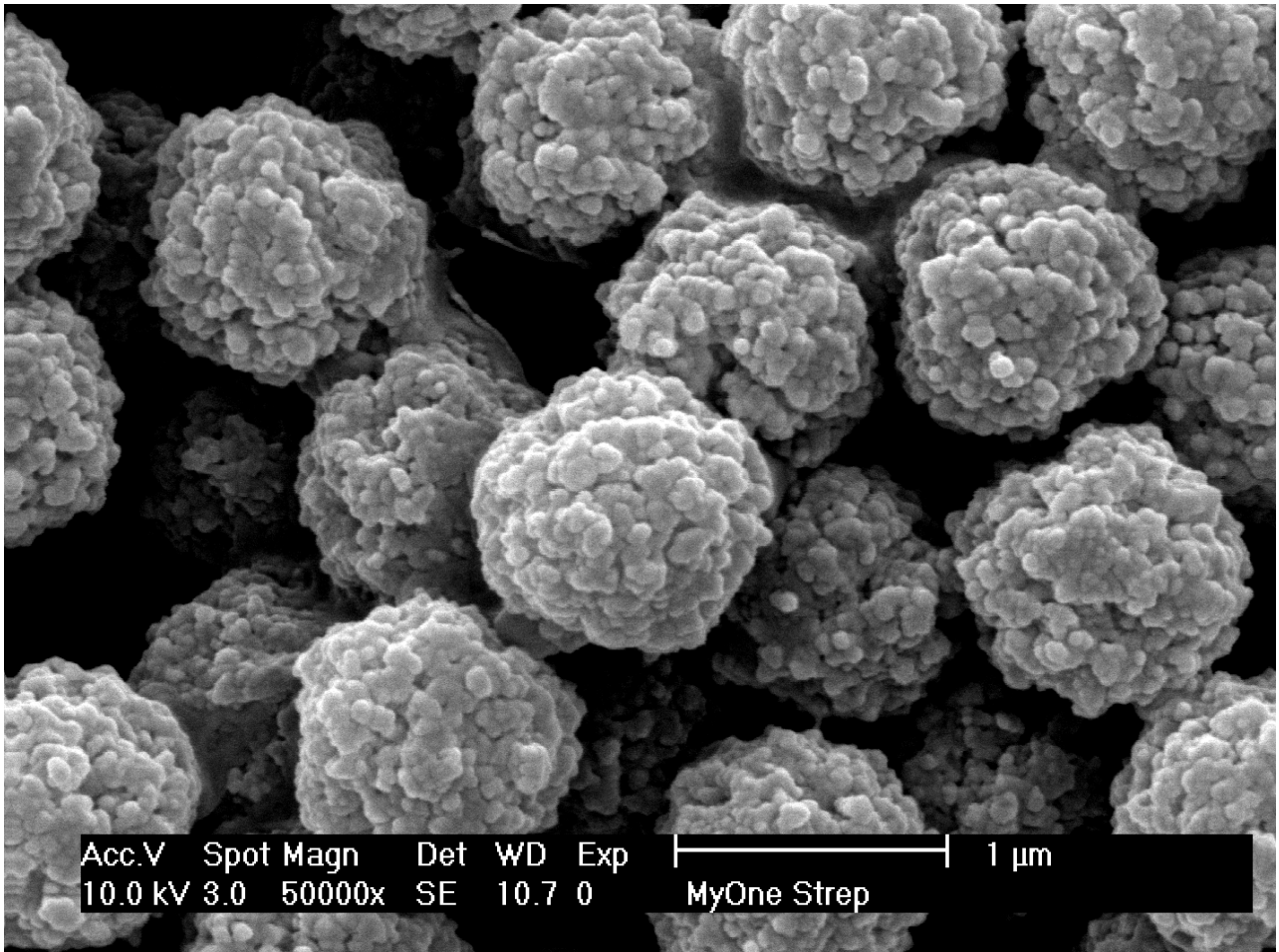


Biosensoren



Gecertificeerde
NLT module
voor vwo

Colofon



De module Biosensoren is bestemd voor de lessen Natuur, Leven en Technologie (NLT). De module is op 10 december 2009 gecertificeerd door de Stuurgroep NLT voor gebruik op het vwo in domein F, Biomedische technologie en biotechnologie. Het certificeringsnummer van de module is 4128-048-VF.

De originele gecertificeerde module is in pdf-formaat downloadbaar via ► <http://www.betavak-nlt.nl>.

Op deze website staat uitgelegd welke aanpassingen docenten aan de module mogen maken, voor gebruik in de les, zonder daardoor de certificering teniet te doen.

De module is gemaakt in opdracht van het Landelijk Ontwikkelpunt NLT.

Deze module is ontwikkeld door:

- dr. Knippenbergcollege, Helmond, Tom van Heeswijk, Rino Loman
- Lorentz Casimir Lyceum, Eindhoven, Jan Willem Noordenbos, Martin Groeneveld, Martine de Jong.
- Inhoudelijk expert: Leo van IJendoorn (TU Eindhoven)
- Onderwijskundig adviseur: Willem van Hoorn (TU Eindhoven)
- Uitwerking practica: Derya Ay, Erik Janssen, Gert-Jan van Sinten, Ylona Rooyackers (studenten Fontys Applied Science) en hun begeleiders: Paul Boelens, Jan van Geldrop
- Hoofdredacteur: Erik Meijer (TU Eindhoven)
- Eindredacteur: Betty Majoor (In Profiel Tekstontwerp)
- Projectleider: Elise Quant (TU Eindhoven)

Met dank aan:

- Biosensorengroep TU Eindhoven
- Diverse collega's Lorentz Casimir College en dr. Knippenbergcollege
- Diagnostisch Centrum Eindhoven, Gerard Moerenhout
- Mw. J. Delamarre (huisarts te Eindhoven)

- De testscholen voor hun waardevolle feedback: Evert-Jan Nijhof (Laar en Berg, Laren (NH)), Anneke Kaskens (Gymnasium Celeanum, Zwolle)
- Dirk-Jan Boerwinkel en Berenice Michels van het Landelijk Ontwikkelpunt NLT.

Aangepaste versies van deze module mogen alleen verspreid worden, indien in dit colofon vermeld wordt dat het een aangepaste versie betreft, onder vermelding van de naam van de auteur van de wijzigingen.

Materialen die leerlingen nodig hebben bij deze module zijn beschikbaar via het vaklokaal NLT:

► <http://www.vaklokaal-nlt.nl/>

© 2009. Versie 1.0

Het auteursrecht op de module berust bij Stichting Leerplan Ontwikkeling (SLO). SLO is derhalve de rechthebbende zoals bedoeld in de hieronder vermelde creative commons licentie.

De auteurs hebben bij de ontwikkeling van de module gebruik gemaakt van materiaal van derden en daarvoor toestemming verkregen. Bij het achterhalen en voldoen van de rechten op teksten, illustraties, enz. is de grootst mogelijke zorgvuldigheid betracht. Mochten er desondanks personen of instanties zijn die rechten menen te kunnen doen gelden op tekstgedeeltes, illustraties, enz. van een module, dan worden zij verzocht zich in verbinding te stellen met SLO.

De module is met zorg samengesteld en getest. Landelijk Ontwikkelpunt NLT, Stuurgroep NLT, SLO en auteurs aanvaarden geen enkele aansprakelijkheid voor onjuistheden en/of onvolledigheden in de module. Ook aanvaarden Landelijk Ontwikkelpunt NLT, Stuurgroep NLT, SLO en auteurs geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade, voortkomend uit (het gebruik van) deze module.

Voor deze module geldt een

Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie

► <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl>



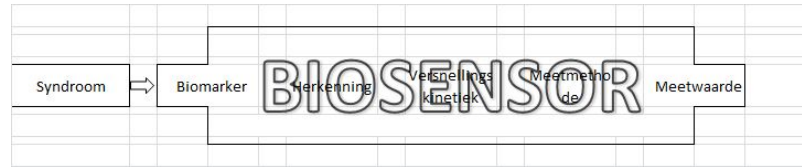
*De afbeelding op de voorzijde is een foto van beads. De foto is genomen met een elektronenmicroscop. Wat beads zijn, wordt uitgelegd in hoofdstuk 6.
Bron: TU Eindhoven*

Inhoudsopgave

1 Inleiding.....	1
2 Bekende biosensoren nu.....	5
2.1 Uit de praktijk.....	5
2.2 Zwangerschapstest.....	6
2.3 Glucosemeter.....	10
2.5 Afsluiting	14
3 Biomarkers slaan alarm.....	15
3.1 Uit de praktijk van de huisarts	16
3.2 Eiwitten en biosensoren	18
3.3 Steeds specifieker	26
3.4 Specifiek en sensitief.....	29
3.5 Afsluiting	35
4 Afkijken bij de natuur	37
4.1 De precisie van ons afweersysteem.....	37
4.2 De Ouchterlonytest	42
4.3 Afsluiting	46
5 Meten in het lab	47
5.1 Immunoassays	48
5.2 ELISA	51
5.3 Zwangerschapstest.....	54
5.4 Afsluiting	58
6 Kan het ook snel?	59
6.1 Het maken van een ijklijn	59
6.2 Kwantitatief meten in een biosensor	60
6.3 De meting versnellen.....	69
6.4 Afsluiting	72
7 Je eigen laboratorium op zak	74
7.1 De glucosemeter	74
7.2 Nieuwe mogelijkheden met magnetisme	78
7.3 Het meten van de magnetische deeltjes.....	81
7.4 Afsluiting	85
8 Biosensoren in de toekomst?.....	86
8.1 Samenvatting	86
8.2 Hoe ziet de toekomst eruit?.....	89
8.3 Impact op het leven	90
Bijlage 1 Invulschema rode-draad-opdracht.....	92

Bijlage 2 Formulier Diagnostisch Centrum Eindhoven	93
Bijlage 3 Instructies 'urine'-test	97
Bijlage 4 Instructies Bloedgroep bepaling	101
Bijlage 5 Instructies glucosemeter	104
Bijlage 6 Instructies Spectrofotometer proef	104
Bijlage 7 Extra uitleg differentiaalvergelijkingen	111
Bijlage 8 URL-lijst	116
Bijlage 9 Bronnen	117

1 Inleiding



Figuur 1: schema biosensor.

Deze module gaat over biosensoren. Dat klink hightech en dat is het ook. Toch ben je in het dagelijks leven waarschijnlijk al een aantal voorbeelden van biosensoren tegengekomen. Zoals bij mensen die lijden aan diabetes of suikerziekte. Zij hebben vaak een klein apparaatje bij zich waarmee zij hun bloedsuikerconcentratie kunnen meten, en dat is een biosensor. Maar, niet elk medisch apparaatje is een biosensor. Daarom eerst een omschrijving van waar deze module over gaat.

Als er met je lichaam iets aan de hand is, bijvoorbeeld griep, dan is dat te merken aan veel verschijnselen; hoofdpijn, koorts, misselijkheid etcetera. We noemen die verschijnselen bij elkaar een **syndroom**. Bij een syndroom hoort ook vaak een afwijkende biochemische reactie. Een biosensor meet die. De toepassingen zijn legio. Het schema in figuur 1 geeft een overzicht van de stappen in het meetproces. Elk hoofdstuk legt een volgende stap uit. Aan het eind van deze module moet je alle onderdelen uit dit schema kunnen toelichten.

Oftewel:

Een biosensor is een klein apparaat dat als resultaat van een biochemische reactie een meetsignaal geeft.

In deze module maak je kennis met een aantal toepassingen van biosensoren. Je gaat zelf met een biosensor metingen verrichten. Je komt te weten hoe de meest gangbare biosensoren werken en je krijgt een indruk van wat er op het gebied van biosensoren in de nabije toekomst op de markt zal komen.

Op de TU Eindhoven is een onderzoeksgroep 'Moleculaire Biosensoren voor Medische Diagnostiek'. Deze module is geschreven onder supervisie van deze onderzoeksgroep.

Opbouw van de module

Hoofdstuk 1	Hier vind je een globaal overzicht van de module. De benodigde voorkennis wordt geschetst en er wordt beschreven hoe de toetsing plaatsvindt.
Hoofdstuk 2	Hier wordt het begrip ‘biosensor’ op de kaart gezet. Een praktijkvoorbeeld schetst het belang van biosensoren.
Hoofdstuk 3	Hier worden de eerste voorbeelden van biosensoren inhoudelijk besproken. Wat wil je meten en hoe? Eerst komt de benodigde achtergrondkennis aan bod. Hierop wordt later teruggegrepen. Aan de hand van voorbeelden worden de begrippen aspecifiek, specifiek en sensitief meten toegelicht. Ook komt hier een eerste proef aan bod.
Hoofdstuk 4	Hierin wordt de biomarker geïntroduceerd, een begrip dat regelmatig terugkeert in de volgende hoofdstukken. We nemen een kijkje bij de natuur. Hoe vindt ons lichaam schadelijke stoffen en hoe schakelt het precies dat ene stofje uit? Je gaat zelf een uitgebreide test uitvoeren en erover rapporteren.
Hoofdstuk 5	Hierin wordt het eerste tipje van de sluier opgelicht. Hoe kunnen die geweldig specificiteit en sensitiviteit, die voor ons lichaam zo vanzelfsprekend zijn, in het laboratorium worden nagebootst? Besproken wordt hoe lichaamseigen methodes in het laboratorium kunnen worden gesimuleerd en zodanig worden aangepast dat ze bruikbare gegevens opleveren. Aan de hand van de behandelde methodes wordt uitgelegd hoe een zwangerschapstest precies werkt.
Hoofdstuk 6	We weten nu hoe je stoffen kunt detecteren, maar hoeveel tijd kost dat? Met behulp van wiskunde wordt de reactiesnelheid in kaart gebracht.

	Er wordt een nieuwe testmethode gepresenteerd die aanzienlijk snellere testtijden mogelijk maakt. Je voert zelf enkele berekeningen uit.
Hoofdstuk 7	Hierin komen de basisingrediënten voor een biosensor aan bod. We bespreken een bestaande biosensor en een techniek die een nieuwe generatie biosensoren mogelijk maakt. Je gaat zelf met een bestaande biosensor aan de slag.
Hoofdstuk 8	Hier kijken we terug - Wat heb je geleerd? - en we kijken vooruit. Wat heeft de toekomst voor ons in petto op het gebied van biosensoren? Schets hier ook je eigen toekomstscenario.

Benodigde voorkennis

Voor het volgen van deze module heb je de volgende voorkennis nodig:

- biologie: afweersysteem/antilichaam/ antigeen
- natuurkunde: magnetisme, optica (brekingswetten van Snellius)
- scheikunde: molaire massa, getal van Avogadro
- wiskunde: differentiëren.

Leerdoelen in hoofdlijnen

Na afloop van deze module kun je:

- verschillende toepassingen beschrijven van biosensoren en de rol van een biosensor toelichten
- eigenschappen opnoemen en toelichten waar een biosensor aan moet voldoen
- verschillende voorbeelden van biomarkers beschrijven
- uitleggen hoe het menselijk lichaam een specifiek eiwit herkent
- uitleggen hoe antistoffen bij verschillende vormen van immunoassays worden gebruikt om de aanwezigheid en/of concentratie te bepalen van een te detecteren stof
- een techniek beschrijven en toelichten waarmee de meettijd aanmerkelijk verkort kan worden en betrouwbare metingen bij zeer lage concentraties mogelijk worden
- van een relevante differentiaalvergelijking de oplossing controleren
- aan de hand van een zelf uitgevoerde test uitspraken doen over de

- concentratie van een biomarker
- het algemene schema van een biosensor tekenen en daarmee de werking toelichten
- tenminste één fysische detectietechniek beschrijven die in biosensoren wordt toegepast
- in eigen woorden beschrijven hoe een biosensor het leven van mensen kan beïnvloeden.

Per hoofdstuk wordt dit nog verder uitgewerkt in deel-leerdoelen.

Toetsing

De toetsing bij deze module bestaat uit drie onderdelen, die samen het eindcijfer geven voor deze module.

Het gaat om:

- verslagen van de practica (telt mee voor 25%)
- een schriftelijke eindtoets (telt mee voor 60%)
- een essay, zie hoofdstuk 8 (telt mee voor 15%).

2 Bekende biosensoren nu

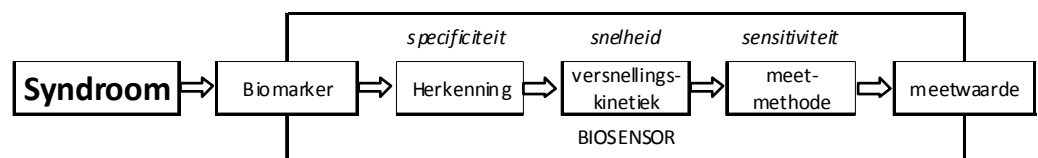
Wat is een biosensor? Kun je er een paar noemen?

In dit hoofdstuk maak je kennis met een aantal biosensoren die je misschien wel kent. Je zult merken dat ze in het dagelijks leven van mensen een belangrijke rol kunnen spelen. Het is immers belangrijk te weten hoe het met je gezondheid is gesteld!

Leerdoelen

Na dit hoofdstuk kun je:

- een aantal voorbeelden geven van biosensoren
- een aantal kenmerken geven van deze voorbeelden van biosensoren.



Figuur 2: schema biosensor, syndroom.

2.1 Uit de praktijk

1. Bron: twee biosensoren in de praktijk

Met bonkend hart zit Daisy in de bus. Diep weggestopt in haar tas zit het kleine pakketje waarvoor ze helemaal naar de andere kant van de stad is gereisd. Daar kent niemand haar tenminste. Ze zou het niet in haar hoofd halen om een zwangerschapstest te kopen bij de buurt drogist waar haar ouders ook vaak komen.

Gisteravond had ze besloten om die test te gaan kopen. Ze is inmiddels een week over tijd, terwijl ze altijd zo regelmatig is. Ja inderdaad, ze had één keer de pil vergeten, maar volgens de bijsluiter.....

Typisch iets voor haar om dan net op zo'n moment die leuke knul tegen te komen in de dancing. Ze kon zich wel voor haar kop slaan. Maar hoe dan ook: ze moet zekerheid hebben.

Een uur later heeft ze die zekerheid. De test is 'negatief'. Dat betekent dus, legt het instructieboekje uit, dat ze niet zwanger is.

Ze heeft het boekje al vier keer doorgenomen of ze de test wel op de juiste manier heeft gedaan. En ze heeft al tien keer naar het testbuisje gekeken, maar het is duidelijk: niet zwanger! Daisy heeft het gevoel door het oog van de naald te zijn gekropen.

Die avond gaat ze met haar ouders naar de verjaardag van haar oma. Ze is er nog niet helemaal bij met haar gedachten. Met een half oor hoort ze hoe haar oma aan haar moeder en tante vertelt over dat metertje dat ze sinds kort heeft om zelf haar bloedsuiker te kunnen meten. Een paar maanden geleden is bij haar oma een beginnende suikerziekte geconstateerd. Oma is opgetogen over het bloedsuikermetertje: nu hoeft ze tenminste niet om de haverklap bij de huisarts langs, dat scheelt haar een hoop gedoe.

Daisy kijkt eens naar het apparaatje dat oma trots laat zien. Het is nauwelijks groter dan haar mp3-speler. Inderdaad wel handig. Ze is trots op haar oma, omdat die zich door haar ziekte niet haar onafhankelijkheid laat afnemen.

In het verhaal in bron 1 komen twee biosensoren voor, namelijk de zwangerschapstest en de glucosemeter. In dit hoofdstuk lichten we de werking hiervan in grote lijnen toe.

2.2 Zwangerschapstest

Zwanger of niet? Als een vrouw over tijd is - zoals dat vaak genoemd wordt als haar menstruatie uitblijft - betekent dat niet meteen dat ze zwanger is. Wanneer is ze dat wel?

Biologisch gezien is een vrouw zwanger als een embryo zich heeft ingenesteld in het baarmoederslijmvlies. Tussen de sex die daaraan is voorafgegaan en de *innesteling* is er dan al heel wat gebeurd. We gaan hier vooral in op de innesteling omdat daarna een stof in de urine terecht komt waarmee de zwangerschap aangetoond kan worden.

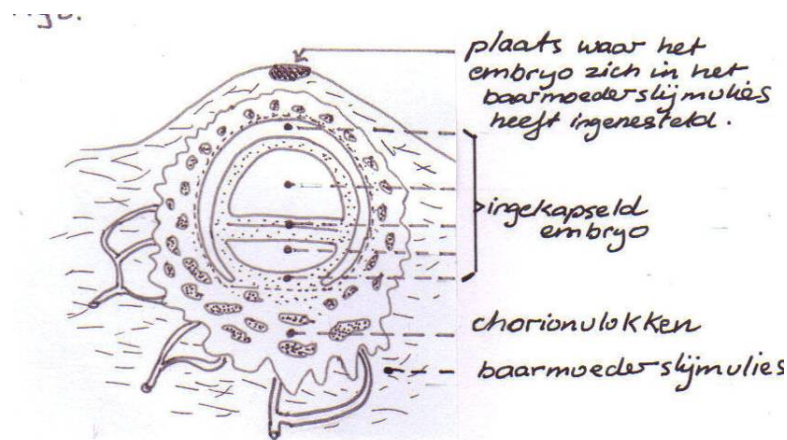
In de eerste week na de conceptie heeft de bevruchte eicel zich al vele malen gedeeld. Hierdoor is een klompje cellen ontstaan dat je kunt onderverdelen in een *embryoblast* en *trophoblast*. Uit de embryoblast groeit het latere kind en uit de trophoblast groeien de placenta - of moederkoek - en de vruchtvliezen. De buitenste cellen van de trophoblast - *chorionvlokken* genaamd - infiltreren het baarmoederslijmvlies, zodat de trophoblast met de embryoblast als

een krent in de pudding wegzakt. Dit proces wordt innesteling genoemd.

Voor een succesvolle zwangerschap is het van belang dat een week na de innesteling, het moment dat de menstruatie normaliter zou beginnen, het baarmoederslijmvlies nu NIET loslaat. Daarom maken de chorionvlokken een hormoon (=signaalstof) aan waardoor het loslaten van het baarmoederslijmvlies wordt tegengegaan. Dit hormoon is het **human Chorion Gonadotroop** hormoon, afgekort tot hCG. Dit hormoon wordt dus alleen aangemaakt tijdens een zwangerschap. Zolang het niveau van hCG in het bloed voldoende hoog is, blijven de eierstokken voldoende **progesteron** (=zwangerschapshormoon) maken om het baarmoederslijmvlies vast te houden. Een complex samenspel dus tussen embryo, eierstokken en baarmoeder.

2. Achtergrondinformatie: gonadotroop

De geslachtsklieren - bij vrouwen zijn dit de eierstokken en bij mannen de teelballen - worden ook **gonaden** genoemd. Een hormoon dat op de gonaden inwerkt is **gonadotroop**.



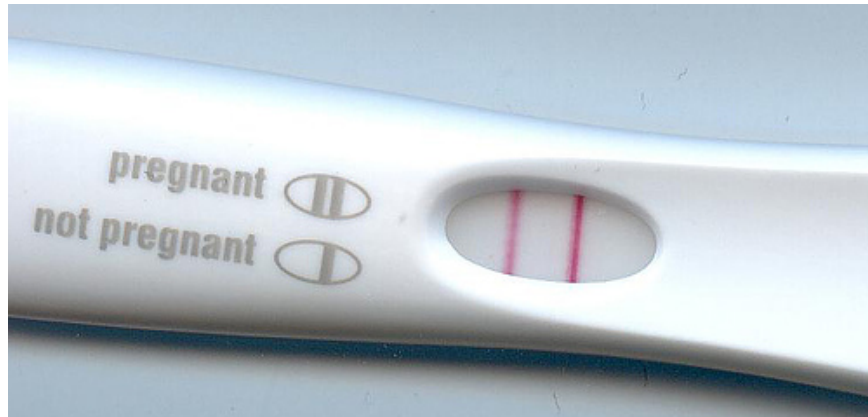
Figuur 3: het ingekapselde embryo twee weken na de conceptie.

Via de nieren wordt hCG uit het bloed gefilterd en komt het in de urine terecht. Bij zwangere vrouwen is hCG in de urine meetbaar vanaf twee weken na de conceptie, de dag dus dat de menstruatie zou plaatsvinden. In de eerste tien weken verdubbelt elke twee à drie dagen de hoeveelheid hCG.

hCG-niveau's gedurende de zwangerschap	
aantal weken na de conceptie	normaal hCG-niveau: mIU/mL
1	5-50 (gemiddeld 14)
2	5-50 (gemiddeld 21)
3	5-50 (gemiddeld 42)
4	10-425
5	19-7340
6	1080-56500
7-8	7650-229000
9-12	25700-288000
13-16	13300-254000
17-24	4060-165400
25-40	3640-117000

Figuur 4: het verloop van het hCG-niveau tijdens de hele zwangerschap. De tabel vermeldt onder- en bovengrenzen voor het hCG-niveau omdat dit voor elke zwangere vrouw anders kan zijn.

Via het baarmoederslijmvlies komt het hCG in het bloed terecht en daarna via de nieren in de urine. Door een teststrip in ochtendurine te houden kan je dus vrij gemakkelijk bepalen of iemand zwanger is of niet.



Figuur 5: foto van een zwangerschapstest. Kleuren beide streepjes dan ben je zwanger. Kleurt alleen het tweede streepje dan ben je niet zwanger. Bron: Wikipedia.

1. Vraag

- Waarom verdient ochtendurine de voorkeur bij een zwangerschapstest?
- Vanaf 25 mIU/mL leest de zwangerschapstest positief af. Hoeveel weken na de conceptie is dat gemiddeld? En hoeveel weken na het tijdstip van de verwachte menstruatie?
- Vanaf hoeveel weken weet je met een zwangerschapstest, die vanaf 25 mIU/mL een positieve uitslag geeft, zeker dat er geen sprake is van een zwangerschap?
- Tegenwoordig is er ook een zwangerschapstest in de handel die aangeeft hoeveel weken de zwangerschap al gevorderd is. Stel de test geeft aan: 3 weken zwanger op basis van de gemiddelde waarde. Hoeveel weken kan de test ernaast zitten?

In hoofdstuk 3 en hoofdstuk 5, als we al wat meer weten over biosensoren, gaan we dieper in op hoe de teststrip precies werkt.

3. Achtergrondinformatie: International Unit

Normaal gesproken druk je de hoeveelheid van een stof uit in gewichten, maar als een stof niet altijd hetzelfde molgewicht heeft, zegt dat niets over de activiteit.

Daarom maakt de farmacie gebruik van de IU, de **International Unit**, die gebaseerd is op de biologische activiteit van een stof. De IU wordt onder meer gebruikt voor vitaminen, hormonen, vaccins en andere biologisch actieve stoffen.

Voor hCG geldt dat 1 mIU equivalent is aan 0,084 microgram hCG.

Ondanks de naam hoort de IU niet tot het internationale systeem van eenheden dat in de natuur- en scheikunde wordt gebruikt.

2.3 Glucosemeter

Diabetes is een ziekte die steeds meer voorkomt in de westerse samenleving. Dat suikerziekte een groot probleem is blijkt o.a. uit dat in Engeland 2% van de inwoners (meer dan 1 miljoen mensen) last van deze suikerziekte heeft. In Engeland wordt 10% van het budget van de gezondheidszorg eraan uitgegeven.

De oma van Daisy heeft een glucosemeter gekregen om deze ziekte te helpen controleren.

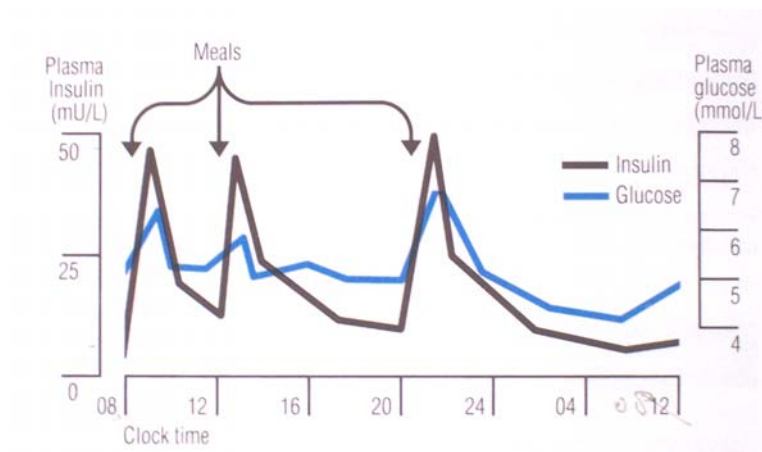
Een afbeelding van een glucosemeter voor thuisgebruik zie je in figuur 6. Het is een klein apparaatje dat de gebruiker altijd in een etui bij zich kan hebben. Eén druppel bloed is voldoende om in vijf seconden een betrouwbare meting te krijgen van het glucosegehalte van het bloed. Hoe dat gebeurt, komt in hoofdstuk 7 nog uitgebreid aan de orde. Dan ga je ook zelf metingen met deze meter doen.



Figuur 6: foto van een glucosemeter. Bron: Lifescan.

Glucose in het lichaam

In het bloed van elk mens bevindt zich **glucose**. De concentratie van glucose neemt toe na een maaltijd. Je ziet in figuur 7 dat door de insulineaarden te variëren de glucosewaarde binnen bepaalde grenswaarden blijft.



Figuur 7: 24 uurs verandering van de insuline concentratie en van de glucoseconcentratie in het bloedplasma bij gezonde mensen. Bron: Textbook of Medicine, R.L. Souhami.

Glucose heeft vele namen: druivensuiker, dextrose, bloedsuiker. Het is de belangrijkste brandstof van ons lichaam. We krijgen het via ons voedsel binnen. Glucose kan als afzonderlijke stof in ons voedsel zitten of verbonden met andere suikers, zoals in sacharose of als keten van glucosemoleculen zoals in zetmeel en glycogeen. **Glycogeen** wordt ook wel dierlijk zetmeel genoemd. De verzamelnaam van deze verbindingen is **koolhydraten**.

Het bloed transporteert vervolgens de glucose naar de cellen van het lichaam, die het als brandstof verbruiken. De vertering van zetmeel tot glucose gaat relatief langzaam en daardoor gaat de afgifte van glucose vanuit de darm naar het bloed ook relatief langzaam. Koolhydraten in de vorm van zuivere glucose en sacharose worden veel sneller door ons lichaam opgenomen dan zetmeel en veroorzaken daardoor grotere schommelingen in de concentratie van glucose in ons bloed dan koolhydraten zoals zetmeel.

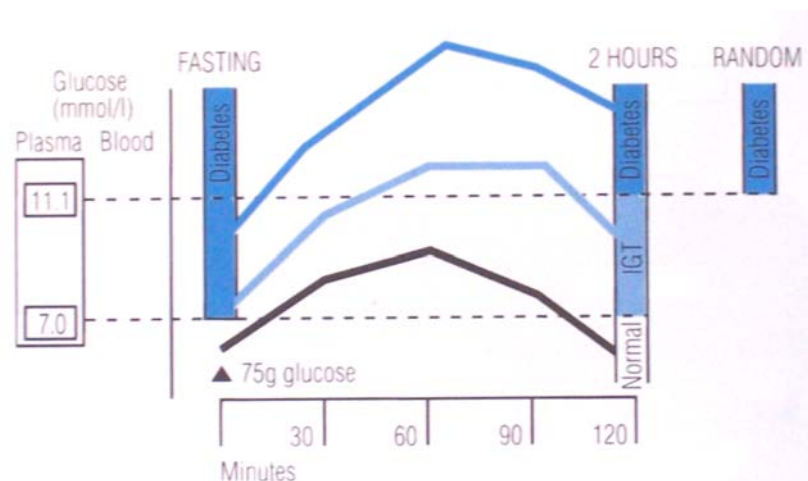
In onze alvleesklier bevinden zich groepjes cellen, die de **eilandjes van Langerhans** worden genoemd. In het midden van de eilandjes van Langerhans bevinden zich de **B-cellen**. Deze reageren op het glucosegehalte in het bloed. Hoe hoger het glucosegehalte, hoe meer zij het hormoon **insuline** afgeven. Insuline stimuleert het opnemen van glucose door de levercellen en stimuleert het omzetten van glucose in glycogeen. Hierdoor zal de te hoge glucoseconcentratie in het bloed weer dalen. Bij een te laag glucosegehalte geven **a-cellen** van de eilandjes van Langerhans het hormoon **glucagon** af. Hierdoor worden de levercellen gestimuleerd glycogeen omzetten in glucose en dat

vervolgens aan het bloed af te staan. Zo blijft de hoeveelheid glucose in het bloed mooi in balans. In feite fungeren de eilandjes van Langerhans als natuurlijke biosensoren. Zelfs meer dan dat:

De eilandjes van Langerhans zorgen er ook voor dat de glucosewaarden binnen de normen blijft.

Mensen met diabetes

Mensen die aan suikerziekte of diabetes lijden, maken onvoldoende insuline aan waardoor het glucosegehalte in hun bloed voortdurend te hoog is en vaak sterk schommelt. Voor hen is een glucosemeter een zegen. Met zo'n meter kunnen zij op elk gewenst moment hun bloedsuikerconcentratie meten en bepalen wanneer en hoeveel insuline ze bij zichzelf moeten inspuiten. Zo kunnen ze de te hoge glucoseconcentraties en de grote schommelingen van hun bloedsuikergehalte vermijden en ondanks hun ziekte toch een vrijwel normaal leven leiden.



Figuur 8: verloop van glucoseconcentratie in bloed na drinken van 75 g glucose opgelost in water bij gezonde personen en diabetes patiënten. Bron: Textbook of Medicine, R.L. Souhami.

Om de diagnose diabetes te stellen worden de volgende criteria aangehouden:

- eerste criterium is te hoge concentratie (> 7 mmol/L) glucose na een periode van vasten
- tweede criterium is dat bij het drinken van 75g glucose opgelost in water, twee uur later de glucose concentratie niet onder de 11,0 mmol daalt in het bloed.

2. Opdracht

2.1 Glucose en insuline

Reken uit hoeveel het procentuele verschil is tussen de toppen en de dalen bij glucose en bij insuline. Maak gebruik van de schaalverdeling naast figuur 7.

2.2 Glucosemeter

- a. Bedenk minstens drie eisen waaraan een glucosemeter voor thuisgebruik moet voldoen, vergeleken met een glucosemeter die in ziekenhuislaboratoria wordt gebruikt.
- b. Op de afbeelding van de glucosemeter (figuur 6) is een waarde af te lezen van 5,8 mmol glucose per liter. Reken uit hoeveel gram glucose dit per liter bloed is en per druppel bloed (neem als volume voor een druppel bloed 50 μL). Deze waarde is verkregen na een periode van vasten, heeft deze persoon insuline nodig of niet?

2.3 Bloedsuikergehalte

Figuur 7 geldt voor een gezond, gemiddeld persoon, maar iedereen is anders. Kun je bedenken welke lichaamskenmerken en leefomstandigheden van invloed zijn op het bloedsuikergehalte? Noem er minstens 4.

2.4 Injectie insuline

Mensen met diabetes injecteren zichzelf met insuline. Ze meten voordat ze gaan eten hun glucosegehalte en schatten in hoeveel glucose daarbij komt. Op den duur stellen ze voor zichzelf een standaard ratio vast.

- a. De oma van Daisy heeft bijvoorbeeld voor elke 10 gram koolhydraten die zij eet 1 eenheid insuline nodig. Reken voor de oma van Daisy uit hoeveel eenheden insuline deze moet injecteren als ze voor de lunch een broodje jonge kaas wil eten met een glaasje melk. Gebruik eventueel de koolhydratenlijst op internet, ►URL1.
- b. Een verpleegster moet een patiënt 25 eenheden insuline (25 I.E.) toedienen. Ze heeft een oplossing met 100 I.E./mL tot haar beschikking. Hoeveel mL moet de verpleegster toedienen?

2.5 Wel of geen biosensor?

Geef van onderstaande items aan of het een biosensor betreft of niet. Geef kort aan waarom wel/niet

- a. hartslagmeter

- b. dopingcontrole
- c. cholesterolbepaling
- d. blaastest politie
- e. weegschaal

Bijlage 1 bevat een schema dat je in de loop van deze module steeds verder in kunt vullen. Dit gebeurt aan de hand van een rode-draad-opdracht die je in elk hoofdstuk tegenkomt. Werk aan deze opdracht bij voorkeur in tweetallen. Soms kun je delen invullen aan de hand van de module, maar soms zul je ook op internet moeten zoeken naar antwoorden. Handige websites hierbij zijn bijvoorbeeld [URL2-3](#). Hier is het eerste deel van de rode-draad-opdracht.

3. Rode-draad-opdracht - deel I

Je hebt in dit hoofdstuk twee voorbeelden van biosensoren gezien: een zwangerschapstest en een glucosemeter.

Vul voor deze twee testen het volgende in het schema van bijlage 1 in:

- de naam van de sensor
- het syndroom dat met deze sensor vast te stellen is
- de naam van de stof die je wilt meten (vul dit in onder het kopje biomarker)
- de concentratie die je wilt kunnen meten (onder het kopje gewenste concentratie).

Misschien kun je nog niet alle gewenste concentraties invullen, laat dan het vakje leeg en vul dit later in.

2.5 Afsluiting

Je hebt nu twee voorbeelden van biosensoren gezien. De term biosensor wordt gebruikt voor een klein apparaat dat een concentratie van een stof in je bloed of urine via een biochemische reactie omzet in een meetsignaal. Daarmee geeft die stof informatie over een bepaalde situatie in het lichaam. Zo'n stof wordt aangeduid met het begrip biomarker.

Maar hoe herkent zo'n apparaat zo'n stof? Lukt dat ook bij lage concentraties? En hoe wordt deze herkenning omgezet in een getal op een display? En hoe zorg je dat de uitslag binnen korte tijd af te lezen is? En dat allemaal binnen een handzaam formaat? In de volgende hoofdstukken zal in een aantal stappen uitgelegd worden hoe een biosensor nu eigenlijk werkt.

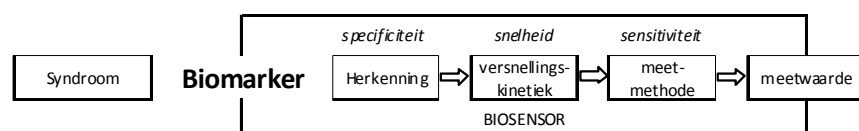
3 Biomarkers slaan alarm

In hoofdstuk 2 heb je een aantal voorbeelden van biosensoren gezien. In dit hoofdstuk zul je zien dat een huisarts gebruik maakt van veel meer soortgelijke tests. Meestal worden deze uitgevoerd in een ziekenhuislaboratorium of in een medisch diagnostisch centrum. Je maakt kennis met stoffen die een aanwijzing kunnen geven dat er iets mis is, deze stoffen worden ook wel **biomarkers** genoemd. Daarnaast gaan we in op het begrip **specificiteit**: soms volstaat het om een hele groep stoffen te meten en soms is het nodig één heel specifieke stof te detecteren.

Leerdoelen

Na afloop van dit hoofdstuk kun je:

- de voordelen geven van een biosensor ten opzicht van een laboratoriumtest
- een aantal voorbeelden geven waarbij een biosensor wenselijk zou zijn
- uitleggen op welke manier de ruimtelijke structuur van een eiwit tot stand komt
- de definitie van een biomarker geven
- een aantal voorbeelden van biomarkers geven met hun betekenis bij aanwezigheid in het lichaam
- uitleggen wat specificiteit van een biosensor inhoudt
- uitleggen wat het begrip sensitiviteit inhoudt.



Figuur 9: schema biosensor, biomarker.

4. Theorie: biomarker

Een biomarker is een stof in het lichaam die iets zegt over het verloop van een biologisch proces. Typerend voor een biomarker is dat hij een objectieve maat is voor hoe dat proces verloopt.

In de medische wereld wordt de term biomarker vooral gebruikt voor stoffen die een indicatie zijn dat er iets mis gaat met het normale biologisch proces.

Een biomarker kan ook een RNA molecuul zijn dat aangeeft of een bepaald gen actief is. Dit type biomarkers wordt in deze module niet besproken.

3.1 Uit de praktijk van de huisarts

Een bezoekje bij de huisarts begint meestal met een gesprek. De patiënt vertelt waarom hij langskomt en de arts probeert met vragen erachter te komen wat er aan de hand zou kunnen zijn. Bij veel klachten levert dit voldoende informatie om een diagnose te kunnen stellen, maar vaak ook heeft de huisarts extra informatie nodig om zeker van zijn zaak te kunnen zijn.

Als een huisarts besluit tot verder onderzoek is een van de mogelijkheden om een klinische test in het laboratorium te laten doen. Meestal is dat het meten van een stof in bloed, urine of faeces. De stof waarnaar dan gezocht wordt is in feite een biomarker, een stof uit het lichaam die door zijn aanwezigheid - of door zijn verhoogde of verlaagde concentratie - aangeeft dat er iets mis is in het lichaam.

70000 ☐ Ter uitsluiting van een mogelijke aandoening	T/F ☐ CITO aanvraag ☐ doorbellen ☐ faxen
70019 ☐ Controle bekende aandoening	T/F nummer:
70025 ☐ Ter bevestiging van een vermoedelijke aandoening	☐ Thuisprikken na telefonische afspraak (040) 21 41 202

Reden voor aanvraag/klinisch beeld:

PROBLEEMGEORIENTEERD AANVRAAGFORMULIER VOOR LABORATORIUM

1. Acut coronair syndroom 1-5 dagen na klachten 74004 H+ ☐ Troponine I	6. Bloedingsneiging, verhoogd Diagnostiek: 70330 CE ☐ Onderstaande tests 70349 C ☐ APTT 70355 C ☐ PT 70363 E ☐ Tromba's Controle therapie orale-anticoagulantia: 72340 C ☐ INR	10. Diabetes Mellitus typ Diagnostiek (Opsporing >45 jr, 3 jaarlijks of) 70476 N ☐ Glucose (nuchter) 72244 N ☐ Glucose (willekeurig tijdstip) Risico-inventarisatie: 74100 HE ☐ Bloed (nuchter): HbA1c, kreatinin HDL-cholesterol, triglyceriden, LDI 72280 U ☐ Urine (<50 jaar: 1e portie ochtend albumine/kreatinine-ratio (indien positief 2x herhalen)
2. Algemeen onderzoek 70058 E ☐ Borstink 70066 E ☐ Hb 20120 E ☐ Bloedbeeld 70074 N ☐ Glucose (willekeurig tijdstip) 70082 H ☐ TSH (indien afwijkend, vrij T4) Op indicatie: 72002 H ☐ Kreatinine (vooral ouderen) 72019 H ☐ ALAT (bij verdenking leveraandoening)	7. Cholesterol Zonder HVZ: 72164 H ☐ Chol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol (herhaal na min. 1 week) Met HVZ: 70429 H ☐ Cholesterol, LDL-cholesterol	Controle 3-maandelijks: (zorg) 72279 N ☐ Glucose (nuchter; stabiele instelling) 72287 E ☐ Gly-Hb (HbA1c; slechte instelling)
3. Anemic		

Figuur 10: deel van het aanvraagformulier voor laboratoriumonderzoek.
Bron: Diagnostisch Centrum Eindhoven.

5. Bron: interview met Dr. J. Delamarre, Huisarts in Eindhoven

Vraag

Welke bepalingen laat je als huisarts zoal uitvoeren?

Antwoord

Hier is een aanvraagformulier voor het Diagnostische Centrum Eindhoven. Zoals je ziet is dit een probleemgestuurd aanvraagformulier voor laboratoriumonderzoek. De uitslagen van onze aanvraag krijgen we in het algemeen binnen een week binnen. Voor niet-acute situaties is dat snel genoeg.

Vraag

Is er in de huisartsenpraktijk zoals hier behoefte aan biosensoren, dus aan kleine apparaatjes waarmee je snel en nauwkeurig een bepaling kunt doen, waar je anders een week op moet wachten?

Antwoord

Die behoefte is er alleen voor die aandoeningen, die mogelijk levensbedreigend zijn en voor aandoeningen waar de behandeling direct gestart moet worden. Ik neem de lijst van het Diagnostisch Centrum erbij:

Voor de volgende aandoeningen zou ik het als huisarts fijn vinden als er een snelle meting met een biosensor mogelijk is:

1. Acuut coronair syndroom

De patiënt heeft mogelijk een hartinfarct. Het eiwit troponine is een goede indicator hiervoor.

2. Algemeen onderzoek

Het hemoglobinegehalte van het bloed is iets wat je als huisarts graag wilt weten. De huidige methode om het 'in huis' te bepalen is zo onbetrouwbaar dat we het niet meer doen.

12. Diepveneuze trombose

Een stolsel, meestal in een van de beenaders, kan losschieten en een longembolie veroorzaken. Dit is een levensbedreigende aandoening. Een bepaald eiwit in het bloed, D-dimeer, kan uitsluitel geven of de patiënt hierdoor wordt bedreigd.

21. Ziekte van Pfeiffer

Een niet-levensbedreigende ziekte die veel bij jongeren voorkomt, de zogenaamde 'kissing disease'.

29. SOA met name chlamydia

Ook niet levensbedreigend, maar wel fijn om snel een diagnose van deze ziekte vast te stellen. Behandeling en preventie van verdere besmetting kan snel gestart worden.

Bij sommige klachten is er dus haast geboden en kosten laboratoriumtesten teveel tijd. In andere gevallen zou het fijn zijn als er snel duidelijkheid wordt verkregen met een biosensor zodat snel met een behandeling gestart kan worden. In deze gevallen kunnen biosensoren een uitkomst zijn.

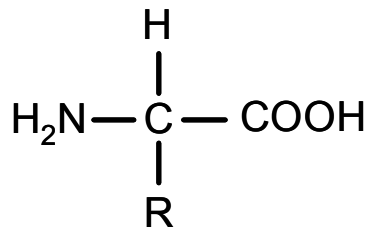
In bijlage 2 vind je het volledige formulier dat deze huisarts gebruikt. Zoals je ziet, kunnen er op het lab heel wat ziektes en aandoeningen worden onderzocht. Wat je niet direct ziet is welke stoffen daarbij gemeten worden. We gaan hier op een aantal belangrijke stoffen in.

3.2 Eiwitten en biosensoren

Veel biomarkers zijn eiwitten. Om te kunnen begrijpen hoe biosensoren werken moet er aandacht worden besteed aan hoe een biosensor het voor elkaar krijgt dat één specifiek eiwit wordt herkend in een mengsel van een groot aantal verschillende stoffen. Je moet hiervoor iets weten hoe eiwitten met elkaar kunnen reageren. Kennis omtrent de ruimtelijke structuur van eiwitten is noodzakelijk en in de volgende paragrafen zullen de details van de structuur van eiwitten worden besproken. Ook als de biomarker geen eiwit is, hebben we vaak toch te maken met eiwitstructuren. In de biosensor zelf zitten namelijk ook vaak eiwitten die voor de herkenning zorgen.

De bouwstenen van eiwitten

Eiwitten zijn lange polymeren die zijn opgebouwd uit aminozuren. De algemene structuurformule van een aminozuur ziet er als volgt uit:



Figuur 11: de algemene structuurformule van een aminozuur.

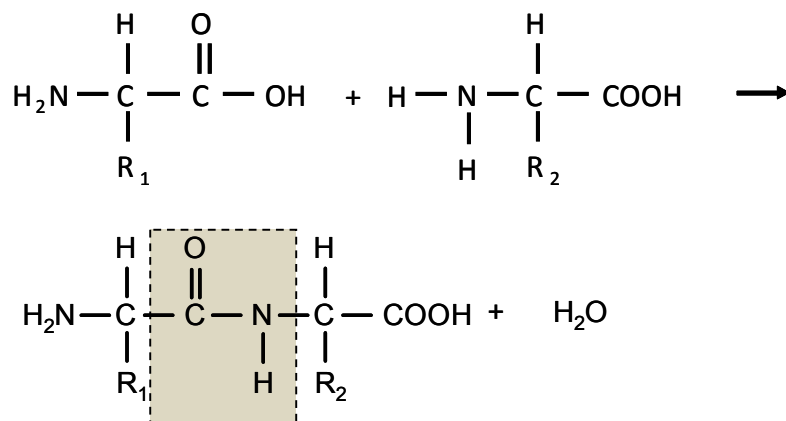
Zoals je ziet, is een centraal C-atoom verbonden met:

- een H-atoom
- een NH₂-groep, ook wel aminogroep genoemd
- een COOH-groep, ook wel (carbon)zuurgroep genoemd
- en een restgroep, gesymboliseerd door de letter R.

De aminogroep en zuurgroep zorgen voor de algemene naam aminozuur.

De restgroepen spelen een belangrijke rol. Ze beïnvloeden zowel de ruimtelijke structuur van een eiwit als de werking ervan. Door de restgroep R te variëren krijg je verschillende aminozuren. De belangrijkste twintig aminozuren die in de natuur voorkomen, staan in Binas Tabel 67C1.

Door een chemisch proces dat **condensatie-polymerisatie** heet (condensatie: er komt water vrij; polymerisatie: er wordt een keten gevormd), kunnen twee aminozuren aan elkaar worden gekoppeld. Hierbij ontstaat de voor eiwitten karakteristieke **peptide-binding**.



Figuur 12: het koppelen van twee aminozuren; in de grijze rechthoek zie je de karakteristieke peptide-binding die hierbij ontstaat

Je kunt de verschillende aminozuren voorstellen als legostenen waarmee je oneindig veel verschillende eiwitten kunt bouwen. Als je bijvoorbeeld gekozen zou hebben voor

$R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ (Leucine, afkorting Leu) en

$R_2 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ (Methionine, afkorting Met)

dan heb je na de condensatie-polymerisatie de dipeptide Leu-Met gemaakt.

4. Vraag

Teken de volledige structuurformule van de tripeptides Leu-Met-Cys en Cys-Met-Leu. Geef aan wat de verschillen zijn tussen deze twee tripeptides.

De structuur van eiwitten

Een eiwit is dus een keten van aminozuren. Zo'n keten is vaak weer op een bepaalde manier gewonden, zoals een telefoonsnoer. Bovendien kunnen delen van de keten elkaar aantrekken of afstoten. Zo ontstaat er een ruimtelijke structuur die bepaalt wat een eiwit kan gaan doen inde cel.

Hieronder worden de verschillende structuurelementen van een eiwit nader uitgelegd.

De primaire structuur

Zoals je in vraag 4 hebt gezien, kunnen aminozuren in allerlei volgordes aan elkaar worden gekoppeld. Deze aminozuurvolgorde wordt de *primaire structuur* van een eiwit genoemd.



Figuur 13: een schematische weergave van een α -helix structuur. Bron: Wikipedia

De secundaire structuur

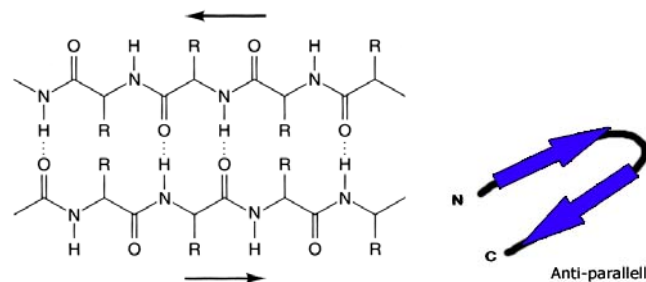
De primaire structuur van een eiwit resulteert niet in een rechte keten van aminozuren. De aminozuurketen kan zich lokaal op twee manieren gaan opvouwen tot een *secundaire structuur*:

- *de α -helix*

Dit is een soort wenteltrap structuur waarbij de aminozuurketen draait rond een denkbeeldige gemeenschappelijke as. De lengte van de α -helix kan variëren. Het aantal α -helices in een eiwit varieert ook: tien of meer α -helices in een eiwit is mogelijk.

- **de β -sheet**

Dit is een plaatvormige ruimtelijke structuur die ontstaat als twee of meer aminozuurketens ergens in het eiwit dicht bij elkaar komen te liggen. Er ontstaat dan een plaatstructuur die gestabiliseerd wordt door H-bruggen tussen de N-H-groep in de peptide-band van de ene aminozuurketen en de C=O-groep in de peptide band van de andere aminozuurketen. De lengte van de β -sheet kan variëren. Dit geldt ook voor het aantal β -sheets in een eiwit.



Figuur 14: een schematische weergave van een β -sheet, ontstaan uit twee aminozuurketens die in tegengestelde richting dicht bij elkaar liggen. Bron: Wikipedia.

Links in figuur 14 kun je zien hoe de N-H-groepen en C=O-groepen met elkaar een binding zijn aangegaan. Rechts in de figuur zie je hoe een complete β -sheet in een eiwitstructuur wordt aangegeven met een pijl. Behalve de β -sheets worden hier de uiteinden van het eiwit weergegeven:

- het **N-terminale uiteinde** (waar de aminozuurketen eindigt met de $-\text{NH}_2$ groep)
- het **C-terminale uiteinde** van het eiwit (waar de aminozuurketen eindigt met de $-\text{COOH}$ groep).

Kijk nog eens terug naar vraag 4. Waar bevinden zich in dat voorbeeld het N-terminale en C-terminale uiteinde van de peptideketens?

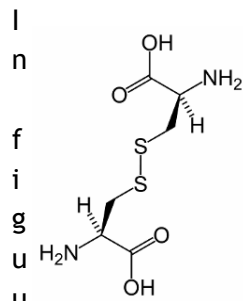
Tertiäre structuur

Voor verdere stabilisering van het eiwit, vinden er ook driedimensionale vouwingen plaats. De restgroepen van de verschillende aminozuren spelen hierbij een belangrijke rol. De restgroepen van de belangrijkste aminozuren zijn weergegeven in Binas Tabel 67C1. Op grond van de samenstelling van de restgroepen kunnen de aminozuren globaal in vier verschillende groepen worden ingedeeld:

- de apolaire aminozuren: dit zijn de alifatische, de cyclische en de aromatische aminozuren zoals vermeld in Binas tabel 67C1
- de polaire aminozuren: dit zijn aminozuren die een O- of S-atoom bezitten
- de basische aminozuren: deze aminozuren bevatten de NH_2 groep (Lysine en Arginine) of een cyclische variant zoals in histidine
- de zure aminozuren: deze aminozuren bevatten de COOH groep als restgroep zoals in asparaginezuur en glutaminezuur.

Met deze vier verschillende aminozuurgroepen kan op vier verschillende manieren als volgt een bijdrage worden geleverd aan de driedimensionale vouwing van een eiwit:

- manier 1
Alle eiwitten zijn opgelost in een waterige oplossing. Dat betekent dat de apolaire aminozuren zodanig 3-dimensionaal worden gevouwen dat het apolaire gedeelte van de restgroep zover mogelijk van de water moleculen af komt te zitten.
- manier 2
De polaire aminozuren daarentegen zorgen ervoor dat de driedimensionale vouwing van het eiwit zodanig plaatsvindt dat deze groepen juist zo dicht mogelijk bij de water moleculen komen te liggen. Bovendien zorgen deze apolaire aminozuren voor H-brug vorming tussen verschillende aminozuren die mogelijk tien tot vijftig aminozuren uit elkaar kunnen liggen. Dit levert wederom een mogelijkheid op om de 3-dimensionale structuur van een eiwit meer vorm te geven.
- manier 3
Het aminozuur cysteine heeft een $-\text{SH}$ restgroep. Hiermee kunnen twee cysteine aminozuren een zogenaamde disulfidebrug ($-\text{S}-\text{S}-$) vormen zoals weergegeven in figuur 15.



Figuur 15: schematische weergave van een disulfide-(S-S)-brug tussen twee cysteine aminozuren.

1

5 wordt ook informatie gegeven over de driedimensionale structuur van de verbinding door sommige atoombindingen met een 'driehoekje' en andere met een 'stippellijntje' aan te geven. Het 'driehoekje' geeft aan dat de atoombinding naar voren uitsteekt uit het papier. Het 'stippellijntje' betekent dat de atoombinding naar achteren uitsteekt uit het papier.

Deze disulfidebrug verbindt dus twee cysteine aminozuren met elkaar en deze cysteine aminozuren kunnen ver uit elkaar liggen in de primaire structuur van het eiwit. Hiermee ontstaat dus een andere mogelijkheid voor een driedimensionale vouwing van het eiwit.

- manier 4

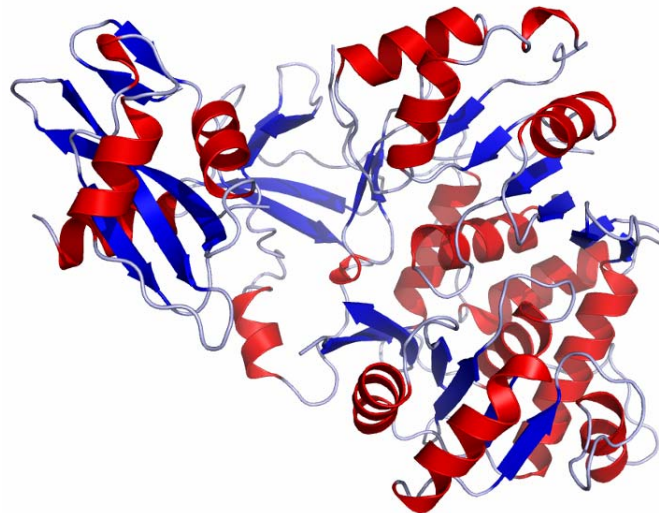
De basische en zure aminozuren kunnen een elektrostatische interactie aangaan. Het zure H-atoom van het zure aminozuur verplaatst naar het basische aminozuur. Het overblijvende negatief geladen COO^- deel van het zure aminozuur gaat dan een elektrostatische interactie aan met het positief geladen $^+\text{NH}_3$ deel van het basische aminozuur. Deze elektrostatische interactie zorgt voor een vierde mogelijkheid om de driedimensionale structuur van het eiwit vorm te geven.

5. Opdracht

- Teken 3 verschillende alifatische en 2 verschillende aromatische apolaire aminozuren. Leg uit waarom deze aminozuren apolair zijn. Rangschik de alifatische aminozuren naar toenemende apolariteit.

- b. Teken de H-bruggen tussen 1 molecuul van de volgende aminozuren
- serine en tyrosine
 - arginine en threonine.
- c. Geef de reactievergelijking in structuurformules van 2 cysteine aminozuren die een disulfide brug vormen. Waarom kan dat niet plaatsvinden met methionine?
- d. Teken de elektrostatische interactie tussen de aminozuren lysine en asparaginezuur.

Al deze verschillende interacties leveren een bijdrage aan de driedimensionale vouwing van het eiwit zodat er uiteindelijk een compacte, natuurlijke vorm van het eiwit wordt gevormd. Dit is de **tertiaire structuur** van het eiwit. Een voorbeeld van de tertiaire structuur van het eiwit luciferase is te zien in figuur 16.



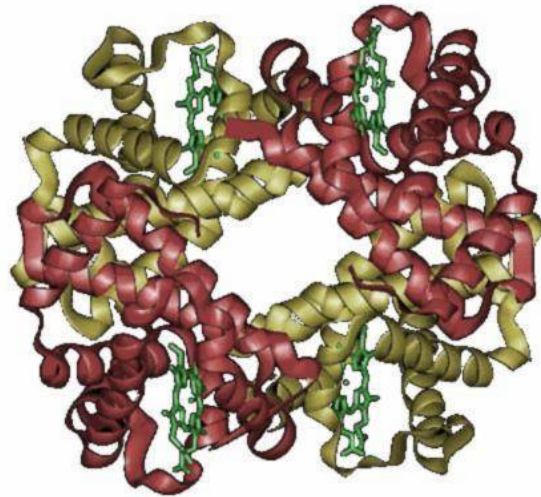
Figuur 16: tertiaire structuur van het eiwit luciferase afkomstig van het vuurvliegje *Photinus pyralis*. Bron: Protein Data Bank (PDB 1LCI).

De verschillende α -helices (rood) en β -sheets (blauw) zijn duidelijk zichtbaar, net als de verschillende vouwingen van de aminozuurketen die uiteindelijk leiden tot de driedimensionale tertiaire structuur van het eiwit.

Quaternaire structuur

Verschiede tertiaire structuren van eiwitten kunnen zich samenvoegen in één groter eiwitcomplex. Dit wordt de **quaternaire structuur** van een eiwit genoemd. Een voorbeeld van een eiwit met

een quarternaire structuur is hemoglobine. Dit eiwit speelt een belangrijke rol bij het transporteren van zuurstof in het menselijke lichaam. De quarternaire structuur van hemoglobine bestaat uit 4 eiwitten, waarbij ieder eiwit een zogenaamde heemgroep bevat, zie Binas tabel 67C2.



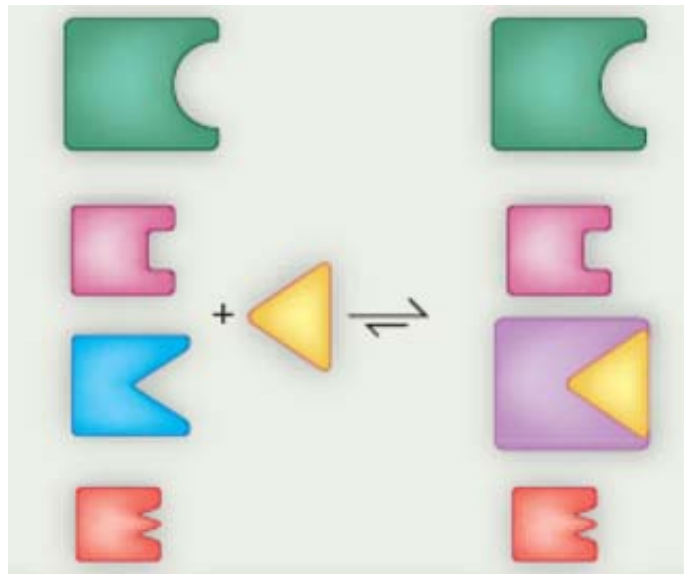
*Figuur 17: schematische weergave van de quarternaire structuur van hemoglobine.
Bron:Wikipedia.*

In figuur 17 kun je zien dat hemoglobine bestaat uit een complex van (zie ook Binas tabel 67C2):

- twee identieke eiwitten (getekend in geel)
- twee andere identieke eiwitten (getekend in rood)
- voor ieder eiwit een heemgroep (weergegeven in groen; zie ook Binas tabel 67D).

Interactie tussen verschillende eiwitten

Eiwitten kunnen dus heel verschillende en exotische vormen aannemen. Daarom kunnen eiwitten niet zomaar met elkaar reageren. De driedimensionale structuur van een eiwit bepaalt of deze een interactie (of binding) aan kan gaan met een ander eiwit. Deze binding kan alleen plaatsvinden als de ruimtelijke structuur van het ene eiwit 'past' op de ruimtelijke structuur van het andere eiwit. Je kunt je dit voorstellen als een sleutel die in een slot moet passen.



Figuur 18: schematische weergave van het sleutel-slot-mechanisme tussen verschillende eiwitten. Bron: Science, juni 2008, figuur gebruikt met toestemming van AAAS.

Figuur 18 illustreert het **sleutel-slot-mechanisme** dat bepaalt of eiwitten met elkaar kunnen reageren. Links van de reactiepijl zie je vijf verschillende eiwitten. Deze worden schematisch weergegeven door vijf verschillende vormen. De figuur laat duidelijk zien dat door de structuren van de verschillende eiwitten er maar één goede sleutel-slot-combinatie mogelijk is, namelijk tussen het driehoekige eiwit en het 3^e eiwit van boven. Dit eiwit noemen we **complementair** aan het driehoekige eiwit. Er ontstaat een nieuw eiwitcomplex waarin beide eiwitten aan elkaar zijn gekoppeld.

Het sleutel-slot-mechanisme is het basisprincipe waarop biosensoren zijn gebaseerd. In een biosensor wordt er een koppeling gemaakt met een groep eiwitten of met één bepaald eiwit in bijvoorbeeld urine of bloed. De eiwitten waarmee een koppeling in urine of bloed worden gemaakt worden de biomarkers genoemd. Het zal duidelijk zijn dat het koppelen aan één bepaalde biomarker lastiger is dan het koppelen aan een groep biomarkers. Een biosensor die koppelt aan slechts één bepaalde biomarker wordt daarom een **specifieke biosensor** genoemd dan een biosensor die een koppeling maakt met een groep biomarkers.

3.3 Steeds specifieker

Bij een ziekte treden er allerlei chemische processen op in het menselijk lichaam waardoor er een groot aantal verschillende

biomoleculen worden aangemaakt. Deze biomoleculen zijn veelal eiwitten en zijn goede biomarkers.

Een eenvoudige urinetest kan veel zeggen over het functioneren van de nieren.

Per dag scheiden mensen 1 à 1,5 liter urine uit. Urine heeft de volgende massasamenstelling:

1. 95% is water
2. 5% bestaat uit
 - Ionen zoals Cl^- (0,6%); PO_4^{3-} (0,4%); Na^+ (0,4%); Ca^{2+} (0,03%); K^+ (0,15%).
 - organische moleculen zoals ureum $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (2%). Dit is een afvalstof bij de afbraak van eiwitten.
3. een heel klein percentage wordt gevormd door een grote variëteit aan door organismen gemaakte stoffen zoals glucose en kleine eiwitten zoals hormooneiwitten.

Als de nieren niet goed werken, neemt de hoeveelheid eiwitten in de urine toe. Als je dus een verhoogde concentratie eiwitten kunt meten, weet je dat er met de nieren iets niet in orde is.

Eiwitten beïnvloeden de zuurgraad van urine. Een tot voor kort veelgebruikte niertest is dan ook gebaseerd op een pH-meting. Met deze test kun je weliswaar controleren of de concentratie eiwitten te hoog is of niet, maar er kleven ook nadelen aan. De test is bijvoorbeeld niet geschikt voor mensen die medicijnen gebruiken. Dit komt doordat behalve eiwitten, ook andere stoffen van invloed zijn op de pH. We hebben hier dus te maken met een weinig specifieke test, dat wil zeggen een test die niet reageert op één stof maar reageert op verschillende stoffen.

6. Opdracht

Ga naar de site van de nierstichting ► [URL4](#) en

- a. Zoek uit wat de niercheck inhoudt.
- b. Zoek uit wat de belangrijkste nierziekten zijn en waardoor die veroorzaakt worden.

Een specifiekere test

Liever zou je één stof willen meten die iets zegt over hoe goed of slecht de nieren functioneren. Zo'n stof is **albumine**. Albumine is een eiwit dat een belangrijke rol speelt bij het regelen van de osmotische druk in bloed. Dagelijks wordt er in de lever 12 gram van dit eiwit aangemaakt.

De halveringstijd van albumine bedraagt 21 dagen. Dat betekent dat na 21 dagen er nog $0,5 \times 12 = 6$ gram over is van de aangemaakte 12 gram (na 42 dagen is er nog $0,5 \times 6 = 3$ gram over etc.). Bij gezonde mensen zorgen de nieren ervoor dat de restanten albumine uit het bloed worden verwijderd. Hierdoor is er zo'n 10 - 20 mg albumine in 1 liter urine aanwezig. Als de nieren niet goed functioneren dan stijgt de hoeveelheid albumine.

- Bij de nierziekte microalbuminurie stijgt de hoeveelheid albumine naar 300 mg in 1 liter urine.
- Bij de nierziekte proteïnurie loopt dit zelfs op naar een hoeveelheid albumine van 500 mg in 1 liter urine.

Albumine is dus een uitermate geschikte biomarker om te bepalen of iemand aan een nierziekte lijdt of niet.

6. Achtergrondinformatie: de Niercheck

De Nierstichting heeft een campagne gelanceerd om mensen te informeren over de gevolgen van verborgen nierschade en over het belang van vroege opsporing ervan.

Mensen konden een eenvoudige zelftest aanvragen waarmee zij zichzelf konden screenen op mogelijke nierschade. Deze test, de Niercheck, bevat 3 zogenaamde albusticks waarmee semi-kwantitatief de hoeveelheid albumine in de urine wordt bepaald.

- **Semi-kwantitatief** betekent hier dat je niet precies de hoeveelheid aanwezige albumine bepaalt, maar dat je een van de volgende uitslagen kunt krijgen:
- de hoeveelheid albumine is maximaal 30 mg per liter urine: geen probleem met de nieren
- de hoeveelheid albumine is maximaal 300 mg per liter urine: dit is een indicatie voor de nierziekte microalbuminurie
- de hoeveelheid albumine is maximaal 500 mg per liter urine: dit is een indicatie voor de nierziekte proteïnurie.

De Niercheck maakt gebruik van een biosensor (de albusticks) om de hoeveelheid albumine in urine te bepalen. Omdat deze test alleen albumine meet, noemen we het een specifieke test.

Nauwkeurigheid

Een kernbegrip bij het meten met biosensoren, of eigenlijk met alle meetinstrumenten, is **nauwkeurigheid**. Dat betekent dat als je meet je altijd met een bepaalde marge moet werken waarbinnen je meting nauwkeurig is.

Voorbeeld: als je met een geodriehoek met een onderverdeling van millimeters gaat werken, zul je waarschijnlijk aflezen met één cijfer achter de komma: 8,1 cm. Het zou een beetje gek zijn als je dan 8,1237 cm precies kunt afmeten! Bovendien kan de geodriehoek een beetje verschuiven of wat ook. Waarschijnlijk kun je dus tot op een paar millimeter nauwkeurig meten. Je kunt dat als volgt noteren: 8,1 ± 0,1 cm. Ook kun je dat als percentage van je meetwaarde aangeven, in dit geval $0.1/8,1 \times 100\%$ is afgerond 1%.

Maar hoe zit dat met biosensoren? Ook daar heeft de meter een bepaalde nauwkeurigheid. Dat ga je in een aantal experimenten in deze module testen.

7. Opdracht

7.1 Practicum: urine

Je gaat nu zelf een 'urine'-test uitvoeren, met een stof die op urine lijkt. De instructies voor de test vind je in bijlage 3.

Schrijf een kort verslag van je resultaten. Gebruik hiervoor

► werkinstructie practicumverslag in de NLT Toolbox.

7.2 Meting pH en glucosegehalte

Bij een urinetest wordt vaak ook de pH van de urine en het glucosegehalte gemeten. Voor welke ziekte vormen de pH en het glucosegehalte een belangrijk gegeven in de diagnose? Maak bij de beantwoording van deze vraag gebruik van de website van de Nierstichting ► URL4.

3.4 Specifiek en sensitief

Als je een stof wilt meten die in een hoge concentratie aanwezig is, zoals albumine, is dat nog redelijk eenvoudig te doen. Veel moeilijker wordt het om stoffen te meten waarvan maar een paar moleculen aanwezig zijn. Je methode moet dan heel gevoelig - of **sensitief** - zijn. We bespreken hier een voorbeeld van een biomarker met een heel lage concentratie in bloed.

De samenstelling van bloed

Bloed is een stuk complexer dan urine en bestaat uit een groot aantal componenten. Zo'n 45% van ons bloed bestaat uit vaste bestanddelen zoals de rode en witte bloedcellen en de bloedplaatjes. De overige 55% is vloeistof, ook wel **bloedplasma** genoemd. Dit bestaat voornamelijk uit water (91%) en voor een klein deel (7%) uit plasma-eiwitten.

Het aantal plasma-eiwitten wordt geschat op 10.000.000 verschillende soorten waarvan er momenteel zo'n 100.000 bekend zijn. Dat betekent dat 99% van de plasma-eiwitten nog onbekend terrein is. Veel van de 100.000 bekende plasma eiwitten zijn te verbinden met een bepaald ziektebeeld en zijn dus geschikte biomarkers.

Een biosensor die uit 10.000.000 kandidaten een paar moleculen van één specifiek eiwit moet detecteren, is in feite bezig om een speld in een hooiberg te zoeken. Toch is het mogelijk om biosensoren te ontwikkelen die dit aankunnen. In deze paragraaf bespreken we het ontwerp van een biosensor die in staat is één specifiek eiwit te detecteren dat een indicatie is van een levensbedreigende aandoening aan het hart.

7. Bron: vage klachten

Jan van Dongen is een succesvol zakenman. Zijn motto is: "Live fast and make lots of money". Hij is directeur van een groot, eigen bedrijf en maakt werkweken van minstens negentig uur.

Jan zit veel op de weg. In zijn overvolle agenda is geen plaats voor de ochtendspits. "Files zijn voor het klootjesvolk", roept hij soms brallerig. Hij vindt zichzelf een sportieve rijder, maar zijn medeweggebruikers vinden hem 'een asociale hufter in een veel te groot scheurijzer'.

Jan schuift graag aan bij de vele zakendiners. Af en toe baart het hem wel zorgen: hij is veel te zwaar en zijn huisarts heeft hem als eens gewaarschuwd dat zijn bloeddruk te hoog is. "Meneer zou wat minder moeten eten en meer moeten sporten". Maar ja, die diners kun je toch niet laten lopen, dan denken ze dat het slecht gaat met je bedrijf. En sporten? Tja, waar haalt hij de tijd vandaan?

Die maandagochtend aan het ontbijt voelt Jan zich niet fit. Beetje kortademig, transpireren. Af en toe een ongemakkelijke tinteling in zijn linkerarm. Na een kwartiertje drementen tussen de voordeur - om naar kantoor te gaan - en de telefoon - toch maar de huisarts te bellen - kiest hij voor bellen. "Met van Dongen. Ik wil graag langskomen, ik voel me niet fit."

In de wachtkamer van de huisarts voelt Jan zich eigenlijk alweer wat beter. Hij doet zijn verhaal tegen de huisarts, maar voegt er meteen een toe: "Het zal wel vermoeidheid zijn."

De huisarts echter, vindt het toch verstandig om wat bloed te laten afnemen voor onderzoek. "Al is het maar om wat dingen uit te sluiten. Gaat u met dit formulier naar het laboratorium en kom vrijdag nog even voor de uitslag terug."

Die uitslag zou Jan krijgen, maar niet van de huisarts.

Donderdagochtend: patiëntenbespreking op de afdeling 'hartbewaking' van het ziekenhuis.

"Patiënt van Dongen. Maandagmiddag binnengebracht door de GGD. Onwel geworden op het werk. De symptomen wezen op een snel verergerend acuut coronair syndroom. Het cardiogram en de gevonden troponinwaarde in het bloed van 0,08 µg/L passen duidelijk bij een beginnend hartinfarct. "

"Opmerkelijk", zegt een van de specialisten, "deze patiënt was 's morgens met vergelijkbare klachten bij de huisarts geweest, al waren ze toen tijdelijk. Slechte zaak dat zijn beginnend hartinfarct niet eerder op te sporen was!"

De artsen bespreken vervolgens welke behandeling voor patiënt van Dongen, de beste is.

Vlak voor zijn hartinfarct heeft Jan een aantal vage klachten. Deze hoeven niets te betekenen, maar kunnen ook een aanwijzing zijn voor dreigend gevaar.

8. Achtergrondinformatie: hartziektes en hun klachten

Op de site van de hartstichting, ►URL5 staan een aantal hartziektes en de klachten die daarbij op kunnen treden.

Angina pectoris of hartinfarct, in verergerde mate ook wel acuut coronair syndroom (ACS genoemd)

Een typische beklemmende, drukkende pijn achter het borstbeen. De pijn straalt vaak uit naar de linkerarm of naar de kaken en soms naar de rug of de schouderbladen. Soms is er pijn in de rechter- in plaats van de linkerarm. Misselijkheid en zweten kunnen ook signalen zijn. Vrouwen kunnen, behalve deze signalen, ook andere verschijnselen hebben zoals ongewone moeheid, slecht slapen en kortademigheid.

Ritmestoornissen

Hartkloppingen, hartbonzen, overslaan van het hart, duizeligheid, neiging tot flauwvallen en zelfs bewusteloosheid. Bijkomende klachten zijn: transpireren, een onaangenaam gevoel en misselijkheid tijdens een aanval.

Hartfalen

Vermoeidheid, kortademigheid, opgezette benen en enkels, een vol gevoel in de bovenbuik, een opgezette buik, zwaarder worden terwijl u niet meer dan normaal eet, vaker moeten plassen 's nachts met soms weinig urineproductie overdag, prikkelhoest, vooral bij platliggen, verminderde eetlust, slapeloosheid of onrustige slaap, duizeligheid, koude handen en voeten.

De klachten van Jan kunnen dus symptomen zijn voor een hartinfarct (ACS), maar de symptomen van ACS zijn niet altijd even duidelijk. Deze kunnen van persoon tot persoon sterk verschillen. Een huisarts wil dus graag vast kunnen stellen of de vage klachten van Jan betekenen dat hij een van bovenstaande hartziektes heeft. Om hier uitsluitel over te krijgen, gebruikt hij het liefst een klinische test die snel een duidelijk antwoord oplevert. Daarom wordt er gezocht naar een stof die bij ACS een verhoogde concentratie krijgt. Het bloedeiwit troponine is waarschijnlijk zo'n stof.

Troponine

Troponine is een bolvormig eiwit dat een belangrijke rol speelt bij spiercontractie en spierrelaxatie. Er zijn drie soorten troponines bekend:

1. Troponine C, afgekort TnC
2. Troponine I, afgekort TnI
3. Troponine T, afgekort TnT

Alle drie troponines komen zowel in de hartspier als in de skeletspieren voor. De ruimtelijke structuur van TnC is hetzelfde in de hartspier en de skeletspieren. Echter de ruimtelijke structuur van het eiwitmolecuul TnI en TnT verschilt wel in de hartspier en de skeletspier. Dat maakt TnI en TnT geschikt om problemen met de hartspier te diagnosticeren.

Als er om wat voor een reden dan ook een spiercel in het hart kapot gaat, komt er troponine in het bloed. Bij een sluipende hartziekte, waarbij af en toe enkele cellen sterven en de patiënt geen acute klachten heeft, neemt de concentratie van troponine een klein beetje toe. Een verhoogd troponinegehalte zonder verdere klachten geeft dus aan dat er toch iets aan de hand is met het hart. Bij een hartinfarct, waarbij een deel van de hartspiercellen plotseling afsterft, neemt het troponinegehalte zeer sterk toe.

Pijn in de borst kan meerdere oorzaken hebben. Als iemand pijn in zijn borst heeft zonder een toename van troponine is er dus iets anders aan de hand. Zo zie je dat de concentratie van troponine in combinatie met de fysieke verschijnselen - en eventueel met het meten van andere biomarkers of een EEG - informatie geeft over het soort aandoening dat iemand heeft.

De eerste uren na het optreden van een hartinfarct is het troponinegehalte nog niet hoog genoeg om vast te kunnen stellen dat er een hartinfarct heeft plaatsgevonden. Pas na 6 tot 8 uur kan een verhoogde concentratie TnI en TnT in het bloed worden aangetoond. De concentratie blijft daarna nog 10 tot 14 dagen hoog. Als je binnen de eerste uren na een hartinfarct een verhoogd troponinegehalte probeert aan te tonen is de kans dus groot dat de uitslag negatief is. Daarom zal bij een patiënt met typische hartklachten een aantal uren later nog eens het troponinegehalte gemeten worden. Troponine kan bepaald worden met een geschikte biosensor.

9. Theorie: troponine

Troponine is een stof waar veel onderzoek aan wordt verricht. Het komt niet alleen vrij bij een hartinfarct, maar ook, in veel kleinere hoeveelheden, als er al problemen zijn met de hartspier, maar nog geen acute verschijnselen.

Een lichte verhoging van troponine kan aanleiding zijn om medicijnen toe te dienen die een naderend hartinfarct uitstellen of zelfs kunnen voorkomen. Begrijpelijk dus dat troponine zo in de belangstelling staat.

8. Opdracht

8.1 Troponine

- a. Boven 0,1 μg troponine (TnI) per mL bloed wordt op het ogenblik als niet normaal en dus risicovol beschouwd. Dat is heel wat minder dan het normale glucosegehalte in het bloed. Bepaal de verhouding tussen het aantal TnI moleculen per mL bloed en het aantal glucose moleculen per mL bloed bij een gezond persoon.
- b. We onderzoeken het bloed van iemand die een verhoogde concentratie troponine heeft. Hoeveel moleculen troponine zitten er in één druppel bloed met een troponine concentratie van 400 ng/mL? Ga er van uit dat
 - de molecuulmassa van troponine 22500 g/Mol is
 - de concentratie troponine 400 ng = 4×10^{-7} g per mL bloed is
 - voor het bepalen van het volume van één druppel geldt dat het volume van 20 druppels 1 mL bedraagt.De uitkomst van deze vraag is van belang omdat een biosensor al met één druppel bloed goed moet kunnen werken.

8.2 Kenmerken biosensor

Eerder in deze module, bij opdracht 2.2a, heb je een aantal kenmerken benoemd waar een biosensor aan moet voldoen. In dit hoofdstuk zijn er nog een aantal genoemd. Voeg deze toe aan je antwoord van opdracht 2.2a.

9. Rode-draad-opdracht - deel II

Je hebt nu al wat meer gezien over biosensoren.

Vul het schema in bijlage 1 verder aan:

- Voeg onder het kopje 'naam sensor' de Niercheck en - op de volgende regel - urineonderzoek toe en vul - op de volgende lege regel - onder het kopje 'biomarker' troponine in.
- Vul nu de velden in van de kolommen 'syndroom', 'biomarker' en 'gewenste concentratie'. Vul nu ook in of de tests al dan niet heel specifiek moeten zijn.

10. Theorie: specifiek en sensitief

Specifiek en sensitief zijn twee begrippen die je makkelijk door elkaar haalt. Daarom even kort het verschil:

Specifiek zegt iets over het aantal verschillende biomarkers die een sleutel-slot-combinatie kunnen vormen met de biosensor, zodanig dat de biosensor een meting kan uitvoeren. Als er veel biomarkers geschikt zijn dan is de biosensor niet erg specifiek. Als er slechts met één biomarker een sleutel-slot-combinatie gevormd kan worden dan is de biosensor zeer specifiek..

Sensitief zegt iets over hoeveel stof je nodig hebt om hem te kunnen detecteren. In een flinke plas urine, met een hoge concentratie van de stof die je wilt meten, is het makkelijk zoeken. Zo'n test hoeft niet sensitief te zijn. Een molecuul waarvan er maar een paar 'rondzwemmen' in een druppeltje bloed, vraagt om een zeer sensitieve test.

3.5 Afsluiting

In dit hoofdstuk heb je te maken gehad met twee type biosensoren:

- Bij de urine test heb je semi-kwantitatief de hoeveelheid albumine in urine bepaald. Er wordt dus gemeten aan één biomarker en de biosensor is daarom zeer specifiek. De concentratie van de biomarker is echter vrij hoog. Dat betekent dat de biosensor maar een beetje sensitief is.
- Bij de bloedtest moet de hoeveelheid van één bloedeiwit (troponine) worden bepaald. De biosensor is dus zeer specifiek. De concentratie troponine die gedetecteerd moet worden is bijzonder laag. Het is dus ook een zeer sensitieve test.

Een biomarker is niet altijd één op één gerelateerd aan een bepaalde ziekte. Een ontsteking kan natuurlijk op heel veel verschillende plaatsen optreden. Hoe specifieker de biomarker hoe waardevoller.

Vaak is echter een combinatie van biomarkers nodig om een bepaalde ziekte te identificeren.

Er zal steeds meer vraag ontstaan naar specifieke en sensitieve biosensoren. In hoofdstuk 4 kijken we naar hoe het lichaam heel specifiek en sensitief lichaamsvreemde stoffen herkent. Biosensoren maken namelijk gebruik van dat principe!

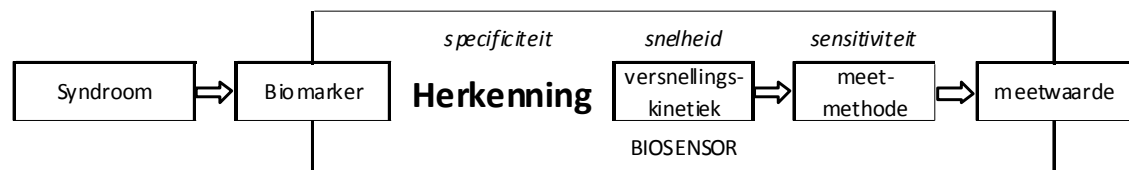
4 Afkijken bij de natuur

Bij sommige ziektebeelden horen dus stoffen die verraden dat er iets aan de hand is (de biomarkers). Maar, zoals we in het voorbeeld van troponine zagen, is de concentratie van deze stof soms heel laag. Ook wil je als je gaat meten alleen dat ene eiwit meten en niet een van die talloze andere, soortgelijke stoffen in je bloed. Hoe kun je dat doen? De natuur heeft dat blijkbaar al opgelost, kijk maar naar ons afweersysteem. Als we biosensoren willen maken, kunnen we dus mooi afkijken bij hoe ons eigen lichaam dat doet.

Leerdoelen

Na afloop van dit hoofdstuk kun je:

- uitleggen hoe het menselijk lichaam een specifiek eiwit herkent
- zelf een proef met antistof-antigeen uitvoeren
- de uitslag van een Ouchterlonytest juist interpreteren.



Figuur 19: schema biosensor, herkenning.

4.1 De precisie van ons afweersysteem

Ons lichaam heeft een zeer specifiek en gevoelig systeem ontwikkeld om ongewenste indringers te detecteren en zonodig op te ruimen: ons afweersysteem. Met indringers wordt hier zowel bacteriën en virussen bedoeld als lichaamsvreemde eiwitten. Hoe gaat dat in zijn werk? Een vreemde indringer in ons lichaam wordt binnen enkele dagen opgemerkt waarna er een heel proces op gang komt om de indringer onschadelijk te maken en weg te werken. Dat uit zich bijvoorbeeld in tranende ogen, een lopende neus, extra slijmproductie in de longen en hoesten. Alles is erop gericht om de binnendringers weg te werken.

11. Biologie: afweersysteem

Hoe ons afweersysteem werkt heb je bij de biologielessen gehad. Werk je kennis bij als dat niet het geval is. Kijk hiervoor in je biologieboek en op internet (op ►URL6 vind je mooie animaties over de werking van B-cellen, T-helpercellen, geheugencellen, enzovoort,).

Woordenlijst

In dit hoofdstuk kom je veel nieuwe woorden tegen. We lichten de belangrijkste eruit:

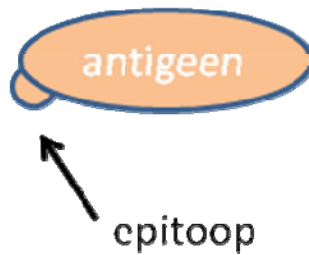
- Antigeen: lichaamsvreemde stof, meestal in de vorm van een (groot) eiwit.
- Epitoot: specifieke bindingsplaats waarmee het antigeen zich aan andere moleculen kan binden.
- Immunoglobuline: antistof of antilichaam.
- Lymfocyt: witte bloedcel die lichaamsvreemde stoffen kan herkennen en antistoffen aan kan maken.
- Polypeptide: eiwitketen.

Ons afweersysteem in drie stappen

Het afweersysteem in het menselijke lichaam is een complex proces waarbij een groot aantal verschillende moleculen (vooral eiwitten) actief zijn. In grote lijnen kan ons afweersysteem in drie stappen worden samengevat:

Stap 1: een indringer wordt herkend aan zijn jasje

Wanneer een bacterie of virus het lichaam binnendringt, komt ons afweersysteem in actie. Het afweersysteem reageert op lichaamsvreemde stoffen, die **antigenen** worden genoemd. Antigenen zijn vrij grote moleculen en vrijwel altijd eiwitten. Antigenen kunnen een onderdeel vormen van bacteriën of virussen, maar ook een ‘los’ lichaamsvreemd eiwit roept een reactie van het afweersysteem op en fungeert dan als antigeen. Deze antigenen hebben vaak heel specifieke bindingsplaatsen, het zogenaamde **epitoot**, waarmee ze zich aan andere moleculen - meestal ook eiwitten - kunnen binden. Een antigeen kan één of meerdere epitopen hebben. Een schematische voorstelling van een antigeen met één epitoot is geschetst in figuur 20.



Figuur 20: schematische voorstelling van een antigeen met één epitooop.

De lichaamsvreemde epitopen worden herkend door cellen van het afweersysteem, de **lymfocyten**. Herkennen houdt in dat het epitooop hecht aan een receptor op de lymfocyt. Dat betekent dus dat er heel veel soorten lymfocyten in ons bloed moeten zitten die elk een andere receptor aan de buitenkant hebben! Op deze manier lost ons lichaam het probleem van de specificiteit op.

Er zitten ook antigenen op de cellen van je eigen lichaam. Daar reageert je afweersysteem niet op. Als jouw lichaamscellen terecht komen in een ander organisme, dan reageert het afweersysteem van dat andere organisme er wel op.

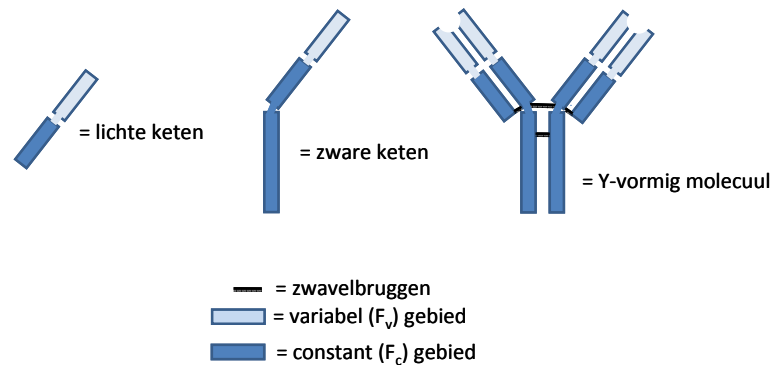
Stap 2: lymfocyten maken specifieke antistoffen

In ons beenmerg worden continu verschillende lymfocyten (B-cellen) gemaakt uit stamcellen. Wanneer een antigeen door een bijpassende lymfocyt wordt herkend, gaat deze lymfocyt grote hoeveelheden antistoffen produceren. Deze antistoffen worden ook wel antistoffen genoemd of **immunoglobulinen**, afgekort: Ig.

Antistoffen zijn eiwitten met een structuur die precies past bij het epitooop op het antigeen, weer volgens het sleutel-slot-principe. Door het vrijkomen van de antistoffen in het bloed komen deze in contact met de indringers.

We zullen eerst de structuur van de antistoffen verder uitwerken.

Er zijn vijf verschillende soorten immunoglobulinen bekend (zie Binas, tabel 84K). We bespreken hier immunoglobuline type G, afgekort IgG. Een IgG molecuul bestaat uit vier **polypeptiden** (= eiwitketens): twee identieke **zwarte ketens** en twee identieke **lichte ketens**. Deze ketens worden door zwavelbruggen aan elkaar gekoppeld tot een Y-vormig molecuul.



Figuur 21: schematische opbouw van het IgG-molecuul.

Het IgG-molecuul heeft constante delen die **F_c -gebieden** worden genoemd (in figuur 21 donkerblauw) en variabele delen, de **F_v -gebieden** (de lichtblauwe gedeelten in figuur 21). Het variabele gebied wordt zo genoemd omdat de aminozuurvolgorde in dit gebied van het molecuul per antistof sterk varieert. De variabele delen van de zware en de lichte ketens vormen samen een unieke structuur die bij één bepaald epitoom van een antigeen past.

In de overige delen van het molecuul is de aminozuurvolgorde voor elke antistof hetzelfde. Dit wordt dan ook het constante gebied van de zware en lichte ketens genoemd.

Vervolg woordenlijst

- Antigeen-antistof-complex: molecuul dat ontstaat als een antigeen en een antistof zich aan elkaar binden.

Dit is een voorbeeld van een sleutel-slot-combinatie, zoals besproken in hoofdstuk 3. De naam van zo'n combinatie - in dit geval dus antigeen-antistof-complex - zegt iets over de componenten waaruit het complex is opgebouwd.

- Fagocyt: witte bloedcel die lichaamsvreemde stoffen kan verwijderen.

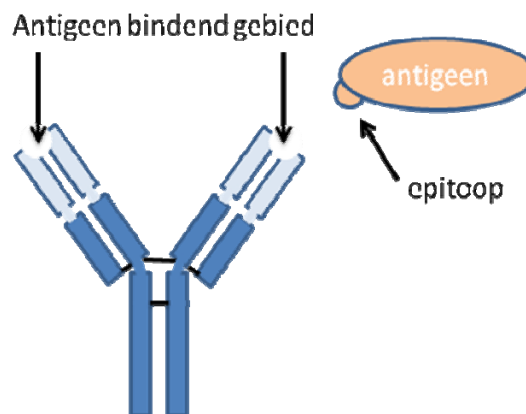
Stap 3: antistoffen binden zich aan de indringer

Een antistof bindt zich niet aan het hele antigeen. Ze passen maar op een klein deel ervan: het epitoom.

De eiwitten van de antistof en het epitoom gaan aan elkaar vast zitten zonder dat er een chemische (covalente) binding wordt gevormd. De interactie tussen de moleculen is meestal gebaseerd op waterstofbruggen en/of de aantrekking tussen positief en negatief geladen delen van de moleculen. Het antigeen-bindend gebied van een antistof en het epitoom passen in elkaar volgens het sleutel-slot-mechanisme uit paragraaf 3.2. Afhankelijk van de structuur van het

variabele deel van de antistof is de binding tussen epitoom en antistof sterker of minder sterk.

De niet-covalente bindingen tussen epitoom en antistof vormen samen een stabiel **antigeen-antistof-complex**. Uit de structuur van een antistof blijkt dat er twee antigeen-bindende gebieden zijn te onderscheiden, beide gelegen aan het uiteinde van het Y-molecuul. Door de grote hoeveelheid antistoffen in het bloed zullen de meeste indringers na verloop van tijd 'bezet' zijn met antistoffen.



Figuur 22: het Y-vormige IgG-molecuul met twee antigeen-bindende gebieden.

Stap 4: de indringer wordt opgeruimd

De indringers met het gevormde antigeen-antistof-complex worden door zogenaamde **fagocyten** 'opgegeten' in een proces dat fagocytose wordt genoemd. Het antigeen-antistof-complex en dus de indringer verdwijnt op deze manier uit het lichaam.

Vervolg woordenlijst

- Polyklonale antistof: antistof die door verschillende plasmacellen is gevormd en zich aan verschillende epitopen kan binden.
- Monoklonale antistof: antistof die door één soort plasmacel is gevormd en zich aan één soort epitoom kan binden.

Meer of minder specifiek

Omdat antistoffen zich zeer specifiek binden aan één bepaalde epitoom worden ze in de klinische chemie gebruikt om bepaalde stoffen aan te tonen.

Soms worden hiervoor **polyklonale antistoffen** gebruikt. Dit zijn antistoffen die door verschillende lymfocyten zijn gevormd en daardoor verschillen in hun variabele gebieden. Polyklonale antistoffen zijn tegen verschillende epitopen van hetzelfde antigeen gericht.

Vaak echter wordt er gebruik gemaakt van **monoklonale antistoffen**. Biotechnologen laten een bepaald type lymfocyten (plasmacellen), die één bepaalde antistof produceren versmelten met een kankercel. Hierdoor ontstaat een cel die één soort antistof produceert en zichzelf oneindig blijft delen. De cellen die op deze manier ontstaan, noemt men **klonen**. De antistoffen die deze klonen produceren, worden monoklonale antistoffen genoemd. Deze antistoffen passen heel specifiek op het epitoom van het antigeen die de plasmacel aanzette tot de vorming van antistoffen.

10. Vraag

- a. Wat is een antigeen?
- b. Op welke manier herkent het afweersysteem de lichaamsvreemde indringers?

Tot zover de theorie. In paragraaf 4.2 gaan jullie zelf aan de slag met antistoffen in de zogenaamde Ouchterlonytest.

4.2 De Ouchterlonytest

De **Ouchterlonytest** is een simpele, al wat oudere test die nog steeds goed voldoet om antigenen te detecteren. Het is een kwalitatieve test. Dit wil zeggen dat je uit de resultaten geen hoeveelheden of concentraties kunt aflezen.

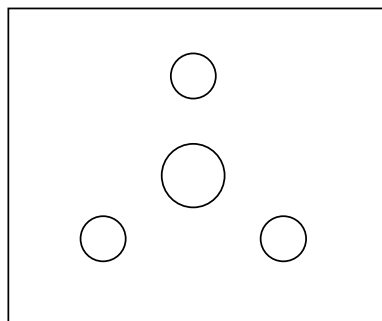
Vervolg woordenlijst

- Serum: vloeistof die antistoffen bevat.
- Extract van vlees: vloeistof waarin vleesstoffen zijn opgelost.
Een extract van vlees krijg je door het vlees in contact te brengen met een zogenaamde extractievloeistof waardoor er stoffen uit het vlees oplossen in de extractievloeistof. In de scheikunde wordt dit extraheren genoemd. Het geheel van de extractievloeistof met de opgeloste vleesstoffen noemen we het extract van vlees.

Het principe van de Ouchterlonytest

De test wordt gedaan in een gel van agar of **agarose**. Dat is materiaal dat op gelatine lijkt. De antigenen en antistoffen kunnen door de gel heen diffunderen. Daar wordt in de test op een handige manier gebruik van gemaakt. Met de Ouchterlonytest kun je aantonen of een bepaald antigeen in een oplossing aanwezig of bepaalde antistoffen in een **serum**.

Stel dat je aan wilt tonen dat een bepaalde hoeveelheid gehakt alleen uit rundvlees bestaat en geen paardenvlees bevat. Dit kun je met de Ouchterlonytest doen. Je hebt dan koeienserum nodig dat anti-paard-antistoffen bevat. Om aan dit serum te komen, moet je een koe inspuiten met een extract van paardenvlees. Het immuunsysteem van de koe reageert hierop door anti-paard-antistoffen aan te maken (koeien maken natuurlijk geen anti-koe-antistoffen). Vervolgens tap je wat bloed af bij de koe. Als je dit bloed laat stollen, blijft een vloeistof over met anti-paard-antistoffen: het serum. Dit koeienserum laat je reageren met een extract uit het te onderzoeken gehakt. Als het gehakt paardenvlees bevat, zullen de anti-paardantistoffen uit de koe zich hechten aan de paard-antigenen in het gehakt.



Figuur 23: putjespatroon in agargel voor het uitvoeren van een Ouchterlonytest.

Uitvoering van de test

Op een glasplaatje wordt agargel aangebracht, waarin vier ronde putjes worden gemaakt: drie putjes rondom één centraal putje, waarbij de afstand van het middelste putje tot de buitenste putjes overal even groot is. Dit levert het patroon in figuur 23.

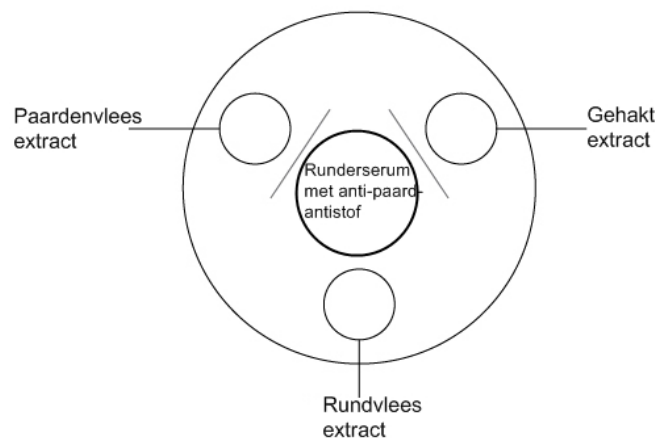
Het middelste putje wordt gevuld met koeiens serum dat anti-paard-antistoffen bevat. In de drie putjes eromheen worden verschillende antigeenoplossingen aangebracht: paardenvleesextract, rundvleesextract en het te onderzoeken gehaktexttract.

Vervolg woordenlijst

- Precipitatielij: witte lijn die zichtbaar wordt op de plaats waar antigeen en antistof zich binden tot een antigeen-antistof-complex.

De eiwitten in de extracten en het serum diffunderen vanuit de putjes door de gel alle kanten op. Als een antigeen en een antistof elkaar tegenkomen, kan er een antigeen-antistof-complex ontstaan. Dit antigeen-antistof-complex is onoplosbaar (bij een bepaalde verhouding tussen antistof en antigeen). Het onoplosbare complex slaat neer en wordt zichtbaar als een dun wit lijntje in de agar. Dit witte lijntje wordt een **precipitatielij** genoemd (precipitatie=neerslag).

Diffusie van moleculen in agargel is een langzaam proces. Daarom levert een Ouchterlonytest pas na ongeveer 48 uur een goed zichtbaar resultaat. Twee dagen na het vullen van de putjes levert onze test het resultaat zoals weergegeven in figuur 24.

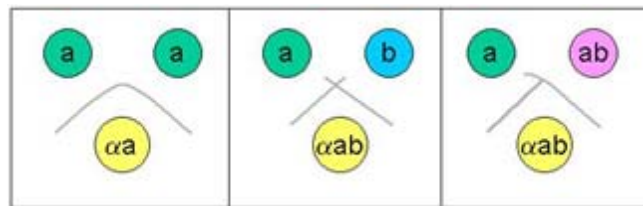


Figuur 24: resultaat van onze Ouchterlonytest.

In figuur 24 zie je twee precipitatielijnen. De precipitatielij tussen het paardenvleesextract en het koeiens serum bevestigt dat het serum anti-paard-antistof bevat. De precipitatielij tussen het gehaktexttract en het koeiens serum toont aan dat het gehakt inderdaad paardenvlees bevat.

De vorm van precipitatielijnen

Als er een precipitatielijijn ontstaat dan betekent dat, dat er een immuunreactie heeft plaatsgevonden tussen een antigeen en een antistof. De vorm van een precipitatielijijn kan ons nog meer vertellen. We leggen dat uit aan de hand van de resultaten van drie verschillende Ouchterlonytests.



Figuur 25: het resultaat van drie verschillende Ouchterlonytests: van links naar rechts: test I, test II en test III. Bron: niet achterhaald

Zoals je in figuur 25 ziet, hebben de precipitatielijnen in elke test een andere vorm. We bespreken hieronder hoe dit komt.

Test I

In deze test is in het gele putje een antistof (αa) aangebracht die alleen reageert op antigeen type a. In de beide groene putjes is antigeen type a aangebracht. De precipitatielijijn die nu ontstaat, ziet eruit als een soort boemerang (zie figuur 25 test I). Als je een test hebt uitgevoerd en dit is het resultaat, dan mag je dus concluderen dat de antigenen in de groene putjes identiek zijn.

Test II

In deze test is een antistof (αab) in het gele putje aangebracht die reageert met antigeen type a én met antigeen type b. In het groene putje is antigeen type a en in het blauwe putje antigeen type b aangebracht. Het patroon van de precipitatielijnen dat dan zichtbaar wordt, bestaat uit twee kruisende lijnen (zie figuur 25 test II). Bij dit resultaat zijn beide antigenen dus niet identiek.

Test III

In deze test is dezelfde antistof gebruikt als in test II. Hij reageert dus met antigeen type a én met antigeen type b. In het groene putje is antigeen type a en in het roze putje antigeen type ab (reageert met zowel antistof- αab) aangebracht. In dit geval ontstaat er een doorlopende precipitatielijijn met een 'haakje' eraan (zie figuur 25 test III). Bij dit resultaat zijn de beide antigenen gedeeltelijk identiek.

11. Practicum: antistoffen en antigenen

Jullie gaan nu zelf een proef uitvoeren hoe antistoffen en antigenen met elkaar reageren.

De details van de proef vind je in bijlage 4.

Schrijf van deze proef een verslag. Gebruik hiervoor ► werkinstructie practicumverslag in de NLT Toolbox.

12. Rode-draad-opdracht - deel III

Ga weer verder met het schema in bijlage 1.

Geef aan welke testen gebaseerd zijn op immunologie, dat wil zeggen op hetzelfde principe dat ons afweersysteem gebruikt.

Als je dit niet voor alle sensoren in het schema kunt beantwoorden, laat je een vakje voorlopig nog even open.

4.3 Afsluiting

In dit hoofdstuk heb je geleerd hoe het lichaam reageert op antigenen en heb je enige kennis opgedaan omtrent antistoffen. Hoe kun je deze kennis toepassen in een diagnostisch laboratorium en uiteindelijk in een biosensor? Dit komt in hoofdstuk 5 aan bod.

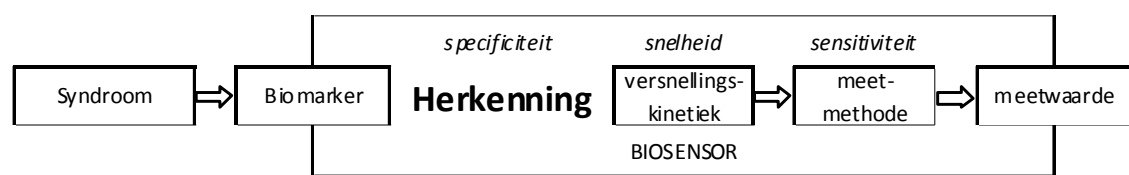
5 Meten in het lab

Met behulp van antistoffen kun je dus ontdekken of een bepaalde biomarker in het lichaam voorkomt. Maar hoe realiseer je een vergelijkbaar systeem in een laboratorium? In dit hoofdstuk lichten we een aantal van dit soort systemen toe. Met deze systemen is het zelfs mogelijk een uitspraak te doen over de concentratie van de gemeten stof in het bloed.

Leerdoelen

Na afloop van dit hoofdstuk kun je:

- uitleggen hoe de beschreven werking van het afweersysteem benut wordt in het laboratorium
- overeenkomsten en verschillen aangeven tussen een sandwichassay en een ELISA
- aan de hand van het voorbeeld van de zwangerschapstest het principe van een immunoassay illustreren
- de structuur van antistoffen beschrijven
- uitleggen hoe een zwangerschapstest werkt
- uitleggen hoe antistoffen bij verschillende vormen van immunoassays worden gebruikt om van de te detecteren stoffen de aanwezigheid en/of de concentratie te bepalen
- uitleggen waarom een ELISA meer geschikt is om kleine hoeveelheden te detecteren dan een gewone immunoassay.



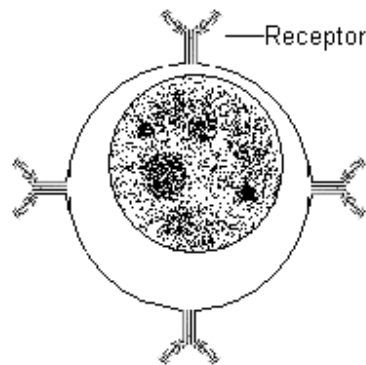
Figuur 26: schema biosensor, herkenning.

Woordenlijst

- Immunoassay: een biochemische test die gebruik maakt van de reactie tussen antistoffen en antigenen. Er bestaan verschillende soorten immunoassays.
- Sandwichassay: een bijzondere vorm van een immunoassay.
- Tracer: een deeltje of chemische groep, die een meetbaar signaal kan produceren.
- ELISA: een sandwichassay die gebruik maakt van een enzym als tracer en daardoor zeer gevoelig is.

5.1 Immunoassays

Een veelgebruikte laboratoriumtechniek is de **immunoassay**. Het doel is om een kwantitatieve bepaling te doen van hoeveel antigeen (bijvoorbeeld een bepaald hormoon) in een bepaalde vloeistof zoals bloed, urine e.d. aanwezig is.



Figuur 27: schematische weergave van een B-cel in ons immuunsysteem.

Het principe van immunoassays

In een immunoassay maak je gebruik van de specifieke binding van een antistof aan een specifiek epitoom van een antigeen.

Tijdens de biologielessen heb je geleerd dat speciale lymfocyten, de B-cellen receptoren aan hun membraanoppervlak hebben waarmee ze antigenen kunnen herkennen.

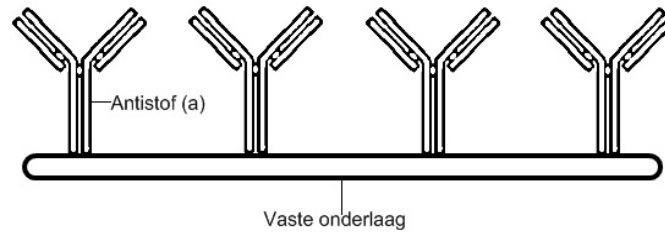
Een immunoassay maakt gebruik van hetzelfde principe. Hiervoor plaatsen we antistoffen met hun F_c -gebied op een vaste ondergrond. Vervolgens wordt er een oplossing met de te onderzoeken antigenen toegevoegd.

De antistoffen fungeren als receptor voor een bepaald antigeen en binden deze met hun F_v -gebied aan de ondergrond. Op deze manier bootsen we de natuur enigszins na. De ondergrond met gebonden antistoffen is te vergelijken met het celmembraan van de B-cel, waarop receptoren voorkomen waaraan de antigenen zich kunnen binden.

Het sandwichassay

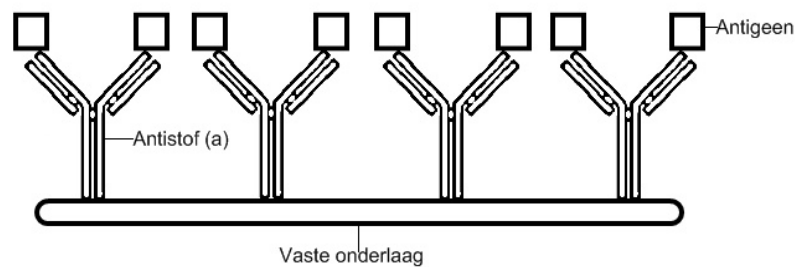
Er bestaan verschillende soorten immunoassays. Een veel gebruikt immunoassay is een **sandwichassay**. Hierbij wordt eerst een monoklonale antistof met het F_c -gebied aan een ondergrond gehecht.

We noemen dit de **primaire antistof**. De uiteinden van de F_V -gebieden kunnen zich binden aan het te detecteren antigeen.



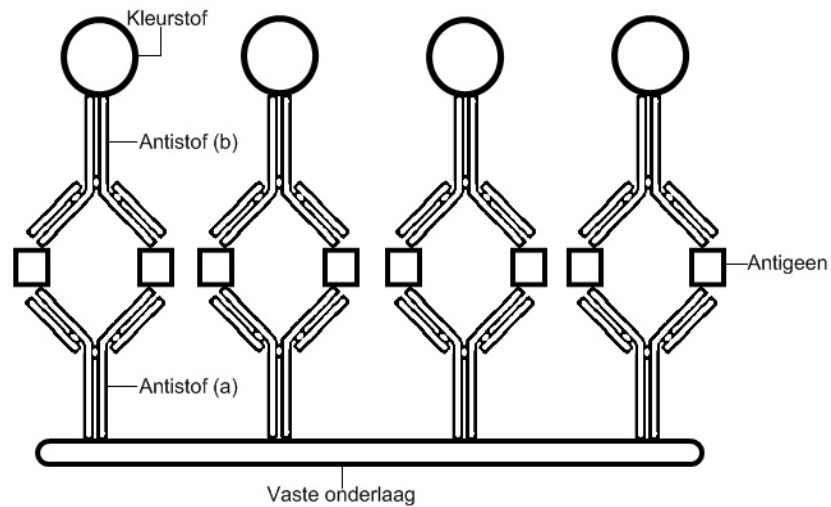
Figuur 28: vaste ondergrond met Y-vormige antistoffen.

Vervolgens wordt de te analyseren vloeistof toegevoegd. De te detecteren antigenen in deze vloeistof - dit zijn dus de biomarkers waarnaar we op zoek zijn - hechten zich aan het variabele deel van de vastgehechte antistoffen. Hierdoor ontstaan antigeen-antistof-complexen.



Figuur 29: antigeen-antistof-complexen op een vaste ondergrond.

De overgebleven antigenen worden nu weggespoeld. Na het spoelen worden andere antistoffen toegevoegd, die zich ook met hetzelfde antigeen kunnen binden. Dit is de **secundaire antistof**. Bij deze antistoffen is het F_C -gebied voorzien van een label (bijvoorbeeld een kleurstof) waardoor we de secundaire antistoffen kunnen zien. Na spoelen blijven alleen de secundaire (gelabelde) antistoffen achter die zich gebonden hebben aan de te bepalen antigeen. We krijgen dan het geheel zoals weergegeven in figuur 30.

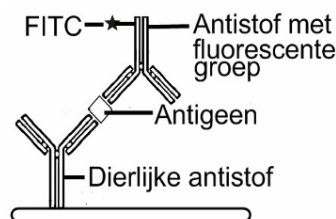


Figuur 30: sandwichassay met aan de ondergrond gebonden antistoffen met daarop gebonden antigenen met daarop antistoffen met een kleurstoflabel.

We kunnen nu we meten hoeveel gelabelde antistoffen - en dus ook hoeveel antigenen - er achtergebleven zijn. Afhankelijk van de meting die je wilt doen, kun je allerlei soorten stoffen gebruiken om de secundaire antistoffen 'zichtbaar' te maken. Deze stoffen worden ook wel **tracers** genoemd.

Tracers

Tracers zijn deeltjes die in staat zijn een meetbaar signaal te produceren, bijvoorbeeld in de vorm van licht of radioactiviteit. Deze tracers kunnen als label gebonden worden aan het F_c -gebied van een antilichaam. De volgende tracers worden in de praktijk veel toegepast:



Figuur 31: een sandwichassay met FITC als tracer.

1. Fluorescente groepen

Als je fluorescente moleculen met licht van een bepaalde golflengte bestraalt, zenden ze daarna licht met een andere

golf lengte uit. Een veel gebruikt fluorescent molecuul is FITC (Fluoresceïne IsoThioCyanaat). Een sandwichassay met FITC is weergegeven in figuur 31.

2. Radioactieve tracers

Radioactieve tracers zenden straling uit die je kunt meten. Radioactieve stoffen die snel vervallen (een kleine halfwaardetijd hebben) zenden per mol meer straling uit dan stoffen met een grote halfwaardetijd. Het nadeel van een korte halfwaardetijd is echter dat de houdbaarheid van de radioactieve stof kort is. Een tweede nadeel van radioactieve stoffen vormt de veiligheid.

3. Magnetische deeltjes

Door hun magnetische eigenschappen zijn deze deeltjes gemakkelijk te detecteren. Hier komen we in een later hoofdstuk nog uitgebreid op terug.

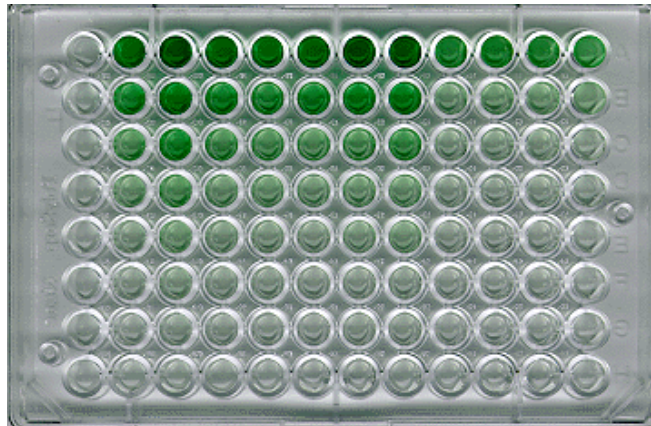
4. Enzymen

Door een enzym te koppelen aan het F_c -gebied van een antistof, kun je een reactie laten verlopen waarbij licht vrijkomt. Bovendien kun je met enzymen de snelheid van de reactie enorm vergroten. De immunoassays waarbij een enzym als tracer wordt gebruikt, worden ELISA's genoemd.

5.2 ELISA

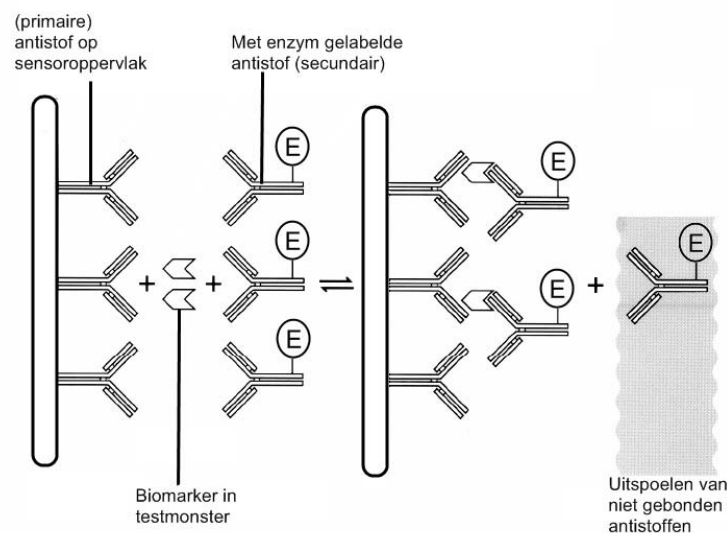
Gewone immunoassays hebben al een grote gevoeligheid, maar door enzymen te gebruiken kun je de gevoeligheid nog veel vergroten. Dit gebeurt in een **ELISA**, een Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.

Een ELISA werkt als een gewone sandwichassay. We beginnen dus met het binden van de primaire antistoffen aan een vaste ondergrond. In figuur 32 is die ondergrond een microtiterplaatje met kleine kuiltjes die welletjes worden genoemd.



Figuur 32: microtiterplaatje met 96 welletjes.

Vervolgens wordt een bloedmonster van een patiënt toegevoegd, waarvan we willen onderzoeken of daarin een bepaalde biomarker aanwezig is. De biomarker bindt zich aan de primaire antistof en de overgebleven antigenen worden weggespoeld. Na spoelen voegen we de secundaire antistof toe, die nu met een enzym gelabeld is. Vervolgens worden de niet gebonden antistoffen uitgespoeld. Schematisch ziet dat eruit zoals in figuur 33.



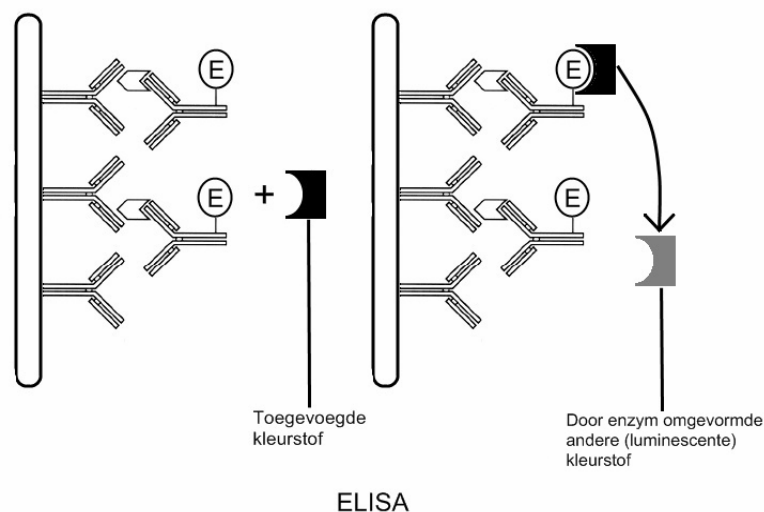
ELISA (enzym linked immuno sorbent assay)

Figuur 33: ELISA na het binden van antistoffen gelabeld met enzymen.

In feite hebben we nu een sandwichassay die gelabeld is met een enzym. Nu volgt er echter een extra stap waardoor de ELISA de gevoeligheid van gewone immunoassays ver overtreft. Er wordt een

kleurstof toegevoegd die door het enzym gedurende een vaste tijd wordt omgezet in een andere (luminescente) kleur.

De intensiteit van deze kleur is een maat voor de hoeveelheid gebonden antilichaam (zie figuur 34).



Figuur 34: fase in de ELISA waarin de gebonden enzymen een kleurstof omzetten in een andere (luminescente) kleur.

Het enzym kan per minuut 10^7 moleculen omzetten. Hierdoor wordt een enorme versterking van het signaal gerealiseerd. Dit is mogelijk door de bijzondere eigenschappen van enzymen.

12. Achtergrondinformatie: enzymen

Een enzym is een eiwit dat een bepaalde reactie versnelt: hij werkt als een katalysator. Een enzym maakt een chemische reactie mogelijk en versnelt deze zonder daarbij zelf verbruikt te worden of van samenstelling te veranderen. Tijdens de reacties verbindt het enzym zich met een reactief molecuul - ook wel substraat genoemd - tot een **enzym-substraatcomplex**. In het geval van een ELISA is het reactief molecuul een kleurstof die licht geeft bij omzetting door het enzym.

Het enzym hecht zich met het bekende sleutel-slot-mechanisme aan het molecuul. Na de reactie keert het enzym weer terug naar de oorspronkelijke toestand en kan direct een nieuwe reactie versnellen. Op deze manier kunnen er 10^7 omzettingen per seconde plaatsvinden.

Enzymen worden door biologische organismen (dieren, planten, insecten, schimmels) zelf gemaakt.

Enzymen bestaan niet alleen maar uit een aminozuurketen, maar bevatten ook andere groepen die we co-enzymen noemen. Daarom hebben we voor de opbouw van enzymen vaak andere stoffen nodig in het voedsel. We kennen die als vitaminen.

Vaak gebruikte enzymen zijn **peroxidasen**, zoals HRP (Horse Radish Peroxidase), die via een of meer tussenstappen een kleurstof of luminescentie doen ontstaan. Hoe meer van de te detecteren antigenen aanwezig waren, hoe meer kleurstof of luminescentie er uiteindelijk ontstaat.

Om vast te kunnen stellen hoeveel antigenen aanwezig waren in de gemeten vloeistof, wordt er gebruik gemaakt van referentiemetingen. Van tevoren worden verdunningen gemaakt met bekende concentraties van de te meten stof. Met de metingen aan deze bekende concentratie wordt een ijkgrafiek gemaakt. Deze ijkgrafiek kun je vervolgens gebruiken om vast te stellen hoe groot de concentratie in het monster is.

Een voorbeeld van een ELISA is de dopingtest: door concentraties te meten en te vergelijken met de toegestane (van nature aanwezige) concentraties, wordt een atleet gecontroleerd op doping.

13. Practicum: ELISA

Jullie gaan nu zelf een proef uitvoeren met een ELISA.
De details van de proef ontvang je van je docent.

Schrijf van deze proef een verslag. Gebruik hiervoor ► werkinstructie practicumverslag in de NLT Toolbox.

5.3 Zwangerschapstest

(Bron 1)

De zwangerschapstest uit hoofdstuk 2 is gebaseerd op een immunoassay. Bij deze test wordt het zwangerschapshormoon hCG aangetoond.

Op dag 28 van de menstruele cyclus - twee weken na de conceptie - is het hCG gehalte zo hoog dat het kan worden aangetoond met een zwangerschapstest. De hoeveelheid hCG neemt in het begin van de zwangerschap exponentieel toe (zie ook de tabel in figuur 4 in hoofdstuk 2).

Het aantonen van hCG met een zwangerschapstest kan doordat hCG voor dieren werkt als een antigeen. hCG bevat twee belangrijke epitopen:

- De α -keten.
Deze keten komt ook voor bij het hypofysehormoon LH (Luteïniserend hormoon).
- De β -keten.
Deze keten is specifiek voor hCG.

Tegen beide ketens kunnen met muizencellen monoklonale antistoffen worden geproduceerd.

De zwangerschapstest bestaat uit een strip. Aan het begin van de strip liggen losse, gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG. Als er een vloeistof op de strip wordt aangebracht, kunnen deze antistoffen zich samen met de vloeistof over de strip verplaatsen.

Verderop in de strip, zijn op twee plaatsen antistoffen aangebracht. Deze stoffen zijn aan de strip gebonden en kunnen zich dus niet verplaatsen.

Op plaats 1 (de testplaats) zijn dit monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de α -keten van hCG.

Op plaats 2 (de controleplaats) zijn dit monoklonale (geiten)antistoffen gericht tegen de losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen

Uitvoering van de test:

Met urine van een zwangere vrouw

1. Als urine van een zwangere vrouw aan het begin van de strip wordt aangebracht beweegt dit eerst langs de gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG. Hier bindt het hCG zich aan de gekleurde antistoffen tot een antigeen-antistof-complex.
2. Dit complex beweegt zich verder over de strip naar plaats 1. Hier wordt het complex (met de nog vrije α -keten) gebonden aan monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de α -keten van het hCG. Hierdoor wordt het complex vastgelegd aan de strip en ontstaat op die plaats een kleuring.
3. De losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG die geen hCG gebonden hebben bewegen verder op de strip naar plaats 2. Daar worden deze antistoffen gebonden door de monoklonale (geiten)antistoffen gericht tegen de losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen. Ook hier ontstaat kleuring. Deze laatste test is noodzakelijk om aan te tonen dat de urine zich daadwerkelijk over de strip verplaatst heeft.

Met urine van een niet-zwangere vrouw

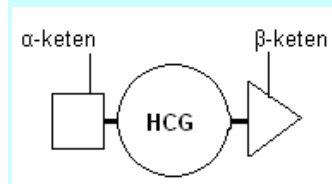
1. Als urine van een niet-zwangere vrouw aan het begin van de strip wordt aangebracht beweegt dit eerst langs de gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van HCG. Omdat er geen hCG aanwezig is en dus ook geen β -keten, is er geen binding aan de gekleurde antistoffen tot een antigeen-antistof-complex.
2. De losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG die geen hCG gebonden hebben bewegen verder over de strip naar plaats 1. Omdat er geen hCG is en dus ook geen α -keten, worden op deze plaats geen moleculen gebonden en vindt er ook geen kleuring plaats.
3. De losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG bewegen verder op de strip naar plaats 2. Daar worden deze antistoffen gebonden door de monoklonale (geiten)antistoffen gericht tegen de losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen. Ook hier ontstaat kleuring. Deze kleuring is het bewijs dat de urine zich daadwerkelijk over de strip verplaatst heeft.

14. Opdracht

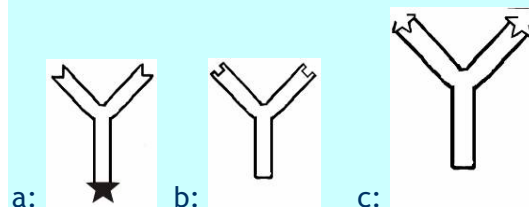
14.1 Tekening zwangerschapstest

Maak een tekening waarin je duidelijk maakt hoe een zwangerschapstest bij een zwangere vrouw verloopt.

Gebruik de volgende symbolen:



= hCG met α -keten en β -keten



a = (losse) gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de β -keten van hCG.
 b = monoklonale (muizen)antistoffen gericht tegen de α -keten van het hCG.
 c = monoklonale (geiten)antistoffen gericht tegen de losse gekleurde monoklonale (muizen)antistoffen

Teken de teststrip zoals in figuur 35.

plaats waar urine wordt aangebracht		plaats 1		plaats 2	
-------------------------------------	--	----------	--	----------	--

Figuur 35: tekening teststrip.

Begin met het tekenen van een strip waarop nog geen urine is aangebracht. Geef vervolgens in de tekening aan waar de verschillende antistoffen zich bevinden. Teken tenslotte waar het antigeen zich bevindt als de urine zich over de totale strip verplaatst heeft.

14.2 Immunoassay zwangerschapstest

- Hoe heet het type immunoassay dat gebruikt wordt bij de zwangerschapstest? Waarom heet deze immunoassay zo?
- Leg uit met gebruikmaking van de antigene structuur van hCG waardoor deze stof goed aangetoond kan worden met een dergelijke immunoassay.

14.3 Vragenkring

Voordat we met de Rode-draad-opdracht beginnen doen we eerst nog de “vragenkring”.

Verdere instructies krijg je van je docent.

15. Rode-draad-opdracht: deel IV

- Uit het aanvraagformulier van het Diagnostisch Centrum Eindhoven (bijlage 2) hebben we nog twee tests gekozen die ook gebaseerd zijn op immunologische reacties, namelijk T4 (vrij) en Pfeifer (= Epstein-Barr virus). Voeg die toe aan het schema in bijlage 1 en vul voor deze tests het schema zover mogelijk aan.
- Kijk op ►URL2 op welk type test de immunologische testen zijn gebaseerd. Kies uit bindingstest, afweerstoffentest, enzymtest
 Let op: bij sommige syndromen zijn meerdere tests mogelijk.

5.4 Afsluiting

Immunoassays vormen een belangrijke basis voor de ontwikkeling van biosensoren. Tot nu toe worden immunoassays voornamelijk in een laboratoriumomgeving toegepast. Daar heb je genoeg tijd om gecontroleerd alle benodigde stappen uitvoeren en een eindresultaat te bepalen. Soms duurt het tot stand komen van een reactie best lang. In hoofdstuk 6 gaan we eens wat rekenen aan reactietijden om wat gevoel te krijgen van hoeveel tijd je voor een reactie nodig hebt.

6 Kan het ook snel?

In hoofdstuk 5 heb je kennis gemaakt met het principe van een immunoassay. Hiermee worden antigenen opgespoord in een vloeistof en zichtbaar gemaakt met behulp van een tracer. Immunoassays worden veel toegepast in laboratoria. Het voordeel van laboratoriumtests is dat je de beschikking hebt over veel testmateriaal, een buisje bloed per te onderzoeken aandoening is heel normaal. Bovendien heb je volop tijd om te mengen, roeren, spoelen en om te wachten tot het resultaat zichtbaar wordt. Bij een biosensor daarentegen, wil je zo min mogelijk testmateriaal gebruiken, liefst niet meer dan één druppel bloed, en wil je zo snel mogelijk een uitslag zien. In dit hoofdstuk gaan we onderzoeken of immunoassays ook geschikt zijn om toe te passen in biosensoren.

Leerdoelen

Na afloop van dit hoofdstuk kun je:

- aan de hand van een formule berekenen na hoeveel tijd je een betrouwbare meting kunt verrichten
- een techniek uitleggen waarmee je die meettijd aanmerkelijk kunt verkorten en het mogelijk wordt bij zeer lage concentratie betrouwbaar te meten
- de oplossing controleren van een relevante differentiaalvergelijking.



Figuur 36: schema biosensor, versnellingskinetiek.

6.1 Het maken van een ijklijn

Bij een zwangerschapstest is de uitslag positief of negatief: er is wel of geen hCG in de urine aanwezig. Over de hoeveelheid hCG wordt geen uitspraak gedaan. Het enige dat je weet is dat de concentratie boven de drempelwaarde van de sensor uitkomt. Daarom noemen we een zwangerschapstest **kwitatatief**.

Bij veel andere sensoren wordt de concentratie van de biomarker ook in een getal weergegeven. Een dergelijke meting noemen we **kwantitatief**. (van kwantiteit: hoeveelheid).

Maar hoe wordt die concentratie vastgesteld? Eén manier om dat te doen is met behulp van een ijklijn. Daarbij wordt gebruik gemaakt van samples met bekende concentraties. Als je op zo'n sample een meting uitvoert, weet je met welke waarde dat zou moeten corresponderen. Als je dit voor een aantal samples uitvoert kun je dit in een grafiek uitzetten. Op die manier kun je ook van onbekende samples de concentratie bepalen.

16. Practicum: ijklijn

De concentratie van een onbekende zetmeeloplossing wordt bepaald met behulp van een spectrofotometer. Dit gebeurt met behulp van een ijklijn die eerst gemaakt gaat worden. Zie bijlage 5.

6.2 Kwantitatief meten in een biosensor

Het principe van een sandwichassay wordt in een biosensor net iets anders toegepast dan in het laboratorium. In het laboratorium gebruiken we de volgorde:

- de primaire antistof wordt aan een oppervlak gehecht
- de te onderzoeken vloeistof wordt toegevoegd en de antigenen hechten zich via de primaire antistof aan het oppervlak
- de antigenen die zich aan het oppervlak hebben gehecht, worden gelabeld met de secundaire antistof.

In een biosensor gaat het eigenlijk net andersom:

- de te onderzoeken vloeistof wordt gemengd met de secundaire antistof (de antigenen worden gelabeld)
- het mengsel met de gelabelde antigenen wordt aangebracht op een oppervlak dat van de primaire antistof is voorzien
- de gelabelde antigenen hechten zich via de primaire antistof aan het oppervlak.

Vervolgens kan de sensor het aantal tracers aan het oppervlak meten en daarmee de concentratie bepalen van het te meten antigeen in het vloeistofmonster dat we hebben gebruikt.

Het aantal deeltjes aan het sensoroppervlak

Echter, het aantal antigenen met hun tracers aan het sensoroppervlak is niet zomaar recht evenredig met de concentratie van de antigenen in de vloeistof. Immers de sensor meet het aantal tracers per oppervlakte-eenheid (bijvoorbeeld 1000 per mm^2) en dat is niet direct te vergelijken met een concentratie in de vloeistof, die wordt uitgedrukt in het aantal moleculen per volume. In deze paragraaf gaan we wiskundig het verband afleiden tussen het aantal tracers aan het sensoroppervlak en de concentratie in het monster.

Gebruikte symbolen

Ag^*	=	gelabeld antigeen (= antigeen-antistofcomplex met tracer)
$[\text{Ag}^*]$	=	concentratie Ag^* uitgedrukt in mol/liter
$\theta(t)$	=	deel van het sensoroppervlak dat op tijdstip t bezet is met Ag^*
k_{on}	=	reactieconstante voor de binding van Ag^* aan het sensoroppervlak
k_{off}	=	reactieconstante voor het verbreken van Ag^* en het sensoroppervlak.

We gaan uit van de volgende situatie: In een volume bevinden zich antigenen die al gereageerd hebben met hun antistof (inclusief tracer). Deze gelabelde antigenen noemen we Ag^* . De gelabelde antigenen bewegen zich door de vloeistof en hebben een concentratie $[\text{Ag}^*]$ uitgedrukt in mol/liter. Nu willen we graag weten hoeveel gelabelde antigenen na verloop van tijd gereageerd hebben met de antistoffen op het sensoroppervlak. En wat we vooral willen onderzoeken is of het aantal Ag^* dat aan het oppervlak gebonden is, een maat kan zijn voor de concentratie van Ag^* in de oplossing, dus voor $[\text{Ag}^*]$.

Om dit te kunnen berekenen stellen we een zogenaamde **differentiaalvergelijking** op. In deze vergelijking drukken we uit welk deel van het sensoroppervlak bezet is met gelabelde antigenen als functie van de tijd. Dit deel van het oppervlak noemen we $\theta(t)$. Het deel van het sensoroppervlak dat nog onbezet is kan nu worden geschreven als $1-\theta(t)$ immers als het hele oppervlakte bezet is met antistoffen geldt per definitie $\theta=1$.

Hoe kan de bezetting van het oppervlak veranderen in de tijd? Ten eerste kunnen antigenen Ag^* reageren met de antistoffen op het oppervlak. Daardoor zal de bezetting $\theta(t)$ toenemen. Dit kunnen we wiskundig opschrijven als:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{on} [Ag^*] (1 - \theta) \quad (1)$$

In woorden: de verandering van de oppervlaktebezetting in de tijd $\left(\frac{d\theta}{dt}\right)$ is gelijk aan een constante die de reactiesnelheid tussen antigen Ag^* en de antistof weergeeft (k_{on}) vermenigvuldigd met de concentratie aan antigenen in het volume ($[Ag^*]$) en het deel van het oppervlak dat nog onbezet is $(1 - \theta)$.

Deze wiskundige uitdrukking is intuïtief goed te begrijpen. Wanneer de concentratie antigenen in de vloeistof hoog is zal de bedekking snel toenemen. Als het aantal beschikbare (nog niet gereageerde) antistoffen op het sensoroppervlak groot is $(1 - \theta)$ zal de bedekking ook snel toenemen. Tenslotte is de snelheid van de reactie evenredig met een constante die de reactiesnelheid aangeeft k_{on} . Deze wordt ook gebruikt bij het beschrijven van chemische reacties.

Het is altijd nuttig om even naar de eenheden te kijken. Allereerst is de oppervlaktebedekking uitgedrukt als een relatief getal zonder dimensie. Een waarde van 0,5 correspondeert met 50% bedekking. De verandering van de bezetting van het oppervlak per seconde $\left(\frac{d\theta}{dt}\right)$ heeft dus als eenheid s^{-1} waarbij de s voor seconde staat.

Aan de rechterkant van het isgelijkteken heeft $[Ag^*]$ de eenheid mol per liter, aangegeven met M (molair) en k_{on} moet dus de eenheid $M^{-1}s^{-1}$ hebben om ook rechts van het isgelijkteken de eenheid s^{-1} te krijgen.

We hebben nu een vergelijking voor de bezetting van het sensoroppervlak, maar toch missen we nog iets. Deze vergelijking geldt alleen als het antigen Ag^* en de antistof permanent aan elkaar gekoppeld blijven. In de praktijk laten deze echter ook weer los van elkaar. De bezetting wordt dus nooit 100%, maar zal een evenwichtssituatie bereiken. Om die evenwichtssituatie wiskundig te

beschrijven moeten we aan de vergelijking een term toevoegen die aangeeft dat het reactieproduct van het Ag^* en de antistof ook weer kan dissociëren waardoor de antigenen weer kunnen loskomen van het sensoroppervlak. De mate van loskoppelen is evenredig met de bezettingsgraad van de Ag^* -antistof bindingen op het oppervlak: θ en met een reactieconstante voor het verbreken van de binding: k_{off} . Het loskoppelen kan dus wiskundig worden beschreven als $k_{off} \cdot \theta$.

De totale vergelijking wordt dan:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{on} [Ag^*] (1 - \theta) - k_{off} \theta \quad (2)$$

De eenheid van k_{off} is hier s^{-1} en geeft aan hoeveel antigenen loskomen per tijdseenheid.

Het aantal deeltjes per volume

Vergelijking (2) beschrijft dus een dynamisch proces waarin gelabelde antigenen enerzijds reageren met een oppervlak maar anderzijds ook weer kunnen loskomen van dat oppervlak.

Vergelijking (2) beschrijft de verandering in de bezetting van het oppervlak als functie van de concentratie antigen. Vergelijking (2) is dus de afgeleide van de vergelijking die het verband aangeeft tussen de bezetting van het sensoroppervlak en de concentratie antigen. En die vergelijking zoeken we om na te gaan hoe de bezetting van het oppervlak van een biosensor een maat voor de concentratie kan zijn.

De vraag is dus of we een functie $\theta(t)$ kunnen vinden, waarvan de afgeleide voldoet aan vergelijking (2). Met andere woorden, kunnen we een vergelijking vinden die het verband geeft tussen de bezetting van het sensoroppervlak en de hoeveelheid gelabelde antigenen in de testvloeistof. Om dit te kunnen doen, maken we eerst een uitstapje naar de wiskunde over differentiaalvergelijkingen.

In bijlage 7 vind je extra uitleg en oefening, waarmee je alvast aan de slag kunt gaan.

13. Theorie: inleiding differentiaalvergelijkingen

Er volgt nu een pittig stukje wiskunde, namelijk differentiaalvergelijkingen en hoe je deze kunt oplossen. In deze inleiding gaan we ervan uit dat je functies kunt differentiëren en dat je de kettingregel kent, dus dat je weet dat de afgeleide van

$$s(t) = 3t^2 - 5t + 1 \text{ gelijk is aan } s'(t) = 6t - 5$$

$$\text{en dat } y = 7e^{3t} \text{ geeft } \frac{dy}{dt} = 7e^{3t} \cdot 3 = 21e^{3t}.$$

Algemene vergelijking

De algemene vergelijking van de differentiaalvergelijking die we willen oplossen is:

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot f(t) + c \quad (3)$$

Je moet dus een formule vinden voor y als functie van t zodanig dat, als je deze functie differentieert, de differentiaalvergelijking klopt. In vergelijking (3) zijn k en c constanten.

Er zijn in de praktijk heel moeilijke differentiaalvergelijkingen. Wij beperken ons tot deze betrekkelijk eenvoudige.

Bedenk dat $\frac{dy}{dt}$ een betekenis heeft. Het geeft namelijk in het algemeen de snelheid (een verandering) aan.

Voorbeeld:

Een voorbeeld uit de natuurkunde is de beweging van een voorwerp dat eenparig versnelt met versnelling a en met beginsnelheid v_0 . Dit levert de volgende bewegingsvergelijking op:

$$s(t) = v_0 \cdot t + \frac{1}{2} \cdot a \cdot t^2 \quad (4)$$

Hierbij is $s(t)$ de afgelegde weg op tijdstip t .

Differentieer $s(t)$. Welke grootheid volgt hieruit?

Differentieer het resultaat van opgave a nog een keer. Welke grootheid volgt hieruit?

Je ziet dus dat:

$\frac{ds}{dt}$ de snelheid v oplevert en

$\frac{dv}{dt}$ de versnelling a geeft.

Het omgekeerde van differentiëren noemen we integreren. Bij

$\frac{ds}{dt} = 3 + 2t$ is vrij simpel te controleren dat $s(t) = 3t + t^2$ een oplossing

is die past bij $\frac{ds}{dt} = 3 + 2t$. Het is niet de enige oplossing:

$s(t) = 3t + t^2 + 5$ of $s(t) = 3t + t^2 - 6$ is ook een oplossing. Je mag er altijd een constante bij zetten, omdat differentiëren van een constante 0 oplevert. De algemene oplossing van deze differentiaalvergelijking is dus eigenlijk $s(t) = 3t + t^2 + c$.

Als je de waarde van de constante c wil invullen heb je een extra gegeven nodig; bijvoorbeeld dat bij de gegevens staat dat $s(0) = 0$.

De differentiaalvergelijking die wij willen oplossen is wat

ingewikkelder dan het bovengenoemde voorbeeld. Immers, $\frac{d\theta}{dt}$ is nu geen functie van t , maar een functie van θ . We zullen uitkomen bij een e-macht. De reden is dat de afgeleide van $y = e^t$ de functie zelf weer geeft: $y' = e^t$.

Het oplossen van de differentiaalvergelijking

We gaan dus uit van de differentiaalvergelijking:

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot y + c \quad (5)$$

waarbij k en c constanten zijn.

Je moet je nu eerst afvragen welke functie weer zichzelf oplevert als je hem differentieert. We pakken dit in een aantal stappen aan.

Stap 1:

Voor het gemak denken we de constanten k en c even weg. We houden dan over:

$$\frac{dy}{dt} = y \quad \text{of: (als je dat liever ziet)} \quad y = \frac{dy}{dt} = y' \quad (6)$$

De meest simpele algemene oplossing hiervan is een e-macht: $y = e^t$.

Als je deze differentieert komt er hetzelfde te staan.

Maar ook $y = 5e^t$ of $y = -3e^t$ is een oplossing.

Controleer dit maar door $y = 5e^t$ in te vullen in het linker- en

rechterlid van de vergelijking $\frac{dy}{dt} = y$.

Stap 2:

Nu een iets ingewikkelder differentiaalvergelijking, namelijk

$$\frac{dy}{dt} = 4y \quad (7)$$

Laat zien dat $y = e^{4t}$ een oplossing is van (7).

Laat zien dat $y = 3e^{4t}$ een oplossing is van (7).

Stap 3:

De volgende stap is de differentiaalvergelijking

$$\frac{dy}{dt} = 4y + 8 \quad (8)$$

Deze differentiaalvergelijking $\frac{dy}{dt} = 4y + 8$ is van dezelfde vorm als vergelijking (1) en vergelijking (2).

Immers vergelijking (1) kan je herschrijven als

$\frac{d\theta}{dt} = -k_{on}[Ag^*]\theta + k_{on}[Ag^*]$ en vergelijking (2) is te herschrijven tot

$$\frac{d\theta}{dt} = -(k_{on}[Ag^*] + k_{off})\theta + k_{on}[Ag^*].$$

Een oplossing van vergelijking (8) is bijvoorbeeld

$$y = -2 + 7e^{4t} \quad (9)$$

Invullen in het linkerlid $\frac{dy}{dt}$ geeft $7 \cdot e^{4t} \cdot 4 = 28e^{4t}$.

Invullen in het rechterlid $4y + 8$ geeft

$4(-2 + 7e^{4t}) + 8 = -8 + 28e^{4t} + 8 = 28e^{4t}$. Het linker- en het rechterlid zijn gelijk, dus we hebben een oplossing van de differentiaalvergelijking gevonden.

Op dezelfde manier kan je nu de oplossing van vergelijking (2) vinden.

Deze oplossing ziet er als volgt uit:

$$\theta(t) = \frac{k_{on} [Ag^*]}{k_{on} [Ag^*] + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on} [Ag^*] + k_{off})t} \right) \quad (10)$$

Dit is een interessant resultaat. We waren op zoek naar een relatie tussen de bedekking van het sensoroppervlak en de concentratie van gelabelde antigenen in de vloeistof. Die hebben we nu inderdaad gevonden.

17. Vraag

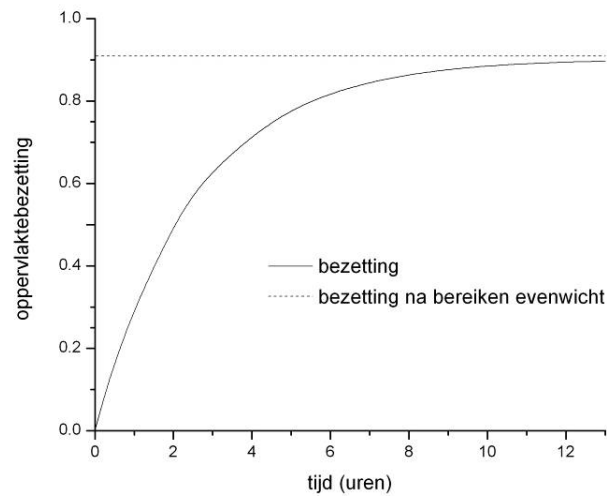
Ga na dat vergelijking (10) inderdaad een oplossing is voor vergelijking (2).

Vergelijking (10) maakt duidelijk dat de bezetting van het oppervlak afhangt van de tijd. In figuur 37 zie je hoe dit verloopt. Om deze figuur te tekenen hebben we de volgende getallen ingevuld:

$$k_{on} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{off} = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

$$[Ag^*] = 10^{-12} \text{ M}$$



Figuur 37: bezetting van het sensoroppervlak als functie van de tijd.

Zoals je ziet, duurt het heel lang voordat de oppervlaktebezetting constant wordt. Die tijd hangt echter sterk af van de getallen die we invullen. Je kunt ook niet spreken van een precieze tijd waarop het evenwicht bereikt wordt. De oppervlaktebedekking nadert een 'asymptoot' voor hele lange tijden.

18. Opdracht

Op ► vaklokaal NLT is bij deze module een Excel sheet te vinden waarin je de waarden van vergelijking 10 kunt variëren. Die kun je gebruiken als controlemiddel bij de volgende opgaven.

18.1 Sensoroppervlak voor lange tijden

Geef een uitdrukking voor θ in formulevorm die geldig is voor hele lange tijden $t \rightarrow \infty$. Laat zien dat de stippellijn in de grafiek overeenkomt met de waarde van θ bij de gegeven waarden van de reactiesnelheden en de gegeven concentratie. Controleer dit met behulp van de Excel sheet.

18.2 Evenwichtstijd (1)

Een goede maat voor de snelheid waarmee het evenwicht wordt ingesteld is de tijd waarop 50% van de eindwaarde wordt bereikt. We noemen deze tijd $t_{1/2}$

Voor een bezettingsgraad van 50% geldt:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{on}[Ag^*] + k_{off}}$$

- Bereken $t_{1/2}$ voor $[Ag^*] = 10^{-12} M$ in seconden en in uren.
- Controleer de gevonden waarde met behulp van de Excel sheet.
- Welk probleem heb je dus als je een biosensor wilt maken?
- Wat zou je kunnen doen om dit probleem op te lossen?

Uit opdracht 18.2 blijkt opnieuw dat voor lage concentraties het heel erg lang duurt voor een evenwicht bereikt is.

18.3 Evenwichtstijd (2)

- Stel dat we de concentratie $[Ag^*]$ zouden kunnen verhogen naar $10^{-9} M$. Bereken dan $t_{1/2}$.
- Stel dat we de concentratie $[Ag^*]$ zouden kunnen verhogen naar $10^{-6} M$. Bereken dan $t_{1/2}$.
- Stel dat we de concentratie $[Ag^*]$ zouden kunnen verhogen naar $10^{-3} M$. Bereken dan $t_{1/2}$.
- Controleer de berekende waarden met de waarden die je in de grafiek in Excel kunt uitlezen.

Je ziet dat de tijd die nodig is om een evenwicht te bereiken, snel kleiner wordt.

6.3 De meting versnellen

In biosensoren moeten we met kleine hoeveelheden werken. Als we een methode kunnen vinden om die kleine hoeveelheden zo dicht mogelijk bij het sensoroppervlak te brengen, wordt de concentratie aan het oppervlak groot en wordt de tijd die nodig is voor een reactie misschien klein genoeg om aanvaardbaar te zijn.

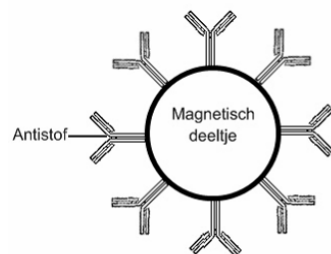
We hebben in hoofdstuk 5 al gezien dat we de antistoffen met allerlei stoffen kunnen labelen. Een geschikte kandidaat om de reactietijd in een biosensor te versnellen is een **magnetisch label**. Een magnetisch label heeft twee belangrijke voordelen:

- de magnetisch gemaakte antistoffen kun je naar het reactieoppervlak trekken met een magnetisch veld
- het totaal van de magnetische deeltjes kan gemeten worden, zodat je een maat hebt voor de hoeveelheid aanwezige antistoffen.

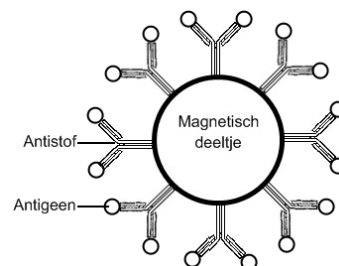
14. Achtergrondinformatie: beads

Op de voorpagina van de module zie je een foto van beads. De foto is gemaakt met een elektronenmicroscop. Zoals je kunt zien is de doorsnede van een bead ongeveer 1 micrometer.

De beads zijn van antistof voorzien, maar die kun je op de foto niet zien. Een Y-vormig antistofmolecuul is ongeveer 15 nanometer hoog en 7 nanometer breed, dus nog zo'n 100 keer kleiner dan een bead. De onregelmatige structuur die je ziet, is de oppervlaktestructuur van de beads zelf.



Figuur 38: magnetisch deeltje dat bedekt is met secundaire antistof.



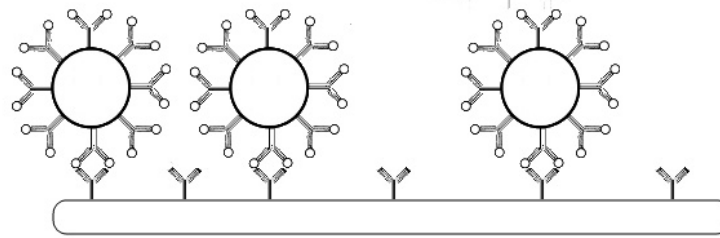
Figuur 39: magnetische deeltje met aan de antistof gebonden antigenen.

In de (onderzoeks)praktijk gebruiken we magnetische deeltjes die helemaal bedekt worden met antistoffen (zie figuur 38). Deze deeltjes worden beads genoemd.

De magnetische deeltjes kunnen we met een magneet door de te onderzoeken vloeistof roeren, zodat ze goed verdeeld worden, en reageren met de antigenen (zie figuur 39). In theorie zou de getekende bead zestien antigenen kunnen binden. In de praktijk echter, kun je maar een klein deel van alle antigenen in de vloeistof aan de magnetische deeltjes binden en bevat een bead meestal niet meer dan één antigeen.

De nu magnetisch geworden antigenen trekken we met een magneet naar het reactieoppervlak van de biosensor waar ze op hun beurt weer

reageren met de antistoffen die daarop zijn aangebracht. (zie figuur 40).



Figuur 40: reactieoppervlak waaraan magnetisch gelabelde antigenen gebonden zijn.

We hebben op deze manier dus een sandwichassay gemaakt.

Door magnetische deeltjes te gebruiken, kunnen we de concentratie van gelabelde antigenen bij het sensoroppervlak dus sterk vergroten. Hierdoor kunnen we de reactie enorm versnellen, zoals je in opgave 18.1 hebt gezien.

We gaan ervan uit dat alle magnetische deeltjes met bijbehorend antigeen naar het reactieoppervlak getrokken worden. Als het aantal magnetische deeltjes groter is dan het aantal beschikbare plaatsen op het sensoroppervlak, zal het sensoroppervlak volledig bezet zijn. Je hebt dan geen maat meer voor de concentratie van het antigeen in het te onderzoeken monster. Boven een bepaalde concentratie kun je dus geen verschil meer meten tussen de concentraties van verschillende te onderzoeken monsters.

Een nadeel van magnetische deeltjes is dat deze deeltjes ook elkaar aantrekken. In de te meten oplossing zouden dan enorme klonten van gelabelde antigenen kunnen ontstaan. Dit probleem lossen we op door deeltjes te gebruiken die pas magnetisch worden als ze zich in een magnetisch veld bevinden. Dit soort deeltjes noemen we **superparamagnetische** deeltjes. Als je - gedurende een korte tijd - een magnetisch veld aanzet zijn de deeltjes magnetisch en worden ze naar het reactieoppervlak togetrokken. Als het veld uit staat kunnen de deeltjes weer alle kanten op bewegen.

19. Vraag

Bij het ontwerp van een biosensor moet je er rekening mee houden dat er voldoende plaats is op het sensoroppervlak om de te detecteren eiwitmoleculen en hun tracers te kunnen binden.

Stel je wilt een verhoogde troponine cTnI concentratie kunnen meten van 400 ng/mL. De biosensor die je hiervoor wilt ontwerpen, moet een reactiekamer boven het sensoroppervlak hebben met een volume van 1 nanoliter. Ga er van uit dat 1 op de 100 troponinemoleculen in het bloed aan een magnetisch deeltje wordt gebonden.

Gebruik bij het beantwoorden van de vragen de volgende gegevens: het molecuulgewicht van troponine cTnI is 22500 Dalton
het oppervlak van 1 magneetdeeltje is 300 x 300 nanometer².

- Bereken het totale aantal troponinemoleculen in één nanoliter bloed.
- Bereken het aantal troponinemoleculen dat gebonden is aan een magnetische deeltje.
- Wat is het minimale sensoroppervlak dat nodig is om de troponinemoleculen met een tracer te binden.
- Geef de afmetingen van de reactiekamer boven het sensoroppervlak.

Per biosensor en per meting kan de fractie van antigenen die aan de magnetische deeltjes wordt gebonden variëren. Daarom werken we in de praktijk vaak met ijkings. Dit doe je met behulp van vloeistoffen met bekende concentraties van de biomarker die je wilt meten. Je kijkt dan voor de verschillende concentraties hoe sterk het signaal van de biosensor is. De meetresultaten verwerk je in een grafiek die het verband geeft tussen de concentratie en de signaalsterkte. Deze grafiek noemen we de ijklijn. Met behulp van de ijklijn kun je bepalen wat de concentratie van de biomarker in een monster is.

20. Rode-draad-opdracht - deel V

Ga verder in het schema in bijlage 1.

- Bereken voor elk van de biosensoren- met behulp van de gewenste concentratie - de $t_{1/2}$ (in minuten) voor het bereiken van het evenwicht. Geef aan bij welke test de truc met de magnetische deeltjes zinnig is.
- Voor de sensoren in het schema waarvoor je deze vraag niet kunt beantwoorden, laat je het vakje voorlopig nog even open.

6.4 Afsluiting

In hoofdstuk 7 ga je zelf een biosensor gebruiken waarmee je het glucosegehalte in bloed kunt bepalen. Ook gaan we verder in op de

laatste wetenschappelijke ontwikkelingen met het gebruik van magnetische deeltjes in biosensoren.

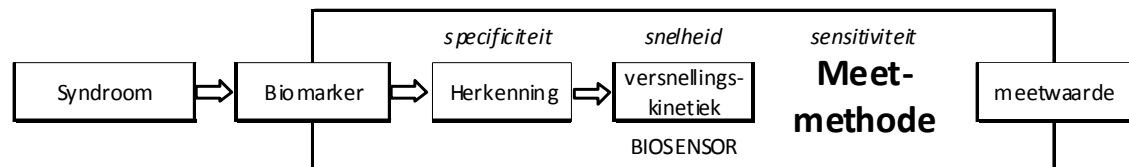
7 Je eigen laboratorium op zak

We zijn nu bijna rond met de uitleg van de werking van een biosensor. Het enige puzzelstukje dat nog ontbreekt, is hoe met of zonder hulp van tracers het aantal gebonden antistoffen wordt omgezet in een getalletje op een display. Hiervoor worden een aantal technieken gebruikt, die je kunt begrijpen met behulp van de natuurkunde. We geven nu eerst een overzicht van verschillende methodes die nu toegepast worden of onderzocht worden en daarna wordt een daarvan meer in detail uitgelegd. Belangrijk is dat deze technieken geschikt zijn om te miniaturiseren zodat je ze in een klein en handzaam apparaatje kunt verwerken.

Leerdoelen

Na afloop van dit hoofdstuk kun je:

- een uitgewerkt voorbeeld geven van de werking van een biosensor uit de praktijk: de glucosesensor
- vier detectieprincipes noemen die geschikt zijn voor gebruik in een biosensor
- uitleggen hoe je in biosensoren gebruik kunt maken van magnetisme.

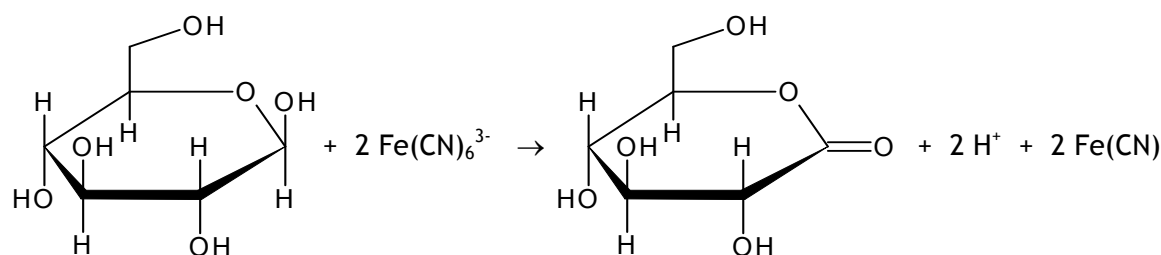


Figuur 41: schema biosensor, meetmethode.

7.1 De glucosemeter

Hoe gaat dat in z'n werk?

Bij elke glucosemeter worden teststrookjes meegeleverd. Op elk teststrookje zitten twee Pd elektroden en in poedervorm een hoeveelheid rood bloedloogzout (= kaliumijzer(III)cyanide: $K_3Fe(CN)_6$) en een hoeveelheid van het enzym glucoseoxidase, in het vervolg afgekort met GOx. Dit enzym heeft een cofactor die bestaat uit pyrolo quinoline quinone (PQQ). Het totale enzym wordt dus genoteerd als GOx-PQQ. Dit enzym katalyseert de redoxreactie in figuur 42.



β -D-glucose D-glucono-1,5-lactone

Figuur 42: redoxreactie. Bron: <http://www.enzymeindia.com>

De redoxreactie in figuur 42 is het resultaat van twee achter elkaar uitgevoerde verschillende redoxreacties. Deze twee redoxreacties kunnen als volgt worden omschreven:

1. In de eerste redoxreactie treedt het enzym GOx-PQQ op als oxidator en wordt in de oxidatiereactie gereduceerd tot GOx-PQQH₂. Het molecuul β -D-glucose treedt op als reductor en wordt in de reductiereactie geoxideerd tot D-glucono-1,5-lactone.
2. In een tweede redoxreactie wordt de oxidator Fe(CN)_6^{3-} gereduceerd tot Fe(CN)_6^{4-} en GOx-PQQH₂ wordt geoxideerd tot GOx-PQQ.

Op deze manier wordt duidelijk dat GOx-PQQ wel wordt gebruikt maar niet wordt verbruikt in deze reactie hetgeen natuurlijk een kenmerk is van een enzym.

De afzonderlijke halfreacties van beide redoxreacties wordt hier niet nader toegelicht. Dat zal wel terugkomen in opdracht 21.1.

De hoeveelheid rood bloedloogzout is aan het teststrookje toegevoegd om te dienen als een zogenaamde chemische mediator. De meeste enzymen en andere biologische moleculen, zoals glucose, blijken namelijk niet in staat te zijn om direct elektronen uit te wisselen met elektroden. Het rode bloedloogzout faciliteert dus de elektronenoverdracht van het enzym glucoseoxidase naar de elektroden. In figuur 43 is de glucosemeter schematische weergegeven met een teststrookje.

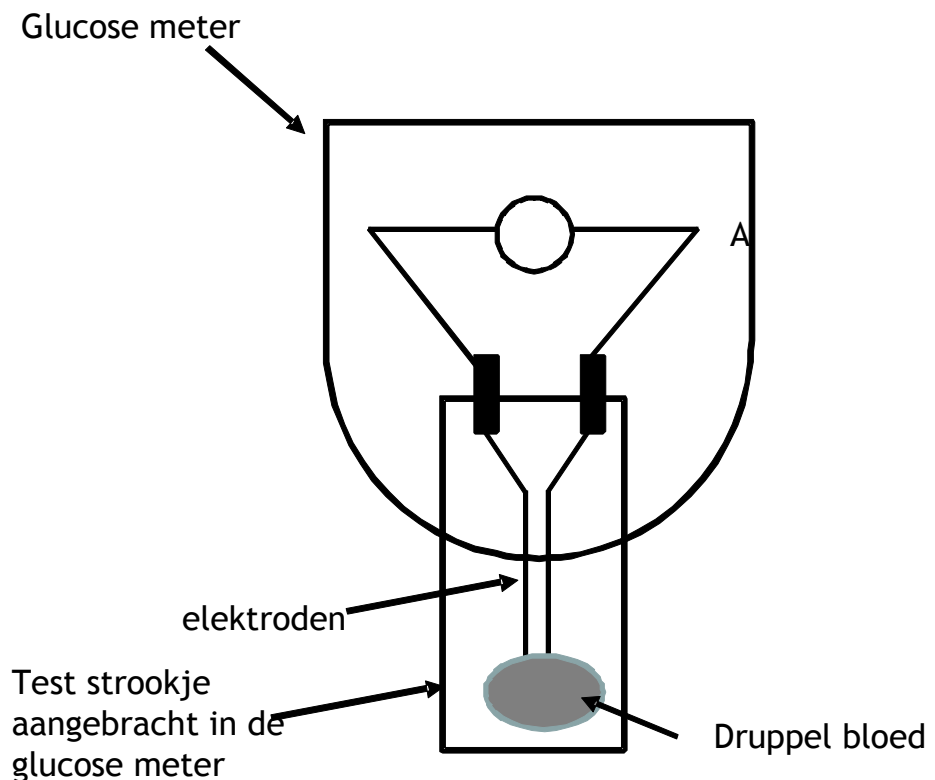
De meetprocedure van een glucosemeter bestaat uit vier verschillende fases:

1. Als het teststrookje in de glucosemeter wordt gestopt, gaat de glucosemeter automatisch aan en worden er een aantal testen

uitgevoerd. Na deze testen wordt er 200 mV over de twee Pd elektroden aangebracht. Deze spanning wordt aangebracht om te detecteren of er een druppel bloed goed is aangebracht op de twee Pd elektroden. Bovendien wordt hiermee de start van de reactietijd bepaald. Na afloop van deze fase wordt de spanning over de elektroden teruggebracht naar 0 mV.

2. Tijdens de reactietijd van ongeveer 20 seconden zorgt de bloeddruuppel ervoor dat het enzym en het rode bloedloogzout in oplossing komen zodat beide redoxreacties zoals hierboven beschreven plaatsvinden.
3. Nu volgt een zogenaamde meetperiode van ongeveer 5 seconden. Bij het begin van de meetperiode wordt er een spanning van 300 mV over de twee Pd elektroden aangebracht. De glucosemeter meet in deze fase de grootte van de elektrische stroom. Door het aanbrengen van de spanning worden de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ d.m.v. elektrolyse weer omgezet naar $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ionen. De stroom die in deze fase wordt gemeten is dus een maat voor de hoeveelheid glucose in het bloedmonster.
4. Tenslotte verschijnt de glucoseconcentratie (in mMol/L) op het scherm.

De lezer die nog meer gedetailleerde informatie wilt hebben over de meetprocedure van een glucosemeter wordt verwezen naar Wikipedia en zoeken op glucosemeter of via Google en dan zoeken naar het meetprincipe van de zogenaamde Accu-Chek® glucosemeter.



Figuur 43: schematisch weergave van een glucose meter met daarin aangebracht een teststrookje. Dit teststrookje bevat twee elektroden en op één van deze elektrodes is op het uiteinde het enzyme GOx-PQQ aangebracht. Dit is niet te zien in deze figuur omdat op het uiteinde een druppel bloed is weergegeven.

21. Opdracht

21.1 Redoxreactie

- Stel de twee halfreacties en de totale redoxreactie op van de twee redoxreacties die in een glucosemeter plaatsvinden.
- In de tweede redoxreactie wordt in de oxidatie halfreactie de oxidator $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ gereduceerd tot $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Hoe groot is de redoxpotentiaal van deze halfreactie (zie Binas). Wat kan je nu zeggen van de redoxpotentiaal van de bijbehorende reductie halfreactie?
- Bereken hoe groot de stroom door de glucosemeter moet zijn om een glucose concentratie te meten van 1,0 g/L in een druppel bloed. Maak gebruik van de volgende gegevens:
 - volume druppel bloed = 0,050 mL
 - meetijd glucosemeter = 5,0 s
 - $q = n \cdot F$ met q = de lading in Coulomb (C); n = aantal Mol elektronen (in Mol) en F = de constante van Faraday = 9,648 x

10^4 C/Mol

- $q = I \cdot t$ met I de stroom in ampère (A) en t de meettijd in seconden (s).
- d. Bereken hoeveel mg GOx-PQQ op de elektrode aanwezig moet zijn om 20 mA in 5,0 seconde te kunnen meten. De massa van GOx-PQQ bedraagt 160 kDa.

21.2 Practicum: glucosemeter

Je gaat nu zelf een aantal metingen verrichten met een glucosemeter. Kijk voor de instructies in bijlage 6.

7.2 Nieuwe mogelijkheden met magnetisme

De glucosesensor voldoet dus aan al onze wensen met betrekking tot snelheid en handzaamheid. Nu is de concentratie van glucose in bloed redelijk hoog. Daardoor kunnen we in de glucosemeter gebruik maken van een relatief ongevoelige techniek. Bij een nieuwe generatie biosensoren willen we ook stoffen kunnen meten met veel lagere concentraties, bijvoorbeeld troponine. Hiervoor hebben we veel gevoeliger technieken nodig zoals sandwichassays.

Op dit moment wordt veel onderzoek verricht naar de toepassingsmogelijkheden van immunoassays met licht. Een voorbeeld hiervan is de enzymreactie die we in paragraaf 5.2 hebben gezien. Magnetisme biedt een andere, veelbelovende, mogelijkheid.

Magnetische tracers

Organische moleculen zijn in het algemeen niet magnetisch. Door er magnetische deeltjes aan vast te maken, een magnetisch tracer dus, kunnen we de moleculen makkelijk manipuleren. Met behulp van magnetische velden kun je magnetische deeltjes - met de daaraan vastgehechte moleculen - door een vloeistof roeren en ze naar een oppervlak trekken, een klein laboratorium dus op chipformaat.

In paragraaf 6.3 is al aangegeven dat een nadeel van magnetische deeltjes is dat ze elkaar aantrekken en dus makkelijk gaan klonteren. De oplossing daarvoor is het gebruik van superparamagnetische deeltjes. In paragraaf 6.3 is vermeld dat deze deeltjes als eigenschap hebben dat ze magnetisch worden als er een uitwendig magnetisch veld op wordt gezet. Zodra het magnetisch veld wordt uitgezet, verliezen ze hun magnetische eigenschappen.

22. Vraag

Verklaar waarom het essentieel is voor een goede werking dat de deeltjes niet langer als magneet optreden als het externe magnetisch veld uitgezet wordt.

In de nieuwe technologie worden polystyreenbolletjes met een diameter van 300 nm gebruikt. De bolletjes zijn gevuld met ijzeroxidedeeltjes, en aan de buitenkant bedekt met een antilichaam. Zoals gezegd hebben de polystyreenbolletjes de bijzondere eigenschap dat ze alleen magnetisch zijn als ze zich in een magnetisch veld bevinden. Die eigenschap komt door de heel kleine afmetingen van de ijzeroxide deeltjes. De ijzeroxidedeeltjes zijn zogenaamde **nanodeeltjes** en gedragen zich ieder afzonderlijk als een magneetje. Door hun kleine afmeting zijn de magneetjes niet in staat om continu in één bepaalde richting te blijven staan. Hun magneetjes wijzen willekeurig in alle richtingen en het netto magnetisch veld is dan nul. De tijd die een deeltje in één richting kan blijven staan kun je uitdrukken met de volgende formule:

$$\tau = \tau_0 e^{\frac{KV}{k_B T}} \quad (11)$$

waarin

- V = het volume van het nanodeeltje
- k_B = de constante van Boltzmann ($1,380 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
- T = de absolute temperatuur in kelvin (K)
- $\tau_0 = 10^{-9} \text{ s}$
- K = magnetische anisotropie, een materiaalconstante met de eenheid van energie/volume.

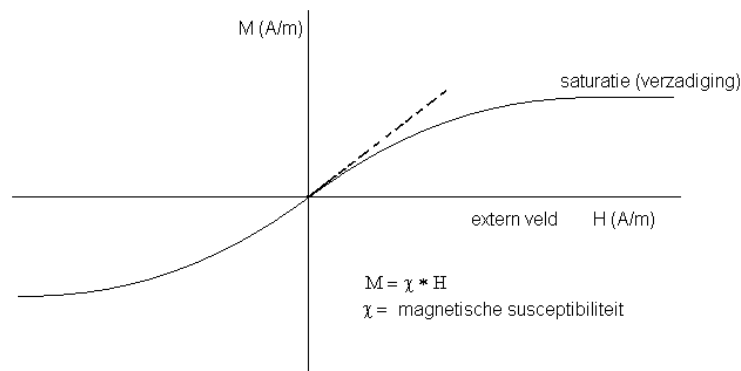
De constante K geeft aan hoeveel energie er nodig is per volume van het magnetisch materiaal om de richting van het magneetje te veranderen. Het product van K en V is dus de energie die nodig is om het magneetje van richting te laten veranderen. Voor kleine deeltjes is die energie heel laag. Dat heeft als consequentie dat voor deeltjes die klein genoeg zijn het magneetje steeds in een andere richting staat. Op de tijdschaal waarop wij het deeltje waarnemen lijkt het zelfs helemaal niet magnetisch te zijn!

23. Opdracht

- Teken een grafiek van τ als functie van straal van het nanodeeltje.
Houd voor de waarde van K aan: $K = 1.8 \times 10^4 \text{ J/m}^3$.
- Hoe klein moeten de deeltjes zijn om ervoor te zorgen dat de bolletjes zich bij kamertemperatuur niet als magneetjes gedragen?
Stel $\tau \leq 0.1 \text{ s}$.

De magnetisatiecurve

Wat gebeurt er nu met de ijzeroxide deeltjes en de bolletjes als we een magnetisch veld aanleggen? Alle individuele ijzeroxidedeeltjes gaan zich dan richten langs het aangelegde veld. Hoe sterker het veld des te groter is de kans dat deeltjes zich langs het veld richten. Plotseling gaat ieder bolletje zich dus gedragen als een magneetje waarop je krachten kunt uitoefenen. De grafiek in figuur 44 geeft het verband tussen het extern aangelegde veld H en het daardoor veroorzaakte veld M ook wel de **magnetisatie** genoemd. De magnetisatie vermenigvuldigd met het volume van het bolletje geeft nu sterkte van de magneet.



Figuur 44: voorbeeld van een magnetisatiecurve.

Je ziet in de grafiek dat het resultaatveld M toeneemt als het externe veld H toeneemt, maar op een gegeven ogenblik wordt M niet meer groter. We zeggen dat er verzadiging (**saturatie**) is opgetreden.

24. Vraag

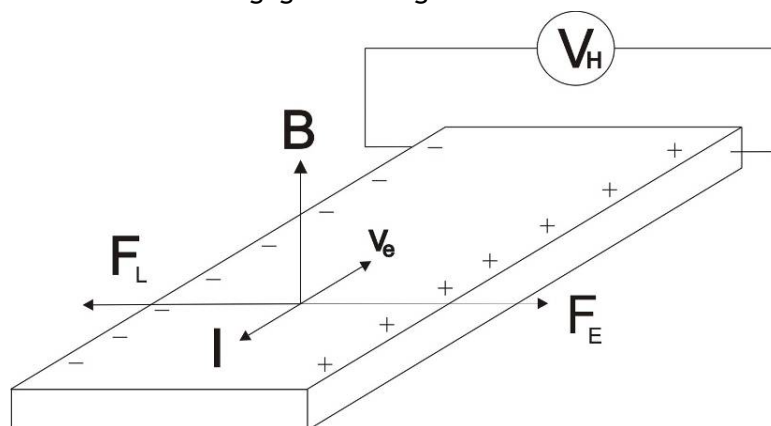
- Verklaar waarom er verzadiging optreedt.
- De stippellijn geeft de helling vanaf het punt (0,0) aan. In het algemeen geldt: hoe steiler de helling, des te beter is dit materiaal voor ons doel te gebruiken.
Verklaar waarom dit zo is.

7.3 Het meten van de magnetische deeltjes

Als de deeltjes gebonden zijn aan de sensoroppervlak, moet je nog meten hoeveel het er zijn. In het onderzoek aan biosensoren worden verschillende manieren onderzocht om magnetische deeltjes te meten. Het ligt voor de hand om het meetprincipe te baseren op hun magnetische eigenschappen, maar er zijn ook andere meetprincipes mogelijk. We behandelen hier twee methodes die gebaseerd zijn op de magnetische eigenschappen van de deeltjes en één methode die gebruik maakt van licht.

Metten met behulp van het Hall-effect

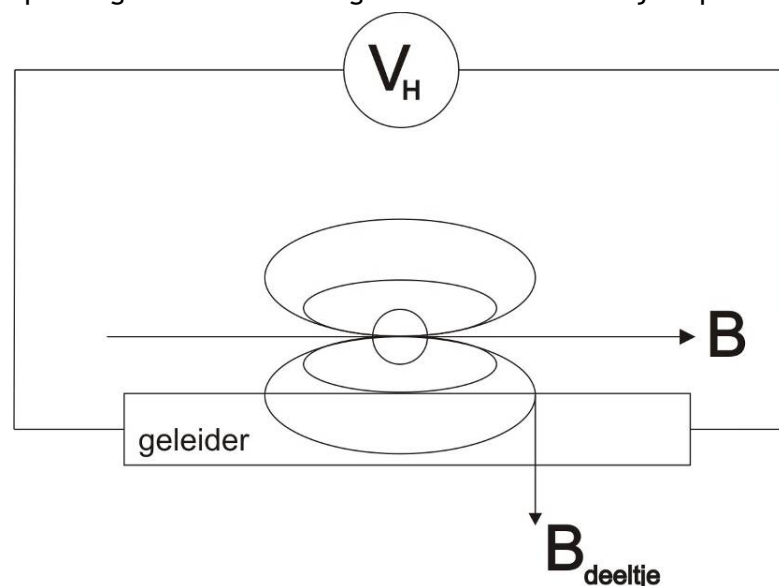
Het Hall-effect is genoemd naar de natuurkundige Edwin Hall. Hij ontdekte dat er een elektrische spanning, de Hall-spanning (V_H) ontstaat in de dwarsrichting van een stroomdrager als loodrecht op de stroom- en dwarsrichting een magnetisch veld aangelegd wordt. Dit wordt schematisch weergegeven in figuur 45.



Figuur 45: schematische weergave van het Hall-effect. Bron: Wikipedia.

Deze Hall-spanning is het gevolg van de Lorentzkracht (F_L) die werkt op de elektronen die in de geleider tegengesteld aan de richting van de stroom bewegen. Eén zijde van de geleider krijgt daardoor een overschot aan negatieve lading; de tegenoverliggende zijde krijgt een tekort aan negatieve lading. Het spanningsverschil wat daardoor ontstaat, zorgt voor een elektrische kracht (F_E) op de bewegende elektronen die precies tegengesteld gericht is aan de Lorentzkracht. De netto Hall-spanning die hierdoor ontstaat, is recht evenredig met de grootte van het magneetveld. De geleider in figuur 45 kan daarom als een magneetveldsensor worden gebruikt.

Hoe kun je nu het Hall-effect gebruiken om het aantal magnetische deeltjes aan een sensoroppervlak te meten? Dat werkt als volgt: Voor het sensoroppervlak waar de magnetische deeltjes zich aan binden, wordt geleidend materiaal gebruikt. Het magnetische veld van de deeltjes aan het oppervlak van de geleider wekt een Hall-spanning op. Er is echter wel een complicatie: er is een extern magneetveld nodig om de deeltjes te magnetiseren. Dit wordt in de biosensor opgelost door het externe magneetveld in het vlak van de geleider te plaatsen (zie figuur 46). Alleen het dipoolveld van de magnetische deeltjes heeft dan een component loodrecht op het vlak. Deze loodrechte component zorgt voor de Hall-spanning. De gemeten Hall-spanning is recht evenredig met het aantal deeltjes op het oppervlak!



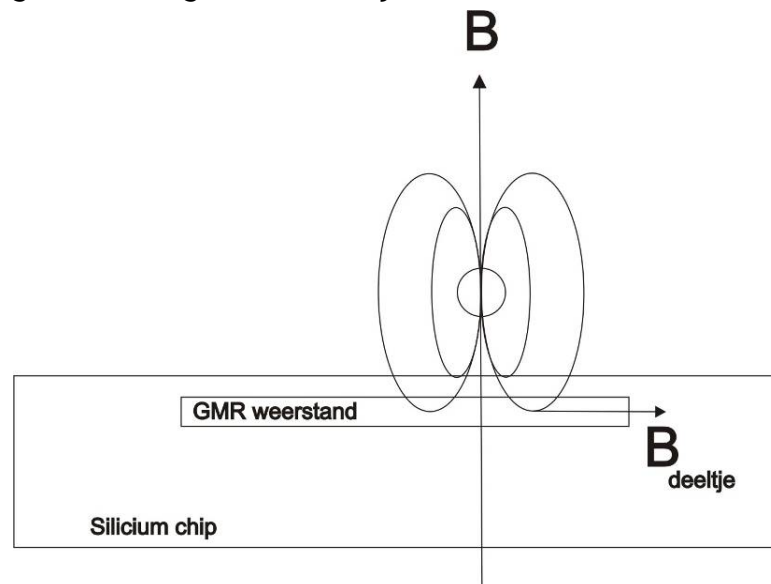
Figuur 46: doorsnede van de geleider loodrecht op de stroomrichting. De loodrechte magneetveldcomponent ten gevolge van magnetische deeltjes veroorzaakt de Hall spanning. Bron: Wikipedia.

Metten met een magneetgevoelige weerstand

Een andere manier om de magnetische deeltjes te detecteren is met een magneetgevoelige weerstand. In 2007 is de Nobelprijs toegekend aan de ontdekkers van het zogenaamde **GMR-effect**. Deze afkorting staat voor Giant Magneto Resistance. GMR is een quantummechanisch effect dat optreedt in een pakket van hele dunne laagjes (films) en ervoor zorgt dat de weerstand van deze films gevoelig is voor een aangelegd magneetveld dat in het vlak ligt van de dunne lagen. De weerstand blijkt niet gevoelig te zijn voor magneetvelden die loodrecht staan op deze dunne films. Dankzij dit GMR effect kunnen tegenwoordig kleine magneetveldgevoelige weerstanden worden

gemaakt. Deze sensoren worden toegepast in bijvoorbeeld de leeskop van een harde schijf.

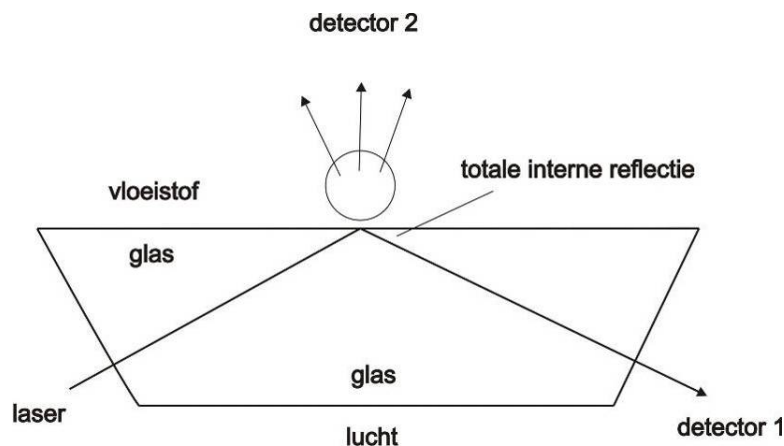
In een biosensor kunnen we deze weerstanden gebruiken op een vergelijkbare manier als bij het Hall-effect. Nu maken we echter een sensor met het externe magneteveld loodrecht op het oppervlak van de sensor en van de magneetgevoelige weerstand. Alleen de componenten van het magneteveld van de biochemisch gebonden magnetische deeltjes zorgen nu voor een verandering van de weerstand. Dit zie je weergegeven in figuur 47 waarbij de dunne lagen die de GMR weerstand vormen in een silicium chip zijn geplaatst. De verandering van de weerstand is recht evenredig met het aantal gebonden magnetische deeltjes.



Figuur 47: een magneteveldgevoelige weerstand in een silicium chip. Bron: Wikipedia.

Metten met licht

Er zijn nog andere technieken waarmee je het aantal gebonden magnetische deeltjes kunt detecteren. We meten dan niet het magneteveld van de deeltjes maar een andere eigenschap. Een veelbelovende techniek is gebaseerd op het meten van gereflecteerd licht zoals in figuur 48 is weergegeven.



Figuur 48: detectie van magnetische deeltjes met behulp van licht.

We gebruiken een lichtstraal afkomstig van een laser die aan de onderzijde van een glasplaatje invalt. De lichtstraal breekt eerst op het grensvlak tussen lucht en glas volgens de wetten van Snellius. Wanneer de lichtstraal scherend genoeg invalt op het glas/vloeistof grensvlak kan daar totale interne reflectie plaatsvinden. De grenshoek hangt af van de brekingsindex van het glas en de brekingsindex van de vloeistof daarboven.

Door de aanwezigheid van deeltjes bij het oppervlak verandert de lokale brekingsindex op de plaats waar de straling reflecteert. Dit kan leiden tot een verandering van de reflectiehoek maar ook tot het inkoppelen van licht in het magnetische deeltje. Dit licht wordt niet meer gereflecteerd en komt dus ook niet meer in detector 1 terecht. Het uitgekoppelde licht ontsnapt in de richting van de vloeistof en kan daar eventueel worden gemeten (detector 2). Het aantal gebonden deeltjes in de immunoassay is evenredig met de afname van de gemeten intensiteit in detector 1 én evenredig met de toename in intensiteit in detector 2.

De aanwezigheid van de deeltjes bij het grensvlak zorgt voor een gecompliceerde variatie van de brekingsindex als functie van de positie en er wordt veel onderzoek gedaan om het gedrag van het licht bij dit grensvlak in detail te beschrijven. Voor een biosensor kunnen we volstaan met het principe en het maken van een ijklijn.

25. Vraag

- In figuur 48 zijn twee detectoren getekend. Beredeneer welke detector het meeste geschikt is voor het meten van troponine in bloed.
- Bereken onder welke hoek(en) het licht moet invallen op het glas-vloeistof grensvlak om totale interne reflectie te krijgen. Neem aan dat de brekingsindex van de vloeistof 1.33 en de brekingsindex van het glas 1.51 is.

26. Rode-draad-opdracht- deel VI

Bekijk de biosensoren die je in bijlage 1 hebt ingevuld.

Geef voor deze biosensoren aan welke detectiemethode gangbaar is.

Kies uit: optisch, magnetisme, fluorescentie of elektrochemie.

Voor de sensoren in het schema waarvoor je deze vraag niet kunt beantwoorden, laat je het vakje voorlopig nog even open.

7.4 Afsluiting

In dit hoofdstuk hebben we vier detectieprincipes besproken die geschikt zijn voor gebruik in een biosensor:

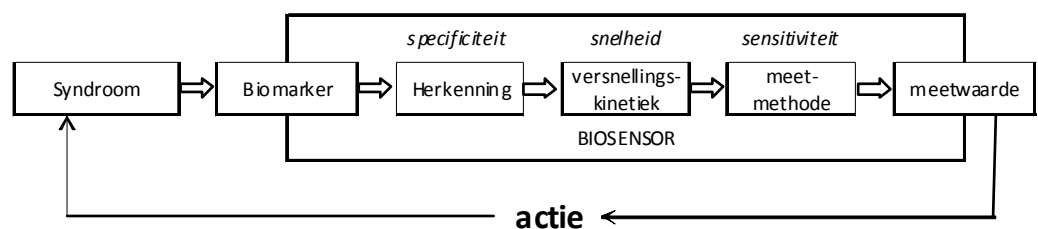
Het eerste en oudste type is gebaseerd op elektrochemische reacties. De glucosemeter is hier een voorbeeld van. Het is ook een voorbeeld van de eerste generatie biosensoren, die concentraties kunnen meten in de orde van millimolair.

De drie daarop volgende principes, het Hall-effect, GMR en de breking van licht, zijn - hoewel verschillend van aard - alledrie geschikt voor het detecteren van magnetische deeltjes die als tracer gebruikt zijn en vervolgens gebonden aan het sensoroppervlak van de biosensor. De toepassing van magnetische deeltjes luidt een nieuwe generatie biosensoren in die concentraties kunnen detecteren in de orde van picomolair (een factor 10^9 gevoeliger dus dan de eerste generatie biosensoren).

Wetenschappers steken veel energie in het ontwikkelen van nieuwe technieken waarmee steeds meer biomarkers kunnen worden gemeten. In hoofdstuk 8 kijken we naar wat de toekomst ons mogelijk brengt.

8 Biosensoren in de toekomst?

Je weet nu hoe biosensoren werken en hoe het mogelijk is dat ze heel kleine concentraties van precies dat ene type eiwit kunnen meten. Een aantal biosensoren zijn al op de markt. Maar wat kunnen we nog verwachten aan ontwikkelingen? Welke hobbels moet het wetenschappelijk onderzoek nemen? En, ook niet onbelangrijk, wat voor effect zullen biosensoren hebben op het leven van mensen?



Figuur 49: schema biosensor, actie.

8.1 Samenvatting

We zetten eerst nog een keer op een rij wat er in de vorige hoofdstukken aan bod is gekomen.

Startpunt is altijd een vraag. Er is bijvoorbeeld een vermoeden dat iemand ziek is, maar wat is er precies aan de hand? Dat wordt dus geprobeerd te meten. Hoe doe je dat?

Je lichaam bevat allerlei stoffen die iets vertellen over wat er gaande is. Het lichaam gebruikt de aanwezigheid van die stoffen als signaal. Dit soort stoffen worden biomarkers genoemd. Voorbeelden die je bent tegengekomen zijn:

- troponine
- albumine
- glucose
- hCG.

Als een patiënt met klachten bij de huisarts komt, kan de arts beslissen om een test te laten uitvoeren. In een ziekenhuislaboratorium of diagnostisch centrum is daarvoor allerlei specialistische apparatuur aanwezig. Nadeel is wel dat er een buisje met testmateriaal opgestuurd moet worden en dat het minstens een

dag duurt voor de uitslag bekend is. Bij sommige ziektes wil je niet zo lang wachten!!

Zoals gezegd worden ook in je lichaam stoffen gedetecteerd, bijvoorbeeld viruseiwitten. Daarvoor ontwikkelt je lichaam speciale eiwitten die maar aan precies één type eiwit hechten, de zogenaamde antistoffen.

In het lab wordt dezelfde truc gebruikt. Daarvoor worden antistoffen gemaakt, meestal met behulp van gekweekte cellen. Die worden in immunoassays gebruikt. Hierbij worden de gekweekte antistoffen aan een oppervlak gehecht. Als in een sample de gezochte stof aanwezig is, zal alleen die stof zich via de antistof aan het oppervlak hechten. Dit heet specificiteit.

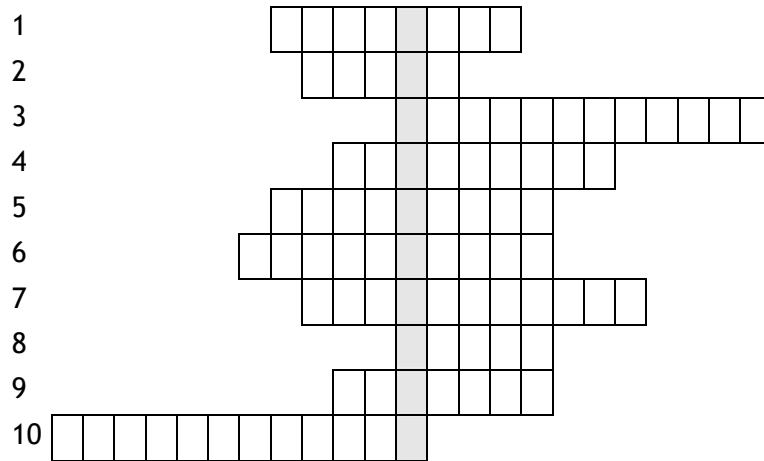
Een biosensor die al commercieel verkrijgbaar is, is een glucosesensor. Ideaal natuurlijk voor een suikerpatiënt. De hoeveelheid glucose in het bloed wordt in een handomdraai gemeten en weergegeven in een concentratie op een display.

Zoals blijkt uit de vergelijking voor de reactiesnelheid aan een oppervlak duurt het een bepaalde tijd voordat alle biomarkers de kans gehad hebben om zich te hechten aan het sensoroppervlak waar de concentratie kan worden gemeten. Zeker bij lage concentraties duurt dat erg lang.

Een nieuwe techniek die momenteel wordt onderzocht op toepasbaarheid in de praktijk is het labellen van de biomarkers met paramagnetische bolletjes (beads). Hierdoor kunnen door het aanleggen van een magnetisch veld de deeltjes zowat in een klap naar het oppervlak getrokken worden. Omdat de concentratie laag is, is er voor elke molecuul ook een plek op het oppervlak. Bovendien kun je door weer gebruik te maken van de magnetische eigenschappen van de beads relatief eenvoudig het aantal moleculen en daarmee de concentratie vaststellen.

27. Opdracht

Los de volgende puzzel op:



1. Lichaamsvreemde stof.
2. Wordt gebonden aan antilichaam om meting in biosensor mogelijk te maken.
3. Zorgt ervoor dat de concentratie hCG in bloed toeneemt.
4. Stof in je lichaam die iets vertelt over je gezondheid.
5. Beroep, werkt mee aan ontwikkeling biosensoren.
6. Deel van een biosensor dat een te meten signaal geeft.
7. Klinische test gebaseerd op neerslag van antistof-antigeen complexen.
8. Hiervan komen in het bloed 10^7 verschillende soorten voor.
9. Deel van het antigeen waar de antistof aan bindt.
10. Belangrijke eigenschap van een biosensor, nodig om kleine concentraties te kunnen meten.

Welk woord verschijnt in de grijze kolom?

28. Rode-draad-opdracht- deel VII

Voeg in bijlage 1 de volgende biomarkers toe:

- **creatinine**
- **cholesterol.**

Vul voor deze stoffen het schema zo ver mogelijk in.

Kijk nu of er bij de andere biosensoren nog vakjes zijn die je inmiddels in kunt vullen. Maak het schema zover mogelijk af.

8.2 Hoe ziet de toekomst eruit?

Zoals je hebt gezien zijn er al een aantal biosensoren op de markt. Maar de verwachting is dat dat in de toekomst flink zal toenemen. Er wordt momenteel veel onderzoek verricht op het gebied van biosensoren. Op de TU/e, de Technische Universiteit Eindhoven, houdt sinds 2005 een zelfstandige groep wetenschappers zich hiermee bezig.

De grote uitdaging is om de gevoeligheid van de sensoren met meer dan een factor miljoen te verbeteren. Als dat lukt wordt het mogelijk om de eiwitten te meten die in ons lichaam voor de communicatie tussen de cellen zorgen. Het onderzoek aan de TU/e is vooral gericht op het gebruik van magnetische deeltjes. We hebben gezien dat daarmee de snelheid van een sensor kan worden verhoogd voor hele lage concentraties. Het doel is om uiteindelijk binnen enkele minuten te kunnen meten. Om een betrouwbare sensor te kunnen maken is het dus wel nodig om eerst de reactiviteit van eiwitten te meten (de k_{on} en k_{off} in vergelijking (2) en (10)). Juist daar is nog veel aan te onderzoeken.

Een volgende generatie sensoren zal nog een stapje verder gaan. Deze sensoren gaan niet alleen de concentratie van eiwitten meten maar ook hun functie. Dat is mogelijk omdat nadat eiwitten (met de magnetische bolletjes) aan een sensoroppervlak zijn gebonden, het ook mogelijk is om ze weer los te trekken. De kracht die daarvoor nodig is, vertelt iets over de bindingssterkte en die hangt samen met de werking van het eiwit. Daarom worden er nu allerlei subtiële technieken onderzocht waarmee je heel precies krachten kunt uitoefenen op bindingen en kunt kijken hoe de bindkracht samenhangt met de functie van het eiwit.

Bij het ontwikkelen van een biosensor wordt kennis uit een aantal vakgebieden bij elkaar gebracht. Bijvoorbeeld medische kennis: wat is er bekend over allerlei ziektebeelden. En kennis over de structuur en eigenschappen van stoffen in het lichaam, dus op het kruisvlak van scheikunde en biologie (ook wel biochemie genaamd). Om een meetbaar signaal in een biosensor te krijgen, is kennis nodig van natuurkunde en elektrotechniek. En bij het op de markt brengen van een biosensor heb je kennis nodig van bedrijfskunde en marketing. Naast specialisten heb je ook mensen nodig die van meerdere gebieden genoeg afweten om de koppeling daartussen te maken. En wat dacht je van een projectleider die ervoor zorgt dat er met zo'n

team van specialisten - binnen het budget en de geplande tijd - een goed product ontstaat.

Kortom er zijn genoeg interessante banen op dit vlak! Mocht je interesse hebben in een dergelijk beroep ga dan eens kijken bij een technische universiteit.

8.3 Impact op het leven

Een apparaat is een levenloos voorwerp. Je zou kunnen zeggen dat het daarmee niets meer of minder is dan een ding, een gebruiksvoorwerp. Maar uit de geschiedenis is wel gebleken, dat techniek wel degelijk een enorme impact heeft op het leven van alledag. Zonder takelwerktuigen konden er in Egypte geen piramides worden gebouwd en zonder vliegtuigen is het veel lastiger om veel van de wereld te zien. Of denk maar aan huishoudelijke apparaten zoals de wasmachine waardoor het zorgen voor schone kleren toch een stuk eenvoudiger geworden is.

Ook met de introductie van biosensoren verandert er veel aan het leven van mensen. Het voorbeeld van de glucosesensor is al heel duidelijk. Het leven van een diabeticus wordt er veel eenvoudiger door. Ook kun je je voorstellen dat het beschikbaar komen van een troponinometer voor (mogelijke) hartpatiënten veel impact heeft.

Wat voor biosensor zou jij willen ontwikkelen voor de toekomst?

29. Opdracht

In deze opdracht ga je zelf een voorbeeld beschrijven van een biosensor voor de toekomst. Deze opdracht telt voor 15% mee in het eindcijfer van deze module.

Beschrijf in 1 à 2 A4-tjes de impact van een in ontwikkeling zijnde biosensor op het leven van een door jou te kiezen persoon.

Beschrijf ook de volgende aspecten:

- welke stof is de biomarker
- welke concentraties wil je meten
- aan welke eigenschappen moet de te ontwikkelen biosensor voldoen.
-
- Maak bijvoorbeeld gebruik van de volgende bronnen:
- zelfdenkende pillen

- inauguratierede Menno Prins
- internetbronnen bijv. via Google zoekterm: biosensor toekomst.
-
- Deze opdracht wordt beoordeeld op:
- de verwerking van opgedane kennis over biosensoren in je verhaal
- je vermogen om de impact van een apparaat te beschrijven op het leven van mensen
- algemene aspecten voor een goed opstel: met name opbouw, woordkeuze en lay-out.

Bijlage 1 Invulschema rode-draad-opdracht

Naam sensor (type meting)	Syndroom	Gebruikte biomarker	Gewenste concentratie (g/L)	Wel/geen specifiek e test	Wel/niet immunologisch	Type test	$t_{1/2}$ (minuten)

Bijlage 2 Formulier Diagnostisch Centrum Eindhoven



Stratumsedijk 28a, 5611 NE Eindhoven

Info over openingstijden bloedafname en decentrale biometrie zie internet:
www.diagnostischcentrum.nl
Uitslagenlijn: (040) 21 41 149

Wilt u graag een afspraak?
Vul hier uw gegevens in:

Gegevens compleet invullen in blokletters! S.v.p. verzekeringspapieren meenemen!

PATIËNTGEGEVENS

Naam/geb. naam/ voorletters: _____

Geboortedatum: _____ ☐ man ☐ vrouw

Adres: _____

Postcode/Woonplaats: _____

BSN nummer: _____

Telefoonnummer: _____

Verzekeringsmaatschappij: _____

Verzekeringsnummer: _____

Kopie uitslag naar: _____

BSN nummer: _____

Geboortedatum: _____ man ☐ vrouw ☐

Patiënt nuchter: Ja ☐ Nee ☐
Form. bij patiënt: Ja ☐ Nee ☐
PRC: _____ INC: _____ Datum afname: _____

70000 ☐ Ter uitsluiting van een mogelijke aandoening
70019 ☐ Controle bekende aandoening
70025 ☐ Ter bevestiging van een vermoedelijke aandoening
T/F ☐ CITO aanvraag ☐ doorbellen ☐ faxen
T/F nummer: _____
☐ Thuispraken na telefonische afspraak (040) 21 41 202

Reden voor aanvraag/klinisch beeld: _____

PROBLEEMGEORIENTEERD AANVRAAGFORMULIER VOOR LABORATORIUMONDERZOEK

1. Acut coronair syndroom

1-5 dagen na klachten

74004 HP ☐ Troponine I

2. Algemeen onderzoek

70058 E ☐ Bezinking

70056 E ☐ Hb

20120 E ☐ Bloedbeeld

70074 N ☐ Glucose (willekeurig tijdstip)

70082 H ☐ TSH (indien afwijkend, vrij T4)

Op indicatie:

72002 H ☐ Kreatinine (vooral ouderen)

72019 H ☐ ALAT (bij verdenking leveraandoening)

3. Anemie

74020 ☐ Hb, MCV, indien afwijkend vervolgonderzoek

DIS ☐ Micro- en normocytaire: ferritine

Macrocytaire: LDH, reticulocyten

thrombocyten, leukocyten, vitamine B12

en foliumzuur

4. Angina pectoris

Bij vermoeden van anemie of hyperthyreoïdie

72740 EH ☐ Hb, TSH (indien afwijkend, vrij T4)

5. Atriumfibrilleren

Bij vermoeden van anemie of hyperthyreoïdie

en bij diabetes mellitus:

74127 EHN ☐ Hb, TSH (indien afwijkend, vrij T4), glucose

Bij aanvang/controle digoxine:

6. Bloedingsneiging, verhoogd

Diagnostiek:

70330 DE ☐ Onderstaande tests

70349 C ☐ APTT

70355 C ☐ PT

70363 E ☐ Trombo's

72340 C ☐ INR

Controle therapie orale-anticoagulantia:

72340 C ☐ INR

7. Cholesterol

Zonder HVZ:

72164 H ☐ Chol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

(herhaal na min. 1 week)

Met HVZ:

70429 H ☐ Cholesterol, LDL-cholesterol

(herhaal na min. 1 week)

Risico-inventarisatie HVZ:

72180 N ☐ Glucose (willekeurig tijdstip)

Controle medicamenteuze therapie:

72228 H ☐ Totaal cholesterol (na 3 maanden)

8. Coeliakie

74047 S ☐ tTGa (anti-human tissue transglutaminase)

9. Delier

Opsporing onderliggende aandoening:

74055 ☐ CRP, Hb, Glucose (nuchter), kreatinine, E/HU

TSH, natrium (urine)

Op indicatie:

74063 H ☐ Na, K (na braken, diarree, bij diureticagebruik)

10. Diabetes Mellitus type 2

Diagnostiek

(Opsporing >45 jr, 3 jaarlijks op indicatie):

70476 N ☐ Glucose (nuchter)

72244 N ☐ Glucose (willekeurig tijdstip)

Risico-inventarisatie:

74100 HE ☐ Bloed (nuchter): HbA1c, kreatinine, chol./

HDL-cholesterol, triglyceriden, LDL-cholesterol

Urine (<50 jaar: 1e portie ochtendurine):

albumine/kreatinine-ratio

(indien positief 2x herhalen)

Controle 3-maandelijks (zonder oproep)

72279 N ☐ Glucose (nuchter, stabiele instelling)

72287 E ☐ GlyHb (HbA1c, slechte instelling)

Controle jaarlijks (zonder oproep)

74119 H ☐ Kreatinine

72308 U ☐ Urine (<50 jaar: 1e portie ochtendurine):

albumine/kreatinine-ratio

Niet behandeld met cholesterolverlaagders:

72316 H ☐ Chol, HDL-cholesterol, triglyceriden (jaarlijks)

11. Diarree

Bij ernstig ziek zijn:

71001 F* ☐ Faeces: Salmonella, Shigella, Campylobacter

Indien langer dan 10 dagen:

71006 ☐ Parasitologisch onderzoek (herhaal zo nodig); F&S

vermeld klinische symptomen, koorts

(met/zonder piket) maag/darm verschijn-

selen, lever/tilt afwijkingen, verrijt buiten-

12. Diep-veneuze trombose

20438 C* ☐ D-dimeer

13. Geneesmiddelen therapie, controle op

Lithium:

72767 SH ☐ Lithium (min 2x per jaar, 12 uur na innamen),

TSH, kreatinine

Digoxine:

72332 E ☐ Digoxine (vermeeden van intoxicatie: voor gift)

14. Hartfalen

Diagnostiek:

64238 E ☐ BNP

Opsporing onderliggende aandoening:

74127 NEH ☐ Hb, TSH, glucose (nuchter)

Controle therapie:

(Gebruik diuretica/ACE-remmers)

74135 H ☐ Na, K, kreatinine (1x per 3-6 maanden)

74143 H ☐ Kreatinine (2 weken na start ACE-remmer)

15. Hemochromatose

Diagnostiek:

74174 ☐ Urine, transferrine, verzadigingspercentage (nuchter)

E/HU

Vervolgonderzoek bij verhoogde ijzer-

verzadigingsfractie:

Ferritine, ALAT, BSE, Hb, MCV, reticulocyten,

glucose

16. Hypertensie
Opsporing onderliggende aandoening:
72775 HU ☐ Kreatinine, kalium, albumine in urine
Risico-inventarisatie:
74199 HN ☐ Glucose, Chol./HDL-cholesterol
Controle bij medicamenteuze behandeling:
72783 HNU ☐ Kalium (diuretica jaarlijks), glucose, kreatinine, albumine in urine

17. Jicht
Diagnostiek:
74213 H ☐ Urinezuur (vermoeden gecompliceerde jicht)
Controle onderhoudsbehandeling:
74221 H ☐ Urinezuur, kreatinine

18. Leveraandoening
Diagnostiek leveraandoening:
72420 H ☐ ALAT, Gamma-GT
Virushepatitis diagnostiek:
74248 S ☐ Hepatitis A (IgM+IgG), Hepatitis B (HBsAg), Hepatitis C (IgG-anti HCV)

19. Maagklachten
Diagnostiek H. pylori-infectie
50874 F ☐ Focustest
Controle behandeling
50874 F ☐ Focustest (4 wk. na behandeling)

20. Microbiologisch onderzoek
55315 ☐ **Kweek banaal**
Materiaalsoort: _____
Herkomst mat: _____
Ziekteverschijnsel: _____
55315 ☐ **Kweek specifiek op**
Materiaalsoort: _____
Afhankelijkheid: _____
Ziekteverschijnsel: _____

21. Mononucleosis infectiosa
70552 E ☐ Leuko's, differentialie
70580 S ☐ Antilichamen tegen EBV (na 7 dagen)

22. Neonatale icterus
10022 H ☐ Bilirubine

23. Nieraandoening
72463 H ☐ Kreatinine
70683 H ☐ Berokende klaring (Cockcroft en Gault, gewicht kg)
10930 H ☐ Berokende klaring (MDRD formule)
74254 U ☐ Testbroek op: eiwit, ery's (indien afw.: sediment)
50070 U ☐ Albumine (concentratie, albumine/kreat.-ratio)

24. Overgevoeligheid
70201 S ☐ Inhalatiemix, indien pos. uitspijlen naar onderstaande allergenen of bij duidelijke anamnese alleen:
70218 S ☐ Huidstofmijt (hele jaar)
70226 S ☐ Kattenepitheel (hele jaar)
70234 S ☐ Hondenepitheel (hele jaar)
70242 S ☐ Graspollen (mei-juni)
70250 S ☐ Berkenpollen (april-mei)

Allergie kinderen (<4 jaar):
70269 S ☐ Voedselmix, indien pos. uitspijlen naar onderstaande allergenen of bij duidelijke anamnese alleen:
70275 S ☐ Melkeiwit
70291 S ☐ Pinda
70293 S ☐ Ei-eiwit
70306 S ☐ Kattensporen
70314 S ☐ Tarwe
70322 S ☐ Soja
42913 S ☐ Kinderrekening (inhalatie en voedsel)
Indien positief: uitspijlen _____
S ☐ Overige allergenen _____

25. Prostaat/mictieklachten
74262 U ☐ Nierlittek, dysplasia
70740 S ☐ (Bij afwijkend rectaal toucher): PSA
74279 H ☐ Kreatinine (vermoeden nierfunctiestoornis)

26. Psychogeriatric
72486 ☐ Beëindiging, Hb, glucose (willensurging tijdstip), CHN
Kreatinine TSH
72484 H ☐ Kalium, natrium (diuretica gebruik)
74287 H ☐ Gamma-GT (vermoeden alcoholabus)
72500 ☐ Vit. B1, Vit. B6, Vit. B12, foliumzuur (vermoedelijk deficiënte voeding)

27. Reumatoïde artritis
Diagnostiek:
30149 S ☐ Reumafactor, anti-CCP
Controle:
74301 E ☐ BSE, Hb, MCV

28. Schildklier
Diagnostiek:
70834 H ☐ TSH indien afwijkend: vrij T4
Thyreoiditis:
72519 EH ☐ Beëindiging, leuкоcyten, vrij T4
Controle van therapie bij hypothyreoïdie:
70847 H ☐ TSH, vrij T4 (elke 6 weken na start tot stabiel, vervolgens elke 3 maanden tot jaarlijks)
Controle van combinatetherapie bij hyperthyreoïdie:
70851 H ☐ Vrij T4 (elke 6 weken na start tot stabiel, vervolgens elke 3 maanden tot jaarlijks)
70878 H ☐ TSH controle na stoppen therapie (elke 3 maanden tot jaarlijks)

29. SOA
72527 S ☐ HIV antistoffen
72543 S ☐ HBsAg
72535 S ☐ Lues (diagnostiek)
74328 S ☐ Lues (behandeling)
72566 U ☐ Chlamydia tr.
74334 ☐ Chlamydia tr. (swab)
72574 U ☐ Gonorrhea
74342 ☐ Gonorrhea (swab)
74350 ☐ Trichomonas (swab)
74367 ☐ Herpes (swab)

30. Subfertiliteit
72582 F ☐ Sperma-onderzoek: zie instructie lab.
Geraamte bij opname van: >12 jaar na uitlijnen zwangerschap
72580 S ☐ Chlamydia IgG-antistoffen

31. TTA
70886 N ☐ Glucose (willensurging tijdstip)
72807 H ☐ Chol./HDL-cholesterol
70900 E ☐ Beëindiging (bij anamnese lagos)

32. Urineweginfectie
(onderzoek binnen 2 uur na kleding af max. 24 uur in koelkast, middelensteriliseren)
Diagnostiek:
74375 U ☐ Nitriet (indien negatief: sediment en uricul)
74383 U* ☐ Uricul (dipstick) met resist. bep. (gecomp. LW)
persid. kl. bij ongecomp. LW)
Controle:
74391 U* ☐ Uricul (zwangere, kind)

33. Zwangerschap en geboorte
Landelijke screening 1^o trimester:
71083 ☐ ABO, Rh, int. antist. Jues,
ES ☐ HBsAg, HIV (geen boeswae),
gegevens zwangere (bij 1) invullen
3^o wk:
71122 ☐ (bij RhD-neg. zwangere) RhD-antistoffen;
EE ☐ afname vóór event. bloeding anti-RhD.
Gegevens (bij 1) invullen
88889 ☐ Anti D bloeding in 3^o week
(na afname RhD-antistoffen)
Diagnostiek Rubella (op indicatie):
70974 S ☐ Rubella IgG-antistoffen
Verdenking op infectie (alleen bij zwangere):
70982 S ☐ Rubella IgM-antistoffen (recente infectie)
Bij bestaande schildklierfunctiestoornis:
74408 HS ☐ TSH (indien afwijkend vrij T4 en TSH receptor-antistoffen)
Diagnostiek hyperbilirubinemie bij pasgeborenen:
70877 H ☐ Bilirubine

ALFABETISCHE LIJST BLOEDONDERZOEKEN

10053 H ☐ ALAT
10344 H ☐ Albumine
10030 H ☐ Alkalische fosfatase
10129 H ☐ Amylase
30157 S ☐ ANF
30149 SS ☐ Anti-CCP reumafactor
20219 C ☐ APTT
10057 H ☐ ASAT
30106 S ☐ AST (Anti Streptolysine Titer)
70683 H ☐ Berokende klaring (Cockcroft en Gault, gewicht kg)
10930 H ☐ Berokende klaring (MDRD formule)
20018 E ☐ Beëindiging
12029 H ☐ Bicarbonaat
10022 H ☐ Bilirubine neonataal
10006 H ☐ Bilirubine totaal
10014 H ☐ Bilirubine totaal + esters
20120 E ☐ Bloedcoëf.
30487 E ☐ Bloedgroep, rhesusfactor en tita.s.
64236 E ☐ BNP
63477 S ☐ Bordetella pertussis (kinkhoest)
to ziektedag _____
vroeger ingezet: j / n
30573 S ☐ Borrelia burgdorferi (risiko van Lyme)
10328 H ☐ Calcium
62451 S ☐ CDT-TIA's (CD-test)

10217 H ☐ Chloride
10223 H ☐ Cholesterol
10069 H ☐ Cholesterolpakket (nuchter)
10066 H ☐ CK (spierafbraak)
74047 S ☐ Coelakie (HGA)
30114 H ☐ CRP
30902 S ☐ Cytomegalovirus antistoffen IgG + IgM
30606 E ☐ Digoxine (dalspiegel)
20438 C* ☐ D-Dimeer
10631 HS ☐ Eiwit elektroforese
10362 H ☐ Eiwit totaal
20075 E ☐ Eosinofielien abs.
30237 S ☐ Epstein barr virus antistoffen (VCA) IgG + IgM
20040 E ☐ Erythrocyten
10301 H ☐ Ferritine
10627 S ☐ Folaanzuur
10336 H ☐ Fosfaat
10391 S ☐ FSH
10049 H ☐ Gamma GT
☐ Geneesmiddelen: _____
Medicament _____
Doserings _____
Laatste innome _____ uur
Afname tijd _____ uur
Gewicht _____ kg
10432 N ☐ Glucose dagwaarde (nuchter, 11.00 na 15.00 uur)
10545 N ☐ Glucose niet nuchter
10539 N ☐ Glucose nuchter

10440 NF ☐ Glucose (toespraak test (nuchter))
10500 E ☐ Glycocyteoglobuline (HbA1c)
10231 H ☐ HDL-cholesterol
20059 E ☐ Hemakriet
20024 E ☐ Hemoglobine
30292 S ☐ Hepatitis A IgG (vaccinatie controle)
31238 S ☐ Hepatitis A antistoffen IgG + IgM (diagnostiek)
30317 S ☐ Hepatitis B antistoffen (anti HBs)
30294 S ☐ Hepatitis B core IgM
30348 S ☐ Hepatitis B core totaal
30275 S ☐ Hepatitis B surface antigen (HBsAg)
30309 S ☐ Hepatitis C antistoffen
30330 S ☐ Hb (1+2) antistoffen + p24 Ag
20307 E ☐ HLA - B27 (ma. 1rm do.)
63069 EF ☐ Homocysteïne (nuchter)
90117 EF ☐ Homocysteïne voor en na Methionine
betasting, Feden aamag invullen op blz. 1
40005 S ☐ IgE
20188 C ☐ INR (bij gebruik orale antistolling)
10192 H ☐ Kalium
10143 H ☐ Kreatinine
10071 H ☐ LD
10266 H ☐ LDL-cholesterol
20112 E ☐ Leucocyten
20147 E ☐ Leucocyten differentiatie
10365 S ☐ LH
10079 S ☐ Lithium (TP voor na innamen)

10184 H ☐ Natrium
40021 S ☐ Phosphatop
60136 H ☐ Prolactine
30512 S ☐ Prostaat specifiek antigeen (PSA)
20227 C ☐ Prolactinebindend (PT)
S ☐ RAST mengsel
S ☐ RAST specifiek _____
20067 E ☐ Reifolocyten
30149 S ☐ Reumafactor, anti-CCP
EE ☐ Rhesus antistoffen (CLB) kinden
zwangere, gegevens (bij 1) invullen
30229 S ☐ Rubella virus antistoffen IgG
30210 S ☐ Rubella virus antistoffen IgM
30044 H ☐ T3
74171 H ☐ T4 (vrij)
74047 S ☐ TGA (anti-humaan tissue transglutaminase)
20032 E ☐ Thrombocyten
30195 S ☐ Tumorplasma antistoffen IgG + IgM
10280 S ☐ Transferrine
10258 H ☐ Triglyceriden (nuchter)
63807 H* ☐ Tropoline I
30001 H ☐ TSH
10151 H ☐ Ureum
10178 H ☐ Urinezuur
62041 H ☐ Vitamine B1
10066 H ☐ Vitamine B6
10018 S ☐ Vitamine B12



ALFABETISCHE LIJST URINE ONDERZOEKEN

50070 U

☐ Albumine (Microalbumine)

72260 U

☐ Albumine/kreatinine-ratio

50827 U

☐ Alcohol (Ethanol)

62777 U

☐ Amfetamine

62865 U

☐ Barbituraten

50712 U

☐ Baroreceptorin

62263 U

☐ Cannabinoïden

50841 U

☐ Chlamydia

62308 U

☐ Cocaine

50142 U

☐ Diabetes urine

50189 U

☐ Eiwit

50921 U

☐ Gonococci

50048 U

☐ Kreatinine

71069 U*

☐ Kweek

64123 U

☐ LSD

62316 U

☐ Metformine

62324 U

☐ Cijabari

64381 U

☐ PCP

50150 U

☐ Volledige urine

50175 U*

☐ Urinecult (Dipstick)

74383 U*

☐ Urinecult (Dipstick) met restit. bep.

U

☐ 24 uurs urineonderzoek op

50183 U

☐ Zwangerschapstest

50948 U

☐ XTC

60027

☐ Chlamydia antigen (swab)

71001 F

☐ Feceskwak (feces)

60035

☐ Gonococci antigen (swab)

50874 F

☐ Helicobacter pylori (feces)

71026 F

☐ Parasitologisch onderzoek (feces)

60919 F

☐ Semenanalyse (sperma)

50230 F

☐ Verkoeking (feces)

50224 F

☐ Occult bloed (1x)

1. GEGEVENS VOOR SCREENING ZWANGEREN/RH-ANTISTOFFEN

Erste dag Lin.

Aantal weken:

A term:

Graviditeit:

Heeft u reeds eerder kind:

☐ ja

☐ nee

Bloedgroep:

Pariteit:

Weigering onderdorst rijksonderzoek:

(Belofte test invullen)

* = steris # = alleen (afnemen) op DCE += citroenpaling l = in donker bewaren

Altoeslaan maken via tel.nr. (040) 21 41 149

Aanvraag betalen (040) 21 41 154

OVERIGE AANVRAGEN

AANVRAAGFORMULIER VOOR FUNCTIEONDERZOEKEN

AFSPRAKENLIJN (040) 21 41 149

1. Cardiovasculaire onderzoeken

Let op: bij aanvraag ECG ook achterzijde "Gegevens i.v.m. (inspannings-)ECG" invullen.

Gebruik voor ondersteunende diensten "Aanmeldingsformulier voor chronisch zieken"

80447

☐ ECG in rust (>15 jaar)

80455

☐ ECG thuisopname

80447

☐ ECG decentrale locatie

83456

☐ Enkel arm index (EAI)

80027

☐ X-thorax

80463

☐ Inspannings ECG, incl. ECG in rust (>18 jaar)

81343

☐ 24 uurs ECG registratie, incl. ECG in rust (>15 jaar)

82288

☐ Event horis (7 dgn. registratie), incl. ECG in rust (>15 jaar)

81351

☐ 24 uurs bloeddrukmeting (dte)

83142

☐ Cardiale Echografie, incl. ECG in rust (>15 jaar)

2. Eenmalig diagnostiek t.b.v. cardiovasculair risico management

81537

☐ Invasieve CVR (nuchter bloed- en urineonderzoek, gln, cholestak, kret., MDRD, ka, als Atrial. ratio)

81543

☐ Riscanalyse CVR (bloed- en urineonderzoek, angiotensine en opgevoersverzamelend t.b.v. absoluut risicoberekening vps. Score)

81551

☐ Diagnostiek hartfalen (bloedonderzoek: na, ka, ureum, kret., hemoglobine, hematocriet, gln, TSH, BNP)

81578

☐ Diagnostiek dyspnea (bloedonderzoek aangevuld met X-thorax, echocardiografie, ECG, longfunctie)

3. Diabetes Mellitus

Gebruik voor ondersteunende diensten "Aanmeldingsformulier voor chronisch zieken"

80494

☐ Funduskopie

83455

☐ Enkel arm index (EAI)

4. Astma/COPD

Gebruik voor ondersteunende diensten "Aanmeldingsformulier voor chronisch zieken"

83083

☐ Inkuuring incl. reversibiliteit (verslag via longarts)

70201 S

☐ Spirologie

80027

☐ X-thorax

54238 E

☐ BNP

83046

☐ Longfunctie incl. reversibiliteit (kort verslag via longarts) (>7 jaar)

83054

☐ Controle longfunctie incl. reversibiliteit (indien reeds opgenomen in A/C dienst)

83038

☐ Piektoegang registratietest

83011

☐ Diagnostische steroïdtest

5. Röntgen onderzoek

80002

☐ Thorax

80051

☐ Buikoverzicht

80076

☐ Schedel

80109

☐ Kalkgevoeligheden

80092

☐ Mesofalen

80084

☐ Sinussen

80084

☐ Adenoid

80035

☐ Ribben

80035

☐ Borstbeen

80115

☐ Halswervels

80123

☐ Borstwervels

80131

☐ Lendewervels

S.I. gewrichten

80164

☐ Bekken/heupen

80003

☐ Schouder links

80011

☐ Schouder rechts

80036

☐ Bovenarm links

80042

☐ Bovenarm rechts

80050

☐ Clavicula links

80069

☐ Clavicula rechts

80077

☐ Elleboog links

80085

☐ Elleboog rechts

80093

☐ Onderarm links

80116

☐ Onderarm rechts

80134

☐ Pols links

80130

☐ Puls rechts

80157

☐ Hand rechts

80165

☐ Vinger links

80173

☐ Vinger rechts

80181

☐ Bovenbeen links

80202

☐ Bovenbeen rechts

80210

☐ Knie links

80227

☐ Knie rechts

80235

☐ Onderbeen links

80243

☐ Onderbeen rechts

80251

☐ Enkel links

80278

☐ Enkel rechts

80284

☐ Voet links

80292

☐ Voet rechts

6. Radiologisch echo onderzoek

80359

☐ Hals/schouder

80340

☐ Bovenbuik

81271

☐ Midden

80112

☐ Aorta

80332

☐ Onderbuik

80407

☐ Scrotum

80404

☐ Testikelen

80357 S

☐ Prostaat (jussio, incl. PSA-onderzoek)

81330

☐ Congenitale heupdysplasie (jarts)

81220

☐ Algemene (o.a. welke delen) nl.

(geen voorbereiding)

80359

☐ (geen voorbereiding)

80340

☐ (nuchter)

81271

☐ (geen voorbereiding)

80112

☐ (geen voorbereiding)

80332

☐ (volle blaas)

80407

☐ (geen voorbereiding)

80404

☐ (geen voorbereiding)

80357 S

☐ (geen voorbereiding)

81330

☐ (geen voorbereiding)

81220

☐ (geen voorbereiding)

7. Mammac onderzoek

80316

☐ Mammografie

80375

☐ Echografie mammae

8. DEXA onderzoek

Let op: ook achterzijde "Gegevens DEXA-meting" invullen

80010

☐ DEXA (algemeen)

80279

☐ Bij verdenking wervelfracturen (DEXA en laterale DEXA)

9. Echoscopie voor obstetric en gynaecologie

80383

☐ Echoscopie gynaecologie (vaginaal)

80324

☐ Echo i.v.m. zwangerschap

81319 SS

☐ Combinatietest

82238 SS

☐ 20-Weken echo (SEO)

(geen voorbereiding)

80383

☐ (geen voorbereiding)

80324

☐ (volle blaas <14 wkn. zwangerschap)

81319 SS

☐ (11-14 wkn. zwangerschap, volle blaas)

82238 SS

☐ (19-21 wkn. zwangerschap)

10. Gehoor onderzoek (contra-indicatie: gehoorschade)

Let op: onderzoek met KNO beoordeling ook achterzijde

"Gegevens audiometrisch onderzoek met KNO beoordeling" invullen.

Kinderen (5-16 jaar)

81806

☐ Tympanometrie (met KNO beoordeling)

81239

☐ Audiogram (incl. tym. + KNO beoordeling)

Volwassenen (>16 jaar)

81806

☐ Tympanometrie (met KNO beoordeling)

80335

☐ Audiogram

83431

☐ Audiogram (incl. tym. + KNO beoordeling)

82255

☐ Uitgebreid audiologisch onderzoek (>50 jaar standaard)

(tympanometrie, audiogram, spraakaudiogram)

11. Oriënterend diagnostisch onderzoek

85187

☐ Visus, screeningsaudiogram, longfunctie, thoraxfoto, ECG, tensie, antihypertensie, urine- en bloed

85191

☐ onderzoek (BSE, bloeddruk, cholesterol, cholesterol, gamma GT, ALAT, kreatinine, glucose, nuchter, TSH)

85145

☐ Bovenstaand onderzoek inclusief bloedonderzoek voor autoant. (VH, BS, lymfite, eiwit

HHs

☐ spectrum, PSA bij mannen)

Nlt4-v128

Biosensoren

95

GEGEVENS AUDIOMETRISCH ONDERZOEK MET KNO-BEOORDELING

Reden aanvraag: _____
 Duur gehoorstoornis: _____
 Gehoorstoornissen familiair: ☐ Ja ☐ Nee
 Wijze van ontstaan: ☐ Acuut ☐ Dagen ☐ Langzaam progressief
 KNO-afwijkingen in het verleden: ☐ Ja ☐ Nee
☐ Otitiden ☐ Ototoxiteit ☐ Trauma ☐ Buisjes ☐ Operatie
☐ Overige: _____

Onderzoek trommelfliezen: **Links** ☐ Ja ☐ Nee **Rechts** ☐ Ja ☐ Nee
 Ingetrokken tv: ☐ Ja ☐ Nee ☐ Ja ☐ Nee
 Vocht(bellen) achter tv: ☐ Ja ☐ Nee ☐ Ja ☐ Nee
 Perforatie: ☐ Ja ☐ Nee ☐ Ja ☐ Nee

GEGEVENS DEXA-METING

Risicofactoren:
☐ Menopauze voor 45 jaar ☐ Doorgemaakte wervelfractuur
☐ Heupfractuur bij 1^e-graads familielid ☐ Fractuur doorgemaakt na 50^e levensjaar
☐ Langdurig gebruik van corticosteroiden (>1 jaar; > 7,5 mg/dag) ☐ Gewicht <60 kg
☐ Aandoeningen met secundaire osteoporose (bv hyperthyroïdie) ☐ Ernstige immobiliteit
☐ Röntgenologische aanwijzingen voor osteoporose of osteopenie

Geneesmiddelengebruik:
☐ Bisfosfonaten ☐ Calcium ☐ Vitamine D ☐ Oestrogenen ☐ Anders: _____

Menopauze-status:
☐ Premenopauzaal ☐ Perimenopauzaal ☐ Postmenopauzaal vanaf: _____

GEGEVENS I.V.M. (INSPANNINGS-) ECG

Indicatie _____
 Medicatie _____

PM contra-indicatie ergometrie: • Instabiele AP • Ritmestoornissen • Cardiomyopathie • Aortastenose • Pacemaker • Onder controle cardioloog



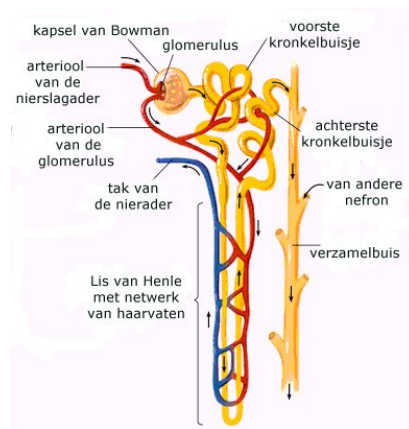
Stratumseindijk 28a, Postbus 6274, 5600 HG Eindhoven
 Tel. (040) 21 41 100 • Fax (040) 21 41 188

CE/07.11

Bijlage 3 Instructies ‘urine’-test

Doel

Het bepalen van de nauwkeurigheid waarmee de totale hoeveelheid eiwit in urine kan worden gemeten m.b.v. de kookproef volgens Bang en een striptest. Zijn de twee methodes geschikt om een uitspraak te doen of een patiënt naar alle waarschijnlijkheid een nierziekte heeft en zo ja om welke nierziekte het naar alle waarschijnlijkheid gaat.



Figuur 50: nefron[12].

Inleiding

Waarom wordt er naar eiwit gezocht in urine? Dit is omdat eiwit in de urine kan wijzen op nierschade.

Eiwit in de urine is vaak het eerste signaal van nierschade. Als de nieren zijn beschadigd, zal de nierfunctie mogelijk sneller achteruit gaan dan normaal. Je merkt daar lange tijd niets van. Eiwit in de urine is het gevolg van aantasting van de kleine

vaatkluentjes, nefronen (zie figuur 50) in de nier, waar de filtratie van het bloed plaatsvindt. Het eiwit ‘lekt’ dan als het ware in de urine. Eiwit in de urine wijst op schade aan de wand van de bloedvaten in de nier.

Principe

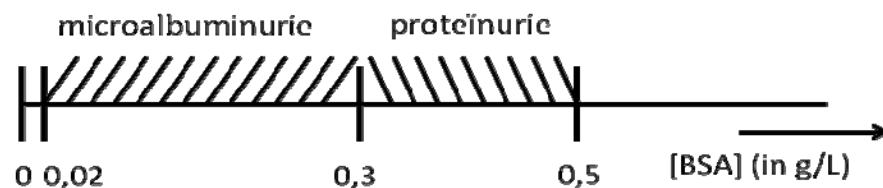
Eiwitten (in urine) zijn op verschillende manieren aan te tonen. In deze test worden twee manieren uitgetest.

Een eerste methode is door het eiwit neer te laten slaan door verhitting in een zwak zuur milieu zoals in de kookproef volgens Bang gebeurt. De verhitting in combinatie met het zwakke zuur milieu zorgt ervoor dat de eiwitten denatureren, waardoor ze zichtbaar worden.

Een tweede methode is een sneltest met een zogenaamde **striptest**. Deze strip maakt gebruik van een kleuromslag. De

kleurstof die voor deze omslag zorgt, broomfenolblauw is in een zuur milieu geel en in een basisch milieu, of in de aanwezigheid van eiwit blauw. Dit komt omdat de pH-indicator aan het eiwit wordt geadsorbeerd. Door de veranderde polariteit verandert de pK-waarde van de indicator, waardoor deze kleur verandert. Deze eigenschap van de indicator wordt de eiwitfout genoemd.

Het eiwit waaraan de metingen worden uitgevoerd is het albumine uit bovine serum (afkorting BSA). Zoals in paragraaf 3.3 is besproken zijn de volgende concentraties van het eiwit, in deze proef BSA (in g/L), in urine van belang:



Figuur 51: concentraties eiwitten.

1. als $[BSA] < 0,02$ g/L: niets aan de hand
 2. als $0,02 < [BSA] < 0,3$ g/L: indicatie voor de nierziekte microalbuminurie
 3. als $0,3 < [BSA] < 0,5$ g/L: indicatie voor de nierziekte proteïnurie.
- In de urinetest wordt onderzocht of met de kookproef volgens Bang en met de stripmethode zo nauwkeurig de concentratie BSA gemeten kan worden dat er een onderscheid gemaakt kan worden tussen:

- er is niets aan de hand
- er is een indicatie voor de nierziekte microalbuminurie
- er is een indicatie voor de nierziekte of proteïnurie.

Om dit te onderzoeken worden er 5 oplossingen gemaakt met verschillende concentraties BSA. In dit onderzoek wordt dus niet gewerkt met urine!

Benodigdheden

Striptest:

- eiwitoplossing
- teststrips
- afleeslegenda (aanwezig op potje van teststrips).
- Kookproef volgens Bang:
- eiwitoplossing
- acetaatbuffer pH = 4,8
- pipetten om 3 mL en 0,5 mL te kunnen overbrengen

- bunsenbrander
- driepoot
- bekerglas (500 mL)
- reageerbuizen.

Werkwijze

1. Het maken van de eiwitoplossingen met verschillende [BSA].
Kies eerst de 5 verschillende concentraties BSA die je wilt gebruiken. Maak op basis van de beschikbare standaardoplossing de juiste verdunningen. Het oplossen van BSA in demiwater lukt nauwelijks. Om BSA wel goed op te lossen moet dit gebeuren in een fysiologische zoutoplossing van 0,15 M NaCl. Dit geldt ook voor de verdunningen.
2. Het maken van de natriumacetaat buffer met pH = 4,8 voor de kookproef volgens Bang
 - meet 11,6 mL ijsazijn af en vul dit in een maatkolf aan met demiwater tot 1000 mL = oplossing 1
 - weeg 16,4 gram NaAc (watervrij) af en los dit op in 1000 mL demiwater = oplossing 2
 - om de acetaatbuffer met pH = 4,8 te maken moet 20 mL van oplossing 1 worden gemengd met 30 mL oplossing 2.
3. Kookproef volgens Bang
 - Pipetteer 3 mL BSA oplossing en een 0,5 mL acetaatbuffer in een reageerbuis. Goed schudden.
 - Doe dit voor de verschillende [BSA] in verschillende reageerbuizen.
 - Kook alle reageerbuizen tegelijk in een bekerglas met water gedurende 2 minuten.
 - Bekijk de reageerbuizen na de kookproef (let op: heet!) en schrijf de waarnemingen op.
 - Beoordeel de aanwezigheid van eiwitten als volgt:
 - opalescentie: spoor - zwak positief
 - melkachtig: zwak positief
 - troebel: positief
 - uitvloeking: sterk positief[4].
4. Test strip proef
 - Neem een strip uit het potje.
 - Dip de strip in de reageerbuis en haal deze er meteen weer uit.
 - Overvloedige eiwitoplossing wordt verwijderd door de rug van de strip langs de rand van het potje te strijken waardoor de urine terug het potje in loopt.

(NB. Wanneer er met de kant van de kussentjes wordt afgestreken, kunnen de chemische stoffen in elkaar overlopen, waardoor de test onbetrouwbaar wordt)

Wacht een halve minuut met aflezen. Controleer nu op de aanwezigheid van eiwitten.

Opdrachten

1. Welke spreiding in waarde oftewel range heeft een kleur op de afleesschaal van de teststrip?
 2. Noteer de waarde(n) die je hebt gemeten met vermelding van de nauwkeurigheid.
Geef ook relatief de grootte aan van de meetfout.
 3. Wat is de nauwkeurigheid bij de kookproef?
 4. Kun je op basis van deze proeven vaststellen of iemand lijdt aan een nierziekte? Licht toe.
 5. Welke van de twee proeven verdient de voorkeur? Waarom?
- Verwerk de antwoorden op deze vragen in je verslag.

Bijlage 4 Instructies Bloedgroep bepaling

Bij deze proef kan door je school een keuze gemaakt worden of er met echt bloed gewerkt wordt (waarbij iedereen zich strikt aan de veiligheidsvoorschriften moet houden) of dat gebruikt wordt gemaakt van kunstbloed dat ook verkrijgbaar is. Het principe en de handelingen zijn dan hetzelfde als hieronder beschreven.

Met eigen bloed

Tijdens dit practicum gaat iedereen zijn of haar eigen bloedgroep bepalen. Zoals je weet, is bloed een gevaarlijk stofje. Er kunnen allerlei vervelende ziekteverwekkers in aanwezig zijn. Daarom moet je ervoor zorgen dat je zeer zorgvuldig en veilig te werk gaat.

Belangrijke punten tijdens dit practicum zijn:

- stoer doen met bloed betekent dat je direct kunt vertrekken
- werk uitsluitend met je eigen bloed
- werk altijd boven een schoon papier
- zorg ervoor dat alles wat met jouw bloed in aanraking is geweest in de afvalbak komt
- zorg ervoor dat je wondje schoon blijft, doe er bijvoorbeeld een pleister op.

Dan het practicum

Het principe van dit practicum is dat een bepaalde antistof met een bepaalde antigen samenklontert. Zie ook de schema's in figuur 52.

bloedgroep	Antigenen op het membraan van de rode bloedcellen	Antistoffen in het bloedplasma
A	Antigen-A	Anti-b
B	Antigen-B	Anti-a
AB	Antigen-A en Antigen-B	Geen antistoffen van het AB0-systeem
0	Geen antigenen van het AB0-systeem.	Anti-a en Anti-b

Bloedgroep \ Serum	Anti-a	Anti-b
A	Klontering	Geen klontering
B	Geen klontering	Klontering
AB	Klontering	Klontering
0	Geen klontering	Geen klontering

Figuur 52: antigenen en antistoffen per bloedgroep.

Benodigdheden

- het speciale werkpapier in figuur 54, waarop de plaats van de glaasjes en roerstaafjes is aangegeven
- 2 voorwerp-glaasjes
- 2 cocktailprikkers
- testsera: anti-a, anti-b
- 2 druppels bloed van jezelf.

Werkwijze

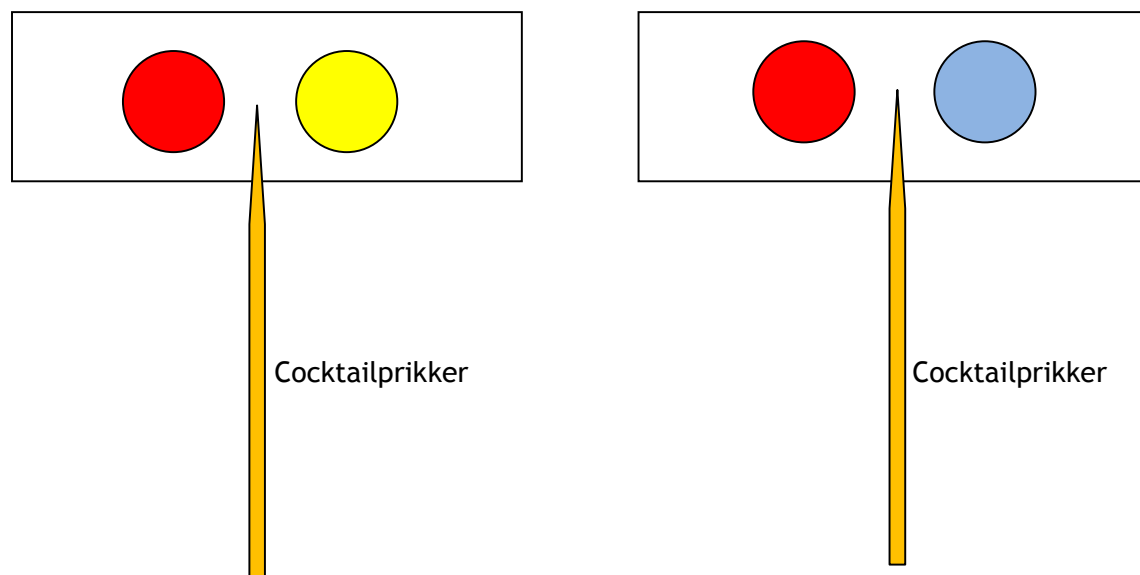
1. Neem het schone werkpapier voor je en leg hierop de 2 voorwerp-glaasjes. Leg de glaasjes op de aangegeven plaatsen.
2. Neem 2 roerstaafjes en leg die op de aangegeven plaatsen.
Haal ze niet door elkaar!
3. Druppel op de juiste plaatsen de antistoffen uit de druppelflesjes. Dus anti-a (blauwe vloeistof), anti-b (gele vloeistof).
4. Zorg ervoor dat de te prikken vinger niet te koud is, bedenk waarom? Ontsmet de te prikken vingertop, van je linkerhand, in de alcohol. Laat de ontsmette vingertop even aan de lucht drogen. Zorg ervoor dat de vingertop wel schoon blijft.
5. Laat je in de ontsmette vingertop prikken, en druppel nu snel de druppels bloed bij de antistoffen en de controle vloeistof.
Maak geen contact tussen je vingertop en de antistoffen.
Je kunt het bloed stuwen door met een vingertop, van je andere hand, stevig te strijken vanuit de handpalm naar de geprikte vingertop. Zorg ervoor dat het wondje schoon en droog is. Er zijn pleisters beschikbaar!
6. Roer de antistoffen anti-a en anti-b met de juiste cocktailprikkers door het bloed.
7. Kijk nu of er klontering optreedt bij de verschillende mengsels.
Laat dit controleren door de docent of de TOA.
8. Omcirkel je gegevens in het onderste schema van figuur 52.
9. Zet in het schema op het bord (figuur 53) een streepje bij de bloedgroep die je hebt.

Let op ! Gebruik de uitslag van de hier bepaalde bloedgroep nooit voor serieuze doeleinden, want er kan hier altijd een foutje gemaakt zijn. Wil jij je bloedgroep zeker weten, neem dan contact op met de bloedbank of met het Rode Kruis.

	Bloedgroep A	Bloedgroep B	Bloedgroep AB	Bloedgroep 0
Antigeen	A	B	A en B	Geen A en B
Antistof in bloedplasma	anti-b	anti-a	geen anti-a en anti-b	anti-a en anti-b
Percentage in Nederland	43%	9%	3%	45%
Aantal in de klas				
Percentage in de klas				

Figuur 53: conclusies bloedgroep bepaling in de klas.

Zorg ervoor dat je tafel weer compleet schoon is. En dat alles wat met bloed in aanraking is geweest in de prullenbak is terecht gekomen.



Figuur 54: werkpapier.

Bijlage 5 Instructies Spectrofotometer proef

Doel

De spectrofotometrische bepaling van de concentratie een onbekende zetmeeloplossing via een ijklijn.

Benodigheden:

- spectrofotometer
- jodiumoplossing
- zetmeeloplossing (0,5%) (gebruik oplosbare zetmeel)
- onbekende zetmeeloplossing (tussen 0 en 0,05%)
- gedestilleerd water
- 8 reageerbuizen
- 2 10 mL pipetten, een voor water en een voor de zetmeeloplossing.

Uitvoeren van de proef:

A. Het maken van een verdunningsreeks uitgaande van een 0,5% zetmeeloplossing.

- Etiketeer de buizen 1 t/m 8.
- In buis 1 bevindt zich 10 mL 0,5% zetmeeloplossing. Haal hier 5 mL uit en doe dat in buis 2.
- Voeg hier 5 mL gedestilleerd water aan toe. Goed mengen.
- Haal uit buis 2, 5 mL oplossing en doe dit in buis 3, enz.
- Ga hiermee door tot je in buis 7 een zetmeeloplossing hebt van 0,0078%.
- Haal uit deze buis nog 5 mL oplossing en gooi dat weg.
- Maak een blanco bestaande uit een buis (buis 8) met 5 mL gedestilleerd water.
- Voeg nu aan elke buis 1 druppeltje (en niet meer) jodiumoplossing toe.
- Meet de transmissie van de blanco bij rood licht (700nm) en stel deze op 1.
- Meet de transmissie van elke buis in de fotospectrometer bij rood licht (700 nm).
- Spoel het kuvetje tussendoor telkens met gedestilleerd water.

- Geef je resultaten weer in een tabel en een grafiek.

B. Het bepalen van de concentratie van de onbekende oplossing.

- Neem 5 mL van de onbekende oplossing.
- Voeg 1 druppeltje jodium toe.
- Meet de transmissie met de spectrofotometer bij rood licht (700 nm).
- Lees in de grafiek af wat de concentratie zetmeel is in de onbekende oplossing.

Bijlage 6 Instructies glucosemeter

Doel

De betrouwbaarheid van een glucosemeter nagaan bij gebruik van verschillende concentraties glucose.

Inleiding

In de gezondheidszorg spelen biosensoren een steeds belangrijker rol. Het is van groot belang dat er snel en betrouwbaar de concentratie van verschillende stoffen wordt bepaald in bloed, speeksel en andere lichaamsvloeistoffen.

Glucosemeter is een voorbeeld van het snel weergeven van de glucoseconcentratie in het bloed (en of vloeistof). Deze biosensor maakt gebruik van kleine wegwerp strips. Hierop wordt een druppel bloed aangebracht en vervolgens wordt deze strip in een uitleesapparaatje gedaan. Binnen enkele seconden verschijnt dan op het scherm het glucosegehalte.

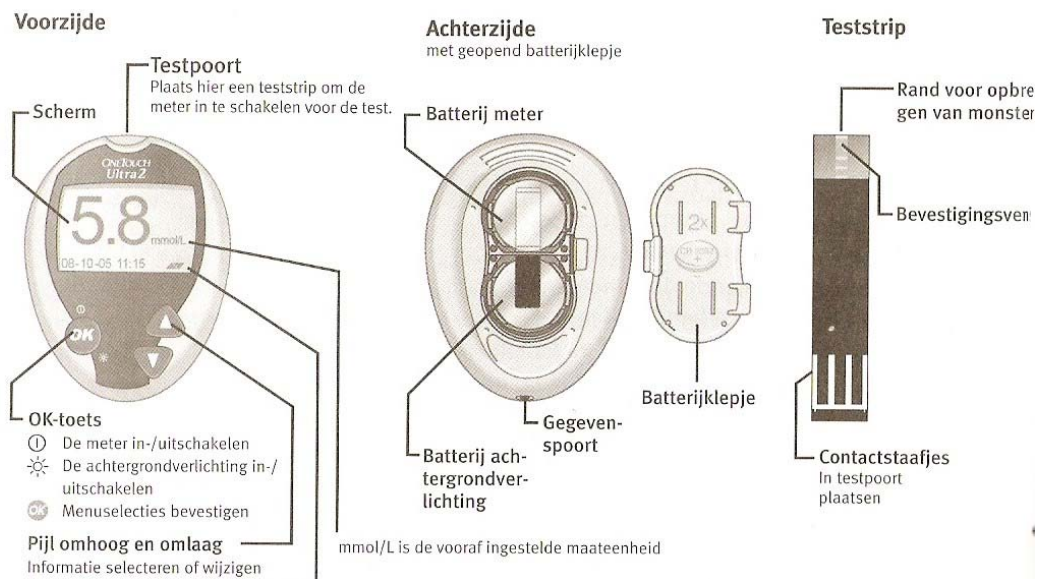
Principe

In de teststrips zit het enzym glucose-oxidase dat vermengd wordt met de glucose in het bloedmonster. Door de reactie van enzym en glucose wordt er een zwakke elektrische stroom geproduceerd. De sterkte van de stroom is afhankelijk van de glucoseconcentratie in het bloedmonster. Vervolgens wordt de stroomsterkte gemeten door de meter en wordt het resultaat weergegeven. Het resultaat wordt daarna opgeslagen in het geheugen. Zie ook paragraaf 7.1.

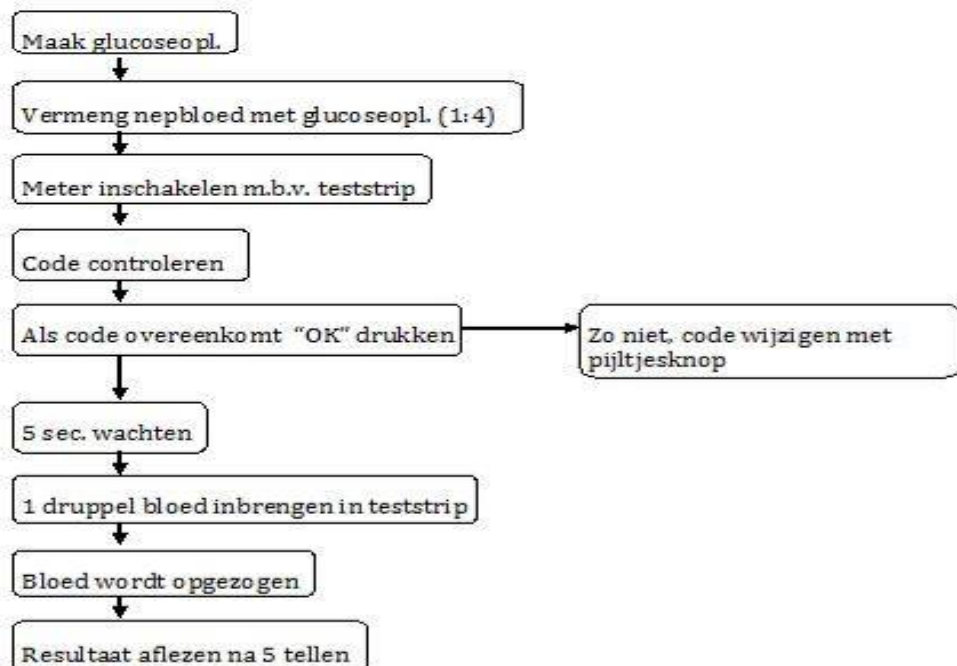
Benodigdheden

- OneTouch Ultra 2 meter
- Onetouch Ultra teststrips
- glucoseoplossingen
- pipet.

De glucosemeter die je gaat gebruiken is weergegeven in figuur 55.



Figuur 55: voorzijde, achterzijde en een teststrip van een LifeScan - OneTouch Ultra 2 glucosemeter.



Figuur 56: werkwijze.

Werkwijze

Meter inschakelen door middel van een teststip te plaatsen in de testpoort.

De code op het buisje teststrips moet eerst gecontroleerd worden. Er verschijnt een code op het scherm, deze code moet overeenkomen met de code op het buisje

Teststrips. Komt dit niet overeen, deze wijzigen met behulp van de pijltjesknoppen.

Druk vervolgens op de 'ok' knop, er verschijnt over 5 sec op het scherm 'bloed opbrengen'.

1 druppel bloed met behulp van een pipet tegen de bovenrand van de teststrip opbrengen (op de smalle kanaaltjes).

1. Bloed wordt door de strip opgezogen, deze aanhouden totdat het bevestigingsvenster volledig gevuld is.
(NB. Wanneer het kanaaltje niet volledig gevuld is, zal het glucoseapparaat een foutmelding geven: (fout 5).)
2. Let op de bloeddruuppel moet niet op de smalle kanaaltjes worden gebracht, maar erin.
3. Het resultaat kan na 5 tellen op het scherm worden afgelezen.

Nog een paar aandachtspunten:

- Het bloed moet niet op maar tegen het uiteinde van het teststrookje worden gehouden. Capillaire werking zorgt ervoor dat het bloed in het testkanaal komt.
- Teststrookjes zijn na het inbrengen in het apparaat maar een keer te gebruiken, ook al heb je er geen bloed in gedaan. In het apparaat zit een controle, die dubbel gebruik blokkeert.
- Het teststrookjes vlak voor een meting in het apparaat stoppen, Als je te lang wacht met het opbrengen van bloed krijg je een foutmelding.
- Breng je een te klein druppeltje bloed op het teststrookje dan krijg je de foutmelding: te klein monster.
- Bij het meten moet je goed kijken of je op de display van de meter bloed of controle vloeistof hebt staan.

Opdracht

1. Vul de gegeven concentraties in van de oplossingen die klaar staan in de tabel van figuur 57 bij X.
2. Meet de concentratie van de verschillende samples met behulp van de glucosemeter en vul die in bij Y.

3. Bereken de verhouding tussen de opgegeven waarden van de beschikbare glucoseoplossingen en de gemeten waarde (X/Y) en vul deze in in de tabel van figuur 57.
4. Verklaar een eventueel afwijkende waarde bij lage concentraties.
5. Hoeveel spreiding zit er in de verhouding tussen gegeven en gemeten waarde? Noteer de verhouding in termen van nauwkeurigheid.
6. Welke waarde zou je verwachten bij X/Y ?
7. De glucosemeter is gemaakt om te meten in bloed. De glucoseconcentratie in je lichaam die je ermee wilt meten is die in het bloedplasma. De meter corrigeert hiervoor. Wij hebben nu met een andere vloeistof gemeten i.p.v. bloed. De correctie die de glucosemeter uitvoert verklaart de gevonden verhouding X/Y . Beredeneer welke waarde de meter aanhoudt als gemiddelde verhouding bloedplasma/bloedcellen.

	Buis 1	Buis 2	Buis 3	Buis 4	Buis 5	Buis 6	Buis 7	Buis 8
X = Mmol/L								
Y = Aflezing Glucosemeter In stand: BLOED OPBRENGEN								
X/Y								

Figuur 57: concentraties oplossingen.

Bijlage 7 Extra uitleg differentiaalvergelijkingen

Afkoelende ketel

Zet een ketel water op het vuur, wacht tot het water kookt. Haal de ketel van het vuur en zet hem op ene onderzetter van kurk op het aanrecht.

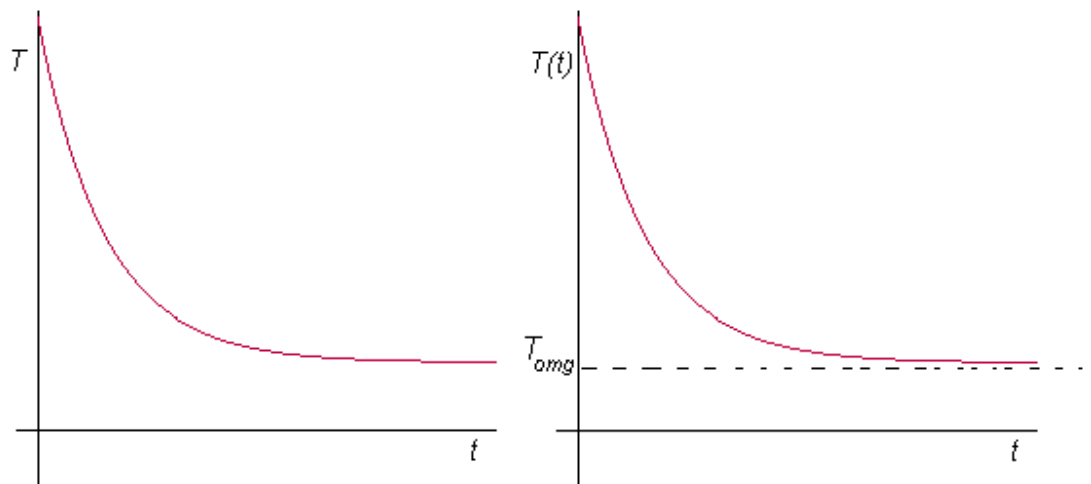
Het water in de ketel is nu 100°C (eigenlijk direct na het uitzetten van het vuur al onder de 100°C , maar zeg even 100°C): $T = 100$.

De temperatuur van de omgeving (kamer in dit geval) is T_{omg} (omgevingstemperatuur). T_{omg} is constant, zeg 20°C .

Vragen

- Koelt het water in de ketel af?
- Tot welke temperatuur koelt het water af?
- Wanneer koelt het water het snelst af, $T_{\text{omg}} = 5^{\circ}\text{C}$, of als $T_{\text{omg}} = 20^{\circ}\text{C}$?
- Hoe snel koelt het water af?

Als je met het gegeven uit vraag 4 $T(t)$ schetst krijg je de linker grafiek van figuur 58.



Figuur 58: $T(t)$ zonder (links) en met asymptoot (rechts).

Naarmate de tijd t groter wordt, komt de temperatuur steeds dichterbij T_{omg} .

Doordat het verschil tussen T en T_{omg} steeds kleiner wordt als t groter wordt, daalt de temperatuur steeds langzamer. Hierdoor duurt het oneindig lang totdat de temperatuur van precies T_{omg} bereikt wordt. Hierdoor heeft de grafiek van $T(t)$ een asymptoot met de vergelijking $T = T_{\text{omg}}$ (figuur 58, rechts).

Je ziet in de figuur dat op $t = 0$ de grafiek van $T(t)$ veel steiler is dan later in de tijd. De verandering in temperatuur van het water wordt gegeven door $T'(t)$, ook wel geschreven door dT/dt .

Bij vraag 4 merken we op dat de mate van afkoeling afhangt van $T - T_{\text{omg}}$, het verschil tussen de temperatuur van het water en de omgevingstemperatuur.

Dat verband is als volgt:

$$T'(t) = k \cdot (T(t) - T_{\text{omg}}) \quad (12)$$

Hier is k een constante waarvan de waarde afhangt van onder andere het soort vloeistof in de ketel en ook de hoeveelheid vloeistof in de ketel.

Omdat $[T(t) - T_{\text{omg}}]' = T'(t)$, want de afgeleide van $T_{\text{omg}} = 0$, is vergelijking (12) ook te schrijven als $[T(t) - T_{\text{omg}}]' = k \cdot (T(t) - T_{\text{omg}})$

Noem $f(t) = T(t) - T_{\text{omg}}$, dan staat er (13)

$$f'(t) = k \cdot f(t) \quad (14)$$

Kunnen we een functie $f(t)$ bedenken waarvoor dit geldt?

Laten we er eens een paar proberen:

poging 1

Is $f(t) = at + b$?

Dan is $f'(t) = a$

Dan is $f'(t) \cdot t + b = f(t)$

dus nee, dat klopt niet.

poging 2

Is $f(t) = t^n$?

Dan is $f'(t) = nt^{n-1}$

Dan is $\left(\frac{f'(t)}{n}\right) \cdot t = f(t)$, want $\left(\frac{nt^{n-1}}{n}\right) \cdot t = t^n$

dus nee, dat klopt ook niet.

poging 3

Is $f(t) = \frac{1}{1-t^2}$?

Dan is $f'(t) = \frac{2t}{1-t^2}$

Dan is $\left(\frac{f'(t)}{2t}\right) = f(t)$, want $\left(\frac{2t}{1-t^2}\right) / (2t) = \frac{1}{1-t^2}$

dus nee, dat klopt ook niet.

Zo komen we tenslotte bij:

Neem $f(t) = 2e^{3t}$, dan is $f'(t) = 3 \cdot 2e^{3t}$ (kettingregel, de u' komt er achter).

Dan is $f'(t) = 3 \cdot f(t)$ en dat lijkt er meer op.

Nu algemener: $f(t) = a \cdot e^{kt}$, dan is $f'(t) = a \cdot ke^{kt}$

Nu is $f'(t) = k \cdot f(t)$ zoals moest.

Er geldt dus:

$$f(t) = a \cdot e^{kt} \quad (15)$$

Omdat $f(t) = T(t) - T_{\text{omg}}$ (zie II) kun je ook schrijven:

$$T(t) = a \cdot e^{kt} + T_{\text{omg}} \quad (16)$$

Voorbeeld:

1. Stel de temperatuur van het kokende water is na drie uur nog 40°C en $T_{\text{omg}} = 20^\circ\text{C}$. Wat is het functievoorschrift van $T(t)$?
2. Stel je hebt een ketel met koud water (5°C) dat je in een kamer zet van 30°C . Na 6 uur is het water 10°C . Stel weer het functievoorschrift van $T(t)$ op.

Nu de formules in hoofdstuk 6

Formule (2) zegt:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{on}[Ag^*](1-\theta) - k_{off}\theta$$

Dit ziet er erg ingewikkeld uit, laten we het een beetje vereenvoudigen. Alles behalve θ in deze vergelijking zijn constanten. We halen eerst die θ eens buiten haakjes aan de rechterkant:

$$\frac{d\theta}{dt} = \theta(-k_{on}[Ag^*] - k_{off}) + k_{on}[Ag^*]$$

Noem $-k_{on}[Ag^*] - k_{off} = k$, en $k_{on}[Ag^*] = c$, dat mag, want het zijn
(17)

allebei constanten, onafhankelijk van t .

Dan staat er:

$$\frac{d\theta}{dt} = k\theta + c, \text{ of ook wel } \theta' = k\theta + c, \text{ of ook wel:}$$

$$\theta' = k\left(\theta - -\frac{c}{k}\right) \quad (18)$$

Deze formule heeft dezelfde vorm als formule (12) hierboven.

Er geldt nu dus (volgens onze afleiding 16):

$$\theta(t) = a \cdot e^{kt} - \frac{c}{k} \quad (19)$$

De differentiaalvergelijking (19) is te vergelijken met (8) in hoofdstuk 6.

De differentiaalvergelijking (10) geldt voor alle waarden van a .

In het dictaat nemen ze voor a de waarde c/k , maar dat hoeft niet beslist.

Neem als in het dictaat voor a de waarde c/k en vul alles in 19 in, dan krijg je:

$$a = \frac{c}{k} = \frac{k_{on}[Ag^*]}{-k_{on}[Ag^*] - k_{off}} \quad \text{gebruik } c \text{ en } k \text{ bij (17)}$$

en

$$\theta(t) = \frac{k_{on}[Ag^*]}{-k_{on}[Ag^*] - k_{off}} \cdot e^{(-k_{on}[Ag^*] - k_{off})t} - \frac{k_{on}[Ag^*]}{-k_{on}[Ag^*] - k_{off}}$$

Als je dit om werkt krijg je (haal c/k buiten haakjes):

$$\theta(t) = \frac{k_{on}[Ag^*]}{-k_{on}[Ag^*] - k_{off}} \left(e^{(-k_{on}[Ag^*] - k_{off})t} - 1 \right)$$

En dat is weer gelijk aan (voor en binnen de haakjes vermenigvuldigen met -1)

$$\theta(t) = \frac{k_{on}[Ag^*]}{k_{on}[Ag^*] + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on}[Ag^*] + k_{off})t} \right)$$

Haal in de macht van e nog -1 buiten haakjes:

$$\theta(t) = \frac{k_{on}[Ag^*]}{k_{on}[Ag^*] + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on}[Ag^*] + k_{off})t} \right)$$

Antwoorden op vragen

1. Ja, want T_{omg} is lager dan T.
2. Tot T_{omg} , want dan is $T = T_{omg}$ en staat de ketel geen warmte meer af aan zijn omgeving.
3. Als $T_{omg} = 5^\circ C$ want dan is het verschil tussen T en T_{omg} het grootst.
4. Dat ligt eraan. Als het verschil tussen T en T_{omg} groot is, koelt het water snel af. Als het verschil tussen T en T_{omg} kleiner wordt, koelt het water ook langzamer af.

Het water koelt dus het snelst af als je de ketel net van het vuur genomen hebt.

5. Gebruik formule (16)

Vul eerst $t = 0$ in, want $T(0) = 100$: $T(0) = a \cdot e^{k \cdot 0} + 20 = a + 20 = 100$

Nu is $a + 20 = 100$, dus $a = 80$

Vul nu in $T(3) = 40$: $T(3) = 80 \cdot e^{k \cdot 3} + 20 = 40$

Nu is $e^{k \cdot 3} = \frac{20}{80} \Rightarrow k \cdot 3 = \ln\left(\frac{20}{80}\right) \Rightarrow k = \frac{1}{3} \ln\left(\frac{20}{80}\right) \approx -0,3269$

(sla op in letter A)

Dus nu is

$$T(t) = 80 \cdot e^{At} + 20$$

6. Vul eerst $t = 0$ in, want $T(0) = 5$:

$$T(0) = a \cdot e^{k \cdot 0} + 30 = a + 30 = 5$$

Nu is $a + 30 = 5$, dus $a = -25$

Vul nu in $T(6) = 10$: $T(6) = -25 \cdot e^{k \cdot 6} + 30 = 10$

Nu is $e^{k \cdot 6} = \frac{-20}{-25} \Rightarrow k \cdot 6 = \ln\left(\frac{20}{25}\right) \Rightarrow$

$$k = \frac{1}{6} \ln\left(\frac{20}{25}\right) \approx -0,01615 \quad (\text{sla op in letter B})$$

Dus nu is

$$T(t) = -25 \cdot e^{Bt} + 30$$

Bijlage 8 URL-lijst

URL1	De koolhydratenlijst http://www.dekoolhydratenlijst.nl/
URL2	Medischlab, medische laboratoriumtests toegelicht http://www.medischlab.nl/
URL3	NVVC, medisch laboratoriumspecialisten in bloedonderzoek http://www.nvvc.nl/ >ga naar 'klinische chemie' en kies 'regio-overzichten uniforme referentiewaarden'
URL4	Nierstichting http://www.nierstichting.nl/
URL5	Nederlandse Hartstichting http://www.hartstichting.nl/
URL6	Bioplek, biologiesite voor het voortgezet (secundair) onderwijs http://www.bioplek.org/inhoudbovenbouw.html#afweer

Bijlage 9 Bronnen

Department of Obstetrics and Gynecology University of New Mexico,
<http://www.hcglab.com/>