

ESERCITAZIONE:

Dosaggio del glucosio in siero

Mediante saggio spettrofotometrico

Parte 2

RICHIAMO DI TEORIA SULLA SPETTROFOTOMETRIA

Legge di Lambert-Beer:

$$A=abc$$

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

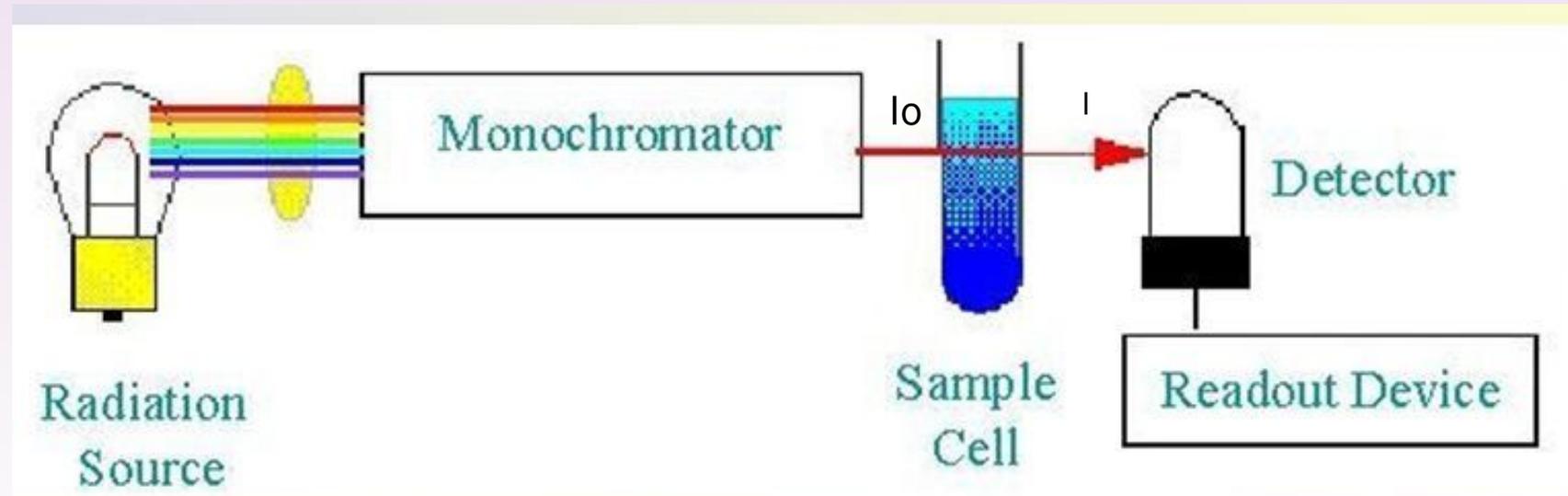
$a = \text{una data lunghezza d'onda, coefficiente di estinzione (molare oppure peso/volume) tipico della molecola}$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] oppure [$\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

$b = \text{cammino ottico percorso dalla luce all'interno del campione}$ [cm]

$c = \text{concentrazione del campione (molare oppure peso/volume)}$ [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



Quantificazione di glucosio in siero

In commercio sono disponibili diversi kit di saggio.

Tutti i kit sono **enzimatici**.

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

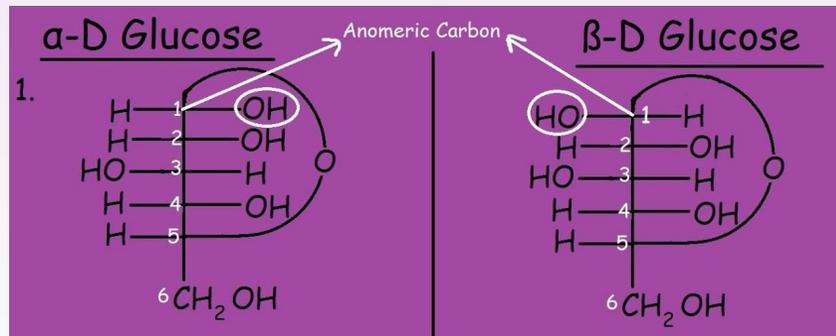
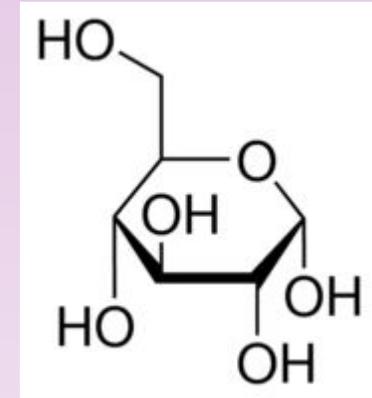
- 1) **Esochinasi (HK) (fosforilasi)**
- 2) **Glucosio ossidasi (GO) (ossidasi)**



**METODI
COLORIMETRICI**

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

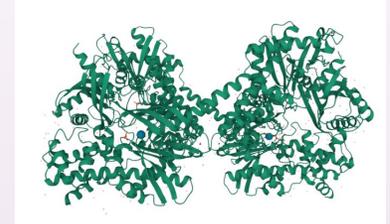
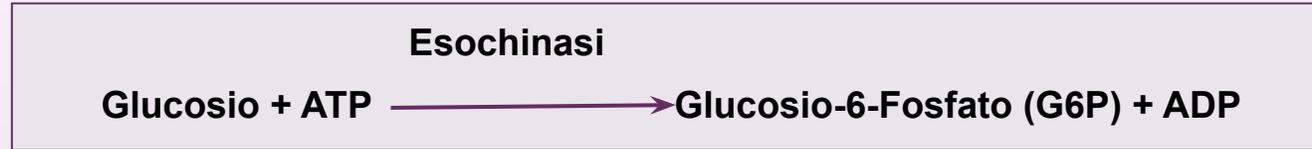
**METODO
POLARIMETRICO**



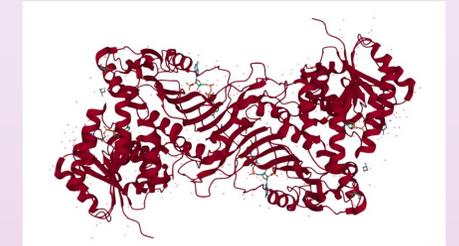
1) ESOCHINASI

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'**ASSORBANZA** A 340 nm DEL PRODOTTO DELLA II reazione (NADH) è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione

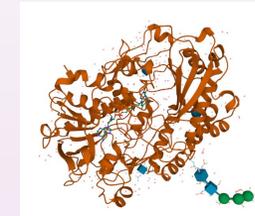
=> SAGGIO ENZIMATICO COLORIMETRICO

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

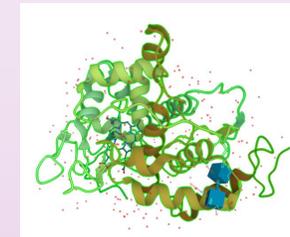
2) GLUCOSIO OSSIDASI (che vedremo in dettaglio)

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

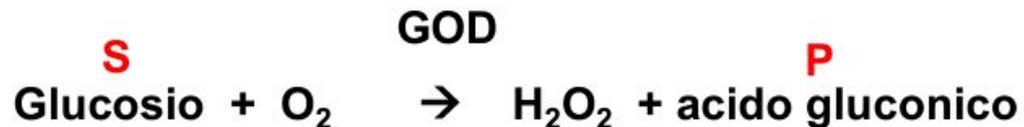


O-dianisidina ossidata assorbe la luce a 540 nm (PIENA REGIONE VISIBILE)

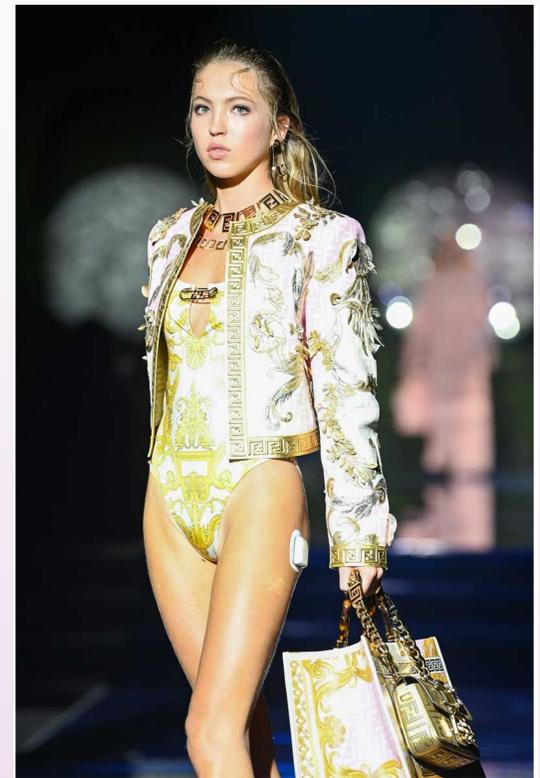
=> l'**ASSORBANZA** a 540 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente

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
Glucosio + GOD(FAD⁺) → acido gluconico + GOD (FADH₂)
 - 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
GOD(FADH₂) + O₂ → H₂O₂ + GOD(FAD⁺)
- 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.

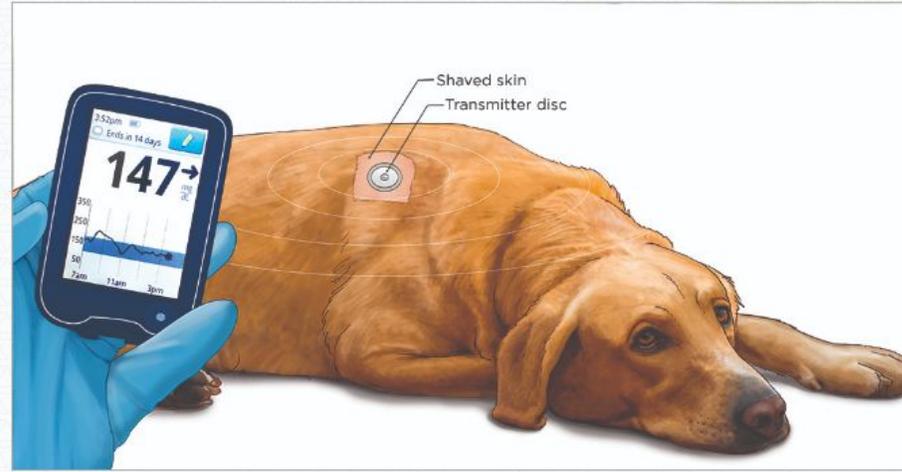


Figure 2. Components of a continuous glucose monitor. (B) The sensor records, stores, and transmits the data to the monitor. Illustration: Kip Carter

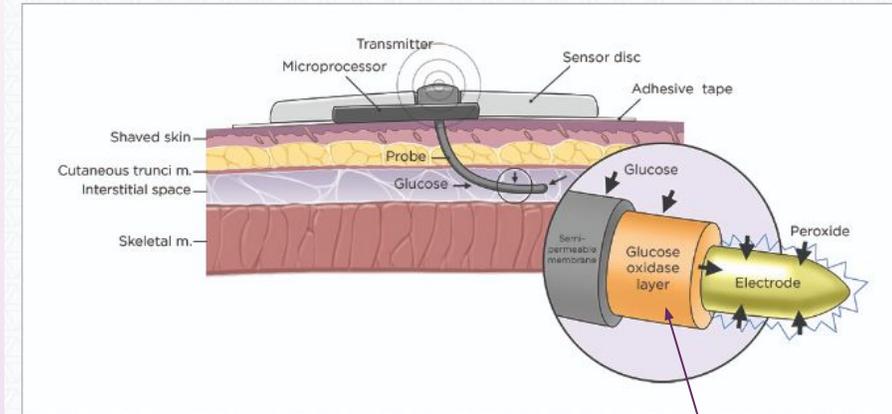


Figure 2. Components of a continuous glucose monitor. (A) The semipermeable membrane covering the subcutaneous probe allows glucose to pass through and come in contact with the inner layer, which contains glucose oxidase. The reaction of glucose with glucose oxidase creates hydrogen peroxide, generating 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

 **Improve
Veterinary Practice**

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>

**GLUCOSE
OXIDASE**

Search for Articles:

Title / Keyword

Author / Affiliation / Email

Animals

All Article Types

Search

Advanced

Journals / Animals / Volume 12 / Issue 7 / 10.3390/ani12070860



Submit to this Journal

Review for this Journal

Edit a Special Issue

Article Menu

Academic Editor



Francois-Rene Bertin

Subscribe SciFeed

K

Order Article Reprints



Open Access Case Report

Clinical Use of a 180-Day Implantable Glucose Monitoring System in Dogs with Diabetes Mellitus: A Case Series

by Antonio Maria Tardo ^{1,*} , Concetta Irace ² , Francesca Del Baldo ¹ ,
 Armando Foglia ¹ and Federico Fracassi ¹ ¹ Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, 40064 Bologna, Italy² Department of Health Science, University Magna Græcia, 88100 Catanzaro, Italy

* Author to whom correspondence should be addressed.

Animals **2022**, *12*(7), 860; <https://doi.org/10.3390/ani12070860>

Received: 10 December 2021 / Revised: 24 March 2022 / Accepted: 28 March 2022 / Published: 29 March 2022

(This article belongs to the Special Issue Animal Endocrinology and Medicine Research)



Share



Help



Cite

Discuss in
SciProfiles

Endorse



Comment



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"/> − + i

[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



REAGENTI NON PRESENTI NEL KIT

CAMPIONE:

Siero

H_2SO_4 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

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H290

H314

Può essere corrosivo per i metalli.

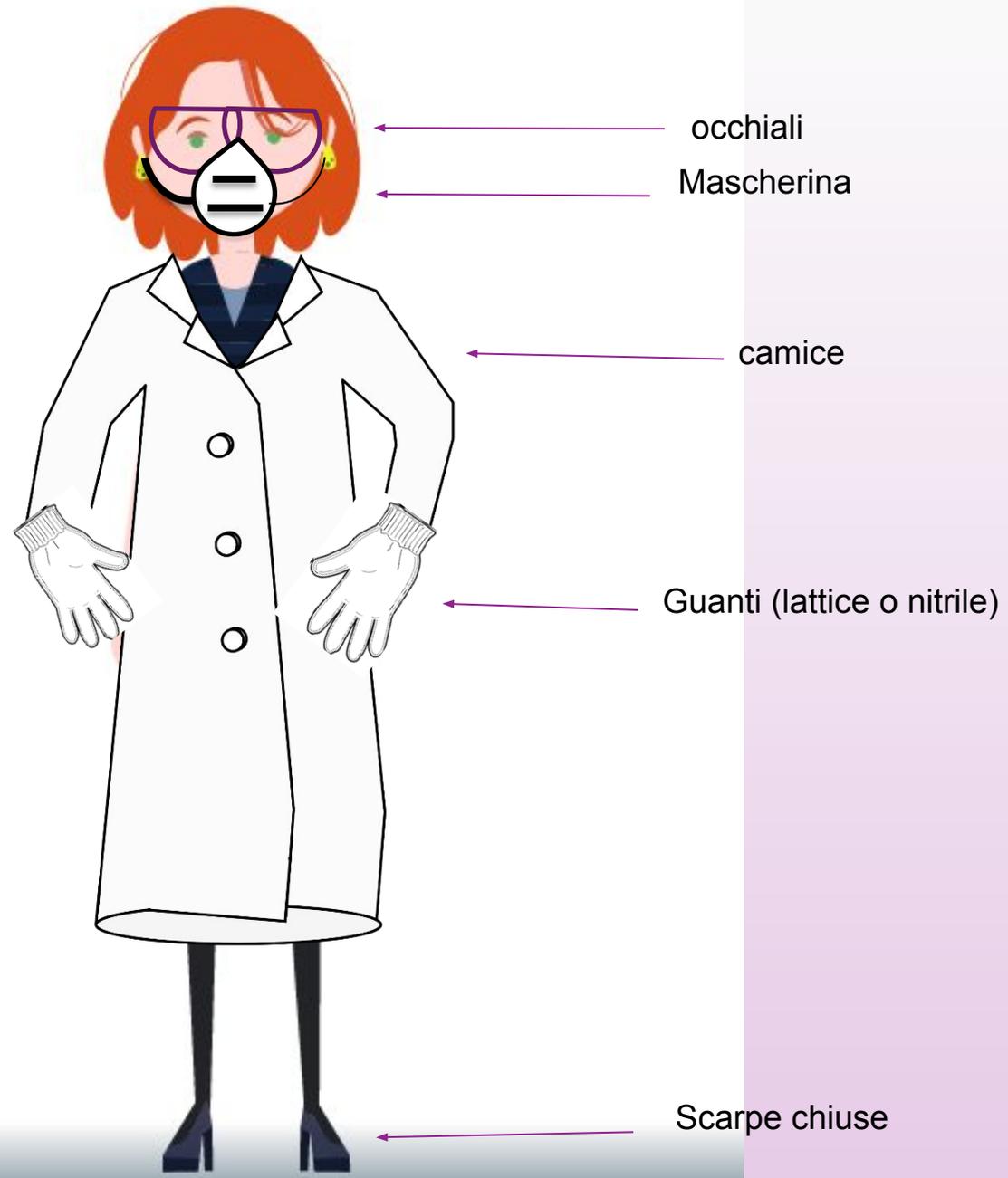
Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Consigli di prudenza

P280

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

DPI



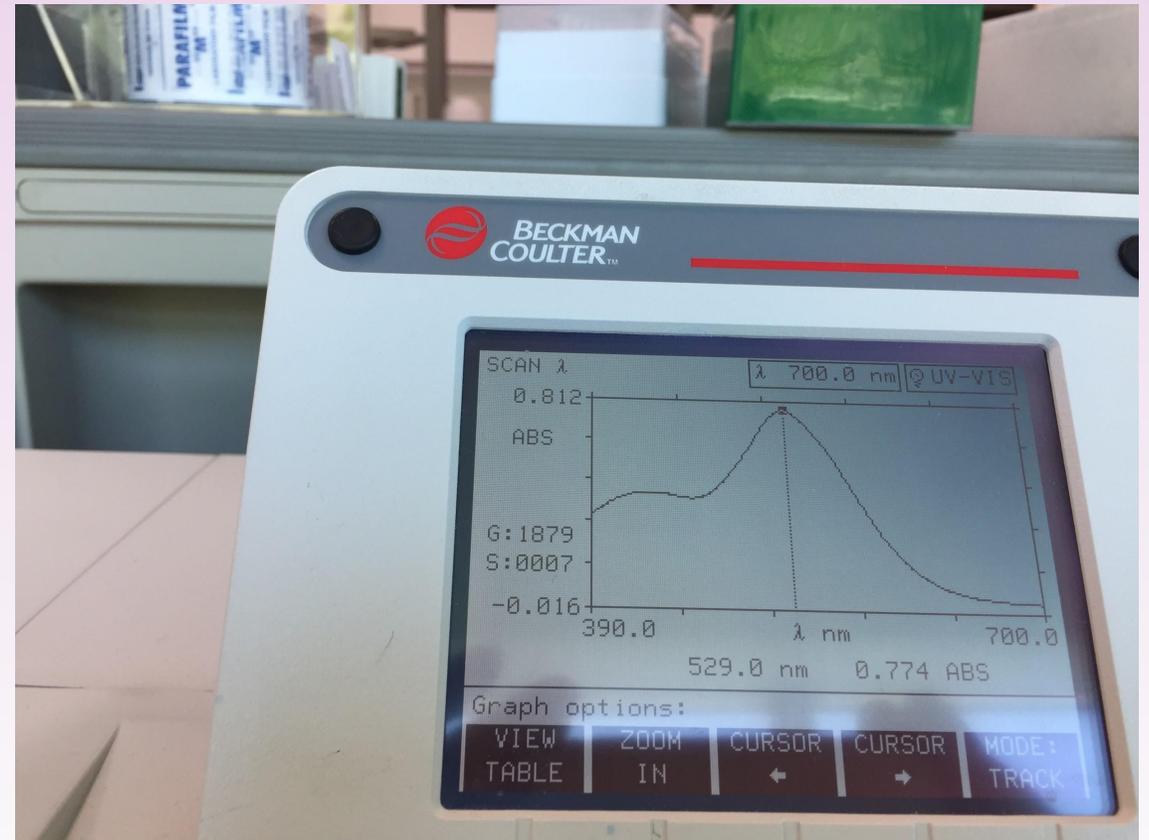
STRUMENTAZIONE

- 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 μ L a 2 mL e relativi puntali
- 5) termoblocco da settare alla temperatura di 37 °C

- 6) **DISPOSITIVO ELETTRONICO** (PC, tablet, smartphone) **dotato di foglio di calcolo!!!!**

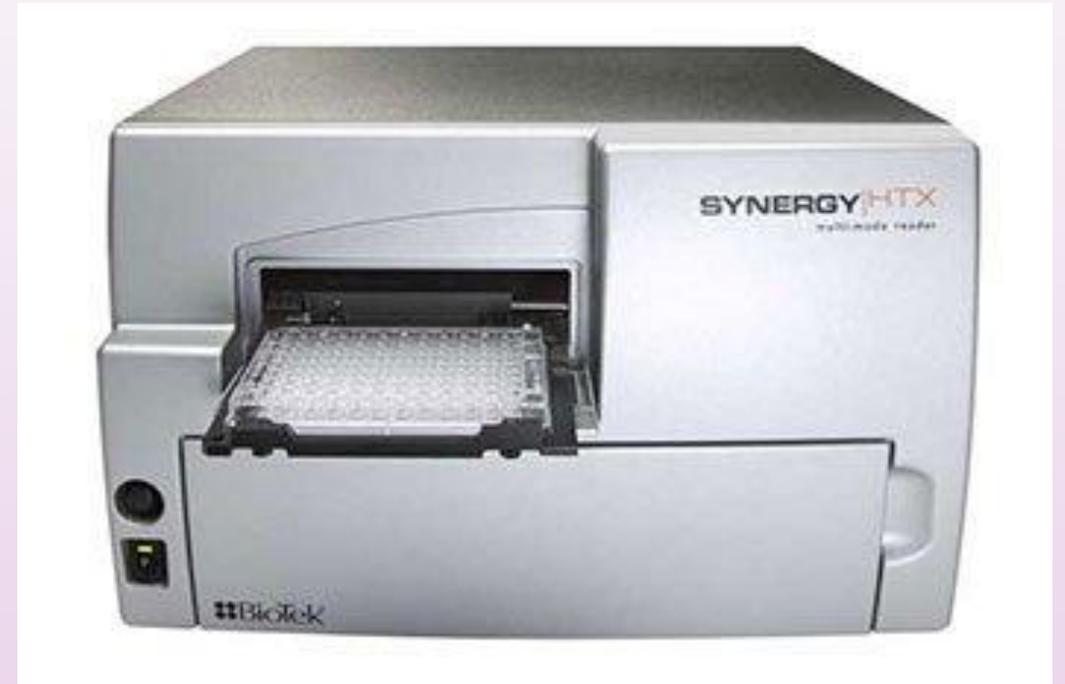
1) SPETTROFOTOMETRO

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



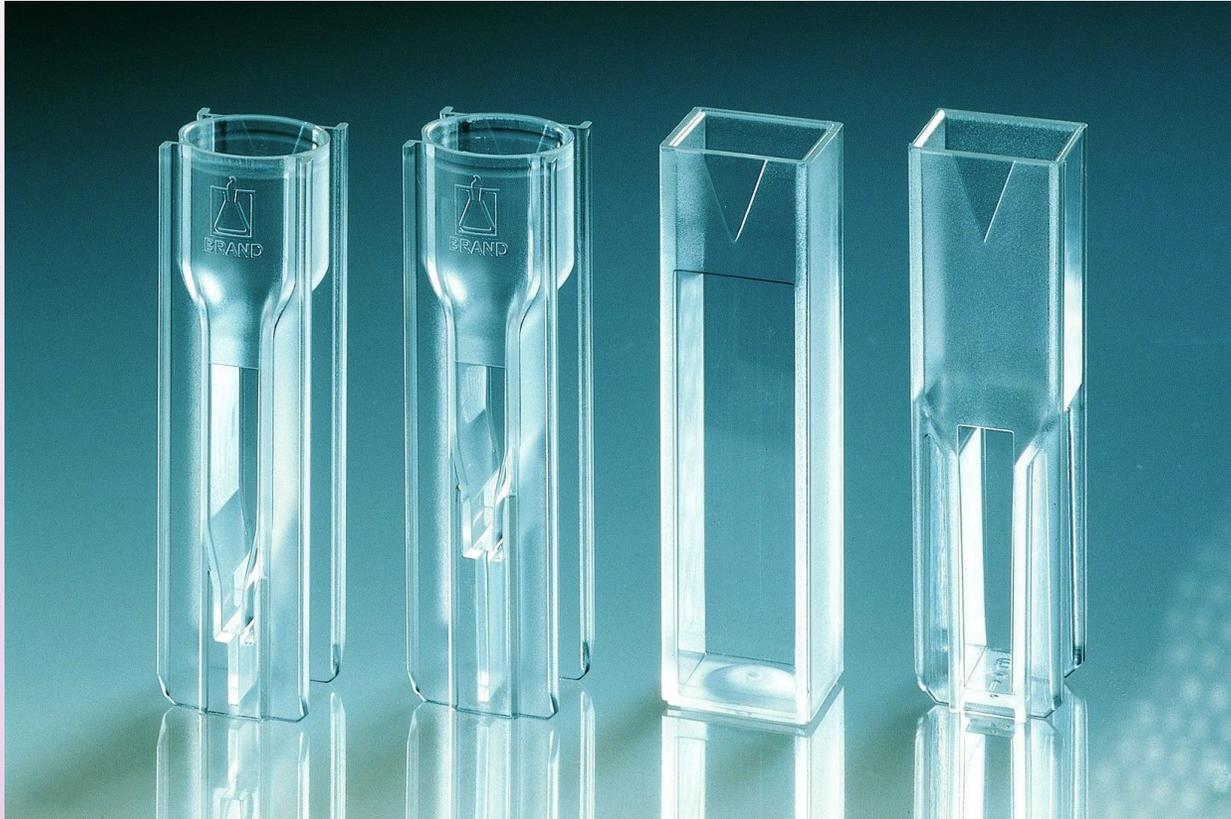


CUVETTA



PIASTRA

2) CUVETTE PER VISIBILE

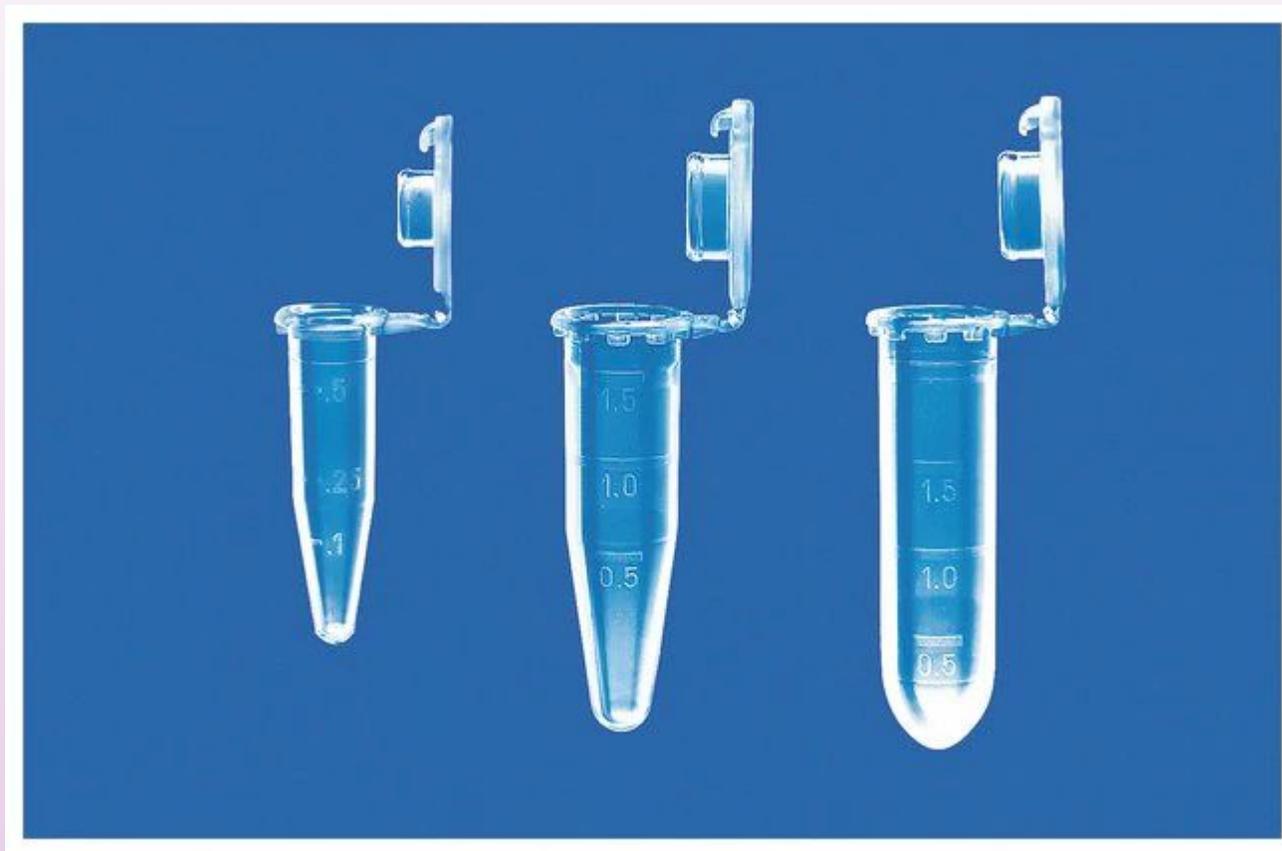


MATERIALE PLASTICO
TRASPARENTE ALLA LUCE VISIBILE.
USA E GETTA

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

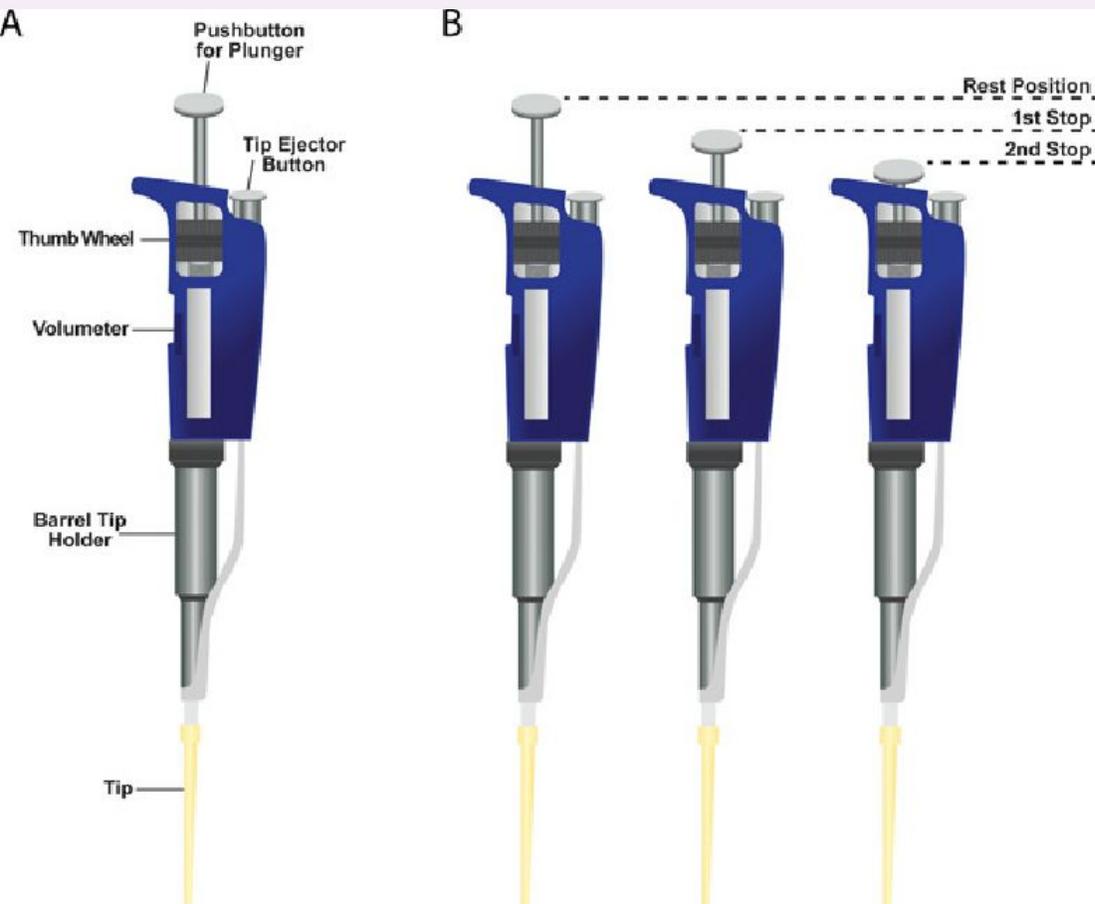


4. MICROPIPETTE

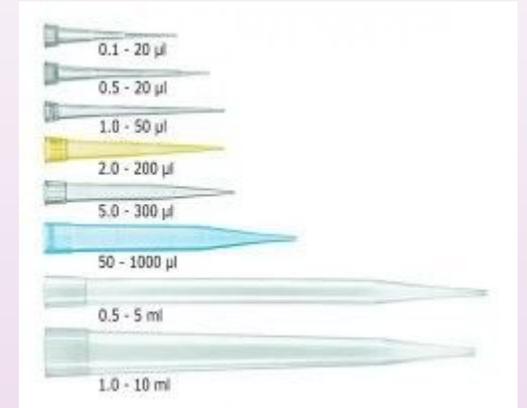
<https://youtu.be/3d-U9vowVwg>

PIPETTING SKILLS

Micropipetta



Puntali



5) TERMOBLOCCO settato a 37 gradi



PROTOCOLLO GAGO

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.

● PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI SAGGIO

- 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
alla concentrazione di
20-80 μg glucosio /ml

DOMANDE:

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

RISPOSTE

1) DI QUANTO DILUIRE IL CAMPIONE

Consultiamo i valori di riferimento per la specie

Consideriamo una c. iniziale teorica di 100 mg/dL

$100 \text{ mg/dL} = 100 \text{ mg} / 10^2 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL} \text{ (1000 } \mu\text{g/mL)}$

Per avere una c. di lavoro **50 $\mu\text{g/mL}$**
(Nel range richiesto dal protocollo)

⇒ Possiamo RAGIONEVOLMENTE
effettuare una **diluizione 1:20**

⇒ prepariamo una stock 1:10 e in cuvetta diluiamo 1:2

2) PERCHE' DEVO DILUIRE:

Per avere valori di assorbanza nel range
di capacità di lettura dello strumento

		Nitriti		
Esame microscopico del sedimento urinario	Eritrociti	$10^6/\mu\text{L}$	cane gatto	
	Leucociti	$10^3/\mu\text{L}$		
	Cellule epiteliali			
	Cilindri			
	Cristalli			
Ferro (Sideremia)	microg/dL	cane gatto cavallo	100 - 220 68 - 215 74 - 209	
Fosfatasi alcalina	U/L	cane gatto cavallo	≤ 280 25 - 93 ≤ 285	
Fosforo	mg/dL	cane gatto cavallo	2.5 - 4.7 4.0 - 5.2 2.0 - 4.3	
Fruttosammina	micromoli/L	cane	non diabetico diabetico	225 - 365 320 - 850
		gatto	non diabetico diabetico	190 - 365 350 - 740
Gamma-glutamnil-transferasi (GGT)	U/L	cane gatto cavallo	≤ 12 ≤ 5 ≤ 23	
Glicemia	mg/dL	cane gatto cavallo	60 - 110 70 - 110 77 - 132	
Potassio	mEq/L	cane gatto cavallo	4.0 - 5.2 3.0 - 4.8 2.8 - 4.5	
Lattico Deidrogenasi (LDH)	U/L	cane gatto cavallo	≤ 100 ≤ 100 ≤ 380	
Lipasi	U/L	cane gatto cavallo	≤ 250	
Magnesio	mg/dL	cane	1.0 - 2.2	
Proteine totali	g/dL	cane gatto cavallo	6.0 - 7.6 5.8 - 7.8 6.1 - 8.0	
		Proteine urinarie	mg/dL	cane
Albumina	g/dL	cane gatto cavallo	5.4 - 7.6 5.4 - 7.8 6.1 - 8.0	
		%	cane gatto cavallo	50 - 60 45 - 55 40 - 65
	g/dL	cane gatto	2.20 - 3.60 2.20 - 3.20	

Metodo di determinazione mediante retta di taratura (curva standard) a 5 punti

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

PREPARAZIONE DELLA RETTA DI TARATURA CON CAMPIONE STANDARD DI GLUCOSIO

La retta è stata costruita utilizzando D-glucosio in acqua a 5 concentrazioni crescenti nel modo seguente:

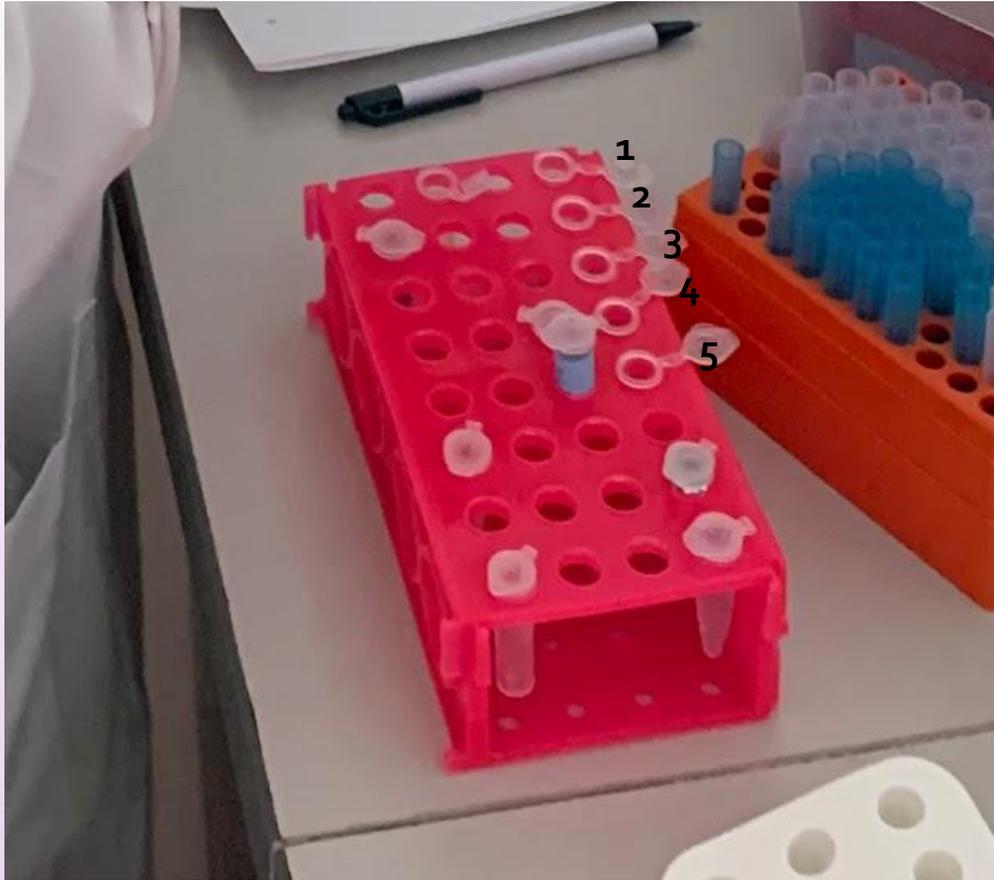
1) in 5 eppendorf da 1,5 ml abbiamo dispensato, utilizzando una micropipetta da 200 μ l, H₂O bidistillata e glucosio standard dal kit GAGO (diluito 1:10 =>conc iniziale: 100 ug/ml) secondo il seguente schema:

Concentrazione di glucosio standard in ogni eppendorf

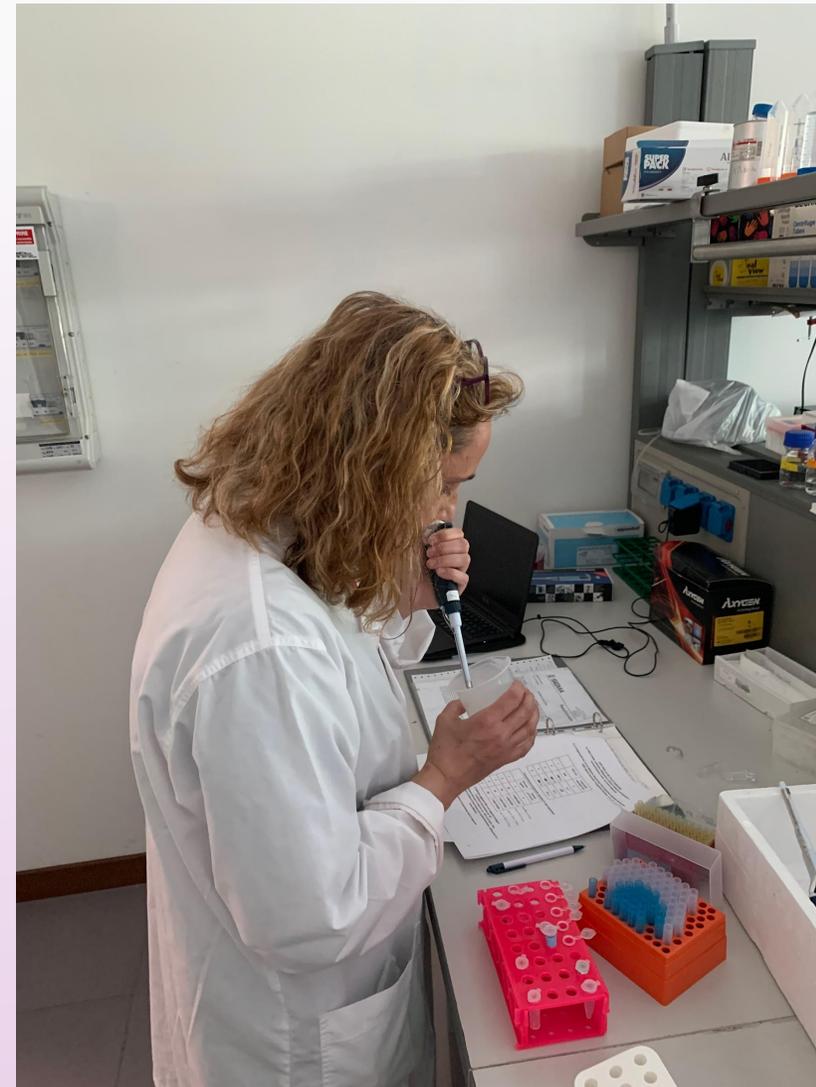
	H ₂ O (ul)	glucosio 100ug/ul (ul)
1	200	0
2	160	40
3	120	80
4	80	120
5	40	160



	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

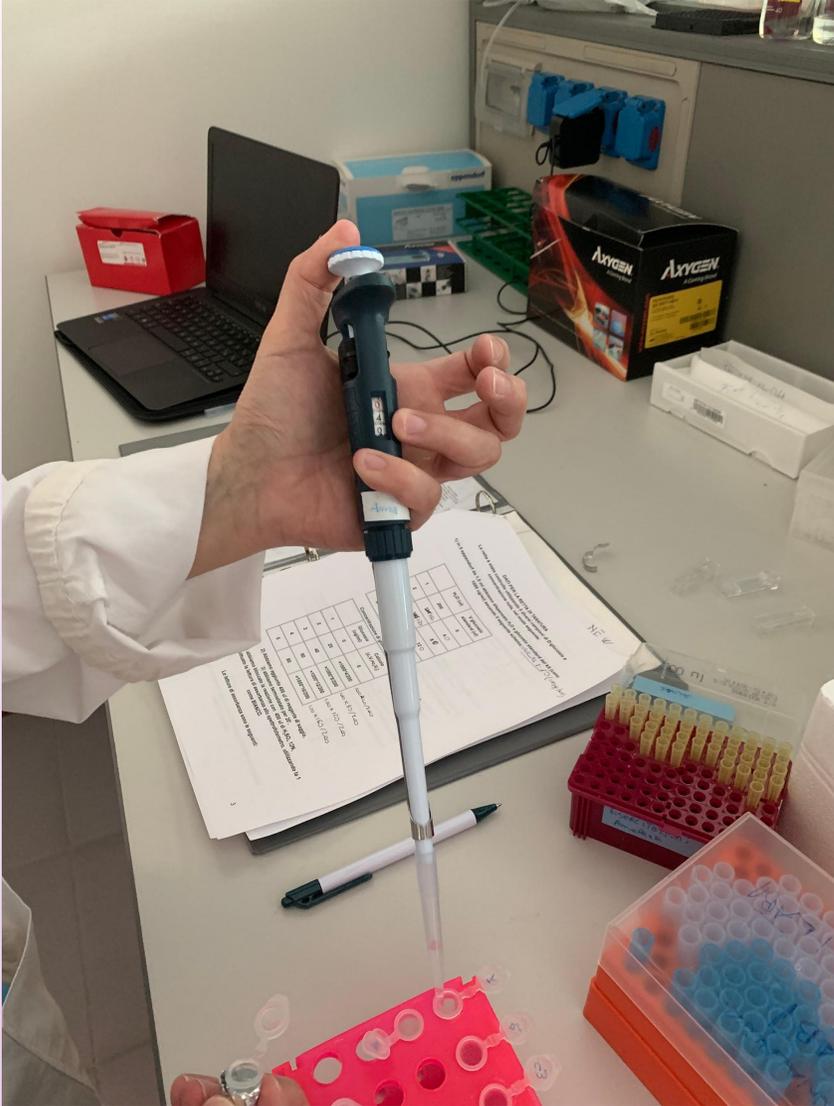


Disposizione delle eppendorf in rack



Dispensazione di H₂O bidistillata

2) In ogni eppendorf, mediante micropipetta da 1000 ul, abbiamo aggiunto 400 ul di reagente di saggio (contenente i 2 enzimi ed il 2° substrato, O-dianisidina)



Dopo l'aggiunta del reagente di saggio, le provette iniziano a sviluppare colore.

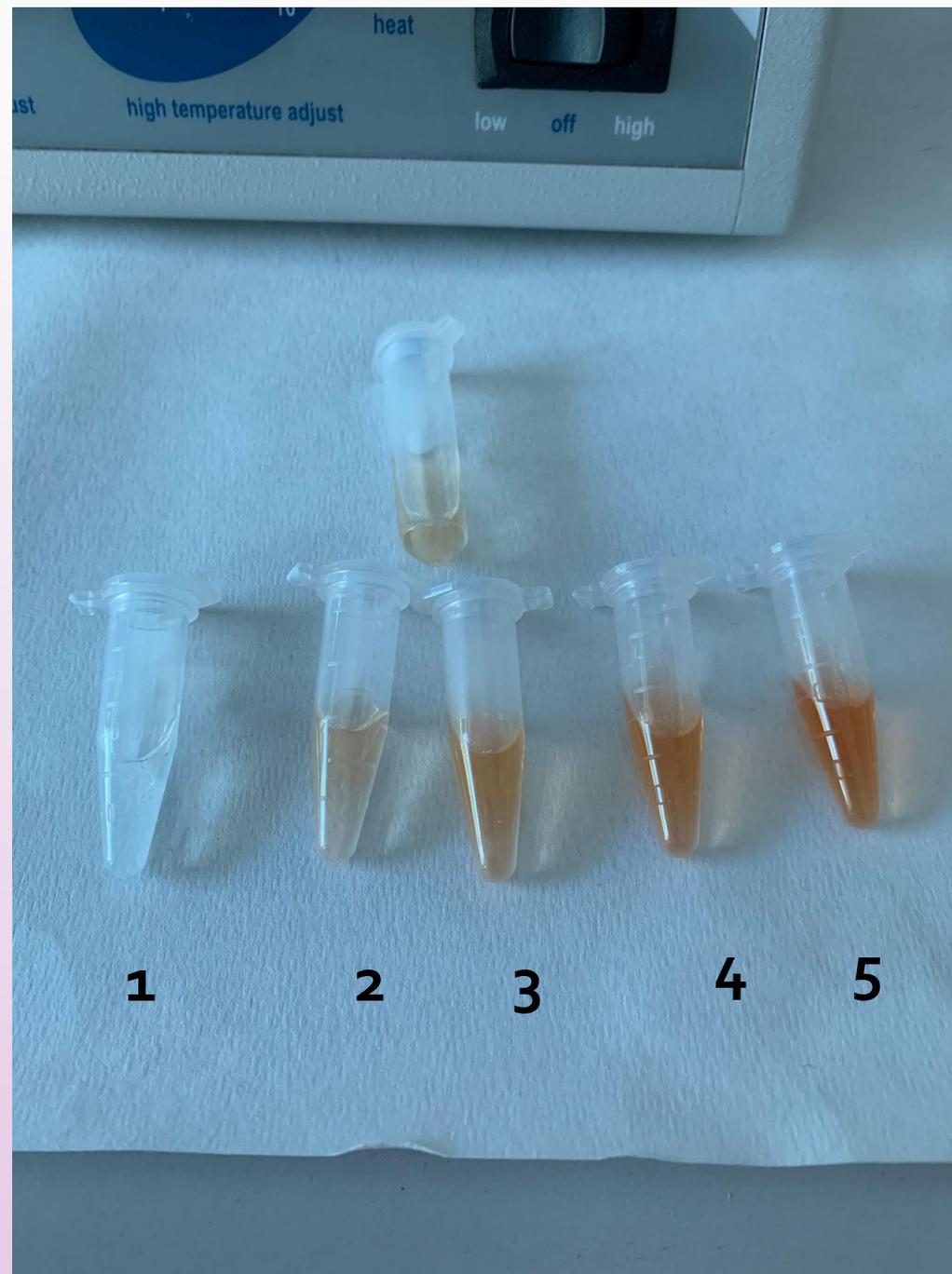


3) abbiamo inserito le provette in termoblocco settato alla temperatura di 37°C e le abbiamo termostatate per 20'



37°C

Dopo questo passaggio,
l'intensità del colore è aumentata

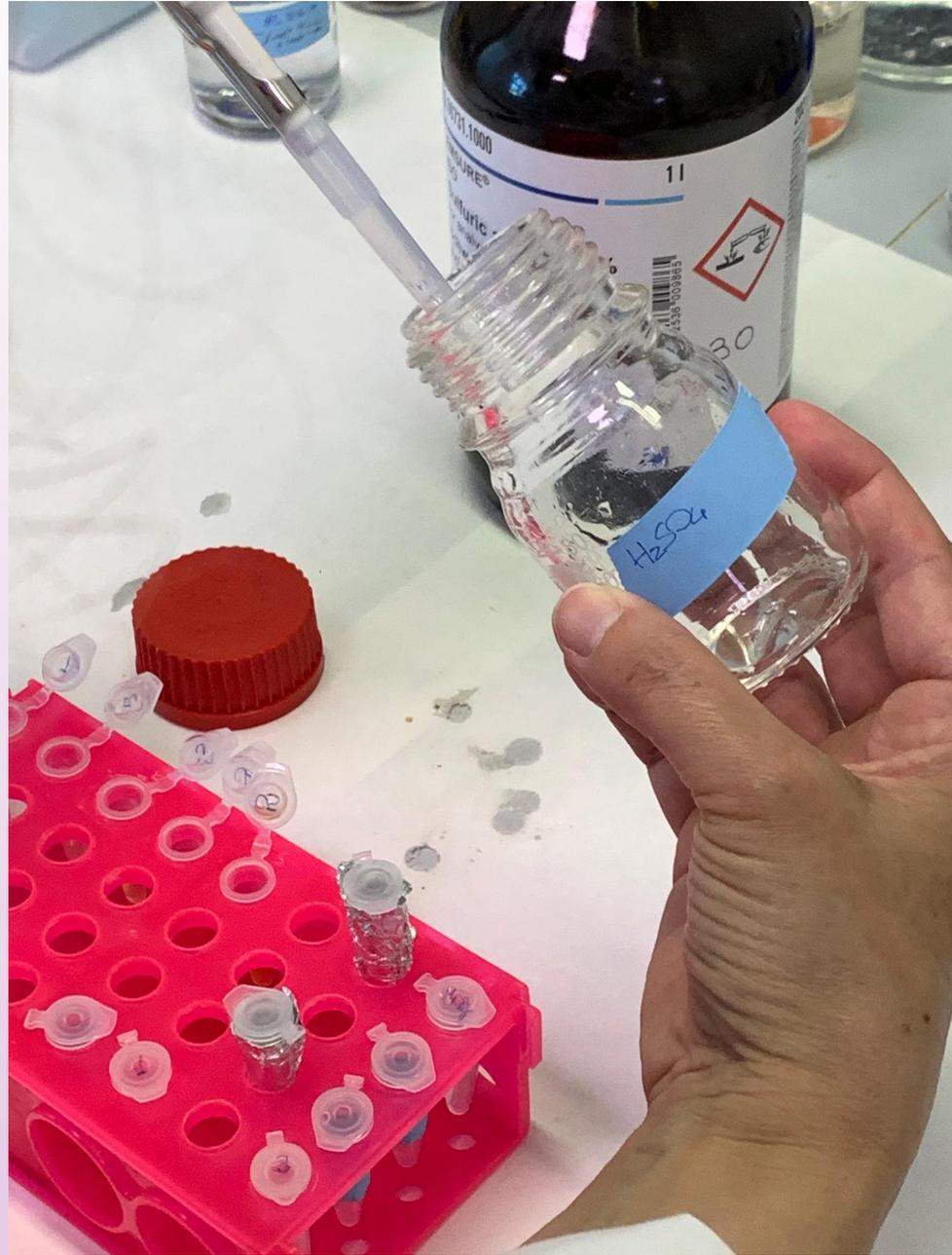


sotto cappa chimica abbiamo diluito H_2SO_4 al 98% (MW 98, $c=10\text{M}$) in H_2O bidistillata (6 ml H_2SO_4 , 4 ml H_2O) per portarlo alla concentrazione di 6M



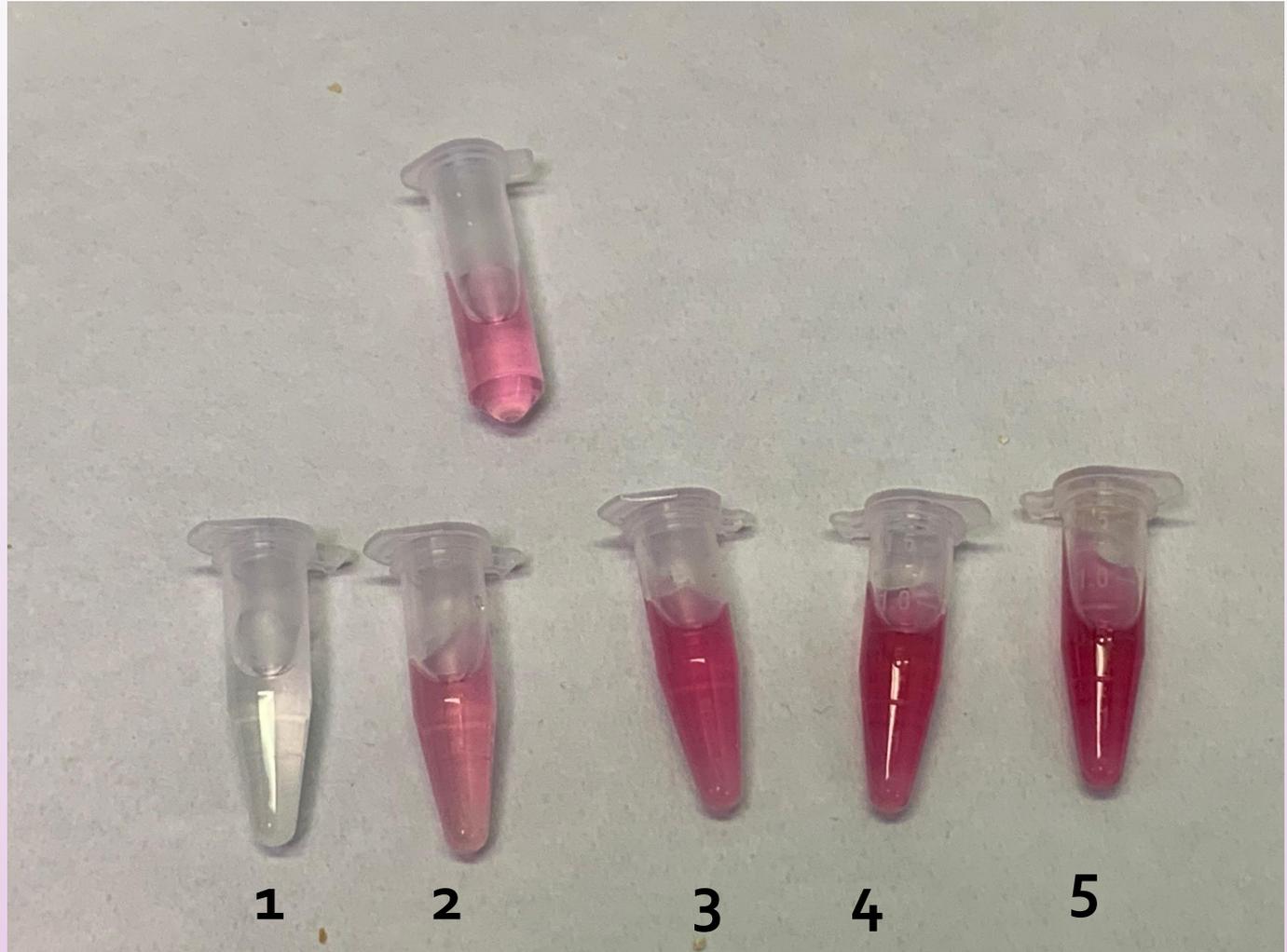
4) SOTTO CAPPA CHIMICA, abbiamo bloccato la reazione in ogni provetta con 400 ul di H_2SO_4 6M





L'aggiunta di acido ha 2 conseguenze:

- blocca la reazione enzimatica
- fa virare il colore del prodotto da giallo a rosa

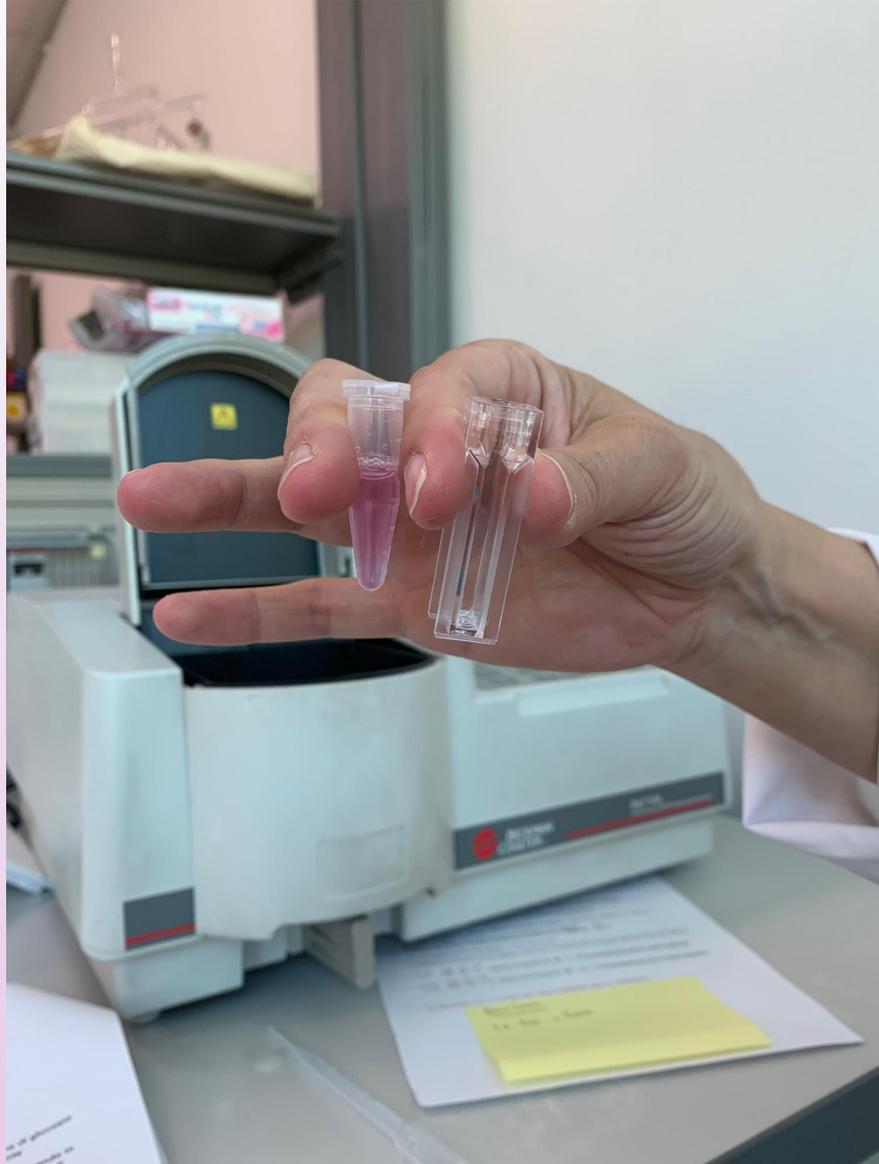


A questo punto abbiamo letto
l'assorbanza dei campioni allo
spettrofotometro

Abbiamo effettuato la lettura di assorbanza a 530 nm allo spettrofotometro, utilizzando la 1 come BIANCO.



Abbiamo quindi effettuato la lettura degli altri campioni ed annotato il valore di assorbanza letto





NB se si effettua uno **SPETTRO VISIBILE** di assorbanza del campione, si puo' verificare che il massimo cade esattamente alla lunghezza d'onda di 530 nm!)

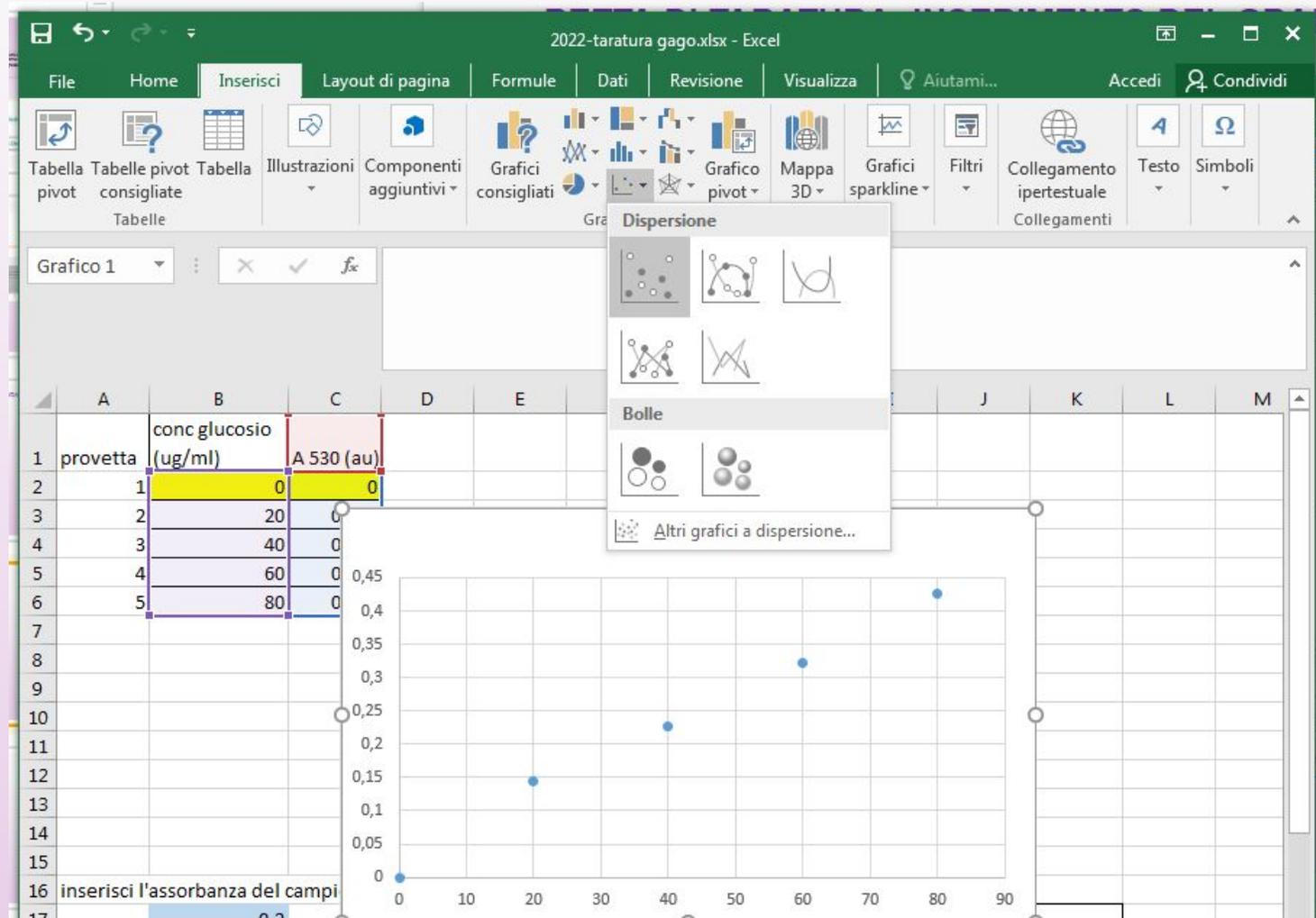


COSTRUZIONE DELLA RETTA DI TARATURA IN FOGLIO DI CALCOLO MICROSOFT EXCEL

In un foglio excel inseriamo 2 colonne nella prima la concentrazione di glucosio (asse delle ascisse) e nella seconda il valore di assorbanza letto allo spettrofotometro

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

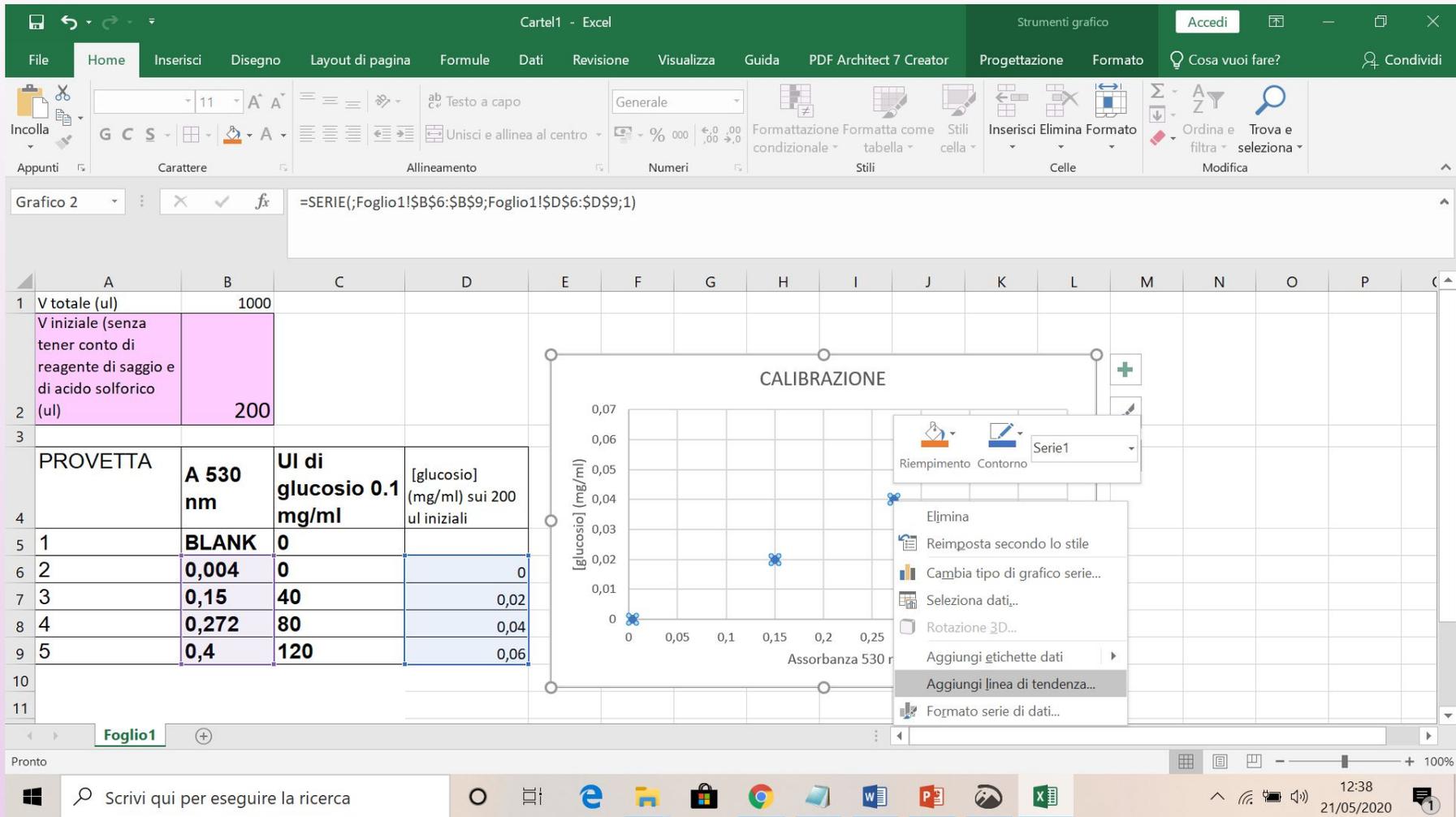
- Assi
- Titoli degli assi
- Titolo del grafico
- Etichette dati
- Barre di errore
- Linee della griglia
- Legenda
- Linea di tendenza

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

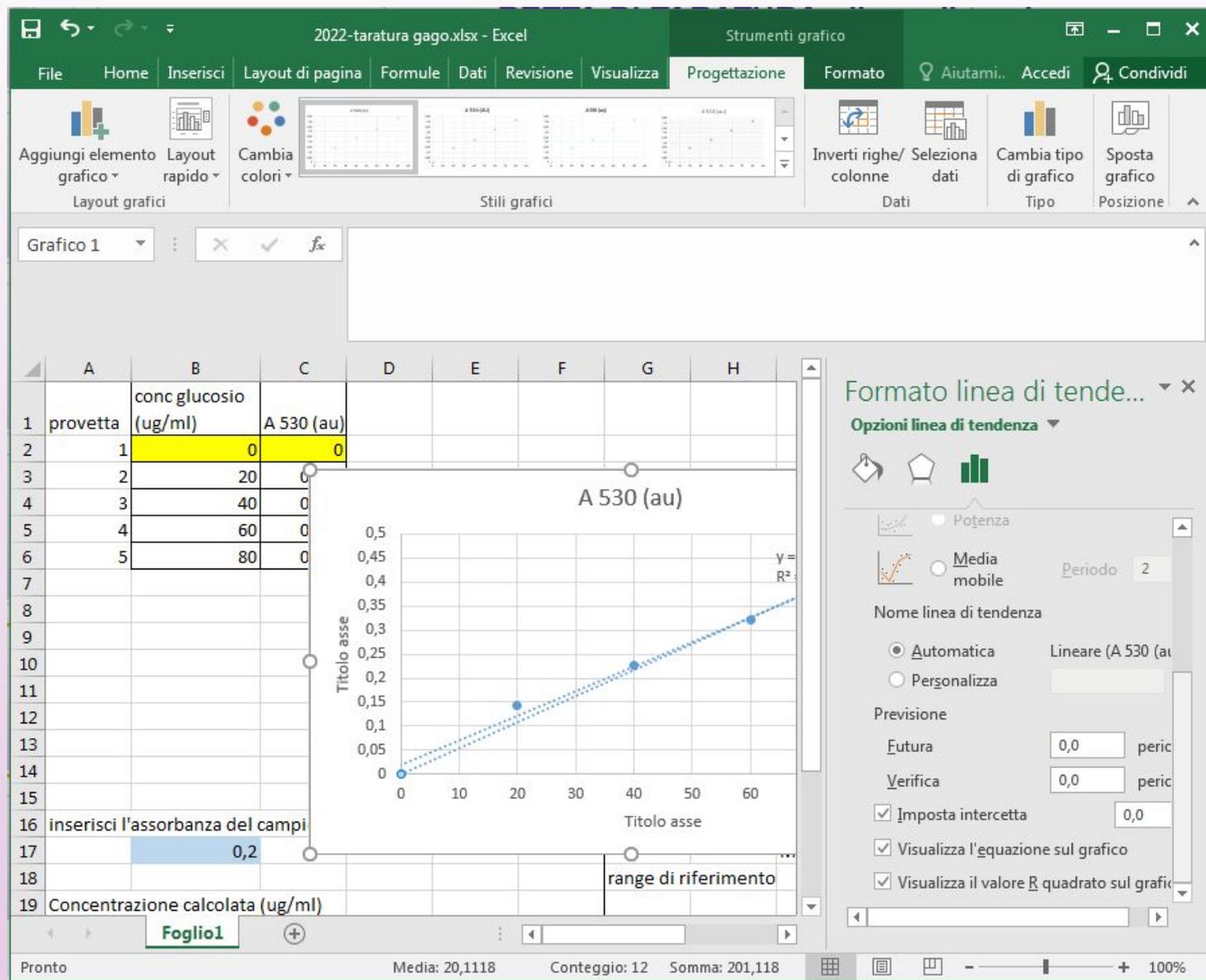
Foglio1

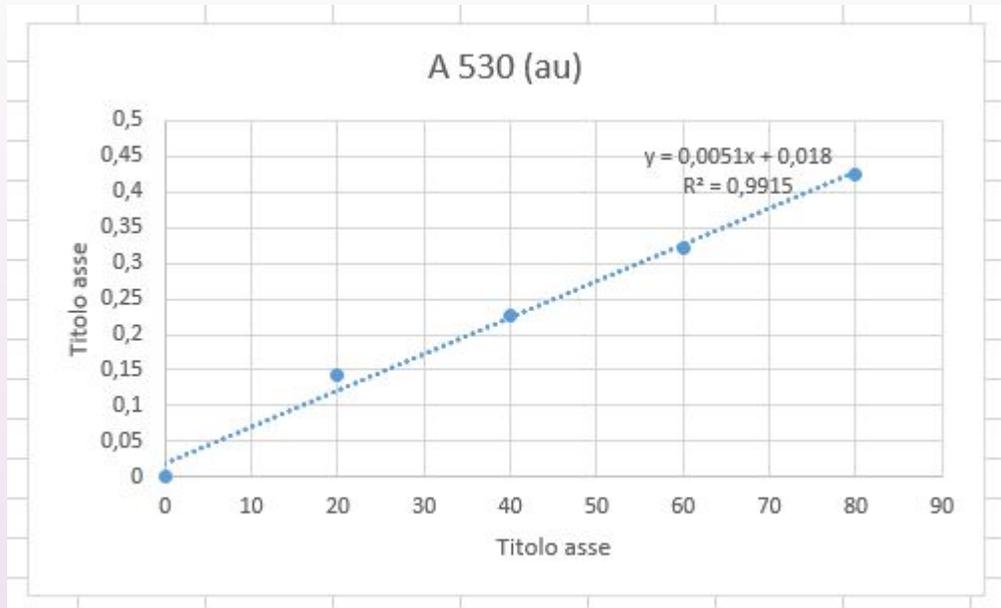
Pronto Media: 20,1118 Conteggio: 12 Somma: 201,118

RETTA DI TARATURA: aggiunta linea di tendenza

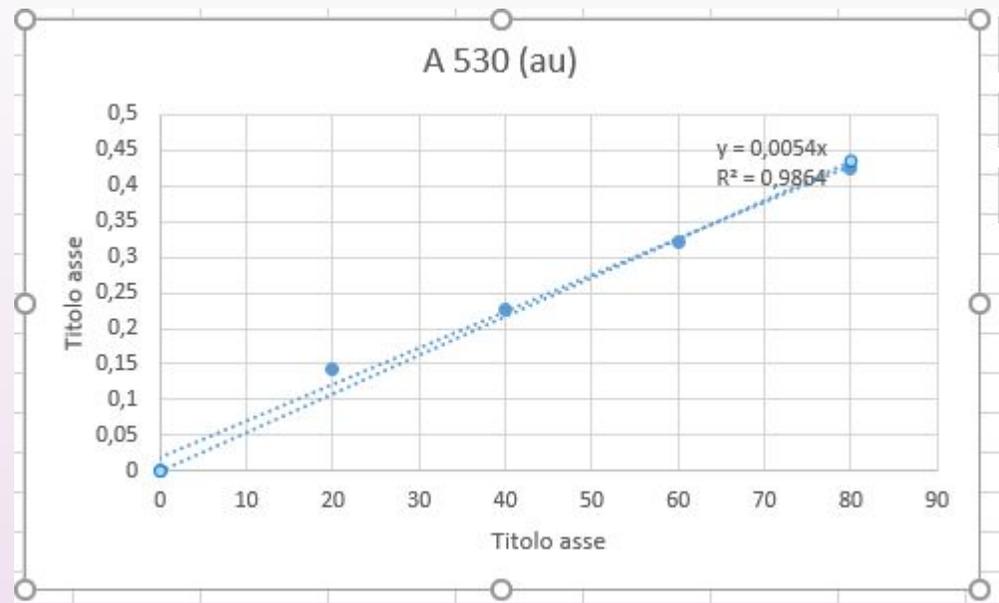


RETTA DI TARATURA: linea di tendenza: equazione e coefficiente di correlazione





Miglior retta



Retta passante per l'origine

Ci vediamo in laboratorio Motti

Portare

- camice
- dispositivo elettronico con foglio di calcolo

GRAZIE