

叶绿素荧光显微成像分选模块的研制及应用

尹燕

(中国科学院 植物研究所 公共技术中心, 北京 100093)

摘要: 叶绿素荧光成像是光合作用研究中广泛应用的测量技术, 叶绿素荧光显微成像又将研究尺度进一步拓展到细胞、亚细胞水平。然而, 对于检测到的叶绿素荧光参数出现差异的藻细胞, 现有的显微成像设备却无法将目标细胞分选出来。本研究开发了与原有设备匹配的显微分选模块, 可实现基于叶绿素荧光参数的单细胞精准弹射分选。

关键词 显微分选; 叶绿素荧光; 光合作用; 藻

Development and application of single cell sorting module for fluorescence kinetic microscope

Yin Yan

(Plant Science Facility of the Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093 China)

Abstract: Chlorophyll fluorescence technology is widely used in photosynthesis research, and the analysis scale has been extended to cell and subcellular level by application of chlorophyll fluorescence microscopic imaging. However, for microalgae cells with different chlorophyll fluorescence parameters detected, there is no available microscopic imaging equipment capable of isolating those target single cells. To address this issue, a single cell sorting module for fluorescence kinetic microscope, which is capable of single cell accurate ejection sorting based on chlorophyll fluorescence parameters, is developed.

Keywords: single cell sorting; chlorophyll fluorescence; algae

光合作用是地球上最重要的化学反应, 植物、藻类及光合细菌等吸收光能、将 CO₂ 和水转化为有机物并释放 O₂。获得光能的叶绿素分子从基态跃迁到激发态, 激发态的叶绿素分子可通过三种途径释放能量回到基态: 推动光化学反应、以热的形式耗散、释放光子产生荧光。这三种途径的总和是一定的, 它们互相竞争、此消彼长, 因此叶绿素荧光的变化反映了光化学效率和热耗散能力的变化。叶绿素荧光信号与光能吸收与转换、能量传递与分配、

反应中心状态、过剩光能及耗散、光抑制与破坏等几乎光合作用所有过程都密切相关，叶绿素荧光技术是光合生理研究的重要探针 (Baker, 2004, 2008)。

叶绿素荧光技术发展出了很多不同的测量程序，以慢诱导荧光动力学曲线为例，通过测量光 (ML)、作用光 (AL)、饱和脉冲光 (SP) 激发样品，记录动力学曲线并计算叶绿素荧光参数。常用的叶绿素荧光参数包括 F_0 (最小荧光)、 F_0' (作用光下的最小荧光)、 F_m (暗适应后的最大荧光)、 F_m' (作用光下的最大荧光)、 F_v (暗适应后的最大可变荧光)、 F_v/F_m (PSII 最大光化学效率)、 Φ_{PSII} (作用光下的实际光化学效率)、NPQ (非光化学淬灭系数)、qP (光化学淬灭系数) 等，这些参数可以用于反映植物光合作用机理和光合生理状况 (许大全, 2021)。

叶绿素荧光成像技术能记录整个叶片、植株、藻类群体等样品不同区域的荧光动力学分布变化，实现从宏观到微观的光合机理研究。叶绿素荧光成像由于其无损、高通量的技术特征，在光合作用相关突变体筛选领域成为了广泛应用的重要技术，为光合作用机理及抗逆研究提供了强大的技术支持。叶绿素荧光显微成像技术最早出现于 2000 年，Küpper 等人将叶绿素荧光脉冲调制式激发光源与显微镜结合，应用于十字微星鼓藻、四尾栅藻、伊乐藻、长囊水云、木槿叶片等多种材料，首次获得了显微尺度的叶绿素荧光图像，并记录单个细胞的动力学曲线 (Küpper *et al.*, 2000)。多年来叶绿素荧光显微成像技术在国外已经展开多方面研究应用，例如一种喜阴植物秋海棠的蓝晕色叶片中具有特殊的光合质体，能增强遮阴环境下对绿光的捕获，将低光照条件下的量子产额提高了 5-10%，从而适应了极度弱光的环境条件 (Jacobs *et al.*, 2016)。以及应用于研究鱼腥藻异形胞分化过程中的光合作用规律 (Ferimazova *et al.*, 2013)、褐藻被壶菌感染后的光合生理变化 (Gachon *et al.*, 2006)、蓝藻固氮与光合放氧的关系 (Berman-Frank *et al.*, 2001) 等领域。

目前国内的叶绿素荧光成像显微研究尚处于起步阶段，多个课题组都已开始在不同研究领域应用这项技术。最新的研究进展包括：Yu 等分析了狗枣猕猴桃白化和绿色叶片栅栏组织、海绵组织的叶绿素荧光参数，揭示了白化叶片海绵组织光合能力增强的机理 (Yu *et al.*, 2022)；Liu 等比较了干旱处理下的玉米叶肉细胞和维管束鞘细胞，发现这两种细胞具有不同的不同光保护策略 (Liu *et al.*, 2022)。这两篇文章分别是我们与吉林师范大学、四川省农业科学院课题组合作发表的，也是国内第一、第二篇发表的叶绿素荧光显微成像研究论文。

然而在实际应用中，在单细胞微藻、植物细胞、光合细菌等样品的显微荧光成像分析中，由于缺乏相应的分选技术，无法对叶绿素荧光参数出现差异的进行筛选。为了解决实际科研

中遇到的问题，我们为现有的叶绿素荧光显微成像仪自主研制了显微分选模块。该模块可实现多种不同种类微藻、植物细胞、光合细菌等材料的光合功能差异样品在复杂样品群中的精准显微分选，将目标样品分离到接收器中，用于后续的培养与研究。该模块突破性地将叶绿素荧光显微成像与单弹射细胞分选技术结合起来，成为光合作用研究的重要工具，具有高效、精准等特点，检测与分选过程都能实现非标记、无损伤。

1 叶绿素荧光成像显微分选模块的研制

为了研制出叶绿素荧光成像显微分选模块，我们采用了单细胞弹射系统，通过光与物质相互作用，以非接触的方式实现单细胞的精准分离。将藻液等样品加在分选芯片上，通过光路转接部件将激发光引至分选芯片进行叶绿素荧光成像，检测并分析数据后，根据叶绿素参数选择目标细胞，再启动分选弹射部件中的激光器对样品进行显微分选，将目标细胞弹射到收集器中。

1.1 分选模块总体方案设计

项目的技术路线如图所示，首先对样品进行叶绿素荧光成像，计算各种荧光参数并进行分析，根据分析结果筛选参数有差异的样品，然后分选弹射部件发射激光，将目标样品收集到收集器中，并用于后续的培养与分析。

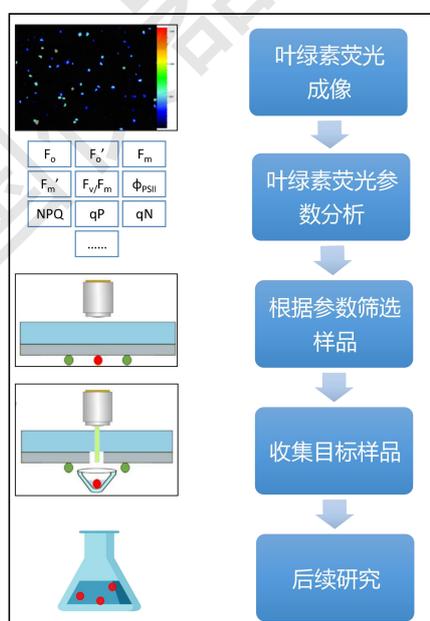


图 1 总体技术路线图

显微分选模块由分选弹射部件、光路转接部件、分选芯片、接收器等部件组成，如图 2

所示。通过软件检测叶绿素荧光，移动芯片到目标区域，并触发分选，完成目标样品收集。

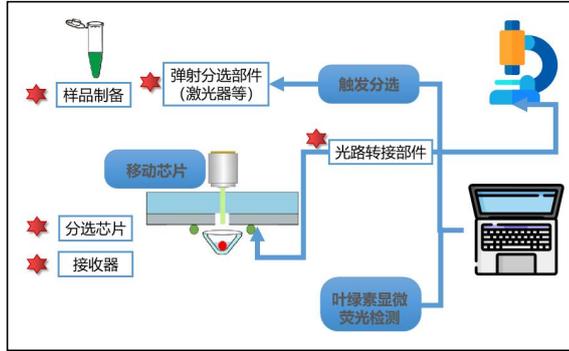


图 2 显微分选模块总体框图

1.2 分选模块实物的研制

1.2.1 分选弹射部件

分选弹射部件是整个显微分选模块的核心部件。包括有激光器、光束大小控制系统、激光光束能量调节装置、弹射及上成像系统等。采用紧凑型设计，分选光路系统、发光装置都集成在一个小型的系统中（图 3）。

在显微分选过程中，不同的细胞种类，其形态、大小不尽相同，其质量和重心有所差别。分选弹射部件中设计了激光光束能量调节装置，可以通过软件随时根据样品大小调节激光器触发能量，能兼容一定尺寸的样品分选模式，尽量减低对细胞的损伤。

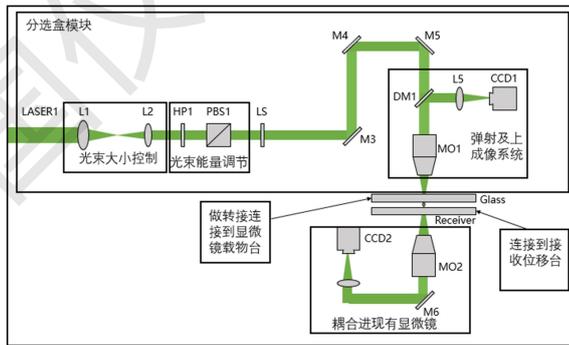


图 3 分选弹射部件设计图

1.2.2 光路转接部件

原设备显微成像为正置显微镜，分选过程中分选芯片是倒置的。为了不影响原有设备功能的正常使用，我们设计制作了光路转接部件，包括两组反射镜和两组转换透镜，将正置显微镜的成像光路系统与分选弹射部件的光路系统进行匹配。

对样品进行分选时，将滴加藻液样品的分选芯片倒置放于样品架上，一方面通过光路转接部件将光路引到显微分选装置中，通过原有成像设备的激发光源、物镜、CCD 相机观测

叶绿素荧光参数, 激发光源经过两次反射到达样品, 荧光信号再经过两次反射到达相机成像。另一方面, 将芯片移动到分选区域后触发分选, 分选光源从上方到达芯片, 将目标细胞弹开, 进行样品的显微分选、接收 (图 4)。

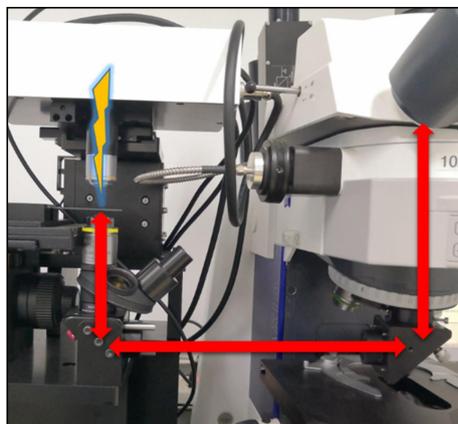


图 4 光路转移部件

1.2.3 分选芯片

为了能够实现显微分选, 我们对分选芯片表面做了镀膜处理, 激光照射到介质薄膜上, 薄膜会吸热膨胀, 产生向下的推力将样品弹开。我们测试了不同的镀膜厚度的分选效果, 最终选择了 200 nm。另外, 为了避免藻液样品聚成液滴, 我们还对分选芯片进行亲水处理, 使藻液等样品形成均匀薄膜。

1.2.4 接收器

设计分节式细胞接收器, 可与 PCR 管匹配, 便于后续研究。收集器中可预先放置培养基, 分选后直接继续培养。分选接收器和物镜通过螺纹连接于转接转盘, 转接转盘可转动, 切换物镜用于成像观察、分选接收器用于接收弹射的目标细胞。

2 叶绿素荧光成像显微分选模块的应用

2.1 叶绿素荧光成像显微分选模块的分选过程

以紫球藻为例, 叶绿素荧光成像显微分选过程如图 5 所示。首先选择测量程序, 调节各项指标, 对样品进行叶绿素荧光显微成像。再通过软件计算成像视野中每个微藻细胞的叶绿素荧光参数。接着根据结果选择目标细胞 (如箭头所指), 启动弹射分选, 将样品弹射到收集器中。

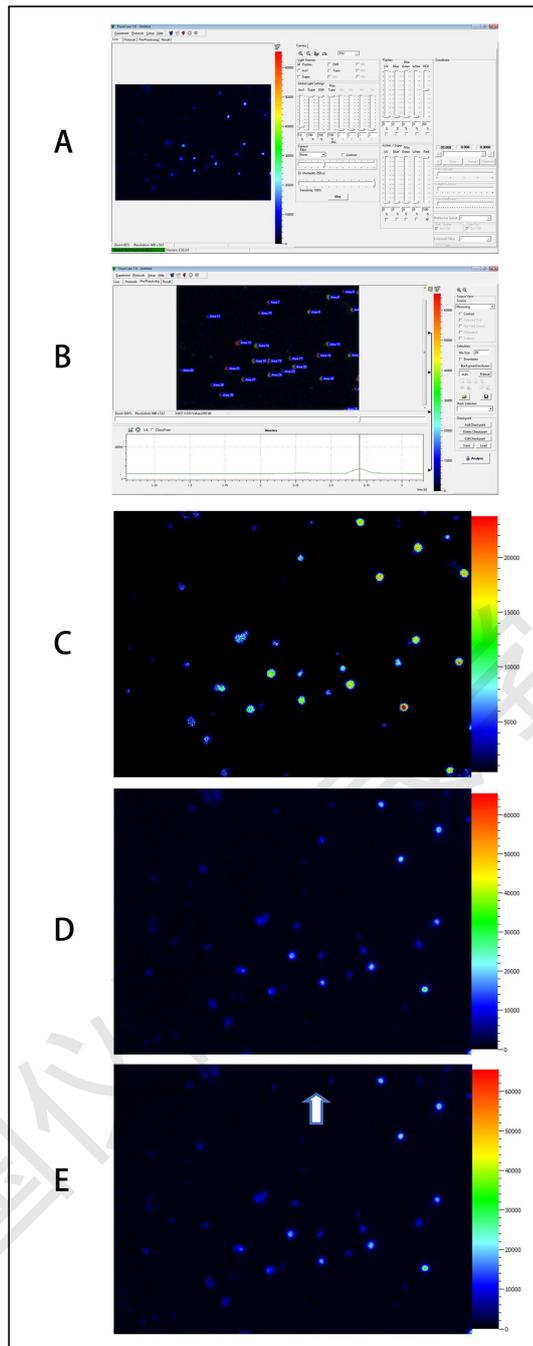


图5 紫球藻显微分选过程

A：选择测量程序，调节各项指标；B：计算各项叶绿素荧光参数；C：紫球藻的最大荧光值 F_m ；D：根据叶绿素荧光参数结果选择目标细胞；E：启动激光器进行显微分选，将目标弹射到收集器中。

相比于传统的单细胞分离技术，显微分选模块具有无标记、可视化、准确率高等优势。同时，可以保留细胞的原始状态，最大程度上减少对细胞的损伤与污染，避免因获取单细胞的过程对细胞产生的影响，从而减少在后续单细胞分析研究中产生的误差和干扰。

2.2 叶绿素荧光成像显微分选模块的应用

在实际应用过程中,该显微分选模块对于多种不同的微藻等样品都能实现精准的非损伤显微分选。

以红藻门的紫球藻 (*Porphyridium purpureum*) (图 6)、绿藻门的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) (图 7)、蓝藻门的集胞藻 (*Synechocystis sp. PCC6803*) (图 8) 为例,该研究研制的叶绿素荧光显微分选模块均能实现理想的显微分选效果。显微分选之前的荧光成像图中,红色圆圈标注目标细胞所在位置;启动显微分选之后,红色圆圈内部已无荧光信号,目标细胞已成功弹射。

常规的藻类转化后的突变体筛选工作通常需要经过“转化后涂板生长-单藻落培养-表型筛选-获得所需突变株”的过程,这一过程周期较长。使用显微分选模块,可以直接从转化后的藻液中选择具有特定光合表型(比如较低的 Fv/Fm 或较高的 NPQ 等)的藻细胞,直接分选单个细胞并培养,可以快速获得突变株系,大大缩短突变体筛选工作的周期。

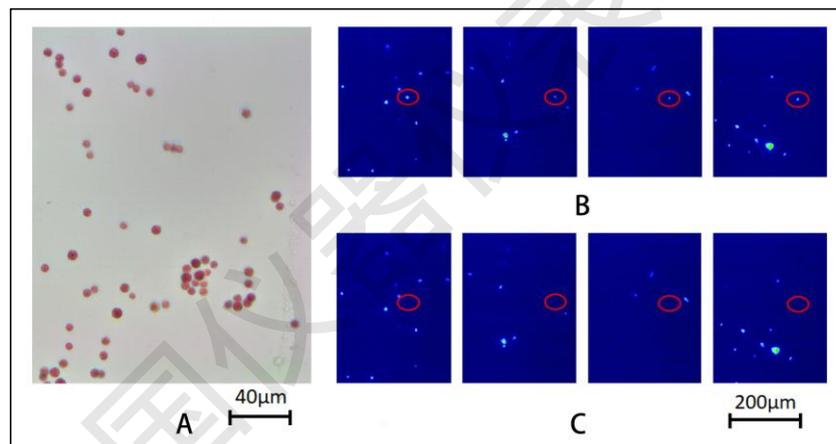


图 6 紫球藻显微分选效果

A: 光学显微镜下的紫球藻; B: 显微分选之前; C: 显微分选之后

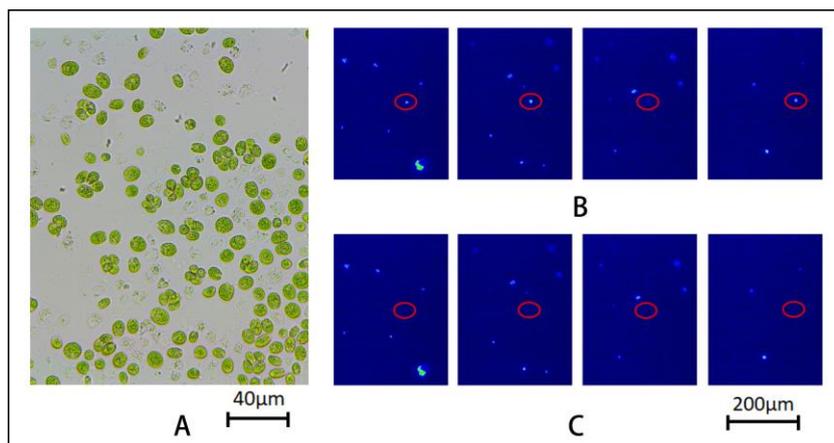


图7 莱茵衣藻显微分选效果

A : 光学显微镜下的莱茵衣藻; B : 显微分选之前; C : 显微分选之后。

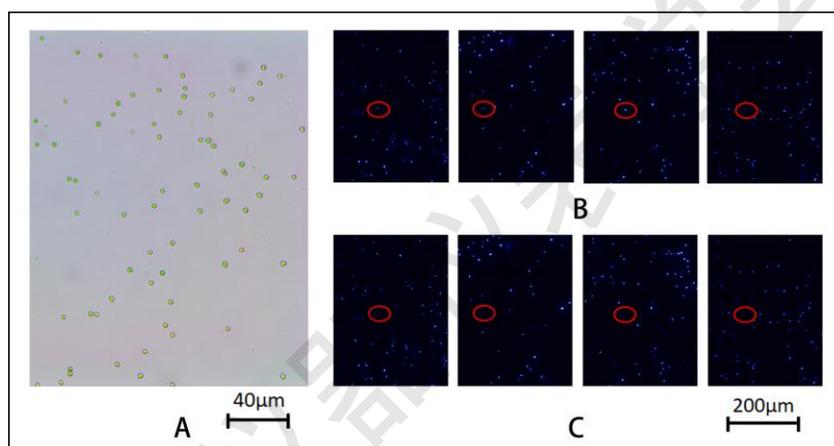


图8 集胞藻显微分选效果

A : 光学显微镜下的集胞藻; B : 显微分选之前; C : 显微分选之后

3 结语

叶绿素荧光显微成像技术在藻类光合作用研究中具有广泛应用前景,但现有设备都不能进行对感兴趣的微藻细胞进行精准分选,也影响了后续进一步研究。研制的显微分选模块将叶绿素荧光参数与单细胞分选技术结合起来,极大地促进了藻类、植物细胞、光合细菌等样品的显微分选,可以将光合功能有差异、对环境胁迫或病菌产生抗性的样品从复杂样品中筛选出来,实现突变体的筛选、优良株系选育等。该项目弥补了原有的叶绿素荧光显微成像仪在检测之后无法分选的技术缺陷,同时也显著拓展了同类设备的后续应用范围。

参考文献:

- [1] Baker N R and Rosenqvist E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities[J]. *J. Exp. Bot.*, 2004, 55(403): 1607-1621.
- [2] Baker N. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59: 89-113.
- [2] Berman-Frank I, Lundgren P, Chen Y B *et al.* Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*[J]. *Science*, 2001, 294: 1534.
- [3] Ferimazova N, Felcmanová K, Šetlíková E *et al.* Regulation of photosynthesis during heterocyst differentiation in *Anabaena sp.* strain PCC 7120 investigated in vivo at single-cell level by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy[J]. *Photosyn. Res.*, 2013, 116: 79-91.
- [4] Gachon C, Küpper H, Küpper F *et al.* Single-cell chlorophyll fluorescence kinetic microscopy of *Pylaiella littoralis* (Phaeophyceae) infected by *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota)[J]. *Eur. J. Phycol.*, 2006, 41(4): 395-403.
- [5] Jacobs M, Lopez-Garcia M, Phrathep O P *et al.* Photonic multilayer structure of *Begonia* chloroplasts enhances photosynthetic efficiency[J]. *Nature plants*, 2016, 2(11): 16162.
- [6] Küpper H, Šetlík I, Trtílek M *et al.* A microscope for two-dimensional measurements of in vivo chlorophyll fluorescence kinetics using pulsed measuring radiation, continuous actinic radiation, and saturating flashes[J]. *Photosynthetica*, 2000, 38, s553-570.
- [7] Liu W J, Liu H, Chen Y E *et al.* Chloroplastic photoprotective strategies differ between bundle sheath and mesophyll cells in maize (*Zea mays* L.) under drought[J]. *Front. Plant Sci.*, 2022, 13: 885781.
- [8] Yu M, Chen L, Liu D H *et al.* Enhancement of photosynthetic capacity in spongy mesophyll cells in white leaves of *Actinidia kolomikta*[J]. *Front. Plant Sci.*, 2022, 13: 856732.
- [9] 朱新广, 许大全主编. 光合作用研究技术, 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 97-105.