

DE BEPALING VAN HET PHOSPHAATGEHALTE IN KOLOMMENCHROMATOGRAPHISCH
VERKREGEN FRACTIES, NA DESTRUCTIE VAN DE ORGANISCHE VERBINDINGEN
MET ZWAVELZUUR

=====

Literatuur: G.R. Bartlett
Journal of Biol.Chem. 234 (1959) pg 466
Phosphorus assay in Column Chromatography

Principe

Alle organische verbindingen in de verkregen kolomfracties worden door langdurige verhitting bij 160°C in 10 N zwavelzuur waaraan een paar druppels 30% waterstofperoxide zijn toegevoegd, omgezet in CO_2 , water en anorganische zouten. Eventueel aanwezig fosfaat wordt daarna omgezet in een blauwgekleurd molybdeen-complex, met een absorptiemaximum bij 700 m μ ; de extinctie bij deze golflengte kan men spectrofotometrisch bepalen en deze extinctie is een maat voor het fosfaatgehalte.

Wanneer men uitgaat van een aantal standaard fosfaatoplossingen en hiermee dezelfde bewerkingen uitvoert dan kan men een ijklijn construeren, waarbij men de concentratie van de fosfaatoplossingen uitzet tegen de extinctie bij 700 m μ die uiteindelijk na alle bewerkingen met deze oplossingen wordt verkregen.

Het fosfaatgehalte van een onbekend monster kan nu met de bovenbeschreven methode en de ijklijn worden bepaald.

Benodigde reagentia

- a) 10 N H_2SO_4
140 ml 95% H_2SO_4 (Brocades) wordt voorzichtig in ca 200 ml aqua dest. gegoten; na afkoelen wordt het volume aangevuld tot 500 ml aqua dest. Deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren.
- b) 30% H_2O_2 (Brocades)
- c) 0.22 % Ammoniummolybdaat in water
2.2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (brocades) wordt opgelost in 1 liter aqua dest. Deze oplossing kan men bij kamertemperatuur bewaren.

d) Fiske-Subdarow reagens

Men lost 30 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (BDH) op in 200 ml aqua dest, daarna wordt er 0.5 g 1-Amino-2naphtol-4 Sulfonzuur (BDH) opgelost (men verwarmt hierbij het mengsel in warm water) en vervolgens 1 g Na_2SO_3 of 2 g NaSO_3 7 aq (BDH).

Deze oplossing wordt vlak voor gebruik gemaakt en in een donkere fles bewaard.

e) standaard fosfaatoplossing van 1 mg fosfor/ml

0.574 g Na_2HPO_4 2aq (Brocades) wordt opgelost in 100 ml aqua dest.

Methode

Men pipetteert in twee lange reageerbuizen achtereenvolgens:

Reagensblanco

0.5 ml 10 N H_2SO_4
2 druppels 30% H_2O_2
1 ml aqua dest

Bepaling

0.5 ml 10 N H_2SO_4
2 druppels 30% H_2O_2
1 ml monster (dit mag niet meer dan 5 µgr fosfor bevatten).

Men voegt nu aan elke buis een glaspareltje toe en zet ze daarna gedurende 3 uur in een oliebad met een temperatuur van 160°C . (wanneer men een oliebad gebruikt is het aan te raden om de buizen in het oliebad te brengen als de temperatuur 125°C is om dan na 5 minuten de temperatuur op te voeren tot 160°C).

Vervolgens voegt men na afkoelen aan elke buis:

4.6 ml 0.22% ammoniummolybdaat

0.2 ml Fiske-Subdarow reagens toe.

Na mengen worden de buizen gedurende 7 min. in een kokend waterbad geplaatst. Na afkoelen wordt binnen het half uur de extinctie bij 700 mµ van het bepalingsmengsel gemeten tegen de reagensblanco. Met de ijklijn kan men nu de bij de extinctie behorende concentratie bepalen.

Opmerkingen

De ijklijn bepaalt men door, gebruik makende van dezelfde werkwijze, de $E_{700\text{ m}\mu}$ van een aantal oplossingen te bepalen waarvan het fosfaatgehalte bekend is.

LJKLIJN VOOR FOSFAATBEPALING

E_{700 mμ}

600

500

400

300

200

100

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

γ fosfor
ml

0.061	1	γ P/ml
0.129	2	"
0.189	3	"
0.229	4	"
0.288	5	"
0.333	6	"
0.395	7	"
0.430	8	"
0.495	9	"
0.545	10	"

ISOLEREN VAN ZUIVERE VITALE LYMFOCYTEN UIT PERIFEER MENSELIJK BLOED

Literatuur: D.Roos en J.A. Loos, Biochim. Biophys. Acta, 222 (1970) 565

I. Voorbereidingen

1. Het klaarmaken van een kolom

De kolom wordt gestopt met kleine plukjes nylon watten die niet te stijf aangestampt worden. Boven aan de kolom wordt een stukje rubber-slang bevestigd met daaraan een nippel, + een meter plastic slang, en een naald aan het eind. Van onder wordt de kolom afgesloten met een rubberstop waar een naald door gestoken is. Om te voorkomen dat bij de montage van de naald door de rubber stop de naald loslaat uit zijn plastic houder wordt: 1) de stop $\frac{1}{4}$ ingekort met een schaar, 2) de stop voorgeboord met de punt van een schaar en 3) de naald vóór het doorsteken gesmeerd met een paar druppels fysiologisch zout. Aan de naald wordt weer een plastic slang van + 1 meter lengte bevestigd met een naald aan het eind. De gehele kolom kan gesteriliseerd worden bij 140°C . Daarbij mag de plastic slang niet in sterke knikken liggen.

2. Oplossingen

- a) Gebufferd zout, 500 ml, waaraan toegevoegd 0,5 ml 0,1 M EDTA.
- b) EDTA 0,1 M: door oplossen van 3,7 g in 100 ml bidest.
- c) NH_4Cl -oplossing: 8,3 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 en 1 ml 0,1 M EDTA aanvullen tot 1 liter met bidest en op pH 7,4 brengen bij 4°C .
- d) Krebs-Tris oplossing (1 mM fosfaat) : pipetteer
 - 40 ml 9 % NaCl
 - 1,6 ml 11,5% KCl
 - 0,4 ml 38,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 389 ml H_2O
 - 57,6 ml 0,3 M Tris-HCl
 - 4,9 ml 0,1 M Fosfaat-HCl

Breng 100 ml hiervan op pH 7,4 bij 37°C en 50 ml op pH 7,4 bij 4°C .

- e) Tris-HCl 0,3 M : los 3,634 g Tris op in 80 ml bidest, breng de pH op 7,4 met geconc. HCl en vul aan tot 100 ml.
- f) Fosfaat-HCl 0,1 M : 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 2 ml 1 N HCl aanvullen tot 100 ml met bidest.
- g) MgCl_2 0,37 M: los 7,54 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ op in 100 ml bidest.

3. Pasteurpipetten

Trek in een vlam enige Pasteurpipetten uit tot een dunne naald.

4. Voorspoelen van de kolom

Spoel de kolom voor met gebufferd zout plus EDTA (van onderaf invoeren). Sluit de waterslangen aan en zet de waterpomp aan voor de watermantel (37°C). Wanneer steriel gewerkt moet worden, moet het zout weer opgevangen worden in een steriele fles.

5. Voorbereiding van het bloed

Neem de gegevens van het etiket over in het telschrift. Voeg aan 250 ml goed gemengd ACD-bloed onder voortdurend roeren 6 ml 0,37 M MgCl_2 toe. Wanneer de afnamefles niet geheel gevuld was, moet evenredig meer MgCl_2 toegevoegd worden, en andersom. Neem een telmonster.

II. De verwijdering van granulocyten

Steek een lange ontluchtingsnaald in de fles met bloed (tot op de bodem). Verwissel de lege zoutfles voor de fles met bloed. Laat de kolom met bloed vollopen en klem de toevoer gedurende 5 minuten af. Regel daarna de doorstroomsnelheid tot op + 1 druppel per seconde.

Vang het bloed op in een met zout voorgespoelde fles in ijs.

Zet 8 dikke buizen in ijs. Werk steeds met ijskoude oplossingen.

Breng de NH_4Cl oplossing op pH 7,4 bij 4°C .

Weeg 4 mg ADP af, maar los het nog niet op.

Tegen het einde van de filtratie moet de uitstroomnaald in de bloedfles scheef gehouden worden tot al het bloed is uitgestroomd. Keer daarna de kolom om en let nu vooral op de druppelsnelheid. Wanneer de kolom leeg is zuigt men via de ontluchting van de opvangfles het restant bloed uit de slangen. Meng het opgevangen bloed en verdeel het over acht dikke, koude centrifugebuizen (31 ml per buis, met een maatcylinder). Neem ook een telmonster. Draai de buizen af in een Christcentrifuge bij maximaal toerental (2000 g) gedurende 20 minuten bij 0°C .

III. De verwijdering van erythrocyten

Zuig het plasma af met een 25 ml volpipet met pipetballon. Zorg dat de cellaag niet opwarrelt.

Meng het sediment goed op een whirlmix en voeg per buis 34 ml NH_4Cl -oplossing toe. Controleer of de cellen los van de bodem zijn en schudt zo nodig. Druk na de vierde buis de stopwatch in. Nadat alle buizen behandeld zijn worden ze éénmaal per minuut gekeerd. Na 10 minuten wordt afgecentrifugeerd bij 0°C bij 1700 toeren per minuut (450 g) gedurende 20 minuten. Tijdens het afdraaien wordt 36 ml NH_4Cl -oplossing gemengd met 4 ml plasma, en in ijs gezet.

Na de centrifugering wordt het bovenstaande tot op ± 1 cm van de bodem afgezogen met behulp van een gewone Pasteurpipet aan de waterstraalpomp. Het restant wordt voorzichtig afgezogen met een uitgetrokken Pasteurpipet aan de pomp. Verwijder ook de erythrocytenmembranen die rond het witte sediment liggen. Voeg dan aan iedere buis 3 druppels NH_4Cl -10% plasma toe en druk de stopwatch in. Schudt de sedimenten los op de mixer maar voorkom schuimvorming. Voeg per buis nog 1 ml NH_4Cl -10% plasma toe, en breng alles over in twee lange buizen. Spoel tweemaal na met NH_4Cl -10% plasma. Breng de lange buizen op gelijke volume. Doe er een stopje op en meng de inhoud door de buizen éénmaal te keren. Verwijder de stoppen en centrifugeer af na 15 minuten (10 minuten, 0°C , 1300 tpm = 130 g).

Meng tijdens het afdraaien 15 ml Krebs-Tris pH 7,4 bij 37°C met 5 ml plasma. Indien nog nodig, weeg dan 4 mg ADP af.

IV. De verwijdering van thrombocyten

Zuig het bovenstaande af als bij de vorige bewerking. Breng enkele druppels van de Krebs-Tris-25% plasma in de buizen en schudt de sedimenten los op de mixer (géén schuim!). Breng ± 5 ml Krebs-Tris-25% plasma in één van de buizen, meng en breng de suspensie over in de andere buis. Spoel de eerste buis tweemaal na. Los de ADP op in enige ml Krebs-Tris-25% plasma en voeg dit toe aan de cellen. Maak het totale volume ± 10 ml. Zet de buis in schuine stand in het waterbad, druk de stopwatch in en laat de cellen 10 minuten incuberen bij 37°C .

Tijdens de incubatie worden een paar Pasteurpipetten voorzien van een plukje watten. Spoel met een beetje Krebs-Tris-25% plasma.

Na de incubatie wordt de celsuspensie voorzichtig afgefiltreerd op de watten. Hierbij moet het thrombocytenaggregaat zo lang mogelijk in de buis achterblijven. Spoel na met enig Krebs-Tris-25% plasma.

Centrifugeer bij 1300 tpm (130 g) gedurende 10 minuten bij 0°C.

Pipetteer intussen 9 ml Krebs-Tris pH 7,4 bij 0°C met 1 ml AB-serum.

Na de centrifugering wordt het bovenstaande afgezogen als bij de vorige bewerkingen. Voeg aan het sediment enige druppels Krebs-Tris-10% AB-serum toe en suspendeer de cellen op de whirlmix (voorzichtig!).

Vul aan met de rest van het wasmedium. Centrifugeer bij 1300 tpm (130 g) gedurende 10 minuten bij 0°C.

Pipetteer intussen 4,5 ml Krebs-Tris pH 7,4 bij 37°C met 0,5 ml AB-serum.

Zuig het bovenstaande af en suspendeer het sediment in de gewenste hoeveelheid Krebs-Tris-10% AB-serum (pH 7,4 bij 37°C). Houdt de cellen in ijs.

V. Kwaliteitscontrôle

Neem twee druppels van de goed gemengde eindsuspensie in een Rose-test buisje. Met het verdunapparaat van de Coultercounter wordt 0,02 ml opgezogen en tot 10 ml uitverdund. Hierbij worden drie druppels Triton saponine gedaan en doorgeroerd. Na ongeveer 5 minuten kan deze suspensie gemeten worden (eerst weer goed oproeren).

Berekeningen:

Stel telling vòòr filtratie	a	tikken	(250 ml)
" " na "	b	"	(250 ml)
" " eindpreparaat	c	"	(3 ml)
" " blanco	d	"	

Percentage granulocyten in het bloed: $\frac{(a-d) - (b-d)}{(a-d)} \times 100\%$

Totale hoeveelheid lymfocyten in het eindpreparaat: $(c-d) \times 10^3$ per ml.

Opbrengst lymfocyten: $\frac{(c-d) \times 3}{(b-d) \times 250} \times 100\%$

Zuiverheidscontrôle wordt uitgevoerd door een druppeltje van de eindsuspensie op een objectglaasje te brengen, af te dekken met een dekglazje en onder het microscoop het aantal erythrocyten en thrombocyten per 100 cellen te tellen. Na incubatie met Tuerks blauw in een leukocytenpipet

kan het aantal granulocyten geteld worden. De vitaliteit van de cellen wordt bepaald met een trypanblauw kleuring.

VERKLARINGEN

De kolom wordt met kleine plukjes watten gestopt om het bloed te dwingen zigzag door de watten te gaan en niet erlangs. Op deze manier wordt een goed contact tussen het bloed en de watten bereikt.

De rubberslang dient om een scherpe knik in de plasticslang te voorkomen.

Bij steriliseren moeten scherpe knikken vermeden worden omdat de slangen op zulke plaatsen dicht kunnen smelten.

De Krebs-Tris oplossingen waarvan de pH bij verschillende temperatuur gesteld wordt dienen om bij de verschillende handelingen tijdens de isolatie een goede pH te waarborgen.

Voorspoelen met EDTA verwijdert zware metalen die de enzymen van de bloedcellen zouden kunnen remmen. De vloeistoffen worden van onderaf de kolom in geleid om de lucht uit de kolom te drijven.

De MgCl_2 wordt toegevoegd om de fagocytose van de granulocyten aan de nylonwol te bevorderen. Er mag niet te veel Mg^{2+} toegevoegd worden omdat dit anders het Ca^{2+} uit zijn citraatverbinding gaat verdrijven.

Hierdoor gaat stolling optreden.

Een lange ontluchttingsnaald dient om schuimvorming te voorkomen.

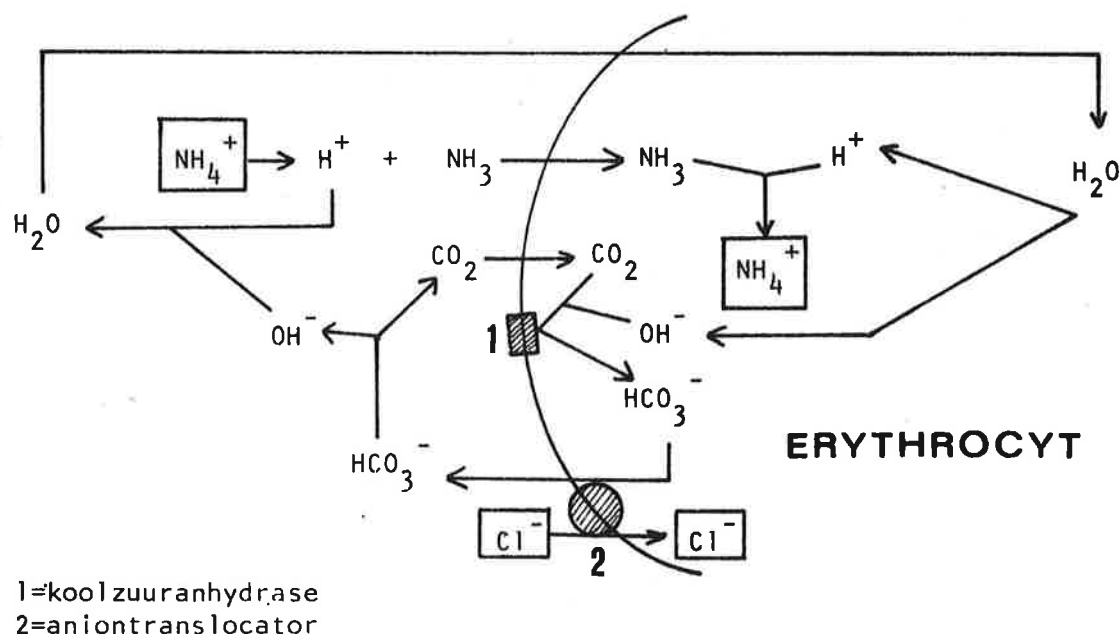
Vijf minuten krijgt het bloed de gelegenheid om met de nylonwatten te reageren, voordat de doorstroming begint.

Granulocyten zijn fagocyterende cellen; zij hechten zich aan de nylonwatten waardoor deze cellen uit het bloed verwijderd kunnen worden.

Het omkeren van de kolom doet deze geheel leeg stromen.

Telmonsters dienen voor opbrengstberekening.

Lysis in NH_4Cl treft de rode cellen het eerste omdat deze in de celwand het enzym koolzuuranhydrase bezitten. Dit enzym zet $\text{CO}_2 + \text{OH}^-$ om in HCO_3^- . Dit anion kan uitwisselen tegen Cl^- . NH_4^+ gaat als NH_3 naar binnen en verbindt zich daar met een proton weer tot NH_4^+ . Ongeladen deeltjes kunnen vrij het membraan passeren. In schema aldus:



Door de opname van NH_4Cl wordt water aangetrokken tot de cel barst.

Toevoegen van KHCO_3 doet dit proces niet alleen sneller maar ook reproduceerbaarder verlopen.

Omdat koolzuuranhydrase ontbreekt in lymfocyten en thrombocyten, worden deze cellen veel minder snel gelyseerd door NH_4Cl dan de erythrocyten.

Behandeling gedurende korte tijd (10-15 minuten) en in de kou tast deze cellen dan ook niet aan. Dit proces is de eerste keer niet compleet.

De behandeling wordt daarom herhaald.

Plasma wordt toegevoegd om de witte cellen te beschermen tegen mechanische beschadiging.

ADP heeft de eigenschap thrombocyten te laten klonteren. Op deze wijze kunnen dus thrombocyten en lymfocyten van elkaar gescheiden worden.

De lymfocyten worden nog éénmaal gewassen. Hierbij mag geen plasma meer gebruikt worden omdat hierin nog thrombocyten zitten. In plaats daarvan wordt serum gebruikt. Hiervoor wordt AB-serum genomen omdat dit geen antigenen tegen andere bloedgroepen bevat, zodat hierdoor geen lymfocytenstimulatie opgewekt wordt.

Voor het tellen op de Coultercounter worden de cellen gelyseerd met Triton-saponine, en de kernen geteld. Erythrocyten worden dus niet meegeteld. De telling berust op een verandering (door de cellen) van de diëlectrische constante tussen de plaatjes van een condensator.

Dit wordt elektronisch versterkt en geregistreerd. De cellen worden met constante snelheid en gedurende een zeer bepaalde tijd tussen de condensatorplaten door gezogen.

Tuerks vloeistof is een kleurstof die de cellen lyseert en de kernen kleurt. Hierdoor wordt de vorm van de kern goed zichtbaar: bij granulocyten gelobt en bij lymfocyten rond.

Levende cellen hebben het vermogen trypanblauw buiten te houden, dode cellen worden blauw gekleurd.

BEPALEN VAN DE VERDUNNINGSFACTOR VAN EEN AUTODILUTER (Hook & Tucker, Mk II)

=====

I. Grove bepaling door wegen

Alvorens een nauwkeurige ijking te doen wordt eerst een grove ijking gedaan om een indruk te krijgen van de verdunning. De verdunning wordt eventueel veranderd, weer wordt een grove ijking gedaan en daarna wordt de verdunning nauwkeurig bepaald.

- a. Koppel de voorraadfles los van de AUTODILUTER en zuig en spuit zolang tot het systeem geheel met lucht gevuld is.
- b. Zet een schoon bekersglas van 25 ml op de METTLER balans en bepaal nauwkeurig het gewicht.
- c. Zuig nu water op en spuit uit in het bekersglas en bepaal direkt het gewicht (zo snel mogelijk in verband met verdamping). Het gewicht van de vloeistof is I_1 .
- d. Herhaal dit 4 maal; dus wegen, opzuigen, uitspuiten en weer wegen. De gewichten van de hoeveelheden vloeistof zijn I_2 t/m I_5 .
- e. Koppel de voorraadfles weer aan en vul het systeem weer met vloeistof door herhaald opzuigen en uitspuiten.
- f. Zet weer een schoon en droog bekersglas van 25 ml op de METTLER en bepaal nauwkeurig het gewicht.
- g. Zuig nu lucht aan en spuit vloeistof na in het bekersglas en bepaal direkt het gewicht van de vloeistof : U_1 .
- h. Dit wordt 4 maal herhaald op dezelfde wijze als boven (d): U_2 t/m U_5 .
- i. Bereken nu I_m en U_m , resp. de gemiddelden van I_{1-5} en U_{1-5} .

De verdunningsfaktor is dan $V = \frac{U_m + I_m}{I_m}$

II. Nauwkeurige bepaling met behulp van een hemoglobine oplossing

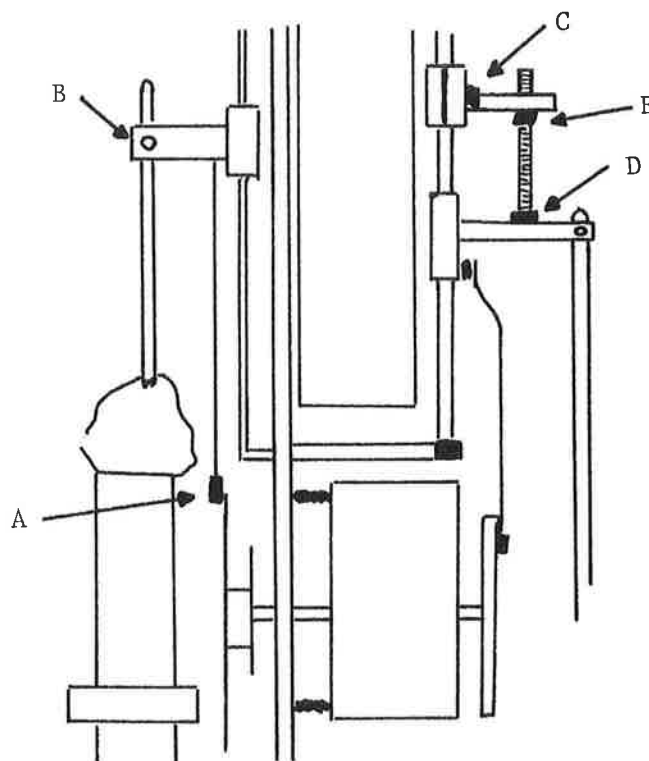
Neem 1 ml ACD-campagne bloed en verdun met 9 ml 1 mM NH_3 -oplossing, waaraan toegevoegd twee druppels gec. NH_3 (in de 9 ml).

- b. Verdun deze oplossing 30 maal door pipetteren: 1 ml oplossing + 9 + 10 + 10 ml 1 mM NH_3 .
- c. Verdun de Hb oplossing (a) met de AUTODILUTER eveneens ca 30 maal en herhaal dit 9 maal.

d. Bepaal nu de extinctie van de gepipetteerde en de AUTODILUTER-verdunningen bij 540 nm: E_p en E_1 t/m E_{10} .

e. Bereken nu het gemiddelde van E_1 t/m E_{10} : E_A

De factor is dan : $V = \frac{E_p \cdot 30}{E_A}$



Instellen van de volumina

De AUTODILUTER is gemakkelijk in te stellen over 0 ml tot het maximale volume van de verdunningsspuit. Het opname volume is variabel afhankelijk van de gebruikte spuit: .

0.02 ml - 0.1 ml bij gebruik van een speciale microspuit

0.1 ml - 1.0 ml bij gebruik van een tuberculine spuit

1.0 ml - 3.5 ml bij gebruik van een 5 ml spuit

Handelwijze

Haal de netsteker uit het stopkontakt.

Maak de twee schroeven aan de achterzijde los en verwijder het perspex deksel. Alle veranderingen van het uitspuitvolume moeten gedaan worden aan het eind van de uitspuitslag (gele lamp aan).

Uitspuitsvolume

Maak moer A los en daarna inbusschroef B.

Voor volumevergroting moet het draaipunt (moer A) langs de gleuf naar de buitenkant van de flens verschoven worden.

Voor volumeverkleining naar het middelpunt. Zet daarna A weer vast, druk de zuiger tot bijna geheel in de spuit en zet B vast (hierdoor wordt bewerkstelligd dat bij elke slag de spuit bijna geheel geleegd wordt).

Opnamevolume

Als de verandering gering behoeft te zijn wordt E losgemaakt en het volume ingesteld door draaien aan D.

Bij grotere veranderingen wordt door losmaken van C en verschuiven van het stootblok de grove instelling gedaan en daarna de fijne met D en E.

Na controle van de verkregen volumina en eventueel opnieuw instellen wordt de perspex beschermkap weer aangebracht en de schroeven vastgedraaid.

GEMECHANISEERDE BEPALING VAN STOFWISSELINGSPRODUKTEN

Literatuur: General Operating Instruction Manual (1964),
 Technicon Instruments Corporation, Chauncey, New York.
 J.A. Loos, H.K. Prins, Biochim.Biophys.Acta 201 (1970) 185.

Principe

Alle bepalingen die met behulp van dit systeem kunnen worden uitgevoerd berusten op het genereren of consumeren van NADH_2 , of NADPH_2 . De vereiste reagentia worden met behulp van een slangenpomp in de juiste verhouding bijeen gepompt, gemengd met een monster waarvan de hoeveelheid wordt bepaald door de monstertijd, en geïnkubeerd gedurende een vaste tijd bij 37°C . Vervolgens wordt de fluorescentie van het inkubatiemengsel gemeten en op een recorder weergegeven. (zie Fig.1 = Flowschema).

Om onderlinge vermenging van de monsters in het systeem te voorkomen wordt lucht in de vloeistof gepompt zodat een bellentrein ontstaat.

Om de fluorescentiemeting mogelijk te maken worden, vlak voor de doorstroomcel, de luchtbellens gescheiden van de vloeistofstroom.

Bij alle tot nu toe ontwikkelde bepalingen wordt een monsterfrequentie van 1 monster per minuut gebruikt. De monsternaald valt na het monsteren terug in een spoelbakje; de verhouding monstertijd : spoeltijd is 2 : 1.

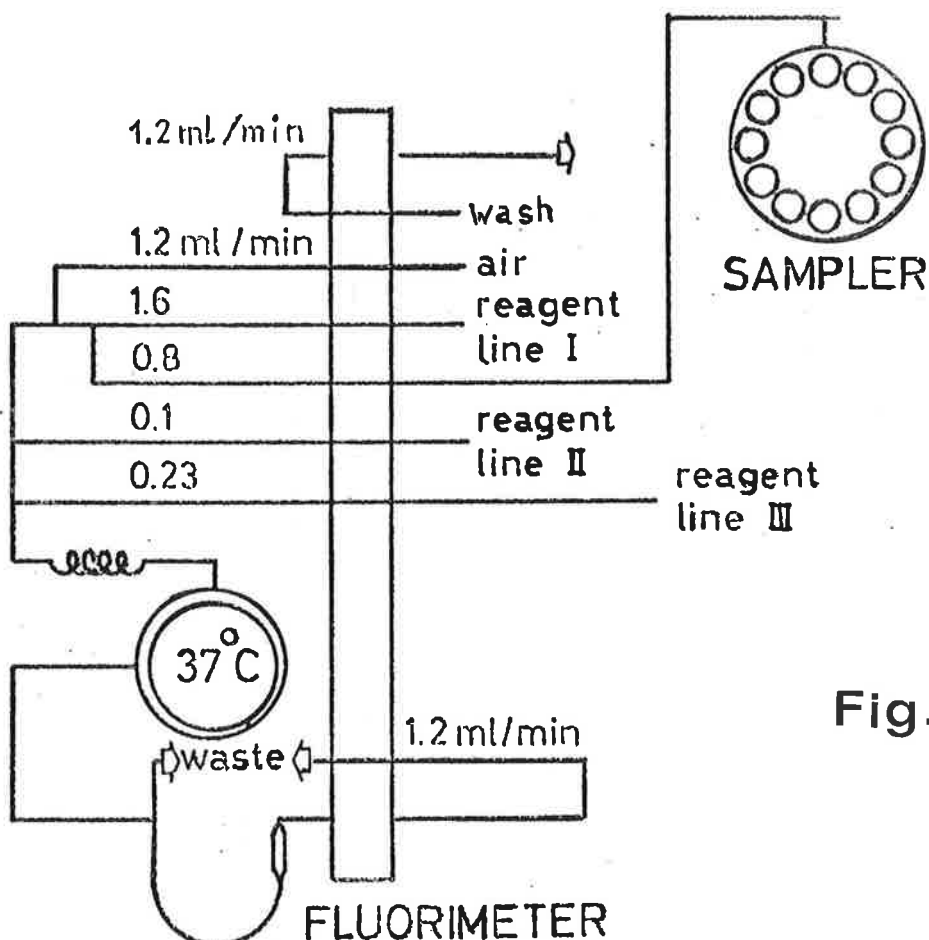


Fig.1

FLOWSCHEMA

Fig. 1 Flowschema;

Overzicht van de pompsnelheidsverhoudingen en de te gebruiken hulpapparatuur. De horizontale spiraal is een mengspiraal, de balk stelt een slangenpomp voor, de cirkel met 37°C inschrift stelt een verticale spiraal in een waterbad voor.

De reagentia I, II en III worden bij alle bepalingen gespecificeerd. De recorder is niet aangegeven.

Beschrijving van de dubbelkanaals opstelling

I. De fluorimeters

a) Optisch gedeelte. De stralengang van het licht in het optische gedeelte van de opstelling (zie Fig. 2) is als volgt. Het licht wordt uitgezonden door een kwiklamp en valt via een continu instelbare spleet en een condensorlens op een filter; op deze wijze wordt licht verkregen met een maximale intensiteit bij 365 nm. Dit filter laat geen licht door met golflengte groter dan 420 nm. De intree-opening van het kuvettenhuis kan worden afgesloten met een schuif (DC) en is voorzien van een lichtspleet (FS) die trapsgewijze kan worden gevarieerd. De lichtspleet (FS) wordt in deze opstelling altijd maximaal open gezet evenals de lichtschuif. In het kuvettenhuis bevindt zich een metalen doorstroom-kuvettenhouder recht tegenover de intree-opening. Deze doorstroom-kuvettenhouder bevat een kwarts doorstroomcel (LKB quartz measuring flow cell 4711B-5) een intree-opening en, loodrecht op de intredende stralenbindel, een uittree-opening. Het licht van 365 nm valt via de intree-opening op de vloeistof in de doorstroomcel en brengt de fluoresceerbare stof tot fluorescentie. Fluorescentielicht en strooilicht komen nu uit de uittree-opening en vallen op een tweede filter dat ál het licht met golflengten kleiner dan 450 nm tegenhoudt. Het doorgelaten licht wordt door de achter het filter gelegen fotomultiplier omgezet in een elektrische spanning.

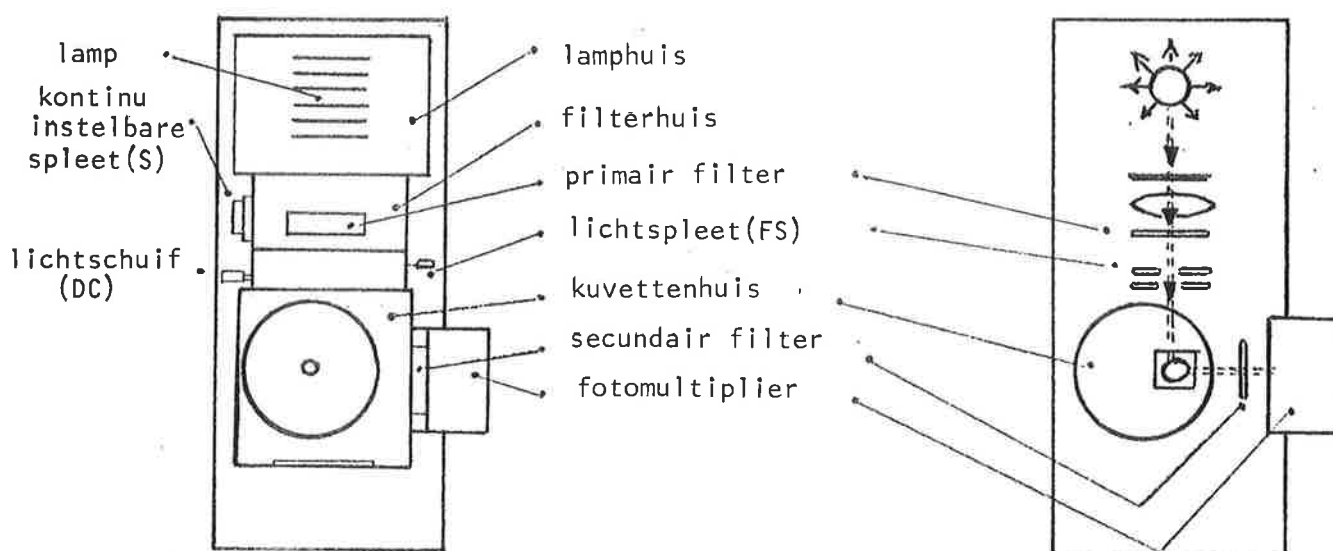


Fig. 2

OPTISCH GEDEELTESTRALENGANG

Lamp : Hg 3 spectral (Osram)

Primair filter : U 9

Sekundair filter : U 11

Fotomultiplier : IP 28

b) Electrische gedeelte. Het electrische gedeelte van de opstelling bestaat uit een gestabiliseerde spanningsbron voor de kwiklamp en een versterkereenheid die tevens een aanwijsmeter bevat. De spanningsbron voor de kwiklamp bevat een aan-uit schakelaar die tijdens het voorspoelen van het systeem al wordt aangezet. Na het uitschakelen van de lamp moet men tenminste 30 minuten wachten voor men de lamp opnieuw kan starten. Dit is de reden dat de lamp meestal slechts éénmaal per dag wordt gestart. Het versterker gedeelte versterkt het signaal van de fotomultiplier en geeft het resultaat af aan de aanwijsmeter en de recorder. De versterker wordt aangezet met knop 4 (Fig. 3); de fotomultiplier moet daarna worden aangezet met knop 2 en de spanning op de fotomultiplierbuis kan trapsgewijs worden opgevoerd met schakelaar 3. Bij elke verhoging van de spanning over de fotomultiplier wordt het signaal + 2 maal zo groot.

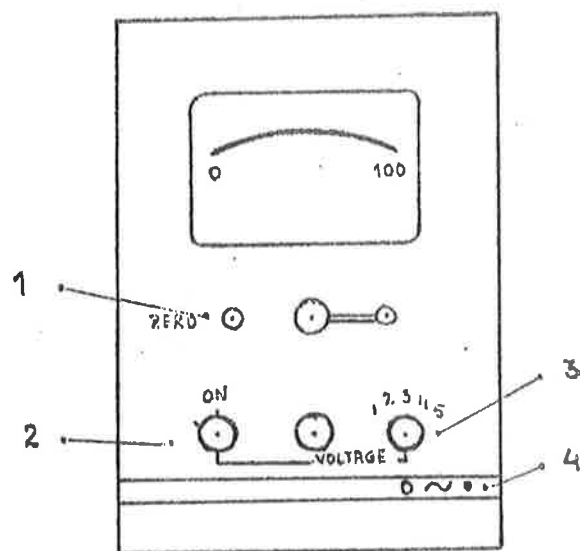


Fig. 3

VERSTERKER GEDEELTE

De uitslag van de aanwijsmeter wordt meestal niet gebruikt bij de bepaling zelf, alleen bij de instelling van de versterking van de pilot-monsters. De gevoeligheid (onbenoemde bovenste knoppen) en de nulpunts-onderdrukking (knop 1, Fig.3) van de aanwijsmeter werken ONAFHANKELIJK van de recorder-uitgang.

Met knop 1 wordt de wijzer op nul gezet tijdens het voorspoelen van het systeem. Bij het instellen van de versterking wordt met behulp van de variabele spleet (Fig.2) en de spanning over de fotomultiplier, dus met knop 3, de wijzer BINNEN DE SCHAAL gehouden.

De demping van het aanwijsinstrument staat altijd op stand 3.

c) Het recorder gedeelte (Fig. 4 en 5)

Het signaal afkomstig van de versterker kan op een recorder direkt of versterkt worden weergegeven. Om fluktuaties in het inkomende signaal te onderdrukken wordt over de recorder-ingang een condensator van 500 μF gezet. De versterking door de recorder kan men wijzigen door de tegenspanning, afgegeven door de recorder, te vergroten of te verkleinen.

Dit kan zowel trapsgewijs als kontinu. Bij de GOERZ recorder moet bij kontinu versterken de keuzeschakelaar op variabel staan. Bij bepalingen, die beginnen met een signaal over de volle schaal, zal bij versterking de pen van de schaal aflopen. Dit kan men voorkomen door tegelijk het nulpunt te onderdrukken.

Bij de tweekanaals recorder zit de nulpunts instelling op de achterwand naast de recorderingang van elk kanaal. Bij de GOERTZ kan men de nulpuntsonderdrukking met een grof- en een fijnregelaar instellen (zie Fig. 4 en 5).

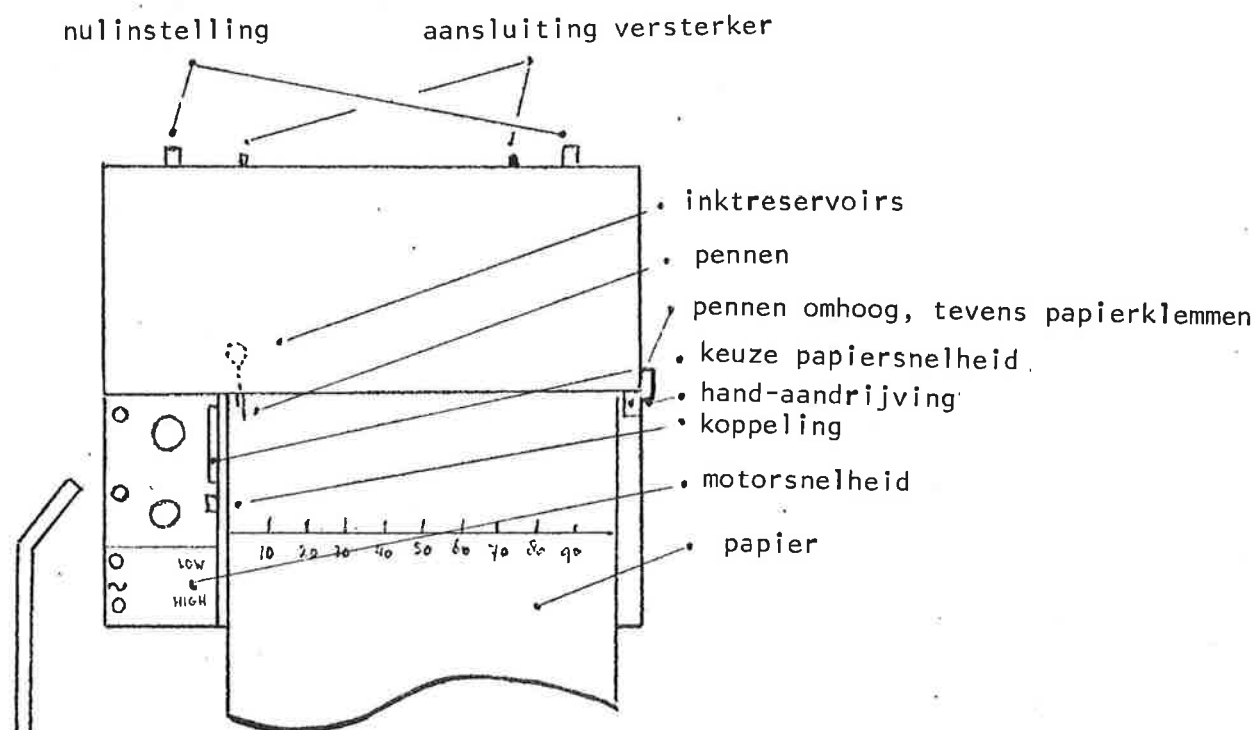
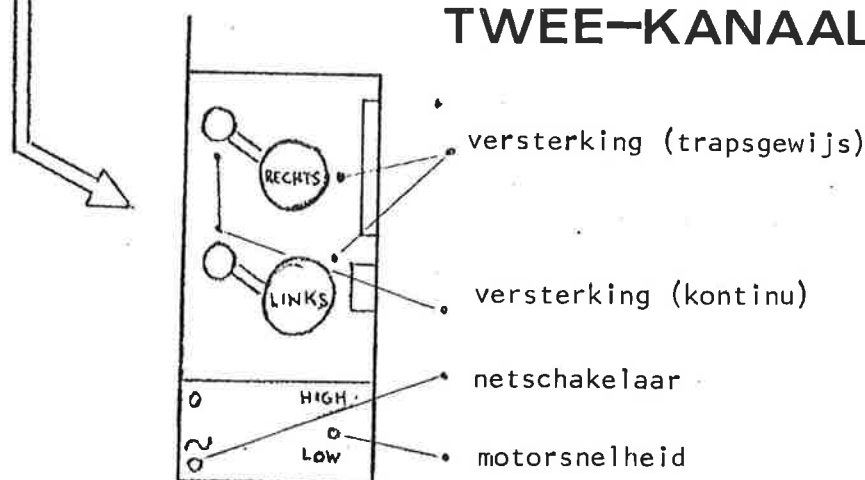


Fig.4

TWEE-KANAALS RECORDER



De papiersnelheid bedraagt bij alle bepalingen ca 1 cm/min. Dit is bij de tweekanaals schrijver stand 4 van de snelheidskeuzeknop bij de laagste motorsnelheid. Bij de GOERTZ moet de keuzeschakelaar op 600 mm/h staan.

Het inktniveau van de pennen op de dubbelkanaals recorder kan men controleren door het deksel boven de pengeleiders op te lichten. De pennen worden gevuld met behulp van een 2 ml injectiespuit, een injectienaald en eventueel een stukje dunne slang. Bij de GOERTZ kan men het inktniveau direkt zien, bijvullen geschiedt met een pasteurpipet.

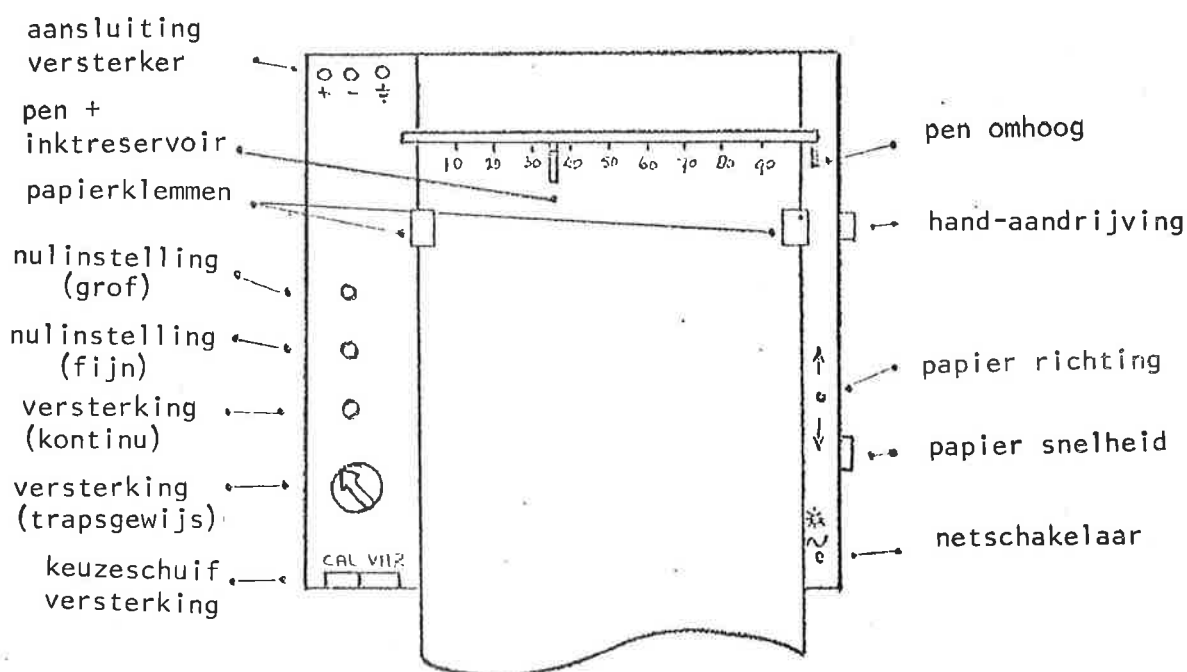


Fig. 5

EEN KANAALS RECORDER

Het inzetten van een nieuwe papierrol bij de tweekanaals recorder gebeurt door de klem van het papier te halen, en onder het papier het deksel op te lichten. De oude rol kan nu voor een nieuwe verwisseld worden en het papier wordt onder de aandrijfrol gedraaid met behulp van de aandrijfknoop aan de rechterkant van de recorder (Fig.4). Het papier wordt onder de geleiderand doorgehaald en opgespannen door de klem er aan te hangen. Controleer of de aandrijftanden in de perforaties van het papier komen. Bij de GOERTZ recorder gaat het verwisselen van de papier-

rol als volgt: De pen wordt opgelicht en de beide papierklemmen opgeklapt. De oude papierrol wordt uit de houder genomen en de stang uit de rol getrokken. Nadat de stang in de nieuwe rol is gestoken wordt deze in de houder gelegd en het papier onder de pengeleider over de aandrijftanden gelegd. De papierklemmen worden teruggeklapt nadat de perforaties en tanden precies in één geschoven zijn. Controleer bij hoge papiersnelheid of het papier recht loopt.

d) Het slangensysteem.

Het systeem werd opgezet met een AutoAnalyzer pomp, bij de verdubbeling van het systeem werd overgegaan op twee Cenco pompen.

Afhankelijk van de gebruikte pomp worden de volgende slangen gebruikt:

AutoAnalyzer pomp

funktie van de slang	pompsnelheid	kleurkode	bestelnummer
spoellijn	1.2 ml/min	geel/geel	1-03-012
luchtlijn	1.2 "	geel/geel	1-03-012
reagens I of bufferlijn	1.6 "	blauw/blauw	1-03-014
monsterlijn	0.8 "	rood/rood	1-03-010
reagens II of substraatlijn	0.1 "	oranje/groen	1-03-004
	(0.16 "	oranje/geel	1-03-005)
reagens III of enzymlijn	0.23 "	oranje/wit	1-03-006
kuvetafzuiglijn	1.2 "	geel/geel	1-03-012

N.B. CENCO-slangen zijn anders dan AUTOANALYZER-slangen !!!

Daarom slangen van verschillend merk NOOIT met elkaar verwisselen.

Cenco pomp

functie van de slang	pompsnelheid	kleurkode	Cenco bestelnummer
spoellijn	1,22 ml/min	blauw/blauw	34510-616
luchtlijn	1,22 "	blauw/blauw	34510-616
reagens I of bufferlijn	1,58 "	groen/groen	34510-618
monsterlijn	0,79 "	wit/wit	34510-613
reagens II of substraatlijn	0,12 "	oranje/blauw	34510-605
reagens III of enzymlijn	0,224 "	oranje/groen	34510-607
kuvetafzuiglijn	1,22 "	blauw/blauw	34510-616

Alleen de substraatlijn pompt sneller in het CENCO-systeem (0,16 ml/min) en de verdunning van het substraat is daarom aangepast aan deze grotere snelheid. Omdat het substraat in grotere hoeveelheden wordt gemaakt, in een verdunning welke is aangepast aan het CENCO-systeem, is het beter bij herbouw van een AUTOANALYZER-systeem de substraatlijn een pompsnelheid van 0,16 ml/min. te geven (kleurkode oranje/geel).

De vloeistofstromen worden samengevoegd met behulp van een uit D₁ fittings bestaande "cactus" (bestelnummer D₁ : 1-13-021), de mengspiraal is van het type 105-86 (bestelnummer 1-13-052) en de vertragingsspiraal heeft een inhoud van 44 ml. Bij de dubbele opstelling wordt één spiraal met een diameter van 17 cm (bestelnummer 1-05-006) en één spiraal met een diameter van 14 cm (bestelnummer 1-05-002) gebruikt. De debubbler is van het type C₁ (bestelnummer 1-13-015).

Voor de verbindingen van slang en glas, en van glas en glas wordt sleeving gebruikt van 1/8 x 1/4" (bestelnummer 1-03-027).

Als aan- en afvoerslangen wordt voor substraat- en enzymlijn polyaethyleenslang gebruikt van 0,030 x 0,068" (bestelnummer 1-03-303) en voor de monsterlijn polyaethyleenslang van 0,030 x 0,048" (bestelnummer 1-03-302). Alle andere verbindingsslangen zijn van Tygon transmission tubing 1/8 x 1/16" (bestelnummer 1-03-025). De pompslangen worden telkens gecontroleerd, door bij het starten van een bepaling in elke slang een luchtbel op te laten zuigen; de luchtbel moet zonder haperen tot in de cactus worden opgepompt. Indien dit bij één van de pompslangen niet gebeurt en de aanzuiglijn is NIET VERSTOPT, worden ALLE pompslangen vernieuwd.

De lengteas van de "cactus" wordt onder een hoek van 45° opgesteld om te voorkomen dat de luchtbellens in de "cactus" blijven hangen. Om dezelfde reden wordt elk h-stuk zo gemonteerd dat de inlaten aan de onderkant van de "cactus" komen. Het uiteinde van de luchtinlaat wordt hoger gemonteerd dan het niveau van spoelvroelstof in de flessen om terughavelen van de vloelstof te voorkomen in de ruststand van de opstelling (slangen ontspannen). Als spoelvroelstof wordt gebruikt aqua dest met per 500 ml toegevoegd 1 druppel Levor IV. (Dit dient om de wanden van de slangen en de glazen tussenstukken te bevochtigen).

e) De pompen

I AUTOANALYZERpomp

Voor een éénkanaalsopstelling is één AUTOANALYZERpomp noodzakelijk, een tweesnelhedenpomp is wenselijk omdat het spoelen van het systeem dan 6x zo snel kan gebeuren.

De slangen worden op één niveau gemonteerd in de volgorde: (gerekend vanaf de klem) substraatlijn, enzymlijn, spatie, monsterlijn, luchtlijn, spoelijn, kuvetafzuiglijn en bufferlijn. Deze volgorde is zo gekozen opdat nu alle slangen bij benadering dezelfde druk van de klem ondervinden.

Na afloop van een bepaling wordt de belasting van de slangen weggenomen door de klem open te maken en éen van de slanghouders los te maken.

II CENCOpomp

Voor een éénkanaalsopstelling is één CENCOpomp noodzakelijk. De pompsnelheid kan met de hand, tijdens de spoelfase, worden vergroot. De slangen worden in de zelfde volgorde (nu gerekend vanaf het motorhuis) gemonteerd als bij de AUTOANALYZERpomp. Daarbij wordt gecontroleerd of de schouders van de pompslangen in korresponderende houders zijn gevat. De schouders van de pompslangen worden geborgd met een klemschuifje. De slangen worden opgespannen door achteruit draaien van de schouderhouder met een stelschroef tot aan het potloodstreepje op het motorhuis. DE KLEM WORDT PAS AANGEBRACHT ALS DE SLAGEN ZIJN GESPANNEN!

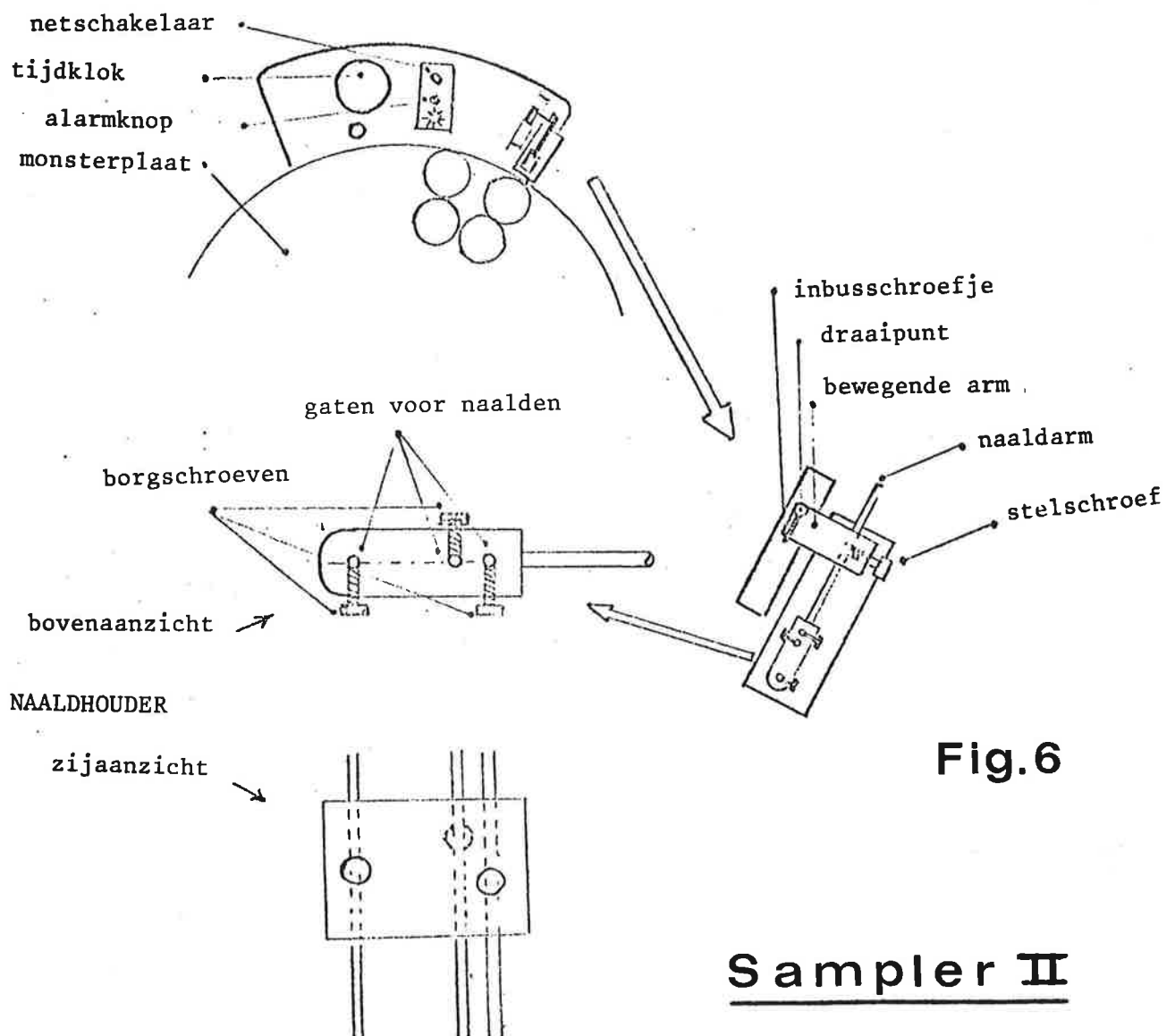
Na afloop van de bepaling wordt de klem verwijderd en de slangen ontspannen.

f) De monsternemer (SAMPLER II)

De monsternemer wisselt 1x per minuut, bij het wisselen valt de naald terug in het spoelbakje. De spoelvloeistof wordt kontinu verversd met een snelheid van 1,2 ml/min (Fig.1, washline). Het schakelen van de monsternemer gebeurt met behulp van een klok (niet zichtbaar), een programmaschijf (kode 60-2/1) (bestelnummer 1-02-101) en een schakelaar (zichtbaar in het schijfhuys als koperen stripje).

Voor de monsternaalden zijn in de naaldhouder 3 mogelijke plaatsen beschikbaar (Fig.6).

- 1) De opstelling wordt éénkanaals gebruikt, één van de naalden wordt daarom uit de naaldhouder genomen en los in het spoelbakje geplaatst.
- 2) Er moeten twee monsters uit één monsterbakje genomen worden: beide naalden worden zo dicht mogelijk bij elkaar in de houder gemonteerd.
- 3) Er moeten twee monsters uit twee monsterbakjes genomen worden: beide naalden worden zover mogelijk uiteen in de houder gemonteerd.



Het monteren van naaldhouder en naalden is een zeer precies werk daar de lichte konstruktie van het bewegingsmechaniek gemakkelijk wordt beschadigd!! Het monteren gaat als volgt:

De schakelschijf wordt uit het schijfhuis omhoog getrokken en de netschakelaar wordt aangezet (kontrolelampje gaat branden).

De schakelaar in het schijfhuis wordt voorzichtig aangeraakt tot dat de bewegende arm juist zijn hoogste stand heeft bereikt. De naaldarm wordt uit de bewegende arm genomen nadat de stelschroef is losgedraaid. Met behulp van een kleine, goed passende schroevendraaier worden de borgschroeven van de naaldhouder losgeschroefd en de naalden verplaatst naar de gewenste positie. De naalden worden tot ongeveer halverwege in de naaldhouder geschoven en LICHT geborgd met de borgschroeven.

(Gezien de positie van de borgschroeven wordt meestal de dichtst bij de naaldarm geplaatste naald verplaatst.) De naaldarm wordt nu in de bewegende arm geschoven tot aan het merkstreepje en met een stelschroef LICHT geborgd. De schakelaar wordt voorzichtig naar binnen gedrukt tot de naaldarm in de monsterstand staat. WANNEER EEN VAN DE NAALDEN BIJ DEZE BEWEGING EEN MONSTERBAKJE RAAKT WORDT DE SCHAKELAAR ONMIDDELIJK LOSGELATEN. In dat geval worden de borgschroeven losgeschroefd en de naalden omhoog geschoven. De schakelaar wordt weer voorzichtig bediend tot de naaldarm in de monsterstand staat. De naaldarm wordt na losmaken van de stelschroef zo geschoven dat beide naalden ongeveer in het midden van het / de monsterbakje(s) komen. De naalden worden nu zover naar beneden geschoven dat ze bijna de bodem van het / de bakje(s) bereiken en daarna geborgd met de borgschroeven. (Niet al te stijf aandraaien: de schroefdraad is van perspex!!).

Het TERUGgaan van de bewegingsarm KAN NIET worden onderbroken met de schakelaar in het schijfhuis. Dan moet gebruik gemaakt worden van de NETSCHAKELAAR.

DEZE SCHAKELAAR WORDT NU VOORZICHTIG BEDIEND WAARBIJ ER WORDT OPGELET DAT DE NAALDEN NU NIET DE RAND VAN HET SPOELBAKJE RAKEN.

INDIEN DIT WEL HET GEVAL IS WORDT DE NETSCHAKELAAR ONMIDDELIJK UITGEZET en worden de naalden weer losgemaakt. De netschakelaar wordt nu bediend tot de naaldarm in de spoelbak staat. De stelschroef wordt nu weer losgeschroefd en de naaldarm zo verschoven zodat de voorste naald

de rand van de spoelbak net niet raakt. De procedure wordt nu herhaald totdat de naalden vrij blijven gedurende de gehele beweging. Bij al deze manipulaties is het mogelijk dat de bewegende arm om zijn verticale as is gedraaid. Deze kan voorzichtig weer teruggebogen worden en eventueel weer opnieuw geborgd met de inbusschroef op het draaipunt (zie Fig.6).

De monstertafel kan ook zonder motor worden verdraaid als de naaldarm in de spoelstand staat. De tafel wordt dan uit de borgpennen omhoog geheven, verdraaid en opnieuw in de pennen geborgd.

De monster bakjes worden altijd MET EEN PINCET uit de voorraadlade genomen en op de monstertafel geplaatst om verontreiniging met melkzuur van de vingertoppen te vermijden.

(Leverancier monsterbakjes: LANDA N.V., Postbus 12, Hoogerheide. AutoAnalyzercups vlakke bodem 1 cc).

g) Het waterbad

Het element van het waterbad stoort de aanwijsinstrumenten en het wordt daarom op een andere groep van het lichtnet aangesloten. De schakelaar waarmee roerwerk en verwarming apart kunnen worden geschakeld wordt niet gebruikt. Het bad wordt aan en uit gezet met de stekker. De temperatuur moet na een half uur 37°C zijn. De hoogte van de pieken is vooral bij de cyclische bepalingen direct afhankelijk van de temperatuur.

De juiste TEMPERATUUR is dus ZEER BELANGRIJK voor de bepalingen.

UITVOERING VAN DE ENZYMATISCHE BEPALINGEN

=====

Bereiden van reagentia, spoelvloeistoffen en monsters

Spoelvloeistoffen

- a. Vòòr de bepaling begint wordt het systeem voorgespoeld met een mengsel van 4 M ureum en 4 N NaOH. Indien langer dan ca 90 min. bepaald wordt, wordt dit mengsel ook gebruikt voor tussentijds spoelen.
- b. Daarna en ook tijdens de bepaling zelf wordt als spoelvloeistof gebruikt gedeïoniseerd water met daaraan toegevoegd per 500 ml 1 druppel LEVOR IV. Gebruik hiervoor vers water, dat dezelfde dag getapt is. De LEVOR dient om de wanden van slangen en glaswerk te bevochtigen, zodat een goede vloeistofstroom en een goed bellenpatroon gehandhaafd wordt.

Monsters

Als monsters voor deze bepalingen dienen ca 30-, ca 900- en ca 27.000-voudige verdunningen van de te bepalen monsters in 1 mM NH_4OH . Deze verdunningen worden gemaakt met behulp van een semi-automatisch verdunningsapparaat, Autodiluter (Hook & Tucker).

De Autodiluter zuigt 0,05 of 0,1 ml monster op (afhankelijk van het gebruikte instrument; op het laboratorium zijn er een drietal) en spuit vervolgens na met ca 1,5 resp. 3,0 ml 1 mM NH_4OH .

Het ammoniakale water doet zowel rode als witte cellen lyseren. Voor witte en rode cellen worden verschillende Autodiluters gebruikt. Op elk van de apparaten staat aangegeven de juiste verdunning (deze wordt regelmatig gecontroleerd).

ALTIJD MOET VOOR VERDUNNEN VAN MONSTERS EN STANDAARDEN VOOR EEN BEPALING DEZELFDE AUTODILUTER WORDEN GEBRUIKT.

Hoe verdund wordt hangt van de gebruiker af, zorg er in elk geval voor dat het te verdunnen monster goed homogeen is (Whirlmix).

De monsters en verdunningen worden vòòr en tijdens de bepaling afgesloten bewaard in een koelbad van smeltend ijs. Kunnen de verdunningen niet binnen ca 3 uur gebruikt worden, dan worden zij ingevroren bij -20°C en pas zo kort mogelijk voor de bepaling ontdooid in een waterbad van 25°C

en daarna weer in het ijsbad gezet.

Buiten het koelbad kunnen de gehalten van de te bepalen stoffen in de verdunningen snel achteruit gaan. Welke verdunningen gebruikt worden hangt af van het experiment dat gedaan is. Voor de witte cellen worden de 30-voudige verdunning meestal gebruikt, voor de rode cellen meestal de 900- en de 27.000-voudige.

In de 900-voudige verdunning worden bepaald: Melkzuur, ATP+ADP, pyruvaat en 3-PG.

In de 27.000-voudige verdunning: 2,3-DPG en GDP.

In welke verdunningen glycerol + glycerol-1-fosfaat en glucose bepaald worden is afhankelijk van het bijbehorende experiment.

N.B. Bij lactaat-, glucose en de glycerol + glycerol-1-fosfaatbepaling in verdunningen van vol bloed of plasma moeten de gebruikte standaardoplossingen gemaakt worden als inwendige standaarden. De eigen fluorescentie en/of quench, veroorzaakt door de hemoglobine of plasmaeiwitten, kan bij deze bepalingen aanzienlijk zijn.

Reagentia

Berekening van de benodigde hoeveelheden.

Bij de bepaling wordt een vast monsterschema aangehouden:

2x watermonster

hoogste standaard (om de versterking in te stellen)

2x watermonster

hoogste standaard, tweede maal (om de instelling te controleren,
eventueel bij te stellen)

2x watermonster

5 (of meer) standaarden

2x watermonster

1e groep monsters

2x watermonsters

2e groep monsters

enz.

2x watermonsters

5 (of meer) standaarden (om te kijken of de bepaling verlopen is)

2x watermonster

EINDE

De watermonsters dienen om een eventueel verloop van de basislijn te vervolgen, tevens vormen zij een scheiding tussen groepen monsters, hetgeen terugzoeken gemakkelijk maakt. Een groep monsters moet, afhankelijk van het experiment, 8 à 12 stuks bedragen.

Er moet naar gestreefd worden niet langer dan $1\frac{1}{2}$ uur achtereen te bepalen omdat anders het systeem sterk vervuult.

Spoel b.v. na $1\frac{1}{2}$ uur de opstelling gedurende 10 minuten door met de ureum/loog. Spoel alle slangen door, ook de monsterslangen door de naalden uit de naaldhouder los te maken en in de ureum/loog te hangen.

Spoel daarna na met levor-water totdat aan de uiteinden van de waste-slangen lakmoespapier niet meer blauw gekleurd wordt. Dit naspoelen kan eventueel versneld gebeuren. Maak het spoelbakje van de Sampler leeg met een Pasteur-pipet en vul het weer met levorwater. Herhaal dit 1x.

Start daarna de bepaling opnieuw en ga door.

Vereiste hoeveelheid reagentia

Aan de hand van bovenstaand schema wordt de berekening opgezet, ervan uitgaande dat één monster één minuut tijd kost; bovendien is er voor de reagentia een bepaalde inspoeltijd nodig.

Stel dat, inclusief standaarden en watermonsters er 55 monsters zijn dan zal er 55 minuten lang reagentia worden gebruikt, vermeerderd met de inspoeltijd voor buffer (8 min) resp. substraat (5 min) resp. enzym (2 min). Nodig is dan:

Bufferoplossing:	$55 + 8 = 63 \text{ min} \times 1,6 \text{ ml/min} = 100,8 \text{ ml}$
Substraat "	$: 55 + 5 = 60 \text{ min} \times 0,16 \text{ ml/min} = 9,6 \text{ ml}$
Enzym "	$: 55 + 2 = 57 \text{ min} \times 0,23 \text{ ml/min} = 13,4 \text{ ml}$

De hoeveelheden enzym en substraat worden met 10% verhoogd en op 5 ml naar boven afgerond. De bufferoplossing wordt op 50 ml naar boven afgerond. Dus: buffer 150 ml, enzym 20 ml en substraat 15 ml.

ALGEMENE AANWIJZINGEN VOOR HET BEREIDEN VAN DE REAGENTIA
=====

Voor de hoeveelheden van elk reagens nodig voor een bepaling wordt verwezen naar de desbetreffende voorschriften.

1. Bufferoplossingen

Bufferoplossingen worden nauwgezet volgens de voorschriften bereid, altijd met gedestilleerd water (Beentjes, Eysvoogel, Scheepstra). Meestal zijn stockoplossingen aanwezig in de koelcel (+2°C). Op deze oplossingen dient duidelijk vermeld te staan de inhoud, de pH en de datum van bereiding. Bij twijfel over de inhoud: NOOIT GEBRUIKEN. Kijk, voordat men zelf bufferoplossingen gaat bereiden of er van vorige bepalingen nog bufferoplossing over is.

Kontroleer voor gebruik de pH van verse of bewaarde buffers.

Voor NADH₂-oplossingen: NADH₂ is duur !!! Alvorens verse oplossingen te maken, kijk of er nog van vorige bepalingen over is en hoeveel NADH₂ er nog inzit (zie onder). Verdun eventueel een oude oplossing van b.v. 200 µM om 50 µM te krijgen. Controleer de pH van de bufferoplossingen door een kleine hoeveelheid ervan op kamertemperatuur (25°C) te brengen en daarvan de pH te meten. De rest van de oplossing wordt koel gehouden. Bij hogere temp. verloopt de NADH₂-oplossing snel (gaat over in NAD), en dit gebeurt ook bij een pH lager dan 7.0.

Kontroleer de sterkte van de vers bereide of bewaarde NADH₂-oplossing met de spektrofotometer, bij 340 nm in een 1 cm kuvet.

Volgens de wet van Lambert-Beer: $E = E \cdot c \cdot d$ met $E = 6,22 \cdot 10^3$ moet de E_{340} voor een 50 µM NADH₂-oplossing ca 0,311 zijn, en voor de 200 µM-oplossing ca 1,2. Ook als de sterkte van de buffer 10-15% minder is kan deze nog gebruikt worden.

Na gebruik wordt de rest van de bufferoplossing in de koelkast of koelcel gezet met duidelijk vermeld de inhoud en de datum.

2. Substraatoplossingen

Ingevroren substraatoplossingen dienen zo kort mogelijk van te voren te worden ontdooid en na gebruik wordt de rest weer zo spoedig mogelijk ingevroren. Zet er duidelijk de datum op !!

Dreigt de voorraad ingevroren substraat op te raken dan wordt iemand van de afdeling Celchemie gewaarschuwd. Bereid nooit zelf voorraad-oplossingen. Wel kan voor direct gebruik de benodigde hoeveelheid substraat bereid worden, volg hierbij nauwgezet de voorschriften op. Ook de rest van dit substraat invriezen, als de bepaling feilloos verlopen is.

3. Enzymoplossingen

Enzymen zijn duur; wees er zuinig mee en verknoei niets !!!

Kijk eerst of er nog resten enzymoplossing van vorige gebruikers over zijn. Enzymmengsels blijven ca 5 dagen goed.

Bij het pipetteren gaat men als volgt te werk. Haal de benodigde flesjes enzym uit de koelkast en zet ze in een ijsbad. Zet niet meer flesjes in het bad dan voor één bepaling tegelijk. Zet een fles of buis in het ijs en pipetteer daarin ca 3/4 van de benodigde hoeveelheid koude buffer, daarna de albumine (dient als bescherming voor de enzymen). Meng de inhoud van het enzymflesje even op de Whirlmix en open het voorzichtig. Gebruik een schone pipet met een hele punt en pipetteer de benodigde hoeveelheid enzym in de buis, veeg niet de pipet af. Blaas daarna de pipet leeg in het flesje en sluit dit weer voorzichtig. Zet het potje dan weer in het ijs terug. Spoel de pipet met de buffer-albumine en blaas uit in de buis. Ga zo met alle flesjes te werk en zet ze daarna zo snel mogelijk terug in de koelkast. Als een flesje leeg is, is er een nieuw flesje in de koelcel. Voeg daarna de rest van de bufferoplossing toe en spoel daarbij de wand van het vat goed af zodat alle resten enzym in de oplossing komen. Houdt dit mengsel in het ijsbad, na op-roeren met een plastic roerstaafje.

Na gebruik wordt de rest van de oplossing in de koelkast gezet met duidelijke vermelding van de inhoud en de datum.

Houdt ook tijdens de bepaling de enzym- en substraatoplossing in het ijs. Voor de buffer is dat niet nodig.

Schrijf na gebruik op in het kaartstelsel naast de balans hoeveel van elk enzym en substraat gebruikt is. Ook het aanbreken van nieuwe flesjes wordt vermeld en doorgegeven aan André Boom.

ALLEEN ALS IEDEREEN ALTIJD ALLES OPSCHRIJFT WAT HIJ OF ZIJ GEBRUIKT IS ER ALTIJD VOLDOENDE VAN ELK REAGENS AANWEZIG !!

AANZETTEN VAN DE APPARATUUR

=====

Dit moet minstens een half uur voordat de bepaling begint gedaan worden. Laat één persoon alle apparatuur aanzetten, dan worden zo weinig mogelijk vergissingen gemaakt.

Optisch gedeelte

Zet de schakelaar op de voedingseenheid aan en wacht tot men door de gleuven van het lamphuis de lamp ziet branden. ALS DE LAMP PAS UITGEZET WAS MAG DEZE EERST EEN HALF UUR LATER WEER AANGEZET WORDEN. Open de kontinu instelbare spleet geheel (knop S). Kijk of de lichtspleet (FS) vaststaat en trek de lichtschiif (DC) geheel open (uit).

Elektrisch gedeelte

Zet de fotomultiplierbuis uit (knop 2) en DAARNA de netschakelaar (knop 4) aan. Zet de versterking (knop 3) in stand 1, draai de nulknop (knop 1) geheel rechtsom en zet de fotomultiplier weer aan. Het aanwijsinstrument zal nu ca 3 schaaldelen aanwijzen. Schuift men nu de lichtschiif naar binnen dan moet de meter exact 0 aanwijzen bij geheel rechtsom-gedraaide nulknop. Zo niet dan is de meter waarschijnlijk ontregeld (hr Eitjes waarschuwen). Trek de schuif weer uit.

Recorder

Kontroleer de inktniveaus van de pennen en kijk of er nog voldoende papier op de rol zit. Zet de recorder aan met de netschakelaar en breng met de nulknop (achter op de recorder) de basislijn op ca 3 schaaldelen. Doe de pennen omlaag en laat even het papier lopen om te kijken of de pennen schrijven.

Kijk of de papiersnelheid goed is ingesteld.

Pomp en slangen

Span de slangen en breng de klem aan op de voorgeschreven wijze. Daarna wordt verse spoelvroeststof (levor-water) in de flessen gedaan. Met de netschakelaar worden de pompen vervolgens aangezet.

VUL DE SPOELWATERFLESSEN ELK HALF UUR BIJ.

Indien slechts één kanaal gebruikt wordt de spoellijn van de stilstaande pomp afgeklemd. NIET DE VERKEERDE AFKLEMMEN !!

Voorspoelen van het systeem

Haal voor elk kanaal alle slangen uit de spoelvloeistof en laat 10 minuten ureum/loog mengsel opzuigen. Maak ook de naalden los uit de houder en laat ook hierdoor het mengsel opzuigen. Haal de slangen dan weer uit de oplossing, veeg ze goed af met Kleenex en stop ze weer in de flessen levor-water. KIJK NU OF DE SLANGEN ZUIGEN: ER MOET ZICH EEN LUCHTBEL DOOR ELKE SLANG BEWEGEN. Bevestig ook de naald weer na gekeken te hebben of ook de monsterlijn trekt. Spoel (eventueel versneld) door. Zuig met een pasteurpipet het spoelbakje van de sampler leeg en vul het met levor-water. Herhaal dit een keer.

Kijk na ca 15 minuten of alle loog verdwenen is uit het systeem. Pas als aan het uiteinde van de kuvetafzuiglijn met lakmoespapier geen loog meer aantoonbaar is, mag met de bepaling begonnen worden.

Sampler

Plaats enkele monsterbakjes op de plaat en stel vervolgens naaldlengte en -afstand in zoals beschreven in de inleiding. Laat de sampler daarna 3 à 4 keer wisselen en kijk of alles goed gaat. Zet de sampler dan weer uit.

Waterbad

Zet het waterbad aan door de steker in de contrasteker van het verlengsnoer te steken. Kijk of de roermotor draait. Vul het waterbad bij met gedeïoniseerd water totdat de bovenste spiraal van de vertragingsspiraal onder staat.

KONTROLEER NA 30 MINUTEN DE TEMPERATUUR VAN HET BAD.

Diversen

Maak het waste-vat geheel leeg. Zorg dat er voldoende monsterbakjes zijn in de lade. Zorg voor voldoende gewassen pasteurpipetten, een pincet, een stopwatch, Kleenex en een bekerglas met levor-water om de watercups te vullen tijdens de bepaling.

CHECKLIST

=====

Met behulp van onderstaande checklist wordt een laatste kontrôle uitgevoerd op de werking van alle apparaten.

1. Optisch gedeelte

Brandt de lamp? Staan de kontinu instelbare spleet, de lichtspleet en de lichtschuif geheel open?

2. Versterker

Staat deze aan (netspanningskontrolelampje), staat de fotomultiplier aan, wijst de meter ca 3 schaaldelen aan? Staat de versterking in stand 1 ? Zet deze op stand 2 en kijk of de meteraanwijzing verandert, deze moet groter worden, zet terug in stand 1.

3. Recorder

Staat deze aan, is er voldoende inkt en papier? Schrijven de pennen?

4. Pompen en slangen

Zijn alle slangen op de juiste manier gespannen? Zitten er geen kleine of grote luchtbelletjes tussen slanguiteinde en cactus, zo ja dan is waarschijnlijk de slang verstopt.

Is het bellenpatroon net na de cactus regelmatig? Is het bellenpatroon net voor de kuvet regelmatig en gaat er geen lucht mee de kuvet in?

5. Sampler

Vul enkele monstercups met levor-water en laat de sampler enkele malen werken, kijk of alles goed gaat en vervolg de luchtbellen door de monsterlijn tot in de cactus.

6. Waterbad

Is het waterbad op temperatuur (37°C) en voldoende gevuld, draait de roermotor?

7. Is het waste-vat niet vol, is er voldoende spoelvroestof in de flessen. Pincet, stopwatch, Kleenex, viltstift, bekerglas, levor-water pasteurpipetten aanwezig ?

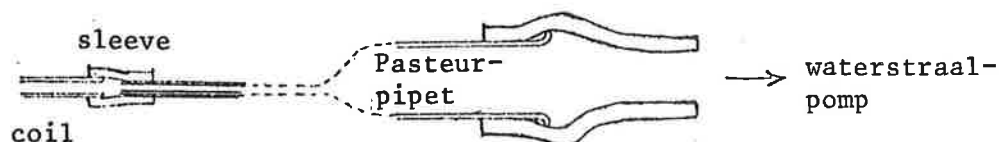
IS DE UIT HET SYSTEEM KOMENDE VLOEISTOF NEUTRAAL ?????

D R A A I E N M A A R !!!!!

TROUBLE SHOOTING BIJ DE GEMECHANISEERDE ENZYMATISCHE BEPALINGEN

Wanneer storingen optreden in de gemechaniseerde enzymatische bepalingen wordt eerst onderzocht of het elektrische/optische gedeelte correct werkt, daarna of het mechanische gedeelte in orde is, en tenslotte of de fout een chemische oorzaak heeft.

<u>KLACHT</u>	<u>ONDERZOEK EN REMEDIE</u>
A. Pen trilt hevig bij instellen nullijn	<u>Electr.</u> 1) Millivoltmeter van de nulinstelling van de recorder is vuil. Draai de nulknop van de recorder enige malen geheel rond. 2) Storing op het elektrische net. Zet de pomp stil: gaat het trillen door, waarschuw dan de hr Eitjes. <u>Mech.</u> 3) Houdt het trillen op als de pomp stilstaat, dan is het slangen-coil systeem vuil. Ga na of de slangen goed trekken. Zijn ze vuil, spoel ze dan door met ureum/loog of knip de verstopte plek eraf (vaak is alleen de ingang van de slang verstopt). Is er één slang kapot, vervang dan ALLE slangen en spoel ze daarna door met ureum/loog. Een zeer vuile coil maakt men als volgt schoon. Koppel de coil af, neem hem uit het waterbad en zuig hem door met hete 5 N NaOH. Spoel na met water + levor tot neutrale pH



KLACHT	ONDERZOEK EN REMEDIE
B. NAD(P)H₂-fluorescentie verschijnt niet op recorder	Electr. 1) Verschijnt de uitslag wèl op de schaal van de fotometer? Zo nee, zie punt 1 t/m 7; zo ja, zie punt 8. Controleer de fotomultiplier door de lichtschuif in te duwen. De meter moet een lagere waarde aan gaan wijzen 2) Controleer de versterker door de versterkingsknop (knop 3, Fig.3) op te draaien. De meter moet een hogere waarde aan gaan wijzen. 3) Controleer of de lamp brandt. 4) Draai <u>voorzichtig</u> aan het knopje op het cuvettenhuis om te controleren of de cuvet gecentreerd staat. Het huis mag niet kunnen draaien. <u>Mech.</u> 5) Kijk of de bufferlijn goed trekt. Maak schoon of vervang waar nodig. 6) Kijk of de cuvetafzuiglijn goed trekt. Maak schoon of vervang waar nodig. <u>Chemisch</u> 7) Controleer de NAD(P)H₂-concentratie van de buffer spectrofotometrisch. Als deze te laag is, was dan de pH van de buffer misschien lager dan 7,4? 8) Als de fotometer wèl een uitslag vertoont, dan zit de fout in de recorder of in de verbinding tussen recorder en versterker.
C. Substraat- en/of enzymfluorescentie verschijnt niet op recorder	<u>Electr.</u> 1) Zie B. <u>Mech.</u> 2) Controleer of de slangen de juiste reagentia trekken. 3) Controleer of de betreffende slangen goed trekken. Vervang en/of maak schoon (zie A).

KLACHT	ONDERZOEK EN REMEDIE
D. Pilotpiek ver- schijnt niet of veel te laag op de recorder	<u>Electr.</u> 1) Zie B. <u>Mech.</u> 2) Controleer of <u>alle</u> lijnen goed trekken. Vervang en/of maak schoon (zie A.) 3) Controleer de temperatuur van het waterbad. 4) Controleer de pH van de wastevloeistof. 5) Controleer of de slangen de juiste reagentia trekken. 6) Kijk of er luchtbellens in de lijnen of in de cactus zitten. Tik ze eruit. Blijven ze komen controleer dan de slangenverbindingen, vooral tussen naald en monsterlijn. 7) Controleer het bellenspatroon van de hele opstelling. Spoel zonodig met ureum/loog. Vervang desnoods een onderdeel.(in overleg!) <u>Chemisch.</u> 8) Controleer pH en sterkte van de buffer. 9) Controleer de activiteit van de enzymen (zie bijlage). 10) Controleer substraten (zie bijlage) 11) Controleer sterkte van de pilot(zie bijl.)
E. Pieken zijn te dun	<u>Mech.</u> 1) Monsterlijn trekt niet goed of zuigt lucht. Vervang en/of maak schoon(zie A.) Let vooral op de verbinding tussen naald en monsterlijn. 2) Naald, cactus of coil is verstopt. Spoel of vervang indien nodig.

KLACHT	ONDERZOEK EN REMEDIE
F. Pieken "sinterklazen"	<u>Mech.</u> 1) Vervang en/of maak alle slangen schoon (zie A) 2) Naald, cactus of coil is verstopt. Spoel of vervang indien nodig.
G. IJkreeks is niet lineair	<u>Mech.</u> 1) Controleer alle slangen. Vervang en/of maak schoon (zie A). <u>Chemisch</u> 2) NAD(P)H_2 -concentratie is te laag. Controleren. 3) Standaarden zijn te hoog. Controleren 4) Bij 2,3-P ₂ -glyceraat en glucose-1,6-P ₂ bepalingen kan er te veel mutase in het enzymmengsel zitten. In dat geval moet de daling resp. stijging van de basislijn bij het binnenkomen van het enzym te groot geweest zijn.
H. IJkreeks aan het eind meer dan 10% lager dan aan het begin van de bepaling	<u>Mech.</u> 1) Vervuiling van het systeem. Vervang en/of maak schoon waar nodig (zie A). <u>Chemisch</u> 2) Enzymdenaturatie tijdens de bepaling. Controleer de activiteit van het enzym.

Correctie

Bereken van beide ijkreeksen de richtingscoëfficiënt en de asafsnede. Als de asafsnede verwaarloosbaar klein is, en aan te nemen is dat de afname van de piekhoogtes lineair verlopen is in de tijd, dan kan als volgt gecorrigeerd worden.

Meet de afstand uit tussen de middens van de beide ijkreeksen op de recordersheet. Zet dit horizontaal af in een grafiek (op schaal). Zet aan de uiteinden hiervan verticaal de twee berekende richtingscoëfficiënten uit (op schaal). Trek de verbindingslijn tussen deze twee punten. Meet de afstand uit tussen de middens van alle series monsters

en het midden van de eerste ijkreeks. Lees in de grafiek af welke richtingscoëfficiënt bij iedere serie monsters behoort. Met het volgende Olivetti-programmatje kan men voor witte cellen de concentratie per 10^{10} cellen berekenen.

AV

C*

D*

S richtingscoëfficiënt van een bepaalde monsterserie

C ↑

S celaantal van die serie

D ↑

AW

S piekhoogte

↓

CX

D:

A◇

W

Voor rode cellen zelf een programmatje bedenken.

HET TESTEN VAN ENZYMEN, SUBSTRATEN EN STANDAARDEN

=====

trouble shooting bijlage 1.

Enzymen, substraten en standaarden kunnen spectrofotometrisch getest worden op de Vitatron. Gewerkt wordt bij 340 nm in 1 cm glazen cuvetten. Als de enzymen geen activiteit vertonen, dan worden één voor één de onverdunde enzymen toegevoegd, (0,01 ml), te beginnen met de meest kwetsbare. Werkt dit niet dan worden de substraatcomponenten één voor één toegevoegd. Wanneer nog steeds geen activiteit gemeten kan worden, dan moet in een nieuwe bepaling als monster uitgegaan worden van stockoplossingen, en alle reagentia in verse bidest met 0,1 mM EDTA opgelost worden. Pipetteer en bepaal volgens het onderstaande schema.

	<u>meetcuvet</u>	<u>blanco</u>
<u>ATP + ADP</u>		
buffer (50 μ M NADH ₂)	2,00 ml	-
NADH ₂ 5 mM	0,03 "	-
ATP 5 mM	0,20 "	-
substraatmengsel	0,15 "	-
water	-	2,50 ml
	schrijf basislijn	
enzymmengsel (start)	0,30 ml	-
<u>2,3-P₂-glyceraat</u>		
buffer (200 μ M NADH ₂)	2,00 ml	-
2,3-P ₂ -glyceraat 2 mM	0,10 "	-
substraatmengsel	0,15 "	-
water	-	2,50 ml
	schrijf basislijn	
enzymmengsel (start)	0,30 ml	-
<u>glucose-1,6-P₂</u>		
buffer	2,00 ml	2,00 ml
glucose-1,6-P ₂ 2 mM	0,15 "	-
substraatmengsel	0,10 "	-
water	-	0,60 ml
	schrijf basislijn	
enzymmengsel (start)	0,30 ml	-

trouble shooting bijlage 2.

	<u>meetcuvet</u>	<u>blanco</u>
<u>Lactaat</u>		
buffer	2,00 ml	2,00 ml
lactaat 2 mM	0,10 "	-
substraat	0,15 "	-
water	-	0,60 ml
	schrijf basislijn	
enzyummengsel (start)	0,30 ml	-
<u>Pyruvaat</u>		
buffer (2,5 μ M NADH ₂)	2,00 ml	2,00 ml
NADH ₂ 5 mM	0,06 "	-
pyruvaat 2 mM	0,10 "	-
water	-	0,50 ml
	schrijf basislijn	
enzyummengsel (start)	0,30 ml	-
<u>Glycerol + glycerol-1-P</u>		
buffer	1,60 ml	1,60 ml
glycerol 2 mM	0,10 "	0,10 "
substraatmengsel	0,40 "	-
water	-	0,80 "
	schrijf basislijn	
enzyummengsel (start)	0,30 ml	-
<u>Glucose + glucose-6-P</u>		
buffer	2,00 ml	2,00 ml
glucose 2 mM	0,10 "	-
substraatmengsel	0,20 "	-
water	-	0,60 ml
	schrijf basislijn	
enzyummengsel (start)	0,30 ml	-