

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*

贾莉君 范晓荣 尹晓明 曹云 沈其荣[†]

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要 详细介绍了用双阻离子选择性微电极活体测定小白菜叶片活体细胞中硝酸根离子的活度的方法原理及注意事项。微电极与溶液中硝酸根离子的浓度呈对数曲线的关系, 斜率为 48~58 mV, 对硝酸根离子浓度有较低的检出限, 是一种选择性高、灵敏、经济的测定植物活体细胞中离子活度的方法。小白菜生长至六叶时期, 用含有 $5\text{mol m}^{-3}\text{NO}_3^-$ 的营养液诱导 48h。测定结果表明, 叶片细胞中硝酸根离子活度分布在活度高低明显不同的两个区间内, 在细胞质中是 $0.24\sim 10\text{mol m}^{-3}$, 液泡中 $20\sim 110\text{mol m}^{-3}$, 且两个区间在细胞跨膜电位上也有差异。液泡占整个细胞体积的 90%, 所以, 植物所吸收的硝酸根离子都集中在液泡中。

关键词 离子选择性微电极; 小白菜; 叶片细胞; 硝酸根离子

中图分类号 S184

文献标识码 A

国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC) 1975 年将离子选择电极定义为: 离子选择电极是一种电化学传感体, 它的电位对所给定的离子活度的对数呈线性关系^[1]。从第一支离子选择性电极的发明到研制出对特定离子具有专性选择的离子选择性微电极, 离子选择性微电极随着进入不同的研究领域而得到了迅速的发展。20 世纪 60 年代, Hinke 制成 pH、K、Na 玻璃微电极。70 年代初, Walker 首次研制出了以液态离子交换剂膜溶液为敏感材料, 测定 K^+ 、 Cl^- 的离子选择性微电极。70 年代末, Simon 等用中型载体大环化合物为敏感材料, 研制出能够测定中性载体离子的选择性微电极, 如可以测定 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的离子微电极, 但是在实际测定中由于受到待测定离子以外的其他离子不同程度的干扰, 中性载体离子选择性微电极在应用方面存在着一定的局限^[2]。

微电极是随着动物神经电生理学的研究而发展起来的, 与其他测定细胞内离子浓度的方法比较, 离子选择性微电极是一种在活体条件下, 测定某一个细胞内离子的活度和细胞内离子活度的动态、连续和瞬时变化的技术方法, 不仅如此, 微电极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。凭借诸多优点, 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。Miller 等和 Zhen 等用双阻硝酸根离子敏感微电极测定了轮藻、拟南芥、大麦、玉米等植物根表皮和皮层细胞中的硝酸根离子的活度^[3], 随后, 在原来双阻电极的基础上加上一个 pH 敏感电极成为三阻电极, 通过测定不同细胞器中的 pH 值来使微电极准确定位在细胞质或液泡中。David 等用三阻离子选择性微电极测得在细胞中 pH 活度集中在两个区域, 分别是 7.26 和 5.18, 与之相对应的 K^+ 活度分别为 71.3mol m^{-3} 和 68.7mol m^{-3} ^[4], 这两个不同的活度范围分别代表所测得的是细胞质和液泡中的 K^+ 活度。离子选择性微电极为植物研究进入细胞及分子水平提供了有效的工具。

国外运用离子选择性微电极研究的作物主要是大麦、玉米、大豆等, 且迄今为止所报道的都是测定作物根系细胞内离子活度, 而没有一篇报道作物叶片细胞的结果, 主要原因是叶片比较薄, 容易被针尖戳破, 另一方面叶片容易发生震动, 使测定结果不稳定。本实验选择不结球小白菜叶片作为双阻离子选择性微电极测定的对象, 摸索出其测定的相关技术

* 国家自然科学基金项目(30270790)资助

[†] 通讯作者, E-mail: shenqrong@njau.edu.cn.

作者简介: 贾莉君(1983~), 女, 硕士研究生, 从事植物电生理与氮素营养研究

收稿日期: 2004-06-03; 收到修改稿日期: 2004-11-10

和注意事项,能为今后该领域的研究提供十分有用的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

不结球小白菜种子经过消毒发芽后,在石英砂中生长至出现两片子叶和一片真叶后,移栽到含有营养液的周转箱中在温室中培养。营养液选用Hogland蔬菜营养液,含有 $1 \text{ mol m}^{-3} \text{ NO}_3^-$, $2.0 \text{ mol m}^{-3} \text{ K}_2\text{SO}_4$, $2.0 \text{ mol m}^{-3} \text{ MgSO}_4$, $1.5 \text{ mol m}^{-3} \text{ CaSO}_4$, $1.0 \text{ mol m}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.05 \text{ mol m}^{-3} \text{ Fe-NaEDTA}$ 和微量元素,用 $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ 调节营养液pH为6.4。每个周转箱中移栽12株苗,一周更换一次营养液,pH值每天调节一次。待不结球小白菜长出5~6片真叶后,将苗转入含有 $5 \text{ mol m}^{-3} \text{ NO}_3^-$ 的营养液中培养48h,然后选用完全展开的新叶开始用离子选择性微电极测定叶片中硝酸根离子的活度。

1.2 双阻硝酸根离子选择性微电极的制作

1.2.1 硝酸根离子敏感剂(Nitrate sensor)的配制

用0.0001g的电子天平依次精确称取0.0060g甲基-N,N,N'-三十二烷基铵硝酸根离子(Methyltridecylammonium nitrate, MTDDA- NO_3^- , Sigma公司生产),0.0010g溴化甲基三苯基磷酸铵(Methyltriphenylphosphonium bromide, Fluca公司生产),0.0650g 2-硝基苯基辛烷基乙醚(2-Nitrophenyl octyl ether, Fluca公司生产),0.0230g聚乙烯(PVC, Fluca公司生产)和0.0050g硝化纤维素(Nitrate cellulose),然后加入0.45ml四氢呋喃溶解。由于四氢呋喃会溶解塑料,配制硝酸根离子敏感剂所用的器械用具应避免使用塑料制品。配置好的硝酸根离子敏感剂应封存在玻璃容器中,第一次使用之前充分振荡后再使用。

1.2.2 双阻微电极的制作 采用PE-21型微电极拉制仪,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拉制成理想的微电极。所使用双管玻璃管由管径不同的两根单管玻璃管粘合而成,其内径分别为0.800mm和0.400mm,外径分别为1.000mm和0.600mm,粗管和细管中所粘含有纤维丝,以使溶液能够迅速地进入电极尖部,其直径分别为0.100mm、0.080mm。根据我们的测定,理想的微电极针尖直径为0.8~1 μm ,加热温度过高,针尖过长或过

软都不适合插进叶片细胞中。

1.2.3 双孔硝酸根离子选择性电极的制备 在通风橱中,将拉制好的双孔玻璃管置于140℃下烘烤30~60min,除去残存在玻璃管内的水蒸气和杂质,然后用1ml注射器在双孔玻璃管中粗管的尾部滴入1~2滴2%的二甲基二氯硅烷(DCMS, Fluca公司生产)进行硅化,使二甲基二氯硅烷的蒸汽进入玻璃管的尖部,目的是在粗管尖部形成一层疏水层,以利于硝酸根离子敏感膜的形成和作用。硅化后,在140℃下继续烘烤1~1.5h,使过量的二甲基二氯硅烷蒸发掉。然后,将已配制好的硝酸根离子敏感剂(Nitrate sensor)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48h以上以使多余的四氢呋喃蒸发。

制备好的双阻硝酸根离子选择性微电极,用1ml的注射器在双孔玻璃管的在细管中注入 $100 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl}$,用作测定膜电位,在粗管中注入 $100 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl}$ 和 $100 \text{ mol m}^{-3} \text{ KNO}_3^-$ 的混合溶液,用于测定由于硝酸根离子敏感膜的存在使硝酸根离子跨膜运动而产生的膜电位。

1.3 双阻离子选择性微电极方法活体测定细胞内硝酸根离子活度的原理

1.3.1 实验仪器 PE-21型微电极拉制仪、显微镜(Olympus),微操纵仪,法拉第操作台,信号放大仪(Electrometer)。

1.3.2 测定原理 细胞膜电位($\Delta\psi_m$)的产生一是来自细胞膜上的ATP-ase的工作,二是来自细胞膜对不同阴、阳离子的通透性不同,这种电位差具有细胞内为负、细胞外为正的。双阻离子选择性微电极插入细胞中,由于微电极中所灌溶液的离子浓度和细胞中离子的浓度存在着浓度差,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内膜电位的变化。

将充灌硝酸根离子敏感膜的微电极插入细胞内,细胞质(或液泡)、硝酸根离子敏感膜和微电极中所充灌的溶液形成一个系统,由于细胞中硝酸根离子的浓度和微电极中所充灌溶液中的硝酸根离子的浓度存在着浓度差,并且硝酸根离子敏感剂对硝酸根离子有专一的选择通透性,只会允许细胞内的硝酸根离子专一的穿过硝酸根离子敏感膜,因此在原来细胞膜电位的基础上加上了由于硝酸根离子移动产生的膜电位,得到 $\Delta\psi_n$ 。因此,单一的由于硝酸根离子跨膜所产生的膜电位($\Delta\psi_{\text{NO}_3^-}$)应该从 $\Delta\psi_n$ 中

除去细胞膜本身的电位($\Delta\Psi_m$)。

所得到的 $\Delta\Psi_{NO_3^-}$ 和硝酸根离子的活度(aNO_3^-) 存在着对数曲线的关系, 离子的活度(aNO_3^-) 最终可以通过修正后的能斯特方程 $E = P_1 - P_2 \times (-\log_{10}(aNO_3^-)) + P_3$ [2] 计算得出。

1.3.3 标定 在使用双阻离子选择性微电极测定膜电位之前应该进行标定(表 1), 以确保: (1) 硝酸根离子敏感剂对硝酸根离子的敏感性, 来验证硝酸根离子敏感剂配制的质量的好坏。(2) 硝酸根离子敏感剂对硝酸根离子敏感的程度, 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。 P_1 为微电极参比电位; P_2 为电位差对 $-\log_{10}(aNO_3^-)$ 作图所得曲线的斜率, 即标定溶液中硝酸根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。理想的 P_2 在 48 ~ 58 mV 之间, $P_3 < 1.0 \text{ mol m}^{-3}$ 。 P_2 大于 59 mV, 说明电极尖部被破坏; 小于 48 mV, 微电极对硝酸根离子的敏感度不高, 检测限较高。

在测定之后, 也应该对微电极进行标定, 以证实测定过程中没有破坏微电极的尖部和所充灌形成的硝酸根离子敏感膜。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。测定之后不能进行标定的电极弃掉。

表 1 用于硝酸根离子选择性微电极标定溶液的组成

Table 1 Composition of solution used for calibration of NO_3^- selective

microelectrodes

硝酸根离子活度 - $\lg_{10}(aNO_3^-)$ Nitrate activity (mol m^{-3})	HEPES (mol m^{-3})	KNO_3 (mol m^{-3})	K_2HPO_4 (mol m^{-3})
100	1.0	5.0	130.0
10	2.0	5.0	12.2
1	3.0	5.0	1.22
0.1	4.0	5.0	0.122
0.01	5.0	5.0	0.0122

1.4 叶片的固定

在根的测定中, 根被固定在 $4 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm}$ 的盛有含 5 mol m^{-3} Mes, 0.5 mol m^{-3} $CaCl_2$, 0.05 mol m^{-3} KCl , pH 为 6.00 的缓冲液(即 Basic solution) 的有机玻璃溶液池中测定, 再用 0.1 cm 的小薄片固定以防止根的震动。由于叶片较薄, 与根相比, 所测得的电位更容易产生幅度较大的变动。我们在测定根的装置的基础上进行了改进, 将叶片固定在 $1 \text{ cm} \times 4 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的有机玻璃斜面上测定, 在测定时使微电极和叶片之间的夹角为 60° 左右, 角度过大或过

小都容易损坏微电极的尖部, 这是我们通过多次实验摸索出来的技术。

1.5 数据分析

计算硝酸根离子的活度的参数 P_1, P_2, P_3 用 VIS-ER 软件计算得到, 根据公式 $E = P_1 - P_2 \times (-\log_{10}(aNO_3^-)) + P_3$ 计算得到硝酸根离子活度。所记录的数据用 Sigmaplot 作图软件绘图。

2 结果

2.1 小白菜叶片的细胞膜电位和硝酸根离子活度

使用双阻离子选择性微电极测定, 电极制作的好坏是成功与否的关键。双阻电极中粗、细玻璃管的尖部通过旋转必须扭交在一起才能确保它们在同一细胞内的记录, 并且电极的尖部必须足够细、足够硬才能穿过叶片的气孔进入叶肉细胞内。我们使用拉针仪所拉制的双阻电极尖部直径为 $0.8 \sim 1 \mu\text{m}$, 且两个玻璃管尖部扭交在一起, 所测得的细胞膜电位相同表明测定时微电极在同一个细胞内。如图 1 所示。

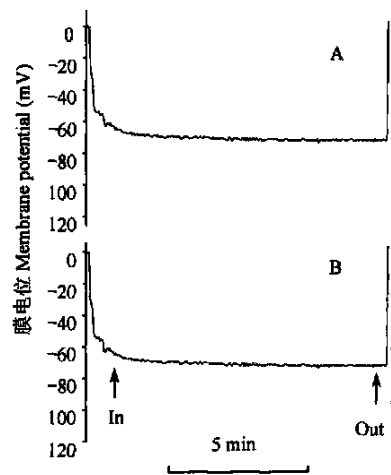


图 1 小白菜叶片细胞膜电位

纵轴表示膜电位($\Delta\Psi_m$), 横轴表示记录时间。粗管和细管都充灌了 100 mol m^{-3} 的 KCl 。两个箭头分别指示微电极进入和离开细胞。图 A 和图 B 显示记录到的 $\Delta\Psi_m$ 相同都为 -76.9 mV , 说明两个玻璃管的尖部在同一个细胞内记录

Fig. 1 Membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of Chinese cabbage leaf cell by double barreled microelectrodes

All barrels were backfilled with 100 mol m^{-3} KCl . The microelectrode was inserted into and removed from leaf cell at the arrowhead. The membrane potential value measured by two barrels was -76.9 mV indicating that the tip of microelectrode was located in one cell

当在粗的玻璃管中灌入硝酸根离子敏感剂后,插入不结球小白菜叶片细胞内所得到的记录,如图2所示。A表示记录到细胞内的膜电位($\Delta\Psi_m$),B表示硝酸根离子选择电极所记录到的膜电位($\Delta\Psi_n$),C是根据变化后能斯特方程计算的得到的细胞内硝酸根离子的活度($a\text{NO}_3^-$)。测定前标定所得到的

$$P_1 = -201 \text{ mV}, P_2 = -54.75 \text{ mV},$$

$P_3 = 0.1957 \text{ mol m}^{-3}$, 标定前后三个参数值分别相近,说明硝酸根离子选择性微电极对硝酸根离子有很好的敏感性,且在整个测定过程中一直保持良好的选择性,没有因为插入叶片而使微电极被破坏。

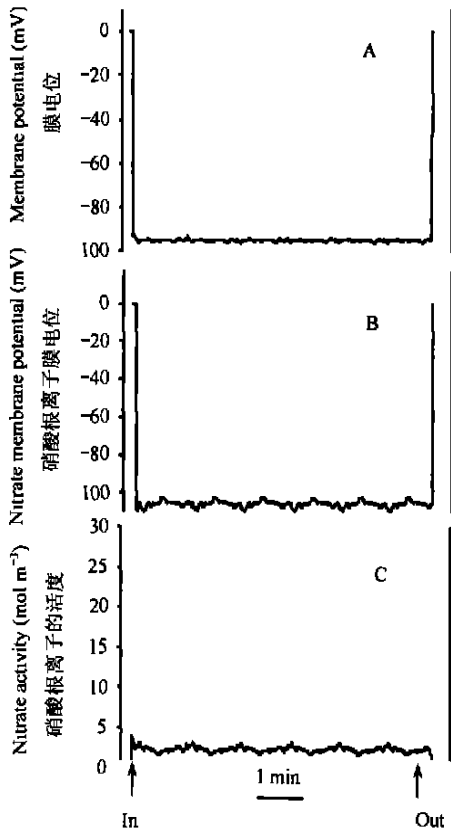


图2 小白菜叶片的细胞膜电位和细胞质中硝酸根离子的活度

小白菜用含有 $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ 的 Hogland 营养液诱导 48 h。箭头表示微电极进细胞的时刻,整个记录保持了 10 min,测得叶片膜电位($\Delta\Psi_m = -98.9 \text{ mV}$, 图 A)、硝酸根离子膜电位($\Delta\Psi_n$, 图 B)和硝酸根离子活度($a\text{NO}_3^- = 3.56 \text{ mol m}^{-3}$, 图 C)

Fig. 2 Membrane potential and nitrate activity in the cytosol of leaf cell of Chinese cabbage growing in $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ for 48 h. The microelectrode was inserted into and removed from leaf cell at the arrowhead. (The recording was maintained for 10 min with membrane potential ($\Delta\Psi_m = -98.9 \text{ mV}$, A), nitrate membrane potential $\Delta\Psi_n$ (B) and nitrate activity ($a\text{NO}_3^- = 3.56 \text{ mol m}^{-3}$, C), respectively)

2.2 不结球小白菜叶片细胞内硝酸根离子的分布

通过重复测定,发现用双阻离子选择性微电极测定不结球小白菜叶片细胞硝酸根离子活度分别落在两个区间即 $< 4 \text{ mol m}^{-3}$ 和 $> 10 \text{ mol m}^{-3}$,由图3还可以看出,测定的数值更多的是落在硝酸根离子活度($a\text{NO}_3^-$) $> 10 \text{ mol m}^{-3}$ 的区间范围内。

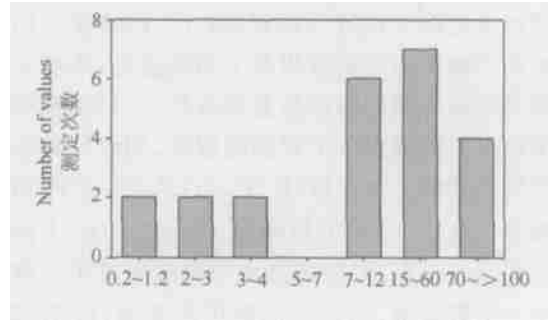


图3 小白菜叶片细胞中硝酸根离子的活度与测定概率分布(小白菜用含 $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ 的 Hogland 营养液诱导 48 h)

Fig. 3 Nitrate activity in leaf cell of Chinese abbage growing in nutrient solution contained $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ for 48 h

图4是不结球小白菜叶片细胞膜电位对细胞内硝酸根离子活度之间关系的散点图。从纵轴方向看,叶片细胞膜电位($\Delta\Psi_m$)分别落在 $-55 \sim -100 \text{ mV}$ 和 $< -100 \text{ mV}$ 两个区间,主要集中在 -90 mV 左右。对于细胞膜电位有较大的差异,估计可能是由于微电极处在叶片不同部位的细胞及同一个细胞中不同亚细胞器内而引起。所测得的硝酸根离子活度

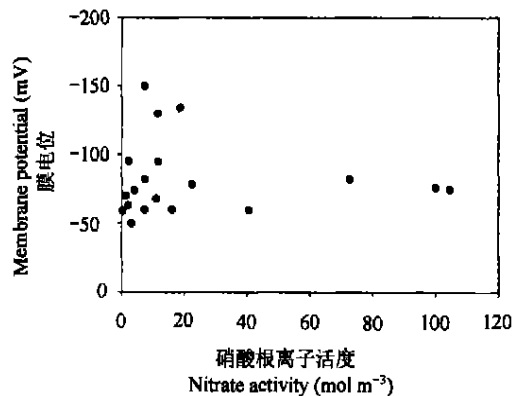


图4 小白菜叶片细胞的膜电位($\Delta\Psi_m$)对细胞内硝酸根离子活度($a\text{NO}_3^-$)的散点图(小白菜用含有 $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ 的 Hogland 营养液诱导 48 h)

Fig. 4 Scattered figure of membrane potential ($\Delta\Psi_m$) to nitrate activity ($a\text{NO}_3^-$) in leaf cell of Chinese cabbage growing in 5 mol m^{-3} nitrate for 48 h measured with double barreled nitrate selective microelectrodes

也分布有两个区间,主要集中在 20 mol m^{-3} 左右和大于 40 mol m^{-3} 的区域。叶片细胞膜电位和硝酸根离子活度在数值上明显的分布在不同的区域,说明所测得的数据来自不同的亚细胞器内。由于液泡作为植物细胞中的养分离子暂时的储存库^[5],其中离子的浓度必然高于细胞中其他的细胞器(如细胞质),且由于液泡膜上 ATPase 和 PPrase 的存在,与细胞的跨膜电位($\Delta\Psi_m$)相比,液泡的跨膜电位($\Delta\Psi$)绝对值较小。因此,从数值上判断,细胞膜电位和硝酸根离子活度出现的两个不同数值区间分别代表细胞质和液泡。从图 4 可以看出,液泡中的硝酸根离子活度明显大于细胞质。

3 讨论

本实验室首次在国内报道了用双阻离子选择性微电极测定蔬菜叶片细胞中的硝酸根离子活度。在国外,离子选择性微电极在植物电生理的研究领域已得到广泛的应用,但是,作为研究的植物仅仅局限于大麦(*Hordeum vulgare*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)和拟南芥(*Arabidopsis*),并且全都测定的是根表皮和皮层细胞中细胞质和液泡中离子的活度,对叶片的研究迄今为止还没有报道过。

Miller 和 Zhen 用双阻离子选择性微电极测得大麦和玉米经过 $10 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ 诱导 24~30 h 后,根表皮细胞质中硝酸根离子的活度分别为 4.9 mol m^{-3} 和 3.1 mol m^{-3} ,而液泡中硝酸根离子的活度则分别为 39 mol m^{-3} 和 26 mol m^{-3} ^[6],不仅如此,在外部硝酸根离子浓度在 $0.11 \sim 10 \text{ mol m}^{-3}$ 范围内细胞质中硝酸根离子的浓度基本稳定在几个 mol m^{-3} ,变化幅度很小。在硝酸盐充足供应 6~30 周后轮藻细胞质和液泡中硝酸根离子的活度分别为 1.6 mol m^{-3} 和 5.2 mol m^{-3} ,而在硝酸盐供应不足的情况下,用双阻离子选择性微电极基本检测不到细胞质和液泡中硝酸根离子的存在^[6]。我们用双阻离子选择性微电极测定的不结球小白菜细胞液泡和细胞质中的硝酸根离子的活度分别为 $0.24 \sim 10 \text{ mol m}^{-3}$ 和 $20 \sim 110 \text{ mol m}^{-3}$,同时我们还用传统水煮的方法经过流动分析仪对同一批苗进行了组织水平上硝酸根离子浓度的测定,结果表明,经过含 $5 \text{ mol m}^{-3} \text{NO}_3^-$ 的 Hogland 营养液 48 h 诱导的不结球小白菜叶片中硝酸根离子浓度为 $35 \pm 5 \text{ mol m}^{-3}$ 。传统的方法经过磨样,所测得的硝酸根离子的浓度是细胞质汁液和液泡汁液混合液中硝酸根离子浓度

的平均值,而微电极测定的是某一个细胞乃至亚细胞器内硝酸根离子的活度,因此更加贴近真实值。

双阻离子选择性微电极方法具有可以活体测定离子活度而不会改变所测离子的活度,同时测定细胞内、外电化学梯度和浓度梯度、离子浓度检出限低等特点。不结球小白菜是容易在地上部积累硝酸根离子的作物,作为储存库的叶片液泡占整个细胞体积的 90%,储存了大部分所吸收的硝酸根离子,因此,根据用离子微电极所测得的硝酸根离子活度的大小就可以判别所记录的是细胞质或是液泡中硝酸根离子活度,而在所有细胞内硝酸根离子活度记录中,60%的记录都在硝酸根离子活度(aNO_3^-) $> 10 \text{ mol m}^{-3}$ 的区间,可以认为是在液泡内。但是,在低硝酸根离子浓度培养或不积累硝酸根离子的植物中,要根据离子活度判别微电极在细胞中的定位很难,且由于细胞跨膜电位和跨液泡膜电位因细胞个体间存在差异,有时细胞跨膜电位和跨液泡膜电位很相近,所以从细胞的跨膜电位角度来说,也难对微电极在细胞中的定位进行准确的判定。

植物细胞液泡膜上存在着 ATPase 和 PPrase,这两个酶通过水解可以逆浓度梯度向液泡内释放 H^+ 而维持液泡内较低的 pH 值,液泡膜上 Ca^{2+} 离子通道也始终维持细胞质内低的 Ca^{2+} 离子浓度,细胞内这两种机制使液泡中积累了大量的 Ca^{2+} 和 H^+ ^[7]。细胞质和液泡内两种离子浓度差异为微电极在细胞亚细胞器内的准确定位提供了可能。Walker 等^[4]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,证实了用双阻离子选择性微电极所测定的硝酸根离子在细胞内的两个活度区间分别代表细胞和液泡。由于三阻电极在制作上和测定技术上有较大的难度,在广泛的运用和操作技术上还需要付出一定的时间和努力。

参考文献

- [1] 顾光煜. 离子选择电极分析在生物医学检验中的应用. 临床检验杂志, 2002, 20(特刊): 29~32. Gu G Y. The application of ion selective microelectrodes in Biomedical Clinical (In Chinese). Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2002, 20(Supple.): 29~32.
- [2] 马逸龙. 离子选择性微电极及其在生物医学中的应用. 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 (In Chinese). The Proceed of Biochemistry and Biophysics, 1991, 18(4): 200~203.
- [3] Miller A J, Smith S J. Nitrate transport and compartmentation in ce

- real root cells. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47: 843~ 854
- [4] Walker D J, Smith S J, Miller A J. Simultaneous measurement of intracellular pH and K^+ or NO_3^- in barley root cells using triple barreled ion selective microelectrodes. *Plant Physiol.*, 1995, 108: 743~ 751
- [5] Martinoia E, Heck U, Wiemken A. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, 1981, 289: 292~ 293
- [6] Miller A J, Zhen R G. Measurement of intracellular nitrate concentrations in Chara using nitrate- selective microelectrodes. *Planta*, 1991, 184: 47~ 52
- [7] 沈其荣, 汤利, 徐阳春. 植物液泡中硝酸盐行为的研究概况. *土壤学报*, 2003, 40(3): 465~ 470. Shen Q R, Tang L, Xu Y C. A review on the behavior of nitrate in vacuoles of plants (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(3): 465~ 470

MEASUREMENT OF NITRATE ACTIVITY IN LEAF CELLS OF CHINESE CABBAGE *IN VIVO* USING DOUBLE-BARRELED NITRATE SELECTIVE MICROELECTRODES

Jia Lijun Fan Xiaorong Yin Xiaoming Cao Yun Shen Qirong[†]

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Intracellular measurement of nitrate activity in leaf cells of Chinese cabbage *in vivo* using double-barreled nitrate selective microelectrode was reported for the first time in China. These microelectrodes showed a typical log linear response to nitrate concentration from 100 mol m^{-3} to 0.01 mol m^{-3} with a slope of 48~ 58 mV and the nitrate activity detectable was very low. The microelectrode was characterized by a high selectivity and sensitivity of ion and a good economy compared with other intracellular measurements. In addition, the *in vivo* method is better than the chemical analysis of the samples. The detected results showed that nitrate activity in leaf cell of Chinese cabbage induced with 5 mol m^{-3} nitrate for 48h fell into two different populations, i.e. 0.24 mol m^{-3} ~ 10 mol m^{-3} in cytosol and 20 mol m^{-3} ~ 110 mol m^{-3} in vacuole. Since vacuolar volume accounts for 90% of a whole cell, most of the nitrate in plants is stored in vacuoles. And, thus it is of great importance to study the remobilization of the nitrate in vacuoles both in increasing nitrogen use efficiency and in decreasing the nitrate content of vegetables.

Key words Ion selective microelectrodes; Chinese cabbage; Leaf cell; Nitrate