



Nachweis der pflanzlichen Photosynthese durch Messung der Sauerstoffbildung

Luuk van Wilderen, Andreas Roth, Lisa Herr, Georg Wille, Stand: 14.10.2021

1 Motivation

Im vorliegenden Versuch wird mit einer Sauerstoff-Elektrode die Bildung von Sauerstoff durch die Aktivität der pflanzlichen Chloroplasten bei Lichteinstrahlung bestimmt.

2 Grundlagen

2.1 Die Photosynthese

Die Photosynthese ist ein Vorgang, bei dem Pflanzen mit Hilfe von Lichtenergie H_2O und CO_2 in Glucose umwandeln. Ein "Nebenprodukt" ist Sauerstoff, der an die Umgebung abgegeben wird.

In der pflanzlichen Photosynthese besteht dieser Prozess aus zwei Phasen: der Lichtreaktion und der Dunkelreaktion. Für unsere Betrachtung der Sauerstoffbildung ist vor allem die Reaktionsabfolge während der Lichtreaktionsphase interessant. In dieser Phase wird Lichtenergie von Proteinkomplexen in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten genutzt, um Elektronen vom Wasser über verschiedene Zwischenstationen wie Plastochinon letztendlich auf NADP zu übertragen. Aus letzterem entsteht dann NADPH, und das Wasser wird dabei zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Das in der Lichtreaktion gebildete NADPH wird später in der sog. Dunkelreaktion für die Reduktion von CO_2 zu Glucose verwendet, wobei NADP regeneriert wird. Die Dunkelreaktion heißt übrigens nicht deshalb so, weil sie nur im Dunkeln stattfindet, sondern weil sie kein Licht mehr benötigt.

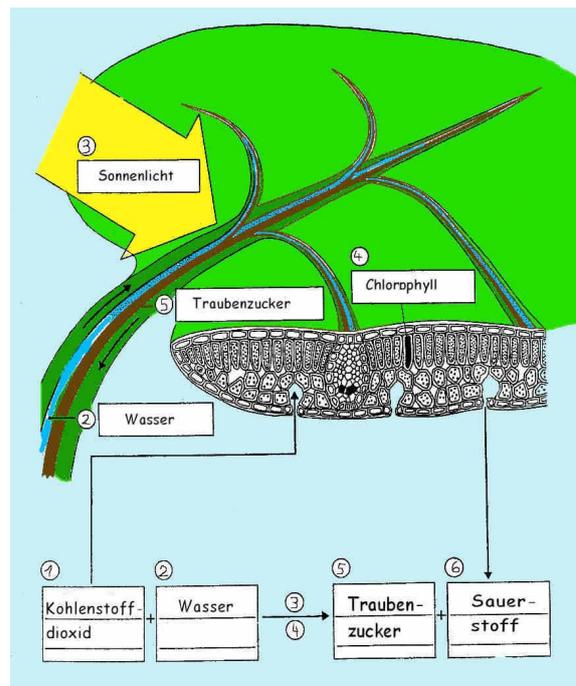


Abbildung 1: Stoffbilanz der pflanzlichen Photosynthese

Im Detail verläuft die Lichtreaktion wie folgt: Auf Pflanzenzellen treffende Photonen werden vom Photosystem II (PS II) und dem *Light Harvesting Complex* (LHC) absorbiert. Beides sind Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Auch der LHC gibt die Lichtenergie weiter an das PS II. Er enthält Chlorophylle und verschiedene Carotinoide und gestattet, auch die Energie der Photonen zu nutzen, deren Wellenlänge nicht genau im Absorptionsmaximum des PS II selbst liegt.

Im PS II führt die Lichtenergie zur Anregung eines Elektrons in einem speziellen Chlorophyll-Dimer, dem P 680. Es kommt zur Ladungstrennung und das angeregte Elektron wird über verschiedene Zwischenstufen weitergereicht, bis es schließlich vom Plastochinon A zum Plastochinon B übergeht (Q_A und Q_B). Das Q_B ist nur locker gebunden und dient als mobiler Elektronenüberträger für die nächsten Reaktionsschritte. Im Endeffekt werden die Elektronen im Photosystem I dann auf NADP übertragen, und das Endprodukt der Lichtreaktion NADPH entsteht. Einige Herbizide, z.B. DCMU, sind in der Lage, fester an die Plastochinon-Bindungsstelle des PS II zu binden als das Q_B selbst. Dadurch können sie die Photosynthese komplett blockieren.

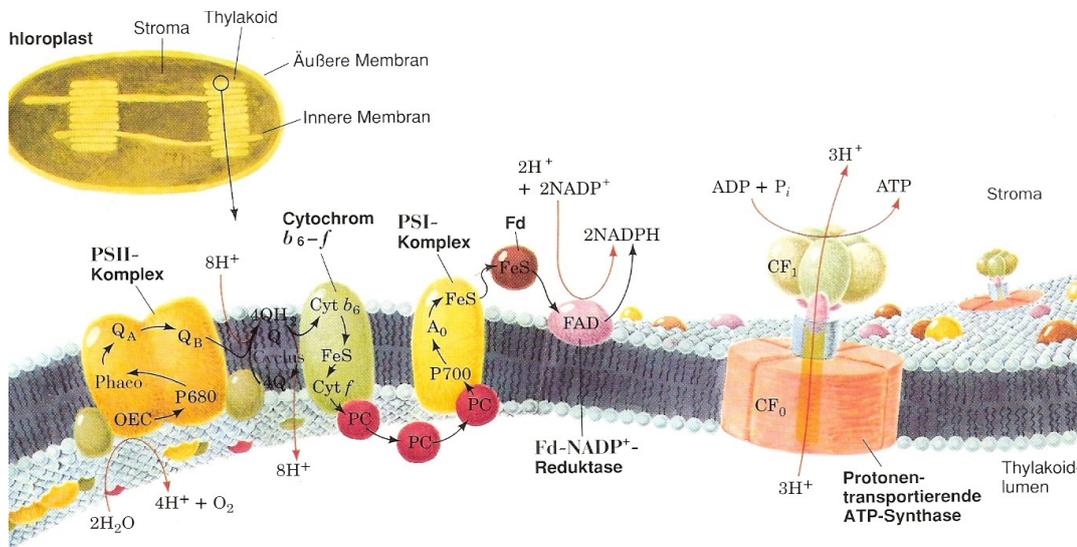
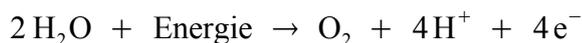


Abbildung 2: Übersicht über die Reaktionen in der pflanzlichen Photosynthese

Die durch die Lichtanregung entstandene Elektronenlücke des Chlorophyll-Dimers wird durch den *oxygen evolving complex* aufgefüllt mit Elektronen aus dem Wasser. Dabei entsteht Sauerstoff nach folgender Bruttogleichung:



Während der Lichtreaktionen werden nicht nur Reduktionsäquivalente in Form von NADPH generiert, sondern es wird durch verschiedene Mechanismen auch ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut. Dieser wird von einer ATP-Synthase zur Produktion von ATP aus ADP und Phosphat genutzt. ATP und NADPH stehen dann für die Dunkelreaktion zur Umwandlung von CO₂ in Glucose zur Verfügung.

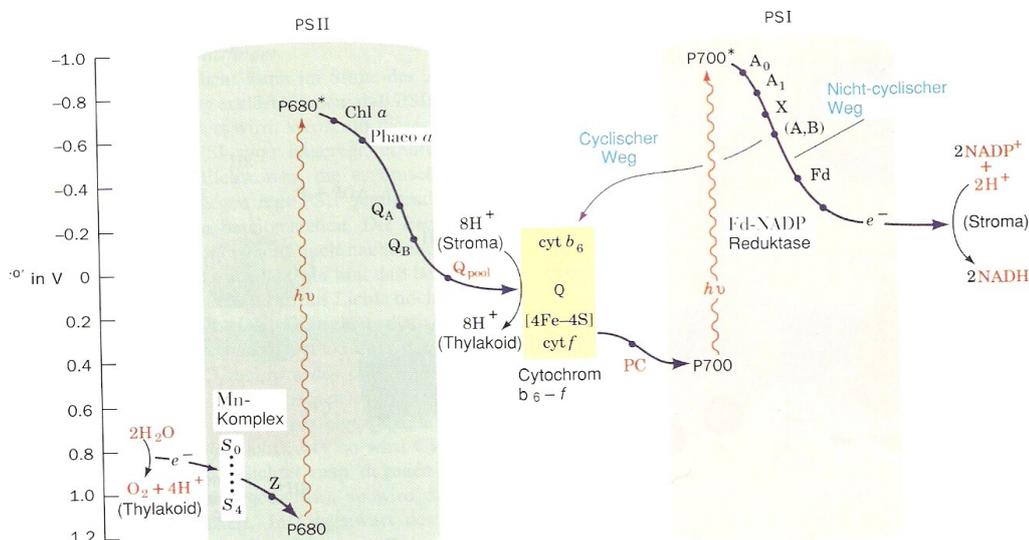


Abbildung 3: Energieniveaus der Elektronen an den verschiedenen Intermediaten der Lichtreaktion

2.2 Die Sauerstoff-Elektrode

Die Sauerstoff-Elektrode nach Clark dient zur Bestimmung der O₂-Konzentration in Lösungen. Sie besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, welche von einer Kaliumchloridlösung als Leiter umgeben sind. Durch eine Membran, die zwar Sauerstoff, aber keine anderen redox-aktiven Substanzen durchlässt, sind die Elektroden von der Messkammer getrennt. Eine an den Elektroden anliegende Spannung führt nur dann zu einem messbaren Stromfluss, wenn Sauerstoff an der Kathode reagieren kann. Der Strom steigt mit steigendem Sauerstoff-Partialdruck und kann daher nach vorheriger Kalibrierung zur Messung der Sauerstoffkonzentration verwendet werden.

An den Elektroden laufen die folgenden Reaktionen ab:

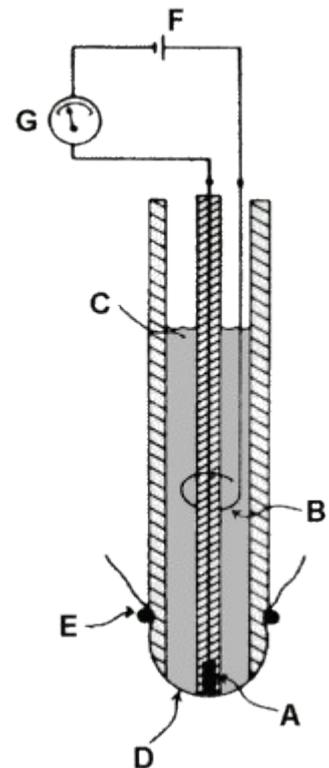
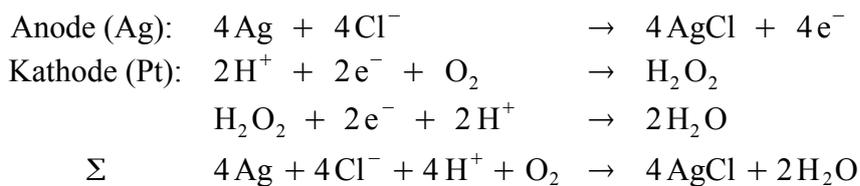


Abbildung 4: Clark-Elektrode (A Pt-Kathode, B Ag-Anode, C KCl-Elektrolyt, D Membran, E Dichtring, F Spannungsquelle, G Ampèremeter)

3 Quellen und Literatur

- „Biochemie“ von D.Voet und J.G. Voet; VCH Verlagsgesellschaft; 1992
- „Mesure de l'activité photosynthétique chez les plantes supérieures“ von Rainer Hienerwadel; Versuchsbeschreibung an der Faculté des Sciences de Luminy
- http://www.suz-mitte.de/angebote/bilder_angebote/photosyntheseschema.jpg
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Sauerstoffelektrode>

4 Vorbereitung auf den Versuch

Für die Messung des bei der Photosynthese produzierten Sauerstoffs werden Thylakoidmembranen verwendet. Diese müssen frisch aus Pflanzenmaterial präpariert werden. Da dadurch der "lösliche" Teil des Q_B-Kreislaufs zerstört wird, der nicht an die Thylakoidmembran gebunden ist, müssen künstliche Elektronenakzeptoren zugesetzt werden, die fehlendes Q_B ersetzen können, z.B. DCBQ oder Ferricyanid.

4.1 Vorbereitung der Lösungen

Stellen Sie zunächst aus Stammlösungen folgende Lösungen her. **Berechnen Sie dazu als Vorbereitung die jeweils von den Stammlösungen benötigten Volumina.** Sucrose, Kaliumphosphat, MgCl₂ und HEPES liegen als 1-molare Stammlösungen vor, NaCl als 5-molare Stammlösung.

Medium A (50 ml): 50 mM NaCl ; 0,3 M Sucrose ; 50 mM Kaliumphosphat (mit Kalilauge auf pH 7,5 einstellen)

Pipettieren Sie hierzu die berechneten Volumina an NaCl, Sucrose und KH₂PO₄ in einen Messzylinder und füllen Sie auf ca. 40 ml mit Wasser auf. Stellen Sie dann den korrekten pH-Wert 7,5 durch langsames Zutropfen von verdünnter Kalilauge (KOH) ein, und füllen Sie zum Schluss das Volumen auf 50 ml auf.

Medium B (25 ml): 5 mM MgCl₂

Medium C (150 ml): 10 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ; 20 mM HEPES (mit Natronlauge auf pH 7,5 einstellen)

Lagern Sie alle Medien auf Eis.

4.2 Präparation der Thylakoidmembranen

Achten Sie darauf, dass die Medien und die Präparate auf Eis und möglichst dunkel gelagert werden, am besten durch Einwickeln in Alufolie!

- (a) Zerkleinern Sie mit einem Mixer etwa 100 g frische grüne Salatblätter in 50 ml Medium A.
- (b) Stülpen Sie einen doppelten Nylonstrumpf über das Mixer-Gefäß (*Gefäß dabei gut festhalten!*) und filtern Sie die Mischung durch Auspressen zügig in ein Becherglas.
- (c) Verteilen Sie das dunkelgrüne Filtrat gleichmäßig auf zwei 50 ml-Falcon-Tubes und zentrifugieren Sie das Filtrat 1 min bei 4°C und 2000 g (entspricht 3400 UpM bei der Megafuge 1.0R).
- (d) Wickeln Sie die Tubes in Alufolie. Invertieren Sie die Falcon-Tubes mehrfach, um abgesetztes Thylakoid erneut aufzulösen. Schütten Sie das Filtrat vorsichtig in zwei neue Tubes um, so dass möglichst nur der weiße Bodensatz zurück bleibt. Zentrifugieren Sie das Filtrat nun 10 min bei 4°C und 5000 g (entspricht 5900 UpM bei der Megafuge 1.0R).
- (e) Nach der Zentrifugation ist in den Röhren der Unterschied zwischen Bodensatz und Überstand meist schwer zu erkennen. Gießen Sie vorsichtig den Überstand in das Becherglas ab, sodass nur noch das fast schwarze, zähflüssige Präparat am Boden übrig bleibt.
- (f) Suspendieren Sie das Pellet in beiden Falcon-Tubes mit jeweils 5 ml Medium B durch Invertieren, bis es sich vollständig aufgelöst hat und füllen Sie danach mit Medium C auf jeweils 45 ml auf.
- (g) Zentrifugieren Sie wieder für 10 min bei 4°C und 5000 g.
- (h) Gießen Sie erneut den nun klaren Überstand ab und suspendieren Sie den Bodensatz in jeweils 3 ml Medium C, bis er sich vollständig aufgelöst hat. Schütten Sie beide Suspensionen zusammen in ein 15 ml-Falcon-Tube. Das Thylakoidmembran-Präparat ist nun fertig. Wickeln Sie das Probenröhrchen in Alufolie und lagern Sie es auf Eis.

4.3 Chlorophyll-Extraktion zur Konzentrationsbestimmung

- (a) Schalten Sie das Spektrometer (Hitachi U-2000) ein und warten Sie die Selbsttests ab.
- (b) Geben Sie 10 µl der Thylakoid-Probe zusammen mit 990 µl einer Aceton-Wasser-Mischung (80/20%) in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß („Eppie“).
- (c) Verschließen und schütteln Sie das Gefäß, bis Sie eine Ausflockung beobachten.
- (d) Zentrifugieren Sie die Probe (mit einem Gegengewichtsgefäß) etwa eine Minute bei maximaler Drehzahl in einer Labor-Tischzentrifuge.
- (e) Die Lösung enthält nur noch Chlorophyll, das Protein wurde durch Aceton denaturiert und verbleibt als Pellet am Boden. Legen Sie das Eppi in Alufolie auf Eis.

5 Versuchsdurchführung

5.1 Spektroskopie

Nehmen sie mit Hilfe der folgenden Anleitung die Spektren auf:

- (a) Wählen Sie als Messart „Absorptionsspektrum“ und als Messparameter ein Absorptionsminimum von 0, ein Absorptionsmaximum von 1,5 und einen Wellenlängenbereich von 700 nm („Start-WL“) bis 400 nm („End-WL“) bei einer Geschwindigkeit von 400 nm/min. Bei den Geräteparametern stellen Sie die Basislinie auf „speziell“.
- (b) Geben Sie 1 ml des Aceton-Wasser-Gemischs ohne Chlorophyll in eine Quarz-Küvette, stellen Sie diese in die vordere Probenkammer und nehmen Sie eine „spezielle Basislinie“ auf.
- (c) Spülen Sie die Küvette aus, trocknen Sie sie möglichst gut und füllen Sie sie mit 1 ml der Chlorophyll-Lösung. Stellen Sie die Küvette wieder in die vordere Probenkammer und nehmen Sie ein Spektrum auf (Taste „Forward“).

- (d) Drucken Sie das Spektrum für jede Gruppe aus (nach einer eventuellen Reskalierung) und notieren Sie (mittels „Cursor“) die Absorptionswerte bei 652 und 663 nm sowie die Wellenlänge und den Absorptionswert beim Maximum (ca. 680 nm).
- (e) Füllen Sie eine Einmal-Küvette mit 1 ml Medium C, stellen Sie sie in die vordere Probenkammer und nehmen Sie erneut eine „spezielle Basislinie“ auf.
- (f) Geben Sie 10 µl der Thylakoidprobe dazu und mischen sie gründlich (z.B. mit einer Einmal-Pipette).
- (g) Nehmen Sie ein Spektrum auf. Bei zu geringem Ausschlag geben Sie nochmals 10 µl der Thylakoidprobe hinzu. Drucken Sie das Spektrum für jede Gruppe aus.
- (h) **Vor** dem Ausleeren und dem Reinigen der beiden Küvetten melden Sie sich bei Ihrem Betreuer.

5.2 Herstellung und Portionierung der Messlösung

- (a) Berechnen Sie die Menge an Thylakoid-Suspension, die Sie benötigen, um 2x 16 ml einer Thylakoid-Lösung in Medium C mit einem Gehalt von 0,1 mg/ml Chlorophyll zu erhalten. Verwenden Sie zur Konzentrationsbestimmung die folgende Gleichung und beachten Sie dabei die bei der Spektroskopie verwendete Verdünnung:

$$\text{Konzentration [mg Chlorophyll / ml]} = \text{Absorption (652 nm)} / 36$$

- (b) Stellen Sie nun diese Lösung durch Verdünnung der Thylakoid-Stammlösung mit Medium C in einer verschließbaren Glasflasche her und stellen Sie diese in Alufolie auf Eis. Jede Gruppe stellt hierbei ihre eigene Chlorophyll-Lösung her.

5.3 Kalibrierung der Sauerstoff-Elektrode

Bevor Sie nun die Freisetzung des Sauerstoffs bestimmen können, müssen Sie zunächst die Sauerstoff-Elektrode wie folgt einstellen und kalibrieren:

- (a) Überprüfen Sie zunächst, ob die Membran am Messkopf der Sauerstoff-Elektrode unbeschädigt ist. Falls dies nicht der Fall ist, melden Sie sich bei Ihrem Betreuer.
- (b) Verbinden Sie die Elektrode mit dem Messgerät und schalten Sie das Messgerät ein.
- (c) Drücken Sie nach der Initialisierung des Messgeräts die Taste „mg/L / O₂“, um in den Messbereich „%O₂“ zu wechseln.
- (d) Nach kurzer Zeit wird der Sauerstoffgehalt der Luft angezeigt. Warten Sie einige Minuten, bis sich der Messwert stabilisiert hat und drücken Sie dann die Taste „CAL.“. Damit wird der typische Sauerstoffgehalt der Luft (20,8 – 20,9 %) als Konstante zur Kalibrierung verwendet.
- (e) Wechseln Sie mit der Taste „mg/L / O₂“ wieder zurück in den Messbereich „mg/L“ und drücken Sie anschließend einmal die Taste „REC. MAX./MIN.“ bis im Display „REC“ angezeigt wird. Damit wird die automatische Abschaltung des Messgeräts verhindert.

5.4 Verwendung der Software zur Datenaufzeichnung

- (a) Starten Sie den PC und loggen Sie sich ein (User: Praktikum, Passwort: Praktikum).
- (b) Starten Sie die Mess-Software („O2.exe“). Nach einigen Sekunden sollte der aktuelle Messwert angezeigt werden. Falls dies nicht der Fall ist, melden Sie sich bei Ihrem Betreuer.
- (c) Wenn der Versuch von zwei Gruppen parallel durchgeführt wird, starten Sie die Software ein zweites Mal. Sowohl der Versuchsaufbau als auch die entsprechende Oberfläche der Software sind mit den Buchstaben „A“ bzw. „B“ gekennzeichnet.
- (d) Die Aufzeichnung der Messdaten wird mit dem entsprechend beschrifteten Button gestartet bzw. beendet, die so gewonnenen Messdaten lassen sich mit dem Button „Daten speichern“ als Text-Datei (ASCII-Datei, 5 Kopfzeilen, Messpunkte bestehen aus Zeit [s] und Sauerstoff-Konzentration [mg/L], Spalten getrennt durch Tabulator, Dezimaltrennzeichen Komma) exportieren.
- (e) Um die einzelnen Messungen in getrennten Dateien zu speichern, verwenden Sie nach jeder Messung den Button „Daten löschen“.

5.5 Durchführung der Messungen

Fetten Sie den Dichtungsring der Elektrode leicht ein und befestigen Sie diese im Messzylinder (fragen Sie Ihren Betreuer) und stellen Sie die Anordnung mit Hilfe eines Plastik-Halters stabil auf den Magnetrührer.

Testen Sie, wie viel Volumen in den Messzylinder passt: Legen Sie dazu den Rührmagneten in den Messzylinder. Fügen Sie 4.5 ml Wasser hinzu und verschließen Sie die Messkammer mit dem Stopfen. Geben Sie schrittweise jeweils 100 µl Wasser zu, bis keine Luftblasen mehr zu sehen sind, wenn die Messkammer verschlossen ist. Kontrollieren Sie auch, ob die Zelle dicht ist. Falls nicht, wenden Sie sich an Ihren Betreuer.

Notieren Sie das Gesamtvolumen der Kammer und verwenden Sie diesen Wert für alle weiteren Rechnungen!

Um nun die Aktivität des Photosystems II bestimmen zu können, geben Sie in jedem Versuchsdurchgang das vorher bestimmte Volumen der vorbereiteten Thylakoidsuspension zusammen mit einem kleinen Rührmagneten in die Messkammer und lassen Sie diese kontinuierlich vom Magnetrührer durchmischen. Geben Sie je nach Versuchsdurchgang einen anderen Stoff (siehe unten) unter Rühren zum Thylakoid, verschließen Sie anschließend die Messkammer mit dem Stopfen und decken Sie die Messkammer sofort mit der Haube ab.

Starten Sie danach die Messwert-Aufzeichnung, schalten Sie die Lichtquelle ein und nehmen Sie die Haube ab. Wenn die Sauerstoffbildung abgeschlossen ist, d.h. ein deutlicher linearer Anstieg zu sehen ist und die Sauerstoffkonzentration nun stabil bleibt oder leicht fällt, stoppen Sie die Aufzeichnung, schalten Sie die Lichtquelle aus, reinigen Sie die Versuchskammer mehrmals gründlich mit Wasser und starten den nächsten Durchgang.

Hier die hinzuzufügenden Zutaten für die Versuchsdurchgänge:

- A) 100 µl Ferricyanid (0,3M; Elektronenakzeptor)
- B) 200 µl Ferricyanid (0,3M; Elektronenakzeptor)
- C) 100 µl Ferricyanid und 50 µl Atraton (Herbicide).

6 Auswertung

Bestimmen Sie für jeden Versuchsdurchgang die Geschwindigkeit der Sauerstoffbildung mittels einer linearen Regression. Zeigen Sie die gesamten Messkurven im Protokoll. Für die Geschwindigkeitsbestimmung **verwenden Sie aber nur den linearen Anstieg** am Anfang der Reaktionskurve. Ermitteln Sie daraus die Freisetzung von Sauerstoff pro Minute. Berechnen Sie danach mithilfe folgender Formel die Aktivität:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \frac{\text{Freisetzung}(\text{O}_2) \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l} \cdot \text{min}} \right]}{\text{Konzentration}(\text{Chlorophyll}) \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}$$

Führen Sie für alle drei ermittelten Aktivitäten eine Fehlerbetrachtung durch. Schätzen Sie dazu den Fehler der Chlorophyll-Konzentration ab und verwenden Sie den Fehler der linearen Regression für die Freisetzung. Geben Sie den Rechenweg für die Aktivitätsbestimmung und die Fehlerbetrachtung einmalig an und stellen Sie die Ergebnisse aller Versuchsdurchgänge tabellarisch zusammen. Berechnen Sie hierzu ebenfalls für jeden Versuchsdurchgang die Konzentration an Elektronenakzeptoren. Stellen Sie weiterhin die Messkurven der einzelnen Versuchsdurchgänge graphisch dar inkl. der ermittelten Regressionsgerade. Vergleichen Sie die Messkurven der Versuchsdurchgänge und die ermittelten Aktivitäten. Geben Sie mögliche Gründe für Unterschiede an.

Das Protokoll soll neben einer kurzen Einleitung zum Thema Photosynthese (maximal eine Seite) sämtliche Berechnungen und ermittelten Werte enthalten. Des weiteren sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Wozu dient die Elektrolytlösung in der Sauerstoff-Elektrode? Warum ist die Membran notwendig?
- An welcher Stelle der Photosynthese können die künstlichen Elektronenakzeptoren eingreifen und warum werden sie gebraucht?
- Wie funktioniert das Herbizid?
- Wozu dienen die Medien A, B und C?
- Warum muss man die Konzentration an Chlorophyll in einer Aceton-Lösung bestimmen? (Vgl. Sie mit der Lösung aus Medium C und dem Thylakoid.)