

## ЗАМЕДЛЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ

### Краткая характеристика цепи транспорта электронов хлоропластов

Световая стадия фотосинтеза зеленых растений осуществляется двумя пространственно разделенными фотосистемами, которые сопряжены цепью переносчиков электронов (рис. 1).

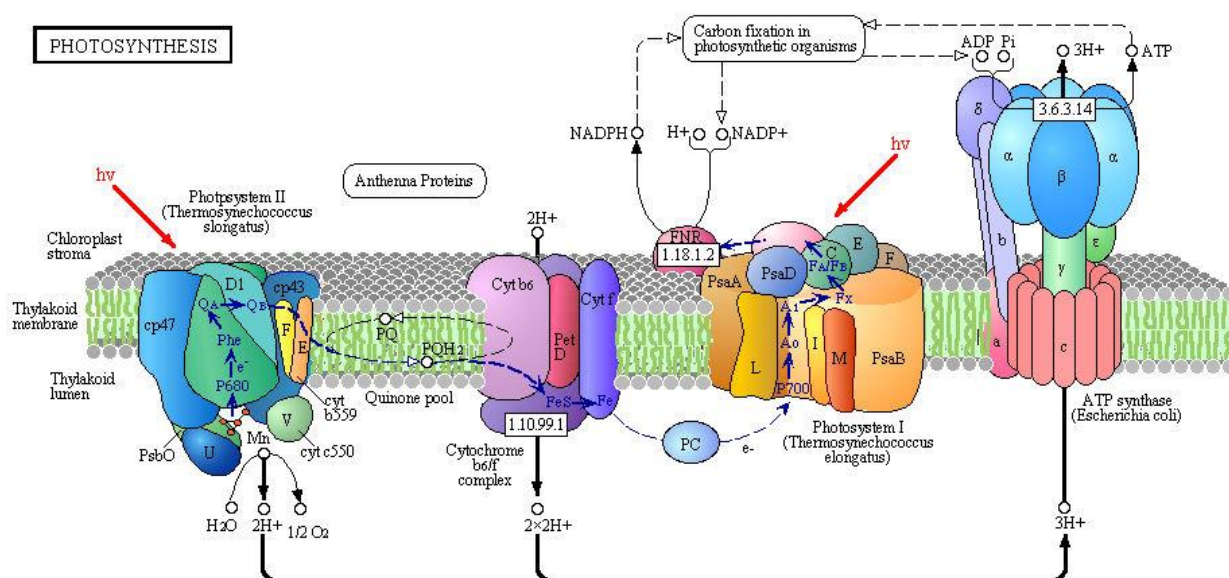


Рис. 1. Detailed view of light reaction of photosynthesis (reprinted with permission from Kanehisa Laboratories and the KEGG project)

Энергия квантов света, поглощенных светособирающими пигментами, мигрирует на реакционные центры фотосистем I и II (далее ФС I и ФС II соответственно). В результате возбуждения молекулы димера хлорофилла *a* реакционного центра ФС I (P700) происходит его окисление до  $P700^+$  и восстановление первичного акцептора  $A_0$  (молекулы хлорофилла  $a_{695}$ ). Первичный акцептор передает электрон в последующую цепь переносчиков, которая восстанавливает NADP до NADPH. Эта цепь включает молекулу филохинона ( $A_1$ ), железо-серные центры  $F_x$ ,  $F_a$  и  $F_b$  и ферредоксины (Fd). В реакционном центре P680 ФС II после поглощения кванта света образуется окисленная форма хлорофилла *a* ( $P680^+$ ) и восстановленная форма молекулы феофетина (первичный акцептор), которая затем передает электрон на молекулы хинона Q. Известно две формы акцептора Q:  $Q_A$  – первичный хинон и  $Q_B$  – вторичный хинон. В дальнейшем  $P680^+$  восстанавливается от первичного донора Z, связанного с системой разложения воды. Характерные скорости процессов миграции электрона в ФС II приведены на рис. 2. Донорно-акцепторные пары  $P700^+ - A_0$  и  $P680^+ - Q^-$  располагаются поперек мембраны (трансмембранно). Перенос электронов от  $Q^-$  к  $P700^+$  осуществляется промежуточными переносчиками: пластохиноном (PQ) и цитохромами (Cyt. *f*, Cyt. *b6*, Cyt. *c*).

### Природа замедленной флуоресценции зеленых растений

В исследованиях первичных реакций фотосинтеза используют метод регистрации характеристик замедленной флуоресценции (послесвечения). В 1951 г. Стрелер и Арнольд, изучая процесс фосфорилирования у хлоропластов методом хемилюминесценции, случайно обнаружили собственное слабое свечение хлоропластов, которое достаточно долго сохранялось после выключения возбуждающего света. Позднее

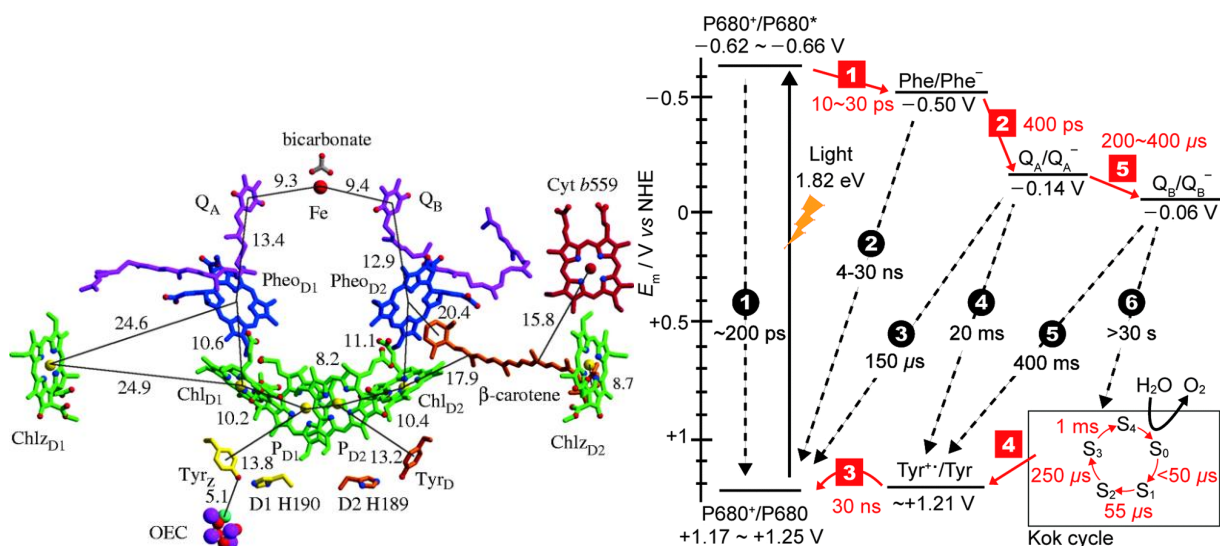


Рис. 2. **Left side** - cofactors involved in electron transfer. The phytol tails of the chlorophylls and pheophytins have been removed for clarity. The side chains of Tyr<sub>Z</sub> (D1 Tyr<sup>161</sup>) and D1 His<sup>190</sup> are shown in yellow, and Tyr<sub>D</sub> (D2 Tyr<sup>160</sup>) and D2 His<sup>189</sup> are in orange. The four chlorophylls comprising P680 are in direct van der Waals contact, and other electron transfer distances are given in Å. According to Kristina N. Ferreira et al. Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science*, 2004. **Right side** - redox potentials of cofactors along with charge separation (red squares) and charge recombination (black circles) pathways and rates. Note that step 1 is the lifetime of the initial exciton/charge-transfer states. The arrows indicate the direction of electron transfer. The insert on the bottom right displays the time constants for the formation of each photo-induced oxidation of the Mn<sub>4</sub>Ca cluster in the Kok cycle (S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub> states). According to Masaru Kato et al. Protein film photoelectrochemistry of the water oxidation enzyme photosystem II. *Chem. Soc. Rev.*, 2014.

было показано, что это явление свойственно всем фотосинтезирующим организмам: высшим растениям, водорослям и фотосинтезирующим бактериям. Спектральный состав послесвечения соответствует спектральному составу света, испускаемого в процессе быстрой флуоресценции антенным хлорофиллом, однако время жизни быстрой флуоресценции составляет  $10^{-9} - 10^{-8}$  с, тогда как замедленная флуоресценция может наблюдаться в течение *нескольких минут* после прекращения освещения. Быстрая флуоресценция является чисто фотофизическим процессом и обусловлена высвечиванием части поглощенной антенным хлорофиллом энергии, которая не успела мигрировать на реакционный центр. Замедленная флуоресценция тесно связана с фотохимическими реакциями, протекающими в реакционных центрах. Основной вклад в замедленную флуоресценцию растений вносит ФС II; замедленная флуоресценция ФС I составляет не более 2% от общего квантового выхода послесвечения. На рис. 2 приведена схема реакций, приводящих к генерации послесвечения в реакционном центре ФС II зеленых растений, водорослей и цианобактерий.

При фотовозбуждении электрон с основного уровня хлорофилла реакционного центра P680 переходит на синглетно-возбужденный уровень P680\*. С уровня P680\* происходит или переход **1** в основное состояние (часть этих переходов сопровождается излучением квантов света  $h\nu$ ), или переход **1** на уровень первичного акцептора с потерей энергии и образованием окисленного P680. Далее происходит перенос электрона на вторичные акцепторы (переходы **2** и **5**) и восстановление фотоокисленного хлорофилла реакционного центра от первичного донора Z (переходы **3** и **4**). Реакциями **3** и **5** завершается цикл окислительно-восстановительных реакций, связанных с утилизацией энергии поглощенного антенным хлорофиллом кванта света.

Возможен обратный переход электрона (**2** – **6**) на возбужденный уровень P680\* с последующим испусканием кванта света  $h\nu$ . Эти переходы сопряжены с преодолением

достаточно высокого барьера энергии активации (в случае реакции  $\Delta E \sim 70$  кДж/моль), поэтому вероятность обратного перехода мала по сравнению с прямым переносом электрона на вторичные акцепторы. Последнее обстоятельство обуславливает очень низкую интенсивность послесвечения. Таким образом, энергия, высвечиваемая в виде замедленной флуоресценции, выделяется в основном в реакции обратного переноса электрона с восстановленного акцептора Q на хлорофилл реакционного центра P680 (в реакции рекомбинации зарядов):



За счет высоких скоростей миграции энергии возбуждения между молекулами хлорофилла замедленная флуоресценция высвечивается не пигментом реакционного центра, а светособирающими молекулами хлорофилла. Именно поэтому спектры быстрой и замедленной флуоресценции идентичны.

Кинетика затухания послесвечения имеет форму сложной экспоненты, которая может быть представлена в виде суммы нескольких компонент с различным временем жизни (от 0,5 мс до нескольких секунд). Это свидетельствует о наличии нескольких реакций, определяющих замедленную флуоресценцию. Скорость реакции рекомбинации (1) зависит от скорости восстановления P680<sup>+</sup> донором Z и окисления Q<sup>-</sup> последующими акцепторами. Количество компонент послесвечения и их время жизни сложным образом зависят от кинетики прямого и обратного транспорта электронов в ближайшем донорно-акцепторном окружении реакционного центра ФС II. Согласно общепринятым представлениям, интенсивность послесвечения  $I$  пропорциональна скорости рекомбинации  $w$  и квантовому выходу  $\varphi$  излучения в акте рекомбинации. В свою очередь, скорость реакций рекомбинации  $w$  определяется концентрацией реакционных центров в состоянии P680<sup>+</sup> – Q<sup>-</sup>, а квантовый выход  $\varphi$  зависит от квантового выхода энергии возбуждения P680 при обратном переносе электронов ( $\varphi_{возб}$ ) и собственно квантового выхода флуоресценции ( $\varphi_{фл}$ ):

$$I = \varphi w = k_1 \times \varphi_{возб} \times \varphi_{фл} \times [P680^+ Q^-] \quad (2)$$

Как было отмечено выше, концентрация [P680<sup>+</sup>Q<sup>-</sup>] зависит от скорости оттока электронов от реакционного центра – этим обстоятельством объясняется зависимость интенсивности и компонентного состава замедленной флуоресценции от изменения скорости транспорта электронов в хлоропластах растений, вызванного изменением внешних условий.

Фотоиндуцированное свечение подобно многим химическим процессам лимитировано больцмановским фактором, в параметры которого входят энергия активации и температура. Кроме того, разделенные заряды в реакционных центрах определенным образом ориентированы в мембране, поэтому образование трансмембранного потенциала на мембране хлоропласта  $\Delta\mu_n$  влияет на процессы прямого и обратного транспорта электронов и, соответственно, на выход послесвечения. Например, создание электрического диффузионного потенциала при быстром введении одновалентных солей металлов или наложение искусственного электрического поля на суспензию хлоропластов приводит к стимуляции замедленной флуоресценции. В связи с этим интенсивность послесвечения определяется соотношением:

$$I = k_2 \times \exp(-(\Delta E - \Delta\mu_n)/kT) \times \varphi_{возб} \times \varphi_{фл} \times [P680^+ Q^-] \quad (3)$$

Важным достоинством метода регистрации замедленной флуоресценции является возможность получения информации от интактного объекта, что оказывается существенным, в частности, при проведении физиологических исследований в полевых

условиях. Быстрота получения информации позволяет использовать метод для экспресс-оценки устойчивости организмов к неблагоприятным факторам среды и фитотоксическим веществам. Например, применение метода в селекционной работе позволяет выявлять сортовые различия растений в устойчивости к температуре, водному дефициту, засолению, болезням, гербицидам.

### Методы регистрации замедленной флуоресценции растений

При исследовании замедленной флуоресценции растений используют методы регистрации кинетики затухания и кривых индукции миллисекундных компонент (зависимостей интенсивности послесвечения от времени освещения образцов).

#### А. Измерение кинетики затухания замедленной флуоресценции

Кинетика затухания флуоресценции растений после короткого ( $\sim 1$  с) импульса света включает в себя короткоживущие ( $\tau = 10^{-9} - 10^{-8}$  с, *быстрая флуоресценция*) и долгоживущие компоненты ( $\tau = 10^{-6} - 10$  с, *замедленная флуоресценция*). Как отмечалось выше, спектральный состав всех компонент флуоресценции одинаков, поэтому выделить послесвечение можно только по времени. Для этого момент возбуждения отделяется от начала регистрации свечения темновым интервалом, в течение которого быстрая флуоресценция хлорофилла полностью затухает. Исследуемый объект (например, лист растения) помещают в кювету 11, расположенную в емкости для исследуемого объекта 10 светонепроницаемой камеры 6. На момент освещения ФЭУ 2 закрывается шторкой 7, на нижней поверхности которой расположен светодиод 8 (интенсивность возбуждающего света можно менять). После окончания освещения (1 с) шторка автоматически открывает ФЭУ (при помощи блока управления шторкой 9, функцию которого выполняет электромагнит), причем за время открывания шторки быстрая флуоресценция полностью затухает. После этого компьютер регистрирует кинетику затухания замедленной флуоресценции (рис. 3). При подготовке фотоэлектронного умножителя для измерения свечения его в течение получаса выдерживают в темноте под напряжением. Фотоэлектронный умножитель эксплуатируют в режиме счета импульсов. После усиления, которое осуществляется предварительным усилителем 3, смонтированным на фотоэлектронном умножителе 2, и основным усилителем 4, импульсы формируются и регистрируются при помощи счетчика импульсов 5. Питание фотоэлектронного умножителя 2 и предварительного усилителя 3 осуществляется блоком питания 1. Время темнового интервала между освещением и измерением послесвечения определяется временем открывания шторки и составляет приблизительно 1 сек. При таких условиях регистрируют кинетики затухания долгоживущих компонент послесвечения со временем жизни  $\tau > 100$  мс.

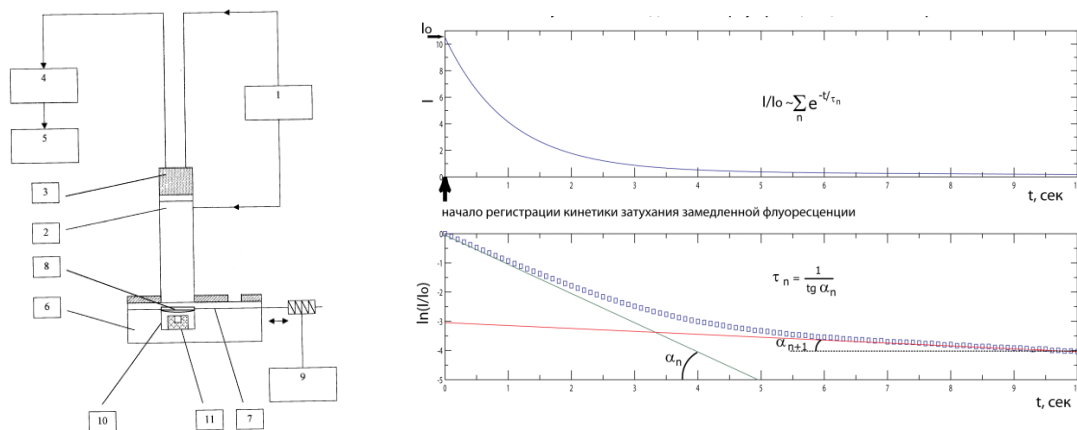


Рис. 3. Схема установки для регистрации кинетики затухания замедленной флуоресценции (пояснения в тексте). Справа – кинетика затухания замедленной флуоресценции листа гороха и вариант разложения кривой по двум временным компонентам.

Типичная кинетика затухания секундных компонент замедленной флуоресценции приведена на рис. 3. Анализ кривых затухания (разложение кривых на сумму нескольких экспонент) позволяет оценить количество компонент послесвечения и их характерные времена жизни  $\tau_i$ . Начальная интенсивность и количество компонент долгоживущего послесвечения определяются скоростями процессов рекомбинации разделенных зарядов в реакционном центре ФС II и переноса электронов на участке цепи, донирующем электроны на  $P680^+$ . В связи с этим метод регистрации секундных компонент послесвечения часто используют для оценки функционального состояния водоразлагающего комплекса и первичного донора Z.

## Б. Регистрация кривых индукции миллисекундной компоненты замедленной флуоресценции

Блок-схема установки для регистрации короткоживущих компонент свечения представлена на рис. 4. Она сконструирована на базе фосфороскопа, который представляет собой систему из трех коаксиальных цилиндров. Неподвижные внешний 1 и внутренний цилиндры 3 имеют по два окна; через окна проходит свет возбуждения от источника (светодиод 4) или свет послесвечения, который регистрируется ФЭУ 5. Средний подвижный цилиндр 2 имеет одно окно и приводится во вращение электродвигателем. При вращении среднего цилиндра попеременно открывается окно возбуждения 6 или измерения свечения 7. Объект помещается во внутренний неподвижный стакан 8; освещение объекта производится красным светом. Время между возбуждением и измерением послесвечения определяется скоростью вращения электродвигателя и составляет 10 миллисекунд. Установка позволяет регистрировать короткоживущие компоненты послесвечения с  $\tau = 10^{-3} - 10^{-2}$  с.

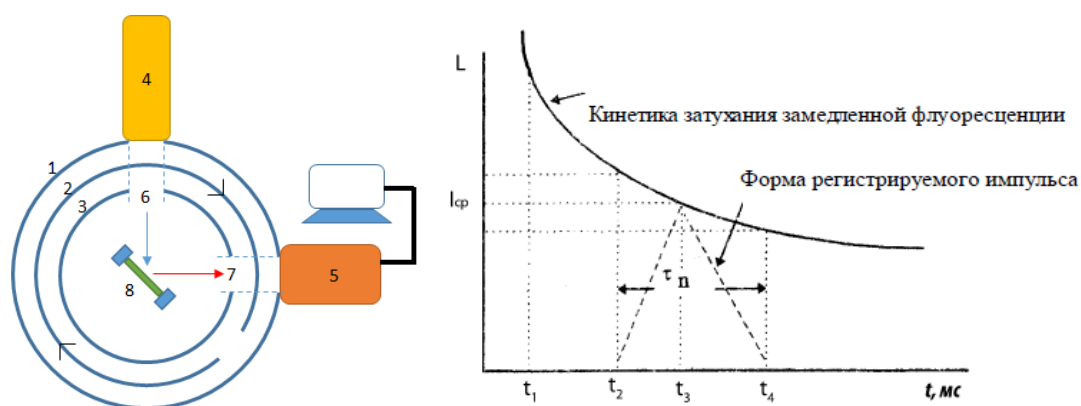


Рис. 4. Схема фосфороскопа, используемого для регистрации индукционной кривой миллисекундной компоненты замедленной флуоресценции (пояснения в тексте). Справа – график, иллюстрирующий принцип измерения интенсивности миллисекундной компоненты послесвечения в течение каждого цикла работы фосфороскопа (поворот среднего цилиндра на  $360^\circ$ ).  $t_1$  – момент окончания возбуждения флуоресценции,  $t_2$  – момент начала регистрации послесвечения,  $t_3$  – момент полного совмещения окон фосфороскопа при регистрации послесвечения,  $t_4$  – момент окончания регистрации,  $\tau_n$  – длительность импульса

С помощью фосфороскопа регистрируется не кинетика затухания послесвечения, а параметр  $L$ , пропорциональный среднему значению интенсивности послесвечения  $I_{cp}$  за время его регистрации  $\Delta t = t_4 - t_2$  (этот параметр часто называют "интенсивностью миллисекундной компоненты послесвечения"). В рабочем режиме фосфороскопа (при непрерывном вращении среднего цилиндра) световой сигнал, регистрируемый ФЭУ, представляет собой серию треугольных импульсов с меняющейся амплитудой. Частота и длительность импульсов ( $\tau_n$ ) задаются скоростью вращения электродвигателя ( $\sim 1000$  оборотов/мин) и шириной окон в цилиндрах фосфороскопа. Параметр  $L$  равен "светосумме" каждого импульса (площадь под кривой, см. рис. 4). Импульсы света

преобразуются ФЭУ в электрический сигнал через интегрирующий усилитель на компьютер для регистрации изменения параметра  $L$  в зависимости от времени освещения образца (индукционные кривые миллисекундной компоненты замедленной флуоресценции). Опыты повторяют, варьируя время предварительной темновой адаптации образца. Следует отметить, что прерывистый свет возбуждения оказывает на фотосинтетические процессы такое же действие, как и постоянный свет. Типичная индукционная кривая миллисекундной замедленной флуоресценции интактных листьев приведена на рис. 5.

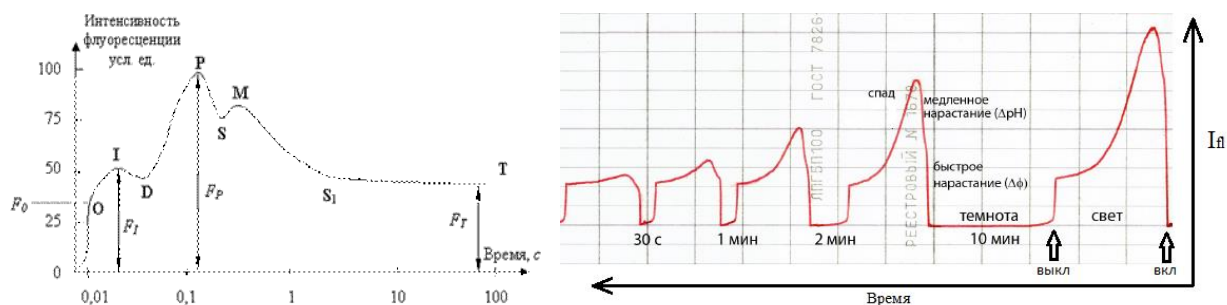


Рис. 5. Слева – общий вид индукционной кривой флуоресценции растений. Справа – индукционные кривые миллисекундной компоненты замедленной флуоресценции листа гороха, измеренные после темновой адаптации 10, 2, 1 мин и 30 сек.

При включении света наблюдается сначала быстрое, а затем медленное нарастание интенсивности послесвечения до максимального значения. Быстрое увеличение интенсивности флуоресценции (переход O-I-D на рис. 5, слева) отражает изменение степени восстановленности  $Q_A$  в цепи транспорта электронов в условиях полного окисления пула NADP, когда стадией, лимитирующей скорость потока электронов, является окисление пластохинона. По мере восстановления пула NADP скорость потока электронов начинает ограничиваться реакциями окисления NADPH. Это связано с тем, что состояние темновой адаптации характеризуется низкой активностью использования восстановленного NADP вследствие недостаточного количества промежуточных продуктов в цикле восстановления  $CO_2$ , а также инактивации в темноте некоторых ферментов этого цикла. Увеличение выхода флуоресценции в фазе D-P отражает смещение квазистационарного состояния в сторону большей восстановленности  $Q_A$  в результате восстановления пулов NADP и пластохинона. Нужно отметить, что обработка листьев разбавителями, снимающими электрохимический градиент протонов на тилакоидной мембране  $\Delta\mu_n$  приводит к исчезновению медленной фазы D-P на индукционной кривой.

Стадия спада интенсивности послесвечения при длительном освещении наблюдается только на интактных листьях, в которых осуществляются темновые реакции фиксации  $CO_2$ , утилизирующие продукты световой стадии фотосинтеза (АТФ, NADPH). Снижение концентрации АТФ в клетке при длительном освещении активирует его ресинтез, который осуществляется за счет энергии протонного градиента на мембране, что, в свою очередь, приводит к уменьшению интенсивности послесвечения. Важно отметить, что вид индукционной кривой очень сильно зависит от состояния исследуемого объекта. Его изменение, например, в зависимости от режима предшествующего освещения листьев, изменения температуры и др. вызывает значительное варьирование формы кривой послесвечения.

## Экспериментальная часть

*Лабораторная работа № 1. Измерение замедленной флуоресценции листа гороха при различных интенсивностях возбуждающего света.*

В этой части работы необходимо зарегистрировать и проанализировать кинетику затухания замедленной флуоресценции при различных интенсивностях возбуждающего света (метод А).

Необходимо поместить лист гороха в держатель образца, задвинуть держатель внутрь камеры. Прибор управляется при помощи компьютера через программу WinWSP. Далее, нужно создать рабочий файл в директории Students на рабочем столе. Файл должен иметь разумное название, содержащее дату проведения эксперимента и идентификатор рабочей группы. После этого нужно проверить установки программы Setup→A/D Converter Voltage Range =  $\pm 5$  В. Аналого-цифровой преобразователь, который переводит сигнал от ФЭУ в цифровую форму, имеет встроенный усилитель, который может дополнительно усиливать сигнал (A/D Converter Voltage Range). Но для изменения коэффициента усиления сигнала нужно пользоваться переключателем диапазонов высокого напряжения на блоке питания ФЭУ (I-IV). Для света низкой интенсивности можно выбрать максимально высокое напряжение (IV), и потом снизить его, если сигнал будет обрезаться сверху. Для выполнения экспериментов Вам нужно открыть окно записи сигнала на диск (Record→Record to Disk). Большая кнопка Record предназначена для запуска эксперимента.

Эксперимент будет записан в файл, если установлена галочка Save to file. Значения диапазонов высокого напряжения, протокола освещения и номера эксперимента в файле необходимо фиксировать в рабочей тетради. Перед запуском эксперимента нужно выбрать протокол управления прибором. Вам нужно последовательно выполнить протоколы, названия которых начинаются «1s\_», что соответствует времени освещения образца 1 с. Следующая часть названия протокола соответствует командному потенциалу, пропорциональному интенсивности возбуждающего света (40mV соответствует самому слабому свету, 1500mV - самому сильному). Таким образом, нужно выполнить несколько экспериментов с последовательно возрастающей интенсивностью возбуждающего света. После каждого эксперимента необходимо выдержать лист в темноте в течение 60 с. Если сигнал обрезается сверху, необходимо уменьшить высокое напряжение и повторить эксперимент. Обрезанный сигнал впоследствии можно удалить из файла.

После выполнения всех протоколов необходимо обработать полученные кривые затухания послесвечения. Цель обработки - разложить сложную кинетику затухания замедленной флуоресценции на сумму из нескольких экспонент. В окне анализа кривых затухания можно выбрать модель аппроксимации (в т.ч. количество временных компонент). Для выполнения фитирования экспериментальных кривых нужно перейти в раздел Analysis→Curve Fitting. До начала фитирования необходимо задать интервал экспериментальных данных для фитирования. Для этого нужно мышкой переместить желтую и зеленую вертикальные линии (соответствуют началу интервала данных для фитирования и началу отсчета времени в уравнении экспоненциального затухания) слева в положение максимума (или немного правее максимума) на экспериментальной записи. Конец экспериментального диапазона можно оставить в крайнем правом положении. Далее нужно выбрать уравнения, по которому программа, используя метод наименьших квадратов, будет подбирать коэффициенты для наилучшего совпадения с экспериментальными данными. Выбрав уравнение из списка, нажмите Do Fit. На экране должна появиться красная линия (кривая аппроксимации), близко расположенная к синей экспериментальной кривой. Нижний график показывает разницу между

экспериментальной и расчетной кривыми. О качестве фитирования можно судить по параметру ResSD: чем он меньше, тем лучше совпадают экспериментальная и расчетная кривые.

Результатом обработки будет таблица, в которой интенсивности возбуждающего света сопоставляются значения амплитуд и времен жизни экспоненциальных компонент, на которые удалось разложить кривую. Чтобы получить необходимые коэффициенты (времена жизни и амплитуды), нужно перейти во вкладку Table и выбрать нужные параметры (tau1, A1, tau2 и A2) из списка Variables слева. Далее таблицу можно доработать в программе OO Calc. Для этого скопируйте данные через меню Copy Data и при импортировании в электронную таблицу выберите в качестве разделителя знак табуляции. При обработке данных необходимо пронормировать амплитуды A1 и A2 так, чтобы их можно было бы сравнивать для экспериментов, проведенных при разном значении высокого напряжения ФЭУ. Для этого нужно рассчитать вклады первой и второй компонент как  $A1/(A1+A2)$  и  $A2/(A1+A2)$ .

*Проанализируйте, как меняются времена жизни и вклады временных компонент при увеличении интенсивности возбуждающего света. Каковы причины этих изменений? Какова природа конкретных временных компонент замедленной флуоресценции?*

По указанию преподавателя проводят дополнительные эксперименты с листьями, обработанными биологически активными веществами, например, диуроном, в растворе которого объекты выдерживают в течение 30 мин перед измерениями. Сравнивают результаты, полученные на нативных и обработанных листьях.

*Лабораторная работа №2. Измерение кривых индукции миллисекундной компоненты замедленной флуоресценции на фосфороскопе.*

Для выполнения данной части работы используется метод Б. Сначала необходимо снять крышку фосфороскопа и поместить в камеру лист гороха, закрыть крышку и повернуть ее до упора против часовой стрелки. Далее, нужно создать еще один рабочий файл в директории Students на рабочем столе. Открыть окно записи сигнала на диск Record→Record to Disk. Выбрать протокол стимуляции (Stimulus Protocol) для записи индукционных кривых induction\_curve. Включить тумблер свет (свет включается и выключается программно) и не выключать его до конца работы. Включить мотор. Запустить запись кнопкой Record.

Момент включения и выключения света на записи виден по отклонению вниз и вверх индукционной кривой. Поэтому для задания коротких интервалов темновой адаптации необходимо обнулить секундомер в момент выключения света (происходит немного раньше окончания протокола) и запустить следующий протокол на 10 с раньше необходимого времени, (поскольку свет включается с 10-с запаздыванием после запуска протокола). Далее выдерживают лист в темноте в течение 10 мин и снова регистрируют индукционную кривую. Эксперименты повторяют, сокращая время темновой адаптации листа до 2 мин, 1 мин, 30 с и менее. Кривые сводят на один график.

*Проанализируйте, как меняются параметры индукционной кривой замедленной флуоресценции при уменьшении времени темновой адаптации. Каковы причины этих изменений?*

По указанию преподавателя проводят дополнительные эксперименты.