

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)

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 (uL)	H2O (ul)	RS Reagente di saggio (uL)	GS Glucosio standard (uL)	
1		20	180		BR (Bianco reagente)
2	20		180		CAMPIONE
3			180	20	ST

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

Effettuare la lettura dell'assorbimento 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 ΔA campione sottraendo all'assorbanza del campione quella del bianco (operazione di SOTTRAZIONE DEL BIANCO da effettuare SEMPRE!!!!):

$$\Delta A_{\text{campione}} = A_{\text{campione}} - A_{\text{BR}}$$

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

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

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

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

c_{mol} = 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,

$$d = 0,5 \text{ cm}$$

$$\Rightarrow c_{\text{mol}} = \Delta A_{\text{campione}} / \epsilon \cdot d = \Delta A_{\text{campione}} / (6220 \cdot 0,5)$$

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

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

$$C_{\text{mg/ml}} = c_{\text{mol}} * MW = c_{\text{mol}} * 180,2$$

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 $10 \times 10 = 100$

$$C_{\text{siero}} = C_{\text{mg/ml}} * 100$$

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.

$$\Delta A_{\text{st}} = A_{\text{st}} - A_{\text{BR}}$$

$$c_{\text{mol}} = \Delta A_{\text{st}} / \epsilon * d = \Delta A_{\text{st}} / (6220 * 0,5)$$

$$C_{\text{mg/ml}} = c_{\text{mol}} * MW = c_{\text{mol}} * 180,2$$

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

Calcoliamo l'errore nella determinazione dallo standard:

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

Effettuiamo la diagnosi

LINK AL FOGLIO DI CALCOLO (FOGLI GOOGLE):

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

CALCOLI GLICEMIA

n pozzetto	CAMPIONE	A 340 nm (u.a.)	coeff estinzione molare NADH ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	peso molecolare glucosio (g/mol)	cammino ottico	
1	BR	0,331	epsilon	6220	MW	180,2 d (cm)
2	CAMPIONE	0,484				0,5
3	GLUC. ST.	0,526				
SIERO		GLUCOSIO STANDARD		CALCOLO DELL'ERRORE SULLO STANDARD		
DA campione	0,153	DA glucosio	0,195	C aspettata (mg/ml)	0,1	
C molare (Moli/L)	0,000049196	C molare (Moli/Litro)	0,000062700964	errore	0,01298713826	ERRORE NELLA DETERMINAZIONE
C (mg/ml)	0,00886514	C (mg/ml)	0,01129871383	errore relativo	0,1298713826	
fattore di diluizioi	100,000	fattore di diluizione	10	errore percentuale	12,99%	
C siero (mg/ml)	0,886514	C glucosio (mg/ml)	0,1129871383			
			0,2259742765			

DIAGNOSI		
	VALORE (mg/ml)	ERRORE (mg/ml)
GLICEMIA	0,89	0,12

