小，安装简易，便于收纳

范例：植物生长过程对氮源营养 ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) 如何选择

1. 实验目的

了解植物生长过程中对氮源营养 (NH_4^+ 和 NO_3^-) 如何选择

2. 材料用具及仪器药品

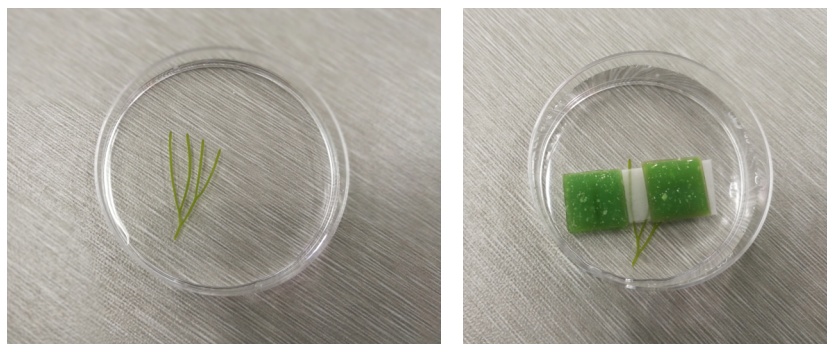
绿萝根、NMT系统、培养皿、测试液 (0.1m NH_4NO_3 、pH6.0)、滤纸、样品固定专用树脂块。

3. 原理

植物在生长过程中根系可以吸收硝态氮(NO_3^- -N)、铵态氮(NH_4^+ -N)、亚硝态氮(NO_2^- -N)和少量的小分子有机态氮。

4. 方法步骤

1、剪取一段绿萝根，使用滤纸条和树脂块将样品进行固定，加入5毫升的测试液浸泡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的表面 NH_4^+ 和 NO_3^- 流速。

5. 实验报告

根据实验结果，解释植物根部对氮源如何选择。

6. 预期结果

植物根在成熟区对 NH_4^+ 的吸收会更强。

7. 思考题

1为什么NMT能够快速检测到植物根 NH_4^+ 和 NO_3^- 流速?

答：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梯度的技术，能够快速检测到样品分子离子的变化。

2不同生长阶段的植物对氮源的选择是否一样?

答：不同生长阶段的植物对氮源的选择不同，幼苗期对养分需求不高，生长期对养分的需求很高，主要是氮肥的需求，成熟期对磷和钾的需求量增大，这个阶段主要以磷钾肥为主。所以不同时期的植物会检测到不同的结果。

8. 参考文献

1. Luo J., et al. Net fluxes of ammonium and nitrate in association with H^+ fluxes in fine roots of *Populus popularis*. *Planta*, 2013, 237(4):919-31.

2. Ruan L., et al. Characteristics of NH_4^+ and NO_3^- fluxes in tea (*Camellia sinensis*) roots measured by scanning ion-selective electrode technique, *Sci Rep*, 2016, 6:38370.

3. Sun H, Guo X, Qi X, et al. SPL14/17 act downstream of strigolactone signalling to modulate rice root elongation in response to nitrate supply[J]. *The Plant Journal*, 2021.

二、国内NMT教材

- 1) 细胞生物学实验技术教程（第四版）——首都师范大学印莉萍
- 2) 植物生物学实验教程——厦门大学朱学艺
- 3) 小麦根尖的钙离子流测定——南京农业大学植物营养实验
- 4) 进出作物活体的离子/分子流速和运动方向测定 非损伤微测法 ——山东农业大学NMT实验教材

三、与NMT相关的文献资源

1. 英文论著

Kunkel JG, Lin LY, Xu Y(许越), Prado AMM, Feijó JA, Hwang PP, Heper PK (2001). The strategic use of good buffers to measure proton gradients about growing pollen tubes. *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. IOS Press, Amherst:81-94

Kunkel JG, S Cordeiro, Y(J) Xu(许越), AM Shipley and JA Feijo(2005) The use of non-invasive ion-selective microelectrode techniques for the study of plant development. Chapter V in *Plant Electrophysiology- Theory and Methods* ed. by AG Volkov, Springer-Verlag, Berlin/

Heidelberg, pp 109-137.

Natalia Maria Ordoñez , Lana Shabala , Chris Gehring , and Sergey Shabala. Noninvasive Microelectrode Ion Flux Estimation Technique (MIFE) for the Study of the Regulation of Root Membrane Transport by Cyclic Nucleotides . MIFE in Studying Signaling Molecules.

2. NMT 中英文综述

Shi,J. ,et al.(2013)Nanomaterial based self-referencing microbiosensors for cell and tissue physiology research,Biosensors and Bioelectronics,2013, 40(1), 127-134

Peter K. Hepler, et al.(2013)Control of Cell Wall Extensibility during Pollen Tube Growth. Mol. Plant,2013,6 (4): 998-1017

Adeeba Dark,et al.(2011)Release of extracellular purines from plant roots and effect on ion fluxes.

Plant Signaling & Behavior ,2011,6:11, 1855-1857;

Sergey Shabala,et al.(2011)Endomembrane Ca^{2+} -ATPases play a significant role in virus-induced adaptation to oxidative stress.Plant Signaling & Behavior,2011,6:7,1053-1056.

Jayakumar Bose,et al(2011)Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants.Front. Plant Sci.,2011,02

Eric S. McLamore et al.Non-invasive tools for measuring metabolism and biophysical analyte transport self-referencing physiological sensing. Chemical Society Reviews,2011,40(11):5308-20.

Marshall WS, et al. The 50 year evolution of in vitro systems to reveal salt transport functions of teleost fish gills. Comparative Biochemistry and Physiology. 2010,155(3):275-80.

Anuphon Laohavisit,et al.(2010)Annexins: Components of the Calcium and Reactive Oxygen Signaling Network.Plant Physiol.2010,152: 1824-1829

Sun J, et al. Ion flux profiles and plant ion homeostasis control under salt stress. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4: 261 - 264.

Isaac Zepeda-Jazo,et al.(2008) Na^{+} - K^{+} transport in roots under salt stress.Plant Signaling & Behavior,2008,3:6,401-403.

3. 中文论著

季丹丹, 等. 非损伤微测技术及其在环境科学领域的应用. 生态学杂志.

李静, 等. 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. 吕杰, 等. 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.

何杰, 等. 自动化扫描微测技术在腐蚀科学中的应用——扫描离子选择性电极技术. 材料保护.

丁亚男, 等. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. 物理学和高新技术.

朱俊英, 等. 选择性微电极在植物生理学研究中的应用. 植物生理与分子生物学学报. 2007,33 (2): 101-108.

印莉萍, 等. 非损伤性扫描离子选择电极技术及其在高等植物研究中的应用. 自然科学进展, 2006, 16: 262 - 266.

印莉萍, 等. 《细胞分子生物学科教程 (第三版) 普通高等教育“十一五”国家级规划教材》, 第十一章 实验 42 非损伤微测技术简介和微电极的制备.

四、NMT教学版与科研版对比

性能	NMT教学版		NMT科研版	
	技术指标	功能特点	技术指标	功能特点
检测方式	"活体, 原位, 非损伤, 实时, 动态"	"实时、动态、不接触、不损伤被测样品, 也可在体检测"	"活体, 原位, 非损伤, 实时, 动态"	"实时、动态、不接触、不损伤被测样品, 也可在体检测"
检测指标	1种	可选: H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、IAA、 O_2 、 H_2O_2	1~14种	可选: H^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 、IAA、 O_2 、 H_2O_2 、膜电势
数据类型	流速	"获取样品与外界环境进行离子分子交换的动态信息"	流速和浓度	"获取样品与外界环境进行离子分子交换的动态信息, 和样品外微环境中的离子分子浓度"

传感器类型	半固态离子选择性微电极	不易损坏, 寿命更长	液态离子选择性微电极	时间、空间分辨率更高
时间分辨率	5~10秒	能检测样品反应后的结果信号	0.1~1秒	可监测瞬时信号、实时动态信号
空间分辨率	20~50微米	可检测整体、器官、组织类样品	1~5微米	"可检测整体、器官、组织、细胞(包括单细胞)"
检测下限	$10^{-9} \sim 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	"能检测到样品较大的信号, 比传统微电极技术高3~6个数量级"	$10^{-12} \sim 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	不仅能检测样品较大的信号, 还能检测到更微弱的信号, 比传统微电极技术高6~9个数量级
成像倍数	7倍~45倍	可定位到整体、器官、组织类样品的待测区域	40倍~400倍	可定位到整体、器官、组织和单细胞类样品的待测区域
"获取流速数据时间"	15~30秒	能检测到结果信号	3~5秒	能捕捉瞬时信号, 检测速度更快实验效率更高
数据维度	1维	可检测X方向流速	最高可3维	"可检测X或Z方向一维流速, 也可检测XYZ三维矢量流速"
操作方式	半自动	X轴自动, Y/Z轴手动	自动	X/Y/Z三维自动
传感器制备	无	半固态传感器, 在厂家采购后直接使用	有	传感器时空分辨率更高, 需要采购耗材后利用制备装置灌充液态离子交换剂

扩展升级	无	"初始指标、操作方式可升级,初始功能确定后,无法再升级"	有	可随时升级新指标、操作方式及其他功能
适用场景	教学	重现已知的规律和现象	教学/科研	探索未知规律和现象
指导成交价	10万元以内	部分科研需求,可用教学版或在其基础上升级满足,根据升级需求确定产品功能及报价	50~500万元	不同系列、不同型号有对应报价

第十一章 NMT科研成果转化

一、前言

孙中山先生说过：“凡百事业，收效愈速，利益愈小；收效愈迟，利益愈大。”

因此，由于国家科技竞争日趋激烈，国家迫切需要将科技成果进行市场转化，但一窝蜂，运动式地，甚至带有强制意味的成果转化自然不可取。当然，在当今科技实力决定国家胜败和民族存亡的特殊历史时期，我们又必须找到非常规手段和高效做法。

这里必须避免的是拔苗助长式的一味追求速度而必将导致的资源浪费，特别是时间上的损失是绝对要努力避免的，因为这事关国家前途。

其解决方案就是充分借鉴别人的成功经验和失败教训，尽量少走弯路。同时利用一切可以利用的先进工具，做到欲速可达。



'成果转化'，不同部门，不同时期，不同国度，不同文化，甚至不同种族，不同年龄，都可能有不同的定义和解读。

广义的科技成果转化是指将科技成果从创造地转移到使用地，使劳动者的素质、技能或知识得到增加，劳动工具得到改善，劳动效率得到提高，经济得到发展。

狭义的科技成果转化实际上仅指技术成果转化，即将具有创新性的科技成果从科研单位转移到生产部门，使新产品增加，工艺改进，效益提高，最终经济得到进步。我们通常所说的科技成果转化大多指这种类型的转化

二、NMT科研成果转化经验

通常企业是科技成果转化和推广过程中的主力军。特别是创新型企业科技成果转化中扮演着非常重要的角色。

但实际上，上面的这些网上信手拈来的宽泛理论，无论是对于十六年前创立之初的旭月公司，还是对于十六年后的今天，业已摸索出了一套自己成果转化模式的旭月团队，它们仍然只是泛泛的纸上理论。因为对于像旭月这样的科技企业，'成果转化'就是'存亡之道'！或'生死之战'！，即：成果转化成功则生，成果转化失败就亡！

大家知道，我国小企业生存率，与世界发达经济体相比，比较低。据互联网信息，能够生存十几年以上的小企业，在我国在2%左右。而只专注于一项技术而能够依然存活下来，像旭月一样的小型科技公司，还未见数据统计。

由此可见，旭月是非常幸运的！

幸运，主要是赶上了中华民族复兴的大好年代，赶上了党和国家好的政策，以及实实在在的各项支持，以及全国科研人员的共同努力。

然而，除了这些外部条件，旭月这些年通过自身的努力拼搏和不懈探索，也是能够顽强生存下来的根本内因所在。

我在国外生活工作20多年，切身感受到了发达国家小型科技企业的活力与实力，特别是它们很强的生存能力，也就是极强的科技成果转化能力。比如，此次科技战西方卡我们芯片脖子的荷兰光刻机公司，就是一个跟旭月公司规模类似的微型企业，但是专注一项技术很多年。

那么咱们国家要成为强国，特别是科技强国，不提高广大小微型科技企业的存活率和市场竞争力，科技强国就难免步履维艰。

也许有人会说，成果转化主要还是要靠国家队，要靠大学和科研院校。我认为这是错误的！原因很简单，这些机构的主要职责是原始创新和教书育人。而成果转化要靠市场化运作的企业，其关键在于国家队和科研院校没有像旭月这些小微企业时刻要面临的生死存亡的市场压力！

人们应该还记得，中国当年的改革初衷，不就是为了改变在国家的企事业单位里，上班一杯茶一份报纸的懒惰现象吗？！我们今天的改革成就，不正是打破这种已被证明的、导致国家落后的养懒人的体制的结果吗？！

所以，作为百分之一生存下来的旭月人，我觉得有责任和义务将旭月成功生存的经验和故事分享给社

会大众，这不仅是对自己的汗水甚至泪水负责、也是对老中青三代2000多位中国科研人员和工程师们这十六年来的贡献负责，也是对国家这些年的投入与大力支持负责，更是对国家的未来负责！

无论是创新驱动，还是大众创业，要实现这些国家战略，我们既需要信心勇气和鼓舞人心的口号，但也需要冷静理智的、基于客观历史发展事实的分析和判断，更需要的是切实可行的建设性意见、经实践检验过的实战方法和经验。

旭月NMT团队从几篇文献和一台实验室原型机做起，经过十六年的不懈努力，将拥有自主知识产权的NMT设备远销到了欧洲瑞士苏黎世大学，基本完成了“从文献到套现”的转化过程。

下面是《非损伤微测技术及其应用》通过科技部认定机构评审时展示的成果转化内容及过程：



从旭月团队的经验来看，一个从文献开始的成果转化包含3大关键创新，即：理论创新、技术创新和应用创新。各自又可以分为不同的层次和发展阶段。

就像孙中山先生说的，如果想获得较大的效益，那么各个要素就都必须具备，当然花费的时间和精力也就较多。

所以，旭月团队的经验为大家提供了一个某种意义上的“成果转化路线图”，既能够为科研人员指明阶段性前进方向，还能够为相关决策部门评价科技成果的转化潜力和现状提供清晰的标准。

三、民生NMT成果转化范例

1. 《公共场所空气恐怖攻击（含新冠病毒）报警系统》

当前国际形式复杂严峻，公共场所的空气安全保障越来越重要。比如地铁、地下停车场等封闭、人员密集区域，急需能够更快、更灵敏地实时监测空气中的有害病毒、细菌等有害微生物，以及有毒化学物质的恐怖攻击活动，且能够及时报警的空气安全监测系统。

利用生物体对有害物质的超高敏感度这一特点，世界首创性的建立了通过监测生物体的生理信号来判别空气安全性的检测方法，并且最终也将实现空气中对人体有害物质的快速、高灵敏度、实时的监测和报警的目标。

目前本成果已有相关的技术专利支撑（一种通过生物体离子分子流速判别气体安全性的方法 专利号：ZL201310613776.6），并且已完成了理论验证与样机检测的步骤。

2. 《冷链运输有害微生物（含新冠病毒）快速检测仪》

当前新冠疫情依然严峻，国内已出现多起基于冷链运输导致的疫情传播，对国家财产和人民的的生活造成了较为严重的影响，急需能够快速、高灵敏度地检测出食品中的有害菌、病毒（包括新冠病毒）等的快速检测仪器。

利用有害病毒/细菌/微生物的分子离子流速指纹特征这一特点，世界首创性的建立了通过检测生物体信号来判别食品安全性的检测方法，并且最终也将实现食品中有害菌、病毒（含新冠病毒）的快速、高灵敏度、实时的监测和报警的目标。

目前本成果已有与澳洲科学家共同完成的技术专利支撑（一种通过氢离子流速判别食品安全性的方法 专利号：ZL20120462141.6），并且已经完成了理论验证与样机检测的步骤。

3. 精准化疗个体化用药

4. 老年痴呆风险评估

5. 水健康指数

附录

附录一 NMT技术常用单位及换算

附录二 NMT领域常用词语及词汇

附录三 流速换算表

附录四 实验方案体系标准

一.盐胁迫Na⁺吸收实验体系标准

- 1、材料：拟南芥
- 2、基因型：WT、转基因1、转基因2
- 3、处理：200mM NaCl处理
- 4、检测指标：Na⁺
- 5、检测部位：根分生区（过渡区中间）
- 6、具体方案：

- 1) Na⁺吸收（测Na⁺）

【目的：查看盐胁迫下，谁的Na⁺进入的少】

一般来说，耐盐材料在盐胁迫下，吸Na⁺速率更小。

- (1) 对照组

置于测试液中检测，记录10分钟，8重复/组

- (2) 盐胁迫组

- a.置于200mM NaCl中处理0.5/1/2 h后，直接检测，记录10分钟，8重复/组

（例如：200mM NaCl处理半小时，测试液50mM NaCl，0.1mM CaCl₂，pH6.0，不需要平衡，放入测试液中直接开始测）

二、重金属胁迫测Cd实验体系标准

1、材料：2种茶树

2、处理：

(1) 0.01 mM CdCl₂瞬时处理

目的：Cd实时处理后，Cd²⁺吸收和H₂O₂的信号相对较强，有利益观察不用材料间的差异

(2) 0.01 mM CdCl₂处理12h、48h（时长可调整）

目的：观察Cd长时处理效应

(3) 0.1 mM CdCl₂瞬时处理（浓度可调整）

(4) 0.1 mM CdCl₂处理12h、48h（时长可调整）

3、检测指标：Cd²⁺

4、检测位点：根

（根部Cd定点位置统计：分生区52.94%、伸长区41.18%、成熟区23.53%、根冠11.76%；根部Cd定点优先位置：伸长区）

5、具体实验细节：

(1) Cd²⁺

1) 瞬时处理后建议检测时长为30分钟，根据前2个样品的实际信号变化情况，可现场优化检测时长。

2) 12h、48h处理后，检测10分钟稳定数据即可

6、参考文献

https://mp.weixin.qq.com/s/ghdDSYJqyha59A5_BYFCJg

三、植物营养 NH_4^+ 、 NO_3^- 实验体系标准

- 1、材料：水稻
- 2、基因型/品种：1个对照、1个过表达株系、1个RNAi株系
- 3、检测指标： NH_4^+ 、 NO_3^-
- 4、检测位点：根
- 5、重复：8
- 6、处理
 - (1) 正常 NH_4NO_3 处理3d
 - (2) 低 NH_4NO_3 处理3d
 - (3) 高 NH_4NO_3 处理3d

【具体方案】

1. 扫点实验：对照样品选取4个重复进行扫点实验，具体检测位点300 μm 、800 μm 、1500 μm 、2500 μm 、7500 μm 、15000 μm 每个点检测3min
2. 定点实验：根据扫点实验结果，选择 NH_4^+ 、 NO_3^- 吸收最大的点进行定点实验，每个点检测5min

测试费用报价：

扫点：

1（基因型） \times 1（处理） \times 1（指标） \times 6（位点） \times 4（重复） \times 132元/样（定点3min）=3168元

定点：

3（基因型） \times 2（指标） \times 3（实验组） \times 8（重复） \times 195元/样（定点：5min）= 28,080元

共计：3168+ 28,080 = 31,248元

四、植物免疫Ca²⁺流（测叶肉细胞）实验体系标准

- 1、材料：水稻
- 2、基因型/品种：WT、mutant、OE
- 3、检测部位：叶肉细胞
- 4、检测指标：Ca²⁺
- 5、处理：
 - (1) 无处理
 - (2) 10 mg/mL chitin处理 24h
 - (3) 病原菌处理24h
 - (4) 10 mg/mL chitin瞬时处理
 - (5) 病原菌瞬时处理

6、具体方案：

处理1、2、3：无处理、10 mg/mL chitin处理24h、病原菌处理24h后，定点检测叶肉细胞10min，8重复/组

处理4、5：10 mg/mL chitin、病原菌处理前检测5min，10 mg/mL chitin、病原菌处理后，检测10分钟（如信号在瞬时处理后10分钟内没有稳定，会延长测试时间），8重复/组

参考文献

保卫细胞：<https://mp.weixin.qq.com/s/YovUANqOYkIViXUHe0dFWw>

叶肉细胞：https://mp.weixin.qq.com/s/0UZ_cqxDL_zBxQZz4ok7Pg

测试费用报价：

3（基因型）*1（测试指标）*1（测试部位：根）*1（处理方式：chitin瞬时）*8（重复数）*470（10分钟测试收费275元/样，5分钟测试收费195元/样）=11,280元

五、植物免疫Ca²⁺流（测根）实验体系标准标准

1、材料：拟南芥

2、品种：WT、mutant

3、检测部位：根内皮层细胞

4、检测指标：Ca²⁺

5、处理

1 μM Flg22瞬时处理

6、具体方案：

1 μM Flg22瞬时处理前检测5分钟，1 μM Flg22瞬时处理后检测10min，8重复/组

测试液：0.1mM CaCl₂, pH 6.0

平衡时间：4 h

附录五 NMT 知识库算

附录六 NMT产品系列

- 教学类仪器
- 科研类仪器
- 民生类仪器
- 抗疫类仪器
- 生物安全类仪器
- 创新研究配套仪器
- 仪器耗材



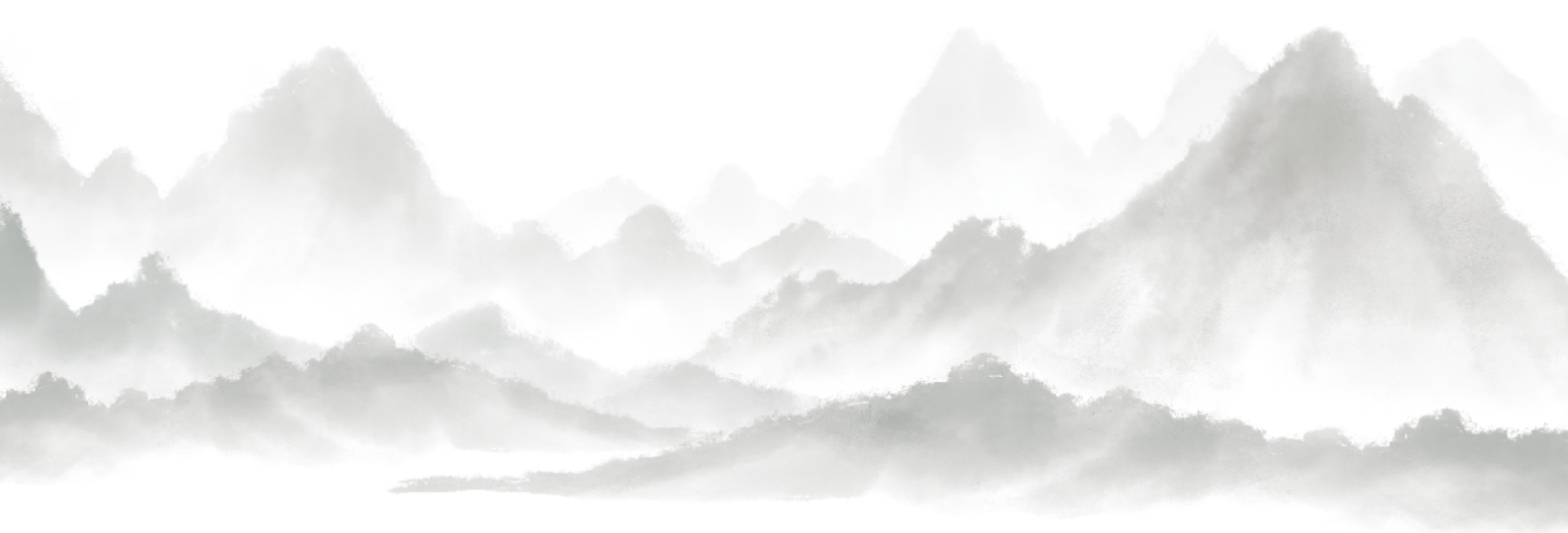
地址:北京市海淀区苏州街49-3号
盈智大厦6层

邮编:100080

电话:010-82624800

邮件:pub@nmtia.org.cn

网址:nmtia.org.cn



扫码获取论文集