

VOORSCHRIFTEN:

BIOCHEMIE

Productie Laboratorium
Eiwit Analytisch Laboratorium
Productie Ontwikkeling Laboratorium

I N H O U D
=====

0525 en 620

1 =	Het lipoproteïne vrij maken van sera	2 pag.
2 =	Immuno - elektroforese (I.E. Veronalbuffer)	4 pag.
3 =	Klaarmaken van I.E. bak	2 pag.
4 =	Radiaal - diffusie - test	3 pag.
5 =	Poly - acry - amide elektroforese in buizen	4 pag.
6 =	Het gieten van een kolom	4 pag.
7 =	Het regenereren van Sephadex	
8 =	Aerosilbehandeling	2 pag.
9 =	Extraktie uit het aerosilprecipitaat	2 pag.
10 =	Het helder maken van sera	
11 =	De zuivering van plasminogeen voor immunisatie	8 pag.

Het lipoproteïne vrij maken van sera

Doel

Voor de titerbepaling van rubeola is het noodzakelijk serum lipoproteïnevrij te maken.

Materialen

buffer

Na Cl	8	g	}	in 1 ltr aq.dest
K Cl	0,2	g		
Na ₂ HPO ₄	1,15	g		
K H ₂ PO ₄	0,2	g		
Ca Cl ₂	0,15	g		
Mg Cl ₂ 6H ₂ O	0,1	g		

D. G. V.

glucose	10	g	}	in 1 ltr aq.dest
gelatine	0,6	g		
barbituurzuur	0,58	g		
na- barbituraat	0,38	g		
Ca Cl ₂	0,02	g	}	7,2 < pH < 7,4
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,12	g		
Na Cl	8,5	g		

Kaolin Light 25 g (firma: B.D.H.)

Uitvoering

Suspendeer 25 g Kaolin light in 100 ml buffer.

Steriliseer deze suspensie gedurende 20 min. bij 121°C.

Na afkoeling gedurende 10 min. centrifugeren bij een snelheid van 2900 rpm.

Zuig het bovenstaande af en voeg aan het precipitaat D.G.V. toe tot een volume van 100 ml en suspendeer dit precipitaat in het D.G.V.

Voeg nu samen: 0,2 ml serum
 0,2 ml D.G.V.
 1,2 ml suspensie

Centrifugeer dit gedurende 10 min. bij een snelheid van 2900 rpm.

Het bovenstaande bevat het uitgangsserum, dat ongeveer 5 x verdund is, berekend op IgG basis.

Om het serum in zijn oorspronkelijke concentratie te verkrijgen kan het bovenstaande na dialyseren en vriesdrogen aangevuld worden tot het oorspronkelijke volume met de gewenste buffer.

Immuno - elektroforese =====

Doel

Het aantonen van antigene componenten in oplossingen en het kwalitatief en semi - kwantitatief vaststellen van de verschillende componenten.

Materialen

fixeeragar: 3% oplossing van agar-noble (Difco) in aq.dest

gietaar: 1,3% oplossing van agar-noble (Difco) in I.E. Veronalbuffer

De agar wordt gesuspendeerd in een oplossing van 7 delen veronalbuffer op 3 delen aq.dest in een erlenmeyer welke in een waterbad van 100°C wordt verwarmd tot alle agar is opgelost.

I.E. Veronalbuffer: 41,6 g ^{diethyl} na- barbituraat = Na-barbitol = Medinal
7,36 g diethylbarbituurzuur (0,0375 μ) veronal

oplossen in ± 1 ltr kokend aq.dest.

Na afkoeling aanvullen met aq.dest tot 4 ltr. $8,4 < \text{pH} < 8,6$,
eventueel bijstellen met geconcentreerd HCl of NaOH behalve als
 $\text{pH} > 8,9$ of $\text{pH} < 8,1$

Tenslotte 1 ml merthiolaat / 1 ltr buffer (thiomersal 1:1000) toevoegen!

Kleurstoffen

Panceaurood: 1 g ponceaurood
6,12 g Na Ac . $3\text{H}_2\text{O}$
2,6 ml ijsazijn
100 ml glycerine
900 ml aq.dest

Amidozwart: 1 g amidozwart
 6,12 g Na Ac . $3H_2O$
 2,6 ml ijsazijn
 100 ml glycerine
 900 ml aq.dest

Coomassie blue 50 gram
 Ethanol 4,5 Liter
 Azijnzuur (ijsazijn) 1 Liter
 Aqua dest. 4,5 Liter

} volgen
 de dag
 filteren

Ontkleuringsvlst:
 Ethanol 4,5 Liter
 Ysazijn 1 Liter
 Aqua dest. 4,5 Liter

} opnieuw te
 gebruiken
 na filtratie
 met koolstg.

Ontkleuringsmiddel:

150 ml azijnzuur 80%
 500 ml glycerine

aanvullen tot 6 ltr met aq.dest

$150 \times 80 = 7 \times 100 \rightarrow 120 \text{ ml } 100\%$

Glasplaatje: dikte: 2 mm, breedte 8 cm, lengte afhankelijk van
 het aantal monsters

Uitvoering

1. Glasplaatjes vetvrij maken met alcohol; goed droog wrijven.
2. glasplaatjes beschrijven met glasinkt op de volgende manier:
 monster-nummers onderaan; bijzonderheden, datum e.d. bovenaan;
 de inkt laten drogen in vlam.
3. één of meerdere druppels fixeearagar (afhankelijk van de grootte
 van het plaatje) op het plaatje brengen en snel uitwrijven;
 + 15 min. laten drogen in stoof bij 100°C .
4. gietaagar gieten als volgt: de pipet in het midden van de plaat
 gedeeltelijk laten uitlopen; vervolgens met de punt van de pipet
 langs de rand van het plaatje gaan en voorzichtig, indien nodig,
 agar laten druppelen. Op de zelfde manier de eventueel nog „open”
 plaatsen op de plaat behandelen. De nog resterende agar laten
 uitlopen en de agar afkoelen.
5. In de agar gaatjes ponsen met een diameter van 3 mm op 12 mm afstand
 van elkaar; hiervoor wordt een prikker gebruikt met een naar binnen
 geslepen rand. Met de waterstraalpomp wordt de agar uit de gaatjes
 gezogen.

6. Op horizontaal-plaat de gaatjes vullen m.b.v. ^{capillaire} capillair tot het vloeistofniveau horizontaal en gelijk met de agarlaag ligt.
7. Glasplaatjes recht onder elkaar in I.E. bak leggen, iets van elkaar af; de bovenkant van de plaatjes i.h.a. tegen de pos. pool. Contact maken m.b.v. bijna gestolde gietagar, door deze te laten druppelen, langs de randen van de plaat, uit een pasteurse pipet met gebroken punt.
8. Stroom inschakelen en spanning controleren: 60 V (loopt iets op na enige minuten)
De bak i.h.a. 50 min. onder stroom zetten. De veronalbuffer (onverdund!) laten door druppelen.
9. De plaat voorzichtig lossnijden uit de contactagar; vervolgens gootjes snijden met een dikte van $1\frac{1}{2}$ à 2 mm; precies tussen 2 gaatjes in. De gootjes agar eruit wippen m.b.v. een naaldje.
In de gootjes het antiserum brengen m.b.v. een „getrokken” pasteurse pipet.
10. Glasplaatjes bij kamertemperatuur in een vochtige ruimte gedurende een nacht horizontaal laten liggen om zowel het antigeen als de antistof te laten diffunderen.
11. De plaatjes de volgende dag, na aflezen in $\frac{1}{2}$ gebufferd zout te spoelen zetten, de volgende twee dagen de plaatjes voorzichtig afspoelen met aq.dest en in vers $\frac{1}{2}$ gebufferd zout leggen.
12. De vierde dag de plaatjes afspoelen met aq.dest en op elk plaatje een stukje filtreerpapier (Whatman no.20) liefst een beetje natgemaakt, met de ruwe kant op de agar leggen. De gaatjes en gootjes ontluichten door op die plaatsen door het papier te prikken.
13. Na een nacht drogen bij 37°C het filtreerpapier verwijderen en de plaatjes afspoelen onder de kraan; de plaatjes worden nu gekleurd door ze gedurende 3-5 uur in een bak met kleurstof te leggen.
N.B. ^{amidozwart} amidozwart kleurt sterker dan ponceaurood.
14. Na kleuring de kleurstof in de fles terug gieten; de plaatjes eventueel met een beetje aq.dest afspoelen en vervolgens in het ontkleuringsmiddel leggen gedurende 10 à 30 min. Daarna de plaatjes goed afspoelen met water en bij 100°C laten drogen.

ad punt 7.

In plaats van agar kan ook viscose-spons als contactmedium gebruikt worden.

Hiertoe worden de sponzen aan weerszijden van de plaat gelegd, met de vlakke kant naar beneden, zodanig dat ze de plaat voor $\pm 0,5$ cm bedekken. Het voltage, gemeten tussen de sponzen, moet 60 V bedragen.

N.B. De sponzen voor gebruik goed verzadigen met buffer!

(voor afmetingen sponzen zie 0525/3 blz.2)

Klaarmaken van I.E. bak

=====

Materialen

I.E. Veronalbuffer: (zie Immuno-elektroforese) blz. 0525/2

agar: 2% agaroplossing in I.E. Veronalbuffer

Uitvoering

De oude agar verwijderen uit de I.E. bak; ook de agar uit ge gaatjes. Alles afspoelen en drogen. Met pleister de gaatjesplaat dichtplakken. Als de agar tot 70 à 75°C is afgekoeld kan het gegoten worden. Met kurken kunnen de platen recht gehouden worden. Als de agar gestold is, de pleisters verwijderen en de elektriciteitsdraden onder buffer zetten.

Het klaarmaken van de I.E. bak

materialen:

Viscose-spons strips (fa. Heyman, Amsterdam)

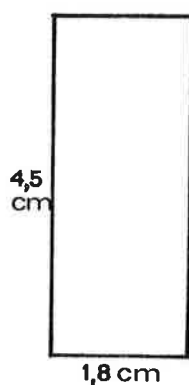
I.E. veronalbuffer (zie immuno-elektroforese)

uitvoering:

Voor de door de fa. Halaglas gemaakte I.E. bak zijn de afmetingen van de sponzen als volgt:

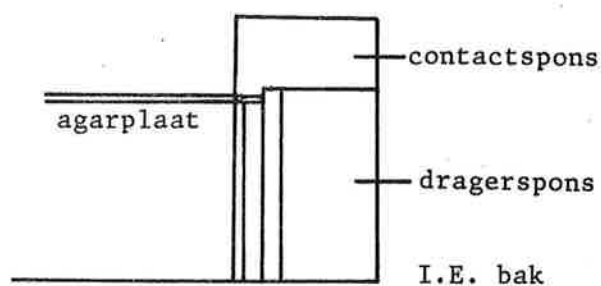
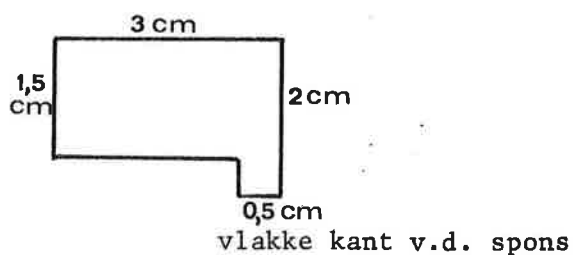
DRAGERSPONS

lengte 50 cm



CONTACTSPONS

lengte 50 cm



De sponzen kunnen, wanneer ze droog zijn, gemakkelijk met een scherp mes gesneden worden, b.v. met een scalpelmessje.

De sponzen voor gebruik goed verzadigen met I.E. veronalbuffer, en de elektriciteitsdraden onder buffer zetten.

Radiaal - diffusie - test
=====Doel

Bepaling van de hoeveelheid antigeen, respectievelijk antistof in een oplossing t.o.v. een standaardreeks.

Materialen

fixeeragar: 3% oplossing van agar-noble (Difco) in aq.dest

gietaagar: 1% oplossing van ionagar nr 2 (Oxoid codenr. 112) in veronalbuffer (onverdund). Men lost de agar in de buffer op door deze in een erlenmeyer in een waterbad van 100°C te brengen.

N.B. gietaagar dient men steeds vers te maken; fixeeragar kan men bij +4°C bewaren.

Veronalbuffer: I.S. 0,075μ pH = 8,6.
15,45 g Na - barbituraat
2,76 g diëthylbarbituurzuur
oplossen in 1 ltr kokend aq.dest

Kleurstof

1 g amidozwart
6,12 g Na Ac . 3H₂O
100 ml glycerine
2,6 ml ijsazijn
900 ml aq.dest

Ontkleuringsmiddel

150 ml azijnzuur 80%
500 ml glycerine
aanvullen tot 6 ltr met aq.dest

Uitvoering

1. Glasplaat vetvrij maken met alcohol, goed droogwrijven.
2. gegevens met glasinkt op de bovenrand van het plaatje schrijven, de inkt laten drogen in vlam.
3. één of meerdere druppels fixeëragar (afhankelijk van de grootte van het plaatje) op het plaatje brengen en snel uitwrijven; + 15 min. laten drogen in stoof bij 100°C .
4. een goed schoongewreven gesiliconeerde glasplaat tegenover de gefixeerde glasplaat vastzetten op een bepaalde afstand, door er een plasticrand (dikte 2 mm) tussen te klemmen. Deze rand tevoren met een klein beetje siliconevet inwrijven om lekken te voorkomen.
5. een hoeveelheid agar, nodig voor één plaat (voor een plaat met 33 gaatjes is + 15 ml nodig) pipetteren in een erlenmeyer en laten afkoelen in een waterbad van max. 52°C tot + 50°C .
6. de antistof erbij pipetteren en goed mengen met de agar oplossing.
7. m.b.v. pasteursepipet de agar gieten in de ruimte tussen de glasplaten; de plaat in verticale stand neerzetten en de agar laten afkoelen (10 à 15 min.). Daarna de gesiliconeerde glasplaat er voorzichtig afschuiven en de plastic rand verwijderen.
8. in de agargel gaatjes ponsen met een diameter van 3 mm op 12 mm afstand van elkaar, hiervoor wordt een prikker gebruikt met naar binnen geslepen rand. Met de waterstraalpomp wordt de agar uit de gaatjes gezogen.
9. op horizontaal-plaat de monsters in de gaatjes brengen met een 10 μl Pleugerpipet.
10. één of meerdere dagen (afhankelijk van de stof en de concentratie) in een horizontale vochtige ruimte laten liggen, er ontstaan precipitatie-ringetjes.

11. de plaat, na de ringetjes gemeten te hebben, in $\frac{1}{2}$ geb. zout te spoelen zetten, de volgende twee dagen de plaat voorzichtig afspoelen met aq.dest en in nieuw $\frac{1}{2}$ geb. zout leggen.
12. de vierde dag de plaat afspoelen met aq.dest en een stukje filtreerpapier Whatman No. 20 liefst een beetje natgemaakt met de ruwe kant op de agar leggen.
De gaatjes ontluchten door op die plaatsen door het papier te prikken
13. Na een nacht drogen bij 37°C het filtreerpapier verwijderen en de plaat afspoelen onder de kraan, de plaat wordt nu gekleurd door deze gedurende 3-5 uur in een bak met kleurstof te leggen.
14. na kleuring de kleurstof in de fles teruggieten, de plaat eventueel met een beetje aq.dest afspoelen en vervolgens in het ontkleuringsmiddel leggen gedurende 10 à 30 min. Daarna de plaatjes goed afspoelen en bij 37°C laten drogen.

Interpretatie:

In de agarplaat wordt tevens een aantal bekende antigeenconcentraties gebracht. Na 3 dagen worden de ringdiameters gemeten en gekwadrateerd. De kwadraten van de bekende antigeenconcentraties worden uitgezet op de ordinaat tegen de concentraties op de abscis. De onbekende antigeenconcentraties worden door interpolatie van de gekwadrateerde diameters op deze lijn bepaald.

N.B. Indien mogelijk de antigeenconcentratie niet bepalen door extrapolatie.

Poly - acryl - amide elektroforese in buizen
=====

Doel

Het scheiden van eiwitten op grootte en lading.

Materialen

Oplossing A: 8 g Tris (hydroxymethyl aminomethaan) (Baker)
 0,92 ml Temed (= tetramethylethyloëndiamine)
 aanvullen met aq.dest tot + 50 ml
 pH brengen op 7,9 met + 48 ml 1N HCl; eventueel tot
 100 ml aanvullen met aq.dest

Oplossing B: 5,98 g Tris
 0,5 ml Temed
 aanvullen met aq.dest tot + 50 ml
 pH op 7,4 brengen met + 45 ml 1N HCl; eventueel tot
 100 ml aanvullen met aq.dest

Oplossing C: 30 g Acrylamide (Cohnbroch - Buchs)
 0,8 g Bis (N,N' - methyleen - bisacrylamide Fluka A.G.)
 15 mg $K_3 Fe (CN)_6$
 aanvullen tot 100 ml met aq.dest

Oplossing D: 10 g Acrylamide
 2,5 g Bis
 aanvullen tot 100 ml met aq.dest

Oplossing E: 4,0 mg Riboflavine
 aanvullen tot 100 ml met aq.dest

Bovenstaande oplossingen in bruine flessen bij +4°C bewaren.

Small pore gel

3	delen A	4,5	ml
6,6	" C	9,9	ml
14,4	" aq.dest	21,6	ml
x mg	ammonium persulfaat	20	mg

Large pore gel

1,2	delen B	2,4	ml
1,2	" D	2,4	ml
0,96	" C	1,92	ml
1,8	" E	3,6	ml
4,8	" aq.dest	9,6	ml

Bovenstaande volumina zijn berekend voor een bereiding van acht gels.

Kleurstof

0,67 g amidozwart
 45 ml methanol
 10 ml ijsazijn
 aanvullen tot 100 ml met aq.dest

Ontkleuringsmiddel

7% azijnzuur

Anode / kathodebuffer

14,4 g glycine
 3 g tris
 in 1 ltr aq.dest

pH 8,2

Aan kathodebuffer ($\frac{1}{2}$ ltr) een mespuntje broomfenolblauw toevoegen.

De elektrodebuffers zo koud mogelijk maken.

Na gebruik mogen de elektrodebuffers niet opnieuw gebruikt worden.

Uitvoering

1. Buisjes schoonspoelen metalconox en aq.dest; even laten drogen en vervolgens m.b.v. een watje om een stokje gewonden, de buisjes siliconeren met „Repelcote”
2. De onderkant van de buisjes dichtplakken met pleister; goed strak trekken.
3. Small pore gel bereiden bij voorkeur in een erlenmeyer; vermijd T.L. licht en zonlicht (ter voorkoming van vroegtijdige polymerisatie)
4. De buisjes voor ruim de helft met deze gel vullen m.b.v. een pasteursepipet. Onder U.V. licht laten polymeriseren ($\pm \frac{1}{2}$ uur)
5. Ondertussen $\frac{1}{2}$ ltr kathodebuffer ; 1 ltr anodebuffer en large pore gel bereiden, oplossing E pas vlak voor het gieten van de large pore gel toevoegen (opl. E is initiator van de polymerisatie)
6. Het dunne laagje small pore gel, dat na een half uur nog niet gepolymeriseerd is, drogen met tissue; de buisjes vullen met een laagje large pore gel van 1 à 2 cm; onder U.V. licht laten polymeriseren (± 15 min.)
7. De eiwitmonsters indien nodig ontdooien en bepalen hoeveel μ l er opgebracht moet worden; in het algemeen wordt 1 mg eiwit opgebracht.
8. Op de gepolymeriseerde large pore gel 2 à 3 druppels vloeibare large pore gel brengen voordat het monster opgebracht wordt met een maatverdeelde 0,1 ml pipet; vervolgens nog een laagje large pore gel van ± 1 cm toevoegen; onder U.V. licht laten polymeriseren (± 10 min.)
9. De anodebuffer in het anodevat gieten; de pleisters van de buisjes verwijderen, doorboorde kurken om de buisjes schuiven en in elektroforese-apparaat plaatsen; de kurken stevig vastdrukken.
10. M.b.v. pasteursepipet de buisjes aan de bovenkant opvullen met kathodebuffer, vervolgens het kathodevat voorzichtig volgieten met buffer, totdat alle buisjes ruimschoots onder staan. Pas op voor luchtballen!
Laat 3 à $3\frac{1}{2}$ uur elektroforeren op 5 mA per buisje.

VOORLOPIG VOORSCHRIFT

AEROSILBEHANDELING
=====

Literatuur: Stephan en Roka - Z.Klin.Chem. und klin.Biochem. 183, ('68)

Aerosil is een zeer zuiver colloidaal silicium-oxide (SiO_2) met een zeer groot bindingsoppervlak ($340 \text{ m}^2/\text{g}$)

Het absorbeert α_1 -, α_2 - en β lipoproteïne vrijwel selektief uit serum, en fibrinogeen uit plasma.

Ook stollingsfaktor VIII en het hepatitis antigeen worden onder bepaalde omstandigheden geabsorbeerd.

Doel

Het verwijderen van fibrinogeen α_2 lipo, β lipo en α_1 lipoproteïnen uit plasma of serum.

Materiaal

Aerosil 380

Uitvoering

- a) Het verwijderen van fibrinogeen.

Aan 100 ml plasma 2 g aerosil 380 toevoegen.

Gedurende 2 uur bij 37°C roeren.

Centrifugeren gedurende 30 min. bij 2200 r.p.m.

In het bovenstaande is fibrinogeen niet meer aantoonbaar.

- b) Het verwijderen van α_2 en β lipoproteïne.

Aan 100 ml serum 2 g aerosil 380 toevoegen.

Gedurende 2 uur bij kamertemperatuur roeren pH = 7,4.

Centrifugeren gedurende 20 min. bij 2200 r.p.m.

- c) Het verwijderen van α_1 lipoproteïne.

Aan 100 ml serum 2 g aerosil 380 toevoegen.

pH tussen 7 en 8.

Gedurende 4 uur roeren bij 45°C .

Centrifugeren gedurende 20 min. bij 2200 r.p.m.

N.B. Bij deze behandeling worden ook de α_2 lipoproteïnen en het fibrinogeen verwijderd.

Resultaten:

plasma voor aerosil behandeling plasma na aerosil behandeling
gedurende 2 uur bij 45°C.

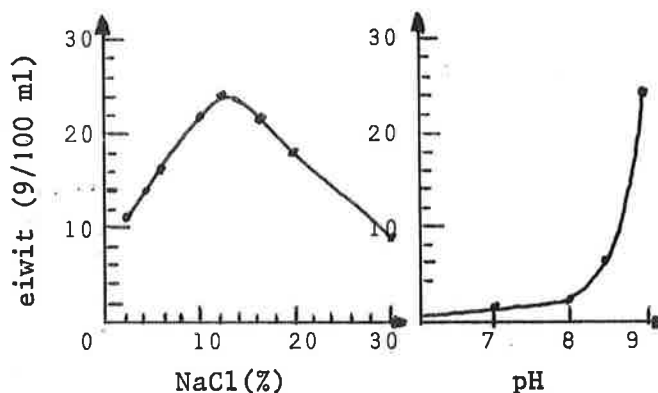
α_2 macro	100 %	100 %
IgG	100 %	98 %
fibrinogeen	100 %	< 5 %
albumine	100 %	96 %
α_2 lipoproteine	100 %	< 3 %
α_1 lipoproteine	100 %	< 2 %

Bovenstaande percentages zijn berekend in de radiaal - diffusie test.

VOORLOPIG VOORSCHRIFT

EXTRAKTIE UIT HET AEROSILPRECIPITAAT

Het is mogelijk, bij hoge zoutconcentratie in alkalisch milieu, uit het gewassen aerosilprecipitaat een groot gedeelte van de geadsorbeerde eiwitten te extraheren.



Extraktie van Aerosil geadsorbeerde eiwitten.

links : extraktie bij pH=9

rechts : extraktie met 12% NaCl

Uitvoeringa) α_1 lipoproteïne

Het aerosilprecipitaat wassen met fysiologisch zout;

het laatste waswater mag niet meer dan 0,1% eiwit bevatten.

90 g precipitaat mengen met 100 ml 0,1 M glycine 15% NaCl oplossing.

Met 1 N NaOH de pH naar 9 brengen.

Gedurende + 1 uur roeren bij kamertemperatuur en de pH geregeld bijstellen tot 9.

Zodra de pH niet meer terugloopt centrifugeren gedurende 20 min.

Het bovenstaande bevat naast het α_1 lipoproteïne ook de andere eiwitten, welke aan het aerosil geadsorbeerd waren, maar in relatief lage concentratie.

b) α_2 lipo - en β lipoproteinen

Het precipitaat, verkregen bij a) drie keer wassen met 150 ml 10% NaCl oplossing bij pH=9; het laatste waswater mag niet meer dan 0,2% eiwit bevatten.

90 g precipitaat mengen met 100 ml aqua dest

45 g vast NaCl toevoegen en pH wederom naar 9 brengen.

Gedurende 1 uur bij kamertemperatuur roeren en pH voortdurend bijstellen.

Gedurende 30 min. centrifugeren en het bovenstaande ($\pm$ 100 ml)

$\pm$ 16 uur dialyseren tegen 5 ltr 0,3% NaCl oplossing en ter concentrering gedurende $\pm$ 48 uur dialyseren tegen 10% poly-vinylpyrrolidon K 90 (P.V.P.

Ook bij deze behandeling komen andere geadsorbeerde eiwitten vrij.

c) fibrinogeen

Aan 100 ml aerosilprecipitaat 100 ml 0,1 M glycine NaOH buffer pH=9 toevoegen.

Vast NaCl toevoegen tot een concentratie van 12%.

De pH die nu $\pm$ 6 is, terugbrengen naar 9. Gedurende $\frac{1}{2}$ uur roeren, pH steeds tot 9 bijstellen.

Zólang doorroeren tot pH niet meer terugloopt.

Centrifugeren gedurende 20 min.

Het bovenstaande bevat fibrinogeen. Het precipitaat uitwassen met 100 ml 0,1 M glycine 12% NaCl oplossing.

pH bijstellen en roeren tot pH niet meer terugloopt.

Centrifugeren gedurende 20 min. De twee bovenstaanden samenvoegen.

Het fibrinogeen precipiteren met 8% alcohol.

N.B. Bij deze behandeling worden ook de lipoproteinen enigermate geextraheerd.

HET HELDER MAKEN VAN SERA

=====

Materiaal:

Freon T.F. (fa. Dupont)

Uitvoering:

De hoeveelheid freon, welke toegevoegd moet worden om een helder preparaat te verkrijgen is afhankelijk van de troebelheid.

Deze wordt o.a. veroorzaakt door lipoidachtige stoffen.

In het algemeen is 1 deel freon op 9 delen serum voldoende.

Na toevoeging van freon goed schudden en vervolgens centrifugeren gedurende 10 min. in tafelcentrifuge.

De meeste troebelingveroorzakende substanties zitten nu in de tussenlaag tussen het serum en het freon.

DE ZUIVERING VAN PLASMINOGEEN VOOR IMMUNISATIE

=====

Inleiding

De zuivering valt uiteen in 3 stappen:

1. Sorptie uit plasma m.b.v. affiniteitschromatografie;
2. Gelfiltratie over G 25;
3. Iso-electro-phocusing (I.E.P.).

Een uitgesneden stukje I.E.P.-gel wordt fijngewreven m.b.v. een geruwde glazen staaf in een glazen buis; suspensie van ± 1 ml in aq.dest.

Materialen

Met freon behandeld bovenstaande van cryoprecipitaat.

Cellulose-lysine (10 gram);

0,1 M fosfaatbuffer pH = 7,4; 0,003 M EDTA

0,3 M fosfaatbuffer pH = 7,4; 0,003 M EDTA

0,1 M fosfaatbuffer pH = 7,4; 0,003 M EDTA; 0,2 M ϵ -aminocapronzuur
(ϵ -ACA);

Sephadex G 25 (coarse) kolom in aq.dest. + 0,01% NaN_3 bij $+4^\circ\text{C}$;

Concentreerapparaat (collodiumhuls, waterstraalpomp);

Ampholine (pH 3-10);

I.E.P.-gel (zie methoden);

0,2% H_2SO_4 (ontlucht m.b.v. vacuumpomp);

0,4% ethyleendiamine (=diamino ethaan) (ontlucht m.b.v. vacuumpomp).

Methoden

1. Sorptie uit plasma m.b.v. affiniteitschromatografie

- A. Bereiding cellulose-lysine;
- B. Bereiding met freon geschud bovenstaande van cryoprecipitaat;
- C. Sorptie;
- D. Wassing;
- E. Elutie m.b.v. ϵ -ACA.

A. Cellulose poeder wordt gesuspenderd in aq.dest. en zorgvuldig gewassen als volgt (100 gram in 4 liter):

2x met aq.dest.

2x met azijnzuur (10%) op pH=3

2x met loog (4N) op pH=11

2x met aq.dest. op pH=7

2x met 96% ethanol

5x met aq.dest.

Hierbij worden tegelijkertijd de fijne deeltjes weggezogen, die langzaam (langer dan 10 min.) en slecht uitzakken.

Na snel invriezen m.b.v. koolzuursneeuw/alcohol wordt het cellulose gevriesdroogd.

Het aldus gewassen en gevriesdroogd cellulose wordt bij kamertemperatuur goed afgesloten bewaard.

In de zuurkast

10 gram cellulose wordt gesuspenderd in 100 ml aq.dest.

3,3 gram CNBr (=cyanogeenbromide; giftige damp!) wordt erin gemengd m.b.v. magn. roerder.

Met ijs wordt de temperatuur 20°C gehouden.

Met 4N NaOH wordt de pH op 10 gebracht en door constant bijdruppelen op 10 gehouden.

Als de pH niet meer terugloopt is de activatie voltooid en moet direct afgezogen worden op een D₃ glasfilter. Met ± 500 ml 0,1 M NaHCO₃ buffer pH=8,9 moet direct gewassen worden op het glasfilter. Daarna wordt het drooggezogen geactiveerde cellulose in een lysine-oplossing gemengd (2 gram lysine in 100 ml 0,1 M NaHCO₃ pH=8,9).

Na 16 à 20 uur roeren bij +4°C moet nog eens gewassen worden met ± 500 ml ethanolamine (0,05 M in 0,1 M NaHCO₃ pH=8,9) om:

- Rest actief cellulose te inactiveren: amine-groep blokkeert;
- Rest CNBr (eventueel) weg te wassen: reageert met de hydroxyl-groep → CO₂↑, N₂↑ etc.

Hierna wordt het cellulose/lysine veelvuldig gewassen met aq.dest. en tenslotte met 0,1 M fosfaatbuffer pH=7,4.

- B. Het bovenstaande van het cryoprecipitaat wordt met freon geschud, voornamelijk om het plasma vetvrij en helder te maken en verstopping van kolommen later, te voorkomen.
100 ml bovenstaande van cryoprecipitaat + 50 ml freon wordt 1/2 uur bij $+4^{\circ}\text{C}$ geroerd (heftig) en daarna afgecentrifugeerd in de MSE-centrifuge: 2000 rpm, 1/2 uur.
Het bovenstaande wordt afgezogen en verder gebruikt.
- C. 60 ml vers plasma met freon geschud, wordt geïncubeerd met het uitgezakte cellulose/lysine gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur.
M.b.v. een Büchnerfilter met filtreerpapier wordt de suspensie voorzichtig afgezogen onder vacuum. Het filtraat kan worden opgevangen om er desgewenst het restant plasminogeen in te bepalen.
- D. Met ± 150 ml, 0,3 M fosfaatbuffer pH=7,4 moet voorzichtig gewassen worden op het filter zonder het cellulose/lysine-plasminogeen droog te zuigen (bij kamertemperatuur).
Een kolom ($\emptyset$ 4 cm; lengte 8 cm; Boehringer) wordt klaargemaakt met gietschijf en deze wordt gevuld met 0,3 M fosfaatbuffer pH=7,4.
De voorgewassen cellulose/lysine-plasminogeen suspensie wordt in de afgesloten kolom gegoten en na 1/2 uur uitzakken en stapelen, laat men de kolom doorlopen. D.m.v. hoogteverschil (max. 10 cm) is de druppelsnelheid (± 1 dr./5 sec.) te regelen.
Na ± 4 uur kan de kolom afgesloten worden, de trechter leeggezogen en verwijderd worden en de afsluiter bevestigd worden.
Met 250 ml, 0,3 M fosfaatbuffer pH=7,4 moeten de resterende-plasma-eiwitten weggewassen worden (constant hoogteverschil)
De volgende morgen moet de $E_{280}^{1\text{cm}}$ v.d. doorloop $<0,50$ zijn.
- E. De afsluiter wordt verwijderd en de kolom moet net drooglopen.
Met kleine beetjes elutievloeistof (0,1 M fosfaatbuffer pH=7,4 + 0,2 M ϵ -ACA), die men telkens net laat intrekken (3x), wordt van buffer gewisseld zodanig dat een scherp front verkregen wordt.
Met 50 ml elutievloeistof wordt na bevestigen van de afsluiter uiteindelijk geëluëerd bij kamertemperatuur.
Fracties van ± 4 ml worden opgevangen en de E_{280} wordt ervan bepaald.
De piekfracties worden opgezameld ($E_{280}^{1\text{cm}} >0,050$) en de totale $E_{280}^{1\text{cm}}$ wordt bepaald. Deze moet $\geq 10,0$ zijn.

De cellulose/lysine ϵ -ACA kolom wordt gewassen met 0,1 M fosfaat-buffer pH 7,4 ($\pm$ 300 ml), en het cellulose/lysine kan dan voor een volgende sorptie gebruikt worden.

2. Gelfiltratie over G 25 (in aq.dest., 0,01% NaN_3)

Om het plasminogeen uit het plasminogeen/ ϵ -ACA mengsel te verkrijgen, wordt een gelfiltratie uitgevoerd. Het plasminogeen komt met het „void” volume mee en het ϵ -ACA wordt geremd en komt pas later van de kolom.

Door E_{280} meting wordt het plasminogeen gedetecteerd en het ϵ -ACA geeft een duidelijke verhoging van de geleidbaarheid (λ).

De gelfiltratie wordt bij $+4^\circ\text{C}$ uitgevoerd (5 ml fracties).

De E_{280} piekfracties moeten worden opgezameld, waarvan de $E_{280}^{1\text{cm}}$

$\geq 0,050$ is.

De totale $E_{280}^{1\text{cm}}$ moet $\geq 7,5$ zijn.

Om het gezuiverde plasminogeen geschikt te maken voor de iso-electrophocusing, moet er geconcentreerd worden tot de $E_{280}^{1\text{cm}} = 3,0$.

3. Iso-electrophocusing

Materialen:

Poly-acryl-amide gel electroforese bak;

Glazen buisjes (lengte 9,5 cm, binnen $\varnothing$ 0,5 cm);

Oplossingen voor het maken van gels;

Oplossing A : 9,22 gram acrylamide

0,30 gram N-N¹-methyleen-bis acrylamide (=Bis)

25 gram sucrose

aanvullen met aq.dest. tot 100 ml (evt. affiltreren; heldere opl.);

Oplossing B₁ : 20 mg riboflavine

aanvullen met aq.dest. tot 100 ml (evt. affiltreren; gele opl.);

Oplossing B₂ : 600 mg persulfaat

aanvullen met aq.dest. tot 100 ml;

Oplossing C : 40% amfoline (pH bereik: 3-10);

Oplossing D : N, N, N¹, N¹ - tetramethylethyleendiamine (=TEMED);

Kleurstof	: Coomassie briljant blue (nr. G 250)	0,26 gram	} $\pm$ 24 uur roeren.
	Tri-chloor azijnzuur	30 gram	
	Sulfosalicylzuur	9 gram	
	Aq.dest.	186 ml	
	Methanol	75 ml	

Ontkleuring : Ethanol (96%) 250 ml
 aq.dest. 670 ml
 IJsazijn (100%) 80 ml

Methode:

De glazen buisjes moeten goed schoongemaakt zijn. Met „Repelcote“ moeten ze gesiliconeerd worden, opdat de gels er naderhand gemakkelijker uit te halen zijn. Bij 37°C goed grogen.

Met stukjes „parafilm“ worden de buisjes afgedicht aan één kant en recht in een rekje geplaatst.

Voor elke gel is $\pm$ 2 ml mengsel nodig, dat in de volgende verhoudingen wordt samengesteld: (let op de volgorde)

20 ml oplossing A ;
 1 ml oplossing C ;
 1 ml oplossing B₂;
 1 ml oplossing B₁;
 0,08 ml oplossing D ;
 17 ml aq.dest.

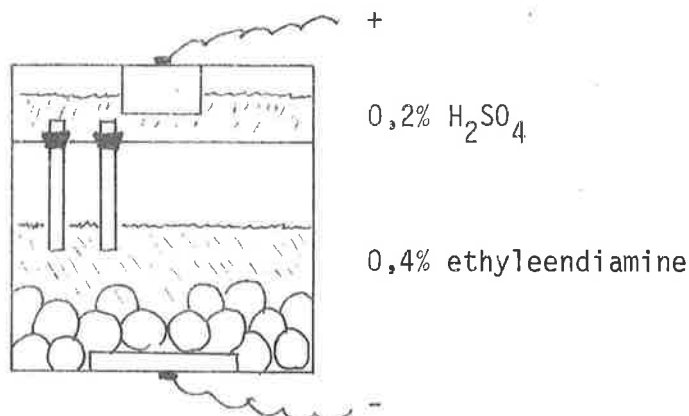
Het mengsel moet liefst in een "donker potje" worden aangemaakt, omdat het polymeriseren onder invloed van U.V.-licht gebeurt.

Een stukje aluminiumfolie om het vaatje voldoet hierbij goed.

Elk glazen buisje moet tot dezelfde hoogte worden gevuld, en m.b.v. een plastic slangetje moet een laagje aq.dest. worden aangebracht ($\pm$ 2 mm). Het polymeriseren gaat nl. beter onder afsluiting van de lucht.

Met verse oplossingen zijn de gels binnen 20 min. in het zonlicht gepolymeriseerd.

De stukjes parafilm moeten voorzichtig worden verwijderd en de buisjes worden met doorboorde kurkjes klaargemaakt voor de electroforese. Het laagje water wordt m.b.v. een stukje kleenex weggezogen en de buisjes worden in de bak geplaatst (recht!).



Het op te brengen monster wordt 1:2 verdund met 50% sucrose in aq. dest. +25% sucrose; in duplo. Als blanco gel wordt een gel gebruikt, waar alleen 25% sucrose wordt opgebracht. Het opbrengvolume moet, indien mogelijk, 200 μ l zijn en 1 mg eiwit bevatten.

(d.w.z. plasminogeenconcentraat: $E_{280}^{1\text{cm}} = 1,8$ d.w.z. 1% eiwit d.w.z. 100 μ l bevat 1 mg).

Als de $E_{280}^{1\text{cm}}$ laag is, kan hooguit 200 μ l (d.w.z. 400 μ l) worden opgebracht. Weer m.b.v. een plastic slangetje wordt op de "monsterlaag" in dunne laagjes een sucrosegradient aangebracht: 10% sucrose en 5% sucrose. Hierna worden de buisjes dieper in de kurkjes geduwd en nogmaals gecontroleerd op recht staan. Met de anode buffer 0,2% H_2SO_4 worden de buisjes overvol gevuld.

Het kathode vat wordt met gevulde afgesloten glazen flesjes (of iets dergelijks) opgevuld, opdat er maar weinig kathode buffer nodig is. Dit volume van de kathode buffer heeft n.l. invloed op de instelling van het iso-electrische evenwicht van de amfolines.

Het anode vat wordt voorzichtig gevuld met de anode buffer en er wordt contact gemaakt: Alles bij $+4^\circ\text{C}$.

N.B. Men begint met constant gehouden stroom d.w.z. 1 mA per gel.

Het voltage zal hierbij langzaam oplopen van ± 60 V $\rightarrow$ 200 V. Dan moet omgeschakeld worden (meestal na 1 à $1\frac{1}{2}$ uur) op constant gehouden voltage: 200 V. Gedurende de nacht (± 16 uur) neemt de stroom dan af tot $\pm 0,5$ mA totaal; dan is de evenwichtsinstelling van de amfolines voltooid.

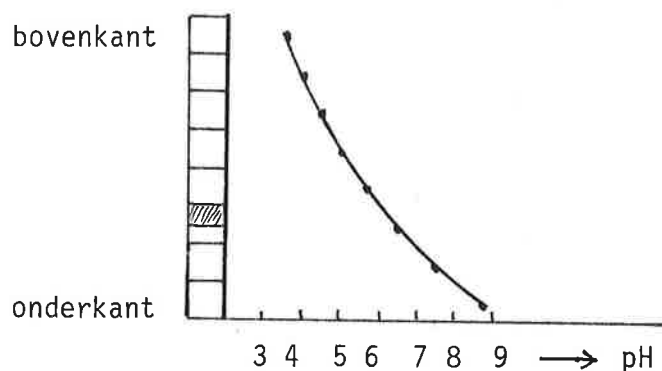
De duplo gel wordt na uitschakelen van de stroom en afgieten van de anode buffer uit de bak gehaald en met een kurk wordt het gat afgesloten. De anode buffer wordt weer opgegoten en de stroom wordt weer aangezet: evenwichtsinstelling blijft behouden (anders teveel

diffusie). M.b.v. een lange naald aan een injectiespuit (± 25 ml) wordt onder water spuitend de gel uit het buisje gehaald. Hierna wordt de gel in 12,5% TCA gezet. Het eiwit precipiteert in dunne bandjes, terwijl de amfolines uit de gel diffunderen. Na een paar maal verversen zijn na 1 uur duidelijk amfolines uitgewassen (de gelige kleur spoelt weg); de eiwitbandjes zijn duidelijker te onderscheiden.

Vervolgens wordt de stroom uitgeschakeld en de anode buffer wordt verwijderd. De gels worden uit de buisjes gehaald m.b.v. de lange naald, onder water, en van een monstergel wordt dat gedeelte uitgesneden wat overeenkomt met het duidelijkste bandje van de duplo gel. Dit uitgesneden stukje gel wordt gebruikt voor de immunisatie.

De resten van de gel worden verder afgewerkt zodat ook na kleuren bekeken kan worden welk bandje is ingespoten in het konijn.

De blanco gel wordt in minstens 8 stukjes gesneden en elk stukje wordt met 2 ml aq.dest. gewassen. D.w.z. na ± 2 uur staan (en schudden) kan de pH gemeten worden van de uitgewassen amfoline. Voor de gebruikte range 3-10 is het pH verloop als volgt:



 dit uitgesneden stukje gel wordt m.b.v. een geruwde glazen staaf in een reageerbuisje fijngewreven en gesuspenderd in 1 ml aq.dest.

Kleuring

Met 12,5% TCA worden de gels gespoeld (= laten staan in buis, meermalen verversen).

Gedurende ± 16 uur worden de gels in kleurstof gezet.

Met ontkleuring worden de gels gespoeld, net zolang tot de achtergrond doorzichtig en helder is.

Tenslotte worden de gels in 7% azijnzuur bewaard.

N.B. De gels mogen nooit blijven staan 's-nachts in ontkleuring. Hierdoor krimpen ze nl. sterk. Als er niet voldoende ontkleurd was 's-avonds, kan men ze beter in 7% azijnzuur zetten. Ook in de kleurstof kunnen ze gedurende het week-end niet blijven staan. Dan liever weer in TCA zetten.

Opmerkingen

Omdat niet bekend is of gezuiverd plasminogeen, volgens deze zuivering bereid, goed houdbaar is bij -30°C , wordt het hele procedé achterelkaar afgewerkt tot en met het fijnmaken van de gel.