



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto
„Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų
plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

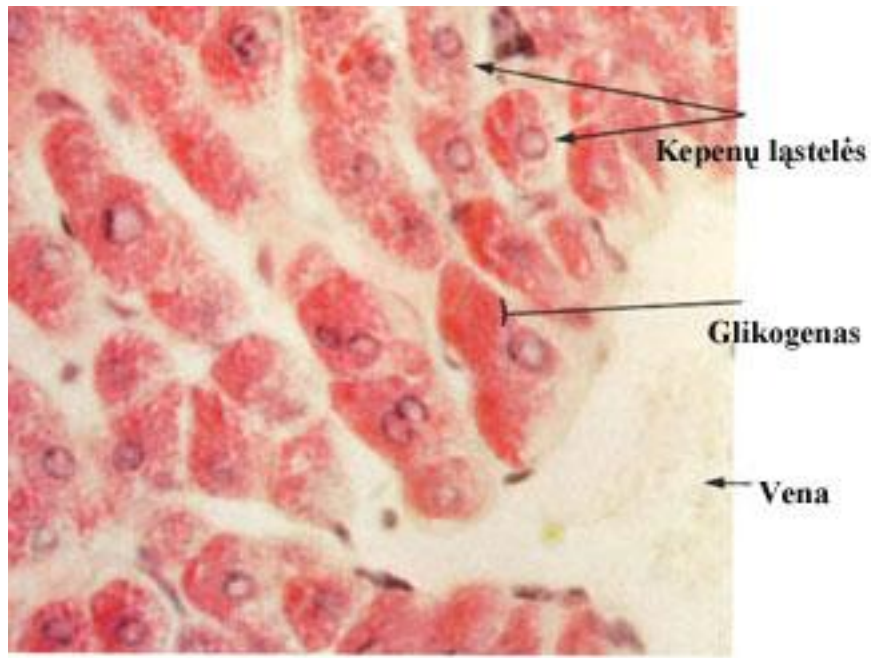
Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios
technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 321. BIOCHEMIJA

Laboratorinis darbas

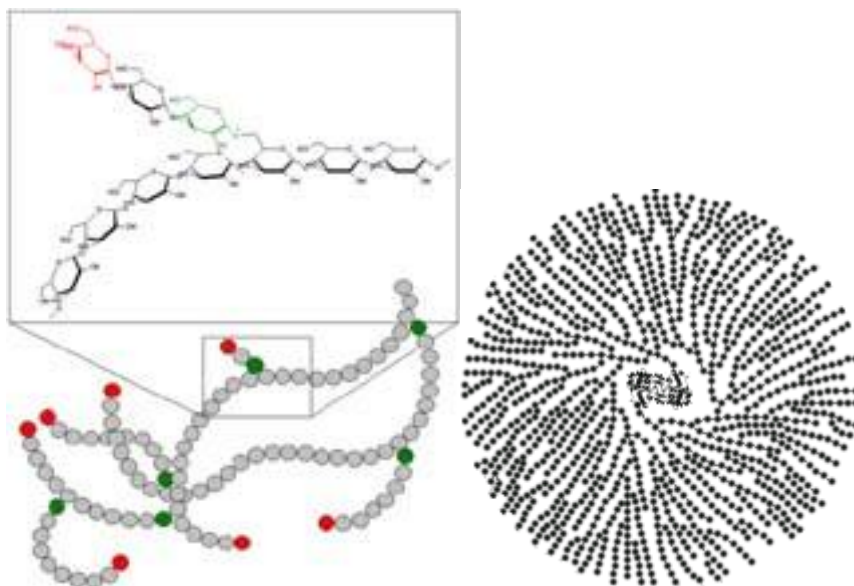
Glikogeno išskyrimas iš raumenų ir kepenų.

Gliukozė yra pagrindinis energijos šaltinis, tačiau laisvos gliukozės koncentracija organizmuose yra nedidelė. Gliukozės perteklių aukštesnieji organizmai saugo polisacharido glikogeno, o augalai – krakmolo pavidalu (1 pav). Kepenyse veikia heksokinazės izofermentas gliukokinazė. Šis fermento K_m gliukozei didesnis (apie 10 mM). Gliukokinazė svarbi, kai kepenyse gliukozės koncentracija labai didelė – tada gliukokinazė gliukozę fosforilina į Glu-6-P, o šis tuoj pat verčiamas į saugojimo formą – glikogeną..



1 pav. Glikogeno granulės (~0,1 μm) hepatocito citozolyje.

Glikogeno molekulės yra ilgos (monomerų skaičius gali siekti 6 mln.) ir labai išsišakojusios (pav. 2). Daugiausia glikogeno saugoma kepenyse ir raumenyse. Jo atsargos gali sudaryti iki 10 proc. kepenų ir iki 1 proc. raumenų audinio masės. Kodėl metabolinė energija saugoma glikogeno molekulėje ir kodėl jis efektyviai skaidomas?



2 pav. Glikogeno struktūra.

- Glikogenas yra skaidomas greičiau nei riebalai, nes vienu metu nuskeliamos kelios gliukozės molekulės nuo šakotos glikogeno molekulės galų.
- Riebalų rūgštys negali būti oksiduojamos anaerobinėse sąlygose.
- Gyvūnai negali sintetinti gliukozės iš riebalų rūgščių, todėl skaidant vien tik tai riebalų rūgštis sunkiau palaikyti gliukozės koncentraciją kraujyje.
- Saugant energiją gliukozės monomerų formoje, padidėtų osmotinis slėgis ir jiems išstipinti būtino tirpiklio kiekis (ląstelės tūris turėtų būti didesnis).

Glikogenas vartojamas, kai padidėja organizmo energetiniai poreikiai. Glikogeno skaldymui reikalingi trys fermentai: glikogeno fosforilazė, genėjimo fermentas ir fosfogliukomutazė. Glikogeną taip pat skaido seilių α -amilazė. α -amilazės katalizuojama reakcija vyksta kaip paprasta hidrolizės reakcija.

Iš tirpalų glikogenas gali būti nusodinamas etanolio. Reaguodamas su jodu jis nusidažo raudona spalva.

Reagentai: 1 % acto rūgštis (CH_3COOH),
95 % etanolis,
1 % jodo tirpalas.

Darbo eiga:

Pastaba: Glikogeno išskyrimui naudojami indai ir įrankiai prieš naudojimą turi būti atšaldyti.

I. Glikogeno išskyrimas:

1. 1 g šviežių kepenų ar raumenų susmulkinama ir sutrinama su smėliu grūstuvėje.
2. Sutrinta kepenų ar raumenų masė užpilama 4 ml verdančio vandens.
3. Grūstuvės turinys perpilamas į platų stiklinį mėgintuvėlį ir virinamas 2-3 min. Taip nusodinamos baltymų nuosėdos.
4. Mėgintuvėlio turinys perpilamas į grūstuvę ir trinamas iki vienalytės masės.
5. Gauta masė skiedžiama į grūstuvę pripilant 5 ml vandens.
6. Grūstuvės turinys perpilamas į platų stiklinį mėgintuvėlį, parūgštinamas 5 lašais 1% acto rūgšties tirpalo ir 20 min. virinamas.
7. Stebima, kad neišdžiūtų mėgintuvėlio turinys. Išdžiūvimo išvengiama lašinant vandenį. Virinimo metu glikogenas pereina į tirpalą.
8. Baltymo nuosėdos pašalinamos filtruojant. Glikogenas lieka filtrate.

II. Filtratas, kuriame yra glikogenas, padalinamas į tris dalis ir atliekamos reakcijos:

1. Glikogeno nusodinimas etanoliu: į mėgintuvėlį įlašinami 5 lašai filtrato ir 5 lašai etanolio. Glikogeno dalelės netenka vandens apvalkalėlio, todėl nusėda amorfinės glikogeno nuosėdos.
2. Glikogeno reakcija su jodu: imami du mėgintuvėliai. Į 1-ą mėgintuvėlį lašinama 5 lašai filtrato, į 2-ą – 5 lašai vandens. Po to į abu mėgintuvėlius įlašinama po 2 lašus 1 % jodo tirpalo. 1-ame mėgintuvėlyje tirpalas nusidažo raudona spalva, nes koloidinės glikogeno dalelės adsorbuoja jodą. 2-ame mėgintuvėlyje tirpalas įgauna geltoną spalvą.
3. Glikogeno hidrolizė seilių α -amilaze: į mėgintuvėlį įlašinama 5 lašai filtrato ir 1 lašas 10 kartų praskiestų seilių. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 5 min. į mėgintuvėlį įlašinamas 1 lašas 1 % jodo tirpalo. Tirpalas įgauna geltoną spalvą, nes seilėse esanti α -amilazė suskaidė glikogeną.