

9. AKTYWNOŚĆ FOTOCHEMICZNA CHLOROPLASTÓW

Fotosystem II (PSII) jest jednym z dwóch kompleksów barwnikowo-białkowych aparatu fotosyntetycznego, w których następuje przekształcenie energii wzbudzenia dostarczanej przez fotony na energię pary ładunków: elektron – kationorodnik centrum reakcji. Wzbudzone centrum reakcji PSII przekazuje elektron na plastochinon i kolejne przENOŚniki fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Powstałą „lukę elektronową” zajmuje elektron pochodzący z H_2O . W procesie utleniania wody, w wyniku którego wydzielany jest tlen, bierze udział układ rozszczepiający wodę zawierający 4 jony manganu (II). Aktywność PSII można zdefiniować jako ilość elektronów przeniesionych z wody na plastochinon w jednostce czasu, przeliczoną na jednostkę masy chlorofilu w próbce.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów.
- Inhibitory i sztuczne akceptory elektronów.
- Budowa chloroplastów.
- Metody izolacji organelli subkomórkowych.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- *Fizjologia roślin*. Kopcewicz J., Lewak S. (red.), PWN, Warszawa 2005.
- *Fotosynteza*. Hall D. O., Rao K. K., Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1999.

9.1. Izolacja błon tylakoidów z liści

ZASADA:

Nieuszkodzone, świeże liście sałaty homogenizuje się w odpowiednim buforze i przesącza przez gazę. Przesącz poddany zostaje wirowaniu różnicowemu celem uzyskania osadu chloroplastów. Osad ten zawieszają w wodnym roztworze hipotonicznym (bez sacharozy), a następnie poddaje się wirowaniu uzyskując osad błon tylakoidów.

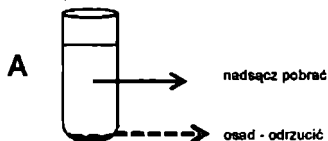
Błony tylakoidów można izolować też z liści pszenicy lub liścieni siewek ogórka. Należy wówczas zoptymalizować warunki wirowania.

UWAGA: podczas izolacji materiał roślinny należy trzymać w pojemniku z lodem, używać wychłodzonych próbek wirówkowych. Izolację przeprowadzać w słabym świetle.

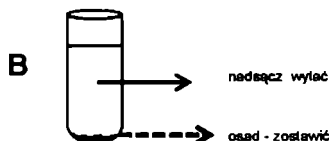
WYKONANIE:

Materiał roślinny homogenizować w roztworze A przez 3×15 s, przefiltrować przez 4 warstwy gazy lub stilon i umieścić w probówkach do wirówki K-23. Probówki zrównoważyć parami, odwirować przez 90 s przy 1800 obr./min. Zebrać nadsącz, wirować w tej samej wirówce przez 7 min przy 2500 obr./min. Osad zawiesić w około 25 ml roztworu B, odwirować jeszcze raz przy takich samych parametrach. Uzyskany osad zawiesić w 10 ml roztworu C i pozostawić na mieszadle magnetycznym w lodzie przez 5 min (szok osmotyczny). Po tym czasie dodać 10 ml roztworu D i odwirować przez 10 min przy 4000 obr./min na wirówce K-23. Osad zawiesić w 5 ml roztworu B i wstawić, w naczyniu z lodem, do lodówki. Procedura izolacji jest schematycznie przedstawiona poniżej.

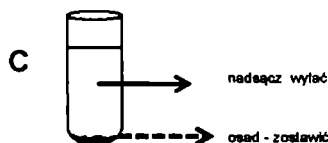
- homogenizacja
- przesączenie
- wirowanie I - 90 s \times 1800 obr./min



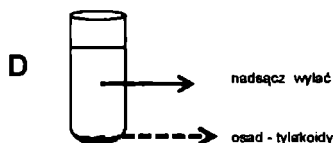
- nadsącz zlać do innych probówek wirówkowych
- wirowanie II - 7 min. \times 2500 obr./min



- osad zawiesić w buforze
- wirowanie III - 7 min. \times 2500 obr./min



- szok osmotyczny
- wirowanie IV - 10 min. \times 4000 obr./min



9.1.1. Oznaczenie zawartości chlorofilu w zawieszynie tylakoidów

ZASADA:

Barwniki fotosyntetyczne (chlorofile i karotenoidy) są związkami o charakterze hydrofobowym. Można je wyekstrahować z tkanki roślinnej rozpuszczalnikami organicznymi np. acetonem. Z zawieszyny chloroplastów lub błon tylakoidów barwniki ekstrahuje się mieszając zawieszynę z acetonem w takich proporcjach, aby końcowe stężenie acetonu wynosiło 80%.

WYKONANIE:

Dokładnie wymieszać zawieszynę tylakoidów (chloroplastów). Do dwóch probówek Eppendorfa odmierzyć 200 μ l zawieszyny i 800 μ l acetonu. Odwirować przez 5 min przy 10 000 obr./min. Zmierzyć absorbancję względem 80% acetonu przy długościach fali: 645 i 663 nm, odpowiadających maksimum absorpcji Chl a i b oraz przy 710 nm (poziom tła).

Obliczyć stężenie Chl *a* i Chl *b* na podstawie wzoru:

$$C_{\text{Chl } (a+b)} (\mu\text{g/ml}) = 20,2(A_{645} - A_{710}) + 8,02(A_{663} - A_{710})$$

ODCZYNNIKI:

Aceton.

Roztwory do izolacji chloroplastów:

A – 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 + 0,4 M sacharoza + 10 mM NaCl;

B – 0,2 M sacharoza + 0,1 M KCl;

C – 0,1 M KCl;

D – 0,4 M sacharoza + 0,1 M KCl.

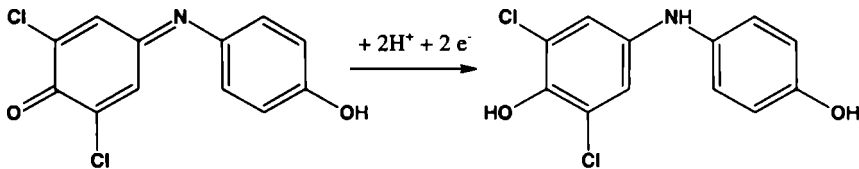
MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Liście salaty, homogenizator, gaza, mieszadło magnetyczne, wirówka K-23, kuweta, spektrofotometr.

9.2. Oznaczanie aktywności fotosystemu II i układu rozszczepiającego wodę

ZASADA:

Jedną z metod mierzenia szybkości przekazywania elektronów w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów jest pomiar zmian stężenia utlenionego/zredukowanego donora lub akceptora elektronów w czasie, w warunkach umożliwiających reakcję. Forma utleniona dichlorofenolindofenolu (DCIP) jest akceptorem elektronów z plastochinonu zredukowanego przez PSII. Podczas tej reakcji DCIP ulega redukcji według równania:



Forma utleniona DCIP jest intensywnie niebieskofioletowa z maksimum absorpcji w zakresie 580–600 nm, w zależności od pH roztworu. W formie zredukowanej związek ten jest bezbarwny. Zatem spadek absorbancji DCIP w oświetlanej zawieszynie błon tylakoidów dostarcza informacji o aktywności fotochemicznej PSII. DCMU (dichlorofenylodimetylomocznik) hamuje przekazywanie elektronów z PSII do DCIP, wiążąc się z miejscem, w którym następuje redukcja plastochinonu. Natężenie światła użytego w doświadczeniu powinno wysycić PSII. W innym wypadku zmierzona aktywność będzie mniejsza od maksymalnej aktywności.

9.2.1. Przygotowanie zawiesiny tylakoidów

WYKONANIE:

Zawiesinę błon tylakoidów należy wyizolować z materiału roślinnego w sposób opisany w pkt. 9.1. Rozcieńczyć zawiesinę buforem 10 mM Tricyna-NaOH pH 7,7 z do-

datkiem 1 mM MgCl₂ tak, by stężenie Chl w próbce było w zakresie 20–40 µg/ml. Należy przygotować około 10 ml próbkę, przechowywać ją w lodzie i osłonić przed światłem.

9.2.2. Oznaczanie aktywności PSII

WYKONANIE:

1. Do kuwety spektrofotometrycznej odmierzyć 2 ml przygotowanej zawiesiny błon tylakoidów. Dodać taką ilość roztworu DCIP, aby absorbancja roztworu przy $\lambda = 590$ nm wynosiła około 0,5. Próbkę umieścić w spektrofotometrze i zmierzyć absorbancję (A_0).
2. Próbkę oświetlić wysycającym światłem białym przez określony czas (10–30 s) i zmierzyć absorbancję (A_t).
3. Powtórzyć kilkakrotnie oświetlanie próbki (5–7 razy), każdorazowo mierząc absorbancję bezpośrednio po wybranym czasie oświetlania (A_t).
4. Wykreślić zależność A od czasu i wyznaczyć aktywność maksymalną PSII.
5. Doświadczenie powtórzyć trzykrotnie, dla świeżych porcji zawiesiny błon tylakoidów.

Na podstawie otrzymanych wyników oznaczyć maksymalną aktywność fotochemiczną PSII w $\mu\text{mol (elektronów)} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ (Chl) (lub jednostkach pochodnych). Molowy współczynnik absorpcji DCPIP, $\epsilon_{590} = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

UWAGA: doświadczenie wykonujemy w temperaturze pokojowej. Czas oświetlania należy ustalić dla danej zawiesiny tylakoidów tak, by obserwowane zmiany absorbancji były mierzalne, ale nie większe niż 0,1.

9.2.3. Hamowanie aktywności PSII przez DCMU

WYKONANIE:

Przygotować próbkę jak w doświadczeniu opisanym w pkt. 9.2.2. Dodać do kuwety roztwór DCMU tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło 200 µM. Zmierzyć absorbancję próbki bezpośrednio po wymieszaniu (A_0). Próbkę oświetlić przez czas ustalony w doświadczeniu w pkt. 9.2.2. i zmierzyć absorbancję. Obliczyć o ile procent została zahamowana aktywność fotochemiczna PSII, po dodaniu DCMU.

ODCZYNNIKI:

Bufor 10 mM Tricyna-NaOH pH 7,7 + 1 mM MgCl₂; 1 mM DCIP; 10 mM DCMU.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Zawiesina błon tylakoidów, kuweta, spektrofotometr.