

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*

印莉萍¹ 上官宇² 许越^{2*}

1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 2. Younger USA Company, P. O. Box 37106, Raleigh, NC 27627 USA

摘要 各种分子和离子进出细胞的过程对于维持植物体自身的活性至关重要。非损伤性扫描离子选择电极技术(scanning ion-selective electrode technique, SIET)在不接触被测生物样品, 即在保持被测生物样品完整和近乎实际生理环境的状态下, 获得进出样品的各种分子和离子的信息。该技术不仅能够测量离子及分子静止状态下的绝对浓度, 而且还可以测量它们进出生物样品的运动速率及运动方向。SIET可以围绕被测的单个或多个细胞、组织甚至器官进行灵活、方便而准确的立体测量并获得被测物体周围的离子或分子的三维立体数据。目前, SIET不但可以分别测量 H^+ , Ca^{2+} , K^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , 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, 为获得生物样品内外分子或离子运动的有关信息提供了良好的实验平台。

关键词 非损伤性电生理技术 离子选择性电极 离子跨膜转运 SIET

对于跨膜的离子分子、活性和转运机制的研究始终是植物分子生物学研究的一个重要方面。特别是在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转载体, 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。非损伤性扫描离子选择电极技术(scanning ion-selective electrode technique, SIET)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。

SIET技术的核心是离子和分子选择性微电极(以下简称为离子电极)(图1), 是由Kühtreiber和Jaffe^[1]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。在计算机控制、信号放大和三维测量方面做了较大的改进^[2]。由于SIET能够以非

损伤的方式测量到进出生物材料的离子以及分子的运动速率, 并随着离子/分子电极种类的不断增多以及电子线路技术和计算机硬件软件的逐步完善, SIET逐渐被应用到基础生物学、生理学、神经生物学、空间生物学、临床医学、基础医学、病理学、毒理学、营养分子生理学、农林学及药物机理研究等领域^[3,4]。

尽管人们通过膜电压的测量, 如膜片钳技术^[5,6]及与显微技术相结合的荧光染料技术获得了一些有关离子分布和运动的情况, 但是, SIET技术作为对上述几项技术的重要补充, 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转运系统的功能提供了非常有利的工具。在这篇综述里, 我们将介绍SIET的基本原理、方法及其在高等植物细胞研究中的应用。

2005-08-05 收稿, 2005-10-20 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30170552), 北京市自然科学基金(批准号: 5042004)和北京市教委科技发展项目(批准号: KM200410028015)资助

** 通讯作者, E-mail: jeff@youngerusa.com

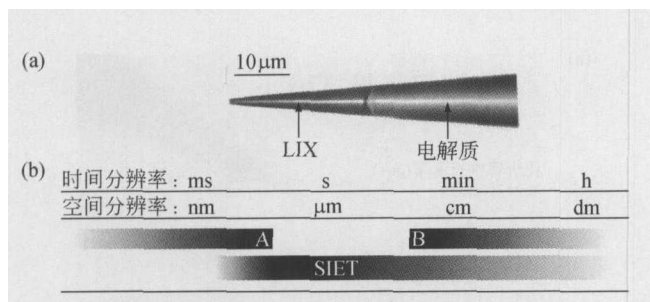


图1 离子选择性电极和 SIET 的时间和空间分辨率分布
 (a) Ca^{2+} 微电极的显微照片, 由液体离子交换剂(LIX)和电解质组成; (b) 图中 A 表示通过染料标记或膜片钳等局部研究方法的时空分辨率; B 表示整体组织研究过程中通过较慢的化学痕量方法的时空分辨率; 而 SIET 作为一个开放式的实验平台, 较好地填补了较慢的化学痕量方法与较快的染料标记或膜片钳等方法两者之间的技术空白

1 SIET 原理

1.1 物理学及数学基础

物质在液体环境中存在从高浓度到低浓度扩散的趋势。对于带电粒子而言, 还有从高电化学电势到低的电化学电势运动的趋势。如果, 离子电极的移动距离 dx 在几十微米以下, 生物材料实验证明, 影响带电粒子运动的电化学电势的梯度可以忽略不计, 那么, 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^[7](图 2)。

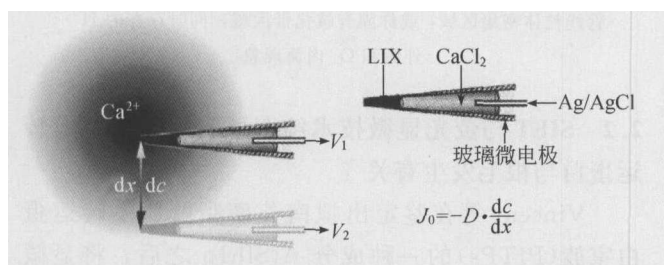


图2 以 Ca^{2+} 浓度梯度和 Ca^{2+} 微电极为例说明 SIET 的物理学及数学原理

离子选择性电极由玻璃微电极、Ag/AgCl 导线、电解质(100 mmol/L CaCl_2)及液态离子交换剂(LIX) 4 部分组成。该电极在待测离子浓度梯度中以已知距离 dx 进行两点测量, 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

($\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 将它们代入 Fick 的第一扩散定律公式: $J_0 = -D \cdot dc/dx$, 可获得该离子的移动速率($\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。

液态离子交换剂是基于大型中性分子载体的一类有机化合物。目前可以购买得到一些常见的 LIX。有些研究人员根据自己的需要还自行开发特殊的 LIX, 其他的种类还在不断的开发中。

1.2 计算机技术及系统集成

SIET 的诞生、发展与完善与计算机技术的不断进步是密不可分的^[2,8]。尽管计算机需要同时控制三维运动系统、显微成像系统和信号放大系统 3 个子系统, 但由于离子选择电极相对较低的时间分辨率要求, 使得普通的个人计算机也可以完全胜任。这为 SIET 的普及和发展提供了很好的基础。

1.3 SIET 的缓冲溶液

在使用 SIET 技术过程中, 通常要在溶液中加入一些缓冲剂, 如 MES, Tris 或 EDTA 等, 用以稳定被测离子以便离子选择电极进行测量^[9-12]。然而, 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 SIET 的应用效果。Kunkel 等通过系统的比较试验, 寻找了一些最适合于 SIET 技术的溶液 pH 缓冲剂及其使用方法, 并以实际生物材料的研究证明通过使用这些方法可以将 SIET 测知离子流动速率的能力达到最大化^[13]。因此, 在 SIET 实验设计过程中, 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液态离子交换剂(LIX)有无严重干扰。

1.4 SIET 测量的空间几何构型

现有的 1—2 μm 直径的离子电极, 在电极距被测材料 2—20 μm 及 dx 在 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 3 类: 点、平面及球体。在离子电极距被测材料小于 5 μm 时, 通常认为离子以平面方式运动。

值得一提的是, SIET 是目前世界上惟一能够按照研究人员的设定, 以手动或编程的方式, 从任

意角度(相对于被测物体表面)用离子选择电极对被测样品进行测量的系统. 利用 SIET 灵活的空间测量方式的经典的例子是对植物花粉管生长过程中, 尖端 Ca^{2+} 内流的研究^[13]. Kunkel 等发现花粉管的生长与 Ca^{2+} 内流密切相关, 只有在花粉管尖端迅速生长的部位才能检测到 Ca^{2+} 内流速度. 已经伸长成熟的花粉管, 几乎检测不到 Ca^{2+} 内流速率. 人们不但能够测量出 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+} 进入细胞的区域^[14].

2 SIET 的应用

SIET 诞生和发展是在植物学研究中实现的. 这可能与植物细胞外的细胞壁对膜片钳技术来讲操作较为困难有关. 而利用 SIET 特有的非损伤性特点, 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或分子的转运情况. 正是意识到 SIET 的这一优势, Kochian 等在原有的 Ca^{2+} 选择微电极的基础上, 又相继开发出了 H^+ , K^+ , Al^{3+} 和 Cd^{2+} 离子选择性电极, 将其应用于玉米根和植物毒理学研究, 并为这些电极在动物研究中的应用开辟了道路^[15-17]. 随后, SIET 技术被应用于整体根、根毛及花粉管的研究, 并阐明了诸如钙离子转运与样品内部活动及生长的相关性^[14,18-24]. Messerli 等应用 SIET 技术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^[25].

2.1 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有一个碱化带, 之后他们提出该碱化带可能是由于区域的线粒体的密集存在所致^[23]. 许越等^[6]应用 SIET 特有的双电极同时测量功能, 发现 H^+ 离子的外流和 O_2 分子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 分子的内流, 伴随 H^+ 离子的外流是形成能量的主要驱动力. 也正是由于 H^+ 离子的外流造成了花粉管前端局部的碱化带, 从而证明 Hepler 等的假说是正确的(图 3).

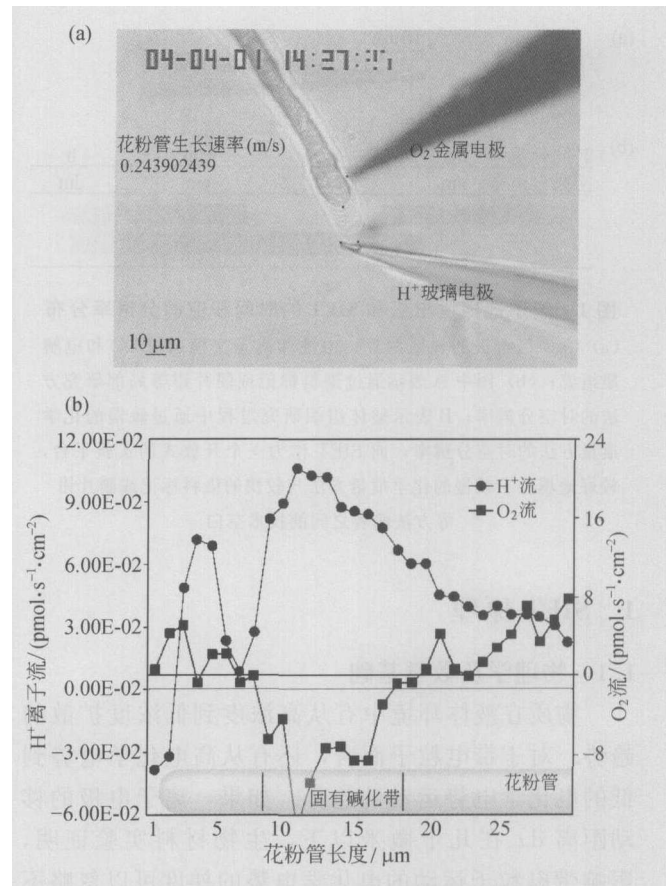


图 3 H^+ 和 O_2 流动速率的同时测量

(a) 显微照片显示金属氧电极与玻璃 H^+ 电极同时测量百合花粉管生长过程中 H^+ 和 O_2 分子进出的变化; (b) 在花粉管线粒体密集区域, 或称固有碱化带区域, 同时存在的 H^+ 外流和 O_2 内流现象

2.2 SIET 与荧光显微技术结合证明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 SIET 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. 在植物细胞的极性生长机理研究方面向前推进了一步.

拟南芥缺失根毛突变体(*AtSfh1p*)不仅在根毛形态上有变化, 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^[26]. 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 SIET 可测得外部 Ca^{2+} 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^[26].

2.3 多离子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理, 通过对重力非敏感的拟南芥突变体的研究, 许越等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 4)^[6].

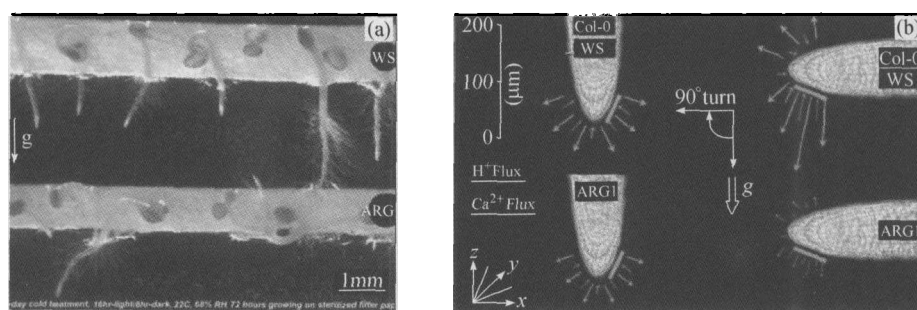


图 4 利用 SIET 对重力非敏感植物突变体 Ca^{2+} 及 H^+ 变化的同时测量

(a) 拟南芥突变体(ARG)及其野生型拟南芥(WS);

(b) ARG 在重力变化刺激下的 Ca^{2+} 及 H^+ 变化与野生型对照有明显的区别

3 总结及展望

经过多年的改进, SIET 数据的生成、采集以及校准等方面不断得到完善. 特别是应用 SIET 强大的三维立体测量方式, 研究人员可以获得其他电生理技术无法测到的被测样品某些点的特异活性^[8,27-29]. SIET 是一个与膜片钳^[30]无论在时间分辨率还是在空间分辨率上都不相同的技术, 但两者在应用过程中可以极好地相互补充. 由于 SIET 技术的出现, 人们对于生物体特异离子转运系统的研究, 在灵敏度上, 时间和空间分辨率上已经被大大地提高了, 并已成功地与细胞和分子生物学技术、其他电生理技术和显微荧光成像技术配合使用. SIET 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.

分子生物学的进展使得我们能够对质膜转运载体分子加以确定、克隆和进行可控制的表达. 当这些转运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阐明之后, SIET 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.

致谢 感谢匡廷云院士在身患重病的情况下对 SIET 技术的关心与支持. 同时感谢美国 Duke 大学裴真明教授所作的有益的讨论.

参 考 文 献

- 1 Kuhlreiter W M, Jaffe L F. Detection of extracellular calcium gradients with a calcium specific vibrating electrode. *J Cell Biol*, 1990, 110(5): 1565—1573
- 2 Shipley A M, Feijo J A. The use of the vibrating probe technique to study steady extracellular currents during pollen germination and tube growth. In: *Fertilization in Higher Plants—Molecular and Cytological Aspects*. Berlin: Springer-Verlag, 1999, 17: 235—252
- 3 Porterfield D M, Laskin J D, Jung S K, et al. Proteins and lipids define the diffusional field of nitric oxide. Measurement of nitric oxide fluxes from macrophages using a self-referencing electrode. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(4): L904—912
- 4 Smith P J S, Trimarchi J R. Noninvasive measurement of hydrogen and potassium ion flux from single cells and epithelial struc-

- tures. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280: C1-C11. 10
- 5 Cao Z S, Kang H G, Zou S B, et al. Application of patch-clamp technique into the study of cell secretion. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1992, 19(1): 14—18
 - 6 Xu Y. Introduction of the SIET. Raleigh, NC, Younger USA, Company. http://youngerusa.com/NY/Chinese/basics/04sanya_talk.php. [2004-06-06]
 - 7 Schiefelbein J W, Shipley A M, Rowse P, et al. Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 1992, 187: 455—459
 - 8 Richardson D C, Richardson J S. Teaching molecular 3-D literacy. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2002, 30: 21—26
 - 9 Pfanz H, Heber U. Buffer capacities of leaves, leaf cells, and leaf cell organelles in relation to fluxes of potentially acidic gases. *Plant Physiology*, 1986, 81: 597—602
 - 10 Pierson E S, Miller D D, Callaham D A, et al. Pollen-tube growth is coupled to the extracellular calcium-ion flux and the intracellular calcium gradient-effect of bapta-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell*, 1994, 6(12): 1815—1828
 - 11 Arif I, Newman I A, Keenlyside N. Proton flux measurements from tissues in buffered solution. *Plant, Cell and Environment*, 1995, 18: 1319—1324
 - 12 Demarest J R, Morgan J L M. Effect of pH buffers on proton secretion from gastric oxyntic cells measured with vibrating ion-selective microelectrodes. *Biological Bulletin*, 1995, 189: 219—220
 - 13 Kunkel J G, Lin L Y, Heper P K, et al. The strategic use of good buffers to measure proton gradients about growing pollen tubes. *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. Amherst: IOS Press, 2001, 81—94
 - 14 Cardenas L, Feijo J A, Kunkel J G, et al. Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J*, 1999, 19(3): 347—352
 - 15 Huang J W W, Shaff J E, Grunes D L, et al. Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology*, 1992, 98(1): 230—237
 - 16 Kochian L V, Shaff J E, Kuhlreiber W M, et al. Use of an extracellular, ion-selective, vibrating microelectrode system for the quantification of K^+ , H^+ , and Ca^{2+} fluxes in maize roots and maize suspension cells. *Planta*, 1992, 188(4): 601—610
 - 17 Degenhardt J, Larsen P B, Howell S H, et al. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiology*, 1998, 117(1): 19—27
 - 18 Miller D D, Callaham D A, Grass D J, et al. Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of liliium. *Journal of Cell Science*, 1992, 101: 7—12
 - 19 Felle H H, Hepler P K. The cytosolic Ca^{2+} concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca^{2+} -selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiology*, 1997, 114(1): 39—45
 - 20 Holdaway-Clarke T, Feijo J A, Hackett G A, et al. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell*, 1997, 9(11): 1999—2010.
 - 21 Holdaway-Clarke T, Hackett G A, Feijo J A, et al. Oscillations of cell expansion rate, cytoplasmic calcium, and calcium influx in the pollen tube. *J General Physiology*, 1998, 112(1): 35A—35A
 - 22 Shabala S N, Newman I A, Morris J. Oscillations in H^+ and Ca^{2+} ion fluxes around the elongation region of corn roots and effects of external pH. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 111—118
 - 23 Feijo J A, Sainhas J, Hackett G R, et al. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *Journal of Cell Biology*, 1999, 144(3): 483—496
 - 24 Newman I A. Ion transport in roots: Measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant Cell Environ*, 2001, 24(1): 1—14
 - 25 Messerli M A, Robinson K R. Cytoplasmic acidification and current influx follow growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Plant J*, 1998, 16(1): 87—91
 - 26 Vincent P, Chua M, Xu Y, et al. A *Sec14p*-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *J Cell Biol*, 2005, 168(5): 801—812
 - 27 Xu Y. How does the SIET works? Raleigh, NC, Younger USA, Company. <http://www.youngerusa.com/movies/SIET>. [2004—06—06]
 - 28 Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, 406(6797): 731—734
 - 29 He Y, Tang R H, Hao Y, et al. Nitric oxide represses the *arabidopsis* floral transition. *Science*, 2004, 305(5692): 1968—1971
 - 30 Xu Y, Qiu Z. Patch-clamp technique and its applications to and prospects for the studies of higher plant cells. *Plant Physiology Communications*, 1993, 29(3): 169—174