

VOORSCHRIFTEN:

Laboratorium voor

RADIO CHEMIE

I N H O U D

=====

- | | |
|---|--------|
| 1 = Bepaling insuline bindende antistoffen | 2 pag. |
| 2 = Labeling van fibrinogeen met ^{125}J of ^{131}J | 2 pag. |
| 3 = Labeling insuline met ^{125}J of ^{131}J | 2 pag. |

BEPALING INSULINE BINDEDE ANTISTOFFEN
=====Bereiding van incubatie mengsels

In een reeks van gewoonlijk zeven buisjes brengt men achtereenvolgens

1. 0,35 ml veronalbuffer 0,1 M pH 8.6 met 0,25% humaan serumalbumine
2. 0,05 ml radio-insuline oplossing bevattende 0,2-0,4 μ gr insuline
3. 0,05 ml runderinsuline oplossing in veronalbuffer met hoeveelheden insuline variërend van 0-50.000 μ E
4. 0,05 humaan antiserum, onverdund of verdund in veronalbuffer, afhankelijk van de antistoftiter. Het totaal volume is 0,5 ml.

Als contrôle wordt een incubatiemengsel bereid, waarin het humaan antiserum vervangen wordt door een normaal humaan serum.

De mengsels worden vier dagen bij +4°C geïncubeerd.

Scheiding van vrij en gebonden insuline met behulp van hydrodynamische papier chromatografie.

Hiervoor wordt gebruik gemaakt van Whatman 3 MM papier (z.g. "non selected for chromatography"), dat bij de toegepaste insuline concentraties de eigenschap heeft, dat niet aan antistof gebonden, intacte insuline aan de opbrengplaats wordt geadsorbeerd, terwijl aan antistof gebonden en beschadigd insuline met de plasma eiwitten migreren. Om specifieke adsorptie van aan antistof gebonden insuline op de opbrengplaat te voorkomen, wordt vlak voor de chromatografie door toevoeging van normaal serum de serum concentratie op 20 vol % gebracht.

De scheiding van vrij en antistof gebonden insuline wordt als volgt uitgevoerd

1. Stroken Whatman 3 MM papier (46 x 4 cm), waarvan de opbrengplaats met potlood op 21 cm van een der uiteinden is aangegeven, worden gedoopt in 0,1 M veronalbuffer pH 8.6 en afgevoerd.
2. Zeven bevochtigde papierstroken worden op twee naast elkaar liggende glazen platen gelegd, zodanig dat de opbrengplaats tussen beide glazen platen ligt. (afstand tussen beide glazen platen + 6 cm).

3. Vlak voor de chromatografie wordt aan elk incubatie mengsel 0,06 ml normaal humaan serum toegevoegd of een evenredig grotere hoeveelheid tot maximaal 0,12 ml indien het antiserum in een verdunning is ingezet. De eindconcentratie van het serum is steeds 20 vol %.
4. Op elke papierstrook wordt 3 x 0,1 ml van een incubatiemengsel opgebracht; op deze wijze wordt dus één serie incubatiemengsels tegelijk behandeld.
5. De serum eiwitten worden gemarkeerd door de opbrengplaats aan te stippen met een broomphenolblauw oplossing; deze kleurstof bindt zich aan albumine.
6. Hydrodynamische papier chromatografie wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur in veronalbuffer 0,1 M pH 8,6. Daartoe worden de papierstroken met behulp van klemmen horizontaal uitgespannen tussen twee op \pm 20 cm van elkaar staande chromatografie bakken (10x10x53 cm), waarvan één is gevuld met de veronalbuffer. Daarbij hangt een der vrije uiteinden van de papierstrook in de veronalbuffer.
Als gevolg van verdamping van het water uit de buffer in de papierstrook neemt de concentratie van de buffer zouten toe en wordt langs osmotische weg buffervloeistof door de papierstrook aangezogen. Ook door de capillaire werking wordt buffervloeistof aangezogen. Serum eiwitten en aan antistof gebonden insuline migreren met de vloeistofstroom, terwijl vrij insuline op de opbrengplaat wordt gefixeerd. Nadat een afstand van \pm 7 cm is afgelegd (duur \pm 1 uur) is de scheiding voldoende.
De papierstroken worden gedroogd en in twee delen geknipt op 3 cm voor en voorbij de opbrengplaats (deel I) en enige centimeters voor bij de markering (broomphenolblauw) (deel II).
Uit radioactiviteits meting van de beide strookdelen kan het percentage gebonden insuline worden berekend.
Uit de radioactiviteitsmeting van de contrôle stroken (normaal humaan serum) kan worden berekend welk percentage radio-insuline is beschadigd. Deze beschadiging moet bij de berekening van het bindingspercentage als correctie worden toegepast.
De bindings capaciteit wordt uitgedrukt in het aantal eenheden insuline dat door één liter serum kan worden gebonden.

LABELING VAN FIBRINOGEEN MET ^{125}J OF ^{131}J

=====

Benodigde reagentia

1. fibrinogeen oplossing van $\pm 0,4\%$ (controleer of de stolbaarheid voldoet aan de gestelde eisen)
2. Na^{125}J of Na^{131}J oplossing 2 mCi in 0,05 ml, vrij van reductie middelen
3. K J oplossing 0,025 g per liter
4. K J oplossing 15%
5. H_2SO_4 2 N
6. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ p.a.
7. fosfaatbuffer 0,2 M pH 8.2
8. Na Cl oplossing 0,9%
9. Na Cl oplossing 10%
10. Amberlite hars IRA-401 (Cl.)
11. 20% albumine oplossing
12. trichloorazijnzuur oplossing
13. vast koolzuur
14. aceton

Apparatuur

Vacuumdestillatie apparaatje bestaande uit twee kolfjes verbonden door een U buisje met afzuig kraantje, voorzien van een verwarmings spiraaltje van $\pm 30^\circ\text{C}$.

In kolfje I wordt gebracht: 0,05 ml (2 mCi) Na radio J

0,30 ml KJ 0,025%

0,60 ml H_2SO_4 2 N

0,30 ml fosfaatbuffer 0,2 M pH 8.2

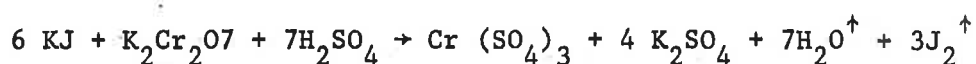
Dit mengsel bevriezen in aceton-koolzuur sneeuw.

Op dit bevroren mengsel worden enige kristallen kaliumbichromaat gedaan. Het kolfje wordt nu bevestigd aan het U buisje (vacuum dicht) evenals het lege kolfje II, en de verwarmingsspiraal aangesloten.

Het geheel wordt nu vacuum gezogen (druk 2 à 1½ mm Hg) terwijl het mengsel in kolfje I bevroren wordt gehouden.

De kraan naar de vacuumpomp wordt gesloten.

Nu wordt kolfje II afgekoeld met aceton-koolzuur sneeuw terwijl kolfje I voorzichtig wordt verwarmd. De inhoud smelt en het kalium bichromaat lost op in dit mengsel, waarbij J² vrijkomt en destilleerd naar kolfje II.



Na + 15 min. is alle J₂ over gedestilleerd.

Aan het over gedestilleerde mengsel wordt onder voortdurend roeren toegevoegd 3 ml fibrinogeen oplossing (0,4%), druppels gewijs.

Hierna wordt toegevoegd 0,1 ml KJ 15%

15 min. laten staan en vervolgens het radiofibrinogeen scheiden van het niet gereageerde jodium met hars IRA 401 Cl.

Uitvoering

3 g IRA 401 korrelen in een met 0,9% NaCl gevulde kolom. Enige tijd spoelen met 0,9% NaCl en hierna 1 x doorspoelen met 10% NaCl en vervolgens weer spoelen met ruime hoeveelheid Na Cl 0,9%.

Hierna 1 ml 20% HSA oplossing op de kolom gevolgd door 1 ml NaCl 0,9%.

De kolom nog net niet droog laten vallen en voorzichtig het reactie mengsel opbrengen. Langzaam laten lopen (druppels gewijs). Als de kolom weer bijna droogvalt het eluaat opnieuw op de kolom brengen.

Het eluaat opvangen in maatglasje, de kolom geheel leeg laten lopen.

Het gelabelde fibrinogeen testen op TCA praecipitatie en stolbaarheid. Voor intraveneuse toepassing alle oplossingen en glaswerk voor zover mogelijk steriel en het eindproduct steriliseren met een kleine Seitz filter welke vooraf is gespoeld met de onbehandelde fibrinogeen oplossing. (om adsorptie aan het asbest filterplaatje te beperken)

LABELING INSULINE MET ^{125}J OF ^{131}J
 =====

Benodigde reagentia

Boraat buffer : 0,2 M pH 8.0

HCl : 1/200 N

Chloramine T : 100 mg in 50 ml boraatbuffer

Natrium metabisulfiët: 60 mg in 50 ml boraatbuffer

Insuline oplossing : $\frac{1}{2}$ tot 1 mg insuline oplossen in $\frac{1}{2}$ ml HCl 1/200
 Na oplossen verdunnen met 2 ml boraatbuffer

Na ^{125}J of Na ^{131}J oplossing: 2-5 mCi in een volume van 0,05-0,10 ml
 NaOH (0,02-0,04 N) zonder drager jodide en
 zonder reductie middelen.

Aan de Natriumradiojodide oplossing wordt toegevoegd 0,025 ml insuline oplossing en daarna 0,025 ml chloramine T oplossing.

Na één minuut mengen wordt aan dit mengsel toegevoegd 0,1 ml Natriummetabisulfiët oplossing en tenslotte 0,2 ml boraatbuffer. De totale inhoud wordt overgebracht in een \pm 20 cm lange dialyseslang (Visking 8/32") en gedurende twee uur bij $+4^{\circ}\text{C}$ in 2 ltr aq.dest gedialyseerd.

Na een half uur wordt de dialysevloeistof ververst.

Inmiddels wordt een kolom gemaakt van sephadex G75 medium die tevoren is gewassen met een gebufferde fysiologische zout oplossing en daarin gedurende 24 uur heeft kunnen zwellen.

De kolom (25x1 cm) wordt geequibreerd met gebufferd zout met 0,25% humaan serum albumine.

Aan de gedialyseerde radio-insuline oplossing wordt 120 μltr normaal plasma toegevoegd en na enkele minuten wordt het geheel op de kolom gebracht en bij $+4^{\circ}\text{C}$ met behulp van een fractiecollector geelueerd met gebufferd zout + 0,25% HSA.

Loopsnelheid 4 druppels per minuut en collectietijd per fractie 10 min. (40 druppels). In iedere fractie wordt de radioactiviteit bepaald en uitgezet in een grafiek (+ 30 fracties).

De eerste piek is de aan eiwitgebonden afbraakproducten van insuline, de tweede piek het intacte radio-insuline. De beste fracties worden bewaard bij -20°C en kunnen worden gebruikt voor de bepaling van insuline antistoffen, autoradiografie etc.

Bij deze methode van labelen is gebleken dat de immunologische eigenschappen van het radio-insuline niet merkbaar zijn veranderd, de biologische activiteit is echter wel achter uitgegaan.