

OJIP 荧光动力学曲线 J、I 点特征时间确定方法

丁志超^{1,2,3}, 殷高方^{1,3*}, 赵南京^{1,3}, 甘婷婷^{1,3}, 元培龙^{1,2,3}, 谷梦园^{1,2,3}, 陈敏^{1,2,3},
王璐^{1,2,3}, 董鸣^{1,2,3}, 黄朋⁴, 马明俊^{1,3}, 方丽^{1,3}, 杨瑞芳^{1,3}

¹中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所, 中国科学院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

²中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

⁴合肥学院生物食品与环境学院, 安徽 合肥 230601

摘要 OJIP 荧光动力学被广泛应用于藻类光合作用研究,而在常用的 OJIP 曲线分析中,常将 J、I 点的特征时间固定,忽略了藻类种类对 J、I 点特征时间的影响,这会造成 J、I 点荧光强度计算结果的偏差,直接影响测量结果的准确性。鉴于此,提出使用三级指数函数逼近 OJIP 曲线的方法动态获取 J、I 点的特征时间。不同藻种的 J、I 点的特征时间和二氯苯基二甲脲(DCMU)胁迫下 J 点特征时间实验的测试结果表明:所提方法能够有效获得不同藻类 J、I 点的特征时间,二形栅藻、蛋白核小球藻、普通小球藻和新月筒柱藻 J 点的特征时间分别为 2.22, 1.52, 1.33, 1.01 ms, I 点的特征时间分别为 28.80, 27.15, 29.90, 15.28 ms, 多次计算结果的相对标准偏差均小于 10%, 具有较好的一致性;在 DCMU 浓度(质量浓度)分别为 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ 的毒性胁迫实验条件下,所提方法计算的普通小球藻的 J 点特征时间分别为 1.25, 1.18, 1.10 ms, 相对标准偏差为 12.03%。此外,利用所提方法计算得到的光合活性参数 V_j 与 DCMU 浓度之间具有良好的毒性剂量-效应关系,相关性系数 R^2 为 0.991。

关键词 物理光学; 荧光动力学; 特征时间确定; 指数分析; 藻类

中图分类号 X832

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202242.0826001

Method for Determining Characteristic Time of J and I Points of OJIP Fluorescence Kinetic Curve

Ding Zhichao^{1,2,3}, Yin Gaofang^{1,3*}, Zhao Nanjing^{1,3}, Gan Tingting^{1,3}, Qi Peilong^{1,2,3},
Gu Mengyuan^{1,2,3}, Chen Min^{1,2,3}, Wang Lu^{1,2,3}, Dong Ming^{1,2,3}, Huang Peng⁴,
Ma Mingjun^{1,3}, Fang Li^{1,3}, Yang Ruifang^{1,3}

¹Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

²University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

³Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Anhui Province, Hefei, Anhui 230031, China;

⁴School of Biological Food and Environment, Hefei University, Hefei, Anhui 230601, China

Abstract OJIP fluorescence kinetics is widely used in the study of algae photosynthesis, but in common OJIP curve analysis, the characteristic time of J and I points is often fixed. Therefore, the influence of algae species on the characteristic time of J and I points is ignored, which results in the deviation of the fluorescence intensity calculation

收稿日期: 2021-09-23; 修回日期: 2021-10-19; 录用日期: 2021-11-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC3200100)、国家自然科学基金项目(61875207)、安徽省科技重大专项(202003A07020007)、安徽省杰出青年科学基金项目(1908085J23)、中科院仪器设备功能开发技术创新项目(后资助)(Y93H3G1251)、中国科学院合肥物质科学研究院院长基金(YZJJZX202013)

通信作者: *gfyin@aiofm.ac.cn

results of J and I points and directly affects the accuracy of the measurement results. In view of this, a method of using three-level exponential function to approximate OJIP curve is proposed to dynamically obtain the characteristic time of J and I points. The test results of experiments of characteristic time of J and I points of different algae species, and the characteristic time of J point under dichlorophenyl dimethylurea (DCMU) stress show that the proposed method can effectively obtain the characteristic time of J and I points of different algae. The characteristic time of J point of *Scenedesmus dimorpha*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* and *Cylindrotheca closterium* is 2.22, 1.52, 1.33, 1.01 ms, respectively. The corresponding characteristic time of I point is 28.80, 27.15, 29.90, 15.28 ms, respectively. The relative standard deviation of multiple calculation results is less than 10%, which has a great consistency. Under the toxic stress test conditions with DCMU concentrations (mass concentrations) of 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$, the characteristic time of J point of *Chlorella vulgaris* calculated by the proposed method is 1.25, 1.18, and 1.10 ms, respectively, and the relative standard deviation is 12.03%. In addition, the photosynthetic activity parameter V_j calculated by the proposed method has a good toxic dose-effect relationship with the DCMU concentration, and the correlation coefficient R^2 is 0.991.

Key words physical optics; fluorescence kinetics; characteristic time determination; exponential analysis; algae

1 引言

藻类细胞在特定光照条件下,叶绿体产生的荧光表现出从本底荧光 O 点到最大荧光 P 点的上升现象,称为 OJIP 荧光动力学过程^[1],该过程蕴含着丰富的藻类光合作用能流过程信息,是检测藻类光合作用状态的有效工具,已被广泛应用于藻类生理学、病理学和毒理学的研究中^[2-3]。通常,典型的 OJIP 荧光动力学曲线存在 3 个上升阶段,即 O-J 阶段(0~3 ms)、J-I 阶段(3~30 ms)和 I-P 阶段(30~200 ms),分别对应光系统 II(PSII)中初级电子受体 Q_A 、质醌(PQ)库与光系统 I(PSI)侧的电子受体还原过程^[4]。Strasser 等^[5]提出的 JIP-test 分析方法是常用的 OJIP 曲线分析方法,该方法依据生物膜能量流动模型,利用 O 点、J 点、I 点和 P 点对应的荧光强度 F_O 、 F_J 、 F_I 和 F_P 等参数构建能够表征植物光合活性的多种光合活性参数,如 V_j (J 点最大可变荧光)、 PI_{ABS} (综合光合活性参数)等。因此,J、I 点荧光强度的准确测量是 JIP-test 分析方法的基础和关键。目前, F_J 、 F_I 多采用 J(2 ms)、I(30 ms)点的荧光强度。然而,已有研究表明,不同实验样本和实验条件下 OJIP 曲线的 J、I 点的特征时间并不固定,固定时间获得的 F_J 和 F_I 必然存在偏差^[6]。为此,Tomek 等^[7]采用 9 阶多项式拟合 OJIP 曲线,通过计算拟合函数局部最小值来确定 J、I 点的特征时间。Xia 等^[6]在此基础上,通过曲率分析的方式确定 J、I 点的位置,能够在不进行任何预先设定的情况下确定 OJIP 曲线 J、I 点的特征时间。然而,该方法无法实现光合胁迫下藻类光合活性参数的准确获取。

因此,本文提出了一种基于三级指数的 OJIP 曲线 J、I 点特征时间的计算方法。通过对不同藻种

和与毒性胁迫实验样本测试,并与曲率分析方法比较,验证所提方法的有效性。

2 实验装置与材料

将蛋白核小球藻、普通小球藻、二形栅藻和新月筒柱藻作为受试对象,藻种分别使用 BG11、F/2+Si 培养基进行接种,将接种后的藻液置于恒温培养箱中进行扩大培养,温度设置为(25±1) °C,光照强度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗比为 1:1(光照时间为 12 h)。样品初始叶绿素浓度(质量浓度)为 100~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,藻液体积为 70 mL。藻类胁迫实验选用药剂为二氯苯基二甲脲(DCMU),将其溶于二甲基亚砜(DMSO)中,并利用去离子水稀释至实验所需的药剂浓度。

藻类 OJIP 曲线测量装置如图 1 所示,其中 PMT 为光电倍增管,MUX 为模拟开关,TIA 为跨阻放大器,A/D 为模数转换,ADC 为模数转换器,SPI BUS 为串行通信协议总线,GPIO 为通用输入输出接口,I2C BUS 为两线制串行通讯总线,D/A 为数模转换,LDO 为低压差线性稳压器。激发光源选用发射波段位于 469 nm 的激光二极管(LD)^[8],光源开启时间小于 50 μs ^[9],光源光强连续可调(最大可达 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。通过预实验确定激发光强为 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,激发时间为 280 ms。依据 OJIP 荧光信号特点,O-J 段荧光信号采用跨阻放大方式,初始采样率可达每秒 83 万次。为保证 J-I-P 阶段荧光信号不失真,采用积分放大方式,后续采样率为每秒 2.3 万次,采样率可依据积分时间调整。

3 分析方法

由于光子被叶绿素分子吸收的概率满足泊松分

布,因此在强光照射下, t 时刻的荧光强度与最大可变荧光呈指数函数关系^[10]。同时,Boisvert 等^[11-12]的实验结果表明,两级、三级指数函数可以定量分析

OJIP 曲线。因此,本文提出利用三级指数函数逼近 OJIP 曲线,以确定 J、I 点的特征时间。典型普通小球藻的 OJIP 曲线如图 2 所示。

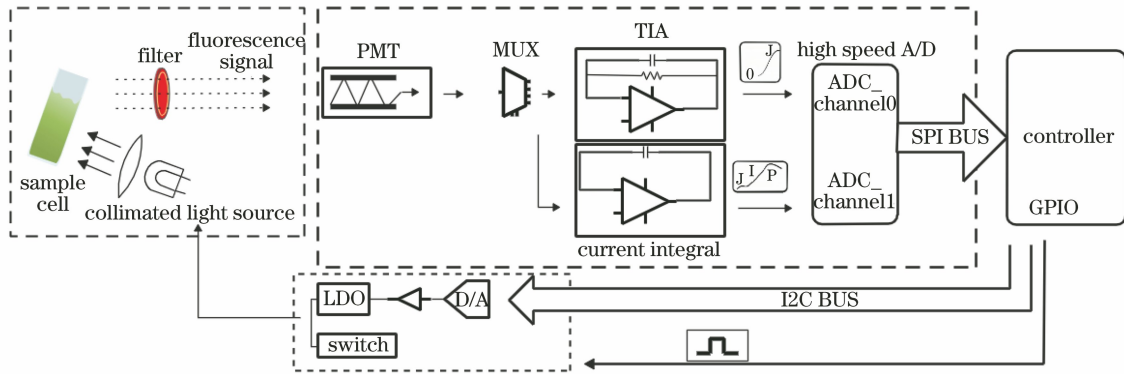


图 1 藻类 OJIP 荧光动力学测量系统

Fig. 1 Measurement system of algae OJIP fluorescence kinetics

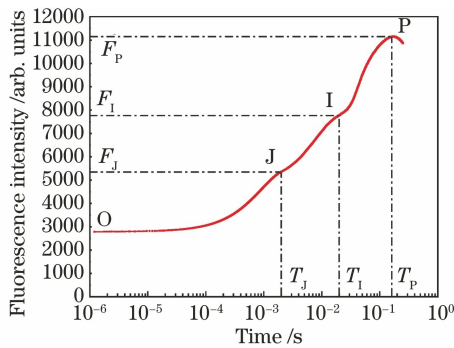


图 2 普通小球藻的 OJIP 曲线

Fig. 2 OJIP curve of *Chlorella vulgaris*

t 时刻的荧光产率^[11-12]的表达式为

$$F(t) = F_O + (F_J - F_O) \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_J}\right) \right] + (F_I - F_J) \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_I}\right) \right] + (F_P - F_I) \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_P}\right) \right], \quad (1)$$

式中: F_O 为暗适应条件下的最小荧光; T_J 、 T_I 、 T_P 分别为 J、I、P 点的特征时间; t 为荧光信号采样时间; F_J 、 F_I 、 F_P 分别为 J、I、P 点对应的荧光强度; $F(t)$ 为计算的 OJIP 曲线。

最大荧光强度 F_P 可通过局部斜率逼近的方式获得, T_J 和 T_I 分别可选取理论时间范围 $1 \sim 3$ ms 和 $15 \sim 30$ ms 内采样点的时间 t 。因此,若 $1 \sim 3$ ms 内有 M 个采样点, $15 \sim 30$ ms 内有 N 个采样点,则 (1) 式可计算出 $M \times N$ 条 OJIP 曲线。然后,由皮尔逊相关系数得出计算的 OJIP 曲线与测量的 OJIP 曲线间的相关程度,相关程度最大的计算荧光动力学曲线对应的 T_J 、 T_I 即为 J、I 点的特征时间。

此外,本文将 Xia 等^[6]提出的曲率分析法作为对比分析方法,以验证指数分析法的可靠性和优势。为避免噪声对曲率分析的影响,先对 OJIP 曲线的原始数据进行平滑处理,再利用离散点的一阶、二阶导数来计算 OJIP 拟合曲线的曲率,并利用曲率对数局部最大值与时间的对应关系确定 J、I 点的特征时间。

4 分析与讨论

4.1 不同藻种实验结果分析

为研究不同藻类在相同激发条件下,OJIP 荧光动力学曲线中 J、I 特征时间的差异性。选择小球藻、蛋白核小球藻、二形栅藻和新月筒柱藻为研究对象,利用所提藻类 OJIP 曲线测量系统对以上藻类进行荧光探测,并获取相应的 OJIP 曲线。然后,分别采用指数分析法、曲率分析法计算 J、I 点特征时间,结果如图 3~6 所示。

由图 3~6 可以看出,不同藻类 OJIP 曲线形状有显著差异。指数分析法和曲率分析法分析结果证实,不同藻种 OJIP 曲线的 J、I 点特征时间均出现在 2 ms、30 ms 附近,但并不完全固定。此外还发现,新月筒柱藻的 OJIP 曲线在 O-J 阶段出现连续上升情况,其曲率并未出现明显的局部尖峰,因此曲率分析法不能准确定位 J 点位置,而指数分析法仍能有效定位 J 点位置。

进一步对 4 种藻类样本分别进行 5 次平行测量分析,结果如表 1 所示。指数分析法 5 次计算的 J、I 点的特征时间具有较好的一致性,相对标准偏差 (RSD) 均不超过 8.9%。小球藻、蛋白核小球藻、二

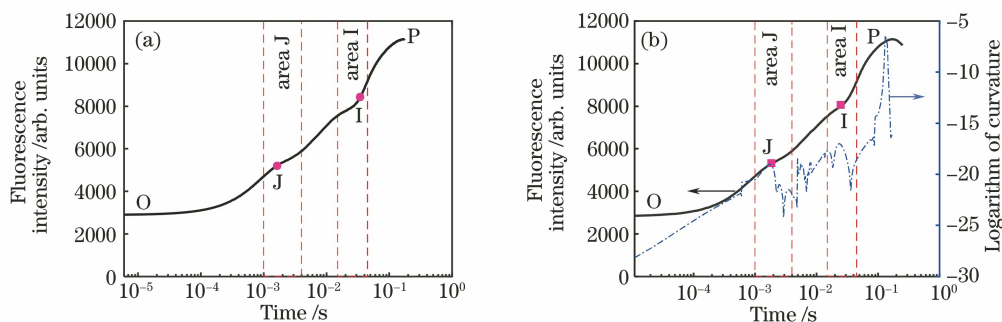


图 3 小球藻荧光动力学和 J、I 特征时间计算结果。(a)指数分析法;(b)曲率分析法
Fig. 3 Fluorescence kinetics of *Chlorella vulgaris* and calculation results of J, I characteristic time.
(a) Exponential function analysis method; (b) curvature analysis method

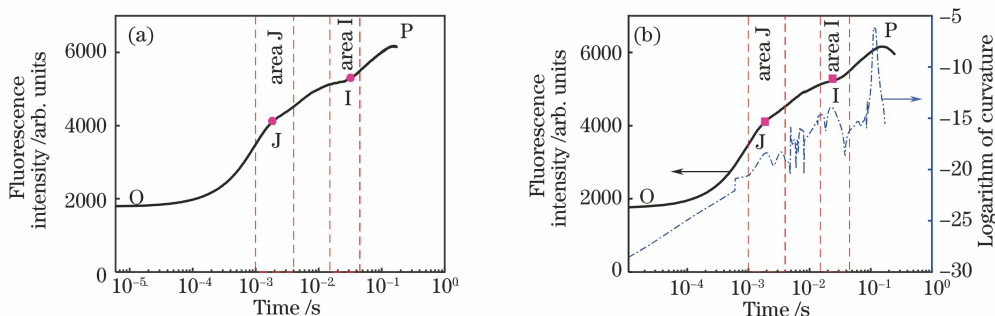


图 4 蛋白核小球藻荧光动力学和 J、I 特征时间计算结果。(a)指数分析法;(b)曲率分析法
Fig. 4 Fluorescence kinetics of *Chlorella pyrenoidosa* and calculation results of J, I characteristic time. (a) Exponential function analysis method; (b) curvature analysis method

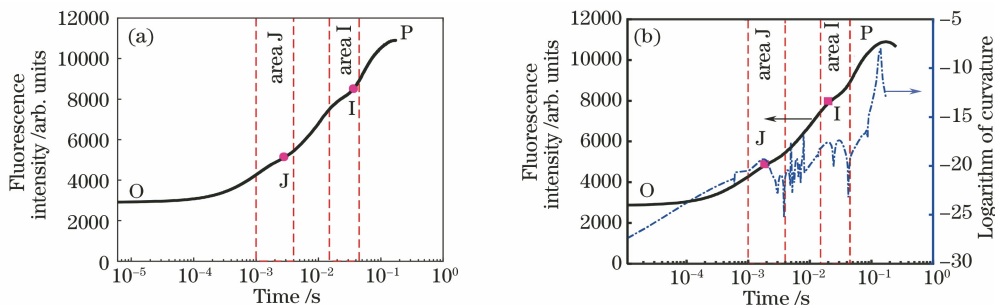


图 5 二形栅藻荧光动力学和 J、I 特征时间计算结果。(a)指数分析法;(b)曲率分析法
Fig. 5 Fluorescence kinetics of *Scenedesmus dimorpha* and calculation results of J, I characteristic time.
(a) Exponential function analysis method; (b) curvature analysis method

形栅藻和新月筒柱藻 J 点的特征时间分别为 1.33, 1.52, 2.22, 1.04 ms, I 点的特征时间分别为 29.90, 27.15, 28.80, 15.28 ms, 且存在明显差异。因此, 将 J、I 点的特征时间固定在 2 ms、30 ms 必然会造成 J、I 点荧光强度计算偏差, 光合活性参数 V_J 、 V_I 的最大偏差分别为 15.50%、5.30%, J 点荧光强度的偏差会直接影响光合活性参数 PI_{ABS} 的计算结果。

4.2 胁迫实验结果分析

DCMU 能够抑制叶绿体中次级电子受体 Q_B 还原, 阻断电子传递, 进而实现对光合作用的抑制。在

DCMU 胁迫下, OJIP 曲线的 J 点荧光强度与 DCMU 浓度(质量浓度)呈正相关关系, 光合活性参数 V_J 反应敏感且快速^[13]。对荧光动力学曲线形状出现变化时, 同种藻受影响处的特征时间是否能够保持一致性, 计算得到的光合活性参数是否具有好的剂量-效应关系进行了研究。实验将普通小球藻作为研究对象, 在实验样本中分别添加浓度为 10, 20, 40 $\mu\text{g/L}$ 的 DCMU, 进行 30 min 的毒性胁迫实验, 利用藻类 OJIP 曲线测量系统对实验样本进行荧光探测。为消除测量产生的随机误差, 在同一浓度下进行 3 次平行测量。普通小球藻在不同浓度

DCMU 胁迫下的 OJIP 曲线如图 7 所示。 V_j 与 DCMU 浓度的剂量-效应关系曲线如图 8 所示,不

同浓度 DCMU 胁迫下 J 点的特征时间变化如表 2 所示。

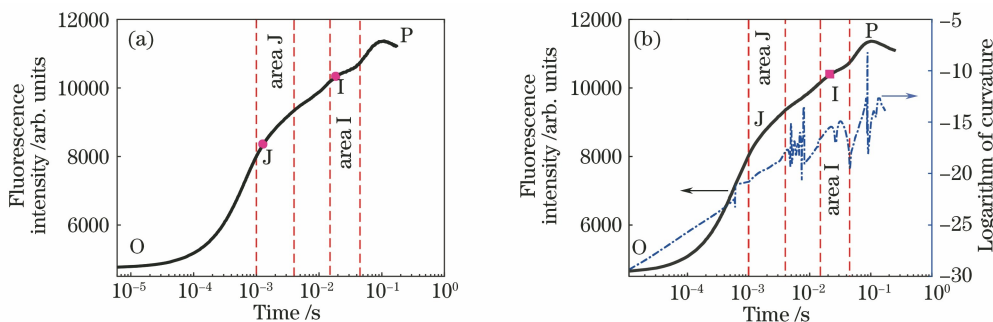


图 6 新月筒柱藻荧光动力学和 J、I 特征时间计算结果。(a)指数分析法;(b)曲率分析法

Fig. 6 Fluorescence kinetics of *Cylindrotheca closterium* and calculation results of J, I characteristic time.

(a) Exponential function analysis method; (b) curvature analysis method

表 1 指数分析法计算 4 种藻的 J、I 点特征时间结果

Table 1 Results of characteristic time of J, I points for four kinds of algae calculated by exponential function analysis method

Alga	Average of T_j /ms	RSD of T_j /%	Average of T_i /ms	RSD of T_i /%
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1.52	1.8	27.15	8.9
<i>Chlorella vulgaris</i>	1.33	1.4	29.90	0.1
<i>Cylindrotheca closterium</i>	1.04	2.2	15.28	4.1
<i>Scenedesmus dimorpha</i>	2.22	8.5	28.80	5.2

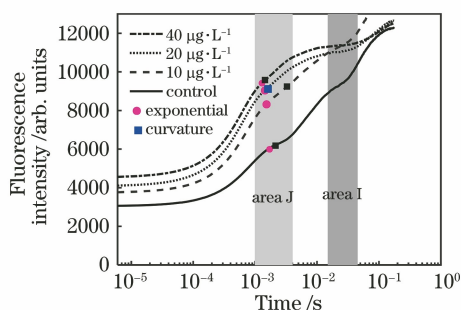


图 7 普通小球藻在 DCMU 胁迫下的 OJIP 曲线

Fig. 7 OJIP curve of *Chlorella vulgaris* under DCUM stress

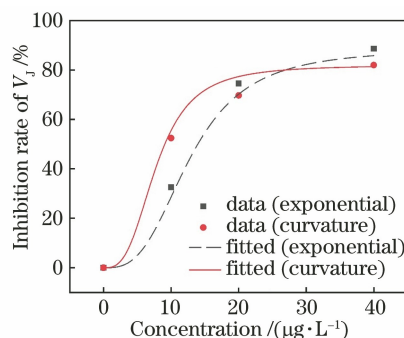


图 8 V_j 随 DCMU 浓度的变化

Fig. 8 V_j varying with DCMU concentration

表 2 DCMU 胁迫下 J 点特征时间的变化

Table 2 Change of characteristic time of J point under DCMU stress

unit: ms

Concentration of DCMU	0	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Curvature analysis	1.80	2.82	1.32	1.22
Exponential function analysis	1.45	1.25	1.18	1.10

如图 7 所示,在 J 点对应的 DCMU 作用下, OJIP 曲线荧光强度总体抬升,指数分析法和曲率分析法计算得到的 J 点特征时间的 RSD 分别为 12.03% 和 40.88%。通常毒性强度与受试藻的抑制程度间的剂量-效应曲线呈现反“S”形,一般利用阻滞增长模型(Logistic)进行非线性拟合^[14]。以 DCMU 浓度作为毒性强度,光合活性参数 V_j 的抑制率作为抑制程度,利用 Logistic 函数拟合,结果如图 8 所示。可以发现,利用指数分析法计算出的光

合活性参数 V_j 与 DCMU 浓度具有良好的剂量-效应关系,拟合相关系数 R^2 为 0.991,结果优于曲率分析法的拟合相关系数(0.983)。由此可见,指数分析法计算结果的稳定性明显优于曲率分析法,所得的 F_j 点荧光强度更能体现 DCMU 对藻类 J 点的抑制效应规律。

5 结 论

针对将 J、I 点特征时间固定会引起 F_j 、 F_i 计算

偏差的问题,提出了一种基于三级指数的 OJIP 曲线 J、I 点特征时间计算方法。不同藻种测试分析结果表明,所提方法能够克服曲率分析法对 OJIP 曲率变化的依赖,有效计算出所有实验藻种 J、I 点的特征时间。同时,证实不同藻种 J、I 点的特征时间均不完全固定,对蛋白核小球藻、小球藻、二形栅藻和新月筒柱藻进行 5 次测量得到的 J 点特征时间的平均值分别为 1.52, 1.33, 2.22, 1.01 ms, I 点特征时间的平均值分别为 27.15, 29.90, 28.80, 15.28 ms, 相对标准偏差均不超过 8.90%, 并且 V_j 、 V_i 的最大偏差分别为 15.50%、5.30%。DCMU 胁迫实验结果表明:指数分析法可有效计算出所有 DCMU 浓度胁迫下藻种 J 点的特征时间,相对标准偏差为 12.03%, 稳定性明显优于曲率分析法;利用指数分析法计算出的光合活性参数 V_j 与 DCMU 浓度具有良好的剂量-效应关系,拟合相关系数 R^2 为 0.991,能够体现 DCMU 对藻类 J 点荧光的抑制效应规律。本研究提供了一种对 OJIP 曲线 J、I 点特征时间准确定位的新方法,为 OJIP 曲线定量分析提供了更为准确的基础荧光参数 (F_j 、 F_i),对叶绿素荧光法在藻类生理学、病理学和毒理学中的应用研究具有重要价值和意义。

参 考 文 献

- [1] Han B P, Han Z G, Fu X. Algal photosynthesis: mechanisms and models[M]. Beijing: Science Press, 2003.
韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] Strasser R J, Govindjee. The F_0 and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae[M]// Argyroudi-Akoyunoglou J H. Regulation of chloroplast biogenesis. Nato ASI series. Boston: Springer, 1992, 226: 423-426.
- [3] Guo Y, Zhang Y, Lu Y, et al. Special issue in honour of Prof. Reto J. Strasser-effect of AtLFNR1 deficiency on chlorophyll *a* fluorescence rise kinetics OJIP of *Arabidopsis*[J]. Photosynthetica, 2020, 58 (SI): 391-398.
- [4] Strasser R J, Srivastava A, Govindjee. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria[J]. Photochemistry and Photobiology, 1995, 61(1): 32-42.
- [5] Papageorgiou G C, Govindjee. Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis[M]// Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Srivastava A, et al. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. Netherlands: Springer, 2004, 19: 321-362.
- [6] Xia Q, Tan J, Cheng S, et al. Sensing plant physiology and environmental stress by automatically tracking F_j and F_i features in PSII chlorophyll fluorescence induction [J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1495-1503.
- [7] Tomek P, Lazár D, Ilik P, et al. Research note: on the intermediate steps between the O and P steps in chlorophyll *a* fluorescence rise measured at different intensities of exciting light [J]. Functional Plant Biology, 2001, 28(11): 1151-1160.
- [8] Malapascua J R, Ranglová K, Masojídek J. Photosynthesis and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* R-117 cultured in an internally LED-illuminated photobioreactor [J]. Photosynthetica, 2019, 57(1): 103-112.
- [9] Bates H, Zavafer A, Szabó M, et al. A guide to Open-JIP, a low-cost open-source chlorophyll fluorometer[J]. Photosynthesis Research, 2019, 142 (3): 361-368.
- [10] Ley A C, Mauzerall D C. Absolute absorption cross-sections for Photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1982, 680(1): 95-106.
- [11] Boisvert S, Joly D, Carpentier R. Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step[J]. The FEBS Journal, 2006, 273(20): 4770-4777.
- [12] Pospíšil P, Dau H. Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution[J]. Photosynthesis Research, 2000, 65(1): 41-52.
- [13] Guo Y J, Lu Y P, Goltsev V, et al. Comparative effect of tenuazonic acid, diuron, bentazone, dibromothymoquinone and methyl viologen on the kinetics of Chl *a* fluorescence rise OJIP and the MR_{820} signal[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 156: 39-48.
- [14] Gan T T, Zhao N J, Yin G F, et al. Optimal chlorophyll fluorescence parameter selection for rapid and sensitive detection of lead toxicity to marine microalgae *Nitzschia closterium* based on chlorophyll fluorescence technology [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2019, 197: 111551.