



Qualitative und quantitative Charakterisierung der Photosynthesepigmente

Versuchsdurchführende

Oscar Moore (634083)
Frido (...)
Philipp.. (...)
Daniel... (...)
Huyen Anh Nguyen (572309)

Versuchsort

Campus Nord, Haus 9
R2002

Versuchsbetreuer

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Grimm

11. Juni 2024

Contents

1	Einführung	2
2	Material und Methode	2
2.1	Herstellung des Pigmentextraktes	2
2.2	Photometrische Bestimmung Chlorophylle a und b	2
2.3	DC-Trennung Chlorophylle und Carotinoide	2
2.4	Fluoreszenz des Chlorophyllextraktes	2
2.5	Phäophytinbildung	2
3	Ergebnis	2
3.1	Konzentrationsbestimmung von Chlorophylle im Rohextrakt	2
3.2	Quantitative Bestimmung der Pigmentebestandteile des Rohextraktes	3
4	Diskussion	7
5	Anhang	8
5.1	Rechenwege	8
5.2	Rohdaten	8
5.2.1	Einwaage der Proben	8
5.2.2	Extinktion des Rohextraktes	9
5.2.3	Substanzstrecke auf der DC-Platte	9

1 Einführung

2 Material und Methode

Für diesen Versuch wurde die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* als Wildtyp und die antisense FC1 mutierte Variante verwendet.

Die Verdünnungen und Homogenisieren wurde jeweils auf Eis durchgeführt.

2.1 Herstellung des Pigmentextraktes

Es wurde 0.9965g Pflanzenmaterial des Wildtypens und 0.9960g des Mutantes eingewogen.

Die Proben wurden mit kalten basischen Aceton (100% Aceton und 20 mM NH_4OH) homogenisiert und über einem Miraclothfilter in einem 50 mL Falconröhrchen filtriert. Homogenisierung mit Quarzsand wurde zwei Mal durchgeführt und das Homogenisat in einem 15 mL Falconröhrchen vereint.

2.2 Photometrische Bestimmung Chlorophyll a und b

Um eine quantitative Bestimmung von Chlorophyll a und b durchzuführen, wurden zuerst 0.2ml des Wildtyp-Extrakts (WT) und des der Mutante (MU) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde ein Verhältnis von 1:5 geschaffen, indem 0.8ml basisches Aceton hinzugegeben wurde.

Das Gemisch wurde gevortext und für eine Minute bei 15.000 rpm herunterzentrifugiert. Die photometrische Bestimmung von 1 mL Probevolumen erfolgte bei 470nm, 646nm, 663nm und 720nm wobei 720nm Wellenlänge als Maß für Verunreinigung diente und 470nm als nicht relevanter Kontrollwert.

Als Blank-Lösung wurde das Extraktionslösung (basisches Aceton) verwendet.

2.3 DC-Trennung Chlorophyll und Carotinoide

5 mL des basischen Pigmentextraktes vom Wildtyp und Mutant wurde mit 1 mL Petrolether versetzt und 3 mal vorsichtig invertiert. Die Proben wurden für 10 Minuten im Eis inkubiert und die obere dunkelgrüne Phase für die weiteren Versuchen in einem 1.5 mL Eppendorf Tube überführt.

50 Mikroliter von den beiden Proben wurden auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte (abgekürzt: DC-Platte) als breite Bande aufgetragen. In einem mit Laufmittel (Petrolether/Aceton/Isopropanol/Wasser, 400:80:48:1)-abgesättigte DC-Kammer wird die DC-Platte inkubiert und der Lauf wurde gestoppt, als diese 5 mm Abstand zur DC-Plattenkante erreicht hatte.

2.4 Fluoreszenz des Chlorophyllextraktes

2.5 Phäophytinbildung

3 Ergebnis

3.1 Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll im Rohextrakt

Die Konzentration von Chlorophyll a und b wurde mit der Gl. 1 und 2 photometrisch bestimmt. Für den Wildtyp wurde eine Konzentration an Chlorophyll a von 2.221 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht und Chlorophyll b 0.510 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht gemessen. Für die Mutante wurde eine Konzentration an Chlorophyll a von 3.363 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht und Chlorophyll b 0.742 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht gemessen.

Rechenweg kann im Anhang

$$\frac{(12.21 \cdot (A_{663} - A_{720}) - 2.81 \cdot (A_{646} - A_{720})) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{m(\text{Frischgewicht})} \quad (1)$$

$$\frac{\frac{(20.21 \cdot (A_{663} - A_{720}) - 4.91 \cdot (A_{646} - A_{720}))}{V(\text{Extrakt})} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{m(\text{Frischgewicht})} \quad (2)$$

Table 1: Chlorophyll a und b Konzentration des Rohextraktes vom Wildtyp und Mutant der Nicotina tabacum Pflanze.

Typ	c[Chl a] in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht	c[Chl b] in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht
Wildtyp	2.221	0.510
Mutant	3.363	0.742

3.2 Quantitative Bestimmung der Pigmentebestandteile des Rohextraktes

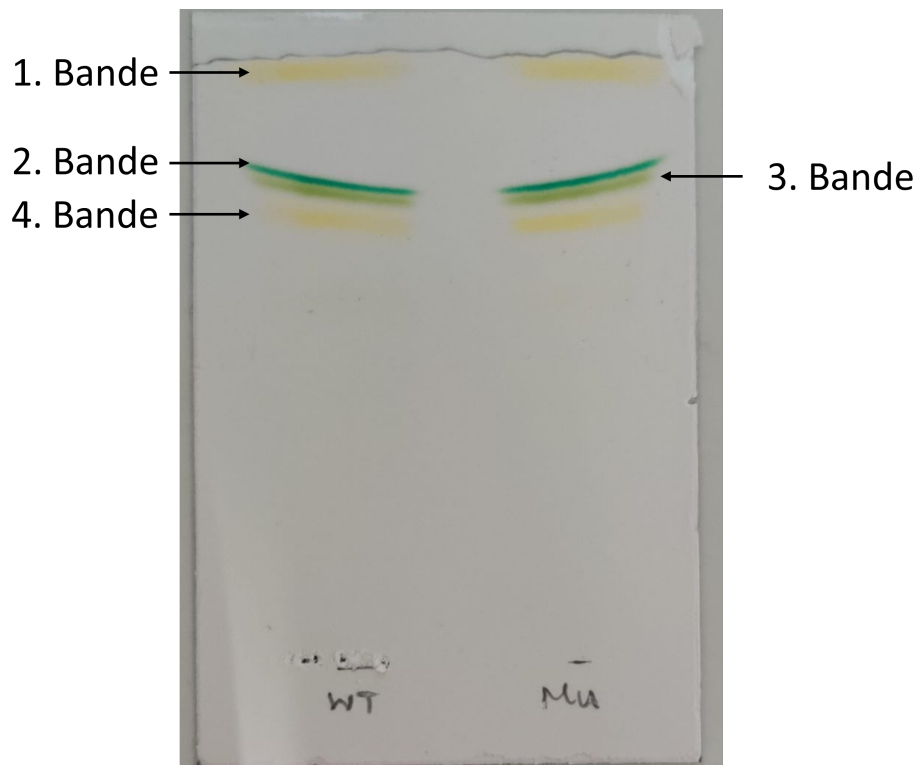


Figure 1: Probenauftrennung mittels Dünnschicht Chromatographie-Platte von der Spezies Nicotina tabacum (Wildtyp und FC1 - Mutant). Pigment wurden in Petrolether überführt und auf die Platte aufgetragen.

Die Auftrennung der in Petrolether gelösten Pigmenten zeigen 4 stark gefärbte Banden (siehe Figure 1) bei beiden Nicotina tabacum Proben. Die jeweiligen Banden vom Wildtyp und Mutanten zeigen die gleichen R_f -Werte (siehe Tab 2) und auf der DC-Platte sind die vier Banden bei beiden Typen gleich schnell liefen.

Table 2: R_f -Werte von Band 1-4 aus Figure 1 vom Nicotina Tabacum Wildtyp und Mutant.

Band	Wildtyp	Mutant
1	0.97	0.97
2	0.79	0.79
3	0.73	0.73
4	0.61	0.61

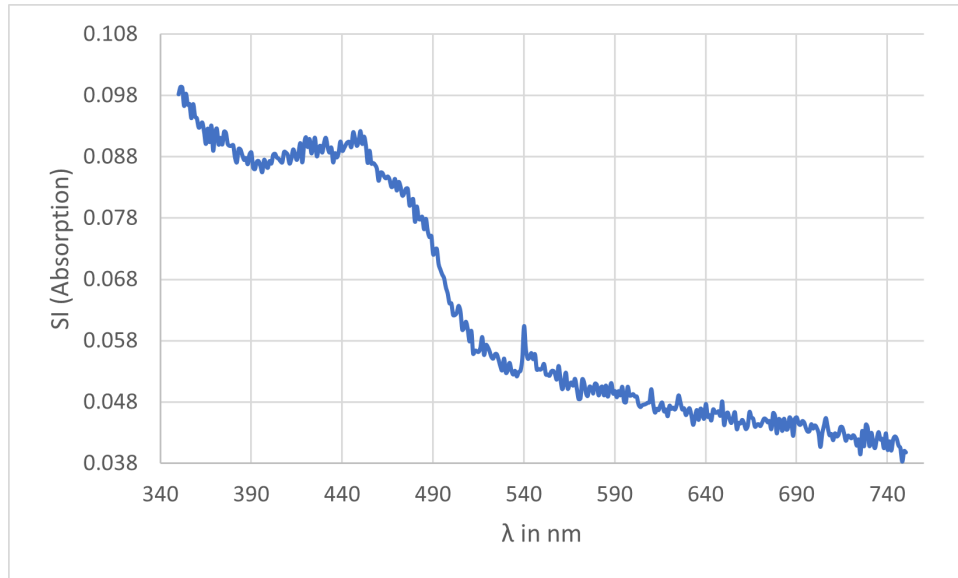


Figure 2: Absorptionsspektrum der ersten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima liegt bei $\lambda = 400$ bis 460 nm.

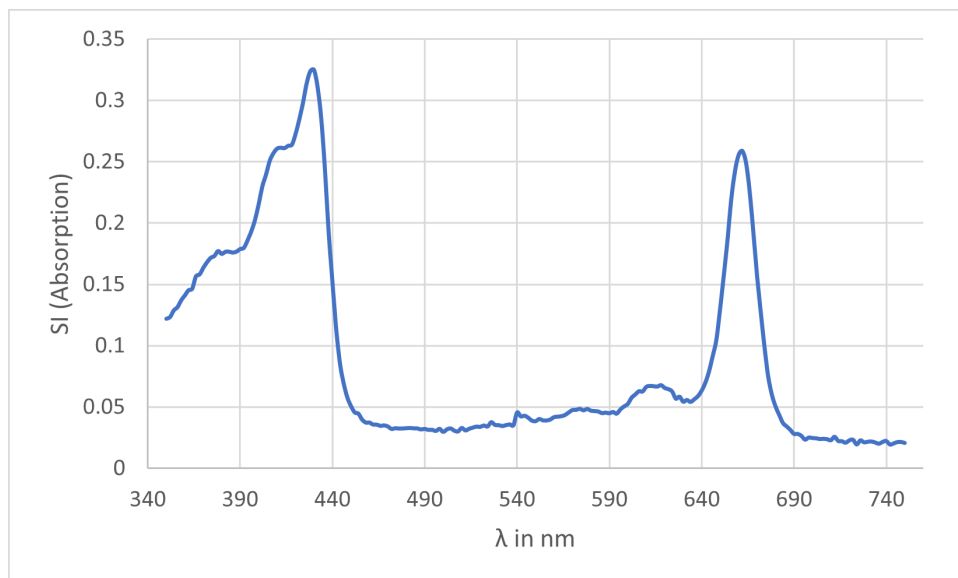


Figure 3: Absorptionsspektrum der zweiten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich $\lambda = 430$ und 664 nm.

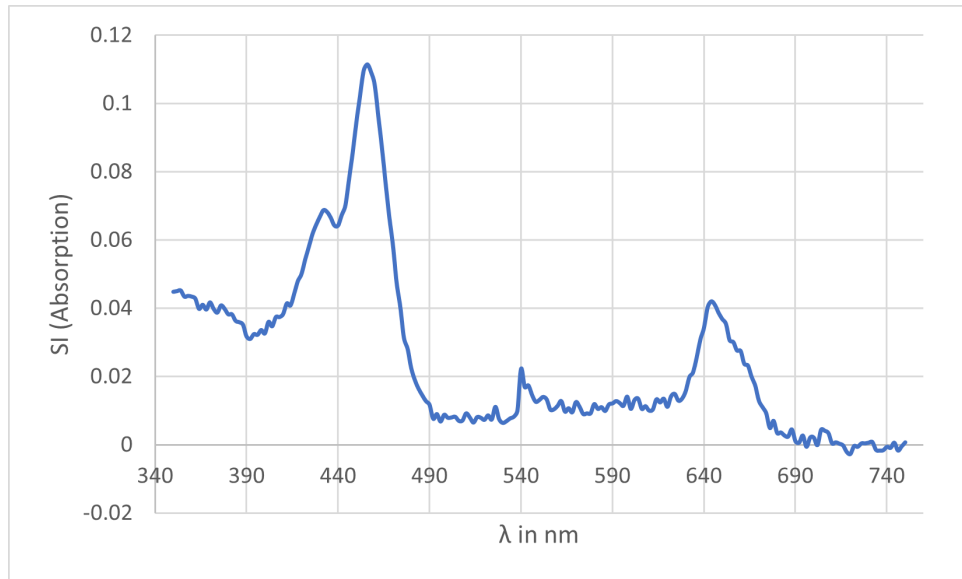


Figure 4: Absorptionsspektrum der dritten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich $\lambda = 458$ und 646 nm. In diesen Absorption gibt es ein weiteren Peak bei $\lambda = 434$ nm

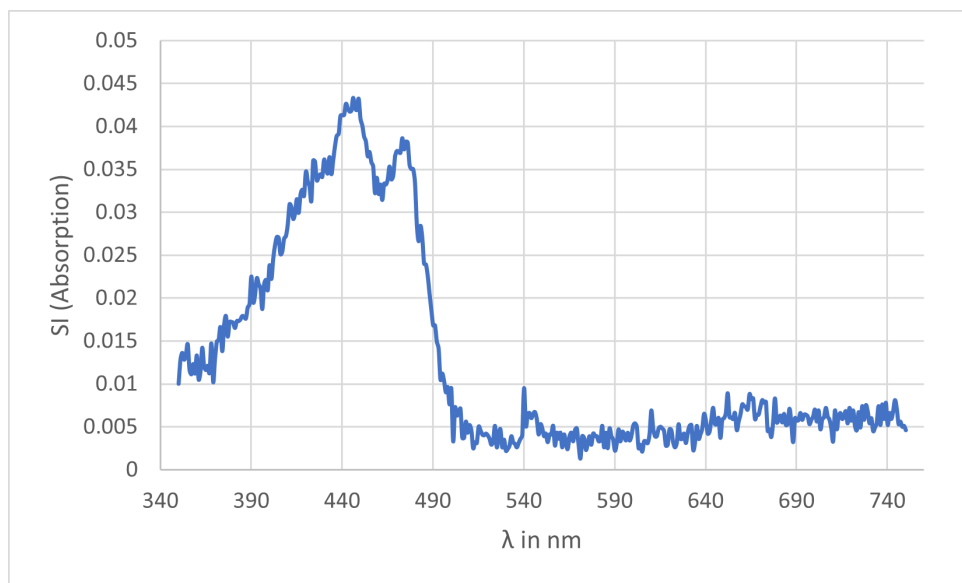


Figure 5: Absorptionsspektrum der vierten Bande aus Figure 1. Absorptionsmaxima Bereich liegt im Bereich $\lambda = 448$ und 476 nm.

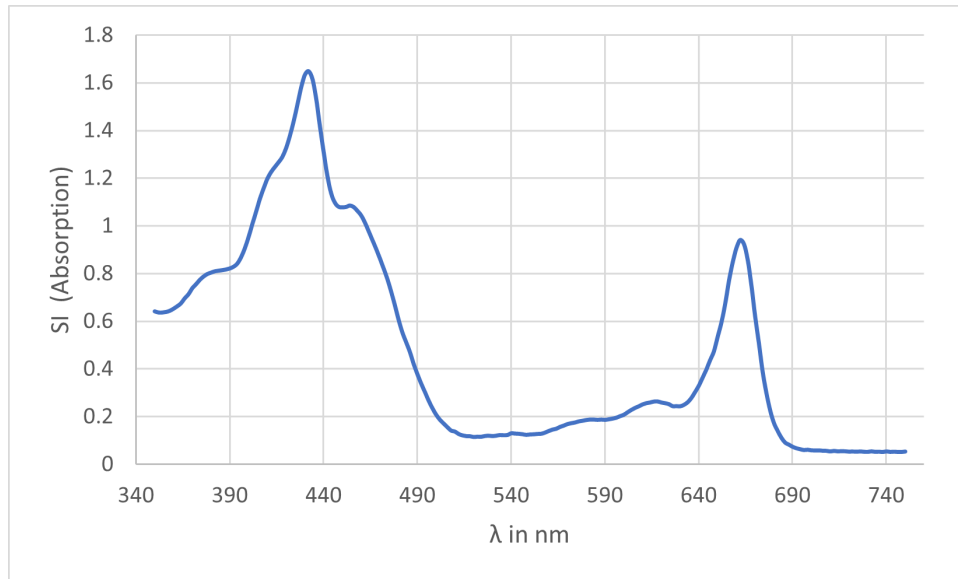


Figure 6: Absorptionsspektrum vom unbekannten Pigmentextraktes.

Die Absorptionskurve der Bande 1 ist stark verrauscht zeigt ein Absorptionsmaximumbereich bei $\lambda = 400 - 460$ nm (siehe Figure 2).

Bande 2 besitzt zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda = 430$ und 664 nm (siehe Figure 3). Zusätzlich sind noch zwei kleinen Peak bei $\lambda = 412$ nm und 614 nm in der Kurve zu sehen.

In Figure 4 gibt es ebenfalls mehr als zwei Peaks. Zwei Absorptionsmaxima sind bei $\lambda = 458$ und 646 nm und ein weiteren kleinen Peak bei $\lambda = 434$ nm.

Das Absorptionsspektrum von Bande 4 ist wie von Bande 1 etwas verrauscht und hat zwei Peaks bei $\lambda = 448$ und 476 nm (siehe Figure 5).

Bei den vier Absorptionsspektrum (Figure 2 - 5) existiert ein kleiner Peak bei $\lambda = 540$ nm.

Die vom Betreuer gegebene Pigmentextraktes zeigt mehrere Peaks (siehe Figure 6), welches bei der Überlappung mit Bande zwei und drei Gemeinsamkeiten der Absorptionsmaxima zeigen (Siehe in Figure 7). Ein Peak jedoch ist beim Pigmentextrakt nicht zu sehen, welches bei Bande 3 zu sehen ist. Der Peak bei $\lambda = 646$ nm wurde in Figure 7 rot hervorgehoben.

Die Signalintensität des Pigmentextraktes ist circa 3 mal höher als die von Band 2 und 3.

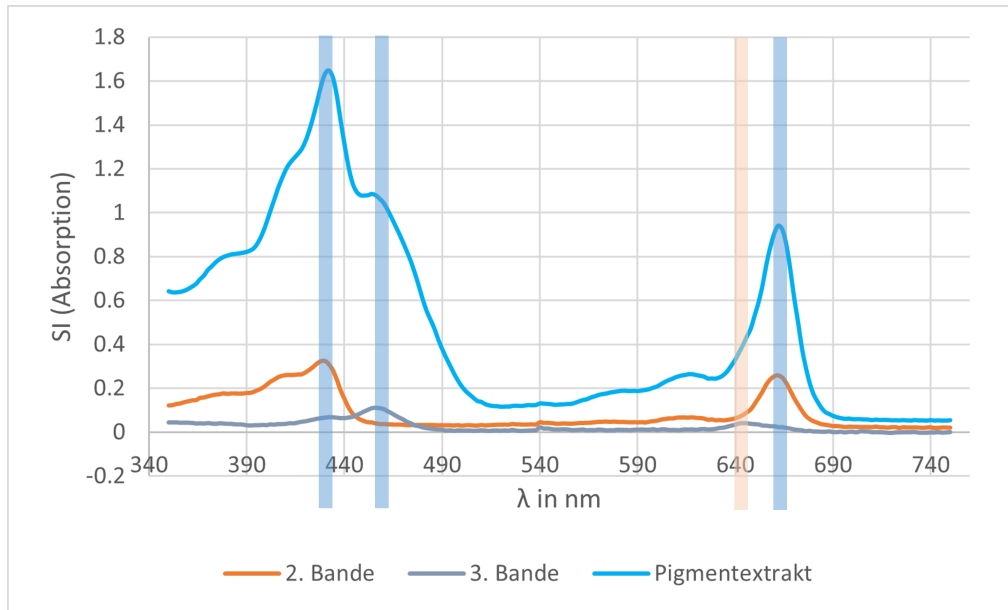


Figure 7: Vereintes Absorptionsspektrum von der unbekannten Probenextraktes, der zweiten und dritten Bande. Die Maximas der zweiten und dritten Bande wurde hier farblich hervorgehoben. Die rote Markierung zeigt ein fehlenden Peak bei der unbekannte Probeextraktes

4 Diskussion

Aus der Nicotina Tabacum Pflanze wurde von der FC1-Antisense Mutante mehr Chlorophylle a und b als beim Wildtyp extrahiert(siehe Table 1).

Da beide Proben mit der gleichen Mengen an Volumina bei der DC-Auftrennung weitergearbeitet wurde, ist auch bei den Banden zwischen den beiden Typen kein Farbintensitätsunterschied zu erkennen (Figure 1).

Die Identifikation der 4 Banden bei der DC-Platte wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und mit den Literaturwerten von Heather A. Hager³ und Peter von Sengbusch⁴ verglichen.

5 Anhang

5.1 Rechenwege

$\mu\text{g Cl. a / g FG}$

WT
$$\frac{(12,21 \cdot (0,463 - 0,012) - 2,81 \cdot (0,178 - 0,012)) \cdot 5}{11,5 \text{ mL} \cdot 0,9965 \text{ g}}$$

$= 2,221 \mu\text{g Cl. a / g Frischgewicht}$

MU
$$\frac{(12,21 \cdot (0,493 - 0,014) - 2,81 \cdot (0,188 - 0,014)) \cdot 5}{8 \text{ mL} \cdot 0,9960 \text{ g}}$$

$= 3,3632 \mu\text{g Cl. a / g Frischgewicht}$

$\mu\text{g Cl. b / g FG}$

WT
$$\frac{(20,31 \cdot (0,178 - 0,012) - 4,91 \cdot (0,463 - 0,012)) \cdot 5}{11,5 \text{ mL} \cdot 0,9965 \text{ g}}$$

$= 0,5099 \mu\text{g Cl. b / g Frischgewicht}$

MU
$$\frac{(20,31 \cdot (0,188 - 0,014) - 4,91 \cdot (0,493 - 0,014)) \cdot 5}{8 \text{ mL} \cdot 0,9960 \text{ g}}$$

$= 0,7417 \mu\text{g Cl. b / g Frischgewicht}$

Figure 8: Rechenweg der Konzentrationsbestimmung von Chlorophylle a und b des Rohextraktes. Absorptionswerte bei den jeweiligen Wellenlänge $\lambda = 470, 646, 663$ und 720 nm wurde aus der Table 4 entnommen.

5.2 Rohdaten

5.2.1 Einwaage der Proben

Table 3: Masse der Blätter und das Volumen des in basischen Aceton extrahierten Pigmenten vom Nicotiana tobacum des Wildtyps und FC1-Antisense Mutant

	Wildtyp	Mutant
m(Frischgewicht) in g	0.9965	0.9960
V(Rohextrakt) in mL	11.5	8

5.2.2 Extinktion des Rohextraktes

Table 4: Die Extinktion des Rohextraktes vom Wildtyp und Mutant in basischen Aceton wurde bei $\lambda = 470, 646, 663, 720$ nm gemessen. Als Blank wurde die Extraktionslösung (100% Aceton und 20 mM NH_4OH) verwendet. Die Proben wurden jeweils 1:5 mit der Extraktionslösung verdünnt.

λ in nm	470	646	663	720
Wildtyp	0.424	0.178	0.463	0.012
Mutant	0.423	0.188	0.493	0.014

5.2.3 Substanzstrecke auf der DC-Platte

Table 5: Substanzstrecke der 4 Banden aus Figure 1 für den Wildtyp (WT) und der FC1-Mutante (MU). Die Laufmittelfront-Distanz beträgt 6.2 cm

Substanzstrecke Wildtyp in cm	Substanzstrecke Mutant in cm
6.0	6.0
4.9	4.9
4.5	4.5
3.8	3.8

References

- ¹ Bernhard Grimm (Principal Investigator) Daniel Hey (first Author). Transgenic tobacco lines expressing sense or antisense ferrochelatase 1 rna show modified ferrochelatase activity in roots and provide experimental evidence for dual localization of ferrochelatase 1. published in October 2016. doi:\url{https://doi.org/10.1093/pcp/pcw171}.
- ² Bernhard Grimm. Qualitative und quantitative charakterisierung der photosynthesepigmente, 2024. Komplex 3.
- ³ A. Hager. Formation of maxima in the absorption spectrum of carotenoids in the region around 370 nm; consequences for the interpretation of certain action spectra, 1970. page 41, 42. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00390164.pdf>.
- ⁴ Peter von Sengbusch. Absorption spectra of chlorophyll a (light green) and chlorophyll b (turquoise). 1996 - 2004. URL: <https://www-archiv.fdm.uni-hamburg.de/b-online/e24/3.htm>.