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

**MĚŘENÍ VÝVOJE KYSLÍKU VE FOTOSYNTÉZE POLAROGRAFICKOU METODOU**

1. **ZADÁNÍ**
2. Seznamte se s konstrukcí kyslíkových komůrek, se zapojením aparatury a s ovládáním vyhodnocovacího programu OxyWin. Proveďte kalibraci kyslíkových elektrod.
3. S pomocí kyslíkové komůrky DW1 změřte vývoj kyslíku na izolovaných (intaktních a teplem inaktivovaných) tylakoidních membránách chloroplastů.
4. S pomocí kyslíkové komůrky LD 2/3 porovnejte vývoj kyslíku bez a za přítomnosti umělého zdroje CO2. Diskutujte výsledky v absolutních jednotkách v závislosti na ploše měřeného vzorku.
5. **SEZNAM POMŮCEK**
6. Přístrojové vybavení: kyslíková komůrka DW1 a LD 2/3, teflonová membrána, magnetická míchačka, Clarkova elektroda s příslušenstvím, OxyLab Plus (řídí a zaznamenává napětí na elektrodě), zdroj světla LH36 (firma Hansatech), termoblok.
7. Rostlinný materiál: podle dostupnosti (listy a tylakoidní membrány ječmene, hrachu, tabáku).
8. Chemikálie: polonasycený roztok KCl, 1M NaHCO3, 70 mM PPBQ (2-fenyl-p-benzochinon) v etanolu, resuspendační tlumivý roztok (pH 6.5) podle tabulky:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Chemikálie | Koncentrace (mM) | Mw (g mol-1) |
| sacharóza | 400 | 342,3 |
| MES | 40 | 195,24 |
| NaCl | 15 | 58,44 |
| MgCl2 bezvodý | 5 | 95,22 |

**C: TEORIE**

**Úvod**

Měření vývoje kyslíku v uzavřeném systému je jednou z nejstarších a nejlevnějších metod demonstrace či zkoumání fotosyntetických procesů v listu. Teoretické vysvětlení bylo podáno v práci Roberta Hilla, který prokázal, že kyslík uvolňovaný rostlinami pochází z fotochemického rozkladu vody, proto mluvíme o tzv. Hillově reakci. Obecně lze Hillovu reakci zapsat následující rovnicí, ve které A značí elektronový akceptor:

*2 H2O + 2 A + (světlo, chloroplasty) → 2 AH2 + O2*

Z rovnice je patrné, že vývoj kyslíku souvisí s přenosem elektronů ve fotosyntéze, takže na základě změn (přirozených či uměle vyvolaných např. specifickými inhibitory elektronového transportu) lze sledováním vývoje kyslíku nepřímo určit aktivitu některých součástí fotosyntetického aparátu, zejména fotosystémů I a II.

**Princip měření produkce kyslíku**

Existují dvě metody měření produkce kyslíku ve fotosyntéze, isotopová (sledujeme vývoj isotopu 18O2) či polarografická metoda (viz níže). Protože pro isotopovou detekci kyslíku je třeba drahého hmotnostního spektrometru, užívá se především polarografická metoda: koncentrace kyslíku v komůrce je měřena pomocí tzv. Clarkovy elektrody ze změny proudu, který vzniká při redukci kyslíku na katodě (Pt). Polarizace vzniká připojením vnějšího napětí (0,7 - 0,8 V). Anoda (Ag) je s katodou vodivě spojena pomocí elektrolytu (KCl) a celý tento systém je od okolí oddělen pomocí teflonové membrány, jež propouští pouze kyslík a nikoli vodu nebo další ionty. Chemické reakce, které probíhají na anodě a katodě, lze popsat následujícími rovnicemi:

Anoda (Ag) *4Ag + 4Cl- → 4AgCl + 4e-*

Katoda (Pt) *2H2O + 4e- + O2 → 4OH-*

Elektrický proud, který se generuje je přímo úměrný koncentraci kyslíku a je konvertovaný na digitální signál. Protože polarizační napětí způsobí redukci kyslíku na katodě, vzniká mezi vzorkem a katodou gradient koncentrace kyslíku. Tento gradient následně vyvolá difúzi kyslíku ke katodě. Rychlost difúze ovlivňuje rychlost odezvy kyslíkové elektrody (Obr. 1).

**Obr. 1** Ag/Cl elektroda a princip měření.

**Příprava elektrod**

* ustřihneme cigaretový papírek o rozměrech cca 1,5 × 1,5 cm a teflonovou membránu o rozměrech cca 2,5 × 2,5 cm.
* na Pt katodu pipetou naneseme větší kapku polovičně nasyceného KCl (elektrolyt; příprava, pokud není k dispozici: 17g KCl ve 100g H2O) (Obr. 2A).
* na kapku položíme nejdříve cigaretový papírek a na něj pak pinzetou teflonovou membránu (Obr. 2B).
* obojí stáhneme dolů (do drážky elektrody) pomocí O-kroužku a „membránového aplikátoru“ (Obr. 2C).
* do žlábku Ag anody napipetujeme 200-300 l polovičně nasyceného KCl a kolem žlábku umístíme velký O-kroužek (Obr. 2D).
* systém necháme 15 minut stabilizovat.

**Obr. 2.** Postup při přípravě kyslíkové elektrody

Poznámky k zacházení s elektrodou

* otisky prstů na teflonové membráně snižují citlivost elektrody.
* elektrodu po skončení měření opláchneme od elektrolytu a skladujeme v desikátoru.
* hnědé zabarvení Ag elektrody (AgCl) není závadné.
* černé zabarvení Ag elektrody (oxidace) snižuje signál a zvyšuje šum elektrody, proto nános oxidu odstraníme navlhčenou bučinou nebo bavlnou, popř., pokud je k dispozici, použijeme leštící pastu od výrobce elektrody (Hansatech Instruments).
* uděláme-li dírku do cigaretového papírku nebo ho vůbec nepoužijeme, rapidně vzroste rychlost difúze kyslíku přes teflonovou membránu; při zvyšování koncentrace kyslíku ale neporoste napětí lineárně a zhorší se také podíl signál/šum.

**D. POSTUP**

**Úloha I: Měření vývoje kyslíku v suspenzi intaktních a teplem inaktivovaných tylakoidních membrán.**

**Aparatura 1 (DW1)**

Komůrka DW1 (Obr. 3) se skládá ze tří částí: na spodní část se pokládá připravená AgCl elektroda, střední část představuje reakční komůrku a poslední část slouží na uzavření reakční komůrky. Střední část má dva ventily pro případnou temperaci komůrky protékající vodou z termostatu (při použití LED-diodového osvětlení není nutná). Do reakční komůrky se vkládá magnetické míchadlo na důkladné promíchání suspenze. Při měření se celá komůrka umístí na magnetickou míchačku, která značně urychlí pomalou difuzi kyslíku k elektrodě.

**Obr. 3** Komůrka DW1

**Kalibrace 1 (DW1)**

Kyslíkovou elektrodu je potřeba před měřením nakalibrovat. První kalibrační roztok je deionizovaná voda nasycená vzduchem pro získání tzv. O2-line (max. množství kyslíku při dané teplotě a tlaku). Při známe teplotě a tlaku deionizovaná voda obsahuje známou koncentraci kyslíku podle vztahu:

 Ctep =14.16 - (0.394 \* T) + (0.007714 \* T2) - (0.0000646 \* T3)

kde Ctep je koncentrace kyslíku (v ppm, 1 ppm = 31,25 nmol L-1 ) a T je teplota v °C. Při jiném jako standartním atmosférickém tlaku (101,32 kPa) se získaná hodnota upraví podle vztahu:

 Ctlak = Ctep x (aktuální atmosférický tlak / standartní atmosférický tlak, 101,32 kPa)

Druhým kalibračním roztokem je deionizovaná voda zbavená kyslíku pomocí dithioničitanu sodného (sodium dithionite, natrium dithionite), kterým změříme signál při tzv. N2-line. Vypočítanému rozdílu potenciálů mezi O2- a N2-line se přiřadí tabelovaná hodnota pro koncentraci kyslíku ve vodě nasycené vzduchem při dané teplotě a tlaku.

**Měření 1 (DW1)**

Jednu část suspenze tylakoidních membrán inaktivujeme zahřátím na 50 °C v termobloku, druhou část necháme stát při pokojové teplotě. Připravíme reakční směs, vzniklou smícháním 960 µl resuspendačního tlumivého roztoku (pH 6,5); 20 µl umělého akceptoru elektronů – 70 mM PPBQ (2-fenyl-*p*-benzochinon, Mw 184,2 g mol-1) v etanolu a 20 µl suspenze chloroplastů (tylakoidních membrán). (Množství jednotlivých složek může být upřesněno na cvičení). Reakční směs přidáme do reakčního prostoru elektrody a sledujeme změnu napětí (odrážející změny velikosti proudu v důsledku produkce kyslíku) nejdříve ve tmě (min. změna) a pak po osvětlení. Při osvětlení by napětí mělo vzrůstat díky O2 vznikajícímu aktivitou PS II. Porovnejte produkci kyslíku v intaktních a teplem inaktivovaných tylakoidních membránách. Berte do úvahy ředění vzorku (50 x).

**Úloha II: Měření vývoje kyslíku v plynné fáze na segmentu listu.**

**Aparatura 2 (LD 2/3)**

Samotná komůrka LD 2/3 (Obr. 4) se skládá ze tří částí, na spodní část se pokládá elektroda, střední část (s trojcestnými ventily) slouží pro ukládání pomocných měřících disků (podpěrná funkce pro list a nosné medium pro umělý zdroj CO2) a horní pro přívod světla. Horní a spodní část má ještě bílé ventily pro případnou temperaci komůrky protékající vodou z termostatu. Do střední části komory se vkládají disky v tomto pořadí od spodu: 1. Kovový plný disk, 2. Plstěný disk, 3. Mřížkový kovový disk, 4. Plstěný disk, 5. Mřížkový disk s plným středem. Na tento poslední disk se pokládají listové segmenty vykrojené přiloženým kruhovým kráječem nebo utržené listy menší než je měřící listová plocha (10 cm2). Kolem disků uprostřed střední části komůrky se umisťuje jako těsnění O-kroužek.

 **Obr. 4** Komůrka LD2/3

**Kalibrace 2**

Pro vyhodnocení v absolutních jednotkách je opět nutné provést kalibraci elektrody. Za teploty 0 °C a tlaku 101,32 kPa obsahuje 1 ml vzduchu cca 210 μl O2 (21%). 1 μmol plynu má objem 22,414 μl, tedy, 1 ml vzduchu obsahuje 9,37 μmol O2 (210/22.414). Při laboratorní teplotě koncentraci přepočítáme podle vzorce:

 Ctep = 9,37 x [273/(273+T°C)].

Při teplote 25°C pak 1 mL vzduchu obsahuje 8,58 μmol O2. V případě známého atmosférického tlaku možno provést korekci i na atmosférický tlak podle vzorce:

 Ctlak = Ctep x (aktuální atmosférický tlak / standartní atmosférický tlak, 101,32 kPa)

Do komůrky LD 2/3 vložíme disky (pořadí viz část Aparatura 2) a ujistíme se, že modrý trojcestný ventil je otevřený. Komůrku zapečetíme a pečlivě zkontrolujeme-dotáhneme všechna těsnění, uzavřeme modrý trojcestný ventil. Spustíme měření, počkáme, až se signál ustálí a odečteme hodnotu R1 (mV). Do stříkačky natáhneme 1 ml vzduchu a stříkačku utěsníme do modrého trojcestného ventilu, otevřeme modrý ventil, vstříkneme 1 ml vzduchu do komůrky a držíme stále píst stříkačky, dokud neuzavřeme trojcestný ventil. Počkáme, až se ustálí hodnota napětí a odečteme hodnotu R2 (mV). Rozdíl napětí odpovídá množství kyslíku v 1mL, při dané teplotě a tlaku. Po otevření ventilu se uvolní vzduch z komůrky a signál se vrátí na hodnotu R1.

**Měření 2**

Jedno měření provedeme bez a druhé s dodáním CO2 v souladu s rovnicífotosyntézy: *hν* + *CO2 + H2O* => *CH2O + O2*. CO2 do systémuuměle dodáme formou bikarbonátu sodného (jeho disociace probíhá samovolně dle rovnice: *NaHCO3 => NaOH + CO2*) tak, že na plstěný disk napipetujeme 400 l 1M NaHCO3. Pomocí kráječe vykrojíme z listu kruhový segment (tabák) nebo, pokud je list menší než měřící plocha komůrky (10 cm2), měříme na celém listu (např. hrachu). Po stabilizaci signálu komůrku osvětlíme zdrojem světla LH36 a sledujeme vývoj kyslíku. Po ukončení měření změříme velikost listové plochy. Získané hodnoty přepočítáme na standartní velikost listové plochy (vývin kyslíku na m2 za 1s).

**Literatura**

Walker D. 1987. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. University of Sheffield, Pp. 212.