



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Fluoreszcencia lecsengési kinetikák in vivo mérésére alkalmas mérőberendezés fejlesztése és alkalmazása

Illés Levente

Témavezető:

Dr. Lenk Sándor
egyetemi docens
BME Fizikai Intézet
Atomfizika Tanszék

BME
2021

Kivonat

A BME Atomfizika Tanszéke pikoszekundumos lézerforrással, egyfoton detektorral és időkorrelált mérés technikával levélmintákból izolált klorofill tartalmú folyadék minták fluoreszcencia lecsengésének mérésére alkalmas mérési elrendezéssel rendelkezett. A tudományos diákköri munkám során olyan mérőfejet terveztem és valósítottam meg, amellyel könnyen és praktikusán mérhetjük a levélminták fluoreszcencia lecsengési idejét. Az új mérőberendezéssel egyrészt kiválthatjuk a komplex és időigényes biológiai minta előkészítési lépéseket, másrészt lehetőség nyílik a levélminták differenciáltabb vizsgálatára. Az elkészült mérőeszközzel kelkáposzta leveleken tesztméréseket végeztem. A mérési eredményeimet összevettem ugyanazon növényből készített izolált minták fluoreszcencia lecsengésével.

Tartalomjegyzék

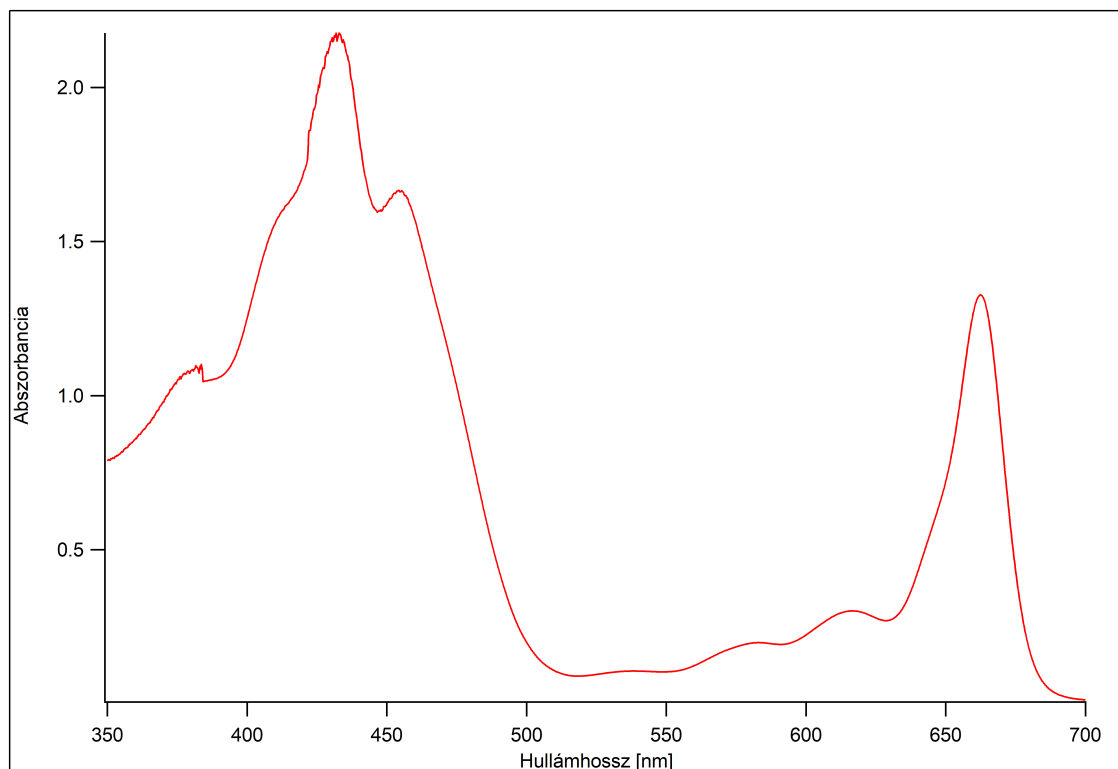
1. Elméleti bevezető	3
1.1. Fotolumineszcencia	3
1.2. Növényi minták fluoreszcencia indukciós kinetikájának vizsgálata	4
1.3. Növényi minták fluoreszcencia lecsengési idejének mérése	5
1.4. Dekonvolúció és rekonvolúció	6
2. Célkitűzés	8
3. Eredmények	8
3.1. Mérőberendezés főbb elemei és a vizsgált mintanövény	8
3.2. Konceptcionális tervezés	9
3.3. Kész mintatartó	11
3.3.1. 3D nyomtatás	14
3.4. Mérések és mérésiértékelés	15
4. Összefoglalás	22
5. Köszönetnyilvánítás	23

1. Elméleti bevezető

1.1. Fotolumineszcencia

Anyagminták kvalitatív vizsgálatához számtalan módszer áll rendelkezésünkre, melyekkel roncsolás nélkül is hasznos következtetéseket vonhatunk le a mintával kapcsolatban. Kézenfekvő megoldás például az anyagok optikai tulajdonságait kihasználni ezen mérések során. A fotolumineszcencia azon jelenségek gyűjtőneve, amely során jellemzően látható fény, vagy ultraibolya gerjesztés hatására egy molekula, vagy molekulacsoport magasabb energiaállapotba kerül, és a fényemisszóval kísért relaxáció során a gerjesztéshez képest nagyobb hullámhosszú fotont bocsájt ki. A jelenséget két kategóriába szoktuk csoportosítani; a fluoreszcenciára, illetve a foszforeszcenciára. A kettő közti legszembevetőbb különbség a fotonabszorpció és emisszió között eltelt idő. Míg a fluoreszcencia a másodperc tört része alatt valósul meg (akár 10^{-6} s vagy kevesebb), addig a foszforeszcencia percekig, vagy órákig is megfigyelhető. Az időállandók közti nagyságrendi különbségsnek kvantummechanikai oka van.

Az abszorpciós spektrum megadja, hogy egy anyag milyen hullámhosszú fotonokat képes elnyelni, amely tulajdonsága összefüggésbe hozható azzal, hogy a fotolumineszcencia milyen gerjesztéssel valósulhat meg. Az abszorpciós spektrum továbbá arra vonatkozó információt is adhat, hogy egy számunkra kérdéses molekula vagy molekulacsoport milyen mennyiségben van jelen egy mintában. Egy ilyen spektrum meghatározása spektrométerrel történik, amelyről a 1. ábrán láthatunk egy konkrét példát egy klorofill tartalmú oldatra.



1. ábra. Klorofill oldat abszorpciós spektruma [1]

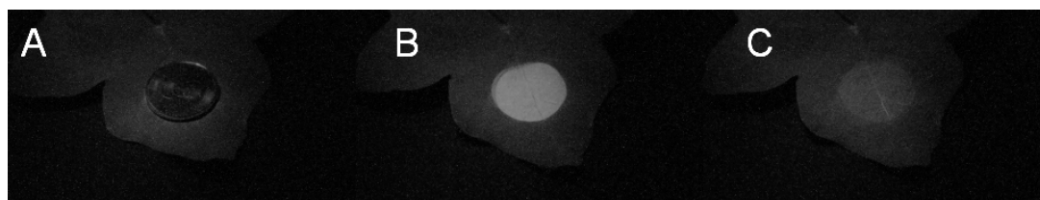
Jelenlegi munkám során a fluoreszcencia jelenségkörére szorítkoztam, azon belül is növényi mintákon végeztem méréseket.

1.2. Növényi minták fluoreszcencia indukciós kinetikájának vizsgálata

A fotoszintézis az a biológiai folyamat, melyben az élőlények a napfény energiáját felhasználva szervetlen anyagból szerves anyagot hoznak létre. Ez a folyamat nagyon komplex, a kutatóknak a mai napig sem sikerült teljes mértékben feltérképezniük. Példaként említeném meg, hogy az együttműködő partnereink az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén a fotoszintetikus elektron-transzportláncon belül a vas-transzport mechanizmusokat vizsgálják. Kevésbé ismert az a tény, hogy a fotoszintetikus elektron-transzportlánc egységeinek a felépítéséhez összesen 22 vas-atomra van szükség [2].

A folyamat biológiájának részletes leírása nem témája a dolgozatomnak, ugyanis a munkám célja mindössze az, hogy egy olyan mérőberendezést fejlesszek ki, amely a fotoszintetikus folyamatok vizsgálatára új, releváns információkat szolgáltat. Jelen munkámat megelőző, folyadékminták vizsgálatára alkalmas mérési elrendezésünkkel, a növénybiológus kollégákkal közösen folytattunk szisztematikus kutatásokat, melyek eredményeit konferenciákon mutattuk be [3] [4], illetve egy folyóirat-publikációnk az év végéig beadásra kerül [5].

A fluoreszcenciafény mérésével tehát egy komplementer folyamatot vizsgálunk, melyből komplex ún. fluoreszcencia indukciós mérési protokollokkal a fotoszintetikus működést mérhetjük [6]. Az említett fluoreszcencia indukciós protokollok alapját a Kautsky effektus adja [7]. Ha a levél percekig el van zárva a fénytől, a fotoszintézis folyamata nem tud megvalósulni. Ha viszont sötétből újból fényhatásnak tesszük ki, akkor a folyamat elindulásához időre van szükség. Ez idő alatt a felesleges energiát fluoreszcenciafény formájában sugározza ki. Néhány perc szükséges ahhoz, hogy a fotoszintézis ugyan olyan mértékben legyen jelen, mint a sötétbentartás előtt. Ezt szemlélteti a 2. ábra, ahol olyan szűrőkön keresztül figyelhetjük meg a jelenséget, amely csak a fluoreszcencia-fotonok hullámhosszán enged át, a sötétítést pedig egy érme biztosítja.



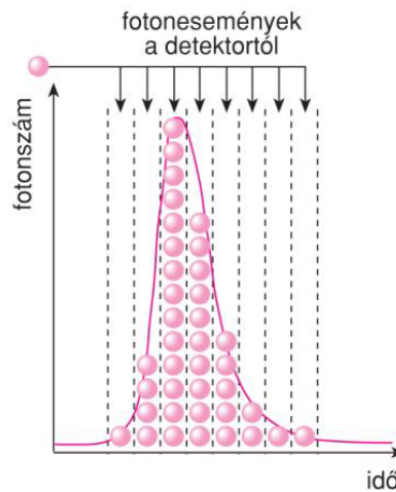
2. ábra. Kautsky effektus a borostyánlevelel A: Levél megvilágítva rajta egy pénzérmével, B: Levél megvilágítva pénzérme nélkül, C: Levél az érme levétele után néhány perccel [8]

Ezt az alapjelenséget fejlesztették tovább számtalan fluoreszcencián alapuló mérési eljárásba, mérőberendezésbe [9].

1.3. Növényi minták fluoreszcencia lecsengési idejének mérése

Szemben a fluoreszcencia indukciós kinetikával a mi módszerünknel a növényt nem kvázi folytonos gerjesztés mellett vizsgáljuk és az arra kapott válasz jelet folyamatosan rögzítjük, hanem rövid gerjesztések (≈ 100 ps) mellett a fluoreszcencia lecsengést kívánjuk nagyon rövid időskálán rögzíteni. Ettől a módszertől azt reméljük, hogy a fotoszintetikus elektron-transzport lánc elemeiről, például az antennarendszer meglétéről kapunk információt, melyből a fotoszintetikus működés intaktságára is tudunk következtetni [10] [11].

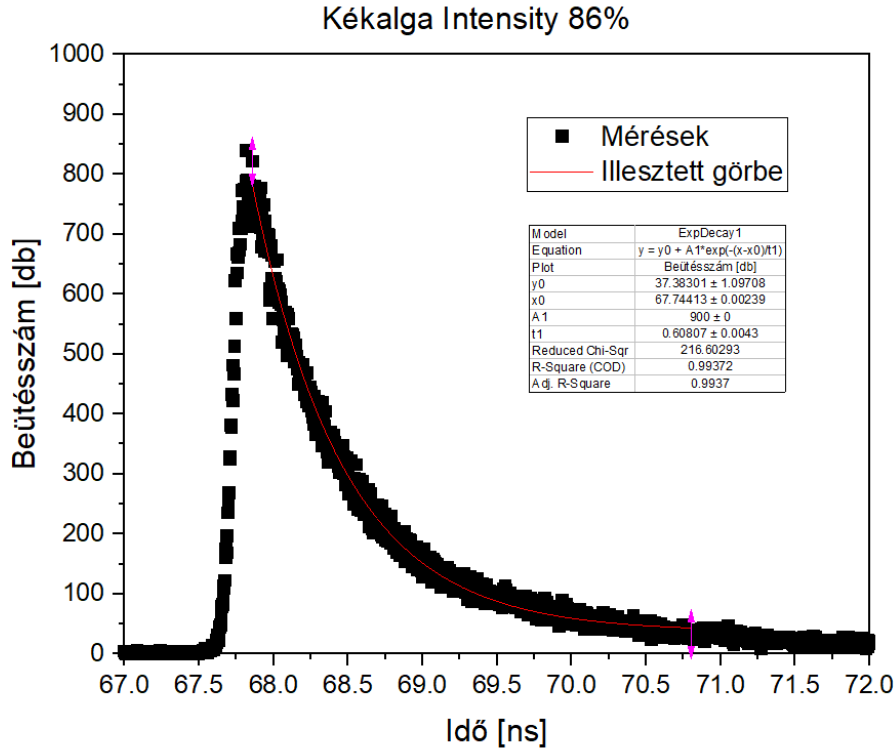
A feladatnak azonban vannak nehézségei, ugyanis ahogy azt a korábbi fejezetekben írtam, a legerjesztődés folyamata nanoszekundumos időskálán mozog. Erre a problémára nyújt megoldást az időkorrelált mérés technika. Ennek lényege, hogy a mintát nagy frekvenciával, rövid fényimpulzusokkal gerjesztjük, majd a gerjesztés és a fluoreszcencia közti időt mérjük. A beérkezett fotoneseményeket időbélyeggel látjuk el, azokat időrekesekben akumuláljuk, majd ebből hisztogramot készítünk. Ezzel valójában a gerjesztett molekulák számának időbeli fogyását határozhatjuk meg. Ha az eltelt idő-beérkezett foton-számból grafikont készítünk, a felfutást követően egy exponenciálisan lecsengő görbét kapunk (3. ábra).



3. ábra. Gerjesztett molekulák időbeli változását szemléltető ábra [15]

Ha egy ilyen grafikonra (1) egyenlet alakú exponenciális függvényt illesztünk, az illesztési paramétereiből megkapható az általunk keresett időállandó (4. ábra).

$$f(x) = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{(x-x_0)}{t_1}} \quad (1)$$



4. ábra. Kékalgán mért lecsengés illesztett exponenciális görbével [1]

Ekkor az exponensben szereplő (4. ábrán t_1) paraméter. Az eredményünk pontosságát ekkor az illesztés pontossága határozza meg.

A szakdolgozatom során azt tapasztaltam, hogy az illesztések sokszor csak nagy hibával végezhetőek el, illetve látszik az illesztett görbén, hogy jellegre is eltér a grafikontól. Ennek okát részben az okozza, hogy több fluoreszcens jelenség is lejátszódhat az anyagban más időállandókkal, emiatt a mért görbe több exponenciális függvény összegeként állhat elő. A másik, nehezebben kiküszöbölhető problémát az okozza, hogy a mért jelben benne van a rendszer válaszidő függvénye, hiszen a gerjesztőfény impulzushossza (≈ 0.1 ns) esetünkben összemérhető a meghatározni kívánt fluoreszcencia élettartamokkal (≈ 0.5 ns - 3 ns).

1.4. Dekonvolúció és rekonvolúció

A keresett időállandók ns-os skálán mozognak, így az eredményes méréshez szükséges, hogy a gerjesztési impulzushossz ennél rövidebb legyen. A rendelkezésemre álló impulzuszórával a felépítéséből adódóan körülbelül száz pikoszekundumos impulzushosszúságú jelet bocsájt ki (erre vonatkozó méréseket a korábbi munkám során végeztem [1]). Ideális esetben a gerjesztés dirac-delta alakú, és a minta erre adott válaszát mérjük. A valóságban viszont a gerjesztési jelalaknak nem csak kiszélesedése van, hanem kissé szabálytalan alakja is. Az általunk mért lecsengési görbe ezért valójában a rendszer válaszfüggvényének (IRF, Instrument Response Function) és a tisztán fluoreszcencia lecsengéséből adódó görbének a konvolúciójaként áll elő.

A rendszer válaszidejének kiszűrését a mért adatsorból többféleképpen is megvalósíthatjuk. Az egyik megoldás a dekonvolúció, amely során megmérjük a rendszer válaszidejét is, és a két adatsorból létrehozunk egy harmadikat, amely már csak tisztán fluoreszcens lecsengést tartalmaz. Ezt el lehet érni például a konvolúciós szabályt kihasználva, mely szerint két függvény konvolúciója, a két függvény fourier transzformáltjának a szorzata.

$$f(t) * g(t) = F(\omega) \cdot G(\omega) \quad (2)$$

Ahol F és G a fourier transzformáltjai f és g függvénynek $*$ pedig a konvolúció műveletét jelöli. Ebből következik (3) egyenlet.

$$\frac{f(t) * g(t)}{G(\omega)} = F(\omega) \quad (3)$$

Ha úgy tekintjük hogy az általunk mért lecsengési adatsor $f * g$ diszkrét értékekkel, valamint az IRF diszkrét értékekkel a G függvény, akkor a dekonvolúció megoldható az impulzusválasz Fouriertranszformálásával, egy osztással és egy inverz Fouriertranszformációval. Ez azonban egy zajjal arányos hibát visz a számolásba, ami miatt nem érdemes ezt az eljárást alkalmazni.

Egy másik lehetséges eljárás az úgynevezett iteratív rekonvolúció, amely során az IRF adatsort egy általunk meghatározott függvénytípussal (pl.: exponenciális, két exponenciális összege, stb.) konvolválja, majd azt összeveti a mért lecsengési adatsorral. Az iteráció során addig változtatjuk a függvény paramétereit, amíg az a mért lecsengési adatsortól minimális eltérést mutat. A módszer egyik hátránya, hogy az eredményt befolyásolja az, hogy milyen alakú megoldást keresünk. A másik nehézség, hogy más megoldást kaphatunk attól függően, hogy milyen kezdeti paraméterekkel indítjuk el az iterációt. Ezek azonban kiküszöbölhetőek, ha nagyjából tisztában vagyunk azzal, hogy milyen fizikai jelenségek játszódtak le a mérés során és ettől függően választjuk meg a jelalakot és kezdeti paramétereit.

Az eljárás végén a függvény paramétereit adják az általunk keresett lecsengési időt, valamint a megoldásfüggvény és az IRF konvolúciójának a valós adatsortól való eltérése megmondja, hogy mennyire pontos az eredményünk. A rendelkezésemre álló program matematikailag a (4) egyenletben leírt eljárást valósítja meg.

$$\text{Dec}(t) = \left[\int_{-\infty}^t dt' [\text{IRF}(t - \text{Shift}_{\text{IRF}}) - \text{Bkgr}_{\text{IRF}}] \left[\sum_{i=1}^{n_{\text{Exp}}} A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \right] \right] + \text{Bkgr}_{\text{Dec}} \quad (4)$$

Ahol $\text{Dec}(t)$ az illesztett függvény, $\text{Shift}_{\text{IRF}}$ az IRF és a mért fogyás közti időeltolás, Bkgr_{IRF} az IRF időfüggetlen háttérzaja, A_i az i -edik komponens amplitúdója, τ_i az i -edik komponens lecsengési ideje és Bkgr_{Dec} a fogyás időfüggetlen háttérzaja. [12] alapján a kiértékelésre legalkalmasabb paraméter (5) összefüggés szerint számolandó.

$$\tau_{AvInt} = \frac{\sum_{i=1, I_i > 0}^{n_{Exp}} I_i \tau_i}{\sum_{i=1, I_i > 0}^{n_{Exp}} I_i} \quad (5)$$

Amelyben szereplő I_i mennyiséget (6) alapján számoljuk.

$$I_m = A_m \tau_m \quad (6)$$

2. Célkitűzés

A fent említett időkorrelált mérés technikán alapuló mérési elrendezést hoztunk létre folyadék halmazállapotú, klorofill tartalmú minták vizsgálatára [szakdolgozat]. Az új mérési elrendezéssel szisztematikus kutatások folynak az ELTE Biológiai Intézetének kollégáival, melyek első eredményei már megmutatkoznak [3] [4]. A kutatások során a növényi mintákból a biológus kollégák fotoszintetikusán jól, vagy kevésbé jól működő szuszpenziókat izolálnak. Ez az izolálás több órát vesz igénybe, és nagy odafigyelést, szakértelmet igényel. A vizsgálni kívánt fotoszintetikus rendszerek azonban *in situ* a levélben is rendelkezésre állnak, a kibocsátott fluoreszcencia-fény közvetlenül a levélről is begyűjthető.

A kutatásom egyik célja egy olyan szilárd minta vizsgálatára alkalmas mintatartó létrehozása, amellyel képesek vagyunk időkorrelált mérés technika alkalmazásával közvetlenül a levélmintákon fluoreszcencia lecsengési időket mérni. Ezt a mérőfejet felhasználva kelkáposzta leveleken (mint teszt növények) teszt mérések végzése után az eredményeim összehasonlítom folyadékmintákon mért lecsengési időekkel, ezzel ellenőrizve azt, hogy ez a fajta mérési módszer mennyire bizonyul hatékonynak és konzisztensnek az eddigi tapasztalatokkal.

Céлом továbbá más, mérési adatok kiértékelésére alkalmas programok és módszerek vizsgálata. Ezen célok megvalósítása előrelépést jelenthet a fotoszintézis pontosabb megértésének terén.

3. Eredmények

3.1. Mérőberendezés főbb elemei és a vizsgált mintanövény

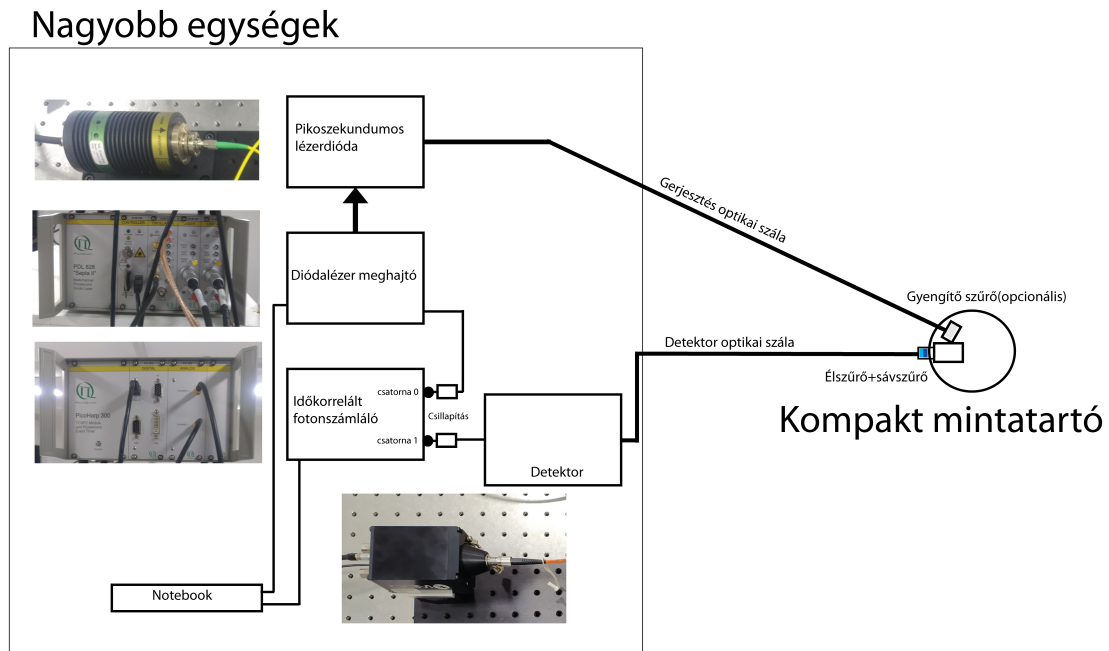
A mérések során rendelkezésemre állt egy PicoQuant LDH-P-C-650 típusú 650 nm-es hullámhosszúságon működő, szálbacsatolt, pikoszekundumos diódalézer, amellyel a gerjesztést végeztem. A detektáláshoz SPAD egyfoton detektort, valamint időkorrelált foton számláló elektronikát használtam. Ezen kívül a mérési összeállításoknak szerves részei voltak optikai szálak és különböző optomechatronikai elemek.

Méréseimhez modell növényként a kelkáposztát (*Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda*) választottam. Azért esett a választásunk erre a növényre, mert egy növényen belül található benne jól működő fotoszintetikus rendszereket tartalmazó kloroplasztiszokat, valamint akár teljes sötétségben nevelkedő, így a fotoszintetikus működés szempontjából zsákutcába került egyéb szintesteket. A választott növénynek az előnye például a fejes káposztával (*Brassica oleracea convar. capitata var. alba*) szemben az,

hogy ez a növény jellemzően nyitottabb. Így a fény a belső rétegekbe jobban eljut, vagyis az átmenet a kloroplasztiszok és az etioplasztiszok között fokozatosabb.

3.2. Konceptcionális tervezés

A mintatartó megtervezésének első lépése a specifikációk meghatározása, azaz hogy milyen követelményeknek feleljen meg. A kísérleti elrendezés blokkvázlata a 5. ábrán látható.



5. ábra. A kísérleti elrendezés blokkvázlata [13]

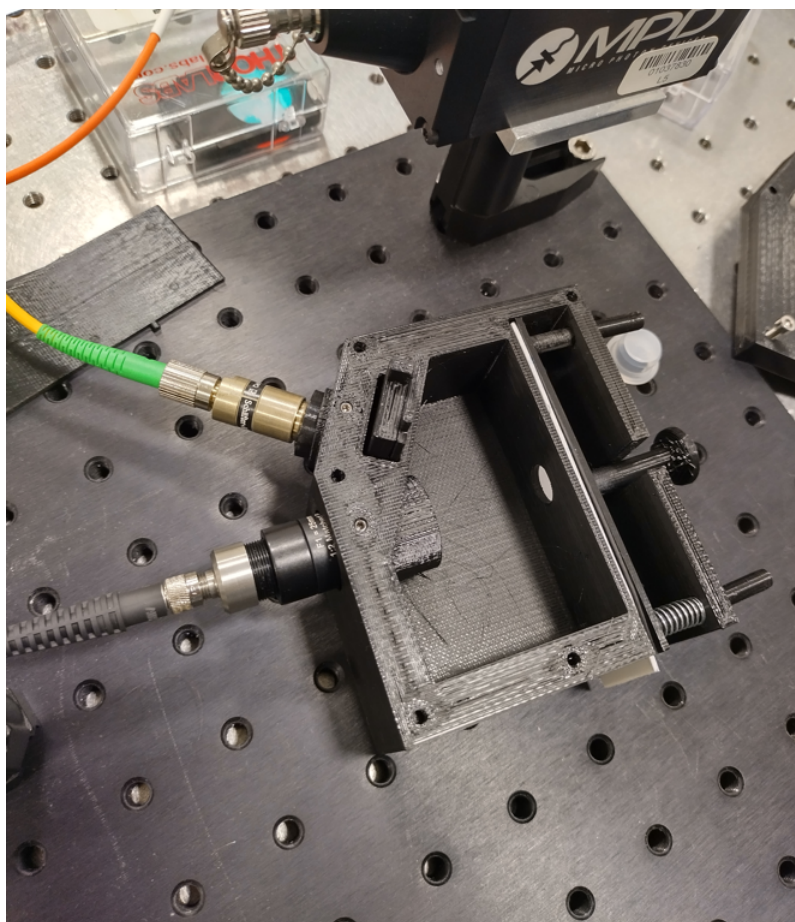
A lézer és a detektor összehangolásáért egy nagyobb, a mintatartótól elkülönülő vezérlőegység felel. Az időkorrelált mérés technika alkalmazásához a lézer gerjesztéséért felelős oszcillátor és a detektor pontos összehangolása kulcsfontosságú. A műszerek innen kapják a tápot is, és ezekkel a részegységekkel kommunikál a számítógép, amellyel a méréseket megvalósíthatjuk.

A lézertől optikai szálakkal vezettem a fényt egy kisebb részegységbe, amely maga a mintatartó. Ennek a módszernek az előnye, hogy a mintatartó könnyen, a nagyobb berendezésektől függetlenül mozgatható, vagyis a kialakított mérőberendezés már jelenlegi formájában is részben hordozható.

A kompakt tartó elkészítése és legyártása az én feladatomban volt, míg a fentebb taglalt lézer, detektor, vezérlőegység és az adatfeldolgozó programok rendelkezésemre álltak. A tartó készítésekor három főbb szempontot vettem figyelembe. Egyrészt a mérete legyen akkora, hogy kézben nagyjából elférjen, másrészt a minták és a különböző méréshez használt eszközök (pl.: optikai szűrő) könnyedén cserélhető legyen. A harmadik szempont pedig, hogy a lehető legkisebb háttérzaj mellett a lehető legtöbb, számomra releváns

fluoreszcenciajelet detektálhassam.

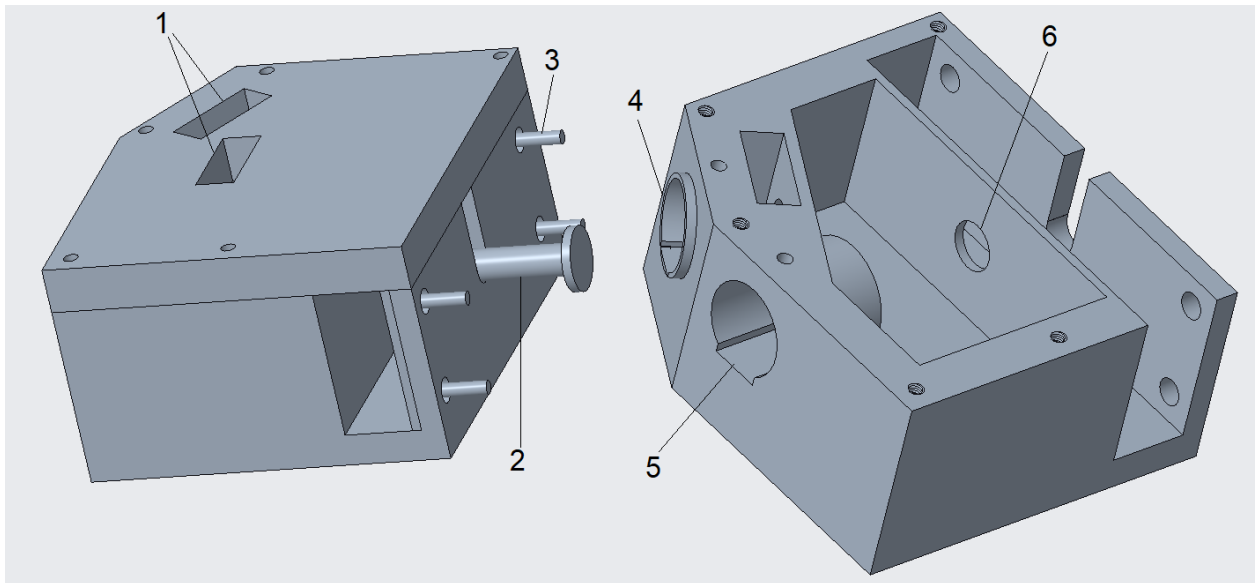
A detektált fluoreszcencia jelünk az esetek jelentős részében elég sok, ám nyilván a jel elnyomása könnyebben és pontosabban kivitelezhető feladat, mint kis intenzitású jel felerősítése. Az optikai elemek méretei ($\approx 20\text{mm}$ átmérő) és a kísérleti tapasztalatok alapján arra jutottam, hogy akkor kapjuk a legtöbb fluoreszcencia-fényt, ha a detektor merőlegesen néz a mintára, illetve a gerjesztés a merőlegeshez képest legfeljebb 30° -os szögben világítja meg azt. Itt nem részletezett számításaim során [14] meghatároztam, hogy készíthető-e a felsorolt specifikációknak megfelelő mintatartó, illetve ha igen, milyen geometriai paraméterekkel kivitelezhető. Ezeket a számolásokat alapul véve terveztem azt a mintatartót, amivel szilárd mintákon végeztem méréseket. A kész mintatartó a mérési elrendezésnek megfelelően a 6. ábrán látható.



6. ábra. Szilárd minták mérésére alkalmas mintatartó

3.3. Kész mintatartó

A legyártandó mintatartó modelljét a 7. ábrán tekinthetjük meg, melyet a Creo nevezetű programmal terveztem.



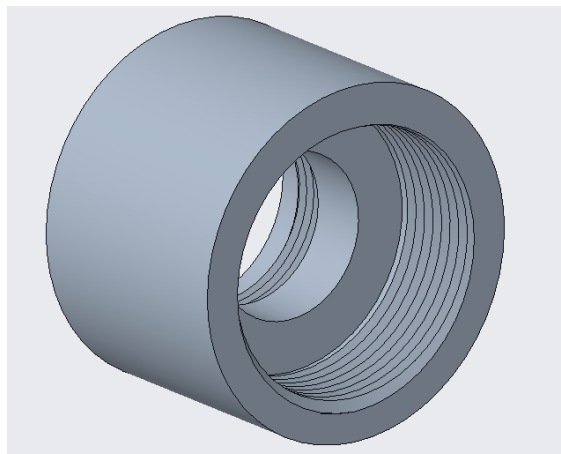
7. ábra. Mintatarató modellje

A tartó három különálló részből tevődik össze, melyből a legkomplexebb az alsó rész, ami a vázát adja az egésznek. Az alsó részt láthatjuk a 7. ábra jobb oldalán. Ennek tetejére jön a tetőrész, aminek feladata, hogy a mintát elzárja a külső fényforrásoktól, ezzel is csökkentve a zajt. A harmadik rész a szilárd minta rögzítéséhez szükséges, ami egy pármilliméter vastag lemezből és a rajta elhelyezkedő négy rögzítőrúdból (3), valamint egy vastagabb pozicionáló rúdból áll (2). A tetőrészen található öt csavarment az alsó- és felsőrész csavarokkal való rögzítését szolgálják, illetve a két nyílás (1) az optikai gyengítősűrőknek biztosít helyet. Ezekből az egyikkel (szükség esetén) a detektorba érkező fluoreszcenciafotonok száma csökkenthető, a másikkal pedig a lézerből kijövő fényintenzitás változtatható. A (4) és (5) számmal jelölt részek sorrendben a gerjesztőlézer és a detektor befogásának helyei. A (6) számmal található a szilárd minta gerjesztéséhez szükséges rész. Az ide tervezett rugó segítségével a műanyaglemez a falhoz nyomja a levélmintát, aminek egyik pozitív vonzata, hogy egy közel sem sík levél is aránylag kisimul a mérési keresztmetszeten.

Az ábrán (3) számmal jelölt rudakon rugók biztosítják, hogy a levelet a lemez fixen tartsa. Ez a rögzítési módszer a különböző levélvastagságok miatt indokolt. Előfordulhat az is, hogy a levél széltébe vagy hosszába nagyobb helyet igényel, mint amekkora maga a mintatartó. Emiatt látható az alsó rész oldalán egy kivágás. Amennyiben a levél minden irányba több helyet igényel, a tető opcionálisan levehető. Ilyenkor a helyére egy kisméretű tető kerül, ám emiatt a háttérzaj is kicsit megnő.

Azért, hogy a későbbiekben a mérőfejünket más (például kék hullámhosszú gerjesztéssel is) minél inkább csereszabattossá tegyük, az optikai szálon lévő kollimátor lencse és a min-

tartató közé egy adapterelemet terveztem. (8. ábra).



8. ábra. Lézer végén elhelyezkedő rögzítőelem modellje

A detektorba beérkező fény begyűjtése egy leképező optikán keresztül történik, melynek részegységeit a 9. ábrán tekinthetjük meg.



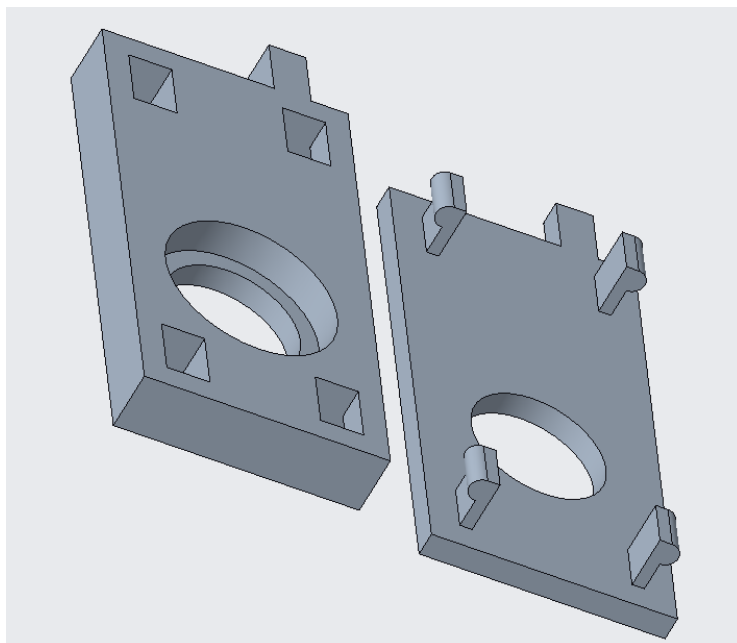
9. ábra. Detektorba csatlakozó optikai szálhoz tartozó leképező optika modellje

Az ábrán (a) betűvel jelölt rész maga a leképező optika, amely két domborúlencséből áll. A (b) jelű rész egy csatolóelem, amely a (c) jelű tubust és a leképezőoptikát kapcsolja össze. A (c) tubusban található egy felületeresztő élszűrő és egy sávszűrő, amelyek biztosítják, hogy csak a számunkra megfelelő hullámhosszúságú fluoreszcenciafényt engedjék át. Mivel a mérni kívánt fluoreszcenciafényt jól meghatározott hullámhossztartományba esik, ezen két szűrő megfelelő megválasztásával a tartóban szóródó gerjesztőfényt és a háttérből érkező fotonokat elkülönítettem a releváns információt tartalmazó fluoreszcenciafotonoktól. A (d) jelű részem (SMA csatlakozó) az optikai szál és a tubus csatolását valósította meg.

Mind a gerjesztő, mind a detektor oldalon sarkalatos kérdés volt a rögzítés, ugyanis a rendszer méreteinél a megvilágítás és a beérkező fotonmennyiség-érzékelés nagyon érzékeny a szögerekre. Mindkét esetben henger alakú rögzítőelemet kellett becsatolni a rendszerbe, így azt a megoldást találtam ki, hogy a hengereket egy ponton és egy sín mentén fogatom meg. A 7. ábra (4) és (5) részénél hengeres bemenet látható, melynél egy téglalap alakú kivágás biztosítja, hogy alulról két egyenes mentén legyen megfogva a henger. A harmadik megfogási pont egy hernyócsavarral történik, melynek szintén biztosítottam helyet a modell tervezésekor. A henger fix hossza és ez a három pontos befogás biztosítja, hogy bármelyik átszerelés után ugyan olyan pozícióba kerüljön a detektor és a lézer.

A korábbi méréseimből kiderült, hogy a lézer impulzushossza, illetve a gerjesztési jelalak függ a lézer intenzitásától, azaz a meghajtóáram értékétől. A legoptimálisabb jelalak a program által engedélyezett maximális feszültségnek a 90%-ánál valósult meg, emiatt a mérések során az ehhez tartozó intenzitásra szorítkoztam. A különböző minták azonban más mértékben gerjesztődnek, ami miatt az esetek túlnyomó részében túl sok fluoreszcenciafoton keletkezett. Ezt a problémát a gerjesztési- és detektoroldalon elhelyezett denzitásszűrőkkel orvosoltam. A rendszer méreteit úgy választottam meg, hogy mindkét oldalra 1-1 félcollos szűrőt helyezhessek el.

A saját kialakítású szűrőtartó tervezését a 10. ábrán láthatjuk.



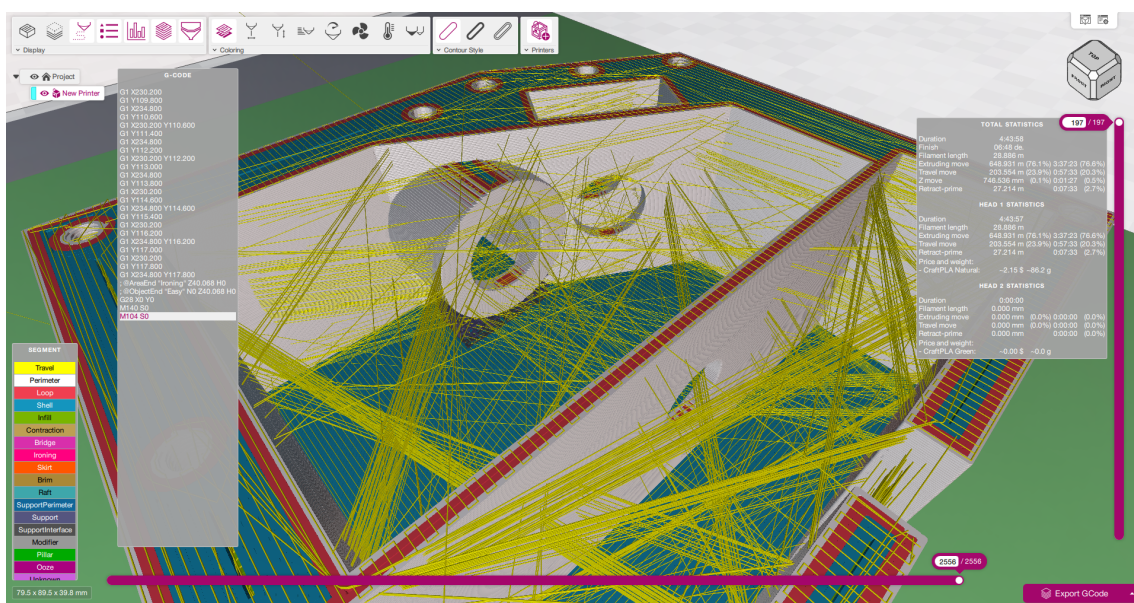
10. ábra. Optikai szűrőtartó modellje

A baloldali elem közepén lévő mélyedésbe behelyezhető a csupasz szűrő, amelyet a jobb oldalon lévő ellendarab akadályoz meg a kicsúszástól. Az ellendarabon lévő patentok a négy hézagba pattannak be, ezzel összekapcsolva a szűrőtartó két felét. A darabok

tetején látható pöckök a két fél szétszedését, valamint a tartóelemek mintatartóból való kiemelését szolgálják.

3.3.1. 3D nyomtatás

A mintatartó specifikációinak meghatározása és a modellezés után a legyártási folyamat következett. A legpraktikusabb kivitelezési módnak a 3 dimenziós nyomtatás bizonyult. Ennek a gyártási technológiának egyik előnye, hogy a modellezést követően gyorsan lehet belőle prototípust gyártani, valamint műszaki rajzot sem szükséges belőle készíteni. A tervezőprogramban készült modellt először olyan file-formátummá kell konvertálni, amelyet az adott nyomtatóeszköz tud értelmezni (g-code). Ehhez külön program kell, amely nyomtatónként eltérhet. Ezekben a konvertáló programokban állítható be, hogy a nyomtatás pontosan hogy bonyolódjon le (11. ábra).

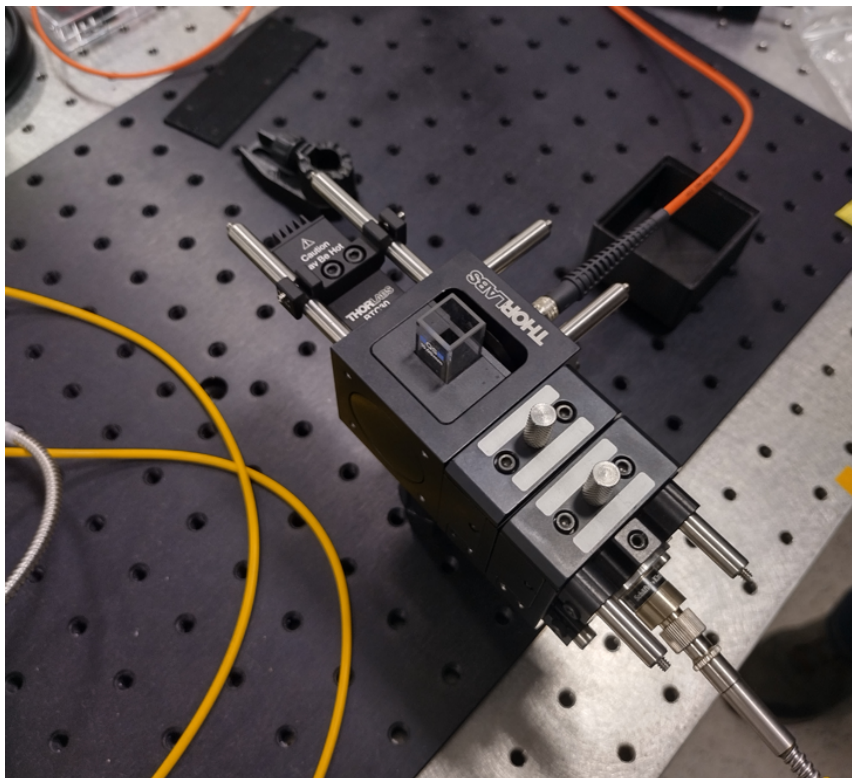


képest kisebb a pontossága (pártized milliméter). A másik hátrány, hogy mivel rétegenként építkezik, ezért nem minden geometria valósítható meg vele, mivel minden rétegnek kell alap, amire érkezik. Emiatt néha alátámasztásokat kell alkalmazni, hogy ne süllyedjen be. Ez a fentebb említett program segítségével történik és legtöbb esetben a tervező dönti el, hogy hova érdemes elhelyezni. A kitámasztások mindig eltávolíthatók a nyomtatást követő megmunkálással.

3.4. Mérések és méréskiértékelés

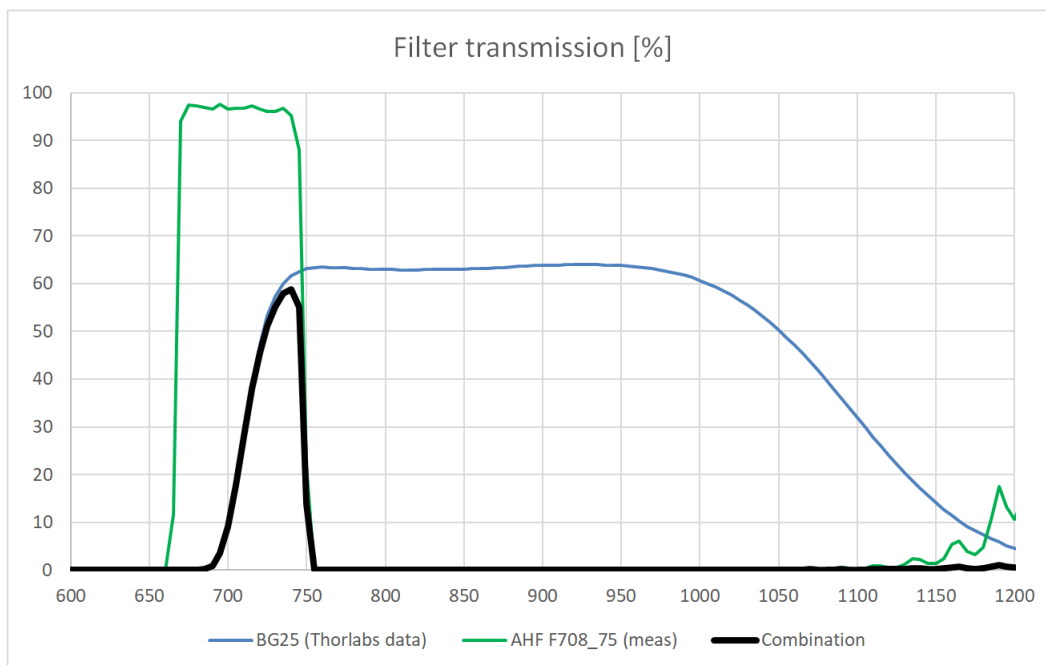
Az elkészült mintatartóval kelkáposztaleveleken végeztem fluoreszcencia élettartam méréseket, amely növény a rétegeltsége miatt előnyös a vizsgálataimhoz. A külső rétegek a környezeti fénynek jobban kitettek, bennük jól fotoszintetizáló kloroplasztiszok vannak. Ezzel szemben a belső rétegekbe nem, vagy alig jut fény, így abban "zsákutcába" került kloroplasztiszok, úgynevezett etioplasztiszok találhatóak. Ezek fotoszintetikus viselkedést kevésbé, vagy egyáltalán nem mutatnak.

A rétegeket 1-6-ig számoztam be, amelyből az 1-es számú a legkülső réteg és befelé haladva növekszik a rétegek számozása. A levélmintákat azonban nem csak ezzel a módszerrel vizsgáltam. Az ELTE-s kollégák készítettek izolált szuszpenziókat, melyeket a korábbi folyékony minták vizsgálatára kifejlesztett elrendezésben vizsgáltam. A folyadékmintákhoz ugyanazt a lézert, valamint detektort használtam. Az egyetlen változtatás, ami módosul a 5. ábrán bemutatott elrendezéshez képest, az a mintatartó. Korábbi munkáim során megvalósítottam egy folyékony minták mérésére alkalmas tartót is, amelyet felhasználtam a folyékony minták mérésére is (12. ábra).



12. ábra. Folyékony minták mérésére alkalmas tartó [1]

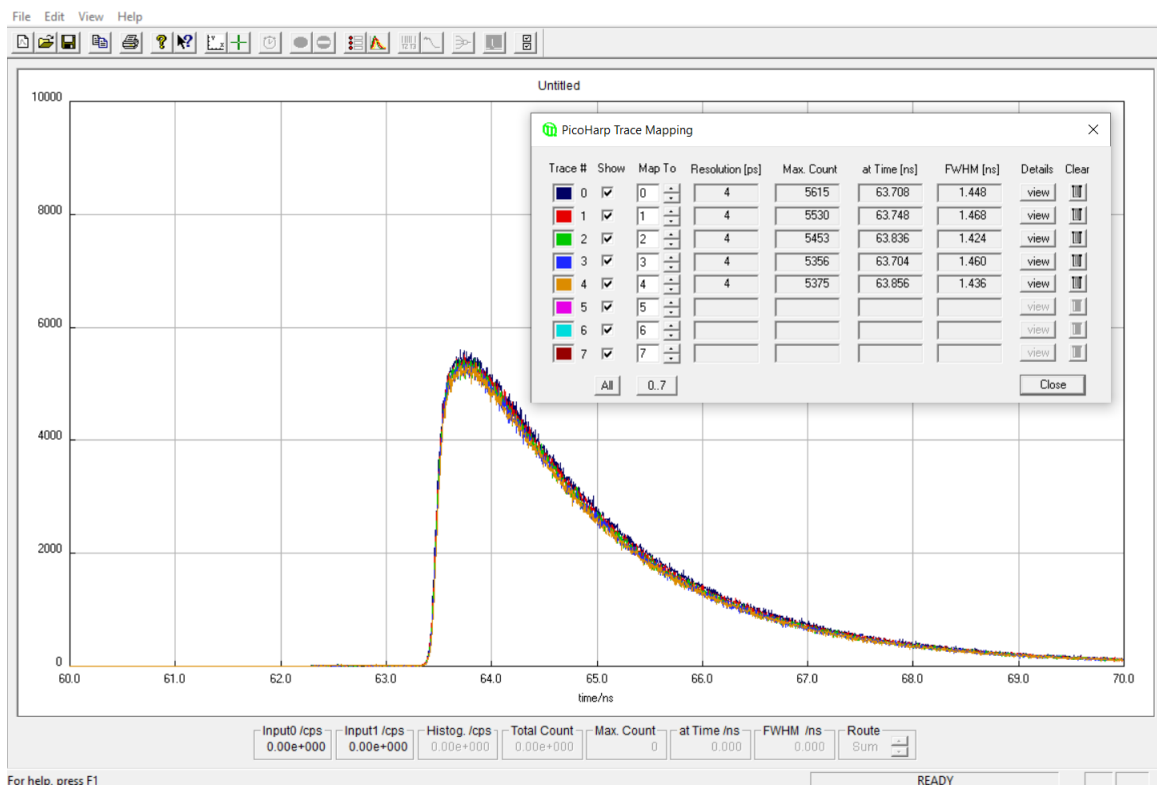
Minden mérést a környezeti fénytől védett környezetben végeztem el. Az 9. ábrán szereplő (c) tubusban olyan szűrők vannak, amelyek leginkább a 700 nm és 750 nm hullámhosszú fényt engedik át. A két szűrő együttes transzmisszióját a 13. ábra mutatja.



13. ábra. Tubusban lévő szűrők transzmissziója a hullámhossz függvényében

Amennyiben túl széles levéllel végeztem a mérést, a 7. ábrán szereplő tető módosított változatát helyeztem a tartóra. A biológiai minták alacsony fénykitettségeinek megőrzése érdekében.

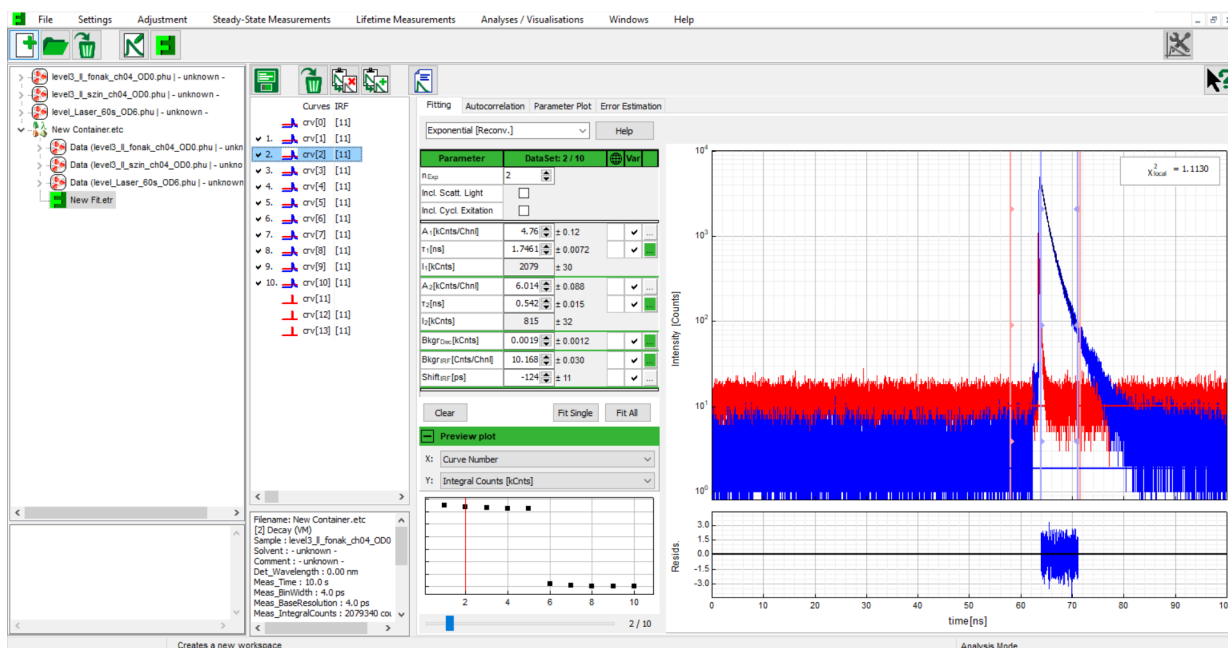
A mérésekhez és az adatok kiértékeléséhez rendelkezésemre álltak a PicoHarp300 mérő, valamint az EasyTau nevű mérésiértékelő programok, amelyek a lézerekhez hasonlóan a PicoQuant nevű vállalat termékei. A PicoHarp kezelőfelületét a 14. ábrán láthatjuk. Itt állíthatunk be olyan fontos paramétereket, mint például a mérés integrálási idejét, valamint a program azt is jelzi, ha túl sok az egy gerjesztőfotonra jutó fluoreszcencia.



14. ábra. PicoHarp kezelőfelület

A függőleges tengely a beérkezett fotonok számát jelzi, míg a vízszintes a gerjesztés óta eltelt időt mutatja. A program 8 különböző adatsort képes kirajzolni és elmenteni, amely megkönnyíti az egyes mintákon elvégzett kísérletek ismétlését és kiértékelését. Egy előhívható munkaablakban a program becslést is ad az egyes fluoreszcencia lecsengésekre, ez azonban nem tekinthető pontos eredménynek. A lecsengési idők precízebb meghatározásához az EasyTau programot használtam, amely az elméleti bevezetőben taglalt rekonvolúciós eljárást alkalmazza.

A programban beállítható, hogy egy adatsort impulzusválaszként vagy lecsengésként kezelünk. Miután ezt megadtuk, beállítjuk hogy milyen alakú függvényt keresünk megoldásnak. A tapasztalat az, hogy két exponenciális összegénél kellően kis hibájú illesztés elérhető. Fontos beállítandó paraméter még a háttérzaj és a figyelembe veendő adatok kijelölése, amelyeket kurzorok segítségével tehetünk meg. Azt tapasztaltam, hogy a lecsengésnél fontos, hogy melyik adatokat szórjuk ki, ugyanis a jel végén előfordulhatnak kisebb elektronikából adódó csúcsok. Az IRF-ben ilyen kiugrás nem található, így ott a kurzorok beállítása nem sokat változtatott az illesztés eredményén. Egy illesztést akkor tekintettem elfogadhatónak, ha a hibát jellemző χ^2 paraméter 0.8 és 1.2 közé esett (amely érték tökéletes illesztésnél 1 lenne).



15. ábra. EasyTau kezelőfelülete

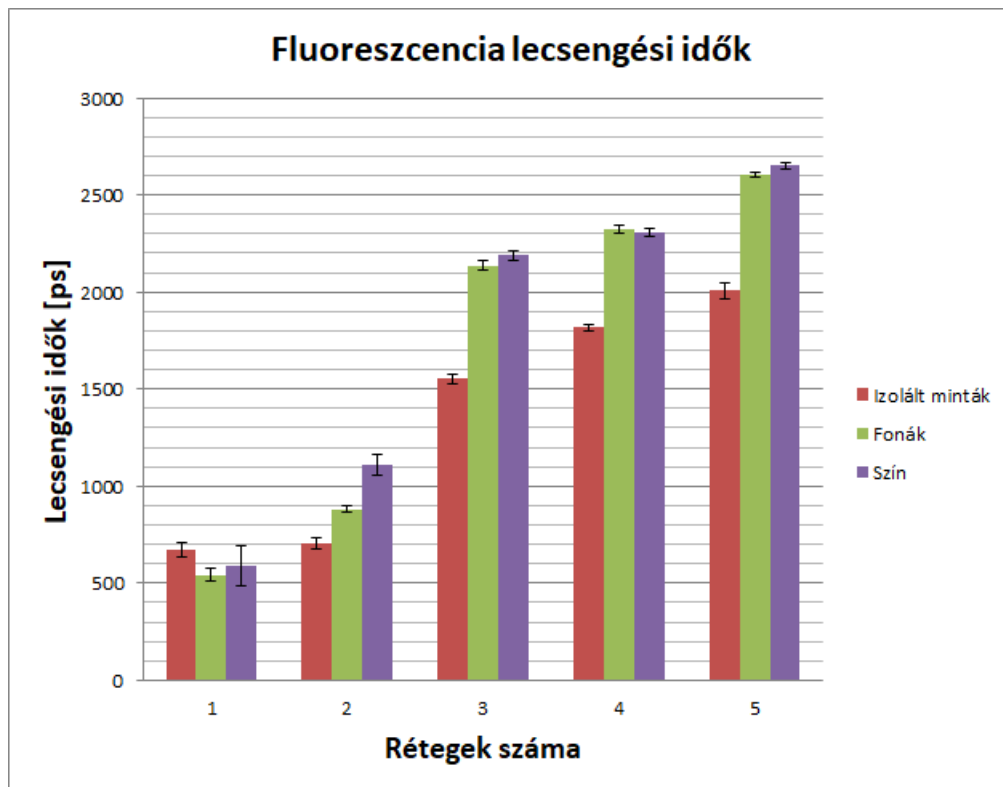
A programban a τ_{avg} érték a leginkább alkalmas a lecsengési idő meghatározására. Minden réteget háromféleképpen vizsgáltam meg. Megmértem a lecsengést a levélminta színén és a vele ellentétes oldalú fonákján, valamint a belőle készített szuszpenzió. Minden esetben legalább 5 mérést hajtottam végre és minden adatsoron végrehajtottam a rekonvolúciós eljárást. Az így kapott τ_{avg} értékeket átlagoltam és kiszámoltam ezek szórását is. Az egyes rétegeken mért időállandók átlagait és szórásait a 1. táblázatban foglaltam össze.

Rétegek sorszáma	1	2	3	4	5
Izolált mintákon mért átlag [ps]	671	708	1552	1819	2006
Levél fonákján mért átlag [ps]	543	882	2136	2322	2606
Levél színén mért átlag [ps]	588	1111	2188	2305	2653
Izolált mintákon mért szórás [ps]	37	30	25	17	41
Levél fonákján mért szórás [ps]	31	18	25	20	14
Levél színén mért szórás [ps]	103	51	28	21	17

1. táblázat. Kelkáposzta leveleken mért lecsengési idők átlagai és szórásai pikoszekundumban megadva

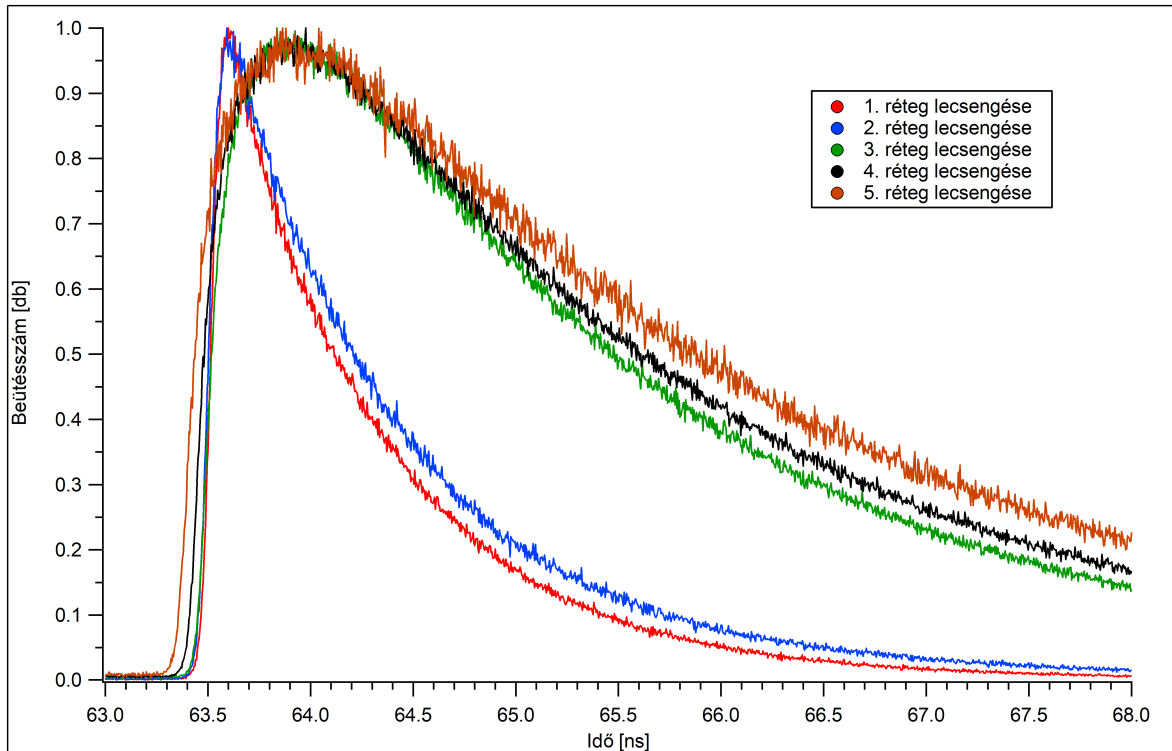
A 1. táblázat eredményeit oszlopdiagramon ábrázoltam, melyen látszódik, hogy jelentős különbség mérhető a szilárd mintákon, viszont nyomonkövethető a rétegekre jellemző növekvő tendencia. Fontos megjegyezni azt a tényt, hogy a mérési eredményeink nem pontosan ugyanahhoz a levélhez tartoznak. Az izolált minta előállításához mindig

2-3 szomszédos levelet használtunk fel, míg a mérőberendezéssel közvetlenül mért minták ezek valamelyik szomszédja.

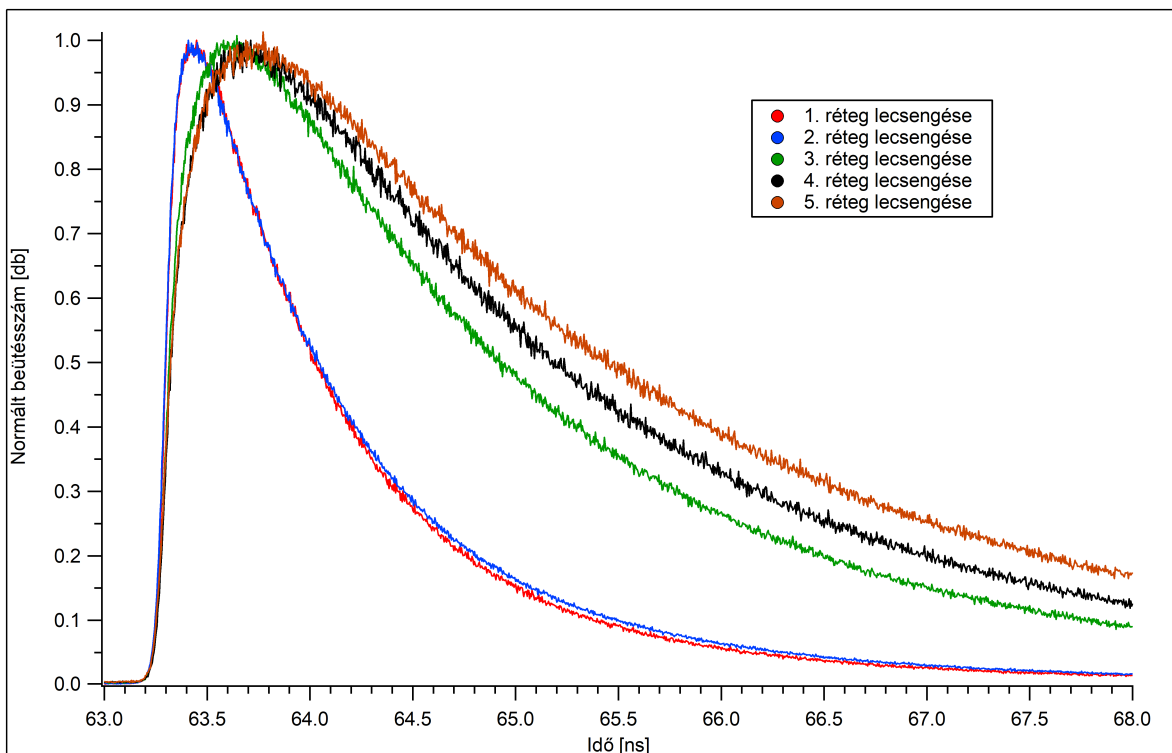


16. ábra. Lecsengési idők az egyes rétegekre vonatkoztatva

Szemmel is jól megfigyelhető a lecsengési idő különbség, ha az izolált minták egyes rétegeihez tartozó adatsoraikat egy ábrán tüntetem fel (18. ábra). Mivel a bérkező foton-szám függött attól, hogy milyen mértékben volt szükséges a fluoreszcenciafény elnyomása, ezért érdemes volt a maximálisan beérkező foton-szám szerint lenormálni minden adatot. Jellegre hasonló ábrát kapunk, amennyiben ugyanezt ábrázoljuk a levélmintákon végzett mérések adatsoraival (17. ábra).



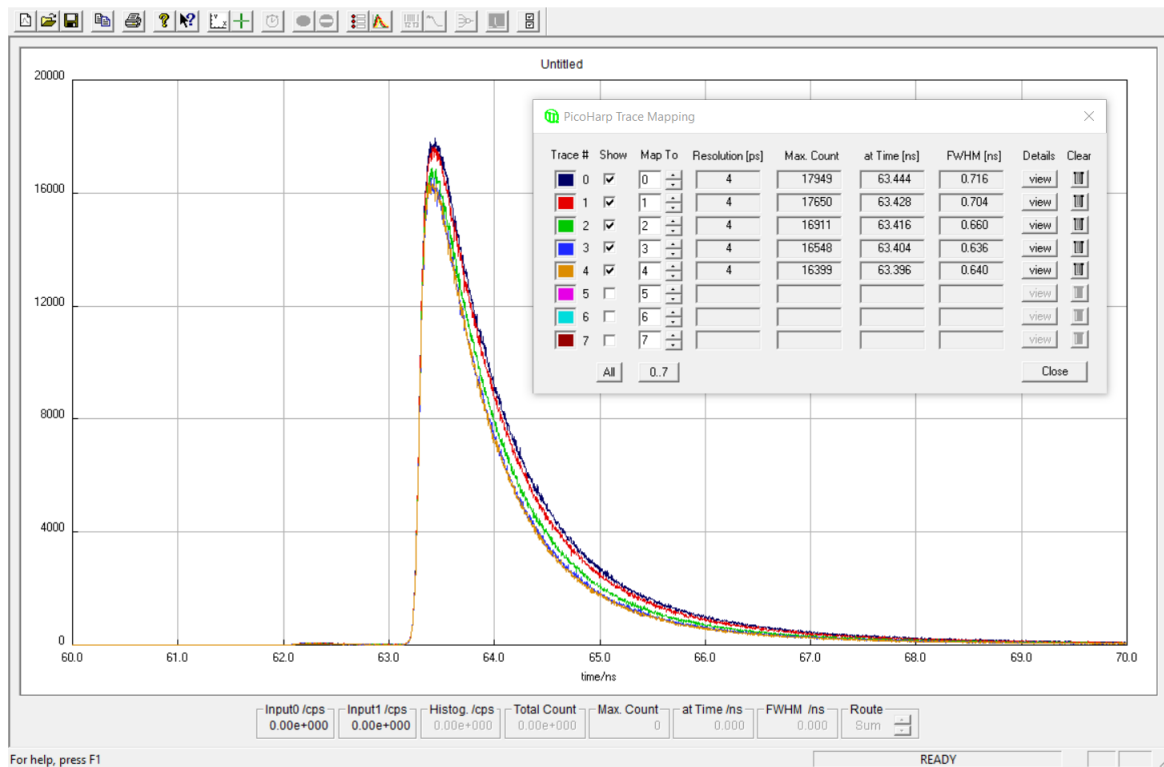
17. ábra. Egyes rétegek fonákjainak normált lecsengése



18. ábra. Rétegekből készített izolált szuszpenziók normált lecsengése

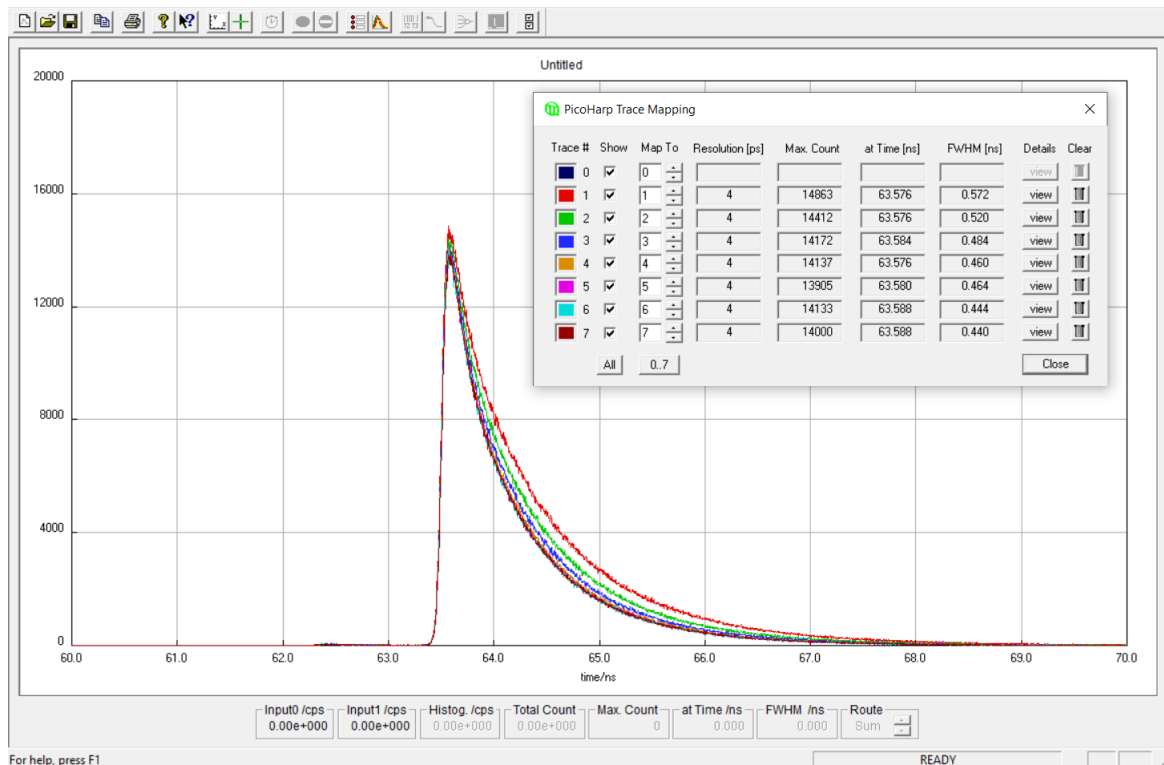
A folyadékminták és a levelek színén mért értékek esetében megfigyeltem egy másik érdekes jelenséget is, amely a mérések szórását növelte. A biológiai minták esetében gyakran előfordul az a nehézség, hogy a mérési eredményt befolyásolják a mérés előtti

körülmények, aminek a minta ki volt téve. A folyadékmintákban az izolálás miatt sokkal kisebb volt a klorofill-koncentráció mint a szilárd levélmintákban, emiatt a méréseket nagyobb integrálási idővel kellett lebonyolítani. A szuszpenzióknál ez az idő nagyjából 1 perc volt, azaz az első és az utolsó mérés között 5 perc telt el. Ez az idő már éppen elegendő ahhoz, hogy a minta másképp viselkedjen, azaz befolyásolja az a tény, hogy folyamatosan gerjesztőfénynek van kitéve. A 19. ábrán megfigyelhető, ahogy a relaxációs idők minden mérés után egyre kisebbek.



19. ábra. Oldat lecsengési ideje az idő függvényében

Ugyanez a jelenség játszódott le az 1. réteg levél színén elvégzett méréseknél (20. ábra).



20. ábra. 1. réteg levél színén elvégzett mérések lecsengési ideje az idő függvényében

Minél alacsonyabb számozású réteget vizsgáltam, annál nagyobb mértékben tapasztaltam a relaxációs idők csökkenését. Ennek magyarázata az lehet, hogy a külső rétegekben indukált, működőképes kloroplasztiszok vannak, melyeknél a fotoszintetikus működés, vagy a fénykörnyezetre való érzékenység jelentősebb.

4. Összefoglalás

A munkám során olyan mintatartót készítettem, amellyel megvalósíthatóvá válik az időkorrelált fotonszámláláson alapuló fluoreszcencia élettartamok mérése szilárd növényi mintákon. Ez az új mérési módszer hatékonynak bizonyult, így lehetőségünk nyílik levélminták differenciált vizsgálatára, amely mind mezőgazdasági, mind alap kutatási szempontból előnyösnek mondható.

A méréseket kelkáposzta leveleken végeztem és az eredményeket összehasonlítottam az izolált mintákon mért, hasonló módon kiértékelt lecsengési időkkel. Az összehasonlításból tisztán látszik a szilárd- és folyékony mintákon megfigyelhető hasonló tendencia. A külső rétegekből izolált mintákban egyértelműen magasabb volt a kloroplasztiszkoncentráció, amely jobb fotoszintetizáló képességet, és ebből adódóan kisebb lecsengési időket eredményezett. Ugyanezt találtam, amennyiben a levelek színén és fonákján mért fluoreszcencia lecsengési időket hasonlítottam össze. Az új mintatartó előny az, hogy a szilárd levélmintákon helyileg, akár a növény sérülése nélkül is végezhetünk méréseket.

A fotoszintézis vizsgálatának és megértésének egyik fontos eleme lehet a lecsengési

idők vizsgálata, melyre az általam készített mintatartó és mérési elrendezés alkalmas.

5. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni dr. Lenk Sándornak a témavezetőmnek, aki koordinálta és segítette a munkámat. Köszönöm továbbá Gádoros Patriknak, aki a mechanikai tervezésben és 3D nyomtatásban segédkezett. Végül, de nem utolsó sorban Sági-Kazár Máténak a növényi mintákat, a folyadék izolációs munkáját, valamint a számos értékes növénybiológiai információt. Köszönöm továbbá minden egyetemen dolgozó, vagy egyetemen tanuló kollégának, akik bármilyen formában elősegítették a haladást ebben a kutatásban.

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.

Hivatkozások

- [1] L. Illés: Pikoszekundumos lézerdiódák és időkorrelált foton számlálók karakterizálása és klorofill fluoreszcencia élettartamok mérése. szakdolgozat, BME, 2020
- [2] JF. Briat; C. Dubos; F. Gaymard: Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, 20 (1): 33–40. (2015)
- [3] M. Sági-Kazár; S. Lenk; B. Cseh; L. Illés; A. Barócsi; É. Sárvári; K. Solymosi; Á. Solti: A redukción alapuló plasztidiális vasfelvétel mintázata és szabályozása, XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged (2021).
- [4] M. Sági-Kazár; S. Lenk; L. Illés; K. Solymosi; Á. Solti; A. Barócsi: Növényi minták fluoreszcencia lecsengési idejének vizsgálatai, IX. Szimpózium a hazai kvantumelektronikai kutatások eredményeiről, KVANTUMELEKTRONIKA 2021, ISBN 978-963-306-775-8, <https://dio.org/10.14232/kvantumelektronika.9>
- [5] M. Sági-Kazár; S. Lenk; B. Cseh; B. Müller; L. Illés; Z. May; A. Barócsi; É. Sárvári; Á. Solti (). Molecular background of the iron metabolism of non-photosynthetic plastids. Tervezett benyújtás *Frontiers in Plant Science* folyóirathoz 2021 őszén.
- [6] Neil R. Baker; Eva Rosenqvist: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 403, pp. 1607–1621, August 2004
- [7] H. Kautsky; A. Hirsch: Chlorophyll fuoreszenz und Kohlensaureassimilation. I. Mitteilung : Das Fluoreszenzverhalten gruner Planzen. *Biochemische Zeitschrift* 247, 423-434., 1934.
- [8] S. Lenk; P. Gádoros; L. Kocsányi; A. Barócsi : Teaching laser-induced fluorescence of plant leaves. *European Journal of Physics*, 37, (2016)
- [9] A. Barócsi: Intelligent, net or wireless enabled fluorosensors for high throughput monitoring of assorted crops. *Meas. Sci. Technol.* 24 (2013)
- [10] A. Natali; JM. Gruber; L. Dietzel; MC. Stuart; R. van Grondelle; R. Croce: Light-harvesting complexes (LHCs) cluster spontaneously in membrane environment leading to shortening of their excited state lifetimes. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (32): 16730-16739. (2016)
- [11] M. Tutkus; J. Chmeliov; G. Trinkunas; P. Akhtar; PH. Lambrev; L. Valkunas: Aggregation-related quenching of LHCII fluorescence in liposomes revealed by single-molecule spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 218: 112174. (2021)
- [12] J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Third Edition). Springer Science+Business Media LLC, New York, USA, 2006 (ISBN: 978-0-387-46312-4).
- [13] S. Lenk; M. Sági-Kazár; L. Illés; B. Cseh; Cs. Hegedűs; É. Sárvári; K. Solymosi; Á. Solti; A. Barócsi: Növényi fotorendszerek kvantum-hatékonyságának vizsgálata fluoreszcencia mérés technikákkal, HunQuTech conference 2021.10.07, Budapest

- [14] L. Illés: Növényi levelek fluoreszcencia lecsengési idejének in vivo vizsgálatát lehetővé tevő kompakt mérőfej megvalósítása és méréskiértékelési eljárások optimalálása, BME, 2021
- [15] S. Damjanovich; J. Fidy; J. Szöllősi : Orvosi biofizika. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007
- [16] M. Wahl : Time-Correlated Single Photon Counting. PicoQuant GmbH, Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin, Germany, technical note, 2014
- [17] <https://www.freedee.hu/sls-nyomtatás-szelektív-lezershinterezés-utmutató/>