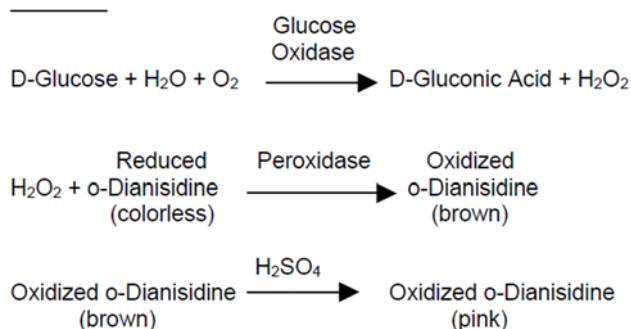


ESERCITAZIONE
DOSAGGIO DEL GLUCOSIO IN SIERO EQUINO
mediante saggio enzimatico **COLORIMETRICO**

KIT ENZIMATICO PER IL DOSAGGIO GaGO20

PRINCIPIO:



REAGENTI DEL KIT:

1. - Reagente di saggio (RS): 40 ml di soluzione contengono:
 - Enzimi: 500 Unità di Glucosio Ossidasi da *Aspergillus niger* e 100 unità di Perossidasi di rafano sciolte in 38,2 ml di acqua deionizzata;
 - 800 ul di O-dianisidina di-idrocloruro alla concentrazione di 5 mg/ml in acqua distillata,
2. soluzione standard di glucosio alla concentrazione di 1mg/ml in acido benzoico 0.1%.

REAGENTI NECESSARI NON PRESENTI NEL KIT:

- Acido solforico 12N (6M) sotto cappa chimica
- H₂O Bidistillata

MATERIALE FORNITO PER L'ESERCITAZIONE

- **CAMPIONE:** eppendorf contenente 100 ul di Siero Equino precedentemente diluito 1:10 in acqua bidistillata (10 ul di siero, 90 ul di acqua bidistillata)
- **STANDARD:** eppendorf contenente 100 ul di GLUCOSIO del kit precedentemente diluito 1:10 in H₂O bidistillata (c=0,1 mg/ml)
- **REAGENTE DI SAGGIO:** 1500 ul di reagente di saggio in provetta ricoperta da carta argentata per evitare l'esposizione alla luce
- **ACQUA BIDISTILLATA** in provetta tipo Falcon
- 3 eppendorf vuote
- 1 pipetta Pasteur
- 1 micropipetta

- 1 scatola di puntali per micropipetta

PROTOCOLLO:

Utilizzando una micropipetta dotata di opportuno puntale, dispensare, in ognuna delle 3 eppendorf vuote a disposizione, un volume totale di 200 ul, secondo il seguente schema:

	siero precedentemente diluito 1:10 (ul)	glucosio standard (ul)	H ₂ O (ul)
1	-	-	200
2	100	-	100
3	-	100	100

In ogni eppendorf aggiungere 400 ul di Reagente di saggio (il campione dovrebbe assumere una colorazione giallo-marrone data dalla O-dianisidina ossidata).

Disporre le 3 eppendorf nel termoblocco settato a 37°C e **IMPOSTARE UN TIMER a 20 minuti**; in questo tempo la reazione andrà a saturazione.

Allo scadere dei 20 minuti, togliere le 3 eppendorf dal termoblocco.

Andare sotto cappa e dispensare in ogni eppendorf 400 ul di acido solforico 12 N; il colore dei campioni virerà verso il rosa.

Effettuare la lettura di assorbimento dei 3 campioni alla lunghezza d'onda di 530 nm, corrispondente al picco di assorbanza, nel seguente modo:

Trasferire con la pipetta Pasteur la soluzione contenuta nella eppendorf 1 in una cuvetta da spettrofotometro.

Impostare lo spettrofotometro in modalità 'lunghezza d'onda fissa' al valore di 530 nm.

Registrare la lettura del BIANCO (BLANK), ovvero il valore di fondo da sottrarre a tutti i campioni, costituito dal campione 1.

Svuotata la cuvetta, dispensarvi il contenuto della provetta 2 (campione da testare).

registrare il valore di assorbanza a 530 nm.

Svuotata la cuvetta, dispensarvi il contenuto della provetta 3 (glucosio standard).

registrare il valore di assorbanza a 530 nm.

Calcolare la concentrazione di glucosio nel siero in 2 modi differenti:

1) rispetto allo standard misurato;

$$C_{\text{standard}} : A_{530 \text{ standard}} = C_{\text{campione}} : A_{530 \text{ campione}}$$
$$\Rightarrow C_{\text{campione}} = C_{\text{standard}} * A_{530 \text{ campione}} / A_{530 \text{ standard}}$$

2) in base alla retta di taratura (vedi paragrafo seguente).

Valutare se tale valore rientra nei valori di riferimento

DATI PER LA RETTA DI TARATURA

La retta è stata costruita utilizzando 5 diversi campioni di D-glucosio a concentrazione nota, nel modo seguente:

1) in 5 eppendorf da 1,5 ml abbiamo dispensato H₂O e glucosio standard del kit (diluito 1:10 => conc 100 ug/ml) secondo il seguente schema:

	H ₂ O (ul)	V glucosio standard (ul)
1	200	0
2	160	40
3	120	80

4	80	120
5	40	160

Concentrazione di glucosio standard in ogni eppendorf

	Glucosio (ug/ml)	Calcolo ($c_2=c_1V_1/V_2$)
1	0	0
2	20	= $100*40/200$
3	40	= $100*80/200$
4	60	= $100*120/200$
5	80	= $100*160/200$

- 2) Abbiamo aggiunto 400 ul di reagente di saggio,
- 3) abbiamo termostatato per 20',
- 4) abbiamo bloccato la reazione con 400 ul di H₂SO₄ 12N,
- 5) abbiamo effettuato la lettura di assorbanza allo spettrofotometro, utilizzando la 1 come BIANCO.

Le letture di assorbanza sono le seguenti:

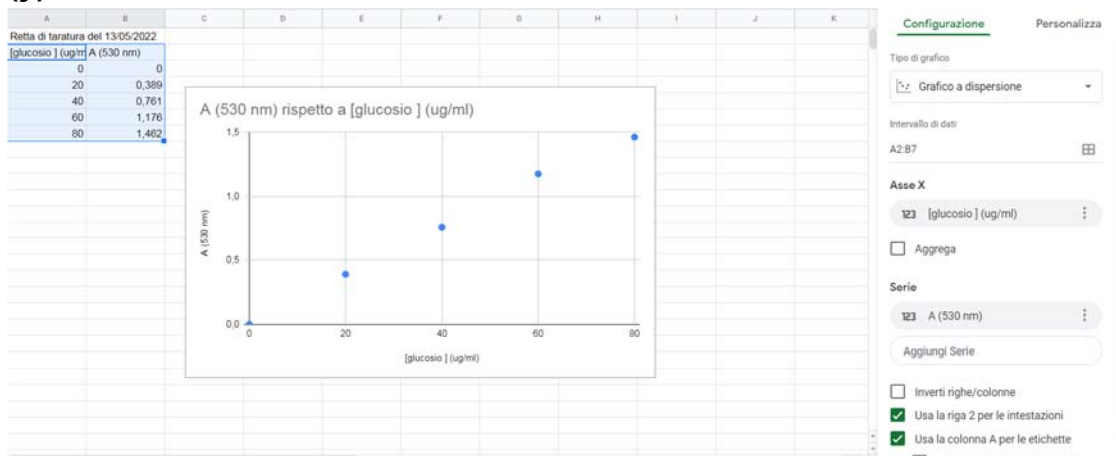
campione	A 530 nm
1	BLANK
2	0,389
3	0,761
4	1,176

5	1,462
---	-------

Su un foglio di calcolo (fogli google o excel) riportare per ogni punto in colonna A la concentrazione di glucosio in cuvetta e in colonna b il valore di assorbanza corrispondente

A	B
Retta di taratura del 13/05/2022	
[glucosio] (ug/ml) A (530 nm)	
0	0
20	0,389
40	0,761
60	1,176
80	1,462

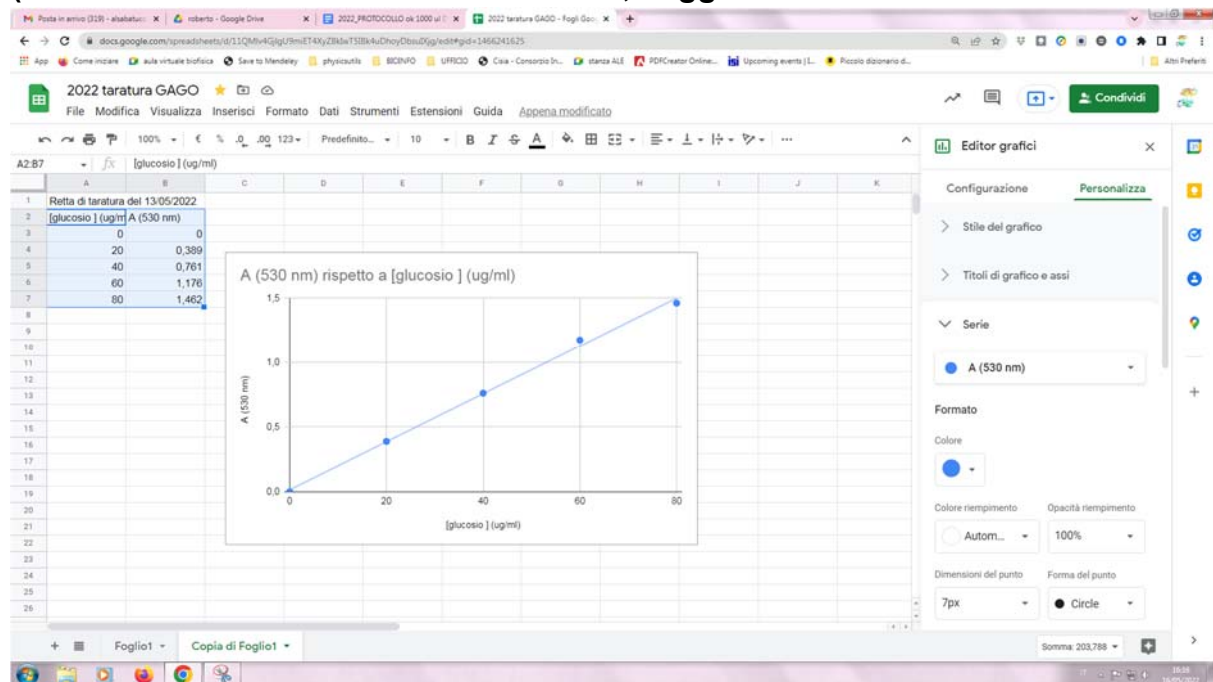
Per costruire la retta di taratura, inserire un grafico a dispersione xy selezionando in ascissa (x) la concentrazione di glucosio (ug/ml) e in ordinata (y) il valore di assorbanza.



Poiché, come abbiamo visto, l'assorbanza a 530 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio, i punti dovrebbero avere un andamento lineare:

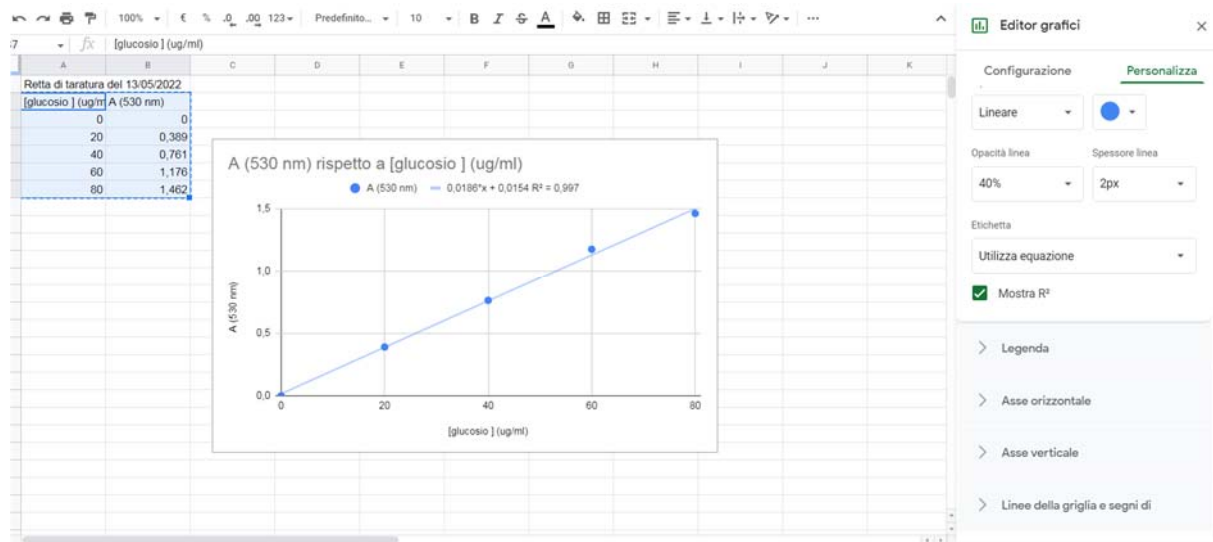
$$y=ax+b$$

Interpolare i punti con una retta, (SU FOGLI GOOGLE: Personalizza Serie, flaggare 'linea di tendenza')



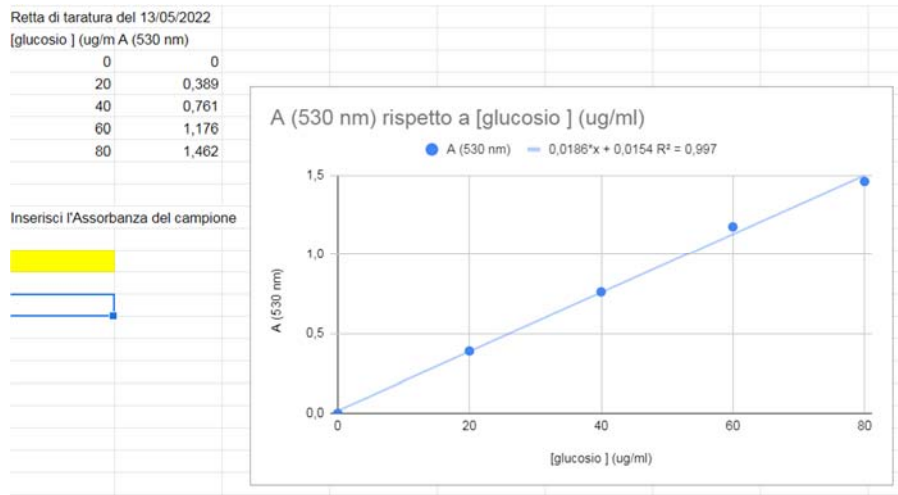
Per visualizzare l'equazione della retta, su 'Etichetta' scegliere 'utilizza equazione' e flaggare 'Mostra R²'

Il coefficiente di correlazione lineare R² è un indice della bontà dell'interpolazione. Più è vicino a 1, più i punti si adattano alla retta.



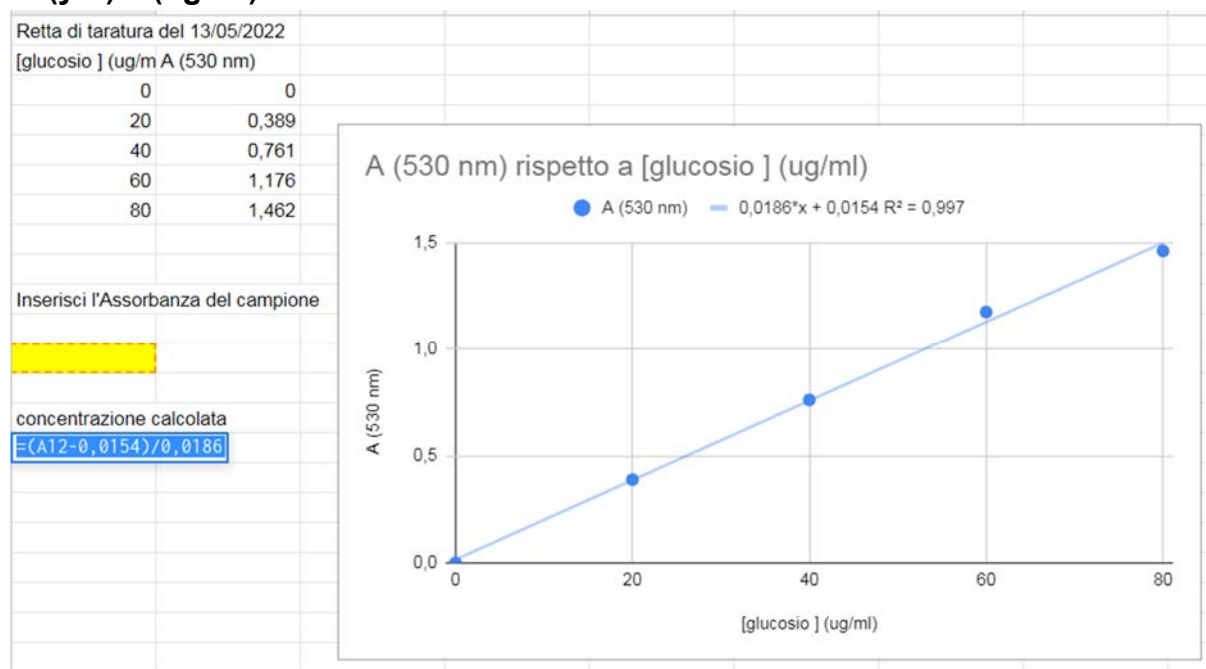
Ricaviamo i valori della pendenza della retta (a) e il valore di assorbanza a concentrazione di glucosio 0 (se abbiamo effettuato bene le misure, b dovrebbe tendere a 0).

Predisponiamo una casella dove inserire il valore di assorbanza letto per il nostro campione ignoto.



Possiamo ora aggiungere una casella per il calcolo della concentrazione del nostro campione (x), dal valore di assorbanza (y) letto:

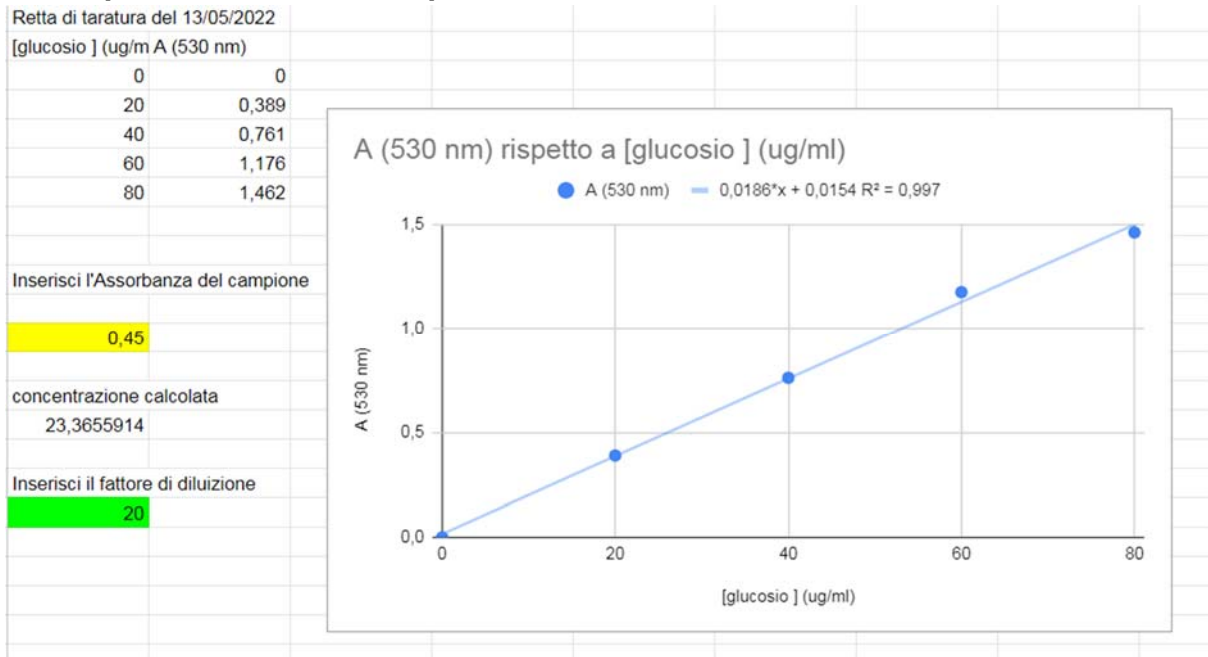
$$x = (y - b) / a \text{ (ug/ml)}$$



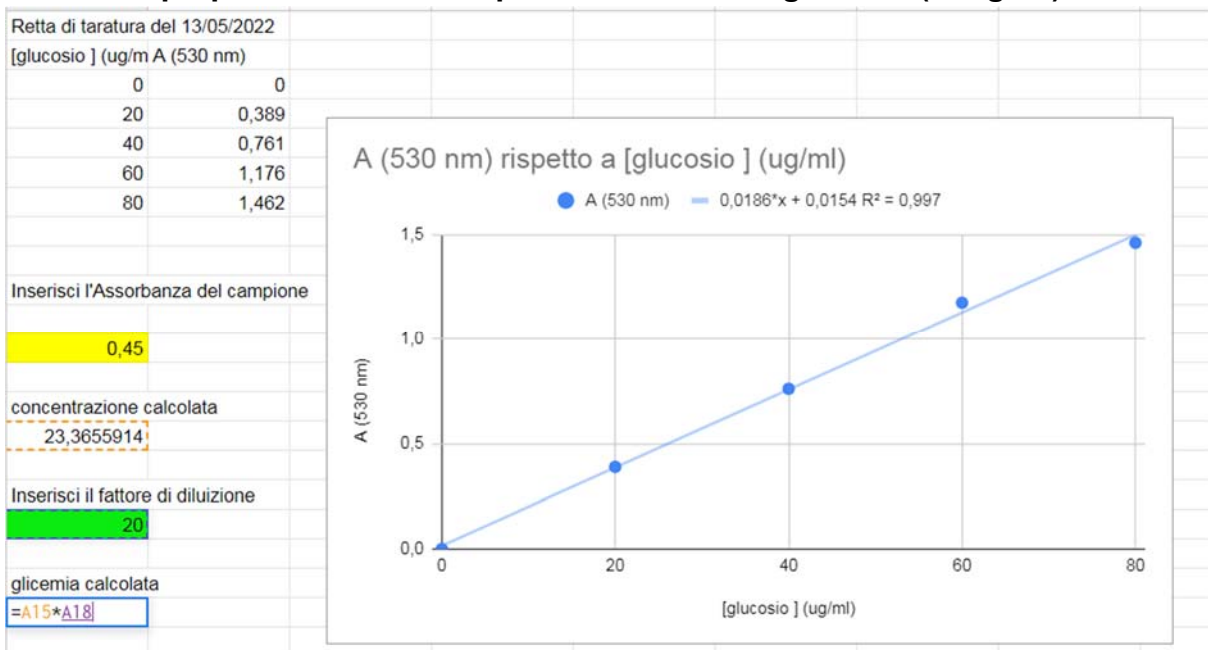
Attenzione: questa è la concentrazione di glucosio nella cuvetta. Dovremo tener conto della diluizione effettuata per ottenere la concentrazione di glucosio nel campione di siero.

Nello specifico, il fattore di diluizione si ottiene moltiplicando le due diluizioni successive, che sono state: 1:10 e 1:2; quindi, la concentrazione ottenuta deve essere moltiplicata per 20.

Predisponiamo una casella per inserire il fattore di diluizione utilizzato



Da ultimo prepariamo la casella per il calcolo della glicemia (in ug/ml)



Confrontiamo il valore ottenuto con i valori di riferimento.

(per la specie equina (range: 77-132 mg/dl; 0,77-1,32 mg/ml; 770-1320 ug/ml) ed effettuiamo la diagnosi

(ad esempio aggiungiamo una regola di formattazione condizionale che colora la casella di verde se il risultato è nel range fisiologico, di rosso se è al di fuori di tale range).

File Modifica Visualizza Inserisci Formato Dati Strumenti Estensioni Guida Appena modificato

100% € % ,00 123 ▾ Predefinito... 10 ▾ B I A

fx =A15*A18

A	B
Retta di taratura del 13/05/2022	
[glucosio] (ug/m A (530 nm))	
0	0
20	0,389
40	0,761
60	1,176
80	1,462

Inserisci l'Assorbanza del campione

0,85

concentrazione calcolata
44,87096774

Inserisci il fattore di diluizione

20

glicemia calcolata (ug/ml)
897,4193549

A (530 nm) rispetto a [glucosio] (ug/ml)

● A (530 nm) $y = 0,0186x + 0,0154 R^2 = 0,997$

Regole di formattazione condizionale

- 123 Il valore è tra 770 e 1320 A21
- 123 Il valore è minore di 770 A21
- 123 Il valore è maggiore di 1320 A21

+ Aggiungi un'altra regola

100% € % ,00 123 ▾ Predefinito... 10 ▾ B I A

fx =A15*A18

A	B
Retta di taratura del 13/05/2022	
[glucosio] (ug/m A (530 nm))	
0	0
20	0,389
40	0,761
60	1,176
80	1,462

Inserisci l'Assorbanza del campione

0,42

concentrazione calcolata
21,75268817

Inserisci il fattore di diluizione

20

glicemia calcolata (ug/ml)
435,637634

A (530 nm) rispetto a [glucosio] (ug/ml)

● A (530 nm) $y = 0,0186x + 0,0154 R^2 = 0,997$

Regole di formattazione condizionale

- 123 Il valore è tra 770 e 1320 A21
- 123 Il valore è minore di 770 A21
- 123 Il valore è maggiore di 1320 A21

+ Aggiungi un'altra regola