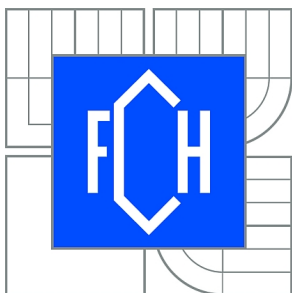




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ OBSAHU ENZYMU RUBISCO V LISTECH

DETERMINATION OF RUBISCO ENZYME CONTENT IN LEAVES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

VILIAM HLAVÁČEK

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0595/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Viliam Hlaváček	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu enzymu Rubisco v listech

Zadání bakalářské práce:

V teoretické části práce pojednat stručně o základních procesech fotosyntézy. Podrobněji se věnovat enzymu Rubisco a zvláště různým metodám stanovení jeho obsahu.

V experimentální části stanovit obsah Rubisco v listech metodou SDS-PAGE s denzitometrickou kvantifikací velké podjednotky enzymu, stanovit citlivost a linearitu metody a porovnat účinnost různých způsobů extrakce Rubisco.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Viliam Hlaváček
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Cieľom bakalárskej práce bola optimalizácia podmienok pre stanovenie obsahu enzýmu Rubisco metódou SDS-PAGE a stanovenie vhodného postupu extrakcie proteínov z rastlinného pletiva. Taktiež bolo stanovené aj rozmedzie koncentrácií Rubisco, v ktorých je daná metóda lineárna. Pre účely optimalizácie bolo testované delenie proteínov na géloch rôznej hustoty pri pôsobení rôzne veľkého napätia. V rámci práce boli otestované aj dva rôzne typy extrakcie proteínov s niekoľkými modifikáciami a to priama extrakcia do TRIS pufru a extrakcia metódou TCA/acetón.

Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri separácii bielkovín na 8% géle a napätí 90 V, pokiaľ bolo na gél dávkaných 5 µl vzorky. Za týchto podmienok bola zóna veľkej podjednotky enzýmu Rubisco dostatočne oddelená od ostatných zón, takže pri denzitometrickom hodnotení poskytovala kvalitné píky s dobrou základnou líniou. Linearita metódy za týchto podmienok bola v rozmedzí koncentrácií 0,125–1,0 mg enzýmu v 1 ml vzorky.

Priama extrakcia enzýmu do TRIS pufru bola menej účinná ako vyzrážanie bielkovín kyselinou trichlóroctovou v acetóne s následným rozpustením zrazeniny. Rozpustenie zrazeniny proteínov bolo však obtiažne, najlepšie sa pritom osvedčil tiomočovínový vzorkový pufer podľa Amalraja et al. [17].

Abstract

The aim of the bachelor thesis was to optimize the conditions of the Rubisco enzyme quantity determination by the SDS-PAGE method and the determination of appropriate protein extraction method from plant tissue. Also the concentration range for which the method is linear was determined. Gels with different density ran under different voltages during the electrophoresis were tested for the aims of optimization. Also two different protein extraction methods were used. These were direct extraction to TRIS buffer and extraction with TCA/acetone method.

The best results were obtained with protein separation on 8% gel and voltage of 90 V, while the volume of loaded sample was 5 µl. Under these conditions was the Rubisco great subunit band enough separated from the other protein bands, so that the densitometric evaluation provided better quality peaks with good baseline. The linearity of method under these conditions was in concentration range 0,125–1,0 mg of enzyme in 1 ml of sample.

Direct extraction of the enzyme with TRIS buffer was less effective than the precipitation of proteins with trichloroacetic acid in acetone followed with dissolution of the precipitate. The best buffer for the protein pellet dissolution was the thiourea buffer prepared according to Amalraj et al. [17].

Kľúčové slová

Rubisco, optimalizácia SDS-PAGE, extrakcia listových proteínov

Key words

Rubisco, SDS-PAGE optimization, leaf protein extraction

HLAVÁČEK, V. *Stanovení obsahu enzymu Rubisco v listech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 36 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Rád by som týmto poďakoval za odborné vedenie pri vypracovaní mojej bakalárskej práce, cenné rady a pripomienky vedúcemu práce PhDr. Miroslavovi Hrstkovi, Ph.D. Ďalej ďakujem za odborné rady a pripomienky doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc.

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	FOTOSYNTÉZA.....	8
2.1.1	Svetelná fáza fotosyntézy	9
2.1.2	Temná fáza fotosyntézy – Calvinov cyklus	9
2.1.2.1	Syntetická fáza	10
2.1.2.2	Regeneračná fáza.....	10
2.1.3	Kontrolné mechanizmy Calvinovho cyklu.....	12
2.2	RIBULOZA-1,5-BISFOSFÁTKARBOXYLASA/OXYGENASA	12
2.2.1	História	12
2.2.2	Štruktúra	13
2.2.3	Syntéza	14
2.2.4	Aktivácia enzýmu.....	15
2.2.4.1	Rubisco aktivasa.....	15
2.2.5	Karboxylácia a oxygenácia	15
2.3	METÓDY STANOVENIA OBSAHU ENZÝMU RUBISCO	16
2.3.1	HPLC.....	16
2.3.2	Immunologické metódy.....	16
2.3.2.1	ELISA.....	16
2.3.2.2	Rádioimunožrážacia metóda	17
2.3.3	Gélová elektroforéza	17
2.3.4	Kapilárna elektroforéza	18
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	19
3.1	EXTRAKCIA ENZÝMU RUBISCO.....	19
3.1.1	Prístroje	19
3.1.2	Chemikálie	19
3.1.3	Príprava vzoriek	19
3.1.3.1	Priama extrakcia proteínov do TRIS pufru	19
3.1.3.2	Extrakcia proteínov metódou TCA/acetón.....	20
3.2	STANOVENIE OBSAHU ENZÝMU RUBISCO METÓDOU SDS-PAGE.....	20
3.2.1	Prístroje	20
3.2.2	Chemikálie	20
3.2.3	Roztoky pre prípravu gélov.....	21
3.2.4	Roztoky pufrov.....	21
3.2.5	Roztoky k zviditeľneniu bielkovín.....	21
3.2.6	Príprava gélov	21
3.2.6.1	Separačné gély.....	22
3.2.6.2	Zaostrovaný gél	22
3.2.7	Príprava štandardov	22
3.2.8	Elektroforéza	23
3.2.9	Vizualizácia bielkovín.....	23
3.2.10	Vyhodnotenie gélov	23

4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	24
4.1	LINEARITA.....	24
4.2	EXTRAKCIA ENZÝMU RUBISCO.....	29
4.3	SEPARÁCIA A KVANTIFIKÁCIA ENZÝMU RUBISCO.....	30
5	ZÁVER.....	33
6	POUŽITÁ LITERATÚRA	34
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	36

1 Úvod

Enzým Rubisco je kľúčovým z hľadiska fotosyntézy nakoľko práve tento enzým fixuje CO_2 zo vzduchu, ktorý zabudováva do molekúl sacharidov. Dochádza pritom k prevodu uhlíku z jeho najviac oxidovanej formy na redukované formy pričom sa fixuje fotochemická energia. Tým pádom tvorí základ potravinového reťazca z čoho vyplýva, že či už priamo, alebo nepriamo, na ňom závisí všetok život na Zemi.

Napriek svojej dôležitosti má však tento enzým veľmi malú katalytickú aktivitu ($k_{\text{cat}} = 2$ až 12 s^{-1}). Tá je však vykompenzovaná množstvom enzýmu, v listoch tvorí totiž podľa druhu rastliny až 50 % zo všetkých proteínov. Jeho dôležitosť z hľadiska výživy z neho spravila najštudovanejší rastlinný proteín súčasnosti. Výskum tohto enzýmu smeruje jednak k vytvoreniu efektívnejšej formy enzýmu genetickou manipuláciou, ale taktiež sa zameriava na zistenie vplyvu súčasných klimatických zmien, hlavne zvýšeného obsahu CO_2 v atmosfére, na aktivitu a množstvo tohto enzýmu. Doterajšie štúdie poukazujú práve na to, že sa síce pri vyšších koncentráciách oxidu uhličitého zvýši aktivita enzýmu, no zároveň poklesne jeho množstvo. Nakoľko sa tento enzým v listoch vyskytuje v aktívnej aj neaktívnej forme, nie je možné jeho množstvo určiť priamym meraním aktivity. Preto je nutné jeho množstvo určiť vhodnou analytickou metódou.

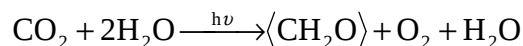
Pre stanovenie množstva Rubisca bolo použitých niekoľko metód s rôznymi modifikáciami. Patria medzi ne imunologické metódy, HPLC, kapilárna a gélová elektroforéza. Najpoužívanjšou je práve gélová elektroforéza na polyakrylamidovom géle s použitím dodecylsírany sodného. Okrem metódy separácie bielkovín v skúmanej vzorke je však dôležitá aj samotná extrakcia a príprava týchto vzoriek z rastlinného tkaniva.

Cieľom tejto práce bolo jednak porovnať účinnosť rôznych spôsobov extrakcie Rubisco z rastlinného materiálu a tiež optimalizácia podmienok elektroforézy tak, aby bolo možné zónu zodpovedajúcu veľkej podjednotke Rubisco čo najlepšie denzitometricky kvantifikovať. Vzhľadom k tomu, že metóda by mala byť rutinne používaná k spracovaniu veľkého množstva vzoriek, bola v celej práci kladená zreteľ jednak na účinnosť jednotlivých metód, ale aj na jednoduchosť a transparentnosť ich prevedenia.

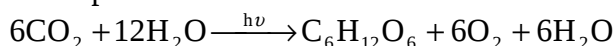
2 Teoretická časť

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je základným fotochemickým procesom vďaka ktorému je prevedený uhlík zo svojej najviac oxidovanej, nízko energetickej formy, oxidu uhličitého, na redukované produkty, sacharidy. Redukčná sila na zabudovanie oxidu uhličitého do sacharidov pochádza u vyšších zelených rastlín z vodíku vody. Dochádza teda k spráženiu redukcie CO_2 s oxidáciou H_2O :

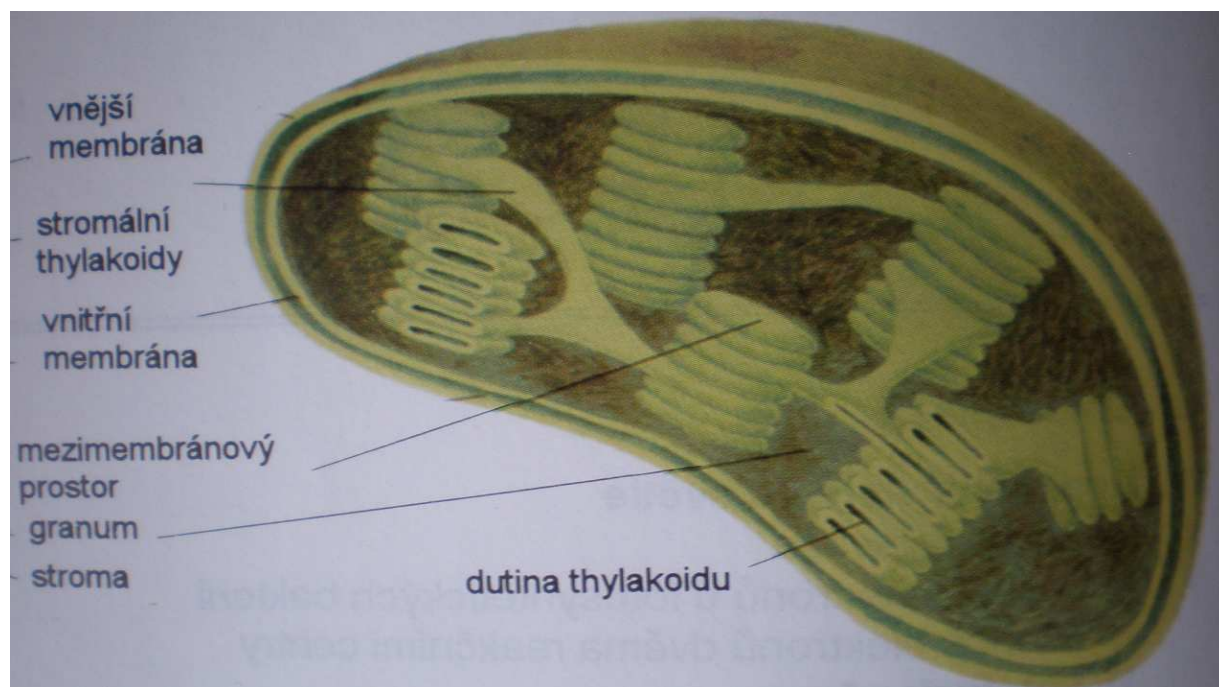


pri reakcii vzniká kyslík a monosacharidová jednotka (CH_2O) molekuly sacharidu, ktorej vznik možno zjednodušene zapísať:



Poznáme však aj anoxygénnu fotosyntézu, pri ktorej nedochádza k uvoľňovaniu O_2 nakoľko sú donormi vodíku namiesto vody iné zlúčeniny ako H_2S , H_2 alebo aj jednoduché organické kyseliny. Tento druh fotosyntézy prebieha u nižších fotosyntetizujúcich organizmov, ktoré fotosyntetizujú za anaeróbných podmienok.

U fotosyntetizujúcich eukaryotických buniek vyšších rastlín a rias prebieha fotosyntéza v chloroplastoch (obr. 2.1). Tieto organely sú ohraničené dvoma membránami a obsahujú mnoho sploštených vezikúl, tylakoidov, zoskupených do väčších celkov, gran. Vnútorň priestor tylakoidov býva označovaný ako lumen. V membránach tylakoidov sú umiestnené všetky zlúčeniny nutné pre priebeh svetelnej fázy fotosyntézy. Patria medzi ne pigmenty zachytávajúce svetlo, na pigmenty bohatý fotosystém I a II s reakčnými centrami fotosyntézy P680 a P700, prenášače elektrónov, ATP-syntetasy a ďalšie enzymatické komplexy. Oproti tomu stróma obsahuje enzýmy potrebné pri syntetickej fáze [1,2].

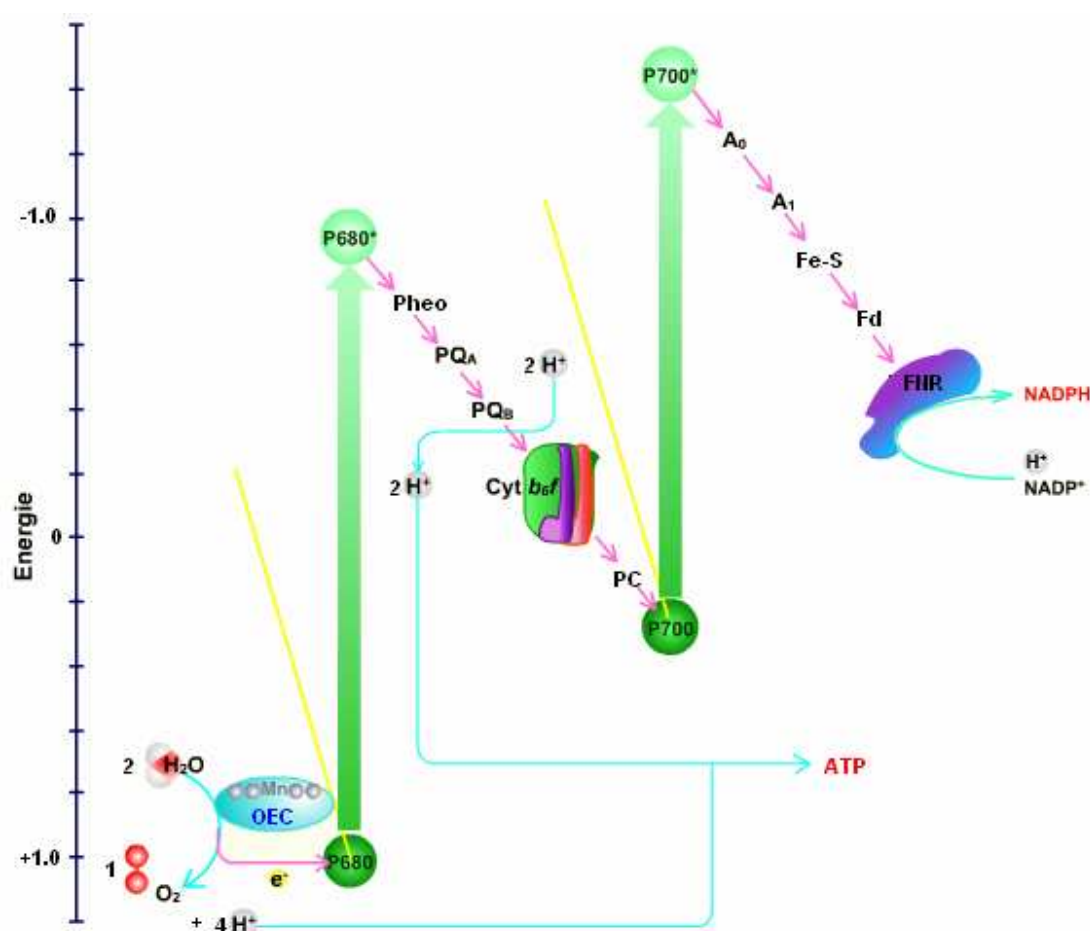


Obr. 2.1 Schematický náčrt chloroplastu. Prevzaté z [2]

2.1.1 Svetelná fáza fotosyntézy

Priebeh fotosyntézy je uskutočňovaný v dvoch oddelených, ale na seba nadväzujúcich, fázach. Prvou je svetelná fáza, počas ktorej sa zachytáva a premieňa energia fotónov na energiu chemickú. Energia excitovaných elektrónov sa pri tom využíva, prostredníctvom oxidoreduktas, na produkciu makroergických zlúčenín ako ATP a NADPH. Túto fázu možno rozdeliť na štyri hlavné procesy a to:

- Fotochemická excitácia fotoreceptoru, čiže zachytenie slnečného žiarenia chlorofylom, výsledkom čoho je presun elektrónu do vyšších energetických hladín.
- Fotolýza vody poskytujúca redukujúci vodík.
- Fotoredukcia NADP^+ pri ktorej sa na redukciu využívajú excitované elektróny chlorofylu a vodík z predchádzajúceho kroku.
- Fotofosforylácia, ktorá dáva vznik ATP



Obr. 2.2 Z-schéma svetelnej fázy fotosyntézy. Prevzaté z [11].

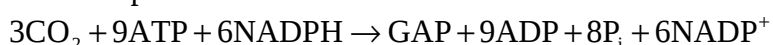
2.1.2 Temná fáza fotosyntézy – Calvinov cyklus

Druhou fázou, ktorá prebieha paralelne so svetelnou, je temná fáza fotosyntézy. Táto fáza prebieha v stróme chloroplastov a v cytosóle. Je súborom enzýmových reakcií prebiehajúcich v cyklických sledoch, výsledkom ktorých je redukcia CO_2 na sacharidy. Najznámejšou metabolickou cestou ich vzniku je Calvinov cyklus [1].

Tento cyklus je metabolickou dráhou, pri ktorej sa spotrebúvajú produkty svetelnej fázy, ATP a NADPH, na zabudovanie CO₂ do sacharidov. Produkciu základného substrátu pre vznik ostatných produktov, glyceraldehyd-3-fosfátu, možno rozdeliť do dvoch fáz a to syntetickej a regeneračnej.

2.1.2.1 Syntetická fáza

V syntetickej fáze dochádza k samotnej fixácii CO₂ na ribulosa-1,5-bisfosfát pričom vzniká nestály šesťuhlíkový medziprodukt ihneď štiepený na dve molekuly 3-fosfoglycerátu. Toto prevedenie nereaktívneho CO₂ na aktivovanú formu je katalyzované enzýmom ribulosa-1, 5-bisfosfátkarboxylasou. 3-Fosfoglycerát je následne za spotreby NADPH a 2 ATP zredukovaný na glyceraldehyd-3-fosfát (GAP) cez 1,3-bisfosfoglycerát. GAP je prekursorom pre vznik glukosa-1-fosfátu a iných biosyntetických produktov. Sumárnu stechiometriu Calvinovho cyklu možno zapísať nasledovne:



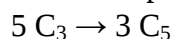
Primárny produkt fotosyntézy, ktorým je GAP, je potom premieňaný rôznymi metabolickými dráhami na rôznorodé produkty. Napríklad dochádza aldolovou kondenzáciou k tvorbe fruktosa-6-fosfátu a ten môže byť enzymaticky ďalej konvertovaný na glukosu-1-fosfát (G1P). G1P je prekursorom pre rôzne iné vyššie sacharidy ako napríklad sacharosu, ktorá je hlavným transportným sacharidom pre nefotosyntetizujúce bunky. Z G1P takisto vznikajú polysacharidy ako napríklad zásobný škrob či celulóza, ako primárna štruktúra bunkových stien. GAP je však prekursorom aj pre vznik aminokyselín a mastných kyselín [1,2].

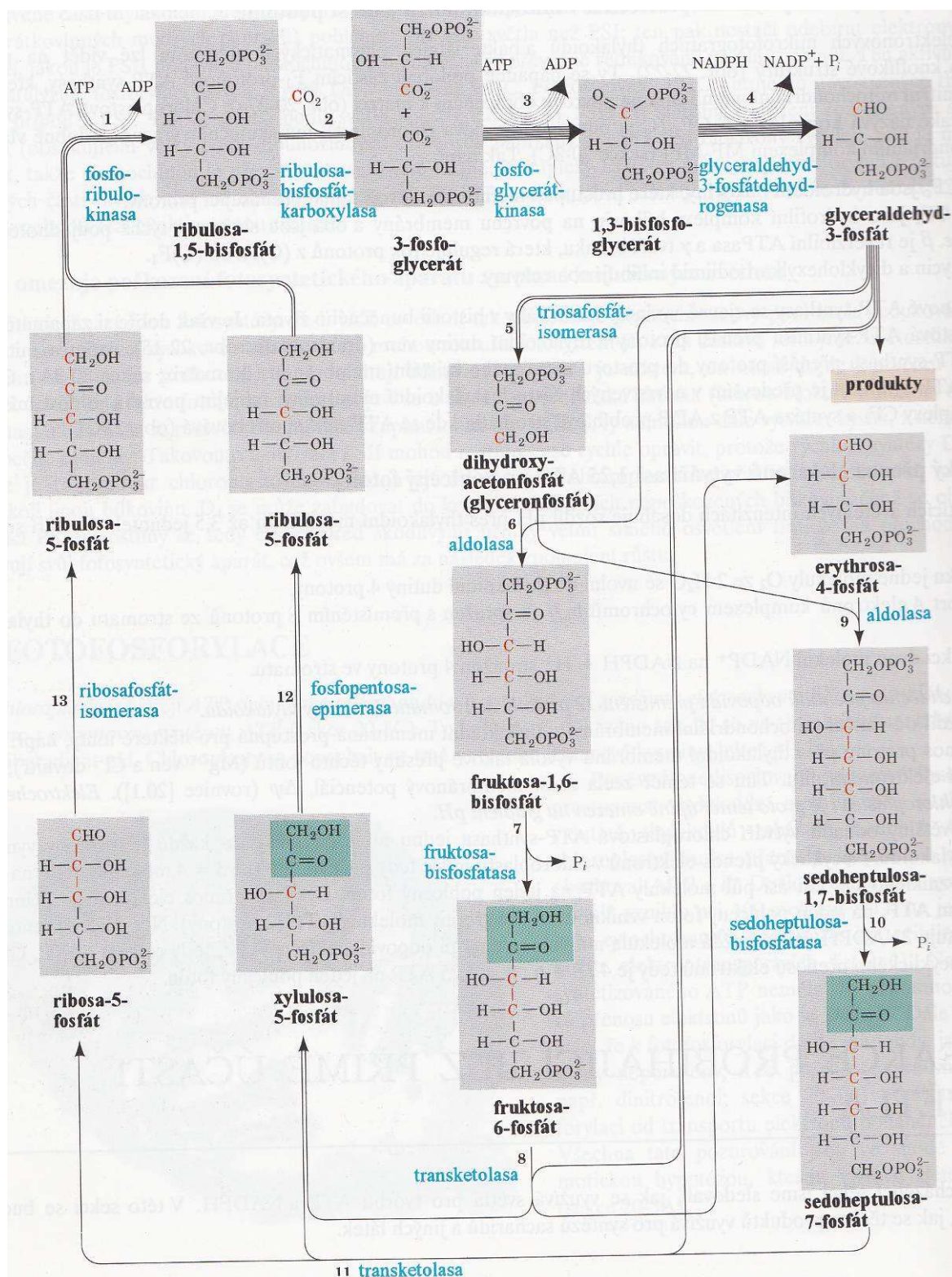
2.1.2.2 Regeneračná fáza

Aby sa mohol cyklus obnoviť je potrebná regenerácia ribulosa-5-fosfátu, na ktorý sa môžu viazať ďalšie molekuly CO₂. To zabezpečuje zložitý rad transglykozidačných reakcií znázornených na obrázku 2.2. Pri týchto reakciách nedochádza k ďalšej spotrebe voľnej energie vo forme ATP, ani k spotrebe redukčného činidla vo forme NADPH, ako to vyplýva aj zo schémy. Túto fázu možno zjednodušene zhrnúť do štyroch skupín reakcií:

6. $\text{C}_3 + \text{C}_3 \rightarrow \text{C}_6$
8. $\text{C}_3 + \text{C}_6 \rightarrow \text{C}_4 + \text{C}_5$
9. $\text{C}_3 + \text{C}_4 \rightarrow \text{C}_7$
11. $\text{C}_3 + \text{C}_7 \rightarrow \text{C}_5 + \text{C}_5$

Číslovanie reakcií zodpovedá číslovaníu na obrázku 2.3 a sumárne možno teda stechiometriu týchto rovníc napísať nasledovne:





Obr. 2.3 Calvinov cyklus: počet čiar v šípkach naznačuje počet molekúl reagujúcich v jednom kroku pri jednom prebehnutí cyklu, ktorý premení tri molekuly CO₂ na jednu molekulu GAP. Pre zachovanie prehľadnosti sú všetky cukry uvedené v lineárnej forme, v skutočnosti sa však hexosy a heptosy vyskytujú hlavne v cyklickej forme. Prevzaté z [2]

2.1.3 Kontrolné mechanizmy Calvinovho cyklu

Za neprístupu svetla využívajú rastliny, rovnako ako iné organizmy, svoje nutričné rezervy pre tvorbu ATP a NADPH. Nakoľko sú v stróme obsiahnuté rovnako enzýmy pre glykolýzu ako aj enzýmy zúčastňujúce sa Calvinovho cyklu, majú rastliny svetlocitlivý mechanizmus regulácie Calvinovho cyklu, aby sa zabránilo spotrebe katabolicky vytvoreného ATP a NADPH. Aktivita Rubisco je v súhrne regulovaná tromi svetelne závislými faktormi:

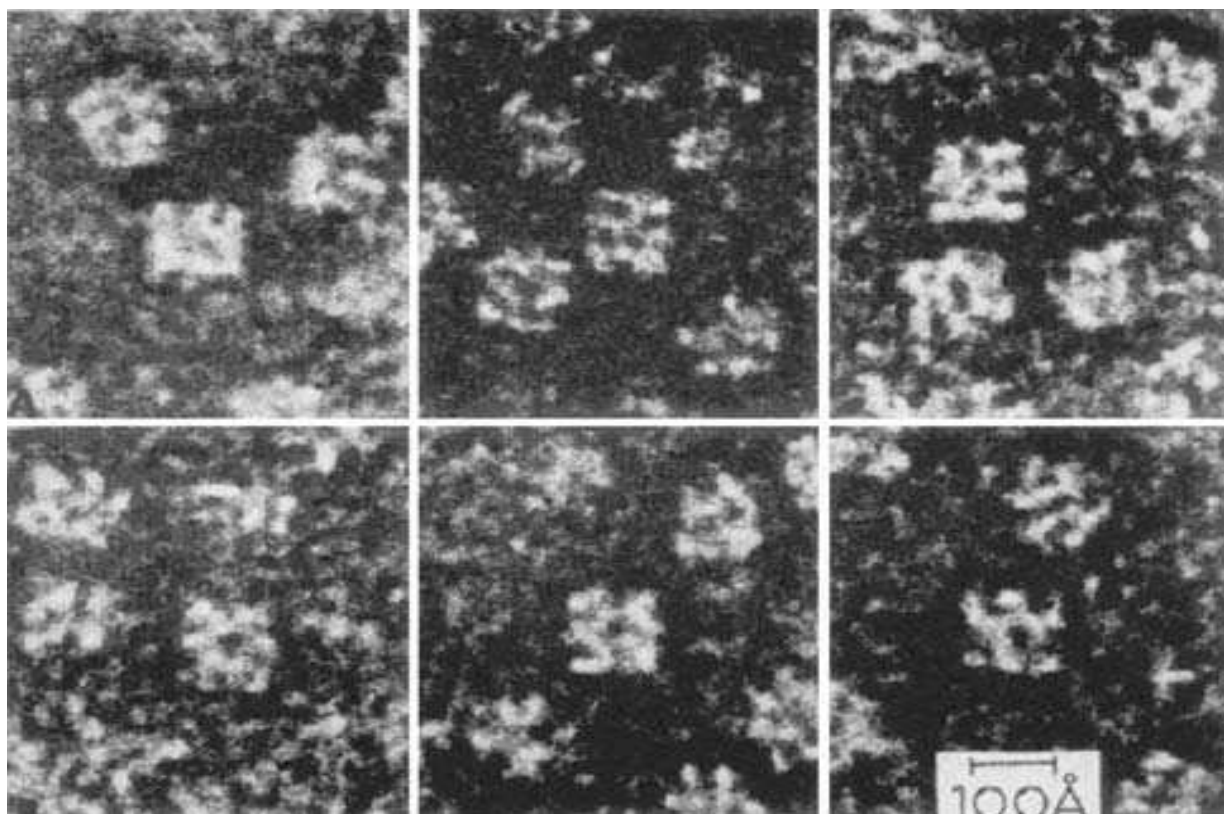
1. Rubisco má ostré pH optimum pri pH 8. Práve pri osvetlení sa mení pH strómy z pôvodného pH okolo 7 na pH 8 v dôsledku toho že protóny sú prepumpované do tylakoidov.
2. Ďalším faktorom, ktorý zvyšuje aktivitu enzýmu je prítomnosť horečnatých iónov. Práve presun protónov do tylakoidov spôsobuje že sa Mg^{2+} ióny presúvajú do strómy. Tie sa potom stávajú súčasťou aktívneho miesta enzýmu.
3. 2-karboxyarabintol-1-fosfát, ktorý je mnohými rastlinami syntetizovaný len v tme, silno inhibuje Rubisco pevným naviazaním sa na jeho aktívne miesto. Jeho uvoľnenie potom katalyzuje Rubisco aktivasa, ktorá je okrem toho zodpovedná aj za karbamyláciu enzýmu [2].

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

Ako už bolo spomenuté fixáciu CO_2 na ribulosu-1,5-bisfosfát, ako iniciačný krok v Calvinovom cykle, katalyzuje enzým Rubisco. Nepochybne je preto tento enzým najdôležitejším enzýmom na Zemi, nakoľko na ňom závisí, či už priamo alebo nepriamo, skoro všetok život. Zároveň je aj najrozšírenejším enzýmom podľa druhu rastliny môže tvoriť až 50% z všetkých listových proteínov, jeho hojnosť totiž vyrovnáva jeho veľmi malú katalytickú efektivitu ($k_{cat} = 2-12 \text{ s}^{-1}$). Ročne pri tom tento enzým fixuje približne $10^{11} \text{ t } CO_2$, pre porovnanie, ročne sa spotrebuje približne $3 \cdot 10^9 \text{ t}$ ropy [2].

2.2.1 História

Asi prvým významným krokom pri začiatkoch štúdia enzýmu Rubisco bola jeho izolácia Wildmanom a Bonnerom v roku 1947. Pri frakcionácii listových proteínov síranom amónnym izolovali veľmi hojný proteín, ktorý nazvali Frakcia I. Kým však bola objavená biologická funkcia Rubisca uplynulo skoro 10 rokov [3]. V roku 1965 Horeckerove laboratória izolovali takmer čistý enzým zo špenátu. Výskumy s týmto enzýmom jednoznačne preukázali, že katalyzuje vznik GAP naviazaním CO_2 na RuBP. Po tomto objave Horeckcer prehlásil že boli identifikované všetky enzýmy Calvinovho cyklu, pričom enzým nazval ako enzým karboxylácie naproti Calvinovmu názvu, karboxydismutáza. Calvinova skupina v roku 1963 dokázala zvýšenie aktivity enzýmu po inkubácii s horečnatými iónmi a CO_2 , presný mechanizmus zvýšenia aktivity bol však popísaný až v roku 1976 Lorimerom et al. [12]. Štúdie s enzýmom Rubisco izolovaným zo sóje a jeho inhibície v prítomnosti O_2 boli uskutočnené v roku 1971 Ogrenom a Bowsom. Vďaka tomu sa zistilo že je Rubisco zodpovedný za fotorespiráciu a o niečo neskôr Hageman objavil, že Rubisco katalyzuje fixáciu O_2 na RuBP čo vedie ku vzniku fosfoglykolátu [4].



Obr. 2.4 Prvá elektrónová mikroskopická fotografia Rubisco vo vysokom rozlíšení (Haselkorn et al., 1965). Prevzaté z [4].

2.2.2 Štruktúra

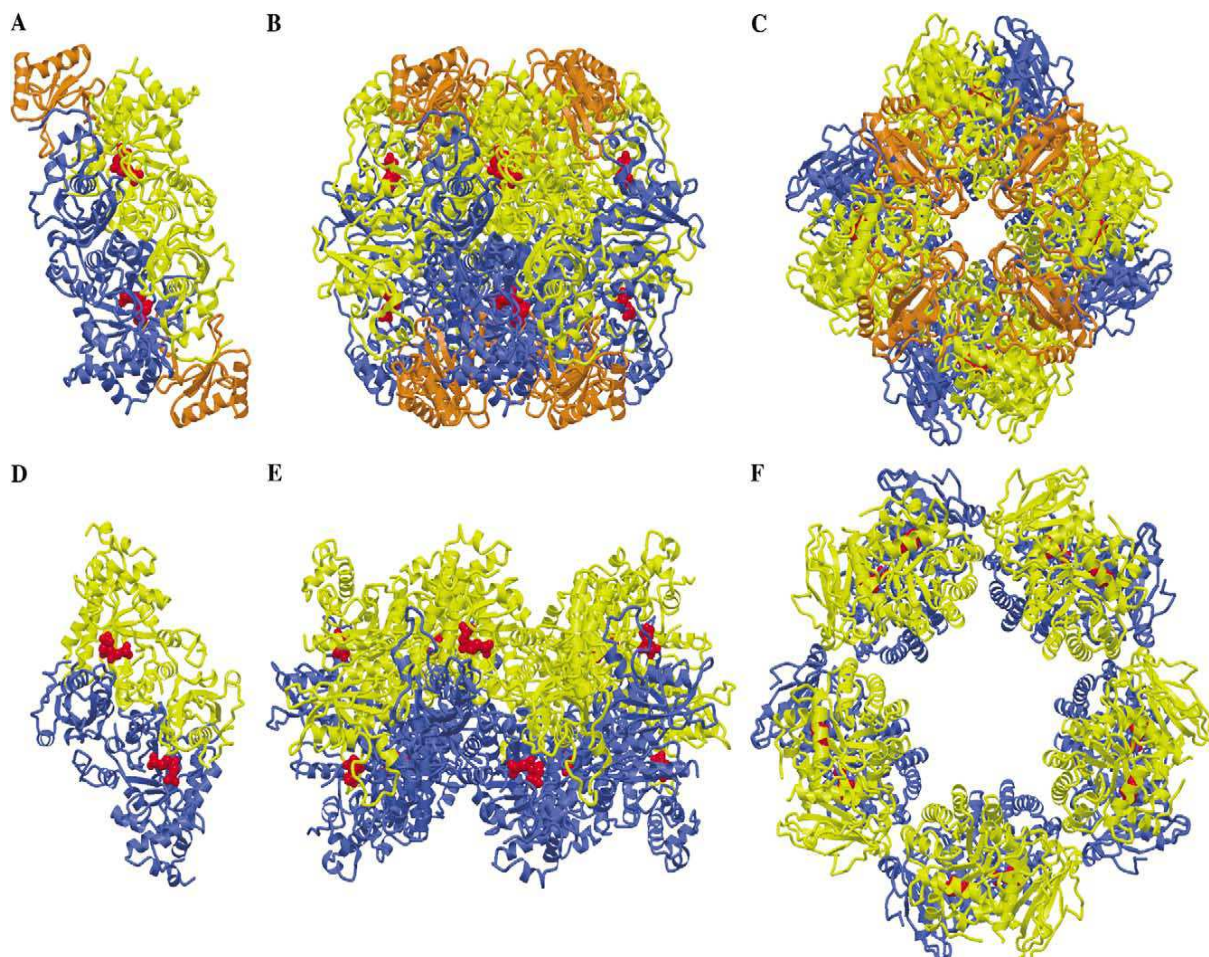
Z hľadiska štruktúry rozoznávame dve základné, štrukturálne odlišné, formy enzýmu Rubisco. U fotosyntetizujúcich baktérií sa stretávame s jednoduchšou formou II, ktorá sa skladá z dvoch veľkých podjednotiek. Tieto baktérie s dimérnou štruktúrou enzýmu však nedokážu prežiť za normálnych atmosférických podmienok, nakoľko je enzým silne inhibovaný prítomnosťou O_2 . Prispôsobivejšie druhy majú však vyvinutý mechanizmus, vďaka ktorému sú schopné prechádzať medzi syntézou štruktúrnej formy II a I [6].

Monomér podjednotky L sa skladá z dvoch domén a to menšej N-terminálnej domény a väčšej C-terminálnej domény. Aktívne miesto enzýmu sa pritom nachádza vždy medzi dvoma doménami. Z toho vyplýva že pri L_2 dimérnej forme obsahuje enzým dve aktívne miesta medzi C-terminálnou doménou jednej podjednotky a N-terminálnou doménou druhej podjednotky [7].

Štruktúrna forma I, ktorá je prítomná u zelených rias a vyšších rastlín, sa skladá z ôsmich veľkých a rovnakého počtu malých podjednotiek. Veľká podjednotka (L) je kódovaná genómom chloroplastov a jej veľkosť je približne 53 kDa. Malá podjednotka (S) má veľkosť približne 14 kDa a kóduje ju skupina génov v jadre bunky. Syntéza podjednotky S prebieha v cytosóle a prenos do chloroplastov je uskutočňovaný pomocou ATP dependentnej reakcie. U nezelených rias je však L aj S podjednotka kódovaná genómom chloroplastov [5]. Katalytickú funkciu pri tom vykazuje len L podjednotka nakoľko je schopná katalýzy aj bez S podjednotky [2]. S podjednotky ale svojou interakciou s L podjednotkami zvyšujú afinitu

aktívneho miesta k substrátu a rýchlosť jeho premeny, aj keď priamo neovplyvňujú štruktúru aktívneho miesta. Takisto zvyšujú celkovú stabilitu enzýmu L_8S_8 [6]. Tvar formy I, čiže L_8S_8 , má symetriu štvorbokého hranolu, čo demonštrujú aj rentgenové snímky zhotovené Haselkornom et al. [4].

Najnovšie bol, pri už spomínaných dvoch štruktúrnych formách, popísaný aj nový typ Rubisco III, ktorý bol izolovaný z archeónu *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. Tento typ je komplexom piatich dimérov veľkej podjednotky zoradených do kruhu $(L_2)_5$ [8].



Obr. 2.5 Rôzne druhy usporiadania kvartérnej štruktúry Rubisco znázorňujúce symetriu molekuly. (A) L_2S_2 jednotka z typu I izolovaná zo špenátu. (B, C) rôzne uhly pohľadov na celý L_8S_8 hexadekamér. (D) dimérna jednotka L_2 typu II izolovaná z *Rhodospirillum rubrum*. (E, F) rôzne uhly pohľadov na $(L_2)_5$ Rubisco typu II z *Thermococcus kodakaraensis*. Prevzaté z [10].

2.2.3 Syntéza

Syntéza a posttranskripčné úpravy Rubisco prebiehajú u prokaryotických organizmov v cytoplazme bunky po transkripcii jediného génu pre L podjednotku, pri type II, alebo po prepise operónu kódujúceho obe podjednotky, L aj S zároveň, u formy L_8S_8 [9].

U eukaryotických organizmov sú gény pre syntézu S podjednotky, označované ako *rbcS* gény, umiestnené v jadrovom genóme. Predstavujú malú multigénnu rodinu obsahujúcu 2 až 12 členov. *rbcS* gény obsahujú zväčša jeden až tri intróny a kódujú bielkoviny o veľkosti

približne 120 aminokyselín. Nakoľko je *rbcS* mRNA transkribovaná na ribozónoch v cytoplazme je potrebné dopraviť polypeptidový prekursor S podjednotky do chloroplastu, kde prebieha jeho finálna úprava na funkčný proteín. To sa deje prostredníctvom tranzitného peptidu s N-terminálom pričom sa pri prenose spotrebúva ATP. Po prenose je tranzitný peptid v chloroplaste odstránený a za pomoci chaperónov je uvedený polypeptid do funkčného stavu.

Na druhej strane, sú gény pre L podjednotku, *rbcL*, uložené u vyšších rastlín priamo v chloroplastovom genóme vždy v jednej kópii. Nakoľko však chloroplasty obsahujú niekoľko kópií genómu, možno v každom z nich identifikovať niekoľko zhodných *rbcL* génov. S malými výnimkami, *rbcL* neobsahujú intróny a kódujú približne 475 aminokyselín. *rbcL* gény sú svojou štruktúrou veľmi podobné prokaryotickým génom. Čo dokazuje napríklad neprítomnosť intrónov, podobnosť transkripčných promotorov s bakteriálnymi, translácia v stróme na 70S chromozómoch a ďalšie znaky.

Po importe S podjednotiek do chloroplastu a ich úprave je možné ich spojenie s chloroplastmi nasyntetizovanými L podjednotkami do L_8S_8 holoenzýmu. Tomuto procesu napomáhajú chaperóny. Nevyhnutným pri tomto procese je chaperonin cpn60 (molekulová hmotnosť približne 60kDa). Pred zložením do holoenzýmu totiž vzniká binárny komplex práve medzi cpn60 a L podjednotkou, ktorý následne umožní pripojenie S podjednotky [6].

2.2.4 Aktivácia enzýmu

Pred samotným dosiahnutím katalytickej aktivity je potrebné Rubisco aktivovať. Aktivácia, ktorá prebieha hneď potom, ako sú všetky polypeptidy správne poskladané, spočíva v naviazaní molekuly CO_2 (karbamylácia) a koordinácii Mg^{2+} iónu k aktívnemu miestu. Pri karbamylácii sa molekula CO_2 viaže na ϵ -aminoskupinu Lys-201. Na karbamylované aktívne miesto sa už následne rýchlo naviaže Mg^{2+} ión, čím sa dosahuje celková stabilita enzýmu. Molekula CO_2 využitá pri karbamylácii však nie je totožná s molekulou CO_2 , ktorá sa viaže počas procesu karboxylácie [5].

2.2.4.1 Rubisco aktivasa

V prírode je Rubisco väčšinou vysoko aktivované pri normálnych koncentráciách CO_2 a dostatočnom ožiarení listov. Napriek tomu pri *in vitro* analýzach kinetiky Rubisco bolo zistené že rovnovážna karbamylácia dosahuje menej ako 25% za rovnakých podmienok prostredia aké sú u vitálnych chloroplastov [12].

Ako bolo neskôr zistené, aktiváciu *in vivo* uľahčuje ďalší proteín, a to Rubisco aktivasa. Tá sa po hydrolytickom rozštiepení molekuly ATP aktivuje a je možné jej naviazanie na Rubisco. Úlohou aktivasy je potom uvoľnenie inhibítora, vďaka čomu sa umožní karbamylácia enzýmu. Týmto procesom sa teda otvára aktívne miesto, aktivasa však nehrá žiadnu úlohu v samotnej karbamylácii aktívneho miesta [13].

2.2.5 Karboxylácia a oxygenácia

Rubisco katalyzuje práve iniciačný krok Calvinovho cyklu. Pôsobí ako promotor kovalentného naviazania molekuly CO_2 na päťuhlíkatý sacharid RuBP, rovnako ako rozpadu nestáleho šesťuhlíkatého medziproduktu na dve molekuly GAP.

Mechanizmus katalytickej karboxylácie RuBP prebieha v piatich na seba navzájom nadväzujúcich krokoch. Prvým je vytvorenie medziproduktu, enediolu, zo substrátu RuBP bez účasti druhého substrátu, CO_2 (O_2). Behom karboxylácie reaguje práve vzniknutý C2,C3-

enediol s molekulou CO₂ na pozícii C2, čím sa vytvorí nestabilný šesťuhlíkatý medziprodukt hydrolyticky rozštiepený na dve molekuly GAP [6].

Nanešťastie však enzým Rubisco nieje úplne špecifický k CO₂, ale je schopný využívať ako substrát aj O₂. Výsledkom naviazania O₂ je potom jedna molekula GAP a jedna molekula 2-fosfoglykolátu. Nakoľko je však 2-fosfoglykolát metabolicky nevyužiteľný, vstupuje do glykolátovej dráhy. Reakcie tejto dráhy prebiehajú jednak v samotnej stróme chloroplastu, ale aj v peroxizómoch a mitochondriálnom matrixe. Výsledkom je v podstate reakcia dvoch molekúl 2-fosfoglykolátu za vzniku jednej molekuly CO₂ a jednej molekuly GAP, ktorá môže byť zapojená do Calvinovho cyklu. Týmto reakciami sa však spotrebuje mnoho energie. Oxygenácia, katalyzovaná Rubiscom, je teda pre bunku náročným procesom, spotrebou substrátu využiteľného na karboxyláciu totiž dochádza k energetickým a metabolickým stratám. Nakoľko je tento proces podobný mitochondriálnej respirácii, spotrebúva sa O₂ a vzniká CO₂, je tiež nazývaný fotorespiráciou [14].

2.3 Metódy stanovenia obsahu enzýmu Rubisco

2.3.1 HPLC

HPLC je druh kvapalinovej chromatografie, pri ktorej je separácia zložiek skúmanej vzorky urýchlená čerpaním elučného činidla pod veľkým tlakom. Metóda je založená na vzniku interakcií medzi zložkami mobilnej fázy, ktorá obsahuje vzorku, a pevnej fázy, tvorenej náplňou kolóny. Mobilná fáza je v tomto prípade kvapalina a stacionárnu fázu tvorí film príslušnej látky zakotvený na povrchu nosiča, alebo pevný adsorbent. Zložky analytu s pevnou fázou interagujú rôzne veľkými silami v závislosti na rôznych chemických a fyzikálnych vlastnostiach interagujúcej dvojice.

Pri aplikácii HPLC k stanoveniu Rubisco sa používa gélová kolóna, ktorá delí jednotlivé zložky podľa veľkosti častíc, a to tak, že najrýchlejšie prechádzajú veľké molekuly a najviac zadržované sú malé molekuly. V porovnaní s nasledujúcimi metódami sa metóda HPLC k stanoveniu množstva enzýmu Rubisco používa v menšej miere [19].

2.3.2 Immunologické metódy

2.3.2.1 ELISA

Táto metóda patrí medzi veľmi citlivé imunochemické metódy a je schopná detegovať aj veľmi nízke koncentrácie antigénu a protilátky, ktoré neumožňujú vznik precipitátu. Názov metódy je skratkou pre anglický názov Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.

Stanovenie imunokomplexu možno spraviť ešte citlivejším naviazaním vhodného značkovača na jeden z imunoreaktantov ešte pred samotným začiatkom ich interakcie. K tomuto značeniu sa používajú niektoré enzýmy, ktoré umožňujú bezpečné, citlivé a jednoduché stanovenie. Finálna kvantifikácia potom prebieha meraním zmeny absorbancie reakčného roztoku, ktorú spôsobuje produkt enzýmovej reakcie. Najčastejšie používanými enzýmami sú pri tejto reakcii peroxidasa a alkalická fosfatasa. Najcitlivejšie modifikácie tejto metódy umožňujú určenie analytu v množstve 10⁻¹²–10⁻⁹ g [18].

Pre stanovenia množstva enzýmu Rubisco je táto metóda jednou z najcitlivejších. Túto metódu využili vo svojej práci napríklad Metodiev a Demiremvská-Kepová [21]. Taktiež bola

použitá Besfordom [22], ktorý využil elektroforetický prenos bielkovín z PAGE gélu na nitrocelulóзовý nosič. Na tomto nosiči ďalej určil obsah pomocou peroxidasevej aktivity.

2.3.2.2 Rádioimunozrážacia metóda

Pri tejto metóde je enzým najskôr aktivovaný inkubáciou v prítomnosti horečnatých iónov a HCO_3^- , rádioaktívne značeného ^{14}C 2-karboxyarabintol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra so špecifickou afinitou k enzýmu Rubisco. Tým vznikne zrazenina komplexu Rubisco ^{14}C 2-karboxyarabintol-1,5-bisfosfát-protilátka. Tá je potom odstránená filtráciou cez polysulfónový filter a premytá od nadbytku ^{14}C 2-karboxyarabintol-1,5-bisfosfátu. Úroveň radiácie vyžarovanej premytou zrazeninou je priamo úmerná množstvu Rubisco [23].

2.3.3 Gélová elektroforéza

Štandardnou metódou pre štúdium chloroplastových proteínov je SDS-PAGE, čiže elektroforéza na polyakrylamidovom géle v prítomnosti dodecylsírany sodnej. Táto metóda umožňuje rozdelenie molekúl na princípe sieťového efektu a zároveň elektroforetickej pohyblivosti delených látok. Pri metóde SDS-PAGE sa dodecylsírany sodný viaže na molekuly bielkovín, tým im udeľuje uniformný valcovitý tvar a jednotný záporný náboj, veľkosť tohto náboja je úmerná veľkosti molekuly. SDS sa viaže na molekuly v pomere približne 1,4 g na 1 g bielkoviny. Na takto vzniknuté ióny, pohybujúce sa konštantnou rýchlosťou úmernou veľkosti ich náboja, pôsobí elektrická sila:

$$F_E = qE$$

pričom q je náboj iónu a E je sila elektrického poľa pôsobiaceho na ióny. V opačnom smere pôsobí na ióny odporová sila:

$$F_F = -3\pi\eta dv$$

kde η je viskozita prostredia, d je priemer častice a v je rýchlosť častice.

Polyakrylamidový, gél používaný pri elektroforéze, je inertný, mechanicky dostatočne pevný, priehľadný a dáva možnosť vzniku nosiča rôznych dopredu určených vlastností. Vzniká kopolymerizáciou dvoch monomérov, akrylamidu a N,N'-metylénbisakrylamidu. Kopolymerizácia prebieha v roztoku pufru za prítomnosti peroxodisírany amónneho ako iniciátora. Na svetle z iniciátora vznikajú voľné radikály, ktoré dávajú vznik samotnej polymerizácii. Štruktúra polyakrylamidového gélu pozostáva z otvorených pórov určitej veľkosti, ktoré obsahujú kvapalinu s pufrom. Molekuly sa pri priechode gélom delia na základe svojej veľkosti v dôsledku odporu, ktorý vzniká pri priechode molekúl pórmi s porovnateľnou veľkosťou, ako je ich vlastná.

Jednou z variant elektroforézy, ktorá používa dva gély rôznej hustoty, je diskontinuálna elektroforéza. Pri tomto postupe sa výsledný gél skladá zo separačného gélu a zaostrovacieho gélu s veľkými pórmi. V zóne so zaostrovacím gélom dochádza ku koncentrácii bielkovín a v separačnom géle prebieha samotné delenie bielkovín podľa molekulovej hmotnosti. Zóny bielkovín vzniknuté na géle pri elektroforéze je možné zviditeľniť farbením v alkoholovom roztoku s obsahom farbiva Coomassie blue. Týmto spôsobom sa vytvoria komplexy bielkovina farbivo. Prebytok farbiva je potom odstránený odfarbovaním v kyslom roztoku. Koncentrácia proteínu je potom priamo úmerná intenzite sfarbenia jednotlivých zón [18].

Stanovenie množstva enzýmu Rubisco metódou SDS-PAGE využili vo svoji prácach napríklad Damervalová et al. [24] a Rogers et al. [25].

2.3.4 Kapilárna elektroforéza

Podobne ako metóda SDS-PAGE je aj kapilárna elektroforéza založená na rovnováhe elektrickej a odporovej sily, ktoré pôsobia v elektrickom poli na elektricky nabitú časticu. Na separované zložky taktiež pôsobí elektroosmotický tok, čiže neselektívna sila, ktorá unáša ióny smerom ku katóde a trecia sila, ktorá pôsobí proti pohybu iónov a jej veľkosť je úmerná veľkosti častíc. Ak sa použije táto elektroforéza v zosieťovanom prostredí, kde je kapilára naplnená gélom alebo je ako separačný pufer použitý roztok lineárnych polymérov, zvýši sa sila odporu prostredia [19].

Túto metódu využili napríklad Warren et al. [20] pri stanovovaní enzýmu v eukalypte. Elektroforéza prebiehala pri napätí 15 kV a teplote 20 °C v kapiláre o priemere 50 µm, celkovej dĺžke 24 cm s 19,4 cm efektívnej dĺžky. Kapilára bola naplnená SDS pufrom a bielkoviny boli detegované pri 220 nm s nástrekom vzorky pri 10 kV počas 5 s. kapilára bola medzi jednotlivými stanoveniami vypláchnutá 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl a SDS pufrom, rovnakým, aký bol používaný pri elektroforéze.

3 Experimentálna časť

Cieľom experimentálnej časti bolo jednak porovnať účinnosť rôznych spôsobov extrakcie enzýmu Rubisco z rastlinného materiálu, jednak optimalizovať podmienky elektroforézy tak, aby bolo možné zónu zodpovedajúcu veľkej podjednotke Rubisco čo najlepšie denzitometricky kvantifikovať. Ďalej bolo určené rozmedzie koncentrácií enzýmu, pre ktoré kvantifikácia veľkej podjednotky Rubisco vykazuje linearitu.

3.1 Extrakcia enzýmu Rubisco

3.1.1 Prístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® VZ Hradec Králové. Parametre: najmenší diel 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML
Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)
Centrifúga MLW T52,1

3.1.2 Chemikálie

2-Merkaptoetanol; Sigma-ALDRICH
Acetón Chromasolv®; Seidel-de-Haën
Amfolyt pH 3–10; Fluka analytical
Bromfenolová modrá Na soľ; SERVA
DTT – ditiotreitol; Sigma –ALDRICH
Glycerol; Sigma-ALDRICH
CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimetylamonio]-1-propánsulfonát; Sigma-ALDRICH
Močovina, Sigma-ALDRICH
Sacharóza; Sigma-ALDRICH
SDS – dodecylsírán sodný; Sigma-ALDRICH
TCA – kyselina trichlóroctová; Lachema
Tiomočovina, Sigma-ALDRICH
TRIS – tris(hydroxymetyl)aminometan; Sigma -ALDRICH

3.1.3 Príprava vzoriek

Pri príprave vzoriek boli otestované dva spôsoby extrakcie proteínov z ihličia: priama extrakcia proteínov do TRIS pufru a extrakcia pomocou kyseliny trichlóroctovej rozpustenej v acetóne. Po vyzrážaní bielkovín metódou TCA/acetón bola otestovaná rozpustnosť vzniknutej zrazeniny v niekoľkých pufoch rôzneho zloženia.

3.1.3.1 Priama extrakcia proteínov do TRIS pufru

Približne 60 mg ihlíc bolo v tretej miske rozdrvených s pridaním malého množstva morského piesku. K vzorke boli pridané 2 ml TRIS pufru, s následnou asi 30 sekundovou homogenizáciou. Suspenzia po homogenizácii bola preliata do centrifugačnej skúmavky a odstredená 2 minúty pri 2500 ot./min. Po odstredení bolo zo získaného extraktu odobratých 0,5 ml do mikroskúmavky Eppendorf a bolo k nej pridaných 0,5 ml vzorkového pufru. Takto vzniknutá zmes bola premiešaná na vortexe a 5 minút varená v termobloku. Po vychladnutí bola vzorka uchovávaná v mrazničke pri teplote $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.3.2 Extrakcia proteínov metódou TCA/acetón

Bolo navážených 0,3 g vzorky ihličia a táto vzorka bola zhomogenizovaná spolu s morským pieskom a 10 ml TRIS pufru v tretej miske. Po homogenizácii nasledovalo preliatie vzorky do centrifugačnej skúmavky a jej odstredenie pri 2500 ot./min počas 2 minút. Po centrifugácii bolo odobraných 5 ml číreho extraktu do čistej centrifugačnej skúmavky a bolo k nemu pridaných 5 ml roztoku 10% (w/v) TCA v acetóne s 0,07% (v/v) merkaptotetanolu. Roztok v skúmavke bol pretrepaný a proteíny sa nechali hodinu zrážať v mrazničke pri teplote -18°C . Po ukončení zrážania bielkovín bola skúmavka umiestnená do centrifúgy a odstredená pri 2500 ot./min. po dobu 2 minút. Zrazenina na dne skúmavky bola zbavená supernatanu a trikrát premytá 5 ml roztoku 0,007% (v/v) merkaptotetanolu v acetóne. Po každom prídavku premývacieho roztoku bol obsah skúmavky dôkladne premiešaný na vortexe a znovu scentrifugovaný. Po konečnom premytí bielkovín bola zrazenina v skúmavke opatrne vysušená dusíkom. Po dôkladnom vysušení bola zrazenina rozpustená pri prvých pokusoch v 5 ml vzorkového pufru.

Taktiež bol otestovaný protokol podľa Niea et al. [16]. Zrazenina po extrakcii bola rozpustená v 8 ml TRIS pufru s pH 8 so zložením 0,1 M Tris, 5% (w/v) SDS, 58 mM DTT, 30% (w/v) sacharosa. Vzorka bola inkubovaná pri teplote 90°C 6 minút.

A napokon bol vyskúšaný postup s rozpustením zrazeniny v 2 ml pufru s tiomočovinou podľa Amalraja et al. [17] o zložení 7 M (w/v) močovina, 2 M (w/v) tiomočovina, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) amfolyt pH 3–10, 0,3% (w/v) DTT. Vzorka bola hodinu inkubovaná pri teplote 37°C s dvojminútovým vortexovaním po každých 15 minútach.

3.2 Stanovenie obsahu enzýmu Rubisco metódou SDS-PAGE

3.2.1 Prístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® VZ Hradec Králové. Parametre: najmenší diel 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

pH Meter HI 221 Calibration Check, HANNA instruments (USA)

Aparatúra pre elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD (USA)

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid; SERVA

Brilantná modrá G 250 – Coomasie; SERVA

Bromfenolová modrá Na sol'; SERVA

Butanol; Lachema

D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa – štandard Rubisco; Sigma-ALDRICH

DTT – ditiotreitol; Sigma-ALDRICH

Etanol; Lachema

Glycerol; Sigma-ALDRICH

Glycín; SERVA

Kyselina chlorovodíková; Penta

Kyselina octová; Lachema

Metanol CHROMASOLV®, Seidel-de-Haën

N,N'-metylénbisakrylamid; SERVA

Peroxodisíran amónny; SERVA

SDS – dodecylsírán sodný; Sigma-ALDRICH
TEMED – N,N,N',N'-tetrametyletylendiamín; SERVA
TRIS – tris(hydroxymetyl)aminometan; Sigma-ALDRICH

3.2.3 Roztoky pre prípravu gélov

Roztok A: 30 g akrylamidu a 8 g bisakrylamidu bolo rozpustených v 100 ml vody. Roztok bol ďalej uchovávaný pri teplote 4 °C.

Roztok B: 18,16 g TRIS bolo rozpustených v 50 ml vody, po rozpustení bolo upravené pH pomocou koncentrovanej HCl na pH 8,8. Roztok bol po úprave pH doplnený na 100 ml a uchovávaný pri teplote 4 °C.

Roztok C: 18,16 g TRIS bolo rozpustených v 50 ml vody, po rozpustení bolo upravené pH pomocou koncentrovanej HCl na pH 6,8. Roztok bol po úprave pH doplnený na 100 ml a uchovávaný pri teplote 4 °C.

Roztok D: 10 g SDS bolo rozpustených v 100 ml vody. Roztok bol uchovávaný v temne.

Roztok E: 0,1 g peroxodisíranu amónneho bolo rozpustených v 1 ml vody. Na každé stanovenie bol pripravený čerstvý roztok.

Roztok F: V 1 ml vody bolo rozpustených 10 mg bromfenolovej modrej. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

TEMED Komerčne dodávaný roztok

3.2.4 Roztoky pufov

Elektrodový pufer: 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycínu bolo rozpustených v 1000 ml vody. Roztok bol používaný opakovane a uchovávaný pri teplote 4 °C.

TRIS pufer: 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,2 g DTT a 50 ml glycerolu bolo rozpustených v 450 ml vody. pH pufru bolo následne upravené na 6,8 pomocou koncentrovanej HCl. Roztok bol uchovávaný pri laboratórnej teplote.

Vzorkový pufer: Bolo zmiešaných 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptobetanolu. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

3.2.5 Roztoky k zviditeľneniu bielkovín

Stabilizačný roztok: Bolo zmiešaných 400 ml vody a 100 ml methanolu.

Farbiaci roztok: Bolo zmiešaných 450 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej, 450 ml vody a 0,5 g Coomassie Blue G 250.

Odfarbovací roztok: Bolo zmiešaných 250 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 650 ml vody.

3.2.6 Príprava gélov

Elektroforetické sklá boli najprv dôkladne umyté vodou a odmastené, potom opláchnuté v destilovanej vode a vyleštené buničinou s etanolom. Sklá boli upevnené v stojane a dôkladne zatlačené na gumovú podložku aby sa zabránilo vytečeniu gélu. Po dôkladnom upevnení mohli byť medzi sklá naliate roztoky gélov.

3.2.6.1 Separačné gély

Gély bol pripravený napipetovaním jednotlivých roztokov pomocou automatických pipiet podľa tab. 3.1.

Tab. 3.1 Objemy roztokov k príprave jednotlivých gélov

Roztok	Objemy na 8% gél [ml]	Objemy na 10% gél [ml]	Objemy na 12% gél [ml]
A	2,700	3,300	4,000
B	2,500	2,500	2,500
D	0,100	0,100	0,100
Destilovaná voda	4,600	4,000	3,300
E	0,100	0,140	0,140
TEMED	0,006	0,004	0,004

Roztoky E a TEMED boli pridávané ako posledné tesne pred naliatím gélu medzi elektroforetické sklá. Hotový roztok gélu bol naliaty vždy približne 2 cm pod okraj skiel, aby bolo možné naliať zaostrovací gél. Po naliatí bol roztok prevrstvený butanolom, ktorý slúži ako ochrana proti vysychaniu.

3.2.6.2 Zaostrovací gél

Po stuhnutí separačného gélu bol zliaty butanol a gél premytý destilovanou vodou. Napokon bol naň naliaty zaostrovací gél pripravený podľa tab. 3.2.

Tab. 3.2 Objemy roztokov pre prípravu zaostrovacieho gélu

Roztok	Objemy na 8% gél [ml]
A	1,000
C	0,380
D	0,030
Destilovaná voda	2,100
E	0,030
TEMED	0,003

Roztoky E a TEMED boli opäť pridané až tesne pred naliatím medzi sklá. Roztok gélu bol naliaty až po okraj skiel a ihneď bol medzi sklá vložený elektroforetický hrebienok. Hrebienok bol z gélu odstránený až pred samotným nanášaním vzoriek. Gél môže byť po príprave uchovávaný v chladničke maximálne 24 hodín.

3.2.7 Príprava štandardov

V mikroskúmavke Ependorf boli rozpustené 2 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru. Zmes bola premiešaná na vortexe a 5 minút varená v termobloku. Vhodným nariedením boli následne pripravené aj ostatné koncentrácie štandardov:

1,5 mgml⁻¹, 1,0 mgml⁻¹, 0,75 mgml⁻¹, 0,5 mgml⁻¹, 0,25 mgml⁻¹, 0,125 mgml⁻¹. Roztoky štandardov boli po schladnutí uchovávané v mrazničke pri teplote -18 °C.

3.2.8 Elektroforéza

Pripravené elektroforetické sklá z akrylamidovým gélom boli vybrané zo stojanu a očistené od zvyškov gélu. Spomedzi skiel bol opatrne odstránený hrebienok a sklá boli vložené do stojanu pre elektroforézu väčším sklom smerom von. Stojan zo sklami bol potom vložený do elektroforetickej nádoby. Najskôr bol naplnený elektródovým pufrom priestor medzi sklami, pre kontrolu či sú sklá dobre uchytené a stojan tesní, a potom bola pufrom naplnená aj samotná nádoba asi do polovice. Vzorky boli do jamiek dávkané pomocou automatickej pipety. Pri určovaní linearít bolo dávkaných na jednotlivé gély 10 µl a 5 µl roztoku štandardov. Pri nanášaní extrahovaných vzoriek z ihličia bolo na gély nanášaných 5 µl roztoku vzorky a pre porovnanie a výpočty do jednej jamky 5 µl roztoku štandardu Rubisco.

Po nanesení vzoriek bola aparatura pripojená na zdroj jednosmerného prúdu s možnosťou nastavenia veľkosti konštantného napätia. Pri 12% géle bolo napätie nastavené na 120 V, pri 10% na 100 V a napätie u 8% gélu bolo 90 V. Elektroforéza prebiehala až kým čelo vzorky nedostúpilo asi 2 cm nad spodný okraj gélu, tj. 60–120 minút, v závislosti na koncentrácii gélu.

3.2.9 Vizualizácia bielkovín

Po skončení elektroforézy bola nádoba odpojená od prúdu a boli z nej vybraté elektroforetické sklá. Sklá boli ponorené do misky s destilovanou vodou menším sklom smerom dole. Pomocou špachtle bolo opatrne od gélu oddelené vrchné sklo a prevrátením malého skla pod vodou sa gél od neho odlepil. Z premytého gélu bola zliata voda a bol prevrstvený stabilizačným roztokom. Gél bol stabilizovaný na trepačke 5 minút. Po zliati stabilizačného roztoku bol gél prevrstvený farbiacim roztokom a farbený 30 minút na trepačke. Po farbení nasledovalo prevrstvenie odfarbovacím roztokom, s ktorým bol gél pretrepávaný 90 minút. Po dokončení farbenia bol gél premytý destilovanou vodou a zabalený s elektroforetickým sklom do potravinárskej fólie, ktorá ho chránila pred vysychaním. Takto pripravené gély boli skladované do vyhodnotenia v chladničke pri teplote 4 °C.

3.2.10 Vyhodnotenie gélov

Hotové gély boli naskenované a vyhodnotené pomocou počítačového programu Science Lab 2006 Multi Gauge, ver3.1, fy FUJIFILM. Pomocou tohto programu boli zóny veľkých, popríklad malých, podjednotiek enzýmu Rubisco prevedené na píky a integráciou bola vypočítaná ich plocha. Porovnaním veľkosti plochy a koncentrácie štandardu s plochou vzorky bola určená koncentrácia enzýmu vo vzorke, a tak porovnaná účinnosť jednotlivých metód.

4 Výsledky a diskusia

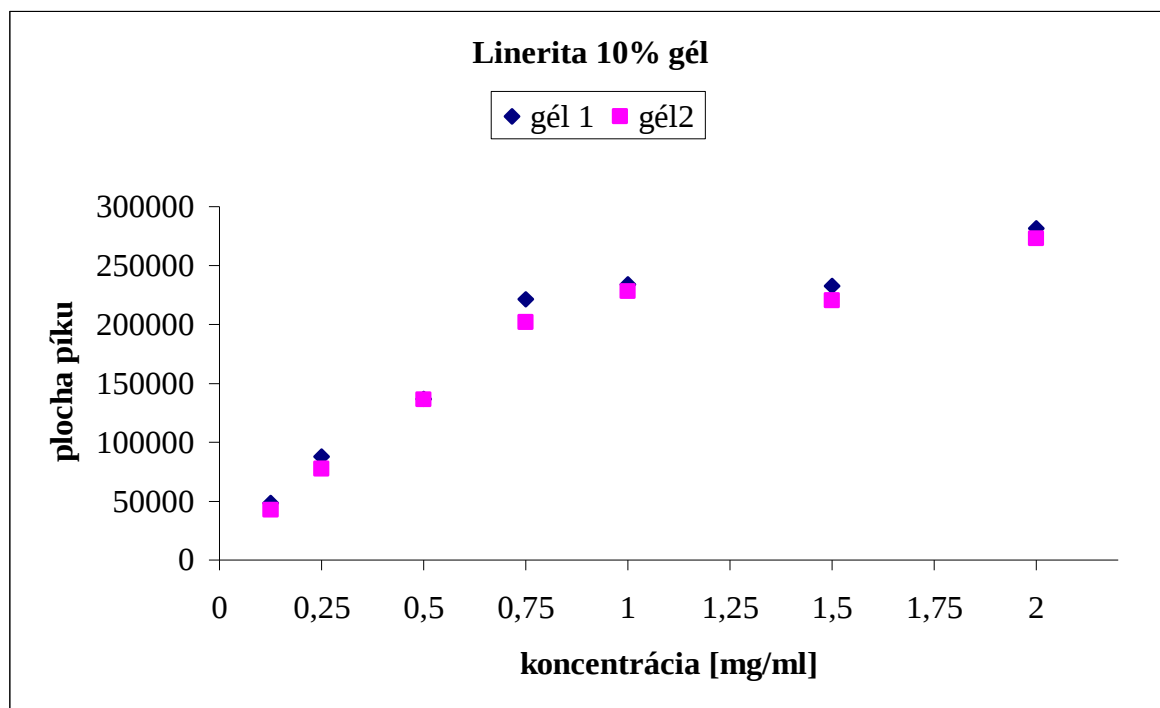
4.1 Linearita

Pokusy pre overenie linearity boli uskutočnené so štandardmi ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy (Sigma-Aldrich) na géloch s koncentraciami 8%, 10% a 12%. Na týchto géloch boli spresnené aj množstvá dávkovanej vzorky a napätie pri ktorom elektroforéza prebiehala.

Na 10% gél boli nanesené štandardy jednotlivých koncentrácií po 10 μl . Dané množstvo nanášanej vzorky sa však ukázalo ako príliš veľké, čo viedlo k zhoršeniu kvality bandov. Zhoršená kvalita bandov spôsobila zhoršenie kvality základnej línie píkov vzniknutých denzitometrickým vyhodnotením gélu, čo viedlo k nepresnostiam pri určení ich plochy. Lepšie výsledky boli dosiahnuté pri nanášaní 5 μl roztoku štandardu na gél. Tým sa zvýšila kvalita bandov, ktorá však stále nebola ideálna. Z toho dôvodu bolo znížené aj napätie, pri ktorom elektroforéza prebiehala, zo 120 V na 100 V. Táto modifikácia síce viedla k predĺženiu celkového času, počas ktorého elektroforéza prebiehala, z necelých hodiny na hodinu a pol až dve hodiny, na druhej strane však viedla k značnému skvalitneniu bandov na géle. Táto skutočnosť viedla aj k značnému uľahčeniu určenia presnej plochy pík po denzitometrickom vyhodnotení. Vzorové výsledky určenia plochy pík sú uvedené v tabuľke 4.1 a ich grafické znázornenie na obrázku 4.1.

Tab. 4.1 Plochy štandardov na 10% géle

koncentrácia [mg/ml]	plocha 1	plocha 2
2,000	281302	273056
1,500	232437	220509
1,000	234051	228116
0,750	221086	201965
0,500	136772	135978
0,250	87856	77506
0,125	48399	42496

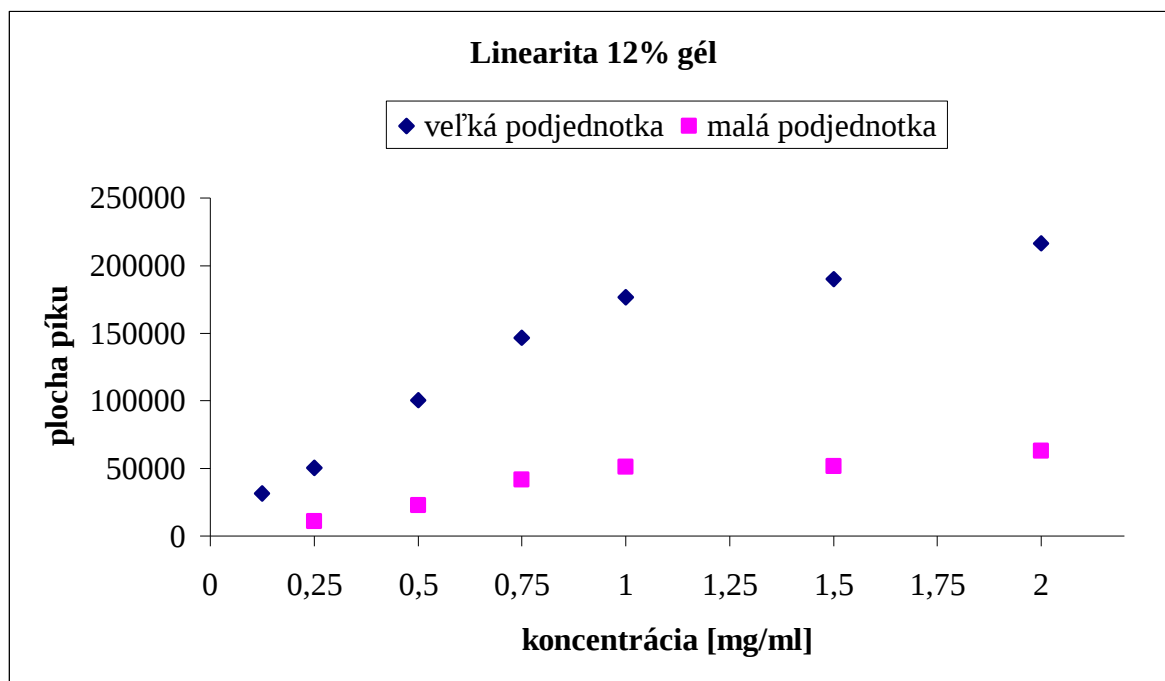


Obr. 4.1 Závislosť plochy píkov na koncentrácii štandardu.

Na 12% gél boli vzorky nanášané, po predošlých zisteniach, po 5 μ l. Napätie elektroforézy bolo pre väčšiu hustotu gélu ponechané na 120 V. Tento gél bol použitý hlavne z toho dôvodu aby bolo možné určiť aj plochu malej podjednotky enzýmu. Po prevedení bandov gélu na píky sa však ukázalo, že píky malej podjednotky niesu natoľko kvalitné, ako píky veľkej podjednotky. Napriek tomu aj dáta získané z týchto píkov vykazujú linearitu v rovnakom koncentračnom rozmedzí ako pri veľkej podjednotke. Vzorové výsledky určenia plochy píkov sú uvedené v tabuľke 4.2 a ich grafické znázornenie na obrázku 4.2.

Tab. 4.2 Plochy štandardov na 12% géle

koncentrácia [mg/ml]	plocha veľkej podjednotky	plocha malej podjednotky
2,000	216505	63075
1,500	190062	51833
1,000	176507	51321
0,750	146502	41744
0,500	100461	22819
0,250	50371	11123
0,125	31598	

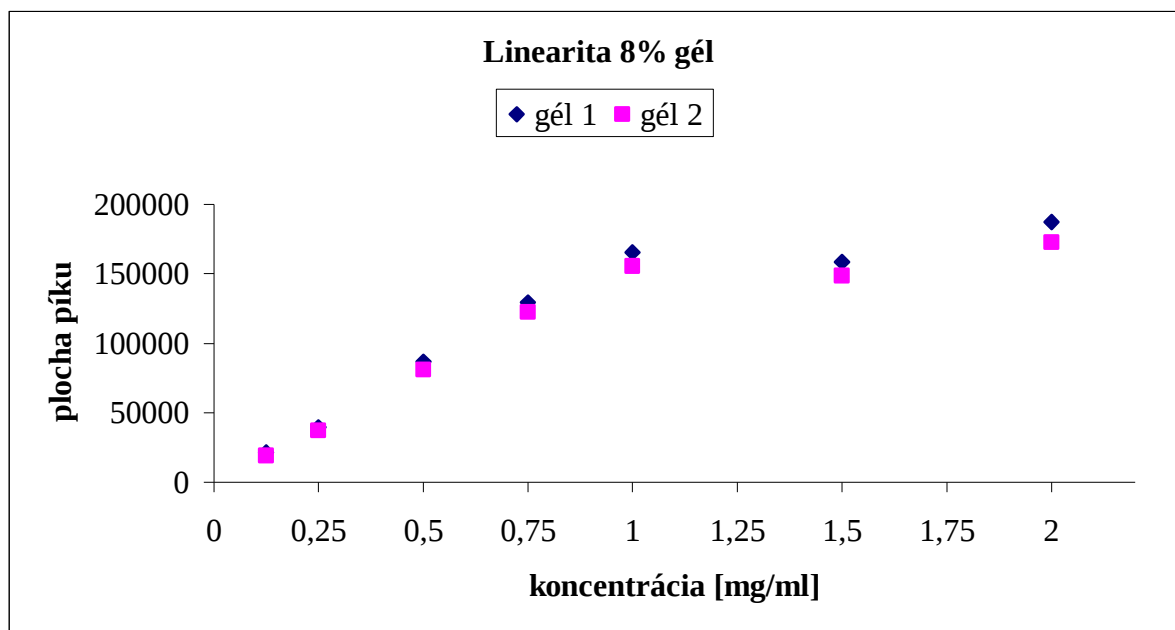


Obr. 4.2 Závislosť plochy pík na koncentrácii štandardu.

Ako najvhodnejší pre kvantifikáciu veľkej podjednotky Rubisco sa ukázal gél koncentrácie 8% pri napätí 90 V. Na géle bola zachovaná linearita po koncentráciu 1 mg ml^{-1} . Navyše na tomto géle došlo, pri stanovovaní enzýmu zo vzorky ihličia, k oddialeniu rušivých zón iných bielkovín od zóny veľkej podjednotky enzýmu. Vďaka tomu bolo možné lepšie určiť jej plochu. Vzorové výsledky určenia plochy pík sú uvedené v tabuľke 4.3 a ich grafické znázornenie na obrázku 4.3.

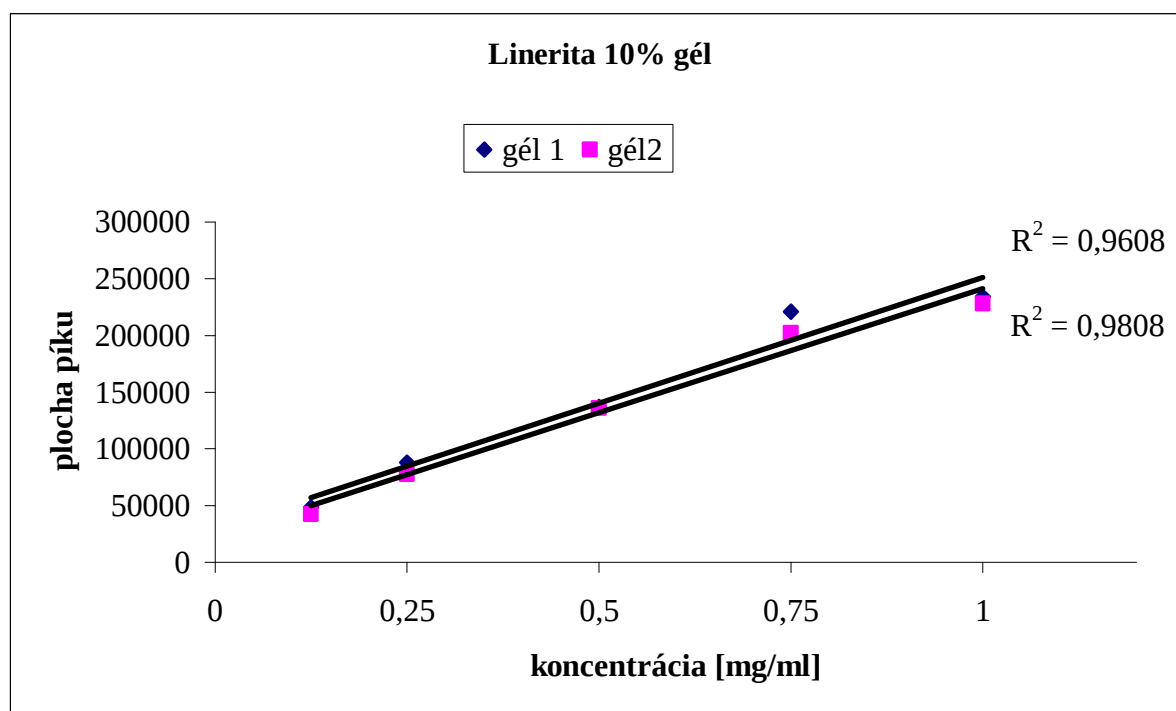
Tab 4.3 Plochy štandardov na 8% géle

koncentrácia [mg/ml]	plocha 1	plocha 2
0,125	21419	19193
0,250	39458	37196
0,500	86778	81094
0,750	129299	122541
1,000	165620	155329
1,500	158480	148592
2,000	187185	172633

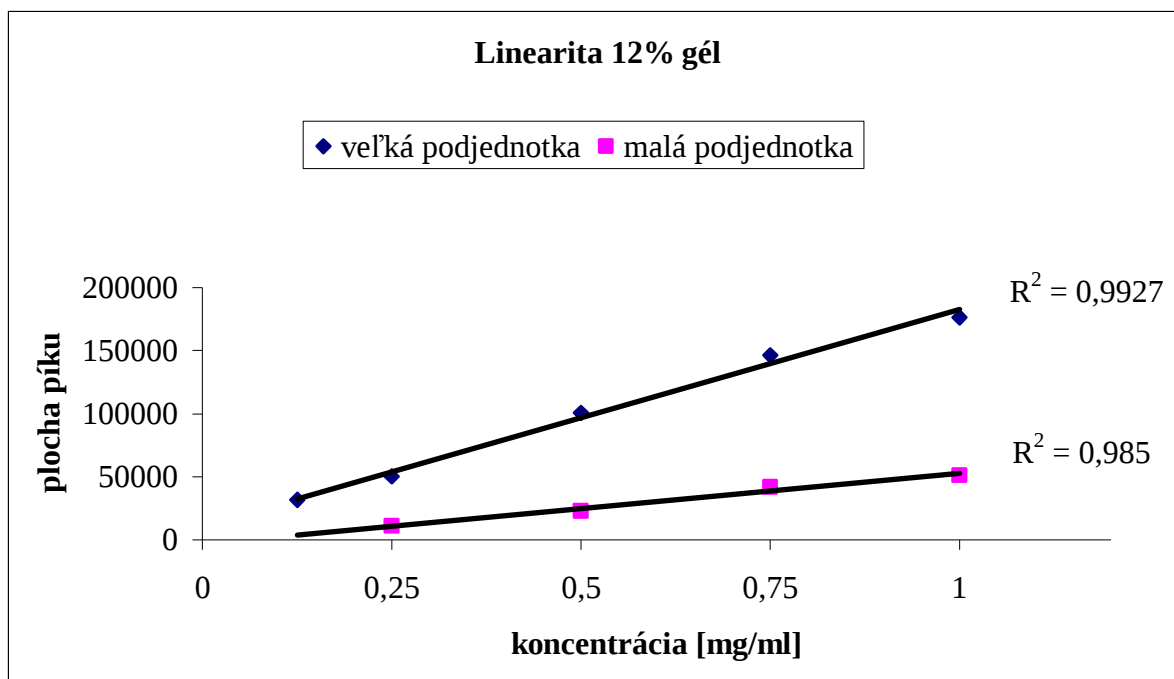


Obr. 4.3 Závislosť plochy pík na koncentrácii štandardu.

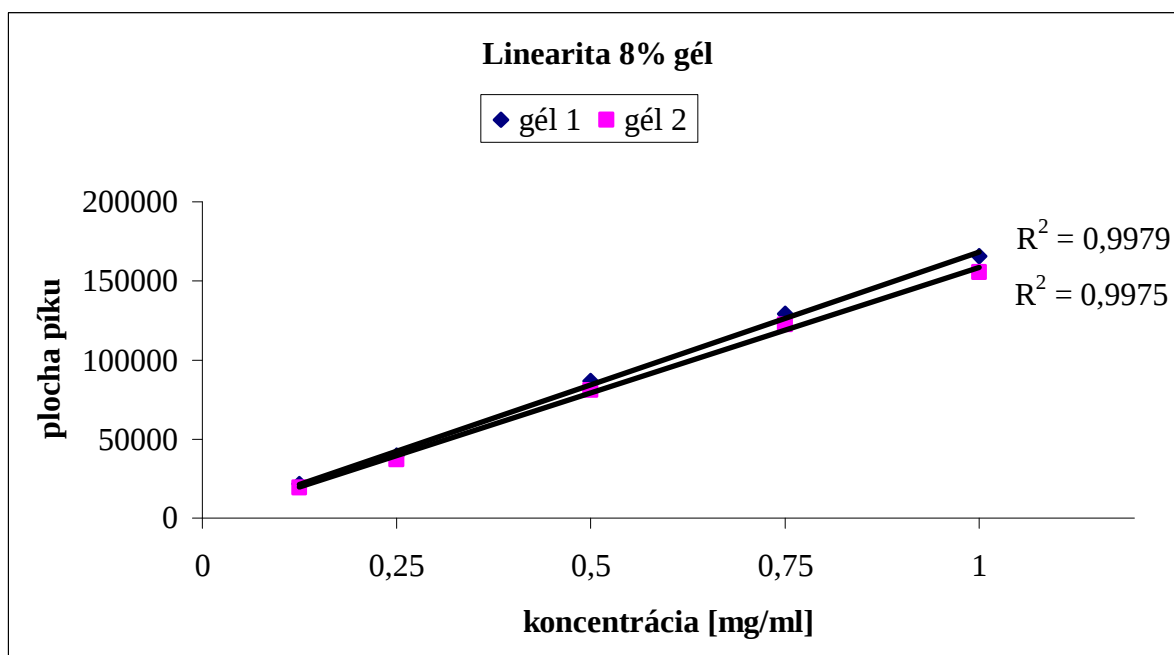
Pre lepšiu názornosť boli z nameraných hodnôt vynechané dáta s odľahlými hodnotami. Takto upravené grafy boli doplnené aj regresnou priamkou. Upravené grafy linearity sú na obrázkoch 4.4, 4.5 a 4.6.



Obr. 4.4 Upravený graf s regresnou priamkou pre 10% gél.



Obr. 4.5 Upravený graf s regresnou priamkou pre 12% gél.



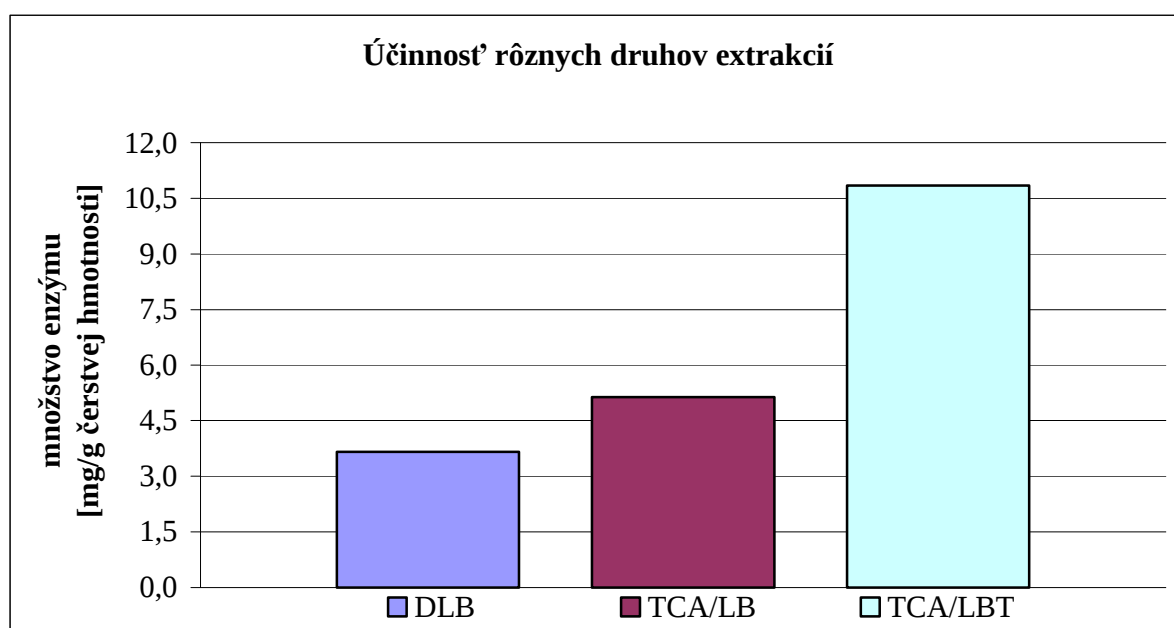
Obr. 4.5 Upravený graf s regresnou priamkou pre 8% gél.

Je teda zrejmé že metóda stanovenia množstva enzýmu Rubisco metódou SDS-PAGE je lineárna v rozmedzí koncentrácií Rubisco 0,125–1,000 mg ml⁻¹. Najlepšie výsledky, z otestovaných gélov, poskytuje 8% gél pri 90 V s 5 µl nanasenej vzorky. Pri tomto postupe

bola najlepšie zachovaná linearita, plochy zón veľkých podjednotiek boli za týchto podmienok ostro ohraničené, vďaka čomu boli získané kvalitné píky s dobrou základnou líniou.

4.2 Extrakcia enzýmu Rubisco

V druhom kroku bola porovnaná účinnosť jednotlivých druhov extrakcie proteínu Rubisco zo vzoriek ihličia. Po extrakcii metódou TCA/acetón bolo nemožné, zrazeninu proteínov rozpustiť v klasickom vzorkovom pufre, a to aj pri väčších zriedeniach. Preto boli vyskúšané aj iné pufre a to LBT pufer podľa Amalraja et al. [16] a TRIS pufer podľa Niea et al. [17]. Nasledujúci obrázok 4.6 znázorňuje porovnanie účinnosti extrakcie jednotlivých metód po vyjadrení obsahu extrahovaného proteínu Rubisco v miligramoch enzýmu na gramy čerstvej vzorky.

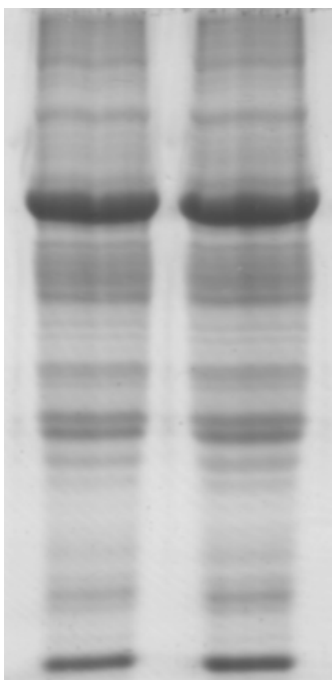


Obr. 4.6 Účinnosť jednotlivých druhov extrakcie proteínov. (DLB – priama extrakcia do TRIS pufru, TCA/LB – extrakcia proteínov metódou TCA/acetón s následným rozpustením vo vzorkovom pufre, TCA/LBT – extrakcia proteínov metódou TCA/acetón s následným rozpustením v pufre s tiomočovinou).

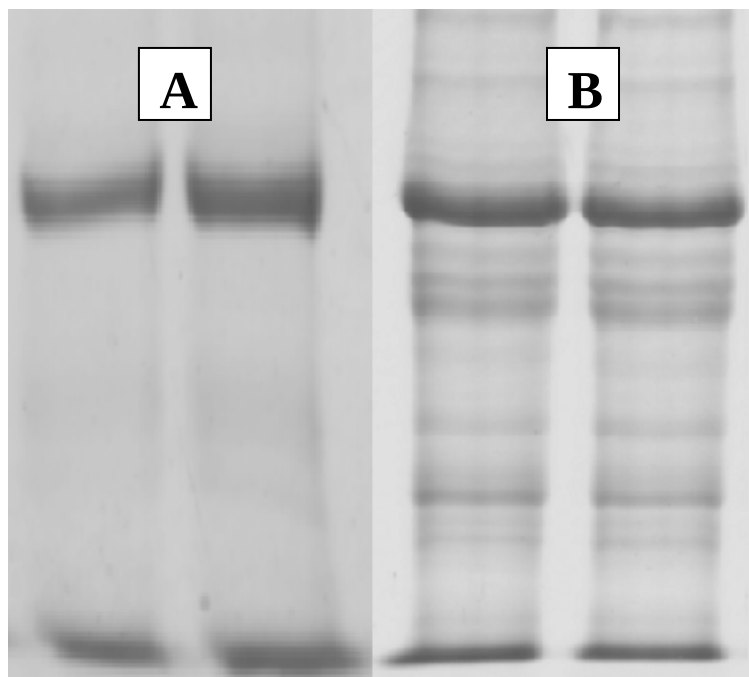
Na obrázku nieje zahrnutý výsledok po extrakcii proteínov s TRIS pufrom podľa Niea [16] pretože po elektroforéze takto pripravenej vzorky gél obsahoval príliš veľa rušivých zón a nebolo z neho možné odčítať.

4.3 Separácia a kvantifikácia enzýmu Rubisco

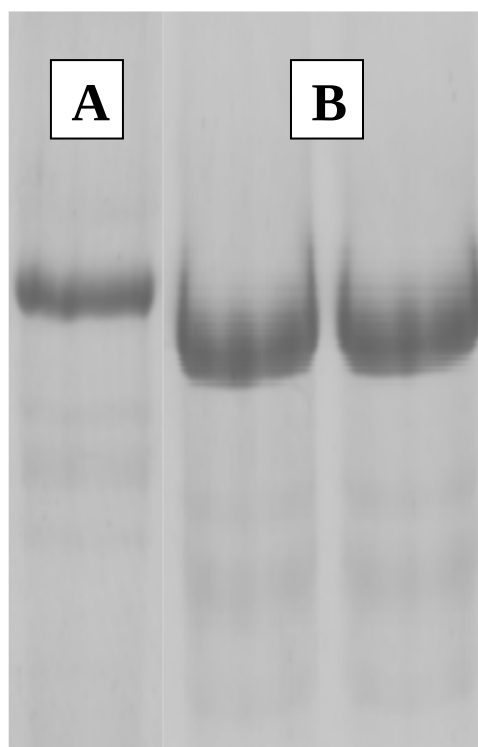
Cieľom pri kvantifikácii enzýmu Rubisco bolo získanie čo najlepších zón veľkej podjednotky na polyakrylamidovom géle. To znamená eliminovanie rozmazávania zón na okrajoch a čo najlepšie oddialenie zón rušivých zón iných proteínov. Tým sa získajú po denzitometrickom vyhodnotení dobre ohraničené píky s dobrou základnou líniou. Tieto podmienky splňoval 8% gél pri napätí 90 V a nanášanom objeme vzorky 5 μ l.



Obr. 4.7 Gél po elektroforéze bielkovín rozpustených v TRIS pufre podľa Niew et al. [16].



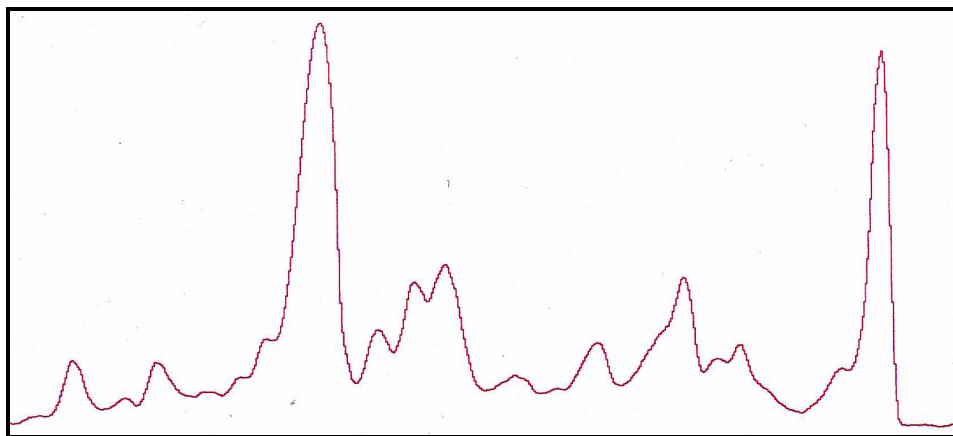
Obr. 4.8 Oddialenie rušivých zón. A – 8% gél, 90V, 5 μ l; B – 10% gél, 120 V, 5 μ l.



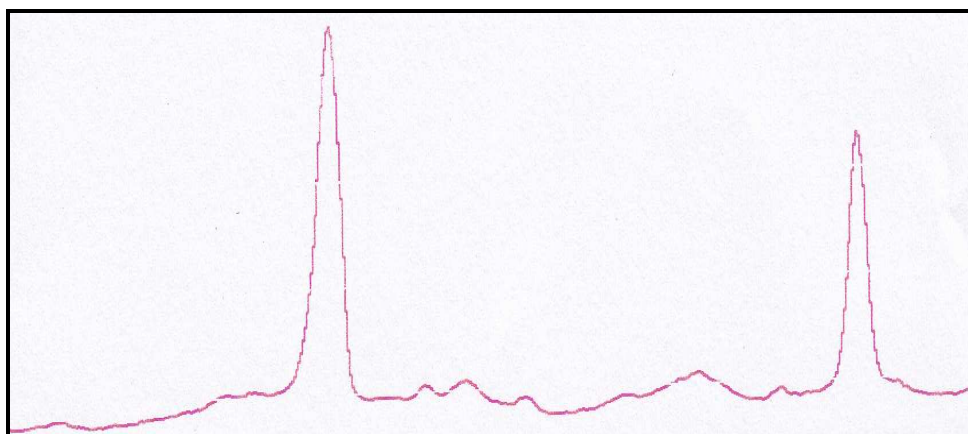
Obr. 4.9 odstránenie rozmazávanie zón znížením napätia a objemu nanášanej vzorky. A – 8% gél, 90 V, 5 μ l; B – 8% gél, 120 V, 10 μ l.

Na obr. 4.8 možno vidieť oddialenie zón ostatných bielkovín od zóny veľkej podjednotky Rubisco pri použití 8% gélu a obr. 4.9 znázorňuje odstránenie rozmazávania zón veľkej

podjednotky Rubisco znížením napätia a objemu nanášaney vzorky. Práve vplyv rušivých zón bol problémom aj pri extrakcii TRIS pufrom podľa Niea [16] čo možno vidieť na *obr. 4.7*. Tieto modifikácie majú za následok zlepšenie kvality základnej línie pík a takisto ich ohraničenia pri denzitometrickom vyhodnotení. Porovnanie možno vidieť na obrázkoch *4.10* a *4.11*.



Obr. 4.10 Chromatogram 10% gélu. Na chromatograme sú zrejmé rušivé zóny iných bielkovín, ktoré znemožňujú presné určenie plochy píku veľkej podjednotky Rubisco.



Obr. 4.11 Zlepšenie ohraničenia píku veľkej podjednotky Rubisco a jeho základnej línie pri použití 8% gélu.

5 Záver

K stanoveniu obsahu enzýmu Rubisco sa používa niekoľko metód. Najčastejšou z nich je separácia listových proteínov vertikálnou elektroforézou na polyakrylamidovom géle s SDS (SDS-PAGE) a následná kvantifikácia veľkej podjednotky Rubisco. Pri denzitometrickej kvantifikácii veľkej podjednotky enzýmu však vznikajú veľké nepresnosti plynúce z nedostatočného oddelenia a zlého ohraničenia zóny veľkej podjednotky Rubisco a nekvalitnej základnej línie. Cieľom tejto práce bola minimalizácia uvedených nepresností, experimentálne overenie postupu extrakcie listových proteínov a rozmedzie koncentrácií enzýmu, pre ktoré je táto metóda lineárna.

Bolo zistené, že metóda je lineárna ($R^2 = 0,9979$) v rozmedzí koncentrácií 0,125–1,000 mg ml⁻¹ štandardu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy (Sigma-Aldrich). Najlepšie oddialenie zóny veľkej podjednotky Rubisco od ostatných zón bolo dosiahnuté na 8% géle. Najkvalitnejšia zóna, a teda aj pík, bol získaný pri napätí 90 V a dávkovaní 5 µl vzorky.

Najúčinnejší extrakčný postup spočíval vo vyzrážaní listových proteínov zmesou kyseliny octovej a aceónu (TCA/acetónová metóda) s následným rozpustením zrazeniny proteínov v pufre podľa Amalraja et al. [17]. Táto metóda je však značne prácna, preto možno pre rutinné stanovenie dopraviť jednoduchú extrakciu listových proteínov do TRIS pufru s následnou separáciou proteínov SDS-PAGE za podmienok uvedených v predchádzajúcom odstavci a denzitometrickým vyhodnotením veľkej podjednotky enzýmu Rubisco.

6 Použitá literatura

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2., opravené vyd. (dotisk) Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0438-6.
- [2] VOET, D., VOETOVÁ, J.G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1990.
- [3] TROWN, P. W. An important method for the isolation of carboxydismutase, *Biochemistry*. 1965, 4: 908-918.
- [4] ARCHIE, R. et al. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective, *Photosynth. Res.*, 2007. 94: 121-143.
- [5] LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T.D.; VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and metabolism*. Dordrecht: Kluwer academic Publisher, 2000, 113 s. ISBN 0-7923-6143.
- [6] GUTTERIDGE, S.; GATENBY, A. A. Rubisco synthesis, assembly, mechanism and regulation, *The plant cell*, 1995, 7: 809-819.
- [7] SCHNEIDER, G.; LINDQVIST, Z.; BRANDEN, C.I.; LORIMER, G. Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9 Å resolution, *EMBO J.*, 1986, 13: 3409-3415.
- [8] KITANO, K.; et al. Crystal structure of a novel-type archeal Rubisco with pentagonal symmetry, *Structure*, 2001, 9: 473-481.
- [9] SPREITZER, R.J. Questions about complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Photosynth. Res.*, 1999, 60: 29-42.
- [10] ANDERSSON, I.; TAYLOR, T. C. Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 2003, 414: 130-140.
- [11] Dostupný z <<http://www.chemgapedia.de>>
- [12] LORIMER, G. H.; BADGER, M. R.; ANDREWS, T. J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase by carbon dioxide and magnesium ions, Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications: *Biochemistry*, 1976, 32: 9018-9024.
- [13] PORTIS, A. R. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1992, 43: 415-437.
- [14] NELSON, D. C.; COX, M. M. *Principles of biochemistry*: W. H. Freeman and company, New York, 2005. Fourth edition p. 723-770.
- [15] ANDERSON, I., BACKLUND, A. Structure and function of Rubisco, *Plant Physiol. Biochem.*, 2008, 46: 275-291.
- [16] NIE, G.-Y., TOMASEVIC, M., BAKER, N. R. Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat, *Plant, Cell Environ.*, 1993, 16: 643-651.
- [17] AMALRAJ, R. S., et al. Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map, *Electrophoresis*, 2010, 31: 1959-1974.
- [18] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. 1. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. 203 s.

- [19] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, 1997, 91: 320-329.
- [20] WARREN, CH. R., CHEN, Z.-L., ADAMS, M. A. Effect of N source on concentration of Rubisco in *Eucalyptus diversicolor*, as measured by capillary electrophoresis, *Physiol. Plant.*, 2000, 110: 52-58.
- [21] METODIEV, M., DEMIREVSKA-KEPOVA, K. Rubisco quantitation in leaves of different barley varieties by enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Exp. Bot.*, 1992, 43: 155-158.
- [22] BESFORD, R. T. The greenhouse effect: Acclimation of tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes, *J. Plant Physiol.*, 1990, 136: 458-463.
- [23] Kobza, J., Seemann, J. R. Mechanisms for the light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 85: 3815-3819.
- [24] DAMERVAL, C., VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT H. Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52-54.
- [25] ROGERS, A., ELLSWORTH, D.S., HUMPHRIES, S.W. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated PCO₂. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 1555-1561.

7 Zoznam použitých skratiek

ATP	adenozíntrifosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimetylamonio]-1-propánsulfonát
DTT	ditiotreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
G1P	glukosa-1-fosfát
GAP	glyceraldehyd-3-fosfát
HPLC	vysokotlaká kvapalinová chromatografia
LB	vzorkový pufer
LBT	tiomočovínový vzorkový pufer
NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsírán sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamín
TCA	kyselina trichlóroctová
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan