

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

[zapisz się](#)



[Strona główna](#) > [Start](#)

Proteoglikany - metody otrzymywania i badania właściwości

W skład proteoglikanów wchodzi białka i węglowodany, które to występują w przeważającej większości (80 - 90%). Ponadto, proteoglikany (PG) zawierają dużo estrowych grup siarczanowych [7].

Proteoglikany (PG) zaliczane są do glikoprotein. Ich główną cechą jest to, że zawierają duże ilości komponentu cukrowego (aż do 90%) , a także uczestniczą w uorganizowaniu międzykomórkowej substancji podstawowej tkanki łącznej. Biorą też udział w tworzeniu specyficznych receptorów powierzchniowych, które „wmontowane„ są w błony plazmatyczne. Fizjologiczne właściwości proteoglikanów wynikają z ich zdolności do wiązania kationów, łatwego tworzenia kompleksów z niektórymi białkami (np. lizozymem bądź kolagenem), a także z ich wielkiej hydrodynamicznej objętości molekularnej [1].

Ponadto, wykazano , że natywne proteoglikany występują w tkankach w postaci suprakompleksów tj. agregatów proteoglikanowych (PGA), które to powstają w wyniku niekowalencyjnej agregacji dużej liczby podjednostek proteoglikanowych (PGS) z wysokopolimerową nicią kwasu hialuronowego. Tak więc, elementarną jednostką strukturalną jest PGS o charakterystycznym składzie chemicznym

i strukturze przestrzennej [1].

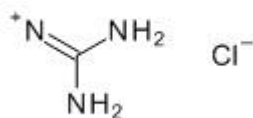
Metoda izolacji kompleksów proteoglikanowych z chrząstki za pomocą chlorku guanidyny [2], [1].

Za pomocą 4M chlorku guanidyny (GdnCl) możliwe jest całkowite wyekstrahowanie agregatów proteoglikanowych (PGA), które są dość silnie związane z włóknami łącznotkankowymi. Ekstrakcja jest najefektywniejsza przy pH= 5,8. Jednocześnie, w środowisku 4 M roztworu GdnCl dochodzi do odwracalnej dysocjacji agregatu PGA na elementy składowe tj.:

- PGS
- kwas hialuronowy oraz
- białka wiążące.

W celu zachowania integralności natywnej struktury PGA, do roztworu ekstrakcyjnego wprowadza się inhibitory grupowe proteaz, zaś oczyszczone cząsteczki PGA uzyskuje się ostatecznie na drodze ultrawierowania [2], [1].

Jako materiał wyjściowy stosuje się chrząstkę przegrody nosowej (lub tchawicy) bydłowej (wołu), które pobiera się natychmiast po uboju i zamraża w termosie z lodem. Następnie, chrząstki oczyszcza się ze śluzówki oraz z ochrząstnej, rozdrabnia się ją na małe kawałki oraz mieli w elektrycznej maszynce do mięsa. Wszystkie te zabiegi należy przeprowadzać w chłodni. Rozdrobnioną chrząstkę mrozi się w -20 - -40°C [2], [1].



Zdjęcie: chlorek guanidyny, https://pl.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=A4014.1000

Wykonanie:

Rozdrobnioną wcześniej chrząstkę należy rozmrozić, po czym 5g chrząstki należy zalać 100 ml 4 M roztworu GdnCl (tj. 4 M roztwór GdnCl w 50 mM buforze octanowym o pH=5,8, zawierającym inhibitory proteaz: 1 ml benzamidyny, 10 mM wersenianu sodowego i 100 mM kwasu e-aminokapronowego (EAK). Całość wymieszać dokładnie używając mieszadła szklanego (mieszać w chłodni przy małych obrotach przez 20 godzin [2], [1].

Po tym czasie opalizujący ekstrakt należy przesączyć na lejku z watą szklaną. Otrzymany w ten sposób klarowny roztwór należy rozdzielić na kilka woreczków dializacyjnych, po czym dializować go wobec 9 objętości 50 mM buforu octanowego z inhibitorami w chłodni. Otrzymany roztwór zawiera zasocjowane agregaty proteoglikanowe oraz część białek nieproteoglikanowych (w tym fragmenty kolagenu) [2].

Następnie, do połączonych dializatów należy dodać równą objętość etanolu zawierającego 1% CH₃COOK, po czym należy odstawić w 4°C na kilka godzin. Utworzony po odstaniu osad odwirować przy 10 000xg przez 10 minut. W tym czasie do odmierzonych objętości buforu octanowego (pH=5,8) dodać stałego CsCl do końcowego stężenia równego 1,69g/ml [2].

Osad PGA rozpuścić w 20 ml tego roztworu, po czym próbkę przenieść do cienkościennej plastikowej probówki wirówkowej i po dokładnym zrównoważeniu przenieść do głowicy kątownej 50 Ti (bądź podobnej ultrawirówki) i odwirować w temperaturze 20°C przez 20h, przy prędkości 105 000 x g [2]. Po upływie czasu wirowania, dochodzi do grawitacyjnego rozwarstwienia mieszaniny białek próbki, a następnie do oddzielenia frakcji PGA. Agregaty proteoglikanowe z racji tego, że mają największą masę cząsteczkową, gromadzą się w dolnej (1/3) słupa roztworu, z kolei kolagen mieści się

w szczytowej warstwie. Frakcje dolne (zawierające PGA) można w najprostszy sposób uzyskać odcinając za pomocą pipety 2/3 górnego słupa roztworu [2].

Frakcje zawierające PGA należy połączyć, po czym dializować wobec 50 mM buforu octanowego o pH=5.8 w chłodni przez kolejne 12 godzin. Na tym etapie należy oznaczyć zawartość kwasu uronowego i białka w 1 ml roztworu, z kolei pozostałość roztworu zadać 2 objętościami 98% roztworu etanolu zawierającego 1% CH₃COOK i odstawić w chłodni na kilka godzin. Utworzony osad odwirować przy 10 000xg, następnie przemyć etanolem, po czym wysuszyć w eksykatorze próżniowym. Wysuszony osad rozpuścić w 10 ml buforu octanowego (pH=5.8), po czym zamrozić w temperaturze -30°C. Osad ten stanowi materiał wyjściowy do preparatyki podjednostek proteoglikanowych PGS [2].

Izolowanie podjednostek proteoglikanowych w gradiencie chlorku cezu [3], [1].

Oczyszczone agregaty proteoglikanowe (PGA) uzyskane na drodze wirowania w warunkach, które sprzyjają asocjacji, można zdysocjować w warunkach sprzyjających dysocjacji na podjednostki proteoglikanowe PGS, które to następnie oddziela się od pozostałych składników przez ultrawirowanie w gradiencie chlorku cezu [3].

Wykonanie:

Roztwór PGA w 50 mM buforze octanowym o pH=5.8, należy rozcieńczyć za pomocą równej objętości 8 M roztworu chlorku guanidyny. Końcowe stężenie 4M roztworu GdnCl powoduje całkowitą dysocjację agregatów PGA. Następnie, roztwór doprowadzić za pomocą stałego chlorku cezu do wyjściowego stężenia 1,50 g/ml. Następnie, cały roztwór rozlać do przezroczystych probówek plastikowych, po czym zwirować przez 20 godzin w temperaturze 20°C, przy 105 000xg [3].

W czasie tego długotrwałego wirowania wytwarza się gradient chlorku cezu, elementy składowe zdysocjowanego agregatu ulegają rozdzielaniu w polu grawitacyjnym oraz gradiencie (zgodnie z ich masą cząsteczkową). Białka wiążące tworzą najwyższą warstwę gradientu, dzięki czemu łatwo jest je odciągnąć. Hialuronian zajmuje warstwę środkową, zaś w dolnej 1/3 słupa płynu gromadzą się wszystkie niejednorodne cząsteczki PGS [3].

Za pomocą pipety automatycznej odciągnąć 2/3 słupa płynu, pozostawiając PGS w dolnej reszcie. Wszystkie frakcje, które zawierają PGS połączyć i dializować wobec wody destylowanej w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Następnie, oznaczyć stężenie kwasu uronowego, heksamin i białka w 1 ml roztworu. Pozostały roztwór zadać 2 objętościami etanolu, po czym próbkę odstawić do chłodni na 12 godzin. Na koniec osad odwirować, przemyć etanolem i wysuszyć w eksykatorze próżniowym [3].

Degradacja proteoglikanów przez proteazy [4], [1].

Proteazy, są enzymami, które odgrywają bardzo ważną rolę w każdej żywej komórce. U człowieka występuje ok. 500 różnych proteaz, które to kodowane są przez 2% wszystkich ludzkich genów. Proteazy odgrywają bardzo ważną rolę w wielu procesach, m.in. w trakcie zapłodnienia, trawienia, wzrostu, dojrzewania, a także starzenia się i śmierci organizmu [6].

Ponadto, regulują liczne procesy fizjologiczne przez kontrolę aktywacji, syntezy i degradacji białek. Proteazy pełnią także istotną funkcję w procesie replikacji i rozprzestrzenianiu się wirusów, bakterii oraz pasożytów. Dodatkowo, enzymy te odpowiedzialne są za efektywną transmisję choroby wywołanej przez wymienione patogeny. I to właśnie z tego powodu peptydazy stanowią istotny cel w przypadku leczenia wielu chorób. Nieprawidłowy poziom proteaz prowadzi do wielu nieprawidłowości fizjologicznych, czego konsekwencją jest choroba [6].

Podjednostka proteoglikanowa PGS składa się z nitkowatego rdzenia polipeptydowego oraz z przyłączonych do niego łańcuchów siarczanów chondroityny i siarczanu keratanu.

Proteazy mają zdolność rozrywania łańcuchów peptydowych w różnych miejscach, dzięki czemu powstają fragmenty o różnej masie cząsteczkowej. Dodanie do mieszaniny poreakcyjnej chlorku cetylopirydynowego (CPC) powoduje wypadanie z roztworu nierozpuszczalnych kompleksów nie rozłożonego PGS oraz powstałych peptydoglikanów. Z kolei, wprowadzenie kwasu trichlorooctowego powoduje rozpuszczenie peptydoglikanów (produktów enzymatycznego rozkładu) [4].

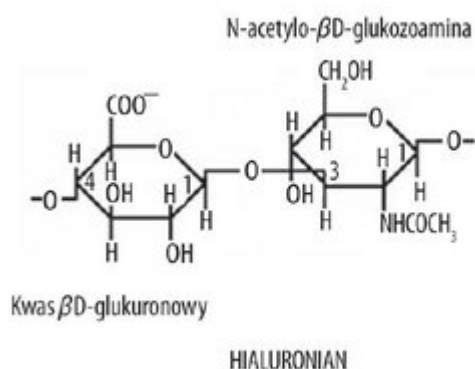
Wykonanie:

Przed przystąpieniem do przeprowadzenia doświadczenia, należy przygotować odpowiedni roztwór substratu tj. każdorazowo sporządzić świeży roztwór substratu o stężeniu 5 mg PGS w 1 ml odpowiedniego buforu:

- dla trypsyny: 50 mM bufor fosforanowy o pH= 7.8
- dla pepsyny: 50 mM bufor cytrynianowy o pH=3,6
- dla lizosomowej katepsyny D: 50 mM bufor octanowy pH= 5.0 [4], [1].

Roztwory proteaz w 1 ml odpowiedniego buforu:

- 1) 20 µg krystalicznej trypsyny
- 2) 50 µg krystalicznej pepsyny
- 3) 5 mg lizosomowej katepsyny D



Zdjęcie: <http://www.phmd.pl/images/ryciny/20081223114758.jpg> [5].

Do próbki wirówkowej typu Eppendorf wprowadzić 100 µl roztworu substratu PGS, próbkę preinkubować w temp. 37°C przez 5 min. Następnie, do próbki dodać 50 µl próby enzymatycznej, dobrze wymieszać (próba B). Równoległe, nastawić próbę kontrolną (K) dodając w tym celu do substratu 50 µl wody. Próbkę inkubować w 37°C przez 30 minut. Po upływie czasu inkubacji, działanie enzymatyczne należy przerwać dodając 50 µl roztworu CPC (tj. 2,5% roztwór CPC), po czym próbkę odstawić w temperaturze pokojowej na 5 minut, zaś po upływie tego czasu dodać 100 µl 9% CCl₃COOH i całość dobrze wymieszać [4], [1].

Pozostawić w temperaturze pokojowej na kolejne 5 minut, Po tym czasie próbki przenieść do łaźni lodowej (temp. 4-5°C) na 30 minut. Po upływie tego czasu odwirować przy 10 000xg, w temperaturze 4°C przez 10 minut [4].

Po wirowaniu, w klarownym supernatancie oznaczyć kwas uronowy metodą boranową stosując mikromodyfikację, tj. do próbek szklanych o poj. 5 ml oznaczonych: B (próba badana), K(kontrola), Wku(wzorzec kwasu uronowego: 250 µg kwasu glukuronowego w 1 ml H₂O) i Wcs(wzorzec siarczanu chondroityny: 1000µg siarczanu chondroityny w 1ml H₂O) wprowadzić 0,2 ml wody i 1,5 ml roztworu : stężony H₂SO₄- 0,025 M czteroboran sodu. Probówki wstawić do łaźni lodowej i ochłodzić, następnie na powierzchnię odczytnika boranowego nawarstwić po 50µl odpowiedniej próbki i trzymając nadal w łaźni wodnej zawartość próbek bardzo dokładnie

wymieszać [4], [1].

Wszystkie próbki należy wstawić jednocześnie do wrzącej łaźni wodnej na 15 minut, po inkubacji próbki ochłodzić i dodać do nich po 50µl 0,125% roztworu karbazolu w etanolu bezwodnymi dobrze wymieszać, ponownie wstawić do łaźni wodnej na 6 minut. W tym czasie rozwija się zabarwienie prób. Po inkubacji próbki wyjąć z łaźni i odstawić do wystygnięcia. Na koniec dokonać odczytu absorbancji (dopiero po upływie 30 minut) wobec kontroli przy $\lambda = 530$ nm. W podobny sposób należy odczytać absorbancję wzorców. Powstała w próbkach barwa jest trwała przez 48h. Aktywność enzymu wyrazić liczbą µg kwasu uronowego oraz siarczanu chondroityny powstałych z rozkładu PGS w ciągu 1 minuty [4], [1].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 295-304.
- [2]. Heinegard D., Hascall V.C, 1974. Agregation of cartilage proteoglycans, III. Characteristics of proteins isolated from trypsin digests of aggregates. J. Biol. Chem., 249: 4250-4256
- [3]. Hascall V.C., Sajdera S.W, 1970. Physical properties and polydispersity of proteoglycans from bovine nasal cartilage. J. Biol. Chem., 245: 4920-4926
- [4]. Sapolsky A.J., Woessner J.F.jr., Howell D.S, 1975. A photometric assay for protease digestion of the N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem., 217: 959-962.
- [5]. <http://www.phmd.pl/images/ryciny/20081223114758.jpg>
- [6]. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Proteazy/>
- [7]. <http://nedo.gumed.edu.pl/wszpziu/skrypty/My%9Cliwski%20skrypt/tkanka%20%B3%B9czna.pdf>

<https://laboratoria.net/home/13985.html>

Informacje dnia: [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#)
[Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)
[Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#)
[Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)
[Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#)
[Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)

Partnerzy