

15

AU – LABORATORIUM

I N H O U D  
=====

840

- |   |        |
|---|--------|
| 1 = Het aantonen van Au-antigeen en Au-antistof | 2 pag. |
| 2 = Ouchterlony techniek                        | 2 pag. |
| 3 = Counter - Electrophoresis                   | 3 pag. |

HET AANTONEN VAN AU-ANTIGEEN EN AU-ANTISTOF

Gaatjes - gootjes methode

Doel:

Het testen van een groot aantal plasmamonsters op Au-antigeen respektievelijk Au-antistof.

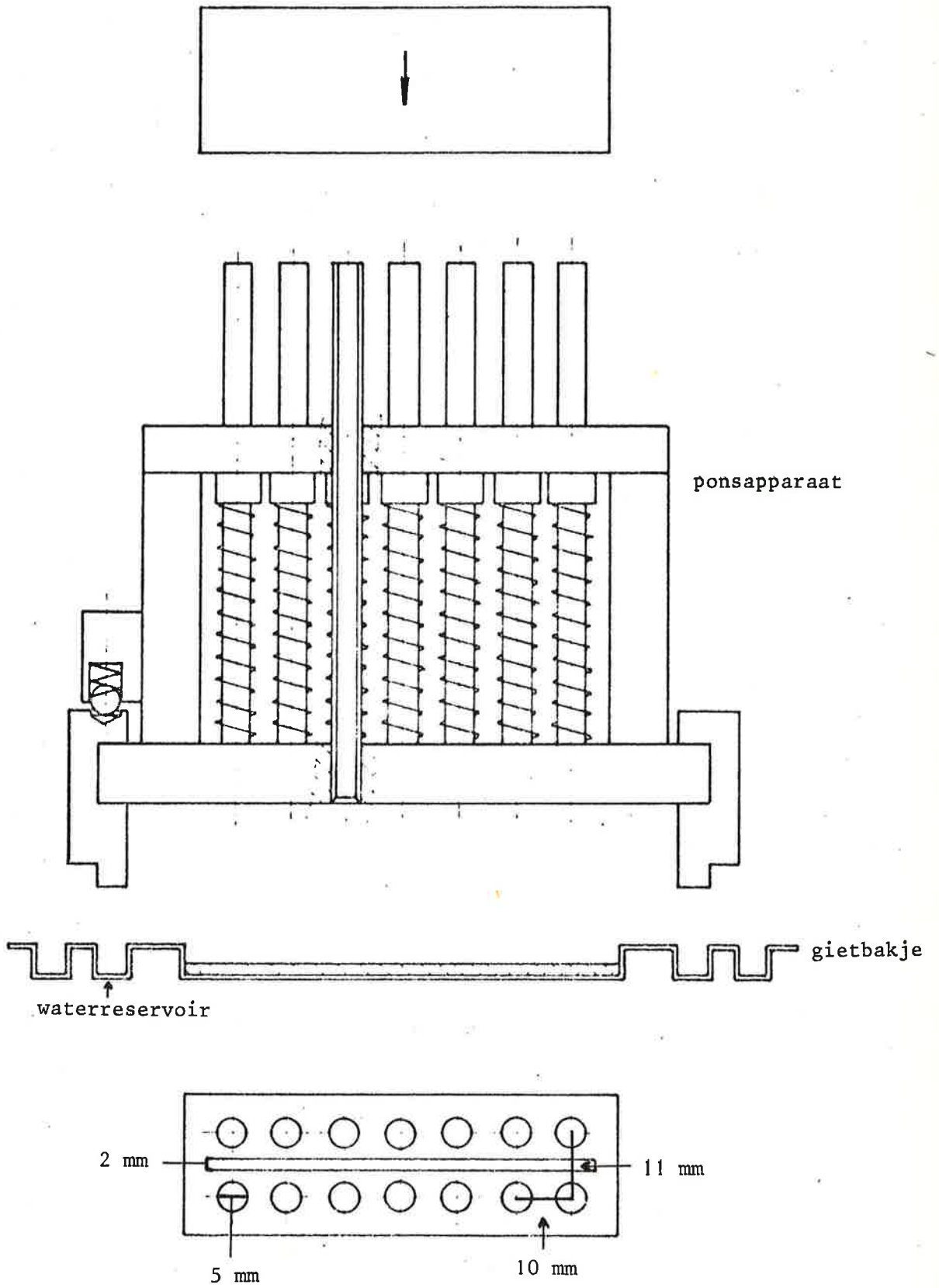
Materialen:

- Gietagar : 1% agarose (1' Industrie Biologique Francaise S.A; Brocades)  
in agarosebuffer
- Agarosebuffer : 1,21 g Tris (hydroxymethylamino methaan) (0,01 M)  
5,85 g NaCl (0,1 M)  
0,37 g EDTA-Na<sub>2</sub> (0,001 M)  
10 ml protaminesulfaat (0,01%)  
met 1 N HCl de pH naar 7,6 brengen
- Gietbakje : Het gietbakje (18,5 x 13,5 cm) is gemaakt van dun plastic, het bestaat uit vier afzonderlijke langwerpige bakjes (7,5 x 2,5 cm) rondom zijn twee goten geperst; de eerste dient als waterreservoir, de tweede als steun voor een plastic deksel.

Uitvoering:

1. 4 ml agar gieten in een plastic bakje.
2. Nadat de gel gevormd is, twee rijen gaatjes prikken met een  $\emptyset$  van 5 mm op 10 resp. 11 mm afstand; tussen de twee rijen gaatjes een gootje snijden met een doorsnede van 2 mm (zie tekening)
3. De agar uit de gaatjes en gootjes zuigen m.b.v. de waterstraalpompe.
4. De gaatjes op een horizontaalplaat vullen met de plasmamonsters; één van de gaatjes met bekend Au-antigeen, het gootje vullen met een standaard anti-Au serum.
5. Om uitdroging van de agar te voorkomen, het waterreservoir met water vullen en de deksel op het bakje plaatsen.

De bakjes kunnen na twee à drie dagen afgelezen worden afhankelijk van het verschijnen van de precipitatielijnen tussen standaardantigeen en antiserum.



OUCHTERLONY TECHNIEK (modificatie)  
 =====

Doel:

Het testen op Au-antigeen, Au-antistof en identiteit.

Materialen:

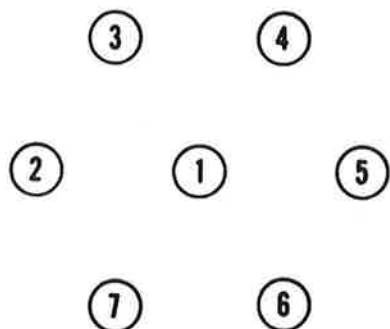
Fixeeragar	3% oplossing van agar-noble (Difco) in aq.dest.	
Gietagarose	0,9% agarose oplossing (Brocades)	
Agarosebuffer	1,21 g Tris hydroxymethylaminomethaan (0,01M) 5,85 g NaCl (0,1M) 0,37 g EDTA-Na <sub>2</sub> (0,001M) 10 ml protaminesulfaat (0,01%) pH bijstellen tot 7,6 met 1N HCl	} in 1 l. aq.dest

Kleurstof: ]  
 Ontkleurstof: ] zie immuno-elektroforese 0525/2

Uitvoering:

1. Glasplaatjes vetvrij maken met alcohol; goed droog wrijven.
2. glasplaatjes beschrijven met glasinkt; de inkt laten drogen in vlam of in stoof bij 100°C.
3. één of meerdere druppels fixeeragar (afhankelijk van de grootte van het plaatje) op het plaatje brengen en snel uitwrijven; + 15 min. laten drogen in stoof bij 100°C.
4. gietagar 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. Voor een glasplaatje van 5 x 5 cm wordt 4,5 ml gietagarose gebruikt.
5. in de agarose gaatjes ponsen met een diameter van 7 mm op 11 mm afstand van elkaar (middelpunt-middelpunt); met de waterstraal-pomp de agar uit de gaatjes zuigen.

6. de gaatjes op de horizontaalplaat met een pasteurpipet vullen volgens onderstaand schema



1 = anti-Au serum

2 en 5 = referentie Au-positief serum

3, 4, 6 en 7 = de te onderzoeken monsters.

7. glasplaatjes bij kamertemperatuur in een vochtige ruimte gedurende een nacht horizontaal laten liggen om zowel het antigeen als de antistof te laten diffunderen.
8. De plaatjes, 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.  
De plaatjes kunnen na 48 uur worden afgelezen.
9. 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 ontluichten door op die plaatsen door het papier te prikken.
10. na een nacht drogen bij  $37^{\circ}\text{C}$  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 kleurt sterker dan panceaurood.
11. 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  $100^{\circ}\text{C}$  laten drogen.

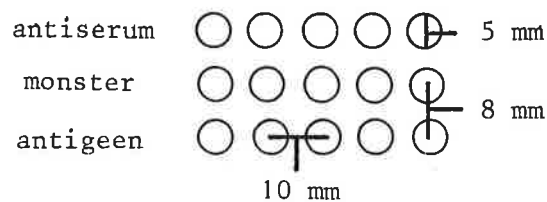


hoeveelheid agarose per plaat van:

6 x 8 cm	6,7 ml
12 x 8 cm	13,5 ml
17 x 8 cm	19 ml

(0,14 ml/cm<sup>2</sup>)

- In de agar gaatjes ponsen met een diameter van 5 mm, op resp. 8 mm en 10 mm van elkaar, (middelpunt tot middelpunt (zie tekening))  
Hiervoor wordt een prikker gebruikt met een naar binnen geslepen rand. Met de waterstraalpompe wordt de agar uit de gaatjes gezogen.
- Op horizontaalplaat de gaatjes vullen m.b.b. een pasteurpijpet volgens onderstaand schema:



- De plaatjes recht onder elkaar in de I.E. bak leggen.  
De rij gaatjes waarin het antiserum is ingebracht ligt tegen de positieve pool.  
De met I.E. veronal buffer doordrenkte contactspunzen op de plaat en de dragerspons leggen. De I.E. veronal buffer laten doorstromen.
- De stroom inschakelen en de spanning controleren.  
Deze moet op de plaat gemeten, 20 V bedragen.  
De elektroforeseduur is 30 min.
- glasplaatjes bij kamertemperatuur in een vochtige ruimte gedurende een nacht horizontaal laten liggen om zowel het antigeen als de antistof te laten diffunderen. De plaatjes kunnen eventueel reeds na 3 uur worden afgelezen, maar bij voorkeur na 24 uur.
- 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.
- 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 ontluichten door op die plaatsen door het papier te prikken.
- 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 <sup>15 min.</sup> ~~20 min.~~ in een bak met kleurstof te leggen.



13. 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.

11. Zodra het blauwgekleurde vloeistoffront nog + 1 cm van de onderkant van de buisjes af is, de stroom uitschakelen en zo snel mogelijk de gel uit het buisje halen; dit doet men onder water m.b.v. een injectiespuit met lange naald, waarvan men de punt met de schuine kant naar binnen tegen het glas drukt; steeds verder duwende spuit men water tussen gel en glaswand totdat de gel voldoende beweegt; dan al spuitende de naald voorzichtig terugtrekken en de gel met een speentje uit het buisje blazen; de gel direkt in de kleurstof zetten (deze fixeert nl. de bandjes)
12. Na + 15 min. de kleurstof terug gieten in de fles en de gels in 7% azijnzuur zetten; dit azijnzuur enkele malen verversen. Vervolgens ontkleuren in ontkleuringsbak: de bak vullen met 7% azijnzuur tot de gel juist onder ligt: de stroomsterkte is + 150 mA. tijdsduur 10 à 15 min.  
N.B. de kleurstof trekt van links naar rechts (of omgekeerd) uit de gel. De gels bewaren in 7% azijnzuur.

## HET GIETEN VAN EEN KOLOM

=====

### Doel

Het scheiden van eiwitten op lading (ionenwisselaars: DEAE en CM)  
en op "size and shape" (G serie)

### Materiaal

kolom: zie tekening

#### Sephadex:

G 200 sephadex	(Pharmacia)
DEAE sephadex A - 50	"
CM sephadex C - 50	"

Leverancier: van Oortmerssen

#### Bed Volume:

G 200	30 - 40 ml/g	dry gel
DEAE - A 50	25 - 33 ml/g	dry gel
CM - C 50	32 - 40 ml/g	dry gel

### Uitvoering

1. Sephadex gedurende een nacht laten zwellen in aq.dest (G 200 3 dagen)
2. De gezwollen sephadex in ruim volume buffer laten uitzakken en bovenstaande vloeistof afzuigen, teneinde de kleine deeltjes sephadex te verwijderen. Vervolgens buffer toevoegen en mengen met de sephadex; deze behandeling 4x herhalen.
3. Kolom schoon en vetvrij maken.
4. Filterhouders (zie tekening: no.7) monteren:
  - a) uitloopslang (polyaethyleen PT 53) lekdicht aan de filterhouder bevestigen door middel van een klein stukje silicon-slang no.SR 2H.
  - b) rond gaasje (Monodur no.236) aanbrengen, zodanig dat een horizontaal oppervlak verkregen wordt, het dekgaas (Monodur no.31) wordt strak over de filter-kop gespannen en hieraan bevestigd door middel

Loopsnelheden

Het is van belang de loopsnelheid tijdens een proef constant te houden.

Maximale loopsnelheden voor G200 bij optimale waterdrukhoogte.

G-200	Flow rate		Operating pressure cm H <sub>2</sub> O
	ml/cm <sup>2</sup> .hr	ml/min	
Kolom diameter 1.5 cm	4	0.12	5 - 20
Kolom diameter 2.5 cm	3.6	0.3	4 - 16
Kolom diameter 5 cm	3	1	3 - 12

Fig. 1

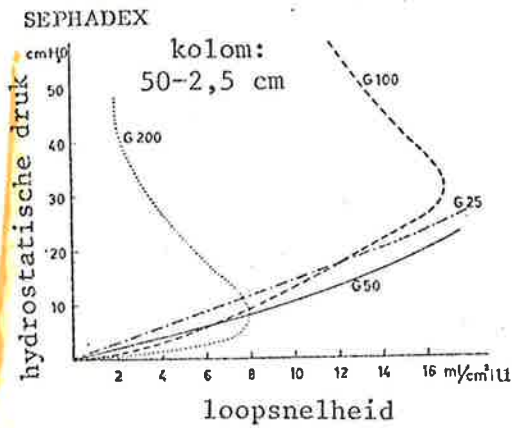


Fig. 2

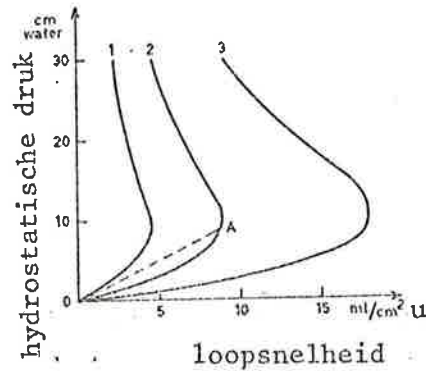


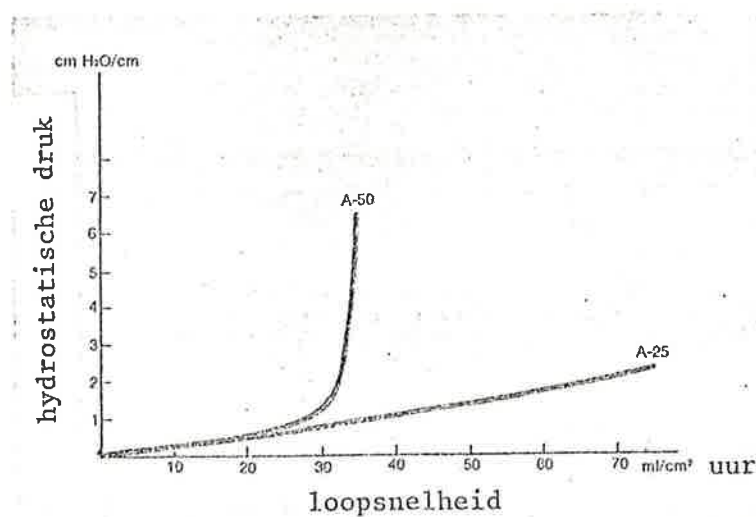
Fig.1 De relatie tussen loopsnelheid en hydrostatische druk van verschillende Sephadex soorten.

Fig.2 De relatie tussen loopsnelheid en hydrostatische druk bij Sephadex G 200 kolommen.  
Kolomdiameter: 2,5 cm;  
Kolomhoogte 1) 100 cm; (2) 50 cm; (3) 25 cm.

(M.K. Joustra, Protides of the Biol. Fluids 14, 533 ('66))

De relatie tussen loopsnelheid en hydrostatische druk /cm bij DEAE Sephadex (pH= 7, ionsterkte = 0,1).

Fig. 3



(Pharmacia - dokumentatie)

HET REGENEREREN VAN SEPHADEX

## A. DEAE sephadex A-50

- a) De sephadex suspenderen in aq.dest + 1 M NaCl. Filtreren over een glasfilter.
- b) Het neerslag suspenderen in aq.dest, en de pH naar 11 brengen met 1 N. NaOH en filtreren.
- c) Wassen met aq.dest en filtreren.
- d) Suspenderen in aq.dest en de pH naar 3 brengen met 7% azijnzuur.
- e) Wassen met aq.dest en filtreren.
- f) Suspenderen in aq.dest en de pH naar 7 à 8 brengen met 1 N NaOH
- g) Wassen met aq.dest (4x).
- h) Suspenderen in de gekozen buffer en pH bijstellen, afzuigen en nogmaals in de buffer suspenderen.

## B. CM sephadex C-50

- a) De sephadex suspenderen in aq.dest + 1 M. NaCl. Filtreren over een glasfilter.
- b) Het neerslag suspenderen in aq.dest, en de pH naar 2 brengen met 7% azijnzuur en filtreren.
- c) De nu sterk gekrompen sephadex oproeren met aq.dest en filtreren.
- d) Suspenderen in aq.dest en de pH naar 11 brengen met 1 N NaOH.
- e) Wassen met aq.dest en filtreren.
- f) Suspenderen in aq.dest en de pH naar 8 brengen met 1 N HCl.
- g) Wassen met aq.dest (4x).
- h) Suspenderen in de gekozen buffer en pH bijstellen, afzuigen en nogmaals in de buffer suspenderen.

## C. G 200 sephadex

- a) De sephadex suspenderen in aq.dest + 1 M NaCl
- b) Wassen met aq.dest (2x)
- c) Wassen met 7% azijnzuur
- d) Wassen met aq.dest
- e) Suspenderen in de gekozen buffer, pH bijstellen, afzuigen en nogmaals in de buffer suspenderen.