



Gimnazija Kranj
Koroška cesta 13
4000 Kranj

Raziskovalna naloga na področju biologije

Razvoj metode za analizo L-aminokislinsko- oksidazne aktivnosti v gelu in njena uporaba pri analizi vzorcev gob

Avtor: Gašper Žun

Mentorica: dr. Jerica Sabotič

Kranj, 2014

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem svoji mentorici dr. Jerici Sabotič, ki mi je omogočila raziskovanje na Institutu Jožef Stefan ter bdela nad mojim raziskovalnim delom.

Hvala tudi vsem raziskovalcem na odseku B3 in Mojci Brložnik, ki ste mi pomagali pri delu v laboratoriju.

Za gobje vzorce se zahvaljujem dr. Jožetu Brzinu, Jasni Šlenc in Dragani Savić, za strup modrasa pa dr. Adriani Leonardi.

Najlepša hvala tudi Mihaelu Šorliju za lektoriranje pričujočega besedila in sošolki Ani Tacer, državni prvakinji v znanju angleškega jezika, za prevod povzetka.

Coprnicica zgodaj vstala
razkopavala zemljo,
nore gobe je sejala
pod stoletno bukvijo.

(S. Makarovič) [1]



Slika 1: »Nora goba« [2]

Kazalo

1. Opredelitev naloge.....	6
2. Uvod.....	7
3. L-aminokislinske oksidaze (LAKO)	8
4. Metode za detekcijo aktivnosti LAKO.....	12
5. Poliakrilamidna gelska elektroforeza ob prisotnosti natrijevega lavril sulfata (NaDS-PAGE).....	13
6. Spremljanje rasti mikroorganizmov.....	15
7. Uporabljeni vzorci.....	16
8. Raziskovanje.....	23
9. Standardni postopki.....	27
10. Prvi test.....	31
11. Optimizacija.....	33
12. Izbiranje vzorcev.....	42
13. Koncentriranje vzorcev.....	47
14. Testiranje vzorcev pri različnih pH vrednostih z različnimi viri aminokislin.....	48
15. Primerjava uporabnosti substratov za analizo LAKO aktivnosti v gelu.....	58
16. Poskus s katalazo.....	60
17. Ugotavljanje antibiotičnega učinka izbranih vzorcev na podlagi rastnih krivulj.....	62
18. Diskusija.....	67
19. Zaključek.....	72
20. Viri.....	73

Povzetek

L-aminokislinske oksidaze so encimi, ki pretvarjajo L-aminokisliline v α -ketokisliline, amonijak in vodikov peroksid. Nahajajo se v rastlinah, žuželah, kačjem strupu in glivah, kjer imajo funkcijo obrambe organizma, vključene pa so tudi v metabolizem aminokislin.

Prisotnost L-aminokislinskih oksidaz lahko zaznamo posredno, saj hrenova peroksidaza pri svoji katalitični aktivnosti na vodikovem peroksidu z o-fenilendiaminom povzroči nastanek barvnega produkta, glede na intenziteto obarvanja pa lahko primerjamo tudi aktivnosti teh encimov v različnih vzorcih. V svoji raziskavi sem razvil in optimiral metodo za detekcijo L-aminokislin v gelu in jo uporabil pri analizi več gobjih vzorcev. Pri tem sem primerjal aktivnosti L-aminokislinskih oksidaz v gobah na različnih substratih in določil njihove molekulske mase.

Ugotavljal sem tudi fungicidni in protibakterijski učinek gobjih ekstraktov in ugotovil, da je učinek posledica predvsem encimov, saj predhodno toplotno obdelani vodni izvlečki niso inhibirali rasti mikroorganizmov.

L-aminokislinske oksidaze so uporabne v medicini in biotehnologiji ter v različnih panogah industrije. Uporabljajo se že kot biosenzorji za zaznavanje L-aminokislin v prehrabnih izdelkih, za beljenje v tekstilni in papirni industriji ter v zobnih pastah. Potencialne biomedicinske aplikacije pa vključujejo antibiotične in protivirusne učinke ter zdravljenje rakavih obolenj. V nalogi sem pokazal, da gobe predstavljajo nepoznan, a bogat vir L-amino kislinskih oksidaz z različnimi lastnostmi, ki se lahko uporabijo na omenjenih področjih.

Ključne besede: L-aminokislinske oksidaze, glive, L-aminokislina, hrenova peroksidaza, rastna krivulja

Summary

L-amino-acid oxidase is an enzyme whose function is to convert L-amino acids into α -keto acid, ammonia and hydrogen peroxide. It can be found in plants, insects, snake venom and fungi, where it helps protect the organism and is also active in amino acid metabolism.

We can determine its presence indirectly, as during the catalytic reaction of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide a coloured product is formed from o-phenylenediamine. Judging by the intensity of this characteristic change, we are also able to compare the activity of these enzymes in different samples. In my research, I have developed and optimised a method for detecting L-amino acid oxidase activity in a gel and used it to analyse several different samples of mushrooms. While doing so, I compared the activity of L-amino-acid oxidases in mushrooms on different substrates and determined their molecular masses.

I have also investigated the fungicidal and antibacterial effect of mushroom extracts, reaching the conclusion that the toxicity of mushrooms results from the activity of enzymes, as water extracts that had been heated beforehand did not inhibit the culture's growth.

L-amino-acid oxidases are highly useful enzymes in medicine, biotechnology and many different fields of industry. They are used as biosensors for detecting L-amino acids in food industry, for bleaching in textile and paper industry and also in tooth pastes. Potential biomedical applications include antibiotic and antiviral effects of these enzymes and also treatment of different illnesses, especially those of cancerous origin. In my research I have proven that mushrooms represent a highly unknown, but rich source of L-amino acid oxidases with different features, which could find applications in abovementioned fields.

Key words: L-amino acid oxidase, fungi, L-amino acid, horseradish peroxidase, growth curve

Okrajšave

- Abi = dvotrosni kukmak (lat. *Agaricus bisporus*)
- Abo = severnjaška mraznica (lat. *Armillaria borealis*)
- Ac = citronasta mušnica (lat. *Amanita citrina*)
- Am = rdeča mušnica (lat. *Amanita muscaria*)
- Ap = zelena mušnica (lat. *Amanita phalloides*)
- APS = amonijev persulfat (ang. ammonium persulfate)
- Ar = rdečkasta mušnica (lat. *Amanita rubescens*)
- Cci = gnojščna tintovka (lat. *Coprinopsis cinerea*)
- Cco = velika tintnica (lat. *Coprinus comatus*)
- Cg = pozna livka, martinovka (lat. *Clitocybe geotropa*)
- Cn = meglenka, poprhnjena livka (lat. *Clitocybe nebularis*)
- Ec = lat. *Escherichia coli*
- He = pordečela polževka (lat. *Hygrophorus erubescens*)
- Hf = navadna žveplenjača (lat. *Hypholoma fasciculare*)
- HRP = hrenova peroksidaza (ang. horseradish peroxidase)
- La = vijoličasta bledivka (lat. *Laccaria amethystina*)
- LAKO = L-aminokislinska oksidaza (ang. LAAO = L-amino acid oxidase)
- L-Ala = L-alanin
- L-Arg = L-arginin
- L-Asn = L-asparagin
- L-Asp = L-asparaginska kislina
- L-Glu = L-glutamin
- L-His = L-histidin
- L-Ile = L-izolevcin
- LI = lat. *Lactococcus lactis*
- L-Leu = L-levcin
- L-Lys = L-lizin
- L-Lys-ox. = L-lizin oksidaza
- L-Met = L-metionin
- Ln = vijoličasta kolesnica (lat. *Lepista nuda*)
- L-Phe = L-fenilalanin
- Lt = kosmata mlečnica (lat. *Lactarius torminosus*)
- L-Thr = L-treonin
- L-Trp = L-triptofan
- L-Tyr = L-tirozin
- L-Val = L-valin
- Mp = orjaški dežnik (lat. *Macrolepiota procera*)
- NaDS = natrijev lavril sulfat (ang. SDS = sodium dodecyl sulfate, sodium lauryl sulfate)
- ODA = o-dianisidin (ang. o-dianisidine)
- OPD = o-fenilendiamin, benzen-1, 2-diamin, (ang. o-phenylenediamine)
- P sp. = gologlavka (lat. *Psilocybe sp.*)
- Pg = ledenka (lat. *Pseudohydnum gelatinosum*)
- Po = bukov ostrigar (lat. *Pleurotus ostreatus*)
- Ro = okrasta golobica (lat. *Russula ochroleuca*)
- Sc = kvasovka (lat. *Saccharomyces cerevisiae*)
- STD = standard
- Sv = peščenka, peščena lupljivka (lat. *Suillus variegatus*)
- T. v. = lat. *Trichoderma viride*
- TEMED = N, N, N', N'-tetrametilendiamin (ang. N, N, N', N'-Tetramethylenediamine)
- Tm = gomoljika, tartuf (lat. *Tuber mesentericum*)
- Ts = milnata kolobarnica (lat. *Tricholoma saponaceum*)
- Vaa = modras (lat. *Vipera ammodytes ammodytes*)
- Xb = kostanjevka (lat. *Xerocomus badius*)

1. Opredelitev naloge

V lanskem letu sem uspešno izdelal raziskovalno nalogo z naslovom Inhibitorno delovanje Pepsi na delecije mutante kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, s katero sem na državnem tekmovanju osvojil 2. mesto in zlato priznanje. Mentor, izr. prof. dr. Uroš Petrovič z Instituta Jožef Stefan z Odseka za biomedicinske znanosti, mi je omogočil obisk 10. konference Slovenskega biokemijskega društva, ki je bila septembra 2013 v Ljubljani in so jo organizirali sodelavci z IJS. Na konferenci je v predavanju svoje raziskovalno delo predstavila tudi dr. Jerica Sabotič, ki na Institutu Jožef Stefan na Odseku za biotehnologijo raziskuje aktivne snovi v glivah, in tematika me je zelo zanimala.

Z mentorico sva se dogovorila o področju mojega raziskovalnega dela, ki je bilo proučevanje proteinov iz gob. Po prebiranju literature sva izdelala načrt, pri čemer sva se odločila, da bom raziskoval encime L-aminokislinske oksidaze (LAKO), ki imajo mnoge potencialno pozitivne lastnosti v medicini in farmaciji in odpirajo nova obzorja pri terapiji mnogih bolezni. Ti encimi iz gobjih vzorcev še niso bili dobro raziskani; le malo člankov navaja njihovo uspešno kvalitativno dokazovanje, zato niti analize tehnike niso bile dobro razvite. Tu se je pojavila prva ovira, torej razvoj metode za specifično dokazovanje L-aminokislinskih oksidaz, ki mora biti čim bolj preprosta, poceni, a učinkovita, natančna, selektivna in izvajalcu prijazna–nestrupena.

Metodo, ki bi jo razvil in optimiral, bi nato uporabil na večjem številu vzorcev, ki te encime morda vsebujejo, pri čemer bi dokazal tudi splošno uporabnost te nove metode. Rezultate bi preveril z negativno kontrolo s katalazo, ki reakcijo inhibira, in pa z rastnimi krivuljami organizmov, katerih rast L-aminokislinske oksidaze zavirajo oz. denaturirani encimi na njihovo rast ne vplivajo.

Nameni mojega raziskovanja so bili torej **razvoj in optimizacija analize tehnike** L-aminokislinskih oksidaz, njena **uporaba na večjem številu različnih vzorcev** ter **potrditev uspešne analize z negativno kontrolo** ter z **rastnimi krivuljami mikroorganizmov**, pri čemer bi hkrati **preučeval tudi lastnosti teh encimov**.

Glede na podatke iz najnovejših znanstvenih člankov postavljam **hipoteze**:

1. **Predvidevam, da sta možna razvoj in optimizacija analize metode za LAKO, ki ustreza kriterijem preprostosti, dostopnosti, natančnosti in selektivnosti.**
2. **Uporaba metode za ugotavljanje prisotnosti L-aminokislinskih oksidaz je možna na mnogih glivnih vzorcih.**
3. **Predvsem med strupenimi organizmi (glivami, kačami) so LAKO bogato zastopane, saj so citotoksične.**
4. **Predvidevam, da so LAKO prisotne pri vseh tesno sorodnih organizmih.**
5. **Ker LAKO s svojim delovanjem škodujejo celicam, bodo živi organizmi ob prisotnosti teh encimov slabše rasli, in nasprotno, pri denaturiranem vzorcu bodo organizmi rasli podobno kot kontrola.**

Zbiranje podatkov

2. Uvod

Človek je z okušanjem gobe razdelil med strupene in užitne, slednje so bogat vir beljakovin, vlaknin, vitaminov in mineralov. Predvsem v kulturah daljnega vzhoda so že pred več tisočletji odkrili zdravilne lastnosti tako užitnih kot tudi nekaterih neužitnih gob.

Poleg hranilnih lastnosti gliv, njihove uporabe v fermentacijske namene priprave alkoholnih pijač, kruha, kisa in sirov, danes z njihovo pomočjo proizvajajo antibiotike, vitamine encime in hormone [3].

V Sloveniji raste približno 3000 vrst gob (2500 je identificiranih), od teh je 650 užitnih in 85 strupenih, 20 celo smrtno nevarnih [3].

Gobe imajo imunomodulatorne (imunomodulatorji tvorijo interakcije z imunskim sistemom in lahko spodbudijo ali zavrejo posamezne stopnje delovanja imunskega odziva) in protirakave lastnosti, delujejo kot antioksidanti, znižajo krvni tlak in ravni holesterola ter sladkorja v krvi, delujejo protivnetno, protivirusno in protibakterijsko, poleg tega pa so odkrili tudi adaptogene učinke, to pomeni, da povečajo odpornost proti stresu in utrujenosti [3].

Bioaktivne snovi iz gob razdelimo na sekundarne metabolite (kislina, terpenoidi, alkaloidi, steroli, vitamini), proteine in visokomolekularne polisaharide, od katerih so β -glukani že uporabni v medicini zaradi svojih antitumornih in imunomodulatornih lastnosti. V gobah se prav tako nahajajo proteini s prej neznanimi lastnostmi, zato jih lahko uporabimo za sintezo novih zdravil. Odličnost mikoproteinov je med drugim tudi v tem, da imajo nove, drugačne lastnosti, saj se močno razlikujejo od prej znanih mikrobnih, živalskih in rastlinskih proteinov [4].

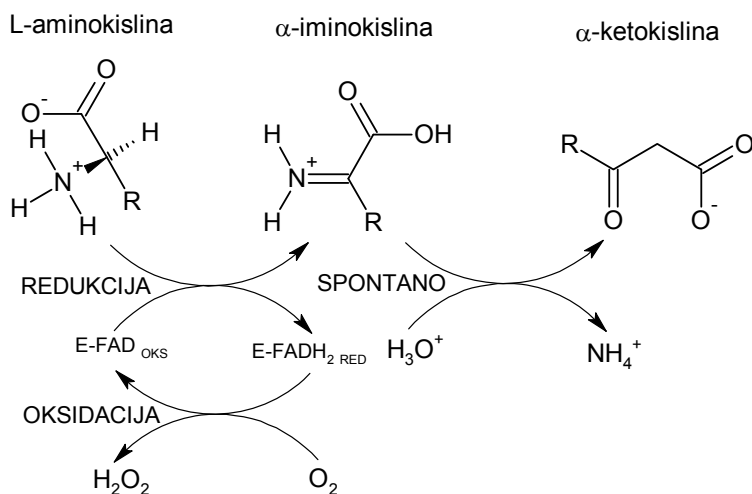


Slika 2: Gobarjenje je v Sloveniji v jesenskih mesecih zelo razširjeno [5]

3. L-aminokislinska oksidaza (LAKO)

3.1 REAKCIJA

L-aminokislinske oksidaze (LAKO, EC 1.4.3.2) sta prvič opisala Zeller in Maritz leta 1944 [6,7]. Vse L-aminokislinske oksidaze so flavoencimi, ki katalizirajo stereospecifično oksidativno deaminacijo L-aminokislin do ustrezne α -ketokislina, amonijaka in vodikovega peroksida [6-18] po enačbi $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^- + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOCOO}^- + \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}_2$ [8]. Oksidacija L-aminokislin z LAKO poteka v dveh korakih; najprej poteče redukcija aminokislina in nato reoksidacija encima s kisikom [9], intermediat je α -iminokislina [8, 6], ki se preko neencimske hidrolize pretvori v α -ketokislino in amonijev ion. LAKO so zelo stereospecifične do L-enantiomerov [10] in imajo različno preferenco do substrata; nekatere imajo zelo ozko področje specifičnosti [6].



Shema 1: Reakcija oksidacije L-aminokislin z L-aminokislinsko oksidazo [prirejeno po 6, 8, 9, 10]

LAKO imajo nekovalentno vezan flavin adenin dinukleotid FAD [6, 7]. Med reduktivno polovico reakcije se α -vodikov atom amino skupine abstrahira s FAD, da nastane α -iminokislinski intermediat, ki reagira z vodo, da nastane α -iminokislina. Za reduktivni del sta bila predlagana dva mehanizma: karboanionski (proton se premesti, nastane negativni naboj na α -ogljiku) in premestitev hidrida (vodikov atom in dva elektrona se premestijo skupaj), ki je glede na zadnje podatke bolj verjetna zaradi konformacijskih sprememb na aktivnih mestih [7, 8, 19]. Reducirani kofaktor FADH₂ se reoksidira na kisiku, kar vodi do nastanka vodikovega peroksida [6].

Drugi del reakcije poteka v dveh korakih: najprej nastane na pol reduciran encim, ki se nato do konca reducira zaradi substrata ali pa se oksidira zaradi kisika, kar poteka hitreje. En encim dehidrogenira dve molekuli aminokislina.

LAKO katalizirajo dehidrogeniranje L-aminokislin preko mehanizma prenašanja vodika, kar je enako kot pri D-aminokislinskih oksidazah. Podobni encimi so L-aminokislinske deaminaze, ki oksidirajo brez proizvodnje vodikovega peroksida [6].

3.2 STRUKTURA ENCIMA

LAKO so homodimerni proteini, ki vsebujejo močno nekovalentno vezan koencim FAD [7, 8, 10, 20, 21] in imajo molekulsko maso 100-150 kDa [11, 20, 21]. Vsaka identična podeonta ima molekulsko

maso okrog 60 kDa ter vsebuje po eno molekulo FAD [6, 8, 20]. Čisti encimi so glikoproteini s 3-4 % ogljikovih hidratov [8].

Vse LAKO imajo dva posebno oblikovana kanala za dva substrata: aminokislino in kisik. V en kanal prihaja aminokislina in iz njega odhaja iminokislina, skozi ožji kanal prihaja kisik in je nujen za oksidacijo reduciranega FAD, saj je dostop iz širšega kanala onemogočen zaradi iminokislina. Elektrostatske sile usmerjajo substrat. Specifičnost do oksidacije substrata je odvisna od velikosti in polarnosti tako lijaka kot substrata, pri tem so pomembne tudi vodikove vezi [6].

Zgradba LAKO iz različnih organizmov je dokaj podobna, kar kaže na močno evolucijsko povezavo med temi encimi [6], hkrati pa se razlikujejo po molekulski masi in preferenci do substrata, kar pomeni, da so že stara pridobitev zaradi številnih evolucijskih sprememb. Različni organizmi proizvajajo različne LAKO [7].

3. 3 SUBSTRATNA SPECIFIČNOST

LAKO so zelo specifične za oksidacijo le L-aminokislin, D-enantiomera pa ne oksidirajo. Oksidacija L-aminokislin zahteva prisotnost prostih primarnih α -aminoskupin. [6, 8, 12, 13, 20, 22].

V splošnem so aminokislina L-alanin, L-levcin (alifatski), L-fenilalanin, L-tirozin (aromatski), L-arginin, L-lizin, L-asparagin, L-ornitin (bazične aminokislina) aminokislina, ki jih LAKO najbolj oksidirajo. Za oksidacijo so potrebne proste α -amino in α -karboksilne skupine [10, 14]. LAKO na peptonu oksidirajo predvsem L-aspartam, L-triptofan, L-lizin, L-izolevcin, L-arginin, L-asparagin in L-glutamin [23]. Oksidacije L-cisteina in L-homocisteina se ne da detektirati posredno s hrenovo peroksidazo (HRP), saj vodikov peroksid oksidira fulhidrilno skupino teh substratov [14]. Viri so lahko tudi mešanice aminokislin [20].

Nekatere LAKO so zelo specifične za substrat in oksidirajo le eno L-aminokislino, npr.: L-aspartat oksidaza (oksidira prvi korak biosinteze nikotinamid adenin dinukleotida NAD⁺), L-glutamat oksidaza, L-fenilalanin oksidaza, L-triptofan oksidaza, L-lizin oksidaza [6]. Slednja je bila odkrita v plesni *Trichoderma viride*, iz katere je bila tudi izolirana [21]. Homodimerni flavoencim ima molekulsko maso 116 kDa in ima veliko specifično aktivnost za lizin. Tudi LAKO iz rib in drugih morskih organizmov ter nekaterih drugih gliv preferenčno oksidirajo L-lizin [6]. Edina prebavna pot L-lizina je v nekaterih organizmih preko α -keto- ϵ -aminokaproata, kjer ima LAKO ključno vlogo [10].

3. 4 OBSTOJNOST ENCIMOV

LAKO so stabilne pri sobni temperaturi in pri 4 °C, nekatere celo pri 37 °C [7, 8], spet druge so termofilne z največjo aktivnostjo pri 50 °C [20]. Nekatere LAKO se lahko reverzibilno inaktivirajo v neugodnih pogojih zaradi občutljivih aktivnih mest. Nekatere se inaktivirajo pri nizkih temperaturah, aktivirajo se zopet pri ogrevanju, verjetno zaradi konformacijskih sprememb encima [7, 8]. Pri kuhanju se LAKO denaturirajo [15].

LAKO za svojo dejavnost potrebujejo Mg²⁺ [8], Mn, Ca, Ce, Nd, Co in Tb (10 mM) [16], medtem ko jih p-kloromerkuribenzoat, alifatske, aromatske kisline [8] in težki bivalentni ioni [21] inhibirajo. Mnoge aminokislina stabilizirajo encime, v večjih koncentracijah pa postanejo inhibitorji [8]. Reakcijo za 15 % inhibira tudi produkt vodikov peroksid, zato se v industrijskih procesih uporablja katalaza, ki ne preprečuje le inhibicije, pač pa s sproščenim kisikom začetno hitrost reakcije tudi 1,5X poveča. Encim se inaktivira zaradi disociacije na podenoti. Pri sobni temperaturi in zamrznjena LAKO ne denaturira [21]. LAKO so odporne na NaDS in β -merkaptotanol, Coomassie brilliant blue in očetno kislino, s tem pa so odporne na postopek dela z NaDS-PAGE [12]. Pri ugotavljanju vpliva koncentracij aminokislin so ugotovili, da pri koncentracijah nad 10 mM pride do inhibicije, verjetno zato, ker se dve molekuli aminokislina vežeta na encim in nastane neaktiven kompleks [9, 22].

pH optimum je med 7 in 8,5 [8, 11, 14, 17, 19, 20, 22]. Encimi so aktivni pri pH 7-10 [22]. Optimalna aktivnost je v območju fosfatnega (pH 5,5-7,0) in Tris-HCl (pH 8-9) pufru. Encim je posebej občutljiv na

kisel pH, ko se spremeni njegova zgradba. Gre za protoniranje oz. deprotoniranje katalitskega dela, zato pride do spremembe encimatske aktivnosti [11]. Nekatere LAKO iz kačjih strupov pa imajo optimalen pH za oksidacijo 3,5-5,5, maksimum 4,7, poleg tega pa kažejo tudi dobro aktivnost pri pH 7,5-9,0 [16].

3. 5 BIOLOŠKI VIRI

LAKO se nahajajo v strupu kač, žuželk, v glivah, bakterijah, algah in morskem zajcu [6, 7, 8, 12], mehkužcih [19], pri sesalcih v jetrih, ledvicah, možganih in levkocitih ter tudi v ribah [6, 10], cianobakterijah, polžih in drugih vretenčarjih [18]. Nasploh so v organizmih ti encimi široko zastopani [7]. Najbolj raziskani so LAKO iz kačjih strupov, tako z vidikov toksikologije, fiziologije, biokemije in medicine [7, 12, 24] in so glavni faktor za smrtno toksičnost [8]. Nahajajo se v družinah *Viperidae*, *Crotalidae* in *Elapidae* [16]. Biološka vloga je najverjetneje pogojena s tvorbo vodikovega peroksida [7, 12].

LAKO imajo funkcijo obrambe, orožja in katabolizma aminokislin. Ščitijo pred infekcijami v črnilu morskega zajca in služi velikega afriškega polža, iz glive *Trichoderma sp.* preprečuje rast in razvoj drugih mikroorganizmov, v sesalčjem mleku pa deluje antibakterijsko [6]. Organizmi lahko razgradijo vir dušika z LAKO in nato sintetizirajo ustrezne spojine, če jih v naravi ni, s tem pa LAKO reciklira dušik v aminokislinah [17]. V rastlinah [7] in glivah [15] so LAKO ključnega pomena pri metabolizmu L-aminokislin [7, 15].

LAKO iz različnih virov se razlikujejo po molekularni masi in specifičnosti do substrata. Noben LAKO še ni bil uspešno izražen kot rekombinantni protein v prokariotskem gostitelju, kar pa je pogoj za biotehnoško sintezo in nadaljnje modifikacije proteina [6].

3. 6 FARMAKOLOŠKE LASTNOSTI

Posebne značilnosti LAKO so posledica tvorbe vodikovega peroksida, ki preko reaktivnih kisikovih zvrsti deluje na celico in vzbudi mehanizme za celično smrt [6, 8], torej povzroča oksidativni stres [16]. Ogljikovi hidrati na encimu omogočajo vezavo na celično membrano [8, 12]. Imajo antimikrobne, insekticidne in proti-tumorske lastnosti [6, 10, 12, 16, 21], povzročajo edem, preprečujejo koagulacijo krvi—so antikoagulantni in zavirajo množenje virusov, tudi HIV, povzročajo zlepljanje trombocitov [8, 10, 21], apoptozo (so citotoksične) [4, 6, 8, 10] in imajo imunomodulatorni efekt [4, 7]. Na tilakoidnih membranah prenašajo elektrone in tudi vezano železo [7]. Katalaza, ki razgrajuje nastali vodikov peroksid, nevtralizira te učinke [6, 7, 10]. Vendar pa toksičnosti ne gre vedno pripisati samo vodikovemu peroksidu, temveč tudi interakciji med LAKO in tarčno celico [6].

CELIČNA SMRT

Apoptoza je programirana celična smrt zaradi cepitve DNA [6]; vodikov peroksid poškoduje DNA, saj prekine vez med sladkorjem in fosfatno skupino, zato ne more priti do prevajanja [10, 25]. Apoptozna aktivnost je bila zmanjšana s katalazo in drugimi katalizatorji razgradnje vodikovega peroksida. Možno je, da celice zaradi oksidativnega stresa aktivirajo določene proteine, ki povzročijo reorganizacijo membrane, fragmentacijo DNA in posledično celično smrt. Vendar pa so ugotovili, da je apoptozni celični mehanizem ob prisotnosti LAKO drugačen od tistega, ki ga povzroči samo vodikov peroksid, kar pomeni, da peroksid ni edini faktor pri apoptozi. Pomembna je na primer tudi vezava na celično membrano, saj s tem vodikov peroksid neposredno ob membrani doseže višjo lokalno koncentracijo [6].

V zeleni mušnici *Amanita phalloides* so odkrili zelo toksično spojino toksofalin, ki povzroča fragmentacijo DNA in apoptozo. Ugotovili so, da je ta toksin LAKO. Ima široko selektivnost do substratov, askorbinska kislina njegovo delovanje inhibira, saj kot oksidant zmanjša oksidativni stres. Mušnica sicer vsebuje tudi toksične peptide (amanitin, falolidin) in falolizin (v trosnjaku), toksofalin pa

se razlikuje od ostalih toksinov, saj povzroča apoptozo zaradi kondenzacije kromatina, fragmentacije DNA in jedra, zato je mnogo bolj strupen od ostalih toksinov [26].

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Antibakterijska aktivnost je bila zaznana tako pri grampozitivnih kot pri gramnegativnih bakterijah. K antibakterijskemu delovanju gotovo prispeva tudi sproščeni vodikov peroksid, saj katalaza delno inhibira antibakterijski učinek. Vodikov peroksid povzroči pokanje membrane in posledično celično smrt [6]. S spektrometrijo s HRP so ugotovili, da se antibakterijski učinek pojavi šele v stacionarni fazi, če bakterije izločajo LAKO [13]. Ugotovili so, da ima LAKO enake antibiotične učinke kot antibiotik kanamicin [11]. LAKO zavirajo rast bakterije MRSA *Staphylococcus aureus* [13].

ANTIVIRUSNA AKTIVNOST

LAKO inhibira napredovanje infekcije z virusom HIV in podvojevanje virusa. Zanimivo, da pri enakih koncentracijah LAKO in vodikovega peroksida pri slednjem ni bilo opaziti aktivnosti proti virusu HIV. LAKO se specifično veže na celično membrano in z večjo koncentracijo vodikovega peroksida vzbudi določene signale v celici, katerih odzivi vodijo v inhibicijo delovanja HIV [6, 10].

LAKO zavirajo reprodukcijo virusa *Herpes simplex* tipa I in genitalnega herpesa, pri čemer so bolj učinkovite od zdravil aciklovirja in luteolina [6, 21].

ANTITUMORSKI UČINEK

LAKO iz plesni *Trichoderma viride* ima antitumorski učinek, aktivna sestavina je L-lizin α -oksidaza. Ta učinek zaviranja celične rasti so pripisali sproščenemu vodikovemu peroksidu v reakciji, a v celicah, ki so bile inhibirane ob prisotnosti vodikovega peroksida, je po dodatku L-lizina prišlo do še večje inhibicije zaradi LAKO aktivnosti [20, 25]. LAKO zavirajo sintezo DNA, RNA in proteinov pri levkemiji, raku jajčnikov, limfomu in tumorskih celicah in vitro. L-asparaginaza se že uporablja za zdravljenje tumorjev, a injiciranje lahko povzroči anafilaktični šok [21].

3. 7 UPORABNOST

L-aminokislinske oksidaze so biosenzorji, uporabni za zaznavanje aminokislin v medicinske, biokemijske in prehranske namene, saj so instrumentalne metode drage in kompleksne [7]. Z biosenzorsko elektrodo, ki deluje ob pomoči LAKO, je moč meriti količino L-aminokislin v sokovih in alkoholnih pijačah [6, 7].

Zaradi svojega delovanja se LAKO uporabljajo v tekstilni industriji za barvanje, beljenje in čiščenje z vodikovim peroksidom, so sestavine v detergentih, ki preprečujejo barvanje oblek med pranjem. Uporabljajo se v nekaterih zobnih pastah in kozmetiki. Sodelujejo pri čiščenju odpadnih voda in beljenju papirja. D-aminokislinske že uporabljajo v industriji hrane in zdravil, zato so LAKO uporabne pri ločevanju racemata med enantiomeri. LAKO s širokim spektrom za substrate omogočajo preživetje celicam v okolju z različnimi viri dušika, ki ga celice nato lahko vgradijo v druge pomembne spojine [7].

LAKO so torej multifunkcionalni proteini s potencialnimi biomedicinskimi lastnostmi. L-aminokislinske oksidaze bodo uporabne kot zdravilo proti raku, HIV in pri infekcijah s paraziti. Kačji LAKO se zelo aktivni in so uporabni za pripravo α -ketokislin, ki se uporabljajo v medicini in farmaciji; glede na raziskave pa imajo LAKO ugodne lastnosti tudi za zdravljenje tumorjev [8]. Industrijska proizvodnja standardnih koncentracij encimov in nadaljnje raziskave bodo omogočile uporabo LAKO v medicinske namene za zdravljenja raka [21], vendar je izražanje v gostiteljskih celicah slabo zaradi toksičnih učinkov [8], zato so potrebne bioinženirske spremembe [7].

4. Metode za detekcijo aktivnosti LAKO

Razvitih je več metod za merjenje LAKO aktivnosti, ki temeljijo na zaznavanju snovi v reakciji: z Warburgovim manometrom in z elektrodo merjenje porabe kisika, zaznavanje nastalega vodikovega peroksida, amonijaka in 2-okso kisline [7, 12, 22] z 2, 4-dinitrofenilhidrazinom [19].

Merjenje porabe kisika zahteva veliko natančnost in ni primerno za hitro merjenje več vzorcev hkrati. Najlažje, občutljivo in ponovljivo je spremljati količino vodikovega peroksida [7, 22], njegovo nastajanje pa lahko merimo spektrofotometrično ob prisotnosti spojin, ki spremenijo barvo: s pruskim modrilom [12] ali s hrenovo peroksidazo HRP [22].

Spektrofotometrična analiza lahko poteka na mikrotitrski plošči s 96 prostori, kar omogoča analizo veliko vzorcev naenkrat [12], pri tem pa se za zaznavanje vodikovega peroksida uporablja hrenova peroksidaza, ki ga razgrajuje in pri tem z ustreznim substratom nastaja barvni produkt [11]. Spektrofotometrično je mogoče s standardnimi raztopinami ugotovili koncentracije vodikovega peroksida in 2-oksokisline v vzorcu s HRP [17]. Metoda ima širok meritveni razpon [11].

V prejšnjih raziskavah so uporabili substrat, ki je bil 5 mM aminokislina [11, 16, 18], 2 mM o-fenilendiamin (OPD), 0,81 U/ml (4,7 [11]) HRP in vzorec LAKO v boraks-HCl pufru pH 8,5 [22]. Vzorce so inkubirali v reakcijski raztopini 60 min pri 37 °C, nato pa so reakcijo ustavili z 2 M H₂SO₄ in nato ploščo spektrofotometrično analizirali [22]. Namesto OPD se lahko uporabi tudi o-dianisidin (ODA) koncentracije 0,25 mg/ml [11].

Vzorci pa se lahko zazna tudi v gelu s HRP in ODA. V raziskavi so proteine zaznali z barvanjem z barvilom Coomassie brilliant blue in še s HRP. Uporabili so pufer 0,1 M kalijev fosfat in 0,02 % Triton-X-100 [19]. Gele so inkubirali pri sobni temperaturi v 0,1 M Tris-HCl pH 8, 15 mM L-fenilalaninu, 200 µg/l o-dianisidinu, 3 U/ml peroksidazi, dokler se lise niso videle po 30 min ali preko noči. Reakcijo so ustavili s spiranjem z vodo [17]. Aktivnost LAKO so ovrednotili glede na sposobnost oksidacije, ko so merili obarvanost kompleksa, ki je nastal med vodikovim peroksidom in o-dianisidinom [8].

Pri drugi raziskavi aktivnosti LAKO v gelu so inkubacijsko raztopino pripravili iz drugačnih reagentov, in sicer iz: pufra 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 5 mM aminokisline, 400 mM 4-aminoantipirina, 1 mM fenola in 4 U/ml peroksidaze. Do obarvanja pride zaradi interakcije fenola, peroksidaze in 4-aminoantipirina z vodikovim peroksidom. Avtorji navajajo, da bi lahko uporabili tudi 1 % CSM ali 5 mM raztopine vsake aminokisline. Gel so inkubirali tako, da so na vsak izrezan pas iz gela dolili 2 ml mešanice. Z optičnim čitalcem so zaznavali svetlo roza obarvanje, ki se je pojavilo po 15-45 min na mestih, kjer je nastajal vodikov peroksid, torej na območjih z LAKO. Po barvanju s Coomassie brilliant blue so ugotovili, da so s HRP zaznali lise LAKO, ki se po barvanju z modrilom niso pokazale kot proteini. Metoda je hitra, zanesljiva, ponovljiva, občutljiva, natančna in preprosta, poleg tega pa se lahko v enem koraku določi molekulska masa in število različnih LAKO, kar je prednost pred spektrofotometrično metodo [18].

Ker se porabi majhne količine HRP, je metoda poceni, sicer je HRP draga in se zlahka inaktivira [7, 12]. Potek motijo katalaza in ioni težkih kovin, ki katalizirajo razpad vodikovega peroksida. Substrati za HRP (2,2'-azinobis (3-etenbenzotiazolin-6) sulfonska kislina, o-fenilendiamin, o-dianisidin) so strupeni [7, 12], pri tem je OPD manj kancerogen in ima boljšo občutljivost ter večji razpon linearnosti pri merjenju absorbanca pri različnih koncentracijah [22].

Metoda, sklopljena z NaDS-PAGE, se uporablja tudi za preverjanje čistosti na podlagi molekulskih mas [16, 18], pri čemer se proteinov za zaznavanje LAKO ne sme kuhati, saj denaturirajo [19]. V poskusu so uporabili NaDS-PAGE 10 % ločevalni oz. 4 % koncentrirni gel, natančnejšo molekulska maso proteinov pa so določili z masno spektrometrijo [16, 18].

5. Poliakrilamidna gelska elektroforeza ob prisotnosti natrijevega lavril sulfata (NaDS-PAGE)

Pri metodi NaDS-PAGE vzorcem najprej v prisotnosti anionskega detergenta natrijevega lavril sulfata, ki raztaplja hidrofobne snovi in ima negativen naboj, spremenimo njihovo strukturo, da imajo vsi proteini podobno površino na enoto mase. Površina proteinov se nabije negativno, in to zaradi enake zgradbe povsod enako močno [27, 28]. Pri naši različici NaDS-PAGE vzorcev nismo denaturirali, da ti ne bi izgubili encimske aktivnosti.

PRIPRAVA VZORCEV

Gobji izvleček pridobimo iz gobe ali njenega micelija, s homogenizacijo razgradimo celične stene in njihova vsebina se raztopi v vodni raztopini. Delamo pri nizki temperaturi, da zmanjšamo možnost razgradnje proteinov s proteazami. Dobro je, da uporabimo nove metode za analizo glivnih proteinov, saj bomo le tako lahko zaznali novo biološko aktivnost [4].

Vzorci proteinov morajo biti v homogeni vodni raztopini. Če niso dovolj koncentrirani za kvalitativno analizo, je dobra tehnika koncentracije vzorcev ultrafiltracija, saj ne povzroča večje koncentracije soli [26].

Vzorci se zmeša z NaDS-nanašalnim pufrom; količina je odvisna od gostote vzorca, da se ves nabije negativno [28]. Za gobje vzorce so nanašalni pufer 2X redčili z izvlečkom [15, 19].

PRIPRAVA GELA

Poliakrilamidni gel je narejen iz monomerov akrilamida, ki vsebuje prazne prostorčke. Ko negativno nabite vzorce vlijemo v gel in jih damo v električno polje, se bodo ti gibali proti pozitivni elektrodi. Zaradi različnih velikosti proteinov se bodo skozi labirint praznih prostorčkov v poliakrilamidnem gelu najlažje gibali najmanjši proteini in tako prepotovali mnogo daljšo pot od začetka proti pozitivni elektrodi kot večji proteini. Ker je električna sila na vse proteine enaka, se bodo proteini enake velikosti-enakih molekulskih mas premikali z enako hitrostjo in zato prepotovali enako pot [27].

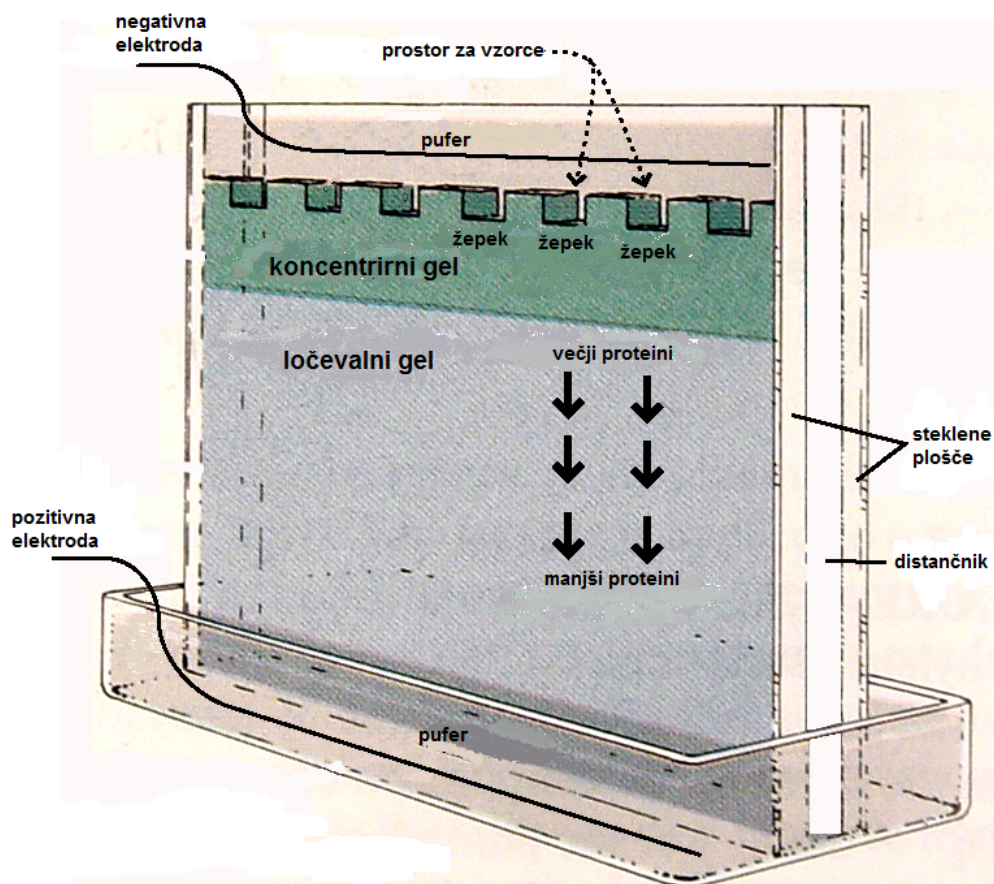
Za ločevanje proteinov sta običajno uporabljeni glicin-NaDS-PAGE (Laemmli-NaDS-PAGE) in triclin-NaDS-PAGE, ki temeljita na glicin-tris in triclin-tris pufrih. Za proteine, večje od 30 kDa, se uporablja glicin-NaDS-PAGE [28]. Geli akrilamida so označeni z odstotki akrilamida in povezovalca bisakrilamida glede na celotno koncentracijo, saj to vpliva na kvaliteto ločevanja. Koncentrirni gel je običajno 4 %, koncentracija ločevalnega gela pa je odvisna od potreb po natančnosti separacije [28].

Akrilamid in bisakrilamid sta nevrotoksična. TEMED in APS morata biti zadnja dodana k raztopini za gel, saj ga polimerizirata [28].

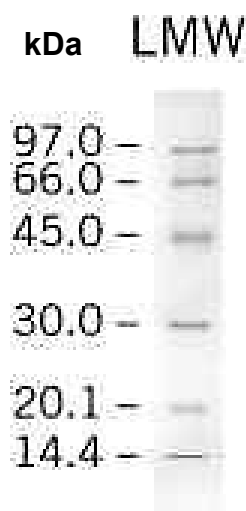
ANALIZA VZORCEV

Z NaDS-PAGE ločeni proteini so brezbarvni, zato jih vizualiziramo z barvanjem z barvilom Coomassie brilliant blue ali srebrom v gelu [28, 29], s primerjavo s standardi pa lahko ugotovimo molske mase analiziranih proteinov [28]. Skupki proteinov v gelu morajo imeti najmanj 0,2 µg proteinov za barvanje s Coomassie brilliant blue, intenzitete obarvanja pa se v določeni meri lahko uporabijo za določanje količine proteina. 100X manj proteinov je potrebnih za barvanje s srebrom [28, 30]. Z barvilom Coomassie brilliant blue gel inkubiramo v barvalni raztopini, dolžina barvanja je odvisna od debeline

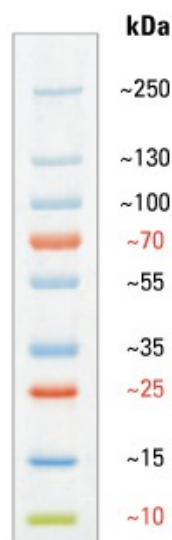
gela, za 1,5 mm 60 min, sicer pa lahko tudi več dni. Nato v razbarvalni raztopini 2X dlje (kot v 0,025 % modrilu) v 10 % očetni kislini, razbarva se dvakrat. Gel nato dokumentiramo z optičnim čitalcem [28].



Slika 3: Potek NaDS-PAGE [31]



Slika 4: Lestvica standarda za relativne molekulske mase STD LMW za barvanje v barvilu Coomassie brilliant blue [32]



Slika 5: Lestvica standarda za relativne molekulske mase STD prestained [33]

6. Spremljanje rasti mikroorganizmov

Po celični delitvi vsaka hčerinska celica nadaljuje s celično rastjo, dokler se pri primerni velikosti tudi sama ne začne deliti; v tekočem gojišču se celice enakomerno porazdelijo po celotnem volumnu. S povečanjem števila celic se poveča tudi motnost oz. turbidnost suspenzije; tako povečanje mase pa lahko zaznavamo s turbidimetrijo, ki izkorišča lastnost kulture, da deluje kot koloidna raztopina. V spektrometru obsevamo gojišče s svetlobo določene valovne dolžine in merimo količino absorbirane svetlobe, ki je premosorazmerna s koncentracijo celic, ki so jo absorbirale. Metoda je enostavna, hitra in neinvazivna, a je uporabna le za vrste kultur, ki imajo povsem difuzno rast [34].

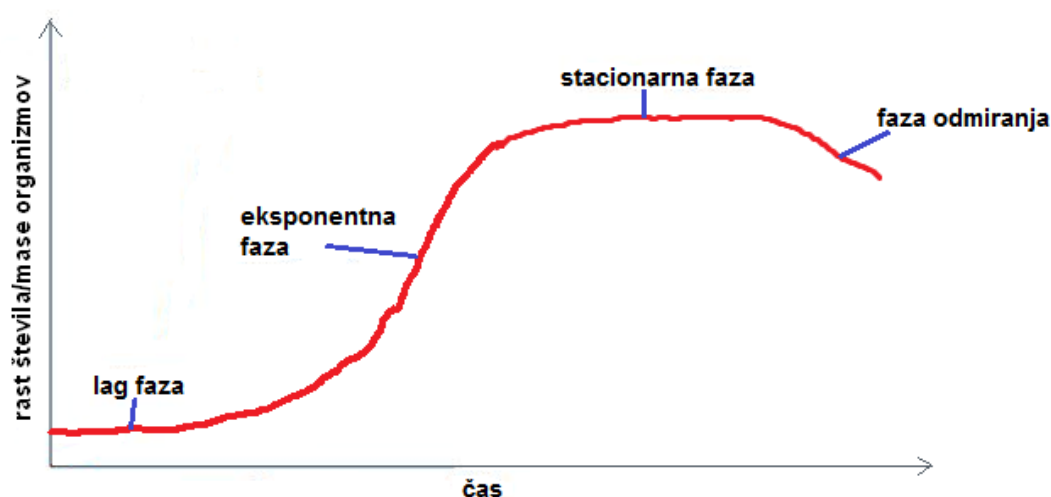
Rastna krivulja predstavlja zaporedje sprememb odziva svetlobe določene valovne dolžine v odvisnosti od časa, to pomeni, da preučujemo povečanje števila celic kulture. Oblika rastne krivulje je značilna za določen sev in pogoje kultivacije. Pri tem opazovanju zaznamo 4 značilne faze: adaptivno, logaritemsko in stacionarno ter fazo odmiranja [34].

Takoj po inokulaciji gojišča se celična delitev ne prične takoj, saj se morajo celice prilagoditi novim življenjskim pogojem, zato to fazo imenujemo lag faza, adaptivna faza oz. faza prilagajanja. Dolžina lag faze je odvisna od razlike pogojev med koncentratom in gojiščem. Poteka sinteza celičnih komponent, vendar ne prihaja do delitve.

Prilagojene celice se začnejo izjemno hitro deliti, celična masa se povečuje, zato to fazo imenujemo logaritemska oz. eksponentna faza, katere hitrost je odvisna od pogojev okolja (temperatura, hranila, pH, vodna aktivnost, tudi genetske lastnosti organizma). Rast je uravnotežena, saj se število in masa kulture povečujeta s konstantno hitrostjo.

Sledi upor okolja, saj začne primanjkovati hranil in kopičijo se odpadni produkti, zato število celic ostaja konstantno. Ta faza se zato imenuje stacionarna faza, v kateri enako število celic nastane kolikor jih odmre. Zaradi inhibicije delitve se upočasni metabolizem in celice začnejo izrabljati rezervne snovi [34].

Ker se količina hranil zmanjšuje in število odpadnih produktov povečuje, sledi faza odmiranja, kjer se število živih celic prične zmanjševati [34].



Slika 6: Značilna rastna krivulja gojenih mikroorganizmov [prirejeno po 35]

7. Uporabljeni vzorci

1 DEBLO: *Ascomycota*

1.1 PODDEBLO: *Pezizomycotina*

1.1.1 RED: *Pezizales*

1.1.1.1 DRUŽINA: *Tuberaceae*

GOMOLJKA, TARTUF *Tuber mesentericum* Vittad.

Raste pod zemljo. Ima močan vonj, ki na zraku hitro izgublja intenziteto. Čas nabiranja je od septembra do februarja, raste v bogatih prezračenih tleh v simbiozi s hrasti, borom, gabrom, lesko in bukvijo [36].



Slika 7: Tartuf *Tuber mesentericum* [36]

1.2. RAZRED: *Sordariomycetes*

1.2.1 RED: *Hypocreales*

1.2.1.1 DRUŽINA: *Hypocreaceae*

***Trichoderma viride* Pers.**

Plesen, ki se jo uporablja kot biofungicid v kmetijstvu zaradi glivnih patogenov, pri čemer je tudi sama patogena in povzroča zeleno plesen na čebuli in pri umetno gojenih gobah. Parazitira na lesu in gobah, pri čemer izloča celuloze, hitinaze in druge encime [37].



Slika 8: Plesen *Trichoderma viride* na lubju [38]

2 DEBLO: *Basidiomycota*

2.1 PODDEBLO: *Agaricomycotina*

2.1.1 RAZRED: *Agaricomycetes*

2.1.1.1 RED: *Agaricales*

2.1.1.1.1 DRUŽINA: *Agaricaceae*

DVOTROSNI KUKMAK *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing.

Užitna goba prijetnega okusa, ki raste od poletja do zgodnje jeseni po vrtovih in gnojenih tleh. Užitna je tudi surova, vendar je zaradi potencialno kancerogenega agaritina ni priporočljivo uživati v večjih količinah [39].



Slika 9: Dvotrosni kukmak *Agaricus bisporus* [40]

GNOJIŠČNA TINTOVKA *Coprinopsis cinerea* (Schaeff.) Redhead

Majhna goba, ki raste na kupih hlevskega gnoja od pomladi do jeseni in je dokaj pogosta. Stare gobe počrniijo. Ni užitna, meso je neprijetnega vonja [41]. Je tudi laboratorijski organizem; njen genom so že sekvencirali [42].



Slika 10: Gnojiščna tintovka *Coprinopsis cinerea* [43]

VELIKA TINTNICA, ČOPASTA TINTNICA *Cóprinus comátus* (Müll ex Fr.) S. F. Gray

Klobuk je pri mladi gobi valjasto zaprt okrog beta, pri stari klobuk postane črn. Goba je užitna, ko je še bela. Iz utekočinjenih tintnic so včasih pripravljali črnilo. Raste od spomladi do jeseni na pognojeni zemlji in v gozdu [39].



Slika 11: Velika tintnica *Coprinus comatus* [44]

ORJAŠKI DEŽNIK *Macrolepióta prócera* (Scop. ex Fr.) Sing.

Do 30 cm visoka goba s klobukom, ki ima premer do 25 cm, je užitna in v Sloveniji zelo pogosta. Raste od poletja do pozne jeseni [39].



Slika 12: Orjaški dežnik *Macrolepiota procera* [45]

2.1.1.1.2 DRUŽINA: Amanitaceae

CITRONASTA MUŠNICA *Amanita cítrina* (Schiff.) S. F. Gray

Je pogojno užitna goba, pri kateri je lahko usodna zamenjava z zelo podobno zeleno mušnico. V Sloveniji je zelo razširjena in raste jeseni [39].



Slika 13: Citronasta mušnica *Amanita citrina* [46]

RDEČA MUŠNICA *Amanita muscária* (L. ex Fr.) Hooker

Goba ima značilen rdeč klobuk z belimi krpicami in je strupena. Raste od poletja do jeseni in je zelo pogosta [39].



Slika 14: Rdeča mušnica *Amanita muscaria* [47]

ZELENA MUŠNICA *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr.

Je smrtno nevarna goba, ki v naših krajih povzroči 90 % vseh zastrupitev z gobami, ki se končajo smrtno zaradi faloidnega sindroma, saj je v enem samem klobuku smrtna količina strupov za odraslega človeka. V Sloveniji je pogosta in raste od poletja do jeseni [39].



Slika 15: Zelena mušnica *Amanita phalloides* [48]

RDEČKASTA MUŠNICA, PUREŠNICA, BISERNICA *Amanita rubescens* (Pers. ex Fr.) Gray

Rdečkasto-rjav klobuk je prekrit z belimi krpicami, meso pa na zraku postane temno rdeče. Je zelo razširjena goba, ki raste od poletja do jeseni. Je pogojno užitna po kuhanju, poleg tega pa jo lahko zamenjamo za strupeno panterjevo mušnico (*Amanita pantherina*) [39].



Slika 16: Rdečkasta mušnica *Amanita rubescens* [49]

2.1.1.1.3 DRUŽINA: Hygrophoraceae

PORDEČELA POLŽEVKA *Hygrophorus erubescens* Fr.

Neužitna goba z grenkim okusom, raste v začetku jeseni na apnenčastih tleh v senčnih iglastih gozdovih in ni pogosta. Ima neenakomerno pordečel klobuk [39].



Slika 17: Pordečela polževka *Hygrophorus erubescens* [50]

2.1.1.1.4 DRUŽINA: Hymenogastraceae

GOLOGLAVKA *Psilocybe* sp.

Te gobe so majhne, a po svetu slovijo zaradi svojih psihedeličnih učinkov kot posledica psilocina in psilocibina. Gobe so strupene, pri nas pa raste več vrst na bogatih tleh oz. hlevskem gnoju [51, 52]. Te psihedelične gobe so uporabljala predvsem ljudstva iz Srednje Amerike, v Evropi pa so vrači uporabljali rdečo mušnico [3].



Slika 18: Gologlavka *Psilocybe* sp. [53]

2.1.1.1.5 DRUŽINA: *Physalacriaceae*

SEVERNJAŠKA MRAZNICA *Armillária boreális* Marxm. & Korhoen

Je pogojno užitna goba, ki raste v šopih na odmrlem in tudi še živem lesu; je parazit ali saprofit. Uspeva poleti in jeseni [54].



Slika 19: Severnjaška mraznica *Armillaria borealis* [55]

BUKOV OSTRIGAR, POZNI ŠKOLJKAR *Pleurótus ostreátus* (Jacq. ex Fr.) Kumm

Užitna goba dobrega okusa, ki raste v jeseni, na deblih in štorih listavcev, zlasti na bukvi, raste v šopih, gojijo pa ga tudi umetno. Sicer pa kot parazit na drevju povzroča belo trohnobo [39].



Slika 20: Bukov ostrigar *Pleurotus ostreatus* [56]

2.1.1.1.7 DRUŽINA: *Strophariaceae*

NAVADNA ŽVEPLENJAČA *Hypholóma fasciculáre* (Huds. ex Fr.) Kummer

Klobuk je zelenkasto do žvepleno rumene barve, v sredini je temnejši. Meso je neprijetnega vonja. Goba ni užitna. Raste od pomladi do jeseni na trhljih panjih listnatih dreves v šopih in je zelo pogosta [39].



Slika 21: Navadna žveplenjača *Hypholoma fasciculare* [57]

2.1.1.1.8 DRUŽINA: *Tricholomataceae*

POZNA LIVKA, MARTINOVKA *Clitocybe geótrope* (Bull. ex Fr.) Quéf.

Je užitna goba, ki raste predvsem na Primorskem do začetka zime [39].



Slika 22: Pozna livka *Clitocybe geotropa* [58]

MEGLENKA, POPRHNJENA KOLESNICA
Clitocybe nebularis (Batsch) P. Kumm.

Je pogojno užitna goba, meso je neprijetnega okusa. Je zelo pogosta in raste jeseni [39].



Slika 23: Meglenka *Clitocybe nebularis* [59]

VIJOLIČASTA BLEDIVKA *Laccaria amethystina*
(Bolt. ex Hooker) Murr.

Le 2-6 cm visoka goba značilno vijolične barve. Raste od poznega poletja do pozne jeseni in je v Sloveniji zelo razširjena. Goba je užitna [39].



Slika 24: Vijoličasta bledivka *Laccaria amethystina* [60]

VIJOLIČASTA KOLESNICA *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cke.

Užitna goba vijolične barve, ki raste celo jesen do zmrzali in je zelo pogosta [39].



Slika 25: Vijoličasta kolesnica *Lepista nuda* [61]

MILNATA KOLOBRANICA *Tricholoma saponaceum* (Fr.) Kumm

Pogojno užitna goba, z nekoliko grenkim mesom, ki ima vonj po milu. Raste v zgodnji jeseni in je v Sloveniji zelo pogosta [39].



Slika 26: Milnata kolobarnica *Tricholoma saponaceum* [62]

2.1.1.2 RED: *Auriculariales*

2.1.1.2.1 DRUŽINA: *Hyaloriaceae*

LEDENKA *Pseudohydnum gelatinosum* (Scop. ex Fr.) Karst.

Goba je značilne bele do prosojne barve, je užitna in ima vonj po smoli. Raste od poletja do jeseni na starih trhljih panjih iglastih dreves, po navadi v skupinah in je zelo pogosta. Užitna je surova v solati [39].



Slika 27: Ledenka *Pseudohydnum gelatinosum* [63]

2.1.1.3 RED: *Boletales*

2.1.1.3.1 DRUŽINA: *Boletaceae*

KOSTANJEVKA *Xerocomus badius* (Fr.) Kühn. ex Gilb

Užitna goba, ki raste predvsem v iglastih gozdovih v nižinah od poznega poletja do pozne jeseni [39].



Slika 28: Kostanjevka *Xerocomus badius* [64]

2.1.1.3.2 DRUŽINA: *Suillaceae*

PEŠČENKA, PEŠČENA LUPLJIVKA *Suillus variegatus* (Sow. ex Fr.) O. Kuntze

Klobuk je rjav kot skorja zapečenega kruha. Je užitna goba, ki ima rumeno meso, ki na zraku pomodri. Raste v začetku jeseni, predvsem v skupinah pod bori [39].



Slika 29: Peščenka *Suillus variegatus* [65]

2.1.1.4 RED: *Russulales*

2.1.1.4.1 DRUŽINA: *Russulaceae*

KOSMATA MLEČNICA, KOSMATA SIROVKA *Lactarius torminosus* (Schiff. ex Fr.) Gray

Površina klobuka je prekrita z dlačicami. Če gobo prerežemo, se izcedi bel pekoč mleček. Je strupena. Raste celo jesen na svetlih peščenih tleh in je zelo pogosta [39].



Slika 30: Kosmata mlečnica *Lactarius torminosus* [66]

OKRASNA GOLOBICA *Rússula ochroléuca* (Pers.) Fr.

Pogojno užitna goba, oster okus s kuhanjem izgine. Raste celo jesen v iglastih gozdovih in je pogosta [39].



Slika 31: Okrasna golobica *Russula ochroleuca* [67]

3 DEBLO: *Chordata*

3.1 RAZRED: *Reptilia*

3.1.1 RED: *Squamata*

3.1.1.1 DRUŽINA: *Viperidae*

MODRAS *Vipera ammodytes ammodytes* L.

Kača ima značilen rožiček na nosu, na hrbtu pa temen cik-cak vzorec, sicer je rjave do sive barve. Živi na prisojnih legah vse južne Evrope. Je strupena kača, ki živi tudi v Sloveniji [68].



Slika 32: Modras *Vipera ammodytes ammodytes* [69]

Vsi gobji vzorci so bili nabrani v slovenskih gozdovih; vzorce s Primorske je nabral in določil dr. Jože Brzin, iz osrednje Slovenije Jasna Šlenc, večino vzorcev pa sva na Gorenjskem v okolici Kranja nabrala in določila jaz in Dragana Savič. Gnojščna tintovka je bila vzgojena v laboratoriju, L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride* in tartufi pa so bili kupljeni pri prodajalcu. Vsi vzorci so bili določeni z določevalnim ključem do vrste oz. do rodu.

Kačji strup so znanstveniki pridobili iz modrasa, ki so ga imeli nekaj časa v laboratoriju na Institutu Jožef Stefan na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti.

Gobe so bile izbrane zaradi svoje strupenosti, užitnosti, pogostnosti ali le zaradi svoje zanimivosti (barva); plesen in kačji strup sta bila izbrana zaradi člankov, ki potrjujejo močno encimsko delovanje LAKO [8, 11, 16, 20, 21, 24, 25].

8. Raziskovanje

Raziskavo sem izvajal od oktobra 2013 do februarja 2014 na Institutu Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana, v stavbi B na Odseku za biotehnologijo (B3), pod vodstvom dr. Jerice Sabotič in ob pomoči mladih raziskovalcev, ki so v istem času tudi opravljali svoje raziskovalno delo na tem odseku.

Na podlagi različnih znanstvenih člankov sva z mentorico pripravila načrte za vsako stopnjo raziskovanja in sproti reševala probleme glede na pojavljene težave, saj so bile nekoliko podobne raziskave že narejene, vendar ne na enak način, kot sem se ga lotil, saj je bil cilj raziskave tudi uporaba novo razvite lastne metode na več različnih vzorcih in njeno ovrednotenje.

Potek raziskave:



Shema 2: Načrt eksperimentalnega dela

V **prvem testu** sem želel preveriti podatke iz literature glede možnih analiznih metod z izbiro in uporabo najprimernejše izmed njih ter glede na rezultate prvega testa začrtati smernice za optimizacijo.

Z **optimizacijo** sem raziskoval najprimernejše reagentne in razmerje med njimi za čim boljši rezultat.

Pri **testiranju vzorcev** sem želel novo metodo preizkusiti na čim večjem številu vzorcev in ugotoviti razširjenost LAKO, hkrati pa glede na rezultate tudi ovrednotiti optimizacijo in predlagati morebitne izboljšave.

Na koncu sem s **kontrolno** preveril rezultate testiranja vzorcev z negativno kontrolo s katalazo in rastnimi krivuljami različnih organizmov ter obenem želel raziskati in/ali potrditi značilne lastnosti LAKO.

UPORABLJENI PRIPOMOČKI

Instrumenti

- pH meter: Mettler Toledo, Seven Easy
- elektroda za pH meter: Mettler Toledo, Inlab Export Pro, pH 0-14, 100 °C
- elektroda v Friscolyt-u
- magnetno mešalo za pH meter: IKA KMO2 basic
- magnetno mešalo: Tehnica Rotamix S-10
- tehnica: Vibra AJ 5 g-4200 g, odstopanje < 100 g: $\pm 0,01$ g, odstopanje > 100 g: $\pm 0,1$ g
- avtoklav: G + H Labortechnik GmbH Varioklav Dampfsterilisatoren, 400 E, 1998, Nemčija, tlak: 2,5 bar
- analitska tehnica: ANG GH-252, max 250 mg, min 1 mg, e = 1 mg, d = 0,01/0,1 mg, prodaja: ALBA
- pipete: Eppendorf Research, 0,5-10,0 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l
- multikanalna pipeta: Eppendorf, 8X200 μ l
- pipetor
- stresalnik: Tehnica VIBROMIX 31 HLD
- kamera za črno-belo slikanje v vidnem in ultravijoličnem spektru s tiskalnikom: UVI tec
- hladilnik: + 4 °C
- zamrzovalnik: -20 °C
- zamrzovalnik: -80 °C
- barvni optični čitalec
- laminarij
- digestorij: Wesemann
- termoblok: ThermoShaker, Biometra
- računalnik
- set za NADS-PAGE: BioRad
 - o kadička
 - o elektroda
 - o primež za dva gela
 - o pokrov s kablom
 - o izvir napetosti: Power basic, 300 V, 400 mA, 75 W
- vortex: Tehnica, 300 rpm = max, Vibromix 10
- čitalec mikrotitrskih plošč:
 - o SUNRISE, Tecan, Serial number: 709004319, Firmware: V 3.31 25/08/05
 - o program za zajem podatkov o absorbanci: XFLUOR4 Version: V 4.51
 - o program za obdelavo rezultatov: Microsoft Excel 2010
- komplet za ultrafiltracijo Amicon 8400
 - o plastična posoda z merilno skalo
 - o mešalo
 - o pokrov
 - o podstavek
 - o jekleni primež
 - o cev za iztek
 - o cev za dotok dušika
 - o celulozna membrana: PALL, Omega, 3 kDa
- inkubator s stresalnikom 30 °C: Memmert
- Inkubator s stresalnikom 37 °C: Binder

Pripomočki

- alkoholni flomaster
- aluminijasta folija za živila: Mercator
- cedilo
- celulozni robčki-gaze: Mercator
- centrifugirke za ultrafiltracijo z membrano: Millipore, Amicon Ultra, Centrifugal filters, Ultracel 3K, regenerated cellulose, 3000 NMWL, 4 ml
- debela stekla z distančniki: 1,5 mm, Mini protean 3 system glass plates, spacer plates with 1,5 mm spacers, 1656612, Bio Rad
- centrifugirke s pokrovčki: 15 ml in 50 ml, ISO LAB
- filtri za brizge: ca-membrane 0,20 μ m, 90491011; Whatman, FP 13/0,2 RC-S, 0,2 μ m; 7 bar max
- filtrirni papir: Whatman 4, Cat# 1004125
- glavnički: 10 well (10 žepkov), 1,5 mm, Bio Rad
- gumijaste podlage za vliivanje gelov
- kovinska pinceta
- kvadratna posoda od nastavkov za pipetiranje
- lepilni trak
- lonec
- magneti, obdani s PTFE
- merilni valji 100 in 500 ml, 1000 ml, plastični
- mikrocentrifugirke: plastične, 1,5 in 0,5 ml
- mikrotitrna plošča s pokrovom: 96 mest
 - o plastičen film za mikrotitrsko ploščo
- nastavki za pipetiranje: Sarstedt, 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l, 200 μ l s podaljšano konico za nanašanje v žepek v gelu
- papirnate brisače
- parafilm
- platenke s pokrovom: 100 ml, 150 ml, 250 ml
- plastična folija za živila: Mercator
- plastična ploščica za elektroforezo (če se razvija le 1 gel): Bio Rad
- plastična stojala za gele: Bio Rad
- plastične čaše: 1000 ml, 2000 ml, 5000 ml, ISO LAB
- plastične ladjice za tehtanje

-
- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● plastične petrijevke s pokrovom: premer 80 mm ● plastično stojalo za mikrocentrifugirke ● plastično stojalo za centrifugirke ● plavajoče stojalo za mikrocentrifugirke med kuhanjem ● plinski gorilnik trak z živosrebrovo spojino: Comply™, Steam Indicator Tape ● plošča z utorom za lažje pipetiranje-rezervoar za tekočino: Brand plates, S, 781662, sterile, Germany ● ploščica-vzvod za odpiranje stekel: Bio Rad ● pole filtrirnega papirja ● posoda iz stiropora za led ● pripomoček za pipetiranje ● prozorna plastična mapa ● puhalka za vodo in etanol ● spatula ● steklene čaše: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml ● steklene petrijevke s pokrovom: premer 150 mm | <ul style="list-style-type: none"> ● steklenica za avtoklaviranje ● steklenice s pokrovom: 250 ml, 500 ml ● sterilne cepilne zanke ● sterilne merilne pipete: 10 ml, 25 ml ● sterilne plastične brizge: 5 ml ● sterilne steklene epruvete s kovinskim zamaškom ● stiskalec za pire krompir ● stojalo za epruvete ● stojalo za nastavke za pipete: Eppendorf ● škarje ● štedilnik ● stoparica ● tanka stekla: Short plates, Mini protean 3, 1653308, Bio Rad ● ura ● zaščitne rokavice ● zeleni primeži za gele: Bio Rad ● žlička |
|--|---|
-

Kemikalije

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ● agar: agar M 17 acc. to Terezaghi, 1151080500, for microbiology, Merck Millipore ● akrilamid/bis (40 %): Acrylamide, N, N'-Methylenebisacrylamide 37,5 : 1 solution, 40 % in H₂O, 01709-500ML, Fluka analytical ● APS: Ammonium persulfate, for molecular biology, for electrophoresis, ≥ 98 %, Sigma, A3678-25G ● Bis-Tris: Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane, ≥ 98 %, B9754-500G, C₈H₁₉NO₅, MW: 209,24 g/mol, Sigma Life Science, USA ● bromfenol modro: Bromphenol blau, pH-indikator, podr. 3,0-6,0, 612893, Kemika, Zagreb ● butan-1-ol: Merck, 1019901000, Emsure, Reag. ph Eur. ● casamino acids: N-Z-Case Plus, N4642-250G, Fluka, from bovine milk, ≥ 6 % amino ● CH₃COOH: Acetic acid, 100 %, p. A., M = 60,05 g/mol, A0820, Applichem, Germany ● Coomassie brilliant blue: Amersham GE Healthcare, Life Sciences, 17-0517-01, PhastGel® Blue R 250 ● CSM: Complete supplement (CSM), DCS0011, PE365JC, Fornedium LTD, England ● destilirana voda ● glicerol: Glycerol, for analysis, 453752, CH₂OHCHOHCH₂OH, Carlo Erba reagents ● glicin: Glycine, analytical grade, C₂H₅NO₂, Mr = 75,07, 23390, Serva ● glukoza: D-(+) Glucose, C₆H₁₂O₆, 49159-1KG, ≥ 99,0 %, Fluka analytical | <ul style="list-style-type: none"> ● H₂SO₄: Sulphuric acid, 96 %, for analysis, 410301, ρ = 1,835 ● HCl: Hydrochloric acid, 37 %, p. A., A0695, M = 36,46 g/mol, Applichem, Germany ● HRP: Peroxidase from horseradish, Type I, essentially salt-free, lyophilized powder, 52 units/mg solid, 96,2 mg solid, P8125-5KU, Sigma Life Science ● K₂HPO₄: Potassium phosphate dibasic anhydrous, Mr = 174,18, ≥ 99,0 %, 60354, Fluka biochemica ● katalaza: Catalase from bovine liver, lyophilized powder, 2000-5000 units/mg protein, C9322-5G, Sigma, USA ● KCl: Potassium chloride, Fluka, Biochemika, 2312118, 60129, ≥ 99,5 %, Mr 74, 56 ● KH₂PO₄: Potassium phosphate monobasic, 1 kg, puriss., 70100, M = 136,09 g/mol, Riedel-de-Haën ● kvasni ekstrakt: Select Yeast Extract, Y1000-500G, Sigma Life Science ● L-Ala: L-Alanine, 11482, reinst-research grade, biochemical standard, C₃H₇NO₂, M = 89,1, Serva Feinbiochemica, Heidelberg/New York ● L-Arg: L-Arginine, BioUltra, ≥ 99.5 %, 11009-100G-F, Sigma ● L-Asn: L-Asparagine, A-4280, C₄H₆N₂O, Sigma Cell Culture ● L-Glu: L-Glutamine, 22930, p. A., C₅H₁₀N₂O₃, M = 146,2, Serva Entwicklungslabor., Heidelberg ● L-Leu: L-Leucine, 61819, ≥ 99,5 %, C₆H₁₂NO₂, Mr 131,18, Fluka Biochemica, Sigma Aldrich, Germany ● L-Lys: L-Lysine, 28195, cryst. pure, C₆H₁₂N₂O₂·XH₂O, Mr = 164,2, Serva Feinbiochemica |
|---|--|
-

● L-Phe: L-Phenylalanine, 32191, research grade, C₉H₁₁NO₂, Mr = 165,2, Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg ● MgSO₄: Magnesium sulphate heptahydrate, ≥ 99,0 %, BioXtra, Sigma M5921 ● Na₂CO₃: Sodium carbonate, puriss, p. a., anhydrous, ≥ 99,8 %, 31432-500-G-R, MW: 105,99 g/mol, Sigma Aldrich, Germany ● Na₂S₂O₃: Sodium thiosulfate, purum p.a., anhydrous, ≥ 98,0 %, Sigma Aldrich, 72049-250G ● NaCH₃COO: Natrij acetat brezvodni, pro analysi, C₂H₂NaO₂, Mr 0 82,03, 1441908, Kemika, Zagreb ● NaCl: Sodium chloride, 479687, Carlo Erba, for analysis ● NaDS: Sodium dodecyl sulfate, ReagentPlus, ≥ 98,5 %, L4509-1KG, Sigma-Aldrich ● NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat, zur analyse, p. a., 1.06329.0500, M = 84,01, Merck ● NaOH: Sodium hydroxide, pellets for analysis, Merck, B0964298339, M = 40,00 g/mol	● OPD: o-Phenylendiamine, flakes, 99,5 %, P23983-100g, 108,1 g/mol, Aldrich Chemistry ● pepton: Peptone from anima tissue, from meat, Type I, for microbiology, P7750-1kg, Sigma Life Science ● pufri za pH meter in FriscoLyt: Mettler Toledo, pH 4,01, 7,00, 9,21 ● STD prestained: PageRuler™ Plus, Prestained Protein Ladder, 26619, Thermo scientific, Lithuania ● tehnčni etanol: 70 % ● TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylenediamine, research grade, min 99 %, C₆H₁₀N₂, M = 116,2, Serva, Heidelberg ● tripton: Bacto™ Tryptone, Pancreatic Digest of Casein, microbiological peptone for use in culture media, 211699, Becton-Dicson and Company, USA ● Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane, analytical grade, 120745, C₄H₁₁NO₃, Mr 121,1, Serva ● Triton-X-100: Serva 37240, p. a. ● ZnCl₂: Zinkchlorid, ≥ 98 %, 20808-6, M 136,30, Sigma Aldrich
---	--

Vzorci

● kačji strup <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> – Vaa ● L-lizin oksidaza iz <i>Trichoderma viride</i>, Lysine Oxidase from <i>Trichoderma viride</i> lyophilized powder, 20-60 units/mg protein, L6150, Sigma – T. v. ● sok <i>Agaricus bisporus</i> – Abi (20. 8. 2013) ● sok <i>Amanita citrina</i> – Ac (12. 10. 2013) ● sok <i>Amanita muscaria</i> – Am (12. 10. 2013) ● sok <i>Amanita phalloides</i> – Ap (20. 8. 2013) ● sok <i>Amanita rubescens</i> – Ar (12. 10. 2013) ● sok <i>Armillaria borealis</i> – Abo (18. 11. 2013) ● sok <i>Clitocybe geotropa</i> – Cg (20. 8. 2013) ● sok <i>Clitocybe nebularis</i> – Cn (8. 11. 2013) ● sok <i>Coprinopsis cinerea</i> – Cci (12. 10. 2013) ● sok <i>Coprinus comatus</i> – Cco (25. 11. 2013)	● sok <i>Hygrophorus erubescens</i> – He (12. 10. 2013) ● sok <i>Hypholoma fasciculare</i> – Hf (15. 11. 2013) ● sok <i>Laccaria amethystina</i> – La (12. 10. 2013) ● sok <i>Lactarius torminosus</i> – Lt (29. 10. 2013) ● sok <i>Lepista nuda</i> – Ln (20. 11. 2009) ● sok <i>Macrolepiota procera</i> – Mp (20. 8. 2013) ● sok <i>Pleurotus ostreatus</i> – Po (20. 8. 2013) ● sok <i>Pseudohydnum gelatinosum</i> – Pg (12. 10. 2013) ● sok <i>Psilocybe sp.</i> – P sp. (5. 10. 2013) ● sok <i>Russula ochroleuca</i> – Ro (25. 10. 2013) ● sok <i>Suillus variegatus</i> – Sv (20. 8. 2013) ● sok <i>Tricholoma saponaceum</i> – Ts (13. 10. 2010) ● sok <i>Tuber mesentericum</i> – Tm (20. 8. 2013) ● sok <i>Xerocomus badius</i> – Xb (21. 11. 2013)
--	--

Mikroorganizmi

● <i>Escherichia coli</i> DH5α (trajna kultura)	● <i>Lactococcus lactis</i> NZ8000, 15. 1. 2014 (razmaz na plošči) ● <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BT 4741, 16. 1. 2014 (razmaz na plošči)
---	---

9. Standardni postopki

9.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

- **Pufer za ločevalni gel:** 1,5 M Tris-HCl pH 8,8: za 100 ml v vodi raztopimo 18,17 g Tris, s HCl uravnamo pH na 8,8, nato avtoklaviramo in hranimo v hladilniku pri 4 °C.
- **Pufer za koncentrirni gel:** 0,5 M Tris-HCl pH 6,8: za 100 ml v vodi raztopimo 6,06 g Tris, s HCl uravnamo pH na 6,8 nato avtoklaviramo in hranimo v hladilniku pri 4 °C.
- **10 % NaDS:** za 100 ml v vodi raztopimo 10 g natrijevega lavril sulfata, hranimo pri sobni temperaturi.
- **10 % APS:** za 5 ml raztopine v vodi raztopimo 500 mg amonijevega persulfata, raztopino alikvotiramo v mikrocentrifugirke po 60 ali 120 µl in hranimo zamrznjeno pri -20 °C.
- **Nanašalni pufer** (2X sample buffer): 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2,0 ml glicerol, 4,0 ml 10 % NaDS, 1,5 ml destilirana voda, čisto malo indikatorja bromfenol modro, da se obarva temno modro. Pufer hranimo v hladilniku pri 4 °C. Običajno vzorce pripravljamo tako, da pufer 2X razredčimo-torej dodamo enak volumen vzorca kot pufera, saj nanašalni pufer omogoča, da se vzorci posedejo na dno žepka v gelu in se ne raztopijo v elektrolitu pri elektroforezi, proteini se negativno nabijejo in fronta najhitrejših delcev je obarvana modro.
- **Pufer za elektroforezo** (10X running buffer): 29 g Tris, 144 g glicin, 10 g NaDS, do 1 l destilirana voda, pH je približno 8,3 in ga ne uravnavamo. Hranimo ga pri sobni temperaturi. Ta pufer je elektrolit pri elektroforezi in ga nalijemo najprej v žepke, torej na površino gela, nato pa kadičko dopolnimo vsaj do elektrode, kar znaša približno 500 ml za eno kadičko, za kar ga torej porabimo 50 ml in z destilirano vodo dopolnimo do 500 ml.
- **20 mM OPD:** 3 mg o-fenilendiamina raztopimo v 1,4 ml destilirane vode. Centrifugirko ovijemo v aluminijasto folijo in raztopino pripravimo vsakič svežo.
- **52 enot HRP/ml:** 1 mg hrenove peroksidaze raztopimo v 1 ml destilirane vode. Alikvote shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C. (81 U/ml pripravimo iz 0,5 mg HRP v 0,3125 ml destilirane vode.)
- **2 M H₂SO₄:** 100 ml raztopine pripravimo iz 11 ml 96 % žveplove(+6) kisline, ki jo vlijemo v vodo, shranimo pri sobni temperaturi.
- **Fosfatni pufer pH 7,4** se pripravi vsakič svež: 40,1 ml 1 M K₂HPO₄ (za 50 ml 8,71 g K₂HPO₄) in 9,9 ml KH₂PO₄ (za 50 ml 6,80 g KH₂PO₄).
- **Pufer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0:** 500 ml raztopine pripravimo iz 6,055 g Tris, s HCl uravnamo na pH 8,00. Shranimo v hladilniku pri 4 °C.
- **Pufer 0,1 M Bis-Tris pH 5,5:** 500 ml raztopine pripravimo iz 10,462 g Bis-Tris, s HCl uravnamo na pH 5,50. Shranimo v hladilniku pri 4 °C.
- **2,5 % Triton-X-100:** za 50 ml raztopimo 1,25 ml Triton-X-100 v destilirani vodi.
- **Pufer glicin-HCl pH 2,0:** 25 ml 0,1 M glicin (0,1877 g glicin/l raztopine), s HCl uravnamo na pH 2,00, z destilirano vodo dopolnimo do 50 ml.
- **Pufer 0,1 M NaCH₃COO-CH₃COOH pH 3,0/4,0/5,0:** pH 3,0: 25 ml 0,1 M CH₃COOH, 1 ml 0,1 M NaCH₃COO, pH 4,0: 20,5 ml 0,1 M CH₃COOH, 4,5 ml NaCH₃COO, pH 5,0: 7,4 ml CH₃COOH, 17,6 ml NaCH₃COO, vsakokrat z destilirano vodo dopolnimo do 50 ml.
- **Pufer 0,1 M Bis-Tris-HCl pH 6,0/7,0:** pH 6,0: 12,5 ml 0,1 M Bis-Tris, s HCl uravnamo na pH 6,0, pH 7,0: 12,5 ml 0,1 M Bis-Tris, s HCl uravnamo na pH 7,0, vsakokrat z destilirano vodo dopolnimo do 50 ml.
- **Pufer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0/9,0:** pH 8,0: 12,5 ml 0,1 M Tris, s HCl uravnamo na pH 8,0, pH 9,0: 12,5 ml 0,1 M Tris, s HCl uravnamo na pH 9,0, vsakokrat z destilirano vodo dopolnimo do 50 ml.
- **Pufer 0,1 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 10,0/11,0:** pH 10,0: 6,875 ml 0,1 M Na₂CO₃, 5,625 ml 0,1 M NaHCO₃, pH 11,0: 14,375 ml 0,1 M Na₂CO₃, z 0,1 M NaHCO₃ uravnamo na pH 11,0, z destilirano vodo vsakič dopolnimo do 50 ml.
- **Katalaza 10000-25000 enot/ml** (5 mg katalaze/ml raztopine): za 12 ml raztopine raztopimo 60 mg katalaze (oz. 1 mg katalaze/1 ml raztopine, pri čemer ima taka raztopina 2000-5000 U/ml). Raztopino pripravimo vsakič svežo.
- **50 mM L-Leu:** 32,8 mg L-levcina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **50 mM L-Arg:** 39,0 mg L-arginina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.

- **50 mM L-Glu:** 36,6 mg L-glutamina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **50 mM L-Asn:** 37,5 mg L-asparagina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **50 mM L-Ala:** 22,3 mg L-alanina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **50 mM L-Phe:** 41,3 mg L-fenilalanina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **50 mM L-Lys:** 41,1 mg L-lizina raztopimo v 5 ml destilirane vode, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **10 % tripton:** za 5 ml raztopine v destilirani vodi raztopimo 0,5 g triptona, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **10 % pepton:** za 5 ml raztopine v destilirani vodi raztopimo 0,5 g peptona, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **1,0 % CSM:** za 10 ml raztopine v destilirani vodi raztopimo 100 mg CSM, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **10 % casamino acids:** za 5 ml raztopine v vodi raztopimo 0,5 g casamino acids, shranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
- **100 mM Zn²⁺:** za 10 ml raztopine v destilirani vodi raztopimo 136,3 mg ZnCl₂
- **gojišče SOC:** za 100 ml v destilirani vodi raztopimo 0,5 g kvasnega ekstrakta, 2,0 g triptona, 58 mg NaCl, 18,6 mg KCl, 0,5 g MgSO₄, 0,4 g glukoze. Steriliziramo s filtriranjem in shranimo pri 4 °C.
- **gojišče GM17:** za 100 ml v destilirani vodi raztopimo 5,5 g agarja M17 in 0,5 g glukoze. Avtoklaviramo in shranimo pri 4 °C.
- **gojišče YPD:** za 100 ml v destilirani vodi raztopimo 1,0 g kvasnega ekstrakta, 2,0 g peptona, 2,0 g glukoze. Avtoklaviramo in shranimo pri 4 °C.

9. 2 PRIPRAVA VZORCEV

Nabrane gobe je potrebno najprej določiti, saj imajo še svojo značilno obliko in druge lastnosti. Nato z njih očistimo umazanijo in druge tujke ter jih v plastični vrečki (vsako vrsto posebej) zamrznemo pri -20 °C, da pri tem popokajo celične stene in membrane.

Ko jih odmrznemo, se zato vsebina celic razlije in raztopi v vodni raztopini. Tako odmrznjenim vzorcem dodamo natrijev tiosulfat (0,1 g Na₂S₂O₃/100 ml vzorca), da ne počrniijo, in jih homogeniziramo. Iztisnemo jih skozi gazo in tlačilko za pire krompir, nato pa ekstrakt filtriramo in zamrznemo pri -20 °C, da proteaze ne uničijo želenih encimov. Kačji strup in raztopino L-lizin oksidaze prav tako shranimo pri -20 °C. Najbolje je, da ekstrakt alikvotiramo in tako čim manjkrat odmrznemo in zamrznemo.

Ekstrakte pred uporabo odmrznemo, vorteksiramo, če so se morda težji delci posedli, dodamo ustrezno količino nanašalnega pufra in neuporabljen sok čim prej zamrznemo. Za elektroforezo NaDS-PAGE se vzorce običajno kuha, da denaturirajo in imajo po dodatku enak naboj na enoto mase, vendar je zelo verjetno, da bi se pri tem izničile fiziološke lastnosti encima. Zato naših vzorcev nismo kuhali, ampak le zmešali z nanašalnim pufrom.

9. 3 PRIPRAVA GELOV

Preglednica 1: Kemikalije za pripravo gelov [prirejeno po 70]

	KONCENTRIRNI GEL 4 % pufer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	LOČEVALNI GEL 10 % pufer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
dH ₂ O	3,168 ml	4,835 ml
pufer	1,250 ml	2,500 ml
NaDS (10 %)	0,050 ml	0,100 ml
akrilamid/bis (40 %)	0,500 ml	2,500 ml
APS (10 %)	0,025 ml	0,050 ml
TEMED	0,008 ml	0,015 ml
končni volumen	5,000 ml	10,000 ml

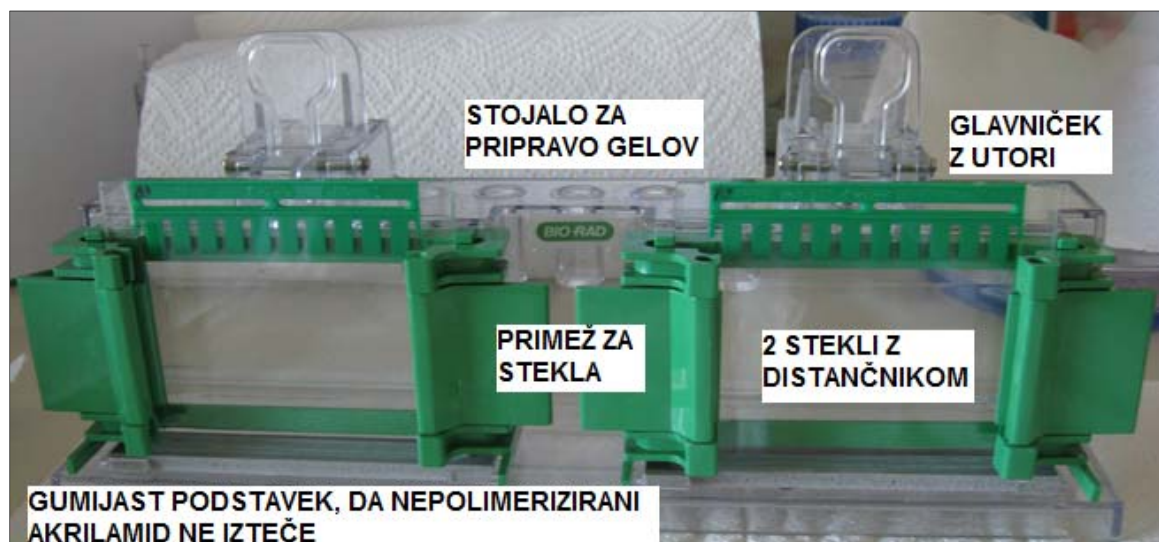
Potrebne količine raztopin za posamezno vrsto gela:

- ločevalni gel (v njem se ločujejo proteini po molekulskih masah): 10 ml mešanice za 1 gel debeline 1,5 mm
- koncentrirni gel (v njem se vzorci koncentrirajo, da proteini potujejo v čim manjšem volumnu): 5 ml mešanice za 1 gel debeline 1,5 mm

Volumen žepka: 10 žepkov v 1,5 mm debelem gelu po 60 µl

Potek dela:

1. Sestavimo si plastično stojalo, v katerega vpnejo primež z dvema stekelcema z distančnikom, da je med njima prostor za gel, ki ga bomo vlili. Stekla morajo biti gladka in po robovih neokrušena, da raztopina za gel ne izteče, še preden bi polimerizirala.
2. V dve centrifugirki vlijemo destilirano vodo, pufer, natrijev lavril sulfat in akrilamid.
3. Odmrznemo amonijev persulfat ter ga s TEMED-om dodamo mešanici za ločevalni gel ter hitro premešamo. APS je strjevalec, TEMED pa pospeševalec polimerizacije akrilamida.



Slika 33: Priprava gelov za elektroforezo

4. S pipeto hitro vlijemo tako pripravljeno raztopino med stekli približno do označene višine na stojalu ter na vrh dodamo malo z vodo nasičenega butan-1-ola, da se površina izravna, zračni mehurčki popokajo in kisik tako ne more inhibirati polimerizacije. Po navadi polimerizira v 20-45 min (da je enakomerno homogeno); to preverimo pri mešanici v centrifugirki, ki nam je še preostala.

5. S filtrirnim papirjem popivnamo butan-1-ol z gela ter dolijemo destilirano vodo, ki jo pred naslednjim korakom osušimo.

6. Mešanici za koncentrirni gel dodamo APS in TEMED ter pazljivo odpipetiramo med stekla na površino ločevalnega gela, pri tem pazimo, da ne nastanejo zračni mehurčki (če nastanejo, jih odpipetiramo). Na vrh stekelc zatakne glavniček z utori, da nastanejo prazna mesta za vzorce.

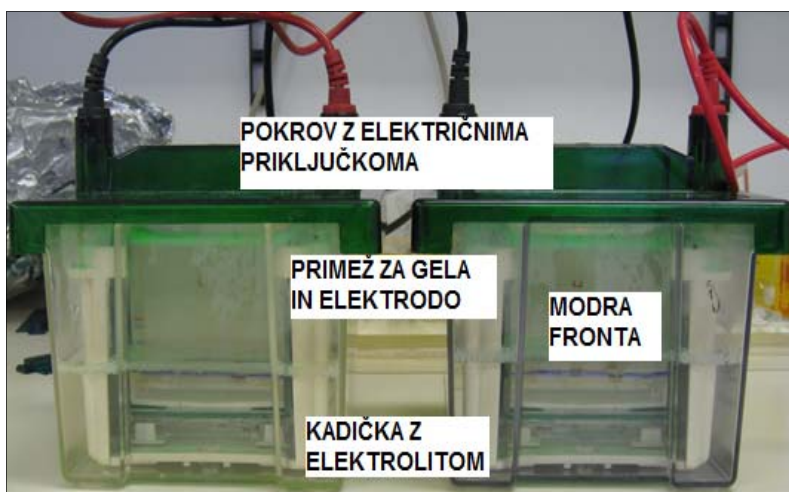
7. Ko tudi koncentrirni gel polimerizira, stekla z gelom vzamemo s stojala in iz gela previdno odstranimo glavniček. Gel med dvema stekelcema položimo na plastično folijo z omočeno papirnato brisačo ter zavijemo in shranimo v hladilniku. Mokra brisača in nizka temperatura preprečujeta, da bi se gel izsušil; uporabimo ga v roku enega tedna [prirejeno po 70].

Elektroforeza

Z dvema geloma obdamo elektrodo (če nimamo dveh gelov, namesto enega vzamemo posebno plastično ploščico) in vse skupaj vstavimo v primež ter položimo v kadičko na nosilce. Nalijemo elektroforezni pufer; najprej v žepke gela in nato vsaj do elektrode visoko. Nato v žepke gela odpipetiramo standarde in vzorce z nanašalnim pufrom.

Kadičko pokrijemo s pokrovom s priključkoma za elektriko ter nastavimo izvir napetosti na standardni tok, ki naj bo približno 35 mA na en gel; za dva torej 70 mA (vzporedna vezava). Da fronta modrega nanašalnega pufra pride do konca gela, traja približno 45 min.

Izvir napetosti izključimo ter s ploščico, ki služi kot vzvod, stekelci razpremo ter previdno ločimo gel od drugega stekla in odrežemo spodnji desni kot, da vemo zaporedje vzorcev pri nadaljnji analizi. Gel nevtraliziramo s spiranjem NaDS z mešanjem v petrijevki v ustreznem pufru približno 15 min. Po tem koraku sledi analiza ločenih proteinov [prirejeno po 70]. Taka elektroforeza je pol-nativna, saj vzorcev nisem kuhal, ker bi se inaktivirali in bi bila analiza LAKO aktivnosti onemogočena.



Slika 34: Elektroforeza

Barvanje z barvilom Coomassie brilliant blue

1. Barvanje 1 h v raztopini, za katero za 1 l potrebujemo: 5 tablet Coomassie brilliant blue, 400 ml destilirane vode, 600 ml etanola. Proteini bolj vežejo barvilo kot gel, a pri tem se tudi gel obarva z enako intenziteto kot proteini.

2. Razbarvanje dvakrat v 30 % v razbarvalni raztopini, za katero potrebujemo: 300 ml etanola, 100 ml etanojske kisline in 600 ml destilirane vode, pravo razmerje med obarvanimi proteini in prozornim gelom pa dosežemo z nadaljnjim razbarvanjem v 10 % razbarvalni raztopini, za katero potrebujemo: 100 ml etanola, 50 ml etanojske kisline in 850 ml destilirane vode. Pri kateremkoli načinu razbarvanja moramo inkubirati toliko časa, da dosežemo pravo ravnotežje, pri katerem so proteini dobro vidni-torej so intenzivno modro obarvani, gel pa je čim bolj prozoren [prirejeno po 28].

10. Prvi test

Glede na prebrane članke sva z mentorico izdelala tak postopek dela za analizo LAKO, ki je preprost, poceni in zahteva čim manj strupenih kemikalij, hkrati pa daje čim boljše rezultate. Odločila sva se za analizo s HRP, ki je sicer draga, a za analizo zadostuje le manjša količina, saj daje pozitivne rezultate že pri nizkih koncentracijah, za substrat pa zahteva strupeno spojino; najmanj strupen je OPD. Substrat za LAKO je bil L-levcin, ki je bil pogosto omenjen v člankih kot aminokislina, ki daje pozitivne rezultate s širšim spektrom različnih LAKO. Boljša je analiza kar v gelu, kjer hkrati lahko ocenimo tudi molekulske mase z NaDS-PAGE ločenih proteinov, pri tem pa se porabi le manjše količine analiziranega vzorca. Pufer v inkubacijski zmesi mora imeti pH nevtralen do rahlo bazičen, saj viri navajajo, da ima v tem področju največ LAKO svoj optimalni pH [8, 11, 14, 17, 19, 20, 22].

Vsi postopki analize L-aminokislinsko-oksidadzne aktivnosti, torej tako elektroforeza kot spiranje in inkubiranje gelov, so potekali pri sobni temperaturi v laboratoriju.

Potek dela: Za prvi test sem uporabil le 1 gel, za vzorce pa sem vzel Ap, ker zagotovo vsebuje encime LAKO [26], poleg tega pa še Cg, Tm in Mp. Vzorce in nanašalni pufer sem zmešal v razmerju 1 : 1.

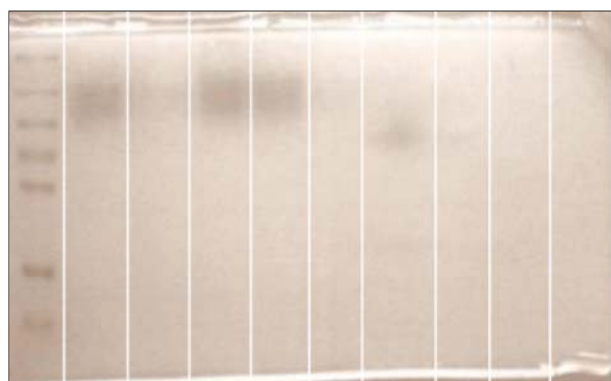
Razporeditev vzorcev na gelu:

1. STD prestained 5 μ l	2. Ap 10 μ l	3. Ap 2 μ l	4. Ap 20 μ l	5. Ap 10 μ l	6. Ap 2 μ l	7. Cg 20 μ l	8. Cg 2 μ l	9. Tm 20 μ l	10. Mp 20 μ l
-----------------------------------	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------	--------------------	---------------------	--------------------	---------------------	----------------------

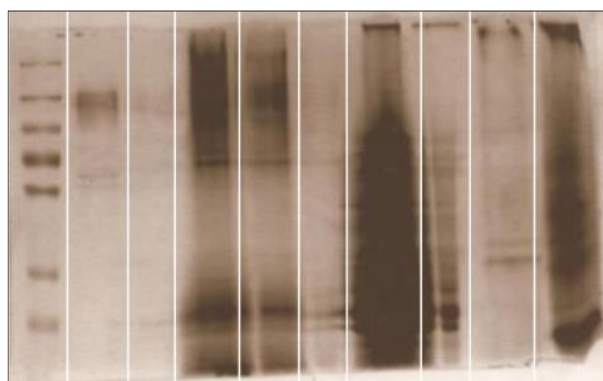
Gel sem najprej spral s stresanjem v 20 ml fosfatnega pufru 10 min, da se spere NaDS. Nato sem gel inkubiral 45 min v 15 ml raztopine pri sobni temperaturi, sestavljene iz 1,5 ml 50 mM L-Leu (5 mM), 1,5 ml 81 U/ml HRP (0,81 U/ml), 10,5 ml fosfatnem pufru in 1,5 ml 20 mM OPD (2 mM). Reakcijo sem zaustavil z dodatkom 2 M H_2SO_4 , v kateri sem gel inkubiral 10 min.

Po končani reakciji sem gele spral z destilirano vodo in jih obarval s Coomassie brilliant blue.

Rezultati:



Slika 35: Slika gela v VIS spektru



Slika 36: Slika gela po barvanju s Coomassie brilliant blue

Opazanja: Ob dodatku pufru s kalijevim fosfatom se je v gelu pojavila bela oborina. Po 45 min so se pojavile rjave lise, kar je znak, da je poskus uspel in so LAKO res prisotne v vzorcih. Gel sem slikal v UV in VIS spektru s črno-belo kamero, pri čemer v UV spektru ni bilo opaznih novih obarvanj. Ob

dodatku žveplove kisline se je reakcija ustavila, lise so postale temnejše in tako zaradi večjega kontrasta s prozornim gelom bolj vidne.

Pozitivno reakcijo za LAKO ima sok iz Ap; pri tem je odziv 2 μ l vzorca zelo slab, odziva 10 in 20 μ l sta zelo močna, pri čemer 20 μ l ni veliko izrazitejši. Rezultati ponovitev so enaki. LAKO iz Ap ima molekulsko maso okrog 130 kDa. Pozitivno reakcijo ima tudi Cg, pri čemer je odziv šibkejši kot pri Ap, a opazni sta lisi pri 20 μ l kot tudi 2 μ l, molekulska masa je okrog 70 kDa. Tm in Mp pri teh pogojih nista imela pozitivne reakcije za LAKO.

Glede na obarvanje z modrilom sok iz Ap ne vsebuje veliko proteinov, a nekateri izmed njih kažejo močno LAKO aktivnost, Cg ima veliko proteinov, tako kot jih ima tudi Mp. Opazne so razlike med količinami proteinov pri različnih količinah vzorca.

Sklepi: Pufer iz kalijevega fosfata ni primeren, saj se v gelu pojavi bela oborina, kar morda negativno vpliva na aktivnost LAKO. LAKO vsebujeta Ap in Cg, pri čemer so rezultati pri Ap dobro vidni pri 10 μ l vzorca, pri Cg pa pri 20 μ l vzorca. Ap ne vsebuje velike količine proteinov, a ti kažejo močno LAKO aktivnost, v nasprotju z Mp, ki vsebuje veliko proteinov, a ne kaže LAKO aktivnosti.

Na istem gelu je mogoče zaporedno vizualizirati proteine s HRP in nato še z barvilom Coomassie brilliant blue.

Pri nadaljnji optimizaciji želimo porabiti čim manj dragih in strupenih reagentov ter vzorcev, a pri tem dobiti čim boljši rezultat.

11. Optimizacija

Ker vsako razmerje med reagenti tvori specifične interakcije, bi bilo najbolj natančno, če bi vse spremenljivke testirali z vsemi, kar pa zahteva ogromno testov (kombinacij), dela in kemikalij, zato sem vsakokrat optimiral le po 1 spremenljivko ter najbolj optimalne rezultate več spremenljivk med seboj preveril na koncu.

Načrt optimizacije:

- Včasih se lahko zgodi, da na voljo nimamo dovolj vzorca oz. je le-ta drag, zato ga želimo uporabiti čim manj, a še vedno dobiti izrazito liso kot rezultat. Za uporabo pri postopku optimizacije smo izbrali vzorca Ap in Cg, ki sta pri prvem testu pokazali LAKO aktivnost.
- Optimirati se da debelino gela, ki je namesto 1,5 mm lahko 0,75 mm, a se tanjši gel tudi lažje strga, nova metoda pa zahteva mnogo rokovanja z gelom, zato njegova debelina ostaja 1,5 mm.
- Namesto pufra iz kalijevega fosfata bi uporabil 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 pufer, ki ima enak pH, a drugačne kemijske lastnosti. Upoštevati je potrebno, da se lahko optimira tudi pH.
- Spreminjamo lahko substrat, tako vrsto aminokislino ali proteinov kot njegovo koncentracijo. Boljše je, da se porabi čim manj aminokislino, ker so drage.
- Optimiramo lahko količino OPD; ker je strupen, ga želimo uporabiti čim manj.
- HRP je zelo draga, zato je prav tako želimo porabiti čim manj.
- Analizo želimo opraviti v čim krajšem času.
- Optimiramo lahko tudi temperaturo, pri kateri je aktivnost encimov največja, vendar pri višjih temperaturah pride do izhlapevanja snovi in do denaturacije encimov, pri nižjih temperaturah pa encimi niso aktivni, zato so bili geli inkubirani pri sobni temperaturi.
- Reakcijo želimo ustaviti s kislino, zaradi katere bo kontrast med svetlim gelom in temnejšo liso čim večji.

11. 1 OPTIMIZACIJA KOLIČINE HRP IN PREIZKUS NOVEGA PUFRA

Potek dela: Uporabil sem enake količine nanašalnega pufra kot vzorca. Po elektroforezi sem gele razrezal na takšno število trakov skupaj, kot sem si zastavil načrt:

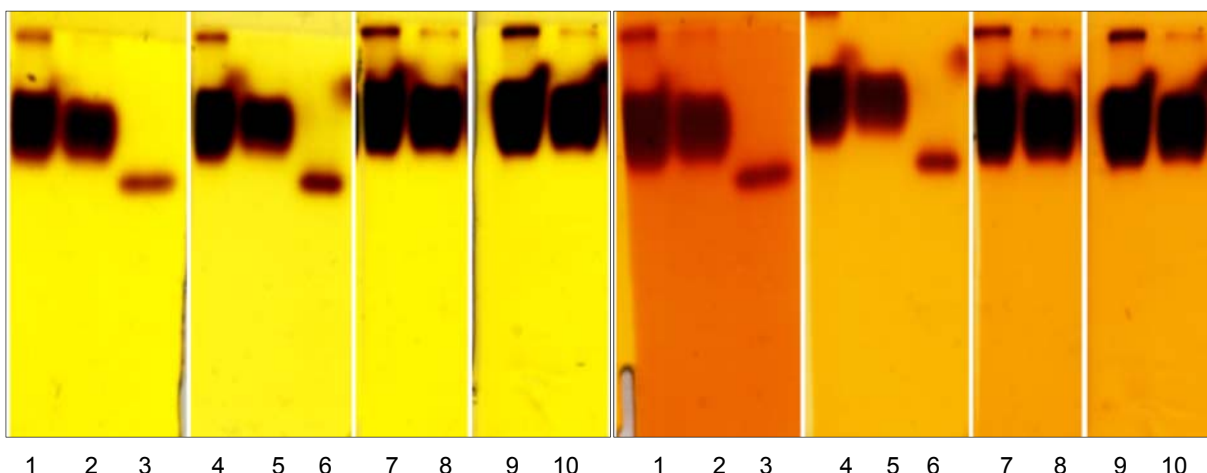
1. Ap 10 µl	2. Ap 2 µl	3. Cg 10 µl	4. Ap 10 µl	5. Ap 2 µl	6. Cg 10 µl	7. Ap 10 µl	8. Ap 2 µl	9. Ap 10 µl	10. Ap 2 µl
0,1 U/ml HRP			0,2 U/ml HRP			0,5 U/ml HRP		0,8 U/ml HRP	
2 M H ₂ SO ₄			5 % CH ₃ COOH			10 % CH ₃ COOH		20 % CH ₃ COOH	

Po elektroforezi sem gele spral s pufrom 0,1 M Tris-HCl pH 8,0.

Uporabil sem založno raztopino 81 U/ml HRP. Končni volumen inkubacijske raztopine je bil 10 ml; poleg ustrezne količine pufra 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 sem dodal še 1 ml 50 mM Leu (5 mM) in 1 ml 20 mM OPD (2 mM).

Koščke gelov sem posnel z optičnim čitalcem v plastični foliji z optičnim čitalcem, s čimer sem zajel barvne slike. Reakcijo sem po 19 h ustavil z različnimi kisljinami: 5 % CH₃COOH, 10 % CH₃COOH, 20 % CH₃COOH in 2 M H₂SO₄, pri čemer sem posnel slike gelov po 10 min in 2 h inkubacije v kislini.

Rezultati:



Slika 37: Encimogram pri različnih koncentracijah HRP; levo: pred dodatkom kisline, desno: po 10 min zaustavitvi reakcije s kislino

Opazanja: Pufer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 se je izkazal za dobro izbiro, saj so rezultati zelo intenzivni, torej dobro vpliva na aktivnost LAKO; bela oborina se ni pojavila.

Po 50 min so se najbolj rjavo obarvale lise pri največji koncentraciji peroksidaze, pri nižjih se odziv slabo pozna. Čez čas raztopina postaja rjavkasta zaradi OPD, ki na svetlobi razpada, zato sem odtlej inkubiral vedno v posodi, zaviti v aluminijasto folijo.

Po 16 h inkubacije je razlika med intenziteto obarvanja pri 0,8 in 0,5 U/ml peroksidaze majhna, medtem ko se lise pri 0,2 in 0,1 U/ml le slabo vidijo. Po daljšem času je reakcija tudi napredovala, lise so bolj intenzivne.

Po dodatku žveplove kisline so lise pri najmanjši koncentraciji HRP, ki so bili slabše vidni, sedaj zelo intenzivni. Signal se po daljši inkubaciji v kislini nekoliko izgubi; po 19 h sicer razlika med intenzitetami ustavljenih in ne ustavljenih reakcij ni velika, verjetno je to bolj opazno po krajši inkubaciji. Po daljši inkubaciji v očetni kislini se pojavi oborina.

Za 1 gel je dovolj 10 ml reakcijske zmesi, saj daje manjša količina prav tako dobre rezultate; količina za 1 gel ne more biti manjša, saj drugače ta ni potopljen v raztopino, pri čemer je ustrezna posoda plastičen pokrov škatle nastavkov za pipete, saj je njegova osnovna ploskev le malo večja od gela (oz. za trakove gela manjša petrijevka).

Sklepi: Daljši čas inkubacije pozitivno vpliva na rezultat. Ker je razlika med intenziteto 0,8 U/ml in 0,5 U/ml HRP majhna, je najbolje uporabiti končno koncentracijo 0,5 U/ml HRP, oz. založno raztopino 52 U/ml. Posoda mora biti zavita v aluminijasto folijo, saj OPD na svetlobi razpada. Izmed kislin je najmočnejši odziv po dodatku žveplove kisline, zato je reakcijo najbolje ustaviti v 2 M H₂SO₄ in inkubirati okrog 10 min.

11. 2 OPTIMIZACIJA VRSTE IN KONCENTRACIJE AMINOKISLIN L-Leu in L-Asn

Pri optimizaciji aminokislin ne gre le za določitev čim manjše koncentracije, pri kateri so rezultati še dovolj intenzivni, pač pa gre tudi za izbiro najprimernejšega, torej univerzalnega substrata, saj so LAKO različno specifične–nekatero imajo široko območje, druge pa zelo ozko.

Potek dela: Za natančnejše nanašanje Ap soka sem ga 10X redčil, kar pomeni, da za 10 žepkov potrebujem 14 µl Ap soka, 126 µl destilirane vode in enako količino nanašalnega pufra, torej 140 µl.

Pufer ostaja 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, s katerim sem inkubacijsko raztopino dopolnil do 10 ml, substrat za HRP je 20 mM OPD, ki se razredči na 2 mM, in 0,5 U/ml HRP, kar sem optimiral v prejšnjem poskusu. Spreminjal sem vrsto in količino substrata, torej različne koncentracije tako L-Leu kot tudi L-Asn, pri čemer se je L-Leu v prejšnjih poskusih izkazal za dober substrat. Vzorec sem nanese v dveh količinah za lažjo oceno intenzitete obarvanja.

Razvrstitev vzorcev na gelih:

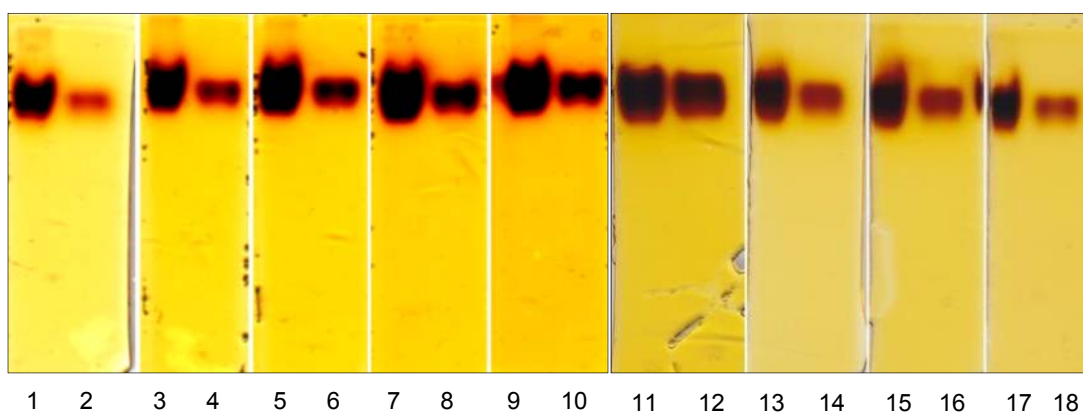
1. Ap 40 µl	2. Ap 8 µl	3. Ap 40 µl	4. Ap 8 µl	5. Ap 40 µl	6. Ap 8 µl	7. Ap 40 µl	8. Ap 8 µl	9. Ap 40 µl	10. Ap 8 µl
0,5 mM L-Leu		1 mM L-Leu		2 mM L-Leu		4 mM L-Leu		6 mM L-Leu	

11. Ap 40 µl	12. Ap 8 µl	13. Ap 40 µl	14. Ap 8 µl	15. Ap 40 µl	16. Ap 8 µl	17. Ap 40 µl	18. Ap 8 µl
4 mM L-Leu		6 mM L-Leu		8 mM L-Leu		10 mM L-Leu	

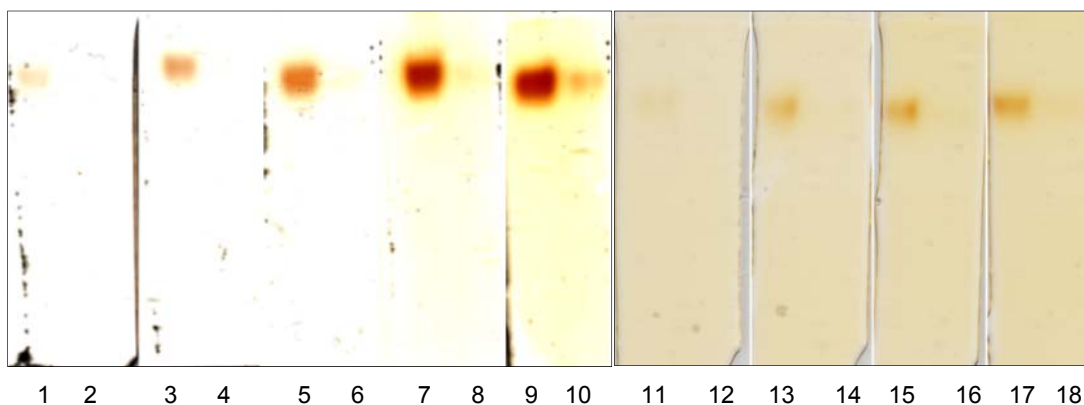
1. Ap 40 µl	2. Ap 8 µl	3. Ap 40 µl	4. Ap 8 µl	5. Ap 40 µl	6. Ap 8 µl	7. Ap 40 µl	8. Ap 8 µl	9. Ap 40 µl	10. Ap 8 µl
0,5 mM L-Asn		1 mM L-Asn		2 mM L-Asn		4 mM L-Asn		6 mM L-Asn	

11. Ap 40 µl	12. Ap 8 µl	13. Ap 40 µl	14. Ap 8 µl	15. Ap 40 µl	16. Ap 8 µl	17. Ap 40 µl	18. Ap 8 µl
4 mM L-Asn		6 mM L-Asn		8 mM L-Asn		10 mM L-Asn	

Rezultati:



Slika 38: Encimogram z variantami koncentracij L-Leu po zaustavitvi reakcije s kislino



Slika 39: Encimogram z variantami koncentracij L-Asn po zaustavitvi reakcije s kislino

Opažanja: V obeh primerih aminokislin so bile lise intenzivneje obarvane po 24 h kot po 16 h in pri obeh je večji kontrast v obarvanosti po dodatku žveplove kisline. Odziv L-asparagina je mnogo bolj izrazit po 24 h, intenziteta pa se zvišuje z zviševanjem koncentracije 0,5-10 mM, pri 0,5 mM se komaj vidi, odziv pa je odvisen tudi od količine vzorca, saj se 8 μ l Ap soka vidi šele pri koncentraciji 6 mM L-Asn, po dodatku kisline pa tudi pri 2 mM po 24 h.

Pri L-Leu je opazna tudi lisa pri najnižji koncentraciji aminokislinske, odziva pri 4 in 6 mM pa sta si zelo podobna. Odzivi 40 μ l Ap soka v L-Leu so si pri vseh koncentracijah zelo podobni, razlika je le pri manjši količini vzorca, ki narašča 0,5 mM-4 mM L-Leu, pri večji koncentraciji aminokislinske 4-8 mM so si odzivi precej podobni, odziv pri 10 mM pa je že šibkejši kot pri 8 mM L-Leu.

Sklepi: L-Leu je boljši substrat kot L-Asn, zato je zanj pri optimalni koncentraciji 5 mM, kot je po protokolu, potrebna manjša količina vzorca. Pri višjih koncentracijah L-Leu očitno pride do inhibicije encimov. Odzivi v L-Asn so slabši, a naraščajo z naraščanjem koncentracije najmanj do 10 mM.

11. 3 OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OPD

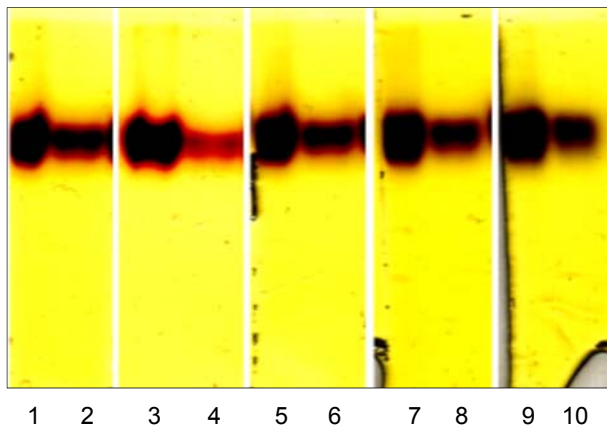
OPD je strupen in kancerogen, zato je za izvajalca analize LAKO bolje, da se ga uporabi čim manj.

Potek dela: Za inkubacijsko raztopino sem uporabil 0,5 U/ml HRP, 5 mM L-Leu, pufer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 do volumna 10 ml, spreminjal pa sem koncentracijo OPD.

Razvrstitev vzorcev na gelu:

1. Ap 40 μ l	2. Ap 8 μ l	3. Ap 40 μ l	4. Ap 8 μ l	5. Ap 40 μ l	6. Ap 8 μ l	7. Ap 40 μ l	8. Ap 8 μ l	9. Ap 40 μ l	10. Ap 8 μ l
0,2 mM OPD		0,5 mM OPD		1 mM OPD		2 mM OPD		5 mM OPD	

Rezultati:



Slika 40: Encimogram z variantami koncentracij OPD po zaustavitvi reakcije s kislino

Opažanja: Med 1, 2 in 5 mM OPD so le majhne razlike v odzivu, večje pa so med 0,2, 0,5 in 1 mM OPD, saj v tem vrstnem redu narašča odziv, predvsem pri manjši količini vzorca, saj so si odzivi pri večji količini vzorca med seboj podobni pri vseh koncentracijah.

Sklepi: Substrat za 0,5 U/ml HRP OPD je za analizo lahko nižje koncentracije kot je po protokolu (2 mM [22]), torej 1 mM, pri tem pa so rezultati enako intenzivni, le analiza je nekoliko cenejša in precej manj strupena. V nadaljnjih raziskavah sem zato uporabljal 0,5 ml 20 mM OPD v 10 ml inkubacijske raztopine, kar predstavlja koncentracijo 1 mM OPD.

11. 4 OPTIMIZACIJA ČASA INKUBACIJE IN VPLIVA NaDS

Pufer 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 se je v prejšnjih poskusih izkazal za zelo primerne, kljub temu pa sem uporabil še 2,5 % Triton-X-100, ki iz gela spere ves NaDS, ki sicer iz gelov v ostalih pufrih ne difundira popolnoma, kar morda ugodno vpliva na aktivnost LAKO. Poleg tega sem gele spremljal po različnih časovnih intervalih in tako določil, kako čas inkubacije vpliva na intenziteto rezultata.

Potek dela: Vzorce Ap sem 10X redčil z vodo. Polovico gelov sem najprej 2X po 10 min spirali v 2,5 % Triton-X-100 in nato 10 min v 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, inkubacijsko raztopino pa sem pripravil z enakim pufrom kot za ostalo polovico gelov, ki so se spirali v 0,1 M Tris-HCl pH 8,0.

Uporabil sem 0,5 U/ml HRP (0,1 ml 52 U/ml), 1 mM OPD (0,5 ml 20 mM), 5 mM L-Leu in tudi 5 mM L-Asn (1 ml 50 mM), ki so se v prejšnjih poskusih izkazali za dobro kombinacijo. Testiral sem dve različni količini vzorca. Pufra 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 sem uporabil 8,4 ml za 10 ml inkubacijsko raztopino.

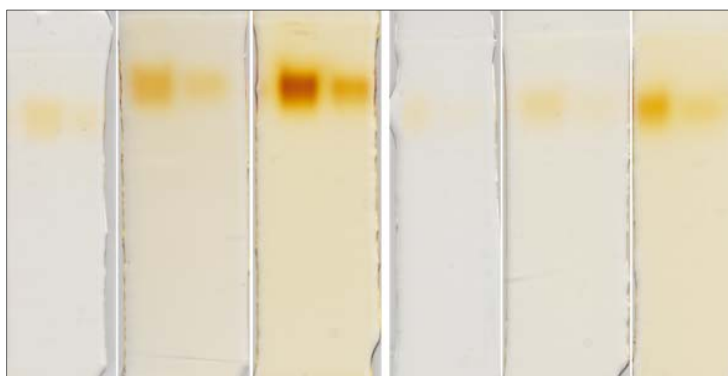
Ker so se v preteklih poskusih odzivi v L-Asn po krajšem času zelo slabo videli, sem gele s tem substratom slikal po 2 in 4 h inkubacije, tiste s substratom L-Leu pa po 1, 2 in 4 h. Reakcijo sem nato ustavil z 10 min inkubacijo v 2 M H₂SO₄.

Razvrstitev vzorcev na gelih:

1. Ap 40 µl	2. Ap 8 µl	3. Ap 40 µl	4. Ap 8 µl	5. Ap 40 µl	6. Ap 8 µl	7. Ap 40 µl	8. Ap 8 µl	9. Ap 40 µl	10. Ap 8 µl
5 mM L-Leu, 1 h		5 mM L-Leu, 2 h		5 mM L-Leu, 4 h		5 mM L-L-Asn, 2 h		5 mM L-Asn, 4 h	
spiranje in inkubacija v pufru 0,1 M Tris-HCl pH 8,0									

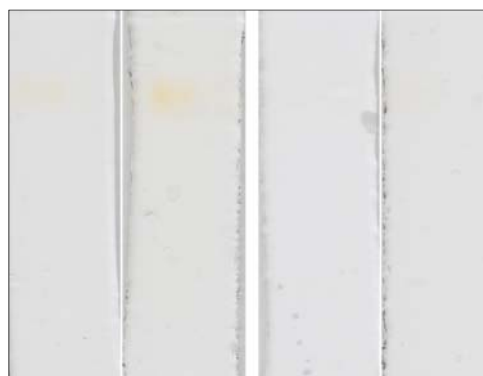
11. Ap 40 µl	12. Ap 8 µl	13. Ap 40 µl	14. Ap 8 µl	15. Ap 40 µl	16. Ap 8 µl	17. Ap 40 µl	18. Ap 8 µl	19. Ap 40 µl	20. Ap 8 µl
5 mM L-Leu, 1 h		5 mM L-Leu, 2 h		5 mM L-Leu, 4 h		5 mM L-L-Asn, 2 h		5 mM L-Asn, 4 h	
2X spiranje v pufru 2,5 % Triton-X-100, nato spiranje in inkubacija v pufru 0,1 M Tris-HCl pH 8,0									

Rezultati:



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

Slika 41: Encimogram s časovnimi variantami inkubacije v L-Leu v različnih pufrih po zaustavitvi reakcije s kislino



13 14 15 16 17 18 19 20

Slika 42: Encimogram s časovnimi variantami inkubacije v L-Asn v različnih pufrih po zaustavitvi reakcije s kislino

Opažanja: Odzivi vzorcev v L-Leu se vidijo že po 1 h tudi pri manjši količini vzorca pri obeh postopkih, medtem ko pozitivni rezultati v L-Asn po spiranju v tritonu niso vidni niti po 4 h, medtem ko je brez spiranja v tritonu viden rezultat po 2 h pri večji količini vzorca. Dodaten korak spiranja z raztopino 2,5 % Triton-X-100 ni pokazal izboljšanja, saj so rezultati pri vseh količinah vzorcev v obeh substratih manj intenzivni, poleg tega se tudi večja količina vzorcev v L-Asn po enakem času (2 h, 4 h) v pufru

0,1 M Tris-HCl pH 8,0 vidi le, če spiranja v 2,5 % Triton-X-100 ni bilo. V času do 4 h se intenziteta rezultatov povečuje, zato naj inkubacija glede na prejšnje teste poteka 16-24 h.

Sklepi: Za spiranje je boljša uporaba pufra v 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 kot raztopine 2,5 % Triton-X-100, čeprav slednji iz gela spere ves NaDS, a aktivnost LAKO se je zato zmanjšala. Daljša inkubacija izboljša intenziteto signala, zato v prihodnje inkubiramo vsaj 16 h, kar je ugodno za izvajalca z vidika službenega delovnega časa.

11. 5 OPTIMIZACIJA pH

Nekateri encimi imajo delovanje le v ozkem spektru pH, a za gobje encime je značilno, da delujejo v širšem spektru, pri tem pa je neko območje pH optimalno [4].

Odziv je odvisen tako od pH kot tudi od snovi, iz katere je sestavljen pufer, zato sem uporabil nekaj različnih pufrov, ki pa imajo pH v širokem razponu lestvice.

Potek dela: Kot pufre za spiranje in inkubacijo gelov sem uporabil:

- pH 2,0: 0,1 M glicin-HCl
- pH 3,0, 4,0, 5,0: 0,1 M NaCH₃COO/CH₃COOH
- pH 6,0, 7,0: 0,1 M Bis-Tris-HCl
- pH 8,0, 9,0: 0,1 M Tris-HCl
- pH 10,0, 11,0: 0,1 M Na₂CO₃/NaHCO₃

Inkubacijsko raztopino sem pripravil iz optimalnih koncentracij komponent iz prejšnjih testiranj: 0,5 U/ml HRP, 1 mM OPD, 5 mM L-Leu in 8,4 ml ustreznega pufra. Med vzorci je bil Ap sok 10X redčen.

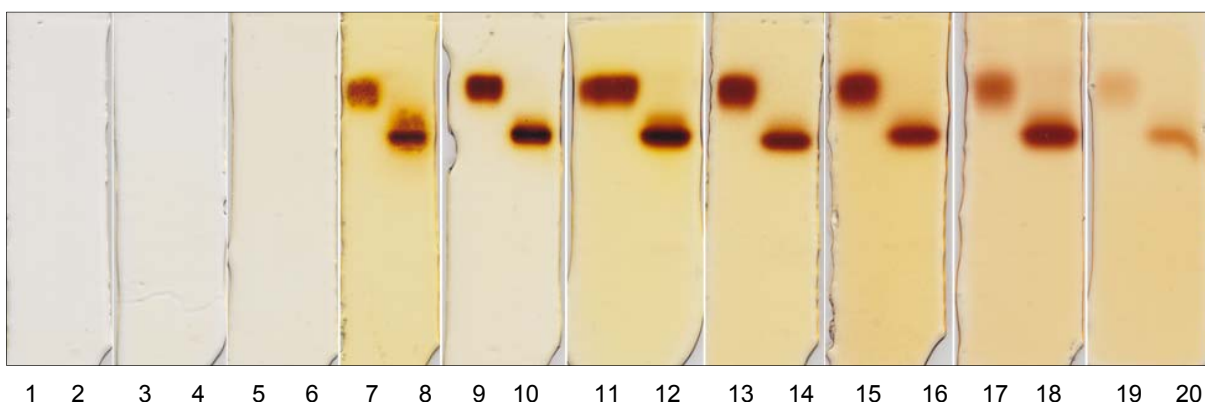
Razporeditev vzorcev na gelih:

1. Ap 10 µl	2. Cg 20 µl	3. Ap 10 µl	4. Cg 20 µl	5. Ap 10 µl	6. Cg 20 µl	7. Ap 10 µl	8. Cg 20 µl	9. Ap 10 µl	10. Cg 20 µl
pH 2,0		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		pH 6,0	

11. Ap 10 µl	12. Cg 20 µl	13. Ap 10 µl	14. Cg 20 µl	15. Ap 10 µl	16. Cg 20 µl	17. Ap 10 µl	18. Cg 20 µl	19. Ap 10 µl	20. Cg 20 µl
pH 7,0		pH 8,0		pH 9,0		pH 10,0		pH 11,0	

Koščke gelov sem najprej 15 min spiral v ustreznem pufru, nato pa inkubiral 16 oz. 24 h in dodal kislino.

Rezultati:



Slika 43: Slika gela z variantami pH v različnih pufrih po zaustavitvi reakcije s kislino

Opazanja: Aktivnost LAKO je bila v območju pH 4,0-11,0, morda tudi še v bolj bazičnem, a pri pH 2,0 in 3,0 ni bilo opazne aktivnosti. Signal je po 24 h močnejši kot po 16 h pri pH 5,0-11,0, pri pH 4,0 je bil odziv po 24 h šibkejši. Pri pH 4,0 sta pri Cg vidni dve lisi; spodnja med njima se pri drugih pH ne pojavlja. V acetatnem pufru je pri pH 4,0 in 5,0 prišlo do obarjanja temne oborine, kjer je bil vzorec, torej v gelu in v žepkih. Najmočnejši so odzivi pri pH 5,0-8,0, torej v pufrih 0,1 M NaCH₃COO/CH₃COOH, 0,1 M Bis-Tris-HCl in 0,1 M Tris-HCl, odziv pri pH 9,0 je šibkejši kot pri pH 8,0. Pri največji intenziteti lis v območju pH 5,0-8,0 so si odzivi podobni, le pri pH 5,0 je prišlo do obarjanja. Odziv pri pH 10,0 je šibkejši kot pri pH 9,0 in pri pH 10,0 je močnejši kot pri pH 11,0. V močno bazičnem pufru je odziv Cg mnogo intenzivnejši od Ap. Cg ima širši spekter delovanja pri pH 4,0-11,0, Ap pa pri pH 5,0-11,0, pri čemer daje LAKO iz Cg intenzivnejše rezultate v nekoliko bazičnem pH. Odsotnost odziva v kislem je lahko posledica tudi slabšega delovanja HRP, ki ima svoj optimum delovanja pri pH 6,0-6,5 [71].

Sklepi: Pufrji z ekstremno kislim pH niso uporabni in odziv pri ekstremno bazičnem pH je slabši. Najbolj uporabna sta pufra Bis-Tris in Tris, pri čemer deluje Bis-Tris pri nižjem pH. LAKO so bile najbolj aktivne pri pH 5,0-8,0, pri čemer ima Cg večji pH razpon delovanja kot Ap; LAKO iz Cg je bolj aktivna v bolj bazičnem mediju. Očitno imajo LAKO iz različnih virov različne lastnosti, zato le uporaba enega pH medija ne bo dovolj za analizo več različnih vzorcev. Potrebno bo testiranje v nekoliko kislem in v nekoliko bazičnem pufru. LAKO iz gob imajo res širok spekter delovanja.

11. 6 OPTIMIZACIJA VRSTE SUBSTRATA

Različne LAKO imajo različno preferenco do substrata L-aminokislina, zato je verjetno optimalna rešitev za testiranje več različnih vzorcev oz. vzorce z neznano vrsto LAKO v mešanici različnih L-aminokislin.

Potek dela: Uporabil sem 3 različne vzorce, pri čemer je bil Ap sok 10X redčen z vodo, vsi pa so bili 2X redčeni z nanašalnim pufrom.

Za inkubacijsko raztopino sem uporabil 0,5 U/ml HRP, 1 mM OPD, ustrezno količino pufra 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 do 10 ml in substrata. Pred tem sem že ugotovil, da je L-Leu mnogo boljši substrat od L-Asn, zato ga tokrat nisem testiral. Raztopino 6 aminokislin sem pripravil tako, da sem pripravil mešanico, v kateri je imela vsaka od aminokislin (L-Arg, L-Glu, L-Asn, L-Ala, L-Leu in L-Phe) koncentracijo 50 mM. CSM zmes je pripravljena iz naslednjih komponent, skupno 790 mg/l:

	adenin	L-Arg	L-Asp	L-His HCl	L-Ile	L-Leu	L-Lys HCl	L-Met	L-Phe	L-Thr	L-Trp	L-Tyr	uracil	L-Val
količina mg/l	10	50	80	20	50	100	50	20	50	100	50	50	20	140

Tripton in casamino acids sta kemijsko nedefinirani mešanici organskih dušikovih spojin, ki vsebujeta tako L-aminokislina kot tudi manjše peptide [72, 73].

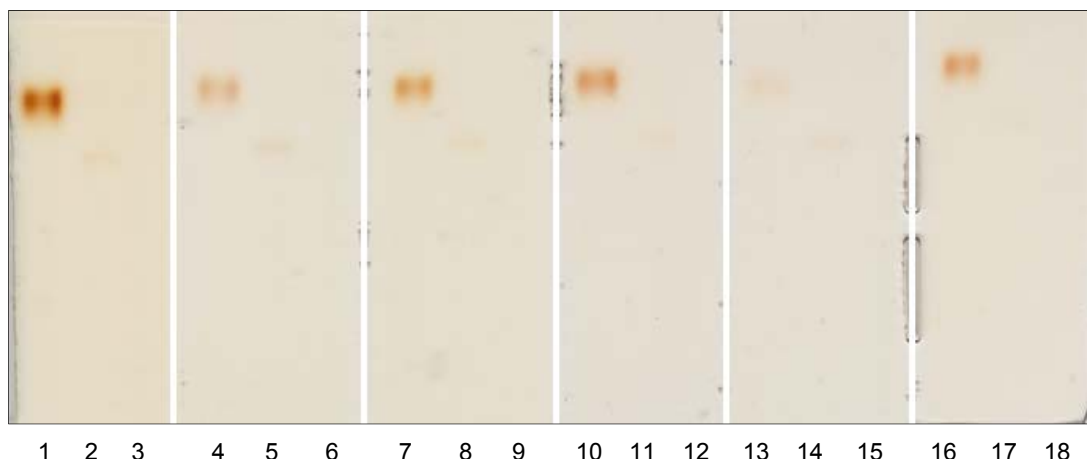
Založne koncentracije ostalih virov so bile: 10 % tripton, 10 % pepton, 10 % casamino acids, 1,0 % CSM. Inkubiral sem 24 ur in nato dodal kislino.

Razporeditev vzorcev na gelih:

1. Ap 5 µl	2. Cg 10 µl	3. Tm 20 µl	4. Ap 5 µl	5. Cg 10 µl	6. Tm 20 µl	7. Ap 5 µl	8. Cg 10 µl	9. Tm 20 µl
Leu 5 mM			5 mM 6 aminokislin			0,1 % CSM		

10. Ap 5 µl	11. Cg 10 µl	12. Tm 20 µl	13. Ap 5 µl	14. Cg 10 µl	15. Tm 20 µl	16. Ap 5 µl	17. Cg 10 µl	18. Tm 20 µl
1 % tripton			1 % pepton			1 % casamino acids		

Rezultati:



Slika 44: Encimogram z variantami različnih virov aminokislin po zaustavitvi reakcije s kislino

Opazanja: Ker sem uporabil manjše količine vzorcev, so odzivi manj intenzivni; Ap se vidi pri vseh virih, njegova intenziteta pa je v tem vrstnem redu: L-Leu > tripton > casamino acids > CSM > 6 AK > pepton. Lisa Tm soka ni vidna pri nobenem viru aminokislin, niti po dodatku kisline. Lisa soka Cg je slabo opazna pri vseh virih, močnejše se vidi po dodatku kisline.

Sklepi: Pri naslednjih poskusih moram uporabiti večjo količino Cg in Tm soka. Ker je L-Leu mnogo dražji od triptona, bi bilo slednjega smiselno uporabiti pri naslednjih poskusih, saj je potencialno dober kandidat za ustrezen substrat. Očitno je, da je bila raztopina 6 AK zelo nasičena, zato je prišlo do inhibicije pri reakciji z LAKO.

11. 7 OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OPD IN RAZLIČNIH KONCENTRACIJ SUBSTRATOV

Ker se moji rezultati optimizacije glede koncentracije OPD razlikujejo glede na protokol, sem se odločil preveriti različne koncentracije OPD pri različnih koncentracijah substratov L-Leu, triptona in CSM.

Potek dela: Pripravil sem 10X redčen sok Ap in ga dodal po 10 μ l v žepek. V inkubacijski raztopini sem vedno uporabil 0,5 U/ml HRP, spreminjal sem tako koncentracijo OPD kot vira aminokislinske in uporabil ustrezno količino pufru 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 do končnega volumna 10 ml. Končna koncentracija OPD je bila 1 ali 2 mM OPD (kar sem ugotovil pri prejšnjih poskusih in kar navaja protokol [22]), koncentracije L-Leu so bile 2, 4 in 6 mM, koncentracija triptona 1 in 2 % ter koncentracija CSM 0,1, 0,2 in 0,5 %. Inkubiral sem 24 h pri sobni temperaturi ter nato dodal kislino.

Razporeditev vzorcev na gelih:

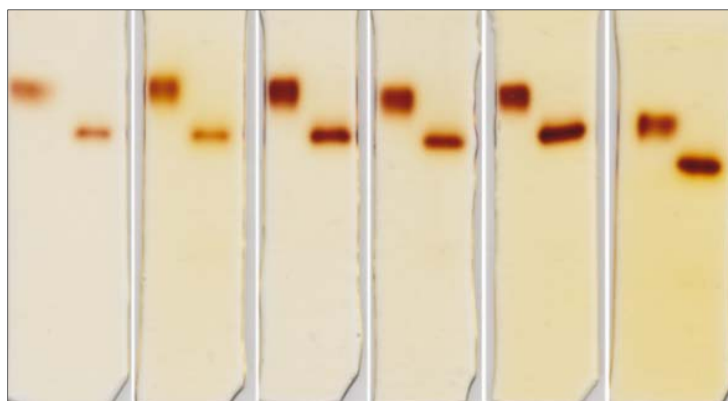
1. Ap 10 μ l	2. Cg 20 μ l	3. Ap 10 μ l	4. Cg 20 μ l	5. Ap 10 μ l	6. Cg 20 μ l	7. Ap 10 μ l	8. Cg 20 μ l	9. Ap 10 μ l	10. Cg 20 μ l
2 mM L-Leu		2 mM L-Leu		4 mM L-Leu		4 mM L-Leu		6 mM L-Leu	
1 mM OPD		2 mM OPD		1 mM OPD		2 mM OPD		1 mM OPD	

11. Ap 10 μ l	12. Cg 20 μ l	13. Ap 10 μ l	14. Cg 20 μ l	15. Ap 10 μ l	16. Cg 20 μ l	17. Ap 10 μ l	18. Cg 20 μ l	19. Ap 10 μ l	20. Cg 20 μ l
6 mM L-Leu		1 % tripton		1 % tripton		2 % tripton		2 % tripton	
2 mM OPD		1 mM OPD		2 mM OPD		1 mM OPD		2 mM OPD	

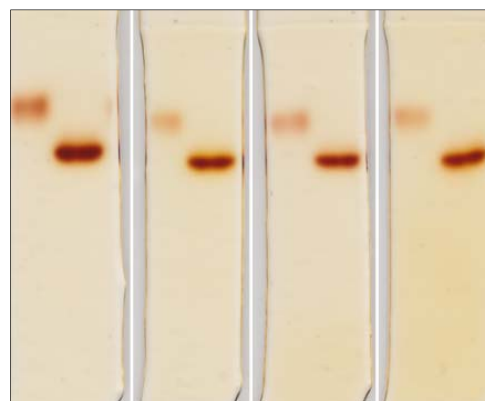
21. Ap 10 µl	22. Cg 20 µl	23. Ap 10 µl	24. Cg 20 µl	25. Ap 10 µl	26. Cg 20 µl	27. Ap 10 µl	28. Cg 20 µl	29. Ap 10 µl	30. Cg 20 µl
0,1 % CSM		0,1 % CSM		0,2 % CSM		0,2 % CSM		0,5 % CSM	
1 mM OPD		2 mM OPD		1 mM OPD		2 mM OPD		1 mM OPD	

31. Ap 10 µl	32. Cg 20 µl
0,5 % CSM	
2 mM OPD	

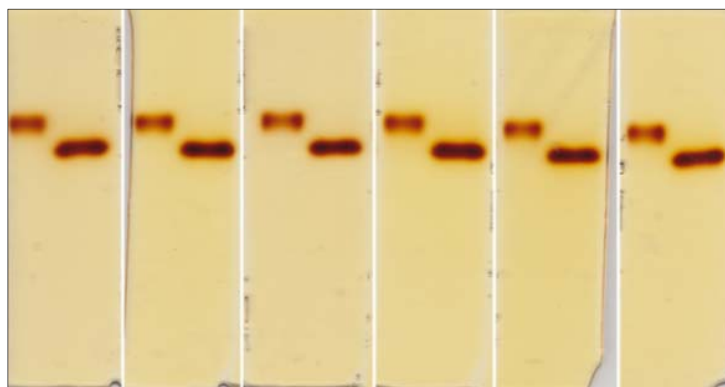
Rezultati:



Slika 45: Encimogram z variantami koncentracij L-Leu in OPD po zaustavitvi reakcije s kislino



Slika 46: Encimogram z variantami koncentracij triptona in OPD po zaustavitvi reakcije s kislino



Slika 47: Encimogram z variantami koncentracij CSM in OPD po zaustavitvi reakcije s kislino

Opazanja: Razlika med odzivom L-Leu pri 2 in 4 mM je velika, medtem ko sta si odziva pri 4 in 6 mM vselej podobna. Pri 2 mM Leu je odziv 2 mM OPD močnejši, pri 4 in 6 mM pa je odziv pri 1 mM OPD močnejši kot pri 2 mM, predvsem pri Ap LAKO. Odziv v 2 % triptonu je šibkejši kot v 1 %, predvsem pri Ap. Pri 1 % triptonu je odziv 2 mM šibkejši kot 1 mM, pri 2 % triptonu pa je odziv 2 mM OPD močnejši, vendar šibkejši kot pri 1 % triptonu in 1 mM OPD. Odzivi posameznih koncentracij pri Ap in Cg so vselej enako intenzivni pri različnih koncentracijah CSM in OPD.

Sklepi: Tudi tokrat sem dokazal, da je smotrna uporaba 5 mM L-Leu, saj skoraj ni razlike med odzivom 4 in 6 mM. Ker je pri višjih koncentracijah L-Leu intenzivnejši odziv pri 1 mM OPD kot 2 mM OPD, je smiselna tudi nadaljnja uporaba 1 mM OPD. Ker koncentracija 2 % triptonu očitno inhibira delovanje LAKO, sem v nadaljnjih poskusih uporabil 1 % tripton, pri katerem je odziv pri 1 mM OPD optimalen. Ker so v CSM vsi odzivi enaki, je bolj racionalna uporaba nižje koncentracije CSM, torej 0,1 % in nižja koncentracija OPD 1 mM. Zaključujem, da je optimalna koncentracija L-Leu 5 mM, triptonu 1 % in CSM 0,1 %, pri vseh pa je najmočnejši odziv pri 1 mM OPD.

12. Izbiranje vzorcev

12. 1 TESTIRANJE VZORCEV V L-Leu IN TRIPTONU

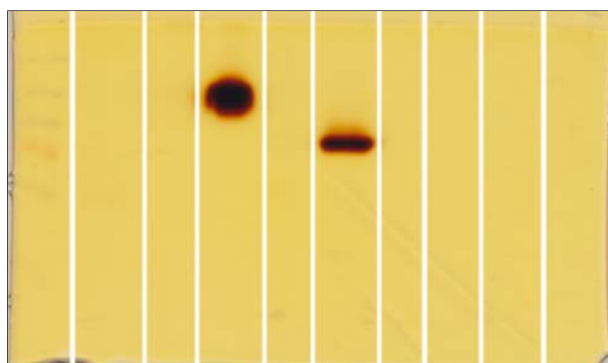
Potek dela: Vzorce, katerih prisotnost LAKO je bila še neznana, sem testiral v dveh substratih, ki sta se izkazala za zelo učinkovita: v 5 mM L-Leu in 1 % tripton. Sok Ap sem 10X redčil z vodo, ostalih vzorcev pa sem želel v žepek dodati čim več, zato sem jih mešal v razmerju vzorec : nanašalni pufer = 7 : 3 in dodal 50 μ l v žepek, zadostna količina 10X redčenega Ap soka se je izkazala 10 μ l in soka Cg 20 μ l na žepek.

Gele sem najprej spral pufru, nato dodal raztopino za inkubacijo: 0,5 U/ml HRP, 1 mM OPD, v 0,1 M Tris-HCl pufru in 5 mM L-Leu ali 1 % triptonu. Inkubiral sem v 20 ml raztopini za cel gel 24 h.

Razporeditev vzorcev na gelih:

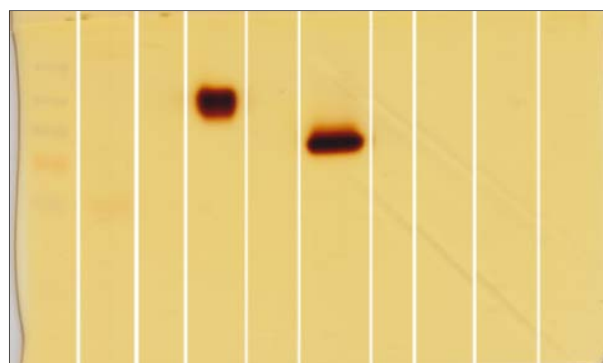
1. STD prestained 5 μ l	2. Tm 50 μ l	3. La 50 μ l	4. Ap 10 μ l	5. Cco 50 μ l	6. Cg 50 μ l	7. Pg 50 μ l	8. Am 50 μ l	9. Ac 50 μ l	10. Hf 50 μ l
5 mM L-Leu									
11. STD prestained 5 μ l	12. Tm 50 μ l	13. La 50 μ l	14. Ap 10 μ l	15. Cco 50 μ l	16. Cg 20 μ l	17. Pg 50 μ l	18. Am 50 μ l	19. Ac 50 μ l	20. Hf 50 μ l
1 % tripton									
21. STD prestained 5 μ l	22. Sv 50 μ l	23. Ts 50 μ l	24. Abi 50 μ l	25. Mp 50 μ l	26. Cco 50 μ l	27. Cn 50 μ l	28. Cg 20 μ l	29. Tm 50 μ l	
1 % tripton									
30. STD prestained 5 μ l	31. Ar 50 μ l	32. He 50 μ l	33. Xb 50 μ l	34. Ln 50 μ l	35. Ap 10 μ l				
1 % tripton									

Rezultati:



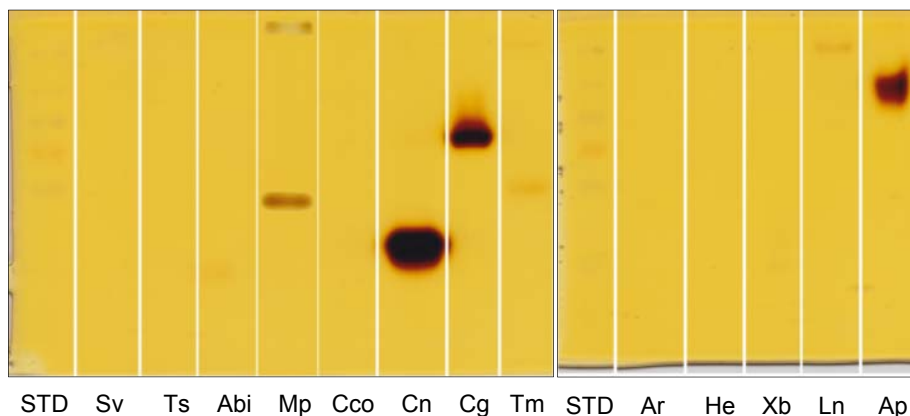
STD Tm La Ap Cco Cg Pg Am Ac Hf

Slika 48: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Leu po zaustavitvi reakcije s kislino



STD Tm La Ap Cco Ca Pa Am Ac Hf

Slika 49: Encimogram z odzivi vzorcev v triptonu po zaustavitvi reakcije s kislino



Slika 50: Encimogram z odzivi vzorcev v triptonu po zaustavitvi reakcije s kislino

Opažanja: Kljub manjši količini nanašalnega pufru so se vzorci posedli na dno žepka, pri tem sem analiziral večjo količino posameznega vzorca. Odziv Ap in Cg je enak v L-Leu in triptonu. V triptonu, ne pa tudi v L-Leu, je opazna lisa pri vzorcu Tm, ki je še izrazitejša po dodatku kisline. Aktivni vzorci so tudi Abi (se slabo vidi, boljše v kislini), Cn (zelo aktivno, močan odziv), Cg, Tm (bolje se vidi po dodatku kisline), Xb (bolje se vidi po dodatku kisline), Ln (bolje se vidi po dodatku kisline), Ap. Slabi so odzivi Abi, Tm, Xb in Ln, a kažejo LAKO aktivnost. Pri ostalih vzorcih odziva ni bilo; možno je, da LAKO ne vsebujejo ali pa so premalo koncentrirani za kvalitativno opazovanje, lahko pa so njihovi proteini denaturirali v postopku analize. Pri primerjavi s standardi sem ugotovil, da ima LAKO iz Ap molekulsko maso približno 130 kDa, iz Cg 70 kDa, iz Tm 55 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 30 kDa, iz Xb 25 kDa, iz Mp 55 kDa in 250 kDa.

Sklepi: Pozitivno reakcijo za LAKO ima tudi Tm v triptonu, ostale vzorce je potrebno koncentrirati in ponovno testirati. LAKO iz Ap soka ima molekulsko maso 130 kDa, iz Cg 70-80 kDa, iz Tm 55-60 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 30 kDa, iz Xb 25 kDa in iz Mp 25 kDa ter 250 kDa.

Smotno bi bilo skoncentrirati vzorce Abi, Tm, Xb in Ln, da bi dobili boljši odziv. Cn soka lahko uporabim manj. Problem triptona je, da poleg aminokislin vsebuje tudi druge peptide [72], zato ni nujno, da je pozitiven odziv posledica reakcije LAKO.

12. 2 TESTIRANJE KAČJEGA STRUPA Vaa IN Z ACETONOM KONCENTRIRANIH VZORCEV NA PRISOTNOST LAKO

Mnogo člankov navaja, da so kačji strupi zelo bogat in raziskan vir LAKO [6, 7, 8, 12, 16, 24], zato sem testiral tudi strup modrasa *Vipera ammodytes ammodytes* na prisotnost teh encimov.

Potek dela: Proteine je možno oboriti tudi z acetonom [74], zato sem nekatere vzorce primerjal z enakimi vzorci, le da so bili drugi koncentrirani–oborjeni z acetonom, pri čemer sem vse vzorce mešal z nanašalnim pufrom v razmerju 7 : 3, le Cg in Ap 10X redčen z vodo v razmerju 1 : 1. Vzorcev, ki bi jih moral koncentrirati, je veliko, in ultrafiltracija je draga in zamudna, zato bi bilo cenejše, če bi že vzorci, katerih proteini so bili oborjeni z acetonom, dali pozitivno reakcijo za LAKO.

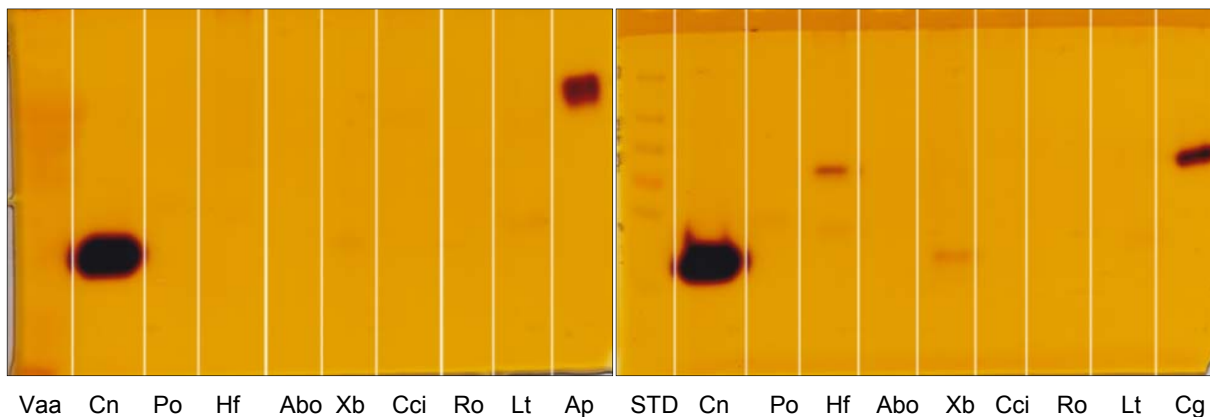
Testiral sem tudi čisti Vaa strup, pri čemer sem ga mešal z nanašalnim pufrom v razmerju 1 : 1.

Inkubiral sem v 4X raztopini iz 0,5 U/ml HRP, 1 mM OPD, 0,1 % CSM v 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 pufru. Gela sem med inkubacijo ločil s plastično folijo od mape, da se lise pozitivnih reakcij ne bi odtisnile na drug gel. Z optičnim čitalcem sem gele posnel po 24 h in dodal kislino.

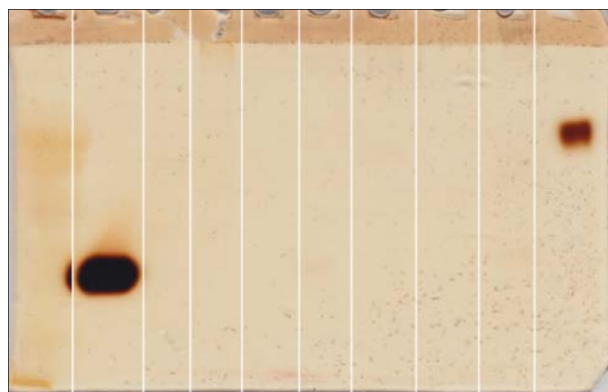
Razvrstitev vzorcev na gelih:

1. Vaa 50 μ l	2. Cn 50 μ l	3. Po 50 μ l	4. Hf 50 μ l	5. Abo 50 μ l	6. Xb 50 μ l	7. Cci 50 μ l	8. Ro 50 μ l	9. Lt 50 μ l	10. Ap 10 μ l
11. STD prestained 5 μ l	12. Cn 50 μ l acetone	13. Po 50 μ l acetone	14. Hf 50 μ l acetone	15. Abo 50 μ l acetone	16. Xb 50 μ l acetone	17. Cci 50 μ l acetone	18. Ro 50 μ l acetone	19. Lt 50 μ l acetone	20. Cg 20 μ l

Rezultati:



Slika 51: Encimogram z odzivi Vaa in vzorcev v CSM po zaustavitvi reakcije s kislino



Slika 52: Encimogram z odzivi Vaa in vzorcev v CSM po enem tednu v destilirani vodi

Opazanja: Med vzorci brez obarjanja z acetonom so aktivni Cn, Po, Xb, Lt, Ap in Cg, med tistimi, ki so bili dodatno obarjani z acetonom, pa Cn, Po, Hf, Xb in Lt. Hf je aktiven le po koncentraciji z acetonom, LAKO iz Po, Xb in Lt pa so bolj aktivne, če so koncentrirane z acetonom v primerjavi z nekoncentriranimi vzorci.

Vaa strup je pri večji količini šibko aktiven za LAKO encime; mnogo bolj se odziv vidi po dodatku kisline, še boljše pa, ko se gel nekaj časa inkubira v vodi. LAKO iz kačjega strupa so v celotnem spektru molekulskih mas.

LAKO iz Cn ima molekulsko maso okrog 35 kDa, iz Hf 80 kDa in iz Xb 35 kDa.

Sklepi: V nadaljnjih raziskavah bom uporabil Hf, Po, Xb in Lt koncentrirane z acetonom in nadaljnja koncentracija ne bo potrebna; Cn pa nekoncentriran sok, saj se dobro vidi že brez koncentracije z acetonom, in to tako dobro, da bom nadalje uporabil le 20 μ l vzorca z nanašalnim pufrom, mešanim v razmerju 1 : 1, tako, kot sem do sedaj uporabljal vzorec Cg. Oba vzorca pripadata gobam iz istega rodu.

Kačji strup Vaa vsebuje več različnih LAKO, saj imajo molekulske mase v celotnem spektru do 250 kDa. LAKO iz Cn ima molekulsko maso okrog 35 kDa, iz Hf 80 kDa in iz Xb 35 kDa.

12. 3 BARVANJE VZORCEV S COOMASSIE BRILLIANT BLUE ZA OCENO KOLIČINE PROTEINOV V VZORCIH IN OCENO SMISELNOSTI KONCENTRACIJE

Postopek dela: Vse vzorce, na katerih sem do sedaj testiral aktivnost LAKO, sem 10 min kuhal (z nanašalnim pufrom), da so proteini denaturirali in se razvili, da so imeli vsi enak naboj na enoto mase. Pri tem sem želel ugotoviti, kako zelo so koncentrirani vzorci, ki kažejo aktivnost LAKO, in kako tisti, pri katerih LAKO še nisem zaznal. Pri tem sem tudi želel izbrati vzorce, ki bi jih bilo smiselno koncentrirati, torej tiste, ki vsebujejo malo proteinov, in obratno, tiste vzorce, ki ne kažejo aktivnosti LAKO, a imajo veliko koncentracijo proteinov, opustiti pri nadaljnjem raziskovanju.

Za določanje molekulskih mas sem uporabil standard LMW, na katerega se veže barvilo in je nato moč določiti molekulske mase proteinov v vzorcih.

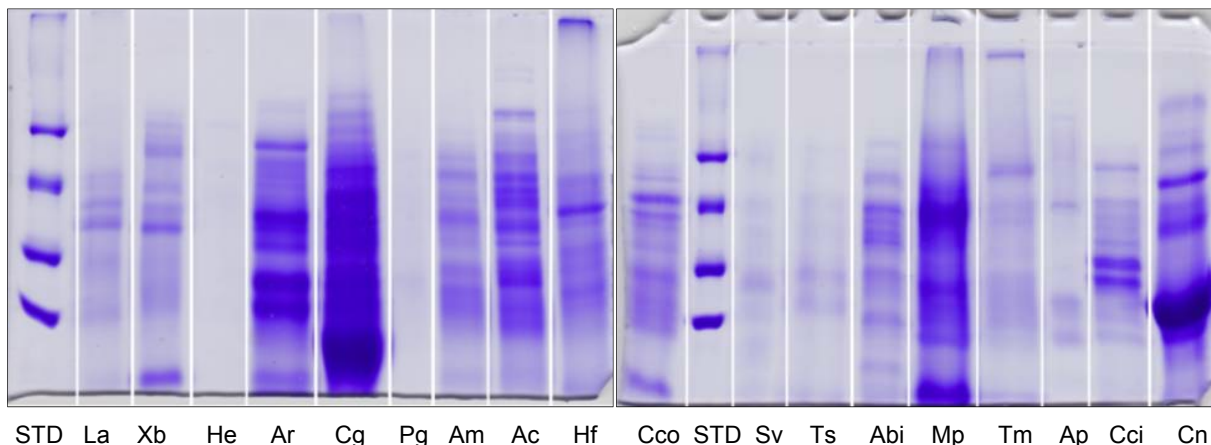
Vzorci sem zmešal z nanašalnim pufrom v razmerju 7 : 3, oz. Cg in Ap 1 : 1, pri čemer sem Ap 10X redčil z vodo. Uporabil sem 50 μ l take mešanice oz. 20 μ l Cg in 10 μ l Ap. Tako pripravljene vzorce sem 10 min kuhal v vreli vodi pri 100 °C na plavajočem stojalu, nato pa sem jih centrifugiral, saj so se kapljice vzorcev nabrale po stenah mikrocentrifugirke. Take vzorce sem nanese na gel in izvedel NaDS-PAGE.

Razvrstitev vzorcev na gelih:

1. STD LMW 5 μ l	2. La 50 μ l	3. Xb 50 μ l	4. He 50 μ l	5. Ar 50 μ l	6. Cg 20 μ l	7. Pg 50 μ l	8. Am 20 μ l	9. Ac 50 μ l	10. Hf 50 μ l
11. Cco 50 μ l	12. STD LMW 5 μ l	13. Sv 50 μ l	14. Ts 50 μ l	15. Abi 50 μ l	16. Mp 50 μ l	17. Tm 50 μ l	18. Ap 10 μ l	19. Cci 50 μ l	20. Cn 20 μ l

Po razvitju sem oba gela najprej 1 h barval v barvalni raztopini in nato 2X v 30% razbarvalni raztopini ter preko noči v 10 % razbarvalni raztopini. Pri tem so barvilo vezali le proteini, gel pa ne. Take gele sem posnel z optičnim čitalcem in tudi z UV-VIS črno-belo kamero.

Rezultati:



STD La Xb He Ar Cg Pg Am Ac Hf Cco STD Sv Ts Abi Mp Tm Ap Cci Cn

Slika 53: Slika gelov po barvanju proteinov z barvilom Coomassie brilliant blue

Opažanja:

● La:	nizka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Xb:	nizka koncentracija proteinov,	šibek odziv LAKO
● He:	zelo nizka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Ar:	visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Cg:	visoka koncentracija proteinov,	močen odziv LAKO
● Pg:	zelo nizka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Am:	srednje visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Ac:	srednje visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Hf:	srednje visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Cco:	srednje visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Sv:	nizka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Ts:	nizka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Abi:	nizka koncentracija proteinov,	šibek odziv LAKO
● Mp:	visoka koncentracija proteinov,	LAKO aktivnost v triptonu
● Tm:	nizka koncentracija proteinov,	šibek odziv LAKO
● Ap:	nizka koncentracija proteinov,	močen odziv LAKO
● Cci:	srednje visoka koncentracija proteinov,	ni LAKO aktivnosti
● Cn:	visoka koncentracija proteinov,	močen odziv LAKO

Sklepi: V primeru Ap, ki kaže močno LAKO aktivnost, je proteinov malo, kar kaže na to, da je pomembna količina pravih proteinov, torej LAKO, za močan odziv. Ap, Cn, Cg in Mp, ki imajo že nekoncentrirani močno LAKO aktivnost, lahko v nadaljnjem raziskovanju uporabim nekoncentrirane. Odločil sem se, da pri nadaljnjih raziskavah ne bom več uporabljal Ar, saj že vsebuje veliko proteinov, a nima LAKO aktivnosti. Izločil sem tudi Sv in Cci, ker ju ne morem koncentrirati zaradi pomanjkanja vzorca. Koncentriral bom: La, Xb, He, Pg, Am, Ac, Cco, Ts, Abi, Tm in Ln, pri kateri pa nisem mogel preveriti količine encimov zaradi pomanjkanja prostora na gelu, a tudi kažejo šibko LAKO aktivnost.

13. Koncentriranje vzorcev

Glede na prejšnje ugotovitve o smiselnosti koncentriranja vzorcev sem se odločil, da mi Hf, Po, Xb in Lt ni potrebno koncentrirati, saj bom uporabil vzorce, v katerih so bili proteini oborjeni z acetonom. Koncentriral sem vzorce La, He, Pg, Am, Ac, Cco, Ts, Abi, Tm in Ln, saj sem imel dovoljšnjo količino izvlečkov. Pri tem sem na membrani z ultrafiltracijo koncentriral Cc, Pg, Am, Ac in La, saj sem imel teh vzorcev na voljo v velikih količinah, vzorce Ts, Tm in Ln pa sem koncentriral v centrifugalnih koncentradorjih.

Obe tehniki koncentriranja temeljita na filtriranju skozi celulozno membrano, ki prepušča le manjše molekule, medtem ko večji proteini ostanejo nad njo. Koncentrat je tako običajno temnejše barve, če je koncentriran. Če nismo prepričani v uspešnost koncentracije, je potrebno izmeriti absorbanco filtrata in koncentrata, ki mora biti višja. Membrane so namočene v posebne raztopine, ki ohranjajo njihovo poroznost in omogočajo vlažnost, zato jih je pred uporabo potrebno sprati z destilirano vodo.

Vzorce sem najprej prefiltriral skozi filtrirni papir, saj bi večji delci lahko zamašili pore membrane pri koncentraciji. Na membrani z dušikom sem vzorce koncentriral tako, da sem jih nalil v za to namenjeno posodo, pri čemer mora biti vzorca vsaj okoli 100 ml. Na podstavek sem položil celulozno membrano, ki prepušča le manjše molekule (3 kDa) in v posodo vstavil mešalo, vse skupaj pa sem vstavil v primež. Ker je čas take ultrafiltracije dolg in je aparaturna velika, sem ta postopek izvedel v hladni sobi pri 4 °C, saj so proteini pri nižji temperaturi bolj obstojni. Na posodo sem priključil cev za inertni dušik iz jeklenke, ki nad raztopino vzorca med mešanjem povzroča pritisk in tekočino potiska na membrano, skozi katero izteče raztopina z manjšimi molekulami. Tako koncentriranje traja dalj časa.

Pri koncentraciji s centrifugiranjem sem v centrifugirko vstavil poseben nastavek s celulozno membrano, ki prepušča le manjše molekule (3 kDa). Vzorec, a vsakokrat največ 4 ml, sem vлил v ta nastavek. Pri koncentriranju v centrifugi pri 4 °C 15 min pri 4000 g manjše molekule preidejo skozi membrano v centrifugirko, koncentrat pa ostane nad membrano in je temnejše barve kot filtrat.

Opazanja: Koncentrat je vsakokrat temnejše barve, kar pomeni, da so se večje molekule v njem koncentrirale. Cco vzorec je bil 8,33 X koncentriran, Pg 7,65X, Am 5X, Ac 12,31X in La sok 5X koncentriran; Ln sok je bil 1,47 X koncentriran, Ts 2,40X in Tm 1,55X. Pri tem je bilo razmerje med filtratom in koncentratom pri večkratnem koncentriranju vzorca s centrifugiranjem vsakokrat enako.

Sklepi: V glavnem poskusu bom analiziral vzorce na dveh gelih pri dveh 2 različnih pH vrednostih – v nekoliko kislem in nekoliko bazičnem pufri v različnih substratih kot virih aminokislin. Ker mora biti na vsakem gelu standard za določanje molekulskih mas, to skupno pomeni 18 različnih vzorcev. Uporabil bom vse sokove gob, ki so kadarkoli kazali aktivnost LAKO in vse, ki sem jih koncentriral. To pomeni, da bom uporabil Cco (koncentrirano), Abi (aktivno), Mp (aktivno v triptonu), La (koncentrirano), Cg (aktivno), Cn (aktivno), Ts (koncentrirano, aktivno), Am (koncentrirano), Ap (aktivno), Ac (koncentrirano), Hf (aktivno, koncentrirano z acetonom), Po (aktivno, koncentrirano z acetonom), Pg (koncentrirano), Xb (aktivno, koncentrirano z acetonom), Lt (aktivno, koncentrirano z acetonom), Tm (aktivno, koncentrirano), Ln (aktivno, koncentrirano). To predstavlja 17 vzorcev, zato bom aktivnost LAKO testiral tudi na strupu Vaa, ki pa ga nisem imel na voljo v dovolj veliki količini za analizo pri vseh parametrih.

S tem naborom vzorcev bom lahko raziskal prisotnost encimov LAKO tako v širokem naboru taksonomsko zelo različnih vrst kot tudi med sorodnimi vrstami, tudi znotraj istega rodu.

Vzorcev, ki imajo veliko proteinov in ne kažejo LAKO aktivnosti, ne bom uporabil. To so: Cci, Ar, He, Abo, Sv in Ro.

14. Testiranje vzorcev pri različnih pH vrednostih z različnimi viri aminokislin

Načrt razporeditve vzorcev na gelih:

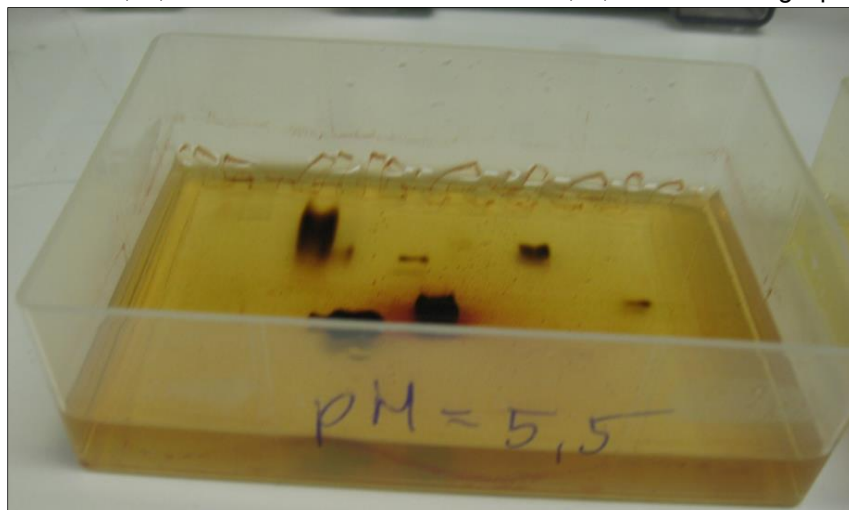
1. STD prestained	2. Cco konc. 50 μ l	3. Abi 50 μ l	4. Mp 50 μ l	5. La konc. 50 μ l	6. Cg 20 μ l	7. Cn 20 μ l	8. Ln konc. 50 μ l	9. Ts konc. 50 μ l	10. Hf konc. z acet. 50 μ l
11. Vaa / T. v. 40/50 μ l	12. Am konc. 50 μ l	13. Ap 20 μ l 10X redč.	14. Ac konc. 50 μ l	15. Po konc. z acet. 50 μ l	16. Xb konc. z acet. 50 μ l	17. Lt konc. z acet. 50 μ l	18. Pg konc. 50 μ l	19. Tm konc. 50 μ l	20. STD prestained

Ker kačjega strupa Vaa nisem imel več dovolj, sem v nadaljnjih poskusih uporabil L-lizin oksidazo iz plesni *Trichoderma viride* (2 mg/ml).

Vzorci sem z nanašalnim pufrom zmešal v razmerju 7 : 3 in jih v žepek gela odpipetiral 50 μ l, sok Ap sem 10X redčil z vodo in ga z nanašalnim pufrom zmešal v razmerju 1 : 1 ter ga v žepek odpipetiral 20 μ l, saj se je v zadnjih testih lisa pri 10 μ l slabše videla, sok Cn in Cg sem zmešal z nanašalnim pufrom v razmerju 1 : 1 ter ga v žepek odpipetiral 20 μ l. Kačji strup Vaa sem z nanašalnim pufrom zmešal v razmerju 1 : 1 in ga v žepek odpipetiral 40 μ l, L-lizin oksidazo pa sem 10X redčil z vodo in jo z nanašalnim pufrom zmešal v razmerju 1 : 1 ter jo v žepek odpipetiral 50 μ l, saj je zelo koncentrirana.

Vzorci sem spiral in inkubiral pri dveh različnih pH vrednostih: pH 5,5 in pH 8,0, ki nekako predstavljata mejni področji optimalne aktivnosti, določene v prejšnjih poskusih, saj imajo LAKO iz različnih virov različne lastnosti in različno optimalno območje pH. Za to sem uporabil 2 kemijsko sorodna puфра Bis-Tris in Tris, saj tako kot pH vrednost vpliva na aktivnost encimov, prav tako lahko vplivajo tudi prisotne snovi. Bis-Tris pufer je namenjen nekoliko bolj kislim pH vrednostim, medtem ko pa je Tris namenjen za nekoliko bazično področje. Torej, uporabil sem puфра 0,1 M Bis-Tris HCl pH 5,5 in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0.

Eno paralelo obeh gelov sem 15 min spiral in 24 h inkubiral v pufru s pH 5,5 in drugo v pufru s pH 8,0. Inkubiral sem jih v 40 ml inkubacijske raztopine za 2 gela, sestavljene iz 0,1 ml 52 U/ml HRP = 0,5 U/ml HRP, 0,5 ml 20 mM OPD = 1 mM OPD, 8,4 ml ustreznega puфра ter 1,0 ml ustreznega vira aminokislin. Gele sem slikal po 24 h in po dodatku kisline ter jih nato še nekaj časa inkubiral v destilirani vodi. Med inkubacijo sem med oba gela z različnimi vzorci pri enakih pogojih vložil plastično folijo, da se odtis pozitivne reakcije enega gela ne bi prenesel na drugega.

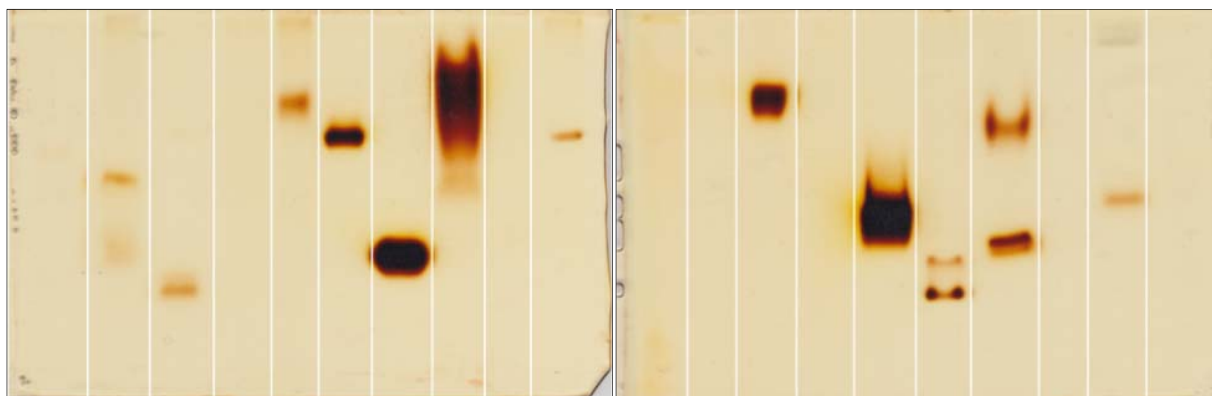


Slika 54: Inkubacija gelov; opazne so lise pozitivnih reakcij. Med geloma je plastična folija, da se pozitivni odziv ne prenese na drug gel.

14. 1 TESTIRANJE VZORCEV V CSM PRI pH 5,5 IN pH 8,0

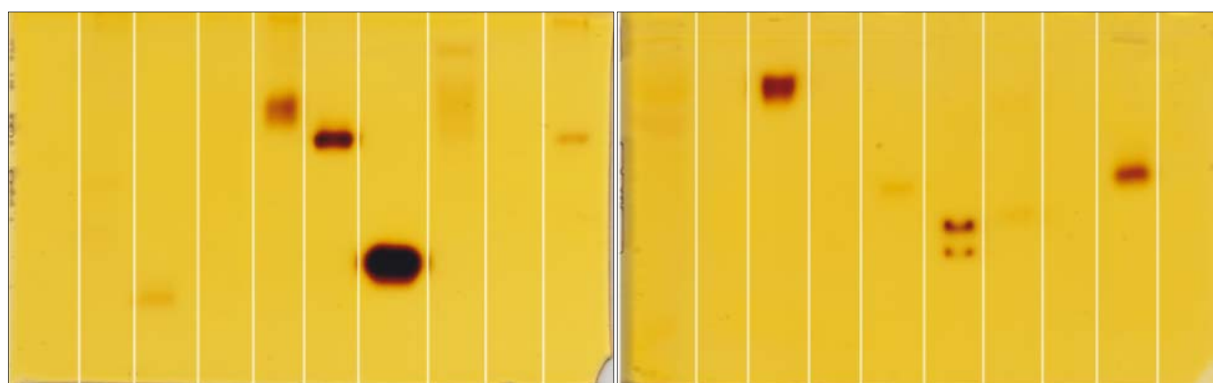
Postopek dela: V CSM sem testiral kačji strup Vaa in izbrane vzorce gob ter uporabil 5 μ l standarda za določanje molekulskih mas.

Rezultati:



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf Vaa Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD

Slika 55: Encimogram z odzivi vzorcev
v CSM pri pH 5,5 po dodatku kisline



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf Vaa Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD

Slika 56: Encimogram z odzivi vzorcev
v CSM pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opažanja: Pri pH 5,5 opazimo več aktivnosti kot pri pH 8,0. Pri pH 5,5 so v 0,1 % CSM aktivni: Cco (3 lise; najmočnejša 2.), Abi, La (2 lisi; najmočnejša 2.), Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), Hf (2 lisi; močnejša 2.), Vaa (različne molekulske mase), Ap, Po, Xb (2 lisi; močnejša 2.), Lt (2 lisi; močnejša 2.), Tm (2 lisi; močnejša 2.). Močno so aktivni Cg, Cn, Ln, Ap, Po, Xb, Lt. Pri pH 5,5 je prišlo pri inkubaciji do temne oborine.

Pri pH 8,0 so aktivni: Abi, La (2 lisi; močnejša 2.), Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), Hf (2 lisi; močnejša 2.), Ap, Po, Xb (2 lisi; močnejša 2.), Tm. Močno so aktivni Cg, Cn, Ap. Po dodatku kisline in v vodi se pri pH 8,0 vidi tudi lisa pri Vaa.

Razlike med pH vrednostma: odziv Vaa je brez dodatka kisline viden pri pH 5,5, Cco se pri 8,0 ne vidi, Ln je pri pH 5,5 mnogo močnejši, odziv Abi, Hf, Ap, Xb in Lt je pri pH 5,5 močnejši, prav tako tudi pri Po, ki ima pri pH 5,5 tudi več različnih molekulskih mas. Le odziv Tm je pri pH 8,0 močnejši.

Standard se pri količini 5 μ l pri tem testu ni videl, zato nisem mogel določiti molekulskih mas LAKO, ki so dale pozitivne rezultate, zato bom v naslednjem poskusu uporabil 7 μ l standarda.

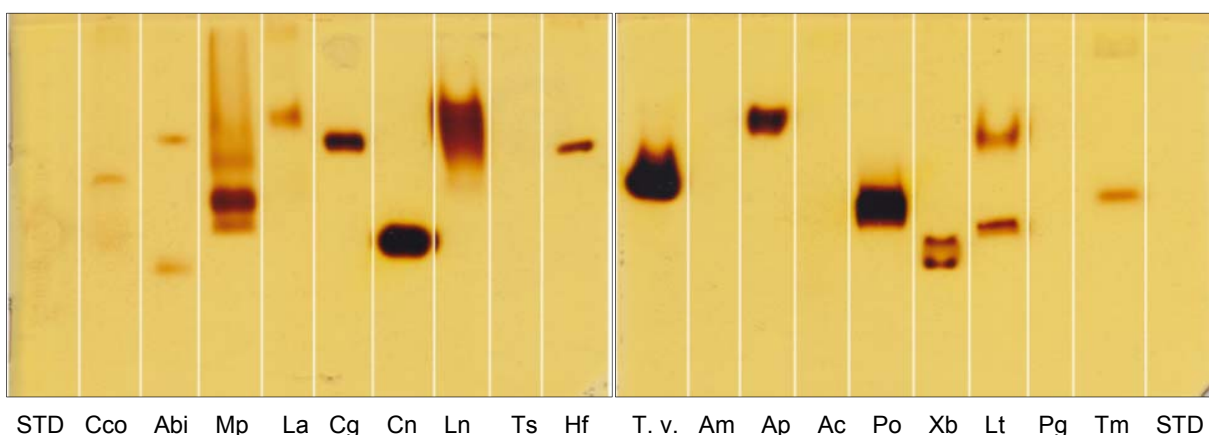
Sklepi: V glavnem so odzivi vzorcev pri pH 5,5 močnejši, poleg tega pa odziva Cco in Lt pri pH 8,0 nista vidna, pri pH 5,5 pa sta. Le aktivnost LAKO pri Tm je večja pri pH 8,0. Substrat 0,1 % CSM se je izkazal za zelo splošnega, pri katerem so aktivne mnoge različne LAKO.

Pri poznejši primerjavi z znanimi molekulskimi masami pozitivnih vzorcev sem določil približno molekulsko maso LAKO iz Xb, ki znaša 25 kDa in 30 kDa.

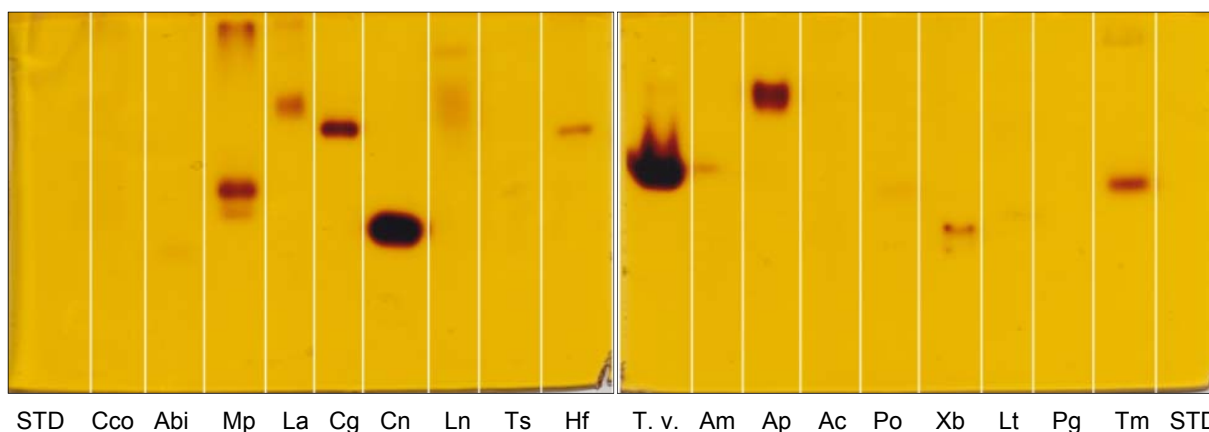
14. 2 TESTIRANJE VZORCEV V TRIPTONU PRI pH 5,5 IN pH 8,0

Potek dela: Namesto kačjega strupa Vaa sem uporabil 10X redčeno L-lizin oksidazo iz plesni *Trichoderma viride*, ki sicer preferenčno oksidira L-Lys, poleg tega pa oksidira tudi druge substrate [21]. Uporabil sem večjo količino standarda 7 μ l.

Rezultati:



Slika 57: Encimogram z odzivi vzorcev v triptonu pri pH 5,5 po dodatku kisline



Slika 58: Encimogram z odzivi vzorcev v triptonu pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opažanja: Pri pH 5,5 v 1,0 % triptonu so aktivni: Cco (2 lisi; 2. močnejša), Abi (2 lisi; 1. močnejša), Mp (različne molekulske mase), La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), Hf, T. v., Ap, Po, Xb (2 lisi; 2. močnejša), Lt (2 lisi; 2. močnejša), Tm. Pri pH 5,5 so močno aktivni Mp, Cg, Cn, Ln, T. v., Ap, Po.

Pri pH 8,0 so aktivni: Mp (2 lisi; 2. močnejša), La (2 lisi; 2. močnejša), Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), Hf, T. v., Ap, Po, Xb, Tm (2 lisi; 2. močnejša), Abi. Pri pH 8,0 so močno aktivni Mp, Cg, Cn, T. v., Ap, Tm.

Razlike med pH vrednostma: Cco pri pH 8,0 ni aktiven, Abi ima pri pH 5,5 dve molekuli masi in sta obe močnejši kot pri pH 8,0, odziv Mp je pri pH 5,5 močnejši in ima več različnih molekulskih mas, odzivi Cg, Ln, Hf, Ap in Xb so pri pH 5,5 močnejši kot pri pH 8,0, odziv Po je pri pH 5,5 prisoten, pri pH 8,0 ga ni, odziv Lt je pri pH 5,5 močan, pri pH 8,0 ni odziva. Odziv Tm je močnejši pri pH 8,0 kot pri pH 5,5.

Sklepi: Več vzorcev je v triptonu bolje aktivnih pri pH 5,5: Abi, Mp, Cg, Ln, Hf, Ap, Xb, poleg tega so pri pH 5,5 aktivni Cco, Po in Lt, ki pri pH 8,0 niso aktivni. Pri pH 8,0 je bolj aktiven le LAKO iz Tm, zato je za analizo LAKO aktivnosti vzorcev gob boljši pH 5,5, kjer ima več vzorcev močnejšo aktivnost.

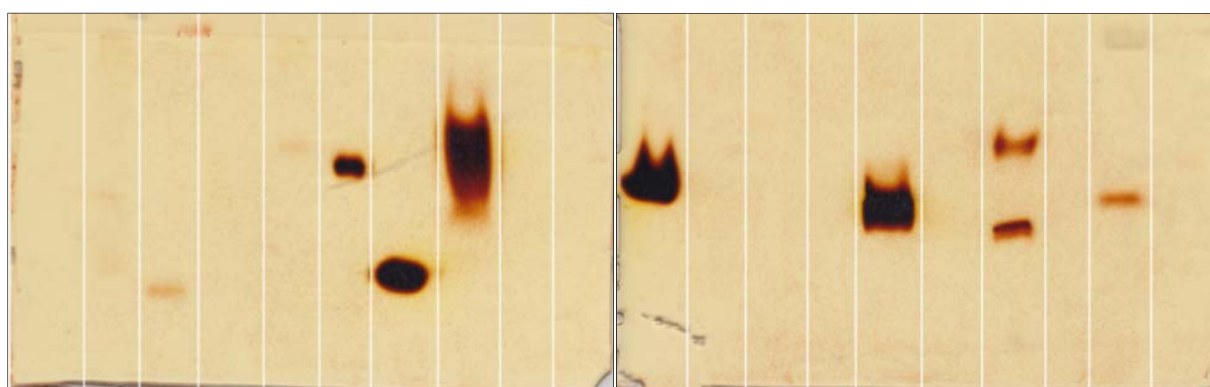
Tudi povečana količina standarda 7 μ l se po inkubaciji ne vidi.

Pri poznejši primerjavi z znanimi molekulskimi masami pozitivnih vzorcev sem določil približno molekulsko maso LAKO iz Tm, ki znaša 55 kDa.

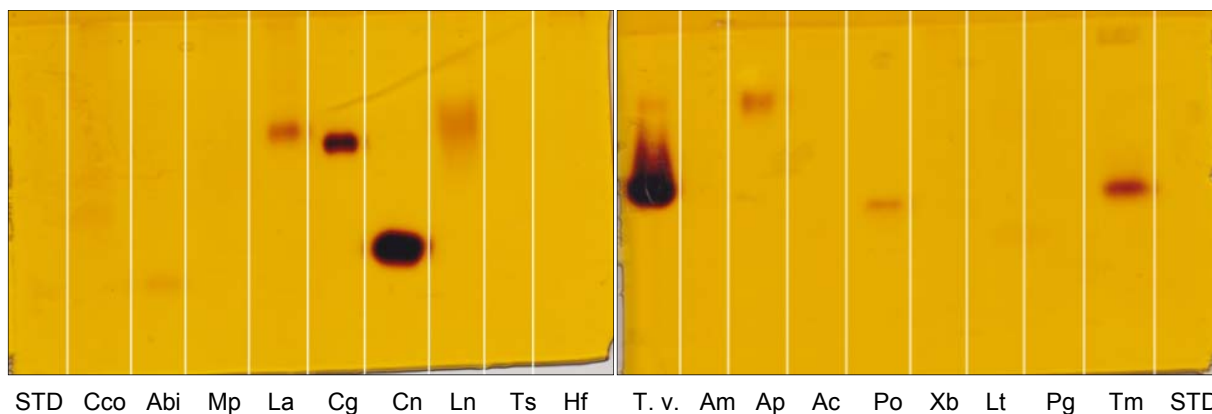
14. 3 TESTIRANJE VZORCEV V L-Lys PRI pH 5,5 IN pH 8,0

Potek dela: L-lizin oksidaza preferenčno oksidira L-Lys [11, 20, 21, 25], zato sklepam, da bo imel izvleček iz *Trichoderme viride* najmočnejši odziv v tem substratu. Ponovno sem uporabil 7 μ l standarda za določanje molekulskih mas proteinov.

Rezultati:



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf T. v. Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD
Slika 59: Encimogram z odzivi vzorcev
v L-Lys pri pH 5,5 po dodatku kisline



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf T. v. Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD
Slika 60: Encimogram z odzivi vzorcev
v L-Lys pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opazanja: V 5 mM L-Lys so pri pH 5,5 aktivni: Cco (2 lisi; 2. močnejša), Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Po (različne molekulske mase), Lt (2 lisi; 2. močnejša), Tm. Pri pH 5,5 so močno aktivni Cg, Cn, Ln, T. v., Po in Lt.

Pri pH 8,0 so aktivni: Cco, Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Ap, Po, Tm. Po intenziteti aktivnosti pri pH 8,0 izstopajo predvsem vzorci Cg, Cn, T. v. in Tm.

Razlike med pH vrednostma: pri pH 5,5 so bolj aktivni Abi, Ln in Po, pri čemer je pri pH 5,5 bolj aktiven tudi Lt, ki pri pH 8,0 ni aktiven. Pri pH 8,0 sta bolj aktivna La in Tm, pri pH 8,0 je bolj aktiven tudi Ap, saj pri pH 5,5 ne kaže LAKO aktivnosti.

V L-Lys je L-lizin oksidaza vzorca T. v. po pričakovanjih zelo aktivna.

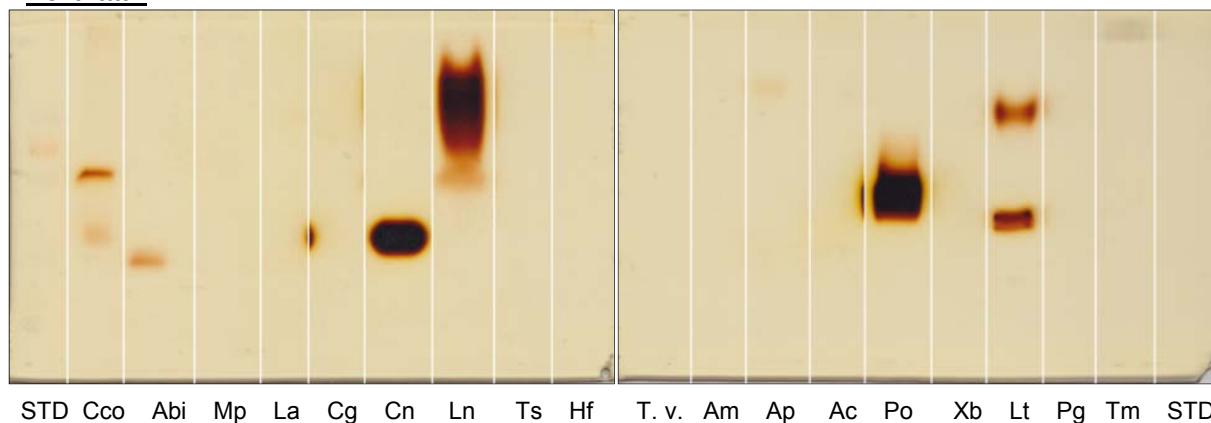
Sklepi: V splošnem se je kot boljši pH izkazal 5,5, saj so vzorci Abi, Po, Ln in Lt bolj aktivni pri kislem pH, Lt pa pri pH 8,0 sploh ni aktiven. Vendar pa so pri pH 8,0 bolj aktivni La, Tm in Ap, ki pri pH 5,5 sploh ni aktivna. Dokazal sem, da je L-lizin oksidaza v L-Lys zelo aktivna in res preferenčno oksidira ta substrat.

Niti povečana količina standarda se po inkubaciji v gelu ne vidi toliko, da bi lahko z gotovostjo določil molekulske mase proteinov, ki kažejo LAKO aktivnost.

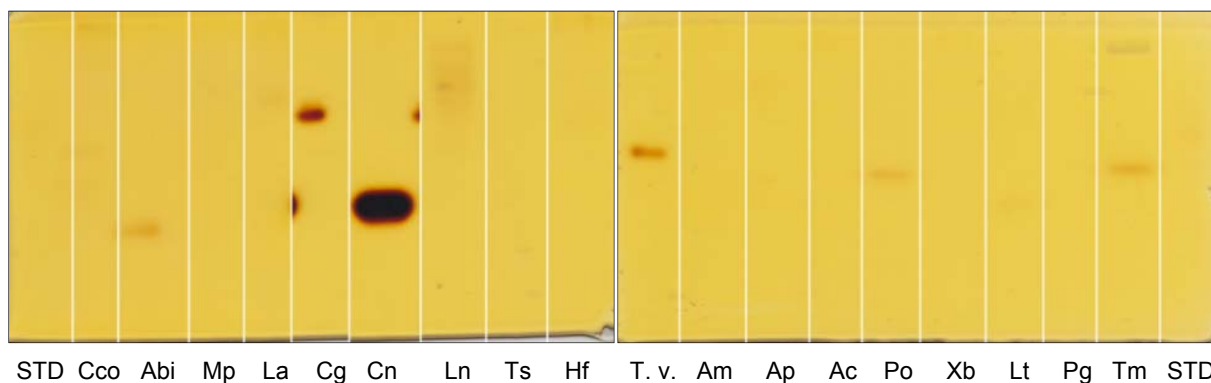
14. 4 TESTIRANJE VZORCEV V L-Asn PRI pH 5,5 IN pH 8,0

Potek dela: Čeprav se je L-Asn v prejšnjih poskusih v primerjavi z L-Leu izkazal kot manj splošen substrat, sem vse vzorce inkubiral v njem. V gel sem dodal še več standarda, in sicer 10 µl.

Rezultati:



Slika 61: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Asn pri pH 5,5 po dodatku kisline



Slika 62: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Asn pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opazanja: V 5 mM L-Asn so pri pH 5,5 aktivni: Cco (2 lisi, 1. močnejša), Abi, Cn, Ln (različne molekulske mase), Ap, Po (različne molekulske mase), Lt (2 lisi, 2. močnejša). Pri pH 5,5 so močno aktivni Cn, Ln, Po in Lt.

Pri pH 8,0 so aktivni: Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Po, Tm. Pri pH 8,0 sta močno aktivna le vzorca Cg in Cn.

Razlike odzivov med pH vrednostma: pri pH 5,5 so bolj aktivni: Abi, Ln, Po, Lt ter Cco in Ap, ki pri pH 8,0 nista aktivni. Pri pH 8,0 so bolj aktivni Cg, T. v. in Tm, ki pri pH 5,5 niso aktivni.

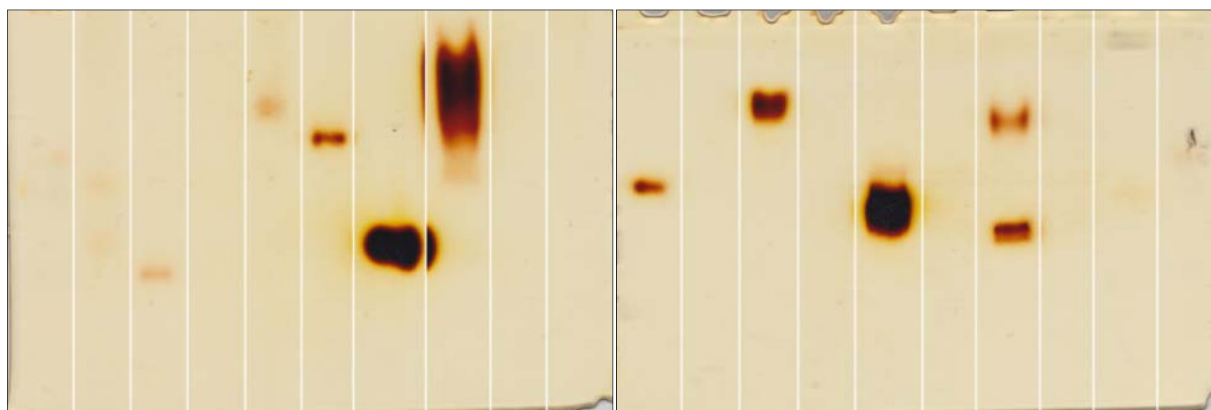
Približne molekulske mase proteinov, ki imajo pozitivno reakcijo: iz Cco 35 in 60 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 25-35 kDa in iz Ln 60-250 kDa.

Sklepi: Pri pH 5,5 v L-Asn je aktivnih manj vzorcev, saj so le pri pH 8,0 aktivni Cg, T. v. in Tm, a sta v kislem aktivna dva druga vzorca: Cco in Ap. V kislem je tudi odziv Abi, Ln, Po in Lt večji kot v bazičnem, zato sklepam, da je pri analizi v L-Asn bolje inkubirati pri pH 5,5. L-lizin oksidaza vzorca T. v. res preferenčno oksidira L-Lys, saj je L-Asn šibko oksidirala le pri pH 8,0.

Ob dodatku 10 µl standarda sem določil molekulske mase LAKO iz Cco, ki znaša 35 in 60 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 25-35 kDa in iz Ln 60-250 kDa.

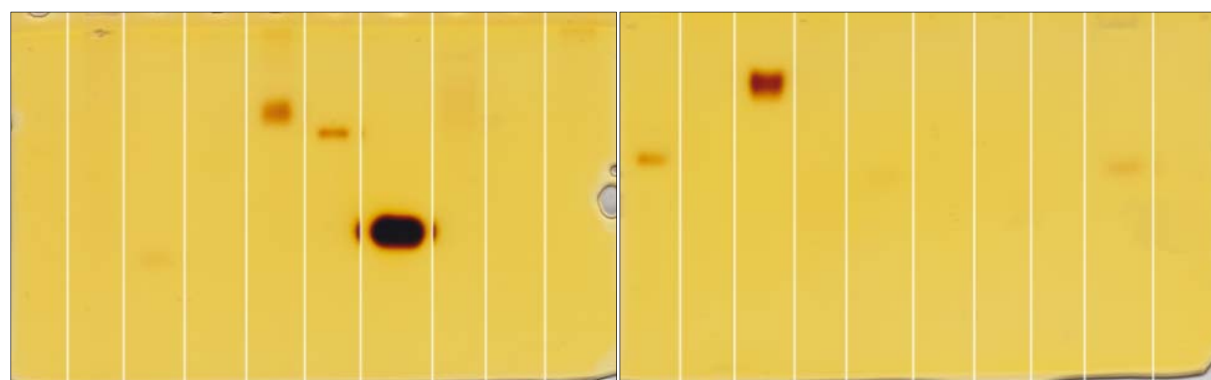
14. 5 TESTIRANJE VZORCEV V L-Phe PRI pH 5,5 IN pH 8,0

Rezultati:



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf T. v. Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD

Slika 63: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Phe pri pH 5,5 po dodatku kisline



STD Cco Abi Mp La Cg Cn Ln Ts Hf T. v. Am Ap Ac Po Xb Lt Pg Tm STD

Slika 64: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Phe pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opažanja: V 5 mM L-Phe kažejo LAKO aktivnost: pri pH 5,5: Cco, Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Ap, Po (različne molekulske mase), Lt (2 lisi; 2. močnejša) in Tm. Močno so aktivni vzorci Cg, Cn, Ln, Ap, Po in Lt.

Pri pH 8,0 so v 5 mM L-Phe aktivni: Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Ap, Tm. Močno sta aktivna le vzorca Cn in Ap.

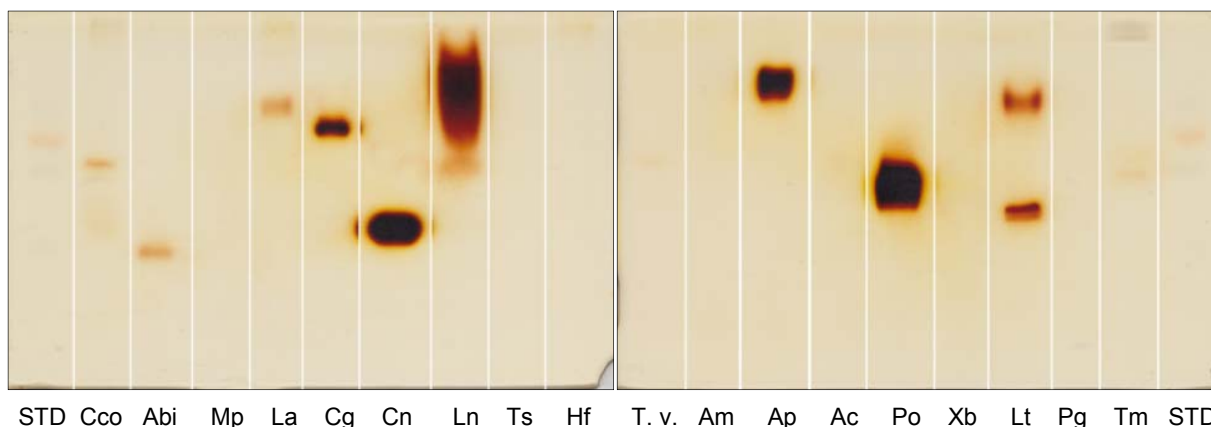
Razlike odzivov med pH vrednostma: pri pH 5,5 so bolj aktivni: Abi, Cg, Ln, T. v., Ap, Tm ter Cco, Po, Lt, ki pri pH 8,0 niso aktivne. Pri pH 8,0 sta bolj intenzivna odziva LAKO pri La in Tm.

Sklepi: Abi, Cg, Ln, T. v., Ap in Tm so bolj aktivni pri kislem pH, pri bazičnem pa Cco, Po in Lt sploh niso aktivne. V bazičnem pH imata večjo aktivnost le La in Tm, zato sklepam, da je večja aktivnost LAKO pri pH 5,5.

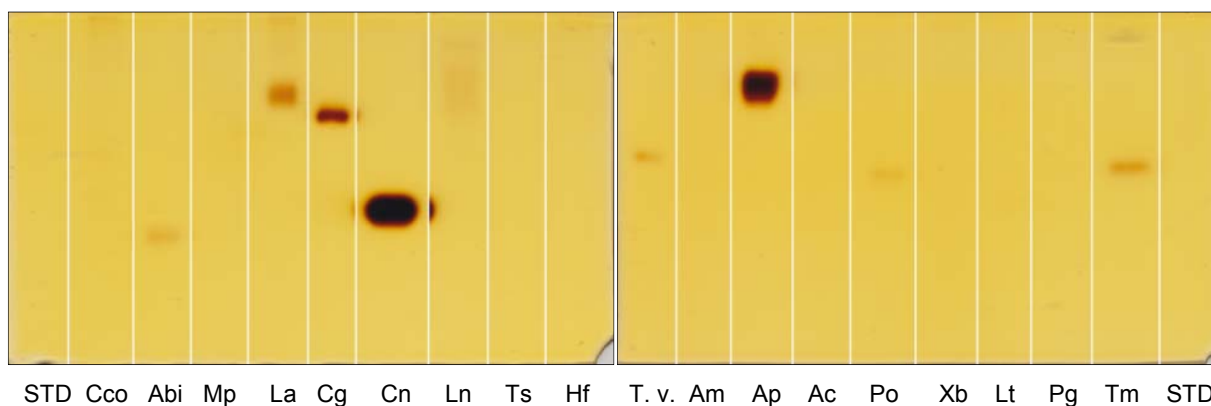
14. 6 TESTIRANJE VZORCEV V L-Leu PRI pH 5,5 IN pH 8,0

L-Leu se je že v procesu optimizacije izkazal kot zelo splošen substrat, v katerem ima več različnih LAKO dobro aktivnost, zato predvidevam, da bo na njem imelo največ vzorcev pozitiven rezultat, ki bo tudi najmočnejši med vsemi testiranimi substrati.

Rezultati:



Slika 65: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Leu pri pH 5,5 po dodatku kisline



Slika 66: Encimogram z odzivi vzorcev v L-Leu pri pH 8,0 po dodatku kisline

Opažanja: Pri pH 5,5 je prišlo do obarjanja temnih kosmov okrog lise, kjer je potekla pozitivna reakcija. V 5 mM L-Leu so pri pH 5,5 aktivni: Cco (2 lisi; 1. močnejša), Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), Ap, Po (različne molekulske mase), Lt (2 lisi; spodnja močnejša), Tm. Pri pH 5,5 so močno aktivni Cg, Cn, Ln, Ap, Po in Lt.

Pri pH 8,0 so aktivni: Abi, La, Cg, Cn, Ln (različne molekulske mase), T. v., Ap, Po, Tm. Močno so aktivni: Cg, Cn in Ap.

Razlike odzivov med pH vrednostma: pri pH 5,5 so bolj aktivni Abi, Cg, Ln, Po ter Cco in Lt, ki v bazičnem pH nista aktivna. Pri pH 8,0 je bolj aktiven Tm in tudi T. v., ki pri pH 5,5 ni aktiven.

Približne molekulske mase proteinov, ki imajo pozitivno reakcijo: iz Cco 35 in 60 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 25-35 kDa, iz Ln 60-250 kDa, iz La 100 kDa, iz Cg 70-90 kDa, iz Ap 110-130 kDa, iz Po 35-55 kDa in iz Lt 35 kDa in 100 kDa.

Sklepi: Več vzorcev je aktivnih pri pH 5,5: Cco in Lt, ki pri pH 8,0 nista aktivna, a T. v. je pri pH 8,0 aktiven in pri pH 5,5 ni. Močnejši odzivi v kislem so pri Abi, Cg, Ln, Po, a v bazičnem je močnejši odziv Tm. Ker je več aktivnih pri pH 5,5 kot pH 8,0 in so njihovi odzivi intenzivnejši v kislem, sklepam, da je pri uporabi substrata L-Leu optimalnejši pH 5,5.

Predvidevanje, da je L-Leu najbolj splošen substrat, je bilo napačno, saj je več vzorcev aktivnih in imajo večjo aktivnost v substratih CSM, triptonu, z L-Lys pa imata podobne odzive vzorcev.

Z 10 μ l standarda sem določil molekulske mase LAKO, ki so dale pozitivno reakcijo: iz Cco 35 in 60 kDa, iz Abi 25 kDa, iz Cn 25-35 kDa, iz Ln 60-250 kDa, iz La 100 kDa, iz Cg 70-90 kDa, iz Ap 110-130 kDa, iz Po 35-55 kDa in iz Lt 35 kDa in 100 kDa.

14. 7 PONOVIŠE REZULTATOV IN TESTIRANJE NOVEGA VZORCA P sp.

Ključnega pomena pri rezultatih je njihova ponovljivost, zato sem izbral nekaj vzorcev, ki so pri določenih pogojih izstopali, npr. Mp sok je imel LAKO aktivnost le v triptonu, Ap in Cg sta bila v L-Asn zelo slabo aktivna. Poleg tega pa sem testiral še L-lizin oksidazo v CSM, ki je prej še nisem, in sok novega vzorca gobe iz rodu gologlavk *Psilocybe*.

Postopek dela: Pri ponovnem oziroma novem testiranju vzorcev sem le-te na gele razporedil tako, da bo na vsakem koščku gela, ki se bo inkubiral v drugačnem substratu pri drugačnem pH, vzorec, ki je v prejšnjih poskusih že dal pozitiven rezultat, torej pozitivna kontrola.

Preveriti sem želel nekatere izmed rezultatov, ki so se mi zdeli sumljivi:

- Ap ni aktiven pri L-Asn pH 8,0,
- ponovno sem želel preveriti aktivnost Vaa v CSM in L-Leu, ker je bila slaba,
- ponovil sem testiranje vzorca Mp v triptonu, saj je imel v prejšnjih poskusih aktivnost le v tem substratu,
- Cg, ki je običajno kazal močno aktivnost, ni bil aktiven v L-Asn pri pH 5,5,
- T. v. nisem testiral v CSM, zato sem opravil še ta test.

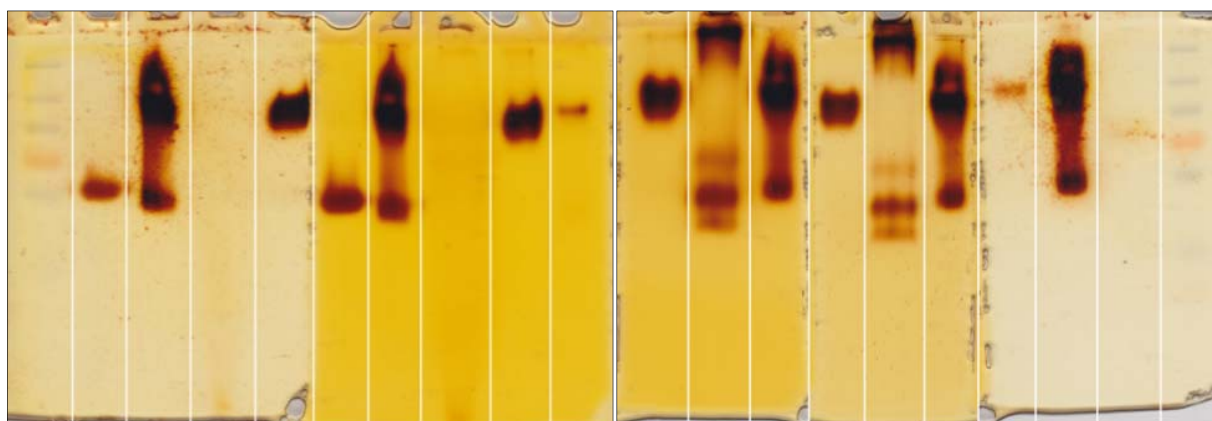
Načrt razporeditve vzorcev na gelih:

1. STD prestained 10 μ l	2. T. v. 50 μ l	3. P sp. 50 μ l	4. Vaa 50 μ l	5. Ap 20 μ l 10X	6. T. v. 50 μ l	7. P sp. 50 μ l	8. Vaa 50 μ l	9. Ap 20 μ l 10X	10. P sp. 1 : 1 50 μ l
0,1 % CSM pH 5,5					0,1 % CSM pH 8,0				
11. Ap 20 μ l 10X	12. Mp 50 μ l	13. P sp. 50 μ l	14. Ap 20 μ l 10X	15. Mp 50 μ l	16. P. sp. 50 μ l	17. Ap 20 μ l 10X	18. P sp. 50 μ l	19. Cg 20 μ l	20. STD prestained 10 μ l
1 % tripton pH 8,0			1 % tripton pH 5,5			5 mM L-Asn pH 5,5			

21. STD prestained 10 µl	22. Ap 20 µl 10X	23. P sp. 50 µl	24. T. v. 50 µl	25. P sp. 50 µl	26. T. v. 50 µl	27. P sp. 50 µl
5 mM L-Asn pH 8,0			5 mM L-Lys pH 8,0		5 mM L-Lys pH 5,5	

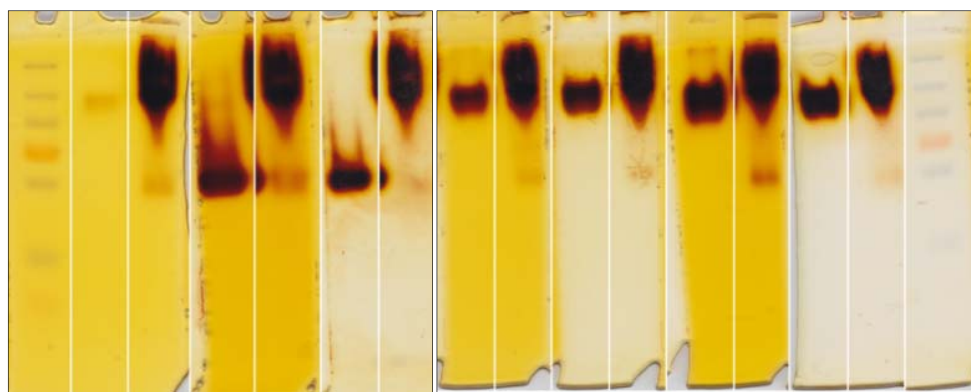
28. Ap 20 µl 10X	29. P sp. 50 µl	30. Ap 20 µl 10X	31. P sp. 50 µl	32. Ap 20 µl 10X	33. P sp. 50 µl	34. Ap 20 µl 10X	35. P sp. 50 µl	36. STD prestained 10 µl
5 mM L-Phe pH 8,0		5 mM L-Phe pH 5,5		5 mM L-Leu pH 8,0		5 mM L-Leu pH 5,5		

Rezultati:



STD T. v. P sp. Vaa Ap T. v. P. sp. Vaa Ap P sp. Ap Mp P sp. Ap Mp T. v. Ap P sp. Cg STD
CSM pH 5,5 CSM pH 8,0 tripton pH 8,0 tripton pH 5,5 L-Asn pH 5,5

Slika 67: Encimogram z odzivi ponovno testiranih vzorcev ter P sp. in T. v. po dodatku kisline



STD Ap P sp. T. v. P sp. T. v. P. sp. Ap P sp. Ap P. sp. Ap P. sp. Ap P. sp. Ap P. sp. STD
L-Asn pH 8,0 L-Lys pH 8,0 L-Lys pH 5,5 L-Phe pH 8,0 L-Phe pH 5,5 L-Leu pH 8,0 L-Leu pH 5,5

Slika 68: Encimogram z odzivi T. v. in P sp. po dodatku kisline

Opažanja:

- Ap ni aktiven v L-Asn pH 8,0.
- Aktivnost katerega strupa Vaa v CSM je pri pH 5,5 šibka, a močnejša kot pri pH 8,0.
- Aktivnost Mp v triptonu pri pH 8,0 in 5,5 je zelo močna.

- Odziva Cg v substratu L-Asn pri pH 5,5 ni.
- T. v. je aktivna v CSM tako pri pH 5,5 kot 8,0.
- Določil sem približne molekulske mase LAKO vzorcev, ki v prejšnjih testiranjih pri 10 µl standarda niso kazali aktivnosti: LAKO iz T. v. ima molekulsko maso 55-70 kDa, iz Mp 45-70 kDa in 250 kDa, pri čemer je višek aktivnosti pri 45 kDa, 55 kDa in 250 kDa.

Sklepi:

- LAKO iz Ap v L-Asn pri pH 8,0 ni aktivna.
- Kljub ponovitvi je odziv Vaa strupa dokaj šibek
- Pri Mp v triptonu sem ponovno dobil zelo dober odziv, torej sklepam, da Mp res vsebuje encime, ki dajejo pozitivno reakcijo v triptonu.
- Ponovno je bil rezultat Cg v L-Asn pri pH 5,5 negativen, torej so bile LAKO pri teh pogojih očitno neaktivne.
- T. v. je v CSM pri obeh pH enako aktivna, a je kljub temu njen odziv šibkejši od odziva v triptonu, L-Lys in L-Phe ter v L-Asn in L-Leu pri pH 8,0 (pri pH 5,5 ni aktivnosti).
- LAKO iz T. v. ima molekulsko maso 55-70 kDa, iz Mp 45-70 kDa in 250 kDa, pri čemer je višek aktivnosti pri 45 kDa, 55 kDa in 250 kDa.

Dobil sem nov vzorec zelo strupene gobe P sp., ki sem ga preveril na vseh testiranih substratih, ker pa je bil to 1. test gobe, sem moral primerjati tudi odzive različnih koncentracij.

Opazanja: P sp. ima zelo veliko aktivnost pri skupni količini 50 µl z nanašalnim pufrom, mešanim z vzorcem 7 : 3 v 0,1 % CSM in ima več različnih molekulskih mas, pri čemer je pri pH 5,5 odziv nekoliko močnejši kot v pH 8,0, poleg tega je v kislem pH prišlo tudi do obarjanja temnih kosmov okoli lise, ki ima 3 med seboj skoraj povezane dele, od katerih je srednja najmočnejša, nato sledi zgornja in spodnja je najšibkejša. Signal je v vseh substratih opazen že po 45 min. Odziv manjše količine vzorca, mešane z nanašalnim pufrom v razmerju 1 : 1, je mnogo šibkejši, a še vedno dobro opazen, pri čemer pa se dobro vidi le srednja lisa.

Tudi v 1,0 % triptonu je odziv P sp. zelo močen in lisa je enake trodelne oblike kot v CSM, pri čemer sta si odziva v obeh substratih po intenziteti enaka in tudi pri kislem pH je v triptonu prišlo do obarjanja.

V 5 mM L-Asn je odziv zelo močen, a je pri pH 5,5 močnejši kot pri pH 8,0 in tudi lisa je drugačne oblike: v kislem ima trodelno obliko, pri čemer so vse tri lise dobro vidne, v pH 8,0 pa sta zelo dobro vidni zgornji dve lisi, medtem ko se spodnja slabo pozna. L-Asn je za P sp. slabši substrat od CSM in triptona.

V L-Lys je odziv P sp. tudi močen in lisa ima tako obliko, kot v L-Asn pri pH 8,0, torej zgornja lisa je zelo močna, medtem ko je spodnja šibka in je tako L-Lys manj primeren substrat od L-Asn.

Enako obliko, kjer je odziv zgornje lise zelo izrazit, spodnji pa šibek, je tudi pri L-Phe pri obeh pH in je tako učinkovitost substrata L-Phe enaka L-Lys.

Pri L-Leu je odziv zelo močen; zgornja lisa je zelo intenzivna, medtem ko je spodnja šibka, a je pri pH 8,0 izrazitejša kot pri pH 5,5. L-Leu je za P sp. enako učinkovit kot L-Phe in L-Lys.

LA KO iz P sp. ima molekulsko maso 55-250 kDa, pri čemer je višek aktivnosti pri 55 kDa, 100-130 kDa in 250 kDa

Sklepi: Ker je odziv manjše količine vzorca zelo šibek in iz rezultatov ni razvidnega večjega števila različnih molekulskih mas, je za analizo primernejša večja količina vzorca. Sok iz P sp. ima zelo močno LA KO aktivnost na vseh šestih testiranih substratih in je tako skupaj s Cn najboljši vir LA KO izmed testiranih vzorcev, saj ni specifičen do substrata. Aktivnost lise je primerljiva z aktivnostjo Ap in boljša od aktivnosti T. v. na preferenčnem substratu L-Lys. Molekulska masa LA KO iz P sp. je 55-250 kDa, pri čemer ima zgornja lisa maso 250 kDa, srednja najmočnejša 120 kDa in najnižja najšibkejša 55 kDa; na substratih, kjer sta zgornji dve lisi združeni, pa ima ta molekulsko maso 100-250 kDa.

15. Primerjava uporabnosti substratov za analizo LAKO aktivnosti v gelu

S primerjavo med odzivi vzorcev v različnih substratih pri različnih pH vrednostih ugotavljam, da je največ vzorcev aktivnih in imajo tudi največjo aktivnost v triptonu, sledi substrat CSM, odzivi vzorcev so si v L-lizinu in L-leucinu tako po intenziteti signalov kot tudi po številu pozitivnih vzorcev dokaj podobni. Za analizo LAKO iz različnih vrst vzorcev je substrat L-fenilalanin nekoliko slabši, najmanj vzorcev pa je bilo aktivnih v L-asparaginu, kjer so bili tudi odzivi najmanj intenzivni. Že tekom optimizacije sem ugotovil, da je L-Leu v primerjavi z L-Asn substrat, kjer so LAKO močnejše aktivne. Ugotavljam, da so za analizo LAKO iz različnih virov z različnimi lastnostmi primernejši kompleksni substrati, ki vsebujejo več različnih L-aminokislin, saj imajo LAKO različno preferenco do oksidacije substrata.

Čeprav so v literaturi [17, 19, 22] podatki, da je za analizo LAKO aktivnosti optimalen pH nekoliko bazičen oz. je priporočljiva inkubacija v pufru Triton-X-100, sem ugotovil, da je optimalen pH za analizo širšega spektra LAKO iz različnih virov nekoliko kisel, tj. pH 5,5, spiranje v pufru Triton-X-100 pa negativno vpliva na intenziteto rezultatov.

Prav pri vseh analiziranih pogojih, tako v vseh vrstah substratov kot pri obeh pH vrednostih, so aktivni vzorci Cn, Ln in P sp., ki so torej zelo nespecifični do vrste analiziranega substrata, Cn in P sp. tudi do pH medija.

Ugotovil sem, da je večina vzorcev bolje aktivnih v mediju pri pH 5,5, npr. LAKO iz Cco, ki pri pH 8,0 sploh ni aktivna, ter LAKO iz Abi, Ln, Po in Lt, ki imajo v kislem mediju močen odziv, v bazičnem pa so le šibko aktivne.

Edina izjema je bila LAKO iz Tm, ki je imela močnejšo aktivnost v bazičnem mediju pri pH 8,0.

L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride* po predvidevanjih [11, 20, 21, 25] kaže močno preferenco do oksidacije L-Lys, poleg tega pa oksidira tudi snovi v triptonu, L-aminokislina v CSM, slabo L-Phe ter L-Asn in L-Leu zelo slabo le pri pH 8,0.

Kačji strup iz modrasa *Vipera ammodytes ammodytes* sem testiral v CSM, kjer ima LAKO le šibek odziv pri obeh pH.

LAKO iz Ap, ki je bila pozitivna kontrola [26], ima močno aktivnost v triptonu, CSM, L-Phe in v L-Leu, v L-Lys in L-Asn pa je le šibko aktivna, pri čemer v L-Lys pri pH 5,5 ne kaže aktivnosti.

LAKO iz gobe Mp ima močno aktivnost pri obeh pH vrednostih le pri analizi v triptonu, pri čemer ima tudi več različnih molekulskih mas. Pri analizi v substratih z izključno L-aminokislinami ni opazne pozitivne reakcije za LAKO.

Zbir rezultatov odzivov pri vseh analiziranih pogojih se nahaja v Preglednici 2 na naslednji strani. Rezultati so podani tako kvalitativno kot tudi kvantitativno z medsebojno primerjavo med intenzitetami odzivov.

Preglednica 2: Zbir vseh rezultatov testiranj vzorcev

	CSM		tripton		L-Lys		L-Asn		L-Phe		L-Leu	
	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0
Cco	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+	-
Abi	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mp	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
La	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Cg	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	+	+++	++
Cn	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ln	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
Ts	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hf	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaa	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/
T. v.	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+	-	+
Am	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap	+++	++	+++	+++	-	+	+	-	+++	++	+++	+++
Ac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Po	+++	+	+++	-	+++	+	+++	+	+++	-	+++	+
Xb	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lt	++	+	++	-	++	-	+++	-	++	-	++	-
Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tm	+	++	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
P sp.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: / = ni bilo testirano, - = ni odziva, + = šibka intenziteta odziva, ++ = srednje močna intenziteta odziva, +++ = močna intenziteta odziva

16. Poskus s katalazo

Preveriti sem želel, če so proteini, ki dajejo pozitivno reakcijo, res LAKO; to sem storil s katalazo, ki katalizira razgradnjo vodikovega peroksida (ki nastane pri oksidaciji L-aminokislin z L-aminokislinskimi oksidazami) do vode in kisika [6-18] tako kot HRP, ki za svoje delovanje potrebuje elektrondonor, ki je npr. OPD in omogoča aktivnost kompleksa, ki nastane pri povezavi HRP s H_2O_2 . Ko se proton prenese s substrata na kompleks, se vodikov peroksid razgradi, pri čemer se elektrondonor oksidira; če pri tem spremeni barvo, se imenuje kromogen [71, 75].

Katalaza razgrajuje po drugačnem mehanizmu, saj kompleks za aktivacijo ne potrebuje zunanjega elektrondonorja, pač pa je to že železov ion iz hema katalaze, pri čemer se iz oksidacijskega stanja +3 oksidira v +4, da nastane kisikov atom, ki nato reagira z vodikovim peroksidom, pri čemer se železo reducira v primarno stanje [76].

Ob predpostavki, da encimi proizvajajo vodikov peroksid, bi moralo ob prisotnosti katalaze nastati manj obarvanega kompleksa z OPD, saj se pri katalizi katalaze vodikov peroksid porablja in kompleksa z OPD bi posledično nastalo manj, saj bi imela HRP na voljo manj vodikovega peroksida, zato bi rezultati morali biti manj intenzivni.

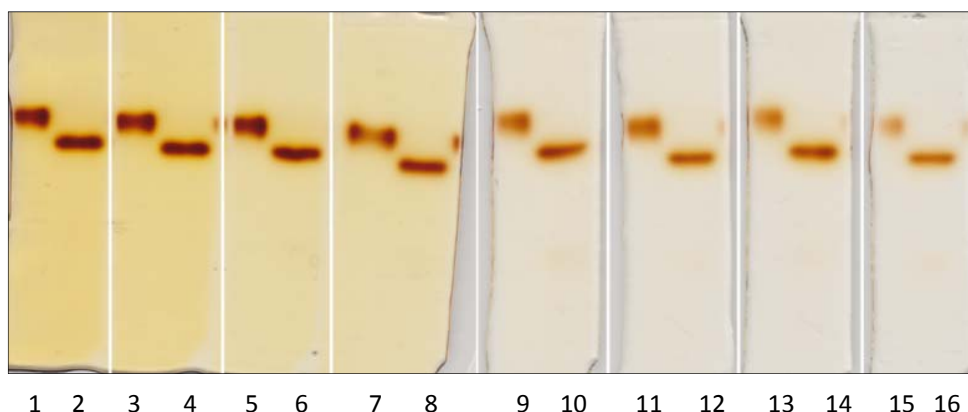
Potek dela: Pri poskusu s katalazo sem en košček gela pustil za kontrolo, k ostalim pa sem dodal ustrezno količino katalaze v raztopino iz 0,5 U/ml HRP, 1 mM OPD, 5 mM I-Leu in ustrezno količino 0,1 M Tris-HCl pufra pH 8,0. Založna raztopina katalaze je bila 1 mg katalaze/ml raztopine, pri čemer ima taka raztopina 2000-5000 U/ml, oz. za višje koncentracije 10000-25000 U/ml. Sok Ap je bil 10X redčen z vodo. Inkubiral sem 24 h pri sobni temperaturi in nato dodal kislino.

Razvrstitev vzorcev na gelih:

1. Ap 10 μ l	2. Cg 20 μ l	3. Ap 10 μ l	4. Cg 20 μ l	5. Ap 10 μ l	6. Cg 20 μ l	7. Ap 10 μ l	8. Cg 20 μ l
kontrola brez katalaze		80-200 U/ml katalaza		200-500 U/ml katalaza		800-2000 U/ml katalaza	

9. Ap 10 μ l	10. Cg 20 μ l	11. Ap 10 μ l	12. Cg 20 μ l	13. Ap 10 μ l	14. Cg 20 μ l	15. Ap 10 μ l	16. Cg 20 μ l
1000-2500 U/ml katalaza		2000-5000 U/ml katalaza		3000-7500 U/ml katalaza		5000-12500 U/ml katalaza	

Rezultati:



Slika 69: Encimogram z odzivi vzorcev po inkubaciji z različno količino katalaze po dodatku kisline

Opazanja: Na encimogramu ni opazne razlike med odzivoma kontrole brez katalaze in 80-200 U/ml katalaze, pri čemer 200-500 U/ml že kaže slabši odziv LAKO, odziv 800-2000 U/ml pa je že mnogo šibkejši kot pri kontroli, vendar so lise še vedno zelo opazne. Pri višji koncentraciji katalaze od 800-2000 U/ml intenziteta lis pada, pri čemer je zelo velik preskok med kontrolo brez katalaze in 1000-

2500 U/ml katalaze. Tudi pri najvišji koncentraciji katalaze 5000-12500 U/ml intenziteta obarvanja lis še vedno kaže na LAKO aktivnost. Po dodatku kisline je pri nižjih koncentracijah katalaze ozadje gela bolj rumeno, pri višjih pa prozorno.

Sklepi: Več kot je katalaze, več vodikovega peroksida razgradi, zato ga za HRP ostane le malo (katalaza se z razgradnjo vodikovega peroksida ne porablja) in je odziv šibkejši, saj nastane manjša količina obarvanega kompleksa z OPD. Sklepam, da encimi res proizvajajo vodikov peroksid, saj je ob dodatku katalaze intenziteta obarvanosti lise v primerjavi s kontrolo bistveno manjša. Ugotavljam, da se z višanjem koncentracije katalaze intenziteta zmanjšuje, a tudi pri visoki koncentraciji, ko se katalaza že težko raztaplja, tudi HRP še vedno razgrajuje vodikov peroksid, kar pomeni, da ga je veliko, poleg tega pa tudi ugotavljam, da katalaza in HRP za substrat tekmujeta, zato tudi ob veliki koncentraciji katalaze tudi HRP še vedno razgradi nekaj vodikovega peroksida. Sklepam, da je testiranje pri višji koncentraciji katalaze nesmiselno, ker do popolne inhibicije verjetno ne bo prišlo, saj bo HRP vedno reagirala z nekaj vodikovega peroksida, poleg tega pa se katalaza pri tako visokih koncentracijah težko raztaplja.

17. Ugotavljanje antibiotičnega učinka izbranih vzorcev na podlagi rastnih krivulj

LAKO sodelujejo pri ustvarjanju toksičnega učinka gobjih in kačjih vzorcev, saj s sproščenim vodikovim peroksidom povzročajo celično smrt [6]. Da bi preveril trditev in ugotovil povezavo med vsebnostjo in aktivnostjo LAKO na podlagi opravljenih testov in toksičnostjo teh encimov, sem primerjal rast biomase treh različnih mikroorganizmov ob prisotnosti izvlečkov iz gliv: prokariotov po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* in po Gramu pozitivne bakterije *Lactococcus lactis* ter evkarionta glivo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*.

Predvidevam, da dodatek vzorca, ki vsebuje LAKO, povzroča počasnejšo celično rast, kar je posledica encimske aktivnosti, med drugim tudi LAKO. Ob dodatku manjše količine ali po kuhanju bo inhibitorni učinek vzorca na rast mikroorganizmov manjši ali izničen.

pH gojišč za mikroorganizme je približno nevtralen, zato imata v tem območju Ap in L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride* maksimalno aktivnost, nasprotno pa LAKO iz Ln kaže le šibko aktivnost, saj ima optimum delovanja pri nekoliko bolj kislem pH. Zato sem tudi izbral te tri vzorce za analizo.

Potek dela: Najprej sem po protokolu pripravil kemijsko definirana gojišča: SOC za Gram-negativno bakterijo *Escherichia coli*, GM17 za Gram-pozitivno bakterijo *Lactococcus lactis* in YPD za glivo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ter jih steriliziral.

V aseptičnih pogojih sem pripravil prekonočne kulture; to pomeni, da sem gojišča okužil s kulturo mikroorganizma in jih inkubiral preko noči pri optimalni temperaturi, da so se celice namnožile. Inokuliral sem pri aseptičnih pogojih tako, da sem s sterilno cepilno zanko s plošče s trdnim gojiščem, kjer je bila razmazana kultura *Saccharomyces cerevisiae* ali *Lactococcus lactis*, prenesel del ene kulture v sterilno epruveto s sterilnim gojiščem ter jo zaprl. Podobno sem storil tudi z bakterijo *Escherichia coli*, le da je trajna kultura shranjena pri -80 °C v raztopini glicerola. Za primerjavo sem okužil dve epruveti s tekočim gojiščem, tretjo epruveto pa ohranil sterilno za kontrolo sterilnosti tako gojišča kot tudi epruvet. Vseh tako 9 pripravljenih epruvet sem preko noči inkubiral v inkubatorju: bakterijo *Escherichia coli* pri 37 °C z mešanjem, bakterijo *Lactococcus lactis* pri 37 °C brez mešanja ter kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* pri 30 °C z mešanjem. Naslednjega dne so bile epruvete, ki so bile inokulirane, bolj motne, medtem ko se motnost sterilnih gojišč ni spremenila, kar pomeni, da je bila priprava gojišč in prekonočnih kultur ustrezno izvedena v aseptičnih pogojih.



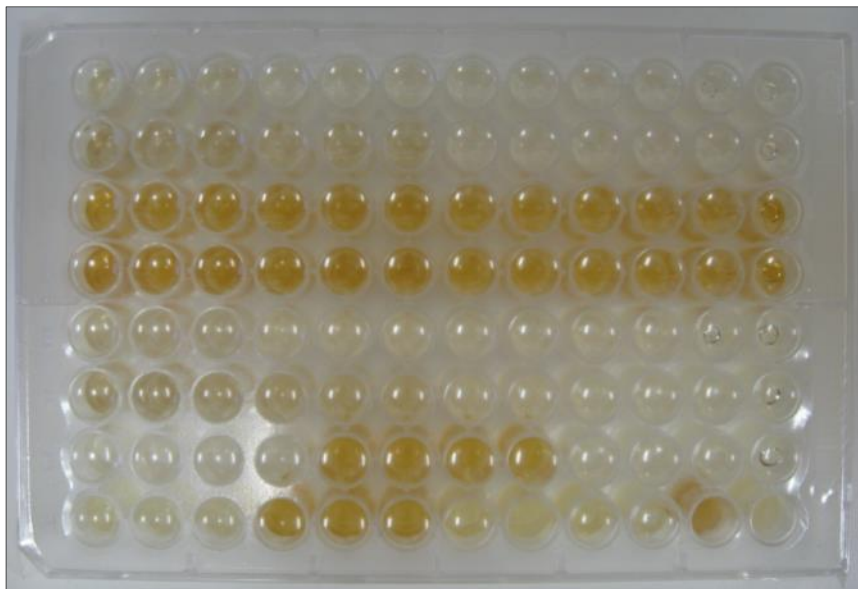
Slika 70: Primerjava motnosti med sterilnimi in z mikroorganizmi okuženimi prekonočnimi kulturami

Izvedel sem spektrofotometrično zaznavanje rasti biomase pri različnih pogojih s tremi ali štirimi ponovitvami. Vzorce sem pred uporabo steriliziral s filtracijo preko 2 μ m filtra.

Pogoji analize za vsakega izmed treh organizmov so bili:

- ◆ 1,0 % Ap sok
- ◆ 0,1 % Ap sok
- ◆ 1,0 % Ap sok, denaturiran s kuhanjem 10 min pri 100 °C
- ◆ 1,0 % Ln sok
- ◆ 0,1 % Ln sok
- ◆ 1,0 % Ln sok, denaturiran s kuhanjem 10 min pri 100 °C
- ◆ 1,0 % L-lizin oksidaza
- ◆ sterilno gojišče

Na mikrotitrsko ploščo s 96 mest za vzorce sem odpipetiral 2 μ l soka, s katerim sem nadzoroval rast mikroorganizmov, ter 198 μ l kulture, katere raztopina je bila pripravljena iz 100 μ l prekonočne kulture in 9,9 ml gojišča. Za kontrolo sem na nekatera mesta z gojiščem in mikroorganizmi odpipetiral namesto 2 μ l soka 2 μ l destilirane vode, saj do inhibicije rasti v primerjavi z dodatkom gobjega soka ne bi smelo priti. Poleg tega sem v nekatere luknjice odpipetiral le 198 μ l sterilnih gojišč in 2 μ l sterilne destilirane vode, pri katerih se odziv ne bi smel spreminjati, torej v njih ne bi smelo priti do rasti mikroorganizmov, če so bila zares sterilna.



Slika 71: Mikrotitrsko plošča z nanesenimi vzorci

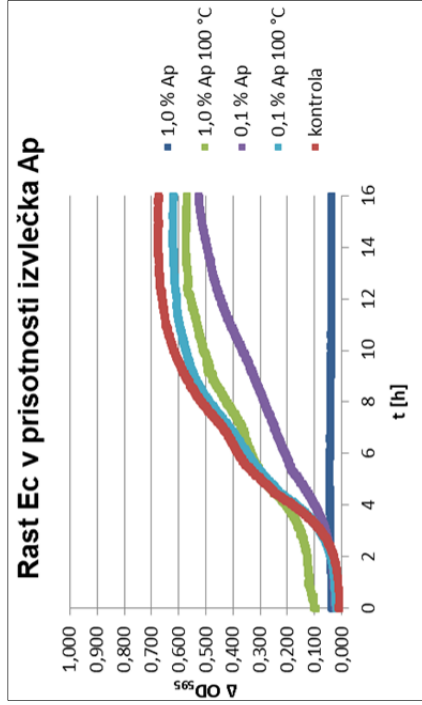
Po nanosu vseh ponovitev sem mikrotitrsko ploščo prelepil s filmom, ki onemogoča tujkom, da bi zašli v analizirane vzorce in jih okužili ter hkrati preprečuje izhlapevanje vode in omogoča izhajanje plinov, nastalih med celičnim dihanjem.

Ploščo sem vstavil v čitalec mikrotitrskih plošč, ki meri absorbanco svetlobe na vsakem izmed 96 mest, iz te svetlobne prevodnosti pa sem nato lahko v Microsoft Excelu 2010 narisal grafe rasti krivulj. Temperaturne pogoje v čitalcu sem nastavil na 30 °C, kar je nekoliko neugodno za bakterijo *Escherichia coli* (Ec), a je nižja temperatura ugodnejša za mikroorganizma *Lactococcus lactis* (Li) in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), poleg tega pa je tudi izhlapevanje vode pri nižji temperaturi manjše. Določil sem meritev absorbance pri 595 nm za mikroorganizme ter določil dolžino cikla merjenja, ki je znašala 121 s, med cikli pa je instrument mikrotitrsko ploščo stresal 110 s, da je bila vsebina čim bolj homogena za natančnejši izmerek absorbance (v času merjenja absorbance se plošča ni stresala). Določil sem, naj se izvede 800 ciklov, kar je znašalo več kot 24 h, kolikor sem načrtoval merjenje, da bi vsi organizmi prišli v stacionarno fazo. Program za čitalec XFLUOR4 sproti vse podatke o absorbanci za vsako mesto na plošči posebej izpiše v Microsoft Excelu.

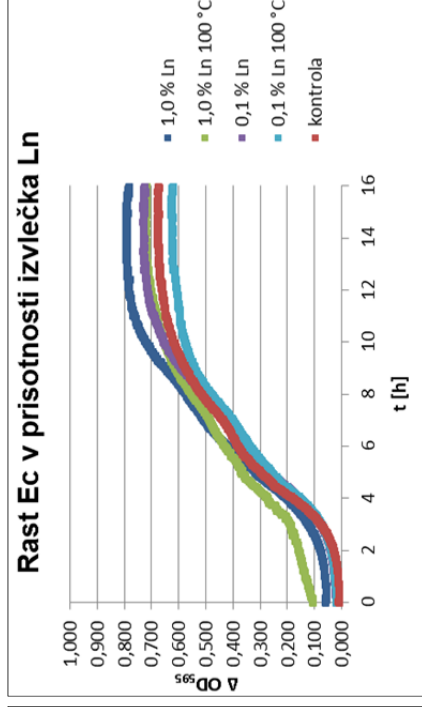
Tako sem dobil 800 rezultatov s podatki o absorbanci ob določenem času za vsako od 96 mest na mikrotitrski plošči, kar skupaj znaša 76 800 podatkov, ki sem jih nato uredil in analiziral.

Narisal sem vseh 96 grafov, pri čemer nisem narisal trendne črte, saj bi lahko povzročila večje odklone. Grafe, ki so predstavljali ponovitve pri enakih pogojih, sem primerjal in izbral najbolj reprezentativnega med njimi, kar pomeni, da na njem ni bilo kakršnih koli ostrih sprememb zaradi napak v meritvah in je tipično predstavljal grafe vseh ponovitev. Od najbolj reprezentativnih rezultatov sem odštel konstantne vrednosti za absorbanco sterilnega gojišča z vodo in plastiko mikrotitrsko plošče in tako dobil rezultate o spremembi optične gostote zaradi rasti mikroorganizmov v suspenziji. Ker sem analiziral 3 različne organizme pri 8 pogojih, to predstavlja 24 grafov, a sem rezultate za posamezen organizem v mediju z enim od izvlečkov iz gliv združil na en graf, kjer sem lahko primerjal absorbanco, torej velikost biomase oz. njeno rast v standardnem gojišču z rastjo tega organizma ob dodatku gobjih vzorcev ter ugotavljal inhibicijo rasti v prisotnosti dodanih izvlečkov.

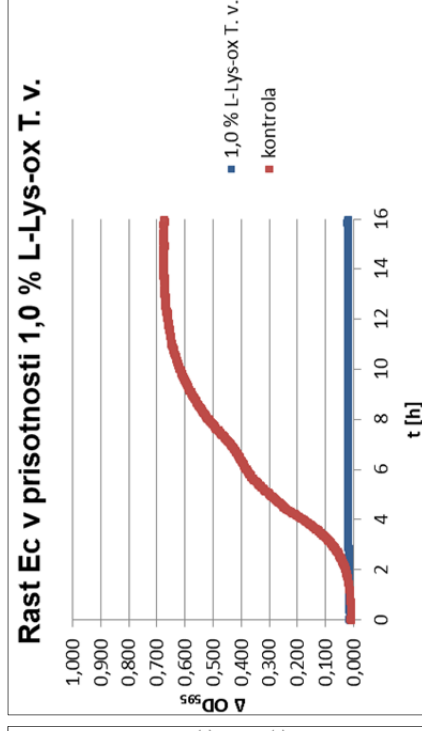
Rezultati:



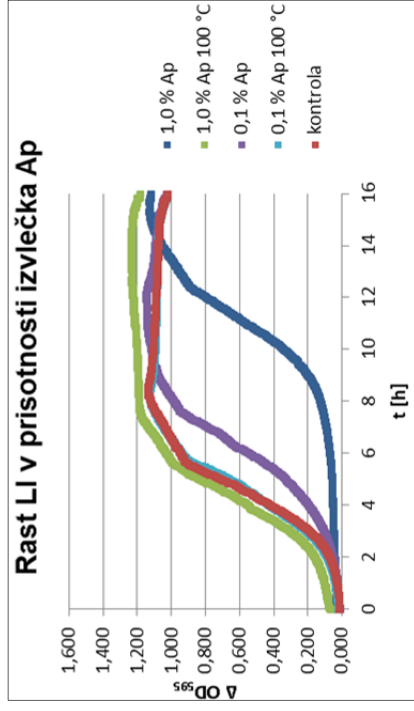
Graf 1 : Rast Ec v prisotnosti izvlečka Ap



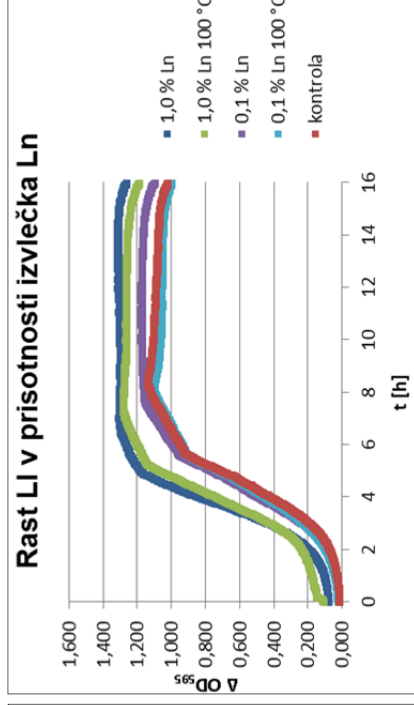
Graf 2 : Rast Ec v prisotnosti izvlečka Ln



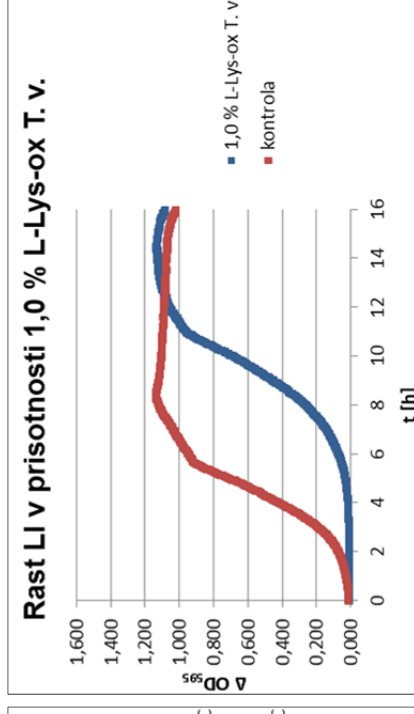
Graf 3 : Rast Ec v prisotnosti 1 % L-lizin oksidaze



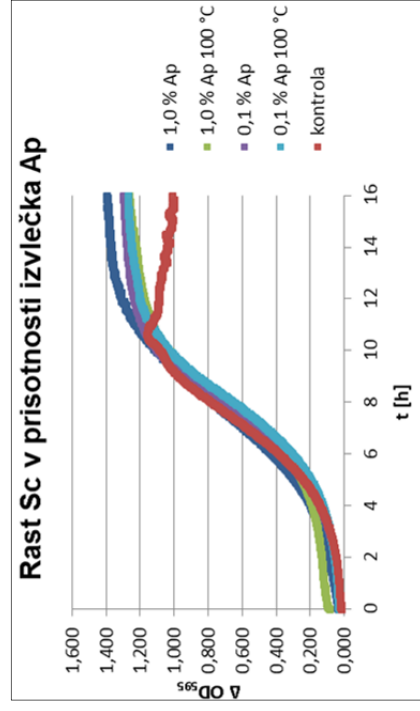
Graf 4 : Rast LI v prisotnosti izvlečka Ln



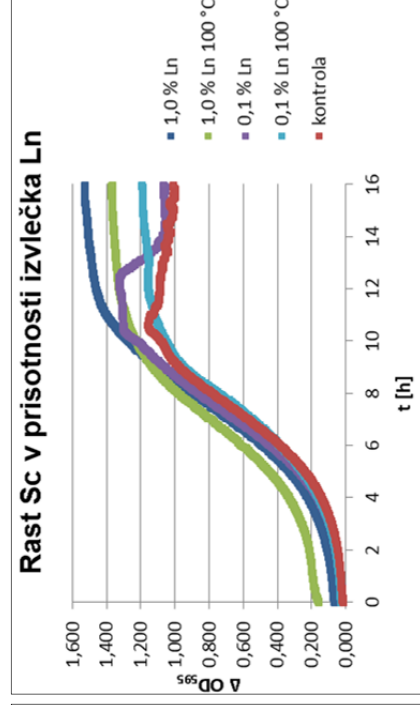
Graf 5 : Rast LI v prisotnosti izvlečka Ln



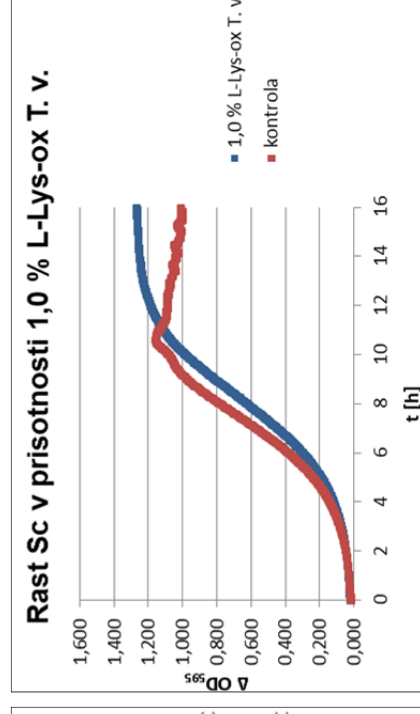
Graf 6 : Rast LI v prisotnosti 1 % L-lizin oksidaze



Graf 7 : Rast Sc v prisotnosti izvlečka Ln



Graf 8 : Rast Sc v prisotnosti izvlečka Ln



Graf 9 : Rast Sc v prisotnosti 1 % L-lizin oksidaze

Opazanja: Gojišča so bila sterilna in se tekom inkubacije niso okužila. Vsi mikroorganizmi so po 16-ih urah že dosegli stacionarno fazo oz. sprememba absorbance ni nakazovala trenda rasti organizma. Rezultati med posameznimi ponovitvami so si zelo podobni, le pri *Saccharomyces cerevisiae* je po daljšem času pri več rezultatih prišlo do strmega padca v absorbanci suspenzije, kar je zelo verjetno posledica napake v meritvah zaradi posedanja kvasovk.

- Rast Ec v prisotnosti izvlečka Ap: 1,0 % Ap sok je popolnoma inhibiral rast Ec, poleg tega pa je 10X redčen Ap sok upočasnil rast Ec, saj je ta 5 ur kasneje dosegla stacionarno fazo v primerjavi s kontrolo z gojiščem brez dodatkov iz gliv. Denaturiran Ap sok obeh koncentracij ne vpliva na rast Ec, saj so organizmi ob prisotnosti kuhanega soka rasli zelo podobno kontroli.
- Rast Ec v prisotnosti izvlečka Ln: Rast Ec je ob prisotnosti kakršnega koli Ln soka, tako naravnega kot denaturiranega obeh koncentracij, podobna kot je rast Ec v kontrolnem gojišču.
- Rast Ec v prisotnosti 1,0 % L-Lys-ox. T. v.: L-lizin oksidaza popolnoma inhibira rast Ec.
- Rast LI v prisotnosti izvlečka Ap: 1,0 % Ap sok je za približno 7 ur zaustavil rast LI v primerjavi s kontrolo, vendar so organizmi po tem času začeli normalno eksponentno rasti. Enako se je zgodilo po dodatku 0,1 % Ap soka, ko je bila rast LI zamaknjena za približno 2 uri, a je LI nato začel normalno rasti. Denaturirani različici Ap soka rasti LI v primerjavi s kontrolo nista inhibirali.
- Rast LI v prisotnosti Ln: Rasti LI v vseh različicah gojišč z dodanim sokom Ln so podobne kot v kontrolnem gojišču.
- Rast LI v prisotnosti 1,0 % L-Lys-ox. T. v.: L-lizin oksidaza je zavrla rast LI za približno 5 ur v primerjavi s kontrolo, a je nato LI v prisotnosti LAKO začel eksponentno rasti.
- Rast Sc v prisotnosti izvlečka Ap: Rast kvasovke v nobenem gojišču z dodanim izvlečkom Ap ni bila inhibirana in so organizmi rasli podobno kot v kontroli, ki pa vrh doseže ob času 10 h, ko je krivulja postala konkavna.
- Rast Sc v prisotnosti izvlečka Ln: Rast kvasovke v nobenem gojišču z dodanim izvlečkom Ln ni bila inhibirana in so organizmi rasli podobno kot v kontroli, ki pa vrh doseže ob času 10 h, ko je krivulja postala konkavna.
- Rast Sc v prisotnosti 1 % L-Lys-ox. T. v.: L-lizin oksidaza ni inhibirala rasti Sc, saj so organizmi v gojišču z LAKO rastli na enak način kot v kontrolnem gojišču.

Sklepi: Vsi organizmi so pri danih pogojih po 16 h dosegli stacionarno fazo, razen v primeru, ko je glivni izvleček popolnoma inhibiral rast.

1,0 % Ap sok popolnoma inhibira rast Ec, tako kot tudi 1,0 % L-lizin oksidaza, ki očitno močno vplivata na rast Ec, 0,1 % Ap sok pa samo nekoliko zaustavi rast mikroorganizmov. Za Ec je tako L-lizin oksidaza enako strupena kot Ap sok. Kuhan denaturiran Ap sok in Ln sok ne vplivata na rast Ec. K povečani občutljivosti Ec na dodane izvlečke morda vpliva tudi temperatura 30 °C, saj je optimalna temperatura za rast Ec 37 °C.

LI je bolj odporen na glivne izvlečke. 1,0 % in 0,1 % Ap sok za določen čas zaustavita rast organizmov in nanje le delno vplivata, saj čez nekaj časa, ko se organizmi adaptirajo na strupene snovi, njihova rast postane eksponentna. Tudi L-lizin oksidaza zaustavi rast za približno enako dolgo kot 1,0 % Ap sok in sta si tako po učinku tudi na LI podobna. Denaturirana Ap sok in Ln sok ne vplivata na rast LI.

Na rast Sc ne vpliva noben izvleček iz gliv, niti naraven niti kuhan niti L-lizin oksidaza. Očitno so evkariontski organizmi bolj odporni na LAKO in ostale toksine, poleg tega pa je bila kvasovka tudi na temperaturi, ki je optimalna za njeno rast. Očitno bi bile za enak učinek, kot ga imajo glivni izvlečki na prokariote, potrebne večje količine teh izvlečkov, da bi bil opazen inhibični učinek na rast Sc.

Kvasovke se posedajo, zato pride do napak pri meritvi absorbance po daljšem času, ko je v suspenziji večja biomasa.

Sklepam, da ima 1,0 % naraven Ap sok na prokariote Ec in LI podoben učinek kot 1,0 % L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride*. L-aminokislinska oksidaza iz Ap po lastnostih glede na moje ugotovitve ni enaka L-lizin oksidazi, torej Ap sok vsebuje druge toksine in LAKO, ki skupaj tvorijo tak zaviralni učinek, kot ga ima L-lizin oksidaza.

LAKO iz Ln soka pri danih pogojih ni bila aktivna, saj je bil pH višji od optimalnega za njeno aktivnost, ali pa samo LAKO aktivnost ni dovolj za protimikrobni učinek, saj Ln ni strupena goba.

Sklepam pa lahko, da imajo LAKO protimikrobni učinek, saj je L-lizin oksidaza uspešno zavirala rast prokariotov. Na LAKO so pri 30 °C najbolj odporne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, zatem Gram-pozitivna bakterija *Lactococcus lactis* in najbolj občutljiva Gram-negativna bakterija *Escherichia coli*. Zaviralni učinek Ap soka je encimskega izvora, saj takega učinka ni bilo opaziti po denaturiranju proteinov s kuhanjem, ko so se encimi, ki drugače na organizme delujejo toksično, inaktivirali.

Ker se LAKO nahajajo tudi v užitnih gobah, ne morem zaključiti, da so prav ti encimi glavni povzročitelji toksičnosti tako gob kot tudi kačjega strupa za ljudi, vsekakor pa prispevajo k temu.

18. Diskusija

18. 1 ANALIZA LAKO AKTIVNOSTI VZORCEV

• Pri analizi vzorcev sem ugotovil:

- Cco: LAKO encimi so šibko aktivni le v kislem pH 5,5 v vseh substratih, medtem ko pri pH 8,0 ni opazne aktivnosti na nobenem izmed testiranih substratov.
- Abi: LAKO encimi so šibko aktivni v vseh substratih pri vseh vrednostih pH, razen v triptonu pri pH 8,0.
- Mp: LAKO močna aktivnost izključno v triptonu pri obeh pH vrednostih.
- La: LAKO encimi so šibko aktivni pri vseh pH vrednostih v vseh substratih, razen v L-Asn.
- Cg: LAKO encimi so močno aktivni pri obeh pH v CSM, triptonu in L-Lys, v L-Asn ni opazne aktivnosti pri pH 5,5, medtem ko je pri pH 8,0 dobro aktiven. V L-Phe in L-Leu pa je večja aktivnost LAKO pri pH 5,5 kot pri pH 8,0.
- Cn: LAKO encimi so močno aktivni pri vseh pH v vseh substratih.
- Ln: LAKO encimi so močno aktivni v vseh substratih pri pH 5,5, medtem ko je pri vseh substratih pri pH 8,0 aktivnost šibka.
- Ts: pri eksperimentalnih pogojih ni bilo opaziti LAKO aktivnosti.
- Hf: šibka LAKO aktivnost je bila opazna le pri CSM in triptonu pri obeh pH vrednostih.
- Vaa: šibka LAKO aktivnost je opazna pri CSM pri obeh pH. Na drugih substratih LAKO aktivnosti Vaa nisem testiral.
- T. v.: močna LAKO aktivnost je opazna predvsem na L-Lys in triptonu, dobra aktivnost je tudi v CSM, v L-Asn, L-Leu in L-Phe je šibka aktivnost le pri pH 8,0, v L-Phe pa je nekoliko močnejša aktivnost tudi pri pH 5,5.
- Am: pri eksperimentalnih pogojih ni bilo opaziti LAKO aktivnosti.
- Ap: močna aktivnost je opazna v triptonu, CSM, L-Leu in L-Phe, pri čemer je v L-Phe in CSM nekoliko slabša aktivnost pri pH 8,0. V L-Lys je šibka aktivnost pri pH 8,0, v L-Asn pa pri pH 5,5.
- Ac: pri eksperimentalnih pogojih ni bilo opaziti LAKO aktivnosti.
- Po: močna LAKO aktivnost je opazna pri vseh substratih pri pH 5,5, pri pH 8,0 pa je šibka aktivnost opazna le v L-Lys, L-Asn in L-Leu.
- Xb: srednje močna aktivnost je opazna le v CSM in triptonu, pri čemer je odziv v triptonu pri pH 8,0 šibek.
- Lt: srednje močna aktivnost LAKO je opazna pri vseh substratih pri pH 5,5, pri pH 8,0 pa je šibka aktivnost le pri CSM.
- Pg: pri eksperimentalnih pogojih ni bilo opaziti LAKO aktivnosti.
- Tm: opazna aktivnost LAKO je pri vseh substratih pri pH 8,0, pri pH 5,5 je opazna aktivnost le v CSM, triptonu, L-Lys in L-Leu.
- P sp.: LAKO encimi so močno aktivni pri vseh pH v vseh substratih.

V primerih vzorcev, kjer ni potekla pozitivna reakcija za dokaz LAKO aktivnosti, je lahko prišlo do denaturacije encimov tekom priprave, ločbe in analize, možno je tudi, da je njihova koncentracija pod mejo detekcije raziskovalne metode. Poleg tega je možno, da v različni dobi rasti vzorci v različnih delih glive vsebujejo različne LAKO različnih koncentracij, in nenazadnje, primerki gob so si med seboj različni, zato je možno, da nabrani primerki (uporabljenih je bilo po več primerkov iste vrste) ne vsebujejo teh encimov oz. je njihova koncentracija zelo nizka.

Zato sklepam, da so najprimernejši pogoji za analizo vzorcev različnih vrst naslednji:

- Cco: v L-Asn pri pH 5,5, odziv je srednje močen
- Abi: vsi substrati pri obeh pH, odziv je šibek
- Mp: v triptonu pri pH 5,5, odziv je zelo močen
- La: vsi substrati pri vseh pH, razen L-Asn, kjer je odziv šibek
- Cg: v CSM, triptonu in L-Lys, kjer je odziv pri obeh pH zelo močen
- Cn: pri vseh substratih pri vseh pH je odziv zelo močen
- Ln: pri vseh substratih pri pH 5,5 je odziv zelo močen
- Hf: v triptonu pri pH 5,5, odziv je srednje močen

- Vaa: v CSM pri obeh pH, odziv je šibek
- T. v.: v triptonu in L-Lys pri obeh pH, odziv je močen
- Ap: v CSM, triptonu, L-Phe in L-Leu pri obeh pH, odziv je močen
- Po: v vseh substratih pri pH 5,5, odziv je močen
- Xb: v CSM in triptonu pri obeh pH, odziv je srednje močen
- Tm: v CSM pri pH 8,0, odziv je srednje močen
- P sp.: v vseh substratih pri vseh pH, odziv je zelo močen

- ◆ Ugotovljene molekulske mase LAKO, ki so na različnih substratih pokazale pozitivno reakcijo:

Preglednica 3: Molekulske mase LAKO iz vzorcev

	Približna molekulska masa L-aminokislinske oksidaze
<i>Coprinus comatus</i>	35 kDa, 60 kDa (močen odziv)
<i>Agaricus bisporus</i>	25 kDa
<i>Macrolepiota procera</i>	45-70 kDa, 250 kDa; višek aktivnosti pri 45 kDa, 55 kDa, 250 kDa
<i>Laccaria amethystina</i>	100 kDa
<i>Clitocybe geotropa</i>	70-90 kDa
<i>Clitocybe nebularis</i>	25-35 kDa
<i>Lepista nuda</i>	60-250 kDa
<i>Hypholoma fasciculare</i>	90 kDa
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	0-250 kDa
L-lizin oksidaza iz <i>Trichoderma viride</i>	55-70 kDa
<i>Amanita phalloides</i>	110-130 kDa
<i>Pleurotus ostreatus</i>	35-55 kDa
<i>Xerocomus badius</i>	25 kDa (močen odziv), 30 kDa
<i>Lactarius torminosus</i>	35 kDa (močen odziv), 100 kDa
<i>Tuber mesentericum</i>	55 kDa
<i>Psilocybe sp.</i>	55-250 kDa; višek aktivnosti pri 55 kDa, 100-130 kDa, 250 kDa

Opomba: 1 Da = 1 u = $1,6605 \times 10^{-27}$ kg

- ◆ Pri tem sem ugotovil značilne vzorce odzivov posameznih vrst LAKO, ki so se razlikovali po obliki, torej po velikosti intervala zajetih molekulskih mas in višine na gelu, torej velikosti molekulskih mas proteinov.
- ◆ LAKO imajo različne lastnosti, saj se med seboj ti encimi iz različnih virov razlikujejo po molekulski masi, po velikosti intervala molekulskih mas oz. LAKO z različnimi masami, kar na gelu vsakokrat predstavlja značilno obliko odziva encima iz določenega vira. Različne LAKO imajo različne pH optimume; nekatere so bolj aktivne v kislem pH 5,5: Cco, Ln, Ap, Po, Lt in so v bazičnem pH slabše aktivne oz. neaktivne: Cco, Po, Lt. Spet LAKO iz drugih virov so bolj aktivne v bazičnem pH 8,0: Tm, druge LAKO pa delujejo enako dobro v območju pH 5,5-8,0. LAKO iz različnih virov se razlikujejo tudi v preferenci do substrata, saj so nekateri encimi dokaj nespecifični do vira aminokislin: Cco, Abi, Cn, Ln, Po, Lt, Tm in P sp., drugi LAKO pa kažejo veliko selektivnost do substrata: Mp (aktiven le v triptonu), La (ni aktiven v L-Asn), Cg (ni aktiven v L-Asn in L-Phe), Hf (aktiven v CSM in triptonu), T. v. (L-lizin oksidaza najbolj aktivna v L-Lys, triptonu in CSM), Ap (ni aktiven v L-Lys in L-Asn) in Xb (aktiven v CSM in triptonu).
- ◆ Glede na primerjavo odzivov med različnimi viri aminokislin pri obeh pH sklepam na naslednje zaporedje pri splošnosti uporabe substratov:

1 % tripton > 0,1 % CSM > 5 mM L-Leu = 5 mM L-Lys > 5 mM L-Phe > 5 mM Asn

- ◆ Največ vzorcev je bilo aktivnih v triptonu, kjer so imeli encimi tudi najmočnejši odziv, medtem ko je bilo v L-Asn aktivnih najmanj vzorcev in odzivi so bili šibki. 1,0 % tripton je le malo boljši substrat od 0,1 % CSM, a se v njem nahajajo poleg aminokislin tudi peptidi, ki jih razgrajujejo peptid-oksidadze [72], ki so morda prisotne v ekstraktu gliv in tudi proizvajajo vodikov peroksid ter z OPD dajejo pozitiven rezultat, poleg tega pa kemijska sestava triptona ni stalna in bi lahko prišlo pri analizah s triptonom različnih proizvajalcev ali pakiranj do odstopanj med rezultati, zato uporaba triptona kot substrata za analizo L-aminokislinskih oksidaz ni najprimernejša; zato je boljši substrat

0,1 % CSM, ki je kemijsko definirana mešanica več L-aminokislin, ki zaradi stalne sestave daje pri analizi ponovljive rezultate. Poleg tega vsebuje le L-aminokislino in so pozitivni rezultati v tem substratu le pri L-aminokislinskih oksidazah. Le L-enantiomeri so proteinogene aminokislino [77].

- Oksidirane L-aminokislino pripadajo različnim skupinam [78]: električno nabita stranska veriga (L-Lys), polarna električno nenabita stranska veriga (L-Asn), hidrofobne stranske verige (L-Leu, L-Phe). LAKO iz različnih vzorcev so si po zgradbi lijaka in aktivnega mesta za oksidacijo substrata očitno zelo različne, saj oksidirajo kemijsko in fizikalno zelo raznolike L-aminokislino.
- Pri vseh substratih kot virih aminokislin se je nekoliko bolj kisel medij s pH 5,5 izkazal za bolj optimalnega kot pH 8,0, saj je bilo pri pH 5,5 več vzorcev gob aktivnih in so imeli močnejši odziv, kar je lahko posledica tako različnega delovanja LAKO kot tudi HRP.
- Zaključujem, da je **najboljši substrat za analizo različnih LAKO 0,1 % CSM v pufru 0,1 M Bis-Tris HCl pH 5,5.**
- Pri vzorcih *Tricholoma saponaceum*, *Amanita muscaria*, *Amanita citrina*, *Amanita rubescens*, *Pseudohydnum gelatinosum*, *Coprinopsis cinerea*, *Hygrophorus erubescens*, *Armillaria borealis*, *Suillus variegatus* in *Russula ochroleuca* ni opazne LAKO aktivnosti. To pomeni, da je morda koncentracija teh encimov pod mejo detekcije te metode, morda so LAKO iz teh vrst občutljive na postopek dela in so denaturirale pri obdelavi ali pa te gobe ne vsebujejo LAKO.
- Vzorec iz gobe *Macrolepota procera* je aktiven le v triptonu, zato je zaznani encim ali LAKO s specifičnostjo do L-aminokislino, ki ni bila prisotna v drugih substratih, ali pa je drugačen encim.
- Ker je aktivnost Vaa zelo šibka, a mnogi viri poročajo o bogati vsebnosti LAKO v kačjih strupih [6, 7, 8, 12], sklepam, da je prišlo do zmanjšanja aktivnosti pri pripravi in obdelavi vzorcev, saj so očitno nekoliko denaturirali in metoda ni najbolj primerna za analizo kačjih strupov. V telesu premikajočih se živali vladajo stabilnejše razmere kot pri statičnih bitjih, zato so verjetno encimi bolj občutljivi na vsakršna fizikalna in kemijska nihanja.
- Ker pa so odzivi (vsaj nekaterih) gliv zelo močni tudi po pripravi in obdelavi vzorcev, sklepam, da LAKO encimi iz gob pri takih pogojih dela verjetno ne denaturirajo – vsaj pri testiranih vrstah.

18. 2 OPTIMALNE KOLIČINE REAGENTOV ZA ANALIZO

- Optimalna raztopina za inkubacijo pri detekciji L-aminokislinsko-oksidadzne aktivnosti je sestavljena iz 0,1 ml 52 U/ml HRP (0,5 U/ml HRP), 0,5 ml 20 mM OPD (1 mM OPD), 1,0 ml 1,0 % CSM (0,1 % CSM) in 8,4 ml pufru 0,1 M Bis-Tris-HCl pH 5,5. Pri tem 20 ml mešanice zadostuje za analizo 1 gela. V primerjavi z metodo [17] za novo razvito metodo za optimalno analizo potrebujemo 6X, v primerjavi z metodo [18] pa 8X manjšo količino drage HRP za analizo, v primerjavi z metodo [22] pa 2X manj strupenega OPD. Kot v metodi [22] se je H₂SO₄ izkazala za najboljšo kislino za zaustavitev reakcije, kot v metodah [11, 16, 18] pa se je kot optimalna koncentracija L-aminokislin za substrat izkazala 5 mM.
- Novo razvita metoda je manj strupena od prejšnje različice, ima dobro občutljivost, je enostavna, cenejša, ponovljiva in primerna za analizo večjega števila vzorcev, pri tem pa lahko analiziramo le specifične snovi (npr. na enem substratu iščemo določeno L-aminokislinsko oksidazo) ali pa splošno aktivnost L-aminokislinskih oksidaz v vzorcih. V gelu lahko določimo tudi molekulske mase analiziranih proteinov.

18. 3 POSKUS S KATALAZO

- Po dodatku katalaze so se intenzitete odzivov zmanjšale, kar kaže na to, da encimi proizvajajo vodikov peroksid, ki ga je katalaza razgradila pred HRP in je tako nastalo manj obarvanega kompleksa z OPD.

18. 4 VPLIV GLIVNIH EKSTRAKTOV NA RAST MIKROORGANIZMOV

- Pri analizi toksičnosti na živa bitja sem ugotovil, da ima izvleček iz Ap v koncentraciji 1,0 % močnejši vpliv na rast bakterije *Escherichia coli*, saj jo popolnoma zaustavi in ima tako enak učinek kot 1,0 % L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride*. 0,1 % Ap sok na rast bakterije delno vpliva, saj le zaustavi njeno rast za nekaj časa, nato pa bakterije začnejo eksponentno rasti.
- 1,0 % Ap sok zavira rast bakterije *Lactococcus lactis*, saj do faze eksponentne rasti pride kasneje kot v kontroli. Poleg tega nekoliko zaustavi rast tudi 0,1 % Ap sok. 1,0 % L-lizin oksidaza ima enak učinek kot 1,0 % Ap sok.
- Na kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* nobeden izmed testiranih izvlečkov nima vpliva. Izvleček iz Ln ni imel vpliva na rast na nobenega izmed testiranih organizmov.
- Skleпам, da so bakterije na toksične izvlečke iz gliv bolj občutljive kot evkariontski organizmi. Pri tem je sok iz gobe *Amanita phalloides* enako toksičen kot L-lizin oksidaza iz plesni *Trichoderma viride*, sok iz gobe *Lepista nuda* pa pri analiziranih pogojih ne kaže toksičnosti.
- Po denaturiranju encimov toksičnega učinka Ap soka ni bilo opaziti, kar kaže na to, da je ta vpliv encimskega izvora. Ker pa sok Ln kljub dokazani vsebnosti LAKO, ki ima optimalen pH 5,5, ni kazal toksičnih učinkov, sklepam, da LAKO niso glavni toksini v glivah, pač pa pri toksičnem vplivu sodelujejo še druge spojine.
- Povezava strupenosti gob za človeka z njihovim protimikrobnim učinkovanjem in LAKO aktivnostjo:

• Cco:	užitna goba,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• Abi:	užitna goba,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• Mp:	užitna goba,	opazna je močna aktivnost encimov, morda niso LAKO
• La:	užitna goba,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• Cg:	užitna goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Cn:	pogojno užitna goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Ln:	užitna goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Ts:	pogojno užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Hf:	neužitna goba,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• Vaa:	zelo strupen kačji strup,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• T. v.:	neužitna plesen,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Am:	strupena goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Ap:	zelo strupena goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Ac:	pogojno užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Po:	užitna goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Xb:	užitna goba,	opazna je srednje močna LAKO aktivnost
• Lt:	strupena goba,	opazna je srednje močna LAKO aktivnost
• Pg:	užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Tm:	užitna goba,	opazna je šibka LAKO aktivnost
• P sp.:	strupena goba,	opazna je močna LAKO aktivnost
• Cci:	neužitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Ar:	pogojno užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• He:	neužitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Abo:	pogojno užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Sv:	užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
• Ro:	pogojno užitna goba,	ni opazne LAKO aktivnosti
- Obstaja šibka povezava med strupenostjo izvlečka in vsebnostjo LAKO, saj so izvlečki iz Ap, Vaa, P sp., T. v. in Lt kazali močno do srednje močno LAKO aktivnost in ti izvlečki so zelo strupeni do strupeni. A Am, ki je strupena goba, ne kaže LAKO aktivnosti. Poleg tega užitne gobe Cco, Abi,

Mp, La, Xb in Tm kažejo šibko LAKO aktivnost, izvlečki iz užitnih gob Cg, Ln in Po kažejo močno LAKO aktivnost. Užitna goba Pg ne kaže LAKO aktivnosti, pogojno užitne Ts, Hf, Ac, Cci in Ar ne kažejo LAKO aktivnosti oz. zelo šibko.

- Zaključujem, da je pri zelo strupenih do strupenih ekstraktih iz organizmov opazna LAKO aktivnost, ki pa očitno ni glavni toksin, saj tudi nekatere užitne gobe vsebujejo LAKO.

18. 5 RAZŠIRJENOST LAKO MED TAKSONOMSKIMI ENOTAMI GLIV

- LAKO so razširjene med obema debloma *Ascomycota* in *Basidiomycota*.
- LAKO so razširjene med primerki iz redov *Pezizales*, *Hypocreales* ter *Agaricales*, *Boletales* in *Russulales*.
- V redu *Pezizales* se LAKO nahaja v družini *Tuberaceae*, v rodu *Tuber* pri vrsti *Tuber mesentiforicum*.
- V redu *Hypocreales* se LAKO nahaja v družini *Hypocreaceae* v rodu *Trichoderma* pri vrsti *Trichoderma viride*.
- V redu *Agaricales* se LAKO nahajajo v družini *Agaricaceae* pri rodovih *Coprinus* pri vrsti *Coprinus comatus*, v rodu *Agaricus* pri vrsti *Agaricus bisporus*, a ne v rodu *Coprinopsis* pri vrsti *Coprinopsis cinerea* ter v rodu *Macrolepiota*, pri vrsti *Macrolepiota procera* (aktivnost le v triptonu).
 - V družini *Amanitaceae* se LAKO nahajajo v rodu *Amanita* pri vrsti *Amanita phalloides*, a ne pri vrstah *Amanita citrina*, *Amanita muscaria* in *Amanita rubescens*.
 - V družini *Hygrophoraceae* v rodu *Hygrophorus* pri vrsti *Hygrophorus erubescens* ni opazne LAKO aktivnosti.
 - V družini *Hymenogastraceae* je močna LAKO aktivnost opazna pri rodu *Psilocybe*.
 - V družini *Physalacriaceae* LAKO aktivnost v rodu *Armillaria* pri vrsti *Armillaria borealis* ni opazna.
 - V družini *Pleurotaceae* v rodu *Pleurotus* pri vrsti *Pleurotus ostreatus* je opazna LAKO aktivnost.
 - V družini *Strophariaceae* je v rodu *Hypholoma* pri vrsti *Hypholoma fasciculare* opazna šibka LAKO aktivnost.
 - V družini *Tricholomataceae* v rodu *Clitocybe* pri vrstah *Clitocybe geotropa* in *Clitocybe nebularis* opazna močna LAKO aktivnost, prav tako je LAKO aktivnost opazna tudi pri rodu *Laccaria* pri vrsti *Laccaria amethystina* in v rodu *Lepista* pri vrsti *Lepista nuda*, pri rodu *Tricholoma* pri vrsti *Tricholoma saponaceum* pa LAKO aktivnost ni opazna.
- V redu *Auriculariales* v družini *Hyaloriaceae* v rodu *Pseudohydnum* pri vrsti *Pseudohydnum gelatinosum* LAKO aktivnost ni opazna.
- V redu *Boletales* je v družini *Boletaceae* v rodu *Xerocomus* pri vrsti *Xerocomus badius* opazna LAKO aktivnost.
 - V družini *Suillaceae* v rodu *Suillus* pri vrsti *Suillus variegatus* LAKO aktivnost ni opazna.
- V redu *Russulales* LAKO aktivnost v družini *Russulaceae* pri rodu *Russula* pri vrsti *Russula ochroleuca* ni opazna, pri rodu *Lactarius* pri vrsti *Lactarius torminosus* pa aktivnost je opazna.
- Sorodnost med organizmi pri vsebnosti LAKO očitno ni pogoj, saj v istem rodu vrsti *Clitocybe geotropa* in *Clitocybe nebularis* vsebujeta LAKO, ki imajo močno aktivnost, a pri rodu *Amanita* ima močno LAKO aktivnost le vrsta *Amanita phalloides*, medtem ko vrste *Amanita citrina*, *Amanita muscaria* in *Amanita rubescens* ne kažejo LAKO aktivnosti. Sklepam, da je vsebnost LAKO encimov že stara pridobitev, saj se nahajajo tako med zelo sorodnimi kot nesorodnimi glivami v obeh debljih; v deblju *Basidiomycota* so široko zastopane, vendar bližja sorodnost med organizmi ne pomeni tudi, da bodo vsi vsebovali LAKO.
- Glede na to, da so LAKO pomembne pri osnovnem metabolizmu aminokislin, je zelo verjetno, da so že stara pridobitev in prisotne v večjem številu različnih organizmov, kjer so v minimalnih količinah potrebne za osnovni metabolizem; v večjih količinah pa so verjetno prisotne pri tistih organizmih, ki so jih tekom evolucije začeli uporabljati v obrambne ali napadalne namene. Ščasoma so encimi v različnih organizmih spremenili svoje lastnosti.

19. Zaključek

V svojem raziskovalnem delu sem uspešno razvil in optimiral novo metodo za analizo aktivnosti L-aminokislinskih oksidaz v gelu ter njeno uporabo preveril na večjem številu vzorcev, ki so LAKO potencialno vsebovali. Poleg tega sem specifičnost analize preveril s katalazo, ki zmanjša intenziteto pozitivnih rezultatov. Toksičnost glivnih vzorcev sem nazadnje preveril še z vplivom ekstraktov na rast mikroorganizmov. Pri tem sem pridobil številne podatke o molekulskih masah LAKO, o njihovi razširjenosti med vrstami, njihovi toksičnosti za mikroorganizme in povezave vsebnosti L-aminokislinskih oksidaz s strupenostjo gob.

Ocenjujem, da so cilji raziskovalne naloge doseženi.

- Ugotavljam, da je 1. hipoteza potrjena, saj sem uspešno razvil in optimiral analizo metodo za LAKO, ki ustreza kriterijem preprostosti, dostopnosti, natančnosti in specifičnosti. Poleg tega ima metoda tudi dobro občutljivost in ponovljivost. Zaključujem, da sta možni tako kvalitativna kot tudi kvantitativna analiza LAKO aktivnosti glivnih vzorcev v gelu z razvito metodo.
- Potrjujem 2. hipotezo, saj sem razvil splošno uporabno metodo za analizo vzorcev, ki vsebujejo LAKO iz različnih vrst in se zato razlikujejo med seboj.
- 3. hipotezo moram ovreči, saj so LAKO bogato zastopane tako med nestrupenimi kot strupenimi organizmi, pri čemer nekateri strupeni organizmi ne kažejo LAKO aktivnosti.
- Tudi 4. hipotezo zavračam, saj sorodnost med organizmi ni pogoj za vsebnost LAKO, saj imajo nekatere vrste znotraj istega rodu prisotne L-aminokislinske oksidaze, medtem ko pri drugih vrstah znotraj rodu le nekatere vrste vsebujejo LAKO, druge pa verjetno ne. Ugotavljam, da so ti encimi že stara pridobitev in so se tekom evolucije spreminjali.
- 5. hipotezo delno potrjujem, saj LAKO s svojim delovanjem uničujejo celice in živi organizmi ob prisotnosti teh encimov slabše rastejo, in nasprotno, pri denaturiranem vzorcu organizmi rastejo podobno kot kontrola. Vendar učinek ni enak za vse organizme, saj so bakterije res slabše rastle, a ko gobji izvlečki na rast kvasovk niso imeli vpliva. Poleg tega so organizmi pri denaturiranem vzorcu povsod rastli podobno kot kontrola. Zaključujem, da LAKO zavirajo rast nekaterih organizmov, drugi pa so zanje bolj odporni. Potrjujem, da je toksični učinek soka zelene mušnice *Amanita phalloides* encimskega izvora, a ne morem potrditi, da gre izključno za LAKO aktivnost.

L-aminokislinske oksidaze iz gob so zelo raznolike, saj imajo zelo različno preferenco do oksidacije substrata in optimalen pH za delovanje. Prednost metode detekcije v gelu pred spektrofotometrično je predvsem v tem, da je moč ugotoviti, da imajo LAKO iz različnih vzorcev med seboj različne molekulske mase, pri čemer nekateri vzorci vsebujejo več različnih LAKO z različnimi molekulskimi masami. Ti encimi so se izkazali kot izredno obstojni, saj za razliko od LAKO iz kačjega strupa tudi po preparaciji vzorcev in separaciji kažejo močno aktivnost, zato bi bili bolj primerni za uporabo v biotehnologiji.

Nadaljnje raziskave bi bile lahko usmerjene v analizo več glivnih vzorcev z novo razvito metodo, poleg tega bi jo bilo dobro tudi optimirati za analizo občutljivejših vzorcev višjih organizmov. Za izboljšanje vrednosti analize bi bilo smiselno razviti tudi postopek kvantifikacije odziva obarvanosti kompleksa z o-fenilendiaminom, HRP in vodikovim peroksidom, kar bi omogočilo natančnejše zaključke in kvantitativno oceno aktivnosti.

Metoda, ki sem jo razvil, je uporabna pri hitri analizi prisotnosti L-aminokislinskih oksidaz v vzorcih, poleg tega pa omogoča tudi analizo večjega števila vzorcev naenkrat. S takim postopkom dela bi lahko pridobili podatke o vsebnosti in lastnostih LAKO iz večjega števila virov, kar bi po nadaljnji analizi encimov omogočalo natančnejši vpogled v njihovo delovanje. Z raziskovanjem novih lastnosti LAKO, katerih vir so novi, še neraziskani vzorci, za katere je nujna analiza z metodo, ki omogoča široko specifičnost, bi morda odkrili vrsto L-aminokislinske oksidaze, katere izražanje v gostiteljskih celicah bi bilo primerno za pridobivanje rekombinantnih proteinov za uporabo v medicini pri terapiji mnogih bolezni. Trenutno raziskovalci na Institutu Jožef Stefan že uporabljajo mojo metodo pri analizi vzorcev, ki bi potencialno lahko vsebovali L-aminokislinske oksidaze.

20. Viri

1. Makarovič, S. Srčevac. 1. izd. Ljubljana: Cankarjeva založba, 1973.
2. *Mušnica*. (online). Moj video. Datum objave: 25. 5. 2010. Datum zadnjega popraviljanja: 25. 5. 2010. (citirano 25. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.mojvideo.com/uporabnik/desa/slika/musnica/216656>.
3. Kreft, S. et. al. *Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. 1. izdaja, 1. natis. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovensko farmacevtsko društvo, 2013. ISBN 978-961-92900-4-0. str. 628-687
4. Erjavec, J. et. al. *Proteins of higher fungi – from forest to application*. Cell press, Trends in Biotechnology, maj 2012, let. 30, št. 5, str. 259-273.
5. *Košara gob*. (online). Bodi eko. Datum objave: 16. 7. 2012. Datum zadnjega popraviljanja: 16. 7. 2012. (citirano 15. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.bodieko.si/nabiranje-gob-gobarjenje>.
6. Pollegioni, L. et. al. *L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far?* Appl Microbiol Biotechnol, 2013, št. 97, str. 9323-9341.
7. Hossain, G. S. et. al. *L-Amino acid oxidases from microbial sources: Types, properties, functions, and applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, št. 98, str. 1507–1515.
8. Tan, N. in Fung, S. *Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications*. Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, let. 16, št. 1, str. 1-10.
9. Wellner, D. in Alton Meister. J. *Studies on the mechanism of action of L-amino acid oxidase*. Biol. Chem, 1961, vol. 236, št. 8, str. 2357-2364.
10. Lukaseva, E. V. et. al. *L-amino acid oxidases: Properties and molecular mechanisms of action*. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2011, let. 5, št. 4, str. 337–345.
11. Yang, C. et. al. *Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from Trichoderma harzianum ETS 323*. The FEBS Journal, 2011, št. 278, str. 3381-3394.
12. Yu, Z. et. al. *In-gel determination of L-amino acid oxidase activity based on the visualization of prussian blue-forming reaction*. PLoS ONE, februar 2013, let. 8, str. 1-8.
13. Chen, W. M. et. al. *Involvement of an L-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium Pseudoalteromonas flavipulchra against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Enzyme and Microbial Technology, 2010, št. 47, str. 52–58.
14. Geueke, B. in Hummel, W. *A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: Purification and characterization*. Enzyme and Microbial Technology, 2002, št. 31, str. 77–87.
15. Chen, W. M. et. al. *Investigating antimicrobial activity in Rheinheimera sp. due to hydrogen peroxide generated by L-lysine oxidase activity*. Enzyme and Microbial Technology, 2010, št. 46, str. 487–493.
16. Sun, M. Z. et. al. *Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom L-amino acid oxidase from Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. Biochimie, 2010, št. 92, str. 343-349.
17. Nuutinen, J. T. in Timonen, S. *Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-amino acid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi Hebeloma spp. And Laccaria bicolor*. Mycological research, 2008, št. 112, str. 1453–1464.
18. Rau, J. E. in Fischer, U. *In-gel detection of L-amino acid oxidases based on the visualisation of hydrogen peroxide production*. Journal of Microbiological Methods, 2011, št. 85, str. 228–229.
19. Nuutinen, J. T. et. al. *L-Amino acid oxidase of the fungus Hebeloma cylindrosporum displays substrate preference towards glutamate*. Microbiology, 2012, št. 158, str. 272-283.

20. Kusakabe, H. et. al. *A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from Trichoderma viride: Purification and enzymological properties.* *The Journal of Biological Chemistry*, februar 1980, vol. 255, št. 3, str. 976-981.
21. Lukashova, E. V. in Berezov, T. T. *L-lysine α -oxidase: Physicochemical and biological properties.* *Biochemistry (Moscow)*, 2002, vol. 67, št. 10, str. 1152-1158.
22. Kishimoto, M. in Takahashi, T. *A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase.* *Analytical Biochemistry*, 2001, št. 298, str. 136-139.
23. Tong, H. et. al. *SO-LAAO, a novel L-amino acid oxidase that enables Streptococcus oligofermentans to outcompete Streptococcus mutans by generating H₂O₂ from peptone.* *Journal of Bacteriology*, julij 2008, vol. 190, št. 1, str. 4716-4721.
24. Georgieva, D. et. al. *The structure of a native L-amino acid oxidase, the major component of the Vipera ammodytes ammodytes venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions.* *Mol. Biosyst.*, 2011, let. 7, str. 379-384.
25. Kusakabe, H. et. al. *Antibacterial activity of L-lysine α -oxidase against rec⁺ and rec⁻ strains of Bacillus subtilis.* *Agric. Biol. Chem.*, 1979, let. 6, št. 43, str. 1371-1373.
26. Stasyk, T. et. al. *A new highly toxic protein isolated from the death cap Amanita phalloides is an L-amino acid oxidase.* *FEBS Journal*, 2010, št. 277, str. 1260-1269.
27. *SDS-PAGE.* (online). Davidson, Department of Biology, Davidson College. Datum zadnjega popraviljanja: 2001. (citirano 25. 2. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>.
28. Schägger, H. *Tricine-SDS-PAGE.* *Nature Publishing Group*, 2006, vol. 1, št. 1, str. 16-22.
29. *Polyacrylamide gel electrophoresis.* (online). Datum zadnjega popraviljanja: 4. 3. 2014. (citirano: 5. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis.
30. Kang, D. et. al. *Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* *Korean Chem. Soc.*, 2002, vol. 23, št. 11, str. 1511-1512.
31. *SDS page gel electrophoresis.* (online). Georgia, School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology. Datum zadnjega popraviljanja: 1. 5. 2001. (citirano 25. 2. 2014). Dostopno na naslovu: https://www2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html.
32. *Protein standards: Amersham LMW marker.* (online). (citirano: 18. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.uni-leipzig.de/~strotm/molbio/amersham_lmw.html.
33. *Page ruler prestained protein ladder.* (online). Thermo scientific, Pierce protein biology products. (citirano: 18. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.uni-leipzig.de/~strotm/molbio/amersham_lmw.html.
34. Danevčič, T., Mandić-Mulec, I. *Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije.* Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2007.
35. *Growth curve.* (online). Tutorvista. (citirano 1. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/plant-growth-movements/growth-curve.php>.
36. *Tartuf.* (online). Fogy Tartufi. (citirano 6. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.tartuf.com/pages/si/o-tartufih/crni-tartufi.php>.
37. *Trichoderma viride.* (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 7. 5. 2013. (citirano 4. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_viride.
38. *Trichoderma viride.* (online). (citirano 3. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://mycoweb.narod.ru/fungi/Trichoderma_viride.html.
39. Stropnik, Z. et. al. *Naše gobe bogastvo.* 1. izd. Ljubljana: Mladinska knjiga, 1988.

40. *Agaricus bisporus*. (online). With Friendship. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://withfriendship.com/user/sathvi/agaricus-bisporus.php>.
41. Serod, Š. in Serod, M. *Coprinopsis cinerea*. (online). Gobarsko društvo Lisička Maribor. Datum zadnjega popraviljanja: 10. 2. 2014. (citirano: 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.gobe.si/Gobe/CoprinusCinereus>.
42. *Coprinopsis cinerea*. (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 8. 3. 2014. (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Coprinopsis_cinerea.
43. Lindsey, J. K. *Coprinopsis cinerea*. (online). The Ecology of Commanster. Datum zadnjega popraviljanja: 2007. (citirano 4. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.commanster.eu/commanster/Mushrooms/Agaric/SpAgaric/Coprinopsis.cinerea.html>.
44. *Coprinus comatus*. (online). California Native Plants Garden. (citirano 7. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://californianativeplantgarden.wordpress.com/category/mushrooms/>.
45. *Macrolepiota procera*. (online). Setas y hongos. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://setas-hongos.blogspot.com/2012/10/parasol-macrolepiota-procera.html>.
46. *Amanita citrina*. (online). (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.natur-um-triberg.de/InhaltPilzeLatein.html>.
47. *Amanita muscaria*. (online). (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://mushroomhobby.com/Gallery/Amanita/Amanita%20muscaria%20subsp.%20flavivolvata/>.
48. *Amanita phalloides*. (online). Mykonet. Datum zadnjega popraviljanja: 17. 9. 2008. (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.mykonet.ch/images/Amanita.htm>.
49. *Amanita rubescens*. (online). English Country Garden. (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.english-country-garden.com/fungus/the-blusher.htm>.
50. *Hygrophorus erubescens*. (online). Datum objave: 10. 10. 2008. Datum zadnjega popraviljanja: 25. 5. 2013. (citirano 9. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.pilzfotopage.de/Agaricales/slides/Hygrophorus_erubescens.html.
51. *Psilocybe*. (online). Gobarsko društvo Lisička Maribor. Datum zadnjega popraviljanja: 29. 4. 2012. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.gobe.si/Mikologija/Psilocybe>.
52. *Psilocybe*. (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 28. 1. 2014. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Psilocybe>.
53. *Psilocybe cubensis*. (online). Datum objave: 2006. Datum zadnjega popraviljanja: 2006. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.erowid.org/plants/show_image.php?i=mushrooms/psilocybe_cubensis__i2006e0293_disp.jpg.
54. Poler, A. in Mali, S. *Armillaria borealis*. (online). Gobarsko društvo Lisička Maribor. Datum zadnjega popraviljanja: 3. 8. 2012. Dostopno na naslovu: <http://www.gobe.si/Gobe/ArmillariaBorealis>.
55. Andersson, S. *Armillaria borealis*. (online). iGoTerra. Datum objave: 23. 9. 2012. Datum zadnjega popraviljanja: 23. 9. 2012. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.igoterra.com/photo_info.asp?photoid=41471.
56. Higginson-Tranter, D. in Swift, S. *Ex-situ degradation of pentachlorophenol by the white rot fungus Pleurotus ostreatus*. (online). Kula. Hawaii. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://pandora.simons-rock.edu/~wburelbach09/theses/seanswift.html>.
57. Salichs, A. *Hypholoma fasciculare*. (online). Asociacion Micologica El Ryo. (citirano 11. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.amanitacesarea.com/hypholoma-fasciculare.html>.
58. Goodwin, L. *Clitocybe geotropa*. (online). Datum objave: 16. 10. 2008. Datum zadnjega popraviljanja: 16. 10. 2008. (citirano 10. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.leifgoodwin.co.uk/Fungi/Clitocybe%20geotropa.html>.
59. Calleda, F. *Clitocybe nebularis*. (online). Datum objave: 26. 1. 2006. Datum zadnjega popraviljanja: 26. 1. 2006. (citirano 11. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.funghiitaliani.it/?showtopic=15281>.

60. Schou, J. C. *Laccaria amethystina*. (online). Biopix. Datum objave: avgust 2003. (citirano 11. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.biopix.com/amethyst-deceiver-laccaria-amethystina_photo-16392.aspx.
61. Maly, J. *Lepista nuda*. (online). Naturephoto.cz. (citirano 11. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.naturephoto-cz.com/vijolicasta-kolesnica-picture_sl-12798.html.
62. Wood, M. *Tricholoma saponaceum*. (online). The Fungi of California. (citirano 12. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.mykoweb.com/CAF/species/Tricholoma_saponaceum.html.
63. Wood, M. *Pseudohydnum gelatinosum*. (online). The Fungi of California. (citirano 12. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pseudohydnum_gelatinosum.html.
64. *Xerocomus badius*. (online). Fichas Micologicas. (citirano: 12. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.fichasmicologicas.com/?micos=1&alf=X&art=68>.
65. *Suillus variegatus*. (online). Datum objave: 26. 9. 2012. Datum zadnjega popraviljanja: 26. 9. 2012. (citirano 12. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://vezi.eu/Arten/Suillus_variegatus.html.
66. *Lactarius torminosus*. (online). Tu Salud y Bienstar. (citirano 12. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://www.tusaludybienstar.es/consejos-de-salud/setas-y-hongos-beneficios-propiedades-y-especies-venenosas/>.
67. Valentine, M. *Russula ochroleuca*. (online). Wild About Britain. Datum objave: 2009. Datum zadnjega popraviljanja: 2009. (citirano 12. 3. 2014.). Dostopno na naslovu: <http://www.wildaboutbritain.co.uk/pictures/showphoto.php/photo/85885>.
68. *Modras*. (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 22. 10. 2013. (citirano 13. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Modras>.
69. *Vipera ammodytes*. (online) Wikipedia. Datum objave: 4. 1. 2011. Datum zadnjega popraviljanja: 4. 1. 2011. (citirano 13. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benny_Trapp_Vipera_ammodytes.jpg.
70. Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970, vol. 227, št. 5259, str. 680-685.
71. *Product information: Peroxidase from horsheradish, Sigma Type I*. (online). (citirano 25. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/1/p8125dat.pdf>.
72. *Tryptone*. (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 14. 3. 2013. (citirano 13. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tryptone>.
73. *Casamino acid*. (online). Wikipedia. Datum zadnjega popraviljanja: 15. 1. 2014. (citirano 14. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Casamino_acid.
74. *Acetone precipitation of proteins*. ZDA. Thermo Fisher scientific Inc., Pierce biotechnology. Datum izdaje: 2009. Tech tip št. 49.
75. Boenisch, T. *Immunohistochemical staining methods*. 5. izd. North America: Dako, 2009. Chapter 3: Basic Enzymology, str. 15-19.
76. *How does catalase break down hydrogen peroxide?* (online). UCSB Science Line, MRL, NSF, University of California. (citirano 25. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://scienceline.ucsb.edu/getkey.php?key=166>.
77. *Aminokislina, peptidi, delo s proteini*. (online). Ljubljana. Biotehniška fakulteta. (citirano 20. 3. 2014). Dostopno na naslovu: <http://web.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/Biotehn/Proteini.pdf>.
78. Cojocari, D. *Twenty-one amino acids*. (online). Wikipedia, Department of Medical Biophysics, University of Toronto. Datum objave: 2011. Datum zadnjega popraviljanja: 22. 3. 2014. (citirano 25. 3. 2014). Dostopno na naslovu: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Amino_Acids.svg.