

Recherche du glycogène dans le foie et les muscles

| | |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Matériel nécessaire | <ul style="list-style-type: none"> • Morceau de foie de veau • Morceau de viande de bœuf. <p><u>Attention:</u> ne pas prendre du steak haché de grande surface car on peut y déceler de l'amidon, ce qui fausse la mise en évidence du glycogène...</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mortier, pilon, sable • Bec Bunsen, trépied, allumettes, pince • Bêcher de 250 ml • Tubes à essais, petit entonnoir, papier filtre • Sulfate de Sodium et spatule • Eau iodée, éthanol. |
| Manipulation | <ul style="list-style-type: none"> • Broyer dans le mortier un morceau de foie avec du sable jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. • Ajouter environ 20 ml d'eau distillée et continuer à broyer quelques minutes. • Mettre la suspension dans un bêcher de 250 ml avec une spatule de Sulfate de Sodium. • Porter à ébullition et laisser chauffer le mélange pendant 1 minute pour précipiter toutes les substances albuminoïdes. • Laisser refroidir et filtrer dans 2 tubes à essais. |
| Caractérisation du glycogène | <p>Après filtration, on caractérise le glycogène par 2 tests:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test à l'eau iodée: mettre un volume égal de filtrat et d'eau iodée <p>Le glycogène se colore en brun acajou. Faire un témoin avec de l'eau distillée.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test à l'éthanol: mettre 2 volumes d'éthanol pour un volume de filtrat <p>Le glycogène forme alors un précipité blanc.</p> |

Ces tests ne seront pas effectués car il y a manque d'eau iodée. A cet effet, il faut se baser sur le 2ème protocole.

Merci beaucoup et saha f'tourkoum.

EXTRACTION ET DOSAGE DU GLYCOGENE DANS UN ORGANE

Matériel

| Matériel | Matériel au bureau |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 g de foie de veau et 5 g de muscle de bœuf | Mixer |
| 2 béchers renforcés de 250mL | Balance |
| 2 spatules- 1 marker- 1 chronomètre | Na ₂ SO ₄ + spatule-Acide acétique à 4% + pipette 2mL |
| Portoir + 7 tubes à essais | Centrifugeuse |
| + 6 tubes à centrifuger | Lugol + micro pipette de 50µL |
| 1 bec électrique + grille + pince en bois | 1 micro pipette de 100µL à faire tourner en changeant à chaque fois le cône jaune. |
| 1 pipette en verre de 5mL + poire | |
| 2 pipettes plastiques de 3mL | |
| Ethanol 95° | |

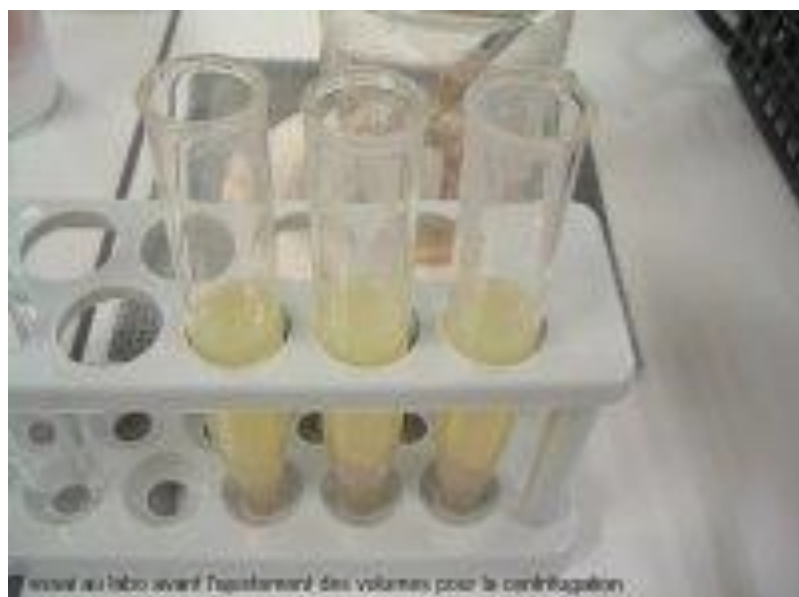
Le foie et le muscle sont broyés à tour de rôle (lavage du mixer) à raison de 5 g d'organe + 17,5mL d'eau déminéralisée, compter une portion de plus.

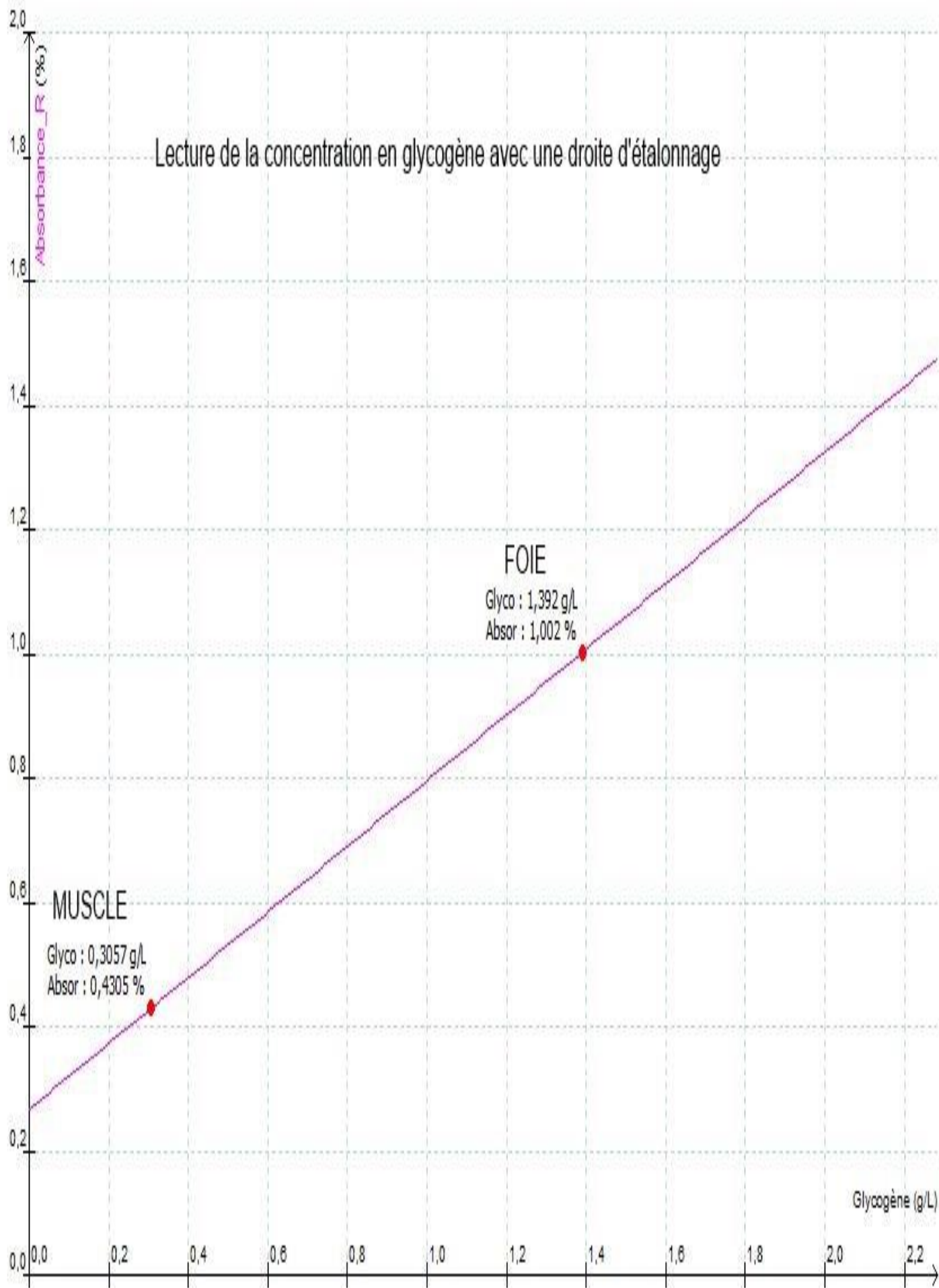
Broyer le muscle dans un mortier relève d'un tour de force.

N'ayant pas eu le temps de mesurer la densité du foie et du muscle, considérer que dans 25 g du mélange: eau + organe: il y avait 5 g d'organe.

Protocole

1. Mettre en marche le bec bunsen ou plaque chauffante
2. Dans le bécher de 250mL, prendre de l'organe mouliné : 25g à peser (tare de la balance) du mélange eau + organe
3. Ajouter une spatule de Na₂SO₄, 2mL d'acide acétique à 4%(à défaut d'acide trichloracétique); mélanger rapidement pendant 10s.
4. Porter à ébullition en remuant avec la spatule pendant 3mn, lorsque l'ébullition débute baisser le bec.
5. Poser le bécher avec la pince en bois sur la grille sur la paillasse.
6. Remplir en versant délicatement 2 tubes à centrifuger au même niveau (équilibre de la centrifugeuse) – Boucher- Identifier vos tubes- Centrifuger à 4200tours/mn pendant 5mn
7. Récupérer le surnageant sans prélever du culot avec 1 pipette de 3mL en plastique des 2 tubes dans un tube à essai en notant le volume final de surnageant.





Dosage

Dans 3 tubes à essais, introduire dans l'ordre:

| | Tube 1: témoin | Tube 2: muscle | Tube 3: foie |
|------------------------------|----------------|----------------|--------------|
| Eau déminéralisée (ml) | 4 | 3,9 | 3,9 |
| Surnageant (μL) | 0 | 100 | 100 |
| Lugol (μL) | 50 | 50 | 50 |

Noter les résultats visuels de la coloration dans les tubes.

Transvaser les tubes 2 et 3 dans des cuves de colorimétrie

Sur le spectrophotomètre à 470nm, le zéro a été réalisé. Lire la DO (densité optique) sur l'écran ou sur le colorimètre, et avec l'outil pointeur, trouver la valeur du taux de glycogène en g/L (2 décimales) sur la droite d'étalonnage.

Calculer la masse de glycogène dans les 5 g d'organe.

Calcul

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| Concentration lue sur la droite d'étalonnage | C (g/L) |
| Volume total de la cuve | V (L) |
| Quantité de glycogène dans la cuve | C x V (g) |
| Volume total de surnageant recueilli | V1 (L) |
| Volume de surnageant introduit dans la cuve | V2 (L) |
| Quantité de glycogène dans l'échantillon | Q=C x V x V1/V2 (g) |

Le volume du Lugol n'est pas compté, surcharge les calculs en décimales de façon insignifiante, (soit à peu près 4mL ou 0,004L).

Mise en évidence du glycogène sans dosage.

Dans un autre tube, placer 2 mL (pipette plastique) du surnageant et ajouter 4mL(pipette plastique) d'alcool à 95°: le liquide se trouble, flocons blanchâtres = présence de glycogène.

Transvaser dans un tube à centrifuger – Boucher-Identifier le.

Centrifuger à 4200 tours/mn pendant 5mn.

Eliminer le surnageant par renversement dans l'évier, le glycogène est dans le culot: blanc sous forme de grain.

Dissoudre le glycogène en ajoutant 4mL d'eau, puis ajouter 1 goutte de Lugol.

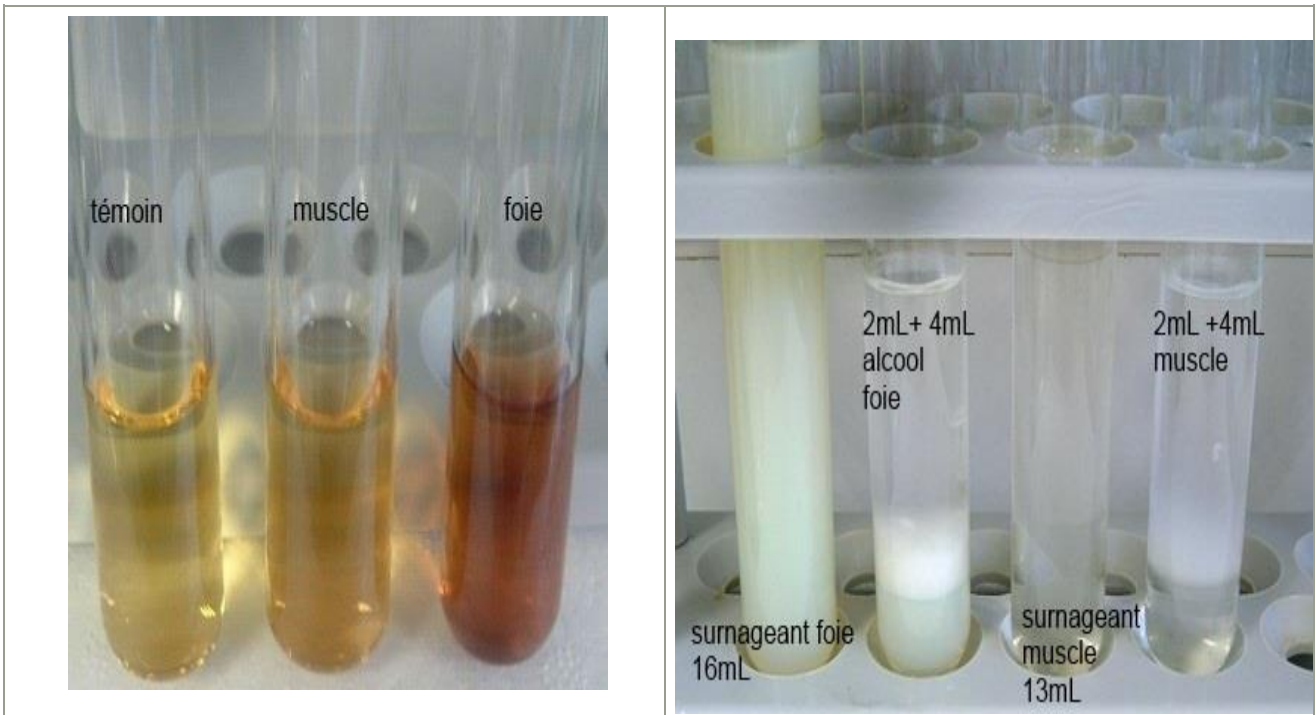
Faire un témoin sur de l'eau.

La présence de glycogène se traduit par une coloration acajou.

Les culots de centrifugation peuvent être séchés au four pendant 24h et ensuite pesés si on pris soin de peser les tubes vides.

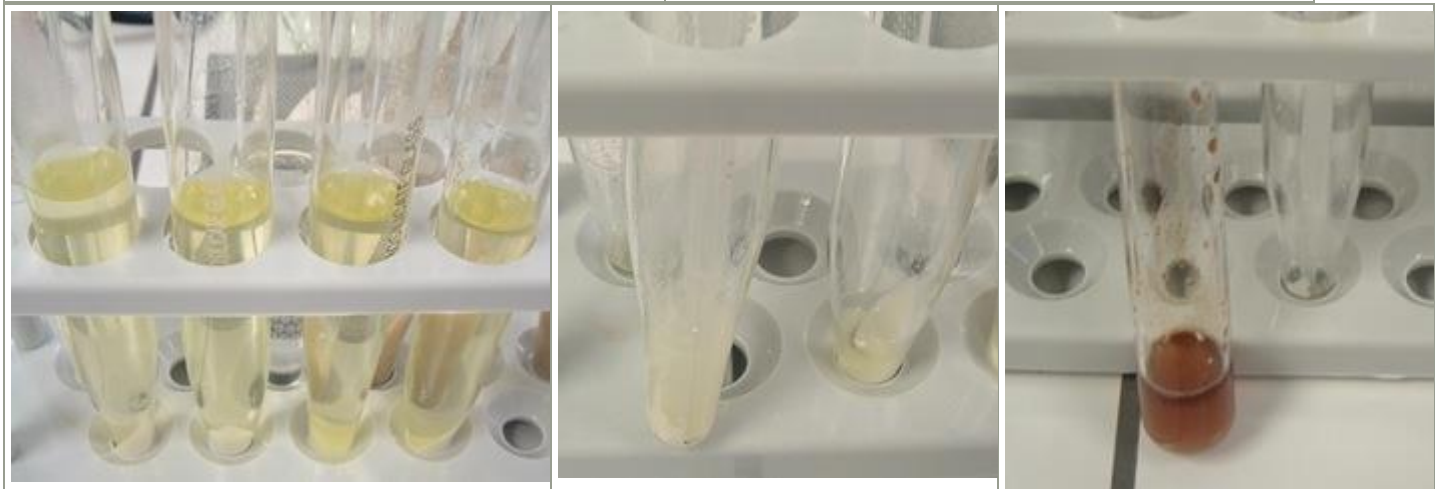
On peut déduire la masse de glycogène dans l'échantillon.

Le glycogène récupéré est conservé au frigo à +4°C pour les TP : activité enzymatique



tubes pour le dosage en colorimétrie

mise en évidence du glycogène avec l'alcool



2ème centrifugation, le glycogène est dans le culot

dissolution du glycogène avec de l'eau

coloration au Lugol