

双通道调制叶绿素荧光仪

Dual-PAM-100

操作手册



上海泽泉科技股份有限公司

Zealquest Scientific Technology Co., Ltd.

2016年2月

目 录

1 安全指导	- 2 -
2 简介	- 3 -
3 Dual-PAM-100 的组件及安装.....	- 4 -
3.1 基本系统组件	- 4 -
3.2 基本系统的安装	- 4 -
3.3 安装 DualPAM 软件.....	- 4 -
3.3.1 USB 端口设置（建议）	- 5 -
3.4 Dual-PAM/F.....	- 5 -
3.5 其它组件	- 6 -
3.5.1 检测悬浮液的光学单元 ED-101US/MD.....	- 6 -
3.5.2 DP515/535 附件	- 6 -
3.5.3 NADPH/9-AA 模块.....	- 6 -
3.5.4 微型光量子探头 US-SQS/WB	- 6 -
3.5.5 Dual-PAM/F 相关附件.....	- 7 -
4 使用 Dual-PAM-100.....	- 8 -
4.1 概述	- 8 -
4.2 软件安装	- 9 -
4.3 测量模式选择	- 10 -
4.4 分析模式选择	- 10 -
4.5 测量参数设置	- 11 -
4.5.1 诱导曲线的测量	- 11 -
4.5.2 快速光曲线的测量	- 12 -
4.5.3 快速叶绿素荧光诱导动力学(Fast Acquisition)曲线的测量.....	- 13 -
4.5.4 鼓包 (Post-Illumination)曲线的测量	- 14 -
4.5.5 P700 暗还原(P700+Re-reduction)曲线的测量.....	- 17 -
4.5.6 PQ 库（PQ pool）的测量.....	- 18 -
4.5.7 P515/535 的测量.....	- 19 -
4.6 测量结果数据保存	- 20 -
4.6.1 全部数据保存，打开与编辑	- 20 -
参考文献:	- 21 -

1 安全指导

- 1、仪器安装使用前首先请阅读安全指导和操作指南。
- 2、请注意本节中所有的安全警告。
- 3、保持仪器清洁,注意防尘,远离水和潮湿的地方。特别是主控单元Dual-C、激发检测单元Dual-DR(Dual-DB)和Dual-E更应防震、防潮和防尘。
- 4、仪器尽量放置在通风的环境中。
- 5、仪器要远离热源。
- 6、严格按照操作手册连接电源, **禁止在Dual-PAM-100 开机的情况下连接外接电源!!! 禁止在Dual-PAM-100开机的情况下通过数据线连接PC!!!**
- 7、**禁止过度弯曲Dual-PAM-F光导纤维!**
- 8、**禁止将光纤末端对着眼睛, 防止灼伤!!!**
- 9、光源不用时应当关闭,这样可以延长光源的寿命。
- 10、测量间隙较长时应关闭主机,这样可以省电。**仪器长期放置不用时, 应每隔2个月充电一次!**
- 11、P700测量之前一定要点击天平按钮进行调平。
- 12、测量过程中请勿使计算机处于待机、屏保状态, 否则会使软件报错。
- 13、只能按厂家推荐方法清洁仪器。
- 14、不允许液体或其它东西进入仪器内部。
- 15、仪器应由专业人员维修。

2 简介

1988年，Schreiber教授利用PAM-100成功测量了P700的吸收变化（Schreiber et al, Z. Naturforsch, 43c: 686-698, 1988）。1994年，Schreiber教授利用饱和脉冲技术和P700法成功测量了PS I的量子产量（Klughammer & Schreiber, Planta, 192: 261-268, 1994）。

过去，利用PAM-100测量P700必须专门的附件。若想同步测量叶绿素荧光（PS II活性）和P700（PS I活性），必须要两台PAM-100同时工作才行。仪器昂贵，操作复杂，需要相当强的专业背景。

现在，最新推出的双通道PAM-100测量系统Dual-PAM-100，将两台PAM-100整合在一个主机里，可以非常方便的（不需很强的专业背景）同步测量叶绿素荧光和P700，同时检测PS II和PS I的活性。

此外，通过特殊的激发-检测单元还可以测量叶绿体或微藻的许多重要光合参数，如跨膜质子梯度 ΔpH （通过9-AA荧光或吡啶黄荧光）、类囊体膜的电势（通过类胡萝卜素的差示吸收，“P515”）和NADP的氧化状态（通过NADPH荧光）等。如果需要极高的灵敏度可以通过连接光电倍增管检测器实现。

2009年4月，WALZ公司将DUAL-PAM-100与光合仪结合，在世界上第一次做到了同步测量CO₂气体交换、P700和叶绿素荧光。

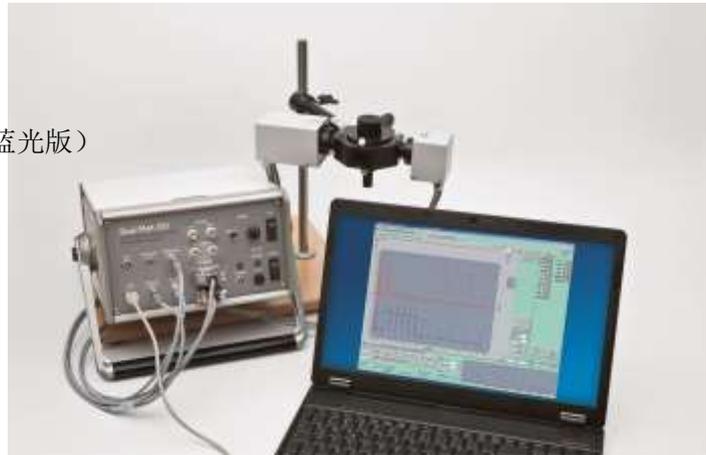
Dual-PAM-100双通道调制叶绿素荧光仪作为著名的PAM-101叶绿素荧光仪的升级版，能够同步测量光系统II和光系统I活性的调制叶绿素荧光仪，在植物生理研究中有着广泛的应用。其测量慢速动力学荧光诱导曲线和快速光曲线均由内置程序自动测量，利用Dual-PAM-100的脚本编制功能测量某些特殊意义的非标准化荧光曲线，用于特殊的植物生理研究。

在庞大的PAM家族中，Dual-PAM-100能够同时测量光系统I和光系统II的活性变化，成为研究植物光合生理的重要的技术手段之一。同步测量两个光系统活性变化的荧光诱导曲线和快速光曲线均由仪器自带的程序自动测量，此外如何利用Dual-PAM-100手动测量某些特殊意义的荧光曲线，例如光化光关闭后的荧光瞬时上升（俗称鼓包）变化、P700+暗还原曲线等在本手册中都会一一叙述。

3 Dual-PAM-100 的组件及安装

3.1 基本系统组件

- 主机：DUAL-C
- 激发单元：DUAL-E
- 检测单元：DUAN-DR(红光版)/DUAL-DB（蓝光版）
- 电源线：充电线
- 数据线：USB通讯线
- 支架：平板，金属杆，连接器
- 遮光帽（2个）
- 电脑：



3.2 基本系统的安装

Dual-PAM-100所有连接线接头端都有标签，如Charge, Emitter, Detector, USB等，连接时与主机面板上的接口一一对应即可(参考上图)

- 充电线——CHARGE
- USB——USB
- DUAL-E { Emitter- Emitter
LED Array E- LED Array E
- DUAL-DB { LED Array D- LED Array D
Detector – Detector 1
Fluo ML – Fluo ML



3.3 安装 DualPAM 软件

- ◆ 最新版的 DUAL-PAM-100/f 软件为 Dual PAM V1.19（20160218）
 - ◆ 下载地址：http://www.walz.com/products/chl_p700/dual-pam-100/downloads.html
- 下载后成功安装，桌面上会生成以下两个图标



3.3.1 USB 端口设置（建议）

安装 DualPAM 时，程序会安装 USB 数据线的驱动。第一次启动 DualPAM 时需要对 USB 端口进行设置，设置方法如下（Windows 7）：

- 确保已经通过 USB 数据线将 Dual-PAM-100 与电脑连接。
- 在桌面右键点击“我的电脑”，选择“属性”
- 点击“设备管理器”
- 选择“端口（Com 和 LPT）”，双击展开
- 选择“USB Serial Port COM#”，双击打开
- 点击“端口设置”
- 点击“Advanced”
- 将“Latency timer”设置为 1ms
- 点击“确定”完成设置

3.4 Dual-PAM/F

为 1 以记录环境光强，叶片温度，更适合野外样品测量。Dual-PAM/F 可以同步测量叶绿素荧光和 P700，同时检测 PS II 和 PS I 的活性，具有脚本编制功能测量某些特殊意义的非标准化荧光曲线，用于特殊的植物生理研究。例如光化光关闭后的荧光瞬时上升（俗称鼓包）变化、P700+暗还原曲线等。



3.5 其它组件

3.5.1 检测悬浮液的光学单元 ED-101US/MD

设计: 黑色铝合金制，中部可装 10×10 mm 样品杯；可以连接测量头 DUAL-DB (DUAL-DR)、DUAL-E 和微型磁力搅拌器 US-MS；还可以连接两个额外的测量头(如吡啶黄荧光、NADPH 荧光或 P515 吸收)

安放: 安装在特制铁架台 ST-101 上

重量: 750 g



3.5.2 DP515/535 附件

P515/535 模块是 WALZ 公司为 DUAL-PAM-100 设计的测量模块，可以直接连接 DUAL-PAM-100 的主机，测量 550-510 nm 的差式吸收以及 535 nm 波长的信号变化。P515/535 模块可以测量光合器官的跨膜质子动力势 (pmf)、跨膜电位 ($\Delta \psi$)、跨膜质子梯度 (ΔpH) 和玉米黄素 (Zea) 变化等内容。此外，该模块还提供一种特殊的“P515 Flux”操作模式，可让光化光以光-暗脉冲形式打开-关闭 (1/1 调制光/暗)，原位测量活体样品处于稳态的偶联电子和质子的流动速率。



3.5.3 NADPH/9-AA 模块

NADPH/9-AA 模块是 WALZ 公司为 DUAL-PAM-100 设计的测量模块，可以直接连接 DUAL-PAM-100 的主机，测量 NADPH 荧光和 9-AA 荧光。NADPH 荧光可用于估算 NADP 的还原程度，9-AA 荧光用于估算跨膜质子梯度 ΔpH 。该模块的一个很大特色是与标准探头联用，在国际上第一次做到了同步测量叶绿素荧光与 NADPH 荧光。



3.5.4 微型光量子探头 US-SQS/WB

设计: 直径 3.7 mm 的球状探头安装在直径 2 mm 的光纤上；探头可深入样品杯中。可与主机连接。



3.5.5 Dual-PAM/F 相关附件

3.5.5.1 2030-B 叶夹

叶夹 2030-B 是 Dual-PAM/F 最重要的附件，它配备了特制的微型光量子/温度探头，每个测量数据都被及时传到 DualPAM 软件。

叶片被 2030-B 的两个扁平有机玻璃环夹住，光纤与叶片成 60° 角，叶片照光部分由一直径 10 mm 的不锈钢环决定。



3.5.5.2 DLC-8 暗适应叶夹

暗适应叶夹 DLC-8 重 4 g，因此可以直接夹到多数叶子上，而不会伤害到叶片。在叶夹上装有一个滑片，可以在暗适应时阻止光线照射。实际测量时，打开滑片，使叶片只受到来自光纤的光，而不受环境光干扰。只有经过合理的暗适应，才能得到较好的最大量子产量 F_v/F_m 和暗-光诱导动力学曲线。



3.5.5.3 光纤

设计：柔软，塑料包裹，利用三个支路与 PAM-2500 连接
末端（测量端）：外径 8 mm，有效直径 6 mm
长度：100 cm
重量： ≈ 300 g



4 使用 Dual-PAM-100

4.1 概述

Dual-PAM-100 的所有操作设置均通过 DualPAM 软件进行。

- 可以进行测量模式的选择（Fluo 和/或 P700，P515 和/或 I535 等）。
- 可以进行分析模式的选择（饱和脉冲，快相）
- 可以进行测量参数设置，保存，调用，修改。
- 可以进行特殊测量程序脚本编辑，保存，调用，修改。
- 可以进行数据（曲线）保存，查看，筛选。
- 可以进行固件升级。

DualPAM 软件内涉及到的缩略语全称及注释

缩写	全称	注释
P ML	P700 Meas. Light	P700 测量光
F ML	Fluorescence Meas. Light	荧光测量光
MF-H	Meas. Light Frequency High	测量光高频模式
MF-L	Meas. Light Frequency Low	测量光低频模式
Int.	Intensity	强度
AL	ActinicLight	光化光
Bal.	Balance	平衡
FR	Far Red Light	远红光
ST	Single Turnover	单周转饱和脉冲
MT	MultiTurnover	多周转饱和脉冲
SP	Sat Pulse	饱和脉冲
SK	Slow Kinetics	慢速诱导荧光动力学曲线
Ind.Curve	Induction Curve	诱导曲线
LC	Light Curve	光曲线
Calib.	Calibration	校准
Temp	Temperature	温度
PAR	Photosynthetically Active Radiation	光合有效辐射

4.2 软件安装

- ◆ 最新版的 DUAL-PAM-100/f 软件为 Dual PAM V1.19 (20160218)
- ◆ 下载地址: http://www.walz.com/products/chl_p700/dual-pam-100/downloads.html

DualPAM 软件成功安装后, 桌面上会出现以下两个图标, 点击软件快捷方式, 可打开软件。



软件打开初始界面如下



4.3 测量模式选择

双通道调制叶绿素荧光仪可以单通道测量和双通道测量，常用测量模式有以下几种

A, 主机上连接的是 Dual-E 和 Dual-DB (或 Dual-DR)

- 1, 单独测 PSII 荧光, 测量模式选择 Fluo
- 2, 单独测 P700 差示吸收, 测量模式选择 P700
- 3, 同时测 Fluo+P700, 测量模式选择 Fluo+P700 (图中所示)

B, 主机上接的是 Dual-EP515 和 Dual-DP515

- 4, 单独测 P515, 测量模式选择 P515
- 5, 单独测 I535, 测量模式选择 I535
- 6, 同时测 P515+I535, 测量模式选择 P515+I535

以上 A 和 B 两套探头各自的初始设置, 可以通过点击下图左边的 Open User Settings, 打开 WALZ 出厂文件加载, 文件保存在 DualPAM 安装文件夹下的 User Settings 文件夹内。

检测器类型会根据测量模式自动调整, 测量前检查与接到主机上的 Detector 是否一致即可。



4.4 分析模式选择

双通道调制叶绿素荧光仪可以进行饱和脉冲分析和快速叶绿素荧光诱导动力学分析 (快相)

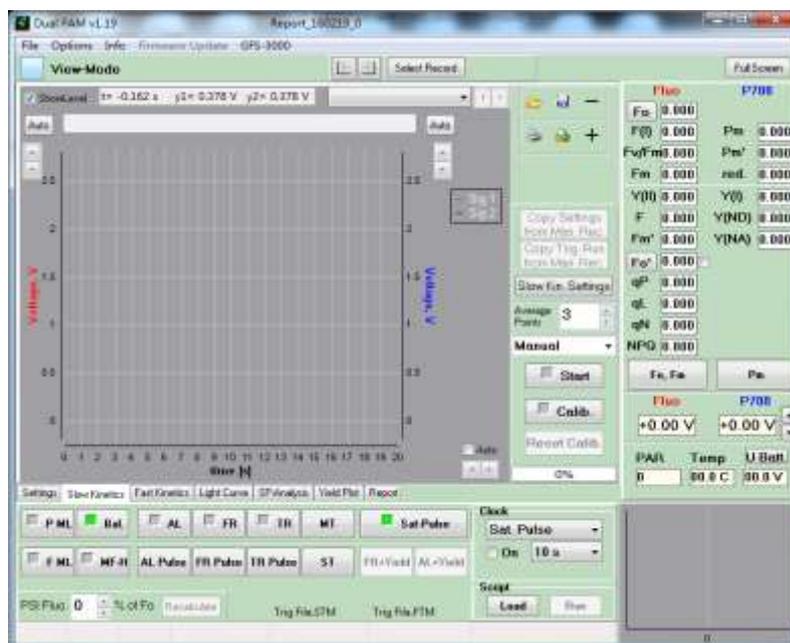
SP-Analysis: 诱导曲线, 快速光曲线, 鼓包, P700 暗还原, P515/I535 测量时选择

Fast-Acquisition: 快速叶绿素荧光诱导动力学分析 (快相), OJIPtest 时选择

4.5 测量参数设置

4.5.1 诱导曲线的测量

- 将样品暗适应 20-30 分钟（该时间为高等植物暗适应时间，藻类为 5-10 分钟）。
- 选择 Settings 选项，在 Mode 子选项中选择所需要测量的模式，单独测量 PSII 活性选择 Fluo；单独测量 PSI 活性选择 P700；同时测量 PSII 和 PSI 活性选择 Fluo+P700。Analysis Mode 选择 SP Analysis。其他版块不需更改。
- 在 Meas. Light 子选项中选择测量光 ML 强度，一般不需要更改。如单独测量 P700 或同时检测 Fluo+P700 时，需点击天平按钮进行调平，使得 P700 数值稳定且在 0-0.2 之间（此为建议值，可通过界面右下方 P700 数值边的上下键调节）。
- 在 Actinic Light 子菜单中选择合适的光化光，高等植物普通测量一般选取 100-300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 左右光强即可，即 8-11 档中间选择。其他不需更改
- 查看或修改诱导曲线程序，在 Slow Kinetics 子选项中，修改 AL Width 可延长测量时间，一般而言不需要更改，只有当样品跑完后没有走平时才需要增加时间。
- 查看饱和脉冲 SP，在 Saturate Pulse 菜单中查看饱和脉冲，一般不需更改。
- 选择 Slow Kinetics 主菜单，在右侧 Start 按钮上方下拉菜单中将 Manual 改为 Ind. Curve，点击 Start 开始程序测量。
- 测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。
- 选择 Report 主菜单，点击左上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。



4.5.2 快速光曲线的测量

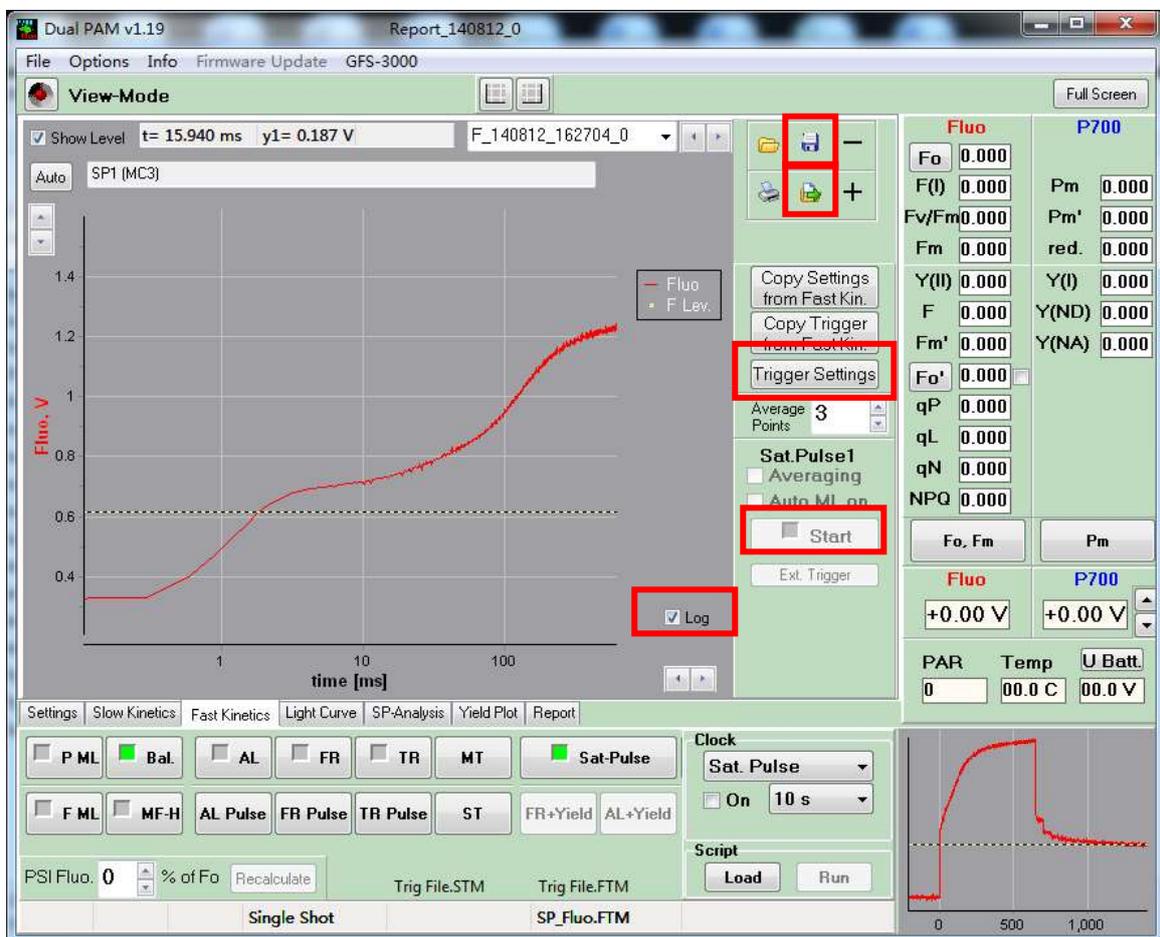
- 测量此曲线无需进行暗适应，将样品夹在叶片夹上，点击 Light Curve 主菜单（如测量 PSI 的 Light Curve 需要在 Meas. Light 中点击天平平衡），点击“Edit”按钮，跳出对话框，此对话框共有四列，第一列为步数，即一共可以跑 20 步；第二列为光强强度显示，即 PAR 值；第三列即光强梯度设置，我们一般选择从低到高的梯度，当然，并不是一定要按照依次顺序来选择档位，只需要由低到高即可；第四列为每一个梯度下光强照射的时间，一般选择相同的时间；
- 设置完光强和照射时间后，按 OK 确认，并点击 Start 按钮，开始快速光曲线测量；
- 测量结束后，数据会自动导入到 report 中；仪器提供了两个不同的拟合曲线 EP 和 Platt et al.，我们可以自由选择任意一个，并点击 Fit 作出拟合图，点击计算器图标生成计算数值，并手动抄写下来。
- 测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。
- 选择 Report 主菜单，点击左上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。

The screenshot shows the 'Light Curve' dialog box in the Dual PAM v1.19 software. The main window displays a graph of ETR (umol/m²/s) versus PAR (μE). The 'Light Curve' dialog is open on the right, showing a table of 20 steps with PAR, Intensity, and Time values. The 'Model' section is set to 'EP', and the 'Fit' button is highlighted. The 'Edit' button is also highlighted. The 'Start' button is visible at the bottom of the dialog.

Step	PAR	Intens.	Time/10s
1	5	1	3
2	13	2	3
3	31	3	3
4	89	5	3
5	167	7	3
6	209	8	3
7	325	10	3
8	496	12	3
9	754	14	3
10	1173	16	3
11	1450	17	0
12	1804	18	3
13	496	12	0
14	325	10	3
15	209	8	3
16	167	7	3
17	89	5	3
18	31	3	3
19	13	2	3
20	5	1	3

4.5.3 快速叶绿素荧光诱导动力学(Fast Acquisition)曲线的测量

- 将样品暗适应 20-30 分钟。
- 选择 Settings 选项，在 Mode 子选项中选择所需要测量的模式，单独测量 PSII 活性选择 Fluo; Analysis Mode 选择 Fast Acquisition。其他版块不需更改。
- 选择 Fast Kinetics 主菜单，点击 Trigger Settings，选择 Poly300ms。
- 回到 Fast Kinetics 主菜单，点击 Start，测量快速叶绿素荧光诱导动力学曲线，勾选 Log，使横坐标以对数模式显示，即可得到 OJIP 曲线。
- 测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式表格。



4.5.4 鼓包 (Post-Illumination)曲线的测量

鼓包：Post-illumination 是光化光关闭后的荧光瞬时上升现象（俗称“鼓包”）

鼓包的产生：光合电子传递链分为非环式电子传递（线性电子传递，Z 链：“Z” scheme）和围绕 PSI 的环式电子传递（Cyclic Electron Transport, CET），两种电子传递方式共用 PQ 库，光化光关闭后，部分 PQ 被环式电子传递还原，从而使叶绿素荧光量增加。

非环式电子传递：H₂O → PS II → **PQ** → Cyt b6/f → PC → PS I → Fd → FNR → NADP⁺

环式电子传递：PS I → Fd ↓ **PQ** → Cyt b6/f → Fe-S → Cyt f → PC → PS I (PGR 5 介导)

PS I → Fd → FNR → NADPH⁺/NADPH ↓ **PQ** → Fe-S → Cyt f → PC → PS I (NDH 介导)

鼓包的意义：它能够很好地通过 PSII 荧光反应围绕 PSI 的循环电子传递，是得到国际公认的一项衡量环式电子传递速率的技术。

鼓包的测量：五个步骤，“打开 Start”、“打开 F ML”、“打开 AL”、“关闭 AL”、“关闭 F ML”。

附 1. 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线

如图 4.5.4.1 所示，图中红色荧光曲线为蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线（高等植物测量方法类似，但有所不同，请参考相关文献），蓝色虚线即表示荧光上升的斜率，该斜率越高，表示循环电子传递活性越高。本节主要阐述如何利用 Dual-PAM-100 手动测量本曲线。

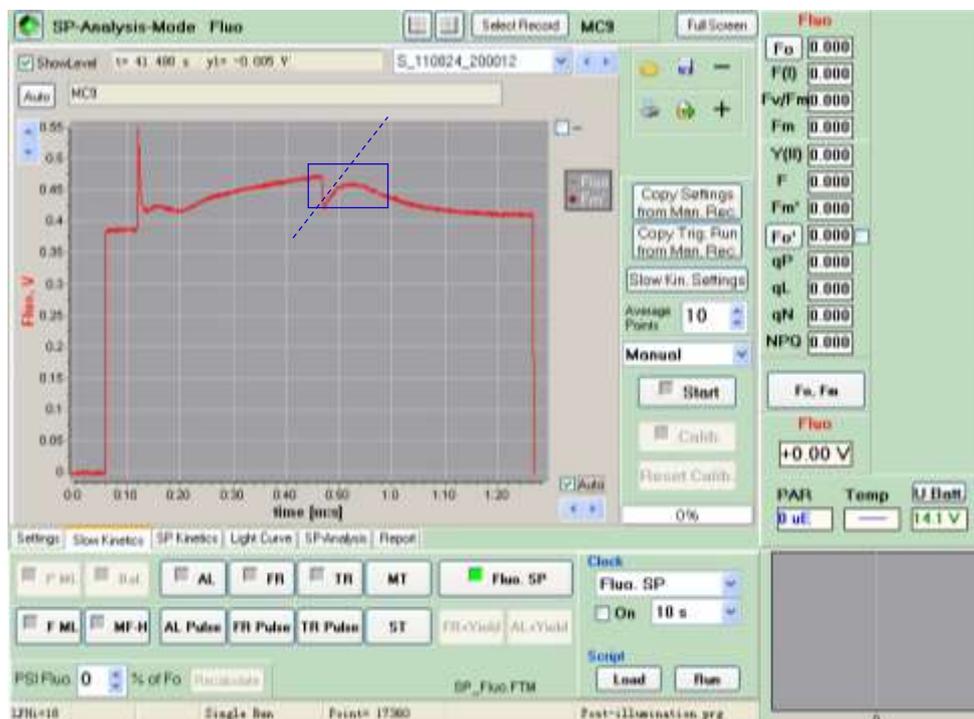


图 4.5.4.1 利用 Dual-PAM-100 测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线

如图 4.5.4.12 所示，为手动测量蓝藻鼓包曲线的测量分解图。图中共分为五个步骤，分别是“打开 Start”、“打开 F ML”、“打开 AL”、“关闭 AL”、“关闭 F ML”。“打开 Start”表示开始慢速动力学（Slow Kinetics）曲线测量，此时得到平稳的荧光信号。荧光信号平稳一段时间（通常为 5-10 秒）后，打开测量光，即“打开 F ML”，此时得到本底荧光信号 F_0 ，同样使荧光信号平稳数秒。此时，可打开光化光对样品进行诱导，即“打开 AL”。通常在曲线测量之前，我们会在 Settings 选择合适的光化光强度，而在曲线测量时，只需打开光化光即可。此外，如果测量样品为高等植物，通常会在打开光化光 AL 之前打饱和脉冲 SP^[1]，然后开始光化光诱导。等光化光诱导平稳后，“关闭 AL”，荧光会产生瞬时淬灭，紧接着便会产生上升现象，待曲线走平稳后，关闭 Slow Kinetics，关闭测量光，即“关闭 F ML”。手动测量完毕后，可点击右上角红色方框中的按钮，导出曲线，用于数据处理。

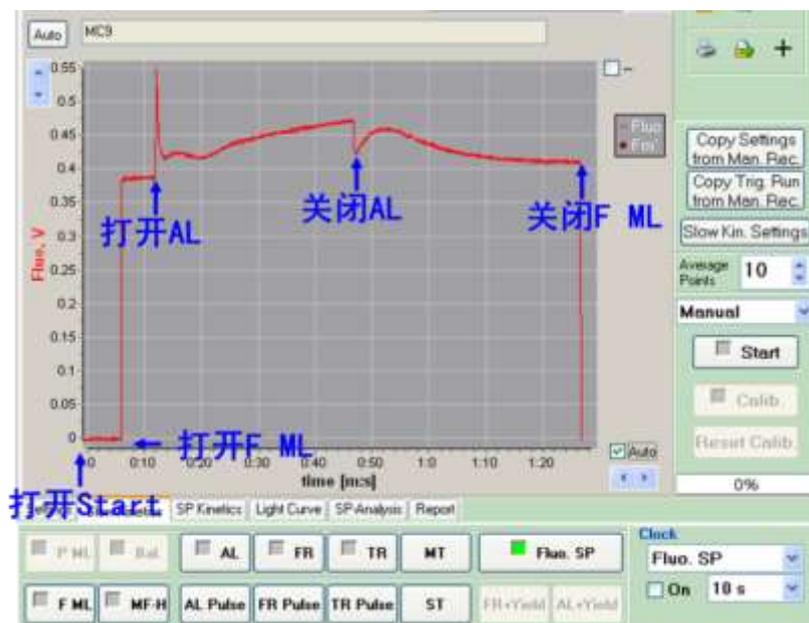


图 4.5.4.2 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线的分解图

2. 利用编制脚本测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线

为了使测量数据重复性更好，我们需要准确地对平行样品进行重复测量。然而，纯手动测量不能保证在同样的时间位点做出相同的测量动作。例如，我们需要每次在第 5 秒时打开测量光，而靠手动点击鼠标，可能会在第 4.5 秒或 6 秒时打开测量光，这样会导致做数据平均时出现曲线变形，对实验结果影响很大。为了解决这一问题，我们就需要用到 Dual-PAM-100 软件中的脚本编制功能，编写一条标准的鼓包测量曲线，即可将繁琐的手动测量变成简单的自动测量。利用该功能，还可以编写其他不同的荧光曲线，用于不同的科研目的。

详细的脚本编辑方法会在附录中完整展示

鼓包测量脚本文件仪器安装调试时会提供，也可以向泽泉科技技术人员索取

3. 脚本调用以及曲线运行状态查看

点击右下方 Script 中的“Load”调用编辑好的 Script，点击“Run”按钮，即可启动编辑好的脚本文件，仪器可自动测量光化光关闭后荧光瞬时上升曲线，如图 4.5.4.3 所示。可以从 Slow Kinetics 界面中查看曲线运行状况。

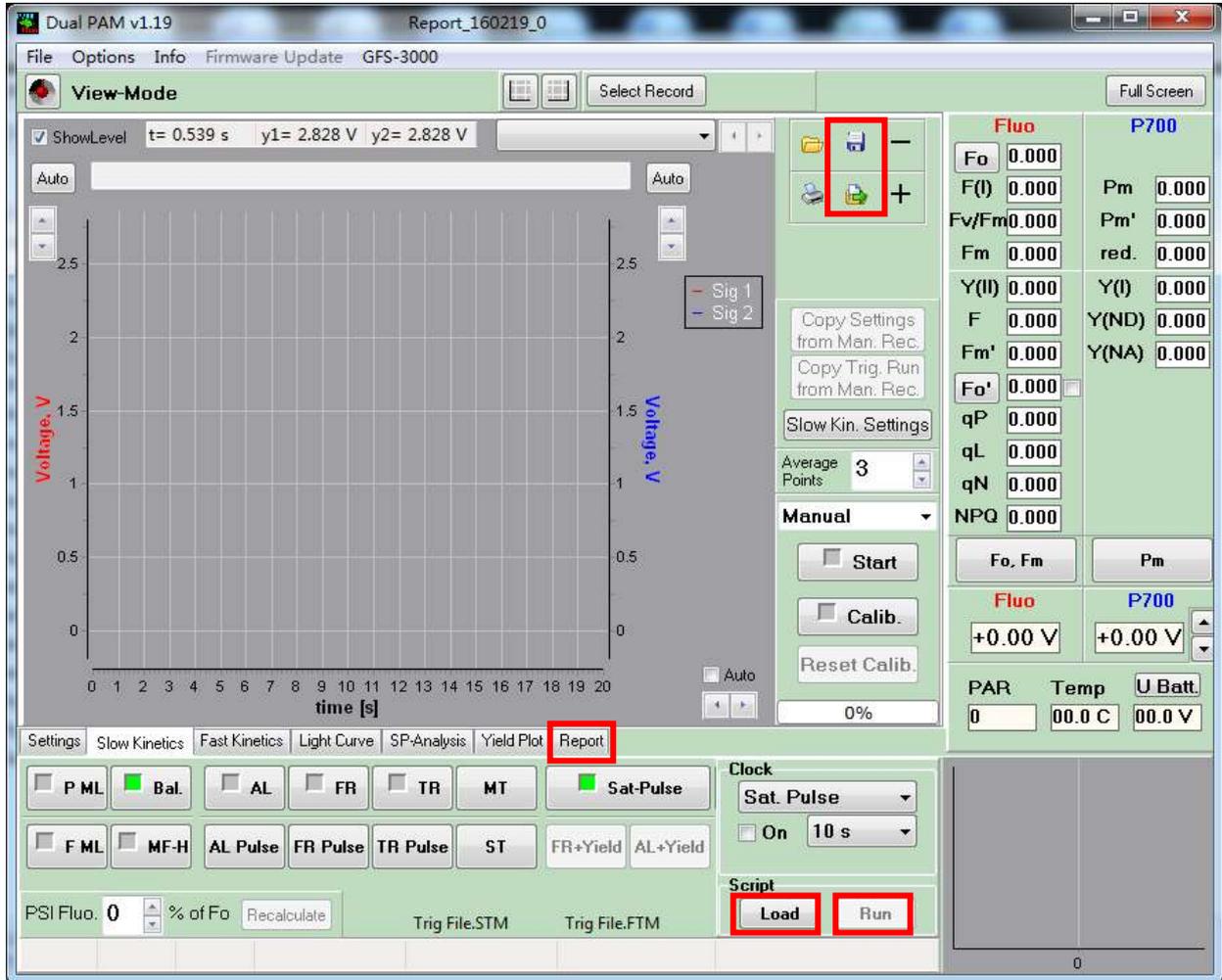


图 4.5.4.3 启动脚本文件图示

脚本运行结束后会自动停止，测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。选择 Report 主菜单，点击左上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。

曲线所有的数据点存储在 Excel 文件内，可以导入作图软件实现曲线的再现与编辑。

4.5.5 P700 暗还原(P700+Re-reduction)曲线的测量

P700 暗还原：在远红光诱导下，P700 会发生电荷分离，失电子被氧化，远红光关闭，氧化态的 P700 会被电子传递链上的电子还原。

P700 暗还原曲线意义：根据 P700+暗还原曲线下降斜率的快慢能够表示环式电子传递的速率，反应环式电子传递能力，是研究电子传递的重要工具。

准备：选择测量模式 P700，点击 Bal 平衡，进入 Slow, Kinetics 界面

P700 暗还原曲线手动测量：“打开 Start”、“打开 FR”、“关闭 FR”、“点击 Stop”

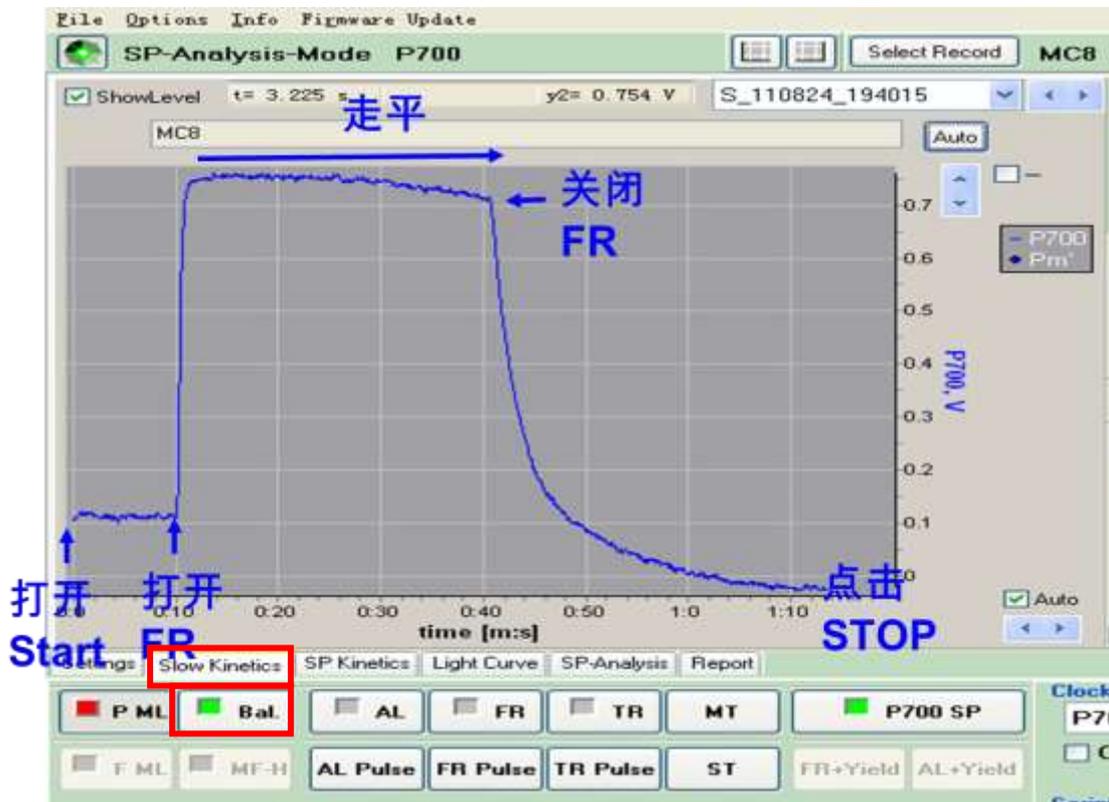


图 4.5.5 利用 Dual-PAM-100 测量 P700 暗还原曲线

P700 暗还原曲线的测量也需要编辑脚本，通过加载脚本实现曲线测量的一致性

脚本运行结束后会自动停止，测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。选择 Report 主菜单，点击左上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。

曲线所有的数据点存储在 Excel 文件内，可以导入作图软件实现曲线的再现与编辑。

详细的脚本编辑方法会在附录中完整展示

P700 暗还原曲线测量脚本文件在仪器安装调试时会提供，也可以向泽泉科技技术人员索取

4.5.6 PQ 库 (PQ pool) 的测量

质醌(plastoquinon, PQ) 也叫质体醌, 是 PS II 反应中心的末端电子受体, 也是介于 PS II 复合体与 Cyt b6/f 复合体间的电子传递体, 在膜中含量很高, 能在类囊体膜中自由移动, 是双 e⁻和双 H⁺传递体, 在光合膜上转运电子与质子, 对类囊体膜内外建立质子梯度起着重要的作用。另外, PQ 库作为电子、质子的缓冲库, 能均衡两个光系统间的电子传递, 可使多个 PS II 复合体与多个 Cyt b6/f 复合体发生联系, 使得类囊体膜上的电子传递成网络式地进行。

准备: 选择测量模式 P700, 点击 Bal 平衡, 进入 Slow, Kinetics 界面

PQ 库手动测量: “打开 Start”、“打开 FR”、“打开 ST”、“打开 MT”、“点击 Stop”

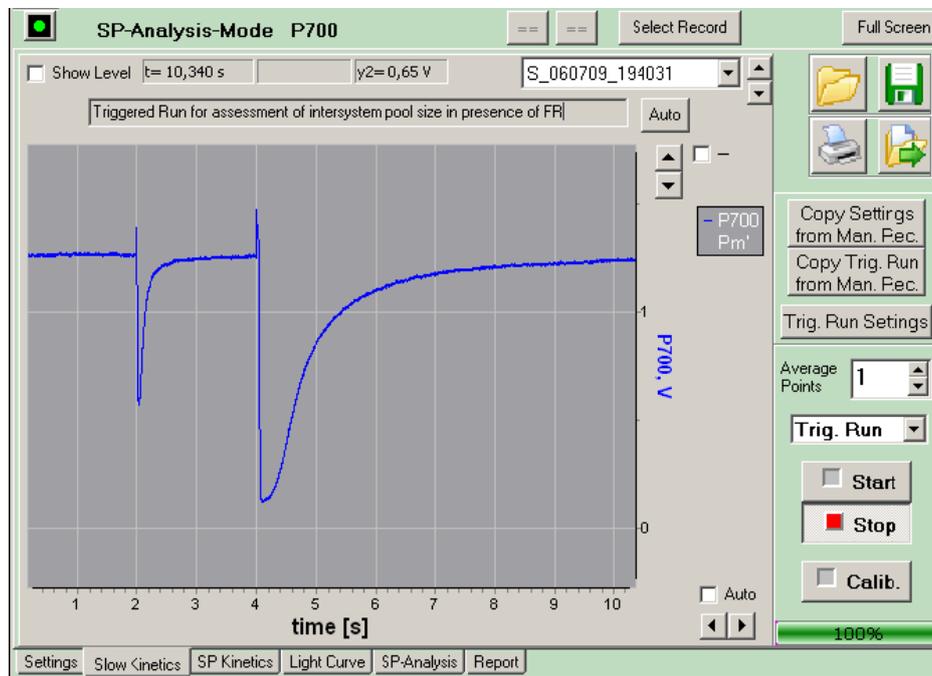


图 4.5.6 利用 Dual-PAM-100 测量 PQ 库

鼓包测量也需要编辑脚本, 通过加载脚本实现曲线测量的一致性。

脚本运行结束后会自动停止, 测量结束后, 如需保存图形, 点击上方软盘按钮保存 Report, 点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。选择 Report 主菜单, 点击左上方软盘按钮保存 Report, 点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。

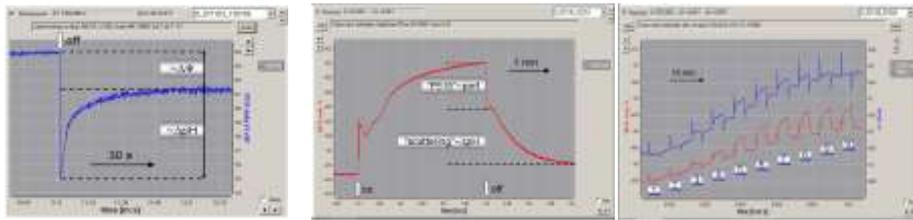
曲线所有的数据点存储在 Excel 文件内, 可以导入作图软件实现曲线的再现与编辑。

详细的脚本编辑方法会在附录中完整展示

鼓包测量脚本文件在仪器安装调试时会提供, 也可以向泽泉科技技术人员索取。

4.5.7 P515/535 的测量

P515/535 模块是 WALZ 公司为 DUAL-PAM-100 设计的测量模块，可以直接连接 DUAL-PAM-100 的主机，测量 550-510 nm 的差式吸收以及 535 nm 波长的信号变化。P515/535 模块可以测量光合器官的跨膜质子动力势 (pmf)、跨膜电位 ($\Delta\psi$)、跨膜质子梯度 (ΔpH) 和玉米黄素 (Zea) 变化等内容。此外，该模块还提供一种特殊的“P515 Flux”操作模式，可让光化光以光-暗脉冲形式打开-关闭 (1/1 调制光/暗)，原位测量活体样品处于稳态的耦联电子和质子的流动速率。



通过测量 P515 变化得出质子动力势 (pmf) 两个组分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH

通过测量 535 nm 变化得出质子动力势 (pmf) 及其组分 ΔpH

同步测量 P515 和 535 nm 信号的光响应曲线

准备：加载 P515/535 模块出厂设置，选择测量模式，P515 或 I535 或 P515+I535

P515/535 模块的所有测量程序测量也需要编辑脚本，通过加载脚本实现曲线测量的一致性。

脚本运行结束后会自动停止，测量结束后，如需保存图形，点击上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 格式图形。选择 Report 主菜单，点击左上方软盘按钮保存 Report，点击绿色箭头按钮导出 Excel 数据报告。

曲线所有的数据点存储在 Excel 文件内，可以导入作图软件实现曲线的再现与编辑。

详细的脚本编辑方法会在附录中完整展示

鼓包测量脚本文件在仪器安装调试时会提供，也可以向泽泉科技技术人员索取。

1. Nishikawa Y, Yamamoto H, Okegawa Y, et al. PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(12): 2117-2126.
2. Alric J, Lavergne J, Rappaport F. Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (l) aerobic conditions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2010, 1797(1): 44-51.
3. Suzuki K, Ohmori Y, Ratel E. High root temperature blocks both linear and cyclic electron transport in the dark during chilling of the leaves of rice seedlings[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(9): 1697-1707.
4. Wang C, Yamamoto H, Shikanai T. Role of cyclic electron transport around photosystem I in regulating proton motive force[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2015, 1847(9): 931-938.

4.6 测量结果数据保存

4.6.1 全部数据保存，打开与编辑



诱导曲线和光曲线的数据都显示在 **Report** 界面，主显示区最左边的一列按钮可以实现数据的翻页，中间为数据显示，最右面是数据的勾选框，即勾选上的才会在中间显示，不勾选的不显示。在主显示区的最上面是打开，保存，打印，导出数据的按钮，其中**软盘**保存的文件时可以用 **Dual PAM** 软件打开的，而“文件夹导出”的则为 **Excel** 格式的文件。

特殊测量，如“鼓包”即 **Post-illumination** 的测量 **Report** 界面只显示动作，并不显示数据，曲线数据点集需要在曲线显示界面导出，相关描述可参考前面的测量说明。
菜单栏 File 选项也具有数据保存选项，下图为各选项的详细介绍



File 菜单中 **Save Report** 的功能等同于 **Report** 界面的“软盘”按钮。**Export** 等同于“文件夹导出”

参考文献:

1. Benson S L, Maheswaran P, Ware M A, et al. An intact light harvesting complex I antenna system is required for complete state transitions in Arabidopsis[J]. *Nature Plants*, 2015, 1: 15176.
2. Pinnola A, Cazzaniga S, Alboresi A, et al. Light-Harvesting Complex Stress-Related Proteins Catalyze Excess Energy Dissipation in Both Photosystems of *Physcomitrella patens*[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(11): 3213-3227.
3. Pinnola A, Dall'Osto L, Gerotto C, et al. Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in *Physcomitrella patens*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3519-3534.
4. Iwai M, Yokono M, Kono M, et al. Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss *Physcomitrella patens*[J]. *Nature Plants*, 2015, 1(2).
5. Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Rossi F, et al. Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms[J]. *The Plant Journal*, 2013, 75(4): 671-684.
6. Pietrzykowska M, Suorsa M, Semchonok D A, et al. The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(9): 3646-3660.
7. Belgio E, Kapitonova E, Chmeliov J, et al. Economic photoprotection in photosystem II that retains a complete light-harvesting system with slow energy traps[J]. *Nature communications*, 2014, 5.
8. Sukhov V, Surova L, Sherstneva O, et al. Influence of variation potential on resistance of the photosynthetic machinery to heating in pea[J]. *Physiologia plantarum*, 2014, 152(4): 773-783.
9. Xu, D., Y. Wang, et al. (2014). Long-Term Experiment on Physiological Responses to Synergetic Effects of Ocean Acidification and Photoperiod in the Antarctic Sea Ice Algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Environmental Science & Technology* 48(14): 7738-7746. (黄海水产研究所)
10. Xu, L., Q. Wang, et al. (2014). Improvement of hydrogen yield of lba-transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* caused by increasing respiration and impairing photosynthesis. *International Journal of Hydrogen Energy*. (上海师范大学)
11. Yuan, X., L. Zhang, et al. (2014). Photosynthetic Physiological Response of *Radix Isatidis* (*Isatis indigotica* Fort.) Seedlings to Nicosulfuron. *PLoS ONE* 9(8): e105310. (山西农业大学)
12. Zhang, G., Y. Liu, et al. (2014). Exogenous Calcium Alleviates Low Night Temperature Stress on the Photosynthetic Apparatus of Tomato Leaves. *PLoS ONE* 9(5): e97322. (沈阳农业大学)
13. Zhang, J., F. Gao, et al. (2014). NdhP Is an Exclusive Subunit of Large Complex of NADPH Dehydrogenase Essential to Stabilize the Complex in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* 289(27): 18770-18781. (上海师范大学)
14. Zhang, X., S. Mou, et al. (2014). Roles of the transthylakoid proton gradient and xanthophyll cycle in the non-photochemical quenching of the green alga *Ulva linza*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. (黄海水产研究所)
15. Zhao, J., F. Gao, et al. (2014). Deletion of an electron donor-binding subunit of the NDH-1 complex, NdhS, results in a heat-sensitive growth phenotype in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chinese Science Bulletin*: 1-7. (上海师范大学)
16. Zhao, J., F. Gao, et al. (2014). NdhO, a Subunit of NADPH Dehydrogenase, Destabilizes Medium Size Complex of the Enzyme in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* 289(39): 26669-26676. (上海师范大学)
17. Zhao, P., W. Gu, et al. (2014). Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports* 4. (中科院海洋所)
18. Zhou, W., L. He, et al. (2014). *Pyropia yezoensis* can utilize CO₂ in the air during moderate dehydration. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 32: 358-364. (中科院海洋所)

19. An, Y., X. Han, et al. (2014). Poplar GATA transcription factor PdGNC is capable of regulating chloroplast ultrastructure, photosynthesis, and vegetative growth in *Arabidopsis* under varying nitrogen levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-15. (北京林业大学)
20. An, Y., S. Wang, et al. (2014). O₂ evolution and cyclic electron flow around photosystem I in long-term ground batch culture of *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*. (中科院武汉水生所)
21. Deng, C.-N., D.-Y. Zhang, et al. (2014). Toxic effects of erythromycin on photosystem I and II in *Microcystis aeruginosa*. *Photosynthetica*: 1-7. (云南师范大学)
22. Deng, C., X. Pan, et al. (2014). Cu²⁺ Inhibits Photosystem II Activities but Enhances Photosystem I Quantum Yield of *Microcystis aeruginosa*. *Biological Trace Element Research* 160(2): 268-275. (云南师范大学)
23. Deng, C., X. Pan, et al. (2014). Influence of ofloxacin on photosystems I and II activities of *Microcystis aeruginosa* and the potential role of cyclic electron flow. *Journal of bioscience and bioengineering*. (云南师范大学)
24. Dong, Y., C. Wang, et al. (2014). A novel bHLH transcription factor *PebHLH35* from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (北京林业大学)
25. Fan, J., Y. Cui, et al. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for biofuels* 7(1): 17. (华东理工大学)
26. Fan, X., H. Qiao, et al. (2014). Short-term retention of kleptoplasty from a green alga (*Bryopsis*) in the sea slug *Placida* sp. YS001. *Biologia* 69(5): 635-643. (黄海水产研究所)
27. Fan, X., D. Xu, et al. (2014). The effect of nutrient concentrations, nutrient ratios and temperature on photosynthesis and nutrient uptake by *Ulva prolifera*: implications for the explosion in green tides. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 537-544. (黄海水产研究所)
28. Gao, S., W. Gu, et al. (2014). Desiccation enhances phosphorylation of PSII and affects the distribution of protein complexes in the thylakoid membrane. *Physiologia plantarum*. (中科院海洋所)
29. Gao, S., Z. Zheng, et al. (2014). Photosystem I shows a higher tolerance to sorbitol-induced osmotic stress than photosystem II in the intertidal macro-algae *Ulva prolifera* (Chlorophyta). *Physiologia plantarum*. (中科院海洋所)
30. Gao, Z., D. Xu, et al. (2014). The green tide-forming macroalga *Ulva linza* outcompetes the red macroalga *Gracilaria lemaneiformis* via allelopathy and fast nutrients uptake. *Aquatic Ecology* 48(1): 53-62. (黄海水产研究所)
31. Huan, L., S. Gao, et al. (2014). Specific photosynthetic and morphological characteristics allow macroalgae *Gloiopeltis furcata* (Rhodophyta) to survive in unfavorable conditions. *Photosynthetica*: 1-7. (中科院海洋所)
32. Huan, L., X. Xie, et al. (2014). Positive Correlation Between PSI Response and Oxidative Pentose Phosphate Pathway Activity During Salt Stress in the Intertidal Macroalgae. *Plant and Cell Physiology*: pcu063. (中科院海洋所)
33. Jia, X.-H., P.-P. Zhang, et al. (2014). Regulation of *pepc* gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120 and its effects on cyclic electron flow around photosystem I and tolerances to environmental stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*: n/a-n/a. (上海海洋大学)
34. Lei, Y.-b., Y.-l. Zheng, et al. (2014). Different responses of photosystem I and photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery. *Trees* 28(3): 923-933. (中科院西双版纳植物园)
35. Ou, H.-S., C.-H. Wei, et al. (2013). Principal component analysis to assess the efficiency and mechanism for enhanced coagulation of natural algae-laden water using a novel dual coagulant system. *Environmental Science and Pollution Research* 21(3): 2122-2131. (华南理工大学)
36. Shi, Y., R. Wang, et al. (2014). Molecular Cloning and Functional Characterization of the Lycopene ϵ -Cyclase Gene via Virus-Induced Gene Silencing and Its Expression Pattern in *Nicotiana tabacum*. *International journal of molecular sciences* 15(8): 14766-14785. (郑州大学)
37. Song, Y., Q. Diao, et al. (2014). Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. *Plant Growth Regulation*: 1-12. (沈阳农业大学)

38. Teng, K., J. Li, et al. (2014). Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress. *Acta Physiologiae Plantarum*: 1-9. (河南农业大学)
39. Wang, B., Z. Zhang, et al. (2014). Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing Lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE* 9(9): e106679. (厦门大学)
40. Wang, S., X. Pan, et al. (2014). PSI Showed Higher Tolerance to Sb (V) than PSII Due to Stimulation of Cyclic Electron Flow Around PSI. *Current microbiology*: 1-8. (中国科学院新疆生地所)
41. Cao, S., X. Zhang, et al. (2013). A transthylakoid proton gradient and inhibitors induce a non-photochemical fluorescence quenching in unicellular algae *Nannochloropsis* sp. *FEBS Letters* 587(9): 1310-1315. (青岛农业大学)
42. Dai, H., L. Zhang, et al. (2013). Identification of a cyanobacterial CRR6 protein, Slr1097, required for efficient assembly of NDH-1 complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant Journal* 75(5): 858-866. (上海师范大学)
43. Deng, C., D. Zhangb, et al. (2013). Toxic effects of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and transthylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 127: 1-7. (云南师范大学)
44. Gao, S., J. Niu, et al. (2013). The physiological links of the increased photosystem II activity in moderately desiccated *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) to the cyclic electron flow during desiccation and re-hydration. *Photosynthesis Research* 116(1): 45-54. (中科院海洋所)
45. Gao, Z., D. Li, et al. (2013). Survival and proliferation characteristics of the microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L after hypergravitational stress pretreatment. *Icarus* 226(1): 971-979. (山东理工大学)
46. Gu, W., X. Xie, et al. (2013). Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: From a perspective of photosynthesis. *PLoS ONE* 8(7): e67028. (中科院海洋所)
47. He, Z. H., H. W. Li, et al. (2013). Comparative analysis of the chloroplast proteomes of a wheat (*Triticum aestivum* L.) single seed descent line and its parents. *J Plant Physiol* 170(13): 1139-1147. (中科院植生所)
48. Huang, W., P.-L. Fu, et al. (2013). Differences in the responses of photosystem I and photosystem II of three tree species *Cleistanthus sumatranus*, *Celtis philippensis* and *Pistacia weinmannifolia* exposed to a prolonged drought in a tropical limestone forest. *Tree physiology* 33(2): 211-220. (扬州大学)
49. Jiang, Y. P., L. F. Huang, et al. (2013). Brassinosteroids accelerate recovery of photosynthetic apparatus from cold stress by balancing the electron partitioning, carboxylation and redox homeostasis in cucumber. *Physiologia plantarum* 148(1): 133-145. (浙江大学)
50. Hu, Y.-Y., D.-Y. Fan, et al. (2013). Whole-tissue determination of the rate coefficients of photoinactivation and repair of photosystem II in cotton leaf discs based on flash-induced P700 redox kinetics. *Photosynthesis Research* 117(1-3): 517-528. (石河子大学)
51. Lv, Z., L. Wei, et al. (2013). Moderate Heat Pretreatment Alleviates the Inhibition of Photosystem II Activity Caused by the Response of *Cyanobacterial* Cells to High Red Light. *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future*, Springer: 502-504. (上海师范大学)
52. Mou, S., X. Zhang, et al. (2013). Photoprotection in the green tidal alga *Ulva prolifera*: role of LHCSR and *PsbS* proteins in response to high light stress. *Plant Biology* 15(6): 1033-1039. (黄海水产研究所)
53. Ou, H.-S., C.-H. Wei, et al. (2013). Principal component analysis to assess the composition and fate of impurities in a large river-embedded reservoir: Qingcaosha Reservoir. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15(8): 1613-1621. (华南理工大学)
54. Pfündel, E. E., C. Klughammer, et al. (2013). Deriving fluorometer-specific values of relative PSI fluorescence intensity from quenching of F₀ fluorescence in leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Photosynthesis Research* 114(3): 189-206. (德国 WALZ)
55. Qi, M., Y. Liu, et al. (2013). Nano-TiO₂ Improve the Photosynthesis of Tomato Leaves under Mild Heat Stress. *Biological*

- Trace Element Research 156(1-3): 323-328. (沈阳农业大学)
56. Qu, C., C. Liu, et al. (2013). Improvement of Cerium on Photosynthesis of Maize Seedlings Under a Combination of Potassium Deficiency and Salt Stress. *Biological Trace Element Research* 155(1): 104-113. (苏州大学)
 57. Shao, N., G. Y. Duan, et al. (2013). A mediator of singlet oxygen responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis* identified by a luciferase-based genetic screen in algal cells. *The Plant Cell Online* 25(10): 4209-4226. (华南植物园)
 58. Li, D.-D., X.-L. Xia, et al. (2013). Two poplar calcineurin B-like proteins confer enhanced tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 57(1): 70-78. (北京林业大学)
 59. Lin, A., G. C. Wang, et al. (2013). Simultaneous measurements of H⁺ and O₂ fluxes in *Zostera marina* and its physiological implications. *Physiologia plantarum* 148(4): 582-589. (中科院海洋所)
 60. Liu, J., P. Wang, et al. (2013). A deficiency in chloroplastic ferredoxin 2 facilitates effective photosynthetic capacity during long-term high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 76(5): 861-874. (中山大学)
 61. Song, R., C.-Y. Zhao, et al. (2013). Effect of sulphate nutrition on arsenic translocation and photosynthesis of rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(11): 3237-3243. (河南农业大学)
 62. Wang, J., M. R. Sommerfeld, et al. (2013). Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation. *Algae* 28(2): 193-202. (中科院植物所)
 63. Wang, J. H., S. C. Li, et al. (2013). Differences in the stimulation of cyclic electron flow in two tropical ferns under water stress are related to leaf anatomy. *Physiologia plantarum* 147(3): 283-295. (云南省农业科学院)
 64. Wang, L. Y., D. Li, et al. (2013). Antisense-mediated depletion of tomato GDP-L-galactose phosphorylase increases susceptibility to chilling stress. *J Plant Physiol* 170(3): 303-314. (山东农业大学)
 65. Wang, P., J. Liu, et al. (2013). Evidence for a Role of Chloroplastic m-Type Thioredoxins in the Biogenesis of Photosystem II in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163(4): 1710-1728. (中山大学)
 66. Wang, S., F. Chen, et al. (2013). Simultaneous analysis of photosystem responses of *Microcystis aeruginosa* under chromium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88: 163-168. (中科院生地所)
 67. Wang, S., D. Zhang, et al. (2013). Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow. *Chemosphere* 93(2): 230-237. (中科院生地所)
 68. Wang, Y., D. Xu, et al. (2013). Variation of photosynthetic performance, nutrient uptake, and elemental composition of different generations and different thallus parts of *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology* 25(2): 631-637. (青岛农业大学)
 69. Wei, L., X. Li, et al. (2013). A simple approach for the efficient production of hydrogen from Taihu Lake *Microcystis* spp. blooms. *Bioresource Technology* 139: 136-140. (上海师范大学)
 70. Wang, J., D. Han, et al. (2013). Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 25(1): 253-260. (中科院植物所)
 71. Xie, X., S. Gao, et al. (2013). Desiccation Induces Accumulations of Antheraxanthin and Zeaxanthin in Intertidal Macro-Alga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *PLoS ONE* 8(9): e72929. (中科院海洋所)
 72. Xu, D., F. Li, et al. (2013). Facilitative interactions between the green-tide macroalga *Monostroma arctium* and the red macroalga *Porphyra yezoensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 444: 8-15. (黄海水产研究所)
 73. Xu, D., N. Ye, et al. (2013). Variation in morphology and PSII photosynthetic characteristics of *Macrocystis pyrifera* during development from gametophyte to juvenile sporophyte. *Aquaculture Research*. (黄海水产研究所)
 74. Xu, J., X. Zhang, et al. (2013). Activities of principal photosynthetic enzymes in green macroalga *Ulva linza*: functional implication of C₄ pathway in CO₂ assimilation. *Science China Life Sciences* 56(6): 571-580. (中科院海洋所)
 75. Yuan, X., P. Guo, et al. (2013). Safety of herbicide Sigma Broad on *Radix Isatidis* (*Isatis indigotica* Fort.) seedlings and their photosynthetic physiological responses. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106(1): 45-50. (山西农业大学)
 76. Zhang, Q., C. Zhou, et al. (2013). Stereoselective Phytotoxicity of HCH Mediated by Photosynthetic and Antioxidant Defense

Systems in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 8(1): e51043. (浙江大学)

77. Zhang, X., N. Ye, et al. (2013). Occurrence of the *Psb S* and *Lhc SR* products in the green alga *Ulva linza* and their correlation with excitation pressure. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 336-341. (黄海水产研究所)
78. Zhang, Y.-J., Q.-Y. Yang, et al. (2013). Extended leaf senescence promotes carbon gain and nutrient resorption: importance of maintaining winter photosynthesis in subtropical forests. *Oecologia* 173(3): 721-730. (中国科学院西双版纳热带植物园)
79. Zhang, Y.-M., H. Chen, et al. (2013). Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. PLoS ONE 8(7): e69225. (中科院武汉水生所)
80. Zhang, Y., K. Cao, et al. (2013). Winter Photosynthesis of Evergreen Broadleaf Trees from a Montane Cloud Forest in Subtropical China. *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future*, Springer: 812-817. (中国科学院西双版纳热带植物园)

如果您需要了解更多信息，或有问题需要与我们交流，请按如下方式与我们联系：

	地 址	邮 编	电 话	传 真
上海总部	普陀区金沙江路 1038 号华东师大科技园 2 号楼 8 层	200062	021-32555118	021-32555117
北京分公司	海淀区北三环西路 43 号青云当代大厦 1907 室	100048	010-88824075/76/77	转 605 分机
广州代表处	天河区潭村路 348 号马赛国际商务中心 2206 室	510632	020-85645707	020-85645359
成都代表处	人民南路一段 97 号现代之窗 1018 室	610016	028-86722096, 86719836	028-86721922

高新技术: www.zealquest.cn 产品销售: www.zealquest.com

微博: weibo.com/zealquest E-mail: sales@zealquest.com service@zealquest.com

QQ 技术讨论群: 154279317 (陆地环境应用); 222678293 (水环境应用)

如果您需要植物表型、植物生理生态、植物基因型、植物培养、种子纯度鉴定等方面的测试服务或项目合作，请联系：

	地 址	邮 编	电 话	传 真
AgriPheno 平台	上海浦东新区沔北路 185 号 C9-1	201210	021-50199251/3/6/8	021-50199252

网址: www.agripheno.com E-mail: phenotype@zealquest.com

附录

调制叶绿素荧光仪 Dual-PAM-100 脚本编写方法

吕中贤 褚胜利

[1]上海泽泉科技股份有限公司，上海 200062

摘要： Dual-PAM-100 作为能够同步测量光系统 II 和光系统 I 活性的调制叶绿素荧光仪，在植物生理研究中有广泛的应用。其测量慢速动力学荧光诱导曲线和快速光曲线均由内置程序自动测量，本文主要阐述利用 Dual-PAM-100 的脚本编制功能测量某些特殊意义的非标准化荧光曲线，用于特殊的植物生理研究。

关键词： 调制叶绿素荧光仪、Dual-PAM-100、脚本编写

叶绿素荧光技术作为光合作用的经典测量方法，已经成为藻类和高等植物生理生态研究领域功能最强大、使用最广泛的技术之一。由于常温常压下叶绿素荧光主要来源于光系统 II 的叶绿素 a，而光系统 II 处于整个光合作用过程的最上游，因此包括光反应和暗反应在内的多数光合过程的变化都会反馈给光系统 II，进而引起叶绿素 a 荧光的变化，也就是说几乎所有光合作用过程的变化都可通过叶绿素荧光反映出来。与其它测量方法相比，叶绿素荧光技术还具有不需破碎细胞、简便、快捷、可靠等特性，因此在国际上得到了广泛的应用。

然而，对于光系统 I 的叶绿素荧光，在常温常压下很难测量。先前，人们测量光系统 I 的叶绿素荧光采用超低温叶绿素荧光法（77k），利用液氮冻融样品，然后放入含液氮的超低温荧光分光光度计，选择合适的激发光测量样品的光系统 I 叶绿素荧光。该方法的局限性在于无法获得动态的光系统 I 叶绿素荧光曲线，也无法对已冻融的样品再次进行诱导，因此只能获得某一状态下的光系统 I 叶绿素荧光数据。后来，德国乌兹堡大学 Schreiber 教授——调制叶绿素荧光仪 PAM 发明人——通过差示吸收技术，成功地在调制叶绿素荧光仪 PAM 中加入了测量 P700 信号的功能。植物样品的 P700 信号在常温常压下能够稳定被测量，并且能够很好地反映光系统 I 的叶绿素荧光变化，因此人们可以在常温常压下通过监测动态的 P700 信号的变化研究光系统 I 的荧光变化。

在庞大的 PAM 家族中，Dual-PAM-100 能够同时测量光系统 I 和光系统 II 的活性变化，成为研究植物光合生理的重要的技术手段之一。同步测量两个光系统活性变化的荧光诱导曲线和快速光曲线均由

仪器自带的程序自动测量，在此不再赘述。本文主要阐述如何利用 Dual-PAM-100 手动测量某些特殊意义的荧光曲线，例如光化光关闭后的荧光瞬时上升（俗称鼓包）变化、P700+暗还原曲线等。

1. 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线

在蓝藻和高等植物中，光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线能够反映由 NADPH 脱氢酶介导的围绕光系统 I 的循环电子传递的活性。荧光瞬时上升斜率越高，说明循环电子传递活性越高。该方法是研究围绕光系统 I 的循环电子传递活性的主要方法之一，能够快速、准确地表示循环电子传递的活性，是利用叶绿素荧光反映循环电子传递活性的经典方法。

如图 1 所示，图中红色荧光曲线为蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线，蓝色虚线即表示荧光上升的斜率，该斜率越高，表示循环电子传递活性越高。本节主要阐述如何利用 Dual-PAM-100 手动测量本曲线。

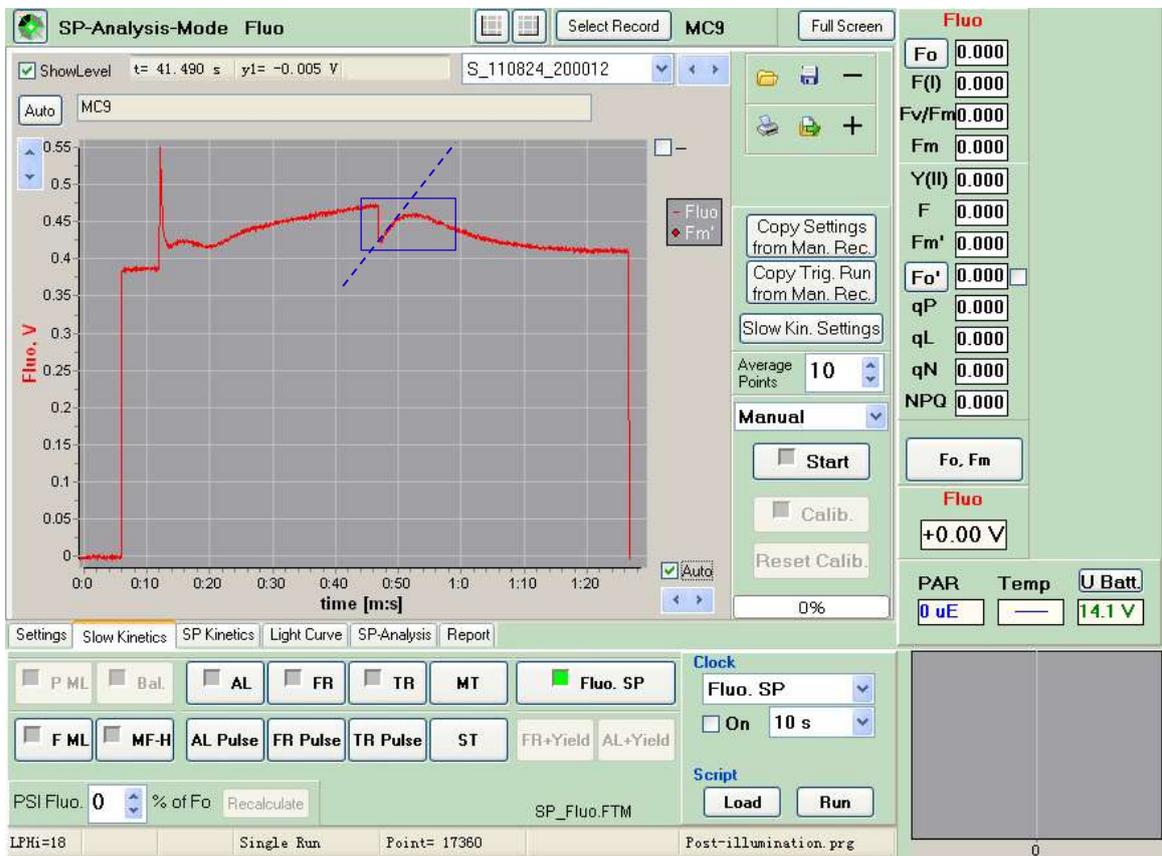


图 1 利用 Dual-PAM-100 测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线

如图 2 所示，为手动测量蓝藻鼓包曲线的测量分解图。图中共分为五个步骤，分别是“打开 Start”、“打开 F ML”、“打开 AL”、“关闭 AL”、“关闭 F ML”。“打开 Start”表示开始慢速动力学（Slow Kinetics）曲线测量，此时得到平稳的荧光信号。荧光信号平稳一段时间（通常为 5-10 秒）后，打开测量光，即“打开 F ML”，此时得到本底荧光信号 F_0 ，同样使荧光信号平稳数秒。此时，可打开光化光对样品进行诱导，即“打开 AL”。通常在曲线测量之前，我们会在 Settings 选择合适的光化光强度，而在曲线测量时，只需打开光化光即可。此外，如果测量样品为高等植物，通常会在打开光化光 AL 之

前打饱和脉冲 SP^[1]，然后开始光化光诱导。等光化光诱导平稳后，“关闭 AL”，荧光会产生瞬时淬灭，紧接着便会产生上升现象，待曲线走平稳后，关闭 Slow Kinetics，关闭测量光，即“关闭 F ML”。手动测量完毕后，可点击右上角红色方框中的按钮，导出曲线，用于数据处理。

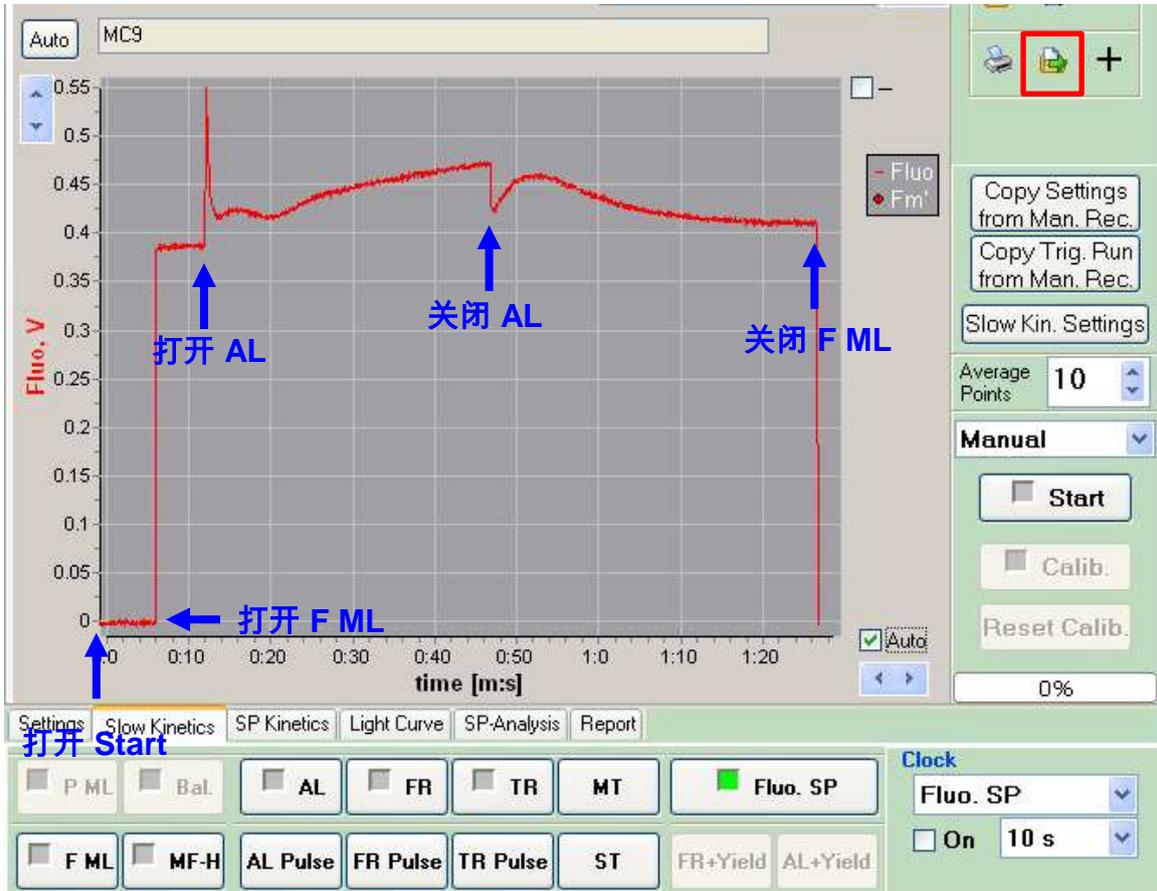


图 2 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线的分解图

2. 编制测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线的脚本

为了使测量数据重复性更好，我们需要准确地对平行样品进行重复测量。然而，纯手动测量不能保证在同样的时间位点做出相同的测量动作。例如，我们需要每次在第 5 秒时打开测量光，而靠手动点击鼠标，可能会在第 4.5 秒或 6 秒时打开测量光，这样会导致做数据平均时出现曲线变形，对实验结果影响很大。为了解决这一问题，我们就需要用到 Dual-PAM-100 软件中的脚本编制功能，编写一条标准的鼓包测量曲线，即可将繁琐的手动测量变成简单的自动测量。利用该功能，还可以编写其他不同的荧光曲线，用于不同的科研目的。

2.1 Dual-PAM-100 脚本编辑器介绍

如图 3 所示，点击软件界面右下方 Script 中的 Load 按钮，弹出 Script Files 对话框，显示软件自带的脚本程序。选择任意一条程序打开，加载至脚本文件编辑器中，如图 4 所示。点击编辑器左上角新建按钮，输入新建脚本文件名（如 Post-illumination），即可新建一条未编辑的脚本文件，如图 5 所示。



图 3 脚本程序按钮图示

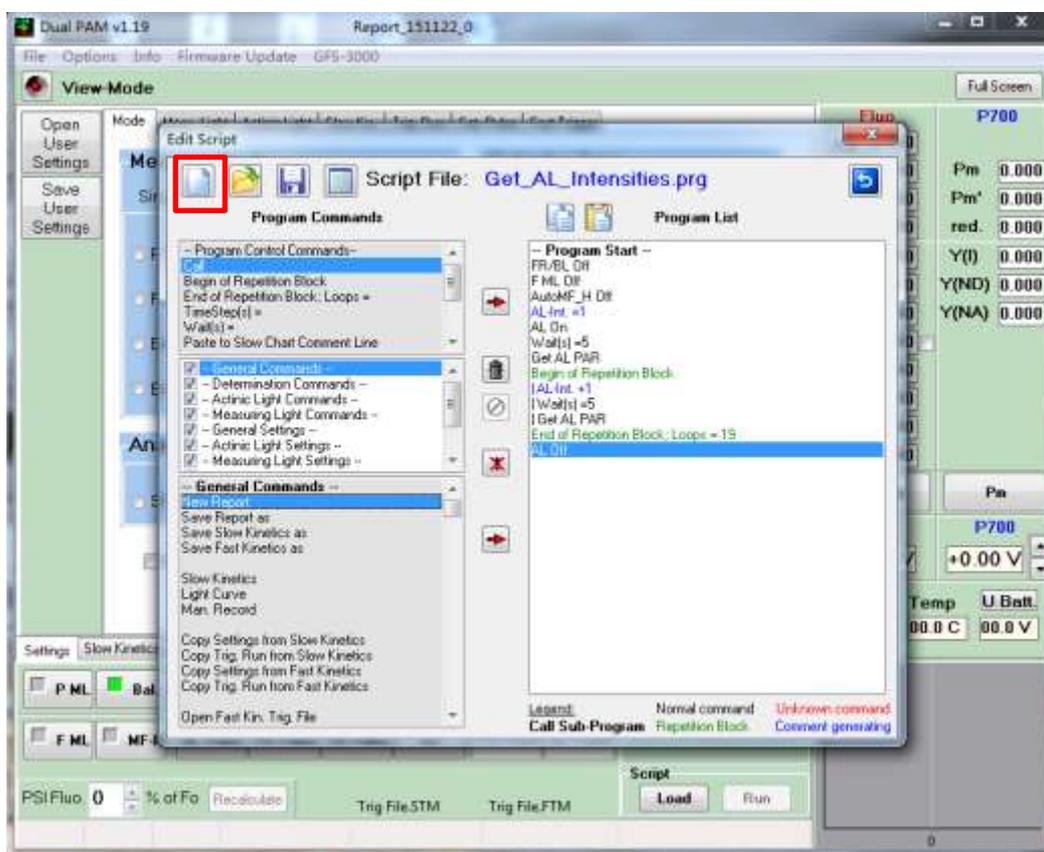


图 4 加载已有的脚本程序图示

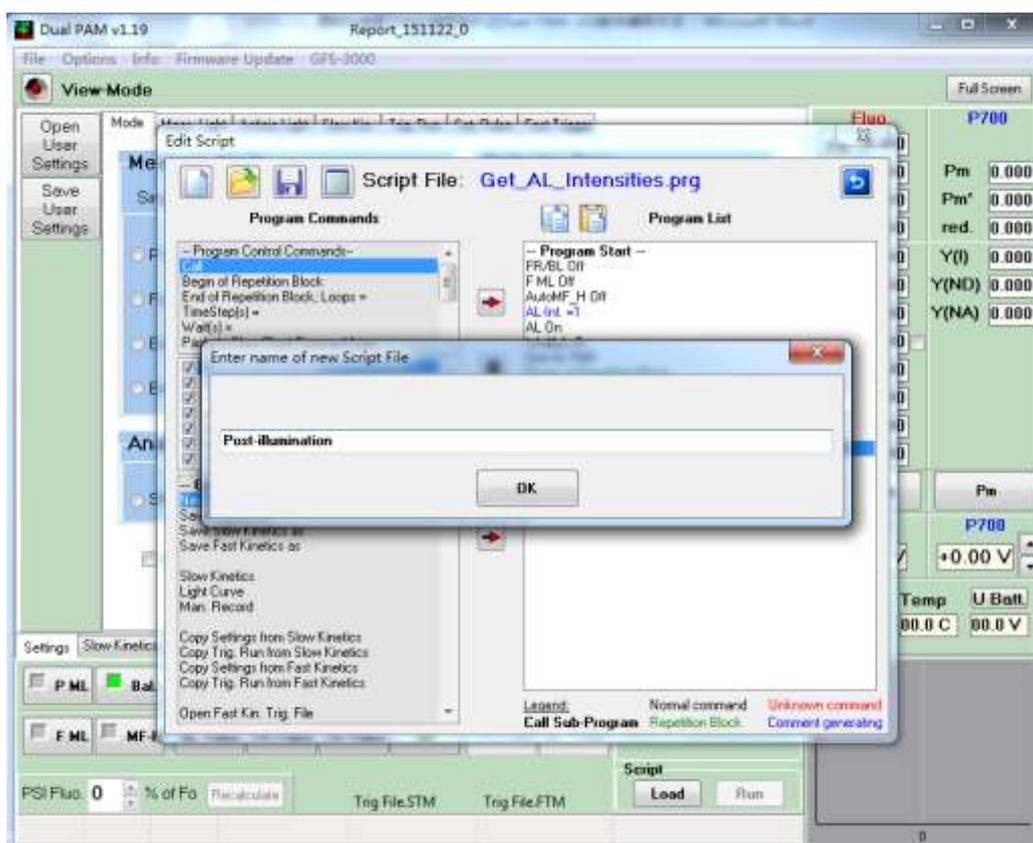


图 5 新建脚本文件图示

新建的脚本文件编辑器如图 6 所示，编辑器主要含有两大编辑控制区，分别为蓝色方框内的“程序控制按钮区域”和红色方框内的“通用控制按钮区域”，本节主要阐述该两大编辑控制区域内不同命令行所代表的意义及用法。

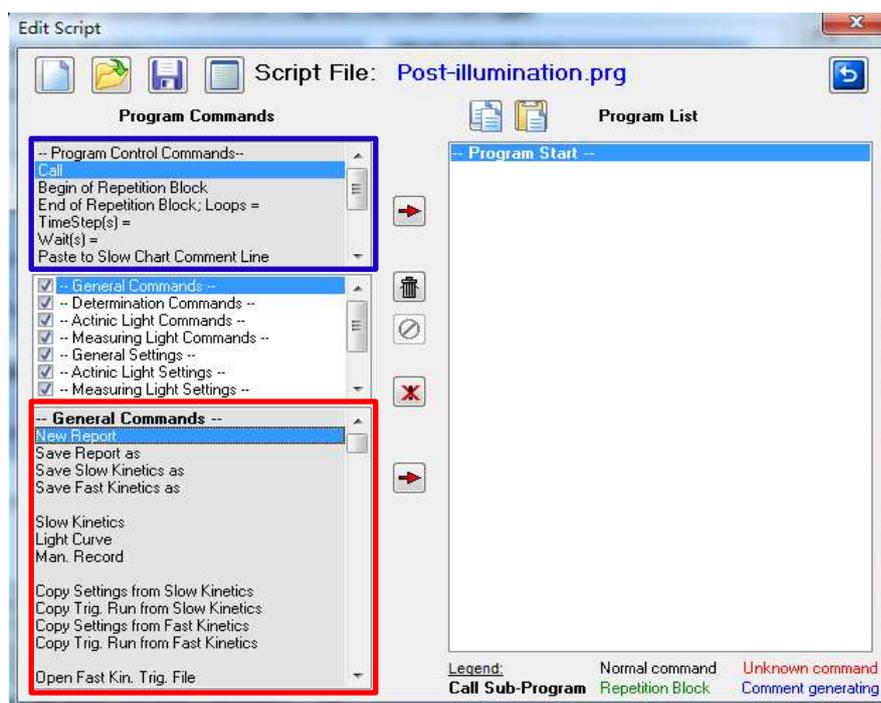
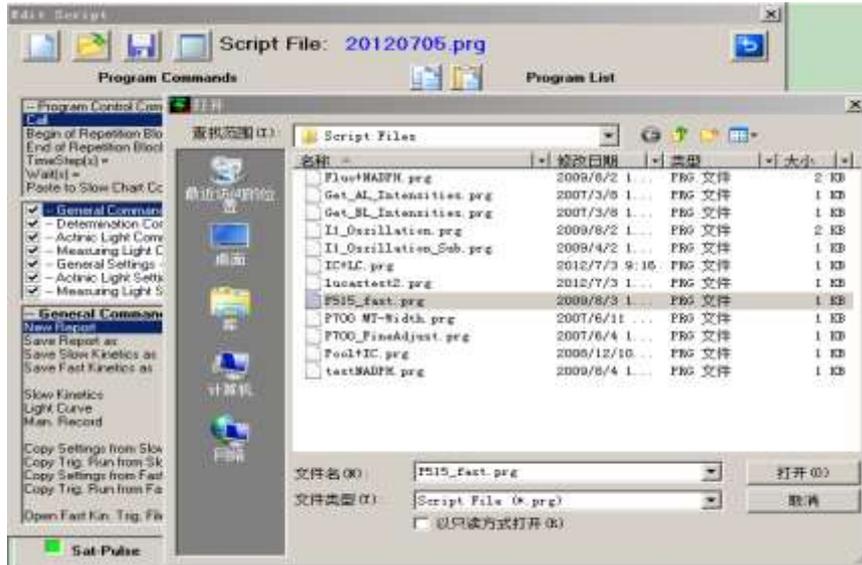


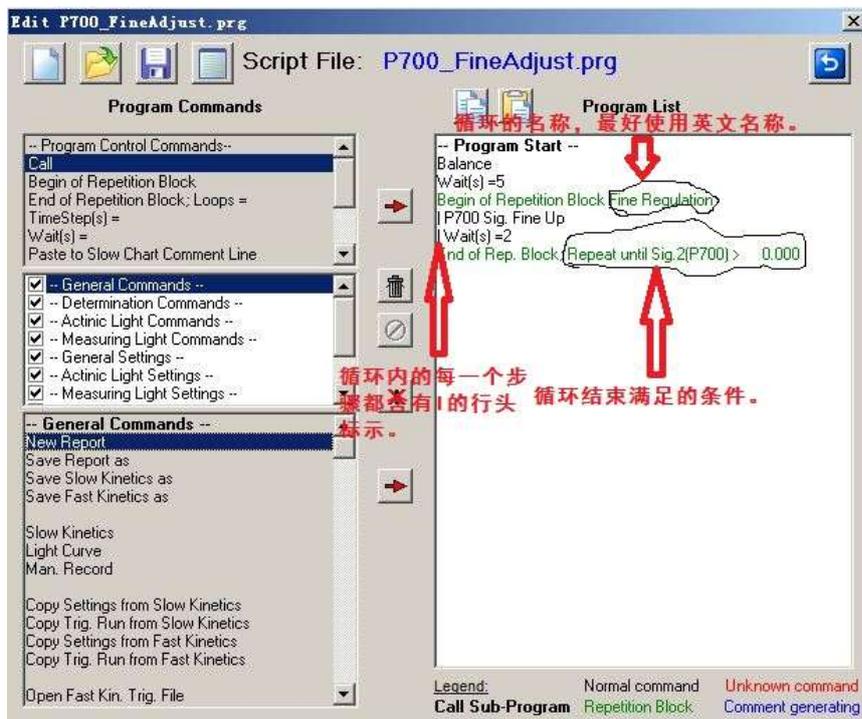
图 6 新建的脚本文件编辑器图示

蓝色方框的“程序控制按钮区域”为主程序编辑控制区域，其中命令行按钮所代表的意义如下：

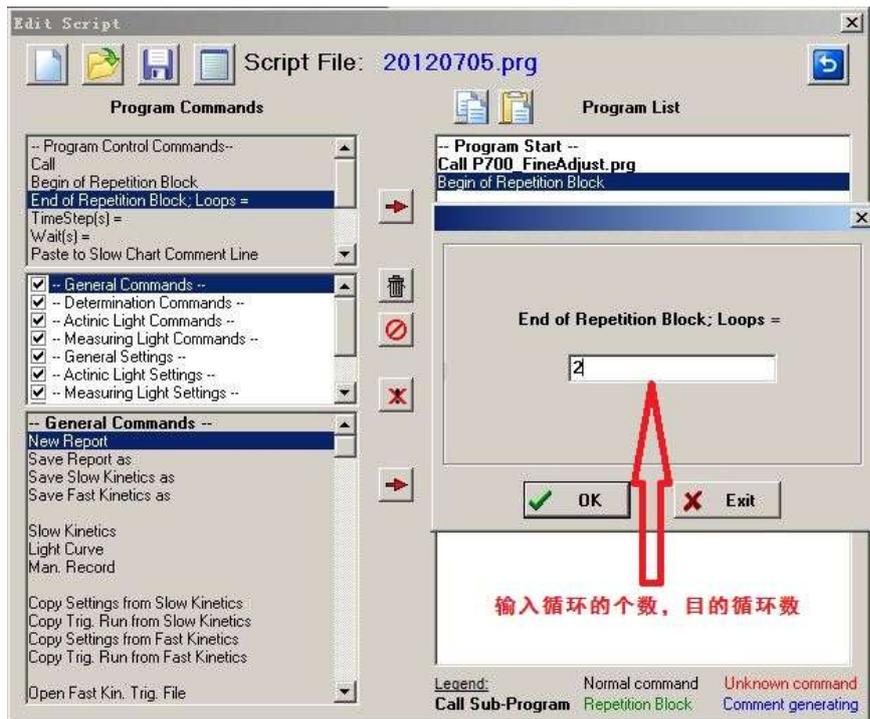
Call： 导入一个已有的程序镶嵌到您要编制的程序中；



Begin of Repetition Block: 循环程序的开始，输入循环的名称开始设置循环程序；



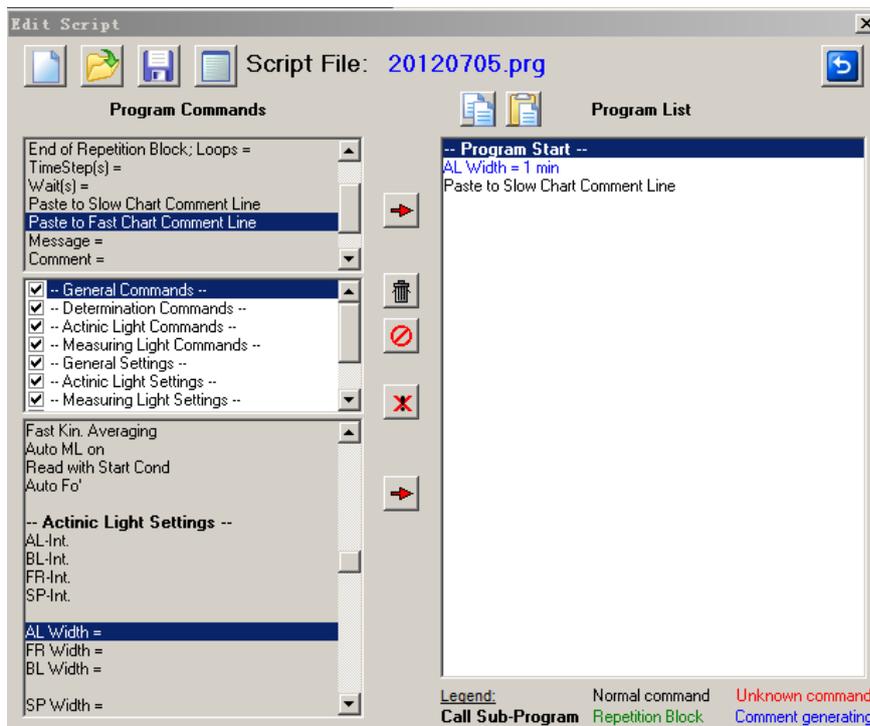
End of Repetition Block; Loops=: 循环的结束，Loops=输入循环的个数；



TimeStep(s)=: 该设置的时间包含了上一步操作所需要的时间，一般该设置的时间都要比上步时间长；

Waits(s)=: 上一步操作完成之后等待设置的时间之后进行下一步操作；

Paste to Slow Chart Comment Line: 将上一步蓝色显示的设置参数写入到 Slow Kinetics 界面的 command 备注窗口中；

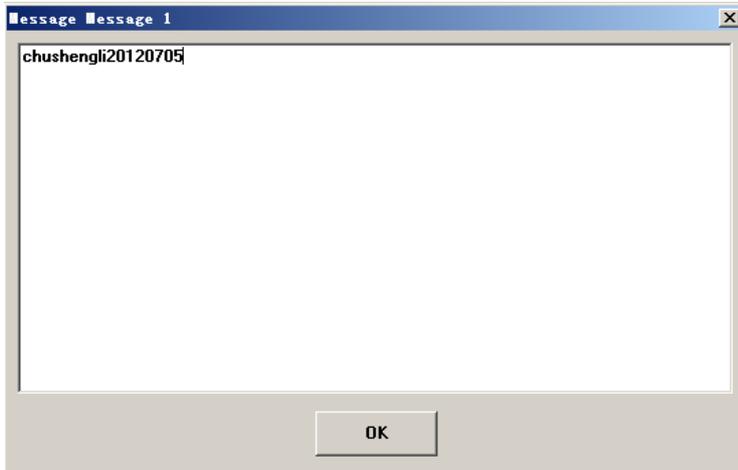


Paste to Fast Chart Comment Line: 将程序的参数设置下入到 Fast Kinetics 界面下的 command 命令窗中；

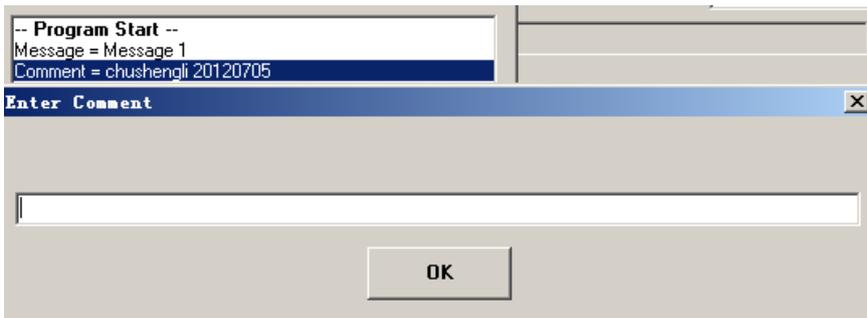
Message=: 输入备注信息；



先输入信息的名称，再输入备注信息；



Comment =: 输入注释名称，输入完成的会显示在程序中



Spacer: 增加一个空行；

Exit: 退出

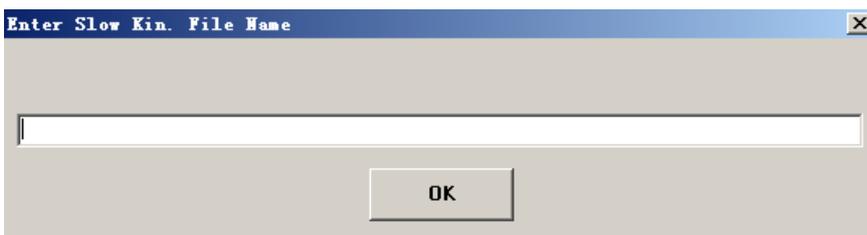
红色方框的“通用控制按钮区域”为编辑脚本文件的主要按钮区域，各按钮所代表的意义如下：

a. General Commands 通用命令按钮栏：

New Report: 创建一个新的数据存储文件；

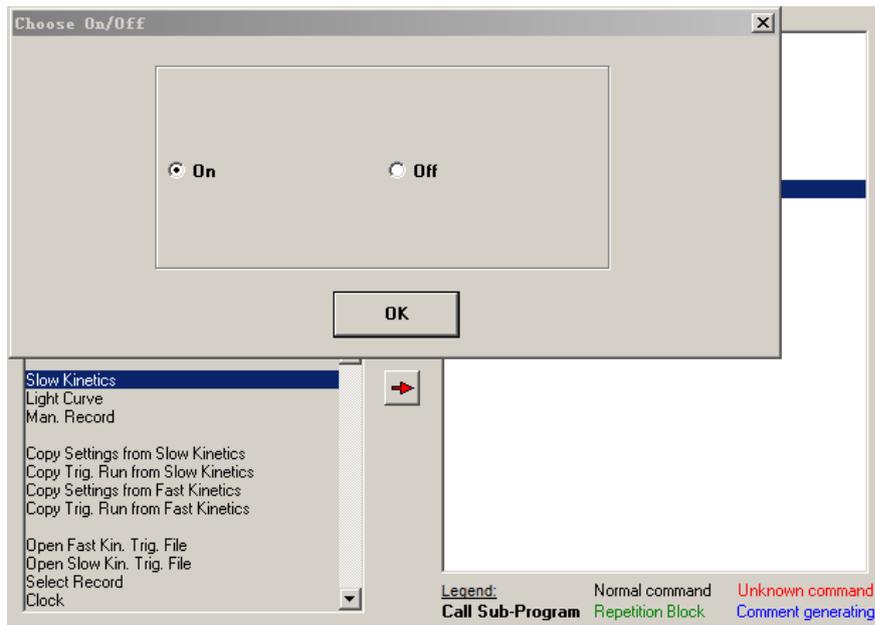
Save Report as: 创建一个新的文件名称；

Save Slow Kinetics as: 输入一个需要的慢速诱导动力学曲线的名称；



Save Fast Kinetics as: 输入一个需要的快速诱导动力学曲线的名称;

Slow Kinetics: 打开或关闭慢速诱导动力学曲线;



Light Curve: 打开或关闭快速光响应曲线;

Man. Record: 开启或关闭手动测量的记录;

Copy Settings from Slow Kinetics: 复制设置中的慢速诱导动力学曲线的参数设置;

Copy Trig. Run from Slow Kinetics: 复制慢速诱导动力学曲线的 Trig. Run 程序;

Copy Settings from Fast Kinetics: 复制设置中的快速诱导动力学曲线的参数设置;

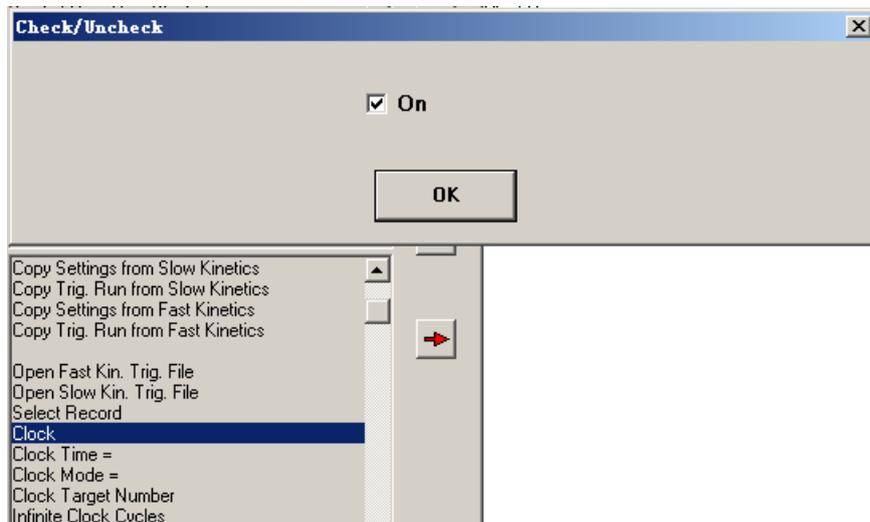
Copy Trig. Run from Slow Kinetics: 复制快速诱导动力学曲线的 Trig. Run 程序;

Open Fast Kin. Trig. File: 打开已经存在的快速诱导动力学的 Trig. Run 程序;

Open Slow Kin. Trig. File: 打开已经存在的慢速诱导动力学的 Trig. Run 程序;

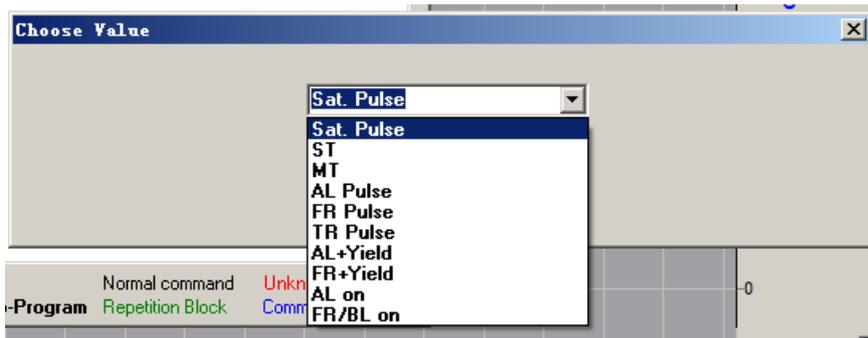
Select Record: 选择储存记录;

Clock : 打开或关闭 clock 测量程序;

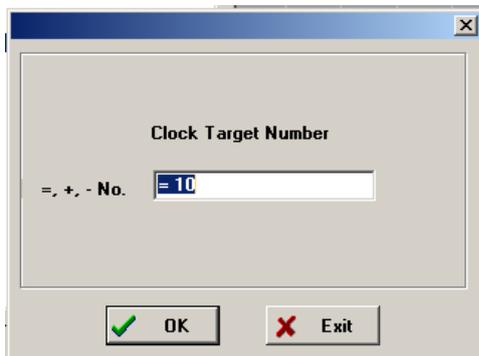


Clock Time =: 输入循环间隔时间，设置两次操作之间的时间；

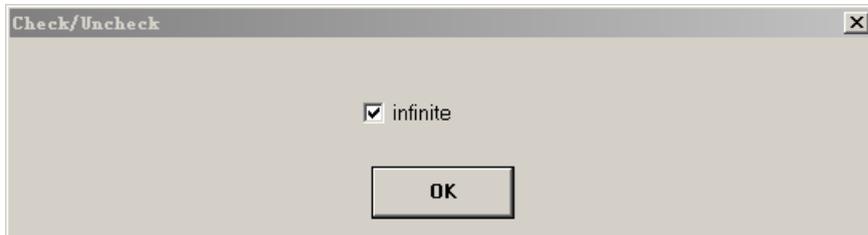
Clock Mode =: 选择循环操作的指令；



Clock Target Number =: 输入循环的次数；



Infinite Clock Cycles: 打开或关闭无限循环；



b. Determination Commands 测量命令按钮栏

Sat-Pulse/Fast Kin.: 仪器发出一个饱和脉冲（进行一次快相检测）；

Fo: 仪器记录一组 Fo 的数据；

Fo' : 仪器测量一组 Fo' 的值；

Fo, Fm: 仪器打开一个饱和脉冲，测量一组 Fo, Fm 的值计算 Fv/Fm；

Calibration: 仪器进行 P700 测量的自动校准；

Pm: 仪器测量 P700 的量子产量；

Auto FoFm/Pm: 自动测量 Fo, Fm 和 Pm 的值；

FR+Yield/Fast Kin.: 打开远红光测量 P700 的量子产量和快相；

AL+Yield/Fast Kin.: 打开光化光测量 P680 的量子产量和快相；

c. Actinic Light Commands 光化光命令按钮栏

AL: 打开或关闭光化光；

TR: 打开或关闭 TR 光；（在 Dual-PAM-100 中，该按钮用于控制测量藻类时使用的搅拌转子的开关）

FR/BL: 打开或关闭远红光；

Toggle FR/BL: 触发远红光;

Select FR/BL =: 选择 PSII 的光源, 远红光或蓝光;

Select Act. Light =: 选择光化光的光强来源, 红光、蓝光、红光和蓝光三种选择;

ST: 打一个单周转饱和闪光;

MT: 打一个多周转饱和闪光;

AL Pulse: 打一个光化光饱和脉冲光;

FR/BL Pulse: 打一个远红光饱和脉冲光;

TR Pulse: 打一个 TR 饱和脉冲光; (在 Dual-PAM-100 中, 该按钮意义不大)

d. Measuring Light Commands 测量光命令按钮栏

F ML: 打开或关闭荧光的测量光;

P ML: 打开或关闭 P700 的测量光;

Balance: P700 测量调平衡;

P700 Sig. Fine Up: 是 P700 的平衡信号向上;

P700 Sig. Fine Down: 是 P700 的平衡信号向下;

MF-H: 打开或关闭测量光频率自动调整高频的功能;

e. General Settings 通用设置命令按钮栏

Open User Settings: 打开用户已保存的参数设置;

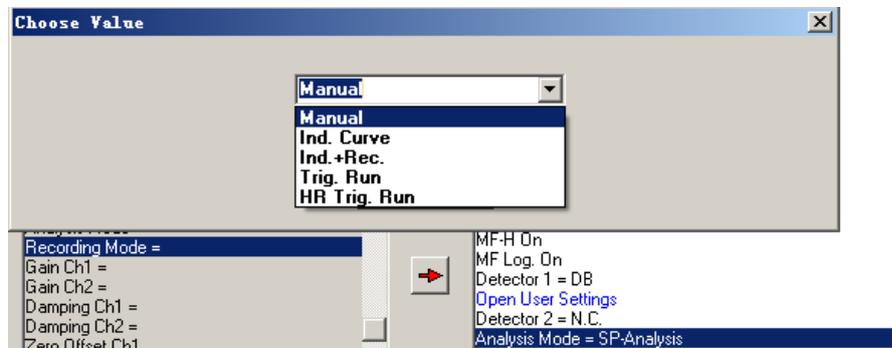
Detector 1 =: 选择 1 号接口连接的检测器类型;

Detector 2 =: 选择 2 号接口连接的检测器类型;

Measure Mode =: 选择测量的模式;

Analysis Mode =: 选择采样分析的模式, 慢速或快速可选;

Recording Mode =: 选择数据记录的模式;



Gain Ch1 =: 选择增益 1 对应的数值;

Gain Ch2 =: 选择增益 2 对应的数值;

Damping Ch1 =: 选择阻尼 1 的数值;

Damping Ch2 =: 选择阻尼 2 的数值;

Zero Offset Ch1: 通道 1 进行调零;

Zero Offset Ch2: 通道 2 进行调零;

Slow Kin. Acquisition Points =: 选择慢速诱导动力学曲线的采样点个数;

Slow Kin. Acquisition Rate =: 选择慢速诱导动力学曲线的采样频率;

Target Averages: 几个样点进行平均取值;

Multiple Average Cycles: 多重平均循环;

Fast Kin. Averaging: 选择是否将快相的点进行平均取样;

Auto ML on: 选择是否自动打开测量光;

Auto Fo': 是否自动进行 Fo' 的测量;

f. Actinic Light Settings 光化光设置命令按钮栏

AL-Int. : 设置光化光的强度梯度, 再循环中如果选择的是=号, 表示每次循环均是该梯度的光强; 如果是+号, 表示下一次循环光化光强度增加您输入的数值, -号则相反;

BL-Int. : 设置蓝色光化光的强度梯度, 符号与上相同;

FR-Int. : 选择远红光的梯度;

SP-Int. : 选择饱和脉冲光的梯度强度;

AL Width =: 选择光化光照射的时间长度;

FR Width =: 选择远红光照射的时间长度;

BL Width =: 选择蓝色光化光的时间长度;

SP Width =: 饱和脉冲光的照射时间长度;

AL Pulse Width =: 光化光饱和脉冲的照射时间长度;

FR Pulse Width =: 远红光饱和脉冲的照射时间长度;

ST Pulse Width =: 单周转饱和脉冲的照射时间长度;

MT Pulse Width =: 多周转饱和脉冲的照射时间长度;

ST sequence number: 单周转闪光的序号;

ST sequence number: 单周转闪光顺序间的时间间隔宽度;

Fast Kin. After ST sequence: 单周转之后进行快相测定;

SP Width Setup =: 饱和脉冲光的照射时间长度的梯度设置;

AL Pulse Width Setup =: 光化光饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

FR Pulse Width Setup =: 远红光饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

ST Pulse Width Setup =: 单周转饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

MT Pulse Width Setup =: 多周转饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

Get AL PAR: 获得光化光强度;

Get BL PAR: 获得蓝色光化光强度;

g. Measuring Light Settings 测量光设置命令按钮栏

MF-H =: 选择高频测量光;

MF-L =: 选择低频测量光;

MF-M =: 选择最大频测量光;

MF-H Step =: 选择高频测量光的变化梯度;

MF-L Setup =: 选择低频测量光的变化梯度;

MF-M Setup =: 选择最大频测量光的变化梯度;

F ML-Int.: 设置荧光测量光的梯度;

P ML-Int.: 设置 P700 测量光的梯度;

Auto MF_H: 选择是否自动将测量光变为高频;

MF Log.: 测量光对数值

Variable Block Frequency: 测量光频率变化

Get FML PAR: 测量光 PAR 测量

h. Condition Commands 条件设置命令按钮栏

If Sig. (Fluo): 如果荧光信号满足什么条件;

If Sig. (P700): 如果 P700 信号满足什么条件;

Wait until Sig. (Fluo): 等待荧光信号满足什么条件;

Wait until Sig. (P700): 等待 P700 信号满足什么条件;

End of Rep. Block; Repeat until Sig. (Fluo): 如果荧光信号达到某一个标准即可结束循环程序;
End of Rep. Block; Repeat until Sig. (P700): 如果 P700 信号达到某一个标准即可结束循环程序;
Wait until Clock Counter: 等待直至 clock 循环满足什么条件;

i. Display Commands 显示命令按钮栏

Visible Page =: 选择显示的界面窗口;

Visible Settings Page =: 选择显示的设置窗口;

Slow Kinetics Auto Scaling Left: 选择慢速诱导动力学曲线自动左对齐;

Slow Kinetics Auto Scaling Right: 选择慢速诱导动力学曲线自动右对齐;

Slow Kinetics Auto Scaling Horizontal: 选择慢速诱导动力学曲线自动水平对齐;

Slow Kinetics Average Points: 慢速动力学曲线平均数据点数;

Fast Kinetics Auto Scaling Left: 选择快速诱导动力学曲线自动左对齐;

Fast Kinetics Auto Scaling Right: 选择快速诱导动力学曲线自动右对齐;

Fast Kinetics Auto Scaling Horizontal: 选择快速诱导动力学曲线自动水平对齐;

Fast Kinetics Horizontal Log.: 选择显示快速诱导动力学曲线曲线的 log 图标;

Fast Kinetics Average Points: 快速动力学曲线平均数据点数;

2.1 蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线的脚本编制

对于光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线，并不需要用到所有的按钮，只需选择程序需要的命令按钮，形成脚本文件命令行即可。

首先，在手动测量时，第一步为“打开 Start”，即开启一条新的慢速动力学荧光曲线。因此，我们需要在 General Commands 中双击“Slow Kinetics”，弹出对话框，选择“on”，即形成启动慢速动力学曲线的命令行，如图 7 所示。

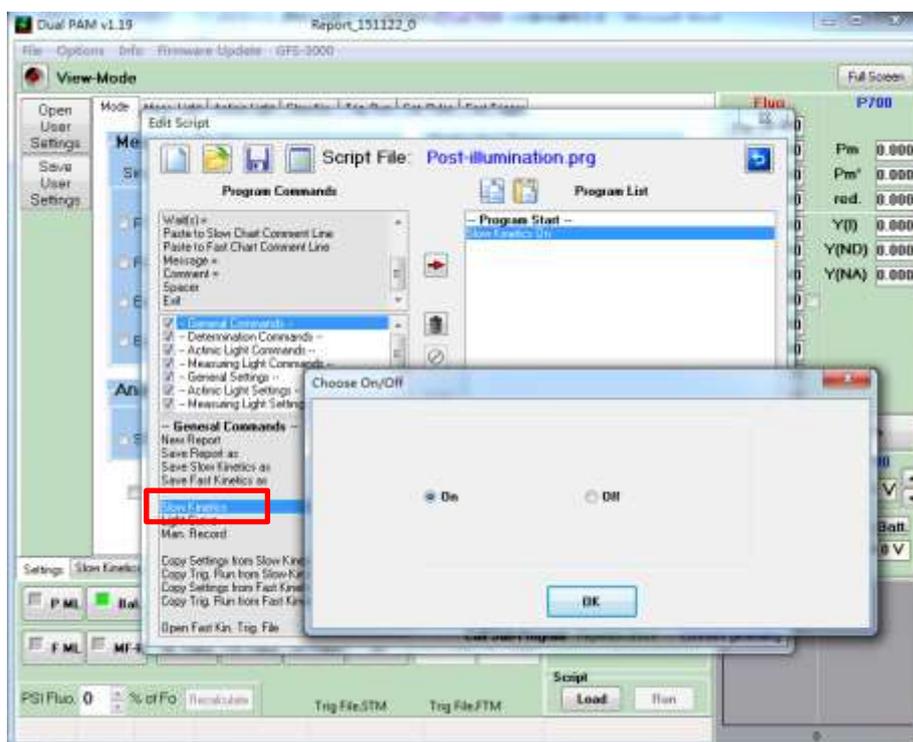


图 7 编辑新建慢速动力学荧光曲线图示

紧接着需要走稳 5-10 秒，这里我们使用的是 Program Commands 中的“TimeStep(s)”命令按钮。如图 8 所示，双击“TimeStep(s)”按钮，输入我们需要设置的时间，点击确定，即可形成命令行。

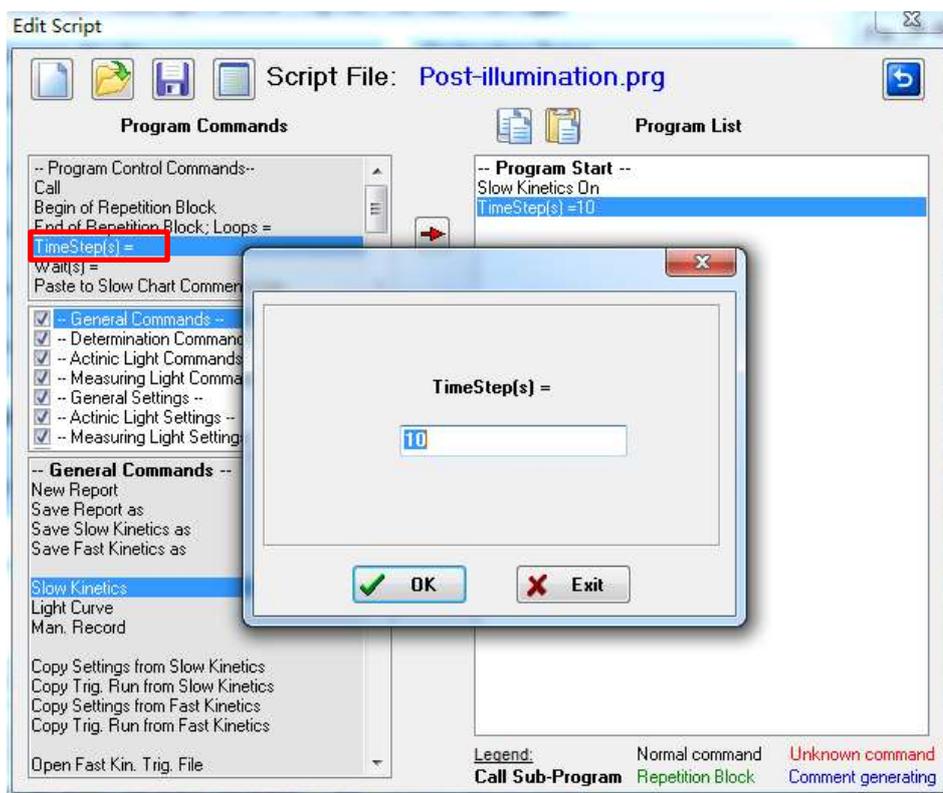


图 8 编辑建立间隔时间命令图示

然后打开测量光，即“打开 F ML”，获得初始荧光 F_0 。此时我们需要使用 Measuring Light Commands 中的“F ML”按钮，双击，选择“on”，完成打开测量光的命令行，如图 9 所示。

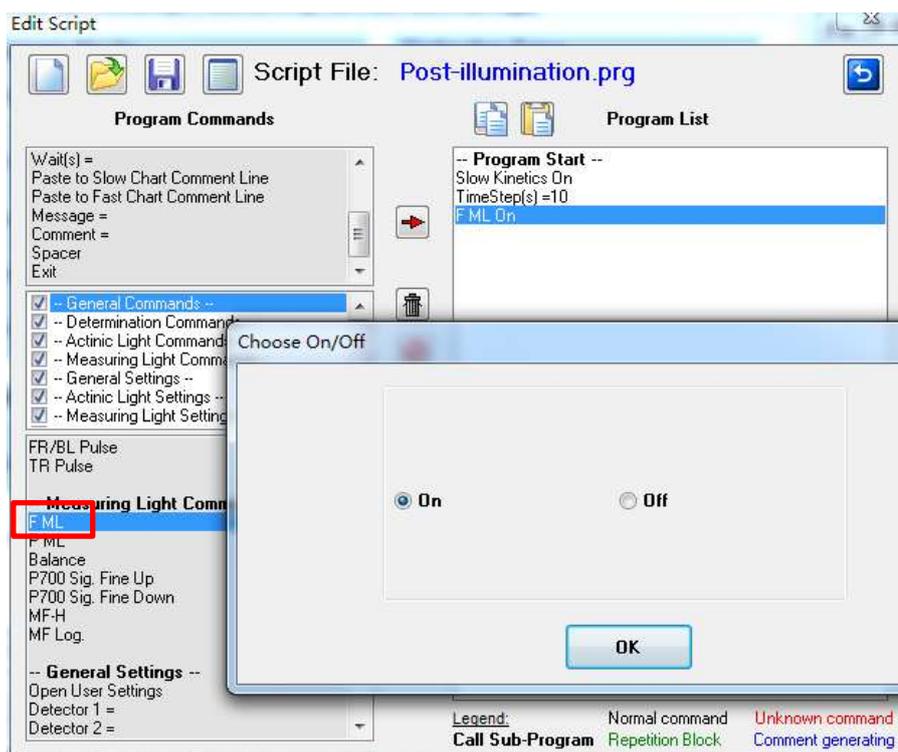


图 9 编辑打开测量光程序图示

利用图 8 同样的方法建立一个新的 TimeStep，使测量光信号走稳，时间同样可以设置为 10 秒。然后，开始设置光化光。如果测量样品为高等植物，可以在此先设置打一个饱和脉冲，方法为双击 Determination Commands 中“Sat-Pulse/Fast Kin.”按钮即可。与手动测量时不同，编制脚本文件时，需要将光化光强度一起编写进去。在 Actinic Light Settings 中选择“AL-Int.”按钮，输入光化光光强档位，例如 5 档，如图 10 所示，即完成设置光化光光强。设置好光强后，在 Actinic Light Commands 中选择“AL”按钮，选择“on”，设置打开光化光，如图 11 所示。

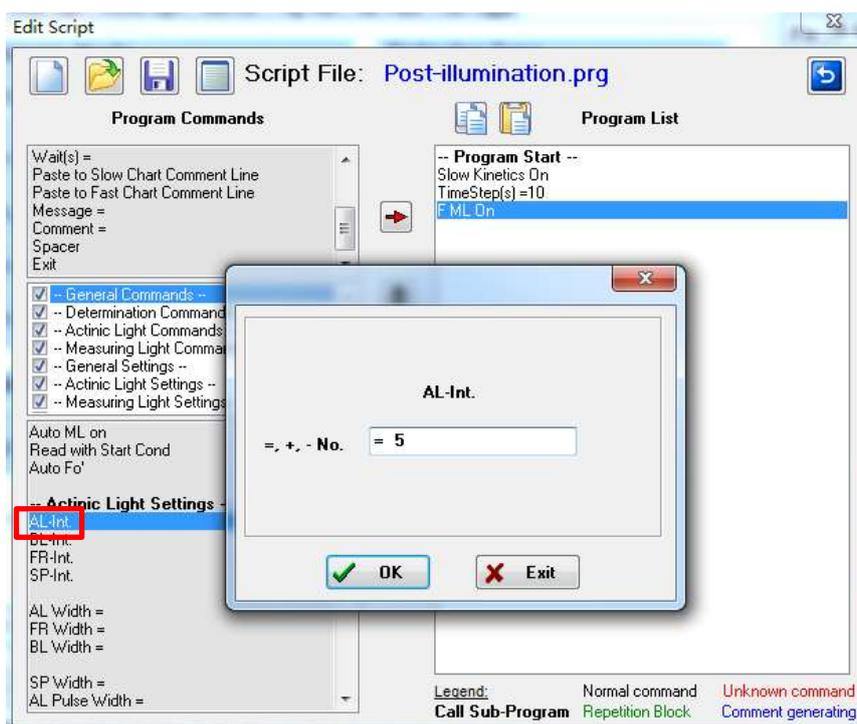


图 10 编辑光化光强度设置命令图示

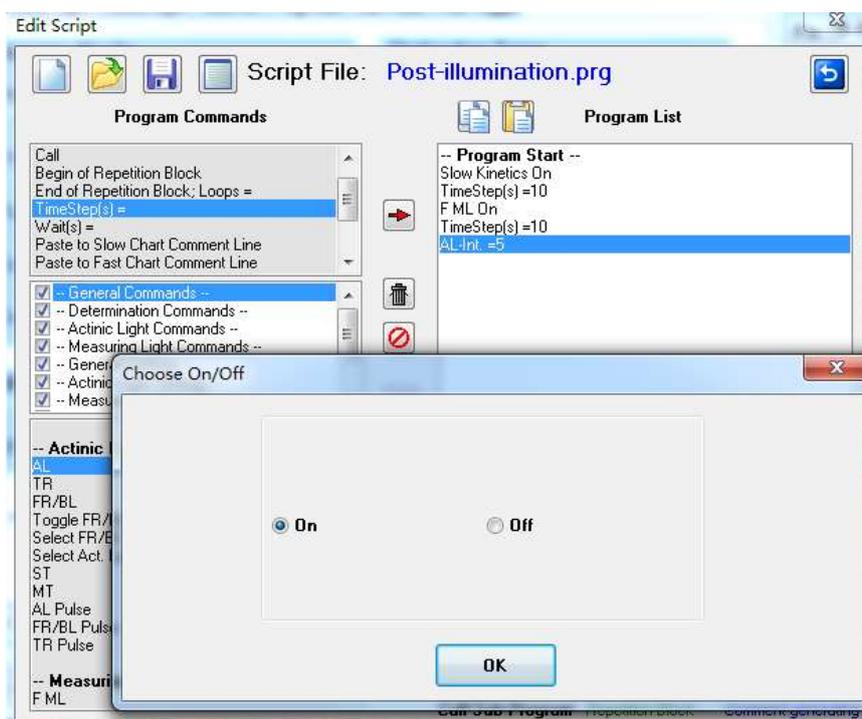


图 11 编辑打开光化光命令图示

利用与图 8 相同方法设置光化光诱导时间，以荧光曲线走平为基本原则。对于蓝藻而言，一般在 60 秒以内即可，而对于高等植物，一般需要 120-180 秒，甚至更久。本文中实验材料为蓝藻，故设置 TimeStep(s)为 30 秒。

在手动测量时，当荧光曲线走平后，可关闭光化光 AL，因此在编辑脚本文件时，需要在光化光诱导的 TimeStep 之后，关闭 AL。方法是：在 Actinic Light Commands 中选择“AL”按钮，双击，选择“off”即可，如图 12 所示。

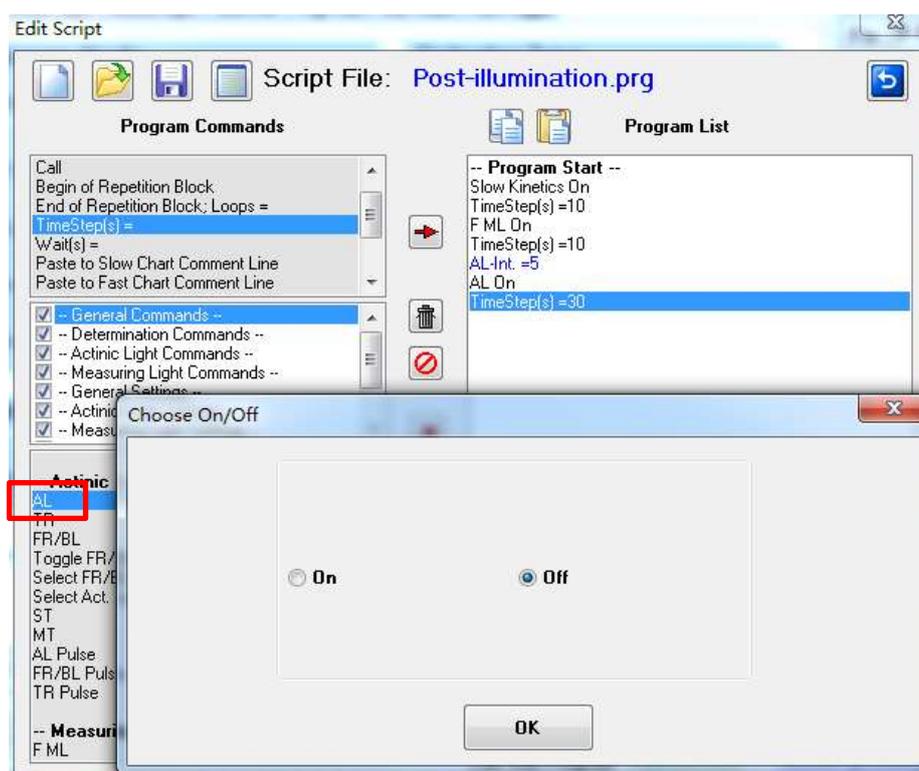


图 12 编辑关闭光化光命令图示

关闭光化光后，荧光会出现瞬时淬灭和瞬时上升的现象，因此在编辑脚本文件时，只需要设置足够的 TimeStep，等待荧光曲线稳定即可。一般而言，在蓝藻中，设置时间为 30-60 秒；而在高等植物中，一般需要设置 120-180 秒左右，视鼓包上升情况而定。设置 TimeStep 的方法与图 8 相同。

当测量结束后，需要关闭慢速动力学程序和测量光。一般地，关闭程序和测量光的先后顺序没有具体要求，但使用脚本文件时，如果先关闭测量光，即会出现图 1 中最后的荧光淬灭曲线，对于实验数据没有影响，但不利于数据的整体观看效果，因此，建议先关闭慢速动力学程序，再关闭测量光。如图 13 所示，在 General Commands 中双击“Slow Kinetics”，选择“off”，即关闭了慢速动力学曲线。然后在 Measuring Light Commands 中双击“F ML”，选择“off”，即关闭测量光，如图 14 所示。至此，蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线的脚本文件编写完毕。

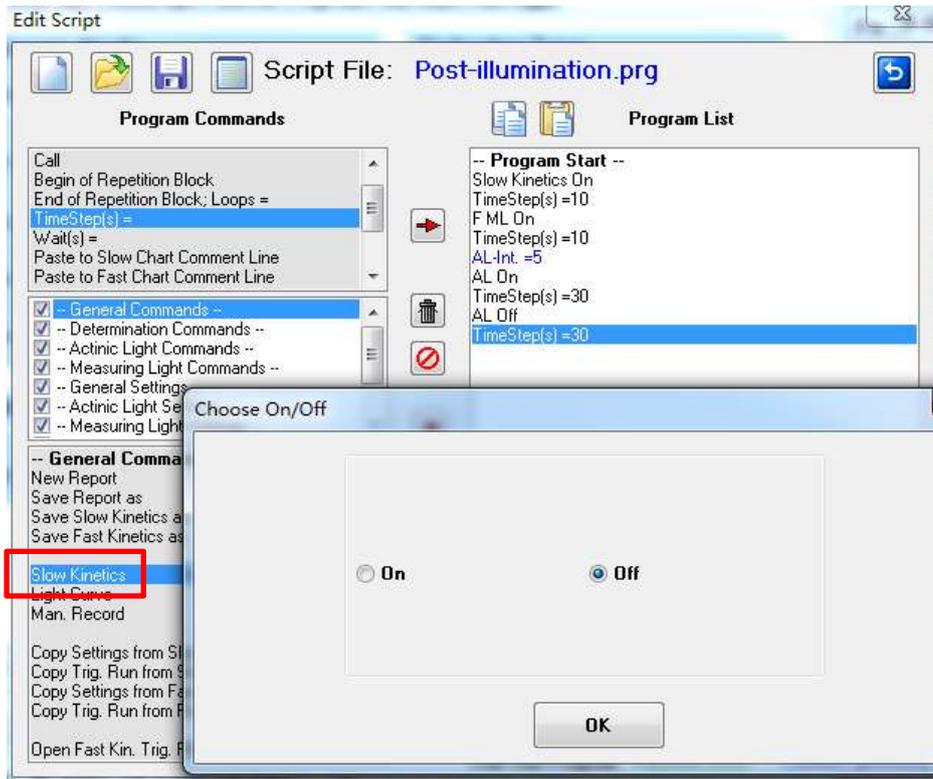


图 13 编辑关闭慢速动力学程序命令图示

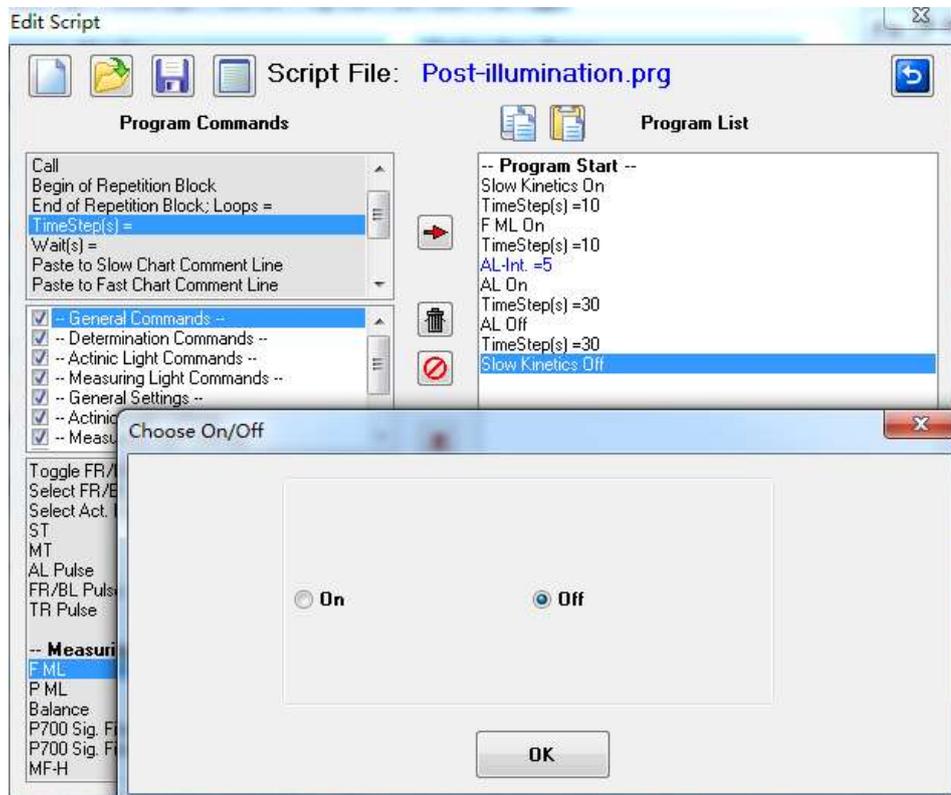


图 14 编辑关闭测量光命令图示

完成编写的蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线的脚本文件如图 15 所示，此时点击左上方软盘形状的保存按钮，将脚本文件保存至电脑中。点击右上角返回按钮，返回主菜单。

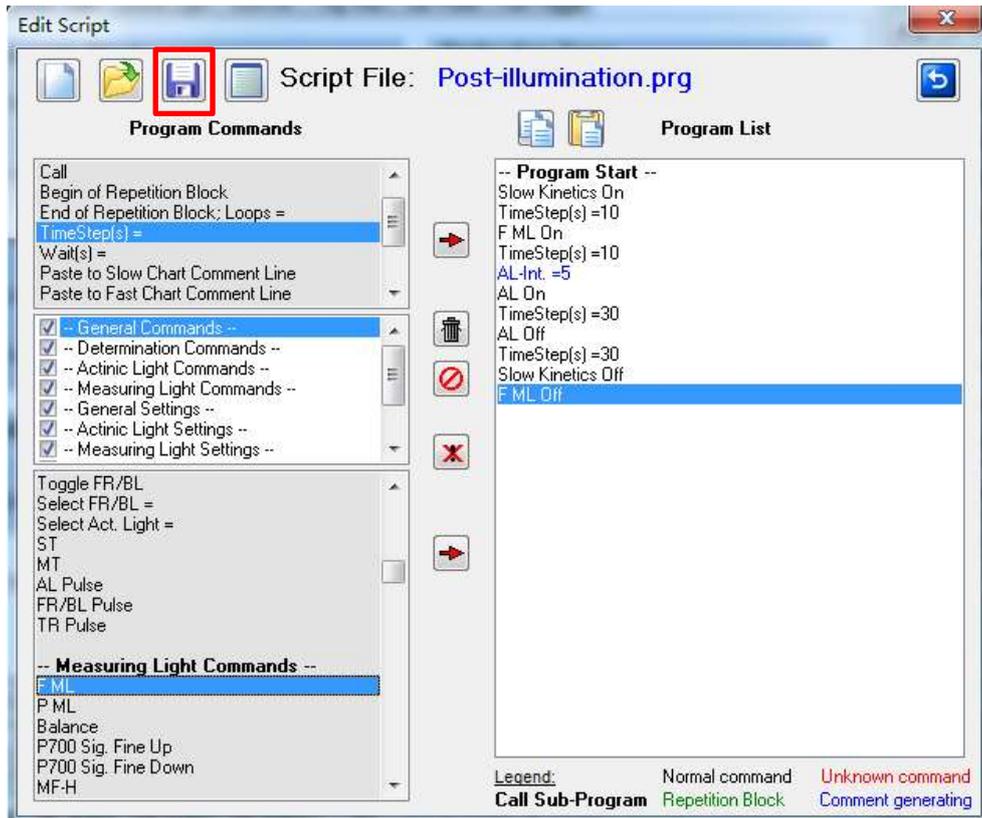


图 15 蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线脚本文件程序图示

返回主菜单后，点击右下方 Script 中的“Run”按钮，即可启动该脚本文件，仪器可自动测量光化光关闭后荧光瞬时上升曲线，如图 16 所示。人们可以从 Slow Kinetics 界面中查看曲线运行状况。



图 16 启动脚本文件图示

曲线测量完成后，人们可以运用图 2 的相同方法储存曲线，用于数据处理。下次使用该曲线时，只需点击 Script 中的“Load”按钮，调用已经存好的“Post-illumination”脚本文件，返回主菜单，点击“Run”即可测量光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线。

3. 结论

利用 Dual-PAM-100 中的脚本编辑功能，可以编辑出例如光化光关闭后荧光瞬时上升曲线等非标准化曲线，用于深入研究不同材料的各种生理指标，以满足不同的科研需求。该功能不仅存在于 Dual-PAM-100 中，同时也存在于 PAM-2500 和 Multi-Color-PAM 中，使用方法类似，以便于适应不同实验材料和实验条件的拓展测量。

参考文献：

[1] Y. Munekage, M. Hashimoto, C. Miyake et al., Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 2004, Vol 429, 579-582.

Dual-PAM-100的 P515/535模块及其应用举例

作者: Ulrich Schreiber, Christof Klughammer (Heinz Walz GmbH, Germany)

来源: PAM Application Notes (2007) 1: 1-10

摘要: Dual-PAM-100的新模块 P515/535已经上市。它可以同时检测双波长 550 - 515 nm的差示吸收（反映 Electrochromic pigment shift, ECS）以及 535 nm波长的信号变化（反映“膜的能态”，即“scattering”变化）。本文介绍了 P515/535激发-检测单元的技术参数及其典型的应用举例。该模块的调制测量光有多种频率可供选择，软件可控制频率快速切换。因此，暗适应后的基线（低频下）和紧随其后的快速诱导动力学（高频下）都可测量。由于仪器的信/噪比很高，因此由单周转饱和和闪光诱导的 P515变化数据非常可靠，不需进行数据平均。通过比较单波长 550、535和 515 nm的变化以及双波长 550-515 nm的差示吸收，证明后者不会引起“scattering”变化。除了 P515 (ECS)，双波长 550-515 nm的差示吸收也能反映玉米黄素（ Zeaxanthin, Z）含量的变化，这可以通过“暗基线”的变化来反映。使用人工叶片进行检测的结果表明，信号的稳定性非常高。通过分析 P515信号的光-暗响应，可得到跨膜质子动力势（proton motive force, pmf）的两个组分：跨膜电位（ $\Delta\psi$ ）和跨膜质子梯度（ ΔpH ）。这与 Kramer及其同事利用 DIRK技术得出的结果一致。Dual-PAM-100提供一种特殊的“P515 Flux”操作模式，可让光化光以光暗脉冲形式打开-关闭（1/1调制光/暗）。“P515 Flux”信号能原位反映活体样品处于稳态的偶联电子和质子的流动速率。

关键词: DUAL-PAM-100, P515/535模块, 跨膜质子动力势 (pmf), 跨膜电位 ($\Delta\psi$), 跨膜质子梯度 (ΔpH), 叶黄素循环, 玉米黄素

前言

Dual-PAM-100是 1985年商业化的调制叶绿素荧光仪 PAM-100（即 PAM-101/102/103）的升级版。“Dual”表示 DUAL-PAM-100可以同时检测两个重要的信号，即分别反映 PS I和 PS II光能转换效率的 P700吸收和叶绿素荧光。实际上，最初的 PAM-100只要配置多种附件（例如特殊的激发-检测单元，单/多周转饱和和闪光，提供持续照明的蓝光、红光和远红光，以及数据采集系统等），也能检测 P700吸收和叶绿素荧光变化，但其构造及操作都非常复杂。WALZ公司的科学家经过不懈的努力，终于把 PAM-100以及这些复杂的组件小型化，优化整合并实现电脑化操作，最终开发出了一个紧凑、高效、操作简单、功能强大的光合作用测量系统 Dual-PAM-100。除了能同步或分别测量 P700和/或叶绿素荧光，Dual-PAM-100还可以扩展许多其它功能，如加一些特殊模块就可检测跨膜质子梯度、跨膜电位等。一般来说，标准 Dual-PAM-100既可以测量单脉冲调制的单色光信号（如被红/蓝光激发的叶绿素荧光），也可以测量单脉冲调制的双色光差示信号（如通过检测 870和 830 nm的透光率差异得到 P700的吸收变化）。

本文将介绍 Dual-PAM-100的一种新模块——P515/535模块。它能在活体条件下检测质子动力势（pmf）的两个组分：跨膜电位（ $\Delta\psi$ ）和跨膜质子梯度（ ΔpH ），它们是 ATP合成的驱动力。通过 515-525 nm的“electrochromic pigment shift”（ECS, P515）来测量跨膜电位，通过 P515信号的光-暗动力学变化以及 535 nm的“scattering”信号变化来测量 ΔpH 。

P515研究背景

Junge和 Witt (1968) 最先发现 P515信号与类囊体的跨膜电势成线性关系。P515信号主要来自类胡萝卜素和叶绿素 b的 **electrochromic shift**。早期关于 P515信号的研究，多应用重复闪光弛豫光谱学 (repetitive flash relaxation spectroscopy)，因为通过对快速响应的平均可获得高质量的信号，从而与“非特异性的”慢速吸收变化区分开来。单周转饱和闪光诱导的信号快速上升，反映了 **PS I**和 **PS II**反应中心的原初电荷分离。对于活体暗适应样品来说，信号快速上升之后会有一个较慢的上升相 ($t_{1/2}$ 约 20 ms)，这与 Cyt b/f处的醌循环 (Q cycle) 有关，反映了由原初电荷分离引起的系统间电子传递。信号的衰减高度依赖于样品的生理状态，特别是膜的完整性和测量前的照光状态。膜的漏渗性尤其是经过跨膜 ATP酶的质子传递，会加速信号的衰减。经过 ATP酶的质子传递效率，与照光状态和质子动力势密切相关。

直到现在，仍很少有人关注持续照光时间达几分钟时 P515吸收的慢速动力学变化。Klughammer等(1990)开发了一种 LED阵列动力学分光光度计，可以将包括 P515在内的多种重叠的吸收变化解析出来。利用这套系统发现，持续照光期间能维持显著的跨膜电势，但这种跨膜电势对生理胁迫极其敏感。近来，Sacksteder和 Kramer (2000) 介绍了一种 DIRK (Dark Internal Relaxation Kinetic) 技术，通过利用短暂的黑暗 (< 500 ms) 来干扰处于稳态的电子和质子流，可以检测稳态照光下的 P515 (ECS) 信号。ECS (P515) 下降的初始斜率与质子流的速率 (稳态光合时通过光合电子传递引起的质子流入速率与通过 ATP酶的质子流出速率相等) 和电子流成线性关系。Cruz等 (2001) 的实验表明，如果将黑暗时间延长，ECS (P515) 表现出复杂的衰减动力学。从该动力学变化中，可区分总的质子动力势 (pmf) 的两个组分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 。但是这个测定要求测量信号具有较高的稳定性和选择性。

535 nm信号研究背景

535 nm的吸收变化来自于照光后类囊体膜内部由 ΔpH 的建立引起的“光散射” (light scattering) (Deamer et al. 1966, Heber 1968)。535 nm的吸收变化已成为一种研究叶绿体和完整叶片的“膜能态”以及 ΔpH 的非常方便的半定量方法。这种方法与另外一种测定“膜能态” / ΔpH 的方法——非光化学淬灭 (NPQ和 qN, 特别是组分 qE) (Bilger et al. 1988)——密切相关。尽管长期以来有观点认为 535 nm的吸收变化部分是由叶绿体中基粒的垛叠引起的，但近来 Ruban等 (2002) 对这种解释提出了质疑。Ruban等认为 535 nm的吸收是由玉米黄素吸收峰的红移引起的。

材料与方法

P515/535模块的技术特点

P515/535模块由激发单元 DUAL-EP515和检测单元 DUAL-DP515组成，外观及光学设计与标准的可同时检测 P700和叶绿素荧光的激发检测单元 DUAL-E和 DUAL-DR (或 DUAL-DB) 相同。这些单元能连接到同一个固定叶片装置或测量悬浮液可选附件 ED-101US/MD上。因此，相同的光学设计及光的状态允许我们对不同的光合参数进行比较。

激发单元 DUAL-EP515与检测单元DUAL-DP515 (图 1) 分别与主机 DUAL-C上的EMITTER和 DETECTOR1插孔连接。



图 1 激发单元 DUAL-EP515和检测单元 DUAL-DP515

与通过检测 870-830 nm 的差示吸收来测量 P700 信号类似，通过检测 550-515 nm 的差示吸收来测量 P515 信号。以 550 nm 作为参考，以便将“光散射”的影响降到最低。假设 535 nm 的吸收峰呈 Gauss 曲线形，那么在 550 nm 和 515 nm 的吸收变化应该是相同的。另一方面，与 550 nm 相比，玉米黄素在 515 nm 有显著吸收（宽吸收带）。因此，550-515 nm 信号不仅反映了 P515，还反映了玉米黄素含量的变化。这两个信号组分很容易区分，因为玉米黄素含量的变化非常慢。暗-光和光-暗诱导的 550-515 nm 在 1 秒以下到分钟级的变化几乎都是由 P515 的变化引起的，而较慢的从几分钟到几个小时的变化则反映了玉米黄素的生成（分别通过紫黄素 V 和花药黄素 A 的去环氧化）以及玉米黄素的环氧化。

DUAL-EP515 技术参数

DUAL-EP515 主要由 8 个带干涉滤光片的白光 LED 组成。550 nm 测量光由分别带有 550 nm 干涉滤光片（5.5 nm HBW）的 3 个 LED 提供。分别带有 515 nm 干涉滤光片（8.5 nm HBW）的 4 个 LED 用于提供 520 nm 的测量光（用来检测 515 nm 的吸收变化）。535 nm 测量光由一个带有 535 nm 干涉滤光片（5.5 nm HBW）的 LED 提供。这些 LED 呈环形排列，聚焦于一个 COB 绑定的 LED 阵列（635 nm 的大功率 LED）中央的一个直径 6.5 mm 的小孔上，通过一个 10 x 10 mm 的有机玻璃导光杆（可以将光混匀）将光传输至样品。另外，还有一个带 RG9 滤光片的 730 nm 的 LED，位于 LED 阵列中心，用于提供优先激发 PS I 的远红光。这个 COB 绑定的 LED 阵列由 24 个大功率 LED 组成，可短时间内被大电流（超过 1.5 A）驱动，提供连续的光化光及单周转和多周转饱和闪光。

DUAL-DP515 技术参数

DUAL-DP515 主要由 1 个带有 5 mm 蓝-绿滤光片（BG39）的 PIN 光电二极管（10 x 10 mm）组成。BG39 滤光片允许 520、535 和 550 nm 的光透过，但会将 635 nm 的光化光和 730 nm 的远红光吸收掉。一个 10 x 10 mm 的有机玻璃导光杆引导从样品透射的测量光传输至位于 PIN-光电二极管前方的 BG39 滤光片处。PIN-光电二极管安装在一块印制电路板上，在那里可以将脉冲调制新型进行放大。需要注意的是，与 DUAL-DR（或 DUAL-DB）相比，为了得到最大的信/噪比，DUAL-DP515 不具有提供光化光的 COB LED 阵列。拔掉 DUAL-DR（或 DUAL-DB）的连线之后，我们可以在同样的参数设置条件下，比较光诱导的 P700/叶绿素荧光和 P515/“光散射”的变化。

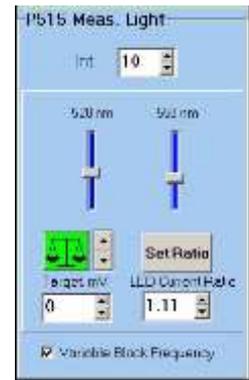


图 2 520 和 550 nm 的平衡

P515 信号的校正

DUAL-PAM-100 采用一种特殊的调制技术，高灵敏地检测双波差示信号。Dual-PAM 软件可以通过调节 LED 电流来自动平衡双波透射信号（“Balance”，图 2），使得差示信号接近于零。软件会显示调节后的 LED 电流比率，该比率与样品的光谱特征相关。调平衡后，DUAL-PAM-100 能高灵敏地检测差示信号的变化，并且绝对不会导致放大器的饱和。在一个特殊的校正程序的帮助下，我们可以检测单波信号，该信号比实际记录的信号要放大超过 1000 倍。校正过程中，与 550 nm 信号相比，P515 信号会表现出短暂下降（通过降低 LED 电流）。原始的差示信号以伏特为单位记录，然后利用校正程序，将其转换成 $\Delta I/I$ 单位。“T”代表平衡过的总信号的放大幅度。

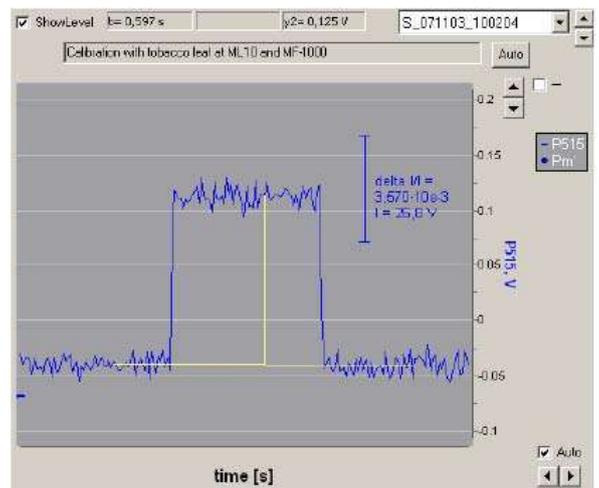


图 3 使用自动校正程序，检测烟草叶片的信号 ($\Delta I/I$ 单位)

图 3 记录了烟草叶片的校正（测量光强度为 10）。

在这个例子中， $\Delta I / I = 3.57 \times 10^{-3}$ 单位，计算出总的信号 $I = 26.8 \text{ V}$ 。

记录单波 535 nm信号:

与叶绿素荧光相似，单波光 535 nm信号以非补偿信号的形式记录。与荧光信号类似，535 nm信号在 5.5 V达到饱和。因此，与双波光 550-515 nm信号相比，记录 535 nm单波信号时，为了获得高信/噪比，要应用高强度的测量光，这时一定要调低增益（Low Gain）（图 4A）。同时，因为“光散射”变化相对较慢，可以使用高阻尼（High Damping），从而可以进一步提高信/噪比。因为 535 nm信号的动力学是被反向记录的，所以如果“光散射”增加，这说明某个信号降低，那么一个瞬间的上升信号就会显示出来，与 P515信号相似。

预防测量光预照明效应的方法

通过 870-830 nm信号变化测定 P700时，可使用高强度的近红外测量光，而不会引起光合效应；相比之下，使用能被光合色素吸收的含有大部分绿光的测量光，使 P515及“散射”的测量显得很复杂。

DUAL-PAM软件，在保证信号质量的情况下，提供了多种方法来预防测量光引起的明显的预照明效应。这特别适用于由单周转饱和闪光诱导的快速 P515变化的测量，因为 P515动力学对预照明效应非常敏感（光激活了可逆的 ATP酶）。实现这种测量的一个前提是：提供测量光 ML的 LED可以很快地被打开。若“Auto ML on”被激活（图 4B），当开始记录快速动力学时，ML会被自动打开，以便测量前样品处于完全黑暗状态。同时还可以通过激活“Variable Block Frequency”（图 4C）来消除预照明效应。在低“Block Frequency”（MF-low: 1-1000 Hz）设置下，测量光的光化效应几乎可以忽略。在测量光诱导的变化时选用高脉冲频率设置（MF-high: 100-10000 Hz），频率设置与所需的时间分辨率有关。为了得到最大的时间分辨率，ML脉冲频率可以开到 MF-max（大约 400 kHz）。在预先编写程序 Fast Trigger文件夹中，可以设定多种光源的开关及 MF-max（2.5 μs分辨率）。

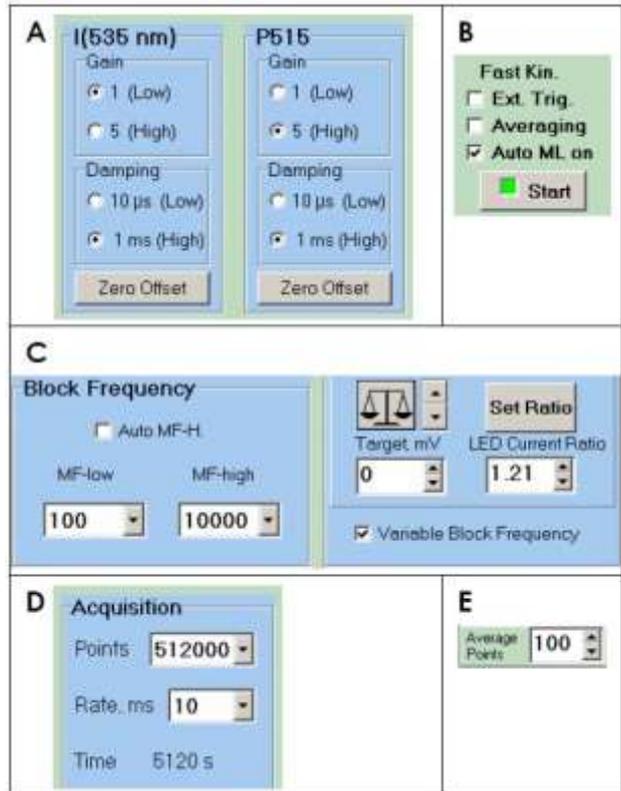


图 4 参数的调节

信/噪比与信号稳定性

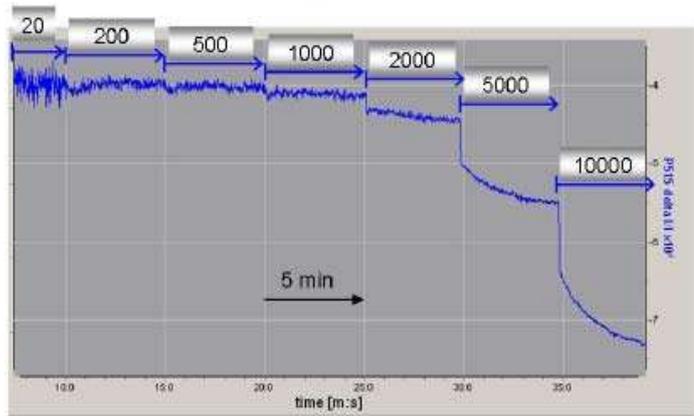
要对完整叶片进行可靠的活体测量，必须要求很高的信/噪比及信号的稳定性。测量光强度（1-20）、放大器增益（1-5）以及样品的透光率都会影响信号幅度。叶片和分离的叶绿体的信号噪音主要来源于电子元件；而藻细胞悬浮液的信号噪音主要来自于细胞运动或聚集引起的“样品噪音”。信号稳定性（对长时间测量来说是很重要的），主要受仪器及样品参数的影响。需要指出的是，温度改变引起的调制 LED测量光强度的变化，以及（由叶片含水量变化或藻细胞沉淀引起的）样品的光学变化，都会引起信号漂移。由于这些变化会同时作用于515 nm和550 nm信号，因此其影响在检测550-515 nm差示信号的过程中应该能被消除。

一个给定记录噪音幅度与跟“Point Averages”、ML频率（MF-low、MF-high和MF-max）以及阻尼（测定快速动力学时时间常数为10 μs，慢速动力学为 1 ms）的设置有关。Dual-PAM-100软件提供大范围的数据采集速率选择。记录快速动力学时，数据采集速率可以在 2.5-1000 μs/点，共可保存 128 000点；记录慢速动力学时，速率可以在1-100 ms/点，可以保存512 000点（图 4D，最大记录时间超过14 h）。实际上，测量动力学时采用的采点率一般比要求的时间分辨率要高，而在后期的查看和分析数据时，可以应用合适的“Point Averaging”来降低信号噪音（图 4E）。例如，在采点速率为 2.5 μs/点、测量光频率为 MF-10000的

条件下，测定闪光诱导的P515变化（信号先瞬间上升，接着在ms时间内慢慢变化），如果“Point Averages”设为100（参看结果部分的图 6），就不会丢失动力学信息。在这个例子中，“Point Averages”设为100，噪音放大度为 $10^{-4} \Delta I/I$ 单位；如果不使用“Point Averages”，噪音为 $3 \times 10^{-3} \Delta I/I$ 单位。闪光诱导的信号变化在 $15 \times 10^{-3} \Delta I/I$ 单位，可见噪音已经很低了。

使用人工叶片可以清楚地评价仪器的噪音和信号漂移。为此，使用类似于绿色叶片的可以让绿光透过的塑料滤光片（artificial leaf, Roscolux #01, Light Amber Bastard）夹在两层高度透光的纸中间。使用这种人工叶片（“artificial leaf #01”）测得的 515、535和550 nm信号大幅度与正常的烟草叶片非常相似。

图5表示在逐步增加测量光频（MF）的情况下，用人工叶片（“artificial leaf #01”）测得的 550-515 nm的信号。高MF设置下，一方面，噪音被减少；但另一方面，信号会发生明显的负漂移。当MF20时，噪音为 $3 \times 10^{-3} \Delta I/I$ 单位；当 MF1000时，噪音降低到 $10^{-4} \Delta I/I$ 单位；当 MF10000时，噪音为 $3 \times 10^{-5} \Delta I/I$ 单位。在MF10000，ML强度为 10的条件下，测量光ML的PAR为 $4 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。实际应用中，MF5000以下，测量光 ML的光合效应都可以被忽略掉。当MF超过1000时，5分钟内信号的漂移不超过 $10^{-4} \Delta I/I$ 单位。



切换到高MF设置下后，信号呈双相下降，5分钟内信号的漂移在 MF2000时为 $3 \times 10^{-4} \Delta I/I$ 单位，MF10000时为 $2 \times 10^{-3} \Delta I/I$ 单位。

只有在测量1秒内的快速动力学（Fast Kinetics）时才应用高 MF设置，此时不考虑信号的慢漂移，ML的光化效应也可以忽略。

图 5 增大测量光频率 MF对人工叶片（“artificial leaf #01”）550-515 nm 信号噪音和稳定性的影响。测量光 ML强度： 10；Points averaged: 30

结果与讨论

单周转饱和和闪光诱导的P515快速弛豫动力学

图6是典型的单周转饱和和闪光诱导的活体烟草叶片的 P515吸收变化图。图 6A表示样品经过1小时暗适应后的吸收变化。P515信号先快速上升 $14 \times 10^{-3} \Delta I / I$ 单位，接着缓慢上升，在 20 ms达到峰值，然后缓慢下降。图 6B表示同一烟草叶片，先照光 10 min ($100 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)再暗适应 4 min后测得的信号变化。结果表明：预照光显著地加快了闪光诱导的 P515信号的下降，缓慢上升相也消失了，快速上升相降低了约13%。

值得强调的是，新的P515/535模块可以得到单个记录（不需要对曲线求平均）的闪光诱导的 P515变化的基本参数。这对于测定 P515信号的慢速上升相特别重要，因为该上升相很容易受重复测定的预照光的影响。预照光活化了类囊体膜上的可逆ATP酶，从而增加了膜的H⁺传导性。P515信号的衰减，反映了

通过ATP酶质子通道的质子外流引起的（闪光诱导的）跨膜电荷区的恢复，该电荷区由两个光系统的电荷分离以及细胞色素b/f复合体上Q循环的电子传递所产生。功能完整的光合机构的P515信号的变化特征是：样品暗适应后，P515诱导曲线表现为慢速下降，这说明膜的完整性很高；经过预照光之后，P515诱导曲线表现为信号快速下降，这说明ATP酶活性很高。

然而，从原理上来说，除了electrochromic shift (P515, ECS) 之外，其他吸收变化（如玉米黄素的形成或“散射”）也会影响 550-515 nm的差示信号。但是由这些因素引起的信号变化非常慢，因此我们可以认为闪光诱导的信号在微秒内的快速变化只反映了P515。值得注意的是，分钟级的慢速变化则不一定仅仅反映了P515。

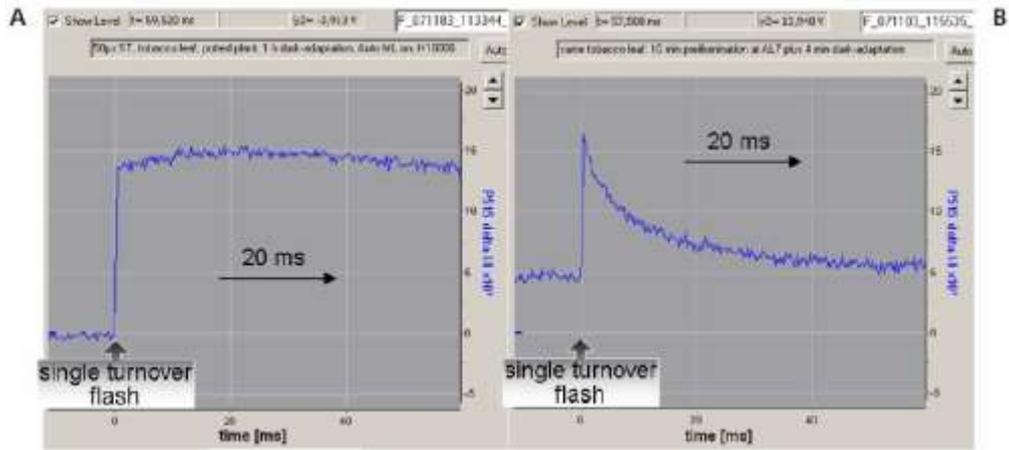


图6 单周转饱和闪光诱导的烟草叶片P515的吸收变化。参数设置：选中“Auto ML”，MF=10000，“Point Averages” 设为100。 A：暗适应1 h； B：100 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 预照光 10 min后，暗适应4 min

550-515 nm信号的慢速暗-光-暗诱导瞬变

图7A记录了烟草活体叶片的暗-光和光-暗诱导的慢速P515变化。测定前，先将叶片暗适应几个小时，以便降低玉米黄素（Z）含量。在这种情况下，光诱导的信号增加不仅反映了跨膜电势（ECS）的增加，也反映了Z的形成。Z的形成是一个缓慢的过程，随着类囊体腔内质子的累积时，Z逐渐形成。通过关掉光之后“暗基线”（“dark baseline”）的增加可以判断Z的相对含量。由于550–515 nm信号差的高度稳定性，可用暗基线的缓慢变化来可靠地评价可逆的 Z含量变化。在光诱导的暗基线增加（图7A）之后，在黑暗中信号的缓慢下降（ $t_{1/2}$ 约为20 min）表明了Z的环氧化过程（数据未示出）。

图7B详细地介绍了（图 7A中的）光化光关闭后P515信号的快速响应，这个过程反映了 H^+ 通过类囊体膜上的ATP酶从腔内向基质的外流。首先信号快速下降，接着分两相上升并逐渐达到“暗基线”。根据 Kramer 及其同事（Kramer & Sacksteder 1998, Cruz et al. 2001）的研究，根据光化光关闭后的曲线变化，可以得出 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 的相对大小（图7B）。达到稳态水平的信号与暗基线的差异，反映了稳态照光状态下 $\Delta\psi$ 的大小；暗基线与关闭光化光后信号下降的最低点的差值反映了稳态 ΔpH 的大小（图 7B）。在持续照光过程中，类囊体腔内积累的 H^+ ，慢慢地被流入的阴离子中和。光掉光化光之后，类囊体腔内积累的 H^+ 通过ATP酶快速释放到基质中，这时在腔内就会出现负电荷过剩，从而引起 ECS的反转。在黑暗过程中，随着类囊体腔和基质中的阴离子浓度逐步达到平衡，反转的ECS又会慢慢恢复。

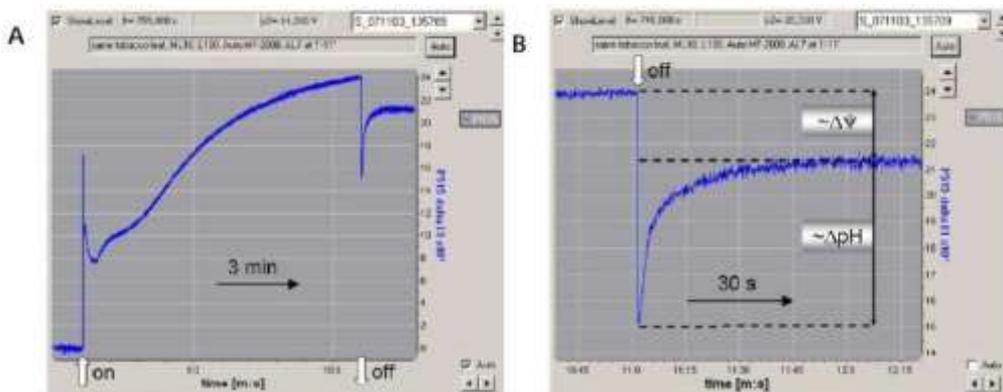


图7 打开光化光（100 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ）10 min后再关闭，诱导的P515的慢速变化。

所用样品同图4（经过暗适应的）。参数设置：激活Auto MF-High，将MF从200调到2000。

A：打开和关闭光化光记录的完整曲线； B：关闭光化光后响应的放大图，标示出质子动力势的两个组分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH

535 nm信号的暗-光-暗诱导瞬变

单波535 nm信号具备复杂的暗-光-暗诱导瞬变，这种变化在低光化光强下主要受 electrochromic shift 影响，而在高光化光强下主要受“散射”影响。图8记录了烟草叶片照光 3 min (800 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 后的 P535信号变化。快速开 /关瞬变主要由ECS (P515) 引起，而慢速的上升及下降则反映了“散射”变化，与 ΔpH 的形成和降低一致 (Bilger et al. 1989)。

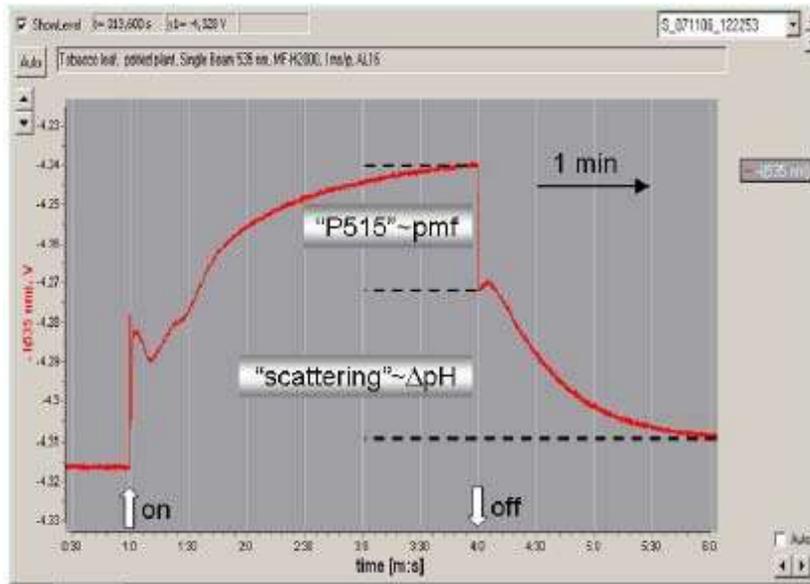


图8 单波535 nm的暗-光-暗诱导瞬变。

盆栽烟草叶片照光3 min (800 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)。

通过光化光关闭后的快速和慢速响应可得到总的质子动力势 (pmf) 及其组分 ΔpH 。

应该注意的是，跟以前很多的报道一样，光化光关闭后535 nm信号的快速响应幅度不能作为测量跨膜 $\Delta\psi$ 的参考依据。与上述光化光关闭后550-515 nm信号的快速响应不同，535 nm信号不可能得到“暗基线”，这是因为由于阴离子的外流所引起的ECS信号的缓慢增加，被“scattering”信号驰豫所导致的慢速信号所覆盖。

双波与单波响应的比较

测量P515双波550-515 nm差示信号的主要目的是消除“散射”变化引起的重叠效应。以下数据说明“散射”变化确实被成功地抑制了。图 9比较了单波 515、550、535 nm和双波 550-515 nm响应的变化。平衡了信号差后，双波中的一个被关掉 (将LED电流设为0)，可记录单波 515和550 nm信号。单波515 和 550 nm的响应基本上都有慢速的“散射”变化 (这个“散射”变化在 535 nm信号中占主要地位)，但在 550-515 nm差示信号中没有明显的“散射”变化。

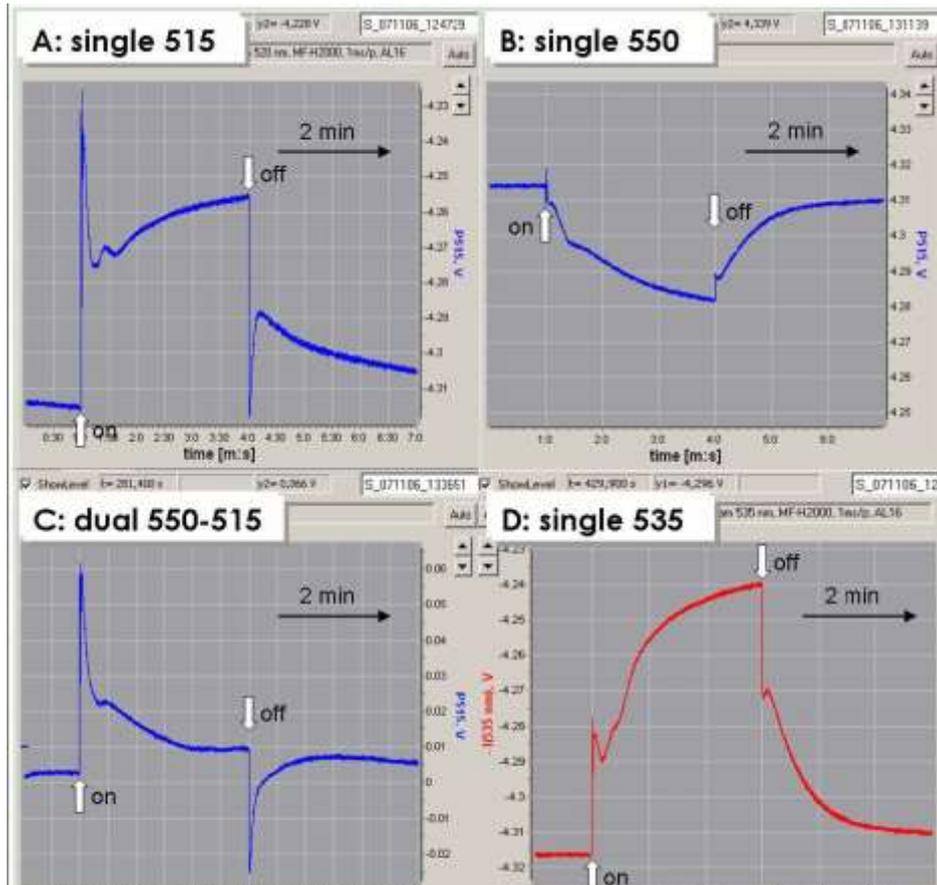


图9 单波和双波信号响应的比较

800 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 照光的盆栽烟草叶片，连续测量中样品经过 8 min的暗适应

中度热胁迫处理可以显著增强光诱导的“散射”变化，并抑制光诱导的 P515变化（ Bilger & Schreiber 1990）。图10A记录了烟草叶片经41℃热处理 5分钟后，同时检测的单波 515和535 nm的响应。与图 9相比，“散射”响应被明显增强，幅度加倍。同时，P515的快速开/关响应被降低了约3倍。如图 10B所示，即使在 这些非常不利的条件下，550-515 nm差示信号也没有出现明显的“散射”变化。

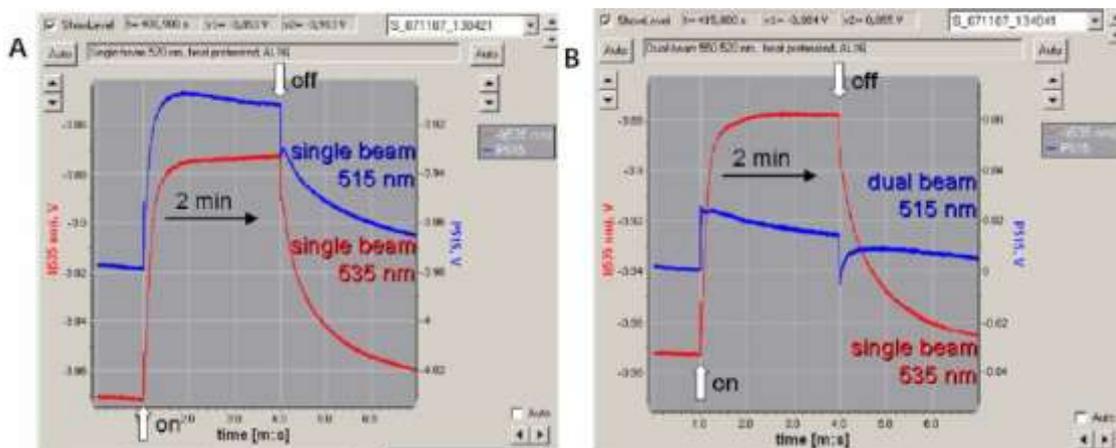


图10 烟草叶片在41℃处理5 min并在室温下（20℃）恢复 30 min后，同步记录烟草叶片单波和双波信号的暗-光-暗瞬变

A: 比较单波515和535 nm 信号； B: 比较双波550-515 nm和单波535 nm信号

长时间记录P515及535信号的光响应特性

量光LED稳定后（参见材料与方法部分的信号稳定），P515及535 nm信号已经足够稳定，可以进行小时级的信号测量。这种测量的一个必要前提是保证叶片含水量状态稳定。图11记录了光强逐步增加条件下，P515及535 nm暗-光-暗信号的光响应变化。Dual-PAM软件可以在包含一系列命令的Script-files中进行编程，可以让仪器在设定的时间内执行编写的程序。原则上，所有可以进行手动操作的步骤，同样也能在Script-file中进行编程。这样的话，即使非常复杂的实验也能被可靠地重复出来。

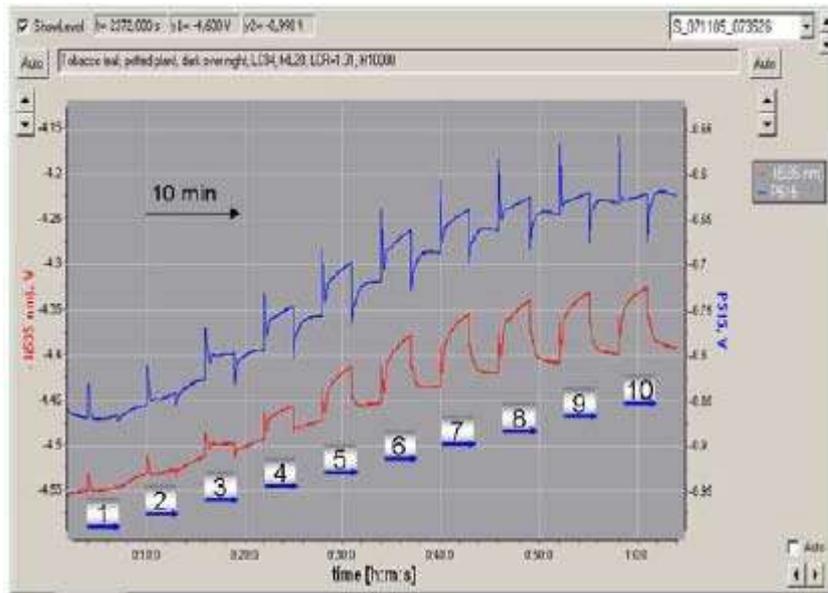


图11同时记录暗适应后烟草叶片P515和535 nm 信号的变化, 每个光强梯度照射 3 min, 接着暗适应3 min; 光化光梯度从 1到10, 对应光强从 10到1600 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\text{s})$ 。开始测量前, 样品过夜进行暗适应。

尽管详细地讨论图11中包含的复杂信息超出了本文的主题，仍有几点需要指出：

- 1) P515和535 nm信号都显示出暗基线明显增加，这反映了玉米黄素（Z）的形成。关掉光之后，“暗基线”慢慢地恢复到初始水平（ $t_{1/2}$ 约20 min）（数据未示出）。
- 2) 令人惊讶的是，及时在最低的光化光强度下（step 1, $10 \mu\text{mol quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ）（典型的光限制条件），Z 也已经开始形成。
- 3) 在低光化光强度下，P515及535 nm信号响应非常相似：ECS占主导，没有明显的“散射”变化。
- 4) 应用图 7B描述的方法测得的稳态 $\Delta\psi$ ，在到 $60 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ （照光第3步）时小到几乎可以忽略不计；之后随光强升高 $\Delta\psi$ 逐渐增加，并在 $300\text{-}400 \mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ （照光第6-7步）时达到峰值；此后又随光强的升高而降低，直到0。
- 5) 相比之下，随着光强的增加，质子动力势 pmf的组分 ΔpH 持续增加，最大光强下 ΔpH 也达最大值。这个结果与 ΔpH （而不是 $\Delta\psi$ ）在光保护中起关键作用的观点一致。

通过“P515 flux”测量来原位检测偶联的电子和质子传递速率

Kramer及其同事在利用 DIRK (Dark Internal Relaxation Kinetic) 技术来估算质子动力势pmf及其组分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 方面做了很多工作（Kramer & Sachsteder 1998, Kanazawa & Kramer 2002, Cruz et al. 2004）。这些结果与其它许多研究者（如 Witt, Junge, Rumberg, Joliot, Delosme, Bouges-Bocquet, Velthuys, Vredenberg, van Kooten, Hope, Cramer, Crofts, Whitmarsh, Rich, Garab, Hind, Crowther, Shahak, Morita）的基础性研究表明，P515信号反映了偶联的电子和质子运输速率。在持续照光过程中， $\Delta\psi$ 的形成（通Zealquest Scientific Technology Co., Ltd.

过反应中心的电荷分离)和释放(由质子通过 ATP酶的外流引起)逐步达到平衡。当照光被中断时, $\Delta\psi$ 的形成瞬间被终止(除了暗下的 Q循环), 而这时 H^+ 仍以不变的速率持续外流。光化光关闭后 P515衰减曲线的初始斜率反映了照光过程中 H^+ 的外流速率, 后者是质子动力势pmf(驱动力)和ATP酶的 H^+ 传导性的函数。

图12是利用Dual-PAM-100测量烟草叶片 P515信号在光化光关闭后的响应的例子。程序设定为: 持续照光过程中(350 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), 关光2秒, 测量快速动力学(4 averages)。关光后约 20 ms观察到最大斜率。

Dual-PAM-100软件在测量P515和P700时, 可以采用“Flux Mode”分别连续测定P515弛豫的初始斜率以及P700再还原的初始斜率。当激活“Flux Mode”标签时, 光化光将以光-暗脉冲形式打开(1/1调制光/暗)。调制频率由慢速动力学采点速率(Slow Kinetics Acquisition Rate)的设置决定。例如采点速率设置为 20 ms/p, 那么光化光脉冲将会以光 20 ms-暗20 ms的形式打开和关闭。在稳态照光过程中, 打开光化光(光脉冲)引起的P515信号(或 $\Delta\psi$)的增加等于关闭光化光后(暗脉冲) P515信号(或 $\Delta\psi$)的减少。Dual-PAM-100记录的这些重复的信号就可以给出连续的“P515 Flux”信号, 并且可以与原始的 P515信号在同一张图上显示。

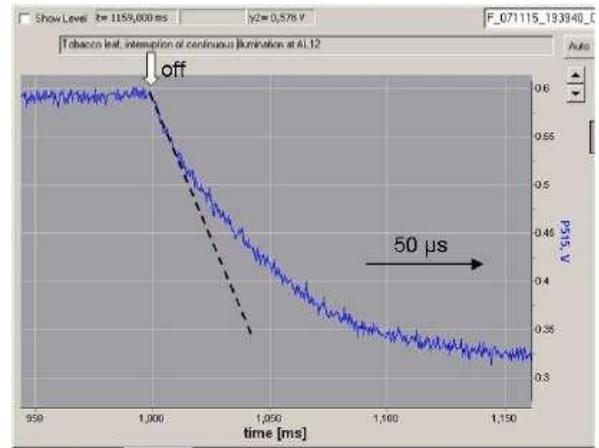


图12 350 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 照光达到稳态时, 关闭光化光后P515信号的响应
取4个记录的平均, 照光30 s, 关光2 s。材料为盆栽烟草

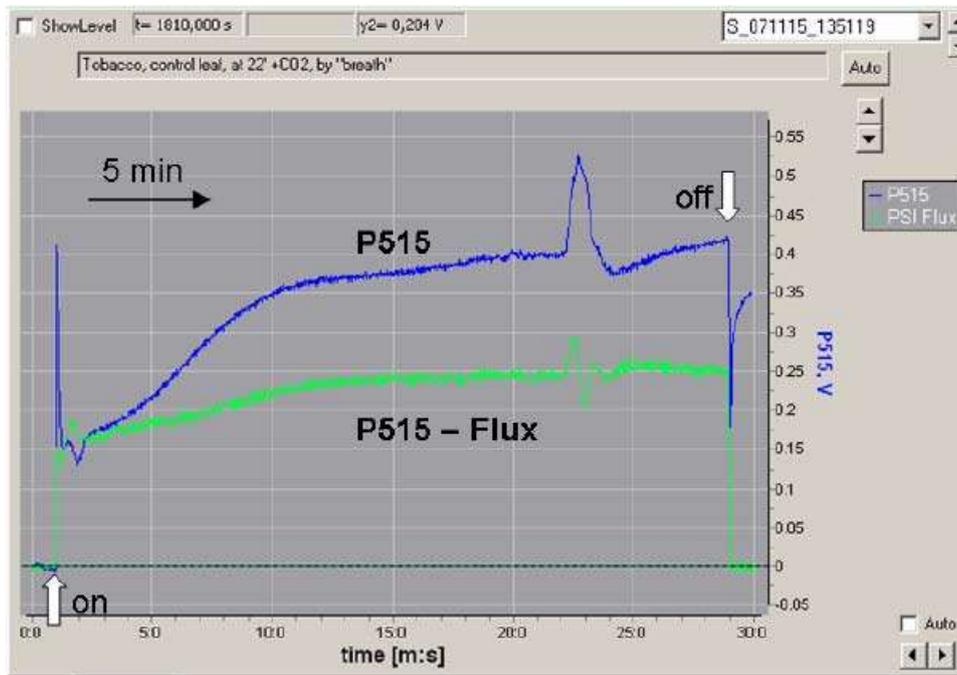


图13 暗-光诱导P515 (蓝色)和P515 Flux (绿色)信号曲线。

参数设置: 慢速动力学采点速率设为 20 ms/p。

暗适应后的烟草活体叶片放在标准的叶夹中(不控制气体组分)照光(300 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)。

在第22分钟时, 在离叶片1米处吹气, 来短暂增加 CO_2 浓度。

图13是在20 ms/p采点率条件下,测定的“P515 Flux”暗-光诱导曲线。从表面上看,Flux信号与原始的P515信号表现出一些相似性,但它们之间有几点明显不同:

1) 与P515信号相比,在没有光化光的条件下,Flux信号为0。根据定义,测得的Flux对应于PS I和PS II的电荷分离速率(暗下电荷不发生分离,所以速率为0)。

2) 因为Flux信号是从光化光关闭/打开的快速变化过程中获得的,因此它不包含慢速的玉米黄素(和“散射”)的变化。

瞬间升高CO₂浓度会引起P515信号的瞬间显著增加。同时,Flux信号出现阻尼震荡,先增强后抑制。信号抑制很有可能是由于ADP的瞬间缺乏所引起的,从而暂时降低了通过ATP酶的H⁺外流。震荡表明与光合电子流偶联的H⁺内流(从基质到类囊体腔)和通过ATP酶的H⁺外流的平衡受到了干扰。震荡,和最终重新建立的稳定的流动速率是一个复杂的调节过程的结果,这使原初电荷分离(随后的电子的运输和质子的内流)和后续的H⁺的外流速率达到平衡

从原理上来看,根据单周转饱和闪光诱导的P515变化的快相幅度,可以将“P515 Flux”信号校正为绝对单位H⁺/(mg Chl time)或e⁻/(mg Chl time)。P515变化的快相对应于两个电子从内向外移动所形成的跨膜区域。在将来的交流过程中,我们将详细地讨论校正步骤以及“P700 Flux”信号的测定。

参考文献

Bilger W and Schreiber U (1990) Chlorophyll luminescence as indicator of stress-induced damage to the photo-synthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. *Photosynth Res* 25: 161-171

Bilger W, Björkman O, Thayer SS (1989) Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol* 91: 542-551

Bilger W, Heber U and Schreiber U (1988) Kinetic relationship between energy-dependent fluorescence quenching, light scattering, chlorophyll luminescence and proton pumping in intact leaves. *Z Naturforsch* 43c: 877-887

Cruz JA, Avenson TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE and Kramer DA (2004) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photo-protection. *J Exp Botany* 56: 395-406

Deamer DW, Crofts AR and Packer L (1966) Mechanisms of light-induced structural changes in chloroplasts. I. Light-scattering increments and ultrastructural changes mediated by proton transport. *Biochim Biophys Acta* 131: 81-96

Heber U (1969) Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo. *Biochim Biophys Acta* 180: 302-319

Junge W and Witt HT (1968) On the ion transport system in photosynthesis: investigations on a molecular level. *Z Naturforsch* 23b: 244-254

Kanazawa A and Kramer DA (2002) In vivo modulation of non-photochemical quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12798-12794 Zealquest Scientific Technology Co., Ltd.

Klughammer C, Kolbowski J and Schreiber U (1990) LED array spectrophotometer for measurement of time resolved difference spectra in the 530–600 nm wave-length region. *Photosynth Res* 25: 317-327

Kramer DA and Sacksteder CA (1998) a diffused-optics flash kinetic spectrophotometer (DOFS) for measurements of absorbance changes in intact plants in the steady-state. *Photosynth Res* 56: 103-112

Ruban AV, Pascal AA, Robert B, Horton P (2002) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J Biol Chem* 277: 7785–7789

Sacksteder CA and Kramer DA (2000) Dark interval relaxation kinetics of absorbance changes as a quantitative probe of steady-state electron transfer. *Photosynth Res* 66: 145-158

Velthuys BR (1978) A third site of proton translocation in green plant photosynthetic electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2765-2769

如果您需要了解更多，或有问题需要与我们交流，请按如下方式与我们联系：

地 址	邮 编	电 话	传 真
上海总部 普陀区金沙江路 1038 号华东师大科技园 2 号楼 8 层	200062	021-32555118	021-32555117
北京分公司 海淀区北三环西路 43 号青云当代大厦 1907 室	100048	010-88824075/76/77	转 605 分机
广州代表处 天河区潭村路 348 号马赛国际商务中心 2206 室	510632	020-85645707	020-85645359
成都代表处 人民南路一段 97 号现代之窗 1018 室	610016	028-86722096, 86719836	028-86721922

高新技术：www.zealquest.cn 产品销售：www.zealquest.com

微博：weibo.com/zealquest E-mail: sales@zealquest.com service@zealquest.com

QQ 技术讨论群：154279317 (陆地环境应用)；222678293 (水环境应用)

如果您需要植物表型、植物生理生态、植物基因型、植物培养、种子纯度鉴定等方面的测试服务或项目合作，请联系：

地 址	邮 编	电 话	传 真
AgriPheno 平台 上海浦东新区沔北路 185 号 C9-1	201210	021-50199251/3/6/8	021-50199252

网址：www.agripheno.com E-mail: phenotype@zealquest.com

技术文章

调制叶绿素荧光仪 Dual-PAM-100 脚本编写方法

吕中贤 褚胜利

[1]上海泽泉科技股份有限公司，上海 200062

摘要： Dual-PAM-100 作为能够同步测量光系统 II 和光系统 I 活性的调制叶绿素荧光仪，在植物生理研究中有广泛的应用。其测量慢速动力学荧光诱导曲线和快速光曲线均由内置程序自动测量，本文主要阐述利用 Dual-PAM-100 的脚本编制功能测量某些特殊意义的非标准化荧光曲线，用于特殊的植物生理研究。

关键词： 调制叶绿素荧光仪、Dual-PAM-100、脚本编写

叶绿素荧光技术作为光合作用的经典测量方法，已经成为藻类和高等植物生理生态研究领域功能最强大、使用最广泛的技术之一。由于常温常压下叶绿素荧光主要来源于光系统 II 的叶绿素 a，而光系统 II 处于整个光合作用过程的最上游，因此包括光反应和暗反应在内的多数光合过程的变化都会反馈给光系统 II，进而引起叶绿素 a 荧光的变化，也就是说几乎所有光合作用过程的变化都可通过叶绿素荧光反映出来。与其它测量方法相比，叶绿素荧光技术还具有不需破碎细胞、简便、快捷、可靠等特性，因此在国际上得到了广泛的应用。

然而，对于光系统 I 的叶绿素荧光，在常温常压下很难测量。先前，人们测量光系统 I 的叶绿素荧光采用超低温叶绿素荧光法（77k），利用液氮冻融样品，然后放入含液氮的超低温荧光分光光度计，选择合适的激发光测量样品的光系统 I 叶绿素荧光。该方法的局限性在于无法获得动态的光系统 I 叶绿素荧光曲线，也无法对已冻融的样品再次进行诱导，因此只能获得某一状态下的光系统 I 叶绿素荧光数据。后来，德国乌兹堡大学 Schreiber 教授——调制叶绿素荧光仪 PAM 发明人——通过差示吸收技术，成功地在调制叶绿素荧光仪 PAM 中加入了测量 P700 信号的功能。植物样品的 P700 信号在常温常压下能够稳定被测量，并且能够很好地反映光系统 I 的叶绿素荧光变化，因此人们可以在常温常压下通过监测动态的 P700 信号的变化研究光系统 I 的荧光变化。

在庞大的 PAM 家族中，Dual-PAM-100 能够同时测量光系统 I 和光系统 II 的活性变化，成为研究植物光合生理的重要的技术手段之一。同步测量两个光系统活性变化的荧光诱导曲线和快速光曲线均由

仪器自带的程序自动测量，在此不再赘述。本文主要阐述如何利用 Dual-PAM-100 手动测量某些特殊意义的荧光曲线，例如光化光关闭后的荧光瞬时上升（俗称鼓包）变化、P700+暗还原曲线等。

1. 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线

在蓝藻和高等植物中，光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线能够反映由 NADPH 脱氢酶介导的围绕光系统 I 的循环电子传递的活性。荧光瞬时上升斜率越高，说明循环电子传递活性越高。该方法是研究围绕光系统 I 的循环电子传递活性的主要方法之一，能够快速、准确地表示循环电子传递的活性，是利用叶绿素荧光反映循环电子传递活性的经典方法。

如图 1 所示，图中红色荧光曲线为蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线，蓝色虚线即表示荧光上升的斜率，该斜率越高，表示循环电子传递活性越高。本节主要阐述如何利用 Dual-PAM-100 手动测量本曲线。

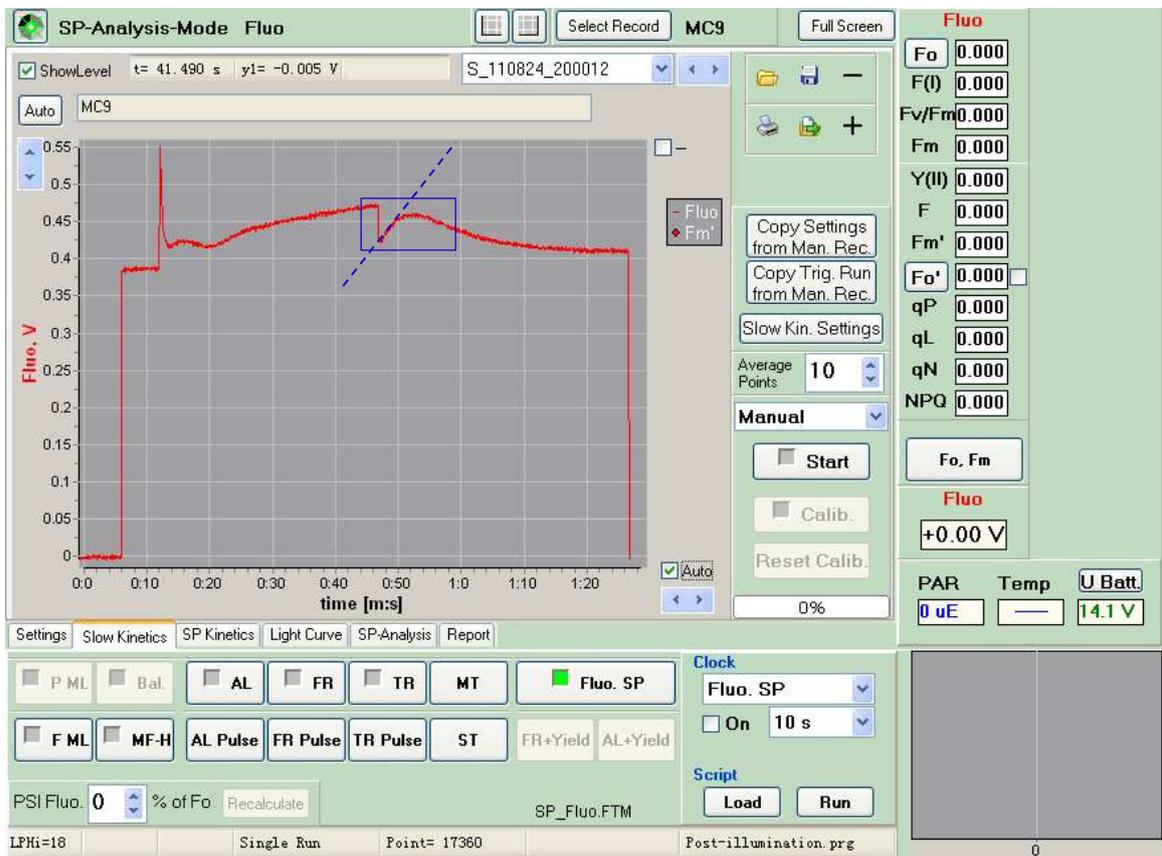


图 1 利用 Dual-PAM-100 测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线

如图 2 所示，为手动测量蓝藻鼓包曲线的测量分解图。图中共分为五个步骤，分别是“打开 Start”、“打开 F ML”、“打开 AL”、“关闭 AL”、“关闭 F ML”。“打开 Start”表示开始慢速动力学（Slow Kinetics）曲线测量，此时得到平稳的荧光信号。荧光信号平稳一段时间（通常为 5-10 秒）后，打开测量光，即“打开 F ML”，此时得到本底荧光信号 F_0 ，同样使荧光信号平稳数秒。此时，可打开光化光对样品进行诱导，即“打开 AL”。通常在曲线测量之前，我们会在 Settings 选择合适的光化光强度，而在曲线测量时，只需打开光化光即可。此外，如果测量样品为高等植物，通常会在打开光化光 AL 之

前打饱和脉冲 SP^[1]，然后开始光化光诱导。等光化光诱导平稳后，“关闭 AL”，荧光会产生瞬时淬灭，紧接着便会产生上升现象，待曲线走平稳后，关闭 Slow Kinetics，关闭测量光，即“关闭 F ML”。手动测量完毕后，可点击右上角红色方框中的按钮，导出曲线，用于数据处理。

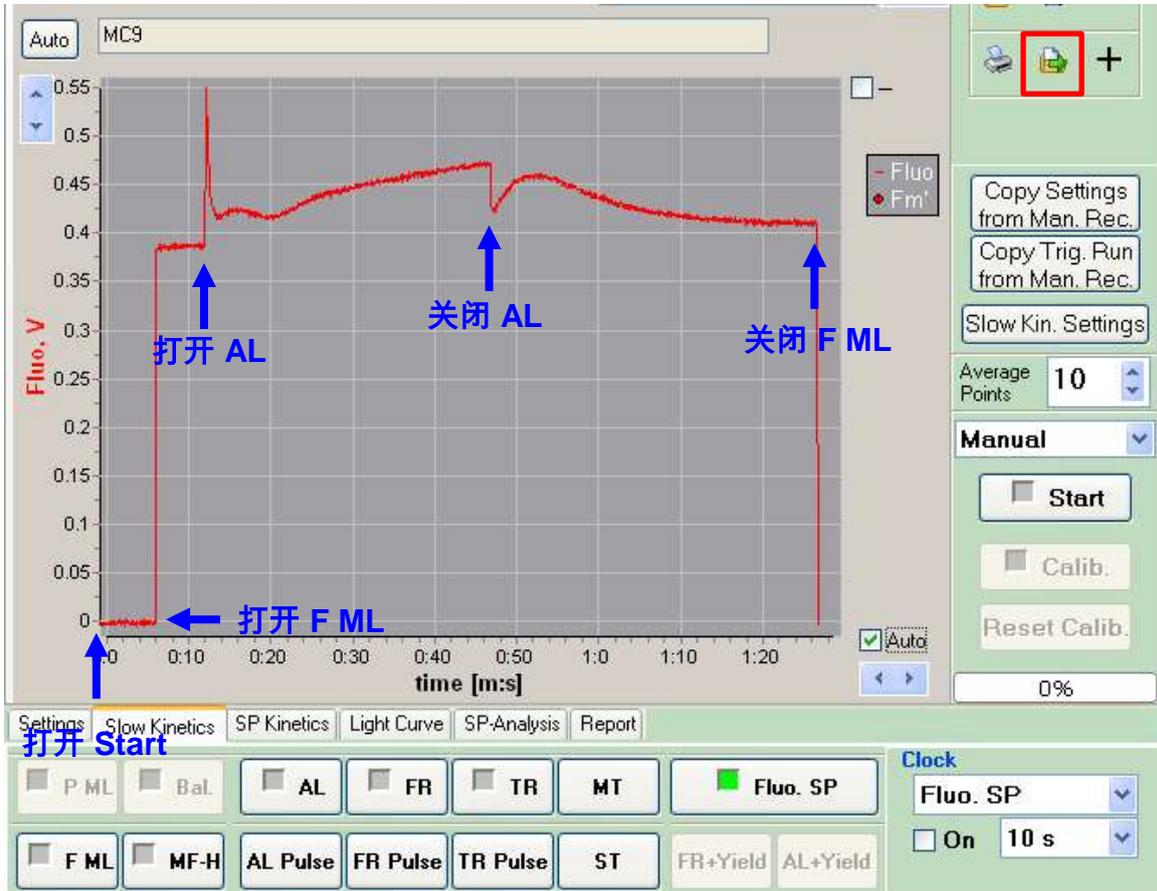


图 2 手动测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线的分解图

2. 编制测量蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线的脚本

为了使测量数据重复性更好，我们需要准确地对平行样品进行重复测量。然而，纯手动测量不能保证在同样的时间位点做出相同的测量动作。例如，我们需要每次在第 5 秒时打开测量光，而靠手动点击鼠标，可能会在第 4.5 秒或 6 秒时打开测量光，这样会导致做数据平均时出现曲线变形，对实验结果影响很大。为了解决这一问题，我们就需要用到 Dual-PAM-100 软件中的脚本编制功能，编写一条标准的鼓包测量曲线，即可将繁琐的手动测量变成简单的自动测量。利用该功能，还可以编写其他不同的荧光曲线，用于不同的科研目的。

2.1 Dual-PAM-100 脚本编辑器介绍

如图 3 所示，点击软件界面右下方 Script 中的 Load 按钮，弹出 Script Files 对话框，显示软件自带的脚本程序。选择任意一条程序打开，加载至脚本文件编辑器中，如图 4 所示。点击编辑器左上角新建按钮，输入新建脚本文件名（如 Post-illumination），即可新建一条未编辑的脚本文件，如图 5 所示。



图 3 脚本程序按钮图示

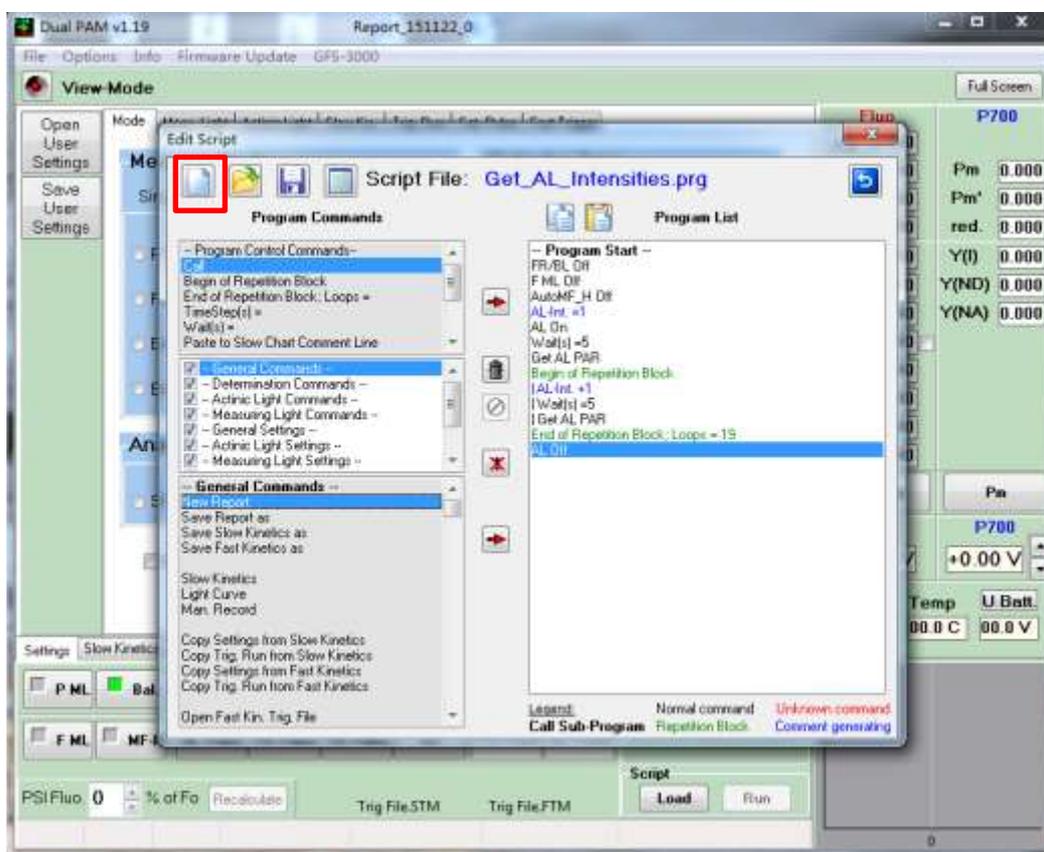


图 4 加载已有的脚本程序图示

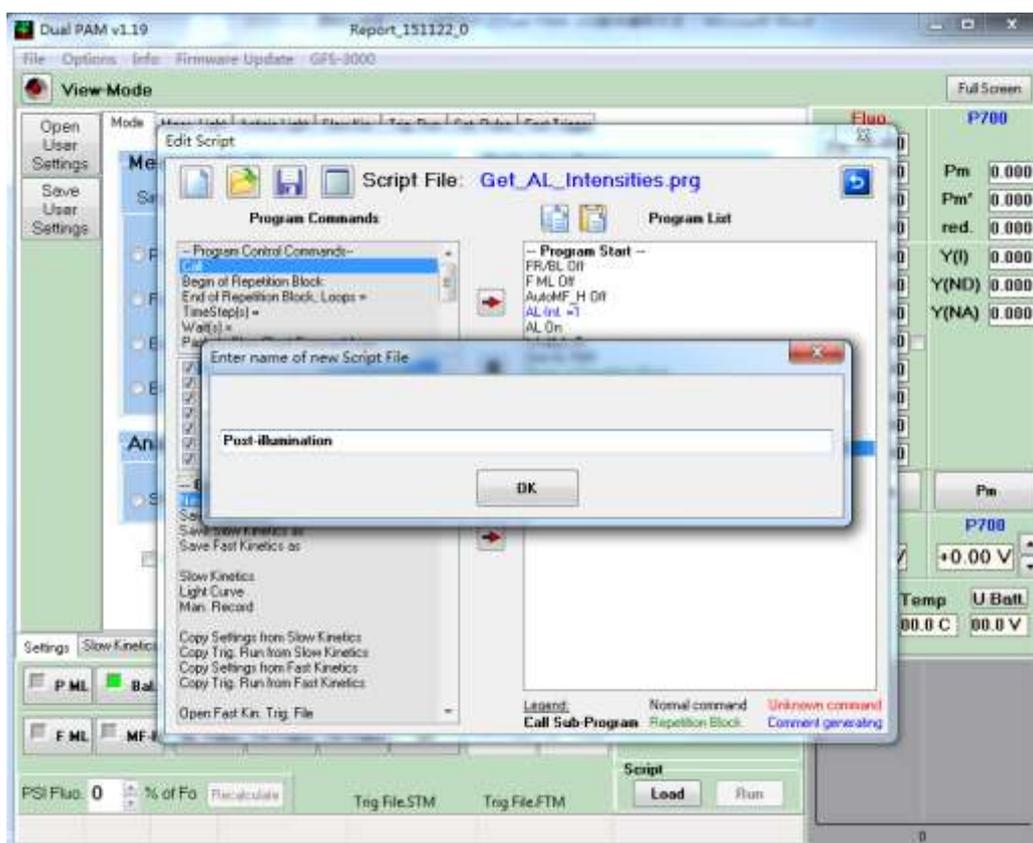


图 5 新建脚本文件图示

新建的脚本文件编辑器如图 6 所示，编辑器主要含有两大编辑控制区，分别为蓝色方框内的“程序控制按钮区域”和红色方框内的“通用控制按钮区域”，本节主要阐述该两大编辑控制区域内不同命令行所代表的意义及用法。

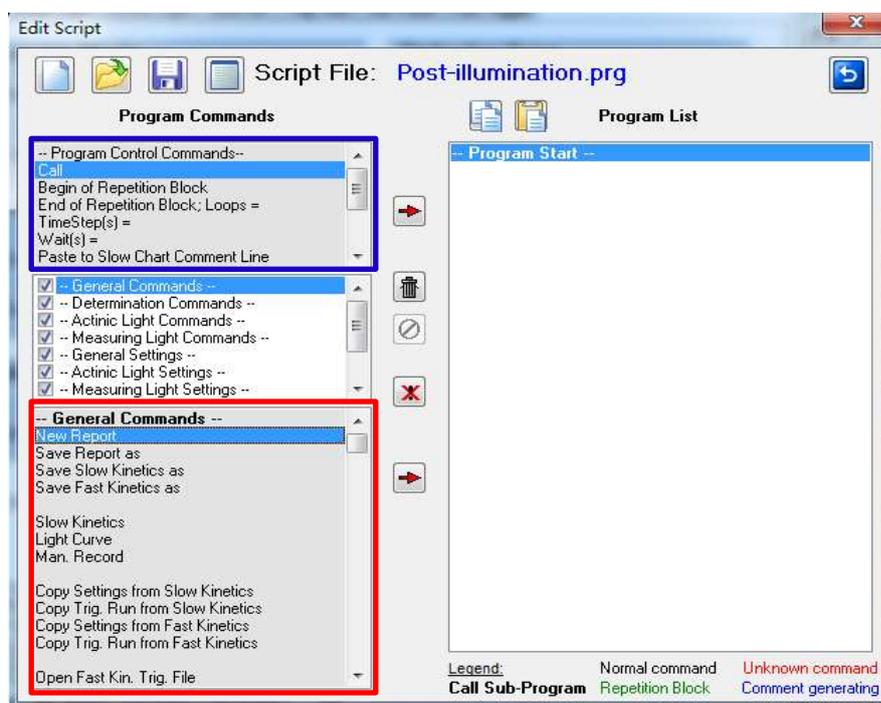
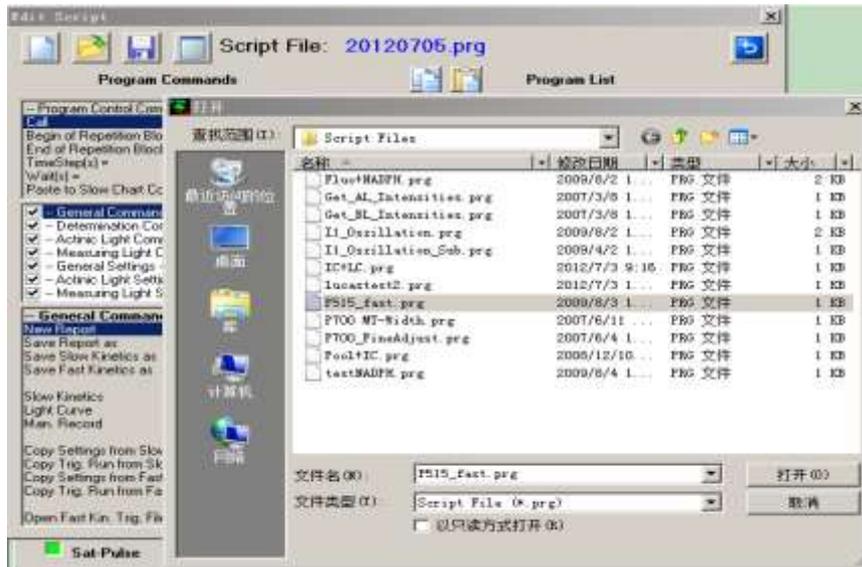


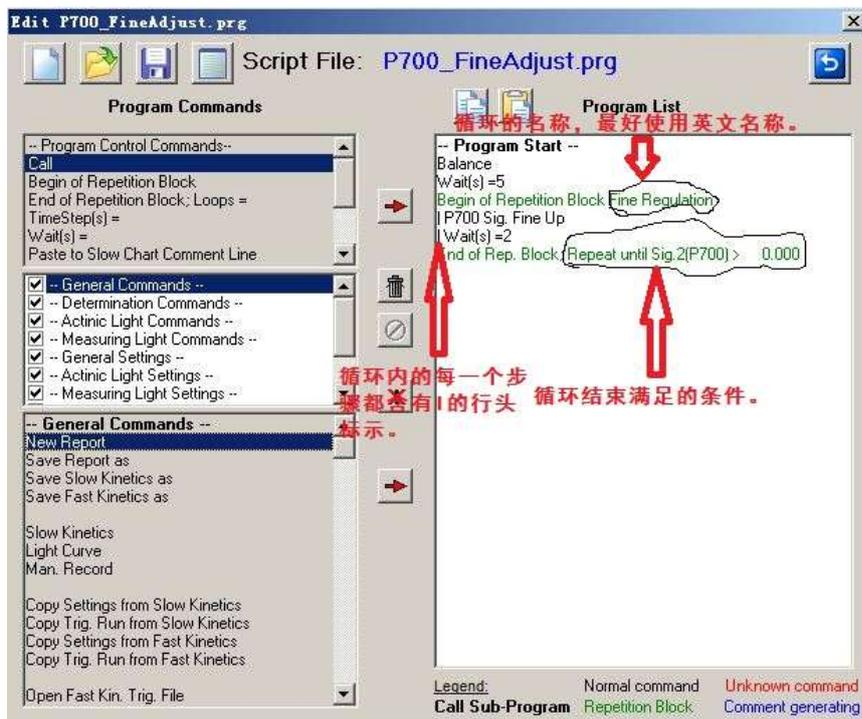
图 6 新建的脚本文件编辑器图示

蓝色方框的“程序控制按钮区域”为主程序编辑控制区域，其中命令行按钮所代表的意义如下：

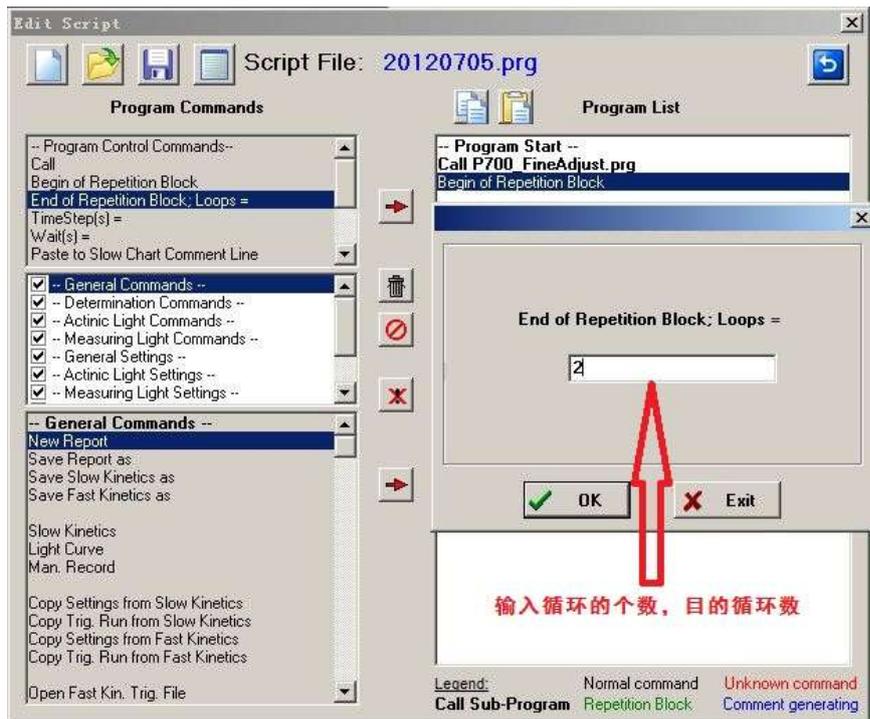
Call： 导入一个已有的程序镶嵌到您要编制的程序中；



Begin of Repetition Block: 循环程序的开始，输入循环的名称开始设置循环程序；



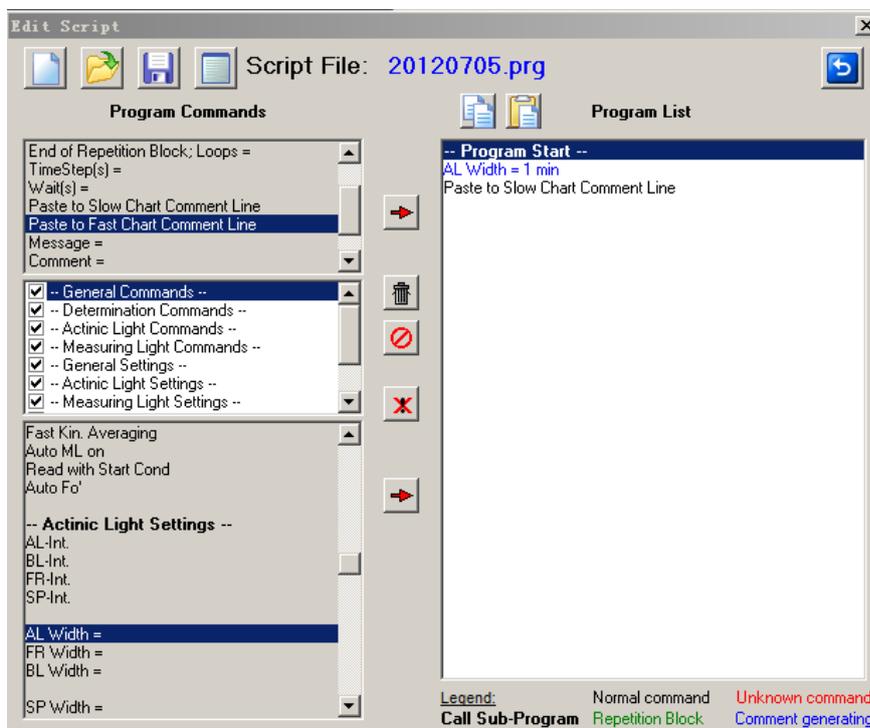
End of Repetition Block; Loops=: 循环的结束，Loops=输入循环的个数；



TimeStep(s)=: 该设置的时间包含了上一步操作所需要的时间，一般该设置的时间都要比上步时间长；

Waits(s)=: 上一步操作完成之后等待设置的时间之后进行下一步操作；

Paste to Slow Chart Comment Line: 将上一步蓝色显示的设置参数写入到 Slow Kinetics 界面的 command 备注窗口中；

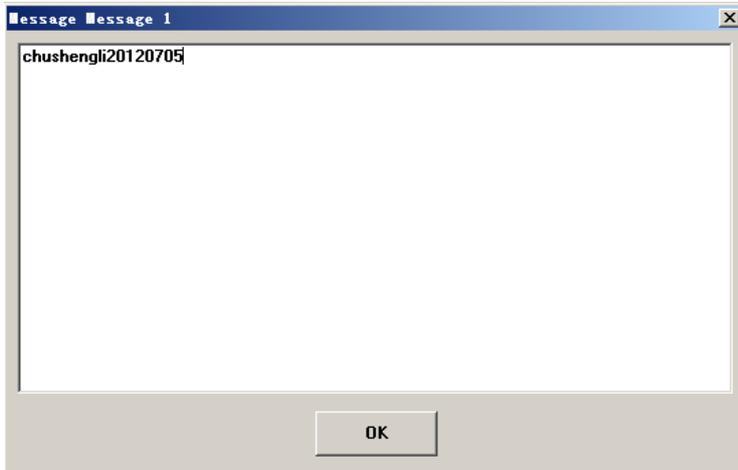


Paste to Fast Chart Comment Line: 将程序的参数设置下入到 Fast Kinetics 界面下的 command 命令窗中；

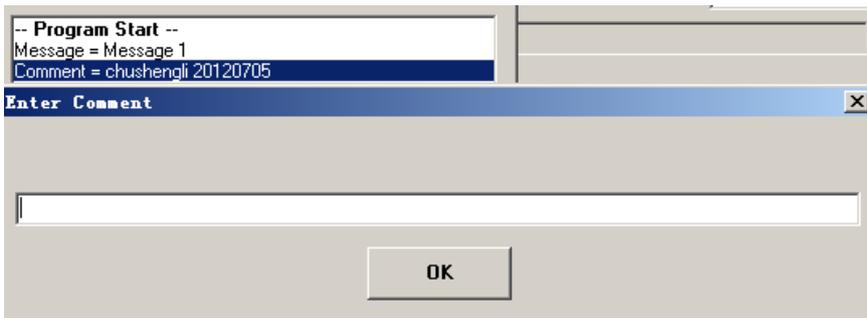
Message=: 输入备注信息；



先输入信息的名称，再输入备注信息；



Comment =: 输入注释名称，输入完成的会显示在程序中



Spacer: 增加一个空行；

Exit: 退出

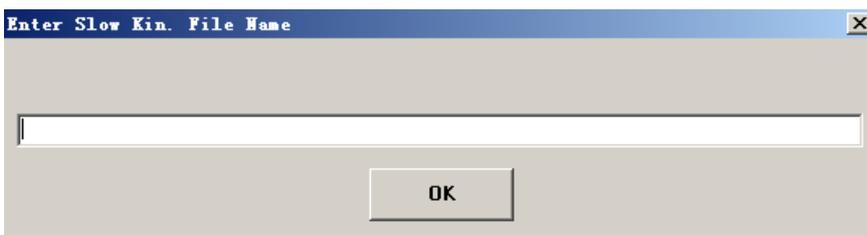
红色方框的“通用控制按钮区域”为编辑脚本文件的主要按钮区域，各按钮所代表的意义如下：

a. General Commands 通用命令按钮栏：

New Report: 创建一个新的数据存储文件；

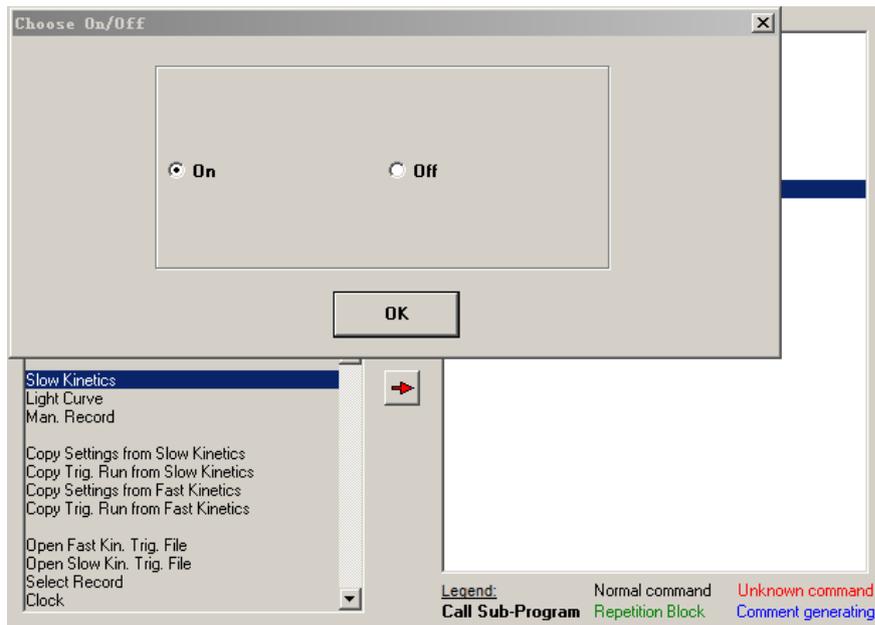
Save Report as: 创建一个新的文件名称；

Save Slow Kinetics as: 输入一个需要的慢速诱导动力学曲线的名称；



Save Fast Kinetics as: 输入一个需要的快速诱导动力学曲线的名称;

Slow Kinetics: 打开或关闭慢速诱导动力学曲线;



Light Curve: 打开或关闭快速光响应曲线;

Man. Record: 开启或关闭手动测量的记录;

Copy Settings from Slow Kinetics: 复制设置中的慢速诱导动力学曲线的参数设置;

Copy Trig. Run from Slow Kinetics: 复制慢速诱导动力学曲线的 Trig. Run 程序;

Copy Settings from Fast Kinetics: 复制设置中的快速诱导动力学曲线的参数设置;

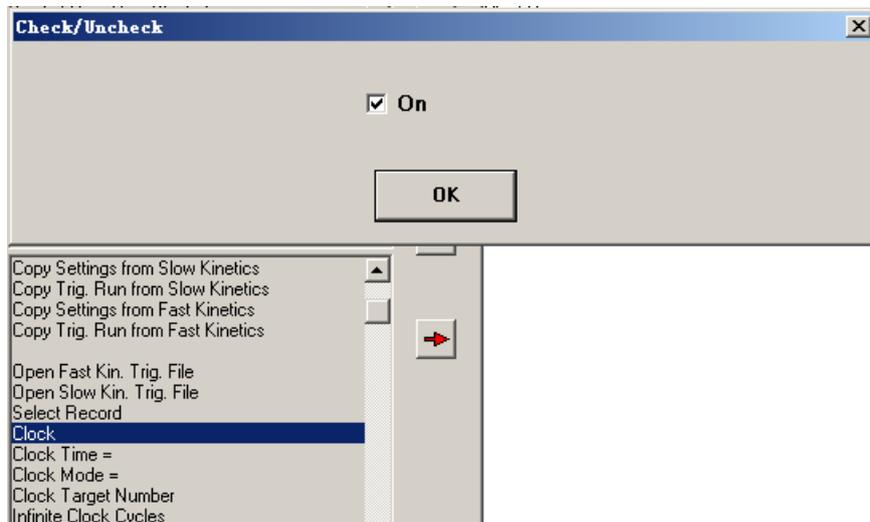
Copy Trig. Run from Slow Kinetics: 复制快速诱导动力学曲线的 Trig. Run 程序;

Open Fast Kin. Trig. File: 打开已经存在的快速诱导动力学的 Trig. Run 程序;

Open Slow Kin. Trig. File: 打开已经存在的慢速诱导动力学的 Trig. Run 程序;

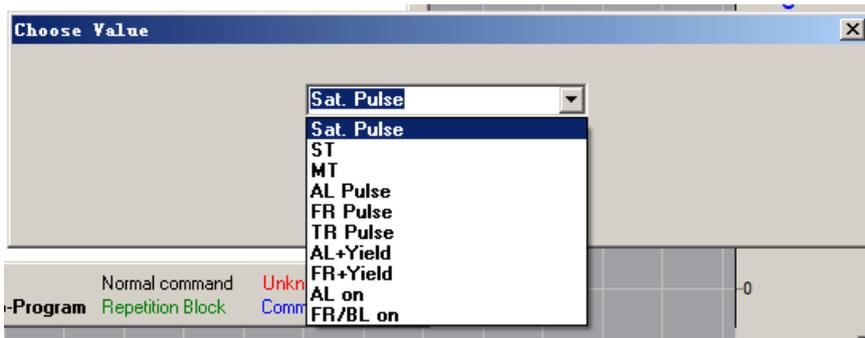
Select Record: 选择储存记录;

Clock : 打开或关闭 clock 测量程序;

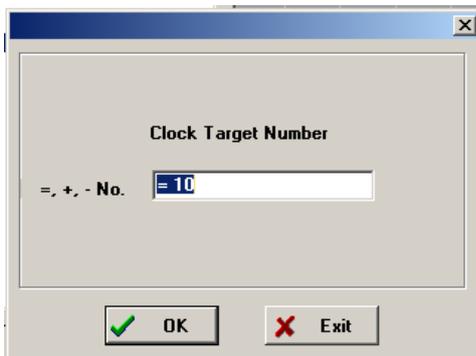


Clock Time =: 输入循环间隔时间，设置两次操作之间的时间；

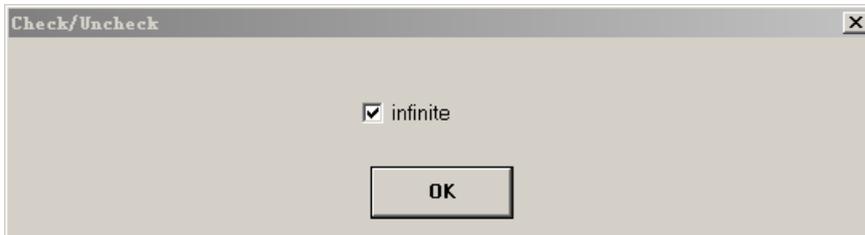
Clock Mode =: 选择循环操作的指令；



Clock Target Number =: 输入循环的次数；



Infinite Clock Cycles: 打开或关闭无限循环；



b. Determination Commands 测量命令按钮栏

Sat-Pulse/Fast Kin.: 仪器发出一个饱和脉冲（进行一次快相检测）；

Fo: 仪器记录一组 Fo 的数据；

Fo' : 仪器测量一组 Fo' 的值；

Fo, Fm: 仪器打开一个饱和脉冲，测量一组 Fo, Fm 的值计算 Fv/Fm；

Calibration: 仪器进行 P700 测量的自动校准；

Pm: 仪器测量 P700 的量子产量；

Auto FoFm/Pm: 自动测量 Fo, Fm 和 Pm 的值；

FR+Yield/Fast Kin.: 打开远红光测量 P700 的量子产量和快相；

AL+Yield/Fast Kin.: 打开光化光测量 P680 的量子产量和快相；

c. Actinic Light Commands 光化光命令按钮栏

AL: 打开或关闭光化光；

TR: 打开或关闭 TR 光；（在 Dual-PAM-100 中，该按钮用于控制测量藻类时使用的搅拌转子的开关）

FR/BL: 打开或关闭远红光；

Toggle FR/BL: 触发远红光;

Select FR/BL =: 选择 PSII 的光源, 远红光或蓝光;

Select Act. Light =: 选择光化光的光强来源, 红光、蓝光、红光和蓝光三种选择;

ST: 打一个单周转饱和闪光;

MT: 打一个多周转饱和闪光;

AL Pulse: 打一个光化光饱和脉冲光;

FR/BL Pulse: 打一个远红光饱和脉冲光;

TR Pulse: 打一个 TR 饱和脉冲光; (在 Dual-PAM-100 中, 该按钮意义不大)

d. Measuring Light Commands 测量光命令按钮栏

F ML: 打开或关闭荧光的测量光;

P ML: 打开或关闭 P700 的测量光;

Balance: P700 测量调平衡;

P700 Sig. Fine Up: 是 P700 的平衡信号向上;

P700 Sig. Fine Down: 是 P700 的平衡信号向下;

MF-H: 打开或关闭测量光频率自动调整高频的功能;

e. General Settings 通用设置命令按钮栏

Open User Settings: 打开用户已保存的参数设置;

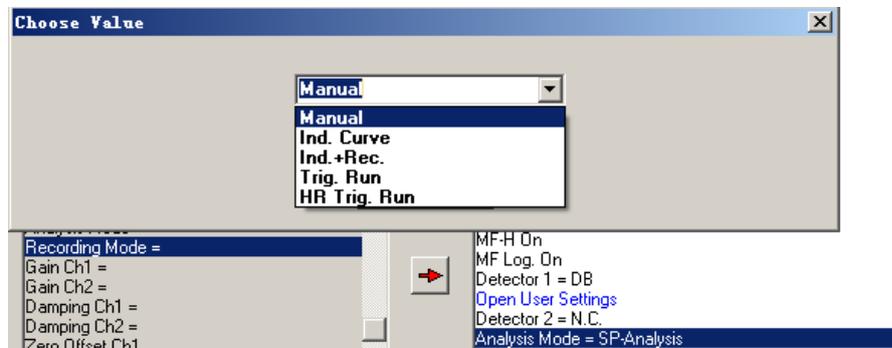
Detector 1 =: 选择 1 号接口连接的检测器类型;

Detector 2 =: 选择 2 号接口连接的检测器类型;

Measure Mode =: 选择测量的模式;

Analysis Mode =: 选择采样分析的模式, 慢速或快速可选;

Recording Mode =: 选择数据记录的模式;



Gain Ch1 =: 选择增益 1 对应的数值;

Gain Ch2 =: 选择增益 2 对应的数值;

Damping Ch1 =: 选择阻尼 1 的数值;

Damping Ch2 =: 选择阻尼 2 的数值;

Zero Offset Ch1: 通道 1 进行调零;

Zero Offset Ch2: 通道 2 进行调零;

Slow Kin. Acquisition Points =: 选择慢速诱导动力学曲线的采样点个数;

Slow Kin. Acquisition Rate =: 选择慢速诱导动力学曲线的采样频率;

Target Averages: 几个样点进行平均取值;

Multiple Average Cycles: 多重平均循环;

Fast Kin. Averaging: 选择是否将快相的点进行平均取样;

Auto ML on: 选择是否自动打开测量光;

Auto Fo': 是否自动进行 Fo' 的测量;

f. Actinic Light Settings 光化光设置命令按钮栏

AL-Int. : 设置光化光的强度梯度, 再循环中如果选择的是=号, 表示每次循环均是该梯度的光强; 如果是+号, 表示下一次循环光化光强度增加您输入的数值, -号则相反;

BL-Int. : 设置蓝色光化光的强度梯度, 符号与上相同;

FR-Int. : 选择远红光的梯度;

SP-Int. : 选择饱和脉冲光的梯度强度;

AL Width =: 选择光化光照射的时间长度;

FR Width =: 选择远红光照射的时间长度;

BL Width =: 选择蓝色光化光的时间长度;

SP Width =: 饱和脉冲光的照射时间长度;

AL Pulse Width =: 光化光饱和脉冲的照射时间长度;

FR Pulse Width =: 远红光饱和脉冲的照射时间长度;

ST Pulse Width =: 单周转饱和脉冲的照射时间长度;

MT Pulse Width =: 多周转饱和脉冲的照射时间长度;

ST sequence number: 单周转闪光的序号;

ST sequence number: 单周转闪光顺序间的时间间隔宽度;

Fast Kin. After ST sequence: 单周转之后进行快相测定;

SP Width Setup =: 饱和脉冲光的照射时间长度的梯度设置;

AL Pulse Width Setup =: 光化光饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

FR Pulse Width Setup =: 远红光饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

ST Pulse Width Setup =: 单周转饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

MT Pulse Width Setup =: 多周转饱和脉冲的照射时间长度的梯度设置;

Get AL PAR: 获得光化光强度;

Get BL PAR: 获得蓝色光化光强度;

g. Measuring Light Settings 测量光设置命令按钮栏

MF-H =: 选择高频测量光;

MF-L =: 选择低频测量光;

MF-M =: 选择最大频测量光;

MF-H Step =: 选择高频测量光的变化梯度;

MF-L Setup =: 选择低频测量光的变化梯度;

MF-M Setup =: 选择最大频测量光的变化梯度;

F ML-Int.: 设置荧光测量光的梯度;

P ML-Int.: 设置 P700 测量光的梯度;

Auto MF_H: 选择是否自动将测量光变为高频;

MF Log.: 测量光对数值

Variable Block Frequency: 测量光频率变化

Get FML PAR: 测量光 PAR 测量

h. Condition Commands 条件设置命令按钮栏

If Sig. (Fluo): 如果荧光信号满足什么条件;

If Sig. (P700): 如果 P700 信号满足什么条件;

Wait until Sig. (Fluo): 等待荧光信号满足什么条件;

Wait until Sig. (P700): 等待 P700 信号满足什么条件;

End of Rep. Block; Repeat until Sig. (Fluo): 如果荧光信号达到某一个标准即可结束循环程序;
End of Rep. Block; Repeat until Sig. (P700): 如果 P700 信号达到某一个标准即可结束循环程序;
Wait until Clock Counter: 等待直至 clock 循环满足什么条件;

i. Display Commands 显示命令按钮栏

Visible Page =: 选择显示的界面窗口;

Visible Settings Page =: 选择显示的设置窗口;

Slow Kinetics Auto Scaling Left: 选择慢速诱导动力学曲线自动左对齐;

Slow Kinetics Auto Scaling Right: 选择慢速诱导动力学曲线自动右对齐;

Slow Kinetics Auto Scaling Horizontal: 选择慢速诱导动力学曲线自动水平对齐;

Slow Kinetics Average Points: 慢速动力学曲线平均数据点数;

Fast Kinetics Auto Scaling Left: 选择快速诱导动力学曲线自动左对齐;

Fast Kinetics Auto Scaling Right: 选择快速诱导动力学曲线自动右对齐;

Fast Kinetics Auto Scaling Horizontal: 选择快速诱导动力学曲线自动水平对齐;

Fast Kinetics Horizontal Log.: 选择显示快速诱导动力学曲线曲线的 log 图标;

Fast Kinetics Average Points: 快速动力学曲线平均数据点数;

2.1 蓝藻光化光关闭后的荧光瞬时上升（鼓包）曲线的脚本编制

对于光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线，并不需要用到所有的按钮，只需选择程序需要的命令按钮，形成脚本文件命令行即可。

首先，在手动测量时，第一步为“打开 Start”，即开启一条新的慢速动力学荧光曲线。因此，我们需要在 General Commands 中双击“Slow Kinetics”，弹出对话框，选择“on”，即形成启动慢速动力学曲线的命令行，如图 7 所示。

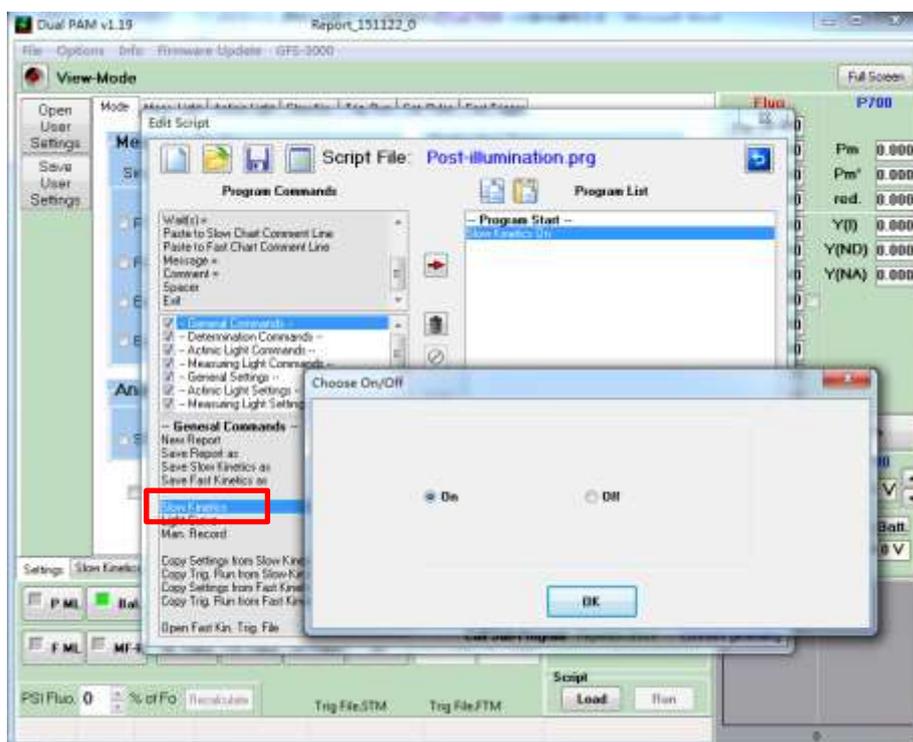


图 7 编辑新建慢速动力学荧光曲线图示

紧接着需要走稳 5-10 秒，这里我们使用的是 Program Commands 中的“TimeStep(s)”命令按钮。如图 8 所示，双击“TimeStep(s)”按钮，输入我们需要设置的时间，点击确定，即可形成命令行。

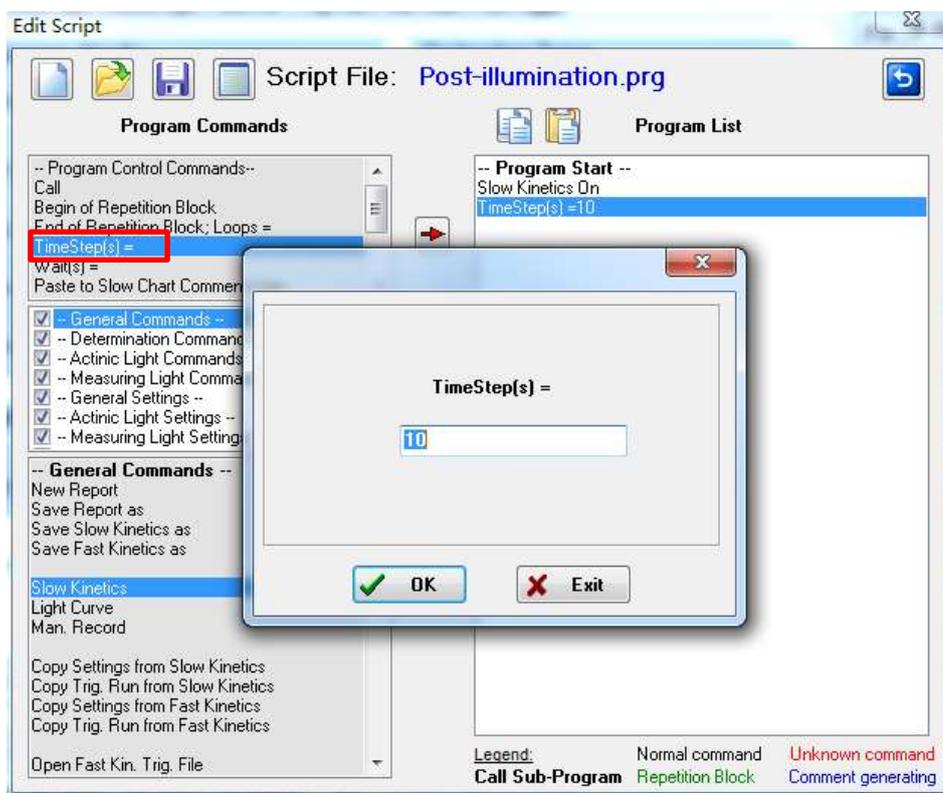


图 8 编辑建立间隔时间命令图示

然后打开测量光，即“打开 F ML”，获得初始荧光 F_0 。此时我们需要使用 Measuring Light Commands 中的“F ML”按钮，双击，选择“on”，完成打开测量光的命令行，如图 9 所示。

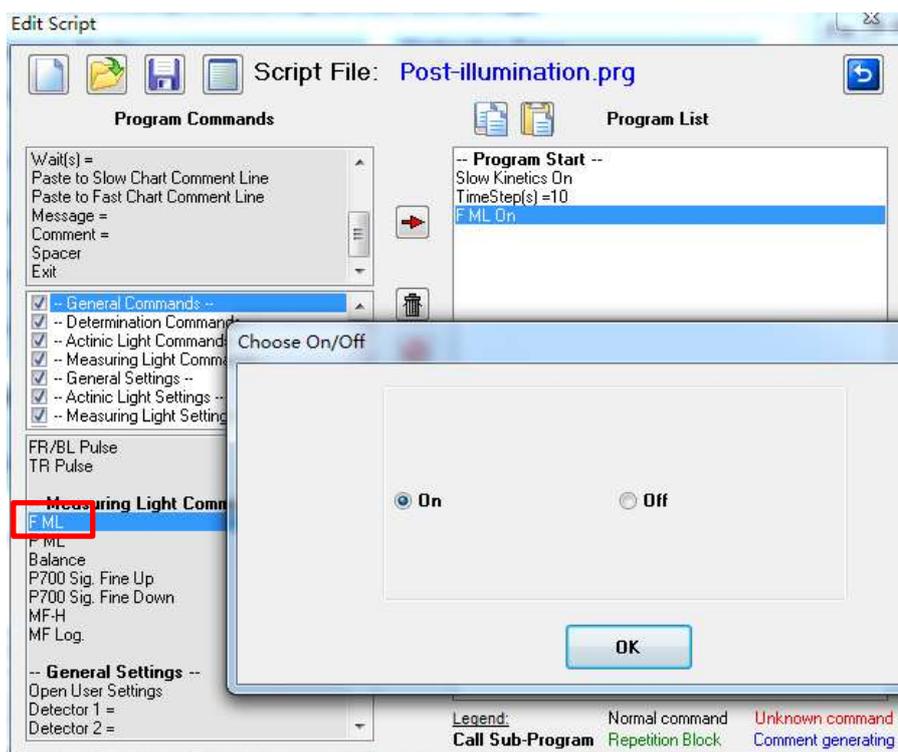


图 9 编辑打开测量光程序图示

利用图 8 同样的方法建立一个新的 TimeStep，使测量光信号走稳，时间同样可以设置为 10 秒。然后，开始设置光化光。如果测量样品为高等植物，可以在此先设置打一个饱和脉冲，方法为双击 Determination Commands 中“Sat-Pulse/Fast Kin.”按钮即可。与手动测量时不同，编制脚本文件时，需要将光化光强度一起编写进去。在 Actinic Light Settings 中选择“AL-Int.”按钮，输入光化光光强档位，例如 5 档，如图 10 所示，即完成设置光化光光强。设置好光强后，在 Actinic Light Commands 中选择“AL”按钮，选择“on”，设置打开光化光，如图 11 所示。

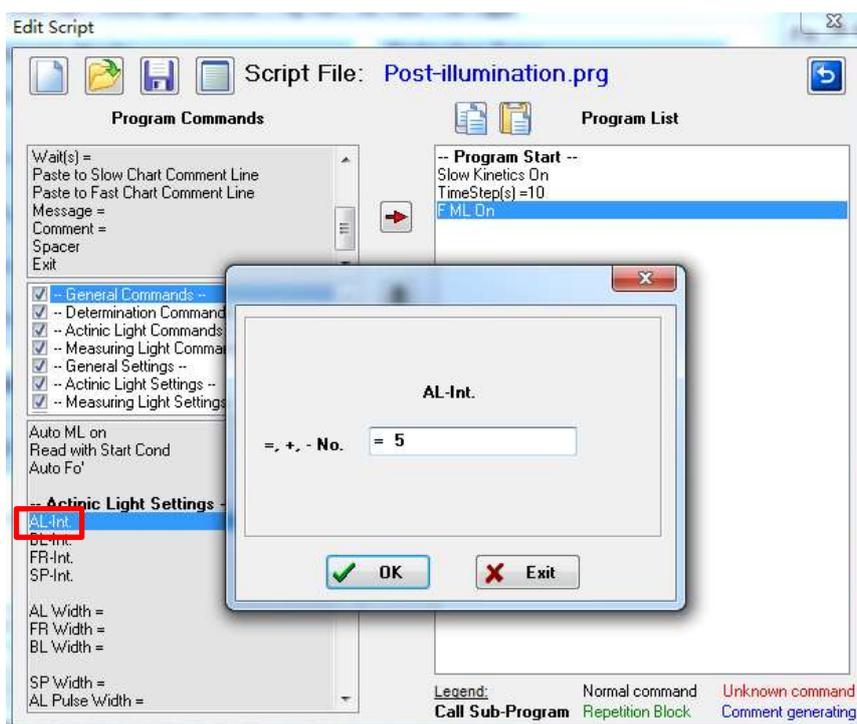


图 10 编辑光化光强度设置命令图示

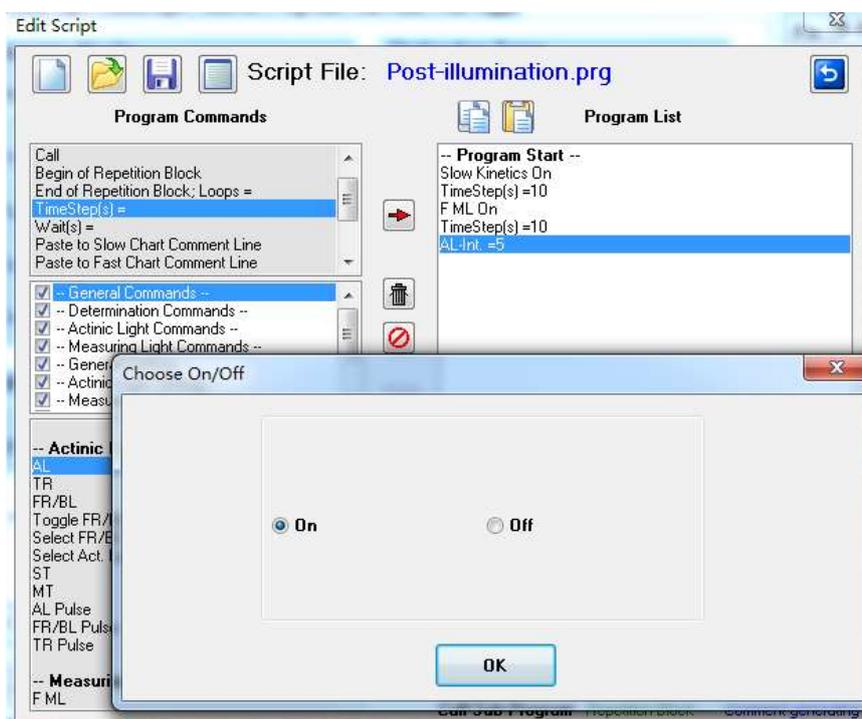


图 11 编辑打开光化光命令图示

利用与图 8 相同方法设置光化光诱导时间，以荧光曲线走平为基本原则。对于蓝藻而言，一般在 60 秒以内即可，而对于高等植物，一般需要 120-180 秒，甚至更久。本文中实验材料为蓝藻，故设置 TimeStep(s)为 30 秒。

在手动测量时，当荧光曲线走平后，可关闭光化光 AL，因此在编辑脚本文件时，需要在光化光诱导的 TimeStep 之后，关闭 AL。方法是：在 Actinic Light Commands 中选择“AL”按钮，双击，选择“off”即可，如图 12 所示。

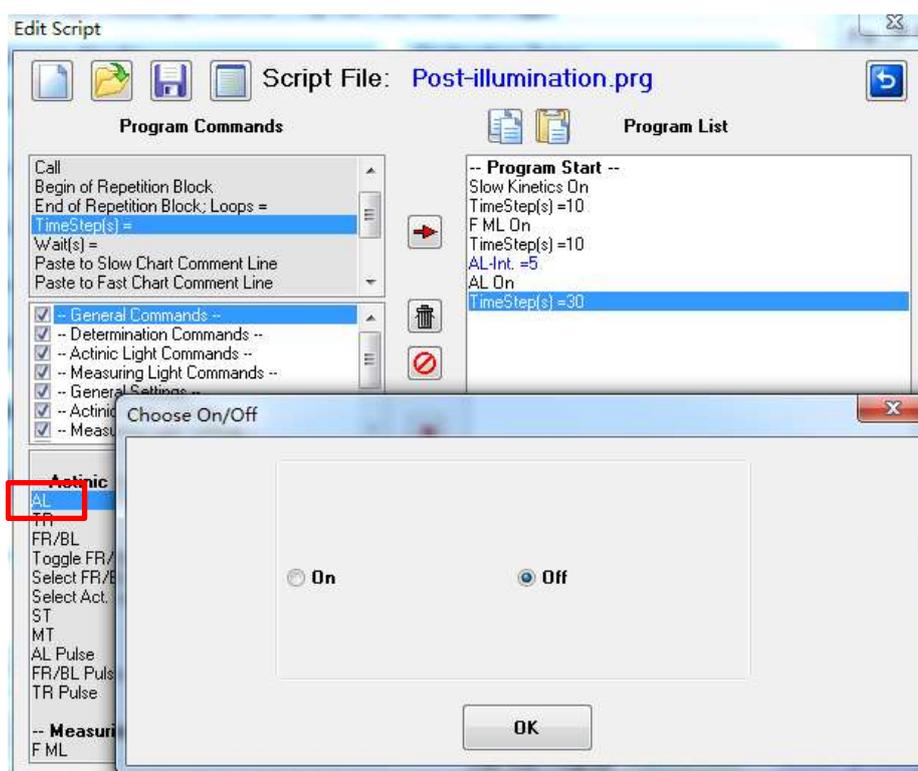


图 12 编辑关闭光化光命令图示

关闭光化光后，荧光会出现瞬时淬灭和瞬时上升的现象，因此在编辑脚本文件时，只需要设置足够的 TimeStep，等待荧光曲线稳定即可。一般而言，在蓝藻中，设置时间为 30-60 秒；而在高等植物中，一般需要设置 120-180 秒左右，视鼓包上升情况而定。设置 TimeStep 的方法与图 8 相同。

当测量结束后，需要关闭慢速动力学程序和测量光。一般地，关闭程序和测量光的先后顺序没有具体要求，但使用脚本文件时，如果先关闭测量光，即会出现图 1 中最后的荧光淬灭曲线，对于实验数据没有影响，但不利于数据的整体观看效果，因此，建议先关闭慢速动力学程序，再关闭测量光。如图 13 所示，在 General Commands 中双击“Slow Kinetics”，选择“off”，即关闭了慢速动力学曲线。然后在 Measuring Light Commands 中双击“F ML”，选择“off”，即关闭测量光，如图 14 所示。至此，蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线的脚本文件编写完毕。

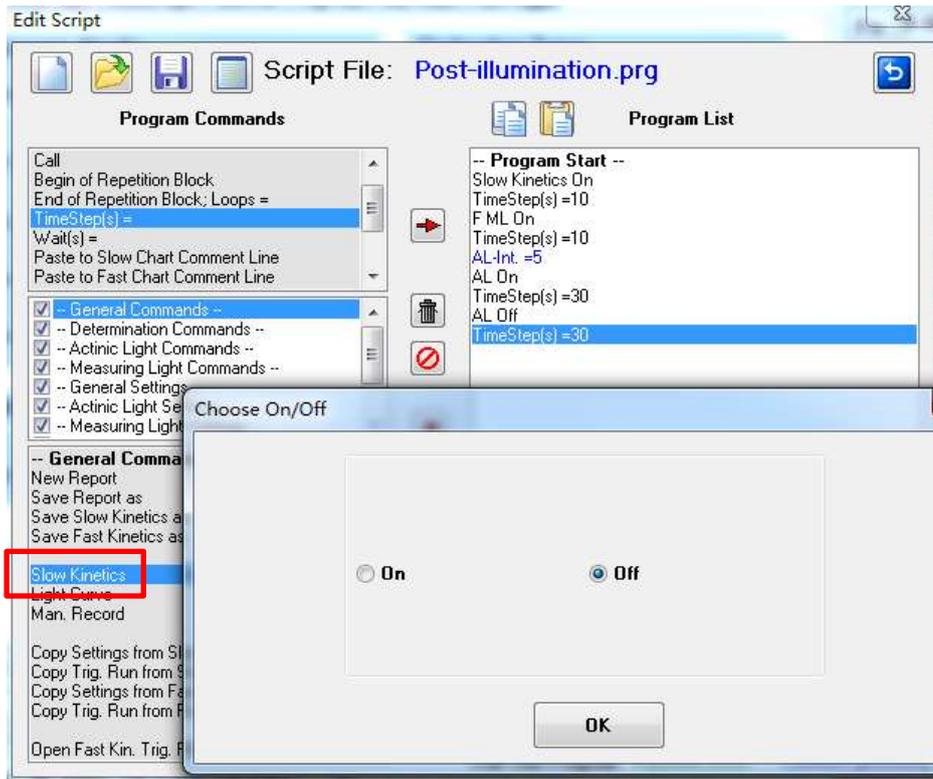


图 13 编辑关闭慢速动力学程序命令图示

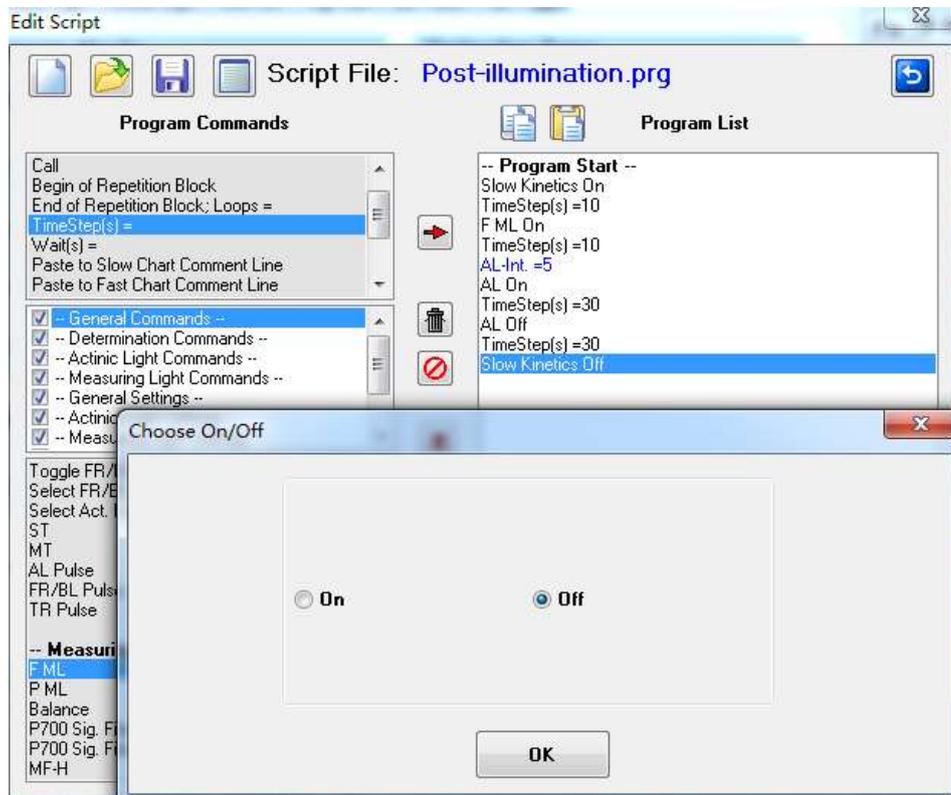


图 14 编辑关闭测量光命令图示

完成编写的蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线的脚本文件如图 15 所示，此时点击左上方软盘形状的保存按钮，将脚本文件保存至电脑中。点击右上角返回按钮，返回主菜单。

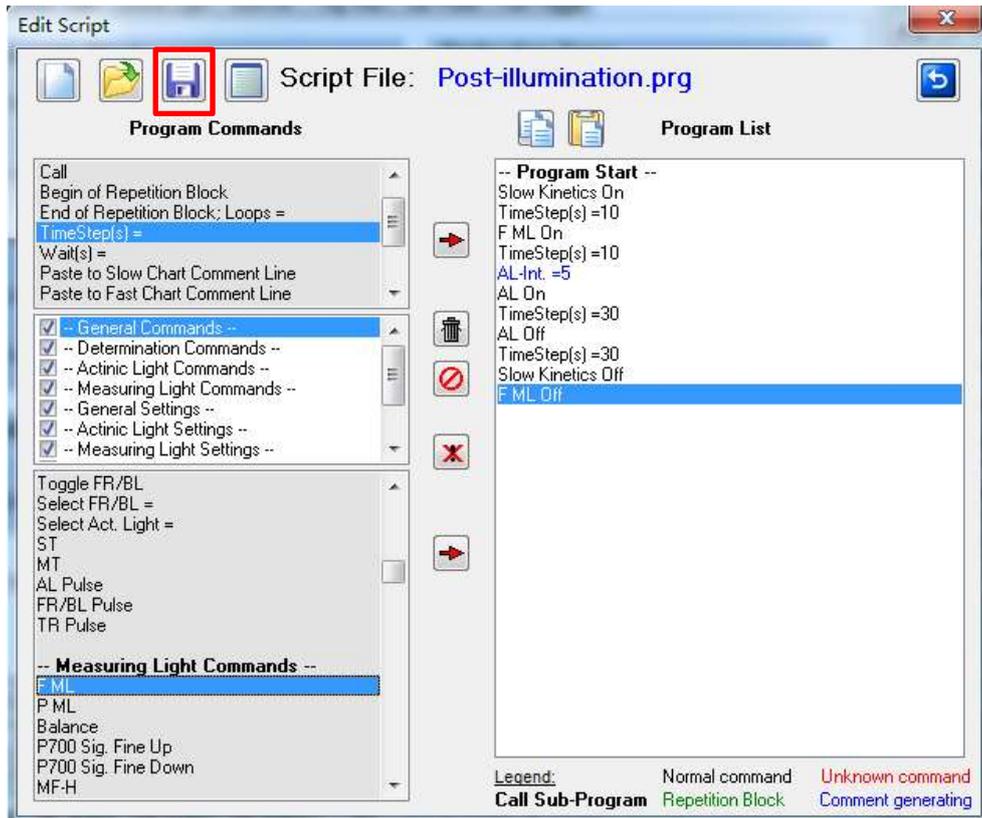


图 15 蓝藻光化光关闭后荧光瞬时上升曲线脚本文件程序图示

返回主菜单后，点击右下方 Script 中的“Run”按钮，即可启动该脚本文件，仪器可自动测量光化光关闭后荧光瞬时上升曲线，如图 16 所示。人们可以从 Slow Kinetics 界面中查看曲线运行状况。



图 16 启动脚本文件图示

曲线测量完成后，人们可以运用图 2 的相同方法储存曲线，用于数据处理。下次使用该曲线时，只需点击 Script 中的“Load”按钮，调用已经存好的“Post-illumination”脚本文件，返回主菜单，点击“Run”即可测量光化光关闭后的荧光瞬时上升曲线。

3. 结论

利用 Dual-PAM-100 中的脚本编辑功能，可以编辑出例如光化光关闭后荧光瞬时上升曲线等非标准化曲线，用于深入研究不同材料的各种生理指标，以满足不同的科研需求。该功能不仅存在于 Dual-PAM-100 中，同时也存在于 PAM-2500 和 Multi-Color-PAM 中，使用方法类似，以便于适应不同实验材料和实验条件的拓展测量。

参考文献：

[1] Y. Munekage, M. Hashimoto, C. Miyake et al., Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 2004, Vol 429, 579-582.