

ZUIVERING VAN 3-FOSFOGLYCERAAT (3-PG)
=====Principe:

3-P-glyceraat wordt gezuiverd van andere organische fosfaat-verontreinigingen door anionen-wisseling op een DOWEX-1-X2-formiaat kolom, met behulp van een lineaire formiaat-gradiënt volgens G.R. Bartlett, Biochim. Biophys. Acta, 156 (1968) 221.

3-PG wordt in de verkregen kolomfrakties bepaald volgens R. Czok, L. Eckert in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 224, H.U. Bergmeyer e.d., Verlag Chemie, Weinheim
De verontreiniging door 2,3-DPG wordt bepaald volgens J.A. Loos, H.K. Prins, Biochim. Biophys. Acta 201 (1970) 185.

Voorbehandeling van de hars

Ongeveer 100 g DOWEX-I-X2 (Fluka) in de chloridevorm met een deeltjesgrootte van 200/400 mesh wordt met behulp van een roermotor opgeroerd in aqua dest. Vervolgens laat men de hars gedurende een uur bezinken, waarna de bovenstaande troebele vloeistof wordt afgezogen. Dit herhaalt men een aantal malen totdat de hars binnen het uur volledig uitzakt. Op deze wijze worden de kleinste harsdeeltjes verwijderd en het dicht-slibben van de kolommen voorkomen.

Met de verkregen harssuspensie wordt een kolom van ca. 25 cm hoogte en 3 cm \emptyset gebouwd in een met een wattenprop afgesloten glazen kolom. Daarna wordt er 500 ml 4M ammoniumformiaatoplossing doorgevoerd, gevolgd door 100 ml 100% mierzuur. De uitstromende vloeistof mag uiteindelijk geen chloride-ionen meer bevatten, hetgeen men controleert door na te gaan of er een witte troebeling ontstaat in de laatst opgevangen fractie, indien men hieraan een druppel 0,1 M AgNO_3 -oplossing toevoegt. Tenslotte wordt de kolom uitgewassen met 3 à 4 liter aqua dest dat van te voren met 4 M mierzuur op pH 3 à 4 is gebracht. De hars wordt daarna met aqua dest van pH 3 à 4 overgespoeld in een bruine wijdmondse fles, welke goed afgesloten kan worden. De aldus behandelde hars is voor gebruik gereed.

Regenereren van gebruikte hars

Van gebruikte hars in de formiaatvorm wordt een kolom gebouwd van ca. 25 cm hoogte en 3 cm \emptyset in een met een wattenprop afgesloten glazen buis. Daarna wordt er 500 ml 0,8 M ammoniumformiaat in 4 M mierzuur doorgevoerd, gevolgd door 100 ml 100% mierzuur.

Tenslotte wordt de hars nagespoeld met 3 à 4 liter aqua dest. dat met 4 M mierzuur op pH 3 à 4 gebracht is. De aldus behandelde hars is weer voor gebruik gereed.

Opmerking

Vóór gebruik wordt de pH van de harssuspensie gecontroleerd; deze moet tussen pH 3 en 4 liggen. Indien de pH hoger is moet deze met 4 M mierzuur teruggebracht worden tot 3 à 4.

De hars heeft dan nl. CO_2 uit de lucht opgenomen, dat bij de percolatie met 4 M mierzuur als gas vrijkomt.

Zuivering

1 g 3-fosfoglyceraat (BOEHRINGER 3-PG-Na, 15175 SGAP, volgens de specificatie bevat het Na-zout nog 10% H_2O) wordt opgelost in 50 ml gedestilleerd water en met 4 M mierzuur op pH 5 gebracht.

Met behulp van een AUTOANALYZER-pomp met pompslang zwart/zwart ($\approx 0,32$ ml/min) wordt deze oplossing gepompt op een kolom, 25 cm x 0,9 cm, gevuld met Dowex-1-formiaat.

Zodra alle 3-PG-oplossing opgezogen is wordt de aanzuigslang overgebracht in een erlenmeyerkolf, gevuld met 250 ml water, dat met enkele druppels 4 M mierzuur aangezuurd is. Tegelijkertijd wordt een oplossing van 0,8 M ammoniumformiaat in 4 M mierzuur in de erlenmeyerkolf gepompt met een snelheid van 0,16 ml/min (oranje/geel als kleurkode).

De inhoud van de kolf wordt magnetisch geroerd; er ontstaat dus een lineaire formiaat-gradiënt. De uit de kolom stromende vloeistof wordt opgevangen in frakties, (4 wisselingen per uur) Ca. 80 frakties worden opgevangen.

Bepaling van fosfaatgehalte, 2,3-DPG-gehalte en 3-PG-gehalte

Met behulp van de Autodiluter worden 30-, 900- en 27000-voudige verdunningen gemaakt met 1 mM NH_4OH -oplossing.

De meting van het fosfaatgehalte geschiedt automatisch met een opstelling voor automatische fosfaatanalyse (J.F. Kuijman, Diss. Amsterdam 1969). De meting kan echter ook met de hand geschieden, zie voorschrift: 0540/27.

Voor de automatische bepaling worden de verdunningen van de frakties achtereenvolgens aan de opstelling aangeboden zonder tussentijds te spoelen met water. Begin en eind van de serie wordt gemarkeerd door vóór de eerste en na de laatste fraktie (verdunning) een oplossing van ATP (16 mg/100 ml) aan te bieden. Monsterfrequentie is 60/uur.

I.p.v. een totaal fosfaatbepaling kan ook gebruik worden gemaakt van de mechanische bepaling van 3-PG en 2,3-DPG.

Voor de bepaling van 3-PG (in de 900-voudige verdunning) en 2,3-DPG (in de 27.000-voudige verdunning) zie de betreffende voorschriften.

(730/36-730/35)

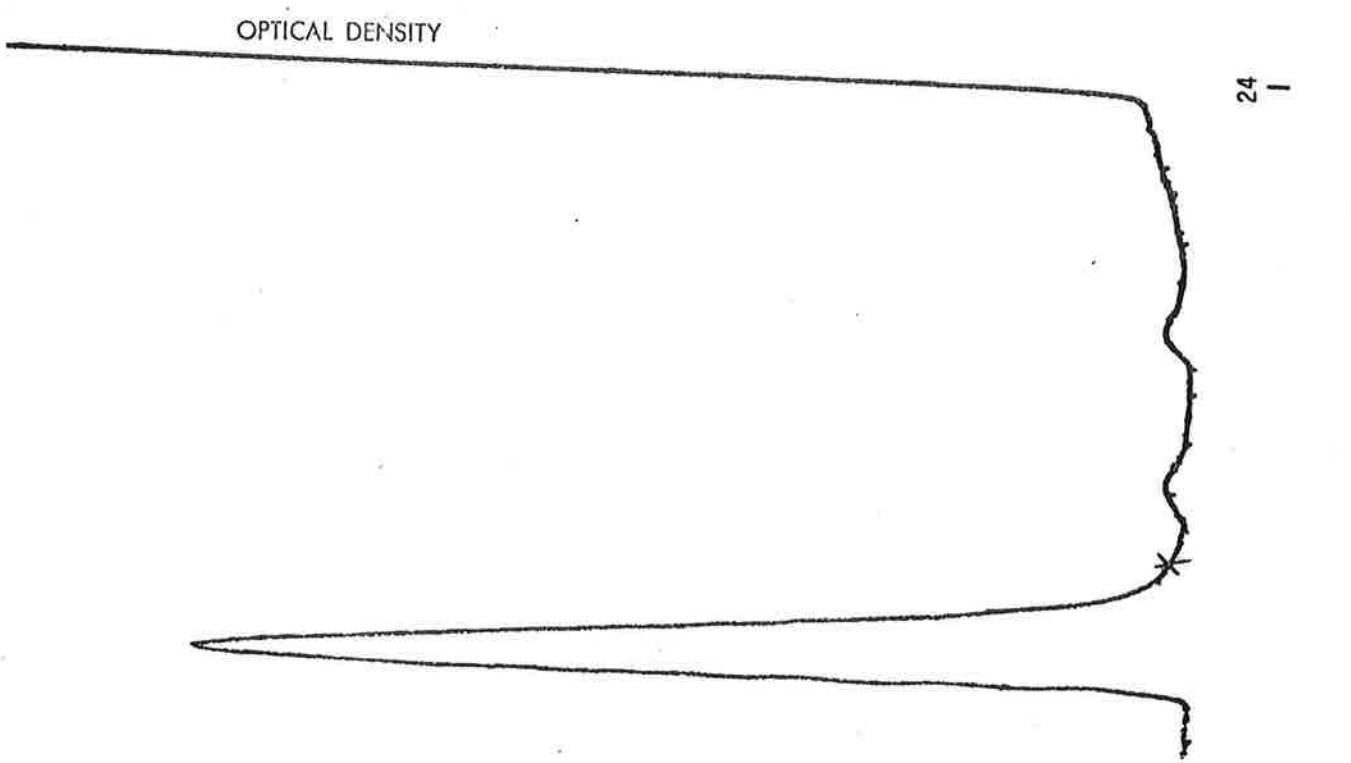
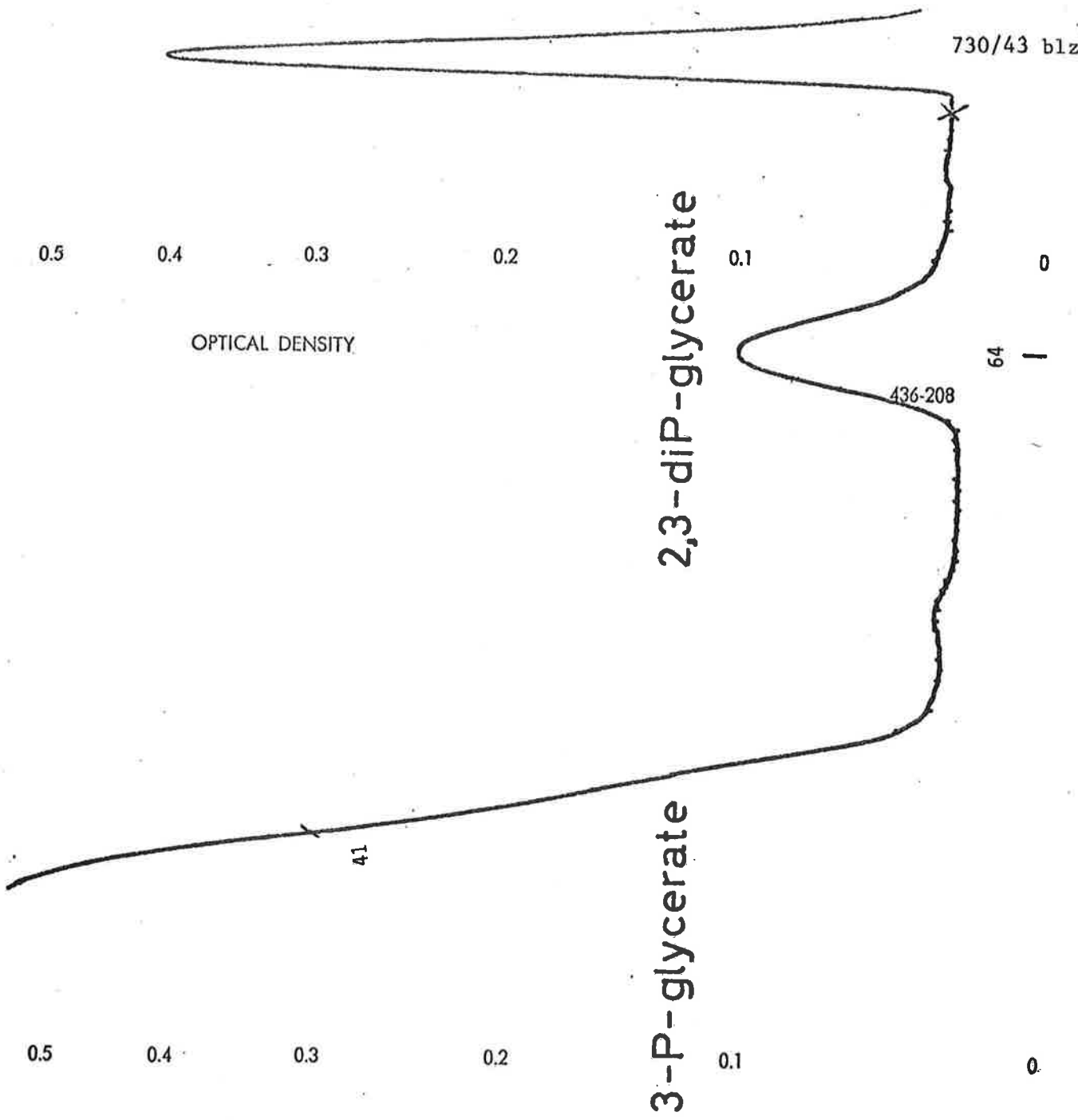
Uitvullen van de buizen 3-PGZ

De onverdunde frakties, die meer 3-PGZ bevatten dan 20 mM worden samengenomen en geneutraliseerd met 5 N KOH en aangevuld tot 100 ml. Van dit mengsel wordt in duplo het 3-PG gehalte bepaald met behulp van de spectrofotometrische bepaling (zie voorschrift No: 730/36 blz.3) Daarna wordt de 3-PG oplossing in de buizen uitgevuld.

In elke buis wordt zoveel oplossing gedaan dat later na aanvullen tot 15 ml de 3-PG concentratie 4 mM wordt. De buizen worden voorzien van een etiket waarop vermeld de datum en PGZ en daarna ingevroren bij -20°C .

Voorbeeld van een recorder-sheet van een automatische bepaling van totaal fosfaat, zie blz.4.

In de frakties 24 t/m 45 wordt het grootste deel van het fosfaat-houdend materiaal teruggevonden, d.i. in ca. 100 ml van het eluaat. Aan het eind van het elutieproces wordt de voornaamste onzuiverheid, het 2,3-DPG, teruggevonden (ca. 2% van de totale hoeveelheid).



HET METEN VAN DE FOSFAATINCORPORATIE IN NUCLEOTIDEN VAN LYMFOCYTEN
 =====

Literatuur:

Oxidatieve fosforylering: E.C. Slater, Ned.Tijdschrift v. Geneesk.
 107 (1963) 1.

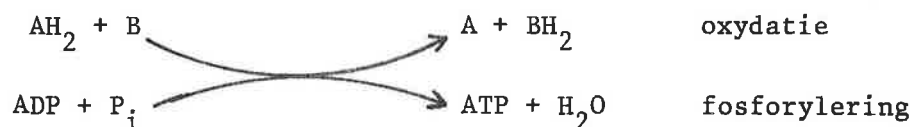
Isoleren lymfocyten: Lab.voorschrift CLB afd.Celchemie no. 730/28
 D. Roos en J.A. Loos, B.B.A. 222 (1970) 565.

Meting incorporatie: D. Roos en J.A. Loos, B.B.A. 222 (1970) 565.

Principe:

Tijdens de oxidatieve fosforylering wordt ATP opgebouwd uit ADP en fosfaat (P_i). Hiervoor is nodig dat de energie, geleverd door de oxidatie van substraten, efficiënt aangewend wordt bij de synthese van deze hoogenergetische fosfaatverbinding. Hiertoe wordt deze energie in stappen opgeslagen in de vorm van ATP.

Deze processen vinden plaats in het mitochondrion en kunnen schematisch aldus weergegeven worden:



AH_2 = gereduceerde component van de ademhalingsketen

B = geoxideerde component van de ademhalingsketen

De reacties, volgens welke dit proces verloopt, stelt men zich aldus voor:



C = onbekende component of configuratie van de ademhalingsketen

$\text{A} \sim \text{C}$ = hoogenergetische verbinding tussen A en C

$\text{A} \sim \text{P}$ = hoogenergetische verbinding tussen A en P_i

Tengevolge van het feit dat het hier om evenwichtsreacties gaat, vindt er dus een voortdurende uitwisseling plaats tussen fosfaat en ATP. Bij een cel in rust, die weinig energie-verbruikende processen heeft, wordt dus toch fosfaat in de nucleotiden ingebouwd. Is de cel echter in een metabolisch actieve toestand, dan wordt veel ATP verbruikt. Er moet dus ook veel ATP aangemaakt worden en de turnover van de nucleotiden is daardoor verhoogd. Dit zal resulteren in een snellere inbouw van fosfaat. Dit proces kan bestudeerd worden door de cellen te incuberen met P^{32} -gemerkt fosfaat. Na afloop van de incubatie worden de nucleotiden geïsoleerd en het gehalte aan P^{32} erin gemeten. Bij cellen in rust wordt langzaam een evenwichtsgehalte aan P^{32} opgebouwd; bij metabolisch actieve cellen wordt dit gehalte sneller bereikt. Deze reacties zijn een maat voor de oxidatieve fosforyleringssnelheid en dus voor de Krebs-cyclusactiviteit van de cel.

Er wordt echter via de glycolyse ook P_i in de nucleotiden ingebouwd, n.l. in de 3-P-glyceraldehyde dehydrogenase + fosfoglyceraatkinase stappen.



Aangezien echter in de Krebscyclus 18 maal zoveel ATP gemaakt wordt als in de glycolyse, is de P_i -ATP-uitwisseling van de glycolyse veel minder belangrijk dan die van de oxidatieve fosforylering.

Tenslotte moet men ermee rekening houden, dat de activiteit niet alleen in ATP terecht komt, maar ook in ADP via de myokinase-reactie



en via de de novo-synthese van nucleotiden ook in de nucleotide-monofosfaten. Via de substraat-gebonden fosforylering wordt ook guanosine-trifosfaat (GTP) gelabeld. Uitwisselingsreacties tussen de verschillende nucleotiden onderling zorgen tenslotte, dat alle nucleotiden gelabeld worden. Voor lymfocyten, die 4 uur geïncubeerd worden, zullen ATP, ADP en GTP echter de belangrijkste gelabelde nucleotiden zijn.

Na incubatie moeten de nucleotiden gescheiden worden van de grote overmaat radioactief fosfaat. Hiertoe worden de nucleotiden geadsorbeerd aan actief koolstof, het fosfaat wordt uitgewassen en de kool wordt geëluëerd met ammonia-ethanol. Dit eluaat kan zonder scintillatievloeistof in een vloeistof-scintillatieteller geteld worden t.g.v. het Cerenkov-effect. De electronen, die door het ^{32}P uitgezonden worden ($^{32}_{15}\text{P} \rightarrow ^{32}_{16}\text{S} + ^0_{-1}\text{e}$) hebben in water n.l. een hogere snelheid dan het licht, waardoor een lichtfront opgebouwd wordt, dat door de teller gemeten kan worden. De efficiëntie, waarmee dit effect gemeten kan worden, wordt versterkt door plastic in plaats van glazen telflessjes te gebruiken en door de monsters, in plastic centrifugebuisjes, te omgeven door een watermantel.

Vorbereidingen

- 1) Zorg voor 250 ml ACD-bloed (max. 1 dag oud)
- 2) Controleer of Eppendorf centrifuge cupjes aanwezig zijn (bestelnummer 3810)
- 3) Zorg dat gewassen actieve kool aanwezig is (zie reagentiabereiding en opwerken extract)
- 4) Zorg voor, reagentia voor lymfocytenuisolering (zie CLB voorschrift No.730/28), voor incubatie en voor het maken van extracten (zie blz. 3-5)
- 5) Zorg voor [^{32}P]-natriumorthofosfaat (1 mCi in 1 ml, Philips-Duphar).
- 6) Reserveer teltijd in de vloeistofscintillatieteller (10 min. per monster)

Uitvoering

Het bereiden van het incubatiemedium

Reagentia:

- 1) lymfocyten in Krebs-Tris-1mM P_i - 10% AB (zie bereidingsvoorschrift lymfocyten)
- 2) glucose-aneurine in Krebs-Tris zonder P_i (pH 7,4 bij 37°C). Los 200 mg glucose (anhydrisch, Dextropur) op in 10 ml Krebs-Tris zonder P_i (pH 7,4 bij 37°C). Los 4 mg aneurine (aneurinehydrochloride, Brocades) op in 10 ml Krebs-Tris zonder P_i (pH 7,4 bij 37°C). Meng 9 ml glucose-oplossing met 1 ml aneurine-oplossing.

- 3) ^{32}P -gemerkt fosfaat. Verdun 1 ml [^{32}P]-natrium-orthofosfaat met 9 ml 0,9 % NaCl. Dit levert 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ op dag 0 op.
- 4) 10 mM fosfaat-HCl in Krebs-Tris zonder P_i (pH 7,4 bij 37°C).

Isoleer lymfocyten uit 250 ml ACD-bloed volgens de methode van Loos (CLB voorschrift 370/28).

Was de cellen uit met een ijskoud mengsel van 9 ml Krebs-Tris-1mM P_i en 1 ml AB-serum (pH 7,4 bij 0°C) en neem ze op in Krebs-Tris-1mM P_i - 10% AB serum (pH 7,4 bij 37°C). Deze lage fosfaatconcentratie is nodig om het radioactieve fosfaat in het incubatiemengsel niet te veel te verdunnen.

Maak het volgende radioactieve mengsel (pipet met ballon!)

$$\begin{array}{rcl} a \text{ ml} & ^{32}\text{P}_i & (1 \text{ ml } 1 \text{ mCi } ^{32}\text{P}_i + 9 \text{ ml } 0,9\% \text{ NaCl}) \\ \frac{1}{4}b \text{ ml} & & \text{glucose-aneurine} \\ \frac{3}{4}b-a \text{ ml} & & \text{Krebs-Tris zonder } \text{P}_i \text{ (pH 7,4 bij } 37^\circ\text{C)} \end{array}$$

Totaal b ml

Kies b zodanig, dat per incubatiebuis 40% van het volume door dit mengsel ingenomen kan worden. Hierdoor wordt de concentratie van glucose en aneurine uiteindelijk 10 maal verdund. Van het radioactieve mengsel is nog 0,2 ml nodig voor standaarden bij de telling. Kies a zodanig, dat in het radioactieve mengsel 17,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ zit; in het incubatiemengsel komt dan 7 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$.

Zoek in de verval tabel (zie blz. 12) de activiteit van het $^{32}\text{P}_i$ op, op de dag van gebruik. Stel dit is x $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Dan moet gelden $a/b \cdot x = 17,5$, dus $a = b \cdot 17,5/x$ ml.

In het incubatiemengsel moet in totaal 10% AB-serum en 1 mM fosfaat aanwezig zijn. De celconcentratie moet rond $20 \times 10^6/\text{ml}$ zijn. Houdt er rekening mee, dat in het celpreparaat al 10% AB-serum zit en dat AB-serum ongeveer 1 mM fosfaat bevat. Het incubatiemengsel ziet er dan b.v. als volgt uit:

lymfocyten ($\pm 100 \cdot 10^6$ /ml)	0,56 ml
AB-serum	0,22 ml
10 mM fosfaat-HCl pH 7,4	0,20 ml
radioactief mengsel	1,12 ml (pipet met ballon!)
Krebs-Tris zonder P_i (pH 7,4, bij 37°C)	0,70 ml
	<hr/> 2,80 ml

Hier zit dus in:

$$0,22 + 0,056 = 0,28 \text{ ml} = 10\% \text{ AB-serum}$$

$$*0,20 + 0,056 + 0,022 = 0,28 \text{ ml } 10 \text{ mM } P_i \longrightarrow 1 \text{ mM } P_i$$

$$1/5 \times 100 \cdot 10^6 = 20 \cdot 10^6 \text{ lymfocyten/ml}$$

$$2/5 \times 17,5 = 7 \text{ } \mu\text{Ci } ^{32}P_i/\text{ml}$$

$$1/4 \times 2/5 \times 100 \text{ mM} = 10 \text{ mM glucose}$$

*De fosfaatconcentratie in het radioactieve mengsel is verwaarloosbaar klein.

2,8 ml is voldoende voor 10 monsters voor de fosfaat-incorporatie en 30 Autodilutermonsters voor bepaling van andere parameters. Gewoonlijk wordt 4 uur geïncubeerd, waarbij monsters genomen worden op $t = 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210$ en 240 minuten.

Bereiding en opwerken van het extract

Reagentia:

- 1) 3% perchloorzuur. Verdun 25 ml 72% HClO_4 (s.g. 1,7; Analar, BDH) tot 1000 ml in een maatkolf.
- 2) actieve kool. Was een portie koolstof in 1N HCl, zuig af op filterpapier in een Büchner trechter, en was na met gedestilleerd water tot het waswater neutraal geworden is. Breng de kool over in een Petrischaal en droog een nacht bij 100°C in een droogstoof. Van dit koolstof wordt een suspensie in gedestilleerd water gemaakt van 40 mg/ml.
- 3) alcohol-ammonia. Meng in een maatcilinder gelijke delen 96% ethanol (Poviet) en 13 N ammonia (25% Ammonia Fortior, Brocades).

Uit de incubatiebuizen wordt 0,10 ml gepipetteerd bij 1,2 ml 3% perchloorzuur. De pipet wordt daarbij zo laag mogelijk in de buis gebracht en de buis wordt daarna voorzichtig schuin gehouden en gedraaid om de vloeistof langs de wand volledig op te nemen in het perchloorzuur. Hierna worden de buizen afgesloten met een rubberstopje en in de koelkast bewaard ($+4^{\circ}\text{C}$). Moeten de monsters echter langer dan 1 nacht bewaard worden, dan gaan ze in de diepvries (-20°C).

Voor het opwerken worden de monsters eerst 10 min. afgedraaid (0°C , $\pm 2000 \times g$). Tijdens het draaien wordt de koolstofsuspensie gemaakt (11 ml per 100 monsters) en hiervan wordt 0,1 ml snel achter elkaar gepipetteerd (anders zakt het uit) in Eppendorf centrifugecupjes. Hierbij wordt 1,0 ml van het bovenstaande der extracten gepipetteerd (ballon). De cupjes worden goed gesloten, genummerd en de inhoud stevig gemengd op een Whirlmixer.

Hierna worden de cupjes 4 min. afgedraaid in een Eppendorf tafelf-centrifuge (kamertemp., $16000 \times g$). Het supernatant wordt zorgvuldig verwijderd met een pasteurpipet zonder de koolstof te beroeren.

De koolstof wordt daarna 2x uitgewassen met ± 1 ml gedestilleerd water. Vervolgens wordt 1,0 ml van het ethanol-ammoniamengsel aan ieder cupje toegevoegd (ballon!), stevig gemengd, afgedraaid, en het bovenstaande voorzichtig overgebracht in schone cupjes. De koolstof wordt nagespoeld met 0,2 ml ethanol-ammonia en na mengen en centrifugeren wordt dit eluaat bij het eerste gevoegd. De nieuwe cupjes worden genummerd en nog éénmaal afgedraaid om eventuele koolstofsporen onderin te verzamelen. Koolstof stoort namelijk de telling van het radioactieve fosfaat.

Bereiding standaarden

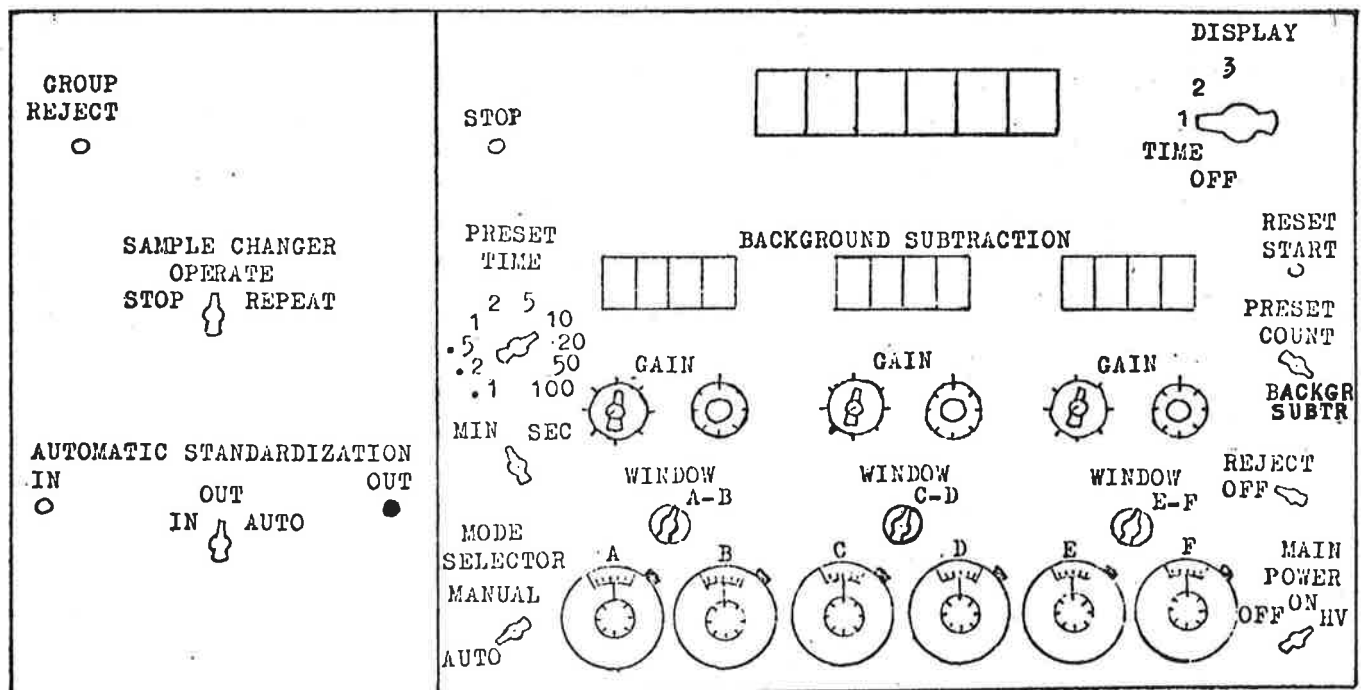
Om de exacte hoeveelheid radioactief fosfaat in het incubatiemedium te meten worden altijd enige standaarden meegenomen. Om de telling hiervan vergelijkbaar met die van de monsters te maken, worden de omstandigheden, waaronder geteld wordt, zoveel mogelijk gelijk gemaakt. Hiertoe wordt 0,10 ml van het radioactieve mengsel gepipetteerd (dikke 0,2 ml pipet met ballon) bij 0,1 ml koolstofsuspensie.

Hierbij komt 0,9 ml ethanol-ammonia. Na oproeren en afdraaien wordt het bovenstaande in een schoon cupje gebracht en de kool nagewassen met 0,2 ml ethanol-ammonia, die na oproeren en afdraaien bij de eerste portie gevoegd wordt.

Telling:

Van de cupjes worden de scharniertjes afgeknipt; daarna gaan ze in hun geheel in plastic telflesjes. Er wordt vervolgens zoveel gedestilleerd water in de telflesjes gedaan, dat de cupjes net niet gaan drijven. De telflesjes worden gesloten, genummerd, en in de vloeistofscintillatieteller geplaatst. Bij de huidige afstelling van de Packard-Tricarb-teller moet geteld worden met een gain van 40% en een venster van 30-1000 Volt. Bij een andere afstelling moeten de optimale condities opnieuw vastgesteld worden. Bij de in dit voorschrift genoemde activiteit behoeft geen rekening gehouden te worden met achtergrondactiviteit en is 10 minuten tellen voldoende.

De teller wordt als volgt ingesteld:



Het eerste kanaal heeft de grenzen A en B. De ondergrens A wordt ingesteld op 30 Volt, de bovengrens B op 1000 Volt (knopje opzij losmaken, meter instellen en knopje weer vastzetten). Evenzo wordt het tweede kanaal ingesteld op C = 30 Volt en D = 200 Volt en het derde kanaal met E = 200 Volt en F = 1000 Volt. Het eerste kanaal geeft nu het volledige meetbereik weer; met het aantal counts, dat hierin gemeten wordt, wordt verder gerekend. De twee andere kanalen verdelen dit meetbereik in stukken; uit de verhouding van het aantal tikken hierin kunnen conclusies omtrent eventuele quench getrokken worden.

De windows worden op A-B, C-D en E-F gezet. De gain (versterking van de fotomultiplier) wordt in alle drie de gevallen op 40% gezet. Hiertoe wordt telkens de rechter knop (met de plastic schijf) op nul gezet, en de linker knop op 40%. Denk erom, dat de binnenknop van deze laatste op 100% moet staan. De background subtraction wordt voor alle kanalen op nul gezet. De mode selector wordt op "automatic" gezet en de preset time op 10 minuten. De main power-knop dient op "high voltage" te staan en de reject-knop op "off". De preset count komt op "background subtraction" (deze staat zelf op nul, zodat de telling bij nul begint). De automatic standardization (linker paneel) moet op "out" staan (het lichtje bij "out" moet dan branden). De sample changer wordt op "operate" gezet. Met de display-knop kan men de tijd in honderdste minuten of het aantal counts in de diverse kanalen zichtbaar maken.

De monsters in de teller dienen te worden voorafgegaan door een groene ring en gevolgd te worden door een rode ring. Op deze manier worden alleen de monsters tussen deze twee ringen in geteld. Denk erom, dat de printer voldoende papier bevat en dat de strook goed opgewonden wordt tijdens de telling. Is de teller ingesteld en zijn de potjes in het apparaat gezet (klep niet te lang open laten staan, de inhoud wordt gekoeld) dan wordt de teller als volgt in werking gesteld. Druk op het knopje "stop", de printer print dan de gegevens uit van het monster, dat in behandeling was. Dit monster wordt nu uit de telkamer naar boven gebracht op de lopende band. Druk direct op het knopje "group reject", de teller slaat dan alle monsters over tot een groene ring passeert. De daarop volgende monsters worden geteld.

Eerst worden de standaarden geteld, iedere standaard driemaal gedurende 0,2 minuut. Zet hiertoe de "preset time" op .2 minute en de sample changer op "repeat". Tijdens de derde keer tellen wordt deze schakelaar weer op "operate" gezet. Na het monster wisselen, als de volgende standaard voor de eerste keer geteld wordt, weer terug op "repeat" zetten. Niet veranderen tussen de tellingen in of gedurende het wisselen! De standaarden moeten 300.000 tot 400.000 tikken in het eerste kanaal opleveren gedurende 0,2 minuut. Daarna worden de monsters geteld, met de sample changer weer op "operate" en de preset time op 10 minuten. Alle standaarden en monsters moeten direct achter elkaar geteld worden. Als dit onmogelijk is, moet voor het verval van het ^{32}P gecorrigeerd worden door opnieuw tellen van de standaarden. Bij zeer grote hoeveelheden monsters (50 of meer) moeten de standaarden vóór en na de monsters geteld worden en bij de berekening het gemiddelde hiervan gebruikt worden. De machine wordt gestopt door de mode selector op "manual" te zetten. Als het dan in de telkamer staande monster 10 minuten geteld is, stopt de machine automatisch.

De telstrook ziet er als volgt uit:

132	nummer van het monster in de teller
1000	tijd in minuten $\times 10^{-2}$
23592	counts in kanaal 1
9021	counts in kanaal 2
15324	counts in kanaal 3

Berekening

Stel er zijn geteld: a tikken per standaard (gemiddelde)
b tikken per monster

er zat in: c μ molen fosfaat per ml incubatiemedium

en: $d \times 10^6$ lymfocyten per ml incubatiemedium

Eerst wordt berekend het aantal cpm aan radioactief fosfaat, dat per ml extract teruggevonden wordt. Dit is:

$$a \times 5 \times 10 \times \frac{1,12}{2,8} \times \frac{0,1}{1,3} = A$$

factor 5	omrekening 0,2 minuut op 1 minuut
factor 10	omrekening op ml radioactief mengsel
factor $\frac{1,12}{2,8}$	omrekening op ml incubatiemengsel
factor $\frac{0,1}{1,3}$	omrekening op ml extract

Vervolgens wordt berekend het aantal cpm aan radioactief fosfaat in de nucleotiden per ml extract. Dit is:

$$\frac{b}{10} = B \text{ (omrekening op minuten)}$$

Vervolgens het aantal μ molen fosfaat, dat per ml extract aanwezig was. Dit is:

$$c \times \frac{0,1}{1,3} = C$$

Tenslotte het aantal cellen per ml extract = $d \times 10^6 \times \frac{0,1}{1,3} = D \times 10^6$

Het aantal μ molen fosfaat, dat geïncorporeerd is per 10^{10} lymfocyten is dan:

$$\frac{B}{A} \times \frac{C}{D} \times 10^4$$

$\frac{B}{A}$ is de fractie van het radioactieve fosfaat, dat in de nucleotiden is ingebouwd. Deze fractie, vermenigvuldigd met de totaal aanwezige hoeveelheid fosfaat, levert de totale hoeveelheid ingebouwd fosfaat. Deze berekening wordt vergemakkelijkt met het volgende Olivetti-programma.

Olivetti-programma

AV

S ← getal A x 10⁻⁴

C↑

S ← getal D

D↑

S ← getal C

↓

C:

D:

b↕

AW

S ← getal B

↓

bX

S ← bijbehorende ATP + ADP-waarde

A◇ → μmolen ingebouwd P_i per 10¹⁰ lymfocyten

:

A◇ → μmolen ingebouwd P_i per μmol ATP + ADP

/◇

W

PHOSPHORUS-32 DECAY TABLE fraction remaining

DAYS ELAPSED	FRACTION REMAINING	DAYS ELAPSED	FRACTION REMAINING	DAYS ELAPSED	FRACTION REMAINING
1	0.95265	41	0.13687	81	0.01966
2	0.90755	42	0.13039	82	0.01873
3	0.86457	43	0.12421	83	0.01785
4	0.82364	44	0.11833	84	0.01700
5	0.78464	45	0.11273	85	0.01620
6	0.74749	46	0.10739	86	0.01543
7	0.71210	47	0.10231	87	0.01470
8	0.67838	48	0.09746	88	0.01400
9	0.64626	49	0.09285	89	0.01334
10	0.61565	50	0.08845	90	0.01271
11	0.58651	51	0.08426	91	0.01211
12	0.55874	52	0.08027	92	0.01153
13	0.53229	53	0.07647	93	0.01099
14	0.50708	54	0.07285	94	0.01047
15	0.48307	55	0.06940	95	0.00997
16	0.46020	56	0.06612	96	0.00950
17	0.43841	57	0.06299	97	0.00905
18	0.41765	58	0.06000	98	0.00862
19	0.39788	59	0.05716	99	0.00821
20	0.37904	60	0.05446	100	0.00782
21	0.36109	61	0.05188	101	0.00745
22	0.34400	62	0.04942	102	0.00710
23	0.32771	63	0.04708	103	0.00676
24	0.31219	64	0.04485	104	0.00644
25	0.29741	65	0.04273	105	0.00614
26	0.28333	66	0.04071	106	0.00585
27	0.26991	67	0.03878	107	0.00557
28	0.25713	68	0.03694	108	0.00531
29	0.24496	69	0.03519	109	0.00506
30	0.23336	70	0.03353	110	0.00482
31	0.22231	71	0.03194	111	0.00459
32	0.21178	72	0.03043	112	0.00437
33	0.20176	73	0.02899	113	0.00416
34	0.19220	74	0.02761	114	0.00397
35	0.18310	75	0.02631	115	0.00378
36	0.17443	76	0.02506	116	0.00360
37	0.16618	77	0.02387	117	0.00343
38	0.15831	78	0.02274	118	0.00327
39	0.15081	79	0.02167	119	0.00311
40	0.14367	80	0.02064	120	0.00297

HALF LIFE
14.29 Days*

*Goodier and Pritchard, International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 17, 121-123 (1966)

BEREKENING VAN DE GEHALTES VAN STOFWISSELINGSPRODUKTEN
AAN DE HAND VAN RECORDERTRACKS

=====

I. Voor rode cellen

De hoogte van de pieken, inclusief die van de standaarden worden gemeten, in mm nauwkeurig (eventueel in tienden van mm).

Met behulp van een rekenprogramma voor de lineaire regressie (005/006) worden op de Olivetti de gehalten in milli-, micro-, of nanomol per ml berekend.

In de literatuur worden deze waarden echter meestal opgegeven per ml rode cellen; er moet dus een omrekening plaatsvinden.

Verder is gebleken dat de grootste fout bij de bepaling niet in de bepaling zelf schuilt maar ontstaat bij het maken van de verdunningen. De fout die hierbij kan optreden kan worden gecorrigeerd door in dezelfde verdunning als waarin de bepaling plaatsvond een hemoglobine bepaling te doen. We werken dan dus met absolute standaarden, d.w.z. standaarden die niet verdund hoeven te worden. Voor de ATP + ADP en de lactaatbepaling in de tweede verdunning wordt dus ook een Hb bepaling bij 412 of 540 gedaan. Voor de derde verdunning, waarin DPG en GDP bepaald worden, worden de standaarden ook een keer extra verdund; voor deze stap kan dus niet gecorrigeerd worden. Alleen voor de eerste twee verdunningsstappen wordt dus gecorrigeerd. Als b.v. door verkeerd afvegen van de opzuigstaaf van de Autodiluter de verdunning niet 30 maar b.v. 31 maal is zou het gehalte te laag zijn, echter ook het Hb-gehalte is lager en door deling op elkaar wordt deze fout geelimineerd. We hebben dan echter het gehalte per g Hb. Met behulp van de MCHC, d.i. de hoeveelheid Hb per ml cellen, kan dan de omrekening tot mM, μ M of nM per ml cellen gedaan worden.

Voor het bepalen van de omrekeningsfactor hebben we nodig de extinctie-coëfficiënt bij 412 of bij 540 nm, afhankelijk waarbij de Hb in de tweede verdunning bepaald is:

bij 540 : 1 g Hb/ml heeft een extinctie van 858

bij 412 : 1 g Hb/ml heeft een extinctie van $8,564 \times 858 = 7348$

Voorbeeld:

$E_{412} = 0,640$, ATP+ADP = $0,5263 \mu\text{M/ml}$

gehalte Hb = $0,640 : 7348 \text{ g/ml}$

het gehalte ATP+ADP is dan $\frac{0,5263}{0,640:7348} \mu\text{M/g Hb}$

omrekening naar ml cellen:

ATP + ADP =

$$\frac{0,5263 \times 0,335}{0,640 \times 7348} \mu\text{M/ml cellen}$$

Dit getal dient nog door 1000 gedeeld te worden om mM/ml cellen te krijgen.

De omrekeningsfactor in dit geval was dus $\frac{7348}{1000} \times 0,335$

De factor voor bepaling Hb bij 540 kan op analoge wijze bepaald worden.

Met de Olivetti kunnen in een programma deze twee factoren gekombineerd worden.

Het programma wordt als volgt gebruikt:

Start de machine, kijk of de REG PROG toets uit staat en druk de algehele schoonmaaktoets in. Voer kaart 0020 in en druk op V.

Als de tweede verdunning bij 540 gemeten is kunnen zonder meer de waarden ingevoerd worden. Is de tweede verdunning bij 412 gemeten dan moet eerst de W toets ingedrukt worden.

De waarden worden als volgt ingevoerd:

Eerst de extinctie en daarna in willekeurige volgorde ATP+ADP, 2,3-DPG, lactaat en GDP. De machine geeft daarna de resultaten in dezelfde volgorde als waarin de gegevens ingebracht zijn. Als een waarde mist moet toch de S toets ingedrukt worden. De machine print dan het voorafgaande antwoord nogmaals.

Na het laatste antwoord is de machine klaar voor een nieuwe serie.

Voorbeelden

gemeten bij 540		
		V
E 540	0.077	S
ATP+ADP	0.4801	S
2,3 DPG	1.3569	S
lactaat mist		S
GDP	0.0598	S
ATP+ADP	1.7927	A ◊
2,3 DPG	5.0668	A ◊
	5.0668	A ◊
GDP	0.2233	A ◊

gemeten bij 412		
		V
		W
E 412	0.659	S
ATP+ADP	0.4801	S
2,3 DPG	1.3569	S
lactaat	2.0548	S
GDP	0.0598	S
ATP+ADP	1.7940	A ◊
2,3 DPG	5.0706	A ◊
lactaat	7.6786	A ◊
GDP	0.2234	A ◊

Programma 0020

(Olivetti)

AV
a†
rS
RS
RS
D†
‡
a†
r◊
R-
D◊
:
a†
R-
R‡
R‡
dS
:
D‡
Y
AW
D†
a†
R+
Rx
R-
d◊
:
D‡
AY
S
b†
S
B†
S
c†
S
C†
S
d†
b†
DX
b‡
/◊
B†
b:
A◊
c†
b:
A◊
C†
b:
A◊
d†
b:
A◊
/◊
/◊
Y