

jméno:		1
obor:	datum provedení:	

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Oxidačně-redukční reakce. Donory a akceptory elektronů. Respirační řetězce mitochondrií a bakterií. Fotosyntetický přenos elektronů v chloroplastech.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení). Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): část A. Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): část A.

ÚVOD

Mezi procesy v živých systémech zauímají významné místo oxidačně-redukční (redoxní reakce, při kterých se mezi reaktanty přenášejí elektrony (obecněji tzv. „redukční ekvivalenty“). Donor je ztrácí, tj. oxiduje se, zatímco akceptor je přijímá, tj. je redukován. Některé redoxní reakce probíhají značnou rychlostí spontánně (např. přeměny volných radikálů), většina ovšem vyžaduje katalýzu specifickými enzymy z třídy oxidoreduktas. Tak například cytoplazmatický enzym laktátdehydrogenasa (laktát:NAD⁺-oxidoreduktasa, EC 1.1.1.27) při nedostatku kyslíku v pracujícím svalu redukuje pyruvát (akceptor) na L-laktát (redukováný akceptor); NADH (donor) přitom přechází na NAD⁺ (oxidovaný donor) . V játrech probíhá obrácená reakce mezi L-laktátem (zde donor) a NAD⁺ (zde akceptor).

Oxidoreduktasy známe jak rozpustné, tak i vázané na biologické membrány. Některé membránové oxidoreduktasy mohou vzájemně spolupracovat tím, že produkt předchozího enzymu (redukováný akceptor) zastává funkci donoru pro enzym následující. Funkční seskupení enzymů a elektronových přenašečů, které uskutečňuje sérii následných redoxních reakcí vázaných na biologickou membránu, nazýváme řetězec přenosu elektronu (angl. electron transfer chain).

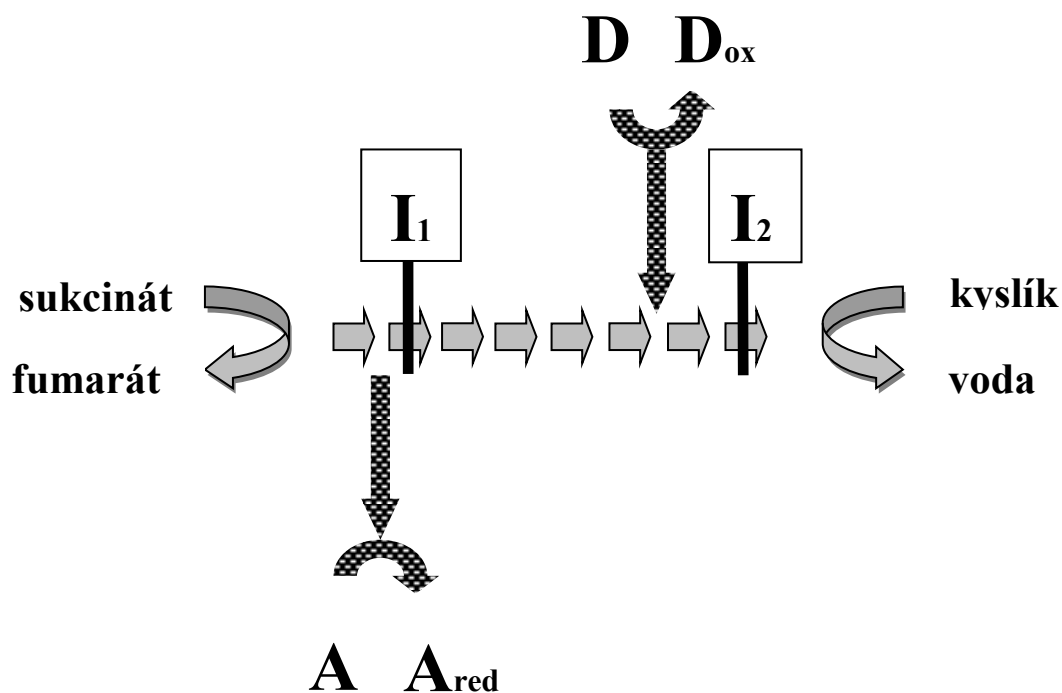
Krátké řetězce přenosu elektronu typicky nacházíme v endoplasmatickém retikulu, kde se uplatňují při syntéze nenasycených mastných kyselin, steroidních hormonů a transformací cizorodých látek. Z hlediska energetiky buňky mají zásadní význam dlouhé řetězce obsažené v membránách přeměňujících energii (vnitřní mitochondriální membrána, cytoplazmatická membrána bakterií, membrána tylakoidu chloroplastu). Přenos redukčních ekvivalentů se v nich uskutečňuje napříč lipidovou dvojrůstvou a je spojen se vznikem transmembránových rozdílů elektrického potenciálu a pH. Ty spolu tvoří tzv. „protonový gradient“, formu energie využitelnou k tvorbě adenosintrifosfátu (ATP) z adenosindifosfátu (ADP) a fosfátu (P_i).

Vstupním donorem mitochondriálního řetězce přenosu elektronu bývá NADH (oxiduje se na NAD⁺) nebo sukcinát (oxiduje se na fumarát) a konečným (terminálním) akceptorem je kyslík (redukuje se na vodu). Protože se zde spotřebovává vdechovaný kyslík, hovoříme o mitochondriálním respiračním řetězci (respirace = dýchání). U bakterií může být kyslík nahrazen jiným terminálním akceptorem, např. dusičnanem nebo síranem (anaerobní respirace). V chloroplastu se při tzv. světelné fázi fotosyntézy oxiduje voda na kyslík a NADP⁺ se redukuje na NADPH. Elektrony zde tedy tečou „obráceně“ než při respiraci. Aby to bylo energeticky možné, obsahuje zde přítomný řetězec dva fotosystémy (fotosystém I a II),

schopné využívat k pohonu redoxních reakcí energie slunečního záření (fotosyntetický přenos elektronu).

Oproti rozpustným enzymům mají membránové respirační a fotosyntetické řetězce značně složitější stavbu. Pro jejich snazší studium se proto někdy nejdříve rozdělují na menší součásti například pomocí solubilizace neiontovými detergenty a následné chromatografie. Separace funkční využívá umělých donorů a akceptorů, kombinovaných případně se specifickými inhibitory. Umělý donor je nefyziologická redoxaktivní látka, která dodává elektrony definované složce elektrontransportního řetězce; umělý akceptor naproti tomu z určitého místa řetězce elektrony odebírá. Protože oxidovaná a redukovaná forma těchto látek se liší svými absorpčními spektry, lze jejich vzájemné přeměny sledovat jako změny absorbance. Inhibitor se váže na některou oxidoreduktasu řetězce a brání průběhu jí katalyzované reakce.

Metodu funkční separace u respiračního řetězce si budeme ilustrovat pomocí následujícího schématu:



Respirační inhibitory I_1 i I_2 blokují přenos elektronů ze sukcinátu na kyslík, nebrání však redukcí umělého akceptoru A sukcinátem. Enzymová oxidace umělého donoru D kyslíkem je inhibována I_2 , ale nikoli I_1 . Měřením vlivu inhibitorů na jednotlivé reakce tedy můžeme získat relativní pořadí míst interakce donorů, akceptorů a inhibitorů s řetězcem (v uvedeném schématu A, I_1 , D, I_2).

CÍL PRÁCE

A) Inhibitory respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*

Cytoplazmatická membrána aerobně rostlé půdní bakterie *P. denitrificans* obsahuje respirační řetězec, který se podobá respiračnímu řetězci mitochondrií. Přenos elektronů ze sukcinátu na kyslík je inhibován kyanidem, malonátem a antimycinem. Místa zásahu uvedených inhibitorů budete v úloze lokalizovat s využitím redoxaktivních látek 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCIP) a N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiaminu (TMPD). Před vlastními experimenty s biologickým materiálem si u DCIP a TMPD jednoduchými chemickými zkouškami ukážete existenci redoxních přechodů, jež jsou provázeny barevnými změnami.

B) Oxidace vody chloroplasty a vliv herbicidu diuronu

Osvětlené chloroplasty oxidují vodu na molekulový kyslík. Jeho obsah v roztoku před a po osvětlení průběžně zaznamenáte pomocí Clarkovy elektrody. Proudová odezva tohoto ampérometrického čidla je přímo úměrná koncentraci analytu. Současně s produkcí O₂ se v chloroplastech generuje biologické redukční činidlo, jež může předávat elektrony vhodnému umělému akceptoru. Redukce umělého akceptoru chloroplasty (nebo fragmenty jejich membrán) při osvětlení se nazývá Hillova reakce (podle Robina Hilla, který ji poprvé popsal v roce 1937). Inhibice oxidace vody je základem působení některých látek, používaných k hubení rostlin jako herbicidy. To si v úloze sami ověříte při studiu vlivu herbicidu diuronu.

PRAKTICKÁ ČÁST

A) Inhibitory respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*

Materiál a vybavení:

membrány z buněk *Paracoccus denitrificans* (cca 3 mg proteinu/ml)

12,5 mmol.l⁻¹ DCIP

0,1 mol.l⁻¹ TMPD

10 mmol.l⁻¹ TMPD

kyselina askorbová - krystalky

peroxodisíran amonný - krystalky

50 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH = 7,3)

50 mmol.l⁻¹ kyselina jantarová

10 mmol.l⁻¹ kyselina malonová

0,1 mg. ml⁻¹ roztok antimycinu (v ethanolu!)

10 mmol.l⁻¹ kyanid sodný

mikrotitrační destička, mikropipety, špachtlička, stopky, jehla na míchání

Upozornění: umělohmotné špičky k mikropipetám vyměňujte za nové tak, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku – např. jinými inhibitory.

Pokud máte směs v jamce mikrotitrační destičky zamíchat, proveďte míchání buď špičkou z mikropipety, kterou jste použili jako poslední nebo jehlou. Míchejte jen jednou, a to bezprostředně po napipetování posledního z roztoků! Později nemíchat!

Dodržujte bezpečnostní zásady při práci s chemikáliemi, jsou toxické!

EXPERIMENT 1

Roztok TMPD připravte přidavkem 0,5 ml vody do mikrozkušavky s navážkou pevného TMPD. TMPD se oxiduje vzdušným kyslíkem na Wursterovu modř. Jestliže je roztok TMPD, který jste připravili, zbarven modře, přidejte k němu malý krystalek kyseliny askorbové a promíchejte – dojde k odbarvení roztoku. V experimentech (1 a 2) používejte **bezbarvý 0,1 mol.l⁻¹ roztok TMPD**.

V jamkách mikrotitrační destičky proveďte následující reakce – dávkujte podle tabulky:

oxidační činidlo – peroxidisíran amonný - roztok, ke krystalkům přidejte 200 μl vody

redukční činidlo – kyselina askorbová, krystalky

jamka č. 1	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 20 μl	H ₂ O 200 μl	oxidační činidlo 2 μl	pozorování: modrá →
jamka č. 2	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 20 μl	H ₂ O 200 μl	redukční činidlo - krystalky	pozorování: modrá →
jamka č. 3	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 20 μl	H ₂ O 200 μl	oxidační činidlo 2 μl	pozorování: bezbarvá →
jamka č. 4	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 20 μl	H ₂ O 200 μl	redukční činidlo - krystalky	pozorování: bezbarvá →

Na základě svých pozorování (alespoň 10 minut) vyberte správné varianty:

DCIP

oxidovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

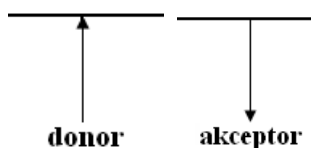
redukovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

TMPD

oxidovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

redukovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

Výsledky pokusu znázorněte pomocí šipek:



EXPERIMENT 2

Dávkujte do mikrotitrační destičky jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. Ihned po přidání TMPD zapněte stopky a směs zamíchejte (jehlou).

jamka č. 1	membrány 30 µl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 µl	H ₂ O 50 µl	bez inhibitoru	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 5 µl
jamka č. 2	membrány 30 µl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 µl	H ₂ O 40 µl	10 mM NaCN 10 µl	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 5 µl
jamka č. 3	membrány 30 µl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 µl	H ₂ O 45 µl	10 mM kys. malonová 5 µl	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 5 µl
jamka č. 4	membrány 30 µl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 µl	H ₂ O 45 µl	antimycin (0,1 mg. ml ⁻¹) 5 µl	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD 5 µl

Sledujte časový průběh (cca 10 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svá pozorování zapište:

jamka č. 1: bezbarvá →

jamka č. 2: bezbarvá →

jamka č. 3: bezbarvá →

jamka č. 4: bezbarvá →

TMPD působí jako elektronový DONOR/AKCEPTOR

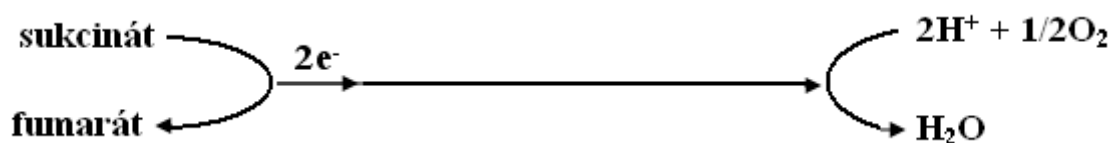
Před místem napojení TMPD inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCN

Za místem napojení TMPD inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCN

Místo napojení TMPD na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky



zaznamenejte: **inhibitor**



EXPERIMENT 3

7

Dávkujte do mikrotitrační destičky jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. Ihned po přidání DCIP zapněte stopky a směs zamíchejte (jehlou).

jamka č. 1	membrány 30 μ l	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μ l	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μ l	H ₂ O 45 μ l	bez inhibitoru	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 5 μ l
jamka č. 2	membrány 30 μ l	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μ l	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μ l	H ₂ O 35 μ l	10 mM NaCN 10 μ l	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 5 μ l
jamka č. 3	membrány 30 μ l	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μ l	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μ l	H ₂ O 40 μ l	10 mM kys. malonová 5 μ l	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 5 μ l
jamka č. 4	membrány 30 μ l	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μ l	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μ l	H ₂ O 40 μ l	antimycin (0,1 mg. .ml ⁻¹) 5 μ l	12,5 mmol.l ⁻¹ DCIP 5 μ l

Sledujte časový průběh (cca 10 – 15 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svá pozorování zapište:

jamka č. 1: modrá →

jamka č. 2: modrá →

jamka č. 3: modrá →

jamka č. 4: modrá →

DCIP působí jako elektronový DONOR/AKCEPTOR

Před místem napojení DCIP inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCIN

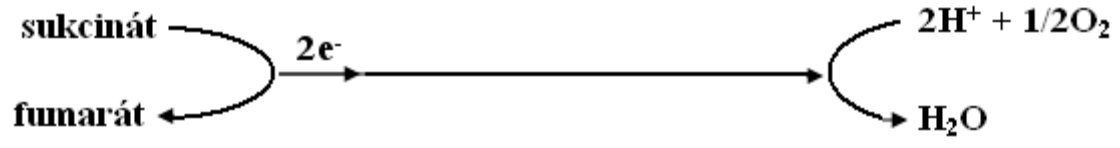
Za místem napojení DCIP inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCIN

Místo napojení DCIP na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky



zaznamenejte: **inhibitor**

Úloha 12: Biologické řetězce přenosu elektronů



EXPERIMENT 4

Jestliže je roztok **10 mM TMPD**, který máte k dispozici, bezbarvý, připravte si z něj Wursterovu modř tak, že 200 μl **10 mM TMPD** zředíte ve zkumavce 200 μl destilované vody a přidáte 2 μl roztoku peroxidisíranu (viz experiment 1). Jestliže má tmavé zbarvení, není potřeba jej upravovat (Wursterova modř vznikla oxidací TMPD vzdušným kyslíkem). Pak dávkujte do mikrotitrační destičky jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. Ihned po přidání Wursterovy modři zapněte stopky a směs zamíchejte (jehlou).

jamka č. 1	membrány 30 μl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μl	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μl	H ₂ O 45 μl	bez inhibitoru	Wursterova modř 5 μl
jamka č. 2	membrány 30 μl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μl	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μl	H ₂ O 35 μl	10 mM NaCN 10 μl	Wursterova modř 5 μl
jamka č. 3	membrány 30 μl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μl	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μl	H ₂ O 40 μl	10 mM kys. malonová 5 μl	Wursterova modř 5 μl
jamka č. 4	membrány 30 μl	50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl 170 μl	50 mmol.l ⁻¹ kys. jantarová 5 μl	H ₂ O 40 μl	antimycin (0,1 mg/ml) 5 μl	Wursterova modř 5 μl

Sledujte časový průběh (cca 5 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svá pozorování запиšte:

jamka č. 1: modrá →

jamka č. 2: modrá →

jamka č. 3: modrá →

jamka č. 4: modrá →

Wursterova modř působí jako elektronový DONOR/AKCEPTOR

Před místem napojení Wursterovy modři inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCIN

Za místem napojení Wursterovy modři inhibuje KYANID – MALONÁT – ANTIMYCIN

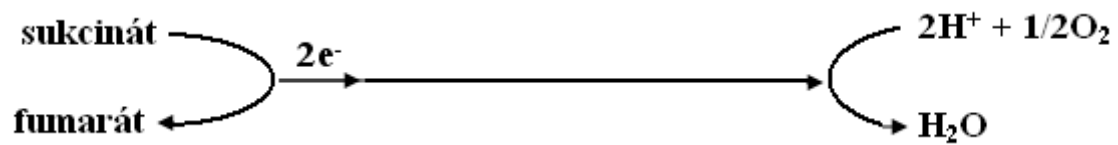
Úloha 12: Biologické řetězce přenosu elektronů

Místo napojení Wursterovy modři na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů

10

inhibitor

schematicky zaznamenejte:



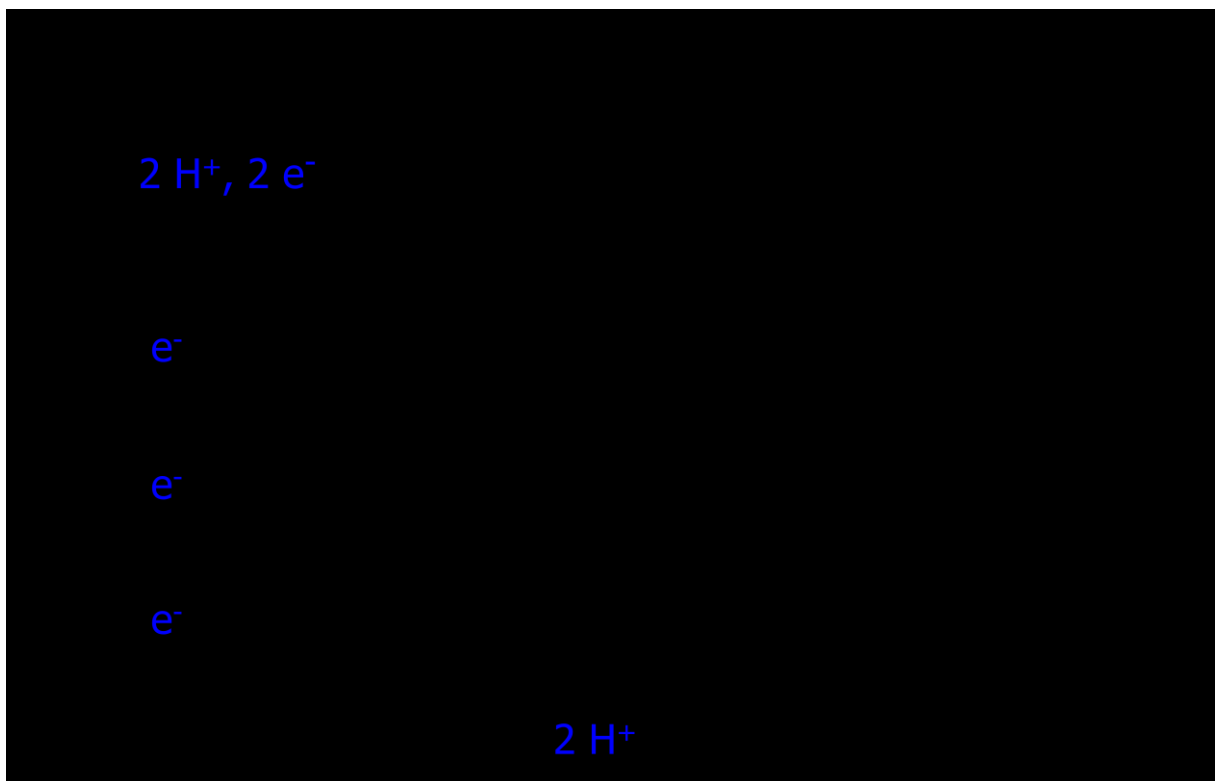
Úloha 12: Biologické řetězce přenosu elektronů

Do následujícího závěrečného schématu respiračního řetězce zakreslete ve správném pořadí místa napojení DCIP, TMPD a Wursterovy modři a místa inhibice kyanidem, malonátem a antimycinem.

11



V dalším obrázku se pokuste zakreslit konkrétní místa napojení DCIP a TMPD a místa zásahu inhibitorů (malonát, antimycin, kyanid).



B) Oxidace vody chloroplasty a vliv herbicidu diuronu

Materiál a vybavení:

suspenze chloroplastů (cca 80 μg chlorofylu/ml; koncentrace určená z A_{652} suspenze dle vztahu $\mu\text{g chlorofylu/ml} = 28,98 \cdot A_{652}$)

50 mmol.l^{-1} fosfátový pufr (pH = 7,5)

50 mmol.l^{-1} fosfátový pufr (pH = 6,5)

0,5 mmol.l^{-1} DCIP ve fosfátovém pufru (50 mmol.l^{-1} , pH 6,5)

dimethylsulfoxid (DMSO)

roztoky diuronu v DMSO: $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l^{-1} (nižší koncentrace připraveny postupným desetinásobným ředěním)

komůrka, kyslíková elektroda s lístkem tabáku, notebook, mikrotitrační destička, umělohmotná zkumavka (Eppendorf), mikropipety, zdroj světla, stopky

Postup:

a) Produkce kyslíku při fotosyntéze

Tato část cvičení bude provedena demonstračně.

Zapište:

Při osvětlení listu v komůrce červeným světlem z diody

- se koncentrace kyslíku v blízkosti kyslíkové elektrody ZVYŠUJE/SNIŽUJE (vyberte správnou možnost) – rychlost fotosyntézy ROSTE/KLESÁ (vyberte správnou možnost)

Při vypnutí světla

- se koncentrace kyslíku v blízkosti kyslíkové elektrody ZVYŠUJE/SNIŽUJE (vyberte správnou možnost) – rychlost fotosyntézy ROSTE/KLESÁ (vyberte správnou možnost)

Zakreslete tvar závislosti, kterou jste pozorovali. Vysvětlete význam jednotlivých jeho částí z pohledu fotosyntézy.

b) Inhibiční působení diuronu

- 1) Nachystejte si pomůcky pro měření (zdroj světla, přednastavené mikropipety se špičkami, chemikálie, mikrotitrační destičky), protože celý proces přípravy vzorků v dalším kroku musí proběhnout co nejrychleji!
- 2) Chloroplastovou suspenzi před použitím zhomogenizujte na vortexu, aby chloroplasty v ní obsaženy nebyly usazeny na dně.
- 3) Do mikrotitrační destičky napipetujte přesné množství jednotlivých chemikálií – **bez chloroplastové suspenze** – tu napipetujete do všech jamek až nakonec. Dávkujte podle tabulky.

DESTIČKA 1

číslo vzorku	Na fosfát (50 mmol.l ⁻¹ , pH 6,5) μl	DCIP (0,5 mmol.l ⁻¹) v Na fosfátu (50 mmol.l ⁻¹ , pH 6,5) μl	DMSO μl	roztok diuronu v DMSO	chloroplastová suspenze μl
1	168	-	2	-	30
2	-	168	2	-	30
3	-	168	-	1.10 ⁻⁶ mol.l ⁻¹ 2 μl	30
4	-	168	-	1.10 ⁻⁵ mol.l ⁻¹ 2 μl	30
5	-	168	-	1.10 ⁻⁴ mol.l ⁻¹ 2 μl	30
6	-	168	-	1.10 ⁻³ mol.l ⁻¹ 2 μl	30
7	-	168	-	1.10 ⁻² mol.l ⁻¹ 2 μl	30

DESTIČKA 2

číslo vzorku	Na fosfát (50 mmol.l ⁻¹ , pH 6,5) μl	DCIP (0,5 mmol.l ⁻¹) v Na fosfátu (50 mmol.l ⁻¹ , pH 6,5) μl	DMSO μl	chloroplastová suspenze μl
1	168	-	2	30
2	-	168	2	30

- 4) Do všech jamek přidejte chloroplastovou suspenzi a jemně zamíchejte. Později už nemíchejte! Druhou mikrotitrační destičku obalte hliníkovou fólií. První destičku položte na zdroj světla a zapněte lampu.
- 5) Sledujte průběh redukce DCIP v jednotlivých vzorcích. Srovnajte je i se vzorkem č. 2 na destičce 2, který byl zakrytý hliníkovou fólií. Zaznamenejte pozorování a výsledky. Odhadněte, jaké výsledné minimální koncentrace diuronu je zapotřebí k úplné inhibici reakce.

Zaznamenejte pozorování:

DESTIČKA 1

- vzorek č. 1: (barva) →
vzorek č. 2: (barva) →
vzorek č. 3: (barva) →
vzorek č. 4: (barva) →
vzorek č. 5: (barva) →
vzorek č. 6: (barva) →
vzorek č. 7: (barva) →

DESTIČKA 2

- vzorek č. 1: (barva) →
vzorek č. 2: (barva) →

Výsledky vysvětlete:

DCIP působí jako elektronový DONOR/AKCEPTOR

DESTIČKA 1

- ve vzorku č. 1 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 2 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 3 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 4 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 5 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 6 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 7 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:

DESTIČKA 2

- ve vzorku č. 1 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění:
ve vzorku č. 2 oxidace vody probíhala/neprobíhala – zdůvodnění: