

C₁-ESTERASE REMMER BEPALING IN PATIENTE SERA

=====

Algemeen:

C₁-esterase remmer (C₁ inh.) is een serumeiwit dat voorkomt in het plasma (en serum) van vrijwel alle mensen. De biologische werking van deze stof beruht op het remmen van de omzetting van de reactie:



Zonder aanwezigheid van deze factor wordt bij 37°C, neutrale pH en fysiologische zoutconcentratie het proenzym C₁ (de eerste complement-component) omgezet in het enzym C₁-esterase, dat behalve zijn natuurlijke werking, te weten het activeren van C₄ en C₂, de eigenschap bezit bepaalde synthetische aminozuur esters te hydrolyseren o.a. ATEe en TAME. Van dit vermogen wordt gebruik gemaakt bij de bepaling van dit enzym en van de remmer.

Het belang van de bepaling van het C₁ inh. gehalte in serum is gelegen in het feit, dat bij patiënten lijdende aan hereditair angio neurotisch oedeem (HANE) deze enzym remmende activiteit in het serum ontbreekt. Het al of niet aanwezig zijn van deze remmer kan van doorslaggevende betekenis zijn bij het stellen van een diagnose.

Werkwijze:

Bij de bepaling van het C₁ inh. gehalte in serum maakt men gebruik van het feit, dat toevoeging van deze stof aan een C₁a preparaat de esterolytische activiteit hiervan doet afnemen.

Door de enzym activiteit vòòr en nà toevoeging van de remmer te meten, kan men uit de vermindering hiervan het gehalte aan C₁ inh. berekenen.

Uitvoering:

Benodigde apparatuur, reagentia en hulpmiddelen:

Apparatuur:

1. Automatische titrator en titrigraph van radiometer.
2. Een circulatie en een gewoon waterbad van 37°C.

Reagentia:

1. C₁a oplossing (+ 130 eenheden/ml)
2. 1 molair N Acetyl-l-tyrosine ethyl ester (ATEe) in cellosolve (Ethoxyethanol)
3. Gebufferde zoutoplossing (PBZ). pH 7,35 Voor samenstelling★ blz.4

4. Normaal humaan serum

Hulpmiddelen:

1. Reageerbuisjes 1.5x12 cm met rekje
2. Eppendorf pipet 1000 en 500 microliter, met blauwe pipet tipjes
3. Meetpipet 0,500 ml
4. Pasteur pipetten
5. IJkbuffer voor pH meter pH 6,5
6. 0,100 n NaOH oplossing
7. Spuitfles met PBZ
8. Stikstof cylinder

Bepaling:

1. In drie reageerbuizen (genummerd 1 t/m 3 in duplo) wordt één ml C_1 a oplossing gepipetteerd.
In buis 1 pipetteert men nog 1 ml PBZ
In buis 2 pipetteert men nog 0,5 ml PBZ + 0,5 ml normaal hu serum.
In buis 3 pipetteert men nog 0,5 ml PBZ + 0,5 ml patiënte serum.
2. Na het mengen van de inhoud worden de buizen 15 min. geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie en vóór de titratie worden deze buizen bij kamertemperatuur bewaard.
3. Het instellen van de titrator TTT1c:
Selector op stand-by
End point op 7.5
Delay of shut-off sec. op 00
Range op TC
Proportional band op 0,3
Temp. compensator op 37°C.
Instelling van de titrigraph:
Recording op pH stat off
Compensation op 0
Line op ON
Sample temp. op 37°C
Chart calibration op 0,1
Speedsettings A op 5
 B op 0,5
 C op 30
 D op 1

4. Het ijken van de pH meter:

- a. Zet de 'range' knop van de pH meter op 20°C
- b. Plaats een bekersglas met ijkbuffer onder de gecombineerde glas-AgCl electrode.
- c. Zet selector op 'reading' en wacht 2 minuten
- d. Stel de 'buffer adjustment' knop zo in dat de wijzer op de schaalverdeling precies 6,50 aanwijst
- e. Zet de 'range' knop terug op TC
- f. Zet 'selector' terug op 'stand-by'

5. Titratie van C₁a in buis 1 t/m 3:

- a. Zet het circulatie waterbad aan en stel de temperatuur in op 37°C. Verwarmingselement na het bereiken van deze temperatuur op '1/4' zetten.
- b. Plaats in het dubbelwandig titratievat de electrode, de vin van de roermotor, de buretpunt met de opening zo dicht mogelijk tegen de bol van de glaselectrode aan, hang de slang van de stikstof toevoer over de rand van het vat. Zet de stikstof cylinder aan. Deze moet een regelmatige kleine stroom belletjes geven via het gas/wasflesje met 20% indicator.
- c. Vul het voorraadvatje van de buret met 0,100 n NaOH.
- d. Bevestig de glazen 2,5 ml spuit aan de houder en vul het met loog. Zorg dat er geen luchtbellens in de spuit zitten. Zijn deze er toch, haal dan de glazen plunjer van de spuit enige malen snel op en neer, waardoor de belletjes loslaten van de wand.
- e. Stel de micrometerschroef van de buret in op z'n laagste stand. De onderkant van de glazen plunjer moet op de micrometerschroef rusten.
- f. Zet de kraan van de buret zō, dat hij in verbinding staat met de glazen buretpunt in het titratievat.
- g. Zet de selector van de titrator op 'reading'
- h. Breng met een Pasteurpipet de inhoud van buis 1 (esterase blanco) in het titratievat.
Spoel de buis 1x na met 2,125 ml PBZ en breng dit ook in het titratievat.
Breng nu met een meetpipet 0,375 ml ATE in het titratievat.
- i. Zet de roerder aan.
Let op dat deze vrij van de wand en de electrode roert.

(Titrigraph stirring motor op ON)

- j. Spoel de buis nog een keer na met 3,0 ml PBZ en breng dit weer met de Pasteurpipet over in het titratievat.
- k. Zet de selector op reading.
- l. Draai met de micrometerschroef van de buret zolang tot de pH 7,40 is.
- m. Zet de selector op 'UPSCALE'
- n. Zet de 'recording' knop van de titrigraph op 'pH stat ON'
Plaats de pen op het recorder papier en duw hem met de hand naar 0.
- o. Na enige tijd moet het lampje VALVE van de titrator regelmatig aan en uit gaan.
Wanneer het lampje brandt, draait de micrometerschroef van de buret een klein stukje waardoor er loog in het titratievaatje komt.
Tevens schuift de pen van de recorder bij het branden van het lampje een klein stukje op, waardoor op het papier een schuine lijn getekend wordt.
- p. Wanneer het papier 4 cm gelopen heeft (d.w.z. 16 min.) wordt de titratie gestopt:
Recording op 'OFF'
Selector op 'stand by'
Stirring motor 'off'
- q. Zuig het titratievat leeg en spoel het drie keer goed met totaal 30 ml PBZ.
Spoelvloeistof helemaal wegzuigen.
- r. Titreer de inhoud van de buizen 2 en 3 op dezelfde manier als buis 1.

★ Samenstelling:

Bereiding fosfaat gebufferde zoutoplossing voor C_1 inh. bepaling.
N.B. de samenstelling hiervan wijkt af van de normaal gebruikte PBZ
(lab.zout) oplossing.

Fosfaatbuffer:

$$\left. \begin{array}{l} 2,059 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O} \\ 8,375 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O} \end{array} \right\} \text{ oplossen tot 1 liter pH stellen op 7,35}$$

Voor gebruik mengen: 7 delen fosfaatbuffer op 2 delen fysiologische zoutoplossing.

BEREKENING

Na beëindiging van de laatste titratie (een of meer patiënte sera) wordt het beschreven papier van de recorderrol gesneden en af gevloeid.

Met een lineaal wordt door de titratiecurves, die soms heel licht gebogen zijn, een rechte lijn getrokken.

Met een gradenboog wordt de hoek van de titratielijn gemeten.

Uit deze hoek wordt het aantal eenheden enzym (C_1a) berekend.

Een eenheid enzym (C_1a) is gedefinieerd als die hoeveelheid, die uit ATEe in 15 min. tijd 0,0005 m.mol.zuur afsplitst onder gestandaardiseerde omstandigheden (0,05 m ATEe, 37°C, pH 7,4, $\mu = 0,15$).

Een eenheid C_1 -esterase remmer is die hoeveelheid die 10 eenheden C_1 -esterase remt.

Voor de berekening van het aantal eenheden esterase bepaalt men de tangens van de hellingshoek en vermenigvuldigt deze met de factor 75. Hierin zijn alle constanten opgenomen die voor de berekening noodzakelijk zijn.

Deze factor is als volgt afgeleid:

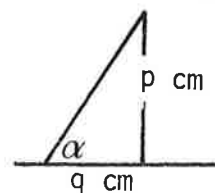
Het aantal m.mol.zuur vrijgekomen in 15 min. gedeeld door 0,0005 is het aantal eenheden C_1 -esterase.

Het aantal m.mol. is gelijk aan:

het percentage van de spuit-inhoud maal de spuit-inhoud (2,5 ml) maal de normaliteit van de loog.

Dus het aantal eenheden C_1 -esterase is gelijk aan: $\frac{X \cdot 2,5 \cdot 0,1}{100 \cdot 0,0005} = 5X$

De tg van de hoek α tussen de titratielijn en de tijdas van het papier bedraagt: $\text{tg}\alpha = \frac{p \text{ cm}}{q \text{ cm}}$



De papierrol is 25 cm breed verdeeld in 100%.

1% is dan 0,25 cm.

p cm is dan $0,25X$

De papierrol loopt 0,25 cm per minuut gedurende 15 min. d.w.z.

$q \text{ cm} = 0,25 \times 15$ $\text{tg}\alpha = \frac{0,25X}{0,25 \times 15} = \frac{X}{15}$ of wel $15 \cdot \text{tg}\alpha = X$

$5X$ is het aantal eenheden C_1 -esterase dus $75 \text{ tg}\alpha$ is het aantal eenheden C_1 -esterase per ml.

Van het aantal eenheden esterase dat bepaald wordt in buis 1 trekt men het aantal eenheden dat overgebleven is in buis 2 of 3 af. Het ontstane verschil deelt men door 10 (zie def. remmer) en vermenigvuldigt het met de verdunningsfactor 2 (0,5 ml serum werd gebruikt voor de bepaling).

Bij hoge remmerconcentraties is het soms nodig de hoeveelheid serum die voor de bepaling gebruikt wordt te verminderen tot 0,2 of 0,1 ml. Voor de berekening geldt dan de verdunningsfactor 5 resp. 10.

Wel moet voor de incubatie van serum en esterase het volume steeds met PBZ op 2 ml gebracht worden.

Behalve het op deze wijze bepaalde aantal eenheden C_1 inh. in het patiënte serum, wordt ook het percentage hiervan t.o.v. een normaal standaard serum opgegeven.

ISOLATIE VAN PARAPROTEINE IgA UIT PATIENTESERUM

=====

Het patienteserum wordt met 100%-ige ammoniumsulfaat (0°C) tot een verzadiging gebracht van 50% en na 4 uur 0°C gecentrifugeerd m.b.v. een Sorvall (10 min. 10.000 rpm, SS34 rotor). Het precipitaat wordt opgelost in PBZ en verdund tot het oorspronkelijke serum volume; daarna gedialyseerd (24 uur) tegen een 100-voudig volume PBZ.

Daarna wordt toegevoegd 2 volumina acetaatbuffer, 0,06 M pH 4,8. Aan dit preparaat wordt langzaam onder roeren caprylzuur toegevoegd tot een eindconcentratie van 6,8%. Na 20 min. incuberen bij kamertemperatuur centrifugeren m.b.v. een Sorvall (+4°C, 10 min. 10.000 rpm, SS34 rotor). Bovenop ligt dan vast caprylzuur dat voorzichtig met een pincet verwijderd kan worden. Het sup nu decanteren en filtreren over watten.

Het filtraat is dan het sup_{cp} dat op pH ca. 8 gebracht wordt met loog; daarna gedialyseerd tegen PBZ. Het prec_{cp} wordt opgenomen in PBZ.

Het sup_{cp} en prec_{cp} worden getest in immunoelectroforese tegen anti-totaal (PH00).

Als het sup_{cp} inderdaad bijna alleen de immunoglobulinen bevat, wordt dit verder verwerkt. Het prec_{cp} bestaat dan grotendeels uit gedenateerd eiwit.

Ionenwisseling wordt uitgevoerd over Sephadex DEAE-A50 met een kolom met een volume van minimaal 6x het volume van het op te brengen preparaat. De Sephadex is van tevoren geëquilibreerd met fosfaatbuffer (FFB) 0,01 M pH 7,4.

Het sup_{cp} wordt gedialyseerd tegen dezelfde buffer. Na doorspoelen van de kolom met FFB 0,01 M pH 7,4 volgt elutie m.b.v. een stapsgewijze gradiënt met de buffers:

I	FFB 0,05 M pH 7.0	} ieder ca. 2x bedvolume v.d. Sephadex
II	FFB 0,05 M pH 7.0 + 0,05 M NaCl	
III	FFB 0,05 M pH 7.0 + 0,1 M NaCl	

Van de frakties welke m.b.v. een collector worden opgevangen wordt de extinctie gemeten; de eiwitbevattende frakties worden aan de hand van het elutiepatroon gepooled en geconcentreerd (conc. ± 1%), dan getest in immunoelectroforese tegen PH00. Frakties die zuiver IgA blijken te bevatten worden verder getest m.b.v. dubbeldiffusietechnieken volgens

Ouchterlony tegen specifieke antisera.

Voor frakties die naast IgA nog meerdere eiwitten bevatten kunnen de volgende zuiveringsmethoden gebruikt worden:

1. De stapsgewijze verzadiging met ammoniumsulfaat:

Eerst tot 40% verzadiging; na centrifugering wordt het sup gebracht op 45% verzadiging.

Het prec 40, prec 45 en sup 45 worden getest in immunoelectroforese en Ouchterlony (zie boven).

2. Caprylzuur precipitatie (zie terug).

Deze methode kan het best toegepast worden bij sterk verontreinigde frakties: hoe zuiverder het preparaat, des te groter het verlies door denaturatie.

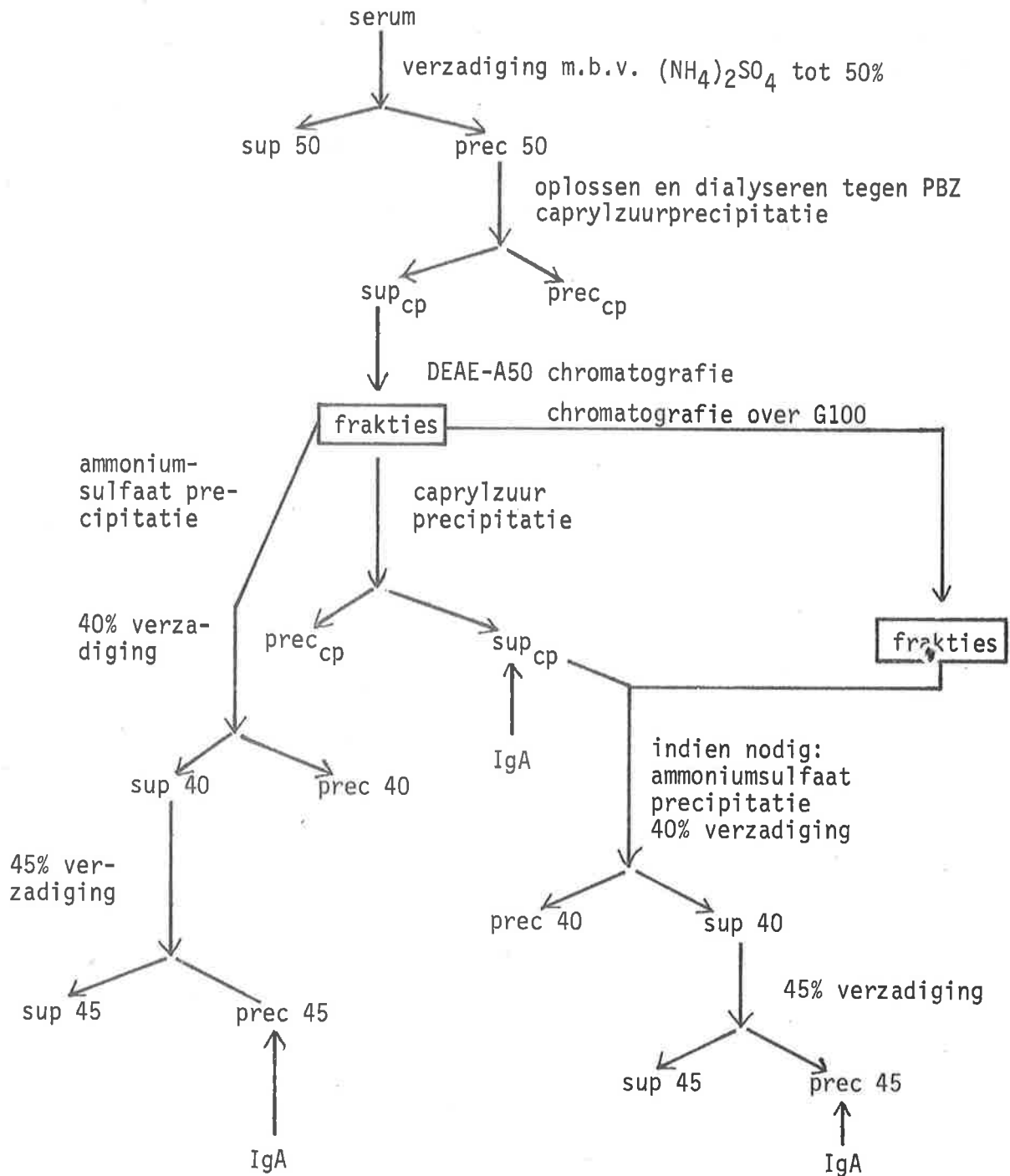
Na centrifugering blijven in het sup alleen de immunoglobulinen achter. Hierna kan dan weer stap 1 gedaan worden (indien nodig) om het resterende IgG te verwijderen.

3. Gelfiltratie over Sephadex G100:

Soms komt het voor dat frakties als contaminant losse L-keten bevatten. Door gelfiltratie over Sephadex G100, geëquilibreerd met PBZ + 1 M NaCl kan deze verwijderd worden.

Voor het zuiveringsschema zie blz. 750/39 blz.3

ZUIVERINGSSCHEMA



BATCHGEWIJZE ZUIVERING VAN HUMAAN IgG UIT EEN IMMUNOGLOBULINE FRAKTIE
=====

30 ml, 16%-ige immunoglobuline preparaat (uit normaal serum) wordt gedialyseerd tegen fosfaatbuffer 0,01 M pH 7.0 (natriumbifosfaat, op pH gesteld met NaOH). Na dialyse wordt het preparaat verdund tot $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = \pm 50$ en geïncubeerd gedurende 60 min. bij 25°C met een minimaal 2-voudige hoeveelheid Sephadex DEAE-A50 die geëquilibreerd is in dezelfde fosfaatbuffer.

Het niet gebonden materiaal wordt afgezogen op een Büchnertrechter. De Sephadex wordt daarna nog 3x gewassen met de fosfaatbuffer. Het filtraat en de wasvloeistof bevatten het IgG.

Vervolgens wordt de Sephadex nog geïncubeerd met 0,5 M fosfaatbuffer + 0,5 M NaCl om de rest van de eiwitten uit de Sephadex te wassen. Alle frakties worden dan in hoge concentraties getest in immunoelectroforese en dubbeldiffusietechniek volgens Ouchterlony.