

Guidance for Plant Physiology NMT Laboratory Practice

植物生理学

NMT实验指南

范例专家参考版



前言

高等教育是科教兴国战略重要的组成部分。

随着科技部2021年NMT非损伤微测技术国际领先评审结果的发布，在深化和拓展中国各科研领域应用的同时，也正加速向高等教育领域稳步推进。

在此大背景下，中关村 NMT 产业联盟利用自身的技术、人才和信息三大平台优势，汇集全国各个领域，有志于提升我国高等教育水平的专家学者智慧，利用中国非损伤微测技术领先于世界的历史契机，共同打造高水平的高等教育NMT相关教程教材。为我国科教兴国战略贡献力量！

许越
NMT创始人
北京，2022年7月

目 录

实验一：植物种子活力快速检测（范例）	5
一、实验目的	5
二、实验原理	5
三、实验材料及药品	5
四、实验步骤	6
五、实验要点	6
六、实验结果分析	7
七、实验预期	7
八、思考题	7
九、参考文献	7
实验二：光对水生植物光合作用的影响（范例）	8
一、实验目的	8
二、材料用具及仪器药品	8
三、原理	8
四、方法步骤	8
五、实验报告	9
六、预期结果	9
七、思考题	9
八、参考文献	10
实验三：植物生长过程对氮源营养（ $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ）如何选择	11
一、实验目的	11
二、材料用具及仪器药品	11
三、原理	11
四、方法步骤	11
五、实验报告	12
六、预期结果	12
七、思考题	12
八、参考文献	12
实验四：植物抗逆性测定实验（盐碱胁迫、干旱胁迫、水淹胁迫、重金 属胁迫、温度胁迫）	13

实验五：生长素在植物防御中的作用	13
实验六：花粉萌发过程中钙离子的作用	13
实验七：植物根系不同区域对重金属吸收的比较	13
实验八：哪种植物对重金属有更强的吸收作用	13
实验九：钾离子在植物培养中应该添加多少	13
实验十：果实腐烂过程中的钙离子如何变化	13
附录一：什么是非损伤微测技术？	14
定义	14
应用	14
起源	15
特色	15
原理	15
NMT微传感器	16
附录二：教学版NMT系统介绍	17
教学版NMT介绍（型号：TNMT-100）	17

实验一：植物种子活力快速检测（范例）

种子活力：是种子发芽和出苗率、幼苗生长的潜势、植株抗逆能力和生产潜力的总和，是种子品质的重要指标。

种子寿命：种子从发育成熟到丧失生活力所经历的时间。

种子寿命既与植物种类有关，也与贮藏条件（种子含水量、贮藏温度）有关。

正常性种子：水稻、玉米、小麦等种子（1-3年）

短寿命：柳树种子（12h）

长寿命：莲子（400年）

贮存条件：低温、低湿，保存时间长

一、实验目的

了解种子活力测定的生产意义

掌握重要种子活力测定的方法和评价标准

理解NMT法测定种子活力的原理

二、实验原理

NMT检测方法：检测活体种子萌发过程中氧气的消耗，当种子萌发时会消耗氧气来促进细胞代谢，活力小的种子在萌发中的耗氧量小于活力高的种子，通过NMT检测种子的吸入氧的速度来判别种子的活力。

三、实验材料及药品

不同年份的大豆种子和水稻种子

烧杯、镊子、培养皿、滤纸、样品固定专用树脂块

溶液：0.1mM KCl、0.3mM $C_6H_{13}NO_4S$ 、0.1mM $CaCl_2$ 、pH6.0

四、实验步骤

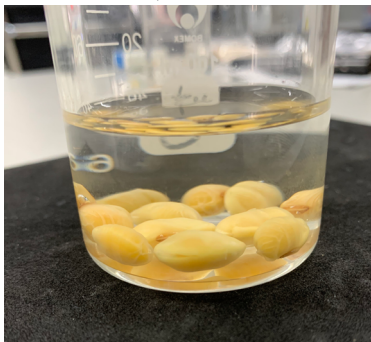
1.原理

直接检测活体种子萌发过程中的吸收氧的情况，得到具体的数值，比较种子活性。

2.材料：不同年份的大豆种子和水稻种子

3.方法：

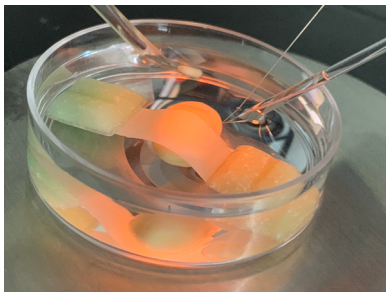
(1) 取20粒种子浸泡在测试液中进行吸胀2h,



(2) 取出吸胀好的种子放在培养皿中，使用滤纸、样品固定专用树脂块进行固定。



(3) 使用NMT系统检测胚轴的氧流速。



4.作业：比较不同年份大豆种子氧吸收的强弱。

五、实验要点

1.种子先要浸泡吸胀

2.判断种子胚轴位置

3.通过流速数值判断种子活力情况。

六、实验结果分析

- 1.比较不同年份的大豆种子活力高低
- 2.比较不同品种种子的氧吸收大小
- 3.植物种子活力测定的其他方法

七、实验预期

由于年份越远，种子的活力越低，不同活力种子对氧消耗的能力不同，年份较远的种子总体出现氧吸收的值会小于年份较近的种子。

八、思考题

- 1.不浸泡吸胀的种子能否进行实验？

答：吸胀是让干燥的种子迅速吸水，其原生质吸水后膨胀，种子体积变大。发根是当种子吸水达到饱和状态后即开始进行萌动、发芽。未吸胀种子的细胞活性较低，不适合直接检测。

- 2.其他指标是否也能检测种子活性

答：参考文献中提到 Ca^{2+} ， H_2O_2 等指标都可以进行种子活力的判断。

九、参考文献

- 1.Xin X, et al. A real-time, non-invasive, micro-optrode technique for detecting seed viability by using oxygen influx. *Sci Rep*, 2013, 3: 3057.
2. Liu MY, et,al. Spermidine Enhances Waterlogging Tolerance via Regulation of Antioxidant Defence, Heat Shock Protein Expression and Plasma Membrane H^+ -ATPase Activity in *Zea mays*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2014, 200: 199-211.
3. Li J, et al. The fluxes of H_2O_2 and O_2 can be used to evaluate seed germination and vigor of *Caragana korshinskii*. *Planta*, 2014, 239(6): 1363-1373.
4. Robert Steven Tegg,et al(2005)Plant Cell Growth and Ion Flux Responses to the Streptomyces Phytotoxin Thaxtomin A: Calcium and Hydrogen Flux Patterns Revealed by the Non-invasive MIFE Technique.*Plant Cell Physiol*,2005,46 (4): 638-648
5. Tracey Ann Cuin,et al.(2012)Genetic behaviour of physiological traits conferring cytosolic K^+/Na^+ homeostasis in wheat.*Plant Biology*,2012,14,438-446

实验二：光对水生植物光合作用的影响（范例）

一、实验目的

了解光对水生植物光合作用的影响

二、材料用具及仪器药品

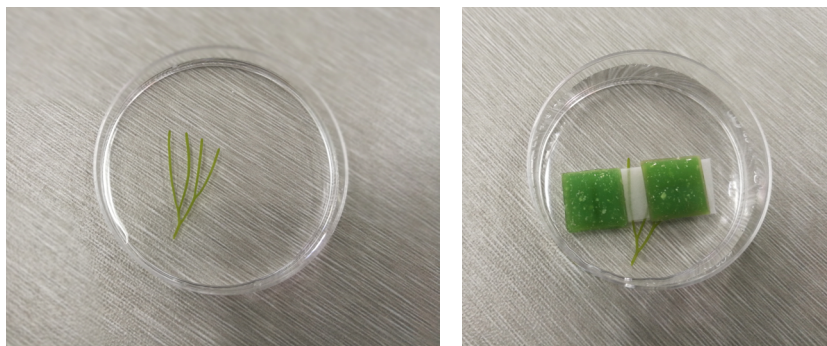
金鱼藻（绿菊）叶片、NMT系统、培养皿、测试液（0.1mM CaCl_2 、0.1mM KCl 、pH6.0）、滤纸、样品固定专用树脂块、锡箔纸。

三、原理

在光照条件下，植物叶片利用光能，同化二氧化碳（ CO_2 ）和水（ H_2O ）制造有机物质并释放氧气。

四、方法步骤

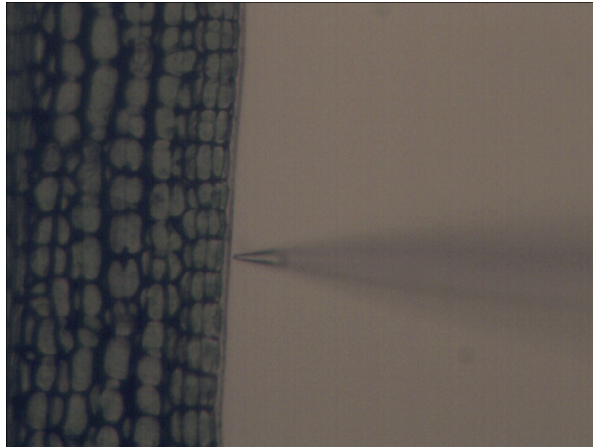
1、取出金鱼藻，用剪刀剪下叶片，使用滤纸条和树脂块将样品进行固定，加入5毫升的测试液。



2、将样品放置在锡箔纸包覆的直径60mm的培养皿，将样品盖住避光处理30min。



3、处理后的样品放入NMT系统中在不开灯的情况下，检测叶片表面氧分子流速。



4、打开显微镜灯光，调高光源亮度，再次检测叶片同一位点的表面氧分子流速。

五、实验报告

根据实验结果，解释叶片在有光和无光下进行哪些作用。

六、预期结果

在黑暗情况下叶片以呼吸作用为主，需要耗氧，氧气的流速应该呈现吸收的趋势；在光照的情况下，光合作用和呼吸作用共同参与，光合作用的产氧高于呼吸作用，氧气为外排的趋势。

七、思考题

1为什么NMT能够快速检测到水生植物的氧分子流速？

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非水生植物叶片是否也能做出同样的结果？

答：旱生植物叶片小，角质膜厚，表皮毛和蜡被比较发达，有明显的栅栏组织，有的有复表皮，而水生植物可以直接从环境获得水分和溶解于水的物质，但不易得到充分的光照和良好的通气，其叶片的结构特点为：机械组织、保护组织退化，角质膜薄或无，叶片薄或丝状细裂。叶肉细胞层少，没有栅栏组织和海绵组织的分化，通气组织发达。所以如果做非水生植物叶片时需要考虑蜡被和栅栏组织的影响。

八、参考文献

1. Lin A P, et al. Simultaneous measurements of H⁺ and O₂ fluxes in *Zostera marina* and its physiological implications. *Physiol Plant*, 2012, 148(4): 582-589.
2. B. D. IVANOVI et al. Light-induced transient ion flux responses from maize leaves and their association with leaf growth and photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 2005, 28(3):340-352.
3. Porterfield DM et al. Single-cell, real-time measurements of extracellular oxygen and proton fluxes from *Spirogyra grevilleana*. *Protoplasma*, 2000, 212(1-2):80-88.
4. Kyle A. Serikawa et al. Calcification and measurements of net proton and oxygen flux reveal subcellular domains. *Planta*, 2000, 211(4):474-483.

实验三：植物生长过程对氮源营养 ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) 如何选择

一、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

二、材料用具及仪器药品

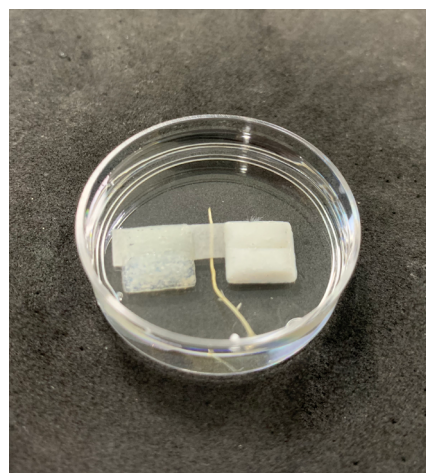
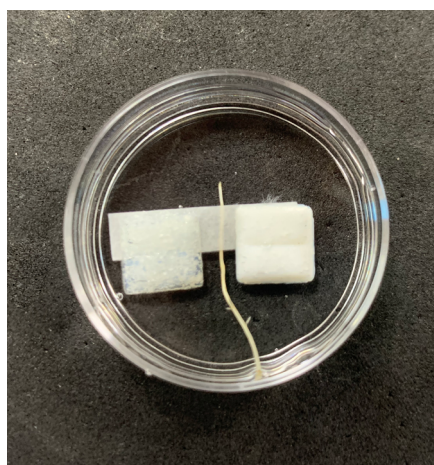
绿萝根（拟南芥根、大豆根、水稻根等均可）、NMT系统、培养皿、测试液（ $0.1\text{mNH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{pH}6.0$ ）、滤纸、样品固定专用树脂块。

三、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。

四、方法步骤

1、剪取一段绿萝根（或其他植物根），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。

五、实验报告

根据实验结果，解释植物根部对氮源如何选择。

六、预期结果

植物根在成熟区对 NH_4^+ 的吸收会更强。

七、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。

八、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.

实验四：植物抗逆性测定实验（盐碱胁迫、干旱胁迫、水淹胁迫、重金属胁迫、温度胁迫）

实验五：生长素在植物防御中的作用

实验六：花粉萌发过程中钙离子的作用

实验七：植物根系不同区域对重金属吸收的比较

实验八：哪种植物对重金属有更强的吸收作用

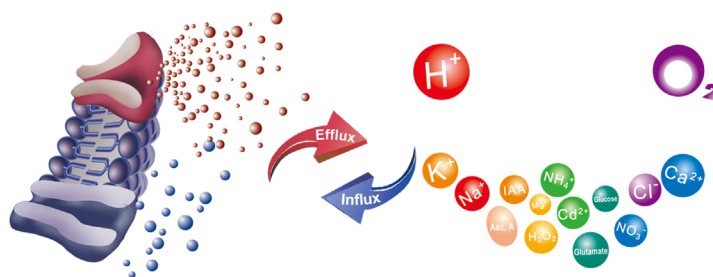
实验九：钾离子在植物培养中应该添加多少

实验十：果实腐烂过程中的钙离子如何变化

附录一：什么是非损伤微测技术？

定义

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



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。

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。

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。

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。

起源

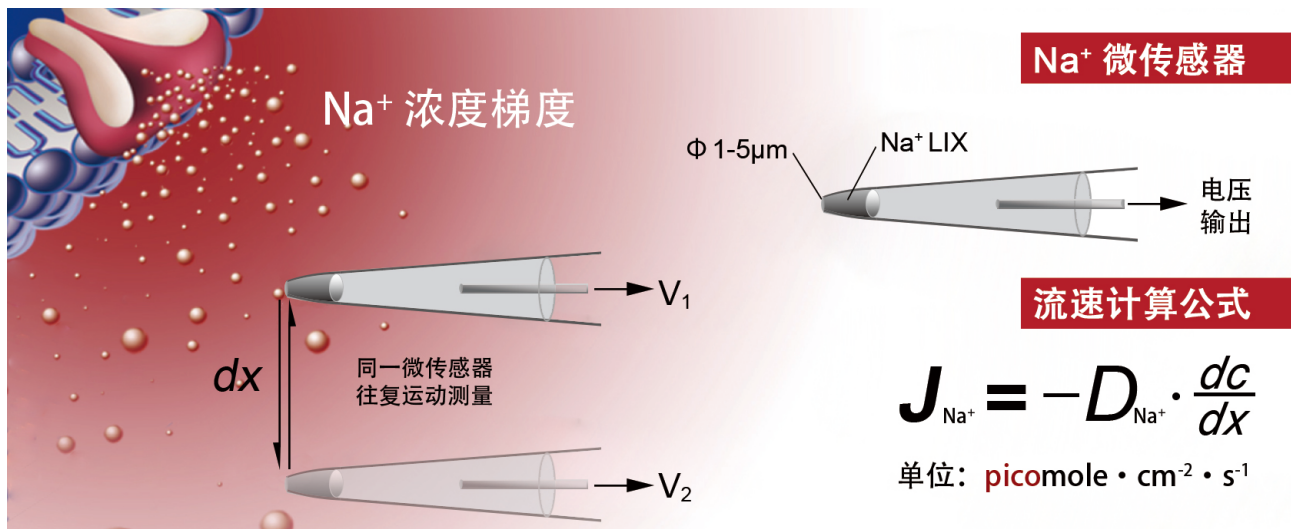
非损伤微测技术（Non-invasive Micro-test Technology: NMT）及其命名，是旭月公司创始人许越教授，在匡廷云院士、杨福愉院士、林克椿教授的帮助下，在美国科学家Lionel Jaffe的钙离子振荡电极技术（Vibrating Probe: VP, 1974）原理基础上，经过分子离子种类扩增，测量精度的大幅提升，测量方式的模块化、自动化、专业化、智能化、标准化改进，以及3D立体数据采集及动画演示等新功能的成功研发，成为世界上同类型VP技术商业化，比如澳洲：MIFE，美国：SIET、SERIS等品牌中的一员。



特色

- 活体/非损伤
- 精准可控材料外部微环境
- 原位
- 几乎不受材料大小尺寸的限制
- 无需任何荧光或放射性标记
- 揭示离子分子运动的大小和方向
- 实时/长时间检测
- 多离子多分子自由组合同时检测
- 1维，2维，3维测量
- 人工智能与高通量自动化检测

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⁺浓度梯度中已知距离dx进行0.3Hz频率的两点往复测量，分别获得电压V1和V2。两点间的浓度差dc则可以从V1、V2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。

NMT微传感器

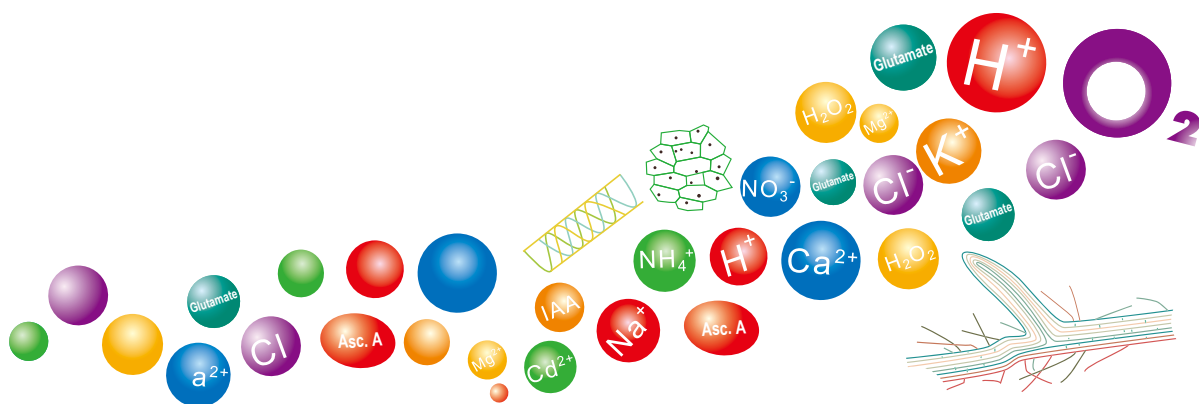
NMT微传感器是满足非损伤微测技术特殊技术规格、标准（团标：T/ZFL 002-2021）的微型传感器。

材质：

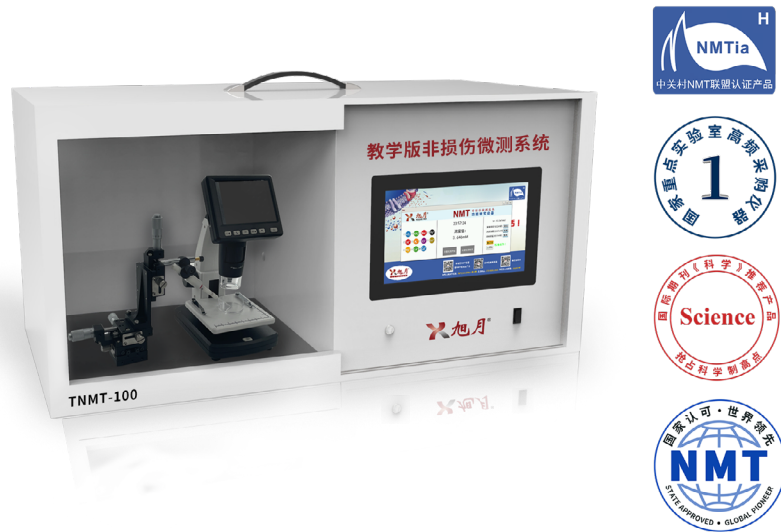
荧光染料/光纤、纳米碳丝、酶电极、金属/合金等。

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。



附录二：教学版NMT系统介绍



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

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注液态离子交换剂
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



地址:北京市海淀区苏州街49-3号

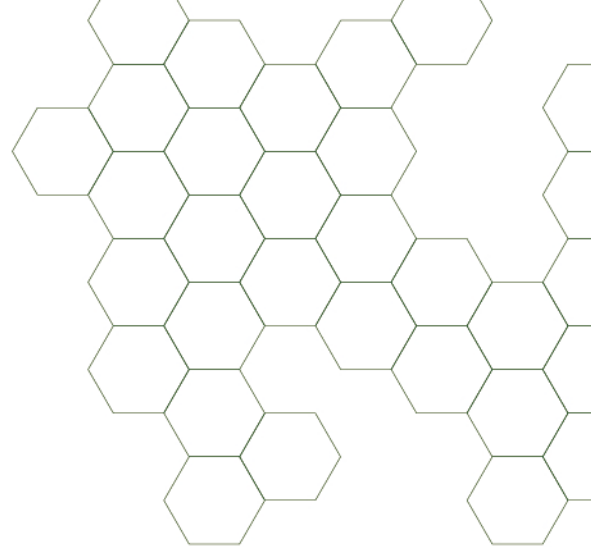
盈智大厦6层

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