

been completely removed even from the electrophoretically prepared samples. In agreement with HOMMES *et al.*¹², we find less half-cystine in fetal hemoglobin than in hemoglobin A, but the value is three to four rather than six residues per molecule. Unlike these authors, however, we have not been able to secure any evidence for the presence of a disulfide bond in fetal hemoglobin. The cysteic acid and amperometric values agree, and titration after treatment with Na₂SO₃ gave the same value for sulfhydryl groups as the one given in Table I.

Except for isoleucine and cysteine, the analytical results given in Table I are in general quite similar to other values to be found in the literature, although the present results show a tendency to be lower. It should be emphasized that the single analyses of the 22 h and 70 h hydrolysates do not provide sufficient data for the formulation of definitive tables on the complete amino acid composition of the proteins, nor do they permit decisions as to the possibility of small differences in the compositions of hemoglobins A, C, and E. This is particularly the case since there is reason to suspect from the sulfhydryl analyses that these preparations still may not be completely pure. Since further work along these lines is not contemplated, the present results are summarized simply to demonstrate that the absence of isoleucine is one criterion to be considered in the evaluation of the purity of hemoglobin, and that determinations of sulfhydryl groups and of half-cystine as cysteic acid may be useful in following the purification of this protein.

The authors are greatly indebted to Dr. JOHN LEGGETT BAILEY for preliminary work on the amperometric titrations, to Miss KERSTIN JOHANSSON and Miss JOYCE F. SCHEER for expert technical assistance, and to Mr. S. THEODORE BELLA who performed the microanalyses reported in this paper.

The Rockefeller Institute for Medical Research, New York, N.Y. (U.S.A.)

WILLIAM H. STEIN
HENRY G. KUNKEL
R. DAVID COLE
DARREL H. SPACKMAN
STANFORD MOORE

- ¹ W. A. SCHROEDER, L. M. KAY AND I. C. WELLS, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 221.
- ² J. P. DUSTIN, G. SCHAPIRA, J. C. DREYFUS AND O. HESTERMANS-MEDARD, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1207.
- ³ P. C. VAN DER SCHAAF AND T. H. J. HUISMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 81.
- ⁴ T. H. J. HUISMAN, P. C. VAN DER SCHAAF AND A. VAN DER SAR, *Blood*, 10 (1955) 1079.
- ⁵ A. ROSSI-FANELLI, D. CAVALLINI AND C. DE MARCO, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 377.
- ⁶ H. G. KUNKEL AND G. WALLENIUS, *Science*, 122 (1955) 288.
- ⁷ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN AND S. MOORE, *Federation Proc.*, 15 (1956) 358.
- ⁸ C. H. W. HIRS, W. H. STEIN AND S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 941.
- ⁹ E. SCHRAM, S. MOORE AND E. J. BIGWOOD, *Biochem. J.*, 57 (1954) 33.
- ¹⁰ R. E. BENESCH, H. A. LARDY AND R. BENESCH, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 663.
- ¹¹ V. M. INGRAM, *Biochem. J.*, 59 (1955) 653.
- ¹² F. A. HOMMES, J. S. DRINKWAARD AND T. H. J. HUISMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 564.

Received March 22nd, 1957

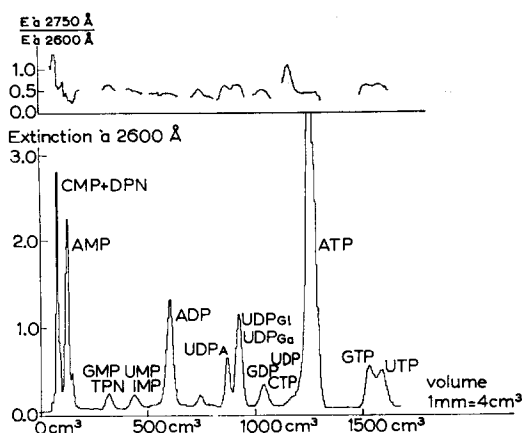
Les nucléotides libres du cristallin de veau

Nous avons abordé l'étude de la répartition des nucléosides mono-, di- et triphosphates dans le cristallin comme préliminaire aux recherches sur le métabolisme nucléaire de cet organe.

Nos essais ont porté sur des cristallins de veaux prélevés aux abattoirs à moins d'une minute après la mort, puis congelés dans un mélange neige carbonique-acétone. Après un broyage à l'homogénéisateur POTTER¹ dans l'acide perchlorique 0.6N et 0° C, la fraction acido-soluble a été séparée par centrifugation à 15,000 tours/minute pendant 20 minutes dans une centrifugeuse MSE réfrigérée 0° C. Nous avons encore effectué une extraction du culot, par l'acide perchlorique 0.2N et l'ensemble des fractions acido-solubles a été ensuite neutralisé par la potasse à -5°. Après séparation du perchlorate de potassium insoluble, par centrifugation, le surnageant a été soumis à une chromatographie sur colonne Dowex-1 X8, 200 à 400 mesh selon la technique de SCHMITZ^{2,3,4}.

Le résultat d'une des chromatographies portant sur 11 cristallins de veaux est présenté dans la Fig. 1.

La nature des composés des divers pics a été déterminée après rechromatographie, tenant compte: de l'absorption dans l'ultra-violet à deux longueurs d'onde, 2600 et 2750 Å, des résultats



mono-, di- et triphosphate; CMP – CTP: cytidine mono- et triphosphate; UMP – UDP – UTP: uridine mono-, di- et triphosphate; UDPa: uridine diphosphate N-acétylglucosamine; UDPGl: uridine diphosphate glucose; UDPGa: uridine diphosphate galactose; IMP: inosine mono-phosphate.

Fig. 1. Chromatographie de nucléotides acido-solubles de cristallins sur colonne Dowex-1 X8 200–400 mesh 0.8×27 cm. Elution par l'acide formique et formiate d'ammonium. Chambre de mélange 440 ml. Gradients d'élution: fractions 0 ml–508 ml $\text{HCOOH } 4 \text{ N}$; 508 ml–960 ml $\text{HCOOH } 4 \text{ N} + \text{HCOONH}_4 \text{ } 0.2 \text{ N}$; 960 ml–1280 ml $\text{HCOOH } 4 \text{ N} + \text{HCOONH}_4 \text{ } 0.4 \text{ N}$; 1280 ml–fin $\text{HCOOH } 4 \text{ N} + \text{HCOONH}_4 \text{ } 0.8 \text{ N}$. En abscisse sont portés les volumes du liquide d'élution, en ordonnée les extinctions à $260 \text{ m}\mu$ correspondantes. Pour l'adénosine triphosphate, ces valeurs étant trop élevées, elles n'ont pu être portées sur le graphique. Le tracé du haut représente le rapport des lectures de deux longueurs d'onde Ext. $2750/\text{Ext. } 2600 \text{ Å}$. Abréviations: AMP – ADP – ATP: adénosine mono-, di- et triphosphate; GMP – GDP – GTP: guanosine

des dosages de phosphore selon BRIGGS⁵, de la détermination des pentoses selon MEJBAUM⁶ et d'une identification par chromatographie sur papier Whatman No. 1 à l'aide des solvants suivants: isobutyrate d'ammonium (100:60), propanol-ammoniaque-eau (60–30–10), butanol tertiaire HCl 0.3 N . Dans le cas de l'uridine diphosphate glucose et galactose, l'identité des oses a été établie par chromatographie sur papier Whatman No. 1, solvants: pyridine-acétate d'éthyle saturé d'eau (10:40). Pour la mise en évidence de l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine, nous avons employé la réaction d'AMINOFF et coll.⁷ modifiée par REISSIG et coll.⁸. Pour le diphosphopyridine nucléotide, nous avons déterminé la courbe d'absorption à l'ultra-violet avec et sans cyanure de potassium selon COLOWICK et coll.⁹.

Il résulte de l'ensemble de nos essais que le cristallin comprend les nucléosides mono-, di- et triphosphates de l'adénine, de la guanine, de la cytosine et l'uracyle à côté du diphosphopyridine nucléotide et du triphosphopyridine nucléotide et des composés qui restent encore à identifier.

Exprimés en millimolécules, les nucléotides de l'adénine représentent 54% du total des nucléotides des bases puriques et pyrimidiques. A l'intérieur de cette fraction adénylique, il y a 10.4% d'acide adénylique, 18.1% d'adénosine diphosphate et 71.5% d'adénosine triphosphate. D'autre part, le phosphore hydrolysable de l'adénosine triphosphate et de l'adénosine diphosphate représente 62.2% de la totalité du PO_4 libéré à partir des nucléosides polyphosphates en 10 minutes en milieu HCl N . Nous reviendrons ultérieurement sur la participation au métabolisme énergétique et à celui de l'acide ribonucléique des divers nucléotides décelés.

Nous remercions le Docteur H. SCHMITZ, Privatdozent am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps Universität, Marburg/Lahn (Deutschland), qui nous a très aimablement conseillé au cours de la mise au point de la technique chromatographique.

Clinique Ophtalmologique et Institut de Chimie biologique
de la Faculté de Médecine de Strasbourg (France)

J. KLETHI
P. MANDEL

¹ V. R. POTTER ET C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 495.

² R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.

³ H. SCHMITZ, R. B. HURLBERT ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 41.

⁴ H. SCHMITZ, V. R. POTTER ET R. B. HURLBERT, *Cancer Research*, 14 (1954) 58.

⁵ A. P. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 53 (1922) 13.

⁶ W. MEJBAUM, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 117.

⁷ D. AMINOFF, W. T. J. MORGAN ET W. M. WATKINS, *Biochem. J.*, 51 (1952) 379.

⁸ J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER ET L. F. LOLOIR, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 959.

⁹ S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN ET M. M. CIOTTI, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 447.