

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

Особенности использования 2,6-дихлорофенолиндофенола в качестве акцептора электронов в исследованиях фотосинтеза**А.В. Локтюшкин* , Е.Р. Ловягина , Б.К. Семин ***Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: allokt@gmail.com*

2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ) — редокс-индикатор, широко используемый для исследования реакций переноса электрона в биологических системах, в том числе в процессе фотосинтеза. При восстановлении ДХФИФ, поглощающий свет в видимой области, обесцвечивается. ДХФИФ существует в растворе в двух формах — «розовой» и «синей», которые переходят друг в друга при протонировании/депротонировании. Нами исследована рН-зависимость скорости восстановления ДХФИФ фотосистемой 2 (ФС2) при двух длинах волн — 522 нм (изобестическая точка ДХФИФ) и 600 нм (вблизи максимума поглощения депротонированной «синей» формы). Показано, что при изменении рН среды измерения на длине волн 600 нм требуют внесения поправок, связанных с изменением соотношения «синей» и «розовой» форм акцептора, а также использования для расчета скорости восстановления ДХФИФ параметра рК этого акцептора, значения которого варьируют в различных источниках. Измерения в изобестической точке (522 нм) позволяют избежать этих сложностей. Также нами установлено, что максимум на рН-зависимости скорости восстановления ДХФИФ ФС2 сдвинут примерно на одну единицу в кислую область относительно максимума рН-зависимости скорости восстановления акцепторной пары 2,6-дихлоро-*p*-бензохинон — феррицианид калия. Этот сдвиг может быть связан с меньшей доступностью Q_B -сайта на акцепторной стороне ФС2 для заряженной депротонированной формы ДХФИФ по сравнению с незаряженной протонированной формой.

Ключевые слова: 2,6-дихлорофенолиндофенол, фотосистема 2, рН-зависимость, акцепторы электронов, 2,6-дихлоро-*p*-бензохинон, феррицианид калия, фотометрия

Скорость выделения кислорода и скорость восстановления искусственных акцепторов электронов являются интегральными показателями функциональной активности фотосинтезирующих кислород-выделяющих объектов [1]. В исследованиях мембранных препаратов фотосистемы 2 (ФС2) или тилакоидных мембран выделение кислорода регистрируется полярографически с помощью электрода Кларка и искусственных акцепторов электронов типа производных бензохинона, феррицианида и других соединений. Восстановление окрашенных искусственных акцепторов электронов также можно регистрировать фотометрически. Последний метод оценки активности ФС2 является более универсальным, так как он применим и для препаратов с нефункциональным кислород-выделяющим комплексом (КВК). В этом случае используются искусственные доноры электронов (дифенилкарбазид, ионы Mn^{2+} , донорная система $Mn^{2+} + H_2O_2$ и др.). При этом в качестве акцептора электронов наиболее часто используется окислительно-восстановительный индикатор 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ), который при фотоиндуцированном восстановлении фотосистемой 2 обесцвечивается [2–4].

В состав активных центров ферментов, в том числе белковых комплексов электрон-транспортной цепи фотосинтеза, входят ионогенные группы, для изучения свойств которых получают рН-зависимости ферментативной активности. При этом важно, чтобы используемая методика оценки активности была применима во всем исследуемом диапазоне величин рН. Важная особенность ДХФИФ состоит в том, что он может протонироваться или депротонироваться с образованием «розовой» и «синей» форм при изменении рН среды [5]. Эту особенность необходимо учитывать при изучении рН-зависимостей реакций электронного транспорта фотосинтезирующих объектов с помощью фотометрии.

В данной работе мы исследовали особенности измерения скорости электронного транспорта в ФС2 с помощью ДХФИФ при различных величинах рН среды. Было установлено, что при определении скорости восстановления ДХФИФ ФС2 на длине волны 600 нм могут быть получены неоднозначные результаты при использовании в расчетах различных величин рК акцептора электронов, известных из литературы. Эта неоднозначность может быть устранена при использовании для из-

мерений активности длины волны 522 нм (изобеситической точки ДХФИФ). Кроме того, показано, что ингибирование фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ в щелочной области может быть в значительной степени обусловлено его депротонированием, затрудняющим связывание с Q_B -сайтом на акцепторной стороне ФС2.

Материалы и методы

Мембранные препараты ФС2 с активным кислород-выделяющим комплексом (BBY-частицы) выделяли из рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно опубликованной методике [6] с незначительными изменениями [7]. Их спектральные и функциональные характеристики соответствовали ранее измеренным [8]. Согласно литературным данным акцепторная сторона таких препаратов ФС2 полностью сохраняет пластохиноны Q_A , Q_B и несколько пластохинонов пула [9]. Полученные препараты хранили при -80°C в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (Mes), pH 6,5. Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно известному методу [10]; во всех экспериментах она составляла 10 мкг/мл. Перед измерениями препараты размораживали в темноте при температуре -5°C в течение часа.

Скорость электронного транспорта в препаратах ФС2 регистрировали фотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кюветах с длиной оптического пути 0,4 см. Источниками возбуждающего света были светодиоды с максимумами 450 нм (при измерении восстановления ДХФИФ) и 650 нм (при измерении восстановления феррицианида калия (ФЦК)), обеспечивающие насыщающую интенсивность света $1800 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Фотоиндуци-

рованные изменения оптической плотности регистрировали при длинах волн 522 и 600 нм (ДХФИФ), а также 420 нм (2,6-дихлоро-*n*-бензохинон (ДХБХ) + ФЦК). Для отсекающего возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали стеклянные светофильтры: желтый ЖС-18 (при длине волны регистрации 522 нм), оранжевый ОС-14 (при длине волны регистрации 600 нм) и синий СС-15 (при длине волны регистрации 420 нм).

pH-измерения проводили в буферных растворах, содержащих 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ лимонную кислоту (для диапазона pH 4,0–5,0), 50 мМ Mes (для диапазона pH 5,5–6,5), 50 мМ NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту) (для диапазона pH 7,0–8,0). Необходимую величину pH буферного раствора получали добавлением концентрированного раствора NaOH.

Результаты и обсуждение

ДХФИФ может существовать в растворе в двух формах в зависимости от величины pH среды: протонированной (ДН, «розовая» форма) и депротонированной (D^- , «синяя» форма) с максимумами поглощения 515 и 605 нм соответственно. При восстановлении этих форм образуются продукты H_2D^- и $H_2ДН$, практически не поглощающие свет в видимой области [5, 11]. Структурные формулы различных форм ДХФИФ приведены на рис. 1А. Интенсивное поглощение в видимой области, физиологически приемлемый окислительно-восстановительный потенциал (E_m лежит в интервале от +130 мВ до +217 мВ [12, 13]) и реакция обесцвечивания при восстановлении являются причинами широкого использования ДХФИФ для регистрации транспорта электронов в различных фотосинтетических объектах.

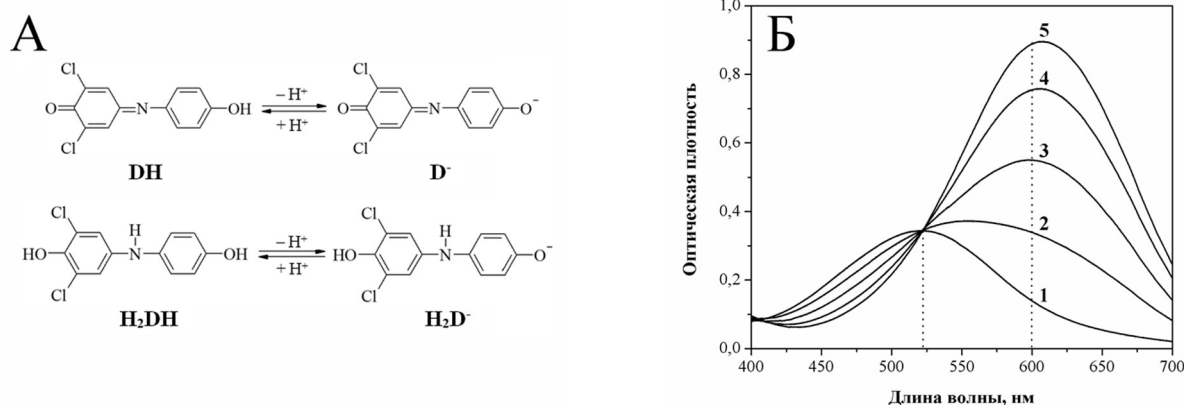


Рис. 1. Реакции протонирования/депротонирования ДХФИФ (А) и влияние pH на спектры его поглощения (Б). А. Схемы реакций протонирования/депротонирования окрашенных форм D^- и ДН ДХФИФ (вверху) и восстановленных лейко-форм H_2D^- и $H_2ДН$ (внизу). Для последней реакции рК составляет 7,0 [10]. Б. Спектры поглощения ДХФИФ при различных величинах pH: 1 – 4,5; 2 – 5,5; 3 – 6,0; 4 – 6,5; 5 – 7,5. Спектры получены в буферных растворах, состав которых приведен в разделе «Материалы и методы», в кювете с длиной оптического пути 1 см. Концентрация ДХФИФ (суммарно протонированной и депротонированной форм) составляет 40 мкМ. Вертикальные пунктирные линии соответствуют длинам волн, на которых проводилось измерение скорости фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ ФС2 – 522 нм и 600 нм.

На рис. 1Б приведены спектры поглощения ДХФИФ в средах с различными величинами pH. При $\text{pH} < 4$ ДХФИФ находится практически полностью в «розовой» форме DH, при $\text{pH} > 7$ — в «синей» форме D^- [11]. В диапазоне pH от 4 до 7 единиц присутствуют обе формы в различных соотношениях, зависящих от pH и константы диссоциации. При увеличении pH наблюдается закономерная трансформация спектра поглощения, являющегося суперпозицией спектров двух форм: сдвиг максимума в длинноволновую область и рост оптической плотности в максимуме. Спектры пересекаются в изобестической точке 522 нм. При этой длине волны коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм совпадают ($\epsilon_{522} = 8600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [14]).

При использовании ДХФИФ в качестве акцептора электронов для исследования транспорта электронов в тилакоидных мембранах влияние pH на результаты измерений незначительно, так как оптимальная величина pH при этом составляет 7,5. При этом значении pH ДХФИФ находится полностью в депротонированной D^- форме. Другая ситуация имеет место в случае исследования мембранных препаратов ФС2 (ВВУ-частиц), когда оптимум pH для измерения активности находится в достаточно широком диапазоне 6,0–7,0. В этом случае в растворе будут присутствовать в разных соотношениях обе формы ДХФИФ — DH и D^- . Аналогичная картина будет наблюдаться и при получении pH-зависимостей электронного транспорта в фотосинтетических объектах.

Чаще всего для фотометрического измерения скорости фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ фотосинтетическими объектами используют длину волны 600 нм вблизи максимума поглощения «синей» формы [15]. Однако при этой длине волны коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм различаются почти на порядок. Чтобы выявить влияние pH-зависимого перехода ДХФИФ между формами DH и D^- на измеряемые величины скорости транспорта электронов, мы исследовали зависимости скорости восстановления этого акцептора электронов мембранными препаратами ФС2 от величины pH среды при двух длинах волн — 600 нм и 522 нм (изобестическая точка). Типичные кинетические кривые фотоиндуцированного изменения оптической плотности при восстановлении ДХФИФ ВВУ-частицами ФС2 приведены на рис. 2. Во время освещения (30 с) наблюдалось практически линейное снижение оптической плотности на обеих длинах волн и при всех величинах pH среды исследуемого диапазона (4,0–8,0). Для расчета скорости снижения оптической плотности кинетические кривые аппроксимировали прямой в программе OriginPro 2015. Активность препаратов рассчитывали, исходя из угловых коэффициентов полученных прямых.

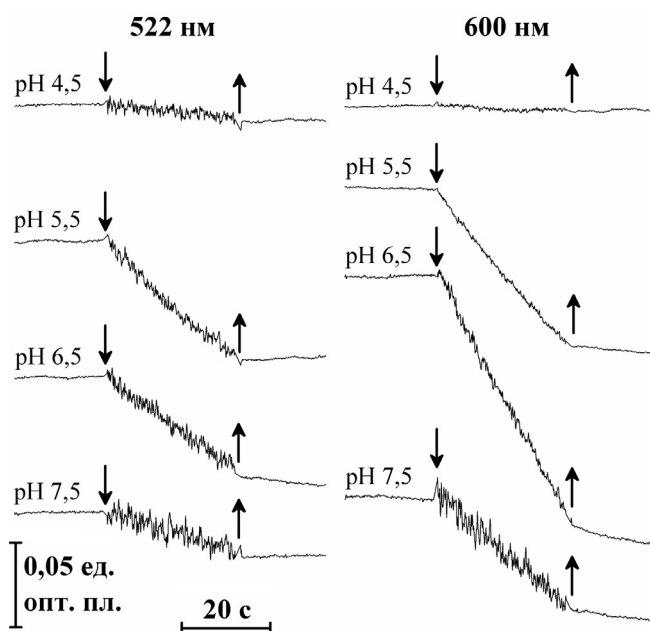


Рис. 2. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ ВВУ-частицами ФС2 на длинах волн 522 нм (слева) и 600 нм (справа) в средах с различной величиной pH. Концентрация ДХФИФ составляла 80 мкМ (минимальная насыщающая концентрация). Стрелками обозначены моменты включения (↓) и выключения (↑) возбуждающего света. Ед. опт. пл. — единицы оптической плотности.

На рис. 3А (кривая 1) приведена зависимость активности ВВУ-частиц ФС2 от величины pH среды, полученная при длине волны 522 нм. Кривая имеет колоколообразный вид с максимумом при величине pH 5,5. Полные зависимости активности ФС2 от величины pH приведены во многих работах [16–20]. При этом измеряемым параметром была скорость выделения кислорода, регистрируемая с использованием различных искусственных акцепторов электронов. pH-зависимость скорости восстановления ДХФИФ как показателя активности ФС2 исследовалась ранее лишь в работах [21, 22]. Снижение активности препаратов ФС2 в кислой области (при pH 5,0 и менее) может быть связано с диссоциацией трех периферических белков КВК PsbP, PsbQ и PsbO [23]. В щелочной области (при pH 6,0 и более) причиной ингибирования может быть экстракция из КВК ионов Cl^- [19].

При расчете активности ВВУ-частиц ФС2 (в единицах $\text{мкмоль ДХФИФ} \cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) на основании скорости фотоиндуцированного снижения оптической плотности при длине волны 600 нм возникают трудности, связанные с присутствием в среде двух форм ДХФИФ (DH и D^-) и их взаимными переходами при варьировании pH. При 600 нм мы использовали для определения активности кажущийся коэффициент молярной экстинкции акцептора, который рассчитывали по формуле:

$$\varepsilon_{600}(\text{pH}) = \frac{\varepsilon_{600}(\text{DH}) + \varepsilon_{600}(\text{D}^-) \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}},$$

где $\varepsilon_{600}(\text{DH}) = 2700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\varepsilon_{600}(\text{D}^-) = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм, а pK — отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации ДХФИФ [14]. Эта формула может быть получена из условий аддитивности оптической плотности и равновесного соотношения концентраций двух форм акцептора при варьировании pH . По данным разных авторов, величина pK ДХФИФ варьирует в широком диапазоне от 5,57 до 5,9 [5, 11, 14]. Причиной неоднозначности определения величины pK может быть нестойкость протонированной формы ДХФИФ в кислой среде [14]. pH -зависимости активности ФС2, рассчитанные

с использованием величин pK 5,57, 5,7 и 5,9, приведены на рис. 3А (кривые 2, 3 и 4). При использовании в расчетах различных величин pK максимум на pH -зависимости скорости восстановления ДХФИФ остается в диапазоне 5,5–6,0, в то же время абсолютное значение максимальной активности существенно варьирует. Так, при увеличении pK от 5,57 до 5,9 максимальная активность возрастает на 27,6%. Таким образом, величины активности препаратов ФС2, рассчитанные на основании скорости восстановления ДХФИФ, определяемой по уменьшению оптической плотности при 600 нм, в значительной степени чувствительны к используемой в расчетах величине pK акцептора электронов. В то же время при использовании длины волны 522 нм, при которой обе формы ДХФИФ имеют одинаковый коэффициент экстинкции,

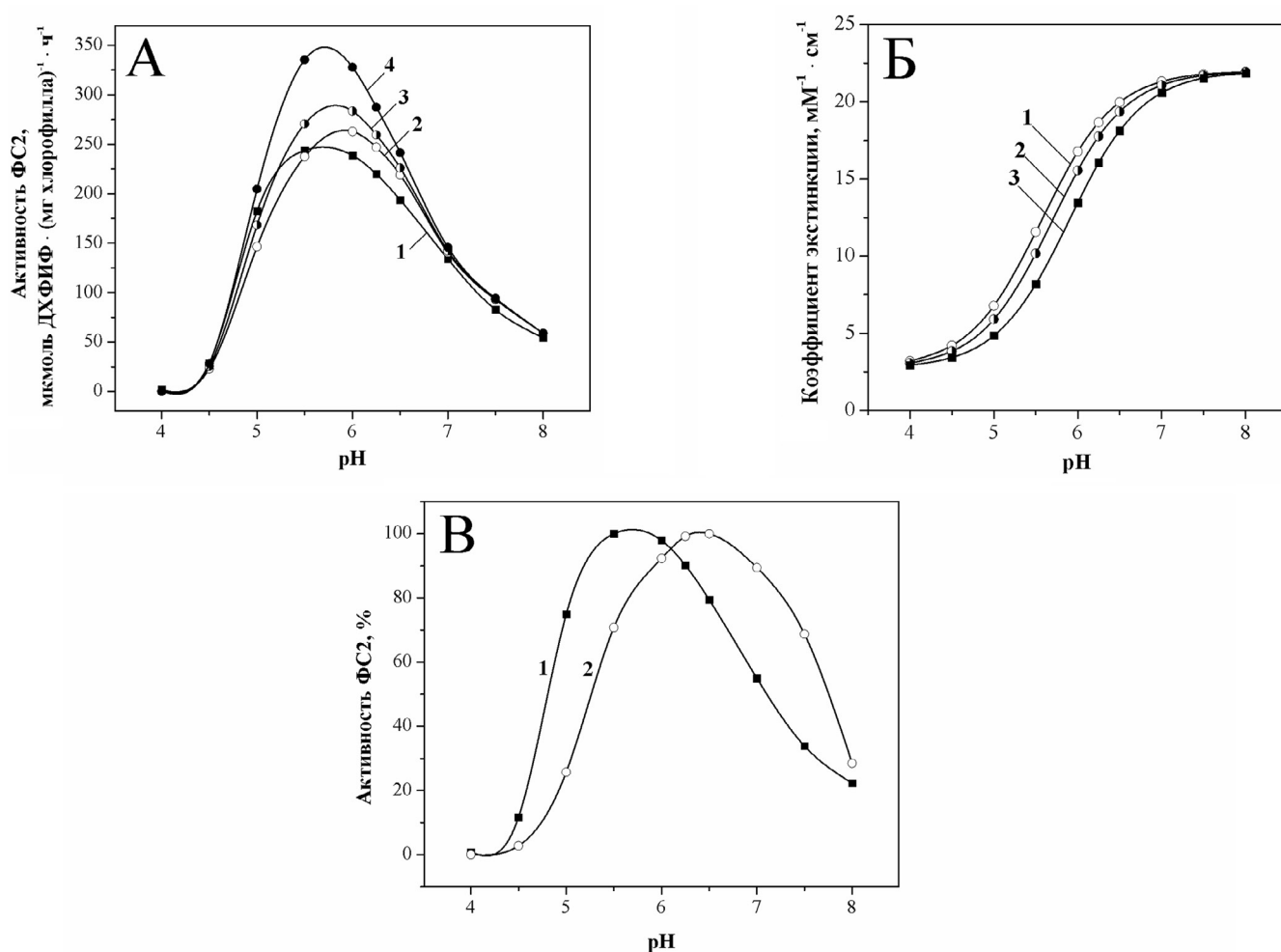


Рис 3. pH -зависимости скорости восстановления искусственных акцепторов электронов (активности) ФС2. **А.** pH -зависимости активности ФС2, измеренной по скорости восстановления ДХФИФ. Кривая 1 — измерения при длине волны 522 нм. Кривые 2, 3, 4 — измерения при длине волны 600 нм. Для определения активности использовались кажущиеся коэффициенты молярной экстинкции ДХФИФ при 600 нм, рассчитанные по формуле, приведенной в тексте, с pK 5,57 (кривая 2), 5,7 (кривая 3) и 5,9 (кривая 4). **Б.** Зависимости кажущегося коэффициента экстинкции ДХФИФ при 600 нм от pH , рассчитанные по формуле, приведенной в тексте, с pK 5,57 (кривая 1), 5,7 (кривая 2) и 5,9 (кривая 3). **В.** pH -зависимости активности (нормированной на максимальное значение) ФС2, полученные при использовании в качестве электронных акцепторов ДХФИФ (длина волны измерения 522 нм, кривая 1) и пары ДХБХ + ФЦК (длина волны измерения 420 нм, кривая 2). Концентрации ДХФИФ, ДХБХ и ФЦК составляли 80 мкМ, 200 мкМ и 2 мМ соответственно. Максимальная абсолютная величина активности, измеренной в присутствии пары ДХБХ + ФЦК (при pH 6,5), составила $2100\text{--}2200 \text{ мкмоль ФЦК} \cdot (\text{mg chlorophyll})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

подобные сложности не возникают. При этой длине волны регистрируемое фотоиндуцированное снижение оптической плотности будет отражать суммарную скорость восстановления ФС2 обеих форм акцептора вне зависимости от их соотношения, определяемого величиной рН среды. Следовательно, не требуется вносить поправки, связанные с рН-зависимостью коэффициента экстинкции. Дополнительным преимуществом использования длины волны 522 нм (по сравнению с 600 нм) является более интенсивное поглощение при этой длине волны протонированной формы ДХФИФ, что позволяет надежнее измерять относительно низкую активность препаратов ФС2 в кислой области.

Следует отметить, что форма рН-зависимостей активности ВВУ-частиц ФС2, приведенных в опубликованных работах [16–21], значительно варьирует. При этом изменяется как положение максимума, так и ширина области, в которой активность максимальна и практически постоянна. Причиной различий может быть как сам препарат ФС2, используемый при измерении, так и акцептор (акцепторы) электронов. Чтобы выявить влияние природы акцептора электронов на форму зависимостей активности ФС2 от величины рН среды, мы на одних и тех же препаратах ФС2 параллельно измерили рН-зависимости с ДХФИФ и акцепторной парой ДХБХ + ФЦК. ДХБХ относится к той же группе акцепторов электронов ФС2, что и ДХФИФ (аналоги хинона – акцепторы, связывающиеся с Q_B -сайтом) [1]. При использовании ДХБХ в паре с ФЦК последний выполняет роль неконкурентного вторичного акцептора электронов. ФЦК окисляет восстановленный ФС2 ДХБХ и тем самым поддерживает концентрацию окисленного хинона на постоянном уровне [1]. В данном случае вторичный акцептор электронов ФЦК выполняет роль «стока» электронов, донируемых ФС2 при фотоокислении воды. Восстановление ФЦК регистрировали фотометрически в его максимуме поглощения 420 нм ($\epsilon_{420} = 1020 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). На рис. 3Б приведены зависимости активности ВВУ-частиц ФС2 (в % от максимального значения) от величины рН среды для ДХФИФ (измерение при 522 нм) и пары акцепторов электронов ДХБХ + ФЦК. Максимум активности ФС2 при использовании ДХФИФ (при рН 5,5) смещен на одну единицу в кислую область по сравнению с максимумом при использовании ДХБХ и ФЦК. Следует отметить, что авторы одной из работ [21] также обнаружили смещение максимума активности частиц ФС2, измеренной по скорости восстановления ДХФИФ, в кислую область по сравнению с максимумом активности, измеренной по скорости выделения кислорода в присутствии акцептора электронов фенил-*n*-бензохинона. Важно отме-

тить, что снижение активности при переходе из нейтральной в щелочную область для ДХФИФ выражено существенно сильнее, чем для ДХБХ + ФЦК. При рН 7,0 скорость восстановления ФЦК снижается лишь на 10% по сравнению с максимальной скоростью при рН 6,5, а скорость восстановления ДХФИФ – на 45% по сравнению с максимальной скоростью при рН 5,5. Причиной различий рН-ингибирования активности ФС2 в щелочной области при использовании в качестве акцепторов электронов ДХФИФ и пары ДХБХ + ФЦК является природа самих акцепторов. Вероятно, при прочих равных условиях (концентрация акцептора электронов, уровень ингибирования ФС2 при определенной величине рН) скорости переноса электрона с ФС2 на протонированную и депротонированную форму ДХФИФ различаются. При этом доступность участка связывания акцептора электронов – гидрофобного Q_B -сайта ФС2 – для незаряженной протонированной формы должна быть выше, чем для заряженной депротонированной формы [15]. Следует отметить, что возможность восстановления ДХФИФ непосредственно в Q_B -сайте на сегодняшний день остается лишь предположением. Не исключено, что ДХФИФ восстанавливается от пластохинола Q_BH_2 . Однако пластохинон Q_B и его полностью восстановленная форма Q_BH_2 связаны с белком D1 ФС2 относительно непрочны и могут замещаться в Q_B -сайте как ингибиторами электронного транспорта, так и экзогенными акцепторами электронов [24]. В любом случае свободный Q_B -сайт ФС2 или связанный с ним Q_BH_2 находятся в глубине гидрофобной области мембраны, и доступность их для ДХФИФ будет зависеть от его заряда, то есть от его состояния (протонированного или депротонированного). Так как в щелочной области в среде преобладает депротонированная форма ДХФИФ, менее эффективно акцептирующая электроны от ФС2 по сравнению с протонированной формой, снижение скорости восстановления ДХФИФ при росте рН происходит достаточно резко.

Таким образом, при использовании ДХФИФ в качестве акцептора электронов для исследования электронного транспорта в ФС2 даже при незначительном варьировании рН среды необходимо учитывать не только зависимость активности фермента от рН как таковую, но и дополнительный фактор – изменение соотношения «розовой» и «синей» форм, являющихся, вероятно, акцепторами разной «силы».

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wiwczar J., Brudvig G.W. Alternative electron acceptors for photosystem II // *Photosynthesis: structures, mechanisms, and applications* / Eds. H. Hou, M. Najafpour, G. Moore, and S. Allakhverdiev. Cham: Springer, 2017. P. 51–66.
2. Vernon L.P., Shaw E.R. Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments // *Plant Physiol.* 1969. Vol. 44. N 11. P. 1645–1649.
3. Chernev P., Fischer S., Hoffmann J., Oliver N., Assunção R., Yu B., Burnap R.L., Zaharieva I., Nürnberg D.J., Haumann M., Dau H. Light-driven formation of manganese oxide by today's photosystem II supports evolutionarily ancient manganese-oxidizing photosynthesis // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. N 1: 6110.
4. Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Semin B.K. Effective binding of Tb³⁺ and La³⁺ cations on the donor side of Mn-depleted photosystem II // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 26. N 1. P. 1–11.
5. Eröss K., Svehla G., Erdey L. The use of 2,6-dichlorophenolindophenol as indicator in acid-base titrations // *Anal. Chim. Acta.* 1964. Vol. 31. P. 246–250.
6. Berthold D.A., Babcock G.T., Yocum C.F. A highly resolved, oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes: EPR and electron transport properties // *FEBS Lett.* 1981. Vol. 134. N 2. P. 231–234.
7. Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K. Interaction of terbium cations with the donor side of photosystem II in higher plants // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 81–85.
8. Dunahay T.G., Staechelin L.A., Seibert M., Ogilvie P.D., Berg S.P. Structural biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem 2 preparations from spinach // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1984. Vol. 764. N 2. P. 179–193.
9. Kurreck J., Seeliger A.G., Reifarth F., Karge M., Renger G. (1995). Reconstitution of the endogenous plastoquinone pool in photosystem II (PS II) membrane fragments, inside-out-vesicles, and PS II core complexes from spinach // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. N 48. P. 15721–15731.
10. Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
11. Tonomura B., Nakatani H., Ohnishi M., Yamaguchi-Ito J., Hiromi K. Test reactions for a stopped-flow apparatus: Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid // *Anal. Biochem.* 1978. Vol. 84. N 2. P. 370–383.
12. Petrova A., Mamedov M., Ivanov B., Semenov A., Kozuleva M. Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes // *Photosyn. Res.* 2018. Vol. 137. N 3. P. 421–429.
13. Jahn B., Jonasson N.S., Hu H., Singer H., Pol A., Good N.M., Op den Camp H.J.M., Martinez-Gomez N.C., Daumann L.J. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020. Vol. 25. N 2. P. 199–212.
14. Armstrong J.M.D. The molar extinction coefficient of 2, 6-dichlorophenol indophenol // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1964. Vol. 86. N 1. P. 194–197.
15. Izawa S. Acceptors and donors and chloroplast electron transport // *Methods in Enzymology. Photosynthesis and Nitrogen Fixation – Part C*, vol. 69 / Eds. A. San Pietro. Cambridge: Academic Press, 1980. P. 413–434.
16. Schlodder E., Meyer B. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (P-680) in Photosystem II particles from *Synechococcus* sp // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1987. Vol. 890. N 1. P. 23–31.
17. Vass I., Styring S. pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. N 3. P. 830–839.
18. Haddy A., Hatchell J.A., Kimel R.A., Thomas R. Azide as a competitor of chloride in oxygen evolution by photosystem II // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. N 19. P. 6104–6110.
19. Schiller H., Dau H. Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S2-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2000. Vol. 55. N 2–3. P. 138–144.
20. Semin B.K., Davletschina L.N., Aleksandrov A.Yu., Lanchinskaya V.Yu., Novakova A.A., Ivanov I.I. pH-dependence of iron binding to the donor side of photosystem II // *Biochemistry (Mosc.).* 2004. Vol. 69. N 3. P. 410–419.
21. Damoder R., Dismukes G.C. pH dependence of the multiline, manganese EPR signal for the 'S2' state in PS II particles: Absence of proton release during the S1 → S2 electron transfer step of the oxygen evolving system // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 174. N 1. P. 157–161.
22. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca²⁺-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosyn. Res.* 2013. Vol. 117. N 1. P. 385–399.
23. Ono T., Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 227. N 2. P. 147–152.
24. Zharmukhamedov S.K., Allakhverdiev S.I. Chemical inhibitors of photosystem II // *Russian J. Plant Physiol.* 2021. Vol. 68. N 2. P. 212–227.

Поступила в редакцию 09.07.2021

После доработки 17.09.2021

Принята в печать 07.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Features of using 2,6-dichlorophenolindophenol as an electron acceptor in photosynthesis studies

A.V. Loktyushkin* , E.R. Lovyagina , B.K. Semin 

*Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow 119234, Russia*

**e-mail: allokt@gmail.com*

2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) is a redox indicator widely used to study electron transfer reactions in biological systems, including in the process of photosynthesis. DCPIP exists in solution in two forms – “pink” and “blue,” which transform into each other during protonation/deprotonation. Upon reduction, the DCPIP is discolored. We investigated the pH-dependence of DCPIP reduction rate in the presence of the photosystem II (PSII) at two wavelengths – 522 nm (isobestic DCPIP point) and 600 nm (near the absorption maximum of the deprotonated “blue” form). It was shown that in experiments with change of the pH medium, measuring at a wavelength of 600 nm requires corrections related to changing the ratio of the “blue” and “pink” forms of the acceptor, as well as using the pK parameter of this acceptor, whose values pK vary in various sources, to calculate the DCPIP reduction rate. Measurements at the isobestic point (522 nm) avoid these complexities. We also found that the maximum at the pH-dependence of the DCPIP reduction rate by PSII shifted by about 1 unit to the acidic region relative to the maximum of the acceptor pair 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone – potassium ferricyanide reduction rate pH-dependence. This shift may be due to the lower availability of the Q_B site on the acceptor side PSII for the charged deprotonated DCPIP form compared to the uncharged protonated form.

Keywords: 2,6-dichlorophenolindophenol, photosystem II, pH-dependence, electron acceptors, 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone, potassium ferricyanide, photometry

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 121032500058-7

Сведения об авторах

Локтюшкин Алексей Владимирович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: allokt@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-9082-1966>

Ловягина Елена Рудольфовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: elena.lovyagina@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-3586-0575>

Семин Борис Константинович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: semin@biophys.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-0058-2798>