

Исследование транспорта электронов в фотосистеме 2 методом дифференциальной спектрофотометрии.

Аннотация задачи

С помощью модифицированного метода абсорбционной спектроскопии – дифференциальной спектрофотометрии студентам предлагается исследовать фотоиндуцированный электронный транспорт в нативных мембранных препаратах фотосистемы 2 (ФС2). В ходе выполнения работы регистрируются спектры поглощения препаратов, подбирается система «скрещенных» светофильтров для регистрации фотоиндуцированного выцветания искусственного акцептора электронов (2,6-дихлорфенолиндофенола или феррицианида калия), измеряются кинетические кривые восстановления акцептора за счет транспорта электронов в ФС2 и рассчитывается фотохимическая активность препаратов ФС2.

Цель работы: практическое освоение метода дифференциальной спектрофотометрии на примере исследования фотоиндуцированного электронного транспорта в мембранных препаратах фотосистемы 2.

Приборная база: двухлучевой спектрофотометр Specord UV-Vis (185-800 нм)

Объект: мембранные препараты фотосистемы 2, полученные путем солиubilизации тилакоидных мембран детергентом Triton X-100 (ВВУ-частицы ФС2) [Berthold, Babcock and Yocum, 1981].

Введение

Значительная часть современных структурно-функциональных исследований фотосинтетического аппарата растений проводится на изолированных пигмент-белковых комплексах, в разной степени сохраняющих нативные функции фотосистем (рис.1). Непременным условием таких исследований является качественная и количественная характеристики пигментов фотосинтетических препаратов. Регистрируют, как минимум, спектры поглощения и флуоресценции для определения степени чистоты изолированной фотосистемы, определяют концентрацию хлорофилла, на величину которой нормируют все исследуемые параметры, измеряют фотоиндуцированную скорость электронного транспорта через фотосистему для оценки фотохимической активности препарата. Все эти характеристики могут быть получены с помощью одного метода – абсорбционной спектрофотометрии.

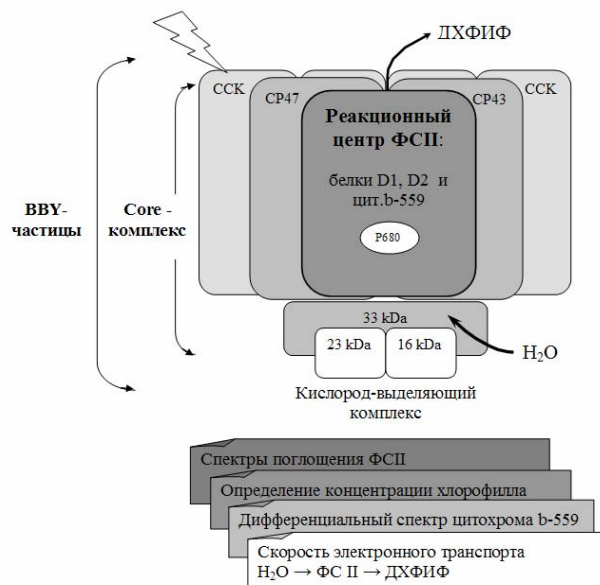


Рис.1. Препараты ФСII, получаемые из тилакоидных мембран высших растений.

Современные дулучевые спектрофотометры позволяют использовать модификацию метода – дифференциальную спектрофотометрию – для регистрации индуцированных светом или химическими агентами крайне малых спектральных изменений ($\sim 0,001D$). Дифференциальная спектрофотометрия в различных модификациях широко используется при исследовании индуцированных светом или химическим путем изменений спектров поглощения пигментов, цитохромов, хинонов и других компонентов электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Метод основан на том, что в качестве раствора сравнения используют не чистый растворитель, а раствор, идентичный опытному. Регистрируют разность оптической плотности, обусловленную применяемыми к раствору воздействиями. Метод позволяет регистрировать незначительные и быстрые изменения в спектрах поглощения на фоне большой оптической плотности раствора и сильного светорассеяния, проводить количественное определение веществ непосредственно в нативной системе в присутствии других поглощающих свет компонентов, например, цитохромов и пигментов в хлоропластах или изолированных фотосинтетических пигмент-белковых комплексах. Для регистрации фотоиндуцированного потока электронов через фотосистему в кинетическом режиме кюветное отделение дулучевого спектрофотометра должно быть дополнительно оснащено источником возбуждающего света, перпендикулярного измеряемому лучу (рис.2). Добавление к препарату фотосистемы окрашенного искусственного акцептора электронов, меняющего окраску при восстановлении, позволяет следить за его выцветанием за счет работы электрон-транспортной цепи фотосистемы. Техническая сложность таких измерений состоит в том, что необходимо исключить

попадание возбуждающего хлорофилл света на ФЭУ прибора. Это достигается подбором цветных светофильтров, пропускающих свет во взаимоисключающих областях спектра.

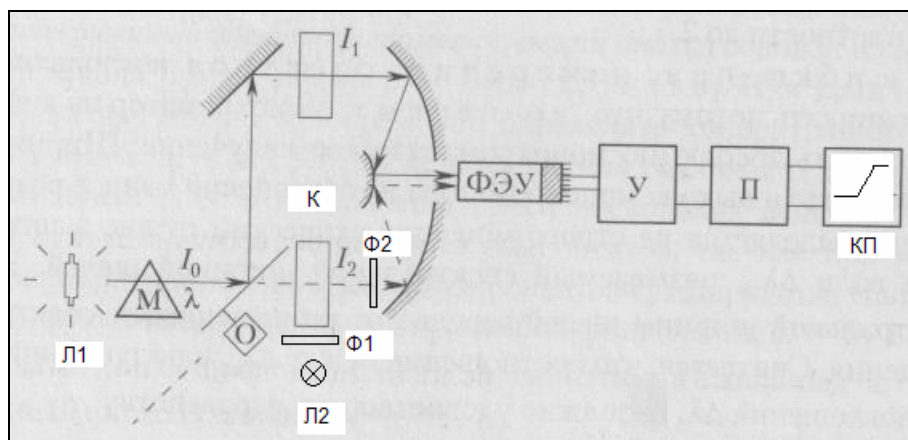


Рис.2. Блок-схема двухлучевого спектрофотометра, модернизированного для кинетических измерений фотоиндуцированного транспорта электронов через фотосистему. Л1 и Л2 – источники измеряющего и возбуждающего хлорофилл света; Ф1 и Ф2 – система «скрещенных фильтров»; К – кюветы с препаратом; М – монохроматор; О – обтюратор (вращающееся зеркало с вырезами секторов); ФЭУ – фотоэлектронный умножитель; У – усилитель; П – электронный блок преобразователя; КП – компьютер. I_0 , I_1 , I_2 – интенсивности монохроматического света.

Материалы методы

Всю работу студенты выполняют на мембранных препаратах ФС2 из листьев шпината, выделенных преподавателем согласно методике [Ghanotakis and Babcock, 1983] с небольшими модификациями. Методика основана на мягкой солиubilизации тилакоидных мембран хлоропластов детергентом Triton X-100 с последующим разделением фотосистем 1 и 2 с помощью высокоскоростного центрифугирования. Полученные таким методом препараты ФС2 обладают высокой степенью обогащенности РЦ ФС2, способны к фотохимическому разложению воды и выделению кислорода со скоростью 400-500 мкмоль O_2 на мг хлорофилла в час, а также к восстановлению искусственных акцепторов электронов, таких как ДХФИФ, феррицианид калия, *n*-бензохинон и др.

Спектральные измерения проводятся на компьютеризированном двухлучевом спектрофотометре Specord UV-Vis с приставкой для измерения фотоиндуцированных кинетик поглощения, сконструированной в лаборатории. Кюветное отделение прибора дополнительно оснащено магнитной мешалкой для исследования суспензий фотосинтетических препаратов высокой плотности при непрерывном перемешивании.

Ход работы.

I. Регистрация спектров поглощения мембранных частиц ФС2.

Спектры поглощения мембранных частиц ФС2 регистрируют на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS. Для этого хранящийся в жидком азоте препарат ФС2 ($C_{\text{хлорофилла}} = 1 \text{ мг/мл}$) медленно размораживают и разводят буфером А, содержащим 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ Mes-NaOH, pH 6,5 в соотношении 15 мкл на 2,5 мл буфера. В качестве раствора сравнения используют буфер А. Измерения проводят в 1 см кюветах. Характеризуют основные полосы поглощения фотосистемы 2.

II. Спектральное определение фотохимической активности препаратов ФС2.

Скорость электронного транспорта в ФС2 можно оценить, измеряя фотоиндуцированную кинетику поглощения акцептора электронов для ФС2 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) или феррицианида калия.

ДХФИФ в окисленном состоянии при pH 6,5 имеет синюю окраску с максимумом поглощения при 600 нм, а при восстановлении за счет работы электрон-транспортной цепи ФС2 обесцвечивается. Донором электронов для исследуемых препаратов ФС2 является вода.

Феррицианид калия имеет желтую окраску с максимумом поглощения 420 нм и также как и ДХФИФ обесцвечивается при восстановлении.

1. Регистрация спектра искусственного акцептора электронов фотосистемы 2.

7 мкл 4мМ раствора ДХФИФ или 20 мкл 50 мМ раствора феррицианида калия добавляют к 2 мл воды и записывают спектр раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

2. Подбор «скрещенных» фильтров.

Используя каталог цветного стекла, подбирают фильтры для регистрации фотоиндуцированного выцветания окрашенного акцептора электронов фотосистемы 2. Фильтр между источником возбуждающего фотосистему 2 света и образцом должен пропускать свет в области поглощения ФС2. Фильтр перед ФЭУ должен пропускать свет в области максимума поглощения искусственного акцептора; свет в других областях он должен полностью поглощать. Правильно подобранные фильтры при сложении вместе не должны пропускать свет.

Записать спектры подобранных фильтров и убедиться, что их области пропускания не перекрываются.

3. Регистрация фотоиндуцированной кинетики выцветания искусственного акцептора.

К разбавленным препаратам ФС2 (конечная концентрация хлорофилла ~ 10 мкг/мл, объем 4 мл) добавляют 40 мкл 4мМ раствора ДХФИФ или 80 мкл 50 мМ раствора феррицианида. Полученную смесь разливают поровну в 1 см кюветы, одна из которых (опытная) должна иметь все отполированные грани. В кюветное отделение спектрофотометра устанавливают кюветодержатель, оснащенный магнитной мешалкой и подсветкой, перпендикулярной измеряющему лучу. Опытную кювету помещают в этот кюветодержатель, предварительно поместив в нее маленькую мешалку, не перекрывающую измеряющий луч. В качестве раствора сравнения используют раствор, идентичный опытному. В кинетическом режиме регистрируют оптическую плотность при 600 нм в случае использования в качестве акцептора ДХФИФ и при 420 нм - феррицианида. Во время регистрации опытную кювету освещают насыщающим светом, используя систему подобранных «скрещенных» светофильтров. При использовании в качестве акцептора электронов феррицианида калия следует учесть, что этот акцептор является гидрофильным, и передача электрона с переносчика Q_B , находящегося в мембране, на него пространственно затруднена. Для более эффективного «скидывания» электрона можно добавить липофильный промежуточный акцептор 2,6-дихлорбензохинон (конечная концентрация 0,2 мМ). Концентрация исходного раствора дихлорбензохинона составляет 10 мМ.

Чтобы убедиться, что регистрируемое уменьшение оптической плотности добавленного акцептора связано с фотоиндуцированным транспортом электронов через ФС2, добавляют в опытную кювету блокатор электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 диурон (20 мкл 4 мМ раствора диурона). Записывают кинетику поглощения акцептора.

По тангенсу угла наклона кинетики поглощения акцептора во время освещения препаратов рассчитывают фотохимическую активность ФС2 в мкмоль ДХФИФ или феррицианида на мг хлорофилла в час. В расчетах используют молярный коэффициент поглощения для депротонированной формы ДХФИФ при 600 нм, равный $21 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ или коэффициент поглощения феррицианида калия, равный $1,02 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Контрольные вопросы

1. Каковы возможности абсорбционной спектрофотометрии в исследованиях фотосинтетических комплексов растений?
2. На чем основан метод дифференциальной спектрофотометрии? В чем его преимущества?
3. Почему во время регистрации фотоиндуцированных изменений оптической плотности в кинетическом режиме необходимо использовать систему «скрещенных» фильтров?

4. Какова структура фотосистемы 2 и последовательность переносчиков электрон-транспортной цепи?