

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vesna OPREŠNIK

**CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V
KALČKIH IN LISTIH REDKVE, BROKOLIJA IN BELEGA ZELJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN
THE SPROUTS AND LEAVES OF COMMON RADISH,
BROCCOLI AND WHITE CABBAGE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Oprešnik V. Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti v kalčkih in listih redkve, brokolija in belega zelja.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Blaž Cigić, za somentorico asist. dr. Mihaela Skrt, za recenzenta pa doc. dr. Tomaž Požrl.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentorica: asist. dr. Mihaela Skrt

Recenzent: doc. dr. Tomaž Požrl

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Član:

Članica:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna Oprešnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.151.6:581.1:582.683.2:635.1/.3(043)=163.6
KG encimi/fiziologija rastlin/redkev/brokoli/belo zelje/rastlinski ekstrakti/proteolitični encimi/aminopeptidaze/aminopeptidazna aktivnost/cimografija/nativna elektroforeza /fluorogeni substrati
AV OPREŠNIK, Vesna
SA CIGIĆ, Blaž (mentor)/ SKRT, Mihaela (somentorica)/ POŽRL, Tomaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN CIMOGRAFSKA ANALIZA AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI V KALČKIH IN LISTIH REDKVE, BROKOLIJA IN BELEGA ZELJA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XV, 65 str., 9 pregl., 18 sl., 8 pril., 83 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Aminopeptidaze so encimi, ki sodelujejo v razgradnji proteinov in jih uvrščamo v skupino proteolitičnih encimov. Katalizirajo cepitev peptidnih vezi z N-terminalnega konca proteinov. S cimografijo smo analizirali aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih različnih delov rastlin redkve, brokolija in belega zelja. Aminopeptidazno in peptidazno aktivnost smo določali s posameznimi substrati (Phe-AMC, Ala-AMC, Lys-AMC in N- α - benzoyl-Arg-AMC) in z mešanico letih. Ugotovili smo, da imajo korenine najmanjšo aminopeptidazno aktivnost, največjo pa klični listi in endosperm. Delež suhe snovi je bil najmanjši v koreninah odraslih rastlin, največji pa v kličnih listih in endospermu rastlin. Z inhibitorjem serinskih proteaz, fenilmethylsulfonil-fluoridom, smo v ekstraktih redkve, brokolija in belega zelja identificirali serinske proteaze. Cisteinskih proteaz z uporabo inhibitorja jodoacetamida ali z dodanim reducentom nismo identificirali. Prav tako nam ni uspelo dokazati aktivnosti metaloproteaz. Ugotovili smo, da se po povzročenem mehanskem stresu na listih odraslih rastlin, aminopeptidazna aktivnost zmanjša.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.151.6:581.1:582.683.2:635.1/.3(043)=163.6

CX enzymes/plant physiology/radish/broccoli/white cabbage/plant extracts/proteolytic enzymes/aminopeptidases/aminopeptidase activity/zymography/native electrophoresis/fluorogenic substrates

AU OPREŠNIK, Vesna

AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ SKRT, Mihaela (co-advisor)/ POŽRL, Tomaž (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2011

TI ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINOPEPTIDASE ACTIVITY IN THE SPROUTS AND LEAVES OF COMMON RADISH, BROCCOLI AND WHITE CABBAGE

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XV, 65 p., 9 tab., 18 fig., 8 ann., 83 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Aminopeptidases are enzymes involved in degradation of proteins. They belong to a group of proteolytic enzymes, who catalyse the cleavage of peptide bonds on N-terminus side of proteins. Aminopeptidase activity was analysed by zymography of extracts of different parts of the radish plant, broccoli and white cabbage. Aminopeptidase and peptidase activity were determined with individual substrates (Phe-AMC, Ala-AMC, Lys-AMC and N- α -benzoyl-Arg-AMC) and in the mixture of these substrates. We found minimal amino peptidase activity in the roots and maximal activity in the cotyledons and endosperm. The lowest amount of dry matter was found in roots and highest amount in cotyledons and endosperm. With the use of serine proteinase inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride, serine proteinases were identified in the extracts of radish, broccoli and white cabbage. Cysteine proteinases were not identified by application of the inhibitor iodoacetamide or under reducing conditions. Metalloprotease activity was not detected as well. After the mechanical stress, the aminopeptidase activity in wounded leaves was reduced.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRIŽNICE	3
2.1.1 Botanična razdelitev	4
2.2 ZELJE	4
2.2.1 Morfologija zelja	4
2.2.2 Zgodovina in pridelovanje zelja v Sloveniji in svetu	4
2.3 BROKOLI	5
2.3.1 Morfologija brokolija	5
2.3.2 Zgodovina brokolija	5
2.4 REDKEV	6
2.4.1 Morfologija in zgodovina redkve	6
2.5 PREHRANSKE VREDNOST SVEŽEGA BELEGA ZELJA, BROKOLIJA IN POLETNE REDKVE	6
2.6 SEME IN SETEV	7
2.7 DOGAJANJE MED KALJENJEM	8
2.7.1 Kalitev	9
2.7.1.1 Toplota	9
2.7.1.2 Vлага	10
2.7.1.3 Tla	10
2.7.1.4 Kolobar	10
2.8 RASTLINSKE PROTEAZE	10
2.8.1 Struktturna razdelitev proteaz	11
2.8.2 Rastlinske aminopeptidaze	12

2.8.2.1 Razdelitev aminopeptidaz	12
2.8.2.2 Aminopeptidaze v posameznih rastlinah.....	13
2.8.2.3 Katalitski tipi proteolitičnih encimov	13
2.8.2.3.1 Serinske proteaze	13
2.8.2.3.2 Cisteinske proteaze	14
2.8.2.3.3 Metaloproteaze.....	14
2.8.3 Inhibitorji proteaz.....	15
2.9 CIMOGRAFIJA	16
2.9.1 Cimografija s proteinskimi substrati.....	17
2.9.2 Cimografija s sintetičnimi substrati	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI.....	20
3.1.1 Izbor rastlinskega materiala	20
3.1.2 Spojine	21
3.1.3 Raztopine	22
3.1.3.1 Priprava pufrov.....	22
3.1.3.1.1 Pufri za ekstrakcijo proteinov	22
3.1.3.1.2 Pufri za testiranje encimske aktivnosti s cimografijo	22
3.1.3.1.3 Pufra za pripravo gelov	23
3.1.3.1.4 Pufra za elektroforezo	23
3.1.3.1.5 Nanašalna pufra za elektroforezo.....	23
3.1.3.2 Fluorogeni substrati.....	24
3.1.3.2.1 Priprava fluorogenih substratov in raztopin za analizo aminopeptidazne aktivnosti s cimografijo	24
3.1.4 Aparature.....	25
3.1.4.1 Elektroforezni sistem.....	25
3.1.4.2 Kamera za slikanje in dokumentiranje gelov	25
3.1.4.3 Spektrofotometer	25
3.1.4.4 Druge aparature in ostali laboratorijski pribor	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Izvedba procesa kaljenja	26
3.2.2 Vzorčenje	27
3.2.3 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov.....	27

3.2.4 Cimografija	27
3.2.4.1 Priprava gelov za nativno elektroforezo	28
3.2.4.2 Nativna elektroforeza	29
3.2.4.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov	29
3.2.4.3.1 Analiza aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi fluorogenimi substrati v prisotnosti reducenta DTT	30
3.2.4.3.2 Analiza metaloproteaz z inhibitorjem EDTA in v prisotnosti Ca^{2+} in Zn^{2+} ionov	30
3.2.4.3.3 Analiza serinskih proteaz z inhibitorjem PMSF	30
3.2.4.3.4 Analiza cisteinskih proteaz z aktivatorjem DTT in inhibitorjem IA	31
3.2.4.4 NaDS elektroforeza	32
3.2.4.4.1 Priprava gelov za NaDS-elektroforezo	32
3.2.5 Določanje vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih po Bradfordovi metodi	32
3.2.6 Stabilnost shranjenih ekstraktov	33
3.2.7 Določanje vsebnosti vode	33
3.2.8 Izpostavitev listov rastlin mehanskemu stresu	34
4 REZULTATI	35
4.1 DELEŽ SUHE SNOVI TER VSEBNOST PROTEINOV IN AMINOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZ KALČKOV IN LISTOV BROKOLIJA, REDKVE IN BELEGA ZELJA	35
4.1.1 Vsebnost suhe snovi in topnih proteinov v delih kalčka in odrasle rastline.....	36
4.1.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z izbranimi substrati v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	37
4.1.2.1 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti s Phe-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	38
4.1.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Lys-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	39
4.1.2.3 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Ala-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	40
4.1.2.4 Cimografska analiza peptidazne aktivnosti z N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	42
4.1.3 Cimografska analiza aminopeptidazne z mešanico substratov v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov	43
4.2 CIMOGRAFSKA ANALIZA KATALITIČNEGA TIPO AMINOPEPTIDAZ.....	44
4.2.1 Vpliv jodoacetamida in reducenta DTT na aminopeptidazno aktivnost.....	44

4.2.2 Vpliv inhibitorja PMSF na aminopeptidazno aktivnost.....	45
4.2.3 Vpliv EDTA in kovinskih ionov na aminopeptidazno aktivnost.....	47
4.3 VPLIV MEHANSKEGA STRESA NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST V LISTIH	49
4.4 VPLIV NATRIJEVEGA DODECILSULFATA NA DOLOČANJE AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI S CIMOGRAFIJO.....	50
4.5 VPLIV SHRANJEVANJA EKSTRAKTOV NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST DOLOČENO S CIMOGRAFIJO.....	51
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1 RAZPRAVA	52
5.2 SKLEPI	55
6 POVZETEK.....	57
7 VIRI.....	59
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Energija v kcal v 100 g očiščenega belega zelja, brokolija in redkve (Černe in Vrhovnik, 1992)	6
Preglednica 2: Hranilna vrednost belega zelja, brokolija in redkve v g/100g (Černe in Vrhovnik, 1992)	7
Preglednica 3: Količina aminokislin v belemu zelju, brokoliju in redkvi v mg/100g (Černe in Vrhovnik, 1992)	7
Preglednica 4: Uporabljene rastline.....	20
Preglednica 5: Uporabljene spojine in njihovi proizvajalci.....	21
Preglednica 6: Fluorogeni substrati (proizvajalca Biosynth) za cimografijo in njihove molske mase v g/mol	24
Preglednica 7: Spojine za pripravo gelov za nativno elektroforezo	28
Preglednica 8: Spojine za pripravo gelov za NaDS-elektroforezo	32
Preglednica 9: Vsebnost suhe snovi, deleža topnih proteinov v suhi snovi in koncentracije proteinov v ekstraktu za posamezne dele kalčka in odrasle rastline	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Kalitev dvokaličnic (Encyclopaedia Britanica..., 2011).....	9
Slika 2: Struktorna formula proteina (Boyer, 2005).....	10
Slika 3: Kamera CAM-GX-CHEMI HR sistem, proizvajalec Syngene (Syngene, 2011) ..	25
Slika 4: Različne faze kaljenja (Fink, 1993)	26
Slika 5: Aparatura za elektroforezo MiniProtean II.	29
Slika 6: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). ..	38
Slika 7: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14).	39
Slika 8: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktih brokolija (2 ,3, 4 in 5), redkev (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14)..	40
Slika 9: Proteazna aktivnost na substrat N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14).	42
Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost na mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC Ala-AMC in proteazna aktivnost na N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih brokolija (1, 2, 3, 4), redkve (6, 7, 8, 9) ter belega zelja (11, 12, 13, 14).....	43
Slika 11: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1 ,4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Encimska aktivnost v vzorcih 1-3 je bila določena v prisotnosti 5 mM DTT. Vzorcem 4-6 je bil pred nanosom na elektroforezni gel dodan jodoacetamid. Encimska aktivnost v vzorcih 4-6 je bila določena brez dodanega DTT.	44

Slika 12: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Vzorcem 1-3 je bil dodan pred nanosom DMSO (kontrola), vzorcem 4-6 smo pred nanosom na elektroforezni gel dodali v DMSO raztopljen PMSF. Encimska aktivnost vseh vzorcev je bila določena brez dodanega PMSF v reakcijski pufer. 45

Slika 13: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Vzorcem 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DMSO (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali v DMSO raztopljen PMSF. 46

Slika 14: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in kompleksant kovinskih ionov EDTA. 47

Slika 15: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in ZnCl₂. 48

Slika 16: Encimska aktivnost v ekstraktih listov rastlin izpostavljenih mehanskemu stresu (2, 5) in kontrola (3, 6) za redkve (2, 3) in belo zelja (5, 6) določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in Met-AMC. 49

Slika 17: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov belega zelja (1, 2), brokolija (3, 4) ter redkve (5, 6). Vzorce smo pred nanosom na elektroforezni gel redčili z nanšalnim pufrom, ki je vseboval NaDS (1, 3, 5) in s pufrom, ki ni vseboval NaDS-a (2, 4, 6). Elektroforeza je potekala pri denaturirajočih pogojih v prisotnosti NaDS. Protenine smo po končani elektroforezi in pred analizo encimske aktivnosti renaturirali s tritonom X-100. .. 50

Slika 18: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov belega zelja (2-5), brokolija (6-9) ter redkve (10-13). Ekstrakte kalčkov smo pred analizo encimske aktivnosti hranili 14 dni na -80 °C (2, 6, 10), 10 dni na -20 °C (3, 7, 11), 24 ur na +4 °C (4, 8, 12) in 24 ur na +20 °C (5, 9, 13). 51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje skupnih proteinov po Bradfordu

Priloga B: Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 595 nm pri določitvi vsebnosti proteinov v ekstraktih posameznih delov rastlin

Priloga C: Primer izračuna masne koncentracije (γ) topnih proteinov (mg/ml)

Priloga D: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Gly-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3)

Priloga E: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Met-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3)

Priloga F: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Trp-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3).

Priloga G: Gel po 30 minutnem spiranju z destilirano vodo po končani analizi aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih z mešanico fluorogenih substratov.

Priloga H: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkvice (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in CaCl₂.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₅₉₅	absorbanca pri valovni dolžini 595 nm
Ala-AMC	L-alanin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-alanine-7-amido-4-methylcoumarin)
AMC	7-amino-4-metilkumarin (ang. 7-amino-4-methylcoumarin)
APS	amonijev persulfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
Glu-AMC	L-glutaminska kislina alfa-7-amido-4-metilkumarin (ang. L- glutamic acid alpha- 7-amido-4-methylcoumarin)
Gly-AMC	glicin 7-amido-4-metilkumarin (ang. glycine 7-amido-4-methylcoumarin)
HCl	klorovodikova kislina
IA	jodoacetamid
Lys-AMC	L-lizin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-lysine-7-amido-4-methylcoumarin)
m	masa proteinov
Met-AMC	L-metionin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-methionine-7-amido-4-methylcoumarin)
N-α- benzoyl-Arg-AMC	N-alfa-CBZ-L-Arginin 7-amido-4-metilkumarin (ang. N-alpha-CBZ-L-Arginine 7-amido-4-methylcoumarin)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza

Phe-AMC	L-fenilalanin-7-amido-4-metilkumarin (ang. L-phenylalanine -7-amido-4-methylcoumarin)
PMSF	fenilmetsulfonil-fluoride (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
PVP	polivinilpirolidon
s.m.	masa svežih rastlin
s.s.	masa suhe snovi
SS	suha snov
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametil-etilenediamin
Tris	Tris-hidroksimetil-aminometan
Trp-AMC	L-triptofan-7- amido-4-metilkumarin (ang. L-tryptophan 7-amido-4-methylcoumarin)
VV	vsebnost vode
γ	masna koncentracija (mg/ml)

1 UVOD

Aminopeptidaze so encimi, ki jih uvrščamo v posebno skupino eksopeptidaz, ker odcepljajo aminokisline od proteinskega in peptidnega substrata z N-terminalnega konca. So široko razširjene v rastlinskem in živalskem svetu in jih lahko najdemo v mnogih subcelularnih organelih, citoplazmi in kot komponente membrane. Za nekatere od njih so ugotovili zelo pomembne celične funkcije. Danes so predmet številnih raziskav, saj je proteoliza vpletena v fiziologijo in razvoj rastlin (Taylor, 1993).

Cimografija, ki je bila uvedena pred več kot 20 leti, je dvostopenjska tehnika, ki vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo in analizo encimskih aktivnosti v gelu (Heussen in Dowdle, 1980).

Različne aminopeptidaze so bile izolirane iz različnih rastlin. V literaturi smo zasledili objave o aminopeptidazah v nekaterih rastlinah, kot so krompirjev gomolj (Vujčić in sod., 2010), seme tritikale (Szawłowska in sod., 2011), paradižnikovih listih (Narváez-Vásquez in sod., 2008), kličnih listov arašidov (Isola in Franzoni, 1996), pšenice (Müllertz, 1974). Prav tako pa so objavljene raziskave rastlinskih aminopeptidaz glede na afiniteto do posameznih substratov, katalitičnih lastnosti encimov ter inhibitorjih in aktivatorjih aminopeptidaz.

Na encimsko aktivnost in stabilnost aminopeptidaz vpliva tudi temperatura. Tako se npr. pri nizkih temperaturah inducira ekspresija Met-aminopeptidaze iz ječmena, le-ta pa naj bi imela ključno vlogo tudi pri povečani toleranci na nizke temperature (Jeong in sod., 2011). Po drugi strani pa se encimska aktivnost nekaterih Phe-aminopeptidaz bistveno zmanjša v ekstraktih, ki so bili shranjeni določen čas na -70 °C oz. na -20 °C (Gotar, 2009).

Mehanski stres in tudi druge oblike stresa različno vplivajo na aminopeptidazno aktivnost, saj pride do razgradnje proteinov, ki vodi do predčasnega staranja rastlinskih tkiv in do proteolize, kar ima za rastlino tudi negativne posledice. Po drugi strani pa ta proces rastlinam omogoča regeneracijo in s tem spreminjanje vsebnosti proteinov, ki bi lahko nastali iz novonastalih aminokislin, ki jih zahtevajo spremembe celične presnove. Regulacija razgradnje proteinov je zato eden od temeljnih mehanizmov v odzivu rastlin na stres (Vrhovnik, 2007).

1.1 NAMEN DELA

- preliminarna karakterizacija aminopeptidaz v križnicah in travah;
- cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti s fluorogenimi substrati v poganjku in korenini kalčka skupaj, kličnem listu in endospermu skupaj, korenini in listu odraslih rastlin redkve, brokolija in belega zelja;
- karakterizacija aminopeptidaz glede na katalitični tip;
- ugotavljanje vpliva mehanskega stresa in shranjevanja na aminopeptidazno aktivnost.

1.2 HIPOTEZE

- Predviedevamo, da bomo s cimografijo detektirali večje število aminopeptidaz, ki se izražajo v kalčkih izbranih križnic in trav.
- Pričakujemo, da bodo v različnih delih iste rastline detektirali različne aminopeptidaze.
- Menimo, da bodo inhibitorji vplivali na aminopeptidazno aktivnost.
- Pričakujemo, da bo mehanski stres vplival na aminopeptidazno aktivnost v listih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRIŽNICE

Križnice izvirajo iz Sredozemlja. V razvoju so se, po predvidevanju, iz ene same divje rastline razvile v veliko in zelo pestro skupino rastlin. Da njihovo pridelovanje sodi zelo daleč v zgodovino, dokazuje tudi to, v kako široko, razvejano in pestro skupino rastlin so se razvile križnice.

Mednje sodijo:

- redkvice, redkev, repa, koleraba, pri katerih so užitni deli rastline spremenjene korenine;
- nadzemna kolerabica je povsem posebna oblika, pri kateri se je v užitni del spremenilo steblo;
- zelje, brocoli, ohrov in kitajski kapus oblikujejo čvrste glave iz sklenjenih listov glavnega brsta;
- brstični ohrov nam v hrano ponuja stranske brste.

Velika pestrost tega rodu tudi dokazuje, da so križnice gojili in uživali po vsem svetu, da so ljudem pomemben vir prehrane, zato so se razvile v tako pisano skupino rastlin (Pušenjak, 2007).

Od nekdaj so bile križnice izredno pomembne v prehrani, ker so bile v zimskih mesecih skoraj edine dostopne vrtnine. Že zgodaj so odkrili njihov pomen za zdravljenje različnih bolezni, pa tudi za preprečevanje skorbuta. S širjenjem pridelovanja križnic, se je povečala tudi njihova izbira, kar je vplivalo na večjo pestrost v prehrani (Černe, 1998a).

Za celotno skupino je značilna velika prehranska vrednost, saj vsebujejo vse pomembne vitamine in minerale. Ponavadi imajo nizko energetsko vrednost, torej so pomembne v dietični prehrani vseh, ki imajo v sodobnih časih težave s telesno težo (Pušenjak, 2007).

Križnice so pretežno rastline hladnega dne, zato jih gojimo v hladnejših letnih časih, spomladi, jeseni, nekatere tudi pozimi (Pušenjak, 2007). Vse križnice se dobro razvijajo v vlažnem podnebju (Černe, 1998a).

Vse križnice sadimo na dobro pognojeno zemljo. Potrebujejo namreč s hranili in organsko snovjo bogato založena tla. Zelo občutljive so tudi na pH vrednosti v tleh. V kislih tleh (pH nižji od 6) slabo sprejemajo hranila, razvijejo se tudi glivične bolezni. Težave imajo v bazičnih tleh (pH nad 7), saj potrebujejo veliko mikro in makrohranil, ki pa jih v bazičnih tleh korenine zelo težko sprejemajo. Zato se pogosto, kljub dobrim analizam tal, pojavijo znaki pomanjkanja hranil. Zanje je pomemben celoten spekter hranil, potrebujejo pa veliko kalija, bora, cinka in molibdena. Taki pripravki pomagajo rastlinam pri vzpostavitvi lastne odpornosti in pri učinkovitosti izrabi hranil iz tal in dodatnih hranil (Pušenjak, 2007).

2.1.1 Botanična razdelitev

oddelek *Spermatophytina* (*Angiospermae*) - kritosemenke

razred *Magnoliatae* (*Dicotyledoneae*) - dvokaličnice

podrazred *Dilleniineae* - dilenite

red *Capparales* (*Rhoeadales*) - kaparales

družina *Brassicaceae* (*Cruciferae*) - križnice

(Černe, 1998a)

2.2 ZELJE

2.2.1 Morfologija zelja

Zelje (*Brassica oleracea var. capitata* L.) je vrtnina, ki je najbolj razširjena vrsta kapusnic, imenovana z ljudskimi imeni: glavnato zelje, kapus, belo zelje, beli ohrovit in ga lahko z biološkim kisanjem predelamo v kislo zelje ali pa uživamo presno kot solato.

Gojimo ga zaradi glav. Velikost glave je odvisna od sorte, tehnologije pridelovanja in predelovalnih razmer. Vzgojili so ga iz divje vrste, ki ponekod še danes raste avtohtono. Zelje ima relativno močno razvito glavno korenino z mnogo stranskih koreninic. Nad tlemi razvije glavo z vretenom in kocenom. Najpogosteje so glave okrogle ali ploščate, manj pogosteje podolgovate in koničaste. Glavo obkrožajo listi imenovani vehe. Ločimo jih po oblikah (okrogla, ovalna), po barvi, številu, legi. Cvet je rumene barve, plod imenujemo lusk, seme pa je drobno, rjave do črne barve (Osvald in Kogoj Osvald, 1998).

2.2.2 Zgodovina in pridelovanje zelja v Sloveniji in svetu

V večini evropskih držav je zelje pomembna kapusnica. Pri nas je pridelovanje zelja izredno pomembno, saj smo v preteklosti zelju namenili okoli 3000 ha zemljišč za glavno poljščino in približno 1000 ha za poznejšo poljščino. Ta zemljišča so pomenila eno tretjino vseh površin, namenjenih pridelovanju vrtnin. Ker daje zelje velik hektarski pridelek, je pomenilo v skupnih pridelkih kar 60 % vseh količin. Čeprav se v zadnjih letih zelju namenjena zemljišča zmanjšujejo, je še vedno najpomembnejša slovenska vrtnina. Večina pridelka je namenjena kisanju, del tudi sveži porabi, predvsem zgodaj spomladi in poleti.

Zelje pridelujemo v vseh slovenskih območjih. Za zgodnje pridelovanje sta pomembna Koprsko in Goriško, kjer je večina pridelka namenjena porabi svežega zelja. Tradicionalna območja, kjer je večino pridelka namenjeno za kisanje, so v Ljubljanski kotlini, na Gorenjskem, Celjskem, Mariborskem in v Pomurju.

V Sloveniji imamo avtohtone sorte, ki so jih naši predniki gojili, odkar se je zelje razširilo v pridelovanje. Te sorte je bilo mogoče dobiti po drugi svetovni vojni v vseh slovenskih

območjih, predvsem pa v ljubljanskem, kjer so gojili sorte Ljubljansko in Kašeljsko zelje. V Škofjeloškem pogorju so gojili Zaloško zelje, na Bloški planoti pa Bloško zelje. V sedemdesetih in osemdesetih letih smo v pridelovanje začeli uvajati hibride. Prvi poskus pridelovanje hibridov je bil v letu 1975 na Brniku, v letu 1979 tudi na celjskem območju, v Pomurju in Posavju.

Domače avtohtone sorte smo zbirali po drugi svetovni vojni in iz njih vzgojili sorte Emona in Kranjsko okroglo zelje. Zbrane avtohtone sorte hrаниmo v genski banki pri Kmetijskem inštitutu Slovenije (Černe, 1998b).

2.3 BROKOLI

2.3.1 Morfologija brokolija

Brokoli (*Brassica oleracea var. botrytis L. subvar. cymosa*)

Brokoli, imenovan tudi kavulin, kavolin ali brokuli, razvije v tehnološki zrelosti cvetove, podobno kot cvetača. Osnovna morfologija brokolija je, da so cvetovi temnejše barve (bele, rumene, zelene), sestavljene iz cvetnih popkov na sočnih mesnatih poganjkih. Cvetovi niso tako zbite, ker rastejo vzdolž stebla iz pazduh listov. Brokoli je najodpornejši proti suši in ni tako občutljiv na vročino. Poznana sta dva tipa brokolov, in to zimski brokoli z razvito terminalno rožo (bele ali rumene barve) z izvorom iz Anglije in brokoli, ki razvije manjše, zelene rože vzdolž stebla iz pazduhe listov z izvorom iz Italije (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

2.3.2 Zgodovina brokolija

Čeprav so brokoli v Italiji pridelovali že stoletja, je postal pomemben šele potem, ko so ga italijanski priseljenci prinesli v Ameriko. Brokoli se kot vrtnina zelo veliko uporablja v kulinariki, največkrat njegovo socvetje. Vsebuje več vitaminov kot cvetače, za nekatere je njegov okus boljši in slajši.

Pri nas smo brokoli uvedli v pridelovanje šele pred nekaj desetletij, na Primorskem pa so ga poznali že prej in ga tudi pripravljali v različnih judeh.

V slovenski sortni listi so vpisani hibridi in ena sorte. Vsi razvijejo zeleno glavno rožo, režemo lahko tudi stranske rože, potem ko odstranimo glavo. Pri vseh je čas tehnološke zrelosti zelo kratek in jih moramo odrezati takoj, ko je roža razvita (Černe, 1998b).

2.4 REDKEV

2.4.1 Morfologija in zgodovina redkve

Redkev (*Raphanus sativus* L.)

Redkev je prastara kulturna rastlina, ki so jo gojili že Egipčani. Zelo so jo cenili tudi Grki, Kitajci in Rimljani. Gojimo jo zaradi odebelenega korena, ki je lahko različnih oblik in barv (podolgovat, koničast, okrogel, ovalen; z belo, sivo, črno, rdeče, rumeno ali belo rdeče obarvano povrhnjico). V našem območju je razširjena vrsta redkve s črno obarvanimi korenimi. Poimenovana je z imeni črna redkev, redkva in vrtna redkev. Oblika črno obarvanih korenov je lahko ovalna, koničasta ali okrogla. Način gojenja in klima vplivata na obliko in velikost korenov. Pri slabši osvetlitvi in višji temperaturi tal se razvijejo krajši korenji. Običajno jo gojimo na prostem. Uspešno jo lahko gojimo tudi v zavarovanih prostorih (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

V prehrani je vrednost redkve podobna vrednosti drugih kapusnic. Predvsem v zdajšnjem stresnem svetu delujejo jedi iz redkve blažilno proti vsem težavam znanstveno – industrijskega sveta. Vsebujejo veliko rudnin, železo, silicij, selen, nekaj vitaminov in nekaj vsem znanih antioksidantov. Še več sestavin je v listih, zato je iz njih vredno stiskati sok (Pušenjak, 2007).

2.5 PREHRANSKE VREDNOST SVEŽEGA BELEGA ZELJA, BROKOLIJA IN POLETNE REDKVE

Preglednica 1: Energija v kcal v 100 g očiščenega belega zelja, brokolija in redkve (Černe in Vrhovnik, 1992)

Vrtnine	kcal
sveže belo zelje	23 – 27
brokoli	25 – 40
redkev, poletna	19 – 21

Preglednica 2: Hrnilna vrednost belega zelja, brokolija in redkve v g/100g (Černe in Vrhovnik, 1992)

Vrtnine	Voda	Surove beljakovine	Surove maščobe	Ogljikovi hidrati	Sladkorji	Vlaknine	Minerali
sveže belo zelje	91,0 – 95,0	0,4 – 2,2	0,1 – 0,2	3,3 – 4,3	3,0 – 5,0	1,0 – 1,7	0,37 – 0,80
brokoli	88,0 – 90,4	3,3 – 3,73	0,2 – 0,34	4,2 – 5,8	-	1,3	1,1
redkev, poletna	86,3 – 93,5	0,6 – 2,7	0,1 – 0,4	3,8 – 15,9	2,6	0,6 – 1,11	0,70 – 0,76

Preglednica 3: Količina aminokislin v belemu zelju, brokoliju in redkvi v mg/100g (Černe in Vrhovnik, 1992)

Aminokisline	Sveže belo zelje	Brokoli	Redkev, poletna
tirozin	29	-	35
treonin	36 – 41	120	-
triptofan	11	37	-
lizin	45 – 96	150	51
histidin	21 – 28	63	-
arginin	100 - 110	190	-
izolevcin	36 – 43	130	18
levcin	51 – 61	160	-
valin	34 – 54	170	-
metionin	7 – 18	50	11
cistein	22 – 33	-	-
fenilalanin	22 - 44	120	18

2.6 SEME IN SETEV

Seme je v širšem smislu organ, s katerim rastline razmnožujemo. Pod besedo »seme« razumemmo ves semenski material, ki nastane na spolni, partenokarpni ali vegetativni način in ga uporabljamo za razmnoževanje.

Od reproduktivnih organov (cvet, plod, seme) je za razmnoževanje najvažnejše seme, ker lahko v določenem času iz njega zraste nova rastlina. Seme more biti zdravo in vitalno ter sposobno v ugodnih rastnih razmerah hitro in enakomerno vzkaliti, oziroma ozeleneti.

Seme je živ organizem s posebnimi lastnostmi, ki so pogosto odvisne od okolja in človeka. Da bi bilo seme čim bolj kvalitetno, se njegova pridelava, dodelava, skladiščenje in prodaja nadzira in strokovno vodi na osnovi ustreznih zakonskih predpisih.

Fiziološke značilnosti semena

Vse vrste, ki se gojijo kot vrtnine, so enoletne, dvoletne ali večletne rastline ali trajnice. Enoletne rastline semenijo v istem vegetacijskem letu, dvoletne v drugem vegetacijskem letu, medtem ko večletne (trajnice) v prvem letu običajno ne cvetijo, drugem in naslednjih letih pa cvetijo in od njih pridobivamo semena.

Kaljivost in vitalnost semena

Proces kalitve na poenostavljen način lahko delimo na 4 faze:

- vpijanje vode in nabrekanje semena, pri katerem voda prodira v embrio;
- ustvarjanje in aktiviranje encimov, ki pospešijo aktivnost metabolizma;
- podaljševanje koreninskih celic in prodiranje skozi semensko lupino;
- nadaljevanje rasti kalčka.

Nabrekanje semena je prva stopnja v razvoju kalčka. Semenska ovojnica postane prepustna za zrak in vodo, seme pospeši dihanje in presnova se začne. Na novo nastali encimi vplivajo na spremembo rezervnih hranilnih snovi in kalček začne rasti.

Seme kali šele, ko so topotne razmere zanj ustrezne. Za večino semen, ki jih uporabljam za gojenje kalčkov, je najprimernejša temperatura 18 do 22 °C. Na splošno velja, da manj toplotne zaustavi kaljenje, pri previsoki temperaturi pa se seme lahko izsuši.

Za uspešno kaljenje je pomembno vsakodnevno spiranje, ki ne le zagotavlja samo vлагo kalečemu semenu, temveč spere tudi ogljikov dioksid (CO_2), ki nastaja pri dihanju in druge presnovke, ki nastajajo pri dihanju. Tako preprečimo tudi razvoj glivic in bakterij, torej plesnenje ali gnitje nežnih kalčkov.

Kaljenje je končano, ko se razvijejo prvi zeleni list. Nato si poganjek s pomočjo zelenila v listih s fotosintezo sam ustvarja hranilne snovi in tako postane neodvisen od rezerve v kličnih listih (Fink, 1993).

2.7 DOGAJANJE MED KALJENJEM

Semenska ovojnica obdaja en ali dva klična lista. Globoko v notranjosti semena je kalček ali embrio. Semenska ovojnica in klična lista vsebujejo vse hranilne snovi, ki so potrebne za rast in razvoj kalčka (Fink, 1993). Mirujoča semena že vsebujejo večino encimov, ki so potrebni za začetek življenja mlade rastline. Mitohondrij so še nerazviti – v morfološkem in biokemičnem smislu. Metabolizem in izmenjava plinov sta izredno nizka, kar je posledica nizke vsebnosti vode (okrog 10 %).

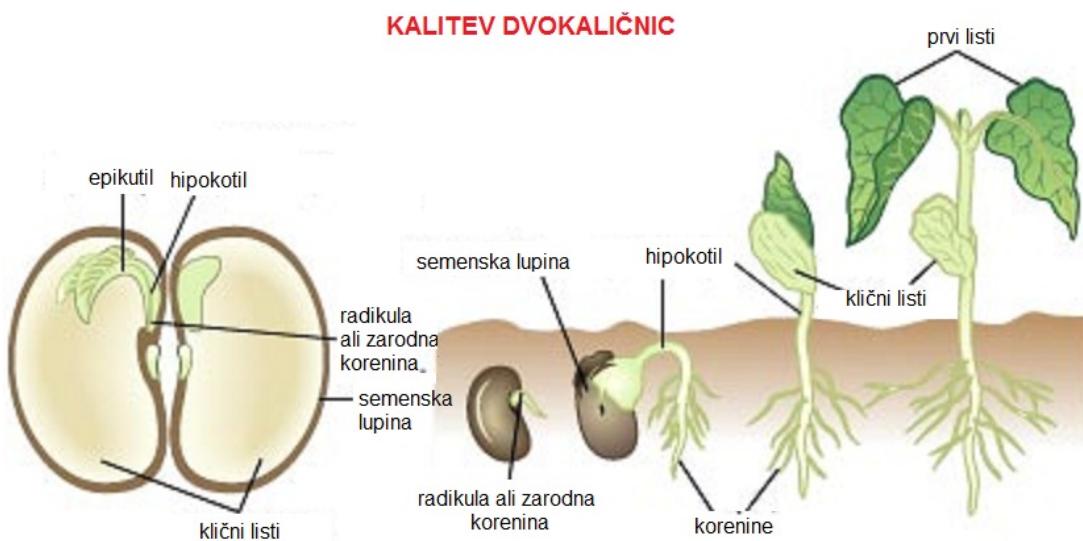
Med imbibicijo poraba kisika strmo narašča. Aktivirajo se encimi, uskladiščeni v semenu. Najprej se porabijo primarne zaloge hranil v embriu, ki jih predstavljajo v glavnem nižji sladkorji (Likar in Regvar, 2003). Hranilne snovi se razgradijo, prerazporedijo in nastajajo takšne, ki so sposobne hraničiti rastoči kalček. Zato se hranilna vrednost kalčkov neprehomoma povečuje, poveča se vsebnost vitaminov in encimov, poteka intenzivna razgradnja maščob in beljakovin. Vsebnost maščob in ogljikovih hidratov se med rastjo

kalčka zmanjša. Beljakovine razpadajo v svoje gradnike – aminokisline, z delovanjem encimov pa nastajajo nove (Fink, 1993).

V teh procesih se porablja tudi kisik, ki je bil uskladiščen v različnih tkivih semena. Seme samo vsebuje približno 10 % vode, štiri dni star kaljenec pa kar 90 %. Temu ustrezeno se zmanjša energijska vrednost.

Ponoven porast porabe kisika navadno opazimo, ko se pojavi s prosim očesom vidni znak kalitve-prodor korenčice. Embrio intenzivno izkorišča rezerve iz sekundarnega endosperma ali kotiledonov (redko so rezerve skladiščene drugje, npr. v hipokotilu pri arašidih). Mlada rastlinica hitro raste. Na svetlobi lahko pri kalici opazimo pozitivno fototropično reakcijo. Razvije se tudi fotosintetski aparat in kalica preide v avtotrofni način življenja.

Pri kalitvi semen v temi dihanje upade približno ob istem času, kot na svetlobi, ko kalica začne avtotrofni del življenja, zaradi pomanjkanja substrata (npr. pri ovsu peti do sedmi dan). Kalica v temi zato počasi odmre (Likar in Regvar, 2003).



Slika 1: Kalitev dvokaličnic (Encyclopaedia Britanica..., 2011)

2.7.1 Kalitev

2.7.1.1 Toplota

Seme križnic kali pri minimalni temperaturi od 4 do 10 °C, optimalna temperatura je od 15 do 20 °C, maksimalna pa 30 °C. Pri nizkih temperaturah traja kalitev 14 dni, pri visokih pa od 4 do 6 dni. Od vznika do tehnološke zrelosti se rastline razvijajo pri minimalni temperaturi od 10 do 15 °C, optimalnih od 15 do 20 °C in maksimalnih do 30 °C. Jeseni

rastejo še pri temperaturah 5 °C. Močno temnozeleno obarvane sorte prenesejo nižje temperature kot svetlozelene (Černe, 1998b).

2.7.1.2 Vlaga

Križnice zahtevajo veliko vlage v zemlji, zato z namakanjem povečujemo pridelek. Zahtevajo tudi veliko zračne vlage, zato zelo dobro uspevajo ob rekah in v kotlinah, kjer je v zraku več vlage. Pri premajhni vlagi se razvijejo majhni listi z močno voščeno prevleko in majhne glave (Černe, 1998b).

2.7.1.3 Tla

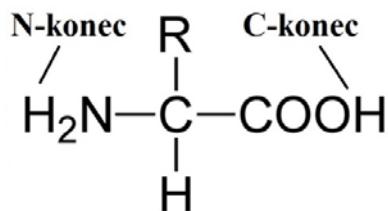
Vse križnice dobro uspevajo v srednje težkih, humoznih, dobro prepustnih tleh, ki so sposobna zadrževati vlago. Na lažjih tleh pridelujemo zgodnje sorte, na bolj težkih, prepustnih pa pozne sorte. Za večino križnic morajo imeti tla nevtralno do blago alkalno reakcijo, to je pH od 6,5 do 7,5 (Černe, 1998b).

2.7.1.4 Kolobar

Križnice vrstimo tako, da pridelujemo na isti površini te posevke po 3 do 4 letih, pri tem upoštevamo pri pridelovanju na polju tudi križnice za podor. Z večletnim kolobarjenjem preprečimo pojav bolezni zlasti golšavost kapusnic in pojav škodljivcev. Dobri prejšnji posevki so stročnice in žita, po kapusnicah pa gojimo vrtnine, ki rastejo na drugi poljini (lilijevke in kobulnice) (Černe, 1998b).

2.8 RASTLINSKE PROTEAZE

Proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v proteinskih in peptidnih substratih. Lahko jih delimo glede na to, kje cepijo peptidne verige. Endopeptidaze cepijo proteine znotraj peptidnih verig, eksopeptidaze pa na njihovih koncih. Eksopeptidaze so razdelili glede na njihovo specifičnost za substrat na aminopeptidaze, ki cepijo peptide na N – koncu, in karboksipeptidaze, ki cepijo peptide na C- koncu.



Slika 2: Strukturna formula proteina (Boyer, 2005)

Aktivnost proteaz je odvisna od stopnje razvoja in fiziološkega stanja rastlin, kot so (kalitev, diferenciacija, morfogeneza, staranje in programirana celična smrt). Določene proteaze so omejene na posamezne rastlinske organe, tkiva in celične organele (Brzin in Kidrič, 1995; Vierstra, 1996; Palma in sod., 2002; Schaller, 2004).

Proteoliza omogoča rastlinam spremembo vsebnosti proteinov med razvojem in prilagoditvi na nove pogoje v okolju (Vierstra, 1993).

Na proteazah danes potekajo številne raziskave, še posebej na področju kliničnih, farmacevtskih in industrijskih aplikacijah (proizvodnja sira, mehčanje mesa, strojenje usnja itd.) (Demir in sod., 2008).

2.8.1 Strukturna razdelitev proteaz

Obstaja več kriterijev za razvrščanje proteaz, zaradi njihove velike raznolikosti. Najbolj uveljavljena načina razdelitve sta tista:

- ki ju predlaga komisija za encime EC (angl. Enzyme commission, kasneje preimenovana v Nomenclature committee od the International Union of Biochemistry and Molecular Biology oz. NC-IUBMB) (NC-IUBMB, 2007) in
- razdelitev po spletni podatkovni bazi MEROPS (Rawlings in sod., 2006).

MEROPS upošteva encimski mehanizem kot glavni kriterij za klasifikacijo vseh proteolitičnih encimov, medtem ko EC uporablja ta kriterij zgolj kot enega izmed kriterijev (pri endopeptidazah).

Po pravilih encimske nomenklature - IUB Nomenclature committee, 1986 - so proteaze razdeljene med:

- endopeptidaze, ki jih na osnovi različnega katalitskega mehanizma delimo na serinske proteaze, cisteinske proteaze, aspartatne proteaze, metaloproteaze, treoninske proteaze in peptidaze z neznanim mehanizmom delovanja,
- eksopeptidaze, ki so razdeljene glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov z amino ali karboksilnega terminalnega konca polipeptidne molekule pa vključuje aminopeptidaze, dipeptidaze, dipeptidil peptidaze, tripeptidil peptidaze, peptidil peptidaze, karboksipeptidaze in omega peptidaze (Barrett in McDonald, 1986).

Klasifikacija po Rawlingsu in Barrettu (1993) upošteva, da imajo nekateri encimi tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost in evolucijsko povezanost encimov oziroma strukturno podobnost:

- izvor: mikrobne, rastlinske, živalske;
- mesto delovanja: zunajcelične in znotrajcelične;
- mesto cepitve peptidne vezi: eksoproteaze (cepijo peptidno vez blizu N ali C terminalnega konca polipeptidne verige substrata) in endoproteaze (cepijo notranje peptidne vezi v polipeptidni verigi s tendenco delovanja strani od N in C koncov);

- kemična narava katalitičnega mesta: katalitski tip proteaze se nanaša na kemijsko skupino odgovorno za katalizo hidrolize peptidne vezi. Poznamo 6 specifičnih tipov katalitičnih tipov: serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne, glutaminske in metalo-proteaze. Pri proteazah serinskega, treonskega in cisteinskega tipa ima vlogo nukleofilna reaktivna skupina stranske verige aminokisline v aktivnem mestu (Ser, Thr, Cys), ki je lahko hidroksilna skupina (serinske in treoninske proteaze) ali sulfhidrilna skupina (cisteinske proteaze). Pri aspartatnih in metalo-proteazah je nukleofil ponavadi aktivna molekula vode. Glutaminske proteaze so prepoznali šele leta 2005 in še niso podrobno proučene (Gotar, 2009).
- molekulska struktura in homologija: odvisna od dostopnosti aminokislinskih zaporedij in 3-D struktur; podlaga za določanje evolucijske sorodnosti (Rao in sod., 1998; Rawlings in sod., 2009).

2.8.2 Rastlinske aminopeptidaze

Kot smo omenili, so aminopeptidaze po eni klasifikaciji proteolitičnih encimov uvrščene v posebno skupino eksopeptidaz; odcepljajo aminokisline od proteinskega in peptidnega substrata z N-terminalnega konca.

So široko razširjene v rastlinskem in živalskem svetu in jih lahko najdemo v mnogih subcelularnih organelih, citoplazmi in kot komponente membrane. Za nekatere od njih so ugotovili zelo pomembne celične funkcije (Taylor, 1993).

2.8.2.1 Razdelitev aminopeptidaz

Obstaja več različnih kriterijev za delitev aminopeptidaz :

- glede na število aminokislin, ki jih odcepijo iz substrata; aminopeptidaze, aminodipeptidaze, aminotripeptidaze,
- glede na afiniteto do posameznih aminokislin;
primer je levcin aminopeptidaza (LAP), ki odceplja levcin in nekatere druge hidrofobne aminokislinske ostanke, poleg nje pa so bile opisane tudi Arg-, Met-, Asp-, Ala-, Glu-, Pro- in Cys- itd. aminopeptidaze,
- glede na lokalizacijo;
nekatere aminopeptidaze so sekretorni encimi, večina pa jih ostane v celici. Lahko so citosolni ali pa so vezani na membrano. Nekatere so bile odkrite v organelih; na primer v jedru, lizosomih, mitohondriih in kloroplastih (Liu in Jagendorf, 1986);
- glede na vsebnost kovinskega iona, ki sodeluje v katalitičnem mehanizmu;
na primer mnoge LAP vežejo dva Zn²⁺ na podenoto, znane so metionin aminopeptidaze, ki za svojo aktivnost potrebuje Co²⁺ ione;
- glede na pH območje, pri katerem ima encim največjo aktivnost;
poznamo kisle, bazične in nevtralne aminopeptidaze,
- glede na občutljivost encima na različne inhibitorje (Vrhovnik, 2007)

2.8.2.2 Aminopeptidaze v posameznih rastlinah

V literaturi smo zasledili nekatere objave v katerih avtorji poročajo o aminopeptidazah v različnih rastlinah. V pričuječem odstavku so predstavljene nekatere značilnosti (substratna specifičnost, proteolitičen tip, molska masa, tkivo ali razvojna faza rastline) detektiranih encimov.

Iz kivija *Actinidia deliciosa* so izolirali aminopeptidazo. Njeno aktivnost so določali s substratom levcin-nitroanilid. Najvišja encimska aktivnost je bila določena v alkalnih pogojih. Ugotovili so tudi, da je encim termolabilen (Premarathne, 2010).

S fenilalanin-p-nitroanilidom kot substratom so analizirali aktivnost aminopeptidaze iz zeljnih listov. Encim je imel optimalen pH 7,2-7,5 (Marinova in sod., 2007).

Iz kličnih listov arašida so izolirali pet aminopeptidaz. Nekatere so imele širšo substratno specifičnost, nekatere pa so bile specifične za substrate levcin, tirozin in fenilalanin (Isola in Franzoni, 1996).

V paradižnikovih listih so odkrili aminopeptidazo z velikostjo 60 kDa (Narváez-Vásquez, 2008), v sončničnih semenih pa aminopeptidazo velikosti 80 kDa, katere optimalni pH je med 7,5-8,0 in optimalna temperatura delovanja med 45-50 °C (Tishinov in sod., 2009).

Prolil aminopeptidaze so izolirali iz poganjkov sadike tritikale. Prolil aminopeptidaza je tetrameren encim, sestavljen iz 4 podenot, vsaka podenota pa ima molsko maso približno 54 kDa, optimalen pH za delovanje encima je 7,5 pri temperaturi 37 °C (Szawłowska in sod., 2011).

V krompirjevih gomoljih (*Solanum tuberosum*) so identificirali levcinsko aminopeptidazo (LAP; hidrolizira substrate, ki imajo na N-terminalnem koncu Leu). Encim ima največjo aktivnost pri 45 °C in pH 9,0 (Vujčić in sod., 2010).

2.8.2.3 Katalitski tipi proteolitičnih encimov

2.8.2.3.1 Serinske proteaze

Serinske proteaze so v rastlinah med vsemi proteolitičnimi encimi najštevilčnejše. Večina serinskih proteaz je izolirana iz bakterij (Rawlings in sod., 2006). V aktivnem mestu teh encimov je aminokislina serin, ki je v kemijskem smislu, zaradi nukleofilnega karakterja OH- skupine, odločilna za cepitev peptidne vezi. Katalitični mehanizem vključuje tudi donor protona, običajno histidinski ostanek, vendar ne vedno, za razliko od cisteinskih proteaz. Poleg njiju je za katalizo potreben tudi tretji aminokislinski ostanek, ki verjetno stabilizira potrebno orientacijo imidazolnega obroča histidina. To je velikokrat aspartat, lahko pa tudi še en histidin. Se pravi, da gre za katalitično triado. V nekaterih klanih ima vlogo protonskega donorja lizinski ostanek in tretji katalitični ostanek ni potreben. Kot pri cisteinskem katalitičnem tipu, se tudi v reakcijah, ki jih katalizirajo serinske proteaze tvori acil-encimski intermediat (Gotar, 2009).

2.8.2.3.2 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze izvirajo iz različnih evolucijskih poti, razdeljene pa so v šest klanov z dvema podklanoma (Rawlings in sod., 2008). Za proteaze tega katalitičnega tipa je karakteristično, da je nukleofil, ki napade peptidno vez, SH- skupina cisteinskega ostanka.

Torej se ta katalitičen tip zelo razlikuje od aspartatnih, glutamatnih in metalopeptidaz, v katerih je nukleofil aktivirana molekula vode. Za serinske in treoninske proteaze enako velja, da je nukleofil v katalitičnem mestu del aminokisline iz peptidne verige encima. Katalitični mehanizem cisteinskih proteaz poleg tega vključuje tudi donor protona. Do sedaj so za vse cisteinske proteaze, ugotovili, da je to histidinski ostanek. Za katalitično delovanje pri nekaterih družinah zadostuje cisteinski in histidinski ostanek, ponekod pa je potreben tudi tretji ostanek. Sorodnost s serinskimi proteazami se kaže tudi v tem, da oba tipa proteaz na njuni reakcijski poti tvorita kovalentne acil-encimske intermediate (Rogers in sod., 1985).

Prva proteaza, ki so jo dejansko določili kot cisteinsko, je papain, široko specifična cisteinska proteaza, ki je ena najbolj pogosto uporabljenih encimov v različnih industrijah (Sathish in sod., 2009). Papain spada v poddržino CA1, ki sicer vsebuje večinoma endopeptidaze, sem pa uvrščamo tudi najbolj poznano rastlinsko aminopeptidazo aleurain iz klana CA, ki vsebuje več kot 20 družin (Polgár, 2004) v poddržino CA1 uvrščajo tudi cisteinsko proteazo (HvCP3), ki je bila raziskana v zelenih listih ječmena (*Hordeum vulgare* L.) (Watanabe in sod., 2009), OsCP iz riža (*Oryza sativa*) (Tian in sod., 2009), SPCP1 iz starih listov sladkega krompirja (*Ipomoea batatas*) (Chen in sod., 2009), AtGC1 iz navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Ludidi in sod., 2006), iz bele detelje (*Trifolium repens*) (Asp in sod., 2004), iz črne jelše (*Alnus glutinosa*), iz grahovca (*Astragalus sinicus*), iz korenja (*Daucus carota*) (Chen in sod., 2009).

2.8.2.3.3 Metaloproteaze

Katalitičnemu tipu metaloproteaz pripada večina do zdaj znanih aminopeptidaz. Od šest katalitičnih tipov so metaloproteaze najbolj raznolike, tako po strukturi kot funkciji (Schaller, 2004). Najpogosteša kovina najdena v metaloproteazah je cink, v nekaterih encimih pa se namesto njega nahajajo kobalt, mangan, nikelj ali baker. Kovinski ion je vezan na protein s pomočjo aminokislinskih ligandov, običajno s tremi in to z ostanki histidina, glutaminske kisline, asparaginske kisline ali lizina. Poleg kovinskih ligandov je za katalitično delovanje potreben vsaj še en aminokislinski ostanek, v mnogih metaloproteazah je to glutaminska kislina. Cink s svojo zapolnjeno d-orbitalo nima oksidacijsko-reduksijskih lastnosti značilnih za sosednje prehodne kovine. Zato je v biološkem okolju, čigar redoks potencial se stalno spreminja, cink stabilen kovinski ion (Gomis-Ruth, 2003).

2.8.3 Inhibitorji proteaz

Proteaze so vključene v številnih pomembnih znotrajceličnih in zunajceličnih procesih. Encimi, ki razgrajujejo proteine, so lahko potencialno škodljivi, zato mora biti njihovo delovanje uravnano. Obstaja več različnih mehanizmov za uravnavanje prekomerne proteolitične aktivnosti. Med pomembnejše regulatorje proteolitične aktivnosti encimov uvrščamo interakcije encimov s proteinimi, ki jih inhibirajo. Proteazni inhibitorji tvorijo kompleks s tarčnimi proteazami in jih lahko inaktivirajo (Rawlings in Berrett, 1993). Med pomembnimi mehanizmi uravnavanja encimske aktivnosti so še: regulacija encimske aktivnosti z delno proteolizo neaktivnih prekurzorjev, z lokalizacijo proteaz, s posttranslacijskimi modifikacijami in s spremembami pH (Turk in sod., 1997).

Inhibitorji proteaz so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in praživalih. Lahko se nahajajo zunajcelično ali znotrajcelično. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih, kar pomeni, da se v aktivno mesto vežejo reverzibilno ter zmanjšajo ali preprečijo razgradnjo substrata. Del molekule inhibitorja, ki predstavlja reaktivno mesto in se poveže z encimom, se prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno veže na encim. Kompleks encim – inhibitor je dodatno stabiliziran s številnimi vodikovimi, ionskimi in hidrofobnimi interakcijami in le počasi disociira (Barret, 1986; Bode in Huber, 1991).

Inhibitorje lahko razdelimo po reakcijskem mehanizmu, izvoru in strukturni podobnosti. Leta 1980 sta Laskowski in Kato delila inhibitorje glede na tip proteaz, ki jih inhibirajo na: inhibitorje serinskih proteaz, inhibitorje cisteinskih proteaz, inhibitorje aspartatnih proteaz in inhibitorje metaloproteaz (Laskowski in Kato, 1980). Vendar nekateri inhibitorji interagirajo tudi z različnimi tipi proteaz.

Salvesen in Nagase sta leta 1989 predlagala delitev proteaznih inhibitorjev glede na specifičnost. Razdelila sta jih na tri razrede: inhibitorje, ki reagirajo z več kot enim tipom proteaz, inhibitorje specifične le za en tip proteaz in inhibitorje, ki so visokoselektivni le za en encim (Laskowski in Kato, 1980; Salvesen in Nagase, 1989).

S povečanjem števila odkritij na področju inhibitorjev proteaz so v bazi podatkov MEROPS, ki je v začetku vsebovala samo proteaze dodali novo bazo, ki temelji na enotni klasifikaciji proteaznih inhibitorjev. V sistemu MEROPS so inhibitorne enote proteaznih inhibitorjev dodeljene v družine na osnovi podrobnosti aminokislinski zaporedij in nato na osnovi 3D struktur v 26 klanov (Rawlings in sod., 2009).

Za inhibitorje serinskih proteaz, ki so najštevilčnejši, so potrdili vlogo obrambnih snovi. Ti proteini so prisotni v majhnih količinah, ustreznih za zaščito pred plenilci. Vsi rastlinski inhibitorji serinskih proteaz so kompetitivni inhibitorji in delujejo po podobnem mehanizmu. Po Laskowskem jih delimo v 13 družin.

Inhibitorje **cisteinskih** proteaz so izolirali iz riža, avokada, papaje, limskega fižola, ambrozije in krompirja (Lawrence in Koudal 2002). Delimo jih na endogene in eksogene inhibitorje. Slednje lahko delimo na kovalentne in nekovalentne inhibitorje, kovalentni pa se še naprej delijo na reverzibilne in ireverzibilne. Najbolj raziskan med irevezibilnimi inhibitorji so epoksisukcinilni inhibitorji, ki so se razvili iz naravnega inhibitorja trans-epoksi sukcinil-L-levcilamido-(4-gvanizino)-butan (E-64), ki so ga izolirali iz plesni *Aspergillus japonicus*. E-64 je splošni ireverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz, ki se veže v aktivno mesto v nasprotni smeri kot se veže substrat (Ren in sod., 1996). Iz krompirja so izolirali tudi inhibitorje **aspartatnih** proteaz. Rastline so razvile vsaj dve družini **metaloproteaz**, ki so jih izolirali iz paradižnika in krompirja (Lawrence in Koudal, 2002). Pyrzyna s sod. (2010) so dokazovali fenilalanin aminopeptidaze v tri tednu starem grahu, kjer so kot inhibitorje cisteinskih proteaz uporabili poliheksametilen bigvanid hidroklorid (pHMB) in E-64 in inhibitorje serinskih proteaz, diizopropilfluorofosfat (DFP) in PMSF. Prav tako pa so Szawłowska in sod. (2011) dokazovali prolil aminopeptidaze v tri dni starih poganjkih sadik tritikala (križanica med pšenico in ržjo) in so kot inhibitorje serinskih proteaz uporabljali DFP in PMSF. Različne inhibitorje proteolitičnih encimov se lahko dodaja v ekstrakcijske pufre, da na ta način preprečimo proteolitično aktivnost in poškodbe proteinov, ki jih želimo izolirati (Müllertz, 1974).

Poleg sintetičnega inhibitorja E-64, na aktivnost encimov, ki imajo v aktivnem mestu cistein vpliva tudi jodoacetamid, ki se kovalentno poveže s SH skupino cisteina in na ta način inhibira aktivnost cisteinskih proteaz (Manoj in sod., 2007). Pogostokrat se med homogenizacijo SH skupina cisteina, ki je v aktivnem mestu encima, delno oksidira. Za polno aktivnost cisteinskih proteaz je potrebno v izolacijski pufer ter v medij v katerem poteka določevanje encimske aktivnosti, dodati reducente kot so 2-merkaptoetanol, glutation, ditiotreitol ali ditioeritriol (Cleland, 1964).

Na aktivnost proteolitičnih encimov, ki imajo v aktivnem mestu vezane dvovalentne kovinske ione lahko vplivamo s kelatorji kot so EDTA in 1,10-fenantrolin (Laeremans in sod., 2005). Zaradi močnih kompleksov, ki jih tvorijo s kovinami, se poveča delež proteolitičnih encimov brez kovinskih kofaktorjev. Takšni encimi posledično niso aktivni.

2.9 CIMOGRAFIJA

Cimografija je preprosta in občutljiva dvostopenjska tehnika za ločevanje in identifikacijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcih, ki je bila uvedena pred več kot 20 leti (Heussen in Dowdle, 1980). Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, ki ji sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu. Prednost cimografije pred ostalimi elektroforetskimi analizami je, da lahko po separaciji identificiramo proteine, ki imajo encimsko aktivnost na substrat vključen v gel. Metoda je primerna za identifikacijo in spremeljanje encimskih

aktivnosti v kompleksnih bioloških in kliničnih vzorcih ter načrtovanju čiščenju oz. izolacije encimov (Kaberdin in McDowall, 2003).

2.9.1 Cimografija s proteinskimi substrati

Opisanih je več postopkov za zaznavo proteolitičnih encimov po gelski elektroforezi. Proteine v ekstraktu ločimo na poliakrilamidnem gelu pod nativnimi ali denaturirajočimi pogoji, kjer nato pod kontroliranimi pogoji hidrolizirajo proteinski ali sintetični substrat. Če ločene proteaze med elektroforezo ohranijo katalitično aktivnost, jih lahko zaznamo z ustreznim postopkom, ki temelji na barvanju proteinov ali bolj specifičnih reakcijah. Metode gelske elektroforeze za preučevanje proteolitičnih encimov lahko razdelimo na dve skupini: pri prvi proteaze zaznamo in situ po elektroforezi, pri drugi jih zaznamo po prenosu z gela na gel s substratom ali na nitrocelulozno membrano. Metode lahko razdelimo tudi glede na vrsto uporabljenega substrata, ki je odvisna od količine informacij o vzorcu, stopnje specifičnosti, potrebe med encimsko analizo, in posebnih ciljev, ki jih želimo doseči. Na voljo so številni postopki za elektroforetsko analizo proteaz z uporabo proteinskih substratov. V večini primerov gre za ločevanje proteaz na NaDS-poliakrikamidnem gelu z vključenim proteinskim substratom. Po migraciji proteine renaturiramo z odstranitvijo NaDS iz gela in proteazam omogočimo hidrolizo proteina v gelu, ki je potopljen v ustrezen aktivacijski pufer. Po barvanju proteinov vidimo na gelu, kjer je potekla proteoliza, svetle lise na temnem ozadju (Michaud, 1998).

Poceni in komercialno dostopni proteini kot so želatina, kazein, goveji serumski albumin ali hemoglobin so najpogostejsi substrati za zaznavo elektroforetsko ločenih proteaz. Ločene proteaze lahko identificiramo tudi tako, da po prenosu hidrolizirajo substrat v novem matriksu (če je protein vključen v indikatorski gel ali fiksiran na trdo membrano). Čeprav proteina, kot sta želatina in kazein nista naravna substrata za večino proteaz, sta uporabna za elektroforetsko karakterizacijo proteolitičnih encimov v velikem številu bioloških vzorcev (Michaud, 1998; Frederiks in Mook, 2004).

Najbolj razširjen postopek za zaznavo proteaz je postopek poliakrilamidne gelske elektroforeze (PAGE) z želatino. Ta tehnika je enostavna, občutljiva ter uporabna za preučevanje različnih proteolitičnih sistemov v številnih bioloških procesih. Želatino hidrolizirajo številne proteaze in proteolitični vzorci so običajno zelo ponovljivi (Kleiner in Stetlerstevenson, 1994; Leber in Balkwill, 1997), mogoč pa je tudi razvoj specifičnih standardov uporabnih za kalibracijo (Makowski in Ramsby, 1996).

PAGE z želatino pa ima, kljub uporabnosti pri proučevanju različnih bioloških procesov, določene omejitve. Po dodatku NaDS nekateri encimi in proteaze izgubijo aktivnost, sistem je v prvi vrsti prilagojen zaznavi endopeptidaz in, kljub temu da želatino hidrolizirajo številne med njimi, jo nekatere endopeptidaze v surovih ekstraktih ne

prepozna jo kot substrat (Michaud in Asselin, 1995). Prav tako je določitev molekulske mase proteaz vprašljiva, saj vključitev želatine v poliakrilamidne gele zmanjša hitrost migracije za 15 do 20 %. Poleg tega se želatina med elektroforeznim potovanjem različno veže na očiščene proteaze in na proteaze v kompleksnih ekstraktih (Hummel in sod., 1996), zaradi česar lahko nastanejo na ozadju gela sledi hidrolize in lahko precenimo število proteaznih oblik. Da bi se temu izognili, lahko substrat vključimo v gel z difuzijo po nereducirajoči NaDS-PAGE, s čimer preprečimo interakcije proteaz-protein med potovanjem in lažje ocenimo molekulsko maso proteaz (Garciacarreno in sod., 1993).

2.9.2 Cimografija s sintetičnimi substrati

Sintetični substrati so zelo uporabni za zaznavo specifičnih tipov proteaz in za ugotavljanje njihovih karakteristik. Običajno so substrati sintetizirani s fuzijo specifičnih substituentov na amino- ali karboksi- skupino aminokislinske verige. Sintetične substrate lahko glede na položaj substituenta razdelimo na dve skupini: endoproteazni substrati, kjer sta amino- in karboksi- konec blokirana in nista na voljo eksoproteazam, ter eksoproteazi substrati, pri katerih je en konec blokiran; karboksi- konec za aminopeptidaze in amino- konec za karboksipeptidaze.

Najpogostejsi substrati, dodani za blokado amino- konca so benzoilna (Bz), benzoiloksikarbonilna (Z), acetilna (Ac), sukcinilna (Suc), O-aminobenzoilna (ABz) in furilakriloilna (Fa) funkcionalna skupina.

Na karboksi- konec so dodane skupine, ki dajo substratu večinoma kromogene ali fluorogene lastnosti. Najpogostejsi med kromogenimi substituenti je 4-nitroanilid (pNA), med fluorogenimi substituenti pa 7-amino-4-metilkumarin (AMC). Substituent, ki je lahko kromogen ali fluorogen, odvisno od postopka, ki ga uporabljamo za zaznavo aktivnosti, je 2-naftilamid (β NA) (Gotar, 2009).

Za proučevanje proteaz, posebno endo- in aminopeptidaz, po gelski elektroforezi je na voljo veliko sintetičnih substratov. Nekateri substrati so relativno nespecifični in omogočajo zaznavo proteaz le na nivoju družine, medtem ko drugi omogočajo zaznavo specifičnih proteaz in so uporabni pri spremeljanju določenih vrst proteaz v ekstraktih (Weder in Kaiser, 1995).

Zaradi raznolikosti proteolitičnih encimov v živih celicah in velikega števila nekarakteriziranih proteaz je potrebno proteazno specifičnost za substrat potrditi za vsak biološki sistem posebej (Michaud, 1998).

Pri proučevanju aminopeptidaz so večino raziskav naredili na levcinskih aminopeptidazah iz živalskih in rastlinskih tkiv (Matsui in sod., 2006). Sprva so za substrat uporabljali aminokisline, označene z β -naftilaminom, vendar so jih kasneje zaradi toksičnosti zamenjali z aminokislinsami, označenimi s 4-nitroanilidi (Hou in sod., 1999; Božić in Vujačić, 2005). Pri obeh tehnikah je potrebno nadaljnje procesiranje za zaznavo aminopeptidaz, zaradi česar pride do irreverzibilne izgube encimske aktivnosti. Redko so

uporabili tudi aminokisline, označene z AMC, pri katerih se po hidrolizi amidne vezi sprosti fluorescentni AMC (Konopka in Zakharova, 2002). Takšni substrati so občutjivejši in omogočajo neposredno analizo brez fiksacije produkta. Budič in sod. (2009) so metodo podrobno razdelali za določanje aminopeptidaz in optimizirali pogoje, pod katerimi se cimografija lahko uporabi za kvantitativno določanje AP v ekstraktih. Ker substrat dodamo po elektroforezi, lahko isti gel analiziramo z različnimi substrati. S sintetičnimi substrati lahko po elektroforezi zaznamo specifične skupine proteaz v surovih in slabo karakteriziranih ekstraktih, hitro določimo njihovo specifičnost za substrat, učinkovito zaznamo eksopeptidaze in se izognemo motnjam, ki jih substrat povzroča med samo elektroforezo (Budič in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Izbor rastlinskega materiala

Različne rastline imajo različno aminopeptidazno aktivnost. Da smo naredili ožji izbor, smo izvajali nativno elektroforezo na kalčkih različnih rastlin. Tako smo uporabili kalčke redkve, pire, pšenice, ovesa, zelja, brokolija, riža. V ožji izbor za nadaljnje analize smo izbrali redkev, brokoli in belo zelje.

Preglednica 4: Uporabljeni rastline

	VRSTA	KULTIVAR	SORTA/KULTIVAR	PROIZVAJALEC
Brokoli	<i>Brassica oleracea</i>	Italica	Calabrese	Semenarna Ljubljana
Zelje	<i>Brassica oleracea</i>	Capitata	Ljubljansko	Semenarna Ljubljana
Redkev	<i>Raphanus sativus</i>	neznan	Daikon	Semenarna Ljubljana

3.1.2 Spojine

Preglednica 5: Uporabljeni spojini in njihovi proizvajalci

Spojine	Proizvajalec
β-merkatoetanol	Sigma, ZDA
10 % APS: amonijev persulfat	Sigma, ZDA
DTT: ditiotreitol	Sigma, ZDA
Glicerol	Carlo Erba, Italija
BSA: goveji serumski albumin	Sigma, ZDA
PVP: polivinilpirolidon X-100	Sigma, ZDA
reagent Bio-Rad	Bio Rad, ZDA
TEMED: N,N,N',N'- Tetrametil-etilenediamin	Sigma, ZDA
Tris: Tris hidroksimetil - aminometan	Merck, Nemčija
PHE-AMC: L-Fenilalanin 7-amido-4 - metilkumarin	Biosynth, Švica
N-α-benzoyl-Arg-AMC: N-alfa-CBZ-L-Arginin 7-amido-4-metilkumarin hidroklorid	Biosynth, Švica
GLU-AMC: L-Glutaminska kislina alfa-(7-amido-4-metilkumarin)	Biosynth, Švica
GLY-AMC: Glicin 7-amido-4-metilkumarin hidrobromid	Biosynth, Švica
TRP-AMC: L-Tryptofan 7-amido-4-metilkumarin hidroklorid	Biosynth, Švica
ALA-AMC: L-Alanin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
MET-AMC: L-Metionin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
LYS-AMC: L-Lizin 7-amido-4-metilkumarin	Biosynth, Švica
DMSO: Dimetilsulfoksid	Merck, Nemčija
PMSF: Fenilmetansulfonil flourid	Sigma, ZDA
Tekoč dušik	Messer griesheim APOLLO
37 % klorovodikova kislina	Merck, Nemčija
Glicin	Merck, Nemčija
Akrilamid/ bisakrilamid (37,5:1)	Roth, Nemčija
Milli-Q voda	
Etanol	Merck, Nemčija
Bromfenolmodro	Sigma, ZDA
Simply Blue™	Invitrogen
NaDS: natrijev dodecil sulfat	Sigma, ZDA
Proteinski standardi , za NaDS elektroforezo; Pierce 3-Color Prestained Protein MW Marker	Thermo Scientific
IA: jodoacetamid	Sigma, ZDA

3.1.3 Raztopine

3.1.3.1 Priprava pufrov

3.1.3.1.1 Pufri za ekstrakcijo proteinov

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 brez reducenta:

Pripravili smo ga iz 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 (Priprava opisana v točki 3.1.3.1.2)

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 z reducentom

V 10 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 7 µl reducenta β-merkaptoetanola.

3.1.3.1.2 Pufri za testiranje encimske aktivnosti s cimografijo

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0:

Zatehtali smo 15,14 g topljenca Tris in ga raztoplili v 350 ml milli-Q vode. S pH-metrom smo uravnali pH raztopine na 7,0 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM DTT

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,3 ml 500 mM DTT raztopljenega v Milli-Q vodi.

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 24 mM IA

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 1,5 ml 500 mM IA.

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM DTT

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml 500 mM DTT raztopljen v Milli-Q vodi.

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 1 mM PMSF

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml 100 mM PMSF raztopljen v etanolu.

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + etanol

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 0,6 ml etanola.

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM PMSF

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 1,2 ml 250 mM PMSF raztopljen v DMSO.

- Priprava 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 2 % DMSO

V 60 ml 50 mM Tris-HCl smo dodali 1,2 ml 100 % DMSO.

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM CaCl₂.

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,5 ml 300 mM CaCl₂.

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 0,1 mM ZnCl₂.

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,5 ml 6 mM ZnCl₂.

- Priprava 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 5 mM EDTA

V 30 ml 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 smo dodali 0,3 ml 500 mM EDTA.

3.1.3.1.3 Pufra za pripravo gelov

- Priprava pufra za ločevalni gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8:

Zatehtali smo 18,17 g topljenca Tris in ga raztopili v 350 ml Milli-Q vode. S pH-metrom smo uravnali pH raztopine na 8,8 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

- Priprava pufra za zbiralni gel: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8:

Zatehtali smo 6,06 g topljenca Tris in ga raztopili v 350 ml Milli-Q vode. S pH-metrom smo uravnali pH raztopine na 6,8 s HCl in nato z Milli-Q- vodo dopolnili do 500 ml.

3.1.3.1.4 Pufra za elektroforezo

- Priprava 1x elektroforeznega pufra:

Pripravili smo 10x elektroforezni pufer tako, da smo raztopili 30,30 g Tris, 144 g glicin in do 1000 ml dopolnili z Milli-Q vodo. 1x elektroforezni pufer smo pripravili iz 10x elektroforeznega pufra tako, da smo le-tega razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:9.

- Priprava 1x NaDS elektroforeznega pufra:

Pripravili smo 10x elektroforezni pufer tako, da smo raztopili 30,30 g Tris, 144 g glicin, 10 g 10 % (w/v) NaDS in do 1000 ml dopolnili z Milli-Q vodo. 1x NaDS elektroforezni pufer smo pripravili iz 10x NaDS elektroforeznega pufra tako, da smo le-tega razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:9.

3.1.3.1.5 Nanašalna pufra za elektroforezo

- Priprava nanašalnega pufra za nativno elektroforezo:

5,55 ml Milli-Q vode

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

2,5 ml glicerola

0,2 ml 0,5 % (w/v) bromfenol modro

- Priprava nanašalnega pufra za NaDS-elektroforezo:

5,55 ml Milli-Q vode

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

2,5 ml glicerola

0,2 ml 0,5 % (w/v) bromfenol modro

2,0 ml 10 % (w/v) NaDS

3.1.3.2 Fluorogeni substrati

3.1.3.2.1 Priprava fluorogenih substratov in raztopin za analizo aminopeptidazne aktivnosti s cimografijo

Preglednica 6: Fluorogeni substrati (proizvajalca Biosynth) za cimografijo in njihove molske mase v g/mol

Substrat	Molska masa (g/mol)
PHE-AMC	436,38
N- α -benzoyl-Arg-AMC	658,15
GLU-AMC	304,30
GLY-AMC	313,15
TRP-AMC	397,86
ALA-AMC	360,29
MET-AMC	420,40
LYS-AMC	363,40

Vse fluorogene substrate smo pripravljali tako, da smo jih raztopili v 100 % DMSO do koncentracije 100 mM. Tako pripravljene raztopine fluorogenih substratov smo do uporabe shranili na -20 °C.

V pufre, katerih priprava je opisana pod točko 3.1.3.1.2, smo dodali fluorogene substrate raztopljene v DMSO, da je bila njihova končna koncentracija 0,1 mM.

Za analizo aminopeptidazne aktivnosti smo dodali v raztopine posamezne substrate ali zmes substratov.

Različice raztopine, ki smo jih uporabljali za analize aminopeptidazne aktivnosti:

- V 30 ml ustreznegra pufra (točka 3.1.3.1.2) smo dodali 0,030 ml 100 mM posameznega fluorogenega substrata (preglednica 6), da je bila njihova končna koncentracija 0,10 mM.
- V 30 ml ustreznegra pufra (točka 3.1.3.1.2) smo dodali 100 mM: 0,015 ml PHE-AMC; 0,015 ml LYS-AMC; 0,015 ml ALA-AMC, da smo dobili mešanico fluorogenih substratov. Končna koncentracija vsakega od aminopeptidaznih substratov v mešanici je bila 0,05 mM.
- V 30 ml ustreznegra pufra (točka 3.1.3.1.2) smo, poleg mešanice substratov iz točke b, dodali še 0,030 ml 100 mM N- α -benzoyl-Arg-AMC, do končne koncentracije 0,10 mM.

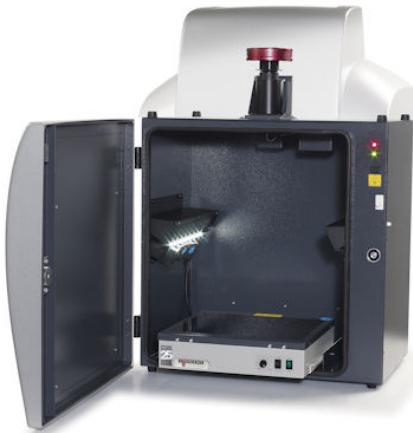
3.1.4 Aparature

3.1.4.1 Elektroforezni sistem

Elektroforezo smo izvajali z aparaturom Mini-Protean 3, proizvajalca Bio-Rad.

3.1.4.2 Kamera za slikanje in dokumentiranje gelov

Uporabljali smo kamero CAM-GX-CHEMI HR sistem, proizvajalca Syngene v Laboratoriju za proteomiko na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.



Slika 3: Kamera CAM-GX-CHEMI HR sistem, proizvajalec Syngene (Syngene, 2011)

3.1.4.3 Spektrofotometer

Za določanje koncentracije proteinov smo uporabljali spektrofotometer znamke Hewlett packard, ZDA model 8453 in polistirenske kivete širine 1cm.

3.1.4.4 Druge aparature in ostali laboratorijski pribor

Aparature: centrifuga, grelna kuhalna plošča, hladilnik, skrinja, stresalnik, mešalo, pH-meter, tehtnica, sušilnik.

Laboratorijski pribor: mikrocentrifugirke, epruvete, pipete, terilnica, pestič, erlenmajerica, čaša, bučka, centrifugirke.

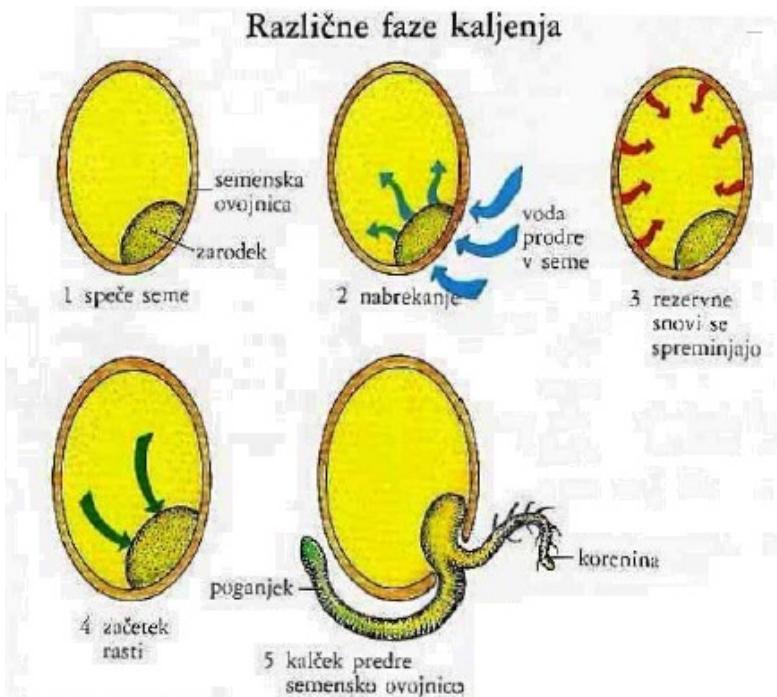
3.2 METODE

3.2.1 Izvedba procesa kaljenja

Poznamo različne vrste kaljenja: kaljenje v kozarcih za vlaganje, kaljenje v skledi ali plastičnem cedilu, kaljenje v zračenem valju, kaljenje v kalilnikih, kaljenje na pladnju, kombinirano kaljenje v kozarcu in na pladnju, kaljenje na splavu, kaljenje v lončenih podstavkih, kaljenje na brisači, prosto improvizirano kaljenje, kaljenje pod obtežitvijo (Cortese, 2009).

Odločili smo se za kaljenje v skledi ali plastičnem cedilu. Vsa uporabljena semena smo preko noči (približno 10 ur) namočili v vodovodni vodi. Odcejena semena smo pretresli na perforiran PVC (polivinil klorid) krožnik. Luknjice, ki smo jih naredili s šilom, so omogočale odtekanje vode. Krožnik s semenami smo prenesli na košček vpojne pomivalke, položen na drug plastičen krožnik.

Krožnike s semenami smo pokrili z listi papirja in tako upočasnili izhlapevanje. Kalitev semen je potekala pri sobni temperaturi ($20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na vsakih 8 ur smo kaleča semena spirali z večjo količino vodovodne vode, da bi se izognili bakterijski okužbi in izsušitvi semen. Kalčke smo vzorčili po dveh do treh dneh od takrat, ko smo končali z namakanjem.



Slika 4: Različne faze kaljenja (Fink, 1993)

3.2.2 Vzorčenje

Po končani kalitvi smo kalčke vzorčili. Za različne analize smo uporabili celotne kalčke, ali posamezne dele kalčkov.

Pri ločenem vzorčenju smo kalček razdelili na dva dela. Ločeno smo zbirali dele kalčka, ki so prebili semensko ovojnico (poganjek in korenina) ter dele kalčka, ki so ostali znotraj semenske ovojnice (klični list in endosperm). Vzorčili smo v paralelkah.

3.2.3 Homogenizacija rastlinskega materiala in priprava ekstraktov

S homogenizacijo in pripravo ekstraktov želimo izločiti iz celice ali celičnih komponent proteine v topni obliki.

Postopek priprave ekstraktov:

V terilnico smo nalili (približno 0,3 g) tekoči dušik in vanjo stresli stehtane vzorce. Vzorce smo štirikrat prelili s tekočem dušikom in jih trli s pestičem, da smo dobili fin prah. Prahu smo dodali 0,2 g polivinilpirolidona (PVP) in vse skupaj premešali. Nato smo na vzorec prelili samo ohlajen ekstrakcijski pufer 50 mM Tris-HCl, pH=7,0 (razmerje: 1 g rastlinskega materiala : 5 ml 50 mM Tris HCl s pH =7,0), ali pa smo le temu dodali še reducent β - merkaptoetanola (7 μ l β -merkaptoetanola/10 ml 50 mM pufra). Suspenzijo smo premešali in jo 1 ml odpipetirali v centrifugirke in centrifugirali 15 min na 13200 g v centrifugi, ohlajeni na 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant ločili od usedline in naredili paralelke za nadaljnjo uporabo. Zamrznili smo jih v tekočem dušiku in jih shranili na -80 °C.

3.2.4 Cimografija

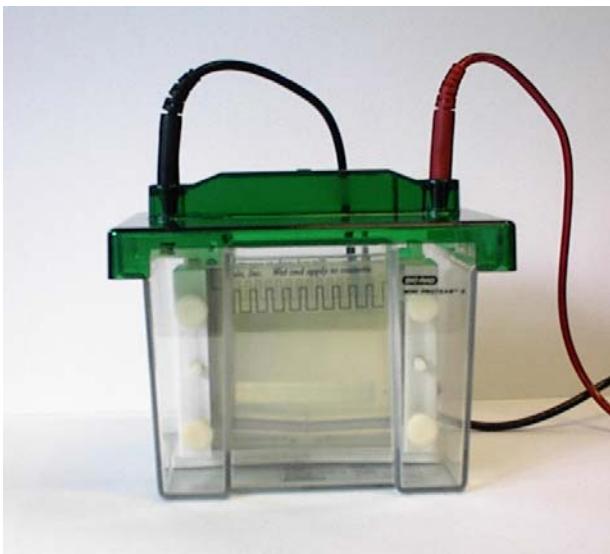
Cimografija je metoda, ki jo izvedemo v dveh korakih. Vključuje ločevanje proteinov z elektroforezo, nato sledi analiza encimskih aktivnosti v gelu. Je učinkovita metoda za ločevanje in detekcijo encimov v encimsko aktivnih bioloških vzorcev (Kaberdin in McDowall, 2003).

3.2.4.1 Priprava gelov za nativno elektroforezo

Z etanolom smo dobro obrisali stekelca in jih vpeli na nosilce za vlivanje gelov. V 50 ml centrifugirki smo najprej pripravili raztopino za ločevalni gel (preglednica 7), dobro premešali in ga s pipeto po robu med obema stekelcema počasi ulivali do primerne višine plošč. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo dolili mili Q vodo, da se je izravnala linija gela in da se gel ni osušil in popokal. Skupaj z nosilci in stekelci smo pokrili z aluminijasto folijo in pustili na sobno temperaturi 1 uro. Po eni uri smo odlili vodo med stekelcema. Nato smo si pripravili mešanico za zbiralni gel (preglednica 7), zopet dobro premešali in vlili do vrha stekelc nad ločevalni gel. V zbiralni gel smo takoj namestili glavničke in pazili, da se pod zobec glavnička niso ujeli mehurčki zraka. Počakali smo vsaj 1,5 h, da je gel polimeriziral.

Preglednica 7: Spojine za pripravo gelov za nativno elektroforezo

Spojine	4 % zbiralni gel	8 % ločevalni gel
	Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Pufer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Mili Q voda	6,2 ml	4,8 ml
Pufer	2,5 ml	2,5 ml
Akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	1,3 ml	2,7 ml
10 % (w/v) APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,005 ml



Slika 5: Aparatura za elektroforezo MiniProtean II.

3.2.4.2 Nativna elektroforeza

Ko so geli polimerizirali, smo odstranili glavnice in v prazne žepke nanesli 1x nativni elektroforezni pufer. Vzorce smo odtalili in zmešali z nanašalnim pufrom (točka 3.1.3.1.5) v razmerju 1:1. Vzorce smo nato nanašali v žepke za nanos vzorca na vrhu gela. Po končanem nanosa smo v elektroforetsko posodo nalili 1x elektroforezni pufer s pH = 8,3, pri katerem je večina proteinov negativno nabita in potujejo proti anodi. Celotno kadičko smo potopili v led in elektrodi priklopili na vir napetosti približno 200 V in na konstanten tok 25 mA/gel.

V električnem polju vsak protein potuje z njemu lastno elektroforetsko mobilnostjo, vendar počasneje od nanašalnega pufra z barvilm bromfenol modro, saj nam le-ta kaže fronto in pomaga ugotoviti kdaj proteini končajo potovanje po gelu in s tem nam naznani, kdaj lahko zaključimo z elektroforezo. Ponavadi je nanašalni pufer zapustil gel po 30 minutah, elektroforezo pa smo prekinili 5 minut kasneje, da so se posamezne proteaze med seboj dovolj dobro ločile, kar nam je omogočilo lažjo analizo gela z računalniškim programom.

3.2.4.3 Analiza nativnih poliakrilamidnih gelov

Po izteku elektroforeze smo gel dali v kadičko s 30 ml 250mM Tris-HCl, pH 7,0 s 500 mM DTT in stresali na sobni temperaturi na stresalniku Labnet GYROTWISTER pri 50 obratih/minuto 10 minut.

Nato smo izvajali številna testiranja aminopeptidazne aktivnosti z različnimi pufri za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2) in fluorogenimi substrati, tako posameznimi kot tudi v mešanici le-teh (točka 3.1.3.2.1).

Vsa testiranja aminopeptidazne aktivnosti smo izvajali tako, da smo gel inkubirali s substratom 10 minut. Izvajali smo posamezno in zaporedno barvanje gelov. Pri zaporedni inkubaciji smo med analizami gel spirali 30 minut v Milli-Q vodi.

Po končani inkubaciji smo gel prenesli v UV trasiluminator in nastavili parametre zajemanja podatkov z CAM-GX-CHEMI HR sistemom.

Nastavitve:

- Eksitacija: EPI long wave UV
- Emisijski filter: Short wave band
- Resolucija zajemanja podatkov: 5,5 mega pikslov
- Zaslonka: 1.2
- Zoom: 12,6
- Fokus: 130
- Čas zajemanja podatkov: 5 sekund, 10 sekund, 20 sekund

Ostalih nastavitev med analizami nismo spremajali. V nadalnjih točkah so opisani podrobnejši postopki analiz.

3.2.4.3.1 Analiza aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi fluorogenimi substrati v prisotnosti reducenta DTT

Za analizo substratne specifičnosti smo v pufer za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 b) dodali posamezne fluorogene substrate raztopljene v DMSO kot je opisano v točki 3.1.3.2.1 a.

3.2.4.3.2 Analiza metaloproteaz z inhibitorjem EDTA in v prisotnosti Ca^{2+} in Zn^{2+} ionov

Za določanje metaloproteaz smo uporabljali različne pufre za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 b, i, j, k) z reducentom 500 mM DTT in dodanimi fluorogenimi substrati (točka 3.1.3.2.1 b, c).

3.2.4.3.3 Analiza serinskih proteaz z inhibitorjem PMSF

Za določanje serinskih proteaz smo porabljali različnimi pufre za testiranje encimske aktivnosti (točka 3.1.3.1.2 d, e, f, g, h) in z dodanimi fluorogenimi substrati (točka 3.1.3.2.1 b, c).

Uporabljali smo dva načina analiz serinskih proteaz:

- 100 mM PMSF raztopljen v etanolu

Po končani elektroforezi smo gel spirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 e) 30 minut. Nato smo gel inkubirali v raztopini: 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 in zmes fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c), kateremu smo dodali 0,3 ml 100 mM PMSF raztopljenega v etanolu. Po 10 minutah inkubiranja smo gel slikali in ga nato ponovno spirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 d) 20 minut. Po preteklem času smo gel inkubirali v 250 mM Tris-HCl, pH 7,0 in zmesi fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c).

Vzporedno smo izvajali tudi kontrolo, pri katerem je postopek enak zgornjemu, le da smo uporabljali etanol brez PMSF.

- 250 mM PMSF raztopljen v DMSO

V tej točki smo izvajali dve različni analizi.

V prvem postopku smo postopali enako kot pri 100 mM PMSF raztopljenemu v etanolu, le da je DMSO zamenjal etanol.

V drugem postopku pa smo izvajali tako, da smo k vzorcem ekstrakta pred elektroforezo dodali 0,01 ml 250 mM PMSF raztopljen v 100 % DMSO v drugo paralelko, pa smo dodali samo 0,01 ml 100 % DMSO. Tako pripravljene vzorce ekstraktov smo nanesli na en gel, na drug gel pa ekstrakte z DMSO, ki so nam je služili kot kontrola. Pred začetkom nanašanja vzorcev na gele smo počakali 30 minut, da je potekla kovalentna vezava PMSF na serinske proteaze.

Po končani elektroforezi smo gele inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c).

3.2.4.3.4 Analiza cisteinskih proteaz z aktivatorjem DTT in inhibitorjem IA

K vzorcem ekstrakta smo pred elektroforezo dodali 0,025 ml 500 mM IA, v drugo paralelko pa smo dodali samo 0,025 ml Milli-Q vode. Tako pripravljene vzorce ekstraktov smo nanesli na en gel, na drug gel pa ekstrakte z Milli-Q vodo, ki nam je služil kot kontrola. Pred začetkom nanašanja vzorcev na gele, smo počakali 30 minut, da se je IA kovalentno vezal na cisteinske aminokislinske preostanke.

Po končani elektroforezi smo gele inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c). Po slikanju gela smo le-tega spirali 30 minut v Milli-Q vodi in ga ponovno inkubirali v pufru (točka 3.1.3.1.2 a) z mešanico fluorogenih substratov (točka 3.1.3.2.1 c) z dodatkom 500 mM DTT.

3.2.4.4 NaDS elektroforeza

Pri tej vrsti elektroforeze smo v 10x elektroforezni pufer dodali 10 % NaDS (5,0 g), prav tako smo 10 % NaDS dodali v raztopino za pripravo gelov (0,1 ml) in v pufer za nanos vzorca (2,0 ml).

Pri tej vrsti elektroforeze se proteini zaradi prisotnosti NaDS denaturirajo. Negativno nabiti proteini se v električno nabitem polju premikajo proti pozitivno nabiti anodi. Vsi proteini imajo zaradi NaDS enako razmerje naboja: masa, zato se na gelu ločijo po velikosti.

3.2.4.4.1 Priprava gelov za NaDS-elektroforezo

Pri pripravi gelov za to vrsto elektroforeze smo postopali isto kot pri pripravi gelov za nativno elektroforezo (postopek opisan v točki 3.2.4.1), s to razliko, da smo v 8 % ločevalni in 4 % zbiralni gel dodali še 0,1 ml 10 % (v/w) NaDS reagenta, ki je denaturant.

Preglednica 8: Spojine za pripravo gelov za NaDS-elektroforezo

Spojine	4 % zbiralni gel	8 % ločevalni gel
	Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Pufer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Mili Q voda	6,1 ml	4,7 ml
Pufer	2,5 ml	2,5 ml
Akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	1,3 ml	2,7 ml
10 % (w/v) NaDS	0,1ml	0,1ml
10 % (w/v) APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,005 ml

3.2.5 Določanje vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih po Bradfordovi metodi

Uporabili smo enostavno in natančno metodo za kvantitativno določanje proteinov z reagentom proizvajalca Bio-Rad. Metoda temelji na vezavi barvila Coomasie Brilliant Blue G-250 pri nizkem pH na bazične in aromatske aminokislinske ostanke proteinov v vzorcu, predvsem na arginin manj na lizin in histidin (Drobnič-Košorok, 1997). Pri tem pride do premika valovne dolžine absorpcijskega maksimuma barvila od 465 nm na 595 nm. Kompleks barvilo - protein, ki nastane med reakcijo, je obstojen le v določenem časovnem intervalu (30 minut), mi pa smo meritve naredili 10 minut po dodatku reagenta.

Postopek:

Najprej smo reagent Bio-Rad razredčili z Milli-Q vodo v volumskem razmerju 1:4. Nato smo tako razredčeno raztopino filtrirali.

Pripravili smo umeritveno krivuljo, s pomočjo katere določujemo koncentracijo proteinov v vzorcu (mg/ml). To smo naredili iz raztopin govejega serumskega albumina (BSA) s koncentracijami v območju 0,2-1,0 mg/ml. Pri izračunu vsebnosti proteinov v rastlinah, ki smo jih izrazili kot maso proteinov na suho snov rastlin, smo upoštevali način priprave ekstraktov (razredčitve).

Vzorce smo odmrznili in premešali na vrtinčniku. Za en vzorec smo potrebovali tri epruvete, v kateri smo najprej vzorec razredčili na petkratno razredčitev (0,5 ml vzorca + 2 ml 50 mM Tris-HCl-ekstrakcijski pufer) in premešali na vrtinčniku. Potem smo iz te epruvete po trikrat odpipetirali 0,025 ml razredčenega vzorca in dodali 1,25 ml razredčenega Bio-Rad reagenta ter vse skupaj dobro premešali na vrtinčniku. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo izmerili absorbanco pri 595 nm proti slepemu vzorcu, kjer je bila namesto ekstrakta destilirana voda.

3.2.6 Stabilnost shranjenih ekstraktov

Za preverjanje stabilnosti ekstraktov smo naredili poskus tako, da smo po ekstrahiranju kalčka in semena skupaj odpipetirali v mikrocentrifugirke 4 paralelke po 20 µl. Eno paralelko smo zamrznili na -80 °C, ta nam je služila za kontrolo. Drugo paralelko smo dali v skrinjo na -20 °C za 10 dni. Tretjo paralelko smo dali za 24 h v hladilnik. Četrto paralelko pa smo za 24 h dali na sobno temperaturo. Po 24-ih urah smo naredili nativno elektroforezo in opazovali ali se ekstraktom istih rastlin po shranjevanju na določeni temperaturi spreminja aminopeptidazna aktivnost.

3.2.7 Določanje vsebnosti vode

Vsebnost vode smo določali v kalčku, endospermu, kalčku in endospermu skupaj, listu in koreninah. Te dele rastlin smo zatehtali v predhodno stehtano mikrocentrifugirko. Tako smo določili maso svežih delov rastlin (s.m.). Nato smo odprli zamaške na mikrocentrifugirkah in jih dali sušit v sušilnik znamke Memmert na 105 °C za 3 h do konstantne mase. Po končanem sušenju smo mikrocentrifugirko ponovno stehtali, ter tako določili suho snov (s.s.). Vsebnost vode smo izračunali s pomočjo enačbe (1):

VV =  .100%

... (1)

VV: vsebnost vode

s.m.: mokra snov

s.s.: suha snov

3.2.8 Izpostavitev listov rastlin mehanskemu stresu

Rastlinski material smo ponovno posadili po že opravljenih ekstrakcijah. Ker smo imeli probleme z rastjo pri brokoliju in zelju, smo naknadno posadili kultivar teh dveh (brokoli: Marathon F1, proizvajalec: Vrtnarstvo Škofic in zelje: Nozomi F1 (zgodnji), proizvajalec: Vrtnarstvo Škofic. Za preverjanje vpliva stresa, smo liste odraslih rastlin ranili s smirkovim papirjem dimenzijske P120. Rastline smo potem zalili in jih pustili rasti na sobni temperaturi. Po dveh dneh smo poškodovane liste vzorčili in analizirali na prisotnost aminopeptidaz. Pri zelju je bilo zelo malo materiala, oziroma pravi listi so slabo rastli, zato smo se odločili za ekstrakcijo direktno v mikrocentrifugirki, kjer je bil vzorec zatehtan. Tako smo tekoči dušik vlivali v mikrocentrifugirko in nato trli zmrznen material s stekleno palčko. Vsi nadaljnji postopki so enaki kot pri običajni ekstrakciji.

Vpliv stresa na aminopeptidazno aktivnost smo preverjali z nativno elektroforezo, prav tako smo proteine kvantitativno ovrednotili z določanjem po Bradfordu (postopek opisan v točki 3.2.5).

4 REZULTATI

Eksperimentalni del diplomske naloge je temeljal na študiju aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih pripravljenih iz kalčkov in listov rastlin s cimografijo. V prvi fazi smo določali aminopeptidazno aktivnost v nekaterih križnicah in travah, nato smo se na osnovi preliminarnih rezultatov odločili, da bomo podrobnejše analizirali aminopeptidazno aktivnost brokolija, redkve in belega zelja. Aminopeptidazno aktivnost, v izbranih delih kalčka ter v listih odrasle rastline, smo ovrednotili tako s posameznimi substrati kot z mešanico substratov. Z uporabo različnih inhibitorjev in aktivatorjev smo poskusili kategorizirati posamezne aminopeptidaze. Preverili smo še vpliv mehanskega stresa na posamezno aminopeptidazno aktivnost. Določili smo koncentracijo proteinov v ekstraktih in ugotavljali vpliv različnih pogojev shranjevanja na stabilnost aminopeptidaz v ekstraktih.

Cimografija, kot metoda določevanja encimske aktivnosti, je že dodobra uveljavljena. Kljub širokim možnostim, ki jih ponuja, je opisanih le nekaj primerov njene uporabe v fizioloških študijah in študijah karakterizacije encimov. Pričujoča diplomska naloga je le en od poskusov v smeri tovrstnih raziskav. Vsi rezultati cimografskih analiz v nalogi so tako zgolj kvalitativne narave in so zato rezultati podani kot število aminopeptidaz, ki smo jih določili pri posameznih pogojih.

4.1 DELEŽ SUHE SNOVI TER VSEBNOST PROTEINOV IN AMINOPEPTIDAZNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZ KALČKOV IN LISTOV BROKOLIJA, REDKVE IN BELEGA ZELJA

Posamezni deli rastline in kalčka se razlikujejo v vsebnosti suhe snovi in proteinov. Ker smo vse ekstrakte pripravljali na enak način (enako razmerje med ekstrakcijskim pufrom in maso kalčka/ ali dela odrasle rastline), je bilo potrebno določiti delež suhe snovi in koncentracijo topnih proteinov v ekstraktu. Večja koncentracija topnih proteinov pogostokrat pomeni tudi višjo vsebnostjo encimov v ekstraktu.

4.1.1 Vsebnost suhe snovi in topnih proteinov v delih kalčka in odrasle rastline

Preglednica 9: Vsebnost suhe snovi, deleža topnih proteinov v suhi snovi in koncentracije proteinov v ekstraktu za posamezne dele kalčka in odrasle rastline

Vzorci	γ topnih proteinov (mg/ml)	% SS	% topnih proteinov / SS
BROKOLI poganjek in korenina kalčka skupaj	1,00	16,4	3,55
BROKOLI klični list in endosperm	2,19	56,4	2,11
BROKOLI celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	2,03	38,7	2,94
BROKOLI list odrasle rastline	*	*	*
BROKOLI list odrasle rastline pod stresom	2,90	*	1,45 **
BROKOLI korenina odrasle rastline	*	13,5	*
REDKEV poganjek in korenina kalčka skupaj	0,75	11,8	3,72
REDKEV klični list in endosperm	2,30	49,5	2,55
REDKEV celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	1,46	37	2,23
REDKEV list odrasle rastline	1,93	23,1	4,81
REDKEV list odrasle rastline pod stresom	0,89		
REDKEV korenina odrasle rastline	0,32	3,9	4,85
ZELJE poganjek in korenina kalčka skupaj	1,50	21,6	4,01
ZELJE klični list in endosperm	2,79	60,9	2,47
ZELJE celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	2,31	36,4	3,58
ZELJE list odrasle rastline	1,41	*	0,76**
ZELJE list odrasle rastline pod stresom	0,77	*	0,38**
ZELJE korenina odrasle rastline	0,19	5,6	2,01

* ni podatka zaradi pomanjkanja rastlinskega materiala / ** izračun % topnih proteinov/mokro snov

Primer izračuna koncentracije topnih proteinov (γ) je prikazana v prilogi C.

Iz rezultatov prikazanih v preglednici 9 je razvidno, da je v vseh vzorcih najmanjši delež suhe snovi v koreninah odraslih rastlin (od 3,5-13,5 %). Največji delež, od 49,5-60,9 %, suhe snovi smo v vseh primerih določili za razvijajoči kalček, kar je razumljivo, saj ima tu shranjene zaloge hranič za rast in razvoj. V skupnem vzorcu poganjka, smo določili manjšo vsebnost suhe snovi, glede na klični list in endosperm kalčka. V primerjavi med korenino odrasle rastline ter poganjka in korenine kalčka, opazimo, da je pri brokoliju suha snov v

poganjku in korenini kalčka le nekoliko višja, v vzorcih redkve trikrat višja, v vzorcih belega zelja pa kar štirikrat višja.

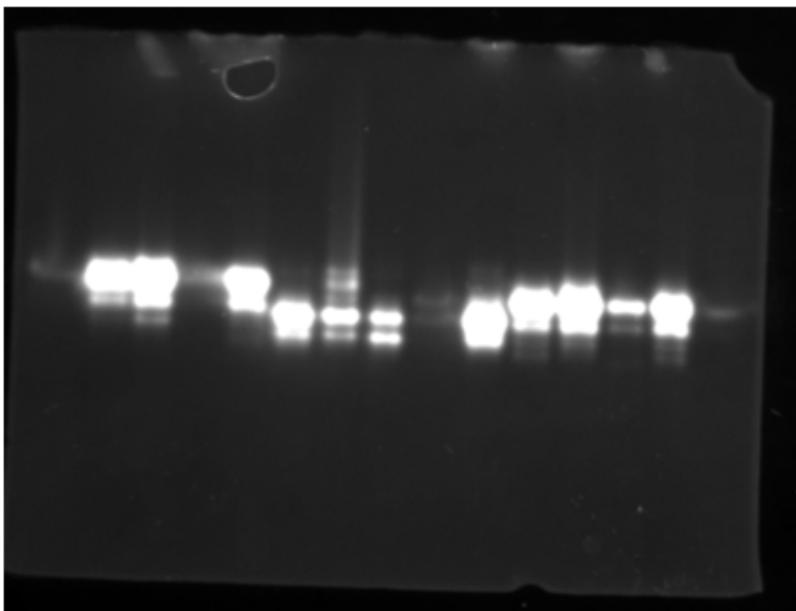
V ekstraktih delov rastlin, kjer je večji delež suhe snovi, smo določili tudi večjo vsebnost topnih proteinov. Povezava pa ni linearна, saj v ekstraktih kličnih listov in endosperma nismo določili tolikokrat večjo vsebnost proteinov, kolikokrat je večja vsebnost suhe snovi, v primerjavi z ekstrakti poganjkov in korenin kalčka. Najverjetneje je delež topnih proteinov v delu kalčka, ki služi kot vir hrani za razvijajočo rastlino, manjši.

4.1.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z izbranimi substrati v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

V nadaljevanju bodo prikazani rezultati cimografskih analiz aminopeptidazne aktivnosti s posameznimi substrati (Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC, N- α - benzoyl-Arg-AMC) v izbranih ekstraktih posameznih delov rastlin (poganjek in korenino kalčka, klični list in endosperm, korenina in list odrasle rastline).

4.1.2.1 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti s Phe-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



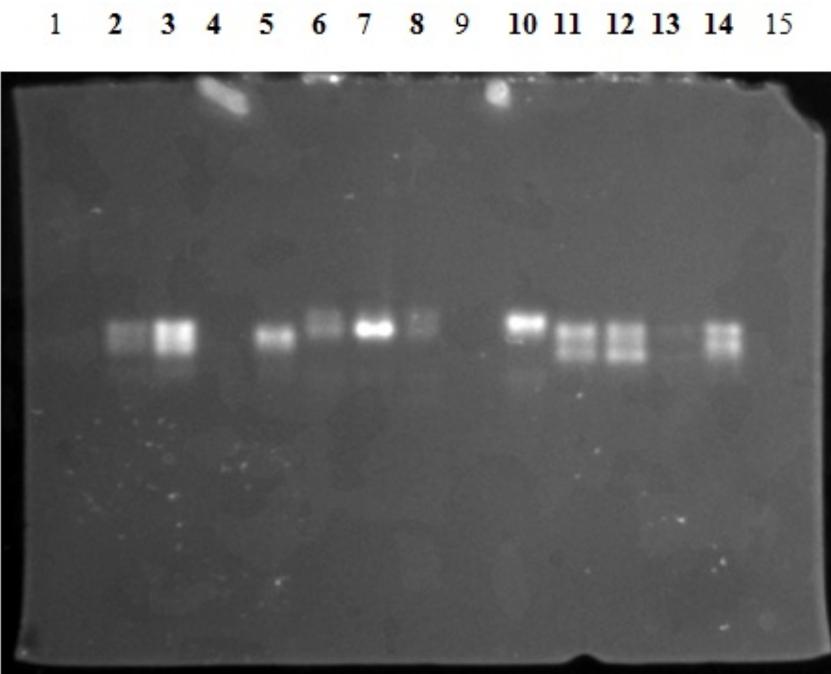
Slika 6: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Phe-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 11), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 12), korenine odrasle rastline (4, 8, 13) in liste odrasle rastline (5, 10, 14). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 6 je razvidno, da je v koreninah odraslih rastlin brokolija (4) najmanjša Phe-AMC aminopeptidazna aktivnost, kar se sklada s podatki v preglednici 9, da je v tem ekstraktu najmanjša koncentracija proteinov, in da je vsebnost vode v koreninah večja kot v ostalih analiziranih delih rastlin. Primerjalna analiza pokaže, da v kličnih listih in endospermu (3) zaznamo tri aminopeptidaze, ki razgrajujejo Phe-AMC, medtem ko v poganjku in korenini kalčka (2) določimo le dve, saj s cimografijo nismo zaznali aminopeptidaze z največjo mobilnostjo. Dodatno lahko trdimo, da je vzorcih 3 in 5 precej večja koncentracija aminopeptidaze s srednjo mobilnostjo kot v vzorcu 2.

Aminopeptidazna aktivnost v ekstraktih redkve je zelo odvisna od analiziranega dela rastline. Pri vzorcih ekstraktov 6, 8 in 10 lahko vidimo, da se med seboj razlikujejo predvsem v koncentracijah dveh aminopeptidaz, ki lahko razgrajujeta Phe-AMC. Izstopa zgolj vzorec 7 kjer je vsebnost aminopeptidaze z največjo mobilnostjo najmanjša, ugotovljeni pa sta najmanj dve aminopeptidazi z manjšo mobilnostjo, ki sta prisotni zgolj v tem ekstraktu.

Pri belem zelju se vzorci razlikujejo predvsem v koncentraciji aminopeptidaz. Najmanjša je v ekstraktu korenin odrasle rastline (13). V vseh vzorcih sta prisotni dve aminopeptidazi, od katerih ima aminopeptidaza z manjšo mobilnostjo večjo encimsko aktivnost. Podrobnejša analiza gelov razkrije, da sta v ekstraktu lista odrasle rastline (14) morda prisotni še dve aminopeptidazi s Phe-AMC specifičnostjo, ki imata večjo mobilnost in katerih aktivnost je tako majhna, da ju pri pogojih analize komaj zaznamo.

4.1.2.2 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Lys-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov



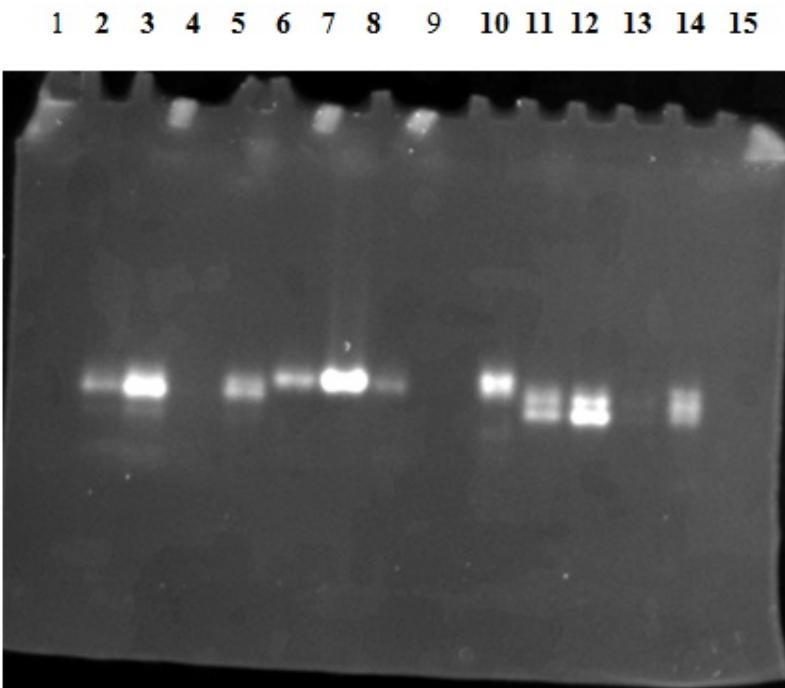
Slika 7: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Lys-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 11), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 12), korenine odrasle rastline (4, 8, 13) in liste odrasle rastline (5, 10, 14). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

Pri analizi aminopeptidazne aktivnosti na substrat Lys-AMC v ekstraktu poganjka in korenine (2) ter kličnega lista in endosperma (3) brokolija smo detektirali tri aminopeptidaze. V vzorcu 3 je koncentracija aminopeptidaz večja. V ekstraktu lista odrasle rastline (5) smo detektirali eno aminopeptidazo. Mobilnost te aminopeptidaze se razlikuje od mobilnosti aminopeptidaz, ki smo jih detektirali v ekstraktih kalčka (2, 3). V ekstraktu korenin odrasle rastline (4) nismo detektirali aminopeptidaz, kar se sklada z majhno koncentracijo proteinov v tem ekstraktu (preglednica 9).

Pri posameznih vzorcih redkve smo zaznali največ tri aminopeptidaze, ki razgrajujejo Lys-AMC. Aktivnost aminopeptidaze z največjo mobilnostjo, ki smo jo detektirali v vseh vzorcih je na meji detekcije. V ekstraktih poganjkov in korenin kalčka (6) ter korenin odrasle rastline (8) sta prisotni obe aminopeptidazi z manjšo mobilnostjo, vendar z majhno encimsko aktivnostjo. V ekstraktu kličnih listov in endosperma (7) smo detektirali le aminopeptidazo s srednjo mobilnostjo, pri listu odrasle rasline (10) pa le aminopeptidazo z najmanjšo mobilnostjo.

Pri posameznih vzorcih belega zelja smo zaznali največ dve aminopeptidazi, ki razgrajujeta Lys-AMC. V ekstraktu poganjka in korenini kalčka (11) ter kličnem listu in endospermu (12) smo detektirali dve aminopeptidazi z enako mobilnostjo in s podobno aktivnostjo. V ekstraktu lista odrasle rastline (14) smo ravno tako detektirali dve aminopeptidazi, vendar iz analize gela lahko opazimo, da je lisa aminopeptidaze z večjo mobilnostjo na drugem položaju kot encim, ki smo ga detektirali v ekstraktih kalčka. Encimska aktivnost v ekstraktu korenine (13) je na meji detekcije.

4.1.2.3 Cimografska analiza aminopeptidazne aktivnosti z Ala-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov



Slika 8: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Ala-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 11), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 12), korenine odrasle rastline (4, 8, 13) in liste odrasle rastline (5, 10, 14). Nanašali smo 7 µl ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

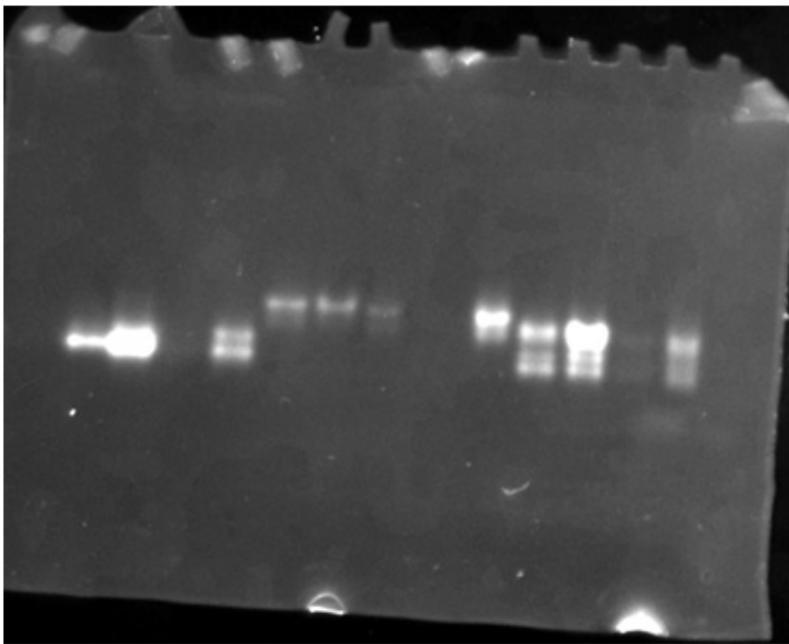
Analiza aminopeptidaz s substratom Ala-AMC je razkrila, da se posamezni vzorci zelo razlikujejo v koncentraciji encimov. Tri aminopeptidaze smo detektirali v ekstraktih kalčka brokolija (2). Največjo aktivnost smo določili za encim z najmanjšo mobilnostjo v ekstraktu endosperma in kličnega lista brokolija (3). Pri vzorcu lista odrasle rastline brokolija (5) opazimo, da je profil aminopeptidazne aktivnosti različen kot pri ekstraktih kalčka, saj encima z največjo mobilnostjo nismo zaznali. Možno pa je tudi, da je v ekstraktu odraslih listov prisotna še aminopeptidaza, z manjšo mobilnostjo kot so tiste v ekstraktih kalčka, vendar ni zadosti dobro ločena od aminopeptidaze z največjo aktivnostjo v omenjenem vzorcu, da bi lahko to nedvoumno potrdili.

Pri vseh ekstraktih redkve je bila ugotovljena zgolj ena aminopeptidaza, pri čemer je njena aktivnost večja pri poganjku in korenini kalčka (7) ter listu odrasle rastline (10). V ekstraktu lista odrasle (10) rastline smo detektirali še eno aminopeptidazo z večjo mobilnostjo, katere aktivnost pa je na meji detekcije.

Pri vseh vzorcih belega zelja smo zaznali tri aminopeptidaze, pri čemer je njuna koncentracija v kličnih listih in endosperma (12) največja. V tem vzorcu je tudi največja koncentracija topnih proteinov (glej preglednico 9).

4.1.2.4 Cimografska analiza peptidazne aktivnosti z N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Slika 9: Proteazna aktivnost na substrat N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih brokolija (2, 3, 4 in 5), redkve (6, 7, 8 in 10) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (2, 6, 11), klični list in endosperm skupaj (3, 7, 12), korenine odrasle rastline (4, 8, 13) in liste odrasle rastline (5, 10, 14). Nanašali smo 7 μ l ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

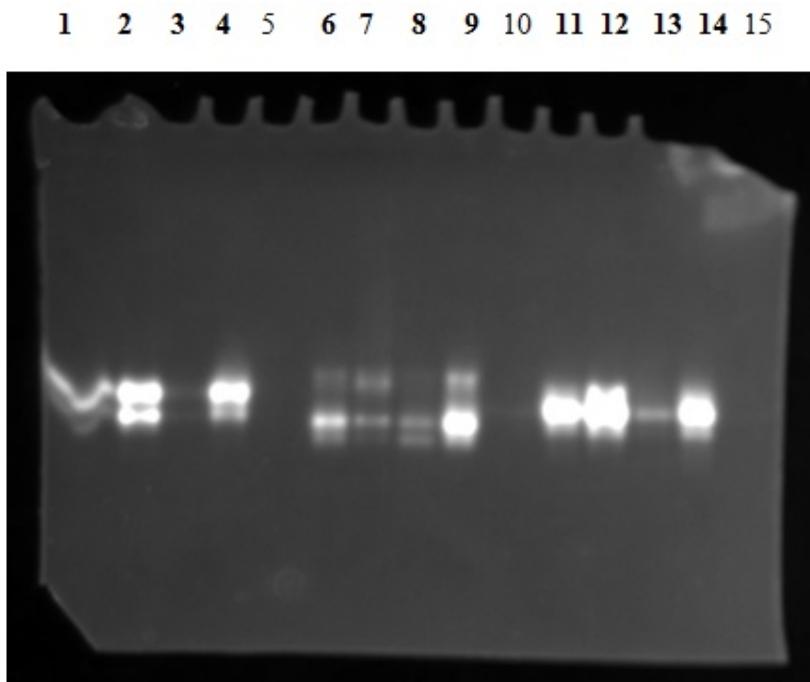
Proteazna aktivnost na substrat N- α -benzoyl-Arg-AMC v posameznih vzorcih brokolija se močno razlikuje. V kalčku smo detektirali le eno proteazo. Njena aktivnost je precej večja v ekstraktu kličnega lista in endosperma (3) kot v ekstraktu poganjka in korenine (2). V ekstraktu korenine odrasle rastline (4) s cimografijo nismo zaznali nobene proteaze, medtem ko smo v ekstraktih listov odrasle rastline (5) zaznali dve proteazi. Proteaze z večjo mobilnostjo je na enaki poziciji kot encim v obeh ekstraktih kalčka, vendar je njena aktivnost manjša. Proteaza, zaznana le v listih, pa ima manjšo elektroforetsko mobilnost.

V vseh ekstraktih redkve smo zaznali dve proteazi, od katerih ima encim z manjšo mobilnostjo večjo aktivnost. Od ostalih odstopa ekstrakt listov odrasle rastline (10), kjer je aktivnost proteaze z manjšo mobilnostjo precej večja kot pri drugih vzorcih.

V vseh ekstraktih belega zelja smo zaznali tri proteaze. Vsebnost posameznih encimov v analiziranih ekstraktih se močno razlikuje. V splošnem velja, da je v ekstraktih kalčkov

večja encimska aktivnost. Od ostalih odstopata predvsem ekstrakta kličnih listov in endosperma (12) ter korenine (13), saj smo v prvem določili največjo aktivnost vseh detektiranih proteaz, medtem ko so bile aktivnosti v ekstraktu korenine na meji detekcije za vse tri encime.

4.1.3 Cimografska analiza aminopeptidazne z mešanico substratov v ekstraktih pripravljenih iz posameznih delov kalčka in listov



Slika 10: Aminopeptidazna aktivnost na mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC Ala-AMC in proteazna aktivnost na N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih brokolija (1, 2, 3, 4), redkve (6, 7, 8, 9) ter belega zelja (11, 12, 13, 14). Pri vsaki rastlini smo analizirali poganjek in korenino kalčka skupaj (1, 6, 11), klični list in endosperm skupaj (2, 7, 12), korenine odrasle rastline (3, 8, 13) in liste odrasle rastline (4, 9, 14). Nanašali smo 7 μ l ekstraktov s polovično koncentracijo proteinov, ki so prikazane v preglednici 9.

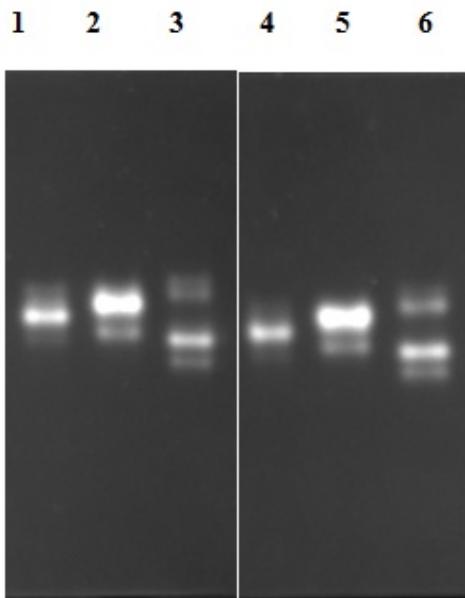
Rezultati analize ekstraktov z različnimi substrati so pokazali, da so v praktično vseh vzorcih prisotne aminopeptidaze, ki razgrajujejo Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in proteaze, ki razgrajujejo N- α -benzoyl-Arg-AMC. Izjema so nekateri ekstrakti korenin (brokoli in belo zelje pri proteazni aktivnosti na substrat Lys-AMC in Ala-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC), kjer nismo zaznali aktivnosti, kar je najverjetnejše posledica nizke koncentracija beljakovin ter posledično tudi encimov.

V nadaljevanju diplomske naloge smo poskusili določiti katalitičen tip posameznih aminopeptidaz in proteaz ter analizirati, kako mehanski stres vpliva na aktivnost encimov.

Če bi takšne študije izvajali z vsakim substratom posebej, bi število analiz preseglo predviden obseg diplomske naloge. Da bi poenostavili eksperimentalni postopek in zmanjšali število eksperimentov, smo v raztopino za analizo proteolitične aktivnosti dodali več različnih substratov. Rezultati proteolitične aktivnosti za posamezne ekstrakte brokolija, redkve in belega zelja so prikazani na sliki 10. Število lis, ki ustreza encimom, je v primeru uporabe mešanice substratov, praktično enako številu lis, ki smo jih določili s Phe-AMC. Izjema so nekateri ekstrakti redkve, kjer v mešanici zaznamo lise z majhno mobilnostjo, ki najverjetneje ustrezajo proteazi, ki hidrolizira z N- α -benzoyl-Arg-AMC. Da je število lis v ostalih primerih enako, lahko pripisemo široki substratni specifičnosti nekaterih aminopeptidaz, ki lahko razgrajujejo več substratov, kot so predhodno že opazili (Budić, 2009). V določenih primerih smo z mešanicami substratov določili manjše število lis kot pa z uporabo čistega substrata. Takšen rezultat je lahko posledica močno izražene aktivnosti različnih encimov s podobno mobilnostjo, kar v končni fazi odraža v »zlivanju« več šibkejših lis v eno močnejšo (npr. rezultati za belo zelje).

4.2 CIMOGRAFSKA ANALIZA KATALITIČNEGA TIPA AMINOPEPTIDAZ

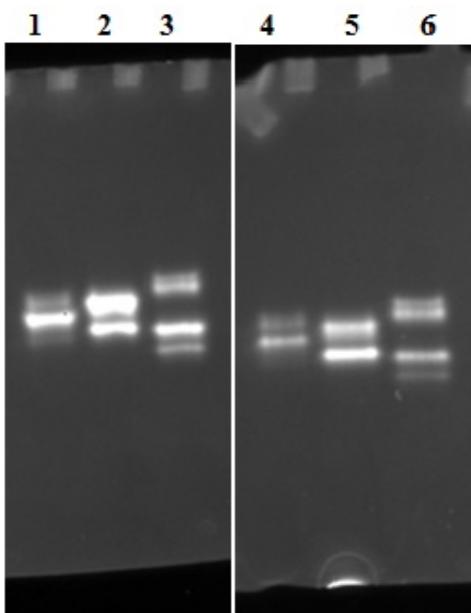
4.2.1 Vpliv jodoacetamida in reducenta DTT na aminopeptidazno aktivnost



Slika 11: Encimska aktivnost določena z mešanicami substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1,4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Encimska aktivnost v vzorcih 1-3 je bila določena v prisotnosti 5 mM DTT. Vzorcem 4-6 je bil pred nanosom na elektroforezni gel dodan jodoacetamid. Encimska aktivnost v vzorcih 4-6 je bila določena brez dodanega DTT.

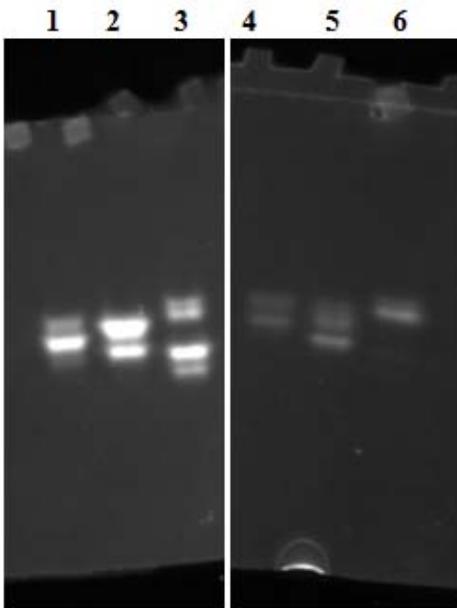
Z dodatkom DTT v pufer za določevanje encimske aktivnosti smo aktivirali cisteinske proteaze, ki bi se lahko inaktivirale med reakcijskim postopkom zaradi oksidacije aminokislino cistein, ki je v aktivnem mestu encima. Iz rezultatov prikazanih na sliki 11 je razvidno, da z dodatkom jodoacetamida, ki se irreverzibilno veže z aminokislino cistein, nismo vplivali na encimsko aktivnost. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da nobeden od encimov v analiziranih vzorcih, ki smo jih zaznali z uporabljenimi substrati, ni cisteinska proteaza.

4.2.2 Vpliv inhibitorja PMSF na aminopeptidazno aktivnost



Slika 12: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Vzorcem 1-3 je bil dodan pred nanosom DMSO (kontrola), vzorcem 4-6 smo pred nanosom na elektroforezni gel dodali v DMSO raztopljen PMSF. Encimska aktivnost vseh vzorcev je bila določena brez dodanega PMSF v reakcijski pufer.

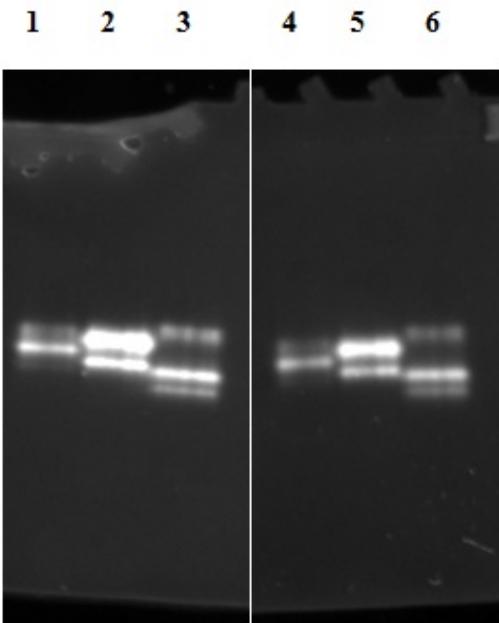
Iz rezultatov prikazanih na sliki 12 je razvidno, da PMSF, ki je irreverzibilni inhibitor serinskih proteaz, vpliva na aktivnost določenih encimov. V vzorcih belega zelja, brokolija in redkve, se je zmanjšala intenziteta lise, ki je v vsakem od analiziranih vzorcev najmočnejša. Sklepamo lahko, da je najmanj ena od aminopeptidaz v vzorcih serinska proteaza, ki jo inhibira PMSF. Ker se intenziteta ustreznih lis le zmanjša in še vedno določimo encimsko aktivnost inhibiranih encimov, je možno, da se na določen delež encimov v reakcijski mešanici PMSF ni irreverzibilno vezal.



Slika 13: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Vzorcem 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DMSO (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali v DMSO raztopljen PMSF.

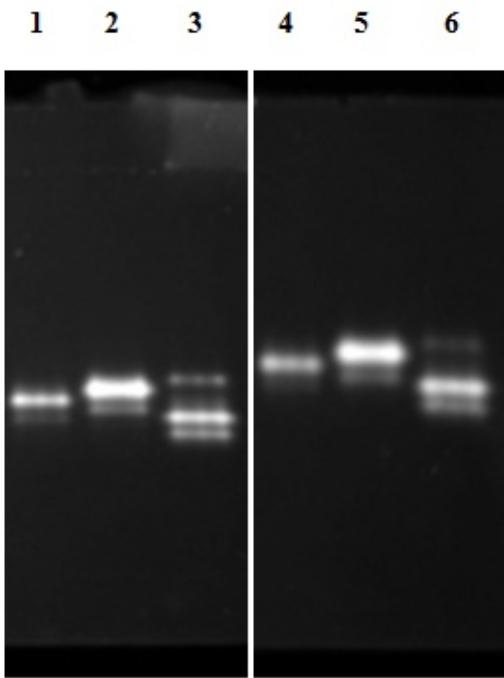
Primerjava rezultatov prikazanih na sliki 12 in 13 razkrije, da smo mnogo učinkoviteje inhibirali encime, če smo dodali PMSF v pufer za določevanje encimske aktivnosti, kot pa če smo »ireverzibilni« inhibitor dodali v vzorec pred elektroforezo. PMSF v reakcijskem pufru je inhibiral praktično vse encime, razen aminopeptidaze z najmanjšo mobilnostjo v ekstraktu belega zelja (1) in aminopeptidaze, ki ima drugo najmanjšo mobilnost v ekstraktu redkve (3). Posebej izrazita je inhibicija aminopeptidaz z največjo mobilnostjo v ekstraktih redkve (6), saj v tem primeru v prisotnosti PMSF nismo določili encimske aktivnosti.

4.2.3 Vpliv EDTA in kovinskih ionov na aminopeptidazno aktivnost



Slika 14: Encimska aktivnost določena z mešanicami substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih (poganjek in korenina kalčka skupaj) belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in kompleksant kovinskih ionov EDTA.

Dodatek EDTA v reakcijski pufer je le malo vlival na aminopeptidazno aktivnost. Iz rezultatov je razvidno, da intenziteta vseh lis v prisotnosti EDTA nekaj manjša kot brez dodanega EDTA. Zmanjšana aktivnost je lahko tudi posledica spiranja encimov iz gela, saj smo aminopeptidazno aktivnost določali zaporedno. Najprej smo analizirali aktivnost brez EDTA, potem smo sprali produkte reakcije in v drugem zaporednem barvanju gela določali encimsko aktivnost v prisotnosti EDTA. Seveda pa je tudi možno, da so kovinski ioni tako močno vezani v aktivno mesto encima, da jih z EDTA nismo mogli odstraniti. Posledično ne moremo zagotovo trditi, da kakšna od detektiranih aminopeptidaz ni metaloproteaza.

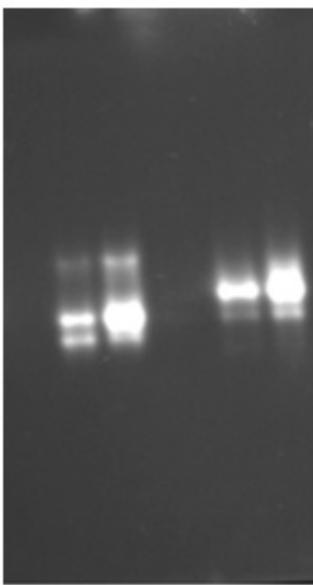


Slika 15: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in ZnCl₂.

Postopek izolacije in elektroforeza vzorcev bi lahko rezultirala v disociaciji kovinskih ionov od encimov. Če so takšni kovinski ioni ključni za encimsko aktivnost (metaloproteaze), po dodatku substrata, ne bi zaznali aktivnosti encima. V ta namen smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali še Zn²⁺ ione, ki so kofaktorji mnogih metaloproteaz. Primerjava intenzitete in števila lis razkrije, da po dodatku Zn²⁺ nismo detektirali novih encimov, ki bi bili lahko neaktivni zaradi morebitne disociacije kovinskega kofaktorja iz aktivnega mesta encima. Večjo difuznost lis pri cimogramu v prisotnosti Zn²⁺ ionov lahko pripisemo zaporednjemu barvanju.

4.3 VPLIV MEHANSKEGA STRESA NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST V LISTIH

1 2 3 4 5 6

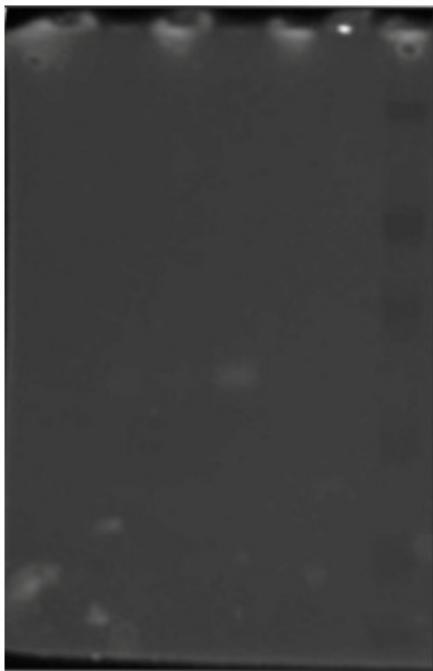


Slika 16: Encimska aktivnost v ekstraktih listov rastlin izpostavljenih mehanskemu stresu (2, 5) in kontrola (3, 6) za redkve (2, 3) in belo zelja (5, 6) določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in Met-AMC.

Liste odraslih rastlin redkve in zelenega zelja smo mehansko poškodovali (postopek opisan v poglavju 3.2.8) ter preverjali, ali stres vpliva na aminopeptidazno aktivnost. Iz analize rezultatov prikazanih na sliki 16 je razvidno, da v primeru stresa ne detektiramo novih aminopeptidaz. Aktivnost večine aminopeptidaz v stresiranih rastlinah je manjša kot v kontrolnih rastlinah, kar bi lahko pripisali prevelikim poškodbam tkiva, ki rezultirajo v zmanjšanju števila živih celic. Kot posledica mehanskega stresa se poveča edino aktivnost aminopeptidaze z največjo mobilnostjo v listnem ekstraktu redkve. Vpliv mehanskega stresa na aktivnost aminopeptidaz v listih brokolija nismo določali, saj nismo uspeli vzgojiti zadosti velikega števila rastlin, da bi lahko testirali vpliv mehanskega stresa.

4.4 VPLIV NATRIJEVEGA DODECILSULFATA NA DOLOČANJE AMINOPEPTIDAZNE AKTIVNOSTI S CIMOGRAFIJO

1 2 3 4 5 6

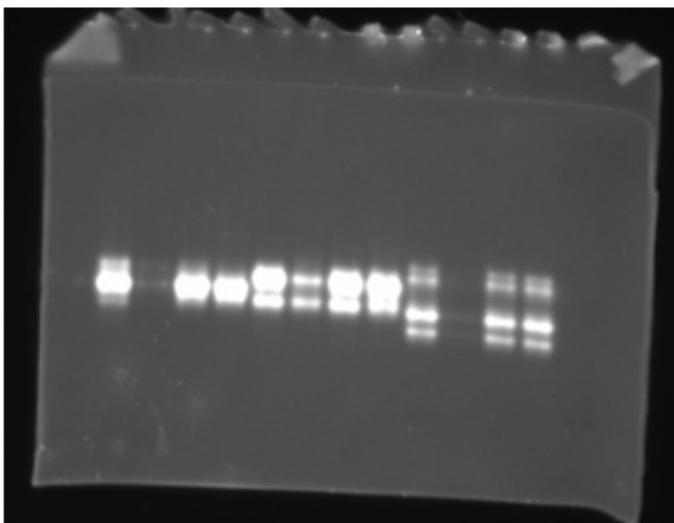


Slika 17: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov belega zelja (1, 2), brokolija (3, 4) ter redkve (5, 6). Vzorce smo pred nanosom na elektroforezni gel redčili z nanašalnim pufrom, ki je vseboval NaDS (1, 3, 5) in s pufrom, ki ni vseboval NaDS-a (2, 4, 6). Elektroforeza je potekala pri denaturirajočih pogojih v prisotnosti NaDS. Proteinine smo po končani elektroforezi in pred analizo encimske aktivnosti renaturirali s tritonom X-100.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 17 je razvidno, da NaDS, ki je denaturant, negativno vpliva na določeno encimsko aktivnost. Tudi dodatek tritona X-100, ki se uporablja za renaturacijo denaturiranih proteinov, ne rezultira v reaktivaciji aminopeptidaz. Od vseh analiziranih vzorcev smo določili sledi encimske aktivnosti ene od aminopeptidaz le za ekstrakt brokolija, kjer pa v nanašalni pufer nismo dodali NaDS (4). V primeru, ko smo ekstrakt brokolija pred nanosom razredčili s pufrom, ki je vseboval NaDS, encimske aktivnosti nismo določili (3). Aktivnost encima, ki smo ga zaznali v vzorcu 4, je tako najverjetnejše posledica nepopolne denaturacije encima, kot pa renaturacije aminopeptidaz po končani elektroforezi. Posledično NaDS elektroforeze ne moremo uporabiti za analizo encimske aktivnosti s cimografijo.

4.5 VPLIV SHRANJEVANJA EKSTRAKTOV NA AMINOPEPTIDAZNO AKTIVNOST DOLOČENO S CIMOGRAFIJO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Slika 18: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC v ekstraktih kalčkov belega zelja (2-5), brokolija (6-9) ter redkve (10-13). Ekstrakte kalčkov smo pred analizo encimske aktivnosti hranili 14 dni na -80 °C (2, 6, 10), 10 dni na -20 °C (3, 7, 11), 24 ur na +4 °C (4, 8, 12) in 24 ur na +20 °C (5, 9, 13).

Temperatura shranjevanja ima velik vpliv na stabilnost encimov v ekstraktih kalčkov belega zelja, brokolija in redkve. Aminopeptidaze so izjemno nestabilne, če ekstrakte shranjujemo na -20 °C, saj se aktivnost vseh encimov v ekstraktu brokolija močno zmanjša (7), oziroma v primeru belega zelja (3) ali redkve (11) praktično ne določimo več encimske aktivnosti. Kratkoročno shranjevanje pri +4 °C in +20 °C rezultira v manjšem zmanjšanju encimske aktivnosti. Po 24 urah shranjevanja na +20 °C določimo manjšo aktivnost aminopeptidaze v belem zelju z najmanjšo mobilnostjo (4) ter manjšo aktivnost aminopeptidaze z največjo mobilnostjo v ekstraktu brokolija (8). Kratkoročno shranjevanje pri sobni temperaturi ali v hladilniku le malo vpliva na aktivnost aminopeptidaz v ekstraktu redkve. Vse vzorce v katerih smo določevali aminopeptidazno aktivnost smo shranjevali na -80 °C, da bi v čim večji meri ohranili encimsko aktivnost.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Preliminarne analize aminopeptidazne aktivnosti smo izvedli na ekstraktih poganjkov in korenin kalčka različnih križnic in trav (redkev, zelje, brokoli, pira, oves, pšenica, riž). V ekstraktih vseh naštetih rastlin smo zaznali aminopeptidazno aktivnost. V svoj izbor smo vključili redkev, belo zelje in brokoli, katerih aminopeptidaze so imele veliko aktivnost ter so bile najbolj raznolike po elektroforetski mobilnosti. Primeri analiz z Gly-AMC, Met-AMC in Trp-AMC za piro in pšenico so prikazani v prilogi D, E in F.

V prvem delu eksperimentalnega dela smo dokazovali tudi učinek zaporednega barvanja z različnimi fluorogenimi substrati. Ker smo substrat dodali po elektroforezi, lahko isti gel analiziram z več različnimi substrati. Budič in sod. so metodo podrobno razdelali za določanje aminopeptidaz in optimizirali pogoje pri katerih se cimografija lahko uporabi za kvantitativno določanje aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih rastlin (Budič in sod., 2009).

Pri naših poskusih smo cimografijo pričela s Phe-AMC (slika 6), isti gel smo po inkubaciji spirali v destilirani vodi (priloga G), nato pa ga zopet analizirali z drugim substratom Lys-AMC (slika 7). Po enakem postopku smo postopali tudi pri drugem gelu, kjer smo najprej uporabili Ala-AMC (slika 8) in potem N- α - benzoyl-Arg-AMC (slika 9).

Delež suhe snovi je bil najmanjši v koreninah vseh odraslih rastlin. Največji delež suhe snovi smo v vseh izbranih vzorcih rastlin določili za klični list in endosperm kalčka, posledično je bila tudi koncentracija topnih proteinov največja, kar je razumljivo, saj ima tu razvijajoči kalček shranjene zaloge hranil za rast in razvoj. Zaradi pomanjkanja rastlinskega materiala te korelacije ne morem potrditi za vzorce brokolija.

V času kaljenja se zmanjša količina ogljikovih hidratov, maščob, količina proteinov pa najbolj naraste po 3 dneh kaljenja, po 5 dneh kaljenja se nekoliko zmanjša, proti koncu kaljenja pa se količina proteinov bistveno ne spreminja (Tarasevičiene in sod., 2009). V aminokislinski sestavi proteinov se v času kaljenja najbolj poveča vsebnost levcina po 3 dneh, vsebnost metionina se bistveno ne spreminja, poveča se tudi vsebnost izolevcina, histidina in valina. Vsebnost vseh esencialnih aminokislín se najbolj poveča po 3 dneh kaljenja, po 5 dneh pa nekoliko zmanjša. (Tarasevičiene in sod., 2009). Nihanje v količini proteinov in njihovi sestavi v času kaljenja je pogojeno z razgradnjo založnih proteinov (Wang in sod. 2007), z aktivacijo različnih metabolnih encimov, ki so vključeni v sintezo novih spojin, ki prispevajo k večji hranilni vrednosti kalčka (Maneemegalai in Nandakumar, 2011). Vloga proteaz pri razgradnji ali mobilizaciji založnih proteinov še ni povsem jasna. Novejše raziskave nakazujejo, da je bolj pomembna vloga na novo sintetiziranih endopeptidaz v začetku mobilizacije založnih proteinov, ki pa skupaj z

obstoječimi karboksipeptidazami razgrajujejo proteine po končanem kaljenju (Münz in sod., 2011). Vloga eksopeptidaz ni dobro raziskana.

Vzgoja redkve, brokolija in belega zelja je potekala v kontroliranih pogojih pri sobni temperaturi in dnevnim zalivanjem. Odrasle rastline smo vzorčili in ovrednotili proteazno aktivnost v ekstraktih z izbranimi substrati. S cimografsko analizo s posameznimi substrati smo za primere Ala-AMC, Lys-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC ugotovili, da se aminopeptidaze v koreninah odrasle rastline slabo izražajo. Pri analizah s temi substrati je bila izražena največja encimska aktivnost pri kličnem listu in endospermu ter pri listu odrasle rastline. Aminopeptidaze niso specifične za lizin in alanin, kar smo lahko opazili iz prekrivanja lis pri analizi aminopeptidazne aktivnosti s substratom Ala-AMC in Lys-AMC (sliki 7 in 8). Kljub relativno majhni aminopeptidazni aktivnosti v koreninah smo substratom Phe-AMC pri redkvi detektirali dve aminopeptidazi, katerih aktivnost je v koreninah močno izražena (slika 6). Pri korenini odraslega zelja in brokolija je izražena ena aminopeptidaza, vendar je pri zelju aktivnost večja kot pri brokoliju. Pri vseh rastlinah je aktivnost in koncentracija encimov v listih odrasle rastline približno enaka, kar smo dokazali tudi z določevanjem skupnih proteinov po Bradfordu (preglednica 9). Pri belem zelju smo z mešanico substratov določili manjše število lis kot z uporabo čistega substrata, kar je verjetno posledica aktivnosti različnih encimov s podobno mobilnostjo, kar se odraža pri zlivanju več koncentracijsko šibkejših lis v eno močnejšo.

Pri mnogih rastlinah imajo prav cisteinske proteaze ključno vlogo pri razgradnji založnih proteinov v semenih kot tudi pri razvoju rastline in drugih fizioloških procesih. Cisteinsko proteazo (CPRGH) so izolirali iz kalečih listov manj znane stročnice *Macrotyloma uniflorum*. Ugotovili so, da je encim popolnoma inhibiran z jodoacetamidom, da pa lahko dodatek reagenta s tiolno skupino (npr. DTT) reverzibilno vpliva na inhibicijo z močnimi inhibitorji (Jinka in sod., 2009). Cisteinske proteaze smo dokazovali z inhibitorjem jodoacetamidom, vendar v nobenem primeru ni prišlo do irreverzibilne vezave inhibitorja z aminokislino cistein.

Najbolj raziskan in dokazan katalitski tip je serinski, ki ima prisotno aminokislino serin v aktivnem mestu encima. Vse tri analizirane križnice vsebujejo aminopeptidaze serinskega katalitičnega tipa. Ko smo k vzorcem dodali inhibitor PMSF pred elektroforezo, je prišlo verjetno do vezave encima s PMSF. Še boljšo inhibicijo smo dosegli z dodatkom PMSF v reakcijsko mešanico s substratom. Trditev je podprta s sliko 13, pri kateri je lepo razvidna popolna inhibicija aminopeptidaze z največjo mobilnostjo pri redkvi. PMSF je sicer irreverzibilni inhibitor serinskih proteaz (James, 1978) in zato je presenetljivo, da ob dodatku inhibitorja v vzorec pred elektroforezoni ni prišlo do popolne inhibicije (slika 12). To je lahko posledica premajhne koncentracije dodanega PMSF k vzorcem ali prekratke inkubacije, pred nanosom na elektroforezni gel. Predvidevamo, da bi z uporabo višje molarnosti PMSF prišlo do popolne inhibicije tudi pri zelju in brokoliju.

Za dokazovanje metaloproteaz smo dodali Zn^{2+} , saj so kovinski ioni ključni za encimsko aktivnost metaloproteaz (Walker, 1998). Po dodatku 0,1 mM $ZnCl_2$ v reakcijsko mešanico nisemo detektirali novih encimov (slika 15), ki bi bili neaktivni zaradi disociacije kovinskega kofaktorja iz aktivnega mesta encima. Enako smo postopali z dodanim 5 mM $CaCl_2$, kjer prav tako nismo detektirali novih encimov (priloga H). V reakcijsko mešanico substratov smo poleg Zn^{2+} in Ca^{2+} dodali tudi reducent DTT. Možno je, da je DTT kompleksiral Zn^{2+} in posledično nismo mogli dokazati metaloproteaz. V naših vzorcih so bile naknadno, na katedri za biokemijo in kemijo živil, dokazane metaloproteaze. Analiza je bila izvedena z Zn^{2+} , ki so ga dodali k substratni reakcijski mešanici, brez prisotnega reducenta DTT. S tem lahko potrdim, da je DTT zagotovo motnja pri dokazovanju metaloproteaz.

Metaloproteaze smo želeli dokazati tudi z EDTA, ki kompleksira dvovalentne kovinske ione (Laeremans in sod., 2005). Ugotovili smo zmanjšano aktivnost encimov, kar pa verjetno ni posledica prisotnosti metaloproteaz, saj smo analizo izvajali zaporedno, pri čemer je lahko prišlo do spiranja encimov iz gela. Možno je tudi, da je EDTA prešibek kelator, da bi nase lahko vezal močno vezane kovinske ione iz aktivnega mesta encima.

Mehanski stres smo izvajali tako, da smo poškodovali liste odraslih rastlin. Pri redkvi in belemu zelju smo opazili zmanjšano aktivnost proteolitičnih encimov. Znano je, da se lahko poveča količina proteaznih inhibitorjev kot obrambni sistem rastline pred insekti in patogenimi organizmi, lahko pa tudi ob mehanskih poškodbah rastline (Casaretto in sod., 2004). Lahko pa bi to pripisali procesu regeneracije rastline, pri katerem zaradi pomanjkanja znotrajceličnih komponent pomembno obnavljanje proteinov, čemur bi lahko pripisali tudi zmanjšano količino proteinov v primerjavi s kontrolo (glej preglednico 9). S procesom obnavljanja si rastlina pridobi aminokisline, ki so potrebne za sintezo novih proteinov (Vierstra, 1996).

Ker smo se tekom diplome pri postopkih izolacije aminopeptidaz ves čas srečevali s shranjevanjem vzorcev, smo želeli ugotoviti, kako pogoji shranjevanja vplivajo na vsebnost proteinov. Ugotovili smo, da je najmanj učinkovito shranjevanje vseh vzorcev pri $-20^{\circ}C$, saj se je pri tej temperaturi aminopeptidazna aktivnost očitno znižala. Zmanjšanje aminopeptidazne aktivnosti lahko potrdimo tudi pri ekstraktu belega zelja, ki je bil hranjen na temperaturi $+20^{\circ}C$. Vzorci ekstraktov so bili na temperaturi $+4^{\circ}C$ in $+20^{\circ}C$ le en dan, zato predvidevamo, da bi pri daljši časovni izpostavitvi tema temperaturama dobili drugačne rezultate. Kot najučinkovitejši način shranjevanja rastlinskih encimov v ekstraktih se je izkazala temperatura $-80^{\circ}C$.

5.2 SKLEPI

- Cimografsko analizo smo uspešno uporabljali za ločevanje in detekcijo aminopeptidaz po nativni elektroforezi iz ekstraktov redkve, brokolija in belega zelja s fluorogenimi substrati Phe-AMC, Lys-AMC, Ala-AMC in N- α -benzoyl-Arg-AMC.
- V vseh preliminarnih analizah križnic in trav smo detektirali vsebnost aminopeptidaz v različnem številu.
- Vsebnost suhe snovi pri vseh treh rastlinah je najmanjša v koreninah odrasle rastline (3,9-13,5 %), največja vsebnost suhe snovi je v kličnih listih in endospermu (49,5-60,9 %).
- Po Bradfordovi metodi za določanje skupnih proteinov smo ugotovili, da je v redkvi in belemu zelju masna koncentracije proteinov v koreninah odraslih rastlin najmanjša, v primeru kličnega lista in endosperma skupaj pa največja. Razen pri vzorcih brokolija, kjer je zaradi pomanjkanja rezultatov, največja koncentracija topnih proteinov v listih odrase rastline pod stresom.
- S substratom Phe-AMC smo detektirali encimsko najbolj aktivne substratno specifične aminopeptidaze, medtem ko so aminopeptidaze, ki cepijo Ala-AMC in Lys-AMC substratno nespecifične, saj najverjetneje nekatere aminopeptidaze lahko razgrajujejo oba substrata. V primerjavi z mešanico substratov in N- α -benzoyl-Arg-AMC, lahko pri ekstraktih redkve zaznamo lise z majhno mobilnostjo, ki najverjetneje ustrezajo proteazi, ki hidrolizira N- α -benzoyl-Arg-AMC.
- Serinske proteaze smo v vseh treh rastlinah detektirali z inhibitorjem PMSF. Inhibicija je bila učinkovitejša, če smo dodali PMSF v reakcijski pufer s substratom, kot pa če smo dodali PMSF pred elektroforezo.
- Prisotnosti cisteinskih proteaz in metaloproteaz v ekstraktih pri danih eksperimentalnih pogojih in uporabljenih substratih, v izbranih križnicah, nismo potrdili.
- Pod vplivom mehanskega stresa se aktivnost analiziranih aminopeptidaz zmanjša.
- Temperatura skladiščenja ima velik vpliv na aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih. Kot najslabši način shranjevanja ekstraktov se je izkazala temperatura -20 °C (10 dni). Kratkoročno shranjevanje na +4 °C in +20 °C vodil le do manjšega

zmanjšanja encimske aktivnosti (1 dan). Temperatura -80 °C pa se je izkazala kot najbolj optimalna temperatura za shranjevanje encimov v ekstraktih.

6 POVZETEK

Med križnice poleg redkve, brokolija in zelja, uvrščamo tudi kolerabo, ohrovt, repo,... Velika pestrost tega rodu tudi dokazuje, da so križnice gojili in uživali po vsem svetu, da so ljudem pomenile pomemben vir prehrane, zato so se razvile v tako pisano skupino rastlin (Pušenjak, 2007).

Diplomsko naloge smo pričeli s cimografskimi analizami različnih fluorogenih substratov (Phe-AMC, Ala-AMC, Lys-AMC, Glu-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC, Gly-AMC, Met-AMC, Trp-AMC), rastlin in njihovih delov. Analizirali smo poganjek in korenino kalčka različnih križnic in trav. Na podlagi preliminarnih rezultatov smo se odločili, da bomo podrobnejše analizirali vzorce redkve, brokolija in belega zelja ter njihove dele (poganjek in korenina kalčka, kličnih listov in endosperma, korenine odrasle rastline ter listi odrasle rastline).

Analizo smo izvajali tako s posameznimi substrati (Phe-AMC, Ala-AMC, N- α -benzoyl-Arg-AMC in Lys-AMC) kot tudi z mešanico teh substratov. Te aminokisline so označene z AMC pri katerih se po hidrolizi amidne vezi sprosti fluorescentni AMC.

Ugotovili smo, da je pri koreninah vseh treh vzorcev (redkev, brokoli in belo zelje) zelo nizka aktivnost aminopeptidazne aktivnosti, izstopa le analiza s Phe-AMC pri redkvi, saj smo zaznali dve aminopeptidazi. Razlike pri barvanju s posameznimi substrati smo med poganjkom in korenini kalčka, kličnim listom in endospermu ter listi odraslih rastlin, opazili predvsem v encimski aktivnosti kot posledici različnih koncentracij.

S Phe-AMC smo določili praktično enako število lis (encimov), kot pri mešanici substratov. Izjema so lise z majhno mobilnostjo pri ekstraktih redkve, ki najverjetneje ustrezajo proteazi, ki hidrolizira z N- α -benzoyl-Arg-AMC. Da je število lis v ostalih primerih enako lahko pripisemo široki substratni specifičnosti nekaterih aminopeptidaz, ki lahko razgrajujejo več substratov kot so predhodno že opazili (Budič, 2009).

Z jodoacetamidom, kot inhibitorjem cisteinskih proteaz, smo želeli preveriti, ali je za katero od aminopeptidaz prosti cistein ključen za encimsko aktivnost. Iz rezultatov je razvidno, da kljub temu, da se jodoacetamid irevrzibilno veže z aminokislino cistein, s tem nismo vplivali na encimsko aktivnost.

Serinske proteaze smo določevali z inhibitorjem PMSF. Tako brokoli kot redkev in belo zelje vsebujejo aminopeptidaze, ki hidrolizirajo uporabljene substrate. Dodatek inhibitorja v reakcijsko mešanico s substratom je rezultiral v boljši inhibiciji kot pa če smo PMSF dodali v vzorec pred elektroforezo.

Metaloproteaze smo želeli dokazati z EDTA, ki veže kovine iz proteina, in z dodatkom Zn^{+2} , ki je kot kovinski ion potencialen aktivator. Z analizi nismo uspeli detektirati metaloproteaz.

Izvajali smo tudi mehanski stres na odrasle rastline. V literaturi smo zasledili, da se encimska aktivnost pod mehanskim stresom kot tudi sušnem (Gotar, 2009) lahko poveča ali zmanjša. V naših analizah smo ugotovili zmanjšanje encimske vrednosti v ekstrakti listov redkve in belega zelja.

Določevali smo tudi suho snov in skupne proteine z Bradfordovo metodo. Ugotovili smo, da korenina odrasle rastline vsebuje najmanjši delež suhe snovi, klični list in endosperm pa največji. Masna koncentracija proteinov je posledično največja v ekstraktih redkve in brokolija kličnega lista in endosperma z izjemo brokolija, kjer je največji delež v listu odrasle rastline pod stresom.

7 VIRI

- Asp T., Bowra S., Borg S., Bach Holm P. 2004. Cloning and characterisation of three groups of cysteine protease genes expressed in the senescing zone of white clover (*Trifolium repens*) nodules. *Plant Science*, 167, 4: 825-837
- Barrett A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. V: Plant proteolytic enzymes. Dalling M.J. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 2-16
- Barrett A.J., McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237, 3: 935-935
- Bode W., Huber R. 1991. Ligand binding: Proteinase-protein inhibitor interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1, 1: 45-52
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Božić N., Vučić Z. 2005. Detection and quantification of leucyl aminopeptidase after native electrophoresis using leucine-p-nitroanilide. *Electrophoresis*, 26, 12: 2476-2480
- Brzin J., Kidrič M. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 1: 422-467
- Budič M., Kidrič M., Meglič V., Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Analytical Biochemistry*, 388, 1: 56-62
- Casaretto J., Zúñiga G., Corcuera L. 2004. Abscisic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161, 4: 389-396
- Chen H.J., Huang G.J., Chen W.S., Su C.T., Hou W.C., Lin Y.H. 2009. Molecular cloning and expression of a sweet potato cysteine protease SPCP1 from senescent leaves. *Botanical Studies*, 50, 2: 159-170
- Cleland W.W. 1964. Dithiothreitol: A new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3, 4: 480–482
- Cortese D. 2009. Kalčki: živahna semena. Ljubljana, Kmečki glas: 144 str.
- Černe M., Vrhovnik I. 1992. Vrtnine in vir zdravja in naša hrana. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 219 str.
- Černe M. 1998a. Kapusnice. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 173 str.

- Černe M. 1998b. Zelenjadarstvo. Železniki, Pami: 175 str.
- Demir Y., Güngor A. A., Duran E. D., Demir N. 2008. Cysteine protease (capparin) from capsules of caper (*Capparis spinosa*). Food Technology and Biotechnology, 46, 3: 286-291
- Drobnič-Košorok M. 1997. Eksperimentalne metode v biokemiji: učbenik s praktičnimi primeri. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 132 str.
- Encyclopaedia Britannica. 2006. Plant development: Monocotyledon: internal structures of a corn seed with stages of germination. London. Encyclopaedia Britannica: 1 str. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/66034/Monocotyledon-Nutrients-are-stored-in-the-cotyledon-and-endosperm-tissue> (september 2011)
- Fink A. 1993. Poganjki in kalčki: vse leto sveža zelenjava. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 97 str.
- Frederiks M.W., Mook R.F.O. 2004. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *in situ* zymography of gelatinases: Review and protocols. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 52, 6: 711-722
- García-Carreño F.L., Dimes L.E., Haard N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry, 214, 1: 65-69
- Gomis-Rüth F.X. 2003. Structural aspect of the matzincin clan of metalloendopeptidases. Molecular Biotechnology, 24, 2: 157-202
- Gotar A. 2009. Vpliv suše na fenilalanin-aminopeptidazno aktivnost v ekstraktih fižolovih listih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.
- Heussen C., Dowdle E.B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry, 102, 1: 196-202
- Hou W.C., Chen H.J., Chen T.E., Lin Y.H. 1999. Detection of protease activities using specific aminoacyl or peptidyl *p*-nitroanilides after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and its applications. Electrophoresis, 20, 3: 486-490
- Hummel K.M., Penheiter A.R., Gathman A.C., Lilly W.W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. Analytical Biochemistry, 233, 1: 140-142
- Isola M.C., Franzoni L. 1996. Aminopeptidase activities in peanut cotyledons. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 8, 3: 167-173

James G.T. 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*, 8, 2: 574-579

Jeong H., Shin J.S, Ok S.H. 2001. Barley DNA-binding methionine aminopeptidase, which changes the localization from the nucleus to the cytoplasm by low temperature, is involved in freezing tolerance. *Plant Science*, 180: 53-60

Jinka R., Ramakrishna V., Rao S.K., Rao P.R. 2009. Purification and characterization of cysteine protease from germinating otyledons of horse gram. *BMC Biochemistry*, 10: 28, doi:10.1186/1471-2091-10-28: 11 str.

Kaberdin V.R., McDowall K.J. 2003. Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. *Genome Research*, 13: 1961-1965

Kleiner D.E., Stetlerstevenson W.G. 1994. Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218, 2: 325-32

Konopka A., Zakharova T. 2002. Evalution of methods to solubilize and analyze cell-associated ectoenzymes. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 3: 273-282

Laskowski M. Jr., Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 1: 593-626

Lawrence P.K., Koudal K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 1, doi:10.2225/vol5-issue1-fulltext-3: 13 str.

Laeremans H., Demaegejt H., De Backer J., Le M.T., Kersemans V., Michotte Y., Vauquelin G., Vanderheyden P.M.L. 2005. Metal ion modulation of cysteinyl aminopeptidase. *Biochemical Journal*, 390: 351–357

Leber T.M., Balkwill F.R. 1997. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249, 1: 24-28

Likar M., Regvar M. 2003. Praktikum fiziologije rastlin. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.

Liu X.Q., Jagendorf A.T. 1986. Neutral peptidase in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiology*, 81, 2: 603-608

Ludidi N., Abrahams G., Gehring C. 2006. AtGC1, a dual function *Arabidopsis thaliana* protein with guanylyl and cysteine protease activity. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 143, Suppl. 1: S179-S179

Makowski G.S., Ramsby M.L. 1996. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Analytical Biochemistry*, 236, 2: 353-356

Maneemegalai S., Nandakumar S. 2011. Biochemical studies on the germinated seeds of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, *Vigna mungo* (L.) Hepper and *Pennisetum typhoides* (Burm f.) Stapf and C.E. Hubb. International Journal of Agricultural Research, 6, 7: 601-606

Manoj K.P., Lu J., Tan K.S.W. 2007. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-κB-dependent manner. Eukaryotic cell, 7, 3: 435-443

Marinova M., Dolashki A., Altenberend F., Stevanovic S., Voelter W., Tchorbanov B. 2007. Characterization of an aminopeptidase and a proline iminopeptidase from cabbage leaves. Zeitschrift fur Naturforschung C-A, 63, 1-2: 105-112

Matsui M., Fowler J.H., Walling L.L. 2006. Leucine aminopeptidases: Diversity in structure and function. Biological Chemistry, 387, 12: 1535-1544

Michaud D. 1998. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. Analytica Chimica Acta, 372, 1: 173-185

Michaud D., Asselin A. 1995. Application to plant-proteins of gel-electrophoretic methods. Journal of Chromatography A, 698, 1-2: 236-279

Müllertz S. 1974. Different molecular forms of plasminogen and plasmin produced by urokinase in human plasma and their relation to protease inhibitors and lysis of fibrinogen and fibrin. Biochemical Journal, 143, 2: 273-283

Müntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E., Schlereth A., Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. Journal of Experimental Botany, 3, 62: 1741-1752

Narváez-Vásquez J., Tu C., Park S., Walling L. 2008. Targeting and localization of wound-inducible leucine aminopeptidase A in tomato leaves. Planta, 227, 2: 341–351

NC-IUBMB. 2007. Enzyme nomenclature. London, NC-IUBMB-Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: 2 str.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (junij 2011)

Osvald J., Kogoj Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 591 str.

Osvald J., Kogoj Osvald M. Železniki. 1998. Splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo: učbenik za poklic vrtnar. Ljubljana, Pami: 321 str.

Palma J.M., Sandalio L.M., Javier Corpas F., Romero-Puertas M.C., McCaethy I., del Rio L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of peroxisomes. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 6-8: 521-530

- Polgár L. 2004. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. V: *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd ed. Vol. 2: Cysteine, serine and threonine peptidases. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (eds.). London, Elsevier: 1072-1079
- Premarathne A., Leung D. 2010. Characterization of activity of a potential food-grade leucine aminopeptidase from kiwifruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 23, 2: 12-13
- Pušenjak M. 2007. Zelenjavni vrt. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 319 str.
- Pyrzyna M., Szawlska U., Bielawski W., Zdunek-Zastocka E. 2010. Purification, biochemical characterisation, and mass spectrometry analysis of phenylalanine aminopeptidase from the shoots of pea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2: 609-617
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 3: 597-605
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2009. MEROPS: the peptidase database. Cambridge, Wellcome Trust Sanger Institute: database <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm> (september 2011)
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36, 1: 320-325
- Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34: 270-272
- Rawlings N.D., Barrett A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290, 1: 205-218
- Ren W.P., Fridman R., Zabrecky J.R., Morris L.D., Day N.A., Sloane B.F. 1996. Expression of functional recombinant human procathepsin B in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 319, 3: 793-800
- Rogers J.C., Dean D., Heck G.R. 1985. Aleurain: A barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 19: 6512-6516
- Salvesen G., Nagase H., 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. V: *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Benyou R.J. (ed.). Oxford, IRL Press: 259 str.
- Sathish H.A., Kumar P.R., Pakash V. 2009. The differential stability of the left and right domains of papain. *Process Biochemistry*, 44, 7: 710-716
- Schaller A. 2004. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta Medica*, 220, 2: 183-197

Syngene. 2011. Gel imaging for fluorescence application, CAM-GX-CHEMI HR system. A division of synoptics Ltd. Cambridge, Syngene: 1 str. <http://www.syngene.com/g-box/> (oktober 2011)

Szawłowska U., Zdunek-Zastocka E., Bielawski W. 2011. Biochemical characterisation of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 11: 1342-1349

Tarasevičiene Ž., Danilčenko H., Jariene E., Paulauskiene A., Gajewski M. 2009. Changes in some chemical components during germination of broccoli seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, 2: 173-176

Taylor A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB Journal*, 7, 2: 290-298

Tian L.H., Zhang L., Zhang J., Song Y., Guo. Y. 2009. Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultures cell proliferation in rice. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1794, 3: 459-467

Tishinov K., Stambolieva N., Petrova S., Galunsky B., Nedkov P. 2009. Purification and characterization of the sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) major aminopeptidase. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1: 199-205

Turk B., Turk V., Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378, 3-4: 141-150

Vierstra R.D. 1993. Protein degradation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 1: 385-410

Vierstra R.D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*, 32, 1-2: 275-302

Vrhovnik M. 2007. Karakterizacija alanin-aminopeptidaze in levcin-aminopeptidaze iz fižolovih listov glede na oskrbo z vodo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 84 str.

Vujčić Z., Lončar N., Dojnov B., Milovanović A., Vujčić M., Božić N. 2010. Characterisation of leucyl aminopeptidase from *Solanum tuberosum* tuber. *Food Chemistry*, 121, 2: 418-423

Walker K.W., Bradshaw R.A. 1998. Yeast methionine aminopeptidase I can utilize either Zn^{2+} or Co^{2+} as a cofactor: A case of mistaken identity? *Protein Society*, 7: 1684-2687

Wang J., Li Y., Wan Lo S., Hillmer S., Sun S.M.S., Robinson G. D., Jiang L. 2007. Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. *Acta Physiologiae Plantarum*, 143: 1628-1639

Watanabe Y., Matsushima S., Yamaguchi A., Shioi Y. 2009. Characterization and cloning of cysteine protease that is induced in green leaves of barley. Plant Science, 176, 2: 264-271

Weder J.K.P., Kaiser K.P. 1995. Fluorogenic substrates for hydrolase detection following electrophoresis. Journal of Chromatography A, 698, 1-2: 181-201

ZAHVALA

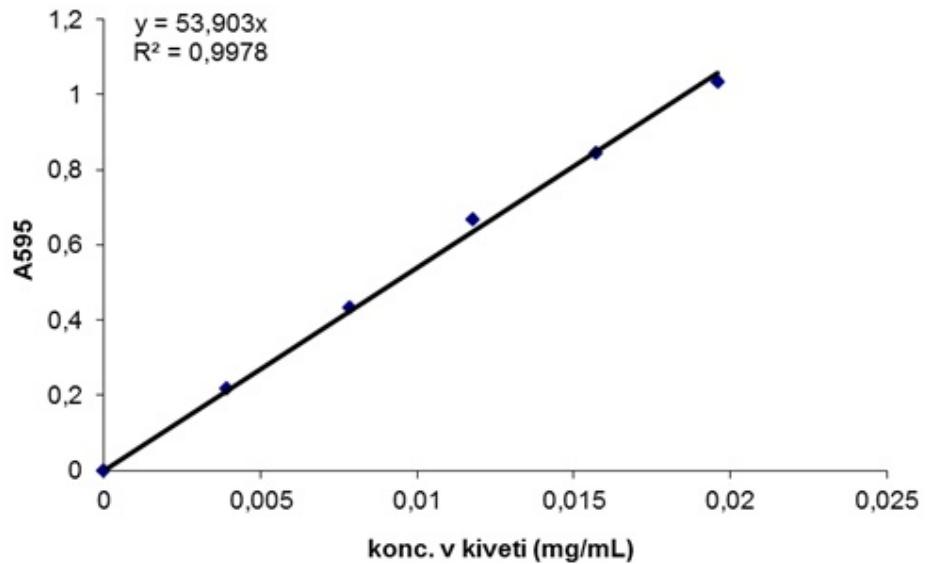
Za vso strokovno pomoč in potrežljivost pri nastajanju te diplome se iskreno zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću. Hvala za odlično mentorstvo!

Zahvaljujem se tudi somentorici asist. dr. Mihaeli Skrt za njeno pomoč in izredno prijaznost.

Hvala doc. dr. Tomažu Požrлу za recenzijo diplomskega dela.

Posebna zahvala gre staršem in sošolki Kaji Trlep, ki so mi v vseh letih študija stali ob strani in me vzpodbjali.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanja skupnih proteinov po Bradfordu

Priloga B: Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 595 nm pri določitvi vsebnosti proteinov v ekstraktih posameznih delov rastlin

VZORCI	A ₅₉₅
BROKOLI poganjek in korenina kalčka skupaj	0,21055
BROKOLI klični list in endosperm	0,46258
BROKOLI celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,42911
BROKOLI list odrasle rastline	*
BROKOLI list odrasle rastline pod stresom	0,61305
BROKOLI korenina odrasle rastline	*
REDKEV poganjek in korenina kalčka skupaj	0,15775
REDKEV klični list in endosperm	0,48517
REDKEV celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,30934
REDKEV list odrasle rastline	0,40702
REDKEV list odrasle rastline pod stresom	0,18842
REDKEV korenina odrasle rastline	0,16757
ZELJE poganjek in korenina kalčka skupaj	0,31688
ZELJE klični list in endosperm	0,59023
ZELJE celoten kalček (poganjek, korenina, klični list in endosperm)	0,48837
ZELJE list odrasle rastline	0,29848
ZELJE list odrasle rastline pod stresom	0,48208
ZELJE korenina odrasle rastline	0,10022

* ni podatka zaradi pomanjkanja rastlinskega materiala

Priloga C: Primer izračuna masne koncentracije (γ) topnih proteinov (mg/ml)

1. ZELJE poganjek in korenina kalčka skupaj

$$A_{595} = 0,31688$$

$$\text{Topnihi proteini} = \frac{A_{595}}{59,908} \cdot R_{f4} \cdot R_{f8}$$

$$\text{Topnihi proteini} = \frac{0,31688}{59,908} \cdot 51 \cdot 5 = 1,50 \text{ mg/ml}$$

2. ZELJE korenina odrasle rastline

$$A_{595} = 0,10022$$

$$\text{Topnihi proteini} = \frac{A_{595}}{59,908} \cdot R_{f4} \cdot R_{f8}$$

$$\text{Topnihi proteini} = \frac{0,10022}{59,908} \cdot 51 \cdot 3 = 0,190 \text{ mg/ml}$$

1 2 3



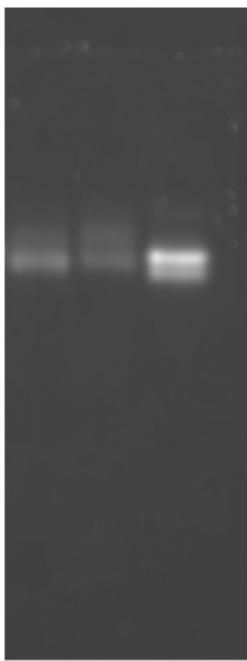
Priloga D: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Gly-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3).

1 2 3



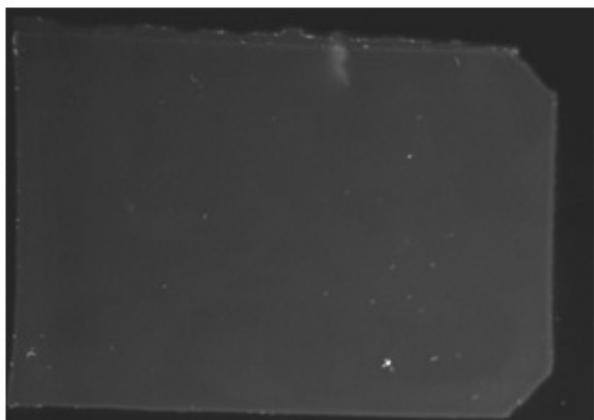
Priloga E: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Met-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3).

1 2 3

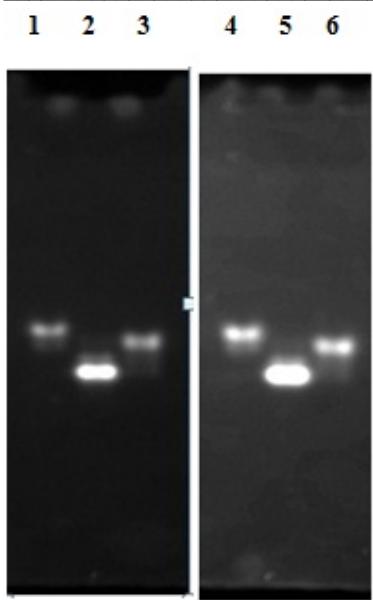


Priloga F: Aminopeptidazna aktivnost na substrat Trp-AMC v ekstraktih poganjka in korenine kalčka skupaj
vzorcev pšenice (1), pire (2) in redkve (3).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Priloga G: Gel po 30 minutnem spiranju z destilirano vodo po končani analizi aminopeptidazne aktivnosti v ekstraktih z mešanico fluorogenih substratov.



Priloga H: Encimska aktivnost določena z mešanico substratov Phe-AMC, Lys-AMC in Ala-AMC v ekstraktih belega zelja (1, 4), brokolija (2, 5) ter redkve (3, 6). Pri določevanju aminopeptidazne aktivnosti vzorcev 1-3 smo v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT (kontrola), medtem ko smo vzorcem 4-6 v reakcijsko mešanico poleg substratov dodali DTT in CaCl_2 .