

Praktikum Cholesterinbestimmung

Es sollen die Fettwerte Triglyceride, LDL und HDL aus Schafserum bestimmt werden. Zusätzlich werden diese Fette aus Hühnereigelb isoliert und ebenfalls gemessen. Triglyceride können direkt enzymatisch gemessen werden. LDL und HDL werden indirekt bestimmt. LDL wird bestimmt, indem das Gesamtcholesterin im Serum gemessen wird und davon das übrig gebliebene Gesamtcholesterin nach Fällung der LDL Partikel abgezogen wird (siehe 5.1). HDL wird nach der Friedwald-Formel aus dem Triacylglycerid- und dem LDL-Wert errechnet (5.2).

1 Extraktion von Cholesterin und Triacylglyceriden aus Hühnereigelb:

Ein Hühnerei wird 10 min. gekocht. Anschließend werden zwei Eppendorfgefäße etwa zu einem Drittel mit Eigelbpulver gefüllt. Zu dem ersten Eppendorfgefäß wird 1 ml Aceton, zu dem zweiten Eppendorfgefäß wird 1 ml Chloroform gegeben. Zunächst werden die Eppendorfgefäße 2 Minuten gevortext und dann weitere 8 Minuten unter Schwenken inkubiert. Danach wird 5 Minuten zentrifugiert. Danach wird die Flüssigkeit vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und im Exsikkator eine Stunde eingeeengt. Die verbleibenden Lösungen (**Ei**_{Chloroform} und **Ei**_{Aceton}) werden dann, wie unten beschrieben gemessen.

2 Fällung von LDL:

Es werden 1000 µl Fällungsreagenz zu 100 µl Schafserum in einem Eppendorfgefäß zusammengegeben. Nach guter Durchmischung wird die Lösung 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß übertragen (**Serum**_{gefällt}).

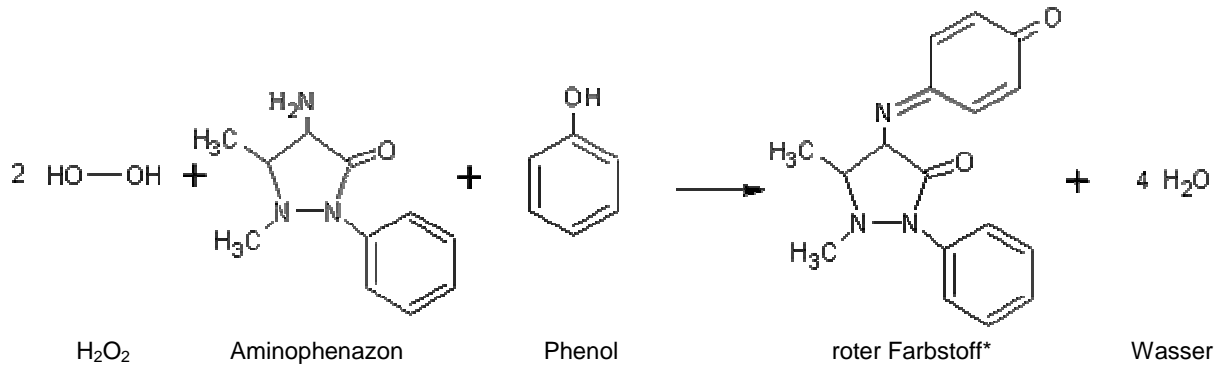
3 Pipettierschema (alle Angaben in µl)

Nr.	Ei Chloroform	Ei Aceton	Serum	Serum gefällt	TRI Stand.	CHOL Stand.	H ₂ O	TRI Reag.	CHOL Reag.	Messwert
1					10			990		
2					5		5	990		
3						10			990	
4						5	5		990	
5	10							990		
6	5						5	990		
7	10								990	
8	5						5		990	
9	10						990			
10	5						995			
11		10						990		
12		5					5	990		
13		10							990	
14		5					5		990	
15		10					990			
16		5					995			
17			10					990		
18			5					990		
19			10						990	
20			5						990	
21			10				990			
22			5				995			
23				10				990		
24				5				990		
25				10					990	
26				5					990	
27				10			990			
28				5			995			
29							10	990		
30							5	995		
31							10		990	
32							5		995	

4 Theorie:

4.1 Nachweis von H₂O₂ durch Phenol + Aminophenazon (PAP):

Bei allen hier beschriebenen Tests erfolgen die Quantifizierungen durch das Messen von enzymatisch produziertem H₂O₂ in der Peroxidasereaktion: Wasserstoffperoxid bildet mit Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff*, dessen Farbintensität der H₂O₂-Konzentration direkt proportional ist.



Die Farbintensität lässt sich wiederum leicht in einem Fotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=546 \text{ nm}$ quantifizieren.

4.2 Triglyceridbestimmung (GPO-PAP):

GPO: Glycerol-3-Phosphat Oxidase

Messprinzip:

Die im Serum vorhandenen Triglyceride werden unter Einwirkung der Lipoprotein Lipase in Glycerol und Fettsäuren gespalten. Das frei werdende Glycerol wird anschließend über Glycerolkinase Phosphoryliert und von Luftsauerstoff unter Mitwirkung von Glycerol-3-Phosphat Oxidase in Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff*, dessen Farbintensität der Triglycerid-Konzentration direkt proportional ist.

Triglycerid + 3 H₂O → Glycerol + 3 Fettsäuren (Lipoprotein Lipase)

Glycerol + ATP → Glycerol-3-Phosphat + ADP (Glycerolkinase)

Glycerol-3-Phosphat + O₂ → Dihydroxyaceton-Phosphat + H₂O₂ (G-3-P Oxidase)

H₂O₂ + Phenol + Aminophenazon → **Farbstoff*** + 4 H₂O + HCl (Peroxidase)

4.3 Gesamtcholesterinbestimmung (CHOD-PAP)

CHOD: Cholesterol Oxidase

Messprinzip:

Die im Serum vorhandenen Cholesterinester werden unter Einwirkung der Cholesterin-Esterase in Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das freie Cholesterin wird von Luftsauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterin-Oxidase zu Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff*, dessen Farbintensität der Cholesterin-Konzentration direkt proportional ist.

Cholesterinester + H₂O → Cholesterin + Fettsäure (Cholesterin Esterase)

Cholesterin + O₂ → Cholestenon + 4 H₂O₂ (Cholesterin Oxidase)

2 H₂O₂ + Phenol + Aminophenazon → **Farbstoff*** + 4 H₂O (Peroxidase)

*4-(p-Benzochinon-monoimino) – phenazon

5 Auswertung

5.1 "Leerwerte" (mock) abziehen:

Von allen Meßwerten, in denen Enzymlösungen verwendet wurden, werden die korrespondierenden Messwerte bei denen nur Wasser verwendet wurde, abgezogen (5 - 9, 6 - 10, 11 - 15 ...)

5.2 Volumenkorrektur und Mittelwertbildung:

Alle Meßwerte, bei denen nur 5 Mikroliter Probe vermessen wurden (2,4,6,8,10 ...), werden mit 2 multipliziert. Anschließend wird der Mittelwert aus diesem Wert und der korrespondierenden Probe, bei der 10 Mikroliter vermessen wurden, gebildet.

5.3 Berechnung der Konzentrationen durch Vergleich mit den Standardmesswerten:

$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = (\text{Messwert}_{\text{Probe}} / \text{Messwert}_{\text{Standard}}) * \text{Konzentration}_{\text{Standard}}$

5.4 LDL-Berechnung:

Der LDL-Wert ergibt sich aus:

$\text{LDL} = \text{Cholesterin}_{\text{gesamt}} - \text{Cholesterin}_{\text{nach Fällung}}$

5.5 HDL-Berechnung:

Der HDL-Wert ergibt sich nach der Friedewald-Formel:

$\text{HDL} = \text{Gesamtcholesterin} - \text{LDL} - \text{Triglycerid}/5$