

GLUCOSE-FOSFAAT-ISOMERASE IN ERYTHROCYTEN
 =====

Literatuur:

M.A. Baughan, W.N. Valentine, D.E. Paglia e.a., Blood 32 (1968) 236;
 Hereditary hemolytic anemia associated with glucose-phosphate isomerase
 (GPI) deficiency - a new enzyme defect of human erythrocytes.

J.E. Smith, M. Mc Cants, Biochim. Biophys. Acta 171 (1969) 372;
 Partial purification of erythrocyte glucosephosphate isomerase.

Principe van de bepaling

Fructose-6-fosfaat wordt door glucosefosfaat-isomerase omgezet tot
 glucose-6-fosfaat; dit wordt weer met behulp van toegevoegd glucose-
 6-fosfaat-dehydrogenase en NADP^+ omgezet tot 6-fosfogluconaat en NADPH_2 .
 De reactieomstandigheden worden zo gekozen, dat de hoeveelheid gevormd
 NADPH_2 per minuut een maat is voor de activiteit van het glucose-
 fosfaat-isomerase.

Reagentia

<u>Buffer:</u>	1,82 g tris (hydroxymethyl) aminomethaan	0,15	M
	0,36 g $\text{MgCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,018	M
	0,25 g EDTA	0,0066	M
	0,60 g KCl	0,08	M
	0,02 g saponine	20	mg%

oplossen in 100 ml gedemineraliseerd water; pH (20°C) bijstellen op
 8.1.

Fructose-6-fosfaat 0,02 M: 52 mg Ba-zout (BOEHRINGER 15148 SFAC)

oplossen in 10 ml water;

toevoegen: 65 mg Na_2SO_4 . 10 minuten schudden in schudapparaat.

Neerslag van BaSO_4 afcentrifugeren (10 min. 3000 r.p.m.); bovenstaande
 gebruiken.

NADP⁺ 1,3 mM: 10 mg β -nicotinamid-adenin-dinucleotidephosphat, di-Na-salz (BOEHRINGER 15600 CNAF) oplossen in 10 ml gedemineraliseerd water.

Tris-albumine 0,4%: 9,8 ml 0,025 M trisbuffer pH 7.4 + 0,2 ml albumine 20%

G6PD: Glucose-6-phosphat-dehydrogenase 10 mg/2,0 ml (BOEHRINGER 15303 EGAE) 10x verdunnen met tris-albumine-opl.

Haemolysaat: 0,1 ml 3x gewassen packed cells + 1 ml buffer

Uitvoering

Pipetteerschema:	<u>Bepaling</u>	<u>Blanco</u>
	1,0 ml buffer	1,0 ml buffer
	1,0 ml water	1,5 ml water
	0,2 ml F-6-P opl.	-
	0,2 ml NADP ⁺ opl.	-
	0,02 ml G6PD	-
	0,025 ml haemolysaat	0,025 ml haemolysaat

Vervolg de vorming van NADP⁺ spectrofotometrisch bij 340 nm (10 min. 25°C) en meet daarna de extinctie bij 415 nm in de bepaling-cuvet tegen een waterblanco.

Berekening

Als voor G6PD; nu wordt evenwel de haemoglobine-concentratie in de reactiecuvet berekend aan de hand van de extinctie bij 415 nm.

Ext 1 cm van 1 g Hb/100 ml is 7340; voor de enzymactiviteit 415 nm

geldt dus:

$$\text{activiteit} = \Delta \text{Ext}_{340} / \text{min} \times 7340 / \text{Ext}_{415} \times 0,4 \text{ Marks-eenheden.}$$

Normale waarde

(Baughan et al.) $13,6 \pm 1,9 \mu\text{mol NADPH}_2 / \text{min} / 10^{10}$ erythrocyten.

KALIUM METING MET BEHULP VAN EEN SPECIFIEKE ELEKTRODE
=====Literatuur:

L.A.R. Pioda, V. Stankova, W. Simon; Highly selective potassium ion responsive liquid-membrane electrode, Anal. Letters 2 (12) (1969) 665

Inleiding

De pH-meting met behulp van een glaselektrode berust op het volgende:

Het glasmembraan is opgebouwd uit silicaatzouten van vnl Na en Pb. De siliciumzuurresten, $(\text{SiO}_3)^{2-}$, aan de grensoppervlakken van het membraan kunnen in meerdere of mindere mate geneutraliseerd worden door de (H^+) ionen van de oplossingen, die grenzen aan de membraanwanden. Als aan weerszijden van het membraan een niet gelijke (H^+) heerst, ontstaat als gevolg van een niet gelijke neutralisatie, een potentiaalverschil over het membraan. Via de geleidende oplossingen kan dit potentiaalverschil met twee afleidelektroden gemeten worden.

Bij een glaselektrode voor pH heerst aan de binnenzijde van het membraan een constante (H^+) , terwijl aan de buitenzijde een andere pH kan heersen. Via een meetketen, waarin is opgenomen een referentie-elektrode, wordt het potentiaalverschil over het membraan gemeten. Dit kan niet met een normale voltmeter, aangezien de weerstand van het glas enorm hoog is (in de orde van 1 megaohm). Hiervoor zijn speciale meetinstrumenten vervaardigd.

Niet alleen H^+ -ionen zullen neutraliseren, ook andere ionen zoals Na^+ , K^+ e.d. Dit noemt men de alkalifout van de elektrode.

Door bepaalde glassoorten te kiezen kan men deze storende invloeden heel gering maken. Aan de andere kant kan men ook glaselektroden maken die juist heel gevoelig zijn voor Na^+ en waarbij K en H storen. Door keuze van bepaalde glassoorten heeft men elektroden kunnen maken die een specificiteit voor Na hebben over K en H van ca 10.000.

Echter het is niet gelukt om op die manier specifieke K-elektroden te bouwen, de specificiteit kwam niet hoger dan ca 100 over Na en H. Uit onderzoeken op het gebied van membraanpermeabiliteit zijn stoffen naar voren gekomen die zeer specifiek complexen met bepaalde ionen kunnen vormen. Eén van die stoffen, het antibioticum valinomycine, kan zeer specifiek kaliumionen complex binden. Dit berust waarschijnlijk op het feit dat valinomycine een ring vormt, waarin het K^+ -ion precies past. Men heeft nu elektroden ontworpen met een membraan waarin valinomycine geïmpregneerd zit, zodat in feite een membraan van valinomycine ontstaan is.

Dit membraan werkt op dezelfde wijze als het glasmembraan. Aan de ene zijde heerst een constante (K^+), terwijl aan de andere zijde een andere (K^+) kan heersen. Afhankelijk van de (K^+) zal complexvorming optreden. Het gevolg zal zijn een potentiaalverschil, wat ontstaat over het membraan.

Uit de formule van Nernst:

$$E = E_0 + 2,303 \frac{RT}{nF} \log(\text{conc. } K^+) \text{ eigenlijk (akt. } K^+)$$

volgt dat de spanning van de elektrode, beter gezegd het spanningsverschil over het elektrodenpaar lineair afhankelijk is van de logaritme uit de concentratie (eigenlijk de activiteit). Ook de temperatuur speelt hierbij een rol zoals de formule laat zien. Het heeft dus zin om bij een konstante temperatuur te werken.

De gevoeligheid van de gebruikte elektrode, een valinomycine-elektrode dus, voor K^+ loopt van 1 M tot 10^{-6} M (pK van 0 tot 6). De elektrode reageert niet op negatieve ionen.

Bij de meting gebruikt men een uitwendige referentie-elektrode. Door de grote gevoeligheid van de kaliumelektrode mag (wat normaal altijd gebeurt) er geen elektrolyt (KCl) uit de referentie-elektrode lekken. Men gebruikt daarom een zogenaamde "dubbele brug" referentie-elektrode, die geen K^+ maar Na^+ lekt. Zie verder ook de voorschriften, behorend bij deze elektrode (PHILIPS R44).

De valinomycine heeft in het membraan een beperkte levensduur, in het membraan gaat het over in een onwerkzame konformatie. De opgegeven levensduur is ongeveer 14 dagen. Dit betekent niet dat 14 dagen na de montage de elektrode ineens "op" is. Direct na de montage begint het verouderingsproces al, maar pas na ongeveer 14 dagen begint de fout in de metingen merkbaar te worden. Op dat moment dient het membraan vervangen te worden. Dit mag men niet zelf doen.

Montage

Montage en vervanging van het membraan geschiedt volgens de voorschriften van Philips.

Opslag

De elektrode, evenals de ref. elektrode wordt bewaard in een oplossing van 0,1 M KCl/0,01 M NaCl in water.

Andere benodigde apparatuur

Men dient voor de meting een gevoelige pH/mV meter te hebben, liefst met een geëxpandeerde schaal (aflezing op 1 mV nauwkeurig).
Op het laboratorium is hiervoor een Electrofact-meeteenheid aanwezig, voorschriften voor de bediening hiervan zijn bijgevoegd. (730/48)
Wil men een verloop van het K-gehalte vervolgen dan heeft het zin een potentiometer-recorder te gebruiken, b.v. een GOERZ (Servogor) recorder.

Meting

De benodigde hoeveelheid monster is 2 à 4 ml.

Instelling van de meter bij een kaliumbepaling (ruwweg):

bij 1	mM K	ca.	-80 mV
bij 100	mM	ca.	+50 mV

Na aanzetten van de meter en op standby zetten (zie hiervoor de bedieningsvoorschriften van de meter) wordt het elektrodenpaar uit de bewaarvloeistof gehaald en zeer goed afgespoeld met aqua dest om alle kalium te verwijderen, daarna worden de zijanten van de elektroden afgedroogd met een tissue. Niet de onderkant aanraken en ook niet afdrogen.

De elektroden worden daarna in de te meten oplossing gedompeld. De elektroden hoeven niet tot een bepaalde diepte in de oplossing te staan, contact met de oplossing is voldoende. Dit betekent dat een minimaal volume gebruikt kan worden; bij gebruik van een beker-glas van 25 ml heeft men aan $1\frac{1}{2}$ ml monster al voldoende. Nadat de elektroden in de vloeistof staan wordt de meter ingeschakeld en afgelezen als de aanwijzing constant geworden is (d.w.z. bij roeren van het meetvat verandert de meterstand niet meer). Het constant worden duurt gemiddeld $\frac{1}{2}$ -2 min. Bij zeer grote verschillen in op-eenvolgende monsters kan dit wel eens langer zijn.

Na de meting meter uitschakelen (standby), elektroden omhoog, afspoelen met aqua dest, afdrogen enz.

IJken

De elektrode wordt geijkt met oplossingen met een bekende kaliumconcentratie in het gebied waarin men wil meten en in dezelfde vloeistof.

Dus:	kalium in water	standaarden in water
	kalium in zout	standaarden in zout
	kalium in plasma	standaarden in plasma

Berekening

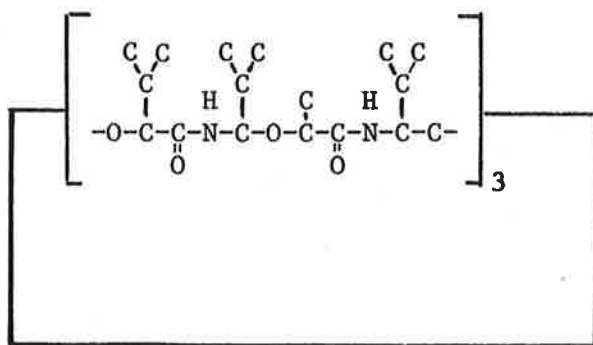
Doordat de meteruitslag (mV) lineair afhankelijk is van de logaritme uit de concentratie moet men, wil men een rechte ijklijn krijgen, deze uitzetten op semilog papier.

Bij niet-kolloidale oplossingen kan men over het algemeen een rechte verwachten en dan kan gebruik worden gemaakt van de regressievergelijking voor de rechte lijn (Olivetti). Men moet dan wel eerst de logaritme van de concentratie uitrekenen, b.v.:

$$\begin{aligned} (K^+) &= 1 \cdot 10^{-3}, \log (K^+) = -3, \quad pK = 3 \\ &2 \cdot 10^{-3}, \quad \quad \quad = -(3-0,3010) = -2,6990, \quad pK = 2,6990 \end{aligned}$$

Met de olivetti rekt men dan uit de ijklijn tussen mV en de
(van te voren berekende) logconc. of mV tegen pK.

Bij kolloidale oplossingen zoals plasma zal bij lage waarden
van (K^+) de ijklijn afbuigen en dan moet een ijkgrafiek gebruikt
worden.



VALINOMYCINE

ELECTROFACT pH/mV meter type 36200
 =====

1. Aanzetten: tuimelschakelaar achterzijde op ON
2. Kanaalkiezer, de meter beschikt over 3 ingangen te weten:
 - 2 ingangen voor pH/mV metingen (glas-e.a. elektroden)
 - 1 ingang voor μ A metingen (titraties, O_2 -elektrode)

Er zijn 5 standen instelbaar:

- a. Meting van kanaal 1 (pH/mV)
- b. Standby (wordt gebruikt voor het tijdelijk buiten gebruik stellen van de meter)
- c. Meting van kanaal 2 (pH/mV)
- d. Standby
- e. Meting van kanaal 3 (μ A)

De kanalen kunnen voortdurend bezet zijn door elektroden, het metergedeelte is echter slechts voor één elektrodepaar tegelijk in te schakelen.

3. Range mogelijkheden:

- a. volle schaal = 14 pH
- b. " " 1,4 pH
- c. " " 0 tot -1400 mV
- d. " " 0 tot -140 mV
- e. " " 0 tot +1400 mV
- f. " " 0 tot +140 mV

De range mag alleen omgeschakeld worden bij STANDBY.

4. Nulknop

14 standen mogelijk van 0 t/m 13 elke trap schakelt 1 pH-eenheid of 100 mV (+ of -) voor. Dit geschiedt cumulatief, bij stand 8 moet men dus 8 pH-eenheden of 800 mV optellen bij de meteruitslag voor de juiste aflezing.

Door schaalexpanctie kan men dus elk bereik instellen.

Voorbeeld voor een pH meting

Men begint met de meting in de ongevoelige stand te doen, dus volle schaaluitslag is 14 pH.

Stel de uitslag ligt tussen 7 en 8. Men schakelt nu 7 pH-eenheden voor en het schaalbereik is dus nu: 7,000 tot 8,400, zodat men nauwkeurig kan aflezen. Voor de mV meting gaat dit analoog eerst met de grove + of - stand en daarna de gewenste schaal kiezen.

5. Gevoeligheid Instelbaar van 53 tot 59 mV per pH-eenheid.
6. Assymetrie potentiaal Door een bepaalde tegenspanning in te schakelen kan bereikt worden dat 0 mV samenvalt met pH 7. (Korrektie bij overgang op een andere pH-elektrode)
7. Temperatuur kompensatie Instelbaar van -5°C tot $+130^{\circ}\text{C}$. De laatste drie knoppen werken per pH/mV kanaal.
8. Titration voltage In de titreerstand kan een spanning instelbaar van 0-1,0 V (kontinu) op de elektroden gezet worden.
9. Meter range In de titreerstand (meting van stroom) kunnen de volgende schaalbereiken gekozen worden:

volle schaal	=	14	nA
" "		140	nA
" "		1,4	μA
" "		14	μA
10. Uitgangen De meter heeft uitgangen voor potentiometrische recorders (0-10 mV) en amperometrische recorders (0-20 mA).

Men kan ook elektroden gebruiken met een ingebouwde weerstandsstandsthermometer, zodat de temperatuurskorrektie automatisch uitgevoerd wordt. Ook hiervoor zijn ingangen op de meter aanwezig. Op de achterzijde van het instrument bevindt zich nog een zekering. Zie bijvoegsel voor technische gegevens (730/48 blz.3)

Voedingsspanning:	110, 127 of 220 V, $\pm 10\%$, 48-100 Hz, omschakelbaar d.m.v. soldeerverbindingen in de voedingseenheid. + en -
Meetbereiken:	0....14 pH 0....1400 mV 0....140 mV 0.... 1,4 pH 100....1500 mV 100....240 mV 1.... 2,4 pH 200....1600 mV 200....340 mV 2.... 3,4 pH etc. 300....1700 mV etc. 300....440 mV etc.
Nauwkeurigheid:	Stroommeting bij amperometrische titratie: 0....14 nA; 0....140 nA; 0....1,4 μ A; 0....14 μ A a. op het aanwijsinstrument op een meetbereik van 1,4 pH, bij een geveerweerstand ≤ 1000 Mohm 1. in de omgeving van de bufferwaarde $< \pm 0,003$ pH 2. op het zelfde meetbereik $< \pm 0,01$ pH 3. op de overige meetbereiken $< \pm 0,05$ pH b. op het aanwijsinstrument op een meetbereik van 140 mV: $< \pm 1$ mV $\pm 0,25\%$ van de eindwaarde c. van de uitgangsstroom of spanning $< \pm 0,5\%$ van de eindwaarde Ingangsweerstand: $> 10^{12}$ ohm Ingangsstroom: $< \pm 5 \cdot 10^{-13}$ A
Invloed van de omgevingstemperatuur:	
Nulpunt:	$< \pm 0,05$ mV $\pm 0,02\%$ van de eindwaarde per $^{\circ}\text{C}$
Gevoeligheid:	$< \pm 0,02\%$ per $^{\circ}\text{C}$
Asymmetrie potentiaal:	$< \pm 0,1\%$ van de as. pot. per $^{\circ}\text{C}$
Afleenauwkeurigheid:	$\pm 0,001$ pH of 0,1 mV
Insteltijd:	minder dan 0,3 sec. binnen 0,5% bij een geveerweerstand van 100 Mohm
Uitgangsstroom:	0....20 mA, belastbaar tot max. 300 ohm
Uitgangsspanning:	0....10 mV, inwendige weerstand 0,5 ohm
Afmetingen:	551 x 226 x 150 mm
Gewicht:	ca. 10 kg

Bedieningsorganen op frontplaat:

Keuzeschakelaar met standen:	ingang 1, stand by, ingang 2, stand by, titratie
Meetbereikomschakelaar met standen:	14 pH, 1,4 pH, + 1400 mV, + 140 mV, - 1400 mV, - 140 mV
Schakelaar voor nulpuntsonderdrukking:	14 standen, genummerd 0 t/m 13, 1 pH of 100 mV per stap
Temperatuur compensatie:	potmeter, voorzien van schaalverdeling, bereik -5 tot + 130 $^{\circ}\text{C}$
Gevoeligheid:	potmeter, voorzien van schaalverdeling, bereik 53 tot 59 mV/pH
Asymmetrie potentiaal:	5-slagen potentiometer, zonder schaalverdeling, bereik ± 2 pH De laatste drie instellingen zijn dubbel (onafhankelijk van elkaar instelbaar) uitgevoerd, ieder behorende bij één van de twee ingangen.
Titratiespanning: Meetbereikomschakelaar voor titratiestroom met standen:	potmeter voorzien van schaalverdeling, bereik 0....1 V 0....14 nA, 0....140 nA, 0....1,4 μ A, 0....14 μ A klasse 0,5 met spiegelschaal en meswijzer, schaalengte 140 mm
Aanwijsinstrument:	140-delige schaal, becijfering 0 t/m 14
Indicatielampen voor:	ingang 1, ingang 2 en titratie

Bedieningsorganen aan de zijkant:

Aansluiting (jack) voor uitgangsstroom.
Aansluiting voor de uitgangsspanning.
2 x Aansluiting voor de glaselectrode: voor Electrofact C-steker. DIN pH-steker op aanvraag.
2 x Aansluiting voor de afscherming van de glaselectrode.
2 x Aansluiting voor de referentie-electrode.
2 x Jack-aansluiting voor de weerstandsthermometer, door het indrukken van de steker wordt de hand-temperatuurcompensatie buiten werking gesteld.
Aansluitingen voor de titratie-electroden.

Bedieningsorganen aan de achterkant:

Aan/uit schakelaar voor netspanning.
Zekeringhouder met smeltveiligheid.
Extra aansluiting voor aarding.
Aansluiting voor netsnoer.

N.B. Meting zowel in gearde als in niet gearde vloeistof mogelijk.

ACETYLCHOLINE ESTERASE IN ERYTHROCYTEN
=====Literatuur:

G.L. Ellman et al., Biochem. Pharmacol., 7 (1961) 88

J. Metz, B.A. Bradlow, S.M. Lewis, J.V. Dacie, Brit. J. Haematol., 6 (1960) 372; The acetylcholinesterase activity of the erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in relation to the severity of the disease.

Principe

Het enzym acetylcholinesterase katalyseert o.a. de hydrolyse van acetylthiocholine, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{C}_2\text{H}_4\text{S-CO-CH}_3$. Het gevormde thiocholine, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{C}_2\text{H}_4\text{SH}$, waarvan de vormingssnelheid onder de gekozen reactieomstandigheden recht evenredig is met de enzymactiviteit, reageert met dithiobisnitrobenzoesuur (DTNB) onder vorming van thionitrobenzoesuur (TNB) (zie bepaling van glutathion, 0540/14). De vorming van TNB wordt vervolgd bij een golflengte van 412 nm.

UitvoeringReagentia:

0,1 M Na-fosfaatbuffer pH 8.0; bewaren bij 0-4°C.

0,01 M DTNB-oplossing: 40 mg DTNB en 15 mg Na-bicarbonaat oplossen in 10 ml fosfaatbuffer pH 8.0; bewaren bij 0-4°C.

Acetylthiocholine-oplossing: 22 mg acetylthiocholine-jodide (Koch/Light) oplossen in 1 ml Na-fosfaatbuffer pH 7.4 0,1 M; dit reagens is slechts enige dagen houdbaar bij -20°C.

Saponine-oplossing 2%; bij -20°C bewaren.

Bereiding haemolysaat: Was de erythrocyten (van pat. en controle) driemaal met physiol. zoutoplossing; centrifugeer de laatste maal 10 min bij maximaal toerental; verwijder steeds de buffy coat.

Pipetteer: 7,5 ml fosfaatbuffer pH 8.0
 0,03 ml saponine-oplossing
 0,003 ml packed cells

meng, wacht tot de cellen volledig gehaemolyseerd zijn (whirlmix)
 en pipetteer dan in 3 plastic buizen volgens onderstaand schema:

	<u>Bepaling</u>	<u>Reagensblanco</u>	<u>Bepalingsblanco</u>
haemolysaat (ml)	3,0	0	3,0
fosfaatb. pH 8 (ml)	0	3,0	0,10
DTNB-opl. (ml)	0,15	0,15	0,15

Bepaling

Meng, meet dan in glascuvetten met 5 mm lichtweg de $\text{ext}_{415 \text{ nm}}$ van de "bepaling" met als blanco de "reagensblanco", breng de oplossingen terug in de buizen, en voeg dan aan de "bepaling"-buis 0,10 ml acetylthiocholine-oplossing toe.

Vervolg nu bij 25°C de toename van de $\text{Ext}_{412 \text{ nm}}$ in glascuvetten met 5 mm lichtweg; de blanco is nu de "bepalingsblanco".

Berekening

De moleculaire extinctiecoefficient van TNB bij 412 nm = 13600;

De extinctie van een 1% Hb-oplossing bij 415 nm = 73,4;

Enzymactiviteit (micromol TNB/min/gHb) =

$$= \frac{\Delta \text{Ext}_{412} / \text{min} / 13,6}{\text{Ext}_{415} \cdot 315 / 325 / 7340} = 5,57 \times \frac{\Delta \text{Ext}_{412} / \text{min}}{\text{Ext}_{415}}$$

Normale waarde

BEPALING VAN HAPTOGLOBINE IN PLASMA OF SERUM M.B.V. DE AUTOANALYZER

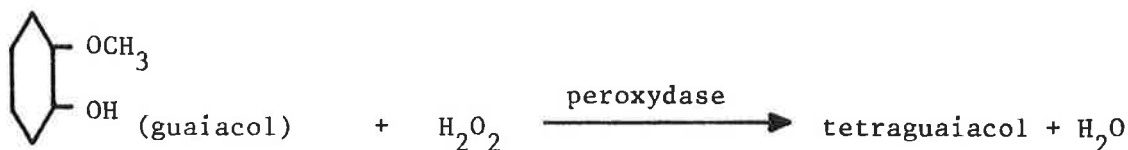
=====

Literatuur:

J.A. Owen, F.C. Better en J. Hoban, J. Clin. Path., 13 (1960) 163;
 A. simple method for the determination of serum haptoglobin.
 S. Burrows en E.B. Hosten, Automation in Analytical Chemistry,
 L.T. Skeggs, e.d., Mediad New York (1966) 401; The automated deter-
 mination of serum haptoglobin in a screening program.

Principe

Het serumeiwit haptoglobine geeft een complex met haemoglobine (ook met methaemoglobine). Het complex heeft een sterke peroxydase-activiteit. In de hier beschreven bepalingmethode wordt gebruik gemaakt van deze eigenschap in de reactie:



Onder de gekozen reactieomstandigheden is de reactiesnelheid evenredig met de peroxydase-concentratie en de H_2O_2 -concentratie. Doordat H_2O_2 snel verbruikt wordt is de reactiesnelheid slechts ongeveer 1½ minuut constant.

Vrij haemoglobine en methaemoglobine hebben eveneens een geringe peroxydase-activiteit. De activiteit neemt toe boven pH 4. Albumine draagt bij tot de peroxydase-activiteit, voornamelijk beneden pH 4. In het bij onze methode gebruikte reactiemengsel zijn beide aanwezig; om de gezamenlijke bijdrage van beide zo gering mogelijk te maken, kiezen wij pH 4 bij onze reactie. De reactietemperatuur is 25°C. Het gevormde tetraguaiacol heeft een brede absorptieband tussen 350 en 550 nm. Wij vervolgen de reactie bij 420 nm.

Reagentia

Methaemoglobine-oplossing 60 mg%: Van een haemolysaat, verkregen door haemolyse van 1 vol packed cells met 1 vol water, wordt een 10-voudige verdunning gemaakt; de verkregen verdunning bevat iets meer dan 1,2 g Hb/100 ml. Een 50-voudige verdunning van een oplossing van 1,20 g/100 ml heeft een $\text{Ext}_{540}^{1\text{cm}} = 0,206$. Breng de oplossing op 1,2 g Hb/100 ml na het meten van de Ext_{540} van een 50-voudige verdunning in ammoniakaal water.

25 ml van de 1,2 % Hb-oplossing worden dan in een maatkolf van 500 ml gebracht en een oplossing van 12 mg $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in ca 10 ml water wordt toegevoegd. Na 10 minuten staan bij kamertemperatuur kan de oplossing worden aangevuld met 0,9 % NaCl-oplossing, gefiltreerd en uitgevuld in porties van 25 ml. Bewaartemperatuur: -15°C .

Oplossing van guaiacol (0,07 M) in acetaatbuffer pH 4.0: Los 136 g Na-acetaat. $3\text{H}_2\text{O}$ op in ongeveer 500 ml water, breng de pH met geconcentreerde azijnzuur op 4.0 en vul aan tot 1 liter.

Los 22 g guaiacol op in 1 liter buffer; vul daarna aan met 1,5 liter water. Oplossing in het donker bewaren.

Waterstofperoxyde-oplossing 0,15 N: Vul 25 ml van een 30% waterstofperoxyde-oplossing aan tot 4,5 l; meng zorgvuldig.

Bepaal de titer door titratie met KJ en thiosulfaat; deze is ongeveer 0,15 N. Verdun deze (in het donker te bewaren) voorraadoplossing vlak voor gebruik tot 0,08 N.

Standaardsera: Uit de bij het diagnostisch onderzoek verzamelde Hb-vrije sera worden die monsters gekozen, welke hetzij geen haptoglobine, hetzij meer dan 240 mg Hp/100 ml bevatten. De sera met de lage Hp-gehalten worden gepoold, evenals die met veel Hp.

In de pool met laag Hp wordt d.m.v. elektroforese (zie electrof.Hp-bep.) (0540/5) en m.b.v. de Ouchterlony-techniek gecontroleerd, dat er niet meer dan een spoor Hp aanwezig is.

In de andere pool wordt het Hp-gehalte m.b.v. de electroforetische methode op 10 mg% nauwkeurig bepaald. Beide pools worden bij -15°C bewaard.

IJKmonsters: Uit de bovengenoemde standaardsera worden ijkmonsters bereid van 0,5 ml met resp. 0, 30, 60, 120, 180 en 240 mg% Hp. Deze ijkmonsters worden gebruikt voor de bereiding van voor de bepaling geschikte verdunningen (zie: verdunnen van de sera).

Voorbehandeling van bloedmonsters: Alle bloedmonsters, ook de sera, worden zorgvuldig door centrifugeren van cellen ontdaan. De centrifugering dient zo spoedig mogelijk na ontvangst te geschieden om zoveel mogelijk de tijdens het verouderen van bloedmonsters optredende haemolyse te voorkomen. De verkregen plasma- en serummonsters kunnen dan bij -15°C bewaard worden. Na ontdooien zorgvuldig mengen!

Verdunnen van de sera: Van ieder serum- of plasma-monster wordt vlak voor de bepaling een 30-voudige verdunning in 0,9% NaCl-oplossing gemaakt m.b.v. een autodiluter.

Bij 3 ml van de verdunning wordt 0,5 ml van de methaemoglobine-oplossing gepipetteerd. Na zorgvuldig mengen (whirlmix) is het monster gereed voor de bepaling.

De ijkmonsters worden op dezelfde manier verdund.

Reinigingsvloeistof: Verdunde NaOH oplossing (ca 2 N).

Spoelvloeistof: Gedemineraliseerd water, waaraan toegevoegd 2 druppels Levor IV per liter.

De opstelling

De opstelling bestaat uit een Sampler II, een proportionering pump, een photometer (filters: 420 nm), een Single-pen recorder en een thermostaatbad (25°C) met circulatiepompje.

Voor bediening en onderhoud Autoanalyzer-apparatuur zie: General Operating Instruction Manual.

Voor het stroomschema zie Fig. 1.

Uitvoering van de bepaling

Spoel vooraf het systeem, door via alle pomp-slangen spoel-vloeistof aan te zuigen. Controleer de temperatuur van het thermostaatbad en de goede werking van het circulatiepompje. Controleer, of er voldoende papier op de recorder is en of inkt moet worden bijgevuld. Zet de lamp van de fotometer aan, zet de recorder aan. Breng nu de daarvoor bestemde aanzuig-slangen in de voorraad-flessen met guaiacol en waterstofperoxyde. Verricht ten minste 10 minuten na het aanzetten van fotometer en recorder de nul-punts-instelling van de recorder. Stel daarna met de 100% T-knop van de fotometer de "basislijn" in op ca 95% transmissie. Dit moet kunnen met diafragma 4, zonder dat een extreme stand boven 9 eenheden van de potentiometerknop vereist

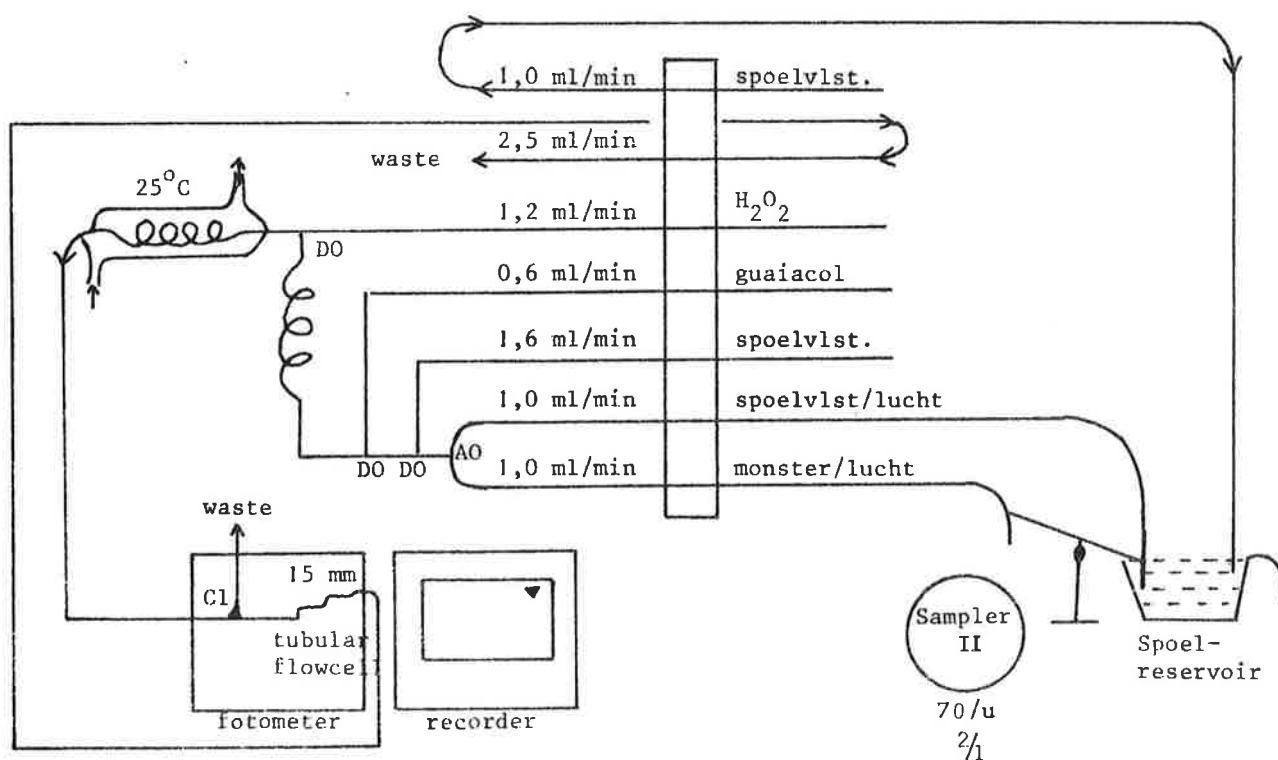


Fig.1 Schematische voorstelling van de gemechaniseerde haptoglobine-bepaling.

is. Wanneer de instelling op deze manier niet gelukt, duidt dit op vervuiling van de doorstroomcel in de fotometer. Het meest waarschijnlijk is dan, dat de reinigingsprocedure onvoldoende zorgvuldig is uitgevoerd (zie: reiniging van het systeem).

Zodra een stabiele basislijn is verkregen kan de monsterringing beginnen. Alle monsters worden van elkaar gescheiden door tenminste 1 monsterbakje met spoelvoeistof. Omdat gebleken is, dat de reactie iets verloopt in het begin, worden eerst 5 willekeurige monsters op de sampler gezet, dan pas komt de serie ijkmonsters, dan 10 - 20 monsters, bereid uit patientensera, dan weer de ijkserie etc.

Doordat het systeem tijdens de bepaling langzaam vervuult door aanslag van de bruine kleurstof, is er een betrekkelijk snel verloop in de basislijn. Om de basislijn m.b.v. de potentiometerknop van de fotometer op gezette tijden bij te kunnen stellen, zetten we om de ca 10 monsters 3 - 4 i.p.v. 1 bakje met spoelvoeistof op de sampler. Dit maakt, dat na het bereiken van de extinctiepiek t.g.v. het voorgaande monster de basislijn ruimschoots wordt bereikt en dan opnieuw kan worden ingesteld.

Een gebruikelijke volgorde van monsterbakjes op de sampler is b.v.:
 Sp-Sp-X1-Sp-X2-Sp-X3-Sp-X4-Sp-X5-Sp-Sp-Sp-Y0-Sp-Y30-Sp-Y60-Sp-Y120-Sp-Y180-Sp-Y240-Sp-Sp-Sp-P1-Sp-P2-Sp-P3-Sp- -----P15-Sp-Sp-Sp-P16-Sp- -----P30-Sp-Sp-Sp-Y0-Sp-Y30-Sp-Y60-Sp-Y120-Sp-Y180-Sp-Y240-Sp-Sp-Sp-

Sp = spoelvoeistof - X1-5 = willekeurige monsters,
 Y0-240 = ijkmonsters - P1-30 = patientenmonsters.

Blanco-run

Haemoglobine heeft een sterke lichtabsorptie-band bij 420 nm. Een haemolytisch serum zal daarom, naast de extinctietoename tengevolge van de peroxydase-activiteit, al een verhoogde lichtabsorptie bij 520 nm geven. Verder kan extreme troebelheid van het serum of een extreem hoog bilirubine gehalte eenzelfde effect hebben; daarnaast komt het soms voor, dat door een afwijkende eiwitsamenstelling van een serum troebeling volgt na het mengen met de zure guaiacol-aceetaat-oplossing, alweer resulterend in verhoogde extinctie bij 420 nm. Om te onderzoeken of een van deze storingen in de reeks onderzochte serum en plasmamonsters is voorgekomen, wordt een z.g. "blanco-run" uitgevoerd, waarbij de H_2O_2 oplossing is vervangen door spoelvoeistof. Voordat de run kan beginnen, moet eerst alle H_2O_2 goed uit het systeem gewassen zijn (systeem spoelen met spoelvoeistof gedurende

een uur). De monsters zijn precies dezelfde als in de run met peroxyde; ze hoeven niet van elkaar gescheiden te zijn door bakjes met spoelvloeistof.

Van alle monsters, welke een verhoogde "blanco-extinctie" hebben zal d.m.v. de electroforetische bepaling het haptoglobine kwalitatief of kwantitatief moeten worden bepaald.

Reiniging van het systeem

De bruine kleurstof alsmede resten eiwit zijn gemakkelijk te verwijderen door spoelen met een alkalische oplossing. Daartoe worden de aanzuigslangen voor H_2O_2 , guaiacol en spoelvloeistof (niet de lijn naar het spoelreservoir) overgebracht in loog (2 tot 4 N NaOH). Na een kwartier pompen worden de lijnen overgezet in verdund zoutzuur (ca 1 N) en na weer een kwartier wordt nagespoeld met spoelvloeistof.

Berekening van het haptoglobine-gehalte

Van alle extinctie-pieken wordt de hoogte als volgt bepaald: Trek met een lineaal een lijn tussen twee stukken basislijn, behorende bij één potentiometerstand van de fotometer. Lees voor iedere piek de extinctie van de piek af en de bijbehorende extinctie van de basislijn. Het verschil van beide is de gecorrigeerde piekhoogte. Gebruik het Olivetti-programma voor lineaire regressie voor het bepalen van de ijklijn en de berekening van de haptoglobine-waarden. Controleer, of de spreiding niet groter is dan 10 mg%. Rond af op 10 mg%. Noem alle waarden boven 240 mg%: groter dan 240 mg% (niet extrapoleren naar boven).

Storingen

1. De instelling van de basislijn op 95% transmissie lukt niet met diafragma 4:

Het systeem is niet goed gereinigd / De doorstroomcel bevat lucht of viezigheid; schoonmaken.

2. De basislijn loopt ongewoon snel op: Er komen voortdurend kleine luchtbelletjes in de doorstroomcel; aansluitingen van de doorstroomcel nazien.

3. De basislijn is onregelmatig, de toppen van de pieken zijn "rafelig", het belvenpatroon is onregelmatig: het systeem is vuil of de pompslangen zijn versleten.
4. De pieken van de ijkmonsters zijn ongewoon hoog: te hoge temperatuur of H_2O_2 concentratie
5. De pieken van de ijkmonsters zijn ongewoon laag: te lage temperatuur of H_2O_2 concentratie.
6. Alle pieken zijn even laag: Verstopping van de autodiluter / ontbreken van een reagens.

Normale waarden

De haptoglobinespiegel kan in een groep van normale gezonde personen variëren van 28-192 mg%.