

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: fotografie destičky č. 1 a destičky č. 2 se suspenzemi chloroplastů

## OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Fotosyntéza. Světelná fáze fotosyntézy. Fotosyntetické pigmenty. Hillova reakce. Inhibice Hillovy reakce. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

## PRINCIP ÚLOHY

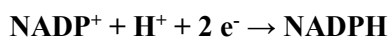
### A. Fotosyntéza (Hillova reakce).

**Fotosyntéza** (též fotosyntetická asimilace) je složitý biochemický proces, při kterém se mění přijatá energie světelného záření na energii chemických vazeb. Dochází k využití světelného (zejména slunečního) záření k syntéze energeticky bohatých cukrů z jednoduchých anorganických látek, jako je CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O.

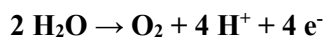
Mezi organismy mající schopnost provádět fotosyntézu patří vyšší rostliny, zelené a hnědé řasy, jednobuněčné sinice či zelené a purpurové bakterie. Reakce probíhající během fotosyntézy se dají rozdělit do dvou základních dějů: **primární děj (světelná fáze – přenos elektronů a protonů)** a **sekundární děj (temnostní fáze – fixace uhlíku, např. přes Calvinův cyklus)**.

Celý proces fotosyntézy je u eukaryotních organismů lokalizován v **chloroplastech**, uvnitř kterých se nacházejí diskovité membránové váčky zvané **thylakoidy**. Primární děj fotosyntézy probíhá především na **thylakoidní membráně**, zatímco ten sekundární se odehrává v chloroplastovém **stroma** („výplňová“ hmota chloroplastů).

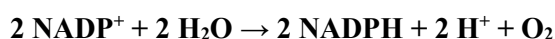
Během světelné fáze fotosyntézy (primární děj) dochází k zachycení světelného kvanta (**fotonu**) rostlinnými pigmenty, přičemž dochází k **excitaci** molekuly pigmentu. Excitovaná molekula vymrští elektron, který putuje přes další molekuly fungující jako elektronové přenašeče, dokud nepřejde na enzym zvaný NADP-reduktasa, kde dochází k **redukci koenzymu NADP<sup>+</sup> na NADPH** (nikotinamidadeninukleotidfosfát) podle následující rovnice:



Molekuly, které po excitaci ztratily elektron, se regenerují získáním elektronu původem **z vody**. Dvě molekuly vody se během fotosyntézy štěpí na molekulární kyslík, čtyři elektrony a čtyři protony prostřednictvím molekulárního komplexu, tzv. **kyslík vyvíjejícího komplexu (OEC z angl. „oxygen-evolving complex“)**.



Voda zde plní úlohu **donoru elektronů** a vodíkových kationtů (**protonů**). Výše uvedené rovnice lze proto sloučit do souhrnné rovnice vypadající takto:



Vznikající protony (H<sup>+</sup>) se shromažďují v dutině thylakoidu, kde jejich počet značně převyšuje počet protonů v chloroplastovém stroma. To vede k transmembránovému rozdílu v **elektrickém potenciálu** a k rostoucímu **protonovému gradientu** – koncentrace protonů mezi stroma a thylakoidní dutinou se snaží vyrovnat, a tak protony prochází přes ATP-synthasu, čímž fungují jako pohonný motor (tzv. protonmotivní síla) pro **syntézu ATP** (adenosintrifosfát). Tento vznik ATP účinkem slunečního záření

se nazývá **fotofosforylace**. ATP je molekula s makroergní vazbou, ve které je uložena energie využívána pro většinu buněčných pochodů, jako je např. vnitrobuněčný transport či anabolické procesy.

V souhrnu lze říci, že při primárních dějích neboli světelné fázi fotosyntézy dochází k přeměně světelné energie (fotonů) na chemickou energii ve formě **NADPH** a **ATP**. Jako **vedlejší produkt** vzniká **kyslík**. Molekuly NADPH a ATP poté slouží k dodání energie pro biochemické procesy v temnostní fázi či sekundárních dějích fotosyntézy (neprobíhají nutně za tmy, ale jsou to reakce nezávislé na světle) vedoucí k **fixaci CO<sub>2</sub> do sacharidů**.

### **Hillova reakce:**

Roku 1937 britský biochemik **Robert Hill** zjistil, že izolované chloroplasty bez přístupu CO<sub>2</sub> ale s umělým akceptorem elektronů mohou po osvětlení tento akceptor redukovat za současného uvolnění kyslíku. Tato tzv. **Hillova reakce** dokazuje, že CO<sub>2</sub> se bezprostředně neúčastní reakce uvolňující O<sub>2</sub>. Toto pozorování umožnilo Hillovi dojít k závěru, že kyslík se uvolňuje během kroků fotosyntézy závislých na světle, a zároveň je Hillova reakce důkazem, že světelná fáze fotosyntézy a fixace CO<sub>2</sub> probíhají na různých místech v buňce.

V této úloze dojde k izolaci chloroplastů **z listů špenátu**. Jako **umělý akceptor elektronů** (místo přirozeného akceptoru **NADP<sup>+</sup>**) bude sloužit **DCIP** (2,6-dichlorfenolindofenol). Oxidovaná forma DCIP je modrá s maximální absorpcí při **600 nm**, zatímco redukovaný DCIP je bezbarvý.

Oxidaci vody probíhající během fotosyntézy lze inhibovat. Na tomto principu fungují některé **herbicidy** používané k hubení rostlin. Příkladem je herbicid **diuron**, jehož vliv na průběh světelné fáze fotosyntézy budete sledovat i v tomto cvičení.

## **B. Kvantitativní stanovení fotosyntetických pigmentů.**

Fotosyntetické pigmenty jsou organická barviva, která jsou využívána fotosyntetizujícími organismy k zachycení sluneční energie (fotonů) při fotosyntéze. Jejich molekuly mají mnoho konjugovaných dvojných vazeb, díky čemuž silně pohlcují viditelné světlo. Hlavní rostlinný pigment je **chlorofyl** lokalizovaný v chloroplastech. Chlorofyly lze řadit mezi cyklické tetrapyrroly (porfyriny) s komplexně navázaným hořečnatým iontem. Kromě chlorofylů obsahují rostliny i jiné pigmenty, např. **karoteny** a **xanthofyly** souhrnně označované jako **karotenoidy**, které slouží jako doprovodné fotosyntetické pigmenty a jsou lokalizované v jiných částech buňky.

Obsah fotosyntetických pigmentů lze stanovit spektrofotometricky, tedy měřením absorbance směsi pigmentů při různých vlnových délkách, které jsou voleny tak, aby odpovídaly absorpčním maximům jednotlivých složek. Tento způsob stanovení je však omezen pouze na pigmenty, které se spektrálně výrazně liší. Proto se tato metoda běžně používá pro stanovení obsahu chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a celkového obsahu karotenoidů.

### **Poznámka:**

Vlnové délky viditelného světla mají hodnoty v intervalu **380–760 nm**. Fotosyntéza zelených rostlin využívá světlo v rozsahu pouze 400–750 nm. Tomuto světlu se říká fotosynteticky aktivní záření (FAR). Různá barviva absorbují různou část světelného spektra – např. chlorofyly absorbují nejvíce světlo v modrofialové a červené části spektra (zelená část spektra se tolik neabsorbuje, a proto jsou chloroplasty zelené).

## PRAKTICKÁ ČÁST A. Fotosyntéza (Hillova reakce).

### Materiál a vybavení:

listy špenátu

fosfátový pufr (50 mmol.l<sup>-1</sup>; pH = 6,5)

0,5 mmol.l<sup>-1</sup> DCIP ve fosfátovém pufru (50 mmol.l<sup>-1</sup>; pH = 6,5)

dimethylsulfoxid (DMSO)

10 mmol.l<sup>-1</sup> diuron v DMSO

*Třecí miska, tlouček, gáza, skleněné zkumavky, držák na skleněné zkumavky, plastové mikrozukavky, stojánek na plastové mikrozukavky, automatické pipety, skleněné pipety, fotometr, fotometrické kyvety, odměrné válce, odměrná baňka, kádinky, centrifuga, centrifugační zkumavky, 96jamková destička, ledová lázeň.*

### Postup:

#### **Izolace chloroplastů:**

Navážte 5 g listů špenátu, které následně natrhejte na menší kousky a rozetřete ve třecí misce s 50 ml vychlazeného 50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátového pufru o pH = 6,5 (pro praktičtější provedení nejprve listy rozetřete v menším objemu fosfátového pufru a následně doplňte do objemu 50 ml). Získanou suspenzi zfiltrujte přes **dvě vrstvy** gázy do kádinky (můžete si pomoci vymačkáním), a poté pipetujte 10 ml filtrátu do plastové centrifugační zkumavky. Zkumavka s filtrátem se následně nechá centrifugovat po dobu 5 minut při 6 000 otáčkách/minutu. Po centrifugaci odlijte supernatant – zbylý pelet jsou izolované chloroplasty.

#### **Příprava vhodné koncentrace chloroplastů:**

Pro dobře viditelný barevný přechod při Hillově reakci je nutné chloroplasty naředit na optimální koncentraci. Z toho důvodu k peletu přidejte 1 ml 50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátového pufru (pH = 6,5), pomocí pipety homogenizujte suspenzi a změřte její absorbanci proti slepému vzorku (50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátový pufr, pH = 6,5) při vlnové délce 652 nm. Pokud absorbance výrazně přesahuje hodnotu 0,8 (závislost absorbance na koncentraci přestává být lineární), odeberte část suspenze chloroplastů a definovaným způsobem ji nařeďte 50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátovým pufr (pH = 6,5), dokud nezískáte hodnotu absorbance nižší než 0,8 (slepý vzorek se ředit nemusí).

Pomocí naměřené absorbance ( $A_{652}$ ) a známého faktoru ředění ( $f$ ) vypočítejte koncentraci chloroplastů v neředěné suspenzi podle následujícího vztahu:

$$c = A_{652} \cdot f \cdot 28,98 = \dots\dots\dots \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)$$

$A_{652}$	Faktor ředění ( $f$ )	$c$ neředěných chloroplastů ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Na základě získané koncentrace neředěné suspenze chloroplastů připravte z této (**neředěné**) suspenze libovolný objem chloroplastové suspenze o koncentraci přibližně **100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$**  (objem si zvolte tak, aby se Vám dobře počítalo při ředění, dbejte ale na to, aby byl tento objem alespoň 400  $\mu\text{l}$ ). Pro ředění použijte 50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátový pufr (pH = 6,5).

#### **Desítková ředící řada diuronu:**

Nachystejte si sadu čtyř plastových mikrozukavek a do všech pipetujte 90  $\mu\text{l}$  DMSO. Poté **do první zkumavky** pipetujte 10  $\mu\text{l}$  10 mmol.l<sup>-1</sup> diuronu a promíchejte na vortexu. Po důkladném promíchání odeberte z první mikrozukavky 10  $\mu\text{l}$  a přidejte tento objem do druhé zkumavky. Opět promíchejte na vortexu. Odeberte z druhé zkumavky 10  $\mu\text{l}$  a přidejte do třetí zkumavky. Po promíchání stejným způsobem přidáte z třetí zkumavky 10  $\mu\text{l}$  do poslední čtvrté zkumavky. Takto vzniknou ve zkumavkách od č. 1 do č. 4 roztoky diuronu o koncentracích 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>.

**Hillova reakce a inhibiční působení diuronu:**

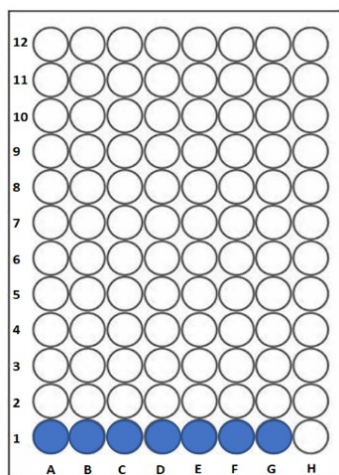
Nachystejte si pomůcky pro měření (přednastavené automatické pipety, špičky, chemikálie a mikrotitrační destičky), protože celý proces přípravy vzorků by měl probíhat bez většího časového prodlžení!

Do dvou mikrotitračních destiček následně pipetujte přesné množství jednotlivých chemikálií **podle rozpisu v tabulkách** níže, a to do jamek **podle obrázku** níže. **Chloroplastovou suspenzi (100 µg.ml<sup>-1</sup>)** před pipetováním homogenizujte na vortexu, aby se netvořily usazeniny, a pipetujte ji do všech jamek až **úplně nakonec!**

Po přidání chloroplastové suspenze obsah jamek jemně zamíchejte špičkou pipety (později už nemíchejte). Destičku č. 2 obalte hliníkovou fólií a destičku č. 1 položte pod zdroj světla.

DESTIČKA Č. 1						
Vzorek č.	Jamka	50 mM fosfátový pufr (pH = 6,5) [µl]	0,5 mM DCIP [µl]	DMSO [µl]	Roztok diuronu o různých koncentracích v DMSO	100 µg.ml <sup>-1</sup> suspenze chloroplastů [µl]
1	A	168	-	2	-	30
2	B	-	168	2	-	30
3	C	-	168	-	2 µl (10 <sup>-6</sup> M)	30
4	D	-	168	-	2 µl (10 <sup>-5</sup> M)	30
5	E	-	168	-	2 µl (10 <sup>-4</sup> M)	30
6	F	-	168	-	2 µl (10 <sup>-3</sup> M)	30
7	G	-	168	-	2 µl (10 <sup>-2</sup> M)	30

DESTIČKA Č. 2					
Vzorek č.	Jamka	50 mM fosfátový pufr (pH = 6,5) [µl]	0,5 mM DCIP [µl]	DMSO [µl]	100 µg.ml <sup>-1</sup> suspenze chloroplastů [µl]
1	A	168	-	2	30
2	B	168	-	2	30
3	C	-	168	2	30
4	D	-	168	2	30



**Obrázek:** Schéma orientace destičky a pipetování chemikálií do konkrétních jamek (modrá barva).

**Vyhodnocení:**

Sledujte průběh redukce DCIP v jednotlivých vzorcích. Srovnajte je i se vzorkem č. 3 a č. 4 na druhé destičce, která byla zakryta hliníkovou fólií. Zaznamenejte pozorování a výsledky. Odhadněte, jaké **výsledné** minimální koncentrace diuronu je zapotřebí k úplné inhibici Hillovy reakce: \_\_\_\_\_.

**Zaznamenejte pozorování (barvu):**

DESTIČKA Č. 1

Vzorek č. 1:

Vzorek č. 2:

Vzorek č. 3:

Vzorek č. 4:

Vzorek č. 5:

Vzorek č. 6:

Vzorek č. 7:

DESTIČKA Č. 2

Vzorek č. 1:

Vzorek č. 2:

Vzorek č. 3:

Vzorek č. 4:

**Vysvětlete výsledky:**

Napište, v jakých vzorcích v rámci obou destiček probíhala či neprobíhala oxidace vody a proč:

## PRAKTICKÁ ČÁST B. Kvantitativní stanovení fotosyntetických pigmentů.

### Materiál a vybavení:

listy špenátu  
50% aceton

Třecí miska, tlouček, gáza, skleněné zkumavky, držák na skleněné zkumavky, automatické pipety, skleněné pipety, fotometr, fotometrické kyvety, odměrné válce, odměrná baňka, kádinky, ledová lázeň.

### Postup:

#### Extrakce pigmentů:

Navážte 5 g listů špenátu, které následně natrhejte na menší kousky a rozetřete ve třecí misce s 10 ml vychlazeného 50% acetonu. Získaný extrakt filtrujte přes čtyři vrstvy gázy do kádinky. Na zbylé kousky špenátu zachycené v gáze pipetujte dalších 10 ml vychlazeného 50% acetonu a filtrujte (můžete si pomoci vymačkáním). Získaný acetonový extrakt pigmentů přelejte do 25 ml odměrné baňky a doplňte po rysku 50% acetonem.

#### Stanovení koncentrace pigmentů:

Z odměrné baňky odeberte 1 ml extraktu pigmentů a oproti slepému vzorku (50% aceton) změřte jeho absorbanci při vlnové délce 470 nm. Pokud absorbance přesáhne hodnotu **0,8**, je nutné vzorek definovaným způsobem naředit 50% acetonem (slepý vzorek se ředit nemusí).

Jakmile naměříte hodnotu absorbance pod 0,8, zapište si faktor ředění a pomocí tohoto faktoru si z neředěného extraktu pigmentů nařeďte do skleněných zkumavek tři paralelní vzorky extraktu pomocí 50% acetonu.

Všechny vzorky postupně měřte při vlnových délkách 470 nm, 646 nm a 663 nm (nejdříve změřte všechny tři vzorky při první vlnové délce, poté všechny při druhé vlnové délce atd.). Pro každou vlnovou délku se musí znovu nulovat na slepý vzorek!

Číslo měření	A <sub>470</sub>	A <sub>646</sub>	A <sub>663</sub>	faktor ředění pro fotometrii
1				
2				
3				
Průměrná absorbance				

### Vyhodnocení:

Do tabulky výše zapište získané absorbance a z jednotlivých trojic měření vypočítejte průměrné absorbance pro každou vlnovou délku.

Vypočítejte koncentraci *chlorofylu a*, *chlorofylu b* a *karotenoidů* ve zředěném extraktu dle následujících rovnic (za absorbance dosadíte jejich průměrné hodnoty):

$$c_{\text{chl. a}} = 12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646} \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

$$c_{\text{chl. b}} = 20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663} \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

$$c_{\text{kar.}} = (1000 \cdot A_{470} - 3,27 \cdot c_{\text{chl. a}} - 104 \cdot c_{\text{chl. b}}) / 198 \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

**Doplňte tabulku níže:** vypočítané koncentrace pigmentů vynásobte faktorem ředění pro fotometrii, čímž získáte koncentrace pigmentů ve 25 ml extraktu. Ze získaných hodnot postupně vypočtete množství pigmentů na 1 g špenátových listů (neboli koncentraci pigmentů ve špenátových listech).

Pigmenty	Vypočítané koncentrace pigmentů [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace pigmentů ve 25 ml extraktu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Množství pigmentů [ $\mu\text{g}$ ] ve 25 ml extraktu odpovídající 5 g špenátu	Množství pigmentů [ $\mu\text{g}$ ] na 1 g špenátových listů
Chlorofyl A				
Chlorofyl B				
Karotenoidy				

## KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	

### ÚLOHA 11A – absorpance

$A_{652}$	Faktor ředění ( $f$ )	$c$ neředěných chloroplastů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

podpis vedoucího cvičení:

### ÚLOHA 11A – zbarvení

#### DESTIČKA Č. 1

Vzorek č. 1:	
Vzorek č. 2:	
Vzorek č. 3:	
Vzorek č. 4:	
Vzorek č. 5:	
Vzorek č. 6:	
Vzorek č. 7:	

#### DESTIČKA Č. 2

Vzorek č. 1:	
Vzorek č. 2:	
Vzorek č. 3:	
Vzorek č. 4:	

podpis vedoucího cvičení:

### ÚLOHA 11B

Číslo měření	$A_{470}$	$A_{646}$	$A_{663}$	faktor ředění pro fotometrii
1				
2				
3				

podpis vedoucího cvičení: