

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

AUTO-IMMUUNZIEKTEN

1 = Stoffen + oplossingen	
2 = Substraat	
3 = Het invriezen van de weefsels	2 pag.
4 = Enige praktische punten voor het gebruik van de cryostaat	
5 = Het behandelen van de objectglaasjes	
6 = Het opplakken van coupes op de objectglaasjes	
7 = Het behandelen van de te onderzoeken sera	
8 = Het incuberen	
9 = Anti nucleaire factoren (A.N.F.)	
10 = Schildklier	
11 = Maagslijmvlies	
12 = Hartspier	
13 = Skeletspier	
14 = Speekselklier	
15 = Bijnier	
16 = Gladde spier en mitochondriën	
17 = Het aantonen van immuuncomplexen of de aanwezigheid van plasmacellen etc. - Het aantonen van complementbindende antistoffen	
18 = Het testen van een nieuw fluorescerend anti-humaan Ig reagens	
19 = DNA-spottest voor het aantonen van antistoffen tegen DNA	(vlgs Friou)
20 = Bereiding tumorcelsuspensie	
21 = Beenmerg van Kahler of Waldenström-patiënten	
22 = Bereiding van kernsuspensie uit kippe-erythrocyten	
23 = I.E. in agarose 0,6% in P.B.Z.	
24 = Kleuren van agarose-dubbel diffusie platen voor agarose 0,6%	
25 = Afnemen maagsap ter bepaling van gehalte aan intrinsic factor	2 pag.
26 = Huid	
27 = Haemagglutinatietechniek vlgs Boyden	
28 = Bepaling van de thyreoglobuline titer met de Takatsy methode	
29 = Standaardmethode voor conjugatie van FITC aan antistoffen	5 pag.
30 = Eiwitbepaling met het Folin-phenolreagens	2 pag.

STOFFEN + OPLOSSINGEN

Glycerine

Glycerinum S.G. $\pm$ 1,23 (Brocades)

Ph.Ned. VI



Glycerol 50% = gelijke delen glycerol en fosphaat buffer.

Paraffine

Paraffine solidum (Brocades)

Ph.Ned. VI

Smelttraject 54 - 57°C

Fosphaat gebufferd zout (PBZ) pH= 7.2; 0,01 M fosphaat:

10x geconcentreerde oplossing

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. 85 g

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 16,4 g

NaCl 525 g

Aanvullen met gedestilleerd water tot 6 liter.

Vóór gebruik 1 deel van deze geconcentreerde buffer verdunnen met 9 delen aqua dest.

Barbitonebuffer 1:3

Barbital natrium 6,18 g

Natriumchloride 25,65 g

Acidum Hydrochloricum 1N 24,5 ml

Aqua dest tot 1000 ml

Voor gebruik 1:3 verdunnen; pH na verdunning 7,2.

SUBSTRAAT

=====

Belangrijk is, dat het weefsel van mens of dier zo snel en zo diep mogelijk wordt ingevroren, daar anders de antigene en morphologische kwaliteit snel achteruit gaan, omdat bij sommige organen direct autolyse optreedt.

Als regel gebruiken wij voor onze bepalingen organen van een rat (Wistar). Dit biedt bijzonder veel voordelen:

- A. Ze zijn gemakkelijk bruikbaar
- B. Ze zijn reproduceerbaar
- C. Ze zijn goed controleerbaar in eigen stal op voeding, infecties enz.
- D. Ze zijn altijd vers te verkrijgen.

Voor sommige bepalingen is het niet mogelijk om ratte-organen te gebruiken, omdat de organen te klein zijn, of omdat er een onvoldoende antigene overeenkomst met menselijke organen bestaat.

Voor de routine-bepalingen gebruiken wij de volgende antigenen:

- anti nucleaire factoren - rattelever of kippenerythrocytenkernen
(ten Veen en Feltkamp, 1969)
- skeletspier - rattediafragma
- hartspier - rattehart
- maagslijmvlies - rattemaag (fundus)
- mitochondriën - rattenier (cortex)
- gladde spier - rattemaag muscularis mucosae
- schildklier - humaan toxisch struma
- bijnier - humane bijnier van obductie of operatie
- speekselklier - humane parotis of submandibularis

HET INVRIEZEN VAN DE WEEFSELS

Neem een weefselstukje van ongeveer $1/8 \text{ cm}^3$ ($\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$).

Plaats dit op de bodem van een aluminium kokertje (zeer geschikt zijn hiervoor de filmkokertjes van kleinbeeldfilms). Sluit de koker goed af.

Neem de koker in een korentang en dompel deze onder in een Dewarvat, gevuld met vloeibare stikstof, gedurende een minuut.

Daarna bewaren bij een zo laag mogelijke temperatuur; minimaal bij -20°C . Het transporteren dient te geschieden in een Dewarvat, gevuld met droge koolzuursneeuw of vloeibare stikstof.

De tweede invriesmethode volgens

Bonomo, L.; Turs, A.; Del Zotti, G,
1964. Am. J. Clin. Path. 42, 555.

Deze methode is speciaal voor biopsiemateriaal of zeer kleine weefsels. Maak een 10% oplossing in fosfaat gebufferd zout, pH 7.2, van gelatine Difco. Wellen bij 56°C .

Voeg hierbij Sephadex G25 fine (Pharmacia, Uppsala, Zweden) tot het geheel compact wordt. Snijdt hiervan kleine blokjes en druk met een spatel een gleufje in het bovenvlak; plaats het weefsel zodanig in het gleufje, dat het voor u in een gunstige snijrichting staat.

Druk de substantie met de vingers wat aan en voeg met een Pasteurspipet nog 2 druppels gelatine oplossing hieraan toe.

Plaats het hierna op de bodem van het filmkokertje en sluit de koker goed; dompel deze met een korentang in de vloeibare stikstof. Daarna bewaren bij een zo laag mogelijke temperatuur.

De derde invriesmethode met gelatine capsules

voor kleine- of naaldbiopsieën volgens

Feltkamp-Vroom, Ruys en Feltkamp (1969)

J. Histochem. Cytochem. 17, 353.

Benodigdheden

Lilly gelatine capsule no. 3

10 g gelatine (Difco) in 100 ml physiologisch zout 0,9%

Laat dit wellen bij $\pm 100^{\circ}\text{C}$ tot een heldere oplossing;

hierna afkoelen tot $\pm 30^{\circ}\text{C}$

Alluminium filmkokertje

Methode

Eerst één druppel gelatine in de capsule.

Plaats daarna de naaldbiopsie schuin in de gelatinecapsule;

druppel vervolgens met een Pasteurs pipet een druppel gelatine op de bodem van het filmkokertje;

plaats de capsule rechtstandig in de koker tegen de wand;

vul vervolgens de capsule met gelatine en vries zo snel mogelijk in, anders smelt de capsule.

ENIGE PRAKTISCHE PUNTEN VOOR HET GEBRUIK VAN DE CRYOSTAAT
=====

- A. Een constante temperatuur van de cryostaat van $\pm -25^{\circ}\text{C}$.
- B. Zorg, dat het microtoom in goede conditie is;
dat alle smeernippels en glijstukken goed gesmeerd zijn en ook de
schroeven van de messlede voor de snijhoekbepaling van het mes.
- C. Belangrijk is om altijd te controleren of alles goed is vastgezet:
1e de messlede
2e de scheermeshouder
3e het scheermesje in de houder
4e de objecttafel
5e het antirolplaatje.
- D. Stel de μ -instelknop op stand 2 ($= 4\mu$), daar dit de beste stand is
om de eerste coupe te gaan snijden. Heeft men op deze stand goede
resultaten bereikt, dan kan men daarna de coupe-dikte corrigeren op
de gewenste dikte.
Als regel worden voor de immunofluorescentie techniek 4μ gebruikt.

HET BEHANDELEN VAN DE OBJECTGLAASJES

=====

Bij het gebruik van ongefixeerde vriescoupes is het beslist noodzakelijk om volkomen vetvrije objectglaasjes te gebruiken, daar de coupes anders tijdens de behandeling beslist van het glaasje zullen afspoelen.

Het vetvrij maken kunt u bereiken door de glaasjes een week in bichromaat $K_2Cr_2O_7$ te zetten; daarna de bichromaat eraf gieten en dan de glaasjes een halve dag met leidingwater spoelen; vervolgens eenmaal spoelen met gedestilleerd water; daarna een week in de alcohol (96%) zetten.

Tweede methode

De objectglaasjes 1 week in zeepoplossing, merk: 7 x O.Matic (AVAC, Naarden) daarna spoelen met leidingwater, $\frac{1}{2}$ dag; vervolgens 1 maal spoelen met aqua dest.; tenslotte 2 à 3 dagen in alcohol (96%) zetten.

Er bestaat van hetzelfde merk ook een zeepoplossing met "afgeremd schuim"; deze is echter niet bruikbaar.

HET OPPLAKKEN VAN COUPES OP DE OBJECTGLAASJES

=====

Als regel worden de coupes gesneden 4 μ met mes of scheermes.

Is de coupe gesneden, houdt dan direct het op kamertemperatuur zijnde objectglaasje evenwijdig boven de coupe.

Druk daarna het glaasje gelijkmatig op het mes.

De coupe plakt dan vast met zijn eigen eiwit.

De glaasjes dienen goed voorbehandeld te zijn, zoals eerder vermeld.

Direct na het opplakken worden de coupes gedroogd en kunnen ze gebruikt worden voor de fluorescentie techniek of histologische bepalingen.

HET BEHANDELEN VAN DE TE ONDERZOEKEN SERA

=====

Voor de indirecte immunofluorescentie techniek wordt serum gebruikt.

Als regel ontvangen we gestold bloed.

Bloed direct afdraaien, 10 minuten, bij 2000 toeren.

Serum afpipetteren en daarna invriezen bij -20°C of gebruiken.

Aan te bevelen is om het serum in kleine hoeveelheden uit te vullen.

Het serum kan bij -20°C worden bewaard.

Na ontdooien dient het vóór gebruik goed te worden gemengd en te worden verwarmd tot kamertemperatuur.

Daarna het serum verdunnen met fosphaat buffer.

Bij grote hoeveelheden is de Eppendorf pipet bijzonder handig.

1/10 verdund = 0,1 ml serum + 0,9 ml fosphaat gebufferd zout (PBZ)

1/20 verdund = 0,1 ml serum + 1,9 ml fosphaat gebufferd zout (PBZ)

HET INCUBEREN

=====

Hiervoor gebruiken we foto-ontwikkelbakken. Het voordeel hiervan is, dat deze uitgevoerd zijn met ribbels.

De coupes worden op de ribbels geplaatst; er wordt tegen de binnenrand van de bak een vochtig filtreerpapier gelegd om een vochtig milieu te verkrijgen.

Hierna volgt het druppelen van het serum, 2 druppels per coupe.

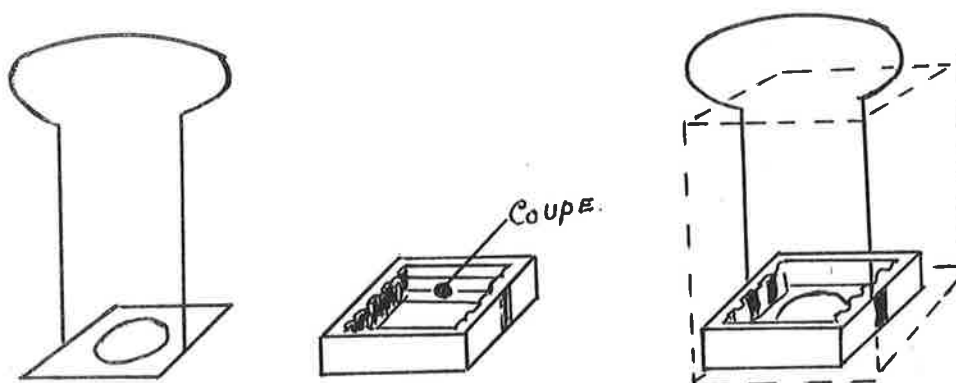
Vervolgens de gehele bak afdekken met een glasplaat.

HET WASSEN

=====

Het wassen geschiedt met/in fosphaat buffer.

Hiervoor zijn speciale rekjes, rekjeshouders en spoelbakken ontworpen.



Plaats allereerst de coupes rechtstandig in de rekjes, daarna onmiddellijk afspoelen met spuitfles (PBZ) en in de spoelbak plaatsen.

Het geheel dan aan de schudmachine bevestigen.

Was of spoelbewegingen met een amplitude van 2 cm; 60 bewegingen per minuut.

ANTI NUCLEAIRE FACTOREN (A.N.F.)

=====

Het aantonen van tegen kernen gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij de lever van een normale rat.

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

45 minuten drogen voor de ventilator.

10 minuten bestralen met U.V.-licht, afstand $\pm$ 25 cm (Philips T. UV buis
30 W, code 57413 P/40 L5)

30 minuten incuberen bij 16°C met onverdund patiëntenserum.

30 minuten wassen bij 37°C Na barbitoonbuffer 3x verversen.

30 minuten incuberen bij 16°C met fluorescerend antiserum.

30 minuten wassen bij 37°C Na barbitoonbuffer 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

- A. Homogeen
- B. Nucleoli
- C. Spikkels
- D. Kernrand.

SCHILDKLIER

=====

Het aantonen van tegen schildklier gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij humaan toxisch struma, dat vrijkomt bij een operatie. Sectie-materiaal is eventueel ook bruikbaar.

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, kamertemperatuur.

30 minuten incuberen met patiëntenserum, 1:10 verdund, kamertemperatuur.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, kamertemperatuur, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, kamertemperatuur, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

colloid

cytoplasma

kernen.

MAAGSLIJMVLIES

Het aantonen van tegen pariëtale cellen gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij rattemaag (fundus).

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

10 minuten fixeren in aceton.

15 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:20 verdund,
kamertemperatuur.

30 minuten wassen in fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen in fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

pariëtale cellen

gladde spier

kernen.

HARTSPIER

=====

Het aantonen van tegen hartspier gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij rattehart.

Methode

Coupes, 2 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met patiëntenserum, 1:10 verdund, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

vezel:

A. "myasthenia gravis type"

B. intermyofibrillair type

sarcolemma

kernen.

SKELETSPIER

=====

Het aantonen van tegen skeletspier gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij diafragma van een rat.

Methode

Coupes, 2 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:10 verdund,
kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met het fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

- A. vezel (myasthenia gravis type)
- B. zebra-type (Feltkamp + Feltkamp-Vroom, 1965)
- C. sarcolemma
- D. kernen.

SPEEKSELKLIER

=====

Het aantonen van tegen speekselgangepitheelcellen gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij humane parotis of submandibularis, afkomstig van een obductie, maximum 6 uur p.m., bloedgroep O.

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

10 minuten fixeren in aceton.

15 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:10 verdund, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

A. epitheelcellen (cytoplasma)

B. kernen.

BIJNIER

=====

Het aantonen van tegen bijnierschors gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij humaan bijnierweefsel, vrijgekomen bij operatie of obductie, maximaal 6 uur p.m.

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten fixeren in aceton.

10 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:10 verdund,
in 37°C broedstoof.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, kamertemperatuur, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, kamertemperatuur, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

A. parenchym

B. kernen.

GLADDE SPIER EN MITOCHONDRIËN

Het aantonen van tegen pariëtale cellen, gladde spier en mitochondriën gerichte antistoffen.

Als antigeen voor pariëtale cellen en gladde spier gebruiken wij rattemaag (fundus) en voor mitochondriën rattenier.

Beide coupes worden naast elkaar op een glaasje geplakt.

Primair

is het de bedoeling om met deze test antilichamen aan te tonen tegen gladde spier, pariëtale cellen en mitochondriën.

Secundair

om met betrekking tot alle positieve bevindingen van de andere organen na te gaan of deze antilichamen orgaan-specifiek zijn of berusten op antilichamen tegen mitochondriën; dit om foutief-positieve uitslagen te voorkomen.

Methode

Coupes, 4 μ (micron), cryostaatcoupes.

10 minuten drogen voor de ventilator.

10 minuten fixeren in aceton.

10 minuten drogen voor de ventilator.

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:20 verdund, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur.

30 minuten wassen met fosfaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

Interpretatie:

- A. pariëtale cellen
- B. gladde spier
- C. kernen
- D. proximale tubuli
- E. distale tubuli
- F. glomeruli
- G. kernen.

HET AANTONEN VAN immuuncomplexen of de aanwezigheid van plasmacellen etc.
in het weefsel van de patiënt, met behulp van de immunofluorescentie
techniek (I.F.T.)

Methode

Coupes, 4 μ of 2 μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator.

10 minuten aceton-fixatie (in sommige gevallen) (10 min. drogen voor de ventilator)

30 minuten wassen met fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met niet fluorescerend konijn antiserum.

30 minuten wassen met fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

30 minuten incuberen met fluorescerend paard anti Ig reagens.

30 minuten wassen met fosphaatbuffer, 37°C, 3x verversen.

Rondom de coupe afdrogen.

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe.

Afdekken met dekglas.

Afranden met paraffine.

HET AANTONEN VAN complementbindende antistoffen

De methode is afhankelijk van het te gebruiken orgaan.

Belangrijk is, dat na de incubatie met het patiëntenserum het normaal mensien-complement (vers AB-serum) dient te worden toegevoegd.

Deze incubatie vindt plaats bij 37°C in broedstoof, daarna wassen met P.B.Z., vervolgens incuberen met een fluorescerend anti-humaan complement serum etc.

HET TESTEN VAN EEN NIEUW FLUORESCEREND ANTI-HUMAAN Ig REAGENS

Allereerst moet hiervan de bruikbaarheidstiter bepaald worden.

In de meeste gevallen zal een bruikbaarheidstiter geadviseerd worden. Het is echter zeer nuttig om deze in eigen laboratorium nogmaals te testen.

Methode

Antigeen + positieve contrôle, 1:10 verdund + conjugaat, 1:1

Antigeen + negatieve contrôle, 1:10 verdund + conjugaat, 1:1

Antigeen + fysiologisch zout + conjugaat, 1:1

Antigeen + dubieus serum, 1:10 verdund + conjugaat, 1:1

Antigeen + serum met ANF, 1:10 verdund + conjugaat, 1:1

Vervolgens het conjugaat 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 en 1:1280 verdunnen.

In deze test zal duidelijk worden bij welke verdunning het antiserum het beste bruikbaar is:

- A. Er mag dan geen achtergrond-fluorescentie zijn
- B. de positieve contrôle moet duidelijk positief zijn
- C. de negatieve contrôle moet duidelijk negatief zijn
- D. de zout contrôle moet absoluut negatief zijn
- E. de dubieuze contrôle moet echt dubieus zijn.

Belangrijk is bij het in gebruik nemen van een nieuwe ampul:

1e oplossen in aqua dest.

2e daarna direct afdraaien, 2500 rpm. of sneller, + 10 minuten

3e bovenstaande afpipetteren en dan pas gebruiken

4e bewaar het niet langer dan één week in verdunde toestand (bij -20°C).

DNA-SPOTTEST VOOR HET AANTONEN VAN ANTISTOFFEN TEGEN DNA(vlgs Friou)
=====

1. Doop objectglaasje in gelatine-oplossing (500 mg/100 ml aq.dest) en laat drogen.
2. Fixeer door objectglaasje in 10% formaline-oplossing te dopen en laat drogen.
3. Breng druppel SS-DNA oplossing (100 γ /ml SSC) op glaasje en laat drogen.
4. Gedurende 30 minuten fixeren in ethanol (96%).
5. (Bewaren bij -20°C).
6. Gedurende 30 minuten incuberen met antiserum (onverdund).
7. Gedurende 30 minuten wassen in PBZ.
8. Gedurende 30 minuten incuberen met conjugaat.
9. Gedurende 30 minuten wassen in PBZ.
10. Insluiten in gebufferde glycerol.
11. Afranden met geen of zeer weinig paraffine.
12. Aflezen bij UV licht in volkomen duistere ruimte.

BEREIDING TUMORCELSUSPENSIE

=====

- A. Trypsine oplossing (trypsine difco 1:250)
0,5% oplossing in fosfaatbuffer, pH 7.2
0,02% EDTA
Magnetische roermotor + roerstaafje $\pm$ 2 cm
Broedstoof $+37^{\circ}\text{C}$
Speciale trypsine Erlenmeyer
- B. Tumorweefsel direct na ontvangst verprutten door knippen of snijden in petrischaal, daarna het geheel overgieten in speciale Erlenmeyer en magnetische roerder.

Methode

- 1e 30 minuten trypsiniseren in stoof $+37^{\circ}\text{C}$
2e bovenstaande afgieten = (verwijderen kapotte cellen)
3e trypsine toevoegen
20' trypsiniseren in stoof $+37^{\circ}\text{C}$
4e bovenstaande afgieten in buisjes à 10 ml, daarna direct inactiveren met 0,5 ml humaan serum.
Daarna afdraaien, bovenstaande afgieten en losse cellen blijven over.
Dit geheel vanaf B 3e herhalen tot alle weefsel in Erlenmeyer op is.

BEENMERG VAN KAHLER OF WALDENSTRÖM-PATIËNTEN =====

Beenmergpunctaat opvangen in Hanks 5% EDTA bij 4°C; 24 uur houdbaar.
1x wassen met Hanks 5% EDTA, 1200 toeren per minuut, + 10 minuten;
verdere wassingen Hanks 5% Bov. Alb., 1200 toeren per minuut, + 6 minuten.
Bij teveel erythrocyten 1 of meer druppels Citraat Hypertoon toevoegen;
na 1 minuut aanvullen met Hanks Bov. Alb.

Afdraaien 1200 toeren per minuut.

Sediment met enige druppels Hanks tot redelijke suspensie; ongeveer
0,1 ml sediment.

aanvullen tot 1 ml

Daarna Sedimentapparaat:

Aandrukplaat

objectglas

filtreerpapier, S.N.S. blauwband

persblok aanschroeven tot zetvast.

- A. 1 druppel Hanks voor bevochtiging van filtreerpapier
- B. 3 druppels suspensie
- C. + 6 minuten afdraaien, 800-1200 toeren per minuut
daarna drogen of invriezen in diepvries -70°C.

Methode voor de immunofluorescentie techniek voor beenmerg-preparaten:

10 minuten drogen voor de ventilator

10 minuten fixeren in ethanol, 5% azijnzuur, -20°C

10 minuten fixeren in aceton, -20°C

10 minuten wassen in fosfaatbuffer, pH 7.2, kamertemperatuur

15 minuten incuberen met antiserum, kamertemperatuur

15 minuten wassen in fosfaatbuffer, pH 7.2, kamertemperatuur

15 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur

15 minuten wassen in fosfaatbuffer, pH 7.2, kamertemperatuur

Rondom de coupe afdrogen

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe

Afdekken met dekglas

Afranden met paraffine.

BEREIDING VAN KERNSUSPENSIE UIT KIPPE-ERYTHROCYTEN

- a. Kippebloed wordt opgevangen in een gelijk volume Alsever's oplossing.
- b. Deze celsuspensie wordt afgedraaid bij 1500 rpm, 15 minuten.
- c. De cellen worden 3x gewassen in overmaat PBZ.
- d. Na de 3e wassing worden de cellen geresuspendeerd in 9 volume delen fysiologisch zout ($\rightarrow$ 10% suspensie).
- e. Aan een deel, 10% celsuspensie, wordt een gelijk deel saponineoplossing toegevoegd, onder goed mengen.
Saponine: 4,55 mg saponine/ml PBZ.
- f. Dit mengsel 4 minuten laten staan.
- g. Er wordt nu 3 minuten afgedraaid bij 2500 rpm.
- h. Wassen met PBZ tot het bovenstaande vrij is van haemoglobine.
- i. Draai uiteindelijk af, 2500 rpm., 5 min., waarna een vrij zuivere kernsubstantie overblijft.
 Deze met PBZ op 10% (v/v) suspensie brengen.

Formaliniseren van kippe-erythrocytenkernen (KEK)

- a. neem X ml 10% KEK-suspensie
- b. onder voortdurend roeren langzaam toevoegen:
 1/10 X ml formaldehyde (40%)
- c. 18 uur bij $+4^{\circ}\text{C}$
- d. nog eens 1/10 X ml formaldehyde toevoegen
- e. kernen uit laten zakken gedurende $\pm$ 3 dagen bij $+4^{\circ}\text{C}$
- f. bovenstaande afzuigen en met PBZ (aq. dest mag ook) brengen op oorspronkelijke (X ml) volume $\rightarrow$ 10% suspensie.
 Bewaren bij $+4^{\circ}\text{C}$.

I.E. IN AGAROSE 0,6% IN P.B.Z. pH= 7.2

=====

1. Bakvulling

1% agarose in P.B.Z., pH 7.2

2. Fixeeragarose

3% in P.B.Z., pH 7.2

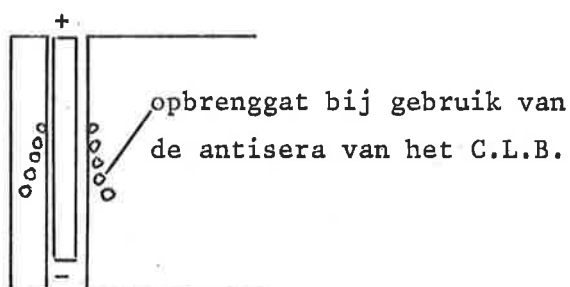
3. Opbrenghoeveelheid

3 ml op objectglas

4. Na het gieten worden de glaasjes bij +4°C gelegd, teneinde de agaroselaag harder te doen worden.

5. Terwijl de glaasjes nog koud zijn, worden ze geponsd.

Het ponsstempel moet echter versteld worden als volgt:



6. De goot mag pas worden "uitgeschept" na de electrophorese!

7. Het uitzuigen van de opbrenggaten, dient met een minimum aan zuigkracht van de waterstraalpomp te geschieden.

8. De electrophorese-spanning bedraagt 15 V.

De electrophorese-duur bedraagt 4 uur + 20 minuten.

KLEUREN VAN AGAROSE-DUBBEL DIFFUSIE PLATEN VOOR AGAROSE 0,6% IN P.B.Z.
=====

Plaat na 3 dagen wassen in P.B.Z. (ev. de buffer waarin agarose is opgelost) drogen onder filtreerpapier bij 37°C.

Kleurstof

Amidozwart	2	g
ijsazijn	5,2	ml
Na-acetaat	12,2	g
glycerol	100	ml
aqua dest ad	1000	ml.

Kleuren gedurende 5-10'

Afspoelen onder de kraan.

Ontkleuren

ijsazijn	25	ml
glycerine	85	ml
aqua dest ad	1000	ml

Ontkleuren geschiedt op het oog + 3-5'

AFNEMEN MAAGSAP TER BEPALING VAN GEHALTE AAN INTRINSIC FACTOR

=====

Patiënt mag 8 à 10 uur van te voren niet eten of drinken.

Indien niet drinken moeilijkheden oplevert, mag wat water worden gedronken tot + 2 uur voor afname maagsap.

Maagsonde met olijf tot op de grote curvatuur laten zakken en daarna 1 tot 2 cm terugtrekken.

Patiënt tijdens afname plat op de rug laten liggen, afwisselen met zijligging; soms gaat een half zittende houding beter.

Patiënt zo weinig mogelijk speeksel laten inslikken.

Het nuchtere maag secreet zo volledig mogelijk wegzuigen; dit is verder niet van belang.

Hierna gedurende 1 uur maagsap verzamelen, bij voorkeur onder continue zuigdrainage. Indien niet mogelijk, dan met intervallen van 5 à 10 minuten opzuigen.

Opvangen in kolfje, geplaatst in smeltend ijs.

Grove verontreinigingen verwijderen (slijm e.d.).

Van het maagsap bepalen :

- a. de pH;
- b. vrij zuur (dimethyl geel);
- c. totaal zuur (phenolphthaleïne).

Het maagsap wordt vervolgens gedurende een half uur op pH 10,0 gehouden (0°C) om het pepsine te vernietigen, en daarna teruggebracht op pH 7,0.

Volumina bij iedere bewerking bepalen wegens eventuele veranderingen van de IF-concentratie door verdunning met NaOH en HCl bij het op de diverse pH-waarden brengen.

Hierna gedurende 15 minuten centrifugeren bij een toerental van 3500 rpm.

Het heldere en neutrale maag secreet bewaren bij -20°C.

Transport maagsap moet gekoeld geschieden in koolzuurijs. Een te hoge temperatuur heeft tot gevolg, dat het IF snel wordt afgebroken. Het moet tijdens het gehele transport in bevroren toestand blijven.

Het volume maagsap, nodig voor een IF-gehalte-bepaling, hangt af van de IF-concentratie en zal liggen tussen de 10 tot 50 ml.

Als de hiervoor beschreven wijze van afnemen geen resultaat oplevert, kan de maag secretie worden gestimuleerd met Betazole hydrochloride (Histalog), dosering 0,5 mg per kilogram lichaamsgewicht. Wijze van toediening : intramusculair of subcutaan.

Toediening na het verwijderen van het nuchtere maagsap en + 15 minuten na het toedienen starten met de drainage volgens de beschreven methode.

Mocht het maagsap, zonder toediening van Histalog, geen vrij zuur bevatten, dan verdient een herhaling met Histalog aanbeveling.

HUID

=====

Het aantonen van tegen huid gerichte autoantilichamen.

Als antigeen gebruiken wij cavialip.

Dit antigeen is een week houdbaar bij -70°C .

Methode

Coupes, 4μ (micron), cryostaatcoupes.

30 minuten drogen voor de ventilator

10 minuten fixeren in aceton

10 minuten drogen voor de ventilator

30 minuten incuberen met het serum van de patiënt, 1:10 verdund, K.T.

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, 37°C , 3x verversen

30 minuten incuberen met fluorescerend antiserum, kamertemperatuur

30 minuten wassen in fosfaatbuffer, 37°C , 3x verversen

Rondom de coupe afdrogen

1 druppel gebufferde glycerol, 50% oplossing, op coupe

Afdekken met dekglas

Afranden met paraffine

Interpretatie :

A. basaalmembraan

B. intercellulair

HAEMAGGLUTINATIE TECHNIEK VOLGENS BOYDEN

=====

A. Bereiding antigeen	Thyreoglobuline	0,2 % in PBZ
	IgG	0,05 % in PBZ
	HSA	1 % in PBZ
	Egg alb.	0,5 % in PBZ
	BSA	1 % in PBZ

B. Tannine oplossing, 5 mg op 100 ml PBZ

C. 10 ml O-ery's, gedefibrineerd met glasparales, 1 per ml

1e O-ery's 3x wassen PBZ à 5 min. 2000 toeren

2e 24 druppels PBZ + 24 druppels tannine oplossing	} 4% ery's
2 druppels packed cells	
Dit geheel af en toe schudden c.q. mengen gedurende 10 min.	

3e Afdraaien gedurende 5 min. + 1x wassen met PBZ 1200 toeren

4e 48 druppels PBZ + 48 druppels antigeenoplossing	} 2% ery's
2 druppels getanneerde packed cells	
Dit geheel af en toe schudden c.q. mengen gedurende 30 min.	

5e 3x wassen met PBZ gedurende 5 min. per wassing 1200 toeren

6e 48 druppels PBZ + 2 druppels geïncubeerde packed cells

7e Deze suspensie bewaren in smeltend ijs 0°C.

BEPALING VAN DE THYROGLOBULINE TITER MET DE TAKATSY METHODE
=====

Materiaal:

disposable titration trays (Cooke Engeneering)

tulips (0,025 ml) (Flow Lab.)

disposo pipette droppers 0,025 ml

NaCl 0,9%

thyroglobulin sensitized sheep red cells

control cells (Wellcome)

Methode:

Titratie schaaltes,

gemarkt horizontaal 1 t/m 12

gemarkt verticaal A t/m H

Voor één bepaling hebben we drie rijen gaatjes nodig, dus

1, 2 en 3; 4, 5 en 6; enz.

Zout druppelen in A1 en A3, 4 druppels,

overigen 1 druppel (0,025 ml)

Verdunningen met tulips (0,025 ml serum), 10 sec. draaien per gaatje

1 en 2 bepaling, 3 controle. A t/m H

Rij 1 en 2 verdunning van 1/5 t/m 1/160.000

Rij 3 verdunning van 1/5 t/m 1/640

Hierna in rij 1 en 2 de geformaliniseerde schape-cellen

(thyroglobulin sensitized - Wellcome), 1 druppel 0,025 ml

In rij 3 de geformaliniseerde schape-cellen (control cells -

Wellcome) 0,025 ml.

Aflezen op lichtbak of op witte ondergrond.

Na 1 uur kamertemperatuur

of 1 nacht bij +4°C.

STANDAARDMETHODE VOOR CONJUGATIE VAN FITC AAN ANTISTOFFEN

I. Isolatie van de antistoffen

1. Isolatie van de ruwe globulinefractie uit het antiserum

Breng 100 ml antiserum op 0°C en voeg hieraan geleidelijk, onder roeren, een gelijk volume verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing van 0°C toe.

Laat het mengsel gedurende 1 uur bij deze temperatuur staan en centrifugeer gedurende 10 minuten bij 28.000 g.

Giet de bovenstaande vloeistof af.

Los het precipitaat in fosfaat gebufferd zout (PBS) op tot ten hoogste de helft van het oorspronkelijke volume.

Verwijder het $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ door dialyse tegen PBS.

2. Isolatie van de IgG antistoffen

Maak een DEAE Sephadex A 50 kolom (b.v. 3,2 x 84 cm) klaar met een inhoud van 650 ml gezwollen Sephadex.

Spoel dan de kolom gedurende de nacht met PBS; controleer de doorstroomsnelheid (minstens 1,5 ml per minuut) en de pH(7,2).

Breng de eiwitoplossing op de kolom.

Elueer met PBS.

Vang de geëluëerde IgG antistoffen in fracties van ± 20 ml bij +4°C op en meet de optische dichtheid bij 280 m μ .

Verzamel de geëluëerde eiwitten met een extinctie $\geq 0,1$.

3. Concentreren van de IgG antistoffen

Breng de temperatuur van de eiwitoplossing op 0°C en voeg hieraan geleidelijk, onder roeren, fijngemalen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kristallen toe totdat een 50% verzadigde oplossing is bereikt (370 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per liter te concentreren eiwitoplossing).

Laat het mengsel gedurende 2 uur bij 0°C staan. Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 28.000 g, giet het bovenstaande af, los het precipitaat in een minimale hoeveelheid PBS op en verwijder het $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ door dialyse. De eiwitconcentratie moet ten minste 25 mg/ml zijn.

Controletest I: Bepaal en vergelijk de antistof titers van de geïsoleerde IgG fractie en van het niet-behandelde antiserum.

II. Conjugatie van FITC aan IgG antistoffen

1. FITC oplossing

Bepaal de totale hoeveelheid te conjugeren antistof. Bereken de benodigde hoeveelheid FITC (dosis 9 mg FITC per gram eiwit). Weeg het FITC in een bekerglas af op een analytische balans. Voeg daarna druppelsgewijs 0,15 M Na_2HPO_4 toe, totdat al het FITC is opgelost.

Bewaar de oplossing niet langer dan 1 uur.

2. Conjugatie

Doe de geconcentreerde IgG oplossing (+ 3% eiwit) in een bekerglas, breng de temperatuur hiervan op 22°C (KT) en voeg hierbij FITC oplossing.

Roer het mengsel en breng de pH al roerende op 9,5 door Na_3PO_4 (0,1 M) bij te druppelen op geleide van een pH meter. De reactie wordt hierna gedurende 60 minuten bij kamertemperatuur voortgezet onder controle van de pH en daarna gestopt d.m.v. gelfiltratie Sephadex G 25.

3. Gelfiltratie

Breng het reactiemengsel direct op een Sephadex G 25 coarse kolom (b.v. 2,3 x 40 cm). Spoel de kolom met PBS dezelfde buffer waarmee deze geëquilibreerd is. Vang de gekleurde eiwitten op.

Controletest II:

Bepaal de mol. F/P verhouding van het conjugaat.

Deze moet + 2,5 zijn.

III. Chromatografische zuivering van het conjugaat

Isolatie van IgG antistofmoleculen met optimale mol. F/P verhoudingen

Equilibreer met PBS een DEAE Sephadex kolom (b.v. 3,2 x 50 cm). Breng het conjugaat op de kolom, spoel deze opnieuw met PBS tot een lichtgekleurde band zich afscheidt. Ga over tot de zout-gradientwassing, (gebruik 0,5 M NaCl, 0,01 M fosfaat, pH 7,2 als gradient buffer).

Vang de gekleurde eiwitten in fracties van $\pm$ 20 ml bij $+4^{\circ}\text{C}$ op. Meet de extincties van de sterk gekleurde eiwitfracties, die door de gradientwassing zijn geëluëerd, bij 280 m μ en 495 m μ . Bepaal de mol. F/P verhoudingen en verzamel de fracties met mol. F/P verhoudingen van 1 tot 4.

Dialyseer deze gedurende 24 uur tegen PBS bij $+4^{\circ}\text{C}$ en concentreer d.m.v. dialyse tegen polyaethyleen glycol of door ultrafiltratie, tot een eiwitconcentratie van ongeveer 10 mg/ml is bereikt.

Vul het conjugaat in porties van 1- à 2 ml uit.

Bewaar deze bij -20°C of in gevriesdroogde vorm in, onder vacuüm gesloten, ampullen.

Controletest III:

Bepaal IgG concentratie, mol. F/P verhouding en optimale verdunning van het conjugaat voor het gebruik in de IFT.

Bespreking

De volgende moeilijkheden kunnen bij de beschreven methode o.m. optreden:

1. Slecht lopende DEAE Sephadex kolommen. Deze maken de chromatografische procedure tot een langdurige zaak. De oorzaak hiervan ligt meestal in een onvoldoende verwijdering van de kleine Sephadex deeltjes. Eventueel aanwezige luchtballen in het systeem werken eveneens vertragend op de doorstroming van de kolom.

2. De resultaten van de conjugatie zijn soms niet goed reproduceerbaar: de verkregen conjugaten hebben dan een moleculaire F/P verhouding lager dan 2,2 of hoger dan 2,8.

De belangrijkste oorzaak hiervan is een foutieve FITC dosering voor de conjugatie. Deze is de moeilijkste variabele gebleken, omdat de werkelijke hoeveelheid FITC, die voor de te conjugeren eiwitten beschikbaar is, mede beïnvloed wordt door:

1. a. weegfouten, b. zuiverheid van het FITC poeder en
2. de bepaling van de hoeveelheid te conjugeren eiwitoplossing.

Het verdient daarom aanbeveling, om in onzekere gevallen (b.v. gebruik van een ander merk of andere FITC "batch", ander soort eiwit, etc.) kleine hoeveelheden van de eiwitoplossing met verschillende hoeveelheden FITC te conjugeren ("proefconjugatie").

3. De precipiterende- en agglutinerende antistofactiviteit vermindert of verdwijnt tijdens de bewerking:

- a. dit kan door de conjugatie van FITC aan antistoffen veroorzaakt worden, vooral bij een te hoge FITC concentratie. Ook bij een hoeveelheid van 9 mg FITC per gram eiwit kan het echter bij sommige antisera voorkomen, dat de precipiterende antistofactiviteit verdwijnt (zie Coons, 1956).
- b. de geconjugeerde eiwitten komen verdund van de kolom (hoogste concentraties 2- tot 7 mg/ml). Voor de bepaling van de precipiterende antistoffen dient het conjugaat daarom tenminste tot 1% geconcentreerd te worden.
- c. het verlies aan antistoffen tijdens de DEAE Sephadex chromatografie wordt groter, indien deze vooral in de IgM fractie zijn gelocaliseerd. Deze eiwitten worden met PBS niet geëluëerd. Dergelijke antisera, waarbij de antistofactiviteit vooral in de IgM fractie aanwezig is, dienen daarom op een andere wijze geconjugeerd te worden. Bij de keuze van het antiserum moet daarom ook nagegaan worden, in welke immunoglobulinefractie de precipiterende antistoffen gelocaliseerd zijn. Dit kan op betrekkelijk eenvoudige wijze geschieden door immunoelectroforese van het te onderzoeken antiserum tegen het antigeen.

Opmerkingen:

De volgende uitbreidingen van de hierboven beschreven techniek zijn mogelijk:

1. Uitvoering van de chromatografie bij $+4^{\circ}\text{C}$, hetzij door de gehele opstelling in een "koude cel" te plaatsen, hetzij door de kolommen van een koelmantel te voorzien.
2. Een automatische schrijver, die de optische dichtheden der geëluëerde fracties meet (fase I-2 en fase III).
Hierdoor kunnen gemakkelijker $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resten uit een eiwitoplossing worden verwijderd d.m.v. Sephadex G 25 gelfiltratie (fase I 1. en I 3.).
3. Een ultrafiltratie apparaat (L.K.B. 6300A) kan gebruikt worden om IgG oplossingen te concentreren, in plaats van de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitatiemethode.

EIWITBEPALING MET HET FOLIN-PHENOLREAGENS

I. Benodigde oplossingen:

Oplossing A Bevat 2% Na_2CO_3 + 0,02% NaK-tartraat + 0,1 N NaOH

Bereiding: los op in 500 ml AD:

10 gr Na_2CO_3

0,1 gr NaK-tartraat

2 gr NaOH

Oplossing A¹ Bevat hetzelfde als oplossing A, behalve de NaOH

Oplossing B Bevat 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Bereiding: door verdunning van de voorraadoplossing,
die 5% CuSO_4 bevat.

Oplossing C Wordt bereid door samenvoegen van 50 delen van
oplossing A en 1 deel van oplossing B

Oplossing D Wordt bereid door samenvoegen van 50 delen van
oplossing A¹ en 1 deel van oplossing B

N.B. De oplossingen C en D zijn slechts 24 uur houdbaar
en dienen dus iedere dag vers gemaakt te worden.

Oplossing E Dit is het verdunde Folin-Ciocalteu-reagens (1 N)
Het F-C-reagens wordt nl. geleverd in ca. dubbel gecon-
centreerde oplossing. Hiervan is door NaOH-titratie de
titer bepaald ($N = 2,07$), waarna door verdunning met AD
de normaliteit op 1 is gebracht.

II. De bepaling:

Hierbij bestaan 2 variaties, afhankelijk van de aard van de eiwit-
oplossing.

a. Heldere eiwitoplossing. Deze verdunt men zodanig met AD, dat ze
tussen de 50 en 1000 γ (= μgr) eiwit per ml bevat. Dan:

1. Bij 0,1 ml van de onbekende eiwitoplossing voegt men 1,0 ml
van oplossing C. Goed mengen (Whirlmix)

2. Na > 10 min. staan bij KT wordt 0,1 ml van oplossing E toegevoegd en gemixt. Dit dient zeer snel te gebeuren (binnen enkele seconden).
 3. De oplossing (1,2 cc) kan na meer dan 30 min. staan bij KT worden afgelezen in $\frac{1}{2}$ cm cuvetten (vol. 1,5 cc) bij 660 nm.
- b. Zuur-geprecipiteerd eiwit. Wanneer men het eiwit (b.v. uit troebele suspensie) met b.v. TCA (trichloor azijnzuur) of PCA (perchloorzuur) heeft neergeslagen, gaat men als volgt te werk:
1. Bij het neerslag (supernatant zo volledig mogelijk afgeschonken) voegt men 1,0 ml 1 N NaOH
 2. Onder geregeld schudden laat men deze oplossing staan bij KT tot alle eiwit is opgelost (na ca 30 min.)
 3. Bij 0,1 ml van deze nu heldere oplossing voegt men 1,0 ml van oplossing D en mengt goed.
 4. Verdere procedure als beschreven onder a 2 en 3

Uit de E_{660} -waarden kan het eiwitgehalte van de oorspronkelijke oplossing berekend worden m.b.v. de ijklijn (die verkregen is door BSA als standaard te gebruiken).

BSA- ijklijn (slechts gebruiken bij $E_{660} < 0.450$)
voor eiwitbepaling m.b.v. Folin-Phenolreagens

