

DE BEPALING VAN FOETAAL HAEMOGLOBINE DOOR MIDDEL VAN ALKALISCHE DENATURATIE

Literatuur: H.K. Prins, diss. Groningen 1958; p.5
K. Singer, A.I. Chernoff & L. Singer, Blood 6 (1951) 413;
Studies on abnormal haemoglobins. I. Their demonstration in
sickle-cell anaemia and other hematologic disorders by means
of alkali denaturation.

Haemoglobine-oplossing

Gewassen erythrocyten worden gehaemolyseerd door mengen met 1 vol. gedestilleerd water, gevolgd door 1 nacht staan bij -15°C .

Reagentia

0,08 N NaOH-oplossing
1 M NaH_2PO_4 -oplossing (156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{aq}/\text{l}$)
verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oplossing (ca 76 g ammoniumsulfaat
op 100 ml water)

Uitvoering

In een grote reageerbuis pipetteert men eerst 10 ml 0.08 N NaOH-oplossing, daarna (op tijdstip 0) 0,5 ml van het haemolysaat en mengt dan zorgvuldig. Van te voren heeft men een mengsel gemaakt van gelijke delen fosfaat-oplossing en ammoniumsulfaatoplossing en hiervan in 5 centrifugebuizen steeds 4 ml gepipetteerd.

Uit de alkalische haemoglobine-oplossing worden nu op de tijdstippen $t = \text{resp. } 2, 4, 6, 8 \text{ en } 10$ minuten porties van 2 ml in de gereedstaande buizen met fosfaatsulfaat-oplossing gepipetteerd. Na zorgvuldig mengen wordt het ontstane precipitaat van gedenateerd haemoglobine afgecentrifugeerd (10 min. 2000 g) en van het bovenstaande bepaalt men de ext. $\frac{1 \text{ cm}}{415 \text{ m}\mu}$ ten opzichte van gedestilleerd water, evenals van een 1000-voudige verdunning van het haemolysaat in gedestilleerd water. Het percentage van de oorspronkelijke hoeveelheid haemoglobine, dat na de centrifugering in een bepaalde buis in oplossing is gebleven, is te berekenen met de volgende formule:

$$\% \text{ niet gedenatureerd Hb} = \frac{\text{ext. bovenstaande} \times 63}{\text{ext. 1000 v. verdunn.haemolysaat} \times 1000} \times 100\%$$

Men maakt nu een grafiek van 10 g % niet gedenatureerd Hb als functie van de tijd, en vindt door extrapolatie naar $t=0$ het percentage alkali-resistent haemoglobine.

N.B.

De factor 63 in de formule is de factor, waarmee het haemolysaat vanaf het begin van de proef is verdund (eerst 0,5 ml tot 10,5 ml, dan hiervan 2 ml tot 6 ml).

DE ELECTROPHORESE VAN HAEMOGLOBINE OP CELLULOSE-ACETAAT-STRIPS

Literatuur: H.K. Prins. J. Chrom. 2 (1959) 129-170

The separation of different types of human haemoglobin.

Buffer oplossing

Veronalbuffer pH 8.6 0,04 M per liter 20,6 g veronal-Na en 2,8 g veronal oplossen. Vlak voor gebruik met twee delen water verdunnen.

Cellulose-acetaat

Oxoid-strips $5 \times 20 \text{ cm}^2$, worden voor gebruik teminste 1 nacht lang gedrenkt in de veronalbuffer, om alle lucht te verdrijven.

Vlak voor de electrophorese worden de stroken afgevoeid met filtreerpapier, op hun plaats in het apparaat gebracht, waarna een half uur lang stroom doorgang van $2\frac{1}{2}$ mA per strip plaats vindt. De strips zijn dan gereed voor de electrophorese.

Haemoglobine-oplossing

Vers citraat- oxalaat- of heparinebloed wordt gecentrifugeerd en na verwijderen van het plasma worden de cellen herhaaldelijk gewassen met phys. zoutoplossing. Aan de gewassen packed cells wordt dan een gelijke volume gedestilleerd water en een half volume tolueen toegevoegd en na tenminste 1 minuut krachtig schudden zet men het mengsel 1 nacht lang in de koelkast ($0-4^{\circ}\text{C}$). 20 minuten lang centrifugeren bij 2000 rpm. brengt dan een goede scheiding teweeg tussen haemoglobine-oplossing en tolueen (bovenlaag) met in het grensvlak een laagje gedenatureerd (stroma) eiwit. De haemoglobine-oplossing, verkregen na afzuigen van tolueen- en stroma-laag, is meestal nog enigszins troebel. Filtratie door een dun laagje silicagel (Celite 545) resulteert in een heldere oplossing. Inleiden van koolmonoxyde geeft omzetting van het oxyhaemoglobine in het veel bestendiger koolmonoxyde-haemoglobine (HbCO). De haemoglobine-concentratie in de aldus verkregen oplossing bepaalt men fotometrisch bij 570 m μ (als HbCO), bij 540 m μ (als HbO_2 of met HbCN). De gemeten concentratie ligt meestal tussen 10 en 15%.

Uitvoering van de electrophorese

Met een gecalibreerd pipetje van 0,1 ml inhoud wordt de haemoglobine-oplossing, $2\frac{1}{2}$ cm van het anode einde, op de strips aangebracht. Dit kan gebeuren in de vorm van stippen (0,001 ml Hb-opl./stip) of als lijnen (0,005 ml per 4 cm lange lijn). Nadat de haemoglobine goed door de strips is opgenomen, wordt een stroom van $2\frac{1}{2}$ mA per strip, gedurende drie uren door de strips geleid.

Door verdamping en electrosrose beweegt het haemoglobine in de richting van de kathode. Na de stroomdoorgang worden de strips ca 5 minuten bij 130°C gedroogd en vervolgens in een bad gedompeld van de volgende samenstelling 0,4 g Amidozwart op 900 ml methanol en 100 ml ijsazijn. Na de kleuring wast men de strips uit met een mengsel van methylalcohol en azijnzuur 9:1.

DE BEPALING VAN Hb-A₂ OP KOLOMMEN VAN DEAE-SEPHADEX

=====

Literatuur: T.H.J. Huisman en A.M. Dozy
 Anal. Biochemistry 2 (1961) 400;
 Quantitative determination of the minor hemoglobin
 component Hb-A₂ by DEAE cellulose chromatography.

Bereiding van de haemoglobine oplossing

Gewassen erythrocyten worden gehaemolyseerd door mengen van 1 vol.
 gedest. water gevolgd door 1 nacht staan bij -15°C.
 0,1 ml van het zo verkregen haemolysaat wordt gemengd met ca 2 ml
 fosfaatbuffer (0,005 mol. pH 8.6)

Bereiding van de bufferoplossingen

0,0075 M fosfaatbuffer pH 8.6: per liter bufferoplossing wordt
 0,0075 mol Na₂HPO₄ opgelost en 100 mg KCN. De pH van de verkregen
 oplossing wordt met een paar druppels fosforzuuroplossing op 8.6
 gebracht.

0,01 M fosfaatbuffer pH 8.6: idem, maar nu 0,01 mol Na₂HPO₄ oplossen.
 Fosfaatbuffer pH 6,0: per liter buffer 0,01 mol NaH₂PO₄ en 0,3 mol
 NaCl oplossen en op pH 6.0 brengen.

Sephadex-kolommen

DEAE-Sephadex A 50 Medium (Pharmacia, Uppsala) wordt gesuspenderd
 in gedestilleerd water. Na 15 min. bezinken van het gesuspenderde
 materiaal worden de fijne, niet bezonken deeltjes verwijderd door
 decantatie. Na drie of viervoudige herhaling van deze wassing is de
 bovenstaande vloeistof na 15 min. bezinken doorgaans helder.
 Het bezonken materiaal wordt nu gesuspenderd in 0,0075 M fosfaat-
 buffer pH 8.6. Onder voortdurend mechanisch roeren wordt met fosfor-
 zuur de pH op 8.6 gebracht. Na uitzakken van de suspensie wordt het
 Sephadex nogmaals gesuspenderd in een nieuwe portie 0,0075 M
 fosfaatbuffer pH 8.6. De pH moet nu opnieuw op 8.6 gebracht worden.
 Van de verkregen suspensie worden kolommen gegoten van 0,9 cm diameter
 en 12-15 cm lengte; de kolommen worden voor gebruik gespoeld met
 0,0075 M fosfaatbuffer pH 8.6.

Chromatographie

Het verdunde haemolysaat (ca 15 mg Hb) wordt op het oppervlak van een juist drooggelopen kolom gebracht. Na intrekken van de oplossing wordt nog nagespoeld met een paar druppels van de 0,0075 M fosfaatbuffer. De Hb-A₂-fractie wordt nu geëluëerd met 0,01 M fosfaatbuffer. Het eluaat wordt opgevangen in fracties van ca 5 ml. Doorstroomsnelheid ca 20 ml/uur. Na 10 fracties is het Hb-A₂ volledig geëluëerd. De rest van het haemoglobine wordt nu geëluëerd met de fosfaatbuffer pH 6.0. De Hb-A₂ bevattende fracties worden verzameld en met water verdund tot 50 ml. De rest van het haemoglobine wordt met water verdund tot 200 ml. Van beide oplossingen wordt in een Unicam spectrophotometer de optical density bij 415 mμ bepaald. Het percentage Hb-A₂ wordt berekend volgens de formule:

$$\% \text{ Hb-A}_2 = \frac{1/4 (\text{O.D. 415 HbA}_2\text{-oplossing}) \times 100\%}{1/4 (\text{O.D. HbA}_2) + \text{O.D. hoofdfractie}}$$

Reproduceerbaarheid van de bepaling

4 bepalingen in bloed van een patient met thalassemia trait gaven als uitkomst resp.: 4,9, 5,0, 5,2, 5,1 gem.: 5,1 % HbA₂.

Een triplobepaling in het bloed van een normale 2,4, 2,0, 2,1 %, gem.: 2,2 % HbA₂.

Normale waarden

In het bloed van 22 normalen werd steeds een enkelvoudige bepaling uitgevoerd (bij kamertemp.)

De gevonden percentages Hb-A₂ waren respectievelijk:

2,7	2,4	2,7	2,5	2,3	2,9	3,1	2,7	2,3	2,8	2,4
2,5	3,1	2,3	1,9	2,4	2,6	2,2	3,3	1,8	2,0	2,3
(gem. 2,5 ± 0,36)										

500 g

DEAE-SEPHADEX A-50

Medium

anion Exchanger

Lot No.

To 9613 M

Dry screen analysis:

On US No.100 2.1 %

Through US No.270 5.1 %

Capacity: 3.0 meq/g

Patents pending:

PHARMACIA-UPPSALA

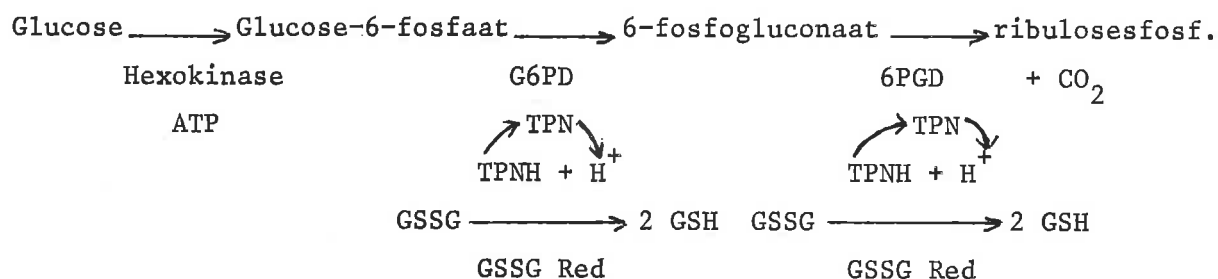
SWEDEN

GLUTATHION BEPALING VOOR EN NA INCUBATIE MET ACETYL PHENYLHYDRAZINE

Literatuur: E. Beutler, R.J. Dern, A.S. Alving; J. Lab. & Clin. Medicine vol. 45 (1955) 40. The hemolytic effect of primaquine VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine.

Principe

Acetylphenylhydrazine werkt oxyderend op het glutathion van rode bloedcellen. Normale rode bloedcellen zijn in staat om bij aanwezigheid van glucose het geoxydeerde glutathion enzymatisch te reduceren op de volgende wijze :



Het glutathiongehalte in de normale rode cel zal daarom bij incubatie met acetylphenylhydrazine hoogstens 10 à 20% dalen tijdens 2 uur incubatie. Rode cellen waarin echter een van de beschreven reactiestappen geblokkeerd is door het ontbreken van één of meer van de benodigde enzymen, zullen een sterke daling van de glutathionspiegel vertonen onder de genoemde omstandigheden (50% en meer).

Methode

Benodigde reagentia

a) Ringer-Glucose oplossing: 0.0020 M CaCl_2
 0.0005 M MgCl_2
 0.1028 M NaCl
 0.0027 M KCl
 0.0238 M NaHCO_3
 0.0030 M fosfaatbuffer pH 7.4
 0.0175 M Glucose

Deze oplossing moet altijd vers bereid worden uit de volgende voorraadoplossingen: 4.10 M NaCl (120 g in 500 ml H_2O) Brocades
 1.34 M KCl (50 g in 500 ml H_2O) "
 1.02 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (75 g in 500 ml H_2O) Merck
 0.246 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (25 g in 500 ml H_2O) "
 0.953 M NaHCO_3 (40 g in 500 ml H_2O) Brocades
 0.500 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (44.5 g in 500 ml H_2O) "

Alle oplossingen worden bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard.

De bereiding van de Ringer-oplossing verloopt als volgt:

de voorraad oplossingen worden van te voren gecontroleerd op schimmelverontreiniging; een beetje van de fosfaatoplossing wordt op pH 7.4 gebracht met 1 N HCl .

Men pipetteert in een 100 ml maatkolf achtereenvolgens:

0.2 ml	CaCl_2	1.020 M
0.2 ml	MgCl_2	0.246 M
ca 20.0 ml	H_2O	
mengen door omschudden, daarna		
2.5 ml	NaCl	4.100 M
0.2 ml	KCl	1.340 M
ca 40.0 ml	H_2O	
mengen door omschudden, daarna		
2.5 ml	NaHCO_3	0.953 M
2 druppels	1 N HCl	
ca 10.0 ml	water	
mengen door omschudden, daarna		
0.6 ml	0.5 M Na_2HPO_4 oplossing, op pH 7.4 gebracht met 1 N HCl ;	
aanvullen tot 100 ml met water.		

Men lost hierin op 316 mg glucose en stelt de pH op 7.4 met 0.1 N HCl (oplossing in een afgesloten vat bij $+4^\circ\text{C}$ bewaren).

- b) β Acetyl-phenylhydrazine Th. Schuchart München.
- c) Zie glutathion bepaling voorschrift.

Het bloed

Vers onstolbaar gemaakt bloed, 5 à 6 ml is voldoende.

Het bloed wordt afgecentrifugeerd in een klinische centrifuge 3000 rpm. gedurende 10 minuten. De cellen worden 3 maal gewassen met fysiologische zoutoplossing en de laatste maal 10 minuten lang afgecentrifugeerd bij 6000 rpm.; de packed cells worden gebruikt. Er moet altijd een controle bloedmonster mee bepaald worden.

Uitvoering

Men brengt in een 25 ml erlenmeyer 15 mg acetylphenylhydrazine en 2 ml Ringer-Glucose oplossing; men zwenkt tot het acetylphenylhydrazine is opgelost (er kan een lichte troebeling ontstaan, hetgeen de proef echter niet beïnvloedt).

Vervolgens pipetteert men 1 ml "packed cells" in dit medium (pipet onder het vloeistof niveau uit laten lopen en tweemaal door opzuigen naspoelen).

Men mengt door zwenken.

- a) 1 ml van dit mengsel wordt gebruikt voor de glutathion bepaling vóór de incubatie.
- b) er wordt een hematocriet van het mengsel bepaald.
- c) het resterende mengsel wordt twee uur bij 37°C in een waterbad geïncubeerd; daarna wordt opnieuw 1 ml gebruikt voor een glutathion bepaling.

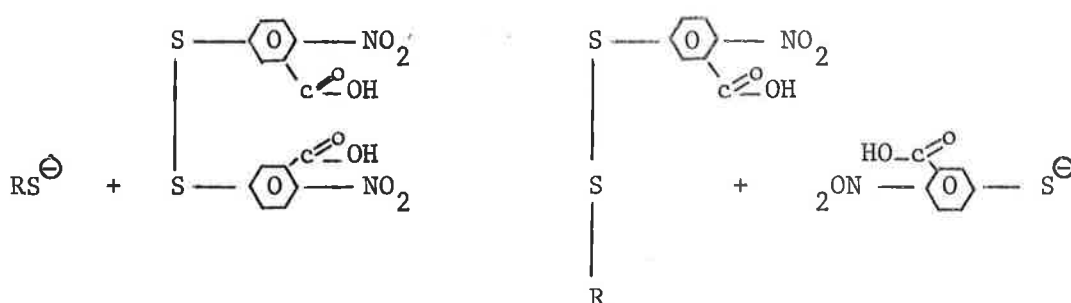
Voor de uitvoering van de glutathion bepaling en de berekening van het gehalte: zie voorschrift.

GSH-BEPALING MET 5,5' -DITHIOBIS-(2-NITROBENZOEZUUR)

Literatuur: G.L. Ellman; Arch.Biochem. 74 (1958) 443, A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans.
 E. Beutler; O. Duron, N.B. Kelly: J.Lab.Clin.Med. 61 (1963) 882. Improved method for the determination of blood glutathione.
 T.D. Stevenson; B.L. Mc Donald; S.Roston: J.Lab. Clin.Med. 56 (1960) 157: Colorimetric method for determination of erythrocyte glutathione.

Principe

Bij de bepaling wordt gebruik gemaakt van de volgende aflopende reactie:



thiol-	+	5,5'-Dithiobis-	gemengd +	gekleurd
anion		2-(nitrobenzoëzuur)	disulfide	anion

Het gevormde 2-nitro-5-thio-benzoëzuur is gekleurd en heeft een absorptiemaximum bij 410 mμ (fig.I).

Bij de bepaling van het pH-optimum van de reactie (fig.II) zijn een aantal maxima gevonden, waarvan datgene dat na pH=9.0 wordt ontwikkeld, berust op een aspecifieke dissociatie van het disulfide. pH=8.0 is gekozen als reactie pH bij de bepaling.

Reagentia

- a) 1/12 N H₂SO₄;
 1.17 ml 95% H₂SO₄ (Brocades) aanvullen tot 500 ml met aqua dest.
 De oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren.

- b) 10% $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (w/v), 0.1 M EDTA in water;
 10 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ en 3.7 g komplexon III oplossen in 100 ml aq.dest.
 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ van BDH, komplexon van Siegfried) De oplossing kan
 men bij kamertemperatuur bewaren.
- c) 1 M Tris-HCl-buffer pH=8.0 in water;
 121.4 g 2-amino-2-(hydroxy-methyl)-propaan- 1,3-diol oplossen in
 ca 800 ml aqua dest, de pH op 8.0 brengen met 35% HCl-oplossing.
 Onder pH meten, volume op 1 liter brengen. (Tris van BDH, HCl van
 Brocades). De oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard en de pH wordt vlak
 voor de meting gecontroleerd en eventueel gecorrigeerd.
- d) 40 mg% Dithiobis in gebufferde fysiologische zoutoplossing;
 40 mg 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoëzuur) oplossen in 100 ml
 gebufferde fysiologische zoutoplossing. Bewaren bij $+4^\circ\text{C}$.
 (Dithiobis van Aldrich-Milwaukee).

Uitvoering

Het bloed : Onstolbaar gemaakt met ACD, heparine of EDTA.

1 ml à 1.5 ml is ruim voldoende; van het bloed moet een hematocriet
 worden bepaald.

Extraktie : 1 ml onstolbaar gemaakt bloed wordt gepipetteerd in
 8 ml $1/12 \text{ N H}_2\text{SO}_4$; na mengen op cellofaan (geen Jodium-duimen
 gebruiken) laat men de hemolyse volledig worden door het mengsel
 10 minuten bij kamertemperatuur te laten staan. Daarna wordt
 1 ml 10% Na_2WO_4 , 0.1 M EDTA toegevoegd en onmiddellijk krachtig
 gemengd door het mengsel in de met rubberstop afgesloten buis
 te schudden. Men schudt daarna nog 5 minuten op de schudmachine.
 Men verwijdt vervolgens de kurk, laat de brei uitzakken door
 de buis ca 10 minuten in een ijsbad te zetten en draait daarna
 het eiwitneerslag af (10 minuten, klinische centrifuge, 3000 rpm).
 De bovenstaande vloeistof is helder, maar kan afgesloten zijn
 met een vlies gedenatureerd eiwit. (Oorzaak: niet lang genoeg uit
 laten zakken voor de centrifugering).

In dat geval wordt de bovenstaande vloeistof voorzichtig met een Pasteurpipet overgebracht in een uitgetrokken glasbuisje die is afgesloten met een wattenpropje en aldus gefiltreerd.

Meting : 2 ml van het extract (of filtraat) wordt gepipetteerd bij 2.5 ml M Tris-HCl-buffer pH=8.0, 0.2 ml 40 mg% Dithiobis-oplossing, gemengd en van dit mengsel wordt onmiddellijk daarna de $E_{410 \text{ m}\mu}$ gemeten ($E_{410 \text{ m}\mu}^{\text{I}}$).

Blanko : Men pipetteert 2 ml H_2O bij 2.5 ml 1 M Tris-buffer, pH=8.0 en 0.2 ml 40 mg% Dithiobis-oplossing, mengt en meet de $E_{410 \text{ m}\mu}$ ($=E_{410 \text{ m}\mu}^{\text{II}}$).

Berekening : $\text{GSH in mg/100 ml cellen} = \Delta E_{410 \text{ m}\mu} \cdot \frac{53.6 \cdot 100}{\text{hematocriet}}$

$$\Delta E_{410 \text{ m}\mu} = E_{410 \text{ m}\mu}^{\text{I}} - E_{410 \text{ m}\mu}^{\text{II}}$$

hematocriet in procenten (zie ijklijn, figuur III)

Opmerkingen :

- Men kan de proef uitvoeren met de helft van de hoeveelheden, dus 0.5 ml bloed + 4 ml 1/12 N H_2SO_4 + 0.5 ml Na_2WO_4 enz. Men krijgt dan voldoende extract voor de normale meting.
- Als men uitgaat van packed cells, pipetteer- men 0.3 ml packed cells bij 4 ml 1/12 N H_2SO_4 + 0.5 ml Na_2WO_4 , de berekening wordt dan:

$$\Delta E_{410 \text{ m}\mu} \times 53.6 \times \frac{100}{60} \times \frac{9.6}{10.0} = \Delta E_{410 \text{ m}\mu} \times 85.7$$

- Als men uitgaat van celsuspensies (1 volume cellen + 2 volume Ringer-oplossing) wordt de uitvoering gelijk aan de normale behandeling en de berekening:

$$\Delta E_{410 \text{ m}\mu} \times 53.6 \times \frac{100}{331/3} = \Delta E_{410 \text{ m}\mu} \times 160.8$$

- Als men celsuspensies gebruikt die voor bepaling van het GSH-gehalte schadelijke bestanddelen bevatten, gaat men als volgt te werk:

Men pipetteert de celsuspensie (1 deel cellen + 2 delen suspensiemedium) uit in een 10 ml ijskoude zoutoplossing, mengt en draait af. De bovenstaande vloeistof wordt zo ver mogelijk afgezogen, zonder cellen mee te zuigen; men voegt 4 ml 1/12 N H_2SO_4 toe, mengt, laat 10 minuten staan en voegt dan 0.5 ml 10% Na_2WO_4 , 0.1 M EDTA toe etc.
Men krijgt weer voldoende extrakt.

Berekening : Het volume dat resteert is ca 0.5 ml, waarvan ca 0.333 ml packed cells, dus:

$$\Delta E_{410 \text{ m}\mu} \times 53.6 \times \frac{100}{66.7} = E_{410 \text{ m}\mu} \times 80.4$$

e) Reproduceerbaarheid: Bij een 10 voudige bepaling werd gevonden:

$$67.8 \pm 0.75 \text{ mg GSH/100 ml cellen}$$

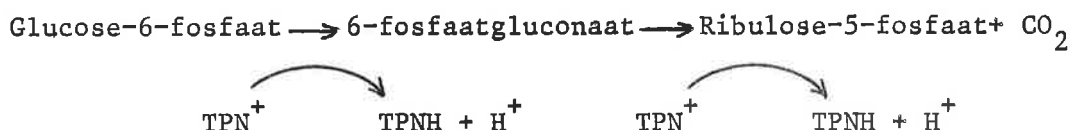
f) Normale waarde: $63.2 \pm 10.7 \text{ mg GSH/100 ml cellen}$.

DE BEPALING VAN GLUCOSE-6-FOSFAATDEHYDROGENASE-ACTIVITEIT IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

Literatuur: A. Kornberg and B.L. Horecker (1955) Methods in
enzymology, pag. 323, Academic Press, NewYork.

Principe

Glucose-6-fosfaat wordt in de erythrocyt enzymatisch geoxydeerd
langs de volgende reactieketen:



Wanneer men in een geschikt medium een overmaat Glucose-6-fosfaat
en TPN^+ aan een hemolysaat toevoegt, dan zal de TPNH productie per
minuut, per gram hemoglobine, een maat zijn voor de Glucose-6-
fosfaatdehydrogenase-activiteit in dit hemolysaat.

De TPNH productie en het hemoglobine-gehalte in het reactiemedium
kan men spectrofotometrisch bepalen.

Opmerking

Het is waarschijnlijk, dat onder de genoemde omstandigheden ook
de volgreactie, gecataliseerd door 6-fosfogluconaatdehydrogenase,
een bijdrage levert in de TPNH productie (ca 40%).

Methode

- a) 0.9% NaCl in water (deze oplossing kan men bij kamertemperatuur
bewaren).
- b) 0.25 M Tris-HCl-buffer in water
15.18 g 2-amino-2 (hydroxy-methyl)-propaan-1:3-diol (BDH) wordt
opgelost in ca 400 ml aq.dest, daarna wordt met 1 N HCl de
pH op 7.4 ingesteld en het totaal volume op 500 ml gebracht met
aqua dest. (Deze oplossing wordt bij $+4^{\circ}\text{C}$ bewaard).

c) 0.10 M MgCl_2 in water

10.2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) wordt opgelost in 500 ml aqua dest.

(Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard).

d) 0.02 M Glucose-6-fosfaat in water

0.0609 g Natriumzout van Glucose-6-fosfaat (Boehringer) wordt

opgelost in 10 ml aqua dest. (Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard).

e) 100 mg% TPN^+ in water (1.3 mM)

0.0100 g Trifosfopyridine-nucleotide (Boehringer) wordt opgelost

in 10 ml water. (Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard).

Het bloed

Bij voorkeur wordt vers, met heparine, ACD of EDTA (verseen) onstolbaar gemaakt bloed gebruikt: 5 ml is gewenst, vooral, wanneer ook andere enzymen moeten worden bepaald. Bij afname-moeilijkheden kan eventueel worden volstaan met 8 à 9 druppels bloed, verkregen uit een hiel- of vingerprik, opgevangen in ACD.

Opmerking

Een geschikt medium voor bloed hetwelk door middel van een vingerprik wordt afgenomen en enige tijd bewaard moet worden, is het volgende: citraat-glucose-cialith; 34.60 g glucose wordt opgelost in 640 ml aqua dest. 8.26 trisnatriumcitraat- $2\text{H}_2\text{O}$ wordt opgelost in 264 ml aqua dest. Beide oplossingen worden door verhitting onder druk op 166°C gedurende 15 minuten gesteriliseerd. Na mengen in een steriele fles wordt Cialith in een verhouding 1:20.000 (w/v) toegevoegd. (Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard). (citraat van Brocades, glucose van Dextropur, Cialith van Hoechst).

Bereiding van het hemolysaat

Het bloed wordt 10 minuten gecentrifugeerd in een klinische centrifuge bij 2000 rpm., het bovenstaande plasma en de leukocyten worden verwijderd m.b.v. een Pasteurpipet. De cellen worden daarna gewassen door ze te mengen met een fysiologische zoutoplossing en vervolgens af te centrifugeren in een klinische centrifuge, bij 2000 rpm. gedurende 5 minuten: na verwijdering van de bovenstaande vloeistof, herhaalt men dit proces nog twee maal.

De cellen worden vermengd met een gelijk volume aqua dest. en gedurende één nacht bij -20°C bewaard.

De activiteitsbepaling

Zo kort mogelijk voor de meting wordt het beschreven hemolysaat ontdooid en een kleine hoeveelheid wordt 50 maal verdund met aq. dest.; men pipetteert dan achtereenvolgens in twee centrifuge buizen:

<u>reactievat</u>	<u>reagensblanco</u>
1.00 ml 50 x verd. hemolysaat	idem
0.50 ml 0.1 M MgCl_2	idem
0.50 ml 0.25 M Tris-HCl pH 7.4	idem
0.20 ml 100 mg% TPN	----
0.60 ml H_2O	1.00 ml H_2O

Men laat de buizen vijf minuten staan bij kamertemperatuur en zet dan de reactie in gang door aan het reactievat 0.20 ml 0.02 M G6P-oplossing toe te voegen; tegelijkertijd drukt men een stopwatch in. Onmiddellijk daarna mengt men, door de buizen af te sluiten met cellofaan en ze twee maal om te draaien; vervolgens giet men de buisinhoud over in cuvetten (OG of H, 3.5 ml inhoud, 1 cm lichtweg) en leest m.b.v. een spectrofotometer gedurende 10 minuten, elke minuut de $E_{340 \text{ m}\mu}$ van de reactie cuvet af (gemeten tegen de reagensblanco).

Dan vervangt men de reagensblanco door een waterblanco en bepaalt de $E_{540 \text{ m}\mu}$ van de reactiecuvet, hierna wordt de temperatuur van het reactiemengsel bepaald.

Berekening van de enzymactiviteit

De toename van de lichtabsorptie bij 340 m μ gedurende de reactie is een maat voor de snelheid van de vorming van TPNH.

De lichtabsorptie bij 540 m μ is een maat voor de hoeveelheid in het reactievat aanwezige haemoglobine.

De vormingssnelheid van TPNH kan men op twee manieren bepalen:

a) door een grafiek te maken van $\text{Ext}_{340}^{1\text{cm}}$ als functie van de tijd.

In de praktijk is er een lineair verband van 0 tot omstreeks 8 minuten.

De helling van dit rechte stuk levert dan $\Delta\text{Ext}_{340}/\text{minuut}$ op.

b) door direkt uit de reeks extinctiemetingen de gemiddelde $\Delta\text{Ext}_{340}/\text{min}$ te berekenen (men dient zich dan evenwel te overtuigen, dat voor het gekozen tijdstraject de extinctietoename per minuut binnen meetnauwkeurigheid (0,001) constant is).

Men kan nu de vormingssnelheid van TPNH betrekken op de hoeveelheid haemoglobine; op deze manier is onze laboratorium-eenheid gedefinieerd:

$$\text{Aantal eenheden G6PD} = \Delta\text{Ext}_{340}/\text{min} \times \frac{858}{\text{Ext}_{540}} \times \text{temperatuurscorrectie-factor}$$

De temperatuurscorrectiefactor is bedoeld, om een gevonden enzym-activiteit om te zetten in de activiteit, die dezelfde hoeveelheid enzym gehad zou hebben bij 25°C ; in ons laboratorium is deze correctiefactor voor een reeks temperaturen experimenteel bepaald. Zij is af te lezen uit de curve in fig. 1.

858 is de $\text{Ext}_{540}^{1\text{cm}}$ van een oplossing van 1 g HbO_2/ml .

Racker e.a. (Arch.Biochem.Biophysics 74 (1958) 306) definiëren een enzym-eenheid als die hoeveelheid enzym, welke onder optimale substraatconcentratie, optimale ionensterkte en pH bij 25° 1 μMol substraat per minuut omzet. De specifieke activiteit is de activiteit per mg vaste stof. Om onze laboratoriumeenheid om te rekenen in de Racker-eenheid doen we het volgende gedachten-experiment:

In een cuvette van 1 cm x 1 cm x 1 cm laten we in een haemolysaat de omzetting van TPN^{+} tot $\text{TPNH} + \text{H}^{+}$ plaatsvinden. We vervolgen de reactie spectrofotometrisch bij 340 m μ . De hoeveelheid gevormde TPNH per minuut is $\Delta\text{Ext}_{340}/\text{min} \times \frac{1}{6,22} \mu\text{Mol}$ (De extinctiecoëfficiënt van TPNH en DPNH is 6,22 $\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$). $\frac{1}{6,22} = 0,161$

Het aantal Racker-eenheden G6PD in de cuvette. = $\Delta \text{Ext}_{340}/\text{min} \times 0,161$

Het aantal grammen haemoglobine in de cuvette = $\text{ext}_{540}/858$

De specifieke G6PD-activiteit van het haemolysaat is derhalve:

$$\Delta \text{Ext}_{340}/\text{min} \times 0,161 \times 858/\text{ext}_{540} \text{ Racker-eenheden/g Hb}$$

$$(\mu\text{Mol TPNH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g Hb}^{-1})$$

We kunnen nu onze laboratorium-eenheden omzetten in Racker-eenheden/g Hb door vermenigvuldiging met de factor 0,161

P. Marks (Science 127 (1958) definieert zijn G6PD-eenheid, door zich de reactie voor te stellen in een cuvette van 2,5 ml inhoud en 1cm weglengte.

De enzymactiviteit wordt nu uitgedrukt als de verandering in $\text{Ext}_{340}^{1\text{cm}}$ per minuut per gram in de cuvette aanwezige haemoglobine.

Onze laboratorium-eenheid moet nu met 0.4 worden vermenigvuldigd, om tot de eenheid van Marks te komen; onze eenheid is namelijk betrokken op het aantal grammen haemoglobine in 1 ml van het reactiemengsel.

Normale waarde

Van 26 gezonde proefpersonen werd in de erythrocyten de G6PD-activiteit bepaald, en hieruit de gemiddelde waarde en de standaard deviatie van de enkele bepaling berekend.

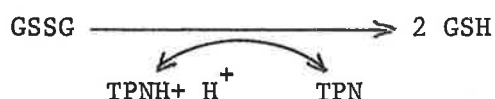
In onze laboratorium-eenheden uitgedrukt is dit	$34,3 \pm 6,7$
in eenheden volgens Marks	$13,7 \pm 2,7$
en in eenheden volgens Racker	$5,7 \pm 1,08$

DE BEPALING VAN TPNH-AFHANKELIJKE GLUTATHIONREDUCTASE IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

Literatuur: Racker E., J. Biol. Chem. 217 (1955) 855
GSSG reductase from bakers yeast and beef liver

Principe

Geoxydeerd glutathion wordt in erythrocyten als volgt enzymatisch gereduceerd.



Wanneer men in een geschikt medium een overmaat geoxydeerd glutathion (GSSG) en TPNH aan een hemolysaat toevoegt, dan zal de afname van TPNH per minuut per gram hemoglobine, een maat zijn voor de glutathion-reductase-activiteit in dit hemolysaat.

De TPNH-afname en het hemoglobinegehalte in het reactiemedium kan men spectrofotometrisch bepalen.

Methode

Benodigde reagentia

- 0.9% NaCl in water (deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren).
- 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4 (men maakt 0.1 M oplossing van $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ door 7,8 g van deze stof op te lossen, in 500 ml aqua dest.; vervolgens maakt men een 0.1 M oplossing van $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ door 8,9 g van deze stof op te lossen in 500 ml aqua dest. Men mengt nu beide oplossingen tot de pH van 7.4 wordt bereikt) (alle fosfaatoplossingen worden bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard en voor gebruik op schimmelverontreiniging gecontroleerd) Fosfaten van (Brocades).
- (1.5 mM TPNH in water, 0.025 M Tris pH 7.4 (Men lost 12.5 mg van deze stof (Boehringer) op in 10 ml 0.025 M Trisbuffer pH 7.4).

- d) 0.02 M GSSG oplossing (0.123 g geoxydeerd glutathion (Boehringer) wordt opgelost in 10 ml aqua dest.) (Zowel oplossing c als d worden bij -20°C bewaard).
- e) 0.1 M EDTA (men lost 3.7 g Komplexon III (Ziegfried) op in 100 ml aqua dest) deze oplossing wordt bij $+4^{\circ}\text{C}$ bewaard.

Het bloed

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Bereiding van het hemolysaat

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

De activiteitsbepaling

Zo kort mogelijk voor de meting wordt het beschreven hemolysaat ontdooid en een kleine hoeveelheid wordt 50 maal verdund met aqua dest. Men pipetteert dan achtereenvolgens:

reactievat	reagensblanco
1.00 ml verdund haemolysaat	idem
1.00 ml 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4	idem
0.2 ml 0.02 M GSSG	
0.10 ml 0.1 M EDTA	idem
0.50 ml aqua dest	0.9 ml aqua dest

Men laat de buizen vijf minuten staan en zet dan de reactie in gang door aan het reactievat 0.20 ml 1.5 mM TPNH oplossing toe te voegen, tegelijkertijd drukt men een stopwatch in.

Onmiddellijk daarna mengt men door de buizen af te sluiten met cellofaan en ze tweemaal om te draaien; vervolgens giet men de inhoud over in cuvetten (OG of H, 3,5 ml inhoud, 1 cm lichtweg) en leest m.b.v. een spectrofotometer gedurende tien minuten, elke minuut de $E_{340\text{ m}\mu}$ van de reactiecuvet af (gemeten tegen de reagensblanco).

Dan vervangt men de reagensblanco door een waterblanco en bepaalt de $E_{540 \text{ m}\mu}$ van de reactiecuvet, hierna wordt de temperatuur van het reactiemengsel bepaald.

Berekening van de enzymactiviteit

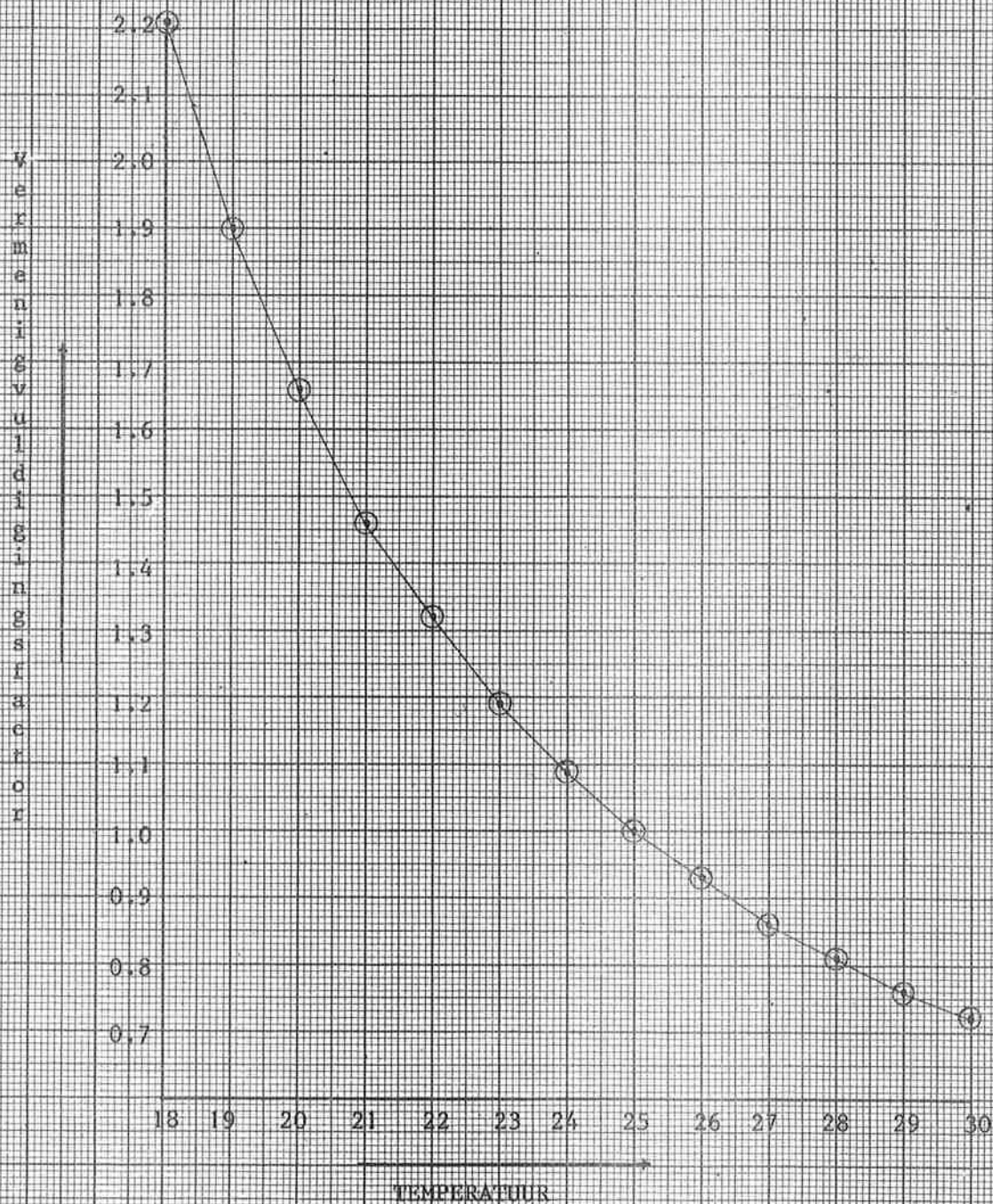
Zie hiervoor onder G6PD-bepaling; voor de temperatuurscorrectie wordt gebruik gemaakt van een experimenteel bepaalde correctie-curve (fig. II)

Normale waarde

Van 24 normale proefpersonen werd op de beschreven wijze de activiteit van de glutathionreductase bepaald; hieruit werd de gemiddelde waarde en de standaard-deviatie in de enkele meting bepaald.

Uitgedrukt in laboratorium-eenheden is dit	15,4	$\pm$	4,4
Uitgedrukt in Marks eenheden	6,2	$\pm$	1,8
Uitgedrukt in Racker eenheden	2,48	$\pm$	0,71

TEMPERATUURSCORRECTIE CURVE VOOR GSSC Red.



DE BEPALING VAN G6PD IN THROMBOCYTEN EN LYMFOCYTEN

=====

(zie ook G6PD-bepaling in erythrocyten)

Bereiding van een thrombocyten-lysaat

Benodigdheden

Gesiliconeerde, dikwandige centrifugebuizen.

Sequestrine-buffer; dit is een oplossing van 3,3 g EDTA, en 3,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 liter physiologische zoutoplossing. De pH van de oplossing is 6.8 - 7.0.

Vaste saponine.

Een gekoelde centrifuge met een hoog maximum-toerental (b.v. Christ).

Ca 10 ml bloed wordt opgevangen in een gesiliconeerde buis, waarin van tevoren reeds 1 ml sequestrine-buffer is gebracht. Het thrombocyten-rijke plasma, bereid door afcentrifugeren van erythrocyten en leucocyten bij een zo laag mogelijk toerental (klinische centrifuge, 2000 r.p.m., 5 min.), brengt men over in een volgende gesiliconeerde centrifugebuis (het is op dit moment belangrijk om zowel het volume als het aantal thrombocyten/ml bij benadering te kennen) en centrifugeert de thrombocyten af (15 min. centrifugeren in Christ-centrifuge, 4°C, 3500-3800 r.p.m.).

De thrombocyten worden 3x gewassen met physiologische zoutoplossing door suspenderen, scherp afcentrifugeren in Christ-centrifuge.

Bij deze wassing gaat ongeveer een derde van alle thrombocyten verloren.

Na de wassing worden de thrombocyten gesuspendeerd in zoveel gedestilleerd water, dat er omstreeks 100.000 thrombocyten per mm^3 zijn (= 10^8 ml). Op dit moment worden de thrombocyten nauwkeurig geteld, daarna voegt men 0,5 mg saponine/ml suspensie toe, en bewaart de suspensie 1 nacht lang bij -20°C.

Uitvoering van de G6PD-bepaling

zie G6PD-bepaling in erythrocyten.

In plaats van 1 ml verdund haemolysaat voegt men 1 ml onverdund thrombocyten-lysaat toe. Als "blanco"-oplossing gebruikt men gedestilleerd water.

De bepaling wordt bij voorkeur uitgevoerd bij 25°C.

Berekening

Onze laboratorium-eenheid is gedefinieerd als de extinctie-toename per minuut (bij 340 mμ) per 10^8 toegevoegde, gelyseerde, thrombocyten.

Normale waarde

Het aantal eenheden G6PD, gevonden in de thrombocyten van een aantal gezonde proefpersonen, was resp.:

21 15,7 24 25 24 30 20 14 8 13 15 7 16 17 12 11 11