

De O₂ bindende eigenschappen van het haemoglobine en aspecten
van Hb-heterogeniteit van Pleuronectes platessa L. en
Pleuronectes flesus L.

door

Han de Wilde

Intern verslag

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 5

13081

De O₂ bindende eigenschappen van het haemoglobine en aspecten
van Hb-heterogeniteit van Pleuronectes platessa L. en
Pleuronectes flesus L.

door

Han de Wilde

Intern verslag

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 5

Rechten voorbehouden

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

De O₂ bindende eigenschappen van het haemoglobine en aspecten
van Hb-heterogeniteit van Pleuronectes platessa L. en
Pleuronectes flesus L.

door

Han de Wilde

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctoraal onderwerp
in het tijdvak augustus 1971 - september 1972

aan

het NIOZ te Texel

voor

Prof. Dr. S. Dijkgraaf

Laboratorium voor Vergeijkende Dierfysiologie

Rijks Universiteit te Utrecht

onder supervisie van

Dr. Roy E. Weber

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 5

De O₂ bindende eigenschappen van het haemoglobine en aspecten
van Hb-heterogeniteit van Pleuronectes platessa L. en
Pleuronectes flesus L.

door

Han de Wilde

Intern verslag

Inhoud

Summary	2
Samenvatting	3
1. Inleiding	4
1.1. Probleemstelling	4
1.2. Strukturele eigenschappen van het haemoglobine	6
1.3. Functionele eigenschappen van het haemoglobine	8
1.4. Hb-heterogeniteit	10
2. Materiaal en methode	10
2.1. Materiaal	10
2.2. Methode	11
2.2.1. Het opvangen en behandelen van natief bloed	11
2.2.2. Het hemolyseren van de erythrocyten	12
2.2.3. Het verwijderen van de organische fosfa- ten d.m.v. "Strippen"	12
2.2.4. Het scheiden van de componenten	13
2.2.4.1. De "microelectrofocusing" methode.	14
2.2.4.2. De "LKB electrofocusing" methode.	16
2.2.5. Het meten van de O ₂ -bindings curven	18
3. Resultaten en discussie	20
3.1. Zuurstofbindende eigenschappen van het bloed	20
3.1.1. Inleidende vergelijkende metingen	20
3.1.1.1. Metingen aan bloed direct na bemonstering	20
3.1.1.2. Metingen aan gewassen erythrocyten	21
3.1.1.3. Metingen aan Hb in oplossing	21
3.1.2. Invloed van de pH : Bohr-effect	22
3.1.3. Invloed van de temperatuur : temperatuur- effect	23

3.2. Hb-heterogeniteit op grond van isoelectrisch punt	24
3.2.1. Inleidende beschrijvende experimenten	24
3.2.1.1. Het aantal Hb-componenten en hun isoelectrische punten	24
3.2.1.2. De kwantitatieve verhouding tussen de Hb-componenten	26
3.2.2. O ₂ -affiniteit van de Hb-componenten	27
3.2.2.1. Bohr-effect van een aantal Hb- componenten van schol	27
3.2.2.2. Temperatuur-effect van een aantal Hb-componenten van schol	28
4. Conclusie	29
5. Literatuur	32
6. Tabellen	
7. Grafieken en figuren	

SUMMARY

1. A comparative study was made of the oxygenation properties of haemoglobins (Hb) from plaice (Pleuronectes platessa L.) and flounder (Pleuronectes flesus L.).
2. The multiple haemoglobins in each species were separated by means of iso-electric focusing and oxygen binding properties of the main component haemoglobins were determined.
3. The oxygen affinity of whole blood, measured directly after collection is higher in plaice than in flounder, under the same conditions of pH and temperature. Removal of the blood plasma lowers the oxygen affinity of the haemoglobin in the erythrocytes. This shift is less pronounced in the flounder than in plaice and corresponds with dilution effects of the Hb and intracellular factors such as the organic phosphates.
4. The isolated Hb components of plaice showed small mutual differences in oxygen affinity at the same pH's and temperatures. These differences were not found to be significant.

5. The Bohr effect was determined for the washed red cells and for Hb in solution of plaice and flounder, and for the six main components of plaice. The Bohr effect, θ , expressed as $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$, of plaice erythrocytes and of Hb in solution were $-0,64$ and $-0,78$ respectively; for flounder the corresponding values were $-0,53$ and $-0,45$. The Bohr factor for the six components of plaice Hb varied from $-1,26$ to $-1,43$.
6. The overall temperature influence, expressed in terms of the apparent heat of oxygenation, ΔH , amounted to $-14,4$ and $-16,6$ kcal/mole respectively for erythrocytes and Hb in solution of plaice. For flounder the corresponding values found were $-15,1$ and $-19,1$ kcal/mole. For five of the main Hb components of plaice the ΔH values varied from $-14,5$ to $-17,0$ kcal/mole.

SAMENVATTING

1. Een vergelijkende studie werd gemaakt van de zuurstofbindende eigenschappen van haemoglobine van schol (Pleuronectes platessa L.) en bot (Pleuronectes flesus L.).
2. Met behulp van een preparatieve electrofocusing techniek zijn de Hb-componenten van bot en schol gescheiden voor het bepalen van de zuurstofbindende eigenschappen van de voornaamste componenten.
3. De zuurstofaffiniteit van onbehandeld bloed, direct na bemonstering gemeten, is voor schol hoger dan voor bot, onder gelijke omstandigheden van temperatuur en pH.

Het verwijderen van het bloedplasma heeft bij schol en bij bot in mindere mate, verlaging van de zuurstofaffiniteit van Hb in de erythrocyten tot gevolg. Hemolyse van de erythrocyten veroorzaakt een verhoging van de zuurstofaffiniteit van het Hb. Dit hangt samen met een verdunningseffect van Hb en ook van intracellulaire

factoren zoals organische fosfaten.

4. De gescheiden Hb-componenten van schol vertonen onderling kleine verschillen in zuurstofaffiniteit onder gelijke omstandigheden van temperatuur en pH. Deze verschillen zijn echter niet significant.
5. Het Bohr-effect is bepaald van gewassen erythrocyten en Hb in oplossing van schol en bot en van de zes voornaamste Hb-componenten van schol. De Bohr-effect index $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ voor schol bedraagt voor de erythrocyten en Hb in oplossing respectievelijk $-0,64$ en $-0,78$; voor bot respectievelijk $-0,53$ en $-0,45$. De Bohr-effect index voor zes verschillende Hb-componenten van schol varieert van $-1,26$ tot $-1,43$.
6. Het temperatuur-effect is bepaald van gewassen erythrocyten en Hb in oplossing van schol en bot en van vijf Hb-componenten van schol. Het totale temperatuur-effect, uitgedrukt als de ogenschijnlijke oxygenatiewarmte, ΔH , bedraagt respectievelijk $-14,4$ en $-16,6$ kcal/mol voor schol- erythrocyten en Hb in oplossing. Voor bot zijn overeenkomstige waardes gevonden van $-15,1$ en $-19,1$ kcal/mol. Voor vijf van de voornaamste Hb-componenten van schol varieert de ΔH waarde van $-14,5$ tot $-17,0$ kcal/mol.

1. INLEIDING

1.1. Probleemstelling

Verreweg het meeste onderzoek naar structuur en functie van haemoglobine is aan zoogdieren gedaan. Vergelijkend fysiologisch zijn de lagere vertebraten veel interessanter vanwege de enorme variatie in habitat en aanpassingen aan verschillende omstandigheden. Bij vissen bestaan uitersten waar het gaat om zuurstofbehoefte en de transport-mechanismen hiervoor ontwikkeld: kleine vissen die in

koud, O₂-rijk water leven zoals bijv. de Antarctische ijs-vis (RIGGS, 1970), hebben weinig O₂-transport middelen nodig; de O₂ die fysisch opgelost wordt in de bloedvloeistof is ruim voldoende. Het dier bezit geen Hb (haemoglobine) en heeft kleurloos bloed. Aktieve grotere vissen, daarentegen, zullen wel Hb bezitten en ook andere transportmechanismen zullen aangepast zijn (kieuwen, longen, ademend oppervlak, pompritme van het hart aantal erythrocyten, Hb-concentratie).

Bovenstaande is uitgangspunt voor dit onderzoek en schol en bot zijn om de volgende redenen als proefdieren gekozen: Pleuronectes platessa L. en Pleuronectes flesus L. zijn twee algemeen voorkomende en nauw verwante soorten. Ze leven beide pelagisch, kruisen onderling ("Blendling"), hebben min of meer dezelfde voedingsgewoontes en gebruiken allebei de Waddenzee als "kinderkamer". Over schol is veel meer bekend dan over bot, waarschijnlijk vanwege de belangrijkere economische betekenis. Het kuitschieten van schol gebeurt in de diepe geul onder de Doggersbank en de eitjes zweven met de stroom mee tot vlak voor de Nederlandse kust en naar de Waddenzee. Na ongeveer twee jaar trekt de jonge schol weg uit de Waddenzee steeds dieper de Noordzee in (HARDY, 1959). Het kuitschieten van bot vindt iets dichterbij de kust plaats en ook deze eitjes komen o.a. in de Waddenzee terecht. Bot nu, vertoont niet de minste behoefte om na een bepaalde tijd weg te trekken. Er rijzen nu twee vragen: 1^e. Waarin verschillen de omstandigheden van Waddenzee en Noordzee? 2^e. Hoe verschillen de aanpassingen van schol en bot aan deze omstandigheden? Een aantal duidelijke verschillen tussen Waddenzee en Noordzee zijn: 1^e Grotere temperatuurschommelingen (2 - 20°C in Waddenzee ↔ 7 - 15°C in Noordzee) 2^e Sterkere wisselingen in zoutgehalte in de Waddenzee: (FRIEDRICH, 1935).

Met deze gegevens kan de hypothese gesteld worden dat schol in het algemeen minder tolerant is ten aanzien van wisselende omstandigheden dan bot. (WAEDE, 1954). Als het om het hele organisme gaat is deze hypothese reeds bevestigd. Reeds in 1933 - 1936 zijn schol en bot met elkaar vergeleken in onderzoeken naar tolerantie (FRIEDRICH 1935; von BUDDENBROCK 1934, 1967) en bleek bot veel toleranter t.o.v. temperatuur - en zoutschommelingen dan schol. Uit dat onderzoek bleek ook al dat bot niet alleen ongeveer twee maal zoveel bloed bevat als schol van gelijke grootte maar ook per ml bloed ongeveer 30% meer Hb. Naar aanleiding van deze gegevens heeft men toen functionele aspecten van het Hb onderzocht met voor de huidige tijd vrij primitieve methoden. De invloed van temperatuur en CO₂ gehalte op de O₂-bindende eigenschappen van het Hb werden onderzocht en hieruit bleek de P₅₀ van bot en schol bij 9°C ± 4 mm. Hg te zijn. Bij 25°C echter was de P₅₀ voor bot ± 12 mm. Hg terwijl de P₅₀ voor schol ± 27 mm. Hg was. Schol had dus bij hogere temperatuur een veel lagere O₂-affiniteit. De invloed van het CO₂ gehalte was ook bij schol groter dan bij bot.

1.2. Strukturele eigenschappen van het Hb

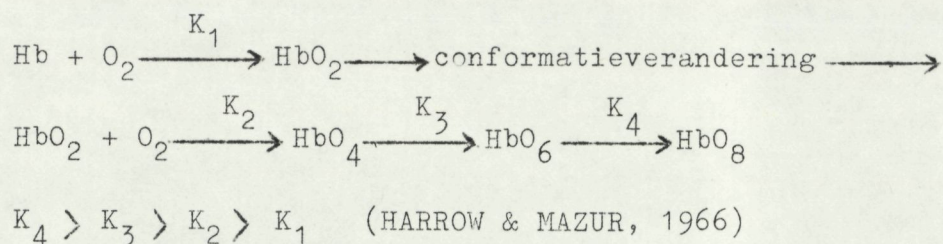
De erythrocyten vormen een metabolisch weefsel. Hieruit volgt dat het metabolisch stadium invloed heeft op de O₂-transport capaciteit van het Hb. Uit de literatuur is bekend dat ± 98% van de O₂ in bloed gebonden is aan het Hb. De functies van het haemoglobine zijn:

- 1) a. O₂ transport b. O₂ opslag c. facilitatie van diffusie
- 2) buffer bij transport van CO₂
- 3) instandhouden van de colloid osmotische druk (eiwitcomponent).

Elk Hb-molecuul (bij vertebraten) bestaat uit vier eenheden (M = 17000) en elk van deze eenheden bevat een haem-groep. Het molecuul is dus een "tetrameer" met een moleculair gewicht van ongeveer 68,000. Dit blijkt o.a. uit de sedimentatieconstante (S₂₀^o) die bij

schol gelijk is aan 4,26 (SVEDBERG, 1934; PROSSER, 1962). Deze waarde komt overeen met die van andere vissen, zoogdieren en vogels. De samenstelling (vier ketens met elk een haem-groep) van het Hb is bij al deze diergroepen gelijk. Het Fe^{++} van het haem is gebonden aan een imidazol-groep van een histidine-residue.

Haemoglobine is een allosterisch eiwit d.w.z. : de combinatie van een molecuul, dat reversibel door het eiwit gebonden wordt, kan de combinatie met een volgend molecuul (een zelfde of ander soort) vergemakkelijken of remmen. Na de binding met het eerste molecuul treedt dan een conformatieverandering in het eiwit op. Anders uitgedrukt :



Het gevolg van deze eigenschap is dat de O_2 -bindings-curve geen hyperbool maar een sigmoïde voorstelt. Het sigmoïdale karakter kan variëren en een maat hiervoor is de n-constante in de vergelijking van Hill:

$$y = 100 \times \frac{\left(\frac{P}{P_{50}}\right)^n}{1 + \left(\frac{P}{P_{50}}\right)^n} \quad y = \% \frac{\text{HbO}_2}{\text{Hb totaal}} \quad (\text{waarbij } y \text{ niet dicht bij } 0\% \text{ of } 100\%)$$

P = PO_2 deelspanning
n = sigmoïde coëfficiënt

De coëfficiënt n wordt de "Hill-constante" genoemd en kan, afhankelijk van de electrolytsamenstelling, variëren (ANTONINI e.a., 1962). Als $n = 1$ dan zijn de O_2 bindingsplaatsen onafhankelijk van elkaar; als $n > 1$ dan treedt subéénheid interactie op, die conformatieverandering veroorzaakt ("loosening up") waardoor de O_2 bindings-

ad B. Het Bohr effect werd vroeger uitsluitend toegeschreven aan CO_2 ; tegenwoordig is bekend dat het grotendeels een pH effect is, hoewel CO_2 ook een specifiek effect heeft.

De waarde van het Bohr effect wordt uitgedrukt als:

$$\Phi = \frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \text{pH}}$$

Bij vissen is het CO_2 effect groter dan bij landdieren (PROSSER, 1962); de normale CO_2 druk in het bloed is lager bij vissen. Tussen vissoorten varieert de waarde van het Bohr effect tamelijk sterk. Actieve vissen zijn gebaat bij een groot Bohr effect (makreel -1,2). Ook blijkt het Bohr effect omgekeerd evenredig te zijn met de grootte van de diersoort (PROSSER, 1962). Volgens RIGGS (1959) is er een lineair verband tussen de grootte van het Bohr effect en het aantal aanwezige -SH (sulfhydril) groepen.

ad C. Er is een groot verschil tussen warm- en koudbloedige dieren wat temperatuur effect betreft, weinig verschil echter tussen koudbloedigen onderling en warmbloedigen onderling. De P_{50} bij koudbloedigen ligt veel lager dan bij warmbloedigen.

BENESCH e.a. (1969) hebben ook aangetoond dat organische fosfaten in de erythrocyten invloed hebben op het temperatuur effect. Het temp effect wordt uitgedrukt als:

$$\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \frac{1}{T} \cdot 10^3}$$

of in de geïntegreerde van't Hoff vergelijking:

$$\Delta H = 4,574 \cdot \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1} \cdot \Delta \log P_{50}$$

1.4. Hb-heterogeniteit

Hb-heterogeniteit treedt bij vissen zeer algemeen op. De haemgroepen zijn van alle haemoglobines gelijk maar de verschillen worden bepaald door de globinecomponenten.

Deze verschillen in globinecomponenten worden gekarakteriseerd

- door:
- 1 oplosbaarheid
 - 2 aminozuursamenstelling
 - 3 isoelectrisch punt
 - 4 alkalische denaturatie
 - 5 electroforetische mobiliteit
 - 6 molecuul grootte ----->68000
 - 7 immunologische eigenschappen
 - 8 O₂-affiniteit

Wat voor biologische betekenis aan het bestaan van Hb-heterogeniteit ofwel multipliciteit gehecht moet worden zou onderzocht kunnen worden aan de aparte haemoglobines, hun structuur en O₂-bindende eigenschappen. In dit onderzoek zijn de verschillende Hb-componenten van elkaar gescheiden op grond van hun isoelectrische punten (i.e.p.) en van de aparte Hb-componenten van schol zijn Bohr effecten en temperatuur effecten bepaald. (verg. punt 3 en 8 hierboven).

2. MATERIAAL EN METHODE

2.1. MATERIAAL

Schol (Pleuronectes platessa L.) en bot (Pleuronectes flesus L.) werden gevangen in fuiken rond het Horntje (Texel) in het najaar 1971 en voorjaar 1972. De gebruikte exemplaren varieerden in lengte van 15 - 30 cm.

2.2. METHODE

2.2.1. Het opvangen en behandelen van natief bloed

Het bloed werd afgetapt en opgevangen in een gehepariniseerd erlenmeyer-kolfje, in ijs gekoeld, waarin \pm 1 cc. NaCl(0,6%) in PO_4 buffer (I=0,05) ($I_{\text{totaal}} = 0,15$; pH7,6 bij $15^{\circ}C$) gedaan was om hemolyse tegen te gaan. De schol of bot werd eerst afgespoeld en goed gedroogd om geen verontreiniging met huidslim te krijgen en vervolgens werd de staart afgeknipt bij de staart inplant. Van het bloed wat nu uit de vis druppelde werden ook twee gehepariniseerde capillairtjes gevuld die gebruikt werden om direct de pH, de Hb-concentratie en de O_2 -bindingscurve van het bloed te meten. De zuurgraad werd gemeten met behulp van een Radiometer model pHM 27 uitgerust met microelectroden type E 502/a. De haemoglobineconcentratie werd gemeten met behulp van een Lovibond comparator 1000 Haemoglobin 5/8 en 5/8B (HARRISON, 1938). De ijklijn voor menselijk bloed werd gebruikt om $\%$ Lovibond om te zetten in gHb/100ml.

Direct nadat het bloed in het erlenmeyer-kolfje was opgevangen werd er CO doorheen geleid om met-haemoglobinevorming te beperken. Om het plasma te verwijderen werd het monster 3x met de gebufferde NaCl oplossing ^{gewassen} afgecentifugeerd (10 min. bij 4000 r.p.m.) en de kleurloze bovenstaande vloeistof en witte bloedlichaampjes afgepipetteerd. Na verdunning met de gebufferde NaCl oplossing tot ongeveer de oorspronkelijke concentratie werden de erythrocyten bij $4^{\circ}C$ bewaard.

2.2.2. Het hemolysen van de erythrocyten

Voor proeven met haemoglobine in oplossing werden de erythrocyten na wassen met NaCl in de oorspronkelijke concentratie gehemolyseerd d.m.v. diepvriezen bij -35°C gedurende 24 uur. Na ontdooien werden de celresten en verontreinigingen neergeslagen door afcentrifugeren gedurende 20 min. bij 16000 g. De supernatans, een helderrode haemoglobine oplossing werd afgepipetteerd en bij -35°C bewaard.

2.2.3. Het verwijderen van de organische fosfaten d.m.v. "Strippen"

Organische fosfaten als A.T.P. (adenosine trifosfaat) en D.P.G. (difosfoglyceraat) hebben invloed op de O_2 -bindende eigenschappen van het haemoglobine (BENESCH e.a., 1969). Om deze invloed uit te sluiten werd het Hb-monster "gestrippt" bij 5°C in een Sephadex kolom (Farmacia, type K50/60, doorsnede: 5 cm; gelbed- hoogte: 40 cm ; doorloopsnelheid: 54 ml/u; vulling: Sephadex G 25 fine). De doorloopvloeistof was een oplossing van 0,1 M NaCl in 0,01 M trisbuffer (pH : 7,75 bij 5°C ; 7,55 bij 15°C en 7,4 bij 25°C). Het monster werd in hoeveelheden van 5 ml opgebracht na verdunning tot de helft van de oorspronkelijke concentratie. Volgens BERMAN e.a. (1971) worden organische fosfaten, die een veel kleiner molecuulgewicht hebben dan Hb, hiervan volledig gescheiden mits de pH $> 7,5$.

Met behulp van een ultraviolet absorptiometer (LKB Uvicord II-detector unit type 8303 A) werd de absorptie gemeten bij 280 nm. en geregistreerd op een Servogor RE511 compensatie schrijver. Slechts één piek was zichtbaar, die van het haemoglobine. Het Hb-monster dat door deze behandeling ± 5 x verdund was, werd geconcentreerd m.b.v. ultradialyse apparatuur (Sartorius-membraanfilter, sm 13200) tegen een mengsel van fosfaatbuffer (I=0,05 en pH=7,00 bij 15°C) en 0,3% NaCl oplossing (I = 0,05) in gelijke verhoudingen. Bij concentreren

tegen aqua dest bleek het Hb uit te kristalliseren. Dit werd voorkomen door het gebruik van een gebufferde dialyse-vloeistof die 2 x ververst werd. Het monster werd regelmatig gehomogeniseerd om Hb-concentratie in de uiterste punt van het membraanfilter te voorkomen. Bij een concentratie van 5-6,5 gHb/100 ml werd het monster uit de membraanfiltertip gepipetteerd en bij -35°C bewaard. De ionensterkte, gemeten met behulp van een chloridometer, bleek overeen te komen met die van de dialyse vloeistof ($I = 0,05$).

2.2.4. Het scheiden van de componenten

Om de verschillende Hb-componenten afzonderlijk te onderzoeken naar structurele en functionele eigenschappen worden ze van elkaar gescheiden op grond van hun verschillende specifieke isoelectrische punten (i.e.p.). Dit gebeurt volgens de methode, beschreven door SVENSSON (1961, 1962) en VESTERBERG & SVENSSON (1966) en wordt genoemd: "Isoelectric focusing in a natural pH gradient". Het principe berust hierop dat een eiwit, of andere ampholyt zich in een oplossing, waarin een stabiele pH gradient heerst, concentreert bij de pH waar het eiwit zelf neutraal geladen is, m.a.w. op zijn isoelectrisch punt. Een pH gradient wordt verkregen door het aanbrengen van een d.c. elektrisch potentiaalverschil op een oplossing met een geschikt mengsel van ampholyten (Ampholine carrier ampholyten LKB, Bromma, Zweden). Ampholine bevat een groot aantal alifatische polyamino - polycarboxy-zuren die allemaal onderling kleine verschillen in ladingsverdeling hebben, verdeeld over het gekozen pH gebied. In een elektrisch veld worden ze afgestoten door zowel de anode als de kathode, die door resp. zuur en base worden afgeschermd, en migreren naar de plaats waar ze elektrisch neutraal zijn. De ampholyten moeten de pH gradient bepalen en dus in voldoende

hoeveelheid aanwezig zijn en een grotere bufferende capaciteit bezitten dan het te scheiden eiwitmonster. Na de migratie ontstaat er een evenwicht. Om het systeem te stabiliseren tegen convectorie wordt de temperatuur constant gehouden en een lineaire dichtheidsgradient aangebracht d.m.v. een afnemende concentratie van sucrose in de kolom.

2.2.4.1. De "microelectrofocusing" methode

Deze methode (KOCH & BACKX, 1969) wordt gebruikt om het Hb- patroon van de vissen afzonderlijk te onderzoeken. Zeer kleine hoeveelheden bloed (of ander eiwitmonster) zijn hiervoor nodig en de benodigde hoeveelheid carrier ampholyten is slechts 1/60 van wat gebruikt wordt om een 440 ml LKB electrofocusing kolom te vullen.

De microkolom bestaat uit de volgende onderdelen (verg. Fig.1.):

- a). Een glazen buis (A) waarin de ampholine sucrose gradient zich bevindt. De binnenwand wordt gecoat met een organisch silicone product (Beckman Desicote) om electroendosmose te voorkomen.
- b). Een dunnere glazen buis (B) die dienst doet als reservoir voor de zware electrolyt.
- c). Een silicone rubberslang (S) die buizen A en B verbindt.
- d). Een glazen buis (C) die dezelfde doorsnede heeft als A en een verlengstuk van B vormt.

Twee plastic houders zorgen ervoor dat de buizen een U vormen. Door de derde houder worden de twee platina electrodes gefixeerd. Veertien van deze microkolommen worden verticaal bevestigd in een bak met koelwater, waardoor de temperatuur constant gehouden wordt (5°C) tijdens het experiment.

Het vullen van de microkolom:

- a). Via buis B wordt de zware, zure electrolyt oplossing aangebracht tot ongeveer 6 cm van onderaf in buis A. Deze oplossing is als

volgt samengesteld: sucrose 12 gr
 H_3PO_4 0,2 ml (1% opl)
 H_2O dest. 14 ml

b). Buis A wordt nu gevuld met sucrose oplossingen van aflopende concentraties waarin zich 1% Ampholine pH5-8 bevindt. Zo ontstaat een vrijwel lineaire dichtheidsgradient. Halverwegen (\pm 15 cm van onderaf) wordt het bloedmonster in de kolom gebracht waarna weer de verder aflopende sucrose oplossingen. Van het bloedmonster is slechts 20 μ l nodig bij een Hb-concentratie van ongeveer 7g/100ml. Als de oplossing in A tot ongeveer 24 cm van onderaf reikt (in B iets lager) wordt de lichte basische elektrolyt in A aangebracht tot beide buizen gevuld zijn. Deze oplossing is als volgt samengesteld:

ethyleendiamine 0,2 ml
 H_2O dest. 10 ml

Het electrofocusing proces:

De twee electrodes van platinadraad steken tot ongeveer 1 cm onder het vloeistof oppervlak in de buizen A en B. Er werd een beginspanning van 400 V tussen deze electrodes aangebracht die na 10 tot 12 uur opgevoerd werd tot 800 V. Na \pm 48 uur hebben de Hb-componenten zich gerangschikt in de kolom en is een evenwichtstoestand bereikt. Er worden foto's en tekeningen gemaakt van de kolom, de spanning wordt afgezet, de electrodes verwijderd en zowel buizen A en B als de holle houder met cm verdeling, D, direct in een vrieskast bij $-35^{\circ}C$ geplaatst. De volgende dag wordt de bevroren buis A gedemonteerd en in stukjes van \pm 2 cm gesneden. Deze stukjes met inhoud worden apart in kleine potjes gedaan en van de inhoud wordt na ontdooien de pH gemeten. Door interpolatie kunnen, rekening houdend met uitzetting door invriezen, achteraf de isoelectrische

punten van de Hb-componenten bepaald worden tot op 0,1 pH eenheid nauwkeurig.

2.2.4.2. De L.K.B. Electrofocusing methode

Deze methode, voor het eerst beschreven door SVENSSON (1962-b), is geschikt om van grotere bloedmonsters (5 ml met Hb-concentratie van ongeveer 7 g/100 ml) de verschillende Hb-componenten van elkaar te scheiden. Het principe is gelijk aan dat waarop de microelectrofocusing berust. Door voorzichtig leegpompen van deze grote kolom, echter kunnen de verschillende Hb-componenten gefractioneerd opgevangen worden. Na dialyseren en concentreren kunnen nu van de afzonderlijke Hb-componenten de O₂ bindende eigenschappen bepaald worden, ook weer met betrekking tot pH- en temperatuur gevoeligheid.

De kolom die bij deze experimenten gebruikt werd was de "440 ml LKB electrofocusing column" (verg. Fig. 2.), grotendeels van glas gemaakt. In het midden bevindt zich een holle buis die aan de onderkant afgesloten kan worden met een plastic stop. Deze stop is d.m.v. een teflon staaf verbonden met de bovenkant van de kolom, waar met een springveer de stop geopend of gesloten kan worden.

Om het teflon is een van de electrodes, een platina draad gewikkeld. De andere electrode bevindt zich aan de bovenkant van de kolom en bestaat uit een ring van platina draad. Via een capillaire slang, verbonden met de onderkant van de kolom, kan de inhoud, na afloop van experiment d.m.v. zwaartekracht eruit lopen of m.b.v. een zware oplossing via een pomp omhoog gepompt worden. Het koelwater stroomt continue door de watermantels in de richting van de pijlen en zorgt voor een constante temperatuur (bij deze experimenten 5°C).

Het vullen van de kolom:

a). Via opening b, wordt de zware, zure electrolyt oplossing aan-

gebracht. Deze bestaat uit: H_3PO_4 0,8 ml (1% opl.)
 sucrose 48 gr
 H_2O dest. 56 ml

Als het niveau tot 2 cm boven de onderkant van de centrale cylinder reikt(1) wordt de stop gesloten en alleen de binnenkolom verder tot instroomopening b, gevuld.

b). Via opening a, wordt nu de sucrosegradient met Ampholine (pH bereik 5-8 bij schol en 6-9 bij bot) aangebracht m.b.v. een gradient mixer (type: LKB-8122).

Deze bestaat uit twee glazen compartimenten, onderling verbonden aan de onderkant met een slangetje. In het ene compartiment, waar de zware oplossing in gedaan wordt, zit een roerder; in het andere compartiment, dat de lichte oplossing bevat, een conisch perspex element dat zorgt voor de lineaire gradient. De uitstroomopening bevindt zich onderaan het compartiment met roerder.

Samenstelling zware oplossing : Ampholine 7,5 ml
 H_2O dest. 142,5 ml
 sucrose 100 gr

Samenstelling lichte oplossing: Ampholine 2,5 ml
 H_2O dest. 212,5 ml

De uitstroomsnelheid wordt geregeld m.b.v. een klem zodat de kolom in \pm 2 uur gevuld is.

c). Als de sucrose-gradient- oplossing tot halverwege de kolom reikt, wordt het bloedmonster (gewassen, gehemolyseerd, gestripped, geconcentreerd) aan de zware oplossing toegevoegd. De kolom wordt verder gevuld tot ongeveer 2 cm onder de kathode.

d). Nu wordt via opening a, de lichte electrolyt oplossing voorzichtig toegevoegd. : ethyleendianine 0,8 ml en aqua dest 40 ml (tot \pm 3 cm boven de kathode). Daarna wordt de stop weer naar beneden gezet zodat er een vrije verdinding is tussen binnen- en buitenkolom.

Het electrofocusing proces is identiek aan dat bij de micro-electrofocusing (beginspanning 400 V gedurende 10 to 12 uur; dan opgevoerd tot 800 V gedurende \pm 40 uur) De kolom wordt gefotografeerd en getekend, de spanning afgezet, en de stop gesloten. Met behulp van een zware suikeroplossing (50%) wordt via een pomp (90 ml/uur) de inhoud van de kolom naar boven geduwd waar hij bij a via een capillaire slang de kolom verlaat. De vloeistof wordt nu door een U.V. absorptiometer (LKB Uvicord II, 280 mm) geleid, die verbonden is met een Servogor RE511 compensatie schrijver, en daarna opgevangen in een fractieverzamelaar (BTL Chromafrac). De pH van elk van de fracties wordt gemeten. De fracties worden gedialyseerd en geconcentreerd volgens de methode beschreven in punt 2.2.3. en bij -35°C bewaard. Alle electrofocusing experimenten, pH- en absorptiemetingen werden gedaan in een koelkamer waar de temperatuur constant op 5 á 6°C gehouden werd.

2.2.5. Het moten van de O_2 -bindings curven

Zuurstofbindingscurven, die het verband tussen partiele O_2 -druk en O_2 -verzadiging van het Hb weergeven, worden bepaald m.b.v. de "zuurstofdiffusiekamer". Deze is gemodificeerd naar NIESEL & THEWS (1961). Het principe berust hierop dat een kleine afgesloten ruimte achtereenvolgens met O_2 , N_2 en mengsels O_2/N_2 gevuld kan worden. Deze gassen staan onder druk en kunnen bij het openen van de kraan alleen via de diffusiekamer een uitweg vinden, door het diffusie-

capillair, zodat deze kamer vrijwel direct geheel gevuld is met het betreffende gas. Het diffusiegas daarentegen, vult de kamer niet door drukverschil maar door concentratieverschil want het stroomt door een buisje dat in open verbinding met de lucht staat.

Loodrecht op dit buisje is een capillair buisje aangebracht, dat uitmondt in de diffusiekamer. Zijn nu alle andere gassen afgesloten, dan diffundeert het diffusiegas (ook een N_2/O_2 mengsel) de kamer binnen. Als de kamer net tevoren met N_2 gevuld was, toont nu de O_2 -toename een rechte lijnig verband met de tijd. Dit verband tussen partiele O_2 -druk en tijd wijkt niet meer dan 1% af van een lineair verband mits de PO_2 van het diffusie-gas 20 á 30 x zo groot is als de P_{50} van het Hb (NIESEL & THEWS 1961; SICK & GERSONDE 1969).

Van een bloedmonster wordt een uitstrijkje (bij lage Hb-concentratie een laagje) op een objectglaasje aangebracht. Dit wordt in de O_2 -diffusiekamer geschoven en de kamer, wordt m.b.v. O-ringen afgesloten van de buitenlucht. Het objectglaasje vormt nu de bodem van de kamer en hierdoorheen valt de monochromatische lichtstraal van de fotometer (Eppendorf 1101 fotometer met kwiklamp en filter van 436 nm).

Achtereenvolgens worden O_2 (voor oxygenatie) en N_2 (voor deoxygenatie) over het monster geleid. Na het N_2 gas, het diffusie-gas (160 mm pO_2 of 94,6 mm pO_2) waardoor langzame oxygenatie plaats vindt. Ijkgassen (1,98 ; 4,48 ; 14,9 ; 30,4 ; 49,2 mm pO_2) worden gebruikt om de P_{50} te bepalen.

De Ijkgassen werden geijkt m.b.v. microgasanalysator (SCHOLANDER, 1947) met een afwijking van minder dan 1%.

Zuurstofbinding door het Hb wordt m.b.v. een fotoreceptorcel gemeten als verandering van de lichtabsorptie door het bloed en weergegeven als extinctieverandering.

Via een elektronische transmissie - extinctie - omvormer wordt deze extinctieverandering gelinealiseerd weergegeven op een Servogor RE511 compensatieschrijver. (Zie Fig. 3 voor een schematische weergave van een registratie).

Ijkgassen I en II worden zogekozen dat zij aan weerszijde van de P_{50} liggen en zo dicht mogelijk ernaast. N_2 gas borrelt eerst door Fiesser's oplossing om sporen O_2 te verwijderen en de diffusie - en ijkgassen eerst door 6n KOH oplossingen om CO_2 verontreiniging te verwijderen. Alle gassen worden door gaswasflessen met aqua dest. geleid om ze met waterdamp te verzadigen.

Langs meetkundige weg kan nu de P_{50} bepaald worden en deze grootte dient bij alle metingen als parameter voor O_2 affiniteit.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1. Zuurstofbindende eigenschappen van het bloed

3.1.1. Inleidende vergelijkende metingen

Om na te gaan of de invloed van het wassen en hemolysen van het bloed bij bot en schol overeenkomt, zijn een aantal inleidende metingen gedaan aan enkele afzonderlijke vissen. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel I.

3.1.1.1. Metingen aan bloed direct na bemonstering (Tabel I)

Het bloed van schol en bot werd steeds direct uit de vis in twee gehepariniseerde buisjes (capillairtjes) opgevangen met zo weinig mogelijk contact met de atmosferische lucht. Een buisje werd gebruikt voor de pH-meting ; een half buisje voor Hb-concentratiebepaling en een half buisje voor het meten van de P_{50} . pH en P_{50} werden steeds bij $15^{\circ}C$ gemeten.

Bij schol en bot van ongeveer 23 cm lengte blijkt de Hb-concen-

tratie bij bot ongeveer 30% hoger te zijn dan bij schol. Dit komt overeen met wat VON BUDDENBROCK reeds in 1934 vond. De pH van het bloed ligt bij bot gemiddeld iets hoger dan bij schol (Bot: 7,56; Schol: 7,44) en de P_{50} aanmerkelijk hoger (Bot: 7,32 mm Hg; Schol: 5,37 mm Hg). In het algemeen gaat een verlaging van de pH gepaard met een verhoging van de P_{50} , zodat na pH-correctie het verschil in P_{50} tussen schol en bot nog groter zal zijn.

3.1.1.2. Metingen aan gewassen erythrocyten (Tabel I)

Het bloed van de onder punt 3.1.1.1. genoemde vissen werd 3 x gewassen met NaCl in fosfaatbuffer (pH 7,6 bij 15°C). De ionensterkte van de buffer was 0,05, aangevuld met NaCl tot $I_{\text{totaal}} = 0,15$.

Hoewel de Hb-concentraties bij schol en bot sterk verschilden bij dit experiment blijkt toch duidelijk dat het wassen (verwijderen van het bloedplasma) een grotere invloed heeft op de P_{50} bij schol dan op de P_{50} bij bot (bij gelijke pH). In beide gevallen is de P_{50} verhoogd. In het bloedplasma van schol en bot in mindere mate) moeten dus factoren aanwezig zijn die een positieve invloed hebben op de O_2 -affiniteit van het Hb in de erythrocyten.

3.1.1.3. Metingen aan Hb in oplossing (Tabel I)

Mengmonsters van de onder punten 3.1.1.1. en 3.1.1.2. genoemde schollen en botten werden gehemolyseerd zoals in punt 2.2.2. beschreven staat. De ionensterkte was 0,15.

Zowel bij schol als bot veroorzaakt hemolyse een verlaging van de P_{50} . Bij schol echter is de P_{50} nog beduidend hoger dan bij het niet gehemolyseerde en ongewassen bloed. Dit pleit voor de grotere aanwezigheid (of grotere invloed) van plasmafactoren.

3.1.2. Invloed van de pH : Bohr effect (Tabel II en III; Fig.4)

Bloed van schol en bot werd na uitwassen met NaCl (I = 0,15) geconcentreerd en in gelijke volumina gemengd met elk van de volgende Tris-buffers (I = 0,15) (Biochemists Handbook)

a	150 ml	1m HCl+	160,6 ml	1M Tris	→ pH	7,22	bij 15°C
b	"	"	+ 166,7	"	→ "	7,37	"
c	"	"	+ 176,7	"	→ "	7,53	"
d	"	"	+ 192,3	"	→ "	7,74	"
e	"	"	+ 217,0	"	→ "	7,84	"
f	"	"	+ 255,5	"	→ "	8,23	"

Als waarde van het Bohr effect bij schol erythrocyten is gevonden : -0,64 en bij bot erythrocyten : -0,53. De door de pH geïnduceerde zuurstof afgifte in de weefsels zal dus in schol groter zijn dan in bot. Andere vissen hebben een Bohr effect vergelijkbaar met bot (forel : -0,53 ; afr. longvis : -0,47) makreel echter blijkt een Bohr effect van -1,2 te hebben (PROSSER & BROWN, 1962) wat voordelig is voor actieve dieren.

De resultaten van de metingen aan de intacte erythrocyten van schol en bot staan vermeld in Table II; die aan Hb in oplossing in Tabel III. Zoals duidelijk blijkt uit Tabel II en III is het Bohr-effect van Hb in de erythrocyten van bot vier maal bepaald en van Hb in oplossing twee maal. Zoveel mogelijk is getracht de behandeling en omstandigheden te standaardiseren en achteraf was niet meer na te gaan waardoor de grote onderlinge verschillen veroorzaakt werden. In Tabel VI staan de waardes van de afzonderlijk berekende regressielijnen en ook die van de gecombineerde gegevens van de vier plus twee Bohr-effect bepalingen aan bot. De richtingscoëfficiënten van de berekende lijnen verschillen onderling zeer sterk, hoewel de richtingscoëfficiënt van de gecombineerde gegevens praktisch gelijk is aan die van bot I. Deze bepaling werd onder de meest vergelijkbare.

omstandigheden met de Bohr effect bepaling van schol gedaan. Benzelfde argumentatie geldt voor de gecombineerde gegevens van bot I en II in Tabel III, zodat alleen deze regressielijnen in Fig. 4 zijn weergegeven. In deze grafiek blijkt, behalve het kleine verschil in Bohr-effecten tussen schol en bot, wel duidelijk dat hemolyse een verlaging van de P_{50} over het hele pH gebied veroorzaakt. De pH gevoeligheid van Hb in oplossing werd bepaald om de eigenschappen van de afzonderlijke Hb-componenten hiermee te kunnen vergelijken. Deze componenten kunnen uiteraard alleen van elkaar gescheiden worden als het bloed gehemolyseerd is.

Voor bot II is nagegaan of hemolyse ook invloed heeft op de subéénheid interactie welke wordt weergegeven in Tabel II en III als de n-waardes. Bij het gehemolyseerde bloed ligt de n-waarde gemiddeld iets hoger dan bij de erythrocyten.

3.1.3. Invloed van de temperatuur : temperatuur effect (Tabel IV en V; Fig. 5)

Het bloed van schol en bot werd gewassen met NaCl in fosfaatbuffer (pH 7,53 bij 15°C ; I = 0,15).

De resultaten van de metingen staan vermeld in Tabel IV (erythrocyten) en Tabel V (voor Hb in oplossing). De richtingscoëfficiënten van de berekende regressielijnen, die nu maat zijn voor de grootte van het temperatuur effect, vertonen onderling geen grote verschillen. Het temp effect bij schol is iets kleiner dan bij bot zowel van erythrocyten als Hb in oplossing. Wel liggen over het hele temperatuurbereik de P_{50} waardes van schol hoger dan van bot. Vergelijkend met punten 3.1.1.1. en 3.1.1.2. ziet het er naar uit dat we deze hoge P_{50} waardes kunnen toeschrijven aan het wassen waardoor het plasma verwijderd is. Redelijkerwijs mogen we aannemen dat de P_{50}

waardes binnen het gemeten temperatuurgebied allemaal beduidend lager zonder liggen als deze metingen waren verricht aan ongewassen erythrocyten (natief bloed). De dan berekende regressielijn zou waarschijnlijk niet significant afwijken van de andere drie regressielijnen (Fig. 5).

3.2. Hb heterogeniteit op grond van isoelectrisch punt

Zoals reeds in de inleiding vermeld staat worden globinecomponenten van het haemoglobine door een aantal eigenschappen gekarakteriseerd. Hier zijn gekozen : 1^e. het isoelectrisch punt (i.e.p.) op grond waarvan de Hb-componenten van elkaar gescheiden zijn en 2^e. de O₂-affiniteit, om eventuele functionele verschillen tussen de Hb-componenten aan te tonen.

3.2.1. Inleidende beschrijvende experimenten

3.2.1.1. Het aantal Hb-componenten en hun isoelectrische punten

Volgens de methode, beschreven onder punt 2.2.4.1. werd het bloed van zeven schollen en twee botten afzonderlijk onderzocht. De lengte van de schollen varieerde van 16-21 cm, Hb-concentratie 4,7 g/100 ml, pH 7,45 ; de botten waren 16 en 23 cm lang, Hb-concentratie 6,0 g/100 ml, pH 7,53. Het bloed van elke vis afzonderlijk werd 3 x gewassen met NaCl (0,9%), gehemolyseerd, en de Hb-concentratie op 6,7 g/100 ml. gebracht. Voor de microelectrofocusing werd 1% Ampholine gebruikt met een pH-bereik van 5-8. Na het beëindigen van het experiment vertoonde schol een Hb-patroon waarin 10-16 verschillende componenten te onderscheiden waren (zie Fig. 6) terwijl het er bij bot slechts 8-10 waren. Bij het bepalen van de isoelectrische punten blijken de bovenste en onderste Hb-componenten van schol wel met elkaar overeen te komen maar de daartussen

liggende banden varieerden in aantal en overlaptten elkaar. Een poging om de Hb-componenten van de zeven schollen te correleren levert het volgende resultaat:

Hb-comp.	i.e.p.	bij	pH:
10 (11-16)	7,0	-	7,1
9 (10-15)	6,8	-	7,0
6-8 (6-14)	6,25	-	6,9
5	6,2	-	6,3
4	6,1	-	6,2
3	5,95	-	6,1
2	5,75	-	5,9
1	5,55	-	5,65

De resultaten van één experiment zijn weergegeven in Figuur 6.

De Hb-componenten van de twee botten kwamen niet goed met elkaar overeen: i.e.p. van de meest zure Hb-component bevond zich in beide gevallen bij pH 6,12 , en van de meest basische Hb-component in beide gevallen bij pH 9,35. Het pH gebied van schol ligt tussen pH 5,5 en pH 7,2. Hierin verschillen bot en schol duidelijk van elkaar maar welke biologische betekenis hieraan gekoppeld moet worden is tot dusver onbekend. Rekening houdende met het feit dat de pH in het bloed en dus ook in de erythrocyten bij schol $\pm 7,4$ en bij bot $\pm 7,6$ is kunnen we wel concluderen dat de globines bij schol allemaal positief gelaten zullen zijn (alle i.e.p. bij $\text{pH} < 7,4$) en bij bot gedeeltelijk positief en gedeeltelijk negatief geladen (i.e.p. bij $\text{pH} < 7,6$ en $\text{pH} > 7,6$). Ook met deze kennis blijft de invloed op de O_2 -affiniteit een duistere zaak.

De grote onderlinge verschillen in Hb-patronen binnen de soorten zou een leeftijdsverschijnsel kunnen zijn. Om dit te onderzoeken zouden veel meer microelectrofocusing experimenten gedaan moeten worden met individuen van een aantal verschillende jaarklassen. Voor sommige vissen is bekend dat het Hb-patroon karakteristiek is

voor de subsoort en in ieder geval genetisch bepaald. Van de haring is reeds bekend dat het Hb-patroon met de leeftijd verschuift (EVERAARTS, ongepubliceerd).

3.2.1.2. De quantitative verhouding tussen de Hb-componenten

Met behulp van de "LKB" electrofocusing methode van HAGLUND (1967) werden de Hb-componenten van elkaar gescheiden. Het bloed van bot, gebruikt voor het eerste experiment (zie Fig. 7 en 8) was een mengmonster (\pm 5 ml ; Hb-concentratie 10,0 g/100 ml) van zeven vissen variërend in lengte van 22-24 cm. Het pH bereik van Ampholine was 6-10.

Zowel de foto als de Uvicord-registratie toont elf duidelijke Hb-componenten met i.e.p. variërend van pH 6,67 tot pH 8,55. De middelste componenten (i.e.p. bij pH 7,0 - 8,0) vertonen de grootste absorptie (Fig. 8).

Met bloed van schol werden overeenkomstige experimenten gedaan en de resultaten van één van deze experimenten staan vermeld in Fig. 9. Het bloedmonster werd verzameld uit 13 vissen in lengte variërend van 19-24 cm. Het pH bereik van de gebruikte Ampholine was 5-8. Het aantal duidelijk gescheiden componenten ligt bij schol lager dan bij bot (slechts 8 à 9) maar naar aanleiding van de resultaten bij microelectrofocusing mag aangenomen worden dat verdere scheiding mogelijk is. De isoelectrische punten van de Hb-componenten variëren van pH 5,8 tot 7,5 bij 15°C en van pH 6,05 tot 7,6 bij 5°C. De componenten met de grootste Hb-concentraties liggen tussen pH 6,5 en pH 7,0.

3.2.2. O₂-affiniteit van de Hb-componenten

Eigenlijk zou nu een alinea moeten volgen waarin de verschillende Hb-componenten van schol en bot die met elkaar overeenkomen wat i.e.p. betreft (zie Fig. 8 en 9) onderling vergeleken werden. De O₂-affiniteiten (P₅₀) zouden gemeten moeten zijn onder gelijke omstandigheden van pH, Hb-concentratie en temperatuur. Helaas ontbreken deze gegevens met name van bot op een paar zeer onbetrouwbare resultaten na. De oorzaak hiervan is geweest de slechte kwaliteit van de monsters en de toen nog in een primitief stadium verkerende methode om te concentreren. Het enige wat geconcludeerd mag worden uit Fig. 8 en 9 is dat er een viertal Hb-componenten van schol, wat i.e.p. betreft, overeenkomt met 4 Hb-componenten van bot:

	Schol		Bot
Comp.	i.e.p.	Comp.	i.e.p.
0	7,50	VI	7,50
I	7,25	IX	7,25
II	7,02	X	7,05
III	6,76	XI	6,81

Van schol zijn uitgebreide experimenten gedaan met betrekking tot Bohr-effect en temperatuur-effect van een aantal verschillende Hb-componenten en deze worden in de volgende twee punten besproken.

3.2.2.1. Bohr-effect van een aantal Hb-componenten van schol

(Tabel VII, Fig. 10)

Van de componenten II t/m VII uit Fig. 9 zijn Bohr-effecten bepaald. Hiertoe werden de fracties gestript over Sephadex G-25 fine kolom 60 cm lang en ϕ 5 cm om Ampholine en sucrose te verwijderen en geconcentreerd tot 3,3 g Hb/100 ml bloed, volgens de methode beschreven in punt 2.2.3. De dialyse-buffer bestond uit NaCl(0,3%)

en fosfaatbuffer (pH 7,04 , I = 0,05) in de verhouding 1 op 1. Na het concentreren werden de fracties in gelijke volumina gemengd met fosfaatbuffer (I = 0,15) waardoor $I_{\text{totaal}} = 0,10$ en Hb-concentratie $\pm 8\%$ lo_v = $\pm 1,2$ g/100 ml. De pH van de fosfaatbuffers was bij 15°C : 7,01 7,22 7,42 7,60 en 7,83.

De resultaten zijn weergegeven in Tabel VII en Fig. 10. De gegevens van de berekende regressielijnen staan vermeld in Tabel IX.

De richtingscoëfficiënten, die maat zijn voor de grootte van het Bohr effect variëren van -1,26 tot -1,43. Met variantie analyse kan geen significant verschil aangetoond worden tussen de lijnen onderling, rekening houdend met de foutenmarge. De Bohr-effect indices van de afzonderlijke Hb-komponenten zijn wel veel groter dan de Bohr-effect index van de gekombineerde Hb-komponenten na hemolyse (r.c. -0,78 zie Fig. 4). Als wij de invloed van de verschillende buffers en het iets verschoven pH gebied mogen verwaarlozen dan blijkt uit Fig. 4 en Fig. 10 dat de gecombineerde componenten minder pH gevoelig zijn wat betreft O₂-affiniteit dan de componenten afzonderlijk. Dit zou een grotere tolerantie t.a.v. het milieu bewerkstelligen. Het is moeilijk hier verdere conclusies uit te trekken over de biologische betekenis van Hb-heterogeniteit.

3.2.2.2. Temperatureffecten van een aantal Hb-komponenten van Schol (Tabel VIII, Fig. 11)

Van de componenten II IV V VI en VII uit Fig. 9 zijn temperatureffecten bepaald. Zie voor behandeling monsters punt 3.2.2.1. en punt 2.2.3. De componenten werden vervolgens gedialyseerd tegen Trisbuffer (pH 7,20 I = 0,20) en de Hb-concentratie bij alle metingen was 7,3 g/100 ml. De resultaten zijn weergegeven in Tabel VIII en Fig. 11. De gegevens van de berekende regressielijnen staan vermeld

in Tabel IX.

De richtingscoëfficiënten, die hier een maat zijn voor de grootte van het temperatuur-effect, variëren van $-3,17$ tot $-3,75$. Rekening houdend met de foutenmarge kan, evenmin als voor de Bohr-effecten (punt 3.2.2.1.), statistisch een significant-verschil tussen de regressielijnen onderling aangetoond worden. Wel blijkt dat de temperatuur-effecten van de afzonderlijke Hb-componenten niet afwijken van het temperatuur-effect van de gecombineerde componenten na hemolyse. (r.c. = $-3,62$ verg. Fig. 5).

4. CONCLUSIE

De zuurstofaffiniteit van natief bloed is voor schol aanmerkelijk hoger dan voor bot. Na correctie tot gelijke pH wordt dit verschil in zuurstofaffiniteit nog groter. Hierbij vergeleken heeft schol ongeveer 30% minder Hb per ml bloed en is de totale hoeveelheid bloed slechts de helft van de totale hoeveelheid in bot van dezelfde grootte. Hieruit kan geconcludeerd worden dat bloed van bot een potentieel grotere O_2 -capaciteit bezit dan schol.

Het verwijderen van het plasma door wassen met NaCl veroorzaakt bij schol een veel sterkere verlaging van de zuurstofaffiniteit dan bij bot. Dit kan een gevolg zijn van een verschillende mate van verstoring van de ionenverhouding tussen erythrocyten en plasma door het NaCl.

Hemolyse van de gewassen erythrocyten verhoogt de zuurstofaffiniteit zowel voor schol als voor bot. Dit komt door een verdunningseffect van het Hb zowel als van intracellulaire factoren zoals organische fosfaten. Bij schol blijft echter de zuurstofaffiniteit lager dan die van natief bloed.

GILLEN & RIGGS (1970) vonden een hoge ATP-concentratie in

erythrocyten en dit ATP heeft een remmende invloed op de zuurstofaffiniteit. Of de ATP-concentraties bij schol en bot overeenkomen is niet onderzocht.

De Bohr-effect index bedraagt bij schol $-0,64$ voor erythrocyten en $-0,78$ voor Hb in oplossing ; deze waarden liggen voor bot bij $-0,53$ (erythrocyten) en $-0,45$ (Hb in oplossing). Door EDDY & HUGHES, (1970) werd het Bohr-effect van Salmo Giardneri (erythrocyten) bepaald : $-0,53$. Ook andere vissen vertonen een dergelijk Bohr-effect. Makreel heeft de hoogste Bohr-effect index : $-1,2$ (PROSSER, 1962). FRIEDRICH (1934) onderzocht het CO_2 effect en vond vrij grote verschillen tussen schol en bot. Door ontbreken van de pH-waardes was het niet mogelijk uit deze gegevens met mijn resultaten vergelijkbare waardes te berekenen. Ook bij temperatuur-effect metingen werd een grotere discrepantie verwacht tussen schol en bot dan wat uit mij resultaten blijkt. FRIEDRICH (1934) vond een veel groter temperatuur-effect voor schol dan voor bot.

Hb-heterogeniteit en Hb-polymorfisme komen bij vissen, evenals reptielen en amphibien zeer algemeen voor ; bij vogels en zoogdieren veel minder (DE LIGNY, 1972; RIGGS, 1970). Het Hb-patroon kan veranderen met de leeftijd. WILKINS & ILES (1966) hebben een dergelijke ontogenie aangetoond bij haring en sprot. Hb-polymorfisme is electroforetisch aangetoond bij twee soorten schol: Verasper varregatus en Karieus bicoloratus (RIGGS, 1970). De eerste bevatte drie, de tweede vijf verschillende Hb-componenten terwijl ze één gemeenschappelijk hadden. SICK e.a. (1963) vergeleek Hb-patronen van schol, bot en hun bastaard (schol 4 componenten, bot 4 componenten, bastaard 7 componenten) VON BUDDENBROCK (1967) suggereert dat de afzonderlijke componenten verschillende fysiologische betekenis zouden hebben. Volgens LOVE (1970) is het niet zeker of de verschillende componenten

ook verschillende haemoglobines zijn. WILKINS & ILES (1966) beweren dat heterogeniteit alleen veroorzaakt wordt door verscheidene recombinaties van peptide ketens. Uit mijn resultaten blijkt dat zowel schol als bot elk minstens 10 afzonderlijke Hb-componenten bezitten. De meest zure component was enigzins geoxideerd (bruin van kleur). De isoelectrische punten van de componenten liggen bij schol in een veel lager pH-gebied (5,8-7,5) dan bij bot (6,67-8,55).

De Bohr-effect index van zes Hb-componenten van schol varieert in grootte van -1,2 to -1,5. Dit zijn aanzienlijk grotere Bohr-effecten dan die van het Hb in oplossing (-0,78). SICK & GERSONDE (1969) vonden dat het Bohr-effect van Hb-componenten van Chironomus Thummi even groot waren; de zuurstofaffiniteit bij gelijke omstandigheden van temperatuur en pH verschillen echter. Een verschil in zuurstofaffiniteit (P_{50}) tussen de Hb-componenten (bij gelijke pH en temperatuur) zou van belang kunnen zijn onder verschillende pO_2 omstandigheden. De Hb-componenten kunnen dan de zuurstofbindende taak van elkaar overnemen. Misschien zijn de hier gevonden kleine verschillen tussen zuurstofaffiniteit van Hb-componenten van schol toch voldoende om deze functie compenserend uit te oefenen. Misschien zal blijken dat bot beter aangepast is aan wisselende omstandigheden door grotere onderlinge functionele verschillen. Dit laatste is echter niet onderzocht. HASHIMOTO e.a. (1960) onderzochten het Bohr-effect en temperatuur-effect van twee electroforetisch afzonderlijke Hb-componenten van de zalm (Onchorynchus keta). De Bohr-effect index van één component bedroeg -1,25 terwijl die van de andere 0,0 was. Het temperatuur-effect van eerstgenoemde was ook veel groter dan van de laatste.

De temperatuur-effecten van de Hb-componenten van schol komen vrijwel met elkaar overeen (Fig. 11) en wijken niet significant af van

het temperatuur-effect van Hb in oplossing.

De sterke differentiatie van de haemoglobines bij deze (en andere vissen pleit voor het bestaan van verschillen in functionele eigenschappen. De primitieve coelacanth, Latimeria chalumnae vertoont deze sterke differentiatie op grond van isoelectrisch punt niet (WEBER, 1973). Deze differentiatie zou in de loop van de evolutie ontstaan kunnen zijn als secundaire aanpassing nadat de opbouw van de haemoglobine moleculen in toenemende mate gelijk werd onder vertebraten: 4 ketens met moleculair gewicht van 17000 en met elk een haem-groep.

5. LITERATUUR

- ANTONINI, E., J. WYMAN JR., A. ROSSI-FANELLI & A. CAPUTO, 1962. Studies on the relations between molecular and functional properties of haemoglobin III. The influence of salts on the Bohr-effect in human haemoglobin. J. Biol. Chem. 237 (9): 2773-2777.
- BENESCH, R. & R.E. BENESCH, 1969. Interaction of red cell organic phosphates with haemoglobin. Försvavsmedicin 1969 volume 5 : Symposium on intracellular regulation of haemoglobin affinity to oxygen.
- BERMAN, M., R. BENESCH & R.E. BENESCH, 1971. The removal of organic phosphates from haemoglobin. Arch. Biochem. Biophys. 145 (1) : 236-239
- BUDDENBROCK, W. VON, 1967. Vergleichendes Physiologie Band VI pp. 22-32.
- BUDDENBROCK, W. VON, W.J. HENSCHEL & H. FRIEDRICH, 1934. Die morfologischen Beschaffenheit des Blutes der Nord-, Belt-, und Ostseescholle. Wiss. Meeresunt. Abt. Kiel Bd. 22: 1-20
- CAMERON, J.N., 1970. Oxygen dissociation characteristics of the blood of the rainbow trout, Salmo giardneri. Comp. Biochem. Physiol. 1971, 38A : 699-704.
- EDDY, F.B. & G.M. HUGHES, 1970. Oxygen dissociation curves of the blood of the rainbow trout, Salmo giardneri. Proc. Physiol. Soc. 1970 J.Physiol. 213 : 71-72.
- EDDY, F.B., 1971. Blood gas relationships in the rainbow trout, Salmo giardneri. J. Exp. Biol. 1971, 55 : 695-711.
- EVERAARTS, J.M., 1973. ongepubliceerde data. Ned. Instituut voor Onderzoek der Zee, Texel.
- FRIEDRICH, H., 1935. Die Blutgase von Pleuronectes flesus und Pleuronectes platessa. Wiss. Meeresunt. Abt. Kiel Bd. 22 : 44-52.
- GIARDINA, B., E. ANTONINI & M. BRUNORI, 1973. Haemoglobins in fishes; structural and functional properties of trout haemoglobins. Neth. J. Sea Res. 1973, 7 : 339-344
- GILLEN, R.G., & A. RIGGS, 1970. The haemoglobins of a fresh-water teleost, Cichlasoma cyanoguttatum (Baird & Girard) - I. The effects of fosforylated organic compounds upon the oxygen equilibria. Comp. Biochem. Physiol. 1971, 38 B : 585-595.
- HAGLUND, H., 1967. Isoelectric focusing in a natural pH gradient -

- a technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins. *Science Tools* 14 No. 2 : 17-22.
- HARDY, SIR A., 1959. The story of the plaice II Fish and fisheries. The open Sea; its natural history. 161-174.
- HARRISON, G.A. 1938. Estimation of haemoglobin in undiluted blood using a Lovibond Comparator, *The Lancet* 235, 621-622.
- HARROW & MAZUR, 1966. Textbook of biochemistry: 450-470, W.B. Saunders Company, Philadelphia - London.
- HASHIMOTO, K., Y. YAMAGUCHI & F. MATSUURA, 1960. Comparative studies on two haemoglobins of Salmon IV Oxygen dissociation curve. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries* 26 No. 8 : 827-834.
- HENSCHEL, J., 1936. Wasserhaushalt und Osmoregulation von Scholle und Flunder. *Wiss. Meeresunt. Abt. Kiel, Bd. 22* : 90-121.
- HUGHES, G.M., 1963. Transport of the respiratory gases. *Comparative physiology of vertebrate respiration*: 94-101.
- KOCH, H.J.A., BERGSTRÖM, BODARWÉ-SCHMITZ & EVANS, 1968. The separation of the haemoglobins of "S. Salar" by means of isoelectrofocusing. *Mededelingen van de koninklijke vlaamse academie voor wetenschappen, letteren en schone kunsten van Belgie* 1968 nr. 20
- KOCH, H.J.A. & J. BACKX, 1969. A miniature electrofocusing method. *Science Tools* 16 (3): 44-47.
- LIGNY, W. DE, 1972. Blood groups and biochemical polymorphisms in fish. XIIth European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism. Dr. W. Junk N.V. Publishers - The Hague.
- LOVE, R. MALCOLM, 1970. The chemical biology of fishes : 129-146; 187-197; 367-368. Academic Press London - New York.
- MANWELL, C., 1960. Comparative physiology : blood pigments *Annual Review Physiol.* 22 : 191-244.
- NIESEL, W. & G. THEWS, 1961. Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlösungen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* Band 273 (4) : 380-395.
- NOBLE, R.W., L.J. PARKHURST & Q.H.GIBSON, 1970. The effect of pH on the reactions of oxygen and carbon monoxide with the haemoglobin of the carp, Cyprinus carpio. *J. Biol. Chem.* 245 (24): 6628-6633.
- PALEUS, S., O. VESTERBERG & G. LILJEGVIST, 1970. The haemoglobins of myxine glutinosa L. I preparation and crystallization.

- Comp. Biochem. Physiol. 1971 (39B) : 551-557.
- PROSSER, C.L. & F.A. BROWN, 1962. Comparative animal physiology. W.B. Saunders, Philadelphia - London.
- RANDALL, D.J., 1970. Gas exchange in Fishes II & III. Fish physiology IV : 270-279; VI : 80-81 Academic Press London - New York.
- RIGGS, A., 1959. The nature and significance of the Bohr-effect in mammalian haemoglobins. J. Gen. Physiol. 43-1.
- , 1970. Properties of fish haemoglobins (Chapter 6). Fish physiology IV 209-253. Academic Press London - New York.
- ROSSI-FANELLI, A. & E. ANTONINI, 1960. Oxygen equilibrium of haemoglobin from Thunnus thynnus. Nature 186 : 895-897.
- SCHMIDT, K. & K.H. HENSER, 1969. Methodischer Beitrag zur aufnahme der Sauerstoff-Dissoziationskurve an einlagigen Erythrozytenschichten. Respiration 26 : 16-34.
- SCHOLANDER, P.F., 1947. Analyzer for accurate estimation of respiratory gases in one half cubic-centimeter samples. J. Biol. Chem. 167 : 235-250.
- SICK, H. & K. GERSONDE, 1968. Die O₂-Bindungseigenschaften einiger Larval-hämoglobine von Chironomus thummi. Eur. J. Biochem J. 1969 : 273-279.
- , 1969. Method for continuous registration of O₂-binding curves of haemoproteins by means of a diffusion chamber. Anal. Biochem. 32 : 362-376.
- SICK, K., 1961. Hemoglobin polymorfism in fishes. Nature 192 : 894-896.
- SICK, K., O. FRYDENBERG & J. TÖNNES NIELSEN, 1963. Hemoglobin patterns of plaice, flounder and their natural and artificial hybrids. Nature 198 : 411-412.
- SVEDBERG, T. & A. HEDENIUS, 1934. The sedimentation constants of the respiratory proteins. Biol. Bull. 66 : 191-223.
- SVENSSON, H., 1961. Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH gradients. I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases. Acta Chem. Scand., 15 : 325-341.
- , 1962. Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes. Acta Chem. Scand. 16 : 456-466.

- , 1962. Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. III. Description of Apparatus for Electrolysis in Columns Stabilized by Density Gradients and direct Determination of Isoelectric Points. Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 132.
- VESTERBERG, O. & H. SVENSSON, 1966. Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. IV. Further Studies on the Resolving Power in Connection with Separation of Myoglobins. Acta Chem. Scand. 20 : 820-834.
- WAEDE, M., 1954. Beobachtungen zur osmotischen, chemischen und thermischen Resistenz der Scholle (Pleuronectes platessa) und Flunder (Pleuronectes flesus). Kieler Meeresforschungen X : 58-67.
- WALD, G. & A. RIGGS, 1951. The haemoglobin of the sea lamprey Petromyzon marinus. J. Gen. Physiol 35 : 45-53.
- WEBER, R.E., 1970. Relations between functional and molecular properties of annelid haemoglobins. Interaction between haems in the haemoglobin of Arenicola marina L. Comp. Biochem. Physiol. 35 : 179-189.
- , 1971. Oxygenational properties of vascular and coelomic haemoglobins from Nephtys hombergii (Polychaeta) and their functional significance. Neth. J. Sea Research. 5 (2) : 240-251.
- WEBER, R.E. & E. PAUFTIT, 1971. Vergelijkende studies over haemoglobinen van mediterrane polychaeten (Napels). Verslag v/d gewone vergadering der afdeling natuurkunde 80 nr. 10. Koninklijke Academie van Wetenschappen, Amsterdam.
- , 1972. Molecular and functional heterogeneity in myoglobin from the polychaete : Arenicola marina L. Arch. Biochem. & Biophys. 148 : 322-324.
- WEBER, R.E., J.F. BOL, K. JOHANSEN & S.C. WOOD, 1973. Physicochemical properties of the hemoglobin of the Coelocanth, Latimeria chalumnae. Arch. Biochem. & Biophys. 154 : 96-105.
- WILKINS, N. & T. ILES, 1966. Haemoglobin polymorphism and its ontogeny in herring (Clupea harengus) and sprat (Sprattus sprattus). Comp. Biochem. Physiol. 17, 1141.

Tabel I

Zuurstofbindende eigenschappen van het bloed. Inleidende vergelijkende metingen

	Natief bloed (15°C.) (bloed direct uit vis)					Gewassen erythrocyten in NaCl in PO ₄ buffer: I=0,15 pH=7,6 bij 15°C				Hb in oplossing (15°C.) I=0,15 (Mengmonster)			
	lengte cm.	Hb-conc. g/100ml.	pH	P ₅₀ mm.Hg	logP ₅₀	Hb-conc. g/100ml.	pH	P ₅₀ mm.Hg	logP ₅₀	Hb-conc. g/100ml.	pH	P ₅₀ mm.Hg	logP ₅₀
Schol													
1	25,0	5,0	7,35										
2	23,5	5,0	7,44	5,71	0,756	5,0	7,35	12,1 11,7	1,082 1,068				
3	22,5	5,0	7,45	4,52 4,49	0,654 0,652	5,0	7,40	12,6 13,8	1,100 1,140				
4	24,0	5,0	7,53	5,95 6,19	0,774 0,791	5,0	7,47	19,5 18,5 17,8	1,255 1,267 1,290				
gem.	23,5	5,0	7,44	<u>5,37</u>	0,725	5,0	7,41	<u>14,6</u>	1,155	5,0	7,67	<u>7,18</u>	0,856
Bot													
1	22,5	6,9	7,58	8,25 7,70	0,916 0,886	10,0	7,46	9,10 8,75	0,958 0,942				
2	24,5	5,0	7,58	6,68 6,34	0,824 0,802	9,7	7,44	11,9 12,3	1,075 1,090				
3	22,0	6,9	7,51	7,06 7,80	0,848 0,891	10,0	7,31	9,74 9,60 9,40 8,55	0,988 0,983 0,973 0,932				
gem.	23,0	6,3	7,56	<u>7,32</u>	0,861	9,9	7,40	<u>10,11</u>	1,003	6,0	7,64	<u>4,15</u>	0,618

Tabel II

Invloed van de pH op de O₂-affiniteit van het Hb in de erythrocyten (mengmonsters). Bloed 3x gewassen met NaCl, 0,9% (I=0,15), gemengd met trisbuffers (I=0,15). pH van de trisbuffers bij 15°C: 6,79; 7,22; 7,37; 7,53; 7,77; 7,84; 8,24. Zie Fig. 4.

Soort	Aantal + lengte	Hb-conc. g/100 ml.	pH	P50 mm. Hg	log P50	n-waarde
Schol	15 19-25cm.	3,7	7,23	22,9	1,3600	
				18,0	1,2553	
				17,3	1,2380	
				21,4	1,3306	
			7,37	18,0	1,2553	
				17,1	1,2332	
				19,2	1,2835	
				17,8	1,2507	
			7,485	19,9	1,2990	
				19,9	1,2990	
				17,6	1,2457	
			7,745	9,30	0,9683	
9,60	0,9822					
7,805	8,75	0,9420				
	8,40	0,9241				
Bot I	5 22-24cm.	3,7	7,19	18,1	1,2553	
				16,6	1,2202	
			7,40	14,3	1,1554	
				14,1	1,1492	
				13,6	1,1335	
				13,4	1,1271	
			7,49	13,4	1,1271	
				13,2	1,1206	
				12,3	1,0900	
			7,72	10,2	1,0043	
				10,5	1,0108	
			7,82	7,86	0,8954	
8,18	0,9127					
Bot II	7 22-24cm.	6,0	7,35	8,21	0,914	1,53
			7,64	5,83	0,766	1,55
			7,92	5,36	0,792	1,38
			8,07	4,90	0,690	1,65

Tabel II (vervolg)

Soort	Aantal + lengte	Hb-conc. g/100 ml.	pH	P50 mm. Hg	log P50
		10,0	7,144	21,9	1,34
				21,2	1,33
Bot III	3 18-21cm.	11,7	7,32	21,7	1,34
		10,7	7,41	12,0	1,08
				12,2	1,09
		8,7	7,56	15,0	1,18
				13,3	1,12
		11,7	7,85	12,3	1,09
				12,2	1,09
				11,5	1,06
		11,7	8,23	6,3	0,76
				7,6	0,82
Bot IV	8 19-23cm.	7,5	7,25	36,5	1,563
			7,44	20,0	1,307
			7,72	10,8	1,034

Tabel III

Invloed van de pH op de O₂-affiniteit van Hb in oplossing
(mengmonsters). Zie Fig. 4.

Soort	Aantal + lengte	Hb-conc. g/100 ml.	pH	P50 mm. Hg	log P50	n-waarde
Schol	15 19-25cm.	3,7	7,26	11,6	1,064	
				11,5	1,060	
		3,7	7,35	10,0	1,000	
				10,2	1,008	
				10,1	1,004	
				10,0	1,000	
		3,7	7,46	7,74	0,888	
				7,83	0,894	
				7,60	0,880	
				7,51	0,875	
		3,7	7,74	5,58	0,746	
				5,43	0,734	
				5,42	0,734	
				5,41	0,733	
		4,0	7,79	4,03	0,605	
4,10	0,612					
4,06	0,608					
4,04	0,608					
Bot I	5 22-24cm.	3,7	7,19	7,77	0,890	
				7,73	0,888	
				8,13	0,910	
				8,06	0,906	
		4,0	7,33	6,85	0,835	
				6,92	0,839	
				7,07	0,849	
				7,24	0,859	
		4,0	7,47	6,40	0,806	
				6,53	0,814	
				6,15	0,788	
		3,7	7,73	4,55	0,657	
				4,35	0,638	
				4,46	0,649	
				4,47	0,650	
3,7	7,82	4,11	0,613			
		4,12	0,614			
		4,23	0,626			
		4,16	0,618			
Bot II	7 22-24cm.	6,0	7,35	6,93	0,841	1,62
			7,64	4,10	0,613	1,46
			7,92	3,87	0,588	1,95
			8,07	3,58	0,554	2,27

Tabel IV

Invloed van de temperatuur op de O_2 -affiniteit van het Hb in de erythrocyten (mengmonsters). Zie Fig. 5. Bloed 3 x gewassen met NaCl in PO_4 -buffer. $I_{buffer}=0,05$; $I_{totaal}=0,15$; pH(NaCl in PO_4 -buffer) = 7,53 bij $15^\circ C$.

Soort	Aantal + lengte	Hb-conc. g/100 ml. +pH	Temp. (in $^\circ C$)	$T_{abs.}$	$\frac{1}{T} \times 10^{-3}$	P50	logP50
Schol	3 22,5-24 cm.	5,0 7,46	5,5	278,5	3,590	6,63 7,03	0,8215 0,8470
			11,7	284,7	3,512	12,0 12,1 12,4	1,0792 1,0828 1,0934
			14,5	287,5	3,478	19,0 18,8	1,2788 1,2742
			18,2	291,2	3,434	21,8 24,7 26,4	1,3385 1,3927 1,4216
			24,1	297,1	3,365	32,6 32,3	1,5132 1,5092
			5,0	278,0	3,597	3,48 3,51 3,38	0,5416 0,5453 0,5289
			11,5	284,5	3,515	5,31 5,43	0,7251 0,7348
			17,7	290,7	3,439	10,6 11,2	1,0253 1,0492
			22,0	295,0	3,390	17,1 16,2	1,2330 1,2095
			Bot	5 21-23,5 cm.	5,0 7,51		

Tabel V

Invloed van de temperatuur op de O₂-affiniteit van Hb in oplossing.
(mengmonsters). Zie Fig. 5).

Soort	Aantal + lengte	Hb-conc. g/100 ml. +pH	Temp. (in °C)	T _{abs.}	$\frac{1}{T} \times 10^{-3}$	P50	log p50
			5,0°C.	278°K.	3,597	2,71	0,4330
						2,71	0,4330
Schol	3	5,0	10,8	283,8	3,523	4,50	0,6532
	22,5-24 cm.	7,67				4,46	0,6493
			14,7	287,7	3,475	5,08	0,7059
						4,90	0,6902
			17,0	290,0	3,448	9,14	0,9610
						9,03	0,9557
			19,6	292,6	3,417	10,1	1,0043
						10,0	1,0000
			22,5	295,5	3,384	15,2	1,1818
						15,0	1,1761
			25,2	298,2	3,353	20,4	1,3096
						19,7	1,2945
						18,5	1,2672
			5,3	278,3	3,593	2,15	0,3324
						2,24	0,3503
Bot	5	5,0	10,7	283,7	3,525	3,73	0,5717
	21-23,5 cm.	7,70				3,74	0,5729
						3,80	0,5798
						3,85	0,5855
			16,9	289,9	3,449	6,32	0,8007
						6,24	0,7952
						6,12	0,7868
			22,0	295,0	3,390	18,1	1,2579
						17,4	1,2406

Tabel VI

Berekening van de regressielijnen ($y = a x + b$) d.w.z. het lineaire verband tussen: pH en log P50 en tussen: $\frac{1}{T} \times 10^3$ en log P50 beide van zowel Hb in de rode bloedlichaampjes als het Hb in oplossing. (verg. Tabel II, III, IV, V, zie Fig. 4 en 5) (r = correlatie coeff. S_{xy} = spreiding in de puntenwolk).

Tabel	Soort	a	b	r	S_{xy}
IV	Schol	-0,64092	5,97473	0,90353	0,06308
IV	Bot I	-0,50224	4,86038	0,97942	0,02097
IV	Bot II	-0,29553	3,06362	0,96017	0,02367
IV	Bot III	-0,44693	4,51833	0,91143	0,07228
IV	Bot IV	-1,11422	9,62455	0,99584	0,01966
IV	Bot I t/m IV gecombineerd	-0,52542	5,05960	0,79082	0,11904
V	Schol	-0,78342	6,75022	0,97970	0,03239
V	Bot I	-0,46209	4,23076	0,99215	0,01414
V	Bot II	-0,37457	3,55004	0,91443	0,04564
V	Bot I + II gecombineerd	-0,44697	4,11609	0,97872	0,02477
VI	Schol	-3,14009	12,13386	0,98046	0,04445
VI	Bot	-3,30250	12,39467	0,99323	0,03157
VII	Schol	-3,62371	13,41539	0,98270	0,05410
VII	Bot	-4,16826	15,27174	0,96899	0,07241

Tabel VII

Invloed van de pH op de O_2 -affiniteit van de Hb-componenten II t/m VII van schol (zie Fig. 10). De componenten zijn gestript, geconcentreerd tot 3,3gHb/100 ml en 1 op 1 gemengd met PO_4 buffers ($I=0,15$). De pH van de PO_4 buffers bij 15° : 7,01; 7,22; 7,42; 7,60; 7,83. $I_{\text{totaal}}=0,10$, Hb-conc = 1,5g/100 ml., $t=15^\circ C$.

Hb-component	pH	P_{50}	$\log P_{50}$	
II	7,02	38,1	1,581	
		38,4	1,585	
		37,3	1,572	
		36,9	1,567	
	7,16	24,4	1,387	
		24,7	1,393	
		22,6	1,355	
		22,4	1,350	
		7,27	16,5	1,218
		16,4	1,216	
	16,2	1,210		
	16,3	1,212		
	16,1	1,207		
	7,36	11,7	1,068	
		11,9	1,076	
		11,9	1,076	
		12,0	1,079	
	7,44	9,5	0,978	
		10,0	1,000	
		9,6	0,982	
9,5		0,978		
III	6,99	46,7	1,669	
		46,5	1,667	
		7,14	29,1	1,464
		28,6	1,475	
	7,24	28,0	1,447	
		27,5	1,440	
		19,9	1,299	
		21,7	1,336	
	7,33	19,9	1,299	
		19,7	1,295	
		15,8	1,198	
		15,9	1,202	
	7,42	15,4	1,188	
		15,5	1,190	
		12,3	1,090	
		12,4	1,094	
11,9		1,076		
12,1		1,083		
IV	7,01	47,7	1,678	
		47,7	1,678	
		46,4	1,666	
		46,9	1,671	

Tabel VII (vervolg)

Hb-component	pH	P ₅₀	log P ₅₀
IV	7,13	31,8	1,503
		32,0	1,506
		32,6	1,513
		31,9	1,504
	7,215	21,9	1,340
		22,4	1,350
		23,3	1,368
		23,4	1,369
	7,30	18,7	1,272
		18,8	1,274
		18,9	1,277
		18,7	1,272
	7,36	15,7	1,196
		15,7	1,196
		16,1 15,5	1,207 1,190
	V	7,02	40,7
42,6			1,630
7,17		23,1	1,364
		23,3	1,368
		23,8	1,377
		23,9	1,378
7,30		26,9	1,430
		17,4	1,241
		17,3	1,238
		16,1	1,207
7,40		15,7	1,198
		12,1	1,083
		12,2	1,086
		12,1	1,083
7,48		12,1	1,083
		9,00	0,954
	8,84	0,946	
	8,96	0,952	
		8,94	0,951
VI	7,01	44,5	1,647
		44,3	1,646
		46,6	1,668
		46,7	1,669
	7,12	31,4	1,497
		31,3	1,496
		31,7	1,501
	7,21	31,8	1,503
		24,5	1,390
		24,6	1,391
		23,5	1,371
	7,29	23,9	1,378
		18,5	1,267
		18,7	1,272
		19,3	1,282
	7,33	19,4	1,283
17,9		1,253	
18,0		1,255	
16,9		1,228	
17,0		1,231	

Tabel VII (vervolg)

Hb-component	pH	P ₅₀	log P ₅₀
VII	7,01	43,4	1,638
		43,5	1,639
		44,3	1,647
	7,11	44,8	1,651
		34,3	1,535
		34,7	1,541
		33,2	1,521
		33,4	1,524
	7,175	27,2	1,435
		27,1	1,433
		28,7	1,458
		28,5	1,455
		21,6	1,333
	7,24	21,5	1,335
		22,4	1,350
		22,1	1,345
	7,28	21,1	1,324
		21,1	1,325
		20,3	1,308
		20,4	1,310

Tabel VIII

Invloed van de temperatuur op de O₂-affiniteit van de Hb-componenten II, IV, V, VI, en VII van Schol (zie Fig. 11). Voor behandeling componenten zie Tabel VII. De componenten zijn gedialyseerd tegen tris-buffer (pH 7,20 bij 15°C; I = 0,2). De Hb-conc. = 7,3 g/100 ml.

Hb-comp.	pH	Temp. °C	T _{abs.} °K	$\frac{1}{T} \times 10^3$	P ₅₀	log P ₅₀
II	7,20	5,4	278,4	3,589	2,55	0,406
					2,50	0,398
		10,2	283,2	3,529	4,14	0,618
					4,36	0,640
		15,0	288,0	3,470	6,72	0,828
					6,96	0,843
20,1	293,1	3,409	12,1	1,083		
			11,9	1,070		
24,8	297,8	3,356	19,0	1,278		
			18,7	1,272		
IV	7,20	5,1	278,1	3,593	3,26	0,514
					3,42	0,537
		5,5	278,5	3,588	3,56	0,551
					3,19	0,504
		10,2	283,2	3,529	5,65	0,752
					5,42	0,734
		15,2	288,2	3,467	9,55	0,980
9,55	0,980					
19,9	292,9	3,412	16,3	1,214		
			15,5	1,191		
24,9	297,9	3,355	23,7	1,375		
			23,9	1,378		
V	7,22	15,2	288,2	3,476	8,50	0,930
					8,35	0,922
					7,71	0,886
		20,0	293,0	3,411	7,71	0,886
					12,7	1,104
24,8	297,8	3,356	12,8	1,108		
			20,2	1,306		
VI	7,20	10,4	283,4	3,526	19,9	1,299
					4,67	0,669
		15,2	288,2	3,467	4,88	0,688
					7,69	0,886
		20,0	293,0	3,411	7,77	0,890
10,9	1,033					
24,8	297,8	3,356	11,5	1,061		
			17,0	1,230		
VII	7,22	4,5	277,5	3,601	16,4	1,215
					2,84	0,452
		10,1	283,1	3,530	2,68	0,428
					4,84	0,685
		15,5	288,5	3,464	4,53	0,656
					8,49	0,929
		20,0	293,0	3,411	8,44	0,926
					14,1	1,149
		24,8	297,8	3,356	13,5	1,132
					21,6	1,334
					22,2	1,346

Tabel IX

Berekening van de regressielijnen ($y = ax + b$) d.w.z. het lineaire verband tussen: pH en $\log P_{50}$ (Bohreffect), Tabel IX en tussen: $\frac{1}{T} \cdot 10^3$ en $\log P_{50}$ (temperatuur-effect), Tabel X. Deze twee verbanden zijn berekend voor een aantal Hb-componenten van Schol en weer-gegeven in Fig. 10 en 11. (a = richtingscoefficient, b= asafsnede, r= correlatiecoefficient, S_{xy} = spreiding in de puntenwolk).

Tabel	Hb-comp.	a	b	r	S_{xy}
VII	II	-1,427	11,592	0,998	0,0125
	III	-1,347	11,070	0,998	0,0128
	IV	-1,369	11,263	0,996	0,0156
	V	-1,410	11,503	0,996	0,0187
	VI	-1,313	10,852	0,997	0,0116
	VII	-1,261	10,486	0,995	0,0126
	VIII	II	-3,748	13,853	0,999
IV		-3,645	13,618	0,999	0,0149
V		-3,391	12,681	0,999	0,0057
VI		-3,171	11,866	0,998	0,0119
VII		-3,721	13,824	0,999	0,0153

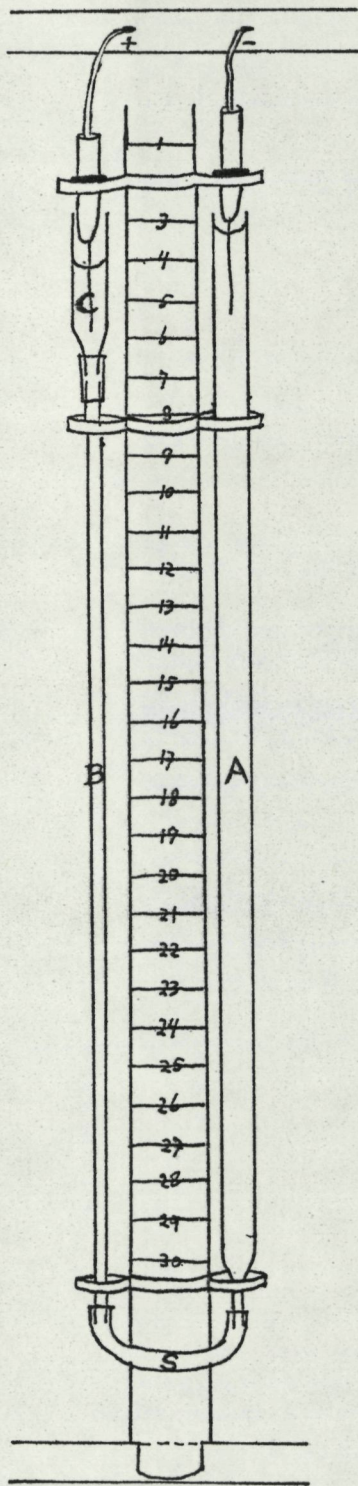


fig. 1. $\frac{1}{2}$ x ware grootte
(zie punt 2.2.4.1.)

"MICRO-ELECTROFOCUSING"
KOLOM

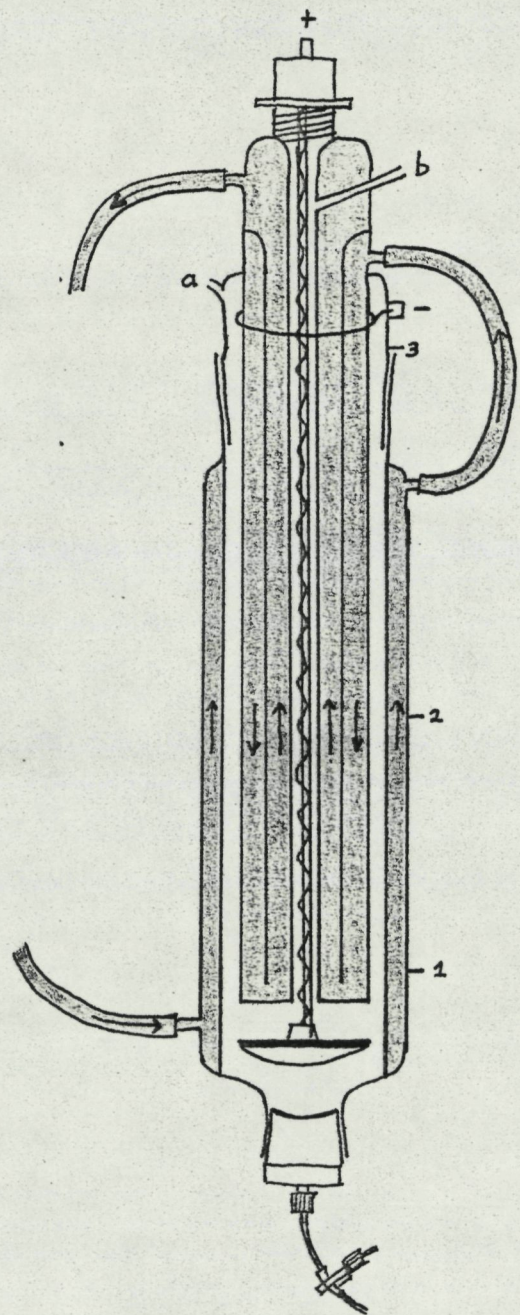
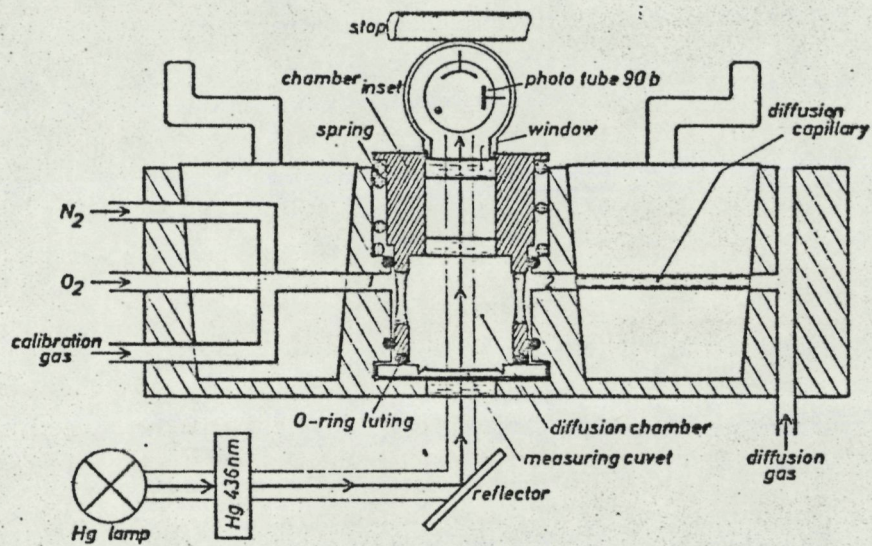
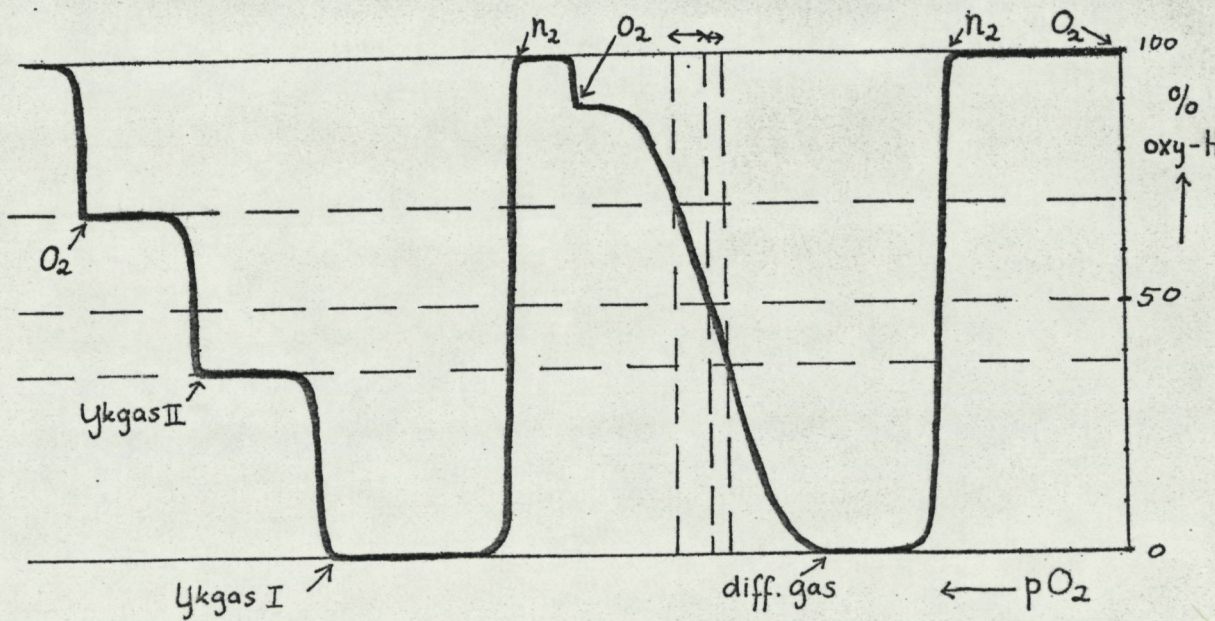


fig. 2. $\frac{1}{3}$ x ware grootte
(zie punt 2.2.4.2.)

LKB preparatieve
electrofocusing kolom



Diffusiekamer (Sick en Gersonde, 1969)
 3a. Voor verklaring zie punt 2.2.5.



3b. Schema van een registratie. (zie punt 2.2.5.)

fig. 3.

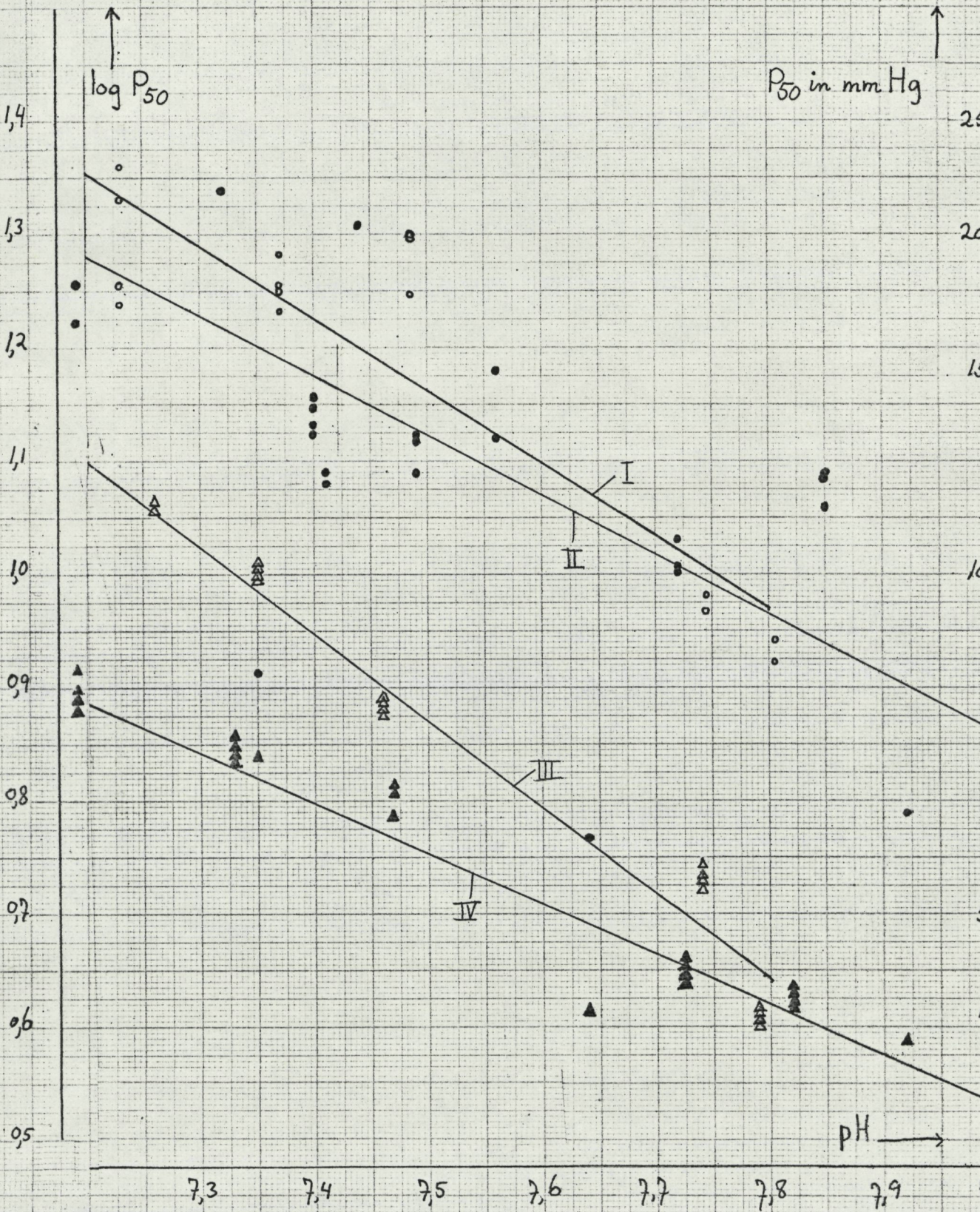


fig. 4. Bohr-effekt $\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta pH} \equiv$ richtingscoëfficient (r.c.)

Involed van de pH op de zuurstofaffiniteit van het Hb in de rode bloedlichaampjes (RBC's) en Hb in oplossing (Tabel II & III)
 $T=15^{\circ}\text{C}$

I ○ Schol-erythrocyten r.c. -0,64; III △ Schol gehemolyseerd r.c. -0,7

II ● Bot erythrocyten r.c. -0,53; IV ▲ Bot gehemolyseerd r.c. -0,4

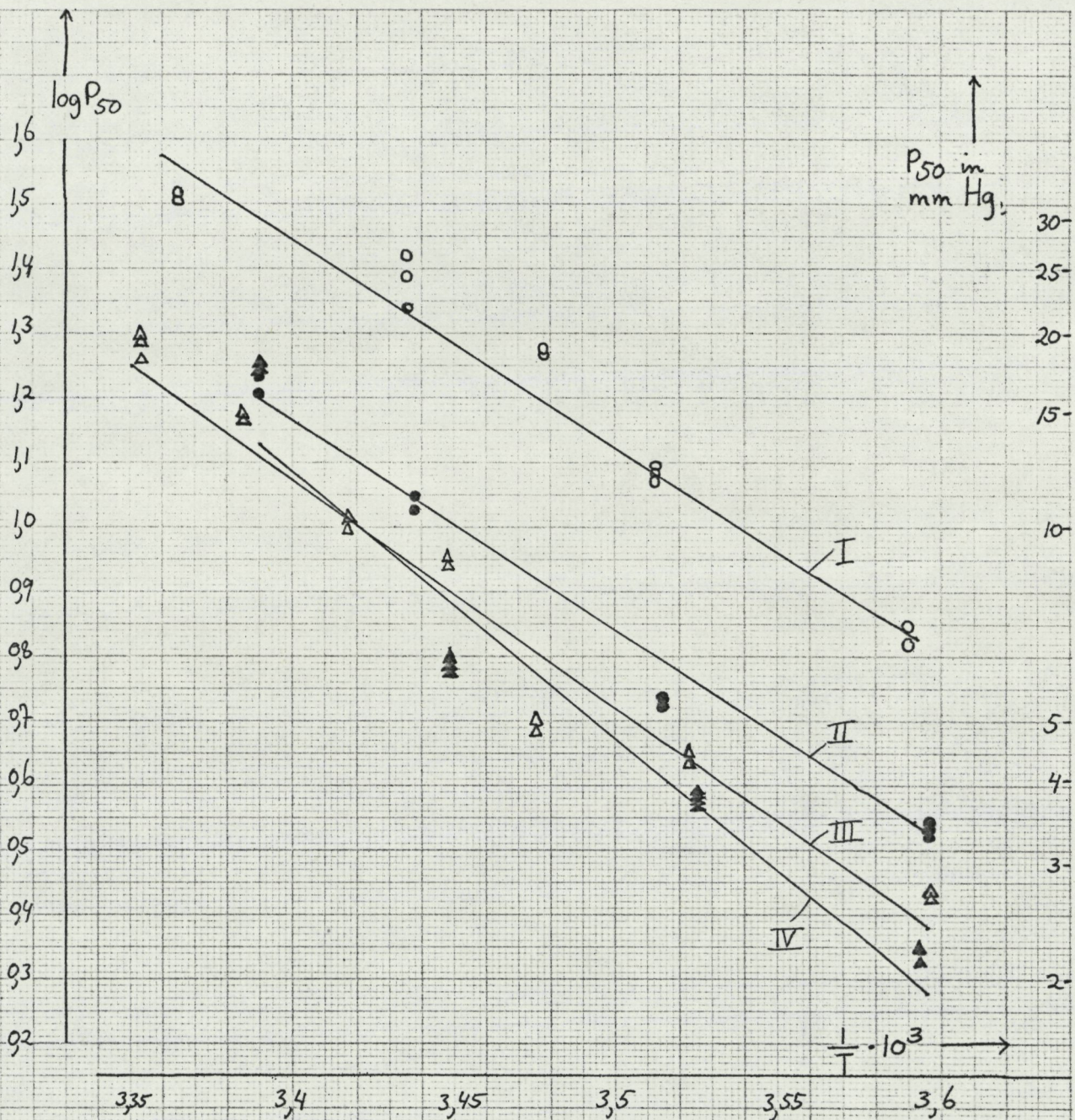


fig 5. Temperatuur-effekt $\frac{\Delta \log P_{50}}{\Delta \frac{1}{T} \cdot 10^3} \equiv$ richtingscoëfficiënt (z.c.)

Involed van de temperatuur op de zuurstofaffiniteit van het Hb in de rode bloedlichaampjes (RBC's) en Hb in oplossing. (Tabel IV-V)

- I ○ Schol erythrocyten z.c. $-3,14$ (pH 7,46 bij 15°C , $[\text{Hb}]$ 5,0 g/100ml)
 $\Delta H = 14,4$ kcal/mol.
- II ● Bot erythrocyten z.c. $-3,30$ (pH 7,51 bij 15°C , $[\text{Hb}]$ 5,0 g/100ml)
 $\Delta H = -15,1$ kcal/mol.
- III △ Schol Hb in oplossing: z.c. $-3,62$ (pH 7,67 bij 15°C , $[\text{Hb}]$ 5,0 g/100ml)
 $\Delta H = -16,6$ kcal/mol.
- IV ▲ Bot Hb in oplossing: z.c. $-4,17$ (pH 7,70 bij 15°C , $[\text{Hb}]$ 5,0 g/100ml)
 $\Delta H = -19,1$ kcal/mol.

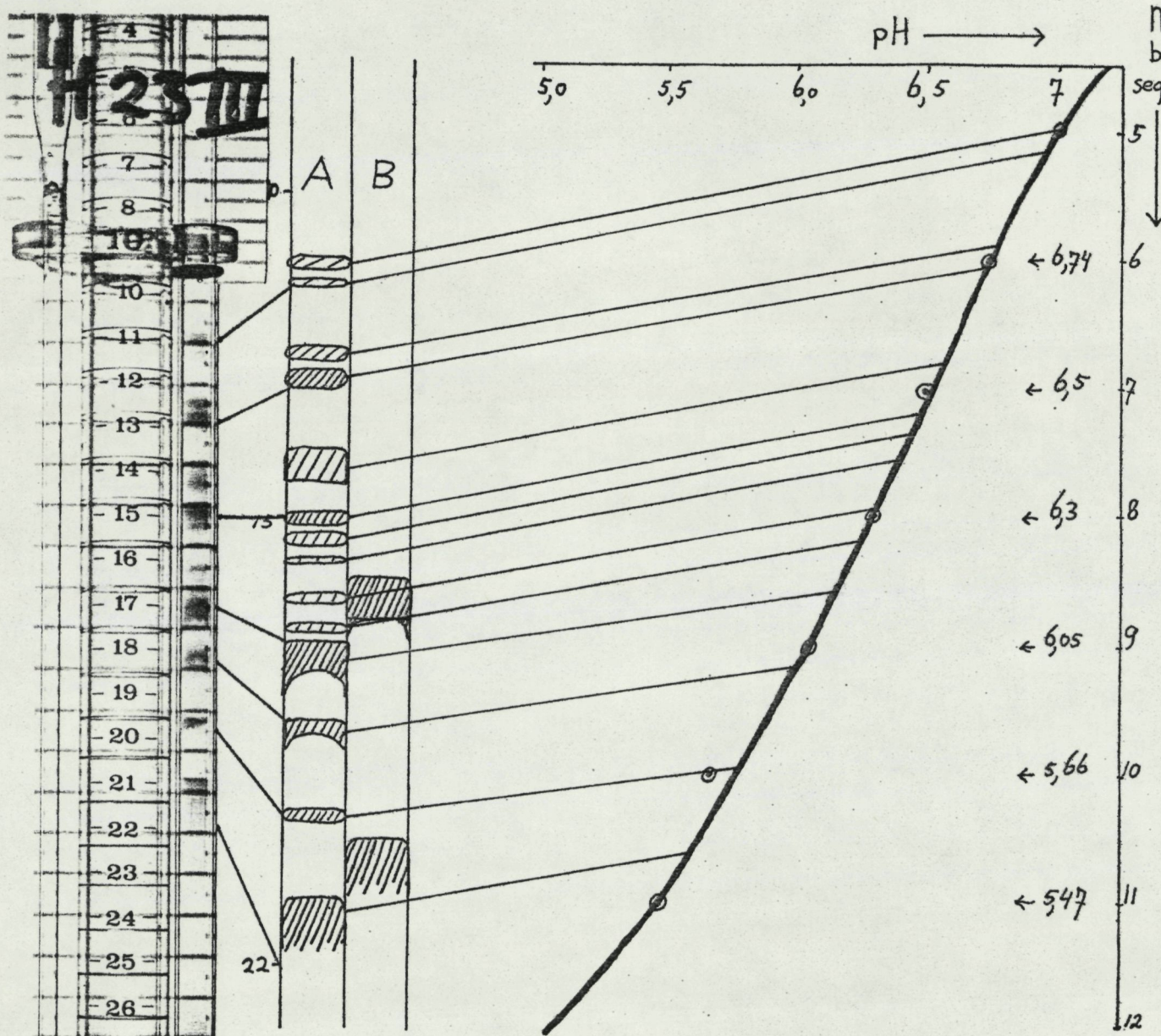


fig. 6. Microelectrofocusing analyse van Hb in oplossing (schol) in een pH gradient 5-8. A: tekening van de Hb-komponenten, overeenkomend met de foto (links). B: tekening van de Hb-komponenten in bevroren toestand (uitzettingscorrectie). Zie punt 2.2.4.1.

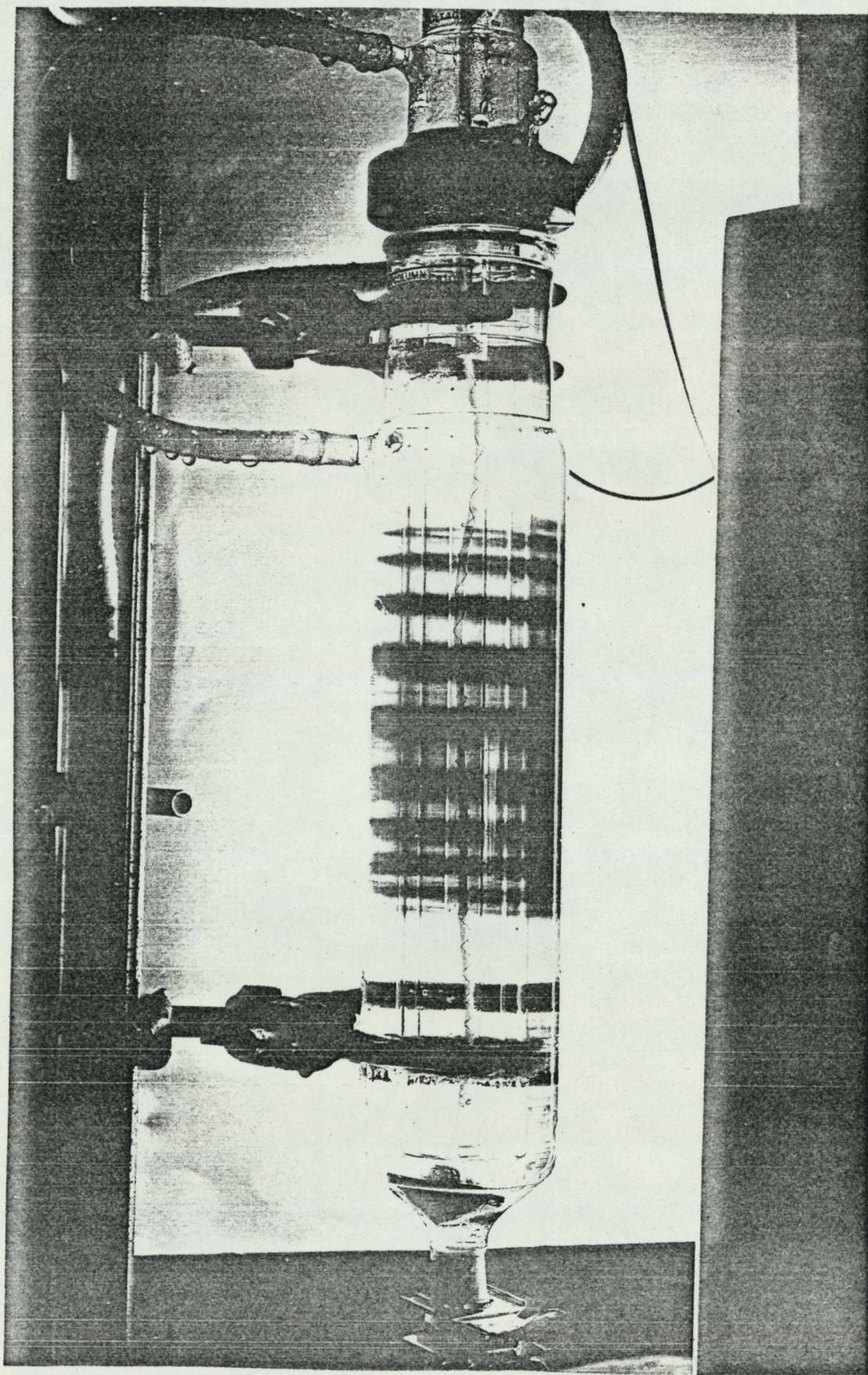


fig 7. LKB. electrofocusing kolom (440 ml.). Scheiding van het hemoglobine monster van Bot (5 ml ; Hb-conc 7 g/100 ml). ampholine 1%, pH bereik 6-10. Zie voor absorptie en pI fig 8.

pH 9,0

8,5

8,0

7,5

7,0

6,5

6,0 o?

5,5

fig 8. Bot: Scheiding van het
 haemoglobine monster
 LKB-Uvicord 280 nm
 pH-gradient bij 15°C
 2,4 ml. per fraksie.

fraksie nr. 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

Hb komponent pI (15°)

o?	9,2
I	8,57
II	8,45
III	8,32
IV	8,10
V	7,83
VI	7,50
VII	7,33
VIII	7,29
IX	7,25
X	7,05
XI	6,81
XII	6,65

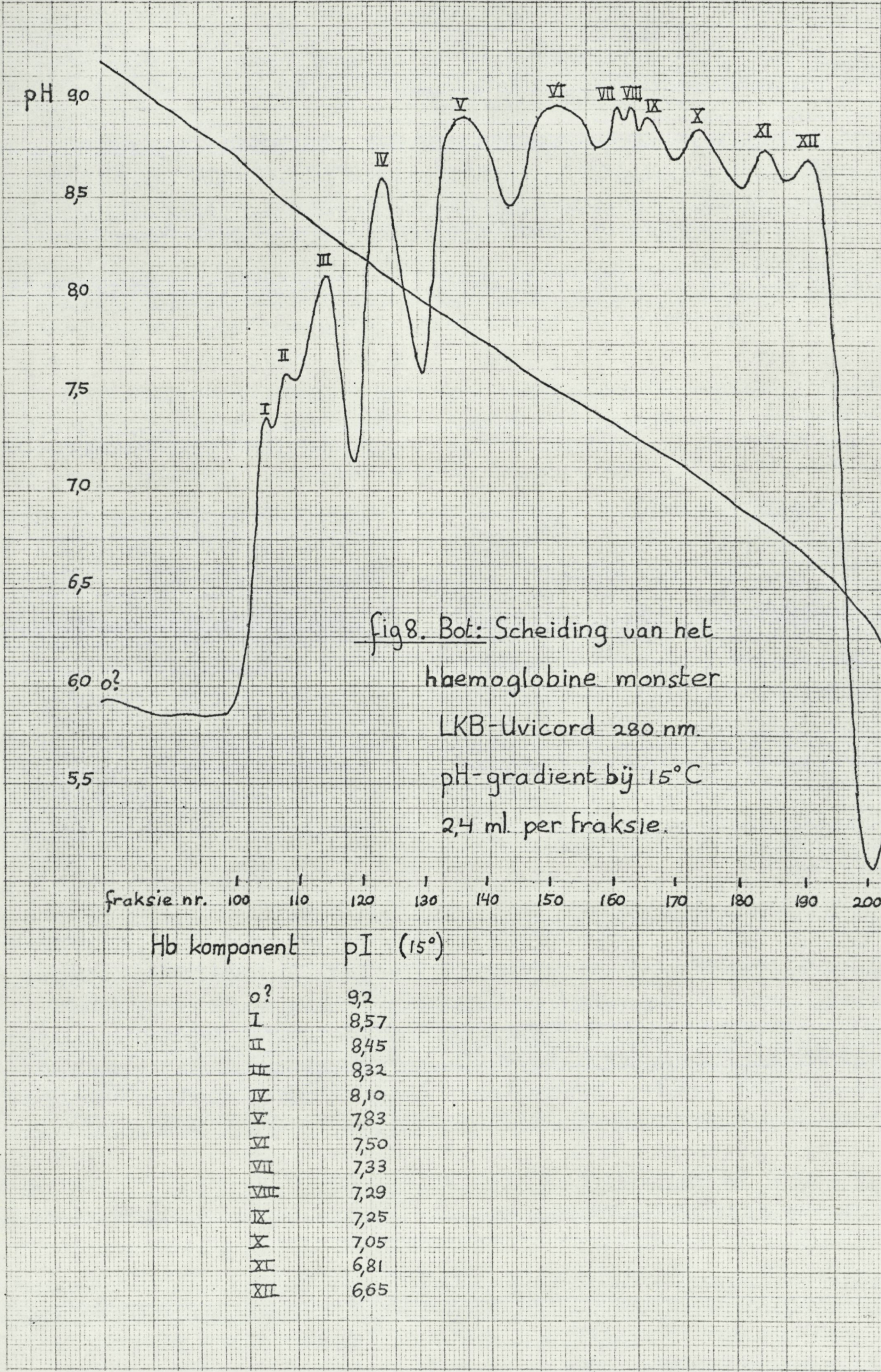
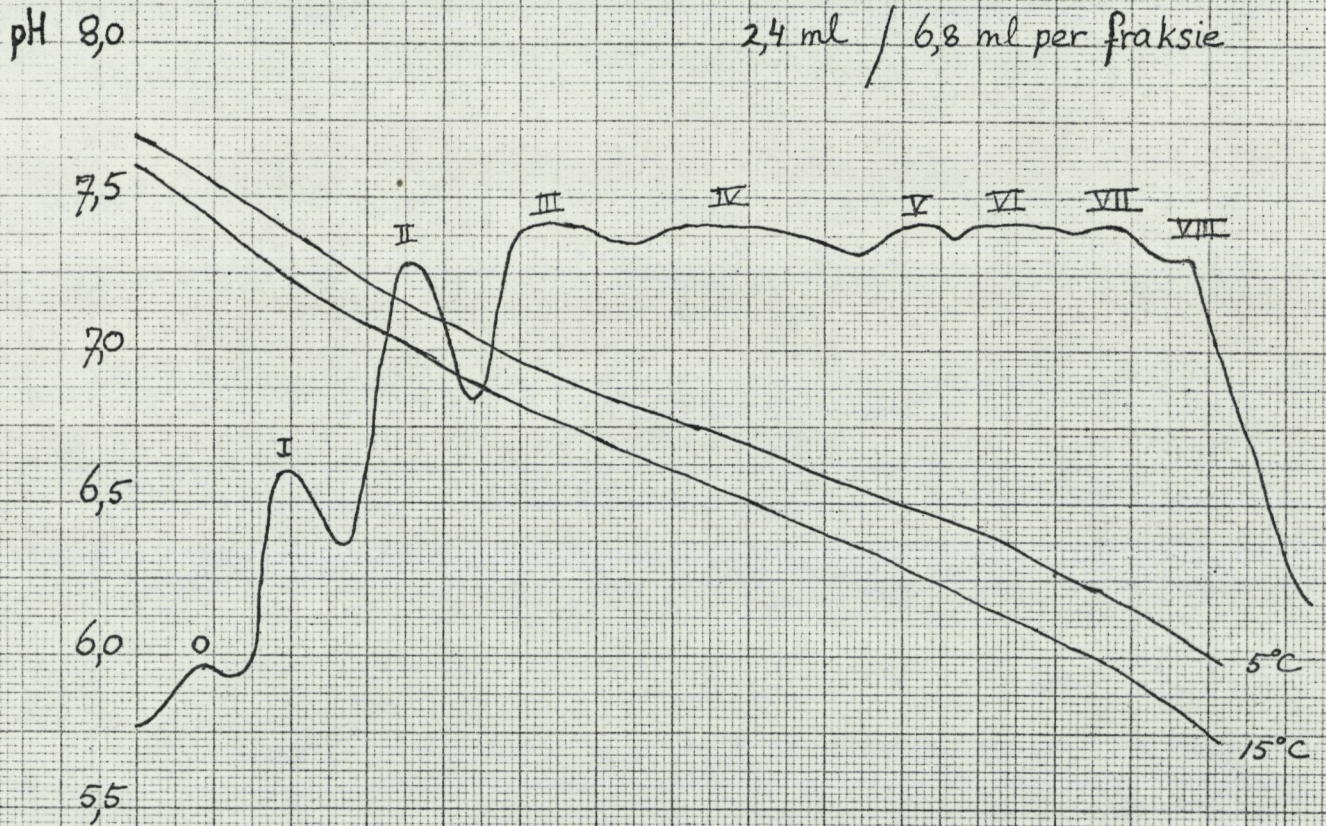


fig 9. Schol: Scheiding van het Hemoglobine monster

LKB-Uvicord 280 nm. pH-gradient bij 5°C en 15°C

2,4 ml / 6,8 ml per fraksie



fraksie nr 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 III 10 15 20

Hb komponent	pI (15°)	(5°)
0	7,5	7,6
I	7,25	7,4
II	7,02	7,15
III	6,76	6,8
IV	6,5	6,7
V	6,25	6,45
VI	6,12	6,35
VII	5,95	6,2
VIII	5,8	6,05

1,7

1,6 $\log P_{50}$

1,5

1,4

1,3

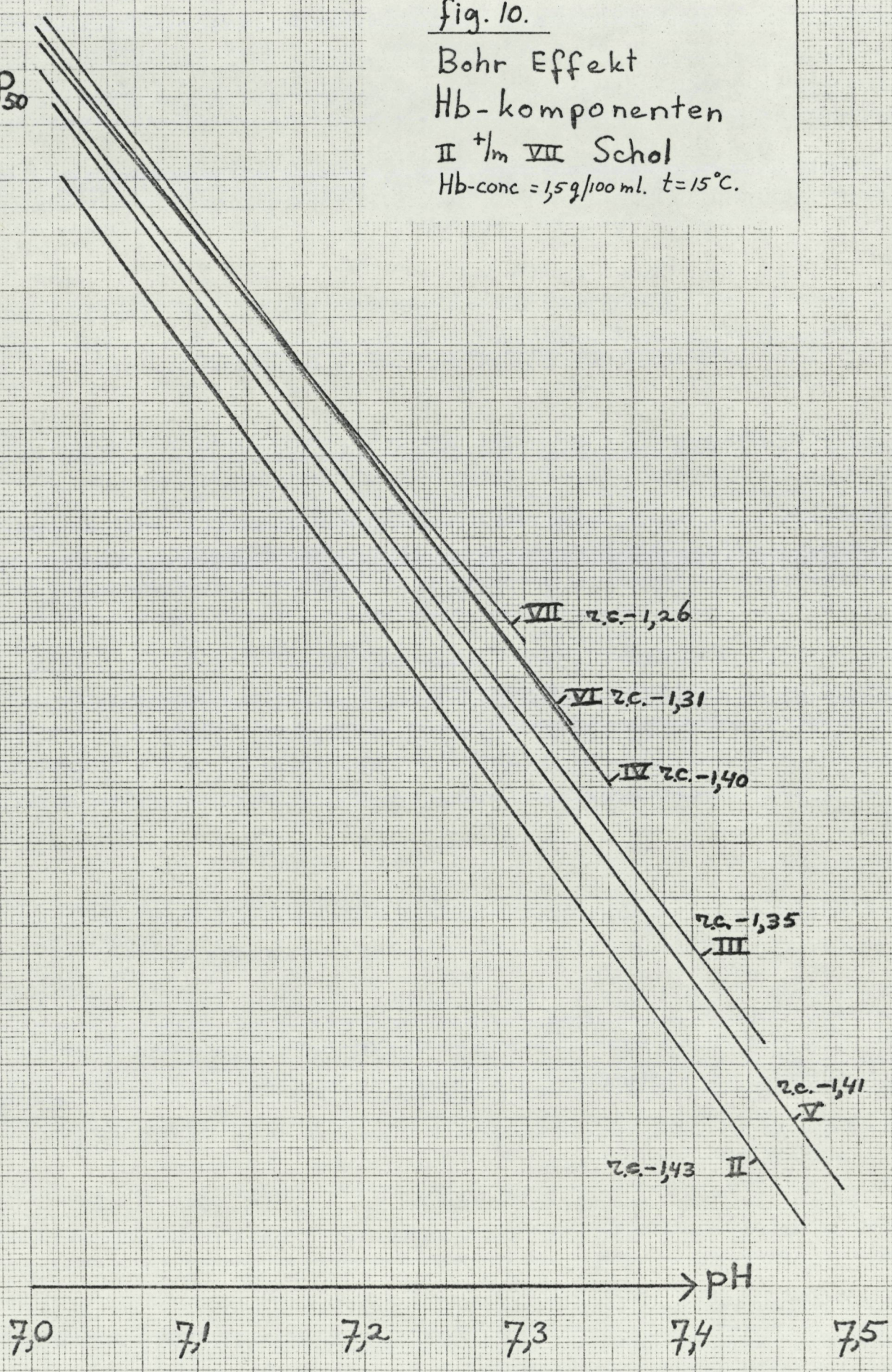
1,2

1,1

1,0

fig. 10.

Bohr Effekt
Hb-komponenten
II +_m VII Schol
Hb-conc = 1,5 g/100 ml. t = 15°C.



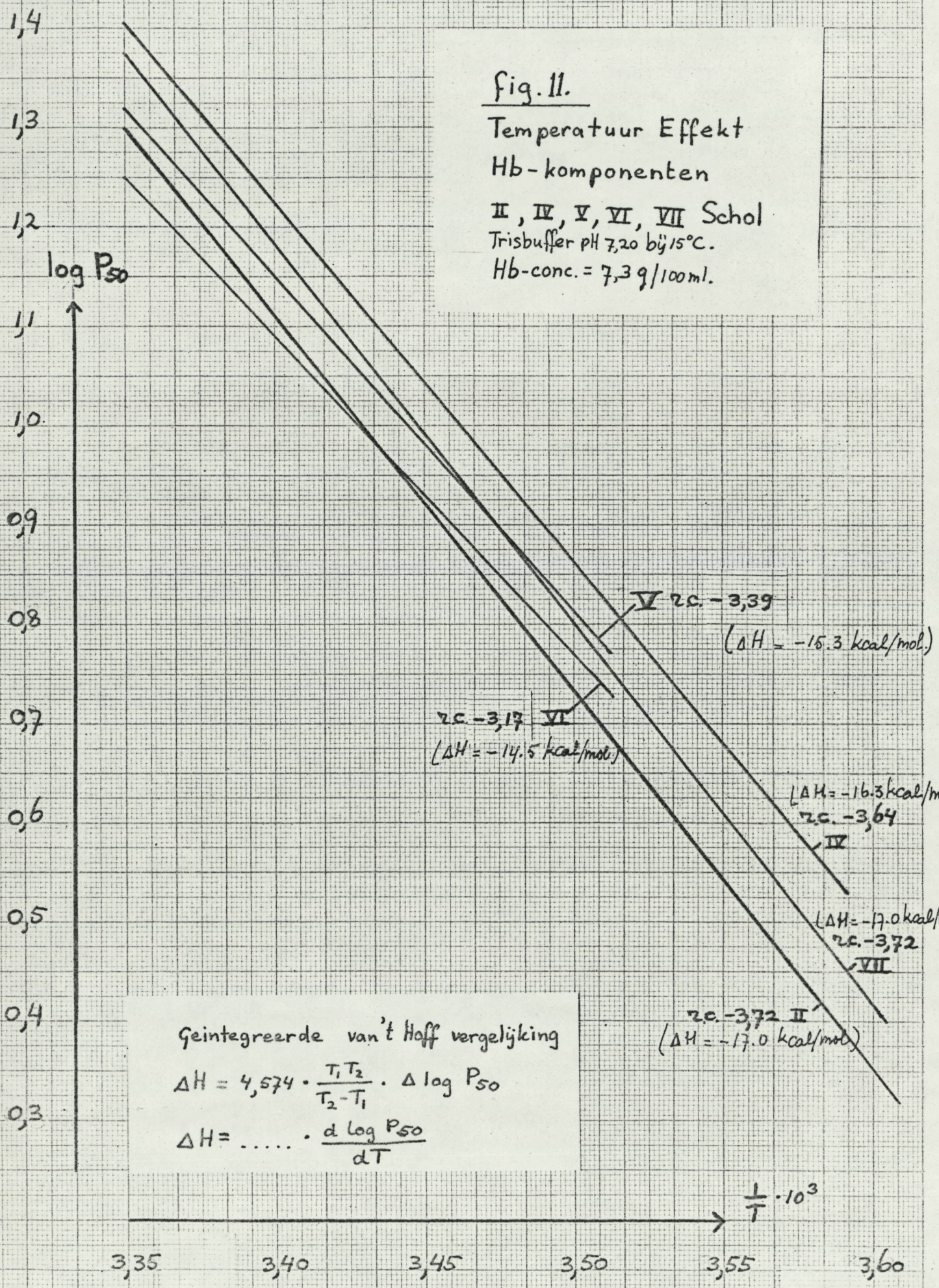


fig. 11.
 Temperatur Effekt
 Hb-komponenten
 II, IV, V, VI, VII Schol
 Trisbuffer pH 7,20 bij 15°C.
 Hb-conc. = 7,3 g/100ml.

V zc. -3,39
 ($\Delta H = -15.3 \text{ kcal/mol.}$)
 VI zc. -3,17
 ($\Delta H = -14.5 \text{ kcal/mol.}$)
 IV zc. -3,64
 ($\Delta H = -16.3 \text{ kcal/m}$)
 VII zc. -3,72
 ($\Delta H = -17.0 \text{ kcal/m}$)
 II zc. -3,72
 ($\Delta H = -17.0 \text{ kcal/mol.}$)

Geintegreerde van't Hoff vergelijking

$$\Delta H = 4,574 \cdot \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1} \cdot \Delta \log P_{50}$$

$$\Delta H = \dots \cdot \frac{d \log P_{50}}{dT}$$

3,35 3,40 3,45 3,50 3,55 3,60