血清蛋白質の定量的濾紙電気泳動法における誤差の根源とその対策

韓国 SEOUL カトリック大学医学部 生化学教室 (主任 沈鳳変教授)

朴 永 夏

Yong-Ha Park

濾紙電気泳動法は、Wieland¹⁾, Grassmann²⁾ および Durrum³⁾ らの発表以来、日常臨床検査には勿論、基礎的研究にもひろく利用されているが、まだその定量結果の再現性がやゝひくいのが唯一の欠点である。これは、同じ血清を十数個所の研究室で、同じ操作法で検査した成績⁴⁾でも、明らかにあらわれている。

したがってこのような誤差の原因を、根本的に明らかにすることによつて、より再現性の高い国際的標準操作法を見出そうとするのが本実験の目的である。

泳動方法

泳動は沈氏の標準泳動法⁵⁾によつた。すなわち、pH 8.6、イオン強度 0.1 の Sod. barbital—Sod. acetate buffer および Whatman No. 1 濾紙を用い、水平式で低圧泳動 (75 V/20 cm) した (14—16 時間)。

泳動時の室温は大して問題とならない。

泳動終了後は、ただちに 95°C 内外で乾燥固定したあと、Grassmann 法に準じて Amidoblack 10 B を用いて型の如く染色脱色 (充分に) し、Photovolt model 425 Densitometer で泳動曲線をプロットした。濾紙は流動パラフィンで透明化した。

連続濾紙電気泳動には、沈氏が設計試作した装置と、pH 8.6 イオン強度 0.045 の Barbital buffer および東洋濾紙 50 号 (40 × 40 cm) (Drip point 20個) を用いて、300 V/40 cm で泳動した。

実験内容と考察

I 所謂 Albumin trail による誤差に対する検討

泳動曲線の定量においてもつとも障礙になるのは、泳動した蛋白質のあとにのこる Trail である。長さ 20 cm (水平面) の濾紙を用いる水平式泳動では、水平面で陰極側から 3 cm はなれた線に試料を塗布するので、 γ -globulin も陽極に向つて移動するから特に問題となる。ところで、この Trail ははたして Durrum⁶⁾ がいうように、albumin だけによるもので、globulin では見られないか否かという点が問題である。それで、連続濾紙電気泳動で分離した、albumin と glo-

Fig. 1 Electropherogram by the standard procedure of the albumin and globulins obtained with continuous paper electrophoresis.

bulin (収量がすくないので α_2 , β , γ -globulin 分層をあわせた.) を 48 時間水で透析したあと、前述標準泳動操作法で再泳動して、Densitometry した結果が第 1 図である。

すなわち、albumin だけでなく globulin 分層も Trail をのこすことがわかる。Trail になる特異な蛋白分層の存在を考える人もあるが、これは同じ血清でも採血したあと長時間を経過した血清を泳動すれば、Trail がよりあらわれる傾向¹¹⁾があり、また、濾紙によつてより甚だしく Trail をのこすものもあり (東洋濾紙 50 号は 51 号より Trail を多くのこす)、上記の如く一度連続濾紙泳動にかけた血清も、また Trail をのこす点からみて、そのような特異な分層の存在によつて Trail が生ずるのではなく、むしろ、蛋白質の通過に際して、ごく微量の蛋白質が濾紙に吸着されるか、もしくは、蛋白質の通過により濾紙線維の物理化学的性質がかわつて、脱色が完全におこなわれないためであろう。第 1 図において、Start line の吸光度が高いのは、試料を塗布したとき濾紙線維が損傷されたからである。すなわち、単純な機械的損傷によつても濾紙の脱色は影響をうける。しかしながら、無限度に吸着されるのではなくして、第 1 図でみられるよう

に, Trail effect はその位置には関係なく比較的一定な点からして, ある飽和点があるようである。もちろん, 最前進端では飽和点に達しないから漸次的であり, 最後端では Trail effect はおもに紙質の均等性如何に支配されるが, また, Trail になる蛋白もすこしは移動するので, わずかながら不規則になりがちである。さて, このような飽和点は, おもに濾紙の厚さと濾紙自体の吸着性によつてそれぞれちがう。

要するに, Trail effect は附加的にあらわれるのではないということが注目すべき点である。いいかえれば, 全分層が通過した原点附近で Trail がもつとも甚だしく, albumin 分層にちかづくにつれて Trail がすくなくなるのではない。

しからば, このような Trail をどうすればなくすることができかが問題となる。Monty⁷⁾らは, 濾紙を Detergent であらかじめ処理したあと泳動する方法を試みているが, 満足すべき結果をえていない。また Robbins⁸⁾は albumin だけが Trail をのこすものと考えて, albumin を移動させない Reverse flow migration を試みているが, 上述の如く globulin も Trail をのこすので無意味である。

要するに, 今のところ完全に Trail をのぞく方法はなく, できるだけすくなくしてみようというのが眼目である。そのためには, 第一に吸着性が弱い濾紙をえらぶことと (Whatman No. 1, 東洋 51 号), 第二には直接定量に支し障りがない限度内に, 各分層間の分離距離をちぢめることである。その理由は第 2 図をみればすぐわかる。

第 2 図 (a) のような泳動図をうるには, できるだけイオン強度が高い Buffer (あんまり高すぎると電流が多く流れ Joule 熱が発生してよくない) を使用すべきである (0.05~0.06 のものが多く用いられているがもつとも 適当である)。そうかといつて, Trail が完全にのぞかれるのではなく, Trail effect が縮小されただけであるので, これは後述のように,

Fig. 2 The influence of the trail upon the paper electrophoretic relative serum protein percentages. The distance between each fractions should be reduced as narrow as possible, because the trail area of globulins is much wider than that of albumin.

吸光度曲線を解析するとき考慮しなければならない。

II 血清蛋白質各分層の Amidoblack 10 B の結合能の差による誤差について

濾紙を染色したあと, 色素を N/100 NaOH 溶液で抽出して行ふ定量法においては, albumin と globulin とは Amidoblack 10 B に対する結合能に差があるという報告⁹⁻¹¹⁾が多く, 一般的に albumin の方がより多くの色素と結合するといひ, それに対する補正係数が提出されているが, Böhle, Fischer⁹⁾は 1.7, Pugar¹⁰⁾は 2.2, また Esser¹¹⁾らは albumin に対して α_1 -globulin は 2.36, α_2 -globulin 2.06, β -globulin 2.20, γ -globulin 1.62 であるが, 病的血清ではこれらの係数がかわるといつている。いずれにせよ, 報告者によつて一致しない。ところで, 血清蛋白質と Amidoblack 10 B との結合は, どういう様式によるかは不明であるが, direct densitometry においては, むしろ globulin 分層の方が抽出法るときよりも高くでるので, 上のような補正係数は同じく直接定量法にもあてはまるとはいわれぬ。それは, 抽出法においては色素との結合能のほか, 抽出率という因子がもうひとつくわるから, そのような方法では蛋白質のほんとうの色素結合能をすることができない。また, 抽出法るときより, 直接定量法において albumin 量がすくなくでるのは, おもに Trail のためである。

したがつて, この問題を再検討するため, 血清を硫酸ソーダで塩析してえた, albumin および各 globulin 分層を 72 時間水で透析したあと, その 0.02 ml ずつを 3 cm の幅に一樣に濾紙にぬつて, 型の如く乾燥, 染色したあと Densitometry して, 各分層の色素との結合能を測定した成績が第 1 表である。

Table 1 Relative dye-combining capacity of the serum protein fractions. (0.02 ml of the salt fractionated preparations were applied to the filter paper 3 cm wide linearly, then dried, stained with amidoblack 10 B, and densitometry were performed. Each values indicate the relative ratio to albumin fraction).

Na ₂ SO ₄ concentration (%)	Relative ratio of N. content of the preparation per ml.	Relative ratio of the densitometric area	Correction factor to albumin
14.5 (γ -globulin)	0.7	0.57	1.23
18.5 (β -globulin)	0.6	0.44	1.36
24.0 (α_1, β -glob.)	0.4	0.38	1.05
28.0 (α_2 -globulin)	0.5	0.50	1.0
Filtrate (albumin)	1.0	1.0	1.0

表のように、各分層間に著明な差はなく、たゞ、 β と γ は albumin より多少色素結合能がひくいようであるが、いずれにしても抽出法のときよりも albumin のそれにもつとちかい。さて、実際の問題として、このような補正係数を使うとしても、Trail による誤差がもつと大きくあらわれうるので、大して意味がなく、 β と γ の色素結合能が albumin よりひくいことは、Trail effect による β , γ 分層率の増加と相殺的に作用するので、むしろ有利であるともいえる。また、病的血清によつて色素結合能が異なるとしても（例 β -globulin 中に多量の脂質が存在すれば異りうる）、従来の成績および著者の経験からして、Moving boundary electrophoresis による成績と大差がない点からみて、実際的には大して差し支えがなく、要は同じ血清に対する再現性が主問題である。

III 吸光度と波長との関係について

同じ泳動図でも Filter (波長) によつて吸光度曲線がちがつてでるということは、Durrum¹²⁾ も指摘しているが、このような差は、おもに蛋白質濃度が高いところで著明である。

第3図および第2表にその実例を示す。

このように、正常血清では α_1 , α_2 , β , γ -globulin のように、蛋白質濃度がひくいところでは、Filter による吸光度の差が著明でないが、蛋白質濃度が高い albumin 分層ではその差が著しい。すなわち、蛋白濃度（色素濃度）が高いと、広範囲に Beer の法則が成立しなくなる。したがつて、病的血清の如く albumin の濃度がひくいと、その差が少くなる¹⁾のは当然である。Amidoblack 10 B は 590 m μ で極大吸収を呈するから、その前後の Filter を使うべきであるが、普通の光電池式濾紙濃度計では、Filter を使うときには、もつと鋭敏な Galvanometer を使はなければならないで不便である。それで、Filter を使わなくても、一樣に Beer の法則が成り立つ蛋白質濃度（厳密に言えば単位面積の濾紙上蛋白質）の極限をしる必要が生じた。

IV 単位面積の濾紙上の蛋白質量の問題

しからば、濾紙上の蛋白量が、どの程度までならば一樣に白色光でも Beer の法則が成立するかをしる必要がある。それで、総蛋白質濃度が 7.0 g/dl である血清を、順次に倍数稀釈して、その 0.01 ml ずつを Whatman No. 1 濾紙に線状にぬり（約 1 平方 cm になる）、型の如く乾燥、染色したあと Densitometry してみたところ、第4図に示した結果をえた。すなわ

Fig. 3 Influence of filter on relative protein percentages for amidoblack 10 B stained paper strips.

Table 2 Influence of filter on relative protein percentages in densitometry (All figures are those which calculated without eliminating the trail effect as described later).

(a) normal serum

filter fraction	white light	green	light green	red	brown
Albumin	50.9	55.3	49.5	48.0	50.8
α_1 -globulin	4.2	4.4	4.3	3.7	4.3
α_2 -globulin	6.8	6.3	7.6	8.1	6.9
β -globulin	14.5	13.3	14.8	15.5	14.5
γ -globulin	23.5	20.6	23.7	24.6	23.4

(b) congestive cardiac failure

filter fraction	white light	green	light green	red	brown
Albumin	31.1	32.5	31.6	29.7	31.3
α_1 -globulin	5.9	5.0	5.9	6.5	5.6
α_2 -globulin	7.1	7.5	8.1	9.4	8.3
β -globulin	12.2	12.4	12.3	13.7	13.3
γ -globulin	43.6	42.5	42.0	40.7	41.5

Fig. 4 Relationship between the protein amount on the paper and the optical density with white light. (Same amounts of serum, 0.01 ml, which diluted serially was applied to filter paper 3 cm wide, and after staining as routinely, densitometry were done, and the areas of the optical density curves were calculated)

ち、吸光度と蛋白質量とは、3.5 g/dl の血清を 0.01 ml スポットしたときまでは比例的であることがわかる。このとき、蛋白質が一平方 cm 内に平等に分布したとして、単位面積 (Slit が小さいので mm^2 をとる) の濾紙上について、蛋白量を換算すれば約 0.0035 mg/mm^2 までは直線的関係が成り立ち、それ以上の濃度では吸光度がひくくなる。したがって、泳動するときに濾紙上に塗布する蛋白質の絶対量が、定量のときに問題となるのである。Hardwicke¹³⁾ は、血清を希釈すればこのような影響をのぞくことができると考えているが、濃度がひくい試料でも、くりかえして多量を塗布するといけない。問題の要点は、血清自体の蛋白質濃度ではなく、単位面積の濾紙上 (mm^2) の蛋白量なることに注目しなければならない。正常血清のときは、総蛋白濃度を 7.0 g/dl とし、また、albumin 量をその約 60% とみなし、その 0.01 ml を塗布して泳動したとき albumin が ($1 \times 3 \text{ cm}$) の面積内に分布したとすれば、濾紙上の albumin の絶対量は約 0.42 mg である。これが上記面積内に Gauss の分布をすると仮定するならば、もつとも濃い中心部における albumin 量を算出すると約 0.0033 mg/mm^2 になる。したがって、総蛋白濃度が 7.0 g/dl 内外の正常血清なら、その 0.01 ml 以下を、すくなくとも幅 3 cm に均等に塗布すればよいわけである。もちろん、濃度が高い血清でも、もつと少量を幅 3 cm にぬれば

Fig. 5 Influence of dry versus translucent scans on relative protein percentages for amidoblack 10 B stained strip.

よいわけである。しかしながら、実際的には総蛋白濃度が 6.0 g/dl になるように、あらかじめ緩衝液で希釈してから、その 0.01 ml 以下をぬつた方が安全である。

前節および本節でのべたように、単位面積の濾紙上の蛋白質量が多いと、波長による吸光度の誤差が入ってくるが、このような関係は、同じ泳動図 (濾紙) でも濾紙を透明化したときとしかつたときの間にもあらわれてくる (第 5 図)。そのほかにも、濾紙上の蛋白質量が多いと、所謂 Packing effect¹³⁾ もあらわれうるだろうし、また、厚い濾紙は蛋白質がよけいつくので、定量的泳動にはよくない。

また光電池は、透射光量がすくなくと光電流が比例的に発生しないので、実際的には吸光度に換算して

Fraction	alb.	α_1	α_2	β	γ
Orig. Serum	44.8	3.8	8.0	16.2	27.2
diluted Serum	55.3	3.2	5.4	11.9	25.2

Fig. 6 Influence of the protein amount on the unit area of the paper upon the relative protein percentages (with same serum).

1.0 以上になる点 (0.8 以下がのぞましい) が、あればもつと少量を塗布して再泳動すべきである。濾紙上の蛋白質による測定差の実例を第 6 図に示した。

V 定量的吸光度曲線の解析法について (Trail effect) の除去法

しからば、如何にして実測吸光度曲線から Trail effect を除去するかが問題である。これに対しては、以上の実験考察および著者の年来の経験からして、つぎのような 2, 3 の原則をきめた。すなわち、

第一にどこまでも実際の泳動原図 (濾紙) を第一基準とすること。第二には Densitometry を忠実に行うことである。さて、第一条件には、泳動図の分離が鮮明で、脱色が完全でなければならないことは言うまでもない。また、第二条件のためには、Densitometry をするとき Artifact が生じないようにすべきである。

このときもつとも重要なことは、濾紙自体の均等性であるが、Whatman No. 1 や東洋濾紙 51 号なら実際に差し支えない。それよりむしろ、濾紙の透明化操作のときに Artifact が生じやすい。ことに Trail 部分は吸湿性があるので、あらかじめ濾紙を充分乾燥して湿気をなくし、また、流動パラフィン中にとけている空気を除去したあと、乾かした濾紙を入れて充分 (すくなくとも 30 分以上) Oil をしみこませたあと、Densitometer にかねなければならない。もちろん、流動パラフィン中に少しでも水分があれば使用してはならない。以上の注意をおろそかにすると、思いがけない Artifact が甚だしく生ずるのである。

Trail は附加的でなく、大体一様にあらわれるということは、第一節においてすでにのべたが、実際には、たまには場所によつて僅かながら差があるときもみられる。しかしながら、Trail effect は主にその面積に比例するので、Trail effect を考慮しなければ、実際よりも albumin 分層率がひくくでる (第 2 図参照)。

しからば、如何に Trail effect をのぞくかが問題である。人によつては、Trail は主に globulin 分層の方にあるものとして、第 7 図のようにカットする人も

Fig. 7 Incorrect elimination of the trail effect.

あるが、albumin 分層中にも Trail は潜在的ではあるが存在するし、また、 γ -globulin にちかづくにつれて Trail がもつと甚だしくなるものではないので不当である。

それで、第 8 図に示したように、一様にカットすべきである。このとき基準となるのが、前述の通り泳動原図 (濾紙) であるが、albumin の前端から γ -globulin の末端までの距離 ($\overline{a-b}$) を測定して、吸光度曲線をカットするのである。大抵の場合は、第 8 図にも示してあるが、 γ -globulin の末端が Base line より少し高いが、これが Trail によるものである。しかし実際的には、たまにはこの γ -globulin 末端の Trail が異常に高いか、もしくは泳動原図で ($\overline{a-b}$) の正確な測定が不可能なときもあるので、補充的に albumin 分層の幅 ($\overline{a-c}$) を測定して ($\overline{a-c} = (\overline{a'-c'})$) になるようにカットすればよい。これは、albumin 分層がもつとも明確に分離される分層であるからであるが、または albumin の前端から明確にみえる α_2 、もしくは β -globulin の末端までの距離を測定して参考にすることもできる。

さて、第 8 図において ($\overline{a-c}$) より ($\overline{d-e}$) が大きいので、albumin 分層が必要以上にカットされるのではないかと考えられるが、albumin 分層の吸光度曲線の幅が実在よりも大きくあらわれるのが普通である。なぜなら、Blank point として albumin の前方、

Fig. 8 Demonstration of the effect of artificial trail and illustration of correct eliminating method of the trail effect. (1)-curve was obtained with artificial trail which is a oiled white paper. (2)-curve is the original electropherogram. If curve-(1) is compared with curve-(2), it is easily recognizable that the trail effect must be eliminated.

すなわち蛋白質が通過しなかつたところをとるが、Slit の幅が 1 mm であるとしても、片方ですくなくとも 1 mm はよりひろくなりうる（濾紙がはじめは少しのびるしまた濾紙の固定部位で（Photovolt densitometer では）多少の融通がありまた 1 mm の Slit 約半分以下を染色された部分がしめるときもありうるから）。また、Trail も両末端においては飽和点に達せず、その強度が漸次的に変化するし、それに濾紙の均等性も完全無欠なものでないから、前後あわせて 4 mm ほど実在よりもつとひろくなりうるのである。40 例について、実際にこの albumin 分層の基底線の縮少を実測してみたところ、 4.0 ± 1.1 mm であった。したがって、albumin peak 中の Trail をカットするといつて albumin が必要以上にすくなくなるのではない。さて、同じ血清を、Trail effect を除去して定量したものと、そのままで行つたものとを比較してみると、第 3 表のようである。

Table 3 Comparison of the relative protein percentages obtained by elimination of the trail effect with those from the original densitometric patterns.

normal sera				Congestive cardiac failure			
Albumin		γ -globulin		Albumin		γ -globulin	
eliminate trail	include trail	eliminate trail	include trail	eliminate trail	include trail	eliminate trail	include trail
57.2	54.5	22.3	20.4	32.8	31.1	47.7	43.6
52.8	48.0	23.0	24.6	29.5	29.7	48.6	40.7
59.2	55.3	20.5	20.6	35.4	32.5	46.2	42.5
54.1	50.8	23.8	23.3	35.0	31.3	44.3	41.5
54.4	49.5	21.0	23.7	33.0	31.6	45.1	42.0
※ F=8.7		F=0.16		F=2.13		F=50.46	

※ (5%=5.32, 1%=11.26)

すなわち、Trail effect を除去しなければ、正常血清では蛋白質濃度が高い albumin で差が確かに生じ (3~5%, 平均 4%), 病的血清では蛋白質濃度がました globulin 分層 (第 3 表の病的血清では γ -globulin が 4~8%, 平均 6% の誤差がある) に差が生ずる。これは統計学的 F 検証値でも明らかにあらわれている。

要 約

本実験結果および考察からして、血清蛋白質の定量的濾紙電気泳動にはつぎのような事項を考慮に入れて実施しなければならず、このような原則のもとに行う方法を Shim-Park の標準操作法として提唱する。

1. 泳動図の分離が鮮明でなければならないのは勿論、各分層間の分離距離をできるだけちめること。

このためには、イオン強度 0.1 pH 8.6 の新鮮なバルビタール緩衝液を用い、低圧で (75 V/20 cm) 泳動すること。

2. Trail effect をなるべく減少せしめるためには、できるだけ吸着性のすくない濾紙を使うこと。

3. Densitometry するときの濾紙の透明化操作には、あらかじめ濾紙および流動パラフィン中の湿気および気泡をのぞいたあと、充分 Oil を均等にしみこませること。これは、Oiling による Artifact をすくなくするために絶対に留意すべきことである。

4. 光電池を使つた普通の Densitometer では、Filter を使わなくても Beer の法則が成り立つように、適当量の血清を濾紙に塗布すること。総蛋白濃度が 7.0 g/dl の血清なら、その 0.01 ml 以下を幅 3 cm にわたつて均等に塗布しなければならない。もちろん、これより濃度が高い血清でも、もつと少量をぬればよいわけであるが、6 g/dl 程度にあらかじめ緩衝液で血清を稀釈してぬつた方が安全である。また、低濃度の試料でも、くりかえして多量を塗布するといけない。濾紙はうすいものほどよく、あつければ多量の試料がつくので、定量的泳動にはよくない。Densitometry するとき、吸光度が 1.0 をこえる点があれば、もつと少量の試料を塗布して再泳動すべきである。

5. 吸光度曲線を定量する目的で解析するときは、前述の要領で Trail effect をカットしなければならない。

このほか、本実験で Trail は albumin だけがのこすのではなく、globulin 分層ものこし、これは附加的にあらわれるのではなく、血清および濾紙によつてある飽和度があり、また、Amidoblack 10 B に対しては、正常 albumin と α -globulin は同じ程度の結合能を有し、 β および γ -globulin は albumin よりわずかに結合能がひくいことをたしかめた。

文 献

- 1) Wieland, T. and Fischer, F.: *Naturwissenschaften*, **35**, 29 (1948)
- 2) Grassmann, W. and Hannig, K.: *ibid.*, **37**, 496 (1950)
- 3) Durrum, E.L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950)
- 4) 阿部外 40 名: *生物物理化学*, **4**, 62 (1958)
- 5) 沈鳳姿: *航空医学* (韓国), **3**, (4, 5), 84 (1955)
- 6) Durrum, E.L.: *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis* (Academic Press, New York) 402 (1956)
- 7) Monty, K.J., Morrison, M., Alling, E. and Stotz, E.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 295 (1956)
- 8) Robbins, J.: *Arch. Biochem. & Biophys.*, **63**, 461

- (1956)
- 9) Böhle, E. and Fischer, H. : *Klin. Wochschr.*, **31**, 798 (1953)
- 10) Pugar, Z. : *Z. physiol. Chem.*, **296**, 62 (1954)
- 11) Esser, H., Heinzler, F., Kazmeiser, F. and Scholtan, W. : *Münch. med. Wochschr.*, **93**, 986(1951)
- 12) Durrum, E.L. : *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, (Academic Press, New York) 398 (1956)
- 13) Hardwicke, J. : *Biochem. J.*, **57**, 166 (1954)
- 14) 朴永夏 : *日医大誌*, 投稿中

SOURCES AND ELIMINATION OF THE ERRORS IN QUANTITATIVE PAPER ELECTROPHORESIS OF THE SERUM PROTEINS

by Yong-Ha Park

Dept. of Biochemistry, Catholic Medical College, Seoul, Korea.

(Director : Prof. Bong-Sop Shim, M.D.)

Sources of errors in quantitative paper electrophoresis of the serum proteins have been investigated, and found that the sources of errors are the so-called trail, difference of dye-combining capacity of each protein fractions, influence of the amount of protein on unit area of the paper to the optical density with white light, and the artifact of oiling process in densitometry. From the experimental results, to obtain reproducible data, following standard procedure is recommended.

1. For accurate quantitation, the electropherogram should be clear-cut, but the distance between each fractions should be reduced as narrow as possible to minimize the trail effect of the migrated protein. For this purpose, barbital buffer of higher ionic strength (0.1) than conventionally used (0.05 to 0.06) should be employed, and migration should be done with low voltage (75 V/20 cm).

2. Another measure to minimize the protein-trail effect is to select a filter paper such as Whatman No. 1 or Toyo No. 51 which adsorbs less protein.

3. To eliminate the densitometric artifact, preliminary removal of moisture and air in the stained paper and oil is absolutely necessary.

4. There are certain limitation of protein amount on unit area of the paper to obtain linear relationship between protein amount and optical density with ordinary photocell-white light densitometer. In other words, optical density of dense area (e.g. center part of albumin) is not proportionally higher than that of light area (e.g. alpha-, beta-globulin part). To obtain Beer's relationship, the protein amount on the unit area should be below 0.0035 mg/mm². In practice, less than 0.01 ml of serum diluted with buffer to the total protein concentration of 6.0 g/dl should be applied evenly 3 cm wide. For this reason, thinner paper is preferable, and it should be avoided to apply repeatedly even with a sample of low protein concentration, and when there is found a point which over 1.0 of optical density in densitometry, it should be re-migrated with less amount of the sample.

5. In the final quantitative analysis of the densitometric curves, the trail effect should be cut as described in the text.

In this experiment, in addition, I have confirmed following facts; that (1) trail is not only originate from albumin, but also from globulins, and its appearance is not additive, and there are certain point of saturation according to the property of paper and serum. (2) The amidoblack 10 B-combining capacity of alpha-globulin is almost same with that of albumin, but beta, and gamma-globulin combine slightly less than albumin.