

Lipidy a lipoproteiny

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Lenka Fialová







2024/25

Obsah

ÚLOHA 1 – HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ TUKŮ PANKREATICKOU LIPASOU	3
ÚLOHA 2 – PRŮKAZ NENASYCENÝCH VAZEB V MASTNÝCH KYSELINÁCH	4
ÚLOHA 3 – STANOVENÍ MALONDIALDEHYDU	5
ÚLOHA 4 – STANOVENÍ KONCENTRACE CELKOVÉHO A HDL-CHOLESTEROLU V SÉRU	6
ÚLOHA 5 – STANOVENÍ KONCENTRACE TRIACYLGLYCEROLŮ V SÉRU	7
ÚLOHA 6 – ODVOZENÉ PARAMETRY LIPIDOVÉHO METABOLISMU	8

Úloha 1 – Hydrolytické štěpení tuků pankreatickou lipasou

Reagencie:



1. Převařené kravské mléko ochlazené na 37 °C (převařením se inaktivují všechny enzymy v mléce)
2. NaOH  0,02 mol/l
3. Extrakt pankreatické lipasy připravený z dražé Pancreolan forte (30 dražé Pancreolanu forte se po odstranění polevy rozpustí v 600 ml směsi glycerol-voda v poměru 1:1 a přefiltruje)
4. Roztok fenolftaleinu v ethanolu   2 g/l
5. Deoxycholát sodný  100 g/l

Pracovní postup:

- a) Do Erlenmeyerovy baňky odpipetujeme 30 ml převařeného mléka a přidáme 3,5 ml extraktu lipasy. Směs promícháme.
- b) Připravíme 5 zkumavek, které označíme 1, 2, 3, 3D a 4 a jednu titrační baňku, do kterých pipetujeme po 5 ml směsi. (Zbytek v Erlenmeyerově baňce vylijeme). Do zkumavky označené 3D přidáme 1 ml deoxycholátu sodného.
- c) Zkumavky vložíme do termobloku temperovaného na 37 °C a poznamenejeme si čas.
- d) Vzorek v titrační baňce, který slouží jako slepá zkouška, titrujeme po přidání indikátoru (fenolftaleinu) NaOH 0,02 mol/l do prvního růžového zbarvení (srovnáváme s bílým zbarvením původního vzorku mléka). Zaznamenejeme spotřebu NaOH.
- e) Za 20 minut po vložení zkumavek do termobloku odebereme zkumavku 1, obsah přelijeme do titrační baňky a opět titrujeme stejně jako v bodě d). Za dalších 20 minut (tedy ve 40. minutě) titrujeme obsah ve zkumavce 2. V 60. minutě provedeme dvě titrace – budeme titrovat obsah ve zkumavce 3 a 3D. V 80. minutě titrujeme obsah ve zkumavce 4.

Úloha 2 – Průkaz nenasycených vazeb v mastných kyselinách

Reagencie:

1. Kyselina palmitová (pevná substance)
2. Kyselina olejová
3. Rostlinný olej
4. KMnO_4  0,05 mol/l
5. Ethanol 

Pracovní postup:


Připravíme a označíme 3 zkumavky. Pipetujeme do nich příslušné roztoky podle tabulky:

Odměře:	Zkumavka 1 Kyselina palmitová	Zkumavka 2 Kyselina olejová	Zkumavka 3 Rostlinný olej	Zkumavka 4 Slepá zkouška
Kyselina palmitová	špetka	–	–	–
Kyselina olejová ml	–	0,5	–	–
Rostlinný olej ml	–	–	0,5	–
Ethanol ml	0,5	0,5	0,5	0,5
Obsah zkumavek promícháme.				
KMnO_4 kapky	1 – 2	1 – 2	1 – 2	1 – 2
Obsah zkumavek promícháme.				

Vyhodnotíme zbarvení reakčních směsí v jednotlivých zkumavkách.

Úloha 3 – Stanovení malondialdehydu

Reagencie:

1. Činidlo s kyselinou thiobarbiturovou (kyselina 2-thiobarbiturová 29 mmol/l v 2,19 mol/l kyselině octové) 
2. Rostlinný olej čerstvý
3. Rostlinný olej s prošlou expirací
4. Kyselina palmitová

Pracovní postup:

Podle tabulky připravíme do 4 zkumavek reakční směs:

Odměřte:	Zkumavka 1 Rostlinný olej čerstvý	Zkumavka 2 Rostlinný olej s prošlou expirací	Zkumavka 3 Kyselina palmitová	Zkumavka 4 Slepá zkouška
Čištěná voda ml	2,0	2,0	2,0	2,0
Rostlinný olej čerstvý	5 kapek	–	–	–
Rostlinný olej s prošlou expirací	–	5 kapek	–	–
Kyselina palmitová	–	–	špetka	–
Činidlo s kyselinou thiobarbiturovou ml	1,0	1,0	1,0	1,0

Zkumavky vložíme do vodní lázně (kádinka s vodou) a zahříváme 20 – 30 minut.

Vyhodnotíme zbarvení reakčních směsí v jednotlivých zkumavkách.

Úloha 4 – Stanovení koncentrace celkového a HDL-cholesterolu v séru

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Cholesterol a HDL-Cholesterol – srážecí roztok firmy Erba-Lachema, s.r.o.

1. Činidlo [PIPES-pufr 50 mmol/l (pH 6,9), fenol 24 mmol/l, [cholan sodný](#) 0,5 mmol/l; [4-aminoantipyrin](#) 0,5 mmol/l; [cholesterolesterasa](#) $\geq 3,3$ $\mu\text{kat/l}$; [cholesteroloxidasa](#) $\geq 4,1$ $\mu\text{kat/l}$; [peroxidasa](#) $\geq 16,5$ $\mu\text{kat/l}$] (koncentrace odpovídají hodnotám v reakční směsi)

Činidlo není klasifikované jako nebezpečné, obsahuje však méně než 0,1 % azidu sodného, jenž je klasifikován jako velmi toxický a nebezpečný pro životní prostředí.

2. Srážecí roztok (kyselina fosfowolframová 0,56 mmol/l; chlorid hořečnatý 30,0 mmol/l)



3. Standardní roztok cholesterolu  7 mmol/l

4. Sérum pro celkový cholesterol – neznámý vzorek (infekční materiál)

5. Sérum pro HDL-cholesterol – neznámý vzorek (infekční materiál)

Pracovní postup:

Příprava vzorku na stanovení HDL-cholesterolu:

K 0,10 ml séra přidáme 0,20 ml srážecího roztoku, promícháme a necháme stát 10 minut při laboratorní teplotě. Pak centrifugujeme 10 minut na malých stolních centrifugách. Supernatant musí být čirý.

Připravíme a označíme 4 zkumavky. Pipetujeme do nich příslušné roztoky podle tabulky:

Odměřit v ml	Zkumavka 1 Celkový cholesterol	Zkumavka 2 HDL-cholesterol	Zkumavka 3 Standard	Zkumavka 4 Slepý vzorek
Činidlo	1,0	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,01	–	–	–
Supernatant	–	0,10	–	–
Standard	–	–	0,01	–
Čištěná voda	–	–	–	0,01

Promícháme a inkubujeme 5 minut při 37 °C. Do 20 minut po skončení inkubace změříme absorbance vzorku séra (zkumavka 1), supernatantu (zkumavka 2) a standardu (zkumavka 3) proti slepému vzorku v 1 cm kyvetě při vlnové délce 500 nm.

Úloha 5 – Stanovení koncentrace triacylglycerolů v séru

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Triacylglyceroly liquid 250 S firmy Erba-Lachema, s.r.o.

1. Činidlo [Goodův pufr (pH 7.2) 49,5 mmol/l; 4-chlorofenol 3.96 mmol/l; adenosin-5-trifosfát (ATP) 1.98 mmol/l; 4-aminoantipyrin 0.495 mmol/l; Mg^{2+} 14.85 mmol/l; glycerol-3-fosfát-oxidasa $\geq 8.2 \mu\text{kat/l}$; glycerolkinasa $\geq 6.6 \mu\text{kat/l}$; peroxidasa 32.7 $\mu\text{kat/l}$; lipoproteinová lipasa 32.7 $\mu\text{kat/l}$]
2. Standardní roztok triacylglycerolů 3 mmol/l
3. Sérum – neznámý vzorek (infekční materiál)

Pracovní postup:

Podle tabulky připravíme do zkumavek 1 – 3 reakční směsi:

Odměřit v ml:	Zkumavka 1 Vzorek séra	Zkumavka 2 Standard	Zkumavka 3 Slepý vzorek
Činidlo	1,0	1,0	1,0
Sérum	0,01	–	–
Standard	–	0,01	–
Čištěná voda	–	–	0,01

Promícháme a inkubujeme 20 minut při laboratorní teplotě. Do 60 minut po skončení inkubace změříme absorbance vzorku séra a standardu proti slepému vzorku při 540 nm v 1 cm kyvetě.

Úloha 6 – Odvozené parametry lipidového metabolismu

a) Výpočet koncentrace LDL-cholesterolu

Výpočet:

$$\text{LDL cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol} - \frac{\text{triacylglyceroly (mmol/l)}}{2,2}$$

(mmol/l) (mmol/l) (mmol/l)

b) Výpočet non-HDL cholesterolu

Výpočet:

$$\text{Non-HDL-cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}$$

(mmol/l) (mmol/l) (mmol/l)