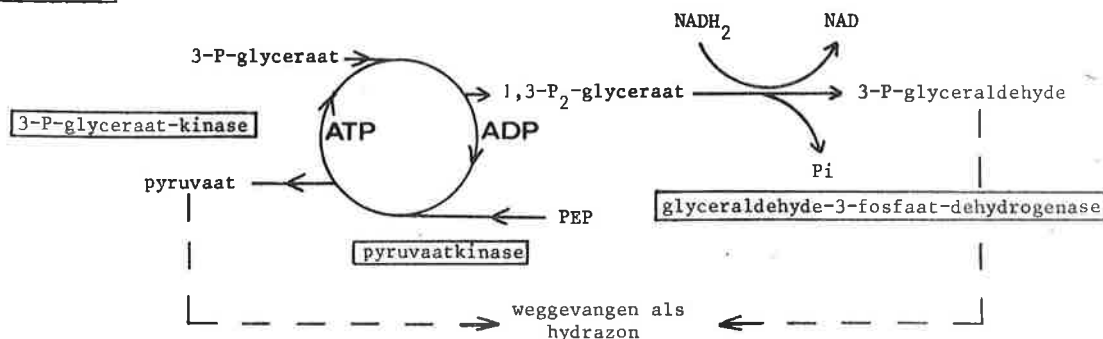


DE ENZYMATISCHE BEPALING VAN ATP + ADP

Literatuur:

J.A. Loos en H.K. Prins, Biochim. Biophys. Acta, 201 (1970) 185-195

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing

Er wordt een voorraadoplossing gemaakt van 0,25 M Tris in aqua bidest., (15,1 g Tris op 500 ml water). Deze oplossing wordt met gec. HCl op pH 7,4 gebracht en bewaard in de koude cel. Naar behoefte wordt de reagentoplossing gemaakt door 10 maal te verdunnen met aqua bidest.

Aan deze 0,025 M Tris oplossing wordt per 500 ml 1 druppel Levor-IV toegevoegd en 0,5 ml 0,1 M EDTA. De pH wordt gebracht op 7,4 (bij 25°C). De oplossing wordt verder Tris-buffer(I) genoemd.

50 µM NADH-oplossing, 100 ml

35,5 mg NADH (= nicotine-amide -adenine-dinucleotide, reduziert) oplossen in 10 ml Tris-buffer(I) geeft 5 mM. 1 ml 5 mM aanvullen tot 100 ml met Tris-buffer(I) geeft 50 µM.

Substraatoplossing

Substraatoplossingen zijn kant-en-klaar ingevroren aanwezig.

Deze worden in hoeveelheden van 150 ml bereid en in porties van 10 ml in buizen ingevroren.

Voor 150 ml is nodig:

PEP (= fosfo-enolpyruvaat)	164 mg
3-PG (= glyceraat-3-fosfaat)	760 mg
KCl	7400 mg
MgSO ₄ . 7 aq	7360 mg
Hydrazine-hydraat	2000 mg

N.B.

Het verdient aanbeveling om bij de bereiding van het substraat, eerst het zoutmengsel + hydrazine op te lossen en dan de fosfaatesters erbij te voegen.

Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 150 ml.

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met duidelijke vermelding van de datum van gebruik.

Enzymoplossing, 10 ml

PGADH (= glyceraldehyde-3-fosfaat-dehydrogenase)	0,16 ml
PGK (= 3-fosfo-glyceraatkinase)	0,06 ml
PK (= pyruvaatkinase)	0,06 ml
albumine 20%	0,20 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ / Na ₂ P ₂ O ₇ (3,4 M / 0,04 M)	0,40 ml
Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 10 ml	9,12 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Standaardoplossingen

Voor witte cellen: Deze zijn gekombineerd met lactaat en bevatten 6-12-18-24-30 µM ATP. De standaarden zijn ingevroren aanwezig en moeten nog ca 30x verdund worden met de Autodiluter.

Voor rode cellen: Deze zijn ook gekombineerd met lactaat en bevatten 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0 µM ATP. De standaarden zijn ingevroren aanwezig en behoeven NIET verdund te worden.

Bereiding van de standaarden

Zie het voorschrift voor de lactaatbepaling (730/37)

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten
bij deze bepaling (BOEHRINGER)

PEP (fosfo-enolpyruvaat)	: 15296 SPAA
3-PG (3-fosfoglyceraat)	: 15175 SGAP
PGADH (glyceraldehyde-3-fosfaat-dehydrogenase) 10 mg/ml enzym	: 15146 EGAN
PGK (3-fosfoglyceraat-kinase) 10 mg/ml enzym	: 15745 EPAP
PK (pyruvaat-kinase) 10 mg/ml enzym	: 15744 EPAU

STARTEN VAN DE BEPALING MET EEN NAD(P)H_2 -KONSUMEREND SYSTEEM =====

(Zie ook voorschriften 730/30, 730/31 en 730/32)

Voer de laatste controle uit met behulp van de "checklist". (730/32 blz.3)

Kies het kanaal waarmee men de bepaling uit wil voeren, één kanaal (het rechtse) is gemarkeerd met blauwe pleistertjes (op naald, pomp, optisch gedeelte, versterker en recorder).

Zorg ervoor dat de standaarden en de eerste groep monsters ontdood in het ijsbad staan.

Houdt nu het volgende tijdschema aan

TIJD (min)	HANDELINGEN
0	Bufferslang uit spoelvroelstof halen, afvegen en tot onder in de bufferoplossing steken. Kijk of er een luchtbel door de slang gaat. Zet met een stukje pleister de slang aan de rand van de fles vast, zodat de slang er niet uit kan schieten. Zet ook alvast een aantal monstercups op de monsterplaat, (MET EEN PINCET UIT DE LADE HALEN), en merk de rand van de watercups met een viltstift.
3	Substraatslang uit de spoelvroelstof halen, afvegen en tot onder in de substraatoplossing steken, kijken of de slang trekt en de slang vastzetten. (De luchtbel doet er 3 min. over om de cactus te bereiken). Vul de watercups met levor-water uit het bekeerglas met een pasteurpipet. Vul ook de eerste pilot.
6	Enzymslang uit de spoelvroelstof halen, afvegen en tot onder in de enzymoplossing steken, kijken of de slang trekt en de slang vastzetten.
8	Zet de SAMPLER aan. Doe de pennen omlaag (RECORDER) en zet het papier aan. Het eerste watermonster wordt nu opgezogen.

9	Tweede watermonster wordt opgezogen.
10	De hoogste standaard wordt opgezogen. Door de fluorescentie van de NAD(P)H_2 in de bufferoplossing zal nu de basislijn gaan verschuiven. Op de meter en de recorder wordt nu als volgt de uitslag op ca. 90 gebracht. VERSTERKER: als bij de voltageknop in stand I de meter van de schaal loopt wordt door draaien aan de kontinu instelbare spleet (op de optische eenheid) het licht zover "geknepen" dat de meter op ca. 90 komt. Bij een meteruitslag van minder dan 30 kan met de voltageknop de versterking vergroot worden en daarna eventueel de lichtopbrengst "geknepen" met (S). RECORDER: met de knoppen voor trapsgewijze en continue versterking kan de pen op ca. 90 gebracht worden.
11	Watermonster wordt opgezogen.
12	Watermonster
13	Hoogste standaard. Tweede maal
14	Watermonster
15	Watermonster
16	Laagste standaard. Door de eigen fluorescentie van het substraat zal de totale fluorescentie nog iets toenemen en de uitslag op meter en recorder zal 95 à 100 worden. Direkt daarna komt het enzym het systeem uit en door de vorming van het substraatenzymkomplex ($\text{E} + \text{S} = \text{ES}$) of door autokatalytische vorming van de te bepalen componenten, b.v. 2,3 DPG uit 3-PG en fosfoglyceraat mutase zal de fluorescentie weer iets afnemen. Indien nodig kan op de RECORDER (met de continue versterking) de uitslag weer op 90 gebracht worden.

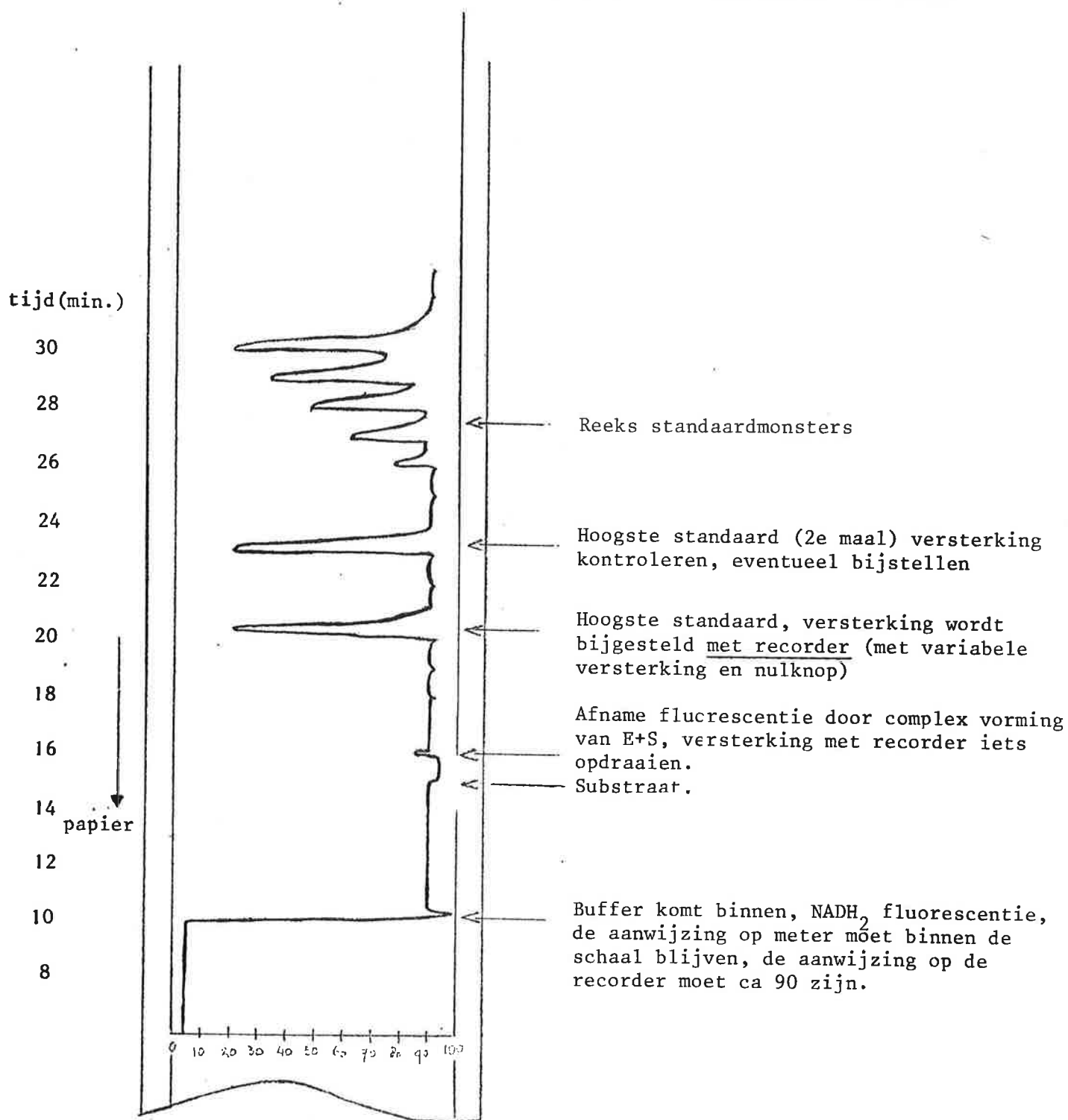
17	2e standaard opgezogen
18	3e standaard
19	4e standaard
20	hoogste standaard. Op dit moment zal de piek van de pilot op de recorder verschijnen, we zien een AFNAME van de fluorescentie, we hebben immers een konsumerend systeem. Als de top van de piek niet tot ca. 20 komt moet met de RECORDER de versterking opgevoerd worden. Als we zonder meer de versterking vergroten zal de pen van het papier lopen. Dit laatste kan voorkomen worden door de nul-instelling van de recorder te veranderen, we verschuiven dus a.h.w. het papier t.o.v. de pen. Men gaat daarom als volgt te werk. Als de piek bijna op de top is wordt met de NULKNOP de piek verder uitgerekt tot even onder de nulwaarde (dus beneden 0 schaaldelen). Nu wordt gewacht tot de pen weer teruggekeerd is tot de basislijn, <u>die nu niet meer bij 90 ligt</u>. (Dit is bij het tweede watertje na de hoogste standaard).
21	watermonster
22	watermonster. Zet de SAMPLER uit als deze in de spoelstand is teruggekomen. <u>Als bij $t = 20'$ de versterking met de RECORDER veranderd was moet nu de basislijn hersteld worden.</u> Dit doet men door met de continue (of trapsgewijze) versterking de basislijn weer op ca. 90 te brengen. (Pas nu heeft men dus de versterking vergroot).
23	De piek van de hoogste standaard verschijnt voor de tweede maal; de versterking kan nu gecontroleerd en eventueel nog iets bijgesteld worden, op dezelfde manier als de eerste keer.

Wacht nu tot de standaarden op de recorder komen en beslis dan of de bepaling voortgezet wordt. Zo ja, begin dan met twee watermonsters en dan de eerste groep monsters, enz.

GOOI GEEN MONSTERS WEG VOORDAT DE UITSLAG OP DE RECORDER VERSCHENEN IS !!

Voorbeeld van een recorder-sheet bij een NADH_2 -konsumerend systeem

LEES DE TEKST VAN ONDER NAAR BOVEN

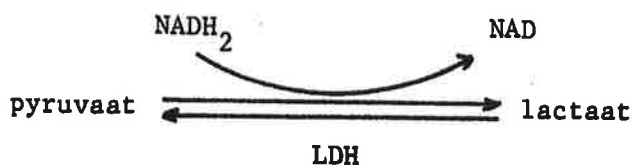


ENZYMATISCHE BEPALING VAN PYRUVAAAT =====

Literatuur:

T. Bücher e.a. in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 253,
H. Bergmeyer ed., Verlag Chemie, Weinheim.

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing: 2,5 μ M NADH₂-oplossing

0,05 ml 5 mM NADH₂ in 100 ml Tris-buffer(I)

Substraatoplossing:

Bij deze bepaling wordt geen substraat gebruikt, de substraatlijn blijft in de spoelvroestof.

Enzymoplossing:

LDH (= lactaatdehydrogenase)	0,017 ml
albumine 20%	0,4 ml
aanvullen met Tris-buffer(I) tot 10 ml	9,6 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Standaardoplossingen (zijn + 2 dagen bij 0°C houdbaar!)

De standaarden worden meestal gemaakt in combinatie met glycerol standaarden.

a) Weeg af 5,6 mg pyruvaat en los op in 10 ml $H_2O \Rightarrow 5$ mM.

1 ml 5 mM + 9 ml $H_2O \Rightarrow 10$ ml 0,5 mM

b) Pipetteer dan:

0,5 mM pyruvaat: 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 ml

H_2O : 1,9 1,8 1,7 1,6 1,5 1,4 ml

concentratie : 25 50 75 100 125 150 μ M

c) Verdun deze met de korresponderende glycerolstandaarden

d) Verdun het totaal met de Autodiluter ca. 30x

N.B. Indien geen gekombineerde standaarden (dus met glycerol) worden gemaakt, worden de standaarden niet aangevuld (b) tot 2 ml met H_2O maar tot 4 ml en vervalt (c).

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten bij deze bepaling (BOEHRINGER)

$NADH_2$ (nicotine-amide-adenine-dinucleotide, reduziert) : 15142 CNAB

LDH (lactaat-dehydrogenase) 10 mg/ml enzym : 15371 ELAC

Na-pyruvaat : 15685 SPAD

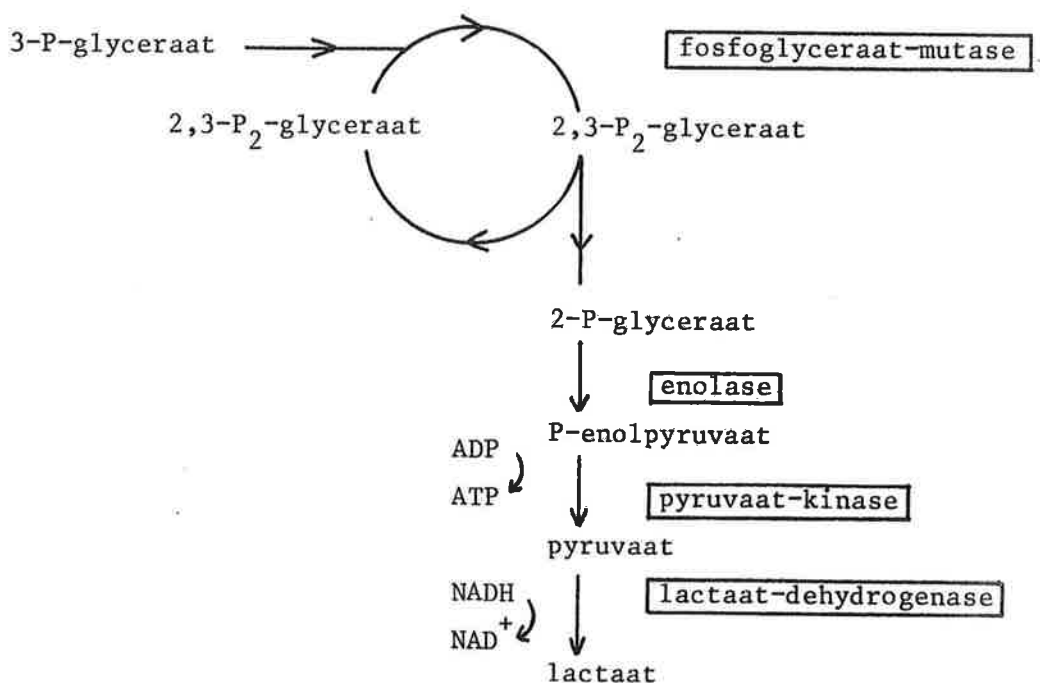
Voor de uitvoering van de bepaling zie bij ATP + ADP. (730/33)

ENZYMATISCHE BEPALING VAN 2,3-DIFOSFO-GLYCERAAT =====

Literatuur:

J.A. Loos en H.K. Prins, Biochim. Biophys. Acta, 201 (1970) 185-195

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing

Als bufferoplossing wordt dezelfde buffer gebruikt als bij ATP + ADP, n.l. 0,025 M Tris, en het zelfde voorschrift voor de bereiding dient gevolgd te worden.

Voor witte cellen: 200 μ M NADH-oplossing, 100 ml

4 ml 5 mM NADH (zie ATP+ADP) aanvullen tot 100 ml met Tris(I).

Voor rode cellen: 250 μ M NADH-oplossing, 100 ml

5 ml 5 mM NADH aanvullen tot 100 ml met Tris-buffer(I).

Substraatoplossingen:

Substraatoplossingen zijn kant-en-klaar ingevroren aanwezig. Deze worden in hoeveelheden van 150 ml bereid en in porties van 10 ml in buizen ingevroren. Voor 150 ml is nodig:

15 buisjes gezuiverde 3-PG (= 60 μ M)	
ADP (= adenosine- 5'-difosfaat)	344 mg
KCl	730 mg
MgSO ₄ · 7 aq	750 mg

Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 150 ml.

Na gebruik wordt de rest van het substraat ingevroren met duidelijk vermeld de datum van gebruik.

Enzymoplossing

LDH (lactaat-dehydrogenase)	0,017 ml
PK (pyruvaat-kinase)	0,017 ml
PGM (fosfoglyceraat-mutase)	0,005 ml
enolase	0,017 ml
albumine 20%	0,4 ml
Aanvullen met Tris-buffer(I)	9,5 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Standaardoplossingen

Voor witte cellen: Deze zijn gekombineerd met GDP en bevatten 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 μ M.

De standaarden zijn ingevroren aanwezig en moeten nog + 30x met de Autodiluter verdund worden.

Voor rode cellen: Ook deze zijn gekombineerd met GDP en bevatten 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 μ M.

De standaarden zijn ingevroren aanwezig en moeten nog + 30x verdund worden.

Bereiding van de standaardoplossingen.

Het voorschrift voor de bereiding van de gekombineerde standaarden is bij de glucose-1,6-difosfaat bepaling aangegeven. (730/39)

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten
bij deze bepaling (BOEHRINGER)

NADH₂ (nicotine-amide-adenine-dinucleotide, reduziert) : 15142 CNAB
3-PG, dit wordt op het laboratorium gezuiverd van 2,3-DPG
met behulp van kolomchromatografie, hiervoor is een
apart voorschrift bijgevoegd.

ADP (adenosine-5'-difosfaat)		: 15014 NAAG
LDH (lactaat-dehydrogenase)	10 mg/ml	: 15371 ELAC
PK (pyruvaat-kinase)	10 mg/ml	: 15744 EPAU
PGM (fosfoglyceraat-mutase)	5 mg/ml	: 15432 EPAQ
enolase	10 mg/ml	: 15327 EEAA

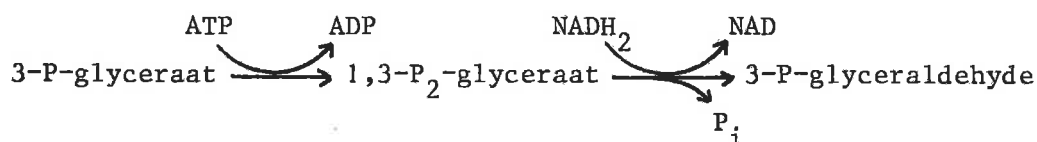
Voor de uitvoering van de bepaling zie bij ATP + ADP. (730/33)

ENZYMATISCHE BEPALING VAN 3-FOSFOGLYCERAAT =====

Literatuur:

R. Czok, L. Eckert in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 224,
H.U. Bergmeyer ed., Verlag Chemie, Weinheim.

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing: 50 μM NADH_2 -oplossing.

Zie voor de bereiding het voorschrift voor de ATP + ADP bepaling. (730/33)

Substraatoplossing: 15 ml.

ATP (adenosine-5'-trifosfaat)	43 mg
KCl	740 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq}$	736 mg

Oplossen in 15 ml Tris-buffer(I).

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met
duidelijk vermeld de datum van gebruik.

Enzymoplossing: 10 ml.

PGADH (glyceraldehyde-3-fosfaat-dehydrogenase)	0,20 ml
PGK (3-fosfoglyceraat-kinase)	0,07 ml
albumine 20%	0,25 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (3,4 M/0,04 M)	0,5 ml
Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 10 ml.	9,00 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van de enzymoplossing in de koel-
kast bij $+4^\circ\text{C}$ weggezet met duidelijk vermeld de datum van bijeen
pipetteren.

Standaardoplossingen:

a) Weef af 4 mg 3-PG (BOEHRINGER 15175 SCAP) en los op in 10 ml

$H_2O \rightarrow 2$ mM.

b) Pipetteer:

2 mM 3-PG	0,30	0,60	0,90	1,20	1,50 ml
H_2O	1,70	1,40	1,10	0,80	0,50 ml
concentratie	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5 mM

c) Na ca. 30x verdunnen met de Autodiluter zijn de eindconcentraties:

10 20 30 40 50 μ M.

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten
bij deze bepaling (BOEHRINGER)

PGADH (glyceraldehyde-3-fosfaat-dehydrogenase)	10 mg/ml enzym	: 15146 EGAN
PGK (3-fosfoglyceraat-kinase)	10 mg/ml enzym	: 15745 EPAP
ATP (adenosine-5'-trifosfaat)		: 15028 NAAH

Voor de uitvoering van de bepaling zie bij ATP + ADP. (730/33)

Spektrofotometrische 3-PG bepalingReagentia:

Zie voorschrift gemechaniseerde 3-PG bepaling.

Uitvoering:

Maak van de geneutraliseerde kolomfrakties een 100-voudige verdunning en pipetteer dan in 2 cuvetten (1 cm lichtweg, glas)

0,025 M Tris-HCl-buffer(I)	0,5 ml
200 μ M NADH ₂ in Tris-buffer(I)	1,6 ml
enzymoplossing	0,25 ml
100-voudig verd. oplossing	0,5 ml

Na mengen met een plastic roerstaafje wordt de extinctie bij 340 nm tegen een waterblanco gemeten in de VITATRON fotometer (laat de recorder 5 min. lopen).

Daarna voegt men 0,15 ml substraatoplossing toe aan beide cuvetten en na mengen wordt de extinctie bij 340 nm vervolgd tot deze constant geworden is.

Berekening:

De afstand op het recorderpapier tussen het signaal van de blanco en dat van de beide cuvetten vòòr de toevoeging van substraat is E_I

De afstand op het recorderpapier tussen het signaal van de blanco en dat van de beide cuvetten nà toevoeging is E_{II} , $\Delta E_{340} = E_I - E_{II}$ (2.85/3.00)

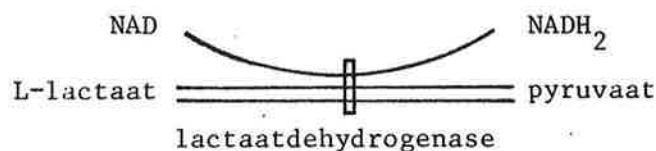
$$\frac{(100)(0.161)(\Delta E_{340})(3.00)}{0,5} = \mu\text{mol 3-PG/ml "gepoolde" kolomfrakties.}$$

ENZYMATISCHE BEPALING VAN MELKZUUR

Literatuur:

H.J. Hohorst, Biochem. Z., 328 (1957) 328

Principe:



Reagentia

Bufferoplossing, glycine-hydrazine-buffer

75,04 g glycine + 1,86 g EDTA oplossen in ca. 400 ml aqua bidest, hierbij 20,04 g hydrazine voegen en aanvullen tot 1000 ml.

Deze stockoplossing wordt in de koude cel bewaard. Eén deel van deze oplossing + 2 delen aqua bidest wordt op pH 9.5 gebracht met 5 N NaOH en dient als bufferoplossing voor deze bepaling.

Substraatoplossing

Substraatoplossingen zijn kant-en-klaar ingevroren aanwezig.

Deze worden in hoeveelheden van 150 ml bereid en in porties van 10 ml in buizen ingevroren. Voor 150 ml is nodig:

384 mg NAD (= nicotine-amide-adenine-dinucleotide) opgelost in 150 ml Tris-buffer(I) (zie ATP + ADP).

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met duidelijk aangegeven de datum van gebruik.

Enzymoplossing 10 ml

LDH (lactaat-dehydrogenase) 0,17 ml

albumine 20% 0,40 ml

Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 10 ml 9,43 ml

Na gebruik wordt de rest van de enzymoplossing in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten
bij deze bepaling (BOEHRINGER)

LDH (lactaat-dehydrogenase) 10 mg/ml : 15371 ELAC

NAD (nicotine-amide-adenine-dinucleotide) : 15298 CNAL

Standaardoplossingen

Als stockoplossing wordt een (enzymatisch gestelde) 10^{-2} M L-lactaat-oplossing gebruikt.

Voor witte cellen worden lactaat en ATP+ADP standaarden gecombineerd.

De volgende standaardoplossingen zijn ingevroren aanwezig:

<u>standaard</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
ATP+ADP	6	12	18	24	30 μ M
L-lactaat	600	1200	1800	2400	3000 μ M

Vlak voor gebruik worden de standaardoplossingen ontdooid en $\pm$ 30 maal verdund met behulp van een Autodiluter.

Voor de rode cellen worden de lactaat en de ATP+ADP standaardoplossingen ook gecombineerd. De volgende standaardoplossingen zijn ingevroren aanwezig:

<u>standaard</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
ATP+ADP	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0 μ M
L-lactaat	1	2	3	4	5 μ M

Vlak voor de meting worden de standaarden ontdooid en direkt gebruikt.

Bereiding van de standaardoplossingen

a) 10^{-2} M L-lactaat: 374 mg 60% lactaatoplossing (een racemaat, natriumzout) wordt tot 100 ml met aqua dest aangevuld. Spectrofotometrisch wordt het lactaatgehalte nu als volgt bepaald: Maak een 0.2 mM oplossing door 0.2 ml 10^{-2} M L-lactaat oplossing met 9.8 ml H_2O te mengen. Pipetteer nu in twee cuvetten met een weglengte van 1 cm;

glycine-hydrazine buffer pH 9.5	2.00 ml	2.00 ml
NAD-oplossing (substraatoplossing)	0.80 ml	0.80 ml
monster	0.50 ml	0.50 ml

De inhoud van de cuvetten wordt gemengd met een plastic roerstaafje (afvegen langs de cuvetrand); daarna wordt in de Vitatron fotometer bij 340 nm de extinctie gemeten tegen een waterblanco (laat de recorder 5 minuten schrijven). Pipetteer nu in beide cuvetten 0.04 ml melkzuurdehydrogenasesuspensie (5 mg/ml enzym), meng opnieuw en schrijf de extinctie tot geen verandering meer optreedt.

Berekening

E_I is de afstand op het recorderpapier tussen het signaal van de blanco en dat van beide cuvetten vóór de toevoeging van het enzym.
 E_{II} is de afstand tussen het signaal van de blanco en dat van beide cuvetten nadat het enzym was toegevoegd en het signaal constant was geworden.

$$\Delta E_{340 \text{ nm}} = E_{II} - (E_I) \cdot (3.30/3.34)$$

$$\frac{(50) \cdot (0.161) \cdot (\Delta E_{340 \text{ nm}}) \cdot (3.34)}{0.5} = \mu\text{mol L-lactaat/ml in de oorspronkelijke } 10 \text{ mM lactaat-oplossing}$$

b) 10^{-2} M ATP stockoplossing: 30.9 mg ATP wordt in 5 ml H_2O opgelost. Van elke nieuwe partij ATP-poeder wordt het gehalte spectrofotometrisch gechecked met de enzymatische methode (voorschrift 0540/24, pg 5). In plaats van de daar aangegeven hoeveelheden pipetteert men nu het dubbele, men gebruikt cuvetten van 1 cm lichtweg en de VITATRON fotometer.

Als monster gebruikt men i.p.v. extract, 0.2 mM ATP-oplossing bereid uit de stockoplossing.

Berekening (zie voorschrift 0540/24)

$$-\Delta E_{340 \text{ nm}} = E_{\text{II}} - (E_{\text{I}}) \cdot (2.42/2.45)$$

$$\frac{(50) \cdot (0.161) \cdot (\Delta E_{340 \text{ nm}}) \cdot (2.45)}{0.3} = \mu\text{mol ATP/ml van de stockoplossing}$$

Als het gehalte te laag is wordt, gebruik makend van het nu bekende gehalte, opnieuw een 10^{-2} M standaard ATP-oplossing gemaakt; als het gehalte te hoog is wordt de stockoplossing tot exact 10^{-2} verdund.

De standaarden worden nu als volgt gemaakt:

1) Maak 10^{-4} M ATP-oplossing door 0.1 ml 10^{-2} M ATP met 9.9 ml H_2O te verdunnen.

2) Pipetteer nu de volgende mengsels (lymfocyten standaarden):

<u>standaard</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
10^{-2} M L-lactaat	0.12 ml	0.24 ml	0.36 ml	0.48 ml	1.20 ml
10^{-4} M ATP	0.12	0.24	0.36	0.48	1.20
H_2O	1.76	1.52	1.28	1.04	1.60

Deze oplossingen worden bij -20°C bewaard.

De standaarden voor de erythrocyten worden als volgt gemaakt:

1) Maak een 2 mM ATP-oplossing door 2 ml 10^{-2} M ATP met 8 ml H_2O te mengen.

2) Pipetteer nu de volgende mengsels (erythrocytenstandaarden)

<u>standaard</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
2 mM ATP	0.10 ml	0.20 ml	0.30 ml	0.40 ml	0.50 ml
10^{-2} M L-lactaat	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
H_2O	0.80	0.60	0.40	0.20	---

Na mengen wordt elk van deze oplossingen 1000 maal verdund en verdeeld in porties van 5 ml bij -20°C bewaard.

Starten van de bepaling met een $\text{NAD(P)}\text{H}_2^-$ genererend systeem

Voer de laatste kontrôle uit met behulp van de "checklist". (730/32 blz.3)

Kies het kanaal, waarmee men de bepaling uit wil voeren; één kanaal (het rechtse) is gemarkeerd met blauwe pleistertjes (op naald, pomp, optisch gedeelte, versterker en recorder).

Zorg er voor dat de standaarden en de eerste groep monsters ontdood in het ijsbad staan.

Houdt nu het volgende tijdschema aan:

TIJD (min)	HANDELINGEN
0	Bufferslang uit spoelvroeststof halen, afvegen en tot onder in de bufferoplossing steken. Kijk of er een luchtbel door de slang gaat. Zet met een stukje pleister de slang aan de rand van de fles vast, zodat de slang er niet uit kan schieten. Zet ook alvast een aantal monstercups op de monsterplaat, (MET EEN PINCET UIT DE LADE HALEN), en merk de rand van de watercups met een viltstift.
3	Substraatslang uit spoelvroeststof halen, afvegen en tot onder in de substraatoplossing steken, kijken of de slang trekt, en de slang vastzetten. (De luchtbel gaat langzaam en doet er 3 min. over om de cactus te bereiken). Vul de watercups met levor-water uit het bekerglas met een pasteurpipet. Vul ook de eerste pilot.
6	Enzymslang uit spoelvroeststof halen, afvegen en tot onder in de oplossing steken, kijken of de slang trekt en de slang vastzetten.
8	Zet de SAMPLER aan, doe de pennen van de RECORDER omlaag en zet het papier aan. Het eerste watermonster wordt nu opgezogen.
9	Tweede watermonster wordt opgezogen

10	De hoogste standaard wordt opgezogen. Door de luchtbel, die ontstond bij het overzetten van de buffer-slang kan de basislijn op de recorder even verstoord worden, maar deze zal vanzelf weer hersteld worden.
11	Watermonster wordt opgezogen
12	Watermonster
13	Hoogste standaard, tweede maal
14	Watermonster
15	Watermonster
16	Laagste standaard. De basislijn op de recorder zal gaan verschuiven door de eigen fluorescentie van het substraat, gevolgd door een verschuiving door de eigen fluorescentie van het enzym. Door een tegenspanning op de meter te zetten met de nulknop van de VERSTERKER kan deze basisfluorescentie onderdrukt worden. Aangezien echter de uitgang van de versterker onafhankelijk van de meter werkt moet ook op de RECORDER met de nulknop het basisniveau opnieuw ingesteld worden.
17	2e standaard
18	3e standaard
19	4e standaard
20	Hoogste standaard. Op dit moment zal op de meter en de recorder een piek verschijnen, nl. de piek van de hoogste standaard. Met de voltageknop op de VERSTERKER (fig. 3 knop 3) wordt de meteruitslag binnen de schaal gehouden. Staat deze knop al in de laagste stand, knijp dan het licht met de kontinu instelbare spleet (S) aan de zijkant van het

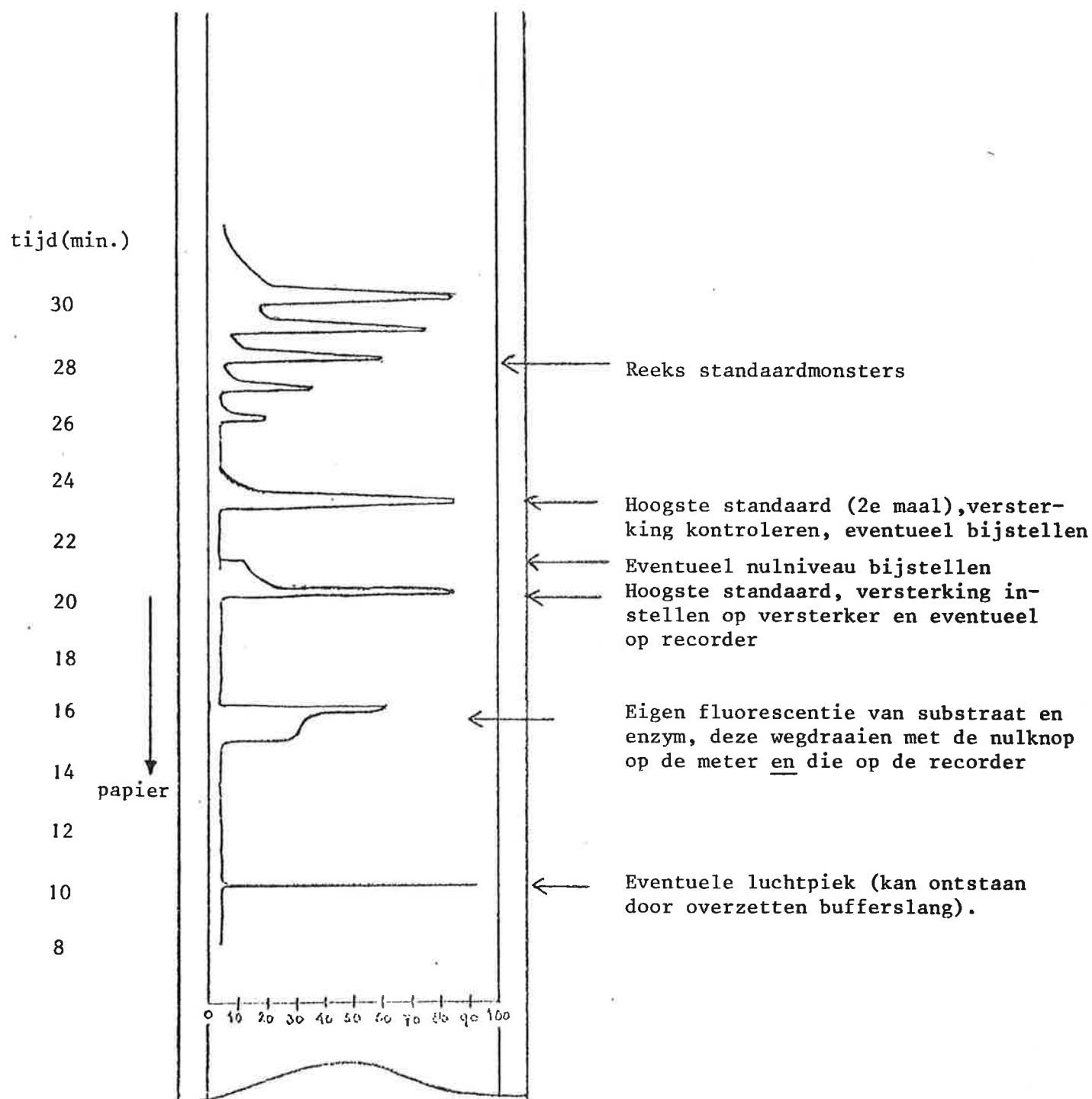
	optisch gedeelte. Breng indien nog nodig met de continue en trapsgewijze versterking van de RECORDER de penuitslag op ca 90. Het spreekt vanzelf dat dit snel moet gebeuren; de piek blijft maar kort op het hoogste punt. In het algemeen wordt de spanning over de fotomultiplier van te voren zo ingesteld, dat alleen met de RECORDER de versterking ingesteld hoeft te worden.
21	Watermonster
22	Watermonster Als de SAMPLER nu terug is in de spoelstand zet hem dan uit. Als bij t =20' de voltageknop op de VERSTERKER en/of de versterking op de RECORDER verdraaid is, moet nu het nulniveau op de VERSTERKER en de RECORDER opnieuw ingesteld worden. Immers niet alleen de piekuitslag is veranderd, maar ook de basis fluorescentie van substraat en enzym.
23	De piek van de hoogste standaard verschijnt voor de tweede maal, de versterking kan nu gecontroleerd en eventueel nog iets bijgesteld worden met de RECORDER.

Wacht nu tot de standaarden uit de recorder komen en beslis dan of de bepaling voortgezet wordt. Zo ja, begin dan met twee watermonsters en dan de eerste groep monsters enz.

GOOI GEEN MONSTERS WEG VOORDAT DE UITSLAG OP DE RECORDER VERSCHENEN IS !!

Voorbeeld van een recorder-sheet bij een NADH_2 -producerende bepaling

LEES DE TEKST VAN ONDER NAAR BOVEN

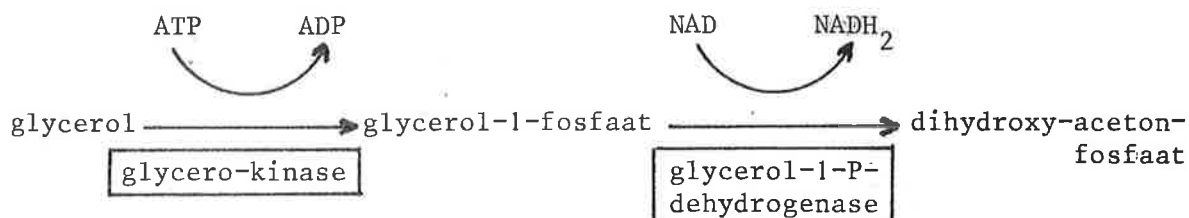


ENZYMATISCHE BEPALING VAN GLYCEROL + GLYCEROL-1-FOSFAAT

Literatuur:

O. Wieland in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 211,
H. Bergmeyer ed., Verlag Chemie, Weinheim.

Principe:



Reagentia:

Glycine-hydrazine buffer

Zie bij de melkzuur bepaling (730/37)

Substraat oplossing 15 ml

ATP (= adenosine-5'-trifosfaat)	42,3	mg
NAD (= nicotine-amide-adenine-dinucleotide)	46,3	mg
MgSO ₄ · 7 aq	736	mg

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met
duidelijk aangegeven datum van gebruik.

Enzymmengsel

LET GOED OP: De hier gebruikte enzymen worden vaak in wisselende sterkte
geleverd ¹⁾

glycerol kinase	bij 2 mg/ml enzym	0,05	ml
	of bij 5 mg/ml enzym	0,03	ml
glycerol-1-fosfaat dehydrogenase	bij 2 mg/ml enzym	0,24	ml
	of bij 10 mg/ml enzym	0,048	ml
albumine 20%		0,2	ml

1) Voor bepaling van de optimale enzymconcentratie
zie het algemene voorschrift.

Aanvullen met Tris-buffer(I) tot 10 ml. (Afhankelijk van de sterkte van de gebruikte enzymen).

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Standaardoplossingen

Deze worden meestal gekombineerd met pyruvaat gebruikt.

a) Weeg af 0,92 g glycerol (Brocades) en vul aan tot 1 liter met



b) 3,6 ml 10 mM + 6,4 ml $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 3,6 \text{ mM}$

c) 1 ml hiervan + 9 ml $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 360 \text{ } \mu\text{M}$

d) Pipetteer

360 μM :	1	1	1	1	1	0,5 ml
H_2O :	1	1,4	2	3	5	5,5 ml
geeft :	180	150	120	90	60	30 μM

e) Verdun deze 1:1 met de korresponderende pyruvaatstandaarden.

f) Verdun het totaal met de Autodiluter ca. 30 maal.

N.B.

1.- Indien de standaarden niet in combinatie worden gebruikt (dus met pyruvaat) worden de standaarden uit (d) 1:1 met H_2O verdund en vervalt (e)

2.- De werkelijke concentratie van de glycerol standaarden is x % hiervan, want de geconcentreerde glyceroloplossing is verwaterd. Om de juiste waarde van x vast te stellen doet men een spectrofotometrische bepaling. Een voorschrift hiervoor is op de volgende bladzijde.

Sterkte en bestelcodes van gebruikte enzymen en substraten

bij deze bepalingen (BOEHRINGER)

ATP (=adenosine-5'-trifosfaat)	:	15028 NAAH	
NAD (=nicotine-amide-adenine-dinucleotide)	:	15300 CNAA	
glycerol kinase	2 mg/ml of 5 mg/ml	:	15746 EGAP
glycerol-1-fosfaat-dehydrogenase	2 mg/ml of 10 mg/ml	:	15135 EGAQ
VOOR DE UITVOERING VAN DE BEPALING ZIE DE MELKZUUR-BEPALING (730/37)			

Spectrofotometrische bepaling

Men bepaalt van de 360 μ M glycerol-oplossing de werkelijke concentratie spectrofotometrisch op de volgende wijze.

Reagentia:1. glycine-hydrazine buffer pH 9.5

Weeg af 1,5 g glycine en spoel dit over in een maatkolf van 100 ml. Vul aan tot ca. 50 ml, en voeg dan 5 g hydrazine-hydraat-oplossing toe en 5,4 ml 0.37 M MgCl_2 -oplossing (zie lymfocyten voorschrift). Breng de pH met 5 N NaOH op pH 9,5 en vul daarna aan tot 100 ml.

2. 10 mM ATP (zie de ATP + ADP bepaling)3. 0,02 M NAD

Weeg af 13,3 mg NAD en los op in 1 ml water.

4. 0.37 M MgCl_2 -oplossing.Uitvoering:

Men pipetteert in cuvetten met een lichtweg van 1 cm:

	<u>blanco</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
glycine buffer	2	2	2
ATP, 10 mM	0,2	0,2	0,2
NAD, 20 mM	0,1	0,1	0,1
0.37 M MgCl_2	0,1	0,1	0,1
aqua bidest	0,3	---	---
360 μ M glycerol	---	0,3	0,3
glyc-1-P-dehydr.genase(2 mg/mlenzym)	0,03	0,03	0,03

Na mengen met een plastic roerstaaf meet men in de VITATRON fotometer de extinctie bij 340 nm van de cuvetten A en B tegen de blanco gedurende 5 min. (Met cuvettenwisselaar en schrijver)

Daar voegt men aan alle cuvetten 0,02 ml glycero-kinase suspensie toe, mengt en vervolgt de extinctie bij 340 nm gedurende 15 min.

Berekening:

E_I = afstand tussen het niveau van de blanco en de cuvet A of B voor het toevoegen van de glycerokinase.

E_{II} = de afstand tussen het niveau van de blanco en de cuvet A of B 15 min. na toevoeging van de glycerokinase.

$$\begin{aligned}\Delta E_{340} &= E_{II} - E_I \quad (2,73/2,75) & \Delta \bar{E}_{340} &= \frac{\Delta E_A + \Delta E_B}{2} \\ & & & \\ &= \frac{(0,161)(\Delta E_{340})(2,75)}{0,3} & &= \mu\text{mol glycerol/ml monster}\end{aligned}$$

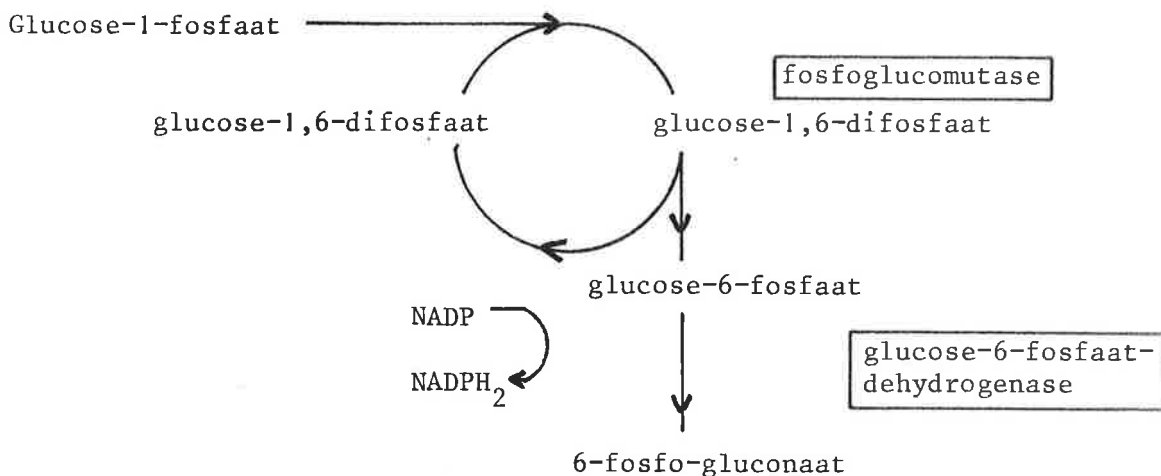
Uitgaande van dit gegeven maakt men uit de 10 mM glycerol-oplossing een oplossing van exact 360 μM .

ENZYMATISCHE BEPALING VAN GLUCOSE-1,6-DIFOSFAAT

Literatuur:

J.V. Passonneau e.a., J. Biol. Chem., 244 (1969) 902

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing 500 ml

0,005 M iminazolbuffer pH 7.0

1,7 g iminazol in ca. 400 ml aqua dest. + 0,5 ml 0,1 M EDTA

oplossen, op pH 7,0 brengen met gec. HCl en aanvullen tot 500 ml.

Substraatoplossing

Substraatoplossingen zijn kant-en-klaar ingevroren aanwezig.

Deze worden in hoeveelheden van 150 ml bereid en in porties van

10 ml in buizen ingevroren. Voor 150 ml is nodig:

15 buisjes gezuiverde G-1-P (=glucose-1-fosfaat)

MgSO₄ · 7 aq 730 mg

NADP (=nicotine-amide-adenine-dinucleotide-fosfaat) 111 mg

Aanvullen tot 150 ml met Tris-buffer(I) (zie ATP + ADP, 730/33)

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met duidelijk aangegeven de datum van gebruik.

Enzymoplossing

fosfo-glucomutase	0,005 ml
G6PD (=glucose-6-fosfaat-dehydrogenase)	0,06 ml
Albumine 20%	0,2 ml
Aanvullen tot 10 ml met Tris-buffer(I)	9.7 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet, met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

StandaardoplossingenVoor witte cellen:

Deze zijn gekombineerd met de 2,3-DPG standaarden en bevatten:
0,05 0,01 0,15 0,2 0,25 μ M GDP.

De standaarden zijn ingevroren aanwezig en moeten nog 30x verdund worden met de Autodiluter.

Voor rode cellen:

Ook deze zijn gekombineerd met 2,3 DPG en zijn ingevroren aanwezig, en bevatten 0,05 0,1 0,15 0,2 0,25 μ M GDP.

De sterkte is het zelfde als bij de witte cellen en ook deze moeten nog 30x verdund worden.

Bereiding van de gekombineerde standaardoplossingen 2,3 DPG/GDPVoor witte cellen

- a) Weeg af 8 mg glucose-1,6-difosfaat (BOEHRINGER : 15082 SGAL)
en los op in 10 ml $H_2O \Rightarrow 2$ mM
- b) Weeg af 17 mg 2,3-difosfo-glyceraat (BOEHRINGER : 15178 SGAQ)
en los op in 10 ml $H_2O \Rightarrow 2$ mM
- c) 0,1 ml 2 mM (DPG of GDP) + 9,9 ml $H_2O \Rightarrow 20$ μ M
- d) 1 ml 20 μ M + 9 ml $H_2O \Rightarrow 2$ μ M

e) Pipetteer:

2 μ M DPG-oplossing	0,1	0,2	0,3	0,4	1,0 ml
2 μ M GDP-oplossing	0,05	0,10	0,15	0,20	0,5 ml
H ₂ O	1,85	1,70	1,55	1,40	2,5 ml
eindconcentratie DPG	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5 μ M
eindconcentratie GDP	0,05	0,1	0,15	0,20	0,25 μ M

Voor rode cellena) 1 ml 2 mM GDP (zie boven) + 1 ml H₂O $\Rightarrow$ 1 mMb) Weeg af 21,8 mg DPG (zie boven) en los op in 5 ml H₂O $\Rightarrow$ 5 mM

c) Pipetteer:

5 mM DPG-oplossing	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5 ml
1 mM GDP-oplossing	0,05	0,1	0,15	0,20	0,25 ml
H ₂ O	0,85	0,70	0,55	0,40	0,25 ml
eindconcentratie DPG	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5 mM
eindconcentratie GDP	50	100	150	200	250 mM

Neem van elke buis 0,1 ml + 9,9 ml H₂O $\Rightarrow$ 10 mlNeem daarvan 1 ml + 9 ml H₂O

Controleer de verkregen standaarden, die nog 30x verdund moeten worden (Autodiluter) met een fluorimetrische bepaling.

Verdeel daarna de 10 cc over 20 Rose-testbuisjes en vries in.

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten bij deze bepaling (BOEHRINGER)

fosfo-glucose-mutase 2 mg/ml enzym : 15340 EPAH
 G6PD (glucose-6-fosfaat-dehydrogenase) 5 mg/ml enzym : 15303 EGAE
 NADP (nicotine-amide-adenine-dinucleotide-fosfaat) : 15600 CNAF
 G-1-P (glucose-1-fosfaat), dit wordt op het laboratorium gezuiverd van glucose-6-fosfaat en glucose-1,6-difosfaat met behulp van kolomchromatografie. Hiervoor is een apart voorschrift bijgevoegd.

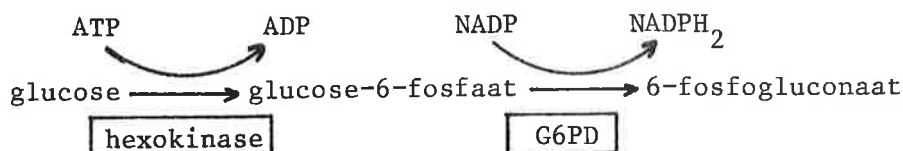
VOOR DE UITVOERING VAN DE BEPALING ZIE DE MELKZUUR-BEPALING (730/37)

ENZYMATISCHE BEPALING VAN GLUCOSE

Literatuur:

M.W. Slein in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 117,
H.U. Bergmeyer ed., Verlag Chemie, Weinheim

Principe:



Reagentia:

Bufferoplossing Tris/HCl-buffer, 0,025 M pH = 8.0

Uitgaan van de 0,25 M stockoplossing Tris. Deze wordt 10 maal verdund met aqua bidest en per 500 ml wordt 1 druppel Levor IV toegevoegd en 0,5 ml 0,1 M EDTA. De pH wordt met 5 N NaOH op 8.0 gebracht (bij 25°C).

Substraatoplossing 15 ml

MgSO ₄ ·7 aq	73 mg
NADP (nicotine-amide-adenine-dinucleotide-fosfaat)	11 mg
ATP (adenosine-5'-trifosfaat)	43 mg

Oplossen in 15 ml Tris-buffer(I) (zie ATP + ADP)

Na gebruik wordt de eventuele rest van het substraat ingevroren met duidelijk aangegeven de datum van gebruik.

Enzymoplossing 10 ml

G6PD (glucose-6-fosfaat-dehydrogenase)	0,016 ml
hexokinase	0,040 ml
albumine 20%	0,2 ml
Aanvullen tot 10 ml met Tris-buffer(I)	9,7 ml

Na gebruik wordt de eventuele rest van het enzym in de koelkast bij +4°C weggezet met duidelijk vermeld de datum van bijeen pipetteren.

Standaardoplossingen

a) Weeg af 9 mg glucose en los op in 10 ml $H_2O \longrightarrow 5 \text{ mM}$

b) 1 ml 5 mM + 9 ml $H_2O \longrightarrow 500 \text{ } \mu\text{M}$

c) Pipetteer:

500 μM	0,2	0,4	0,6	0,8	2,0	ml
H_2O	1,8	1,6	1,4	1,2	2,0	ml
eindconcentratie	50	100	150	200	250	μM glucose

d) De verkregen standaarden moeten nog ca. 30x verdund worden met de Autodiluter.

Opmerking:

Gezien de grote versterking die bij deze bepaling gebruikt wordt moet rekening gehouden worden met een eigen fluorescentie van de eiwitbestanddelen van de monsters. Het is daarom raadzaam de standaarden evenveel van hetzelfde eiwit te laten bevatten. Een andere oplossing is een correctie aan te brengen bij de berekening. Dit wordt op de volgende wijze gedaan:

Eerst wordt de eigen fluorescentie van de monsters bepaald.

Tijdens de bepaling, b.v. op het laatst, haalt men de substraatslang uit het substraat, zuigt dan met de SAMPLER, 2 watermonsters op en daarna een monster, gevolgd door weer twee watermonsters. Na ca 10 min zal dit op de recorder zichtbaar zijn: de basislijn zakt beneden de nulwaarde. Met de nulknop van de versterker en de recorder wordt de basislijn hersteld. De eigen fluorescentie van het eiwit in het monster verschijnt nu als piek op de recorder en hiermee kan bij de berekening de correctie uitgevoerd worden.

Sterkte en bestelcodes van de gebruikte enzymen en substraten bij deze bepaling (BOEHRINGER)

G6PD (glucose-6-fosfaat-dehydrogenase)	5 mg/ml enzym	: 15303 EGAE
hexokinase	2 mg/ml enzym	: 15341 EHAA
NADP (nicotine-amide-adenine-dinucleotide-fosfaat)		: 15600 CNAF
ATP (adenosine-5'-trifosfaat)		: 15028 NAAH

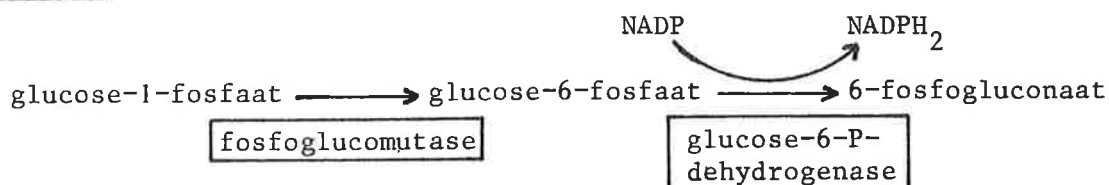
VOOR DE UITVOERING VAN DE BEPALING ZIE DE MELKZUUR-BEPALING (730/37)

ENZYMATISCHE BEPALING VAN GLUCOSE-1-FOSFAAT (G-1-P)

Literatuur:

H.U. Bergmeyer, H. Klotsch in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962)
131, H.U. Bergmeyer e.d., Verlag Chemie, Weinheim

Principe:



Uitvoering:

Men pipetteert in een cuvet (lichtweg 1 cm, glas):

5x verdunde oplossing van een kolomfractie (neem 0,1 ml van de fractie en verdun tot 0,5 ml)	0,02	ml
0,1 M MgCl ₂	0,10	ml
0,02 M EDTA	0,10	ml
0,012 M NADP	0,05	ml
0,025 M Tris-HCl buffer pH 7.6	2,69	ml
G6PD (glucose-6-fosfaat-dehydrogenase) 5 mg/ml	0,004	ml
2 mM GDP-oplossing 900x verdund	0,02	ml

Meng de inhoud met een plastic roerstaaf en meet de extinctie bij 340 nm tegen een waterblanco in de VITATRON fotometer (laat de recorder 5 min lopen).

Daarna voegt men toe (pipet)

fosfogluco-mutase	2 mg/ml	0,02	ml
-------------------	---------	------	----

aan de cuvet en na mengen wordt de extinctie bij 340 nm weer vervolgd tot deze constant geworden is.

Berekening:

De afstand op het recorderpapier tussen het signaal van de cuvet en de blanco vóór toevoegen van G6PD is E_I , de afstand na toevoegen is E_{II} .

$$\Delta E_{340} = E_I - E_{II} \quad (2.984/3.004)$$

$$\frac{(0,161)(\Delta E_{340})(3.004)}{0,02} \times 5 = \mu\text{mol G-1-P/ml}$$

ZUIVERING VAN GLUCOSE-1-FOSFAAT (G-1-P)

=====

Principe:

Glucose-1-fosfaat wordt gezuiverd van andere fosfaatverontreinigingen door anionen-wisseling op een DOWEX-1-X2-formiaat kolom, met behulp van een lineaire formiaatgradiënt volgens G.R. Bartlett, Biochim. Biophys. Acta 156 (1968) 221.

G-1-P wordt bepaald in de verkregen kolomfrakties volgens H.U. Bergmeyer H. Klotsch in: Methoden der enzymatischen Analyse (1962) 131, H.U. Bergmeyer ed., Verlag Chemie, Weinheim.

De verontreiniging glucose-1,6-difosfaat wordt bepaald door bij de eerstvolgende GDP-bepaling een ca. 30-voudige verdunning van het, met vers gezuiverd G-1-P gemaakte substraat mee te nemen als monster. Er mag dan geen piek van GDP verschijnen. Bepaling geschiedt volgens J.A. Loos, H.K. Prins, Biochim. Biophys. Acta, 201 (1970) 185.

Voorbehandeling en regenerering van de hars

Zie het voorschrift voor de zuivering van 3-PG (730/43)

Zuivering

1 g glucose-1-fosfaat (BOEHRINGER, diNa-zout, 15323 SGAF, volgens de specificatie 98% zuiver) wordt opgelost in 50 ml aqua dest en met 4 M mierzuur op pH 5 gebracht. Vervolgens wordt dit gezuiverd op de kolom zoals beschreven voor 3-PG.

Bepaling van totaal fosfaat en G-1-P

De meting van het totaal fosfaatgehalte kan automatisch geschieden met de opstelling voor automatische fosfaatbepaling (J.F. Kuylman, Diss. Amsterdam 1969). De meting kan ook met de hand geschieden, zie lab. voorschrift 0540/27.

Van de ca. 80 frakties wordt van elke vijfde fraktie het gehalte G-1-P bepaald en ongeveer de plaats vastgesteld van de piek van de kolomfrakties die het G-1-P bevatten. Zie voor de meting van G-1-P het desbetreffende voorschrift (730/41). Daarna wordt nauwkeurig begin en eind van de piek bepaald, weer door meting van G-1-P gehalte. De frakties met G-1-P worden samengenomen, geneutraliseerd met 5,2 N KOH en aangevuld tot 100 ml. Van dit mengsel wordt in duplo weer een G-1-P bepaling uitgevoerd.

Uitvullen van de buizen

Uitgaande van de G-1-P bepaling wordt berekend hoeveel ml in elke buis gedaan moet worden opdat per buis 60 μ mol G-1-P aanwezig is. Daarna wordt een kleine hoeveelheid substraat (5 ml) bereid om te bepalen of het preparaat nog glucose-1,6-difosfaat bevat. Tenslotte worden de buizen ingevroren nadat duidelijk de inhoud en de datum van bereiding op elke buis vermeld zijn.