

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И КИНЕТИКИ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ.

Исследование спектров флуоресценции - зависимости интенсивности излучения от длины волн / $I=f(\lambda)$ / позволяет проводить качественный и количественный анализ различных компонентов в биологических и модельных системах, изучать их состояние, (например, агрегацию, комплексообразование и т.д.) и взаимодействие с другими соединениями. По положению максимума (нм, см.⁻¹) в спектре флуоресценции можно судить о величине кванта энергии, запасаемой в молекуле данного компонента системы, а сопоставление спектров флуоресценции и поглощения дает информацию о миграции энергии (межмолекулярном переносе энергии возбуждения в системе). Величина квантового выхода флуоресценции, представляющего собой отношение числа квантов флуоресценции к числу поглощенных квантов

$$\varphi = \frac{n_{\text{фл}}}{n_{\text{пог}}},$$

позволяет определить время жизни возбужденного состояния молекул компонента.

Таким образом, высокая информативность метода в сочетании с чувствительностью и возможностью проводить измерения непосредственно на нативном объекте позволяет считать изучение спектров флуоресценции одним из важнейших методов исследования различных биологических процессов.

Основные закономерности флуоресценции.

Принципиальная схема установки для измерения спектров флуоресценции и кинетики ее изменения.

Флуоресценция возникает при переходе молекулы с самого нижнего колебательного подуровня первого синглетного возбужденного состояния на основной:

$S^* \rightarrow S_0 + h\nu$. Излучательный переход в молекуле происходит на разные колебательные подуровни основного состояния, причем акт испускания, также как и поглощения, сопровождается повышением общей колебательной энергии молекулы.

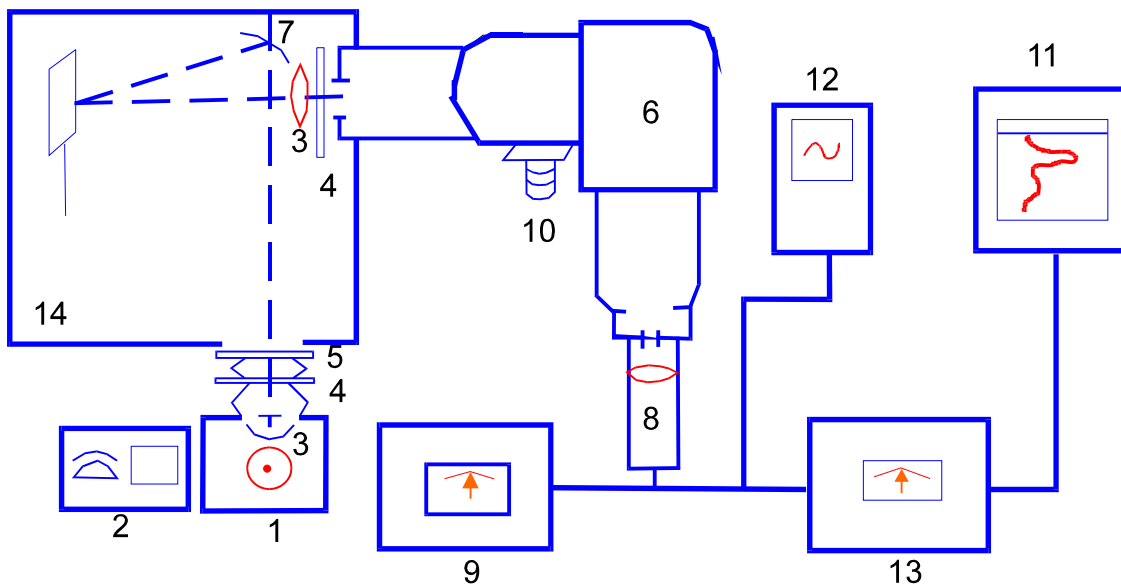
Таким образом, энергия поглощенного кванта всегда больше, чем энергия кванта флуоресценции, а спектр флуоресценции будет расположен в более длинноволновой области, чем самый длинноволновый максимум в спектре поглощения (закон Стокса). Очевидно, что поскольку высвечивание квантов флуоресценции происходит с самого нижнего колебательного подуровня возбужденного первого синглетного состояния / S^* / , спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения (закон Вавилова).

Длительность жизни молекулы в синглетном возбужденном состоянии обычно составляет $10^8 - 10^9$ сек¹. Интенсивность флуоресценции вещества можно описать следующим выражением:

$$I = K \cdot I_0 (1-T)^{\varphi},$$

где I_0 - интенсивность возбуждающего света, (1-T) - поглощение, а φ - квантовый выход флуоресценции.

Измерение спектров флуоресценции и кинетики ее изменения обычно производятся на установке, принципиальная блок-схема которой представлена на следующем рисунке:



1. Источник возбуждающего света.
2. Автотрансформатор.
3. Линза.
4. Светофильтр.
5. Фотозатвор.
6. Монохроматор.
7. Зеркало.
8. Фотоумножитель.
9. Высоковольтный источник питания.
10. Мотор барабана длин волн.
11. Самопишущий потенциометр.
12. Осциллограф.
13. Усилитель.
14. Кюветная камера.

В качестве источника возбуждающего света используется лампа накаливания с иодным циклом КГМ-75, мощностью 75 ватт. Питание лампы осуществляется от автотрансформатора, снабженного амперметром.

Включение питания лампы необходимо осуществлять при выведенной в крайнее левое положение ручке автотрансформатора. Затем постепенно увеличивают ток через лампу не более, чем до 7а. Выключение осветительного устройства производят в обратном порядке. Для выделения необходимого спектрального интервала возбуждения перед кюветной камерой устанавливается светофильтр (СЗС-22), пропускающий свет в сине-зеленой области ($\lambda \leq 580\text{нм}$). Для быстрого включения и выключения возбуждающего света используется фотозатвор.

Фокусировка возбуждающего света на объект, помещенный в специальном держателе, осуществляется вогнутым зеркалом, установленным на стенке камеры. Свет флуоресценции от объекта фокусируется на щель монохроматора линзой.

Юстировку установки рекомендуется выполнять по рассеянному свету при выключенной измерительной аппаратуре (при закрытой шторке перед фотоумножителем). Для этого на место объекта помещают рассеивающий свет образец (например, лист белой бумаги) и добиваются, чтобы входная щель монохроматора была освещена возбуждающим светом,

рассеянным от этого образца. Затем, не меняя юстировки, рассеивающий предмет заменяют объектом исследования.

Для того чтобы избавиться от рассеянного возбуждающего света, который может попасть в монохроматор вместе с измеряемым светом флуоресценции, применяют, так называемые, «скрещенные» светофильтры. Перед входной щелью монохроматора помещают светофильтр, не пропускающий возбуждающий свет, но пропускающий свет в области флуоресценции объекта. С этой целью перед входной щелью монохроматора установлен «красный» светофильтр КС-14, пропускающий лишь длинноволновую часть спектра ($\lambda \geq 630 \text{ нм}$). Возбуждающий свет проходит через «синий» светофильтр СЗС-22 ($\lambda \leq 580 \text{ нм}$). Таким образом, светофильтры КС-14 и СЗС-22 оказываются «скрещенными».

Испускаемый объектом свет флуоресценции определенного спектрального состава проходит через «красный» светофильтр, попадает на призменную систему монохроматора и разлагается в спектр. Выходная щель монохроматора выделяет узкий спектральный интервал, определяемый геометрической шириной щели и дисперсией монохроматора. Отношение геометрической ширины щели к линейной дисперсии монохроматора определяет, в свою очередь, разрешающую способность установки и носит название спектральной ширины щели:

$$\Delta\lambda_{нм} = \frac{\Delta S_{мм}}{\Delta D_{мм/нм}}.$$

Таким образом, для получения спектра флуоресценции с высоким разрешением измерения следует производить при максимально узких входной и выходной щелях монохроматора, что достигается оптимальными для данного эксперимента условиями фокусировки.

Положение спектра в плоскости выходной щели и, следовательно, длин волн света флуоресценции определенного спектрального состава, выходящего из монохроматора и попадающего на фотоумножитель, зависит от угла поворота призмы. Положение призмы устанавливается барабаном, откалиброванным в длинах волн. Двигатель, соединенный с барабаном длин волн, осуществляет автоматическую развертку спектра.

Узкий спектральный участок (определяемый спектральной шириной щели $\Delta\lambda_{нм}$) света флуоресценции из выходной щели попадает на фотокатод фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). На выходном тубусе монохроматора имеется специальная шторка, перекрывающая при необходимости свет, попадающий на фотокатод ФЭУ.

В период проведения всех подготовительных операций до непосредственного измерения спектра флуоресценции шторка должна быть закрыта, поскольку попадание на фотокатод ФЭУ интенсивного света может привести к выходу его из строя.

Питание фотоумножителя осуществляется от стабилизированного выпрямителя ВС-22 (высоковольтный источник питания). Не рекомендуется подавать на ФЭУ напряжение более 1200 в. Включение высокого напряжения можно проводить только при закрытой крышке камеры, в присутствии преподавателя и в соответствии с правилами по технике безопасности. Сигнал с фотоумножителя поступает на усилитель В2-11, после чего регистрируется самопишущим потенциометром КСП-4 (усилитель и самописец должны быть соответствующим образом согласованы по величине входного и выходного сопротивления).

Для регистрации кинетики быстрых процессов вместо самопишущего потенциометра применяется осциллограф; при этом сигнал с ФЭУ прямо подается на вход усилителя осциллографа С1-19 и согласования в этом случае не требуется.

Особенности измерения спектров флуоресценции биологических объектов.

Малая величина квантовых выходов и низкая концентрация флуоресцирующих компонентов приводит к тому, что интенсивность флуоресценции биологических объектов, как правило, весьма незначительна. При комнатной температуре квантовый выход флуоресценции хлорофилла в нативных фотосинтетических мембранах составляет не более 3%. Все это требует увеличения чувствительности измеряющей аппаратуры, тщательной фокусировки света и специального выбора оптимальных условий регистрации флуоресценции, позволяющих исключить влияние «паразитного» свечения кювет, оптики и возможных примесей.

При измерении спектров флуоресценции биологических объектов следует также учитывать влияние интенсивного возбуждающего света на возможные индуцируемые им процессы фотохимически активных компонентов. Чтобы ослабить влияние возбуждения на светоиндуцируемые процессы, следует по возможности уменьшать яркость возбуждающего света на объекте за счет улучшения условий фокусировки, а также увеличивать скорость измерений и использовать низкотемпературную технику. Для решения этих задач применяют светосильные монохроматоры, чувствительные приемники света и охлаждение объектов вплоть до температуры жидкого азота (77К).

Биологические объекты, как правило, сильно рассеивают свет, что приводит к усилению экранирующего эффекта (т.е. к увеличению поглощения возбуждающего света другими компонентами системы) и эффекта реабсорбции (поглощения света испускаемой флуоресценции или, так называемого, явления перепоглощения) вследствие увеличения оптического пути. Поэтому рекомендуется, выбрав оптимальную область возбуждения (обычно в максимуме поглощения и, если возможно, расположенного дальше от полосы флуоресценции, например, для хлорофилла - в синей области спектра), производить измерения в тонких слоях и при малых концентрациях. При этом надо стремиться уменьшить светорассеяние, для чего дополнительно используются специальные приемы, например, инфльтрация листьев растений, добавление глицерина к суспензии клеток, хлоропластов или хроматофоров, приготовление гомогенатов, применение специальных кювет, уменьшение светового пути в образцах и т.д.

Общие черты механизма первичных процессов фотосинтеза. Стационарная флуоресценция и индукционные явления.

Согласно современной гипотезе о существовании двух последовательных фотореакций и фотосинтезе световое возбуждение первой (длинноволновой) пигментной системы приводит к окислению цитохромов, а также других переносчиков электрона и восстановлению НАДФ. Вторая (коротковолновая) пигментная система обеспечивает восстановление окисленных первой фотосистемой переносчиков и выделение кислорода. Возбуждение фотосинтеза высших растений и водорослей светом с $\lambda \geq 700\text{nm}$ включает функционально только первую систему, которая окисляет компоненты цепи переноса между обеими фотосистемами и восстанавливает НАДФ. Действие коротковолнового света с $\lambda \leq 650\text{nm}$ приводит к возбуждению как первой, так и второй пигментной системы. Вторая фотосистема сенсibiliзирует разложение воды и восстановление переносчиков, которые окисляются первой фотосистемой.

Процесс переноса электрона между обеими пигментными системами осуществляется по градиенту редокспотенциала и электрон-транспортная цепь включает в том числе железосодержащие и медьсодержащие белковые переносчики, а также пластохинон. Преобразование энергии электронного возбуждения в энергию разделенных зарядов происходит в, так называемых, реакционных центрах (РЦ), представляющих собой специализированные пигмент-белковые комплексы, содержащие первичные доноры и акцепторы электрона. Предполагается, что первичным донором электрона является димер хлорофилла *a* (P680 для фотосистемы 2 и P700 для ФС1). Первичным акцептором в ФС2 служит феофетин, а в ФС1 - мономер хлорофилла *a*. Далее электрон переносится на акцепторы хинонной природы, а затем на другие компоненты электрон-транспортной цепи. Доля пигментов, включенных непосредственно в фотоактивный РЦ, весьма незначительна по сравнению с общей массой светособирающих (антенных) пигментов. Для высших растений один РЦ приходится на 400-500 молекул хлорофилла светособирающей антенны, а в состав активного комплекса РЦ входит не более 6 молекул хлорофилла *a*.

Энергия света, поглощаемого светособирающими молекулами хлорофилла и сопровождающих пигментов (каротиноидов, ксантофиллов, фикобилинов), которые входят в состав антенных пигмент-белковых комплексов, переносится (мигрирует) в виде энергии возбуждения на реакционные центры, где происходит быстрый процесс разделения зарядов с высокой эффективностью и их стабилизация.

Флуоресценция в нативных фотосинтетических мембранах продуцируется молекулами хлорофилла антенны и при комнатной температуре характеризуется главным максимумом при 684-687 нм и «плечом» в более длинноволновой области около 720-730 нм (для хлоропластов и гомогенатов высших растений, для клеток водорослей). Однако в случае целых листьев растений, вследствие сильной реабсорбции в спектрах флуоресценции относительная доля длинноволновой полосы существенно возрастает.

Для фотосистемы 1 квантовый выход флуоресценции при комнатной температуре в несколько раз меньше, чем для фотосистемы-2, поэтому флуоресценция хлоропластов обусловлена в основном светособирающей массой хлорофилла второй пигментной системы. Только при низкой температуре (77К) относительная доля (и квантовый выход) длинноволновой флуоресценции в области 730 нм значительно возрастает и спектр становится более структурированным (за счет выявления дополнительных флуоресцирующих центров).

Интенсивность флуоресценции целых клеток и хлоропластов чувствительна к температуре и ингибиторам фотосинтеза, а также претерпевает характерные индукционные изменения после «темновой» адаптации при включении света. Интенсивность флуоресценции в начальный период после включения возбуждающего света отличается от установившегося затем стационарного уровня флуоресценции, который достигается в течение нескольких (иногда десятка) секунд. Такая переходная кинетическая кривая изменения интенсивности флуоресценции обычно имеет сложный характер и отражает, так называемую, индукцию флуоресценции. Варьируя время темновых интервалов, можно наблюдать различные индукционные кривые флуоресценции.

Индукция флуоресценции — довольно сложное явление и интерпретируется обычно с точки зрения первичного механизма стабилизации энергии возбуждения и переноса электрона. Поскольку изменения флуоресценции обусловлены конкуренцией процессов запасаения энергии в лабильных фотопродуктах и процессов излучательной дезактивации возбужденных состояний пигмента, то флуоресценция основной массы хлорофилла (антенны) будет изменяться в зависимости от состояния РЦ, (состояние с «закрытыми» или «открытыми» РЦ).

При включении света РЦ переходит в «закрытое» состояние, и интенсивность флуоресценции быстро возрастает, а затем, вследствие реакции образовавшегося первичного фотопродукта с последующими акцепторами, произойдет обратный переход РЦ в исходное («открытое») состояние, что приведет к замедлению скорости возрастания флуоресценции. Таким образом, по кинетике флуоресценции антенного хлорофилла измеряемой на описанной выше установке можно следить за состоянием фотохимически активных реакционных центров в нативных фотосинтетических мембранах.

Первичный фотохимический акт во второй пигментной системе вызывает изменение выхода флуоресценции хлорофилла. Предполагается, что тушителем флуоресценции антенного хлорофилла является первичный хинонный акцептор (Q_A), локализуемый между P680 и феофитином с одной стороны и вторичным акцептором (Q_B) с другой. Было установлено, что под действием света происходит восстановление первичного акцептора Q_A и выход флуоресценции возрастает от начального уровня (F_0) до максимального уровня (F_m), т.е. возникает так называемая переменная флуоресценция ($F_v = F_m - F_0$). При введении в систему избыточных количеств экзогенных акцепторов электрона (например, ферроцианида) выход флуоресценции сохраняется относительно низким. Если Q_A предварительно восстановлен в темноте, то при включении света сразу достигается максимальный уровень флуоресценции (F_m).

Изложенные выше представления позволили прийти к заключению, что исследование кинетики флуоресценции светособирающей антенны позволяет получить информацию о состоянии реакционных центров и электрон-транспортной цепи в нативных фотосинтетических мембранах.

Упражнения и работа на установке.

1. Произвести юстировку установки и подготовить ее к работе. Выбрать режим сопряжения усилителя фототока с ФЭУ и самопишущего потенциометра для измерения спектров флуоресценции и кинетики «медленных» изменений флуоресценции.
2. Измерить спектр флуоресценции листа фасоли при комнатной температуре. Установить положение максимумов флуоресценции. Проверить воспроизводимость результатов при повторных записях спектра, начиная с коротковолновой и длинноволновой стороны.
3. Приготовить гомогенат листьев. Записать спектры флуоресценции разбавленного и концентрированного гомогенатов. Обратить внимание на характерные изменения интенсивности флуоресценции и соотношения полос в спектре. Сопоставить спектры флуоресценции гомогенатов и листьев.
4. Исследовать действие температуры на характер спектральных кривых. Провести измерение спектра флуоресценции гомогената после предварительного прогрева его при 40°С, 60°С и 100°С в течение 30 сек. и 1 мин.
5. Изучить кинетику медленных индукционных процессов, приводящих к изменению флуоресценции. Произвести запись кинетики в главной полосе флуоресценции при 20°С с временным разрешением порядка 3 сек. в течении 1,5 мин при различных темновых интервалах адаптации (30 сек, 1 мин, 2 мин, 5 мин). Определить время полужатухания ($\tau_{1/2}$).
6. Выбрать режим сопряжения ФЭУ с осциллографом для регистрации быстрых индукционных процессов (переменной флуоресценции) с использованием отметчиков времени на экране. Получить картину индукционных кривых быстрых изменений флуоресценции листа или суспензии водорослей на экране осциллографа при различных темновых интервалах адаптации при 20°С. Произвести аналогичные измерения после предварительного прогрева объекта (см. пункт № 4).

Все указанные выше работы можно производить с суспензиями водорослей, хлоропластами или субхлоропластными фрагментами.