

TYPING VAN GLUCOSE-6-FOSFAAT-DEHYDROGENASE d.m.v. STIJFSELGEL-
ELECTROFORESE

=====

Literatuur

1. H.N. Kirkman en E.M. Hendrickson: Am.J.Hum.Genet. 15, 241 (1963)
"Sex-linked electrophoretic difference in Glucose-6-phosphate
Dehydrogenase".
2. O. Smithies: Bioch.J. 71, 585 (1959), "An improved procedure for
starch gel electrophoresis; further variations in the serum proteins
of normal individuals".
3. C.K. Mathai, S. Ohno en E. Beutler: Nature 210, 115 (1966), "Sex
linkage of the Glucose-6-phosphate Dehydrogenase gene in equidae".
4. W.H.O. Report on G6PD (5- 10 Dec. 1966), pp. 10- 11, 45-47.

Bereiding bufferoplossingen en reagentia

Voorraad-oplossingen

- A. 0,5 M K_2HPO_4 (87,10 g/l) (348,4 g/l) bewaren bij +4°C
B. 0,5 M KH_2PO_4 (68,05 g/l) (272,2 g/l)

- a) Buffer voor stijfsgel 0,01 M K-fosfaat, pH 7,0 (vlak voor gebruik
bereiden)

6 ml van opl. A wordt verdund met aqua dest tot 300 ml (A');

6 ml van opl. B wordt verdund met aqua dest tot 300 ml (B').

Oplossing A' wordt met opl. B' op pH 7,0 gebracht (ca 290 ml B' nodig)

- b) Buffer voor haemolysaat-bereiding

In 250 ml 0,01 M K-fosfaat-buffer pH 7,0 (zie opl.a) wordt 0,25 g EDTA
(Komplexon III, Siegfried) en 0,5 ml β -mercaptoethanol (Fluka) opgelost.
Bewaren bij +4°C.

- c) Buffer voor de elektrodevaten 0,1 M K-fosfaat, pH 7,0 (vlak voor gebruik
bereiden)

250 ml van opl. A wordt verdund met aqua dest tot 1250 ml (A'');

200 ml van opl. B wordt verdund met aqua dest tot 1000 ml (B'').

Oplossing A'' wordt met opl. B'' op pH 7,0 gebracht (ca 850 ml B'' nodig).

In het kathodevat (het bovenste) wordt 1 liter buffer gebracht + 2 ml
van een NADP-oplossing welke 5 mg/ml bevat (zie opl. e).

De rest van de buffer in het anodevat. Deze opstelling dient zich te
bevinden in de koude kamer (+4°C).

d) Kleuringsoplossing

Deze wordt vlak voor het gebruik bereid uit een voorraad-oplossing 0,1 M Tris-HCl-buffer pH 8,0 (welke bewaard wordt bij +4°C) in 10 ml buffer wordt opgelost:

- 10 mg glucose-6-fosfaat (di-Na-zout, Boehringer)
- 2 mg NADP(TPN, Na-zout, Boehringer)
- 2 mg MTT (tetrazolium-zout, Sigma)
- 2 mg Phenazine Methosulfaat (PMS, Sigma)

e) NADP(TPN)-oplossing

50 mg NADP (TPN, Na-zout, Boehringer) oplossen in 10 ml aqua dest. Bewaren bij -20°C.

Bereiding stijfselgel

65 g stijfsel (starch-hydrolysed, Connaught) wordt tezamen met 0,5 g EDTA (Komplexon III, Siegfried) gesuspendeerd in 500 ml 0,01 M K-fosfaat-buffer, pH 7,0 (opl. a), in een 2 ltr Pyrex rondbodemkolf met lange hals.

Vervolgens wordt verhit op een open gasvlam onder voortdurend omzwenken. Na enige tijd wordt de massa viskeus, bij verder verhitten wordt ze echter weer dunvloeibaar. Als het mengsel begint te koken, wordt ontlucht aan een waterstraal- of oliepomp.

Na het ontluchten wordt 1 ml van de NADP-oplossing (dus 5 mg) toegevoegd en wordt nog enige seconden voorzichtig geschud.

Daarna wordt de gel zo egaal mogelijk over het frame gegoten; op de plaats waar de monsters opgebracht zullen worden (ca 10 cm van een der uiteinden), wordt een van tevoren licht met paraffine-olie ingevette mal aangebracht (vlak voor het aanbrengen wordt de mal overgoten met de gel-massa).

Vervolgens kan men de gel 1 uur bij kamertemperatuur laten staan, daarna nog 1 uur bij +4°C.

Bereiding haemolysaat

Uitgegaan wordt van gewassen packed cells. In het algemeen (bij normale G6PD-activiteit) kan een 1:100 haemolysaat gemaakt worden: 0,01 ml cellen + 1 ml buffer "b".

Bij een lagere activiteit kan een geconcentreerder haemolysaat bereid worden, bijv. 1:50 of 1:25.

Gereed maken van de gel voor electroforese

Na verwijdering van de mal vult men de gleufjes met haemolysaat (indien een gleufje overloopt moet m.b.v. Kleenex afgezogen worden). Daarna wordt de gel bedekt met een mengsel paraffine en vaseline (55 g vaste paraffine en 250 g vaseline) van 60°C.

Eerst dienen de gleufjes bedekt te worden (voorzichtig, opdat het monster niet uit de gleuf wordt verwijderd), vervolgens het gehele frame.

Eventuele barsten worden hersteld met een nieuw laagje. Na het hard worden van de deklaag worden de zijschotten verwijderd en de gel wordt verticaal in de electrode-opstelling geplaatst. Deze bevindt zich in de koude kamer (+4°C). De vaten dienen gevuld te zijn zoals bij buffer "c" aangegeven. De opbrengplaats moet zich aan de bovenkant van het frame bevinden. M.b.v. filtreerpapier verbindt men het bovenste einde van de gel met de kathode, het onderste eind met de anode. (N.B. Het kathode-vat dient zich op een verhoging te bevinden, zodat de bovenrand van vat en gelframe zich ongeveer op dezelfde hoogte bevinden). Vervolgens wordt de gelijkspanningsbron ingeschakeld; de spanning over de platinaelectroden stelt men in op ca 170 V. De stroomsterkte bedraagt dan ongeveer 35-45 mA. De duur van de electroforese is 16-17 uur. Na een uur dient de spanning, welke iets oploopt, bijgesteld te worden.

Ontwikkeling van het electroforese-beeld

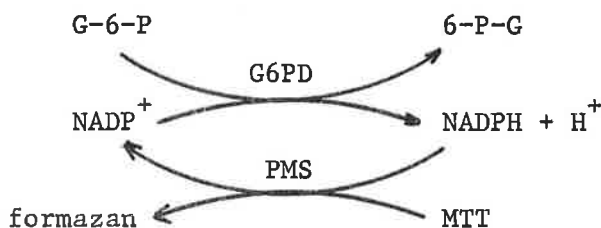
Na de electroforese wordt de paraffinelaag verwijderd. Bij de gebruikte pH loopt het haemoglobine naar de kathode, het G6PD, evenals het 6PGD, naar de anode, dus naar beneden. Het gedeelte waarin G6PD verwacht mag worden, d.w.z. vanaf de opbrengplaats tot ca 10 cm daarvan verwijderd in de

richting van de anode, wordt uitgesneden en overgebracht op het "snijframe". Het snijden gebeurt met een scherp, natgemaakt vleesmes, terwijl op de gel een glasplaat of iets dergelijks wordt gelegd (dit om opbollen e.d. te voorkomen). De gel dient ook zo vochtig mogelijk te zijn tijdens het snijden. Eén van beide helften (liefst de onderste) wordt gebruikt voor de kleuring. De andere helft kan nog gebruikt worden voor kleuring van eventuele andere enzymen. De kleuring gebeurt door over de gel (die zich nog op het snijframe bevindt) 10 ml kleuringsoplossing (zie opl. d) te gieten. Hierna wordt de gel onmiddellijk in het donker gelegd, aangezien het PMS lichtgevoelig is, en men laat de oplossing ca 30 min. inwerken. Dan wordt ontkleurd in een bakje met water (ook in het donker) gedurende 2-4 uur.

Het G6PD is dan zichtbaar als een blauw vlekje, 3-4½ cm vanaf de opbrengplaats. Meestal is ook nog het 6PGD zeer licht zichtbaar (2-3 cm vanaf de oorsprong) t.g.v. het bij de reactie ontstane 6-fosfo-gluconaat. Het is op deze manier mogelijk G6PD te onderscheiden in verschillende fenotypen.

Het mechanisme van de kleuring

De kleuring berust op een enzymatisch mechanisme; de reacties die plaatsvinden zijn:



MTT wordt door het vrijkomende NADPH gereduceerd tot een onoplosbaar formazan (blauw).

PMS fungeert waarschijnlijk als "electron carrier".

In principe is op deze manier ieder dehydrogenase aan te tonen, bijv. 6PGD of LDH, als maar het juiste substraat wordt toegevoegd (en event. NAD i.p.v. NADP).

ELECTROPHORESE VOOR G6PD TYPERING IN POLYACRYLAMIDEGEL

=====

- Literatuur
- 1) L. Ornstein, B.J. Davis Disc Electrophoresis
Preprinted by Distillation Products Industries
 - 2) D.A. Smink Het gebruik van polyacrylamide gel
bij het onderzoek van G-6-PD (stencil)

Oplossingen

De oplossingen, waarvan de samenstelling hieronder vermeld is, worden in de ijskast bij +4°C bewaard. Het gevormde neerslag in de flesjes, wordt verwijderd door filtratie.

A:	1 N HCl	48 ml
	Tris tot pH 7,9	
	Tetramethylaethyleen-	
	diamine	1 ml
	aqua dest tot	100 ml
B:	1 N HCl	48 ml
	Tris tot pH 6,7	
	Tetramethylaethyleen-	
	diamine	3 ml
	aqua dest tot	100 ml
C:	Acrylamide	30 g
	Methyleenbis-	
	acrylamide	0,8 g
	$K_3Fe(CN)_6$	15,0 mg
	Aqua dest tot	100 ml
D:	Acrylamide	20,0 g
	Bis	2,5 g
	$K_3Fe(CN)_6$	10,0 mg
	aqua dest tot	100 ml
E:	Riboflavine	4,0 mg
	aqua dest tot	100 ml

Het gereed maken voor electrophorese

- 1) Zet de vorm in elkaar. Gebruik hierbij de kam met 20 tussenschotten. De vorm wordt afgedicht met klemmen, vaseline en leukoplast.
- 2) Bereid de volgende oplossing in een bekersglasje in de opgegeven volgorde:

11 ml aqua dest + spatelpunt ammonium persulfaat
3 ml oplossing D
2 ml oplossing B

Giet deze oplossing direkt in de rechtopstaande vorm tussen de tanden van de kam en een paar millimeter daar boven. Zodra de gel gevormd is, wordt het waterlaagje afgegoten.

- 3) Bereid de volgende small pore gel in een bekersglas:

24 ml aqua dest + spatelpunt ammonium persulfaat
11 ml oplossing C
5 ml oplossing A pH 7.9

Giet deze oplossing op de reeds gestolde gel-laag. Let de eerste 10 min. goed op eventuele lekkages; deze zijn te verhelpen door aanstrijken met vaseline. Nadat de polymerisering voltooid is, wordt het laagje water dat boven op de gel-laag aanwezig is, verwijderd.

- 4) De kam wordt nu voorzichtig losgemaakt. Met een klein spateltje kan men het loslaten van de gel tussen de tanden van de kam vergemakkelijken. Wanneer de kam verwijderd is, wordt de vaseline in de vorm weggeveegd met een Kleenex-tissue en worden de polyacrylamide staafjes netjes recht gelegd. Vervolgens wordt de vorm weer afgedicht met de gladde deksel met behulp van leukoplast, vaseline en de klemmen. Er zijn nu 20 kokertjes ontstaan, die gevuld kunnen worden met een oplossing ongepolymeriseerd acrylamide en haemolysaat.

5) 0,1 ml vers haemolysaat wordt verdund tot ca 1 ml met aqua dest en gedurende 10 minuten afgedraaid in de klinische centrifuge op maximaal toerental. In een puntbuis worden twee druppels (0,1 ml) van dit haemolysaat vermengd met

0,4 ml van een oplossing van de volgende samenstelling:

1,5 ml oplossing E

2,0 ml oplossing D

4,0 ml H₂O

1,0 ml oplossing B

Het verkregen mengsel wordt in de uitgespaarde kokertjes gedaan en gepolymeriseerd met behulp van zonlicht of een 250 Watt photoflux-lamp. De warmte welke door de lamp ontwikkeld wordt, is schadelijk voor het enzym, zodat deze geabsorbeerd moet worden met een fles gevuld met water, die tussen de lamp en de electrophorese-vorm is opgesteld.

6) Nadat de polymerisering is voltooid, verwijdert men het laagje, dat niet is gepolymeriseerd, plaatst de vorm in een glazen buffer-vat met de positieve electrode en brengt op de large-pore gel de "Tris"-glycine buffer pH 8,3 + TPN(1 mg/100 ml) aan, alsmede de negatieve electrode. De lucht, welke zich aan de onderkant in de vorm bevindt, wordt met een kromgebogen pipet weggezogen. De electrode in het bovenvat moet zo goed mogelijk horizontaal lopen. Vervolgens wordt de stroom ingeschakeld. De stroomsterkte mag maximaal 45 mA bedragen met het oog op denatureren door warmteontwikkeling. De electrophorese wordt uitgevoerd in een koelruimte.

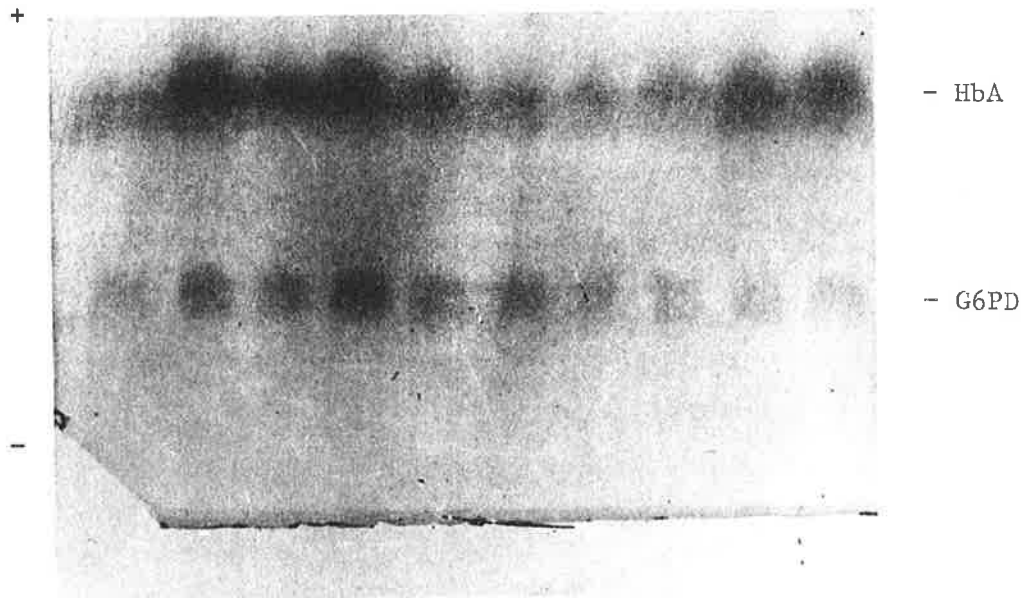
7) Het verdient aanbeveling de buffer in het bovenvat gedurende de electrophorese enige malen te verversen; doet men dit niet, dan loopt men het gevaar, dat zich na enige tijd een tweede front gaat vormen, dat alle eiwitfracties die zojuist zijn gescheiden, weer gaat verzamelen in één enkele band.

8) Na 4 à 5 uur is de electrophorese doorgaans ver genoeg gevorderd. De gel wordt nu uit de vorm gehaald en in twee gelijke delen gesneden in de electrophorese richting. Ieder deel wordt met de helft van het nu volgende reagens gekleurd in een plastic zak bij 25°C, in het donker.

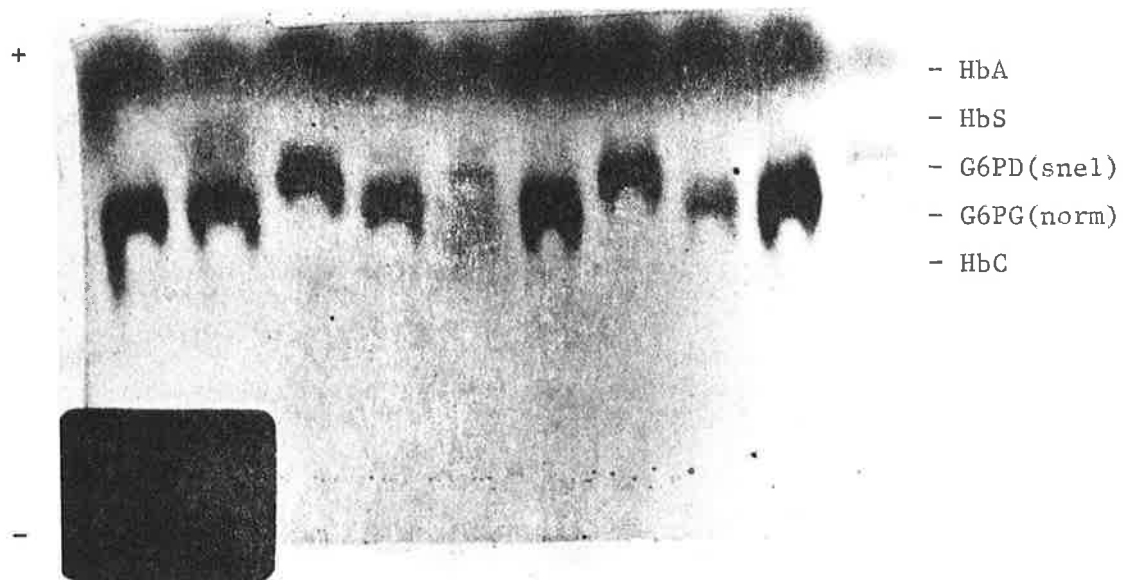
50	mg	G-6-P
12	mg	TPN
2	mg	Nitro blue tetrazolium (Serva Heidelberg)
0,5	mg	Phenazine methosulfaat (Sigma Chemical Company)
2,5	mg	0,1 M MgCl ₂ oplossing
2,5	ml	0,25 M Tris-HCl oplossing
7	ml	H ₂ O

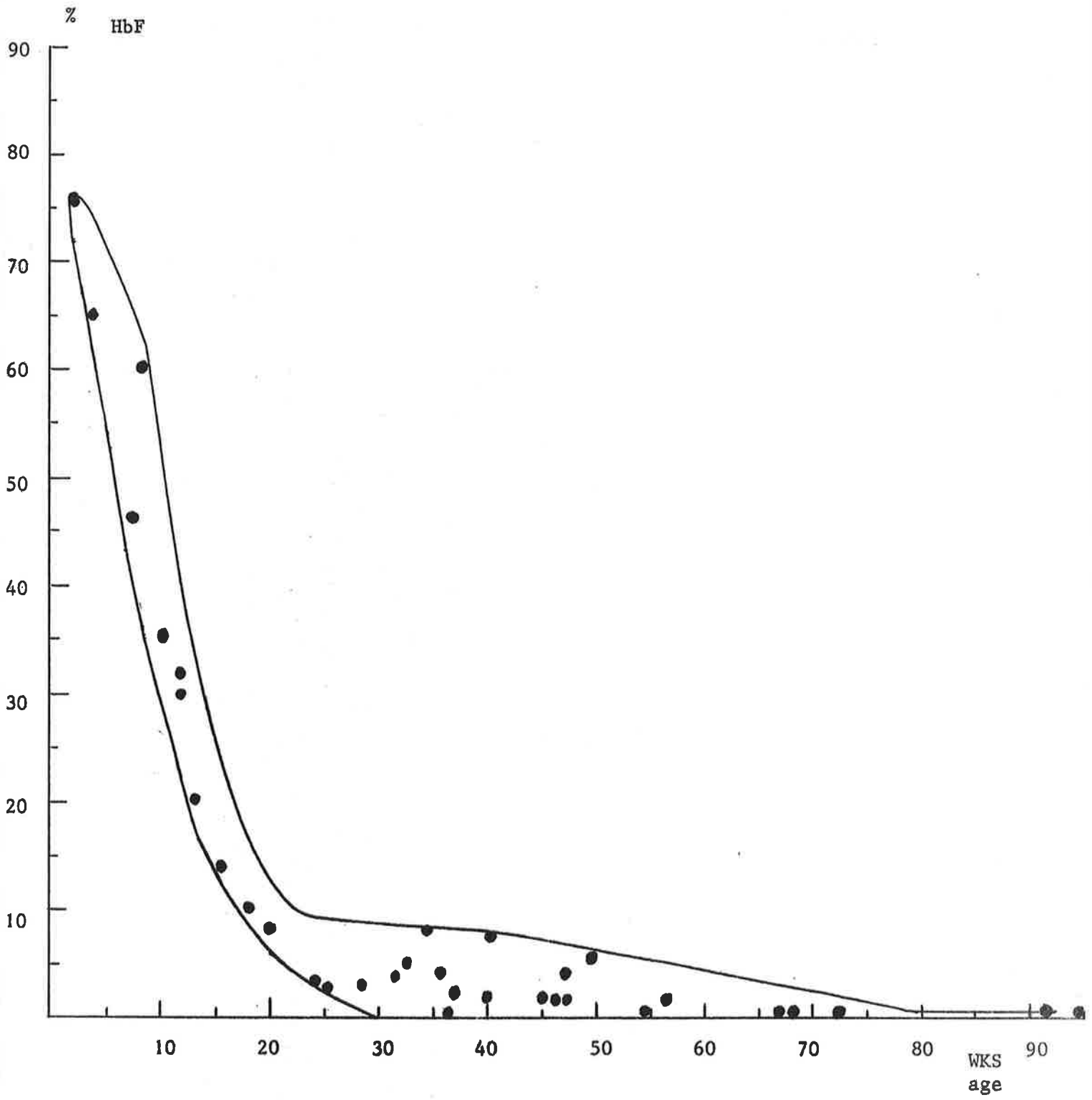
Er wordt ca 16 uur gekleurd. De meest actieve fracties worden na ca 2 uur zichtbaar. De overmaat reagens wordt nu weggewassen met een 7% azijnzuur oplossing in aqua dest.

Indien men dat wenst kan men de gel bewaren, door deze bij kamertemperatuur te laten indrogen.



Normale haemolysaten





DE BEPALING VAN HAEMOGLOBINE IN PLASMA

Bij de hier beschreven spectrophotometrische bepaling wordt gebruik gemaakt van het hoge absorptie-maximum van haemoglobine bij 415 m μ . Terwijl plasma in het spectrale gebied van 500 m μ tot 350 m μ een zeer gelijkmatige, bijna rechtlijnige stijging van de extinctie vertoont, heeft haemoglobine bij 500 m μ een minimum, bij 415 m μ een scherp maximum en bij 370 m μ weer een minimum.

In principe laat zich de haemoglobine-concentratie in plasma dus als volgt bepalen:

Men meet van een haemoglobine-houdend plasma-monster de extinctie bij 370, 415 en 500 m μ , brengt daarna de drie gevonden waarden in grafiek (X-as: golflengte en Y-as: extinctie), verbindt door een rechte lijn de gevonden waarden bij 370 en 500 m μ . Op deze manier kan men tennaaste bij de extinctie bepalen, welke het plasma bij 415 m μ zou hebben gehad, wanneer geen haemoglobine aanwezig was. (Hierbij uitgaande van de veronderstelling, dat het extinctie-verloop van haemoglobine-vrij plasma tussen 370 en 415 m μ rechtlijnig is; dit is moeilijk te controleren, daar haemoglobine-vrij plasma zeer moeilijk te bereiden is).

In het verschil tussen de grafisch gevonden extinctie en de gemeten extinctie bij 415 m μ heeft men een maat voor de haemoglobine-concentratie in het plasma.

De bruikbaarheid van de methode is in de volgende experimenten met een reeks plasma-monsters nagegaan.

De gang van zaken was als volgt:

Van een reeks plasma-monsters (getrokken direct na de V.U.-bestraling) werd steeds 1 ml verdund met 4 ml gedestilleerd water. Van de zelfde reeks werd bovendien nog een serie 1 ml-porties genomen, waaraan steeds 1 ml of 2,2 mg % HbO₂ solution werd toegevoegd, weer gevolgd door verdunning tot 5 ml. Van ieder van de zo bereide oplossingen werd in een Unicam-spectrophotometer de extinctie bepaald bij 370 m μ , 415 m μ en 500 m μ ; spleetbreedten resp. 0,1 0,05 en 0,03 mm. Van ieder plasma-monster werd een grafiek gemaakt volgens het schema, aangegeven in fig. 2. De punten van eenzelfde plasma-monster,

gemeten met en zonder extra-haemoglobine toevoeging, werden ondergebracht in één grafiek.

De resultaten van de verschillende metingen zijn samengebracht in de volgende tabel:

Plasma zonder extra-Hb			Plasma met extra-Hb			Stijging door Hb-toevoeging		
370 m μ	415 m μ	500 m μ	370 m μ	415 m μ	500 m μ	370 m μ	415 m μ	500 m μ
0,253	0,259	0,121	0,312	0,605	0,133	0,058	0,346	0,012
420	508	208	520	878	234	100	370	026
301	362	148	378	680	165	077	418	017
575	545	278	640	920	305	065	355	027
342	332	161						
358	368	169	418	721	188	060	353	019
387	369	184	462	732	211	075	363	027
388	428	178	453	780	201	065	352	023
390	419	191						
403	412	190	465	764	213	062	352	023
381	368	176	437	718	195	056	350	019
362	367	167	413	716	186	052	349	019
375	368	182						
520	492	256	575	845	270	055	353	014
452	458	223	500	795	231	048	337	008
382	401	178	442	752	197	060	351	019
360	401	160						
307	337	144	362	700	161	055	363	017
530	530	254	585	877	270	055	347	016
423	338	153	391	698	171	-0,032	360	018
568	565	275						
370	384		430	750	190	+0,060	366	018
452	442	208	504	792	222	052	350	014
304	315	149	365	664	160	061	349	011
514	493	249						
532	524	254	580	885	276	048	361	013
540	548	270	572	875	268	032	328	
288	310	130	382	683	173	094	373	043
603	577	285						
404	414	187	450	754	204	046	340	017
654	649	313	723	1,019	338	031	370	025
412	422	197	462	750	212	050	<u>328</u>	015
gem.						0,359		
σ						0,013		

1. De gemiddelde stijging van de waarde h (zie fig.2) na toevoeging van extra-haemoglobine is 0,306 ($\sigma = 0,013$) 1 mg % stijging 0,0139

2. Het gemiddelde van de waarde e (zie fig.2), dus de extinctie bij 415 $m\mu$ teweegebracht door het plasma, na aftrek van de extinctie-bijdrage van het haemoglobine, is 0,345; $\sigma = 0,085$. De laagste e -waarden, die men in normaal plasma mag verwachten, zijn dus $0,345 - 2 \sigma = 0,175$.

De extinctie van een 5 mg % (25 mg % in vijfvoudige verdunning) HbO_2 -opl. bij 415 $m\mu = 0,405$.

De berekende Ext.415 van een vijfvoudige verdunning van een plasma-opl. met een zeer lage eigen extinctie, bevattende 25 mg HbO_2 per 100 ml onverdund plasma, is derhalve $0,175 + 0,405 = 0,580$. Van een vijfmaal met water verdund plasma-monster met extinctie bij 415 $m\mu$ lager dan 0,580 mag men dus met een zeer geringe foutenkans zeggen, dat het minder dan 25 mg % oxy-haemoglobine bevat.

De gang van zaken bij het beoordelen van het haemoglobine-gehalte van plasma moet zijn:

- a) Van alle monsters wordt 1 ml aangevuld met gedestilleerd water tot 5 ml; bij een spleetbreedte van 0,05 mm wordt dan de extinctie bij 415 $m\mu$ gemeten, met water als blanco. Is de extinctie lager dan 0,500, dan wordt het betreffende plasma zonder meer goedgekeurd. Is de extinctie hoger dan 0,500, dan moet ook nog de extinctie bij 370 $m\mu$ (spleetbreedte 0,1 mm) en 500 $m\mu$ (spleetbreedte 0,03 mm) bepaald worden. Met behulp van de drie gemeten punten wordt grafisch de hoogte h (fig.2) bepaald. Wanneer deze lager is dan 0,350 wordt het plasma alsnog goedgekeurd. (0,350 is de stijging van de waarde h , wanneer aan plasma 25 mg % HbO_2 wordt toegevoegd).
- b) Wil men van een bepaald plasma-monster het HbO_2 -gehalte weten, dan bepaalt men de hoogte h ; uit deze hoogte h vindt men alsvolgt het HbO_2 percentage:

$$\text{aantal mg \% } HbO_2 = \frac{h}{0,350} \times 25 = \frac{h}{0,350} \times 71,4$$

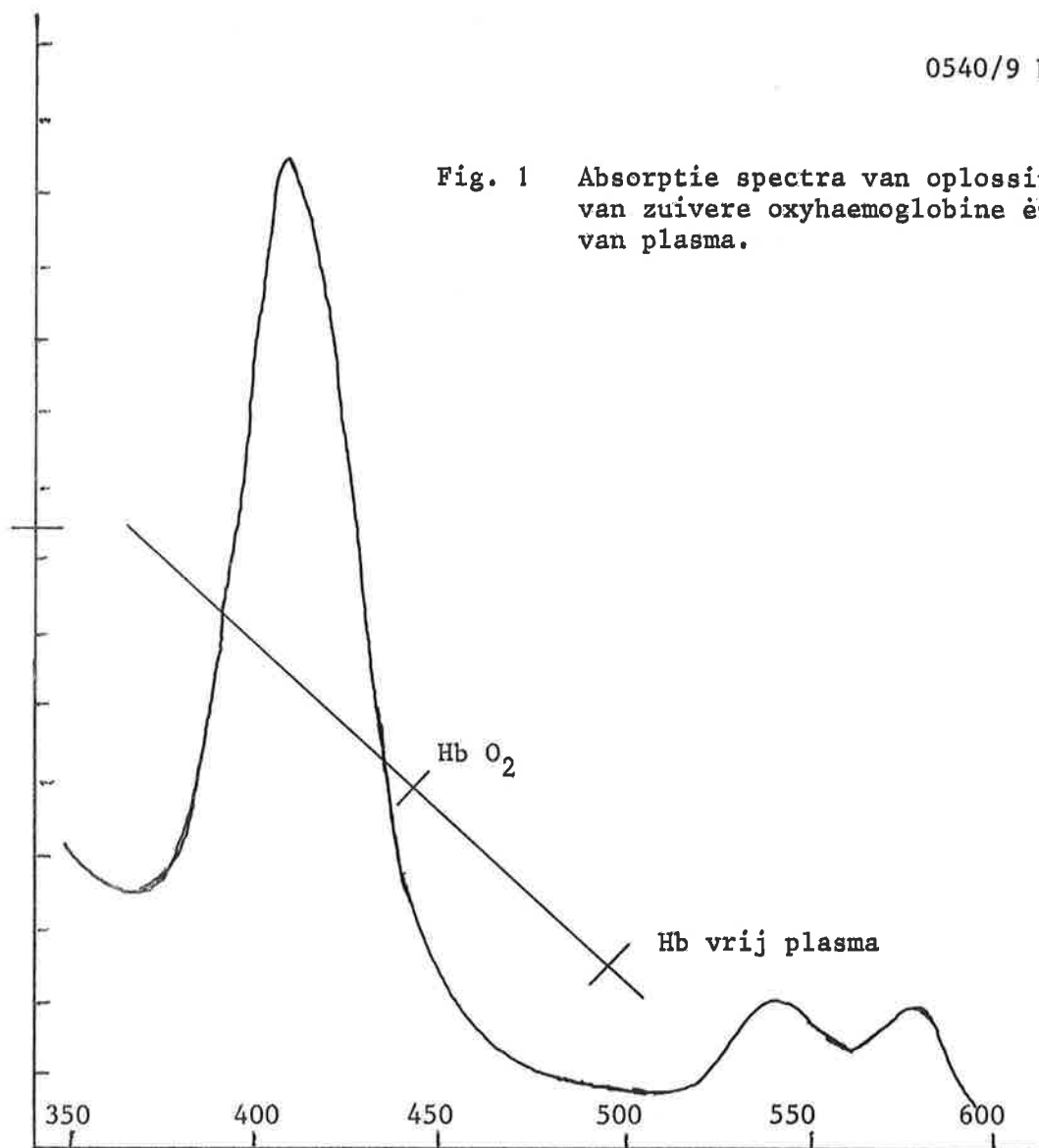
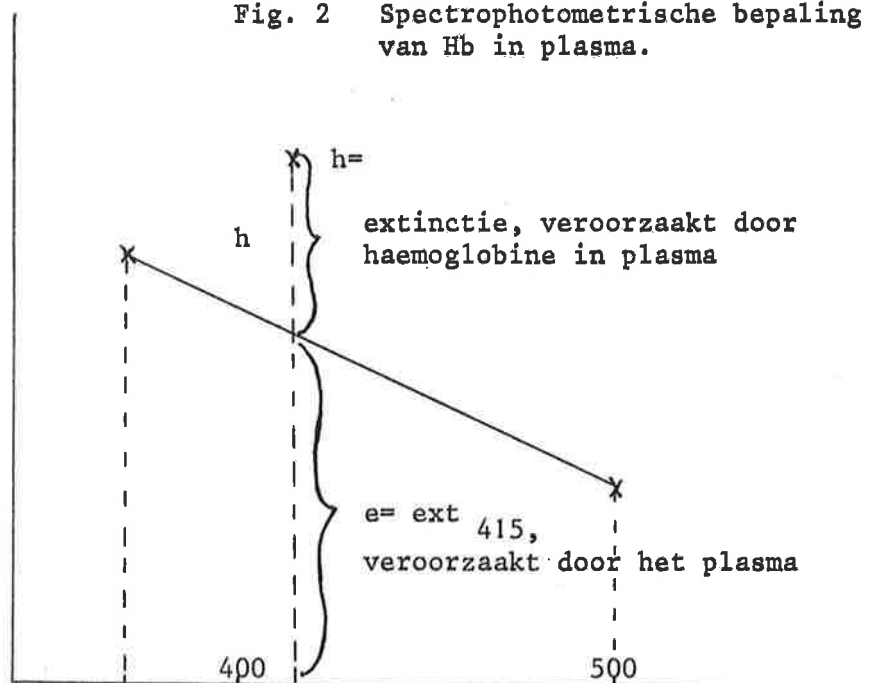


Fig. 2 Spectrophotometrische bepaling van Hb in plasma.



BEPALING VAN METHAEMOGLOBINE IN BLOED
=====Literatuur:

K.A. Evelyn and H.T. Malloy. J. Biol. Chem. 126 (1938) 655, 662;
Microdetermination of oxyhaemoglobin, methaemoglobin and sulphae-
moglobin in blood.
T. Leahy and R. Smith, Clin. Chem. 6 (1960) 148;
Notes on methaemoglobin determination.

Principe

Bij de bepaling wordt gebruik gemaakt van de omstandigheid, dat methaemoglobine licht absorbeert bij 635 m μ , terwijl oxyhaemoglobine en methaemoglobine-cyanide dat niet doen. De daling van de optische dichtheid van een haemoglobine-oplossing bij 635 m μ na toevoeging van cyanide is recht evenredig met de hoeveelheid methaemoglobine. De totale hoeveelheid haemoglobine in oplossing kan men bepalen, door zowel de methaemoglobine als de oxyhaemoglobine om te zetten in methaemoglobinecyanide en de optische dichtheid te meten bij 540 m μ .

Reagentia

$\frac{1}{60}$ M fosfaatbuffer pH 7.4; verkregen door 6-voudige verdunning van 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4 (zie voorschrift v. glutathionreductase), na verdunning de pH controleren.
een neutrale oplossing van 4 g NaCN/100 ml;
een oplossing van 10 g kaliumferricyanide/100 ml.

Uitvoering

In vier grote reageerbuisen (A,B,C en D) pipetteert men resp. 10, 9,7 7 en 7 ml fosfaatbuffer. In buis B pipetteert men 0,3 ml onstolbaar gemaakt bloed, mengt, en meet na 5 minuten de optische dichtheid D_1 bij 635 m μ , de inhoud van buis A als blanco-oplossing gebruikend.

De meting wordt herhaald, 2 minuten nadat aan beide buizen 2 druppels natriumcyanide-oplossing zijn toegevoegd (D_2).

Nu pipetteert men bij buis A en B 0,1 ml kaliumferricyanide-oplossing en brengt na goed mengen 1 ml van A en B over in resp. C en D.

Na goed mengen wordt van de inhoud van buis D de optische dichtheid bij 540 μ bepaald, met C als "blanco".

Berekening

$D_1 - D_2$ is de daling van de optische dichtheid bij 635 μ na de cyanide toevoeging en is dus recht evenredig met de hoeveelheid methaemoglobine.

D_3 is recht evenredig met de totale hoeveelheid haemoglobine.

$$\text{percentage metHb} = K \times \frac{D_1 - D_2}{D_3}$$

De K- waarde moet voor iedere spectrofotometer worden bepaald.

Voor onze Unicam-spectrofotometer is $K = 51$.

Bepaling van de K-waarde

Hiertoe gaat men uit van een reeks oplossingen met een bekend gehalte aan methaemoglobine.

De bereiding van een reeks bloedmonsters van bekend methaemoglobine-gehalte gaat als volgt:

Verse gewassen erythrocyten worden na centrifugeren in twee porties verdeeld; aan 1 portie voegt men een gelijk volume van een oplossing van 1 g NaNO_2 per 100 ml gebufferd phys. zoutoplossing toe, om alle haemoglobine om te zetten in methaemoglobine. Na enkele wassingen pipetteert men onbehandelde en methaemoglobine houdende erythrocyten in zodanige verhoudingen bij elkaar, dat een reeks mengsels ontstaat met 10, 20 30 t/m 100% methaemoglobine. Na de bepaling van de grootheid $(D_1 - D_2)/D_3$ voor ieder mengsel maakt men een grafiek van deze grootheid als functie van het methaemoglobine-percentages en bepaalt K uit de hellingshoek van de verkregen rechte lijn.