

VEROUDERD

0560/19

BEREIDING HUMAAN F_{ab} EN F_c UIT EEN ZUIVERE POOL HUMAAN IgG

=====

Splitting IgG in F_{ab} en F_c d.m.v. papaïne

Biochem. J. 73, 119 (1959) R. Porter

300 mg humaan IgG + 3 mg papaïne oplossen in 20 ml buffer:

0.1 M NaH_2PO_4 . 2 aq. pH= 7.0; 0.01 M cysteine; 2 m M EDTA (Complexon III).

Deze oplossing 2 uur incuberen bij 37°C.

Hierna gedurende 48 uur dialyseren tegen aqua dest (4°C) om de reactie te stoppen (100-voudige overmaat aq.dest; na één uur verversen met eenzelfde hoeveelheid).

Scheiding ongesplitst IgG en F_{ab} , F_c fragmenten

De oplossing wordt een nacht gedialyseerd tegen gebufferd phys.zout.

Daarna elutie over een G-100 kolom in gebufferd phys.zout.* De opgevangen frakties van de eerste twee pieken worden gecontroleerd in I.E.

Het ongesplitste IgG wordt eventueel opnieuw behandeld met papaïne zoals beschreven. Het tweede piek mengsel van F_{ab} en F_c fragmenten wordt gescheiden op een DEAE cellulose kolom.

Scheiding F_{ab} en F_c

De gebruikte cellulose is Kodak DEAE no. 7392 in het Yagi buffersysteem (zie voorschrift isolatie cavia langzaam IgG).

Startbuffer : trisfosfaatbuffer pH = 8.2 - 8.6

Gradiëntbuffer: trisfosfaatbuffer pH = 4.0

Het prepareren van de cellulose en de gebruikte buffers zijn beschreven onder isolatie cavia langzaam IgG.

Het mengsel F_{ab}/F_c wordt vooraf gedialyseerd tegen startbuffer. Na de eerste eiwitpiek: F_{ab} fragment, wordt de continue gradiënt ingezet.

De tweede eiwitpiek bevat F_c fragment.

Controle in Ouchterlony tegen anti- $(F_{ab}')_2$ en anti-totaalserum.

* Het elutiepatroon bestaat uit drie pieken, resp. ongesplitst IgG, F_{ab}/F_c mengsel en tenslotte afbraak peptiden. Het F_c fragment bevat nog een verontreiniging die als F_{ab} fragment reageert. Acrylamide elektroforese toont geen F_{ab} fragment, maar wel een sterke heterogeniteit in het F_c fragmentmengsel.

COLORIMETRISCHE SUIKERBEPALING VOLGENS ELSON-MORGAN* (10-100µg hexosamme)
 =====

Reagentia

1. acetylaceton: 0,75 ml acetylaceton in 25 ml 1,25n Na₂CO₃
2. Ehrlich's reagens: 1,6 g p-dimethylamino benzaldehyde in 30 ml alcohol 96% + 30 ml HCl 12,5n
3. 2,5n NaOH
4. 5n H₂SO₄
5. alcohol 96%

Bepaling

IgG oplossing (1% in geb. NaCl 0,9%)

1 ml IgG opl. + 1 ml 5n H₂SO₄ gedurende 16 uur in een kokend waterbad. Afkoelen tot kamertemperatuur.

Fenolftaleïne toevoegen en neutraliseren met + 2 ml 2,5 n NaOH met aqua dest tot 5 ml aanvullen.

2 ml hiervan + 2 ml acetylaceton gedurende 20 minuten in een waterbad van 96°C.

Snel afkoelen tot kamertemperatuur.

Toevoegen : + 17 ml alcohol 96%
 2 ml Ehrlich's reagens
 aanvullen tot 26 ml met alcohol 96%.

Na 45 minuten bij KT 0.D meten bij 530 mµ.

blanco : 1 ml geb. NaCl 0,9% + 1 ml 5n H₂SO₄
 hydrolyseren; verder hetzelfde als met het IgG.

controle : glucosamine oplossing 150 µg/ml
 1 ml hydrolyseren met 1 ml 5n H₂SO₄ en dezelfde methode als het IgG volgen.

*Lit. Kent and Whitehouse: "Biochemistry of the aminosugars
 Butterworths scientific Publ."

COLORIMETRISCHE SUIKERBEPALING MET INDOLREAGENS*

=====

(5-25µg suiker per 0,5 ml)

0,5 ml IgG 0,4%	}	10 minuten in kokend water
0,2 ml indol (1% oplossing in ethanol)		
5 ml H ₂ SO ₄ 75%		

O.D meten bij 470 mµ

blanco :

1. IgG + H₂SO₄ + aq.dest i.p.v. indol
2. aq.dest i.p.v. IgG + H₂SO₄ + indol

* Carbohydrate estimation for carbohydrates in general.
Kabat and Mayer. 1961. blz. 526

HET AANTONEN VAN HUIDREACTIEVE ANTISTOFFEN D.M.V. DE PASSIEVE CUTANE
ANAFYLAXIE (PCA)- EN/OF DE PRAUSNITZ-KÜSTNER (P.K.) REACTIE

=====

In antisera kunnen antistof populaties voorkomen die na reactie met het betreffende antigeen vaatdoorlaatbaarheid veroorzaken. Deze reactie kan alleen in vivo worden uitgevoerd. Men onderscheidt homologe - (in het zelfde diertype) en heterologe (in een ander diertype) huidreacties. Antistoffen van het reagine type van de mens reageren homogoloog, maar ook heteroloog in de (rhesus) aap. Deze toets is van belang om te weten welk antigeen de oorzaak is van de waargenomen allergische verschijnselen. Als biologische reactie heeft de toets allereerst een kwalitatieve waarde; daarnaast kan door middel van verdunningsreeksen een semikwantitatieve indruk worden verkregen van de hoeveelheid huidreactieve antistof.

Procedure

Witte caviae van 3 à 400 gram worden geschoren en onthaard op de flanken van de schouders tot de achterhand. Het te onderzoeken monster wordt (eventueel in enkele verdunningen) in de huid gebracht m.b.v. speciale injectienaalden. De insteek moet vrijwel evenwijdig aan de huid geschieden. De ingebrachte hoeveelheid vloeistof moet niet groter zijn dan 0.15 ml. Indien de vloeistof op de juiste wijze in de huid is gebracht, ontstaat een met vocht gevulde halve bol. Na een noodzakelijke incubatietijd van 3 à 4 uur wordt een mengsel van het antigeen en kleurstof oplossing (Evans blauw 2% in phys.zout of Pontamine hemelblauw 5% in phys.zout) intercardiaal ingespoten. De totale hoeveelheid vloeistof moet niet groter zijn dan 0.5 ml. In het algemeen wordt omstreeks 0.2 mg antigeen 0.2 ml kleurstof ingebracht. Indien de reactie op de juiste wijze verloopt wordt 10 à 15 min. na het inbrengen van het antigeen een blauwe vlek zichtbaar.

Voor een goede beoordeling van de reactie moet altijd een positieve controle (een bekend PCA-actief antiserum) en een negatieve controle (normaal caviaserum) in het experiment worden meegenomen. Pas als deze sera op de juiste wijze reageren heeft het zin de onderzochte sera af te lezen.

Beoordeling van de aflezing

De aflezing kan slechts semikwantitatief gebeuren, er is geen lineair verband tussen concentratie en grootte van de vlek. De waardering wordt uitgedrukt in + tekens en loopt van + tot 4+.

De geoefende aflezer kan nog onderscheid maken tussen de waardering in hele waarden. De beoordeling kan geschieden op de kleurintensiteit uitgedrukt in + tekens en de diameter van de vlek in millimeters.

HISTAMINE BEPALING VOLGENS DE METHODE VAN SHORE ETC.
=====

Deze methode is uitgevoerd, maar er is slechts 25% van de ingewogen hoeveelheid histamine teruggevonden.

De amberlite anionenwisselaar (IRA-410) wordt in de acetaat vorm gebracht in een grote kolom door met + 1 liter 0.75 M natriumacetaat + 0.05 M natronloog te wassen. Daarna wordt het amberlite met aqua dest gewassen, totdat het de pH van het aqua dest heeft aangenomen.

Het klaarmaken van de elutie kolom

Als kolom wordt een 10 ml meetpipet gebruikt, die aan de bovenkant is afgesneden. Onder in de kolom wordt een plukje glaswol gebracht. Het amberlite wordt in de pipetten gegoten, zodat het volume 6 ml wordt. Voor het opbrengen van de oplossing laat men het laagje water boven het amberlite intrekken.

Het maken van een weefselextract en oplossing

1 gram van een weefsel wordt gehomogeniseerd met 4 ml 5% trichloorazijnzuur en het mengsel wordt gecentrifugeerd.

(Het volume van de oplossing bedraagt + 4.8 ml). 1 ml van de supernatant wordt in een 10 ml maatkolfje gepipetteerd, dat 0.50 ml, 0.50 n. NaOH en enige ml 0.01 M fosfaatbuffer bevat.

Het wordt met aqua dest tot de streep aangevuld.

5 ml van deze oplossing wordt met een pipet op de kolom gebracht. Als eluent vloeistof wordt fosfaatbuffer (0.005 M - 0.01 M) gebruikt. pH=6.0-7.4 De snelheid van de vloeistof is ongeveer 1 ml/min., dit wordt ingesteld met een schroefkraantje. De eerste 1-2 ml wordt weggegooid, en de elutie vloeistof wordt verzameld tot ongeveer het merkje van een 10 ml maatkolfje en wordt op volume gebracht. Aan 2 ml van deze oplossing wordt 0.40 ml 0.5n NaOH en 0.1 ml 1% O.P.T. toegevoegd.

Na 3.5 + 0.5 min. (bij kamertemperatuur) wordt 0.20 ml 2.5 M H₃PO₄ toegevoegd. De fluorescentie wordt gemeten bij 445 m μ met aanslaan op 345 m μ .

Voor bepaling histamine oplossing wordt inplaats van 1 gram weefsel, 1 ml van een histamine oplossing gebruikt.

In oplossingen waarin de histamine niet gebonden is in de vorm van histamine decarboxylase, is het raadzaam de volgende procedure te gebruiken.

2 ml oplossing die histamine bevat (0.001-0.5 γ /ml) wordt op een kolom met een volume van 3 ml gebracht.

De eerste ml wordt weggegooid en iets minder dan 4.5 ml elutievloeistof wordt verzameld in een 5.0 ml maatglasje dat 0.5 ml 30% trichloorazijnzuur bevat, en de oplossing wordt tot 5 ml aangevuld met aqua dest. De oplossing wordt gecentrifugeerd en de van de supernatant 2 ml oplossing afgepipetteerd.

Hieraan wordt 0.40 ml 1.5 n. NaOH en 0.10 ml O.P.T. (1%) toegevoegd.

Na 3.5 ± 0.5 min. (bij kamertemperatuur) wordt 0.20 ml 2.5 M H_3PO_4 toegevoegd.

De fluorescentie wordt gemeten bij 445 m μ met aanslaan bij 345 m μ .

Standaardcurven worden gemaakt met verschillende histamineoplossingen in 0.03% trichloorazijnzuur, wanneer men te maken heeft met gebonden histamine en histamine oplossingen in 3% trichloorazijnzuur voor bepaling standaardcurve voor vrij histamine.

De fluorescentie intensiteit is evenredig met de concentratie van histamine in het gebied 0.003-0,5 γ /ml histamine.

De fluorescentie aktiviteit neemt na een half uur af. Dus de metingen moeten binnen een half uur na toevoegen O.P.T. worden verricht.

BEREIDING MUIS FIBRINOGEEN

=====

Systeem : fibrinogeen \longrightarrow fibrine (monomeer) $\xrightarrow{\text{polymerisatie}}$ fibrine (polymeer)

Procedure

- a. 1 volume plasma + 1/3 volume verzadigd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0°C) 2 uur laten staan bij 0°C . Afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- b. Neerslag 1x wassen met 25% verzadigd ammonium sulfaat oplossing (0°C). Afdraaien 15 min. 10.000 rpm.
- c. Neerslag oplossen in oorspronkelijk volume phys.zout bij kamertemperatuur.
- d. Hieraan rundertrombine toevoegen, zodanig dat de concentratie in het reactiemengsel 100 eenheden per ml is. Een half uur bij kamertemperatuur laten staan.
- e. Stolsel op filtreerpapier brengen, vocht uittrekken tot zich een vlies gevormd heeft. Dit vlies van het filtreerpapier losmaken in een zakje van nylongaas doen en in phys.zout hangen. Zo minstens één nacht bij 4°C onder roeren laten staan.
- f. Het stolsel met behulp van een potter tot een fijne dispersie verwerken.

ISOLATIE PAARDE IgG* UIT TOTAAL PAARDESERUM
=====

Volgens gewijzigd voorschrift van Levy en Sober:

Proc. Soc. Exp. Biol. and M. 103250 (1960)

Het gewijzigd voorschrift staat beschreven onder isolatie humaan IgG uit totaal humaan serum.

Scheiding

De eerste eiwitpiek, die met de startbuffer van de kolom komt, wordt verzameld en geconcentreerd of gevriesdroogd.

Met een controle in polyacrylamide gelelektroforese vindt men een zeer geringe verontreiniging van het IgG.

Het hele snelle IgG gebied komt met de gradiënt van de kolom (sterk verontreinigd).

* Het paarde IgG gebied is zeer gecompliceerd, slechts een deel van het IgG gebied wordt geïsoleerd. De rest bevat nog wel immunoglobulinen, maar is verontreinigd met een aantal niet geïdentificeerde eiwitten.

VOORSCHRIFT VOOR DE ISOLERING VAN L-KETEN UIT HUMAAN GAMMA-GLOBULINE
=====

Een 2% (w/v) oplossing van IgG in 0,55 M tris-HCl buffer pH 8,2 wordt, na 10 min. roeren gecentrifugeerd in de Lourdes (15 min. 10.000 rpm.). Aan het supernatant wordt vervolgens zoveel, pas gedestilleerd β -mercapto-ethanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,75 M. Na 1 uur roeren van deze oplossing wordt hieraan toegevoegd een gelijk volume van een oplossing van, pas omgekristalliseerd α -joodaceetamide in a.d. (concentratie 0,75 M), waarna weer 1 uur wordt geroerd. De eiwitoplossing wordt vervolgens gedurende 24 uur gedialyseerd tegen 50 volumina a.d. en daarna gedurende 12 uur tegen 10 volumina 7 M ureum, pH 2,0 (deze ureumoplossing is behandeld met ontkleuringskool). Tenslotte wordt de oplossing geconcentreerd tot een 10 - 20% eiwitoplossing m.b.v. drukdialyse.

6 ml van deze geconcentreerde eiwitoplossing wordt gebracht op een, met 7 M ureum, pH 2,0 geëquilibreerde Sephadex G-100 kolom (3,4 x 100) en bij kamertemperatuur geëluëerd met 7 M ureum, pH 2,0 (maximaal 15 ml/uur). De opgevangen frakties worden door gemeten bij 280 nm op de Unicam Spectrofotometer en de frakties van de tweede piek worden verzameld en geconcentreerd tot 1 ml. Dit nieuwe concentraat wordt gebracht op een Sephadex G-100 kolom (2,2 x 40) en geëluëerd met 7 M ureum pH 2,0 (3 ml/uur). Alle frakties worden daarna doorgemeten bij 280 nm en na dialyse tegen gebufferde zoutoplossing, ingezet in een Ouchterlony tegen anti-H en anti-L. De frakties, welke na 2 dagen staan wel een precipitatie vertonen tegen anti-L, doch niet tegen anti-H, worden verzameld. Deze bevatten dan zuivere L-keten.

ANTISTOFBEPALING MET QUANTITATIEVE PRECIPITATIE TEST (micro Kjeldahl)

=====

Het maken van een precipitatiecurve

Met behulp van de Ouchterlony techniek bepalen wat de optimale verhouding is van antigeen (Ag) en antistof (As).

Antiserum vooraf inactiveren 56°C - 30 min. en afdraaien in de Servall 1 uur max. speed.

3 ml As 1/2 verdund en 1,5 ml Ag van verschillende concentraties gedurende 30 minuten bij 37°C incuberen.

Tenminste 1 nacht bij 4°C laten staan, maar liefst 48 uur. Afdraaien in Servall (10 min. 10.000 rpm.).

2x wassen met koud gebufferd NaCl 0,9%. Zeer voorzichtig zijn met opnemen van bovenstaande om verlies van immuun-precipitaat te voorkomen.

Precipitaat oplossen in 0,2 ml 1 n NaOH en aanvullen tot 3 ml met koud NaCl 0,9%.

O.D. meten bij 280 m μ . Uitzetten in een grafiek: Y as O.D. 280.

X as antigeen concentratie in mg N. Het bij het optimum verkregen precipitaat, evenals antigeen oplossing gebruiken voor Kjeldahl.

Reagentia voor Kjeldahl

H_2SO_4 98% : boorzuur (1 vol. verzadigd boorzuur + 1 vol. aq.dest)

glaskraaltjes: mengsel van 50% NaOH

katalisator : (15 g CuSO_4 + 2 g Seleen + 95 g Na_2SO_4)

0,01 n HCl : methyl rood

methyleen blauw

Bepaling

1 ml (As+Ag) + 100 mg katalisator + 2 ml H_2SO_4 98% + 2 glaskraaltjes.

Kolfje gedurende 1 uur op destructieapparaat in stand 1 (120°C).

In stand 2 (165°C) tot kleurloos, daarna 1 uur op stand 3 (225°C).

Afkoelen en de hals schoonpoetsen met aqua dest.

Kurk erop.

Destilleren: Knijp slang waar stoom doorgaat af.

Houdt water (aq.dest) aan de kook.

Breng boorzuur 10 ml (5 ml verz.boorzuur + 5 ml aq.dest) + indicator onder tuutje.

Breng gedestruerde bepaling quantitatief over in trechter.

Spoel na met 12 ml NaOH. Leidt stoom door gedurende 10 minuten.

Haal tuutje eruit en spoel af.

Boorzuur nu groen van kleur wegzetten.

Vlam onder waterkolf weghalen.

Titreeren met 0.01 n HCl tot de groene kleur net verdwenen is.

Blanco: hetzelfde, maar i.p.v. eiwit een buffer of zout.

Berekening

bepaling - blanco = a

a. titer HCl $\frac{1}{\text{aantal ml gepi-
petteerde stof}}$. 14. 6,25 = mg eiwit per ml.

Boorzuur

5,2 g/100 ml aqua dest

koken en afkoelen

voor gebruik 1/2 verdunnen

Indicator

a. methylrood (1,7 g gekristalliseerd methylrood in 100 ml 95% ethylalcohol)

b. methyleenblauw (1% methyleenblauw in aq.dest)

Meng indicatoren vlak voor gebruik: 9a + 1b.

Kjeldahl apparatuur voor gebruik schoonstomen en stoom doorleiden, tot geen N meer wordt getitreerd in boorzuur.

Voor beginners eerst bepaling leren en omslagpunt leren kennen door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a. het gehalte te bepalen volgens onderstaande methode:

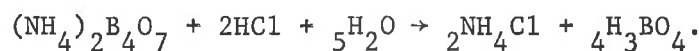
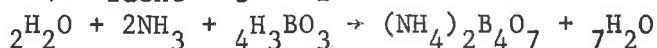
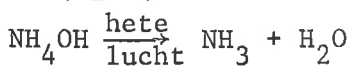
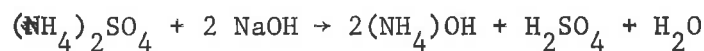
0,132 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 200 ml aqua dest.

Monsters van 3 ml voor Kjeldahl.

Naspoelen met 12 ml NaOH (40% NaOH + 5% thio) NH_3 opvangen in 10 ml boorzuur oplossing (5 ml verzadigde opl. + 5 ml aq.dest) + indicator (methylrood: methyleenblauw = 9:1).

Titreeren met 0,00948 n HCl.

Reactievergelijkingen:



POTENTIOMETRISCHE TITRATIE

=====

Uitrusting

Radiometer titrator, type TTT, met titratie hulpstukken.

Gecombineerde glas- calomel electrode.

In principe zijn er twee mogelijkheden :

- a. Titratie, waarbij de pH verandert, ter bepaling van het equivalent punt (zuur-base titratie).
- b. Titratie, waarbij men de pH constant houdt.

a. Zuur-base titratie (b.v. titratie van H_3PO_4 met NaOH)

Reagentia

+ 0,01 n H_3PO_4
0,1 n NaOH

Uitvoering

Vul de spuit met 0,1 n NaOH (inhoud spuit is 2,5 ml)

Pipetteer 8 ml H_3PO_4 in het reaktievat.

Voor de instelling van de potentiometer dienen de volgende handelingen te worden verricht :

1. Zet de "stirring motor" op ON.
2. Zet de "recording titration curve" op START.
De standen OFF en ON van "pH-stat" worden gebruikt bij een bepaling, waar de pH in het reaktievat constant moet blijven (dus bij bepaling b).
3. Zet de potentiometer van de titigraph op de nulstand, zodat men het hele pH-gebied ter beschikking heeft. Dit doet men door de knop van de papierrol aan de rechterzijde van de titigraph naar rechts te draaien (terwijl men de papierrol vasthoudt) totdat men een klik hoort. Bij het naar links draaien van de knop mag het tandwiel binnenin niet meer meedraaien en het stoplicht van de recording titrationcurve moet gaan branden.

4. Voor het pH-gebied van 0-13 moet de "compensation" op 0 staan. Het pH-gebied kan men verlagen of verhogen door de knop resp. naar links of naar rechts te draaien.
5. Met de "sample temp" kan men de gewenste temperatuur instellen. Deze temperatuur moet men ook instellen op het temp. kastje aan de titrator. De knop bij "range" op de titrator moet dan op T.C. d.w.z. temperatuur compensatie staan.
6. Zet de "chart calibration" op 0,5 pH/cm, d.w.z. 1 cm op het papier komt overeen met een 0,5 pH eenheid.
7. Zet de "selector" van de titrator op up-scale, omdat er getitreerd wordt met loog. De knop op down-scale zetten wanneer er getitreerd wordt met zuur.
8. Wanneer de potentiometer van de "Titigraph" is ingeschakeld, geeft de titrator niet de werkelijke pH aan, doordat de potentiometer van de titrator uitgeschakeld is.
Om de werkelijke pH in het reaktievat af te lezen, drukt men op de knop "read pH or mV".
9. Met de "end point" stelt men de werkelijke begin pH in.
Op dit moment moet de valve lamp regelmatig aan en uitgaan. Is dit niet het geval dan is het te bewerkstelligen door de rechter knop van de "end point" te verdraaien.
10. De schrijver van de titgraph wordt ook op de werkelijke begin pH ingesteld.
11. Zet de "delay of shut off" op ∞ .
12. Zet de "proportional band" op 1,5. Met deze knop kan men de grootte van de stapjes waarmee de loog toegevoegd wordt regelen.
Bij 0,1 wordt de loog in veel grotere stappen toegevoegd dan bij 5. De loog wordt bij een bepaalde proportional band steeds in dezelfde hoeveelheden toegevoegd, maar bij het equivalentiepunt van de titratie zal de tijd tussen twee opeenvolgende toevoegingen veel groter zijn dan in andere delen van de titratiecurve. Bij het equivalentiepunt heeft een klein loogverbruik een grote pH verandering tot gevolg. Het apparaat heeft bij een grote pH verandering meer tijd nodig om zich in te stellen dan bij een kleine pH verandering. (registratie titigraph).

13. Druk de startknop op de titigraph in en houdt deze ingedrukt tot het stoplicht uitgaat.
14. Titreer tot de volledige pH curve is ontstaan.

Opmerkingen

1. Op bovenbeschreven wijze kan men het equivalentiepunt bepalen, maar men moet dan titreren tot de hele pH curve is ontstaan. Heeft men één keer de hele pH curve gemaakt, dan is het mogelijk om de volgende keer precies tot het equivalentiepunt te titreren (de bepalingen moeten volledig identiek zijn!)

Dit gaat als volgt :

Bij de eerste bepaling, waarbij men de hele pH curve maakt, bepaalt men hoeveel tijd er verloopt tussen twee opeenvolgende toevoegingen in het gebied van het equivalentiepunt.

Is dit b.v. 15 sec. dan stelt men de "delay of shut off" in op 14 sec., dus iets minder dan de tijd die nodig is tussen twee opeenvolgende toevoegingen.

Wordt de tijd van 14 sec. overschreden, dan schakelt het apparaat zich automatisch uit en de shut off lamp gaat branden.

2. Het stellen van de pH meter :

De pH meter wordt op 6,5 gesteld bij 20°C met een 1 M fosfaatbuffer pH 6,5 (te bestellen bij Radiometer, Kopenhagen). Giet de fosfaatbuffer in het reaktievat en zet de "selector" op reading. De "range" knop moet op 20°C staan.

Is de pH niet precies 6,5, dan kan men dit bijstellen met de "buffer adjustment".

Instelling van de motors :

Speed settings

- | | | |
|-----------------|---|---|
| A - 5 mm/rev. | } | deze regelen de loopsnelheid van het papier |
| B - 0,5 rev/min | | |
| C - 4 rev/min | } | deze regelen de pensnelheid |
| D - 4%/rev | | |

b. Bepaling acetylcholine esterase in humaan serum

Principe

Acetylcholine esterase splitst acetylcholine in azijnzuur en choline. Het gevormde azijnzuur heeft een daling van de pH tot gevolg.

De temperatuurscoëfficiënt van de reactie is ongeveer 1,35 en de activiteit wordt langzamerhand hoger bij hogere pH van 6.0 - 8.0.

Dit betekent dat bij het meten van de activiteit van het enzym, de temperatuur en de pH constant moeten blijven om optimale condities te verkrijgen.

Bij de hiervolgende methode is een pH van 7.4 en een temperatuur van 37°C aangehouden.

De pH wordt constant gehouden door het toevoegen van NaOH.

De toegevoegde hoeveelheid loog is equivalent aan de hoeveelheid afgesplitste acetylgroepen.

Reagentia

0.9% NaCl, met een pH van 7.4

Acetylcholine chloride (BDH)

Deze oplossing bevat 100 mg per ml aqua dest. Het geheel wordt op pH 7.4 gebracht om een te grote pH verandering na het toevoegen van de oplossing tegen te gaan.

0,02 N NaOH (carbonaatvrij)

Uitvoering

Pipetteer 10 ml 0,9% NaCl in het vat en laat dit gedurende enige tijd op temperatuur komen.

Hierna wordt 0,5 ml serum toegevoegd en de pH wordt met de hand gecorrigeerd (dit om een groot NaOH verbruik van de spuit te voorkomen).

De spuit die een volume heeft van 2,5 ml moet aan het begin van de bepaling geheel gevuld zijn, omdat bij een hoge enzymactiviteit de mogelijkheid bestaat dat halverwege de spuit leeg is.

Voeg hierna 2 ml van de acetylcholine oplossing toe en stel de titrator in op de juiste stand.

Berekening

1 eenheid acetylcholine esterase is gelijk aan 1 μ mol acetylcholine omgezet per ml serum per minuut.

- a. - volume van de spuit 2,5 ml
- b. - percentage van de totale inhoud
- c. - aantal minuten die de bepaling gelopen heeft
- d. - aantal μ mol per ml NaOH
- e. - aantal ml serum in reactievat

$$a. b. \frac{1}{c}. d. \frac{1}{e} \text{ Eenheden enzym}$$

Speed settings

A 5 mm/rev.	<u>recording pH stat</u>	ON
B 0.5 rev/min.	<u>compensation</u>	0
C 4 rev/min.	<u>sample temp.</u>	37°C
D 4	<u>selector</u>	up scale
1 cm = 4 min.	<u>end point</u>	7.36 p.m.
	<u>shut of</u>	∞ sec.
	<u>prop. band</u>	0.1
	<u>range</u>	T.C.

CONWAY MICRODIFFUSIE TECHNIEK

=====

voor bepaling N-gehalte

Microdiffusion analysis. E.J. Conway, Crosby Lochwood and Son Ltd. London 1962, 5th Edition.

Het weggooi Conway-apparaat bestaat uit een centraal vat (kamer) en een buitenvatring, afgedekt door een deksel, het apparaat wordt gasdicht gemaakt door de deksel en de rand van het vat in te vetten met vaseline. In het centrale vat wordt een los schaaltje gezet. De diameter van het apparaat is 6,1 cm, de diameter van het centrale vat is 3,3 cm.

In het centrale vat wordt 1 ml 1½% boorzuur-indicator oplossing gebracht met behulp van een eppendorfpipet. Het apparaat wordt een beetje schuin neergezet, zodat bij inpipetteren van 0,5 ml te onderzoeken vloeistof, deze zich verzamelt in het lage deel.

Het monster wordt ingepipetteerd met een eppendorfpipet.

Dan wordt een 0,5 ml 40% KOH in de buitenring gebracht door een smalle spleet, die ontstaat door het horizontaal verschuiven van het deksel. De vloeistof moet snel inlopen, maar men moet oppassen dat er geen loog in het binnenvat spat. De loog wordt ingepipetteerd met een eppendorfpipet.

Na inlopen wordt het deksel gesloten, het vat horizontaal geplaatst en \pm 10x licht geschud.

Na een geschikte tijd van absorptie (\pm 16 uur) wordt het deksel verwijderd. De vloeistof in de buitenkamer wordt m.b.v. een afzuigstelsel weggezogen.

De inhoud van het middenvat wordt getitreerd met 1/50 n HCl met behulp van een microburet met totale inhoud van 1 ml en onderverdeeld in duizendste ml. Deze opstelling kan gebruikt worden voor een stikstofbepaling in monsters met een gehalte van 300 γ tot 100 γ N.

Bij stikstofbepaling van monsters met een hoger gehalte dan 300 γ N, is de boorzuurconcentratie te laag om alle gevormde NH₃ te binden.

Na de diffusietijd bij openen van de schaaltjes ruikt men dan een ammoniak geur.

De microdiffusietechniek is eerst getoetst met een nauwkeurig afgewogen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Baker; 99,7%) is gedroogd in een vacuumexicator boven P_2O_5 .

Oplossing: 0,11082 g/50 ml aq.dest. Het gevonden gehalte aan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was steeds 1 à 2% te hoog. Dit is te wijten aan de gevoeligheid van het oog bij het titreren.

Per serie Conwaybepalingen worden blanco-bepalingen gedaan: Inplaats van 0,5 ml eiwitmonster wordt een 0,5 ml oplosmiddel ingepipetteerd.

Reagentia

Indikator

0,033% broomkresolgroen + 0,066% methylrood, opgelost in ethanol.

Boorzuur-indikatormengsel

15 gram zuiver boorzuur (Merck).

In een maatkolf van 1 liter 200 ml ethanol toevoegen, daarna 700 ml aq.dest.

Het boorzuur wordt opgelost en 10 ml mergindikator wordt toegevoegd. Na mengen wordt het totaal op de gewenste kleur gebracht (zwak rood) door toevoeging van een beetje loog. De pH moet liggen tussen 5,0 - 5,1. Daarna aanvullen tot streep.

40% KOH oplossing

47,1 g zuiver KOH wordt opgelost in 100 ml aq.dest.

1/50 n. HCl

De HCl oplossing is verdund uit een gedestilleerde HCl oplossing, zodanig dat men ± 1/50 n HCl oplossing krijgt.

Hierna is de oplossing met borax gesteld.

Destrukctie van eiwit

Deze destrukciemethode kan men gebruiken voor eiwitmonsters met 10 mg tot 100 γ N gehalte.

Destrukciemengsel

1 volume geconcentreerd H_2SO_4 (Baker) + 1 volume verzadigd $KHSO_4$ (Merck), dat 0,4 g SeO_2 per 100 ml bevat (Merck).

Destruktiemerkwijze

2,5 ml eiwitoplossing (binnen de bovengenoemde grenzen) en 1,25 ml destrukciemengsel worden in een destruktiebuis gedaan en 1 nacht in de stoof bij 105 $^{\circ}C$ gezet. Per buis worden 3 glaskraaltjes toegevoegd. Daarna op destruktieapparaat :

4 à 5 uur op stand 1 - 120 $^{\circ}C$
4 uur op stand 2 - 165 $^{\circ}C$
1 uur op stand 3 - 225 $^{\circ}C$ tot kleurloos

Hierna 8 à 16 uur op stand 2.

Na afkoelen wordt de inhoud van een buis kwantitatief in een 15 ml maatkolfje overgebracht en met aq.dest tot de streep aangevuld.

Per Conway-bepaling wordt een 0,5 ml uit het maatkolfje gepipetteerd.

Per destrukctie wordt een duplo blancobepaling meegenomen, d.w.z. in plaats van 2,5 ml eiwitoplossing wordt 2,5 ml oplosmiddel gepipetteerd.

Titratie

Het schaalpje wordt op een roermotor onder de buret geplaatst. In de binnenkamer wordt een klein roerdertje gelegd.

De groen geworden boorzuurindikatoroplossing wordt met kleine druppels HCl getitreerd tot de kleur van de blancobepaling, die bij iedere seriebepaling wordt meegenomen. Het boorzuurindikatormengsel van de blanco's moet roze blijven.

Voor verschillende concentraties eiwitmonsters wordt per concentratie een duplo blanco meegenomen. Bij titratie worden deze blanco's met hetzelfde aantal ml aq.dest verdund als het aantal ml benodigde HCl voor titratie van de eiwitmonsters. De met aq.dest verdunde blanco's worden nu met HCl getitreerd tot de kleur van de oorspronkelijke blanco. Dit aantal ml moet worden afgetrokken van het aantal getitreerde ml HCl. Bij deze bepaalde concentratie eiwitmonsters.

Dit is nodig, omdat de indikatorkleur erg afhankelijk is van de verdunning, nl. bij titratie van de monsters wordt het HCl geneutraliseerd door het gebonden NH_3 en het water geeft dus een verdunning van het boorzuurindikatormengsel.

Door het aantal getitreerde ml HCl nodig voor de verdunde blanco af te trekken van het aantal ml HCl nodig voor het monster, wordt deze verdunningsfactor teniet gedaan.

Belangrijke punten voor het goed verlopen van de bepaling

1. Het oppervlak van de buitenkamer moet geheel zijn bedekt.
2. Het vloeistofvolume in de buitenring mag de hoeveelheid die voorgeschreven is bij de bepaling niet overschrijden, omdat het volume een merkbaar effect heeft op de absorptie snelheid (tijd nodig voor 99,5% absorptie).
De invloed van het volume op de absorptie snelheid is omgekeerd evenredig met het volume.
Het volume van het binnenvat heeft geen merkbare invloed op de absorptie snelheid.
3. De bepalingen kunnen worden uitgevoerd bij kamertemperatuur. Incubatie bij 38°C verkort de reactietijd tot 60 - 70% van de k.t. waarde, maar het vloeibaar worden van het fixatief heeft nadelige invloed op de nauwkeurigheid van de ammoniabepaling. Schudden met een schudmachine kan de absorptietijd van $1\frac{1}{2}$ - 2 uur terugbrengen tot ca 1 uur. Volgens voorschrift van Conway is de absorptietijd van $1\frac{1}{2}$ - 2 uur voldoende voor 99,5% absorptie. In de praktijk is gebleken dat de absorptie na 2 uur onvoldoende is, zodat men het beste de schaaltes een nacht kan laten staan alvorens te titreren.

4. pH invloed:

De absorptiesnelheid van ammonia wordt bepaald door de spanning van het ontwikkelde NH_3 gas, dat kan worden gesteld evenredig te zijn met de dissociatiegraad in NH_3 en H^+ zodat

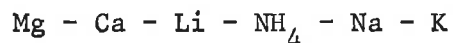
absorptie $A_1 = \alpha$ volledige absorptie A_2
 zodat volgens de vergelijking $\text{pH} = 9,4 + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$

indien $\alpha = 0,5$ de pH van de oplossing 9,4 is, d.w.z. ammonia wordt met halve maximale absorptie snelheid opgenomen.

De pH van 1 n ammoniumoplossing is ca 11.6, bij de pH is 99,5% van de ammonia als vrij gas aanwezig.

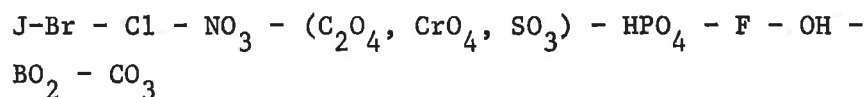
5. Zouteffect:

Sommige zouten kunnen een belangrijke vergroting van de dampspanning van ammonia veroorzaken. Het effect van kationen is als volgt:



De eerste drie verlagen de spanning, de laatste twee verhogen de spanning.

Van anionen is de volgorde:



Dus de combinatie K en CO_3 is het meest effectief.