

C5 ACTIVITEITSBEPALING MET R5 (MAS/A MUIZESERUM)  
=====Bereiding R5

Het serum wordt bereid door volwassen MAS/A muizen te verbloeden. Het serum moet direct in een ijsbad worden opgevangen. Direct na beëindiging van de afname wordt het serum in de kou afgedraaid. Bewaren bij  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Bepaling

De bepaling geschiedt in 1,6 x 10 cm reageerbuizen, die in ijs geplaatst worden.

In de aangegeven volgorde worden dan bij elkaar gevoegd:

0,100 ml Amboceptor 1:20  
0,050 ml E-suspensie 2,5%  
x ml monster  
0,050 ml R5  
0,250 ml -x ml V.B.

Het reactiemengsel wordt 1 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  geïncubeerd. Na afloop wordt de reactie gestopt met 2 ml ijskoude Veronal-buffer.

De cellen worden gecentrifugeerd 5 min. bij 3000 rpm.

Het supernatant wordt afgegoten en de buis uitgedroogd.

De packed cells worden dan gelyseerd in 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . De oplossing wordt bij 412 nm doorgemeten.

Buizen zonder monster geven de 0% hemolyse-waarde en buizen met 50  $\mu\text{l}$  N.S. geven de 100% hemolyse-waarde.

Literatuur:

- The J. of Exp. Med. 120, 897-924 (1964) KP 64/188  
J. Immunol. 89, 861 (1962)  
The J. of Exp. Med. 124, 1, 16 (1967) KP 67/24  
The J. of Immunol. 92, 4, 611 (1964) KP 64/141

BEREIDING KONIJNE IgG

Konijneserum dialiseren tegen Na fosfaat buffer 0.0175 M pH 8,5  
Na verwijderen van mogelijk ontstaan neerslag wordt het gedialiseerde serum op een Kodak DEAE-cellulose kolom gebracht die in evenwicht is met de bovengenoemde buffer.

Voor 1 ml konijneserum wordt een kolom van 25 cm lengte en 1 cm diameter gebruikt. Elutie dient langzaam te geschieden (max. 10 ml per 30 min.) De IgG populatie loopt in deze omstandigheden direkt door de kolom. Indien het serum sterk hemolitisch is wordt een deel van het hemolisaat tegelijkertijd geëluëerd. Herchromatografie is dan nodig. In het algemeen is het verkregen IgG preparaat voldoende gezuiverd voor verder werk.

Voor doeleinden waarbij zeer zuivere IgG nodig is, zal meestal een tweede elutie nodig zijn.

Het resterende eiwit wordt van de kolom gewassen met buffer die 0.5 M NaCl bevat.

## DE BEPALING VAN IMMUUNADHERENTIE

=====

### Reagentia:

GVB<sup>++</sup>: isotone veronal buffer, waarin  $1.5 \times 10^{-4}$  M Ca en  $5 \times 10^{-4}$  M Mg en 0,1% gelatine.

EA: standaard EA suspensie bevat  $5 \times 10^8$  cellen/ml. Voor bereiding zie voorschrift: "de bepaling van het complementgehalte in patientesera" (750/32).

HuEo: hiervoor worden cellen gebruikt van één donor van een plasma-campagne. De cellen worden bewaard in een dubbel volume Alsever en zijn gedurende 3 weken te gebruiken.

Bereiding standaard suspensie HuEo neg. cellen ( $1 \times 10^8$  cellen per ml) De cellen worden 1x gewassen met fysiologisch zout en 2x met GVB<sup>++</sup>; en daarna gesuspenseerd in GVB<sup>++</sup> ( $\pm 2\%$ ).

Van de suspensie wordt 1.00 ml in een 10 ml maatkolfje gelyseerd in aqua dest en hiervan wordt de extinctie gemeten bij 541 m $\mu$ .

De standaardsuspensie moet een  $E_{541}^1$  van 0,395 hebben, gemeten op de Unicam bij een lichtweg van 1 cm.

EDTA : 0.1 M Na<sub>3</sub>HEDTA pH 7.4

BSA : 1% BSA in fysiologisch zout + 0,02% NaAz

### Test:

De test wordt uitgevoerd in Cooke microtiter plaatjes. In ieder gaatje wordt 50  $\mu$ l GVB<sup>++</sup> gedruppeld met een dispopipet van 0,05 ml. Hierin wordt een 1/25 voorverdund serummonster door verdund met een eppendorfpipet; en wel 7 gaatjes per serummonster.

Daarna wordt in ieder gaatje 50  $\mu$ l EA suspensie in GVB<sup>++</sup> van  $2 \times 10^7$  cellen/ml gedruppeld.

Incubatie vindt plaats gedurende een  $\frac{1}{2}$  uur bij 37°C in een schudwaterbad. Na incubatie wordt aan ieder gaatje 50  $\mu$ l HuEo - 1/5 verdunde standaardsuspensie toegevoegd.

De standaardsuspensie wordt als volgt verdund:

1,0 ml standaardsuspensie HuEo  
 0,5 ml 0,1 M EDTA  
 1,0 ml GVB<sup>++</sup>  
 2,5 ml 1% BSA

Na het bijdruppelen van de 1/5 verdunde suspensie worden de plaatjes 10 min. schuddend en 50 min. stilstaand bij 37°C geïncubeerd.

Na een ½ uur en 3 uur kamertemperatuur wordt er macroscopisch afgelezen.

De titer wordt opgegeven als de hoogste serumverdunding die na 3 uur uitzakken nog net zichtbare immuunadherentie geeft.

#### Schema:

EA  
 serumverdunding } ½ uur 37°C schudden } 10 min. schudden } 37°C  
 + HuEo } 50 min. stilstaan }

#### Literatuur

Gewurz et al, Lanzet II : 356 (1966)

Nishioka, J. Immunol. 90, 86 (1963)

Gewurz et al, Int. Arch. Allergy 32, 64-90 (1967)

BEREIDING VAN Fab EN Fc FRAGMENTEN UIT EEN ZUIVERE POOL NORMAAL  
HUMAAN IgG

=====

1. Splitsing van IgG in Fab en Fc d.m.v. papaïne

Voor de splitsing van 300 mg IgG gebruikt men 3 mg papaïne.  
Los deze 3 mg papaïne op in 1 ml buffer I en laat deze in aanwezigheid van 0.2 M DTT (DiThioThreitol) en 0.04 M EDTA gedurende 1 uur preïncuberen bij 37°C. Stort hierna dit hele medium bij de oplossing van 300 mg IgG in 19 ml buffer I + 0,1 M NaCl.  
De eindconcentratie van het DTT en EDTA wordt nu respectievelijk 0,01 M en 0,002 M.  
Incubeer dit gedurende 2 uur bij 37°C.  
Stop de reactie door toevoeging van N-ethylmaleïmide tot 0,03 M.  
Dialiseer na een half uur tegen buffer II bij 4°C. (Dit om het DTT, EDTA en N-ethylmaleïmide benevens laag moleculaire peptiden te verwijderen, bovendien wordt de papaïne verder geremd door de pH verhoging en temperatuursverlaging. Tenslotte is het dialiseren nodig voor het opbrengen op de DEAE kolom).  
De splitsing van het IgG is compleet (95-100%).  
Test dit in I.E. tegen atot. (Het Fc zit in het β2 en snelle γ, Fab in het langzame γ-gebied).

2. Scheiding van Fab en Fc fragmenten

De scheiding geschiedt over een DEAE-Sephadex-A50 kolom. (Liever geen DEAE-Cellex kolom: minder scheidend vermogen).  
Startbuffer: buffer II  
Daarna buffer I laten doorlopen.  
Vervolgens een lineaire gradiënt van buffer I naar buffer I + 0,5 M NaCl.  
De piek, die er met de startbuffer van af komt bevat Fab.  
De piek, die er gedurende de gradiënt van af komt bevat Fc.  
Fab en Fc verder opzuiveren over respectievelijk aFc en aFab kolommen.

Buffers:

Buffer I = 0,03 M Tris-HCl pH 7,5  
Buffer II = 0,03 M Tris-HCl pH 8,5

Opmerkingen:

- a) Gebruik liever geen fosfaat buffers, deze bevorderen uitvloeking; vooral Fc is er gevoelig voor.
- b) Concentreer Fc niet verder dan een oplossing met  $E_{280 \text{ nm}}^{1\text{cm}} = 6,0$ .  
Concentreer IgG niet verder dan een oplossing met  $E_{280 \text{ nm}}^{1\text{cm}} = 20,0$ .  
Dit i.v.m. een exponentiële toename van de aggregatie bij lineaire toename van de concentratie (Vermijd Sephadex kolommen).
- c) Houdt het IgG en Fc nooit lang bij pH's lager dan pH 7,0, dit levert veel verlies door denaturatie op.
- d) EDTA is nodig daar DTT en papaïne geïnactiveerd worden door zware metalen.
- e) Een 1% IgG oplossing heeft een  $E_{280 \text{ nm}}^{1\text{cm}} = 14,0$ ,  
een 1% Fc oplossing een  $E_{280 \text{ nm}}^{1\text{cm}} = 11,5$  en  
een 1% Fab oplossing een  $E_{280 \text{ nm}}^{1\text{cm}} = 15,0$ .
- f) Van de DEAE-Sephadex-A50 kolom kunnen meer dan twee pieken komen. Dit buffersysteem scheidt namelijk ook snelle en langzame fragmenten van een soort. Test de pieken in I.E. en Ouchterlony.

BEREIDING VAN Fab EN Fc FRAGMENTEN UIT ZUIVER MYELOOM HUMAAN IgG

=====

1. IgG<sub>2</sub> en IgG<sub>4</sub>

De bereiding van Fab en Fc fragmenten uit IgG<sub>2</sub> en IgG<sub>4</sub> myeloom d.m.v. papaïne splitsing, geschiedt op dezelfde wijze als normaal IgG. Zie dus aldaar (750/36).

2. IgG<sub>3</sub>

Splitsing van IgG<sub>3</sub> d.m.v. papaïne.

Neem voor de splitsing van 300 mg IgG<sub>3</sub> 30 mg papaïne.

Los deze 30 mg papaïne op in 5 ml buffer I en laat deze in aanwezigheid van 0,2 M DTT (DiThioTheitol) en 0,04 M EDTA gedurende 1 uur incuberen bij 37°C.

Breng hierna snel het mengsel op een G25-sephadex kolom (klein) die bij 4°C staat en doorspoeld is met buffer I.

Elueer met buffer I en vang in fracties op.

Meet de extinctie bij 280 nm.

Kontroleer met de neus of er geen DTT meer bij de papaïne fracties zit. (Al een kleine hoeveelheid DTT is makkelijk te ruiken).

Neem uit een papaïne fractie waar geen DTT in zit, 3 mg papaïne en voeg dit toe aan een oplossing van 300 mg IgG<sub>3</sub> in buffer I + 0,1 M NaCl + 0,01 M EDTA zodat het totale volume 20 ml is.

Een 1% oplossing van papaïne heeft een  $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 8,5$ .

Laat het geheel 2 uur bij 37°C incuberen.

Stop de reactie door toevoeging van N-ethylmaleïmide tot 0,01 M.

Volg verder het voorschrift voor normaal IgG. (750/36)

Zie ook voor de scheiding van de fragmenten, de opmerkingen en de gebruikte buffer het voorschrift voor normaal IgG.

3. IgG<sub>1</sub>

Splitsing van IgG<sub>1</sub> d.m.v. papaïne.

Drie van de vier myeloom IgG<sub>1</sub>'s kunnen worden gesplitst in afwezigheid van reductie middelen. Deze heten papaïne gevoelig p.g.

Een van de vier kan alleen door papaïne gesplitst worden in aanwezigheid van reductie middelen. Deze heet papaïne ongevoelig p.o.

Als u niet weet of het te gebruiken IgG<sub>1</sub> p.g. of p.o. is, verdient het aanbeveling om eerst te proberen of het te splitsen is op de manier waarop IgG<sub>3</sub> wordt gesplitst. Is de opbrengst te laag, volg

dan het voorschrift voor splitsing van normaal IgG.

Opmerking:

Het verschil in behandeling bij de splitsing, tussen IgG<sub>2</sub> en IgG<sub>4</sub> en IgG<sub>3</sub> is gebaseerd op onderzoeken van Gergely et al, die vonden dat IgG<sub>2</sub> en IgG<sub>4</sub> in afwezigheid van reductiemiddelen papaïne ongevoelig (p.o.) en IgG<sub>3</sub> papaïne gevoelig (p.g.) waren. Van de IgG is driekwart p.g. en 1 kwart p.o.

Zie Gergely J. et al, Immunochemistry 7, pg. 1-6 (1970).