

双阻 NH_4^+ 选择性微电极测定水稻 叶片细胞中 NH_4^+ 的活度

尹晓明, 范晓荣, 沈其荣*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省固体有机废弃物资源化利用高新技术研究重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 本文介绍了双阻 NH_4^+ 选择性微电极的制作方法、工作原理及操作方法。微电极电位响应值与溶液中 NH_4^+ 的活度呈对数曲线的关系, NH_4^+ 选择性微电极与其他类型的电极(如 H^+ 、 NO_3^-) 最大区别是 K^+ 的干扰, 在含有 72 mmol/L K^+ 的标定溶液中, 电极标定曲线的斜率为 48~58 mV, 对 NH_4^+ 的检出限小于 10^{-4} mol/L, 说明电极对 NH_4^+ 有较高的选择性, 受 K^+ 的影响较小, 可以用来测定。用以测定 2.5 mmol/L NH_4^+ 培养 2 周的水稻叶片, 结果表明, 叶片细胞中 NH_4^+ 活度分布在高低不同的两个区间内, 分别代表了细胞质和液泡中的测定, 水稻叶片细胞质和液泡 NH_4^+ 的活度分别为 2.58~9.30 mmol/L 和 11.36~25.20 mmol/L。水稻叶片组织中的 NH_4^+ 主要来自液泡, 流动分析仪测定的水稻叶片组织的 NH_4^+ 浓度为 11.12 mmol/L。 NH_4^+ 选择性微电极为研究水稻对 NH_4^+ 的吸收利用提供了技术支撑。

关键词: 双阻 NH_4^+ 选择性微电极; 水稻叶片; 细胞; NH_4^+

中图分类号: Q-31 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2009)03-0701-06

Measurement of NH_4^+ activity in leaf cells of rice using double-barreled NH_4^+ selective microelectrodes

YIN Xiao-ming, FAN Xiao-rong, SHEN Qi-rong*

(College of Resources and Environmental Science/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Organic Solid Waste Utilization,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This paper reported the manufacture method, working principle and operating method of double-barreled NH_4^+ selective microelectrode. An apparent difference of NH_4^+ selective microelectrode from other microelectrodes (such as H^+ and NO_3^- microelectrode) is the interference of K^+ . These microelectrodes showed a typical log linear response to NH_4^+ from 0.01–100 mmol/L in the presence of 72 mmol/L K^+ , with a slope of 48~58 mV. The detect limit was below 10^{-3} mmol/L. The results showed that the microelectrode was more sensitive and selective to NH_4^+ and could be used on the NH_4^+ measurement. Intracellular measurement of NH_4^+ activity in leaf cells of rice using the double-barreled NH_4^+ selective microelectrode showed that NH_4^+ activity fell into two main populations, one was in the cytoplasm with the NH_4^+ concentrations of 2.58–9.37 mmol/L and the other one was in the vacuole with the NH_4^+ concentrations of 11.36–25.20 mmol/L. Tissue NH_4^+ of rice leaf mainly comes from that of the vacuole. Tissue NH_4^+ concentrations of rice leaf using a continuous-flow auto analyzer were 11.12 mmol/L. NH_4^+ selective microelectrode offered technical support for the study of the assimilation and utilization of NH_4^+ in rice.

Key words: double-barreled NH_4^+ -selective microelectrodes; rice leaf; cell; NH_4^+

收稿日期: 2008-04-08 接受日期: 2008-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671234, 30771290)资助。

作者简介: 尹晓明(1970—), 女, 安徽阜阳人, 硕士, 讲师, 主要从事植物营养生理方面的研究。* 通讯作者 E-mail: shenqirong@njau.edu.cn

离子选择性微电极是一种在活体条件下,连续和瞬时地测定单个细胞内离子活度的技术方法,还可以测到一个细胞内不同细胞器内离子的活度,如液泡和细胞质。因此,离子选择性微电极不仅应用在生物医学和电化学的研究领域,在植物电生理的研究中更是得到了广泛的应用^[1-2]。

NH_4^+ 是水稻可利用的重要氮源之一,研究水稻对 NH_4^+ 的吸收常用的方法有吸收动力学方法、同位素标记法、核磁共振法等。Wang 等^[3]用¹³N 研究了水稻根对 NH_4^+ 的吸收,结果表明,当外界 $\text{NH}_4^+ < 1 \text{ mmol/L}$ 时, NH_4^+ 的内流借助于高亲和系统(HATS);当 NH_4^+ 浓度在 $1 \sim 40 \text{ mmol/L}$, NH_4^+ 的内流借助于低亲和系统(LATS)。

近年来, Wells 等^[4]首次用 NH_4^+ 电极测定了 1 mmol/L 培养的轮藻细胞内 NH_4^+ 的浓度在 $7 \sim 30 \text{ mmol/L}$, 但对水稻来说,人们对 NH_4^+ 在细胞亚水平上的分布还缺乏深入的了解。本研究采用双阻离子选择电极同时测定水稻吸收 NH_4^+ 的跨膜电位和细胞内 NH_4^+ 活度,旨在为阐明水稻吸收利用 NH_4^+ 的生理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验选取的水稻品种为粳稻(武育粳3号)。水稻种子经 $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 消毒 30 min , 蒸馏水洗净后放入培养箱($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 出芽后转入光照培养箱, 然后在蒸

馏水中生长 $5 \sim 6 \text{ d}$, 随后转移到含 2 mmol/L NH_4^+ 的营养液(国际水稻所常规营养液)中生长 2 周, 营养液每天更换 2 次。

1.2 电极制作

采用 PE-21 型微电极控制仪, 通过设置加热温度(Heater)、亚磁力(Sub magnet)、磁力(Main magnet)和旋转时间使双管玻璃管控制成理想的微电极。

1.2.1 双阻 NH_4^+ 选择性电极的制备 制备过程参见文献[5]。制备结束后, 将已配制好的 NH_4^+ 敏感剂(NH_4^+ sensor)(表1)灌入双阻玻璃微管的粗管中, 放入硅胶干燥的密闭容器中保存 48 h 以上以使多余的四氢呋喃蒸发。

表1 NH_4^+ 离子敏感剂的组成

Table 1 The composition of NH_4^+ sensor

试剂名称 Chemical name	用量(g) Weigh
氨离子载体 Nonactin(ammonium ionophore)	0.010
4-氯苯基硼酸钾 Potassium tetrakis borate	0.001
二丁基葵二酸 Dibutyl sebacate	0.089

1.2.2 标定 在使用双阻离子选择性微电极之前应该进行标定以确保 NH_4^+ 敏感剂对 NH_4^+ 的敏感性。 NH_4^+ 电极与 NO_3^- 电极不同之处就是要减小 K^+ 的干扰。一般来说, 正常生长的植物细胞内的 K^+ 浓度约为 72 mmol/L , 因此标定溶液中 K^+ 浓度设为 72 mmol/L ^[4]。标定溶液的配制见表2。

表2 NH_4^+ 离子标定液的组成

Table 2 Composition of solution used for calibration of NH_4^+ selective microelectrodes (for 150 mL containers)

NH_4^+ 活度 NH_4^+ activity (mmol/L)	$-\log_{10}(a_{\text{NH}_4^+})$ (mmol/L)	HEPES (100 mmol/L)	NH_4Cl (122 mmol/L)	K_2HPO_4 (1 mol/L)
100	1	7.5 mL	19.5 mL 1 mmol/L NH_4Cl	含 72 mmol/L K^+ pH 6.0
10	2	7.5 mL	15 mL	含 72 mmol/L K^+ pH 6.0
1	3	7.5 mL	1.5 mL	含 72 mmol/L K^+ pH 6.0
0.1	4	7.5 mL	0.15 mL	含 72 mmol/L K^+ pH 6.0
0.01	5	7.5 mL	0.015 mL	含 72 mmol/L K^+ pH 6.0

用经计算机软件计算得到的三个参数(P_1 、 P_2 、 P_3)来表示电极对 NH_4^+ 的专一选择性。 P_1 为微电极参比电位; P_2 为电位差对 $-\log_{10}(a_{\text{NH}_4^+})$ 作图所得曲线的斜率, 即标定溶液中 NH_4^+ 离子活度每改变一个数量级, 所产生的电位的差值; P_3 为选择性离子电极的检出限浓度。标定的电极其 P_2 应在 $48 \sim 58 \text{ mV}$ 之间, $P_3 < 1.0 \times 10^{-4} \text{ mmol/L}$, 说明电极对 NH_4^+

有比较高的选择通透性。同时还应配制不含 K^+ 的标定溶液, 电极在含 K^+ 和不含 K^+ 的标定溶液如有相近的标定曲线, 说明 K^+ 对电极的干扰较小, 可以用于测定。标定曲线如图1所示。在测定之后, 还应该对微电极进行标定, 以证实微电极敏感性和完好性。测定前后所计算得到相近的 P_1 、 P_2 、 P_3 才作为可靠的数据保留。

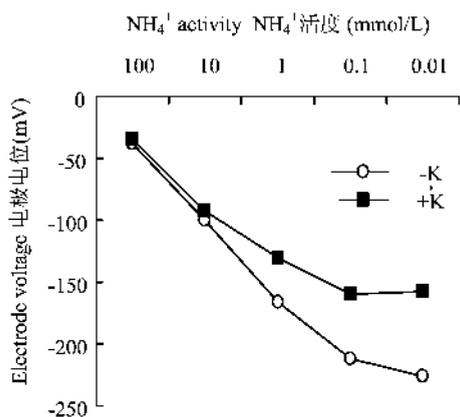


图 1 NH_4^+ 选择电极的标定曲线

Fig.1 Calibration curve of a NH_4^+ -selective microelectrode

[图中显示了 72 mmol/L K^+ 对标定曲线的影响。The figure show the effect of 72 mmol/L K^+ on the calibration curve]

1.2.3 测定 其原理为细胞膜电位($\Delta\psi_m$)的产生主要是来自细胞膜上的 ATP-ase 的工作以及来自细胞膜对不同阴、阳离子(如 K^+)的通透性不同而产生的电位差,这种电位差具有细胞内为负、细胞外为正的。当双阻离子选择性微电极插入细胞后,由于微电极中所灌溶液的离子浓度和插入位点细胞中离子的浓度间存在着浓度梯度,因此,会产生离子及其所带电荷的移动,所产生的电流通过信号放大仪的放大并转化成电压输出到计算机,就可以实时地检测到细胞膜电位的变化。

当充灌 NH_4^+ (或 H^+ 、 NO_3^- 等)敏感膜的微电极插入细胞后,由于细胞中待测离子如 NH_4^+ 的浓度和微电极中所充灌溶液中的 NH_4^+ (或 H^+ 、 NO_3^- 等)的浓度间存在着浓度梯度;并且 NH_4^+ 敏感剂对 NH_4^+ 有专一的选择通透性,理论上只会允许细胞内的 NH_4^+ 专一性地穿过电极的敏感膜,因此在原来细胞膜电位的基础上加上了由于 NH_4^+ 移动产生的膜电位,得到 $\Delta\psi_n$ 。因此,单一的由于 NH_4^+ 跨膜所产生的膜电位($\Delta\psi_{\text{NH}_4^+}$)应该是 $\Delta\psi_n$ 减去细胞膜本身的电位($\Delta\psi_m$)。由于所得到的 $\Delta\psi_{\text{NH}_4^+}$ 和 NH_4^+ 的活度($a_{\text{NH}_4^+}$)间存在着对数曲线的关系,离子的活度($a_{\text{NH}_4^+}$)可以通过修正后的能斯特方程 $E(\Delta\psi_n - \Delta\psi_m) = P_1 + P_2 \times [(\log(a_{\text{NH}_4^+)}) + P_3^2]$ 计算得出,因为标定电极的三个参数 P_1 、 P_2 、 P_3 可以计算得出,而 E 可以测定出来。植物叶片进行细胞内纪录的主要障碍是叶片的稳定固定,可将水稻叶片固定于一斜面上,在测定时与微电极呈约 80° 夹角。由于植物叶片较薄,针尖过硬很容易会穿透叶片,且水稻等作物的叶片表面存在着硅质层,不利于微电极的插入。因此,可以通过设定不同的制作参数,调节拉针仪工作条件 Heater、Main Magnet 和 Sub Magnet,使针尖够细且有一定的硬度,使其可以插入细胞内纪录而不至于破坏叶片细胞乃至整个叶片。用电极测定叶片膜电位、离子活度的操作方法见图 2。

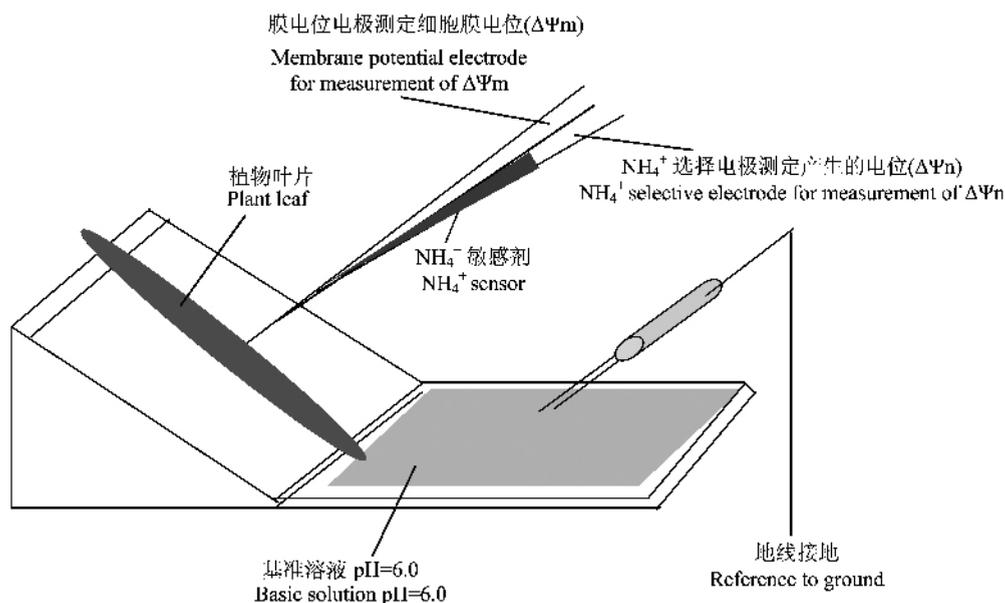


图 2 双阻离子选择微电极结构以及测定植物叶片细胞离子活度的示意图

Fig.2 The construction of double barreled selective-microelectrode and sketch of measurement of ion activity in plant leaf cell

1.3 水稻叶片组织水平 NH_4^+ 浓度的分析

称取 0.5 g 的水稻叶片剪碎, 研磨后加入 10 mL 去离子水, 置入沸水浴中 30 min 后取出, 用自来水冷却, 定容至 20 mL, 加入 0.5 g 无磷活性碳脱色, 过滤后取约 4 mL 过滤液用流动分析仪(Auto analyzer3, Bran + Luebble GmbH, Germany)进行测定。

数据用 VISER 软件计算 NH_4^+ 活度的参数 P1、P2、P3, 根据公式 $E = P1 + P2 \times [\log(a_{\text{NH}_4^+})] + P3$ 计算得到 NH_4^+ 活度。实验记录的数据用 Sigmaplot (6.0) 软件作图。

2 结果与分析

2.1 水稻叶片的细胞膜电位和 NH_4^+ 活度

由于植物的活细胞 80% 以上的空间为液泡, 而电极插入细胞是随机的, 在测定过程中膜电位的数值变化较大。但是, NH_4^+ 活度基本集中在两个范围(表 3), 两类数据点的膜电位也存在显著差异, 这两类数据点群应分别代表了电极在细胞质和液泡中的

测定。当外界浓度 NH_4^+ 在 1~2 mmol/L 时, 细胞质中的 NH_4^+ 可在 0.01~76 mmol/L^[6], 而液泡液中 NH_4^+ 浓度可达 6~66 mmol/L。图 3 显示了双微电极在细胞内的跟踪记录, 分别测得水稻叶片细胞膜电位 $\Delta\psi_m = -92 \text{ mV}$ (图 3, 上), NH_4^+ 膜电位 $\Delta\psi_n = -102 \text{ mV}$ (图 3, 下)。标定的此电极三个参数分别为 $P1 = 173.5$ 、 $P2 = 62.88$ 、 $P3 = -2.952 \times 10^{-7}$, 根据公式 $E = P1 + P2 \times [\log(a_{\text{NH}_4^+})] + P3$ 计算得到 NH_4^+ 活度 = 2.58 mmol/L。根据细胞膜电位和计算值, 判断这是细胞质内的测定。微电极在细胞内的整个记录保持了 6 min。

表 3 水稻叶片细胞膜电位和 NH_4^+ 活度

Table 3 Membrane potential and NH_4^+ activity of rice leaf

膜电位 Membrane potential (mV)	NH_4^+ 活度 NH_4^+ activity (mmol/L)
-40 ~ -45 (n=6)	11.36 ~ 25.2 (液泡 Vacuole)
-59 ~ -146 (n=6)	2.58 ~ 9.37 (细胞质 Cytoplasm)

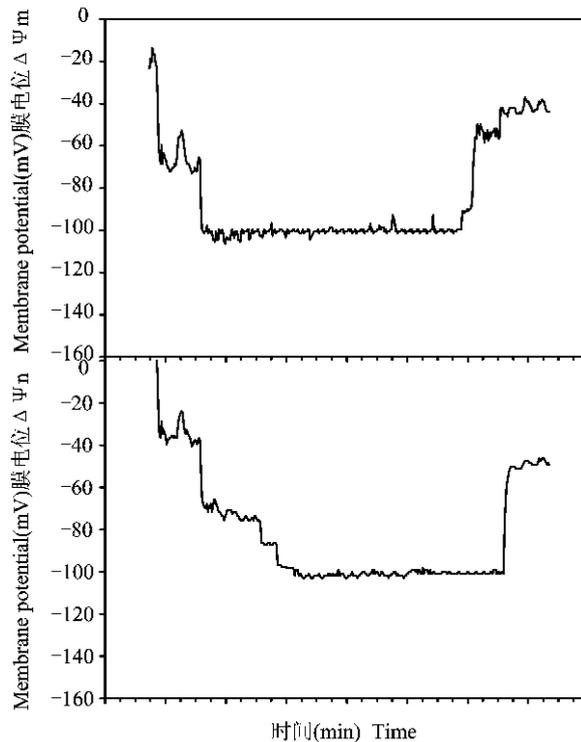


图 3 NH_4^+ 选择双电极测定水稻叶片 NH_4^+ 活度示意图

Fig.3 Measurement of NH_4^+ activity in leaves of rice with double-barreled NH_4^+ microelectrode

{水稻预先用含有 2.5 mmol/L NH_4^+ 的营养液培养 48 h。图中显示微电极在细胞内的记录保持了 6 min, 测得叶片膜电位 $\Delta\psi_m = -92 \text{ mV}$ (上图), NH_4^+ 膜电位 $\Delta\psi_n = -102 \text{ mV}$ (下图)。根据公式 $E = P1 + P2 \times [\log(a_{\text{NH}_4^+})] + P3$ 计算得到 NH_4^+ 活度为 2.58 mmol/L。Membrane potential and NH_4^+ activity in the leaf cell of rice growing in 2.5 mmol/L NH_4^+ for 48 h. The recording was maintained for 6 min with membrane potential $\Delta\psi_m = -92 \text{ mV}$ (the up figure), NH_4^+ membrane potential $\Delta\psi_n = -102 \text{ mV}$ (the down figure). Activities of NH_4^+ were 2.58 mmol/L according to $E = P1 + P2 \times [\log(a_{\text{NH}_4^+})] + P3$ }

2.2 水稻叶片组织的 NH_4^+ 浓度

叶片是同化利用 NH_4^+ 的主要部位。本研究用流动分析仪测定的水稻叶片为 11.12 mg/kg , 高于根系 NH_4^+ 含量 5.42 mg/kg (表 4)。据报道, 植物体中的 NH_4^+ 因材料和培养条件的不同而有很大差异。1 mmol/L 培养的轮藻细胞内 NH_4^+ 的浓度在 $7 \sim 30 \text{ mmol/L}$ [7]。2.5 mmol/L NH_4^+ 培养 4 d 的水稻叶片和根系组织水平 NH_4^+ 含量分别在 $150 \sim 250$ 和 $50 \sim 100 \text{ mg/kg}$ [8]。

表 4 水稻叶片和根系组织 NH_4^+ 、 K^+ 浓度

Table 4 NH_4^+ and K^+ concentrations in tissue of leaf and root of rice

水稻组织 Tissue of rice	NH_4^+ 浓度 (mg/kg) NH_4^+ concentration	K^+ 浓度 (mg/kg) K^+ concentration
叶片 Leaf	11.12 ± 0.60	0
根系 Root	5.42 ± 0.96	0.95 ± 0.07

注: 表中数据为 4 次重复的平均值。

Note: Values are the mean of four replicates \pm SE

3 讨论

3.1 影响微电极专一性选择离子的因素

20 世纪 70 年代初, Walker [9] 首次研制出了以液态离子交换剂为敏感膜的 K^+ 、 Cl^- 离子选择性微电极。到 90 年代初期, 离子选择性微电极在植物营养研究领域得到广泛的运用 [10-12]。但是在实际运用过程中有些因素会影响微电极对特定离子的专一性选择, 如电极顶端的外部形状, 特定离子感应剂的组成等。尽管离子选择性微电极对植物材料具有活体动态测定、可瞬时变化检测等优点, 但是在实际测定中受到待测定离子以外的其他离子不同程度的干扰影响, 如 ClO_3^- 对 Cl^- 、 K^+ 对 NH_4^+ 选择性电极的干扰。就 NH_4^+ 选择性电极来说, 主要干扰来自细胞中的 K^+ 。一般情况下, 植物细胞质中 K^+ 的浓度维持在大约 70 mmol/L , 只有严重缺 K^+ 时才会降低, 而液泡中 K^+ 的浓度随培养介质中 K^+ 的浓度不同而改变 [4]。本试验中所用水稻营养液含 K^+ 0.5 mmol/L , 而对水稻样品中的 K^+ 进行测定的结果发现, 水稻根系组织中的 K^+ 为 0.95 mmol/L , 叶片组织中没有检测到 K^+ (表 4)。就电极的专一选择性来说, 所用标定溶液含有 72 mmol/L 的 K^+ , 如果待测溶液含有的 K^+ 不超过 72 mmol/L 并且电极对 NH_4^+ 有较好的选择性, 那么对样品中 NH_4^+ 的测定应该是可信的。

因此, 对 NH_4^+ 选择性电极来说, 如何把 K^+ 的干扰减到最小, 进一步提高电极对 NH_4^+ 的专一选择性是今后应解决的一个问题。

3.2 电极在细胞内的定位

在本研究中用流动分析仪测定的水稻叶片组织 NH_4^+ 的浓度为 11.12 mg/kg , 用 NH_4^+ 选择性电极测定的水稻叶片液泡中 NH_4^+ 的活度在 $11.36 \sim 25.2 \text{ mg/kg}$, 高于组织中的 NH_4^+ 浓度。这是由于流动分析仪测定的是整个叶肉组织 NH_4^+ 浓度的平均值, 而 NH_4^+ 选择性电极测定的是特定细胞内 NH_4^+ 的活度。贾莉君等 [5, 13] 用离子选择性电极 (如 NO_3^-) 对水稻、小白菜等作物 NO_3^- 的含量进行的测定也得到类似的结果。另外, 用双阻离子选择性电极进行细胞内的测定有时难以判断电极在细胞内的定位 (细胞质或液泡) 特别是当培养介质中的离子浓度较低或液泡不积累离子的时候。虽然在双阻离子选择性电极的基础上另外加了 pH 电极组成三阻离子选择微电极可以帮助解决这一问题, 但是三阻电极在制作上和测定上有较大的技术难度, 要广泛地运用它还有许多问题。

本研究介绍了双阻 NH_4^+ 选择性微电极的制作过程、工作原理和测定方法, 以及用这一方法测定水稻叶片细胞中的 NH_4^+ , 这在国内尚属首次。随着人们对微电极的不断开发和改进, 这一技术将为研究作物对氮素的吸收利用提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Miller A J, Smith S J. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells [J]. J. Exp. Bot., 1996, 47: 843-854.
- [2] Zhen R G, Koyro H W, Leigh R A et al. Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate selective microelectrodes and by single cell sap sampling [J]. Planta, 1991, 185: 356-361.
- [3] Wang M Y, Siddiqi M Y, Ruth T J, Glass A D M. Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of $^{15}\text{NH}_4^+$ [J]. Plant Physiol., 1993, 103: 1249-1258.
- [4] Walker D J, Leigh R A, Miller A J. Potassium homeostasis in vacuolated plant cells [J]. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1996, 93: 10510-10514.
- [5] 贾莉君, 范晓荣, 尹晓明, 等. 双阻离子选择性微电极测定活体不结球小白菜叶片细胞中硝酸根离子的活度 [J]. 土壤学报, 2005, 42(3): 457-462.
- [6] Jia L J, Fan X R, Yin X M et al. Measurement of nitrate activity in leaf cells of Chinese cabbage *in vivo* using double-barreled nitrate selective microelectrodes [J]. Acta Pedol. Sin., 2005, 42(3): 457-462.

- [6] Kronzucker H J , Siddiqi M Y , Glass A D M . Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce[J]. *Planta* , 1995 , 196 : 691-698 .
- [7] Wells D M , Miller A J . Intracellular measurement of ammonium in *Chara corallina* using ion-selective microelectrodes[J]. *Plant Soil* , 2000 , 221 : 103-106 .
- [8] Li B Z , Xin W J , Sun S B , Xu G H . Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources[J]. *Plant Soil* , 2006 , 287 : 145-159 .
- [9] 马逸龙 . 离子选择性微电极及其在生物医学中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展* , 1991 , 18(4) : 200-203 .
- Ma Y L . Ion selective microelectrode and its application in biomedical science[J]. *Proc. Biochem. Biophys.* , 1991 , 18(4) : 200-203 .
- [10] McClure P R , Kochian L V , Spanswick R M . Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots[J]. *Plant Physiol.* , 1990 , 93 : 281-289 .
- [11] Glass A D M , Jon E S , Leon V K . Studies of the uptake of nitrate in barley[J]. *Plant Physiol.* , 1992 , 99 : 456-463 .
- [12] Wang M Y , Glass A D M , Shaff J E *et al.* . Ammonium uptake by rice roots[J]. *Plant Physiol.* , 1994 , 104 : 899-906 .
- [13] 贾莉君 , 范晓荣 , 尹晓明 , 等 . 微电极法测定水稻叶片液泡中硝酸根离子的再调动[J]. *中国农业科学* , 2005 , 38(6) : 1379-1385 .
- Jia L J , Fan X R , Yin X M *et al.* . Remobilization of nitrate in rice leaf vacuoles measured with double-barrelled nitrate-selective microelectrodes[J]. *Sci. Agric. Sin.* , 2005 , 38(6) : 1379-1385 .