

## Applicazioni dell'elettroforesi capillare all'analisi delle proteine della membrana eritrocitaria

Lorena Mosca, Renata Paleari, Andrea Mosca

Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

### ABSTRACT

**Application of capillary electrophoresis to the analysis of red cell membrane proteins.** Several hereditary hemolytic anemias associated with abnormal red cell shapes, such as hereditary spherocytosis and elliptocytosis, are caused by defects of red cell membrane proteins. The detection of these abnormalities is usually performed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), a time-consuming and laboratory intensive technique. The aim of this study was to set up a method based on SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) for the separation and quantification of major erythrocyte membrane proteins. Twenty blood samples were collected in EDTA and processed within 2 days. Erythrocytes were separated from platelets and leukocytes and then subjected to a hypotonic treatment to obtain membrane ghosts. The analyses of red cell membrane proteins were carried out with a Beckman Coulter ProteomeLab PA800 capillary electrophoresis apparatus equipped with a diode array detector set at 220 nm. The SDS-MW analysis kit (Beckman Coulter Inc.) was used. Seven major erythrocyte membrane proteins were separated and identified:  $\alpha$ - and  $\beta$ -spectrin, and bands 3, 4.1, 4.2, 5 and 6. Their MW values were in good agreement with those reported in the literature. The reproducibility (expressed as CV) of the migration times was between 0.1% and 0.3%. The reproducibility of the relative abundances of these main proteins, expressed in relation to band 5, was between 3.6% (band 6/5) and 7.6 % (band 4.1/5). Our preliminary results prove that SDS-CGE may be an alternative approach to standard SDS-PAGE for the identification of red cell membrane disorders.

### INTRODUZIONE

La membrana dell'eritrocita è costituita da un doppio strato lipidico stabilizzato da proteine sia di tipo integrale che citoplasmatico (1, 2). Le principali proteine integrali di membrana (banda 3 e glicoforine) contengono domini idrofobici e domini idrofilici che sporgono sia verso l'esterno della cellula sia verso l'interno dove vanno ad interagire con le proteine citoplasmatiche che costituiscono lo scheletro dell'eritrocita. Tale scheletro è composto principalmente da  $\alpha$ -spettina (banda 1),  $\beta$ -spettina (banda 2), anchirina (banda 2.1), proteina 4.1, proteina 4.2 e actina (banda 5).

Difetti sia quantitativi che funzionali a carico di una o più di queste proteine indeboliscono la membrana plasmatica del globulo rosso e portano ad una ridotta sopravvivenza in circolo degli eritrociti, che tipicamente si associa a sferocitosi ereditaria (SE) od a ellissocitosi ereditaria (EE), a seconda della forma assunta dall'eritrocita e dalla proteina coinvolta nel difetto (3). Per la diagnosi di tali patologie è importante lo studio delle proteine della membrana eritrocitaria attraverso separazione elettroforetica su gel di poliaccrilammide in sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE), che permette la quantificazione delle singole componenti peptidiche del complesso membrana-citoscheletro (4,5). Queste tecniche soffrono, tuttavia, di una serie di limitazioni, legate alla lunghezza della procedura ed alla sua manualità. Sono inoltre tecniche semiquantitative, anche dopo colorazione con Coomassie o sali d'argento (6).

Negli ultimi due decenni l'elettroforesi capillare su gel (CGE) è stata proposta come metodo valido per l'analisi dei complessi SDS-proteina e la loro separazione in base alla massa molecolare (7). Tale separazione avviene all'interno di un capillare di silice fusa di diametro molto piccolo (25-100  $\mu\text{m}$ ) rivestito da uno strato di polimide e riempito con soluzioni di polimeri che fungono da setaccio molecolare e che, grazie alla loro ridotta viscosità, possono venire sostituite dopo ogni corsa elettroforetica. Confrontata con la classica SDS-PAGE, la versione capillare (SDS-CGE) offre numerosi vantaggi tra cui la velocità, la completa automatizzazione, la richiesta di piccole quantità di reagenti e di campione, il rilevamento diretto UV in colonna, una migliore analisi quantitativa, alta risoluzione e buona riproducibilità (8).

Finora la tecnica CGE è stata applicata principalmente all'identificazione delle masse molecolari di proteine di diversa natura, principalmente per scopi di ricerca scientifica, mentre piuttosto limitate sono state le applicazioni in ambito biochimico-clinico (9). Nel 2000 Lin et al. hanno descritto per la prima volta un metodo per l'analisi delle proteine della membrana eritrocitaria mediante CGE, dimostrando come tale tecnica possa trovare utili applicazioni per la diagnostica delle anemie emolitiche (10). Pertanto, nell'ambito del presente lavoro, abbiamo voluto mettere a punto un metodo SDS-CGE per la separazione e la quantificazione delle principali proteine della membrana eritrocitaria, definendone le caratteristiche analitiche su un numero limitato di campioni provenienti da soggetti in buono stato di salute.

## MATERIALI E METODI

### Campioni

Sono stati utilizzati 20 campioni residui di sangue intero raccolto in EDTA di soggetti (10 maschi e 10 femmine, età  $53 \pm 19$  anni) in buono stato di salute afferenti all'ambulatorio prelievi dell'ospedale San Raffaele di Milano. La presenza di anemia emolitica era esclusa sulla base delle concentrazioni ematiche di emoglobina, contenuto emoglobinico corpuscolare medio (MCH), volume corpuscolare medio degli eritrociti (MCV) e bilirubina. La raccolta dei campioni è stata effettuata nel rispetto della dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (11), e per ciascun individuo arruolato nello studio si è ottenuto il consenso informato.

I campioni di sangue sono stati esaminati entro 24 ore dal prelievo e conservati fino a quel momento a  $+4$  °C per evitare fenomeni di proteolisi.

### Reagenti

I reagenti per l'elettroforesi ("run buffer", "sample buffer"), lo standard interno (proteina ricombinante di 10 kDa), la miscela di proteine standard a PM noto (da 10 a 225 kDa) ed il capillare sono stati acquistati da Beckman Coulter (SDS-MW Analysis Kit); l' $\alpha$ -cellulosa, la cellulosa microcristallina e il  $\beta$ -mercaptoetanolo da Sigma; il fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF) e N-etilmaleimide (NEM) da Fluka; l'EDTA da Carlo Erba Reagenti, SDS da BioRad Laboratories, il fosfato sodico monobasico anidro, il cloruro di sodio ed il cloruro di potassio da Merck.

### Preparazione delle membrane eritrocitarie

I campioni di sangue (circa 1,5 mL) sono stati filtrati su colonnine di  $\alpha$ -cellulosa e cellulosa microcristallina in modo da rimuovere leucociti e piastrine, come descritto da Beutler et al. (12). Le membrane eritrocitarie ("ghosts") sono state preparate seguendo la metodica proposta da Dodge et al. (13), leggermente modificata. In breve, gli eritrociti filtrati sono stati lavati tre volte con soluzione fisiologica (NaCl 9 g/L) e quindi lisati mediante l'aggiunta, in rapporto 1:40, di una soluzione contenente  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, PMSF 0,4 mmol/L, pH 8,0 (tampone di lisi). Dopo incubazione in ghiaccio per 30 min, il lisato è stato centrifugato a 12.000 rpm per 30 min a  $+4$  °C. Le membrane eritrocitarie, costituenti il "pellet", sono state lavate 3 volte con il tampone di lisi. Dopo l'eliminazione del surnatante dell'ultimo lavaggio, le membrane sono state addizionate con SDS 1% e NEM 2,5 mmol/L (concentrazioni finali) ed infine conservate a  $-80$  °C fino al momento dell'analisi (14,15).

### Estrazione di proteine dalle membrane eritrocitarie

Per l'estrazione delle diverse frazioni proteiche dalla membrana eritrocitaria è stato applicato il metodo di Tyler et al. (16), con l'introduzione di qualche modifica, come di seguito specificato. Per l'estrazione delle spettine e della banda 5, le membrane sono state lavate una

volta con un tampone a bassa forza ionica ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 mmol/L, EDTA 0,1 mmol/L, PMSF 0,2 mmol/L, pH 8,0), risospese in 30 volumi di questo stesso tampone ed incubate a  $37$  °C per 30 min. In tali condizioni, vengono estratte dalla membrana circa 80% delle spettine e tutta la banda 5, che rimangono nel surnatante dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 30 min a  $+4$  °C.

Il "pellet" è stato quindi lavato una volta con il tampone a bassa forza ionica e una volta con il tampone di lisi. Le membrane così trattate sono state analizzate od ulteriormente trattate per l'estrazione di altre proteine di membrana. In particolare, per l'estrazione della banda 6 (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi), della banda 4.1 e della banda 2.1, le membrane precedentemente deplete di spettina e di banda 5 sono state risospese in circa 12 volumi di tampone di lisi. E' stato poi aggiunto, sotto agitazione, KCl in modo da portare la sua concentrazione finale nella soluzione a 1 mol/L. La soluzione contenente le membrane è stata incubata a  $37$  °C per 30 min e in seguito centrifugata a 14.000 rpm per 30 min a  $+4$  °C. Dopo aver allontanato il surnatante contenente le proteine estratte, il "pellet" è stato lavato due volte con il tampone di lisi ed è stato raccolto e conservato come precedentemente descritto per le membrane eritrocitarie.

### Metodo SDS-CGE

Tutte le analisi sono state eseguite con un sistema di elettroforesi capillare ProteomeLab PA800 (Beckman Coulter), controllato dal software system 32 Karat™ e fornito di un rivelatore UV-Diode Array impostato alla lunghezza d'onda di 220 nm. E' stato utilizzato un capillare in silice fusa non ricoperto (20,2 cm di lunghezza al detector; 50  $\mu\text{m}$  di diametro interno). Prima di ogni analisi veniva sempre effettuato un ciclo di precondizionamento del capillare allo scopo di pulire il capillare ed equilibrare la sua superficie con "run buffer" fresco.

Le membrane da analizzare venivano solubilizzate con una diluizione 1:5 nel "sample buffer" e bollite per 5 min dopo l'aggiunta di  $\beta$ -mercaptoetanolo e dello standard interno (8,5% e 0,1 g/L, rispettivamente). La miscela di proteine a PM noto veniva utilizzata dopo diluizione 1:10 nel "sample buffer" e trattata come descritto per i campioni di membrana.

Il campione veniva iniettato nel capillare elettrocineticamente a 5 kV per 20 s. La separazione veniva eseguita a polarità inversa (caricamento del campione al catodo) applicando un voltaggio di 15 kV per 35 min. Il capillare era termostato a  $25$  °C. La corrente sviluppata durante la separazione era di circa 26  $\mu\text{A}$ . Al termine di ogni separazione veniva eseguito un ciclo di lavaggio del capillare che prevedeva i seguenti passaggi: NaOH 0,1 mol/L per 5 min (alla pressione di 50 psi), HCl 0,1 mol/L per 2 min (50 psi), acqua per 2 min (50 psi), "run buffer" per 10 min (40 psi) ed infine l'applicazione di un voltaggio di 15 kV per 10 min. Alla fine di ogni giornata veniva eseguito un ulteriore ciclo di lavaggi (NaOH 0,1 mol/L per 10 min a 50 psi, HCl 0,1 mol/L per 5 min a 50 psi, acqua per 2 min a 50 psi, "run buffer" per 10 min a 50 psi), e le due estremità del capillare venivano mantenu-

te in acqua durante la notte.

Per il calcolo dei PM delle proteine della membrana eritrocitaria è stata costruita una curva di calibrazione mettendo in grafico il tempo di migrazione (in ascissa) rispetto al logaritmo del PM delle proteine usate come marker. La linearità della curva era provata dall'elevato valore del coefficiente di determinazione ( $r^2 = 0,9998$ ).

## RISULTATI

Nella Figura 1a è mostrata una separazione tipica ottenuta dall'analisi con il metodo SDS-CGE di un campione di membrane eritrocitarie. Sono evidenziabili, oltre allo standard interno (10 kDa), sette componenti proteiche principali ed alcuni altri picchi di minor rilievo. Per ciascuna proteina principale è stato calcolato il PM utilizzando la curva di calibrazione costruita sulla base dei tempi di migrazione ottenuti dalla separazione dalla miscela di proteine standard a PM noto (Figura 1b). Le masse molecolari così calcolate sono state utilizzate per l'identificazione delle diverse proteine mediante il confronto con quelle riportate in letteratura ed ottenute con la classica SDS-PAGE (Tabella 1) (1,17).

Nell'elettroferogramma ottenuto mediante SDS-CGE la banda 4.1 è presente come un picco unico e non viene separata nelle sue due isoforme 4.1a e 4.1b (5). Il picco corrispondente alla banda 3 è caratterizzato dall'aver una forma molto ampia rispetto agli altri picchi; infine, la  $\beta$ - e l' $\alpha$ -spetttrina non sono completamente separate tra loro. Poco prima delle due catene di spetttrina si può notare la presenza di un picco di dimensioni molto ridotte con PM di circa 225 kDa: esso potrebbe corrispondere alla banda 2.1, che su SDS-PAGE migra con un PM di 215 kDa o alla sua isoforma 2.2 a PM inferiore (186 kDa) (18). Sono inoltre sempre visibili tracce delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  dell'emoglobina che hanno tempi di migrazione di poco superiori allo standard interno.

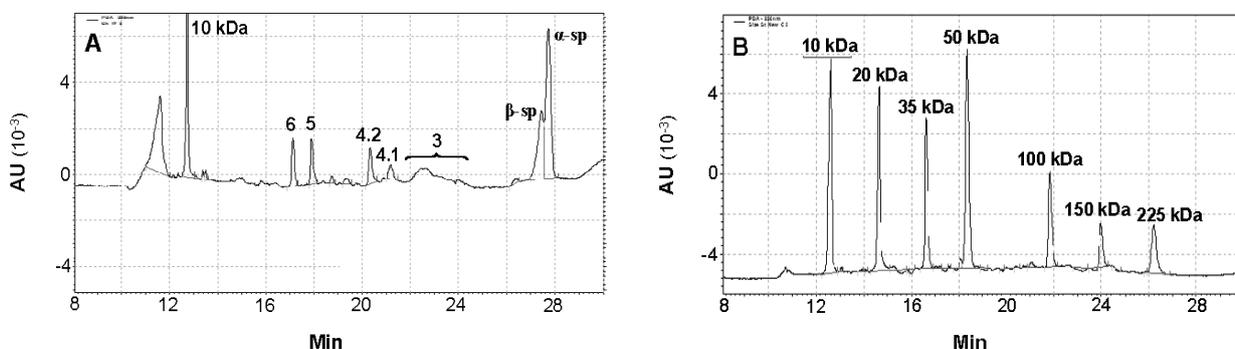
L'identificazione delle varie componenti della membrana eritrocitaria, oltre che con il confronto delle masse molecolari, è stata eseguita incubando le membrane in tamponi di diversa composizione, che portano all'estra-

zione dalla membrana di quelle proteine che sono legate ad essa in maniera più o meno labile. Il trattamento delle membrane con un tampone a bassa forza ionica causa la rimozione dalla membrana di circa 80% delle spetttrine e della quasi totalità della banda 5, e ha permesso quindi la loro identificazione mediante sottrazione (Figura 2a). Una volta private di spetttrine e banda 5, le membrane sono state incubate in tampone contenente alte concentrazioni di KCl (1 mol/L); questo trattamento induce l'estrazione dalla membrana eritrocitaria della banda 6, di circa il 60-80% della banda 4.1 e della banda 2.1 (19). Osservando l'elettroferogramma ottenuto dall'analisi delle membrane dopo questo secondo trattamento (Figura 2b) è stato possibile identificare la banda 6, che risulta pressochè assente, e la banda 4.1, la cui area è ridotta di circa il 70% rispetto al tracciato di controllo (Figura 1a). Il piccolo picco che precede le spetttrine, e la cui massa molecolare è affine a quella della banda 2.1 o della sua isoforma 2.2 a PM inferiore, è ancora presente anche dopo il trattamento con KCl 1 mol/L.

La riproducibilità dei tempi di migrazione delle diverse frazioni proteiche è mostrata nella Tabella 2. Nella Tabella 3 sono riportati i risultati della riproducibilità dell'analisi quantitativa, per la quale le aree dei picchi corrispondenti alle singole proteine sono state normalizzate sulla base dell'area relativa del picco corrispondente alla banda 5. I dati riportati nelle Tabelle si riferiscono alle analisi effettuate sui campioni di membrane ottenuti dai 20 soggetti studiati, analizzati in duplicato.

## DISCUSSIONE

In questo lavoro presentiamo un metodo SDS-CGE per la separazione e la quantificazione delle principali proteine della membrana eritrocitaria. Si tratta di un metodo basato sullo stesso principio della classica SDS-PAGE, ma che fornisce vantaggi di completa automatizzazione ed emissione digitale dei dati tipici della moderna strumentazione HPLC (20). Il capillare è riempito con una soluzione contenente un polimero che si comporta da setaccio molecolare, che viene sostituita dopo ogni



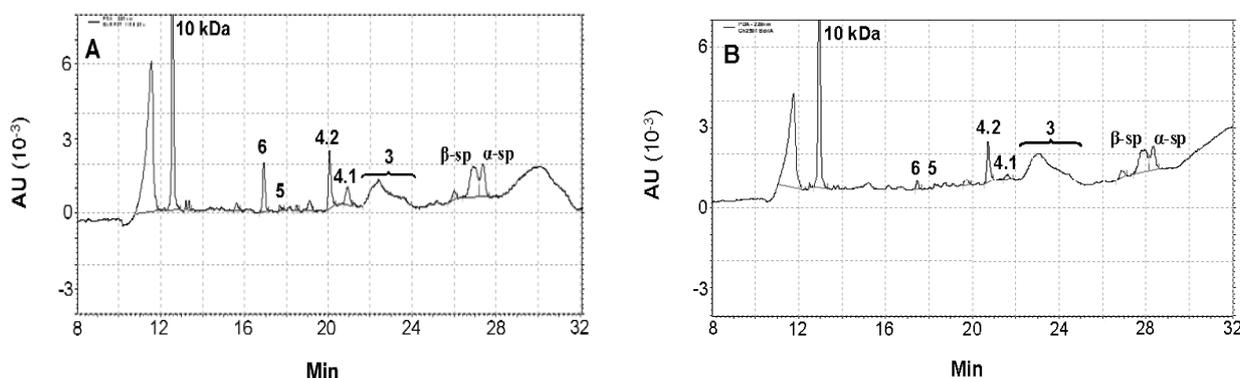
**Figura 1**

Separazione delle proteine della membrana eritrocitaria da un soggetto adulto sano (A) e degli standard a PM noto (B) tramite metodo SDS-CGE. La proteina con PM di 10 kDa è stata utilizzata come standard interno per il calcolo dei tempi di migrazione. 6, banda 6; 5, banda 5; 4.2, banda 4.2; 4.1, banda 4.1; 3, banda 3;  $\beta$ -sp,  $\beta$ -spetttrina;  $\alpha$ -sp,  $\alpha$ -spetttrina.

**Tabella 1**

Masse molecolari apparenti delle principali proteine della membrana eritrocitaria ottenute tramite metodo SDS-CGE (n=20) confrontate con le masse molecolari ottenute da dati della letteratura

Proteina	PM, kDa (media $\pm$ DS)	
	SDS-CGE	SDS-PAGE
Banda 6	38 $\pm$ 0,2	35
Banda 5	45 $\pm$ 0,3	43
Banda 4.2	74 $\pm$ 0,5	72
Banda 4.1	87 $\pm$ 0,6	78
Banda 3	123 $\pm$ 7	90
$\beta$ -Spettrina	288 $\pm$ 4	225
$\alpha$ -Spettrina	309 $\pm$ 5	240

**Figura 2**

Identificazione delle principali proteine della membrana eritrocitaria in membrane diversamente processate.

A) Membrane private di banda 5,  $\beta$ - e  $\alpha$ -spettrina. B) Membrane private di banda 6, banda 5, banda 4.1 e  $\beta$ - e  $\alpha$ -spettrina.

corsa elettroforetica in modo da ripristinare le condizioni iniziali e rendere le separazioni più riproducibili. Tale soluzione è stata formulata in modo da risultare un setaccio molecolare efficace per separare proteine con PM compresi tra circa 10 kDa e 225 kDa.

Per quanto riguarda la caratterizzazione delle componenti proteiche sulla base dei loro PM, va tenuto presente che la massa molecolare ottenuta attraverso SDS-PAGE o SDS-CGE è una massa molecolare apparente che spesso non corrisponde esattamente a quella calcolata attraverso la sequenza amminoacidica. Sulla base di questa considerazione si può quindi affermare che i PM delle principali proteine della membrana eritrocitaria ottenute con il nostro metodo sono generalmente in buon accordo con quelle riportate in letteratura (1, 17). Fanno eccezione i PM delle due catene di spettrina che risultano significativamente più alti di quelli riportati da Steck (1) e da Harris (17), ma che altri hanno dimostrato variare da 130 kDa a 300 kDa (4). Nelle nostre condizioni, tali proteine mostrano un tempo di ritenzione superiore a quello dello standard di più elevato PM (225 kDa), il che indica una loro massa molecolare >225 kDa.

L'identificazione di ciascuna proteina clinicamente rilevante è stata ottenuta privando le membrane eritroc-

itarie di alcune delle loro componenti proteiche principali ed eseguendo la loro analisi tramite SDS-CGE; in questo modo si è stabilito il loro profilo di separazione in banda 6, banda 5, banda 4.2, banda 4.1, banda 3,  $\beta$ - e  $\alpha$ -spettrina. Tale sequenza è solo in parte simile a quella ottenuta e descritta da Lin et al. (10), dove peraltro la strumentazione ed i reagenti impiegati erano diversi da quelli da noi utilizzati. Nel loro metodo SDS-CGE illustrato la separazione ha una durata di 17 min, non viene posta alcuna attenzione alle bande 6 e 5 e la banda 4.1 è separata nelle sue due isoforme 4.1a (80 kDa) e 4.1b (78 kDa) (21). L'ultimo picco del profilo di separazione è costituito dalla banda 2.1, che non è ben separato dall' $\alpha$ -spettrina e il cui comportamento sembrerebbe diverso nei differenti sistemi elettroforetici (4, 5). Nel nostro caso ulteriori indagini sono necessarie per indagare la posizione di tale proteina. Infatti, il picco antecedente la  $\beta$ -spettrina, che possiede una massa molecolare simile a quella della banda 2.1, in seguito all'incubazione delle membrane con KCl 1 mol/L, continua ad essere presente. Tale proteina potrebbe quindi corrispondere non alla banda 2.1, ma alla sua isoforma 2.2 di PM inferiore, che sembrerebbe non essere del tutto rimossa da questo tipo di trattamento (18). Un'ipotesi alternativa potrebbe

**Tabella 2**

Riproducibilità dei tempi di migrazione (min) delle principali proteine della membrana eritrocitaria rilevate tramite metodo SDS-CGE (n=20, metodo delle analisi replicate)

	Banda 6	Banda 5	Banda 4.2	Banda 4.1	$\beta$ -Spettrina	$\alpha$ -Spettrina
Media	16,5	17,3	19,6	20,5	26,5	26,8
DS	0,02	0,02	0,03	0,03	0,06	0,07
CV	0,1%	0,1%	0,2%	0,1%	0,2%	0,3%

**Tabella 3**

Riproducibilità dei rapporti tra le aree dei picchi delle principali proteine della membrana eritrocitaria e la banda 5 rilevate tramite metodo SDS-CGE (n = 20, metodo delle analisi replicate)

	Banda 6/5	Banda 4.2/5	Banda 4.1/5	( $\beta$ + $\alpha$ )Spettrine/5
Media	1,06	0,92	0,45	5,92
DS	0,04	0,05	0,03	0,29
CV	3,6%	5,5%	7,6%	4,9%

essere che il picco della banda 2.1 non è visibile perché sovrapposto al picco parzialmente separato delle due catene della spettrina.

Con il metodo SDS-CGE da noi presentato il picco corrispondente alla banda 3 presenta una forma ampia e non appuntita. Di fatto anche nella classica SDS-PAGE la banda 3, che è una glicoproteina, migra come una banda diffusa, questa sua eterogeneità essendo dovuta al suo differente grado di glicosilazione ed al tipo di catene saccaridiche legate alla proteina (22). Nella Tabella 3 non sono presenti i dati relativi al rapporto banda 3/banda 5 poiché, a causa di questo particolare profilo di migrazione, non è facile identificare con sicurezza l'inizio e la fine del picco della banda 3, con conseguente difficoltà e poco accurata integrazione della sua area. Anche nel metodo SDS-CGE citato la banda 3, che ha un PM compreso tra 86 kDa e 183 kDa, ha un aspetto particolare, con una parte anteriore appuntita ed una lunga coda, peculiarità che ne rende difficoltosa la quantificazione (10).

La riproducibilità dei tempi di migrazione delle principali proteine della membrana eritrocitaria ottenuta con il metodo SDS-CGE da noi presentato è simile a quella ottenuta da Lin et al. (10). La riproducibilità della quantificazione è stata invece da noi stimata valutando la variabilità di rapporti tra alcune proteine di membrana diversi da quelli utilizzati da questi autori. La decisione di normalizzare le diverse proteine di membrana rispetto alla banda 5 non dovrebbe causare particolari problemi nella valutazione dei difetti di membrana, perché tale proteina non sembrerebbe coinvolta in patologie quali la sferocitosi o l'ellisocitosi ereditaria. Inoltre la buona risoluzione del picco della banda 5 ne rende semplice e robusta la sua integrazione per l'analisi quantitativa. Poiché la diagnosi si deve basare su informazioni quantitative, la quantificazione delle proteine medesime risulta di importanza fondamentale. Nelle tecniche SDS-PAGE attualmente in uso essa è ottenuta tramite la colorazione delle proteine con blu di Coomassie, seguita poi da decolorazione. Si tratta di una procedura molto lunga e che può

indurre errori nella quantificazione dal momento che il colorante presenta un'affinità differente per proteine diverse. Le tecniche immunochimiche, più accurate della colorazione con blu di Coomassie, risultano piuttosto difficoltose e costose e ciò ne limita l'applicazione. Nel metodo SDS-CGE da noi proposto il rilevamento "online" dell'assorbanza UV rende possibile la quantificazione diretta della proteina attraverso il calcolo dell'area del suo picco, riducendo così i tempi di lavoro e il rischio di errore derivante dal processo di colorazione. Altre interessanti caratteristiche sono la velocità, la completa automazione, un buon potere risolutivo, un'elevata sensibilità ed una buona riproducibilità.

In conclusione, i nostri dati preliminari suggeriscono che la CGE può essere utilizzata come tecnica di base per lo studio dei difetti della membrana eritrocitaria. Gli effettivi vantaggi di questa metodica dovranno essere valutati studiando pazienti affetti da anemia emolitica cronica e caratterizzati, per quanto riguarda le proteine di membrana, con la classica tecnica SDS-PAGE e con tecniche molecolari.

## BIBLIOGRAFIA

1. Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J Cell Biol* 1974;62:1-19.
2. Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. *Blood Rev* 1996;10:129-47.
3. Birkenmeier CS, Barker JE. Hereditary haemolytic anemias: unexpected sequelae of mutations in the genes for erythroid membrane skeletal proteins. *J Pathol* 2004;204:450-9.
4. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971;10:2606-17.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
6. Lu JJ, Liu S, Pu Q. Replaceable cross-linked polyacrylamide for high performance separations of proteins. *J Proteome Res* 2005;4:1012-6.

7. Cohen AS, Karger BL. High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J Chromatogr A* 1987;397:409-17.
8. Lee HG. High performance sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel capillary electrophoresis of antibodies and antibody fragments. *J Immunol Methods* 2000;234:71-81.
9. Manabe T, Oota H, Mukai J. Size separation of sodium dodecyl sulfate complexes of human plasma proteins by capillary electrophoresis employing linear polyacrylamide as a sieving polymer. *Electrophoresis* 1998;19:2308-16.
10. Lin C, Cotton F, Boutique C, et al. Capillary gel electrophoresis: separation of major erythrocyte membrane proteins. *J Chromatogr B* 2000;742:411-9.
11. [http://www.wma.net/e/humanrights/policy\\_meetings.htm](http://www.wma.net/e/humanrights/policy_meetings.htm).
12. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med* 1976;88:328-33.
13. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-30.
14. Lutz HU, Wipf G. Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells. *J Immunol* 1982;128:1695-9.
15. Skrabut EM, Crowley JP, Catsimpoalas N, et al. The effect of cryogenic storage on human erythrocyte membrane proteins as determined by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Cryobiology* 1976;13:395-403.
16. Tyler JM, Hargreaves WR, Branton D. Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5192-6.
17. Harris JR, ed. *Blood cell biochemistry. Erythroid cells*. New York: Plenum Publishing Corporation, 1990;455-73.
18. Hall TG, Bennett V. Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 1987;262:10537-45.
19. Rybicki AC, Heath R, Wolf JL, et al. Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1988;81:893-901.
20. Bean SR, Lookhart GL. Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries. *J Agric Food Chem* 1999;47:4246-55.
21. Inaba M, Gupta KC, Kuwabara M, et al. Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in aging. *Blood* 1992;79:3355-61.
22. Tsuji T, Irimura T, Osawa T. The carbohydrate moiety of band-3 glycoprotein of human erythrocyte membranes. *J Biochem* 1980;187:677-86.