

Die primêre struktuur van 'n kort neurotoksienhomoloog uit die gif van *Dendroaspis polylepsis polylepsis* (Swartmamba)

Francois J. Joubert
Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium, WNNR, Pretoria

UITTREKSEL

Toksien KM-7 is suiwer uit swartmambagif verkry deur middel van jelfiltrering op Sephadex G-50, gevolg deur ionuitruilchromatografie op KM-sellulose. Die toksien bevat 60 aminosure, waaronder agt halfsistienreste, en die volledige aminosuurvolgorde is bepaal. Die toksien bevat al elf struktureel konstante aminosure van die kort neurotoksiene en kardiotoксиene, maar net een van die vyf funksioneel konstante aminosure van die kort neurotoksiene. Die agt sisteienreste van KM-7 kom in dieselfde posisies as dié van kort neurotoksiene met bekende strukture voor en is waarskynlik eenders kruisgebind. Hoewel die volgorde van KM-7 struktureel soortgelyk aan dié van die kort neurotoksiene is, is dit minder giftig.

ABSTRACT

The primary structure of a short neurotoxin homologue from Dendroaspis polylepsis polylepsis (Black mamba) venom

Toxin CM-7 was purified from black mamba venom by gel filtration on Sephadex G-50 followed by ion exchange chromatography on CM-cellulose. It contains 60 amino acids, including eight half-cystines. The complete amino acid sequence of toxin CM-7 has been elucidated. In toxin CM-7 the eleven structurally invariant amino acids of the neurotoxins and cardiotoxins are conserved, but it has only one of the five functionally invariant amino acids of the neurotoxins. The eight cysteine residues of toxin CM-7 are in the same locations as those in short neurotoxins of known structures and are presumed to be similarly cross-linked. The sequence of CM-7 is structurally homologous with the short neurotoxins, but it is less toxic.

INLEIDING

Die gif van die slangfamilies *Elapidae* (kobras, mambas en die rinkals) en *Hydrophiidae* (seeslange) is goeie bronne van 'n verskeidenheid toksiene. Benewens die uiters giftige kort en lang neurotoksiene wat op die senustelsel se na-sinaptiese posisies inwerk, bevat die gif ook nie-neurotoksiese basiese proteïene wat nie baie giftig is nie. Die laasgenoemde sluit neurotoksienhomoloë,^{1,2} kardiotoксиene,³ kardiotoксиienhomoloë,⁴ protease-inhibeerders,⁵ protease-inhibeerderhomoloë,⁶ *angusticeps*-proteïene,⁷ *melanoleuca*-proteïene⁸ en sinergistiese proteïene⁹ in.

Strydom en medewerkers het 'n kort neurotoksien,¹⁰ twee lang neurotoksiene,^{10,11} twee *angusticeps*-proteïene,^{12,13} 'n aktiewe protease-inhibeerder,⁵ twee protease-inhibeerderhomoloë⁶ en proteïene A en A¹,¹⁴ uit swartmambagif geïsoleer en hul aminosuurvolgordes bepaal. Die volgorde van proteïene A en A¹, wat in 'n enkele posisie verskil, toon geen ooreenkoms met dié van die verskillende neurotoksiene en nie-neurotoksiese proteïene nie en verteenwoordig klaarblyklik 'n nuwe tipe slanggif-proteïen.

As voortsetting van ons studie oor die gif van die swartmamba (*Dendroaspis polylepsis polylepsis*) is 'n proteïen geïsoleer wat nie baie giftig is nie, en waarvan die struktuur met dié van 'n kort neurotoksien

ooreenkom. In hierdie bydrae word die suiwering, sommige eienskappe en die primêre struktuur van die proteïen (toksien KM-7) beskryf.

EKSPERIMENTEEL

Materiaal

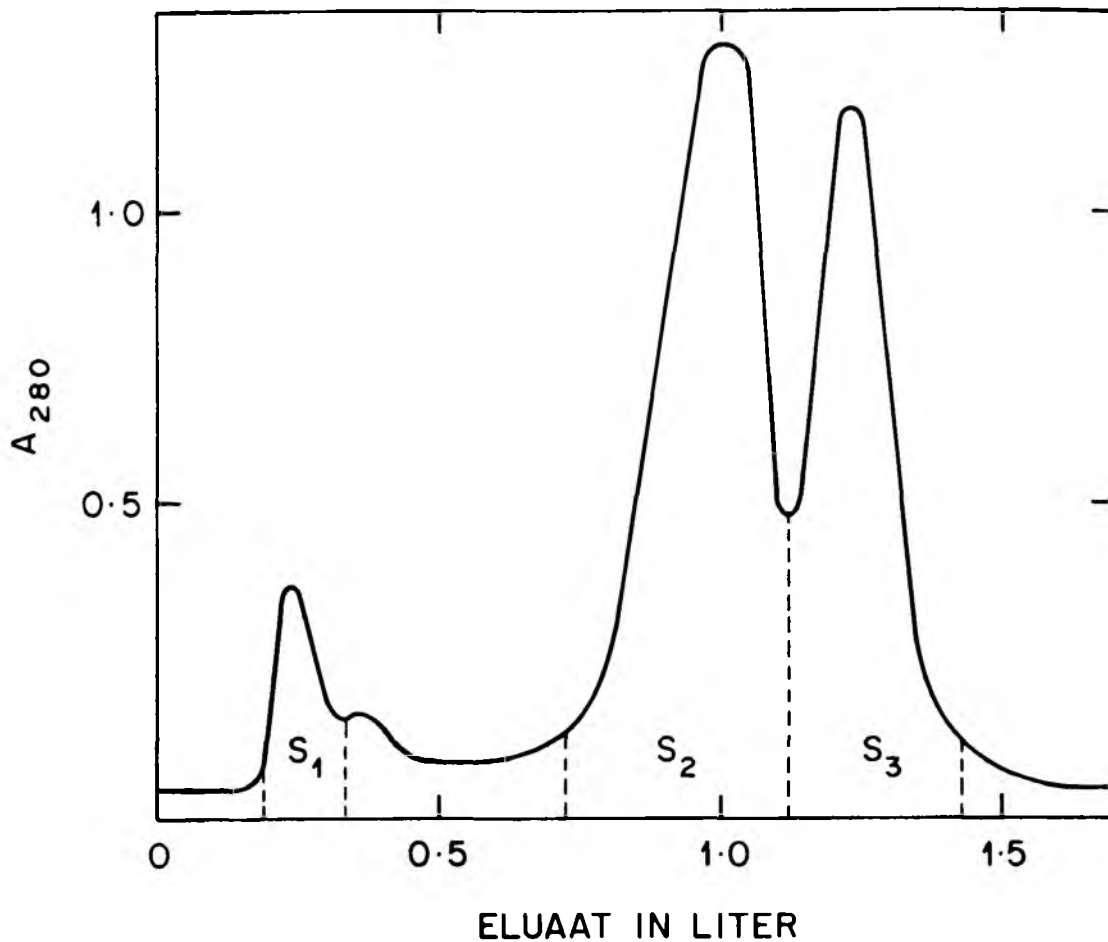
Gedroogde swartmambagif is deur D. Muller, Cedarweg, Northcliff, Johannesburg 2001, verskaf. Tripsien (drie maal gekristalliseer) is van Miles, Kaapstad, verkry. α -chimotoripsien (drie maal gekristalliseer) is deur Worthington verskaf. Diëtielaminoëtielsellulose (DEAE-sellulose) en karboksietiel-sellulose (KM-sellulose) was die mikrokorrelrige bereidings van Whatman. Sephadex G-50 (fyn) is deur Pharmacia verskaf.

Fisies-chemiese metodes

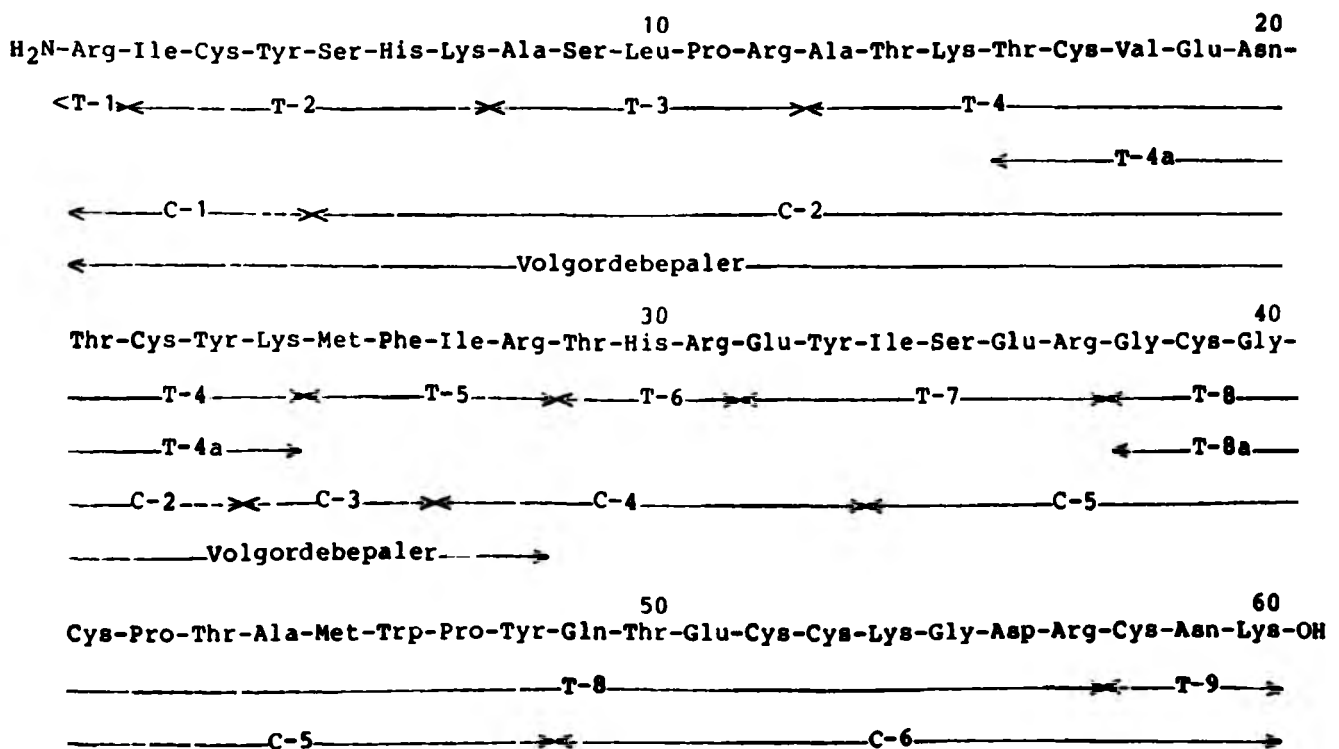
Kolomme gepak met onderskeidelik Sephadex, DEAE-sellulose en KM-sellulose is voorberei soos deur die vervaardigers aanbeveel. Die eluaat van die kolom is by 230 of 280 nm met 'n Beckman-spektrofotometer gemonitor. Die toksienfraksies is vir hul suiwerheid met behulp van dunlaagchromatografie op selluloseplate getoets, soos beskryf deur Shipolini *et al.*¹⁵

Isolering van toksien KM-7

Swartmambagif is op 'n kolom Sephadex G-50



FIGUUR 1: Jelfiltrasie van die gedroogde slanggif van *D. polylepis polylepis*. Gedroogde slanggif (6 g) is op 'n kolom Sephadex G-50 (3.8 x 150 cm) gelaai en met 0.2 M NH_4HCO_3 (pH 7.8) teen 'n vloeispoed van 50 ml/h geëluëer. Die kolomtemperatuur was 20 °C en die eluaat is by 280 nm gemonitor.



FIGUUR 2: Chromatografie van piek S₃ op KM-sellulose. Piek S₃ (4.8 g) is op 'n kolom KM-sellulose (3,8 x 50 cm) gelaai en geëluëer met 'n lineêre gradient van ammoniumasetaat (0,05 - 0,65 van pH 6,5 oor 2 liter) teen 'n vloeispoed van 50 ml/h. Die kolomtemperatuur was 20 °C en die elutaat is by 280 nm gemonitor.

gechromatografeer (Kyk Fig. 1). Piek S₃ is gevriesdroog en verder op KM-sellulose met 'n lineêre ammoniumasetaatgradiënt (0,05-0,6 M oor 2 liter, pH 6,5) gefraksioneer. Vier hoofpieke is verkry (Fig. 2). Die hoofpiek C-7 is herchromatografeer en die elueringspatroon het 'n klein piek en 'n hoofpiek (KM-7) getoon.

Biologiese metodes

Die giftigheid (LD₅₀-waardes) van die peptied-fraksies is bepaal deur die binnearse inspuiting van muis, wat elk 17 tot 20 g geweeg het. Die getal sterftes is na 24 uur aangeteken.

Reduksie en S-karboksümetilering

Toksien KM-7 is met ditiotreitol gereduseer en met jodium-asetaat S-gekarboksümetileer, soos elders beskryf.¹⁶

Vertering met proteolitiese ensieme

Die vertering met tripsien en chimotripsien onderskeidelik, is gedoen met 10 μmol gereduseerde-en-S-gekarboksümetileerde toksien opgelos in 10 ml 0,2 M NH₄HCO₃-oplossing (pH 7,8). 'n Ensiem-substraat-verhouding van 1 : 100 (m/m) is 2 uur lank by 30 °C toegepas. Die vertering is beëindig deur aansuring met asynsuur tot pH 3 en die verteringsmengsel is daarna gevriesdroog.

Fraksionering van die peptiede

Elke ensiemverteerde mengsel is deur jelfiltrering op 'n kolom Sephadex G-50 gefraksioneer. Die fraksies is verder op kolomme DEAE-sellulose met 'n lineêre gradiënt van NH₄HCO₃ (0,05-0,6 M oor 2 liter, pH 7,8) gesuiwer. Die eluaat van die kolomme is by 230 nm met 'n Beckman-spektrofotometer gemonitor.

Chemiese ontleding

Die aminosuurontleding is met behulp van 'n outomatiese Beckman-analiseerder gedoen. Monsters is 24 uur lank by 110 °C in verseëde geëvakueerde glasbuisies gehidroliseer met 6 N soutsuur waarby fenol gevoeg is om die vernietiging van tirosien te verhoed.¹⁷ Vir die bepaling van die triptofaaninhoud is die monsters met 3 M p-tolueensulfoonsuur gehidroliseer, soos elders beskryf.¹⁸ Vry sulfhidriël-groepe in die monster, opgelos in 6 M guanidinium-chloried, is volgens die metode van Ellman¹⁹ bepaal.

Aminosuurvolgordebepaling van toksien KM-7 en die peptiede

Die bepaling van die N-eindpuntaminosuurvolgorde van die gereduseerde-en-S-gekarboksümetileerde toksien is deur Edman-afbreking met 'n Beckman-volgordebepaler gedoen deur van die Quadrol-proteienprogram gebruik te maak. Die volgorde van peptiede wat twaalf of meer aminosure bevat, is ook met die volgordebepaler vasgestel in die teenwoordigheid van Polybrene, soos elders beskryf.^{20,21} Die volgorde van klein peptiede is bepaal soos deur Petersen *et al*²² beskryf (handmetode). Die

TABEL I

Die aminosuursamestelling van toksien KM-7. (in mol. aminosuurreste per mol toksien)

Aminosuur	Ontleding	Volgordebepalings
Aspartienuur	3,3	3
Treonien	5,9	6
Serien	2,5	3
Glutamienuur	5,0	5
Prolien	2,5	3
Glisien	3,2	3
Alanien	2,9	3
Half-sistien*	7,7	8
Valien	1,1	1
Metionien	1,7	2
Isoleusien	3,0	3
Leusien	0,9	1
Tirosien	3,9	4
Feniellalanien	0,9	1
Lisien	5,0	5
Histidien	2,0	2
Arginien	6,0	6
Triptofaan	0,7	1
Totaal		60

*Bepaal as S-karboksümetielsisteien.

fenieltiohidantoïenaminosure is met behulp van hoëdrukvloeistofchromatografie geïdentifiseer deur van 'n mikro-Bondapak-C₁₈-kolom (Water Associates Inc) gebruik te maak.

Benaming van die peptiede

Peptiede wat deur triptiese en chimotriptiese vertering verkry is, is onderskeidelik T en C genoem en opeenvolgend in ooreenstemming met hul posisie in die polipeptiedketting genommer.

RESULTATE

Eienskappe van KM-7

Die suiwerheid van toksien KM-7 is met dunlaagchromatografie op 'n selluloseplaat bepaal en ook deur N-eindgroepbepaling van die toksien. Slegs een kol (R_F = 0,2) is met dunlaagchromatografie waargeneem, terwyl arginien die enigste N-eindpuntaminosuur is.

Die giftigheid (LD₅₀-waarde) van die toksien is bepaal en 'n waarde van 1,5 ± 0,3 μg per gram muis is verkry. Die toksien se aminosuursamestelling word in Tabel I getoon. Geen vry sulfhidriël-groepe kon aangetoon word nie.

Die aminosuurvolgorde van toksien KM-7

Die aminosuursamestelling van die suiwer triptiese en chimotriptiese peptiede word in Tabel II en III getoon. Die N-eindpuntaminosuurvolgorde van die gereduseerde-en-S-gekarboksümetileerde toksien word in Tabel IV gegee. Bykomende volgordes van

TABEL II

Die Aminosuursamestelling van die triptiese peptiedes van toksien KM-7 (in mol aminosuures per mol toksien)*

Aminosuur	T-1	T-2	T-3	T-4	T-4a	T-5	T-6	T-7	T-8	T-8a	T-9
S-karboksimeetelsisteïen		1,0(1)		2,3(2)	2,2(2)				4,2(4)	3,9(4)	1,0(1)
Aspartienuur				1,1(1)	1,1(1)				1,0(1)		1,0(1)
Treonien				3,3(3)	1,8(2)		0,8(1)		2,2(2)	2,1(2)	
Serien		0,8(1)	0,8(1)					1,0(1)			
Glutamienuur				1,1(1)	1,0(1)			1,8(2)	2,1(2)	2,2(2)	
Prolien			1,1(1)						1,9(2)	1,9(2)	
Glisien									2,9(3)	2,1(2)	
Alanien			1,0(1)	1,0(1)					1,0(1)	1,0(1)	
Valien				0,9(1)	0,9(1)						
Metionien						0,7(1)			1,0(1)	1,0(1)	
Isoleusien		1,1(1)				0,8(1)		1,0(1)			
Leusien			0,8(1)								
Tirosien		1,1(1)		1,0(1)	0,9(1)			0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)	
Fenielalanien						1,0(1)					
Lisien		0,8(1)		2,0(2)	1,1(1)				0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)
Histidien		0,7(1)					0,8(1)				
Arginien	1,0(1)		0,7(1)			1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)		
Triptofaan									0,8(1)	0,7(1)	
Totaal	1	6	5	12	9	4	3	6	20	17	3
Opbrengs (%)	10,4	16,5	20,5	43,0	45,0	17,6	4,3	34,0	21,0	5,6	60,0

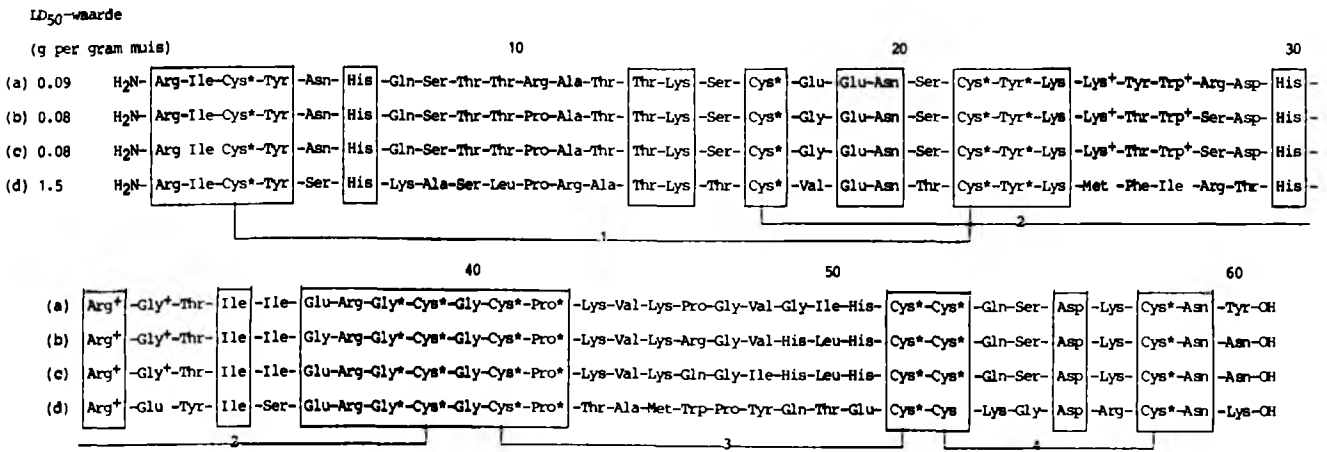
*Die syfers in hakies is die naaste afgeronde heelgetalle.

TABEL III

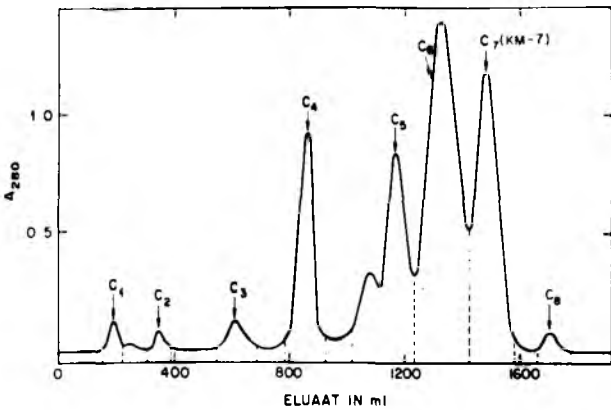
Die aminosuursamestelling van die chimotriptiese peptiede van toksien KM-7 (in mol aminosuuresidu per mol toksien)*

Aminosuur	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
S-karboksimeetelsisteïen	1,0(1)	2,0(2)			2,1(2)	3,1(3)
Aspartienuur		1,0(1)				1,9(2)
Treonien		3,3(3)		0,9(1)	1,0(1)	1,1(1)
Serien		1,9(2)			1,0(1)	
Glutamienuur		1,1(1)		0,9(1)	1,0(1)	1,9(2)
Prolien		1,0(1)			1,8(2)	
Glisien					2,0(2)	0,9(1)
Alanien		2,0(2)			0,9(1)	
Valien		0,9(1)				
Metionien			1,0(1)		0,9(1)	
Isoleusien	1,0(1)			0,8(1)	0,9(1)	
Leusien		1,0(1)				
Tirosien	1,2(1)	1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)	
Fenielalanien			1,0(1)			
Lisien		2,0(2)	1,0(1)			2,1(2)
Histidien		0,8(1)		1,1(1)		
Arginien	1,2(1)	1,1(1)		2,0(1)	1,1(1)	1,0(1)
Triptofaan					0,7(1)	
Totaal	4	19	3	7	15	12
Opbrengs (%)	51,0	21,0	10,5	20,4	23,0	24,2

*Die syfers in hakies is die naaste afgeronde heelgetal.



FIGUUR 3: Die volledige aminosuurvolgorde van toksien KM-7 van die gif van *D. polylepis polylepis*.



FIGUUR 4: Die aminosuurvolgorde van toksiene van verskeie tipes mambagif: (a) kort neurotoksien α van *D. polylepis polylepis*¹⁰; (b) kort neurotoksien 4.11.3 van *D. viridis*²⁶; (c) kortneurotoksien V_n^1 van *D. jamesoni kaimosae*²⁷ en (d) toksien KM-7 van *D. polylepis polylepis*. Die volgordes is opgestel met betrekking tot die posisie van die sisteïenreste. Die vier disulfiedbruë is aangedui as 1,2,3, en 4. Die * dui die struktureel konstante aminosure en die + die funksioneel konstante aminosure aan.

sommige van die triptiese en chimotriptiese peptiede word in Tabel V getoon.

Die volledige aminosuurvolgorde van toksien KM-7 word in Fig. 3 getoon. Uit die N-eindpuntvolgorde van die toksien kan peptiede T-1 tot T-5 geplaas word, asook peptiede C-1 tot C-4. Die aminosuursamestelling van peptiede C-4 en C-5 en die aminosuursamestelling en die gedeeltelike volgorde van peptied C-6 gee onderskeidelik ooreenstemmings tussen T-5 en T-6, T-6 en T-7, T-7 en T-8, en T-8 en T-9 sodat peptiede T-6 tot T-9 geplaas kan word.

BESPREKING

Die aminosuurvolgorde van toksien KM-7 van die slanggif van *D. polylepis polylepis* is met dié van drie kort neurotoksiene van drie spesies van die genus *Dendroaspis* (mamba), te wete *D. polylepis polylepis*,

TABEL IV

N-eindpuntaminosuurvolgorde van gereduseerde- en S-gekarboksimeleerde toksien KM-7 (opbrengs van aminosure in nmol)*

Stap	Identifikasie	Stap	Identifikasie
1	Arg 72	15	Lys 59
2	Ile 234	16	Thr 15
3	Cys 72	17	Cys 28
4	Tyr 190	18	Val 126
5	Ser 23	19	Glu 86
6	His 75	20	Asn 51
7	Lys 125	21	Thr 14
8	Ala 190	22	Cys 39
9	Ser 21	23	Tyr 71
10	Leu 147	24	Lys 60
11	Pro 77	25	Met 57
12	Arg 50	26	Phe 50
13	Ala 127	27	Ile 65
14	Thr 19	28	Arg 20

*Die analise is met behulp van 'n Beckman-volgordebepaler uitgevoer. Die Quadrol-proteïenprogram (Beckman Nr 122974 mod) is gebruik en 380 nmol toksien is gelaai. Die fenielthiohidantoinaminosure is met hoëdrukvloei-stofchromatografie geïdentifiseer.

D. viridis en *D. jamesoni kaimosae*, vergelyk (Fig. 4). Die homologie tussen die verskillende volgordes, met inbegrip van KM-7, is opvallend. Die agt sisteïenmolekule in KM-7 kom in posisies voor wat ooreenstem met dié in die kort neurotoksiene en hulle is heel waarskynlik eenders kruisgebind.

Ryden *et al*²³ het die aminosuurvolgordes van 'n aantal neurotoksiene en kardiotoxiene van die gif van die slangfamilies *Elapidae* en *Hydrophiidae*

TABEL V

Die aminosuurvolgorde van 'n aantal triptiese en chimotriptiese peptiede.*

Peptiede	Reste	Volgorde
T-6	29 tot 31	$\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{His}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T-7	32 tot 37	$\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Tyr}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T-8	38 tot 54	$\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}$ $\overrightarrow{\text{Met}}-\overrightarrow{\text{Trp}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Tyr}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-(\text{Thr},$ $\text{Glu, Cys, Cys, Lys})$
C-6	49 tot 60	$\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Gly}}$ $\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Arg}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-(\text{Asn, Lys})$
T-9	58 tot 60	$\overrightarrow{\text{Cys}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$

*Die volgorde van peptiede T-1 (res 1), T-2 (reste 2 tot 7), T-3 (reste 8 tot 12), T-4 (reste 13 tot 24) en T-5 (reste 25 tot 28) is van die aminosuurvolgorde van die N-eindpuntgedeelte van toksien KM-7 (Tabel III) afgelei. Die onderste halfpylties toon die reste aan wat met die Beckman-volgordebepaler geïdentifiseer is. Die boonste halfpyltjies toon die reste aan wat met die handmetode volgens die Edman-werkwyse geïdentifiseer is.

vergelyk en aangetoon dat elf posisies in alle toksien-volgordes, naamlik Cys-3, 17, 22, 39, 41, 52, 53, 58, Tyr-23, Gly-38 en Pro-42, dieselfde is (kyk Fig. 4). Hierdie aminosure word struktureel konstante reste genoem en hulle is vir plooiing van die peptiedketting noodsaaklik. Verder het Ryden *et al*²³ vasgestel dat in die aminosuurvolgorde van alle neurotoksiene vyf bykomende posisies, te wete Lys-25, Trp-27, Asp-29, Arg-31 en Gly-32, identies is. Hierdie aminosure, wat die funksioneel konstante reste genoem word, is blykbaar belangrik vir die besondere wisselwerking tussen neurotoksiene en nikotienasetielcholienreseptore.

Die driedimensionele struktuur van 'n kort neurotoksien (erabutoksien b) van die gif van *Laticauda semifasciata* wat met behulp van X-straalopmeting verkry is, is in 1976 beskryf.^{24,25} Die struktuur bevestig dat die kort neurotoksien grootliks uit drie β -plaatlusse bestaan wat sy aan sy bind en dat die vyf funksioneel konstante aminosure in die middelste lus (sien lus 2 in Fig. 4) geleë is. Hierdie lus is blykbaar van belang by die molekule se neurotoksiese aktiwiteit.

Toksien KM-7 bevat al elf struktureel konstante aminosure wat kenmerkend is vir neurotoksiene en kardiotoksiene. Dit bevat egter net een van die vyf funksioneel konstante aminosure van neurotoksiene, naamlik Arg-31, terwyl die ander vier (Lys-25, Trp-

27, Asp-29 en Gly-32) onderskeidelik deur Met-25, Ile-27, Thr-29 en Glu-32 vervang is.

Toksien KM-7 se LD₅₀-waarde van 1,5 ± 0,3 µg per gram muis dui op geringe giftigheid as dit vergelyk word met dié van die neurotoksiene (0,08 tot 0,09 µg per gram muis, waarvan die aminosuurvolgordes in Fig. 4 gegee is). Die strukturele kenmerke wat vir die geringe giftigheid van toksien KM-7 verantwoordelik is, is nie slegs die vervanging van vier van die vyf funksioneel konstante aminosure wat gewoonlik in 'n neurotoksien teenwoordig is nie, maar ook die gevolg van ander mutasies wat voorgekom het. Die kumulatiewe uitwerking van al die veranderinge is vermoedelik vir die geringe giftigheid van die neurotoksienhomoloog verantwoordelik.

BEDANKINGS

Die outeur bedank dr. D.F. Louw, Inligtings- en Navorsingsdienste, WNNR, vir die redaksionele verbeterings.

LITERATUURVERWYSINGS

- Joubert, F.J. (1975). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 53.
- Joubert, F.J. (1980). *Int. J. Biochem.*, 12, 567.
- Joubert, F.J. & Taljaard, N. (1980). *Toxicon*, 18, 455.
- Carlsson, F.H.H. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 269.
- Joubert, F.J. & Strydom, D.J. (1978). *Eur. J. Biochem.*, 87, 191.
- Strydom, D.J. (1977). *Nature (London), New Biol.*, 243, 88.
- Joubert, F.J. & Taljaard, N. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, 623, 449.
- Joubert, F.J. & Taljaard, N. (1980). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361, 425.
- Joubert, F.J. & Viljoen, C.C. (1979). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360, 1075.
- Strydom, D.J. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247, 4020.
- Strydom, D.J. & Haylett, T. (1977). *S.-Afr. Tydskr. Chem.*, 30, 40.
- Strydom, D.J. (1977). *Eur. J. Biochem.*, 76, 99.
- Joubert, F.J. & Taljaard, N. (1978). *S.-Afr. Tydskr. Chem.*, 31, 107.
- Joubert, F.J. & Strydom, D.J. (1980). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361, 1787.
- Shipolini, R.A., Bailey, G.S., Edwardson, J.A. & Banks, E.C. (1973). *Eur. J. Biochem.*, 40, 337.
- O'Donnell, J.J., Frangione, B. & Porter, K.R. (1970). *Biochem. J.*, 116, 261.
- Sanger, F. & Thompson, E.O.P. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 488.
- Liu, T.Y. & Chang, Y.H. (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 2842.
- Ellman, G.L. (1959). *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70.
- Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. & McKean, D.J. (1978). *Anal. Biochem.*, 84, 622.
- Hunkapiller, M.W. & Hood, L.E. (1978). *Biochemistry*, 17, 2124.
- Peterson, J.D., Nehrlich, S., Oyer, P.E. & Steiner, D.F. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247, 4866.
- Ryden, L., Gabel, D. & Eaker, D. (1973). *Int. J. Peptide Protein Res.*, 5, 261.
- Tsernoglou, D. & Petsko, G.A. (1976). *FEBS Lett.*, 68, 1.
- Low, B.W., Preston, H.S., Sato, A., Rosen, L.S., Searl, J.E., Rudko, A.D. & Richardson, J.S. (1976). *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2991.
- Banks, B.C.E., Miledi, R. & Shopolini, R.A. (1974). *Eur. J. Biochem.*, 45, 457.
- Strydom, A.J.C. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, 328, 491.