

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

IMMUNO-CHEMIE

1 =	De pentosefosfaatshunt activiteit van menselijke rode bloedcellen	3 pag.
2 =	Bepaling van acetylcholine esterase in serum m.b.v. een titrator	
3 =	Het maken van leucocyten suspensie (humaan)	
4 =	C.Dubbeldiffusie methode vlgs Ouchterlony	
5 =	Immuno-electroforese "Micro-methode"	2 pag.
6 =	Bereiding haptoglobine (Hp) uit humaan serum met een verhoogde concentratie haptoglobine type 1-1 (Hp \uparrow 1-1)	
7 =	Bereiding IgM uit humaan serum met IgM paraproteïne	
8 =	Agar elektroforese van serumeiwitten	2 pag.
9 =	Eiwitbepaling met colorimetrische methoden	
10 =	Bereiding Humaan IgG (Batch methode)	
11 =	Bereiding muis IgA uit muis IgA myeloomserum	
12 =	Isolatie muis IgM uit IgM muis myeloomserum alleen voor immunisatie doeleinden	
13 =	Isolatie cavia snel Ig ($\gamma_1 + \gamma_{1A}$)	2 pag.
14 =	Isolatie muis IgG uit normaal muizeserum	
15 =	Polyacrylamide gel elektroforese	3 pag.
16 =	Isolatie humaan IgG uit totaal huumaanserum	2 pag.
17 =	Immunoradioelektroforese of autoradiogram	
18 =	Bereiding cavia fibrinogeen	
19 =	Bereiding humaan F _{ab} en F _c uit een zuivere pool humaan IgG	
20 =	Colorimetrische suikerbepaling vlgs Elson-Morgan	
21 =	Colorimetrische suikerbepaling met Indolreagens	
22 =	Het aantonen van huidreactieve antistoffen d.m.v. de Passieve Cutane Anafylaxie (PCA)- en/of de Prausnitz-Küstner (P.K.) reactie	2 pag.
23 =	Histamine bepaling volgens de methode van Shore etc.	2 pag.
24 =	Bereiding muis fibrinogeen	
25 =	Isolatie cavia langzaam IgG (γ_2)	
26 =	Isolatie paarde IgG uit totaal paardeserum	
27 =	Voorschrift voor de isolering van L-keten uit humaan γ -globuline	
28 =	Voorschrift voor de isolering van H-keten uit humaan γ -globuline	
29 =	Antistofbepaling met quantitative precipitatie test	2 pag.
30 =	Potentiometrische titratie	5 pag.
31 =	Conway microdiffusie techniek	5 pag.

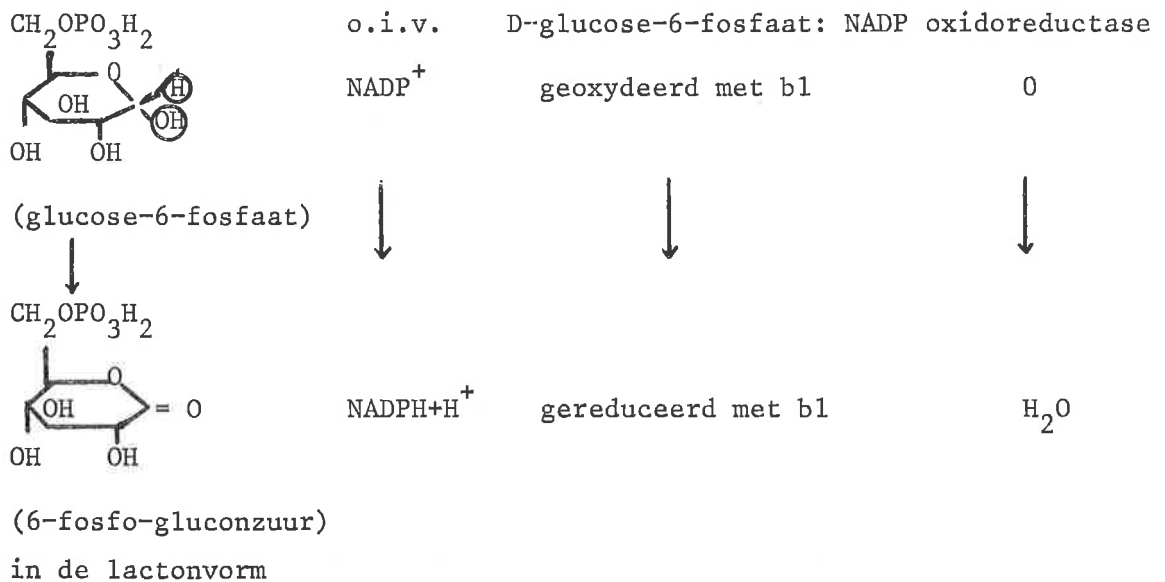
32 =	Bepaling van het complement gehalte in patientesera	11 pag.
33 =	C5 activiteitsbepaling met R5 (Mas/A muizeserum)	
34 =	Bereiding konijne IgG	
35 =	De bepaling van immuunadherentie	2 pag.
36 =	Bereiding van Fab en Fc fragmenten uit een zuivere pool normaal humaan IgG	2 pag.
37 =	Bereiding van Fab en Fc fragmenten uit zuiver myeloom humaan IgG	2 pag.
38 =	C1-esterase remmer bepaling in patientesera	6 pag.
39 =	Isolatie van paraproteïne IgA uit patienteserum	3 pag.
40 =	Batchgewijze zuivering van humaan IgG uit een immunoglobuline fraktie	

DE PENTOSEFOSFAATSHUNT ACTIVITEIT VAN MENSELIJKE RODE BLOEDCELLEN

Literatuur: Proefschrift Dr J.A. Loos pag. 21 e.v.

Principe

Het is reeds lang bekend (Warburg c.s. 1931, Biochem.Z., 242 pag. 206), dat in menselijke erythrocyten een systeem aanwezig is dat de oxydatie van glucose-6-fosfaat met behulp van NADPH_2 en methyleenblauw versnelt. De eerste stap van deze afbraak verloopt schematisch als volgt:



Na verbreking van de lactonvorm van het 6-fosfogluconzuur vindt een tweede oxydatie plaats, waarbij 6-fosfogluconzuur geoxydeerd en gedecarboxyleerd wordt tot ribulose-5-fosfaat m.b.v. NADP^+ en 6-fosfo-D-gluconaat: NADP oxidoreductase.

Ook hierbij wordt het gevormde $\text{NADPH} + \text{H}^+$ weer geoxydeerd m.b.v. met bl. (zie voor het verdere verloop van de pentoseafbraak Lit.1).

(Zonder methyleenblauw vertonen de rode cellen zeer weinig O_2 -opname).

Er zijn 2 erfelijk voorkomende afwijkingen in menselijke erythrocyten, waarbij D-glucose-6-fosfaat: NADP oxidoreductase of 6-fosfo-D-gluconaat: NADP oxidoreductase afwezig (deficiënt) zijn in verschillende mate (0-50%)
De maximale capaciteit van het pentosefosfaatshuntsysteem, getest door de meting van de O_2 -opname (in aanwezigheid van methyleenblauw) van erythrocyten suspensies, is in deze afwijkende celsoorten sterk verminderd.

Vorbereidingen

1. Zet waterbad klaar op $37^{\circ}C$
2. Slijpstukken invetten van

1)	zijkraan-vaatjes
2)	manometers
3. Hoofdkraan-slijpstuk op gasdichtheid controleren laat de kraan open!
4. Manometer vloeistof op luchtbelllen controleren
5. Zet zijkraan op vaatjes, borgen met elastiekjes laat de kraan open!
6. Zet vaatjes aan manometers, borgen met veertje
Noteer gasvolumina vaatjes en bijbehorende manometers!
7. Zet manometers in bad, 10 minuten schudden met open kranen
8. Kiep inhoud zijvat in hoofdvat
9. 15 minuten schudden
10. Rechterbeen manometervloeistof op 15 cm instellen,
daarna kranen dicht (zijkraanvaatjes dus ook!)
manometer aflezen, stopwatch indrukken
voorbeeld 1499 1500
11. Om de 2 minuten aflezen - tijd en stand noteren (telkens rechterbeen op 15 instellen)
12. Aflezangen corrigeren voor TB
13. Vermenigvuldigen met vaatconstante
14. Waarnemingen uitzetten tegen tijd
uit de telling van de rechte μl O_2 -opname/ml cellen/uur berekenen
n.w. = $24 g \pm 22.4 \mu l/ml$ cellen/uur

Reagentia

a) Krebs Ringer fosfaat pH = 7.4 (vers bereiden!)

deze oplossing wordt gemaakt uit geconcentreerde basisoplossingen

10.0 ml	9	% NaCl	(1.54 M)
0.4 "	11.5	% KCl	(1.54 M)
0.3 "	12.2	% CaCl ₂	(0.11 M)
0.1 "	38.2	% MgSO ₄ · 7H ₂ O	(0.154 M)
97.2 "		H ₂ O	
20.0 "	0.1	M fosfaatbuffer pH = 7.4	

17.8 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	} aanvullen tot 1 liter
20' ml 1N HCl	

De pH van de Ringer wordt gecontroleerd en eventueel bijgesteld met (NaOH) loog of zuur (HCl) (t=37°C)

b) 17.5 mg metyleenblauw	}	oplossen in t=37°C
125.0 " adenosine		25 ml Ringer verwarmen tot 60-80°C
316.0 " glucose		toegestaan 20 min. lang perslucht doorleiden

c) vers citraat bloed (een buis voldoende)

10 ml afnemen in 1.9 ml citraat (2.3 g % glucose, 2.7 g % dinatrium-citraat anh.)

Het bloed wordt gecentrifugeerd (5 min. 2000 g, KT), het plasma verwijderd en daarbij de witte cellen, daarna de rode cellen, 3 x wassen met 0.9 % NaCl.

Bij de laatste maal afdraaien 10 minuten draaien (2000 g) en scherp afzuigen.

d) Cel suspensie: 2.4 ml cellen	}	door whirlmixen mengen, 20 min. lucht doorleiden
3.6 " Ringer		

e) 10 % KOH

Pipetteerschema:

Vaatje:	I	II	t.b.
Hoofdvat: celsuspensie	2	2	-
Ringer	-	-	2
Zijvat: m bl	0.4	0.4	-
Ringer	-	-	0.4
Centrale vat: 10% KOH	0.15	0.15	0.15
+ waaiertje (muizetrappetje)			

BEPALING VAN ACETYLCHOLINE ESTERASE IN SERUM M.B.V. EEN TITRATOR
=====Reagentia

1. 1/15M fosfaatbuffer pH 7,36 bij 38°C
2. 0,9 % NaCl, met een pH van 7,4
3. Acetylcholine chloride (BDH)
Deze oplossing bevat 100mg/ml aq.dest. Het geheel wordt op pH 7,4 gebracht om een te grote pH verandering na het toevoegen aan de oplossing tegen te gaan. (Te bewaren bij +4°C)
4. 0,02n NaOH (carbonaatvrij)
5. stikstof cilinder

Uitvoering

Plaats de bufferoplossing in het gethermostateerde reactievat onder stikstof en ijk de radiometer op pH 7,36. Pipetteer hierna 10 ml 0,9% NaCl in het vat en laat dit gedurende enige tijd op temperatuur komen. Hierna wordt 0,5 ml serum toegevoegd. De spuit die een volume heeft van 5 ml moet aan het begin van de bepaling geheel gevuld zijn, omdat bij een hoge enzym-activiteit de mogelijkheid bestaat, dat halverwege de spuit leeg is. Voeg hierna 2 ml acetylcholine oplossing toe en stel de titrator in op de juiste stand.

Berekening

De omgezette hoeveelheid acetylcholine wordt uitgedrukt in $\mu\text{Mol/ml}$ serum/ minuut.

- a - volume spuit.
- b - percentage van de totale inhoud
- c - aantal minuten die de bepaling gelopen heeft
- d - $a \cdot b \cdot \frac{1}{c} \cdot d = \mu\text{Mol/ml}$ serum/minuut

HET MAKEN VAN LEUCOCYTEN SUSPENSIE (HUMAAN)

=====

Het bloed moet afgenomen worden in haeparine (heel kleine hoeveelheid per buis - 10 ml bloed) en daarna goed schudden.

De buizen onder een hoek van 45° drie kwartier laten staan.

Inhoud buizen:

- a. haeparine
- b. + 10 ml bloed
- c. 2,5 ml 5% dextraan, dit vergemakkelijkt het uitzakken van het bloed.

Na drie kwartier 10 min. afdraaien op 1000 rpm.

Giet het bovenstaande plasma af.

Was het neerslag tweemaal met 3 ml hypotone albumine-zout oplossing, zodat de erythrocyten haemolyseren.

Afdraaien 4 min. op 1000 rpm.

Daarna 1x wassen met isotone veronalbuffer op fys. zout;

dan de leucocyten suspenderen in veronalbuffer of fys. zout.

C. DUBBELDIFFUSIE METHODE VOLGENS OUCHTERLONY

=====

Principe

Het te bestuderen antigeen mengsel of antiserum laten diffunderen tegen respectievelijk antisera of antigenen.

Bij vorming van antigeen-antistof complexen ontstaan precipitatielijnen.

Techniek

Vetvrije plaatjes (indien beschreven met inkt, gloeien) fixeren met 3% agaroplossing en drogen in de stoof (zie I.E. techniek).

Plaatjes gieten met 1,3% agar en wel $\pm 0,20 \text{ ml/cm}^2$ glasplaatjes.

Net als bij de I.E. de agar oplossen in veronalbuffer (140 ml) en aq.dest (60 ml), als men uitgaat van 200 ml.

De plaatjes ponsen met een grote boor met middellijn 7 mm of aan de hand van een voorbeeld waarop de afstand van het middelpunt van het middelste gaatje tot het middelpunt van de omringende gaatjes 12 mm bedraagt.

Om te voorkomen dat het antigeen of het antiserum tussen glas en agarlaag loopt, moeten de gaatjes worden opgevuld met een druppeltje 1,3% agaroplossing.

Gaatjes vullen met de antisera en het antigeen of de antigenen en het antiserum en minstens 24 uur laten diffunderen.

Volgende dag de plaatjes in gebufferd fysiologisch zout leggen en drie dagen hierin laten staan.

De zoutoplossing moet wel elke dag verversst worden.

Na deze drie dagen de plaatjes drogen, kleuren en ontkleuren (zie I.E.techn.).

IMMUNO-ELECTROFORESE "MICRO-METHODE"
=====Principe

Het antigeenmengsel wordt aan elektrische scheiding in agar onderworpen. Evenzijdig aan de elektrische bewegingsas wordt het precipiterende antiserum in een gootje aangebracht. Antiserum en antigeen diffunderen in de agar. Als specifieke componenten elkaar in de juiste verhouding ontmoeten worden gebogen precipitatielijnen zichtbaar.

Techniek

De vetvrije * glaasjes schrijven en gloeien, daarna fixeren met 3% agar (fixeeragar opgelost in aq.dest) en \pm 15 minuten drogen in een 100°C stoof. Dan kunnen ze gegoten worden met 1,3% agar, die opgelost wordt in drie delen aqua dest en 7 delen veronalbuffer* in een kokend waterbad (0,19 ml agar/cm² glas)

Gaatjes en gootjes ponsen met een ponsapparaat of aan de hand van een voorbeeld.

De grootte van de gaatjes wordt gekozen afhankelijk van de concentratie van het antigeen mengsel. De gaatjes worden uitgezogen met behulp van een waterstraalluchtpomp, gevuld met antigeen mengsel en in de electroforese bak gelegd, zodanig, dat de ene kant van het plaatje met de positieve en de andere kant met de negatieve pool van het spanningsapparaat verbonden is.

Er wordt contact gemaakt met bijna gestolde 1,3% agar tussen de agar van de bak en de plaatjes. Stroom inschakelen, het voltage over de plaatjes op 60 volt brengen en 50 minuten electroforeren.

Gedurende electroforese loopt er een constante stroom van veronalbuffer door de electroforese bak. Na afloop wordt de agar uit het gootje verwijderd en wordt deze gevuld met het anti-serum.

Plaatjes gedurende één nacht bij kamertemperatuur laten diffunderen in een bak waarin zich wat water bevindt, afgedekt met een glasplaat.

Eind volgende dag de plaatjes in gebufferd NaCl oplossing 0,9% leggen en de bak bij 16°C plaatsen. Volgende 2 dagen NaCl verversen door eerst de plaatjes met aqua dest af te spoelen en ze dan voorzichtig in een bak met

verse NaCl te leggen. Na deze 3 dagen spoelen, de plaatjes uit het zout halen en gaatjes en gootjes goed met aqua dest uitspoelen. Op elk glaasje een stukje "Whatman Nr 20" filtreerpapier leggen met de ruwe kant op de agar (na het drogen laat het zo beter los).

Gaatjes en gootjes doorprikken. In 37°C stoof leggen en één nacht laten drogen. Na drogen filtreerpapier verwijderen, plaatjes afspoelen onder de kraan en dan met amido-zwart*kleuren.

Voor plaatjes waarop het gehele eiwitspectrum is te zien, is het raadzaam met panceaurood te kleuren. Ongeveer één uur de plaatjes in de kleurstof laten staan. Dan de plaatjes ontkleuren*

Na ontkleuren worden de glaasjes weer goed onder de kraan afgespoeld.

Na gespoeld met aqua dest en gedroogd in een 100°C stoof.

* Maken van vetvrije glaasjes

De glaasjes worden in bichromaat gelegd en hierin ongeveer een week bewaard. Dan worden ze één dag gespoeld met water en vervolgens in 96% alcohol bewaard.

Na zo'n week worden de glaasjes gedroogd en in cellofaan bewaard.

* Veronal buffer

41,6 g Na-Veronal (Na-Barbitalum) + 7,36 g Veronal (Barbitalum) verwarmen tot dat het mengsel is opgelost; dan aanvullen tot 4 liter met aqua dest.

pH controleren, mag variëren van 8,2 - 8,6

* Bereiding kleurstof

De kleurstof 1 g amidozwart of panceaurood wordt opgelost in een mengsel van 900 ml aqua dest

6,12	g	Natrium-acetaat	3H ₂ O
100	ml	glycerine	
2,6	ml	ijsazijn	

* Ontkleuringsvloeistof

100 ml ijsazijn

500 ml glycerine

aanvullen met aqua dest tot 5 liter.

BEREIDING IgM UIT HUMAAN SERUM MET IgM PARAPROTEÏNE
=====

"Euglobuline" preparaat maken door het serum 1:10 te verdunnen met aqua dest bij 0°-4°C.

Na + 2 uur bij 0°-4°C centrifugeren in een gekoelde centrifuge.

Precipitaat oplossen in NaCl 0,9% en aanvullen tot het oorspronkelijke volume.

Weer 1:10 verdunnen met aqua dest bij 0°-4°C. Na + 2 uur centrifugeren in gekoelde centrifuge.

Aqua dest precipitatie nog 1x herhalen.

Gelfiltratie van het opgeloste precipitaat over Sephadex G150; elueren met trisbuffer 0,05 M pH 8 + 1M NaCl.

Pieken concentreren en dialyseren tegen NaCl 0,9%.

Controle d.m.v. electroforese.

BEREIDING HAPTOGLOBINE (Hp) UIT HUMAAN SERUM MET EEN VERHOOGDE
CONCENTRATIE HAPTOGLOBINE TYPE 1-1 (Hp \uparrow 1-1)

=====

Hp \uparrow 1-1 serum 1:2 verdunnen met gebufferd NaCl 0,9% en met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing tot 45% verzadigen.

Na \pm 2 uur bij 0°C centrifugeren in gekoelde centrifuge (10 min. 10.000 rpm)
Supernatant met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing verhogen tot 55% verzadiging. Na \pm 2 uur
bij 0°C opnieuw centrifugeren en precipitaat oplossen in NaCl 0,9%.

Dialyseren tegen acetaatbuffer 0,03M pH 5.

Chromatografie over DEAE Sephadex A50 kolom; elueren met acetaatbuffers
pH 5 met concentratiëgradiënt.

(0,03M, 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M)

Pieken concentreren en dialyseren tegen gebufferd NaCl 0,9%.

Controle van de fracties d.m.v. immunolectroforese.

Als er nog α_2 -macro aanwezig is in haptoglobinefractie, dan α_2 M door gel-
filtratie over Sephadex G150 verwijderen; elueren met trisbuffer 0,05M pH 8
+ 1M NaCl.

Pieken concentreren en dialyseren tegen gebufferd NaCl 0,9%.

Controle d.m.v. immunolectroforese.

AGAR ELEKTROFORESE VAN SERUMEIWITTEN

Preparatieve elektroforese in agar

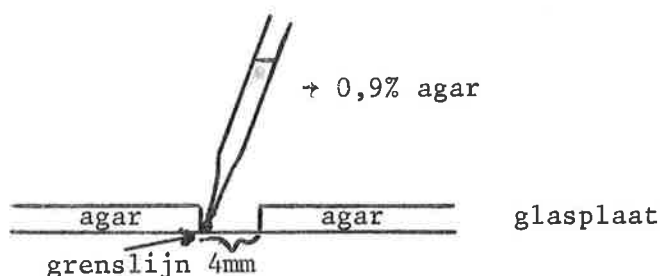
Principe

Evenals bij de IE wordt het antigeen mengsel aan elektrische scheiding in agar onderworpen.

Door een strookje agar aan de rand van de plaat loodrecht op de elektroforetische bewegingsas te fixeren met ijszijn worden de verschillende eiwitten, die het mengsel bevat, als witte bandjes zichtbaar in de agar, zodat de plaats van het gewenste antigeen bekend is.

Techniek

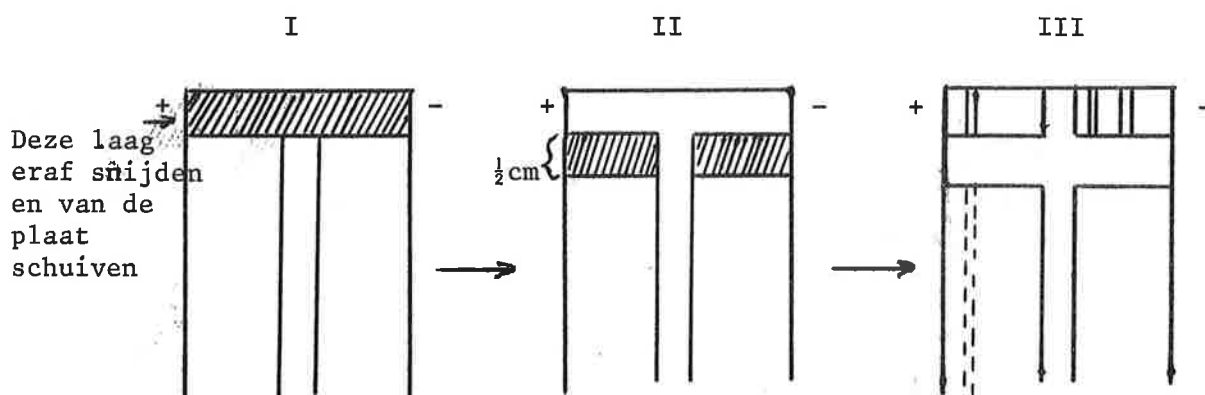
De plaat schrijven, gloeien, fixeren en laten drogen in stoof (zie IE). Dan de plaat gieten met 0,9% agar die homogeen is gemaakt door het mengsel te verhitten in een waterbad van 100°C (agar is opgelost in 2 delen veronalbuffer en 1 deel aq.dest). In het midden van de plaat aan de hand van een voorbeeld een goot (4 mm breed) overlans uitsnijden en de grenslijn van agar en de glasplaat opvullen met 0,9% agar.



De plaat in de IE bak leggen en 60 minuten laten lopen (zie IE: spanning is 60 volt).

Na de elektroforese een agarstrookje aan het eind van de plaat en loodrecht op de goot afsnijden en van de plaat schuiven (zie tekening I).

Vervolgens een strookje agar van ongeveer een halve centimeter afsnijden en opschuiven naar de rand van de plaat (zie tekening II) en dit strookje fixeren met ijsazijn 1:2 verdund, waardoor de eiwitten zichtbaar worden. Naar behoefte kunnen nu de eiwitten in de agar en evenwijdig aan de goot uitgesneden worden.



Het uitgestreken agarstrookje wordt in een buis gedaan, ingevroren bij -20°C en na één nacht weer ontdooid, waarna de bovenstaande vloeistof wordt afgepipetteerd.

EIWITBEPALING MET COLORIMETRISCHE METHODEN*

=====

1. Folin-Ciocalten nieuwe methode (5-35 μ gN) (0,03-0,22 mg eiwit)
- | | | |
|--|---|---|
| 2 ml eiwitoplossing | } | schudden en gedurende 1 uur
bij KT laten staan |
| 6 ml 12.5% Na ₂ CO ₃ | | |
| 1 ml 0,1% CuSO ₄ .5H ₂ O | | |
- Na 1 uur 1 ml Folin reagens** 1:3 verdund met aq.dest al roerend toevoegen.
- Na 20-30 minuten bij KT O.D meten bij 750 m μ
- blanco: 2 ml geb. NaCl 0,9 i.p.v. eiwitoplossing

* Kabat and Mayer. 1961 Second edition, blz. 556-558.

** Folin reagens (Na₂WO₄ = NaMoO₄ in H₃PO₄ en HCl) commercieel Fisher Sc.Co.

2. Biureet (20-400 μ gN) (0,125 - 2,5 mg eiwit)*
- | | | | |
|----------------|--|---|---------------------------------|
| <u>Reagens</u> | 0,9 g Na-k-tartraat | } | oplossen in 100 ml
0,2n NaOH |
| | 0,3 g CuSO ₄ .5H ₂ O | | |
| | 0,5 g KJ | | |
- Bepaling 1 ml eiwitoplossing + 1,5 ml Biureet reagens
gedurende 30 minuten bij 37°C incuberen.
Daarna O.D meten bij 555 m μ
- blanco: 1 ml geb. NaCl 0,9 i.p.v. eiwitoplossing.

* Kabat and Mayer. 1961 Estimation of protein with the Biureet and Ninhydrin reactions 559-561.

BEREIDING HUMAAN IgG (Batch methode)

=====

Uitgaande van Cohn fractie II (Productie Biochemisch Laboratorium van het Centraal Lab. v.d. Bloedtransfusiedienst).

Ongeveer 200 ml uitgezakte DEAE Sephadex A50 in fosfaatbuffer 0,01 M pH 6,8 afzuigen met Büchnertrechter en waterstraalpompe.

Bij de afgezogen Sephadex 100 ml 4% onzuiver IgG.

Na + 1/2 uur opnieuw afzuigen en de Sephadex wassen met 100 ml fosfaatbuffer 0,01 M pH 6,8.

IgG oplossing en wasvloeistof dialyseren tegen aqua dest en vriesdrogen.

Controle d.m.v. immunoelectroforese.

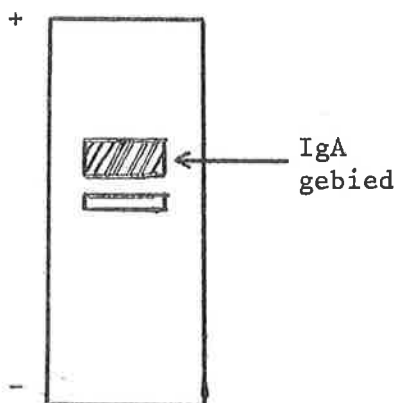
BEREIDING MUIS IgA UIT MUIS MYELOOMSERUM
 =====

1. 45% verzadigd ammoniumsulfaatprecipitatie bij 0°C
 2 uur laten staan bij 0°C.
 Afdraaien 15 min. 10.000 rpm. in een gekoelde centrifuge.
 Het precipitaat 1x wassen met 45% verzadigd ammoniumsulfaat.
 Na afdraaien het precipitaat oplossen in trisfosfaatbuffer
 pH 8.4 - 8.6: $\left\{ \begin{array}{l} 0.035 \text{ M tris-2-amino-2 hydroxymethyl propaan} \\ 0.005 \text{ M H}_3\text{PO}_4 \end{array} \right.$
 Hierna de oplossing dialyseren één nacht tegen een honderd-
 voudige volume trisfosfaatbuffer pH 8.4 - 8.6.

2. Elutie over G-200 Sephadex kolom in trisfosfaatbuffer pH 8.4 - 8.6
 De frakties van de eerste eiwitpiek controleren in agarelektro-
 forese (IE).
 De frakties met IgA combineren en concentreren.

3. Preparatieve agar elektroforese Deze is beschreven onder isolatie
 snel cavia IgG.
 De geconcentreerde combinatie wordt in de gootjes gebracht
 na elektroforeren, aan de hand van het referentieplaatje, het IgA
 gebied uitsnijden.

Wanneer het IgA dient voor immunisatie wordt de agar gepotterd en
 zo gecontroleerd in I.E. en Ouchterlony.



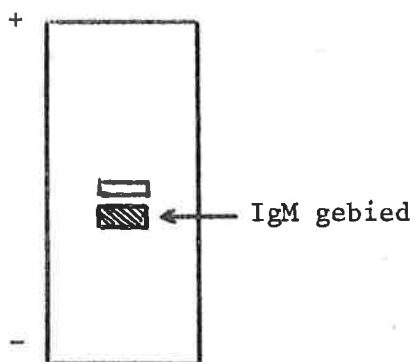
ISOLATIE MUIS IgM UIT IgM MUIS MYELOOMSERUM ALLEEN VOOR
IMMUNISATIE DOELEINDEN

Het IgM wordt geïsoleerd d.m.v. agar elektroforese; dit is beschreven onder isolatie van snel cavia IgG.

Het myeloomserum wordt in de gootjes gebracht en geëlektroforeerd 50 min. - 60 volt.

Na elektroforese is in de gootjes nog verdund serum aanwezig, dit wordt opgepipetteerd en bewaard.

Het IgM gebied wordt uit de platen gesneden aan de hand van het referentieplaatje.



Deze agarsuspensie en het verdunde serum uit de gootjes worden opnieuw geëlektroforeerd zoals boven beschreven.

Na de tweede elektroforese wordt de agarsuspensie gecontroleerd in I.E; beoordeling na kleuring.

Wanneer het IgM niet zuiver is, opnieuw in elektroforese. Na zuiverheidstoets kan de agarsuspensie met het IgM als zodanig ingespoten worden.

Het is niet mogelijk het IgM uit de agar te elueren.

ISOLATIE CAVIA SNEL Ig ($\gamma_1 + \gamma_{1A}$)

vlgs Y. Yagi, J. Immunology 89, 442 (1962)

Zie voor prepareren Kodak DEAE cellulose, No. 7392 en de gebruikte buffer het voorschrift voor de isolatie van langzaam cavia IgG (γ_2).

Scheiding

Na de eerste piek wordt de continue gradiënt ingezet met gradiëntbuffer: 0.50 M Tris en 0.59 M H_3PO_4 ; pH = 4.0.

De frakties van de tweede piek worden in I.E. gezet en zo gecontroleerd op aanwezigheid van snel IgG. De frakties met snel IgG worden verzameld en sterk geconcentreerd, daarna de combinatie dialyseren tegen gebufferd phys. zout (één nacht tegen een hondervoudige volume).

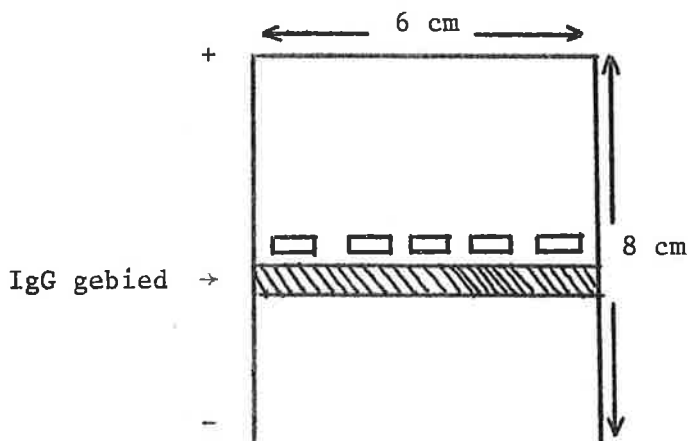
Hierna wordt met deze combinatie agarelektroforese uitgevoerd.

Agarelektroforese

Gebruikte agar 0.9%: 1.215 g agar noble special opgelost in 90 ml veronal buffer 0.05 M pH = 8.2 - 8.6 en 45 ml aq.dest.

Een aantal platen wordt met deze agar gegoten (platen 6 bij 8 cm; 10 ml agar per plaat). Na stollen worden de platen in een afgesloten bak ongeveer een half uur bij 16°C gezet om de agar hard te laten worden.

In het midden worden reepjes uitgesneden en opgevuld met heel weinig agar, zodat het monster niet onder de agar door kan diffunderen.



De gootjes worden gevuld met de geconcentreerde combinatie.
De platen 50 min. elektroforeren bij 60 volt.

Als referentie voorbeeld wordt een klein I.E. plaatje meegenomen, dat na het lopen in 4% azijnzuur wordt gelegd.

Hierdoor worden de eiwitten neergeslagen. Het IgG gebied op de grote platen wordt aan de hand van dit plaatje uitgesneden. (zie tekening)

De agar, met het IgG gebied, wordt ingevroren en daarna ontdooid.

De bovenstaande vloeistof afpipetteren. Dit nog 1x herhalen.

Na concentreren wordt het monster gecontroleerd in I.E. en Oucherlony.

ISOLATIE MUIS IgG UIT NORMAAL MUIZESERUM

Scheiding normaal muizenserum

Scheiding over een Kodak cellulose (no. 7392) kolom met het Yagi buffersysteem.

Zie voor prepareren cellulose en gebruikte buffers het voorschrift voor isolatie van langzaam cavia IgG.

Het normaal muizenserum vooraf één nacht dialyseren tegen trisfosfaatbuffer pH = 8.4 - 8.6 (eventueel ontstaan neerslag wordt verwijderd). Het gedialiseerde serum op de kolom brengen en laten intrekken, de kolom naspoelen met trisfosfaatbuffer pH = 8.4 - 8.6, deze hoeveelheid buffer ook laten intrekken.

Hierna direct de continue gradiënt inzetten met trisfosfaatbuffer pH 4.0 als gradiëntbuffer (gradiënt 350 ml startbuffer, gradiëntbuffer druppelsgewijze bijmengen). De eerste eiwitpiek verzamelen en concentreren.

Scheiding met polyacrylamide gel elektroforese (pH 7.9)

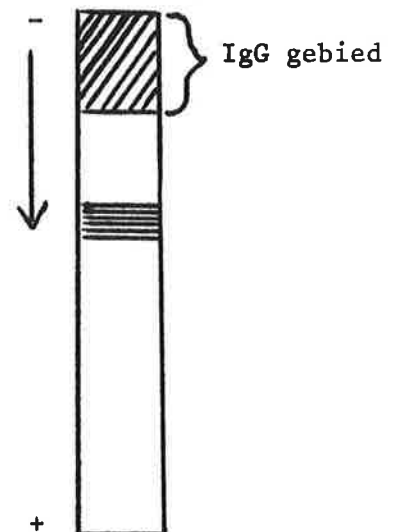
Voor de bereiding en uitvoering van de elektroforese, zie voorschrift polyacrylamide gel elektroforese.

De geconcentreerde eerste piek wordt geëlektroforeerd. Eén gelpijpje wordt gekleurd. Het muize-IgG loopt slechts weinig in de gel; blijft aan het begin van de gel. De andere gelpijpjes worden aan de hand van dit voorbeeld gesneden met een scheermesje.

Het IgG gebied wordt in stukjes gesneden en in een kleine hoeveelheid phys.zout geëluëerd. Dit wordt tweemaal herhaald. De gecombineerde (van 3 x elueren met phys.zout)

elutievloeistof wordt geconcentreerd en gedialiseerd tegen een honderdvoudige volume phys.zout.

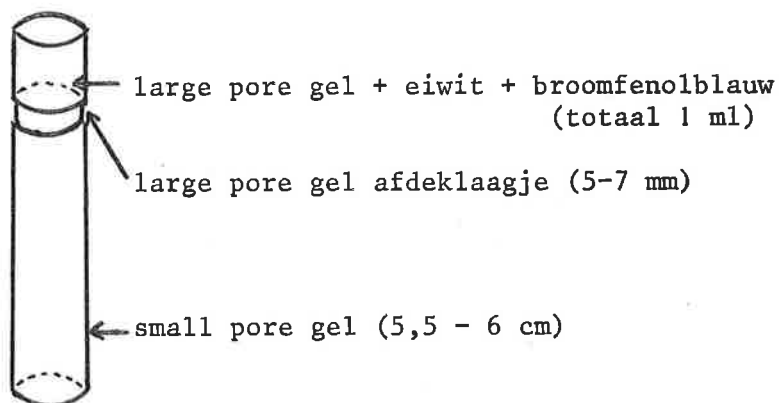
Zuiverheidscontrole van het IgG in een Ouchterlony exp. tegen anti-totaal muizenserum.



POLYACRYLAMIDE GEL ELEKTROFORESE

=====

Samenstelling en bouw elektroforesebuis, lengte 9,5 cm, doorsnede 8 mm.



Voorschrift voor het maken van de buisjes

1. De holle buisjes worden onderin met rubber stopjes afgesloten.
2. De buisjes worden op gelijke hoogte gevuld met small pore gel (l.=6 cm). De gel laten stollen - stollingstijd 10 - 20 min.
3. Na het stollen het bovenstaand water met een tissue wegnemen.
4. Afdeklaagje opbrengen en laten stollen onder ultravioletbestraling (zonlicht of lichtbak met speciale buizen).
5. Na het stollen het water weer wegnemen.
6. De eiwit/large pore gel oplossing opbrengen en ook laten stollen onder ultravioletbestraling.

De buisjes in buffer elektroforeren 7 à 8 m ampère per buis, totdat het blauwe kleurstoffrontje beneden is. De gel uit de buisjes halen door water uit een injectiespuit tussen de wand en de gel te spuiten.

Een half uur kleuren in amidozwart (zoals I.E. kleuring), daarna ontkleuren in 7% azijnzuur.

De gel moet minstens een uur in de azijnzuur staan, alvorens elektrisch kan worden ontkleurd.

Small pore gel

Voor een opsplitsing in het IgG gebied wordt small pore gel met pH= 7.9 gebruikt.

Voor een opsplitsing in het alpha-gebied wordt small pore gel met pH= 8.9 gebruikt.

Samenstelling: 1 deel oplossing A, pH = 7.9 of pH = 8.9
 1,5 " " C
 0,5 " " D
 5 " aqua dest +
 1 mg ammonium persulfaat per ml oplossing goed oplossen,
 + 3.5 ml small pore gel per buis.

Large pore gel

Samenstelling: 1 deel oplossing B
 1 " " D
 0.8 " " C
 1.5 " " E
 4 " aqua dest

Voor het afdeklaagje wordt large pore gel oplossing gebruikt zoals boven is aangegeven met aqua dest.

Samenstelling large pore gel/eiwit monster/kleurstof

per buis: 0.5 ml eiwitoplossing (maximaal 1 mg eiwit per buis)

0.5 ml large pore gel (zie boven) zonder aq.dest

De large pore gel wordt zwak blauw gekleurd met enkele druppels waterige broomfenolblauwoplossing voor de vorming van een kleurstoffront.

Voorschrift oplossingen

		pH= 7.9	pH= 8.9
oplossing A :	1 n. HCl	48 ml	48 ml
	tris	8 g	36.6 g
	temed	0.92 ml	0.46 ml
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
		pH= 7.4	
oplossing B :	1 n. HCl	48 ml	
	tris	5.98 g	
	temed	0.5 ml	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing C :	acrylamide	30.0 g	
	bis acrylamide	0.8 g	
	$K_3 Fe (CN)_6$	15 mg	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing D :	acrylamide	10.0 g	
	bis acrylamide	2.5 g	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
oplossing E :	riboflavine	4.0 mg	
	aanvullen tot 100 ml met aq.dest		
Loopbuffer :	glycine	28.8 g	
	tris	6 g	
	oplossing in 2 liter aq.dest		

De oplossingen kunnen het beste in de kou bewaard worden.

ISOLATIE HUMAAN IgG UIT TOTAAL HUMAANSERUM
 =====

Volgens gewijzigd voorschrift van Levy en Sober, te vinden in
 Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. : 103250 (1960).

Prepareren van de DEAE cellulose (cellex D. Calbiochem.)

Voorschrift Levy en Sober

- a. 3x wassen met 0,5 n. NaOH (de cellulose mag niet lang in de NaOH blijven staan).
- b. Wassen met aqua dest tot de pH van de cellulose neutraal is geworden.
- c. De cellulose op pH= 6.3 brengen door toevoegen van 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$
- d. Een aantal malen wassen met startbuffer: 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ pH= 6.3

Gebruikte buffers

startbuffer : 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$; pH = 6.3
 gradiëntbuffer : 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ + 1 M NaCl; pH = 6.3

Voorschrift in gewijzigde vorm

- a. De DEAE cellulose, merk Calbiochem Cellex D, cap. 0.66, tenminste 10x wassen met een grote hoeveelheid aqua dest, zodanig dat de fijne deeltjes verwijderd zijn.
- b. Daarna wassen met de startbuffer: 0.0175 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ aq.}$ pH= 6.3, totdat de cellulose deze pH heeft aangenomen. De buffers zijn hetzelfde als het oorspronkelijke voorschrift, behalve de gradiëntbuffer, deze wordt 1 : 2 verdund met aqua dest.
- c. De cellulose wordt geregenereerd door wassing met 1 M NaCl, daarna met aqua dest en vervolgens met startbuffer.
 Het igG komt van de kolom in de eerste piek met de startbuffer, daarna wordt de continue gradiëntbuffer 1:2 verdund.
 De cellex D. DEAE cellulose heeft een grote capaciteit; uit ervaring is gebleken dat b.v. 125 ml normaal humaan serum op een kolom gebracht kan worden met een lengte van 38 cm en een doorsnede van 4.7 cm.

De cellulose moet dun gegoten worden, zodanig dat de kolom homogeen wordt. Het serum wordt vooraf + 16 uur gedialiseerd tegen een honderdvoudige hoeveelheid startbuffer.

Het hierbij ontstane precipitaat wordt afgedraaid 10 min. 5000 rpm., het bevat behalve andere eiwitten ook nog geringe hoeveelheid IgG (wordt niet verwerkt).

Voor het opbrengen, de kolom eerst laten doorlopen met startbuffer.

Bij het opbrengen de supernatant rustig laten intrekken.

Het grootste gedeelte van het IgG loopt met de startbuffer van de kolom; het zeer snelle IgG gebied en de andere serumeiwitten worden geabsorbeerd.

Met de continue gradiënt komen ook de andere eiwitten van de kolom.

IMMUNO-RADIO-ELEKTROFORESE OF AUTOEADIOGRAM
=====

De werkwijze voor een autoradiogram is vrijwel gelijk aan die voor een immunoëlektroforese.

In de gaatjes laat men het monster met een specifiek gerichte antistof 50 min. - 60 volt elektroforeren. De goot wordt allereerst gevuld met radioactief gemerkt antigeen + 0.1 ml, zodat de radioactiviteit in de goot + 100.000 tikken/min. is.

Na het intrekken in de agar wordt de goot gevuld met antiserum bevattende antistoffen gericht tegen immunoglobulinen van het monster. B.v. caviae zijn geïmmuniseerd met eialbumine.

De afnamen worden in de gaatjes gebracht en geëlektroforeerd.

De goot wordt gevuld met :

1. Radioactief gemerkt eialbumine (J^{125}).
2. Antiserum met antistoffen gericht tegen cavia immunoglobulinen.

De plaatjes één nacht laten ontwikkelen, de volgende dag 3x wassen met gebufferd phys.zout en aan het eind van de dag drogen. Na het drogen moeten de plaatjes 10 dagen op een fotoplaat (Kodak X ray film NS) liggen (met cellotape vastplakken, de kant met de gedroogde agar direct op de hoes van de fotoplaat).

Film en plaatjes stevig tegen elkaar drukken door tussen twee glasplaten te leggen. Na 10 dagen de fotoplaat laten ontwikkelen. Waar het gemerkt antigeen gebonden is door specifieke antistoffen en deze antistoffen geprecipiteerd zijn door specifieke antistoffen (gericht tegen immunoglobulinen) ziet men een zwarting.

Deze methode maakt het mogelijk heel kleine hoeveelheden antistof aan te tonen.

BEREIDING CAVIA FIBRINOGEEN
=====

Uitgegaan van 10 ml cavia plasma.

- a. Een 35% verzadigde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitatie in het caviaplasma minimum 2 uur laten staan bij 0°C , daarna afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- b. Het precipitaat 1x wassen met eenzelfde volume 35% verzadigde ammoniumsulfaat oplossing. Centrifugeren 15 min. 10.000 rpm.
- c. Precipitaat oplossing in oorspronkelijk volume phys.zout bij kamertemperatuur (hier 10 ml).
- d. Hieraan humaan trombine toevoegen, zodanig dat de concentratie in het reactiemengsel 100 eenheden per ml is. 24 uur laten reageren bij 0°C in het ijsbad.
- e. Het stolsel op filtreerpapier laten uittrekken, zodanig dat zich een vlies vormt.
Dit vlies in een nylongaasje doen en in phys.zout hangen.
Zo minstens één nacht bij 4°C onder roeren laten staan.
- f. Het stolsel m.b.v. een potter tot een fijne dispersie verwerken.