

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

DENNÍ CHOD OBSAHU A AKTIVITY ENZYMU RUBISCO V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO

DIURNAL CHANGES OF RUBISCO CONTENT AND ITS ACTIVITY UNDER AMBIENT
AND ELEVATED CONCENTRATIONS OF CARBON DIOXIDE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

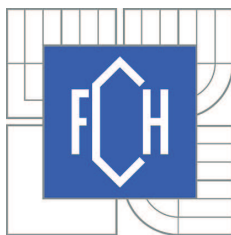
Bc. ZUZANA MATULKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0392/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Zuzana Matulková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého

Zadání diplomové práce:

V teoretické části práce pojednat o základních procesech fotosyntézy, enzymu Rubisco, vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny a o denním chodu obsahu a aktivity Rubisco u různých druhů rostlin.

V experimentální části sledovat změny obsahu, aktivity a aktivace enzymu Rubisco v průběhu dne u buku lesního v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého. Z průběhu počáteční a celkové aktivity a obsahu Rubisco odvodit mechanismus regulace aktivity tohoto enzymu.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

Bc. Zuzana Matulková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci je popsán denní chod počáteční a celkové aktivity a obsahu enzymu Rubisco u buku lesního (*Fagus sylvatica*) v podmínkách normální, tj. $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (A-ambient) a zvýšené, tj. $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (E-elevated) koncentrace CO_2 v průběhu dne. Vzorky byly odebrány 8.7.2009 (10:00-21:30), 9.7.2009 (4:00-12:00) a 22.7.2009 (4:00-21:30). Spektrofotometrickou metodou byla stanovena počáteční a celková aktivita a z poměru počátečních a celkových aktivit byl vypočítán stupeň aktivace. Obsah enzymu Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE a z poměru počátečních a celkových aktivit a obsahu enzymu Rubisco byla vypočítána hodnota počáteční a celkové specifické aktivity.

V našem experimentu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi aktivitami u buků kultivovaných v atmosféře s normální a zvýšenou koncentrací CO_2 , nedošlo tedy k aklimační depresi aktivity Rubisco vlivem zvýšené koncentrace CO_2 . Denní chod aktivit vykazoval pouze statisticky nevýznamné kolísání. Po rozednění nedošlo k významnému vzestupu celkové aktivity Rubisco, což svědčí o nepřítomnosti nebo zanedbatelném vlivu nočního inhibitoru CA1P u buku. Silné kolísání stupně aktivace (40–90 %) svědčí o regulaci fotosyntézy v průběhu dne prostřednictvím karbamylace enzymu Rubisco.

Obsah enzymu Rubisco u buků kultivovaných ve zvýšené koncentraci CO_2 byl nižší než u buků rostoucích při normální koncentraci CO_2 . V podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 lze tedy konstatovat existenci aklimační deprese na úrovni obsahu Rubisco. Před rozedněním vykazoval obsah enzymu Rubisco na hranici statistické významnosti nevýrazné minimum, v průběhu dne bylo zaznamenáno pouze jeho nevýznamné kolísání.

ABSTRACT

In this diploma thesis, the diurnal changes of initial and total Rubisco activity and Rubisco enzyme content in beech (*Fagus sylvatica*) were studied under conditions of ambient (A) CO_2 concentration ($350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) and elevated (E) CO_2 concentration ($700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) during the day. Samples were taken on July 8th (from 10:00 to 21:30), on July 9th (from 04:00 to 12:00) and then on July 22th (from 04:00 to 21:30). The initial and total activity were measured spectrophotometrically and the activation level was calculated from the ratio of initial and total activities. Rubisco enzyme content was determined by SDS-PAGE method and the initial and total specific activity were calculated from the ratio of initial or total activity and Rubisco enzyme content.

In our experiment no statistically significant difference was found between Rubisco activities in beeches cultivated under conditions of ambient CO_2 concentration and elevated CO_2 concentration, so any down-regulation of Rubisco activity did not appear under the influence of ambient CO_2 concentration. Diurnal changes of Rubisco activities showed only statistically nonsignificant fluctuation. After daylight no significant increase of total Rubisco activity was observed, which demonstrates the absence or the immaterial effect of CA1P night inhibitor in beech. Intensive fluctuation of the activation level (40–90 %) proves the regulation of photosynthesis during the day via Rubisco enzyme carbamylation.

Rubisco enzyme content in beech cultivated under conditions of ambient CO₂ concentration was lower than that one in beech cultivated under conditions of elevated CO₂ concentration. Then down-regulation of Rubisco enzyme content is presented under conditions of ambient CO₂ concentration. Before daylight Rubisco enzyme content showed an indistinctive minimum on the level of statistical significance, during the day only nonrelevant fluctuation was noticed.

KLÍČOVÁ SLOVA

obsah Rubisco, aktivita Rubisco, buk lesní, denní chod, zvýšená koncentrace oxidu uhličitého

KEYWORDS

Rubisco content and activity, beech, diurnal changes, CO₂ elevated concentration

MATULKOVÁ, Z. *Denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 70 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis autora

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi Ph.D. za veškerou pomoc a podporu, trpělivost a za odborné vedení mé diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Fotosyntéza	10
2.1.1 Rychlost fotosyntézy	14
2.1.1.1 Vliv světla	14
2.1.1.2 Vliv CO ₂ a jeho zvýšené koncentrace na rostliny	14
2.1.1.3 Vliv teploty, interakce teploty a zvýšené koncentrace CO ₂	16
2.1.1.4 Rychlost fotorespirace	16
2.1.1.5 Vodivost průduchů	17
2.1.1.6 Rychlost dýchání	17
2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)	17
2.2.1 Struktura	18
2.2.2 Karboxylace a oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu	20
2.2.3 Aktivace Rubisco	22
2.2.3.1 Spontánní aktivace	23
2.2.3.2 Aktivace zprostředkovaná aktivasou	23
2.2.3.3 Vliv 2-karboxyarabinitol-1-fosfátu na aktivitu Rubisco	25
2.2.3.4 Časový průběh aktivace	26
2.2.4 Aktivita a množství Rubisco	26
2.2.5 Vliv různých podmínek na obsah a aktivitu enzymu Rubisco	27
2.2.5.1 Vliv dusíkaté výživy	27
2.2.5.2 Vliv ozáření	27
2.3 Metody stanovení aktivity Rubisco	28
2.3.1 In vivo	28
2.3.1.1 Gazometrické stanovení	28
2.3.2 In vitro	28
2.3.2.1 Spektrofotometrické stanovení	28
2.3.2.2 Radiometrické stanovení	29
2.4 Metody stanovení obsahu Rubisco	30
2.4.1 ELISA	30
2.4.2 Radioimunsrážecí technika	31
2.4.3 SDS-PAGE	31
2.4.4 Kapilární elektroforéza	33
2.4.5 HPLC	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 Odběr vzorků, materiál	35
3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco	36
3.2.1 Přístroje	36
3.2.2 Chemikálie	36
3.2.3 Příprava roztoků	37

3.2.3.1	Příprava zásobního roztoku 50mM HEPES-KOH, pH 7,8	37
3.2.3.2	Příprava zásobního roztoku 50mM HEPES-KOH, pH 8,0	37
3.2.3.3	Příprava aktivačních roztoků	37
3.2.3.4	Příprava extrakčního roztoku	37
3.2.3.5	Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy	38
3.2.3.6	Příprava roztoku kreatinfosfokinasy	38
3.2.3.7	Příprava roztoku R5P	38
3.2.3.8	Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy	38
3.2.3.9	Příprava pracovního roztoku	38
3.2.4	Extrakce enzymu	38
3.2.5	Měření aktivity	39
3.2.5.1	Měření počáteční aktivity	39
3.2.5.2	Měření celkové aktivity	39
3.2.6	Výpočet aktivity enzymu Rubisco	39
3.3	Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco	41
3.3.1	Přístroje	41
3.3.2	Chemikálie	41
3.3.3	Příprava roztoků	42
3.3.3.1	Roztoky pro přípravu gelů	42
3.3.3.2	Pomocné roztoky	42
3.3.3.3	Roztoky k vizualizaci bílkovin	42
3.3.4	Příprava gelů	42
3.3.4.1	Separční gel	43
3.3.4.2	Zaostřovací gel	43
3.3.5	Příprava standardů	44
3.3.6	Příprava vzorků	44
3.3.7	Elektroforéza	44
3.3.8	Zviditelnění bílkovin	44
3.3.9	Vyhodnocení gelů	45
3.3.10	Výpočet	45
3.4	Stanovení specifické aktivity	46
3.5	Stanovení stupně aktivace	46
4.	VÝSLEDKY	47
5.	DISKUZE	60
5.1	Denní chod aktivity Rubisco	60
5.2	Denní chod obsahu Rubisco	61
6.	ZÁVĚR	63
7.	POUŽITÁ LITERATURA	64
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70

1. ÚVOD

Produkce potravin na Zemi závisí primárně na fotosyntéze, což je jeden z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Jedná se o vysoce kvantitativní biologický proces přeměny světelné energie na chemickou. Chemicky se jedná o převedení uhlíku z nejméně oxidované formy o nízké energii, oxidu uhličitého, na redukovaný materiál o vysoké energii, sacharidy. Fotosyntéza je silně endotermický redukční proces, energii poskytuje sluneční záření zachycované fotoreceptory a redukční síla pochází u vyšších rostlin z vodíku vody. Vznikající kyslík tedy nepochází z oxidu uhličitého, ale z oxidace vody.

Vstupní bránou anorganického uhlíku do biosféry je enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa), který katalyzuje vazbu oxidu uhličitého na organickou molekulu (karboxylaci) a je tedy klíčovým enzymem fotosyntézy. Rubisco je nejrozšířenější a z hlediska biosférického i nejdůležitější enzym na Zemi a kromě karboxylace katalyzuje také oxygenaci neboli vazbu molekuly kyslíku na stejnou organickou molekulu (oxygenaci). Schopnost Rubisco katalyzovat dva typy reakcí tkví ve strukturní podobnosti molekul CO_2 a O_2 , které si konkurují na aktivním místě enzymu.

Rubisco je pozoruhodně neúčinný enzym, jeho číslo obratu činí necelé tři molekuly substrátu za sekundu, zatímco u typického enzymu je to asi 1000 molekul substrátu za sekundu. Tato pomalost je nahrazována množstvím, v jakém se v rostlinách tento enzym nachází (tvoří 30–50 % celkového obsahu proteinů v listech). Enzym Rubisco existuje v aktivované a neaktivované formě, proto není aktivita enzymu přímo úměrná jeho obsahu. Pouze aktivovaná forma je totiž katalyticky aktivní a navenek se projevuje určitou aktivitou. Aktivita enzymu je regulována pomocí pH (optimum je při pH 8), koncentrace hořčnatých kationtů, množství světla a substrátu. To znamená, že při stejném obsahu enzymu se může měnit jeho aktivita (přecházet z aktivované do neaktivované formy), proto je důležité měřit aktivitu i obsah enzymu.

Efektivita, či spíše neefektivita tohoto enzymu je hlavním limitujícím faktorem rychlosti fotosyntézy. V posledních letech přibývá publikací, ve kterých je snaha genovým inženýrstvím vyrobit efektivnější Rubisco a tím radikálně zvýšit intenzitu fotosyntézy, dále umožnit genovými manipulacemi účinnější aktivaci.

Zvýšená koncentrace CO_2 vede ke zvýšení rychlosti fotosyntézy. Při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny se u mnoha druhů rostlin takto zvýšená rychlost fotosyntézy postupně snižuje, nastává aklimační deprese, která se vysvětluje nahromaděním sacharidů ve fotosyntetizující tkáni, což vede k poklesu rychlosti fotosyntézy, ke snížení množství nebo aktivity enzymu Rubisco nebo dalších enzymů, katalyzujících reakce Calvinova cyklu. Dochází také ke snížení obsahu dusíku a rozpustných bílkovin v listech.

Enzym Rubisco můžeme stanovit pomocí množství metod. Aktivita Rubisco se stanovuje *in vivo* gazometricky nebo *in vitro* radiometricky či spektrofotometricky. Standardní metodou pro stanovení obsahu Rubisco je vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE), dále je možné obsah enzymu stanovit také imunochemicky nebo kapilární elektroforézou.

Tato diplomová práce se zabývá denním chodem obsahu a aktivity enzymu Rubisco u buku lesního v podmínkách normální a zvýšené atmosférické koncentrace oxidu uhličitého. V teoretické části diplomové práce je stručně popsána fotosyntéza a vliv zvýšené koncentrace

CO₂ na fotosyntézu. Další kapitoly jsou věnovány enzymu Rubisco, jeho struktuře, významu pro fotosyntézu, jeho aktivaci a závislosti aktivity a obsahu na vnějších podmínkách. V experimentální části byla spektrofotometrickou metodou stanovena počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco u buku lesního, její změny v průběhu dne. Metodou SDS-PAGE byl sledován denní chod obsahu enzymu Rubisco u buku lesního. Z obsahu a aktivity enzymu Rubisco byla vypočítána počáteční a celková specifická aktivita a stupeň aktivace.

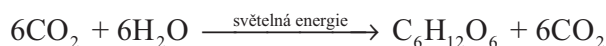
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě, protože umožňuje existenci chemotrofních organismů.

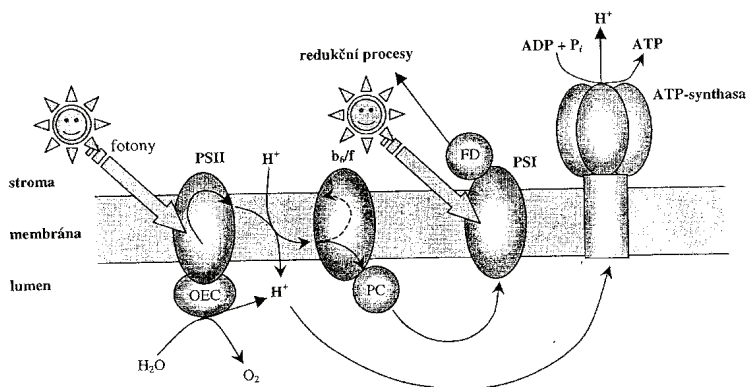
- Zachycuje sluneční energii a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů.
- Je hlavním producentem kyslíku naší planety, nepostradatelného pro existenci aerobních organismů.

Z fyzikálního hlediska představuje fotosyntéza přeměnu energie slunečního záření na energii chemickou. Tato přeměna je uskutečněna biologickým objektem. Z chemického hlediska se jedná o velmi náročný děj, převedení uhlíku z nejvíce oxidované formy o nízké energii, oxidu uhličitého, do molekuly organické sloučeniny o vysoké energii – sacharidu. Jedná se o silně endergonický proces, kde energii poskytuje sluneční záření, zachycované fotoreceptory (chlorofylem), a redukční síla pochází u vyšších zelených rostlin z vodíku vody. Redukce CO₂ na cukry je spřažena s oxidací H₂O, vedoucí ke vzniku O₂. Vznikající kyslík tedy nepochází z oxidu uhličitého, ale z oxidace vody. Fotosyntézu lze tedy vystihnout sumární rovnicí:



Fotosyntéza probíhá ve dvou oddělených, ale na sebe navazujících fázích – primární (světelné) a sekundární (temnostní) [4].

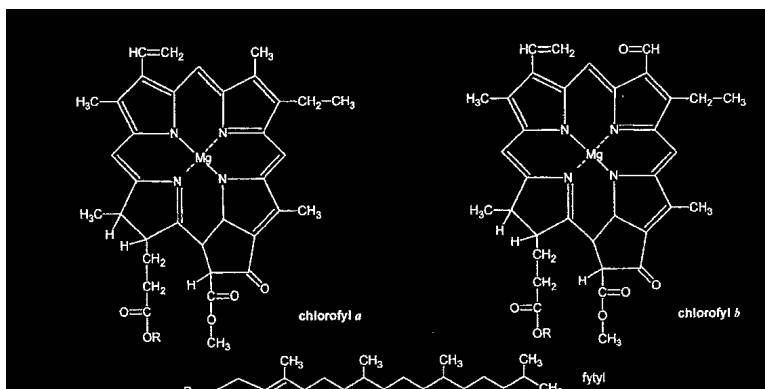
Světelná nebo též primární fáze je fotochemický děj spočívající v přeměně fotonů slunečního záření na chemickou energii. Změna sluneční energie na energii chemickou však není přímá, nejdříve se energie záření mění na energii excitovaných elektronů, která se pak používá na výrobu makroergických sloučenin (ATP a NADPH).



Obr.1 Enzymy primární fáze fotosyntézy v tylakoidní membráně. OEC – komplex uvolňující kyslík, cyt b₆/f – komplex cytochromů, PC – plastocyanin, FD – ferredoxin, PSI – fotosystém I, PSII – fotosystém II. Převzato z [2].

Primární fáze je realizována fotosyntetickým aparátem, který se skládá ze tří částí.

- Fotoreceptory jsou sloučeniny vázané na proteiny, umístěné v tylakoidech. Jsou to pigmenty, které absorbují světelné záření potřebné pro fotosyntézu. Z chemického hlediska se jedná o tetrapyrrolové sloučeniny chlorofyl *a* a chlorofyl *b*, které ve svém centru obsahují hořečnatý kation. Jejich činnost často doplňují karotenoidy.

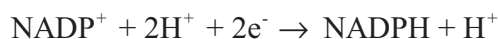


Obr. 2 Struktura chlorofylu *a* a *b*. Převzato z [2].

- Fotosyntetické reakční centrum, které provádí přeměnu světelné energie na energii elektrickou. Dochází tady k excitaci elektronů fotoreceptoru absorbovaným zářením.
- Řetězec oxidoreduktas, přeměňující energii excitovaných elektronů na energii chemickou.

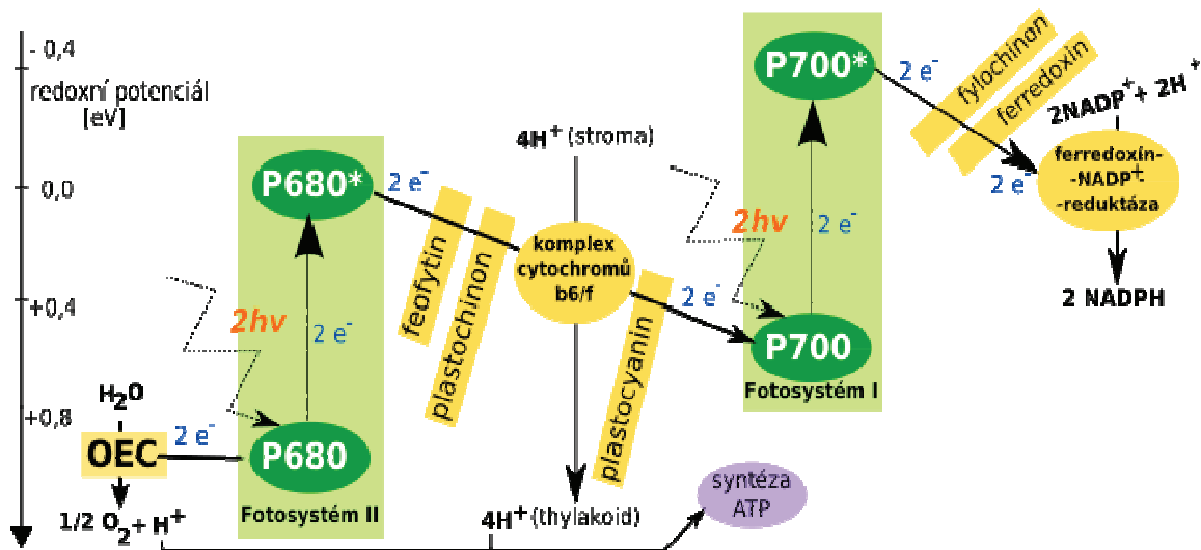
Prvním krokem primární fáze fotosyntézy je absorpce záření chlorofylovými molekulami, které jsou pomocí vazby na speciální bílkoviny neustále optimálně nasměřovány, aby mohly předávat absorbovanou energii. Absorpce fotonů vede k excitaci a uvolnění elektronů, které opustí molekulu chlorofylu a procházejí systémem přenašečů o stoupajícím redoxním potenciálu. Část energie excitovaných elektronů je použita k výrobě ATP. Elektrony se v základním stavu vrací zpět do reakčního centra chlorofylu. Systém transportu elektronů, který začíná a končí v molekule chlorofylu, je současně akceptorem i donorem elektronů, se nazývá cyklická fotofosforylace.

Může však dojít i k uložení energie excitovaných elektronů do NADPH. V takovém případě ale nedojde k návratu elektronů do reakčního centra chlorofylu a tento děj nazýváme necyklickou fotofosforylací.



K regeneraci chlorofylu do původního redukováného stavu je potřeba použít elektrony z oxidace jiné molekuly. Jako donor elektronů je u oxygení fotosyntézy používána voda, jejíž oxidace vede ke vzniku kyslíku:



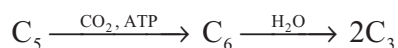


Obr. 3 Z-schéma světelné fáze fotosyntézy: přenos elektronů získaných fotolýzou vody elektronovými přenašeči za pomoci energie získané absorpcí světla fotosystémy I a II. Převzato z [4].

Současně se světelnou fází probíhá temná neboli sekundární fáze. Není závislá na energii slunečního záření a většina reakcí je identická nebo podobná jako obrácené reakce glykolýzy a regenerační fáze pentosového cyklu. V této části fotosyntézy dochází k využití NADPH, které vzniká a hromadí se v primární části fotosyntézy, dále se využívá energie, uložená v ATP, k redukci CO_2 na sacharidy. Biosyntéza sacharidů probíhá v kapalně části chloroplastu (stromatu) a v cytosolu. Reakce probíhají v cyklických sledech a mohou probíhat několika cestami. Nejznámější z nich je cyklický děj, nazvaný podle objevitele Calvinův cyklus.

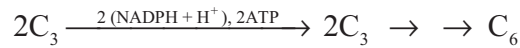
Calvinův cyklus probíhá ve třech fázích:

- Reakce molekuly CO_2 jako karboxylu s molekulou ketopentosy ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP). Tato fáze slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní formy CO_2 na aktivovanou redukovatelnou formu. Výsledkem je vznik nestálé sloučeniny, která se rozpadá na dvě tříuhlíkové molekuly 3-fosfoglycerátu. Reakce je katalyzovaná enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou (Rubisco).



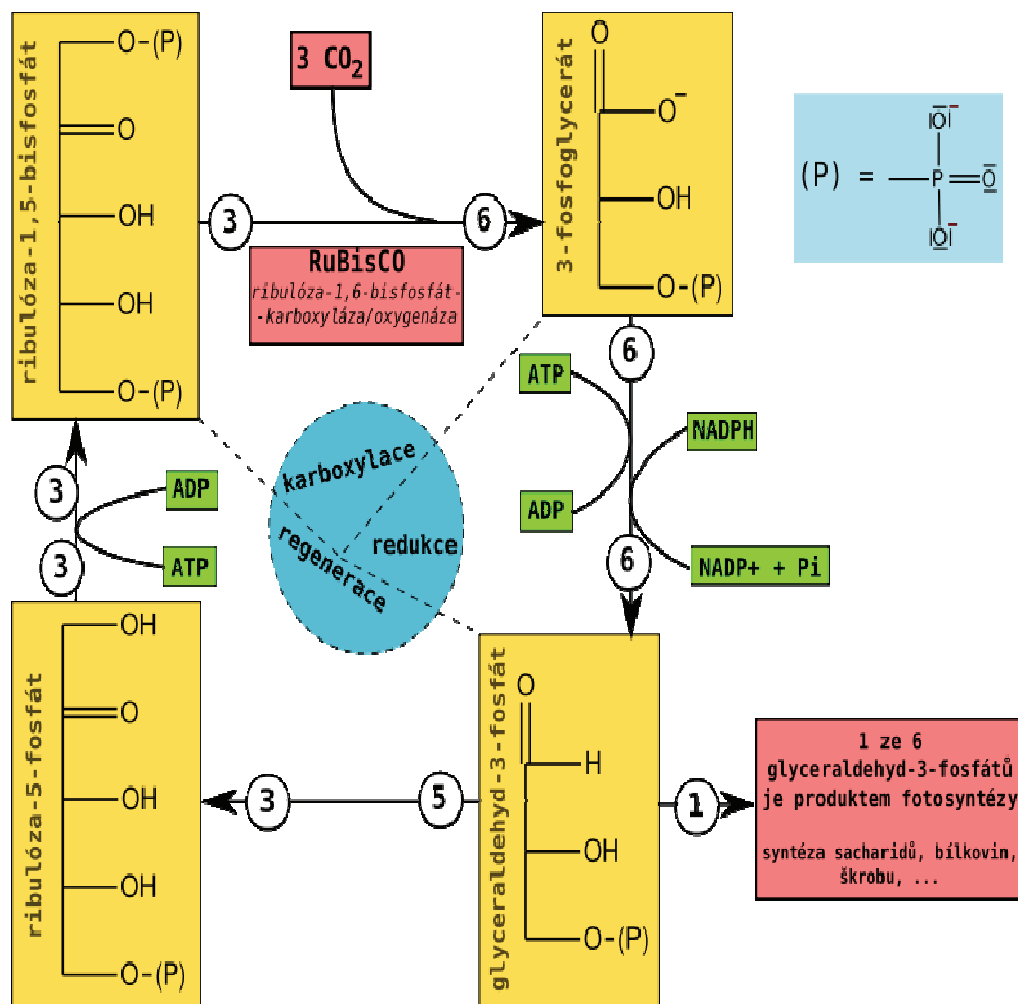
- Fosforylace 3-fosfoglycerátu pomocí ATP na 1,3-bisfosfoglycerát a jeho následná redukce molekulou NADPH na glygeraldehyd-3-fosfát. Z něho pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu

a tam se aldolovou kondenzací, katalyzovanou aldolase, přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát, ze kterého pak izomerací vzniká glukosa-6-fosfát.



- Regenerace akceptoru CO₂ (ribulosa-1,5-bisfosfátu) je obrácenou regenerační fází pentosového cyklu. Z 5 molekul hexos se při ní regeneruje 6 molekul pentos.

V každé obrátce Calvinova cyklu je zachycena jedna molekula atmosférického CO₂ a zabudována do organické molekuly. K vytvoření glukosy je potřeba 6 obrátek Calvinova cyklu [1,5].



Obr.4 Schématické znázornění Calvinova cyklu. Převzato z [3].

2.1.1 Rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy závisí na velkém množství faktorů. Z vnitřních faktorů jsou to zejména množství chlorofylu, stáří listů a minerální výživa, mezi vnější činitele patří světlo, teplota, voda a koncentrace CO₂. Další přímé faktory, které ovlivňují rychlost fotosyntézy jsou rychlost fotorespirace, vodivost průduchů a rychlost dýchání [6].

2.1.1.1 Vliv světla

Na fotosyntézu má největší vliv spektrum a intenzita světelného záření. Spektrum hlavně při vlnové délce 380–760 nm. Přechodem od červených k fialovým paprskům se kvantový zisk snižuje, i když se snižující absorpce chlorofylů částečně kompenzuje doprovodnými pigmenty. Minimální intenzita světla, která je zapotřebí pro začátek fotosyntézy, je u různých druhů rostlin různá. S rostoucí intenzitou světla se rychlost fotosyntézy zvyšuje až do okamžiku, kdy se příjem a výdej CO₂ vyrovná a nastává tzv. kompenzační světelný bod. Dále pak dochází ještě nárůstu rychlosti až po bod světelného nasycení, kdy se rychlost fotosyntézy ustálí. Příliš vysoká intenzita světla je však také nežádoucí z důvodu vzniku velkého množství kyslíkových radikálů, které mohou porušit fotosystém II, a tím zastavit fotosyntézu [6].

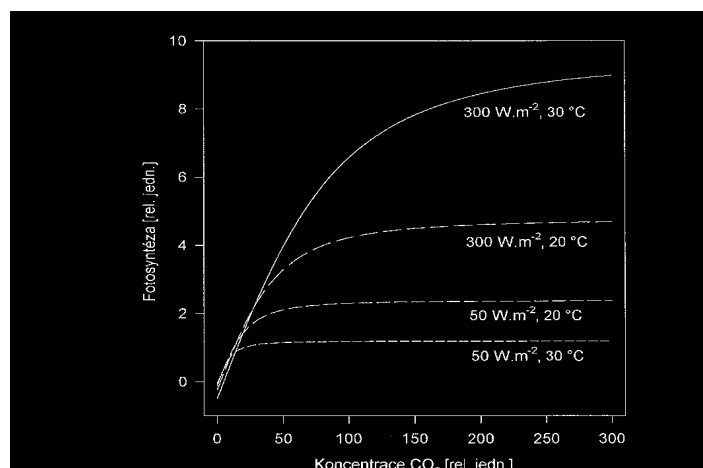
2.1.1.2 Vliv CO₂ a jeho zvýšené koncentrace na rostliny

Atmosférický oxid uhličitý je hlavním a nejdůležitějším dodavatelem uhlíku pro fotosyntézu. Jeho koncentrace ve vzduchu kolísá kolem 0,038 %. Rychlost fotosyntézy jako funkce oxidu uhličitého je křivočará závislost s nasycením. Nejnižší koncentrace pro začátek fotosyntézy je 0,008–0,010 % CO₂. Při zvyšování koncentrace se rychlost fotosyntézy zvyšuje až do bodu nasycení (0,06–0,4 % CO₂), kdy se ustálí. Dalším růstem koncentrace CO₂ za hranici 2–5 % CO₂ ve vzduchu fotosyntéza ustane [6].

K matematickému popisu závislosti koncentrace CO₂ a rychlosti fotosyntézy se nejčastěji používá rovnice Michaelise a Mentenové:

$$P = \frac{P_{\max} \cdot c_{\text{CO}_2}}{c_{\text{CO}_2} + K_c}$$

kde P je rychlost fotosyntézy, P_{max} je nejvyšší dosažená hodnota rychlosti fotosyntézy a K_c je konstanta obdobná konstantě K_m z rovnice Michaelise a Mentenové [7].



Obr. 5 Závislost rychlosti fotosyntézy na koncentraci CO₂ při různých teplotách a úrovních ozáření. Převzato z [7].

Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na rychlost fotosyntézy je studován již dlouhou dobu. Rostliny C₄ jsou při stávající koncentraci CO₂ tímto substrátem saturovány, naproti tomu rostliny C₃ reagují na další zvýšení koncentrace CO₂ zvýšením rychlosti fotosyntézy. Zvýšení rychlosti fotosyntézy je spojeno s působením CO₂ na enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu), ale také s regulačními účinky CO₂ na vazbu iontů Mn²⁺ na donorové straně fotosystému II a vazbu chinonů na akceptorové straně téhož fotosystému.

Pokud rostlinu umístíme do prostředí se zvýšenou koncentrací CO₂, dochází ke zvýšení rychlosti fotosyntézy. Při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO₂ se u mnoha druhů rostlin takto zvýšená rychlost fotosyntézy postupně snižuje a někdy dokonce dosáhne i počáteční hodnoty. Tento jev se nazývá aklimace nebo aklimační deprese. Aklimace se vysvětluje nahromaděním sacharidů ve fotosyntetizující tkáni, což má za následek pokles rychlosti fotosyntézy, snížení množství nebo aktivity enzymu Rubisco nebo dalších enzymů, katalyzujících reakce Calvinova cyklu. Dochází také ke snížení obsahu dusíku a rozpustných bílkovin v listech. Klesá i obsah chlorofylů, kvantového výtěžku fluorescence i fotochemického zhášení. Aklimace projevující se poklesem fotosyntetické účinnosti nastává jen tehdy, když všechny sinky rostliny vykazují nižší akumulační kapacitu než odpovídá zvýšené rychlosti produkce asimilátů [6,7].

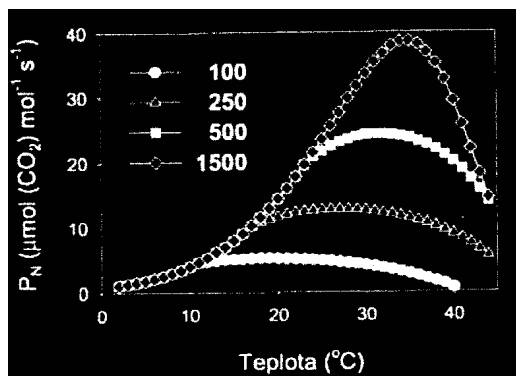
Pokles rychlosti fotosyntetického aparátu při pěstování ve zvýšené koncentraci CO₂ lze vysvětlit také dalším způsobem. Při pěstování rostlin v běžných podmínkách a při okolní koncentraci CO₂ odpovídá rychlost tvorby asimilátů kapacitě transportních drah i aktivitě příslušných sinků. Za této situace je exprese fotosyntetických genů řízena především světlem a stupněm vývoje rostliny. Při kultivaci rostlin v podmínkách se zvýšenou koncentrací CO₂ přesahuje rychlost tvorby asimilátů možnosti jak jejich transportu, tak i využívání sinku. Proto se začne hromadit v cytosolu sacharosa, která je transportována do vakuoly a zde invertasou rozštěpena na glukosu a fruktosu. Tyto hexosy jsou zpětně transportovány do cytosolu, kde se zvyšuje jejich koncentrace. Ovšem sacharosa může být také exportována do apoplastu, kde je zase apoplastickou invertasou rozložena na hexosy transportovatelné rovněž zpátky do

cytoplazmy. Není vyloučeno, že příslušní přenašeči hexos jsou místem, odkud vzniká signál indukující pokles exprese fotosyntetických genů [4].

2.1.1.3 Vliv teploty, interakce teploty a zvýšené koncentrace CO_2

Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě je exponenciální. Zvýšení teploty o $10\text{ }^\circ\text{C}$ urychluje reakci 2–3krát. Při nízkých teplotách fotosyntetizují rostliny pomalu, zvyšováním teploty rychlost fotosyntézy roste, až dosáhne hranici teplotního optima, poté nastává pomalý pokles. Pokles rychlosti fotosyntézy nastává již při teplotách, které nepoškozují fotosyntetický aparát. Při teplotě $35\text{--}45\text{ }^\circ\text{C}$ se většinou fotosyntéza zastavuje, dochází k narušení normálního uspořádání fotosyntetického aparátu a k denaturaci bílkovin. Vliv teploty na fotosyntézu se výrazněji projevuje při vyšší intenzitě světla.

Rychlost fotosyntézy je výrazně ovlivňována kromě zvýšené koncentrace CO_2 také vlivem jeho vzájemné interakce se změnou teploty. Při vyšší koncentraci CO_2 se teplotní optimum posouvá k vyšším hodnotám a toto optimum se výrazně zužuje. Při zvyšování teploty dochází k výraznému poklesu hodnoty specifitního faktoru Rubisco, který udává poměr rychlosti karboxylace k rychlosti oxygenace při stejných koncentracích CO_2 a O_2 , a to jednak větším poklesem rozpustnosti CO_2 vzhledem k O_2 a také poklesem afinity Rubisco k CO_2 vzhledem k afinitě O_2 [4,7].



Obr. 6 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při různých ozářenostech. Převzato z [4].

2.1.1.4 Rychlost fotorespirace

Enzym Rubisco je bifunkční enzym. Metabolické základy fotosyntézy a fotorespirace spočívají ve schopnosti enzymu Rubisco navázat na tentýž substrát (ribulosa-1,5-bisfosfát) jak CO_2 (karboxylace) tak i O_2 (oxygenace). V případě navázání molekuly O_2 na uvedený substrát vzniká kromě fosfoglycerátu také fosfoglykolát, jímž začíná tzv. glykolátová cesta, která je součástí fotorespirace. Během glykolátové cesty dochází při postupném navázání dvou molekul O_2 k uvolnění jedné molekuly CO_2 . Při vyšší koncentraci CO_2 je fotorespirace inhibována. K úplné inhibici fotorespirace dochází při snížení koncentrace O_2 na 5 % a méně nebo dvoj- až trojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 . Zvýšená koncentrace CO_2 ve vzduchu, který obklopuje list působí na rostliny dvojnásobem:

- Zvýšení koncentrace substrátu (CO_2) zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy fotosyntézy.

- Zvýšení koncentrace CO₂ zvyšuje hodnotu poměru koncentrací CO₂/O₂, a tím snižuje fotorespiraci. To představuje další zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy.

Existuje řada metod měření fotorespirace listů a rostlin, ale všechny mají určité nedostatky, snad i proto existuje relativně málo prací udávajících kvantitativní hodnoty fotorespirace [4].

2.1.1.5 Vodivost průduchů

Změna koncentrace CO₂ v atmosféře obklopující list ovlivňuje míru otevřenosti průduchů, která modifikuje jejich vodivost. Vyšší koncentrace CO₂ vede u většiny rostlin k přivření průduchů. Podobně působí i pokles rychlosti fotosyntézy, což zřejmě souvisí s koncentrací CO₂ v intercelulárách. Drake et al. [6] shrnuli výsledky 41 pokusů s 28 druhy rostlin a zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při dvojnásobné atmosférické koncentraci činí 20 %. Pokles vodivosti průduchů, který je způsobený zvýšením koncentrace CO₂ v okolí listu, nemusí vést k poklesu rychlosti čisté fotosyntézy, protože současně dochází ke zvýšení gradientu koncentrace CO₂ mezi atmosférou a místem karboxylace, což fotosyntézu stimuluje. Závisí pak na vzájemném poměru mezi změnou vodivosti a změnou gradientu CO₂, jestli dojde k poklesu nebo zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy.

Snížená rychlost transpirace ovlivňuje jednotlivé složky energetické bilance listu, což se následně projeví i ve změně jejich teploty. Idso et al. [8] prokázali, že zvýšení teploty listů, které je způsobené zvýšenou koncentrací CO₂, je přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů [4].

2.1.1.6 Rychlost dýchání

Rychlost respirace je v porovnání s rychlostí čisté fotosyntézy relativně malá. Ztráty uhlíku způsobené dýcháním odpovídají většinou méně než 10 % jeho zisku paralelně probíhající fotosyntézou. Přesto je dýchání proces, který významně ovlivňuje celkovou bilanci uhlíku v rostlině. Dýchání probíhá nejen v noci, kdy je fotosyntéza nulová, ale také ve dne, přestože rychlosti denního dýchání jsou patrně nižší než rychlosti dýchání v noci. Při sledování vlivu CO₂ na rychlost mitochondriálního dýchání lze rozlišit:

- přímý bezprostřední vliv zvýšené koncentrace CO₂, při němž dochází ke snížení rychlosti dýchání. Gonzáles-Meler et al. [9] prokázali, že zvýšená koncentrace CO₂ inhibuje externě dodaný sukcinát nebo NADPH k suspenzi mitochondrií. Dále zjistili, že zvýšená koncentrace CO₂ inhibuje aktivitu sukcinátdehydrogenasy i cytochrom-c-oxidasy.
- nepřímý vliv zvýšené koncentrace CO₂, který se projevuje při aklimační depresi rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO₂. V tomto případě však existují velmi protichůdné údaje popisující nejen inhibici, ale i stimulaci dýchání.

Novější publikace se kloní k přesvědčení, že dýchání je vyššími koncentracemi CO₂ inhibováno [5].

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

V roce 1947 Wildman a Bonner [10] objevili pomocí elektroforézy v extraktu listů protein, který u některých rostlin tvořil až polovinu hmotnosti listů a pojmenovali ho Frakce I. Teprve

další studie, které provedli o deset let později Calvin a Massini [11], Quayle et al. [12], Weissbach et al. [13] prokázaly, že tento protein vykazuje enzymatickou aktivitu a katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, která vede ke tvorbě dvou molekul 3-fosfoglycerátu. Enzym byl nazván ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa. V šedesátých letech Bowes et al. [14], Andrews et al. [15], Lorimer et al. [16] objevili druhou katalytickou aktivitu enzymu, a to oxygenaci RuBP vedoucí k tvorbě molekuly fosfoglykolátu a fosfoglycerátu. Název enzymu byl poté změněn na ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/ oxygenasa a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco [17].

Rubisco tvoří spojení mezi živou a neživou přírodou a je výchozím bodem každého potravního řetězce. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších proteinů na planetě a tvoří až 16 % veškerých bílkovin v chloroplastech. Fixuje asi 10^{11} tun CO_2 ročně. Nevýhodou tohoto enzymu je jeho nízká katalytická účinnost ($k_{\text{kat}}=2-12\text{s}^{-1}$). Aby se udržela dostatečná rychlost fotosyntézy musí být enzym přítomen ve velkém množství [18].

Rubisco je klíčový enzym fotosyntézy, který katalyzuje následující typy reakcí:

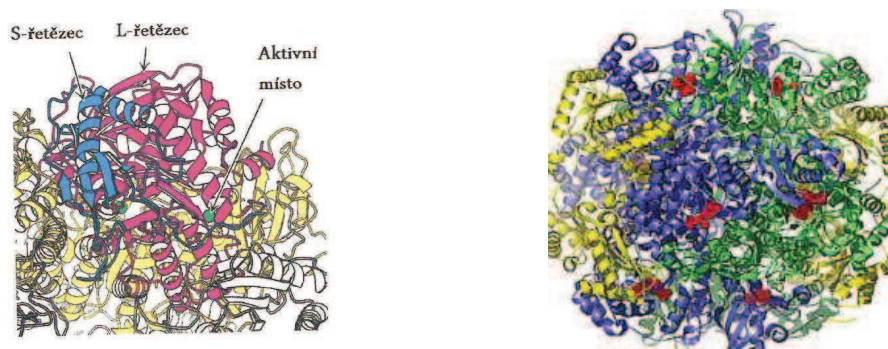
- Karboxylaci neboli fixaci CO_2 v Calvinově cyklu (na ribulosa-1,5-bisfosfát se váže CO_2).
- Oxygenaci při fotorespiraci (na ribulosa-1,5-bisfosfát se váže O_2).

Teplotní optimum enzymu Rubisco se výrazně liší podle zdrojového organismu, nejčastější hodnoty jsou 20–30 °C [19].

2.2.1 Struktura

Příroda vytvořila několik odlišných forem Rubisco. Nejrozšířenější jsou formy I a II.

Forma I, hexadekamer L_8S_8 , se vyskytuje u většiny autotrofních rostlin (vyšší rostliny, cyanobakterie, zelené řasy). Většinou má relativní molekulovou hmotnost 550 kDa a souměrnost čtyřbokého hranolu (diedrální symetrie). Skládá z osmi velkých podjednotek (L), o relativní molekulové hmotnosti 55 kDa a z osmi malých podjednotek (S), o relativní molekulové hmotnosti 14 kDa.



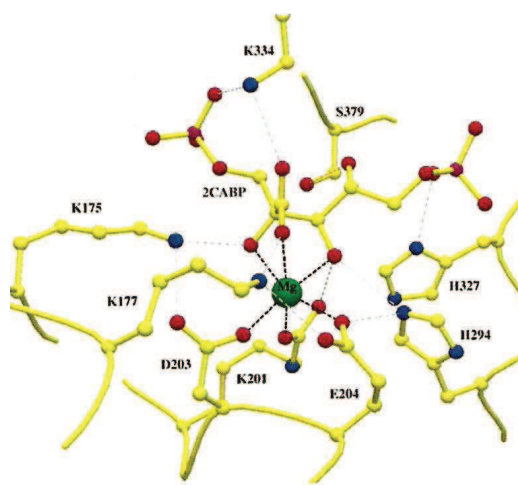
Obr. 7 Struktura Rubisco – forma I (L_8S_8). Enzym Rubisco se skládá z 8 velkých podjednotek (modrá a zelená barva) a z 8 malých podjednotek (žlutá a světle modrozelená barva). Červenou barvou jsou vyznačena aktivní místa. Převzato z [19].

Velké podjednotky obsahují aktivní centrum a mají katalytickou schopnost i bez přítomnosti malých podjednotek. Podjednotky L jsou kódovány geny *rbcL* v genomu chloroplastů

a dimerizují „hlavou k patě“. Malé podjednotky ovlivňují strukturu enzymu i jeho aktivitu, jsou až na výjimky kódovány geny *rbcS* jaderného genomu. Tato podjednotka je po translaci přenesena do chloroplastu, kde se za pomoci přítomných chaperonů spojí s velkou podjednotkou a vytvoří holoenzym [22].

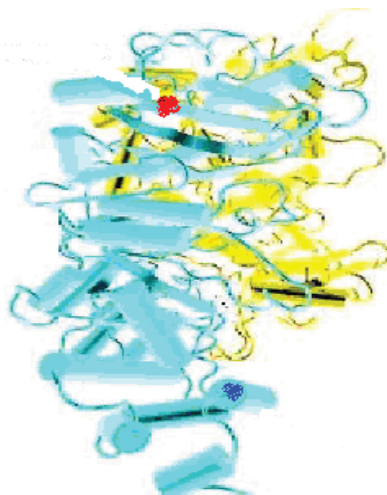
U velké podjednotky L je sekvence aminokyselin téměř shodná u všech vyšších rostlin. Každá velká podjednotka má menší N-terminální doménu, která je tvořena pěti úseky s β -strukturou a dvěma α -helixy, tzv. α - β -tunely. Dále obsahuje větší C-terminální doménu, která má soudkovitý tvar složený z antiparalelních β -struktur, které jsou na jedné straně překryty dvěma α -helixy [21].

Aktivní místo leží na rozhraní mezi N-terminální doménou jedné a C-terminální doménou druhé podjednotky, proto tedy samotná podjednotka nemůže mít katalytickou aktivitu [22].



Obr. 8 Aktivní místo Rubisco s navázaným 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátem (CABP). Převzato z [23].

Forma II je homodimer L_2 a vyskytuje se u anaerobních purpurových bakterií a u obrněnek. Relativní molekulová hmotnost 110 kDa a je složená ze dvou velkých L podjednotek, které jsou asi z 30 % homologní s podjednotkami z vyšších rostlin [5].



Obr. 9 Struktura Rubisco – forma II (L_2). Tato struktura enzymu Rubisco se skládá za dvou podjednotek, vyznačeny žlutou a modrou barvou. Červeně je vyznačená β -struktura, a modře vyznačená struktura α -helix. Převzato z [19].

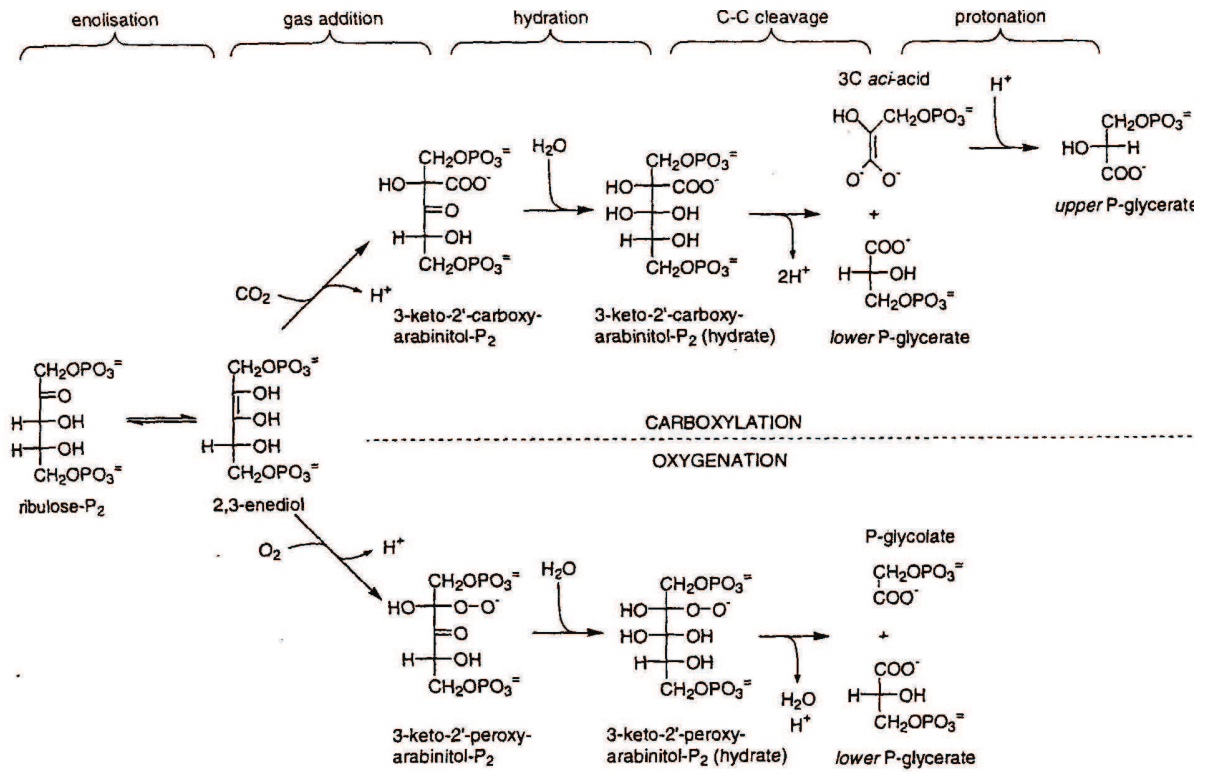
2.2.2 Karboxylace a oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu

Enzym Rubisco je bifunkční, má afinitu jak k oxidu uhličitému, tak ke kyslíku z důvodu podobnosti jejich molekul. To vede ke konkurenci těchto substrátů na stejném aktivním místě [23]. Enzym katalyzuje karboxylaci (vázání CO_2) a oxygenaci (vázání O_2) na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP). Prvním krokem je u obou reakcí přeměna RuBP na endiolát a dále dochází k bimolekulární reakci endiolátu s CO_2 nebo s O_2 . V obou reakcích je rozštěpena vazba mezi C2 a C3 [19].

Při karboxylaci dochází k hydrataci meziprojektu, štěpení vazby C–C meziprojektu a vzniku první molekuly 3-fosfoglycerátu. Z CO_2 se stane karboxylová skupina v molekule 3-fosfoglycerátu. Následně proběhne protonace karbaniontu za vzniku druhé molekuly 3-fosfoglycerátu. Mechanismus karboxylace je založen na stabilizaci přechodného meziprojektu 2-karboxy-arabinitol-1,5-bisfosfátu vlivem komplexu karbamátu s kovovým iontem Mg^{2+} . Karboxylace je prvním krokem Calvinova cyklu, kde z 2 molekul 3-fosfoglycerátu vznikají 2 molekuly glycerinaldehyd-3-fosfátu. Dále dojde k regeneraci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Spojením dvou molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu se vytvoří sacharid [22].

Oxygenace probíhá za nepřítomnosti redox-aktivních kovů nebo organických kofaktorů. Do karboxylové skupiny je inkorporován pouze jeden atom kyslíku za vzniku přechodného meziprojektu 2-peroxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfátu. Následuje štěpení tohoto meziprojektu ve vodném prostředí a uvolnění molekuly 3-fosfoglycerátu a molekuly 2-fosfoglykolátu, jímž začíná tzv. glykolátová cesta [22]. Z fosfoglykolátu se záhy odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát je transportován z chloroplastu do blízkých peroxizomů, kde probíhají další reakce. V glykolátové dráze se při postupném navazování dvou molekul O_2 uvolní jedna molekula CO_2 . Fotorespirace je energeticky nevýhodná, dochází ke ztrátě jednoho atomu uhlíku, ve formě CO_2 , a spotřebuje se jedna molekula ATP. Fotorespirace snižuje čistý výtěžek fotosyntézy, ale poskytuje rostlině důležité metabolity, např. glycin a serin, a dále také chrání rostlinu před

nadměrným příkonem zářivé energie. Rychlost fotorespirace je 4krát menší než rychlost karboxylace za normálních atmosferických podmínek při 25 °C. Fotorespirace, stejně jako karboxylace, potřebuje Lys 201 v karbamátové formě [24, 25].



Obr.10 Reakční schéma karboxylace a oxygenace. Převzato z [18].

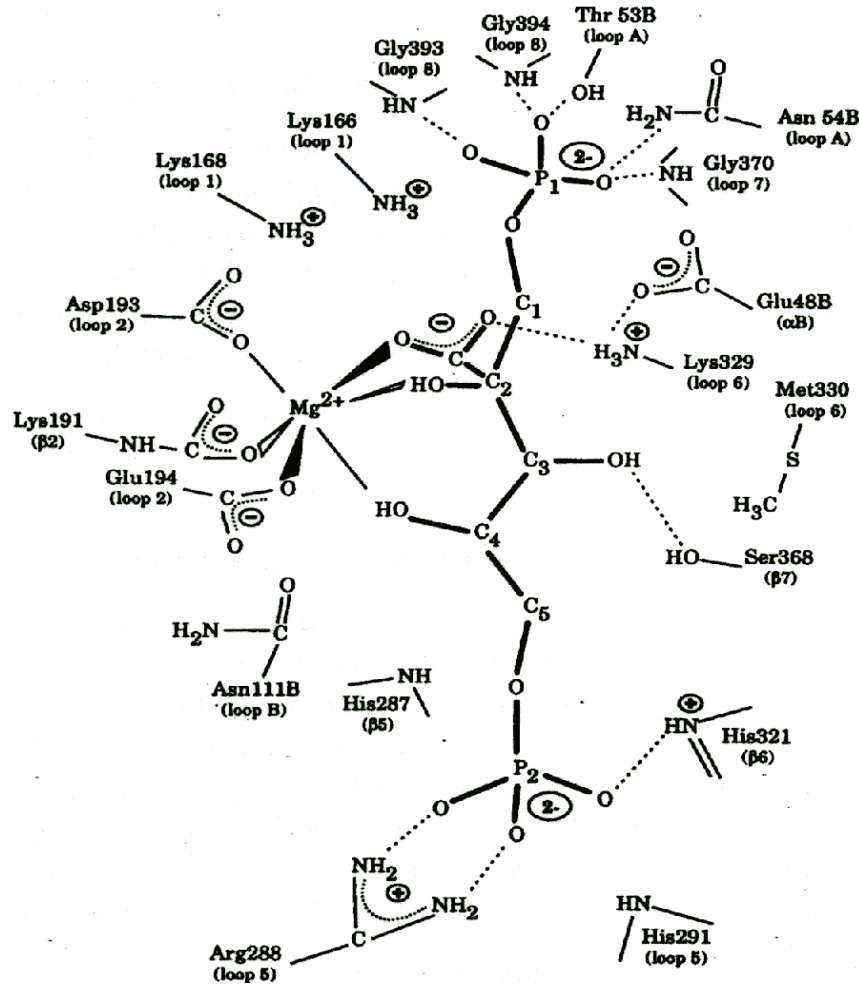
Zda bude Rubisco vázat CO₂ nebo O₂, zda tedy přednostně proběhne karboxylace nebo oxygenace je dáno tzv. specifitním faktorem (Ω), který vyjadřuje poměr rychlosti oxygenace ku rychlosti karboxylace při stejných rovnovážných koncentracích CO₂ a O₂.

$$\Omega = \frac{v_c}{v_o} \cdot \frac{[O_2]}{[CO_2]} = \frac{V_c}{V_o} \cdot \frac{K_o}{K_c}$$

kde v_c je rychlost karboxylace, v_o je rychlost oxygenace, V_c je maximální rychlost karboxylace, K_c je rychlostní konstanta karboxylace, K_o je rychlostní konstanta oxygenace a V_o je maximální rychlost oxygenace. Zvýšením parciálního tlaku CO₂ dojde k jeho přednostnímu navázání na enzym Rubisco, dojde tím k potlačení fotorespirace a zvýší se rychlost fotosyntézy [22].

2.2.3 Aktivace Rubisco

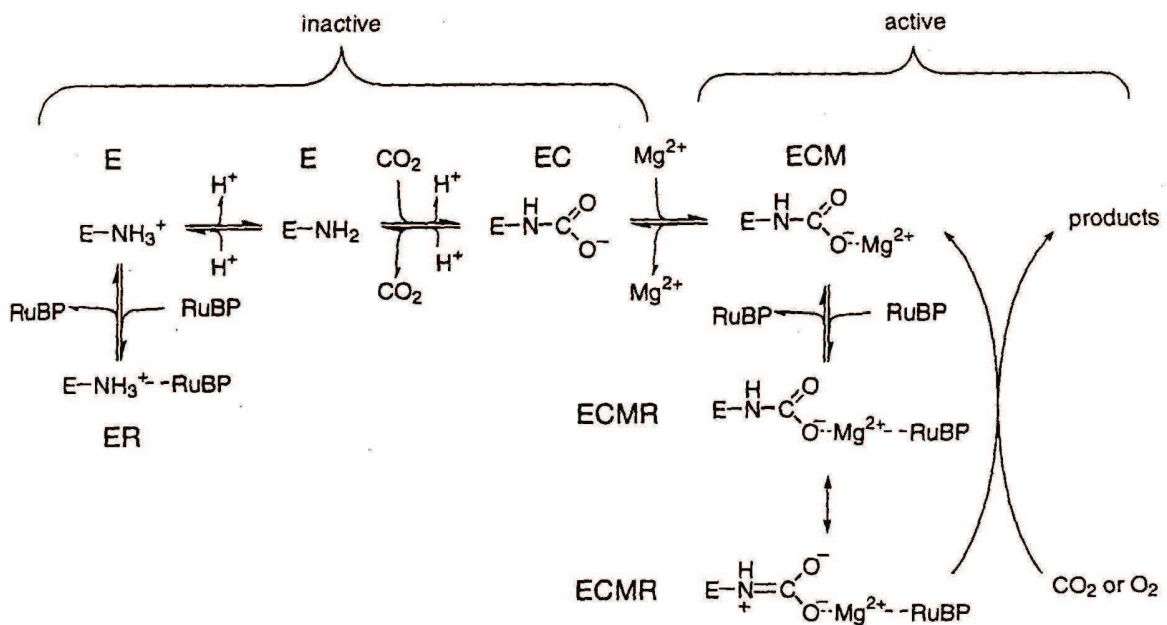
Rubisco je katalytický aktivní pouze v aktivovaném stavu.



Obr. 11 Aktivní místo enzymu Rubisco. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v β/α – stočené doméně přiléhající podjednotky. Dále můžeme na obrázku pozorovat interpodjednotku solného můstku mezi Glu48 a Lys329. Většina zbytků aktivních míst je iontových a polárních, pouze Met 330 je hydrofobní. Součástí aktivního místa je i ion Mg^{2+} , který má mnohočetné role a je nezbytný v aktivaci a katalýze. Je také rozhodující pro správnou orientaci substrátu v aktivním místě, protože CABP se váže k neaktivovanému enzymu v převráceném tvaru. Nejdůležitější v aktivním místě je Lys191, jehož ϵ -aminoskupina je karbamylována molekulou CO_2 a vzniklý karbamát se stabilizuje koordinací s Mg^{2+} . Na takto karbamylované aktivní místo se navazuje RuBP a na jeho uhlík C_2 se navazuje molekula vzdušného CO_2 . Dále jsou v aktivním místě také fosfátové ligandy, ligandy pro P_1 fosfát jsou polární a zahrnují Gly370, Gly393, Gly394, Thr53 a Asn54. P_2 fosfátová skupina je zakotvena v Arg288 a His321. Funkce ostatních zbytků aktivního místa nejsou automaticky určeny strukturou. Převzato z [22].

2.2.3.1 Spontánní aktivace

Enzym Rubisco má 8 vazebných míst, která však nejsou schopna katalýzy, dokud nevytvoří komplex s CO_2 a bivalentním kovovým iontem Mg^{2+} . Tento proces se nazývá aktivace. Součástí aktivace je tzv. karbamylace, reakce molekuly CO_2 s ϵ -aminoskupinou lysinu 201 velké podjednotky enzymu Rubisco. Molekula CO_2 zahrnutá v aktivačním procesu je odlišná od substrátové molekuly CO_2 fixované během karboxylace [26]. Karbamylace je pomalý děj a určuje rychlost celé aktivace. Ion Mg^{2+} poté rychle reaguje s karbamátem koordinační vazbou a karbamát stabilizuje. Pouze pokud je karbamát stabilizovaný kovem, je aktivní místo schopno přeměnit ribulosu-1,5-bisfosfát na produkty. [27].

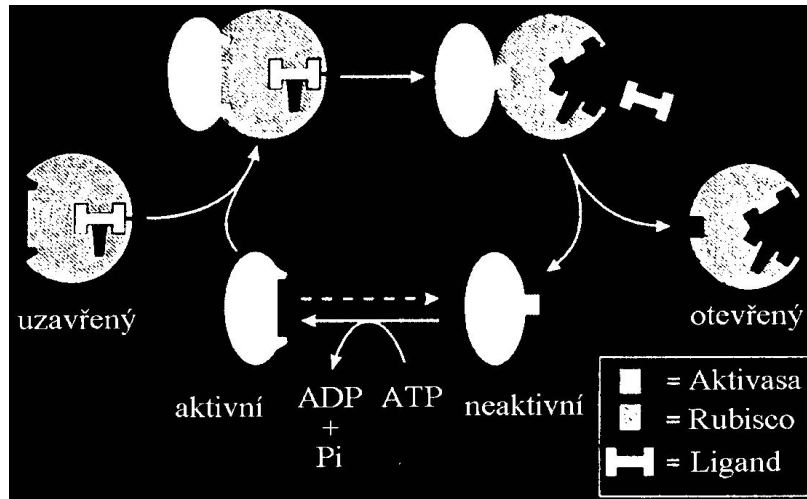


Obr. 12 Aktivace Rubisco (E) karbamylovací K201 (vznik EC), následným navázáním Mg^{2+} (vznik ECM). Vazba RuBP na karbamylovanou formu (ECM) nebo na nekarbamylovanou formu (ER). Převzato z [18].

2.2.3.2 Aktivace zprostředkovaná aktivasou

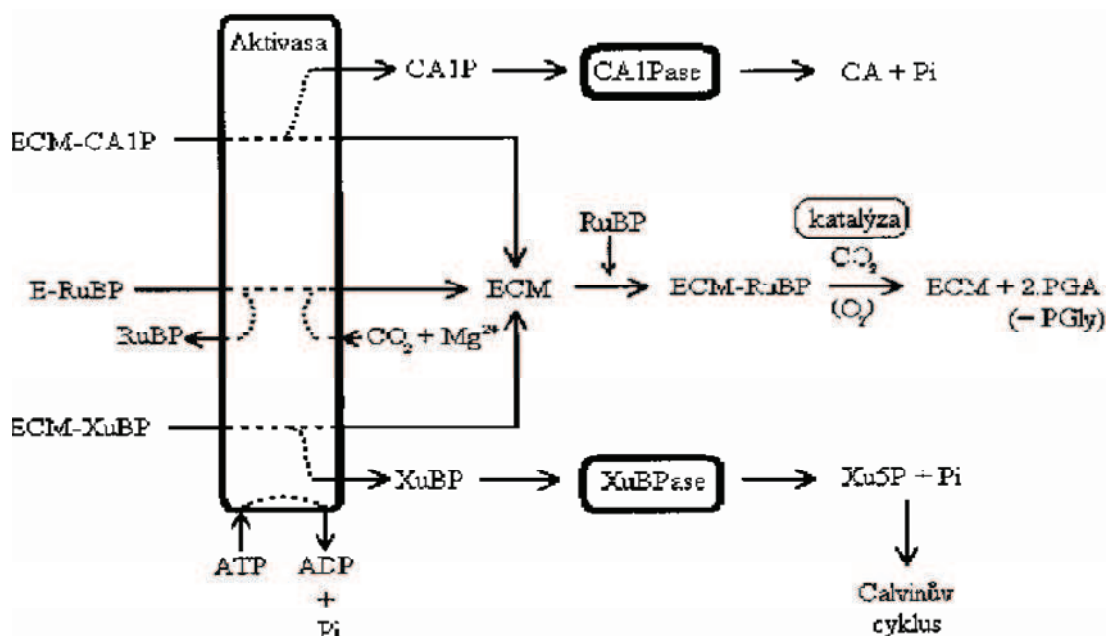
In vivo není možná úplná samovolná karbamylace Rubisco, protože koncentrace CO_2 a iontů Mg^{2+} ve stromatu chloroplastů je pro spontánní aktivaci nedostatečná. Proto bylo dlouho záhadou, jak probíhá aktivace Rubisco *in vivo*. Hlavním průlomem byl objev jaderně kódovaného chloroplastového proteinu, který byl pojmenován aktivasa Rubisco [22], a který usnadňuje aktivaci Rubisco při fyziologických koncentracích CO_2 . Poprvé byla aktivasa identifikována u mutantů *Arabidopsis thaliana* vyžadujících vysoké koncentrace CO_2 , které na světle Rubisco slabě aktivovaly. Aktivasa patří do rodiny AAA proteinů, což jsou ATPasy asociované s různými buněčnými aktivitami. Jedná se o oligomer, který se skládá ze 14 nebo 16 podjednotek, jež mají tendenci spontánně asociovat. Enzymová aktivita aktivasy je tím vyšší, čím větší je stupeň asociace. Pro funkci aktivasy je důležitá hydrolýza ATP, RuBP a noční inhibitor 2-karboxy-D-

arabinitol-1-fosfát (CA1P). Hydrolyzou ATP je aktivasa aktivovaná, na tuto aktivní aktivasu se naváže Rubisco a dojde k aktivaci Rubisco specifickým přemístěním fosfátových zbytků. Poté se aktivasa navrátí k neaktivní formě [18, 20].



Obr. 13 Mechanismus působení aktivasy Rubisco. Převzato z [18].

Při osvětlení a v přítomnosti RuBP, dochází k rychlé aktivaci enzymu Rubisco pomocí aktivasy. Ve tmě však aktivasa nijak neovlivňuje kinetiku a rovnováhu spontánní aktivace. Aktivasa vyžaduje vysokou koncentraci RuBP, i když při vysoké koncentraci tohoto sacharidu dochází k inhibici spontánní aktivace. Ve tmě deaktivované Rubisco upřednostňuje pevnou vazbu s RuBP. Při osvětlení je aktivasa aktivovaná zvýšenou hladinou ATP a dochází k uvolnění RuBP z aktivního místa. Volný enzym pak může projít karbamylovací a výsledný ternární komplex může být stabilizován vazbou RuBP. Nicméně není známo, proč se mění aktivita Rubisco během dne, když hladina ATP zůstává přibližně stejná [22].

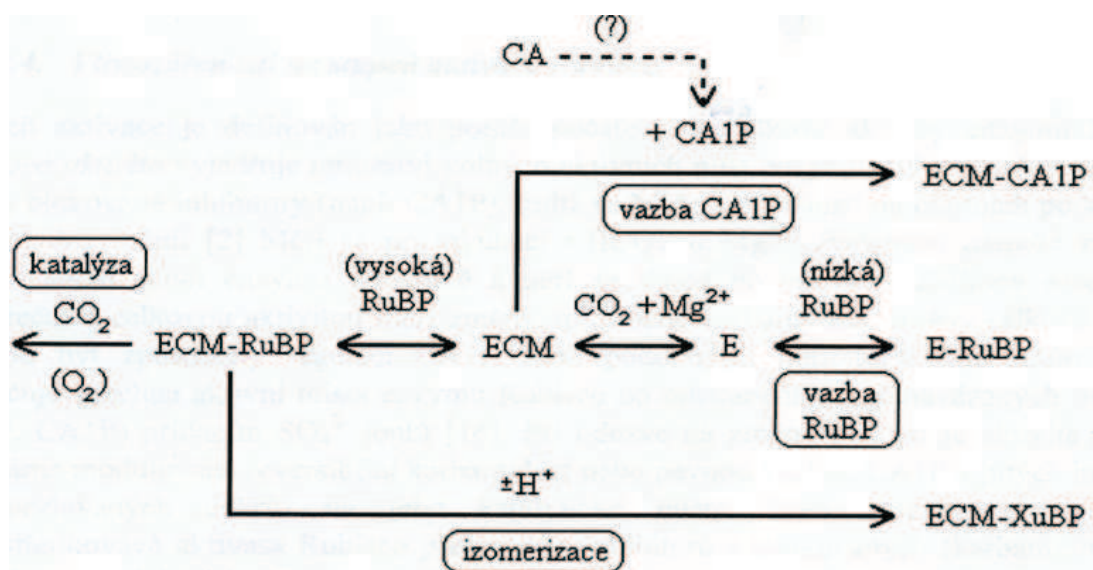


Obr. 14 Přeměna vytvořené neaktivní formy enzymu Rubisco na formu aktivní, způsobená aktivací aktivasou Rubisco, a následný metabolismus CA1P (2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát) a XuBP (xylulosa-1,5-bisfosfát) pomocí specifických enzymů. E – samotný enzym Rubisco a ECM aktivované Rubisco pomocí CO_2 a Mg^{2+} , CA – karboxyarabinitol, Xu5P – xylulosa-5-fosfát. Převzato z [28].

2.2.3.3 Vliv 2-karboxyarabinitol-1-fosfátu na aktivitu Rubisco

In vitro je hodnocení stupně aktivace Rubisco založeno na měření jeho aktivity enzymu v čerstvě připraveném extraktu z listu před a po preinkubaci při vysokém obsahu CO_2 , který je nutný k dosažení plné aktivace. Celková aktivita, tj. aktivita po preinkubaci, může být shodná s celkovou koncentrací aktivních míst Rubisco (počítáno za pomoci syntetického reakčního meziproductového analogu 2-karboxy-D-arabinitol-1,5-bisfosfátu (CABP) označeného uhlíkem ^{14}C). V mnoha případech je však celková aktivita, získaná z extraktu tmavých listů, znatelně nižší než aktivita odhadovaná podle koncentrace aktivních míst. Pokud jsou listy před samotnou extrakcí osvětleny, žádná taková rozdílnost tu není. Tato anomálie vyskytující se u extraktu z tmavých listů vedla k objevu nočního inhibitoru 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfátu (CA1P). Tato sloučenina se od přirozeného meziproductu CABP liší pouze nepřítomností fosfátové skupiny na pátém uhlíkovém atomu. Na rozdíl od RuBP se CA1P přednostně váže na karbamylované Rubisco. Obsazením aktivního místa CA1P dojde k nevratné blokaci aktivního místa a tím k inhibici katalýzy. Vliv CA1P se uplatňuje hlavně za sníženého světla, jedná se tudíž o noční inhibitor. Světlem dochází k aktivaci aktivasy, která obnovuje aktivitu Rubisco.

Dalšími inhibitory jsou epimer RuBP xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a ketoisomer 3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP), které se mohou za určitých podmínek tvořit v listech [16]. XuBP vzniká v průběhu katalytické reakce reprotonací endiolátového meziproductu a je odpovědný za hromadění inaktivního enzymu za světla [28].



Obr.15 Schéma ukazující přeměnu aktivní formy Rubisco na neaktivní formu, navázáním CA1P (2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát), RuBP nebo izomerací substrátu na XuBP (xylulosoxy-1,5-bisfosfát). E – samotný enzym (neaktivní), ECM – enzym s navázaným CO_2 a Mg^{2+} (aktivní), CA – karboxyarabinitol. Převzato z [29].

2.2.3.4 Časový průběh aktivace

Aktivace Rubisco *in vivo* trvá 4–5 minut, deaktivace při snížené úrovni osvětlení 20–25 minut. V porovnání s dobou aktivace a deaktivace ostatních enzymů Calvinova cyklu je to poměrně dlouhá doba. Pomalá aktivace enzymu a jeho ještě pomalejší deaktivace mají pozitivní vliv na schopnost listů fixovat CO_2 v proměnlivých světelných podmínkách. Nebyly však pozorovány žádné stálé změny v rychlosti aktivace a deaktivace enzymu Rubisco u rostlin, které vyrůstají na různých stanovištích, ani mezi druhy s metabolismem CA1P nebo bez CA1P. [30].

2.2.4 Aktivita a množství Rubisco

Aktivita enzymu představuje množství enzymu, které přemění za standardních podmínek za 1 sekundu 1 mol substrátu. Jednotkou aktivity je katal. U enzymu Rubisco se aktivita vyjadřuje jako látkové množství asimilovaného CO_2 za sekundu vztažené na jednotkovou plochu listu [$\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$]. Jak už bylo řečeno, molekulová aktivita enzymu Rubisco je velmi nízká v porovnání s ostatními enzymy. Běžný enzym je schopen přeměnit asi tisíc molekul substrátu za sekundu, Rubisco přemění necelé tři molekuly substrátu za sekundu. Jeho pomalost se však kompenzuje jeho množstvím.

Aktivitu enzymu Rubisco můžeme stanovovat *in vivo* (gazometricky) a *in vitro* (radiometricky nebo spektrofotometricky). Při stanovení *in vitro* se rozlišuje počáteční a celková aktivita. Počáteční aktivita se měří ihned, celková až po 15 min inkubaci s aktivačními roztoky, které obsahují saturační koncentrace iontů CO_2 a Mg^{2+} . Pomocí těchto iontů dojde k aktivaci aktivních center, pokud však nejsou obsazena pevně navázanými inhibitory, a proto je počáteční aktivita nižší než aktivita celková. Poměr počáteční a celkové aktivity udává stupeň aktivace

v procentech. Aktivita enzymu Rubisco je velmi proměnlivá veličina, vyjadřuje pouze obsah katalyticky aktivní formy Rubisco, a proto se stanovuje také celkový obsah enzymu [31].

2.2.5 Vliv různých podmínek na obsah a aktivitu enzymu Rubisco

2.2.5.1 Vliv dusíkaté výživy

Většina dusíku v listech je vázána ve fotosyntetických složkách chloroplastů. V C_3 rostlinách je přibližně 25 % dusíku vázáno v samotném enzymu Rubisco. Dusíku je často nedostatek, což vede poklesu obsahu Rubisco v listech se stářím listů, když je dusík přesouván do vyvíjejících se mladých listů. Množství Rubisco v listech se zvětšuje u rozrůstajících, zvětšujících se listů, a pak klesá se stárnutím listů, přičemž existuje silná závislost mezi rychlostí asimilace CO_2 a aktivitou enzymu Rubisco [18].

Na obsah Rubisco v listech má značný vliv dusíkatá výživa. Rozdíly v obsahu Rubisco jsou také doprovázeny souběžnými změnami v dalších chloroplastových proteinech a chlorofylu, což svědčí o tom, že je udržována rovnováha mezi kapacitou karboxylace a regenerací RuBP.

Závislost mezi enzymem Rubisco a listovým dusíkem je většinou lineární. Listy, které mají nízký obsah dusíku však investují více dusíku do enzymu Rubisco [32]. Mechanismus působení dusíkaté výživy na množství Rubisco je z větší části neznámý [18]. Scheible et al. [33] předpokládají, že dusičnany hrají přímou roli při kontrole vývoje rostlin a při distribuci syntetizovaných sacharidů na úrovni genové exprese.

2.2.5.2 Vliv ozáření

Rostliny vyrostlé při vyšší intenzitě světla mají vyšší obsah Rubisco než rostliny rostoucí při nízké ozáření [34]. Chloroplasty v rostlinách, které rostou na stinných místech vykazují řadu adaptivních změn, např. větší rozvoj tylakoidů. Tyto rostliny mají také menší část listového dusíku zabudovaného v Rubisco (asi 10 %), na rozdíl od rostlin rostoucích při dostatečném osvětlení (asi 19 %). Mnoho druhů rostlin redukuje množství enzymu Rubisco, pokud je vystavíme nízkému osvětlení, nebo pokud vyrůstají při nízké ozáření. Většina druhů rostlin však redukuje množství Rubisco nedostatečně vzhledem k optimální redistribuci dusíku v listech [18].

Obsah enzymu Rubisco v listech se velmi rychle mění v závislosti na změně podmínek prostředí a to dokonce i ve vyzrálých listech [34]. Mnoho prací se soustředilo na regulaci exprese Rubisco v závislosti na intenzitě světla. Tato regulace je uskutečňována různými mechanismy (různou rychlostí transkripce, translace, posttranslačních modifikací mRNA) [18].

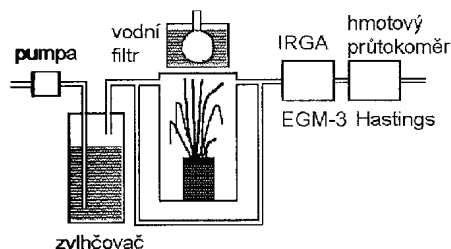
Množství Rubisco v listech se mění i během dne, dopoledne se množství Rubisco mírně zvyšuje, v poledne je nejvyšší a odpoledne mírně klesá, přičemž nedochází k náhlým změnám. Počáteční ani celková aktivita není přímo ovlivněna obsahem enzymu Rubisco, protože změna obsahu během dne nevykazuje stejnou křivku jako počáteční a celková aktivita [35].

2.3 Metody stanovení aktivity Rubisco

2.3.1 In vivo

2.3.1.1 Gazometrické stanovení

Principem gazometrického stanovení je nepřímé měření aktivity enzymu Rubisco pomocí rychlosti spotřeby CO_2 rostlinami. Pro stanovení spotřeby CO_2 je nutné umístit část rostliny do asimilační komory, která je vzduchotěsná, termostabilní a je zajištěno dokonalé míchání vzduchu uvnitř komory.



Obr. 16 Gazometrický systém (IRGA – infrared gas analyzer, infračervený plynný analyzátor). Převzato z [36].

Podle způsobu stanovení změny koncentrace CO_2 v asimilační komoře je možné rozdělit gazometrické systémy do tří kategorií:

- Uzavřené gazometrické systémy – vzduch do systému zvenčí nevstupuje ani z něj nevystupuje. V případě, že do systému vložíme fotosyntetizující list, nastane pokles koncentrace CO_2 v systému než dojde k dosažení tzv. kompenzačního bodu (koncentrace CO_2 , při které jsou procesy příjmu a výdeje CO_2 v rovnováze). Pokles koncentrace CO_2 je měřen infračerveným analyzátozem.
- Polouzavřené gazometrické systémy – systém, kdy je udržována konstantní koncentrace CO_2 . Infračervený analyzátor plynů zde slouží jako prvek, který udržuje rovnováhu mezi tokem CO_2 do systému a rychlosti příjmu CO_2 listem rostliny. Rychlost fotosyntézy se stanoví výpočtem z dodaného množství CO_2 .
- Otevřené gazometrické systémy – neustálý vstup nového vzduchu do systému. Infračervený analyzátor plynů slouží pro měření koncentrace CO_2 ve vzduchu před vstupem do asimilační komory a po výstupu z ní. Rychlost fotosyntézy je počítána z rozdílu koncentrací CO_2 [37].

2.3.2 In vitro

2.3.2.1 Spektrofotometrické stanovení

Stanovení aktivity enzymu Rubisco pomocí spektrofotometrie je založeno na změně absorbance při oxidaci NADH 3-fosfoglycerátem, ke kterému dochází při spřažení prvních tří reakcí Calvinova cyklu. Změna absorbance se měří při 340 nm.

První zmínky o této metodě pocházejí z let 1956 a 1957 od autorů, kteří poprvé izolovali enzym Rubisco. Všechna spektrofotometrická stanovení aktivity Rubisco současných autorů

vycházejí z metody, kterou publikovali Lilley a Walker [38]. Jako základní pufr se používá N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-etansulfonová kyselina (HEPES), Tris nebo Bicin o pH 7,7-8,2. Pro aktivaci Rubisco se do reakční směsi nejčastěji přidává $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KHCO}_3$ a $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$. KHCO_3 poskytuje současně oxid uhličitý pro karboxylaci. Tato metoda je praktičtější než radiometrické stanovení, nevýhodou však je, že je časová prodleva (asi 1 min) mezi karboxylační reakcí a oxidací NADH. Tento nežádoucí efekt může být eliminován přidáním ATP-regenerujícího systému do reakční směsi. Tento systém představuje fosfokreatin, který odstraňuje ADP z reakční směsi [38].

Při stanovení aktivity enzymu Rubisco se rozlišují dva případy – stanovení počáteční a celkové aktivity. Počáteční aktivita se stanovuje ihned po extrakci enzymu a slouží k vyjádření množství fyziologicky aktivovaného enzymu ve vzorku; enzym Rubisco se totiž nestačí aktivovat více než byl aktivován *in vivo*. Tato aktivita je závislá na podmínkách při kterých byl vzorek odebrán. Celková aktivita se stanovuje po inkubaci enzymu s CO_2 a ionty Mg^{2+} . Při inkubaci dochází k aktivaci všech aktivních center, která nejsou blokována pevně vázanými inhibitory.

Extrakci enzymu lze provádět různými způsoby, nesmí však docházet ke změnám jeho aktivity. Uplatňují se hlavně dva postupy:

- Besford [40], Du et al. [41], Gerard a Driscoll [42], Parry et al. [43], Li et al. [38] aj. doporučují vzorek listů ihned po odebrání zvážit, změřit jeho plochu a zmrazit v kapalném dusíku. Před vlastním stanovením vzorek rozmělnit v třecí misce s mořským pískem a poté extrahovat Rubisco extrakčním puffrem (HEPES) a po centrifugaci stanovit aktivitu Rubisco v supernatantu.
- Tissue et al. [44] preferují jiný postup, vhodnější pro jehličnany. Ty totiž obsahují velké množství fenolických látek a terpenů, které při zmrazení kapalným dusíkem rozrušují strukturu Rubisco a tím způsobují pokles jeho aktivity. Proto navrhují odstřížené jehlice ihned zhomogenizovat při $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HEPES}$, s přídavkem $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ EDTA}$ a 2% polyvinylpyrrolidonu, extrakt zcentrifugovat a teprve supernatant zmrazit v kapalném dusíku.

Spektrofotometrická metoda se používá při rutinních stanoveních, protože tato metoda je časově nenáročná. Poměrně snadno můžeme určit rychlost reakce a není třeba radioaktivně značený bikarbonát [38].

2.3.2.2 Radiometrické stanovení

Radiometrická metoda je založená na první reakci Calvinova cyklu. Z reakční směsi je třeba odstranit veškerý CO_2 a endogenní uhličitany, poté se do ní přidá známe množství ^{14}C ve formě NaHCO_3 . Reakce se nastartuje přidáním známého množství RuBP nebo extraktem aktivovaného enzymu. Po 1 min se reakce zastaví přídavkem HCl . Volný značený CO_2 se ze směsi odstraní a následně se změří radioaktivita produktů, která odpovídá množství asimilovaného $^{14}\text{CO}_2$ [45].

2.4 Metody stanovení obsahu Rubisco

2.4.1 ELISA

ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay – enzymová imunoanalýza), patří mezi analytické metody, je to citlivá neprecipitační imunochemická metoda. Tato metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů a je schopna detekovat nízké koncentrace antigenu a protilátky, které neumožňují vznik precipitátu. Pro citlivější stanovení imunokomplexu antigen-protilátka je možné použít vhodnou značku, která se váže na jednoho z imunoreaktantů ještě před uskutečněním interakce antigen-protilátka. Ke značení se u ELISA používají kovalentě navázané vhodné enzymy. Nejčastěji používané enzymy jsou peroxidasa a alkalická fosfatasa. Tyto enzymy katalyzují chemickou přeměnu substrátu přidaného do reakční směsi, umožňují bezpečné, citlivé a poměrně jednoduché stanovení. Pokud je konečný produkt barevný jedná se o spektrofotometrické stanovení, je-li produkt reakce fluoreskující, stanovuje se fluorimetricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky [46].

Heterogenní enzymová imonoanalýza, ELISA, může být provedena jako kompetitivní nebo nekompetitivní. Koncentrace analytu se určuje z kalibrační křivky, která je sestavená s pomocí standardů. Nejcitlivějším provedením můžeme stanovit analyt v množství 10^{-12} – 10^{-9} g. Nejčastěji používaný typ pevného nosiče při ELISA jsou stěny jamek mikrotitračních destiček z tvrdého polystyrenu. Při nekompetitivní (sendvičové) enzymové imunoanalýze nejdříve reaguje protilátka zakotvená na pevný nosič s antigenem v analyzovaném vzorku. Poté, co se ustanoví rovnováha se systém promyje a ve druhé fázi se na protilátku zachycený antigen naváže další protilátka, nesoucí na sobě značku – enzym. Po promytí se měří enzymová aktivita zachycená na pevnou fázi. Při přímé kompetitivní enzymové imunoanalýze interaguje protilátka zakotvená na pevný nosič současně s antigenem ze vzorku i se značeným antigenem. Po ustavení rovnováhy se systém promyje a měří se enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevnou fázi. Nepřímou kompetitivní enzymovou imunoanalýzu můžeme rozdělit na dvě části. První část analýzy je kompetitivní, antigen zakotvený na pevný nosič soutěží se stanovovaným nezakotveným antigenem ze vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky přidávané do systému roztoku. Druhá fáze je nekompetitivní, zjišťuje se množství zprostředkovaně zakotvené protilátky [46].

Pro stanovení množství Rubisco je ELISA jednou z nejcitlivějších metod a je relativně rychlá. Nassoury et al. [47] použili tuto metodu pro stanovení enzymu Rubisco. Protilátky byly vypěstovány uvnitř živých králíků. Protilátka pro Rubisco byla připravena inzercí cDNA kódujícího Rubisco a připravená DNA byla vložena do pQE31 vektoru. Poté byl vektor vložen do buněk M15, které byly kultivovány, a získaná protilátka Rubisco byla purifikována afinitní chromatografií. Rubisco bylo reakcí s připravenou protilátkou za současné interakce s peroxidasou označeným sekundárním antigenem a substrátem 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem stanoveno fotometricky při vlnové délce 650 nm.

2.4.2 Radioimunosrážecí technika

Metoda, která je mnohými autory často využívána ke stanovení množství enzymu Rubisco. Nejdříve se získá extrakt z listů obsahující enzym Rubisco, který je poté aktivován inkubací v přítomnosti iontů HCO_3^- a Mg^{2+} . Dále je pak Rubisco inkubováno v přítomnosti radioaktivně značeného ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra se specifickou afinitou k Rubisco. Vzniklá sraženina komplexu Rubisco- ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát-protilátka je odfiltrována polysulfonovým filtrem a promyta od nadbytku ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Množství Rubisco je přímo úměrné úrovni radiace vyzařované sraženinou. Metodu je nutné kalibrovat na standard Rubisco [48].

2.4.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE neboli elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného patří mezi elektromigrační (elektroforetické) metody. Tyto metody využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. V případě, že jsou látky, které nesou náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě. Na ionty, pohybující se konstantní rychlostí, působí elektrická síla:

$$F_E = qE$$

kde q je náboj částice, E intenzita elektrického pole. V opačném směru působí odporová síla vnitřního tření dána Stokesovým zákonem:

$$F_t = -6\pi\eta r v$$

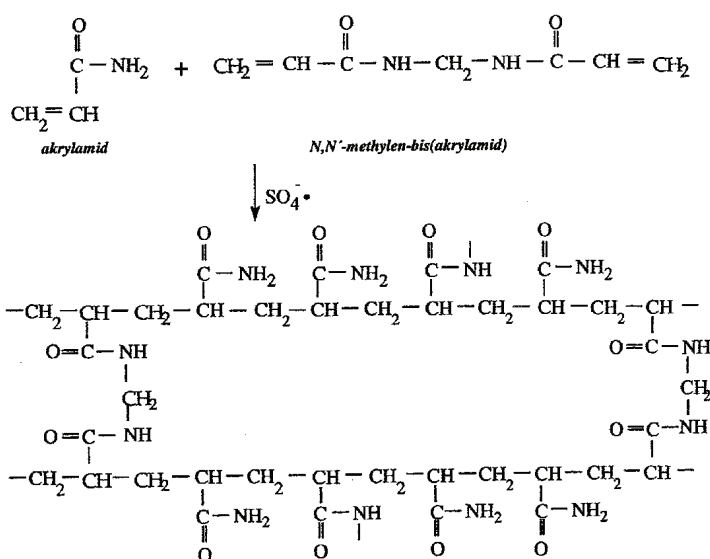
kde η je viskozita roztoku, r je poloměr iontu, v je jeho rychlost.

Při elektroforéze dochází k velmi rychlému ustavení rovnováhy mezi elektrickou silou a odporovou silou, obě síly mají stejnou hodnotu, ale opačný směr. Rychlost pohybu iontu ve stejnosměrném elektrickém poli je pak přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontu k jeho velikosti a odporu prostředí. Efektivní mobilita, t.j. mobilita, kterou při elektroforéze naměříme, bývá většinou nižší a závisí na řadě faktorů: viskozitě prostředí, teplotě, pH roztoku, iontové síle roztoku, koncentraci elektroforetického pufru.

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Při použití porézních gelů dochází k separaci molekul na principu síťového efektu a na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Velké molekuly se oproti malým molekulám zřídňují, protože gel zcela vyplňuje vymezený prostor. Běžně používaný nosič je polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanický, pevný, průhledný a dává možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota, zesíťování gelu, gradient hustoty gelu). Přípravuje se kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylen-bis(akrylamidu). Kopolymerace probíhá v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru – peroxidisírany amonného. Působením světla se molekuly iniciátoru rozkládají za vzniku volných radikálů, tyto radikály poté

zahájí vlastní polymerační reakci. Jako stabilizátor volných radikálů se používá tetramethylethylendiamin „TEMED“ nebo dimethylaminopropionitril (DMPN).

Častou variantou PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS/1 g bílkoviny a udílí jim uniformní, záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Proteiny pokryté SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmotnosti a podobný, válcovitý tvar. Při SDS-PAGE se bílkoviny dělí především na základě rozdílnosti molekulových hmotností. Mnohé proteiny obsahují více než jeden polypeptidový řetězec. Působením SDS se poruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami a pokud se přidá současně 2-merkptoethanol, který redukuje disulfidové můstky, lze stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek [46].

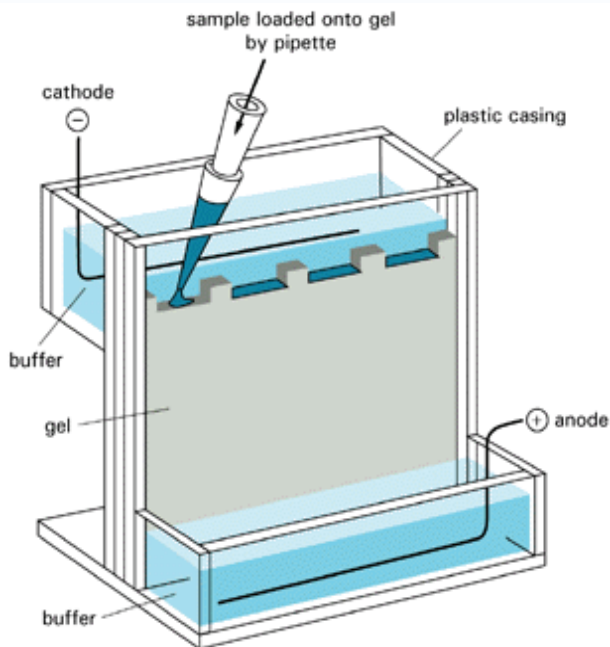


Obr. 17 Chemická struktura polyakrylamidového gelu. Převzato z [49].

Další variantou je diskontinuální elektroforéza. Při tomto postupu se mezi elektroforetická skla nalévá nejdříve separační gel, po zatuhnutí se převrství zaostřovacím gelem s velkými póry. Zaostřovací gel bílkoviny zkoncentruje a v separačním gelu dochází k vlastní separaci bílkovin. Vzniklé zóny jednotlivých proteinů se barví roztokem, který obsahuje alkohol a barvivo Coomassie blue. Proteiny jsou v tomto roztoku jednak denaturovány a tím i fixovány, jednak se vytvářejí komplexy barvivo-protein. Přebytek barviva se odstraní vymýváním gelu kyselým roztokem nebo elektroforetickým odbouráváním. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu a vzdálenost od místa nanesení je nepřímě úměrná jeho molekulové hmotnosti. Ke kvantifikaci se používá speciální software, který převede jednotlivé zóny na píky a koncentrace určitého proteinu se vypočítá porovnáním plochy píky stanovovaného proteinu s plochou píky standardu [49].

Metoda SDS-PAGE je nejpoužívanější metodou ke kvantifikaci obsahu enzymu Rubisco. Metoda byla použita např. v práci Besforda [50] pro stanovení množství Rubisco v listech

rajčatových rostlin. Dále se s ní můžeme setkat také v práci Ferreiry et al. [51], kde byla použita na stanovení obsahu RuBP v listech rostlin kukuřice a pšenice.



Obr. 18 Aparatura používaná pro stanovení množství Rubisco metodou SDS-PAGE. Převzato z [49].

2.4.4 Kapilární elektroforéza

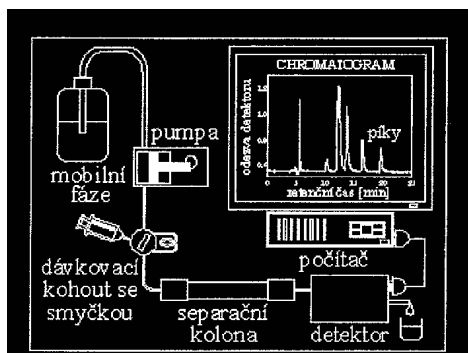
Kapilární elektroforéza je separační metoda založená na rovnováze elektrické a odporové síly působící na elektricky nabitou částici v elektrickém poli. Tato metoda využívá pohyb nabitých částic, ať už malých iontů či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nějakém nosném médiu, například gelu. Kapilární elektroforéza využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Tyto tenké kapiláry odvádějí teplo, takže mohou být použita elektrická pole s vysokým napětím, čím se sníží čas potřebný pro dělení vzorku. Odporovou sílu jde zvýšit použitím elektroforézy v síťových prostředích, kde je kapilára naplněna gelem nebo častěji je jako separační pufr použit roztok lineárních polymerů [49].

Metodu kapilární elektroforézy ke stanovení vlivu zdroje dusíku na koncentraci Rubisco použil ve své práci Charles Warren [52]. Vzorek byl extrahován z listů *Eucalyptus diversicolor*. Analýza extraktů z listů byla možná teprve po vysrážení proteinů kyselinou trichloroctovou. Kapilární elektroforéza byla provedena za použití systému Bio-Rad 3000. K dělení proteinů byla použita křemenná nepotažená kapilára o průměru 50 μm , celkové délce 24 cm a efektivní délce 19,4 cm. Jako separační pufr byl použit komerční pufr CE-SDS pro stanovení proteinů. Elektroforéza probíhala při teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$ a při konstantním napětí 15 kV. Po každém měření byla křemenná kapilára 90 s promývána hydroxidem sodným o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 60 s

kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a nakonec 120 s proteinovým pufrům CE-SDS.

2.4.5 HPLC

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC - high pressure liquid chromatography) je druh kapalinové chromatografie, kde je separace složek analytu urychlena čerpáním elučního činidla pod velkým tlakem. Mobilní fází je kapalina, stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Tato metoda je založena na vzniku slabých vazeb mezi složkami mobilní fáze, která obsahuje vzorek, a pevnou fází, jež tvoří náplň kolony. Složky analytu jsou k pevné fázi vázány různě velkou silou v závislosti na různých chemických či fyzikálních vlastnostech této dvojice. Složení mobilní fáze ovlivňuje rychlost separace analytu.



Obr. 19 Schéma kapalinového chromatografu. Převzato z [53].

Metoda HPLC se pro stanovení množství Rubisco používá v menší míře v porovnání s metodami SDS-PAGE a ELISA. Při aplikaci HPLC se používá gelová kolona, kde jsou jednotlivé složky děleny podle velikosti částic, a to tak, že nejrychleji procházejí velké molekuly a nejvíce zadržovány jsou malé molekuly [53].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Odběr vzorků, materiál

Odběr vzorků listů buku lesního byl prováděn na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. Objekt je situován v nadmořské výšce cca 908 m n.m. Na tomto pracovišti byly vybudovány v roce 1997 dvě minisféry pro sledování vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny. V jedné minisféře je koncentrace CO_2 $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ambient A) a v druhé minisféře je koncentrace CO_2 $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (elevated E).

Vzorky byly odebírány v pravidelném dvouhodinovém intervalu 8. 7. 2009 od 10:00 do 22:00 hod. a 9. 7. 2009 od 4:00 do 12:00 hod. Z každé minisféry byly odebírány dvě série po pěti vzorcích ($n = 5$), jedna pro spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity a druhá pro stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE. 22. 7. 2009 od 4:00 do 21:30 byly v pravidelném dvouhodinovém intervalu odebírány vzorky pouze pro stanovení obsahu Rubisco. Z odebraného listu byly korkovrtem vyříznuty 2 disky, každý o průměru 20 mm a zváženy. Průmět listové plochy dvou disků byl 628 mm^2 a hmotnost asi 56 až 121 mg. Disky byly okamžitě vloženy do mikrozkušavky Eppendorf a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem.



Obr. 20 Minisféry Experimentální ekologické stanice AV ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. Převzato z [54].

3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco

Stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [38] s extrakcí podle Besforda [40]. Tato metoda pro stanovení aktivity Rubisco je založena na sprážením tří reakcí Calvinova cyklu (reakce III – V). Postup byl modifikován pro stanovení počáteční aktivity enzymu podle Heringové [55]. Jako substrát pro reakci byl použit ribosa-5-fosfát, který se v průběhu reakce transformuje na ribulosa-1,5-bisfosfát enzymy obsaženými v extraktu (reakce I a II). Výhodou použití ribosa-5-fosfátu je jeho nižší cena a stabilnější rychlost reakce, protože se substrát uvolňuje do směsi postupně. Do směsi se také přidává KHCO_3 , který uvolňuje CO_2 a aktivuje tak enzym Rubisco. K aktivaci enzymu jsou také důležité ionty Mg^{2+} , které se do směsi přidávají ve formě MgCl_2 . Dále byly do reakční směsi přidávány enzymy, které katalyzují reakce (III) – (V), NADH a ATP. Konečným produktem reakce (III – V) je glycerinaldehyd-3-fosfát. Aby nedocházelo k hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, je ADP fosforylováno v reakci (IV). Počáteční a celková aktivita je vypočítána pomocí Lambertova-Beerova zákona z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V).

- ribosa-5-fosfát $\xrightarrow{\text{ribosa-5-fosfátisomerasa}}$ ribulosa-5-fosfát (I)
- ribulosa-5-fosfát + ATP $\xrightarrow{\text{ribulosa-5-fosfátkinasa}}$ ribulosa-1,5-bisfosfát + ADP + H^+ (II)
- ribulosa-1,5-bisfosfát + CO_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{Rubisco}}$ 2(3-fosfoglycerát) + 2 H^+ (III)
- 3-fosfoglycerát + ATP $\xrightarrow{\text{fosfoglycerátkinasa}}$ 1,3-bisfosfoglycerát + ADP (IV)
- 1,3-bisfosfoglycerát + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa}}$ glycerinaldehyd-3-fosfát + NAD^+ + HPO_4 (V)
- 2-fosfokreatin + 2 ADP $\xrightarrow{\text{kreatinfosfokinasa}}$ 2-kreatin + 2 ATP (VI)

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC (firma HELAGO[®] CZ Hradec králové) – parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI
pH metr KNICK Portamess, typ 913pH
Centrifuga MLW T52.1
Absorpční spektrofotometr Helios γ od firmy Spectronic Unicam. Měřicí rozsah 190-1100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm

3.2.2 Chemikálie

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina (Sigma ALDRICH)
 Na_2EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný (Sigma ALDRICH)

KOH – hydroxid draselný (Penta)
DTT – dithiotreitol (Sigma ALDRICH)
MgCl₂ – chlorid hořečnatý (Sigma ALDRICH)
BSA – bovinní sérový albumin (Sigma ALDRICH)
KHCO₃ – hydrogenuhličitan draselný (Sigma ALDRICH)
Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (Sigma ALDRICH)
Kreatinfosfokinasa (Sigma ALDRICH)
R5P – ribosa-5-fosfát (Sigma ALDRICH)
3-Fosfoglycerátkinasa (Sigma ALDRICH)
ATP – adenosin-5'-trifosfát (Sigma ALDRICH)
NADH – β-nikotinamidadenindinukleotid (Sigma ALDRICH)
Fosfokreatin (Sigma ALDRICH)
Polyvinylpolypyrrolidon (Sigma ALDRICH)

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

V 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,372 g Na₂EDTA. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) na 7,8. Dále byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněn vodou po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu extrakčního roztoku.

3.2.3.2 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0

V 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,438 g Na₂EDTA. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) na 8,0. Dále byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněn vodou po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu pracovního roztoku a aktivačních roztoků.

3.2.3.3 Příprava aktivačních roztoků

V 50 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl₂ v HEPES-KOH, pH 8,0.

V 50 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO₃ v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě. Z těchto roztoků se při spektrofotometrickém stanovení pipetuje do optické kyvety po 50 μl, což odpovídá konečné koncentraci 20 mM MgCl₂ a 25 mM KHCO₃ v aktivačním roztoku.

3.2.3.4 Příprava extrakčního roztoku

V odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl₂ a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Takto připravený roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ a 0,2 % BSA.

3.2.3.5 Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg enzymu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Roztok se uchovává při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.6 Příprava roztoku kreatinfosfokinasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 byly rozpuštěny 2 mg enzymu kreatinfosfokinasy.

Roztok se uchovává při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.7 Příprava roztoku R5P

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg R5P.

Roztok se uchovává při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.8 Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy

Ke stanovení se použije komerčně dodávaný roztok 3-fosfoglycerátkinasy.

Roztok se uchovává při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.9 Příprava pracovního roztoku

V 10 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0:

0,002 g NADH

0,008 g DTT

0,013 g fosfokreatinu

0,019 g ATP

19 μl 3-fosfoglycerátkinasy

100 μl roztoku kreatinfosfokinasy

100 μl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Takto připravený pracovní roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na_2EDTA , 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat kreatinfosfokinasy a 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Pracovní roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovává se při laboratorní teplotě.

3.2.4 Extrakce enzymu

Vzorek, disky listu buku lesního, byl rozdrcen spolu s mořským pískem v třecí misce. Po důkladném rozdrcení bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku. Tato směs byla homogenizována po dobu asi 30 s. Výsledná suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a asi 1 minutu odstředována. Výsledný extrakt byl použit k spektrofotometrickému stanovení počáteční a celkové aktivity. Výsledný extrakt rychle stárne, proto bylo nutné zpracovávat ho co nejrychleji.

3.2.5 Měření aktivity

3.2.5.1 Měření počáteční aktivity

Pro měření počáteční aktivity bylo napipetováno do optické kyvety 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 . Dále bylo přidáno 20 μl extraktu, 850 μl pracovního roztoku a 30 μl roztoku R5P. Po důkladném promíchání byl ihned měřen pokles absorbance v 30s intervalech po dobu 6 minut při vlnové délce 340 nm.

3.2.5.2 Měření celkové aktivity

Pro měření celkové aktivity bylo napipetováno do optické kyvety 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 a 20 μl extraktu. Roztok byl promíchán a inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 850 μl pracovního roztoku a 30 μl roztoku R5P. Po důkladném promíchání byl měřen pokles absorbance v 30s intervalech po dobu 6 minut při vlnové délce 340 nm.

3.2.6 Výpočet aktivity enzymu Rubisco

Aktivita enzymu Rubisco se vypočítá z Lambertova Beerova zákona podle vztahu:

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \epsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

kde ΔA je pokles absorbance, t je čas [s], ϵ je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$], l je délka optické dráhy [cm] a c je koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$].

Aktivita enzymu je vyjádřena jako rychlost úbytku látkového množství substrátu (CO_2):

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A \cdot V}{2 \cdot \epsilon \cdot l}$$

Hodnota ϵ je pro NADH $6300 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$, optická dráha kyvety l je 1 cm.

Vzorový příklad výpočtu aktivity:

Počáteční i celková aktivita je počítána z lineární části naměřených dat. Vzhledem k tomu, že změna absorbance byla měřena po 30 sekundách, také průměrná změna absorbance je uvedena za 30 s. Vynásobením dvěma dostaneme změnu absorbance za minutu.

Tabulka 1. Stanovení počáteční aktivity enzymu Rubisco v extraktu vzorku 9. 7. 2009, 8:00 aE 4

aE 4	plocha [m2]	čers. hm. [g]	A	ΔA
1	0,000628	0,1	1,334	
2	0,000628	0,1	1,331	0,003
3	0,000628	0,1	1,329	0,002
4	0,000628	0,1	1,327	0,002
5	0,000628	0,1	1,325	0,002
6	0,000628	0,1	1,323	0,002
7	0,000628	0,1	1,321	0,002
8	0,000628	0,1	1,318	0,003
9	0,000628	0,1	1,315	0,003
10	0,000628	0,1	1,313	0,002
11	0,000628	0,1	1,311	0,002
12	0,000628	0,1	1,308	0,003
			Průměr ΔA	0,00236

Aktivita v květě:

$$\Delta n = \frac{\Delta A [\text{min}^{-1}] \cdot V [\text{cm}^3]}{2 \cdot \varepsilon [\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}] \cdot l [\text{cm}]} = \frac{0,00472 \cdot 1}{2 \cdot 6300 \cdot 1} = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ mmolCO}_2 \cdot \text{min}^{-1}$$

Převedení na sekundy:

$$\Delta n = \frac{3,8 \cdot 10^{-7} \cdot 1000}{60} = 6,3 \cdot 10^{-6} \mu\text{molCO}_2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Aktivita v 5 ml extraktu:

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 6,3 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 1,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{molCO}_2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Aktivita Rubisco vztážená na jednotkovou plochu listu (0,000628 m²):

$$\Delta n = \frac{1,6 \cdot 10^{-3}}{0,000628} = 2,55 \mu\text{molCO}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$$

Aktivita Rubisco vztažená na jednotkovou hmotnost listu:

$$\Delta n = \frac{2,49.60}{0,1} = 0,94 \mu\text{molCO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$$

3.3 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení obsahu enzymu Rubisco vycházelo z metod Damervalové et al. [56] a Rogerse et al. [39] a metoda byla dále upravena Floriánem [30] a Zachovou [57].

3.3.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC (firma HELAGO® CZ Hradec králové) – parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI
Centrifuga MLW T52.1
Vortex – Stuart formy MERCI s.r.o.
Termoblok TDB-100 (firma BIOSAN, Riga, Lotyšsko)
Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (firma BIO-RAD, USA)
Zdroj Power Pac 300 (firma BIO-RAD, USA)
Třepačka LT2

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid (Serva)
Brilantní modř G 250 – Coomasie (SERVA)
Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)
Buthanol (Lachema)
D-Ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa izolovaná ze špenátu – standard Rubisco (Sigma ALDRICH)
DTT – dithiotreitol (Sigma ALDRICH)
Ethanol (Lachema)
Glycerol (Sigma ALDRICH)
Glycin (SERVA)
Kyselina chlorovodíková (Penta)
Kyselina octová (Lachema)
2-Merkaptoethanol (Sigma ALDRICH)
Methanol CHROMASOLV® (Seidel-de-Haën)
N,N'-Methylenbisakrylamid (SERVA)
Peroxodisíran amonný (SERVA)
SDS-dodecylsulfát sodný (Sigma ALDRICH)
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SERVA)
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)

3.3.3 Příprava roztoků

3.3.3.1 *Roztoky pro přípravu gelů*

- Roztok A: 29,2 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.
- Roztok B: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, po rozpuštění bylo pH upraveno pomocí koncentrované HCl na 8,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.
- Roztok C: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, po rozpuštění bylo pH upraveno pomocí koncentrované HCl na 6,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.
- Roztok D: 10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Roztok nutno chránit před světlem, uchovává se v temnu.
- Roztok E: 0,1 g peroxidisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok nutno připravit pro každé stanovení čerstvým.
- Roztok F: 10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.
- TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.3.3.2 *Pomocné roztoky*

- Elektrodový pufr: 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu bylo rozpuštěno ve 1000 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.
- TRIS pufr: 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu bylo rozpuštěno ve 450 ml vody. pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na 6,8. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.
- Vzorkový pufr: Smíchá se 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.3.3.3 *Roztoky k vizualizaci bílkovin*

- Stabilizační roztok: Smíchá se 100 ml methanolu a 400 ml vody.
- Barvicí roztok: Smíchá se 0,5 g Coomassie Blue R, 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.
- Odbarvovací roztok: Smíchá se 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.3.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou, poté odmašťovacím přípravkem, následně byla opláchnuta destilovanou vodou a ethanolem. Po odpaření ethanolu byla skla upnuta do stojanu, a to tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel leží na gumové podložce a tlakem svrchu byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

3.3.4.1 *Separáční gel*

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 2.

Tabulka 2. Objemy roztoků k pprav 10% separáčnho gelu (10 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,004

Roztok E a roztok TEMED byl přdn tsn před nalitm roztoku mezi skla. Nsledn se roztok nalil mezi skla, do výšky asi 2 cm od horního okraje. Zbyl roztok byl ponechán v kádince jako kontrola zatuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl okamžit převrstven asi 3 mm vrstvou butanolu, pro sprvn vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody. Po ztuhnutí separáčnho gelu byl odstraněn butanol a gel byl několikrát promyt destilovanou vodou.

3.3.4.2 *Zaostřovací gel*

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 3.

Tabulka 3. Objemy roztoků k pprav 5% zaostřovacího gelu (3 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po přdn roztoku E a roztoku TEMED byl zaostřovací gel rovnomrn nalit na vrstvu ztuhlého separáčnho gelu a téměř p okraj a do prostoru mezi skla byl ihned vložen elektroforetick hřebínek. Gel se nechá opět ztuhnout a hřebínek se odstraņuje a před nanšenm vzorků, jinak hrozí vysychání gelu. Hotov gel je mon uchovávat v lednici, nejdle však do dalšího dne.

3.3.5 Příprava standardů

V mikrozkušavce Eppendorf byl rozpuštěn v 1 ml vzorkového pufru 1 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy (standard $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku při teplotě $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Standard $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven smícháním $0,5 \text{ ml}$ vzorkového pufru a $0,5 \text{ ml}$ standardu $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Směs byla opět promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku při teplotě $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí byly standardy uchovávány v mrazničce při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.6 Příprava vzorků

Navážka vzorku o známé ploše byla homogenizována ve vychlazené třecí misce s $0,03 \text{ g}$ inertního mořského písku a 2 cm^3 extrakčního pufru o pH 7,8, který obsahoval 62 mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS), 2% (w/v) dodecylsulfátu sodného (SDS), 65 mM DTT a 10% (v/v) glycerolu. Homogenát byl přelit do centrifugační zkumavky a odstředován po dobu jedné minuty. Následně bylo $0,5 \text{ cm}^3$ supernatantu přidáno k $0,5 \text{ cm}^3$ vzorkového pufru, obsahujícího 3% (w/v) TRIS, 5% (v/v) 2-merkapt ethanolu, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerolu a $0,2 \%$ (w/v) bromfenolové modři. Směs supernatantu a vzorkového pufru byla povařena v termobloku 5 minut při $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Po zchladnutí byly vzorky uchovány v mrazničce při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.7 Elektroforéza

Skla s připraveným a dokonale ztuhlým gelem byly vytažena ze stojanu, očištěna od zbytků gelu a fixem obkreslen tvar hřebenu na zadní sklo. Opatrně byl odstraněn elektroforetický hřebínek a skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodovým roztokem a vnější prostor byl naplněn asi do poloviny. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první pozice nanášeno $10 \text{ } \mu\text{l}$ standardu Rubisco ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a do každé jamky $10 \text{ } \mu\text{l}$ vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 120 V . V průběhu elektroforézy bylo nutné kontrolovat, zda elektrodový pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a popřípadě pufr doplnit. Elektroforéza trvala $120\text{--}150$ minut, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

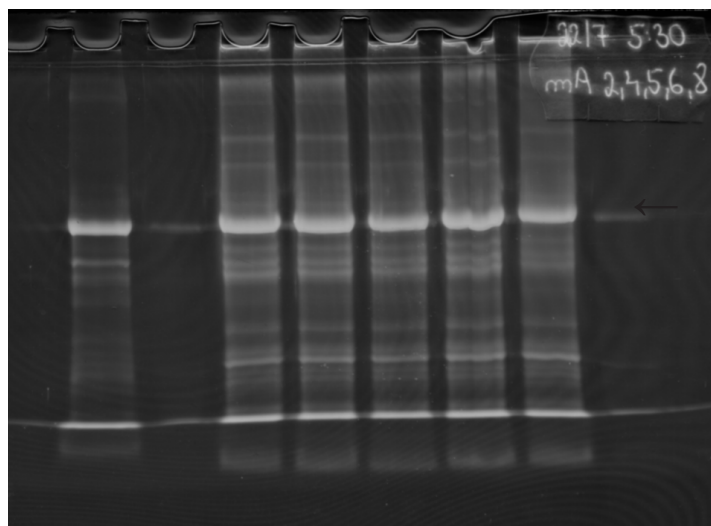
3.3.8 Zviditelnění bílkovin

Elektroforetická skla s gelem byla vyjmuta ze stojanu tak, aby pufr odtékl do vnější nádoby a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo horní sklo sejmuto. Otočením spodního skla pod vodou došlo k vyklopení gelu. Voda v misce byla vylita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Poté byl gel protřepán asi 30 minut s barvicím roztokem. Po uplynutí této doby byl gel promyt odbarvovacím roztokem a poté asi 90 minut protřepán s odbarvovacím roztokem do dostatečného odbarvení. Po slítí použitého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen

na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chrání před vysycháním. Hotové gely byly skladovány v chladničce při teplotě do 4 °C. Celá práce byla prováděna v ochranných gumových rukavicích, z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

3.3.9 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány do počítače. Kvantifikace velké a malé podjednotky enzymu Rubisco byla provedena pomocí HP Scanjet programem Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X. Tím byly zóny velkých a malých podjednotek enzymu Rubisco převedeny na píky (intenzita zbarvení proti vzdálenosti od okraje gelu) a integrací byla vypočítána jejich plocha. Velikost plochy byla přímo úměrná koncentraci bílkovin, proto byla koncentrace Rubisco ve vzorku vypočítána porovnáním plochy a koncentrace standardu. Protože poměr velikosti plochy a koncentrace standardu byl ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel.



Obr.21 Zóny separovaných bílkovin na polyakrylamidovém gelu. První sloupec vlevo je standard Rubisco, 3.–7. sloupec jsou extrakty z listů. Šipka značí zóny velké podjednotky.

3.3.10 Výpočet

Obsah enzymu Rubisco byl vypočítán z velikosti plochy standardu Rubisco o známé koncentraci, plochy zóny stanovovaného vzorku a jeho plochy disku.

Vzorový příklad výpočtu obsahu:

Tabulka 4. Stanovení obsahu Rubisco v extraktu vzorku 8. 7. 2009, 21:45, mA

číslo vzorku	standard	vzorek	obsah [g.m ⁻²]	hmot. list. disků [mg]	obsah [mg(rub).g(fw) ⁻¹]
1	144	148	6,55	90	45,68
4	144	197	8,71	99	55,27
5	144	244	10,79	92	73,67
6	144	226	10,00	93	67,50
7	144	225	9,95	92	67,93
průměrný obsah			9,20		62,01

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci 1 mg.ml⁻¹

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou plochu listu (0,000628 m²):

$$c = \frac{148.4}{144.0,628} = 6,55 \text{ g.m}^{-2}$$

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou hmotnost listu:

$$c = \frac{148.4.1000}{144.90} = 45,68 \text{ mg (rub).g (fw)}^{-1}$$

3.4 Stanovení specifické aktivity

Specifická počáteční aktivita je stanovená jako poměr počáteční aktivity, stanovené spektrofotometricky a množství enzymu Rubisco, které je stanovené elektroforeticky. Specifická celková aktivita se získá poměrem celkové aktivity a množství enzymu Rubisco.

$$sa \left[\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \right] = \frac{a \left[\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \right]}{m \left[\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \right]}$$

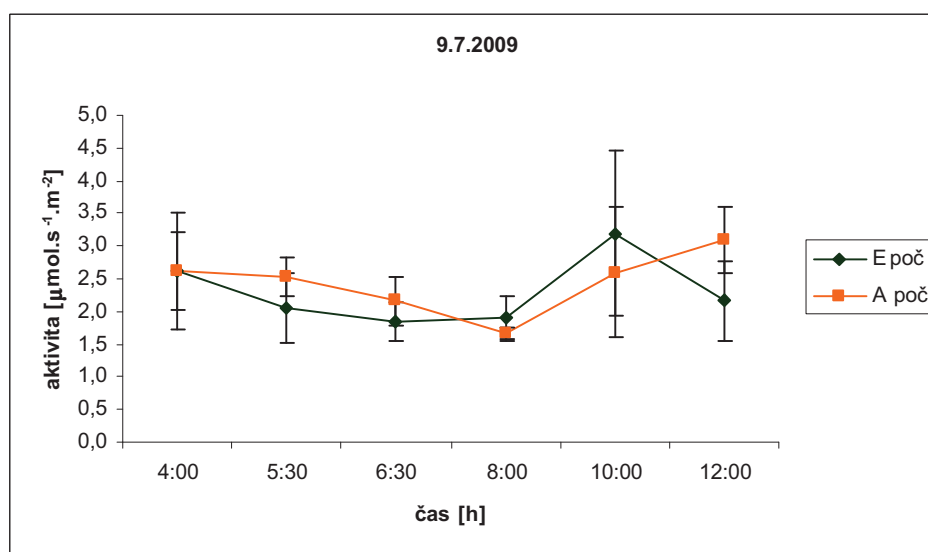
3.5 Stanovení stupně aktivace

Stupeň aktivace byl vypočítán z poměru počáteční a celkové aktivity.

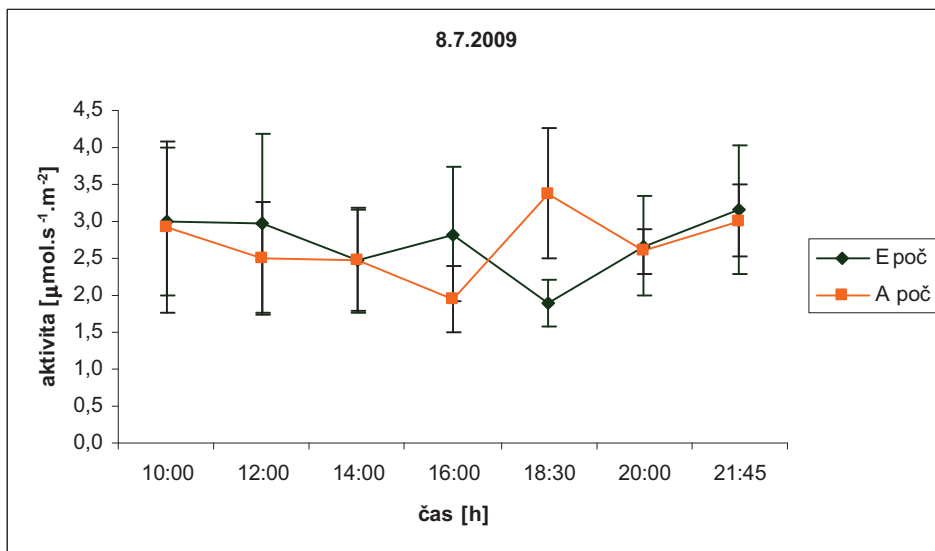
$$\text{stupeň aktivace [\%]} = \frac{a_p}{a_c} \cdot 100$$

4. VÝSLEDKY

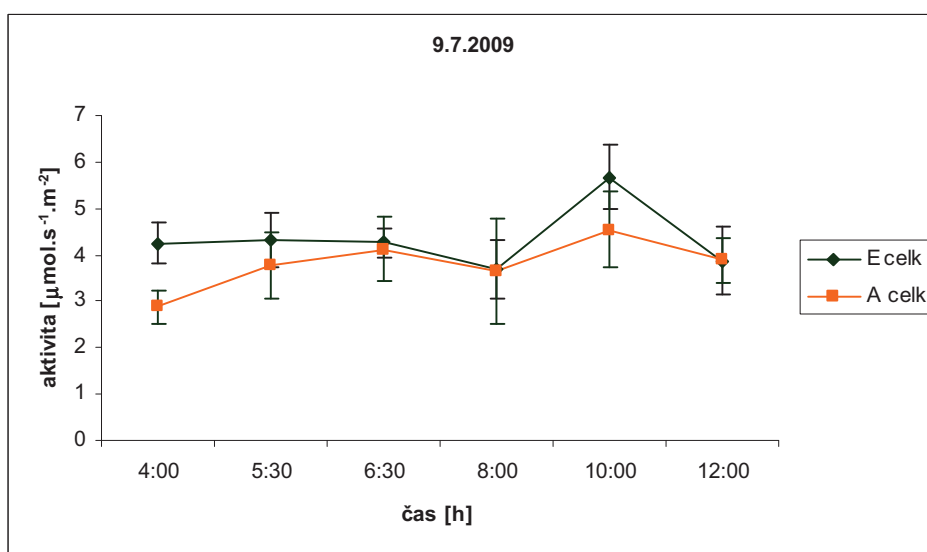
Vzorky byly odebrány v pravidelném dvouhodinovém intervalu 8. 7. 2009 od 10:00 do 22:00 hod. a 9. 7. 2009 od 4:00 do 12:00 hod. Z každé minisféry byly odebrány dvě série po pěti vzorcích ($n = 5$), jedna pro spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity a druhá pro stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE. 22. 7. 2009 od 4:00 do 21:30 byly v pravidelném dvouhodinovém intervalu odebrány vzorky pouze pro stanovení obsahu Rubisco, hodnoty aktivity potřebné pro výpočet specifických aktivit byly převzaty z práce Uhrové [69]. Výsledky jsou zachyceny na obr. 21–28.



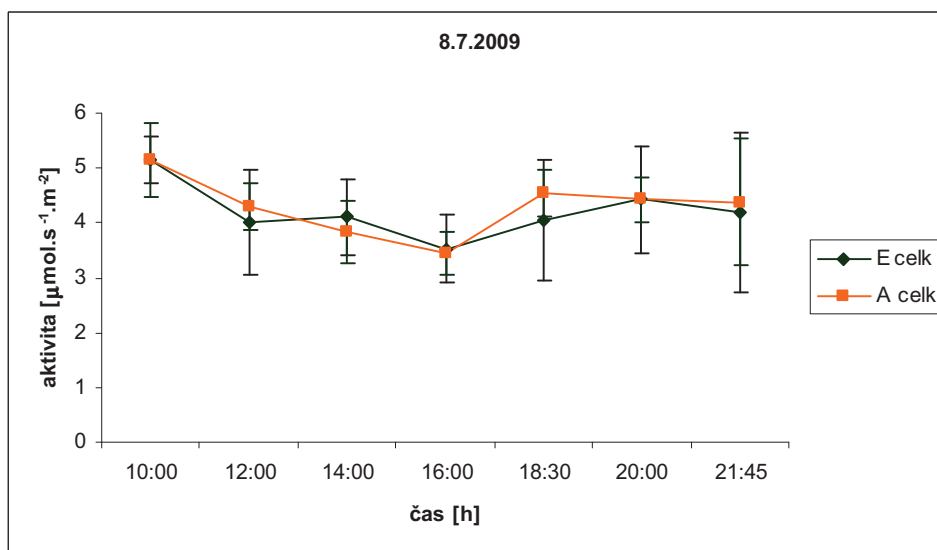
Obr. 22 Srovnání počáteční aktivity, vztažené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 9.7.2009.



Obr. 23 Srovnání počáteční aktivity, vztažené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorky odebrané 8.7.2009.

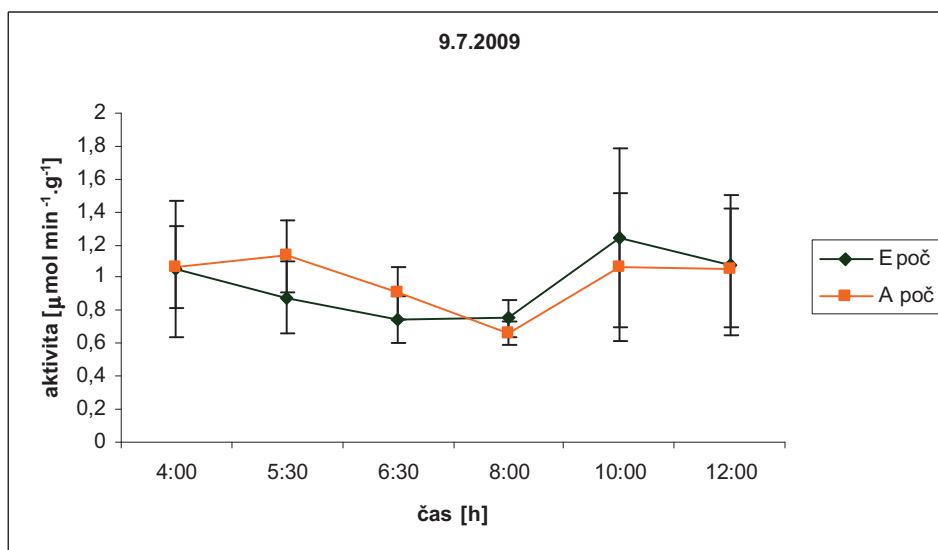


Obr. 24 Srovnání celkové aktivity, vztažené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorky odebrané 9.7.2009.

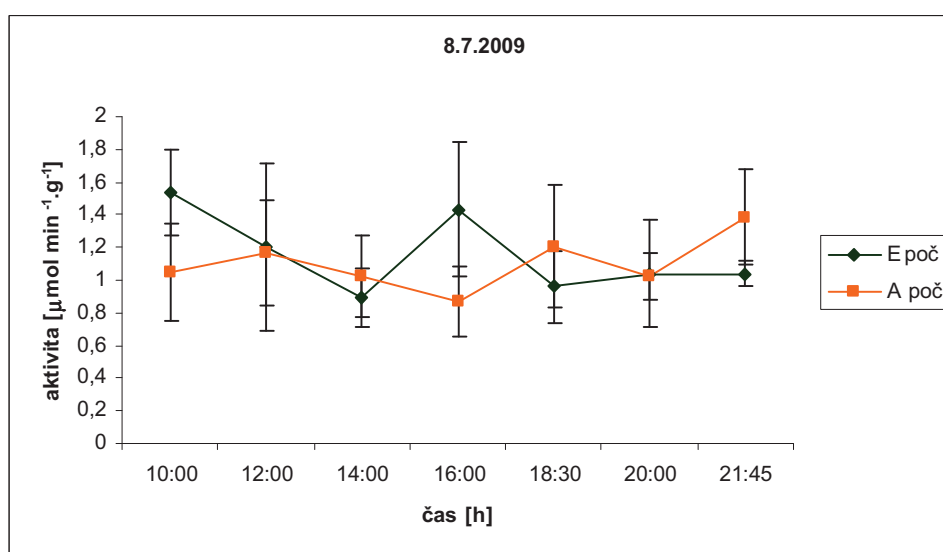


Obr. 25 Srovnání celkové aktivity, vztažené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 8.7.2009.

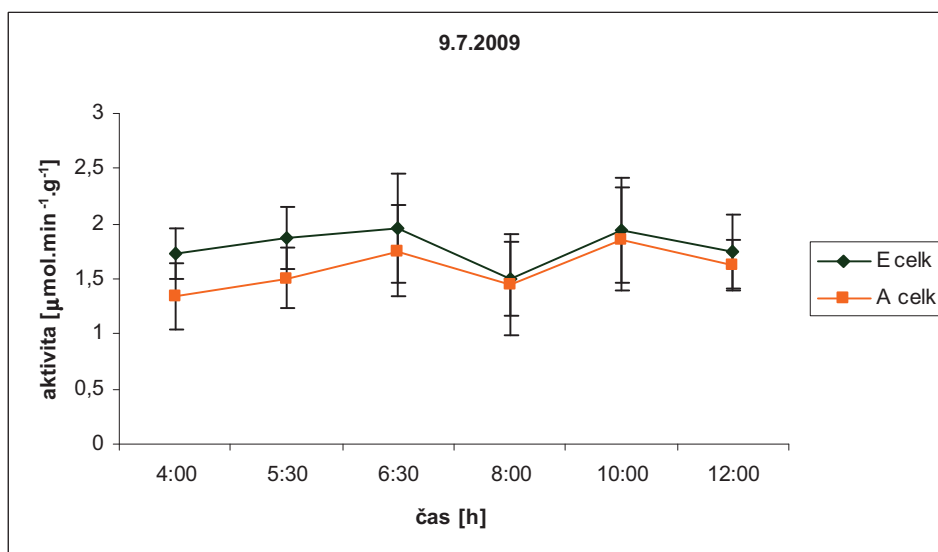
Z obrázků 22 až 25 je patrné, že u vzorků odebraných 8. a 9.7.2009 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi aktivitami u buků kultivovaných v A a E. Denní chod aktivit vykazoval pouze statisticky nevýznamné kolísání ($\alpha = 0,05$). Nápadný je vzestup počáteční a celkové aktivity v A i E v době 8:00–10:00 (o 38 resp. 39 % u počáteční aktivity a o 23 resp. 22 % u aktivity celkové) a počáteční aktivity u varianty A v 18:30 (o 28 %). Zatímco celková aktivita u varianty E byla v době 4:00–6:30 téměř konstantní, u varianty A došlo k nevýznamnému zvýšení (o 24 %). Nejvyšší celková aktivita byla naměřena 9. 7. v 10:00, nejnižší 9. 7. ve 4:00 a 8. 7. v 16:00.



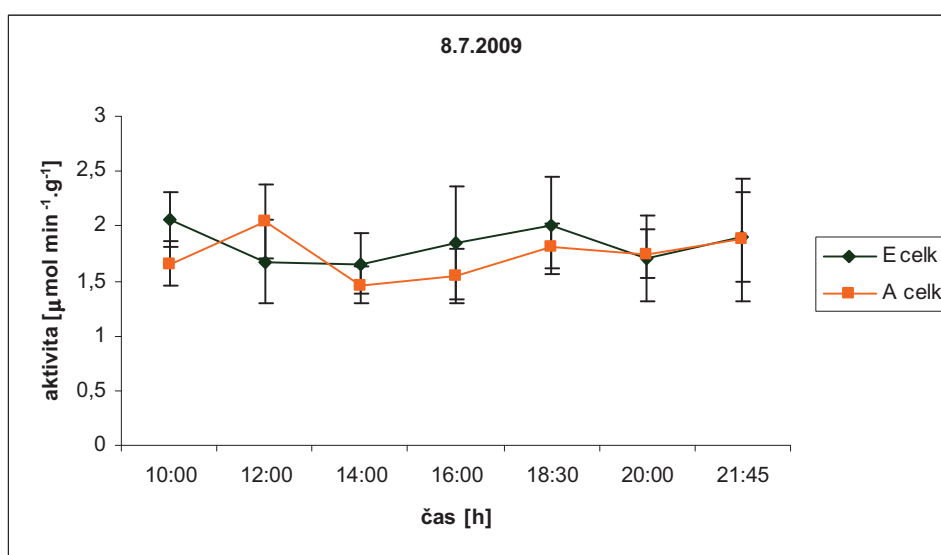
Obr. 26 Srovnání počáteční aktivity, vztážené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorčky odebrané 9.7.2009.



Obr. 27 Srovnání počáteční aktivity, vztážené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorčky odebrané 8.7.2009.



Obr. 28 Srovnání celkové aktivity, vztážené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorčky odebrané 9.7.2009.

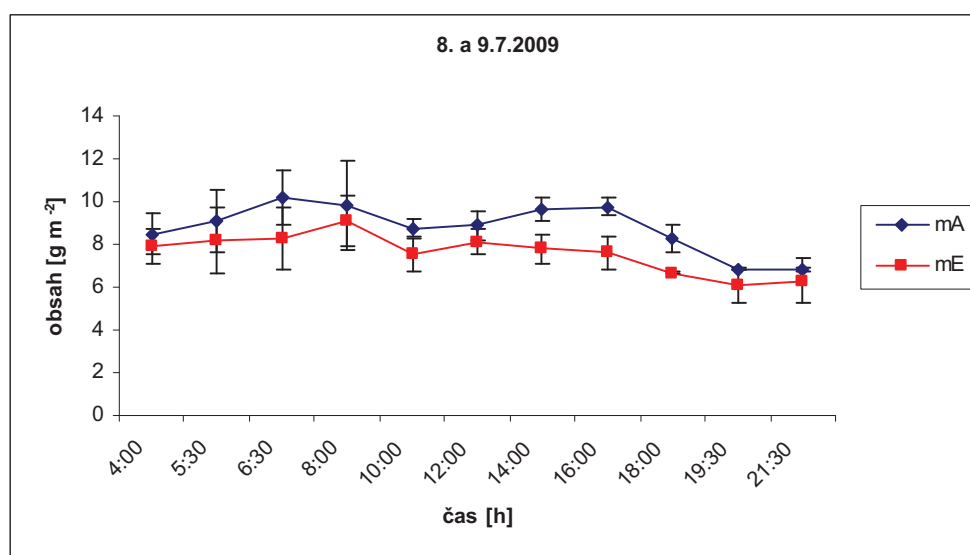


Obr. 29 Srovnání celkové aktivity, vztážené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorčky odebrané 8.7.2009.

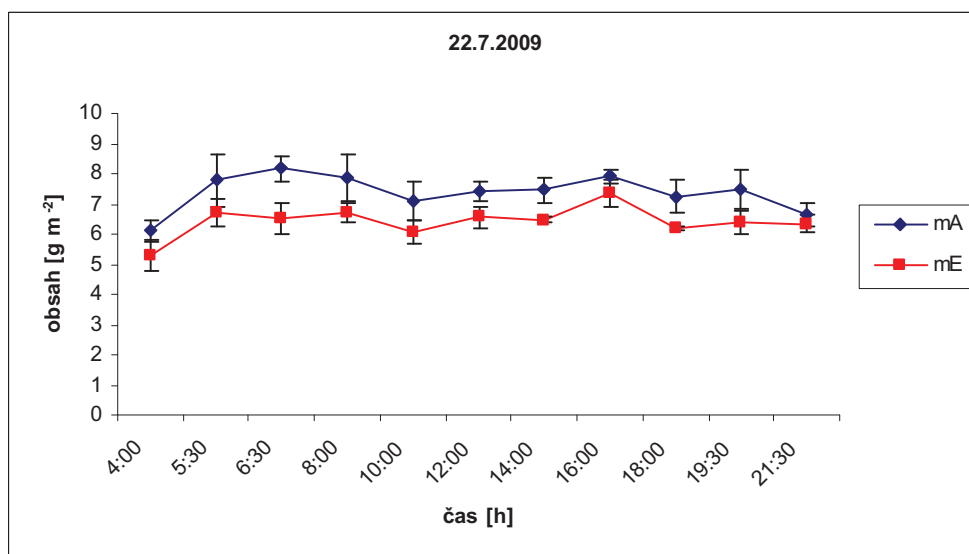
Z obrázků 26 až 29 je patrné, že u vzorků odebraných 8. a 9.7.2009 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) mezi aktivitami u buků kultivovaných v A a E. Denní chod aktivit vykazoval pouze statisticky nevýznamné kolísání. Po rozednění nedošlo k významnému zvýšení

celkové aktivity, což svědčí o nepřítomnosti nočního inhibitoru CA1P u buku. Průběh jednotlivých aktivit, vztažených na jednotkovou hmotnost listu, přibližně kopíruje průběh příslušných aktivit vztažených na jednotkovou plochu listu.

Pomocí metody SDS-PAGE byl stanoven obsah enzymu Rubisco v listech buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E) a to 8. a 9.7.2009 a 22.7.2009. Výsledky zachycují následující grafy.

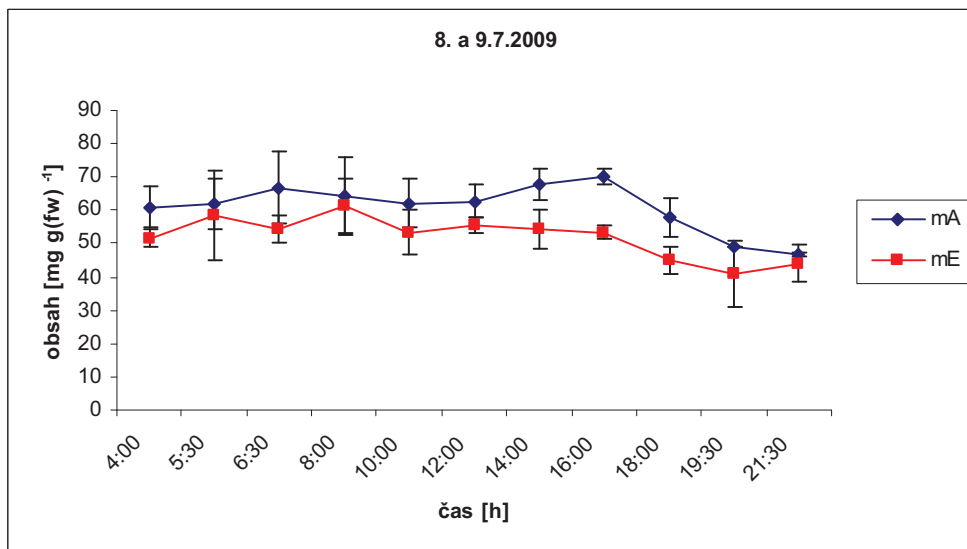


Obr. 30 Srovnání množství enzymu Rubisco, vztažené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 8. a 9.7.2009.



Obr. 31 Srovnání množství enzymu Rubisco, vztahené na jednotkovou plochu listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 22.7.2009.

Z obrázků 30 a 31 je patrné, že obsah enzymu Rubisco u listů buku lesního, rostoucího při normální koncentraci CO_2 je vyšší než obsah enzymu u listů rostoucích v E. U vzorků odebraných 8. a 9.7.2009 není v ranních a dopoledních hodinách statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) mezi hodnotami obsahu enzymu Rubisco u listů kultivovaných v A a E, v odpoledních hodinách je patrný významný rozdíl mezi hodnotami obsahu enzymu u buku lesního kultivovaného v A i E, nejvíce mezi 16:00-19:00. Tyto výsledky svědčí aklimaci obsahu Rubisco při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 . Jednotlivé křivky hodnot vzájemně kopírují svůj průběh, v ranních a odpoledních hodinách dochází k mírnému vzestupu, naopak kolem poledne a ve večerních hodinách nastává mírný pokles obsahu enzymu Rubisco v listech buku lesního. U vzorků odebraných 22.7.2009 se vyskytl statisticky významný rozdíl v hodnotách v A a E v ranních a odpoledních hodinách (nejvíce v 6:30 a 18:00).



Obr. 32 Srovnání množství enzymu Rubisco, vztažené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorky odebrané 8. a 9.7.2009.

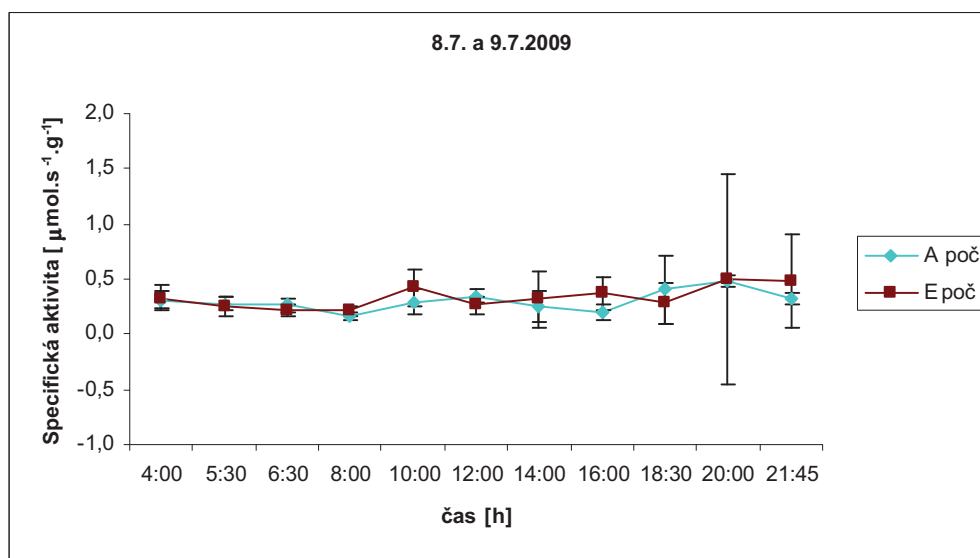


Obr. 33 Srovnání množství enzymu Rubisco, vztažené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorky odebrané 22.7.2009.

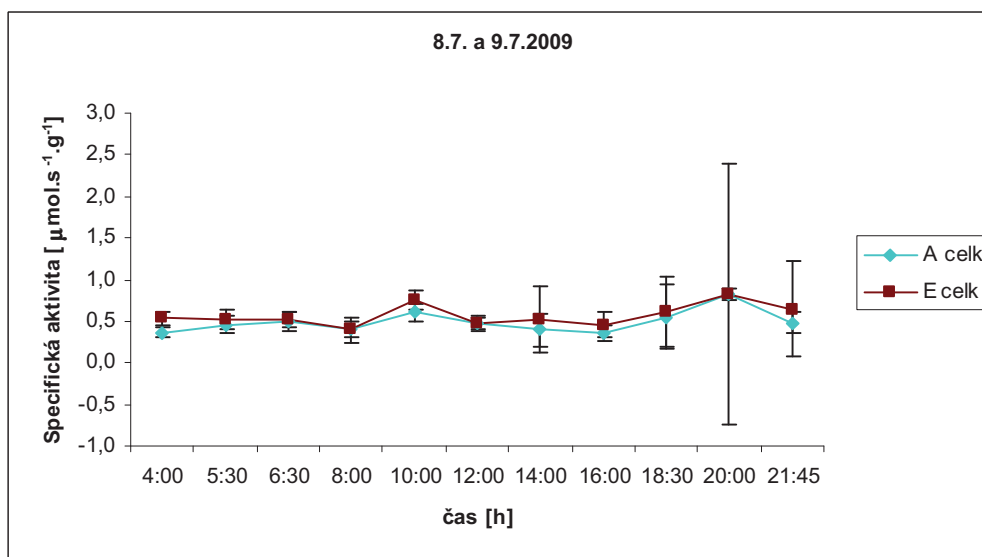
Na obrázcích 32 a 33 je patrné srovnání množství enzymu Rubisco, vztažené na jednotkovou hmotnost listu, u listů buku lesního kultivovaných v A a E. Jednotlivé křivky hodnot vzájemně kopírují svůj průběh, v ranních a odpoledních hodinách dochází k mírnému vzestupu, naopak kolem poledne a ve večerních hodinách nastává mírný pokles obsahu enzymu Rubisco v listech

buku lesního. Množství Rubisco u listů buku kultivovaných v A je v obou případech vyšší než u listů v E (aklimace). U vzorků odebraných 8. a 9.7.2009 není statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) mezi hodnotami množství enzymu Rubisco u listů kultivovaných v A a E, statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) byl zaznamenán pouze ve 14:00–18:00. U vzorků odebraných 22.7.2009 se vyskytl statisticky významný rozdíl v hodnotách v A a E v dopoledních a odpoledních hodinách (nejvíce v 8:00).

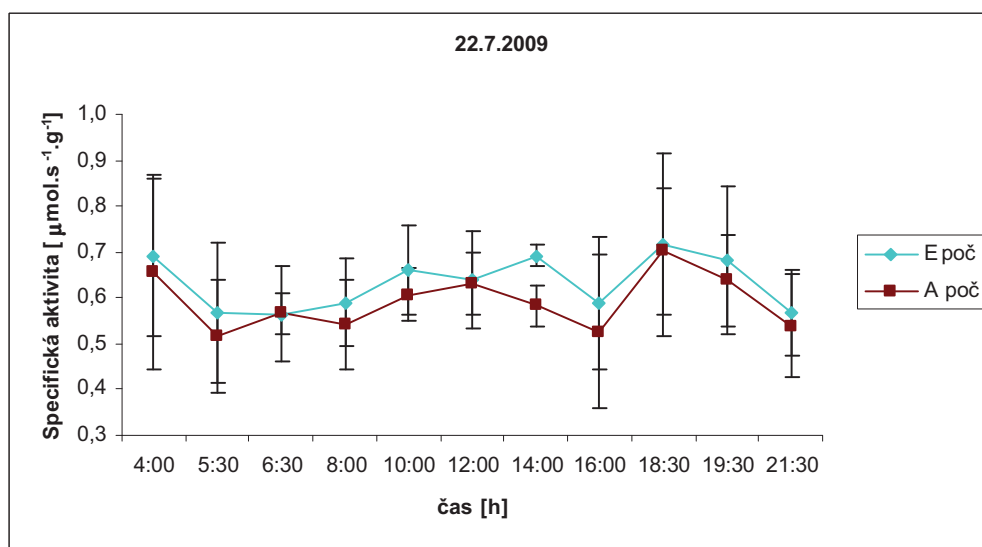
Počáteční a celková specifická aktivita byla vypočítána z poměru počátečních a celkových aktivit a množství enzymu Rubisco u listů buku lesního. Výsledky zachycují následující grafy.



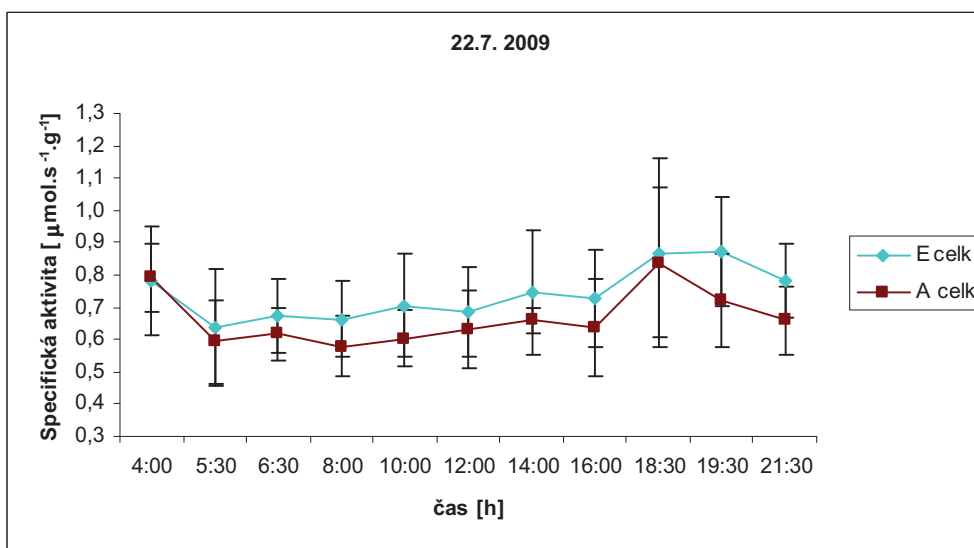
Obr. 34 Srovnání počáteční specifické aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 8. a 9.7.2009.



Obr. 35 Srovnání celkové specifické aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorčky odebrané 8. a 9.7.2009.



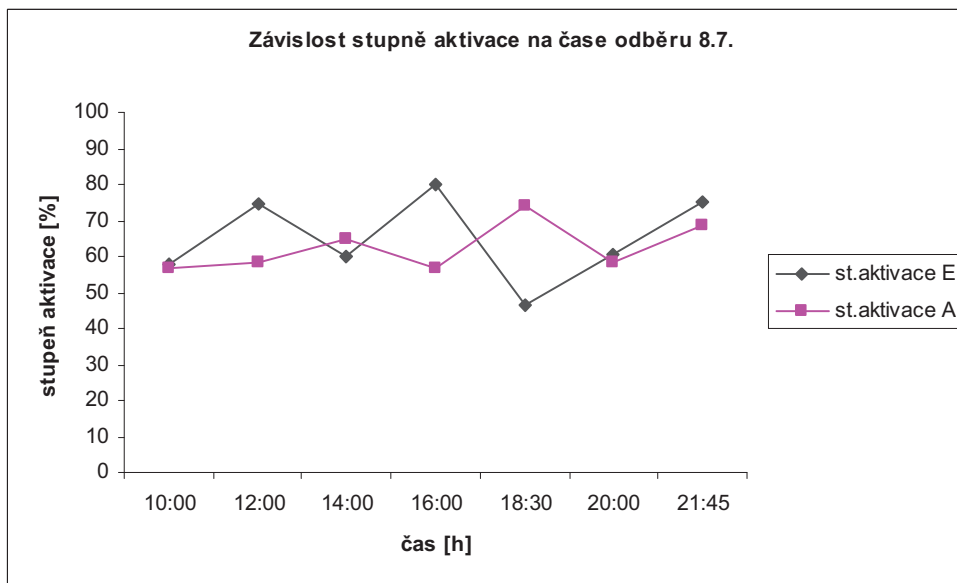
Obr. 36 Srovnání počáteční specifické aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Vzorčky odebrané 22.7.2009. Hodnoty aktivity potřebné pro výpočet specifické aktivity 22.7.2009 byly poskytnuty L. Uhrovou [69].



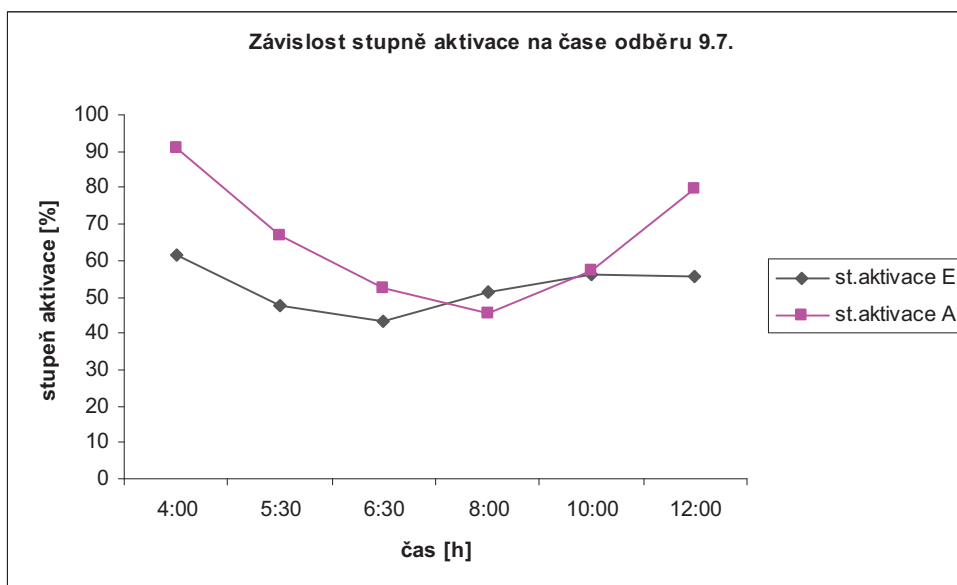
Obr. 37 Srovnání celkové specifické aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorčky odebrané 22.7.2009. Hodnoty aktivity potřebné pro výpočet specifické aktivity 22.7.2009 byly poskytnuty L. Uhrovou [69].

Na obrázcích 30 až 34 je patrné srovnání počáteční a celkové specifické aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální a zvýšené koncentraci CO_2 . U vzorků odebraných 8. a 9.7.2009 byla počáteční a celková specifická aktivita v A a E téměř konstantní, vzestup byl zaznamenán pouze u celkové specifické aktivity okolo 20:00 u listů kultivovaných v E. U vzorků odebraných 22.7.2009 je počáteční i celková specifická aktivita u listů v E vyšší než počáteční a celková specifická aktivita u listů v A, nejsou však zaznamenány statisticky významné rozdíly a průběh specifické aktivity v E kopíruje průběh specifické aktivity v A. V průběhu dne nastává jak u počáteční tak i u celkové specifické aktivity mírný vzestup, nejvyšší v 18:30, v pozdějších hodinách nastává pokles.

Stupeň aktivace byl vypočítán z poměru počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco u listů buku lesního kultivovaných při normální (A) a zvýšené (E) koncentraci CO_2 . Výsledky zachycují následující obrázky.



Obr. 38 Závislost stupně aktivace enzymu Rubisco na čase odběru vzorků u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 8.7.2009.



Obr. 39 Závislost stupně aktivace enzymu Rubisco na čase odběru vzorků u listů buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Vzorky odebrané 9.7.2009.

Obrázky 38 až 39 zachycují závislost stupně aktivace enzymu Rubisco na čase odběru vzorku u listů buku lesního kultivovaných v A i E. U vzorků odebíraných 8.7.2009 se stupeň aktivace

enzymu Rubisco pohyboval v rozmezí 40–80 %. Denní průběh byl variabilní, střídal se pokles a vzestup aktivace enzymu Rubisco. U vzorků odebraných 9.7.2009 kultivovaných v A byl stupeň aktivace enzymu Rubisco vyšší než u listů v E. Stupeň aktivace se pohyboval v rozmezí 40–90 %. V průběhu ranních hodin nastal pokles stupně aktivace enzymu Rubisco, nejnižší hodnota zaznamenaná v 8:00 (45 %), poté se stupeň aktivace zvyšoval. U listů kultivovaných v E se stupeň aktivace pohyboval v rozmezí 40–60 %. V průběhu ranních hodin nastal opět pokles stupně aktivace enzymu Rubisco, nejnižší hodnota byla zaznamenaná v 6:30 (43 %), a poté nastal mírný vzestup stupně aktivace.

5. DISKUZE

5.1 Denní chod aktivity Rubisco

Vzorky byly odebírány v pravidelném dvouhodinovém intervalu 8. 7. 2009 od 10:00 do 22:00 hod. a 9. 7. 2009 od 4:00 do 12:00 hod. U počáteční i celkové aktivity v průběhu dne nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v závislosti na světelných podmínkách. Hodnoty počátečních aktivit u listů kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) byly stanoveny v rozmezí 1,7–3,3 μmol CO₂.s⁻¹.m⁻², u listů kultivovaných při zvýšené koncentraci CO₂ (E) v rozmezí 1,8–3,2 μmol CO₂.s⁻¹.m⁻². Hodnoty celkových aktivit u listů kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) byly stanoveny v rozmezí 2,9–5,1 μmol CO₂.s⁻¹.m⁻², u listů kultivovaných při zvýšené koncentraci CO₂ (E) v rozmezí 3,7–5,7 μmol CO₂.s⁻¹.m⁻². Aktivita Rubisco záleží na mnoha faktorech, které se mění v závislosti na čase odběru a druhu rostliny. Proto je velmi obtížné srovnat aktivity jednotlivých autorů. Z pevně vázaných inhibitorů, které ovlivňují celkovou aktivitu enzymu Rubisco, jsou to především noční inhibitor CA1P a denní inhibitory XuBP a 3-KABP [58].

Je-li v rostlině přítomen noční inhibitor CA1P, který se za světla postupně odbourává, celková aktivita se po rozednění postupně zvyšuje. Tento jev nebyl v našem experimentu pozorován a zdá se tedy, že CA1P nehraje u buku významnou roli. Pro přítomnost denních pevně vázaných inhibitorů na aktivních místech Rubisco, existují dva důkazy:

- Existence polední deprese – prudký pokles počáteční i celkové aktivity v poledních hodinách způsobený tím, že úroveň radiace překročila limitní hodnotu světelného toku. Tento pokles je dokumentován v mnoha pracích [59], [60]. Polední deprese může mít více příčin, jednou z nich může být omezená schopnost tylakoidu zpracovávat vyšší světelné toky. Při vysoké radiaci tylakoidu dochází ke zvýšení excitace, ale současně dochází ke snížení počtu otevřených reakčních center, v nichž může být excitace účinně přeměněna. Proto se s rostoucí ozářeností snižuje účinnost přeměny pohlceného záření, snižuje se podíl pohlcených fotonů, jejichž energie se zachová v podobě rozdělených nábojů a zvyšuje podíl těch, jejichž energie se přemění v teplo nebo ve fluorescenci [7].
- Večerní nárůst aktivity – růst celkové aktivity ve večerních hodinách může být způsoben uvolňováním denních inhibitorů z těsných vazeb na Rubisco a pomalou syntézou CA1P.

Podle našich měření však aktivita typickou polední depresí nevykazuje, k nejvyššímu poklesu aktivity došlo v 8:00 a v 16:00.

Vliv denních inhibitorů je podrobně zkoumán v práci Keyse et al. [61]. V prvním pokusu byl ke standardu Rubisco přidán purifikovaný listový extrakt testovaných rostlin. Vzorky byly odebírány za dne a za tmy, proto bylo možné ideálně porovnat velikost vlivu nočního a denních inhibitorů. U pšenice byl zaznamenán vyšší pokles aktivity způsobený vzorkem s denním inhibitorem, u fazole byl prokázán vyšší účinek nočního inhibitoru.

Sinha et al. [62], Wang et al. [63] objevili, že počáteční aktivita Rubisco u rýže (*Oryza sativa*) má typický průběh se dvěma maximy ráno a odpoledne a s polední depresí. Počáteční aktivita dosáhla prvního maxima okolo osmé hodiny, ve 13 hodin byla patrná polední deprese, odpoledne nastal mírný vzrůst a druhé maximum nastalo v 18 hodin. Stejný průběh se dvěma maximy jsme zjistili i v našem stanovení aktivit, a to jak u vzorků v A, tak i u vzorků v E. První maximum nastalo v dopoledních hodinách 10:00, druhé ve večerní hodině 18:30. V době prvního maxima je

počáteční aktivita u vzorků z E vyšší než u vzorků z A, naproti tomu v době druhého maxima je počáteční aktivita u vzorků z A vyšší než u vzorků z E. V našem měření není patrná polední deprese, není patrný prudký pokles aktivity v poledních hodinách, minimální hodnoty počáteční aktivity jsme naměřili v 8:00 a v 16:00. V práci Servaites et al. [35] je uveden jiný průběh počáteční aktivity. Počáteční aktivita enzymu Rubisco vzrostla několikrát během ranních hodin se vzrůstající ozářeností a zůstala přibližně konstantní mezi dvanáctou a šestnáctou hodinou. Potom se snižující ozářeností začala klesat.

U našich vzorků byla stanovena i celková aktivita a stejně jako u počáteční aktivity, byla patrná dvě maxima, ale druhé maximum nedosahovalo tak vysokých hodnot, bylo patrnější pouze u vzorků z A. První maximum nastalo v 10:00, druhé v 18:30. Nejnížší celková aktivita byla naměřena v 8:00 a 16:00. Celková aktivita u vzorků z E byla vyšší v průběhu dopoledních hodin, odpoledne dosahovaly vyšší hodnot celkové aktivity u vzorků z A. Relativně vysoké hodnoty byly naměřeny ve večerních hodinách, kdy se očekával spíše pokles z důvodu inhibice nočním inhibitorem CA1P. Sinha et al. [62] uvádí také průběh celkové aktivity se dvěma maximy. Od ranních hodin celková aktivita se vzrůstající ozářeností vzrůstala až do deseti hodin, kdy dosáhla maxima. Poté klesala a v poledne opět dosáhla polední deprese. Poté celková aktivita prudce vzrostla a ve třináct hodin dosáhla druhého maxima. S klesající ozářeností poté klesala i celková aktivita. Wang et al. [63] ve své práci uvádějí měření pouze počáteční aktivity. Celková aktivita naměřená v práci Servaitese et al. [35] vzrostla ráno asi třikrát, mezi devátou a desátou hodinou je patrný malý pokles, poté celková aktivita vzrostla a zůstala od dvanácti hodin téměř konstantní. V 18 hodin naměřen mírný pokles, ale v 19 hodin se aktivita opět vrátila na původní hodnotu.

Sinha et al. [62] udávají, že před východem slunce při nízké ozářenosti byl stupeň aktivace u *Prosopis juliflora* kolem 100 %, protože počáteční i celková aktivita byly velmi nízké. Se vzrůstající ozářeností obě aktivity vzrůstaly až do 10 hodin, ale stupeň aktivace klesal na 40 %, protože vzrůst celkové aktivity byl větší než růst počáteční. V poledne stupeň aktivace dále klesal až na 20 %, poté setrval kolem 25 % a po 16. hodině vzrůstal, až o půlnoci dosáhl 100 %. Při našem stanovení stupně aktivace je patrný vyšší stupeň aktivace při ranních a večerních odběrech, a pokles v průběhu poledne, celkově se však stupeň aktivace drží na vyšších hodnotách (40–100 %). Může to být způsobeno rozdílnými hodnotami celkové aktivity, kdy ranní aktivita není tak nízká a její vzestup v průběhu dne není tak razantní, stejně jako její opětovný pokles ve večerních hodinách. Stupeň aktivace odráží karbamylovaný stav Rubisco, tudíž pokles během poledne může být následkem dekarbamylace Rubisco [29]. Práce Servaitese et al. [35] ukazovala, že stupeň aktivace se měnil paralelně se změnou ozářenosti. Na začátku a konci dne byl stupeň aktivace kolem 50 %, v poledne pak dosáhl 100 %.

5.2 Denní chod obsahu Rubisco

Nejdokonalejší způsob extrakce spočívá v precipitaci listových proteinů roztokem kyseliny trichloroctové (TCA) a acetonu při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ [56, 39]. Nevýhodou této metody je značná pracnost a špatná rozpustnost sraženiny proteinů, což způsobuje nepřesnosti v měření. Proto nebyla ke stanovení množství Rubisco používána TCA/acetonová metoda, ale byl použit přímo

extrakt z listů v Tris puftru. Při této metodě je však kvantifikace proteinu ztěžována přítomností dalších látek, které způsobují nerovnosti základní linie.

Obsah enzymu Rubisco v listech je mnohem stálejším parametrem než jeho aktivita. Množství obsahu Rubisco u vzorků odebraných z A byl vyšší po celou dobu než u vzorků z E (aklimační deprese). Na existenci aklimační deprese u stromů se shoduje většina autorů [67, 64, 65, 66]. Moore et al. [67] považují redukci obsahu Rubisco za nejdůležitější projev fotosyntetické aklimace při zvýšené koncentraci CO₂. Příčinou redukce obsahu Rubisco je nahromadění sacharidů ve fotosyntetizující tkáni, které vede k poklesu rychlosti fotosyntézy, a tím i snížení množství enzymu Rubisco nebo dalších enzymů, katalyzujících reakce Calvinova cyklu. Dochází také ke snížení obsahu dusíku a rozpustných bílkovin v listech. Klesá i obsah chlorofylů, kvantového výtěžku fluorescence i fotochemického zhášení. Většina autorů [67, 64, 65, 66] se shoduje v názoru, že redukce obsahu Rubisco nastává pouze při nedostatečném zásobování rostliny dusíkem. Kolísání obsahu Rubisco v průběhu dne bylo statisticky nevýznamné ($\alpha = 0,05$), pouze 22. 7. 2009 byl v době 4:00–5:30 zaznamenán mírný vzestup obsahu Rubisco a 8. 7. 2009 v době 16:00–21:30 mírný pokles.

6. ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo stanovit denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco u buku lesního (*Fagus sylvatica*) kultivovaného v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂.

Stromky byly kultivovány v minisférách na Experimentálním ekologickém pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR Bílý kříž v Moravskoslezských Beskydech. V jedné minisféře byla atmosféra s běžnou koncentrací CO₂, tj. 360 μmol CO₂ mol⁻¹ (A – ambient), druhá minisféra obsahovala atmosféru o dvojnásobné koncentraci CO₂, tj. 700 μmol CO₂ mol⁻¹ (E – elevated).

Odběr vzorků probíhal ve dnech 8. 7. 2009, 9. 7. 2009 a 22. 7. 2009. Odběry byly prováděny každé dvě hodiny od 4:00, kdy byla ještě tma do 21:45, kdy už se setmělo.

U vzorků z 8. a 9. 7. 2009 byly stanoveny počáteční a celkové aktivity a obsah enzymu Rubisco, u vzorků z 22. 7. 2009 byl stanoven obsah enzymu Rubisco, aktivity byly převzaty z práce Uhrové [69]. Aktivita byla stanovena spektrofotometrickou metodou podle Lilleyho a Walkera [38] s extrakcí podle Besforda [40], metoda byla dále modifikována pro stanovení počáteční aktivity Heringovou [55]. Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát. Obsah byl stanoven metodou SDS-PAGE podle Darmervalové et al. [56] a Rogerse et al. [39], metoda byla dále upravena Floriánem [30].

U vzorků odebraných 8. a 9. 7. 2009 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi aktivitami u buků kultivovaných v atmosféře s normální a zvýšenou koncentrací CO₂, nedošlo tedy k aklimační depresi aktivity Rubisco vlivem zvýšené koncentrace CO₂. Denní chod aktivit vykazoval pouze statisticky nevýznamné kolísání. Po rozednění nedošlo k významnému vzestupu celkové aktivity Rubisco, což svědčí o nepřítomnosti nebo zanedbatelném vlivu nočního inhibitoru CA1P u buku. Silné kolísání stupně aktivace (40–90 %) svědčí o regulaci fotosyntézy v průběhu dne prostřednictvím karbamylylace enzymu Rubisco.

Obsah enzymu Rubisco u buků rostoucích ve zvýšené koncentraci CO₂ byl nižší než u buků v normální koncentraci CO₂. Vlivem zvýšené koncentrace CO₂ došlo tedy k aklimační depresi obsahu Rubisco. Obsah Rubisco vykazoval nevýrazné minimum (na hranici statistické významnosti) před rozedněním, v dalším průběhu dne bylo zaznamenáno pouze jeho nevýznamné kolísání.

U všech vzorků byla také stanovena specifická aktivita a to počáteční i celková. Počáteční specifická aktivita byla vypočítána z poměru počáteční aktivity a obsahu enzymu Rubisco, celková specifická aktivita byla vypočítána z poměru celkové aktivity a obsahu enzymu Rubisco. U vzorků odebraných 8. a 9. 7. 2009 i u vzorků odebraných 22. 7. 2009 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi počátečními a celkovými specifickými aktivitami u buků kultivovaných v atmosféře s normální a zvýšenou koncentrací CO₂. Statisticky nevýznamné kolísání specifických aktivit je dáno tím, že denní chod specifické aktivity se odvíjel od denního chodu počáteční a celkové aktivity a obsahu enzymu Rubisco, kde nedocházelo ke statisticky významným rozdílům.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Academia, Praha 2002.
- [2] KLOUDA, P. *Základy biochemie*, Pavel Klouda, Ostrava 2000.
- [3] Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotosynt%C3%A9za>
- [4] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*, 1. vyd. Praha 6: ISV nakladatelství, 2000. 257s. ISBN: 80-85866-62-5.
- [5] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha 1990.
- [6] DRAKE, B. G., GONZALEZ-MELER, M. A., LONG, S. P. More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, 48: 609-639.
- [7] ŠETLÍK, I., SEIDLOVÁ, F., ŠANTRŮČEK, I. Fyziologie rostlin [online]. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, poslední revize 21.2.2007 [cit. 2008-02-04]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/kap06.pdf>
- [8] IDSO, S. B., KIMBALL, B. A., AKIN, D. E., KRIDLER, J. A general relationship between CO₂ -induced reductions in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environ. Exp. Bot.*, 1993, roč. 33, s. 443-446.
- [9] GONZALES-MELER, M. A., RIBAS-CARBÓ, M., SIEDOW, J. N., DRAKE, B. G. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 1996, roč. 112, s. 1349-1355.
- [10] WILDMAN, S., BONNER, J. The proteins of green leaves. Isolation, enzymatic properties, and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.*, 1947, roč. 14, s. 381-413.
- [11] CALVIN, M., MASSINY, P. The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia*, 1952, roč. 8, s. 445-457.
- [12] QUAYLE, J. R., FULLER, R. C., BENSON, A. A., CALVIN, M. Enzymatic carboxylation of ribulose disphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3610-3611.
- [13] WIESSBACH, A., SMYRNIOTIS, P. Z., HORECKER, B. L. Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3611-3612.

- [14] BOWES, G., ORGEN, W. L., HAGEMAN, R. H. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, roč. 45, s. 716-722.
- [15] ANDREWS, T. J., LORIMER, G. H., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction.1 protein of leaves. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s. 11-18.
- [16] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction product and mechanism of action. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s 18-23.
- [17] ŠÍPAL, Z., AZENBACHER, P., PEČ, P., POSPÍŠIL, J., PŮŽIČKA, I. *Biochemie*. 1. vyd. Praha, SPN, 1992. 480 s. ISBN 80-04-21736-2.
- [18] LEEGOOD, R. C., SHARKEY, T. D., von CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. 1. vyd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 624 s. ISBN 0-7923-6143-1.
- [19] Dostupné z <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [20] MILLER, A., TSAI, CH-H., HEMPHILL, D., ENDRES, M., RODERMEL, S., SPALDING, M. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny, *Plant Physiol.*, 1997, 115: 1195-1200.
- [21] SPREITZER, R. J., SALVUCCI, M. E. Rubisco: Structure, regulatory interactions and possibilities for better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, roč. 53, s. 449-475.
- [22] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R. Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, roč. 63, s. 197-234.
- [23] ANDERSSON, I., TAYLOR, T. C. Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of biochemistry and Biophys.* 2003, roč. 414, s. 130-140.
- [24] WINKLER, A., LEA, P. J., QUICK, W. P. et al. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci*, 1999, 1402: 1517-1529.
- [25] Calvinův cyklus a pentosefosfátová dráha [online]. Poslední revize 6.11.2006 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z <http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bch/09.ppt>

- [26] LORIMER, G. H., BADEGR, M. R., ANDREWS, T. J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 1976, 15: 529-536.
- [27] LORIMER, G. H. Ribulosebisphosphate carboxylase-aminoacid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. *Biochemistry* 1981, 20: 1236-1240.
- [28] PORTIS, A. R. Jr. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *J. Exp. Bot.*, 1995, 46: 1285-1291.
- [29] PORTIS, A. R. Jr. Regulation of ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1992, 43: 415-437.
- [30] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce. VUT Brno 2006.
- [31] JIANG, C. H., RODERMEL, S. R., SHIBLES, R. M. Photosynthesis, Rubisco Activity and Amount, and Their Regulation by Transcription in Senescing Soybean Leaves. *Departments of Argonomy and Botany*, 1993, roč. 101, s. 105-112.
- [32] EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 1989, 78: 9-19.
- [33] SCHEIBLE, W.-R., GONZALES-FONTES, A., LAUERER, M., MULLER ROBER, B., CABOCHE, M. and STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 1997, 9, 783-798.
- [34] KRALL, J. P., SHEVELNA, E. V., PEARCZ, R. W. Regulation of photosynthetic induction state in high and low light grown soybean and *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don. *Plant Physiol.*, 1995, 109: 307-317.
- [35] SERVAITES, C.J., TORISKY, R. S., CHAO, S. F. Diurnal Changes in Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and activation state in leaves of field-grown soybeans. *Plant Science Letters*, 1984, 35: 115-121.
- [36] Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky. Dostupné z <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/fotosynteza.htm>.
- [37] ŠESTÁK, Z., ČATSKÝ, J., JARVIS, P. Plant photosynthetic production. Manual of methods. Dr. W. Junk, Publishing, The Hague, 1971.

- [38] LILLEY, R. M., WALKER, D. A. An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate varboxylase. *Biochim. Byophys. Acta*, 1974, 358: 226-229.
- [39] ROGERS, A., ELLWORTH, D. S., HUMPHRIES, S. W. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity, a study on loblolly pine grown in elevated pCO₂. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 1555-1561
- [40] BESFORD, R. T. Some properties of ribulose bisphosphate carboxylase extracted from Tomato leaves. *J. Exp. Bot.*, 1984, 35, 495-504.
- [41] DU, Y. CH., NOSE, A., KAWAMITSU Y. et al. An improved spectrophotometric determination of the activity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 1996, 65(4): 714-721.
- [42] GERARD, V. A., DRISCOLL, T. A spectrophotometric assay fot Rubisco activity: Application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assay. *J. Phycol.*, 1996, 32: 880-884.
- [43] PARRY, M. A. J., ANDRALOJC, P. J., PARMAR, S. et al. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant Cell Environ.*, 1997, 20:528-534.
- [44] TISSUE, D. T., THOMAS, R. B., STRAIN, B. R. Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant Cell Environ.*, 1993, 16: 859-865.
- [45] WARD, D. A., KEYS, A. J. A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assay for RuBP carboxylase. *Photosynthesis Res.*, 1989, 22: 167-171.
- [46] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie. Nakladatelství Olomouc, s. r. o., 2000.
- [47] NASSOURY, N., LAWRENCE, F., MORSE, D. Circadian Changes in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Distribution Inside Individual Chloroplasts Can amount for the Rhythm in Dinoflagellate Carbon Fixion. *The Plant Cell*, 2001, roč. 13, s. 923-934.
- [48] KOBZA, J., SEEMAN, J. R. Mechanisms for the light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesisin intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 85: 3815-3819.

- [49] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. 203 s. ISBN 80-7182-104-7.
- [50] BESFORD, R. T. The greenhouse effect: Acclimation of Tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes. *J. Plant Physiol. Vol.*, 1990, 136: 458-463.
- [51] FERREIRA, R. B., ESQUÍVEL, M. G., TEIXEIRA, A. R. An accurate method to quantify ribulose biphosphate carboxylase content in plant tissue. *Plant, Cell Environ.*, 2000, 23: 1329-1340.
- [52] WARREN, CH. R., CHEN Z-L., ADAMS, A. A. Effect of N source on concentration of Rubisco in Eucalyptus diversicolor, as measured by capillary electrophoresis. *Physiologia plant.*, 2000, 1: 52-58.
- [53] KAŠIČKA, V. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chem. Listy, 1997, 91: 320-329.
- [54] Dostupné z http://www.usbe.cas.cz/lefr/kultivacni_sfery.htm
- [55] HERINGOVÁ, P. *Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne*. Diplomová práce VUT, Brno 2004.
- [56] DAMERVAL, C., VIENNE, D., ZIVY, M., THILLEMENT, H. Technical improvement in two-dimensional electroforesis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 – 54.
- [57] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco*. Diplomová práce. VUT Brno 2008.
- [58] SERVAITES, J. C. Inhibition of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase by 2-Carboxyarabinitol-1-Phosphate. *Plant Physiol.*, 1990, roč. 92, s. 867-870.
- [59] KOBZA, J., SEEMANN, J. R. Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Activity in Response to Diurnal Changes in Irradiance. *Plant Physiol.*, 1989, roč. 89, s. 918-924.
- [60] PONS, T. L., WELSCHEM, R. A. M. Midday depression of net photosynthesis in the tropical rainforest tree Eperua Grandiflora: contribution of stomatal and internal conductances, respiration and Rubisco functioning. *Tree physiol.*, 2003, roč. 23, s. 937-947.

- [61] KEYS, A. J., MAJOR, I. Is there another player in. The game of Rubisco regulation? *J. of Exp. Bot.*, 1995, roč. 46, s. 1245-1251.
- [62] SINHA, A. K., SHIRKE, P. A., PATHRE, U., SANE, P. V. Midday depression in photosynthesis: Effect on sucrose-phosphate synthase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of *Prosopis juliflora* (Schwartz) DC. *Photosynthetica*, 1997, 34(1): 115-124.
- [63] WANG, N.Y., JIANG, D. A., HONG, J., ZHANG, F., WENG, X. Y. Diurnal Changes of Rubisco and RCA Activates and Their Cellular Localization in Rice. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(9):1076-1083.
- [64] SUZUKI, Y., MAKINO, A., MAE, T. Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of *rbcL* and *rbcS* in rice leaves from emergence to senescence. *Plant, Cell, Environ.*, 2001, roč. 24, s. 1353-1360.
- [65] NIE, G. Y., LONG, S. P., GARCIE, R. L. et al. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell, Environ.*, 1995, roč. 18, s. 885-864.
- [66] MAKINO, A. Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and Plant Growth. *Soil Sci. Plant Nutr*, 2003, roč. 49, s. 319-327.
- [67] EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 1989, 78: 9-19.
- [68] MOORE, B. D., CHENG, S. H., SIMS, D., SEEMANN, J. R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell, Environ.*, 1999, roč. 22, s. 567-582.
- [69] UHROVÁ, L. *Denní chod aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Bakalářská práce. VUT Brno 2010.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-KABP	3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát
A	minisféra s normální koncentrací oxidu uhličitého
ADP	adenosin-5'-difosfát
AIDA	Advanced Image Data Analyzer
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
CA	karboxyarabinitol
CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol 1,5-bifosfát
CE-SDS	kapilární elektroforéza za použití SDS
DMPN	dimethylaminopropionotril
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	dithiothreitol
E	minisféra s dvojnásobnou koncentrací oxidu uhličitého
EDTA	ethyldiamintetraoctan
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethanosulfonová kyselina
HLPC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
mRNA	mediátorová RNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Pi	anorganický fosfát
PVC	polyvinylchlorid
R5b	ribosa-5-fosfát
RNA	kyselina ribonukleová
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát