

22. Aislamiento y cuantificación de glucógeno

Jesús Diez Dapena*, Carmen Alicia Padilla Peña, Emilia Martínez Galisteo, José Antonio Bárcena Ruiz, Concepción García Alfonso

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

El glucógeno es la forma de almacenamiento de la glucosa en los tejidos animales. Se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo representando hasta un 10% y un 1-2% de su peso húmedo, respectivamente. Las propiedades físicas y químicas de muchos polisacáridos neutros difieren lo bastante de las de otras biomoléculas, para permitir su fácil aislamiento. El glucógeno se puede liberar del hígado por calentamiento con una base fuerte, hasta la destrucción total del tejido. Al añadir ácido tricloroacético al homogeneizado anterior, precipitan numerosas sustancias de peso molecular elevado, como las proteínas y los ácidos nucleicos, en tanto que el glucógeno continúa disuelto. El glucógeno puede separarse de los monosacáridos y otros compuestos hidrosolubles por precipitación con alcohol, porque los polisacáridos son mucho menos solubles en alcohol acuoso que los monosacáridos. La determinación del grado de pureza de la preparación obtenida se puede realizar mediante el tratamiento con antrona y comparando con una solución estándar de glucógeno.

Título corto: Purificación y cuantificación de glucógeno.

Palabras clave: aislamiento, cuantificación, glucógeno, pureza.

Abreviaturas empleadas. TCA: tricloro acético.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El glucógeno es la forma de almacenamiento de la glucosa en los tejidos animales. Se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo representando hasta un 10% y un 1-2% de su peso húmedo, respectivamente.

Está formado por unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ y ramificaciones $\alpha(1-6)$ (Figura 1).

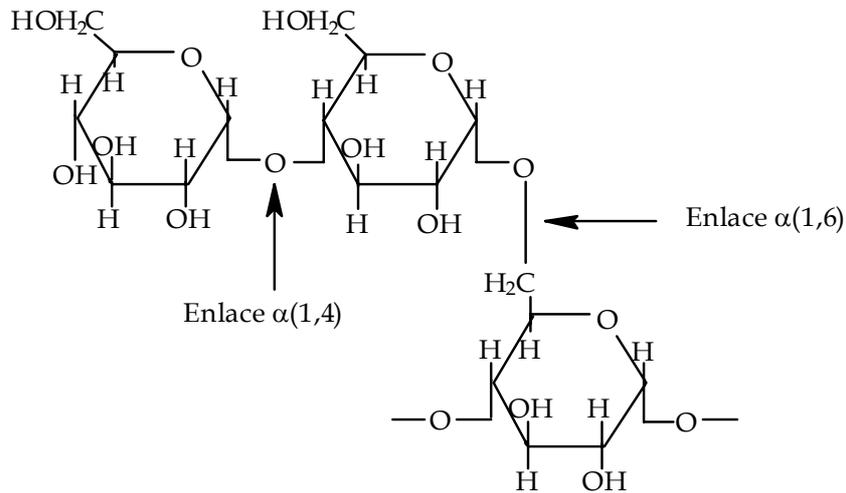


Figura 1. Estructura del glucógeno

El glucógeno actúa como regulador de la glucosa sanguínea, almacenándola como glucógeno durante una buena alimentación (glucogenogénesis) y liberándola por fosforólisis (glucogenólisis) durante el ayuno, ya que en esta situación no hay absorción intestinal. La duración del glucógeno hepático en ayunas es de aproximadamente 24 h. A partir de este momento, la concentración en sangre se mantiene por síntesis de glucosa a partir de sustancias distintas a los carbohidratos (gluconeogénesis) (figura 2). En estos mecanismos de control, actúan la adrenalina y el cortisol.

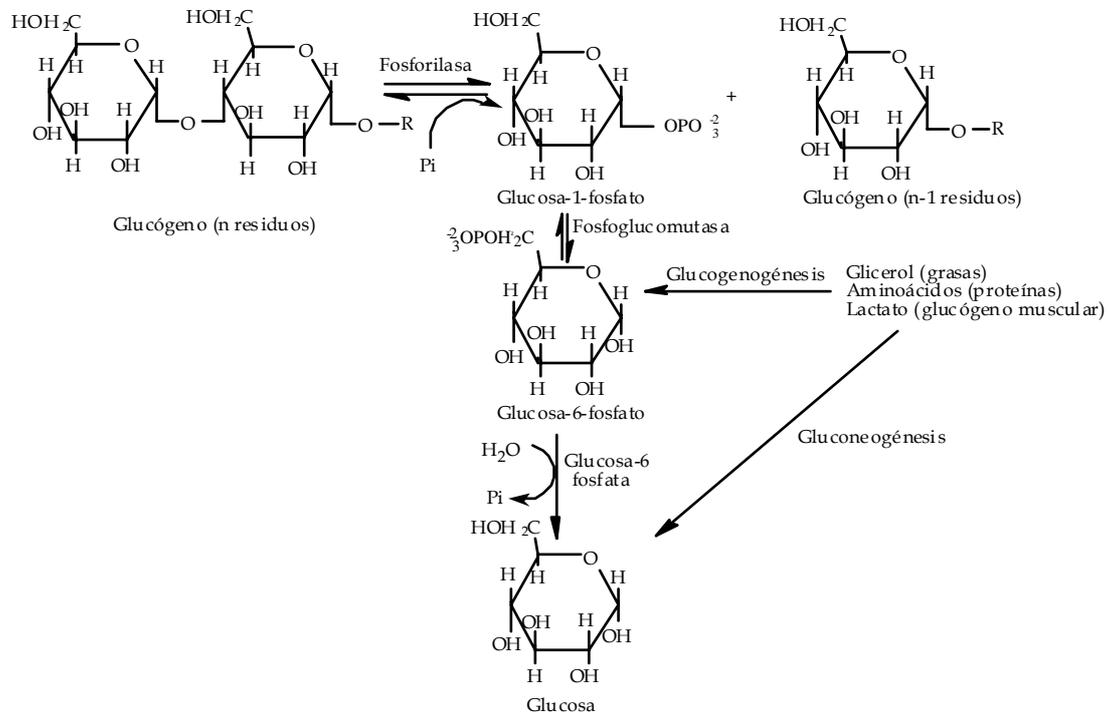


Figura 2. Degradación del glucógeno

El glucógeno se libera de los tejidos que lo contienen por calentamiento con una base fuerte (KOH) hasta la destrucción total del tejido.

La separación del glucógeno del tejido se consigue mediante la adición de etanol (precipita polisacáridos y elimina los monosacáridos solubles) y sulfato de sodio (coprecipitante). Así, se produce un precipitado que contiene una mezcla de glucógeno, proteínas y ácidos nucleicos, que han resistido el calentamiento anterior.

El tratamiento posterior con ácido tricloroacético (TCA) hace que precipiten las proteínas y ácidos nucleicos de la mezcla. El glucógeno aislado se vuelve a precipitar con etanol, obteniéndose una preparación con un alto grado de pureza.

El tratamiento con antrona (que contiene H_2SO_4) es un método rápido para la determinación de hexosas y alopentosas constituyentes de un polisacárido. Mediante este método, el glucógeno es hidrolizado por un ácido (H_2SO_4) hasta sus unidades elementales (monosacáridos), que pueden ser luego deshidratadas dando furfural, y éste último, reacciona con la antrona y se forma un producto coloreado (azul-verdoso) con un máximo de absorbancia a 620 nm. El valor resultante se compara con los obtenidos al preparar una recta estándar con glucosa pura, usando el mismo método.

Los objetivos fundamentales de esta práctica son dos:

- Extracción de glucógeno de hígado de cerdo y cuantificación por pesada y colorimetría.
- Estimación del rendimiento de la purificación del mismo.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. Equipamiento

Baño de agua hirviendo.
Baño de hielo y agua del grifo.
Centrífuga de mesa.
Balanza.
Estufa a 35°C.
Colorímetro.
Agitador de tubos.

2.2. Material

Tubos de vidrio (2,2 x 16 cm; 1,5 x 16 cm) y gradilla.
Tubos de centrífuga cónicos de plástico con tapón.
Guantes de latex.
Pipetas automáticas (0,1 y 1,0 mL) (puntas).
Pipetas de vidrio (5,0 y 10 mL).
Propipeta.
Papel de filtro.
Pinzas de madera.

2.3. Reactivos

Hígado de cerdo troceado.
Solución de hidróxido potásico.
Solución de tricloroacético.
Solución de sulfato de sodio.
Etanol.

Solución de glucosa .
Glucógeno aislado y desecado de hígado de cerdo (apartado 3,1).
Solución de antrona en ácido sulfúrico.
Solución amortiguadora de fosfato sódico .
Agua destilada.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Aislamiento de glucógeno de hígado de cerdo

- 3.1.1. Se ponen 3 mL de la solución de hidróxido potásico al 30% en un tubo de ensayo de vidrio grueso.
- 3.1.2. Se pesan 4 g de tejido (aproximadamente) y se introducen en el tubo anterior. Anotad el peso exacto.
- 3.1.3. Se calienta en un baño de agua hirviendo, agitando con cuidado para acelerar el proceso, durante 20 minutos (o hasta su digestión). **USAD UN TROZO DE PAPEL HIGIÉNICO O PINZAS DE MADERA PARA MANIPULAR LOS TUBOS. ¡¡ PRECAUCION: ALCALI HIRVIENDO!!**
- 3.1.4. Se enfría el tubo bajo el grifo una vez acabada la digestión.
- 3.1.5. Una vez enfriado el tubo de ensayo (comprobadlo por contacto con el dorso de la mano), se añaden 0,2 mL de la solución saturada de Na_2SO_4 y se mezclan fuertemente. Dejad reposar 5 minutos.
- 3.1.6. Se precipita el glucógeno que está en solución por adición de 7 mL de etanol al 95%. Se agita y deja en frío en un baño de hielo durante 5 minutos.
- 3.1.7. Se pasa la solución a tubos de centrifuga cónicos de plástico con tapón, y se centrifuga a la máxima velocidad (5.000 x g) durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se coloca el tubo invertido sobre papel de filtro.
- 3.1.8. Se añaden 5 mL de la solución de TCA al 10% al tubo y se disuelve totalmente el sedimento agitando fuertemente.
- 3.1.9. Se centrifuga de nuevo 5 minutos a 5.000 x g.
- 3.1.10. Se pesa un tubo de centrifuga cónico de plástico vacío y anota el peso. Marcadlo con una señal para su posterior identificación.
- 3.1.11. Se añade el sobrenadante obtenido en la última centrifugación a un tubo de ensayo largo, al que previamente se han añadido 10 mL de etanol al 95%, desechando el sedimento de la centrifugación. Se deja reposar 5 minutos para que se produzca la precipitación del glucógeno.
- 3.1.12. Se traslada la solución al tubo de centrifuga de plástico, previamente pesado, y se centrifuga durante 5 minutos más a 5.000 x g.
- 3.1.13. Una vez acabada la centrifugación se tira el sobrenadante. El sedimento obtenido representa el glucógeno prácticamente exento de sustancias contaminantes. Dejadlo secar en la estufa a 35°C hasta su utilización.

3.2. Determinación de la pureza del glucógeno obtenido

- 3.2.1. Se pesa en la balanza el tubo con el glucógeno desecado, obtenido en la parte anterior, y se anota el resultado.

- 3.2.2.** Se disuelve este glucógeno a razón de 8 mg de dicho glucógeno por mL de tampón fosfato 0,02 M pH 7,0 que contenga NaCl 0,005 M, (el ión que activa la α -amilasa). De esta manera queda preparado el glucógeno para las siguientes determinaciones.
- 3.2.3.** Se prepara una dilución 1/50 del glucógeno disuelto anteriormente (0,1 mL en 5 mL de agua).
- 3.2.4.** Se preparan tres tubos de ensayo como se describe en la Tabla 1:

Tubo (n°)	A	B	C
Glucosa (9 mg/mL)	1 mL	---	---
Agua	---	---	1 mL
Glucógeno (dilución 1/50)	---	1 mL	---
Antrona (2 g/L H ₂ SO ₄)	5 mL	5 mL	5 mL

- 3.2.5.** Una vez preparados los tubos, se sumergen en un baño con agua hirviendo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se enfrían en un baño de hielo. (Precaución al coger los tubos. Usad pinzas de madera).
- 3.2.6.** Se mide la absorbancia a 620 nm ajustando a 0 con el tubo C (blanco).
- 3.2.7.** Para calcular el porcentaje de pureza se aplica la relación:
 $A_{620} \text{ GLUCÓGENO} / A_{620} \text{ GLUCOSA}$
- 3.2.8.** Se expresa la relación de absorbancia obtenida como mg de glucógeno/g de tejido, (rendimiento).

4. RESULTADOS ESPERADOS

Una vez finalizada la parte práctica, hay que presentar los resultados obtenidos. Para ello se debe indicar el rendimiento total en glucógeno y calcular el contenido en glucógeno del hígado, expresándolo en mg de glucógeno por g de tejido fresco. A continuación se muestra un ejemplo representativo de resultados esperados:

En la Tabla 2 se muestran las absorbancias determinadas en las muestras

Glucosa	1,420
Glucógeno	0,527

Porcentaje de glucógeno obtenido:

$$\% \text{ de glucógeno} = \frac{A_{620 \text{ nm glucógeno}} \times 100}{A_{620 \text{ nm glucosa}}} = \frac{0,527 \times 100}{1,420} = 37,1\%$$

Rendimiento de glucógeno en hígado:

Cálculo de los μg glucógeno puro en 25 mg del precipitado obtenido a partir de 4,54 g de hígado utilizado como muestra:

$$\text{glucógeno puro (mg)} = \frac{\text{mg precipitado} \times \% \text{ glucógeno}}{100 \text{ mg}} = 9,257 \text{ mg}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mg de glucógeno puro}}{\text{g de hígado muestra}} = 2,04 \text{ mg glucógeno puro/g hígado}$$

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El método de aislamiento utilizado en este protocolo se basa en las propiedades químicas del glucógeno no compartidas por otras sustancias presentes en el hígado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alemany M, Font S (1983): "Prácticas de Bioquímica", 1ª ed. Editorial Alhambra (Madrid, España), pp 99-107.
- Clark JM (1966): "Bioquímica Experimental", 1ª ed. Editorial Acribia (Zaragoza, España), pp 40-42.
- Nelson DL, Cox MM (2001): "Principios de Bioquímica", 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 304-305.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003): "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp 577-580.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Solución de KOH 30%

Tabla 3. Solución de KOH	
KOH	300 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Solución de tricloroacético TCA 10%

Tabla 4. Solución de TCA	
TCA	100 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Solución saturada de Na₂SO₄

Tabla 5. Solución de Na ₂ SO ₄	
Na ₂ SO ₄	10 g
Agua destilada	Hasta 30 mL

Solución de glucosa (9 mg/mL)

Tabla 6. Solución de glucosa	
Glucosa	90 mg
Agua destilada	Hasta 10 mL

Solución amortiguadora: tampón fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,005 M pH 7,0

Tabla 7. Solución de fosfato sódico pH 7,0	
Na ₂ HPO ₄	1,70 g
NaH ₂ PO ₄	1,59 g
NaCl	0,30 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 7,0 si fuera necesario

Solución de glucógeno: a partir del glucógeno obtenido en el apartado 3.1.

Tabla 8. Solución de glucógeno	
Glucógeno	80 mg
Fosfato sódico 0,02 M; NaCl 0,005 M pH 7,0	Hasta 10 mL

Solución de antrona 0,2% en H₂SO₄

Tabla 9. Solución de antrona	
Antrona	1 g
H ₂ SO ₄	Hasta 500 mL