

ANTONI PIOTR CIEPIELA, CEZARY SEMPRUCH

REDUKTAZA AZOTYNOWA SIEWEK PSZENŻYTA OZIMEGO

*Z Katedry Biologii Molekularnej i Biofizyki
Akademii Podlaskiej w Siedlcach*

ABSTRACT. Nitrite reductase (NiR) was extracted from seedlings of winter triticale cultivar Moreno in the form of homogenous protein fraction with molecular weight of about 61 kDa, characterised by maximum of absorption at 280 and 390 nm. Differences in specific activity of enzyme isolated from plants cultivated in different conditions (garden soil, Hoagland's diet) suggest that NiR may be induced by light and nitrate ions presence in arable medium.

Key words: nitrite reductase, winter triticale seedlings

Wstęp

Reduktaza azotynowa (E.C. 1.7.7.1; NiR) jest jednym z dwóch komponentów enzymatycznych fotosyntetycznego systemu redukcji azotanu. **Vega i in.** (1980) podają, że jest to enzym chloroplastowy zależny od ferredoksyny, który katalizuje 6-elektronową redukcję azotynu do amoniaku. W ostatnich latach opublikowano kilka prac na temat przebiegu asymilacyjnej redukcji azotanu do jonu amonowego. Dokonano m.in. oczyszczenia i charakterystyki NiR otrzymanej z liści szpinaku (**Vega i in.** 1980), ryżu (**Ida i in.** 1989) i jęczmienia (**Sin-Ming i in.** 1990). Jednak w pszenżycie ozimym enzym ten nie był dotychczas badany.

Celem podjętych badań było oznaczenie aktywności oraz określenie niektórych właściwości fizykochemicznych reduktazy azotynowej wyizolowanej z siewek pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno'.

Material i metody

Hodowlę roślin prowadzono w warunkach laboratoryjnych w temperaturze $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ i wilgotności względnej około 70%. Podłoże stanowiły gleba ogrodnicza (hodowla wazonowa) lub pożywka Hoaglanda.

NiR ekstrahowano z liści i korzeni świeżo zebranych siedmiodniowych siewek za pomocą 0,2 M buforu TRIS-HCl o pH 7,5 zawierającego 10% glicerolu, 1 mM EDTA i 10 mM 2-merkaptoetanolu. Jednostkę aktywności enzymu wyliczono na podstawie spadku zawartości azotynu w obecności ditionianu sodu i gramoksonu (MV) w $\mu\text{M NO}_2/\text{mg}$ białka/godz. (Vega i in. 1980). Oznaczenie ilościowe białka w badanych ekstraktach przeprowadzono metodą Layne'a (1957).

Ekstrakty enzymatyczne oczyszczano metodą podaną przez Vega i in. (1980), stosując kolejno: frakcjonowanie acetonem, dwukrotną chromatografię na DEAE-celulozie, frakcjonowanie siarczanem amonowym, chromatografię na DEAE-Sephadex A-50 oraz chromatografię z użyciem Sephadexu G-200.

Uzyskane preparaty enzymatyczne poddawano analizom spektrofotometrycznym z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis typu HP 8453 oraz rozdziałom elektroforetycznym w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Wyniki rozdzielów elektroforetycznych odczytywano po wybarwieniu żeli błękitem brylantynowym kumazyny (Coomassie Brilliant Blue R-250).

Masę cząsteczkową reduktazy azotynowej izolowanej z siewek pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno' wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej zgodnie z metodą opisaną przez Webera i Osborna (1969).

Wyniki i dyskusja

W tabeli 1 zamieszczono przebieg oczyszczania NiR otrzymanej z pędów siewek pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno'. Przedstawiona procedura pozwoliła na uzyskanie 0,01 g białka enzymatycznego, którego aktywność właściwa wynosiła $72,124 \mu\text{M NO}_2/\text{mg}$ białka/godz., przy całkowitej wydajności procesu wynoszącej 15,7%. Uzyskane rezultaty potwierdzają dane przedstawione przez Vega i in. (1980), którzy podają, że postępując zgodnie z opisaną metodą, otrzymano zbliżone ilości oczyszczonych preparatów reduktazy azotynowej ze skrzętnicy, dyni i szpinaku.

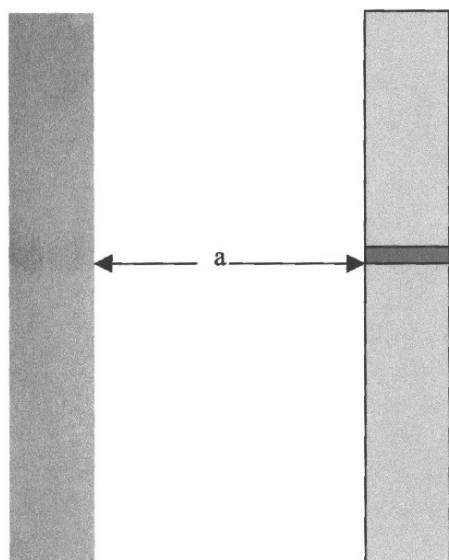
Wysoce oczyszczona NiR siewek pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno' przyjmuje postać jednorodnej frakcji białkowej o masie cząsteczkowej ok. 61 kDa (ryc. 1). Otrzymane wyniki są zgodne z danymi Vega i in. (1980), którzy podają, że enzym ten ma postać monomeru zbudowanego z 575 reszt aminokwasowych w przypadku jęczmienia (Sin-Ming i in. 1990) lub z 536 aminokwasów, jeśli pochodzi z ryżu (Ida i in. 1989). Natomiast NiR występująca w szpinaku i fasoli składa się z dwóch podjednostek o różnej masie cząsteczkowej (Sin-Ming i in. 1990). W opinii cytowanych autorów masa całej cząsteczki reduktazy azotynowej w zależności od pochodzenia waha się od 60 do 63 kDa.

Tabela 1
Oczyszczanie reduktazy azotynowej z pędów siewek pszenżyta ozimego odmiany ‘Moreno’
Purification of nitrite reductase from shoots of seedlings of winter triticale cultivar ‘Moreno’

Etap oczyszczania Purification step	Objętość Volume (cm ³)	Zawartość białka Protein content (g)	Aktywność całkowita ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{godz.}$) Total activity ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{hour}$)	Aktywność właściwa ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{godz.}/$ mg białka) Specific activity ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{hour}/$ mg of protein)	Wydaj- ność Yield (%)
Surowy ekstrakt Crude extract	3 000,0	17 625,00	5,87	0,031	100,0
35-75% aceton 35-75% acetone	245,9	13,94	4,44	0,297	75,6
40-70% (NH ₄) ₂ SO ₄	45,0	5,18	3,04	0,587	51,7
Chromatografia na DEAE-celulozie DEAE-cellulose chro- matography	62,6	0,52	2,54	4,835	43,2
Chromatografia na DEAE-Sephadex A-50 DEAE-Sephadex A-50 chromatography	122,7	0,09	1,87	19,211	31,8
55-67% (NH ₄) ₂ SO ₄	5,1	0,02	1,50	61,928	25,6
Chromatografia na Sephadex G-200 Sephadex G-200 chro- matography	2,7	0,01	0,92	72,124	15,7

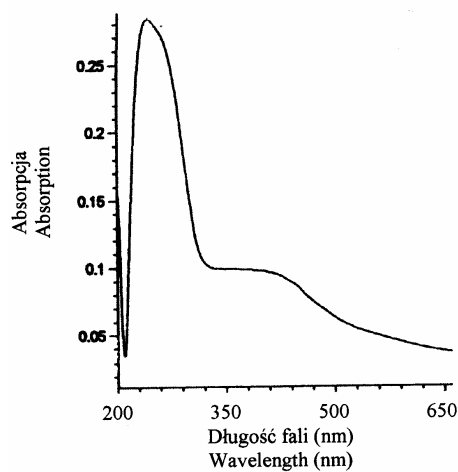
Analiza spektrofotometryczna wysoce oczyszczonych chromatograficznie preparatów enzymatycznych wykazała maksima absorpcji przy 280 i 390 nm (ryc. 2). Zbliżone rezultaty uzyskano wcześniej dla NiR liści jęczmienia (**Sin-Ming i in.** 1990), ryżu (**Ida i in.** 1989) oraz szpinaku (**Vega i in.** 1980). Taki przebieg widma absorpcyjnego jest związany z obecnością w cząsteczce tego enzymu grupy prostetycznej zbudowanej z „sirohemu” i czteroczłonowego centrum aktywnego zawierającego 4 atomy żelaza i 4 atomy siarki (4Fe-4S) (**Guerrero i in.** 1981).

Aktywność właściwa NiR zależała w dużym stopniu od warunków, w jakich hodowano badane rośliny. W siewkach uprawianych w wazonach aktywny enzym stwierdzono w liściach, podczas gdy w roślinach rosnących w pożywce Hoaglanda (znajdującej się w szklanych zlewkach) – w korzeniach (tab. 2). W opinii **Dembińskiego** (1994) reduktaza azotynowa jest zlokalizowana w chloroplastach, gdzie odznacza się największą stabilnością. Jednak **Kretowicz** (1977) podaje, że w pomidorach NiR jest obecna zarówno w liściach, jak i w korzeniach. Uważa się ponadto, że aktywatorami reduktazy



Ryc. 1. Elektroferogram i schemat rozdzielenia reduktazy azotynowej pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno': a – frakcja o ciężarze cząsteczkowym ok. 61 kDa

Fig. 1. Electropherogram and scheme of separation of nitrite reductase from winter triticale seedlings of cultivar 'Moreno': a – fraction with molecular weight about 61 kDa



Ryc. 2. Widmo absorpcyjne reduktazy azotynowej siewek pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno'

Fig. 2. Absorption spectrum of nitrite reductase from winter triticale seedlings of cultivar 'Moreno'

Tabela 2

Aktywność reduktazy azotynowej w siewkach pszenżyta ozimego odmiany 'Moreno'
 ($\mu\text{M NO}_2/\text{mg białka/godz.}$)
Nitrite reductase activity in seedlings of winter triticale cultivar 'Moreno'
 ($\mu\text{M NO}_2/\text{mg of protein/hour}$)

Organy Organs	Warunki hodowli Conditions of cultivation	
	ziemia ogrodnicza gardening soil	pożywka Hoaglanda Hoagland's diet
Korzenie Roots	0,000	0,025
Liście Leaves	0,085	0,000

azotynowej są azotany i azotyny (Aslam i Huffaker 1990, Privalle i in. 1989, Santos i Salem 1992), a inhibitorami – sole sodu i potasu (Guererro i in. 1981, Fry i in. 1982, Rao i Gnanam 1990, Tewari i Singh 1991). Pojawienie się aktywnej reduktazy azotynowej w korzeniach badanych roślin hodowanych w pożywce Hoaglanda może dowodzić, że decydującą rolę w indukcji jej aktywności odgrywa światło oraz jony azotanowe obecne w medium hodowlanym.

Literatura

- Aslam M., Huffaker R.C. (1990): Role of nitrate and nitrite in the induction of nitrate reductase in leaves of barley seedlings. *Plant Physiol.* 91: 1152-1156.
- Dembiński E. (1994): Asymilacja i metabolizm azotu w roślinach. *Post. Nauk. Roln.* 1: 103-113.
- Fry J.V., Cammac R., Hucklesby D.P., Hewitt E.J. (1982): Kinetics of leaf nitrite reductase with methyl viologen and ferredoxin under controlled redox conditions. *Biochemistry* 205: 235-238.
- Guerrero M.G., Vega J.M., Losada M. (1981): The assimilatory nitrate – reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 169-204.
- Ida S., Iwagami K., Minobe S. (1989): Purification and characterization of molecular and immunological properties of rice ferredoxin – nitrite reductase. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2777-2784.
- Kretowicz W. (1977): Redukcja azotanów w roślinach. W: *Przemiany azotu w roślinach*. PWRiL, Warszawa: 89-107.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Layne E. (1957): Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* 3: 448-450.
- Privalle R.S., Lahnert K.N., Mullins M.A., Rothstein S. (1989): Nitrate effects on nitrate reductase activity and nitrite reductase mRNA levels in maize suspension cultures. *Plant Physiol.* 90: 962-967.
- Rao K.R., Gnanam A. (1990): Inhibition of nitrate and nitrite reductase activities by salinity stress in sorgho. *Phytochemistry* 29: 1047-1049.
- Santos I., Salem R. (1992): Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthetase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. *Plant Sci.* 84: 145-152.
- Sin-Ming J.P., Kerr J., Inglede W.J., Wray J.L. (1990): Purification and characterisation of barley leaf nitrite reductase. *Plant Sci.* 66: 155-165.
- Tewari T.N., Singh B.B. (1991): Stress studies in lentil (*Lens esculenta* Moench). *Plant Soil* 136: 225-230.
- Vega J.M., Cardenas J., Losada M. (1980): Ferredoxin – nitrite reductase. *Meth. Enzymol.* 69: 255-271.
- Weber K., Osborn M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

NITRITE REDUCTASE OF WINTER TRITICALE SEEDLINGS

S u m m a r y

The aim of the present study was determination of activity and some physical and chemical properties of nitrite reductase (NiR) obtained from winter triticale seedlings.

Results of studies conducted in laboratory conditions (temp. $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, relative humidity about 70%), showed that analysed enzyme stated homogenous protein fraction with molecular weight of about 61 kDa, characterised by maximums of absorption at 280 and 390 nm.

Activity of NiR was dependent on cultivation conditions of studied plants. In seedlings cultivated in garden soil active enzyme was present only in leaves while in plants grown on Hoagland's diet it occurred in roots. These observations suggest that nitrite reductase obtained from winter triticale seedlings is induced first of all by light and nitrate ions present in growth medium.