

BEPALING VAN METHAEMOGLOBINE-REDUCTASE IN RODE CELLEN

=====

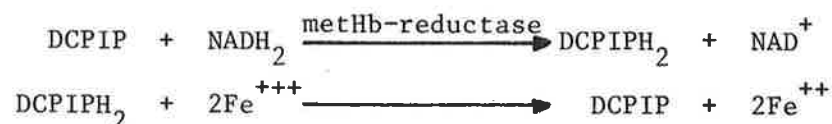
Literatuur:

E.R. Jaffé in: Biochemical methods in red cell genetics, J.J. Yunis e.d., Acad. Press, Londen-New York, (1969) p. 231; DPNH-methemoglobin reductase (Diaphorase).

I. Directe  $\text{NADH}_2$ -afhankelijke methHb-reductase-bepaling.

Principe

Het enzym reduceert in aanwezigheid van  $\text{NADH}_2$  de blauwe kleurstof 2,6-dichloor-phenol indophenol (DCPIP) tot de kleurloze vorm ( $\text{DCPIPH}_2$ ), welke op zijn beurt ferri-Hb weer kan reduceren tot ferro-Hb:



Onder omstandigheden van de bepaling is de snelheid van de tweede reactie te verwaarlozen.

Reagentia

Nitrietoplossing: (0,145 M): 1 g  $\text{NaNO}_2$  per 100 ml water; vers bereiden.

Trisbuffer: (0,5 M): 6,0 g tris(hydroxymethyl)aminomethaan oplossen in 80 ml water, met gec. zoutzuur op pH 7.55 brengen en aanvullen tot 100 ml. Bewaren bij  $0-4^\circ\text{C}$ .

EDTA-oplossing: (0,1 M): 3,7 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  oplossen in 100 ml water. Bewaren bij  $0-4^\circ\text{C}$ .

Tris-EDTA-buffer: 4,0 ml trisbuffer + 0,4 ml EDTA-opl. + 35,6 ml water. Bewaren bij  $0-4^\circ\text{C}$ .

2,6-dichloorphenolindophenol (DCPIP)-opl.: ( $3,55 \times 10^{-5} \text{M}$ ):

Los 6 mg DCPIP (Brocades) op in 12,5 ml water. Centrifugeer en controleer de concentratie van het bovenstaande als volgt: maak een mengsel van 0,1 ml DCPIP-opl. + 1,9 ml water + 1,0 ml tris-EDTA-buffer en bepaal hiervan de  $\text{Ext}_{600\text{nm}}^{1\text{cm}}$ . De mol.ext.coeff. van DCPIP is 19.100.

De gevonden extinctie moet zijn  $0,675 \pm 0,025$ . Verdun de DCPIP-opl. zonodig. Voor de bepaling wordt de onverdunde DCPIP-oplossing gebruikt. Bewaren bij  $-15^{\circ}\text{C}$ .

NADH<sub>2</sub>-oplossing: (1,7 mM): Verdun 1 ml 5mM voorraadoplossing met 2 ml tris-EDTA-buffer.

Behandeling van rode cellen met nitriet: Centrifugeer onstolbaar gemaakt bloed van patient en controle. Verwijder het plasma. Incubeer 1 deel packed cells met 1 vol deel nitriet-oplossing gedurende 15-30 min. bij kamertemperatuur. Bijna alle ferroHb is dan omgezet tot ferriHb. Hierna 5x wassen met physiologische zout-oplossing om de overmaat nitriet te verwijderen.

Lysaat: Voeg 0,5 ml met nitriet behandelde packed cells bij 10 ml gedemineraliseerd water, meng en laat 5 min. staan. Centrifugeer dan 10 min. bij 3000 r.p.m.; gebruik het bovenstaande als lysaat.

#### Uitvoering van de bepaling

Pipetteer in 4 glazen cuvetten met 1 cm lichtweg aan de hand van het volgende schema:

	<u>Blanco</u>	<u>NADH<sub>2</sub>-contr.</u>	<u>Hb-contr.</u>	<u>Bepaling</u>
Tris-EDTA (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O (ml)	2,0	1,4	1,7	1,2
Lysaat (ml)	-	-	0,2	0,2
DCPIP (ml)	-	0,1	0,1	0,1
NADH <sub>2</sub> (ml)	-	0,5	-	0,5

Vervolg de verandering van de  $\text{Ext}_{600\text{nm}}$  van alle cuvetten gedurende 30 min. bij  $25^{\circ}\text{C}$ .

Bepaal de  $\text{Ext}_{415}^{1\text{cm}}$  van een 100-voudige verdunning van het lysaat.

Berekening

$$\Delta\text{Ext}_{600}(\text{gecorrigeerd}) = \Delta\text{Ext}(\text{bepaling}) - \Delta\text{Ext}(\text{Hb-contr.}) -$$

$$\Delta\text{Ext}(\text{NADH}_2\text{-contr.})$$

$$\text{Ext}_{415}^{1\text{cm}} \text{ van een 1\% metHb-opl.} = 73,4$$

$$\text{Enzymactiviteit (eenheden volgens Jaffé)} =$$

$$\frac{\Delta\text{Ext}(\text{gecorr.}) \times 1000 \times 73,4}{\text{Ext}_{415}(\text{lysaat}) \times 100/15 \times t \text{ (in min.)}}$$

BEPALING VAN HET HAPTOGLOBINETYPE DOOR MIDDEL VAN ELECTROFORESE  
IN POLYACRYLAMIDE

=====

Literatuur:

O. Smithies, Biochem. J. 71 (1959) 585; An improved procedure for starch gel electrophoresis; further variations in the serum proteins of normal individuals.

L. Ornstein en B.J. Davis; Disc Electrophoresis. Preprinted by Distillation Products Ind.

A.K. Ray, Diss Leiden 1970; Genetics of haptoglobin, a study at family and population level with reference to ahaptoglobulinaemia.

Principe van de scheiding

Het menselijke haptoglobine-type 1-1 heeft een moleculairgewicht van ca 100.000.

De typen 2-1 en 2-2 bestaan uit een serie polymeren van hogere moleculairgewichten. Al deze eiwitten vormen complexen met haemoglobine, verkrijgen daardoor peroxydase-activiteit, en kunnen daardoor zichtbaar gemaakt worden d.m.v. peroxydase-kleuring.

Tijdens de electroforese van deze complexen in een polyacrylamide-gel is de vertraging in de gel groter naar mate het moleculairgewicht groter is. Bij pH 8 zijn de complexen negatief geladen en lopen dus naar de positieve pool.

Reagentia

Trisbuffer voor de electrode-compartimenten: (pH= 8.8) Bij 0-4<sup>o</sup>C te bewaren.

96,8 g Tris (hydroxymethyl)aminomethaan  
5,5 g Dinatrium-EDTA  
22,0 g Boorzuur  
2,20 l gedemineraliseerd water

Haemoglobine-oplossing 1,5%: Zie: haptoglobine-bepaling

Gel-vloeistof: (vers bereiden in aangegeven volgorde)

62,5 ml Tris-buffer (zie boven)  
 62,5 ml gedemineraliseerd water  
 6,7 g Acrylamide (FLUKA)  
 0,1 ml N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine (FLUKA)  
 0,33 g Bisacrylamide  
 0,15 g Ammoniumpersulfaat

Peroxydase-reagens: (vlak voor de kleuring vers bereiden)

0,40 g O-Dianisidine (BDH)  
 10 ml IJsazijn  
 400 ml gedemineraliseerd water  
 6 druppels Waterstofperoxyde 30% (BROCADES)

Het gieten van de gel

Gietmal klaarleggen (22,0 x 15,5 x 0,5 cm) in atmosfeer van 100% stikstof. Gelvloeistof bereiden in de genoemde volgorde, in de mal gieten, kam aanbrengen en onder stikstof laten polymeriseren.

Bereiding serum of plasmamonsters:

2' druppels serum/plasma + 0,04 ml 1,5% Hb-opl.

Uitvoering van de electrophorese

Verwijder voorzichtig de kam en de zijwanden van de mal, verwijder eventueel overgebleven vloeistof uit de gaatjes en van het oppervlak van de gel met behulp van filtreerpapier. De monsters worden met behulp van een Pasteur-pipetje in de gaten van de gel gebracht (voor ieder monster een afzonderlijk pipetje), waarbij men zorg draagt, dat monsters niet kunnen "overstromen" van het ene gaatje in het andere. Leg de glasplaat + gel in een electroforese-bak, zoals beschreven bij de electroforetische bepaling van haptoglobine. Het contact met de buffercompartimenten van de bak wordt gemaakt m.b.v. filtreerpapier (dubbel), gedrenkt in de trisbuffer. Span nu een strook cello-

tape van wand tot wand van de electroforesebak en wel zodanig dat de strook precies boven de rij monstergaatjes hangt zonder de gel te raken. De gel wordt nu afgedekt met plastic-folie, om verdamping tijdens de electroforese tegen te gaan; het plastic ligt over de cellotape heen. Nu wordt de dekplaat van de electroforesetank aangebracht.

Zet nu de spanningsbron aan; de stroomsterkte moet ongeveer 30 mA bedragen (spanning ca 130 V). Tijd 16-20 uur (eind v.d. middag tot volgende ochtend).

HpHb-complex en overmaat Hb lopen naar de positieve pool. Het front van de migratie is duidelijk zichtbaar.

#### Kleuring

Leg glasplaat + gel in een ontwikkelschaal, incubeer  $\frac{1}{2}$ -1 uur met het peroxydase-reagens, spoel met leidingwater en zet de gel weg onder water. De kleuring gaat nog enige uren door. Bruine aanslag op het geloppervlak is gemakkelijk te verwijderen.

Bewaar de gel tot het fotograferen onder water. Een goede scheiding wordt daardoor gekenmerkt, dat de Hp 1-1 band duidelijk is gescheiden van de overmaat haemoglobine.

#### Fotografie

Polaroid-camera (Immunochemie); Stand camera 29, Diafragma 45, Belichtingstijd 1/125 (voor een "donkere" gel 1/60), Balg midden, Lens f=127mm.

## VOORSCHRIFT VOOR HET WERKEN MET DE OXYGRAAF

---

### I. Literatuur

1. J.E.G. de Boer, Afstudeeropdracht HBO-B, 1971
2. E.J. de Haan, Folia Med. Neerl., 13 (1970) 90.
3. R.S. Weening, D. Roos en J.A. Loos, in voorbereiding
4. D. Roos en J.A. Loos, Biochim. Biophys. Acta., 222 (1970) 565.

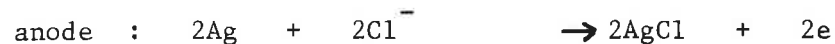
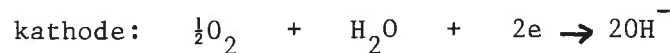
### II. Principe van de zuurstofelectrode

Een zuurstofelectrode is een apparaat dat in staat is een elektrisch stroompje af te geven dat recht evenredig is met de concentratie (eigenlijk de activiteit) van zuurstof in een oplossing. Hierdoor is het mogelijk de zuurstofconcentratie in een oplossing op eenvoudige wijze te meten.

Het stroompje wordt als volgt opgewekt:

De zuurstof in de oplossing diffundeert door een Teflonmembraan heen de electrode binnen (zie Fig.1, pag.7). Aan de kathode wordt de  $O_2$  gereduceerd tot  $2O^{2-}$  en reageert dan met  $H_2O$  tot hydroxylionen.

Aan de zilveranode vindt dan oxidatie van zilver plaats.



Het chloride wordt geleverd door de half-verzadigde KCl-oplossing waarmee de electrode gevuld is. De reactie is evenredig met de diffusiesnelheid van de zuurstof, en deze is evenredig met de zuurstofconcentratie van de oplossing. De kathode wordt op een polarisatiespanning van -0,8 Volt gehouden m.b.v. een batterijtje, waardoor de electronenafgifte aan de kathode resulteert in een stroompje. Het stroompje wordt versterkt en het resulterende signaal wordt aan een recorder afgegeven.

### III. Beschrijving van de oxygraaf

De gehele apparatuur voor het meten van zuurstofconcentraties bestaat uit de volgende onderdelen:

1. zuurstofelectrode YSI 4004 (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio, U.S.A.); zie figuur 1, pag.7.
2. glazen vaatje waarin de electrode past, met meetruimte, roermagneetje en stopje met capillair, het geheel omgeven door een watermantel, fabrikaat CLB; zie figuur 2. pag. 8.
3. magneetroerder

4. vóórschakeleenheid met kwikcelletje voor het handhaven van de polarisatie-spanning (Electrofact, Amersfoort, type no. 37000) met kwikcel Mallory, Duracel, 1,4 V)
5. pH meter/versterker met recorderuitgang (Electrofact, Amersfoort, type no. 36200)
6. recorder met versterkingseenheid (Goerz, Wenen, type no. RE 511)
7. afzuigpomp
8. waterbad met rondpompthermostaat

De roermagneet zorgt voor een homogene verdeling van de zuurstof in de oplossing. Aangezien de electrode zelf enige zuurstof verbruikt is het nodig te roeren om te voorkomen dat aan het membraan een lagere  $O_2$ -spanning heerst dan elders in de oplossing. De oplossing wordt gethermostateerd omdat de temperatuur grote invloed heeft op de oplosbaarheid van  $O_2$ . Het stopje heeft een capillair om eventuele gasbelletjes in het medium te laten ontsnappen. Als het capillair gevuld is met vloeistof voorkomt dit voldoende de diffusie van zuurstof uit de lucht naar de oplossing.

#### IV. Behandeling van de electrode

##### a. demonteren van de electrode

De electrode wordt op zijn plaats gehouden in het vaatje d.m.v. twee ringen met elastiekjes. De rubberring die het electrodemembraan vasthoudt, sluit ook het meetvatje van onderen af. Bij demontage moet het vaatje leeg zijn. De elastiekjes worden verwijderd, het kapje van de electrode afgenomen en de electrode voorzichtig uit het vaatje genomen. Bij hermontage de electrode voorzichtig op zijn plaats duwen en vastzetten. Vooraf niet wringen. Controleer of het vaatje goed afgesloten wordt door de ring van de electrode door na te gaan of er geen water vanuit het vaatje in de electroderuimte komt.

##### b. vulling van de electrode

Half-verzadigde KCl, liefst steriel. Vul de electrode geheel via de opening opzij ("electrolyte filler hole", fig.1). Gebruik een Pasteurpipet en beschadig het binnenbuisje om de kathode niet. Als het membraan aanwezig is, tik dan eventuele luchtbelletjes in het uiteinde van de electrode eruit. Controleer regelmatig of de electrode nog voldoende electrolyt bevat.



# INSTRUCTIONS FOR YSI 4004 CLARK OXYGEN PROBE

The YSI 4004 Clark Oxygen Probe is a complete polarographic system, comprising a platinum cathode, silver anode, and KCl solution held captive around the electrodes by a Teflon® membrane.

## SPECIFICATIONS:

Electrode Current: At 30°C and 760 mm.  
 Nitrogen (Zero Current): .05 microampere maximum  
 Air: About 2 microamperes  
 Oxygen: About 10 microamperes

## Membrane Temperature

Coefficient: About 4%/°C  
 Polarizing Voltage: 0.8 Volt  
 Response Time: 90% in 10 seconds  
 Steady state in 30 seconds

Oxygen Depletion Rate:  $8 \times 10^{-11}$  grammes oxygen/second/  
 1 microampere

## HOW IT WORKS:

When a polarizing voltage is applied across the probe, all oxygen in the probe is consumed (reduced) at the cathode and current flows in direct stoichiometric relation to the rate of oxygen consumption (reduction). Oxygen then diffuses through the membrane at a mass rate proportional to the oxygen pressure outside the probe, since oxygen pressure in the probe is near zero. When steady state conditions are reached in about 30 seconds, current flows through the probe at a rate in proportion to the external oxygen pressure.

## PROBE FEATURES:

### Isolation

Since the probe is a complete system in itself, it is relatively unaffected by, and does not offset, its external environment. For this reason, the electrode may also be used to measure oxygen in nonconducting liquids or gases. Further, the electrodes are bathed in a known medium and protected from contamination by the membrane. Thus, the probe will measure oxygen in solutions contaminated by ionic reducing agents and reducing (ion consuming) organic matter. The probe is subject

to interference only from low molecular weight reducing gases such as the halogens and hydrogen sulfide.

## Voltage Plateau

The current-oxygen pressure relationship is essentially independent of polarizing voltage within a certain voltage range. Specifically, the output signal shall change less than 3% when the polarizing voltage is lowered from .8 to .65 volts.

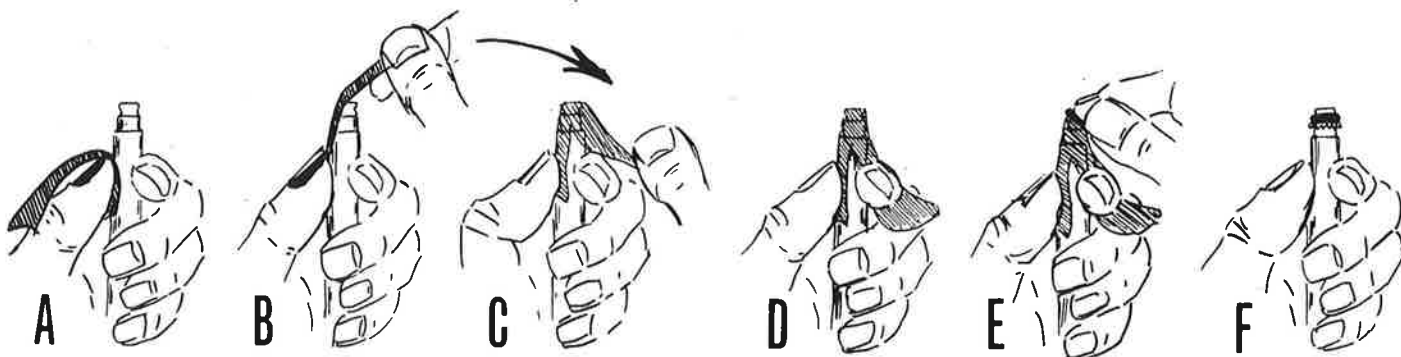
## PREPARATION FOR OPERATION:

1. Remove "O" ring and membrane, inspect probe for cleanliness, rinse with DISTILLED water and shake dry.
2. Dilute saturated KCl solution with an equal part of DISTILLED water. (KCl solution available from YSI contains 1-2 drops of Kodak Photo Flo per ounce to insure wetting).
3. Grasp probe in left hand (A), select a membrane and secure one end against side of probe with thumb. Handle the membrane only by the edges. Stretch membrane up, over, and down (B and C). Secure membrane under left forefinger (D). Roll "O" ring over top of probe and into groove to hold membrane in place (E). Sluggish response may be from a slack or wrinkled membrane or foreign matter between membrane and cathode. Wrinkles can be removed by gently pulling the edges of the membrane. Trim off excess membrane near "O" ring (F).
4. Slide the rubber tube down the barrel to expose filler hole. Fill barrel about 3/4 full of half saturated KCl. An eyedropper or syringe is a handy tool for this operation.
5. Inspect the probe visually for trapped air near the sensing end. To remove trapped air, hold probe in one hand, sensing end tilted down, and gently tap barrel near the sensing end. Tapping all around the barrel will help dislodge all trapped air.
6. For simplified membrane mounting procedures we recommend use of the YSI 5339 Probe Service Kit.

## OPERATION:

### Oxygen Depletion

Reading error in liquids due to oxygen depletion in the area



of the membrane will occur unless adequate stirring is provided. Depletion rate is equivalent to  $8 \times 10^{-11}$  grammes oxygen/sec. per sensor current of 1 microampere.

**Membrane Coefficient**

The approximate  $4\%/^{\circ}\text{C}$  membrane coefficient necessitates good temperature control, and temperature equilibration time must be considered when making changes in the setup.

**Cleaning Procedure**

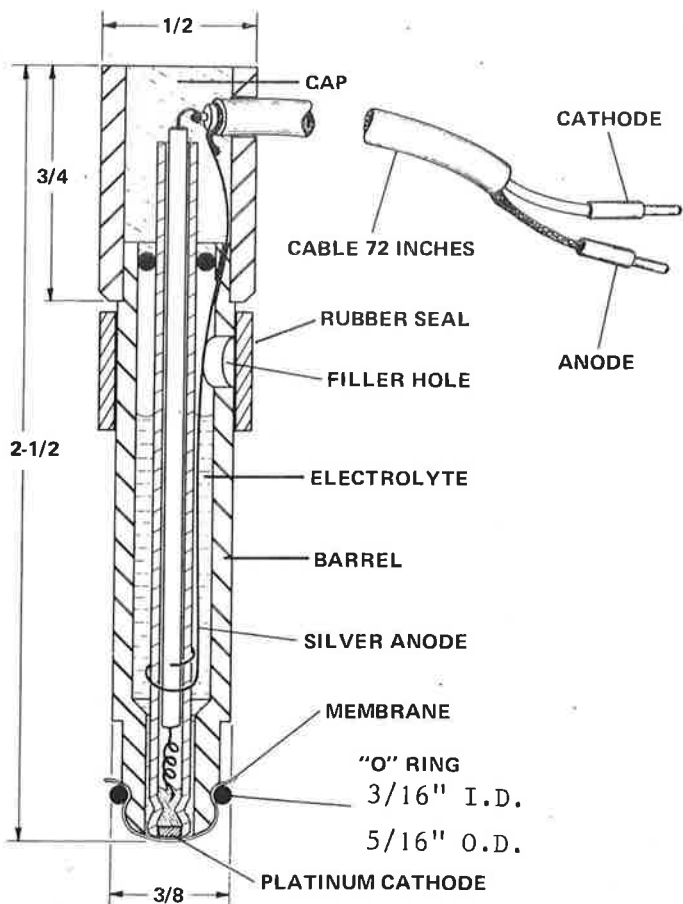
Clean tarnish, etc., off with cotton-tipped swab dipped in 1:1  $\text{NH}_4\text{OH}$  - water solution and flushing the ammonia solution through the probe. Continual noise of several % full scale may occur with time even though the probe and membrane may be in perfect condition. The silver anode may not be making good reference contact with the KCl solution, and re-cleaning with the ammonia solution is recommended. Rinse well with distilled water after each ammonia wash.

**Storage**

Store the probe for short periods submersed in distilled water. For extended periods, clean well and cover with a membrane (no KCl).

**Repair Facilities**

If you are experiencing difficulty with a YSI product, it may be returned to the YSI Customer Service Department for repair, even if the guarantee has expired. YSI maintains complete facilities for prompt servicing of all YSI products.



**REPLACEMENT PARTS AND ACCESSORIES:**

- YSI 5339 Probe Service Kit - Standard Membrane Material Membrane Mounting "O" Rings. "O" Ring Applicator, KCl with Photo Flo, & KCl Dropper Bottle
- YSI 5352 Membrane Kit - 25 (.001" Thk) Standard Membrane
- YSI 5937 High Sensitivity Membrane Kit - 25 (.0005" Thk) Membranes

**GUARANTEE:**

YSI 4004 Clark Oxygen Probes carry a one-year unconditional guarantee on all workmanship and components. Damage through accident, misuse, or tampering will be repaired at a nominal charge, if possible.

**CIRCUIT INFORMATION:**

The following information is offered as a guide for using the YSI 4004 Clark Oxygen Probe. It is not the only way the probe can be used.

**Voltage Supply**

.8 VDC - readily obtained from flashlight cell or mercury battery. If a line operated supply is used the DC must be well filtered and regulated.

**Sensor Load Resistor**

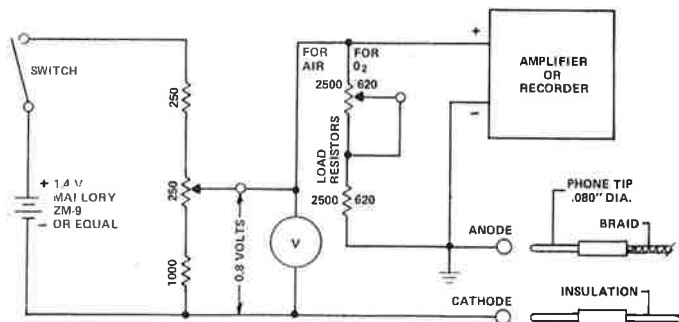
Restrict the voltage across the load resistor to less than 0.10 volt (10-25 mV preferred). The YSI 4004 Sensor will develop about 2.0 microamperes in air at  $30^{\circ}\text{C}$  and 760 mm (10.0 microamperes in oxygen at  $30^{\circ}\text{C}$  and 760 mm).

**AMPLIFIER OR RECORDER INPUT REQUIREMENT:**

The input impedance of the amplifier should be large compared to the sensor load resistor; if not, the input resistance shunts the sensor load resistor. In many cases this is permissible if the effect is recognized and proper circuit modification made. For instance if the amplifier input impedance is purely resistive and has a value of 100,000 ohms the sensor load resistor may be increased so that the resultant paralleled resistors are the desired value.

NOTE: Wire wound resistors and potentiometers are best - 10-turn potentiometers give better resolution - A switch may be installed to permit easy change from air to oxygen.

Values of load resistor for air and oxygen are for use at temperatures between 30 and  $40^{\circ}\text{C}$ . The signal voltage will be 10 millivolts. If the amplifier requires a larger input voltage for full scale these resistors may be increased proportionately.



**Fig. 1**

4004 Oxygen Electrode available only directly from



**YELLOW SPRINGS INSTRUMENT CO.**  
**YELLOW SPRINGS, OHIO 45387**

Fig. 2 Oxygen measurement chamber

