

ESERCITAZIONE

DOSAGGIO DEL GLUCOSIO IN SIERO mediante saggio enzimatico COLORIMETRICO dell'esochinasi HK

REAGENTI DEL KIT:

- Reagente di saggio (RS): soluzione contenente:
1,5 mM NAD; 1,0mM ATP, 1.0 u/mL di esochinasi (hk), 1.0 u/ml di glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PDH).
- Glucosio standard 0,1 mg/ml in H₂O (GS)

REAGENTI NECESSARI NON PRESENTI NEL KIT:

- H₂O Bidistillata
- SIERO: 100 uL di Siero precedentemente diluito 1:10 in acqua bidistillata (10 uL di siero, 90 uL di acqua distillata).
- La concentrazione attesa nel siero è dell'ordine di 1 mg/ml (supponendo che il soggetto sia sano). Potremmo usarlo tal quale, ma per risparmiare materiale, lo diluiamo 1:10 per portarlo a 0,1 ug/ul.

NB il protocollo richiede di dispensare in ogni pozzetto una quantità di glucosio tra i 0,5 e i 50 ug. Aggiungendo 20 ul di siero diluito 1:10, ci aspettiamo di dispensare dunque circa 2 ug di glucosio per ogni pozzetto.

PROTOCOLLO:

Utilizzando una micropipetta opportuna dotata di puntale, dispensare, in ognuna delle eppendorf vuote a disposizione, un volume totale di 200 uL, secondo il seguente schema:

	SIERO dil 1:10 (uL)	H₂O (ul)	RS Reagente di Saggio (uL)	GS Glucosio Standard 0,1 ug/ul (uL)	
1	20	180	-	-	SB (Bianco campione)
2	-	20	180		RB (Bianco reagente)
3	20		180		S (campione)
4		180		20	GB (Bianco glucosio)
5			180	20	GS (glucosio standard)

Incubare 15 minuti: in questo tempo, la reazione andrà a saturazione.

Effettuare la lettura dell'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 340 nm nel seguente modo:

Con una micropipetta trasferire i 200 uL della soluzione contenuta in ogni eppendorf in un pozzetto della piastra, facendo attenzione a non fare bolle nel pozzetto: dispensare lentamente appoggiando il puntale su una parete laterale.

Portare la micropiastra al lettore multifunzione e

Registrare il valore di assorbanza di ogni pozzetto alla lunghezza d'onda di 340 nm.

CALCOLI

Su un **foglio di calcolo** (vedi link sotto) riportare i valori di assorbanza a 340 nm letti per ogni pozzetto.

CAMPIONE

Calcolare l'Assorbanza del campione A_{campione} effettiva sottraendo al valore dell'assorbanza del campione A_s quella del bianco (operazione di SOTTRAZIONE DEL BIANCO da effettuare SEMPRE!!!!):

$$A_{\text{campione}} = A_s - (A_{\text{sb}} + A_{\text{rb}})$$

Dalla legge di Lambert e Beer ricavare la concentrazione molare di NADH presente nel pozzetto:

$$A_{\text{campione}} = \epsilon \cdot c_{\text{mol}} \cdot d$$

dove ϵ = coefficiente di estinzione molare di NADH a 340 nm:

$$\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

c_M = concentrazione molare di NADH \equiv concentrazione molare di glucosio

(La conc. molare di NADH corrisponde alla concentrazione molare di glucosio presente nel campione: per ogni molecola di glucosio si forma una molecola di NADH)

d = cammino ottico: per un volume di 200 μL in una piastra da 96 pozzetti,

$$d = 0,6 \text{ cm}$$

$$\Rightarrow c_M = A_{\text{campione}} / (\epsilon \cdot d) = A_{\text{campione}} / (6220 \cdot 0,6)$$

Per ricavare la concentrazione peso/volume $C_{\text{mg/ml}}$ del glucosio, moltiplichiamo il valore della concentrazione molare per il peso molecolare del glucosio:

$MW = 180,2 \text{ g/mole}$:

$$C_{\text{mg/ml}} = c_M \cdot MW = c_M \cdot 180,2$$

Risaliamo alla concentrazione di glucosio nel siero (c_{siero}) moltiplicando per il fattore di diluizione totale: diluizione del campione di partenza (il siero fornito era già diluito 1:10) e la diluizione in cuvetta: 20 ul su 200 ul totali: altra diluizione 1:10, quindi il fattore di diluizione totale è di $10 \times 10 = 100$

$$c_{\text{siero}} = C_{\text{mg/ml}} \cdot 100 \text{ (mg/ml)}$$

STANDARD

Per validare i nostri risultati, ripetiamo le stesse operazioni con il glucosio standard (concentrazione attesa, $c_{\text{attesa}} = 0,1 \text{ mg/ml}$) e verifichiamo che la concentrazione calcolata corrisponda al valore atteso.

$$A_{\text{glucosio}} = A_{\text{gs}} - (A_{\text{gb}} + A_{\text{rb}})$$

$$c_M = A_{\text{glucosio}} / \epsilon \cdot d = A_{\text{glucosio}} / (6220 \cdot 0,6)$$

$$C_{\text{mg/ml}} = c_M \cdot MW = c_M \cdot 180,2$$

$$c_{\text{glucosio}} = C_{\text{mg/ml}} \cdot 10 \text{ (mg/ml)} \text{ (qui abbiamo solo la diluizione in pozzetto)}$$

Calcoliamo l'errore come deviazione standard dal valore atteso :

$$\text{errore} = \text{rad.q.} ((c_{\text{attesa}} - c_{\text{glucosio}})^2) = \text{rad.q.} ((0,1 - c_{\text{glucosio}})^2) \text{ (mg/ml)}$$

L'errore relativo nello standard è lo stesso che nel nostro campione

Effettuiamo la diagnosi

LINK AL FOGLIO DI CALCOLO (FOGLI GOOGLE):

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/19Tj9ZjOidWkO8s3R0xIFqEBpwqVjWoEfr9mjUFVbj5k/edit?usp=sharing>

CALCOLI GLICEMIA			coeff estinzione molare NADH ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)		peso molecolare glucosio (g/mol)		cammino ottico	
n pozzetto	CAMPIONE	A 340 nm (u. a.)	epsilon	6220	MW	180,2	d (cm)	0,6
1	SB	0,329						
2	RB	0,002						
3	CAMPIONE	0,484						
4	GB	0,002						
5	GLUC. ST.	0,526						
SIERO			GLUCOSIO STANDARD		CALCOLO DELL'ERRORE SULLO STANDARD			
A campione	0,153		A glucosio	0,195	C aspettata (mg/m)	0,1		
C molare (Moli/L)	0,0000410		C molare (Moli/Litro)	0,000	errore	0,0058	SD	
C (mg/ml)	0,007388		C (mg/ml)	0,009	errore relativo	0,0584		
fattore di diluizione	100,000		fattore di diluizione	10,000				
C siero (mg/ml)	0,7388		C glucosio (mg/ml)	0,094				
errore siero (mg)	0,043							

DIAGNOSI		
	VALORE (mg/ml)	ERRORE (mg/ml)
GLICEMIA	0,74	0,04

