

# Whatman CM 23 を用いたカラム クロマト法による異常血色素の $\alpha$ 鎖 および $\beta$ 鎖の分離と同定について

川崎医科大学生化学

吉田克子      井内岩夫

日高和夫

(昭和51年9月30日受理)

Separation and identification of aberrant  $\alpha$  and  $\beta$  chain  
of abnormal hemoglobin with aids of Whatman CM-23  
chromatography.

Katsuko YOSHIDA, Iwao IUCHI and Kazuo HIDAKA

*Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School*

*Kurashiki 701-01, Japan*

*(Received on Sept. 30, 1976)*

## Abstracts

A new improved chromatographic method with use of Whatman CM-23 as supporting medium has been developed in order to identify and separate the aberrant chains of abnormal hemoglobin.

A column (2.6×24cm) was packed the bufferized Whatman CM-23 with 8 M urea-phosphate buffer (pH 6.7) up to 16 cm, and 500mg of dialysed globin with the same buffer was applied on the top of the column, and developed it with 8 M-urea phosphate buffer (pH 6.7, Na<sup>+</sup> gradient from 0.005 to 0.045M) at flow rate of 6.8ml/min.

Chromatographic pattern gave six components, namely, <sup>1</sup>) F I, <sup>2</sup>) F II, <sup>3</sup>) pre  $\beta$ , <sup>4</sup>)  $\beta$ , <sup>5</sup>) pre  $\alpha$  and <sup>6</sup>)  $\alpha$  peaks in the elution order described. F I and F II were faintly yellow colored pigments with non-heme and non-protein component and non-heme protein respectively. Pre  $\beta$  and pre  $\alpha$  fraction were presumed to be oxidized form of the individual  $\alpha$  and  $\beta$  chain after fingerprinting and electrophoretic findings of the components obtained by performic acid oxidation of the pure  $\alpha$  and  $\beta$  chains. The recovery of  $\alpha$  and  $\beta$  chain without pre  $\alpha$  and pre  $\beta$  fraction were 61.1 and 71.5 percent in average, respectively, indicating good recoveries in comparison with other similar methods.



Our method was, therefore, recommendable in routine work for the sake of its simplicity of the procedure, short time operation and good recovery.

血色素の $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖を分取する方法として Whatman CM 23 を用いる尿素解裂クロマト法について吟味し、私共の方法を確立した。2.6×24cm のカラムに 16cm まで支持体をつめ、グロビン 500mg を入れ、pH6.7 の 8M 尿素リン酸緩衝液 ( $\text{Na}^+$  勾配 0.005→0.045M) を使用し 6.8ml/分の流速で展開した。溶出成分は F I, F II, Pre  $\beta$ ,  $\beta$ , Ppe  $\alpha$  および $\alpha$ 鎖の 6 成分であった。F I, F II はそれぞれ非ヘム性、非ヘム蛋白性黄色成分であり、Pre  $\beta$  および Pre  $\alpha$  鎖はそれぞれ対応鎖の酸化型鎖と考えられた。 $\alpha$  および  $\beta$  鎖の回収率はそれぞれ、61.1%, 71.5% であった。本法は容易に実施して、再現性もよく、短時間に行なえる推奨しうる方法であることを知った。

### は じ め に

異常血色素 (異常 Hb) の一次構造解析は通常 (1) 異常血色素の分離精製, (2) グロビンを構成する異常鎖の同定と調製, (3) 異常鎖のトリプシン消化, (4) フィンガープリント等による異常ペプチドの分離, (5) ペプチドのアミノ酸分析の順に操作を進めていくが、グロビンを  $\alpha$  および  $\beta$  鎖に分離することなしに以後の操作を進めると、例えばフィンガープリントでは  $\alpha$  および  $\beta$  鎖由来の多数のペプチドスポットを生じて異常ペプチドの同定と分取が困難になる。従って  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の分離は異常血色素の一次構造解析に不可欠の操作過程である。

$\alpha$  および  $\beta$  鎖分離法には、これまでカラムクロマト法<sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>, カウンターカレント法<sup>6)</sup>, 塩析法<sup>7)</sup> など多数の報告がなされている。カウンターカレント法は回収率は他方にくらべ高いが、多量の試料と高価な装置を必要とし処理時間も長い。また塩析法は分離した  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の純度の点に問題がある。したがって一般にはカラムクロマト法による分離法が普及しているが、この方法も用いる支持体、試薬、用いるクロマト条件などにより、分離効果や回収率、 $\alpha$  および  $\beta$  鎖の溶出順序などが変化する。そこで私共はこれらの諸条件を逐一吟味し、Whatman CM 23 を支持体とし、短時間に再現性のある分離効果のすぐれた方法をこしらえた。それを以下に報告したい。

### 試 料 と 方 法

溶血液は常法に従って作成し、グロビンは Anson-Mirsky<sup>8)</sup> 改良法である Fanelli<sup>9)</sup> らの方法に準じて -20°C 以下で調製し、得たるグロビン粉末はチッ素置換を行ない使用直前まで -10°C の冷凍庫に保存した。HbF の分取は臍帯血を使用し、Zade-Oppen<sup>10)</sup> の改良法を用いて CM セファデックスカラムクロマト法で HbF を単離し、HbF グロビンを作った。溶液中の蛋白同定のための吸収スペクトルは HITACHI 323 自記分光光度計を用い、カラムクロマトの  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の位置を知るためには UV メーター (TOYO UVICON 540M) を用い



た。分離鎖の純度を知るためには6M尿素解裂によるセルロースアセテート膜電気泳動<sup>11)12)</sup>を行ないボンソー3R染色をほどこして調べた。フィンガープリント法<sup>7)</sup>は私共の改良法を用いて行った。透析液中の尿素の有無は、ジアセチルモノオキシム・チオセミカルバジド法を用いて検査した。また本法と比較のための $\alpha$ および $\beta$ 鎖分離法として、支持体にWhatman CM 52, Serva CMCを用いた方法, Amberlite IRC-50クロマト法<sup>4)</sup>, PCMB解裂クロマト法<sup>2)</sup>等を行なった。

## 成 績

カラムクロマト法<sup>3)5)</sup>について種々吟味した結果、以下の如き推奨しうる方法を確立したのでまずその方法の詳細を以下に述べる。

Whatman CM23を用いた尿素解裂CMCカラムクロマトグラフィー

1. 試薬 緩衝液 I (pH 6.7): リン酸水素 2 ナトリウム・ $12\text{H}_2\text{O}$  (半井・特級) 3.5816g; 尿素 (石津・特級) 960.96g; 2-メルカプトエタノール (和光) 7.0ml を順に脱イオン水に溶解し、全量を2lとし濃リン酸でpH6.7に調整する。本液の $\text{Na}^+$ イオン濃度は0.005M, 尿素濃度は8Mである。

緩衝液 II (pH 6.7): リン酸水素 2 ナトリウム・ $12\text{H}_2\text{O}$  16.1172g; 尿素 480.48g; 2-メルカプトエタノール 3.5ml を順に脱イオン水に溶解し、1lにした後、濃リン酸で pH6.7に調整する。本液の $\text{Na}^+$ イオン濃度は0.045M, 尿素濃度は8Mである。

### 2. 準 備

1) グロビンの調製: グロビン 500mg を 50ml の緩衝液 I に溶解し透析チューブ (20/32, Visking 社) に入れ、2.5l の緩衝液 I にむかって1時間ずつ3回、室温で透析する。

2) 支持体の平衡化: Whatman CM23, 20g を約1l の緩衝液 I に浮遊させる。約30分後傾斜法により微粒子を除去する。この操作を3回くり返し、脱気しておく。

3) カラムの調製: カラム (2.6 cm $\times$ 24cm) に、2)で準備した支持体をつめるが、はじめ1/2の高さまでは自然落下で、次にポンプ圧を加えながら高さ16cmのカラムを作る。試料を添加する前に約3時間、ポンプ (流速6.8ml/分) を使って緩衝液 I で更に平衡化する。

4)  $\text{Na}^+$ イオン濃度勾配作成装置: 緩衝液 I および II を各 600ml ずつ下口を連結した内径が9.5cm

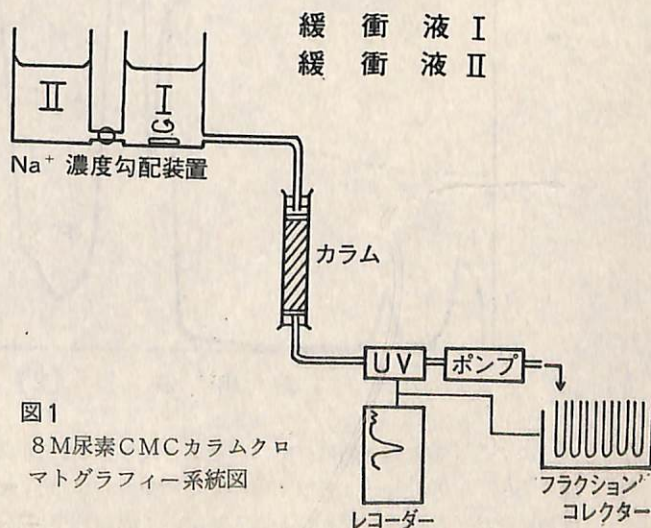


図1  
8M尿素CMCカラムクロマトグラフィー系統図



の2つの円筒容器に別々に入れ、緩衝液 I の入った容器には攪拌子を入れて回転させて緩衝液 I 側から溶液を取り出し、カラムにつなぐようにする。クロマト全体の有様を図 1 に示す。

### 3. 操 作

1) 試料の添加：透析が終ったグロビン溶液全量をカラムに静かにのせて完全に吸着させる。ついで緩衝液 I を支持体の上方 2 cm まで満たす。まず緩衝液 I をカラムにつないでポンプ (6.8 ml/分) を使って、末吸着部分を完全に溶出させる (8 ml 分画で約 35 本を要す。)。Na<sup>+</sup>イオン濃度勾配装置につないで $\alpha$ および $\beta$ 鎖の溶出を開始させ、5 ml ずつフラクションコレクターに集める。操作は室温で行なう。溶出順は  $\beta$  鎖および  $\alpha$  鎖であり、展開を開始してから 6 時間以内に分取は完了する。

2) 透析：Pre  $\beta$ ,  $\beta$ , Pre  $\alpha$  および  $\alpha$  鎖をそれぞれ分画ごとに集め、透析チューブ (27/32 Visking 社) に入れて大量の冷蒸留水に向かって透析する。約 4 日間を要す。尿素の検出を行ない、反応陰性になっていることを確かめておく。

3) 凍結乾燥：透析を終えた各分画はそれぞれ別々のプラスチック容器に入れ凍結後、凍結乾燥機にかける。

#### 方法の吟味

上述の方法を確立するための吟味・成績は以下の如くであった。即ち、上述の方法によって

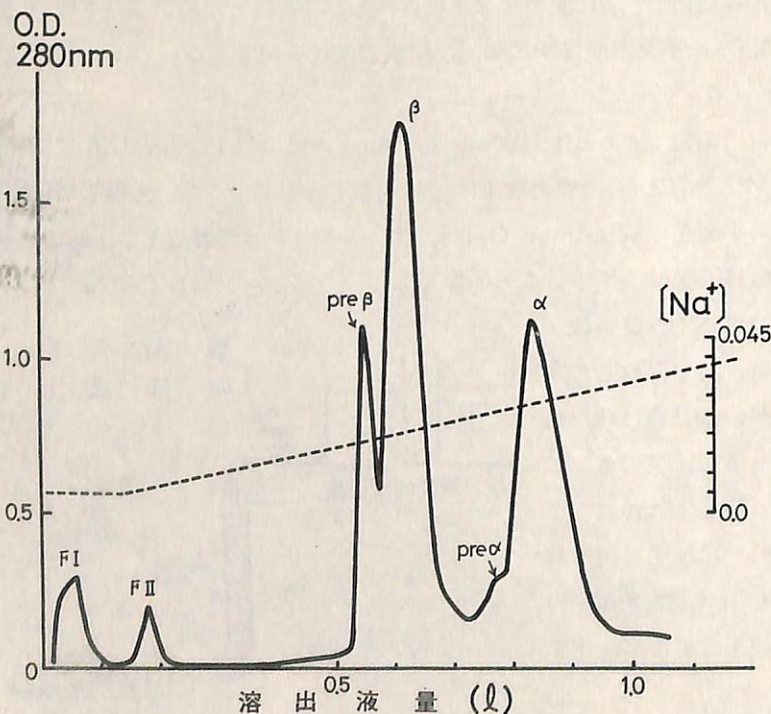


図 2 本法による $\alpha$ および $\beta$ 鎖の分離 カラムの大きさ：2.6×16cm, 展開液の流速：6.8 ml/分, Na<sup>+</sup>イオン濃度勾配：0.005 M→0.045 M 実線は波長 280 nm の吸光度で、タンパク濃度に基づく溶出曲線であり、破線はそれぞれの時点でカラムに入っていく溶離液中の Na<sup>+</sup> イオンの濃度



得られた正常成人グロビンの分離パターンは図2に示す如く、6つの成分に分離され、溶出順にF I, F II, Pre  $\beta$ ,  $\beta$ , Pre  $\alpha$  および  $\alpha$  鎖と名づけた。

F I, F II分画はカラムクロマトグラフィーで最初に溶出される微黄色の成分であった。F Iはベンチジン反応陰性で、その紫外外部吸収スペクトルから非蛋白性色素と考えられたが可視域のそれは吸収が弱く、事実上存在せず、黄色物質の同定はできなかった。F IIはベンチジン反応陰性で蛋白質に共通する紫外外部吸収を示したが、可視域のそれはF I成分と同様に物質の同定はできなかった。(図3C)

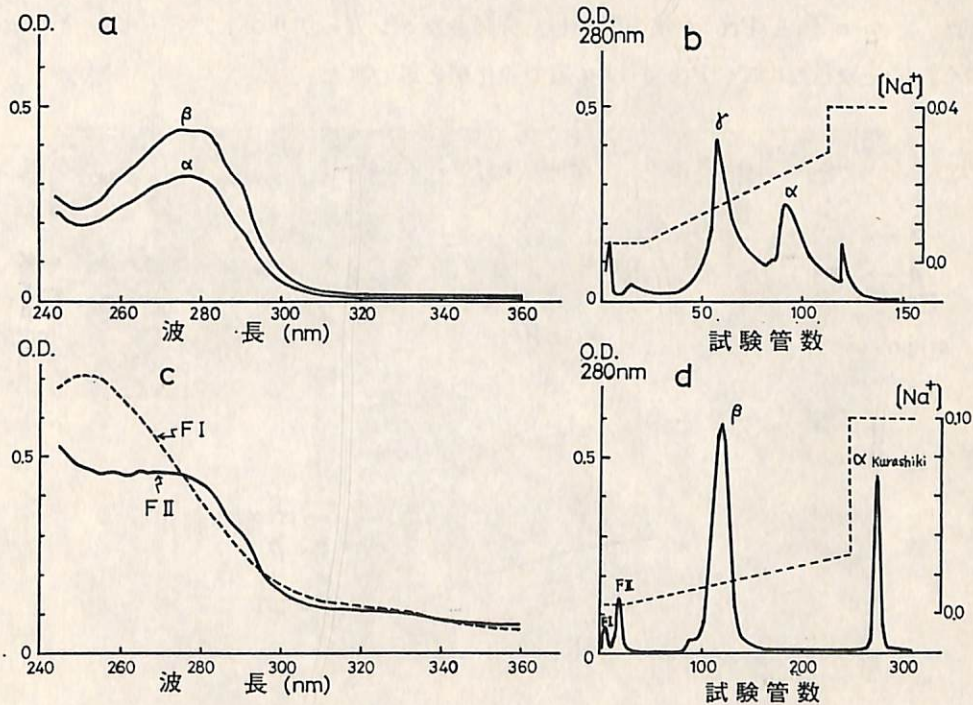


図3 8M尿素クロマトグラフィーと各分画の吸収スペクトル

- $\alpha$  および  $\beta$  鎖の紫外外部吸収スペクトル (pH 6.7)
- Serva CMC による  $\alpha$  および  $\gamma$  鎖の分離  
カラムの大きさ:  $2.0 \times 11\text{cm}$ , 展開液の流速:  $3.4\text{ml/分}$   
 $\text{Na}^+$ イオン濃度勾配:  $0.005\text{M} \rightarrow 0.040\text{M}$   
1~20本  $7\text{ml/1本}$ , 21本~  $5.8\text{ml/1本}$
- F I, F IIの紫外外部吸収スペクトル (pH 6.7)
- Serva CMC による  $\alpha^{\text{Kurashiki}}$  および  $\beta$  鎖の分離  
カラムの大きさ:  $2.0 \times 12\text{cm}$ , 展開液の流速:  $4.0\text{ml/分}$   
 $\text{Na}^+$ イオン濃度勾配:  $0.005\text{M} \rightarrow 0.030\text{M}$ ,  
最終 $\text{Na}^+$ イオン濃度:  $0.10\text{M}$   
1~46本  $5\text{ml/1本}$ , 47本~  $3\text{ml/1本}$

図2の $\beta$ 分画が $\beta$ 鎖であることは、6M尿素電気泳動法<sup>11)12)</sup>, フィンガープリント法<sup>7)</sup>などにより確認されたが、Pre  $\beta$ 分画は6M尿素電気泳動<sup>11)</sup>で $\beta$ 鎖より少し陽極側に泳動され、明



らかに $\beta$ 鎖のそれと異なっていた。そしてこの成分はクロマトの条件、グロビンの保存状態でも量的に変動した。アンスロン硫酸<sup>14)</sup>を用いた糖反応は陰性であった。そしてこの分画のフィンガープリントは $\beta$ 鎖のそれに一致し、同じ位置に溶出される $r$ 鎖(図3, b)のそれは否定し得た。他方この Pre  $\beta$  鎖を過ギ酸酸化処理<sup>13)</sup>後、鎖の電気泳動をしても、処理前のそれと一致して、移動度に変化はなかった。 $\beta$  鎖は同じ酸化により Pre  $\beta$  の位置に泳動されるようになったことから、Pre  $\beta$  は $\beta$ 鎖が酸化されたものであると思われた。

$\alpha$  鎖はこれが純 $\alpha$  鎖であることは、鎖の電気泳動ならびにフィンガープリント法により確認された。他方、Pre  $\alpha$  鎖は、 $\alpha$  鎖との関係が鎖の電気泳動でちょうど Pre  $\beta$  と  $\beta$  の関係にあった。また  $\alpha$  鎖と Pre  $\alpha$  鎖の混和した分画をフィンガープリントしてみても全く  $\alpha$  鎖のみのそれに一致したので、Pre  $\alpha$  は $\alpha$  鎖の酸化型と思われた。

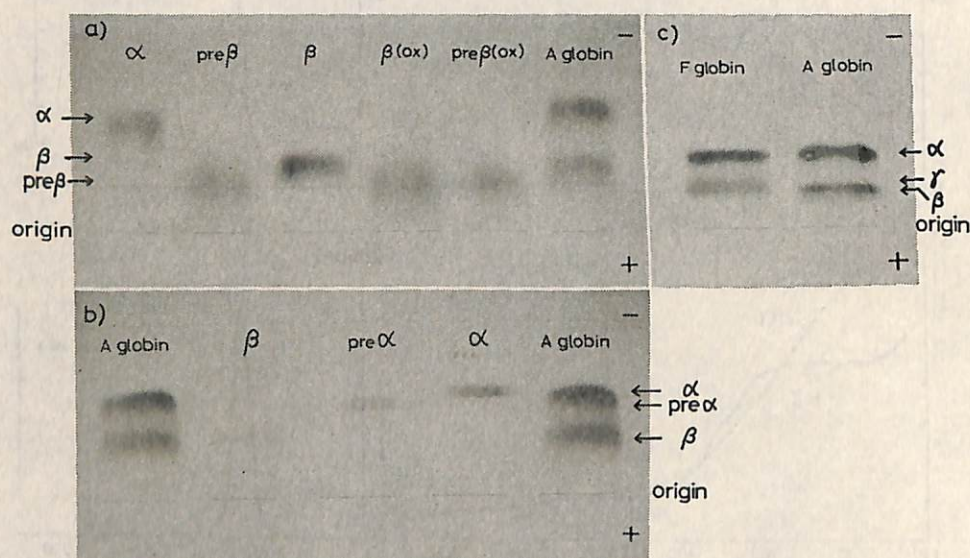


図4 CMC-クロマト分画の尿素セルロースアセテート膜電気泳動 0.05M バルビタール 6M 尿素緩衝液 (pH 8.6) ポンソー3R染色

- a) 左から順に  $\alpha$ :  $\alpha$  鎖, Pre  $\beta$ : Pre  $\beta$  鎖,  $\beta$ :  $\beta$  鎖,  $\beta(\text{OX})$ : 過ギ酸酸化した  $\beta$  鎖  
Pre  $\beta(\text{OX})$ : 過ギ酸酸化した Pre  $\beta$  鎖 A globin: Hb A のグロビン  
 $\beta$  鎖の酸化型の Pre  $\beta$ ,  $\beta(\text{OX})$  および Pre  $\beta(\text{OX})$  鎖は  $\beta$  鎖より陽極に動いている。
- b) 左から順に A globin: Hb A のグロビン  $\beta$ :  $\beta$  鎖, Pre  $\alpha$ : Pre  $\alpha$  鎖,  $\alpha$ :  $\alpha$  鎖,  
A globin: Hb A のグロビン  
 $\alpha$  鎖の酸化型の Pre  $\alpha$  鎖は  $\alpha$  鎖より陽極に動いている。
- c) 左から F globin: Hb F のグロビン A globin: Hb A のグロビン  
 $r$  鎖は  $\beta$  鎖より陰極に動く。

図2の溶出パターンは一般のクロマトグラフィーの場合と同様に、早く溶出されるもの (Pre  $\beta$ ,  $\beta$  鎖) ほど急峻な高い山となり、おくらて溶出されるもの ( $\alpha$  鎖) はなだらかな低い山となった。これによりあとから溶出される成分が量的に少くみえる。ところがこの現象以上に  $\beta$  鎖に比べ、 $\alpha$  鎖の溶出比率が少ないようにみえたので精製した  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の各0.1%



濃度液を緩衝液 I で調製し、波長 280nm に於ける  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖のモル吸光係数を求めると、 $\alpha=4.78 \times 10^3$ ,  $\beta=7.10 \times 10^3$  であり、 $\beta$  鎖が約 1.41 倍吸収が強く、これが  $\alpha$  鎖を小さくみせる原因であることがわかった。(図 3 a)

クロマト法に於ける  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の分離条件をしらべるため、例えば同じカラム (1.2cm  $\times$  12cm) を使って展開液の流速を 1.5ml/分の場合と 0.4ml/分の場合を比較すると、図 5 a と図 5 d に見る如く、遅い展開液の流速の方が、Pre  $\beta$  と  $\beta$  鎖との分離、Pre  $\alpha$  と  $\alpha$  鎖との分離がすぐれていた。また同じカラム (1.2  $\times$  12cm) を使って展開液の  $\text{Na}^+$  イオンの濃度を直線型、凸型、凹型に変化させて各成分の分離効果をみると、図 5 a, b および c に見る如く直線の濃度変化型が良い分離を示すことがわかった。

$\alpha$  および  $\beta$  鎖の回収率は乾燥重量法で求めると  $\alpha$  鎖で平均 61.1%,  $\beta$  鎖で 71.5% であり Pre  $\alpha$  および Pre  $\beta$  鎖は回収率に考慮しなかった。

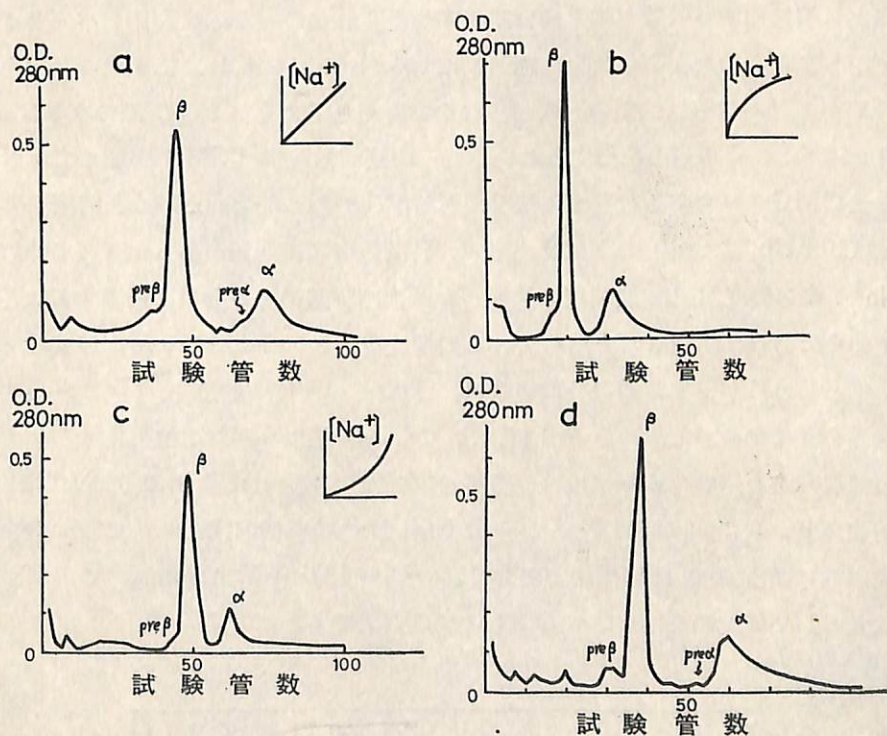


図 5  $\text{Na}^+$  イオン勾配ならびに流速を変化させたときの鎖の分離

a. Whatman CM23 クロマト法

カラムの大きさ: 1.2  $\times$  12cm, 展開液の流速: 1.5ml/分

$\text{Na}^+$  イオン濃度勾配: 0.005M  $\rightarrow$  0.040M, 3ml/1本

b. Whatman CM 23 クロマト法

カラムの大きさ: 1.2  $\times$  12cm, 展開液の流速: 1.5ml/分

$\text{Na}^+$  イオン濃度勾配: 0.005M  $\rightarrow$  0.050M, 3ml/1本

c. Whatman CM 23 クロマト法

カラムの大きさ: 1.2  $\times$  12cm, 展開液の流速: 1.5ml/分



Na<sup>+</sup>イオン濃度勾配：0.005M→0.070M, 3ml/1本

d. Whatman CM 23 クロマト法

カラムの大きさ：1.2×12cm, 展開液の流速：0.3ml/分

Na<sup>+</sup>イオン濃度勾配：0.005M→0.040M, 3ml/1本

## 考 察

本法に於て支持体として、同じCMCのうち Whatman CM 23 を選んだ最大の理由は前処理の容易さとともに、他のCMC支持体にくらべ最も高い収率を得たからである。ちなみに本法に用いた Whatman CM 23 と Whatman CM 52 (図 6 b), Serva CMC (図 6 a) を用いた時の回収率は表 1 に示す如く CM 23 が最も高かった。更に Whatman CM 52 を用いた場合は、この支持体が微粒子性であるため早い展開液の流速ではめずまりを起し使用出来なくなる。Serva CMC を用いた時は、支持体の平衡化までに複雑な操作を要し、同時にこの 2 つの支持体とも鎖に対する吸着が強く高い回収率が得られなかった。またアンバーライトを用いる  $\alpha$ ,  $\beta$  鎖分離法<sup>4)</sup>について吟味したが、溶出は図 6 b の如く  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の順で得られるので  $\alpha$  鎖分取が主目的ならば他鎖の混入が少なく有利と考えられるが実際の収率は  $\alpha$  鎖で 27%,  $\beta$  鎖で 60% と低く事実上使用できない。また直接溶血液に PCMB を加えて  $\alpha$  および  $\beta$  鎖に解裂させ CMC クロマトを行なう方法<sup>2)</sup>があるが、分離に 50 時間という長時間を要するにしては少量 (10% Hb, 1.5 ml) しか処理出来ず、時間的能率に問題があった (図 6 c)。本法において、Na<sup>+</sup>イオン濃度勾配、展開液の流速が  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の分離効果に影響することは、すでに述べた如くであり、指定した方法に於ける条件は正常なグロビンの  $\alpha$  および  $\beta$  鎖を分離する時のめやすとしうるが、異常鎖の分取の時は、勿論その性質に応じ Na<sup>+</sup>イオン濃度の変動範囲、流速等を変化すべきである。例えば、私達は、 $\alpha^A$  鎖より遅れて溶出される  $\alpha^{KURASHIKI}$  鎖に次の様な方法を用いて容易に目的成分を分取した。(図 3 d) まず 0.005M Na<sup>+</sup> で末吸着部分を溶出させ、次に 0.005M Na<sup>+</sup> から 0.03M Na<sup>+</sup> の濃度勾配をかけて、 $\beta$  鎖を溶出させた後、段階的に濃度を 0.1M Na<sup>+</sup> に変えて、 $\alpha^{KURASHIKI}$  を溶出させた。この様に変動範囲を急に大きくして異常鎖を溶出させるのも 1 つの方法である。

	$\beta$ (%)	$\alpha$ (%)
Whatman CM 23	71.5	61.1
Whatman CM 52	65.0	51.9
Serva CMC	71.3	50.2

表 1 支持体を変えた時の各鎖の回収率



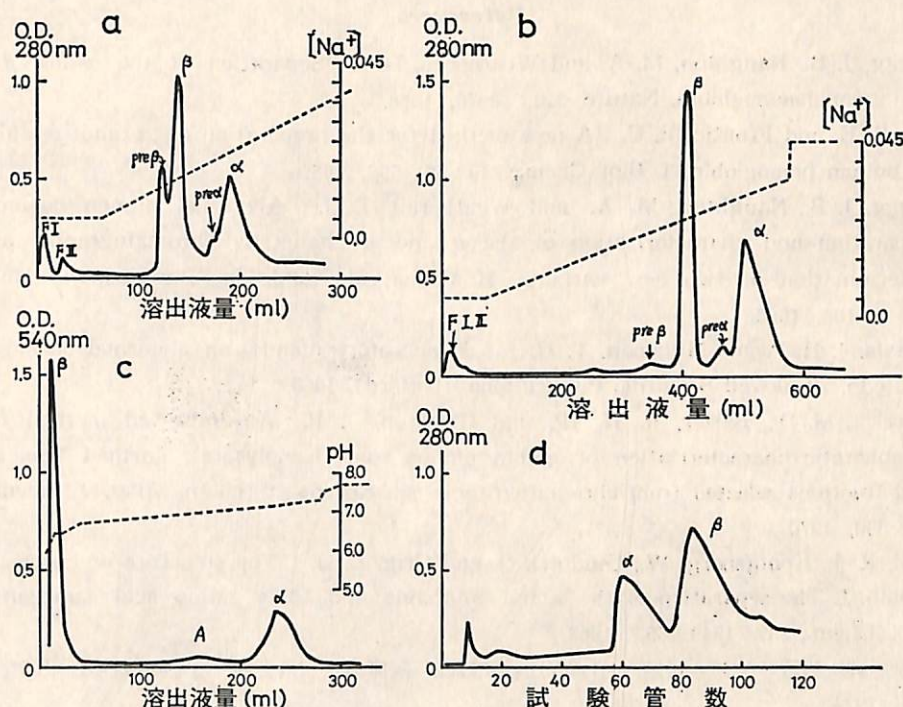


図6  $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖分離のための各種クロマト法

a. Serva CMC 法

カラムの大きさ:  $1.2 \times 11\text{cm}$ , 展開液の流速:  $1.0\text{ml/分}$

$\text{Na}^+$ イオン濃度勾配:  $0.005\text{M} \rightarrow 0.045\text{M}$

d. Whatman CM 52 法

カラムの大きさ:  $2.0 \times 14\text{cm}$  展開液の流速:  $0.6\text{ml/分}$

$\text{Na}^+$ イオン濃度勾配:  $0.005\text{M} \rightarrow 0.045\text{M}$

c. PCMB 解裂CMCクロマト法

カラムの大きさ:  $1.2 \times 12\text{cm}$  展開液の流速:  $0.1\text{ml/分}$

pH 濃度勾配:  $\text{pH}6.7 \rightarrow \text{pH}7.8$

実線は波長  $280\text{nm}$  での吸光度でタンパク濃度に基づく溶出曲線であり、破線は溶出液の pH を示す。

d. アンバーライト IRC-50 クロマト法 ( $\text{pH}1.9$ )

カラムの大きさ:  $1.2 \times 100\text{cm}$  展開液の流速:  $0.32\text{ml/分}$

尿素濃度勾配:  $4\text{M} \rightarrow 8\text{M}$

Whatman CM 23 を使用した時の収率は $\alpha$ 鎖で平均  $61.1\%$ ,  $\beta$ 鎖で平均 $71.5\%$ であり, 最高回収率はそれぞれ $69.0\%$ ,  $76.6\%$ であった。この様な高収率を得るためには, まず分離しようとするグロビン量に応じて支持体量を変化させる必要がある。すなわち一定量のグロビンに対し本法に指定した以上の支持体を用いると鎖の分離はすぐれるが収量に低下がみられた。またグロビンの保存にも注意し, できるだけ Pre  $\beta$ , Pre  $\alpha$  鎖の生成をおさえることが収率をあげる因子であることは当然といえよう。



## References

- 1) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, D. J. : Separation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of human haemoglobin. *Nature*, 219 : 69-70, 1968.
- 2) Bucci, E. and Fronticelli, C. : A new method for the preparation of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 240 : 551-552, 1995.
- 3) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, D. J. : Abnormal human haemoglobin. Separation and characterization of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb-Chesapeake and Hb-J-Bungkok. *J. Mol. Biol.*, 19 : 91-108, 1966.
- 4) Jonxis, J. H. P. and Huisman, T. H. J. : A laboratory manual on abnormal haemoglobins, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, (Oxford), 1968.
- 5) Garrick, M. D., Balzer, R. H. JR. and Charlton, J. P. : An improved method for electrophoretic characterization of globin chains from hemolysates, purified hemoglobins, and fractions selected from chromatographic separations of chain. *Anal. Biochem.*, 34 : 312-330, 1970.
- 6) Hill, R. J., Konigsberg, W., Guidotti, G. and Crig, L. G. : The structure of human hemoglobin, I. The separation of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains and their amino acid composition. *J. Biol. Chem.*, 237 : 1549-1553, 1962.
- 7) 宮地隆興 : 異常ヘモグロビン, 241-275三輪史郎編 臨床検査技術全書, 3巻血液検査 医学書院(東京), 1974.
- 8) Anson, M. L. and Mirsky, A. E. : Protein coagulation and its reversal, The preparation of insoluble globin, soluble globin. *J. Gen. Physiol.*, 13 : 469-476, 1930.
- 9) Fanelli, A. R., Antonini, E. and Caputo, A. : Study on the structure of hemoglobin. II. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. Biophys. Acta*, 30 : 608-615, 1958.
- 10) Zade-Oppen, A. M. M. : Separation of hemoglobin A and F by certain exchange dextran gels. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 15 : 491-496, 1963.
- 11) Ueda, S. and Schneider, R. G. : Rapid differentiation of polypeptide chains of hemoglobin by cellulose acetate electrophoresis of hemolysates. *Blood*, 34 : 230-235, 1969.
- 12) Schneider, R. G. : Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins- such as S, D, G, and P; or A<sub>2</sub>, C, E and O by electrophoresis of the globin chains. *Clin. Chem.*, 20 : 1111-1115, 1974.
- 13) Hirs, C. H. W. : The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J. Biol. Chem.*, 219 : 611-621, 1956.
- 14) Shetlar, M. R. : Glycoproteins : Method of study and changes in health and disease, pp. 419-457, Ed by Stefeanini M., Progress in Clin. Pathol., vol. 1. Grune and Stratton (New York) 1966.