

## **VOORSCHRIFTEN:**

**Laboratorium voor**

## **IMMUNO PATHOLOGISCHE ONDERZOEKEN voor SERUMEIWITTEN**

=====

1 = Kwantitatieve immunoglobuline bepaling	2 pag.
2 = Enkelvoudige Electroforese met Vitatron apparaat	2 pag.
3 = Kleuringen van agar-electroforese preparaten	
4 = Biureet (eiwitbepaling)	2 pag.
5 = Kleuringen van immuno-electroforese preparaten	2 pag.
6 = Herkennen van afwijkende transferrine types, door cross-over electroforese	2 pag.
7 = Poly-acrylamide gel electroforese	3 pag.
8 = E.E. 1 : 1	2 pag.
9 = Aantonen van cryoglobulinen in serum	
10 = Immuno-electroforese (I.E.)	2 pag.

KWANTITATIEVE IMMUNOGLOBULINE BEPALING vlgs Mancini - Heremans  
 =====

Deze bepaling berust op het principe dat een antigeen, dat naar alle zijden kan diffunderen in een agar-laag waarin is opgelost een tegen dat antigeen gericht antiserum, een precipitatie-ring vormt, waarvan het oppervlak recht evenredig is met de hoeveelheid antigeen.

Algemene werkwijze

Glasplaten 8 x 12 cm, met glasinkt merken, branden en met agar fixeren (3% in aqua dest).

1. gefixeerde glasplaat
2. bovenop mal (1 mm dik)
3. daar bovenop een gesiliconeerde glasplaat
4. vastmaken met papierklemmen (4 stuks)

100 cc agar 2% in ongebufferd fysiologisch zout oplossen.

Daarna + 50 mg merthiolaat toevoegen, ter voorkoming van schimmels en bacteriën.

De agar afkoelen tot 56°C in een waterbad.

12 cc agar voorverwarmd (56°C) 25 cc kolfje pipetteren.

Daarna toevoegen :

voor	IgA 2,1 cc (PH 14-2-2)	per 12 cc agar
	IgM 0,6 cc (KH 15-9)	per 12 cc agar
	IgG 1,5 cc (KH 16-16pool)	per 12 cc agar

Voorzichtig maar goed met de agar mengen.

Het mengsel van agar en antiserum met uitgetrokken pasteursepipet tussen de twee platen gieten, en laten stollen (min. 15 minuten).

Dan de klemmen er af en de gesiliconeerde plaat er voorzichtig afschuiven. Met behulp van plexiglas-mal en naald (diameter 2 mm) 30 gaten ponsen en agar laag uitzuigen.

Dan met behulp van een Hamilton microliter spuit serummonster in gaten brengen, 3 microliter per gat.

De spuit eerst als volgt voorspoelen :

- 3 x met fysiologisch zout
- 3 x met aqua dest
- 3 x met serum

De IgA-, IgM- of IgG-plaat 2 x 24 uur in de 16°C kast laten staan, daarna met een gecalibreerde loupe de diameter van de precipitatie-ringen aflezen tot op 0,1 mm nauwkeurig of met een speciaal door het C.L.B. vervaardigd vergrotings apparaat.

Voor IgM ook na 3 x 24 uur aflezen.

Een standaard curve wordt gemaakt door "normaal" serum in 5 verdunningen op te brengen : (voor bepaling van IgA en IgM 100, 75, 50, 25 en 5%, voor bepaling van IgG 10, 7,5, 5, 2,5 en 0,5%).

De kwadraten van de diameters van de precipitatie-ringen worden op de verticale as, de procenten op de horizontale as uitgezet.

Deze punten liggen op een rechte lijn. Met behulp van deze curve kunnen de concentraties van de onbekende serummonsters worden afgelezen.

Indien steeds dezelfde mal wordt gebruikt kan één standaard curve gemaakt worden voor eenzelfde batch normaal serum en antiserum.

Om de hoeveelheid immunoglobuline in mg% uit te drukken wordt gebruik gemaakt van het standaardserum van de Behringwerke in afwachting van het WHO standaardserum.

Het is praktisch, alvorens de kwantitatieve bepaling van een serummonster in te zetten, eerst een immuno-electroforese te verrichten. Naar aanleiding hiervan kan men zien of het onbekende serummonster al of niet verdund opgebracht moet worden.

In principe moet voor de IgG bepaling ieder monster 10 x of meer verdund worden.

ENKELVOUDIGE ELECTROFORESE (E.E.) MET VITATRON APPARAAT

=====

Gebruikte oplossing

Buffermengsel, pH = 8,8; 0,1 mol

34 gram Natriumveronal

25 ml 1 N HCl

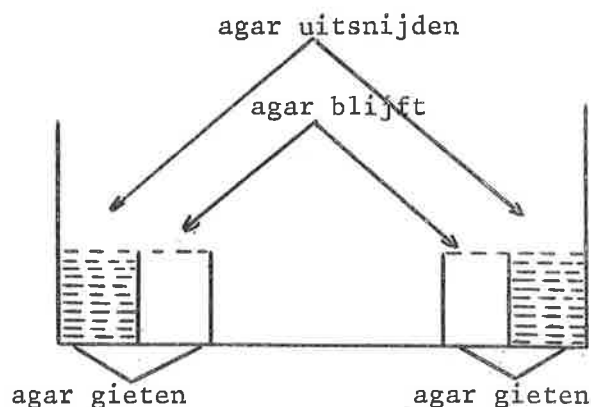
Aqua dest tot 2 liter

0,9% agar voor plaatjes

3,6 gram agar, Difco Noble

200 ml buffer

200 ml aqua dest



2% agar voor electroforese-apparaat en voor stripjes:

16 gram agar, Difco Noble

400 ml buffer

400 ml aqua dest

Het linker en rechter gedeelte van de bak met nog net vloeibare agar opvullen. Als de agar goed gestold is, het uiterste linker en rechter gedeelte verwijderen. Hiervoor in de plaats komt buffer 1:2 verdund. In het middenstuk van de bak komt pentaan (voor de koeling), dat 2-3 cm boven de agarlaag mag staan.

Op de agarlaag, dus op de pentaan wordt aan iedere kant een stripje 2%-ige agar van 5 mm dikte gelegd, waarop de plaat zal komen te liggen.

Fixeeroplossing

750 ml alcohol

200 ml aqua dest

50 ml ijsazijn

Het maken van E.E.'s

24 tot 48 uur voor gebruik worden platen gegoten in een bak van ongeveer 20 cm bij 28 cm.

De bak wordt eerst gevuld met 200 ml agar, 0,9% op een waterpas tafel voor een volkomen vlakke onderlaag.

Na stolling worden hierop 4 grote glasplaten (8 bij 12 cm) of 21 object-glaasjes gelegd, die eerst gefixeerd en daarna bij 100°C gedroogd zijn. Op de platen wordt 150 ml agar gegoten; de bak wordt, na het stijf worden van de agar bij 4°C bewaard tot de volgende dag.

Vlak voor gebruik worden de platen met een mesje uitgesneden.

Het opbrengen van het serum geschiedt met een zelf gemaakte uitgetrokken pasteurse pipet, met een omgebogen zeer fijne punt.

Eerst wordt met een pincet een filtreerpapiertje van 4 mm voor object-glaasjes of van 10 mm voor grote platen in de agar gezet.

De lengte van het papiertje is ongeveer 2½ cm. Het filtreerpapiertje mag niet zo diep in de agarlaag geplaatst worden dat het de bodem raakt; laat de buffer ongeveer 1 cm in het papier trekken, haal het er dan voorzichtig, maar in één keer uit.

Vul het ontstane gleufje met serum, 1½ of 3 microliter.

Laat direct na het vullen de plaat 30 tot 35 minuten lopen, onder constant voltage, 200 volt. Maak gebruik van de koeling, anders loopt de temperatuur te hoog op.

De positieve pool ligt 3½ cm, de negatieve 4 cm van de opbrengplaats.

Na de electroforese wordt de plaat in de fixeeroplossing gelegd, gedurende minimaal een half uur. Daarna wordt de plaat met een in aqua dest gedrenkt filtreerpapier bij 37°C gedroogd.

Is de plaat goed droog dan vindt de kleuring plaats met amidozwart of voor vetkleuring met soedanzwart.

N.B. Het verversen van de agar in de electroforese-bak gebeurt 1 maal per maand, het verversen van de buffer en de fixeeroplossing iedere week.

KLEURINGEN VAN AGAR-ELECTROFORESE PREPARATEN  
=====

Amidozwart (200 ml) (voor gebruik de oplossing vers bereiden)

1 gram amidozwart  
10 gram kwik (II) chloride  
10 ml 80% azijnzuur  
190 ml aqua dest

Kleuring in de gefilterde oplossing minstens een half uur.  
Daarna ontkleuring in 2,0% azijnzuur oplossing.  
Drogen bij 100°C.

Vetkleuring

Preparaat gedurende twee uur laten kleuren in een verzadigde  
oplossing van Soedanzwart in 60% alcohol (vers bereiden).  
Dan ontkleuren in 50% alcohol.  
Drogen bij 100°C.

**BIUREET** (eiwitbepaling)

=====

blanco : 4 ml ongebufferd fysiologisch zout  
0,2 ml zout  
5 ml biureetoplossing met  $\text{CuSO}_4$

blanco : 4 ml zout  
0,2 ml zout  
5 ml biureetoplossing zonder  $\text{CuSO}_4$

standaard : 4 ml zout  
0,2 ml 4,9% albumine-standaard  
5 ml biureetoplossing met  $\text{CuSO}_4$

standaard : 4 ml zout  
0,2 ml 4,9% albumine-standaard  
5 ml biureetoplossing zonder  $\text{CuSO}_4$

monster : 4 ml zout  
0,2 ml serum  
5 ml biureetoplossing met  $\text{CuSO}_4$

monster : 4 ml zout  
0,2 ml serum  
5 ml biureetoplossing zonder  $\text{CuSO}_4$

De tijd tussen het toevoegen van de biureetoplossing en het meten op de Unicam mag beslist niet langer zijn dan een half uur.

Begin na 25 minuten dus al met meten.

Voor het pipetteren wordt gebruikt :

0,2 ml pipet

5 ml pipet

De pipetten eerst eenmaal voorspoelen.



Bij het meten is van belang dat :

- a. de oplossing met  $\text{CuSO}_4$  in dezelfde cuvetten gemeten wordt als die zonder  $\text{CuSO}_4$
- b. de cuvetten één of twee maal zijn voorgespoeld
- c. deze cuvetten van glas zijn
- d. de extinctie 544  $\text{m}\mu$  is
- e. de cuvetten drie- of vier maal voorgespoeld zijn.

### Berekening

De gecorrigeerde uitkomst wordt verkregen door de uitkomst van de oplossing zonder  $\text{CuSO}_4$  af te trekken van de uitkomst van de oplossing met  $\text{CuSO}_4$ .

$$\frac{\text{gecorrigeerde uitkomst serummonster}}{\text{gecorrigeerde uitkomst standaard}} \times \% \text{ eiwit in standaard} = \dots \% \text{ eiwit in monster}$$

### Biureetoplossing

voor 1 liter :

45 gram Na-K-tartraat

5 gram KI

8 gram NaOH

voor blauwkleuring :

5 gram  $\text{CuSO}_4$  (nauwkeurig afwegen)

Na oplossing de biureetoplossing met  $\text{CuSO}_4$  af filtreren met behulp van een blauwband filter.

De biureetoplossingen moeten bewaard worden bij kamertemperatuur en in het donker.

KLEURINGEN VAN IMMUNO-ELECTROFORESE PREPARATEN  
 =====

Amidozwart (1 liter)

1 gram amidozwart  
 6,12 gram Natriumacetaat  $3H_2O$   
 100 ml glycerine  
 2,6 ml ijsazijn  
 900 ml aqua dest

Het preparaat in deze oplossing minstens 1 uur laten kleuren.

Dan ontkleuren in

150 ml 80% azijnzuur  
 500 ml glycerine  
 5350 ml aqua dest

Na ontkeuring (10 - 20 minuten) het preparaat afspoelen en drogen bij  $100^{\circ}C$ .

Ponceaurood (1 liter)

1 gram ponceaurood  
 6,12 gram Natriumacetaat  $3H_2O$   
 100 ml glycerine  
 2,6 ml ijsazijn  
 900 ml aqua dest

Voor kleuring en ontkeuring zie boven.

Ponceaurood kleuring wordt gebruikt wanneer veel precipitatielijnen zichtbaar zijn.

- N.B. 1. Deze kleuringen moeten verricht worden op preparaten, die gedurende 3 x 24 uur gewassen zijn in 3 x verversst gebufferd zout. Indien gedurende kortere tijd gewassen wordt, ontstaan ontsierende vlekken doordat niet geprecipiteerde eiwitten onvoldoende uitgewassen zijn en meekleuren.
2. De kleurende vloeistoffen kunnen na de bereiding gedurende minstens een maand bij kamertemperatuur bewaard worden.  
 Eén zelfde portie van de kleurende vloeistof kan 5 à 10 maal opnieuw gebruikt worden. De ontkeurende vloeistof kan slechts één maal gebruikt worden.

Caeruloplasmine kleuring

Het te kleuren preparaat drie dagen wassen, in 3 x ververst gebufferd zout, daarna niet boven 50°C drogen.

1,36 g Natriumacetaat 3 H<sub>2</sub>O oplossen in 100 ml aqua dest en op pH = 5,7 brengen met 1N HCl.

Daarna 80 mg Fe SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O toevoegen.

Het preparaat hierin bij 37°C 30 minuten laten staan.

Preparaat goed afspoelen met aqua dest.

Dan volgt de kleuring in een mengsel van gelijke delen 2% kaliumferrocyanide-oplossing in aqua dest en 0,2 N HCl.

De kleuring duurt ongeveer 1 minuut. Daarna voorzichtig afspoelen met aqua dest en drogen bij 100°C.

De caeruloplasminelijn wordt blauw.

Als tegenkleur kan ponceaurood dienen.

Benzidine kleuring (voor het aantonen van haemoglobine)

400 mg benzidine

80 ml aqua dest

20 ml ijsazijn

De benzidine oplossen boven de vlam; goed schudden.

Zodra alles is opgelost de kolf afsluiten en laten afkoelen.

Onmiddellijk voor gebruik 1 ml waterstofperoxyde 30% toevoegen.

Het gekleurde (ongedroogde) preparaat hoeft niet ontkleurd te worden.

Deze preparaten kunnen niet bewaard worden, en moeten direct bekeken worden daar de kleuring binnen 15 min. weer verdwijnt.

HERKENNEN VAN AFWIJKENDE TRANSFERRINE TYPES, DOOR CROSS-OVER ELECTROFORESE

1e stap

Electroforese in agarose

Benodigdheden

- a) Ashton buffer d.w.z. 1. 1,2 gram lithium hydroxyde  
11,8 gram boorzuur  
aqua dest ad 1 liter
2.  
1,6 gram citroenzuur  
6,29 gram Trizma Base (Trishydroxymethyl-  
aminomethaan)  
aqua dest ad 1 liter

In electroforese tank buffer 1

In agarose gel 10% buffer 1

b) Glasplaten:

Schoongemaakt met alcohol, niet fixeren.  
afmetingen 12 x 8 cm

Hierop aanbrengen 25 cc agarose 1% opgelost in mengsel van buffer 1 (10%)  
en buffer 2 (90%)

Werkwijze

- a. opbrengen van het serummonster  
filtreerpapiertjes snijden van 15 x 4 mm.  
Aan het serum een beetje broomphenol toevoegen.  
Met een pincet het met serum doordrenkte stripje op de agarose  
leggen aan de korte zijde van de plaat op 2 cm afstand van de  
rand, die aan de negatieve pool ligt. De stroom loopt dus in de  
lengte richting van de plaat.
- b. electroforese  
Werken op constante stroom mA 15; begin voltage + 125 V  
eind voltage = 250 à 300 V. Temp. 20°C.  
Contact tussen de gebufferde agarose en de buffer in de tank wordt met  
kleenex tissues gemaakt.  
Duur van de electroforese 2,5 à 3 uur.  
De afstand tussen opbrengplaats en albumine (gemerkt met broomphenol  
blauw) moet tenslotte 8 cm zijn.

## 2e stap

## Cross-over electroforese

- a. Mancini plaat gieten (zelfde afmetingen, zelfde mal als voor kwantitatieve immunoglobuline bepaling) maar nu met anti-transferrine serum 0,9 cc (KH9-1-p3).  
Op 12 cc agarose 1% opgelost in veronal natrium buffer pH 8.8 (17 g Na-barbital 15 ml 1N HCl, aqua dest ad 1 ltr.) die voor gebruik 1:2 verdund is.
- b. Uit de electroforese strip verkregen bij de 1e stap met speciaal mesje in de lengte richting een reep snijden van 0,5 cm breed.  
Deze reep wordt op de mancini-plaat gelegd op 2,5 cm vanaf de rand van de lange zijde, die aan de kant van de negatieve pool komt te liggen.  
De plaat wordt in de electroforese tank gebracht, waarin dezelfde buffer als in de agar gel (de stroom loopt nu dus loodrecht op de lengte richting van de plaat).  
Het contact tussen de agar-laag en de buffer wordt weer gelegd met Kleenex tissues.
- c. Duur electroforese + 45 minuten op 175 V (constant voltage).  
Na electroforese het electroforese stripje van stap 1 wegnemen en de plaat in gebufferd zout leggen.
- d. Verdere bewerking als van de immuno-electroforese preparaten.

POLY-ACRYLAMIDE GEL ELECTROFORESE  
=====

Samenstelling en bouw electroforese buis

Lengte 9,5 cm

Doorsnede 8 mm

De buizen moeten goed schoon zijn, omdat de gel anders moeilijk uit de buizen te krijgen is.

Voorschrift voor het maken van de buisjes

1. De holle buisjes worden onderin met rubberstopjes of met parafilm afgesloten.
2. De buizen worden op gelijke hoogte gevuld met small pore gel; stollings-tijd bedraagt 10 tot 20 minuten. De gel laten stollen, geen luchtbellens tussen stopje en gel.
3. Na het stollen het bovenstaande water met een tissue wegnemen.
4. Afdeklaagje opbrengen en laten stollen onder ultraviolet bestraling (zonlicht of lichtbak met speciale buizen).
5. Na het stollen het water weer wegnemen.
6. De eiwit/large pore gel oplossing opbrengen en ook laten stollen onder ultraviolet bestraling.

De buisjes in buffer electroforeren, 7 à 8 mA per buis, totdat het blauwe kleurstof frontje beneden is. Geen luchtbellens tussen buffer en gel.

De gel uit de buisjes halen door water uit een injectiespuit tussen de wand en de gel te spuiten. Een half uur kleuren in I.E. kleurstof, daarna ontkleuren in 7% azijnzuur (b.v. een nacht). Dan electrisch ontkleuren, in 7% azijnzuur, gedurende ongeveer één uur, 200 mA.

De gel bewaren in een afgesloten buis in 7% azijnzuur.

I. Small pore gel

Voor een opsplitsing in het IgG-gebied wordt small pore gel, met pH = 7.9 gebruikt (pH meten!). Voor een opsplitsing in het  $\alpha$ -gebied is de pH = 8.9. De gel moet in één keer gegoten worden, omdat hij anders bij het uithalen breekt. Er gaat ongeveer 3,5 ml small pore gel in een buis.

Ammoniumpersulfaat dient voor het vrijmaken van radicalen, waardoor de stollingsreactie kan ontstaan. Vlak voor het vullen ruim 1 mg ammoniumpersulfaat per ml gel toevoegen; goed schudden.

#### Samenstelling

1 deel oplossing A, pH= 7.9 of pH= 8.9  
2,2 delen oplossing C  
4,8 delen aqua dest  
Ammoniumpersulfaat

#### II. Large pore gel

Voor het afdeklaagje wordt een large pore gel met aqua dest gebruikt. Ongeveer 10 druppels large pore gel oplossing per buis.

#### Samenstelling

1 deel oplossing B  
1 deel oplossing D  
0,8 delen oplossing C  
1,5 delen oplossing E  
  
4 delen aqua dest

#### III. Large pore gel met eiwitoplossing en kleurstof

De large pore gel wordt zwak blauw gekleurd met een druppeltje geconcentreerde broomphenol blauw oplossing, voor de vorming van een kleurstof front.

#### Samenstelling

1 deel oplossing B  
1 deel oplossing D  
0,8 delen oplossing C  
1,5 delen oplossing E  
  
4 delen eiwitoplossing, maximaal 1 mg eiwit per buis.

Voorschrift voor de oplossingen

	pH=7,9	pH=8,9
Oplossing A :	1N HCl	48 ml
	Tris	8 g
	Temed	0,92 ml
	aqua dest tot 100 ml.	48 ml
		36,6 g
		0,46 ml
	pH=7,4	
Oplossing B :	1N HCl	48 ml
	Tris	5,98 g
	Temed	0,5 ml
	aqua dest tot 100 ml	
Oplossing C :	Acrylamide	30 g
	Bisacrylamide	0,8 g
	roodbloedloozout	15 mg (= 1 korrel)
	aqua dest tot 100 ml.	
	Bij neerslag af filtreren, door filtreerpapier.	
Oplossing D :	Acrylamide	10,0 g
	Bisacrylamide	2,5 g
	aqua dest tot 100 ml	
	Bij neerslag af filtreren door watten.	
Oplossing E :	Riboflavine	4,0 mg
	aqua dest tot 100 ml	
		pH=8,3
Loopbuffer :	glycine (acidum amino aceticum)	28,8 g
	Tris	6 g
	oplossen in 2 liter aqua dest	

De oplossingen dienen in de kou bewaard te worden.

Bij troebeling nieuwe oplossingen maken.

De loopbuffer moet bij het begin van de electroforese zo koud mogelijk zijn.



E.E. 1 : 1

=====

Een E.E. 1:1 is een hulpmiddel om paraproteïnelijnen aan te tonen, die in de gewone E.E. bij de opbrengplaats blijven hangen.

#### Benodigdheden

Buffermengsel      pH 8.8

34 g Natriumbarbitalum

25 ml 1 N HCl

aqua dest tot 2 liter

Agaroplossing      0,9%

0,9 g agar Difco Noble

100 ml buffermengsel, onverdund (in tegenstelling tot de 1:2 verdunning voor de normale E.E.)

Glasplaten          8 x 12 cm

#### Fixeeroplossing

750 ml ethanol

200 ml aqua dest

50 ml ijsazijn

Pentaaan            voor koeling

#### Werkwijze

24 tot 48 uur voor het inzetten van een E.E. 1:1 wordt de plaat, die geschreven, gebrand, gefixeerd en gedroogd is (zie I.E.'s) met 0,9% agaroplossing op een waterpastafel gegoten. Na het opstijven de plaat bij 4°C bewaren.

Vlak voor gebruik worden met filtreerpapierjes van 12 mm breed gleuven in de agarlaag gemaakt, zoals bij de enkelvoudige elektroforese beschreven is. Daarna wordt 4 microliter van het te onderzoeken serum opgebracht met behulp van een zelfgemaakte pipet.

In de elektroforesebak (Vitatron) bevindt zich in het midden pentaan; in het linker- en rechtergedeelte wordt ook weer onverdunde buffer gegoten. Een agarlaag, zoals in een gewone E.E.-bak ontbreekt. Het contact tussen buffer en plaat wordt gemaakt door middel van ongeveer zes lagen filtreerpapier, die in het midden worden omgevouwen, en over een bij het apparaat behorend plastic stripje worden gelegd.

De plaat komt omgekeerd op de met buffer volgezogen filtreerpapierjes te liggen.

De elektroforese, die plaats vindt bij een constant voltage van 110 Volt, duurt ongeveer 75 minuten. De temperatuur mag niet hoger worden dan 22°C, omdat de plaat anders te snel uitdroogt. Tijdens de elektroforese moeten de ontstane zoutkristallen in de buffer (voornamelijk bij de anode) van de elektroden worden afgehaald, omdat anders de pH van de buffer en de stroomsterkte in de plaat te veel veranderen.

Na 75 minuten wordt de plaat gedurende een half uur in de fixeeroplossing gelegd. Daarna drogen op een, in de fixeervloeistof gedrenkt filtreerpapier, bij 37°C.

Nadat de plaat goed droog is, wordt hij in E.E. kleurstof gekleurd. Na een half uur kleuren, ontkleuren in 5% azijnzuuroplossing en drogen bij 90°C.

## AANTONEN VAN CRYOGLOBULINEN IN SERUM

=====

Een cryoglobuline is een verbinding van een cholesterolester met een globuline. Hij slaat neer bij een temperatuur tussen  $0^{\circ}\text{C}$  en  $4^{\circ}\text{C}$  (wit vlokkerig neerslag of gelvorming), en is bij  $37^{\circ}\text{C}$  weer opgelost.

Cryoglobulinen kunnen worden aangetoond door een buis serum gedurende minstens één nacht bij  $0^{\circ}\text{C}$  (ijsbad) te laten staan. Is er dan een neerslag te zien, dat bij verwarming tot  $37^{\circ}\text{C}$  weer is verdwenen, dan bevat het serum cryoglobulinen.

Vaststellen van het soort globulinen, dat deel uitmaakt van het precipitaat, gebeurt door middel van een I.E. waarin gewassen cryoprecipitaat is opgebracht, dat bij  $37^{\circ}\text{C}$  in fysiologisch zout is opgelost.

Het cryoprecipitaat wordt gewassen met 0,9% NaCl-oplossing nadat het bovenstaande, dus het serum zonder cryoglobulinen is afgenomen. Bij het cryoprecipitaat, dat nu met nog een beetje serum overblijft, wordt de zoutoplossing toegevoegd. Het precipitaat gedurende een half uur onder schudden bij  $37^{\circ}\text{C}$  laten oplossen. Vervolgens de buis een nacht in een ijsbad laten staan. De volgende dag bij  $0^{\circ}\text{C}$  in de Servall op maximum afdraaien. Na centrifugering het bovenstaande afzuigen, en de cryoglobulinen bij  $37^{\circ}\text{C}$  in een zoutoplossing laten oplossen. Na een half uur de buis in een ijsbad plaatsen; de volgende dag weer centrifugeren. De totale handeling nog één maal herhalen. Tenslotte een I.E. inzetten met het gewassen cryoprecipitaat dat vlak voor het opbrengen bij  $37^{\circ}\text{C}$  in fysiologisch zout is opgelost.

IMMUNO - ELEKTROFORESE (I.E.)  
=====Principe

Immuno-elektroforese is een methode om serumeiwitten kwalitatief en semi-kwantitatief te bepalen. De I.E. berust op twee principes:

1. Dat een antigeen (serumeiwit) zich in een elektrisch veld zal bewegen, afhankelijk van zijn lading en grootte;
2. dat een antigeen onder bepaalde omstandigheden met een antilichaam (een, specifiek tegen dat antigeen gerichte stof) kan reageren, om daarmee een complex te vormen, dat kan precipiteren. De hoeveelheid precipitaat bij het patientenserum, wordt vergeleken met de hoeveelheid precipitaat bij Normaal Serum. Daarbij moet rekening worden gehouden dat de I.E. van NS onder zoveel mogelijk gelijke omstandigheden plaatsvond als de I.E. van de patient, bijvoorbeeld door beide sera op één preparaat te laten elektroforeren en met de zelfde hoeveelheid antiserum te laten reageren, door één goot met antiserum te gebruiken, waarvanuit het antiserum naar twee kanten kan diffunderen.

Benodigdheden

I.E. buffer, 0,05 M. pH= 8,6  
7,36 g barbitalum (zuur)  
41,4 g natriumbarbitalum  
mespuntje merthiolaat  
aqua dest tot 4 liter

Fixeeragar 3%

3 g agar Difco Noble  
100 ml aqua dest  
Oplossen in waterbad, uitvullen in buizen en bij 4°C bewaren. Vlak voor gebruik een buis in heet waterbad plaatsen.

Agaroplossing voor het gieten van de plaatjes

1,3 g agar Difco Noble  
70 ml I.E. buffer  
30 ml aqua dest  
Oplossen in waterbad en dan zo gauw mogelijk gebruiken.

Werkwijze

Goed schoongemaakte objectglaasjes worden met glasinkt, bij voorkeur aan de bovenkant, beschreven. Links staat NS, rechts het nummer of de naam van de patient, daaronder de datum van inzetten en welk antiserum in de goot zal worden gebracht. De inkt wordt met een hete vlam ingebrand, na afkoelen vindt het "fixeren" plaats, voor een goede hechting van de agargel aan de glasplaat. Fixatie geschiedt door een klein druppeltje vloeibare fixeeragar zo snel mogelijk met de vinger over het hele objectglaasje uit te wrijven. De fixeerlaag wordt gedroogd bij 90°C gedurende tenminste 15 minuten.

Na drogen wordt de gel gegoten; 3,5 ml 1,3% agaroplossing per plaatje (op een waterpastafel gieten). Na opstijven, de agarlaag is dan lichtgrijs gekleurd, worden de preparaten met een LKB-ponsapparaat geponst. De naaldjes staan in dit apparaat op de vierde (=4 mm) plaats van de goot af, iets onder het midden. De gaatjes worden met een waterstraalpomp leeggezogen, daarna worden ze gevuld met een "Hamilton"-microliterspuit: 2½ microliter serum per gat. Links komt NS, (poolserum van minstens 100 donors) rechts patientenserum. Bevat het serum weinig eiwit, dan moet meer worden opgebracht, bijvoorbeeld 5 microliter met de blauwe naald,  $\varnothing$  2 mm, of 10 microliter voor de grote naald  $\varnothing$  3 mm.

Het gevulde preparaat wordt in een I.E. bak gelegd, met naam of nummer aan de kant van de anode. Het spanningsverschil is 60 volt per plaatje; contact wordt gelegd met tissues. Tijdens de elektroforese, die 50 minuten duurt, moet er een constante doorstroming van onverdunde buffer zijn om pH verandering zoveel mogelijk tegen te gaan.

Is de elektroforese afgelopen, dan wordt de agarlaag van het geponste gootje verwijderd met een LKB-mesje of met een afnamenaald. Eerst wordt aan de boven- en aan de onderkant van de goot een snee gemaakt; dan met een (schone!) vinger over de agarlaag heenwrijven, zodat lucht onder het agarstripje kan komen. Eén van de uiteinden van het stripje wordt daarna met een mesje opgewipt; dan kan de agarlaag er met een tissue of met de vinger uitgehaald worden.

Met een pasteursepipet wordt antiserum in de goot gebracht.

Na één nacht diffunderen kunnen de preparaten worden afgelezen, daarna vindt fotograferen en/of spoelen en kleuren plaats (zie verder onder I.E. kleuringen 0562/5).