

ESERCITAZIONE:

Dosaggio del glucosio in siero equino

Mediante saggio spettrofotometrico

Parte 2

Quantificazione di glucosio in siero equino

In commercio sono disponibili diversi kit di saggio.

Tutti i kit sono **enzimatici**.

Gli enzimi utilizzati, che hanno come substrato il D-glucosio sono :

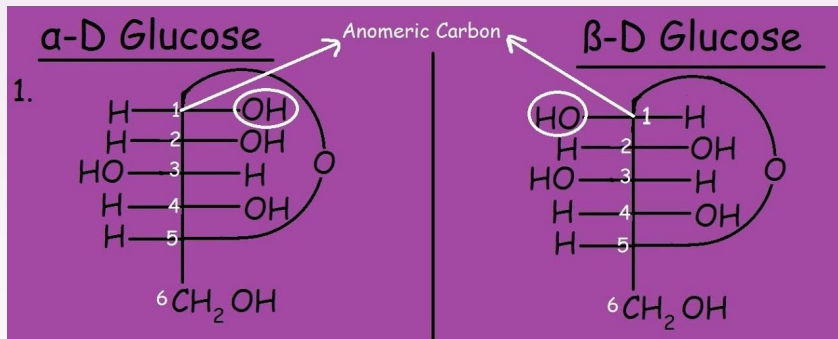
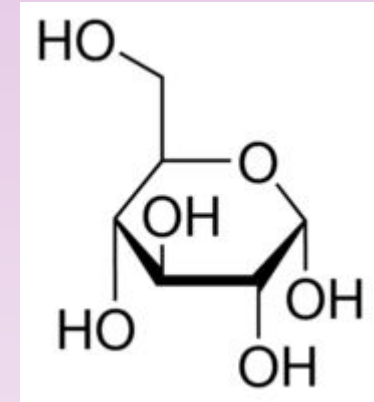
- 1) **Esochinasi (HK) (fosforilasi)**
- 2) **Glucosio ossidasi (GO) (ossodasi)**



**METODI
COLORIMETRICI**

- 3) **Mutarotasi (catalizza l'interconversione tra anomeri alfa e beta)**

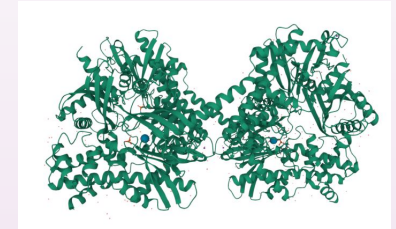
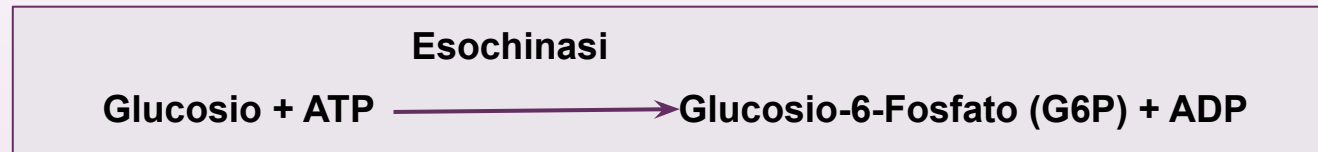
**METODO
POLARIMETRICO**



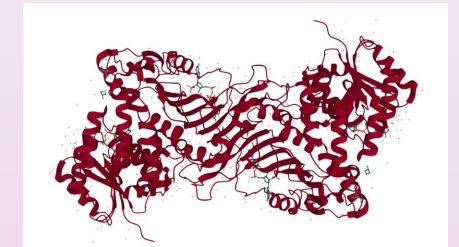
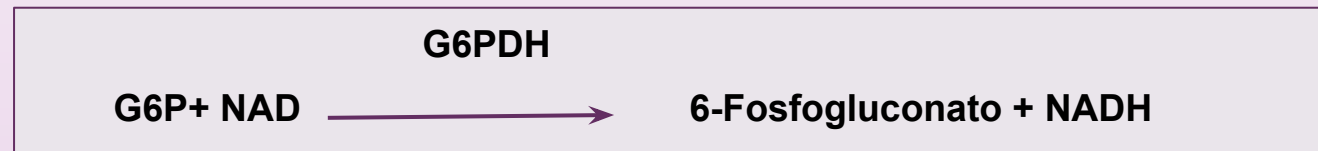
1) ESOCHINASI

DOPPIA REAZIONE ENZIMATICA:

1) **ESPOCHINASI** catalizza la fosforilazione di glucosio dall' ATP con produzione di ADP e glucosio 6 fosfato (G6P)



2) Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (**G6PDH**) catalizza l'ossidazione di G6P in presenza di NAD con produzione di 6-fosfogluconato e NADH.



NADH assorbe luce a 340 nm

=> L'ASSORBENZA A 340 nm DEL PRODOTTO DELLA II reazione (NADH) è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione

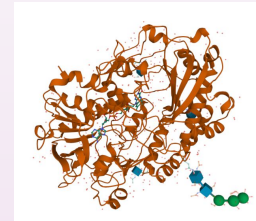
=> SAGGIO ENZIMATICO COLORIMETRICO

NB 340 nm: Limite tra la regione UV e visibile. Regione dove le 2 lampade (UV e vis) di uno spettrofotometro tradizionale devono sovrapporre il segnale

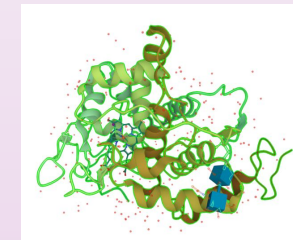
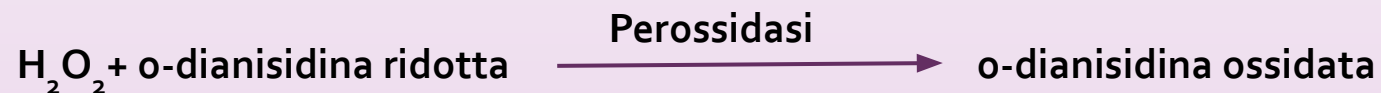
2) GLUCOSIO OSSIDASI (che vedremo in dettaglio)

DOPPIA REAZIONE ENZIMATICA:

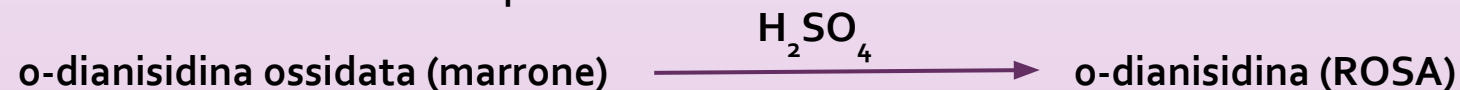
- 1) **GLUCOSIO OSSIDASI (GO)** catalizza l'ossidazione del glucosio in presenza di ossigeno con produzione di acido gluconico e perossido di idrogeno (H_2O_2)



- 2) la **PEROSSIDASI** catalizza l'ossidazione di o-dianisidina ridotta in presenza di H_2O_2 , con produzione di o-dianisidina ossidata (marrone, instabile)



- 3) l'acido solforico reagisce con la o-dianisidina ossidata formando un prodotto **di colore ROSA** stabile nel tempo



O-dianisidina ossidata assorbe la luce a 540 nm (PIENA REGIONE VISIBILE)
=> l'assorbanza a 540 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente

RICHIAMO DI TEORIA: SPETTROFOTOMETRIA

Legge di Lambert-Beer:

$$A=abc$$

A = Assorbanza = $\log(1/T)$. T = trasmittanza = I/I_0 ADIMENSIONALE

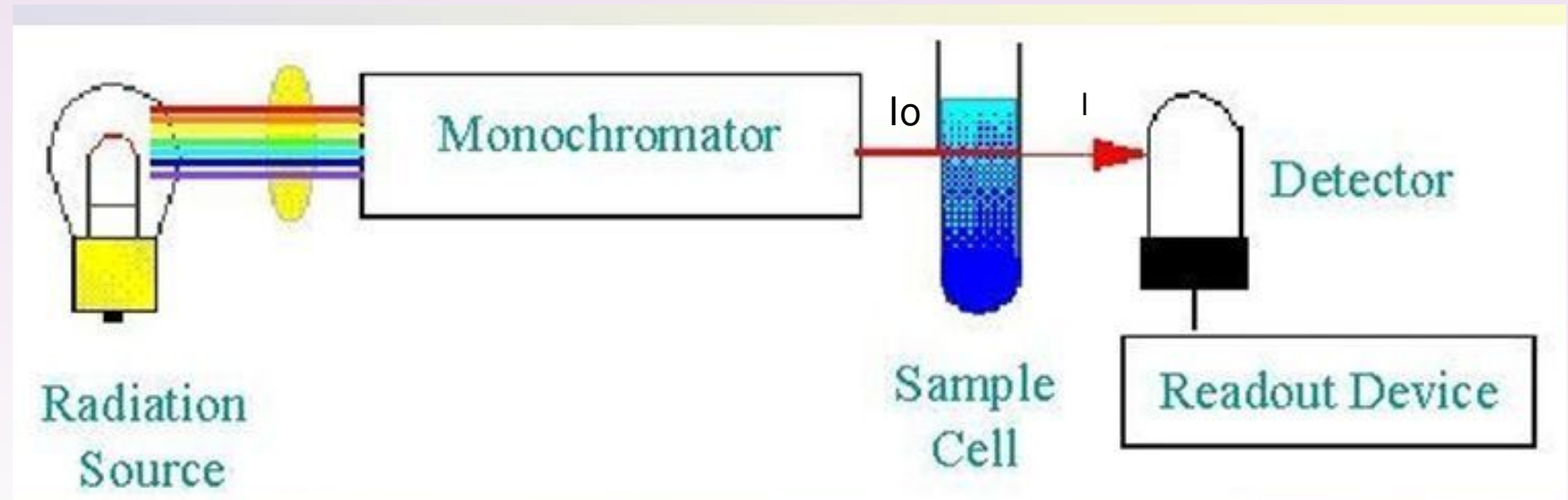
a = una data lunghezza d'onda, coefficiente di estinzione (molare oppure peso/volume) tipico della molecola [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] oppure [$\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

b = cammino ottico percorso dalla luce all'interno del campione [cm]

c = concentrazione del campione (molare oppure peso/volume) [M] oppure [mg ml^{-1}]

Dobbiamo quindi avere bene in mente se ricaveremo la concentrazione espressa in peso/volume o in molare.

Spettrofotometro tradizionale: 2 lampade
UV: 200-350 nm DEUTERIO
VIS 350-700 nm TUNGSTENO





REAGENTI NON PRESENTI NEL KIT

CAMPIONE:

Siero equino

H₂SO₄ Acido solforico 6M

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Sostanze o miscele corrosive per i metalli (Categoria 1), H290

Corrosione cutanea (Sottocategoria 1A), H314

Lesioni oculari gravi (Categoria 1), H318

Per quanto riguarda il testo completo delle indicazioni di pericolo menzionate in questo paragrafo, riferirsi al paragrafo 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza

Indicazioni di pericolo

H290

H314

Consigli di prudenza

P280

Pericolo

Può essere corrosivo per i metalli.

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

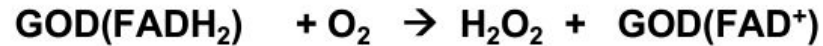
Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

Esempio 1: biosensore glucosio

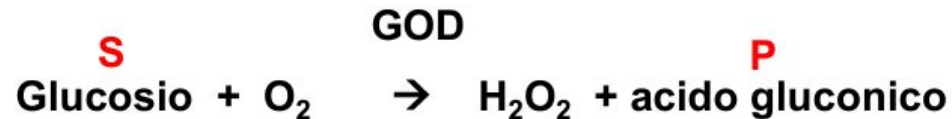
- La maggior parte dei biosensori per il glucosio sono basati sull'ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio-ossidasi (GOD).
 - L'enzima GOD, di solito estratto da funghi, ossida il glucosio secondo la reazione seguente



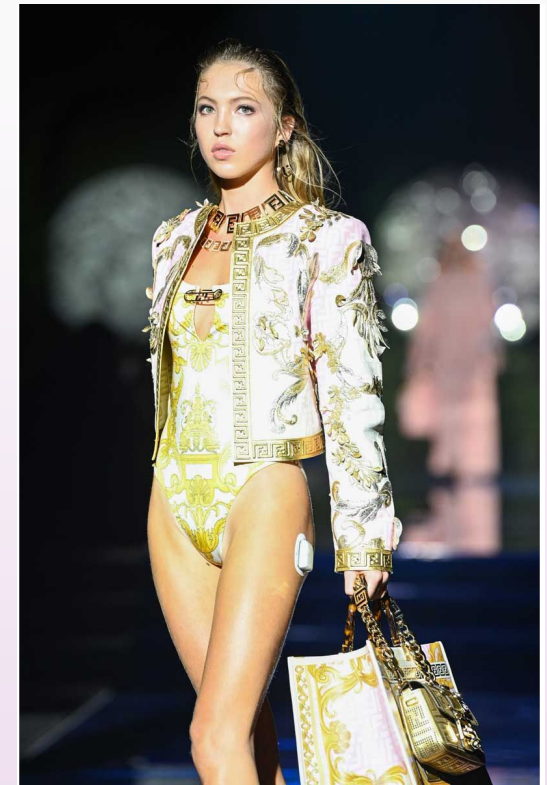
- Dove FAD è una flavina che funziona da cofattore dell'enzima GOD a cui è legato.
- Il GOD (FADH₂) è solitamente riossidato tramite reazione con ossigeno



- La sequenza di reazioni enzimatiche può essere riassunta come:



La concentrazione del prodotto può essere determinata con diversi metodi, una dei più utilizzati è quello elettrochimico in cui viene misurato la diminuzione di pH dovuta al prodotto (acido gluconico). Un'altra possibilità è quella di rilevare una riduzione locale della pressione parziale di O₂



Lila Moss in passerella per Versace con il cerotto CGM, 2021

Continuous Glucose Monitoring in Veterinary Patients

<https://todaysveterinarypractice.com/diagnostics/continuous-glucose-monitoring-in-veterinary-patients/>

CGMs for companion animals with diabetes have become more commonplace in veterinary medicine as the advancement and affordability have progressed past more traditional methods.



Figure 1. The adhesive side of a CGM sensor, after removal from a patient, showing the flexible polyurethane probe that stays in the interstitial space.

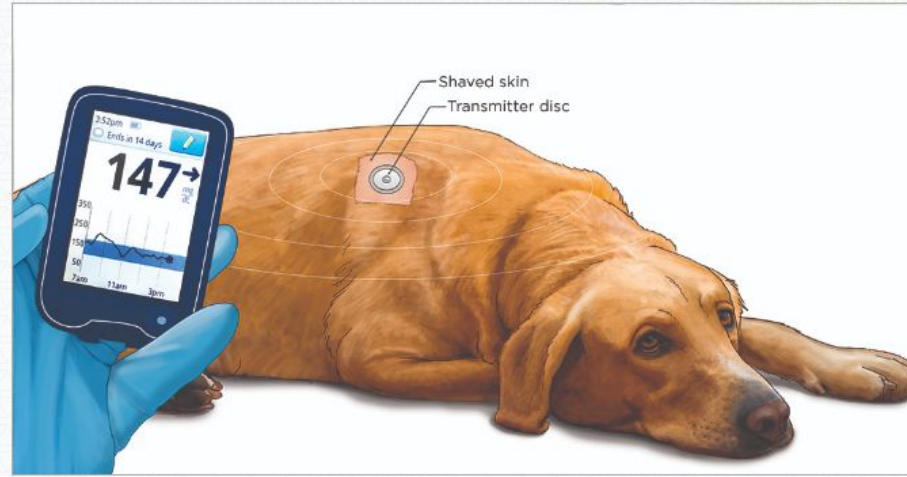


Figure 2. Components of a continuous glucose monitor. (B) The sensor records, stores, and transmits the data to the monitor. Illustration: Kip Carter

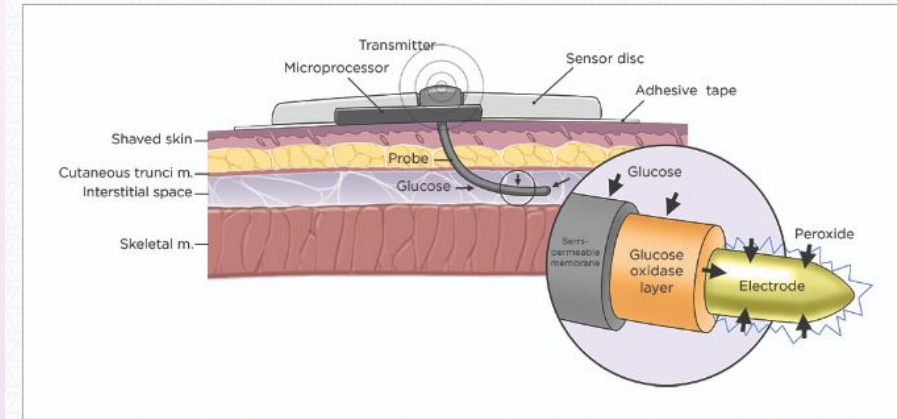


Figure 2. Components of a continuous glucose monitor. (A) The semipermeable membrane covering the subcutaneous probe allows glucose to pass through and come in contact with the inner layer, which contains glucose oxidase. The reaction of glucose with glucose oxidase creates hydrogen peroxide, generating an electrical current in direct proportion to the glucose concentration. The electrode at the center of the probe sends the signal to the external sensor, which translates the signal into a sensor glucose reading. Illustration: Kip Carter

Monitoring the feline diabetic with a continuous glucose monitor

As feline blood glucose is influenced by various factors such as stress in the veterinary clinic, a CGM can be useful to collect data over a longer period of time, including when stress-free at home



by **Samantha Taylor**
03 March 2022

 Read time: Approx 10 mins

<https://www.veterinary-practice.com/article/continuous-glucose-monitoring-feline-diabetes>

KIT GaGO

(Glucose Assay Glucose Oxidase, Sigma-Aldrich)

Merck

MERCK

Prodotti ▼ Fornisci nome del prodotto, numero di lotto, ecc.



IT | IT ▼

Applicazioni ▼ Prodotti ▼ Servizi ▼ Assistenza ▼

Account ▼ Ordine rapido ▼ Carrello 0



Tutte le immagini (1)

Documenti

[↓ SDS](#)

[🔍 CdO/CdA](#)

GAGO20 ▶ Sigma-Aldrich.

Glucose (GO) Assay Kit

★★★★★ (0)

sufficient for 20 assays

NACRES: NA.84

SKU	Taglio della confezione	Disponibilità	Prezzo	Quantità
GAGO20-1KT	1 KIT	🟢 Disponibile per la spedizione il 07 aprile 2022 Dettagli...	100,00 €	<input type="text" value="1"/> − + 📘

[Richiedi un ordine bulk](#)

[Aggiungi al carrello](#)

CONTENUTO DEL KIT GaGO



Vial 1: 100 unità di Perossidasi da rafano e 500 Unità di Glucosio Ossidasi da *Aspergillus niger*

(LIOFILIZZATE)

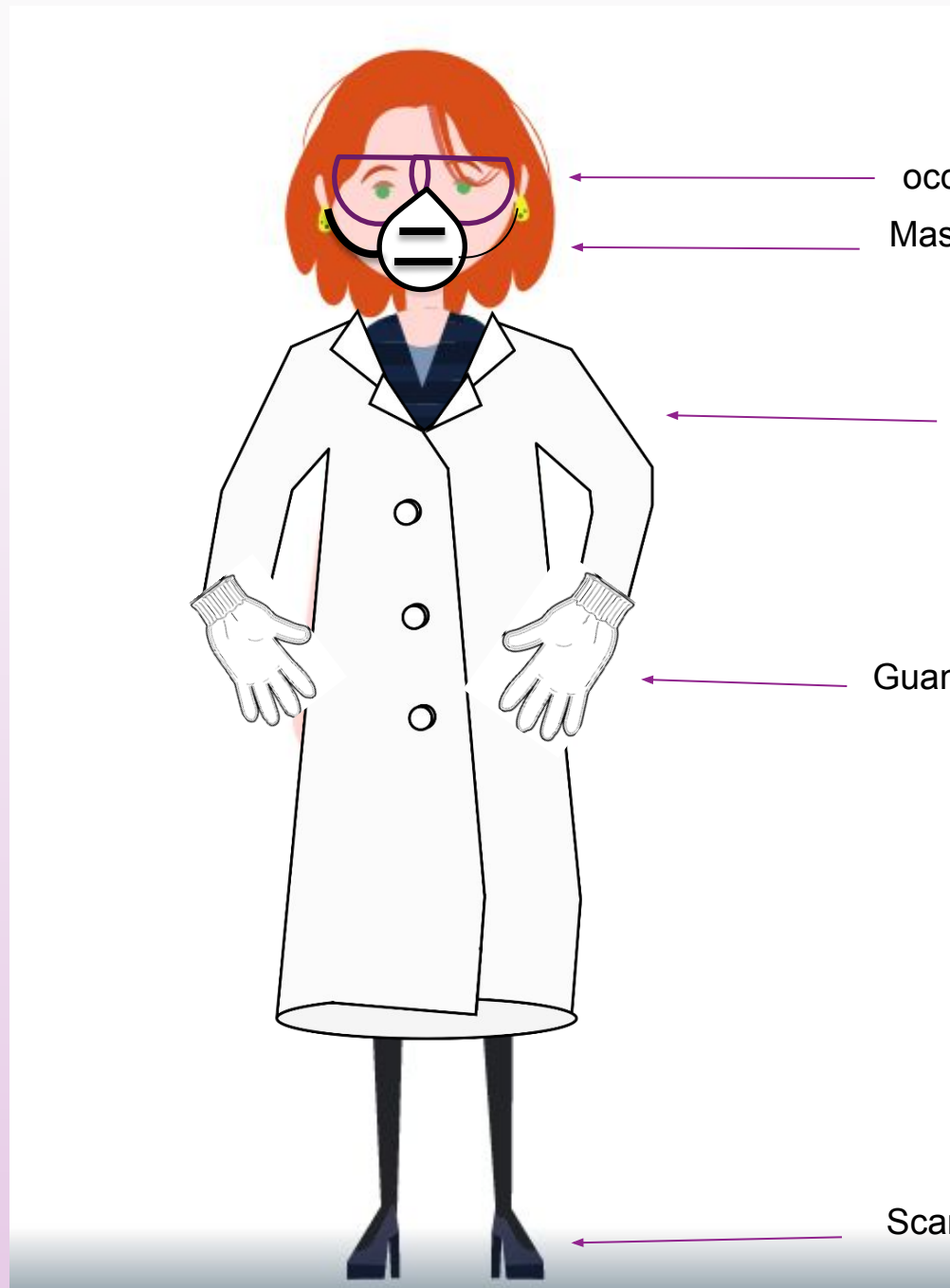
Vial 2: 5 mg O-dianisidina di-idrocloruro

Vial 3 (NON SI VEDE IN FOTO): 1ml di Soluzione **standard** di D-glucosio alla concentrazione di 0,1 mg/ml in 0.1% acido benzoico per la costruzione della retta di calibrazione

BOTTIGLIA AMBRATA vuota da 50 ml



DPI



occhiali

Mascherina

camice

Guanti (lattice o nitrile)

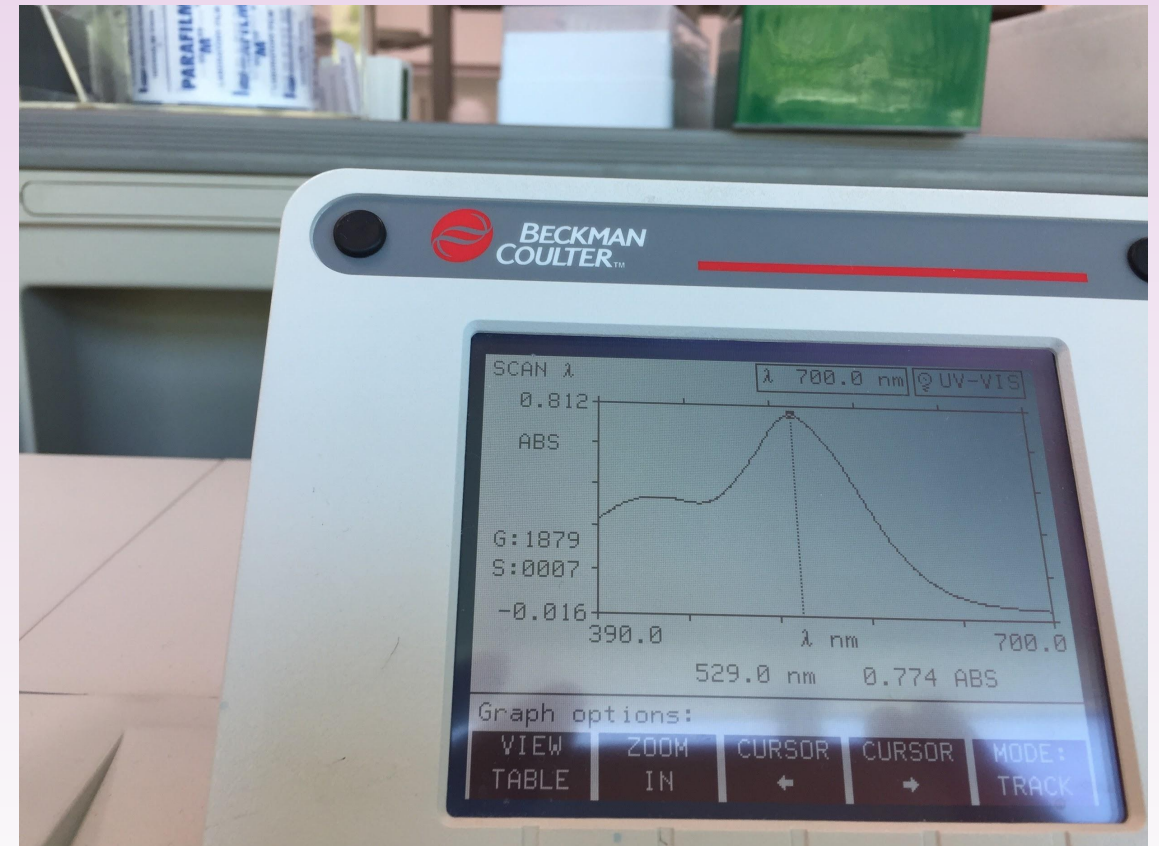
Scarpe chiuse

STRUMENTAZIONE

- 1) Spettrofotometro o colorimetro per leggere l'assorbanza della luce alla lunghezza d'onda di 540 nm
- 2) cuvette per spettrofotometro
- 3) provette (eppendorf) da 1,5 ml o 2 ml
- 4) micropipette dalla capacità da 20 μL a 2 mL e relativi puntali
- 5) termoblocco da settare alla temperatura di 37 °C

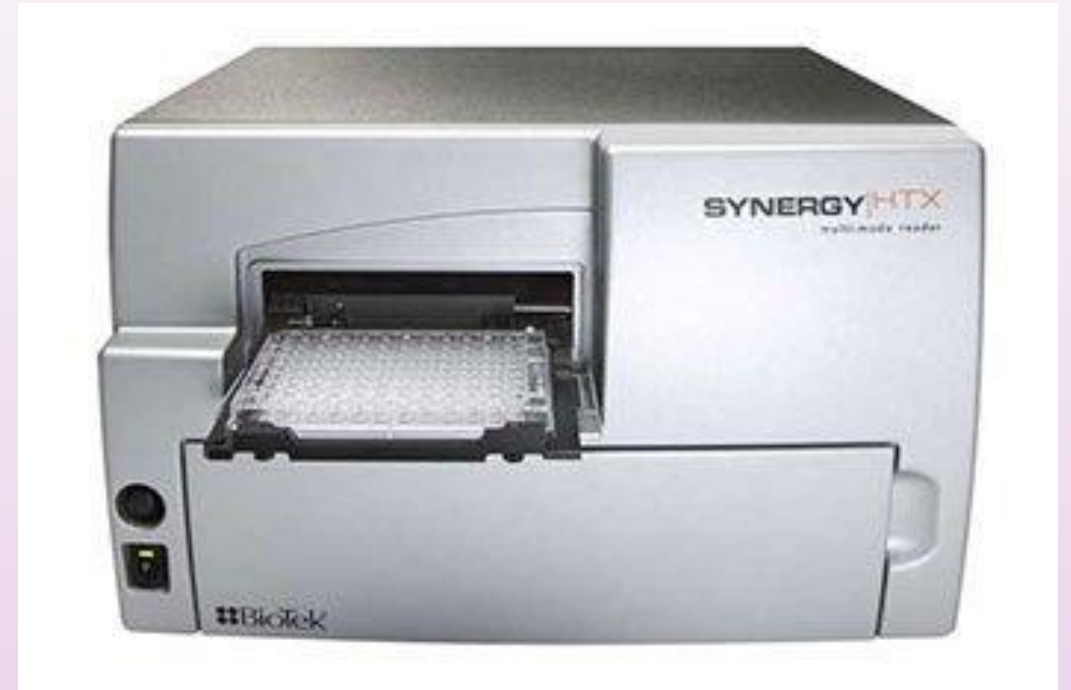
1) SPETTROFOTOMETRO

Observed Color of Compound	Color of Light Absorbed	Approximate Wavelength of Light Absorbed
Green	Red	700 nm
Blue-green	Orange-red	600 nm
Violet	Yellow	550 nm
Red-violet	Yellow-green	530 nm
Red	Blue-green	500 nm
Orange	Blue	450 nm
Yellow	Violet	400 nm



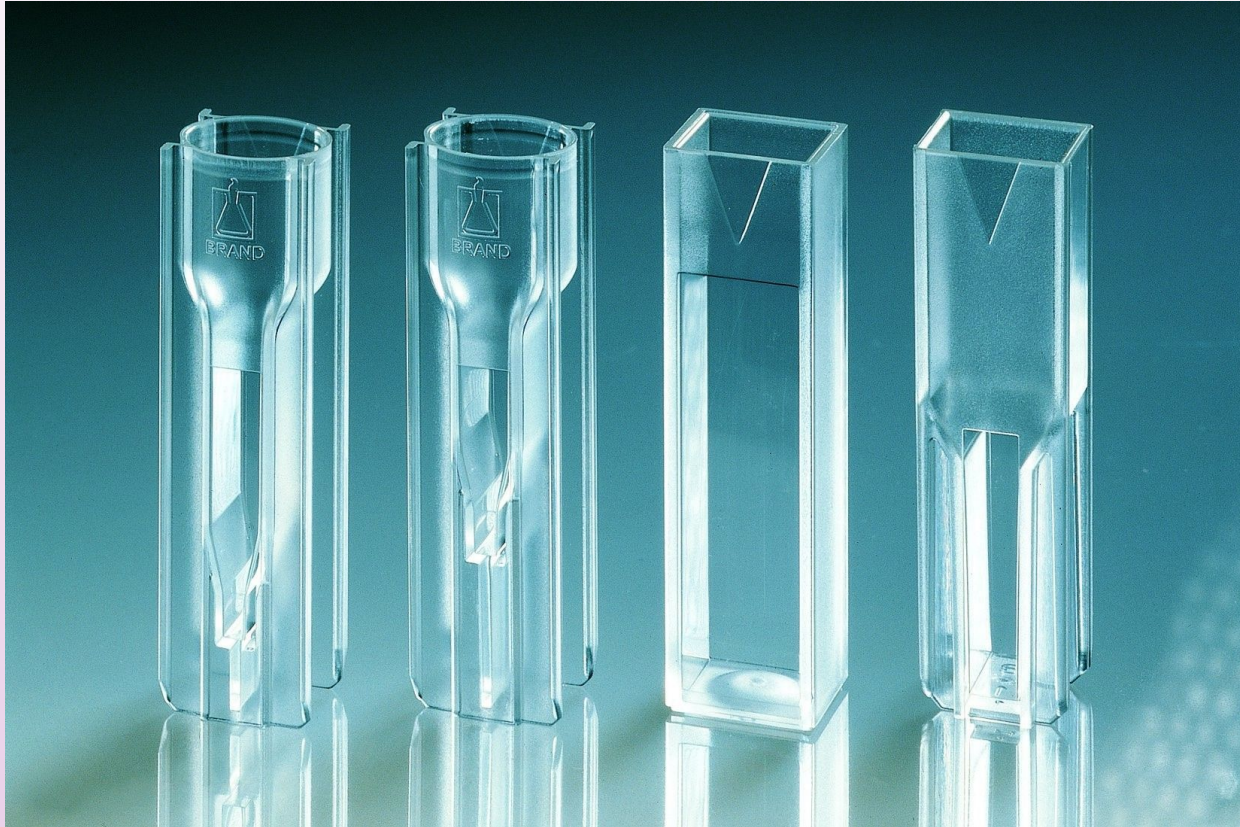


CUVETTA



PIASTRA

2) CUVETTE PER VISIBILE

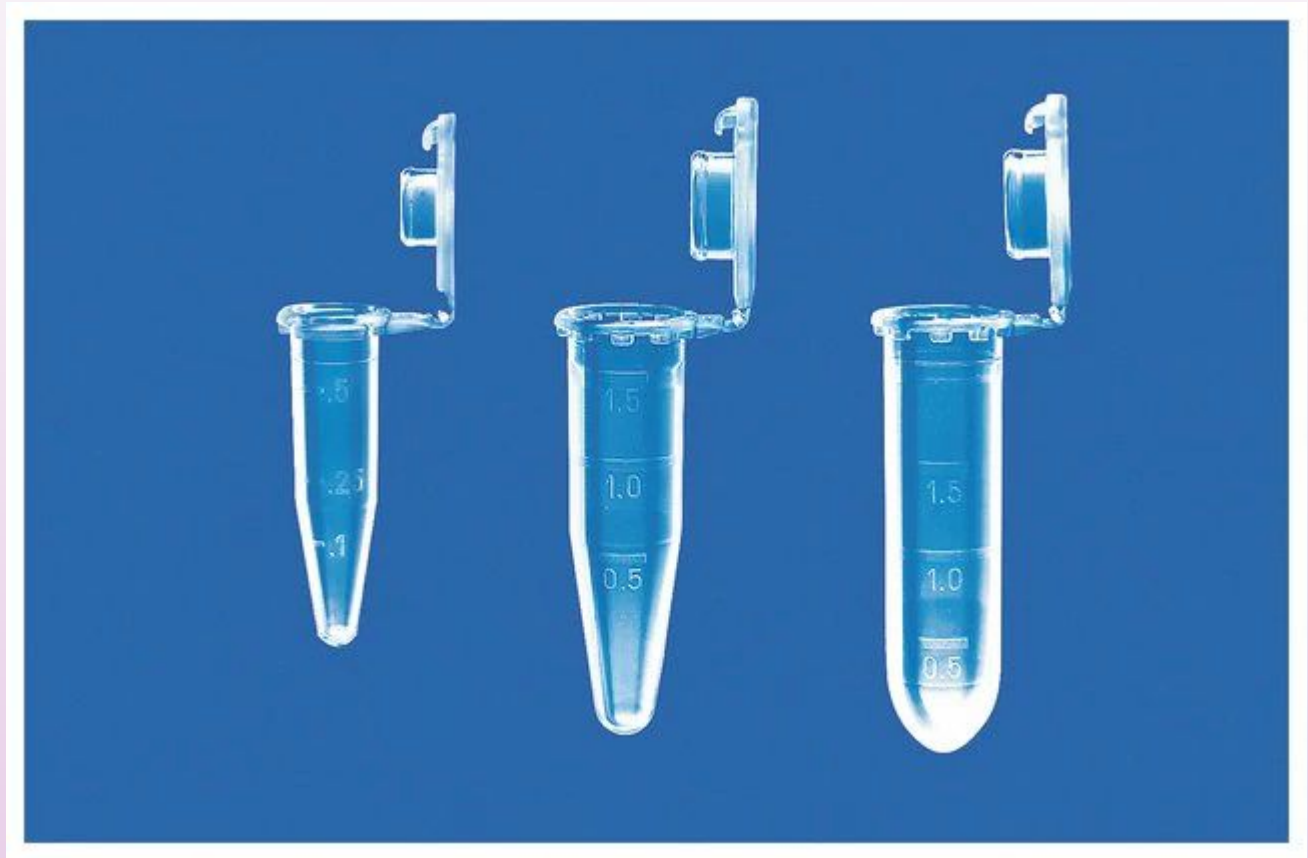


MATERIALE PLASTICO
TRASPARENTE ALLA LUCE VISIBILE.
USA E GETTA

Notare l' altezza della finestra e la
presenza di una freccetta.
Il cammino ottico deve essere di 1 cm,
quindi la direzione della luce è obbligata!

3) **PROVETTE GRADUATE (Eppendorf) Capacità (0,5 ml, 1,5 ml) 2,0 ml .**

RICORDA: 1 mL = 1 cm³

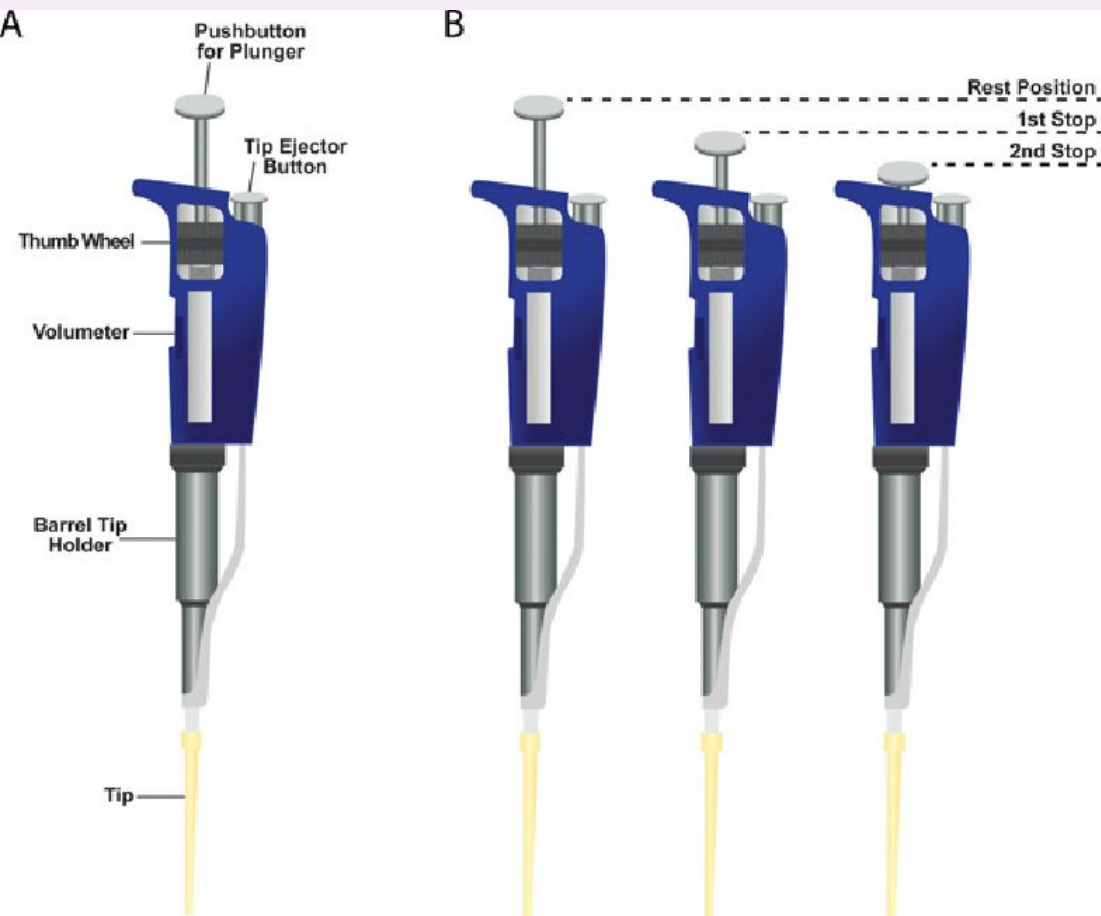


4. MICROPIPETTE

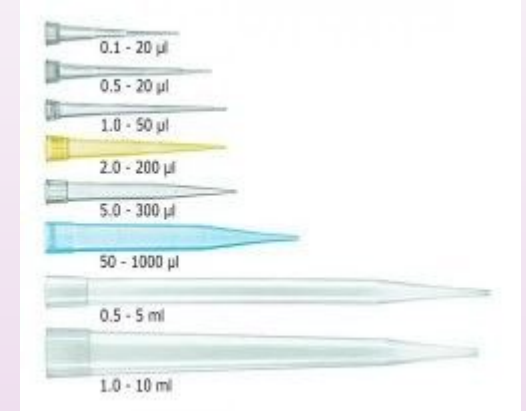
<https://youtu.be/3d-U9vowVwg>

PIPETTING SKILLS

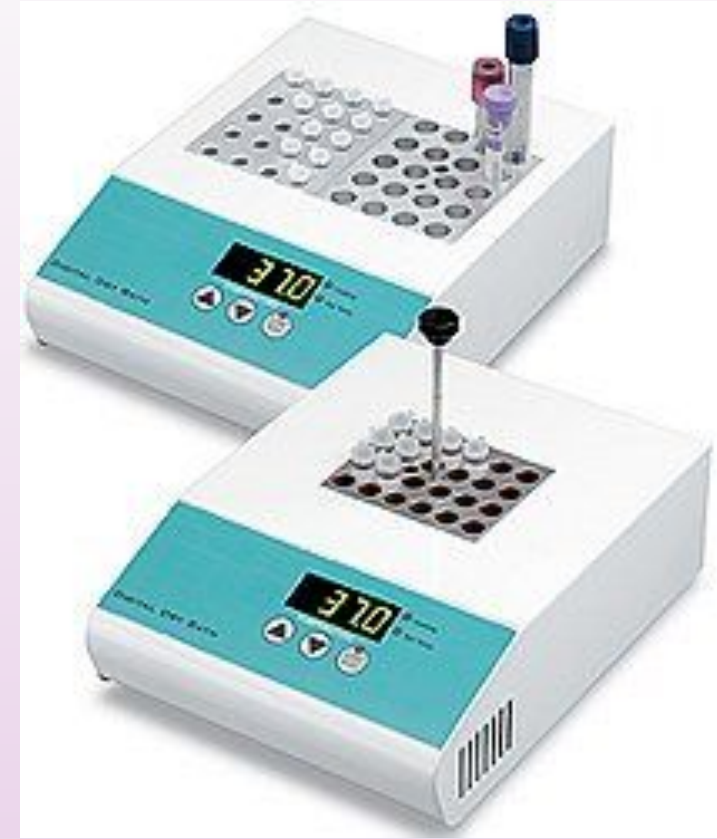
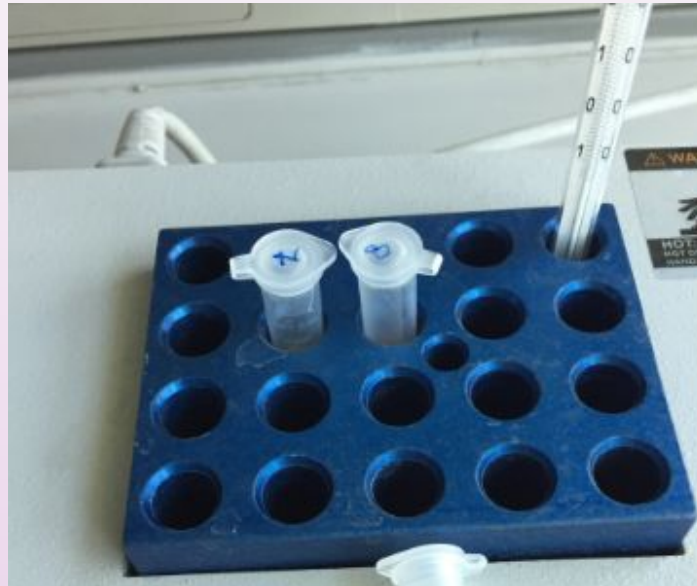
Micropipetta



Puntali



5) TERMOBLOCCO settato a 37 gradi



PROTOCOLLO

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI SAGGIO

Components

1. Glucose Oxidase/Peroxidase Reagent (Catalog Number G3660)
 - Store the unopened kit reagent at 2–8 °C. Each capsule contains 500 units of glucose oxidase (*Aspergillus niger*), 100 purpurogallin units of peroxidase (horseradish), and buffer salts.
 - Empty the capsule contents into an amber bottle.
 - Dissolve those contents in 39.2 mL of deionized water.
 - The solution is stable up to one month at 2–8 °C, and for at least 6 months frozen at –20 °C.
 - Discard if turbidity develops.
2. *o*-Dianisidine Reagent (Catalog Number D2679)
 - Store the unopened kit reagent at 2–8 °C. Minimize exposure to light. The preweighed vial contains 5 mg of *o*-dianisidine dihydrochloride.
 - Reconstitute the contents of the *o*-dianisidine vial with 1.0 mL of deionized water.
 - Invert the vial several times to dissolve.
 - Avoid exposing the reagent to light.
 - Solution is stable for 3 months at 2–8 °C.
3. Assay Reagent
 - Add 0.8 mL of the *o*-Dianisidine Reagent to the amber bottle containing the 39.2 mL of Glucose Oxidase/Peroxidase Reagent.
 - Invert the bottle several times to mix.
 - Minimize exposure to light.
 - Solution is stable up to 1 month at 2–8 °C.
 - Discard if turbidity develops or color forms.
4. Glucose Standard Solution (Catalog Number G3285)
 - D-Glucose, 1.0 mg/mL in 0.1% benzoic acid.
 - This standard is **traceable to an NIST standard** and is supplied ready-to-use.
 - It is stable at 2–8 °C for at least six months.
 - Discard if turbidity develops.

- 1) Sciogliere gli enzimi liofilizzati nella bottiglia ambrata in un volume di 39,2 ml di acqua deionizzata
Attenzione, i reagenti sono FOTOSENSIBILI!
- 2) Ricostituire i 5 mg di *o*-dianisidina con 1 ml di acqua deionizzata
- 3) Aggiungere 0,8 ml della soluzione di *o*-dianisidina nella bottiglia contenente gli enzimi ($V_{tot} = 40$ ml)

In questo modo nella bottiglia si ha il REAGENTE DI SAGGIO

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Procedure

Sample Preparation

Liquids:

- Dilute sample with deionized water to 20–80 μg glucose/mL.
- Filter or deproteinize solution if necessary to clarify.
- Decolorize solutions that are strongly colored and that have a low glucose concentration.
- Degas carbonated or fermented products.

DILUIRE IL SIERO EQUINO

alla concentrazione di 20-80 μg di glucosio /ml

DOMANDE:

- 1) come faccio a sapere quanto devo diluire il campione ?
- 2) Perché devo diluire?

RISPOSTE

1) DI QUANTO DILUIRE IL CAMPIONE

Valori di riferimento per la glicemia nel cavallo: 77-132 mg/dL

(consideriamo 100 mg/dL)

100 mg/dL = 100 mg / 10² mL = 1 mg/mL (1000 µg/mL (concentrazione iniziale teorica, ci)

Concentrazione di lavoro 50 µg/mL (concentrazione finale)

- ⇒ Possiamo RAGIONEVOLMENTE effettuare una diluizione 1:20
- ⇒ ci $V_i = c_f V_f$

Per un volume finale di 1 ml , ($V_f = 1$ ml):

Preleviamo 100 µl di siero dal tubo e dispensiamoli in una eppendorf.
Portiamo a volume con 900 µl di H₂O bidistillata.

2) PERCHE' DEVO DILUIRE: Per avere valori di assorbanza nel range di capacità di lettura dello strumento

PROTOCOLLO

Determination

Method 1: Glucose Concentration from Standard Curve

1. Pipette the following solutions into the appropriately marked test tubes:

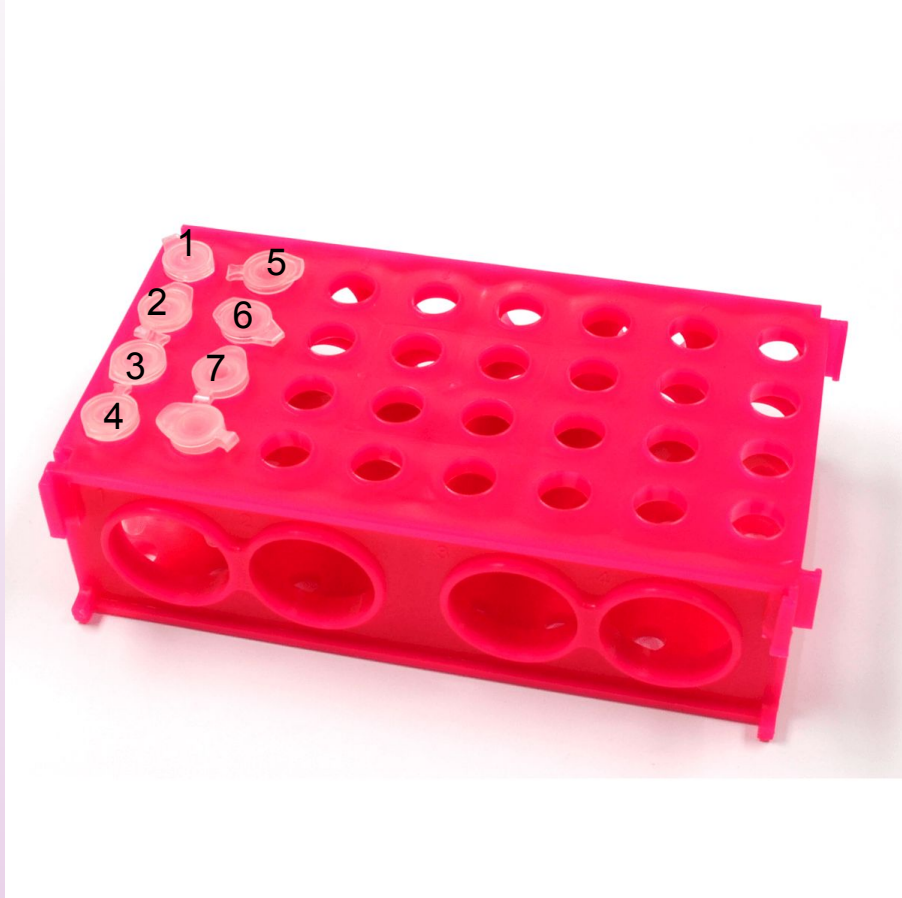
Tube	Water (mL)	Sample (mL)	Glucose Standard (mL)
Reagent Blank	1.00	---	---
Standard # 1	0.98	---	0.02
Standard # 2	0.96	---	0.04
Standard # 3	0.94	---	0.06
Standard # 4	0.92	---	0.08
Test	---	1.00	---

2. At time zero, start the reaction by adding 2.0 mL of Assay Reagent to the first tube and mixing. Allow a 30-60 second interval between additions of Assay Reagent to each subsequent tube.
3. Let each tube react exactly 30 minutes at 37 °C. Stop the reaction at 30-60 second intervals by adding 2.0 mL of 6 M H₂SO₄ into each tube. Carefully mix each tube thoroughly.
4. Measure the absorbance of each tube against the reagent blank at 540 nm.

NB il protocollo originale fornito nel kit prevede un volume totale per ogni campione di 5 ml (5000 ul) che è ESAGERATO , visto che le nostre cuvette hanno un volume di 1000 ul (se usiamo le micro o una micropiastra possiamo scendere fino a 200 ul)

Rispetto a questo protocollo, dobbiamo dividere tutti i volumi per 5!!!!

NB facciamo anche una diluizione intermedia dello standard di glucosio 1:10



Preparare in un rack 7 eppendorf vuote
5 serviranno per la costruzione della curva
di calibrazione con la soluzione di
D-glucosio standard a concentrazioni
crescenti;
2 (e non 1 come nel protocollo del kit) per
il nostro campione di siero incognito a 2
diverse diluizioni (per essere sicuri di stare
dentro la curva di calibrazione)

1) in 7 eppendorf da 2 ml dispensiamo un volume totale di 200 ul secondo il seguente schema.
 NB. la 1 costituisce il BIANCO o FONDO per la lettura spettrofotometrica.
 (la 2 è uguale, l'abbiamo utilizzata per un controllo)

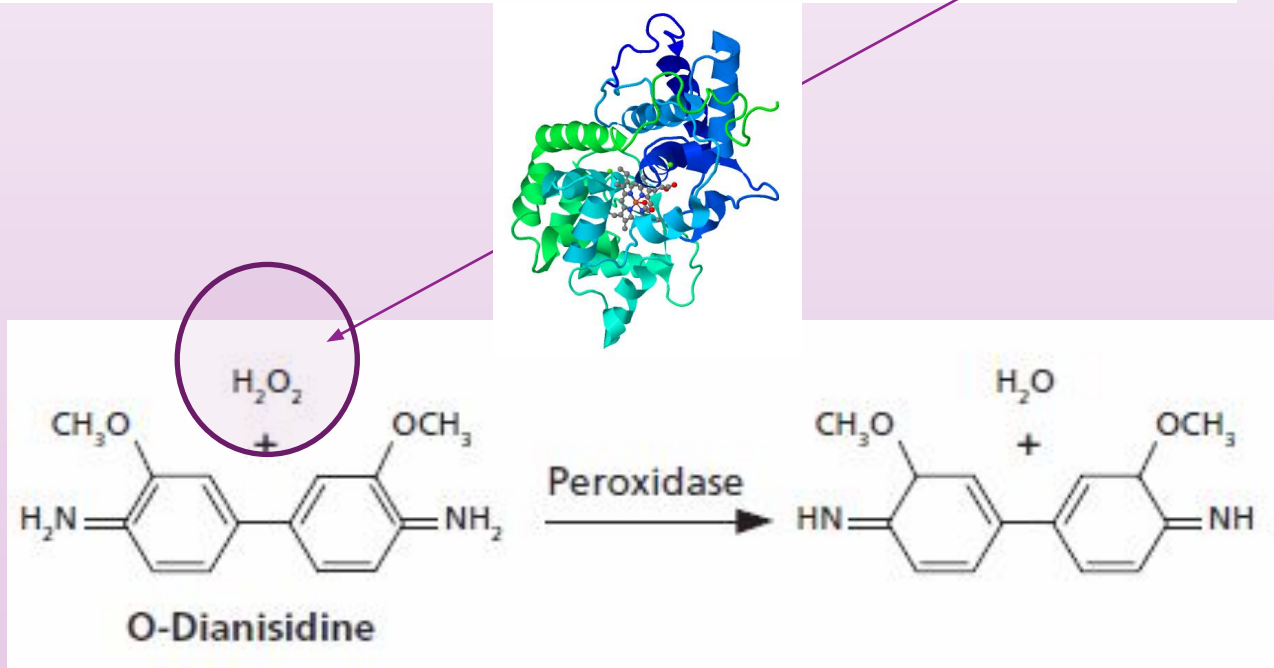
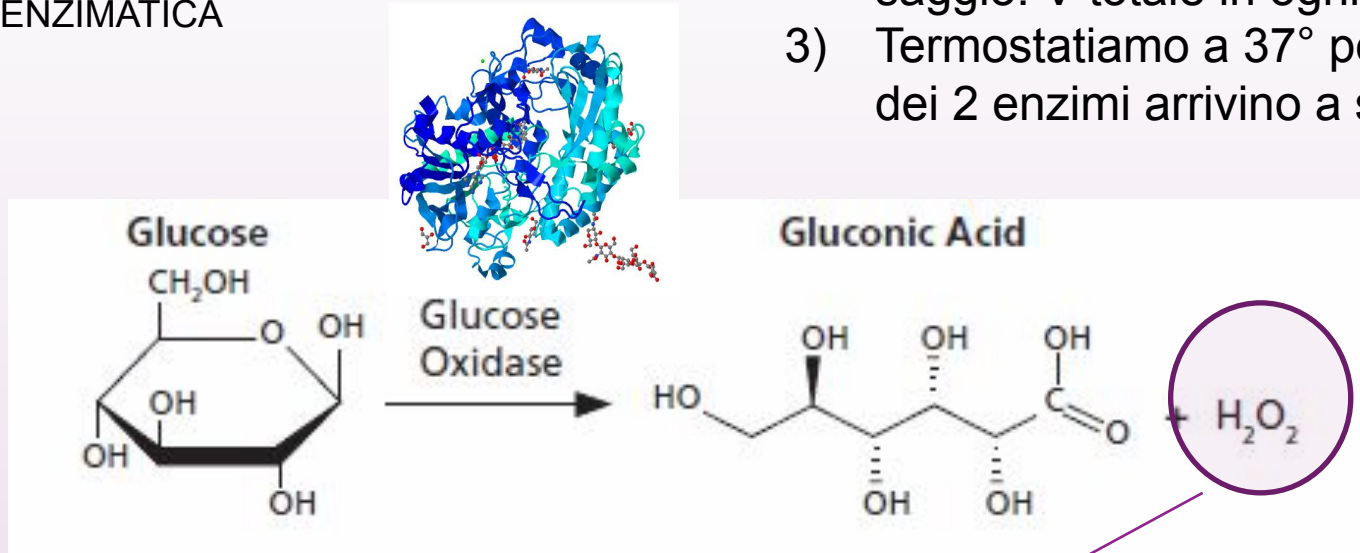
PROVE TTA	H2O (ul)	glucosio 0,1 mg/ml (ul)	C glucosio (ug/ml)
1	200	-	0
2	200	0	0
3	160	40	20
4	120	80	40
5	80	120	60
PROVE TTA	H2O (ul)	Siero diluito 1:10 (ul)	C glucosio teorica (ug/ml)
6	180	20	7,7-13
7	160	40	15,4-26

Per costruire la curva di taratura con glucosio a
 concentrazione nota
 (3 diverse concentrazioni)

Per effettuare la lettura dei campioni a 2 diverse
 diluizioni

REAZIONE ENZIMATICA

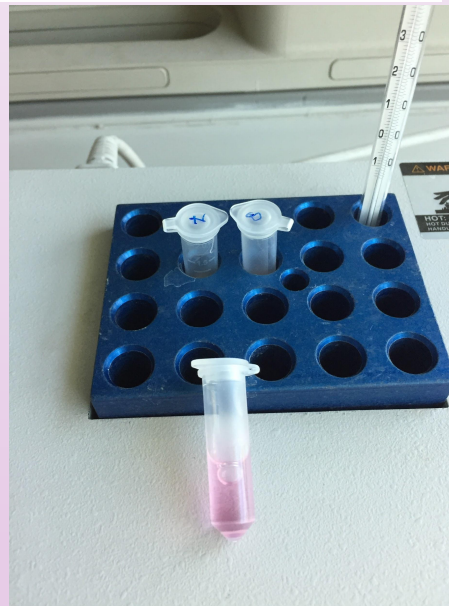
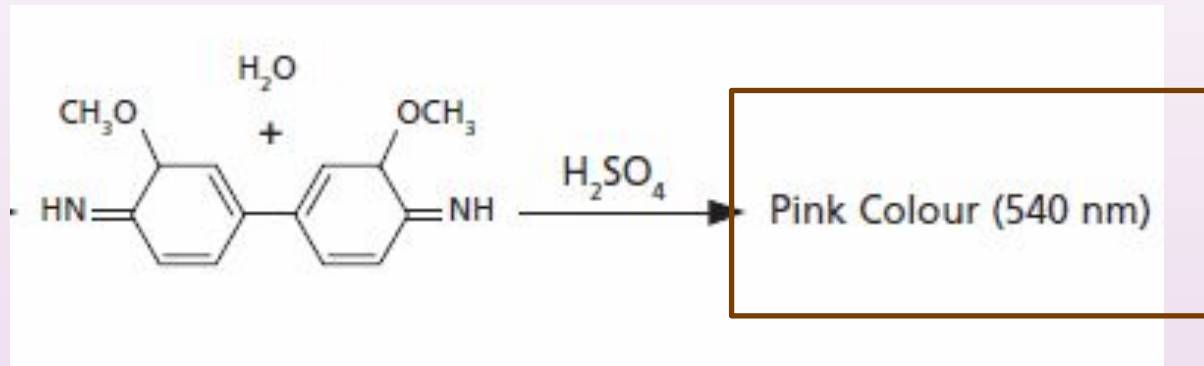
- 2) In ogni provetta aggiungiamo 400 ul di reagente di saggio. V totale in ogni provetta: 600 ul
- 3) Termostatiamo a 37° per 30 minuti affinché le reazioni dei 2 enzimi arrivino a saturazione.



L'O- dianisidina perossidata ha un colore GIALLO L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di glucosio.

BLOCCO DELLA REAZIONE

4) Portiamo i campioni sotto cappa e con una micropipetta aggiungiamo in ogni eppendorf 400 μL di H_2SO_4
Volume totale in ogni provetta: 1000 μL = 1 mL

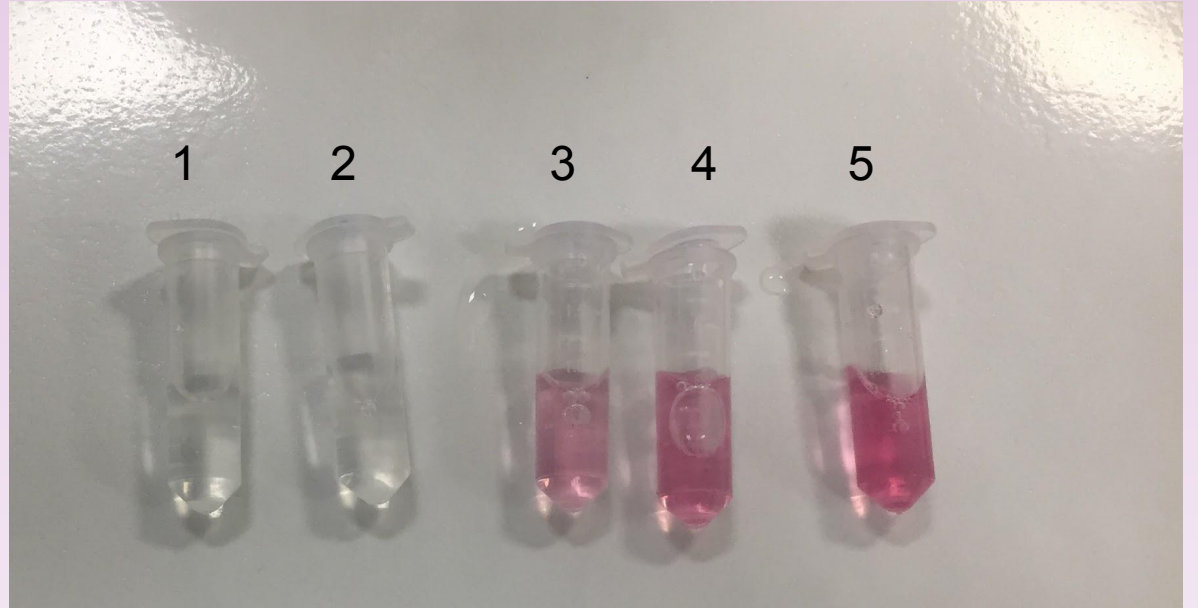


L'aggiunta di acido solforico blocca la reazione e fa virare il colore dell' o dianisidina perossidata dal giallo al rosa (massimo di assorbanza intorno a 540 nm).

Tale colore è stabile nel tempo. L'intensità è sempre proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nella provetta.

Questo è l'aspetto delle prime 5 soluzioni che verranno utilizzate per la costruzione della retta di taratura. Si può già osservare che l'intensità del colore rosa è proporzionale alla concentrazione di glucosio standard presente in ogni provetta.

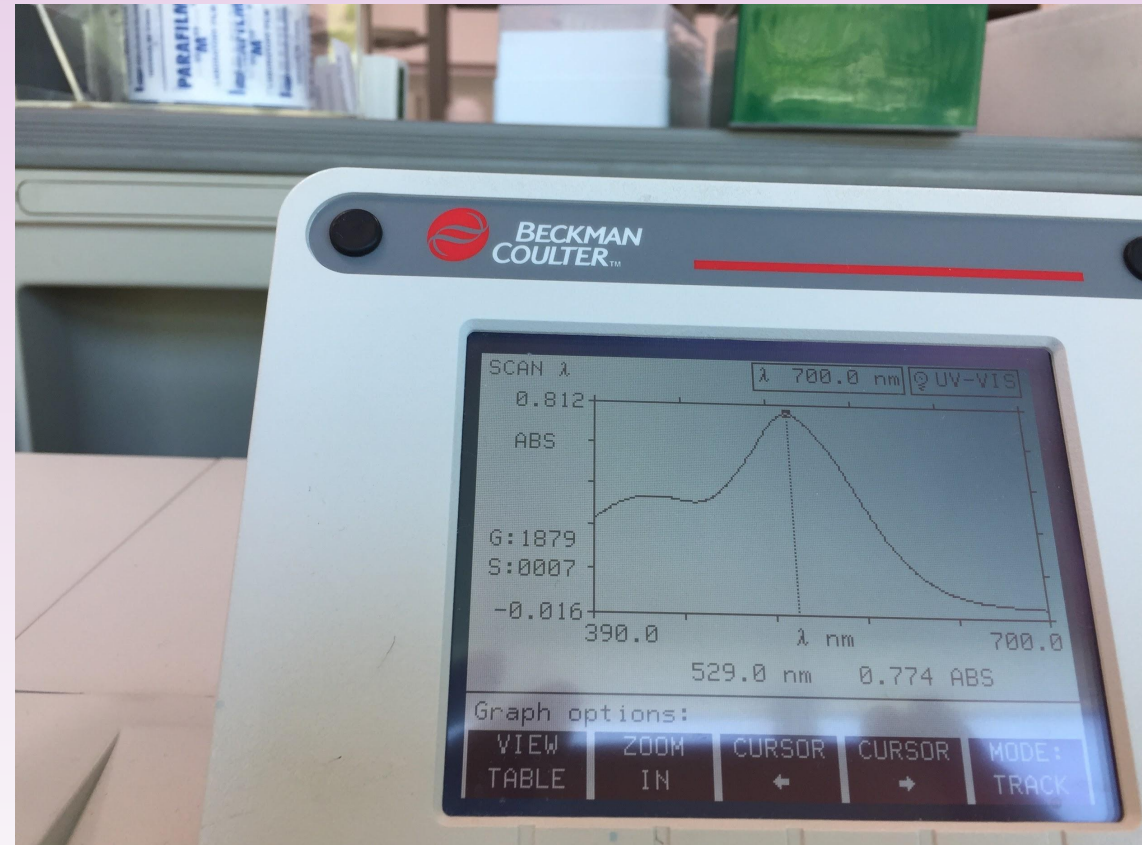
	H ₂ O (ul)	glucosio 0,1 mg/ml (ul)
1	200	-
2	200	0
3	160	40
4	120	80
5	80	120



LETTURA DELL'ASSORBANZA allo spettrofotometro

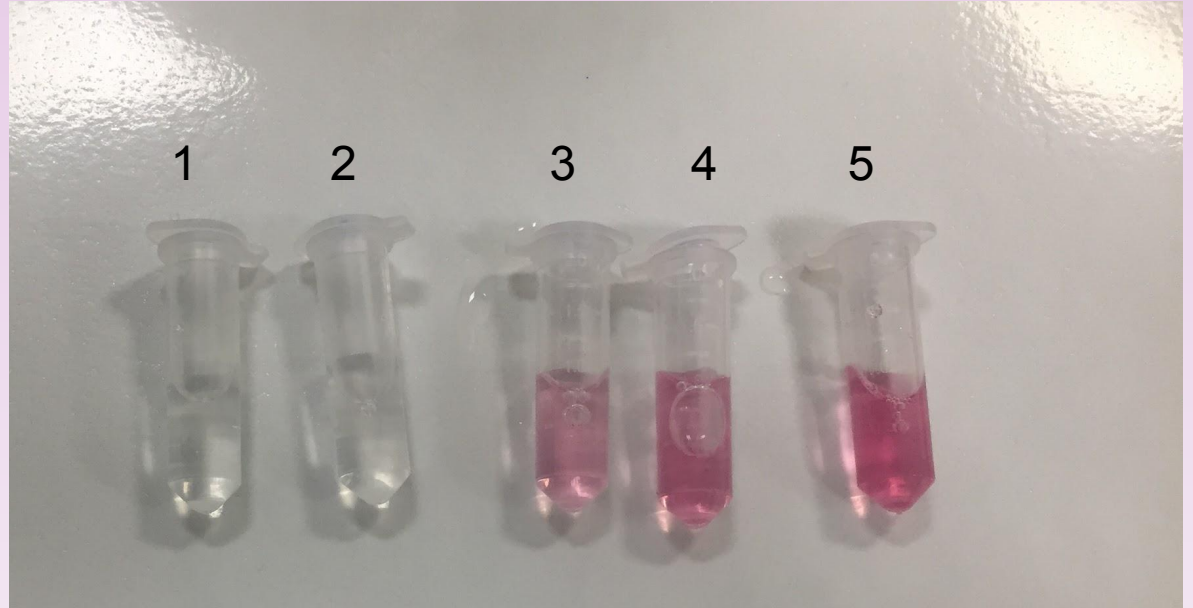
Per verificare le caratteristiche dei campioni, invece che leggere ad una sola lunghezza d'onda, abbiamo effettuato uno spettro di assorbimento da 390 nm a 490. Come si vede, il picco di assorbimento è a 530 nm.

Questo è una campione di prova (troppo concentrato). Il massimo di assorbanza si ha alla lunghezza d'onda di 530 nm ed il valore è $A_{530\text{ nm}} = 0,774$ a.u.



letture di assorbanza alla lunghezza d'onda 530 nm allo spettrofotometro per i campioni standard

	A 530 nm	A650 nm
1	BLANK	BLANK
2	0,004	0,005
3	0,150	0
4	0,272	0,002
5	0,400	0,007



	H2O (u)	glucosio 0,1 mg/ml (ul)
1	200	-
2	200	0
3	160	40
4	120	80
5	80	120

Possiamo ora costruire una RETTA di taratura su un foglio di calcolo riportando l'Assorbanza in funzione della concentrazione di glucosio mg/ml; in (mg/dl; mM/L).

In base alla retta, calcoliamo la concentrazione di glucosio nel siero (provette 6 e 7)

La legge di Lambert –Beer:

$$A=abc$$

È una legge di tipo lineare.

NB b= cammino ottico= 1 cm moltiplica per un fattore 1 quindi è implicito

L'equazione di una retta infatti è data da

$$Y=mx+q$$

Nel nostro caso

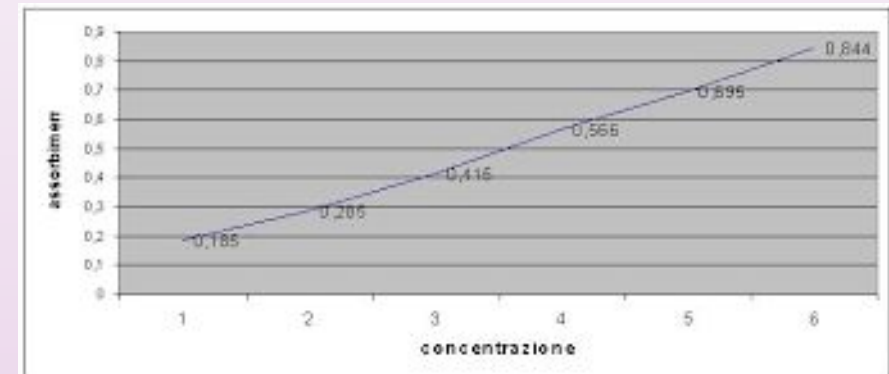
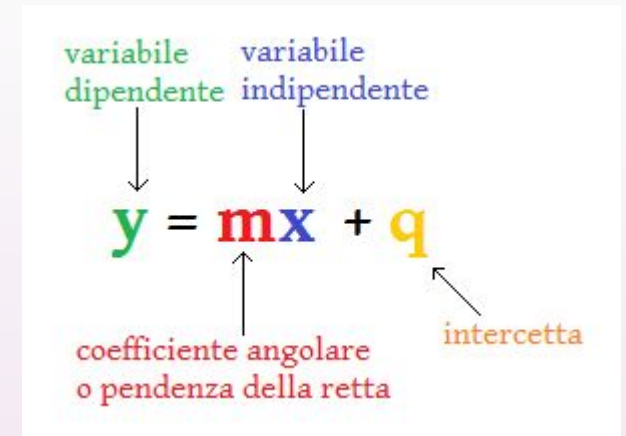
$$y=A \text{ (assorbanza)}$$

$x= c$ (concentrazione di prodotto che assorbe la luce alla lunghezza d'onda)

$m= a$ (coefficiente di estinzione della sostanza) è la **PENDENZA DELLA RETTA**

$q=$ L'intercetta della retta con l'asse delle ascisse dovrebbe essere un valore molto prossimo a zero perché a concentrazione di sostanza 0 dovremmo avere assorbanza **NULLA** a meno di errori di sottrazione del bianco

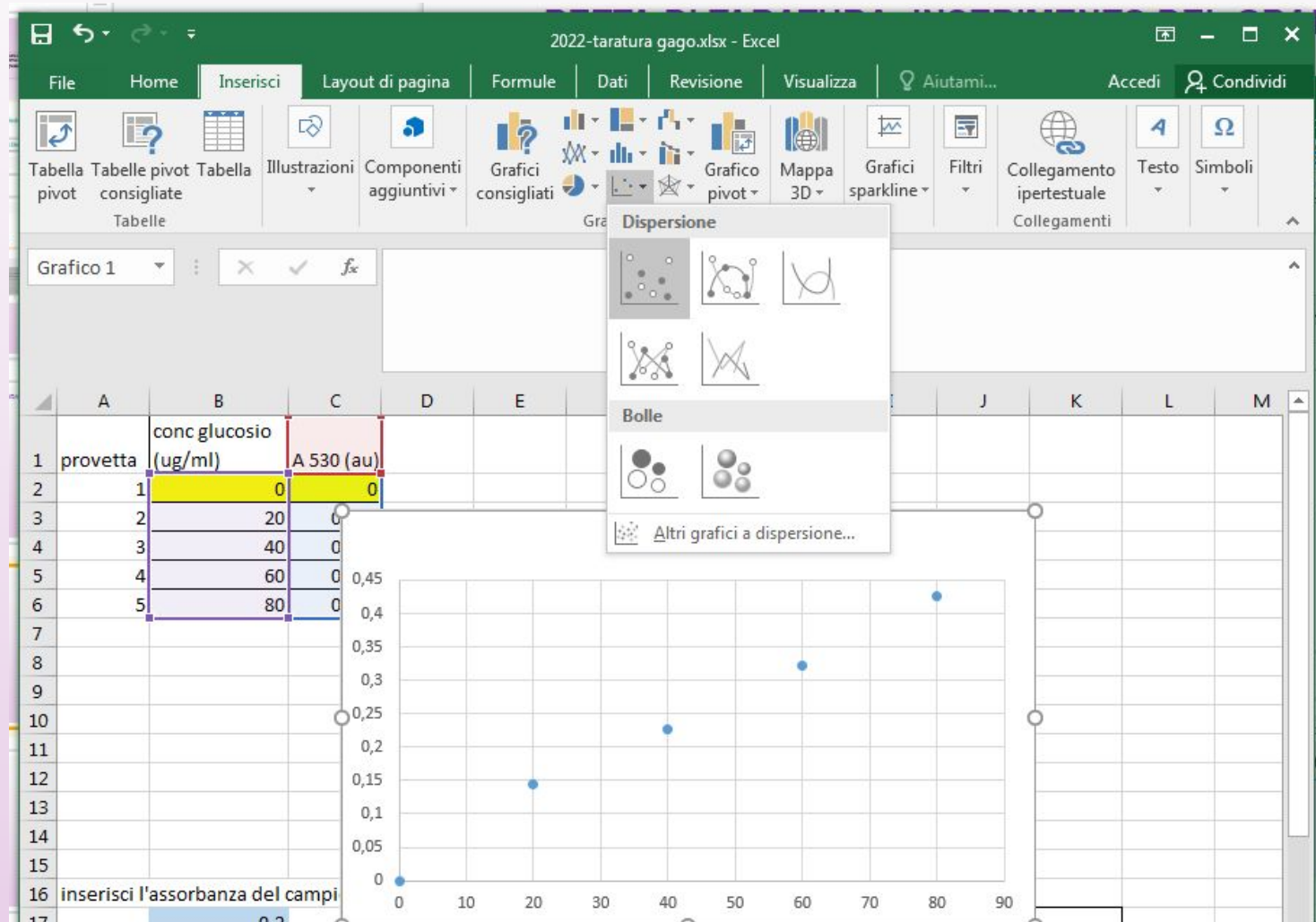
Se grafichiamo l'assorbanza ad una data lunghezza d'onda in funzione della concentrazione del campione, avremo un andamento lineare



RETTA DI TARATURA: CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO STANDARD

provetta	conc glucosio (ug/ml)	A 530 (au)
1	0	0
2	20	0,144
3	40	0,227
4	60	0,322
5	80	0,425

RETTA DI TARATURA: INSERIMENTO DEL GRAFICO A DISPERSIONE



RETTA DI TARATURA: CUSTOMIZZAZIONE DEL GRAFICO A DISPERSIONE

2022-taratura gago.xlsx - Excel

Strumenti grafico

File Home Inserisci Layout di pagina Formule Dati Revisione Visualizza Progettazione Formato Aiutami.. Accedi Condividi

Aggiungi elemento grafico Layout rapido Cambia colori

Layout grafici Stili grafici

Inverti righe/colonne Seleziona dati Cambia tipo di grafico Sposta grafico

Dati Tipo Posizione

Grafico 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	provetta	conc glucosio (ug/ml)	A 530 (au)										
2	1	0	0										
3	2	20	0										
4	3	40	0										
5	4	60	0										
6	5	80	0										
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16	inserisci l'assorbanza dei campi												
17		0,2											
18													
19	Concentrazione calcolata (ug/ml)												
				range di riferimento	77	132 mg/dl							
					0,77	1,32 mg/ml							

A 530 (au)

Titolo asse

Titolo asse

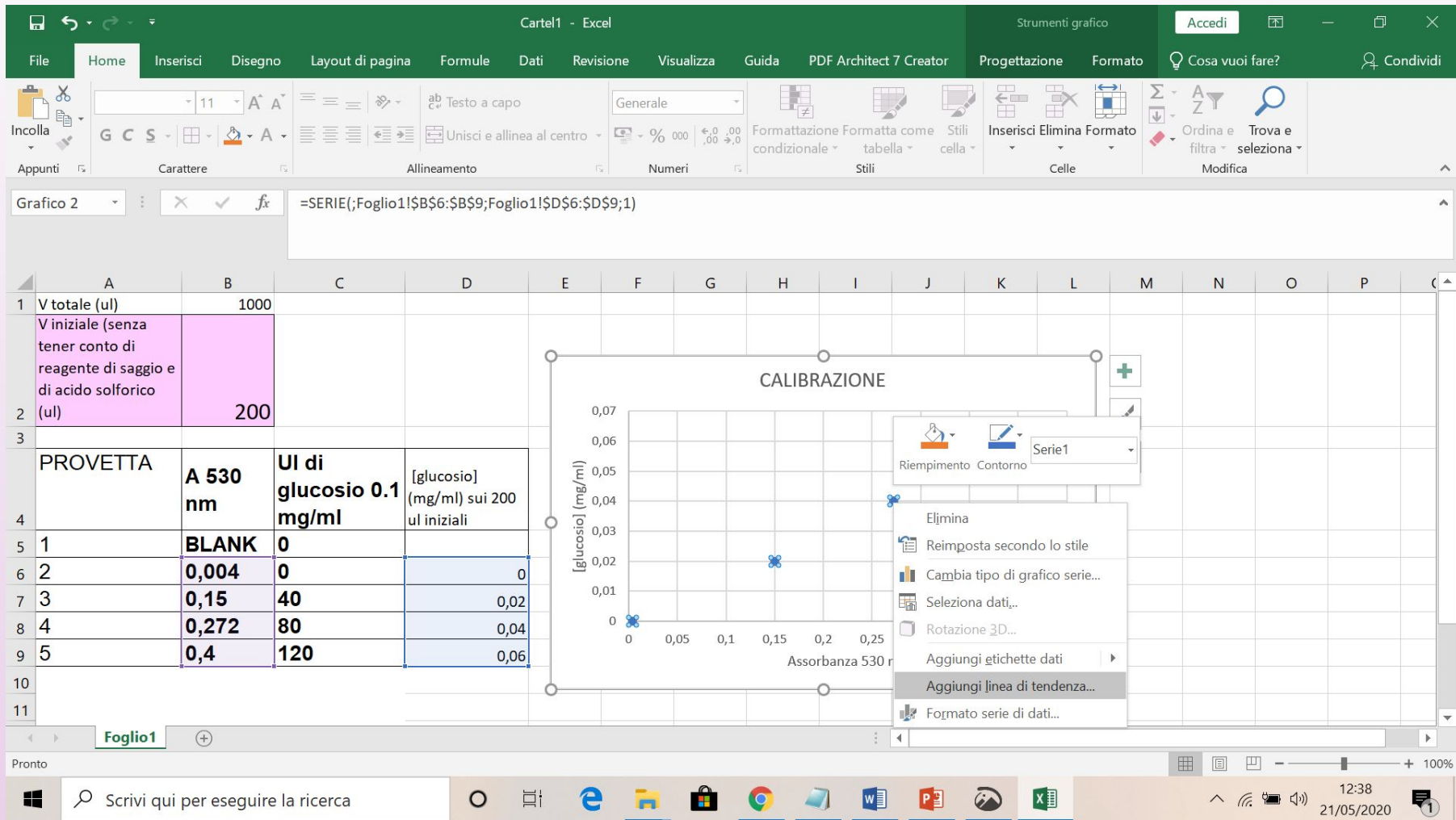
ELEMENTI GRAFICO

- Assi
- Titoli degli assi
- Titolo del grafico
- Etichette dati
- Barre di errore
- Linee della griglia
- Legenda
- Linea di tendenza

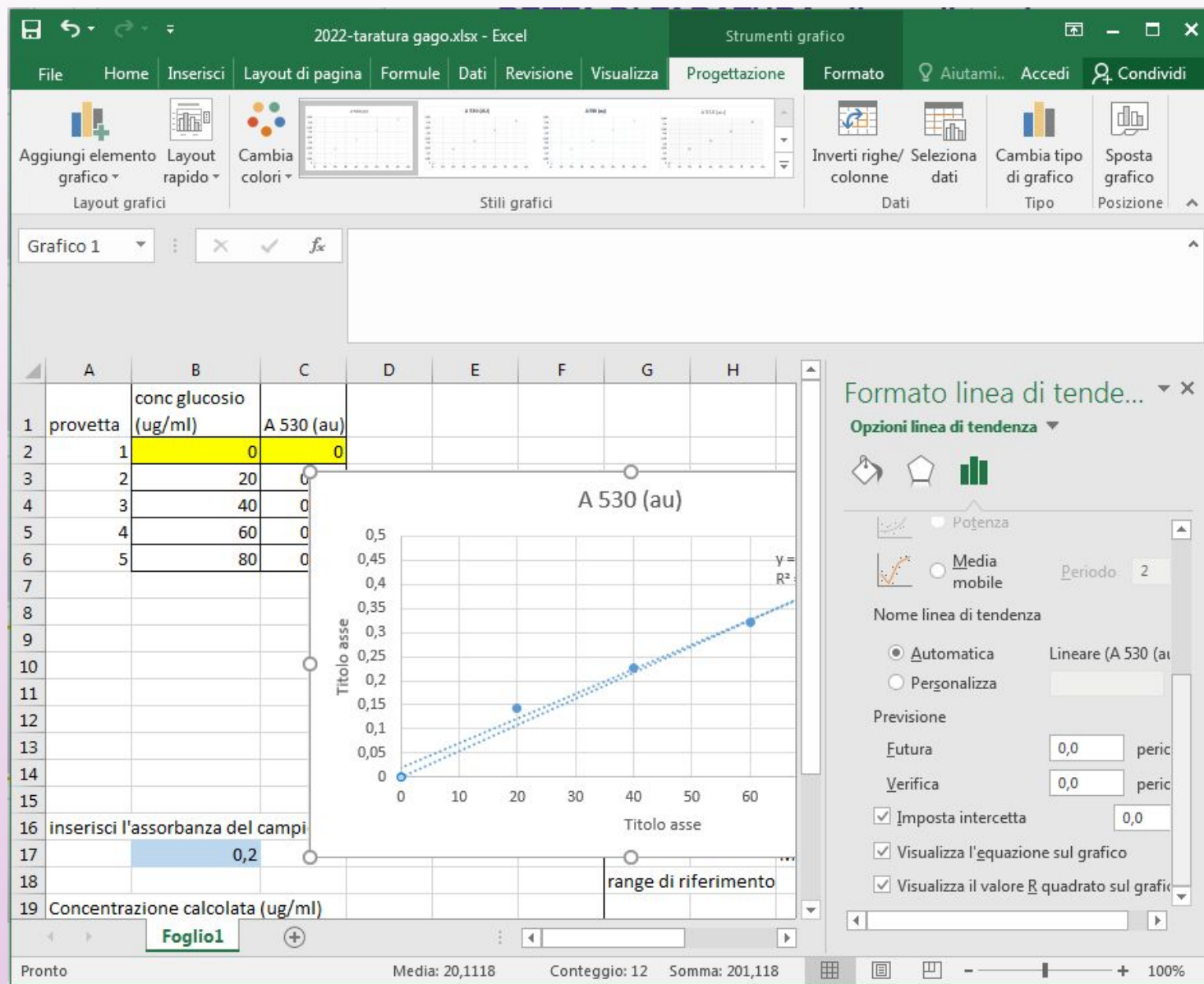
Lineare
Previsione lineare
Media mobile su due periodi
Altre opzioni...

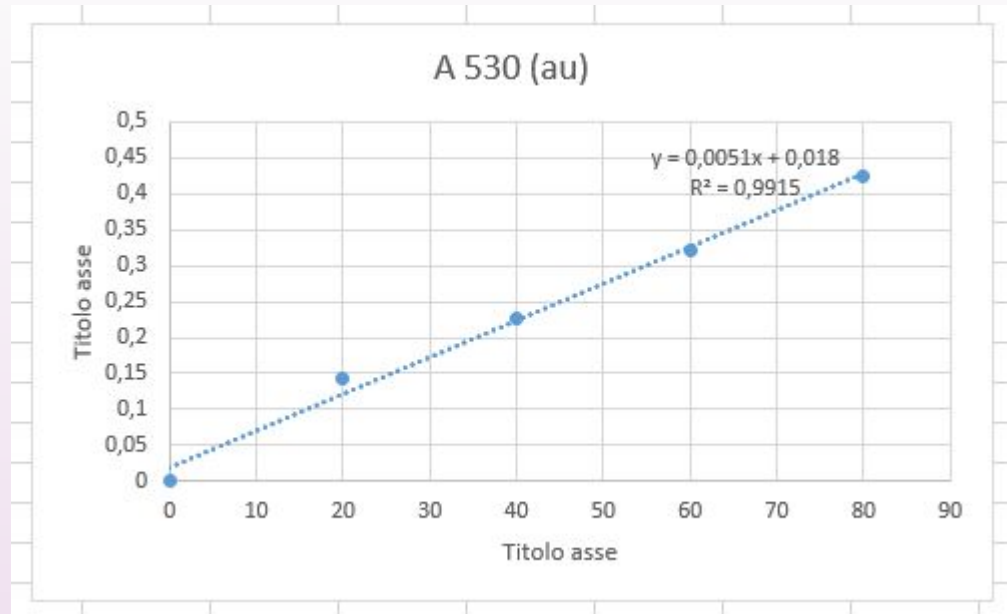
Pronto Media: 20,1118 Conteggio: 12 Somma: 201,118

RETTA DI TARATURA: aggiunta linea di tendenza

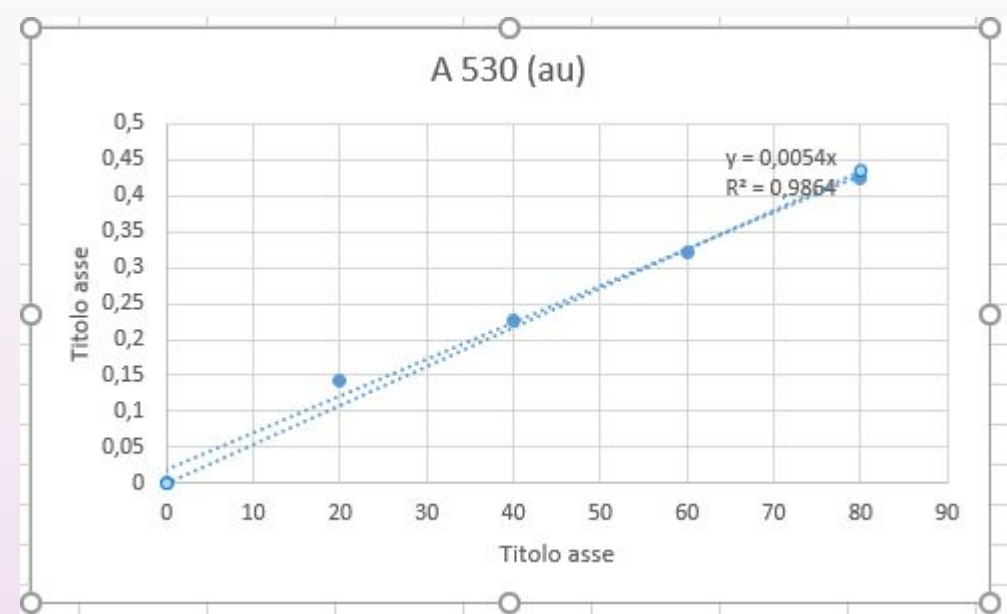


RETTA DI TARATURA: linea di tendenza: equazione e coefficiente di correlazione





Miglior retta



Retta passante per l'origine

