

Stanovení aktivity nitrát reduktázy *in vivo*

Princip stanovení: Aktivitu enzymu nitrát reduktázy (NR) sledujeme na základě rychlosti tvorby produktu katalyzované reakce – nitritu za přítomnosti vysokého nadbytku substrátu a stabilního pH. Toto technicky jednoduché stanovení vychází z předpokladu, že aktivita NR se v pletivech rostlin výrazně nemění i několik desítek minut po oddělení od zbytku rostliny. Protože na počátku měření už v pletivu redukce probíhá, je nutné korigovat rychlost tvorby nitritu na jeho počáteční obsah v pletivu. Proto při analýze používáme dvě sady vzorků.

Cíl práce: Zjistit aktivitu NR v listech a kořenech dvou rostlinných druhů a určit relativní rozdělení asimilace nitrátových iontů mezi kořeny a listy.

Pomůcky: 20 ml lahvičky s víčky, třepačka, vodní lázeň, pH metr,

Materiál: rostliny bobu (*Vicia faba*) a kukuřice (*Zea mays*) pěstované v pevném substrátu. Dva dny před měřením byly rostliny zality 100 ml živného roztoku obsahujícího 6 mM roztok dusičnanových iontů.

Inkubační roztok:

Fosfátový pufr 100 mM, pH 7,5, 5% 1-propanol, 100 mM KNO₃

Příprava pufru z roztoků - K ₂ HPO ₄ – [V-ml]:	200	400	600
- [m-g]:	3.484	6.968	10.452
- KH ₂ PO ₄ – [V-ml]:	100	200	300
- [m-g]:	1.361	2.722	4.083

Přidávejte pomalu roztok KH₂PO₄ k roztoku K₂HPO₄ za stálého míchání až do dosažení požadovaného pH.

Rozpusťte 1.01g KNO₃ ve 100 ml pufru a vznikne 100 mM roztok.

Postup inkubace:

Opláchněte měřené pletivo destilovanou vodou.

Nakrájejte pletivo na malé kousky, dobře promíchejte a připravte z každého orgánu rostliny 4 vzorky (z listů o hmotnosti 0,1g, z kořenů 0,2g) a vzorky dejte do označených inkubačních lahviček. Aktivitu změříte ve dvou rostlinách každého druhu.

Přidejte 5 ml inkubačního roztoku do každé lahvičky a začněte měřit čas inkubace.

Lahvičky dejte na třepačku.

Po 10 minutách dejte první 2 vzorky z každého orgánu do vodní lázně zahřáté na 95°C. Po 15 min. lahvičky vytáhněte, nechte zchladnout. Přeneste cca 1,5 ml inkubačního roztoku do označené mikrozkušavky. Uložte v mrazničce.

Po 90 minutách dejte do vodní lázně zbytek lahviček a opakujte stejný postup jako u první sady vzorků.

Analýza koncentrace nitritu:

Roztoky: 1% sulfanilamide v 3M HCl (=sulfanilic acid-SAC) – 1.05g sulfanilamide rozpusťte ve 100 ml HCl

0.02% NED-HCl ve vodě, 20 mg NED (N-1-Naftyl Etylendiamin Dihydrochlorid) rozpusťte ve 100 ml H₂O

Postup:

Smíchejte 0.5 ml inkubačního roztoku + 0.5 ml NED + 0.5 ml SAC ve 2ml mikrozkušavce, dobře promíchejte.

Inkubujte v temnu 20 min.
Změřte absorbanici roztoku při 540 nm.

Příprava kalibrační řady:

Rozpusťte 172.5 mg NaNO_2 v 500 ml vody, tím získáte 5mM zásobní roztok A. Rozpusťte 5ml roztoku A v 50ml odměrné baňce a získáte 0.5 mM zásobní roztok B.

Zředěním 0.5, 1, 2, 5, 8 and 10 ml roztoku B ve vodě v 50ml odměrkách získáte 5, 10, 20, 50, 80 a 100 uM standardní roztoky.

Postup vyhodnocení:

U párových vzorků (z jednoho orgánu) odečteme množství nitritu (na jednotku inkubované biomasy) zjištěné po 10 minutách od množství zjištěného po 90 minutách. Výsledkem bude množství nitritu vytvořené při vlastní inkubaci (80minut) a to pak podělíme časem inkubace v hodinách a získáme aktivitu NR v příslušném vzorku pletiva (mikromol NO_2^- g(čerstvé hmotnosti) $^{-1}$ h $^{-1}$).

Výsledky prezentujeme ve sloupcovém grafu jako srovnání aktivity v kořenech a listech u obou zkoumaných druhů.