

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201404034

刘瑞娟,蔡振媛,车国冬. 测定植物胞内游离钠离子的研究进展[J]. 广西植物, 2015, 35(3):442-446

Liu RJ, Cai ZY, Che GD. Progress of the study on determination of free sodium in plant cells[J]. Guihaia, 2015, 35(3):442-446

测定植物胞内游离钠离子的研究进展

刘瑞娟¹, 蔡振媛¹, 车国冬^{2*}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘 要: 植物耐盐机制的研究一直是植物抗性研究的焦点。近年来,随着生物学不断发展和新荧光标记技术的运用,胞内钠离子测定逐渐应用于植物盐胁迫研究中。该文论述了以下三方面问题:(1)分别介绍了 SBFI、Sodium Green 和 CoroNa Green 三种钠离子荧光指示剂;SBFI 是一种双激发波长指示剂,其激发波长是 340 nm/380 nm,发射波长是 500 nm;Sodium Green 和 CoroNa Green 是单波长指示剂,其激发波长分别是 507 nm 和 492 nm,发射波长分别是 532 nm 和 516 nm;(2)比较了酯导入、酸导入、电穿孔和显微注射等几种常见荧光指示剂载入胞内方法的优缺点,重点介绍了一种无损伤低温抑制酯酶法:先将荧光指示剂在缓冲液中低温(4℃)处理 2 h,随后回到常温(20℃)在不含荧光指示剂的缓冲液中孵育 2 h;(3)阐述了胞内离子浓度计算公式,包括单波长测定公式、双波长比率测定公式。

关键词: 细胞内游离 Na⁺; 植物; 荧光指示剂; 低温酯导入; 离子浓度计算

中图分类号: Q942; Q2-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0442-05

Progress of the study on determination of free sodium in plant cells

LIU Rui-Juan¹, CAI Zhen-Yuan¹, CHE Guo-Dong^{2*}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology,

Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Northwest Institute of Plateau Biology,

Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: The mechanism of salt tolerance in plants had been the focus of plant resistance research in the past years. As the development of biology and application of new fluorescent labeling technologies, determination of intracellular free sodium had been gradually applied to the study of salt tolerance in plants. This review discussed three points as follows: (1) Introduction of three fluorescent indicators of intracellular free sodium: SBFI, Sodium Green and CoroNa Green. SBFI was a kind of fluorescent indicator for excitation ratio measurements, its emission ratio detected at 500 nm when excited at 340/380 nm. Sodium Green and CoroNa Green were fluorescent indicators that lacked a significant shift in emission or excitation wavelength upon binding to Na⁺. Sodium Green and CoroNa Green could be detected at 532 nm and 516 nm when excited at 507 nm and 492 nm respectively; (2) Compared the advantages and disadvantages of the protocols of loading the fluorescent indicators into cells, including AM esters of the fluorescent probes, acid loading, electroporation and microinjection. A non-invasive loading of acetoxymethyl ester under low temperature was introduced; loading the fluorescent indicator into cells by incubating the cells in solution at 4℃ for 2 h followed by 2 h incubation in the dye-free solution at 20℃; (3) The measurement of the internal sodium concentration in cells was illustrated. The equation for measurement of fluorescence intensity that lacked a significant shift in emission or excitation wavelength was: $[Na^+] = K_d(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$. Fluorescence intensity (F) was

收稿日期: 2014-05-26 修回日期: 2014-07-20

基金项目: 中国科学院(仪器设备功能开发)技术创新项目(2014 年)

作者简介: 刘瑞娟(1981-),女,甘肃成县人,硕士,工程师,从事植物分子生物学与细胞生物学新技术应用研究, (E-mail) Rjliu@nwipb.cas.cn.

* 通讯作者: 车国冬, 硕士, 工程师, 研究方向为天然药物化学, (E-mail) gdche@nwipb.cas.cn.

targeted fluorescence intensity. F_{min} was appropriate mixtures of low Na^+ , and F_{max} was appropriate maximum of high Na^+ . The equation for measurement of fluorescence intensity ratio was: $[[\text{Na}^+]] = K_d Q (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$. The ratio of fluorescence intensity (R) was the ration $F1/F2$ of the fluorescence intensity. F_{min} was the ratio of appropriate mixtures of low Na^+ , and F_{max} was the ratio of appropriate maximum of high Na^+ .

Key words: intracellular free sodium; plants; fluorescent indicators; ester loading under low temperature; calculating the ion concentration

钠是植物体内必需的一种微量元素,被植物吸收后,运输过程及到达所需部位后,其化学形态会发生不同程度的变化,并通过这些变化来实现不同的功能(罗红艺等,2002)。胞内钠除大部分与生物配体结合以配合物的形式存在外,还有小部分是自由离子形式存在的。本文就着眼于这一小部分游离钠离子测定的相关研究。

在动物胞内游离钠离子功能上,电压依赖性钠离子通道对可兴奋细胞完成正常的生理活动起到非常重要的作用,如可兴奋细胞电信号的产生和传导。随着研究的深入,电压依赖性钠离子通道在非兴奋细胞中存在的证据也不断增加,如神经胶原细胞和纤维原细胞等(Black *et al.*,1996)。植物中胞内游离钠离子研究主要集中在盐胁迫机制研究上。与动物细胞相反,大多数植物细胞中高浓度钠离子会抑制植物正常的生理活动和生长发育。钠离子的毒性是盐胁迫的一个重要方面,在器官和组织水平研究较多,但由于直接测定活细胞中游离离子较难,在细胞水平研究较少。本文从现有钠离子荧光指示剂种类、荧光指示剂导入胞内方法和胞内离子浓度计算三个方面进行简要综述。

1 Na^+ 荧光指示剂

荧光测定法是采用荧光指示剂与胞内离子特异结合,结合后荧光指示剂的光学性质发生变化,在一定波长的激发光下能够发出特定波长的荧光,荧光的强弱与溶液中的离子浓度成一定的相关性,因此通过测量其荧光强度就能够实现对胞内离子浓度的测量。常见的钠离子荧光指示剂有以下几种:

1.1 SBFI

最早出现的 Na^+ 荧光指示剂是 SBFI,是一类以冠醚为分子骨架的钠离子的荧光指示剂。尽管 SBFI 对目标离子钠离子的选择效率低于钙离子指示剂(如 fura-2)对钙离子的结合率,但是对于一般生理条件下胞内的钠离子测定已足够(Minta *et al.*,1989)。SBFI 结合离子的光谱反应能进行比率

测定,并与广泛使用的钙离子胞内测定指示剂 fura-2 的光学滤片一样,因此能测 fura-2 的仪器就能测定 SBFI(Negulescu *et al.*,1990),使 SBFI 的应用具有较广范围。

在动物上,SBFI 主要被用来测定不同组织胞内的钠离子水平或钠离子流向。植物中,Halperin *et al.*(2003)应用 SBFI 来测定拟南芥根毛胞内的钠离子浓度,分别得到了 0、30、60 和 90 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度 NaCl 溶液处理下拟南芥根毛胞内钠离子的浓度值,展示了 SBFI 在植物活体细胞胞质内钠离子动力学活性测定上的应用价值。此外,也有报道应用 SBFI 测定水稻胞质中钠离子浓度。通过测定耐盐型与盐敏感型水稻株系中各自胞质内钠离子的浓度,来分析钠离子在细胞水平的摄入和隔离机制,以进一步说明植物耐盐胁迫的机理(Kader *et al.*,2005)。

1.2 Sodium Green

2005 年前后,又出现了一种 Na^+ 荧光指示剂-Sodium Green,与 SBFI 相比,Sodium Green 具有以下优点:(1)Sodium Green 的激发波长是 488 nm,可以在激光共聚焦显微镜和流式细胞仪上使用(Bkaily *et al.*,1999);(2)较长的吸收波长降低了对细胞的毒害;(3)具有更短的载入时间和更强的荧光强度。但其缺点是作为单波长荧光指示剂,检测得到的离子浓度没有双波长指示剂检测所得结果精确(Amorino *et al.*,1995)。

Duan *et al.*(2007)利用 Sodium Green 荧光指示剂对液泡中 Na^+ 的积累进行检测,发现盐胁迫导致株系细胞中荧光强度明显升高,意味着 Na^+ 的积累量增加。说明转入的 *TsVP* 基因确实提高了液泡膜逆浓度梯度转运离子的能力。此外,在荧光寿命测量方面也有应用,比如利用 Sodium Green 监测 HeLa 细胞中的 Na^+ 离子浓度(Despa *et al.*,2000),但在植物研究上目前还未见此类报道。

1.3 CoroNa Green

CoroNa Green 是一种改良的绿色荧光 Na^+ 指示剂,由荧光素分子串联具有选择性能与 Na^+ 结合

表 1 测定胞内钠离子常见荧光指示剂

Table 1 Commonly used fluorescent indicator of determination intracellular sodium

指示剂 Indicator	激发波长 Excitation wavelength (nm)	发射波长 Emission wavelength (nm)	类型 Type	适用仪器 Applied instrument
SBFI	340/380	500	双激发波长指示剂 Double indicator excitation wavelength	荧光显微镜 Fluorescence microscope
Sodium Green	507	532	单波长指示剂 Single wavelength indicator	荧光显微镜、激光共聚焦显微镜和流式细胞仪 Fluorescence microscope, laser scanning confocal microscope and flow cytometer
CoroNa Green	492	516	单波长指示剂 Single wavelength indicator	激光共聚焦显微镜、荧光显微镜、流式细胞仪和多功能酶标仪 Laser scanning confocal microscope, fluorescence microscope, flow cytometer and multimode reader

的冠醚组成,与 Na⁺ 结合后荧光强度高,而波长偏移小(Martin *et al.*, 2005)。CoroNa Green 分子量比 Sodium Green 分子量小一半以上(分子量分别是 586 和 1 668),较小体积使它更容易渗透进入细胞,在相同条件下,20%细胞能被 CoroNa Green 渗透而 Sodium Green 进入的细胞不足 3%(Meier *et al.*, 2006)。CoroNa Green 激发波长是 492 nm,位于激光共聚焦显微镜的氩激光器激发波段,因此非常适用于激光共聚焦显微镜。此外,在流式细胞仪(毕莹等,2012)、多功能酶标仪(袁建辉等,2011)和荧光显微镜等仪器上也能检测 CoroNa Green。

Kavitha *et al.* (2012)应用 CoroNa Green 测定不同耐盐水稻品种根胞质中钠离子浓度,发现盐敏感水稻 IR20 比耐盐水稻 Pokkali 根原生质体中 Na⁺ 积累多,进一步的研究表明不同耐盐水稻品种在其根细胞中含有类似的阳离子通道。Zhang *et al.* (2012)在研究脂肪酸去饱和酶 FAD2 与植物盐胁迫抗性中,利用 CoroNa Green 指示剂测定胞内 Na⁺,得到缺失突变体 *fad2* 根细胞胞质中积累较多 Na⁺ 的结果,综合其它实验说明在种子萌发和早期生长过程中,拟南芥脂肪酸去饱和酶 FAD2 在耐盐胁迫中发挥了必不可少的作用。此外,王晓玲(2009)报道利用 CoroNa Green 研究 Na⁺/K⁺-AT-Pase 抑制剂对中华补血草的生长情况及其根尖中 Na⁺ 的含量和分布的影响。也有利用 CoroNa Green 检验质膜 H⁺-ATPase, NKCC 和 Na⁺/H⁺ antiporter 的活性受到抑制时,是否会导致二色补血草中 Na⁺ 的分泌受到抑制从而更多地积累在盐腺细胞中的研究(丁烽,2010)。

2 荧光指示剂导入胞内方法

与动物细胞相比,植物细胞具有坚韧的细胞壁、

较大的液泡和存在细胞膨压等特点,使得指示剂导入细胞相对困难,报道过有以下几种成功导入细胞的方法:酯导入、酸导入、电穿孔和显微注射等。

酸导入是在弱酸性条件下,指示剂处于不带电荷的非解离状态,有可能透过细胞膜;但对于多数植物细胞酸导入效果不好。电穿孔其原理是在微-毫秒的瞬间施以每厘米数千伏强度的电脉冲,引起细胞膜自修复性穿孔,从而使指示剂进入细胞;但这种方法是一种具有损伤性的导入方法,局限性较大。显微注射适用于一个或几个细胞的注射及单细胞测量,它几乎能将所有的指示剂迅速导入胞内;但对于仪器设备和仪器操作技能都有较高的要求,不适用于一般实验室进行植物胞内离子测定实验(孙天恩等,1996)。

与上述几种方法相比,酯导入法具有适用范围广、导入效率高和应用门槛较低的优点,在当前植物胞内离子测定上被普遍采用。在酯导入法中荧光指示剂一般以酯化的形式(AM 脂,乙酰基甲甲酯)导入胞内,其原理主要是脂化形式容易透过质膜进入细胞内,虽然其自身不发荧光,且不与胞内离子结合,但进入细胞后可以被胞质中的酯酶分解成游离酸形式,从而恢复对胞内离子的选择性,与胞内离子结合后而发荧光。但应用于植物细胞却存在困难,植物细胞细胞壁中存在着脂酶,酯化形式指示剂在进入细胞前就会被水解(Brownlee *et al.*, 1988)。

鉴于此,初期一般以植物各组织的原生质体作为荧光指示剂载入对象。从较早报道将钙离子指示剂 Indo-1 和 fura-2 成功导入大麦糊粉层原生质体(Bush *et al.*, 1987)开始,在绿豆下胚轴、胡萝卜根韧皮部、蚕豆叶肉、小白菜下胚轴、水稻花药愈伤组织、水稻叶片、水稻根毛、鸢尾花粉、烟草叶片和小麦叶片(周平等,1995; Halperin *et al.*, 2003; Duan *et*

al., 2007; 党磊等, 2002) 等细胞原生质体中均实现了不同荧光指示剂的导入。但是使用原生质体作为受体材料也存在一些问题, 如在实验过程中原生质体容易破裂, 给测定过程带来不稳定因素。原生质体是一植物细胞非正常状态, 失去细胞原有的形态特征后, 无法准确判断离子分布的原始和确切位置。

随着科学技术的发展, 出现了一种采用低温抑制酯酶方法成功使脂化形式荧光指示剂进入小麦根尖细胞的方法。此方法的原理是在低温条件下细胞壁中的酯酶活性受到抑制, 无法水解酯化型探针, 但荧光指示剂扩散进入细胞内的过程受低温影响并不大。先以低温(4 °C)处理 2 h, 待植物细胞内积累一定量的荧光指示剂, 再回到常温(20 °C)孵育 2 h, 使细胞内脂酶活性回升, 从而将进入胞内的荧光指示剂水解成离子形式而与钙离子结合, 在一定波长激发下检测荧光从而获得胞内离子浓度值(Zhang *et al.*, 1998)。利用此方法研究报道的有在百合花药、蚕豆叶片、蚕豆茎维管束薄壁组织、砂梨花药、拟南芥叶片、甜菜叶片等中成功导入了钙离子荧光指示剂(尚忠林等, 2001; 徐国华等, 2003; 孙清鹏等, 2004; 余晓丛等, 2013), 但钠离子荧光指示剂应用此方法的报道较少, 可能由于不同植物的不同荧光指示剂载入效率差别较大, 具体做某种植物材料时, 希望通过优化处理条件来使低温导入法在钠离子荧光指示剂上得到推广。

3 胞内离子浓度计算

荧光测定法是通过测定荧光强度来反映细胞中离子浓度的, 而连接荧光信号和离子浓度的关键转换参数就是离子荧光指示剂的离解平衡常数(K_d), 它的单位为纳摩尔(nmol)。 K_d 受很多环境因素的影响, 包括温度, pH 值, 离子强度以及指示剂和蛋白质的相互作用等。

3.1 单波长测定

荧光方法测定中, 荧光指示剂在与反应物结合后, 仅有荧光强度的变化, 而最大荧光激发和发射波长均无变化。像这种利用单一波长下荧光强度的变化进行的测定就是单波长测定。

单波长测定胞内钠离子浓度计算公式如下:

$$[\text{Na}^+] = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

式中, F 为实验所测得的荧光强度, $F_{\min}$ 和 $F_{\max}$

分别为胞内无 Na^+ 和 Na^+ 饱和时所测得的荧光强度。 $F_{\min}$ 和 $F_{\max}$ 的获得是胞内钠离子计算的难点, 首先必须找到能使胞内钠离子螯合掉和达到饱和的试剂。目前, 报道获得 $F_{\min}$ 的试剂有羰基氰化物间氯苯胺(CCCP)和 Na^+ 阻断剂 TTX, 获得 $F_{\max}$ 的试剂有短杆菌肽(gramicidin)和 Na^+ 激动剂 Veratridine (Lo *et al.*, 2006; 毕莹等, 2012)。

单波长测量时, 由于待测细胞厚度、试剂的绝对浓度、光程长或仪器的绝对灵敏度等测量条件的微小变化都会引起测量值的误差, 使单波长指示剂没有双波长指示剂测量结果精确。目前, 单波长指示剂主要应用于离子的动态变化, 离子分布特点的测定, 而在离子定量方面的应用则受到了一定的限制(郭伟等, 2003)。上述的 Sodium Green 和 CoroNa Green 就是单波长钠离子荧光指示剂, 只能进行单波长测定。

3.2 双波长比率测定

荧光方法测定中, 荧光指示剂在与反应物结合后, 出现激发或发射光谱移位的探针, 可使用在两个不同波长测定的荧光强度比率进行测定, 称为双波长比率测量。

比率法测定胞内钠离子浓度计算公式如下:

$$[\text{Na}^+] = K_d Q \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

式中, R 为实验中在两个不同波长位置所测得的荧光强度比, $R_{\min}$ 和 $R_{\max}$ 分别为无 Na^+ 和 Na^+ 饱和时所测得的荧光强度比, Q 为选取 R 定义中处于分母的波长时无 Na^+ 和 Na^+ 饱和时所测得的荧光强度比。

由于双波长比率法是利用两波长处荧光强度之比而不是绝对荧光强度来进行胞内离子浓度的计算, 故能有效减少待测细胞厚度、试剂的绝对浓度、光程长或仪器的绝对灵敏度等测量条件造成的误差。有应用钠离子双激发波长指示剂 SBF1 测定不同水稻品种在不同盐处理下各自胞内钠离子浓度的报道(Kader *et al.*, 2005)。

4 问题与展望

胞内离子测定中钙离子测定技术最为成熟, 钙离子指示剂种类多, 适用于不同浓度范围、pH 值、灵敏度和仪器的情况(王永祥等, 2006)。与此相比, 胞内钠离子指示剂种类较少, 选择余地不大, 具体要

测定某种胞内钠离子浓度时,不一定能找到合适的钠离子荧光指示剂。此外,胞内测定对仪器要求较高,要依赖于激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等大型仪器,应用受限。

随着研究的深入,植物胞内钠离子在植物抗性以及钠离子通道研究中扮演着越来越重要的角色,胞内钠离子定位、定性与定量测定的需求会越来越多,期望合成出一批适应性广的钠离子荧光指示剂。另一方面,随着有机化学、无机化学和材料学等学科的发展,出现了许多新标记技术,为新型钠离子荧光指示剂合成提供了可能性。如一种新型的荧光探针量子点,与传统有机探针相比,具有多目标检测、发光寿命长、光化学稳定性高和毒性低等优点(陈介南等,2010)。新型钠离子荧光指示剂的出现必将推动植物胞内钠离子研究的进展。

参考文献:

- Amorino GP, Fox MH. 1995. Intracellular Na^+ measurements using sodium green tetraacetate with flow cytometry[J]. *Cytometry*, **21**(3):248-256
- Bi Y(毕莹), Lu RY(卢芮伊), Zhou X(周欣), et al. 2012. Evaluation of a flow cytometry based intracellular sodium detection assay by CoroNaTM Green(基于 CoroNaTM Green 检测胞内 Na^+ 浓度的流式细胞术分析方法的建立和评价)[J]. *J Tianjin Med Univ*(天津医科大学学报), **18**(4):428-431
- Bkaily G, Jacques D, Pothier P. 1999. Use of confocal microscopy to investigate cell structure and function[J]. *Meth Enzymol*, **307**:119-135
- Black JA, Waxman SG. 1996. Sodium channel expression: a dynamic process in neurons and non-neuronal cells[J]. *Dev Neurosci*, **18**:139-152
- Brownlee C, Pulsford AL. 1988. Visualization of the cytoplasmic free Ca^{2+} gradient in *Fucus serratus* rhizoids: correlation with cell ultrastructure and polarity[J]. *J Cell Biol*, **81**:249
- Bush DS, Jones RL. 1987. Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2[J]. *Cell Cal*, **8**(6):455-472
- Chen JN(陈介南), Wang Q(王琼), Lu MZ(卢孟柱), et al. 2010. Application of quantum dots in plant molecule fluorescent labeling(量子点在植物分子荧光标记中的应用)[J]. *Sci Sil Sin*(林业科学), **46**(10):153-161
- Dang L(党磊), Wang DM(王冬梅), Liu J(刘娟), et al. 2002. Immunofluorescence localization of microtubule in wheat mesophyll protoplast and its influence factors(小麦叶片原生质体微管骨架的免疫荧光标记及其影响因素)[J]. *J Agric Univ Hebei*(河北农业大学学报), **25**(3):23-27
- Despa S, Vecer J, Steels P, et al. 2000. Fluorescence lifetime microscopy of the Na^+ indicator sodium green in HeLa cells[J]. *Analyt Biochem*, **281**(12):159-175
- Ding F(丁烽). 2010. The salt-secretion mechanism of salt glands in the leaves of *Limonium Bicolor*(二色补血草叶片盐腺泌盐机理的研究)[D]. Jinan(济南):Shandong Normal University (山东师范大学)
- Duan XG, Yang AF, Gao F, et al. 2007. Heterologous expression of vacuolar H^+ -PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance[J]. *Protoplasma*, **232**(1-2):87-95
- Guo Y(郭祎), Ren ZY(任兆玉), Hou X(侯洵). 2003. Fluorescence methods for analyzing in tracellular second messenger-calcium ion(细胞内第二信使-钙离子荧光测定方法的研究进展)[J]. *Laser J*(激光杂志), **24**(10):1-5
- Halperin SJ, Lynch JP. 2003. Effects of salinity on cytosolic Na^+ and K^+ in root hairs of *Arabidopsis thaliana*: in vivo measurements using the fluorescent dyes SBFI and PBFI[J]. *J Exp Bot*, **54**(390):2035-2043
- Kader MA, Lindberg S. 2005. Uptake of sodium in protoplasts of salt-sensitive and salt-tolerant cultivars of rice, *Oryza sativa* L. determined by the fluorescent dye SBFI[J]. *J Exp Bot*, **56**(422):3149-3158
- Kavitha PG, Miller AJ, Mathew MK, et al. 2012. Rice cultivars with differing salt tolerance contain similar cation channels in their root cells[J]. *J Exp Bot*, **63**(8):3289-3296
- Lo CJ, Leake MC, Berry RM. 2006. Fluorescence measurement of intracellular sodium concentration in Single *Escherichia colic* cells[J]. *Biophys J*, **90**(1):357-365
- Luo HY(罗红艺), Jing HJ(景红娟). 2002. Sodium, nickel and silicon, new essential elements in nutrients of plant(植物营养中新的必需元素——钠、镍、硅)[J]. *J Higher Corr Educ: Nat Sci Ed*(高等函授学报·自然科学版), **15**(3):42-45
- Martin VV, Rothe A, Gee KR. 2005. Fluorescent metal ion indicators based on benzoannelated crown systems: a green fluorescent indicator for intracellular sodium ions[J]. *Bioorg & Med Chem Lett*, **15**(7):1851-1855
- Meier SD, Kovalchuk Y, Rose CR. 2006. Properties of the new fluorescent Na^+ indicator CoroNa green: comparison with SBFI and confocal Na^+ imaging[J]. *J Neurosci Meth*, **155**(2):251-259
- Minta A, Tsien RY. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic sodium[J]. *J Chem*, **264**:19449-19457
- Negulescu PA, Machen TE. 1990. Intracellular ion activities and membrane transport in arietal cells measured with fluorescent dyes[J]. *Meth Enzymol*, **192**:38-81
- Shang ZL(尚忠林), Wang YF(王永飞), Qian H(钱洪), et al. 2001. The measurement of calcium fluorescence in lily pollen cells(百合花粉细胞中钙离子的荧光测定法)[J]. *Plant Physiol J*(植物生理学通讯), **37**(4):319-322
- Sun QP(孙清鹏), Wang XJ(王小菁). 2004. The detection of cytosolic free Ca^{2+} in cells of *Arabidopsis thaliana* leaves(拟南芥叶细胞游离钙离子的测定)[J]. *J Trop & Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), **12**(1):79-82
- Sun TE(孙天恩), Zhou P(周平), Ye MW(叶梦炜). 1996. Progress of the study on determination of free calcium in plant cells by fluorescent indicator(荧光指示剂测定植物细胞内游离钙离子的研究进展)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), **32**(2):91-99
- Wang XL(王晓玲). 2009. Construction of a Salt Gland Specific cDNA Library from *Limonium* (补血草盐腺细胞特异性 cDNA 文库构建)[D]. Jinan(济南):Shandong Normal University(山东师范大学)

- He YJ(何跃君), Xue L(薛立). 2005. Biological effects of rare earth elements and their action mechanisms(稀土元素对植物的生物效应及其作用机理)[J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **16**(10): 1 983—1 989
- Liu CJ(刘晨江), Zhao ZH(赵志鸿). 1998. Development of *Rabdosia Rubescens* [Hemsl.] Hara(冬凌草的研究进展)[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), **33**(10): 577—581
- Liu C(刘晨), Li DJ(李冬杰), Li N(李楠), et al. 2009. Effects of rare earth elements on the synthesis of rubescensin A in *Robdosia rubescens* cell(稀土元素对冬凌草细胞合成冬凌草甲素的影响)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), **37**(13): 5 965—5 966, 5 969
- Li JC(李继成), Liu CJ(刘晨江), Sun HD(孙汉董). 1986. Research on the structure of lushan rubescensin B and C(鲁山冬凌草乙素和丙素的结构研究)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **8**(1): 93—97
- Li W(李伟), Liang JS(梁建生), Li YR(李幼荣), et al. 2002. Studies on biological dosage effect of rare earth element on protein(稀土元素对生物体蛋白的剂量效应研究进)[J]. *Biotechnology* (生物技术), **12**(1): 42—44
- Tian M(田蜜). 2009. The germplasm resource evaluation and preliminary screening of excellent strains about *Curcuma longa*, which is produced in Sichuan Province(川产姜黄的种质资源评价及优良株系初步筛选研究)[D]. Chengdu(成都): Chengdu University of Tradition Chinese Medicine(成都中医药大学)
- Xu ZC(徐忠传), Yu D(郁达), Zhou JY(周静亚), et al. 2006. The effects of Eu and Y on regeneration and growth of test-tube plantlet for *Oxalis violacea* (稀土元素铕和钇对紫叶酢浆草试管苗生长的影响)[J]. *Biol Bull* (生物科技通报), (s1): 330—333
- Xie HG(解惠光). 1991. A study on the application of rare earth elements on agriculture(中国稀土元素在农业上应用研究进展)[J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), **36**(8): 561—564
- Xue JP(薛建平), Xu M(徐敏), Zhang AM(张爱民). 2004. Effects of rare-earth elements Cerium on "Red Globe" grape plantlets *in vitro* (稀土元素铈对“红地球”葡萄组培苗生长的影响)[J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **31**(3): 369—371
- Yuan XF(袁晓凡), Zhao B(赵兵), Wang YC(王玉春). 2005. Application of rare earth elements in medicinal plant cell and tissue culture(稀土元素在药用植物细胞和组织培养中的应用)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **22**(1): 115—120
- Zhou J(周洁), Zhang J(张霁), Gou LP(郭兰萍), et al. 2010. Effects of lanthanum on leaf photosynthesis and artemisinin accumulation in *Artemisia annua* (稀土元素镧对黄花蒿光合作用及青蒿素积累的影响)[J]. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), **41**(8): 1 371—1 374
- Zhao YQ(赵英琪), Wang NJ(王乃江), Zhao ZY(赵智渊). 1999. A research of effects of Ce rare earth on photosynthesis and drought resistance of *Prunus armeniaca* $\times$ *sibirica* (稀土铈对大扁杏光合作用和抗旱性影响的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **19**(5): 54—58

(上接第 446 页 Continue from page 446)

- Wang YX(王永祥), Liu B(刘斌). 2006. Development of fluorescent indicators of intracellular free Ca^{2+} (细胞内游离 Ca^{2+} 的荧光指示剂研究进展)[J]. *J Xi'an Univ Arts & Sci: Nat Sci Ed* (西安文理学院学报·自然科学版), **9**(1): 21—24
- Xu GH(徐国华), Zhang SL(张绍玲), Zhang CY(张超英), et al. 2003. Changes in free Ca^{2+} distribution in pollen cell after self-and cross pollination in *Pyrus serotina* Re hd(梨自花与异花授粉后花粉胞内游离 Ca^{2+} 分布的变化)[J]. *J Plant Physiol & Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), **29**(2): 97—103
- Yu XC(余晓丛), Zhang SY(张少英), Na R(娜仁). 2013. Optimization of fluorescence detection conditions of calcium ion in the cell in sugar beet(荧光指示剂检测甜菜胞内钙离子的条件优化)[J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), **44**(1): 61—64
- Yuan JH(袁建辉), Yang H(杨慧), Tang H(唐焕), et al. 2011. A cell-based detection of ciguatoxin usingsodium fluorescence probe (钠离子荧光探针用于检测雪卡毒素的细胞毒性)[J]. *J Southern Med Univ* (南方医科大学学报), **31**(4): 653—655
- Zhang JT, Liu H, Sun J, et al. 2012. Arabidopsis fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth[J]. *PLoS One*, **7**(1): 1—12
- Zhang WH, Rengel Z, Kuo J. 1998. Determination of intracellular Ca^{2+} in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature[J]. *Plant J*, **15**(1): 147—151
- Zhou P(周平), Sun TE(孙天恩), Ye MW(叶梦炜), et al. 1995. Study on the loading of Ca^{2+} fluorescent indicator into protoplasts(钙离子荧光指示剂导入植物细胞原生质的研究)[J]. *Wuhan Univ J: Nat Sci Ed* (武汉大学学报·自然科学版), **41**(2): 208—212