



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 méréstechnikával 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 mintaelőkészítési lépéseket, másrészt lehetőség nyílik a levélminták differenciáltabb vizsgálatára. Az elkészült mérőeszközzel kelkáposzta leveleken tesztméréseket végeztem. A mérési eredményeimet összevetettem ugyanazon növényből készített izolált minták fluoreszcencia lecsengésével.

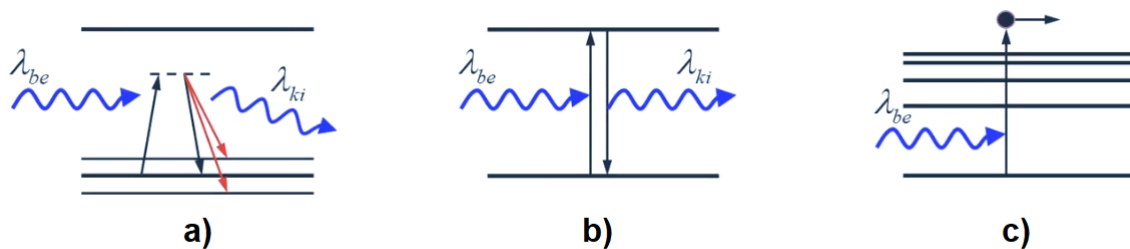
Tartalomjegyzék

1. Elméleti bevezető	3
1.1. Fotolumineszcencia	3
1.2. Növényi minták fluoreszcencia indukciós kinetikájának vizsgálata	5
1.3. Növényi minták fluoreszcencia lecsengési idejének mérése	6
1.4. Dekonvolúció és rekonvolúció	8
2. Célkitűzés	9
3. Eredmények	10
3.1. Mérőberendezés főbb elemei	10
3.2. Koncepcionális tervezés	14
3.2.1. Leképező optika pozícionálása	14
3.2.2. Nyalábátmérő meghatározása késélezős módszerrel	16
3.3. Mintatartó megvalósítása	17
3.3.1. 3D nyomtatás	22
3.4. Mérések és mérésiértékelés	23
3.4.1. Mérő és kiértékelő programok	23
3.4.2. Kelkáposzta levelek vizsgálata	25
4. Összefoglalás	33
5. Köszönetnyilvánítás	34

1. Elméleti bevezető

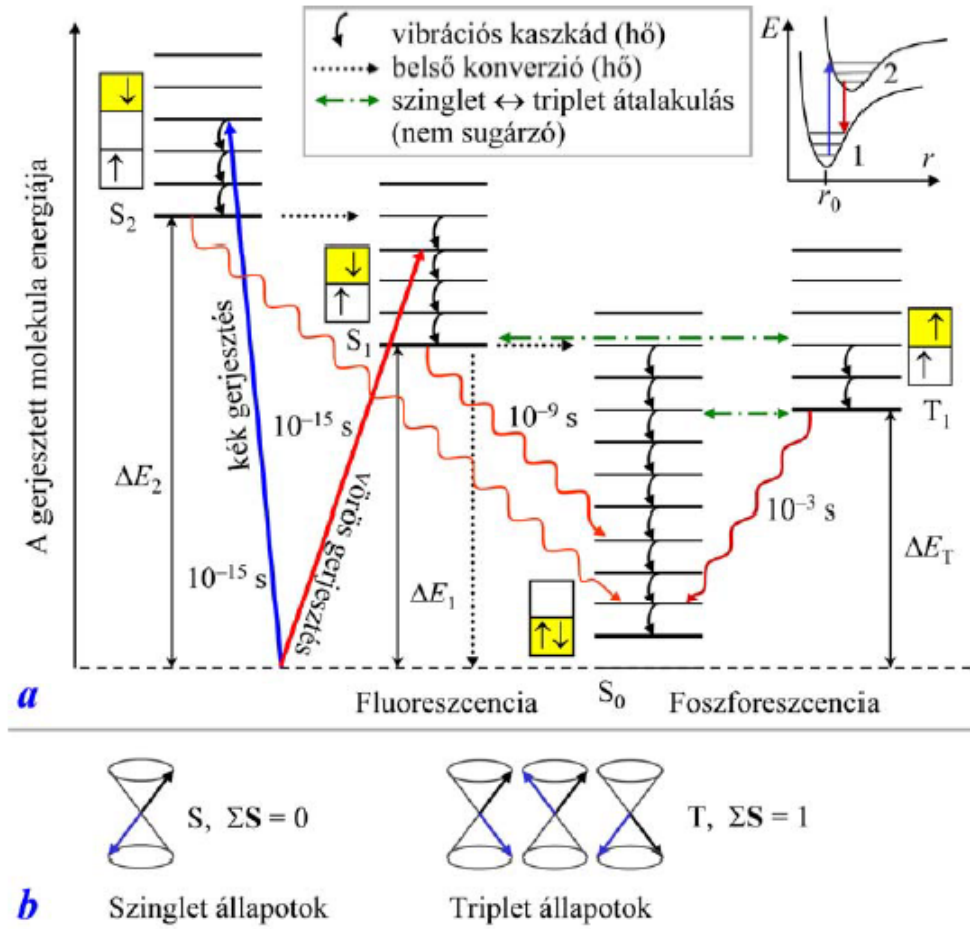
1.1. Fotolumineszcencia

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 elvégzéséhez. A fény-anyag kölcsönhatás során fotonok lépnek kapcsolatba az atomok, molekulák vagy molekulacsoportok elektronszerkezetével. Az abszorbeált fotonok különböző változásokat hozhatnak létre a rendszerben, melyek az anyagi paraméterektől illetve a fény hullámhosszától függenek, melyekre a 1. ábrán láthatunk példákat. Az a) betűjellel különböző szórási folyamatokat láthatunk, amely során a foton rugalmasan (Rayleigh-) vagy rugalmatlanul (Raman-) szóródik az atomon vagy molekulán. A b) ábrán egy egyszerű gerjesztést láthatunk, amelyben az elektron magasabb energiaszintre kerül és onnan a felesleges energiát annak megfelelő hullámhosszúságú fotonként adja le. A c) ábrán a fényelektromos jelenség látható, amelyben a gerjesztőfény elegendő energiával rendelkezik ahhoz, hogy kilökjön a rendszerből egy elektront.



1. ábra. Fény-anyag kölcsönhatás során fellépő lehetséges folyamatok

A fotolumineszcencia azon jelenségek gyűjtőneve, amelyek során jellemzően látható fény, vagy ultraibolya gerjesztés hatására egy molekula, vagy molekulacsoport elektronjai magasabb energiaállapotba kerülnek, és fényemisszóval kísért relaxáció során a gerjesztéshez képest nagyobb hullámhosszúságú fotonokat bocsájtanak ki. A jelenséget két kategóriába szoktuk csoportosítani; a fluoreszcenciára, illetve a foszforeszcenciára. A kettő közti legszembevetőbb különbség a fotonabszorpció és emisszió között eltelt idő. A folyamat mindkét esetben az alapállapotú szinglet állapotból egy gerjesztett állapotú szinglet állapotba történő átmenettel kezdődik. Ezt követően a gerjesztett atom vagy molekula nagyon gyorsan a legkisebb energiájú gerjesztett állapotba kerül, majd a lumineszcencia erről a szintről indul (Kasha szabály). Míg a fluoreszcencia a másodperc tört része alatt valósul meg (nagyjából 10^{-9} s vagy kevesebb), addig a foszforeszcencia percekig, vagy órákig is megfigyelhető. Az időállandók közti nagyságrendi különbség abból adódik, hogy míg foszforeszcenciánál a relaxáció egy triplet állapotból, addig fluoreszcenciánál egy szinglet állapotból történik (2 ábra, Jablonski-diagram). A szinglet állapotban a kételektronosnak tekinthető rendszer elektronjai lehetnek azonos állásúak, vagy ellentétesek. Az előbbi esetben a spinek eredője 0, így a hullámfüggvény antiszimmetrikus. Ez egyféleképpen valósulhat meg, innen ered a szinglet elnevezés. Szimmetrikus hullámfüggvény esetén a spinek orientációja $S = \pm 1, 0$ értékeket adhat, ami miatt a triplet elnevezést kapta. Az optikai sugárzás nélküli energia-átmenetek belső konverzióval valósulnak meg, ez hő formájában manifesztálódik.



2. ábra. Jablonski-diagram [?]

Egy anyagban az elektromágneses hullámok elnyelődését az abszorpcióval jellemezzük, amely szoros összefüggésben van a transzmisszió értékével, ami a beérkező a határfelületi reflexiótól eltekintve a fényintenzitás és az anyagon áthaladt intenzitás hányadosaként definiálható ($\frac{I(\lambda)}{I_0}$). Az argumentumban lévő λ utal rá, hogy ez egy hullámhossztól függő mennyiség. Az intenzitás a Lambert-Beer-törvény szerint exponenciálisan csökken (1).

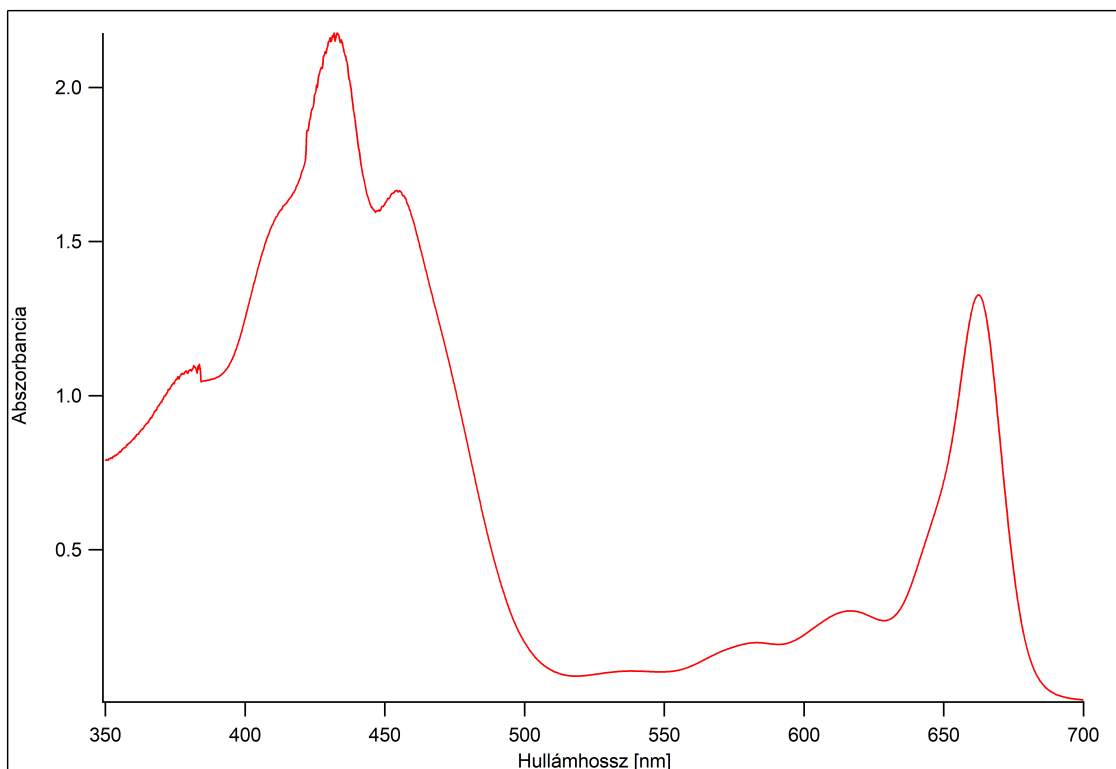
$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\alpha l} \quad (1)$$

Ahol α az abszorpciós együttható, l pedig az anyagban megtett távolság. Tudományterülettől függően szokták az exponenciális függvény alapját 10-nek vagy e -nek választani. A transzmisszióból definiálhatjuk az abszorbanciát (2).

$$A = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

Egy anyag az összetételétől függően különböző mértékben képes elnyelni adott hullámhosszúságú fotonokat. Az elnyelés mértékét az úgynevezett abszorpciós spektrum határozza meg, amelyet érdemes figyelembe venni a fotoluminszcencia kísérletek során alkalmazott gerjesztőlézer kiválasztásakor. Ennek oka, hogy a fotoluminszcencia nagyobb mértékben van jelen olyan hullámhosszakon, ahol nagy az anyag abszorpciója. 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 3. ábrán láthatunk egy konkrét példát egy klorofill tartalmú oldatra.



3. ábra. Klorofill oldat abszorpciós spektruma [1]

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

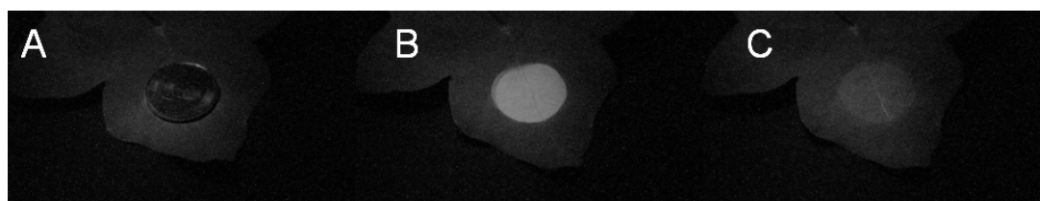
1.2. Növényi minták fluoreszcencia indukciós kinetikájának vizsgálata

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. Kevéssé 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 fluoreszcencia-fény formájában sugározza ki. Néhány perc szükséges ahhoz, hogy a fotoszintézis ugyan olyan mértékben legyen jelen, mint a sötétbentartás előtt. Ezt szemlélteti a 4. ábra, ahol olyan szűrőkön keresztül figyelhetjük meg a jelenséget, amely csak a fluoreszcencia-fotonok hullámhosszán enged át, a sötétítést pedig egy érme biztosítja.



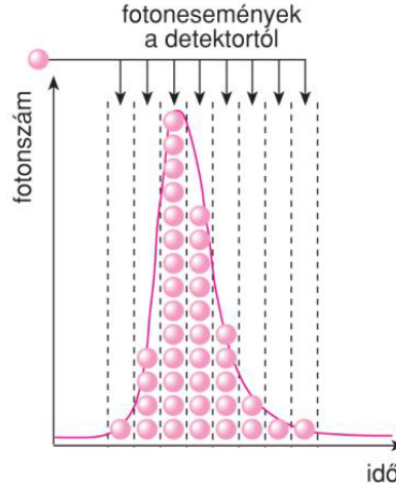
4. ábra. Kautsky effektus a borostyánlevélen A: Levél megvilágítva rajta egy pénzérmével, B: Levél megvilágítva pénzérme nélkül, C: Levél az érme levétele után néhány perccel [8]

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].

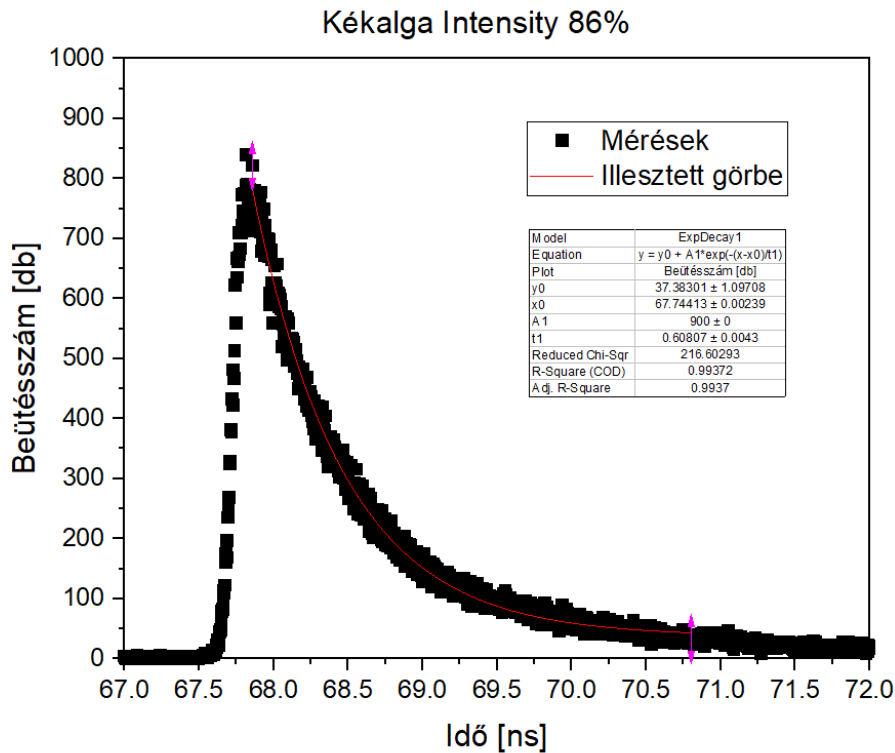
A feladatnak azonban vannak nehézségei, ugyanis ahogy azt a korábbi fejezetekben írtam, a legerjesztődés folyamata nanoszekundumos időskálán mozog. Erre a problémára nyújt megoldást az időkorrelált mérés technika. Ennek lényege, hogy a mintát nagy frekvenciával, rövid fényimpulzusokkal gerjesztjük, majd a gerjesztés és a fluoreszcencia közti időt mérjük. A beérkezett fotoneseményeket időbélyeggel látjuk el, azokat időrekesekben akkumuláljuk, majd ebből hisztogrammot 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 (5. ábra).



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

Ha egy ilyen grafikonra (3) egyenlet alakú exponenciális függvényt illesztünk, az illesztési paramétereiből megkapható az általunk keresett időállandó (6. ábra).

$$f(x) = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{(x-x_0)}{t_1}} \quad (3)$$



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

Ekkor az időállandó az exponensben szereplő (6. ábrán) t_1 paraméter. Az eredményünk pontosságát ekkor az illesztés pontossága határozza meg.

A szakdolgozatomban azt tapasztaltam, hogy az illesztések sokszor csak nagy hibával végezhetőek el, illetve látszik az illesztett görbén, hogy jellegre is eltér a grafikonról. Ennek okát részben az okozza, hogy több fluoreszcens jelenség is lejátszódhat az anyagban más időállandókkal, emiatt a mért görbe több exponenciális függvény összegként 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 impulzuslézer 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 lecsengésből adódó görbének a konvolúciójaként áll elő.

A rendszer válaszütemének kiszűrését a mért adatsorból többféleképpen is megvalósíthatjuk. Az egyik megoldás a dekonvolúció, amely során megmérjük a rendszer válaszütemét 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.

$$\mathcal{F}(f(t) * g(t)) = F(\omega) \cdot G(\omega) \quad (4)$$

Ahol F és G a fourier transzformáltjai f és g függvényeknek $*$ pedig a konvolúció műveletét jelöli. Ebből következik (5) egyenlet.

$$\frac{\mathcal{F}(f(t) * g(t))}{G(\omega)} = F(\omega) \quad (5)$$

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 Fourier transzformáltjával, 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 függvénytypussal (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 paramétereket.

Az eljárás végén a függvény paraméterei 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 (6) egyenletben leírt eljárást valósítja meg.

$$\text{Dec}(t) = \left[\int_{-\infty}^t dt' [\text{IRF}(t - \text{Shift}_{\text{IRF}}) - \text{Bkgr}_{\text{IRF}}] \left[\sum_{i=1}^{n_{\text{Exp}}} A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \right] \right] + \text{Bkgr}_{\text{Dec}} \quad (6)$$

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 (7) összefüggés szerint számolandó.

$$\tau_{\text{AvInt}} = \frac{\sum_{i=1, I_i > 0}^{n_{\text{Exp}}} I_i \tau_i}{\sum_{i=1, I_i > 0}^{n_{\text{Exp}}} I_i} \quad (7)$$

Amelyben szereplő I_i mennyiséget (8) alapján számoljuk.

$$I_m = A_m \tau_m \quad (8)$$

Szintén fontos paraméter az illesztéseknél használt χ^2 paraméter, amely (9) szerint számolandó. Az ebben megjelenő mennyiségek Y_i ami az i -edik általunk mért Y érték, f az illesztett függvény, x_1' a változó, σ_i az i -edik komponens szórása, $\hat{\beta}$ pedig az illesztési paramétereket foglalja magába, azaz $\hat{\beta} = \beta_1, \beta_2, \dots$ (lsd. bővebben [1]).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \left[\frac{Y_i - f(x_1', \hat{\beta})}{\sigma_i} \right]^2 \quad (9)$$

Az általam használt illesztőprogram az ebből származtatott χ_{loc}^2 paramétert határozza meg (10).

$$\chi_{loc}^2 = \frac{\chi^2}{n_2 - n_1 + 1 - p} \quad (10)$$

Amelyben n_1 az illesztés intervallumának első, míg n_2 az utolsó időrekeszének a számát jelzi, valamint p a változók száma. A χ_{loc}^2 paraméterrel jellemezhetjük az illesztés jóságát. Az illesztés csak akkor elfogadható, ha ezen szám értéke 0.7 és 1.3 közé esik. Ezen túl a reziduálisok és az autokorrelációs együtthatók vizuális ellenőrzése is szükséges [12].

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 méréstechnika alkalmazásával közvetlenül a levélmintákon fluoreszcencia lecsengési időket mérni. Ezt a mérőfejet felhasználva kelkáposzta leveleken (mint teszt növények) tesztmérések végzése után az eredményeim összehasonlítom folyadékmintákon mért lecsengési időkkel, ezzel ellenőrizve azt, hogy ez a fajta mérési módszer mennyire bizonyul hatékonynak és konzisztensnek az eddigi tapasztalatokkal.

Dolgozatom további célját képezte különböző mérés kiértékelő programok vizsgálata és a céloknak megfelelő program kiválasztása. Ezen célok megvalósítása előrelépést jelenthet a fotoszintézis pontosabb megértésének terén.

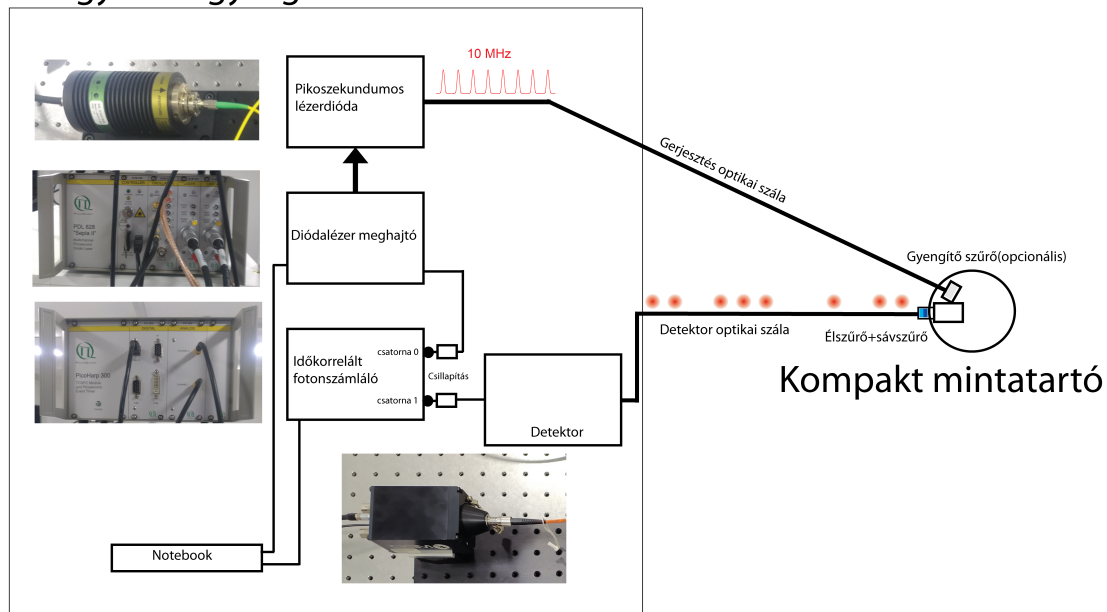
3. Eredmények

3.1. Mérőberendezés főbb elemei

A mérések során rendelkezésemre állt egy PicoQuant LDH-P-C-650 típusú, meghajtóval (PicoQuant Sepia II) felszerelt, 650 nm-es hullámhosszúságon működő, szálba csatolt, pikoszekundumos diódalézer, amellyel a gerjesztést végeztem. A detektáláshoz SPAD egyfoton detektort (Picoquant MPD-100-CTB), 100 μm magátmérőjű többmódusú optikai szálal (Thorlabs M18L01), valamint időkorrelált fotonszámláló elektronikát használtam (PicoQuant PicoHarp 300).

A tervezett mérések egyik alapelvének számított egy kisebb, mobilisabb rész (kompakt mintatartó) megalkotása és szeparálása a nagyobb részegységtől. A mérőberendezés egyes elemeinek blokkvázlata a 7. ábrán látható.

Nagyobb egységek

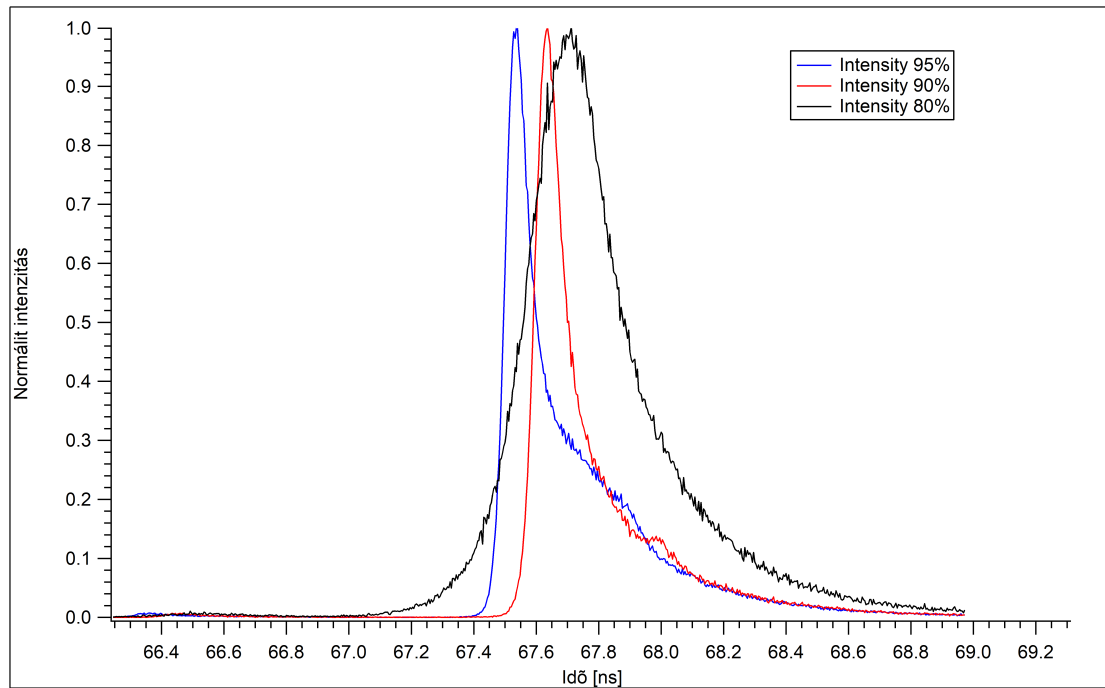


7. ábra. A kísérleti elrendezés blokkvázlata [13]

A lézer és a detektor összehangolásáért egy nagyobb, a mintatartótól elkülönülő vezérlőegység felel. Az időkorrelált méréstechnika alkalmazásához a lézer gerjesztéséért felelős oszcillátor és a detektor pontos összehangolása kulcsfontosságú, amiről a fotonszámolóban található vezérlőelektronika gondoskodik. Ezekkel a részegységekkel kommunikál a számítógép, amellyel a méréseket megvalósítjuk. A fotonszámolóban használt 10dB-es csillapítások feladata a mért jelből a kisebb "tüskék" kiszűrése, amelynek alkalmazásával kedvezőbb jel-zaj viszony érhető el.

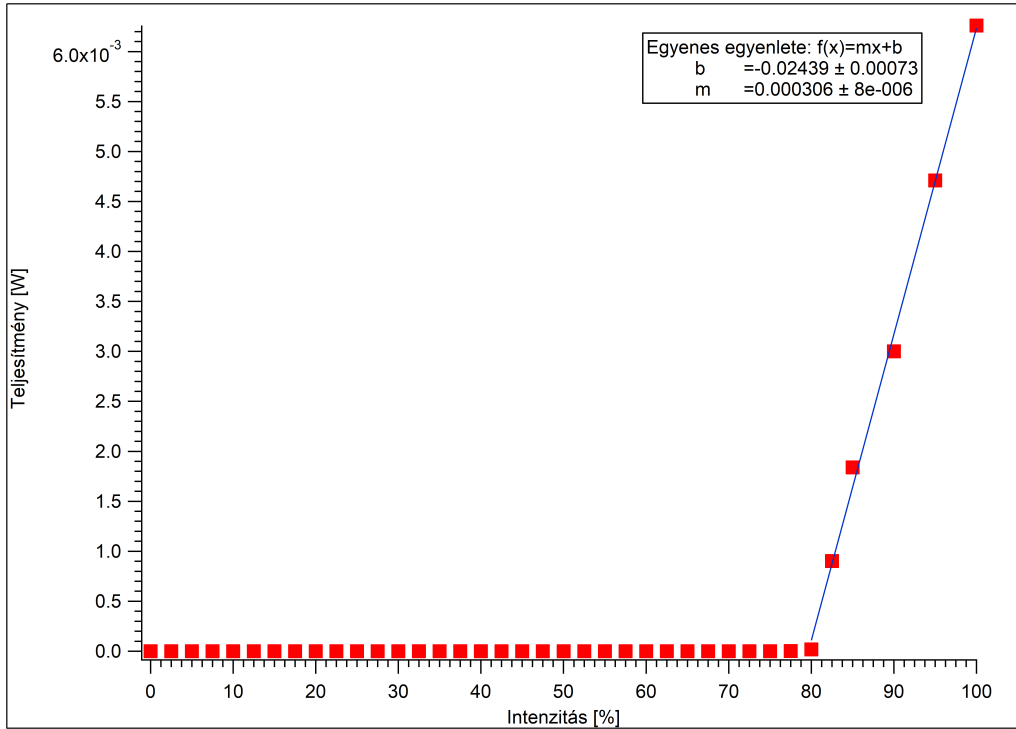
A meghajtó egység maximálisan 80 MHz-es ismétlési frekvenciájú impulzusok előállítására alkalmas, azonban a ns-os skálán mozgó lecsengési idők méréséhez 100 ns méretű időablak alkalmazása szerencsésebb. Ezen időablaknál rövidebbet választva fennáll a veszély, hogy értékes mérési eredmények elveszhetnek, hiszen a fluoreszcencia jel 3-4 nagyságrendű csökkenését célszerű regisztrálni. Ennek megfelelően egy frekvenciaosztó segítségével a lézerből 10 MHz-es ismétlési frekvenciájú optikai jelet vezettem ki. Ez egy kisebb részegységbe csatlakozott, amelyet én terveztem és valósítottam meg a diplomamunkám keretében. Ennek a koncepciónak az előnye, hogy a mintatartó könnyen, a nagyobb berendezésektől függetlenül mozgatható, vagyis a kialakított mérőberendezés már jelenlegi formájában is részben hordozható.

A lézer impulzusalakja a korábbi méréseim alapján [1] akkor ideális, ha a programmal a 90% névleges értékre állítom be. Ez a rajta átfolyó áramot szabályozza, ahol 100% az eszközre kapcsolható maximális értéket jelenti. Ekkor az impulzus jelalak 8. ábrának megfelelően a piros színű görbe. A 90% azonban nem a lézergyő teljesítményét jelenti, hanem egy relatív érték. Valójában a lézergyő fénytelijsítménye a maximálisan elérhető teljesítmény körülbelül 50%-a (lásd 9. ábra).



8. ábra. Lézer impulzushossza különböző intenzitás paramétereknél [1]

Korábbi munkám során azt is megállapítottam, hogy a névleges érték valójában a diódlézerre kapcsolt feszültséggel arányos relatív érték, ezáltal a kimeneten mért fénytéljesítmény a 9. ábrának megfelelő karakterisztikát követi a kezelőfelületen beállított Intensity paraméter függvényében.



9. ábra. Lézer feszültség-teljesítmény karakterisztikája [1]

A berendezés másik legfőbb eleme a SPAD egyfoton detektor, amely a foton-hisztogramok készítésében kulcsfontosságú szerepet tölt be. Ez a műszer az oszcillátorral szinkronizáltan dolgozik és a gerjesztéshez képest megadott időközönként a beérkezett fotonok számát határozza meg és időrekeszekben tárolja el. Ezzel a módszerrel olyan hisztogramokat alkot, amelyből az elméleti bevezetőben leírt adatkiértékelési módszerekkel meghatározhatóak akár 0.1 ns nagyságrendű időállandók. A kutatásaim során 4 ps-os időrekeszekkel dolgoztam.

A detektor pontos működését korábbi munkám során részleteztem [1], így a diplomamunkám során csak az ezzel kapcsolatos fontosabb eredményeket, valamint a mérések során figyelembe vett irányelveket taglalom. A méréseket két főbb tényező zavarhatja, a háttérből jövő fotonok (háttérzaj), valamint a detektor elektronikájából adódó úgynevezett sötétzaj, ami miatt a műszer teljesen sötét környezetben is fotonbeütéseket mér. Ennek mértéke a környezetből jövő háttérzaj nagy részének kiszűrését követően ≈ 10 beütés binenként 30s-os integrálási idő mellett, amely a méréseim során előforduló maximális beütésszámnak kevesebb mint 1%-a. A detektor maximálisan egy időrekeszbe 65535 fotoneseeményt képes eltárolni, így ez a felső határa. Az esetek túlnyomó többségében a detektált jel túl nagy, ezért optikai denzitásszűrők alkalmazása indokolt, azonban ezek megválasztása során figyelembevettem, hogy a maximális zaj-jel arány ne lépje túl a fentebb említett 1%-ot, illetve ne érjem el egy időrekeszben a maximális fotoneseemények számát.

Egy másik fontos irányelv az 5%-os szabály, amely szintén a mérési eljárásból adódik. A detektor rendelkezik holtidővel, amíg a beérkezett fotonokat eltárolja, így előfordulhat, hogy bizonyos fluoreszcencia fotonok nem kerülnek be a statisztikába. Ebből kifolyólag

csak akkor tekintjük sikeresnek a mérést, ha a gerjesztő fotonok és a beérkezett fluoreszcencia fotonok számának aránya nem haladja meg az 5%-ot.

A mérőberendezés megismerését és karakterizálását a mintatartó specifikációs paramétereinek meghatározása és megtervezése, majd a tartó megvalósítása követte.

3.2. Koncepcionális tervezés

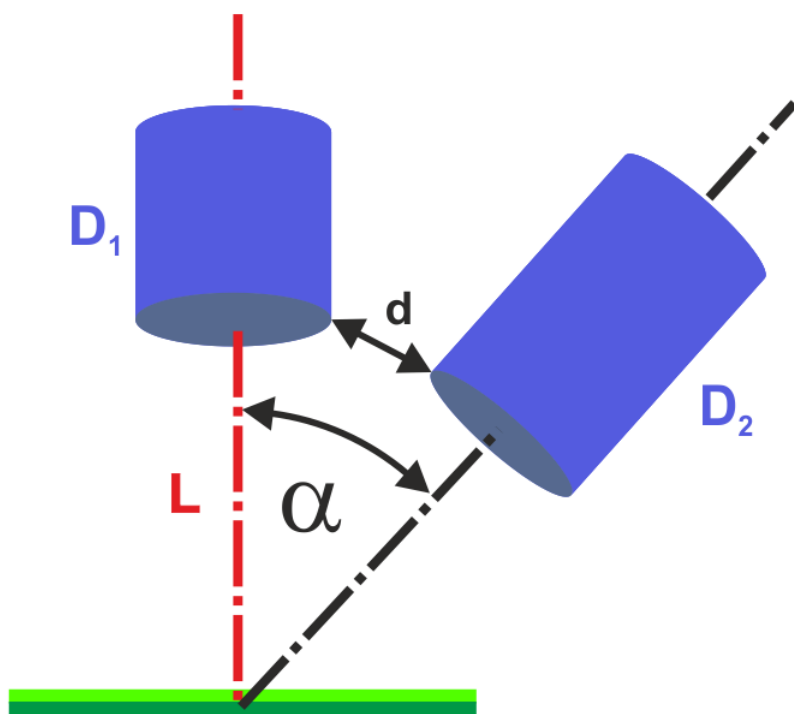
3.2.1. Leképező optika pozicionálása

A kompakt mintatartó elkészítése és legyártása a diplomamunkám részfeladata volt, míg a fentebb taglalt lézer, detektor, vezérlőegység és az adatfeldolgozó programok rendelkezésemre álltak. A tartó készítésekor három főbb szempontot vettem figyelembe. Az egyik szempont a méreteire vonatkozó megkötésekből áll, mivel szeretnénk, könnyen mozgatható legyen, illetve kézben nagyjából elférjen. Másik főbb irányelv a minták és a különböző méréshez használt eszközök (pl.: optikai szűrők, gerjesztő források, gyűjtőoptikák) csereszabatsága. A harmadik szempont a háttérzaj minimalizálása mellett a lehető legtöbb, számunkra releváns fluoreszcencia jel detektálása.

Az alap elképzelés szerint a lézerfényt optikai szálakkal bevezetjük a mintatartóba, ahol az gerjeszti a mintát, majd egy másik szálon keresztül a fluoreszcencia fényt összegyűjtjük onnan. A száloptikai megvalósítás a legpraktikusabb, ugyanis így a gerjesztő fényforrás és az adatrögzítéshez szükséges detektor nincs közvetlenül beépítve a tartóba, így sokkal mobilisabban és egyszerűbben kezelhető, valamint gyorsabb és biztonságosabb a gerjesztőlézer és a detektor cseréje.

A pontos mérések érdekében fontos, hogy a detektor bevezető szálánál lévő optika arra a területre fókuszáljon, mint amit az impulzuslézer megvilágít. A rendszer azonban rendelkezik egy minimális mérettel, amit a szükséges lencsék, szűrők, illetve lencsetartó tubusok méretei határoznak meg, valamint a detektor oldal és a gerjesztő oldal által bezárt szög. Felmerült a kérdés, hogy adott méretű optikai eszközök mellett kivitelezhető-e a mintatartó, ha szeretnénk nagyjából 40 mm-es mintatávolsággal dolgozni, hogy egy kicsi, kompakt a levélminták jellemző méretéhez illeszkedő mintatartót alkothassak. E célból egy Thorlabs (MAP052550-B) optikai leképező rendszert választottam. A leképező optikára vonatkozóan végeztem számításokat, melyben megvizsgálom, hogy adott szög és lencseméretetek esetén, milyen közel lehet a mintához a belépő és kilépő oldal.

A számításban szereplő mennyiségek D_1 és D_2 a kilépő és belépő szálakon lévő lencséből és szűrőkből álló rendszer köré rajzolható henger átmérői, d a két henger egymáshoz legközelebb eső két pontjának távolsága (az a távolság amekkora helyet szeretnénk hagyni a csatolóelem és a leképező optika között), α a szimmetriatengelyeik által bezárt szög, valamint L a távolság a lencsét tartó tubus peremétől (10. ábra).



10. ábra. Számolásokhoz szükséges paramétereket tartalmazó magyarázó ábra. Kékkel a hengerek, melyek a lencsét és szűrőket tartalmazó tubusok, zölddel a minta, pirossal és feketével a tubusok szimmetriatengelyei.

A gondolatmenetem az volt, hogy a hengereket egymástól távol beállítjuk a megfelelő α szögben egymáshoz képest úgy, hogy a minta felé nézzen az alapjuk. Ezután gondolatban közelítem a mintához és a minimális L távolság akkor valósul meg, ha a d eléri az általunk előre meghatározott értéket. A számolásban használtam azt a közelítést, hogy nagyjából azonosnak tekinthető a két henger átmérője, valamint a két szál mintától való távolsága is megegyezik. Elemi geometriai összefüggésekből levezethető a minta és a szálak közti távolságot meghatározó (11) képlet.

$$L = \frac{\frac{D_1}{2}}{\tan \alpha} + \frac{\frac{D_2}{2}}{\sin \alpha} + d \cdot \frac{\sin(180^\circ - \alpha)}{\sin \alpha} \quad (11)$$

A tartótubusok valós méretei $D_1 = 17\text{mm}$ és $D_2 = 17.08\text{mm}$ és kezdetben $\alpha = 30^\circ$ -ra állítottam. Az első méret a lézer adapter eleméből adódik, míg a másodikat a használt leképező optika mérete adja meg. Korábbi kísérleti tapasztalat alapján ennél nagyobb szöget nem érdemes választani a mérések során, valamint a két oldal közti távolságnak is megszabtam egy alsó határt ($d = 5\text{mm}$). Ezeket az értékeket a képletbe behelyettesítve a minta távolságára $L = 36.8\text{mm}$ adódott. A várt 40 mm -es mintatávolságnál ez kisebb, így nem szükséges d csökkentése vagy α növelése, amivel L kisebb értékre hozható.

3.2.2. Nyalábátmérő meghatározása késélezős módszerrel

A lézerefény optikai szálon keresztül egy 60FC-4-A11-02-P típusú kollimátor lencsébe jutott, mely a szálhoz volt rögzítve. A kollimátorból kijövő fénynyaláb átmérőjének megméréséhez az úgynevezett késélezős módszert alkalmaztam.

A mérési elv az, hogy a nyaláb elé egy fénytelsítmény mérőt teszünk. A nyalábot fokozatosan kitakarva azt tapasztaljuk, hogy a mért teljesítmény csökken. Ha a kitakarás úgy történik, hogy a terjedési irányra merőleges síkban egyenlő távolságonként gátoljuk a fénysugarak eljutását a detektorig, akkor a teljesítménycsökkenés egy Gauss-nyaláb integráljának a csökkenésével írható le.

Az Gaussnyaláb intenzitáseloszlása a (12) összefüggés szerint alakul.

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-2(\frac{\rho}{w})^2} \quad (12)$$

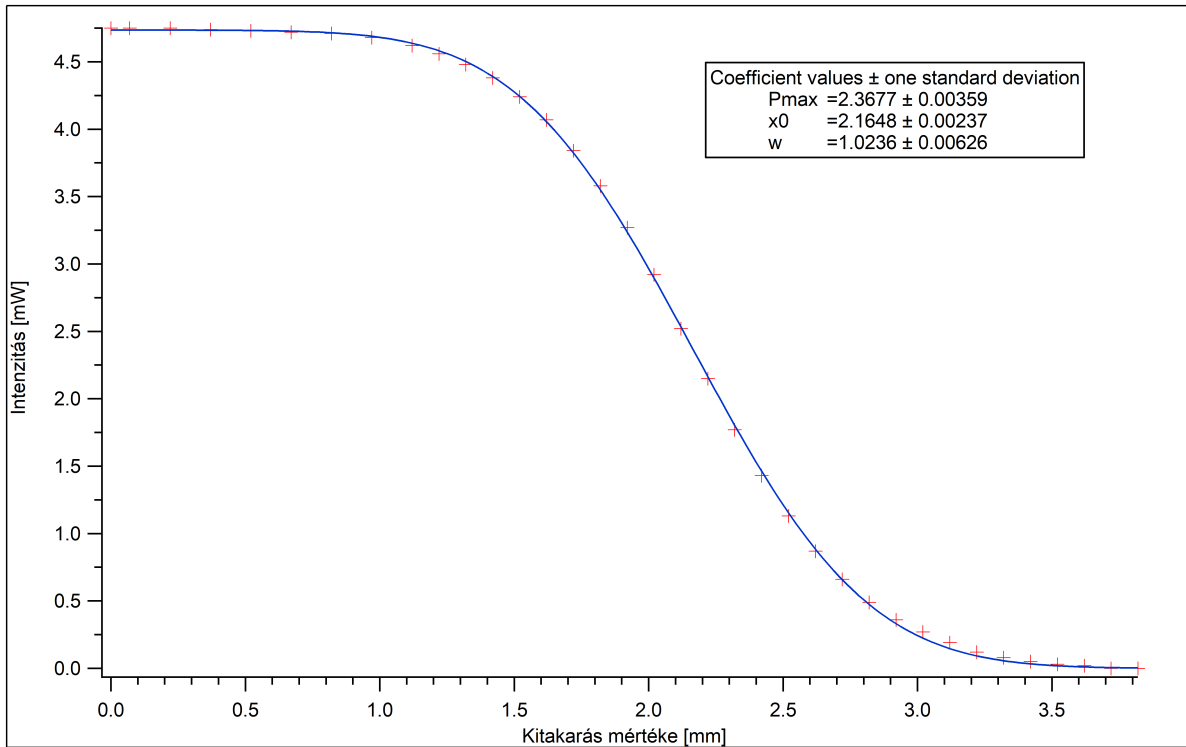
Amelyben I_0 az optikai tengelynél lévő maximális intenzitás, ρ a sugárirányú eltérés a nyaláb közepétől, valamint w a nyaláb sugár. Ez azt a nyaláb közepétől mért távolságot jelenti, ahol az intenzitás az $\frac{1}{e^2}$ részére esik. Ennek kétszeresét hívjuk nyalábátmérőnek.

Ezt felhasználva Coherent Fieldmax II TO típusú lézerteljesítmény mérő és OP-2-VIS típusú mérőfej segítségével megmértem a kollimált fénynyaláb maximális teljesítményét kitakarás nélkül. Ezt követően mikrométer orsóval finoman állítható tartót megfelelően összerakva egy fémlappal eleinte 0.15 mm-enként, majd mikor nagyobb teljesítménycsökkenést tapasztaltam 0.10 mm-enként takartam ki a fényt. A 0 helyzetnek a kitakarás mentes állapotot tekintve felvettem az adott mértékű kitakarásokhoz tartozó teljesítményértékeket.

A 0 helyzettől való eltérés függvényében ábrázolva a teljesítményt olyan adatpontokat kaptam, amelyre [?] alapján 13. egyenletnek megfelelő függvényt illesztve az illesztési paraméterekből meghatározható a nyalábátmérő (az egyenletben megjelenő erf függvény a Gauss-nyaláb integrálja). Itt P_{max} a maximális teljesítmény fele, x_0 a félértékhez tartozó x távolság és w a nyaláb sugár.

$$f(x) = P_{max} \cdot (1 - \operatorname{erf}(\sqrt{2} \cdot \frac{x - x_0}{w})) \quad (13)$$

Az adatpontok és az illesztés a 11. ábrán látható.

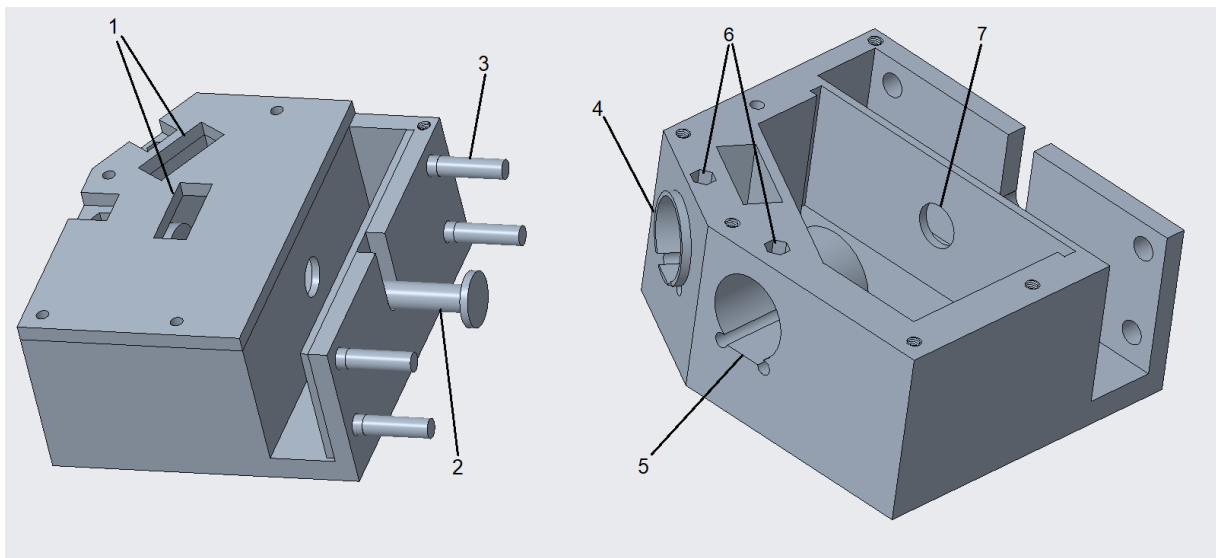


11. ábra. Fényteljesítmény mérővel kapott értékek a kitakarás függvényében, valamint az ezekre illesztett függvény és illesztési paraméterei

Mivel a kitakarás skálája mm-ben értendő, így a w paraméterből megkapott nyaláb sugarat is milliméterben kell értelmezni. A nyalábátmérő a w paraméter kétszereséből adódóan $d_{ny} = 2.04\text{mm}$, amely kellően nagy felület megvilágítására alkalmas.

3.3. Mintatartó megvalósítása

A mintatartót PLA típusú műanyagból, 3 dimenziós nyomtatással készítettem, amely módszernek első lépése a modellalkotás. A legyártandó mintatartót a PTC Creo nevű programmal terveztem, modelljét a 12. ábrán tekinthetjük meg.



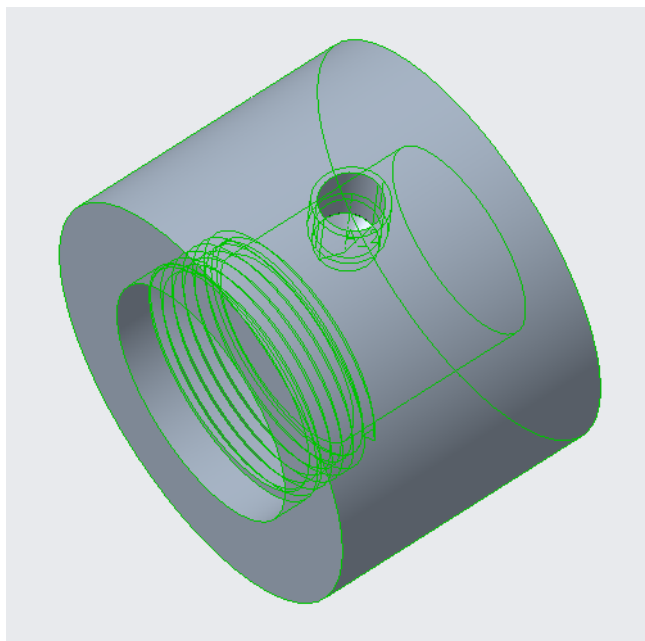
12. ábra. Mintatartó modellje

A tartó három különálló részből tevődik össze, melyből a legkomplexebb az alsó rész, ami a vázát adja az egésznek. Az alsó részt láthatjuk a 12. 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 fluoreszcencia fotonok 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 befogást elősegítő hernyócsavaroknak tervezett hely látható (6) számnál. A (7) számnál található a szilárd minta gerjesztéséhez szükséges rész. Az ide tervezett rugó segítségével a levél kissé kisimul a mérési keresztmetszeten. A műanyag szerkezet a minta finomabb rögzítése szempontjából is jó választás, ugyanis a levélminták a legtöbb esetben sérülékenyek.

Az ábrán (3) számmal jelölt rudakon rugók biztosítják, hogy a levelet a lemez fixen, de óvatosan tartsa. Ez a rögzítési módszer a különböző levélvastagságok miatt indokolt. A rugóerő megfelelő megválasztásával a növény minta sérülése elkerülhető, minimalizálható. Előfordulhat az is, hogy a levél széltében vagy hosszában nagyobb helyet igényel, mint amekkora maga a mintatartó. Emiatt látható az alsó rész oldalán egy kivágás.

A gerjesztőlézer és a detektor befogási helyénél ((4) és (5)) látható egy-egy hatszög alakú rés fölül (6), valamint két-két kör alakú bemenet alul, amelyek az adott elemek fixálását segítik elő. A kör alakú bemenetbe fémcsapokat helyeztem, amelyekre felfekszik a henger alakú csatolóelem, valamint a detektor leképező rendszerének tubusa. A hatszögletű résbe fémfuratok kerültek, amelyekben egy-egy hernyócsavarral felülről is rögzítettem az elemeket, így mind a gerjesztőlézer, mind a detektor stabilan rögzül.

Azért, hogy a későbbiekben a mérőfejet más hullámhosszú (például kék színű) gerjesztéssel is használhassuk, csereszabatság szempontjából előnyös az optikai szálon lévő kollimátor lencse és a mintatartó közé egy (fém) adapter elem tervezése és megvalósítása. (13. ábra). A kötőelmen található csavarmenet a kollimátoron lévő menettel kompatibilis, illetve radiális irányban az M3 furat a korábban említett 12. ábrán szereplő (6) számnál becsatlakozó hernyócsavarhoz, a rögzítéshez szükséges.



13. ábra. Lézer végén elhelyezkedő rögzítőelem modellje

A detektorba beérkező fény begyűjtése egy leképező optikán keresztül történik, melynek részegységeit a 14. ábrán tekinthetjük meg.



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

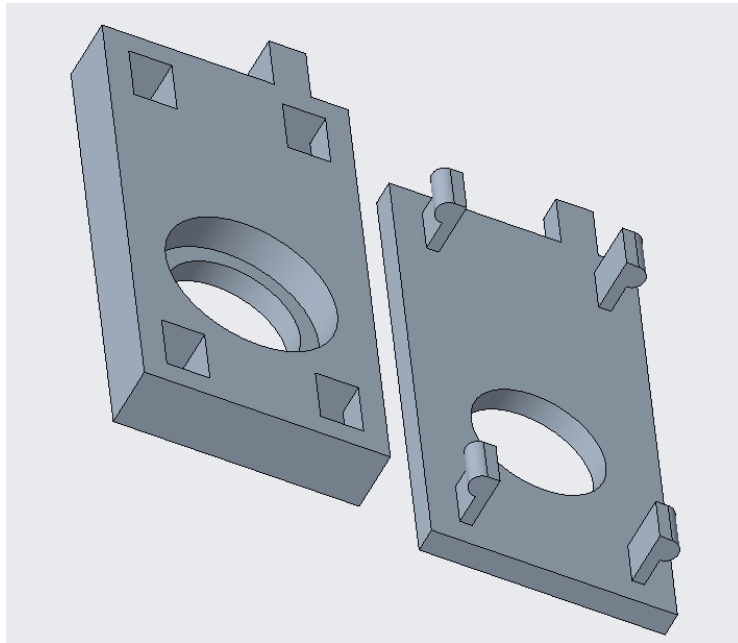
Az ábrán (a) betűvel jelölt rész maga a leképező optika (MAP052550-B), amely két domború lencséből áll. Ennek az optikai rendszernek az effektív fókusz távolsága indokolta a 3.2. fejezetben taglalt számításokat. A (b) jelű rész egy csatolóelem, amely a (c) jelű tubust és a leképező optikát kapcsolja össze. A (c) tubusban található egy felüáteresztő élszűrő és egy sávszűrő, amelyek biztosítják, hogy csak a számunkra megfelelő hullámhosszú fluoreszcencia fényt engedjék át. Mivel a mérni kívánt fluoreszcencia fény jól meghatározott hullámhossztartományba esik, ezen két szűrő megfelelő megválasztásával a tartóban szóródó gerjesztőfényt és a háttérből érkező fotonokat elkülönítettem a releváns információt tartalmazó fluoreszcencia-fotonoktól. A (d) jelű részelem (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 fotonszám-érzékelés nagyon érzékeny a szögekre. 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 12. 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 jelalak torzulásának elkerülése érdekében a lézerteljesítményt érdemes a korábban taglalt 90%-os Intensity értéken tartani. A különböző minták azonban más-más mértékben gerjesztődnek, ami miatt az esetek túlnyomó részében túl sok fluoreszcencia foton keletkezett. Ezt a problémát a gerjesztési- és detektor oldalon elhelyezett denzitásszűrőkkel orvosoltam. A rendszer méreteit úgy választottam meg, hogy mindkét oldalra 1-1 félcollos

szűrőt helyezhesek el.

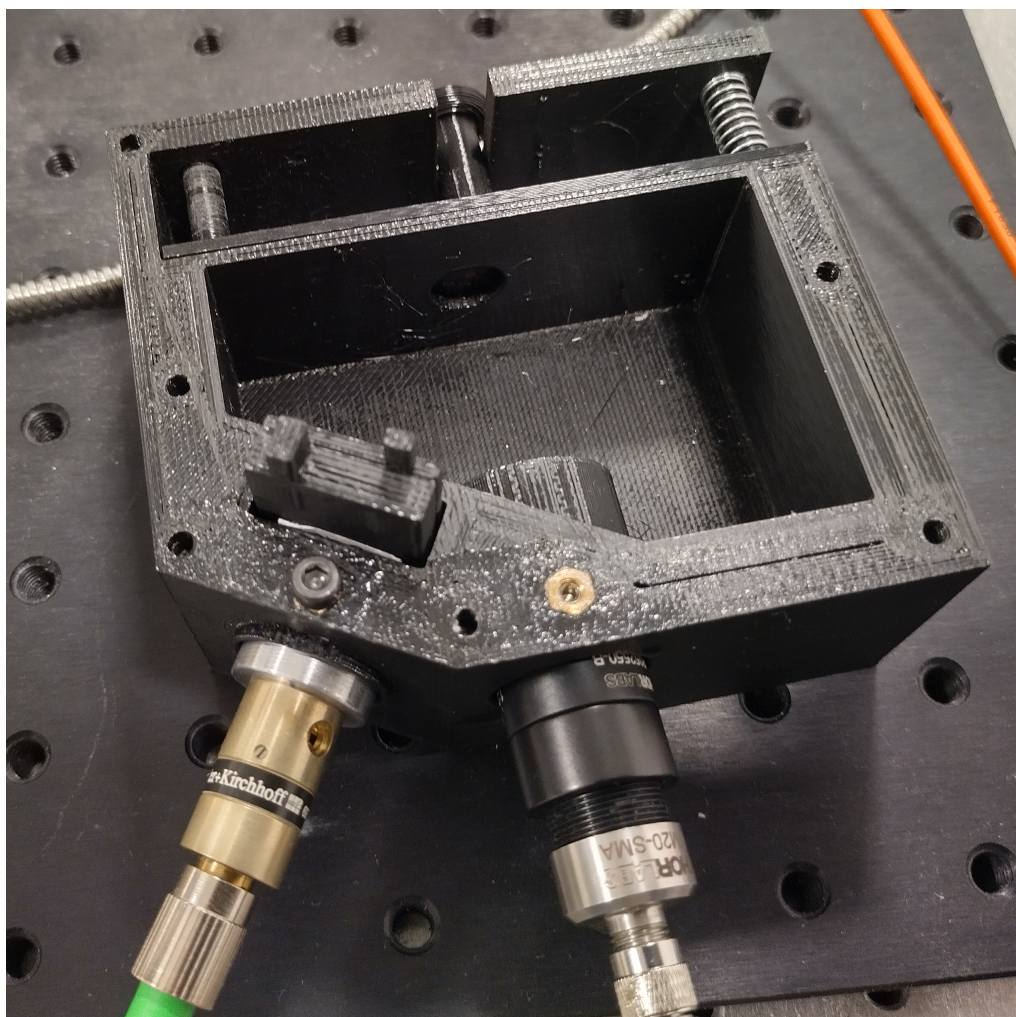
A saját kialakítású denzitásszűrő-tartó tervezését a 15. ábrán láthatjuk.



15. 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 paten-
tok a négy hézagba pattannak be, ezzel összekapcsolva a szűrőtartó két felét. A darabok tetején látható fülek a két fél szétszedését, valamint a tartóelemek mintatartóból való kiemelését szolgálják.

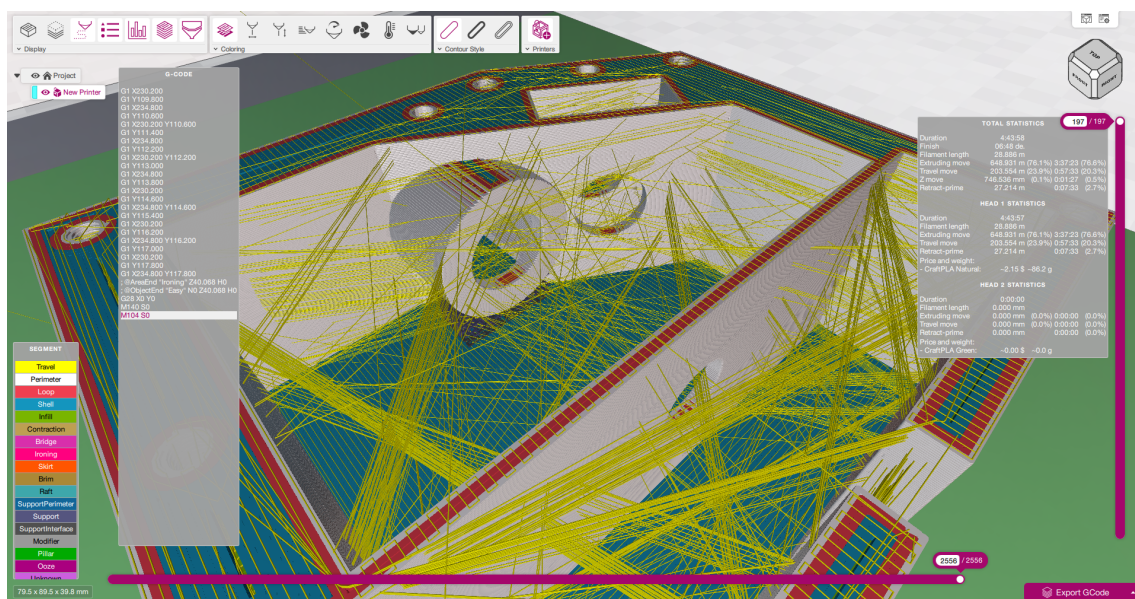
Az egyes elemeket utómunkálatokat követően (pl csiszolás, ragasztás) összeillesztetem. Az így kapott kinyomtatott és összeszerelt, szilárd minták mérésére szolgáló mintatartó a 16. ábrán látható.



16. ábra. Szilárd minták mérésére alkalmas mintatartó

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-formátumra 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 hogyan valósuljon meg (17. ábra).



17. ábra. Program a 3D modell nyomtatásra alkalmas file generálásához

Nyomtatási metódus és anyagok szerint többféle nyomtató is létezik. Az általam tervezett vizsgálatokhoz nem szükséges merev vagy strapabíró anyaggal dolgoznom, ellenben előnyös, ha kis tömegű a mintatartó, ezért műanyagból célszerű azt elkészíteni. Többféle műanyagnyomtató-eljárás létezik, ilyenek például az SLA (Stereo Lithography Apparatus), vagy az SLS (Selective Laser Sintering). Az előbbi fotopolimer töltőanyagot használ alapul, amely lézerfény hatására térhálósodik. A műgyantát egy kádból rétegenként kiemelve és megszilárdulva valósul meg a modell. Az SLS módszer egy termoplasztikus porszerű anyag összeolvasztásával dolgozik. Ennek előnye a nagy pontosság és a geometriai szabadság, ellenben viszonylag drága technológiának számít [17].

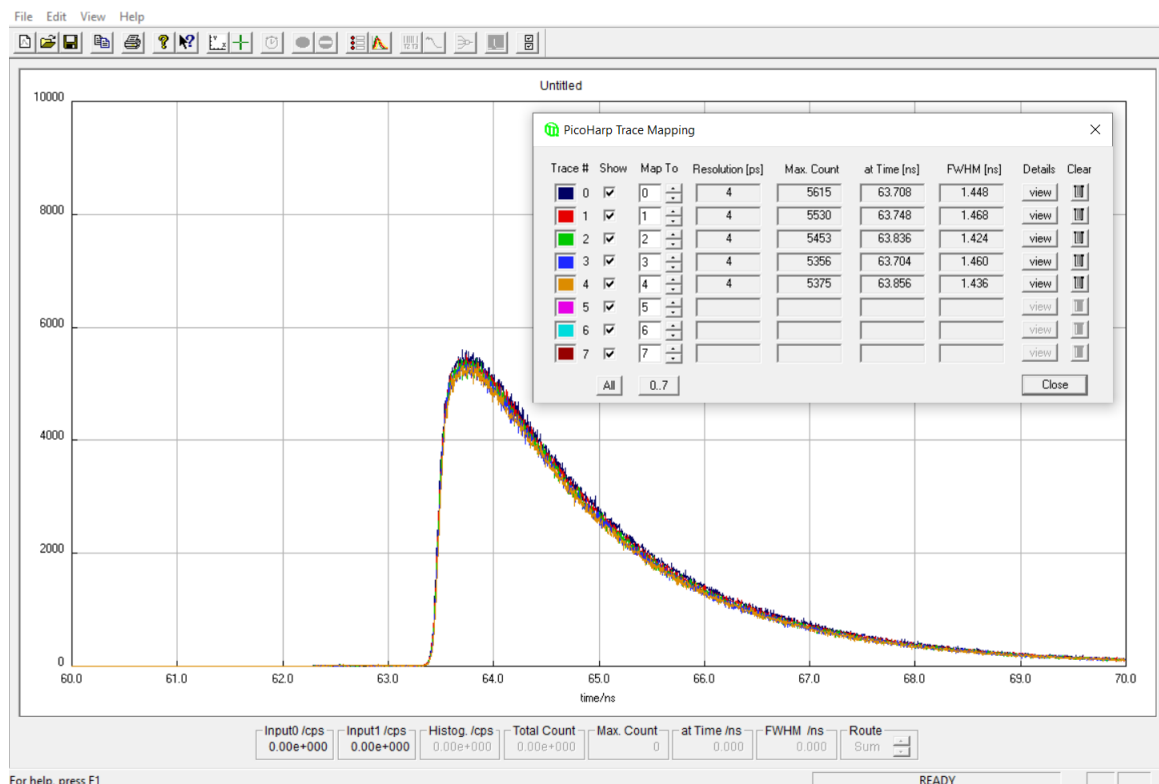
A mérésekhez használt mintatartót FDM (Fused Deposition Modeling) módszerrel nyomtattam PLA műanyagból. Ez a fajta nyomtató a szilárd műanyag szálát egy forró, esetünkben 215 °C-os extruderbe vezetve megolvasztja. Az extruder alján a meleg, folyékony műanyag kifolyik, így annak pozicionálásával egy tálcán rétegenként képes a gép felépíteni a mintatartót. A módszer előnye, hogy viszonylag olcsó az ezen alapuló nyomtató, és az általam használt alapanyag is. A hátránya viszont, hogy a fentebb említett eljárásokhoz képest kisebb a pontossága (pár tized 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 eltávolíthatóak a nyomtatást követő utómegmunkálással.

3.4. Mérések és méréskiértékelés

3.4.1. Mérő és kiértékelő programok

A mérésekhez és az adatok kiértékeléséhez rendelkezésemre álltak a PicoHarp300 mérő, valamint az EasyTau 2 nevű méréskiértékelő programok, amelyek a lézerekhez hasonlóan a PicoQuant nevű vállalat termékei. A PicoHarp kezelőfelületét a 22. ábrán láthatjuk.

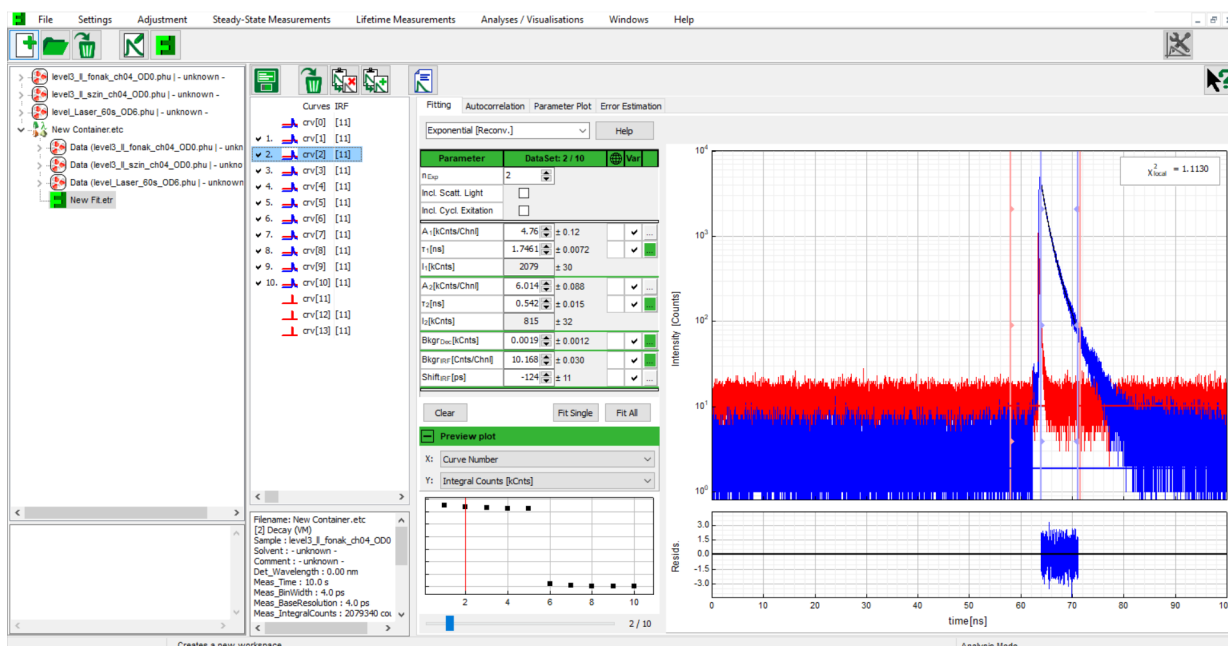
Itt állíthatunk be olyan fontos paramétereket, mint például a mérés integrálási idejét, valamint a program azt is jelzi, ha túl gyakran érkezik gerjesztő fotonra fluoreszcencia foton (lásd 3.1. fejezet 5%-os szabály).



18. 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 munkablakban a program megadja a jel félértékszélességét, ez azonban nem azonos a fluoreszcencia lecsengési idővel. A lecsengési idők precízebb meghatározásához az EasyTau 2 programot használtam, amely a ?? fejezetben taglalt rekonvolúciós eljárást alkalmazza.

A programban beállítható, hogy egy adatsort készülékválasz-függvényként 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 tehettem meg. Azt tapasztaltam, hogy a lecsengésnél lényeges, hogy időben milyen hosszú adatsort vegyük figyelembe, ugyanis a jel végén előfordulhatnak kisebb - a logaritmikus skálán érzékelhető - elektronikából adódó csúcsok. Az IRF-ben ilyen kiugrás csupán elvétve található, így ott a kurzorok beállítása lényegi eltérést nem okoz az illesztés eredményében. Egy illesztést akkor tekintettem elfogadhatónak, ha a hibát jellemző χ^2_{loc} paraméter 0.7 és 1.3 között esett (amely érték tökéletes illesztésnél 1 lenne).



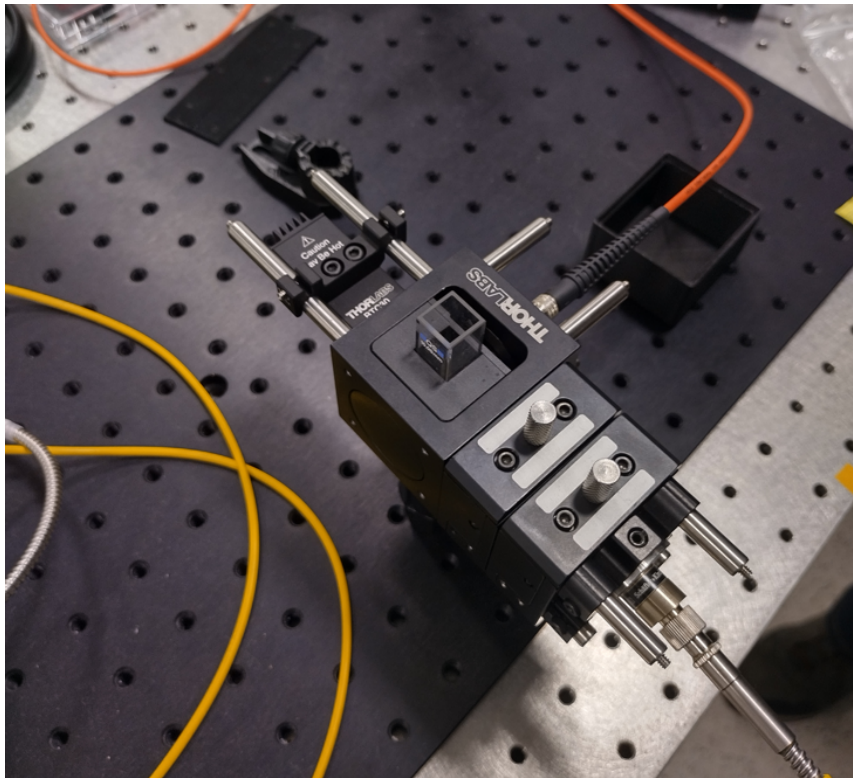
19. ábra. EasyTau kezelőfelülete

A kezelőfelület baloldalán láthatóak a beolvasott adatsorok, amelyeket a mintatartó segítségével mértünk, illetve ide kerülnek a már kiértékelt adatsorok, illesztési paraméterek, ábrák, amelyeket egy tárolóba (container-be) gyűjt össze a program. A kiértékelni kívánt adatsorokak kijelölhetjük, majd az ezután felugró ablak három főbb részre osztható. Ennek baloldalán azon adatsorok láthatóak, amelyeket a porogram kiértékel. Itt állítható be, hogy mely adatsor IRF (piros), illetve melyik fluoreszcencialecsengés (kék). A tőle jobbra található panelen 4 különböző fül segítségével választhatunk, hogy melyik ablakot szeretnénk megnyitni. Az első ablak az illesztési paramétereket tartalmazza, amelyeket kezdetben a felhasználó állít be, ahonnan a program az iterációs folyamatot elkezdi. A paraméterek mellett jobbra beállítható továbbá, hogy mely értékek között változtassa a program az adott paramétert. A második ablak megnyitásával az autokorrelációs függvény tekinthető meg, amely az illesztés pontosságáról hordoz információt. A harmadik ablak az illesztési paramétereket ábrázolja, a negyedik ablakban pedig a hibabecslés található. Utóbbiban megjelenik a kiértékeléseimnél használt átlagolt fluoreszcencia lecsengés (7). Ettől a paneltől jobbra a kiértékelőablak harmadik része található, amelyen az aktuális adatsort (kék), IRF-et (piros), a hozzájuk tartozó háttér (vízszintes piros- és kékvonal), az illesztés pontosságát jellemző χ^2_{loc} , valamint az illesztett függvényt (fekete) tartalmazó ábra látható. Az illesztés elején itt állíthatja be a felhasználó az adatsorban szereplő lecsengést jellemző adatokat a két-két kurzor segítségével (piros és kék függőleges vonalak). Az intervallumon kívül eső adatokat a program figyelmen kívül hagyja.

3.4.2. Kelkáposzta levelek vizsgálata

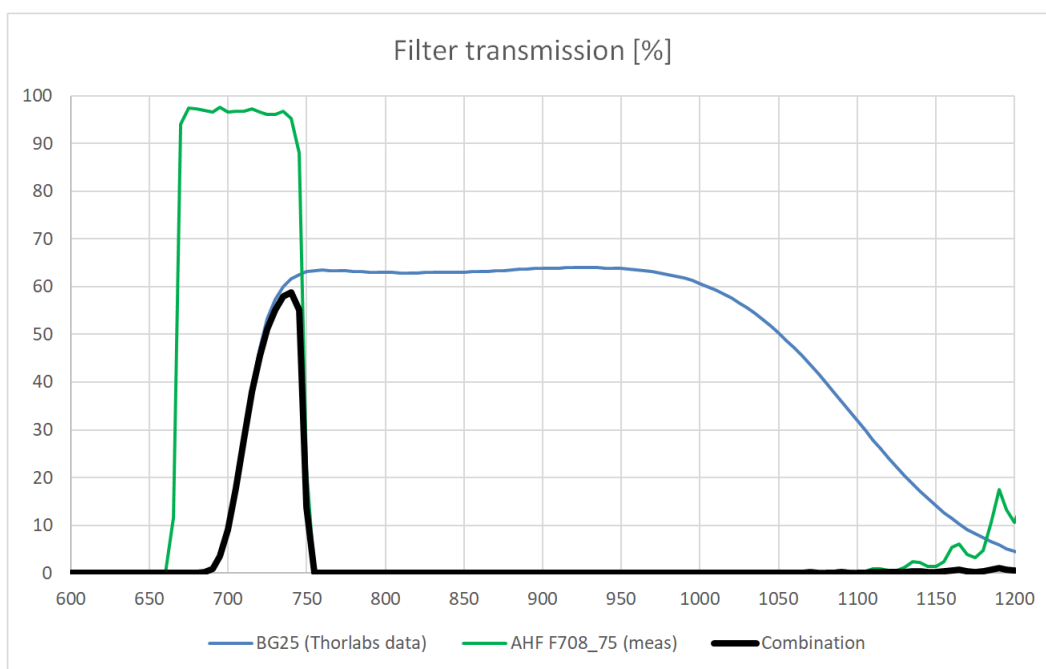
Az elkészült mintatartóval kelkáposztaleveleken végeztem fluoreszcencia élettartam méréseket, amely növény a rétegeltsége miatt előnyös a vizsgálataimhoz. A külső rétegek a környezeti fénynek jobban kitettek, bennük jól fotoszintetizáló kloroplasztiszok vannak. Ezzel szemben a belső rétegekbe nem, vagy 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 7. 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 (20. ábra).



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

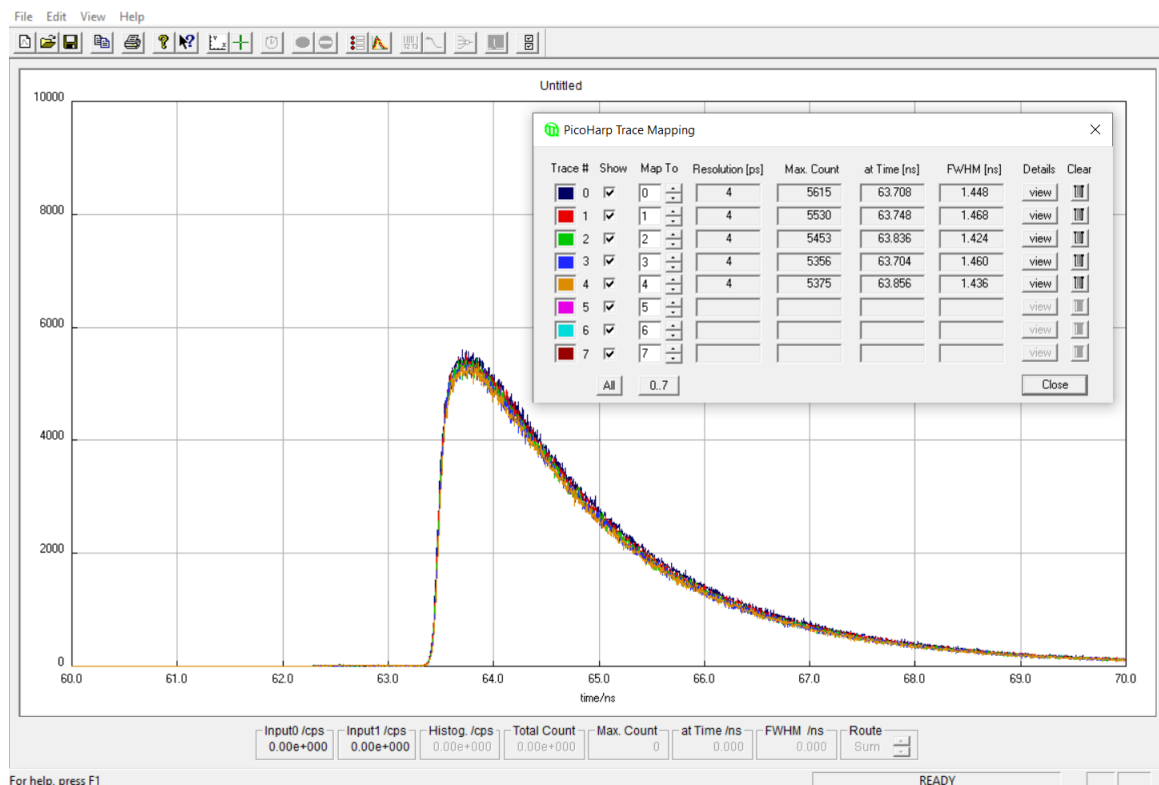
Minden mérést a környezeti fénytől védett környezetben végeztem el. Az 14. ábrán szereplő (c) tubusban olyan szűrők vannak, amelyek leginkább a 700 nm és 750 nm hullámhosszú fényt engedik át. A két szűrő együttes transzmisszióját a 21. ábra mutatja.



21. ábra. Tubusban lévő szűrők transzmissziója a hullámhossz függvényében

Amennyiben túl széles levéllel végeztem a mérést, a 12. ábrán szereplő tető módosított változatát helyeztem a tartóra. A biológiai minták alacsony fénykitettségeinek megőrzése érdekében.

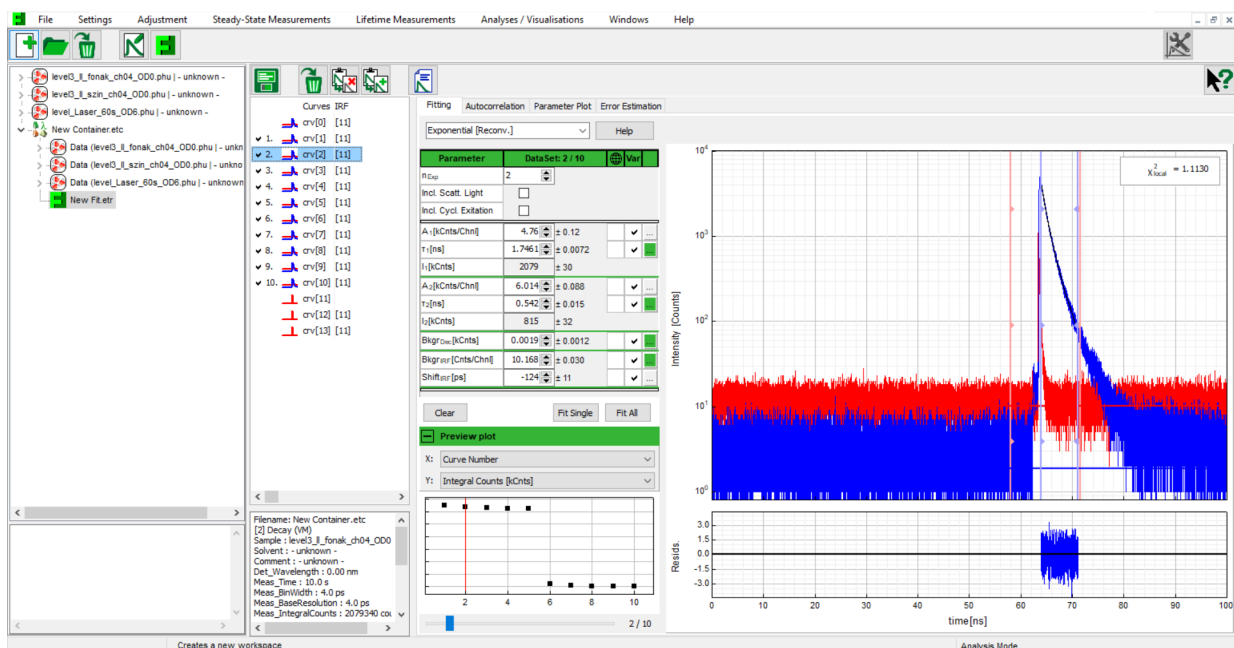
A mérésekhez és az adatok kiértékeléséhez rendelkezésemre álltak a PicoHarp300 mérő, valamint az EasyTau nevű mérésiértékelő programok, amelyek a lézerekhez hasonlóan a PicoQuant nevű vállalat termékei. A PicoHarp kezelőfelületét a 22. ábrán láthatjuk. Itt állíthatunk be olyan fontos paramétereket, mint például a mérés integrálási idejét, valamint a program azt is jelzi, ha túl sok az egy gerjesztőfotonra jutó fluoreszcencia.



22. ábra. PicoHarp kezelőfelület

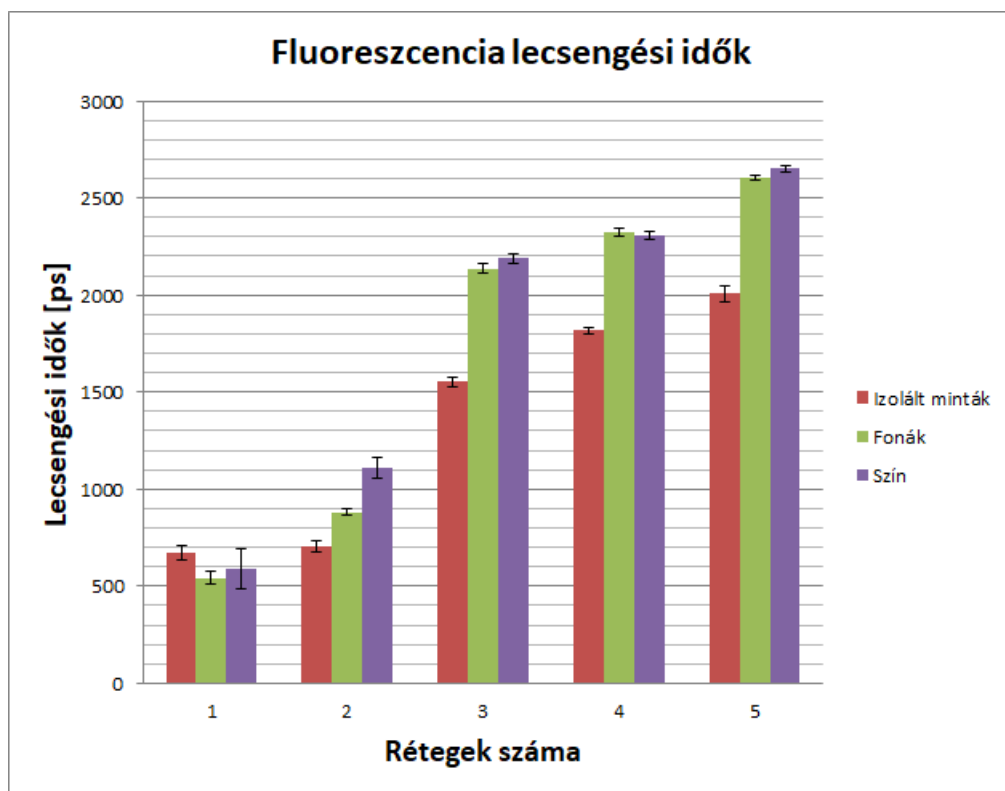
A függőleges tengely a beérkezett fotonok számát jelzi, míg a vízszintes a gerjesztés óta eltelt időt mutatja. A program 8 különböző adatsort képes kirajzolni és elmenteni, amely megkönnyíti az egyes mintákon elvégzett kísérletek ismétlését és kiértékelését. Egy előhívható munkaablakban a program becslést 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).



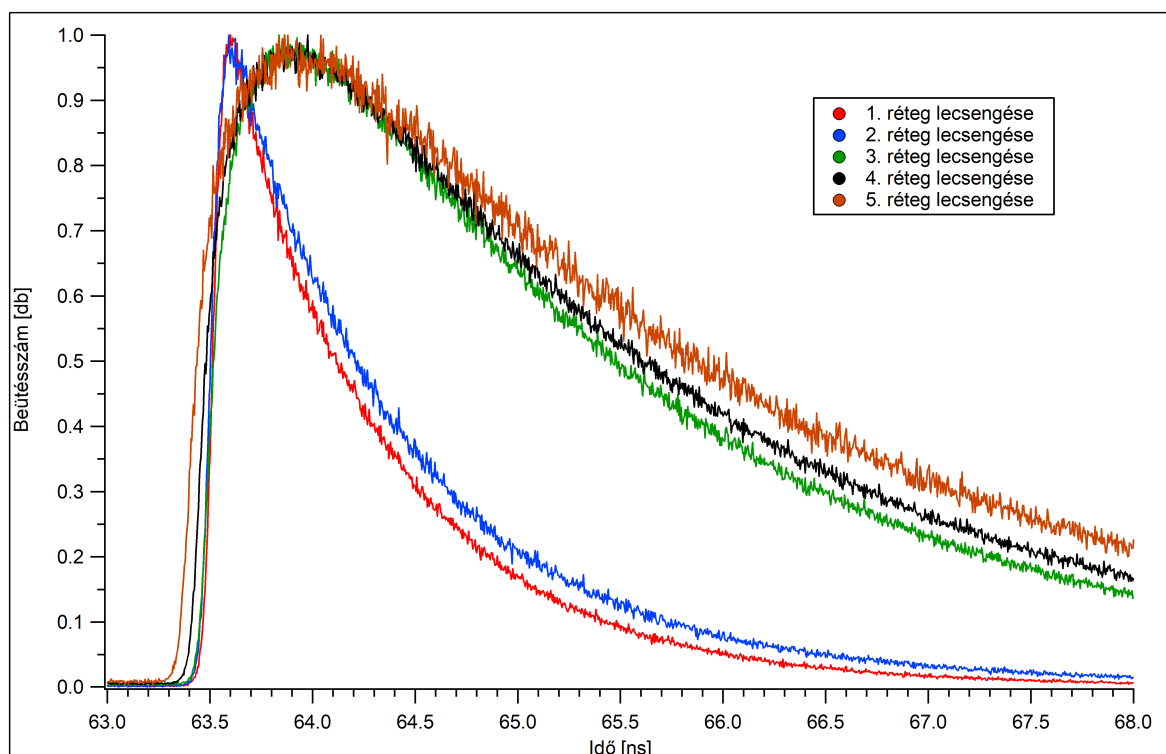
23. ábra. EasyTau kezelőfelülete

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. Ezeket az eredményeket oszlopdiagramon ábrázoltam, melyen látszódik, hogy jelentős különbség mérhető a szilárd mintákon, viszont nyomkövethető 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.

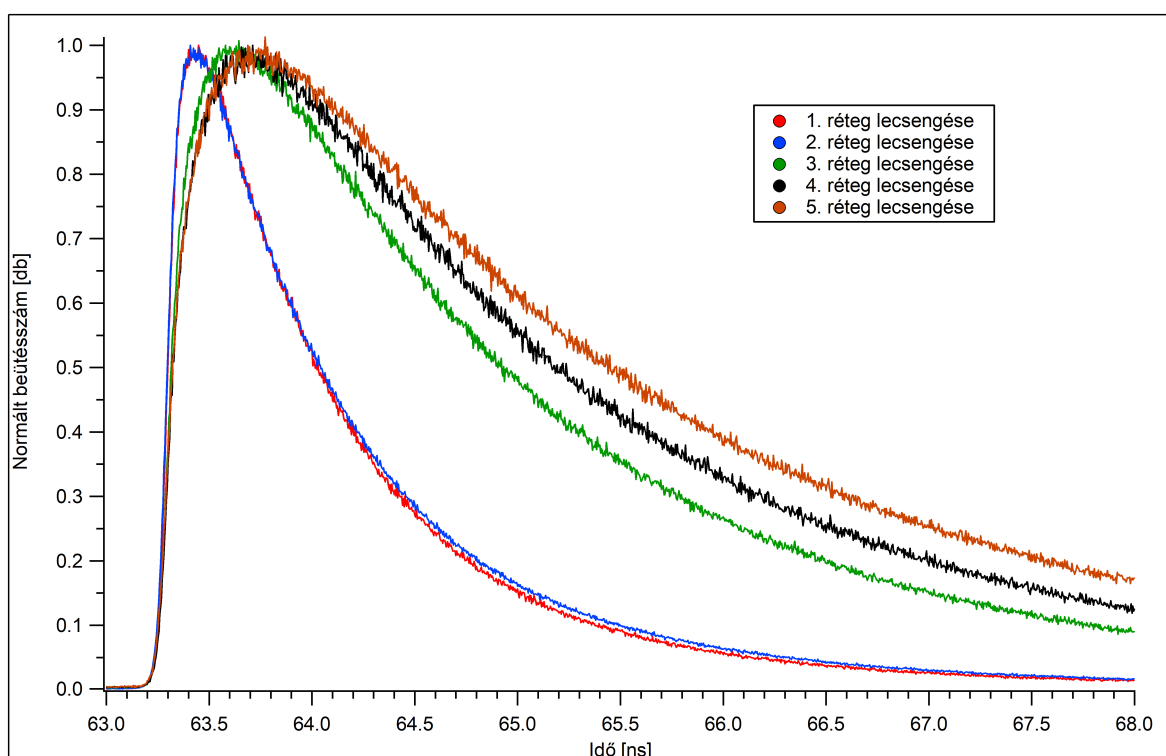


24. ábra. Lecsengési idők az egyes rétegekre vonatkoztatva

Szemmel is jól megfigyelhető a lecsengési idő különbség, ha az izolált minták egyes rétegeihez tartozó adatsorait egy ábrán tüntetem fel (26. 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 (25. ábra).



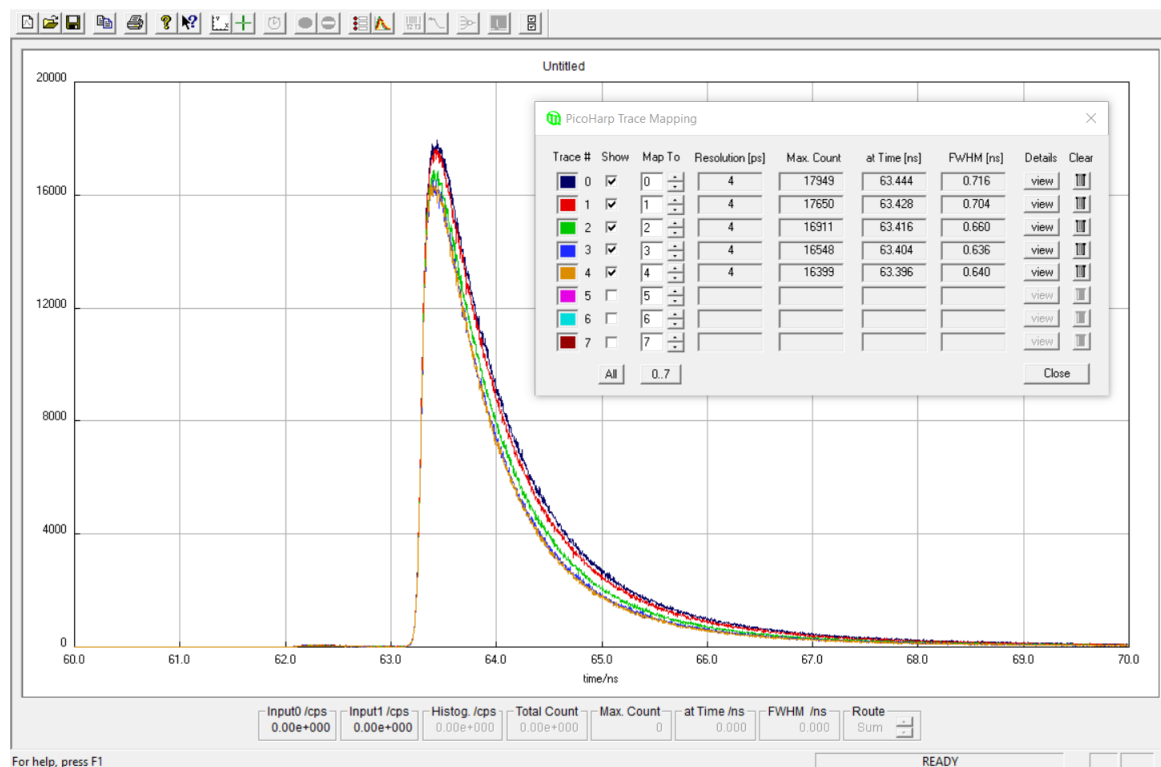
25. ábra. Egyes rétegek fonákjainak normált lecsengése



26. ábra. Rétegekből készített izolált szuszpenziók normált lecsengése

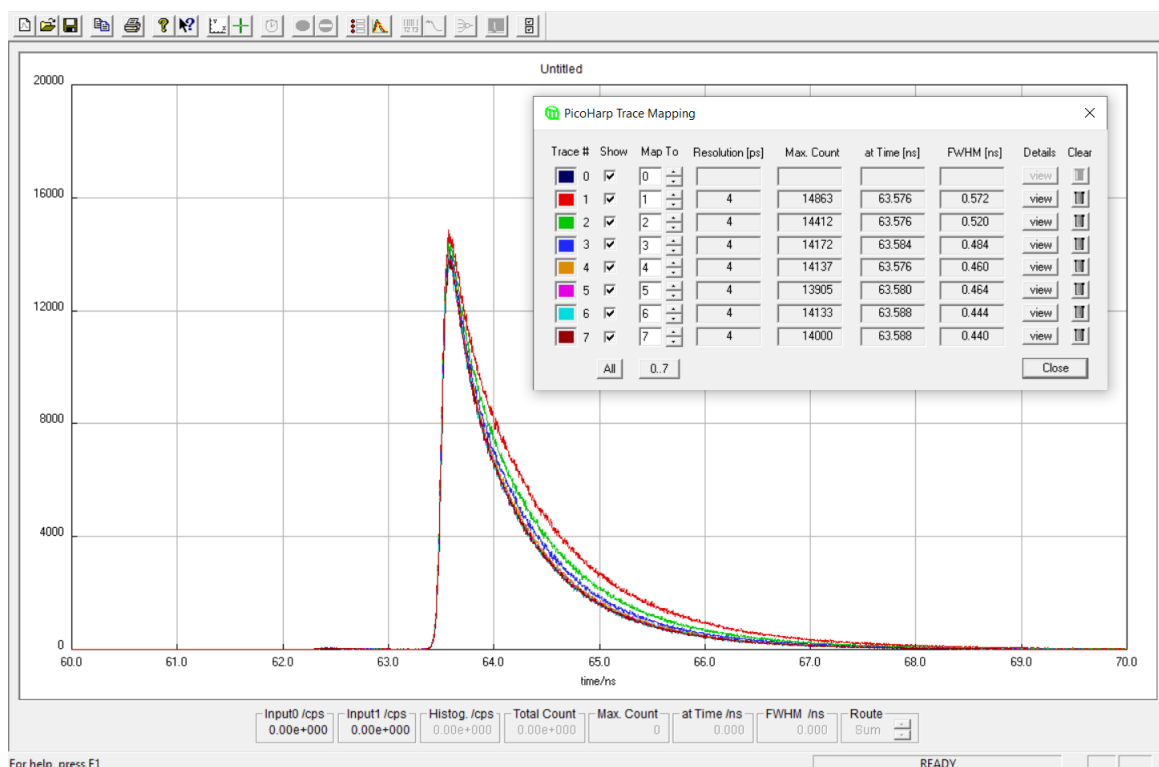
A folyadékminták és a levelek színén mért értékek esetében megfigyeltem egy másik érdekes jelenséget is, amely a mérések szórását növelte. A biológiai minták esetében gyakran előfordul az a nehézség, hogy a mérési eredményt befolyásolják a mérés előtti

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 27. ábrán megfigyelhető, ahogy a relaxációs idők minden mérés után egyre kisebbek.



27. ábra. Szuszpenzióban a lecsengési kinetikának változása az idő függvényében

Ugyanez a jelenség játszódott le az 1. réteg levél színén elvégzett méréseknél (28. ábra).



28. 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 alapkutatási 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 folyékonymintákon 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 grüner Pflanzen. *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 mérésiértékelési 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-nyomtatatas-szelektiv-lezerszintererezes-utmutato/>