

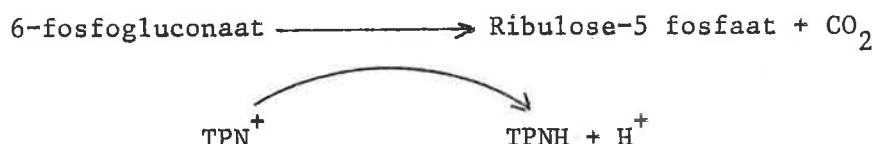
DE BEPALING VAN 6-FOSFOGLUCONAAT-DEHYDROGENASE-ACTIVITEIT
IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

=====

Literatuur : G.W. Löhr, H.D. Waller en O. Karges.
Quantitative Fermentbestimmung in roten Blutzellen.
Klin. Wochenschrift J.G. 35 Hft. 17, pg. 871 (1957)

Principe

6-fosfogluconaat wordt in de erythrocyt enzymatisch geoxydeerd volgens de reactie :



Wanneer men in een geschikt medium een overmaat 6-fosfogluconaat en TPN^+ aan een hemolysaat toevoegt, dan zal de TPNH-productie per minuut per gram hemoglobine, een maat zijn voor de 6-fosfogluconaat-dehydrogenase-activiteit in dit hemolysaat.

De TPNH-productie en het hemoglobine-gehalte in het reactiemedium kan men spectrofotometrisch bepalen.

Methoden

(zie ook onder G6PD-bepaling)

- a) 0.9% NaCl in water (deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren)
- b) 0.25 M Tris-HCl buffer in water pH 7.4 (Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard).
- c) 0.10 M MgCl_2 in water (Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard)
- d) 0.02 M 6-fosfogluconaat in water;
0.1145 g tri-Cyclohexylammoniumzout (Boehringer) wordt opgelost in 10 ml aqua dest (Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard)
- e) 100 mg% TPN in water (Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard)

Het bloed

Zie hiertoe onder G6PD-bepaling

Bereiding van het hemolysaat

Zie hiertoe onder G6PD-bepaling

De activiteitsbepaling

De bepaling geschiedt op precies dezelfde wijze als de G6PD-bepaling, alleen wordt hier de reactie gestart met 0.20 ml 0.02 M 6PG-oplossing.

Berekening van de enzymactiviteit

Zie hiertoe de G6PD-bepaling, de temperatuurscorrectiefactor is af te lezen uit een experimenteel bepaalde curve (zie fig. 1).

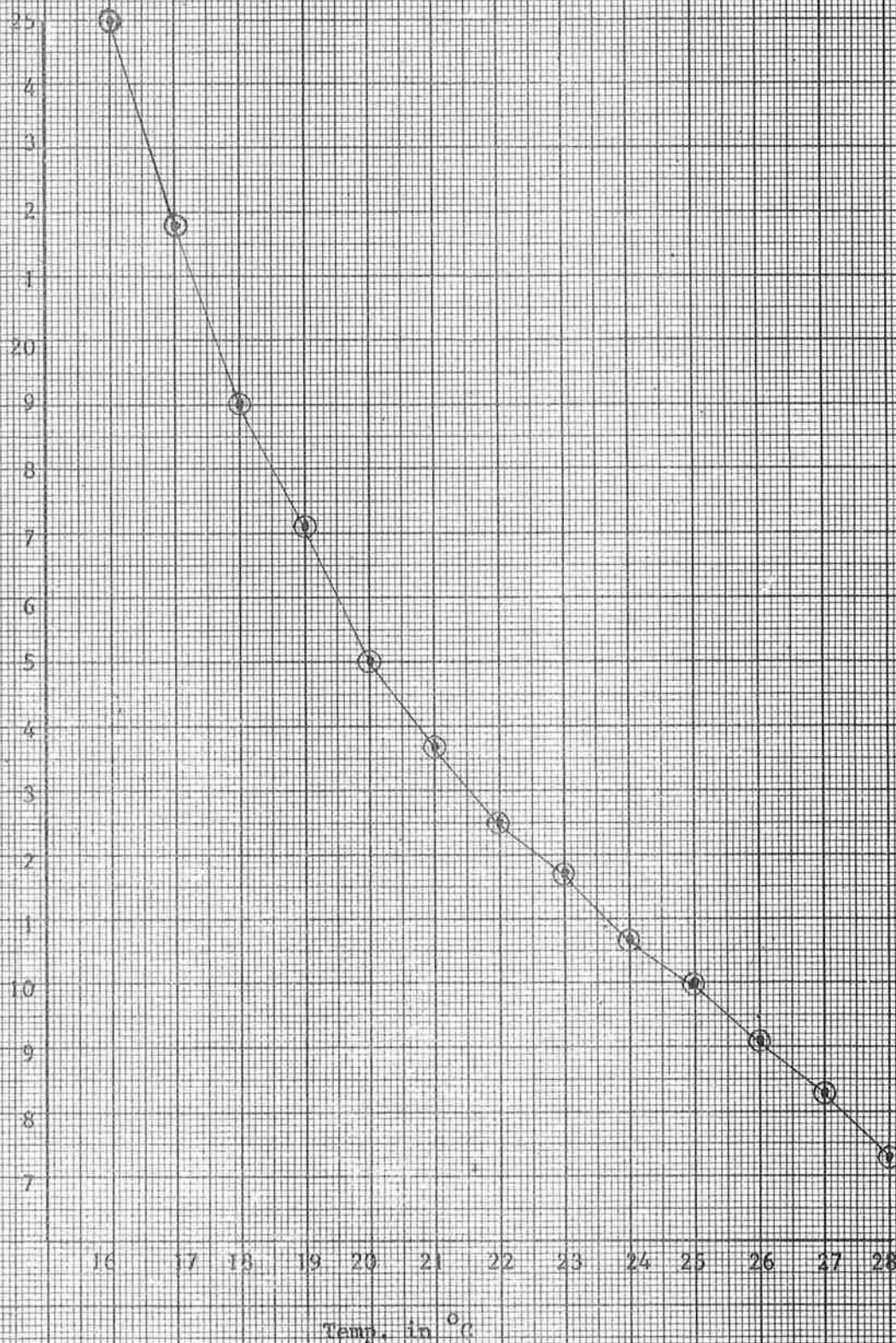
Normale waarde

Van 28 gezonde proefpersonen werd in de erythrocyten de 6PGD-activiteit bepaald; hieruit kon de gemiddelde waarde met de standaarddeviatie voor de enkele meting worden berekend;

in laboratorium-eenheden uitgedrukt bedroeg deze	14.3	$\pm$	2.6
in Marks eenheden uitgedrukt.	5.7	$\pm$	1.0
in Racker eenheden uitgedrukt	2.3	$\pm$	0.42

VERMENIGVULDIGINGSFACTOR

(fig. 1.)



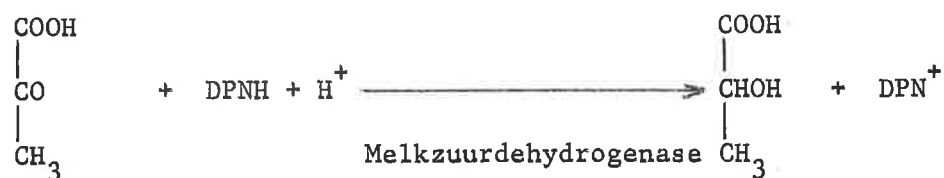
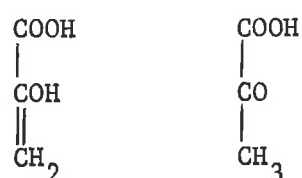
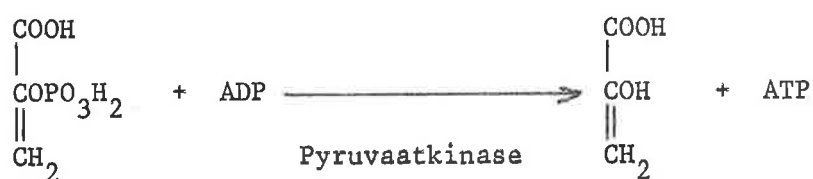
DE BEPALING VAN PYRUVAAKINASE-ACTIVITEIT IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

Literatuur : K.R. Tanaka, N.W. Valentine en S. Miwa
Blood vol. 19, pg. 267, (1962)
Pyruvaat kinase (PK) deficiency hereditary
nonspherocytic hemolytic anemia

Methode

Principe

Wanneer men in een geschikt medium aan een hemolysaat een overmaat ADP, DPNH, fosfo-enolpyruvaat en melkzuurdehydrogenase toevoegt dan komt de volgende reactieketen in gang:



De afname van de DPNH-concentratie per minuut is een maat voor de pyruvaatkinase activiteit in dit systeem.

Het bloed

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Hemolysaat

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Reagentia

1. 0.9% NaCl (houdbaar bij kamertemperatuur)
 2. 1.5×10^{-2} M ADP in water (er wordt 37.5 mg ADP- $\text{Na}_3(\text{H}_2\text{O})$ (Boehringer) in 5 ml opgelost). (Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard).
 3. 0.75×10^{-2} M fosfo-enolpyruvaat

0.975	M KCl	}	in water
0.3	M MgSO_4		
- (er wordt 17.5 mg tricyclohexylammonium - zout van fosfo-enol-pyruvaat (Boehringer), 0.376 g KCl en 0.370 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 5 ml water opgelost). Deze oplossing wordt bij -20°C bewaard.
4. 0.25 M Tris-HCl buffer pH 7.5 (er wordt 15.141 g tris-(hydroxymethyl)-amino methaan (BDH) opgelost in 300 ml water en met 1 N HCl onder de pH-meter op pH 7.5 gebracht. Daarna wordt het volume op 500 ml gebracht met water. Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard.
 5. 5 mg/ml melkzuurhydrogenase suspensie in 2.2 M ammonium-sulfaat oplossing pH 7 (Boehringer) (Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard)

Activiteitsmeting

Vlak voor de bepaling wordt het onverdunde hemolysaat honderd maal verdund met aqua dest.; men pipetteert in twee centrifugebuisjes.

Blanco

2.01 ml water

0.10 ml Trisbuffer pH 7.5

Reactievat

1.40 ml water

0.10 ml 5 mM DPNH-oplossing

0.20 ml 1.5×10^{-2} M ADP

0.20 ml PEP, KCl, MgSO_4 mengsel

0.10 ml Trisbuffer pH 7.5

0.01 LDH suspensie

Men mengt de inhoud van de buisjes en plaatst ze gedurende 5 min. in een waterbad van 25°C; men voegt nu aan de blanco 1 ml 100 maal verdund hemolysaat toe, mengt en giet de buisinhoud in een cuvet (inh. 3.5 ml, lichtweg 1 cm, OG of H); vervolgens voegt men 1 ml 100 maal verdund hemolysaat aan het reactievat toe, mengt, drukt een stopwatch in en giet de buisinhoud in een zelfde cuvet.

Men vervolgt de afname van de $E_{340 \text{ m}\mu}$ van het reactiemengsel, gemeten tegen de blanco, in een Unicam sp 500 uitgerust met een cuvettenhuis dat constant op 25°C kan worden gehouden, door elke minuut gedurende tien minuten de $E_{340 \text{ m}\mu}$ te meten. Daarna vervangt men de blanco door een cuvet gevuld met aqua dest en meet de $E_{540 \text{ m}\mu}$ van de reactiecuvet tegen deze waterblanco.

Berekening van de activiteit

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Normale waarde

In 26 normale bloedmonsters werd een pyruvaatkinase-activiteit gevonden van:

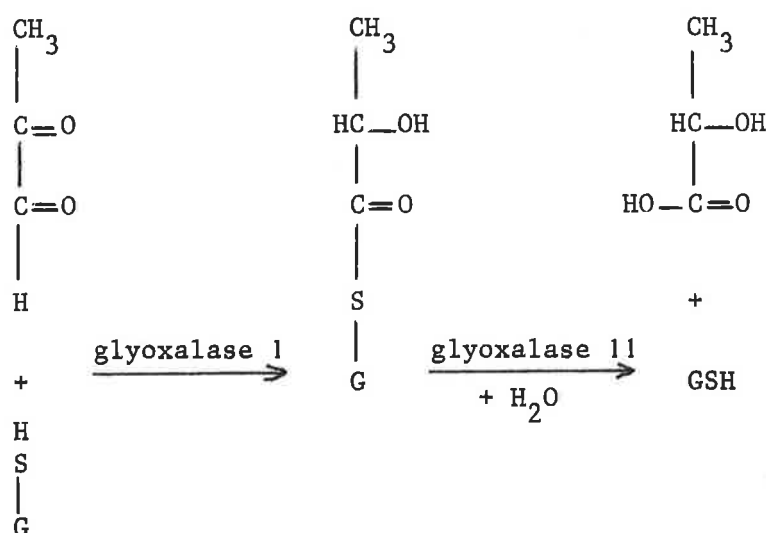
41.7	+	10.6	Laboratorium-eenheden
16.7	+	4.2	Marks eenheden
6.7	+	1.7	Racker eenheden.

DE BEPALING VAN GLYOXALASEACTIVITEIT IN ERYTHROCYTEN

- Literatuur : a) The Glyoxalase Content of Human Erythrocytes and leucocytes
W.N. Valentine and K.R. Tanaka
Acta Haemat. 26 : 303-316 (1961)
- b) Methoden der enzymatische analyse
H.U. Bergmeyer pg. 283, 363 en 980

Principe

Methylglyoxaal kan in erythrocyten worden omgezet tot melkzuur langs de volgende reactieketen:



Wanneer men aan een erythrocyten suspensie een bekende hoeveelheid methylglyoxaal toevoegt en men meet de concentratievermindering met de tijd van deze stof, dan geeft deze concentratievermindering een indruk omtrent de activiteit van de genoemde keten.

Men kan methylglyoxaal spectrofotometrisch bepalen m.b.v. zuiver glyoxalase-I en GSH; in een geschikt medium wordt methylglyoxaal kwantitatief gekoppeld aan de sulfidegroep van het glutathion en de gevormde verbinding heeft een absorptiemaximum bij 240_{mμ}.

Benodigde reagentia

a) 30% methylglyoxaaloplossing (Fluka) wordt aan stoomdestillatie onderworpen; 40 ml uitgangsvloeistof wordt in een 80 ml kolfje, voorzien van een stoominlaat en een destillatieopzet met spatbol, op 100°C gebracht.

Daarna wordt stoom doorgeleid terwijl de temperatuur in de destillatiekolf op 100°C wordt gehouden.

Het destillaat wordt opgevangen in een maatcilinder van 50 ml; de eerste 10 ml wordt apart opgevangen en bewaard(voorloop), de daarop volgende 40 ml bevat de hoofdfractie. Hierna wordt de destillatie stopgezet, de restfractie wordt met de voorloop apart bewaard.

Zuiver methylglyoxaal heeft een kookpunt van 70°C (biochem.Taschenbuch), men mag verwachten dat indien men destilleert als werd beschreven, de hoofdfractie daarom nauwelijks verdund zal zijn (dus ook 30% = 4.2 M). Vers destillaat 1 dag gebruiken.

b) 0.16 M fosfaatbuffer met ca 1,2 mg methylglyoxaal per ml

1. los 2.50 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ op in 100 ml H_2O

2. los 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ op in 100 ml H_2O

neem 25 ml van oplossing 1 en breng deze m.b.v. een pH-meter op pH 6.6 door oplossing 2 toe te voegen.

Voeg nu per 15 ml van deze fosfaatbuffer 0.1 ml van de onder a) genoemde hoofdfractie toe.

c) 30% trichloorazijnzuur; los 30 g TCA op in 100 ml aqua dest

d) 5% TCA; verdun oplossing c) 6 maal

e) 1 M fosfaatbuffer pH 6.6

1. los 13.5 g KH_2PO_4 op in 100 ml water

2. los 17.5 g K_2HPO_4 op in 100 ml water

vermeng 1 met 2 tot pH 6.6

f) 2% GSH in 0.1% EDTA, met NaOH op pH 6.6 brengen, bij -20°C bewaren.

g) 0.9% NaCl in 0.1% EDTA

h) Glyoxalase 1 suspensie in glycerol (Boehringer-Werke)

Vlak voor de methylglyoxaalbepaling wordt een zo gering mogelijke portie eenmaal verdund met 3,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing. Deze verdunning kan slechts eenmaal gebruikt worden (instabiel).

Voor 10 bepalingen in 10 bloedmonsters 0,3 ml stamoplossing verdunnen met 0,3 ml 3,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oplossing.

Uitvoering

Het Bloed

Vers, liefst met EDTA of ACD onstolbaar gemaakt bloed wordt afgedraaid in een klinische centrifuge 3000 rpm., de cellen worden drie maal gewassen met oplossing g) en de leucocyten grondig verwijderd.

Maak een suspensie van ca 10^6 ery's/mm³ door 0,6 ml packed cells in 9 ml oplossing g) te pipetteren.

Incubatie

Pipetteer voor elk bloedmonster in drie dikwandige 10 ml rondbodem reageerbuizen 0,5 ml van fosfaatbuffer b), en verwarm ze tegelijkertijd met de verse celsuspensie 5 min. voor in een waterbad van 37°C. Pipetteer in buis 1, de incubatieblanco, ook nog 0.2 ml 30% TCA oplossing. Maak de celsuspensie homogeen en pipetteer dan op tijd 0 een halve ml van deze suspensie in de incubatieblanco, op 1/4 min. een halve ml in buis 2 en op 1/2 min. een halve ml in buis 3.

Na 15 1/4 min. wordt aan buis 2 0,2 ml 30% TCA toegevoegd, waarna deze even heftig wordt gezwenkt; op 15 1/2 min. wordt hetzelfde gedaan met buis 3. De verkregen mengsels worden dan afgedraaid in een klinische centrifuge bij 3000 rpm., de bovenstaande vloeistof wordt gebruikt in de methylglyoxaal bepaling.

Methylglyoxaal bepaling

Maak voor 9 bepalingen het volgende mengsel:

28.5 ml water

1.0 ml 1 M fosfaatbuffer pH 6.6

0.5 ml 2% GSH in 0.1% EDTA

pH 6.6

Pipetteer voor elke bepaling in 0.5 cm cuvettes (Kwarts)

I	II	III	IV
Blanco	incubatieblanco	monster I	monster II
1,2 ml mengsel	idem	idem	idem
0,02 ml 5% TCA	0,02 ml supernatant buis I	0,02 ml supernatant buis II	0,02 ml supernatant buis III

Meng de inhoud en meet de $E_{240\text{m}\mu}$ t.o.v. de blanco (negatieve waarden)

Voeg aan alle cuvetten 0.014 ml glyoxalase 1 verdunning toe en vervolg de $E_{240\text{m}\mu}$ tot constant (15 min.)

$$\Delta E_{240\text{m}\mu} = (E_{240\text{m}\mu}^{\text{einde meting}} - E_{240\text{m}\mu}^{\text{begin}}) \text{ incubatieblanco}^{\text{minus}}$$

$$(E_{240\text{m}\mu}^{\text{einde meting}} - E_{240\text{m}\mu}^{\text{begin}}) \text{ monster}$$

$$\frac{\Delta E_{240\text{m}\mu} \cdot 2 \cdot 1,234 \cdot 50 \cdot 1,2 \cdot 32 \cdot 4}{3,37} = 5625 E_{240\text{m}\mu} \text{ um/pC/uur}$$

Resultaten

$E_{240 \text{ m}\mu}$ van de incubatieblanco μM methylglyoxaal per ml testmengsel

,203	8,95
,203	8,95
,152	6,69
,179	7,88
,187	8,23
,189	8,32
,198	8,69
,180	7,92
,199	8,74
,169	7,53

vermenigvuldigingsfactor

$$\frac{E_{240 \text{ m}\mu} \cdot 2 \cdot 1,234 \cdot 50 \cdot 1,2}{3,37} = E_{240 \text{ m}\mu} \cdot 44$$

Gemiddeld bevat het testmedium 8,2 μM methylglyoxaal per ml = 0,59 mg.
In de hoofdfractie zat dus 0,59 $\cdot$ 2 $\cdot$ 150 = 177 mg/ml.

$E_{240 \text{ m}\mu}$ voor de monsters μM methylglyoxaal omgezet per ml/pC/uur

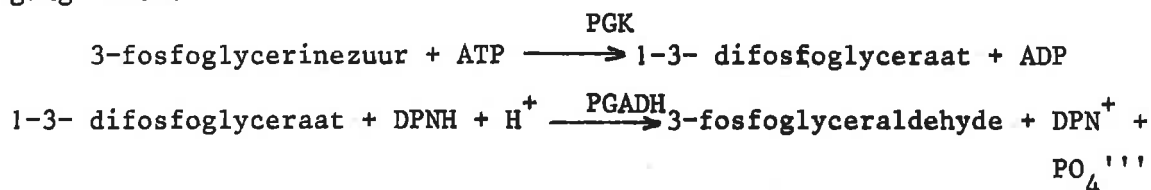
I	II	gem.	
,126	,164	,145	816
,117	,120	,119	670
,088	,088	,088	496
,124	,127	,125	704
,140	,139	,140	788
,160	,167	,164	923
,162	,158	,160	900
,129	,135	,132	743
,155	,167	,161	906
,105	,117	,111	625
gemiddeld			769 $\pm$ 145

DE BEPALING VAN FOSFO-GLYCERALDEHYDE-DEHYDROGENASE (PGADH)
 ACTIVITEIT IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN
 =====

Literatuur: G. Beisenherz, H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok,
 K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer
 Z. für Naturforsch. 8b. pg 555, (1953)
 Die phosphofruktosialdolase, phosphoglyceraldehyd-
 dehydrogenase, Milch säuri dehydrogenase,
 Glyzerophosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus
 kaninschenmuskuleter in einem arbeitgang.

Principe

3-fosfoglycerinezuur wordt in menselijke erythrocyten normaliter via het laatste gedeelte van de glycolyse afgebroken tot melkzuur. Wanneer men echter aan een hemolysaat een overmaat 3-fosfoglyceraat, ATP, DPNH en een gezuiverd, actief, 3-fosfoglyceraatkinase preparaat toevoegt, dan zal in een geschikt medium de volgende reactieketen op gang komen.



Onder deze omstandigheden zal de DPNH-afname per minuut per gram hemoglobine een maat zijn voor de fosfoglyceraldehyd-dehydrogenase activiteit.

De DPNH-afname en het hemoglobinegehalte kan men spectrofotometrisch bepalen.

Methode

Benodigde reagentia

- a) 0.9% NaCl in water (deze oplossing is bij kamertemperatuur houdbaar)
- b) 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6 (men brengt 200 ml 0.25 M Tris-HCl buffer pH 7.4 m.b.v. 1 N NaOH en een pH-meter op pH 7.6 en vult daarna aan tot 500 ml met aqua dest) (deze oplossing wordt bij +4°C bewaard).

- c) 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6, 6 mM 3-fosfoglyceraat en 14.4 mM MgSO_4 in water. (men brengt 20 ml 0.25 M Tris-HCl buffer met 1 N NaOH van pH 7.4 op pH 7.6; hierin lost men 161 mg tri-cyclohexyl-ammoniumzout van 3-fosfoglycerinezuur (of 75.5 mg van het natriumzout van 3-fosfoglycerinezuur) en 179 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ op, vervolgens vult men aan tot 50 ml met aqua dest) (3-fosfoglyceraat van Boehringer, MgSO_4 aq van BDH) (deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard).
- d) 0.033 M EDTA in water (men lost 1.233 g Komplexon III (Ziegfried) op in 100 ml aqua dest) (deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard).
- e) 5 mM DPNH in 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4 (men lost 35.5 mg DPNH (Boehringer) op in 10 ml 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4) (deze oplossing wordt bij -20°C bewaard).
- f) 0.02 M ATP in water (men lost 60.5 mg ATP op in 5 ml aqua dest) (Bij -20°C bewaren).
- g) 3-fosfoglyceraat kinase in 2.7 M ammoniumsulfaat-oplossing (10 mg/ml suspensie van Boehringer) (deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard).

Het bloed

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Bereiding van het hemolysaat

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

De activiteitsbepaling

Vlak voor de meting wordt een beetje hemolysaat 200 maal verdund met aqua dest. Men pipetteert dan achtereenvolgens in twee cuvetten (lichtweg 1 cm, OG of H-glas inhoud 3.5 ml).

Reactievat

reagensblanco

2.4 ml 0.1 M Tris pH 7.6 6 mM
3-fosfoglyceraat, 14.5 mM MgSO_4

2.4 ml 0.1 M Tris pH 7.6

0.24 ml 0.033 M EDTA

0.08 ml 5 mM DPNH in Tris

0.30 ml 0.02 M ATP

0.04 ml 0.1 mg/ml PGK susp.

- - - - -

0.66 ml aqua dest

Men mengt de inhoud van de cuvetten door ze af te sluiten met cellofaan en daarna tweemaal om te keren en laat ze daarna 5 min. bij kamertemperatuur staan. Vervolgens voegt men aan beide cuvetten 0.40 ml verdund hemolysaat toe, mengt en drukt tegelijkertijd een stopwatch in; men vervolgt nu de extinctieafname bij $340_{\text{m}\mu}$ van de reactiecuvet gemeten tegen de reagensblanco, door om de halve minuut deze extinctie af te lezen gedurende vijf minuten. Men maakt hierbij gebruik van een spectrofotometer, waarvan het cuvettenhuis op 25°C gehouden kan worden. Daarna wordt de reagensblanco vervangen door een waterblanco en men bepaalt de $E_{540_{\text{m}\mu}}$ van de reactiecuvet gemeten tegen deze blanco.

Berekening van de enzymactiviteit

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Normale waarde

Van vier normale proefpersonen werd in het bloed op de beschreven wijze de activiteit bepaald; er werd gevonden:

in Laboratorium-eenheden uitgedrukt 268 248 342 282

DE BEPALING VAN MELKZUURDEHYDROGENASE-ACTIVITEIT
IN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

=====

Literatuur: G.W. Löhr, H.D. Waller en Karges
Quantitative fermentbestimmung in roten
Blutzellen. Klin.Wochenschrift J.G. 35, Hft, pg 871 (1957)

Principe

Pyruvaat wordt in de erythrocyt enzymatisch gereduceerd volgens de reactie:



Wanneer men in een geschikt medium een overmaat pyruvaat en DPNH toevoegt aan een hemolysaat, dan zal de afname van DPNH per minuut per gram hemoglobine een maat zijn voor de melkzuurdehydrogenase-activiteit in dit hemolysaat.

De DPNH-afname en het hemoglobine-gehalte in het reactiemedium kan men spectrofotometrisch bepalen.

Methode

Benodigde reagentia

- a) 0.9% NaCl in water (deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren).
- b) 0.25 M Tris-HCl buffer pH 7.5 (deze buffer wordt op dezelfde wijze gemaakt als bij de G6PD-bepaling, alleen wordt hier de pH op 7.5 ingesteld) (deze oplossing wordt bij +4°C bewaard).
- c) 0.75×10^{-2} M natriumpyruvaat
0.98 M KCl } in water
(men lost 0.083 g natriumpyruvaat (Boehringer) en 7.52 g KCl (Brocades) op in 100 ml aqua dest.) deze oplossing wordt bij +4°C bewaard en voor gebruik op schimmelverontreiniging gecontroleerd).
- d) 5 mM DPNH oplossing (35.5 mg DPNH wordt opgelost in 10 ml 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4) (deze oplossing wordt bij -20°C bewaard). (DPNH van Boehringer)

Het bloed

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

Het hemolysaat

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling

De activiteitsbepaling

Vlak voor de meting wordt het hemolysaat ontdooid en met aqua dest wordt een kleine hoeveelheid 200 maal verdund: men pipetteert achtereenvolgens:

Reactievat	Reagensblanco
0.10 ml Tris-buffer pH 7.5, 0.25 M	idem.
1.00 ml hemolysaat	idem.
0.20 ml Natriumpyruvaat/KCl oplossing	
1.60 ml aqua dest	1.90 ml aqua dest

Men laat de buizen vijf minuten staan bij 25°C en zet dan de reactie in gang door aan het reactievat 0.1 ml DPNH-oplossing 0.005 M in 0.025 M Tris pH 7.4 toe te voegen; tegelijkertijd drukt men een stopwatch in. Men mengt de inhoud van de buizen door ze af te sluiten met cellofaan en ze daarna tweemaal om te draaien; vervolgens giet men de buisinhoud over in cuvetten (3.5 ml inhoud, OG of H glas, 1 cm lichtweg) en meet gedurende 10 minuten om de minuut, de $E_{340 \text{ m}\mu}$ van het reactievat tegen de reagensblanco in een spectrofotometer waarvan het cuvettenhuis constant op 25°C gehouden kan worden.

Daarna wordt de reagensblanco vervangen door een waterblanco en meet men de $E_{540 \text{ m}\mu}$ van het reactievat tegen deze blanco.

Berekening van de enzymactiviteit

Zie hiervoor onder G6PD-bepaling; er hoeft hier niet voor de temperatuur gecorrigeerd te worden.

Normale waarde

In het bloed van 26 normale proefpersonen werd op de beschreven wijze de melkzuurdehydrogenase activiteit bepaald; hieruit werd de gemiddelde waarde en de standaarddeviatie in de enkele meting berekend.

Uitgedrukt in Laboratorium-eenheden was dit:	389	$\pm$	61
Uitgedrukt in Marks eenheden	155,6	$\pm$	24.4
Uitgedrukt in Racker eenheden/g Hb	62.7	$\pm$	9.8

DE BEPALING VAN HET ATP-GEHALTE EN DE MELKZUURPRODUKTIE TIJDENS DE
INCUBATIE VAN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN IN RINGER-GLUCOSE EN
RINGER-INOSINEOPLOSSING

=====

Literatuur: G.W. Löhr, H.D. Waller en O. Karges
Quantitative Fermentbestimmung in roten Blutzellen
Klin. Wochenschrift J.G. 35 Hft. 17, pg 871 (1957)

H.J. Hohorst
Enzymatische Bestimmung von L(+) -Milchsäure
Biochem. Z. 328, pg 509 (1957)

H. Adam, in : Bergmeyer,
Methoden der enzymatischen Analyse
(1963) 539

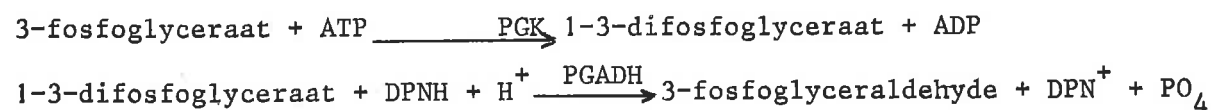
Principe

Glucose wordt in de erythrocyt, via de glycolyse, omgezet tot melkzuur; inosine wordt in de erythrocyt enzymatisch gesplitst in een purine -en een pentosegedeelte, waarna de pentosehelft via een gedeelte van de hexosemonofosfaatshunt en het laatste gedeelte van de glycolyse ook wordt omgezet tot melkzuur.

Tijdens beide processen wordt de vrijkomende energie vastgelegd door de fosforylering van ADP tot ATP.

In axtracten gemaakt voor en na incubatie van de genoemde erythrocyten-suspensies kan men het ATP- en melkzuurgehalte enzymatische bepalen.

Het ATP-gehalte bepaalt men door in een geschikt medium aan het extract een overmaat 3-fosfoglyceraat, DPNH en een gezuiverd enzymmengsel van fosfoglyceraldehyde-dehydrogenase en 3-fosfoglyceraatkinase toe te voegen; de volgende reactieketen komt dan op gang:



De afname van de hoeveelheid DPNH is een maat voor het ATP-gehalte in het extract. Het melkzuurgehalte bepaalt men door in een geschikt medium aan het extract een overmaat DPN^+ , hydrazine en gezuiverd melkzuurdehydrogenase toe te voegen; de volgende reactie komt dan op gang:



Het gevormde pyruvaat wordt weggevangen door hydrazine, terwijl door een zeer hoge pH de reactie wordt gestimuleerd.

De gevormde hoeveelheid DPNH is een maat voor de hoeveelheid melkzuur in het extract.

Methode

Benodigde reagentia

a) 0.9% NaCl in water (deze oplossing kan bij kamertemperatuur worden bewaard).

b) Ringer-Glucose of Ringer-inosine oplossing

0.0020 M CaCl_2

0.0005 M MgCl_2

0.1028 M NaCl

0.0027 M KCl

0.0238 M NaHCO_3

0.0030 M fosfaatbuffer pH 7.4

0.0175 M Glucose of Inosine

Deze oplossingen moeten altijd worden bereid uit de volgende voorraad-oplossingen:

4.10	M NaCl	(120 g in 500 ml H_2O)	Brocades
1.34	M KCl	(50 g in 500 ml H_2O)	"
1.02	M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(75 g in 500 ml H_2O)	Merck
0.246	M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(25 g in 500 ml H_2O)	"
0.953	M NaHCO_3	(40 g in 500 ml H_2O)	Brocades
0.500	M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(44.5 g in 500 ml H_2O)	"

Alle oplossingen worden bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard.

De bereiding van de Ringer-oplossing verloopt als volgt:

de voorraadoplossingen worden van te voren gecontroleerd op schimmelverontreiniging; een beetje van de fosfaatoplossing wordt op pH 7.4 gebracht met 1 N HCl. Men pipetteert in een maatkolf van 100 ml achter-eenvolgens:

0.2 ml CaCl_2 1.020 M

0.2 ml MgCl_2 0.246 M

ca 20 ml aqua dest, mengen door omschudden en daarna

2.5 ml NaCl 4.100 M

0.2 ml KCl 1.340 M

ca 40 ml aqua dest, mengen door omschudden en daarna

2.5 ml NaHCO_3 0.953 M

men voegt een stukje lakmoespapier toe en druppelt daarna sterk HCl in de kolf onder voortdurend omschudden tot de lakmoes omslaat van blauw naar rood, daarna voegt men nog 10 ml aqua dest toe en vervolgens

0.6 ml Na_2HPO_4 , 0.5 M pH 7.4.

Na mengen vult men aan tot 100 ml met aqua dest en neemt hieruit twee porties van 25 ml; in één portie van 25 ml lost men 79 mg glucose (Dextropur) op, in de andere portie van 25 ml lost men 125 mg inosine (Boehringer) op. Beide oplossingen worden daarna m.b.v. de pH-meter, met 1 N NaOH op pH 7.4 gebracht.

- c) 6% perchloorzuur (25 ml 72% Perchloorzuur (BDH) wordt aangevuld met aqua dest tot 500 ml). (deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren).
- d) 2.6 M KHCO_3 , 1 M Tris in water (12,14 g 2-Amino-(hydroxymethyl)-propaan- 1:3-diol (BDH) en 26 g KHCO_3 wordt opgelost in 100 ml aqua dest)
- e) 0.4 M hydrazine, 1 M glycine, 0.005 M EDTA in water pH 9.5.
(18.76 g Glycine (Brocades) en 0.465 g Komplexon III (Ziegfried) worden in een maatkolf van 250 ml gebracht en opgelost in ca 100 ml aqua dest. Daarna weegt men 5.01 g hydrazine hydraat (BDH) af m.b.v. een druppelpipetje in een bekeerglas en spoelt dit voorzichtig over in de maatkolf, daarna vult men aan tot 250 ml met aqua dest.
(Deze oplossing wordt bij $+4^\circ\text{C}$ bewaard, vlak voor de meting wordt de benodigde hoeveelheid met 5 N NaOH op pH 0.5 gebracht m.b.v. de pH-meter).
- f) 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6, 6 mM 3-fosfoglyceraat en 14.4 mM MgSO_4 in water (men brengt 20 ml 0.25 M Tris-HCl buffer met 1 N NaOH van pH 7.4 op pH 7.6; hierin lost men 161 mg Tri-cyclohexyl-ammoniumzout van 3-fosfoglycerinezuur (75.5 mg van het Natriumzout van 3-fosfoglycerinezuur) en 179 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ op, vervolgens vult men aan tot 50 ml met aqua dest)
(3-fosfoglyceraat van Boehringer, MgSO_4 aq van BDH) (Bij $+4^\circ\text{C}$ bewaren).

- g) 0.033 M EDTA (men lost 1.233 g Komplexon III (Ziegfried) op in 100 ml aqua dest) (Bij +4°C bewaren).
- h) 5 mM DPNH (men lost 35.5 mg DPNH (Boehringer) op in 10 ml 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4) (Bij -20°C bewaren).
- i) 0.027 M DPN⁺ (men lost 179 mg DPN⁺ op in 10 ml aqua dest) (DPN⁺ Boehringer) (Bij -20°C bewaren).
- k) 3.4 M (NH₄)₂SO₄, 0.04 M Na₄P₂O₇ in water (men lost 4.48 g (NH₄)₂SO₄ (BDH) en 0.1784 g Na₄P₂O₇ op in 10 ml aqua dest en brengt met geconcentreerde ammonia onder de pH-meter, de pH op 7.5) (Pyrofosfaat van BDH) (Bij +4°C bewaren).
- l) fosfoglyceraldehyde-dehydrogenase in 2.5 M Ammoniumsulfaat-oplossing (10 mg/ml suspensie (Boehringer) (Bij +4°C bewaren).
- m) 3-fosfoglyceraatkinase in 2.7 M Ammoniumsulfaat-oplossing (10 mg/ml suspensie) (Bij +4°C bewaren).
- n) melkzuurdehydrogenase in 2.2 M Ammoniumsulfaat-oplossing (5 mg/ml suspensie (Boehringer) (Bij +4°C bewaren).

Het bloed

Zo vers mogelijk, met ACD onstolbaar gemaakt bloed; 10 ml bloed is voldoende. Indien het bloed vervoerd moet worden, dient dit in ijs gekoeld te gebeuren en mag het niet langer dan 6 uur onderweg blijven.

De incubatiesuspensies en de extractbereiding

Het bloed wordt afgedraaid in een klinische centrifuge bij 2000 rpm., het Plasma en de leucocyten worden zorgvuldig afgezogen en de cellen worden daarna 3x gewassen met fysiologische zoutoplossing, door ze hiermee te vermengen en ze vervolgens weer af te draaien bij 2000 rpm.

Van één bloedmonster pipetteert men nu 1 ml packed cells in 2 ml Ringer-Glucose en 1 ml packed cells in 2 ml Ringer-Inosine en mengt elke suspensie zorgvuldig; onmiddellijk daarna pipetteert men 1 ml van elke suspensie in 1 ml ijskoude 6% Perchloorzuur en mengt door heftig schudden; dit schudden wordt nog tien minuten voortgezet m.b.v. een schudmachine welke in de koude cel bij 0°C staat.

Het mengsel wordt daarna afgecentrifugeerd in een gekoelde centrifuge bij 2000 rpm. gedurende 10 minuten; 1 ml van de heldere bovenstaande vloeistof

wordt vermengd met 0.2 ml 2.6 M KHCO_3 , 1 M Tris en in een ijsbad of bij -20°C bewaard voor de ATP en melkzuurbepaling.

Ondertussen worden de resterende celsuspensie te incuberen gezet in een waterbad van 37°C ; na één uur incubatie wordt van elke suspensie opnieuw een perchloorzuurextract gemaakt op de boven beschreven wijze.

De ATP-bepaling

Vlak voor de bepaling maakt men een mengsel van fosfoglyceraldehyde-dehydrogenase (l) en 3-fosfoglyceraatkinase (m) door;

0.25 ml fosfoglyceraldehyde-dehydrogenase suspensie

0.10 ml 3-fosfoglyceraatkinase suspensie

0.65 ml 3.4 M Ammoniumsulfaat 0.04 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ te mengen.

Men pipetteert dan achtereenvolgens in een 0.5 cm cuvet. OG of H-glas, met een inhoud van 1.5 ml:

0.80 ml 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6

6 mM 3-fosfoglyceraat en 14.4 mM MgSO_4 (TPA/PG)

0.03 ml 5 mM DPNH in 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4

0.08 ml 0.033 M EDTA

0.30 ml extract

Men mengt door de cuvet af te sluiten met cellofaan en daarna de cuvet tweemaal om te draaien; dan leest men in een spectrofotometer bij 340 mμ de extinctie af van deze cuvet, gemeten tegen een waterblanc.

Stel we noemen de waarde die we vinden E_I .

Men voegt nu aan de cuvet 0.015 ml enzymmengsel toe, mengt op de beschreven wijze en vervolgt de extinctie bij 340 mμ tot deze constant blijft; we noemen deze eindwaarde E_{II} .

De $E_{340 \text{ m}\mu} = E_I \times (1.21/1.225) - E_{II}$ waarbij men de E_I gecorrigeerd heeft voor de volumevergroting door de toevoeging van het enzymmengsel.

Voor de berekening van het ATP-gehalte heeft men de volgende gegevens nodig:

De extinctiecoëfficiënt voor DPNH is $6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$. ($1/6.22 = 0.161$)

Het totale reactievolume in de cuvet is 1.225 ml.

De toegevoegde hoeveelheid extract in dit volume is 0.30 ml

De lichtweg in de cuvet is 0.5 cm, voor berekening op een lichtweg van

1 cm moet men vermenigvuldigen met 2.

Uitgaande van een watergehalte van 72% van de erythrocyten, kan men voor vermenigvuldigen van een erythrocytensuspensie van 33 1/3% met een gelijk volume 6% Perchloorzuuroplossing een verdunningsfactor berekenen van:

$$1 + [0.72 \times 1/3) + (1.00 \times 2/3)] = 1.908$$

Bij neutralisatie van het extract verdunt men nogmaals 1.2 maal
Het aantal μMol ATP per ml packed cells is nu:

$$E_{340\text{m}\mu} \times \frac{0.161 \times 2 \times 1.225 \times 1.908 \times 1.2 \times 3}{0.3} = E_{340\text{m}\mu} \times 90.0$$

De melkzuurbepaling

Vlak voor de meting wordt een beetje van oplossing (e), 0.4 M hydrazine, 1 M Glycine, 0.005 M EDTA, op pH 9.5 gebracht m.b.v. 5 N NaOH en een pH-meter. Men pipetteert dan achtereenvolgens in een 0.5 cm cuvet van OG of H-glas met een inhoud van 1.5 ml.

0.50 ml 0.4 M Hydrazine, 1 M Glycine, 0.005 M EDTA pH 9.5

0.50 ml aqua dest

0.06 ml 0.027 M DPN⁺

0.10 ml extract

Men mengt de inhoud van de cuvet door deze af te sluiten met cellofaan en dan tweemaal om te draaien; dan leest men in een spectrofotometer bij 340 $\text{m}\mu$ de extinctie af tegen een waterblanco.

Stel we noemen de gevonden waarde E_I .

Men voegt nu aan de cuvet 0.02 ml melkzuurdehydrogenase-suspensie toe, mengt op de beschreven wijze en vervolgt de extinctie en de reactiecuvet bij 340 $\text{m}\mu$ tot deze constant blijft; we noemen deze eindwaarde E_{II} .

De $E_{340 \text{ m}\mu} = E_{II} - (1.16/1.18) E_I$ waarbij men de E_I gecorrigeerd heeft voor de volumevergroting door de toevoeging van het enzymmengsel.

Gebruik makende van dezelfde gegevens als bij de bepaling van het ATP-gehalte vindt men nu voor het aantal μM Melkzuur per ml packed cells;

$$E_{340\text{m}\mu} \times \frac{0.161 \times 2 \times 1.18 \times 1.908 \times 1.20 \times 3}{0.1} = E_{340\text{m}\mu} \times 26.1$$

De melkzuurproductie vindt men door het melkzuurgehalte dat men gevonden

heeft vóór de incubatie in de beide media, af te trekken van het melkzuurgehalte dat men gevonden heeft ná de incubatie.

De normale waarde

In het bloed van 30 normale proefpersonen werd gevonden:

Incubatie in Ringer-Glucose

ATP-gehalte vóór de incubatie	1.13 ± 0.13	$\mu\text{Mol/ml}$	packed cells
ATP-gehalte ná de incubatie	1.16 ± 0.12	"	" " "
Melkzuurproductie	2.19 ± 0.5	"	" " "

Incubatie in Ringer-Inosine

ATP-gehalte vóór de incubatie	1.12 ± 0.13	$\mu\text{Mol/ml}$	packed cells
ATP-gehalte ná de incubatie	1.13 ± 0.11	"	" " "
Melkzuurproductie	2.33 ± 0.5	"	" " "

TRIOSEISOMERASE IN HEMOLYSAAT

Literatuur: A.S. Schneider, W.N. Valentine;
New Engl. J. Med. 272 (1965) 229.

Principe

Men vervolgt spectrofotometrisch de extinctiedaling bij 340 mμ in een reactiemengsel dat naast hemolysaat, glycerol-1-fosfaat dehydrogenase, 3-fosfoglyceraldehyde en NADH₂ bevat. In dit mengsel verlopen de volgende reacties:

1. 3-fosfoglyceraldehyde $\xrightleftharpoons{\text{trioseisomerase}}$ dihydroxyacetonfosfaat
2. dihydroxyacetonfosfaat + NADH₂ $\xrightleftharpoons{\text{GDH}}$ glycerol-1-fosfaat + NAD.

De omstandigheden zijn zo gekozen dat het trioseisomerase van het hemolysaat de snelheidsbeperkende factor is. De activiteit wordt betrokken op het hemoglobinegehalte van het reactiemengsel.

Uitvoering

1. Ca $5 \cdot 10^{-2}$ M 3-fosfoglyceraldehyde (Boehringer); 47.8 mg Ba-zout van 3 PGA-acetaal wordt opgelost in 1.5 ml 0.1 N HCl.
Men bouwt in een pasteur pipetje een Dowex-50-H⁺ kolommetje (zie opmerking 2) van ca 2 cm lengte en een Ø van 0.5 cm; na voorspoelen met ca 2x2 ml aqua dest laat men de hars drooglopen. Daarna brengt men de oplossing van het 3 PGA-acetaal-zout kwantitatief over op de kolom en vangt de doorlopende vloeistof op in een schone reageerbuis; na hernieuwd drooglopen wordt de hars gespoeld met 2x 0.5 ml aqua dest en ook de spoelvloeistof wordt opgevangen in dezelfde buis.
Het verkregen filtraat wordt 16 uur bij 37°C gezet en vervolgens gebruikt of tot gebruik ingevroren. Door de filtratie over Dowex-50-H⁺ is men de Ba²⁺-ionen kwijt en door de incubatie bij 37°C in zuur milieu wordt uit de stabiliserende acetaalgroep, de aldehydegroep gevormd. Men dient de oplossing telkens te testen

met een normaal hemolysaat; ook in bevroren toestand is de oplossing instabiel.

2. 5 mM NADH_2 in 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.4
3. 0.25 M Tris-HCl buffer pH 7.4
4. 33 mM EDTA
5. hemolysaat bereid door 1 vol. gewassen cellen + 1 vol. aqua dest gedurende 12 uur bij -20°C bewaren wordt vlak voor de meting verdund door 0.01 ml te pipetteren bij 1 ml 0.25 M Tris-HCl pH 7.4
6. glycerol-1-fosfaat dehydrogenase (Boehringer, 1 mg/ml) wordt vlak voor de meting verdund door 0.1 ml van de suspensie te pipetteren bij 1 ml 33 mM EDTA-oplossing.
7. 0.1 M MgCl_2
Men pipetteert in een cuvet met een lichtweg van 0,5 cm en een inhoud van 2,0 ml, type OG 0.05 ml 5 mM NADH_2 in 0.025 M Tris-HCl pH 7.4

0.80 ml 0.25 M Tris-HCl pH 7.4

0.50 ml aqua dest

0.10 ml 0.1 M MgCl_2

0.06 ml 33 mM EDTA

0.05 ml hemolysaat (verdund)

0.05 ml verdunde GDH enzym-oplossing

Men zet de cuvet in de gethermostateerde cuvettenhouder (25°C) en laat hem 5 minuten op temperatuur komen, evenals de waterblanco; men start de reactie met $\rightarrow$ 0.06 ml 3-PGA-oplossing en meet nu om de 0.5 min., gedurende 5.5 minuten, de $E_{340\text{m}\mu}$ tegen een waterblanco.

Daarna meet men de extinctie bij 415 m μ van het reactiemengsel tegen een waterblanco. (De hemoglobineconcentratie is zo laag dat de $E_{540\text{m}\mu}$ niet direct nauwkeurig is te meten). Met behulp van een ijklijn (zie opmerking 1) kan uit de $E_{415\text{m}\mu}$ de $E_{540\text{m}\mu}$ worden berekend.

De $\Delta E_{340/\text{min}}$ wordt grafisch bepaald uit de meetpunten.

$$\text{activiteit} = E_{340\text{m}\mu/\text{min}} \times \frac{858}{E_{540\text{m}\mu}(\text{berekend})}$$

normale waarde 2150 ± 188 eenheden ($n = 10$)

Opmerkingen

1. De ijklijn voor de $E_{540\text{m}\mu}$ en $E_{415\text{m}\mu}$ wordt als volgt gemaakt:

Uitgaande van een normaal hemolysaat wordt een serie verdunningen gemaakt in Tris-HCl buffer (pH=7.4) met extincties bij 540m μ (lichtweg= 0.5 cm, t= 25°C) varieërend van 0.050-0.500.

Van elke oplossing wordt nu exact een 10-voudige verdunning gemaakt en van deze nieuwe verdunningen wordt nu de extinctie bij 415m μ gemeten (lichtweg= 0.5 cm, t= 25°C).

Uit deze beide reeksen wordt een ijklijn gemaakt door de $E_{415\text{m}\mu}$ uit te zetten tegen de overeenkomstige $E_{540\text{m}\mu}/10$; het is een rechte lijn die vrijwel door de oorsprong gaat met een helling van bijna 1.

2. De Dowex-50Wx4 50/100 mesh in de H⁺ vorm (Hicol) wordt gesuspendeerd in 0.1 N HCl, opgereord en vervolgens weggezet om de korrels te laten uitzakken. Het bovenstaande wordt afgezogen na ca 20 min. bezinken en men herhaalt dit tot de korrels allemaal binnen 20 min. uitzakken.

Men giet een kolom van ca 25 cm lengte en een doorsnee van 2 cm en doorstroomt de hars met ca 5 liter 0.1 N HCl. Men spoelt de hars over in een bruine fles met aqua dest.

DE BEPALING VAN DE ATP-ASE ACTIVITEIT VAN MENSELIJKE ERYTHROCYTEN

=====

De afbraak van ATP door hemolysaat is betrekkelijk gering, bovendien wordt de bepaling van anorganisch fosfaat gedurende incubatie van hemolysaat met ATP bemoeilijkt door de hoge endogene concentratie anorganisch fosfaat.

Daarom zijn twee methoden voor de bepaling van ATP-ase activiteit met elkaar vergeleken, nl. een methode waarbij het vrijgekomen anorganisch fosfaat bij incubatie van hemolysaat met ATP in een gebufferd medium in de tijd wordt vervolgd en een methode waarbij de afbraak van endogeen ATP bij incubatie van intacte erythrocyten in isotone NaF-oplossing ook in de tijd wordt vervolgd, waarbij het ATP-gehalte op enzymatische wijze wordt bepaald.

De produktie van anorganisch fosfaat bij incubatie van hemolysaat met ATP

Het bloed

Vers onstolbaar gemaakt bloed.

Het hemolysaat

Driemaal gewassen, leucocytenvrije, packed cells worden gesuspenderd in een gelijk volume aqua dest en gedurende een nacht bij -20°C ingevroren.

Incubatie

Men pipetteert in ijsgekoelde reageerbuizen,

<u>oplossingen</u>	<u>reactievat</u>	<u>reagenscontrole</u>
0.134 M KCl, 0.001 M EDTA, 0.0030 M		
MgCl ₂	2.0 ml	2 ml
0.25 M Tris-HCl buffer pH 7.4	1.0 ml	1.0 ml
0.06 M ATP	0.2 ml	0.2 ml
aqua dest	2.0 ml	2.8 ml
hemolysaat	0.8 ml	-

Op het tijdstip 0, 1, 2, 3 en 4 uur wordt uit elke buis 1 ml genomen en vermengd met 1 ml 6% perchloorzuur-oplossing en gedurende 10 min. geschud (bij $+4^{\circ}\text{C}$, op de schudmachine) en vervolgens gecentrifugeerd (2000 rpm. gedurende 10 min. in een gekoelde centrifuge).

De bovenstaande heldere vloeistof wordt gebruikt voor de fosfaatbepaling. Gedurende de voorgenoemde vier uur worden de beide reageerbuizen in een waterbad van 37°C geplaatst; van 0.2 ml van het resterende incubatiemengsel wordt na vermenging met 8 ml aqua dest en 1 ml 1 N NH_4OH de extinctie bij 540 m μ bepaald.

Fosfaatbepaling (W.C. Hülsmann, Diss. 1959)

Molybdaatreagens

5 g ammoniummolybdaat (brocades) wordt opgelost in 300 ml aqua dest, hieraan wordt 16 ml 95% H_2SO_4 toegevoegd en het geheel wordt aangevuld tot 500 ml met aqua dest.

Vlak voor de meting wordt per 100 ml van dit reagens 4 g FeSO_4 opgelost en gebruikt voor de kleuring.

Kleurreactie

Voor de kleuring pipetteert men in twee reageerbuizen:

<u>oplossingen</u>	<u>reactievat</u>	<u>blanco</u>
eiwitvrij extract	1 ml	-
aqua dest	1 ml	2 ml
molybdaatreagens	2 ml	2 ml

Na vermenging meet men de extinctie bij 700 m μ van de reactieoplossing tegen de blanco.

De extincties bij 700 m μ gemeten van de op verschillende tijdstippen verkregen extracten uit het reactievat, worden verminderd met de extincties bij 700 m μ van de op overeenkomstige wijze verkregen extracten uit het ATP-controlevat; de aldus verkregen extinctie-verschillen worden uitgezet tegen de tijd en leveren een lineair verband op. De helling van de lijn de $\Delta E_{700\text{m}\mu}/\text{uur}$.

Berekening

20 μ g fosfor geeft in het bovenvermelde systeem als anorganisch fosfaat een $E_{700m\mu} = 0.500$, het aantal μ mol fosfor/g Hb/uur wordt gevonden uit de formule:

$$\Delta E_{700m\mu} / \text{uur} \times 858 / E_{540m\mu} \times 0.2 / 9.2 \times 20 / 0.550 \times 1 / 31 \times 2 =$$

$$= \Delta E_{700m\mu} / \text{uur} \times 858 / E_{540} \times 0.051$$

Normale waarden

$7.0 \pm 3.4 \mu\text{mol P/gr Hb/uur} \cdot (14)$

dit is ongeveer

$0.0197 \mu\text{mol ATP/ml packed cells/min.}$

De afbraak van endogeen ATP bij incubatie van intacte erythrocyten in isotone NaF

Het bloed

Vers onstolbaar gemaakt bloed.

De cellen

Driemaal gewassen leucocytenvrije packed cells.

Incubatie

Het medium: 0.0175 M Glucose
0.0020 M CaCl_2
0.0005 M MgCl_2
0.1028 M NaF
0.0027 M KCl
0.0238 M NaHCO_3
0.0030 M fosfaatbuffer pH 7.4

2 volumina van dit medium worden vermengd met 1 volume packed cells; op 0, 10, 20, 40, 60 en 80 min. wordt op de gebruikelijke wijze een eiwitvrij extract gemaakt waarin op enzymatische wijze het ATP-gehalte wordt bepaald; in de tussenliggende tijd (80 min.) wordt de erythrocytensuspensie bij 37°C in een waterbad geïncubeerd.

De ATP-ase activiteit kan worden berekend uit het verschil in ATP-gehalte tussen de 0 en 20 min. waarden.

Normale waarden

In 10 normale bloedmonsters werd gevonden:

0.0246 $\pm$ 0.0027 $\mu\text{mol/ml}$ packed cells/min.

Opmerkingen

- a) de enzymatische ATP bepaling wordt niet gestoord door NaF in een concentratie zoals deze verwacht kan worden in het extract.
- b) met glucose- ul-C^{14} werd gevonden dat gedurende de eerste 40 min. een remming van de glucoseconsumptie optreedt tijdens incubatie met NaF-oplossing van 39%.

- c) de enzymatische bepaalde melkzuurproductie is gedurende hetzelfde tijdsbestek 69% geremd.
- d) uit chromatografische experimenten blijkt dat ATP vrijwel onmiddellijk via ADP tot AMP wordt omgezet en zelfs gedeeltelijk in purine en pentosefosfaat.

Normaal gluc. verbr.	1.10	umol/ml	P.C./uur	
rest. gluc. verbr. met NaF	0.67	"	"	"
hiervan wordt $\frac{31 \times 2.2}{2}$	0.34	"	"	" in melkzuur omgezet.

Het resterende glucoseverbruik = 0.33 umol/ml P.C./uur komt ten koste van ATP in de verschillende suikerfosfaat pools; stel per umol. glucose ten koste van 1 umol. ATP, dan kan dus maximaal $0.33/60 = 0.0055$ umol ATP afbraak/ml P.C./min. maximaal aan deze fosforyleringsverliezen worden toegeschreven.

De werkelijke ATP-ase activiteit zal dus ca 0.0191 umol ATP/ml P.C./min.