

Z Katedry Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego W.S.R. w Lublinie
Kierownik: prof. dr Wiesław Hołobut

Marian WIŚLIŃSKI

**O dwóch rodzajach hemoglobiny u bydła zróżnicowanych przy pomocy
elektroforezy bibułowej**

Два вида гемоглобина у крупного рогатого скота,
выделенных при помощи электрофореза на бумаге

**Two Varieties of Haemoglobin in Cattle Distinguished
by Paper Electrophoresis**

Liczni autorzy techniką elektroforezy przeprowadzali badania nad hemoglobina zwierząt. Wynikiem tych badań było wykrycie elektroforetycznie różnych typów hemoglobin u bydła (1, 3, 4, 10), owiec (4, 8, 9, 12, 13, 18), kóz (4), koni (2, 4), bawołów (10, 20) i ptactwa (6, 11, 14), Reiner i współpracownicy (16), Munro i Munro (15) za pomocą wolnej elektroforezy w środowisku kwaśnym wykazali istnienie dwu elektroforetycznie różnych wariantów hemoglobiny u niektórych zwierząt (krowa, królik).

Cabannes i Serain (3, 4), stosując elektroforezę bibułową w buforze weronalowym o pH 8,6, wykazali dwa typy dojrzałej hemoglobiny u bydła w Algierii. W pierwszym przypadku (3) na 80 krów algerskich, skrzyżowanych rasą europejską dla uszlachetnienia miejscowego bydła, stwierdzili u 64 szt. hemoglobinę, której szybkość migracji na bibule jest nieznacznie mniejsza w porównaniu z hemoglobina normalną człowieka. Ten typ autorzy nazwali Hb α . U 15 szt. obserwowano dwa rodzaje hemoglobiny, z których jeden o wolnej migracji — Hb α i drugi typ o szybszej migracji nazwany Hb β . U 1 szt. znaleziono jeden rodzaj hemoglobiny o szybkiej migracji — Hb β .

W drugim przypadku Cabannes i Serain (4), badając krew niemal wszystkich gatunków zwierząt domowych w Algierii, gdzie między innymi ponownie badano bydło, na 270 krów stwierdzili u 203 szt. (76,3%) Hb α , u 56 szt. (20,7%) Hb α i β i 11 szt. (4%) z Hb β .

Giri i Pillai (10) podczas badań nad hemoglobina różnych gatunków zwierząt techniką elektroforezy agarowej stwierdzili, że krew bawołów zawierała dwa typy hemoglobiny.

Bangham (1) wykazał sposób dziedziczenia i podział wśród różnych ras czynników kontrolujących obecność dwu typów dojrzałej hemoglobiny u bydła. Na 271 szt. badanych krów, różnych ras na terenie W. Brytanii stwierdził u 7 szt. HbB, (o szybkiej migracji) u 37 szt. Hb AB i u 227 szt. Hb A. Hb B zauważono tylko u ras Jersey, Guernsey i South Devon.

Vella (20) odkrył trzy typy hemoglobiny A, B, C, u byków *Bos banteng* i dwa typy A i B u bawołów *Bubalus bubalis*, importowanych z Bali do Singapore. U 27 badanych byków znaleziono 9 szt. (33,3%) posiadających Hb A, prawdopodobnie identyczna z Hb Cabannesa i Seraina, 1 szt. (3,7%) HbC o migracji szybszej niż HbA. 4 szt. (14,8%) Hb A i B i 5 szt. (18,4%) HbAC. Na 28 bawołów badanych 27 szt., (96,4%) zawierały HbAB, a 1 osobnik zawierał komponent wolniejszy niż HbB.

W polskim piśmiennictwie nie znaleziono żadnej pracy dotyczącej elektroforetycznego rozdziału różnych rodzajów hemoglobiny bydła.

Różne wartości podają cytowani autorzy, jeśli chodzi o częstość występowania typów hemoglobiny, na terenach przeprowadzanych badań. Czy u bydła naszego istnieją elektroforetycznie różne typy hemoglobiny?, a jeśli tak, to częstotliwość występowania niniejszego zjawiska, jest celem tej pracy.

BADANIA WŁASNE

Materiał i metoda

Krew pobierano od dojrzałych i zdrowych krów poddawanych ubojowi w rzeźni. Hemoglobinę otrzymywano z krwi cytrynianowej według Drabkina (7) bez użycia chlorku glinowego ($AlCl_3$).

Do elektroforezy używano aparatu produkcji krajowej PPF. Wrocław typ 38 o poziomym zawieszeniu pasków.

10% roztwór hemoglobiny w ilości 0,005 ml наносzono na pasek bibuły Whatman nr 4, stosując bufor weronalowy o sile jonowej wynoszącej 0,06, oddziaływaniu pH 8,6 przy napięciu 300 V i natężeniu 7—9 mA na 6 pasków bibuły o szerokości 3 cm. Elektroforezę przeprowadzono w ciągu 6 godz. w temp. pokojowej.

Jak wiadomo hemoglobina poddana elektroforezie w buforze weronalowym o pH 8,6 migruje do anody. Szybkość migracji podczas 6 godz. elektroforezy wynosiła na ogół od linii startowej od 3,5 do 5,5 cm, przy czym bliżej linii startowej umiejscawia się plama o małej a dalej o szybszej migracji (p. fig. 1).

Elektroforegramy barwiono czernią amidową 10 B. Ilościowego pomiaru, w wypadku uzyskania rozdziału hemoglobiny, dokonywano przez elucję barwika z pociętych 5 milimetrowych skrawków bibuły w 6 ml 0,1% NaOH w ciągu 60 min. w temp. pokojowej.

Ekstynkcję eluatów oznaczono kolorymetrem fotoelektrycznym typ K. F. 2 przy filtrze o długości fali 575 milimikronów (17).

Przed wykonaniem elektroforezy oznaczono ilość hemoglobiny odpornej na denaturację alkaliczną metodą Singera i współpracowników (19) zgodnie z zaleceniem Cabannesa i Portiera (5).

Wyniki

Zbadano 183 krowy, wśród których stwierdzono u 176 szt. (96,2%) jeden rodzaj hemoglobiny o wolnej migracji —Hb —A i u 7 szt. (3,8%) dwa rodzaje hemoglobiny o wolnej i szybkiej migracji na bibule —Hb —AB. Osobników, posiadających jeden rodzaj hemoglobiny, o szybkiej migracji nie udało się wykryć.

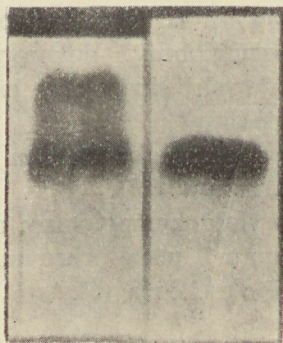
Tab. 1. Liczbowe proporcje dwu elektroforetycznie różnych hemoglobin u badanych krow

Quantitative proportions of two electrophoretically different haemoglobins in the examined cows

Krowa nr	Hb — A %	Hb — B %
11	61,3	38,7
37	56	44
106	55	45
117	58,7	41,3
127	55	45
143	53	47
175	57	43
średnio	56,6	43,4

Ilościowe proporcje elektroforetycznie rozdzielonych dwu typów hemoglobiny wynoszą średnio 56,6% dla plamy o małej ruchliwości i 43,4% dla plamy o większej ruchliwości. Załączona tabela 1 przedstawia 7 przypadków (3,8% materiału) posiadających dwa rodzaje Hb. Elektroforegram przypadku nr 11 o dwóch rodzajach barwika —Hb AB w porównaniu z Nr 10 o jednym rodzaju barwika —Hb A umieszczony jest dla przykładu na ryc. 1.

Zawartości procentowe niezdenaturowanej hemoglobiny po 45 min. działania 0,12N NaOH o pH. 12,7 wynoszą dla Hb —A od 55% do 75% (średnio 67%) i dla Hb —AB od 61 do 68% (średnio 64%).



a b

Ryc. 1. Elektroforegramy hemoglobiny
B bydłych; a) krowa nr 11 — Hb złożona z dwu rodzajów typu AB, b) krowa nr 10 — Hb jednorodna typu A.

Electrophoregrams of bovine haemoglobins, a) Cow N° 11 — haemoglobin of type AB containing two varieties of Hb, b) Cow N° 10 — haemoglobin of type A.

Omówienie wyników

Przedstawione wyniki potwierdzają istnienie w ilości 3,8% u bydła w Lubelszczyźnie dwu rodzajów hemoglobiny.

Plama o wolnej migracji jest prawdopodobnie identyczna z Hb- α Cabannesa i Seraina, z typem A Banghama i Velli, a plama o szybszej migracji z Hb- β Cabannesa i Seraina i z typem B Banghama i Velli. Plamy o pośredniej migracji między Hb-A i B oznaczone przez Valle jako Hb-C nie znaleziono.

Według danych autorów (12) różnice w migracji elektroforetycznej mogą powodować odmienne zawartości aminokwasów w obydwu typach hemoglobiny. Helm, Timmer, Huisman (12), porównując skład aminokwasowy dwu typów hemoglobiny u owiec, stwierdzili bowiem wyraźne różnice w zawartości kwasu asparaginowego, treoniny, seryny, glicyny, alaniny, kwasu glutaminowego.

Być może, że i w naszych przypadkach istnieją także podobne różnice w składzie aminokwasów w obydwu typach hemoglobiny u bydła i powodujące różne własności elektroforetyczne.

Występowanie dwu rodzajów hemoglobiny u zwierząt jednego gatunku jest określone genetycznie i jak wykazały badania Harisa, Warrena i współpracowników (8), Huismana (13) wykonane na owcach, a Cabannesa i Seraina (3) i Banghama (1) wykonane na krowach, uwarunkowane jest obecnością dwu genów allelomorficznych w genotypie, z których każdy odpowiedzialny jest za tworzenie się jednego typu hemoglobiny.

Jeden z dwu alleli może dominować albo ulegać recesji, a obydwa razem mogą być łatwo wykryte u heterozygoty (1).

Osobniki posiadające dwa rodzaje hemoglobiny są więc heterozygotami. Wynika z tego, że wśród naszego bydła znajdują się w małej ilości, choć nie udało się ich wykryć, krowy homozygotyczne, posia-

dające jeden rodzaj hemoglobiny o szybkiej migracji elektroforetycznej. Badania na większym materiale mogłyby to wykazać. Tym też można tłumaczyć stosunkowo niską liczbę krów, posiadających dwa rodzaje hemoglobiny u nas w porównaniu z tymi, jaką podają Cabannes, Serain i Bangham. Obecność genu B przekazującego hemoglobinę o szybkiej migracji nie wpływa na ich zdrowotność, w przeciwieństwie do ludzi, u których obecność genu S, C, E kojarzy się ze stanami chorobowymi (1). Dotąd nie obserwowano żadnego przypadku chorobowego u zwierząt, mającego związek z obecnością genu B.

Cabannes i Serain, biorąc za podstawę częstość występowania, uważają hemoglobinę o wolnej migracji za barwik normalny dojrzalego bydła, a hemoglobinę o szybkiej migracji, mimo jej występowania do 20%, za barwik anormalny (3).

Ilościowe proporcje obydwu typów hemoglobiny wynoszą u badanych zwierząt, posiadających dwa typy hemoglobiny, od 53% do 61,3% dla Hb-A i od 38,7% do 47% dla Hb-B. Jak zaobserwowali u owiec Huisman i współpracownicy (13) oba typy mogą ulegać zmianom przez zwiększenie się ilości jednego typu, a zmniejszenie się drugiego typu i odwrotnie, w zależności od całkowitej zawartości hemoglobiny we krwi.

Wartości niezdenaturowanej hemoglobiny po 45 min. działania N/12 NaOH są zgodne z podanymi przez Cabannesa i Seraina i spowodowane są różną opornością hemoglobiny na działanie roztworów alkalicznych (4). Dane te wskazują, że hemoglobiny o różnej oporności na działanie N/12 NaOH mogą znajdować się u zwierząt tego samego gatunku.

WNIOSKI

1. Wśród przebadanego bydła stwierdzono dwa rodzaje hemoglobiny; typu A i AB.

2. Osobników, posiadających jedynie hemoglobinę B lub barwik o pośredniej migracji między Hb A i Hb B, nie znaleziono.

3. Hemoglobinę A stwierdzono w 96,2% a hemoglobinę AB 3,8%.

4. Średnie zawartości procentowo niezdenaturowanej hemoglobiny po 45 min. działania 0,12N NaOH są nieco niższe dla Hb AB w porównaniu z Hb A.

PIŚMIENNICTWO

1. Bangham A. D.: Distribution of Electrophoretically Different Haemoglobins among Cattle Breeds of Great Britain. *Nature*, vol. 179, s. 467, 1957.
2. Bangham A. D., Lehmann H.: Multiple Haemoglobins in the Horse. *Nature*, vol. 181, s. 267, 1958.

3. Cabannes R., Serain Ch.: Hétérogénéité de l'hémoglobine des Bovidés. Identification électrophorétique de deux hémoglobines bovines. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, vol. 149, s. 7, 1955.
 4. Cabannes R., Serain Ch.: Etude électrophorétique des hémoglobines des Mammifères domestiques d'Algérie. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, vol. 149, s. 1193, 1955.
 5. Cabannes R., Portier A.: Application de l'électrophorèse sur papier des hémoglobines humaines. *Algérie Médicale*, vol. 58, s. 549, 1954.
 6. Datta R., Jharna Ghosh, Guha B. C.: Electrophoretic Behaviour of Avian Haemoglobins. *Nature*, vol. 181, s. 1204, 1958.
 7. Drabkin D. L.: Spectrophotometric Studies. The Crystallographic and Optical Properties of the Hemoglobin of Man in Comparison with Those of other Species. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 164, s. 703, 1946.
 8. Evans J. V., King J. W. B., Cohen B. L., Harris H., Warren F. L.: Genetics of Haemoglobin and Blood Potassium Differences in Sheep. *Nature*, vol. 178, s. 849, 1956.
 9. Evans J. V., Harris H., Warren F. L.: Haemoglobin and Potassium Blood Types in Some non-British Breeds of Sheep and in Certain Rare British Breeds. *Nature*, vol. 192, s. 320, 1958.
 10. Giri K. V., Pillai N. C.: Multiple Haemoglobins in the Blood of Animals. *Nature*, vol. 178, s. 1057, 1957.
 11. Helm van der H. J., Huisman T. H. J.: The Two Hemoglobin Components of the Chicken. *Science*, vol. 127, s. 762, 1958.
 12. Helm van der H. J., Timmer R., Huisman T. H. J.: Myoglobins from Sheep Homozygous for Different Haemoglobin Types. *Nature*, vol. 180, s. 240, 1957.
 13. Huisman T. H. J., Vliet van G., Sebens T.: Sheep Haemoglobins. *Nature*, vol. 182, s. 171, 1958.
 14. Johnson V. L., Dunlap J. S.: Electrophoresis Separation of Hemoglobin from the Chicken. *Science*, vol. 122, s. 1186, 1955.
 15. Munro M. P., Munro F. L.: The Electrophoretic Properties of Globin from Various Species. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 150, s. 427, 1942.
 16. Reiner L., Moore D. H., Lang E. H., Milton G.: Electrophoretic Components of Globin. *Jour. Biol. Chem.*, vol. 146, s. 583, 1942.
 17. Ranney H. M., Larson D. L., McCormack G. H.: Some Clinical Biochemical and Genetic Observations on Hemoglobin C. *Jour. Clin. Invest.*, vol. 32, s. 1277, 1953.
 18. Rodnan G. P., Ebaugh F. G.: Paper Electrophoresis of Animal Hemoglobins. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, vol. 95, s. 397, 1957.
 19. Singer K., Amoz I. M. D., Chernoff M. D., Singer L.: Studies on Abnormal Hemoglobins. II. Their Identification by Means of the Method of Fractional Denaturation. *Blood*, vol. VI, s. 429, 1951.
 20. Vella F.: Haemoglobin Types in Ox and Buffalo. *Nature*, vol. 181, s. 564, 1958.
-

РЕЗЮМЕ

Гемоглобин крупного рогатого скота был подвергнут исследованию методом электрофореза на бумаге при употреблении в качестве буфера веронала при $\text{pH} = 8,6$, ионной силе $= 0,06$, напряжении 300 В и силе электрического тока $= 7 - 9 \text{ м. А}$ в течение 6 часов на 6-и полосках бумаги шириной в 3 см.

В семи случаях — среди 183 исследованных коров — обнаружено наличие двух видов гемоглобина, отличающихся друг от друга разной элеткрофоретической миграцией. Пятно, предвигающееся медленно по направлению к аноду при $\text{pH} = 8,6$ представляет собой нормальный гемоглобин — Hb A , пятно же, характеризующееся перемещением с гораздо большей скоростью, является ненормальным гемоглобином — Hb B . Автором не найдены коровы, обладающие исключительно гемоглобином В или гемоглобином, занимающим по скорости передвижения среднее место между Hb A и Hb B . Количественное соотношение двух видов гемоглобина, обнаруженных у семи упомянутых коров представлялось, как следует: для Hb A в среднем 56,6% и для Hb B — 43,4 %. Средние количества не подвергнувшегося денатурации гемоглобина под действием в течение 45 минут 0,12 N NaOH оказались несколько меньше для Hb B в сравнении с Hb A . Выступление двух видов гемоглобина у коров, как об этом свидетельствуют данные соответственной научной литературы, обосновано генетически.

Табл. 1. Количественное соотношение двух электрофоретически различных гемоглобинов у исследуемых коров.

Рис. 1. Электрофореграммы гемоглобинов крупного рогатого скота:
а) корова № 11 — гемоглобин состоящий из двух видов типа АВ.
б) корова № 10 — гемоглобин однородный типа А.

SUMMARY

Bovine haemoglobin was examined by paper electrophoresis containing veronal buffer of 0.06 ionic strength, $\text{pH} 8.6$. Voltage was maintained constant at 300 volts for a 6 hour period of electrophoresis. Under these conditions the average current across each of the 6 paper strips, 3 cm in width, was 7—9 m amp. Two varieties of haemoglobin, showing different electrophoretic migration, were found in 7 of the 185 cows examined. A spot migrating slowly to anode at $\text{pH} 8.6$ proved to be normal haemoglobin, Hb A . The other spot, which migrated more rapidly, was defined as abnormal haemoglobin, Hb B .

Individuals having Hb B haemoglobin only, or haemoglobin of medial migration between Hb A and Hb B, were not found. In the 7 cows examined, which had two varieties of haemoglobin, the amount of Hb A and Hb B averaged 56.6 and 43.4 per cent, respectively. Both varieties of haemoglobin were treated with 0.12N NaOH for 45 minutes. After this treatment it was found that the average contents of undenaturated haemoglobin was lower in Hb AB than in Hb A. The available literature shows that the incidence of two varieties of haemoglobin in cattle is genetically determined.