

## Termolumineszcencia

A termolumineszcencia (TL) az a jelenség, amelynek során egy előzetesen megvilágított vagy besugárzott minta sötétben történő felmelegítése során fényt bocsát ki. Ez a jelenség elsősorban szilárdtestekre (pl. ásványok) jellemző, de megfigyelhető aminósav kristályokban és komplex biológiai rendszerekben is. A jelenség első leírása az 1770-es évekből származik, amikor R. Boyle kék fény kibocsátását figyelte meg sötétben melegített gyémánt esetén.

Fő alkalmazási területei:

- dozimetria (radioaktív sugárzást mérő személyi doziméterekben)
- archeológiai kormeghatározás (égetett cserépedényeknél), néhány ezer éves időtartamra
- geológiai kormeghatározás (fiatal kőzeteknél), néhány tíz-százezer éves időtartamra
- élelmiszer minőség ellenőrzés (ionizáló sugárzással történő tartósítás kimutatására)
- szilárdtestek csapdaállapotainak, szennyezőinek vizsgálata
- elektrontranszport vizsgálatok fotoszintetikus rendszerekben

A termolumineszcencia értelmezéséhez általános esetben egy három energiaszinttel rendelkező rendszer feltételezése szükséges. A három energiaszint az alap, gerjesztett és a csapdaállapot. Fény vagy más sugárzással történő gerjesztés hatására a rendszer az alapállapotból a gerjesztett állapotba kerül. Innen közvetlenül visszajuthat az alapállapotba sugárzás nélküli, vagy sugárzásos, azaz fénykibocsátással járó, átmenet során (1. ábra). A TL kialakulása szempontjából lényeges esemény azonban az alap és a gerjesztett állapot közötti energiájú csapdaszintek betöltődése. A csapdákban nincs közvetlen átmenet az alapállapotba, a gerjesztett állapottal azonban termikus, Boltzmann, egyensúlyban vannak. Így, hőmérséklet emelés hatására a csapdából a rendszer visszakerül a gerjesztett állapotba. Innen az alap állapotba történő sugárzásos átmenet vezet a TL fény kibocsátására. A csapda és a gerjesztett állapot között fennálló termikus egyensúly miatt a csapdázódott rendszer stabilitását a csapda és a gerjesztett állapot energiaszintjeinek különbsége, az ún. aktiválási energia ( $E_a$ ) határozza meg. A csapdából való kiszabadulás hőmérsékletfüggő valószínűsége a

$$K(T) = A e^{-E_a/kT} \quad (1)$$

Formulával írható le, ahol  $A$  az ún. preexponenciális faktor,  $E_a$  aktiválási energia,  $k$  a Boltzmann állandó,  $T$  pedig a hőmérséklet.

A csapdakoncentráció változása elsőrendű kinetikai közelítésben

$$dn/dT = -k(T) n, \quad (2)$$

A TL intenzitás pedig

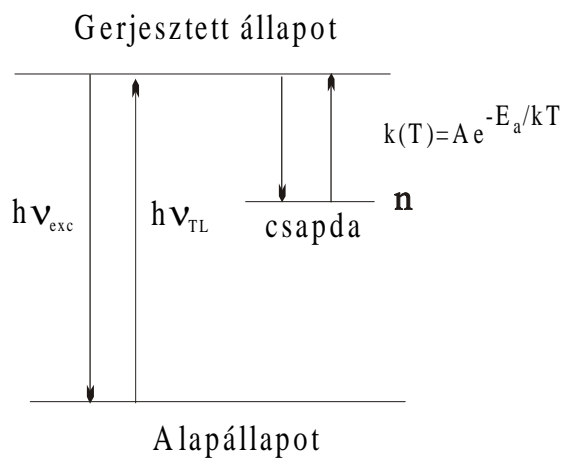
$$I_{TL} = c \, dn/dt = -c/\beta \, dn/dT \quad (3)$$

ahol  $\beta$  az állandó fűtési sebesség ( $T = T_0 + \beta t$ ).

A fenti egyenletek megoldásából

$$I_{TL} = c \, k(T) \exp\left(\frac{1}{\beta} \int_{T_0}^T k(T') \, dT'\right). \quad (4)$$

A mért TL görbéknek a (4)-es egyenlet alapján történő analíziséből a csapdából való kiürülést leíró  $k(T)$  függvény paraméterei (az  $A$  preexponenciális faktor és az  $E_a$  aktiválási energia) meghatározhatók.



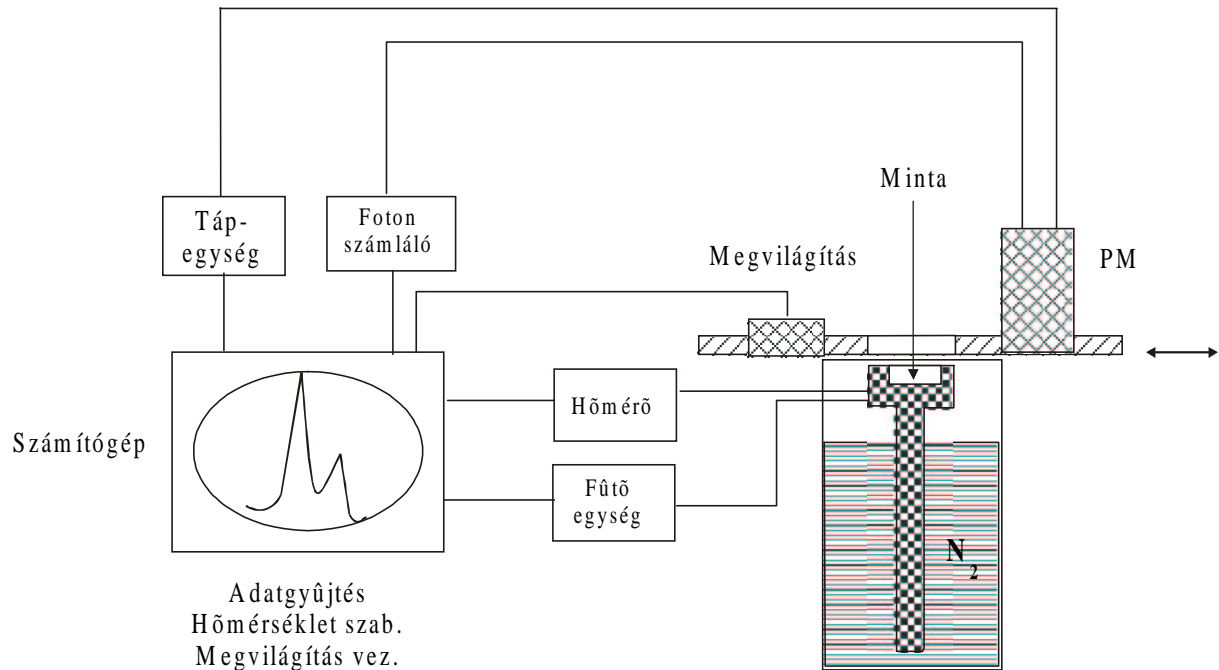
1. ábra. A termolumineszcencia kialakulásának általános sémája

### A termolumineszcencia mérése

A TL mérő berendezés fő egységei

- **Hőmérséklet szabályozott mintatartó.** Ennek hűtését folyékony nitrogén, fűtését pedig elektromos fűtőelem biztosítja. Fotoszintetikus minták esetén az alkalmazott hőmérséklet tartomány  $-196$  és  $+80$  °C között van.
- **Megvilágító egység.** A TL gerjesztését a folyamatos megvilágítás, illetve flash lámpa (kb.  $5\mu s$ ) biztosítja.

- **Fényérzékelő.** A minta melegítése során kibocsátott fény detektálására érzékeny fotoelektronsokszorozó szolgál, ami analóg vagy foton számláló üzemmódban működhet.
- **Vezérlő számítógép.** A mintatartó hőmérsékletének szabályozását (hűtés, fűtés), a gerjesztő fény vezérlését, a hőmérsékleti és fényintenzitás adatok gyűjtését egy A/D és D/A konverter kártyákkal felszerelt számítógép végzi.



2. ábra. A termolumineszcencia mérőberendezés sémája

Tipikus mérési protokollok a következők:

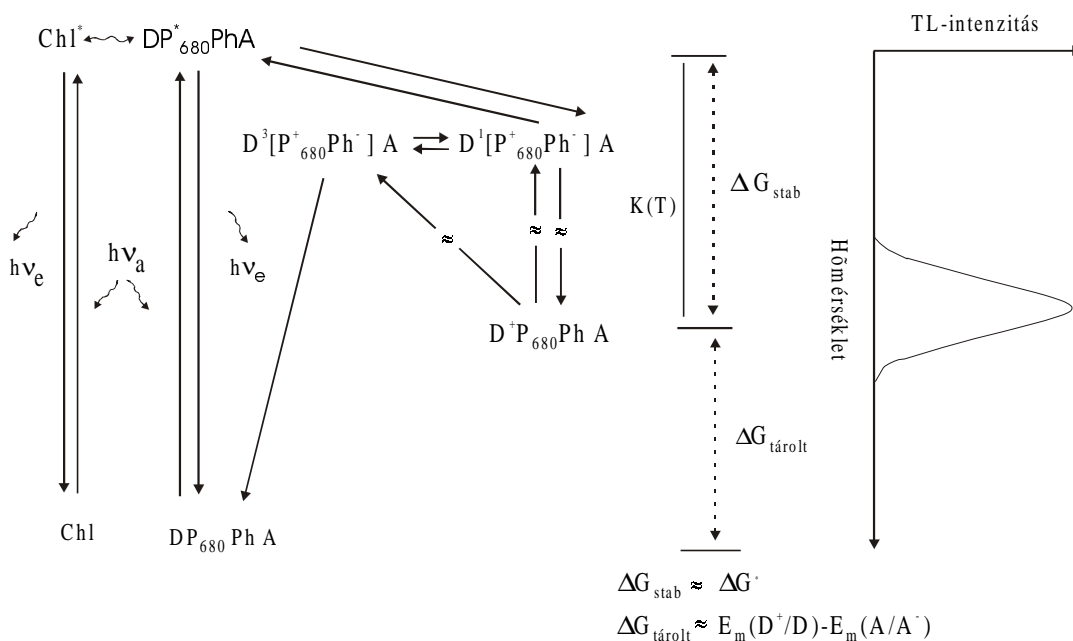
- **Flash gerjesztés.** A mintát néhány perces sötét adaptálás után rövid ( $5\mu\text{s}$ ) fényimpulzusokkal ( ezek száma tipikusan 1 és 10 közötti) gerjesztjük. A gerjesztés hőmérséklete  $0^\circ\text{C}$  körüli. Ezután a mintát gyorsan lehűtjük ( $-40, -60^\circ\text{C}$ -ra) majd sötétben állandó fűtési sebességgel ( $20-40^\circ\text{C}/\text{perc}$ ) felmelegítjük, miközben mérjük a fényintenzitást.
- **Folyamatos gerjesztés állandó hőmérsékleten.** A protokoll megegyezik a flash gerjesztésnél alkalmazottal, de flash helyett 30-60s-os folyamatos megvilágítást alkalmazunk.
- **Gerjesztés hűtés közben.** A mintát folyamatos megvilágítás közben hűtjük le, és azt követően mérjük a TL jelet.

## Fotoszintetikus rendszerből származó termolumineszcencia

Mint korábban láttuk a termolumineszcencia kialakulásának kritikus feltételei:

- fény (sugárzás) által gerjeszthető rendszer
- a gerjesztett állapot fény (sugárzás) kibocsátással járó lecsengése az alapállapotba (fluoreszcencia)
- a gerjesztett állapottal termikus egyensúlyban levő csapdák, amelyekből az alapállapotba nincs közvetlen átmenet.

A fotoszintetizáló szervezetekben található fotokémiai rendszerek (reakciócentrumok) mindegyike teljesíti az első feltételt, és a fluoreszcencia kibocsátás is általában jellemző. Így a TL keletkezése szempontjából a harmadik feltétel, azaz a csapdák jelenléte a kritikus. Csapda állapotok létrejöhetnek alacsony hőmérsékleten ( $-100^{\circ}\text{C}$  alatt) pigment rendszerekben (izolált pigment oldatok, illetve a fénybegyűjtő rendszer pigment tartalmú fehérje komplexei). Csapdák kialakulásának további lehetősége a fényindukált elektrontranszport során keletkező töltések stabilizálódása a fotoszintetikus elektron-transzportlánc redox komponensein. Ebben az esetben a csapdát egy a gerjesztés hőmérsékletén stabil, pozitívan töltött donor és egy negatívan töltött akceptor komponensen található töltéspár alkotja. Ezen töltéspár hőmérséklet növekedés által indukált rekombinációja vezet a gerjesztett állapot újbóli betöltésére és a TL kibocsátására (3. ábra).



3. ábra. A TL keletkezésének sémája a második fotokémiai rendszerben.

Kísérleti adatok szerint ilyen típusú TL csak a második fotokémiai rendszerben (PSII) figyelhető meg. Ennek oka az, hogy csak a PSII-ben található stabil töltéstárolási állapotok a reakciócentrumok mind a donor, mind az akceptor oldalán.

A csapdaszintek energetikailag az alap és a gerjesztett állapot között helyezkednek el. A gerjesztett állapot és a csapda energiaszintjei közötti különbség az ún. stabilizációs energia (szabadentalpia), ami megakadályozza, hogy a szétvált töltéspár szabadon rekombinálódjon. Egy ilyen rekombinációs folyamat a fotoszintézis szempontjából nyilvánvalóan veszteség. A csapda és az alapállapot közötti energia különbség a tárolt energia (szabadentalpia), ami a fotoszintézis későbbi lépéseiben hasznosul. Általános szabályként elmondhatjuk, hogy a TL sáv csúcshőmérsékletét a stabilizációs energia határozza meg. Azaz, minél nagyobb a stabilizációs energia, annál magasabb hőmérsékleten jelenik meg a TL sáv. Fotoszintetikus rendszerek esetén TL a  $-260$  és a  $+150^{\circ}\text{C}$  tartományban figyelhető meg. Ezen belül a fotoszintetikus elektrontranszporttal kapcsolatos komponensek a  $-80$  és  $+60^{\circ}\text{C}$  tartományban jelennek meg. A stabilizációs energia fokozatosan növekszik, amint a töltésszétválási folyamat során a töltések az elsődleges töltésszétválás ( $\text{P}^+_{680} \text{Phe}^-$ ) helyétől egyre távolabb kerülnek. Ezért az alacsony hőmérsékleten megfigyelhető komponensektől várható, hogy a töltésstabilizációs folyamat korai lépéseit tükrözik.

### **A fotoszintetikus TL fő komponensei**

A fotoszintetikus folyamatokhoz rendelhető legfontosabb TL komponensek elhelyezkedése a 4. ábrán látható. A feltüntetett görbék nem valós mérések eredményét tükrözik, hanem egy általános képet (4. ábra).

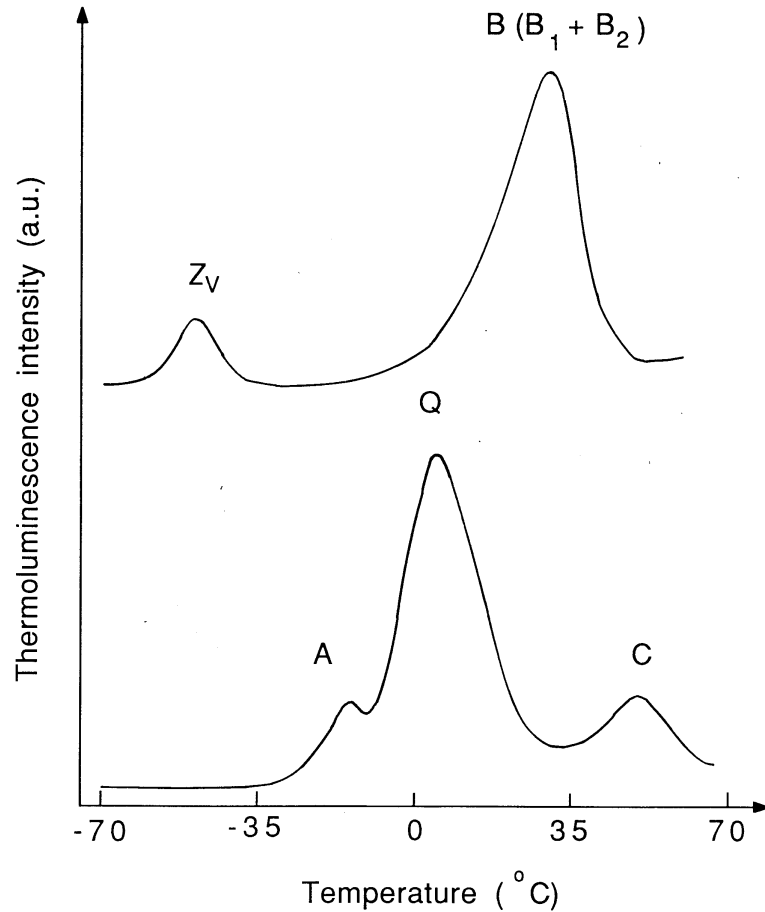
#### *Alacsony hőmérsékletű (20-100K) sávok*

Folyékony He-os kriosztát alkalmazásával végzett mérések alapján TL komponensek figyelhetők meg 20, 50, 70 és 90 K hőmérsékleteknél tilakoid membránokban. Mivel hasonló csúcshőmérsékletű komponensek extrahált kla és klb oldatokban is megfigyelhetők, ezek nem a fotoszintetikus elektrontranszportoz, hanem a szilárd klorofillokban kialakuló igen kicsiny stabilizációs energiájú csapdákhöz rendelhetők.

#### *A Z sáv*

A szokványos folyékony  $\text{N}_2$ -el működő TL berendezésekkel detektálható komponensek közül legalacsonyabb hőmérsékleten ( $-170$ ,  $-150^{\circ}\text{C}$ ) az ún. Z sáv található.

Mivel ez a komponens is megfigyelhető extrahált pigment (kla, klb,  $\beta$ -karotin) oldatokban, így a fénybegyűjtő antenna rendszerben, illetve szilárd pigment oldatokban létrejövő csapdákhöz rendelhető.



4. ábra. A legfontosabb fotoszintetikus eredetű TL sávok elhelyezkedése a hőmérsékleti skálán

-80 és  $-40$  °C közötti csúcshőmérsékletekkel figyelhető meg az ún.  $Z_v$  sáv. Ennek egyedülálló tulajdonsága, hogy csúcshőmérséklete függ a gerjesztési hőmérséklettől, azt kb.  $15-20$  °C-al haladja meg. A többi TL sáv esetén a csúcshőmérséklet a gerjesztési hőmérséklettől függetlenül állandó. A  $Z_v$  sáv a fotoszintetikus elektrontranszportéhoz kötődik. A rekombinációban résztvevő töltéspár az akceptor oldalon  $Q_A^-$ , a donor oldalon pedig a  $P_{680}^+$ , vagy a reakciócentrum egy külső klorofillja  $Chl_z^+$ , esetleg egy oxidált karotenoid ( $Car^+$ ). A  $Z_v$

sáv változó csúcshőmérséklete feltehetően a csapda energia szintjének változását tükrözi, amit a gerjesztő fény által indukált konformáció változás idéz elő.

#### *Az A és A<sub>T</sub> sáv*

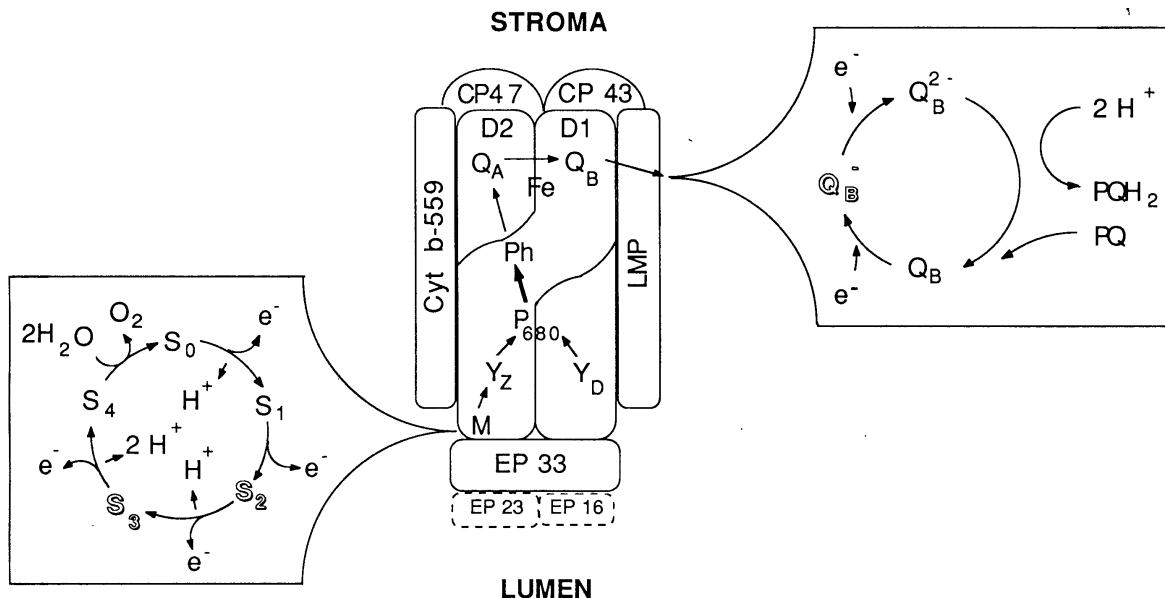
Tilakoid membrán preparátumokban  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  körül figyelhető meg az ún. A sáv. Ugyanezen csúcshőmérsékleten inaktív oxigénfejlesztő komplexszel rendelkező preparátumokban is megfigyelhető egy TL komponens, amit A<sub>T</sub> sávnak neveznek. Az A és A<sub>T</sub> sáv kibocsátásához vezető töltés rekombinációban résztvevő töltéspár akceptor komponense a Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. A donor komponens az A sáv esetén a Tir-Z<sup>+</sup>, vagy az S<sub>3</sub> állapot. Míg az A<sub>T</sub> sáv esetén, a Mn komplex közelében levő és az S<sub>3</sub> állapotban oxidálódó hisztidin (His<sup>+</sup>) részvételét feltételezik. Ez a His<sup>+</sup> lehet az A sáv donor komponense is.

#### *A Q sáv*

Intakt fotoszintetikus rendszerekben és tilakoid membrán preparátumokban a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> akceptorok közötti elektronátadást gátló inhibitorok (pl. DCMU) jelenlétében 0 és  $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$  között figyelhető meg az ún. Q sáv. Ez a komponens a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> akceptor és a vízbontó komplex S<sub>2</sub> állapotának rekombinációjából ered. A Q sáv csúcshőmérséklete függ az alkalmazott gátlószer kémiai tulajdonságaitól, ami azt tükrözi, hogy a Q<sub>A</sub> akceptor energiaszintjét (azaz redox potenciáját) a Q<sub>B</sub> helyre kötődő gátlószer megváltoztatja.

#### *B sáv*

A  $20\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérséklet tartományban figyelhető meg az ún. B sáv, amelynek amplitúdója flash gerjesztés hatására 4-es periódusú oszcillációt mutat. A B sáv kialakulásához szükséges töltés rekombinációban résztvevő akceptor komponens a Q<sub>B</sub><sup>-</sup>. A donor komponens pedig a vízbontó rendszer S<sub>2</sub> valamint az S<sub>3</sub> állapota. Flash gerjesztés esetén az első flash után az S<sub>2</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup>, a második flash után pedig főként az S<sub>3</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> rekombináció adja a B sávot. Alacsony pH-jú közeg (pH = 5.0-6.0) esetén az S<sub>2</sub>-ből és S<sub>3</sub>-ből származó TL sáv különböző hőmérsékleteken jelenik meg. Az S<sub>2</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> -ből származó ( $30\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sávot B<sub>1</sub>-nek az S<sub>3</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> -ből származó sávot ( $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pedig B<sub>2</sub>-nek is nevezik. A Q és B (B<sub>1</sub>) sávok közötti kb.  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérséklet különbséget az okozza, hogy a Q<sub>B</sub> mélyebb energiaszinten, azaz redoxpotenciában van (kb. 0mv) mint a Q<sub>A</sub> (kb.  $-80\text{mv}$ ) (5. ábra).



5. ábra. A termolumineszcencia B sáv eredete a vízbontó rendszer oxidált  $S_2(S_3)$  állapotából és a redukált  $Q_B^-$  állapotból

#### A C sáv

A 45-50 °C-os tartományban figyelhető meg egy TL komponens, amit C sávnak neveznek. A C sáv kialakulásában az akceptor oldalon a  $Q_A^-$ , a donor oldalon pedig a  $Tir^+D^+$  vesz részt. Alternatív donor komponensként felmerült az oxidált citokróm  $b_{559}$  részvétele is, ez a feltevés azonban nem nyert teljes bizonyítást.

#### A vörös fény által indukált TL

Intakt levelekben 45 °C körül figyelhető meg egy TL sáv, aminek megjelenéséhez a szokásos, fehér fényvel történő gerjesztés mellett, távoli vörös fényvel ( $\lambda > 720\text{nm}$ ) történő elővilágítás szükséges. Ezen sáv megjelenése az oxidált  $Q_B$  akceptornak a PQ gyűjtőből (PQ pool) történő újra redukációjához köthető. A donor komponens nincs egyértelműen azonosítva, de feltehetően az  $S_2(S_3)$  állapot.

#### Az 50-60 °C-os sávok

+50 °C fok környékén megfigyelhetők olyan TL komponensek is, amelyek nem a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokhoz rendelhetők. Ilyen sávok láthatók pl. PSII reakciócentrum komplexekben, illetve extrahált klorofill és nem fotoszintetikus fehérje (pl.



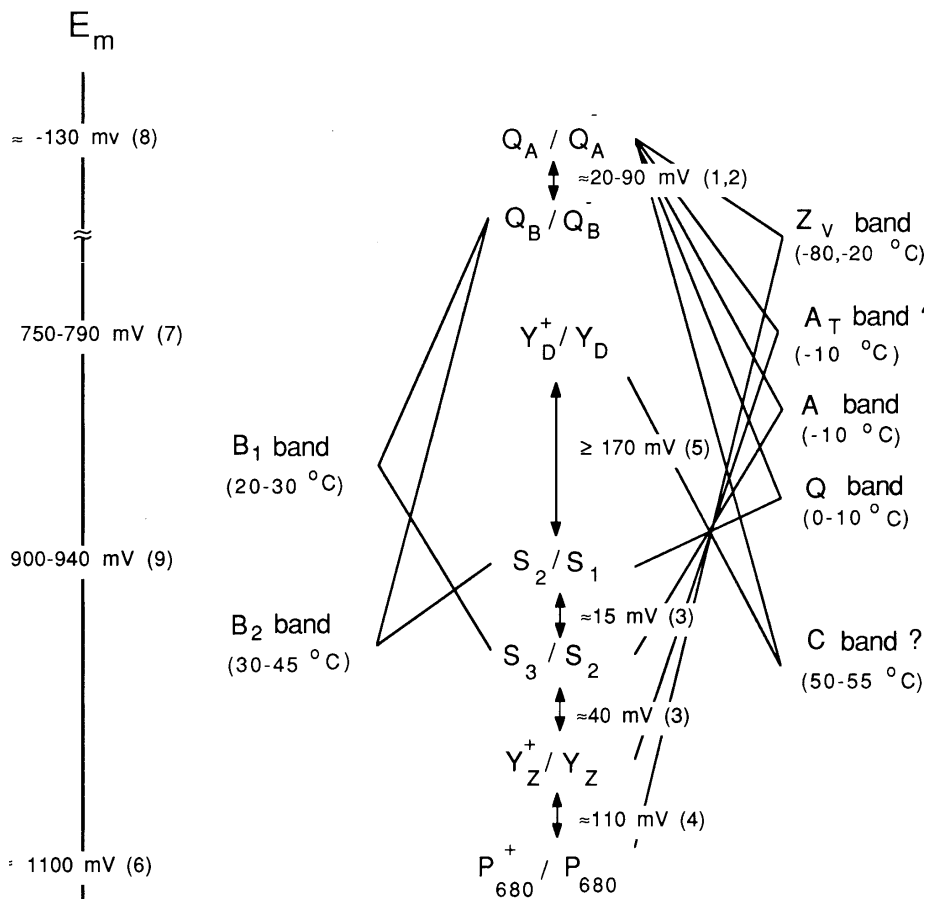
tovin szérum albumin) elegyében. Ezen sávok a fotoszintetikus pigmentek oxidatív kemilumineszcenciájához rendelhetők.

*A 70-80 °C-os sávok*

Tilakoid membrán preparátumok melegítése során a 70-80 °C-os hőmérséklet tartományban a minták előzetes gerjesztése nélkül megjelenik TL. Ez a komponens a tilakoid membrán magas hőmérsékleten bekövetkező károsodásának a membránt alkotó zsírsavak peroxidációjának eredménye.

*A 120-150 °C-os sávok*

Növényi mintákban magas hőmérsékleteken is megfigyelhető termolumineszcencia. Ez a 120-150 °C körül megfigyelhető sáv szintén lipid peroxidációból ered, és a mintát a TL mérése előtt ért oxidatív stresszhatást tükrözi. A fotoszintetikus elektron transzporthoz rendelhető TL komponensek eredetét a 6. ábra foglalja össze.

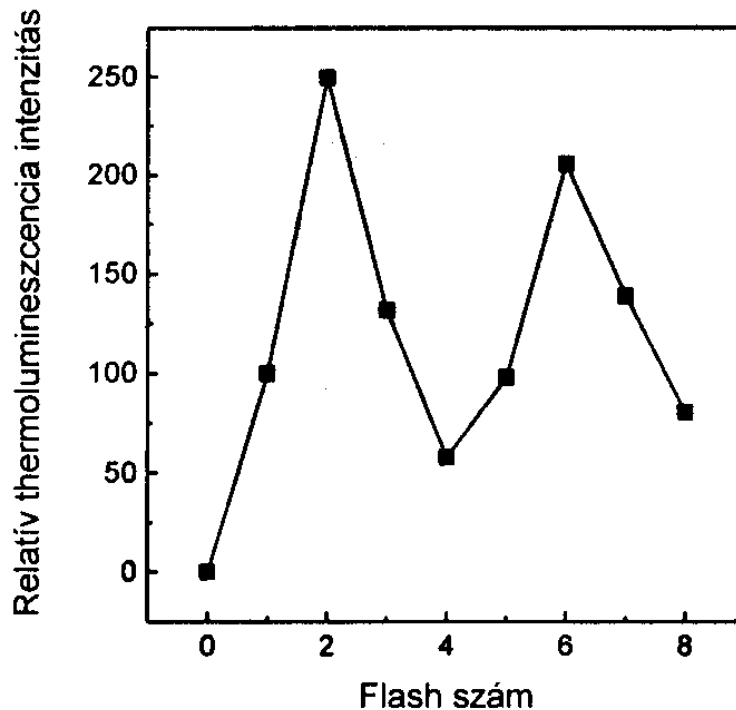


6. ábra. A fotoszintetikus elektrontranszporthoz rendelhető TL sávok eredete, és energetikája.

## A TL alkalmazása a fotoszintetikus folyamatok vizsgálatában

### Az S-állapot redox ciklusa

Mivel a B sáv a vízbontó komplex  $S_2$  és  $S_3$  komponenséből ered, ezen sáv amplitúdójának flash-indukált oszcillációja információt ad az S-ciklus működéséről. Az oszcillációs mintázat változásából megállapítható az S átmenetek esetleges gátlása az  $S_2 \rightarrow S_3$ ,  $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$  átmenetnél. Ez az alkalmazás igen hasznos a vízbontó komplex működését befolyásoló fehérje alegységek, szervesetlen kofaktorok ( $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) és aminosav mutációk hatásának vizsgálatában (7. ábra).

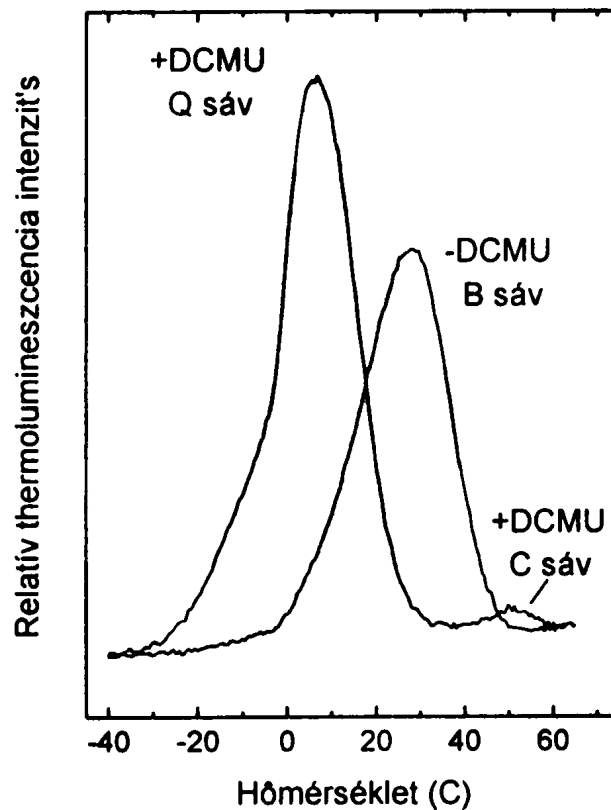


7. ábra. A B sáv intenzitásának oszcillációja flash gerjesztés hatására

### A $Q_A Q_B$ két elektronos kapu működése

A B sáv flash-indukált oszcillációját nemcsak az átmenetek, hanem az oxidált és redukált  $Q_B$  aránya is befolyásolja, így az oszcillációs mintázat információt ad arról is, hogy a TL gerjesztését megelőzően milyen volt a mintában a  $Q_B/Q_B^-$  arány.

A fotoszintetikus elektrontranszportot számos olyan molekula –általában kinon analógok –gátolja, amelyek a  $Q_B$  kötőhelyről kiszorítják a PQ-t. Ezen vegyületek széleskörű alkalmazást nyertek a mezőgazdaságban, mint gyomirtók. Mivel a  $Q_B$  helyre kötődő gátlószer megakadályozza a  $Q_A^-$ -ről a  $Q_B$ -re történő elektronátadás, ez a TL B sávjának a Q sávval történő helyettesítését eredményezi (8. ábra).



8. ábra. A TL csúcshőmérséklet változása a  $Q_A \rightarrow Q_B$  elektronátadást gátló DCMU hatására

Ezért a TL mérések nagyon jól felhasználhatók potenciális herbicid molekulák tesztelésére és hatásmechanizmusuk vizsgálatára.

A herbicidek széleskörű alkalmazásának eredményeként számos gyomnövényben alakult ki rezisztencia. Ez a jelenség a  $Q_B$  kötőhelyet alkotó aminosavak mutációjának következménye. Ez általában egyetlen aminosavat – a Ser 264 – érint. A  $Q_B$  kötőhely módosulásának eredményeként a herbicid már nem tud bekötődni; a PQ ( $Q_B$ ) kötődése azonban csak kevéssé módosul. Ez a módosulás is elég azonban a  $Q_B$  energiaszintjének megváltozásához és a B sáv alacsonyabb hőmérsékletek felé történő tolódását eredményezi. A csúcshőmérséklet változása tükrözi a herbicid rezisztencia mértékét. Ezért a TL módszer igen

hasznos a herbicid rezisztencia meglétének tesztelésére, illetve mechanizmusának vizsgálatára.

### *Környezeti stresszhatások vizsgálata*

A fotoszintetikus apparátus leginkább stresszérzékeny komponense a második fotokémiai rendszer. Ezért TL mérések jól alkalmazhatók a magas és alacsony hőmérsékletek, látható és ultraibolya fény, nehézfémek által okozott stresszhatások mechanizmusának vizsgálatára.

### **A fotoszintetikus TL vizsgálatok előnyei**

- Egyszerű műszerezettség
- Az elektrontranszport folyamatokat időskála helyett hőmérsékleti skálán lehet vizsgálni  
( $t = \mu\text{s-tól h} \rightarrow T = -100\text{-tól } +60 \text{ } ^\circ\text{C}$ )
- A fotoszintetikus minták széles skáláján alkalmazható  
intakt levelek, alga és cianobaktérium sejtek  
tilakoid membránok, PSII részecskék  
reakciócentrum komplex
- A PSII szinte minden redox komponense tanulmányozható  
 $S_2$ ,  $S_3$  állapotok,  $P_{680}^+$   
 $Tir-Z^+$ ,  $Tir-D^+$   
 $Q_A^-$ ,  $Q_B^-$
- A ciklus egyedi reakciói vizsgálhatók  
 $S_1 \rightarrow S_2$ ,  $S_2 \rightarrow S_3$ ,  $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$
- Szabadentápia (redox potenciál) változások érzékeny indikátora  
25-30 °C csúcshőmérséklet különbség  $\rightarrow$  50-60mv

### **A fotoszintetikus TL vizsgálatok hátrányai**

- A minta károsodik a mérés során
- Egyes TL sáv mindig egy töltéspár rekombinációs tulajdonságait jellemzi
- A hőmérséklet emelése a rekombináció sebességén kívül egyéb tényezőket (pl. a fluoreszcencia határfoka) is befolyásolhat.

- A fénykibocsátás egy sok lépésből álló folyamat végeredménye, ami a TL matematikai leírását és a mért görbék analízisét igen komplikálttá teszi.

**Irodalmak:**

Demeter, S. and Vass, I. (1984) "Charge accumulation and recombination in Photosystem II studied by thermoluminescence. I. Participation of the primary acceptor Q and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence of chloroplasts" *Biochim. Biophys. Acta* 764, 24-32.

G. Horvath. Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *CRC Critic.Rev.Plant Sci.* 4:293-309, 1986.

P. V. Sane and W. A. Rutherford. Thermoluminescence from photosynthetic membranes. In: *Light Emission by Plants and Bacteria*, edited by Govindjee, J. Amesz, and D. C. Fork, Orlando:Academic Press, 1986, p. 329-360.

Vass, I. and Inoue, Y. (1992) "Thermoluminescence in the study of photosystem two" a chapter in *Topics in Photosynthesis*, Vol. 11. (Barber, J. ed.) Amsterdam:Elsevier pp.259-294

Vass, I. and Govindjee (1996) "Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus" *Photosynth. Res.* 48, 117-126