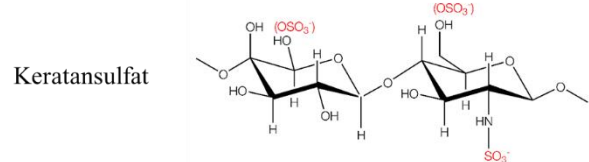
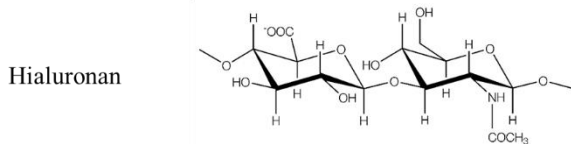
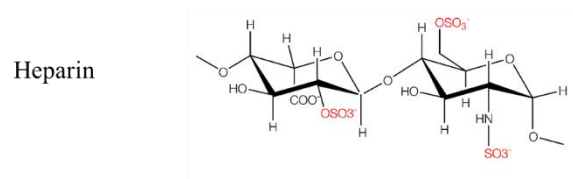
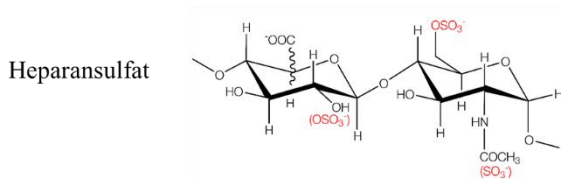
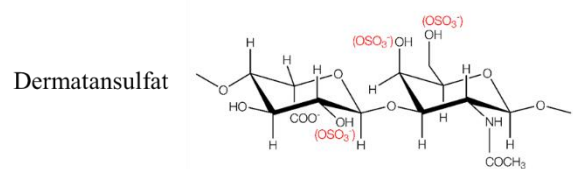
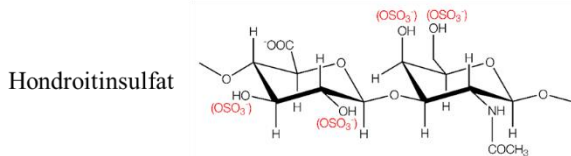


LASTNOSTI VITRONEKTINA

UVOD

Hidratacija zunajceličnega matriksa in njegova mehanska odpornost je zagotovljena s prisotnostjo proteoglikanov. Proteoglikani so proteini, ki imajo na svoji površini kovalentno vezano eno ali več glikozaminoglikanskih (GAG) verig, ki se na osnovni protein pripenjajo preko tetramerne povezovalne regije, ki jo sestavljajo molekula ksiloze, dve molekuli galaktoze in galaktozamin. GAG-i so linearne, polisaharidne verige, sestavljene iz izmenjujočih se disaharidnih enot različnih kombinacij galaktoze (Gal), *N*-acetilglukozamina (GlcNAc), glukuronske kisline (GlcA), iduronske kisline (IdoA) ali *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc). GAG-e lahko razdelimo v dve skupini: sulfatirane GAG-e med katere uvrščamo heparin (HP), heparansulfat (HS), dermatansulfat (DS), keratansulfat (KS) in hondroitinsulfat (CS) ter nesulfatirane GAG-e, kot je na primer hialuronska kislina (HA). Zaradi prisotnosti sulfatnih ali karboksilnih skupin so GAG makromolekule z visokim deležem negativnega naboja, zaradi katerega privlačijo tako katione kot tudi vodo, kar rezultira v nastanku želatinozne strukture, ki zagotavlja ustrezno hidracijo zunajceličnega matriksa.



Slika prikazuje najbolj pogosto zastopane disaharidne enote posameznega glikozaminoglikana z označenimi mesti sulfatacije. Sama narava glikozaminoglikana je tako odvisna ne samo od sestave osnovne disaharidne enote temveč tudi vezi med njimi (1- β 4 ali 1- α 4) in vzorca sulfatacije.

DS je, kot že ime samo pove, najbolj pogosto zastopan GAG v koži, medtem ko CS v obliki proteoglikanov agrekana, nevrokana, verzikana in brevikana v velikih količinah nahaja v centralnem živčnem sistemu. V primerjavi z ostalimi GAG-i lahko za heparin trdimo, da je najbolj sulfatiran glikozaminoglikan s kar 2,2 sulfatirane enote/disaharidno enoto. Zaradi tega so lastnosti le-tega precej drugačne od vezave ostalih GAG-ov.

NAMEN DELA

Z NaDS-PAGE ugotoviti čistost izoliranega proteina. Opazovati vezavo različnih glikozaminoglikanov na vitronektin z gelsko filtracijo, kjer pričakujemo, da bodo kompleksi proteina in glikozaminoglikana zaradi večje mase zapustili kolono prej kot sam protein.

POSTOPEK DELA- GELSKA KROMATOGRAFIJA

1. Priprava kolone

Za ločevanje proteinov pod nativnimi pogoji bomo uporabili kolono Sephacryl S-300, ki uspešno ločuje molekule med 1×10^4 in 1.5×10^6 Da. Kolone za dolgo shranjevanje shranjujemo v 20% etanolu. Zaradi tega je potrebno le-te pred uporabo dobro sprati, nato pa ekvilibrirati v pufru za gelsko filtracijo. Uporabili bomo 20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl.

2. Priprava vzorca

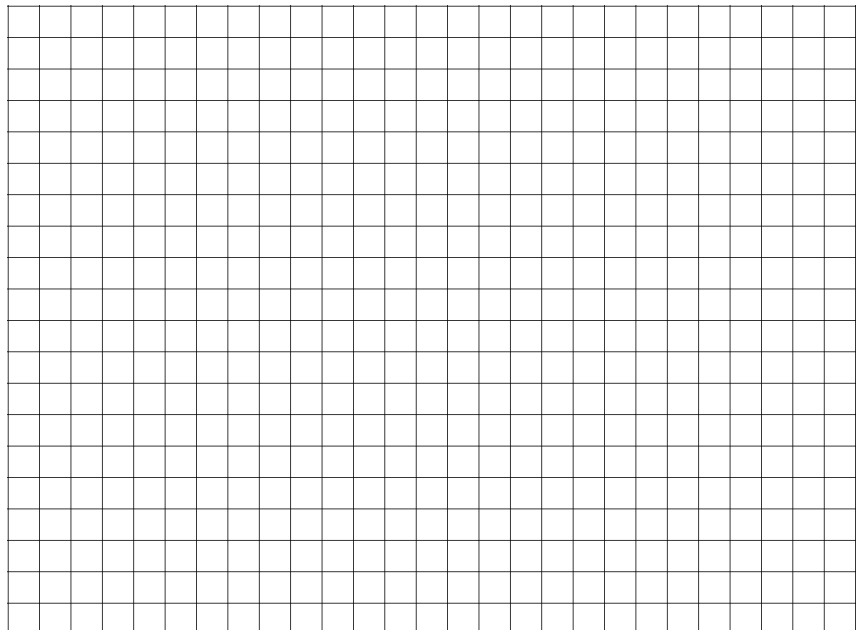
Volumen vzorca, ki ga nanašamo na kolono, naj zaradi ločljivosti ne bi presegel 5% volumna celotne kolone. Zaradi tega bomo nanesti na kolono 50 μ l vzorca vitronektina s koncentracijo 1 mg/ml, ki mu boste dodali glikozaminoglikan (CS, DS, KS ali HP) do končne koncentracije 2 mg/ml.

3. Potek kromatografije

Vzorec nanosite na kolono in takoj začnite z lovljenjem frakcij v epruvete. Zbirajte frakcije volumna 2 ml in sproti merite absorbanco pri 280 nm na spektrofotometru. V spodaj priloženo tabelo vpisujte rezultate in narišite elucijski diagram.

Uporabljen glikozaminoglikan: _____

Frakcija	A_{280}
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Iz rezultatov sklepajte, kakšna je dejanska masa vitronektina, iz koliko polipeptidnih verig je sestavljen in ali je vezal določen glikozaminoglikan.

POSTOPEK DELA- NaDS-PAGE

1. Za NaDS-PAGE potrebujemo plošči, razmaknjeni za 0.75 mm, med kateri boste vlili raztopino za gel.
2. V steklenički zmešajte komponente za 12,5 % ločevalni gel:

3.13 ml 40% raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid : bisakrilamid v razmerju 37.5:1),
2.5 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.8,
4.27 ml dH₂O,
100 µl 10 % NaDS,
30 µl 10 % amonijevega persulfata (APS) in
15 µl reagenta TEMED

in previdno vlije med v naprej pripravljeni ploščici. Na površino nanese približno 2 mm visoko plast izopropanola, da se površina gela izravna.

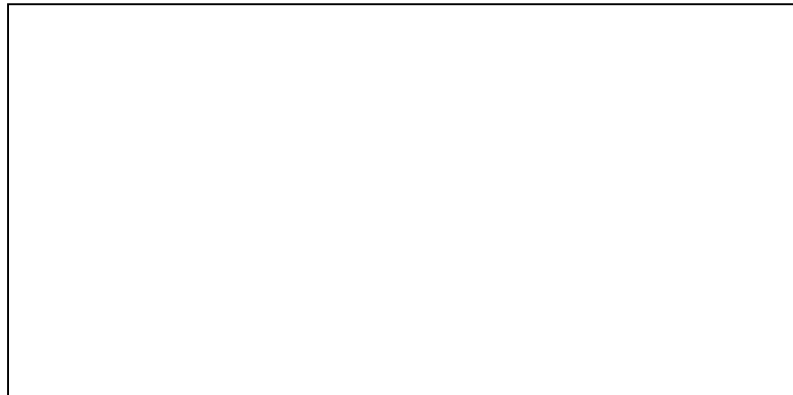
3. Po 30 min, ko gel v celoti spolimerizira, odstranite izopropanol in zmešajte reagente za 5 % koncentracijski gel:

625 µl 40 % raztopine akrilamida ,
1,25 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8,
3,08 ml dH₂O,
50 µl % NaDS,
7,5 µl 10 % amonijevega persulfata (APS) in
15 µl reagenta TEMED

ter previdno vlije na ločevalni gel ter vstavi glavniček, tako da je spodnji rob žepkov okoli 0.5 cm nad zgornjim robom ločevalnega gela. V 30 min gel v celoti spolimerizira. Vpnite pripravljen gel v aparaturo za elektroforezo in dodajte elektroforezni puffer (vsebuje 0.1 % NaDS, 0.4 M Tris/HCl in 0.2 M glicin).

4. V 2 mikrocentrifugirki odpipetirajte po 10 µl izoliranega vitronektina. V prvo mikrocentrifugirko, 5 µl nanašalnega pufra brez reducenta (vsebuje 0.2 % barvila bromfenolmodro, 20 % glicerol, 0.4 % NaDS) in v drugo mikrocentrifugirko 5 µl nanašalnega pufra z reducentom (vsebuje še 3.1 % DTT). Vzorce inkubirajte 5 min pri 100 °C in nanesite na gel po navodilih asistenta..
5. Aparaturo priključite na napetost in pustite, da elektroforeza poteka pri 35 mA/gel dokler barvilo bromfenolmodro ne pride do spodnjega roba.
6. Po končani elektroforezi asistent odstrani gel za koncentriranje ter ločevalni gel 15 min stresa v raztopini barvila Coomassie Brilliant Blue (vsebuje 0.025 % Coomassie Brilliant Blue, 30 % EtOH in 7 % AcOH). Gel nato razbarva v raztopini, ki vsebuje 30 % EtOH in 7% AcOH.

7. V spodnji pravokotnik narišite, kako je zgedal NaDS-PAGE gel po barvanju s CBB. Ugotovite, ali je bil izoliran protein čist. Iz primerjave potovanja proteinov brez in v prisotnosti reducenta sklepajte, ali so bile kakšne polipeptidne verige povezane z disulfidnimi mostički.



Iz primerjave rezultatov nativnega ločevanja makromolekul z gelsko filtracijo in potovanja delcev v denaturirajočih pogojih v in brez prisotnosti reducenta, sklepajte in razložite naravo vitronektina, izoliranega iz govejega seruma.