

· 专题论坛 ·

植物微流芯片——一种实时定量监测生长发育的高通量整合分析平台

王明红¹, 马来², 郑小江¹, 胡一兵^{1, 2, 3*}

¹湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 恩施 445000; ²南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

³中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210076

摘要 生长发育是一个复杂的动态过程, 了解其发生细节是生命科学研究的重要内容。最新发展起来的微流芯片技术为实现这个目标提供了新的途径。动物及微生物中的应用表明, 该技术兼有实时定量监测和高通量整合处理的优势。在植物研究领域, 用针对根生长特点和要求设计的根微流芯片结合荧光共振能量转移探针已经成功地检测出拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根细胞内葡萄糖和游离的Ca²⁺、Zn²⁺的浓度。随着各种底物特异的荧光共振能量转移探针的开发和应用, 根微流芯片还可以用来检测植物细胞内激素或其它代谢中间产物的浓度及其动态变化过程。不仅如此, 以微流芯片为基础发展起来的Plant Chip和Tip Chip则为研究植物与微生物的相互作用以及植物花粉管极性生长和细胞分裂分化提供了理想的平台。作为了解遗传因素或环境刺激导致细胞生命活动变化细节的有力工具, 微流芯片技术有望为植物研究领域带来更多新的进展和突破。

关键词 微流芯片, FRET sensor, 实时定量, 高通量

王明红, 马来, 郑小江, 胡一兵 (2015). 植物微流芯片——一种实时定量监测生长发育的高通量整合分析平台. 植物学报 50, 637–643.

技术进步是推动科学研究向前发展的重要力量。过去几十年间, 由于X-光晶体衍射、电子显微镜和DNA测序等技术的发展和应用, 极大地深化了人们对生命本质的认识。最近几年, 以RNA高通量测序和各种组学为基础的新手段的普及使得这些认识更加全面和深入(董淼等, 2013; 曹继容等, 2014; 黄儒等, 2014)。尽管目前已经可以在分子水平上了解生命现象, 但这些方法一般只能以静态的方式对样本进行研究, 然后以此为基础推测生命活动的具体过程。在植物研究领域, 虽然也有一些对活的样本内特定分子标记后在显微镜下进行动态观察的报道, 但这些检测方法大多具损伤性, 不仅可供处理和观察样本的时间较为短暂, 而且整个过程难以重复。因此, 如何在细胞和亚细胞水平上了解生命活动的动态细节一直是研究者们努力奋斗的目标。在此方面, 最近发展起来的、以荧光共振能量转移探针(FRET sensor)为代表的生物传感器技术和微流控制技术(microfluidics)引领了

目前该领域的发展方向(Okumoto et al., 2012; Jones et al., 2013; Okumoto, 2014; Sozzani et al., 2014)。

FRET sensor是一类经过遗传改造且含有荧光发色团的复合蛋白。最常见的FRET sensor蛋白由形成底物结合位点的肽段两端分别连接CFP和YFP组成, 该蛋白在与特异底物结合以后, 其空间构象发生变化, 引起CFP和YFP基团之间产生荧光共振导致能量转移(图1A)。简单地说, 就是FRET sensor蛋白在没有结合特异底物之前, 其CFP和YFP基团之间距离较远。此时用CFP的激发光(波长433 nm)照射蛋白分子, 产生出CFP特异的发射荧光, 其峰值波长为476 nm(王进军等, 2003)。而当FRET sensor蛋白与特异的底物结合后, 其分子构象发生改变, 导致CFP和YFP基团相互靠近。由于CFP的发射光谱与YFP的激发光谱很大程度上是重叠的, 此时CFP受激发产生的发射荧光随即作为YFP的激发光被吸收, 随后激发YFP产生波长更长的发射荧光(峰值波长为527 nm)。

收稿日期: 2014-09-29; 接受日期: 2015-01-27

基金项目: 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放课题(No.Y412201445)和生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放课题(No.Pklhb1115)

* 通讯作者。E-mail: huyb@njau.edu.cn

因此, FRET sensor在结合底物之前受433 nm的激发光照射时检测到的主要是CFP的发射荧光, 而当它与底物结合后检测到的主要是YFP的发射荧光(王进军等, 2003)。由此, 监测FRET sensor与底物结合前后荧光信号比值(CFP/YFP)发生的变化同时参照FRET sensor的测量范围即可对底物性质和浓度进行定量分析(Looger et al., 2005; Campbell, 2009; 王盛等, 2012; 玄元虎等, 2014)。由于其广泛的适用性, 短短的几年时间内各种底物特异的FERT sensor相继出现(Mank et al., 2008; Davidson and Campbell, 2009; Vinkenborg et al., 2009; Kao et al., 2010; Mérola et al., 2014)。例如Bermejo等(2010, 2011a, 2011b)利用FRET sensor成功地在酵母中测定了葡萄糖和ATP及其它离子和代谢产物的实时动态浓度。这种方法为动、植物及微生物领域研究细胞内目标分子的活动带来了革命性的变化(Jones et al., 2013)。

随后, 微流控制技术的加入为生命活动的实时动态研究提供了加速发展的动力。微流芯片是一种通过在面积较小的平台上(通常只有几个平方厘米)集成的微米级的通道完成一系列微量溶液处理和检测的系统工具。自出现以来, 该技术被迅速应用于化学、生物和医药等研究领域(Whitesides, 2006), 成为一种高通量且低消耗的实时定量研究或筛选平台。在植物研究领域, Grossmann等(2011)利用微流控制技术开发了根微流芯片(图1C), 结合应用FRET荧光探针, 他们成功地监测了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗根细胞内葡萄糖的浓度及半乳糖对根生长的影响。随后更多的报道显示, 微流芯片技术在高通量检测植物细胞内金属离子或激素及其浓度变化、研究细胞极性生长和基因表达及环境化学物质对细胞生长的影响等诸多方面具有广泛的应用潜力(Krebs et al., 2012; Haydon, 2014; Jones et al., 2014; Lanquar et al., 2014)。可以预见, 如同FRET 探针, 微流芯片将成为对植物进行高通量整合分析的有力工具。本文以植物研究领域最先出现的根微流芯片为例, 介绍它的结构、操作过程、技术特点及目前存在的局限, 并展望其应用前景。

1 根微流芯片的结构、操作过程及特点

从本质上说, 根微流芯片是一种高通量的微流控制分

析系统。它是为了观察根或其它植物组织或细胞生长过程中显微结构及特定分子受遗传因素或外界环境影响而产生变化的过程或者细胞内不同蛋白分子之间相互作用而设计的。这种观察通常借助计算机控制的荧光显微镜系统完成。

根微流芯片的基本结构由对细胞无毒性的聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)平面上整合微机械输送系统和植物生长支持及监测系统组成(Unger et al., 2000; Grossmann et al., 2011)。微机械输送系统由位于PDMS表层的溶液输送系统和位于PDMS底层的液流控制系统组成。溶液输送系统包括溶液输入通道、溶液输出通道和连接溶液输入、输出通道的植物生长监测通道3部分。监测通道是一些二分叉树状元件延伸形成的独立的且可以容纳根在其中生长并进行显微观察的窗口。这些微流通道在PDMS平面上以类似于印刷电路的形式分布(图1B)。溶液输入通道连接用来进行处理的不同溶液源容器, 溶液输出通道连接废液收集容器。溶液输入和输出通道内的液体流动是通过向位于PDMS底层的液流控制通道内施加适当的气压驱动实现, 这个过程还需要计算机控制微阀门的开闭配合才能完成(Grossmann et al., 2011, 2012)。植物生长支持通道则由位于溶液输送和观察平面之上的圆锥形支架和截短的Tip头组成, 这些生长支持通道下端与芯片平面上的样品观察窗口相连(图1B)。

根据Grossmann等(2011)的报道, 根微流芯片的具体操作过程是, 先是在无菌条件下用10 μ L Tip头吸取约5 μ L融化的固体培养基置于Tip头盒中冷却; 待培养基凝固后截去Tip头上部无培养基填充的部分, 再将截去上部的Tip头插入含固体培养基的培养皿中固定。植物材料如拟南芥的种子先经表面消毒, 再用镊子将种子移至内含凝固培养基的Tip头上方。每个Tip头内放置一粒种子, 然后将插有Tip头的培养皿用石蜡膜封口, 置于4 $^{\circ}$ C培养箱内低温处理3天。之后, 将培养皿移至23 $^{\circ}$ C培养箱内促使种子萌发, 幼苗的根在Tip头固体培养基内向下生长5–7天, 此时即可将截短的Tip头连同其中的幼苗一起转移到根微流芯片支架上固定。支架是1或2行(通常8或16个)等距离平行排列并与PDMS平面成一定夹角的内部中空小管, 支架顶端可承接内含萌发种子的Tip头下端并与之连接组成生长支持通道。每个支架下面连接的

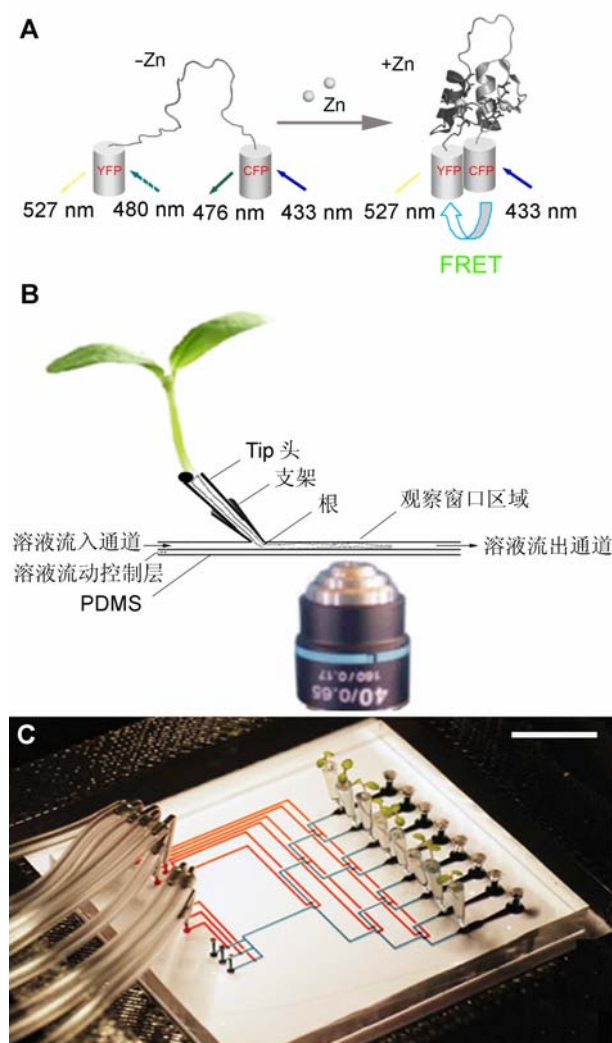


图1 FRET sensor原理及根微流芯片示意图

(A) 锌离子的FRET sensor蛋白在结合锌离子前后空间构象的变化以及它受到433 nm激发光照射时产生的发射光谱变化示意图(根据Evers, 2007); (B) 单个微流通道结构示意图, 箭头示溶液流动方向; (C) 根微流芯片实物图(Grossmann et al., 2011, Plant Cell) (Bar=1cm)

Figure 1 Schematic figures of FRET sensor and root microfluidic chip

(A) Spatial conformation and emission light variations of Zinc FRET sensor before and after binding of Zinc ion (Based on Evers, 2007); (B) Schematic structure of a single microfluidic channel and the plant growth support system; (C) A 8-channel root microfluidic chip (Grossmann et al., 2011, Plant Cell) (Bar=1 cm)

PDMS监测通道内充满了液体培养基。因此, Tip头内原来在固体培养基中向下生长的拟南芥根可以通过

倾斜的支架继续向PDMS平面内的微通道内水平生长, 直至达到PDMS平面内的观察窗口, 此时即可对根进行溶液处理和观察记录。

需要说明的是, 用来进行处理和观察的转基因拟南芥幼苗首先必须能够稳定表达适合检测一定浓度范围底物的FRET sensor蛋白, 因为同一种底物的不同FRET sensor有不同的测量范围或量程。例如, Grossmann等(2011)测定拟南芥根中葡萄糖浓度时用的就是有效检测范围为 $0.05\text{--}9.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的FRET sensor (FLII¹²Pglu-700 $\mu\delta$ 6 (Kd for Glc (660 ± 160) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Takanaga et al., 2008)。这种FRET sensor在拟南芥根细胞质内表达(根据需要也可以使其定位表达于内质网或其它特定的细胞器内), 当微流通道内流经根的葡萄糖通过根细胞膜上葡萄糖载体吸收进入细胞质内并达到相应的浓度范围时, 这些葡萄糖分子与FRET sensor蛋白分子中葡萄糖特异的结合位点结合并引起蛋白空间构象发生改变, 从而导致FRET sensor蛋白CFP/YFP荧光比值变化。这种变化可以通过位于PDMS平面观察窗口下方由计算机控制的倒置荧光显微镜自动记录(Grossmann et al., 2011, 2012)。根据FRET sensor底物的特异性及其相应量程, 该方法可以检测环境中某种物质是否能够被植株根系吸收、如果能够吸收其浓度范围是多少并能观察吸收的物质对细胞生长的影响等。

位于PDMS平面内的观察通道的宽度和长度分别只有100和800 μm , 而其高度仅为20 μm , 这样的尺度既能保证微流通道内拟南芥根的正常生长, 又能将其限制在一定的高度范围内。因此, 用倒置荧光显微镜观察时, 不同观察窗口中的根都在同一个焦平面上, 避免观察过程中出现Z-轴漂移(Grossmann et al., 2011)。一般情况下, 转移至PDMS平面上的拟南芥幼苗在此平台上继续生长1–2天即可进行溶液处理和观察。在此过程中位于芯片底座平台上的整个微流芯片装置都要用保鲜膜覆盖以防止拟南芥幼苗受失水胁迫。为保证幼苗的稳定生长, 整个过程需要在无菌条件下进行。在根微流芯片的准备过程中, 置于Tip头内的幼苗生长5–7天后再整合到芯片支架上是为了便于对幼苗进行预筛选: 如检查幼苗根长是否一致, 幼苗中转入的标记基因是否表达等(Grossmann et al., 2011, 2012)。

与常规芯片的特点类似, 根微流芯片系统可以进

行高通量的连续分析。目前,第2代根微流芯片已经可以实现对2行共16个通道内的植株根系进行分析(Jones et al., 2014)。由于溶液处理过程是在显微操作平台上进行的,少量的溶液即可满足实验需求,因此,在需要使用昂贵试剂的情况下,该系统可以有效地节省经费。其次,根微流芯片可以对植物组织或器官进行长时间的无损检测。据Grossmann等(2011, 2012)的报道,拟南芥植株在微流芯片上可以维持3天的正常生长,这个时间长度已经能够满足大多数实验的要求。不过,根微流芯片最大的优势在于它对研究目标的处理和实时监测进行了整合且整个过程易于重复。

2 微流芯片在植物研究领域的应用

Grossmann等(2011)报道了利用根微流芯片结合葡萄糖/半乳糖的FRET sensor对拟南芥根细胞内的葡萄糖和半乳糖浓度进行实时测定并探讨了半乳糖对根生长的影响。此后,Krebs等(2012)运用同样的手段测定了拟南芥和日本百脉根(*Lotus japonicus*)细胞内 Ca^{2+} 的浓度,这些研究开创了在植物研究领域利用微流芯片和FRET sensor对细胞内分子或离子浓度进行高通量实时定量检测的先河。虽然在此之前,利用微流控制系统测定拟南芥根系的生长或对环境化学物质刺激的研究也取得了成功(Meier et al., 2010; Chaudhuri et al., 2011)。但这些实验都是在整合度相对较低的情况下对单个研究对象进行处理和观察。

Lanquar等(2014)利用 Zn^{2+} 特异的FRET sensor测定拟南芥根细胞内游离 Zn^{2+} 浓度约为 $0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这是在细胞内实时定量检测 Zn^{2+} 浓度的成功尝试。与此相对应的是,他们通过ICP-AES测定的拟南芥根系锌元素总浓度为 $38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$ (Lanquar et al., 2014),大约相当于 $0.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。比较两个浓度可以看出,细胞内游离的 Zn^{2+} 浓度非常低,不到细胞锌元素总浓度的千分之一。这个结果同时也说明,以往通过包括ICP在内的各种静态的元素测定方法实际上很难了解细胞内游离态离子的准确浓度。用类似的方法,Park和Palmer (2014)还测定了哺乳动物细胞内 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的浓度。这些研究建立了实时定量测定细胞内游离金属离子浓度的方法,对认识细胞生命活动的过程意义重大。

除了检测植物细胞内各种金属离子或寡糖等小分子物质的浓度,根微流芯片还可以检测根细胞内外的营养物质,如硝酸盐、磷酸根离子的浓度及其变化对植物生长的影响(Dean et al., 2012; Nezhad, 2014)。最新的报道显示,拟南芥细胞内脱落酸(ABA)浓度变化监测也可以通过FRET sensor和根微流芯片完成(Jones et al., 2014)。随着更多底物特异的FRET sensor的开发应用,根微流芯片将来还可以检测环境(如土壤)中铝、砷和铅等有害离子的存在及其浓度范围并监测这些有害元素对植物生长的影响(Nezhad, 2014)。

不仅如此,目前针对不同的研究对象和要求,一些实验室在微流芯片基础上还开发出如Plant Chip和Tip Chip等用途各异的植物微流芯片。例如,Jiang等(2014)建立了水培条件下支持拟南芥种子萌发和幼苗生长的直立Plant Chip系统,利用该系统可以高通量监测病原微生物与不同发育阶段的拟南芥在植株以及细胞水平上相互作用的过程。其它一些实验室还利用Tip Chip微流芯片系统详尽地揭示了拟南芥、山茶(*Camellia japonica*)和夏堇(*Torenia fournieri*)花粉管极性生长过程(Yetisen et al., 2011; Nezhad et al., 2013a; Denninger et al., 2014; Horade et al., 2014)以及测定花粉管细胞生长的穿透力(一种机械压力)(Nezhad et al., 2013b)。此外,不同的植物微流芯片还可以为细胞分裂分化和细胞融合等多个领域的研究提供便利的平台。最近的一篇报道显示,研究人员利用微流芯片成功观察到植物寄生线虫的入侵和取食行为(Hu et al., 2014)。这些报道表明植物微流芯片已经进入快速发展和应用阶段。不过,尽管不同植物微流芯片的原理基本相似,但它们有各自不同的优势及用途,并且观察样品的相应准备也有很大的差异。

3 植物微流芯片的应用前景及挑战

植物微流芯片提供了一个可在细胞和亚细胞水平上持续观察和记录植物生长过程的整合研究平台,利用它能够长时间对植物进行无损检测且检测过程易于重复。特别是与FRET sensor的结合使植物微流芯片非常适合发育生物学研究中用于了解基因表达导致的生理变化以及植物营养领域检测不同形态和结构的营养成分或激素等物质的吸收过程对根或其它器

官生长的影响,或在环境监测中评估有害的环境污染因子甚至是有害微生物对细胞或植株产生的伤害等,因此该技术具有广泛的应用潜力。

不过,目前植物微流芯片也存在一些应用局限。同样以根微流芯片为例,一个突出的问题是相对于拟南芥和烟草(*Nicotiana tabacum*)等种子微小的模式植物,大部分农作物,如水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)和高粱(*Sorghum bicolor*)等的种子以及根系都大得多,种子萌发后根系的尺度无论是进入微流通道还是进行显微观察都难以在适合拟南芥的根微流芯片平台上进行。因此在作物营养吸收的研究方面如果要利用根微流芯片技术,需要改进设计适合这些农作物根系的微流控芯片系统。其次,为提高分析通量将来可能会在微流芯片上集成更多的微流通道,但如何实现对不同观察通道内材料并行处理(至少是对照和一个样品同时进行处理和观察)也是需要认真考虑的问题。另外,微流通道由于内径微小,用较高浓度的溶液处理时容易造成堵塞(Grossmann et al., 2012),寻找更加适合的芯片材料将有助于解决这个问题。而且,用来进行实时监控的FRET sensor探针需要通过转基因手段使之在植物体内稳定表达,因此也存在探针基因在转基因植物中表达受到抑制以及植物背景荧光干扰显微镜下观察的问题。此外,基于GFP荧光探针或标记蛋白还存在由于荧光基团体积较大可能影响被标记蛋白的正常折叠或干扰与其它蛋白相互作用的问题。不过,针对荧光探针存在的这些问题目前已经有了一些可行的应对方案(Ehrhardt and Frommer, 2012)。相信随着技术的不断发展和完善,上述问题会得到逐步解决。

致谢 感谢德国Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Centre for Organismal Studies/Cell Networks的Guido Grossmann博士提供资料并提出宝贵意见。

参考文献

- 曹继容, 钟广炎, 王其兵 (2014). 植物离子组学及其研究方法与应用进展. 植物学报 **49**, 504–513.
- 董淼, 黄越, 陈文铎, 徐涛, 郎秋蕾 (2013). 降解组测序技术在植物miRNA研究中的应用. 植物学报 **48**, 344–353.
- 黄儒, 苍晶, 于晶, 卢宝伟, 刘丽杰, 王健飞, 郭人铭, 徐琛 (2014). 冬小麦小RNA高通量测序及生物信息学分析. 植物

- 学报 **49**, 8–18.
- 王进军, 陈小川, 邢达 (2003). FRET技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用. 生物化学与生物物理进展 **30**, 980–984.
- 王盛, 陈典华, 蒋驰洲, 吴琼, 李煌, 华子春 (2012). 基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针的构建及应用. 中国细胞生物学学报 **34**, 1258–1267.
- 玄元虎, 朱毅勇, 胡一兵 (2014). SWEET蛋白家族研究进展. 中国科学: 生命科学 **44**, 676–684.
- Bermejo C, Ewald JC, Lanquar V, Jones AM, Frommer WB (2011a). *In vivo* biochemistry: quantifying ion and metabolite levels in individual cells or cultures of yeast. *Biochem J* **438**, 1–10.
- Bermejo C, Haerizadeh F, Takanaga H, Chermak D, Frommer WB (2010). Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. *Biochem J* **432**, 399–406.
- Bermejo C, Haerizadeh F, Takanaga H, Chermak D, Frommer WB (2011b). Optical sensors for measuring dynamic changes of cytosolic metabolite levels in yeast. *Nat Protoc* **6**, 1806–1817.
- Campbell RE (2009). Fluorescent-protein-based biosensors: modulation of energy transfer as a design principle. *Anal Chem* **81**, 5972–5979.
- Chaudhuri B, Hörmann F, Frommer WB (2011). Dynamic imaging of glucose flux impedance using FRET sensors in wild-type Arabidopsis plants. *J Exp Bot* **62**, 2411–2417.
- Davidson MW, Campbell RE (2009). Engineered fluorescent proteins: innovations and applications. *Nat Meth* **6**, 713–717.
- Dean KM, Qin Y, Palmer AE (2012). Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1406–1415.
- Denninger P, Bleckmann A, Lausser A, Vogler F, Ott T, Ehrhardt DW, Frommer WB, Sprunck S, Dresselhaus T, Grossmann G (2014). Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in Arabidopsis. *Nat Commun* **5**, 4645.
- Ehrhardt DW, Frommer WB (2012). New technologies for 21st century plant science. *Plant Cell* **24**, 374–394.
- Emmanouilidou E, Teschemacher AG, Pouli AE, Nicholls LI, Seward EP, Rutter GA (1999). Imaging Ca²⁺ concentration changes at the secretory vesicle surface with a recombinant targeted cameleon. *Curr Biol* **9**, 915–918.
- Evers TH (2007). FRET-based Sensor Proteins: A Molecular Picture. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven.

pp. 19.

- Grossmann G, Guo WJ, Ehrhardt DW, Frommer WB, Sit RV, Quake SR, Meier M** (2011). The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science. *Plant Cell* **23**, 4234–4240.
- Grossmann G, Meier M, Cartwright HN, Sosso D, Quake SR, Ehrhardt DW, Frommer WB** (2012). Time-lapse fluorescence imaging of *Arabidopsis* root growth with rapid manipulation of the root environment using the RootChip. *J Vis Exp* **65**, 4290.
- Haydon MJ** (2014). Getting a sense for zinc in plants. *New Phytol* **202**, 10–12.
- Horade M, Yanagisawa N, Mizuta Y, Higashiyama T, Arata H** (2014). Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device. *Microelectron Eng* **118**, 25–28.
- Hu CX, Kearn J, Urwin P, Lilley C, O'Connor V, Holden-Dye L, Morgan H** (2014). StyletChip: a microfluidic device for recording host invasion behaviour and feeding of plant parasitic nematodes. *Lab Chip* **14**, 2447–2455.
- Jiang HW, Xu Z, Aluru MR, Dong L** (2014). Plant chip for high-throughput phenotyping of *Arabidopsis*. *Lab Chip* **14**, 1281–1293.
- Jones AM, Danielson JA, Manojkumar SN, Lanquar V, Grossmann G, Frommer WB** (2014). Abscisic acid dynamics in roots detected with genetically encoded FRET sensors. *Elife* **3**, e01741.
- Jones AM, Grossmann G, Danielson JÅH, Sosso D, Chen LQ, Ho CH, Frommer WB** (2013). *In vivo* biochemistry: applications for small molecule biosensors in plant biology. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 389–395.
- Kao JPY, Li G, Auston DA** (2010). Chapter 5—practical aspects of measuring intracellular calcium signals with fluorescent indicators. *Methods Cell Biol* **99**, 113–152.
- Krebs M, Held K, Binder A, Hashimoto K, Den Herder G, Parniske M, Kudla J, Schumacher K** (2012). FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of Ca^{2+} dynamics. *Plant J* **69**, 181–192.
- Lanquar V, Grossmann G, Vinkenborg JL, Merx M, Thomine S, Frommer WB** (2014). Dynamic imaging of cytosolic zinc in *Arabidopsis* roots combining FRET sensors and RootChip technology. *New Phytol* **202**, 198–208.
- Looger LL, Lalonde S, Frommer WB** (2005). Genetically encoded FRET sensors for visualizing metabolites with subcellular resolution in living cells. *Plant Physiol* **138**, 555–557.
- Mank M, Santos AF, Drenberger S, Mrcic-Flogel TD, Hofer SB, Stein V, Hendel T, Reiff DF, Levelt C, Borst A, Bonhoeffer T, Hübener M, Griesbeck O** (2008). A genetically encoded calcium indicator for chronic *in vivo* two-photon imaging. *Nat Methods* **5**, 805–811.
- Meier M, Lucchetta EM, Ismagilov RF** (2010). Chemical stimulation of the *Arabidopsis thaliana* root using multi-laminar flow on a microfluidic chip. *Lab Chip* **10**, 2147–2153.
- Mérola F, Fredj A, Betolngar DB, Ziegler C, Erard M, Pasquier H** (2014). Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnol J* **9**, 180–191.
- Nezhad SA** (2014). Microfluidic platforms for plant cells studies. *Lab Chip* **14**, 3262–3274.
- Nezhad SA, Naghavi M, Packirisamy M, Bhat R, Geitmann A** (2013a). Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 8093–8098.
- Nezhad SA, Packirisamy M, Bhat R, Geitmann A** (2013b). *In vitro* study of oscillatory growth dynamics of *Camellia* pollen tubes in microfluidic environment. *IEEE Trans Biomed Eng* **60**, 3185–3193.
- Okumoto S** (2014). Quantitative imaging approaches for small-molecule measurements using FRET sensors in plants. In: Sriram G, ed. *Plant Metabolism*. New York: Humana Press. pp. 55–64.
- Okumoto S, Jones A, Frommer WB** (2012). Quantitative imaging with fluorescent biosensors. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 663–706.
- Park JG, Palmer AE** (2014). Quantitative measurement of Ca^{2+} and Zn^{2+} in mammalian cells using genetically encoded fluorescent biosensors. In: Zhang J, Ni Q, Newman RH, eds. *Fluorescent Protein-Based Biosensors*. New York: Humana Press. pp. 29–47.
- Sozzani R, Busch W, Spalding EP, Benfey PN** (2014). Advanced imaging techniques for the study of plant growth and development. *Trends Plant Sci* **19**, 304–310.
- Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB** (2008). GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1091–1099.
- Unger MA, Chou HP, Thorsen T, Scherer A, Quake SR** (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science* **288**, 113–116.
- Vinkenborg JL, Nicolson TJ, Bellomo EA, Koay MS, Rutter GA, Merx M** (2009). Genetically encoded FRET

sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. *Nat Meth* **6**, 737–740.

Whitesides GM (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373.

Yetisen AK, Jiang L, Cooper JR, Qin Y, Palanivelu R, Zohar Y (2011). A microsystem-based assay for studying pollen tube guidance in plant reproduction. *J Micromech Microeng* **21**, 054018.

Plant Microfluidic Chip, an Integrated High-throughput Platform for Real-time Analysis of Plant Growth and Development

Minghong Wang¹, Lai Ma², Xiaojiang Zheng¹, Yibing Hu^{1, 2, 3*}

¹Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China; ²College of Resources & Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ³State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210076, China

Abstract Plant growth and development is a complex and dynamic process. Understanding the details of the process is a challenge for biological research. The microfluidic technique provides an effective way to achieve this goal. Research of microorganisms and animal cell lines has demonstrated that this technique has the advantages of real-time detection with high resolution and high-throughput processing. Recently, root microfluidic chip assay developed on the basis of microfluidic chip assay for plants showed potential: real-time concentrations of cellular Zn and Ca ions and glucose in Arabidopsis root were successfully and non-invasively measured. With more substrate-specific FRET sensors developed, root microfluidic chip could be used to detect concentrations of cellular phytohormones or other cytosolic metabolites and their variations. In addition, diverse microfluidic-based new chip assays provide ideal platforms for studying biological activities such as interactions between plants and pathogens, polarity growth of pollen tubes or cell division and differentiation. As a powerful tool to survey cellular activities induced by genetic factors or environmental stimuli, microfluidic chip assay could bring more breakthroughs and insights in plant research.

Key words microfluidic chip, FRET sensor, real-time detection, high throughput

Wang MH, Ma L, Zheng XJ, Hu YB (2015). Plant microfluidic chip, an integrated high-throughput platform for real-time analysis of plant growth and development. *Chin Bull Bot* **50**, 637–643.

* Author for correspondence. E-mail: huyb@njau.edu.cn