**Ćwiczenie 3**

**Cel:** Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi

**Odczynniki:** Zestaw diagnostyczny BioSystems SA

**Materiał:** Surowica krwi

**Zasada metody:** Cholesterol jest oznaczany po enzymatycznej hydrolizie estrów cholesterolu przez esterazę cholesterolową and następnie oksydazę cholesterolową. Wskaźnikiem jest chinonoimina, która tworzy się z nadtlenku wodoru, 4-aminoantypiryny i fenolu w reakcji katalizowanej przez peroksydazę. Intensywność zabarwienia chininoiminy jest proporcjonalna do stężenia cholesterolu w badanej próbce i może być zmierzona spektrofotometrycznie przy λ=500 nm.







**Wykonanie:**

1. Do probówki Eppendorfa odmierzyć 250 µl surowicy i 500 µl roztworu strącającego
2. Dokładnie wymieszać. Inkubować w temp. pokojowej przez 10 minut.
3. Odwirować - 3 minuty przy maksymalnych obrotach wirówki. Cholesterol frakcji HDL znajduje się w supernatancie - próbek po wirowaniu nie można wstrząsać!
4. Przygotować trzy probówki i oznaczyć je jako: próba ślepa, standard, próba badana
5. Odpipetować do probówek roztwory według tabeli poniżej:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Próba ślepa** | **Standard** | **Próba badana** |
| **Odczynnik do cholesterolu** | 2 ml | 2 ml | 2ml |
| **OGRZEWAĆ W ŁAŹNI WODNEJ 37⁰C PRZEZ OK. 5 MIN, NASTĘPNIE DODAĆPOZOSTAŁE ODCZYNNIKI:** |
| **Woda** | 20 µl | - | - |
| **Standard cholesteroluWAŻNE: 50 mg%** | - | 20 µl | - |
| **Próba badana (SUPERNATANT)** | - | - | 20 µl |

1. Dokładnie wymieszać zawartość probówek i inkubować w 37⁰C przez 5 minut.
2. Odczytać absorbancję standardu i próby badanej wobec próby ślepej przy 500 nm.

**Wyniki:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Standard** | **Próba badana** |
| **Absorbcja przy 500 nm** |  |  |

**Obliczenia:**

Stężenie próby badanej = Absorbcja próby badanej / Abs standardu × Stężenie standardu × 3 (rozc. próby)

Stężenie standardu: ..........................

Wyliczone stężenie całkowitego cholesterolu w surowicy: ...................................................

**Interpretacja kliniczna dla oceny ryzyka arteriosklerozy:**

poziom pożądany: >55 mg% (mężczyźni) lub >65 mg% (kobiety)

podwyższone ryzyko: 35-55 mg% (mężczyźni) lub 45-65 mg% (kobiety)

wysokie ryzyko: <35 mg% (mężczyźni) lub <45 mg% (kobiety)

**Interpretacja wyniku:**