



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113916851 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 202111129859.9

(22) 申请日 2021.09.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113916851 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(73) 专利权人 中国科学院植物研究所

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20号

(72) 发明人 尹燕 梁鹏 田利金 唐为江

王丽 张春艳

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 王春霞

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101726585 A,2010.06.09

US 2020158641 A1,2020.05.21

AU 2004242121 A1,2004.12.02

US 2006102851 A1,2006.05.18

US 2018058987 A1,2018.03.01

sortingZhengda Sun.Endothelial cell high-enrichment from endovascular biopsy sample by laser capture microdissection and fluorescence activated cell sorting.《Journal of Biotechnology》.2014,全文.

Yu Wang.A microfluidic robot for rare cell sorting based on machine vision identification and multi-step sorting strategy .《Talanta 》.2021,全文.

审查员 葛瑞芳

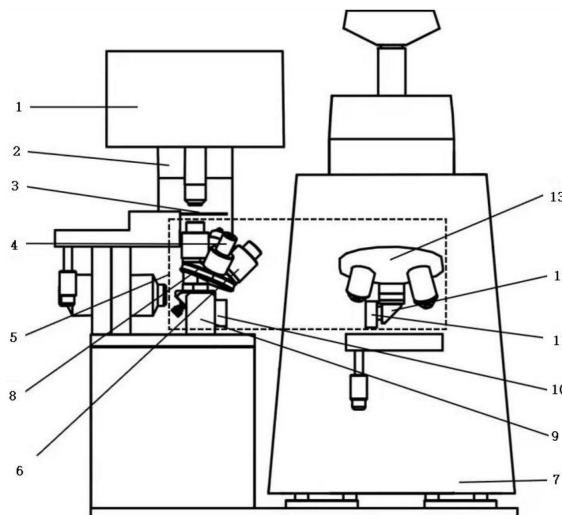
权利要求书2页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法。所述显微分选方法包括如下步骤：将待测样品滴加至弹射分选放样芯片上，并使待测样品朝下，然后将弹射分选放样芯片放置到放样台上；调整显微物镜使其对准待测样品；采用叶绿素荧光动态显微成像设备观测待测样品，记录叶绿素荧光动力学变化情况，计算叶绿素荧光参数，并根据叶绿素荧光参数的不同变化情况，选择需要分选的目标细胞；使目标细胞移动至弹射光斑所在位置，调整分选收集部件使其位于待测样品的下方；触发激光弹射部件弹射激光进行弹射分选并收集目标细胞。本发明分选方法可实现对复杂生物样品中单细胞的精准分选，为细胞异质性研究、光合作用突变体筛选、光合作用机理及抗逆研究提供了有力的工具。



1. 一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法,在显微分选装置上进行,所述显微分选装置的结构如下:

包括激光弹射显微分选系统和叶绿素荧光动态显微成像设备;所述激光弹射显微分选系统包括激光弹射部件、三维微动调节平台、弹射分选放样芯片、分选收集部件、显微物镜和光路转接耦合部件;

所述激光弹射部件设于所述弹射分选放样芯片的上部,所述分选收集部件和所述显微物镜设于所述弹射分选放样芯片的下部;

所述三维微动调节平台与所述激光弹射部件连接,实现对所述激光弹射部件位置的调节;

通过所述光路转接耦合部件将所述叶绿素荧光动态显微成像设备的光路引入至所述激光弹射显微分选系统中,实现对所述弹射分选放样芯片上样品的观察和分选;

所述光路转接耦合部件包括反射镜I、转换透镜I、转换透镜II和反射镜II;

通过所述反射镜I、所述转换透镜I、所述转换透镜II和所述反射镜II的依次配合,实现对光路的转换;

显微分选方法包括如下步骤:

S1、将待测样品滴加至所述弹射分选放样芯片上,翻转所述弹射分选放样芯片,使所述待测样品朝下,然后将所述弹射分选放样芯片放置到放样台上;

所述待测样品为微藻、植物细胞或光合细菌;

S2、调整所述显微物镜使其对准所述待测样品;

S3、采用所述叶绿素荧光动态显微成像设备观测所述待测样品,记录叶绿素荧光动力学变化情况,计算叶绿素荧光参数;

S4、根据所述叶绿素荧光参数的不同变化情况,选择需要分选的目标细胞;

所述叶绿素荧光参数包括 F_o 、 F_o' 、 F_m 、 F_m' 、 F_v 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、NPQ、qP、qN和qL;

S5、通过所述光路转接耦合部件将所述叶绿素荧光动态显微成像设备的光路与所述激光弹射部件的光路进行耦合;

S6、基于上述光路的耦合,通过调整所述三维微动调节平台,移动所述激光弹射部件,使弹射光斑对准所述目标细胞所在位置;

S7、调整所述分选收集部件,使其位于所述待测样品的下方;

S8、通过控制软件,触发所述激光弹射部件弹射激光,进行弹射分选,采用所述分选收集部件收集目标细胞。

2. 根据权利要求1所述的显微分选方法,其特征在于:步骤S7之前,所述方法还包括如下步骤:

根据所述目标细胞的形态和大小,确定用于弹射分选的激光能量。

3. 根据权利要求1或2所述的显微分选方法,其特征在于:所述弹射分选放样芯片为一载玻片,所述载玻片上镀有金属薄膜。

4. 根据权利要求3所述的显微分选方法,其特征在于:所述分选收集部件和所述显微物镜通过螺纹连接于一转接模块物镜转盘,所述转接模块物镜转盘可转动。

5. 根据权利要求4所述的显微分选方法,其特征在于:所述转接模块物镜转盘通过螺纹连接安装于所述反射镜I的安装口上;

所述转换透镜I通过螺纹连接于所述反射镜I上；

所述反射镜II通过螺纹连接于一物镜转盘上,所述转换透镜II通过螺纹连接于所述反射镜II上。

6.根据权利要求5所述的显微分选方法,其特征在于:所述转换透镜I和所述转换透镜II的焦距均为25~250mm;

所述转换透镜I与所述转换透镜II之间的间距为50~500mm。

一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法,属于显微分选技术领域。

背景技术

[0002] 光合作用是植物包括藻类及光合细菌吸收光能、将CO₂和水转化为有机物并释放O₂的过程。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:由天线色素传递到反应中心,引起电荷分离、电子传递和光合磷酸化,推动光化学反应;以热的形式耗散掉,即非辐射能量耗散;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,因此叶绿素荧光技术是光合生理研究的重要探针,能快速、无损地进行检测。

[0003] 叶绿素荧光技术发展出了很多不同的测量程序,例如慢诱导荧光动力学曲线、瞬态荧光诱导动力学曲线、Q_A再氧化曲线等。以慢诱导荧光动力学曲线为例,通过测量光(ML)、光化光(AL)、饱和光(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F₀、F₀'、F_m、F_m'、F_v、F_v/F_m、Φ_{PSII}、NPQ、qP、qN、qL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,其中F_v/F_m改为F_v/F_m反映了光系统II最大光化学效率,当受到胁迫时发生下降,是研究各种环境胁迫及功能突变对光合作用影响的应用最为广泛的重要指标。

[0004] 从二十世纪80年代开始,CCD成像技术被引入叶绿素荧光动力学测定,叶绿素荧光不再仅仅测量单一位点荧光信号随着时间的线性变化数据,而是记录整个叶片、植株、藻类群体等样品不同区域的荧光动力学分布变化。目前该技术已在植物光合作用、植物环境胁迫及响应、植物病理及抗性分析、水生生物学、海洋学、生态学等研究领域得到了广泛的应用。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普遍应用的重要技术,对光合作用机理及抗逆研究提供了强大的技术支持。

[0005] 2000年,Küpper等人在微观尺度上应用叶绿素荧光成像技术原理,发展了叶绿素荧光动态显微镜,可以在细胞水平、亚细胞水平观测微藻、植物细胞、光合细菌等样品叶绿素荧光信号的空间及时间差异性分布情况。该系统至少包括三种光源:1.低强度脉冲的测量光(ML);连续的光化光(AL);饱和脉冲辐射(SP)。

[0006] 常用的叶绿素荧光测量步骤编程存储于测量程序中,并根据研究课题及实验材料进行选择。通过计算可以得到F_v/F_m、Φ_{PSII}、NPQ、qP、qN、qL等叶绿素荧光参数。目前叶绿素荧光动态显微成像技术已经应用于藻类细胞异质性、重金属胁迫(如镉等)、叶片特异光合结构等研究中。目前市面上没有基于叶绿素荧光信号的显微分选技术,尤其是单细胞分选技术,导致无法对叶绿素荧光参数出现差异的微藻、植物细胞、光合细菌等样品进行筛选,严重影响了相关材料的突变体筛选与光合作用机理研究。因此需要提供一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种基于叶绿素荧光信号的显微分选方法,本发明能够根据叶绿素荧光信号来判别细胞,并通过激光弹射技术实现精准显微分选的方法,对于光合作用机理研究与突变体筛选有重要意义。

[0008] 本发明显微分选方法采用的显微弹射分选技术是单细胞研究的创新工具和有力武器,其原理为:应用激光与物质相互作用的原理,非接触性地对附着在芯片上的目标样品进行弹射,将其从复杂的生物样本中精准分离至收集器中,从而实现直观、准确的显微分离。相比于传统的显微分离技术,显微弹射分选技术具有无标记、可视化、准确率高等优势。同时,显微弹射分选技术可以保留细胞的原始状态,尽最大可能减少细胞的损伤,更适合分选后对样品进行测序、培养等后续研究,具有广泛的应用前景。

[0009] 本发明提供的基于叶绿素荧光信号的显微分选方法,在显微分选装置上进行,所述显微分选装置的结构如下:

[0010] 包括激光弹射显微分选系统和叶绿素荧光动态显微成像设备;所述激光弹射显微分选系统包括激光弹射部件、三维微动调节平台、弹射分选放样芯片、分选收集部件、显微物镜和光路转接耦合部件;

[0011] 所述激光弹射部件设于所述弹射分选放样芯片的上部,所述分选收集部件和所述显微物镜设于所述弹射分选放样芯片的下部;

[0012] 所述三维微动调节平台与所述激光弹射部件连接,实现对所述激光弹射部件位置的调节;

[0013] 通过所述光路转接耦合部件将所述叶绿素荧光动态显微成像设备的光路引入至所述激光弹射显微分选系统中,实现对所述弹射分选放样芯片上样品的观察和分选;

[0014] 所述显微分选方法包括如下步骤:

[0015] S1、将待测样品滴加至所述弹射分选放样芯片上,翻转所述弹射分选放样芯片,使所述待测样品朝下,然后将所述弹射分选放样芯片放置到放样台上;

[0016] S2、调整所述显微物镜使其对准所述待测样品;

[0017] S3、采用所述叶绿素荧光动态显微成像设备观测所述待测样品,记录叶绿素荧光动力学变化情况,计算叶绿素荧光参数;

[0018] S4、根据所述叶绿素荧光参数的不同变化情况,选择需要分选的目标细胞;

[0019] S5、通过调整三维微动调节平台,移动所述激光弹射部件,使目标细胞移动至弹射光斑所在位置;

[0020] S6、调整所述分选收集部件,使其位于所述待测样品的下方;

[0021] S7、通过控制软件,触发所述激光弹射部件弹射激光,进行弹射分选,采用所述分选收集部件收集目标细胞,可用于测序、培养等后续研究。

[0022] 上述的显微分选方法中,所述待测样品可为微藻、植物细胞或光合细菌。

[0023] 上述的显微分选方法中,所述叶绿素荧光参数包括但不限于 F_o 、 F_o' 、 F_m 、 F_m' 、 F_v 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、NPQ、qP、qN、qL等。

[0024] 上述的显微分选方法中,步骤S7之前,所述方法还包括如下步骤:

[0025] 根据所述目标细胞的形态和大小,确定合适的用于弹射分选的激光能量。

[0026] 上述的显微分选方法中,所述弹射分选放样芯片为一载玻片,所述载玻片上镀有

金属薄膜,具体可为50~500nm的铂金薄膜,优选200nm。

[0027] 上述的显微分选方法中,所述分选收集部件和所述显微物镜通过螺纹连接于一转接模块物镜转盘,所述转接模块物镜转盘可转动,切换所述显微物镜用于成像观察、所述分选收集部件用于接收弹射掉的细胞。

[0028] 上述的显微分选方法中,所述光路转接耦合部件包括反射镜I、转换透镜I、转换透镜II和反射镜II;

[0029] 通过所述反射镜I、所述转换透镜I、所述转换透镜II和所述反射镜II的依次配合,实现对光路的转换,即使得所述显微物镜所观察到的图像通过转接进入所述叶绿素荧光动态显微成像设备中,通过这种方式将光路引到所述激光弹射显微分选系统中。

[0030] 上述的显微分选方法中,所述转接模块物镜转盘通过螺纹连接安装于所述反射镜I的安装口上;

[0031] 所述转换透镜I通过螺纹连接于所述反射镜I上;

[0032] 所述反射镜II通过螺纹连接于一物镜转盘上,所述转换透镜II通过螺纹连接于所述反射镜II上;

[0033] 所述转换透镜I和所述转换透镜II的焦距均为25~250mm,优选为100mm;

[0034] 所述转换透镜I与所述转换透镜II之间的间距为50~500mm,优选为200mm。

[0035] 本发明显微分选方法可以从无到有地实现微藻、植物细胞、光合细菌等材料的基于叶绿素荧光信号的快速、精准显微分选,将极大地促进光合突变体的筛选,在光合作用机理研究、环境及毒理胁迫与抗性筛选、优良品系选育等领域得到广泛应用。

[0036] 本发明方法可以与市面上普遍应用的叶绿素荧光动态显微成像设备兼容,实现更广泛的应用。此外,如将叶绿素荧光显微成像分选模块与藻类气候培养箱联用,还能实时监控突变体的光合表型,为藻类光合作用研究提供更强大、更便利的技术支持。

[0037] 本发明显微分选方法可实现对复杂生物样品中单细胞的精准分选,为细胞异质性研究、光合作用突变体筛选、光合作用机理及抗逆研究提供了有力的工具。

附图说明

[0038] 图1为本发明显微分选方法采用的显微分选装置的结构示意图。

[0039] 图2为图1所示显微分选装置中光路转接耦合部件的结构示意图。

[0040] 图中各标记如下:

[0041] 1激光弹射部件、2三维微动调节平台、3弹射分选放样芯片、4分选收集部件、5光路转接耦合部件、6显微物镜、7叶绿素荧光动态显微成像设备、8转接模块物镜转盘、9反射镜I、10转换透镜I、11转换透镜II、12反射镜II、13物镜转盘。

[0042] 图3为本发明基于叶绿素荧光信号的显微分选方法的流程示意图。

[0043] 图4为莱茵衣藻的叶绿素荧光动态显微成像。

[0044] 图5为集胞藻PCC6803的叶绿素荧光动态显微成像。

[0045] 图6为嗜热蓝藻的叶绿素荧光动态显微成像。

具体实施方式

[0046] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0047] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0048] 本发明显微分选方法采用的显微分选装置的结构示意图如图1所示,包括激光弹射显微分选系统和叶绿素荧光动态显微成像设备7,激光弹射显微分选系统包括激光弹射部件1、三维微动调节平台2、弹射分选放样芯片3、分选收集部件4、显微物镜6和光路转接耦合部件5,其中,激光弹射部件1设于弹射分选放样芯片3的上部,用于产生并控制激光,该激光作用与弹射分选放样芯片3相互作用产生向下的推力,弹射细胞,分选收集部件4和显微物镜6设于弹射分选放样芯片3的下部,弹射分选放样芯片3为一普通载玻片,其上镀有一层200nm的铂金薄膜,该薄膜可与激光产生相互作用,分选收集部件4用于接收弹射下来的细胞。三维微动调节平台2与激光弹射部件1连接,实现对激光弹射部件1在在x、y、z三个方向上的调节,使其出射光斑准确聚焦到弹射分选放样芯片3指定位置,从而实现弹射分选功能。通过光路转接耦合部件5将叶绿素荧光动态显微成像设备7的光路引入至激光弹射显微分选系统中,在不影响原有功能正常使用的情况下,实现对弹射分选放样芯片3上样品的观察和分选。

[0049] 具体地,光路转接耦合部件5的结构如图2所示,分选收集部件4和显微物镜6通过螺纹连接于一转接模块物镜转盘8上,该转接模块物镜转盘8可转动,切换显微物镜6用于成像观察、分选收集部件4用于接收弹射掉的细胞。光路转接耦合部件5包括反射镜I9、转换透镜I10、转换透镜II11和反射镜II12,具体地,转接模块物镜转盘8通过螺纹连接安装于反射镜I9的安装口上,转换透镜I10通过螺纹连接于反射镜I9上,反射镜II12通过螺纹连接于一物镜转盘13上,转换透镜II11通过螺纹连接于反射镜II12上,其中,转换透镜I9、转换透镜II10的焦距均为100mm,二者之间距离通过安装固定在200mm,通过反射镜I9、转换透镜I10、转换透镜II11和反射镜II12的依次配合,实现对光路的转换,即使得显微物镜6所观察到的图像通过转接进入叶绿素荧光动态显微成像设备7中。

[0050] 利用上述显微分选装置,通过软件控制,在对待测样品完成叶绿素荧光成像、动态分析及数据处理后,对叶绿素荧光参数发生变化的样品实行显微分选、接收,用于后续培养与研究,流程图如图3所示,具体步骤如下:

[0051] 1、将待测样品(微藻、植物细胞、光合细菌等)滴加到弹射分选放样芯片3上,翻转弹射分选放样芯片3,样品朝下,将弹射分选放样芯片3放置到放样台上;

[0052] 2、选择合适放大倍数的显微物镜6,安装在光路转接耦合部件5的转接模块物镜转盘8上,并将分选收集部件4安装在转接模块物镜转盘8上其他位置;

[0053] 3、调整好光路转接耦合部件5,转动转接模块物镜转盘8,使显微物镜6对准待测样品;

[0054] 4、用叶绿素荧光动态显微成像设备7观测样品,记录叶绿素荧光动力学变化情况,通过专业荧光分析软件对样品中不同细胞进行分析,计算 F_o 、 F_o' 、 F_m 、 F_m' 、 F_v 、 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、NPQ、qP、qN、qL等叶绿素荧光参数,图4、图5、图6分别为莱茵衣藻、集胞藻PCC6803、嗜热蓝藻的叶绿素荧光动态显微成像;

[0055] 5、根据叶绿素荧光参数的不同变化情况,选择需要分选的目标细胞;

[0056] 6、通过调整三维微动调节平台2,移动激光弹射部件1,将目标细胞移动到显微镜视野中心(弹射光斑所在位置);

[0057] 7、转动转接模块物镜转盘8,使分选收集部件4位于样品正下方;

[0058] 8、不同的细胞种类,其形态、大小不尽相同,其质量和重心也有所差别。通过控制软件,调节合适的激光能量,以便在不损伤细胞又能成功弹射的情况下进行精准分选;

[0059] 9、通过控制软件,触发弹射激光,启动显微分选;

[0060] 10、通过分选收集部件4收集弹射出来的目标细胞,显微分选完成;

[0061] 11、再继续进行其他目标细胞的显微分选,接收到的目标细胞可进行测序、培养等后续研究。

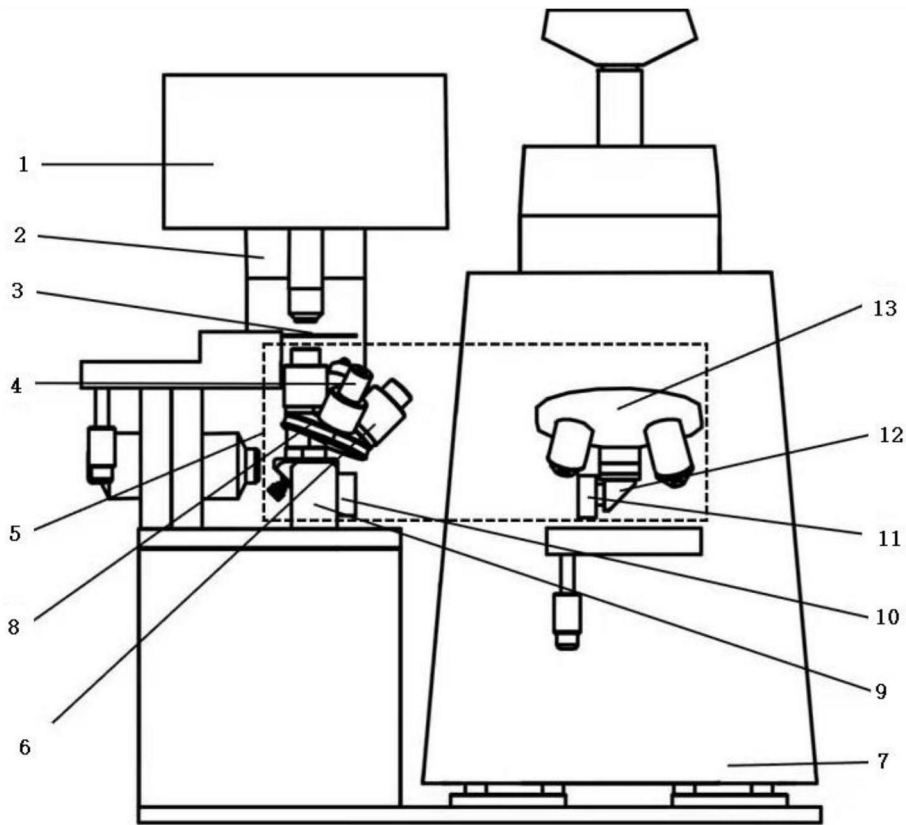


图1

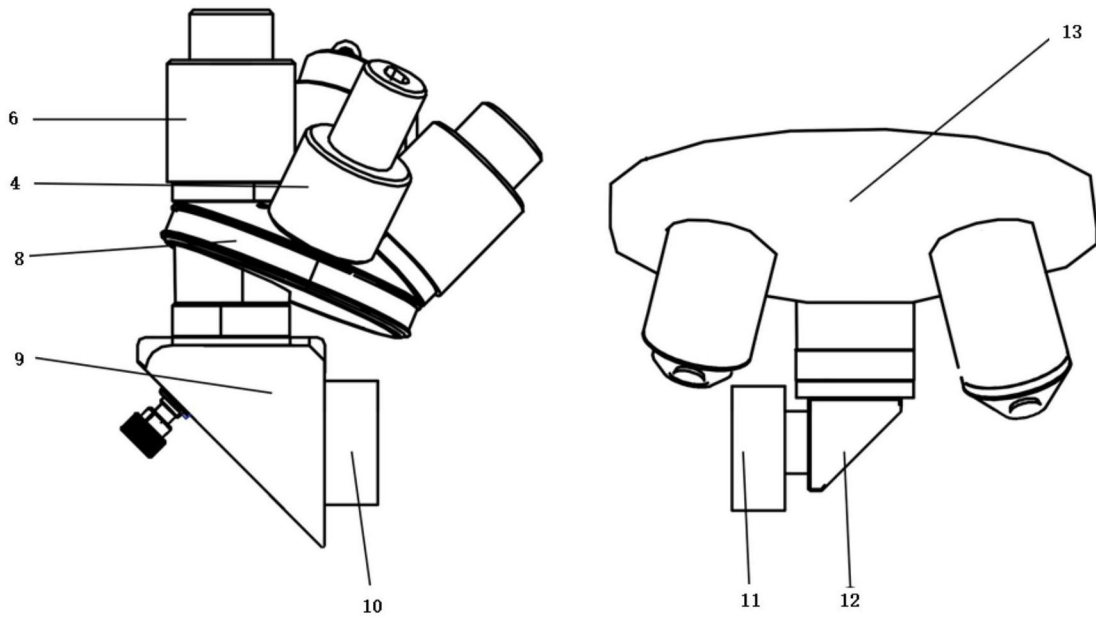


图2

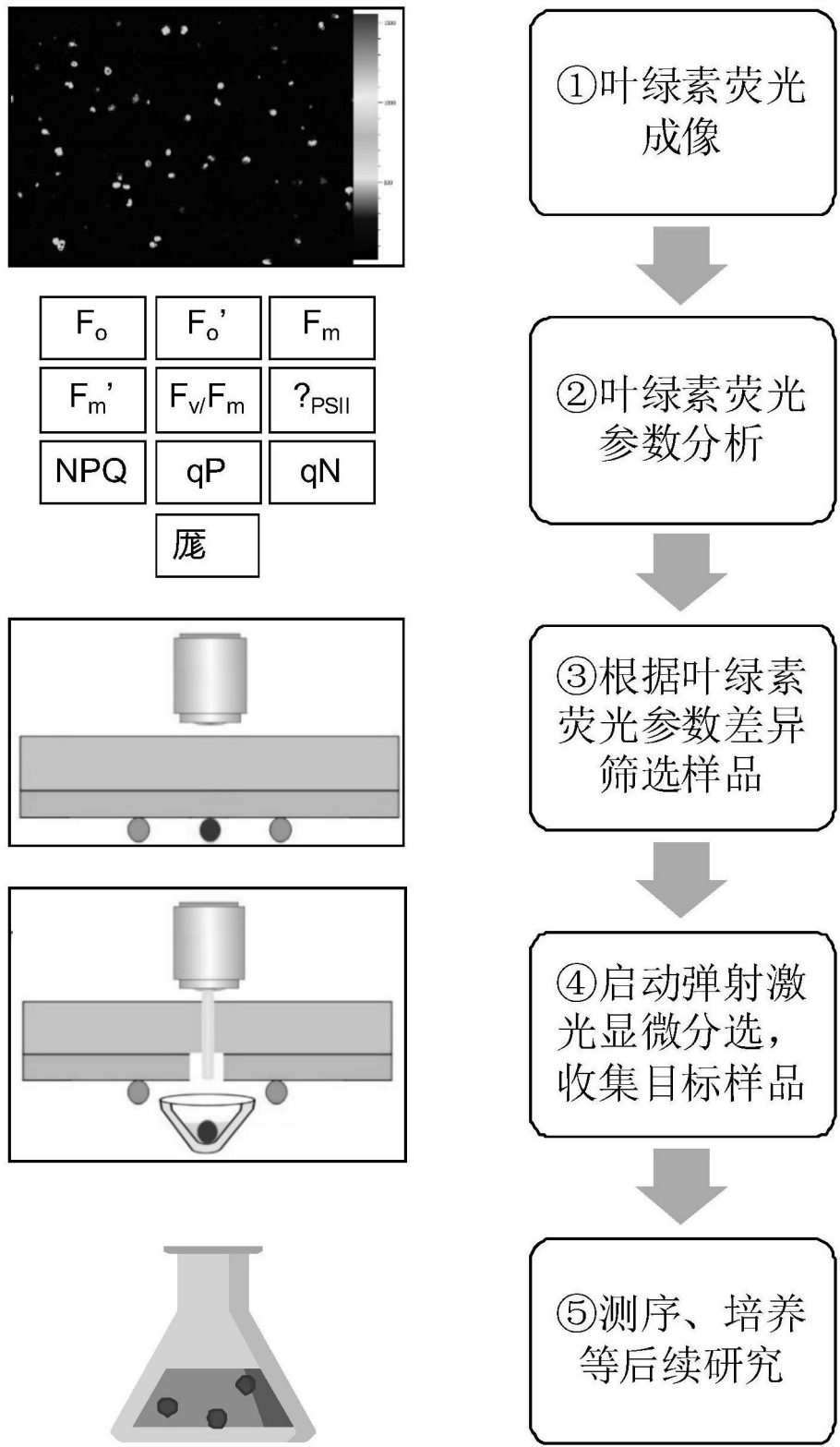


图3

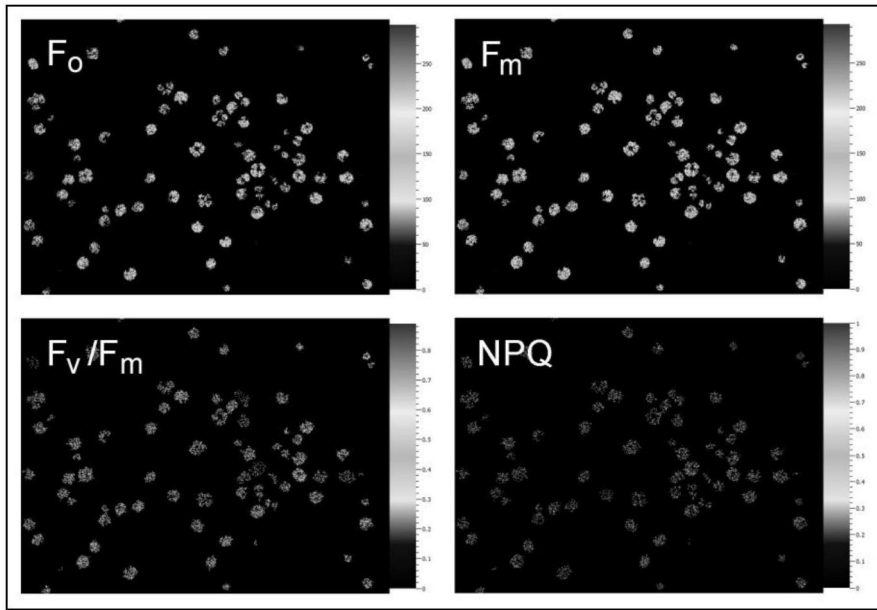


图4

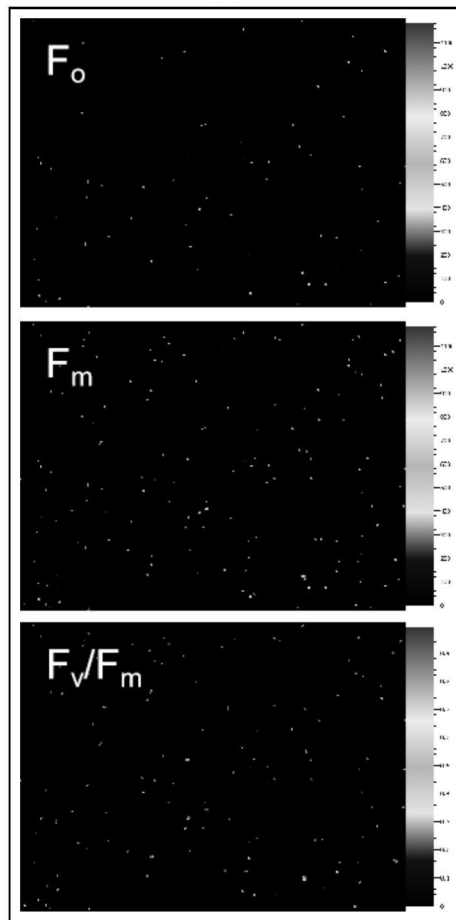


图5

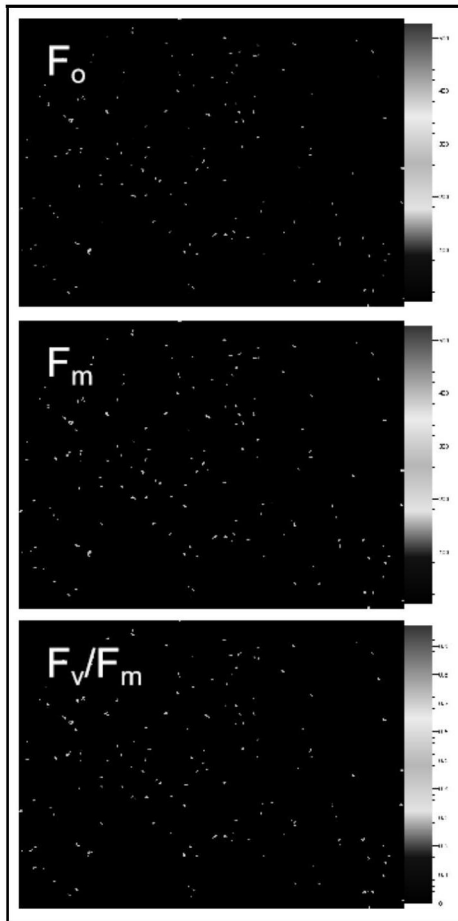


图6