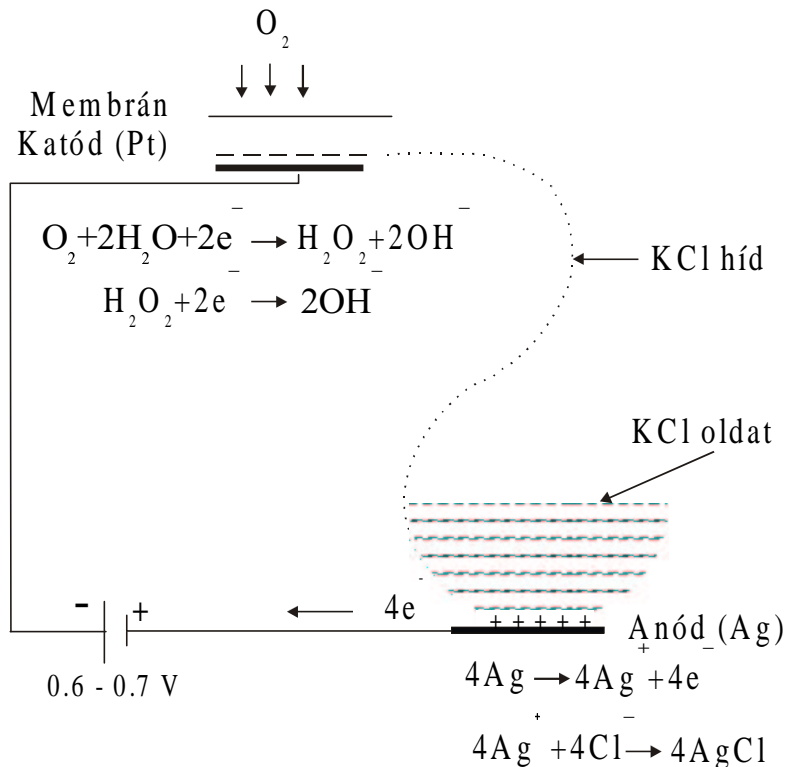


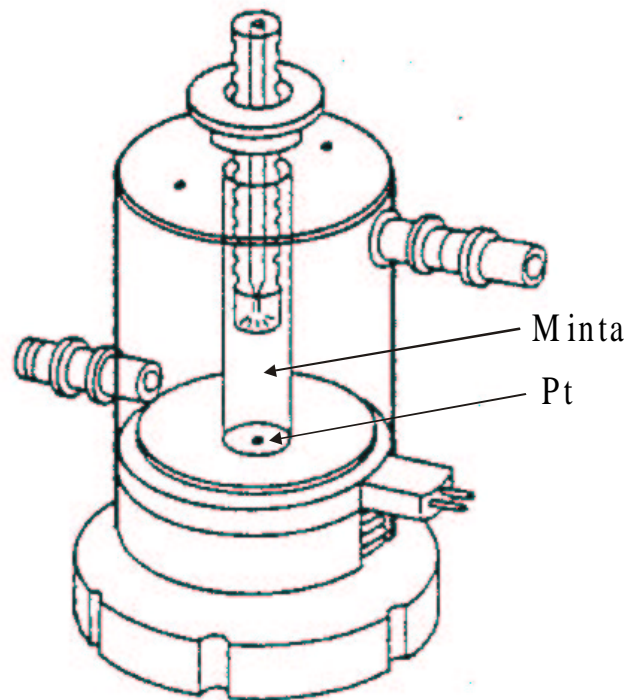
Oxigén polarográfia

Oxigénfejlődés volt az első fotoszintetikus reakció, amit több mint 200 éve felfedeztek és aminek mérésére azóta számos módszert dolgoztak ki. Egyszerűsége és széleskörű alkalmazhatósága miatt leginkább a polarográfias módszer terjedt el a fotoszintetikus oxigén produkció mérésére. A rutinmérésekben alkalmazott oxigén polarográf, az ún. Clark elektród, ami egy bipoláris elektrokémiai oxigén szenzor. A rendszer két elektródból, Pt katód és Ag/AgCl anód illetve az őket összekötő KCl elektrolitból áll. A két elektród közötti polarizációs feszültség 0.6 - 0.7 V. A folyadék vagy gáz fázisú mintából a Pt katódhoz diffundáló O_2 redukálódik. Az anódon az ezüst oxidálódik és AgCl válik ki. Az elektród folyamatok során keletkező áram egyenes arányos a katódon redukált oxigén mennyiségével (1. ábra).



1. ábra. Az oxigén polarográf elektród folyamatai

A fotoszintézisben alkalmazott oxigén elektródoknak két típusa van, a Clark és a Joiot elektród. A Clark elektród esetén az elektródokat egy olyan membrán fedi le, ami permeábilis az oxigén számára, de nem eresztí át a vizet és az ionokat. A Pt elektród kisméretű és a membrán alatt tömény KCl elektrolit köti össze az Ag anóddal (2. ábra).

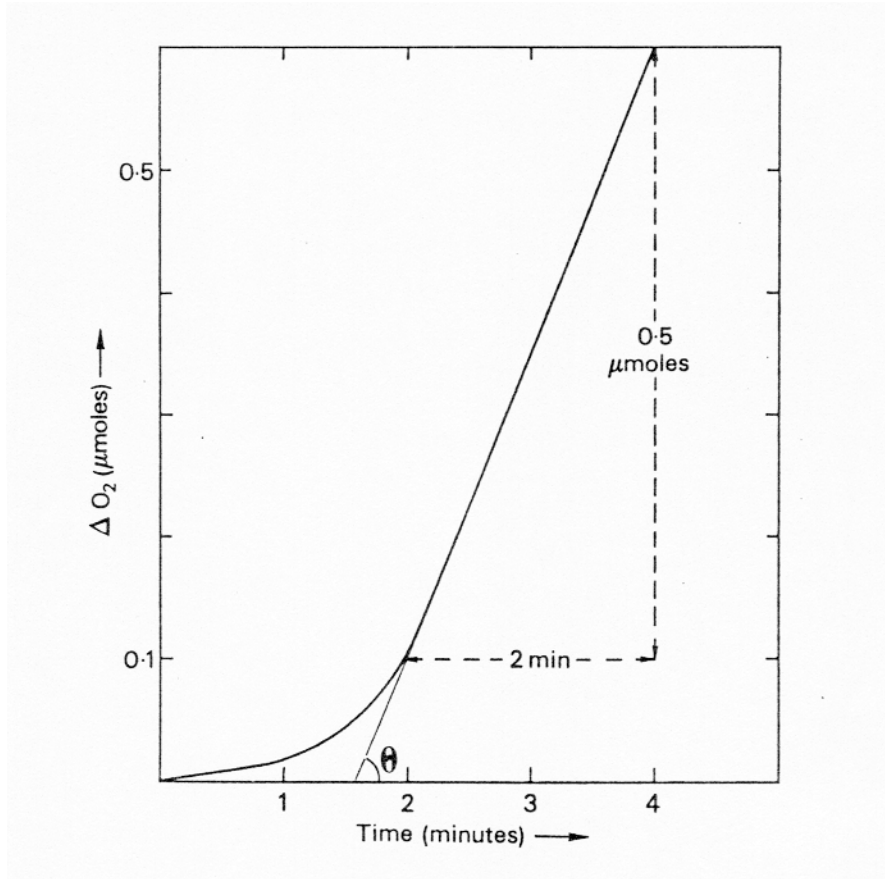


2. ábra. A Clark-típusú oxigén elektród szerkezete.

A kicsiny katódfelület, a zárt mintatartó és a minta keverése biztosítja, hogy a minta térfogatában az oxigén koncentráció állandó, amit a katódon történő oxigénfogyasztás nem befolyásol. Így az elektród által mért oxigén mennyisége a mintában található oxigén parciális nyomásával arányos. Az elektródból kapott jel könnyen kalibrálható mintát nem tartalmazó, levegővel-telített oldatban mért jellel összehasonlítva, ami lehetővé teszi az oxigén koncentráció (parciális nyomás) kvantitatív meghatározását. Mivel az oxigén folyadékokban való oldhatósága erősen függ a hőmérséklettől, kvantitatív mérésekhez elengedhetetlen az elektród termosztálása, és a kalibrálás során az oxigén oldékonyság hőmérséklet függésének korrekcióba vétele. A membránnal fedett elektród nagy előnye, hogy a mintához lehet különböző kemikáliákat, elsősorban a folyamatos oxigénfejlesztéshez szükséges akceptorokat adni anélkül, hogy azok az elektródfolyamatokat befolyásolnák.

Egy tipikus oxigénmérési kísérletnél a fotoszintetizáló mintát (alga, izolált tilakoid membrán) a szükséges akceptorral együtt a mintatartóba helyezzük. Ezt követően néhány percig sötétadaptáljuk, és mérjük az ún. alapvonalat. Intakt fotoszintetikus rendszerek esetén az alapvonal meredeksége negatív, ami a sötétben lejátszódó respiráció során történő

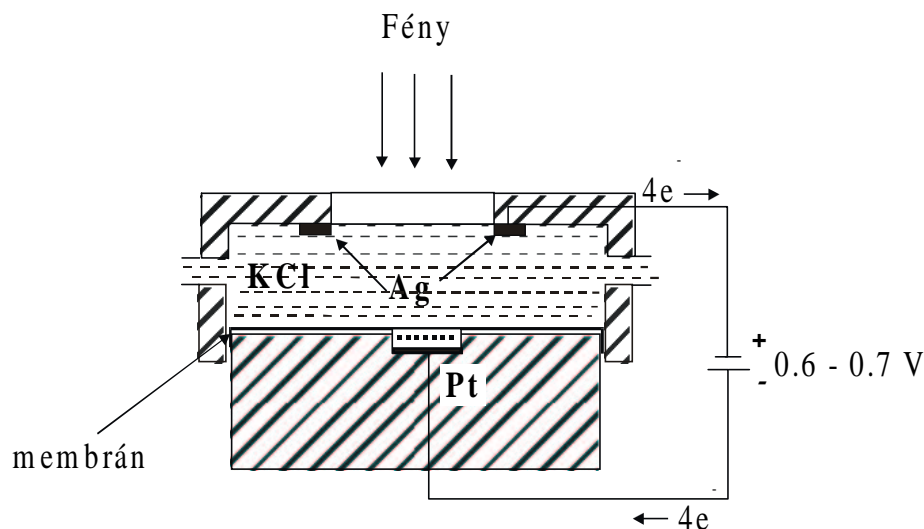
oxigénfelvételt tükrözi. Izolált tilakoid membránokban, respiráció hiányában, az alapvonal meredeksége elvben nulla (ettől eltérést a hőmérséklet változása vagy az elektród instabilitása okozhat). Az alapvonal felvétele után a mintát megvilágítjuk és az egyensúlyi állapot beállása után meghatározzuk a fényindukált és a sötétben mért jel meredekségének különbségét (3. ábra). Ez az érték megfelelő kalibrálás után a minta oxigén fejlesztésének sebességét adja. Ennek tradicionálisan használt mértékegysége a $\mu\text{M O}_2 / \text{mg Chl} / \text{h}$.



3. ábra. Oxigén fejlődési sebesség mérése Clark-típusú elektróddal.

Annak ellenére, hogy a Clark elektród kvantitatív oxigénmérést tesz lehetővé, két hátrányos tulajdonsága is van. Az elektródot fedő membrán miatt a rendszer csak lassan tudja követni az oxigénkoncentráció időbeli változását, tipikusan néhányszor tíz másodperces feloldással. Emellett, a Pt elektród kicsi felülete miatt az érzékenység is kicsi. Ezen hátrányok kiküszöbölésére fejlesztették a gyors és nagyérzékenységű, ún. impulzus elektródokat. Ennek első formáját Pierre Joliot konstruálta a 70-es évek elején. A Joliot elektród esetén a Pt katód felülete nagy (kb. 1 cm. átmérőjű körlap) az Ag anód pedig egy 2-3 cm átmérőjű gyűrű. A minta közvetlenül a Pt katódon helyezkedik el, így az oxigénnek nem kell a membránon átdiffundálni (4. ábra).

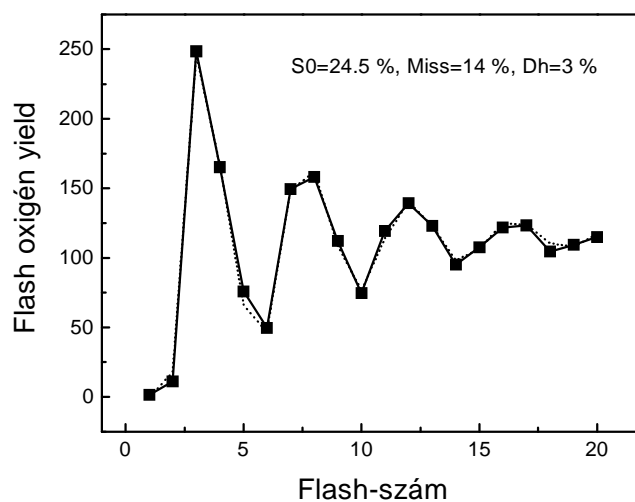
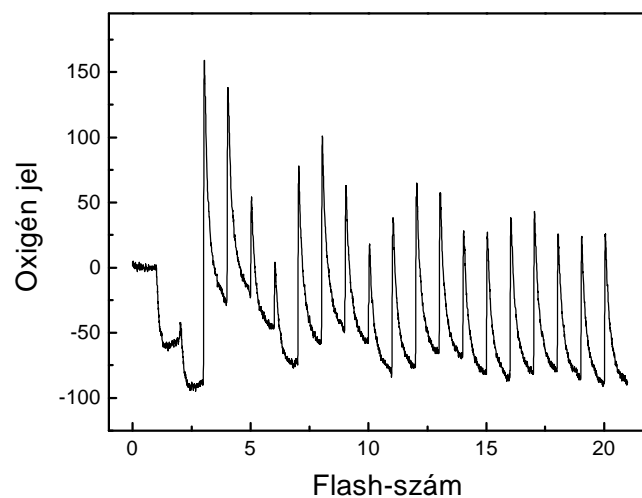
Joliot elektród



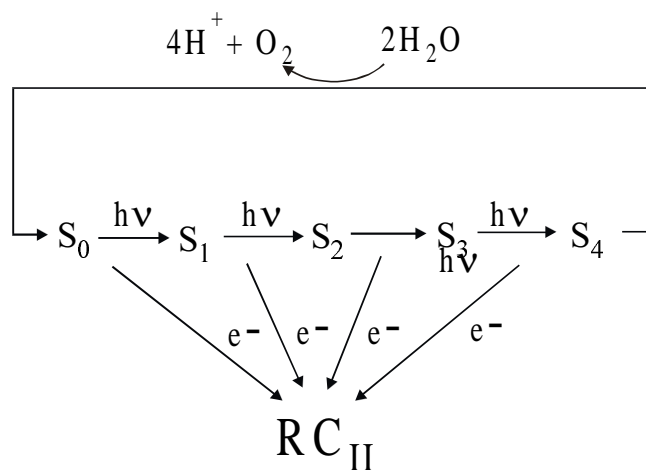
4. ábra. A Joliot-típusú oxigén elektród felépítése.

Ezen elrendezés lehetővé teszi kis térfogatú (50-100 μl) mintából történő oxigénfejlődés kinetikájának néhány μs -os felbontású követését. Illetve, folyamatos fény helyett rövid (1-2 μs) fényimpulzus alkalmazását. A Joliot elektród eredeti elrendezésében szintén tartalmaz membránt, ami a Pt katódra rétegzett mintát választja el a KCl-t tartalmazó puffertól, illetve az ezzel kontaktusban levő Ag anódtól. A Joliot elektród érzékenysége tovább növelhető a membrán elhagyásával, amikor is az Ag anód a Pt katóddal egy síkban van, és azt gyűrű formában veszi körül. Ennél az elrendezésnél a minta mindkét elektródot lefedi és a KCl-t közvetlenül a mintát hígító puffer tartalmazza. A Joliot elektród alkalmazása tette lehetővé annak felfedezését, hogy fényimpulzusokkal történő megvilágítás esetén az oxigénfejlődés 4-es periódusú csillapított oszcillációt mutat (5. ábra). Ezen mérések vezettek el a 4 pozitív töltés szekvenciális tárolására szolgáló vízbontó rendszer ma elfogadott modelljének kifejlesztéséhez (6. ábra).

A flash-indukált oxigénfejlesztés oszcillációjának leírására bevezetett ún. Joliot-Kok modell a vízbontó komplex 5 különböző oxidációs állapotát, S állapotok, posztulálja. Ezek közül az S_0 , S_1 , S_2 , és S_3 stabil állapotok, amelyek közötti átmenetek ($S_i \rightarrow S_{i+1}$) fényindukáltak. Az S_4 állapot az $S_3 \rightarrow S_0$ átalakulás rövid élettartamú átmeneti állapota.

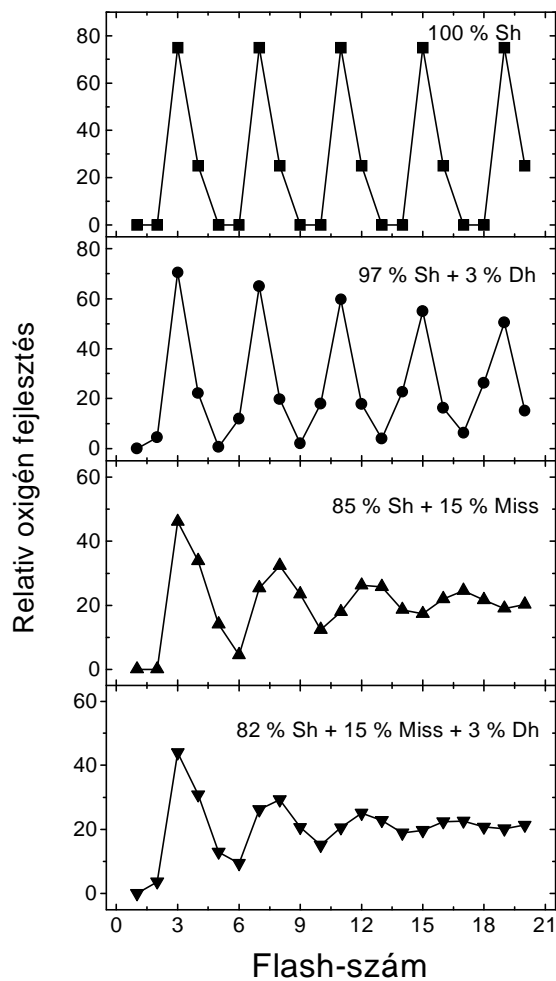


5. ábra. Flash-indukált oxigén jel és oszcillációs szekvencia, Joliot-típusú elektróddal mérve.



6. ábra. Az oxigén fejlesztés Joliot-Kok modellje. S_0, \dots, S_4 jelölik a vízbontó rendszer oxidációs állapotait.

Mivel az O_2 molekula az $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ átmenet során szabadul fel és a maximális oxigén fejlődés a 3. flash után figyelhető meg, ezért sötétadaptált minták esetén a centrumok túlnyomó része (75%) az S_1 állapotban van. Az 1. illetve 2. flash után mérhető zéró, illetve kismennyiségű oxigén azt mutatja, hogy az S_2 és S_3 állapotok sötétadaptált mintákban nincsenek jelen. Mivel a fejlesztett oxigén mennyisége a 4. flash után is magas, ezért sötétadaptált mintákban S_0 állapot is jelen van (25%). Az oszcillációs mintázat csillapodásának értelmezéséhez három fajta átmenetet kell figyelembe venni az S állapotok között (7. ábra).



7. ábra. Az oxigén szekvencia csillapodási paraméterei: single hit (Sh), double hit (Dh) és Miss.

Ezek:

- az egyszeres találat (single hit, β), amikor egy foton elnyelését követően a rendszer eggyel magasabb oxidációs állapotba kerül ($S_i \rightarrow S_{i+1}$). Tipikus értéke 80-85%.

- a kétszeres találat (double hit, γ), amikor egy foton elnyelését követően a rendszer kettővel magasabb állapotba kerül ($S_i \rightarrow S_{i+2}$). Tipikus értéke 2-3%.
- a tévesztés (miss, α), amikor a foton elnyelését követően nem történik oxidációs állapot változás ($S_i \rightarrow S_i$). Tipikus értéke 10-15%.

A fenti modell alapján a flash-indukált oxigén szekvencia a Joliot-Kok-féle mátrixformalizmussal írható le:

$$S^{(i+1)} = KS^{(i)},$$

Ahol $S^{(i)}$ az i -edik fényimpulzus után kialakult S állapot elosztás, K pedig a miss (α), single hit (β) és double hit (γ) tartalmazó átmeneti mátrix.

$$S^i = \begin{bmatrix} S_0^i \\ S_1^i \\ S_2^i \\ S_3^i \end{bmatrix} \quad K = \begin{bmatrix} \alpha & 0 & \gamma & \beta \\ \beta & \alpha & 0 & \gamma \\ \gamma & \beta & \alpha & 0 \\ 0 & \gamma & \beta & \alpha \end{bmatrix}$$

Ez a modell feltételezi, hogy az átmeneti valószínűségek értékei az egyes S átmenetre azonosak.

A flash-oxigén mérések alkalmazási lehetőségei:

- *Az S állapotok kezdeti elosztásának és az átmeneti valószínűségek meghatározása.*

Ebben az esetben megmérjük az adott minta oxigén-fejlesztésének oszcillációs mintázatát. Ezt követően egy legkisebb négyzetek elvén működő minimalizációs eljárással megkeressük a mérési eredményeket legkisebb eltéréssel leíró $S_0, S_1, S_2, S_3, \alpha, \beta, \gamma$ paramétereket.

- *Az S állapotok stabilitásának vizsgálata.*

Sötétben Az S_2 és S_3 állapotok szekvenciálisan visszaalakulnak a stabil S_1 állapotba ($S_3 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$). Az S_2 lecsengési kinetikájának vizsgálatára a sötétadapált mintát 1

flash-el elővilágítjuk, ami a centrumok nagy részét az S_2 állapotba konvertálja. Ezt követően a mintát különböző hosszúságú sötétadaptálásnak vetjük alá, majd megmérjük a flash-indukált oszcillációs mintázatot. Ennek a fentiekben leírt analiziséből meghatározzuk az S állapotok eloszlását, amiből adódik az adott sötétperiódus alatt az S_2 -ből S_1 -be konvertálódott centrumok mennyisége. A mérést különböző sötét periódusokkal elvégezve felvehető az S_2 állapot lecsengési görbéje. Az S_3 állapot lecsengésének vizsgálata esetén az előzőhöz hasonló módon járunk el, de nem egy, hanem két előflash-et alkalmazunk az S_3 állapot kialakítására.

- *Mutációk kémiai, biokémiai kezelések által az S átmenetekre gyakorolt hatások vizsgálata.*

Az oszcillációs mintázat fentebb leírt analizisével fontos információkat kaphatunk a vízbontó komplex működését befolyásoló tényezők hatásmechanizmusáról. Legjelentősebb alkalmazási területek egyes protein alegységeinek biokémiai kezelésekkel vagy genetikai módszerekkel való eltávolításának, a Mn komplex környezetében található aminosavak irányított mutagenézissel történő megváltoztatásának, ill. kémiai ágensek által kifejtett gátló hatások mechanizmusának vizsgálata.

További oxigén-meghatározási módszerek:

ESR oximetria

Ez a technika azon alapul, hogy a molekuláris oxigén paramágneses. Ennek következtében az O_2 és egy megfelelően választott spinpróba kölcsönhatásának eredményeként megváltozik a spinpróba vonalszélessége, és ESR jelének intenzitása. Alacsony mikrohullám intenzitások esetén (nem-telítési körülmények) a sáv szélesség megnő, és így az első deriváltaként detektált jel intenzitása csökken. Az ESR oximetria igen érzékeny, és megfelelő spinpróba esetén alkalmas sejteken belüli oxigén koncentráció mérésére. Hátránya ugyanakkor az, hogy igen költséges ESR mérőműszert igényel. A leggyakrabban használt spinpróbák szénzármazékok (pl. korom, speciális tustinta), illetve litiumftalocianin kristályok. Ezen szilárd részecskék az oxigén parciális nyomását mérik.

Tömegspektográfia

^{18}O izotóppal jelölt víz alkalmazása esetén a fejlesztett oxigén detektálható tömegspektográfia alkalmazásával. Ebben az esetben a fotoszintetikus mintát egy oxigént áteresztő membrán választja el a tömegspektrométer vákum alatt tartott detektáló részétől. A módszer előnye, hogy alkalmazásával egyértelműen elkülöníthető a vízből és H_2O_2 -ből fejlődő oxigén, ami az oxigén elektródokkal nem triviális. Hátránya az igen drága és komplikált műszerigény.

Irodalmak: