

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI

Chromatografia powinowactwa – technika chromatograficzna najwyższej swoistości

Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

Chromatografia powinowactwa (affinity chromatography) jest rodzajem chromatografii cieczowej, w której materiał wypełnienia kolumny wykazuje biologiczne powinowactwo do substancji, jaką zamierzamy wyodrębnić ze złożonej mieszaniny związków. Technika ta wykorzystuje funkcjonalną swoistość układów biologicznych do izolacji białek, polisacharydów, kwasów nukleinowych i innych klas naturalnie występujących składników. Swoiste właściwości sorpcyjne materiału kolumny uzyskuje się przy pomocy odpowiedniego — specyficznego wiążącego ligandu — sprzężonego kowalencyjnie z nierozpuszczalnym nośnikiem (matrycą). Unieruchomiony w ten sposób ligand może adsorbować z roztworu interesującą nas substancję, inne zaś, do których nie wykazuje powinowactwa, przepuszcza do eluatu. Desorpcja związanego składnika z kolumny może nastąpić po zmianie warunków doświadczenia np. po przemyciu buforem o innej wartości pH, wyższej sile jonowej, itp. Cały proces izolacji, oczyszczania względnie zagęszczania substancji jest jednostopniowy i wymaga stosunkowo małej objętości złoza kolumny. Wiązany jest bowiem tylko jeden związek, który w płynie biologicznym występuje zwykle w niewielkim stężeniu. Swoistość rozdziału determinowana jest swoistością reakcji antygen — przeciwdziałalo, enzym — inhibitor, hormon — nośnik i specyficznością reakcji innych układów biologicznych. Chromatografia powinowactwa prowadzi więc do izolacji substancji odpowiednio do ich funkcji biologicznych i tym różni się zasadniczo od innych technik chromatograficznych, w których rezultaty zależą od różnic w fizycznych i chemicznych właściwościach między rozdzielanymi składnikami. Stwarza ona w ten sposób nowe możliwości dla dokonania rozdziałów trudnych lub niemożliwych do przeprowadzenia przy użyciu innych, mniej swoistych technik.

Praktyczne aspekty chromatografii powinowactwa

1. Wybór nośnika, ligandu i metody ich sprzężenia

Podstawowym warunkiem wymaganym dla przeprowadzenia procesu chromatografii powinowactwa jest znalezienie odpowiedniego ligandu, nośnika i właściwej reakcji ich sprzężenia. Nośnik, stanowiący materiał kolumny do którego sprzęga się bioswoisty ligand, powinien posiadać dużą trwałość mechaniczną i chemiczną, stabilność termiczną, stosowną porowatość i dobre właściwości dla przepływu roztworów.

Substancjami nośnikowymi mogą być: porowate szkło, krzemionka, poliakrylamid, celuloza, żele dekstranowe i agarozowe. Najczęściej jednak — z uwagi na łatwość wykluczenia nieswoistych efektów sorpcyjnych dla związków wysokocząsteczkowych — stosowane są pochodne celulozy (Merck) lub agarozy. Ten ostatni nośnik jest produkowany w oparciu o patent szwedzkiej firmy Farmacia Fine Chemicals w postaci sefarozy lub sefarozy CL o gradacji ziaren 4B, 6B i 6 MB, i rozprowadzany w zwykłej lub zaktywowanej formie gotowej do sprzężenia (tab. 1).

Wybór ligandu zależy od rodzaju izolowanej substancji, stąd nie sposób dać tu przeglądu wszystkich możliwości. Przykładowo: sprzężony z sefarozą sojowy inhibitor trypsyny umożliwi wybiórczą izolację tego enzymu z soku trzustkowego i odwrotnie — trypsyna związana z nierozpuszczalnym nośnikiem zezwala w odpowiednich warunkach na wyodrębnienie z układów jej swoistych inhibitorów (3, 30). Złączenie z nośnikiem określonego antygenu ułatwia izolację właściwego mu przeciwciała — i *vice versa* — osadzone na nośniku przeciwciała wiąże ze złożonej mieszaniny płynu biologicznego swoisty dlań antygen (10, 37, 40). Sprzęgnięcie z matrycą AMP lub ADP stwarza warunki do związania i uwolnienia enzymów, których kofaktorem są odpowiednio NAD^+ i $NADP^+$ (6, 36, 47). Nie zawsze ligandy są tak wysoko swoiste, jak te, które wymieniono wyżej. Częściej umożliwiają wychwycenie na kolumnie nie pojedynczych substancji, lecz pewnych grup enzymów, białek lub kwasów nukleinowych. Swoistość procesu osiągnięta jest w takich przypadkach przez zmianę warunków umożliwiających swoistą desorpcję pojedynczego składnika. Dla takiej izolacji związków produkowane są gotowe zestawy wypełnień kolumnowych ligand-nośnik. Najważniejsze z nich wraz z zastosowaniem podano w tab 2.

Przygotowanie materiału złoza kolumny dla chromatografii powinowactwa wymaga wytworzenia trwałego wiązania kowalencyjnego pomiędzy nierozpuszczalnym nośnikiem a ligandem. Ponadto, wiązanie to musi być wytworzone przez grupę ligandu, która nie jest istotna dla jego swoistości wiążącej aktywności.

Najważniejszymi grupami dla wiązania białek do stałego nośnika są N-końcowe grupy aminowe oraz grupy aminowe i guanidynowe, ulokowane odpowiednio w resztach lizyny i argininy. Wiązania kowalencyjne mogą być wytworzone także przez C-końcowe grupy białek lub przez — znajdujące się w nich — grupy karboksylowe kwasów asparaginowego i glutaminowego. Rzadziej do tego celu wykorzystuje się inne grupy funkcyjne aminokwasów ($-SH$, $-OH$).

Przy wiązaniu ligandów węglowodanowych wyzyskuje się najczęściej ich grupy hydroksylowe i aminowe (aminocukry).

Grupy fosforanowe, hydroksylowe grupy cukrów oraz grupy aminowe i enolowe stwarzają możliwość kowalencyjnego związania do nośników kwasów nukleinowych.

Substraty, koenzymy, inhibitory i hormony zawierają co najmniej jedną lub wiele spośród wymienionych wyżej grup.

Aby mogło nastąpić sprzęgnięcie ligandu, nośnik powinien posiadać także odpowiednio aktywne resz-

ty. Wprowadza się je przy preparacji nośnika. Mogą to być:

- 1) grupy nukleofilne (aminowe, sulfhydrylowe, hydroksylowe),
- 2) grupy elektrofilne (karboksylowe, bezwodników kwasowych, izocyjanianowe, izotiocyanianowe, dwuazoniowe, itp).

Umożliwiają one sprzężenie do nośnika prawie wszystkich stosowanych ligandów.

Właściwy wybór techniki sprzężania zależy od natury ligandu. Najczęściej używanymi metodami sprzężania ligandów do nośnika jest metoda bromocyjanowa (5) oraz metoda karbo-dwu-imidowa (29, 44). Przy pomocy pierwszej z metod prawie każdy ligand zawierający grupy aminowe może zostać podłączony do nośnika z sefarozy. Efekty steryczne, jakie mogą występować przy sprzężaniu wysokocząsteczkowych ligandów (np. białek), eliminuje się przez wprowadzenie

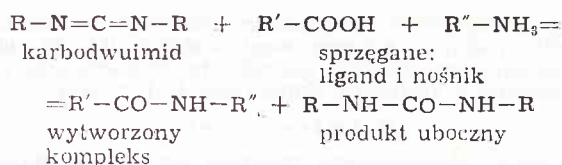
między ligand a nośnik 6—12 atomowych mostków („spacer groups”).

Z uwagi na trudności metodyczne i trujące działanie bromocyjanu, korzysta się najczęściej już z uaktywnionych tym związkiem nośników (aktywna CNBr sefaroza). Ligandy zawierające aromatyczne lub alifatyczne grupy aminowe mogą być sprzężane bezpośrednio do CNBr sefarozy lub do innych aktywnych form tej matrycy. Procedury tych procesów podawane są w odpowiednich publikacjach a także wydawnictwach producentów materiałów nośnikowych (1, 5).

Ligandy zawierające grupy karboksylowe są sprzężane do nośników przy użyciu metody z wykorzystaniem karbodwuimidów. Zasadę tej metody — odkrytej przez Khoranę i Sheehana (29, 44) określają poniższe reakcje chemiczne;

Tab. 1. Najczęściej stosowane nośniki w chromatografii powinowactwa do sprzężania ligandów

Typ ligandu	Grupa funkcyjna	Nośnik	Uwagi	Technika sprzężania
Białka, aminokwasy, peptydy	-NH ₂	CNBr-aktywowana sefaroza 4B (Pharmacia)	Alternatywna metoda dla białek, najlepiej opracowana	Bezpośrednio w pH 8—9
		Aktywowana CH-sefaroza 4B (Pharmacia)	Aktywowana dla sprzężania przez 6-C-mostek. Polecana szczególnie dla ligandów niskocząsteczkowych	Bezpośrednio w pH 5—10
		Epoksy-aktywowana sefaroza 6B (Pharmacia)	Aktywowany żel odpowiedni dla aminokwasów i peptydów	Bezpośrednio w pH 9—13
		1. CH-sefaroza 4B (Pharmacia) 2. Amino-heksylo-celuloza (Merck) 3. Sprzężona z bursztynianem amino-heksylo-celuloza (Merck) 4. Sprzężona z bursztynianem amino-dodecylo-celuloza (Merck) 5. 6-ACA-sefaroza CL 4B (Pierce)	Sprzężanie przez 6—12 atomowy mostek	Karbodwuimidowa
		Karboksymetylo-celulozo-hydrazd (Merck)	Polecany dla wysokocząsteczkowych ligandów (enzymów i ich naturalnych inhibitorów)	Przez formę azydkową lub przy pomocy dwuwinylosulfonu
Aminokwasy, ketokwasy, kw. karboksylowe	-COOH	AH-sefaroza 4B (Pharmacia) DADPA-sefaroza CL 4B (Pierce)	Sprzężanie przez 6—9 atomowy mostek	Karbodwuimidowa
Węglowodany i inne związki hydroksylowe	-OH	Epoksy-aktywowana sefaroza 6B (Pharmacia)	Aktywowana dla sprzężania przez wyjątkowo trwałe wiązanie	Bezpośrednio w pH 9—13
Związki tiolowe	-SH	Tio-propylo-sefaroza 6B (Pharmacia) Aktywowana tio-propylo-sefaroza 4B (Pharmacia)	Reakcje sprzężania odwracalne	Bromocyjanowa Bezpośrednio w pH ok. 7
		Epoksy-aktywowana sefaroza 6B (Pharmacia)	Dla trwałego wiązania produktu	Bezpośrednio w pH 9—13
Białka i inne ligandy wykazujące aktywność immunoadsorpcyjną	-NH ₂	CNBr aktywowana sefaroza 6 MB (Pharmacia)	Chromatografia powinowactwa komórek (limfocytów, erytrocytów, neuronów)	Bezpośrednio w pH 8—10



Synteza wiązania amidowego (peptydowego) jest zwykle prostą procedurą jednoetapową, a ponieważ tylko jeden związek jest unieruchamiany na nośniku, wszystkie niezwiązane substancje są łatwo wymywa-

ne. Z dużej grupy karbodwuimidów najczęściej stosuje się — z uwagi na rozpuszczalność w wodzie i rozpuszczalność ich ubocznych produktów — 1-etylo-3 (3-dwumetylo-amino-propylo) karbodwuimid. HCl (EDC) i 1-cyklo-heksylo-3/2-morfolino-etylo/karbodwuimidu metylo-p-tolueno-sulfonian (CMC).

Karbodwuimidy warunkują ilościową przemianę dopiero w stężeniu 10—100 razy większym od stężenia łączonych ligandów. Czas reakcji sprzęgania różni się dla odmiennych układów. Typowe procesy zachodzą przez noc w miejscu chłodzonym lub w temperaturze pokojowej.

Tab. 2. Gotowe wypełnienia kolumnowe dla chromatografii powinowactwa

Materiał kolumnowy (Producent)	Sprzężony ligand	Zastosowanie
Con A-Sepharose 4B (Pharmacia)	Konkawalina A — białko aglutynujące erythrocyty — izolowane z kanawalii mączkowskiej	Rozdział biopolimerów i białek ścian komórkowych zawierających węglowodany (16, 39, 42, 51)
Protein A-Sepharose CL 4B (Pharmacia)	Białko ścian komórkowych <i>Staphylococcus aureus</i>	Izolacja IgG i cząsteczek zawierających fragment F _c immunoglobulin G (21, 38, 40)
5'AMP-Sepharose 4B (Pharmacia)	N ⁶ -(6-aminoheksylo)5' AMP	Wydzielanie enzymów wiążących kofaktory NAD ⁺ lub ATP (35, 36, 47)
2'5'ADP-Sepharose 4B (Pharmacia)	N ⁶ -(6-aminoheksylo)2' 5'ADP	Wydzielanie enzymów zawierających kofaktory NADP ⁺ (6, 35, 37)
Blue Sepharose CL 6B (Pharmacia) Cibacron Blue F3GA Sepharose CL 6B (Pierce)	Błękit „Cibacron F3GA”	Izolacja surowiczej albuminy przy preparacji immunoglobulin, czynników krzepnięcia krwi, innych białek i enzymów przy pomocy swoistych metod elucji (3, 26, 31, 50, 52, 53)
Poly(U)-Sepharose 4B (Pharmacia)	Kwas polirybouzydylowy (ok. 100 nukleotydów)	Izolacja kwasów nukleinowych zawierających sekwencję oligo (A), mRNA oraz białek wiążących kwasy nukleinowe (23, 32, 43)
Poly(A)-Sepharose 4B (Pharmacia)	Kwas poliryboadenylowy (ok. 100 nukleotydów)	Izolacja kw. nukleinowych oligourydylowych, wirusowych RNA, nukleoproteidów, białek swoistych dla RNA np. polimeraz RNA (9, 19)
Lysine-Sepharose 4B (Pharmacia)	L-lizyna	Izolacja plazminogenu i mRNA (48, 54)
Lentil-Lectin-Sepharose 4B (Pharmacia)	Lektyna soczewicy (<i>Lens esculenta</i>)	Rozdział rozpuszczalnych i związanych z błonami glikoproteidów (12, 34)
Iminodiacetid Acid-Sepharose CL 4B (Pierce)	Kwas iminodwuoctowy	Sprzęgnięty z jonami Zn ²⁺ — do izolacji transferyny, alfa-antytrypsyny, kwaśnych glikoproteidów, gamma globulin, ceruloplazminy, alfa-2-makroglobuliny, interferonu (15, 42) Sprzęgnięty z jonami Cu ²⁺ — do izolacji gamma-globulin, prealbumin, transferyny, haptoglobulin, beta-lipoproteidów, tyrozyny, epsilon-DNP lizyny (22, 23, 42)
TPCK-Trypsin-Sepharose CL 4B (Pierce)	Trypsyna z inhibitorem aktywności chymotrypsynowej	Izolacja inhibitorów trypsyny (28, 30, 45)
SBTI-Sepharose 4B (Pierce)	Sojowy inhibitor trypsyny	Izolacja i oczyszczanie trypsyny, izolacja proteaz z soku trzustkowego (3)
6-Aminocapryl-D-Arginine-Sepharose 4B (Pierce)	6-amino-kaproylo-D-arginina	Izolacja karboksypeptydaz A i B od innych proteaz, rozdział obu karboksypeptydaz (2, 46)
CBZ-D-Phenylalanine-TETA-Sepharose 4B (Pierce)	Karbobenzoksy-D-fenylalanino-trójetyle-no-czterooamina	Izolacja pepsyny, obojętnych metalo-endo-peptydaz, subtylizyny i alfa-chymotrypsyny (16, 17, 18)
Wheat Lectin-Sepharose 6MB (Pharmacia)	Lektyna kielbków pszenicznych	Rozdział komórek, elementów subkomórkowych i cząsteczek zawierających węglowodany (10, 21, 27)
<i>Helix pomatia</i> Lectin-Sepharose 6MB (Pharmacia)	Lektyna ślimaka (<i>Helix pomatia</i>)	Chromatografia powinowactwa komórek, frakcji subkomórkowych i makrocząsteczek zawierających węglowodany (13, 25)

2. Metodyka procesu chromatografii powinowactwa

Metodyka rozdzielania w chromatografii powinowactwa jest podobna do tej, jakiej wymaga się w innych rodzajach chromatografii cieczowej. Podstawową czynnością dla poprawnego przeprowadzenia procesu bywa dobranie kolumny z odpowiednią pojemnością złoza, zapewniającej ilościowe związanie izolowanej substancji. W należycie dobranych warunkach wyodrębniany składnik absorbuje się w górnej 1–2 cm warstwie wypełnienia. W większości przypadków wymagane są kolumny o długości 15–30 cm. Przy pakowaniu kolumn obowiązują te same zasady jak w chromatografii jonowymiennych.

Skład buforu wyjściowego, w którym rozpuszcza się poddawaną rozdzielaniu mieszaninę, powinien być tak dobrany, aby izolowany składnik był silnie absorbowany, tzn. wychwytywany w pierwszych warstwach wypełnienia kolumny. Rodzaj buforu zależy ściśle od stosowanego układu i powinien określać warunki pH, zawartość jonów metalicznych oraz innych czynników wpływających na swoistość wiązania. Ogólną wskazówką przy sporządzaniu buforów są fizjologiczne warunki wzajemnego wiązania się składników układów.

Istotny wpływ na rozdział chromatograficzny wywiera siła jonowa stosowanych buforów, która może wpływać na nieswoistość desorpcję polielektrolitów, powodując związanie ze sprzężonym ligandem jednej tylko interesującej nas substancji (lub grupy związków).

Objętość wprowadzonej do kolumny próby nie ma wpływu na wyniki rozdzielania, jeżeli substancja jest tak silnie wiązana, że zostanie wychwycona w 1–2 cm warstwie złoza kolumny. Słabo wiążące składniki powinny być wprowadzane w małej objętości — wynoszącej ok. 50% objętości wypełnienia kolumny — aby zapobiec wypłukiwaniu niezadsorbowanego materiału.

Metody elucji uprzednio związanej substancji z kolumny mogą być albo nieswoiste lub natury swoistej. W większości przypadków wzrost siły jonowej lub zmiana pH jest wystarczająca dla wywołania dysocjacji (desorpcji) kompleksu i wymycia substancji z kolumny. Uwolnienie związanej białka enzymatycznego może być wywołane w sposób bardziej swoisty przez dodanie do buforu elucyjnego substratów, koenzymów lub odwracalnych inhibitorów (elucja powinowactwa). Obie metody są szeroko stosowane. Ostatnia z nich ma jednakże pewne ograniczenia spowodowane tym, że swoiste dodatki muszą być z kolei usunięte dla umożliwienia dalszych badań wyeluowanego białka.

Warunki przechowywania związanych z nośnikiem ligandów zależą od właściwości samego ligandu. Ogólnie biorąc, muszą one być przetrzymywane w obecności czynników bakteriostatycznych, bez zamrażania, w temp. poniżej 281 kelwinów (8°C). Należy przy tym unikać ekstremalnych wartości pH.

3. Chromatografia powinowactwa komórek

Przy frakcjonowaniu i oczyszczaniu różnych komórek, chromatografia powinowactwa wykorzystuje swoistość grup wiążących, zlokalizowanych na powierzchni ich błon. Z grupami tymi — podobnie jak w przypadku izolacji cząsteczek chemicznych — reaguje bioswoistość odpowiedni ligand (zwykle białkowy immunoadsorbent) — sprzężony z nierozpuszczalnym nośnikiem. Reakcja kompleksu ligand-nośnik z odpowiednim rodzajem komórek powoduje zatrzymanie ich w kolumnie chromatograficznej. Wszystkie inne komórki, do których ligand nie wykazuje powinowactwa, są wymywane. Uwolnienie wcześniej zatrzymanych komórek następuje po zmianie warunków elucji lub enzymatycznym strawieniu ligandu.

W chromatografii powinowactwa komórek stosuje się najczęściej gruboziarnistą sefarozę 6MB — sprzęż-

niętą z ligandem lektynowym (lektyny — białka, zwykle roślinne, wiążące węglowodany) (14, 20, 49). Z dużym powodzeniem technikę tę wykorzystuje się do izolacji i rozdzielania limfocytów B i T (25).

Piśmiennictwo

- Affinity Chromatography. Principles and methods. Farmacia Fine Chemicals. Uppsala, 1976.
- Ager S. P., Hass G. M.: *Anal. Biochem.* 83, 285, 1977.
- Amneus H., Gabel D., Kasche V.: *J. Chromatogr.* 120, 391, 1976.
- Aspberg K., Porath J.: *Acta Chem. Scand.* 24, 1839, 1970.
- Axen R., Porath J., Ernback S.: *Nature* 214, 1302, 1967.
- Barry S., Brodelius P., Mosbach K.: *FEBS Lett.* 70, 261, 1976.
- Brennich H., Johansson S. G. O.: *Advan. Immunol.* 13, 1, 1971.
- Blanchard J. M., Brissac C., Jeanteur Ph.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1882, 1974.
- Burdon R. H., Shenkin A., Douglas J. T. i wsp.: *Biochim. Biophys. Acta* 474, 254, 1977.
- Clemetson K. J., Bertschmann M., Widmer S. i wsp.: *Immunochimistry* 13, 383, 1976.
- Cuatrecasas P., Wilcheck M., Anfinsen C. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 636, 1968.
- Dawson J. R.: *Immunochemistry* 13, 671, 1976.
- Dillner M. L., Hammarström S., Perlmann P.: *Exp. Cell. Res.* 96, 374, 1975.
- Dvorak D. J., Gipps E., Kidson C.: *Nature* 271, 564, 1978.
- Edy V. G., Billiau A., DeSomer P.: *J. Biol. Chem.* 252, 5934, 1977.
- Fujiwara K., Osue K., Tsuru D.: *J. Biochem.* 77, 739, 1975.
- Fujiwara K., Tsuru D.: *Int. J. Protein Res.* 9, 18, 1977.
- Fujiwara K., Tsuru D.: *Int. J. Protein Res.* 9, 166, 1977.
- Fukami H., Itano H. A.: *Biochemistry* 15, 3529, 1976.
- Ghetie U., Mota G., Sjöquist J.: *J. Immunol. Methods* 21, 133, 1978.
- Goudswaard J., Van der Donk J. A. i wsp.: *Scand. J. Immunol.* 8, 21, 1978.
- Goździcka-Józefiak A., Augustyniak J.: *J. Chromatogr.* 131, 91, 1977.
- Grandgenett D. P.: *J. Virol.* 20, 348, 1976.
- Hellström U., Dillner M.-L., Hammarström S. i wsp.: *J. Exp. Med.* 144, 1381, 1976.
- Hellström U., Hammarström S., Dillner M.-L. i wsp.: *Scand. J. Immunol.* 5, Suppl. 5, 45, 1976.
- Heyns W., DeMoor P.: *Biochim. Biophys. Acta* 358, 1, 1974.
- Kahane I., Furthmayer H., Marchesi V. T.: *Biochim. Biophys. Acta* 426, 464, 1976.
- Keilová H., Tomásek V.: *Collect. Czech. Commun.* 41, 489, 1976.
- Khorana H. G.: *Chem. Ind.* 55, 1087, 1955.
- Kowalski D., Laskowski M.: *Biochemistry* 15, 1300, 1976.
- Lamkin G. E., King E. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 560, 1976.
- Lindberg U., Persson T.: *Eur. J. Biochem.* 31, 246, 1972.
- Lonnerdal B., Carlsson J., Porath J.: *FEBS Lett.* 75, 89, 1977.
- Lorusso D. J., Binette J. P., Green F. A.: *Immunochimistry* 14, 503, 1977.
- Lowe C. R., Gore M. G.: *FEBS Lett.* 77, 247, 1977.
- Lowe C. R., Harvey M. L., Dean P. D.: *Eur. J. Biochem.* 41, 347, 1974.
- Mannervik B., Jacobsson K., Boggaram V.: *FEBS Lett.* 66, 221, 1976.
- Nilsson K., Ghetie V., Sjöquist J.: *Eur. J. Immunol.* 5, 518, 1975.
- Ogata S., Muramatsu T., Kobata A.: *J. Biochem.* 78, 687, 1975.
- Peterson P. A., Rask L., Sege K. i wsp.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1612, 1975.
- Plesner T.: *Scand. J. Immunol.* 5, 1097, 1976.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I.: *Nature* 258, 598, 1975.
- Ron A., Horovitz O., Sarov I.: *J. Mol. Evol.* 8, 137, 1976.
- Sheehan J. C., Hess G. P.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1067, 1955.
- Sinha N. K., Light A.: *J. Biol. Chem.* 250, 8624, 1975.
- Sokolovsky M.: *Methods in Enzymology* 34, 411, 1974.
- Sørensen N. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 883, 1975.
- Summaria L., Spitz F. i wsp.: *J. Biol. Chem.* 251, 3693, 1976.
- Tanner M. J. A., Anstee D. J.: *Biochem. J.* 153, 265, 1976.
- Travis J., Bowen J. i wsp.: *Biochem. J.* 157, 301, 1976.
- Van Etten R. L., Saini M. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 404, 487, 1977.
- Wille L. E.: *Clin. Chim. Acta* 71, 355, 1976.
- Wilson J. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 816, 1976.
- Wiman B., Wallen F.: *Thromb. Res.* 1, 213, 1977.

Adres autora: doc. dr habil. Janusz Wierciński, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.