**Praktikum experimentálních metod fyziologie rostlin (KBF/PEMFR)**

**Izolace intaktních chloroplastů a thylakoidních membrán**

**A) ZADÁNÍ**

1. Připravte suspenze chloroplastů a thylakoidních membrán z různých rostlin
2. Připravené suspenze nařeďte na shodné koncentrace chlorofylů *a* a *b*, rozpipetujte do mikrozkumavek a zamrazte. Vzorky budou použity v dalším cvičení.

**B) SEZNAM POMůCEK**

Tyčový laboratorní homogenizátor, nůžky, laboratorní nádobí, nylonová síťka s velikostí oka 40 μm, zelená lampa, chlazená centrifuga s příslušenstvím, štětec, pipety, mikrozkumavky, laboratorní váhy, alobal, vortex, spektrofotometr, spektrofotometrické kyvety

Listy ječmene, hrachu, případně *Arabidopsis*, izolační pufry, 80% aceton

**C) TEORIE**

Chloroplasty jsou buněčné organely elipsovitého tvaru vyskytující se u rostlin a řas. Jsou tvořeny dvojitou vnější membránou obklopující vnitřní prostor nazývaný stroma. Uvnitř stromatu je přítomna další uzavřená soustava membrán, tzv. thylakoidní membrány. Thylakoidní membrány jsou systém navzájem propojených vesiklů a váčků s vnitřním prostorem zvaným lumen a jsou důležité zejména jako místo, v němž probíhá fotosyntéza. V thylakoidních membránách jsou totiž ukotveny pigment-proteinové komplexy fotosystému I a II, které využívají energii slunečního záření k oxidaci vody a k redukci NADP+ na NADPH. Chemická energie obsažená ve vysokoenergetické molekule NADPH je dále zužitkována při syntetických procesech rostliny a oxidací vody vzniká kyslík.

**Princip měření**

 Listy rostlin homogenizujeme v homogenizačním pufru a homogenát následně přefiltrujeme přes nylonovou síťku. Buněčné organely včetně chloroplastů projdou do filtrátu, zatímco hrubší kousky pletiva zůstanou zachyceny na síťce. Pro homogenizaci je používán pufr s vysokou koncentrací sacharosy a NaCl. Vysoké koncentrace těchto látek zajišťují tzv. isotonické prostředí, které je svou iontovou a osmotickou silou podobné vnitřnímu prostředí buněk. Chloroplasty jsou tak tímto roztokem chráněny před popraskáním.

Pokud jsou následně vyizolované chloroplasty přeneseny do pufru s nízkou koncentrací sacharosy a NaCl, dojde u nich vlivem osmotického tlaku k “nasátí” vody a k jejich popraskání. Díky prasknutí vnější chloroplastové membrány tak dojde k uvolnění thylakoidních membrán do prostředí pufru.

 U suspenzí chloroplastů a thylakoidních membrán budeme měřit koncentraci chlorofylů *a* a *b*. Pro toto stanovení se používá celá řada způsobů, v této úloze bude použito měření v 80% acetonu a pro přepočet koncentrace budou použity tzn. Lichtenthalerovy rovnice (Lichtenthaler 1987):

chl*a* = 12,25(A663,6 - A750) - 2,79(A646,8 – A750) μg/ml

chl*b* = 21,5(A646,8 – A750) – 5,1(A663,2 – A750) μg/ml

**D) POSTUP**

**Izolace chloroplastů a thylakoidních membrán**

1. Připravíme si pufry A, B a C:

Pufr A: 35 mM HEPES, pH 7.2, 400 mM sacharosa, 400 mM NaCl, 4 mM MgCl2, 5 mM askorbát sodný, 2mg∙ml-1 BSA

Pufr B: 25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 8 mM MgCl2, 1 mM EDTA

Pufr C: 50 mM HEPES, pH 7.2, 400 mM sacharosa, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl2

1. Před použitím pufry vychladíme na 0-4°C (předem zajistí vedoucí cvičení). Zkontrolujeme všechny potřebné pomůcky: zapneme centrifugu - nastavíme teplotu na 4°C a vložíme rotor, připravíme homogenizátor a homogenizační nádobu, sestavíme aparaturu pro filtraci homogenizátu. Připravíme si centrifugační kyvety. Zhasneme světlo a rozsvítíme zelenou lampu.
2. Z fytokomory přineseme několik květináčů s týdenními rostlinami ječmene (*Hordeum vulgare*), dvoutýdenními rostlinami hrachu (*Pisum sativum*) nebo osmitýdenními rostlinami *Arabidopsis thaliana*.
3. Nůžkami odstřihneme horní polovinu listu ječmene, případně celý list hrachu nebo *Arabidopsis*, dohromady přibližně 20 g, listy vložíme do homogenizační nádoby a zalijeme 100 ml pufru A. Ostrými nůžkami poté listy v homogenizační nádobě prostříháme, abychom usnadnili následnou homogenizaci.
4. Směs rozstříhaných listů a pufru homogenizujeme pomocí tyčového homogenizátoru při 13000 otáčkách za minutu. Homogenizaci provádíme v 5ti 5vteřinových intervalech, přičemž mezi jednotlivé intervaly vkládáme krátké, asi 15vteřinové intervaly. Během homogenizace se doporučuje mít homogenizační nádobu vloženou v jiné, větší nádobě s ledem.
5. Po ukončení homogenizace přefiltrujeme homogenát přes 2 vrstvy nylonové síťky. Nádoba, kam odtéká filtrát, je umístěna na ledu. Filtrát poté rovnoměrně rozdělíme do centrifugačních kyvet a centrifugujeme (5000g, 6 minut). Centrifugační kyvety plníme maximálně do 2/3 objemu a před vložením do centrifugy je vyvážíme.
6. Po centrifugaci z kyvet opatrně odlijeme supernatant (dáváme pozor, abychom nevylili i pelet). Do jedné kyvety přilijeme malé množství vychlazeného pufru A (2-3 ml) a pomocí jemného štětce opatrně resuspendujeme pelet. Tímto získáme suspenzi chloroplastů, kterou pomocí pipety přeneseme do čisté mikrozkumavky, zabalíme ji do alobalu a uložíme ji do lednice nebo do nádoby s ledem. Do ostatních kyvet s peletem nalijeme vhodné množství vychlazeného pufru B a pomocí štětce opatrně resuspendujeme. Kyvety následně vyvážíme a suspenzi zcentrifugujeme (5000g, 10 minut).
7. Po ukončení centrifugace znovu opatrně odlijeme supernatant, přilijeme vychlazený pufr C a resuspendujeme pelet. Vyvážíme kyvety a centrifugujeme při 5000g, 5 minut.
8. Na závěr odlijeme supernatant a pelet resuspendujeme v malém množství vychlazeného pufru C (2-3 ml).
9. Výslednou suspenzi thylakoidních membrán pomocí pipety přeneseme do mikrozkumavky, zabalíme ji do alobalu a umístíme do nádoby s ledem nebo do lednice.

**Měření koncentrace chlorofylů v připravených suspenzích**

1. Připravíme si celkem čtyři 2ml mikrozkumavky a do každé napipetujeme 2 ml 80% acetonu.
2. Do prvních dvou poté napipetujeme 5, resp. 10 μl suspenze chloroplastů a do dalších dvou 5 a 10 μl suspenze thylakoidních membrán.
3. Mikrozkumavky uzavřeme, na vortexu promícháme a poté zcentrifugujeme (10000g, 10 minut).
4. U supernatantu poté změříme absorbance při vlnových délkách 646.8, 663.2 a 750 nm, jako blank použijeme 80% aceton.
5. Absorbance při příslušných vlnových délkách si u všech vzorků zaznamenáme a dosazením do Lichtenthalerových rovnic spočítáme koncentraci chlorofylů *a* a *b* v suspenzích v μg/ml.

**Uskladnění vzorků pro další použití**

Po změření koncentrace chlorofylů *a* a *b* naředíme suspenze příslušnými pufry na stejnou koncentraci chlorofylů *a* a *b*, suspenze rozpipetujeme po vhodných objemových alikvotech do malých mikrozkumavek a do dalšího cvičení je uskladníme v -80°C.

**Vyhodnocení**

Na základě změřené koncentrace chlorofylů, objemu suspenzí chloroplastů a thylakoidních membrán a známého množství použitých listů určete, která z použitých rostlin poskytla větší výtěžek izolace. Výsledky diskutujte.

**E) LITERATURA**

##### Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids. Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148, 350-382.