

非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用*

丁亚男² 许越^{1,2,†}

(1 美国 麻省州立大学生物学系 ,Amherst MA 01003 美国)

(2 旭月(北京)科技有限公司 北京 100080)

摘要 “非损伤微测技术”或称“无损微测技术”是上世纪末产生的一种用非损伤性的方法获取物体表面特异性离子和分子动态信息的新技术平台。该技术平台是微电子、计算机、精密机械加工、物理、数学、高分子化学、纳米技术及光学显微技术等多学科优秀成果的集成。“非损伤微测技术”可使研究人员在被测样品上获得其他技术难以测到的生理特征和生命活动规律,从而在理论研究和应用领域方面产生实质性的突破。“非损伤微测技术”平台还可以方便地与细胞和分子生物学技术、其他电生理技术和显微荧光成像技术配合使用,从而更全面地揭示各种生命现象及其本质。目前,“非损伤微测技术”平台已被多家科研机构、医院和制药公司所采用,其应用范围涵盖了生物学、生理学、神经生物学、环境科学、药理学、材料科学等诸多领域。文章较详细地介绍了非损伤微测技术及其在生物医学中的应用,其中包括植物、动物研究领域中与生物医学相关问题研究中的应用以及与其他技术结合的应用等。

关键词 非损伤微测技术,液体离子交换剂(LIX),Fick第一扩散定律,离子/分子选择性微电极

Non-invasive micro-test technology and its applications in biology and medicine

DING Ya-Nan² XU Yue^{1,2,†}

(1 *Biology Department, University of Massachusetts at Amherst, Amherst MA 01003, USA*)

(2 *Xu-Yue(Beijing) Sci. & Tech. Co. Ltd., Beijing 100080, China*)

Abstract Non-invasive micro-test technology (NMT) was born in the late 20th century, and is a new means to obtain dynamic information of specific ionic/molecular activities on material surfaces non-invasively. This technique is an integration of cutting-edge developments in the fields of micro-electronics, computer science, micro-mechanics, physics, mathematics, polymer science, nanotechnology and microscopy. It covers different temporal and spatial resolution domains from other traditional techniques, and its 3-dimensional measurement capability enables us to observe the physiological characteristics of biological phenomena which would be difficult or even impossible with other techniques. As a result, new breakthroughs have been made in both fundamental research and practical applications. For instance, a new mechanism of calcium ion absorption by mammalian bone has been discovered which may provide a more efficient way to provide calcium supplements to human beings. The integrated application of NMT with techniques in cellular and molecular biology, fluorescence microscopy and traditional electrophysiology will put us in a better position to piece together the puzzles about life. Up till now, NMT has been used by many research institutions, hospitals and pharmaceutical companies, and applications cover many scientific fields including biology, medicine, agriculture and so forth, and the list of applications is still growing.

Keywords non-invasive micro-test technology, liquid ion exchanger, Fick' law of diffusion, ionic/molecular selective microelectrode

* 2007-04-23 收到初稿 2007-05-29 收到修改稿

† 通讯联系人. Email : jeffxu@youngerusa.com

1 非损伤微测技术概述

非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique ,NMT)或称无损微测技术 ,是一种选择性离子/分子微电极技术 ,是由 Kührtreiber 和 Jaffe 在 1990 年设计的一套由计算机控制的自动定位测量系统演变发展而成^[1,2]。非损伤微测技术以其特有的非损伤性测量方式逐渐被广泛应用到基础生物学、生理学、神经生物学、环境科学、药理学、材料科学等诸多领域。目前 ,非损伤微测技术不但可以测量 H^+ , Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ , Al^{3+} , Na^+ , Cd^{2+} , NO_3^- ,氨基酸 , Cl^- 和 O_2 , CO_2 , NO 及温度等参数 ,而且可以同时采集多种离子及参数 ,为获得生物样品分子或离子运动的有关信息提供了良好的实验平台^[3-5]。

1.1 什么是非损伤微测技术？

非损伤微测技术是一项具有世界尖端水平的特异离子/分子检测技术 ,主要是在电脑自动控制下 ,利用选择性微电极 ,在不接触被测样品的情况下获得进出样品的各种分子/离子的浓度(mM 级)、流速($10-12 mol \cdot s^{-1} \cdot cm^{-2}$)及其三维运动方向的信息。被测样品可以是非生命物体(如金属)或生物活体(如细胞器、单个或多个细胞、组织甚至器官)。测量不仅方便、快捷、三维和实时 ,而且对被测对象不会产生任何伤害。

选择性微电极种类包括玻璃离子选择性微电极、纳米碳纤维微电极、铂铱合金丝微电极和光纤微电极等等。

离子选择性微电极通常以玻璃微电极为载体 ,是用液体离子交换剂(liquid ion exchanger ,LIX)制成的液体膜选择性微电极。液体膜可分为两类 :一类主要由可电离的离子交换剂组成 ,如钙离子微电极 ;另一类则由不带电荷的大环状化合物 ,即中性载体组成 ,如钾离子微电极。

1.2 非损伤微测技术的原理

物质在液体环境中有从高浓度向低浓度扩散的趋势。对于带电粒子而言 ,还有从高电化学电势向低电化学电势运动的趋势。如果离子选择性微电极的移动距离 dx 在几十微米以内 ,生物材料实验证明 ,影响带电粒子运动的电化学电势梯度可忽略不计 ,该离子的扩散运动速率可以通过 Fick 第一扩散定律计算出来(图 1)。也可根据能斯特方程计算。图 1 以 Ca^{2+} 浓度梯度和 Ca^{2+} 微电极为例 ,说明非损

伤微测技术的物理学原理。

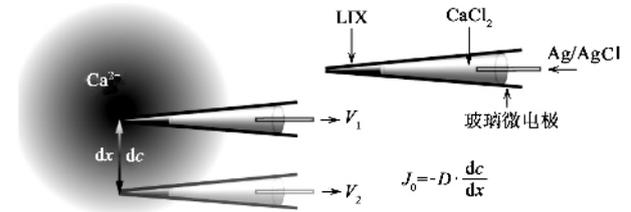


图 1 非损伤微测技术的物理学原理

离子选择性微电极由玻璃微电极、 $Ag/AgCl$ 导线、电解质($100mM CaCl_2$)及液态离子交换剂(LIX)四部分组成。该微电极在待测离子浓度梯度中以已知距离 dx 进行两点测量 ,并分别获得电压 V_1 和 V_2 。两点间的浓度差 dc 则可以从 V_1 , V_2 及已知的该微电极的电压/浓度校正曲线计算获得。 D 是离子/分子特异的扩散常数(单位 $cm^2 \cdot s^{-1}$) ,将它们代入 Fick 第一扩散定律公式 : $J_0 = -D \cdot dc/dx$,可获得该离子的移动速率(单位 $\mu mol \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$) ,即 :每秒钟通过一个平方厘米的该离子/分子摩尔数。

非损伤微测系统可同时提供两种前置放大器 :极谱前置放大器和电压前置放大器(图 2)。极谱前置放大器是配合固体微电极的一种前置放大器 ,如铬铂合金微电极(用于测量 O_2 和 H_2O_2 等)或碳丝微电极(用于测量 NO 等)。尽管两种放大器所使用的微电极及其工作原理不同 ,但它们测量分子和离子流动速率的原理和方法是相同的。因此 ,它们可以共享后续的电子电路以及计算机软件系统。值得一提的是 ,非损伤微测系统具有两个放大器通道 ,可以将极谱前置放大器和电压前置放大器进行任意形式的组合并进行同时测量 ,在非损伤微测技术的应用部分将举例介绍如何利用这一优势对生物材料进行 O_2 (利用极谱前置放大器)和 H^+ (利用电压前置放大器)的同时测量^[6]。

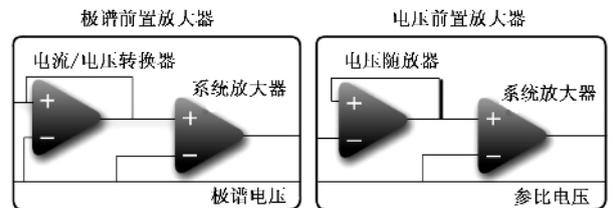


图 2 非损伤微测系统极谱放大器和电压放大器的电子线路简图

1.3 液体离子交换剂

液体离子交换剂是基于大型中性分子载体(macro neutral carriers)的一类有机化合物。目前可

以购买到的一些常见的 LIX(例如 Ca^{2+} , Cd^{2+} , K^{+} , H^{+} , Cl^{-} 等) 其他的种类还在不断地开发中。

此外还有部分选择性微电极使用了纳米碳纤维和铂铱合金丝。前者经卟啉和 1,2-苯二胺修饰可以选择性地测量 NO 。而后者则是利用固定的氧化还原电位通过氧化还原的程度来选择性测量 O_2 。最新的发展已出现了酶反应微电极和光纤微电极。

1.4 非损伤微测系统的组成及原理图

日新月异的微电子和计算机技术,不但是非损伤微测技术诞生的基础,而且非损伤微测技术也必然会随着计算机的发展而不断完善和进步。三维运动、显微成像和信号放大三个子系统(图3和图4)同时受到计算机的控制,加上强大的数据分析软件,真正实现了多学科技术的集成。

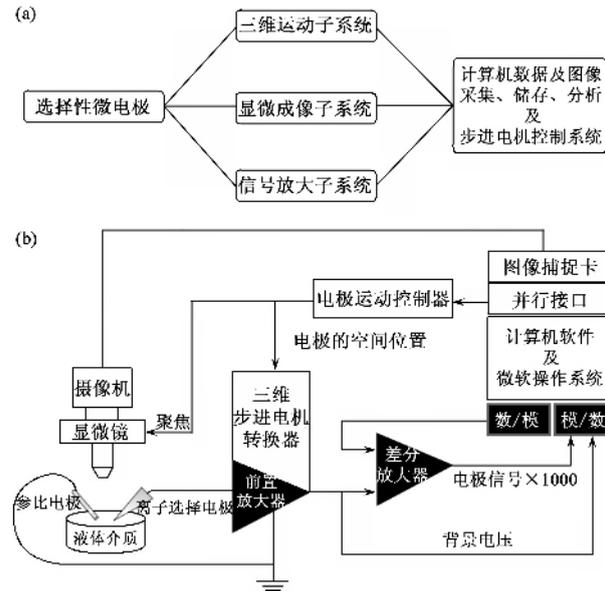


图3 非损伤微测系统组成 (a)组成非损伤微测系统的三大子系统 (b)非损伤微测系统的原理图

电极组成包括参比电极和选择性微电极,选择性微电极可以是单电极也可以是多电极。图中的多电极在计算机控制的步进电机的带动下,沿被测样品做三维运动并实时采集离子/分子的运动信息,所采集的信号经信号放大子系统输入计算机数据处理系统进行分析处理;在测量的同时,显微成像子系统可以从水平和垂直两个方向实时观察微电极和样品,并可以定时抓拍图像供计算机记录和分析。

1.5 选择性微电极的灵敏度及分辨率

选择性微电极尖端 LIX 的高阻抗产生的热力学

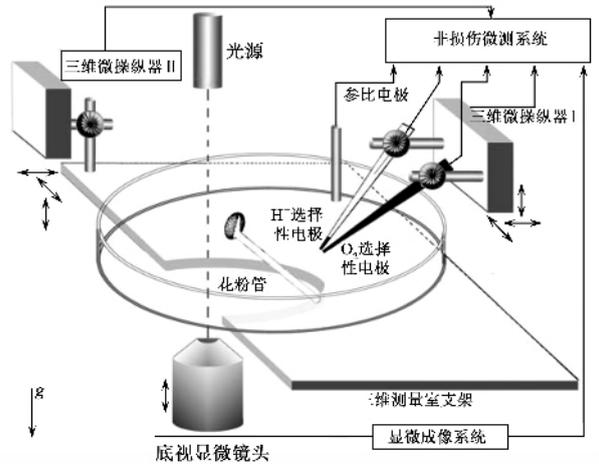


图4 非损伤微测系统的结构示意图(双电极同时测量)

电子噪音(Johnson 噪音)是非损伤微测技术灵敏度的决定性因素。非损伤微测技术通过动态调整采样频率和数字化平均值来降低系统噪音,使其灵敏度能够接近理论极限^[7]。

选择性微电极在测量位点停留的时间通常为 1—10s,而且选择性微电极移动过快将使被测样品周围的溶液受到干扰而破坏离子/分子梯度,另外 LIX 需要一定的时间才能稳定下来,这些因素决定了非损伤微测技术的时间分辨率。选择性微电极的尖端在 $2\mu\text{m}$ 左右,而空间分辨率一般在 $5\mu\text{m}$ 左右。

下面是在电生理研究领域非损伤微测技术与其他常见技术时间分辨率及空间分辨率的比较(见图 5)。

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

非损伤微测技术作为一个开放式的实验平台,在生物医学研究过程中,较好地填补了整体组织研究过程中的化学分析方法与荧光染料标记或膜片钳等局部研究方法两者之间的技术空白。

1.6 影响非损伤微测技术正确使用的主要外部因素

1.6.1 缓冲溶液的影响

被测离子周围的缓冲溶液对稳定被测离子尤为重要。如果离子缓冲剂选择或者使用不当,被测离子会与缓冲剂相互干扰,破坏被测离子的浓度梯度或者被大幅度压缩,从而严重影响到非损伤微测技

术的应用效果。在使用非损伤微测技术过程中,通常要在溶液中加入一些缓冲剂成分,如:MES,Tris或EDTA等,用以稳定被测离子,以便离子选择性微电极进行测量。Kunkel等人通过系统地比较试验,找到了一些最适合于非损伤微测技术的溶液、pH缓冲剂及其使用方法,并证明通过使用这些方法,可以将非损伤微测技术测知离子流动速率的能力达到最大化^[8]。因此,在非损伤微测技术试验设计过程中,不但要考虑到测量溶液中各种成分对被测样品生物活性的影响,还要充分考虑到缓冲剂成分对被测离子梯度的作用以及对LIX有无严重干扰。

1.6.2 空间几何构型的影响

在现有的1—2 μm 直径的选择性微电极距离被测材料2—20 μm 及 dx 为5—30 μm 的技术条件下,被测材料离子流动的空间几何分布可以大致分为三类:点、平面及球体。在微电极距离被测材料小于5 μm 时,通常认为离子是以平面方式运动。

值得一提的是,非损伤微测技术是目前世界上唯一能够按照研究人员的设定,以手动或编程的方式,对被测样品的任意角度(相对于被测表面)用选择性微电极进行测量的系统。在Cardenas等人对植物花粉管生长过程中尖端 Ca^{2+} 内流的研究中,不但能够测量出 Ca^{2+} 的内流速率,而且还计算出该花粉管尖端一个圆盘式的结构是 Ca^{2+} 进入区域的形状^[9],这是一个经典的利用非损伤微测技术灵活的空间测量方式的例子。

1.7 非损伤微测系统数据分析

自从非损伤微测技术诞生以来,数据分析方面一直是较为薄弱的环节,在一定程度上也制约了非损伤微测技术的推广和应用。这主要是由于各个实验室在选择性微电极的制作、校正、测量效率、相对于被测材料的位置、运动方式的定义以及缓冲溶液成分等方面存在着或多或少的差异,而且,即使在同一实验室,由于某一因素的改变也将对最后的结果产生影响,从而很容易在数据分析上造成偏差,甚至错误^[10]。

为此,美国扬格科技公司与旭月(北京)科技有限公司联合开发设计了一套Internet多用户共享的数据分析软件——MageFlux^[11](<http://www.young-erusa.com/mageflux>)。MageFlux通过将试验参数利用计算机软件进行跟踪和管理,不但将数据的分析过程标准化,而且还可以将数据以三维、互动的形式展现在科研人员面前,真正将非损伤微测技术灵活

的空间测量方式体现出来,并且为进出被测材料的离子/分子流的精确定位提供了最直接、最形象的依据。

1.8 非损伤微测技术的特点

1.8.1 非损伤性测量

采用该技术测量时,选择性微电极不接触被测材料,只是在被测材料周围做三维运动测量,因此克服了传统的将微电极插入到细胞或组织中所带来的损伤,以及损伤所造成的测量数据不真实或出现假象的可能性。

1.8.2 三维运动中测量特异离子/分子的浓度、运动方向及运动速率

选择性微电极在计算机控制的步进电机带动下,进行三维运动测量,只要在被测材料周围存在离子或分子的规律性运动,该技术就可以检测到,检测位点的浓度、运动方向和速率均可以获得。

1.8.3 可多个微电极同时测量

采用单一微电极即单通道测量是最常用的检测方式,但随着技术的不断改进,可以实现两个甚至多个微电极的同时测量。多个微电极同时测量的优势在于能够同时分析多个参数,尤其是当这些参数存在相关性时更加有利,例如 O_2 和 H^+ 在研究植物花粉管生长过程中的测量^[6]。

1.8.4 可长时间测量

一支微电极可以持续使用几小时至十几个小时,因此可以进行长时间的连续测量,只需根据用户的需要更换样品,在此期间如无特殊情况一般不需要更换微电极。

1.8.5 实时智能化数据采集,强大的数据分析及管理软件

非损伤微测系统所使用的软件可以实现智能化数据采集,并实时记录所进行的操作。可以将三维测量数据输入计算机数据处理软件进行分析。数据分析软件(Mageflux)将采集的数据以动态三维形式展示,同时研究者可以使用项目或文件管理系统来实现数据的观察、共享、下载以及删除等功能。

2 非损伤微测技术的应用

分子和离子在生物体内运输机制的阐明始终是生命科学领域非常重要的一个方面。随着电生理技术的迅猛发展,配合日新月异的各种生物学技术,必然会加快离子/分子的跨膜生物信息传递机制的阐

明以及各种生物信息的整体研究。膜受体与配体,离子通道与离子,不同信号分子在膜水平的作用等都是生命科学的热点问题,也是膜生物学的中心课题。我们知道膜蛋白是生物膜功能的主要体现者,面对周围环境的改变,细胞会通过复杂的调控网络改变膜的通透性,结果是出现了细胞膜周围分子/离子信息的改变。而记录细胞膜周围分子/离子信息的变化,不仅能够对膜蛋白的功能起到验证的作用,而且能为研究膜蛋白的功能提供了重要信息。非损伤微测技术作为一种综合性较强的电生理技术已成为生物膜研究的重要工具。

2.1 非损伤微测技术在植物研究领域中的应用

在该技术的诞生以及发展过程中,非损伤微测技术在植物学研究中的应用始终占有相当大的比例。这可能与植物细胞的细胞壁对于像膜片钳这样的技术来讲在操作上较为困难有关。利用非损伤微测技术特有的不接触被测样品测量的功能,可以在不对细胞、组织甚至器官造成任何损伤的情况下测知离子/分子的运输情况,从而克服了由于损伤造成的测试结果无法合理解释甚至造成研究假象的问题。正是意识到非损伤微测技术的这一优势,Kochian 等人在原有的 Ca^{2+} 选择性微电极的基础上,又相继开发出了 H^+ , K^+ , Al^{3+} 和 Cd^{2+} 选择性微电极,并将其应用于玉米根和植物毒理学的研究,并为这些微电极在动物研究中的应用开辟了道路^[7,13,14]。随后,非损伤微测技术被应用于整体根、根毛及花粉管的研究,阐明了钙离子运输与样品内部活动及生长的相关性^[9,14,18]。Messerli 等人于1998年进行了一项出色的非损伤微测技术的应用工作,将脉动式的花粉管生长所体现的周期与离子流动速率表现出的频率相互联系起来^[19]。

分子遗传学的进展使得我们能够对这些运输载体分子结构加以确定、克隆和进行可控制的表达。当这些运输载体在分子水平方面通过在酵母、卵细胞等系统中的表达予以鉴定,或者某些细胞成分的物理结构和生理功能被阐明之后,非损伤微测技术的非损伤性,多离子/分子同时测量以及灵活的空间测量方式,将在细胞和组织水平上的功能鉴定方面发挥重要的甚至是无法替代的作用。

下面介绍非损伤微测技术在植物研究领域中具有代表性的三个应用实例。

2.1.1 离子与分子流动的同时测量证明了花粉管碱化带的存在

Feijo 等发现不断生长的百合花粉管前端存在一个碱化带,之后他们提出该碱化带可能是区域的线粒体的密集所致(图6)^[14]。许越等^[6]应用非损伤微测技术所特有的双微电极同时测量的功能,发现 H^+ 的外流和 O_2 的内流是引起该碱化区的主要原因。花粉管的生长需要大量的能量,能量来源于线粒体的氧化磷酸化。 O_2 的内流伴随 H^+ 的外流是形成能量的主要驱动力,也正是由于 H^+ 的外流造成了花粉管前端局部的碱化带,从而证明了 Hepler 等的假说是正确的(图7)。

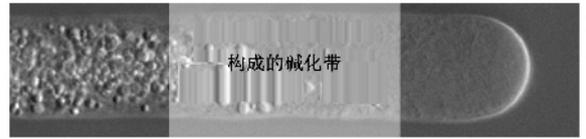


图6 百合花粉管前端推测存在的碱化带

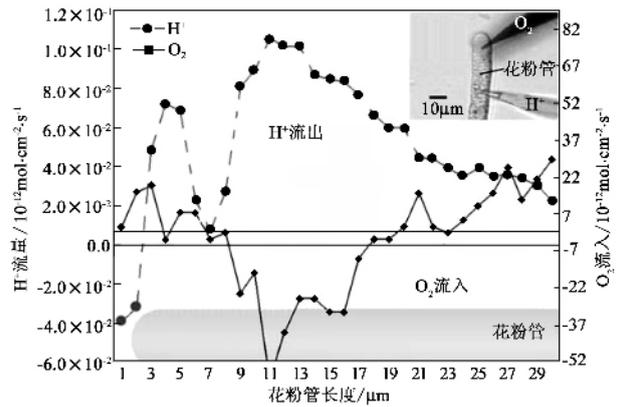


图7 采用非损伤微测技术在花粉管周围进行 O_2 微电极和 H^+ 微电极同时测量,获得了花粉管持续性碱化带周围测量的结果。应用非损伤微测技术特有的双电极同时测量的功能,发现了 H^+ 的外流和 O_2 的内流是引起该碱化区的主要原因(生长速率为 $14.634 \mu\text{m}/\text{min}$)

2.1.2 多离子微电极的同时应用证明 Ca^{2+} 及 H^+ 在植物感知重力变化中起作用

美国北卡罗来纳州立大学植物系 NSCORT 研究组受美国宇航局资助,研究植物感知重力的遗传及生理机制,通过对重力非敏感的拟南芥突变体的研究,许越等^[20]发现植物根部在相对于地球重力不同的位置的情况下,其 H^+ 和 Ca^{2+} 的流动在根部的不同位置呈现出不同的变化,显示出 H^+ 和 Ca^{2+} 可能在植物感知重力变化的过程中扮演一定的角色(图8)。

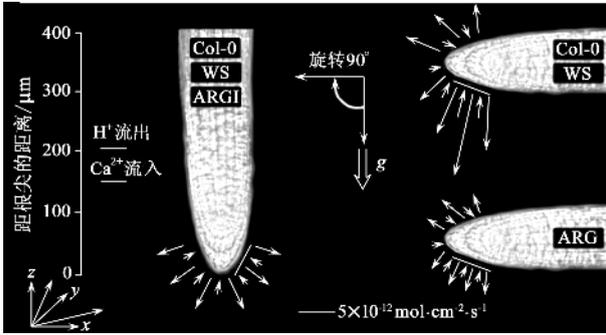


图8 利用非损伤微测技术,采用 H^+ 和 Ca^{2+} 双电极,对拟南芥野生型(WS)和重力非敏感植物突变体(ARG1)进行测量。重力非敏感植物突变体(ARG1)在重力变化刺激下的 H^+ 和 Ca^{2+} 活动的变化与野生型拟南芥有明显的区别。(Col-0 是植株代码)

2.1.3 蚕豆叶肉细胞中离子机制的研究

Shabala 等使用非损伤微测技术测量了蚕豆叶肉细胞 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 以及 Cl^- 的离子流动,以揭示盐胁迫的离子机制^[21]。使用 90mM 的 NaCl 处理样品,可导致 K^+ 外流显著地增加,同时增强质膜上 H^+ 泵活性。然而当溶液中存在高浓度的 Ca^{2+} (10mM)时,两现象均被抑制。同时,高/低 Ca^{2+} 处理对 Na^+ 的流动并没有显著效果。这说明了在 Ca^{2+} 改善盐对蚕豆叶肉细胞的负面影响过程中,是 K^+ 和 H^+ 的转运蛋白而不是 VIC 通道起核心的作用(图9)。使用等渗甘露醇证明,细胞对高渗处理的离子性反应是具有高度胁迫特异性的。反应最显著的是 K^+ ,由 K^+ 净外流(NaCl 处理)转为净内流(甘露醇处理)(图10)。综上所述,在盐胁迫中,离子性组分和渗透性组分造成的现象,其离子机制是完全不同的。

2.2 非损伤微测技术在动物研究领域中的应用

2.2.1 软体动物平滑肌在神经介质和激素刺激下产生的 Ca^{2+} 外流

肌肉可以产生运动的特性使得许多生理学技术,特别是需要插入细胞内的电极技术都一筹莫展。可喜的是,非损伤微测技术的无损性,为其在研究肌肉运动中的离子迁移过程提供了用武之地。Pelc 利用非损伤微测技术测量到了 Mytilus edulis(一种软体动物)平滑肌在 carbachol(一种刺激物)刺激下收缩时大量的 Ca^{2+} 内流。在 1mM Ca^{2+} 背景浓度的条件下,其值高达 $80 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[22]。Pelc 还成功地从单个离体肌细胞 myocytes 中测量到了 Ca^{2+} 流动^[23]。

在 Devlin 等人的研究中,较容易地测量到了

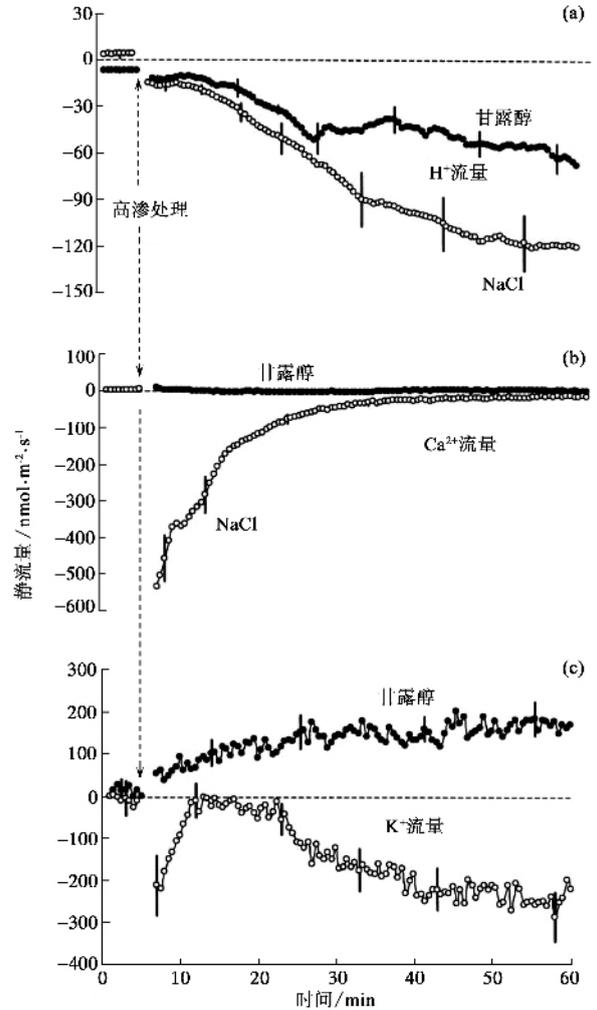


图9 蚕豆叶肉组织经过高渗处理后 H^+ (a)、 Ca^{2+} (b)、 K^+ (c) 离子流的瞬时变化(空心圆圈表示加入 90mM NaCl,实心圆圈表示加入 150mM 甘露醇,加药时间均为 5 分钟)

Sclerodactyla briareus(一种生物)平滑肌在神经介质和激素刺激下产生的 Ca^{2+} 外流(图11)^[24-26]。

应该指出的是,在不存在诸如 verapamil、diltiazem(L-type channels)、 Co^{2+} 或 La^{3+} 等拮抗剂的情况下,非损伤微测技术测量不到 Ca^{2+} 速率信号变化。这一点在应用非损伤微测技术时需要十分注意。因为非损伤微测技术的工作频率在(0.1—10Hz)之间,所以快速的离子变化是检测不到的,即使测到也将是瞬时的。因此,非损伤微测技术不适合于检测离子通道,而适合那些相对较慢的运输机制,比如与膜紧密相连的 ATP 酶(ATPases),以及一些不宜于被其他技术研究系统。因此非损伤微测技术的测量结果是运输载体活性的反映,或膜运输过程的结果,而不是单独个别运输载体的活性。

2.2.2 干细胞保存影响因素的研究

美国麻省 BayState 医院利用非损伤微测技术对

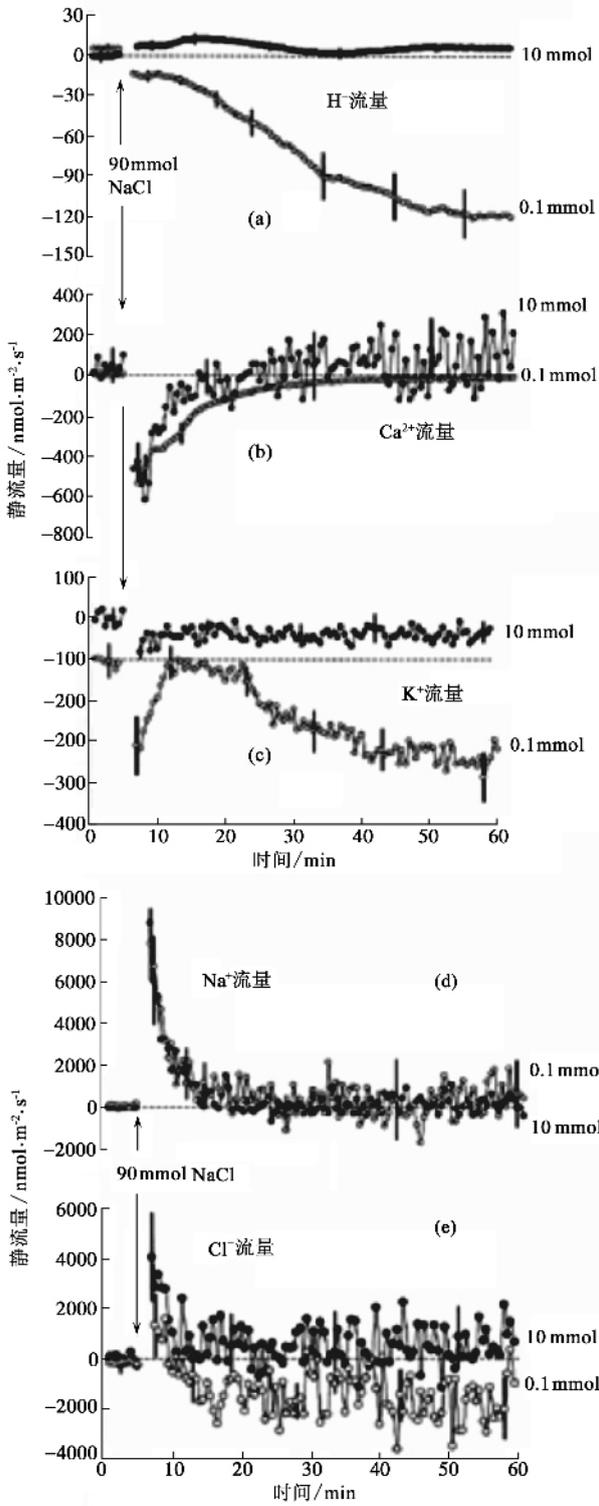


图10 蚕豆叶肉组织在低钙(0.1mM,空心圆圈)和高钙(10mM,实心圆圈)中经过盐胁迫处理后, H⁺(a), Ca²⁺(b), K⁺(c), Na⁺(d)以及 Cl⁻(e)离子流的瞬时变化。5 分钟后加入 90mM NaCl

影响人体干细胞(stem cells)保存期限的若干外部环境及细胞内部因素进行研究,试图克服由于冷冻

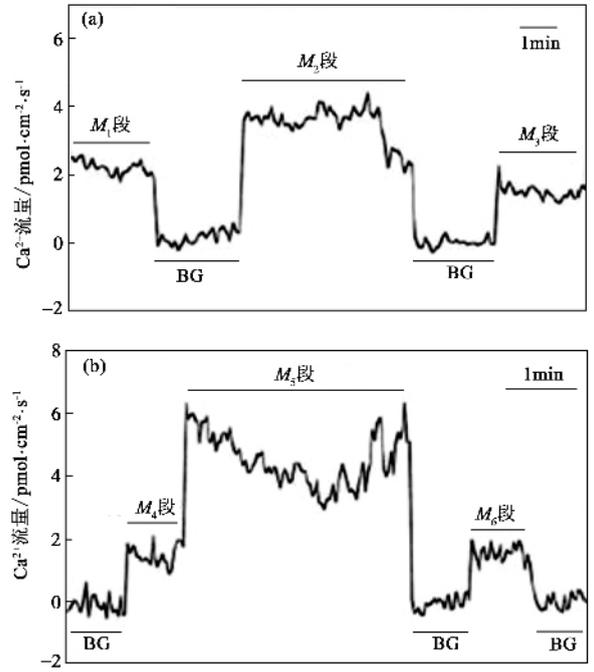


图11 Muscarinic AchR 拮抗剂 himbacine 对 Ca²⁺ 外流的促进作用。(a) M₁ 段和 M₃ 段为肌肉自发的 Ca²⁺ 流动, M₂ 段为 himbacine 诱导下的 Ca²⁺ 流动, BG 为背景信号 (b) M₄ 段和 M₆ 段为肌肉自发的 Ca²⁺ 流动, M₅ 段为钙释放激动剂咖啡因对 Ca²⁺ 流动的影响

造成的高达 50% 以上的损失率,为人体细胞培养、分化及人体器官再生扫清技术障碍。

2.2.3 迁徙鱼类的离子调节机制的研究

台湾中研院应用非损伤微测技术,结合显微荧光染色技术,对鱼类卵黄细胞在从 μ 水(μ 水 = 18 × 10⁻³ g/mol)到海水的双向转换过程中,氯离子细胞(Chloride Cells)吸收和释放氯离子过程进行研究,为阐明迁徙鱼类的离子调节机制提供了有利证据(图 12)。

2.2.4 应用非损伤微测技术研究视网膜细胞的离子运输机制

非损伤微测技术的应用为离子运输机制的研究提供了方便。例如,在近乎实时的情况下,在细胞表面的运输过程以及由离子泵和其他运输载体活性所产生的离子信号^[27,28]可以被较全面地记录下来。在单细胞研究中, Ca²⁺ 和 H⁺ 选择性微电极被应用于研究单个视网膜细胞,而 Knox 等人利用神经元作为材料研究在钙释放激活钙电流(ICRAC)、自由基、重金属及第二信使存在的条件下 Ca²⁺ 的调节机制^[29,30]。2004 年, Molina¹ 等人证明 H⁺ 流动存在于 skate 视网膜细胞神经介质的生理活动中(图

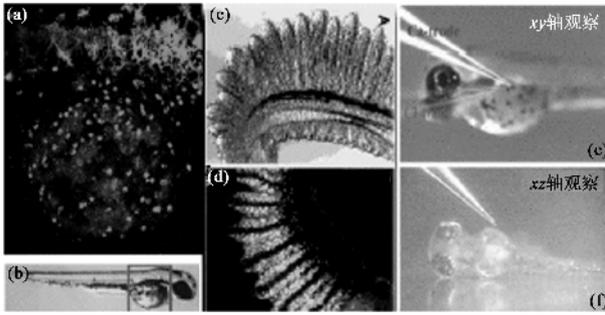


图 12 非损伤微测技术与荧光显微技术的结合应用 (a)通过荧光染色定位 Talipia(卵黄细胞 yolk cell)氯细胞 (b)鱼类组织观察区 (c)鱼鳃细胞荧光染色前 (d)鱼鳃细胞荧光染色后 ; (e)Ca²⁺ 和 Cl⁻ 双电极测量 (f)非损伤微测技术的 xz 平面测量

13)^[31]。

2.2.5 应用非损伤微测技术研究小鼠胚胎的氧消耗

Trimarchi 等^[32]证实非损伤微测技术可以有效地用来分析植入前胚胎的氧消耗和利用,并且证明了氧消耗与重大生理活动息息相关,如小鼠的发育、对药物的反应或者细胞死亡。非损伤微测技术可以被用来快速无损地测量发育中的小鼠胚胎周围的介质中溶解的氧的梯度,从而鉴定发育过程中氧的消耗和利用。该技术可以测量胚胎周围超过 50μm 范围消耗的氧的梯度。囊胚期的胚胎周围介质消耗氧浓度为 0.6 ± 0.1 μmol,而卵裂期为 0.3 ± 0.1 μmol,这说明囊胚期氧的消耗增加了一倍。

2.2.6 非损伤微测技术应用于神经损伤导致快速的 NO 外流的研究

Shanta 等^[33]采用最新的 NO 微电极,检测到水蛭中枢神经元损伤导致 NO 快速的外流,证明在水蛭中枢神经元受到损伤的瞬间,同时损伤激活了已经存在于中枢神经元的一氧化氮合成酶,并且作为小胶质细胞富集于受损部位的上游步骤,证实了 NO 充当了阻止小胶质细胞从受伤处迁移的角色。

2.2.7 采用非损伤微测技术研究铅离子和药理学试剂对海兔神经元钙流动的影响

铅离子作为环境中一种重要的重金属元素,对人和动物的神经系统起到慢性毒副作用。在铅摄入后的代谢过程中,神经细胞钙离子的代谢也发生改变。Catherine 等^[34]采用非损伤微测技术中的钙离子微电极,研究了铅离子和药理学试剂对海兔神经元钙流动的影响,证实了铅离子浓度的增加造成相应的钙离子外流信号的增加,钙离子通道拮抗剂 Verapami(VPML)显著降低了铅离子诱导的钙外流。

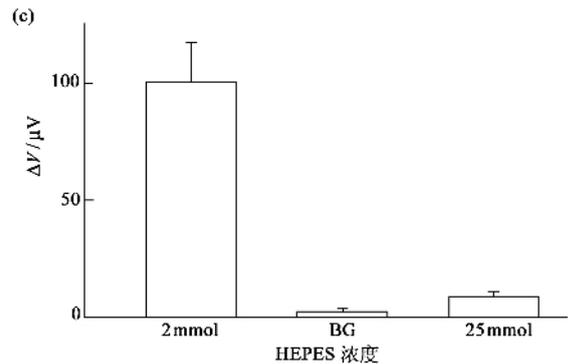
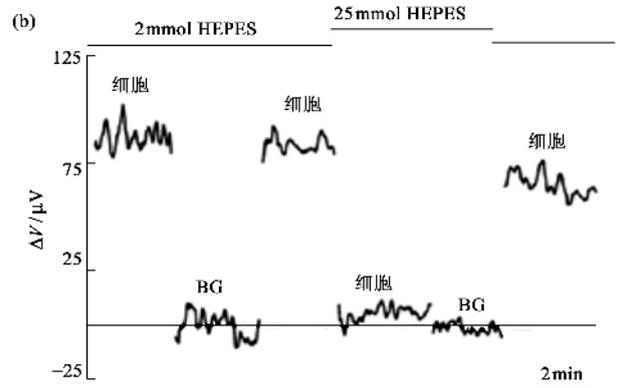
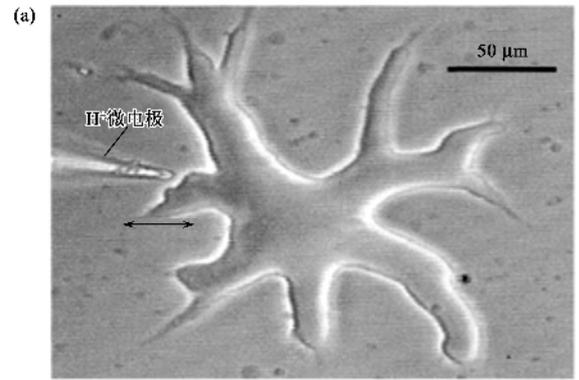


图 13 在非损伤微测技术中采用 H⁺ 微电极测量分离的 skate Horizontal 细胞 (a)通过酶解方法得到的一个细胞。图中左面 H⁺ 微电极正在靠近突触,双箭头代表从近端到远端运动的位置 (b)加入 25mM HEPES(缓冲液)后, H⁺ 流动减弱了 (c) 8 个细胞测量的数据分析

2.2.8 采用非损伤微测技术研究葡萄糖浓度、胰岛素分泌和氧消耗之间的关系

Porterfield 等^[35]使用克隆 β 细胞系 HIT-T-15 来研究葡萄糖浓度、胰岛素分泌和氧消耗之间的关系,证明钙离子在葡萄糖诱导的氧消耗变化中的作用。在单克隆 β 细胞中,用一个氧电极来测量氧的消耗情况,发现在葡萄糖的刺激下发生了大幅度的振荡,而对偶联剂(是一种巯基氰化物,用 FCCP 表示)解偶联呼吸可以阻断这一过程。同样,呼吸链复合体 III 抑制剂抗霉素 A 可以阻断整个呼吸过

程,也可以阻断这一振荡。大约一半细胞样品(大约 100 个)在葡萄糖刺激下表现出了氧振荡的增加。即使没有钙离子的存在,葡萄糖也可以诱导氧振荡,而且氧振荡的振幅在恢复正常细胞外钙离子水平的情况下会增大。这些研究表明,振荡的氧消耗并不受钙离子调控,而氧振荡的振幅在钙离子存在的情况下有所提升,这可能需要对胰岛素分泌和钙离子泵做进一步研究来加以解释。这些研究首次证明了氧气消耗和胰岛素分泌之间的直接联系,单细胞中的氧消耗振荡使人们可以用高分辨灵敏的非损伤的自参比氧电极来观测单个 β 细胞呼吸的可行性。

2.3 非损伤微测技术与其他技术的结合应用

非损伤微测技术的技术路线是从被测材料外周测量离子/分子的活动信息,因此该技术是从被测材料的外部信息来直接或间接分析被测材料内部的活动信息,这一点在被测材料是生物材料时尤为明显。由于非损伤微测技术的出现,人们对于生物体特异离子转运系统的研究,在实验的灵敏度上和时间、空间分辨率上已经大大地提高了,并已成功地与细胞和分子生物学技术、其他电生理技术以及显微荧光成像技术配合使用。人们普遍认为,非损伤微测技术将在主动运输离子或分子泵和协同运输载体的研究方面发挥重大的作用。

许多情况下,生物信息在细胞内部与细胞外部的变化是相呼应的,因此非损伤微测技术结合分子生物学或细胞生物学的其他技术,共同分析,来验证实验结果,这更能够真实地反映细胞的生物信息变化机制。下面的研究实例是非损伤微测技术结合荧光显微技术共同应用于突变体功能的研究。

该实例是非损伤微测技术与荧光显微技术结合,证明了磷脂酰肌醇转运蛋白与根毛发生有关。Vincent 等在鉴定出拟南芥磷脂酰肌醇转运蛋白家族(PITPs)的一种成分 *Atsfh1p* 之后,将显微荧光技术与非损伤微测技术结合,从细胞的内部和外部同时证明 *Atsfh1p* 在根毛顶端生长过程中,具有调节细胞内质膜磷酸肌醇极性运输、 Ca^{2+} 信号传递和细胞骨架的功能,从而在植物细胞的极性生长机理研究方面向前推进了一步^[36]。

拟南芥缺失根毛突变体(*Atsfh1p*)不仅在根毛形态上有变化(如不规则弯曲,失去重力极性),而且在 Ca^{2+} 信号传递方面也有异常。利用 Ca^{2+} 荧光显微技术可测定细胞内部 Ca^{2+} 浓度梯度,而利用非损

伤微测技术可测得外部 Ca^{2+} 的流动情况。结果表明,野生型的根毛只有在生长旺盛的顶尖区, Ca^{2+} 的内流速度快,而突变株的根毛 Ca^{2+} 流动的方向和大小明显不同于野生型的根毛。非重力方向的根毛,四周表面都可以检测到 Ca^{2+} 的内流,而且流速高于野生型的两倍左右(见图 14)。

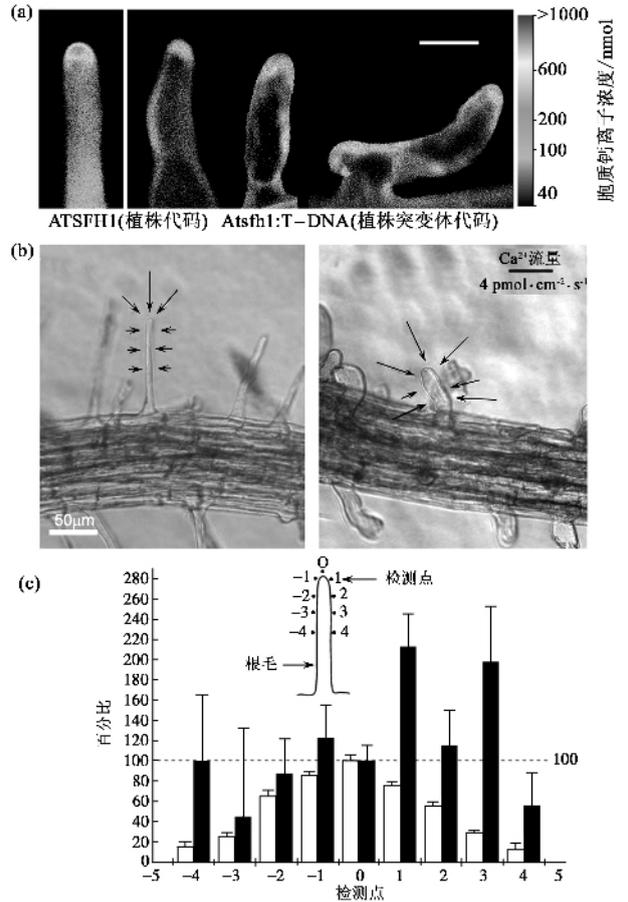


图 14 非损伤微测技术与激光共聚焦荧光染色技术相结合,研究植物细胞极性生长 (a)荧光染色结果显示,突变体细胞内部 Ca^{2+} 与正常细胞相比,呈现不均匀的非极性分布 (b)突变体细胞外部 Ca^{2+} 内流与正常细胞相比,同样呈现不均匀的非极性分布 (c) Ca^{2+} 流数据分布计算(来自 10 次独立试验结果,试验中是以试样顶部 0 点为中心取检测点)

3 非损伤微测技术与膜片钳技术的区别

膜片钳技术是从分子水平研究跨膜离子移动和其他功能的主要方法之一,并且在不断改善^[37,38]。但该技术仅限于单一离子通道的记录和分析,不适合从整体上分析跨膜分子/离子的信息,并且存在封接成功率低、记录时间短和封接不稳等问题。非损伤微测技术作为膜片钳技术的一项重要补充,并以其特有的时间和空间分辨率,为鉴定或验证某些生

物膜运输系统的功能提供了非常有力的工具。表 1 对非损伤微测技术与膜片钳技术进行了比较。

表 1 非损伤微测技术与膜片钳技术的比较

非损伤微测技术	膜片钳技术
测量样品外的分子或离子的流动速率及其方向	测量跨膜的离子通道或载体信息
被测材料可以是细胞器、单细胞、细胞层、组织、离体器官甚至是小型植物整体	被测材料为细胞膜或质膜
不与被测材料接触, 植物不需去除细胞壁	与被测材料接触(需形成高阻封接)
可进行几小时乃至十几小时以上的连续测量	可进行几小时的测量
可以检测离子、分子及其他特异选择性电极可以探知的物质的流动速率及其方向	主要检测离子通道
研究覆盖的时间区域是秒以上, 分钟、小时	毫秒级的离子通透变化
研究覆盖的最小空间分辨率是 2—5 μm	最小空间分辨率是 1 μm 左右
可以对被测材料外部的分子/离子活动进行三维立体扫描	不能
设备对环境抗干扰能力强	设备对环境抗干扰能力弱

4 总结与展望

非损伤微测技术是一项特异离子/分子检测技术。该技术是当今微电子、计算机、精密机械加工、物理、数学、高分子化学、碳纳米技术及光学显微技术等多学科优秀成果的集成, 经过多年的改进和完善, 为科研人员提供了一个较易操作的软硬件环境。

同时, 非损伤微测技术以非损伤性、多离子/分子同时测量及灵活的空间测量方式, 借助强大的数据分析软件, 实时、三维、动态地记录进出被测材料的分子/离子变化的信息, 在数据的生成、采集以及校准等方面极大地方便了研究人员。非损伤微测技术以其特有的时间和空间分辨率, 使研究人员不仅可以获得其他离子/分子检测技术无法测到的被测样品某些点的特异活性^[7], 而且更有利于从整体上分析分子/离子携带的活动信息。非损伤微测技术不仅在细胞和组织水平上的功能鉴定方面以及跨膜生物信息传递机制方面将发挥重要的作用, 而且也为其其他研究领域(如材料腐蚀研究)提供了极有价值的技术平台。

非损伤微测技术应用领域不断扩展, 已被广泛应用于诸多领域, 作为一个开放性的实验平台以其独特的优势发挥更大的作用。比如在临床病理学的

韧带过度拉伸损伤研究中, 尽管利用荧光染色技术可检测到成纤维细胞内钙离子浓度的变化^[39], 但不能确定细胞在受力情况下是胞内钙库释放还是细胞膜离子通道开放引起的细胞外钙内流? 将荧光技术与非损伤微测技术相结合, 则可以很好地回答这个问题。

基因组研究后期所面临的一个挑战就是如何理解和确认那些未知的或者人工表达的蛋白质功能, 特别是细胞质膜上的离子的运输载体本身的研究, 以及由这些蛋白质所产生的众多信息是如何被细胞正确地整合到一起的, 非损伤微测技术作为一个综合性较强的电生理技术成为迎接这一挑战的理想工具。

基因组学的进展使得我们能够对这些运输载体分子加以确定、克隆和进行可控制的表达。当这些运输载体在分子水平方面通过在酵母、卵细胞等系统中的表达予以鉴定, 或者某些细胞成分的物理结构和生理功能被阐明之后, 非损伤微测技术的非损伤性、多离子/分子同时测量及灵活的空间测量方式将在细胞和组织水平上的功能鉴定方面发挥重要的甚至是无法替代的作用。

离子组学和分子组学是将生物体基因组信息与其微量元素和分子组成建立生物学意义关联的研究。将非损伤微测技术应用于离子组学和分子组学, 有可能把离子组学和分子组学从静态研究推进到动态研究水平, 从而将二者与生物体生理变化建立直接联系。因此, 引入非损伤微测技术将形成全新的, 更具有实际生物学意义的动态离子组学和动态分子组学。

参 考 文 献

- [1] Kührtreiber W M, Jaffe L F. *J. Cell Biol.* ,1990 ,110 :1565
- [2] Ammann D. *Ion Selective Micro-electrodes.* New York : Springer-Verlag ,1986
- [3] Kunkel J G, Cordeiro S, Xu Y J. Chapter V in *Plant Electrophysiology-Theory and Methods.* Ed. Volkov A G. Berlin/Heidelberg : Springer-Verlag ,2005. 109—137
- [4] 印莉萍, 上官宇, 许越. *自然科学进展*, 2006 ,16(3) :262 [Yin L P, Shang G Y, Xu Y. *Progress in Natural Science* , 2006 ,16(3) :262(in Chinese)]
- [5] 朱俊英, 高荣孚, 许越. *植物生理和分子生物学报*, 已接收 [Zhu J Y, Gao R F, Xu Y. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 2007(Accepted)(in Chinese)]
- [6] Xu Y, Sun T, Yin L P. *Journal of Integ Rative Plant Biology* , 2006 ,48(7) 823
- [7] Kochian L V, Shaff J E, Kührtreiber W M *et al.* *Planta* ,1992 , 188 :601

- [8] Kunkel J , Lin L Y , Xu Y *et al.* In : al. AGe Ed. Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth. Amsterdam : IOS Press 2001. 81—94
- [9] Cardenas L , Feijo J A , Kunkel J G *et al.* Plant J ,1999 ,19 : 347
- [10] Messerli M A , Smith P J S , Lewis R C *et al.* Plant J ,2004 , 40 :799
- [11] Xu Y , Kunkel J G , Brewer S *et al.* MageFlux : A Web-Interfaced 3D Plotting System to Facilitate Bio-currents Data Conversion and Visualization(submitted)
- [12] Degenhardt J , Larsen P B , Howell S H *et al.* Plant Physiology ,1998 ,117 :19
- [13] Huang J W W , Shaff J E , Grunes D L *et al.* Plant Physiology , 1992 ,98 :230
- [14] Feijo J A , Sainhas J , Hackett G R *et al.* Journal of Cell Biology ,1999 ,144 :483
- [15] Felle H H , Hepler P K. Plant Physiology ,1997 ,114 :39
- [16] Holdaway-Clarke T L , Hackett G A , Kunkel J G *et al.* J. General Physiology ,1998 ,112 :35A
- [17] Holdaway-Clarke T L , Feijo J A , Hackett G R *et al.* Plant Cell ,1997 9 :1999
- [18] Miller D D , Callahan D A , Gross D J *et al.* Journal of Cell Science ,1992 ,101 :7
- [19] Messerli M A , Robinson K R. Plant J. ,1998 ,16 :87
- [20] Xu Y. Introduction of the SIET. Raleigh , NC , Younger USA , Company. <http://youngerusa.com/NY/Chinese/basic/04sanyatalk.php>. [2004-06-06]
- [21] Shabala S. Plant , Cell and Environment 2000 23 :825
- [22] Pelc R , Smith P J S , Ashley C C. J. Physiol. , 1996 4979 : 419
- [23] Pelc R , Smith P J S Ashley C C. EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting 2004
- [24] Devlin C L. Biol. Bull. 2001 200 :344
- [25] Devlin C L , William A , Shawn A *et al.* Invertebrate Neuroscience 2003 5 :9
- [26] Devlin C L , Amole W , Anderson S *et al.* Society for Experimental Biology Annual Meeting 2003
- [27] Godell C M , Smyers M E , Eddleman C S *et al.* PNAS ,1997 , 94 :4751
- [28] Eddleman C S , Ballinger M L , Smyers M E *et al.* PNAS , 1997 94 :4745
- [29] Magoski N S , Knox R J , Kaczmarek L K. J. Physiol. (Lond) 2000 522 :271
- [30] Knox R J , Jonas E A , Kao L S *et al.* J. Physiol. (Lond) , 1996 494 :627
- [31] Molina A J A , Verzi M P , Birnbaum A D *et al.* J. Physiol. (Lond) 2004 560 :639
- [32] Trimarchi J R , Liu L , Porterfield D M *et al.* Biol. Reprod. , 2000 62 :1866
- [33] Shanta M , Kumar D , Porterfield M *et al.* J. Neurosci. 2001 , 21(1) 215
- [34] Catherine T T , Katherine H *et al.* Biol. Bull. ,1998 ,195 :201
- [35] Porterfield D M , Corkey R F , Sanger R H *et al.* DIABETES , 2000 49 :1511
- [36] Vincent P , Chua M , Nogue F *et al.* J. Cell Biol. 2005 ,168 : 801
- [37] 许越 , 邱泽生. 植物生理学通讯 ,1993 29 :169[Xu Y , Qiu Z S. Plant Physiology Communications ,1993 29 :169(in Chinese)]
- [38] 曹忠升 , 康华光 , 邹寿彬等. 生物化学与生物物理进展 , 1992 ,19 :14[Cao Z S , Kang H G , Zou S B *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics ,1992 ,19 :14(in Chinese)]
- [39] 丁亚男 , 李江 , 杨开英等. 生物医学工程学杂志 (已接收) [Ding Y N , Lin J , Yang K Y *et al.* Journal of Biomedical Engineering. (Accepted)(in Chinese)]

封面说明

北京正负电子对撞机(BEPC)于 1988 建成后 ,成为 τ - 粲能区国际领先的对撞机 ,在 1.89GeV 的亮度为 $1.2 \times 10^{31} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$,取得了诸如 τ 轻子质量精确测量、R 值测量和新粒子 $X(1835)$ 的发现等举世瞩目的物理成果。为了争夺在 τ - 粲能区的物理成果 ,美国康奈尔大学于 2000 年提出了 CESRc/CLEOc 的计划 ,把束流能量从原来的 5.6GeV 降低到 1.55—2.5GeV ,在 1.89GeV 时的亮度达到 $6 \times 10^{31} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$,超过了 BEPC。

面对 CESRc/CLEOc 的挑战 ,中国科学院调整了 BEPC 重大改造项目(BEPCII)的方案。科学家决定采用双环方案 ,即在 BEPC 隧道里安装两个储存环 ,正负电子在各自的环里运动 ,只在碰撞区交叉对撞 ,其设计亮度比现有的 BEPC 高两个数量级 ,达到 $1 \times 10^{33} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$,为 CESRc 的 3—7 倍。BEPCII 作为同步辐射光源的性能也将大幅度提高。

目前 BEPCII 设备的制造和安装已基本完成 ,同步辐射环经过调试已向用户开放 ,正在进行对撞束流调试 ,整个工程计划在 2008 年完成。BEPCII 建成后 ,有望在相当长的时间里保持在 τ - 粲能区的国际领先地位 ,做出一批原创性的物理成果。

(中国科学院高能物理所 张闯)