

BBA 75542

## PROTÉINES CONSTITUTIVES DES MEMBRANES MICROSOMIQUES DE LA CELLULE HÉPATIQUE DU RAT

A. PASCAUD, P. B. AULIAC, J.-C. EHRHART ET M. PASCAUD

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, B.P. No. 8, 94-Villejuif, et Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Faculté des Sciences, 1, rue Victor-Cousin, Paris (France)*

(Reçu le 13 juillet, 1970)

## SUMMARY

*Constitutive proteins of the rat liver microsomal membranes*

Treatment of rat liver microsomes by 0.26 % deoxycholate-0.14 mM EDTA followed by centrifugation on a saccharose gradient, leads to the isolation of a "minimal" membrane fraction (density 1.08-1.10), the proteins of which amount to 20 % of the total microsomal proteins. The protein framework of this membrane is associated with about twice its weight lipids.

Disc electrophoretic analysis according to the method of TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> shows essentially 6 protein bands, distributed in 3 groups, and representing, respectively, 44 %, 8 % and 40 % of the total protein content. The molecular weights of these proteins, determined according to their friction coefficient on 5 % and 10 % acrylamide gels, are around 59000 for the three group I proteins, 46000 for the intermediate group II protein, and 25000 for the two group III proteins.

In comparison with the 0.26 % deoxycholate soluble fraction, the protein composition of the 0.5 % deoxycholate soluble fraction is more complex. The functions of the membrane proteins are discussed.

## INTRODUCTION

La constitution des membranes cellulaires met en jeu essentiellement des associations entre molécules protéiques et lipidiques, sans sous-estimer l'importance des composants glucidiques de surface. Certaines protéines, de par leurs propriétés particulières d'association, possèdent une fonction structurale définie par opposition à une fonction catalytique, bien que ces deux fonctions ne soient pas obligatoirement exclusives l'une de l'autre<sup>1</sup>.

L'analyse des protéines microsomiques a fait récemment l'objet de comparaisons entre les protéines de diverses structures et membranes cellulaires<sup>2-5</sup>. Dans le but d'étudier la fraction protéique intimement associée à la structure de la membrane il est nécessaire d'obtenir une fraction membranaire "minimale" hautement purifiée des contaminants ribosomiques et intravésiculaires. Les protéines membranaires faiblement liées ayant les mêmes caractères de solubilité que les protéines intravésiculaires dans le déoxycholate 0.26 %, nous avons mis à profit l'action solubilisatrice du déoxy-

cholate qui à cette concentration conserve à la membrane microsomique son aspect morphologique en microscopie électronique<sup>5</sup>.

Une adaptation de la méthode d'ERNSTER *et al.*<sup>6</sup> et l'isolement des membranes par centrifugation en gradient de densité nous ont permis d'obtenir une fraction membranaire dépouillée dont les protéines représentent environ 20 % des protéines microsomiques totales. L'analyse électrophorétique de ces protéines a montré un nombre réduit de constituants protéiques, dont on a déterminé les poids moléculaires.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Obtention des membranes*

Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar pesant entre 150 et 200 g à jeûn de 12 h. Avant prélèvement les foies sont perfusés au NaCl 9‰ à 10° afin d'éliminer autant qu'il se peut les protéines sériques et l'hémoglobine contaminantes.

Les microsomes sont préparés selon la méthode de MOULÉ *et al.*<sup>7</sup> par centrifugation différentielle à partir d'un homogénat de foie à 10 % dans du saccharose 0.88 M. Le culot d'une première sédimentation des noyaux – mitochondries est lavé par le saccharose 0.88 M. Les deux surnageants sont groupés et centrifugés 2 h à 220 000 × *g*. Les microsomes lisses et rugueux ainsi que les ribosomes libres sont séparés sur gradient de densité de saccharose par la méthode de DECLOITRE ET CHAUVEAU<sup>8</sup>.

Les culots de sédimentation des microsomes sont traités par une solution de déoxycholate selon la méthode d'ERNSTER *et al.*<sup>6</sup> avec les modifications suivantes: afin d'éviter la solubilisation des membranes, le culot de microsomes (1.5 à 2 mg de protéines/ml de solution déoxycholate) est directement repris dans une solution déoxycholate 0.26 % dans du saccharose 0.25 M–Tris 1 mM, ajustée à pH 7.8, additionnée ou non d'EDTA 0.14 mM; l'homogénéisation est effectuée dans un appareil de type Potter, l'action du déoxycholate est prolongée pendant 1 h, puis on centrifuge 3 h à 220 000 × *g*. Dans ces conditions, les membranes forment avec les ribosomes un culot compact et on n'observe pas la présence de "fluffy layer".

Les structures membranaires libérées sont isolées sur gradient de saccharose 25–40 %: on applique au sommet du tube 1 ml de l'homogénat du culot déoxycholate 0.26 % en suspension dans du saccharose 0.25 M (environ 5 mg de protéines/ml de solution) et l'on centrifuge 20 h à 90 000 × *g* (rotor Spinco SW 25<sub>1</sub>). Pour des quantités faibles de matériel les mêmes conditions de gradient sont reproduites avec le rotor SW 39. La collecte de la fraction membranaire, entre les bornes de densité 1.08 et 1.10, est contrôlée par absorption à 254 nm, et ultérieurement les culots de sédimentation des membranes sont examinés en microscopie électronique.

### *Solubilisation des membranes. Electrophorèse des protéines sur colonne de gel d'acrylamide*

Les membranes sont directement solubilisées dans le mélange phénol-acide acétique-eau (2:1:1, v/v/v) préconisé par WORK<sup>9</sup> et TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> à raison de 400 µg de protéines/100 µl du mélange; on ajuste à la concentration d'urée 8 M et de mercapto-éthanol 0.1 % avant d'appliquer sur gel d'acrylamide. La révélation lipidique à l'Oil red O montre une coloration au sommet du tube, mais n'indique pas la présence de lipides au sein du gel.

La résolution protéique ne diffère pas de celle que l'on obtient par électrophorèse de protéines membranaires préalablement séparées des lipides. Dans ce cas les mem-

branes sont solubilisées dans une solution de déoxycholate 0.5 %, la fraction protéique est purifiée à la fois du déoxycholate et des lipides par dialyse contre de l'eau à 4° et précipitation acétonique (acétone 90 % à 4°) et le culot protéique est lavé à l'eau distillée glacée. Les protéines solubilisées par le déoxycholate 0.26 % sont purifiées de la même façon.

Les colonnes d'acrylamide sont préparées selon TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup>. On utilise des gels de concentrations différentes pour lesquels les rapports acrylamide/méthylènebis-acrylamide sont définis en faisant varier seulement la quantité d'acrylamide pour une même quantité de l'agent de réticulation (0.28 g/100 ml de la solution stock). Les tubes demeurent une nuit à 4°, le gel étant recouvert d'eau distillée, puis la polymérisation s'effectue à la température de la pièce. Après polymérisation l'eau est remplacée par de l'acide acétique 75 %. Les cuves (Canalco) contiennent de l'acide acétique à 10 % et le bain supérieur renferme de plus du mercapto-éthanol 0.1 %.

On procède à une prémigration de 8 min à 1 mA, puis à une migration à 4.5 mA par tube pendant 80 min pour les gels à 5 %, temps au-delà duquel la diffusion devient trop importante pour les protéines de bas poids moléculaire. Les gels à 10 % par contre supportent un temps de migration beaucoup plus long, 180 min. Dans tous les cas la température des bains ne dépasse pas 20° en fin de migration. La révélation protéique s'effectue par transfert des tubes dans un bain d'Aniline Blue Back pendant 1 h, suivi d'une décoloration du gel par l'acide acétique 7.5 %.

L'ensemble des techniques expérimentales est schématisé dans la Fig. 1.

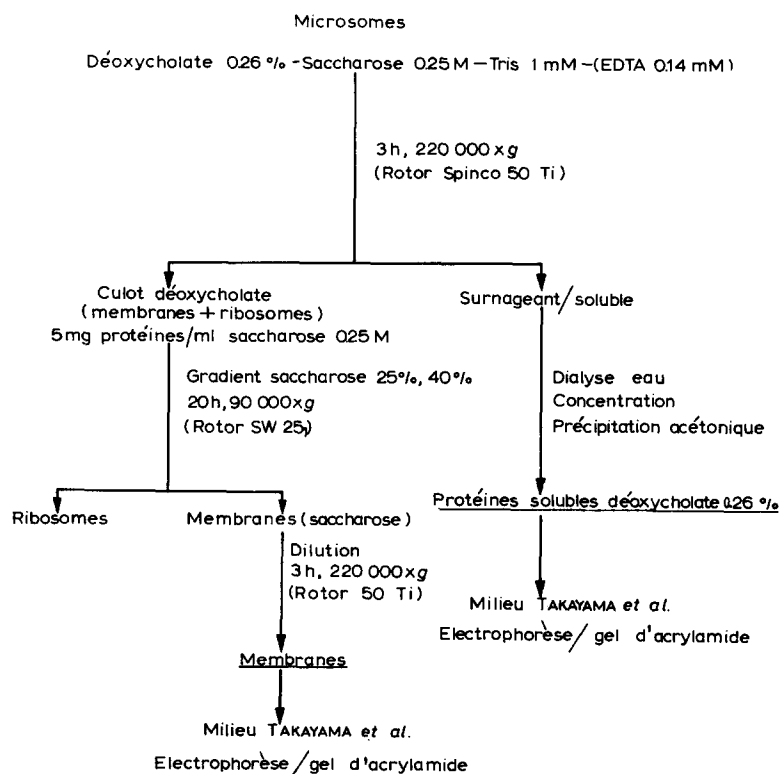


Fig. 1. Schéma de l'obtention et de l'analyse des protéines des diverses fractions microsomiques.

### *Détermination des poids moléculaires*

La détermination des poids moléculaires est effectuée à l'aide des marqueurs protéiques Mann Research Laboratories.

Dans les conditions d'électrophorèse de TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> il n'y a pas de relation de linéarité entre les poids moléculaires des protéines et les distances de migration sur un seul gel de concentration donné. La détermination du poids moléculaire est possible par comparaison des migrations sur deux gels de concentrations différentes. Nous avons adapté à cet effet la méthode de THORUN ET MEHL<sup>11</sup> établie pour l'électrophorèse sur plaque en gradient de concentration.

Afin d'éviter les interactions, les protéines microsomiques et les diverses protéines standards sont appliquées sur des tubes distincts. Les migrations sont effectuées simultanément dans la même cuve sur gels à 10 % et 5 % d'acrylamide pendant 80 min, le temps de migration propre à éviter la diffusion sur gel à 5 % étant un facteur limitant. D'après les protéines marqueurs utilisées, la relation entre poids moléculaire et coefficient de friction (rapport des distances de migration sur gels à 5 % et à 10 %,  $m_5/m_{10}$ ) est une relation linéaire dans la gamme étudiée de 15 000 à 90 000. La dispersion des migrations d'un tube à l'autre provient de ce que la polymérisation du gel n'est pas parfaitement reproductible. Néanmoins, la prise en considération des moyennes des données portant sur 5 à 10 analyses permet d'apprécier les poids moléculaires des protéines membranaires avec une précision de 5 à 10 % selon les protéines.

Les distances de migration sont mesurées sur le densitogramme (Kipp et Zonen). Nous avons estimé le pourcentage des protéines par triangulation des pics.

### *Dosage des phospholipides, de l'azote protéique et du RNA*

Le culot de précipitation trichloracétique, selon SCHMIDT ET THANNHAUSER<sup>12</sup>, des différentes fractions microsomiques, est lavé à l'eau distillée à 2°. On procède ensuite à l'extraction des lipides par une première extraction au méthanol à 2° suivie de deux extractions à 20° par le chloroforme-méthanol successivement (1:1, v/v et 2:1, v/v). Les lipides sont purifiés selon LEA ET RHODES<sup>13</sup> sur colonne de cellulose ou par la technique de FOLCH *et al.*<sup>14</sup>. Le phosphore phospholipidique est dosé par la technique de MACHEBOEUF ET DELSAL<sup>15</sup>. Le cholestérol est dosé par la méthode de WEBSTER<sup>16</sup> modifiée par BADZIO<sup>17</sup> après séparation des lipides neutres et des phospholipides sur colonne d'acide silicique selon BORGSTROM<sup>18</sup>.

Le RNA est extrait par hydrolyse dans l'acide trichloracétique 5 %, 15 min à 90°, et son dosage est effectué par analyse spectrophotométrique à 260 et 286 nm<sup>19</sup>.

Le culot de sédimentation protéique après extraction des lipides et du RNA est solubilisé dans l'acide formique. Des fractions aliquotes sont minéralisées et l'azote est dosé par la méthode de STRAUCH<sup>20</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### *Caractères des membranes*

Les membranes obtenues après action, soit du déoxycholate 0.26 %, soit du déoxycholate-EDTA 0.14 mM, par purification sur gradient de saccharose (Fig. 2), sont prélevées dans la zone de densité 1.08-1.10 où elles forment une bande opalescente. Les clichés de microscopie électronique de la Fig. 3 représentent les membranes prépa-

rées à partir des microsomes totaux et des microsomes rugueux prélevés dans la même zone du gradient.

Le Tableau I rassemble les caractères constitutifs des membranes des microsomes totaux obtenues dans diverses conditions. Le déoxycholate seul conduit à des mem-

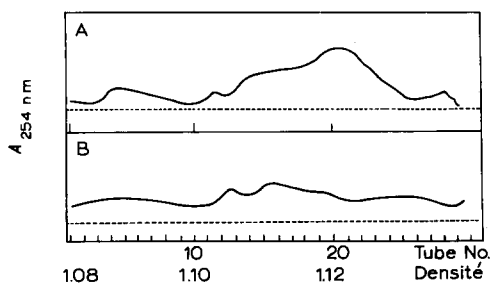


Fig. 2. Isolement de la fraction microsomique membranaire par centrifugation en gradient de densité de saccharose 25–40 % du culot de sédimentation déoxycholate à 0.26 %. A. Action du déoxycholate seul. B. Action combinée du déoxycholate 0.26 % et d'EDTA 0.14 mM sur des microsomes préparés en présence de bentonite.

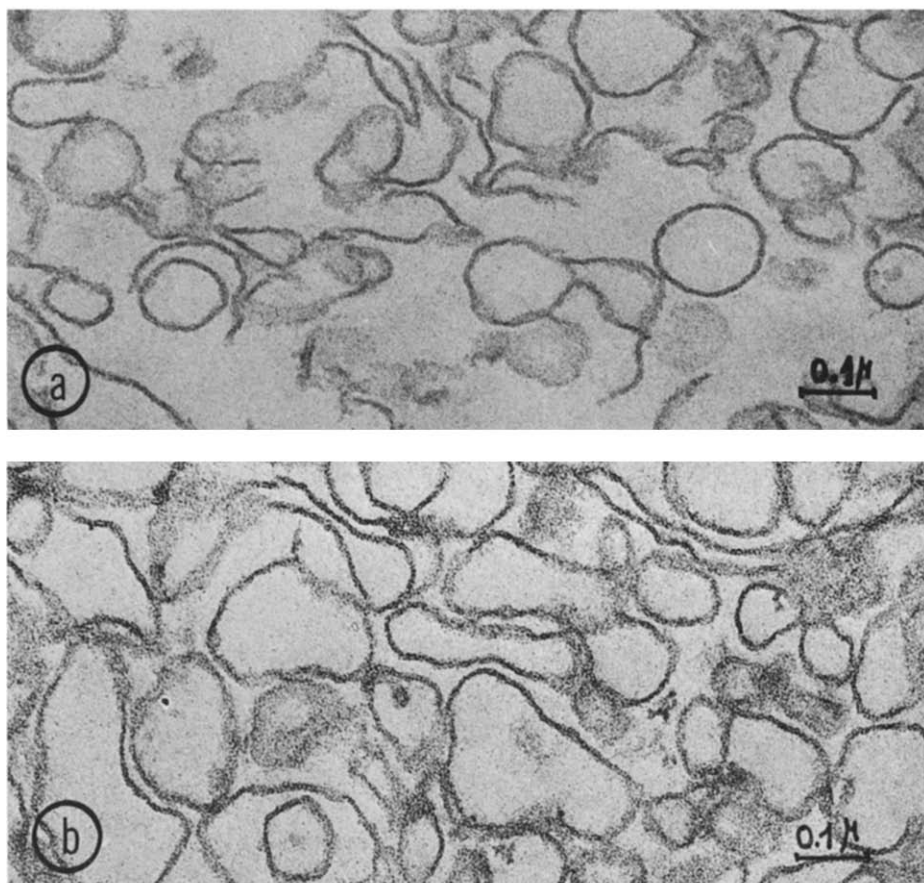


Fig. 3. Micrographie électronique des membranes microsomiques du foie de rat obtenues par traitement. a. Des microsomes totaux. b. Des microsomes rugueux.

TABLEAU I

COMPOSITION DES MEMBRANES PURIFIÉES, ISOLÉES DES MICROSOMES TOTAUX ET DE LA FRACTION MICROSOMIQUE SOLUBLE DANS LE DÉOXYCHOLATE 0.26 %

| Fraction                              | N protéique<br>non ribo-<br>somique* | RNA<br>( $\mu$ g/g de<br>foie frais) | P phospho-<br>lipides | Cholestérol | Phospho-<br>lipides    | Phospho-<br>lipides    |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------|------------------------|
|                                       |                                      |                                      |                       |             | Protéines<br>pondéral§ | Cholestérol<br>molaire |
| Microsomes                            | 2892                                 | 4210                                 | 510                   | 1302        | 0.70                   | 4.91                   |
| Surnageant déoxycholate**             | 1938                                 | 125                                  | 189                   | 437         | 0.39                   | 5.40                   |
| Culot déoxycholate                    | 708                                  | 3580                                 | 298                   | 713         | 1.68                   | 5.20                   |
| Membranes purifiées                   |                                      |                                      |                       |             |                        |                        |
| déoxycholate                          | 310                                  | 116                                  | 172                   | 387         | 2.08                   | 5.53                   |
| déoxycholate + EDTA                   | 483                                  | 370                                  | 215                   | 489         | 1.78                   | 5.44                   |
| déoxycholate + EDTA<br>+ bentonite*** | 504                                  | 256                                  | 210                   | 487         | 1.64                   | 5.38                   |

\* La fraction protéique ribosomique est calculée d'après le rapport expérimental N RNA/ N total = 0.45.

\*\* La composition du surnageant déoxycholate n'est pas modifiée par addition d'EDTA 0.14 mM. La quantité de RNA solubilisé négligeable si les microsomes ne sont pas lavés au KCl représente dans le cas contraire 30 à 40 % du RNA ribosomique.

\*\*\* La bentonite (0.25 mg/ml) est ajoutée à la phase post-mitochondriale lors de la préparation des microsomes.

§ Phospholipides = P phospholipides  $\times$  25. Protéines = N protéique  $\times$  6.25.

branes très pures, mais avec un faible rendement. Le rendement est accru par emploi de l'EDTA ; il importe dans ce cas que la préparation soit réalisée en présence de bentonite qui améliore les conditions de sédimentation des ribosomes.

La densité faible des membranes correspond à un appauvrissement important en protéines par rapport aux lipides. Le rapport pondéral phospholipides/protéines passe de 0.7 environ pour les microsomes totaux à environ 2 pour la fraction membranaire si celle-ci est isolée des vésicules par action du seul déoxycholate 0.26 %. L'action combinée déoxycholate-EDTA-bentonite conduit à une valeur moyenne du rapport phospholipides/protéines sensiblement plus faible, 1.6. Dans ces conditions la fraction membranaire contient 70 % des protéines (non ribosomiques) du gradient, 70 % des phospholipides, et 8 % du RNA.

Les membranes isolées à partir des microsomes totaux proviennent essentiellement des vésicules rugueuses denses et légères (CHAUVEAU ET DECLOITRE). La fraction complexe des vésicules lisses ne contient pas plus de 20 % des phospholipides totaux. En raison de la formation d'agréats au cours de leur isolement, le rendement en membranes à partir de cette fraction lisse est très faible et leur étude n'a pas été entreprise.

Il importe au cours de la préparation des membranes d'exclure rigoureusement les ions  $K^+$ , notamment le lavage des microsomes par KCl 0.17 M qui conduit à une désagréation importante des ribosomes lors du traitement déoxycholate-EDTA par déséquilibre entre les ions  $K^+$  et  $Mg^{2+}$ . L'action conjointe du déoxycholate 0.26 % et du KCl 0.05 M aboutit à la solubilisation des membranes, sinon de toutes les protéines, 90 % des phospholipides étant solubilisés contre 35 % par le déoxycholate seul.

#### Protéines membranaires

La fraction protéique membranaire représente 70 % des protéines non-ribosomiques totales récupérées sur le gradient. Etant donné que le déoxycholate 0.26 % solu-

bilise dans nos conditions expérimentales environ 70 % des protéines des microsomes, on peut évaluer les protéines membranaires à 21 % des protéines microsomiques. Les données du Tableau I montrent que les rendements successifs de récupération du matériel ne permettent pas d'isoler une fraction supérieure à 17 % des protéines des microsomes totaux.

L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide selon TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES) révèle un nombre restreint de bandes majeures dont essentiellement deux groupes de mobilités très distinctes et une bande intermédiaire (Fig. 4). La migration sur gel à 10 % pendant 180 min montre que le groupe I comporte 3 bandes voisines, le groupe III, 2 bandes. Sur gel à 5 % la totalité du maté-

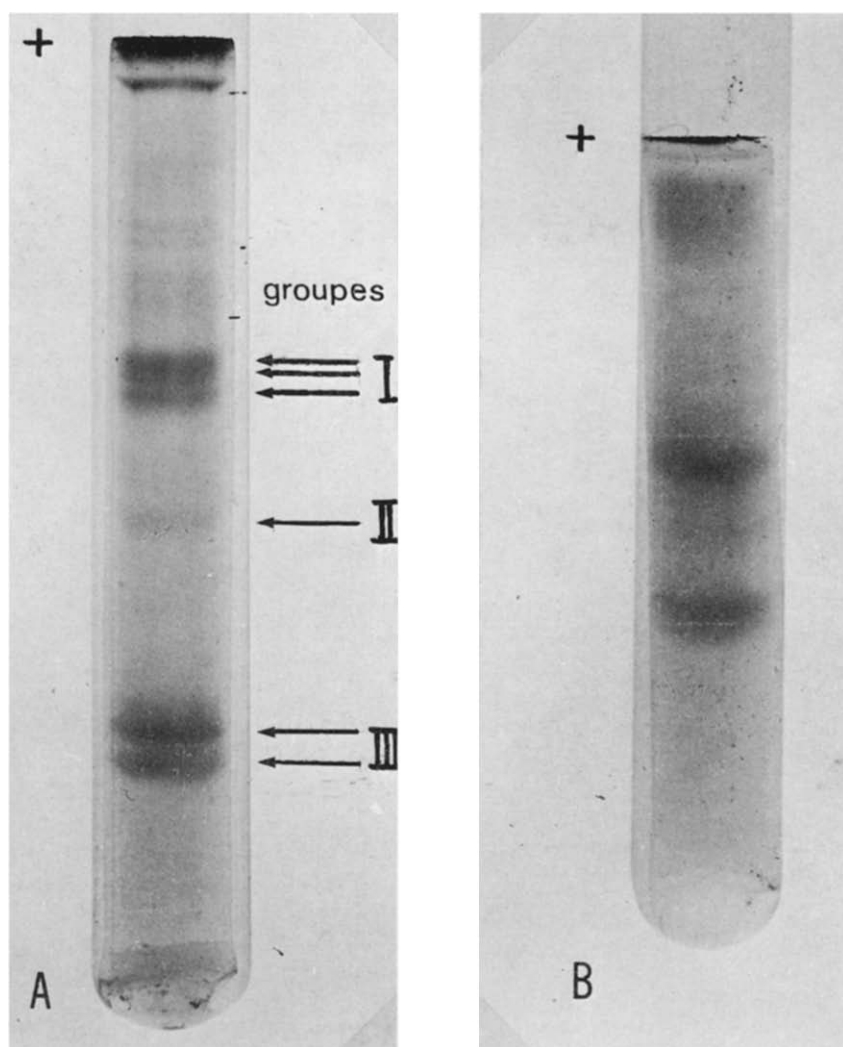


Fig. 4. Électrophorèse sur gel d'acrylamide selon TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> des protéines de la fraction microsomique membranaire purifiée (déoxycholate 0.26 %, EDTA 0.14 mM, bentonite). A. Gel à 10 %, 180 min. B. Gel à 5 %, 80 min.

riel pénètre dans la colonne et l'on n'observe pas de nouvelles bandes quantitativement importantes. La reproductibilité des électrophorégrammes portant sur 30 préparations de membranes est très satisfaisante malgré une certaine variabilité affectant les composants mineurs.

Le fait d'utiliser l'EDTA en présence de bentonite n'entraîne aucun changement dans la composition protéique des membranes. Par ailleurs le spectre électrophorétique est le même pour des quantités variables de microsomes traités (2–1–0.5 mg protéines/ml de déoxycholate 0.26 %) et les trois groupes de protéines sont toujours associés dans les fractions membranaires purifiées obtenues à partir de vésicules rugueuses denses ou légères.

La détermination des poids moléculaires par les coefficients de friction (Fig. 5) (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES) donne pour les trois protéines membranaires du groupe I des poids moléculaires d'environ 59 000 (55 000 à 63 000), pour la protéine intermédiaire II environ 46 000, et pour les deux protéines du groupe III environ 25 000

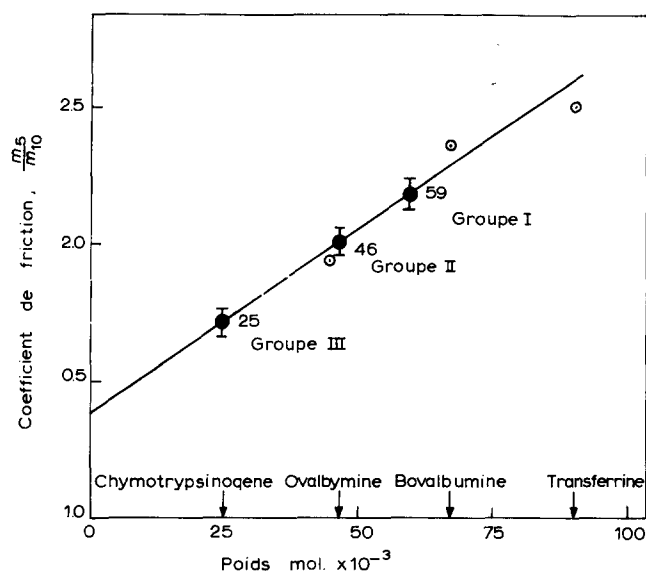


Fig. 5. Détermination du poids moléculaire des protéines constitutives des membranes microsomiques purifiées correspondant aux 3 groupes protéiques de la Fig. 3. ●, protéines constitutives; ○, protéines standards (voir MATÉRIEL ET MÉTHODES).

(23 000 à 28 000). Ces trois groupes représentent respectivement des fractions de 44 %, 8 % et 40 % des protéines totales membranaires.

Si l'on compare l'analyse des protéines membranaires à celle de la fraction microsomique insoluble dans le déoxycholate 0.26 % dissoute par le déoxycholate 0.5 %, on observe dans le surnageant (Fig. 6A) diverses protéines absentes dans les membranes isolées: une protéine de poids moléculaire 15 000 environ, de migration plus rapide que le groupe III, une ou deux bandes additionnelles dans la région II, et, de migration plus lente que le groupe I, des protéines présentes seulement à l'état de traces dans les membranes purifiées. Il ressort de ces analyses l'intérêt de l'isolement de la fraction membranaire minimale en gradient de saccharose.



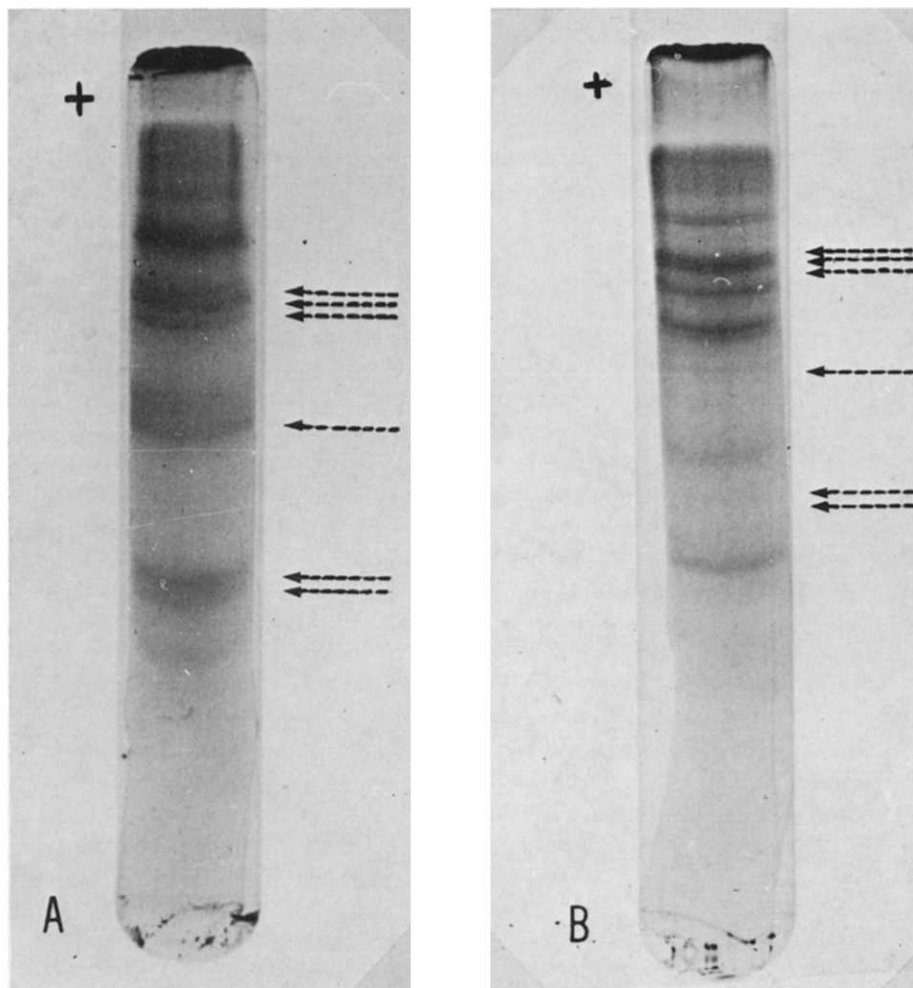


Fig. 6. Electrophorèse sur gel d'acrylamide 10 % selon TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup>. A. Protéines solubilisées par le déoxycholate 0.5 % après séparation du surnageant déoxycholate 0.26 %, migration 140 min. B. Protéines solubilisées par le déoxycholate 0.26 %, migration 120 min (les protéines de ces 2 analyses sont préparées en absence de bentonite). A fin de comparaison les positions des bandes protéiques de la fraction membranaire minimale sont représentées par des flèches pointillées.

Quant aux protéines de la fraction solubilisée par le déoxycholate 0.26 % (Fig. 6B), elles diffèrent des protéines membranaires par une proportion plus élevée dans la région des poids moléculaires de 50000 à 90000 et par des protéines de migration plus rapide, situées de part et d'autre des deux protéines membranaires de poids moléculaire 25000. Il est intéressant de remarquer que dans nos conditions expérimentales les protéines membranaires de poids moléculaire 25000, qui constituent 40 % des protéines de la membrane minimale, ne s'observent pas dans le surnageant, sinon en constituants mineurs. Si les caractères de solubilité suggèrent la spécificité membranaire du groupe I, les conditions d'électrophorèse par contre ne permettent pas de conclure

pour les protéines de ce groupe étant donné leur superposition aux bandes du surnageant déoxycholate 0.26 %.

La recherche des activités enzymatiques éventuellement associées à ces membranes, ainsi que l'étude de la réassociation avec des protéines enzymes microsomiques, permettront de faire la part des fonctions structurales et des fonctions enzymatiques exercées par les protéines constitutives des membranes minimales des microsomes.

## RÉSUMÉ

L'action du déoxycholate 0.26 %–EDTA 0.14 mM sur des microsomes de foie de rat, suivie d'un fractionnement par centrifugation en gradient de saccharose, permet d'isoler dans la zone de densité 1.08 à 1.10 une fraction membranaire "minimale" représentant 20 % des protéines des microsomes totaux. La trame protéique de ces membranes est associée à près de 2 fois son poids de lipides.

L'analyse électrophorétique selon TAKAYAMA *et al.*<sup>10</sup> révèle essentiellement 6 bandes protéiques réparties en 3 groupes, respectivement 44 %, 8 % et 40 % de l'ensemble. La détermination de leurs poids moléculaires est effectué par mesure du coefficient de friction sur 2 gels à 5 % et 10 % d'acrylamide. Les 3 protéines membranaires du groupe I ont un poids moléculaire d'environ 59000, la protéine intermédiaire de 46000 et les 2 protéines du groupe III de 25000.

L'intérêt de l'isolement de cette fraction membranaire minimale est confirmé par l'analyse comparative de la fraction protéique insoluble dans le déoxycholate 0.26 %, dissoute par le déoxycholate 0.5 %, relativement plus complexe.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de D. Bouillon.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. M. FESSENDEN-RADEN, A. J. LANGE, M. A. DANNENBERG ET E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 6656.
- 2 K. A. WARD ET J. K. POLLAK, *Biochem. J.*, 114 (1969) 41.
- 3 C. A. SCHNAITMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 63 (1969) 412.
- 4 E. D. KIEHN ET J. J. HOLLAND, *Biochemistry*, 9 (1970) 1716.
- 5 W. L. ZAHLER, B. FLEISHER ET S. FLEISHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 203 (1970) 283.
- 6 L. ERNSTER, P. SIEKEVITZ ET G. E. PALADE, *J. Cell Biol.*, 15 (1962) 541.
- 7 Y. MOULÉ, CH. ROUILLER ET J. CHAUVEAU, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7 (1960) 547.
- 8 F. DECLOITRE ET J. CHAUVEAU, *FEBS Letters*, 2 (1969) 227.
- 9 T. S. WORK, *J. Mol. Biol.*, 10 (1964) 544.
- 10 K. TAKAYAMA, D. H. MAC LENNAN, A. TZAGOLOFF ET C. D. STONER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 114 (1966) 223.
- 11 W. THORUN ET E. MEHL, *Biochim. Biophys. Acta*, 160 (1968) 132.
- 12 G. SCHMIDT ET S. J. THANNHAUSER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 83.
- 13 C. H. LEA ET D. N. RHODES, *Biochem. J.*, 54 (1954) 457.
- 14 J. FOLCH, M. LEES ET G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497.
- 15 M. MACHEBOEUF ET J. J. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25 (1943) 116.
- 16 D. WEBSTER, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 277.
- 17 T. BADZIO, *Clin. Chim. Acta*, 11 (1965) 53.
- 18 B. BORGSTROM, *Acta Physiol. Scand.*, 25 (1952) 101.
- 19 R. TSANEV ET G. G. MARKOV, *Biochim. Biophys. Acta*, 53 (1960) 1.
- 20 L. STRAUCH, *Z. Klin. Chem.*, 3 (1965) 165.