

異常血色素の α 鎖および β 鎖のトリプシン消化法, ならびにフィンガープリント法による異常ペプチ ドの分離と同定について

川崎医科大学 生化学

日高 和夫 井内 岩夫

吉田 克子

(昭和51年9月30日受理)

Identification and isolation of the abnormal spots in the tryptic hydrolysate of the aberrant α and β chain of abnormal hemoglobin by fingerprint method.

Kazuo HIDAKA, Iwao IUCHI and Katsuko YOSHIDA

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 30, 1976)

異常血色素の異常スポットの確認および分離精製法として、従来のフィンガープリント法の各ステップの吟味を行ない、改良をほどこした。特に懸垂式高圧電気泳動装置、クロマト法の展開液およびフィンガープリントからのペプチドの溶出装置等の改良を行なった。即ち、電気泳動装置は濾紙を塩化ビニール製棒に巻きつけてクリップで固定し、それによって濾紙は常に垂直に定位置に固定出来るように工夫をこらした。新しいクロマト法の展開液（ピリジン：イソアミルアルコール：水=9：7：6）は Baglioni のそれ（ピリジン：イソアミルアルコール：水=7：7：6）にくらべ、ペプチドスポットはさらに上昇し、分離も良好であった。

濾紙小片からペプチドを効率よく抽出するために濾紙の末端を2枚のガラス板の間にはさみ毛細現象によりペプチドを抽出溶媒（6N-塩酸）とともに滴下させる様に工夫した。これらの改良によって容易に各スポットの分離の良いフィンガープリントの作製ができ、再現性もよく、高収率の回収が出来た。

Abstract

A new improved method of fingerprinting for better isolation and identification of the abnormal spots of the abnormal hemoglobin was established after careful examination of each steps based on the traditional way of the methods.

It include a new design of paper hanging type high potential' electrophoresis,

introduction of the new developer for chromatography and the elution device of the peptide from the fingerprint maps.

Electrophoresis apparatus was constructed with special attention on the paper set into electrophoresis vessel with aid of vinyl rod so that paper could be placed vertically at designated position properly.

New chromatographic developer for fingerprinting composed of the mixture of pyridine : isoamylalcohol : water = 9 : 7 : 6 was served to separate the spot more clearly to ascending direction as compared with that (pyridine : isoamylalcohol : water = 7 : 7 : 6) of the Baglioni's.

Extraction device of the peptide from the paper cut is used for drip down the eluate from the paper by interposing the paper end between the two glass plates so that extracting solvent (6 N-HCl) might move down through the paper by capillary phenomenon.

This new method achieved to separate the spots on the fingerprint maps beautifully with easier manipulation, highly efficient peptide extraction and high reproducibility.

はじめに

異常血色素の一次構造解析法は今日では以下の手順に従う、即ち、(1)血色素を脱ヘムしてグロビンを調製し、(2)クロマト法等により α 鎖と β 鎖に分離する、(3)分離鎖にトリプシンを作用させて低分子量のペプチドに切断する。(4)次いでフィンガープリント法かイオン交換カラムクロマト法によって異常ペプチドの分離精製を行ない、(5)異常ペプチドのアミノ酸分析を行なうか、あるいはさらに別の酵素により水解して小ペプチドに分離し、アミノ酸分析やアミノ酸配列を調べ、置換アミノ酸の種類の設定を行なう。これらの操作の中で重要なのはトリプシン等の蛋白分解酵素による水解ペプチドの分離精製で、いかにしてその収量および純度をあげるかはその後の操作に非常に大切である。これには現在 Ingram¹⁾や Baglioni²⁾等のフィンガープリント法と Jones³⁾のカラムクロマト法が使用されているが、上述の目的に叶った詳細な術式の報告はない。そこで私共はペプチドの分離精製法について各操作段階を吟味し、ほぼ満足すべき方法を確立したのでそれをここに報告したい。

試料と方法

本法の吟味に使用した α 鎖と β 鎖は8M尿素CMCカラムクロマト法により分取したものを使用した。フィンガープリントおよびカラムクロマト法に使用した試薬はニンヒドリン陽性物質を除くためピリジンは1.5%の割合にニンヒドリンを加えて還流後蒸留したものを、酢酸は過マンガン酸カリウムを加えて蒸留したものを使用した。イソアミルアルコール、ブタノールおよびアセトン等の溶媒は全てクロマト用特級を使用した。ペプチドの検出および同定にはそれぞれニンヒドリンの0.5%および0.05%アセトン溶液を使用した。また別のペプチド発色法

であるフルオレスカミン法⁴⁾は①10mg/dl フルオレスカミン/アセトン溶液, ② 10ml/dl トリエチルアミン/アセトン溶液を調製し, ①②の順に噴霧し, UVランプ(350nm)で蛍光の有無を調べる方法で使用した。トリプシン水解には pH スタット(東亜電波製, HS-2 A)を使用し, 水解中の pH 維持には0.1N-NaOHを用いた。また水解酵素としてはトリプシン(Worthington, ×3), ペプシン(Worthington, ×3), およびサーモライシン(DAIWA KASEI, ×3)等を用いた。分離鎖のアミノエチル化は Jones 法に準じて行ない, 東京化成のエチレンジイミンを用いた。高圧電気泳動用濾紙は Whatman 3 MM (46×57cm) を用い, 懸垂式泳動槽は私共の改良したものを, サンドイッチ式泳動槽は富士理研の冷却板式泳動槽を使用し, 両者とも電源は富士理研製高圧泳動用電源(10,000V, 200mA)を用いた。トリプシン水解ペプチドのカラムクロマト法は Jones³⁾らの方法に準じて行なった。即ち, Aminex 5 Aカラム(0.9×40cm)を用い, プリジン-酢酸緩衝液(pH3.1→5.0), 流速35ml/hr, 50°Cで行なった。

成 績

ペプチドの分離精製に影響する各ステップの種々の要因について吟味した結果, 最も推奨しうる方法として以下の方法を確立したのでそれについてまず詳述する。

1. 分離した α 鎖および β 鎖のアミノエチル化: 10ml 目盛付スピッツ型有栓試験管に精製した α (または β)鎖20mgを秤量し, 0.2g/dl EDTA 0.1ml およびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 500mg を順に入れ, 8M尿素液で全量を3.0mlとする。濃塩酸でpHを8.0にあわせ, N_2 ガスを10~15分通し, 2-メルカプトエタノール 30 μ l を加え, 密栓して3時間還元する。エチレンジイミン 0.1ml を10分間隔で3回(全量 0.3ml)加え, 密栓し, アミノエチル化反応を進行させる。1時間後透析チューブに移し入れ, 0.2N 酢酸にむかって一昼夜透析し, 凍結乾燥する。

2. トリプシン水解: 分離鎖もしくはアミノエチル化した鎖20mgを加水分解用セル(全容量: 8ml)に入れ, 水2.0mlを加えて溶解する。0.01N-塩酸に1mg/mlの割合にとかしたトリプシン液0.2mlを加え, 反応セルにpHガラス電極を挿入し, 37°Cで0.1N-NaOHを用いてpH8.0に調製する。加水分解反応の進行につれ, pHが下がるので0.1N-NaOHをpHスタットのピストンより注入し, 2時間そのpHを維持する。時間がきたら0.1N-塩酸を加えpH6.4に下げ, 生じた沈殿(core)を遠心(3000rpm, 15分)して除き, 上清を凍結乾燥する。ペプシンおよびサーモライシン水解^{5,6)}: 本法はトリプシン水解ペプチドをフィンガープリントし, それから溶出したペプチドに適用するが, ペプシン水解の場合は溶出ペプチドを入れた試験管(直径1.2cm, 長さ10cm)に0.05N-塩酸0.9mlと0.2%ペプシン0.1mlを加え, パラフィルムで密封し, 37°C, 5時間水解を行なった後, 凍結乾燥する。またサーモライシン水解の場合は0.01M $CaCl_2$ を含むpH8.0の0.05M Tris-塩酸緩衝液0.4mlとサーモライシン0.2mgを加え, パラフィルムで密封し, 40°C, 16時間水解を行ない, 氷酢酸3滴を加え, 凍結乾燥する。

3. フィンガープリント：本法では一次元に高圧電気泳動を、二次元側に分配クロマト法を行ない、ペプチドマップを作る。即ち、

a) 高圧電気泳動：Whatman 3 MMを図1 aのように裁断し、酢酸-ピリジン-水 (4:100:894) 緩衝液 (pH6.4) に浸し、あらかじめこの緩衝液に湿らせて用意した汙紙 (東洋No. 2, 60×60cm) 6枚の真中にはさみ上から圧迫し、余分の緩衝液を除く。さらに試料塗布点Sを1×1cmの乾燥した汉紙で圧迫し、この部分の緩衝液を十分に吸い取る。棒を汉紙の下に敷き塗布点Sを少しうかせ、トリプシン消化ペプチド5mgを緩衝液50μlに溶解したものを少しづつ塗布する。汉紙A側から塩化ビニール製 (塩ビ製) 円筒 (直径4cm, 高さ51cm) にBD線まで巻きつける。次いでこの円筒の中に補助棒 (塩ビ製, 直径3cm, 高さ57cm) を挿入し、巻きつけた汉紙がゆるまないように塩ビ製クリップを用いて円筒に固定する。これらの操作は巻きつけた汉紙全体が電極槽に垂直に取り付けた時落ちないように保持するためである (図1 b)。BCを上にして泳動槽の冷却溶剤 (主成分イソパラフィン) 内に入れ、補助棒を槽の上部にある陽極電極槽に固定し、汉紙のB'C'を折りまげて電極槽につけ、ステンレス製の水槽を泳動槽の上部に乗せて冷却を行なう (図1 c)。最初1000V (20~30mA) で10分間予備通電し、3400 (150~180mA) で70分間本通電を行なう。汉紙を取り出し、ひろげて電極槽に浸っていた部分を切りとりドラフト内で通気しながら乾燥する。

b) クロマトグラフィー：乾燥した汉紙のB'C'とD'E'から1cm幅の部分を取りとる (図1 d)。泳動と直角方向に円筒形をつくり、A部分に補助汉紙をあててステンレスクリップでとめる。円筒上部に補助金具をつけ、それを糸で吊り展開中に円筒がくずれないように装置する (図1 e)。ガラスシリンダー (直径18cm, 高さ62cm) にクロマト用展開液 (ピリジン-イソアミルアルコール-水=9:7:6) 400mlを入れ、汉紙を浸し、密閉し1時間飽和後室温で3日間展開を行なう (図1 f)。円筒汉紙を取り出し、ひろげてドラフト内で通気しながら充分に乾燥する。

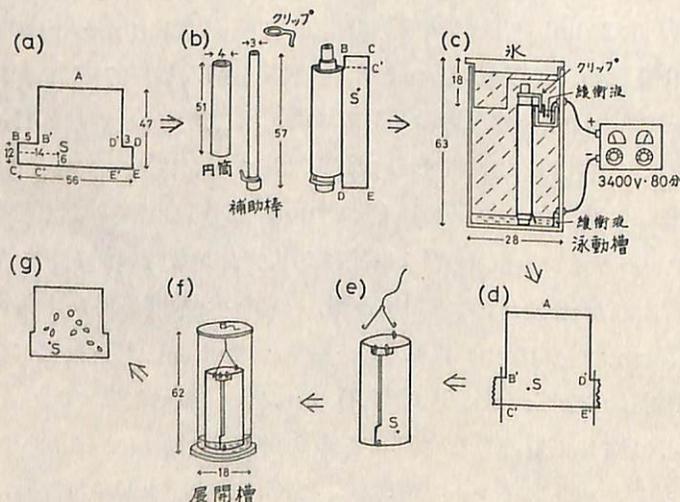


図1 懸垂式電気泳動法によるフィンガープリントの操作図

0.05ないし0.5%ニンヒドリン/アセトン溶液を沓紙に噴霧(60~70ml)し、100°C、15分加温発色させフィンガープリントをうる(図1g)。

前述の事項(a)のいわゆる懸垂式電気泳動の代りに下記のガラス板サンドイッチ式泳動法も使用するのでこれについても以下に詳述することにする。ガラス板サンドイッチ式高圧電気泳動は図2aのように裁断したWhatman 3MMを緩衝液(pH6.4)に浸し、懸垂式と同様に試料を塗布する。それをきれいなガラス板(44×50cm)2枚の間にはさみ、ガラス板から露出した沓紙部分は泳動中緩衝液の蒸発があり、それを防ぐためサララップでおおいをかける。-20°Cの冷却板にのせ冷却とプレスを兼ねた鉛製重りを乗せる。1000V(10~25mA)で10分間予備通電、2600V(100mA)で110分本通電を行なう。泳動中電流が100mA以上にあがらぬように電圧を調整する。沓紙の乾燥、二次元側クロマト法などは前述の方法に従って行なう。

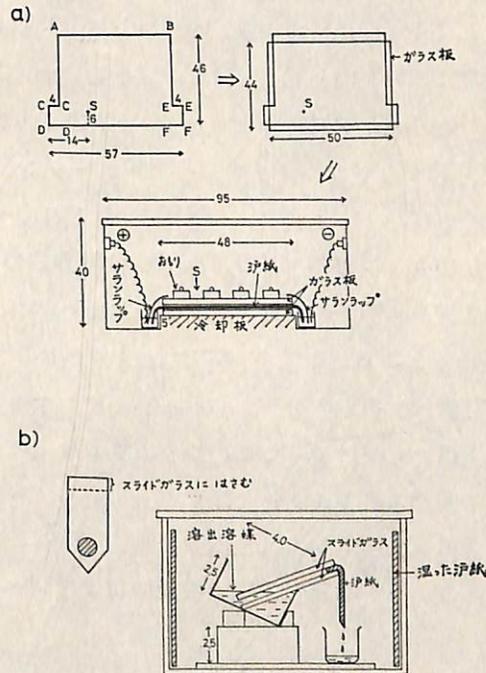


図2 a. ガラス板サンドイッチ式電気泳動法

b. フィンガープリントマップから特定ペプチドの抽出液流下法による溶出

4) フィンガープリントマップからのペプチドの分取: ニンヒドリンはペプチドのN末端アミノ基と反応して発色するため、反応したN末端はその後の分析に使用出来なくなる。そこで出来るだけN末端アミノ基をつぶさずにペプチドを分取するには薄いニンヒドリン溶液を噴霧して加温し、ペプチドスポットが確認出来るだけの発色をさせたらずぐに鉛筆でその位置をしるし、塩酸-アセトン(0.1N-塩酸:アセトン=1:9)を噴霧してペプチドの発色を消し、スポットを切り出し、アセトンで洗浄して過剰の未反応ニンヒドリンを除去し抽出液流下法によ

りペプチドを分取する。即ち、フィンガープリントマップを図 2 b のように装置を組み立て、6 N-塩酸もしくは20%酢酸を用いて溶出を行なう。溶出液量は少なくとも 2.0ml になるまで続ける。溶出中は液の蒸発を防ぐため密閉容器で行ない内壁は湿った濾紙をはっておく。

以上の如き方法を確立するためのいくつかの吟味成績は以下の如くであった。懸垂式、サンドイッチ式のいずれの泳動を用いても上述の条件ではそれぞれのペプチドスポットはお互いによく分離され、泳動およびクロマトの条件を一定にすれば、いつでも再現性のよいフィンガープリントをうる事が出来た。懸垂式泳動法によるフィンガープリントは図 3 に示すごとくであった。またニンヒドリンによる背景の汚れもなかった。ペプシンおよびサーモライシン水解ペプチドの泳動条件は α Tp-9 について、それぞれ、2300 V (70min), 3400 V (60min) で行ない、いずれのフィンガープリントも予想通りの数のペプチドスポットが分離して認められた。即ち、プラス荷電を有するペプチドは陰極側に、マイナス荷電を有するペプチドは陽極側にそれぞれその荷電の割合に対応して移動し、中性ペプチドはそれらの間に移動していた。

クロマト法の展開液として Ingram¹⁾ および Baglioni²⁾ の組成のものがあるが、Ingram の展開液 (ブタノール:酢酸:水=3:1:1) ではスポットのいわゆる tailing が著しく好ましくなかったため、私共は Baglioni のそれ (ピリジン-イソアミルアルコール:水=7:7:6) を採用し、その組成をさらにピリジン:イソアミルアルコール:水=9:7:6に改変し、前者にくらべ1.2倍の高さに全ペプチドが上昇し、しかもそれぞれのペプチドの分離も改善された。サンドイッチ式泳動法のフィンガープリントマップは懸垂式のそれと分離に於て差はなかったが、泳動終了後ガラス板から濾紙をはなす際、ガラス板へのペプチドの付着による損失が懸念された。イオン交換カラムクロマト法で得られたペプチドの溶出パターンは Jones³⁾ のそれと一致していたが、分離ペプチド主分画からペーパークロマト法⁷⁾により主ペプチドの他に数個の微量ペプチドが検出された。従ってこのカラムクロマト法により得られたペプチドは再クロマト法を行なって精製する必要があった。

フィンガープリントからのペプチド溶出は抽出液流下法^{8,9)}により分取したが、溶出後の濾紙に感度の高いフルオレスカミンを噴霧し濾紙の蛍光の有無を調べると完全に陰性で残存ペプチドは存在しなかった。

アミノエチル化 α 鎖および β 鎖のトリプシン水解ペプチドのフィンガープリントを図 3 に示したが、通常の α および β 鎖のフィンガープリントスポット以外に新スポットが矢印で示した様に数個出現した。 α 鎖はアミノエチル化の処理をしても完全に可溶化せず、依然不溶性 core が残っていた。そしてアミノエチル化 α 鎖の理論ペプチド数がフィンガープリントに出現せず、ここにアミノエチル化法にも限界があることを知った。しかしアミノエチル化 β 鎖では不溶性 core が殆んどなく、予想されるペプチド数がフィンガープリントスポットとしてマップ上に出現した。

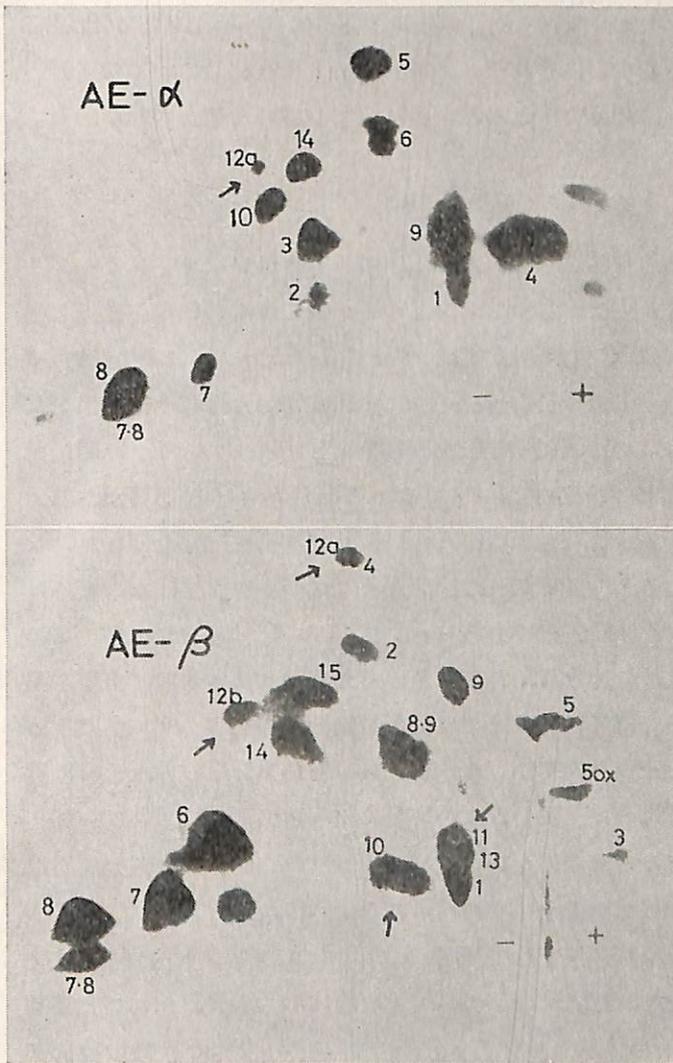


図3 アミノエチル化 α 鎖および β 鎖のフィンガープリント
矢印はアミノエチル化水解ペプチド中に新しく出現したスポットを示す

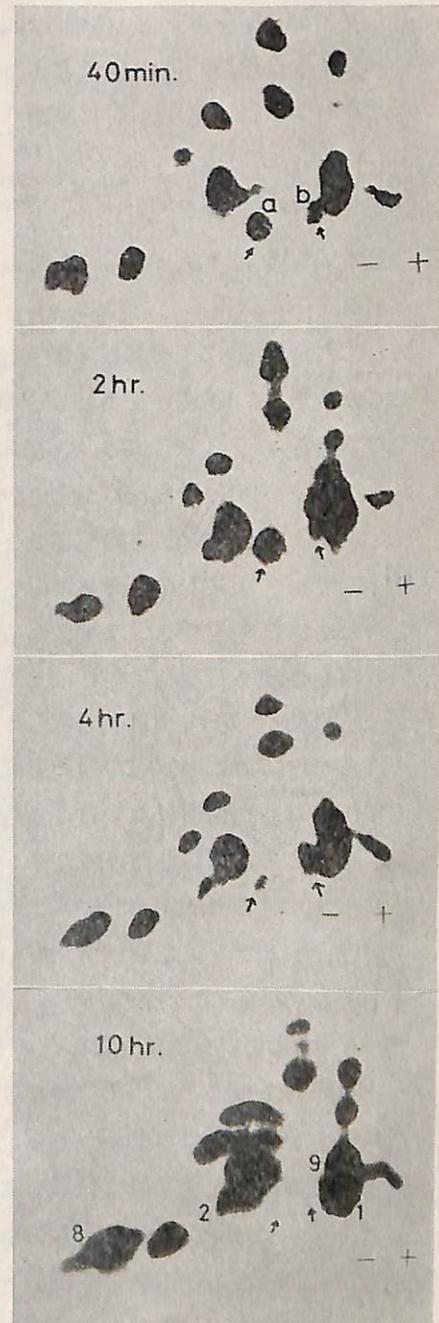


図4 ペプチド水解に於けるトリプシン作用時間の影響、
矢印は α Tp 1, 2 (a) および α Tp 8, 9 (b) のスポット
が作用時間の経過によりそれぞれの単ペプチド α Tp 1
と α Tp 2 および α Tp 8 と α Tp 9 に変化してゆく有様を示す

トリプシン加水分解時間について吟味するため、40分、2時間、4時間および10時間作用さ

せた α 鎖のフィンガープリントは図4の如くであった。矢印で示した α Tp1,2と α Tp 8,9のペプチドは水解時間の経過とともに減少し、それぞれの単ペプチドに変化していく様子がうかがえたが、他のスポットでは明らかに40分ではほとんど水解は完了していることがわかった。

考 案

懸垂式^{8,10)}とサンドイッチ^{8,9)}の両泳動法をくらべたが、いずれもきれいなフィンガープリントパターンが得られ、特に優劣はなかった。しかしサンドイッチ式では次の様な注意点を必要とした。即ち、1) 冷却板の温度は -20°C 位が適当で下げすぎると泳動中ガラス板が破損することがある。2) 電圧をあげすぎると濾紙に電気火花を生じ、濾紙が焼き切れ泳動が出来なくなる。3) ガラス板にプレスをかける場合、泳動面全体に均等に圧力をかけないと泳動に乱れを生じる原因となる。4) 泳動中次第に電流があがってくるので電圧をさげる必要がある、その結果より長い泳動時間を必要とする。これらの点を考慮に入れて泳動を行えばきれいなフィンガープリントパターンが得られるが、避けられない問題として濾紙を直接ガラス板にはさむため泳動後濾紙をガラス板からはなす時、ガラス板にペプチドが一部付着してペプチドの回収率をさげる。これに対し、懸垂式では非水系冷却剤を用いるためペプチドが溶け出す心配がなく目的ペプチド全量を回収しうる。従来の懸垂式では濾紙を陽極電極槽にクリップで止めつけるだけで濾紙の安定が悪く方向も定まりにくかったが、私共は補助棒を用い濾紙を常に垂直に、しかも定位置に取り付けられるように工夫し、より容易に再現性のよいフィンガープリントを得るのに成功した。またサンドイッチ式に比べ、ジュール熱の心配もなく十分な高電圧がかけられるため短時間にきれいなペプチドマップが得られるようになった。

現在、トリプシン水解ペプチドの分離精製法として前述のフィンガープリント法^{1,2,10,11)}と Jones らのイオン交換カラムクロマト法^{3,15)}の2つの大きな流れがあるが、クロマト法は Jones や私共の成績にも示した如く分離されたペプチド分画には主成分以外に複数の微量ペプチドが含まれている。そこでこれを純化するために何らかの再クロマトを行なって、微量混入ペプチドを除去する必要がある、収量も必ずしも高くない。従って私共が取り扱う試料量に限度がある異常血色素研究領域では必ずしも推奨しえず、むしろフィンガープリント法を推奨する。フィンガープリントからのペプチドの分取法には抽出液流下法と抽出液の遠心分離法がある。私共はこの抽出後の濾紙のペプチド残存量を知るためフルオレスカミン(蛍光反応)を用いた。本法ではペプチドの発色感度がニンヒドリンより高いから、そのままペプチドの発色試薬としても使用出来た。抽出液流下法ではペプチドは完全に溶出されたが、遠心分離法ではペプチド含有濾紙部分を小さくきざみ抽出液に1時間以上漬し、ピンホールのあるポリ遠心チューブに入れて遠心して濾紙から抽出液を可能な限り分取し、この操作を3回繰り返しても依然濾紙にペプチド残存をしめした。この事から分取法としては、抽出液流下法が推奨される。

α 鎖および β 鎖をトリプシン水解した場合、それぞれ93—139番と83—120番のペプチドは不溶性ペプチドとして残る。これはジスルフィド結合と Lys 残基の前の Asp 残基がトリプシ

ン作用を阻害するためと考えられている。そこで Jones³⁾はこのジスルフィド結合を還元し、Cys 残基を S-(β アミノエチル) Cys 残基にかえトリプシン水解基として可溶化を行なった。実際にアミノエチル β 鎖は完全にトリプシン水解を受け、フィンガープリントに全ペプチドが現われるが、アミノエチル α 鎖では完全に水解されず、特に 105-139 ペプチドは大部分 core で残り、フィンガープリントでも該当ペプチドは確認出来なかった。従ってアミノ酸置換が α 鎖の core 分画にある異常血色素の場合、Carrell¹²⁾らのように別の酵素、例えば、キモトリプシン¹²⁾、サーモライシン^{6,13)} およびペプシン^{5,14)}等の protease で水解し解析を進める必要があるであろう。

正常 α 鎖のトリプシン水解を行なうと、図 4 のように 1 時間以内でほとんど水解は完了していたが、異常血色素のアミノ酸置換の位置によっては水解時間も考慮する必要がある。例えば、 α Tp-9 に異常アミノ酸置換があり、フィンガープリントマップ上で異常 α Tp-8,9 スポットは他の正常スポットと重なり単一ペプチドとして分取困難な場合、水解時間を長くして完全に異常 α Tp-8,9 を分離し、異常 α Tp-9 のペプチド量を増加させこれを完全に分取出来るようにする。

α Tp-1, 2 の場合も同様である。通常は 2 時間以内ではキモトリプシン効果も殆んどなく適当な水解時間と思われる。

ニンヒドリン発色を行なったフィンガープリントマップは室温では 2, 3 日中に退色してしまいが冷凍室中では退色することなく長期保存が可能である。

References

- 1) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle-cell hemoglobins by "Finger print". *Biochim. Biophys. Acta*, 28: 529-545, 1958.
- 2) Baglioni, C.: An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, 48: 392-396, 1961.
- 3) Jones, R. T.: Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol, 29: 297-308.
- 4) Klein, B., Sheehan, J. E. & Grunbeg, E.: Use of Fluorecsamine ("Fluram") to detect amphetamine in urine by thin-layer chromatography. *Clin. Chem.* 20/2: 272-274, 1974.
- 5) Lorkin, P. A., Charlesworth, D., Lehman, H., Rahbar, S., Tuchinda, S. & Lie Injo Luan Engst.: Two hemoglobins Q, α 74 (EF 3) and α 74 (EF 4) Asp-His. *Brit. J. Haematol.* 19: 117-125, 1974.
- 6) Matsubara, H., Singe, A. & Sasaki, R. M.: Effect of proline residue on the hydrolysis of substrates by thermolysin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34: 714-724, 1969.
- 7) Terao, Y.: Isolation of all soluble tryptic peptides from the α poly-peptide chain of adult hemoglobin from Japanese monkey and their amino acid compositions. *Acta, Med. Nagasaki*, 13: 170-182, 1969.
- 8) Lorkin, P. A.: Fingerprinting-peptide mapping, ppt 431-448, Ed. by Lehman, H. & Huntsman, R. G., *Man's hemoglobin*, North Holland Publ. Co. (Amsterdam) 1974.

- 9) Jonxis, J. H. P. & Huisman, T. H. J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobins. 2nd edn. ppt 83-94. Blackwell Scientific Pub. Oxford (1968).
- 10) 宮地隆興：異常ヘモグロビン, p. 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.
- 11) Clegg, J. B., Naughton, M. A. & Weatherall, D. L.: Abnormal human hemoglobin separation and characterization of the α and β chains by chromatography and the determination of two new variants, Hb-Chesapeake and Hb-J Bangkok. J. Mol. Biol. 19: 91-108, 1966.
- 12) Carrell, R. W. & Irvine, D.: Characterization of the α chain core of human hemoglobin variants α 115 Ala-Asp (Tongariki). Biochim. Biophys. Acta, 154: 78-83, 1968.
- 13) Sick, K. Beale, D., Irvine, D., Lehman, H., Googall, P. T. & D. Macougall, S.: Hemoglobin G Copenhagen and Hemoglobin J Cambridge. Two new β chain variants of hemoglobin A. Biochim. Biophys. Acta, 140: 231-242, 1967.
- 14) Wiltshire, B. G., Clark, K. G. A., Lorkin, P. A. & Lehman, H.: Hemoglobin Denmark α 95(G2) Pro-Ala, a variant with unusual electrophoretic and oxygen-binding properties. Biochim. Biophys. Acta, 278: 459-464, 1972.
- 15) Schneider, R. G., Alperin, J. B., Brimhall, B. & Jones, R. T.: Hemoglobin P ($\alpha_2\beta_2^{117A+G}$): Structure and properties. J. Lab. & Clin. Med. 73: 616-622, 1969.