

7 HORMONE / VITAMINE

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und bei hohen Blutglukosespiegeln ausgeschüttet. Über den Blutkreislauf gelangt es ans Zielgewebe (Leber, Muskulatur, Fett) und erhöht die Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen indem es den Einbau von GLUT4 Transportern in die Zellmembran stimuliert.

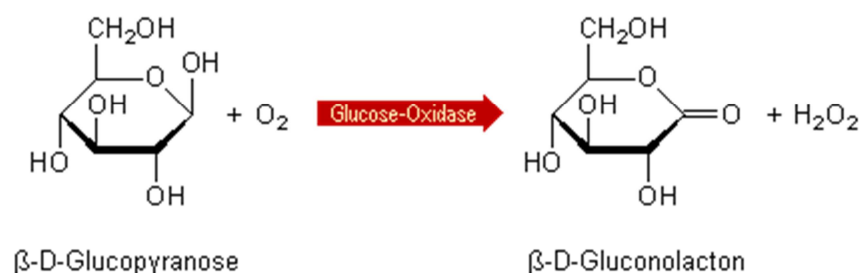
Durch eine insulininduzierte Enzymaktivierung werden darüber hinaus viele andere Stoffwechselprozesse beschleunigt: Glykolyse, Glykogensynthese, Lipidsynthese und Pentosephosphatweg. Dagegen werden Glykogenolyse, Glukoneogenese und Lipolyse durch Insulin gehemmt.

7.1 Nachweis der Insulinwirkung im Blut

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut ist für diabetische Menschen und Tiere lebensnotwendig. Die Glukosemessung erfolgt in Kapillarblut mittels eines Glucometers aus den Fingerkuppen (Menschen) und wahlweise an Pfoten- oder Ohrkapillaren (Hund und Katze). Abhängig von der gemessenen Glukosekonzentration wird die Menge an zu verabreichendem Insulin berechnet.

Versuchsprinzip:

Das aufgetropfte Blut wird über eine Kapillare im Teststreifen in eine Reaktionskammer angesogen. Diese enthält das Enzym Glucoseoxidase. Die Glucoseoxidase katalysiert unter Anwesenheit von Luftsauerstoff die Oxidation von Glukose ($C_6H_{12}O_6$) in Gluconolacton ($C_6H_{10}O_6$), wobei der freiwerdende Wasserstoff mit dem Luftsauerstoff zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert.



Bei Einführen des Teststreifens in das Glucometer wird die Reaktionskammer über integrierte Elektroden mit einer Spannungsquelle verbunden und dadurch das entstandene Wasserstoffperoxid elektrolytisch oxidiert.

Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf die Kathode übertragen und der Stromfluss wird amperimetrisch gemessen. Das chemische Signal wird somit in ein elektrisches Signal umgewandelt und der Messwert rechnerisch interpretiert. Die Höhe des Messwertes ist somit proportional zur Glukosekonzentration.

Versuchsdurchführung:

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration wird zunächst mit einer Lanzette bei einem **freiwilligen, nüchternen** Probanden eine Fingerkuppe angestochen und ein Tropfen Blut mit dem entsprechenden Testplättchen aufgefangen. Das Messergebnis wird abgelesen und festgehalten.

Anschließend nimmt der Proband Nahrung zu sich und die Messung wird nach dem oben beschriebenen Versuchsprinzip nach ca. 1 - 2 Stunden wiederholt.

Messwert 1:

Messwert 2:

In welchem Verhältnis hat sich die gemessene Glukosekonzentration verändert?

7.2 Insulinnachweis mit Dot Blot

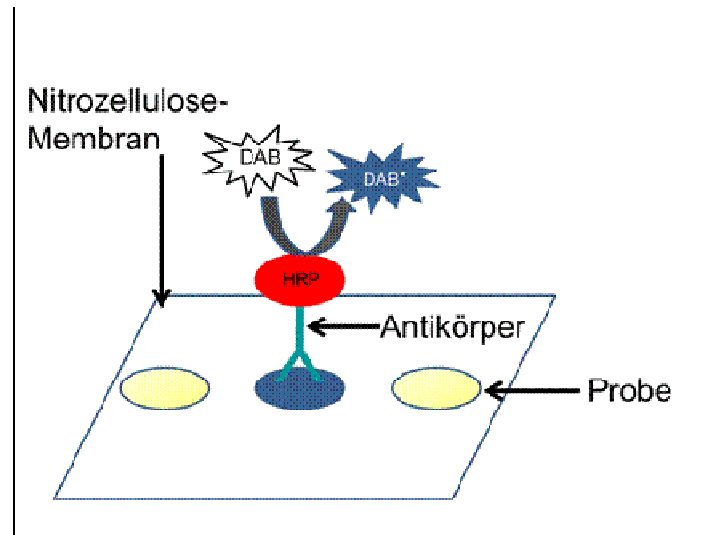
Versuchsprinzip:

Der Dot Blot ist eine einfache Methode, um Proteine in einer Probe nachzuweisen. Im Unterschied zum Western Blot werden die Proteine vor dem Nachweis nicht mittels Elektrophorese getrennt.

Um das kleine Peptid Insulin nachweisen zu können, muss es mit größeren Proteinen vernetzt werden (BSA in der Verdünnungs-Lösung).

Die Probe wird dann direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen (Dot = Punkt) und das gesuchte Protein mittels eines Antikörpers detektiert. An den Antikörper ist ein Enzym gebunden (HRP, Horse Radish Peroxidase, Meerrettichperoxidase), welches den Farbstoff Diaminobenzidin (DAB) zu einem unlöslichen, blau-grauen Präzipitat umsetzt (DAB*).

Der Dot Blot kann als semi-quantitative Nachweismethode genutzt werden.



Fragestellung: In unserem Versuch soll in einer Probe die unbekannte Konzentration des Insulins durch Vergleich mit der Standard-Reihe abgeschätzt werden.

Versuchsdurchführung:

Während des gesamten Versuches sind Handschuhe zu tragen!

1. Herstellung einer Insulin-Standard-Reihe und der Kontrolle

Aus einer Insulin-Stammlösung (1 mg/mL) werden in einer Verdünnungsreihe mit einer BSA-haltigen Lösung (0,1 % bovines Serumalbumin in H₂O) 3 Standard-Lösungen hergestellt und auf Eis gestellt.

Verdünnungsreihe

Es werden 3 Plastiktubes (1,5 mL) beschriftet und nach folgendem Schema befüllt:

	Standard 1 0,1 mg/mL	Standard 2 0,02 mg/mL	Standard 3 0,004 mg/mL
Verdünnung (1 : ?)	1 :	1 :	1 :
	Stammlösung (1 mg/mL)	Standard 1 (0,1 mg/mL)	Standard 2 (0,02 mg/mL)
	µL	µL	µL
BSA-Lösung	µL	µL	µL
Endvolumen	100 µL	100 µL	100 µL

2. Zugabe von Glutardialdehyd

Die Standard-Lösungen, die Probe und die BSA-Lösung (_____ -Kontrolle) werden mit 50%iger Glutardialdehydlösung verdünnt.

In der Endverdünnung soll das Glutardialdehyd in einer Konzentration von 4% vorliegen und das Endvolumen soll 25 μL betragen.

Es werden 5 Plastiktubes (1,5 mL) beschriftet und nach folgendem Schema befüllt:

Pro Tube:

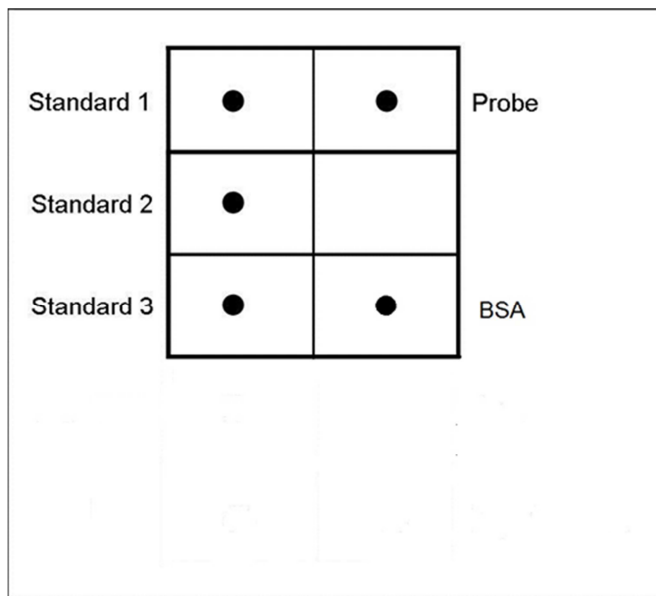
je Standard (3x), Probe (1x), BSA-Kontrolle (1x): _____ μL

Glutardialdehyd (50%): _____ μL

Die Standard-Lösungen, die Probe und die BSA-Lösung werden mit Glutardialdehyd inkubiert (15 Minuten bei 37°C). Hierbei fungiert Glutardialdehyd als Cross-linker zwischen Insulin und BSA, wodurch eine stabile Vernetzung der Moleküle ermöglicht wird.

3. Auftropfen der Proben, Standards und Kontrolle

Es wird jeweils 1 μL von den Standard-Lösungen, der Probe und dem BSA auf die Membran aufgetragen.



Anschließend lässt man die Membran trocknen.

4. Blockierung der Membran

Die Membran wird mit ca. 5 mL Blockierlösung (5% BSA in Puffer) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Erklären Sie warum!

5. Antikörper

Aus einer Stammlösung des anti-Insulin Antikörpers (Maus anti-Schwein-Insulin, IgG-Fraktion, monoklonal, HRP konjugiert) wurden 3 mL Gebrauchslösung durch Verdünnung (1:150000) mit 0,1% BSA in Puffer hergestellt und bereitgestellt und von der/dem Assistentin/en ausgegeben.

Die Blockierlösung wird vorsichtig abgegossen und die Membran mit der Antikörper-Gebrauchslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

6. Waschen

Die Membran wird 3x5 Minuten mit ca. 4 mL Wasch-Puffer gespült.

7. Detektion

Die Membranen werden kurz mit der bereitgestellten DAB-Lösung inkubiert. Bei Sichtbarwerden des blau-grauen Präzipitates wird die Färbung gestoppt und die DAB-Lösung in die dafür vorgesehenen Abfallflaschen gegossen (**Achtung: DAB ist ein Giftstoff! Bitte nicht in den Ausguss entsorgen!**) und die Membran mit H₂O kurz gewaschen. Anschließend lässt man die Membran trocknen.

8. Auswertung:

Die Konzentration des Insulins kann mittels Farbvergleich mit den Standards abgeschätzt werden.

Geschätzte Konzentration: _____

7.3 Charakterisierung und Trennung von Vitaminen

Vitamine sind organische Verbindungen, die für lebenswichtige Funktionen (nicht Energiegewinnung!) essentiell sind, vom Organismus aber zum größten Teil nicht selbst synthetisiert werden können. Sie müssen deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. Einige Vitamine können auch als Vorstufen (Provitamine) aufgenommen werden, die der Körper dann in die biologisch aktive Form umwandelt.

Vitamine werden in zwei Klassen eingeteilt:

- wasserlösliche Vitamine (z.B. Vitamin B₂ = Riboflavin, Vitamin C)
- fettlösliche Vitamine: A, D, E, K (EDeKA)

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein Zuckerderivat, welches von den meisten Spezies selbst gebildet werden kann. Eine Aufnahme aus der Nahrung ist abgesehen vom Menschen (Tagesbedarf 200-300mg), insbesondere beim Meerschweinchen (Tagesbedarf 10-15mg) sowie bei Primaten (>1g) notwendig. Vitamin C ist ein wichtiges Antioxidans. Darüber hinaus ist es beteiligt an:

- Hydroxylierung von
 - Prolin (Kollagenbiosynthese)
 - Steroiden
 - Dopamin (zu Noradrenalin)
 - Tryptophan (zu 5-Hydroxytryptophan)
- Umbaus der Aminosäure Tryptophan zu Serotonin
- Bildung von Gallensäuren
- Abbau cyclischer Aminosäuren
- Carnithinbiosynthese

Aufgabenstellung:

Es sollen verschiedene Nahrungsquellen auf ihren Vitamin C-Gehalt untersucht werden: Apfel, Petersilie, rote Paprika und herkömmliche Vitamin C Tropfen für Meerschweinchen (Vitakraft).

Aus den oben genannten Nahrungsquellen werden Proben entnommen und mit zwei verschiedenen Verfahren der Vitamin C-Gehalt ermittelt.

Erstellen Sie ein Kurzprotokoll für die Extraktion des Vitamin C aus den verschiedenen Proben.

Versuchsdurchführung:

A. Schnellnachweis: Quantofix[®]-Teststäbchen Ascorbinsäure (M&N) zum Vitamin C-Nachweis

Die Extrakte der entsprechenden Proben werden nacheinander auf die Teststäbchen getropft. Anschließend erfolgt der Abgleich mit der angegebenen Farbskala.

B. Tillmans-Reagenz

In einem Erlenmeyerkolben wird 1 mL des zu untersuchenden Extraktes, bzw. Standards (1 mg/mL) vorgelegt. Dazu werden 9 mL Wasser pipettiert. Es wird bis zum Farbumschlag mit DCPIP titriert. Der Versuch ist **zweimal** durchzuführen. Aus den ermittelten Verbrauchsmengen an DCPIP wird der Mittelwert gebildet und anschließend die Konzentration von Vitamin C errechnet.

Messwert Standard (1 mg/mL) in mL:

Messwert 1 in mL:

Messwert 2 in mL:

Mittelwert in mL:

Vitamin C-Gehalt: Ascorbinsäure (mg) = $\frac{\text{verbrauchte mL}}{\text{verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard}} \cdot$

*Verbrauchte mL = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens pro Nahrungsquelle/Probe
 Verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens bei der Titration des Standards

C. Berechnung der benötigten Tagesmenge des jeweiligen Futtermittels:

	Ergebnis in mg		Literaturwerte	Benötigte Tagesmenge (in g)
	Teststäbchen	Tillmanns Reagenz		
Apfel				
Paprika, rot				
Petersilie				
Vitamin C Tropfen				

Welche Angaben zur Vitamin C Konzentration der untersuchten Nahrungsmittel finden sich in der Literatur?

Diskutieren Sie ob die unterstützende Gabe von Vitamintropfen beim Meerschweinchen sinnvoll ist.