

韓國人을 對象으로 한 異常血色素의 變異型에 關한 研究

淑明女子大學校 藥學研究所

魯 一 協

Hemoglobin variant Found in Koreans

Ihl-Hyeob Ro, Ph.D

*The Research Institute of Pharmaceutical Science
Sookmyung Women's University*

= Abstract =

One male in the former group of 2110 Korean males of the Republic of Korea Army stationed Taegu. And two males and one female in the later group of 4590 Korean school children and university students in Seoul and Taejeon were found to have a slow hemoglobin in addition to normal hemoglobin A.

In all four subjects the slow component migrated at a rate characteristic of the G hemoglobin.

The overall incidence of the variant in the present group of Koreans was low: 4 in 6700 or 0.06 per cent.

It appears significant that no insitance of hemoglobin E were found among these Korean subjects. Hemoglobin E has been found among numerous ethnic groups of Southeast Asia and the variant most frequently appeared in Chinese subject.

By Urea-Starch-Gel Electrophoresis in Alkaline PH and A.I. Chernoff method was demonstrated that another 3 cases of abnormal hemoglobin also were beta-chain variants. This was reconfirmed by Hybridization Experiment with canine hemoglobin.

And the results of family test of 3 case of abnormal hemoglobin were heterozygous carrier.

緒 論

Hemoglobin(以下 Hb 라고 略稱함)은 肺에서 組織으로 酸素를 운반하는 生理的機能을 나타내는 一種의 色素蛋白質이다. Hb 은 分子量 6.8萬, heme 와 globin 으로 되어 있고 Hb 의 接合分子인 heme 의 構造는 일찍이 1928年 H. Fischer 에 의하여 밝혀졌으나 蛋白部分인 globin 의 化學的 構造에 대한 研究가 本格的인 進行을 보게 된 것은 1955年 以後의 일이다.

globin 은 두 種類의 polypeptide 即 α -chain 및 β -chain 이 $\alpha_2\beta_2$ 와 같이 結合한 回轉橢圓狀 蛋白體이며 heme 은 各各의 polypeptide 에 한個씩 分配되어 있다. α -chain 및 β -chain 의 生成은 各各 固有의 遺傳子의 支配를 받으며 正常人은 父母로부터 正常的인 α -chain 및

β -chain 을 만드는 遺傳子를 받는다. 兩親의 한쪽에서 非正常的인 polypeptide 를 만드는 遺傳子를 받은 사람은 正常 및 非正常的의 두 種類의 chain 을 生成하므로 正常 Hb 外에 異常 Hb 을 가지게 된다. 또 兩親雙方으로부터 非正常的인 polypeptide 를 만드는 遺傳子를 받은 사람은 正常 peptide 를 만들지 못하므로 全적으로 非正常的인 Hb 을 產出한다.

非正常的인 peptide 組成을 가진 globin 을 保有하고 있는 Hb 를 異常 Hb 라하고 이것의 生成으로 因하여 正常 Hb 의 生成이 部分的으로 또는 全적으로 抑制된 遺傳的인 狀態를 異常血色素症(hemoglobinopathy)라고 한다.

이 疾患의 代表的인 것은 鎌狀赤血球貧血 sickle cell anemia 및 地中海貧血 thalassemia 이다. 鎌狀赤血球貧

血은 鎌狀의 特異한 赤血球가 나타나는 一種의 溶血性 貧血로서 1945年 Pauling¹⁾에 依하여 이 貧血患者의 赤血球가 HbS 라고 불리우는 異常 Hb 을 가진 것이 밝혀졌다. HbS 는 酸素를 放出하여 還元型이 되면 溶解度가 $\frac{1}{200}$ 로 激減되어 sickling 을 이르게 일찌기 死亡하게 된다.

地中海貧血 thalassemia 는 鐵劑가 奏效하지 않는 小赤血球性貧血로서 그 重症은 甚한 骨變化를 이끈다. 그 名稱이 뜻하는 대로 地中海沿岸의 民族間에 볼 수 있는 遺傳的인 疾患이다.

α -chain과 β -chain의 一次構造는 1961年 Braunitzer²⁾에 依하여 γ -chain의 構造는 1962年 Schroeder³⁾에 依하여 完全히 밝혀졌으며 또 δ chain의 構造도 거의 밝혀져 있다. 異常 Hb의 代表的인 HbS 에 있어서 141個로 된 α -chain은 normal α^A -chain과 構造가 같고 146個로 된 β -chain만 Normal β^A -chain과 다르다($\alpha^A_2\beta^S_2$). β^A -chain에서는 N-terminal로부터 6번째 amino acid가 glutamic acid 인데 HbS의 β -chain의 것은 中性인 valine으로 바뀌어져 있음이 Ingram⁴⁾에 依하여 밝혀졌다.

($\alpha^A_2\beta^{Glu \rightarrow Val}$) amino acid 하나의 바뀌임이 α -chain 및 β -chain을 構成하는 血色素의 物理的 性狀(荷電, 溶解度, 易變性沈澱生成, O₂ 抱合能, 色調)에 決定的인 影響을 주어 나아가서는 血色素를 包藏하는 赤血球의 壽命을 短縮시켜 溶血性貧血을 이르게 하는 것이다.

最近 Ingram의 finger printing technique⁵⁾를 비롯한 여러가지 分析手段의 發展으로 Hb에 關한 研究는 急速度로 發展되었으며 이 研究의 動向은 새로운 異常 Hb의 發見, 그 構造의 分析, Hb type와 臨床的 症狀과의 關係, 民族移動의 推移에 關係있는 民族別分布 등을 밝히는 데 큰 도움을 주고 있다.

지금 東洋에 있어서 異常 Hb의 分布를 살펴보면 Thailand, Burma, Cambodia等地는 HbE가 높은 比로 分布되어 있고 中國大陸에는 HbG가 또 北方大陸에는 HbM이 많다는 것은 널리 알려진 일이고 隣接 國家인 日本은 그 先祖가 南方 또는 北方에서 日本列島에 渡來하였으리라는 人類學的인 解釋이 있다. 따라서 異常 Hb의 保有頻度は 낮지 않을 것이 豫想된다.

이와 같은 地域에 接해 있는 韓國은 地理的 또는 過去의 歷史的 事實, 더욱 第二次大戰, 6·25 動亂을 契期로 HbS, HbC의 保有頻도가 높은 黑人兵士와 韓國女性間의 混血兒의 出生 등으로 異常 Hb의 screening test가 切實히 要望되어오던 次 著者는 美國海軍第二醫學研究所(U.S. Naval Medical Research Unit-2)의 Dr. R.Q. Blackwell와 이 問題에 關하여 共同研究하기로 合意

보아 1966年 8月 第1次로 大邱地區의 軍人 2,110名에 對하여 screening test한 結果 1名의 異常 Hb 保有者를 發見하여 發見地名 및 澱粉電氣泳動實驗結果에 依하여 HbG Taegu라고 命名하여 報告^{6,7)}한 바 있다.

그後 著者는 獨自的으로 HbG Taegu의 本態를 究明코저 Absorption Spectrum, Alkali Denaturation, Chain anomaly 및 proband의 家族調查를 通한 遺傳經路等에 關하여 報告⁸⁾한 바 없다.

이에 依하면 HbG Taegu는 heterozygout이며 β -chain anomaly임이 밝혀졌다. 그後 R.Q. Blackwell와 著者는 HbG Taegu의 化學構造를 報告⁹⁾한 바 있다. 이에 依하면 β -chain의 22位置의 glutamic acid가 alanine으로 置換되었음이($\alpha_2\beta_2^{22Glu \rightarrow Ala}$) 밝혀졌다.

이때까지 韓國人을 對象으로 한 異常 Hb에 關한 研究는 이것이 始初였으며 1963年 山岡¹⁰⁾와 1964年 花田¹¹⁾에 依하여 在日僑胞中에서 α -chain 變異型인 Hb Fukuoka 및 Hb Kagoshima가 報告된 바 있다.

1968年 沈等¹²⁾에 依하여 서울地方 居住韓國人 男女 8,400名에 對하여 screening test한 結果 α -chain 變異型 7例, β -chain 變異型 3例를 報告한 바 있다.

今般 著者는 第2次로 서울 및 大田地區의 男女學生 4,590名에 對하여 異常 Hb의 screening test한 結果 얻어진 3名의 異常 Hb 保有者(서울에서 男女各 1名, 大田에서 男子 1名)에 對하여 chain anomaly를 決定한 바 그 結果를 報告코저 한다.

實驗方法 및 材料

1. Abnormal Hb의 檢出:

clotted blood의 hemolysate에 대하여 Smithies Vertical starch gel Electrophoresis¹³⁾ 및 Blackwell法¹⁴⁾에 따라 다음과 같이 試驗하였다.

Starch gel의 調製는 加水分解된 Soluble potato starch 75.6g (Japanese starch 2: Robinson starch 1)에 Tris-EDTA-borate buffer 560 ml를 加한 것을 Erlenmeyer flask에 取하여 強하게 振盪하면서 burner上에서 透明해질 때까지 加熱한다. 透明하게 된 것을 plastic mold(32×6.5 cm)에 熱時부어 4~6時間 또는 그 以上 放置한다.

12~14個의 slot를 하나의 gel slab에 만들어 hemolysate 約 2 μ l를 各 slot에 spotting하여 100 v. 4~7 mA. (3v/cm). 16 hrs. 電氣泳動시켜 그 移動도에 따라 異常 Hb을 檢出한다.

2. Hemolysate의 調製

異常 Hb 을 가지고 있는 proband 의 血液을 미리 heparin sodium 처리한 容器에 取하여 곧 遠沈하여 plasma 를 除去하고 赤血球層을 生理食鹽水로 5回 씻어 plasma protein 을 定全히 除去한다. 이 洗滌된 赤血球 45 ml 에 90 ml 의 蒸溜水와 toluen 40 ml 를 加하여 振盪混合하고 2日間 -25°C 에 두었다가 溶血液과 沈澱의 分離가 잘 되도록 同量의 蒸溜水로 稀釋混合한다.

이것을 4°C 에서 16,000 r.p.m. 으로 30分間 遠沈하여 toluen 層과 沈澱을 버리고 맑은 上層만 取한다.

對照試驗에 使用하는 正常成人과 어미개(成犬)의 hemolysate 도 위와 같은 方法으로 調製한다.

3. 異常 Hb 의 chainanomaly 의 決定

3-1. A. I. Chernoff 法¹⁵⁾

異常 Hb 의 chainomaly 를 決定하기 위하여 A. I. Chernoff 法에 약간의 수정을 加하여 다음과 같이 實驗한다.

Cell 에는 pH 8.6, 이온強度 0.1 의 veronal buffer 를, 電極構에는 28% 飽和 KCl 를 사용한다. starch-gel 의 調製는 111.40 g 의 hydrolyzed Robinson starch 에 pH 8.0 의 gel buffer 450 cc 를 加하여 混合한 다음 70°C 以下에서 減壓하면서 調製하여 plastic mold (32×6.5 cm)에 부어 5~6時間 방치후 사용한다.

Proband 의 Hb 에서 Take¹⁶⁾法에 따라 만든 globin 을 cell-buffer 50 ml 에 2-mercaptoethanol 0.5 ml 를 加한 混液에 4 g/dl 되도록 溶解하여 遠沈시킨 것 10 μ l 를 starch gel slab 에 apply 하여 200 v. 50 mA 16 hrs 4°C 에서 電氣泳動한다.

3-2. Urea-Starch Gel Electrophoresis(尿素解裂 澱粉電氣泳動)

a) Urea-Starch gel 의 調製

尿素 36.0 g(最終尿素濃度 6 M)와 hydrolyzed starch 12.50 g 을 乳鉢에서 잘 混合하여 500 ml 의 beaker 에 넣고 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) 70 ml 와 2-mercaptoethanol 0.35 μ l 를 넣어 잘 부유시켜 500 ml 의 丸底 flask 에 옮기고 70°C 의 水浴에서 7分間 加熱하여 gel 를 만든다.

b) Hb 의 前處理 및 apply

Hb 濃度 約 3 g/dl 의 精製된 HbA₁ 및 異常 Hb 液 各 20 μ l 에 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) 20 μ l 및 尿素 30 mg(最終濃度 8 M)를 加하여 混合溶解시키고 4°C 에서 하루밤 放置하고 그 15 μ l 를 urea-starch

gel 의 中央部에 apply 한다.

3-3. Hybridization Experiment(雜種化實驗)

Huisman 方法¹⁷⁾에 準하였으며 Hb 濃度 3 g/dl 의 異常 Hb 과 개(犬)의 赤血球 hemolysate(Hb can) 各 0.2 ml 를 混合하고 이것을 二分하여 半은 0.1 M-acetate buffer (pH 4.7)에서 1日間 透析한 다음 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1)에 다시 2日間 透析시킨다. 나머지 半은 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1)에서 2日間 透析시킨다.

電解槽에는 pH 9.0 의 boric acid-NaOH buffer 를 넣고 15 v/cm, 3 mA/cm, 5 hrs, 4°C 에서 泳動시킨다.

4. 家族關係 調査

異常 Hb 을 가지고 있는 proband 의 家族에 대하여 遺傳經路를 調査하기 위하여 父母兄弟를 대상으로 finger prick 法에 의하여 採血하고 1에 의하여 檢査한다.

5. 化學藥品

- ① Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan: E. Merck.
- ② Disodium-ethylendiaminetetraacetate. certified A.C.S. Fisher Scientific Co.
- ③ Boric acid: E. Merck.
- ④ Robinson starch: Potato starch (U.S.P). Stock 1-453-075, Robinson Laboratory.
- ⑤ Japanese Starch: Starch potato, Wako Co. Japan.
- ⑥ Merthiolate (Thimerosal): Eli Lilly and company.
- ⑦ Stach hydrolysed: Connaught Medical Research Lab. Univ. of Toronto. Canada.
- ⑧ Ethylendiaminetetracetic acid (EDTA): E. Merck.
- ⑨ 2-Mercaptoethanol: (Metheson) Coleman and Bell, East Rutherford, New Jersey.
- ⑩ Heparin Sodium injection: U.S.P.

實驗結果 및 考察

1. 異常 Hb 의 檢出

proband 의 hemolysate 와 對照하기 위하여 正常 hemolysate 에 對하여 Smithies vertical starch gel electrophoresis 한 結果는 Fig. 1 과 같다. 便宜上 檢出地名에 따라 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Tajuon 이라고 命名한다.

이와 같이 總對象 4,590 名에 對하여 實驗한 結果 3 名의 異常 Hb 保有者를 檢索하였으며 starch-gel-electrophoresis 結果 正常 HbA 에 뒤따르는 slow-moving

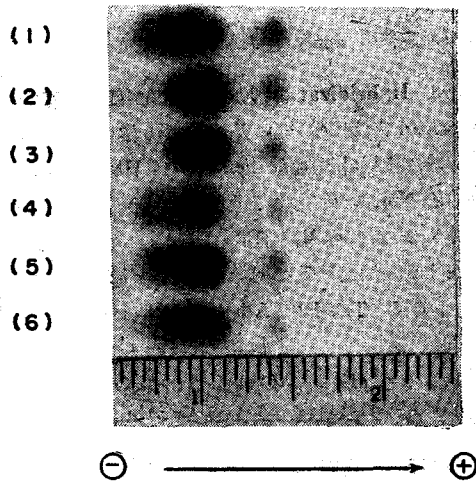


Fig. 1. Starch gel electrophoretic patterns (Tris-EDTA-borate buffer pH 8.9) of hemolysate of normal and proband. Migration left to right. Amidoblack 10B stained.

(1): HbG Taegu, (2), (3): normal A,
(4): Hb Seoul-1, (5): Hb Seoul-2, (6) Hb Taejuon

hemoglobin 을 가지고 있는 異常 Hb 들이다. 泳動結果의 移動度를 HbG Taegu 와 比較하여 보면 대체적으로 相對的移動度가 類似하며 또 3 case 의 異常 Hb 들도 서로 거의 같은 移動性을 나타내고 있다. 보다 決定的인 amino acid 의 sequence 決定이 必要하지만 現在의 實驗結果에 依하면 HbG Taegu 와 類似한 slow-moving hemoglobin 들이라고 볼 수 있다.

參考로 Hb Seoul-(1)은 實驗當時 國民學校 6學年 男學生, Seoul-(2)는 大學校 1學年 女學生, Hb Taejuon 은 中學校 1學年 男學生이었다.

2. 異常 Hb 의 Chainanomaly 決定

2-1. A.I. Chernoff 法에 依한 chainanomaly 實驗結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 正常 및 非正常 globin 의 α -chain 은 陰極으로 β -chain 을 陽極으로 移動하였으며 HbG Taegu 를 비롯하여 異常 globin 인 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon 은 正常 globin 의 β -chain 보담 差異있게 移動하였다.

2-2. Urea-starch Electrophoresis 에 依하여 pH 8.1 에서 8M 尿素로 解離시켜 泳動시킨 結果는 Fig. 3과 같이 HbA 에서는 陰極側에 한개의 band 와 陽極으로 移動한 2개의 band 가 보이며 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon 은 陰極側은 normal A₁과 같고 陽極側에서는 正常 HbA₁의 β^A 보다 빠르면서 正常 A₁에 뒤따르는 band 가 있다.

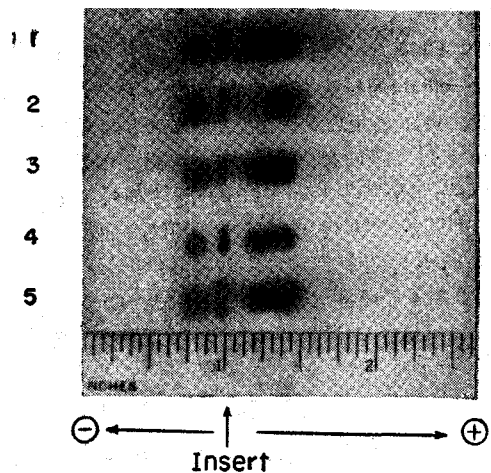


Fig. 2. Vertical starch gel electrophoresis patterns of identifying for chainanomaly of proband's hemolysate. Electrophoresis was carried out at 10 v/cm for 6 hrs. in the cold (4°C), migrated to both sides.

(1): HbG Taegu (2): Normal A (3): Hb Seoul-1, (4): Hb Seoul-2 (5): Hb Taejuon

2-3. hybridization experment 를 한 結果는 Fig. 4와 같다. HbA₁과 Hb can 을 同量 混合하여 pH 4.7의 buffer 및 pH 8.1 의 buffer 에 透析시킨 混合液(Hb A₁+Hb can hybrid)에서는 4개의 band 가 있고 같은 混合液을 pH 8.1 의 buffer 에만 透析시킨 것(HbA₁+Hb can control)은 HbA₁과 Hb can 에 해당하는 2개의 band 만 나타나 있다. Hb A₁+Hb can hybrid 에서 생긴 4개의 band 중에서 두個는 各各 Hb A₁과 Hb can과 一致하는 band 이다.

Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon 3個 모두 陽極側에 거의 같은 移動度를 나타내는 2個와 4개의 band 가 있다.

異常 Hb 의 分子構造가 어느 peptide chain 에 異常이 있는가를 알아보기 위하여 Hb 에서 globin 을 分離하여 얻는 것에 對하여 A.I. Chernoff 法에 따라 2-mercaptoethanol 을 함유하는 barbital buffer (pH 8.6)에 10 μ l 를 apply 하여 泳動시켰으며 對照로 正常 globin 과 比較한 結果 β -chain 이라고 할 수 있는 pattern 이었다.

다음 urea dissociation electrophoresis 에 따라 pH 8.1 의 8M 尿素로 解離시킨 다음 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1)를 사용하여 urea-gel 을 만들어 chainanomaly 를 確認한 結果, 3 case 모두 β -chain 이라고 判別할 수 있었다.

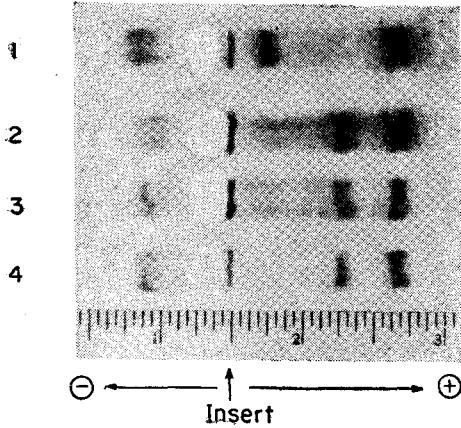


Fig. 3. Urea-mercaptoethanol-tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) starch gel electrophoretic patterns of Hb A₁ and abnormal Hb. Vertical urea gel electrophoresis was carried out at 10v/cm for 10 hrs. in the cold (4°C). Migration to the both sides. Amidoblack 10 B stained.
(1): HbA₁, (2): Hb Seoul-1, (3): Hb Seoul-2, (4): Hb Taejuon

다음 hybridization experiment에 의하여 再確認하였다. Hb은 4개의 polypeptide chain으로 된 tetramer로서 pH 4.5~6.5와 pH 11에서 解離하여 주로 dimer로 존재하며 pH 3.5 이하와 11.5 이상에서 Hb은 變性한다. Hb A₁은 $\alpha_2^A\beta_2^A \rightleftharpoons 2\alpha^A\beta^A \rightleftharpoons 2\alpha^A + 2\beta^A$ 와 같이 tetramer, dimer 및 monomer가 相互平衡狀態에 있으며 pH를 낮추어주면 平衡은 右側으로 解離하고, 中性으로 하여주면 左側으로 再結合이 일어나 $\alpha_2^A\beta_2^A$ 라는 元來의 tetramer로 된다.³²⁾

HbA₁과 Hb can을 同量混合하여 pH 4.7의 buffer에 透析시켜 酸性으로 하면 $\alpha_2^A + \beta_2^A + \alpha_2^{can}\beta_2^{can} \rightarrow 2\alpha^A\beta^A + 2\alpha^{can}\beta^{can} \rightarrow 2\alpha^A + 2\beta^A + 2\alpha^{can} + 2\beta^{can}$ 으로 解離하고 이것을 中和하면 이들 각 monomer들은 再結合되어 dimer를 거쳐 tetramer가 形成된다. 이때 形成되는 tetramer의 數는 $2\alpha^A + 2\beta^A + 2\alpha^{can} + 2\beta^{can} \rightarrow \alpha_2^{can}\beta_2^A + \alpha_2^A\beta_2^{can} + \alpha_2^{can}\beta_2^{can} + \alpha_2^A\beta_2^{can}$ 의 네個가 되며 이中 2個는 來의 Hb A₁과 Hb can과 같은 tetramer이지만 $\alpha^{can}\beta_2^A$ 와 $\alpha_2^A\beta_2^{can}$ 은 새로히 形成된 hybrid tetramer이며 電氣泳動速度가 各各 다르기 때문에 starch gel 또는 agar gel에서 混合物를 泳動시키면 陽極으로부터 $\alpha_2^{can}\beta_2^A$, $\alpha_2^A\beta_2^A$, $\alpha_2^{can}\beta_2^{can}$ 및 $\alpha_2^A\beta_2^{can}$ 順으로 各各 分離된다.

HbG Taegu, Hb Seoul-(1), (2) Hb Taejuon과 Hb can, Hb A₁과 Hb can을 解離시켰다가 再結合시켰을 때 새로 形成된 hybrid tetramer中 移動도가 느린 것은

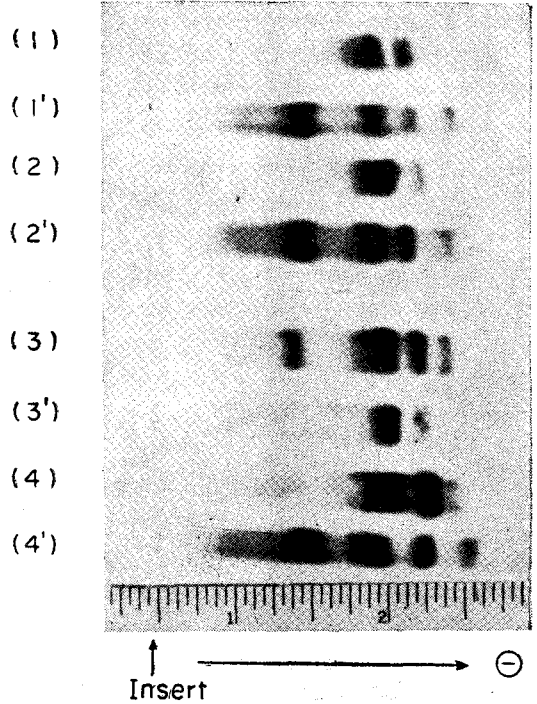


Fig. 4. Starch gel electrophoretic patterns (Tris-EDTA-borate buffer, pH 8.1) of hybridization experiments. Electrophoresis was carried out at 15 v/cm for 5 hrs. in the cold (4°C). Amidoblack 10 B stained.
(1), (1'): Hb Seoul-1, (2), (2'): Hb Seoul-2, (3), (3'): Hb Taejuon, (4), (4'): HbG Taegu

(α^A 에 β^{can} 에서 생긴것) HbG Taegu에서나 그해 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon에서나 서로 같지만 移動도가 빠른것(α^{can} 과 β^A 사이에서 생긴것)은 서로 移動도가 약간 틀리며 HbG Taegu가 多少 빠른 것 같으며 나머지 3 case는 大概 같다.

以上の chainomaly test 세가지 結果를 綜合檢討하여 본 結果 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon은 全部 β -Chain 變異型이다.

3. 家族關係 調査

1의 異常 Hb 檢出法에 따라 異常血色素保有者家族에 對하여 調査한 結果는 다음과 같다. Hb Seoul-(1) 및 (2)는 모두 어머니로부터 Hb Taejuon은 兩親다 死亡하였으므로 生存하고 있는 兄弟 3名에 對하여 screening test 한 바 한 名만이 異常 Hb 保有者인 點으로 보아 역시 父母 한쪽에서 遺傳된 heterozygout이다.

앞에서 말한 바와 같이 Hb Seoul-(1), (2) 및 Hb Taejuon 모두 國民學校, 中學校 및 大學校 在學生들이

며 外觀上 健康하며 特記할만한 臨床的 異常이 없다고 말하는 heterozygout 이다

結 論

本研究는 韓國人을 對象으로 하여 異常 Hb 의 screening test, 保有頻度 및 檢出된 異常 Hb 의 chain anomaly 를 研究한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 總對象 6,700 名中 4 名의 異常 Hb 保有者를 檢索하였다. 이 結果에 依하면 過히 높지 않은 0.06%의 保有頻도를 나타내고 있다.

2. 東南亞等地에서 흔히 있는 異常 HbE 型은 韓國等地에서는 檢出되지 않으리라는 豫想을 뒷받침하는 것 같다.

3. HbG Taegu 를 除外한 3 case 의 異常 Hb 도 역시 β -chain 變異型였음이 밝혀졌다.

4. HbG Taegu 를 除外한 3 case 의 異常 Hb 保有者의 家族調查結果 父母의 한쪽에서 遺傳된 heterozygout 임이 밝혀졌다.

參 考 文 獻

- 1) Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., & wells, I.C.: *Sickle cell anemia, a molecular disease. Science* **110**, 543, 1949.
- 2) Braunitzer, G., Gehring-Muller, R., Hilschmann, N., Hilse, K. Hobom, G., Rudloff, V. & Wittmann-Liebold, B.: *Die Konstitution des normalen adulten human Hämoglobins. Z. physiol. chem.* **325**, 283, 1961.
- 3) Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., & Cormick, J.: *Further sequences in the γ -chain of human fetal hemoglobin. proc. Natl. Acad. Sci. U S.* **48**, 284, 1962.
- 4) Ingram, V.M.: *Abnormal human hemoglobin. III. The chemical difference between normal and Sickle-cell hemoglobin. Biochim. Biophys. Acta.* **36**, 402, 1959.

- 5) Ingram, V.M.: *Abnormal human hemoglobin. I. The composition of normal human and sickle cell hemoglobin. Biochim. Biophys. Acta.* **28**, 539, 1958.
- 6) R.Q. Blackwell, I.H. RO, J.J-H Huang, L.C. Chien.: *J. Formosan Med. Assoc. (Abstract) in press* 1966.
- 7) R.Q. Blackwell, I.H. RO, J.J-H Huang.: *Hemoglobin Variants in Koreans: Hemoglobin G Taegu. Science*, **158**, No. 3804, 1056~57, 1967.
- 8) 魯一協: *Abnormal hemoglobin G. Taegu* 의 本態에 關한 研究. 淑明女子大學校論文集, **7**, 377, 1968.
- 9) R.Q. Blackwell, I.H. RO., C.S. Liu, H.J. Yang, C.C. Wang and J. T-H. Huang.: *Haemoglobin Variant found in Koreans, Chinese, and North American Indians. Am. J. phys. Anthropol.*, **30**, 389-392, 1970.
- 10) 山岡憲二: 診療, **10**, 181, 1963.
- 11) 花田基典: 日本臨床血液協會 Symposium, 1964.
- 12) Shim, B.S., Kim, C.S., Chon, S.U., Lee, T.H., Kang, Y.S., Hong, K.J.: *Four Korean hemoglobin Variants. J. of Korean Med. Ass.* **11**, No. 12, 67, 1968.
- 13) Smithies, O.: *An improved procedure for starch-gel electrophoresis. Biochem. J.*, **71**, 585, 1959.
- 14) R.Q. Blackwell and J. T-H. Huang.: *Simplified preparation of blood hemolysates for hemoglobin electrophoresis. Clin Chem.* **11**, No. 6, 1965.
- 15) Chernoff, A.I. and Pettit, Jr, N.M.: *A qualitative method for identifying abnormalities of the polypeptide chains of hemoglobin, Blood*, **24**, No 6, 1964.
- 16) 田家照生: 生化學, **36**, 387, 1964.
- 17) Huisman, T.H.J.: *Normal and Abnormal human hemoglobins. Adv. clin. chem.* **6**, 231, 1965.