

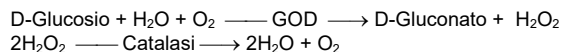
Eliminazione dell'eccesso di glucosio nei campioni
Reagenti per 32 campioni

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 et +8°C

Principio

Diversi test enzimatici della linea Roche sono basati sulla determinazione del glucosio, il che significa dover misurare il glucosio libero in una seconda cuvetta per poterlo poi sottrarre (Lattosio/Glucosio, Saccarosio/Glucosio, Maltosio ed Amido)

Questi test non funzionano correttamente se il campione contiene un eccesso di glucosio, perché la differenza di assorbanza tra le due cuvette sarà debole e non riproducibile ($\Delta A < 0,100$). Per questa ragione, le istruzioni per l'utilizzo di questi test indicano una procedura speciale per eliminare l'eccesso di glucosio, che prevede l'impiego degli enzimi glucosio ossidasi (GOD) e catalasi:



Il presente kit contiene i reagenti necessari per trattare 32 campioni secondo questa procedura.

Reagenti

- # 1: Reagente 1 (buffer): 1 flacone, ca. 70 ml
- # 2: Reagente 2 (GOD): 1 flacone (tappo rosso), ca. 3,5 ml
- # 3: Catalase (catalasi): 1 flacone (tappo nero), ca. 1,0 ml
- # 4: Campione di controllo: 1 flacone (tappo bianco), ca. 10 ml (Glucosio 25 g/L, Lattosio 1 g/L, Saccarosio 1 g/L)

I reagenti sono pronti all'uso. Sono stabili tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza indicata. Portare i reagenti a temperatura ambiente (20 – 25°C) prima dell'uso. Mescolare delicatamente prima di pipettare. Chiudere immediatamente dopo uso.

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per le informazioni di pericolo delle sostanze contenute, consultare le schede di sicurezza (MSDS) del prodotto, disponibili online all'indirizzo www.r-biopharm.com. Dopo l'uso, i reagenti devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Esempi di applicazioni

Determinazione del lattosio in prodotti delattosati (metodo basato sulla legge tedesca § 64 - L 01.00-90)

Questo metodo è adatto sia a prodotti liquidi che solidi, poiché la chiarificazione di Carrez viene condotta prima dell'ossidazione del glucosio:

- Per campioni solidi, prendere un campione rappresentativo (50 – 100 g), macinare ed omogeneizzare.
- Pesare con precisione ca. 25 g di latte in un becher, aggiungere 25 ml di acqua e mescolare. Per il formaggio (solido) o lo yogurt (semisolido), pesare con precisione 15 – 20 g di campione preparato come sopra ed aggiungere 30 ml d'acqua, riscaldare a 50°C per 20 min agitando.
- Aggiungere e mescolare bene ad ogni step le soluzioni di Carrez: 5 ml Carrez-I (3,6 g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ /100 ml) poi 5 ml Carrez-II (7,2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ /100 ml).
- Portare il pH a 7,0 - 7,5 con NaOH (1 M, ca. 3.5 ml).
- Trasferire quantitativamente il campione in un matraccio da 100 ml, riempire al segno e filtrare.
- Pipettare 5 ml del filtrato in una provetta da 50 ml (tipo Falcon). Per il controllo (fl. 4), pipettare 1 ml di campione e 4 ml di H₂O.
- Aggiungere successivamente 2 ml di tampone trietanolamina (reagente 1), 100 µl di GOD soluzione (reagente 2), 10 µl di catalasi e 2,890 ml di acqua (è possibile aggiungere 2,840 ml d'acqua e 50 µl di H₂O₂ 30%). Per evitare la schiuma, è possibile aggiungere una goccia di ottanolo.
- Mescolare delicatamente per 3 ore (agitatore rotatorio).
- Riscaldare la provetta in acqua bollente per 15 min, in seguito lasciare raffreddare.
- Mescolare ed eseguire il test Lattosio-glucosio **con 500 µl di campione** (ridurre H₂O in pari volume), 40 min per la reazione con la β-Galattosidasi, 20 min per la reazione del glucosio, il fattore 2 per il calcolo dei campioni ed il fattore 10 per il controllo.

Determinazione del lattosio nel latte o lo yogurt (procedura semplificata per campioni liquidi soltanto)

I campioni di latte sono liquidi dunque pronti all'uso. Per lo yogurt, il liquido è estratto con una centrifugazione:

- Omogeneizzare il campione di yogurt e versare ca. 50 g in provette da 50 ml (per es. 4 provette x 50 g)
- centrifugare a 3500 g per 10 min (2 - 8°C) e raccogliere il surnatante da tutte le provette per avere più di 10 ml totali
- trasferire 10 ml di surnatante in una provetta da 50 ml, aggiungere 5 ml di acqua dist. e portare il pH a 7,6 con NaOH (1M); portare a 20 ml con acqua dist. (cioè una diluizione al 1/2)
- nella procedura che segue, il volume del campione è portato a 2 ml in modo che la diluizione finale sia anche al 1/10.

L'eliminazione del glucosio si svolge in 3 tappe (incubazione con la GOD, chiarificazione di Carrez ed adeguamento del pH):

Pipettare in tubi di 50 mL	Campione di controllo (ml)	Latte (ml)	Yogourt (ml)
Tampone (reagent 1)	2,000	2,000	2,000
Campione	1,000	1,000	2,000
GOD (reagent 2)	0,100	0,100	0,100
Catalase (catalasi)	0,010	0,010	0,010
Acqua bidistillata	3,890	3,890	2,890
Mescolare, incubare per 3 ore su agitatore orizzontale (300 rpm). <i>L'incubazione può essere realizzata per tutta notte*</i>			
Riscaldare 15 min a 100 °C (inattivazione degli enzimi), in seguito lasciare raffreddare a t° ambiente			
Per Carrez, aggiungere e mescolare attivamente dopo ogni step			
Soluzione di Carrez-I	0,500	0,500	0,500
Soluzione di Carrez-II	0,500	0,500	0,500
NaOH (0,1 M)	1,000	1,000	1,000
Centrifugare 10 min a 3000 g e/o filtrare. Trasferire 4,5 ml di surnatante in una provetta da 10 ml ed aggiungere:			
HCl (0,1 M)	0,500	0,500	0,500
Mescolare, poi eseguire il test lattosio/glucosio con 500 µl di campione (ridurre H ₂ O in pari volume), 40 min d'incubazione per la β-Galattosidasi, 20 min per la reazione del glucosio, ed il fattore 10 per la diluizione **			

* Per il Saccarosio/glucosio, l'incubazione deve essere limitata alle 3 ore: se si lascia ad incubare tutta la notte, una parte del saccarosio è persa a causa di un'attività residua della GOD che ne causa un'idrolisi parziale.

** Per il Saccarosio/glucosio, il test è realizzato con 500 µl di campione, 40 min d'incubazione per la β-Fruttosidasi, 20 min per la reazione del glucosio e fattore 10 per il calcolo dei risultati. Un'applicazione per campioni di miele è disponibile su domanda.

Note

- Il limite inferiore del test Lattosio-glucosio è a 7 mg/l (v = 0,500 ml, ΔA = 0,020). Siccome il campione è diluito 1:10 durante la preparazione, il limite è portato a 70 mg/l (< 0,01%).
- Il test Lattosio-glucosio mostra reazioni incrociate con i galatto-oligosaccaridi (GOS) che possono essere presenti nel latte delattosato. In questo caso non è possibile quantificare il lattosio residuo sotto lo 0,03%.

Avviso: I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto

