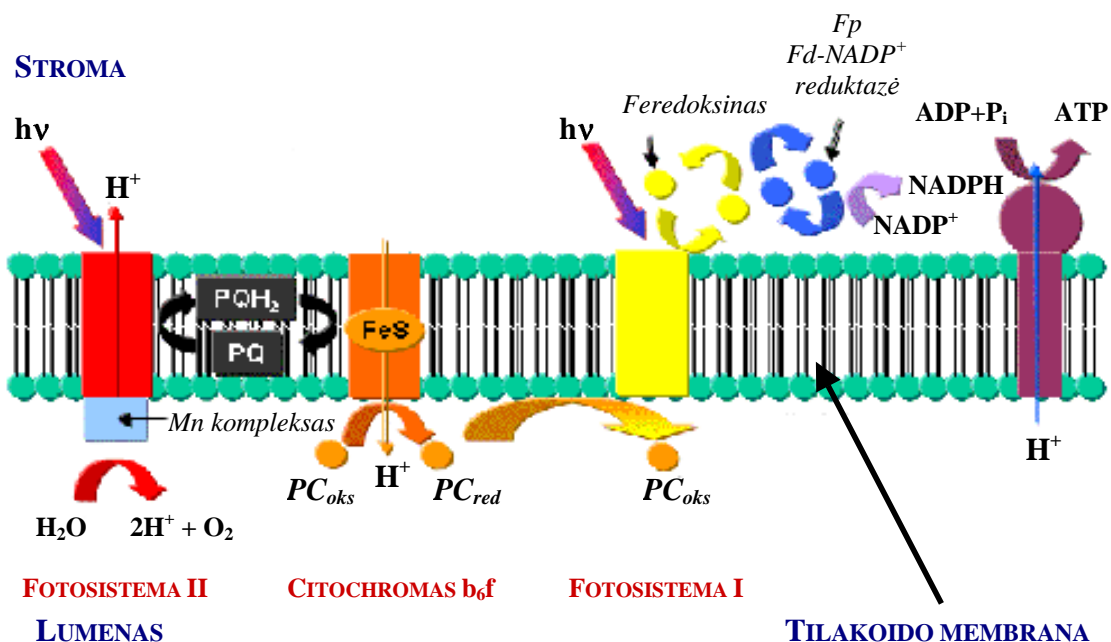


Ląstelės biologija
Laboratorinis darbas
Fotosintezė chloroplastuose

Teorija

Fotosintezės proceso, vykstančio chlorofilo turinčiuose organizmuose (augalai, dumbliai ir ciano-bakterijos), dėka Saulės šviesos energija tampa prieinama ir kitoms Žemėje egzistuojančioms gyvybės formoms. Fotosintezė augaluose vyksta organelėse vadinamose chloroplastais. Šviesos, kritusios ant chloroplastuose esančių pigmentų chlorofilo b (fotosistema II) ir chlorofilo a (fotosistema I) pirmiausiai paverčiama elektrine energija: elektronai nuo H₂O molekulės transportuojami nuo vieno fotosintezės komplekso ant kito (Pav. 1) ir tuo pačiu pumpuojami protonai per tilakoido membraną susidarant transmembraniniam protonų gradientui, kuris savo ruožtu panaudojamas ATP sintezei (procesas panašus į mitochondrijose vykstantį oksidacinį fosforilinimą). Vykstant dviejų molekulių H₂O oksidacijai iki dviejų molekulių O₂, dvi molekulės NADP⁺ redukuojamos iki NADPH. Fotosistemos II kompleksai aptinkami granos lamelėse, fotosistemos I kompleksai – stromos lamelėse, tuo tarpu citochromo b₆f kompleksai aptinkami ir granos ir stromos lamelėse.



Pav. 1 Fotosintezė chloroplastuose. PQ – plastochinonas; PQH₂ – plastochinolas; PC_{oks} – oksiduotas plastocianinas; PC_{red} – redukuotas plastocianinas.

Praktinė dalis I: Chloroplastų izoliavimas

Įranga ir priemonės:

Špinatų lapai, pH-metras, pjaustymo lenta ir peilis, grūstuvai, medžiaginis filtras, centrifūgos, rotoriai, centifūginiai mėgintuvėliai (pastaruosius tris prieš naudojimą atšaldyti (~4°C)).

Reagentai:

Homogenizavimo terpė:

- 0.33 M Manitolio
- 10 mM NaCl
- 4 mM MgCl₂
- 2 mM Askorbato
- pH 6.5 (privedama su HCl)

Suspendavimo terpė:

0.33 M Manitolio

2 mM EDTA

1 mM MgCl₂

50 mM HEPES

pH 7.6 (privesti su NaOH)

N.B. Taip pat vietoj šios suspendavimo terpės galima naudoti 0.035 M NaCl.

Darbo eiga:

1. Visi darbui naudojami indai išanksto atšaldomi.
2. Iš kelių špinatų lapų pašalinamos satmbios gyslos. Pasveriami 4.0 g lapų.
3. Lapai supjaustomi kaip įmanoma smulkiau ir perkeliama į grustuvę. Pridedama 15 ml homogenizavimo terpės ir sutrinama iki homogeniškos masės.
4. Lapų homogenatas perfiltruojamas per medžiaginį filtrą (filtras paspaudomas, kad išbėgtų visas skystis).
5. Filtratas perkeliama į atšaldytą 50 ml centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama prie 1950 aps/min (1000 xg) 10 minučių, 4° C.
6. Supernatantas nupilamas, susidariusios nuosėdos yra chloroplastai.
7. Chloroplastų nuosėdos suspenduojamos 5.0 ml šaltos suspendavimo terpės arba 0.035 M NaCl. Suspendavimui naudojama stiklinė lazdelė.
8. Mėgintuvėlis su chloroplastais uždengiamas aliuminio folija (chloroplastai yra nestabilūs šviesoje) ir padedamas ant ledu.

Praktinė dalis II: Chlorofilo b (fotosistemos II) koncentracijos nustatymas

Įranga ir priemonės:

Centrifugos, rotoriai, centrifuginiai mėgintuvėliai, spektrofotometras, spektro-fotometrinės kiuvetės.

Reagentai:

Chloroplastų suspensija iš I darbo dalies;

Acetonas;

Distiliuotas H₂O.

Darbo eiga:

1. 1.0 ml chloroplastų suspensijos perkeliama į švarų centrifuginį mėgintuvėlį (15 ml).
2. Pridedama 8.0 ml of acetono, gerai sumaišoma.
3. Pridedamas 1.0 ml distiliuoto vandens, gerai sumaišoma ir centrifuguojama prie 1950 aps/min (1000 xg) 5 minutes, 4° C.
4. Supernatantas perkeliamas į spektrofotometrinę kiuvetę ir pamatuojama absorbcija prie 652 nm. Palyginamojoje kiuvetėje naudojamas acetonas.
5. Paskaičiuojamas chlorofilo koncentracija, pagal formulę:

$$c_{\text{chlorofilo}} = \frac{\text{Absorbcija}_{652}}{\varepsilon_{\text{chlorofilo}} \cdot L}$$

kur ε - chlorofilo b molinis ekstinkcijos koeficientas lygus 34.5 mM⁻¹.cm⁻¹, L – kiuvetės plotis, 1 cm.

6. Paskaičiuoti kiek kartų reikia praskiesti jūsų chloroplastų suspensiją, kad gautumėte suspensiją kurioje yra 0.01 mM chlorofilo.

Praktinė dalis III: Fotosistemos II aktyvumo matavimas

Elektronų transportas per fotosistemas II ir I gali būti tiriamas naudojant dirbtinius elektronų donorus ir akseptorius, jei jų oksidacijos/redukcijos pokyčius galima stebėti spektrofotometriškai. Viena iš tokių medžiagų yra 2,6-dichlorofenolis indofenolis (DCPIP), kurio oksiduota forma absorbuoja šviesą prie 600 nm. Apšvietus chloroplastus stipria šviesa, elektronai nuo H₂O yra pernešami ant fotosistemos II ir toliau ant DCPIP (Pav. 1B ir D). Stebint reakciją spektrofotometriškai matysime, kad tirpalo absorbcija prie 600 nm mažėja (oksiduotas DCPIP verčiamas į bespalvį redukuotą). Absorbcijos greičio mažėjimas yra proporcingas DCPIP redukcijos greičiui, kuris savo ruožtu yra proporcingas fotosistemos II aktyvumui. Tuo tarpu tamsoje fotosistema II nefunkcionuoja ir elektronai nepernešami ant DCPIP, todėl stebint reakciją spektrofotometriškai matysime, kad tirpalo absorbcija prie 600 nm nekinta.

Įranga ir priemonės:

verdančio vandens vonia, dėžė su ledais, lempa su 100 W lempute, spektrofotometras, spektrofotometrinių kiuvetės.

Reagentai:

Chloroplastų suspensija iš I darbo dalies

0.035 M NaCl, 4 °C

0.1 M fosfatinis buferis (K_2HPO_4/KH_2PO_4), pH 6.5, 4 °C

0.1 mM 2,6-dichlorofenolio indofenolio (DCPIP), 4 °C

Darbo eiga:

1. Chloroplastų suspensija praskiedžiama 0.035 M NaCl, kad gautumėte suspensiją kurioje yra 0.01 mM chlorofilo (praskiedimo faktorių paskaičiavote II dalyje, 6-tas punktas). **Kadangi chloroplastai yra labia nestabilūs, juos visada laikykite šaltai, o eksperimentams naudokite atšaldytas terpes.**
2. 5 ml praskiestos chloroplastų suspensijos perkeliama į švarų mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis su chloroplastais pakaitinamas verdančio vandens vonioje 5 minutes.
3. Paruošiami 4 mėgintuvėliai pagal schemą:

Mėgintuvėlio Nr.	Fosfatinis buferis	Pakaitinti chloroplastai	Nekaitinti chloroplastai
1	2.5 ml	–	–
2	1.5 ml	0.5 ml	–
3	1.5 ml	–	0.5 ml
4	1.5 ml	–	0.5 ml

4. Mėgintuvėlio Nr. 1 turinys perpilamas į kiuvetę, tai bus jūsų palyginamoji kiuvetė.
5. Prieš pat matavimą į mėgintuvėlius Nr. 2-4 pridedama po 0.5 ml DCPIP, sumaišoma, perpilama į kiuvetes (prieš pradėdant atitinkamai sunumeruoti) ir pamatuojama absorbcija prie 600 nm. Absorbcijos reikšmės surašomos į žemiau pateiktą lentelę (reakcijos laikas = 0 min).

6. Po matavimo kiuvetė Nr. 4 apvyniojama aliuminio folija ir padedama ant ledu. Tai jūsų kontrolinė kiuvetė kurioje reakcija turėtų nevykti.
7. Kiuvetės Nr. 2-3 apšviečiamos stipria šviesa (lemputė 100 W). Apšvitinimo metu kiuvetė patalpinama į žemą indą su vandeniu (kad absorbuotų nuo lempos sklindančią šilumą), lempa laikoma 25 cm atstumu nuo kiuvetės.
8. Po 5, 10 ir 15 minučių pamatuokite absorbciją kiuvetėse Nr. 2 ir 3. **Prieš kiekvieną matavimą kiuvečių turinį gerai sumaišykite, kadangi chloroplastai greitai nusėda ant kiuvetės dugno ir todėl absorbcija sumažėja.** Kiuvetėje Nr. 4 absorbcija pamatuojama tik eksperimento pradžioje ir pabaigoje, (t.y. 0 ir 15 min). Užpildoma lentelė:

Reakcijos laikas, min	Kiuvetė Nr. 2	Kiuvetė Nr. 3	Kiuvetė Nr. 4
	Absorbcija	Absorbcija	Absorbcija
0			
5			–
10			–
15			

9. Atidėkite absorbcijos priklausomybę nuo reakcijos laiko kiuvetėse 2, 3 ir 4. Paaškindite gautus rezultatus.