

Abszorpciós kinetikai mérések alkalmazása a fotoszintetikus reakciócentrumban végbemenő elektrontranszport-folyamatok jellemzésére

Dorogi Márta, Szebényi Kornélia, Nagy László[#]
Szegei Tudományegyetem, Biofizikai Tanszék
([#]Inagy@sol.cc.u-szeged.hu)

A fotoszintetikus apparátus felépítésének és működésének egyik legelterjedtebb rutin-szerűen alkalmazott vizsgálati módszere a fényelnyelésben bekövetkezett változás (abszorpció), egyensúlyi (steady state) és kinetikai vizsgálata. Nem vállalkozhatunk arra, hogy a módszer teljes körű, minden alkalmazásra kiterjedő leírását adjuk. A gyakorlat során a fotoszintetikus reakciócentrum pigment-protein rendszer abszorpciókinetikai vizsgálatát mutatjuk be bízva abban, hogy az itt megtanultak tanulságul szolgálnak más alkalmazások esetére is.

A fotoszintetikus apparátusban elnyelt foton energiája raktározódhat redoxpotenciálként, foszforilációs (foszfát) potenciálként és különböző ionok elektrokémiai grádienseként, amelyek mind a Gibbs-féle szabadenergia megnyilvánulási formái. Az így tárolt energia működteti a sejt alapvető folyamatait (pl. a bioszintéziseket, transzportfolyamatokat). Az energiaátalakítás részletei fajoként változhatnak, figyelemre méltó azonban a jelentős szerkezeti és funkcionális hasonlóság: az elnyelt fény fotonjai egy speciális fehérjében, a reakciócentrumban (RC) ellentett előjelű elektromos töltéseket választanak szét, amelyek egymást követő redoxlépések során stabilizálódnak. Az egyes reakciólépésekben az elektron fehérjéhez kapcsolt redoxaktív pigmentek, ún. kofaktorok láncolatán adódik molekuláról molekulára, míg végül az energetikailag legkedvezőbb lépésben a töltéspár stabilizálódik. Az egyes pigmentek tranziens redoxátmenetei során időben is jól nyomonkövethető spektrális változások következnek be. A fény által elindított elektrontranszferhez protolitikus folyamatok társulnak, amelyek a membránon keresztül a hidrogénionok eltérő felhalmozódásához, protongradiens kiépüléséhez vezetnek. A RC-on belüli elektronvándorlás és a H⁺-ionok megkötése egymást kölcsönösen feltételező folyamatok, és csak együttes bekövetkezésük biztosíthatja a RC normális működését. A fehérje nem csupán passzív alanya a fényerjesztés hatására előálló redox-reakciónak, hanem konformációs mozgással elősegíti azok lejátszódását.

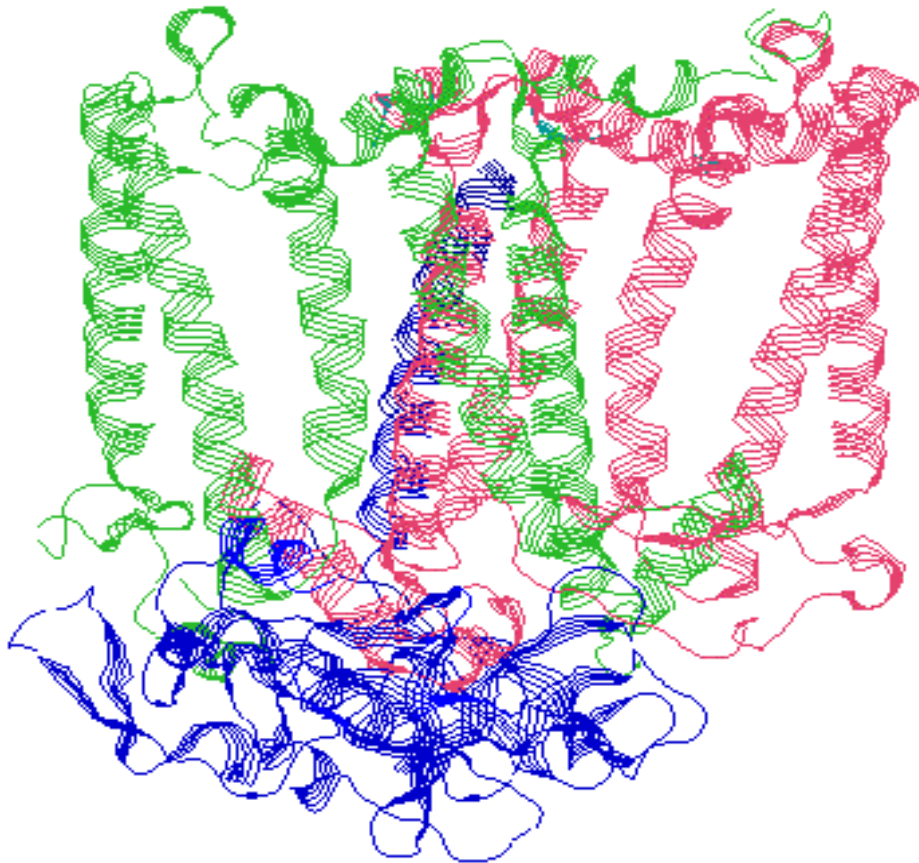
A folyamatokat a legegyszerűbben a bíorbaktériumokból izolált reakciócentrum-szuszpenziókon tanulmányozhatjuk.

A bakteriális reakciócentrum szerkezete

A RC a különböző baktériumokban igen eltérő, számos esetben bonyolult szerveződésű intracitoplazmatikus membránrendszerbe (ún. kromatoforákba) ágyazott pigment-protein komplex. A bíorbaktériumok reakciócentruma három fehérjealegységből áll (1. ábra). A polipeptideket L, M és H-val jelölik az angol elnevezésük (light, middle és heavy) kezdőbetűi után, amely az elektroforetikus mozgékonyaságuk alapján történt molekulatömeg szerinti felosztás. A jelölés azonban félrevezető, mert a későbbi szekvenciaanalízis igazolta, hogy a H-alegység a legkisebb. A félreértést az okozta, hogy ez az alegység ugyanakkor a legkevésbé hidrofób így az SDS-gélen a legkisebb mozgékonyaságot (azaz a legnagyobb molekulatömeget) mutatta (az elnevezést azonban az irodalomban megtartották).

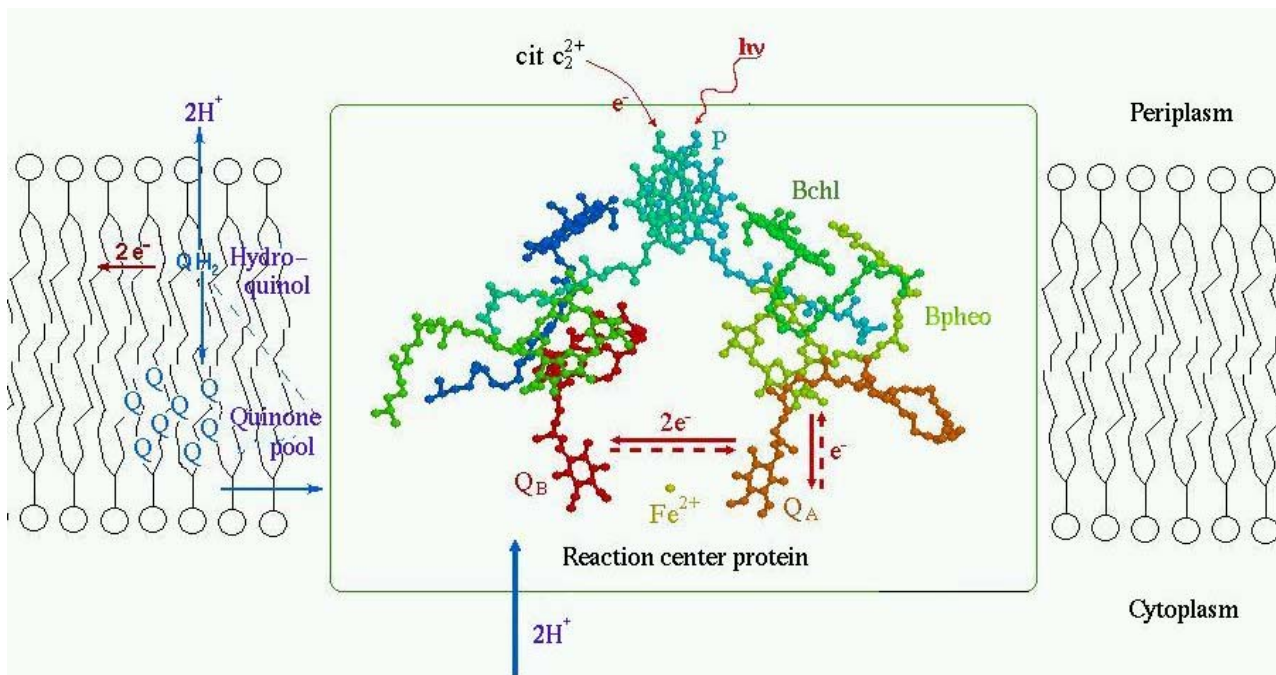
Az L- és az M-polipeptidek 180 °-os forgási szimmetriát és nagyfokú homológiát mutatnak. Az aminosavak közel 70 %-a apoláris, és öt-öt hidrofób láncot (α -hélixet) képeznek a membránon keresztül. A H-alegységnek csak egy transzmembrán hélice van, szorosan kapcsolódik az LM-komplexhez a citoplazmatikus oldalon.

- Az LM-komplexhez kapcsolódnak a redoxaktív kofaktorok:
- négy bakterioklorofill (Bkl),
 - két bakteriofeofitin (Bfeo),
 - két kinon (Q) és
 - egy nem-hem típusú vas (2. ábra).



1. Ábra A *Rb. sphaeroides* bíborbaktérium fotoszintetikus reakciócentrumának fehérje-alegység szekezete. Kék: H-, zöld: M-, piros: L-alegység

A négy bakterioklorofill közül kettő a membrán periplazmikus oldala felől dimert alkot (P), és mint elsődleges elektrondonor vesz részt a redoxfolyamatban. A monomer bakterioklorofillok a dimer és a bakteriofeofitin között helyezkednek el ellentétes oldalakon. A citoplazmikus oldal felől elhelyezkedő két kinon közül az egyik az elsődleges (Q_A), a másik a másodlagos (Q_B) elektronakceptor. A kofaktorok két, a bakterioklorofill dimeren és a Fe^{2+} -on átmenő, a membránra merőleges síkra vonatkoztatott megközelítőleg tükörszimmetrikus ágot (A és B) alkotnak. Az elektrontranszport az esetek döntő többségében az A-ág mentén zajlik, csak nagyon speciális körülmények között játszódhat le a B-ág mentén.

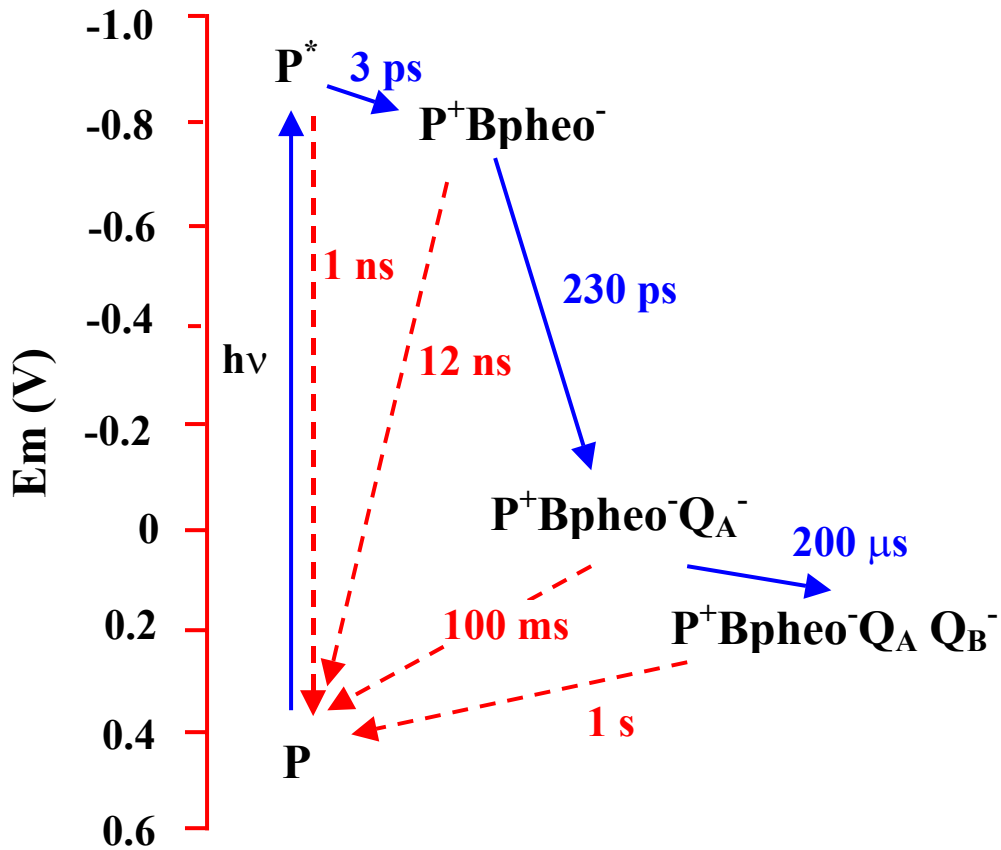


2. Ábra A kofaktorok elrendeződése, valamint az elektrontranszport (piros nyilak) és protonációs folyamatok (kék nyilak) irányai a fotoszintetikus reakciócentrumban. Folytonos nyilak az előremenő, szaggatott nyilak töltésrekombinációs folyamatok irányát jelölik.

Elektrontranszfer

A reakciócentrumban a fény abszorpciója révén elektrontranszfer indul meg. A RC-ban elnyelt foton a dimert gerjesztett állapotba hozza (P^*), melyből a legelső jól elkülöníthető redoxpár (P^+Bpheo^-) közel 3 ps ($3 \cdot 10^{-12}$ s) alatt képződik (3. ábra). A kialakult töltéspár további (egyre lassuló) elektronátadási lépésekkel stabilizálódik: először az elsődleges kinon (Q_A), majd a másodlagos kinon (Q_B) redukálódik. A töltésszétválasztást gyakorlatilag a Q_A redukciója teszi irreverzibilissé, mert ez a folyamat jár a legnagyobb szabadenergia-csökkenéssel. Izolált RC-ban a keletkező $P^+Q_B^-$ (vagy a körülményektől függően (ezt később tárgyaljuk) a $P^+Q_A^-$) töltéspár megszűnik úgy, hogy az elektron a Q_B^- -ről (vagy a Q_A^- -ről) visszajut az oxidált primer donorra, a P^+ -ra.

Az egymást követő redoxállapotok élettartamai drasztikusan növekednek: *Rb. sphaeroides* speciesben a töltésrekombináció élettartama a redukált bakteriofeofitintről csupán 12 ns, a primer kinonról már 100 ns, a másodlagos kinonról már 1 s-nál is nagyobb. Pusztán a RC szerkezetét tekintve meglepő ez az eltérés, hiszen mindkét kinon közel azonos távolságra (kb. 30 nm-re) van a dimertől. A Q_B körüli poláros csoportok és a fehérje belsejében a töltésvezetésre alkalmas út hiánya meggátolják a Q_B -ről történő közvetlen rekombinációt, és az indirekt módon közvetlenül a Q_A -n keresztül játszódik le. Mindezekért a két kinon eltérő környezete a felelős. Az elsődleges kinon erősen hidrofób környezetben van, így a vizes oldatokban megfigyelhetően gyökeresen eltérő a viselkedése: kétszeresen nem redukálható és az egyszeresen redukált (szemikinon) formája nagyon alacsony proton-disszociációs állandójú (pK_a), azaz a fiziológiai körülmények között mindig deprotonált. Ezzel szemben a másodlagos kinon közvetlen közelében több poláros és protonálható aminosav is található (pl. Asp, Glu, His, Tyr).



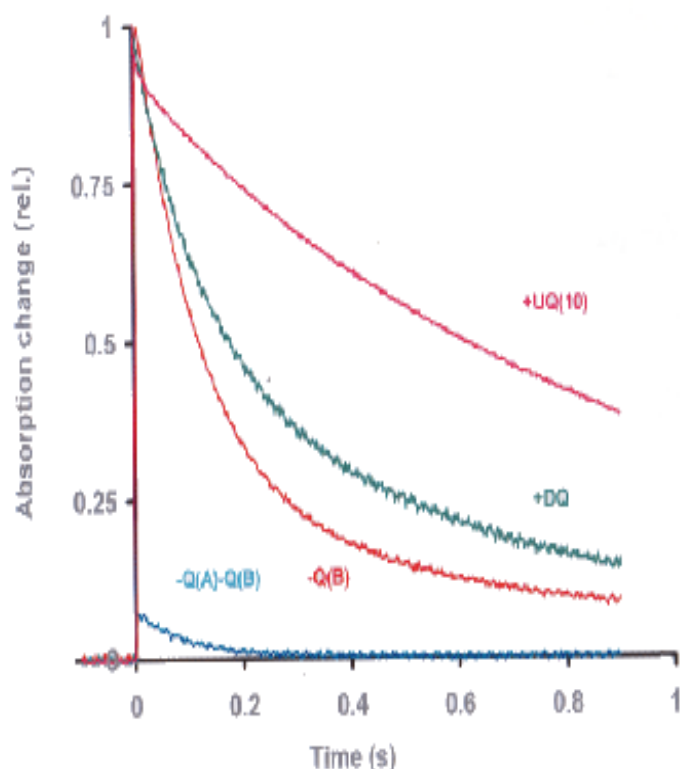
3. Ábra A *Rb. sphaeroides* bíorbaktérium reakciócentrumában végbemenő elektrontranszportfolyamatok. A folytonos (kék) nyilak az előremenő töltésszétválasztás, a szaggatott (piros) nyilak a töltésrekombinációs folyamatokat jelölik. Jelölések a szövegben találhatóak.

A töltésrekombináció vizsgálata a fényindukált abszorpcióváltozás mérésével

Ezzel a mérési módszerrel bármelyik kofaktor abszorpcióváltozását nyomon követhetjük az idő függvényében. Gyakorlatunkon a primer donor abszorpcióváltozását mérjük 430 nm-es hullámhosszon felhasználva azt, hogy az oxidált és a redukált forma fényelnyelése különbözik. A vizsgálatokat *Rb. sphaeroides* fotoszintetizáló baktériumból izolált kromatoforán vagy reakciócentrumon végezzük el. Mivel a tisztított RC-ből hiányzik a másodlagos donor (a vízdékony citokróm c_2), amely az oxidált P^+ -t visszaredukálná, az egyensúly a visszareakció irányába tolódik el, a P^+ , Q_A^- és a Q_B^- közötti töltésrekombinációt eredményezve. Amennyiben a membránból tisztított RC-szuspenziót rövid időtartamú telítési fényimpulzussal megvilágítjuk és figyeljük a 430 nm-nél bekövetkező abszorpcióváltozást, a kísérleti körülményektől függően (pl. a Q_B -kötőhely betöltöttsége, amelyet a kinontartalom határoz meg) egy- vagy kétfázisú exponenciális görbéket kapunk (4. ábra). Az exponenciális lecsengések matematikai leírása a következő összefüggéssel lehetséges:

$$N_t = N_{0,Q_A} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{Q_A}}} + N_{0,Q_B} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{Q_B}}},$$

ahol N_t a t időpontban mérhető amplitúdó; N_{0,Q_A} és N_{0,Q_B} a gyors és lassú komponensek amplitúdói; τ_{Q_A} és τ_{Q_B} a gyors és lassú komponensek időállandói. A fenti összefüggés analízise



4. Ábra Különböző kinontartalmú izolált fotoszintetikus reakciócentrumok abszorpcióváltozása 430 nm-nél impulzusgerjesztés után.

- UQ(10): Q_A és Q_B-t is tartalmazó (2 Q/RC)
- -Q(B) csak Q_A-t tartalmazó (1 Q/RC)
- -Q(A)-Q(B) sem Q_A-t, sem Q_B-t nem tartalmazó (kinont csak kb 5 %-ban (0.05 Q/RC) tartalmazó) reakciócentrumok.

lehetőséget ad az abszorpciós kinetika paramétereinek meghatározására. Az egyes komponensek a kialakult töltéspárokról (gyors: P⁺Q_A⁻ → PQ_A, lassú: P⁺Q_B⁻ → PQ_B) történő töltésrekombinációra utalnak. τ_{QA} és τ_{QB} a P⁺Q_A⁻ illetve a P⁺Q_B⁻ töltéspárok időállandói, az adott populációk tulajdonságaira jellemző állandók. Ezek megváltozása a populációk minőségi tulajdonságainak (pl. redoxpotenciáljának) megváltozását jelzik. N_{0,QA} és N_{0,QB} pedig ugyan-ezen populációk aránya a gerjesztés pillanatában. Ha a preparálás után a másodlagos kinonaktivitás 100 %-os, akkor egyetlen, lassú komponensből álló lecsengést kapunk. Ha a másodlagos kinonaktivitás nem 100 %-os, akkor a Q_B-hely betöltöttségétől függően változik N_{0,QA} és N_{0,QB} aránya.

Az abszorpcióváltozás amplitúdójából a Beer-Lambert törvény ismeretében kiszámolhatjuk a RC-szuszpenzió koncentrációját:

$$\Delta E(\lambda) = \Delta \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I_0 + \Delta I} .$$

Itt ΔE(λ) az abszorpcióváltozás, c a koncentráció, l pedig a fény útja a küvettában. I₀ a gerjesztés előtti, I pedig a gerjesztés utáni fényintenzitás, illetve az azzal arányos fotoáram. ΔI az abszorpcióváltozás miatti fényintenzitás- (illetve fotoáram-) változás. Δε(λ) a moláris dekadikus extinkciós koefficiens a 430 nm-nél mért abszorpcióváltozás esetén. Ennek értéke a RC esetén 28 mM⁻¹cm⁻¹.

A *Rb. sphaeroides*-ből izolált reakciócentrumban a Q_A⁻-ről történő töltésrekombináció élettartama kb. 100 ms, míg a Q_B⁻-ről történő kb. 1 s. Az élettartamok ismeretében a K₂ egyelektronos egyensúlyi állandó meghatározható:

$$K_2 = \frac{\tau_{QB}}{\tau_{QA}} - I .$$

Mivel a Q_B viszonylag gyengén kötődik a RC-hoz, a fenti összefüggésnek tartalmaznia kell nem csak az egyelektronos egyensúlyi állandót, hanem a Q_B -aktivitásnak a kinonkoncentrációtól való függését is. Továbbá, mivel a kötődésre egyes vegyületek, mint pl. a herbicidek is hatást gyakorolnak, célszerű az egyelektronos egyensúlyi állandót a fenti összefüggésben egy látszólagosra ($K_2^{\text{látsz.}}$) cserélni:

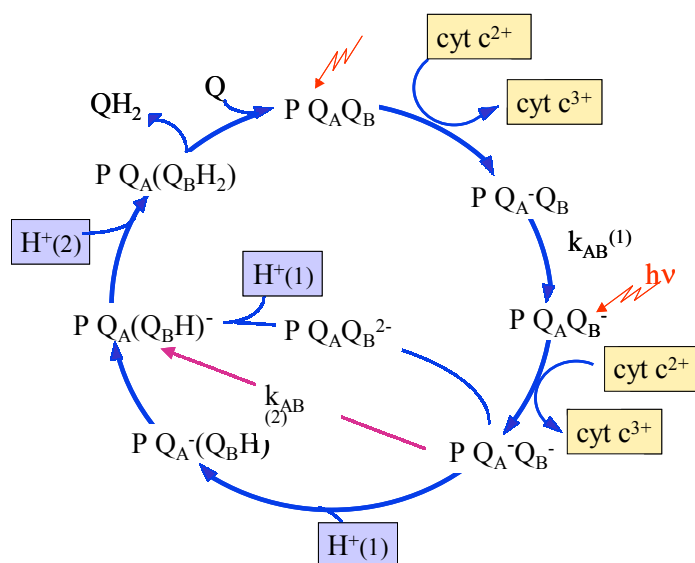
$$K_2^{\text{látsz.}} = \frac{\tau_{QB}}{\tau_{QA}} - I .$$

Az egyensúlyi állandó ismeretében a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ folyamat ΔG_{AB}^0 szabadenergia-változása kiszámolható:

$$\Delta G_{AB}^0 = - 2,3 \cdot R \cdot T \cdot \log K_2^{\text{látsz.}} .$$

A kinon redukciós ciklusa

In vivo körülmények között a foton elnyelése után keletkező oxidált primer donort (P^+) egy másodlagos donor gyorsan (kb. 1 μ s alatt) redukálja, megakadályozva ezzel a $P^+ Q_B^- \rightarrow P Q_B$ töltésrekombinációt. A másodlagos donor a *Rps. viridis* nevű baktériumtörzsből a RC HLM alegységeihez kapcsolódó, azzal együtt is kristályosodó citokróm-alegység, míg a *Rhodobacter* genus fajaiban a citoplazma vizes fázisában oldott diffúzibilis citokróm c_2 . Az oxidált dimer visszaredukálása után a RC újabb töltésszétválasztásra válik alkalmassá. A második felvillanás már heterogén RC-ot ér ($Q_A^- Q_B$ és $Q_A Q_B^-$ állapotok, amelyek arányát a K_2 elektronegyensúlyi állandó határozza meg ($K_2 = [Q_A Q_B^-] / [Q_A^- Q_B]$)), és csak azokban következik be újabb töltésszétválasztás, amelyekben a Q_A oxidált állapotban van, mert a Q_A csak egy elektron fogadására képes. A második fényfelvillanást követő egyensúlyi folyamatok eredményeként a Q_B^- egy második elektron felvétele után a vizes fázisból két proton megkötésével teljesen redukálódik, kinol (QH_2) keletkezik. Mivel a Q és QH_2 lazábban kötődik a RC-hoz mint a szemikinon, a keletkezett kinol leválik a RC-fehérjéről és a helyébe új oxidált kinon (Q) kötődik.



5. Ábra A kinon redukciós ciklusa (magyarázat a szövegben)

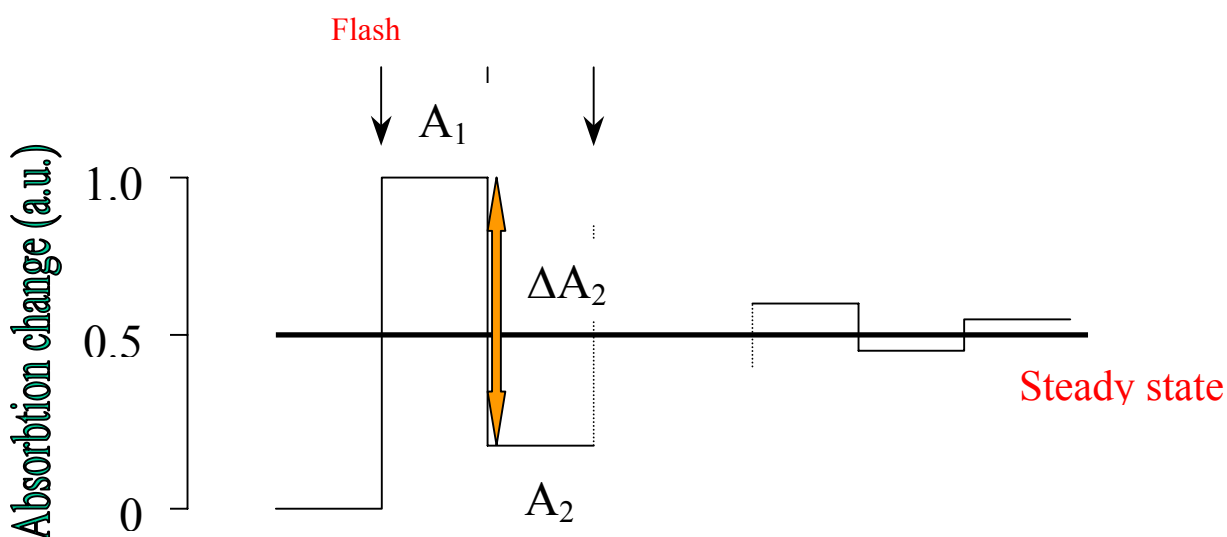
A kinon redukciós ciklusának vizsgálata a szemikinin abszorpciójának mérésével

Abban az esetben tehát, ha másodlagos donor van jelen, és a kinonraktár (ez a reakciócentrumhoz nem kötött, de a micellákban jelenlevő kinonmolekulákat jelenti) is kellően nagy, a RC több fényimpulzussal is gerjeszthető. Másodlagos donor hiányában természetesen ez csak a keletkező töltéspár rekombinációja után lehetséges. Ebben a vizsgálatban másodlagos donorként nem citokrómot használunk, mert a citokrómnak is jelentős abszorpcióváltozása van a mérés hullámhosszánál (450 nm-nél), hanem az ezen a hullámhosszon nem abszorbeáló redoxrendszerek közül választunk. Rendszerint ferrocént szoktunk donorként alkalmazni. 450 nm-nél a szemikinnak jellegzetes abszorpciója van, amit akár kvantitatív vizsgálatára is kihasználhatunk. Ez az abszorpció eltűnik, ha kétszeresen redukált kinon képződik. A reakciócentrum sorozatos impulzusgerjesztése során a 450 nm-nél mért abszorpcióváltozás bináris oszcillációt mutat. Az első fényfelvillanásra, és ez után minden páratlan gerjesztésre az abszorpció növekedik (a szemikinin keletkezése miatt), míg páros számú gerjesztésre az abszorpció csökken (a keletkező kétszeresen redukált kinon nem mutat abszorpcióváltozást, 6. ábra). Figyeljük meg, hogy az oszcilláció egy egyensúlyi állapothoz (az első lépcső amplitúdójának a feléhez) csillapodik.

Mivel az első gerjesztésre kapott amplitúdó arányos a keletkezett összes szemikinin mennyiségével, a második gerjesztés utáni amplitúdócsökkenés pedig azokkal a reakciócentrumokkal, amelyekben a Q_B redukált formában van, ez a mérés is lehetőséget ad az egyensúlyi állandó kiszámítására.

$$K_2 = \frac{\Delta A_2}{\delta \cdot \Delta A_1 - \Delta A_2}.$$

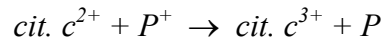
Itt ΔA_1 és ΔA_2 az első és a második impulzusgerjesztésre kapott abszorpcióváltozás amplitúdójának abszolút értéke. δ azt veszi figyelembe, hogy a RC-ok mekkora hányada vesztette el véglegesen a másodlagos kinonaktivitását a preparálás során. Ezek a reakciócentrumok Q_A -aktivitással rendelkeznek, tehát az első gerjesztésre szemikinin keletkezik bennük, de a második gerjesztésre már nem történik bennük töltésszétválasztás. δ a töltésrekombináció vizsgálatával meghatározható.



6. Ábra A szemikinin keletkezése és eltűnése következtében mérhető abszorpciós szignál jellemző paramétereinek vázlatja

A kinon redukciós ciklusának vizsgálata a citokróm abszorpciójának mérésével

Mint azt a kinon redukciós ciklusának a vázlatában láttuk, minden egyes foton abszorpcióját követően egy citokróm oxidációja valósul meg:



Amennyiben a kinonakceptor komplex nem gátolt, a reakciócentrum e folyamat után újabb és újabb töltésszétválasztásra képes. Így a citokróm fotooxidációjának vizsgálata igen jó indikátora a RC redoxfolyamatainak. A fotooxidáció mérésénél azt használjuk ki, hogy a citokróm c oxidált és redukált formáinak abszorpciója különbözik ($\Delta\epsilon_{550\text{nm,red-ox}} = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ha a RC szuszpenziót citokróm jelenlétében fényimpulzusokkal gerjesztjük és az abszorpciót 550 nm-nél mérjük, minden egyes gerjesztésre abszorpciónövekedést tapasztalunk. Mint ahogyan a szemikinon abszorpciójának oszcillációjánál láttuk, itt is csak abban az esetben kapunk a második gerjesztésre abszorpcióváltozást, ha az elektron a Q_B -re került. Azok a RC-ok, amelyekben a Q_A redukált állapotban van (a másodlagos kinaktivitás gátolt) nem mutatnak fotokémiai reakciót, így citokrómoxidációt sem. Sorozatos gerjesztések után tehát a citokróm oxidációja is csillapodó bináris oszcillációt mutat. Az első két lépcső analíziséből a K_2 egyensúlyi állandó itt is kiszámolható.

A kinonok közötti elektrontranszfer gátlása inhibitorok alkalmazásával

Ismertek olyan vegyületek, amelyek képesek a pigment-protein komplex Q_B -kötő helyéhez kötődni, a másodlagos akceptort kiszorítani. Mivel ezek a vegyületek redoxreakciókban nem vesznek részt, az elektrontranszportot blokkolják. Ilyen vegyületek pl. a mezőgazdaságban alkalmazott herbicidek (gyomirtószer) egy része (triazin-, diuron- ill. fenol-típusú herbicidek). Ezek közül számos vegyület a baktériumokban is blokkolja a fotoszintetikus működést. Hatásuk a töltésrekombináció mérésével jól követhető: Q_B hiányában a vizsgált töltésrekombináció az inhibitor-koncentráció mértékétől függően meggyorsul. Az inhibitor- $[I]$ és a kinonkoncentráció $[Q]$, valamint ezek kötési állandóinak (K_I , K_Q) ismeretében a fent bevezetett $K_2^{\text{látsz.}}$ meghatározható, amely a kinon és az inhibitor Q_B -kötőhelyre irányuló kötési egyensúlyáról tájékoztat:

$$K_2^{\text{látsz.}} = K_2 \cdot \frac{\frac{[Q]}{K_Q}}{1 + \frac{[Q]}{K_Q} + \frac{[I]}{K_I}}.$$

$K_2^{\text{látsz.}}$ csökkenése az inhibitor hatásának erősödését mutatja. Az örökítőanyag adott pontján bekövetkező mutáció eredményeképpen megváltozhat a Q_B -kötő protein aminosavsorrendje, csökkentheti, sőt meg is akadályozhatja a herbicid bekötődését. Adott populációban több generáción át alkalmazott herbicidkezelés nyilvánvalóan az így létrejött rezisztens egyedek elszaporodását eredményezheti.

Az inhibitor koncentrációjának növelésével a lassú komponens időállandója, illetve a RC aktivitása ($A = \tau_{QB} / \tau_{QB}^*$) egyre csökken a következő összefüggés szerint:

$$A = \frac{\tau_{QB}}{\tau_{QB}^*} = \left(I - \frac{I}{I + \frac{K_I}{[I]}} \right),$$

ahol τ_{QB}^* a lassú komponens időállandója inhibitor nélkül. K_I a fenti összefüggések alapján meghatározható; azzal az inhibitor-koncentrációval egyezik meg, amely az aktivitást éppen a felére csökkenti:

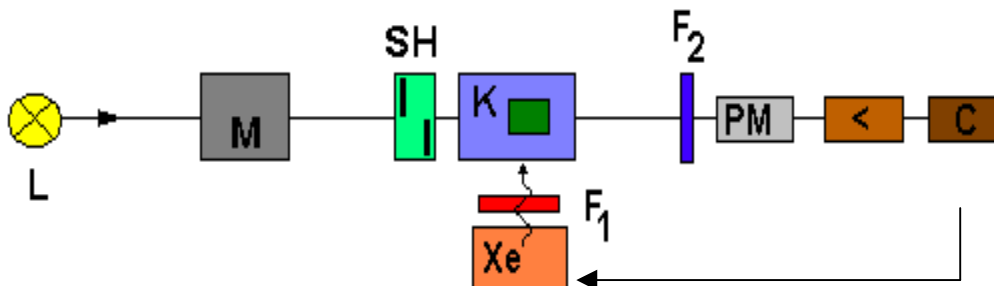
$$K_I = \left(\frac{I}{I - A} - I \right) \cdot [I].$$

Különböző inhibitor-koncentrációk alkalmazása mellett elvégezve az abszorpcióváltozás mérését az aktivitások meghatározhatók. A méréspontokat az inhibitor-koncentráció függvényében ábrázolva, azokra a xxx összefüggés alapján illesztve K_I meghatározható..

A mérőberendezés

A fényfelvillanás okozta abszorpcióváltozás házi készítésű egysugaras abszorpcióváltozás-mérővel vizsgáljuk (7. ábra). A mérőfényt egy stabilizált áramforrásból táplált halogén autóizzó szolgáltatja (L). Az izzólámpa fényét kondenzor lencsével a monokromátor (M) belépő részére fókuszáljuk, míg a kilépő részt a küvettán (K) keresztül a fotoelektronsokszorozó (PM) fotokatódjára képezzük le. Az optikai gerjesztés Xe villanólámpával történik. A telítési gerjesztést fényvezető alkalmazásával biztosítjuk. A fotoelektronsokszorozót keresztezett keresztezett optikai szűrőkkel védjük: a Xe-lámpa fényét 750 nm felett átengedő szűrőn (F_1) keresztül vezetjük a mintára (a megmaradó vörös sáv elegendő a telítési gerjesztéshez), míg a fotokatód elé széles sávú kék szűrőt (F_2) helyezünk.

A mérőfényt maga érzékelhető fotokémiai aktivitást még nem vált ki, de intenzitása kellően nagy ahhoz, hogy az abszorpcióváltozás kis zajjal mérhető legyen. A mérőfényt fényzárral (SH) nyithatjuk, illetve zárhatjuk. A fényfelvillanás előtti stacionárius állapot kiegyenlítésére 200 mV ún. offset feszültséget kapcsolunk a fotokatódra, így a számítógépbe (C) épített analóg/digitális átalakítóba (A/D konverter) csak a gerjesztés által kiváltott, majd felerősített (<) tranziens jel kerül.



7. Ábra Az abszorpcióváltozásmérő blokkdiagrammja (jelölések a szövegben)

Feladatok

- 1) Mérje meg a kiadott reakciócentrum szuszpenzió flashgerjesztés utáni töltésrekombinációjának kinetikáját $\lambda=430$ nm-nél pH:8.0-nál!
 - a) Határozza meg a RC koncentrációját a Beer-Lambert törvény felhasználásával ($\Delta\epsilon_{430\text{nm}} = 28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $I_0 = 200 \text{ mV}$, $I = 200 \text{ mV} + \text{jel}$)!
 - b) Végezze el az exponenciális kinetikák elemzését, határozza meg a τ_{QA} és τ_{QB} időállandókat, amelyekből
 - c) számolja ki a K_2 egyelektronos egyensúlyi állandót, valamint a $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ folyamat ΔG_{AB}^0 szabadenergiaváltozását!

- 2) Adjon az előbbi mintához rendre annyi terbutrint (a terbutrin triazin-típusú herbicid) a kiadott törzsoldatokból, hogy az oldatban a terbutrin koncentrációja 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10 és $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ legyen!

A lépések között mérje meg az abszorpcióváltozás lecsengési kinetikáját! Ábrázolja a fent bevezetett fotokémiai aktivitás értékeit ($A = \tau_{QB}/\tau_{QB}^*$) az alkalmazott inhibítorkoncentráció függvényében! Határozza meg azt az inhibítorkoncentrációt, amelynél az aktivitás értéke a felére csökken (I_{50})!

- 3) Mérje meg a kiadott RC-suszpenzió abszorpcióváltozását sorozatos impulzusgerjesztések során 450 nm-nél $1-4$ Hz ismétlési frekvenciával! A gerjesztési frekvencia figyelembe vételével úgy állítsa be az időablakot, hogy $15-20$ lépcső mérésére legyen lehetősége. Helyezze a mintát a mintatartóba, és tartsa sötétben $10-15$ percig (sötétadaptálás)! Gondoskodjon arról is, hogy a Xe villanólámpa nagyfeszültségű tápegysége ez idő alatt ne maradjon feszültség alatt!

Figyelje meg az oszcilláció főbb tulajdonságait!
Határozza meg a K_2 egyensúlyi állandót és a ΔG_{AB}^0 szabadenergiaváltozást!

- 4) A harmadik mintához citokrómot adtunk. Mérje meg ennek a mintának az abszorpcióváltozását is a 3. feladathoz hasonlóan! A mérőfény 550 nm, a gerjesztés ismétlési ideje most is $1-4$ Hz legyen! Ennél a mérésnél is törekedjen $15-20$ lépcső mérésére. Sötétadaptálás után mérje meg a citokrómlépcsőket, és figyelje meg azok főbb tulajdonságait!
Határozza meg a K_2 egyensúlyi állandót és a ΔG_{AB}^0 szabadenergiaváltozást!