

ESERCITAZIONE

Basi di Diagnostica, Prof Giacominielli Stuffer

PARTE 1:

Verifica taratura micropipette

Ogni gruppo è stato fornito di una micropipetta di opportuna capacità che deve essere verificata nel seguente modo:

- 1) verificare il range di capacità della propria micropipetta (max-min) se la minima non è riportata, chiedere all'esercitatore.
- 2) Verificare come settare il volume desiderato girando il reostato. Prima di forzare, capire dove sono le cifre che indicano le centinaia, decine, unità ed eventualmente decimali
- 3) verificare la sensibilità dello strumento
- 4) Settare lo strumento ad un volume di 100,0 ul
- 5) inserire il puntale
- 6) prelevare 100 ul di H₂O e dispensarli in un tubo da centrifuga a disposizione (capacità massima 600 ul)
- 7) Verificare che il volume nominale corrisponda a quello effettivamente dispensato.
- 8) Ripetere la prova per conferma

Parte 2:
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 1 µg/µl in H₂O (GS)

MATERIALE NECESSARIO NON PRESENTI NEL KIT:

- smartphone per fare una foto dei valori di assorbanza al lettore di micropiastre
- H₂O Bidistillata
- 1 micropipetta (capacità massima 200 µl)
- puntali per micropipetta
- piastra trasparente da 96 pozzetti a fondo piatto
- SIERO: 100 µL di Siero.

NB: La concentrazione attesa nel siero è dell'ordine di 1 mg/ml (supponendo che il soggetto sia sano).

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, ci aspettiamo di dispensare dunque circa 20 ug di glucosio per ogni pozzetto.

PROTOCOLLO:

Utilizzando la micropipetta **dotata di puntale**, dispensare, in 5 pozzetti della piastra, un volume totale di 200 μL , secondo il seguente schema, facendo attenzione a non fare bolle nel pozzetto (dispensare lentamente, appoggiando il puntale su una parete laterale).

	SIERO (μL)	H₂O (μL)	RS Reagente di Saggio (μL)	GS Glucosio Standard (μL)	
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:

Portare la micropiastra al lettore multifunzione e registrare (foto) 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 letto (A_s) quella del bianco (A_{bl}) (operazione di SOTTRAZIONE DEL BIANCO da effettuare SEMPRE!!!!):

$$A_{\text{campione}} = A_s - A_{bl}$$

$$\text{dove } A_{bl} = (A_{sb})$$

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,

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

$$\Rightarrow c_M = A_{\text{campione}} / (\epsilon \cdot d) = A_{\text{campione}} / (6220 \cdot 0,6) = A_{\text{campione}} / 3732$$

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

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

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

Risaliamo alla concentrazione di glucosio nel siero (c_{siero}) moltiplicando per il fattore di diluizione in pozzetto: 20 ul su 200 ul totali:, quindi il fattore di diluizione totale è di 10

$$c_{\text{siero}} = c_{\text{mg/ml}} * 10 \text{ (mg/ml)}$$

STANDARD

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

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

$$c_M = A_{\text{glucosio}} / \epsilon * d = A_{\text{glucosio}} / 3732$$

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

$$c_{\text{glucosio}} = c_{\text{mg/ml}} * 10 \text{ (mg/ml) (diluizione in pozzetto)}$$

Calcoliamo l'errore come deviazione standard (sd) dal valore atteso :

$$sd = \sqrt{(c_{\text{attesa}} - c_{\text{glucosio}})^2} = \sqrt{(1 - c_{\text{glucosio}})^2} \text{ (mg/ml)}$$

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

Errore relativo (er) = sd/valore

Effettuiamo la diagnosi

LINK AL FOGLIO DI CALCOLO (FOGLI GOOGLE) da scaricare sul proprio drive per modificare:

 calcoli dosaggio glucosio

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	SB	0,23	epsilon	6220	MW
2	RB	0,21			180,2
3	CAMPIONE	1,759			d (cm)
4	GB	0,214			0,6
5	GLUC. ST.	1,728			
SIERO			GLUCOSIO STANDARD		CALCOLO DELL'ERRORE SULLO STANDARD
A campione	1,319		A glucosio	1,304	C aspettata (mg/m)
C molare (Moli/L	0,0003534		C molare (Moli/Litro)	3,49E-04	1
C (mg/ml)	0,063688		C (mg/ml)	0,063	errore
fattore di diluizio	10,000		fattore di diluizione	10,000	0,3704 SD
C siero (mg/ml)	0,6369		C glucosio (mg/ml)	0,630	errore relativo
errore siero (mg)	0,037				0,3704

DIAGNOSI		
	VALORE (mg/ml)	ERRORE (mg/ml)
GLICEMIA	0,64	0,24

