

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.10>

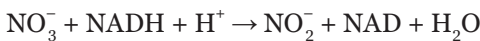
ROZDZIAŁ X. **METABOLIZM AZOTOWY ROŚLIN**
OZNACZANIE AKTYWNOŚCI
REDUKTAZY AZOTANOWEJ

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

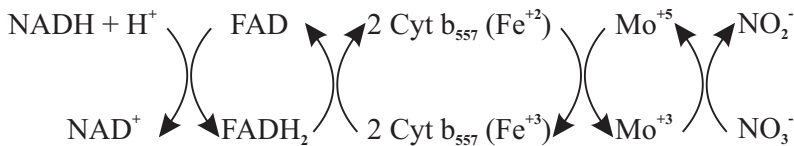
Głównym dostępnym **źródłem azotu dla roślin są azotany**. Jednak przyswajanie azotu w formie jonów azotanowych wymaga ze strony rośliny znacznego nakładu energii. Pierwiastek ten może być wykorzystany do budowy związków organicznych dopiero po **redukcji azotanów do amoniaku**, podczas której do atomu azotu zostaje przyłączone w sumie 8 elektronów.



Redukcja jonów azotanowych do amonowych przebiega dwustopniowo. Pierwszy etap to **redukcja azotanów do azotynów katalizowana przez reduktazę azotanową** (NR, oksydoreduktaza NADH: NO_3^- , EC 1.6.6.1), przebiegająca zgodnie z reakcją:



Reakcja ta zachodzi w cytoplazmie komórek, a dawcą elektronów do redukcji jonów NO_3^- jest NADH. Reduktaza azotanowa jest homotetramerem, który w każdej z 4 podjednostek zawiera FAD, cytochrom b_{557} oraz molibdenopterynę (rysunek 10.1).

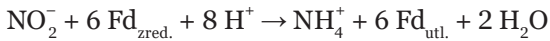


Reduktaza azotanowa jest enzymem indukowanym, tzn. jest syntetyzowana tylko w obecności substratu, czyli azotanów. Aktywność tego enzymu jest proporcjonalna do stężenia azotanów w komórce. Synteza reduktazy azotanowej jest regulowana przez azotan na poziomie ekspresji genu. Ponadto obecność azotanów jest niezbędna do utrzymania odpowiedniego poziomu

Rysunek 10.1.
Przenoszenie elektronów z NADH na NO_3^- przez kofaktory reduktazy azotanowej

białka reduktazy azotanowej, które pozbawione dostępu do substratu ulega degradacji. Synteza białka reduktazy azotanowej oraz aktywność tego enzymu są również kontrolowane przez światło. Czynnikiem warunkującym aktywność reduktazy azotanowej jest także obecność molibdenu.

Drugim etapem jest **redukcja azotynów do jonów amonowych katalizowana przez reduktazę azotynową** (NiR, oksydoreduktaza ferredoksyna: NO_2^- , EC 1.7.7.1), przebiegająca zgodnie z reakcją:



Reakcja ta zachodzi w chloroplastach, a w niefotosyntetyzujących częściach roślin (np. w korzeniach) – w innych plastydach. Dawcą elektronów do redukcji azotynów jest zredukowana ferredoksyna (Fd). W fotosyntetyzujących tkankach roślin redukcja ferredoksyny zachodzi w fazie jasnej fotosyntezy. Natomiast w tkankach niefotosyntetyzujących ferredoksyna jest redukowana przez NADPH_2 – pochodzący ze szlaku pentozofosforanowego. Powstające jony amonowe mogą być następnie wbudowywane w strukturę aminokwasów, co stanowi właściwą asymilację azotu.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka oraz wykazanie zależności między aktywnością tego enzymu w liścieniach a stężeniem azotanów w podłożu hodowlanym.

Doświadczenie I

Materiał

nasiona ogórka, bibuła filtracyjna, lignina, papier milimetrowy

Sprzęt laboratoryjny

plastikowy pojemnik o pojemności około 2 dm^3 do hodowli siewek, cieplarka, skalpel, pęseta, 3 szalki Petriego o średnicy 9 cm,

4 buteleczki 10 cm³ z korkami, sitko plastikowe, pipety (0,1–5 cm³), 20 probówek szklanych, kuwety spektrofotometryczne, spektrofotometr

I.A. HODOWLA ETIOLOWANYCH SIEWEK OGÓRKA

Nasiona ogórka wysiać do plastikowych pojemników na warstwę ligniny zwilżoną wodą destylowaną. Siewki hodować w ciemności, w temperaturze 25°C przez 5 dni.

I.B. HODOWLA LIŚCIENI

Odczynniki

roztwory KNO₃ o stężeniach: 0,01 i 0,1 M, roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³

Przygotować 3 szalki Petriego o średnicy 9 cm. Do każdej włożyć 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać po 5 cm³ odpowiedniego roztworu KNO₃ do hodowli liścieni:

- a) H₂O destylowana (kontrola),
- b) 0,01 M KNO₃,
- c) 0,1 M KNO₃.

Do każdej szalki dodać po 0,1 cm³ roztworu penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³.

Siewki ogórka wyjąć z pojemników do hodowli i ułożyć na bibule. Za pomocą skalpela odcinać liścienie od hypokotyli siewek. W każdej szalce Petriego umieścić 20 liścieni tak, aby były one skierowane wewnętrzną stroną do góry. Hodowlę liścieni prowadzić na świetle, w temperaturze 24–25°C przez 2 dni.

I.C. INKUBACJA LIŚCIENI W ROZTWORZE ZAWIERAJĄCYM AZOTAN

Odczynniki

0,1 M bufor fosforanowy pH 7,5 zawierający 0,02 M KNO₃ i 5% *n*-propanol

Wykonanie doświadczenia

Do 4 buteleczek o pojemności 10 cm³ wlać po 5 cm³ 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,5 zawierającego 0,02 M KNO₃ i 5%

n-propanol. Z każdej szalki Petriego liścienie przenieść pęsetą na sitko, opłukać wodą destylowaną i delikatnie osuszyć na bibule. W 3 buteleczkach umieścić po 5 liścieni z poszczególnych wariantów hodowli. W każdym zestawie jedna buteleczka nie zawiera liścieni i stanowi kontrolę. Buteleczki pozamykać korkami i umieścić w cieplarni o temperaturze 27°C na 0,5 godziny.

I.D. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY AZOTANOWEJ

Zasada metody

Miarą aktywności reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka jest ilość azotynów powstałych w czasie inkubacji liścieni w buforze zawierającym azotan. W metodzie tej oznacza się stężenie jonów NO_2^- w płynie poinkubacyjnym.

Odczynniki

0,02% chlorowoderek N-(1-naftylo)-etylenodiaminy (NEA), 1% sulfanilamid (SA) w 3M HCl, roztwór wzorcowy NaNO_2 o stężeniu 60 nmol cm^{-3}

Wykonanie doświadczenia

Po zakończeniu inkubacji dokładnie wymieszać zawartość buteleczek. Dla każdego wariantu (kontrola + 3 warianty hodowli) przygotować po 2 probówki, do których należy przenieść po 1 cm^3 inkubatu z odpowiednich buteleczek. Następnie do każdej probówki dodać 0,5 cm^3 1% SA i 0,5 cm^3 0,02% NEA. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i umieścić je w ciemności na 10 minut. Po dodaniu 2 cm^3 wody destylowanej i wymieszaniu oznaczyć absorbancję roztworów w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 540 nm wobec kontroli.

Opracowanie wyników

Korzystając z krzywej wzorcowej (por. pkt I.E), odczytać zawartość jonów NO_2^- w badanych próbach i dla każdego wariantu hodowli obliczyć aktywność reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka. Wyniki wpisać do tabeli 10.1.

Wariant hodowli liścieni	Objętość inkubatu [cm ³]	A ₅₄₀ po 0,5 godz. inkubacji	Zawartość NO ₂ ⁻ [nmol]	Aktywność reduktazy azotanowej [nmol liścieni ⁻¹ godz. ⁻¹]
H ₂ O				
0,01 M KNO ₃				
0,1 M KNO ₃				

I.E. WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ DLA NO₂⁻

Korzystając z roztworu wzorcowego KNO₃ o stężeniu 60 nmol cm⁻³ i wody destylowanej, przygotować po 1 cm³ roztworów NO₂⁻ o stężeniach od 6 do 60 nmol cm⁻³, stosując gradację co 6 nmol cm⁻³. Do probówek wprowadzić odpowiednią objętość roztworu wzorcowego (wg tabeli 10.2) i uzupełnić wodą destylowaną do 1 cm³. Do pierwszej probówki dodać 1 cm³ wody destylowanej (próbna odczynnikowa).

Następnie do 1 cm³ wymieszanych dokładnie roztworów dodać po 0,5 cm³ 1% SA i 0,5 cm³ 0,02% NEA. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i umieścić je w ciemności na 10 minut. Następnie do probówek dodać po 2 cm³ wody destylowanej i po wymieszaniu oznaczyć absorbancję roztworów w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 540 nm wobec próby odczynnikowej. Wyniki wpisać do tabeli 10.2, a na papierze milimetrycznym wykreślić krzywą wzorcową dla NO₂⁻, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości stężenia NO₂⁻ w nmol cm⁻³, a na osi rzędnych (y) wartości absorbancji A₅₄₀.

Tabela 10.1. Aktywność reduktazy azotanowej w izolowanych liścieniach ogórka

Tabela 10.2. Zależność między stężeniem NO₂⁻ a absorbancją A₅₄₀

Stężenie NO ₂ ⁻ [nmol cm ⁻³]	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
Objętość roztworu wzorcowego [cm ³]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Objętość wody destylowanej [cm ³]	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
A ₅₄₀											

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.