

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming
van het NIOZ.

Struktuur en funktie van Crangon crangon

hemocyanine

door

J. van Vliet

DE WETENSCHAPPELIJKE VERGENDE

WETENSCHAPPELIJKE VERGENDE

WETENSCHAPPELIJKE VERGENDE

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1970-10

Struktuur en funktie van Crangon crangon
hemocyanine

door

J. van Vliet

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctoraal studie

in het tijdvak februari - juli 1970

aan

NIOZ te Texel

voor

Prof. dr. R.J. Planta

Biochemisch Laboratorium

Vrije Universiteit Amsterdam

onder supervisie van

dr. R.E. Weber

December 1970

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1970-10

Struktuur en funktie van Crangon crangon

hemocyanine

door

J. van Vliet

intern verslag

Inhoud:

I. Samenvatting - Summary	2
II. Inleiding	3
III. Het hecy van de decapode Crustacea	4
A. Het respiratoire gedrag	4
B. De chemische opbouw van hecy	7
C. Fysico-chemische aspecten	8
IV. Het hecy van <u>C. crangon</u>	9
A. Het zuurstofbindingsevenwicht	10
B. De structuur van <u>C. crangon</u>	14
C. De invloed van modifiers op de structuur en de zuurstof bindingsaffiniteit van <u>C. crangon</u> hecy .	17
D. Analyse van de dissociatieprodukten van <u>C. crangon</u> hecy met behulp van Polyacrylgelelektroforese (PAAE)	20
E. RF-waarde-Molecuulmassa-Sedimentatieconstante . .	21
V. Fysico-chemische aspecten	22
A. Fluorescentie	22
B. Elektronenmikroskopie	23
C. Ionensamenstelling van <u>C. crangon</u> bloed	23

VI. Theoretische uitwerking van de gelfiltratie-	
karakteristieken	24
VII. Aanwijzingen voor een model van <u>C. crangon</u> hecy .	25
VIII. Wat er verder zo al op te merken valt	27
IX. Literatuuropgaven	28
X. Tabellen en Figuren	
XI. Addendum: Molecuulgewichtsbepaling van Eiwitten	
d.m.v. lichtverstrooiing	

I. Summary

Structure and function of C. crangon haemocyanin

The molecular weight of the haemocyanin of C. crangon was found to be low ($\pm 320,000$) compared with other Arthropoda. Increase of pH leads to dissociation into smaller subunits of molecular weight of $\pm 160,000$ and $\pm 80,000$. The influence of various ionic effectors on the dissociation pattern of the haemocyanin is investigated.

O₂ equilibruim curves of C. crangon serum and haemocyanin preparations are determined and the influence of factors like pH and temperature and ions in solution on these are evaluated.

Finally, an attempt is made to correlate observations on structure and function with reference to the influence of temperature, pH, Mg⁺⁺ and Cl⁻.

Samenvatting

C. crangon hemocyanine werd onderzocht. De molecuulmassa was klein vergeleken bij die van de overige arthropoda : 320.000 a.m.e. Bij verhoogde pH dissocieerde hemocyanine in de dimere en monomere vorm van de subeenheden (respectievelijk 160.000 en 80.000 a.m.e.). Verder

werd de invloed van diverse effectoren op het dissociatiepatroon van C. crangon hemocyanine onderzocht.

Van zowel C. crangon serum als hemocyanine werden zuurstofbindingsevenwichtcurves bij verschillende pH's bepaald. Tevens werd de invloed van de effectoren hierop nagegaan.

Tenslotte is getracht een correlatie te geven tussen de structuur en de functie van C. crangon hecy met betrekking tot de invloed van temperatuur, pH, Mg^{++} en Cl^{-} .

II. Inleiding

Hemocyanine, het koperhoudende zuurstoftransporterende eiwit van vele Mollusca en Arthropoda, is door vele onderzoekers gebruikt om nieuwe methodieken ter bepaling van molecuulmassa's en verwante karakteristieken van eiwitten te ontwikkelen.

ERIKSSON-QUENSEL & SVEDBERG (1936) gebruikten dit eiwit, wat een bijzonder grote variatie in moleculaire massa's vertoont, voor de uitwerking van zijn sedimentatieanalyses. De experimentele toetsing van het gebruik van lichtverstrooiing bij de bepaling van vorm en molecuulmassa van macromoleculen geschiedde onder andere aan deze "reuze" eiwitten.

Allereerst, omstreeks 1930, beperkte men zich tot de bepaling van de zuurstofbindingscapaciteit en -affiniteit van hecy. Men onderzocht daarbij de relatie tussen de verzadigingspercentages en de aangelegde zuurstofspanningen in afhankelijkheid van onder andere temperatuur en pH. Eerst na 1945 begon men het eiwit op meer structurele en biofysische eigenschappen te onderzoeken. En tot op heden proberen een groot aantal biochemici het wezen van de binding van

enerzijds koper aan het eiwit en anderszijds van zuurstof aan het koper-eiwit complex.

De hecys zijn grof weg te verdelen in twee groepen namelijk;
 a. Het hecy der Mollusca en b. Het hecy van de Arthropoda. Het eerste hecy is opgebouwd uit subeenheden van 50.000 a.m.e. Ieder subeenheid van 50.000 a.m.e. bevat twee koperatomen, die eenwaardig in valentie zijn en is derhalve in staat 1 molecuul zuurstof te binden. In sterk zuur milieu en met behulp van andere dissociatie factoren is dit biologisch subeenheid weer op te splitsen in twee eenheden, ieder met een massa van 25.000 a.m.e. Deze laatste is biologisch inactief en wordt het chemisch subeenheid genoemd (van VLIET, 1970). Ook het hecy der Arthropoda is opgebouwd uit biologische subeenheden, maar met een massa van 75.000 a.m.e. De massa van het chemisch subeenheid is dus 37.000 a.m.e. Het grootste hecy van de Mollusca is dat van de wijngaardslak en heeft een massa van maar liefst $9 \cdot 10^6$ ame (GHIRETTI, 1968). Het grootste hecy bij de Arthropoda heeft een massa van 950.000 a.m.e. (Cancer magister) (BRUGGEN & HOLDE, 1970).

C. crangon behoort tot de Crustacea (Arthropoda) en wel de familie Crangonidae. Het feitenmateriaal, welke in de navolgende alinea's ter sprake komt is derhalve alleen van toepassing op de Crustacea.

III. Het hecy van de decapode Crustacea

A. Het respiratoire gedrag

In de jaren 1920 tot 1940 hebben veel onderzoekers hier hun aandacht op gevestigd. Het werk van veel onderzoekers wordt uitstekend samengevat door REDMOND (1955) en de volgende hoofdpunten komen daarbij

aan de orde:

a. De ligging van het zuurstofbindingsevenwicht is afhankelijk van de temperatuur (negatief), van de pH dan wel het koolstofdioxyde gehalte van het serum (in vivo) of van een gezuiverde oplossing van hecy (in vitro). De afhankelijkheid van de zuurgraad wordt het Bohr-effekt genoemd; dit is fysiologisch van groot belang voor de crustacea en het neemt een maximum aan bij een temperatuur van 16° C (REDMOND, 1955).

b. Dialyse tegen isotone en andere buffers geven een verlaging van de zuurstofbindingsaffiniteit. Verdunning dan wel toevoeging van een geconcentreerde buffer aan serum (ter voorkoming van coagulatie) heeft een analoog effect.

c. Divalente metaalionen, Mg^{++} , Ca^{++} en Sr^{++} verhogen de affiniteit voor zuurstof.

De zuurstofcapaciteit, de hoeveelheid zuurstof die per massa eenheid hecy gebonden kan worden, is laag en ligt tussen de 1,30 en 1,99 vol. % O_2 . De affiniteit kan sterk variëren; de P 50 (half-verzadigingsspanning) die dit kenmerkt bedraagt van 3 tot 30 mm P O_2 .

Hoewel de meeste crustacea in een betrekkelijk zuurstof arm milieu leven is het bloed veelal echter slechts tot op maximaal 65 % verzadigd met zuurstof. Omrekening van deze gegevens suggereert dat zelfs zonder hecy voldoende zuurstof aangevoerd zou kunnen worden (wat voorkomt op momenten dat de dieren gaan vervellen).

Men neemt aan dat hecy benodigd is om een zuurstofgradiënt over het kieuw-bloedbaan grensvlak in stand te houden. Hierdoor kan het dier per tijdseenheid een adequate hoeveelheid zuurstof opnemen (REDMOND, 1968).

De curves, die men krijgt na uitzetting van de zuurstof verzadiging tegen de zuurstof spanning in mm Hg O_2 , zijn sigmoïd van vorm. Dit houdt een positieve interactie tussen de zuurstofbindingsplaatsen in. De vorm kan onder invloed van intensieve dialyse en dissociatie van het hecy tot subeenheden overgaan in een hyperbool (geen interactie). De ligging van de curve is veelal afhankelijk van dezelfde parameters als boven genoemd bij de zuurstofbindingsaffiniteit.

Zet men de logaritmen van de ratio $(O_2\text{-hecy})/(\text{hecy})$ uit tegen logaritmen van de zuurstofspanning, dan wordt een lijn die hoofzakelijk lineair is verkregen. De helling ervan is een maat voor de interactie tussen de zuurstofbindingsplaatsen. Men onderscheidt drie gedeelten n.l. het eerste rechte deel (I), die een waarde van 1 heeft. Dit houdt in dat er geen interactie is (er zijn nog niet genoeg zuurstofmoleculen gebonden). Van 10 % tot op 90 % verzadiging (fase II) is een maat voor de maximale interactie; men noemt de helling van dit recht gedeelte de Hillse n-waarde. Tenslotte de laatste fase, een gedeelte welke weer een lagere n-waarde aanneemt (III). Voor de biologische subeenheid vindt men een n-waarde van 1. Aggregatie hiervan hebben evenredig grotere waarden. Een integrale waarden geeft, uitgaande van een lage toestand van aggregatie aan dat er een mengsel van molecuulmassa aanwezig is. Tevens kan het voor grotere aggregatie van de subeenheden de maximale interactie aangeven. De eerder genoemde evenwichtscurve is hyperbolisch voor een oplossing van biologische subeenheden met n-waarde 1. Voor grotere moleculen is hij sigmoïd. Een negatieve interactie tussen de zuurstofbindingsplaatsen, die zich enigszins manifesteert in fase III, is tevens een theoretische mogelijkheid (MANWELL, 1960).

B. De chemische opbouw van hecy

De associatie van twee chemische subeenheden (37.000 a.m.e.) tot de biologische subeenheid (75.000 a.m.e.) is spontaan en de binding is erg hecht. De subeenheid polymeriseert systematisch tot grotere eenheden van 5 of 10 protomeren en meer. Deze wijze van aggregatie is alleen bij de Crustacea aanwezig. Het werd het eerst aangetoond door ERIKSSON- QUENSEL & SVEDBERG (1936), aan de hand van sedimentatie patronen bij verschillende pH. Voorts is de dissociatie van het "moeder hecy" bestudeert met lichtverstrooiing en elektronenmikroskopie. Polymerisatie op lineaire manier van de "moeder hecy's" vindt veel plaats bij pH's in de omgeving van het iso-elektrisch punt (4,5) (CONDIE & LANGER, 1964). Recent heeft DECLEIR & RICHARD (1970) aangetoond, dat deze lineaire ordening van de hecy moleculen ook voorkomt in de kieuwen van volwassen inktvissen; het een en ander in contrast met de onvolwassen vorm van de bloedvaten. Het kleinste hecy molecuul tot nu toe gevonden heeft een massa van 397.000 a.m.e. (Pandalus).

De polymerisatie van subeenheden tot grotere aggregaten is afhankelijk van een groot aantal parameters waarvan wij er hier een paar zullen noemen:

- a. Verhoging van de pH aan weerszijden van het iso-elektrisch punt doet het hecy dissociëren in haar subeenheden of intermediaire aggregaten. Deze dissociatie is algemeen maar de pH-stabilisatiepatronen van de diverse polyneren verschillen van soort tot soort. Het is belangrijk reeds hier op te merken, dat de behandeling van het eiwit een grote invloed op de dissociatie heeft. De verschillen in dissociatie van het hecy gezuiverd door dialyse, differentiële centrifuge en/of gelfiltratie zijn aanzienlijk.
- b. Ook divalente metaalionen hebben een associatief effect op de

hecy subeenheden (LARIMER & RIGGS, 1964) (COHEN & van HOLDE, 1963) (JOHNSTON, JAMES & BARBER, 1967).

c. In het temperatuurtraject van 4 tot 25° C geeft een verhoging van de temperatuur een grotere associatie. Daarboven treedt natuurlijk denaturatie op (VAN HOLDE & HARRISON, 1963).

d. De binding van zuurstof aan het hecy molecuul geeft bij 70 % verzadiging een dissociatie in kleinere eenheden; dit effect wordt bij bijna verzadiging weer geheel opgeheven (VAN HOLDE, 1964).

e. Tenslotte wordt nog de invloed van hydrostatische druk (Thesis Konings, Groningen), eiwitconcentratie en ionensterkte (GHIRETTI, 1968) aangegeven.

Over de binding van zuurstof aan het koper-hecy complex bestaan veel theoriën (KLOTZ & HEINEY, 1957); een volledig verklarend model is echter nog niet gevonden. De koperatomen zijn met een opmerkelijke hechtheid aan het eiwit gebonden. Men onderscheidt veelal twee "soorten" atomen namelijk de eerste vijftig procent die duidelijk minder stevig gebonden is dan de andere vijftig procent die bijzonder hecht verankerd in het hecy zit. De histidine residuën, met stabiliserende zwitterionen, binden Cu^+ relatief ontzettend goed (zie MAHLER EN CORDES, Biological Chemistry bldz. 196) en men neemt aan dat juist deze aminozuren een belangrijke rol spelen bij de binding van Cu aan het hecy. Het kopergehalte is 0,17 %.

C. Fysico-chemische aspecten

De meeste hecys hebben drie absorptiebanden en wel circa 280, 350 en 580 nm. De laatste twee noemt men de koperbanden; deze zijn karakteristiek voor koperhoudende eiwitten en de exakte plaats verschilt van soort tot soort (VAN HOLDE, 1967).

Aan de hand van Optische Rotatie Spectra (ORD) toonde KLOTZ & HEINEY, (1957) aan het tijdens de oxigenatie een conformatie verandering van hecy optreedt. FOSS (1963), bestreedt dit en wees er op, dat deze conformatie shift eerst in de buurt van de absorptiebanden waar te nemen is. Hij neemt dan ook aan dat er een verandering van de direkte omgeving van de zuurstofbindingsplaats optreedt. Overigens gaven viscositeits metingen voor en na de zuurstofbinding reeds aan dat er tevens een "overall" verandering van de tertiäre structuur van hecy moet plaats vinden. Ook is hecy met Circulair Dichroïsme (CD) onderzocht. Deze metingen gaven op hun beurt weer aan dat er geen conformatie verandering plaats heeft. Uit de CD bepalingen leidde men af dat hecy gemiddeld 22 % alfa-helix bevat (TAKESADA & HAMAGUCHI, 1962).

Wanneer een oplossing van hecy bestraald wordt met ioniserende straling dan wordt in eerste instantie waterstofperoxide (H_2O_2) gevormd. Deze oxidator kan echter niet inwerken op hecy in de geoxygeneerde vorm. Na deoxygenatie van het oxyhecy treedt een intensieve oxidatie van de koper atomen op, waardoor het eiwit geïnactiveerd wordt.

IV. Het hecy van Crangon crangon

De enige publikatie over de bloedpigmenten van C. crangon kwam enige weken na de start van mijn onderzoek uit. Het behandelde de serum eiwit samenstelling in relatie tot seizoens- en vervellingsstadia (DWANGMAH & GROVE, 1970).

Indachtig aan het Peter Principle (PETER & HULL, 1970) koos ik bescheiden de volgende uitgangspunten voor mijn onderzoek:

- a. bepaling van het zuurstofbindingsevenwicht van C. crangon serum en het daaruit gezuiverde hecy.
- b. bepaling van quarternaire structuur en het dissociatiegedrag van C. crangon hecy.
- c. de invloed van modifiers op a en b.

A. Het zuurstofbindingsevenwicht

Voor de bepaling van de zuurstofbindingsevenwichtcurves werd gebruik gemaakt van tonometers. Deze bestaan uit een cuvet met lichtweg van 1 mm, een incubatieruimte afgescheiden van een grote spanningsreglingskamer en een verloopkraan waarmee spanningsvariatiës van circa 1 tot 1,5 mm Hg O₂ te bewerkstellingen zijn (WEBER, 1963). Voor de bepaling van het verzadigingspercentage maakt men gebruik van de blauwkleuring van het hecy onder invloed van oxygenatie. De absorptie is het sterkst in de 350 nm band (een molaire extinctie van circa 15 cm²/mol). Voor de bepaling gaat men als het volgt te werk: -de tonometer wordt gevuld met C. crangon serum of een hecy oplossing, -voorzichtig en met onderbrekingen evacueert men de tonometer totdat een konstante minimum extinctie bij 350 nm verkregen wordt, vervolgens laat via de verloopkraan succesievelijk eenheden zuurstof toe, men incubeert de zuurstof met de hecy oplossing gedurende minstens 30 minuten bij een gestabiliseerde omgevingstemperatuur en meet de extinctie.

Uit de gemeten extinctie berekend men het percentage gebonden zuurstof en zet deze grafisch uit tegen de aangelogde zuurstofspanning. Het afgetapte bloed werd behandeld op de navolgende wijze: -eerst werden de "explosive particles" gedenatureerd (mechanisch) en

het eiwit afgecentrifugeerd (30 minuten op 4.000 g).

-daarna werd het bloed met een pasteurse pipet overgebracht in de cuvet van de tonometer.

Bij de evacuatie van de tonometer trad een hevige denaturatie op. Deze was eerst intensief bij kamertemperatuur en maakte het onmogelijk met één hoeveelheid bloed meerdere reproduceerbare waarden te krijgen. Door toepassing van een zogenaamde tweepuntsbepaling werd hiervoor zo goed mogelijk gecorrigeerd. Men moet op twee punten, namelijk in de absorptiepiek (350 nm) en op een plaats waar geen absorptie plaatsheeft (450 nm). De toename in het tweede meetpunt is tengevolge van de denaturatie van het hecy. Deze wordt dan verrekend met de waarden op het eerste meetpunt. Tenslotte bedierf het bloed, ook bij wegzetten in de koelkast, na enkele dagen.

In figuur 3 worden deze nadelige effecten gedemonstreerd. Alle curves zijn bepaald met één portie bloed. De curves gemaakt bij 15° en 20° C zijn op eenzelfde dag gemaakt en hebben een sigmoïde vorm. Een dag later werd opnieuw een curve gemaakt bij 20° C. Er trad een hevige denaturatie op en de werkelijke extinktie bij 350 nm daalde minstens tot op de helft. Dit wordt gereflecteerd in een opmerkelijke afvlakking van de curve bij circa 80 % verzadiging. Dit laatste is ook te zien bij de curve, welke de dag ervoor gemaakt werd bij 20° C.

De pH van garnalenbloed varieert van 7,8 tot 8,2. De boven vermelde curve, zichtbaar op figuur 2, werd gemaakt met garnalenbloed met pH 8,2. Deze pH steeg na de denaturatie tot op 9,2. Het is dus belangrijk te weten dat tijdens de metingen de pH nimmer geheel konstant is.

In Tabel I zijn de gevonden P50 waarden weergegeven. Tevens vindt men er de Hillse n-waarden. De geringe hoeveelheid waarnemingen maken

het moeilijk iets over het Bohr effect te zeggen. De tendens echter geeft aan dat het wellicht een "normaal" effect is. Dus bij hogere pH neemt de zuurstofbindingsaffiniteit toe.

Het temperatuureffect op de O_2 affiniteit en op de positieve interactie tussen de O_2 bindingsplaatsen, is uit deze weinige gegevens onduidelijk.

Beide karakteristieken zijn zichtbaar in de oxygenatiecurves afgebeeld op figuur 3 en in de logaritmische curves op figuur 1.

Naast onbehandeld serum werd ook van gedialyseerd bloed de zuurstofbindingskarakteristiek gemeten. Ook hier werd in eerste instantie centrifugatie toegepast om alle "explosive particles" te verwijderen. Daarna werd het serum gedurende 15 à 20 uur gedialyseerd tegen fosfaat (pH 6,4 tot en met 7,7) en tris-HCl (pH 7,95 tot en met 8,5) buffers met ionensterkte 0,1 bij kamertemperatuur. De aldus verkregen hecy oplossingen waren beter bestand tegen denaturatie. Wel werd het serum iets verdund.

In figuur 5 ziet men enkele oxygenatie curves bij verschillende pH en temperatuur. De zuurstofbindingsaffiniteit is duidelijk afgenomen en men treft naast de sigmoïde curves ook andere vormen aan zoals hyperbolen. De logaritmische uitzetting vindt men in figuur 4. In een van de lijnen, namelijk die van 6,4, ziet men zelfs een grote mate van negatieve interactie of juist belemmering van de toenadering van O_2 tot de zuurstofbindingsplaatsen ($n=0,5$!).

De oxygenatiekarakteristieken van gedialyseerd bloed zijn tabelarisch weergegeven in Tabel II. Men ziet dat de affiniteit erg afhankelijk is van de pH en van de temperatuur. In figuur 6 is de P_{50} waarde uitgezet tegen de pH bij 9° en 20° C. Verrassend is het ditmaal zo duidelijke Bohr effect. Bij 9° C heeft men een breed optimum plateau

tussen pH 7 en 7,8. Daarentegen bij 20° C een p_{50} -minimum, welke veel scherper is en zijn hoogste affiniteit aanneemt bij een pH van 7,4.

Een ander interessant facet van de oxygenatie van gedialyseerde sera van Crangon crangon is te zien op figuur 7. Een gedialyseerd monster bloed werd met behulp van tonometers getest op de oxygenatie karakteristiek. Na een aanvankelijk snelle stijging van de hoeveelheid gebonden zuurstof nam de oplossing bij 8 mm Hg O_2 een verzadigingsplateau aan. Eerst bij 18 mm Hg O_2 trad een snellere binding van zuurstof op. Herhaling van de oxygenatie na deoxygenatie gaf een snellere verzadiging en het intermediaire verzadigingsplateau lag lager. Dit effect is al meer gekonstateerd bij andere bloed pigmenten en het is interessant dat ook hecy zo'n effect kan vertonen.

Bijzonder treffend zijn de grote verschillen die optraden na dialyse van een bloedmonster. Het hecy van Crangon crangon kan eerst optimaal werken wanneer het in zijn "eigen" omgeving is. Centrifugatie van een bloedmonster gedurende 20 minuten bij een kracht groot 50.000 g doet de p_{50} van het hecy van circa 10 tot 40 mm Hg O_2 dalen. Dialyse van een serum tegen een buffer met ionensterkte 0,1 en variërende pH doet de p_{50} zelfs tot op 200 mm Hg O_2 dalen, een zuurstofspanning die zelfs in de lucht niet aanwezig is !

De verklaring van deze opmerkelijke afname van de zuurstofbindingsaffiniteit van hecy wordt nog gecompliceerder wanneer men er gegevens van LARIMER & RIGGS, (1964) naast leggen. Deze auteurs toonden aan dat, naast de omgekeerde afname met de Ca^{++} en Mg^{++} concentratie (dialyse !) zowel verdunning als toevoeging van geconcentreerde buffer een duidelijke verlaging van de affiniteit geeft. Persoonlijk vond ik geen duidelijke invloed van de variatie van ionensterktes van de door mij gebruikte buffers. Wel had het type buffer (fosfaat, tris-HCl of

carbonaat) een duidelijk verschillende invloed. Al met al kunnen geen van deze factoren de bovengenoemde afname van de affiniteit volledig verklaren. Persoonlijk ben ik van mening dat naast de wel overtuigende invloed van anorganische ionen ook andere factoren een rol spelen. Daarbij valt te denken aan organische verbindingen, die veelal zowel een invloed op de structuur en wellicht op de affiniteit hebben. Ook is het mogelijk dat het hecy in een nauwgezette ordening in het serum voorkomt.

B. De structuur van C. crangon hecy

Zoals vermeld zijn hecy moleculen onder invloed van variatie van de pH op te splitsen in haar subeenheden. Om deze dissociatie goed te kunnen meten werd gebruik gemaakt van de volgende methodieken.

Voor de scheiding van dissociatieprodukten werd gelfiltratie gekozen. Twee achter elkaar geplaatste kolommen met een diameter van 15 mm en een lengte van 500 mm werden geëquilibreerd met buffer en gevuld met Sepharose 6B. Na langdurige equilibratie met buffer werd het hecy monster in een dunne laag opgebracht. De elutiesnelheid was 2,4 ml hr. De frakties werden continu doorgemeten met een LKB 8300 Ultraviolet Absorptie meter bij 280 nm en de absorptie geregistreerd op een recorder met hoge gevoeligheid. Soms werden de frakties tevens doorgemeten met een doorstroomcuvet bij 350 nm. De opgevangen frakties werden met behulp van lichtverstrooiing doorgemeten en de molecuulmassa's van het eiwit bepaald (zie figuur 8).

Ook werden de dissociatie produkten onderzocht met behulp van polyacrylamidegelelelectroforese (PAAE). De gellen werden zowel uit 7,5 % als 10 % acryl gemaakt (toenemende ondoorlaadbaarheid voor

grotere eiwitten). Door een onvolledige koeling zijn de patronen niet altijd even fraai geworden (POILLON & BEAM, 1966).

De molecuulmassa werden bepaald met behulp van lichtverstrooiing. Als standaard werd bovine serum albumine gebruikt. Voor eiwitten met massa van 400.000 amu is de fout circa 5 %. Kleinere eiwitten hebben een geringere fout.

Voor een nauwkeurige beschrijving van de bepaling van molecuulmassa's met behulp van lichtverstrooiing verwijs ik naar de bijgevoegde verhandeling (VAN VLIET, 1970).

De eiwitconcentraties werden bepaald met de methode van Lowry, waarvan de beschrijving in vele handboeken te vinden is. Als standaard eiwit werd lysozym gekozen.

De elektroforese met polyacrylamidegel werd uitgevoerd in glazen buisjes met een doorsnede van 5 mm en een lengte van 70 mm. De uitvoering was vertikaal en als buffer werd een Tris-Glycine buffer met pH=8,3 gekozen. De aangelegde stroom per buisje was circa 3 milli-ampere. Als tracer werd parabroomfehol gebruikt en de kleuring van de eiwitbanden werd met Amidozwart (1 %) gedurende 1 uur gedaan. De ont-kleuring van de gel werd uitgevoerd in een speciale houder en als draagvloeistof voor de stroom werd 5 % azijnzuur gekozen.

De gezuiverde hecy preparaten werden op navolgende wijze gemaakt:

- het serum werd na aftapping uit de garnaal licht geschud en de uit-gevlokte eiwitten afgecentrifugeerd gedurende 30 min. bij 4.000 g,
- vervolgens werd het serum 20 minuten op 20.000 g gecentrifugeerd en het supernatans verder op twee wijzen gereinigd en wel:

a-door 3 uur centrifugeren bij 50.000 g en de resulterende pellet

gedurende de nacht in de koelkast in een van de eerder vermelde

buffers opgelost (oplossing I)

b-het supernatans gedurende 15 à 20 uur gedialyseerd tegen de desbetreffende buffers (oplossing II).

Met de boven genoemde methodieken heb ik vervolgens getracht aan de hand van de bepaling van de volgende punten de structuur van C. crangon te onderzoeken:

- I Bepaling van de gewichtsgemiddeldemolecuulmassa van hecy oplossingen bij variatie van pH, onder gelijkhouden van de andere externe parameters,
- II Analyse van de produkten ontstaan door variatie van de pH met behulp van gelfiltratie en
- III met polyacrylamidegelektroforese.

I. De gewichtsgemiddeldemolecuulmassa's werden bepaald met lichtverstrooiing. De gevonden waarden werden binnen de genoemde fout van 5 % afgerond op gehele getallen (75.000 werd 80.000 aane). In Tabel III wordt een overzicht gegeven van de gevonden waarden. Alle bepalingen werden gedaan bij kamertemperatuur en de gebruikte incidentele golflengte was zowel 436 als 545 nm. Na correctie verkrijgt men een rechte lijn wanneer men de troebelheid, τ , uitzet tegen de concentratie. Hiervan vindt u een voorbeeld in figuur 8. Deze rechte lijn geeft na omrekening de gewichtsgemiddeldemolecuulmassa.

Duidelijk ziet men de fatale invloed van dialyse op de hecy moleculen; bijna bij alle pH's dissociëren de hecy moleculen in hun monomeren. Een opmerkelijke uitzondering is de buffer van pH = 7,6. De vergelijking van de "I" waarden wordt eerst na analyse van de dissociatieprodukten interessant.

II. In Tabel IV worden de percentages van de vier aanwezige

dissociatieprodukten bij alle pH's aangegeven. Een aantal punten vallen direkt op:

Wanneer men deze percentages de gemiddelde molecuulmassa's berekend dan ziet men dat deze waarden geen overeenstemming hebben met de waarden uit Tabel III. Dit effect is juist daarom zo interessant omdat het aangeeft dat het "desalting" effect van de gel eerst bij de carbonaatbuffers een duidelijk verschil geeft.

- De maximaal gemeten molecuulmassa en dus zeer waarschijnlijk die van het "moeder" hecy, 320.000 ame, het kleinste hecy ooit waargenomen.
- De tetrahedrale structuur van dit hecy is binnen de groep der Crustacea al even opvallend. De molecuulmassa van het hecy van de verwante garnaal Pandalus is 397.000 ame en hierin zijn de monomeren in een "ring" gerangschikt (5 monomeren !).
- De opeenvolging van molecuulmassa naar grootte binnen de Crustacea is: krabben, kreeften en tenslotte garnalen.

C. De invloed van modifiers op de structuur en de zuurstofbindings-affiniteit van C. crangon hecy.

Het is algemeen gebruikelijk voor dergelijke modifiers divalente metaalionen te gebruiken en wel in het bijzonder Mg^{++} en Ca^{++} . Veelal wordt hierbij de chloridevorm gekozen. Voorts blijkt uit gegevens van auteurs (GRIMM) dat de garnaal ongewoon streng zijn chloridegehalte in het bloed reguleert. Op grond van deze motieven koos ik Mg^{++} en Cl^{-} als modifiers.

Wanneer het chloride gehalte van het hem omringende zeewater van 60% tot 120% zeewater varieert weet de garnaal zijn chloride-gehalte in het bloed op 0,45 tot 0,50 M Cl^{-} te houden. Om de invloed

van deze "in vivo" concentratie chloride op zowel de structuur als de affiniteit te bepalen werden twee sera tegen buffers van pH 7,1 en 7,6, allebeide tevens 0,5 M Cl^- , gedialyseerd. In figuur 9 en 10 zijn de evenwichtscurves weergegeven. Zeer opvallend is de sterk toegenomen zuurstofbindingsaffiniteit ! De logaritmische uitzetting vindt men in figuur 11 en 12. Hieruit leest men snel de eveneens toegenomen positieve interactie tussen de zuurstofbindingsplaatsen af. In Tabel V worden alle waarden nog eens netjes op een rijtje gezet. Naast de chloride concentratie van 0,5 M werd ook een monster gedialyseerd tegen 0,6 M, een fysiologisch bijna fatale concentratie. Dit inaktiveerde echter circa de helft van de hecy moleculen.

Dialyse van een hoeveelheid serum tegen standaard zeewater deed de affiniteit van het hecy verder oplopen, er werd een p_{50} waarde van 37 mm Hg O_2 gevonden. Deze waarde komt goed overeen met die van serum na verwijdering van "particulate material".

Van de beide bovengenoemde monsters hecy gedialyseerd tegen 0,5 Molair Cl^- bevattende fosfaatbuffers met ionensterkte 0,1 I en pH 7,1 en 7,6 werden de gramgemiddeldemolecuulmassa bepaald. Deze bleken beide 200.000 ame groot te zijn. De gemiddeld beschikbare zuurstofbindingsplaatsen zijn 2,5. De waargenomen n-waarden zijn dus bijzonder opvallend !

Vervolgens werden drie preparaten bereid naar zuiverings methode "I" en opgelost in buffers, allen 0,12 I en 0,5 M Cl^- , met pH's van resp. 7,0, 8,0 en 9,0. De dissociatieprodukten werden met de beschreven gelfiltratiemethode (elutie met 0,5 M Cl^- houdende buffers) geanalyseerd. In Tabel VI wordt de percentuele verdeling van de dissociatieprodukten weergegeven. Opvallend is de stabilisatie van de 160.000 ame eenheid. Chloride bewerkstelligt een hoge mate van

polymerisatie van de monomeren tot dimeren. Voortgaande polymerisatie tot een tetrahedrale structuur inhibeert zij echter weer. De gemiddelde molecuulmassa van de diverse preparaten van hecy liggen weer rond de 200.000 ame. In een aanvullend experiment werd een hoeveelheid uit een preparaat van hecy in buffer met pH van 9,0 bereide 80.000 monomeren gedialyseerd tegen dezelfde buffer maar nu 0,5 chloride bevattend. De gramgemiddelde molecuulmassa bedroeg weer 200.000 ame. Tenslotte werd tevens de molecuulmassa van het serum dat tegen zeewater gedialyseerd was, bepaald. Deze was 225.000 ame. Hieruit kan men het gemiddeld aantal beschikbare zuurstofbindingsplaatsen bepalen. Deze was 2,8 , terwijl de gevonden n-waarde hier echt 7 bedroeg ! (GILBERT & GILBERT, 1968).

Na het opmerkelijke chlorideeffekt was het in tweede instantie erg interessant om de werking van een divalent metaalion, in een niet chloride vorm toegevoegd, na te gaan, naast de werking van lage chloride en/of divalent metaalion concentraties op structuur en affiniteit van hecy.

In overeenstemming met literatuur gegevens werd allereerst een serie hecy oplossingen in normale buffers (waaraan toegevoegd 0,01 MgSO_4) op structurele invloed getoetst. In Tabel VII zijn onder andere de gevonden percentages van de dissociatieprodukten weergegeven. Alle hecy oplossingen werden bereid volgens methode "I". In deze lage concentratie magnesium (of juist sulfaat !) wordt de dissociatie van hecy in haar monomeren vergroot en tevens vindt een voortgezette dissociatie in de chemische subeenheden plaats. Voorts wordt bij pH groter dan 9,0 een hoeveelheid laagmoleculair materiaal waargenomen. Wordt magnesium daarentegen in de chloridevorm toegevend dan wordt weer hoofdzakelijk de 160.000 eenheid gestabiliseerd.

Het is een duidelijke zaak dat niet magnesium maar eerder het chloride associatief werkt. In eerste instantie ken dit echter niet de hogere affiniteit van serum ten opzichte van "in vivo" concentratie houdende hecy oplossingen verklaren. Overigens is het zo dat garnalen bloed een uiterst lage concentratie aan magnesium bevat (zie Tabel X).

D. Analyse van de dissociatieprodukten van C. crangon hecy met behulp van polyacrylgelelektroforese (PAAE)

Een groot aantal oplossingen van hecy werden getest met PAAE. Ook hieruit kwamen een aantal opmerkelijke eigenschappen van C. crangon hecy voort.

De relatief gelopen afstand vermenigvuldigd met 100 (Rf) werd in een aantal groepen verdeeld en wel A, B, C, D enz. A liep van 68-75, B van 58-62, C van 45-50 en D circa 40. De waarden corresponderen respectievelijk o.a. met 80.000 ame, 160.000 ame en 320.000 ame. De groepen D en hoger zijn niet nader gedefinieerd. In Tabel VIII zijn alle Rf-waarden weergegeven. In deze Tabel zijn de elektroforese runs in 7,5 % acrylgellen te zien. In Tabel IX zijn resultaten met de 10 % acrylgellen weergegeven.

Verlaging van de eiwitconcentratie maar niet de magnesiumconcentratie (verhoging Mg-hecy ratio) heeft een associatief effect. Magnesiumchloride geeft hoofdzakelijk, en in hogere dan 0,01M concentraties, 320.000 ame, terwijl magnesiumsulfaat zich beperkt tot 160.000. Voorts zijn deze waarden altijd gekoppeld aan resp. Rf-waarden van 12 en 19.

De laatst genoemde eiwitten met Rf waarden van resp. 12 en 19

kunnen zowel hoogmoleculaire eiwitten (door polymerisatie van de hecy moleculen of haar monomeren) of de gevonden hecy moleculen in een andere conformatie (waardoor het polyelektrolytisch gedrag veranderd is) voorstellen. De concentraties van deze eiwitten zijn er laag en ik neig er toe over aan te nemen dat de conformatie verwisseling er de oorzaak van is. Bezien wij dit in het licht van de theorie van MONOD, WYMAN & CHANGEUX (1965); dan komt hier een interessant facet naar voren. Vooral wanneer men een verklaring zoekt voor de inaktiverende werking van isolatie van het hecy uit het serum. Klaarblijkelijk treedt daarbij een conformatieverandering op zo dat het merendeel van het hecy in een inaktieve vorm omgezet wordt. Diverse divalente kationen en zeer zeker ook andere zouten en eventuele metaboliëtische eindprodukten zullen op het evenwicht tussen de actieve en inaktieve vorm als wel op het zuurstofbindingsevenwicht van beide conformaties een regulerende invloed hebben (ATKINSON, 1966).

Tenslotte wil ik nog wijzen op de "snel" lopende band zichtbaar geworden in de 10 % gellen. Wij komen daar nog op terug (IV e).

E.Rf-waarde - Molecuulmassa - Sedimentatieconstante

De hecy oplossing in buffer van pH 9,7 + 0,01 M $MgCl_2$ werd door middel van gelfiltratie gescheiden in haar dissociatieprodukten. Van de "piekfrakties" werden monsters genomen en met lichtverstrooiing werden de molecuulmassa's bepaald. Tevens werd een elektroforese run op PAA gel uitgevoerd. De hoofdfractie die een molecuulmassa van 148.000 ame had, bereikte een Rf waarde van 62. Tenslotte werd een sedimentieanalyse uitgevoerd, de S bedroeg 7,7. Derhalve kunnen wij de B groep als de groep met molecuulmassa 160.000 ame noemen. De A

en C groep vertegenwoordigen resp. 80.000 ame en 320.000 ame.

Bij de sedimentatieanalyse (overigens uitgevoerd in een SPINCO E Ultracentrifuge bij een snelheid van 40.420 r.p.m.) kwam nog een ander interessant facet naar voren. De oplossing bleek, hoewel elektroforetisch homogeen, in de run niet monodispers te zijn. Er sedimenteerde tevens een eiwit met $S=0,67$ in een verhouding, ten opzichte van de $S=7,7$ component, van 2:1!

Bij het "overnacht" laten staan van de hecy oplossing in de koelkast had zich een component losgemaakt uit de 160.000 ame eenheid. Lang geleden suggereerden sommige auteurs (WOODS, PAULSEN, ENGLE, & PERT, 1958), dat ieder monomeer een klein moleculaire "copper containing moiety" zou bevatten. Deze opmerking is nooit meer ter sprake gekomen. Toch is het een reële mogelijkheid.

V. Fysico-chemische aspecten

A. Fluorescentie van C. crangon hecy

In het algemeen vertonen hecy's een fluorescentie bij 350 nm na aanslaan op 280 nm. Het maximum van een "I" oplossing van C. crangon hecy lag iets lager en wel bij 340 nm. Toevoeging van Cu^{++} deed het maximum naar 345 nm verschuiven. Een hecy oplossing van pH 7,1 bevattend 0,5 mol Cl^- had een maximum bij 370 nm. De fluorescentie was tevens 16 maal zo groot !

Een dergelijke vergroting van de fluorescentie pleit sterk voor een conformatie verandering onder invloed van hogere zoutconcentraties en is een steunpunt voor de bovengenoemde aktieve-inaktieve vorm theorie (SHAKLEI & DANIEL, 1970).

B. Elektronenmikroskopie van C. crangon hecy

In het structuur chemische laboratorium van de R.U. te Groningen werden een aantal fotoos van het hecy gemaakt. Er werd uitgegaan van serum. Op de fotoos, vervaardigd door de heer J. van Breemen¹⁾, was duidelijk de tetrahedrale opbouw van het hecy te zien. Al naar gelang de hoek van projectie waren de moleculen afgebeeld als vierkantjes of rondjes en de gemiddelde breedte was 100 Å. Duidelijk zichtbaar was de opsplitsing van het hecy in haar monomeren. De fotoos suggereerden ook dat de opbouw van de 160.000 eenheden uit de monomeren plaats heeft.

Tenslotte was de snelle afbraak van hecy op enkele fotoos zichtbaar. Deze snelle afbraak is een algemene karakteristiek van de garnaal.

C. De ionensamenstelling van C. crangon bloed.

Een analyse van garnalenbloed waaruit de eiwitten door destructie verwijderd waren werd uitgevoerd door de heer Brouwer²⁾. Deze werd vergeleken met zeewater. In Tabel X vindt men de concentraties van Cu^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ en Cl^- .

Opvallend is de afwezigheid van Mg^{++} in garnalenbloed en de hoge Ca^{++} concentratie. Er is een lichte accumulatie van Cu-ionen en de K^+ -verhouding is normaal. Het lijkt nu interessant de invloed van Ca^{++} op de structuur na de affiniteit van hecy te bekijken!

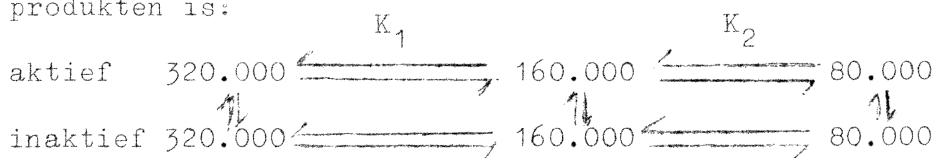
¹⁾ Laboratorium voor Structuur chemie, Groningen.

²⁾ Analytisch laboratorium van TNO, Delft.

VI. Theoretische uitwerking van de gelfiltratiekarakteristieken

In de navolgende alineaas zal ik trachten aan de hand van de bij de gelfiltratie verkregen gegevens een berekening uit te voeren om een idee van de associatiekrachten tussen de diverse polymeren te krijgen. De potentiële vrije energie van een associatie wordt gereflecteerd in de ligging van het evenwicht tussen de partners.

Wij gaan hierbij uit van een model waarbij het hecy met een molecuulmassa van 320.000 in reversibel evenwicht met haar dissociatieprodukten is:



Dit geldt zowel voor de actieve als de inaktieve conformatie van C. crangon hecy; vervanging van een inaktieve vorm voor een actieve zal onmiddellijk leiden tot een totaal-verschuiving van beide evenwichtsreacties.

Wanneer men een niet-dissocierend eiwit over een kolom met een "molecular sieving effect" leidt dan is de vorm van de elutieband afhankelijk van het elutievolumen, de elutiesnelheid, de concentratie en de verdeling bij het opbrengen. Werkt men met een dissocierend eiwit dan wordt de curve tevens bepaald door de evenwichtskonstante van de dissociatie. Constant houden van de voorafgaande parameters geeft een methode om laatstgenoemde te bepalen.

Het elutievolumen van de diverse dissociatieprodukten bleek constant genoemd te kunnen worden binnen een te aanvaarden experimentele fout.

De elutiesnelheid was eveneens nagenoeg constant en gelijk aan 2,4 ml / hr. De concentratie van de evenwichtspartners werden bepaald.

Hieruit kan men de verandering van de absorptie met de tijd bepalen; dit is de gemiddelde helling van een zijde van de gaussiaanse elutiecurve, H . H neemt toe bij verhoging van de concentratie en de elutiesnelheid. Hij neemt af met het elutievolumen. Verder geven metaal en suikerhoudende eiwitten een lagere H . Zet men, bij gelijk houding van de andere parameters, H uit tegen de concentratie dan verkrijgt men in eerste instantie een rechte lijn. Afwijking van deze lijn geeft interactie van het eluerende eiwit met andere verbindingen aan.

Op figuur 13 ziet men de curves voor alle partners wanneer uitgegaan werd van een hecy oplossing in buffers met ionensterkte 0,1 I. Op figuur 14 ziet men de uitzetting van H -versus c van een hecy oplossing waaraan toegevoegd 0,5 mol Cl^- . Tenslotte op figuur 15 de H - c plot onder variatie van MgSO_4 .

De berekende vormings vrije energiën van de 320.000 en de 160.000 bleken ongeveer even groot te zijn. De vormingsenergie van de 160.000 eenheid in een oplossing met 0,5 mol Cl^- had echter een vier maal zo hoge waarde ! In MgSO_4 milieu kon niets berekend worden. Wel was zichtbaar de stabilisatie van de 80.000 uit de 40.000 eenheden eerst bij hogere Mg^{++} -eiwit ratio's. MgCl_2 volgde daarentegen voor de 320.000 eenheid de H - c plot van een oplossing welke alleen pH gevarieerd was. Voor de 160.000 volgde zij de Cl^- H - c plot en voor de 80.000 de MgSO_4 H - c plot.

VII. Aanwijzingen voor een model van C. crangon hecy

Uit de bovenstaande gegevens kan men concluderen dat hecy zich in de genoemde buffers gedraagt als dat zij identiek is in haar protomeren en de herkenningspunten voor haar non-covalente binding.

Onder invloed van chloride in een concentratie van 0,5 molair ondergaat het protomeer een dergelijke verandering, dat zij bijzonder krachtig de 160.000 eenheid opbouwd uit haar monomeren. De genoemde conformationele verandering echter verhinderd een voortgezette polymerisatie tot de 320.000 eenheid. Tevens wordt bij deze conformationele verandering de zuurstofbindingslokatie beter toegankelijk voor zuurstof.

Magnesium speelt een rol bij de binding van de chemische subeenheden tot de biologische subeenheden. Op de grens van deze binding moet de zuurstofbindingsplaats zitten. Chloride zal door de verandering van de conformationele structuur van de monomeren zowel de zuurstofbinding vergemakkelijken als de monomeren een grotere kans op polymerisatie geven.

Het moet mogelijk zijn om met andere modifiers, met name Ca^{++} , het evenwicht tussen de actieve en de inaktieve conformatie zo te verleggen dat een even optimale affiniteit als "in vivo" verkregen wordt.

C. crangon hecy bestaat uit een tetrahedraal gerangschikte groep van vier protomeren. Deze protomeren komen in een actieve en een inaktieve vorm voor. De overgang hiervan is afhankelijk van modifiers. Een van de modifiers is chloride een andere is mogelijk Ca^{++} . Isolatie van het hecy uit het serum, c.q. verwijdering van de broodnodige modifiers doet het hecy overgaan in zijn inaktieve vorm. De overgang is een evenwicht en een klein gedeelte blijft in actieve vorm aanwezig. Magnesium in kleinere concentraties geeft vorming van de 80.000 eenheden. In hogere concentraties doet het de inaktieve vorm van de 160.000 en 320.000 eenheden ontstaan.

VIII. Wat er verder zo al op te merken valt

Uit gegevens van DWANGMAH & GROVE (1970), heb ik de hoeveelheid koperatomen per hecy monomeer bepaald. Deze was 2,5. Het aantal beschikbare zuurstofbindingsplaatsen per hecy molecuul is dus maximaal 4. De Hillse n-waarde kan nooit de aantal beschikbare zuurstofbindingsplaatsen overschrijden. Toch vindt men in chloride houdende hecy oplossingen 2 maal zo hoge n-waarden ! Dit werd overigens eveneens door dezelfde auteurs bevestigd (DWANGMAH & GROVE, 1970).

Pandalus eveneens een garnaal heeft een hecy met molecuulmassa van 397.000 ame. Het immunoserologisch patroon wordt gekenmerkt door liefst 12 componenten (MACKAY & PROSSER, 1970) en (DENUCE & CUSHING, 1963). Het aantal immunoserologische componenten van C. crangon bloed is 6. Alle andere leden van de Crustacea familie hebben 3 immunoserologische componenten. Tenslotte C. crangon heeft de laagste tot nu toe gevonden molecuulmassa wat betreft hecy.

Het is een duidelijke zaak. De garnalen nemen een zeer bijzondere positie in. Zelfs het ontbreken van een evenredige concentratie aan magnesium in het bloed hebben zij gemeen. Het volledig ontbreken van fundamenteel biochemisch onderzoek aan deze zo graag geconsumeerde dierengroep is dan ook ten alle tijde een schromelijk te kort geweest!

Een aap stak, in mijn vaderland,
Des nachts een cederhaag in brand,
En zette een lachend aangezicht,
Toen alles rondom was verlicht;
Ik, ik verander nacht in dag.
Zijn broederschap, met hem verheugd:

Riep mede in uitgelaten vreugd:

Dit is eerst heerlijk ! welk een glans !

Lang, lang leve onze broeder Hans !

Aap Hans is eer en glorie waard;

Hij heeft het rondom opgeklaart !

Joannis Lublink de Jonge (1801)

Veel mensen in de afdeling experimentele biologie van het N.I.O.Z.,
ben ik in verband met het onderzoek, iets verplicht, namelijk: dank!

IX. Literatuur

- ATKINSON, D.E., 1966. Regulation of enzyme activity. Arch. Biochem. Biophys. 35, 85.
- BRUGGEN, van E.F.J., & K.E. HOLDE, 1970. Persoonlijke mededeling.
- CONDIE, R.M. & R.B. LANGER, 1964. Linear polymerization of a Gastropod hemocyanin. Science, 144, 1138.
- COHEN, L.B., & K.E. van HOLDE, 1963. Studies of the structure of Loligo pealei hemocyanin. I Subunit molecular weights and dissociation equilibria near neutral pH. Biol. Bull. 125, 375.
- DECLAIR, W. & A. RICHARD, 1970. A study of the blood proteins in Sepia officinalis L. with special reference to embryonic hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol, 34, 203.
- DENUCE, J.M. & J.E. CUSHING, 1963. Comparative serology of Crustaceans and Molluscs of the coasts of South California. Proc. XIth Colloquium Protides of the Biological fluids, volume, 146.

- DWANGMAH, J.S. & D.J. GROVE, 1970. Blood and hepatopancreas copper in Crangon vulgaris (Fabricius) Comp. Biochem. Physiol. 43, 717.
- DWANGMAH, J.S. & D.J. GROVE, 1970. Persoonlijke mededeling aan R.E. WEBER.
- ERIKSSON-QUENSEL, I.B. & T. SVEDBERG, 1936. Molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. Biol. Bull. 71, 498.
- FOSS, J.G., 1963. An interpretation of the rotary dispersion data for hemocyanin and oxyhemocyanin. Biochem. Biophys. Acta, 79, 41.
- GILBERT, L.M. & G.A. GILBERT, 1968. A study by simulation procedures of the gel filtration of a reversible dissociating protein undergoing cooperative interaction with ligand. The regulation of enzyme activity and allosteric interaction. Universitet forlaget, Oslo 73-87.
- GHIRETTI, F., 1968. The Oxygenases (Editor: Hayashi, O.) Academic Press, New York. London p. 530.
- HOLDE, van K.E. & S.C. HARRISON, 1963. Studies of the structure of Loligo pealei hemocyanin. II Dissociation equilibria in alkaline solution. Biol. Bull. 125, 376.
- HOLDE, van K.E., 1964. Physical studies of hemocyanins. III Circular Bichroism and absorption Spectra. Biochem. 3, 1531.
- HOLDE, van K.E., 1967. Physical studies of hemocyanins. Biochem. 6, 93.
- JOHNSTON, W., T.W. JAMES, & A.A. BARBER, 1967. Oxygen binding characteristics of lobster hemocyanin and its subunits J. Chem. Physiol. 22, 261-7.

- KLOTZ, I.M. & T. HEINEY, 1957. Changes in protein topography upon oxygenations. *Proc. nat. Acad. Sci.* 43, 717.
- LARIMER, J.L. & A.F. RIGGS, 1964. Properties of hemocyanins - I. The effects of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin, *Comp. Biochem Physiol*, 13, 35.
- MANWELL, C., 1960. Comparative Physiology, Blood pigments. *Ann. Review Physiol*, 22, 191.
- MONOD, J., J. WYMAN & J.P. CHANGEUX, 1965. On the nature of allosteric transitions : A plausible model. *J. molec. Biol.* 12, 88.
- MACKAY, W.C. & C.L. PROSSER, 1970. Ionic and osmotic regulation in the king crab and two other North Pacific Crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 34, 273.
- PETER, L.J. & R. HULL, 1970. *The Peter Principle*, Publ. : Bantam Books, N.Y.
- POILLON, W.N. & A.G. BEAM, 1966. The molecular structure of human ceruloplasmins: evidence for subunits. *Biochem. Biophys. Acta* 127, 407.
- REDMOND, J.R., 1955. The respiratory function of hemocyanin in Crustacea. *J. cell. Comp. Physiol* 46, 209.
- , 1962. The respiratory characteristics of chiton hemocyanins *Physiol. Zool.* 35, 304.
- , 1968. The respiratory function of hemocyanin. In *Physiology and Biochemistry of Hemocyanins* (Editor : F. Ghiretti), Academic Press, New York, London.
- SHAKLEI, N. & E. DANIEL, 1970. Fluorescence properties of hemocyanin from Levantina hirosolima. *Biochem*, 9, 564.
- STEDMAN, E. & E. STEDMAN, 1925. The dissociation curves of the oxyhemocyanin in the blood of some decapod Crustacea. *Biochem. J.*

19, 544.

- , 1926. Haemocyanin. Part II. The influence of hydrogen ion concentration on the dissociation curve of oxyhaemocyanin from the blood of the common lobster (Homarus vulgaris) Biochem J., 20, 938-948.
- TAKESADA, H. & K. HAMAGUCHI, 1962. Circular dichroism of hemocyanin. J. Biochem. 63, 725.
- VLIET, van J., 1970. Molecuul gewicht bepaling door middel van licht-verstrooiing. Bijlage van dit verslag.
- REDFIELD, A.C., 1933. The hemocyanins. Biol. Rev. 9, 179.
- WEBER, R.E., 1963. Aspects of haemoglobin function in the larvae of the midge, Chironomus plumosus L. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. C. 66, 284-295.

Tabel I

Oxygenatiekarakteristieken van serum van Crangon crangon

pH	temp	p 50	n-waarde
8,0	9	7,0	2,6
8,0	21	10,6	3,0
8,2	15	17,5	3,0
8,2	20	9,8	3,9
9,2	20	8,0	-

Tabel II

Oxygenatiekarakteristieken van gedialyseerd garnalenbloed

pH	temp	p 50	n-waarde
6,4	9	92	2,6
7,0	9	148	-
7,0	20	80	-
7,6	9	152	
7,6	20	58	-
7,7	9	165	2,0
7,7	17	240	1,8
7,7	23,5	210	2,5
7,95	9	105	3,5
7,95	20	190	3,0

Tabel III

Massamiddeldemolecuulmassa van hecy bij verschillende pH.

pH	Molecuulmassa in a.m.e.		
	I	II	buffer (0,1)
7,0	330.000	80.000	fosfaatbuffer
7,6	320.000	160.000	"
8,0	200.000	-	Tris-HCl buffer (0,05 molair Cl^-)
8,5	110.000	80.000	"
9,0	80.000	80.000	Carbonaatbuffer
10,2	48.000	-	"

Tabel IVa

Percentuele verdeling van de dissociatieprodukten van hecy bij verschillende pH. De oplossingen werden bereid volgens methode "I".

pH	320.000	160.000	80.000	40.000
7,0	100%	-	-	-
7,6	100%	-	-	-
8,0	28%	72%	-	-
8,5	-	83%	17%	-
9,0	9%	25%	66%	-
9,7	16%	14%	70%	-
10,2	-	-	20%	80%

Tabel IVb

Enkele bepalingen van de percentuele verdeling van dissociatie-
produkten van hecy aan onbehandelde serum.

pH elutiebuffer	320.000	160.000	80.000
10,2	43%	57%	-
8,5	25%	20%	55%

Tabel V

Oxygenatiekarakteristieken van sera gedialyseerd tegen Cl^- houdende
buffers.

pH Ionen sterkte		Cl^- gehalte	p 50	n-waarden	gemiddelde O_2 bindingsplaatsen
7,1/0,001	I	0,005 M	300	3,0	4,0
7,1/0,1	I	0,05 M	265	- 2,3 5,5	4,0
7,1/0,12	I	0,5 M	110	1,5 3,3 -	2,5
7,1/0,13	I	0,6 M	110	1,2 2,7 -	?
7,6/0,1	I	0,0 M	107	- 3,4	4,0
7,6/0,12	I	0,5 M	50	1,0 3,6	2,5
zeewater		0,55 M	37	1,0 7,0	2, <u>8</u>

Tabel VI

Percentuele verdeling van de dissociatieprodukten van C. crangon hecy in 0,5 M Cl^- houdende buffers.

pH	320.000	160.000	80.000	K.M.*
7,0	28%	72%	(18%)	
8,0	11%	89%		8,5 en 2,5%
9,0	14%	86%		

Tabel VII

Percentuele verdeling van de dissociatieprodukten van C. crangon hecy onder variatie van de Mg^{2+} -conc.

pH	Mg^{2+} conc.	320.000	160.000	80.000	40.000	K.M.*
8,0	0,01 M MgSO_4	-	-	20%	80%	
9,7	0,01 M MgSO_4	-	-	(8) 11%	(60) 89%	(29)
9,7	0,01 M MgCl_2	++ 5%	++ 73%	-	-	12%

*K.M.=kleiner moleculair materiaal.

Tabel VIII

Rf-waarden van de hecy bepaald met Polyacrylamide-electroforese.
(Onderstreepte Rf-waarden = hoge eiwitconcentratie).

pH		opl.	A	B	C	D	E	F	G	H
8,0	MgSO ₄	a I	72	61				22--19		
8,0	"	b I	-	<u>57</u>	<u>44</u>			20		
8,0	"	c I	-	<u>57</u>					19	
9,1	MgSO ₄	a I	<u>75</u>	<u>58</u>					19--16	
9,1	"	b I	<u>69</u>	<u>59</u>					19--16	
9,0	"	c I	-	<u>57</u>					19	
9,7	MgSO ₄	a I	<u>73</u>		<u>43</u>				19--16	
9,7	"	b I	-	<u>61</u>					19--15	
9,7	"	c I	-	<u>57</u>					19	
8,0	MgCl ₂	a I	-	<u>58</u>			<u>29</u>			12
8,0	"	b I	-	<u>58</u>			<u>29</u>			12
8,0	"	c I	-	-	<u>49</u>					12
9,1	MgCl ₂	a I	<u>73</u>				<u>29</u>		19	
9,1	"	b I	<u>73</u>				<u>29</u>		19	
9,0	"	c I	-	-	<u>49</u>					12
9,7	MgCl ₂	a I	<u>69</u>		<u>52</u>		<u>29</u>		19	
9,7	"	c I	-		<u>49</u>					12
7,0	0,1 I	a I	-	-	<u>52</u>					12
7,0	0,1 I	a II	-	-	<u>54</u>					12
8,0	0,1 I	a I	-	-	<u>52</u>					12
8,0	0,1 I	a II	-	-	<u>54</u>					12
9,0	0,1 I	a I	-	-	<u>52</u>				19	12
9,0	0,1 I	a II	-	-	<u>54</u>				19	12

Tabel IX

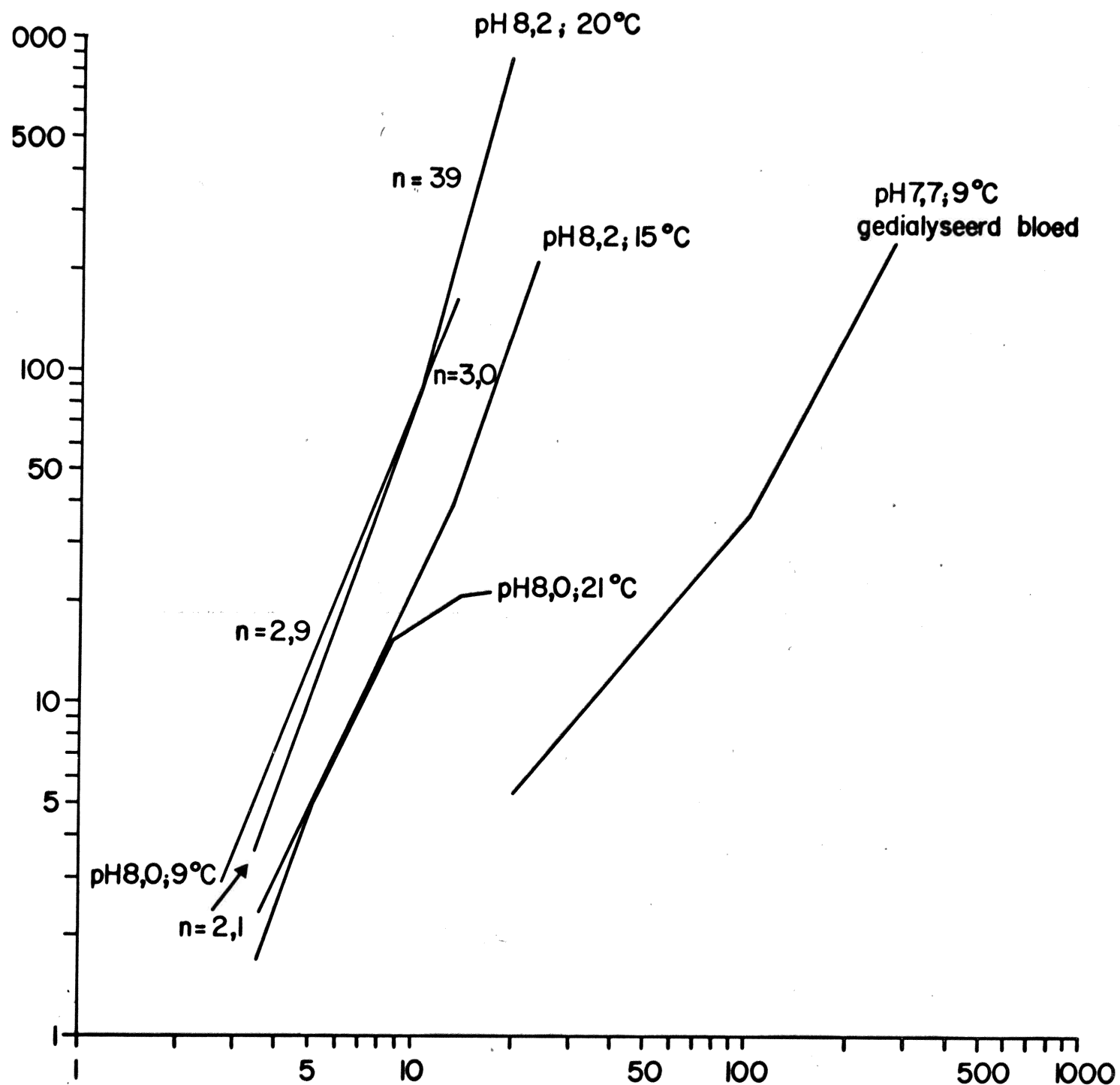
Rf-waarden van de hecy bepaald met Polyacrylamide-electroforese.

pH	opl.	A	B	C
7,0	0,5 Cl ⁻ I	90 -	<u>58</u>	
8,0	0,5 Cl ⁻ I	74	-	
9,0	0,5 Cl ⁻ I	90-85-		<u>49</u>

Tabel X

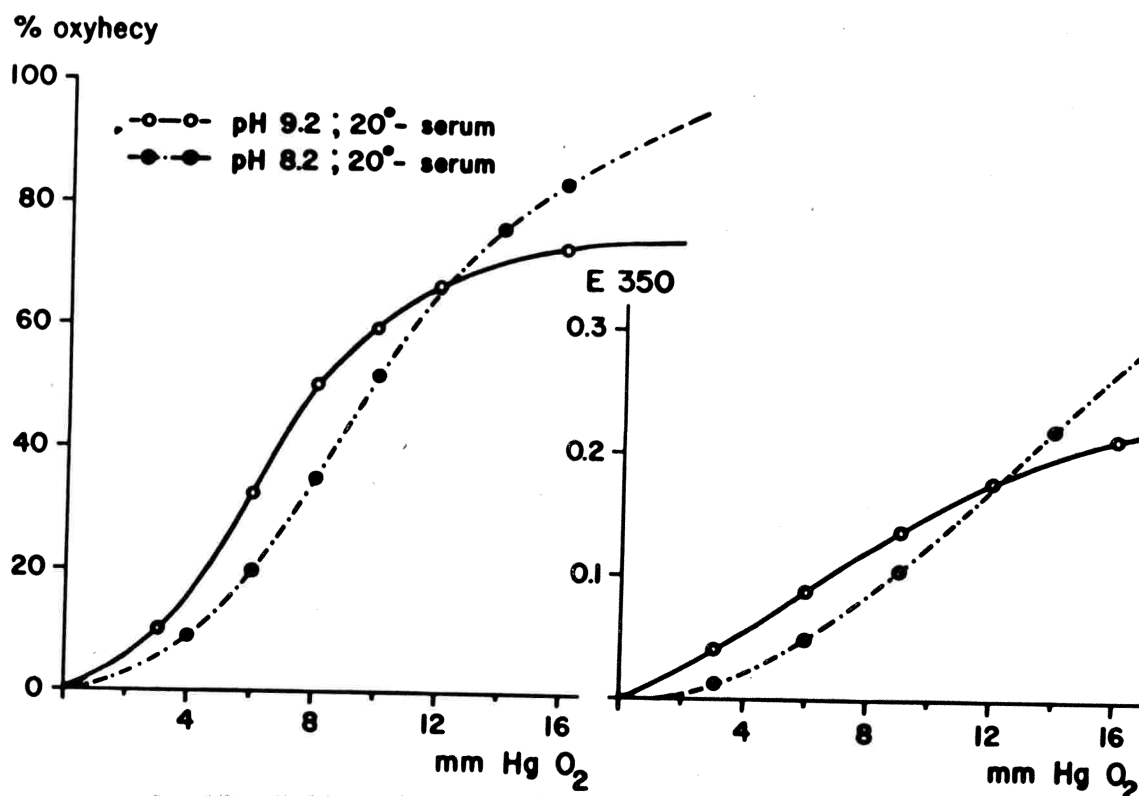
Ionensamenstelling van C. crangon bloed ten op zichte van zeewater.

	%Cu	%Ca	%Mg	%K	%Cl
<u>C. crangon</u>	$5,9 \cdot 10^{-5}$	0,06	-	0,02	0,77
of	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,15	-	0,05	1,95
Zeewater	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,07	0,12	0,04	1,95
Ratio garnalen bloed / zeewater					
	1,25	2,15	0,0	1,25	1,00



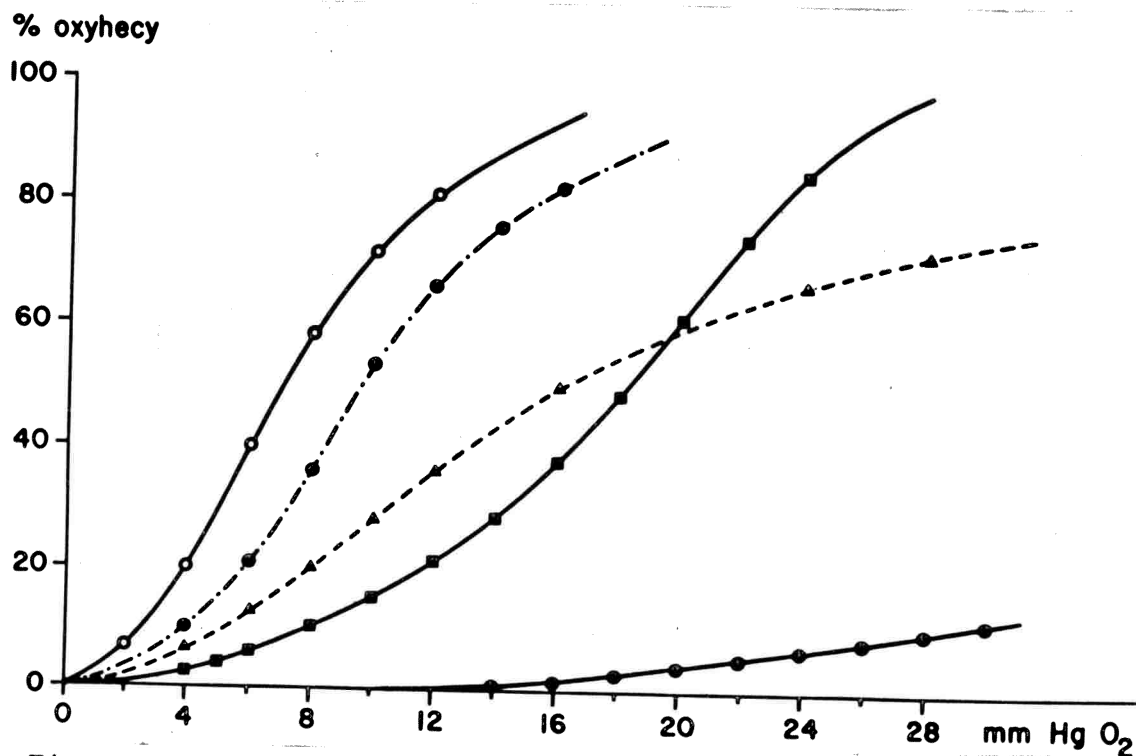
Figuur 1

Logarithmische uitzetting van de ratio (Oxyhecy)/(hecy) versus de zuurstofdruk in mm Hg van C. crangon serum.



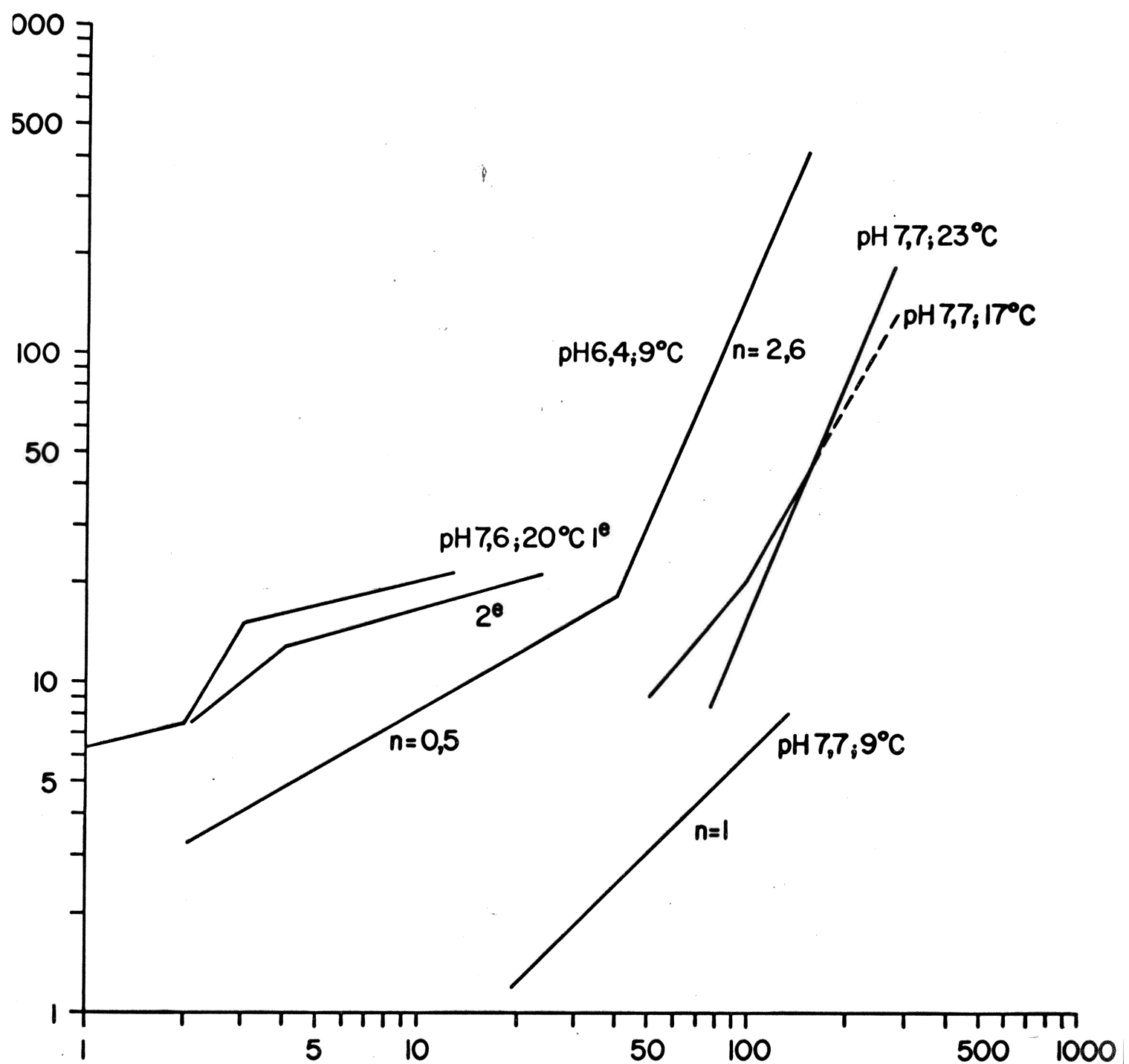
Figuur 2

Zuurstofbindingsevenwichtcurves van C. crangon sera bij verschillende temperaturen en pH's.



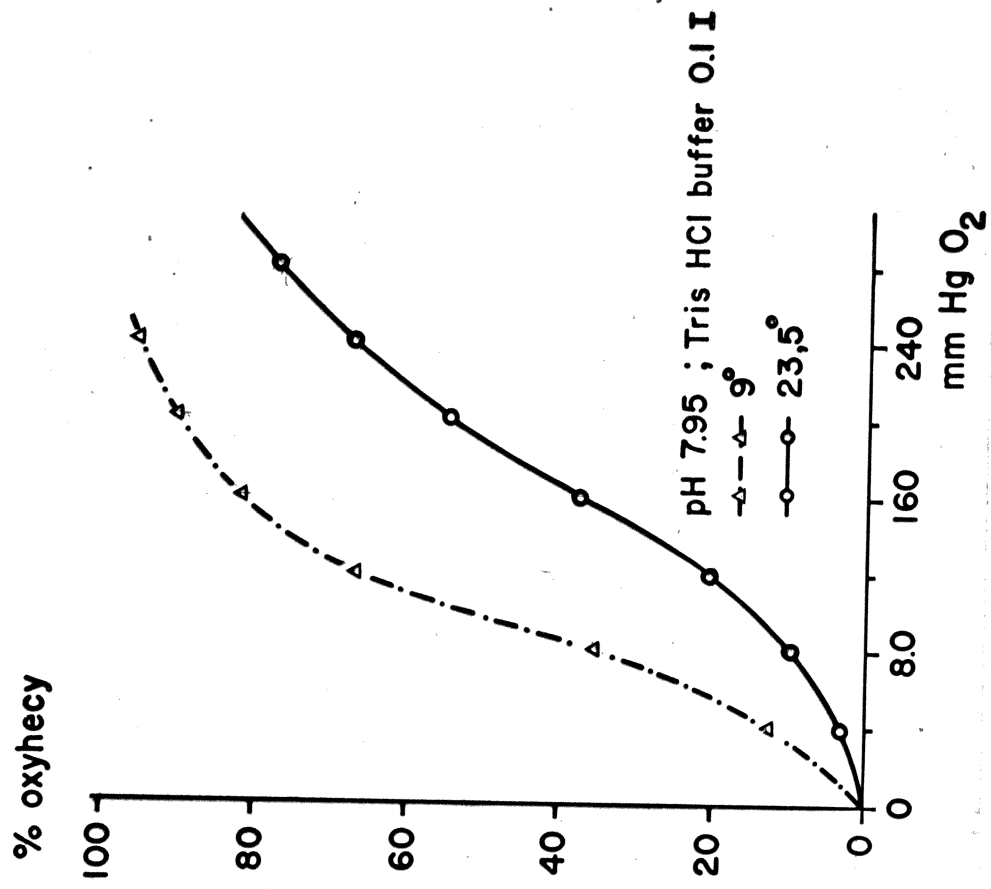
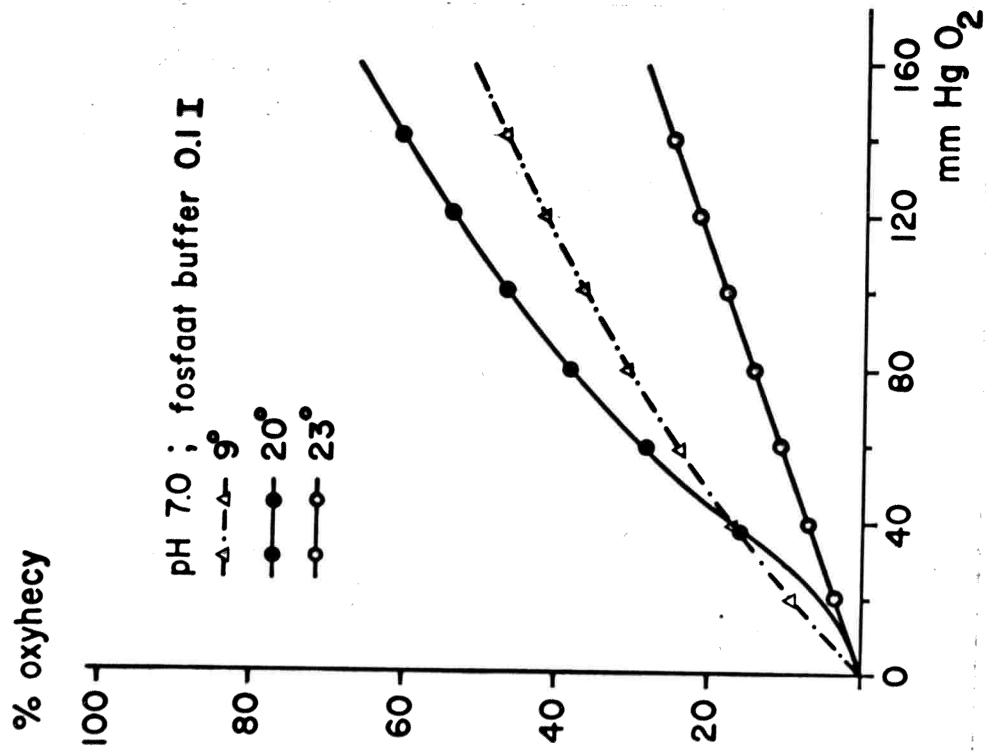
Figuur 3

Zuurstofbindingsevenwichtcurves van C. crangon sera bij verschillende temperaturen en pH's ; -o--o- pH 8,2 (20°), ●-●- pH 8,2 (20°), -▲-▲- pH 8,2 (15°), ■-■- pH 8,2 (15°) serum van Homarus americanus, -●-●- gedialyseerd C. crangon serum, pH 8,0 (9°).



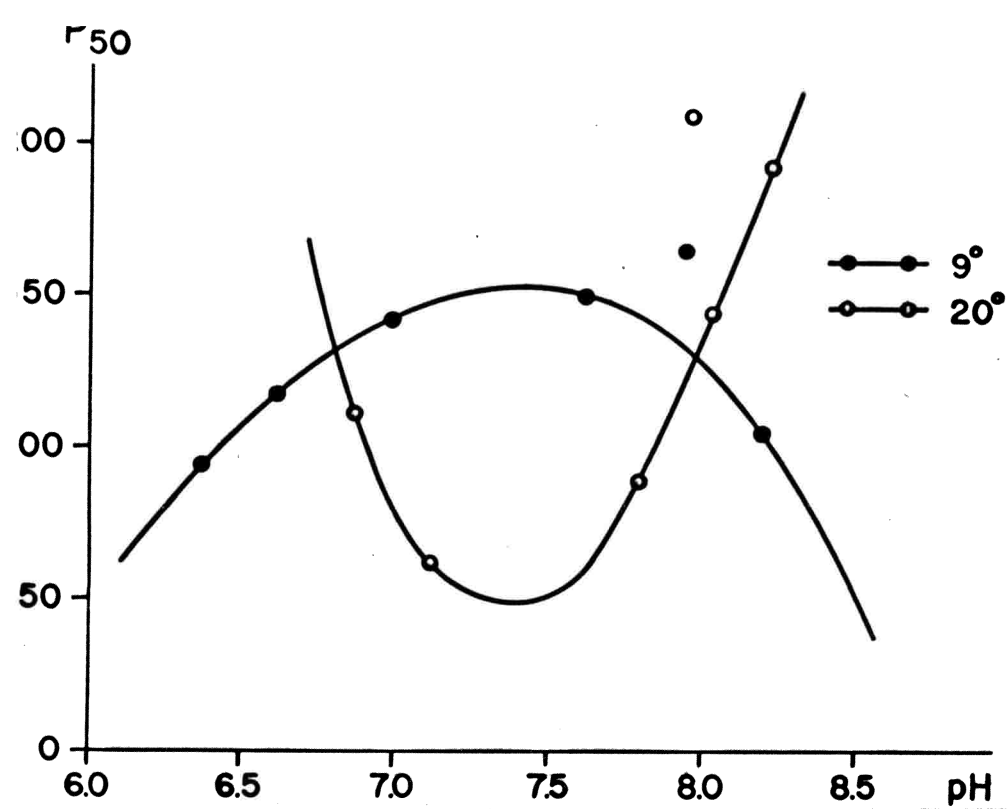
Figuur 4

Logaritmische uitzetting van de ratio (Oxyhecy)/(hecy) versus de zuurstofdruk in mm Hg van C. crangon hecy opgelost in buffers met een ionensterkte 0,1 I.



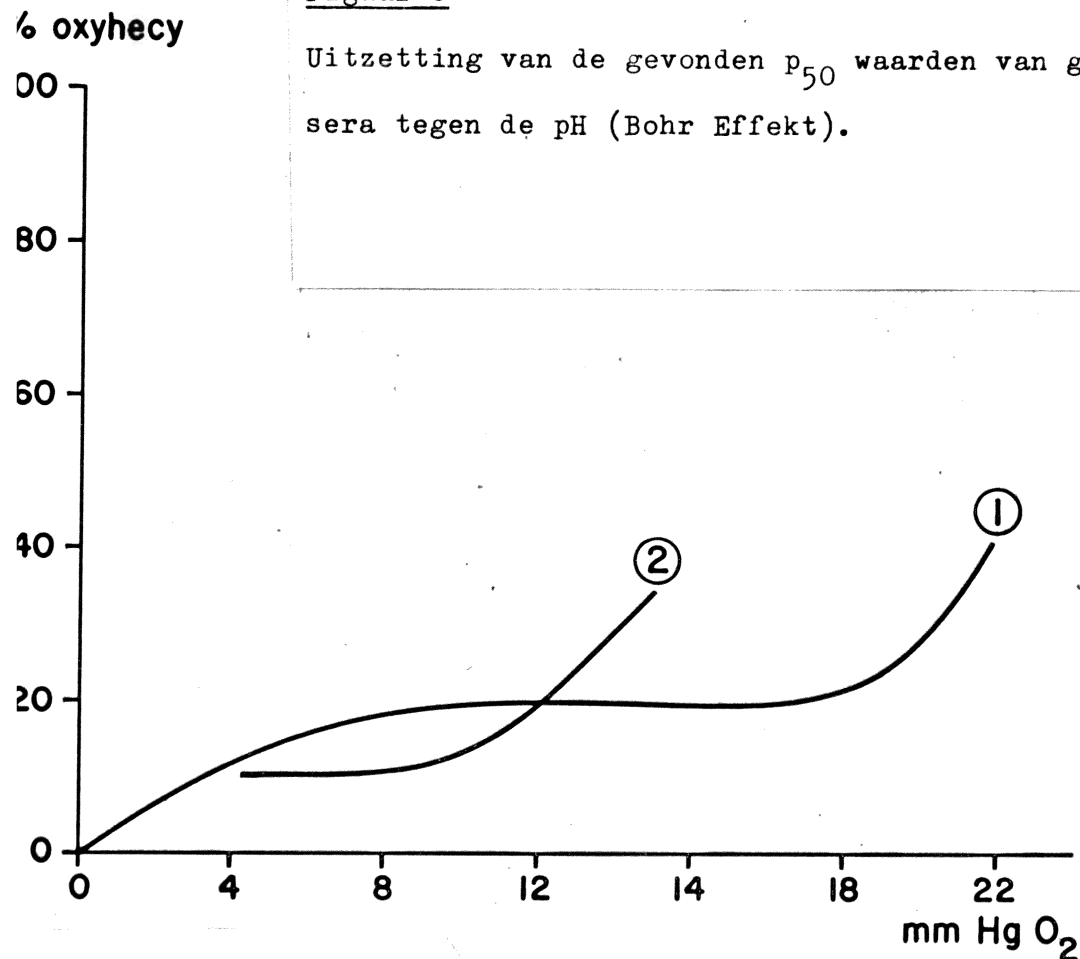
Figuur 5

Zuurstofbindingsevenwichtcurves van gedialyseerde C. crangon sera.



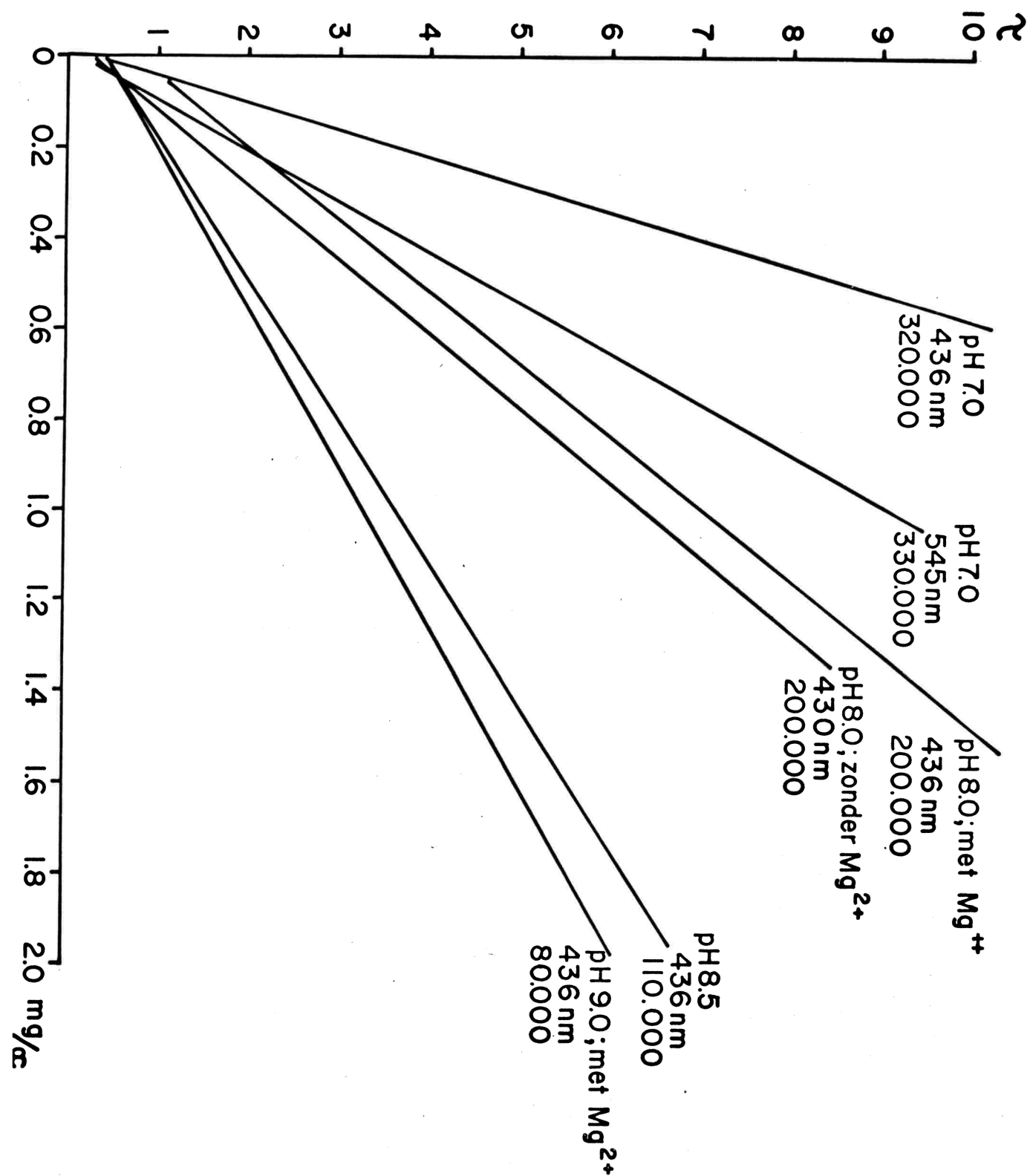
Figuur 6

Uitzetting van de gevonden p_{50} waarden van gedialyseerde *C. crangon* sera tegen de pH (Bohr Effekt).



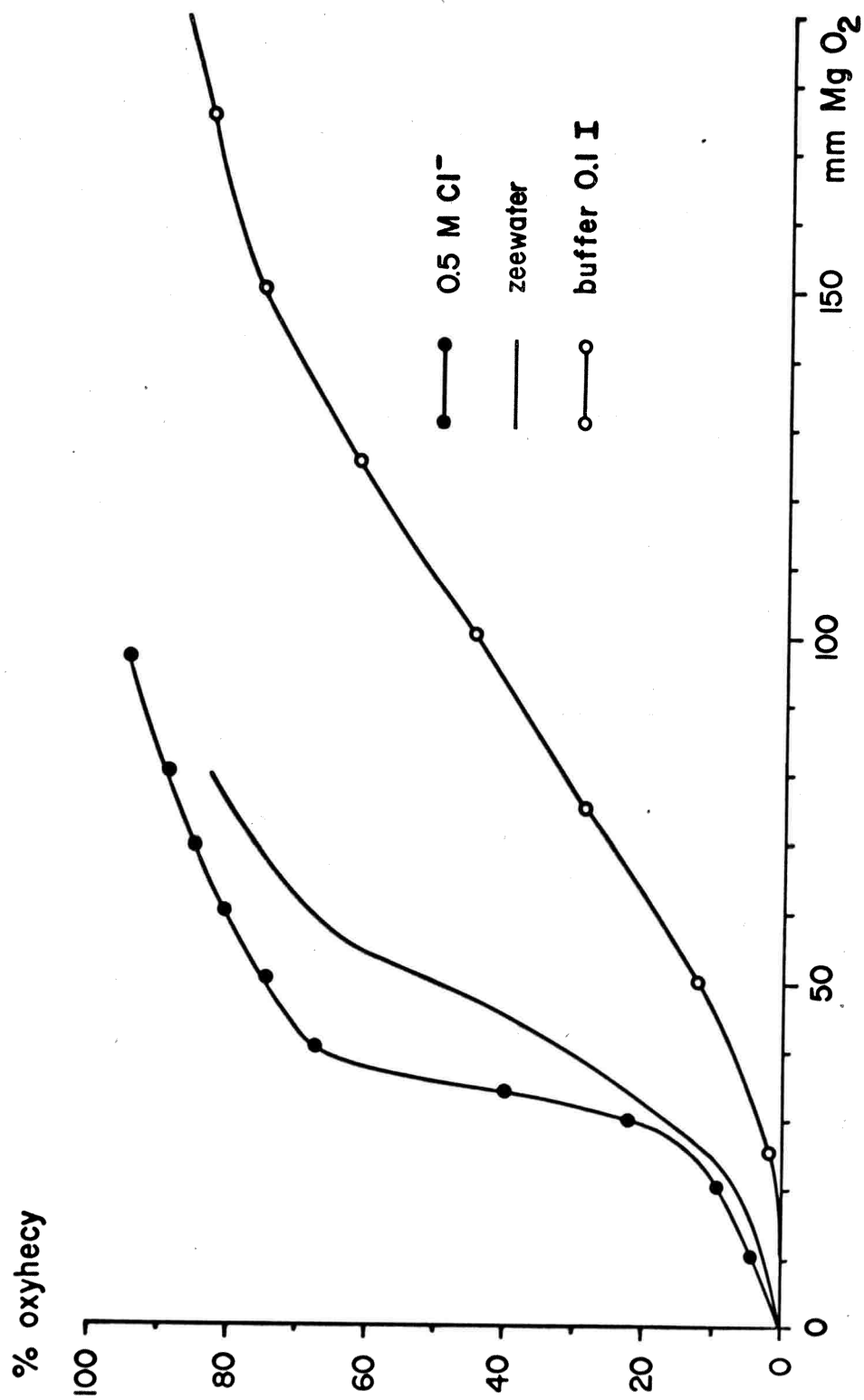
Figuur 7

Het eerste gedeelte van de zuurstofbindingscurve van gedialyseerde *C. crangon* serum (pH 8,0 en temperatuur 20° C). Curve (2) is een herhaling van (1) ; men ziet duidelijk de verhoogde zuurstofbindingsaffiniteit.



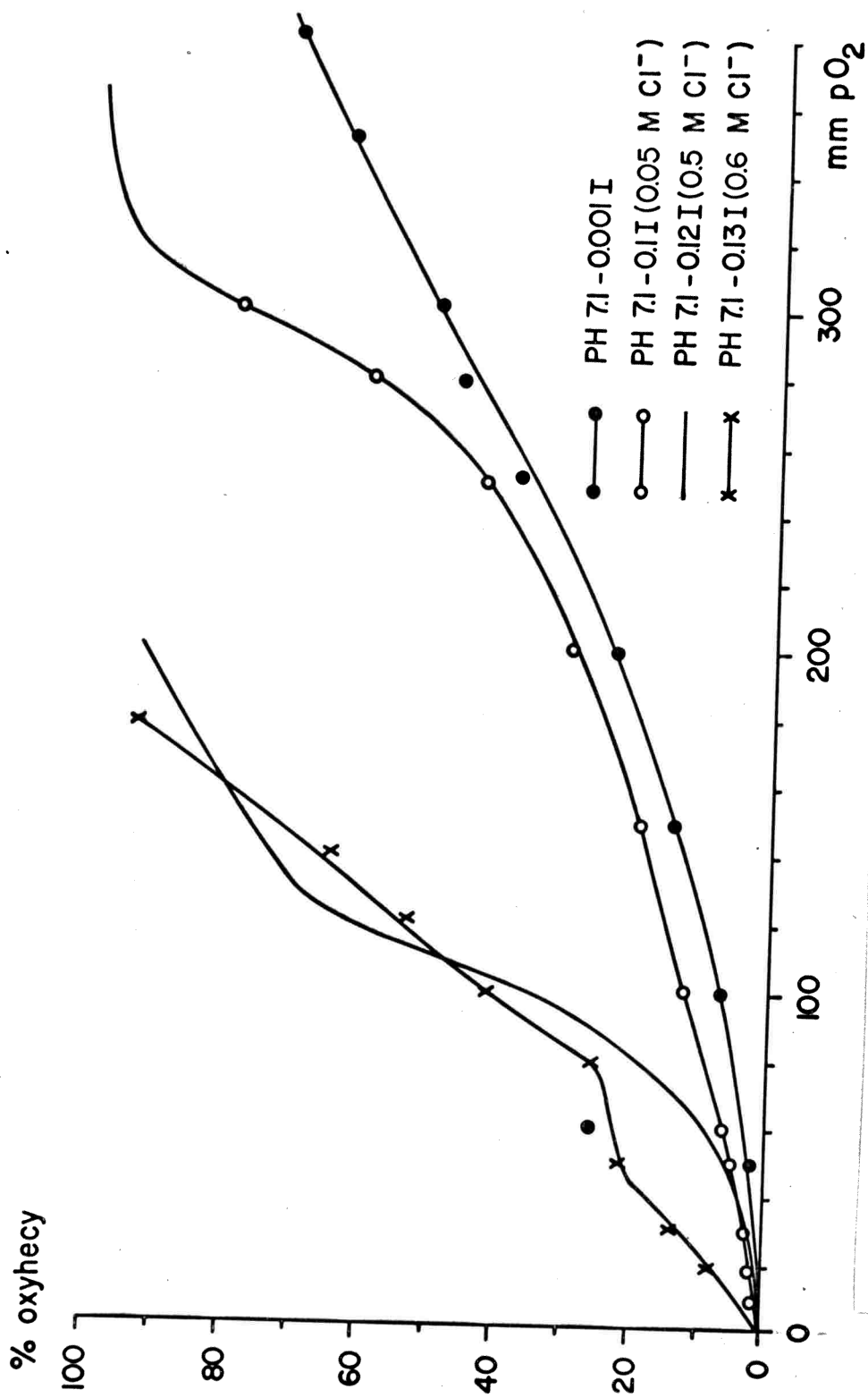
Figuur 8

Bepaling van de molecuulmassa's door middel van lichtverstrooiing.
 Op de y-as in de ζ (troebelheid) en op de x-as de concentratie in
 mg/cc uitgezet.



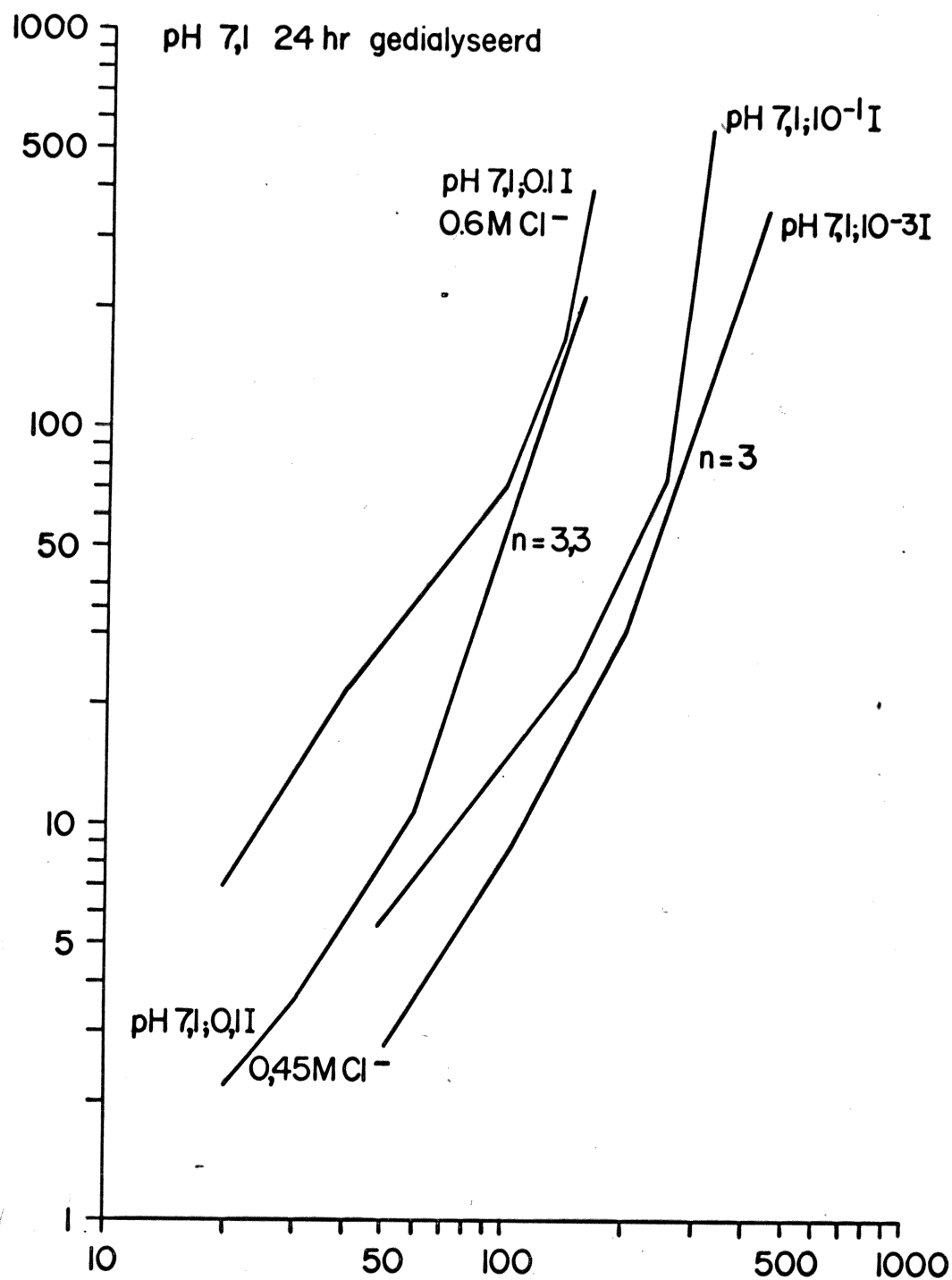
Figuur 2

Zuurstofbindingsewichtcurve van C. crangon hecy gezuiverd door dialyse tegen buffer met pH 7,6 , tegen buffer pH 7,6 met 0,5 m Cl⁻ en tegen zeewater.



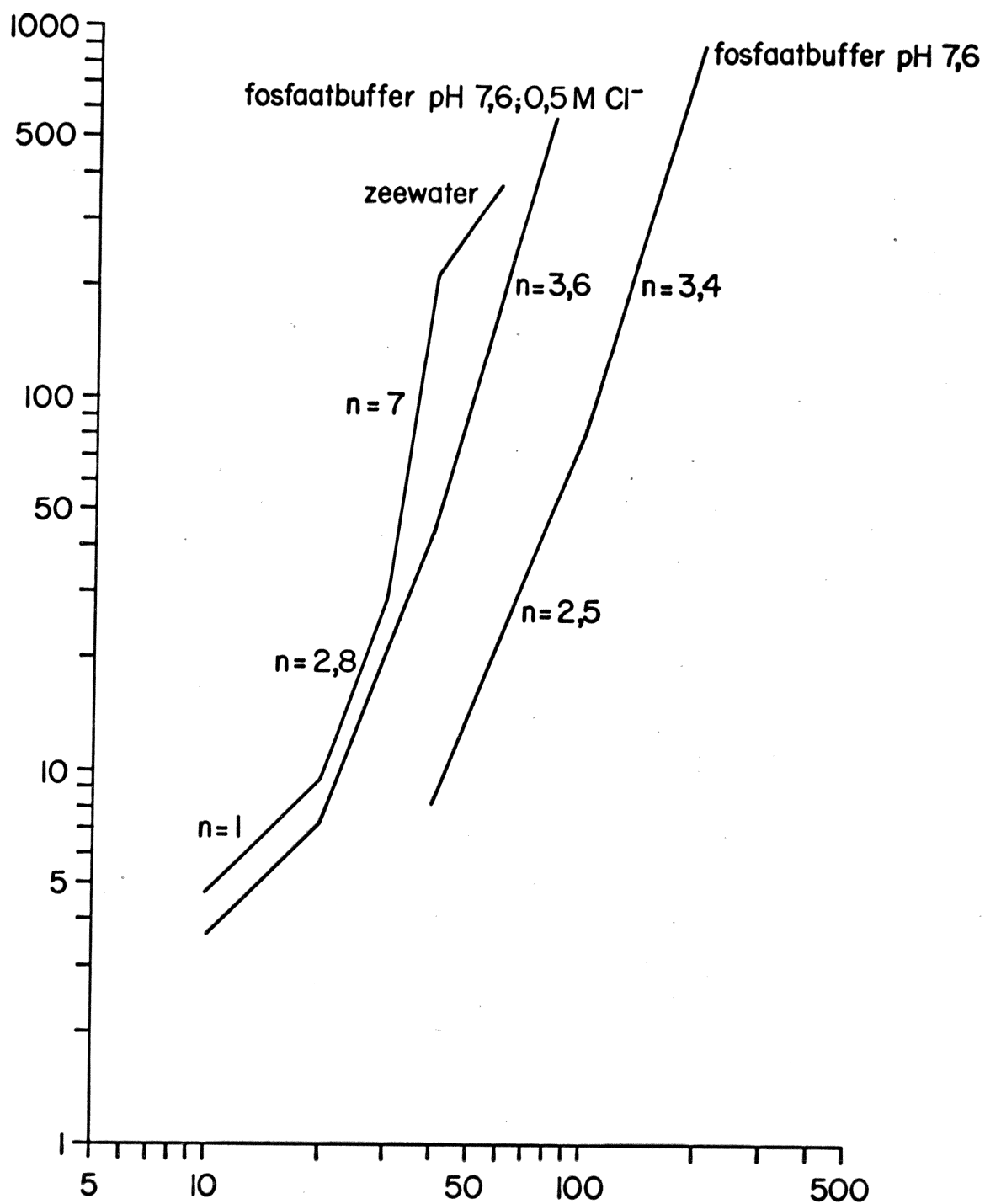
Figuur 10

Zuurstofbindingsevenwichtcurve van C. crangon hecy gedialyseerd tegen buffer met pH 7,1 ; tevens werden de curves gemeten onder variatie van het chloride gehalte en de ionensterkte.



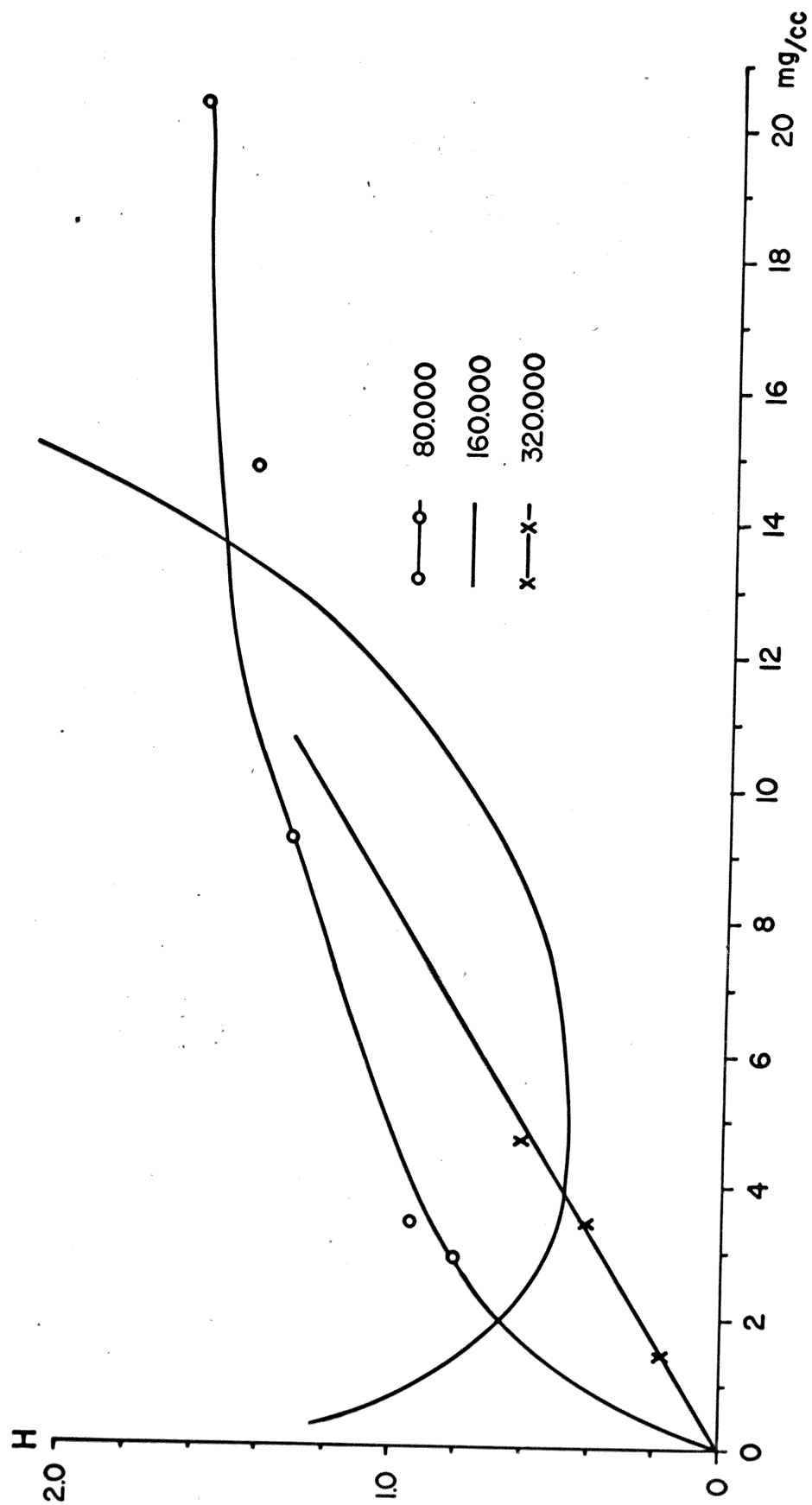
Figuur 11

Logaritmische uitzetting van de ratio (Oxyhecy)/(hecy) versus de zuurstofdruk in mm Hg van C. crangon hecy opgelost in buffers met pH 7,6 en variërende ionensterkte en chloride gehalte.



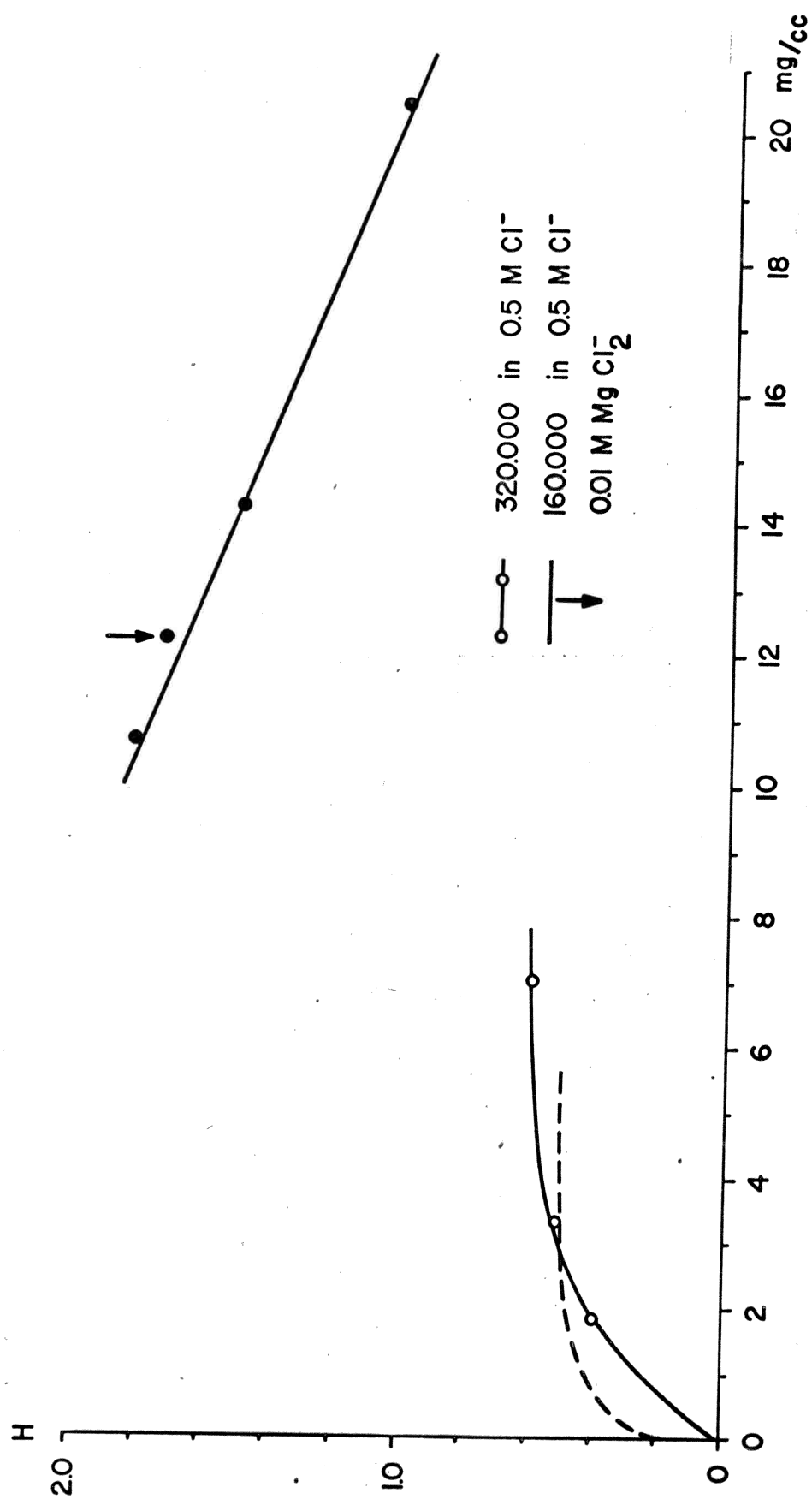
Figuur 12

Logaritmische uitzetting van de ratio ($\text{Oxyhecy}/\text{hecy}$) versus de zuurstofdruk in mm Hg van C. crangon hecy opgelost in buffers met ionensterkte 0,1 I tevens 0,5 m aan chloride.



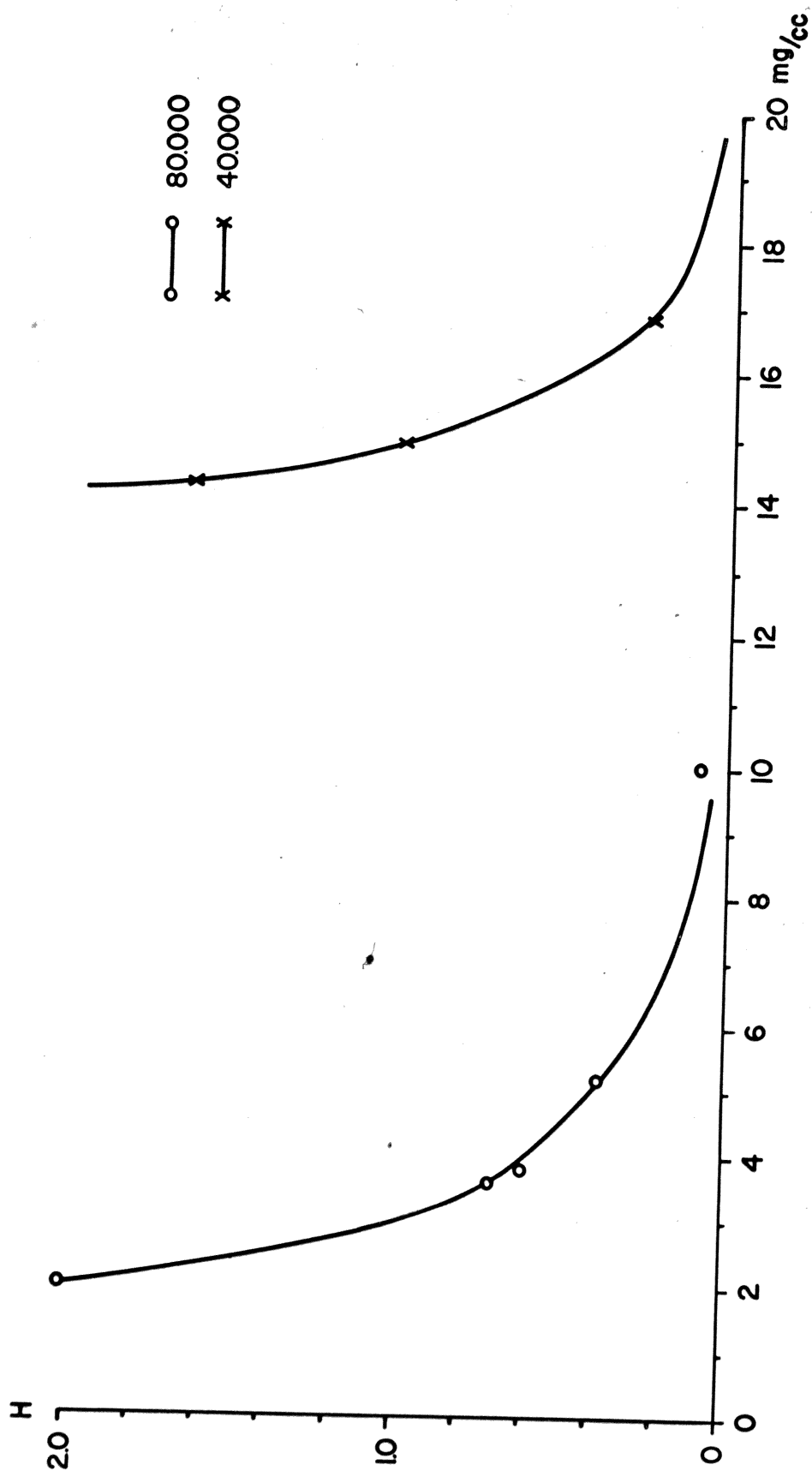
Figuur 13

H-c plot voor diverse aggregatietoestanden van C. crangon hecy
opgelost in buffer met ionensterkte 0,1 I.



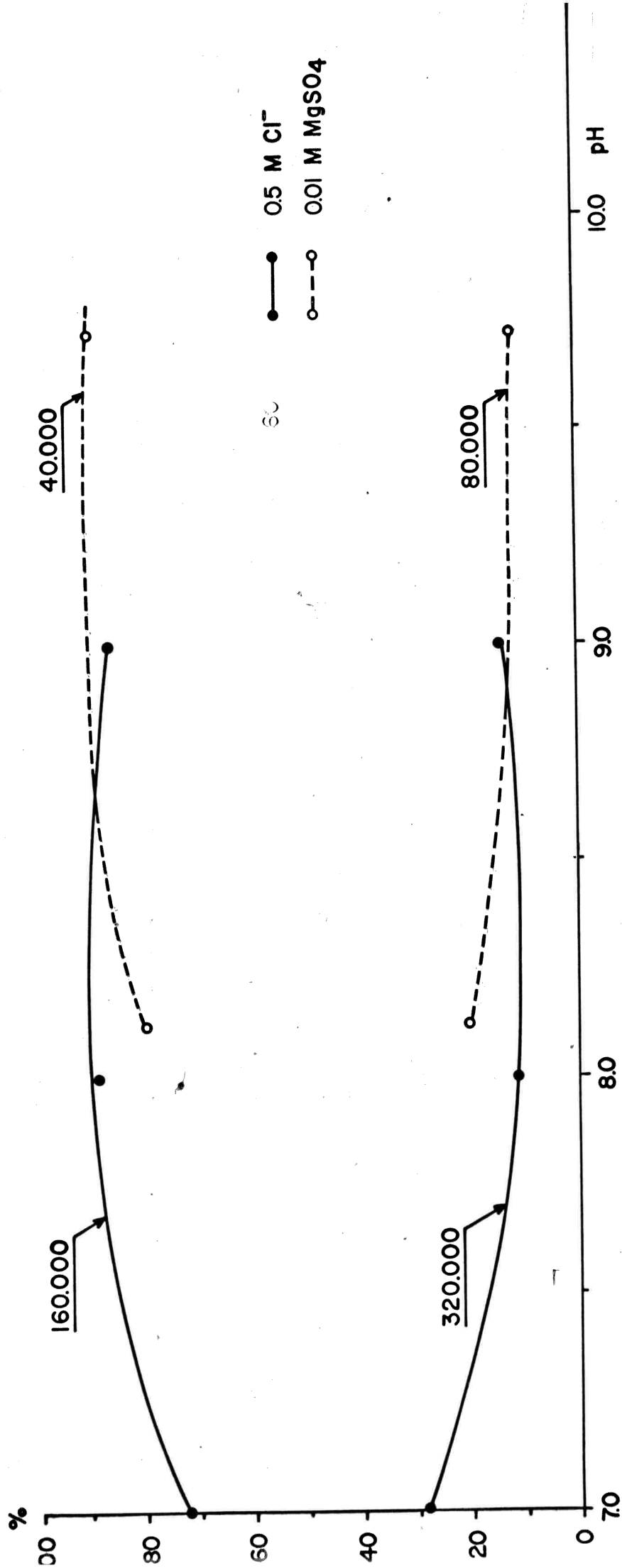
Figuur 14

H-c plot van de diverse aggregatietoestanden van C. crangon hecy opgelost in buffer met een ionensterkte van 0,1 I en tevens 0,5 molair aan chloride.



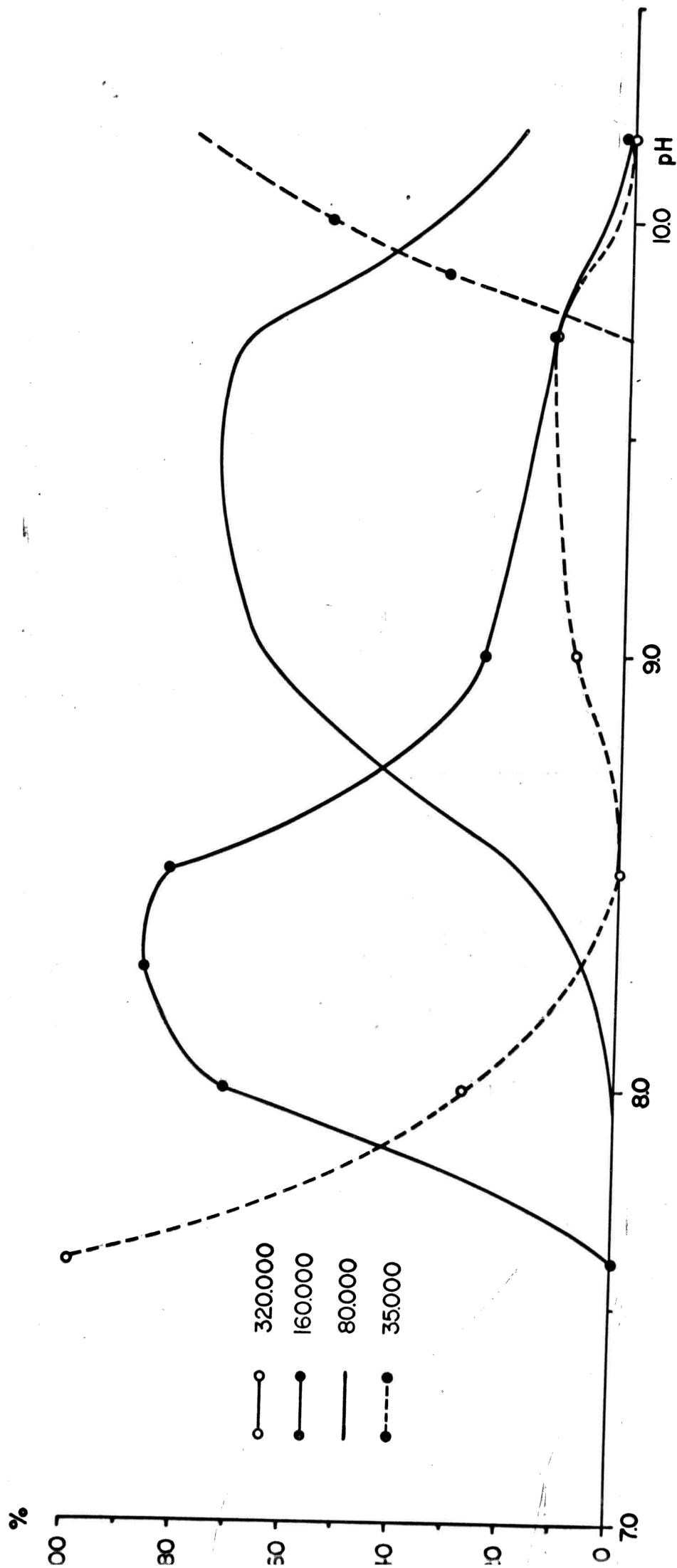
Figuur 15

H-c plot van de diverse aggregatietoestanden van C. crangon hecy
opgelost in een buffer met een ionensterkte van 0,1 I, waaraan
toegevoegd MgSO_4 tot op een concentratie van 0,01 M.



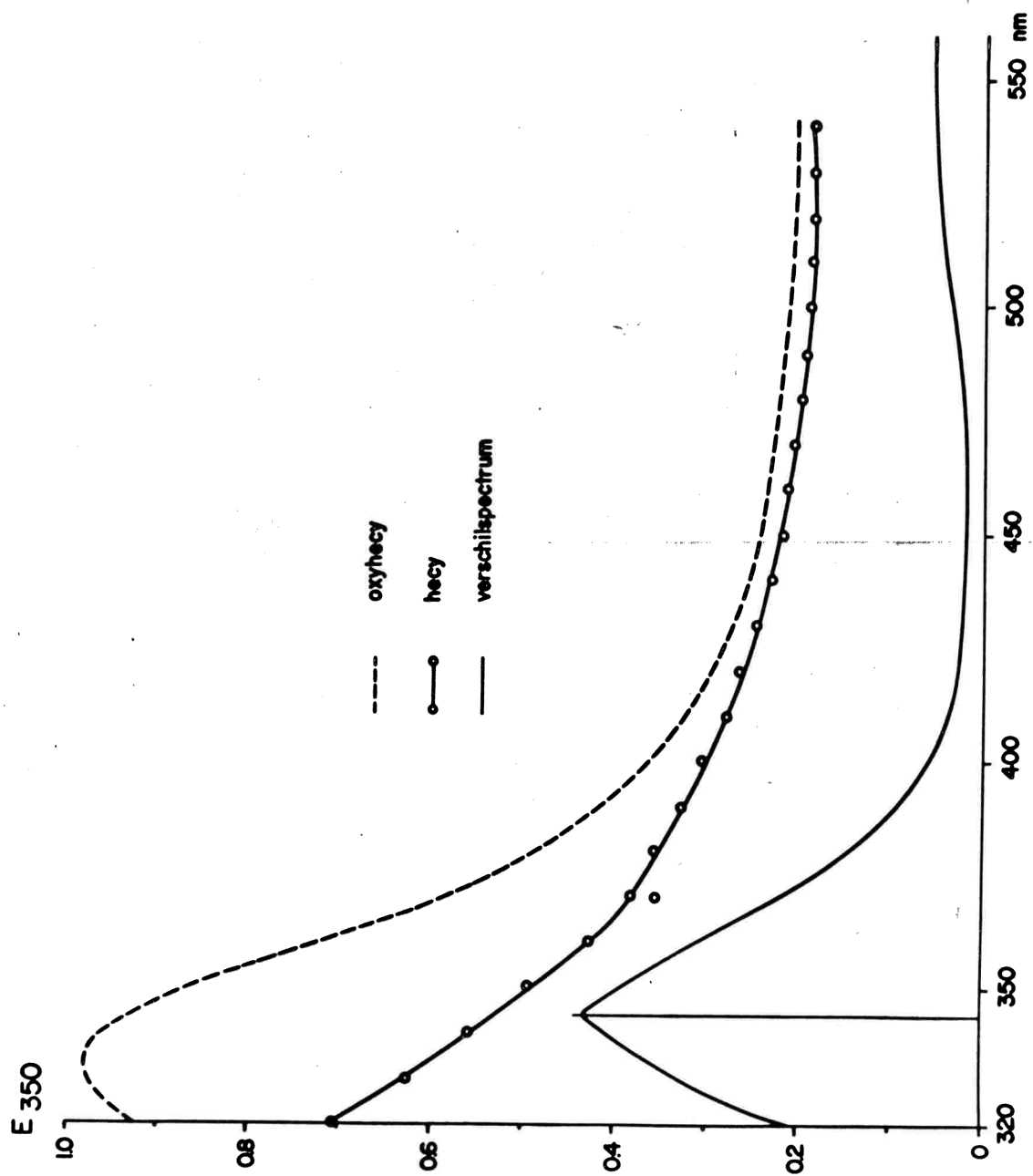
Riguur 16 a

Percentuele verdeling van de aggregatietoestanden van C. crangon hecy opgelost in 0,5 M Cl^- (—●—●) en 0,01 M MgSO_4 houdende buffers met een ionensterkte van 0,1 I.



Figuur 16 b

Percentuele verdeling van de aggregatietoestanden van *C. crangon* hecy opgelost in buffers met een ionensterkte van 0,1 I.



Figuur 17

Absorptiespectra van C. crangon hecy.

Addendum

Molecuulgewichtsbepaling van Eiwitten

d.m.v. lichtverstrooiing

Veel publikaties over lichtverstrooiing halen lyrisch het hemelsblauw aan, als ondersteuning van hun pleidooi voor het gebruik van lichtverstrooiing bij de bepaling van molecuulgewicht en vorm van een eiwit.

Mijnsinziens is het in vergelijking tot andere meettechnieken, te noemen sedimentatieanalyse (Evenwichts en Archibald runs), gel-filtratie en polyacrylamide gelelectroforese, een van de snelste en efficientste bepalingsmethoden (Fig. 1).

Lord (Strutt) Rayleigh wees er in 1871 al op dat een transparant isotroop deeltje klein vergeleken bij het electromagnetische licht, zelf bron van een lichtuitstraling met intensiteit i_{θ} , wordt zodat

$$\frac{Q_{\theta} \cdot r^2}{I_0} = R_{\theta} = 2 \pi^2 (n-1)^2 (1 + \cos \theta) \cdot \frac{1}{\lambda^4}$$

λ = golflengte van het licht

r = het aantal verstrooiende deeltjes/cc

R_{θ} = de Rayleigh ratio

θ = hoek waaronder gemeten

= apparaat constante

n = brekingsindex

Vervanging van de Rayleigh ratio door de geïntegreerde vorm van i_{θ} over alle hoeken levert de troebelheid τ op

$$\tau = \int_{\theta} i_{\theta} \cdot d\theta$$

Voor deeltjes klein vergeleken bij λ wordt deze integratie

$$\text{factor } \tau = \frac{8\pi}{3} \cdot R_{\theta} \text{ zodat } \tau = \frac{32\pi^2(n-1)^2}{3\lambda^4} \quad (\theta = 90^\circ)$$

Bij de theorie van Rayleigh wordt er van uitgegaan dat de verdeling van de deeltjes "Random" is. Dit is alleen in gassen het geval. In vloeistoffen moet men een gecompliceerde berekening toepassen met incalculatie van compressibiliteit K , kT , de thermische energie. Deze laatste parameter is verantwoordelijk voor het plaatselijk veranderen van de dichtheid, de bron van lichtverstrooiing, in de vloeistof.

$$\tau = (8\pi^2/3\lambda^4) \cdot (n^2-1)^2 \cdot kT \cdot K$$

K = Boltz'se constante

Lichtverstrooiing van deeltjes, klein vergeleken bij de golflengte, in oplossing kan door empirisch verantwoorde verwaarlozing een reëel te gebruiken resultaat opleveren dan de vloeistoffen zelf!

Debye (1944) leidde hiervan een formule af

$$\tau = \frac{\frac{32\pi^3}{3\lambda^4} \cdot \frac{RTc}{N}}{dp/dc} \cdot \left[n \left(\frac{dn}{dc} \right) \right]^2$$

P = osmotische druk

C = concentratie

Door in deze vergelijking de relatie tussen molecuulgewicht (M) en osmotische druk in te vullen verkrijgt men

$$K \left(\frac{C}{R90} \right) = H \left(\frac{C}{\gamma} \right) = \frac{1}{M} + 2 a_2 \cdot C + \dots$$

R = Rayleigh ratio

a = Constante van viriaal vergelijking

Wordt de lichtverstrooiing onder 90° bekeken dan is

$$K = \frac{2 \pi^2 n^2}{N} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

$$H = \frac{32 \pi^3 n^2}{3 N \lambda^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

dn/dc = refractieve increment

De tweede viriaal coëfficiënt a_2 karakteriseert de afwijking van de oplossing van haar ideale gedrag (Raoult) door proteïne-oplosmiddel interactie.

Uit de formule ziet men snel dat voor het bepalen van het molecuulgewicht van een eiwit in oplossing naast de troebelheid (turbidity) slechts de brekingsindex en het refractieve increment benodigd zijn.

Deze theorie is niet geheel van toepassing op anisotrope eiwitten in oplossing; in dat geval wordt het licht partieel gedepolariseerd. De verhouding daarentegen van horizontaal en vertikaal gepolariseerd verstrooid licht geeft ons een goede informatie over de vorm van het eiwitmolecuul.

Bij eiwitten van grotere omvang is de grootte niet meer te verwaarlozen en moet men bij de berekening hiervan corrigeren. Men voert dan een zgn. dissymetriefactor in

$$Z = i_{35^0} / i_{135^0} \quad (\text{twee hoeken symmetrisch t.o.v. } 90^0).$$

Deze factor is sterk afhankelijk van zowel de grootte als de vorm van het molecuul (Fig. 2).

Correctie van dissymetrie kan op 3 manieren gebeuren:

a. bepaling dissymetriefactor Z ; groottefactor in figuur II opzoeken; P_{θ} , lichtverstrooiende functie van het deeltje uit figuur III opzoeken.

b. het uitzetten van een zgn. "Zimm Plot", $H \cdot \left(\frac{C}{T}\right) 10^6$ tegen $\sin^2 (\theta/2) + j.c$, waarbij j een arbitrair te kiezen constante is (Fig. 4).

c. zie publikatie Brice (ref. 3).

In de praktijk is zo'n wirwar van parameters betrekkelijk onbruikbaar. Brice et al. (1951) trachtte ook een meer praktische uitwerking te geven.

Hij gaat uit van de Debye's formule

$$H \left(\frac{C}{T} \right) = \frac{1}{M} + 2 \left(\frac{B}{RT} \right)_c + \dots$$

waarbij

$$H = \frac{32 \pi^3 \cdot n_0^2 (n - n_0)^2 / c^2}{3 \lambda^4 \cdot N_0}$$

B = viriaal constante

Gedachtig aan de bovengenoemde feiten gaat hij een empirisch getoetste vergelijking ontwikkelen, zich zeer goed bewust zijnde van het in het bezit hebben van een Photoelectric Light-Scattering Photometer.

Helaas ontbrak het mij aan correctieapparatuur voor depolarisatiefactor, dissymetriefactor en een standaard transmissie-diffusor.

Ik heb daarom een gemodificeerde theorie opgezet bruikbaar bij het

werken met lage concentraties eiwitten.

De grootste handicap bij het bepalen van absolute lichtverstrooiing met de aanwezige fluorescentie opstelling van Zeiss Model PM II is de hardnekkige weigering om tot de hoogste instantie van deze fabriek om de afstand van de lamp tot het centrum van de oplossing te geven.

Daarom moest deze zgn. "apparaatconstante r" zelf bepaald worden. Allereerst werd daartoe uit de bovenstaande theorie de volgende formule afgeleid

$$\frac{i_{\theta}}{I_0} = \frac{2 \tau^2 \cdot n_0^2}{N \lambda^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \cdot \text{M.C.} \cdot \frac{1}{r^2}$$

Uit deze r kunnen wij dan de Rayleigh ratio bepalen

$$\frac{R}{90^\circ} = \frac{i_{90}}{I_0} \cdot r^2$$

Wij hadden reeds gevonden

$$\tau_{90} = \frac{8}{3} \cdot R_{90^\circ} = r^2 \cdot \frac{8\pi}{3} \cdot \frac{i_{90^\circ}}{I_0}$$

Welnu voor ons ligt een handzame formule.

Nu de praktijk.

Reiniging cuvetten

Men gebruikte de fluorescentie cuvetten. Deze worden zorgvuldig gereinigd in bichromaat zwavelzuur en/of een detergensoplossing. Zorg dat er geen stofdeeltjes in zitten.

Bereiding oplossingen

A. Stofvrije standaardoplossing van 10-30 mg/cc Bovine serum

albumine. Afdekken!

(totaal 3 cc)

B. 3 cc stofvrije buffer van de eiwitoplossing.

C. 3 cc stofvrije eiwitoplossing verdund tot een redelijke verstrooiing bij een minimale specifieke absorptie.

Opm. De cuvetten moeten minstens met 3 cc oplossing gevuld worden wegens reflectie aan het vloeistofoppervlak.

Apparatuur fluorescentieopstelling PMQ II Zeiss

Handeling:

Allereerst wordt de maximale specifieke absorptie van het eiwit in het zichtbare bepaald. Vervolgens wordt door beide monochromatoren synchroon te laten lopen de maximale specifieke lichtverstrooiing bepaald.

Hieruit wordt een golflengte gekozen die een goede lichtverstrooiing paart aan één te verwaarlozen specifieke absorptie.

Aan de selectie monochromator wordt een zwaar gedempte recorder gekoppeld. Met behulp van spleten en versterker wordt de standaard BSA oplossing op 100% ingesteld. Bij voorkeur wordt de hoeveelheid invallend licht constant gehouden.

Vervolgens wordt zowel de transmissie van het oplosmiddel als de eiwitoplossing gemeten.

De eiwitoplossing wordt systematisch verdund met factor $6/5$ of $3/2$ tot een aanvaardbare hoeveelheid meetpunten verkregen is.

De bij de verdunning verwijderde hoeveelheden eiwitoplossing worden bewaard voor bepaling van de eiwitconcentratie met de door Lowry ontwikkelde Folin-methode.

Tevens wordt de eiwitconcentratie van de BSA standaard oplossing bepaald.

Uitwerking gegevens

Door aftrekken van de transmissie van het oplosmiddel van de eiwitoplossing wordt de transmissie van het eiwit alleen verkregen.

Vervolgens bepaalt men de eiwitconcentratie van de BSA buffer en substitueert deze gegevens in formule (I) waarbij $\frac{I_{90^\circ}}{I_0} = 1$ cm M = 69.000

etc. Door invullen van het refractieve increment wordt de apparaat constante r^2 verkregen. Vermenigvuldiging met de integratie constante $\frac{8\pi}{3}$ verkrijgt men de troebelheidsfactor f_T . Door substitutie van de transmissie in de vergelijking

$$\tau = f_T T_{90^\circ}$$

wordt de relatieve troebelheid verkregen. Tenslotte zet men de relatieve troebelheid uit tegen de eiwitconcentratie.

Uit de helling van deze lijn berekent men het molecuulgewicht met behulp van de formule

$$H \cdot \left(\frac{C}{\tau}\right) = \frac{1}{M} + \text{Constante}$$

(de voor H benodigde parameters zijn bekend).

Deze methodiek heeft als voordeel dat men geen absolute troebelheden hoeft te berekenen om toch een absoluut molecuulgewicht te bepalen.

Verantwoording

Ik ben mij ten volle bewust dat ik hier zowel statistisch als theoretisch een verwaarlozing maak bij de uitwerking van de ontwikkelde methodiek.

Toch geloof ik dat werkend met eenzelfde eiwit met constante parameter relatief geringe grootte van $100 \text{ \AA}^0$ bij deze benadering juist is.

Bij gebruik van deze methodiek in eiwitmoleculen 10^6 zal men echter terdege na moeten gaan in hoeverre de grootte van het molecuul invloed heeft op de dissymetrie.

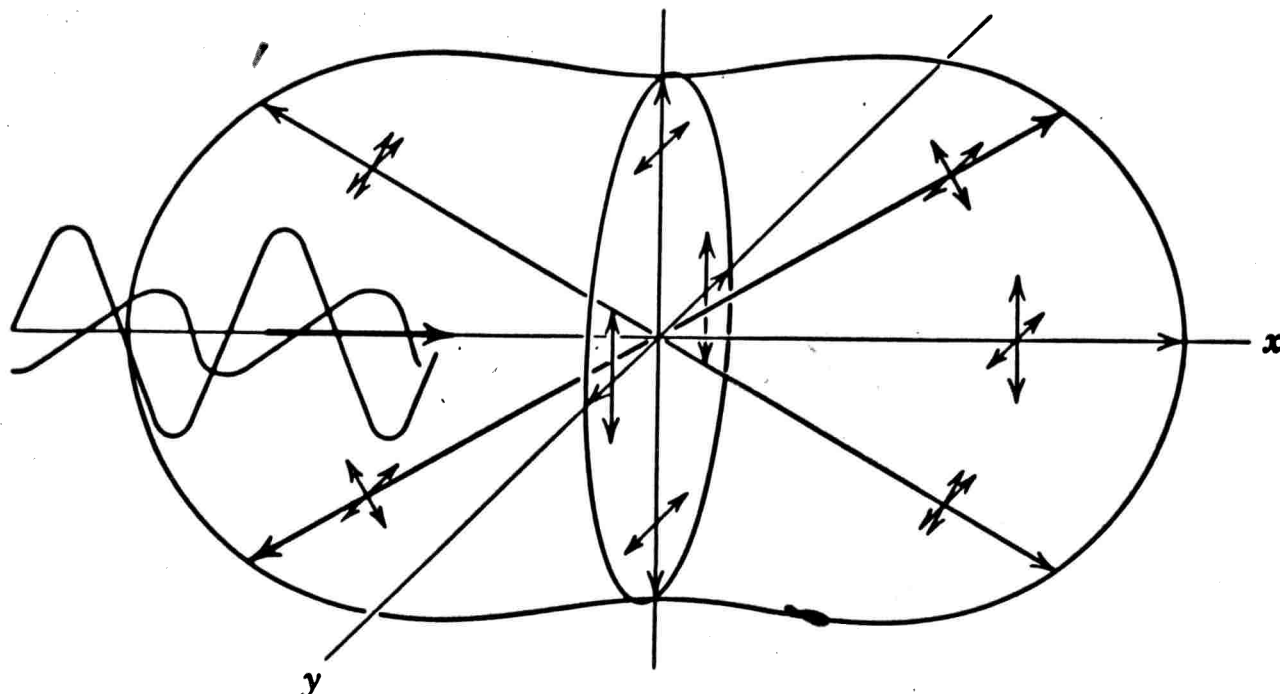
Dan juist weer toont lichtverstrooiing zijn vele kanten. Men kan met één enkele bepaling zowel inzicht verkrijgen in de grootte als in de vorm van het eiwitmolecuul.

Literatuur

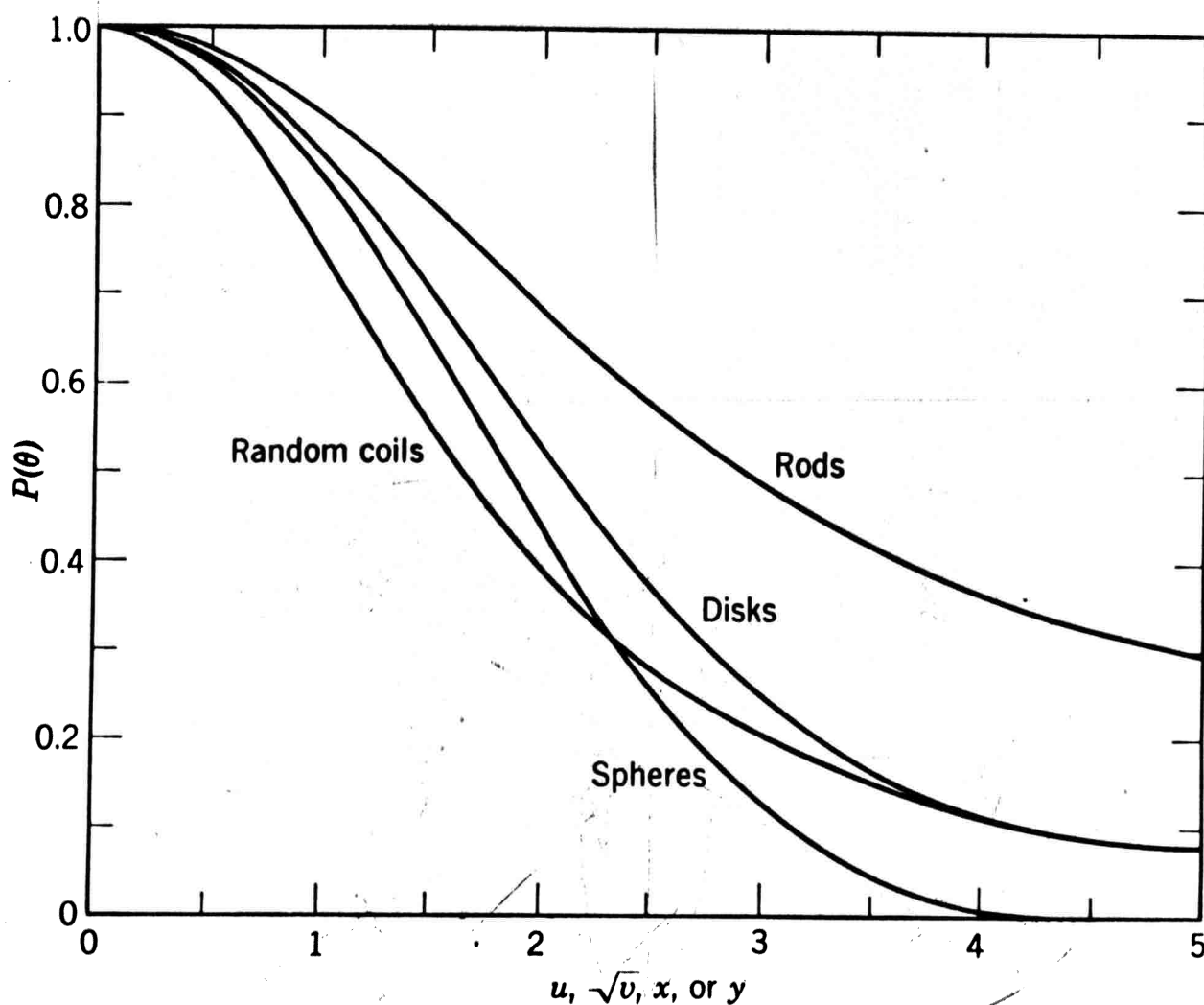
RAYLEIGH, LORD (STRUTT, J.W.), 1871. Phil. Mag., (4), 41, 167, 224, 447.

DEBYE, R.J.J., 1944. Appl. Physics, 15, 338.

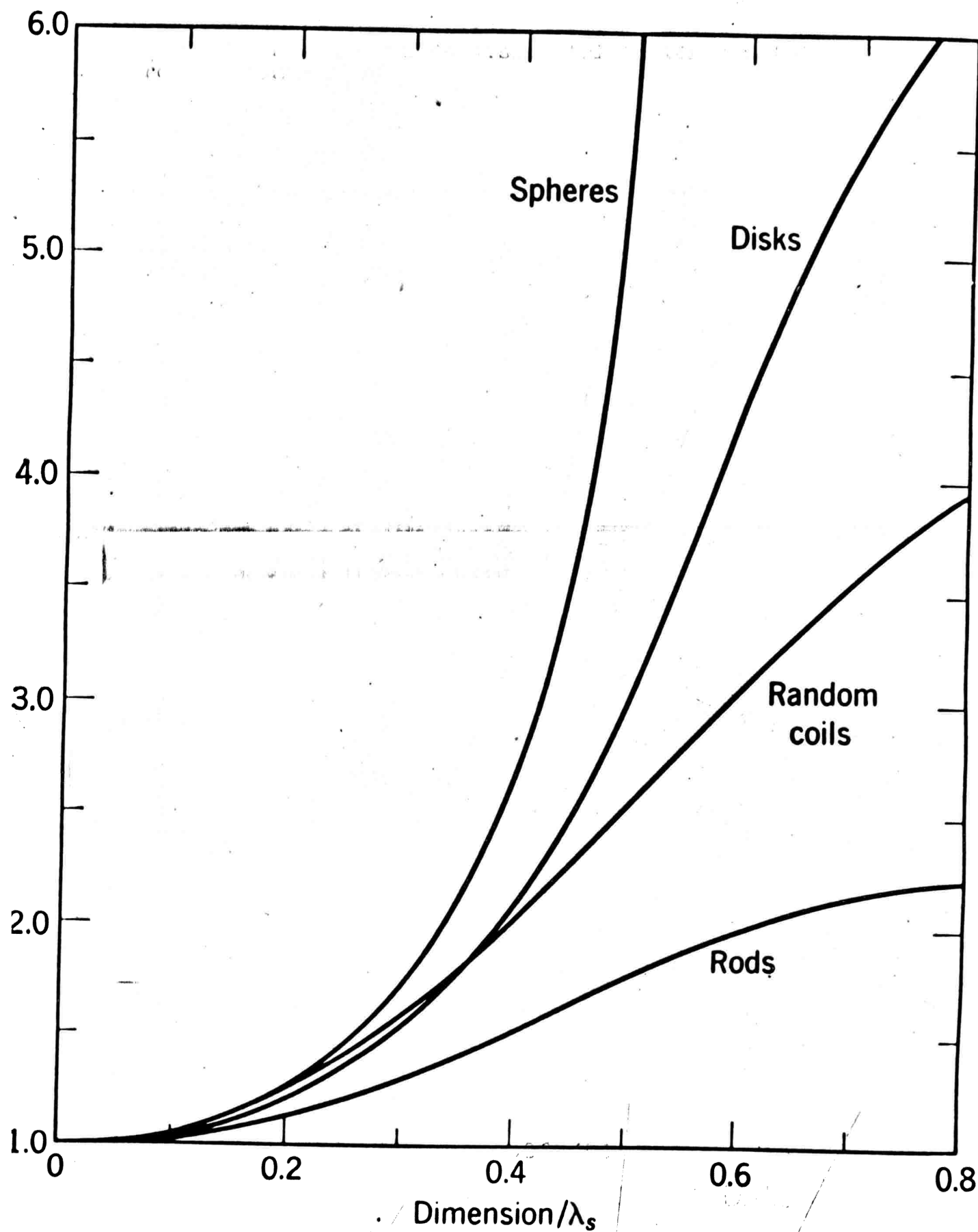
BRICE, HALWER, SPEISER, 1951. Journal of the Optical Society of America 40 (11), 768.



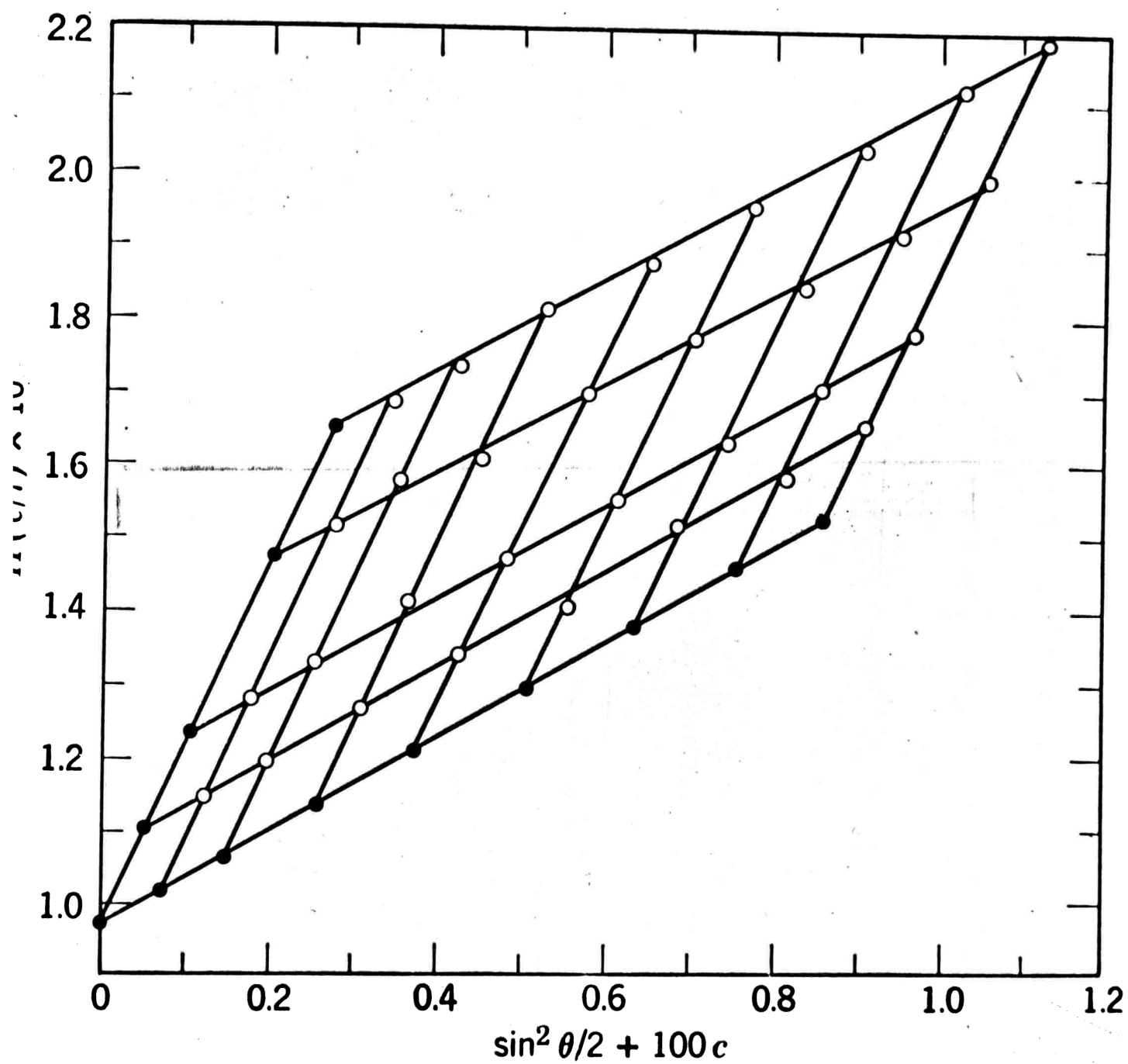
Figuur 1. Polairdiagram waarin de intensiteit van de lichtverstrooiing van een klein deeltje als functie van de hoek te zien is, na bestraling met ongepolariseerd licht. De verstrooiing is symmetrisch rond de x-as.



Figuur 2. Variatie van de deeltjes-verstrooiingsfunctie $P(\theta)$ met de "grootte" parameter; u (spheres), x (monodisperse "random coils"), x (rods), y (disks).



Figuur 3. Variatie van de dissymmetriefactor z met de ratio "grootte" parameter.



Figuur 4. Zimm plot .