**FOTOSYNTEZA I JEJ PROSUTKY**

1. Izolacja chloroplastów z liści i ich właściwości redukujące

*Proces fotosyntezy zachodzi w chloroplastach, czyli wyspecjalizowanych organellach występujących w komórkach roślin i glonów. W pierwszej fazie fotosyntezy, zależnej od światła, powstaje tzw. siła asymilacyjna, którą stanowią* ***cząsteczki ATP*** *magazynujące energię oraz* ***cząsteczki NADPH + H+****, będące źródłem elektronów i protonów. W drugiej fazie fotosyntezy, niezależnej od światła, siła asymilacyjna wykorzystywana jest do syntezy cukrów w cyklu Calvina-Bensona.*

*W fazie świetlnej fotosyntezy elektrony wybite przez kwant światła z fotosystemu II są przenoszone przez szereg przenośników elektronów wbudowanych w błony tylakoidów, aż docelowo trafiają do fotosystemu I, w którym w ten sposób likwidują „deficyt” elektronów powstały pod wpływem działania energii świetlnej. W trakcie tej wędrówki elektronów uwalniana jest energia, niezbędna do syntezy ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego (Pi). Niedobór elektronów w fotosystemie II zostaje uzupełniony elektronami, które pochodzą z procesu fotolizy wody, zachodzącemu dzięki działaniu kompleksu rozszczepiania wody. Produktami fotolizy - poza elektronami - są tlen cząsteczkowy i protony. Tlen cząsteczkowy jest uwalniany do środowiska zewnętrznego jako produkt uboczny fotosyntezy, natomiast protony uczestniczą w redukcji cząsteczki NADP+ do NADPH+ + H+.*

**WNĘTRZE TYLAKOIDU (LUMEN)**

**STROMA CHLOROPLASTU**

**kompleks rozszczepiania wody**

**plastochinon**

**kompleks cytochromowy**

**reduktaza ferredoksyna-NADP**

**ferredoksyna**

**Syntaza ATP**

**plastocyjanina**

*Ryc. 1. Przebieg fazy zależnej od światła w błonach tylakoidu.*

(źródło: <https://proteopedia.org/wiki/images/5/56/800px-Thylakoid_membrane.png>)

*Użyte skróty:* ***P-680 (PSII)*** *- centrum reakcji, fotoukład II;* ***P-700 (PSI)*** *- centrum reakcji, fotoukład I;* ***NADP+*** *- kation fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;* ***NADPH+*** *- forma zredukowana NADP+;* ***ADP*** *- adenozyno-5′-difosforan;* ***ATP*** *- adenozyno-5′-trifosforan;* ***Pi*** *- fosforan nieorganiczny.*

*Chloroplasty można wyizolować z materiału roślinnego i wykorzystać do badań związanych z fotosyntezą. Izolację chloroplastów należy wykonać stosunkowo szybko, a samych chloroplastów nie można przechowywać. Izolowane chloroplasty mogą pochłaniać energię świetlną i wykorzystywać ją do rozkładu wody, uwalniania tlenu i redukcji naturalnych lub sztucznych akceptorów elektronów, podobnie jak to ma miejsce w warunkach naturalnych. Ponieważ reakcje świetlne fotosyntezy nie mogłyby zachodzić bez obecności ostatecznego akceptora elektronów, którym w warunkach fizjologicznych jest NADP+, w doświadczeniach przeprowadzanych na wyizolowanych chloroplastach bardzo często wykorzystuje się sztuczne akceptory elektronów. Wśród nich możemy wyróżnić* ***2,6-dichlorofenoloindofenol (DCPIP; C12H7NCl2O2)*** *- związek jest uży­wany jako kolo­rowy wskaźnik redoks. Jego forma utle­niona ma barwę nie­bie­ską, zaś zre­du­ko­wana jest bez­barwna. Barwnik ten znajdujący się w systemie fotosyntetycznym eksponowanym na światło traci barwę. DCPIP wykazuje większe powinowactwo elektronowe niż ferredoksyna i w fotosyntetycznym łańcuchu transferu elektronu jest redukowany jako odpowiednik NADP+, który jest normalnym przenośnikiem elektronu w fotosyntezie.*

**Materiał:** liście szpinaku (*Spinacia oleracea*)

**Sprzęt:** moździerz porcelanowy, etamina (gaza), pipety Pasteura, probówki szklane, statyw na probówki, lejek szklany, zlewka, lód, probówki wirówkowe (typu Eppendorf 2ml lub falkon 15 ml), wirówka z chłodzeniem, waga

**Odczynniki:** bufor ekstrakcyjny: 0,5 M roztwór sacharozy w 0,05 M Tris HCl, pH 7,2; 1% roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu K3[Fe(CN)6]; 0,5 % roztwór chlorku żelaza (III) (FeCl3), 0,1% roztwór 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCPIP; C12H7NCl2O2)

**Wykonanie:**

Izolacja chloroplastów

Odważyć 20g liści szpinaku (uprzednio trzymanego w lodówce) i utrzeć go w moździerzu z dodatkiem 5 ml buforu ekstrakcyjnego, uzyskany homogenat przesączyć przez etaminę (w celu oddzielenia nieroztartych tkanek) do probówki wirówkowej typu falkon. Następnie przesącz przelać do 2 probówek wirówkowych typu Eppendorf o pojemności 2 ml i wirować przez 3 minuty (1000\*g w temp. 5°C). Po wirowaniu w probówkach wyodrębnimy dwie frakcje: pellet (zawierający nieroztarte komórki, ziarna skrobi) oraz supernatant, który należy przelać do nowej probówki wirówkowej typu Eppendorf i ponownie wirować przez 20 minut przy (5000\*g w temp. 5°C). Po wirowaniu supernatant wylać, a osad zawiesić w 1,5 ml buforu ekstrakcyjnego.

Badanie właściwości redukujących chloroplastów

Zawiesinę chloroplastów przenieść do szklanej probówki i dodać jeszcze 1,5 ml buforu ekstrakcyjnego. Następnie do każdej dodać po 0,2 ml 0,1% roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu. Jedną probówkę należy umieścić w ciemności, zaś drugą na świetle.

**Zadanie: Po 30-60 minutach zanotować wyniki doświadczenia i zapisać wnioski.**

**Literatura:**

1. Banaś A., Jasienicka-Gazarkiewicz K., Demski K., *Przewodnik do ćwiczeń z biochemiczno-biofizycznych podstaw rozwoju roślin*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2017
2. Hill R., *Oxygen Evolved by Isolated Chloroplasts*, Nature, 139 (3525), 1937, str. 881-882
3. Kopcewicz J., Lewak S., Gabryś H., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005
4. Tukaj Z. (red)*, Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin,* Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2016