

# **VOORSCHRIFTEN:**

Laboratorium voor

# **IMMUNO-ENDOCRINOLOGIE**

I N H O U D

=====

0680

- 1 = Bepaling van plasma-renine-activiteit  
Vorming en isolatie van het te meten angiotensine I 3 pag.
- 2 = Meting van het geïsoleerde angiotensine I 3 pag.

VOORSCHRIFT VOOR DE BEPALING VAN PLASMA-RENINE-ACTIVITEIT  
=====

Vorming en isolatie van het te meten angiotensine I.

I. Reagentia:

- 1) diNa-EDTA (Komplexon III, Siegfried A.G., Zolingen).  
12,8 g diNa-EDTA wordt bij ca. 50°C opgelost in 100 ml aqua dest. Uit de nog lauwe oplossing worden porties van 0,10 ml in glazen centrifugebuizen (10 cm x 1,5 cm) gepipetteerd.
- 2) Dowex 50 W-X<sub>2</sub> (mesh 50-100) (Noury-Baker N.V., Deventer).  
500 g wordt achtereenvolgens gewassen met 2 liter 4 N NaOH, 1 liter aqua dest., 1 liter 2N HCl en 2 liter aqua dest. Daarna wordt de hars met zoveel 0,2 M ammoniumacetaatoplossing (pH 6.0) behandeld dat de pH van deze wasvloeistof niet meer verandert.
- 3) Ammoniumacetaatoplossing 0,2 M, pH 6.0.
- 4) Ammonia 4 N.
- 5) Ethanol 99%.

II. Plasma-incubatie

De voor de bepaling benodigde hoeveelheid plasma plus 0,5 à 1,0 ml overmaat wordt met enige druppels 1N HCl op pH 5,5 gebracht. De pH wordt gemeten met een glaselectrode. Door kort centrifugeren wordt het bij het aanzuren ontstane neerslag verwijderd. De plasma-incubatie geschiedt in Erlenmeyers van 25 ml; deze zijn van tevoren gekoeld in een ijsbad. In deze kolfjes worden achtereenvolgens 1 ml Dowex (hars met zo weinig mogelijk aanhangende vloeistof) en 2,50 ml plasma gebracht. De kolfjes worden afgesloten door rubberstopjes, omgeven door cellofaanfolie, en in een schudapparaat (badtemperatuur 37°C) gebracht. Gedurende de incubatie wordt geschud met een frequentie van 100 bewegingen per minuut; de incubatietijd is meestal 2 of 4 uur.

### III. Behandeling van de hars na incubatie

De incubatietijd wordt beëindigd door het kolfje in een ijsbad te plaatsen. Plasma en hars worden overgebracht in een gekoelde centrifugebuis (10 x 1,5 cm). Door kort centrifugeren worden harskorrels en plasma goed gescheiden. Het bovenstaande plasma wordt verwijderd met een Pasteurse pipet. De hars wordt nu 3 maal gewassen met telkens 5 ml 0,2 M ammoniumacetaat. Met de wasvloeistof wordt ook het cellofaanfolie afgespoeld en worden de in de Erlenmeyer achtergebleven harskorrels naar de centrifugebuis overgebracht. Harskorrels en wasvloeistof worden intensief met elkaar in contact gebracht door de buis snel te laten ronddraaien met behulp van een "Whirlmixer".

Na dit wassen zakken de korrels spontaan naar de bodem; centrifugeren is niet nodig. De bovenstaande vloeistof wordt verwijderd met een Pasteurse pipet. Na de behandeling met ammoniumacetaat wordt aan de hars 2 ml 4N ammonia toegevoegd. De buis wordt afgesloten en gedurende een kwartier in een waterbad van 37°C geplaatst en daarbij af en toe geschud. Na kort centrifugeren wordt de bovenstaande ammonia met een Pasteurse pipet overgebracht in een andere centrifugebuis.

Deze behandeling met ammonia geschiedt in totaal 4 maal met 2,0 ml porties. Daarna wordt aan de hars 2 ml ethanol toegevoegd; de buis wordt afgesloten en onder af en toe omschudden enige tijd op kamertemperatuur gehouden.

### IV. Verwijdering van storend eiwit uit het ammoniakaal eluaat

Het volume van de verzamelde ammoniafracties wordt door middel van een over het vloeistofoppervlak strijkende luchtstroom teruggebracht van 8 ml tot 1 ml. Hierbij staat de buis in een waterbad van 40°C. Na ca 7 uur wordt aldus het gewenste volume bereikt; nu wordt aan de buis de 2 ml alcohol toegevoegd waarmee de hars het laatst is behandeld; met nog eens 7 ml ethanol wordt het volume op 10 ml gebracht. Na goed mengen wordt de buis gedurende minstens 4 uur op 4°C gehouden.

Hierbij ontwikkelt zich een troebeling van fijne eiwitdeeltjes, die door centrifugeren worden neergeslagen. De bovenstaande vloeistof wordt overgebracht in een 2,5 cm brede buis (lengte 10 cm), die voorzien is van een geslepen hals en stop. Het eiwitprecipitaat wordt met behulp van een "Whirlmixer" goed gemengd met 2 druppels 4 N ammonia en vervolgens bedeed met nog eens 2 ml ethanol. Na menging wordt, na een half uur staan bij 4<sup>o</sup>C, opnieuw gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof wordt aan de alcoholische oplossing in de 2,5 cm brede buis toegevoegd. De alcohol wordt verwijderd door verdamping met behulp van een luchtstroom.

Het droge residu, waarin zich het gevormde angiotensine I bevindt, wordt opgelost in 6,00 ml Tris-HCl-buffer (zie 0680/2 reagens 2).

METING VAN HET GEISOLEERDE ANGIOTENSINE I  
=====

## I. Reagentia:

- 1) Gebufferde fysiologische zoutoplossing  
NaCl 0,82%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,16%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,02%,  
pH 7.4.
- 2) Tris-HCl-buffer  
0,15 M Tris (Noury-Baker, Deventer) met HCl op pH 8.0  
gebracht.
- 3) Antiserumoplossing met antistoffen tegen angiotensine I  
Antiserum, wordt verdund tot de gewenste titer met gebuf-  
ferde fys.zoutoplossing waaraan 0,25% menselijk  $\gamma$ -globuline,  
0,1% neomycinesulfaat en  $5 \times 10^{-3}$  M EDTA is toegevoegd.
- 4) Tracer-oplossing  
Gejodeerd angiotensine I, wordt zodanig verdund met gebufferd  
fysiologisch zout met daarin 0,25% albumine (runder- of men-  
selijk albumine) dat 20 à 50  $\mu$ l een telsnelheid heeft van  
ca 10.000 c.p.m.  
Deze oplossing wordt bewaard bij -20°C in porties van 3 ml.
- 5) Angiotensine I- standaard  
De standaard wordt opgelost in gebufferde NaCl oplossing  
(100 ng/50  $\mu$ l) en bewaard in porties van 2 ml bij -20°C.  
Deze stamoplossing wordt voor gebruik verder verdund met  
gebufferde zoutoplossing met 0,25% albumine tot een con-  
centratie van 5 ng/50  $\mu$ l.
- 6) Verzadigde ammoniumsulfaatoplossing  
Een bij kamertemperatuur bereide verzadigde (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
oplossing met ammonia op pH 8 gebracht, wordt enige dagen bij  
+4°C bewaard, waarna de bovenstaande vloeistof van het kristal-  
lijn neerslag wordt gescheiden.
- 7) Half verzadigde ammoniumsulfaatoplossing  
Reagens 6, 1:1 verdund met aqua dest.

## II. Algemene uitvoering van de bepaling

In een plastic "Packard" telbuis (14,5 x 1,2 cm) wordt 1,50 ml Tris-HCl-buffer gepipetteerd, waarin zich de te meten hoeveelheid A I bevindt of waaraan met een "Hamilton"-micropipet de standaardhoeveelheid A I wordt toegevoegd. Daarna wordt de traceroplossing (ca 10.000 c.p.m. in b.v. 50  $\mu$ l) en 0,50 ml antiserumoplossing toegevoegd.

Het mengsel wordt gedurende 2 uur op kamertemperatuur gehouden; in deze tijd wordt ook de toegevoegde hoeveelheid radioactiviteit (T c.p.m.) geteld, b.v. in een "Packard Auto-Gamma Spectrometer" (teltijd per buis: één minuut).

Na toevoeging van 2,0 ml verzadigde ammoniumsulfaatoplossing wordt de buis minstens 4 uur (meestal gedurende een nacht) bij +4°C weggezet. Het hierbij ontstane neerslag wordt scherp gescheiden van de bovenstaande vloeistof door centrifugeren gedurende 15 minuten bij 4°C in een gekoelde centrifuge (1600-1700 g). De vloeistof wordt verwijderd en het neerslag wordt gewassen met 5,0 ml half verzadigde ammoniumsulfaatoplossing. Na minstens een half uur staan bij 4°C wordt nogmaals gecentrifugeerd; het waswater wordt verwijderd en het precipitaat wordt opgelost in 2,0 ml gebufferde NaCl-oplossing en gedurende 2 minuten geteld (B c.p.m.).

Met de B/T- waarden van de standaardhoeveelheden wordt de ijkcurve geconstrueerd; op deze curve wordt afgelezen met welke hoeveelheden standaardangiotensine I, de B/T-waarde van iedere buis overeenkomt.

## III. Meting van de standaardhoeveelheden voor de ijklijn

Hiervoor worden 20 buizen ingezet. De initiële binding wordt in vijfvoud bepaald. Hoeveelheden van 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 en 500 ng standaard A I worden met een verdeelde 50  $\mu$ l "Hamilton"-pipet aan de buffer toegevoegd; dit gebeurt in triplo.

IV. Meting van de onbekende hoeveelheid angiotensine I

Uit de oplossing van het gevormde angiotensine I in 6,00 ml Tris-HCl-buffer (zie 0680/1 blz.3 IV) wordt 2 maal 1,50 ml in de bepaling ingezet, de rest van de oplossing wordt bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard. Indien blijkt dat zich in de 1,50 ml meer angiotensine I bevindt dan met de ijkcurve gemeten kan worden, wordt de bewaarde oplossing tot de naar schatting vereiste concentratie verdund met Tris-HCl-buffer. Uit de aldus verkregen oplossing wordt weer 2 maal 1,50 ml ingezet. Indien de hoeveelheden angiotensine in deze verdunning wel goed meetbaar zijn, wordt nogmaals 2 maal 1,50 ml ingezet, anders wordt opnieuw verdund. Voor ieder geïncubeerd plasmamonster worden aldus 4 metingen verricht, welke goed afleesbaar zijn op de ijkcurve. De door ons gebruikte ijkcurve heeft een meetgebied van 0,20 tot 5,0 ng; met een dergelijke curve is meestal genoemde verdunning niet noodzakelijk.