

NÖVÉNYI MINTÁK FLUORESCENCIA LECSENGÉSI IDEJÉNEK VIZSGÁLATAI

Lenk Sándor¹, Sági-Kazár Máté², Illés Levente¹, Solymosi Katalin³, Solti Ádám², Barócsi Attila¹

¹*Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Atomfizika Tanszék, 1111 Budapest
Műegyetem rakpart 3*

²*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék, 1117
Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C*

³*Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növény szerkezet-tani Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter
sétány 1/C*

DOI: <https://doi.org/10.14232/kvantumelektronika.9.24>

1. Növényélettani bevezető

A szintestek (vagy plasztiszok) két burokmembránnal határolt és belső membránrendszerrel rendelkező sejtservecskék, amelyek számos típusa található változatos formában és funkcióval a növények sejtjeiben [1]. Általánosságban a sejt felépítő jellegű (anabolikus), energia-befektetést igénylő anyagcsere-folyamataiban vesznek részt. A zöld növényekben hétféle szintestet szokás elkülöníteni. Ezek közül a legismertebb a fotoszintézis folyamatáért felelős zöld szintest (kloroplasztisz), amely belsejében helyezkedik el a belső burokmembrán befűződéséből kialakult, magányos membrán zsákokból (ún. tilakoidokból) és korongszerűen egymásra rétegződött tilakoidokból álló komplex membránrendszer, amelybe a fotoszintetikus apparátus beágyazódik. Ennek fontos elemei a fényvel kölcsönható pigment-molekulákat tartalmazó ún. fotorendszerek, valamint a fotoszintézishez szükséges enzimek. A fotorendszeren belül a fény energiájának összegyűjtését végző fénybegyűjtő, valamint továbbításáért felelős antenna molekulákat képező klorofill-molekulák tömegei veszik körbe a reakcióközpontot, ami gerjesztett elektron formájában csapdázza az energiát a további fotokémiai reakciókhoz.

Más szintestektől eltérően a jellemzően kicsi, kezdetleges belső membránnal rendelkező proplasztiszok az osztódószövetekre jellemzőek, és különféle belső és külső fejlődési szignálok hatására belőlük indul fejlődésnek a többi szintest típus. Fény hatására a földfeletti, fotoszintetizáló szövetekben a proplasztiszok kloroplasztisszá alakulnak. Fény hiányában azonban úgynevezett etioplasztiszok differenciálódnak, melyek klorofill-molekulákat egyáltalán nem és a fotoszintézishez szükséges enzimek közül is csak néhányat tartalmaznak [2].

Ez azzal függ össze, hogy a klorofilok bioszintézise a zárva termő növényekben fényfüggő folyamat, melyet a protoklorofillid-oxidoreduktáz enzim katalizál. Fény hiányában a protoklorofillid-klorofillid átalakulás nem megy végbe, klorofilok nem szintetizálódnak, és a fotoszintetikus apparátus felépítésében fontos pigment-protein komplexek a tilakoid-membránokba nem épülhetnek be. Ugyanakkor jellegzetes belső membránrendszerük átrendeződésének köszönhetően megvilágítás hatására az etioplasztiszok gyorsan működőképes kloroplasztisszá tudnak alakulni.

A fotoszintetikus rendszerek működése vizsgálatának egyik módja különböző gerjesztési protokollok alkalmazása mellett a fluoreszcencia válaszjel regisztrálása, majd ebből leggyakrabban arányszámok segítségével a fotokémiai és nem fotokémiai kvantumhatásfokok becslése. Az egyik leggyakrabban

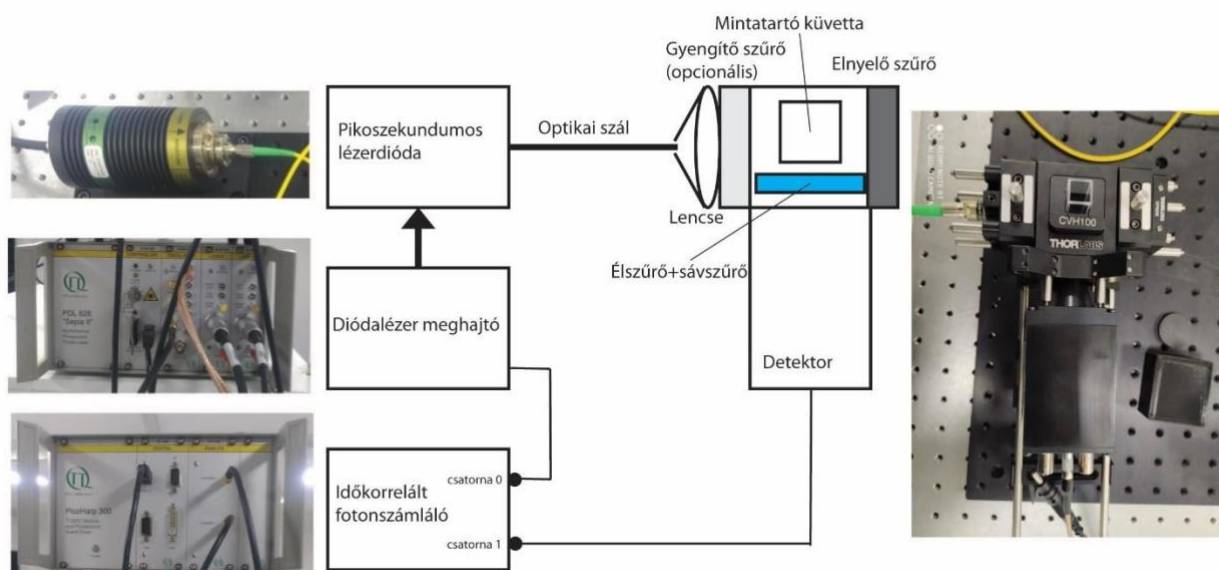
használt mérési protokoll az impulzus amplitúdó modulált (PAM, pulse amplitude modulation) technika [3]. Ennek során a minta fénykörnyezetét állandó, fotoszintetikusan aktív ('aktinikus') megvilágítással, valamint nagy ('telítő') fényimpulzusokkal több nagyságrend dinamikával változtatjuk, melynek hatását egy állandó, de kis fotonszámú, adott (kHz–MHz) frekvenciájú mérőjelre kapott, a mérőjel periódusánál nagyobb (μs – ms) időállandókat felbontani képes változó fluoreszcencia válasz formájában detektáljuk. A módszer segítségével a fotorendszereket igen eltérő növényfiziológiai állapotban tesztelhetjük, ami lehetőséget biztosít arra, hogy a fotokémiai és nem fotokémiai fényhasznosításról megállapításokat tegyünk. A módszer hátránya az, hogy például a fluoreszcencia-jel csökkenéssel válaszolhat a fluoróforok számának csökkenésére és egy megnövekedett alternatív energiafelhasználási (kioltási) mechanizmusra egyaránt [4]. Egy másik fluoreszcencia alapú méréstechnika – a fluoreszcencia lecsengési idők vizsgálata – segíthet a különböző állapotú működőképes rendszerekben különbséget tenni.

A fluoreszcencia lecsengési idők mérésénél ugyanis nagy (néhány 10 MHz) ismétlési frekvenciával rövid – ideális esetben – Dirac-delta-szerű gerjesztést adunk a vizsgált mintára és az erre érkező fluoreszcencia válaszjelet nagy időfelbontással regisztráljuk. A mérésünk eredménye a Dirac-impulzust követő fluoreszcencia jel intenzitásának csökkenése. Ez az intenzitás-csökkenés függ az adott anyagra és azt körülvevő közegre jellemző természetes fluoreszcencia élettartamtól, valamint a nem-sugárzásos átmeneti mechanizmusok kioltási rátájától.

2. Méréstechnikai alapok és eszközök

A fluoreszcencia lecsengési idők többnyire a 'ns', vagy az alatti időtartományba esnek. Vizsgálatukhoz így a mérni kívánt lecsengési időknél rövidebb impulzusokat szolgáltató gerjesztő forrásokra van szükség. A megoldást esetünkben az LDH-P-C-650 (PicoQuant) szálba csatolt lézerdíóda jelenti, amely adott lézerteljesítmény kimenet esetén $\tau_{\text{FWHM}} < 100$ ps hosszú impulzusokat szolgáltat. A mérni kívánt fluoreszcencia lecsengési időállandók hasonlóak ehhez az impulzushosszhoz, amihez 10 ps vagy az alatti időfelbontás szükséges. Ilyen időfelbontásra az időkorrelált egyfoton detektálás (Time Correlated Single Photon Counting – TCSPC) az egyik elfogadott megoldás. A módszer lényege, hogy a mintát 10 MHz nagyságrendű ismétlődési frekvenciával fényimpulzusokkal gerjesztjük és mérjük a gerjesztés és mintából jövő első foton között eltelt időt. A feldolgozó rendszer a gyakorlatban nagyszámú (esetünkben 2^{16}) időcsatornát kezel, melyek időintervalluma rövid (esetünkben akár 4 ps is lehet). Minden sikeresen detektált fotonnál valamelyik időcsatorna értéke +1-gyel növekszik. A mérés eredménye detektálási gyakoriság az eltelt idő függvényében. Vagyis több stopperóra-szerű mérést felösszegezve határozzuk meg a fluoreszcencia élettartamát. A mért eredmények a gyakorlatban általában egy vagy több exponenciális függvény összegeként írhatók le. Kísérletünkben MPD-100-CTB (PicoQuant) egyfoton detektort használtunk PicoHarp 300 (PicoQuant) TCSPC elektronikával. A mérési elrendezést az 1. ábra mutatja.

Megjegyzendő, hogy egy (általunk itt nem alkalmazott) alternatív módszer a fluoreszcencia élettartam vizsgálatára egyrészt a fázisérzékeny detektálás alkalmazása, amikor a mintát modulált fényvel gerjesztve az időállandókat a fázisban eltolt és amplitúdóban modulált fluoreszcencia-jelből számoljuk. Másrészt további lehetőség a molekuláris folyamatok direkt vizsgálatára a lecsengési idők ultrafinom felbontása femtoszekundumos spektroszkópiával.



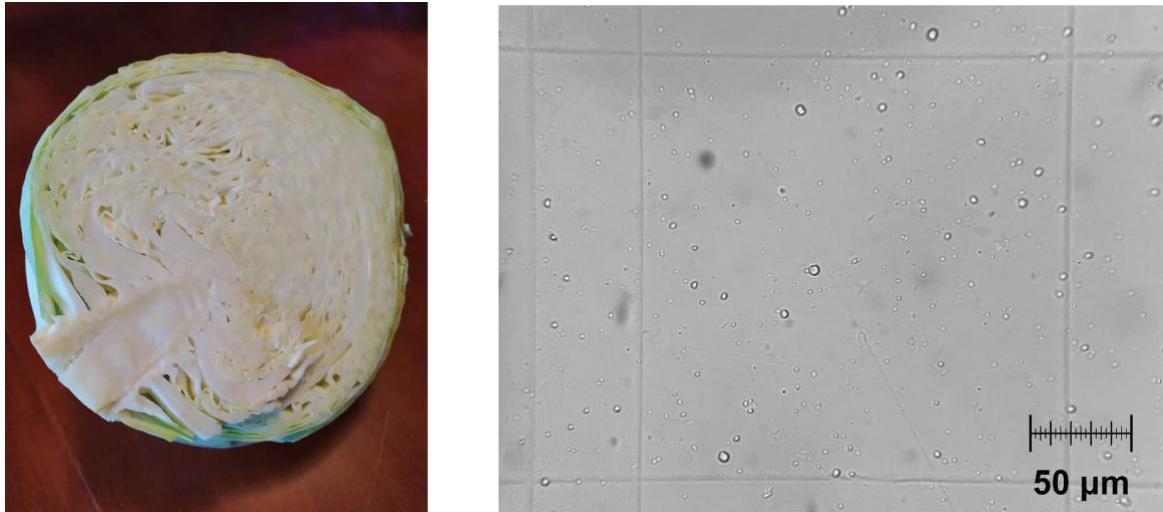
1. ábra

A megvalósított mérési elrendezés sematikus ábrája kiegészítve a főbb elemekről készült fotókkal.

A diódalézerünk fénye egy kollimátor lencsével ellátott optikai szálon keresztül jut a mintartóba. A diódalézer impulzushossza a lézerteljesítmény függvényében változik. Az impulzushossz és alak optimumát az elérhető maximális fényintenzitás 50%-ánál találtuk. Az időkorrelált mérés technika sajátossága, hogy legfeljebb a gerjesztő fotonok 5%-áról detektálhatunk emittált fluoreszcenciát. Ha ennél gyakrabban érkezik fluoreszcencia-foton a detektorra, akkor az a mérés szisztematikus hibáját eredményezi az úgynevezett 'pile-up' (felhalmozódás) jelenségén keresztül. Erősen fluoreszkáló mintáknál így a gerjesztő fény csökkentésére lehet szükség, amely lehetőségre a mérési elrendezésbe egy gyengítő szűrőt terveztünk. A detektorba a fluoreszcencia fényen kívül a gerjesztő jel is beszóródhat. A (655 nm-es) gerjesztő és a mérni kívánt (~690-750 nm tartományba eső) fluoreszcencia jeleket spektrálisan optikai szűrőkkel választjuk szét. Kevésbé fluoreszkáló mintáknál a fluoreszcencia fény akár több nagyságrenddel kisebb lehet a gerjesztő forrás szórt fényénél. Ezért egy optikai élszűrő (Thorlabs FGB25) és egy sávszűrő (Semrock 708/75) kombinált alkalmazására van szükség.

3. Előzetes eredmények

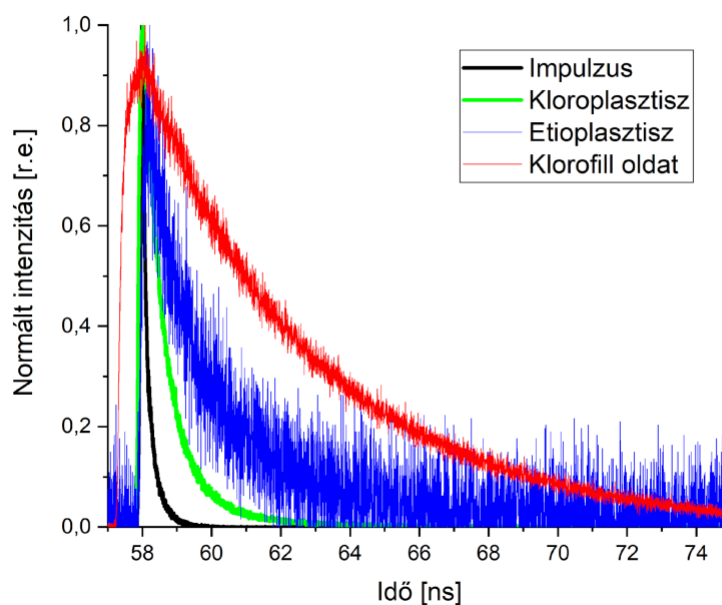
A kísérleti összeállításunkat fejeskaposztából (*Brassica oleracea* convar. capitata var. alba, 2. ábra bal oldala) izolált, fotoszintetikus működésre kész kloroplastszokkal, valamint gátolt működésű izolált etioplastszokkal (2. ábra jobb oldala), és fotoszintetikus működést nem mutató, acetonnal oldott klorofill oldattal teszteltük.



2. ábra

Bal oldalt: fotó egy fejes káposztáról az izolálás megkezdése előtt, jobb oldalt: optikai mikroszkópos felvétel fejeskáposztából izolált etioplasztiszokról

A 3. ábrán a mért fluoreszcencia lecsengési időket egyre normálva, lineáris skálán mutatjuk be, a mérési eredmények a vártnak megfelelő eredményt szolgáltattak. A kloroplasztiszoknál a fényenergia igen jelentős részben fotokémiai úton hasznosul, ami miatt a fluoreszcencia lecsengési idő lerövidül. Ezzel szemben a korlátozott fotoszintetikus működésű etioplasztisznál a fluoreszcencia lecsengési idő lényegesen hosszabb, míg a fotoszintetikus működést nem mutató acetanban oldott klorofill mintánál a leghosszabb. Az etioplasztisz mintánál szükséges mérési idő lényegesen nagyobb volt és a jel/zaj viszony is rosszabbnak bizonyult. Ennek oka részben az etioplasztisz minta kisebb organellum száma, jóval alacsonyabb pigmenttartalma lehetett.



3. ábra

A készülék válasz függvény (fekete), a mért fluoreszcencia lecsengési ideje egy kloroplasztisz mintának (zöld), egy etioplasztisz mintának (kék) és egy klorofill oldatnak (piros)

4. Összefoglalás

Mérési elrendezést hoztunk létre folyadékban elegyített, 655 nm-en gerjeszhető növényi minták fluoreszcencia lecsengési idejének vizsgálatára. Kísérleteket kezdtünk különböző fotoszintetikus működést mutató növényi mintákkal. Az optimális fotoszintetikus működést mutató kloroplasztiszoknál rövidebb, míg a fotoszintetikusan nem aktív etioplasztiszoknál hosszabb fluoreszcencia lecsengési időket találtunk.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alap támogatta a Nemzeti Kiválósági Program keretében, a “Kvantumbitek előállítása, megosztása és kvantuminformációs hálózatok fejlesztése” című, 2017-1.2.1-NKP-2017-00001. számú projekt részeként, valamint az Új Nemzeti Kiválósági Program keretében, az “Etioplasztiszok vastranszport mechanizmusainak molekuláris vizsgálata” című, ÚNKP-20-3-I-ELTE-862 azonosítójú projekt részeként.

Irodalom

- [1] R.R. Wise, “Plastids: The Anabolic Factories of Plant Cells”, in: R.A. Bradshaw and P.D. Stahl (eds.), *Encyclopedia of Cell Biology*, **2**, 324–330, (Waltham, MA: Academic Press, 2016)
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20030-8>
- [2] R.D. Willows, „Chlorophyll synthesis”, in: R.R. Wise and J.K. Hooper (eds.), *The Structure and Function of Plastids*, pp. 295–313, (Amsterdam: Springer, 2006)
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4061-0>
- [3] U. Schreiber, U. Schliwa and W. Bilger Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter *Photosynth. Res.* **10**, 51–62 (1986)
<https://doi.org/10.1007/BF00024185>
- [4] J. Zaks, K. Amarnath, E. J. Sylak-Glassman, G. R. Fleming Models and measurements of energy-dependent quenching *Photosynth. Res.* **116**, 389–409 (2013)
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9857-7>