

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

IMMUNO-CHEMIE

1 =	De pentosefosfaatshunt activiteit van menselijke rode bloedcellen	3 pag.
2 =	Bepaling van acetylcholine esterase in serum m.b.v. een titrator	
3 =	Het maken van leucocyten suspensie (humaan)	
4 =	C.Dubbeldiffusie methode vlgs Ouchterlony	
5 =	Immuno-electroforese "Micro-methode"	2 pag.
6 =	Bereiding haptoglobine (Hp) uit humaan serum met een verhoogde concentratie haptoglobine type 1-1 (Hp $\uparrow$ 1-1)	
7 =	Bereiding IgM uit humaan serum met IgM paraproteïne	
8 =	Agar elektroforese van serumeiwitten	2 pag.
9 =	Eiwitbepaling met colorimetrische methoden	
10 =	Bereiding Humaan IgG (Batch methode)	
11 =	Bereiding muis IgA uit muis IgA myeloomserum	
12 =	Isolatie muis IgM uit IgM muis myeloomserum alleen voor immunisatie doeleinden	
13 =	Isolatie cavia snel Ig ($\gamma_1 + \gamma_{1A}$)	2 pag.
14 =	Isolatie muis IgG uit normaal muizeserum	
15 =	Polyacrylamide gel elektroforese	3 pag.
16 =	Isolatie humaan IgG uit totaal huumaanserum	2 pag.
17 =	Immunoradioelektroforese of autoradiogram	
18 =	Bereiding cavia fibrinogeen	
19 =	Bereiding humaan F _{ab} en F _c uit een zuivere pool humaan IgG	
20 =	Colorimetrische suikerbepaling vlgs Elson-Morgan	
21 =	Colorimetrische suikerbepaling met Indolreagens	
22 =	Het aantonen van huidreactieve antistoffen d.m.v. de Passieve Cutane Anafylaxie (PCA)- en/of de Prausnitz-Küstner (P.K.) reactie	2 pag.
23 =	Histamine bepaling volgens de methode van Shore etc.	2 pag.
24 =	Bereiding muis fibrinogeen	
25 =	Isolatie cavia langzaam IgG (γ_2)	
26 =	Isolatie paarde IgG uit totaal paardeserum	
27 =	Voorschrift voor de isolering van L-keten uit humaan γ -globuline	
28 =	Voorschrift voor de isolering van H-keten uit humaan γ -globuline	
29 =	Antistofbepaling met quantitatieve precipitatie test	2 pag.
30 =	Potentiometrische titratie	5 pag.
31 =	Conway microdiffusie techniek	5 pag.

vervolg I N H O U D

=====

0560 en 750

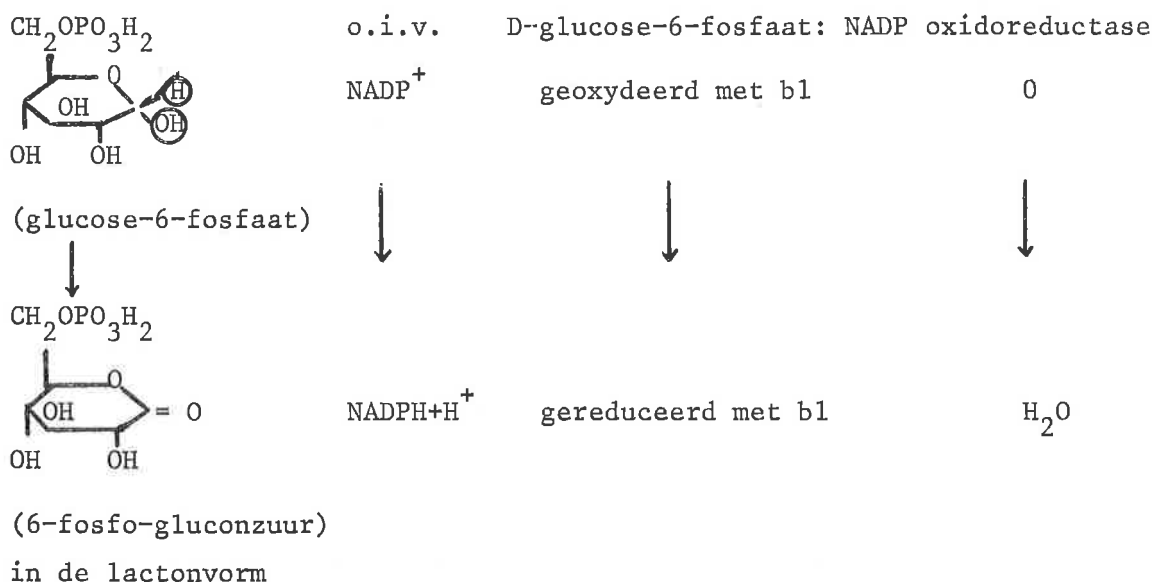
32 =	Bepaling van het complement gehalte in patientesera	11 pag.
33 =	C5 activiteitsbepaling met R5 (Mas/A muizeserum)	
34 =	Bereiding konijne IgG	
35 =	De bepaling van immuunadherentie	2 pag.
36 =	Bereiding van Fab en Fc fragmenten uit een zuivere pool normaal humaan IgG	2 pag.
37 =	Bereiding van Fab en Fc fragmenten uit zuiver myeloom humaan IgG	2 pag.
38 =	C1-esterase remmer bepaling in patientesera	6 pag.
39 =	Isolatie van paraproteïne IgA uit patienteserum	3 pag.
40 =	Batchgewijze zuivering van humaan IgG uit een immunoglobuline fraktie	

DE PENTOSEFOSFAATSHUNT ACTIVITEIT VAN MENSELIJKE RODE BLOEDCELLEN

Literatuur: Proefschrift Dr J.A. Loos pag. 21 e.v.

Principe

Het is reeds lang bekend (Warburg c.s. 1931, Biochem.Z., 242 pag. 206), dat in menselijke erythrocyten een systeem aanwezig is dat de oxydatie van glucose-6-fosfaat met behulp van NADPH_2 en methyleenblauw versnelt. De eerste stap van deze afbraak verloopt schematisch als volgt:



Na verbreking van de lactonvorm van het 6-fosfogluconzuur vindt een tweede oxydatie plaats, waarbij 6-fosfogluconzuur geoxydeerd en gedecarboxyleerd wordt tot ribulose-5-fosfaat m.b.v. NADP^+ en 6-fosfo-D-gluconaat: NADP oxidoreductase.

Ook hierbij wordt het gevormde $\text{NADPH}+\text{H}^+$ weer geoxydeerd m.b.v. met bl. (zie voor het verdere verloop van de pentoseafbraak Lit.1).

(Zonder methyleenblauw vertonen de rode cellen zeer weinig O_2 -opname).

Er zijn 2 erfelijk voorkomende afwijkingen in menselijke erythrocyten, waarbij D-glucose-6-fosfaat: NADP oxidoreductase of

6-fosfo-D-gluconaat: NADP oxidoreductase

afwezig (deficiënt) zijn in verschillende mate (0-50%)

De maximale capaciteit van het pentosefosfaatshuntsysteem, getest door de meting van de O_2 -opname (in aanwezigheid van methyleenblauw) van erythrocyten suspensies, is in deze afwijkende celsoorten sterk verminderd.

Vorbereidingen

1. Zet waterbad klaar op $37^{\circ}C$
2. Slijpstukken invetten van [
 - 1) zijkraan-vaatjes
 - 2) manometers
3. Hoofdkraan-slijpstuk op gasdichtheid controleren laat de kraan open!
4. Manometer vloeistof op luchtbelllen controleren
5. Zet zijkraan op vaatjes, borgen met elastiekjes laat de kraan open!
6. Zet vaatjes aan manometers, borgen met veertje
Noteer gasvolumina vaatjes en bijbehorende manometers!
7. Zet manometers in bad, 10 minuten schudden met open kranen
8. Kiep inhoud zijvat in hoofdvat
9. 15 minuten schudden
10. Rechterbeen manometervloeistof op 15 cm instellen,
daarna kranen dicht (zijkraanvaatjes dus ook!)
manometer aflezen, stopwatch indrukken
voorbeeld 1499 1500
11. Om de 2 minuten aflezen - tijd en stand noteren (telkens rechterbeen op
15 instellen)
12. Aflezingen corrigeren voor TB
13. Vermenigvuldigen met vaatconstante
14. Waarnemingen uitzetten tegen tijd
uit de telling van de rechte μl O_2 -opname/ml cellen/uur berekenen
 $n.w. = 24 \text{ g} \pm 22.4 \mu l/ml \text{ cellen/uur}$

Reagentia

a) Krebs Ringer fosfaat pH = 7.4 (vers bereiden!)

deze oplossing wordt gemaakt uit geconcentreerde basisoplossingen

10.0 ml 9 % NaCl (1.54 M)

0.4 " 11.5 % KCl (1.54 M)

0.3 " 12.2 % CaCl₂ (0.11 M)

0.1 " 38.2 % MgSO₄ · 7H₂O (0.154 M)

97.2 " H₂O

20.0 " 0.1 M fosfaatbuffer pH = 7.4

17.8 g Na₂HPO₄ · 2H₂O

20.1 ml 1N HCl

} aanvullen tot 1 liter

De pH van de Ringer wordt gecontroleerd en eventueel bijgesteld met (NaOH) loog of zuur (HCl) (t=37°C)

b) 17.5 mg metyleenblauw

125.0 " adenosine

316.0 " glucose

oplossen in t=37°C

25 ml Ringer verwarmen tot 60-80°C toegestaan

20 min. lang perslucht doorleiden

c) vers citraat bloed (een buis voldoende)

10 ml afnemen in 1.9 ml citraat (2.3 g % glucose, 2.7 g % dinatrium-citraat anh.)

Het bloed wordt gecentrifugeerd (5 min. 2000 g, KT), het plasma verwijderd en daarbij de witte cellen, daarna de rode cellen, 3 x wassen met 0.9 % NaCl.

Bij de laatste maal afdraaien 10 minuten draaien (2000 g) en scherp afzuigen.

d) Cel suspensie: 2.4 ml cellen

3.6 " Ringer

} door whirlmixen mengen, 20 min. lucht doorleiden

e) 10 % KOH

Pipetteerschema:

Vaatje:	I	II	t.b.
---------	---	----	------

Hoofdvat: celsuspensie	2	2	-
------------------------	---	---	---

Ringer	-	-	2
--------	---	---	---

Zijvat: m bl	0.4	0.4	-
--------------	-----	-----	---

Ringer	-	-	0.4
--------	---	---	-----

Centrale vat: 10% KOH	0.15	0.15	0.15
-----------------------	------	------	------

+ waaiertje (muizetrappetje)

BEPALING VAN ACETYLCHOLINE ESTERASE IN SERUM M.B.V. EEN TITRATOR
=====Reagentia

1. 1/15M fosfaatbuffer pH 7,36 bij 38°C
2. 0,9 % NaCl, met een pH van 7,4
3. Acetylcholine chloride (BDH)
Deze oplossing bevat 100mg/ml aq.dest. Het geheel wordt op pH 7,4 gebracht om een te grote pH verandering na het toevoegen aan de oplossing tegen te gaan. (Te bewaren bij +4°C)
4. 0,02n NaOH (carbonaatvrij)
5. stikstof cilinder

Uitvoering

Plaats de bufferoplossing in het gethermostateerde reactievat onder stikstof en ijk de radiometer op pH 7,36. Pipetteer hierna 10 ml 0,9% NaCl in het vat en laat dit gedurende enige tijd op temperatuur komen. Hierna wordt 0,5 ml serum toegevoegd. De spuit die een volume heeft van 5 ml moet aan het begin van de bepaling geheel gevuld zijn, omdat bij een hoge enzym-activiteit de mogelijkheid bestaat, dat halverwege de spuit leeg is. Voeg hierna 2 ml acetylcholine oplossing toe en stel de titrator in op de juiste stand.

Berekening

De omgezette hoeveelheid acetylcholine wordt uitgedrukt in $\mu\text{Mol/ml}$ serum/minuut.

- a - volume spuit.
- b - percentage van de totale inhoud
- c - aantal minuten die de bepaling gelopen heeft
- d -
$$\frac{a \cdot b \cdot 1}{c} \cdot d = \mu\text{Mol/ml serum/minuut}$$

HET MAKEN VAN LEUCOCYTEN SUSPENSIE (HUMAAN)

=====

Het bloed moet afgenomen worden in haeparine (heel kleine hoeveelheid per buis - 10 ml bloed) en daarna goed schudden.

De buizen onder een hoek van 45° drie kwartier laten staan.

Inhoud buizen:

- a. haeparine
- b. + 10 ml bloed
- c. 2,5 ml 5% dextraan, dit vergemakkelijkt het uitzakken van het bloed.

Na drie kwartier 10 min. afdraaien op 1000 rpm.

Giet het bovenstaande plasma af.

Was het neerslag tweemaal met 3 ml hypotone albumine-zout oplossing, zodat de erythrocyten haemolyseren.

Afdraaien 4 min. op 1000 rpm.

Daarna 1x wassen met isotone veronalbuffer op fys. zout;

dan de leucocyten suspenderen in veronalbuffer of fys. zout.

C. DUBBELDIFFUSIE METHODE VOLGENS OUCHTERLONY

=====

Principe

Het te bestuderen antigeen mengsel of antiserum laten diffunderen tegen respectievelijk antisera of antigenen.

Bij vorming van antigeen-antistof complexen ontstaan precipitatielijnen.

Techniek

Vetvrije plaatjes (indien beschreven met inkt, gloeien) fixeren met 3% agaroplossing en drogen in de stoof (zie I.E. techniek).

Plaatjes gieten met 1,3% agar en wel $\pm 0,20 \text{ ml/cm}^2$ glasplaatjes.

Net als bij de I.E. de agar oplossen in veronalbuffer (140 ml) en aq.dest (60 ml), als men uitgaat van 200 ml.

De plaatjes ponsen met een grote boor met middellijn 7 mm of aan de hand van een voorbeeld waarop de afstand van het middelpunt van het middelste gaatje tot het middelpunt van de omringende gaatjes 12 mm bedraagt.

Om te voorkomen dat het antigeen of het antiserum tussen glas en agarlaag loopt, moeten de gaatjes worden opgevuld met een druppeltje 1,3% agar-oplossing.

Gaatjes vullen met de antisera en het antigeen of de antigenen en het antiserum en minstens 24 uur laten diffunderen.

Volgende dag de plaatjes in gebufferd fysiologisch zout leggen en drie dagen hierin laten staan.

De zoutoplossing moet wel elke dag ververscht worden.

Na deze drie dagen de plaatjes drogen, kleuren en ontkleuren (zie I.E.techn.).

IMMUNO-ELECTROFORESE "MICRO-METHODE"

=====

Principe

Het antigeenmengsel wordt aan electrische scheiding in agar onderworpen. Evenzijdig aan de electrische bewegingsas wordt het precipiterende anti-serum in een gootje aangebracht. Antiserum en antigeen diffunderen in de agar. Als specifieke componenten elkaar in de juiste verhouding ontmoeten worden gebogen precipitatielijnen zichtbaar.

Techniek

De vetvrije * glaasjes schrijven en gloeien, daarna fixeren met 3% agar (fixeeragar opgelost in aq.dest) en $\pm$ 15 minuten drogen in een 100°C stoof. Dan kunnen ze gegoten worden met 1,3% agar, die opgelost wordt in drie delen aqua dest en 7 delen veronalbuffer* in een kokend waterbad ($0,19 \text{ ml agar/cm}^2 \text{ glas}$)

Gaatjes en gootjes ponsen met een ponsapparaat of aan de hand van een voorbeeld.

De grootte van de gaatjes wordt gekozen afhankelijk van de concentratie van het antigeen mengsel. De gaatjes worden uitgezogen met behulp van een waterstraalluchtpomp, gevuld met antigeen mengsel en in de electroforese bak gelegd, zodanig, dat de ene kant van het plaatje met de positieve en de andere kant met de negatieve pool van het spanningsapparaat verbonden is.

Er wordt contact gemaakt met bijna gestolde 1,3% agar tussen de agar van de bak en de plaatjes. Stroom inschakelen, het voltage over de plaatjes op 60 volt brengen en 50 minuten electroforeren.

Gedurende electroforese loopt er een constante stroom van veronalbuffer door de electroforese bak. Na afloop wordt de agar uit het gootje verwijderd en wordt deze gevuld met het anti-serum.

Plaatjes gedurende één nacht bij kamertemperatuur laten diffunderen in een bak waarin zich wat water bevindt, afgedekt met een glasplaat.

Eind volgende dag de plaatjes in gebufferd NaCl oplossing 0,9% leggen en de bak bij 16°C plaatsen. Volgende 2 dagen NaCl verversen door eerst de plaatjes met aqua dest af te spoelen en ze dan voorzichtig in een bak met

verse NaCl te leggen. Na deze 3 dagen spoelen, de plaatjes uit het zout halen en gaatjes en gootjes goed met aqua dest uitspoelen. Op elk glaasje een stukje "Whatman Nr 20" filtreerpapier leggen met de ruwe kant op de agar (na het drogen laat het zo beter los).

Gaatjes en gootjes doorprikken. In 37°C stoof leggen en één nacht laten drogen. Na drogen filtreerpapier verwijderen, plaatjes afspoelen onder de kraan en dan met amido-zwart*kleuren.

Voor plaatjes waarop het gehele eiwitspectrum is te zien, is het raadzaam met panceaurood te kleuren. Ongeveer één uur de plaatjes in de kleurstof laten staan. Dan de plaatjes ontkleuren*

Na ontkleuren worden de glaasjes weer goed onder de kraan afgespoeld.

Na gespoeld met aqua dest en gedroogd in een 100°C stoof.

* Maken van vetvrije glaasjes

De glaasjes worden in bichromaat gelegd en hierin ongeveer een week bewaard. Dan worden ze één dag gespoeld met water en vervolgens in 96% alcohol bewaard.

Na zo'n week worden de glaasjes gedroogd en in cellofaan bewaard.

* Veronal buffer

41,6 g Na-Veronal (Na-Barbitalum) + 7,36 g Veronal (Barbitalum) verwarmen tot dat het mengsel is opgelost; dan aanvullen tot 4 liter met aqua dest.

pH controleren, mag variëren van 8,2 - 8,6

* Bereiding kleurstof

De kleurstof 1 g amidozwart of panceaurood wordt opgelost in een mengsel van 900 ml aqua dest

6,12	g	Natrium-acetaat	3H ₂ O
100	ml	glycerine	
2,6	ml	ijsazijn	

* Ontkleuringsvloeistof

100	ml	ijsazijn
500	ml	glycerine

aanvullen met aqua dest tot 5 liter.

BEREIDING IgM UIT HUMAAN SERUM MET IgM PARAPROTEÏNE

"Euglobuline" preparaat maken door het serum 1:10 te verdunnen met aqua dest bij 0°-4°C.

Na + 2 uur bij 0°-4°C centrifugeren in een gekoelde centrifuge.

Precipitaat oplossen in NaCl 0,9% en aanvullen tot het oorspronkelijke volume.

Weer 1:10 verdunnen met aqua dest bij 0°-4°C. Na + 2 uur centrifugeren in gekoelde centrifuge.

Aqua dest precipitatie nog 1x herhalen.

Gelfiltratie van het opgeloste precipitaat over Sephadex G150; elueren met trisbuffer 0,05 M pH 8 + 1M NaCl.

Pieken concentreren en dialyseren tegen NaCl 0,9%.

Controle d.m.v. electroforese.

BEREIDING HAPTOGLOBINE (Hp) UIT HUMAAN SERUM MET EEN VERHOOGDE
CONCENTRATIE HAPTOGLOBINE TYPE 1-1 (Hp+1-1)

=====

Hp+1-1 serum 1:2 verdunnen met gebufferd NaCl 0,9% en met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing tot 45% verzadigen.

Na $\pm$ 2 uur bij 0°C centrifugeren in gekoelde centrifuge (10 min. 10.000 rpm)
Supernatant met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing verhogen tot 55% verzadiging. Na $\pm$ 2 uur
bij 0°C opnieuw centrifugeren en precipitaat oplossen in NaCl 0,9%.

Dialyseren tegen acetaatbuffer 0,03M pH 5.

Chromatografie over DEAE Sephadex A50 kolom; elueren met acetaatbuffers
pH 5 met concentratiegradiënt.

(0,03M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M)

Pieken concentreren en dialyseren tegen gebufferd NaCl 0,9%.

Controle van de fracties d.m.v. immunoelectroforese.

Als er nog α_2 -macro aanwezig is in haptoglobinefractie, dan α_2 M door gel-
filtratie over Sephadex G150 verwijderen; elueren met trisbuffer 0,05M pH 8
+ 1M NaCl.

Pieken concentreren en dialyseren tegen gebufferd NaCl 0,9%.

Controle d.m.v. immunoelectroforese.

AGAR ELEKTROFORESE VAN SERUMEIWITTEN

Preparatieve elektroforese in agar

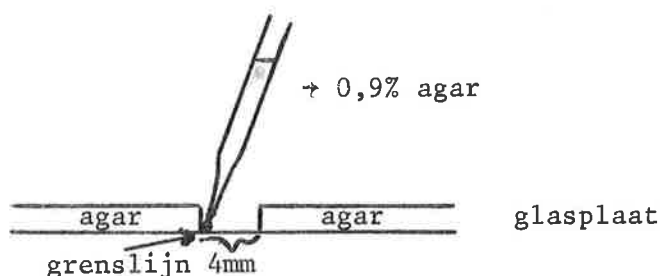
Principe

Evenals bij de IE wordt het antigeen mengsel aan elektrische scheiding in agar onderworpen.

Door een strookje agar aan de rand van de plaat loodrecht op de elektroforetische bewegingsas te fixeren met ijsazijn worden de verschillende eiwitten, die het mengsel bevat, als witte bandjes zichtbaar in de agar, zodat de plaats van het gewenste antigeen bekend is.

Techniek

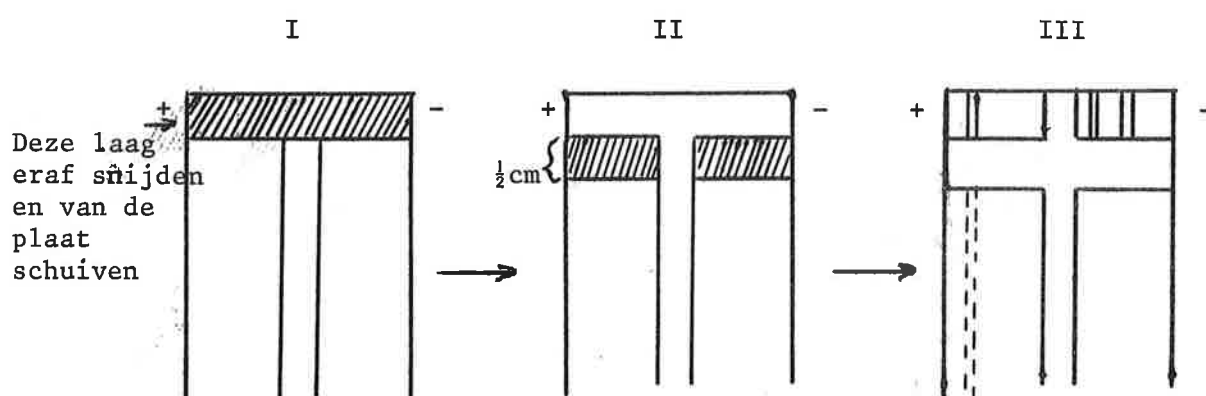
De plaat schrijven, gloeien, fixeren en laten drogen in stoof (zie IE). Dan de plaat gieten met 0,9% agar die homogeen is gemaakt door het mengsel te verhitten in een waterbad van 100°C (agar is opgelost in 2 delen veronalbuffer en 1 deel aq.dest). In het midden van de plaat aan de hand van een voorbeeld een goot (4 mm breed) overlangs uitsnijden en de grenslijn van agar en de glasplaat opvullen met 0,9% agar.



De plaat in de IE bak leggen en 60 minuten laten lopen (zie IE: spanning is 60 volt).

Na de elektroforese een agarstrookje aan het eind van de plaat en loodrecht op de goot afsnijden en van de plaat schuiven (zie tekening I).

Vervolgens een strookje agar van ongeveer een halve centimeter afsnijden en opschuiven naar de rand van de plaat (zie tekening II) en dit strookje fixeren met ijsazijn 1:2 verdund, waardoor de eiwitten zichtbaar worden. Naar behoefte kunnen nu de eiwitten in de agar en evenwijdig aan de goot uitgesneden worden.



Het uitgestreken agarstrookje wordt in een buis gedaan, ingevroren bij -20°C en na één nacht weer ontdooit, waarna de bovenstaande vloeistof wordt afgepipetteerd.

EIWITBEPALING MET COLORIMETRISCHE METHODEN* =====

1. Folin-Ciocalten nieuwe methode (5-35 μ gN) (0,03-0,22 mg eiwit)

2 ml eiwitoplossing	}	schudden en gedurende 1 uur bij KT laten staan
6 ml 12.5% Na ₂ CO ₃		
1 ml 0,1% CuSO ₄ .5H ₂ O		

Na 1 uur 1 ml Folin reagens** 1:3 verdund met aq.dest al roerend toevoegen.

Na 20-30 minuten bij KT O.D meten bij 750 m μ

blanco: 2 ml geb. NaCl 0,9 i.p.v. eiwitoplossing

* Kabat and Mayer. 1961 Second edition, blz. 556-558.

** Folin reagens (Na₂WO₄ = NaMoO₄ in H₃PO₄ en HCl) commercieel Fisher Sc.Co.

2. Biureet (20-400 μ gN) (0,125 - 2,5 mg eiwit)*

<u>Reagens</u>	0,9 g Na-k-tartraat	}	oplossen in 100 ml 0,2n NaOH
	0,3 g CuSO ₄ .5H ₂ O		
	0,5 g KJ		

Bepaling 1 ml eiwitoplossing + 1,5 ml Biureet reagens
gedurende 30 minuten bij 37°C incuberen.
Daarna O.D meten bij 555 m μ

blanco: 1 ml geb. NaCl 0,9 i.p.v. eiwitoplossing.

* Kabat and Mayer. 1961 Estimation of protein with the Biureet and Ninhydrin reactions 559-561.

BEREIDING HUMAAN IgG (Batch methode)

=====

Uitgaande van Cohn fractie II (Productie Biochemisch Laboratorium van het Centraal Lab. v.d. Bloedtransfusiedienst).

Ongeveer 200 ml uitgezakte DEAE Sephadex A50 in fosfaatbuffer 0,01 M pH 6,8 afzuigen met Büchnertrechter en waterstraalpomp.

Bij de afgezogen Sephadex 100 ml 4% onzuiver IgG.

Na $\pm$ 1/2 uur opnieuw afzuigen en de Sephadex wassen met 100 ml fosfaatbuffer 0,01 M pH 6,8.

IgG oplossing en wasvloeistof dialyseren tegen aqua dest en vriesdrogen.

Controle d.m.v. immunoelectroforese.

BEREIDING MUIS IgA UIT MUIS MYELOOMSERUM

1. 45% verzadigd ammoniumsulfaatprecipitatie bij 0°C

2 uur laten staan bij 0°C.

Afdraaien 15 min. 10.000 rpm. in een gekoelde centrifuge.

Het precipitaat 1x wassen met 45% verzadigd ammoniumsulfaat.

Na afdraaien het precipitaat oplossen in trisfosfaatbuffer

pH 8.4 - 8.6: $\left\{ \begin{array}{l} 0.035 \text{ M tris-2-amino-2 hydroxymethyl propaan} \\ 0.005 \text{ M H}_3\text{PO}_4 \end{array} \right.$

Hierna de oplossing dialyseren één nacht tegen een honderd-voudige volume trisfosfaatbuffer pH 8.4 - 8.6.

2. Elutie over G-200 Sephadex kolom in trisfosfaatbuffer pH 8.4 - 8.6

De frakties van de eerste eiwitpiek controleren in agarelektroforese (IE).

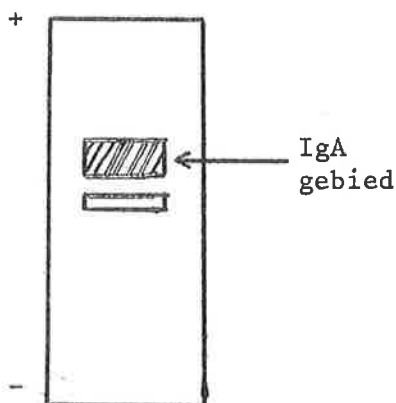
De frakties met IgA combineren en concentreren.

3. Preparatieve agar elektroforese Deze is beschreven onder isolatie snel cavia IgG.

De geconcentreerde combinatie wordt in de gootjes gebracht

na elektroforeren, aan de hand van het referentieplaatje, het IgA gebied uitsnijden.

Wanneer het IgA dient voor immunisatie wordt de agar gepotterd en zo gecontroleerd in I.E. en Ouchterlony.



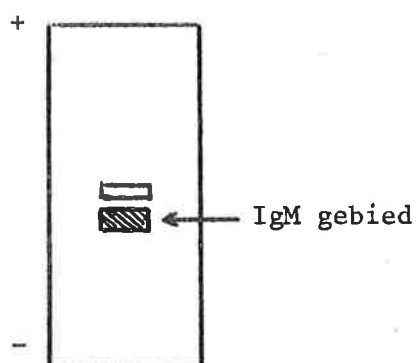
ISOLATIE MUIS IgM UIT IgM MUIS MYELOOMSERUM ALLEEN VOOR IMMUNISATIE DOELEINDEN

Het IgM wordt geïsoleerd d.m.v. agar elektroforese; dit is beschreven onder isolatie van snel cavia IgG.

Het myeloomserum wordt in de gootjes gebracht en geëlektroforeerd 50 min. - 60 volt.

Na elektroforese is in de gootjes nog verdund serum aanwezig, dit wordt opgepipetteerd en bewaard.

Het IgM gebied wordt uit de platen gesneden aan de hand van het referentieplaatje.



Deze agarsuspensie en het verdunde serum uit de gootjes worden opnieuw geëlektroforeerd zoals boven beschreven.

Na de tweede elektroforese wordt de agarsuspensie gecontroleerd in I.E; beoordeling na kleuring.

Wanneer het IgM niet zuiver is, opnieuw in elektroforese. Na zuiverheidstoets kan de agarsuspensie met het IgM als zodanig ingespoten worden.

Het is niet mogelijk het IgM uit de agar te elueren.

ISOLATIE CAVIA SNEL Ig ($\gamma_1 + \gamma_{1A}$)

vlgs Y. Yagi, J. Immunology 89, 442 (1962)

Zie voor prepareren Kodak DEAE cellulose, No. 7392 en de gebruikte buffer het voorschrift voor de isolatie van langzaam cavia IgG (γ_2).

Scheiding

Na de eerste piek wordt de continue gradiënt ingezet met gradiëntbuffer: 0.50 M Tris en 0.59 M H_3PO_4 ; pH = 4.0.

De frakties van de tweede piek worden in I.E. gezet en zo gecontroleerd op aanwezigheid van snel IgG. De frakties met snel IgG worden verzameld en sterk geconcentreerd, daarna de combinatie dialyseren tegen gebufferd phys. zout (één nacht tegen een hondervoudige volume).

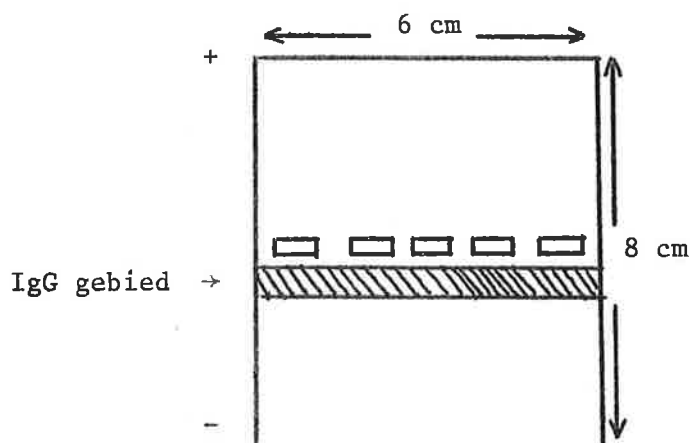
Hierna wordt met deze combinatie agarelektroforese uitgevoerd.

Agarelektroforese

Gebruikte agar 0.9%: 1.215 g agar noble special opgelost in 90 ml veronal buffer 0.05 M pH = 8.2 - 8.6 en 45 ml aq.dest.

Een aantal platen wordt met deze agar gegoten (platen 6 bij 8 cm; 10 ml agar per plaat). Na stollen worden de platen in een afgesloten bak ongeveer een half uur bij 16°C gezet om de agar hard te laten worden.

In het midden worden reepjes uitgesneden en opgevuld met heel weinig agar, zodat het monster niet onder de agar door kan diffunderen.



De gootjes worden gevuld met de geconcentreerde combinatie.

De platen 50 min. elektroforeren bij 60 volt.

Als referentie voorbeeld wordt een klein I.E. plaatje meegenomen, dat na het lopen in 4% azijnzuur wordt gelegd.

Hierdoor worden de eiwitten neergeslagen. Het IgG gebied op de grote platen wordt aan de hand van dit plaatje uitgesneden. (zie tekening)

De agar, met het IgG gebied, wordt ingevroren en daarna ontdooid.

De bovenstaande vloeistof afpipetteren. Dit nog 1x herhalen.

Na concentreren wordt het monster gecontroleerd in I.E. en Ouchterlony.

ISOLATIE MUIS IgG UIT NORMAAL MUIZESERUM

=====

Scheiding normaal muizenserum

Scheiding over een Kodak cellulose (no. 7392) kolom met het Yagi buffersysteem.

Zie voor prepareren cellulose en gebruikte buffers het voorschrift voor isolatie van langzaam cavia IgG.

Het normaal muizenserum vooraf één nacht dialyseren tegen trisfosfaatbuffer pH = 8.4 - 8.6 (eventueel ontstaan neerslag wordt verwijderd).

Het gedialiseerde serum op de kolom brengen en laten intrekken, de kolom naspoelen met trisfosfaatbuffer pH = 8.4 - 8.6, deze hoeveelheid buffer ook laten intrekken.

Hierna direct de continue gradiënt inzetten met trisfosfaatbuffer pH 4.0 als gradiëntbuffer (gradiënt 350 ml startbuffer, gradiëntbuffer druppelsgewijze bijmengen). De eerste eiwitpiek verzamelen en concentreren.

Scheiding met polyacrylamide gel elektroforese (pH 7.9)

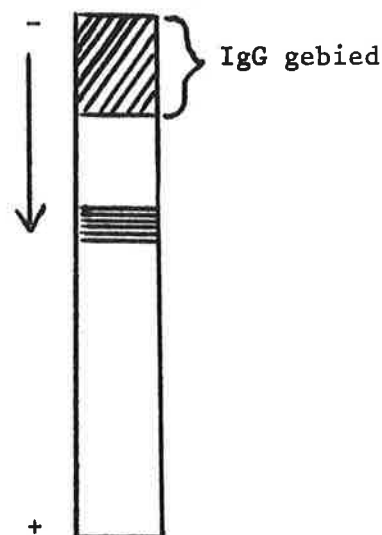
Voor de bereiding en uitvoering van de elektroforese, zie voorschrift polyacrylamide gel elektroforese.

De geconcentreerde eerste piek wordt geëlektroforeerd. Eén gelpijpje wordt gekleurd. Het muize-IgG loopt slechts weinig in de gel; blijft aan het begin van de gel. De andere gelpijpjes worden aan de hand van dit voorbeeld gesneden met een scheermesje.

Het IgG gebied wordt in stukjes gesneden en in een kleine hoeveelheid phys.zout geëluëerd. Dit wordt tweemaal herhaald. De gecombineerde (van 3 x elueren met phys.zout)

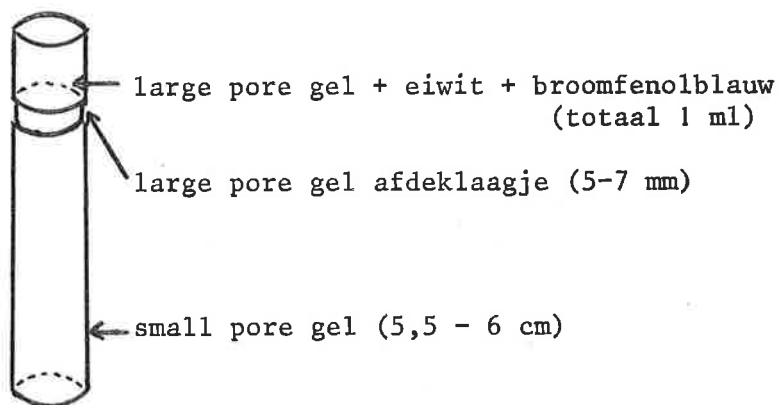
elutievloeistof wordt geconcentreerd en gedialiseerd tegen een honderd-voudige volume phys.zout.

Zuiverheidscontrole van het IgG in een Ouchterlony exp. tegen anti-totaal muizenserum.



POLYACRYLAMIDE GEL ELEKTROFORESE

Samenstelling en bouw elektroforesebuis, lengte 9,5 cm, doorsnede 8 mm.



Voorschrift voor het maken van de buisjes

1. De holle buisjes worden onderin met rubber stopjes afgesloten.
2. De buisjes worden op gelijke hoogte gevuld met small pore gel (l.=6 cm). De gel laten stollen - stollingstijd 10 - 20 min.
3. Na het stollen het bovenstaand water met een tissue wegnemen.
4. Afdeklaagje opbrengen en laten stollen onder ultravioletbestraling (zonlicht of lichtbak met speciale buizen).
5. Na het stollen het water weer wegnemen.
6. De eiwit/large pore gel oplossing opbrengen en ook laten stollen onder ultravioletbestraling.

De buisjes in buffer elektroforeren 7 à 8 m ampère per buis, totdat het blauwe kleurstoffrontje beneden is. De gel uit de buisjes halen door water uit een injectiespuit tussen de wand en de gel te spuiten.

Een half uur kleuren in amidozwart (zoals I.E. kleuring), daarna ontkleuren in 7% azijnzuur.

De gel moet minstens een uur in de azijnzuur staan, alvorens elektrisch kan worden ontkleurd.

Small pore gel

Voor een opsplitsing in het IgG gebied wordt small pore gel met pH= 7.9 gebruikt.

Voor een opsplitsing in het alpha-gebied wordt small pore gel met pH= 8.9 gebruikt.

Samenstelling: 1 deel oplossing A, pH = 7.9 of pH = 8.9
 1,5 " " C
 0,5 " " D
 5 " aqua dest +
 1 mg ammonium persulfaat per ml oplossing goed oplossen,
 + 3.5 ml small pore gel per buis.

Large pore gel

Samenstelling: 1 deel oplossing B
 1 " " D
 0.8 " " C
 1.5 " " E
 4 " aqua dest

Voor het afdeklaagje wordt large pore gel oplossing gebruikt zoals boven is aangegeven met aqua dest.

Samenstelling large pore gel/eiwit monster/kleurstof

per buis: 0.5 ml eiwitoplossing (maximaal 1 mg eiwit per buis)

0.5 ml large pore gel (zie boven) zonder aq.dest

De large pore gel wordt zwak blauw gekleurd met enkele druppels waterige broomfenolblauwoplossing voor de vorming van een kleurstoffront.

Voorschrift oplossingen

		pH= 7.9	pH= 8.9
oplossing A :	1 n. HCl	48 ml	48 ml
	tris	8 g	36.6 g
	temed	0.92 ml	0.46 ml
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
		pH= 7.4	
oplossing B :	1 n. HCl	48 ml	
	tris	5.98 g	
	temed	0.5 ml	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing C :	acrylamide	30.0 g	
	bis acrylamide	0.8 g	
	$K_3 Fe (CN)_6$	15 mg	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing D :	acrylamide	10.0 g	
	bis acrylamide	2.5 g	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing E :	riboflavine	4.0 mg	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
Loopbuffer :	glycine	28.8 g	
	tris	6 g	
	oplossing in 2 liter aq.dest		

De oplossingen kunnen het beste in de kou bewaard worden.

ISOLATIE HUMAAN IgG UIT TOTAAL HUMAANSERUM

=====

Volgens gewijzigd voorschrift van Levy en Sober, te vinden in
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. : 103250 (1960).

Prepareren van de DEAE cellulose (cellex D. Calbiochem.)

Voorschrift Levy en Sober

- a. 3x wassen met 0,5 n. NaOH (de cellulose mag niet lang in de NaOH blijven staan).
- b. Wassen met aqua dest tot de pH van de cellulose neutraal is geworden.
- c. De cellulose op pH= 6.3 brengen door toevoegen van 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$
- d. Een aantal malen wassen met startbuffer: 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ pH= 6.3

Gebruikte buffers

startbuffer : 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$; pH = 6.3

gradiëntbuffer : 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ + 1 M NaCl; pH = 6.3

Voorschrift in gewijzigde vorm

- a. De DEAE cellulose, merk Calbiochem Cellex D, cap. 0.66, tenminste 10x wassen met een grote hoeveelheid aqua dest, zodanig dat de fijne deeltjes verwijderd zijn.
- b. Daarna wassen met de startbuffer: 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ pH= 6.3, totdat de cellulose deze pH heeft aangenomen. De buffers zijn hetzelfde als het oorspronkelijke voorschrift, behalve de gradiëntbuffer, deze wordt 1 : 2 verdund met aqua dest.
- c. De cellulose wordt geregenereerd door wassing met 1 M NaCl, daarna met aqua dest en vervolgens met startbuffer.
Het igG komt van de kolom in de eerste piek met de startbuffer, daarna wordt de continue gradiëntbuffer 1:2 verdund.
De cellex D. DEAE cellulose heeft een grote capaciteit; uit ervaring is gebleken dat b.v. 125 ml normaal humaan serum op een kolom gebracht kan worden met een lengte van 38 cm en een doorsnede van 4.7 cm.

De cellulose moet dun gegoten worden, zodanig dat de kolom homogeen wordt. Het serum wordt vooraf + 16 uur gedialiseerd tegen een honderdvoudige hoeveelheid startbuffer.

Het hierbij ontstane precipitaat wordt afgedraaid 10 min. 5000 rpm., het bevat behalve andere eiwitten ook nog geringe hoeveelheid IgG (wordt niet verwerkt).

Voor het opbrengen, de kolom eerst laten doorlopen met startbuffer.

Bij het opbrengen de supernatant rustig laten intrekken.

Het grootste gedeelte van het IgG loopt met de startbuffer van de kolom; het zeer snelle IgG gebied en de andere serumeiwitten worden geabsorbeerd. Met de continue gradiënt komen ook de andere eiwitten van de kolom.

IMMUNO-RADIO-ELEKTROFORESE OF AUTOEADIOGRAM

De werkwijze voor een autoradiogram is vrijwel gelijk aan die voor een immunoëlektroforese.

In de gaatjes laat men het monster met een specifiek gerichte antistof 50 min. - 60 volt elektroforeren. De goot wordt allereerst gevuld met radioactief gemerkt antigeen ± 0.1 ml, zodat de radioactiviteit in de goot ± 100.000 tikken/min. is.

Na het intrekken in de agar wordt de goot gevuld met antiserum bevattende antistoffen gericht tegen immunoglobulinen van het monster. B.v. caviae zijn geïmmuniseerd met eialbumine.

De afnamen worden in de gaatjes gebracht en geëlektroforeerd.

De goot wordt gevuld met :

1. Radioactief gemerkt eialbumine (J^{125}).
2. Antiserum met antistoffen gericht tegen cavia immunoglobulinen.

De plaatjes één nacht laten ontwikkelen, de volgende dag 3x wassen met gebufferd phys.zout en aan het eind van de dag drogen. Na het drogen moeten de plaatjes 10 dagen op een fotoplaat (Kodak X ray film NS) liggen (met cellotape vastplakken, de kant met de gedroogde agar direct op de hoes van de fotoplaat).

Film en plaatjes stevig tegen elkaar drukken door tussen twee glasplaten te leggen. Na 10 dagen de fotoplaat laten ontwikkelen. Waar het gemerkt antigeen gebonden is door specifieke antistoffen en deze antistoffen geprecipiteerd zijn door specifieke antistoffen (gericht tegen immunoglobulinen) ziet men een zwarting.

Deze methode maakt het mogelijk heel kleine hoeveelheden antistof aan te tonen.

BEREIDING CAVIA FIBRINOGEEN

=====

Uitgegaan van 10 ml cavia plasma.

- a. Een 35% verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitatie in het caviaplasma minimum 2 uur laten staan bij 0°C , daarna afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- b. Het precipitaat 1x wassen met eenzelfde volume 35% verzadigde ammoniumsulfaat oplossing. Centrifugeren 15 min. 10.000 rpm.
- c. Precipitaat oplossing in oorspronkelijk volume phys.zout bij kamertemperatuur (hier 10 ml).
- d. Hieraan humaan trombine toevoegen, zodanig dat de concentratie in het reactiemengsel 100 eenheden per ml is. 24 uur laten reageren bij 0°C in het ijsbad.
- e. Het stolsel op filtreerpapier laten uittrekken, zodanig dat zich een vlies vormt.
Dit vlies in een nylongaasje doen en in phys.zout hangen.
Zo minstens één nacht bij 4°C onder roeren laten staan.
- f. Het stolsel m.b.v. een potter tot een fijne dispersie verwerken.

BEREIDING HUMAAN F_{ab} EN F_c UIT EEN ZUIVERE POOL HUMAAN IgG

=====

Splitsing IgG in F_{ab} en F_c d.m.v. papaïne

Biochem. J. 73, 119 (1959) R. Porter

300 mg humaan IgG + 3 mg papaïne oplossen in 20 ml buffer:

0.1 M NaH_2PO_4 . 2 aq. pH= 7.0; 0.01 M cysteine; 2 mM EDTA (Complexon III).

Deze oplossing 2 uur incuberen bij 37°C.

Hierna gedurende 48 uur dialyseren tegen aqua dest (4°C) om de reactie te stoppen (100-voudige overmaat aq.dest; na één uur verversen met eenzelfde hoeveelheid).

Scheiding ongesplitst IgG en F_{ab} , F_c fragmenten

De oplossing wordt een nacht gedialyseerd tegen gebufferd phys.zout.

Daarna elutie over een G-100 kolom in gebufferd phys.zout*. De opgevangen frakties van de eerste twee pieken worden gecontroleerd in I.E.

Het ongesplitste IgG wordt eventueel opnieuw behandeld met papaïne zoals beschreven. Het tweede piek mengsel van F_{ab} en F_c fragmenten wordt gescheiden op een DEAE cellulose kolom.Scheiding F_{ab} en F_c

De gebruikte cellulose is Kodak DEAE no. 7392 in het Yagi buffersysteem (zie voorschrift isolatie cavia langzaam IgG).

Startbuffer : trisfosfaatbuffer pH = 8.2 - 8.6

Gradiëntbuffer: trisfosfaatbuffer pH = 4.0

Het prepareren van de cellulose en de gebruikte buffers zijn beschreven onder isolatie cavia langzaam IgG.

Het mengsel F_{ab}/F_c wordt vooraf gedialyseerd tegen startbuffer. Na de eerste eiwitpiek: F_{ab} fragment, wordt de continue gradiënt ingezet.De tweede eiwitpiek bevat F_c fragment.Controle in Ouchterlony tegen anti- $(F_{ab}')_2$ en anti-totaalserum.

* Het elutiepatroon bestaat uit drie pieken, resp. ongesplitst IgG, F_{ab}/F_c mengsel en tenslotte afbraak peptiden. Het F_c fragment bevat nog een verontreiniging die als F_{ab} fragment reageert. Acrylamide elektroforese toont geen F_{ab} fragment, maar wel een sterke heterogeniteit in het F_c fragmentmengsel.

COLORIMETRISCHE SUIKERBEPALING VOLGENS ELSON-MORGAN* (10-100µg hexosamme)
 =====

Reagentia

1. acetylaceton: 0,75 ml acetylaceton in 25 ml 1,25n Na_2CO_3
2. Ehrlich's reagens: 1,6 g p-dimethylamino benzaldehyde in 30 ml alcohol 96% + 30 ml HCl 12,5n
3. 2,5n NaOH
4. 5n H_2SO_4
5. alcohol 96%

Bepaling

IgG oplossing (1% in geb. NaCl 0,9%)

1 ml IgG opl. + 1 ml 5n H_2SO_4 gedurende 16 uur in een kokend waterbad.
 Afkoelen tot kamertemperatuur.

Fenolftaleïne toevoegen en neutraliseren met + 2 ml 2,5 n NaOH met aqua dest tot 5 ml aanvullen.

2 ml hiervan + 2 ml acetylaceton gedurende 20 minuten in een waterbad van 96°C.

Snel afkoelen tot kamertemperatuur.

Toevoegen : + 17 ml alcohol 96%
 2 ml Ehrlich's reagens
 aanvullen tot 26 ml met alcohol 96%.

Na 45 minuten bij KT 0.D meten bij 530 mµ.

blanco : 1 ml geb. NaCl 0,9% + 1 ml 5n H_2SO_4
 hydrolyseren; verder hetzelfde als met het IgG.

controle : glucosamine oplossing 150 µg/ml
 1 ml hydrolyseren met 1 ml 5n H_2SO_4 en dezelfde methode als het IgG volgen.

*Lit. Kent and Whitehouse: "Biochemistry of the aminosugars
 Butterworths scientific Publ."

COLORIMETRISCHE SUIKERBEPALING MET INDOLREAGENS^{*}
=====

(5-25µg suiker per 0,5 ml)

0,5 ml IgG 0,4%	}	10 minuten in kokend water
0,2 ml indol (1% oplossing in ethanol)		
5 ml H ₂ SO ₄ 75%		

O.D meten bij 470 mµ

blanco : 1. IgG + H₂SO₄ + aq.dest i.p.v. indol
 2. aq.dest i.p.v. IgG + H₂SO₄ + indol

^{*} Carbohydrate estimation for carbohydrates in general.
Kabat and Mayer. 1961. blz. 526

HET AANTONEN VAN HUIDREACTIEVE ANTISTOFFEN D.M.V. DE PASSIEVE CUTANE
ANAFYLAXIE (PCA)- EN/OF DE PRAUSNITZ-KÜSTNER (P.K.) REACTIE

=====

In antisera kunnen antistof populaties voorkomen die na reactie met het betreffende antigeen vaatdoorlaatbaarheid veroorzaken. Deze reactie kan alleen in vivo worden uitgevoerd. Men onderscheidt homologe - (in het zelfde diertype) en heterologe (in een ander diertype) huidreacties. Antistoffen van het reagine type van de mens reageren homolog, maar ook heteroloog in de (rhesus) aap. Deze toets is van belang om te weten welk antigeen de oorzaak is van de waargenomen allergische verschijnselen. Als biologische reactie heeft de toets allereerst een kwalitatieve waarde; daarnaast kan door middel van verdunningsreeksen een semikwantitatieve indruk worden verkregen van de hoeveelheid huidreactieve antistof.

Procedure

Witte caviae van 3 à 400 gram worden geschoren en onthaard op de flanken van de schouders tot de achterhand. Het te onderzoeken monster wordt (eventueel in enkele verdunningen) in de huid gebracht m.b.v. speciale injectienaalden. De insteek moet vrijwel evenwijdig aan de huid geschieden. De ingebrachte hoeveelheid vloeistof moet niet groter zijn dan 0.15 ml. Indien de vloeistof op de juiste wijze in de huid is gebracht, ontstaat een met vocht gevulde halve bol. Na een noodzakelijke incubatietijd van 3 à 4 uur wordt een mengsel van het antigeen en kleurstof oplossing (Evans blauw 2% in phys.zout of Pontamine hemelblauw 5% in phys.zout) intercardiaal ingespoten. De totale hoeveelheid vloeistof moet niet groter zijn dan 0.5 ml. In het algemeen wordt omstreeks 0.2 mg antigeen 0.2 ml kleurstof ingebracht. Indien de reactie op de juiste wijze verloopt wordt 10 à 15 min. na het inbrengen van het antigeen een blauwe vlek zichtbaar.

Voor een goede beoordeling van de reactie moet altijd een positieve controle (een bekend PCA-actief antiserum) en een negatieve controle (normaal caviaserum) in het experiment worden meegenomen. Pas als deze sera op de juiste wijze reageren heeft het zin de onderzochte sera af te lezen.

Beoordeling van de aflezing

De aflezing kan slechts semikwantitatief gebeuren, er is geen lineair verband tussen concentratie en grootte van de vlek. De waardering wordt uitgedrukt in + tekens en loopt van + tot 4+.

De geoefende aflezer kan nog onderscheid maken tussen de waardering in hele waarden. De beoordeling kan geschieden op de kleurintensiteit uitgedrukt in + tekens en de diameter van de vlek in millimeters.

HISTAMINE BEPALING VOLGENS DE METHODE VAN SHORE ETC.

Deze methode is uitgevoerd, maar er is slechts 25% van de ingewogen hoeveelheid histamine teruggevonden.

De amberlite anionenwisselaar (IRA-410) wordt in de acetaat vorm gebracht in een grote kolom door met + 1 liter 0.75 M natriumacetaat + 0.05 M natronloog te wassen. Daarna wordt het amberlite met aqua dest gewassen, totdat het de pH van het aqua dest heeft aangenomen.

Het klaarmaken van de elutie kolom

Als kolom wordt een 10 ml meetpipet gebruikt, die aan de bovenkant is afgesneden. Onder in de kolom wordt een plukje glaswol gebracht. Het amberlite wordt in de pipetten gegoten, zodat het volume 6 ml wordt. Voor het opbrengen van de oplossing laat men het laagje water boven het amberlite intrekken.

Het maken van een weefselextract en oplossing

1 gram van een weefsel wordt gehomogeniseerd met 4 ml 5% trichloorazijnzuur en het mengsel wordt gecentrifugeerd.

(Het volume van de oplossing bedraagt + 4.8 ml). 1 ml van de supernatant wordt in een 10 ml maatkolfje gepipetteerd, dat 0.50 ml, 0.50 n. NaOH en enige ml 0.01 M fosfaatbuffer bevat.

Het wordt met aqua dest tot de streep aangevuld.

5 ml van deze oplossing wordt met een pipet op de kolom gebracht. Als eluent vloeistof wordt fosfaatbuffer (0.005 M - 0.01 M) gebruikt. pH=6.0-7.4 De snelheid van de vloeistof is ongeveer 1 ml/min., dit wordt ingesteld met een schroefkraantje. De eerste 1-2 ml wordt weggegooid, en de elutie vloeistof wordt verzameld tot ongeveer het merkje van een 10 ml maatkolfje en wordt op volume gebracht. Aan 2 ml van deze oplossing wordt 0.40 ml 0.5n NaOH en 0.1 ml 1% O.P.T. toegevoegd.

Na 3.5 + 0.5 min. (bij kamertemperatuur) wordt 0.20 ml 2.5 M H_3PO_4 toegevoegd. De fluorescentie wordt gemeten bij 445 m μ met aanslaan op 345 m μ .

Voor bepaling histamine oplossing wordt inplaats van 1 gram weefsel, 1 ml van een histamine oplossing gebruikt.

In oplossingen waarin de histamine niet gebonden is in de vorm van histamine decarboxylase, is het raadzaam de volgende procedure te gebruiken.

2 ml oplossing die histamine bevat (0.001-0.5 γ /ml) wordt op een kolom met een volume van 3 ml gebracht.

De eerste ml wordt weggegooid en iets minder dan 4.5 ml elutievloeistof wordt verzameld in een 5.0 ml maatglasje dat 0.5 ml 30% trichloorazijnzuur bevat, en de oplossing wordt tot 5 ml aangevuld met aqua dest. De oplossing wordt gecentrifugeerd en de van de supernatant 2 ml oplossing afgepipetteerd.

Hieraan wordt 0.40 ml 1.5 n. NaOH en 0.10 ml O.P.T. (1%) toegevoegd.

Na 3.5 ± 0.5 min. (bij kamertemperatuur) wordt 0.20 ml 2.5 M H_3PO_4 toegevoegd.

De fluorescentie wordt gemeten bij 445 m μ met aanslaan bij 345 m μ .

Standaardcurven worden gemaakt met verschillende histamineoplossingen in 0.03% trichloorazijnzuur, wanneer men te maken heeft met gebonden histamine en histamine oplossingen in 3% trichloorazijnzuur voor bepaling standaardcurve voor vrij histamine.

De fluorescentie intensiteit is evenredig met de concentratie van histamine in het gebied 0.003-0,5 γ /ml histamine.

De fluorescentie aktiviteit neemt na een half uur af. Dus de metingen moeten binnen een half uur na toevoegen O.P.T. worden verricht.

BEREIDING MUIS FIBRINOGEEN

=====

Systeem : fibrinogeen $\longrightarrow$ fibrine (monomeer) $\xrightarrow{\text{polymerisatie}}$ fibrine (polymeer)

Procedure

- a. 1 volume plasma + 1/3 volume verzadigd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0°C) 2 uur laten staan bij 0°C . Afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- b. Neerslag 1x wassen met 25% verzadigd ammonium sulfaat oplossing (0°C). Afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- c. Neerslag oplossen in oorspronkelijk volume phys.zout bij kamertemperatuur.
- d. Hieraan rundertrombine toevoegen, zodanig dat de concentratie in het reactiemengsel 100 eenheden per ml is. Een half uur bij kamertemperatuur laten staan.
- e. Stolsel op filtreerpapier brengen, vocht uittrekken tot zich een vlies gevormd heeft. Dit vlies van het filtreerpapier losmaken in een zakje van nylongaas doen en in phys.zout hangen. Zo minstens één nacht bij 4°C onder roeren laten staan.
- f. Het stolsel met behulp van een potter tot een fijne dispersie verwerken.

ISOLATIE CAVIA LANGZAAM IgG (γ_2)

=====

volgens Y. Yagi - J. Immunology 89, 442 (1962)

Prepareren van de nieuwe cellulose

Gebruikt Kodak DEAE cellulose no. 7392.

- De droge cellulose wordt in de Star Mix gemalen om de klonten fijn te maken.
- Wassen met aqua dest, totdat na snel uitzakken de bovenstaande vloeistof helder is.
- De suspensie op pH= 8,5 brengen, door te wassen met de startbuffer pH= 8.4 - 8.6.

Regenereren cellulose door wassing met 1 M NaCl, aqua dest en vervolgens met startbuffer als boven.

Buffers volgens Yagi

startbuffer : 0.035 M Tris (2 amino-2 hydroxymethyl propaan 1.3 diol) M= 121.14; pH= 8.4-8.6, door toevoeging geconcentreerd H_3PO_4 [H_3PO_4] = 0.005 M,
 gradiëntbuffer : 0.50 M Tris
 0.59 M H_3PO_4 } pH= 4.0

De kolom moet gegoten worden met dunne cellulose suspensie, aandrukken met luchtdruk (blazen met de mond). Alvorens het monster op te brengen even laten doorlopen met startbuffer. Het monster vooraf + 16 uur dialyseren tegen een 100-voudige hoeveelheid startbuffer.

Scheiding

De Kodak DEAE cellulose heeft niet zo'n grote opname capaciteit b.v. 1 à 1.5 ml normaal caviaserum over een kolom met lengte 30 cm en doorsnede 1.3 cm. Het langzame IgG loopt met de startbuffer van de kolom. Het snelle IgG en de andere serumeiwitten komen van de kolom met de continue gradiënt: gradiënt buffer pH= 4.0 Zie isolatie cavia snel Ig ($\gamma_1 + \gamma_{1A}$).

Zuiverheidscontrole in I.E. en Ouchterlony tegen konijn anti-totaal cavia serum.

ISOLATIE PAARDE IgG* UIT TOTAAL PAARDESERUM

Volgens gewijzigd voorschrift van Levy en Sober:

Proc. Soc. Exp. Biol. and M. 103250 (1960)

Het gewijzigd voorschrift staat beschreven onder isolatie humaan IgG uit totaal humaan serum.

Scheiding

De eerste eiwitpiek, die met de startbuffer van de kolom komt, wordt verzameld en geconcentreerd of gevriesdroogd.

Met een controle in polyacrylamide gelelektroforese vindt men een zeer geringe verontreiniging van het IgG.

Het hele snelle IgG gebied komt met de gradiënt van de kolom (sterk verontreinigd).

* Het paarde IgG gebied is zeer gecompliceerd, slechts een deel van het IgG gebied wordt geïsoleerd. De rest bevat nog wel immunoglobulinen, maar is verontreinigd met een aantal niet geïdentificeerde eiwitten.

VOORSCHRIFT VOOR DE ISOLERING VAN L-KETEN UIT HUMAAN GAMMA-GLOBULINE
=====

Een 2% (w/v) oplossing van IgG in 0,55 M tris-HCl buffer pH 8,2 wordt, na 10 min. roeren gecentrifugeerd in de Lourdes (15 min. 10.000 rpm.). Aan het supernatant wordt vervolgens zoveel, pas gedestilleerd β -mercapto-ethanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,75 M. Na 1 uur roeren van deze oplossing wordt hieraan toegevoegd een gelijk volume van een oplossing van, pas omgekristalliseerd α -joodaceetamide in a.d. (concentratie 0,75 M), waarna weer 1 uur wordt geroerd. De eiwitoplossing wordt vervolgens gedurende 24 uur gedialyseerd tegen 50 volumina a.d. en daarna gedurende 12 uur tegen 10 volumina 7 M ureum, pH 2,0 (deze ureumoplossing is behandeld met ontkleuringskool). Tenslotte wordt de oplossing geconcentreerd tot een 10 - 20% eiwitoplossing m.b.v. drukdialyse.

6 ml van deze geconcentreerde eiwitoplossing wordt gebracht op een, met 7 M ureum, pH 2,0 geëquilibreerde Sephadex G-100 kolom (3,4 x 100) en bij kamertemperatuur geëluëerd met 7 M ureum, pH 2,0 (maximaal 15 ml/uur). De opgevangen frakties worden door gemeten bij 280 nm op de Unicam Spectrofotometer en de frakties van de tweede piek worden verzameld en geconcentreerd tot 1 ml. Dit nieuwe concentraat wordt gebracht op een Sephadex G-100 kolom (2,2 x 40) en geëluëerd met 7 M ureum pH 2,0 (3 ml/uur). Alle frakties worden daarna doorgemeten bij 280 nm en na dialyse tegen gebufferde zoutoplossing, ingezet in een Ouchterlony tegen anti-H en anti-L. De frakties, welke na 2 dagen staan wel een precipitatie vertonen tegen anti-L, doch niet tegen anti-H, worden verzameld. Deze bevatten dan zuivere L-keten.

ANTISTOFBEPALING MET QUANTITATIEVE PRECIPITATIE-TEST (micro Kjeldahl)

Het maken van een precipitatiecurve

Met behulp van de Ouchterlony techniek bepalen wat de optimale verhouding is van antigeen (Ag) en antistof (As).

Antiserum vooraf inactiveren 56°C - 30 min. en afdraaien in de Servall 1 uur max. speed.

3 ml As 1/2 verdund en 1,5 ml Ag van verschillende concentraties gedurende 30 minuten bij 37°C incuberen.

Tenminste 1 nacht bij 4°C laten staan, maar liefst 48 uur. Afdraaien in Servall (10 min. 10.000 rpm.).

2x wassen met koud gebufferd NaCl 0,9%. Zeer voorzichtig zijn met opnemen van bovenstaande om verlies van immuun-precipitaat te voorkomen.

Precipitaat oplossen in 0,2 ml 1 n NaOH en aanvullen tot 3 ml met koud NaCl 0,9%.

O.D. meten bij 280 m μ . Uitzetten in een grafiek: Y as O.D. 280.

X as antigeen concentratie in mg N. Het bij het optimum verkregen precipitaat, evenals antigeen oplossing gebruiken voor Kjeldahl.

Reagentia voor Kjeldahl

H_2SO_4 98% : boorzuur (1 vol. verzadigd boorzuur + 1 vol. aq.dest)

glaskraaltjes: mengsel van 50% NaOH

katalisator : (15 g CuSO_4 + 2 g Seleen + 95 g Na_2SO_4)

0,01 n HCl : methyl rood

methyleen blauw

Bepaling

1 ml (As+Ag) + 100 mg katalisator + 2 ml H_2SO_4 98% + 2 glaskraaltjes.

Kolfje gedurende 1 uur op destructieapparaat in stand 1 (120°C).

In stand 2 (165°C) tot kleurloos, daarna 1 uur op stand 3 (225°C).

Afkoelen en de hals schoonpoetsen met aqua dest.

Kurk erop.

Destilleren: Knijp slang waar stoom doorgaat af.

Houdt water (aq.dest) aan de kook.

Breng boorzuur 10 ml (5 ml verz.boorzuur + 5 ml aq.dest) + indicator onder tuutje.

Breng gedestruëerde bepaling quantitatief over in trechter.

Spoel na met 12 ml NaOH. Leidt stoom door gedurende 10 minuten.

Haal tuutje eruit en spoel af.

Boorzuur nu groen van kleur wegzetten.

Vlam onder waterkolf weghalen.

Titreeren met 0.01 n HCl tot de groene kleur net verdwenen is.

Blanco: hetzelfde, maar i.p.v. eiwit een buffer of zout.

Berekening

bepaling - blanco = a

a. titer HCl $\frac{1}{\text{aantal ml gepi-
petteerde stof}}$. 14. 6,25 = mg eiwit per ml.

Boorzuur

5,2 g/100 ml aqua dest

koken en afkoelen

voor gebruik 1/2 verdunnen

Indicator

a. methylrood (1,7 g gekristalliseerd methylrood in 100 ml 95% ethylalcohol)

b. methyleenblauw (1% methyleenblauw in aq.dest)

Meng indicatoren vlak voor gebruik: 9a + 1b.

Kjeldahl apparatuur voor gebruik schoonstomen en stoom doorleiden, tot geen N meer wordt getitreerd in boorzuur.

Voor beginners eerst bepaling leren en omslagpunt leren kennen door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a. het gehalte te bepalen volgens onderstaande methode:

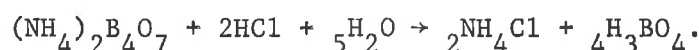
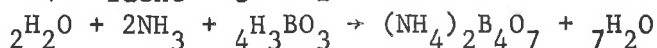
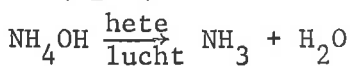
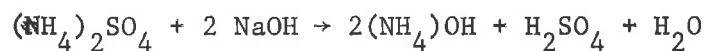
0,132 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 200 ml aqua dest.

Monsters van 3 ml voor Kjeldahl.

Naspoelen met 12 ml NaOH (40% NaOH + 5% thio) NH_3 opvangen in 10 ml boorzuur oplossing (5 ml verzadigde opl. + 5 ml aq.dest) + indicator (methylrood: methyleenblauw = 9:1).

Titreeren met 0,00948 n HCl.

Reactievergelijkingen:



POTENTIOMETRISCHE TITRATIE

=====

Uitrusting

Radiometer titrator, type TTT, met titratie hulpstukken.

Gecombineerde glas- calomel electrode.

In principe zijn er twee mogelijkheden :

- a. Titratie, waarbij de pH verandert, ter bepaling van het equivalent punt (zuur-base titratie).
- b. Titratie, waarbij men de pH constant houdt.

a. Zuur-base titratie (b.v. titratie van H_3PO_4 met NaOH)

Reagentia

+ 0,01 n H_3PO_4
0,1 n NaOH

Uitvoering

Vul de spuit met 0,1 n NaOH (inhoud spuit is 2,5 ml)

Pipetteer 8 ml H_3PO_4 in het reaktievat.

Voor de instelling van de potentiometer dienen de volgende handelingen te worden verricht :

1. Zet de "stirring motor" op ON.
2. Zet de "recording titration curve" op START.
De standen OFF en ON van "pH-stat" worden gebruikt bij een bepaling, waar de pH in het reaktievat constant moet blijven (dus bij bepaling b).
3. Zet de potentiometer van de titigraph op de nulstand, zodat men het hele pH-gebied ter beschikking heeft. Dit doet men door de knop van de papierrol aan de rechterzijkant van de titigraph naar rechts te draaien (terwijl men de papierrol vasthoudt) totdat men een klik hoort. Bij het naar links draaien van de knop mag het tandwiel binnenin niet meer meedraaien en het stoplicht van de recording titrationcurve moet gaan branden.

4. Voor het pH-gebied van 0-13 moet de "compensation" op 0 staan. Het pH-gebied kan men verlagen of verhogen door de knop resp. naar links of naar rechts te draaien.
5. Met de "sample temp" kan men de gewenste temperatuur instellen. Deze temperatuur moet men ook instellen op het temp. kastje aan de titrator. De knop bij "range" op de titrator moet dan op T.C. d.w.z. temperatuur compensatie staan.
6. Zet de "chart callibration" op 0,5 pH/cm, d.w.z. 1 cm op het papier komt overeen met een 0,5 pH eenheid.
7. Zet de "selector" van de titrator op up-scale, omdat er getitreerd wordt met loog. De knop op down-scale zetten wanneer er getitreerd wordt met zuur.
8. Wanneer de potentiometer van de "Titigraph" is ingeschakeld, geeft de titrator niet de werkelijke pH aan, doordat de potentiometer van de titrator uitgeschakeld is.
Om de werkelijke pH in het reaktievat af te lezen, drukt men op de knop "read pH or mV".
9. Met de "end point" stelt men de werkelijke begin pH in.
Op dit moment moet de valve lamp regelmatig aan en uitgaan. Is dit niet het geval dan is het te bewerkstelligen door de rechter knop van de "end point" te verdraaien.
10. De schrijver van de titgraph wordt ook op de werkelijke begin pH ingesteld.
11. Zet de "delay of shut off" op ∞ .
12. Zet de "proportional band" op 1,5. Met deze knop kan men de grootte van de stapjes waarmee de loog toegevoegd wordt regelen.
Bij 0,1 wordt de loog in veel grotere stappen toegevoegd dan bij 5. De loog wordt bij een bepaalde proportional band steeds in dezelfde hoeveelheden toegevoegd, maar bij het equivalentiepunt van de titratie zal de tijd tussen twee opeenvolgende toevoegingen veel groter zijn dan in andere delen van de titratiecurve. Bij het equivalentiepunt heeft een klein loogverbruik een grote pH verandering tot gevolg. Het apparaat heeft bij een grote pH verandering meer tijd nodig om zich in te stellen dan bij een kleine pH verandering. (registratie titigraph).

13. Druk de startknop op de titigraph in en houdt deze ingedrukt tot het stoplicht uitgaat.
14. Titreer tot de volledige pH curve is ontstaan.

Opmerkingen

1. Op bovenbeschreven wijze kan men het equivalentiepunt bepalen, maar men moet dan titreren tot de hele pH curve is ontstaan. Heeft men één keer de hele pH curve gemaakt, dan is het mogelijk om de volgende keer precies tot het equivalentiepunt te titreren (de bepalingen moeten volledig identiek zijn!)

Dit gaat als volgt :

Bij de eerste bepaling, waarbij men de hele pH curve maakt, bepaalt men hoeveel tijd er verloopt tussen twee opeenvolgende toevoegingen in het gebied van het equivalentiepunt.

Is dit b.v. 15 sec. dan stelt men de "delay of shut off" in op 14 sec., dus iets minder dan de tijd die nodig is tussen twee opeenvolgende toevoegingen.

Wordt de tijd van 14 sec. overschreden, dan schakelt het apparaat zich automatisch uit en de shut off lamp gaat branden.

2. Het stellen van de pH meter :

De pH meter wordt op 6,5 gesteld bij 20°C met een 1 M fosfaatbuffer pH 6,5 (te bestellen bij Radiometer, Kopenhagen). Giet de fosfaatbuffer in het reaktievat en zet de "selector" op reading. De "range" knop moet op 20°C staan.

Is de pH niet precies 6,5, dan kan men dit bijstellen met de "buffer adjustment".

Instelling van de motors :

Speed settings

- | | | |
|-----------------|---|---|
| A - 5 mm/rev. | } | deze regelen de loopsnelheid van het papier |
| B - 0,5 rev/min | | |
| C - 4 rev/min | } | deze regelen de pensnelheid |
| D - 4%/rev | | |

b. Bepaling acetylcholine esterase in humaan serum

Principe

Acetylcholine esterase splitst acetylcholine in azijnzuur en choline. Het gevormde azijnzuur heeft een daling van de pH tot gevolg.

De temperatuurscoëfficiënt van de reactie is ongeveer 1,35 en de activiteit wordt langzamerhand hoger bij hogere pH van 6.0 - 8.0.

Dit betekent dat bij het meten van de activiteit van het enzym, de temperatuur en de pH constant moeten blijven om optimale condities te verkrijgen.

Bij de hiervolgende methode is een pH van 7.4 en een temperatuur van 37°C aangehouden.

De pH wordt constant gehouden door het toevoegen van NaOH.

De toegevoegde hoeveelheid loog is equivalent aan de hoeveelheid afgesplitste acetylgroepen.

Reagentia

0.9% NaCl, met een pH van 7.4

Acetylcholine chloride (BDH)

Deze oplossing bevat 100 mg per ml aqua dest. Het geheel wordt op pH 7.4 gebracht om een te grote pH verandering na het toevoegen van de oplossing tegen te gaan.

0,02 N NaOH (carbonaatvrij)

Uitvoering

Pipetteer 10 ml 0,9% NaCl in het vat en laat dit gedurende enige tijd op temperatuur komen.

Hierna wordt 0,5 ml serum toegevoegd en de pH wordt met de hand gecorrigeerd (dit om een groot NaOH verbruik van de spuit te voorkomen).

De spuit die een volume heeft van 2,5 ml moet aan het begin van de bepaling geheel gevuld zijn, omdat bij een hoge enzymactiviteit de mogelijkheid bestaat dat halverwege de spuit leeg is.

Voeg hierna 2 ml van de acetylcholine oplossing toe en stel de titrator in op de juiste stand.

Berekening

1 eenheid acetylcholine esterase is gelijk aan 1 μ mol acetylcholine omgezet per ml serum per minuut.

- a. - volume van de spuit 2,5 ml
- b. - percentage van de totale inhoud
- c. - aantal minuten die de bepaling gelopen heeft
- d. - aantal μ mol per ml NaOH
- e. - aantal ml serum in reactievat

$$a. \cdot b. \cdot \frac{1}{c} \cdot d. \cdot \frac{1}{e} \quad \text{Eenheden enzym}$$

Speed settings

A 5 mm/rev.	<u>recording pH stat</u>	ON
B 0.5 rev/min.	<u>compensation</u>	0
C 4 rev/min.	<u>sample temp.</u>	37°C
D 4	<u>selector</u>	up scale
1 cm = 4 min.	<u>end point</u>	7.36 p.m.
	<u>shut of</u>	∞ sec.
	<u>prop. band</u>	0.1
	<u>range</u>	T.C.

CONWAY MICRODIFFUSIE TECHNIEK

=====

voor bepaling N-gehalte

Microdiffusion analysis. E.J. Conway, Crosby Lochwood and Son Ltd. London 1962, 5th Edition.

Het weggooi Conway-apparaat bestaat uit een centraal vat (kamer) en een buitenvatring, afgedekt door een deksel, het apparaat wordt gasdicht gemaakt door de deksel en de rand van het vat in te vetten met vaseline. In het centrale vat wordt een los schaaltje gezet. De diameter van het apparaat is 6,1 cm, de diameter van het centrale vat is 3,3 cm.

In het centrale vat wordt 1 ml 1½% boorzuur-indicator oplossing gebracht met behulp van een eppendorfpipet. Het apparaat wordt een beetje schuin neergezet, zodat bij inpipetteren van 0,5 ml te onderzoeken vloeistof, deze zich verzamelt in het lage deel.

Het monster wordt ingepipetteerd met een eppendorfpipet.

Dan wordt een 0,5 ml 40% KOH in de buitenring gebracht door een smalle spleet, die ontstaat door het horizontaal verschuiven van het deksel. De vloeistof moet snel inlopen, maar men moet oppassen dat er geen loog in het binnenvat spat. De loog wordt ingepipetteerd met een eppendorfpipet.

Na inlopen wordt het deksel gesloten, het vat horizontaal geplaatst en $\pm$ 10x licht geschud.

Na een geschikte tijd van absorptie ($\pm$ 16 uur) wordt het deksel verwijderd. De vloeistof in de buitenkamer wordt m.b.v. een afzuigstelsel weggezogen.

De inhoud van het middenvat wordt getitreerd met 1/50 n HCl met behulp van een microburet met totale inhoud van 1 ml en onderverdeeld in duizendste ml. Deze opstelling kan gebruikt worden voor een stikstofbepaling in monsters met een gehalte van 300γ tot 100γ N.

Bij stikstofbepaling van monsters met een hoger gehalte dan 300γ N, is de boorzuurconcentratie te laag om alle gevormde NH_3 te binden.

Na de diffusietijd bij openen van de schaaltjes ruikt men dan een ammoniak geur.

De microdiffusietechniek is eerst getoetst met een nauwkeurig afgewogen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Baker; 99,7%) is gedroogd in een vacuumexicator boven P_2O_5 .

Oplossing: 0,11082 g/50 ml aq.dest. Het gevonden gehalte aan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was steeds 1 à 2% te hoog. Dit is te wijten aan de gevoeligheid van het oog bij het titreren.

Per serie Conwaybepalingen worden blanco-bepalingen gedaan:

Inplaats van 0,5 ml eiwitmonster wordt een 0,5 ml oplosmiddel ingepipetteerd.

Reagentia

Indikator

0,033% broomkresolgroen + 0,066% methylrood, opgelost in ethanol.

Boorzuur-indikatormengsel

15 gram zuiver boorzuur (Merck).

In een maatkolf van 1 liter 200 ml ethanol toevoegen, daarna 700 ml aq.dest.

Het boorzuur wordt opgelost en 10 ml mergindikator wordt toegevoegd. Na mengen wordt het totaal op de gewenste kleur gebracht (zwak rood) door toevoeging van een beetje loog. De pH moet liggen tussen 5,0 - 5,1. Daarna aanvullen tot streep.

40% KOH oplossing

47,1 g zuiver KOH wordt opgelost in 100 ml aq.dest.

1/50 n. HCl

De HCl oplossing is verdund uit een gedestilleerde HCl oplossing, zodanig dat men $\pm$ 1/50 n HCl oplossing krijgt.

Hierna is de oplossing met borax gesteld.

Destrukctie van eiwit

Deze destruktiemethode kan men gebruiken voor eiwitmonsters met 10 mg tot 100γN gehalte.

Destruktiemengsel

1 volume geconcentreerd H_2SO_4 (Baker) + 1 volume verzadigd KHSO_4 (Merck), dat 0,4 g SeO_2 per 100 ml bevat (Merck).

Destruktiewerkwijze

2,5 ml eiwitoplossing (binnen de bovengenoemde grenzen) en 1,25 ml destruktiemengsel worden in een destruktiebuis gedaan en 1 nacht in de stoof bij 105°C gezet. Per buis worden 3 glaskraaltjes toegevoegd. Daarna op destruktieapparaat :

4 à 5 uur op stand 1 - 120°C
 4 uur op stand 2 - 165°C
 1 uur op stand 3 - 225°C tot kleurloos

Hierna 8 à 16 uur op stand 2.

Na afkoelen wordt de inhoud van een buis kwantitatief in een 15 ml maatkolffje overgebracht en met aq.dest tot de streep aangevuld.

Per Conway-bepaling wordt een 0,5 ml uit het maatkolffje gepipetteerd.

Per destruktie wordt een duplo blancobepaling meegenomen, d.w.z. in plaats van 2,5 ml eiwitoplossing wordt 2,5 ml oplosmiddel gepipetteerd.

Titratie

Het schaalkje wordt op een roermotor onder de buret geplaatst. In de binnenkamer wordt een klein roerdertje gelegd.

De groen geworden boorzuurindikatoroplossing wordt met kleine druppels HCl getitreerd tot de kleur van de blancobepaling, die bij iedere seriebepaling wordt meegenomen. Het boorzuurindikatorengsel van de blanco's moet roze blijven.

Voor verschillende concentraties eiwitmonsters wordt per concentratie een duplo blanco meegenomen. Bij titratie worden deze blanco's met hetzelfde aantal ml aq.dest verdund als het aantal ml benodigde HCl voor titratie van de eiwitmonsters. De met aq.dest verdunde blanco's worden nu met HCl getitreerd tot de kleur van de oorspronkelijke blanco. Dit aantal ml moet worden afgetrokken van het aantal getitreerde ml HCl. Bij deze bepaalde concentratie eiwitmonsters.

Dit is nodig, omdat de indikatorkleur erg afhankelijk is van de verdunning, nl. bij titratie van de monsters wordt het HCl geneutraliseerd door het gebonden NH_3 en het water geeft dus een verdunning van het boorzuurindikatorengemengsel.

Door het aantal getitreerde ml HCl nodig voor de verdunde blanco af te trekken van het aantal ml HCl nodig voor het monster, wordt deze verdunningsfactor teniet gedaan.

Belangrijke punten voor het goed verlopen van de bepaling

1. Het oppervlak van de buitenkamer moet geheel zijn bedekt.
2. Het vloeistofvolume in de buitenring mag de hoeveelheid die voorgeschreven is bij de bepaling niet overschrijden, omdat het volume een merkbaar effect heeft op de absorptie snelheid (tijd nodig voor 99,5% absorptie).
De invloed van het volume op de absorptie snelheid is omgekeerd evenredig met het volume.
Het volume van het binnenvat heeft geen merkbare invloed op de absorptie snelheid.
3. De bepalingen kunnen worden uitgevoerd bij kamertemperatuur. Incubatie bij 38°C verkort de reactietijd tot 60 - 70% van de k.t. waarde, maar het vloeibaar worden van het fixatief heeft nadelige invloed op de nauwkeurigheid van de ammoniabepaling. Schudden met een schudmachine kan de absorptietijd van $1\frac{1}{2}$ - 2 uur terugbrengen tot ca 1 uur. Volgens voorschrift van Conway is de absorptietijd van $1\frac{1}{2}$ - 2 uur voldoende voor 99,5% absorptie. In de praktijk is gebleken dat de absorptie na 2 uur onvoldoende is, zodat men het beste de schaaltes een nacht kan laten staan alvorens te titreren.

4. pH invloed:

De absorptiesnelheid van ammonia wordt bepaald door de spanning van het ontwikkelde NH_3 gas, dat kan worden gesteld evenredig te zijn met de dissociatiegraad in NH_3 en H^+ zodat

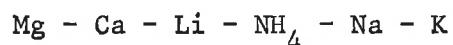
absorptie $A_1 = \alpha$ volledige absorptie A_2
 zodat volgens de vergelijking $\text{pH} = 9,4 + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$

indien $\alpha = 0,5$ de pH van de oplossing 9,4 is, d.w.z. ammonia wordt met halve maximale absorptie snelheid opgenomen.

De pH van 1 n ammoniumoplossing is ca 11.6, bij de pH is 99,5% van de ammonia als vrij gas aanwezig.

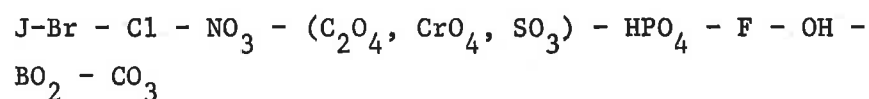
5. Zouteffect:

Sommige zouten kunnen een belangrijke vergroting van de dampspanning van ammonia veroorzaken. Het effect van kationen is als volgt:



De eerste drie verlagen de spanning, de laatste twee verhogen de spanning.

Van anionen is de volgorde:



Dus de combinatie K en CO_3 is het meest effectief.

Voorschriften van de Heer A. Hannema

Alsevers oplossing
Amboceptor titratie
Complement bindingsreactie
Complement titratie in serum-totaal
Complement titratie met R reagentia
C2 bepaling in serum (methode van Austin)
Complex van Egesens-schape cellen met C1 (EAhuC1 ber.)
Complex van Egesens-schape cellen met C4 (EAhuC4 ber.)
Complement comp. defic. sera bereiding R 1 hu
Complement comp. defic. sera bereiding R 2 hu
Complement comp. defic. sera bereiding R 3 hu
Complement comp. defic. sera bereiding R 4 hu
C3 bepaling met EAC_{1,4,2}
Complement component bereiding β_1C (vlgs Steinbuch)
Clq - Clr en Cls
C'₁ esterase bereiding
C'₁ esterase activiteit bepaling met titrator
C'₁ esterase activiteit bepaling titratie met buret
C'₁ esterase remmer bepaling
C4 inactivatie door C'₁ esterase
EDTA bereiding (Na₃HEDTA 0.15 M)
EDTA bereiding (MgNa₂EDTA 0.15 M)
EDTA veronal buffer bereiding
Euglobuline bereiding
Gelatine 0.5%-oplossing in veronal buffer
Haemolytisch systeem bereiding
Schape bloed- opvangen van
Sucrose gradiënt, het maken van. Voor U.C.
Veronal buffer bereiding, voor gebruik complement titratie

DE BEPALING VAN HET COMPLEMENT GEHALTE IN PATIENTE SERA =====

Algemeen

Complement is de verzamelnaam voor een groep van tenminste negen serum factoren die een rol spelen bij immunologische reacties. Samen met antistoffen vernietigt complement bacteriën, virussen, rode bloedlichaampjes enz. Ook speelt het een rol bij immune adherence reacties en phagocytose.

Bij een aantal ziekten is een verandering van het complementgehalte waarneembaar, waardoor het van belang is dit gehalte in serum te bepalen i.v.m. het stellen van een diagnose.

Werkwijze

Bij de bepaling van de complement activiteit in serum maakt men gebruik van het feit dat het rode bloedcellen vernietigt, de zgn. hemolyse.

Schape-erythrocyten (E) worden met behulp van een konijne antiserum tegen schape-erythrocyten (amboceptor A) gesensibiliseerd, waardoor deze het vermogen krijgen om met complement te reageren. Wanneer deze reactie heeft plaats gehad ontstaan er na enige tijd openingen in het cel membraan, waardoor hemoglobine naar buiten komt. De hoeveelheid hemoglobine in het reactiemengsel, die na afcentrifugeren van de overgebleven cellen in een spectrofotometer gemeten kan worden, is een maat voor het complement gehalte van het serum.

Dit gehalte wordt uitgedrukt in de zgn. CH50 titer.

De CH50 eenheid van complement is die hoeveelheid die in het reactiemengsel 50% van de gesensibiliseerde schapecellen hemolyseert.

Uitvoering

Benodigde apparatuur, reagentia en glaswerk:

1. Vitatron colorimeter met digitale aflezing
2. Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuizen 1,6 x 15 cm
3. Waterbad 32°C en 37°C. Beide met schudmachine
4. Whirlmix
5. Plastic bak
6. Reageerbuis rekjes

7. Waterstraalpomp
 8. Erlenmeyer van 200 ml, 300 ml en een van 500 ml
 9. 1 maatglas van 250 ml, drie van 100 ml en een van 5 ml
 10. 1 maatkolfje van 15 ml
 11. 2 reageerbuizen van 1,6 x 15
 12. 9 reageerbuizen 1,6 x 10 (verder 6 buizen voor iedere volgende bepaling)
 13. 1 vol. pipet van 1 ml
 14. 1 vol. pipet van 5 ml
 15. 1 meetpipet van 20 ml
 16. 2 meetpipetten van 0,5 ml
 17. 1 meetpipet van 5 ml
 18. 1 meetpipet van 0,2 ml
 19. Automatische pipet ("Cornwall") 5 ml
 20. Schapebloed in Alsever oplossing
 21. Spuitfles phys.zout en een met aqua dest
 22. Veronalbuffer (Isotonisch pH 7.4 met Ca^{++} en Mg^{++})
 23. Amboceptor oplossing 1 : 20
 24. Gelatine oplossing 0,5%
- } of een agla micro buret van 0,5 ml
- } zie voorschrift

A. Bereiding van gesensibiliseerde schapecel suspensie (E^{A})

1. De reageerbuizen 1,6 x 15 worden gevuld met schapebloed in Alsever oplossing en gedurende 5 min. bij 3000 rpm afgedraaid in de centrifuge. Na afdraaien de bovenstaande vloeistof met de waterstraalpomp afzuigen en de schapecellen suspenderen in phys.zout uit de spuitfles. Opnieuw afdraaien.
Deze bewerking tenminste 4 maal herhalen. Wanneer na de 4e x wassen de bovenstaande vloeistof kleurloos en helder is, zijn de cellen bruikbaar. Anders nieuwe cellen nemen.
2. Cel volume meten in maatglas van 5 ml (meestal 3 tot 5 ml packed cells), de cellen opnemen in 20 volumina veronal buffer en overbrengen in de 200 ml erlenmeyer.
Goed mengen zodat er geen cellen op de bodem van het vat liggen.
3. Met vol. pipet 1,00 ml cell suspensie in het maatkolfje van 15 ml overbrengen. Kolfje aanvullen tot de maatstreep en de inhoud mengen.

4. Extinctie van de oplossing meten in de vitatron fotometer bij 539 m μ , 1 cm cuvet, digilog op stand 1. Stel de aflezing b.v. 0,700.
5. Bereken de benodigde hoeveelheid schapecel suspensie als volgt:

$$\frac{0,286}{0,700} \times 100 \text{ ml}$$
 is de hoeveelheid die nodig is voor 100 ml gesensibiliseerde cel suspensie (EA), voor de bereiding van 200 ml het dubbele enz.
 Meet de benodigde hoeveelheid suspensie af in een maatglas van 100 ml en breng het over in de 500 ml erlenmeyer. Voeg nu zoveel veronalbuffer toe dat het volume 100 ml wordt. Dat is: 100 ml - (2,5 ml (amboceptor 1/20) + 10 ml (gelatine 0,5%) + ml cell suspensie) ml veronalbuffer.
 Voor 200 ml dus: 200 - (5mlA) + 20 ml (gel) + ml cell suspensie enz. ml veronalbuffer.
6. Voeg druppelgewijs 2,5 ml Amb. 1:20 toe. Tijdens en na toevoegen goed schudden. De eindverdunding van de amb. is dus 1:800.
 De cellen zijn dan optimaal gesensibiliseerd. Deze verdunning moet bij iedere nieuwe batch Amboceptor met een amboceptor titratie bepaald worden (zie analyse voorschrift)
7. Tenslotte 10 ml 0,5% gelatine oplossing toevoegen.
 Sluit de erlenmeyer af met een rubber stop en klem hem in de schudmachine vast in het waterbad van 37°C. Schudmachine aanzetten en de cellen een half uur incuberen.
 Na afloop wordt de suspensie in een koelkast bij +4°C bewaard tot hij gebruikt wordt. De gesensibiliseerde cellen zijn als regel slechts 1 dag houdbaar.

B. Complement titratie

1. Plaats een reageerbuisrekje in de plastic bak en vul deze voor 1/4 deel met water en vervolgens met zoveel ijssnippers dat het rekje ermee bedekt is.
2. 10 genummerde reageerbuizen van 1,6 x 10 cm worden in het ijsbad geplaatst. Voor iedere volgende titratie die gelijktijdig uitgevoerd wordt zijn 7 buizen voldoende.
 Maak in buis 7 van de serie een serumverdunding 1 : 10 door 0,5 ml patienteserum (meetpipet) te verdunnen met 4,5 ml VB (meetpipet). Vervolgens de inhoud goed mengen op de whirlmix.

Bij iedere serie bepalingen in patiente sera wordt een titratie in normaal serum uit vloeibare stikstof gedaan.

3. Pipetteer vervolgens serum 1:10 en veronalbuffer in de buizen volgens onderstaand schema: met 0,5 ml en 0,2 ml meetpipet. (zie blz.5 t/m 7)
4. Verdun een deel E A suspensie met een gelijk volume veronalbuffer en pipetteer van deze 1:2 verdunning 3 ml in buis 1 t/m 6 en buis 8 en 9. Bij deze laatste 2 wordt nog 1 ml V.B. gevoegd (blanco's).
5. Tot slot wordt nog een buis met hetzelfde hemoglobine gehalte gemaakt als overeenkomt met 50,0% hemolyse: 1,5 ml EA(onv.) wordt in een drøge buis (10) gepipetteerd en aangevuld met 6,5 ml aqua dest. De cellen hemolyseren direct.
6. Alle buizen worden afgesloten met rubber kapjes en gemengd op de whirl-mix.
7. Plaats de buizen in de schudmachine in het 32°C waterbad en laat ze 1 uur schudden. Na een uur is de complement hemolyse reactie beëindigd en worden de buizen in de centrifuge geplaatst om de overgebleven cellen te verwijderen. Afdraaien: 5 min. bij 3000 rpm.

Wanneer men meerdere complement titraties achter elkaar moet doen is het soms sneller om inplaats van het verdunde serum met meetpipetten af te meten, onverdund serum met een agla micro buret in te pipetteren. Door de kleine hoeveelheid serum die hierbij in de buizen gebracht wordt, wordt het totale volume nauwelijks beïnvloed zodat het aanvullen met V.B. tot 1 ml achterwege kan blijven en men slechts de EA suspensie iets verder verdunnen moet (d.w.z. 3 delen EA + 5 delen veronalbuffer) om dezelfde celconcentratie te houden ($+ 1,9 \times 10^8$ c/ml).

De punten 2 t/m 4 veranderen dan in 2a, 3a en 4a.

- 2a. Dezelfde buizen als onder 2. Zet de agla buret in elkaar en zet de micro met schroef op 12,0. Houdt de buret verticaal en let op dat de glazen plunger met de punt tegen de stalen staaf van de micrometer schroef komt.

Vul nu het glazen deel van de buret tot de rand met serum met een pasteur pipet en plaats het slijpstuk met de naald samen op de buret. Stevig aandrukken. Draai nu de schroef 1 à 2 maal rond en kijk of er serum zonder luchtbellens uit de naald komt. Lukt dit niet, dan opnieuw vullen. Nu de buret met de naald schuin naar beneden houden en de micrometer schroef tot 10.00 doordraaien. Overtollig serum met tissue wegvegen.

Schema Ia voor de bepaling van de CH50 titer van patiente sera

Dit schema kan gevolgd worden wanneer de CH50 titer ligt tussen 35,0 en 66,5
Het schema wordt dan:

Buis	Verdunning	Serum 1:10	Ver.buffer	E A 1:2				
1	1: 125,9	0,318	0,682	3,0 ml				
2	1: 151,4	0,264	0,736	3,0 ml				
3	1: 182,0	0,220	0,780	3,0 ml				
4	1: 218,8	0,183	0,817	3,0 ml				
5	1: 263,0	0,152	0,848	3,0 ml				
6	1: 316,2	0,127	0,873	3,0 ml				

Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				Begin:		Eind:		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 125,9	2,100	0,03178	10,0	0,0	8,0	41,0	4,0 ml
2	1: 151,4	2,180	0,02643	8,0	41,0	7,0	9,0	4,0 ml
3	1: 182,0	2,260	0,02198	7,0	9,0	5,5	49,0	4,0 ml
4	1: 218,8	2,340	0,01829	5,5	49,0	5,0	7,5	4,0 ml
5	1: 263,0	2,420	0,01521	5,0	7,5	4,0	31,5	4,0 ml
6	1: 316,2	2,500	0,01265	4,0	31,5	3,5	18,0	4,0 ml

Schema Ib voor de bepaling van de CH50 titer in patiente sera
tussen 66 en 160

Schema bij gebruik van meetpipetten en serum 1:20

Buis	Log.verd.	Ml serum 1:20	Ver.buffer	E A 1:2				
1	2,42	0,304	0,696	3,0 ml				
2	2,50	0,253	0,747	3,0 ml				
3	2,58	0,210	0,790	3,0 ml				
4	2,66	0,175	0,825	3,0 ml				
5	2,74	0,146	0,854	3,0 ml				
6	2,82	0,121	0,879	3,0 ml				

Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				Begin:		Eind:		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 263	2,42	0,03042	15,0	0,0	13,0	48,0	4,0 ml
2	1: 316	2,50	0,02530	13,0	48,0	12,0	21,5	4,0 ml
3	1: 380	2,58	0,02104	12,0	21,5	11,0	16,0	4,0 ml
4	1: 457	2,66	0,01750	11,0	16,0	10,0	28,5	4,0 ml
5	1: 550	2,74	0,01456	10,0	28,5	9,5	6,0	4,0 ml
6	1: 661	2,82	0,01211	9,5	6,0	8,5	45,5	4,0 ml

Schema Ic voor de bepaling van de CH50 titer in patiente sera
tussen 12 en 35

Pipetteer schema bij gebruik van meetpipetten en serum 1:10 verdund

Buis	Verdunning	Serum 1:10	Ver.buffer	E A 1:2				
1	1: 39,8	1,005	--	3,0 ml				
2	1: 50,1	0,799	0,201	3,0 ml				
3	1: 63,1	0,634	0,366	3,0 ml				
4	1: 70,4	0,504	0,496	3,0 ml				
5	1: 100,0	0,400	0,600	3,0 ml				
6	1: 125,9	0,318	0,682	3,0 ml				
7	1: 158,5	0,252	0,748	3,0 ml				

Buis	Verdunning	Log.verd.	Ml serum	STAND AGLA BURET				E A 3:8
				<u>Begin:</u>		<u>Eind:</u>		
				Vert.	Horiz.	Vert.	Horiz.	
1	1: 39,8	1,60	0,1005	20,0	0,0	14,5	47,5	4,0 ml
2	1: 50,1	1,70	0,07986	14,5	47,5	10,5	48,0	4,0 ml
3	1: 63,1	1,80	0,06340	10,5	48,0	7,5	31,0	4,0 ml
4	1: 79,4	1,90	0,05039	7,5	31,0	5,0	29,0	4,0 ml
5	1: 100,0	2,00	0,04000	5,0	29,0	3,0	29,0	4,0 ml
6	1: 125,9	2,10	0,03178	3,0	29,0	1,5	20,0	4,0 ml
7	1: 158,5	2,20	0,02524	1,5	20,0	0,0	44,0	4,0 ml

Serum in de buizen pipetteren volgens onderstaand schema:

Zie pipetteerschema I Agla Buret. (blz. 5 t/m 7)

Na afloop buret uit elkaar nemen en schoon en droog maken en weer in elkaar zetten enz.

3a. 4 ml EA 3:8 in de buizen spuiten met de automatische pipet.

4a. Blanco's: in twee droge buizen 4 ml EA 3:8 spuiten.

8. Meting van de hemolyse graad

Van een van de blanco's (buis 8) wordt het bovenstaande overgegoten in een droge buis, waarna nog 4 ml veronalbuffer wordt toegevoegd.

9. Spoel de doorstroom cuvet van de vitatron colorimeter met aqua dest en zuig hem daarna leeg. Spoel de cuvet even voor met de 1:2 verdunde blanco. Vul nu de cuvet met een paar ml vloeistof en stel met de fijnregelknop (11) links onder aan de colorimeter de extinctie in op 0. Controleer dit even door op de onderste knop (A) van de digilog te drukken (knop voor de vermenigvuldigingsfactor (c) op 1). Het cijfer dat nu afgedrukt wordt mag niet boven de 3 komen, anders bijstellen.
10. Cuvet leegzuigen, voorspoelen met de inhoud van buis 10 (50% hemolyse waarde) en vullen met een paar milliliter van deze vloeistof. Zet de knop voor de vermenigvuldigingsfactor op 3 en de potentiometer daarboven (D) op 0,9. Druk op A en stel met de potentiometer zolang bij tot de afgedrukte extinctie 500 is d.w.z. 50,0% H. Daarna potentiometer vergrendelen.
11. Cuvet leegzuigen en spoelen met aqua dest. Nu spoelen en vullen met blanco (9). Goed oppassen dat er geen cellen meekomen! Knop C op 1 zetten en met 11 bijstellen op extinctie 0. Controleren met digilog of het gedrukte getal maximaal 3 is.
12. Knop C terug zetten op 3. Teller van de digilog op 000 stellen door op knop B te drukken. Vervolgens de monsters 1 t/m 6 enz. meten. Steeds even voor spoelen met een klein beetje van de te meten vloeistof. Oppassen dat er geen cellen meegaan. De gedrukte cijfers geven nu direct de hemolyse graad (Y) in procenten aan.

Berekening van de CH50 titer

Bij de berekening van de CH50 titer wordt gebruik gemaakt van de formule van von Krogh: $\text{Log } x = \text{Log } K + \frac{1}{n} \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$ (x = serum verdunning, y = hemolyse graad).

Op grafiek papier wordt op de x as een schaal verdeling gemaakt van $\log \left(\frac{y}{1-y} \right)$. Van: -0,9; -0,8; -0,7 t/m -0,9; 0; +0,1; +0,2 t/m 1,0 (van links naar rechts). 0,1 schaal deel is 1 cm.

Op de y as wordt een verdeling gemaakt van de log van de verdunning van 2,0; 2,1 t/m 2,6 (van onder naar boven), weer is 0,1 schaal deel 1 cm.

De log van de zes verdunningen worden ingetekend op de y as, deze logaritmen staan vermeld in de tabel voor het maken van de verdunningen.

Het doel van de grafiek is het vinden van een rechtlijnig verband tussen de $\log \frac{y}{1-y}$ en de log verdunning. Het snijpunt van deze lijn met de waarde $\log \frac{y}{1-y} = 0$ geeft de log van de verdunning waarbij 50% hemolyse optreedt.

De waarde van $\log \frac{y}{1-y}$ van iedere afzonderlijke verdunning vindt men door bij de hemolyse graad y die op de papierstrook gedrukt staat, in de tabel van $\log \frac{y}{1-y}$ waarden de bijbehorende waarde hiervan op te zoeken.

In de grafiek tekent men dan de gevonden punten in en trekt hierdoor een lijn zodanig, dat de meeste punten erop liggen. Wanneer de bepaling goed uitgevoerd is liggen tenminste vier punten op een rechte lijn. Lukt dit niet dan moet hij over gedaan worden.

Bij het snijpunt van deze lijn met $\log \frac{y}{1-y} = 0$ zoekt men de hiermee overeenkomende log verdunning op. Deze zoekt men terug in een anti-logaritmen tabel en vindt hiermee de verdunning waarbij 50% hemolyse optreedt. Deze verdunning is berekend t.o.v. een reactie volume van 4 ml. De reciproke waarde van deze verdunning wordt daarom door 4 gedeeld. Dit is dan de gezochte CH50 titer.

Behalve de CH50 titer wordt bij een patientserum ook nog het complement gehalte t.o.v. normaal serum opgegeven, dat is:

$$\frac{\text{CH50 titer patientserum}}{\text{CH50 titer normaal serum (uit vl.stikstof)}} \times 100\%$$

TABEL VAN DE LOG. Y / 1-Y WAARDEN

Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	-.955	-.951	-.943	-.939	-.935	-.932	-.924	-.921	-.917	-.914
11	-.907	-.903	-.900	-.896	-.889	-.886	-.883	-.876	-.873	-.870
12	-.866	-.860	-.857	-.854	-.848	-.845	-.842	-.839	-.833	-.830
13	-.827	-.824	-.818	-.815	-.810	-.807	-.804	-.799	-.796	-.793
14	-.788	-.785	-.780	-.777	-.775	-.770	-.767	-.765	-.759	-.757
15	-.754	-.750	-.747	-.742	-.740	-.737	-.733	-.730	-.726	-.723
16	-.721	-.717	-.714	-.710	-.708	-.703	-.701	-.699	-.695	-.692
17	-.688	-.686	-.682	-.680	-.676	-.674	-.670	-.668	-.663	-.661
18	-.658	-.656	-.654	-.650	-.648	-.644	-.640	-.638	-.634	-.633
19	-.629	-.627	-.623	-.622	-.618	-.616	-.613	-.611	-.607	-.605
20	-.602	-.599	-.597	-.593	-.592	-.588	-.587	-.583	-.580	-.578
21	-.575	-.573	-.570	-.567	-.565	-.562	-.559	-.557	-.554	-.553
22	-.550	-.547	-.545	-.542	-.539	-.538	-.535	-.532	-.530	-.527
23	-.524	-.523	-.520	-.517	-.516	-.513	-.510	-.507	-.506	-.503
24	-.500	-.498	-.496	-.493	-.491	-.488	-.487	-.484	-.481	-.479
25	-.478	-.475	-.472	-.470	-.468	-.466	-.463	-.461	-.458	-.456
26	-.455	-.452	-.450	-.447	-.445	-.442	-.441	-.439	-.436	-.434
27	-.432	-.429	-.427	-.425	-.424	-.421	-.419	-.417	-.414	-.412
28	-.410	-.408	-.406	-.403	-.401	-.399	-.397	-.395	-.394	-.391
29	-.389	-.387	-.385	-.383	-.381	-.379	-.377	-.375	-.372	-.370
30	-.367	-.365	-.363	-.361	-.359	-.357	-.356	-.354	-.352	-.350
31	-.348	-.346	-.344	-.341	-.339	-.337	-.335	-.333	-.332	-.330
32	-.327	-.325	-.323	-.321	-.320	-.318	-.315	-.313	-.312	-.310
33	-.307	-.305	-.304	-.302	-.299	-.298	-.296	-.294	-.292	-.290
34	-.288	-.286	-.284	-.282	-.281	-.278	-.276	-.275	-.272	-.271
35	-.269	-.267	-.265	-.263	-.261	-.259	-.257	-.256	-.253	-.252
36	-.249	-.248	-.246	-.244	-.243	-.240	-.239	-.237	-.235	-.233
37	-.231	-.229	-.228	-.225	-.224	-.222	-.220	-.218	-.216	-.215
38	-.212	-.210	-.209	-.207	-.205	-.203	-.201	-.200	-.198	-.196
39	-.194	-.192	-.190	-.189	-.187	-.185	-.183	-.182	-.180	-.178
40	-.176	-.175	-.173	-.171	-.169	-.167	-.165	-.164	-.162	-.160
41	-.158	-.156	-.154	-.152	-.151	-.149	-.147	-.146	-.144	-.142
42	-.140	-.138	-.137	-.135	-.133	-.131	-.130	-.128	-.126	-.124
43	-.123	-.121	-.119	-.116	-.115	-.113	-.112	-.110	-.108	-.106
44	-.105	-.103	-.101	-.100	-.097	-.096	-.094	-.093	-.090	-.089
45	-.087	-.085	-.083	-.082	-.080	-.078	-.077	-.075	-.073	-.072
46	-.070	-.068	-.066	-.064	-.062	-.061	-.059	-.057	-.055	-.054
47	-.052	-.051	-.049	-.047	-.045	-.043	-.042	-.040	-.038	-.037
48	-.035	-.033	-.031	-.030	-.028	-.026	-.024	-.023	-.021	-.019
49	-.017	-.015	-.014	-.012	-.011	-.009	-.007	-.005	-.003	-.002
Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

TABEL VAN LOG. Y / 1-Y WAARDEN

Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Y
50	.000	.002	.004	.005	.007	.009	.010	.012	.014	.016	50
51	.018	.019	.021	.022	.025	.026	.028	.029	.031	.033	51
52	.035	.037	.038	.040	.042	.043	.045	.047	.049	.050	52
53	.052	.054	.056	.057	.059	.061	.063	.065	.066	.068	53
54	.070	.072	.073	.075	.077	.079	.080	.082	.084	.085	54
55	.087	.089	.091	.092	.094	.096	.097	.099	.101	.103	55
56	.105	.107	.108	.110	.112	.114	.115	.117	.119	.121	56
57	.123	.124	.126	.128	.130	.131	.133	.135	.137	.138	57
58	.140	.142	.144	.146	.147	.149	.151	.153	.154	.156	58
59	.158	.160	.162	.164	.165	.167	.169	.171	.173	.174	59
60	.176	.178	.180	.182	.183	.185	.187	.189	.191	.193	60
61	.194	.196	.198	.200	.202	.203	.205	.207	.209	.211	61
62	.213	.215	.216	.218	.220	.222	.224	.226	.227	.229	62
63	.231	.233	.235	.237	.239	.241	.242	.244	.246	.248	63
64	.250	.252	.254	.256	.257	.259	.261	.263	.265	.267	64
65	.269	.271	.273	.275	.277	.279	.280	.282	.284	.286	65
66	.288	.290	.292	.294	.296	.298	.300	.302	.304	.306	66
67	.308	.310	.312	.313	.315	.317	.319	.321	.324	.325	67
68	.327	.329	.331	.333	.336	.338	.340	.341	.343	.345	68
69	.348	.350	.352	.354	.356	.358	.360	.362	.364	.366	69
70	.368	.370	.372	.374	.376	.378	.380	.383	.385	.387	70
71	.389	.391	.393	.395	.397	.400	.402	.404	.406	.408	71
72	.410	.412	.415	.417	.419	.421	.423	.425	.428	.430	72
73	.432	.434	.436	.439	.441	.443	.445	.448	.450	.452	73
74	.454	.457	.459	.461	.463	.466	.468	.470	.473	.475	74
75	.477	.479	.482	.484	.486	.489	.491	.494	.496	.498	75
76	.501	.503	.505	.508	.510	.513	.515	.518	.520	.522	76
77	.525	.527	.530	.532	.535	.537	.540	.542	.545	.547	77
78	.550	.552	.555	.557	.560	.562	.565	.568	.570	.573	78
79	.575	.578	.581	.583	.586	.589	.591	.594	.597	.599	79
80	.602	.605	.608	.610	.613	.616	.619	.621	.624	.627	80
81	.630	.633	.635	.638	.641	.644	.647	.650	.653	.656	81
82	.659	.662	.665	.668	.670	.673	.676	.679	.683	.686	82
83	.689	.692	.695	.698	.701	.704	.707	.711	.714	.717	83
84	.720	.723	.727	.730	.733	.737	.740	.743	.747	.750	84
85	.753	.757	.760	.764	.767	.771	.774	.778	.781	.785	85
86	.788	.792	.796	.799	.803	.807	.810	.814	.818	.822	86
87	.826	.829	.833	.837	.841	.845	.849	.853	.857	.861	87
88	.865	.869	.874	.878	.882	.886	.891	.895	.899	.904	88
89	.908	.912	.917	.922	.926	.931	.935	.940	.945	.949	89
90	.954	.959	.964	.969	.974	.979	.984	.989	.994	1.000	90
Y	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Y

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°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°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 H_2O . De oplossing wordt bij 412 nm doorgemeten.

Buizen zonder monster geven de 0% hemolyse-waarde en buizen met 50 μl 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⁺⁺: isotone veronal buffer, waarin $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Ca en $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Mg en 0,1% gelatine.

EA: standaard EA suspensie bevat 5×10^8 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 (1×10^8 cellen per ml) De cellen worden 1x gewassen met fysiologisch zout en 2x met GVB⁺⁺; en daarna gesuspenseerd in GVB⁺⁺ ($\pm 2\%$).

Van de suspensie wordt 1.00 ml in een 10 ml maatkolffje gelyseerd in aqua dest en hiervan wordt de extinctie gemeten bij 541 m μ .

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 Na₃HEDTA 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 μl GVB⁺⁺ 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 μl EA suspensie in GVB⁺⁺ van 2×10^7 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 μl 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⁺⁺

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 serumverdunning die na 3 uur uitzakken nog net zichtbare immuunadherentie geeft.

Schema:

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

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. Splitting van IgG in Fab en Fc d.m.v. papaïne

Voor de splitting 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 dialyseren nodig voor het opbrengen op de DEAE kolom).
 De splitting van het IgG is compleet (95-100%).
 Test dit in I.E. tegen atot. (Het Fc zit in het $\beta 2$ 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 uitvlokking; 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. IgG₂ en IgG₄

De bereiding van Fab en Fc fragmenten uit IgG₂ en IgG₄ myeloom d.m.v. papaïne splitsing, geschiedt op dezelfde wijze als normaal IgG. Zie dus aldaar (750/36).

2. IgG₃

Splitsing van IgG₃ d.m.v. papaïne.

Neem voor de splitsing van 300 mg IgG₃ 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 IgG₃ 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. IgG₁

Splitsing van IgG₁ d.m.v. papaïne.

Drie van de vier myeloom IgG₁'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 IgG₁ p.g. of p.o. is, verdient het aanbeveling om eerst te proberen of het te splitsen is op de manier waarop IgG₃ 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 IgG₂ en IgG₄ en IgG₃ is gebaseerd op onderzoeken van Gergely et al, die vonden dat IgG₂ en IgG₄ in afwezigheid van reductiemiddelen papaïne ongevoelig (p.o.) en IgG₃ 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).

C₁-ESTERASE REMMER BEPALING IN PATIENTE SERA

=====

Algemeen:

C₁-esterase remmer (C₁ inh.) is een serumeiwit dat voorkomt in het plasma (en serum) van vrijwel alle mensen. De biologische werking van deze stof berust op het remmen van de omzetting van de reactie:



Zonder aanwezigheid van deze factor wordt bij 37°C, neutrale pH en fysiologische zoutconcentratie het proenzym C₁ (de eerste complement-component) omgezet in het enzym C₁-esterase, dat behalve zijn natuurlijke werking, te weten het activeren van C₄ en C₂, de eigenschap bezit bepaalde synthetische aminozuur esters te hydrolyseren o.a. ATEe en TAME. Van dit vermogen wordt gebruik gemaakt bij de bepaling van dit enzym en van de remmer.

Het belang van de bepaling van het C₁ inh. gehalte in serum is gelegen in het feit, dat bij patiënten lijdende aan hereditair angio neurotisch oedeem (HANE) deze enzym remmende activiteit in het serum ontbreekt. Het al of niet aanwezig zijn van deze remmer kan van doorslaggevende betekenis zijn bij het stellen van een diagnose.

Werkwijze:

Bij de bepaling van het C₁ inh. gehalte in serum maakt men gebruik van het feit, dat toevoeging van deze stof aan een C₁a preparaat de esterolytische activiteit hiervan doet afnemen.

Door de enzym activiteit vòòr en nà toevoeging van de remmer te meten, kan men uit de vermindering hiervan het gehalte aan C₁ inh. berekenen.

Uitvoering:

Benodigde apparatuur, reagentia en hulpmiddelen:

Apparatuur:

1. Automatische titrator en titrigraph van radiometer.
2. Een circulatie en een gewoon waterbad van 37°C.

Reagentia:

1. C₁a oplossing (+ 130 eenheden/ml)
2. 1 molair N Acetyl-l-tyrosine ethyl ester (ATEe) in cellosolve (Ethoxyethanol)
3. Gebufferde zoutoplossing (PBZ). pH 7,35 Voor samenstelling★ blz.4

4. Normaal humaan serum

Hulpmiddelen:

1. Reageerbuisjes 1.5x12 cm met rekje
2. Eppendorf pipet 1000 en 500 microliter, met blauwe pipet tipjes
3. Meetpipet 0,500 ml
4. Pasteur pipetten
5. IJkbuffer voor pH meter pH 6,5
6. 0,100 n NaOH oplossing
7. Spuitfles met PBZ
8. Stikstof cylinder

Bepaling:

1. In drie reageerbuizen (genummerd 1 t/m 3 in duplo) wordt één ml C_1 oplossing gepipetteerd.
In buis 1 pipetteert men nog 1 ml PBZ
In buis 2 pipetteert men nog 0,5 ml PBZ + 0,5 ml normaal hu serum.
In buis 3 pipetteert men nog 0,5 ml PBZ + 0,5 ml patiënte serum.
2. Na het mengen van de inhoud worden de buizen 15 min. geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie en vóór de titratie worden deze buizen bij kamertemperatuur bewaard.
3. Het instellen van de titrator TTT1c:
Selector op stand-by
End point op 7.5
Delay of shut-off sec. op 00
Range op TC
Proportional band op 0,3
Temp. compensator op 37°C.

Instelling van de titrigraph:

Recording op pH stat off
Compensation op 0
Line op ON
Sample temp. op 37°C
Chart calibration op 0,1
Speedsettings A op 5
B op 0,5
C op 30
D op 1

4. Het ijken van de pH meter:

- a. Zet de 'range' knop van de pH meter op 20°C
- b. Plaats een bekerglas met ijkbuffer onder de gecombineerde glas-AgCl electrode.
- c. Zet selector op 'reading' en wacht 2 minuten
- d. Stel de 'buffer adjustment' knop zo in dat de wijzer op de schaalverdeling precies 6,50 aanwijst
- e. Zet de 'range' knop terug op TC
- f. Zet 'selector' terug op 'stand-by'

5. Titratie van C₁a in buis 1 t/m 3:

- a. Zet het circulatie waterbad aan en stel de temperatuur in op 37°C. Verwarmingselement na het bereiken van deze temperatuur op '1/4' zetten.
- b. Plaats in het dubbelwandig titratievat de electrode, de vin van de roermotor, de buretpunt met de opening zo dicht mogelijk tegen de bol van de glaselectrode aan, hang de slang van de stikstof toevoer over de rand van het vat. Zet de stikstof cylinder aan. Deze moet een regelmatige kleine stroom belletjes geven via het gas/wasflesje met 20% indicator.
- c. Vul het voorraadvatje van de buret met 0,100 n NaOH.
- d. Bevestig de glazen 2,5 ml spuit aan de houder en vul het met loog. Zorg dat er geen luchtbelllen in de spuit zitten. Zijn deze er toch, haal dan de glazen plunjer van de spuit enige malen snel op en neer, waardoor de belletjes loslaten van de wand.
- e. Stel de micrometerschroef van de buret in op z'n laagste stand. De onderkant van de glazen plunjer moet op de micrometerschroef rusten.
- f. Zet de kraan van de buret zō, dat hij in verbinding staat met de glazen buretpunt in het titratievat.
- g. Zet de selector van de titrator op 'reading'
- h. Breng met een Pasteurpipet de inhoud van buis 1 (esterase blanco) in het titratievat.
Spoel de buis 1x na met 2,125 ml PBZ en breng dit ook in het titratievat.
Breng nu met een meetpipet 0,375 ml ATE in het titratievat.
- i. Zet de roerder aan.
Let op dat deze vrij van de wand en de electrode roert.

(Titrigraph stirring motor op ON)

- j. Spoel de buis nog een keer na met 3,0 ml PBZ en breng dit weer met de Pasteurpipet over in het titratievat.
- k. Zet de selector op reading.
- l. Draai met de micrometerschroef van de buret zolang tot de pH 7,40 is.
- m. Zet de selector op 'UPSCALE'
- n. Zet de 'recording' knop van de titrigraph op 'pH stat ON'
Plaats de pen op het recorder papier en duw hem met de hand naar 0.
- o. Na enige tijd moet het lampje VALVE van de titrator regelmatig aan en uit gaan.
Wanneer het lampje brandt, draait de micrometerschroef van de buret een klein stukje waardoor er loog in het titratievaatje komt.
Tevens schuift de pen van de recorder bij het branden van het lampje een klein stukje op, waardoor op het papier een schuine lijn getekend wordt.
- p. Wanneer het papier 4 cm gelopen heeft (d.w.z. 16 min.) wordt de titratie gestopt:
Recording op 'OFF'
Selector op 'stand by'
Stirring motor 'off'
- q. Zuig het titratievat leeg en spoel het drie keer goed met totaal 30 ml PBZ.
Spoelvlloeistof helemaal wegzuigen.
- r. Titreer de inhoud van de buizen 2 en 3 op dezelfde manier als buis 1.

★ Samenstelling:

Bereiding fosfaat gebufferde zoutoplossing voor C_1 inh. bepaling.
N.B. de samenstelling hiervan wijkt af van de normaal gebruikte PBZ
(lab.zout) oplossing.

Fosfaatbuffer:

$2,059 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
 $8,375 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$

} oplossen tot 1 liter pH stellen op 7,35

Voor gebruik mengen: 7 delen fosfaatbuffer op 2 delen fysiologische zoutoplossing.

BEREKENING

Na beëindiging van de laatste titratie (een of meer patiënte sera) wordt het beschreven papier van de recorderrol gesneden en af gevloeid.

Met een lineaal wordt door de titratiecurves, die soms heel licht gebogen zijn, een rechte lijn getrokken.

Met een gradenboog wordt de hoek van de titratielijn gemeten.

Uit deze hoek wordt het aantal eenheden enzym (C_1a) berekend.

Een eenheid enzym (C_1a) is gedefinieerd als die hoeveelheid, die uit ATEe in 15 min. tijd 0,0005 m.mol.zuur afsplitst onder gestandaardiseerde omstandigheden (0,05 m ATEe, 37°C , pH 7,4, $\mu = 0,15$).

Een eenheid C_1 -esterase remmer is die hoeveelheid die 10 eenheden C_1 -esterase remt.

Voor de berekening van het aantal eenheden esterase bepaalt men de tangens van de hellingshoek en vermenigvuldigt deze met de factor 75. Hierin zijn alle constanten opgenomen die voor de berekening noodzakelijk zijn.

Deze factor is als volgt afgeleid:

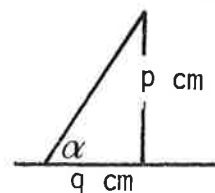
Het aantal m.mol.zuur vrijgekomen in 15 min. gedeeld door 0,0005 is het aantal eenheden C_1 -esterase.

Het aantal m.mol. is gelijk aan:

het percentage van de spuit-inhoud maal de spuit-inhoud (2,5 ml) maal de normaliteit van de loog.

Dus het aantal eenheden C_1 -esterase is gelijk aan: $\frac{X \cdot 2,5 \cdot 0,1}{100 \cdot 0,0005} = 5X$

De tg van de hoek α tussen de titratielijn en de tijdas van het papier bedraagt: $\text{tg}\alpha = \frac{p \text{ cm}}{q \text{ cm}}$



De papierrol is 25 cm breed verdeeld in 100%.

1% is dan 0,25 cm.

p cm is dan $0,25X$

De papierrol loopt 0,25 cm per minuut gedurende 15 min. d.w.z.

$q \text{ cm} = 0,25 \times 15$ $\text{tg}\alpha = \frac{0,25X}{0,25 \times 15} = \frac{X}{15}$ of wel $15 \cdot \text{tg}\alpha = X$

$5X$ is het aantal eenheden C_1 -esterase dus $75 \text{ tg}\alpha$ is het aantal eenheden C_1 -esterase per ml.

Van het aantal eenheden esterase dat bepaald wordt in buis 1 trekt men het aantal eenheden dat overgebleven is in buis 2 of 3 af. Het ontstane verschil deelt men door 10 (zie def. remmer) en vermenigvuldigt het met de verdunningsfactor 2 (0,5 ml serum werd gebruikt voor de bepaling).

Bij hoge remmerconcentraties is het soms nodig de hoeveelheid serum die voor de bepaling gebruikt wordt te verminderen tot 0,2 of 0,1 ml. Voor de berekening geldt dan de verdunningsfactor 5 resp. 10.

Wel moet voor de incubatie van serum en esterase het volume steeds met PBZ op 2 ml gebracht worden.

Behalve het op deze wijze bepaalde aantal eenheden C_1 inh. in het patiënte serum, wordt ook het percentage hiervan t.o.v. een normaal standaard serum opgegeven.

ISOLATIE VAN PARAPROTEINE IgA UIT PATIENTESERUM

Het patienteserum wordt met 100%-ige ammoniumsulfaat (0°C) tot een verzadiging gebracht van 50% en na 4 uur 0°C gecentrifugeerd m.b.v. een Sorvall (10 min. 10.000 rpm, SS34 rotor). Het precipitaat wordt opgelost in PBZ en verdund tot het oorspronkelijke serum volume; daarna gedialyseerd (24 uur) tegen een 100-voudig volume PBZ.

Daarna wordt toegevoegd 2 volumina acetaatbuffer, 0,06 M pH 4,8. Aan dit preparaat wordt langzaam onder roeren caprylzuur toegevoegd tot een eindconcentratie van 6,8%. Na 20 min. incuberen bij kamertemperatuur centrifugeren m.b.v. een Sorvall ($+4^{\circ}\text{C}$, 10 min. 10.000 rpm, SS34 rotor). Bovenop ligt dan vast caprylzuur dat voorzichtig met een pincet verwijderd kan worden. Het sup nu decanteren en filtreren over watten.

Het filtraat is dan het sup_{cp} dat op pH ca. 8 gebracht wordt met loog; daarna gedialyseerd tegen PBZ. Het prec_{cp} wordt opgenomen in PBZ.

Het sup_{cp} en prec_{cp} worden getest in immunoelectroforese tegen anti-totaal (PH00).

Als het sup_{cp} inderdaad bijna alleen de immunoglobulinen bevat, wordt dit verder verwerkt. Het prec_{cp} bestaat dan grotendeels uit gedenateerd eiwit.

Ionenwisseling wordt uitgevoerd over Sephadex DEAE-A50 met een kolom met een volume van minimaal 6x het volume van het op te brengen preparaat. De Sephadex is van tevoren geëquilibreerd met fosfaatbuffer (FFB) 0,01 M pH 7,4.

Het sup_{cp} wordt gedialyseerd tegen dezelfde buffer. Na doorspoelen van de kolom met FFB 0,01 M pH 7,4 volgt elutie m.b.v. een stapsgewijze gradiënt met de buffers:

I	FFB 0,05 M pH 7.0	} ieder ca. 2x bedvolume v.d. Sephadex
II	FFB 0,05 M pH 7.0 + 0,05 M NaCl	
III	FFB 0,05 M pH 7.0 + 0,1 M NaCl	

Van de frakties welke m.b.v. een collector worden opgevangen wordt de extinctie gemeten; de eiwitbevattende frakties worden aan de hand van het elutiepatroon gepooled en geconcentreerd (conc. $\pm 1\%$), dan getest in immunoelectroforese tegen PH00. Frakties die zuiver IgA blijken te bevatten worden verder getest m.b.v. dubbeldiffusietechnieken volgens

Ouchterlony tegen specifieke antisera.

Voor frakties die naast IgA nog meerdere eiwitten bevatten kunnen de volgende zuiveringsmethoden gebruikt worden:

1. De stapsgewijze verzadiging met ammoniumsulfaat:

Eerst tot 40% verzadiging; na centrifugering wordt het sup gebracht op 45% verzadiging.

Het prec 40, prec 45 en sup 45 worden getest in immunoelectroforese en Ouchterlony (zie boven).

2. Caprylzuur precipitatie (zie terug).

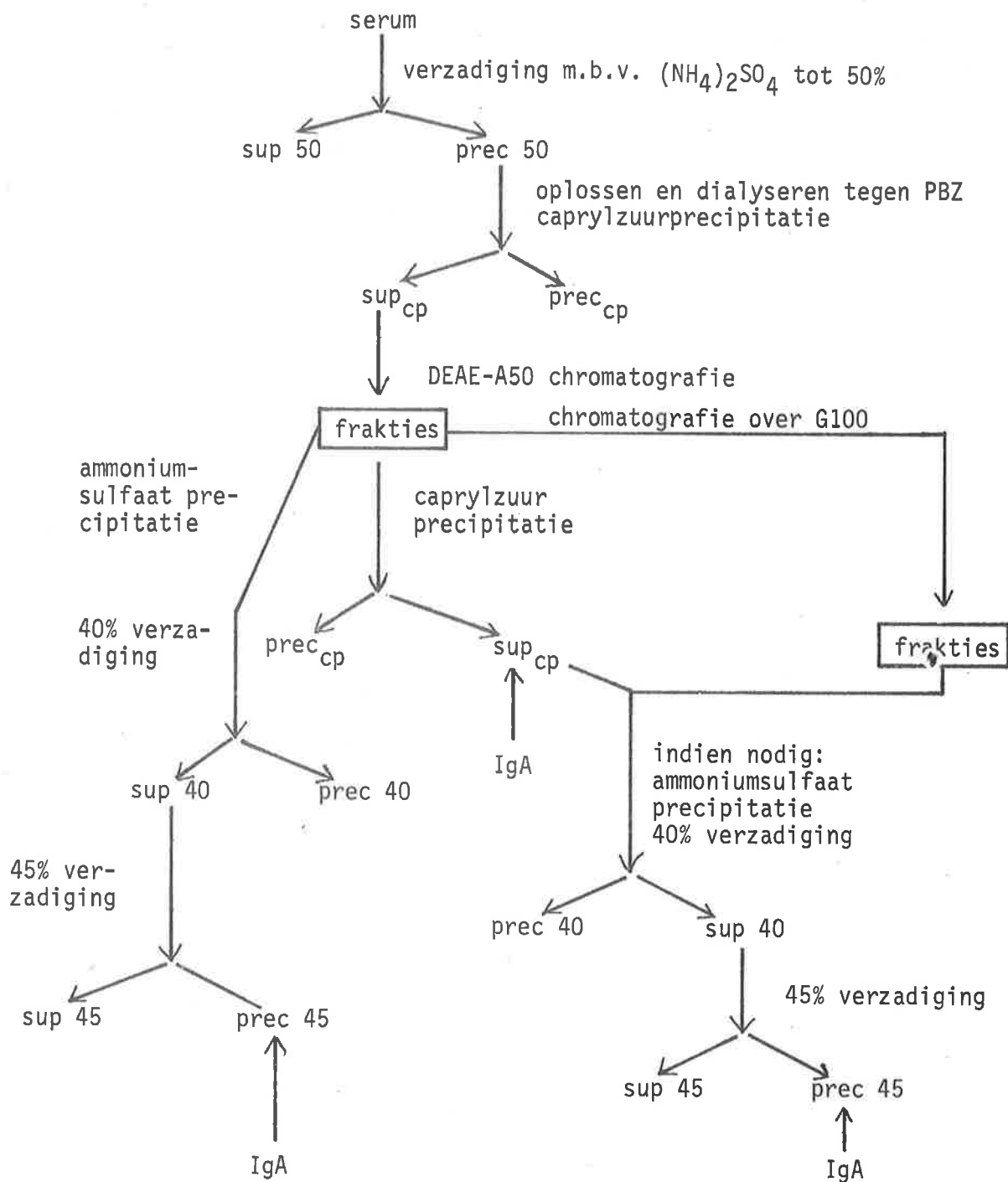
Deze methode kan het best toegepast worden bij sterk verontreinigde frakties: hoe zuiverder het preparaat, des te groter het verlies door denaturatie.

Na centrifugering blijven in het sup alleen de immunoglobulinen achter. Hierna kan dan weer stap 1 gedaan worden (indien nodig) om het resterende IgG te verwijderen.

3. Gelfiltratie over Sephadex G100:

Soms komt het voor dat frakties als contaminant losse L-keten bevatten. Door gelfiltratie over Sephadex G100, geëquilibreerd met PBZ + 1 M NaCl kan deze verwijderd worden.

Voor het zuiveringsschema zie blz. 750/39 blz.3

ZUIVERINGSSCHEMA

BATCHGEWIJZE ZUIVERING VAN HUMAAN IgG UIT EEN IMMUNOGLOBULINE FRAKTIE
=====

30 ml, 16%-ige immunoglobuline preparaat (uit normaal serum) wordt gedialyseerd tegen fosfaatbuffer 0,01 M pH 7.0 (natriumbifosfaat, op pH gesteld met NaOH). Na dialyse wordt het preparaat verdund tot $E_{280\text{ nm}}^{1\text{cm}} = \pm 50$ en geïncubeerd gedurende 60 min. bij 25°C met een minimaal 2-voudige hoeveelheid Sephadex DEAE-A50 die geëquilibreerd is in dezelfde fosfaatbuffer.

Het niet gebonden materiaal wordt afgezogen op een Büchnertrechter. De Sephadex wordt daarna nog 3x gewassen met de fosfaatbuffer. Het filtraat en de wasvloeistof bevatten het IgG.

Vervolgens wordt de Sephadex nog geïncubeerd met 0,5 M fosfaatbuffer + 0,5 M NaCl om de rest van de eiwitten uit de Sephadex te wassen. Alle frakties worden dan in hoge concentraties getest in immunoelectroforese en dubbeldiffusietechniek volgens Ouchterlony.