

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 rostlin tabáku za různé dostupnosti nitrátu v médiu a určit, jak se varianty liší v relativním rozdělení aktivity NR mezi kořeny a listy.

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

Materiál: rostliny tabáku (*Nicotiana tobacco*) pěstované ve vodních kulturách obsahující 0,2 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 mikrokumavky. Uložte v mrazničce.

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

Analýzu provedeme u 5 rostlin z každé varianty.

Analýza koncentrace nitritu:

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

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

Postup:

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

Inkubujte v temnu 20 min.

Změřte absorbanci roztoku při 540 nm.

Příprava kalibrační řady:

Rozpusťte 172.5 mg NaNO₂ 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 NO₂⁻ g(čerstvé hmotnosti)⁻¹ h⁻¹).

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