

ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII DLA STUDENTÓW II ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ I st.

Ćwiczenie 1. METABOLIZM GLIKOGENU W WĄTROBIE. METODY ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA GLUKOZY

Zagadnienia do przygotowania:

1. Znaczenie metaboliczne glikogenu wątrobowego i mięśniowego.
2. Glikogenogeneza – lokalizacja narządowa i wewnątrzkomórkowa, przebieg procesu, enzymy uczestniczące, enzym kluczowy, regulacja allosteryczna i hormonalna.
3. Glikogenoliza – lokalizacja narządowa i wewnątrzkomórkowa, przebieg procesu, enzymy uczestniczące, enzym kluczowy, regulacja allosteryczna i hormonalna.
4. Zasada metody oznaczania fosforanu metodą Fiske-Subbarowa
5. Zasada metody oznaczania glukozy metodą o-toluidynową.
6. Metody ilościowego oznaczania glukozy.

Glikogen jest zapasowym materiałem energetycznym magazynowanym w wątrobie i w mięśniach. Jest to rozgałęziony homoglikan składający się z reszt α -D-glukozy, połączonych wiązaniami α -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi oraz α -(1 \rightarrow 6)-glikozydowymi. Gdy stężenie glukozy we krwi jest wysokie indukowany jest proces glikogenogenezy, podczas którego cząsteczki glukozy są wbudowywane do już istniejącej cząsteczki glikogenu. Natomiast obniżenie stężenia glukozy we krwi indukuje rozpad glikogenu, a proces ten nazywany jest glikogenolizą. Celem ćwiczenia jest ocena metabolizmu glikogenu w homogenacie z wątroby oraz określenie wpływu stężenia substratu i efektorów allosterycznych na syntezę i degradację glikogenu.

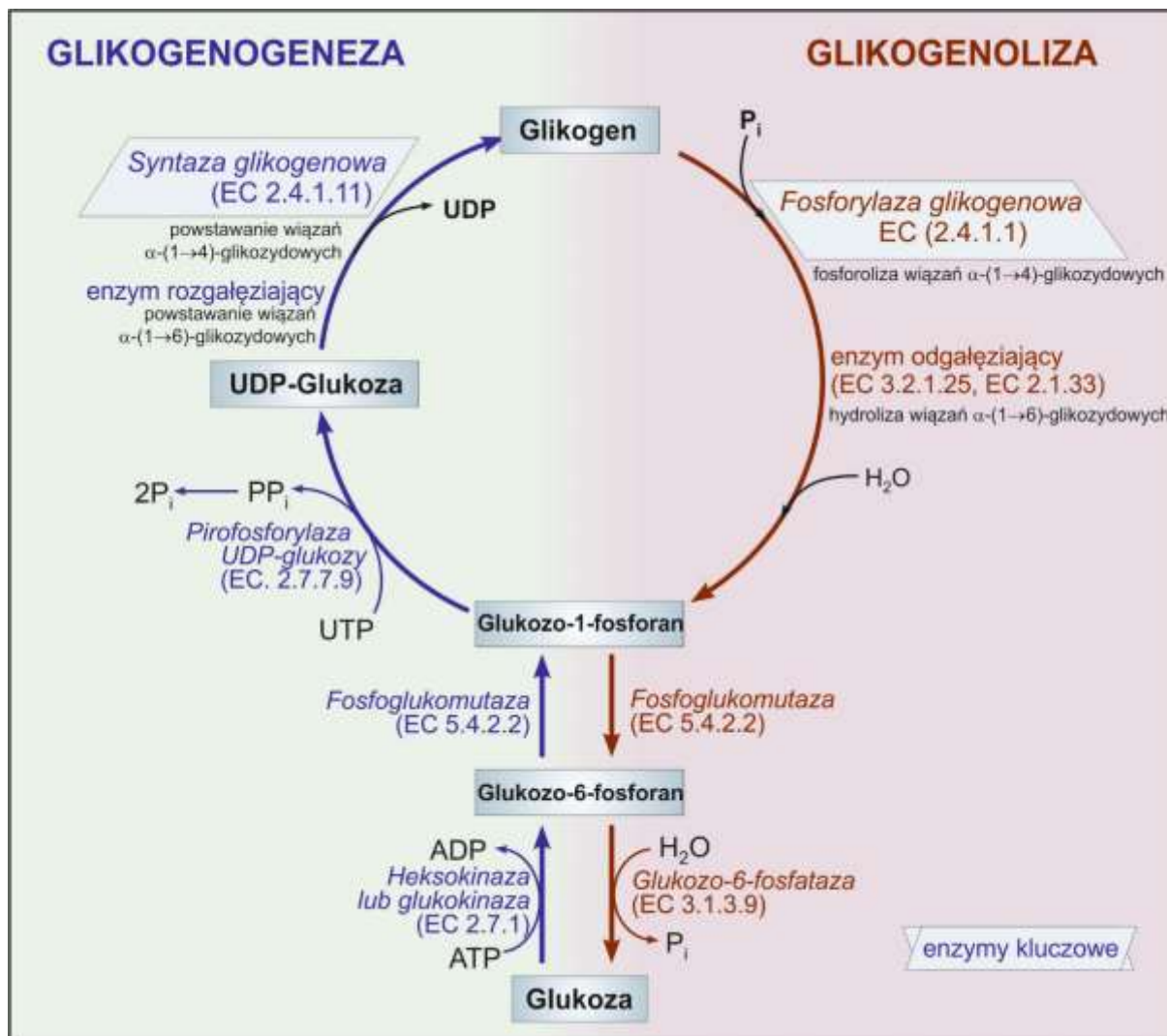
Synteza glikogenu (glikogenogeneza) (Ryc. 1) to wieloetapowy proces do którego zainicjowania niezbędna jest już istniejąca cząsteczka glikogenu. W przypadku jej braku glikogen musi być syntetyzowany *de novo*, z wykorzystaniem glikogeniny - specyficznego białka służącego jako akceptor reszt glukozy. Bezpośrednim substratem do syntezy glikogenu jest UDP-glukoza, powstająca z glukozo-1-fosforanu w reakcji katalizowanej przez pirofosforylaze-UDP-glukozy. Kluczowym enzymem glikogenogenezy jest syntaza glikogenowa katalizująca wydłużanie łańcucha glikogenu, poprzez przyłączenie reszt glukozy z UDP-glukozy do nieredukującego końca łańcucha glikogenu. Produktem elongacji jest liniowy, nierozgałęziony łańcuch złożony z reszt glukozy połączonych wiązaniami α -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi. Rozgałęzienia łańcucha glikogenowego powstają pod działaniem amylo- α -(1,4 \rightarrow 1,6)transglukozydazy (enzym rozgałęziający), którego aktywność prowadzi do powstania wiązań α -(1 \rightarrow 6)-glikozydowych.

Szybkość biosyntezy glikogenu jest wprost proporcjonalna do ilości uwolnionych podczas reakcji katalizowanej przez pirofosforylaze UDP-glukozy reszt fosforanowych, których stężenie można oznaczyć metodą Friske-Subbarowa.

Rozkład glikogenu (glikogenoliza) (Ryc. 1) przebiega na drodze fosforolitycznej degradacji wiązań α (1-4)glikozydowych przy udziale enzymu kluczowego jakim jest fosforylaza glikogenowa. Produktem tej reakcji jest glukozo-1-fosforan, który następnie ulega izomeryzacji do glukozo-6-fosforanu. Wiązania α -(1 \rightarrow 6)-glikozydowe obecne w glikogenie są natomiast hydrolizowane przez enzym odgałęziający. W komórkach

mięśniowych glukozy-6-fosforan jest włączany do szlaku glikolizy. Natomiast komórki wątroby posiadają enzym glukozy-6-fosfatazę, który katalizuje reakcję hydrolitycznego odłączenia grupy fosforanowej z glukozy-6-fosforanu. Powstała w tej reakcji wolna glukoza przenika przez błonę komórkową do krwi i może być dostarczana do innych narządów.

Szybkość glikogenolizy jest wprost proporcjonalna do stężenia powstającej w tym procesie glukozy, której stężenie można oznaczyć metodą o-toluidynową.



Ryc. 1 Schematyczne przedstawienie metabolizmu glikogenu w hepatocytach.

Wykonanie ćwiczenia

Przebieg procesu glikogenogenezy i glikogenolizy będzie oceniany w przygotowanym podczas ćwiczenia homogenacie wątroby (część 1). Procedury oznaczenia syntezy i degradacji glikogenu przedstawiono odpowiednio w części 2 i 3. Etapy ćwiczenia zaprezentowano na schemacie.

1. Przygotowanie homogenatu wątroby

Porcję 1,5 g świeżej, wychłodzonej wątroby rozdrobnić skalpelem na szalce i przenieść do probówki o objętości 15 ml. Następnie dodać 7 ml oziębionego 0,9% roztworu NaCl i homogenizować przez 2 min przy niskich obrotach. Homogenat wykorzystać do oceny metabolizmu glikogenu.

2. Ocena syntezy glikogenu

Zasada metody

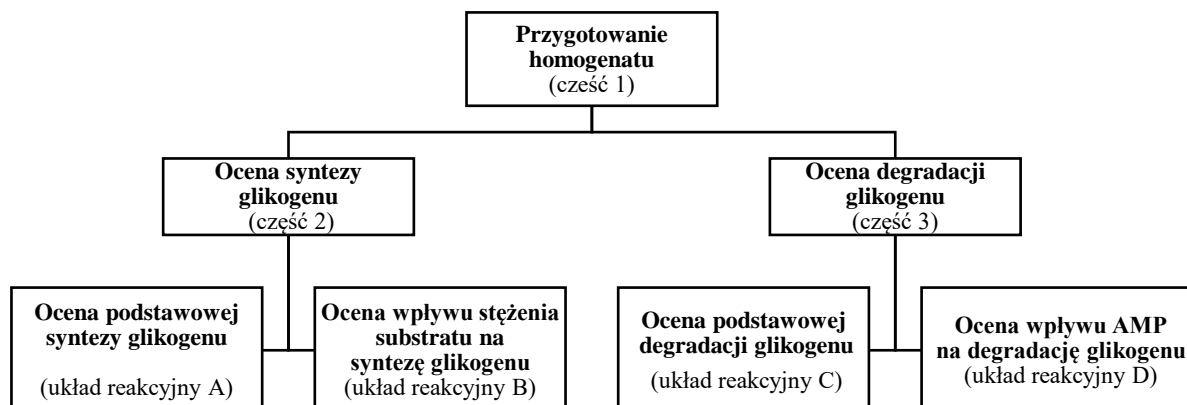
Celem ćwiczenia jest oznaczenie podstawowej syntezy glikogenu (układ reakcyjny A) oraz wpływu stężenia substratu na ten proces (układ reakcyjny B). Podczas glikogenogenezy uwalniane są reszty fosforanowe, a ich stężenie jest wprost proporcjonalne do szybkości biosyntezy glikogenu. Stężenie fosforanów oznacza się metodą Friske-Subbarowa. Zasada metody jest oparta na reakcji jonów ortofosforanowych z molibdenianem amonu (VI) w środowisku kwaśnym. W wyniku reakcji powstaje sól amonowa o żółtym zabarwieniu, która następnie reaguje z odczynnikiem redukującym (eikonogen). W wyniku tej reakcji związany w soli kompleksowej molibden ulega redukcji do mieszaniny tlenków molibdenu na niższym stopniu utlenienia (tzw. "błękit molibdenowy"), którego natężenie barwy mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 690 nm.

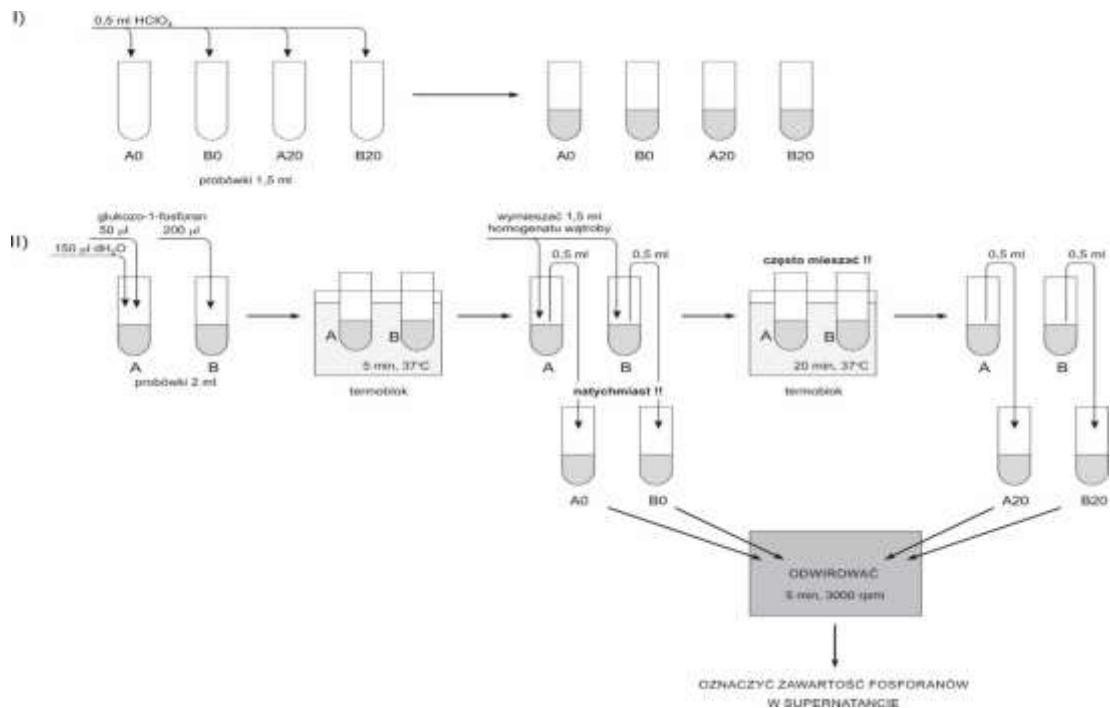
Wykonanie

Oznaczenie obejmuje następujące etapy:

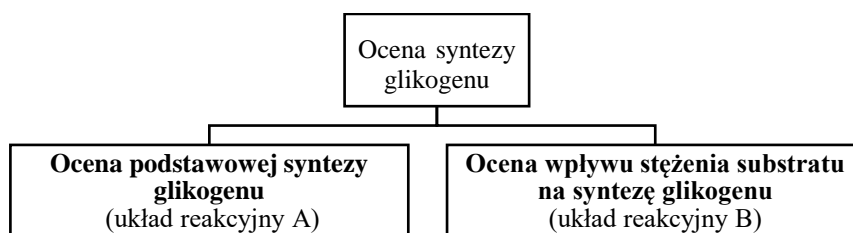
- 2.1 Przygotowanie układów reakcyjnych A i B o różnym stężeniu substratu.
- 2.2 Reakcja enzymatyczna (20 minut).
- 2.3 Oznaczenie stężenia fosforanów metodą Fiske-Subbarowa w momencie rozpoczęcia reakcji (t_0) i po 20 minutach (t_{20}).
- 2.4 Analiza wyników i wyciągnięcie wniosków.

Przed rozpoczęciem praktycznego wykonania ćwiczenia należy zapoznać się z przedstawionym poniżej schematem oznaczenia syntezy glikogenu





2.1. Przygotowanie układów reakcyjnych



1. Przygotować 4 probówki o pojemności 1,5 ml i oznaczyć je jako A0, A20, B0, B20 (Litery oznaczają układy reakcyjne A i B, a cyfry czas inkubacji w minutach).
2. Do wszystkich probówek dodać po 0,5 ml roztworu hamującego reakcję enzymatyczną czyli 7% roztworu kwasu chlorowego (VII).

2.2 Reakcja enzymatyczna

1. Przygotować 2 probówki o objętości 2 ml, oznaczyć je jako A i B, a następnie dodać odczynniki według tabeli:

| Odczynniki | Układ reakcyjny A | Układ reakcyjny B |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
| 0,3 M glukoza-1-fosforan | 50 µl | 200 µl |
| dH ₂ O | 150 µl | - |

2. Roztwory wymieszać i preinkubować w termobloku (37°C, 5 min.).
3. Po 5 min do probówek A i B dodać po 1,3 ml homogenatu, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml roztworu i przenieść do probówek odpowiednio A0 i B0 w których znajduje się 0,5 ml 7% HClO₄ w celu zahamowania reakcji enzymatycznej. Zawartość probówek dokładnie wymieszać.

- Następnie próby zawierające układ reakcyjny A i B (próbówki o objętości 2 ml) inkubować w termobloku (37°C, 20 min) często mieszając.
- Po upływie tego czasu pobrać po 0,5 ml roztworu homogenatu z próbek A i B i przenieść do próbek A20 i B20 zawierających 0,5 ml 7% HClO₄ i dokładnie wymieszać.
- Próbki A0, B0, A20, B20 odwirować (5 min, 6000 obr./min).
- Otrzymany supernatant wykorzystać do oznaczenia stężenia fosforanów.

2.3. Oznaczenie stężenia fosforanów metodą Fiske-Subbarowa

- Przygotować i opisać 9 próbek plastikowych objętości 10 ml:
 - Roztwory wzorcowe (W1-W4)
 - Roztwory badane (A0, A20, B0, B20)
 - Próba ślepa (W0)
- Przygotować roztwory wzorcowe (W1-W4) oraz próbę ślepą:

| Nr próby wzorcowej | Stężenie fosforanu w roztworach wzorcowych [mM] | Roztwór fosforanu o stęż. 0,65 mM [ml] | Woda destylowana [ml] |
|--------------------|---|--|-----------------------|
| Wzorzec W1 | 0,05 | 0,10 | 1,15 |
| Wzorzec W2 | 0,1 | 0,19 | 1,06 |
| Wzorzec W3 | 0,2 | 0,38 | 0,87 |
| Wzorzec W4 | 0,3 | 0,57 | 0,68 |
| Próba ślepa (W0) | 0 | 0 | 1,25 |

- Przygotować próby badane:

| Odczynnik | Próby badane | | | |
|-------------------|--------------|-------|-------|-------|
| | A0 | A20 | B0 | B20 |
| Próba badana | 40 µl | 40 µl | 40 µl | 40 µl |
| dH ₂ O | 1,21 ml | | | |

- Do próbek z roztworami badanymi, wzorcowymi i próby ślepej odmierzyć odczynniki według poniższej tabeli

| Odczynnik | Próby badane | | | | Próby wzorcowe | | | |
|-------------------------------------|--------------|-----|----|-----|----------------|----|----|----|
| | A0 | A20 | B0 | B20 | W1 | W2 | W3 | W4 |
| 10% kwas trichlorooctowy (TCA) [ml] | 0,75 | | | | | | | |
| Molibdenian amonu [ml] | 0,25 | | | | | | | |
| Eikogen [ml] | 0,1 | | | | | | | |

- Zawartość próbek wymieszać i inkubować 40 min w temp. pok.
- Zmierzyć absorbancję wszystkich roztworów względem próby ślepej przy $\lambda = 690$ nm.
- Stężenie fosforanów w próbach badanych odczytać z krzywej wzorcowej $A = f(c)$.

3. Ocena degradacji glikogenu

Zasada metody

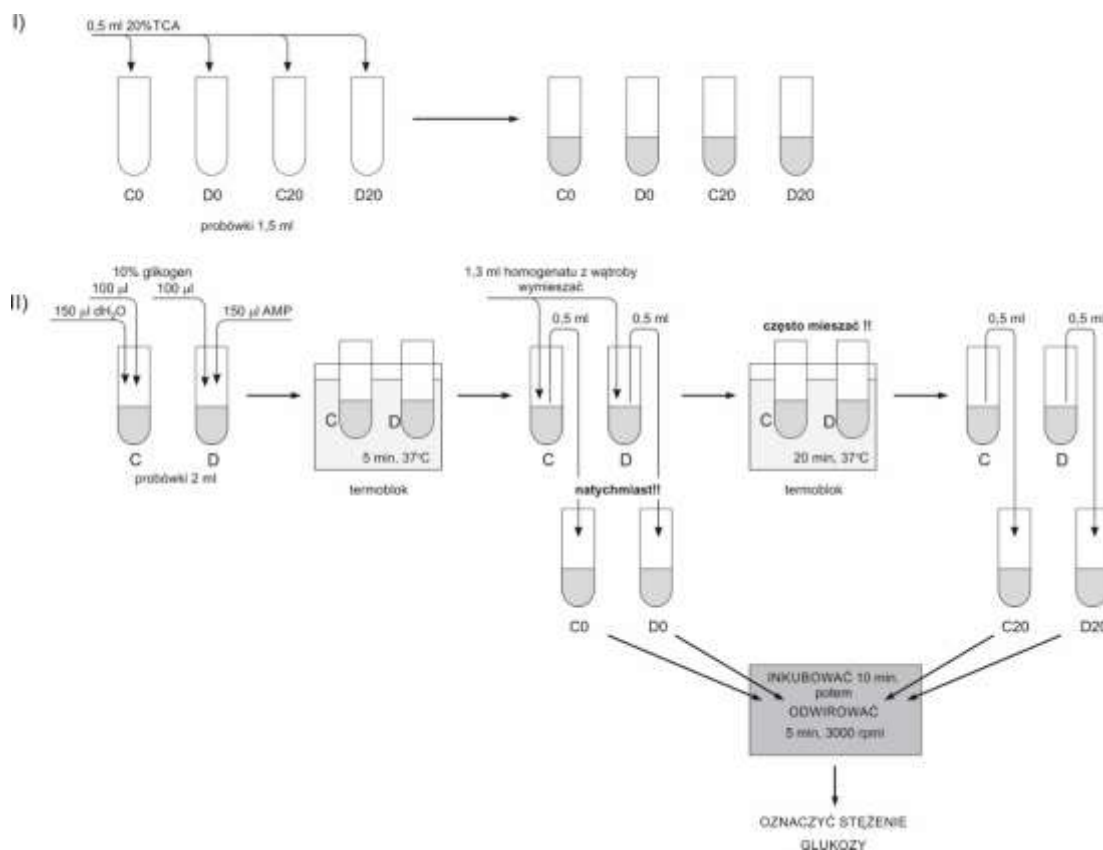
Celem ćwiczenia jest oznaczenie degradacji glikogenu (układ reakcyjny C) oraz wpływu stężenia cAMP na ten proces w komórkach wątroby (układ reakcyjny D). Podczas glikogenolizy uwalniana jest glukoza, a jej stężenie jest wprost proporcjonalne do szybkości degradacji glikogenu. Stężenie glukozy oznacza się metodą o-toluidynową. W środowisku bezwodnym w temp. 100°C o-toluidyna (o-metyloanilina) reaguje z aldozą. W tych warunkach powstaje produkt o barwie niebieskiej, której intensywność mierzona spektrofotometrycznie jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy.

Wykonanie

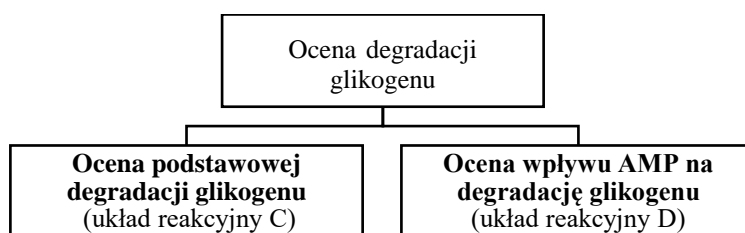
Oznaczenie obejmuje następujące etapy:

- 3.1 Przygotowanie układów reakcyjnych C i D.
- 3.2 Reakcja enzymatyczna (20 minut).
- 3.3 Oznaczenie stężenia glukozy metodą o-toluidynową w momencie rozpoczęcia reakcji (t₀) i po 20 minutach (t₂₀).
- 3.4 Analiza wyników i wyciągnięcie wniosków.

Przed rozpoczęciem praktycznego wykonania ćwiczenia należy zapoznać się z przedstawionym poniżej schematem oznaczenia syntezy glikogenu.



2.1. Przygotowanie układów reakcyjnych



1. Przygotować 4 probówki o pojemności 1,5 ml i oznaczyć je jako C0, C20, D0, D20 (Uwaga Litery oznaczają układy reakcyjne C i D, a cyfry czas inkubacji w minutach).
2. Do wszystkich probówek dodać po 0,5 ml 20% TCA.

II.2 Reakcja enzymatyczna

1. Przygotować 2 probówki o objętości 2 ml, oznaczyć je jako C i D, a następnie dodać odczynniki według tabeli:

| Odczynniki | Układ reakcyjny C | Układ reakcyjny D |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| 10% r-r glikogenu | 100 µl | 100 µl |
| 40 mM AMP | - | 150 µl |
| dH ₂ O | 150 µl | - |

2. Zawartość probówek wymieszać i inkubować (37°C, 5 min).
3. Do probówek C i D dodać po 1,5 ml homogenatu, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml roztworów i przenieść odpowiednia do probówek C0 i D0 zawierających 0,5 ml 20% TCA (w celu zahamowania reakcji enzymatycznej). Zawartość probówek dokładnie wymieszać i inkubować 10 min w temp. pokojowej.
4. Następnie próbki oznaczone jako C i D inkubować w termobloku (37°C, 20 min) często mieszając.
5. Po upływie tego czasu pobrać po 0,5 ml roztworów z probówek C i D i przenieść odpowiednio do probówek C20 i D20 zawierających 0,5 ml 20% TCA. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i inkubować 10 min w temp. pokojowej.
6. Probówki C0, D0, C20, D20 odwirować (5 min, 6000 obr./min).
7. Oznaczyć stężenie glukozy w supernatantach.

II.3. Oznaczenie stężenia glukozy metodą o-toluidynową

1. Przygotować roztwory glukozy o znanych stężeniach oraz próbę ślepą. W tym celu do **5 plastikowych probówek** o objętości 10 ml odmierzyć 10 mM roztwór glukozy, 20% TCA i wodę destylowaną według tabeli:

| Nr próby wzorcowej | Stężenie glukozy w roztworach wzorcowych [mM] | 20% TCA [ml] | 10 mM r-r glukozy [ml] | Woda destylowana [ml] |
|--------------------|---|--------------|------------------------|-----------------------|
| Próba ślepa W0 | 0 | 0,5 | - | 0,5 |
| Wzorzec W1 | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,4 |
| Wzorzec W2 | 2 | 0,5 | 0,2 | 0,3 |
| Wzorzec W3 | 4 | 0,5 | 0,4 | 0,1 |
| Wzorzec W4 | 5 | 0,5 | 0,5 | - |

2. Przygotować i opisać **9 probówek szklanych**:
 - Roztwory wzorcowe (W1-W4)
 - Roztwory badane (C0, C20, D0, D20)
 - Próba ślepa (W0)
3. Próby badane, wzorcowe i ślepą przygotować według poniższej tabeli:

| Odczynnik | Próby badane [ml] | Próby wzorcowe [ml] | Próba ślepa [ml] |
|------------|-------------------|---------------------|------------------|
| C0 | 0,1 | - | - |
| C20 | 0,1 | | |
| D0 | 0,1 | | |
| D20 | 0,1 | | |
| W0 | - | - | 0,1 |
| Wzorzec W1 | - | 0,1 | - |
| Wzorzec W2 | | 0,1 | |
| Wzorzec W3 | | 0,1 | |
| Wzorzec W4 | | 0,1 | |

4. Do **wszystkich probówek** dodać po 1,65 ml odczynnika o-toluidynowego.
5. Zawartość probówek wymieszać, przykryć folią aluminiową i wstawić na 8 min do wrzącej łaźni wodnej.
6. Po wyjęciu probówek z łaźni poczekać aż się ochłodzą.
7. Zaobserwować zmianę zabarwienia roztworów i zróżnicowanie natężenia barwy w zależności od składu mieszaniny reakcyjnej.
8. Zmierzyć absorbancję poszczególnych prób przy długości fali 630 nm, wobec próby ślepej.
9. Stężenie glukozy w próbach badanych odczytać z krzywej wzorcowej $A = f(c)$.