

CHROM. 4132

DÉRIVÉS DANSYLÉS DES ACIDES AMINÉS

CHROMATOGRAPHIE MONODIMENSIONNELLE ET SIMULTANÉE DE PLUSIEURS ÉCHANTILLONS SUR UNE MÊME COUCHE MINCE

DOMINIQUE STEHELIN ET HENRI DURANTON

Laboratoire de Physiologie Végétale, Institut de Botanique, 8 rue Goethe, 67 Strasbourg (France)*

(Reçu le 10 mars 1969)

SUMMARY

Dansyl derivatives of amino acids. Simultaneous analysis of several spots on the same thin layer by one-dimensional chromatography

A new chromatographic method for the identification of dansyl derivatives of amino acids is described. The method permits a rapid, simultaneous analysis of eight to ten samples. The derivatives are spotted along with authentic samples for identification on the plate in parallel streaks, separated by furrows made with a spatula, and successively developed, always in the same direction, using several solvents of increasing polarity. The method has been applied to the analysis of the N-terminal amino acids of several peptides.

INTRODUCTION

L'introduction des dérivés dansylés des acides aminés dans la technologie adaptée à l'étude des structures primaires des protéines s'est avérée très fructueuse¹. Son succès provient de ce que cette technique peut s'appliquer à de faibles quantités de matériel à analyser. En effet, elle nécessite environ 10 à 100 fois moins de matériel que la méthode classique des dérivés dinitrophenylés.

Le chlorure de Dansyl (DNS-Cl)** forme, avec les groupements aminés, des dérivés fluorescents en lumière ultra-violette². Ces dérivés sont stables lors d'une hydrolyse acide ou basique. Il est donc possible, après hydrolyse d'un peptide ou d'une protéine, traité par le chlorure de dansyl, de caractériser l'acide aminé N-terminal par chromatographie. La sensibilité de la technique permet également de contrôler la pureté de fractions peptidiques. (Pour une étude générale, voir les références bibliographiques 2 et 3).

* Applications Biologiques, Centre Nucléaire de Strasbourg, Équipe Associée au C.N.R.S.

** Chlorure de 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfonyle.

NH₂

ILE
LEU
VAL
PRO
PHE
MET
ALA
TYR
TRP
GLY
Glu
Thr
Met-SO₂
Ser

B
A
HT

ILE
LEU
VAL
PRO
PHE
MET
ALA
TYR
TRP
GLY
Glu
Thr
Met-SO₂
Ser

HT
HT

G
D
C
E
G

ASP
GLN
ASN

HO

Met-SO₂
Ser
Gln
ASP
GLY
Glu
Thr
Met-SO₂
Ser

α-HIS
ARG
ε-LYS
α-LYS

F
SLY-3

De nombreux auteurs ont étudié la séparation des dérivés dansylés, soit par électrophorèse¹, soit par chromatographie sur papier⁴ ou sur couches minces de silice^{5,6}, d'alumine⁵ ou encore de polyamide⁷.

Jusqu'à présent, toutes ces séparations ont été réalisées par chromatographie bidimensionnelle. De plus, il était souvent nécessaire, pour lever l'ambiguïté d'une détermination, d'isoler sur le chromatogramme un produit qu'il fallait rechromatographier. Ces manipulations étaient longues et délicates, et il résultait de ces inconvénients que la technique de dansylation ne pouvait guère être utilisée comme procédé de routine.

Nous décrivons ici une méthode de chromatographie monodimensionnelle sur plaque de gel de silice qui permet l'analyse simultanée d'une dizaine d'échantillons par plaque. Parallèlement aux échantillons, migrent une vingtaine de DNS-dérivés d'acides aminés étalons. La caractérisation des échantillons est obtenue par comparaison directe avec les étalons ayant migrés dans des conditions strictement semblables.

De plus, l'introduction de chromatoplaques toutes prêtes, préfabriquées et standardisées*, qui sont pourvues d'excellentes qualités mécaniques, permet une reproductibilité parfaite des résultats et une manipulation simplifiée.

Enfin, la mise au point d'un système d'enregistrement photographique des résultats, permet de conserver les renseignements obtenus par les DNS-dérivés, dont la fluorescence disparaît rapidement.

PRINCIPE

La plaque de silice préfabriquée est striée, au moyen d'une pointe, en couloirs parallèles d'un centimètre de large (voir Fig. 1). Dans chaque couloir est alors déposé, soit un ou plusieurs DNS-acides aminés étalons judicieusement choisis, soit un échantillon à analyser.

Nous développons les plaques toujours dans la même direction, par des solvants de polarité croissante, qui entraînent successivement trois groupes de DNS-acides aminés, classés par polarité croissante:

Groupe 1. Les DNS-dérivés des dix acides aminés suivants: Ile, Leu, Val, Pro, Phe, Met, Ala, Lys, Tyr, Trp.

* Merck: DC Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄.

Fig. 1. Chromatographie des DNS-dérivés sur couche mince de silice. (Photographie effectuée selon la Fig. 3a.) Les DNS-acides aminés sont déposés dans dix couloirs du côté gauche de la plaque et les échantillons à analyser sont déposés du côté droit de la plaque. Ce sont les peptides d'un hydrolysate tryptique de protéine avant séparation (noté HT) et après séparation chromatographique sur colonne échangeuse d'ions (notés A, B etc.). Trois solvants entraînent successivement et toujours dans la même direction tous les DNS-dérivés, partagés en trois groupes de polarité différente (voir le texte). Tous les dérivés ont été purifiés préalablement sur couche mince. Le signe ↓ indique les taches de décomposition sur plaque de la DNS-Met. (a) Plaque après chromatographie dans le solvant 1. L'on identifie par comparaison directe: A = Leu; B = Val; HT = Leu + Val. L'on distingue déjà les dérivés du groupe 2 qui commencent à migrer. (b) Plaque après chromatographie dans le solvant 2. L'on identifie par comparaison directe: C = Glu; D = Thr; E = Asp; G = Glu + Asp. Dans ce dernier cas, il s'agit d'une fraction peptidique non pure. Chacune de ces taches se trouve présente dans la colonne HT. Dans ce solvant le groupe 1 est pratiquement entraîné au front du solvant. (c) Plaque après chromatographie dans le solvant 3. L'on identifie par comparaison directe: F = Cy(SO₃H). De plus, les DNS-dérivés identifiés dans le solvant 2 peuvent être contrôlés ici.

Groupe 2. Les DNS-dérivés des huit acides aminés suivants: Gly, Glu, Thr, Met (SO₂), Ser, Asp, Gln, Asn.

Groupe 3. Les DNS-dérivés dits "hydrosolubles" (que l'on ne peut extraire du milieu aqueux par l'éther éthylique): O-Tyr, α -His, Arg, ϵ -Lys, α -Lys, Cy (SO₃H).

Un premier solvant, peu polaire, entraîne le premier groupe, et permet de caractériser les acides aminés de ce groupe, les autres dérivés restant pratiquement à l'origine. Puis un second solvant, plus polaire que le premier, entraîne, toujours dans la même direction, le deuxième groupe de dérivés, le premier groupe étant alors entraîné pratiquement frontalement, et le troisième groupe restant à l'origine. Enfin, un troisième solvant permet l'identification des quelques dérivés "hydrosolubles" formant le troisième groupe.

Ainsi, après chaque migration, les échantillons sont caractérisés par comparaison directe avec les DNS-acides aminés témoins qui ont été entraînés parallèlement. En cas d'incertitude, celle-ci est levée en observant les spots obtenus après migration dans le solvant précédent ou suivant.

Plusieurs mélanges de solvants ont été étudiés dans chaque groupe de polarité.

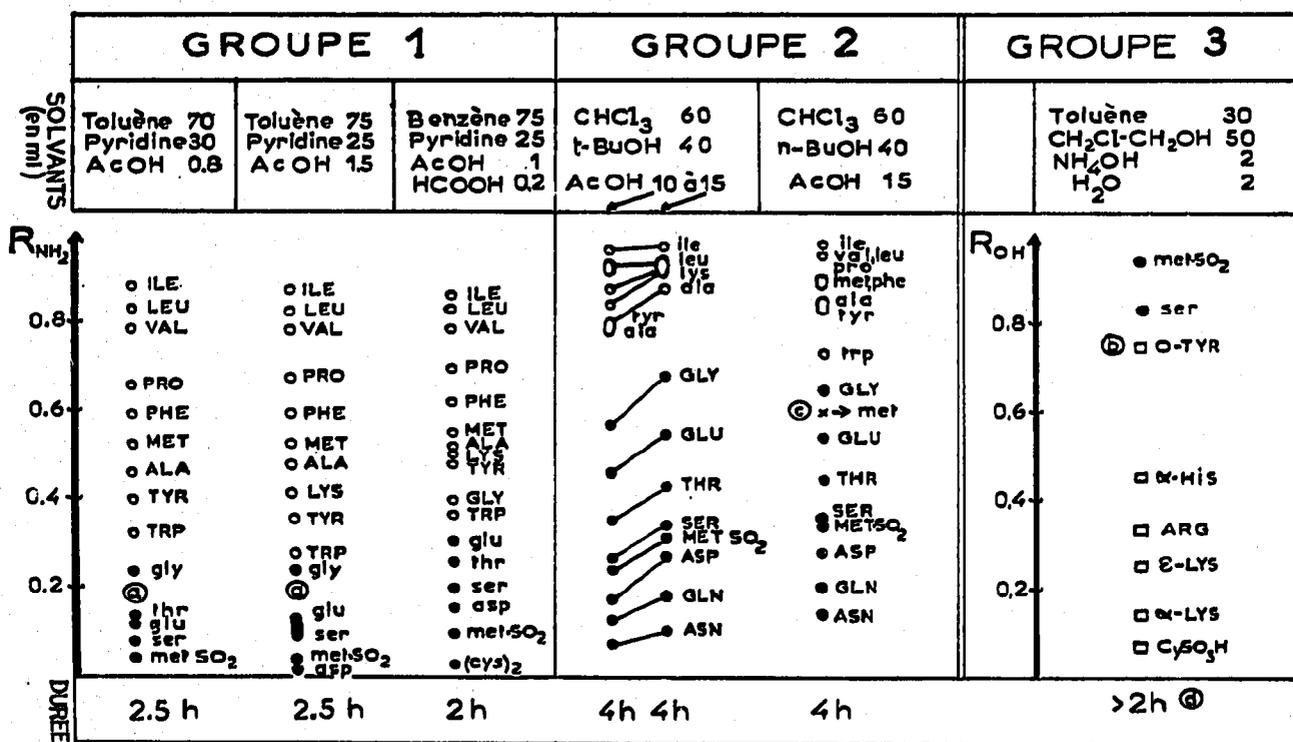
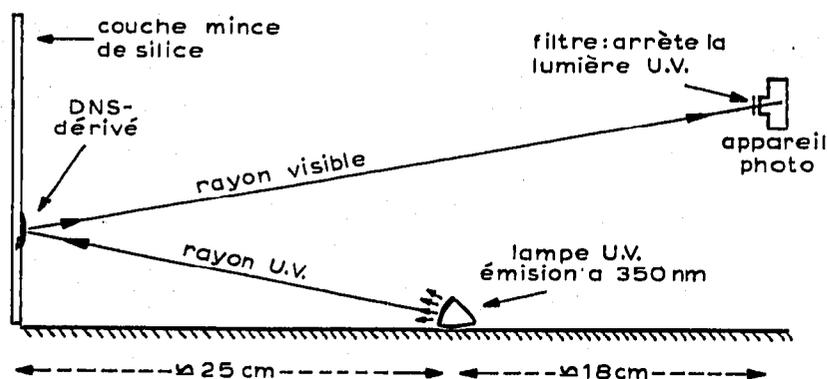


Fig. 2. Les mobilités des DNS-dérivés dans les solvants décrits, sont données par rapport aux étalons internes DNS-NH₂ (R_{NH₂}) pour les groupes 1 et 2, et DNS-OH (R_{OH}) pour le groupe 3. Les noms en lettres majuscules sont ceux des DNS-dérivés identifiés dans le solvant indiqué. Les noms en lettres minuscules indiquent les mobilités des DNS-dérivés des autres groupes dans ce solvant. (a) La di-DNS-HIS fournit une tache rose à cet endroit. Elle se décompose sur plaque pour donner l' α -DNS-HIS (il en est de même lors de l'hydrolyse acide de ce dérivé). (b) La O-tyrosine présente une tache rose, comme la di-DNS-HIS, alors que tous les autres DNS-dérivés présentent une fluorescence verte à 350 nm. Les DNS-dérivés des acides aminés Tyr, Gly, Glu, Thr, Ser peuvent présenter une tache secondaire jaune. Celle-ci est éliminée en traitant l'étalon par HCl 6 N. (c) La DNS-MET se décompose sur plaque en fournissant des taches caractéristiques (voir fig. 1b et c). (d) Le temps peut être augmenté à volonté pour obtenir une meilleure résolution. (Il faut environ 6 h au solvant pour atteindre le bord supérieur de la plaque.)

(a) montage pour diapositives en couleurs.



(b) montage pour photo sur papier sensible

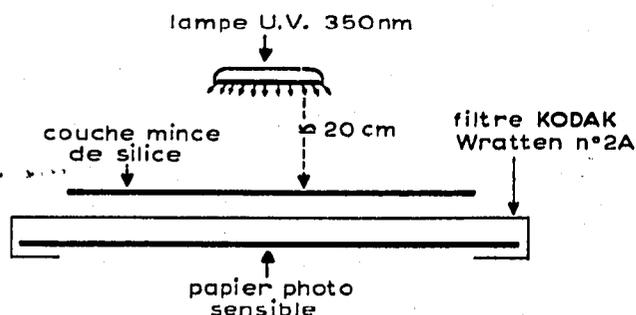


Fig. 3. Photographie des DNS-dérivés. (a) Appareil Zeiss "Ikon" + objectif additionnel $f = 0.5 \text{ m}$ + filtre U.V. Zeiss "Ikolor" (accessoires normaux de l'appareil); film "Ektachrome" pour diapositives couleurs, 23 DIN; temps de pose 6 min, dans les conditions de la figure; lampe U.V. Camag type TL 900. (b) Photographie sur papier sensible normal. Filtre Kodak "Wratten", No 2A ou 8; le filtre doit bien couvrir le papier sensible, à cause des effets de bords; temps de pose 2 min dans les conditions de la figure; lampe UV Camag type TL 900.

Les mobilités obtenues pour les DNS-dérivés figurent sur la Fig. 2, par rapport à deux étalons internes: (1) Pour les groupes 1 et 2, cet étalon interne est la dansylamine (DNS-NH_2)* toujours présente dans le milieu. (2) Pour le groupe 3, l'étalon interne est l'acide sulfonique (DNS-OH)**, composé d'hydrolyse du réactif, qui présente une fluorescence bleue qui le distingue des autres dérivés.

Après chaque migration, les spots sont repérés au crayon graphité, ou photographiés par l'un des dispositifs décrits plus loin (voir Fig. 3). Le principe de la photographie de ces dérivés fluorescents est le suivant: les DNS-dérivés transforment les radiations ultra-violettes en radiations dont la longueur d'onde est située dans la région visible du spectre. Si l'on interpose alors entre la plaque chromatographique et la pellicule sensible un filtre arrêtant les radiations ultra-violettes, seules les radiations visibles, émises par les DNS-dérivés, impressionnent la pellicule sensible. Ce principe est appliqué sur la Fig. 3, par réflexion (a) et par transmission (b).

* $\text{DNS-NH}_2 = 1\text{-diméthylamino-5-naphtalène sulfonamide}$.

** $\text{DNS-OH} = \text{acide } 1\text{-diméthylamino-naphtalène-5-sulfonique}$.

APPLICATION

Notre laboratoire étudie la structure primaire de la protéine du virus de la mosaïque jaune du navet (V.M.J.N.)⁸ et cette technique de chromatographie des DNS-dérivés a été mise au point pour caractériser les acides aminés N-terminaux de peptides issus d'hydrolyses enzymatiques de la protéine, ou pour tester la pureté de fractions peptidiques séparées par chromatographie.

(a) Préparation des DNS-dérivés étalons

Dans des tubes à essais contenant 10 μ môles de chaque acide aminé, on ajoute 0.5 ml de solution tamponnée à pH 9.5 (borate-acide borique 0.05 M) puis 0.5 ml d'une solution de DNS-Cl* dans l'acétone, à raison de 10 mg/ml. Les tubes sont mis à l'obscurité à température ambiante, pendant 30 min avant de pouvoir être utilisés. Si les réactifs sont trop concentrés, on les dilue par l'acétone. À l'obscurité, ces dérivés se conservent plusieurs semaines.

Remarque. Dans certains solvants de chromatographie, l'excès de réactif DNS-Cl peut former des traces bleues. Ceci peut être évité en transformant le DNS-Cl en DNS-NH₂ par adjonction d'une goutte d'ammoniaque 25%.

(b) Préparation des DNS-dérivés des peptides à étudier

On introduit 10-100 nmôles de peptide dans un tube pyrex (diamètre, 8 mm), puis 20 à 50 μ l de la solution tamponnée utilisée pour la préparation des DNS-acides aminés. Il est alors impératif de contrôler que le pH de la solution est bien aux environs de pH 9.5, surtout si le peptide est accompagné de sels. En effet, il faut que le pH du milieu réactionnel soit toujours supérieur au pK du peptide à dansyler puisque la forme réactive est le groupement -NH₂ et non pas le groupement -NH₃⁺ (ajuster le pH à 9.5 par NaOH diluée, si nécessaire). On ajoute alors 50 μ l de la solution de DNS-Cl utilisée pour la préparation des DNS-acides aminés et on met le tube à l'abri de la lumière, à température ambiante, couvert de Parafilm, pendant 30 min au moins. L'on peut mettre deux à trois fois la quantité de DNS-Cl indiquée, si l'on sait que l'échantillon contient de nombreux groupements susceptibles d'être dansylés. Le DNS-Cl en excès est détruit par adjonction d'une goutte d'ammoniaque 25% ou de soude diluée.

On lyophilise à sec, puis on hydrolyse le peptide par 20 à 50 μ l de HCl 6 N en tube scellé, à 108° pendant 4 h (24 h, si l'on désire un rendement maximum pour les DNS-dérivés, Val, Leu, Ile, ceci au détriment de certains autres dérivés qui sont partiellement détruits)².

Remarque 1. Lors de l'hydrolyse acide, il se passe les modifications suivantes:

- (1) Le DNS-Trp est partiellement détruit et fournit plusieurs taches de dégradation.
- (2) La DNS-Gln est transformée en DNS-Glu.
- (3) La DNS-Asn est transformée en DNS-Asp.
- (4) La di-DNS-His est transformée en α -DNS-His.

De plus, une tache secondaire, jaune ou rose, pouvant se produire lors de la dansylation des acides aminés Tyr, Gly, Glu, Thr, Ser, disparaît à l'hydrolyse chlorhydrique. On élimine alors HCl par lyophilisation, puis on ajoute une trace d'ammoniaque, car ces dérivés ne sont fluorescents qu'en milieu basique. Chaque échantillon

* Chlorure de dansyl puriss., Fluka AG, Buchs SG.

est alors déposé sur plaque dans un mélange acétone-eau (9:1). L'on peut évidemment effectuer la réaction de dansylation sur plusieurs échantillons en même temps. Nous avons fait réagir le DNS-Cl sur un hydrolysats tryptique de la protéine du V.M.J.N. (noté HT sur la Fig. 1) et sur sept fractions peptidiques obtenues par chromatographie sur résine Dowex 1X2, 200-400 mesh de cet hydrolysats tryptique (ces fractions sont notées A, B, C, etc. sur la Fig. 1).

Remarque 2. Dans le système décrit, il n'est en général pas nécessaire de séparer les DNS-dérivés en fractions éthersolubles et hydrosolubles, par extraction étherée à pH 3.5. Ceci simplifie notablement la méthode, sans entraîner d'inconvénients, sauf pour un échantillon contenant beaucoup de sels. Dans ce dernier cas, les fractions obtenues sont facilement analysées en adoptant le système décrit au par. (g).

(c) Charge de la plaque

Les produits sont déposés sur plaque à 1.5 cm du bord de la plaque, de la manière suivante. Dans chacun des dix-huit couloirs utilisables de la plaque on peut déposer :

soit un ou plusieurs DNS-dérivés témoins par couloir, à condition que leurs mobilités n'interfèrent dans aucun des solvants utilisés (en pratique, on peut mettre dans un couloir donné des témoins n'appartenant pas au même groupe de polarité),

soit un échantillon à analyser par couloir (dans notre exemple, nous analysons l'hydrolysats tryptique noté HT et les fractions peptidiques obtenues après chromatographie de cet hydrolysats sur colonne, notées A, B, etc.).

Nous adoptons, dans notre exemple, la disposition par couloirs de gauche à droite de la plaque indiquée sur le Tableau I.

Remarques. Si cela est nécessaire, les étalons peuvent être purifiés sur couche mince de silice, par migration dans le solvant de leur groupe. On prélève la silice qui contient le DNS-dérivé purifié, que l'on élue par un mélange acétone-eau (1:1).

Il est plus rapide de mélanger les étalons devant être chromatographiés dans un même couloir, avant de les déposer sur plaque. Exemple: Mélanger les DNS-dérivés des acides aminés Ile, Gly, Arg. Il suffit alors de déposer un spot au lieu de trois.

Il est évident qu'en général, il n'est pas nécessaire de déposer tous les DNS-dérivés étalons. Exemple: Lorsqu'on effectue une hydrolyse acide sur les échantillons à analyser, les dérivés de l'asparagine et de la glutamine sont transformés en acides aspartique et glutamique respectivement, il est donc inutile de déposer les étalons de DNS-Asn et DNS-Gln.

Certains DNS-dérivés fournissent facilement des produits de dégradation. Il

TABLEAU I

DISPOSITION DES PRODUITS DANS LES 18 COULOIRS DE LA PLAQUE DE SILICE

Groupe No.	DNS-dérivés étalons										Échantillons à analyser									
1	Trp	Tyr	Ala	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Ile											
2	Asn	Gln	Asp		Ser	Met(SO ₂)	Thr	Glu	Gly		HT	A	B	C	D	E	F	G		
3						Cy(SO ₃ H)	α -Lys	ϵ -Lys	Arg	α -His										

est souvent préférable de les disposer seuls dans les couloirs. C'est le cas, par exemple, de la DNS-Met qui se transforme sur plaque en DNS-Met (SO_2), ou de la di-DNS-His qui fournit une tache rose située entre DNS-Gly et DNS-Glu dans le solvant No. 1 (voir par. d) et qui se transforme sur plaque en α -DNS-His³.

Enfin, il est préférable de ne déposer aucun dérivé dans les couloirs, aux extrémités de plaque, en raison des effets de bords éventuels.

(d) Chromatographie

Chaque cuve* contient environ 100 ml de mélange solvant**. Il n'est pas nécessaire de saturer les cuves au préalable, ni de les tapisser de papier filtre. Les solvants se gardent plusieurs jours sans dégradations sensibles.

Les solvants utilisés ici sont les suivants (voir Fig. 2):

Solvant du 1er groupe. Toluène-pyridine-acide acétique (70:30:0.8). Durée de la chromatographie: 2-2 h 30, à température ambiante.

Solvant du 2e groupe. Chloroforme-*tert.*-butanol-acide acétique (60:40:15). Durée de la chromatographie: 3-4 h à température ambiante.

Solvant du 3e groupe. Toluène-chloro-2-éthanol-ammoniaque 25%-eau (30:50:2:2). Durée de la chromatographie: 4 h à température ambiante. (Dans ce solvant la migration est très lente; 2 h peuvent suffire pour identifier les produits.) Avant chaque chromatographie la plaque est séchée 5 min à 100° en étuve, puis 10 min à l'air.

Remarques. Le chauffage doit être bref (5 min) après le développement dans les solvants contenant de la pyridine, car sinon, il se produit une diminution sensible de la fluorescence des DNS-dérivés.

S'il est nécessaire d'obtenir une séparation complète de Val, Leu, Ile, il suffit de faire migrer la plaque, après l'avoir tournée de 180° dans le solvant chloroforme-*tert.*-butanol-acide acétique (60:40:0.2) qui sépare parfaitement ces dérivés dans l'ordre Ile, Val, Leu, en moins d'une heure.

(e) Photographie

Après chaque chromatographie, la plaque est photographiée comme l'indique le montage de la Fig. 3a.

Les conditions sont les suivantes: l'appareil photographique (Zeiss "Ikon") est muni d'un filtre U.V. (Zeiss "Ikolor") et d'un objectif additionnel de distance focale $f = 0.5$ m (accessoires normaux de l'appareil) et contient un film pour diapositives (Kodak "Ektachrome" couleurs, 23 DIN). Le temps de pose est de 6 min par photographie, avec la lampe U.V. utilisée (Camag type TL 900, 350 nm).

L'on peut aussi obtenir rapidement des photos sur papier sensible normal, en adoptant, comme le montre le Fig. 3b la disposition suivante: lampe → plaque → → filtre → papier sensible. Le filtre utilisé est un filtre Kodak Wratten No. 8, ou mieux, No. 2A. Le temps de pose est alors de 2 min environ, si la lampe U.V. est à 20 cm de la plaque.

(f) Interprétation

Les photographies montrent sans ambiguïté possible que la caractérisation des

* Cuve de chromatographie Camag 23 × 23 × 7.5 cm.

** Produits Merck, Darmstadt, pour analyses.

DNS-acides aminés N-terminaux des échantillons est obtenue immédiatement, par comparaison directe avec les étalons ayant migrés dans des conditions strictement semblables.

L'on identifie ainsi: après le 1er développement (Fig. 1a) — A = Leu; B = Val. Après le 2e développement (Fig. 1b) — C = Glu; D = Thr; E = Asp; G = Glu + Asp (fraction peptidique non pure). Après le 3e développement (Fig. 1c) — F = Cy (SO₃H).

L'on voit que l'échantillon HT contient tous les dérivés identifiés sur les fractions séparées. De plus, l'on distingue les peptides contenant de la lysine, non en bout de chaîne, celle-ci fournissant alors l' ϵ -lysine, visible pour les échantillons HT, B, C, E, G.

(g) Variante de ce système

Dans le cas où l'on a effectué une séparation des dérivés à pH 3.5, en fractions éthersolubles (groupes 1 et 2) et hydrosolubles (groupe 3), il peut être avantageux d'utiliser le système simplifié suivant:

La fraction éthersoluble est déposée sur plaque, puis chromatographiée dans les solvants 1, puis 3. En repérant chaque spot après les deux éluions, l'on identifie ainsi, sans ambiguïté tous les DNS-dérivés, car aucun ne possède le même R_F dans les deux solvants. La fraction hydrosoluble est alors étudiée par migration dans le solvant 3 uniquement.

L'exemple que nous avons choisi pour illustrer notre système de chromatographie peut être considéré comme un exemple compliqué: nous analysons huit fractions peptidiques à la fois et, pour chacune de ces fractions, l'un quelconque des vingt acides aminés peut, *a priori* être l'acide aminé N-terminal. Dans de nombreux cas, le problème à résoudre est plus simple, et les conditions peuvent être simplifiées en conséquence: dépôt de quelques DNS-dérivés étalons seulement, couches minces de 5 ou 10 cm de large seulement, migrations des couches minces dans un seul solvant, judicieusement choisi, etc.

CONCLUSIONS

La méthode des dansyl-dérivés permet une analyse d'acides aminés N-terminaux de peptides ou protéines 10 à 100 fois plus sensibles que la méthode classique des dérivés dinitrophénylés. Le système de chromatographie décrit permet une analyse simultanée de plusieurs échantillons sur une seule plaque de gel de silice. Ce système est très souple et peut être adapté à de nombreux problèmes. Un avantage certain de cette technique est que la caractérisation des échantillons est réalisée par comparaison directe avec les dérivés étalons ayant migré dans des conditions identiques. De plus, l'usage des plaques préfabriquées standardisées "Merck" permet une excellente reproductibilité des résultats. Enfin, cette méthode est simple et rapide et peut de ce fait constituer une technique de routine pour l'analyse d'acides aminés N-terminaux de peptides et le contrôle de la pureté de fractions peptidiques.

RÉSUMÉ

Il est décrit un système de chromatographie original des dansyl-dérivés des

acides aminés. Ce système permet une analyse rapide d'une dizaine d'échantillons en même temps, sur la même plaque. Les produits sont déposés dans des couloirs parallèles, puis entraînés successivement, toujours dans la même direction, par des solvants de polarité croissante. Ces échantillons sont alors identifiés par comparaison directe avec les dérivés étalons ayant migré sur la même plaque, donc dans des conditions strictement semblables. Ce système est appliqué à l'analyse des acides aminés N-terminaux de plusieurs peptides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. R. GRAY ET B. S. HARTLEY, *Biochem. J.*, 89 (1963) 59P et 379.
 - 2 C. GROS ET B. LABOUESSE, *European J. Biochem.*, 7 (1969) 463.
 - 3 W. R. GRAY, *Methods Enzymol.*, 11 (1967) 139.
 - 4 A. A. BOULTON ET I. E. BUSCH, *Biochem. J.*, 92 (1964) 11P.
 - 5 Z. DEYL ET J. ROSMUS, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 514.
 - 6 M. COLE, J. C. FLETCHER ET A. ROBSON, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 616.
 - 7 K. R. WOODS ET K. T. WANG, *Biochim. Biophys. Acta*, 133 (1967) 369.
 - 8 J. I. HARRIS ET J. HINDLEY, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 117; *ibid.*, 13 (1965) 894.
- J. Chromatog.*, 43 (1969) 93-102