

УДК 58.01.035

БИОХИМИЯ

В. А. СИНЕЦКОВ, В. В. ШУБИН, Ф. Ф. ЛИТВИН

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ МНОГИХ ИЗЛУЧАЮЩИХ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ ВЗАИМОСВЯЗАННЫХ НАТИВНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА МЕТОДОМ СЕЛЕКТИВНОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ И ИЗМЕРЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 II 1973)

Исследование структуры спектров флуоресценции и возбуждения фотосинтезирующих организмов (¹⁻⁶) и, в особенности, производных спектров (⁷) позволяет считать (^{4, 7}), что в люминесценции участвует целая система нативных форм хлорофилла а, между которыми происходит эффективный обмен энергией. Однако для окончательного доказательства этого положения и для расчетов коэффициентов миграции необходимо

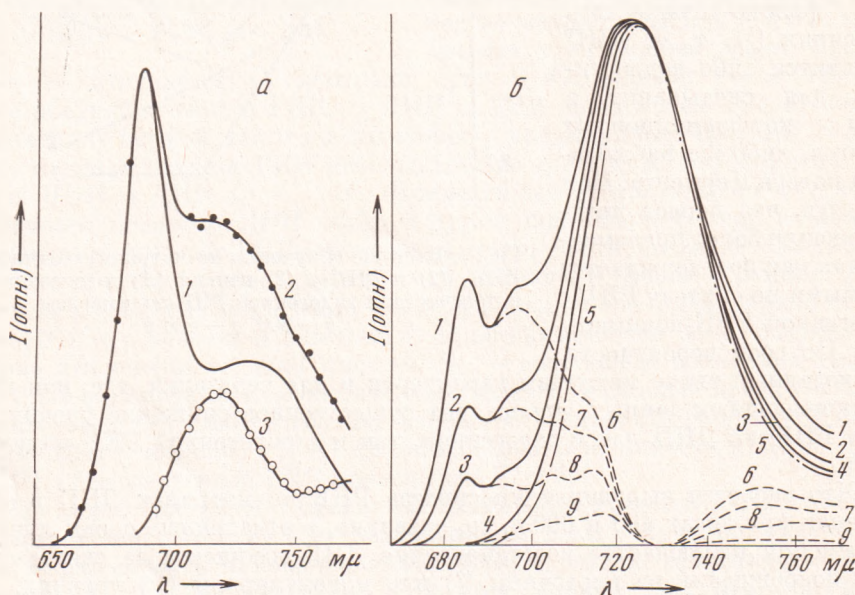


Рис. 1. Зависимость спектров флуоресценции хлореллы от длины волны возбуждающего света ($\lambda_{\text{возб}}$). а — измерение при 20°, 1 — $\lambda_{\text{возб}} = 650$ мμ, 2 — 695 мμ, 3 — разность спектров 1 и 2; б — измерение при -196°, 1 — $\lambda_{\text{возб}} = 676$ мμ, 2 — 683, 3 — 686, 4 — 694, 5 — 705 мμ, 6, 7, 8, 9 — разностные спектры, соответствующие кривым 1, 2, 3, 4 за вычетом кривой 5

обеспечить возможность избирательного возбуждения и измерения флуоресценции каждой индивидуальной формы, т. е. измерять весь спектр флуоресценции при любой длине волны возбуждения. В данной работе это достигнуто путем снижения уровня рассеянного возбуждающего света (10–15% от интенсивности флуоресценции, точность его вычитания 3–5%) за счет сужения щелей (1–3 мμ), использования прозрачных образцов и скрещенных поляроидов.

Исследования проводили при 20 и -196° на хлоропластах гороха и фасоли и на суспензии хлореллы и эвглены. Ниже будут представлены в основном данные по хлорелле.

Зависимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего света. а) При 20° и возбуждении в красной области до 660 м μ спектр флуоресценции с двумя основными полосами 686 и 740 м μ мало зависит от длины волны возбуждения (рис. 1а). В этих условиях излучает преимущественно один центр с двумя указан-

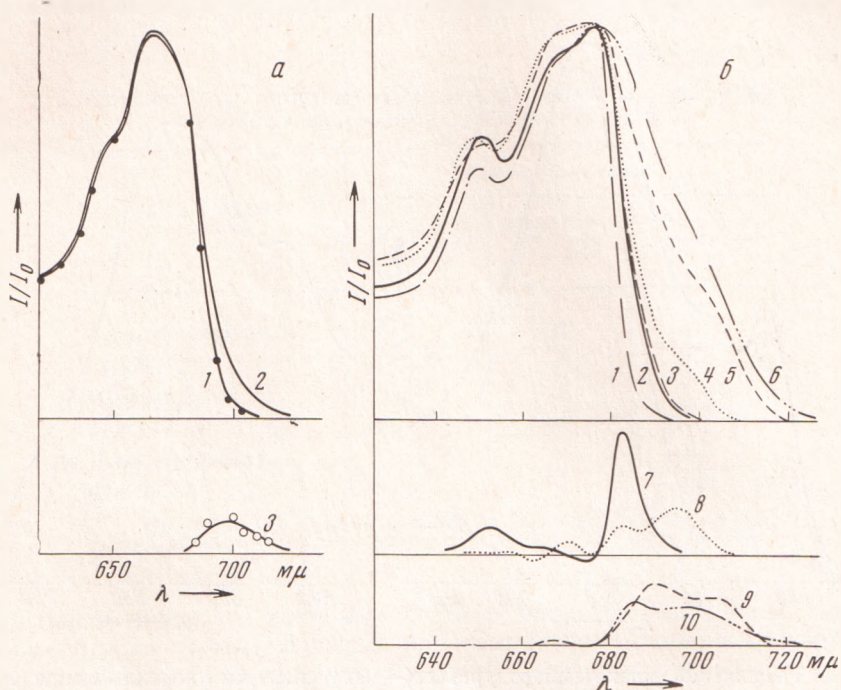


Рис. 2. Зависимость спектров возбуждения хлореллы от длины волны регистрируемой флуоресценции ($\lambda_{изм}$). а — измерение при 20° , 1 — $\lambda_{изм} = 660$ м μ , 2 — 740 м μ , 3 — разностный спектр — 2 минус 1; б — измерение при -196° , 1 — $\lambda_{изм} = 678$ м μ , 2 — 685, 3 — 695, 4 — 705, 5 — 713, 6 — 725 м μ ; 7—10 — разностные спектры: 7—2 минус 1, 8—4 минус 3, 9—5 минус 4, 10—6 минус 5

ными максимумами (слабая вторая полоса — 740 м μ — является колебательным сателлитом первой, о чем свидетельствуют аналогичные измерения растворов пигмента). Полоса у 686 м μ в спектре хлореллы довольно эффективно возбуждается даже в антистоксовой области — при $\lambda = 700$ м μ .

Более детальный анализ позволяет, однако, обнаружить еще один центр излучения. Возбуждение при $\lambda = 686$ м μ приводит к заметному изменению спектра флуоресценции, в котором проявляется новая полоса у 720 м μ . В спектре эвглены при комнатной температуре обнаруживается еще большее число полос (686, 696, 710 м μ).

б) Глубокое охлаждение (-196°) сопровождается известным эффектом возгорания длинноволновой флуоресценции и усложнением спектра. Для низкотемпературного спектра, состоящего из 3 основных полос и ряда минорных компонентов (⁴), зависимость от длины волны возбуждающего света начинает проявляться в еще большей мере.

При возбуждении за 676 м μ интенсивность главных полос у 686 и 695 м μ уменьшается практически до полного исчезновения (при $\lambda = 695$ м μ , рис. 1б). Одновременное пропорциональное их уменьшение свидетельствует о том, что собственное поглощение центра, излучающего у 695 м μ , относительно невелико.

Интенсивность флуоресценции в области 700–715 мμ начинает падать при смещении полосы возбуждающего света в длинноволновую сторону от 680 мμ. Исходя из сравнения обычных и разностных спектров (рис. 16) удается вычленить полосы у 704 и 713 мμ, отмечавшиеся ранее на производных спектрах (7).

Интерпретация главной полосы в низкотемпературном спектре флуоресценции. При возбуждении за 695 мμ в спектре остается практически одна полоса (725 мμ у хлореллы), которая,

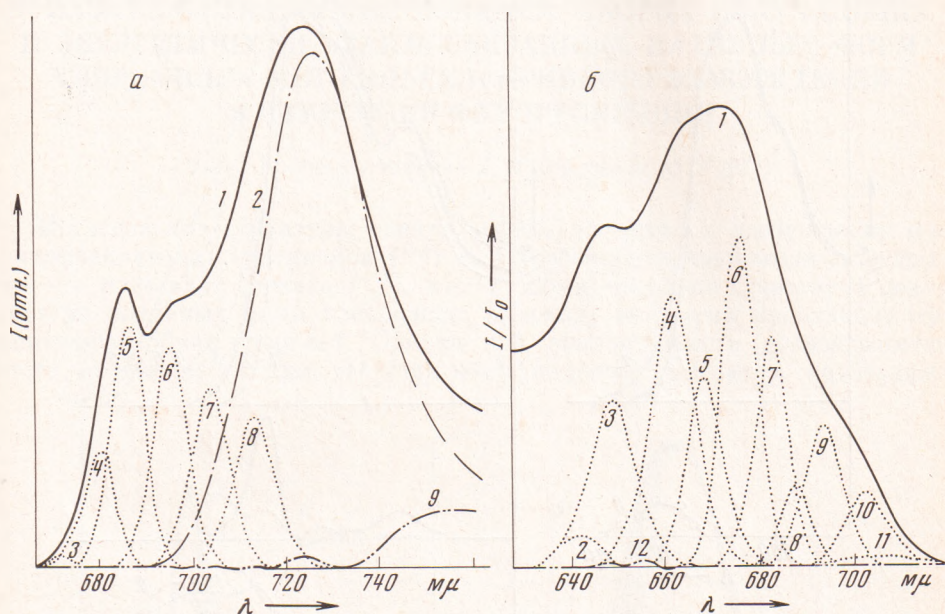


Рис. 3. Разложение низкотемпературных (-196°) спектров хлореллы в виде ряда полос нативных форм хлорофилла. а — флуоресценция: 1 — $\lambda_{\text{возб}} = 640$ мμ, 2 — $\lambda_{\text{возб}} = 705$ мμ, 3–8 — гауссовские кривые индивидуальных форм, 9 — спектр 1 минус сумма индивидуальных спектров 2–8; б — возбуждение: 1 — $\lambda_{\text{изм}} = 713$ мμ, 2–11 — гауссовские кривые, 12 — расхождение между спектром 1 и суммой кривых 2–11 и их сателлитов (не приведены на рис.)

судя по коротковолновому склону, имеет гауссовскую форму и отличается необычно большой полушириной — около 30 мμ. Форма ее не зависит от длины волны возбуждения в области 695–715 мμ, а степень поляризации постоянна от 700 до 760 мμ.

Положение главной полосы низкотемпературного спектра различно у разных видов: 722 мμ у *Chlamidomonas*, 726 мμ у *Chlorella* и *Anabena*, 732 мμ у *Nostoc*, 736–739 мμ у *Phaseolus*. В спектре эвглены она, по-видимому, состоит из двух полос (у 720 и 730 мμ), а в спектре фасоли ее положение изменяется в процессе зеленения от 725 до 738 мμ.

На длинноволновом склоне полосы был отмечен ряд «плеч» в обычных (1–6) и производных спектрах (7). Их присутствие отчасти обусловлено сателлитами главных более коротковолновых узких полос, о чем свидетельствует сходная зависимость от длины волны возбуждения (рис. 16). Однако не исключено, что некоторый вклад вносит и собственное излучение ряда форм, обнаруживаемых по поглощению в области 715–800 мμ (1).

Таким образом, при низкой температуре наблюдается излучение основных центров с главными максимумами: 680, 686, 695, 704, 713, 725 и 732–738 мμ.

Зависимость спектров возбуждения от длины волны регистрируемой флуоресценции. При 20° спектр возбуждения (максимумы 650, 670 и 682 мμ) мало изменяется от длины волны

излучения. Интенсивность полос в спектре возбуждения при -196° последовательно падает (начиная с самых длинноволновых) по мере того, как монохроматическая полоса регистрируемого излучения смещается от 740 до 670 мμ (рис. 26). Низкотемпературный спектр возбуждения коротковолнового излучения в области 670–680 мμ близок по форме к спектру возбуждения при комнатной температуре (рис. 2), что свидетельствует о регистрации в этих условиях излучения преимущественно одного и того же центра. Существование индивидуальных спектров возбуждения (излучения) для отдельных полос доказывает, что последние принадлежат само-

Таблица 1

Относительные квантовые выходы флуоресценции и миграции энергии в хлоропластах фасоли при -196°

Поглощающая группа	Излучающая группа		
	коротковолновая, при 670 мμ	промежуточная, при 687 мμ	длинноволновая, при 738 мμ
Коротковолновая, при 650 мμ	0 <u>1,0</u>	1,2 <u>1,1</u>	3,1 <u>0,9</u>
Промежуточная, при 678 мμ	0 <u>?</u>	1,0 <u>1,0</u>	3,4 <u>1,0</u>
Длинноволновая, при 700 мμ	0 <u>?</u>	0 <u>?</u>	3,3 <u>1,0</u>

Примечание. Цифры над чертой — выходы собственной или сенсibilизированной флуоресценции, под чертой — миграции энергии.

стоятельным центрам — нативным формам пигмента. Разложить суммарные спектры на соответствующий ряд компонентов и найти соответствие между положением спектра поглощения и излучения каждой формы удалось, используя сочетание методов производной спектрофотометрии (⁷) и разностных спектров (рис. 1 и 2). Спектроскопические характеристики системы нативных форм хлорофилла можно представить в виде следующего ряда * (верхняя цифра — максимум флуоресценции, нижняя — максимум поглощения): Хл b_{640}^{645} , Хл b_{648}^{653} , Хл b_{662}^{668} , Хл b_{668}^{674} , Хл b_{676}^{680} , Хл b_{682}^{686} , Хл b_{687}^{690} , Хл b_{693}^{697} , Хл b_{702}^{712} , Хл b_{707}^{718} , Хл b_{712}^{718} , Хл b_{738}^{743} , Хл b_{755}^{760} и группа форм с широкими полосами: Хл b_{702}^{722} , Хл b_{704}^{726} , Хл b_{706}^{732} , Хл b_{710}^{738} .

Результаты анализа миграции энергии для упрощенной системы из трех групп форм (табл. 1) подтверждают качественные выводы (⁴, ⁸) о функциональном разделении форм на донорную, донорно-акцепторную и акцепторную группы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
5 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Ф. Ф. Литвин, Г. Т. Рихирева, А. А. Красновский, Биофизика, 7, 576 (1962). ² Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещев, А. А. Красновский, ДАН, 154, № 2, 460 (1964). ³ Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещев, Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965. ⁴ Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещев, Биофизика, 12, № 3, 433 (1967). ⁵ F. Cho, R. Govindjee, Biochem. et biophys. acta, 216, 139 (1970). ⁶ J. S. Brown, Ann. Rev. Plant. Physiol., 23, 73 (1972). ⁷ Ф. Ф. Литвин, Б. А. Гуляев, В. А. Синещев, ДАН, 199, 1428 (1971). ⁸ Ф. Ф. Литвин, В. А. Синещев, ДАН, 175, 1175 (1967).

* К коротковолновой (донорной) группе отнесены первые четыре формы, к промежуточной (донорно-акцепторной) — следующие четыре, к длинноволновой (акцепторной) — все остальные формы.