

[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



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

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 zorganizowaniu 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].

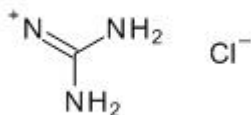
Metoda izolacji kompleksów proteoglikanowych z chrząstki za pomocą chlorku guanidyny [2], [1].

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 dusocjacji 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 ultrawirowania [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 ochrzęstnej, 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 kątowej 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 odciągając 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 ultrawierowanie 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 przeźroczystych 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, heksazamin 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 porynkcyjnej 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].

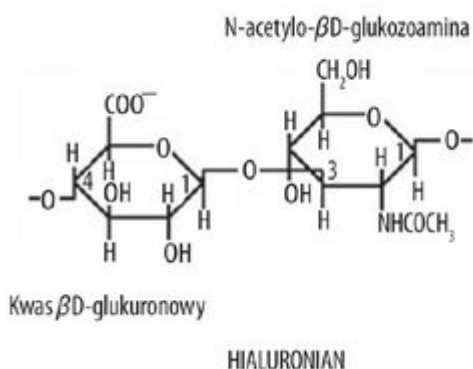
Wykonanie:

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). Równolegle, 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 probówek 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 odczynnika boranowego nawarstwić po 50µl odpowiedniej próbki i trzymając nadal w łaźni wodnej zawartość probówek 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>

<http://laboratoria.net/artukul/13986.html>

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy