

**ELECTROPHORETIC INVESTIGATION OF CYTIDINE DEAMINASE
AN ENZYME RESTRICTED TO LEUKOCYTES**

白血球酵素 Cytidine Deaminase に関する電気泳動的研究

JOHN H. URBANOWICZ
JUN-ICHI ASAKAWA, M.Sc. 浅川順一
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION
財団法人 放射線影響研究所

A cooperative Japan - United States Research Organization
日米共同研究機関

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足した。その経費は日米両政府の平等分担とし、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって充てる。

ELECTROPHORETIC INVESTIGATION OF CYTIDINE DEAMINASE AN ENZYME RESTRICTED TO LEUKOCYTES

白血球酵素 Cytidine Deaminase に関する電気泳動的研究

JOHN H. URBANOWICZ*; JUN-ICHI ASAKAWA, M.Sc. (浅川順一);
HOWARD B. HAMILTON, M.D.

Department of Clinical Laboratories

臨床検査部

SUMMARY

Cytidine deaminase [E.C.3.5.4.5], which catalyzes the deamination of cytidine to ammonia and uridine, has been studied by starch gel electrophoresis using techniques developed by several investigators. Eighteen persons have been screened in Hiroshima for cytidine deaminase (CDA) and preliminary experiments to determine the feasibility of storage of leukocyte extracts, their subsequent electrophoresis, and staining for CDA have been made. Suggestions for the adaptation of CDA to polyacrylamide gel electrophoresis are presented.

INTRODUCTION

CDA, an enzyme restricted to leukocytes, particularly granulocytes, has been well characterized by several investigators.¹⁻⁴ CDA has a molecular weight of 51,000, an isoelectric pH of 4.8, and is maximally active over the broad pH range of 5.0-9.5. Chabner et al² have shown that dithiothreitol stabilizes the enzyme and have examined the affinity of CDA for various substrates (Table 1). It has also been demonstrated that CDA from immature granulocytes of patients with either myelocytic leukemia or infection has much lower activity than that found in mature granulocytes.²

On the basis of a study of four families in the Seattle, Washington area, CDA was shown to exhibit two polymorphic forms, CDA 1 and CDA 2.¹ The phenotypes of the families were consistent with autosomal codominant inheri-

要約

幾人かの研究者によって開発された澱粉電気泳動の技法を用いて, cytidine からアンモニア及び uridine への脱アミノ化を触媒する酵素 cytidine deaminase [E.C. 3. 5. 4. 5] について研究を行った. 広島で 18 人を対象に cytidine deaminase (CDA) について検査を行ったのでその結果について報告する. 白血球抽出物の保存ができるかどうか予備実験をしたのち, 抽出物について電気泳動を行い, CDA の染色を行った. CDA のポリアクリルアミド電気泳動の応用性についても述べる.

緒言

白血球, 特に顆粒球にのみ存在する酵素である CDA の特徴については, 数名の研究者¹⁻⁴ によって詳細に報告されている. CDA は, 分子量 51,000, 等電点 pH 4.8 で, その活性は pH 5.0-9.5 の広範囲にわたって最大である. Chabner ら² は, dithiothreitol がこの酵素を安定させることを確認し, 各種基質に対する CDA の親和力を調べた (表 1). また, 骨髓球性白血病又は感染症のいずれかを有する患者の未熟性顆粒球の CDA では, 成熟性顆粒球のそれよりも活性がはるかに劣ることが認められている.²

Washington 州 Seattle 市地区の 4 家族に関する調査により, CDA に 2 種の多型, すなわち CDA 1 及び CDA 2 のあることが認められた.¹ これらの家族の

*Fellowship support from the Division of Research Resources, NIH, BRSG-RR-05403

米国保健研究所, 研究財源部の援助による特別研究員 (BRSG - RR - 05403)

TABLE 1 MICHAELIS CONSTANTS FOR SUBSTRATES FOR HUMAN GRANULOCYTE CYTIDINE DEAMINASE

表1 ヒト顆粒球の CDA の基質に関するミハイリス定数

Substrate	K_m
	μM
Cytidine	11
Deoxycytidine	26
Ara-cytidine	88
CMP, dCMP, CTP, dCTP	Inactive
Cytosine	Inactive

tance of two allelic genes, CDA^1 and CDA^2 . Homozygotes showed either the CDA 1 or CDA 2 phenotype, while the heterozygous state was represented by the CDA 1-2 phenotype. No isozymes other than these two polymorphic forms, CDA 1 and CDA 2, have as yet been discovered. It has also been suggested that CDA is a tetramer based on the electrophoretic pattern of the heterozygote.¹

Data obtained from 189 Caucasian blood donors in the Seattle area,¹ showed that the allele frequencies were 0.65 for CDA^1 and 0.35 for CDA^2 .

The Biochemical Genetics Study (BGS) at RERF does not currently examine the electrophoretic pattern of any leukocyte enzymes. Techniques are presented here which will enable RERF to incorporate leukocyte enzyme electrophoresis, in particular electrophoresis of CDA, into the BGS program. Preliminary results of experiments to determine the practicality of storing and later electrophoresing leukocyte extracts are also presented.

METHODS

Preparation of Leukocytes^{1,2}

Plastic test tubes and pipettes were used to transfer or mix preparations which contained intact leukocytes because of the tendency of white blood cells, particularly granulocytes, to adhere to glass surfaces.

Five ml samples of heparinized human venous blood (20 IU heparin/ml blood) were stored at 4°C up to a maximum of 12 hours before centrifugation at 800×g for 10 minutes. The

表現型は、二つの対立遺伝子、すなわち、 CDA^1 及び CDA^2 の常染色体性相互優性遺伝型と一致するものであった。同型接合体は、CDA 1 又は CDA 2 のいずれかの表現型を示したのに対して、異型接合体の状態は CDA 1-2 表現型によって代表されていた。今までのところ、これら二つの多型、すなわち、CDA 1 及び CDA 2 以外のアインザイムは発見されていない。また、CDA は、異型接合体の電気泳動像に基づいて四量体であることも示唆されている。¹

Seattle 地区において白人の供血者189人から得られた資料では、¹ 対立遺伝子の頻度は CDA^1 が0.65、 CDA^2 が0.35であることが認められた。

現在、放影研の遺伝生化学的調査(BGS)では、白血球酵素の電気泳動像については何も調べていない。放影研が、BGS 研究計画へ、白血球酵素、特に CDA の電気泳動検査を組み入れることができる方法をここに示す。また、白血球抽出物を貯蔵し、後に電気泳動を実施する可能性を確めるための予備的実験結果をも示した。

方法

白血球の標本作成^{1,2}

白血球、特に顆粒球はガラスの表面に付着する傾向があるので、完全な白血球を含む標本の移し替えや混合には、プラスチック製の試験管やピペットを用いた。

最大限12時間4°Cで貯蔵したヘパリン化したヒト静脈血5ml(20IUヘパリン/ml血液)を、800×gで10分間遠心した。血漿は除去し廃棄した。残りの

plasma was removed and discarded. An equal volume of 3% dextran solution in balanced salt solution* was added to the residual cells and thoroughly mixed with a pipette. The samples were allowed to stand at room temperature for 40 minutes. Samples which were cooled sometimes failed to sediment even after 90 minutes, but no samples failed to sediment after 40 minutes at room temperature. The supernatant was removed and centrifuged at 1,500×g for 10 minutes. After removing and discarding the supernatant, 0.1 ml of distilled water was added to the red blood cell-leukocyte pellet which remained. The cells then were lysed by rapidly freezing and thawing three times in a dry ice-methanol bath. Sonication caused denaturation and loss of CDA activity in samples of this size. Lysis of red cells using 4.5 ml of distilled water for 15 seconds followed by rapid addition of 1.5 ml of 0.6 M NaCl solution sometimes caused some white cell lysis also, as demonstrated by a decrease in CDA staining intensity. Samples in which red and white cells were lysed together were satisfactory electrophoretically and are preferred. After lysis, the sample is centrifuged for 10 minutes at 1,600×g and the supernatant applied to the gel.

Electrophoresis and Staining^{1,3,4}

The Connaught starch (Connaught Laboratories, Toronto, Canada) used in this procedure must be fresh and kept in a cold room. Gel made from old starch is mechanically weak and does not give satisfactory results.

Starch gel is prepared by thoroughly mixing 30.0 g of the starch, 26.0 g of Electrostarch (Hiller, Madison, WI, USA), and 500 ml of 0.005 M Histidine-HCl buffer adjusted to pH 6.70 with 1 N NaOH. The starch is left to settle. After approximately 1 hour, the buffer is decanted and replaced with an equivalent volume of fresh buffer, pH 6.70. The starch is now ready for boiling.

The bridge buffers were 0.02 M citric acid adjusted to pH 6.2 with 1 N NaOH for the cathode electrode and adjusted to pH 6.9 with 1 N NaOH for the anode electrode. Vertical

血球に平衡化食塩水と3%デキストランの混合溶液*を加え、ピペットで十分かき混ぜた。検体は室温で40分間放置した。冷却した検体は時には90分経過しても沈澱しないこともあったが、室温で40分放置した場合は例外なく沈澱した。上澄を除去し1,500×gで10分間遠心した。上澄の除去及び廃棄後、0.1mlの蒸留水を残った赤血球-白血球ペレットに加えた。次いでこの血球を、ドライアイス・メタノール槽の中で急速な冷凍及び融解を3度繰り返して溶血させた。この程度の検体量では、超音波処理によってCDAの変性や活性低下をもたらした。赤血球を4.5mlの蒸留水で15秒間溶血した後、0.6 M NaCl 溶液1.5 mlを速やかに加えた時には白血球の一部も溶血した。このことはCDA染色の度合の減少で確認できる。赤血球と白血球が共に溶血できた検体が、電気泳動の結果も満足であったので、そのような検体が望ましい。溶血後に検体を1,600×gで10分間遠心し上澄をゲルの作成に用いる。

電気泳動及び染色^{1,3,4}

本法で用いる Connaught 澱粉 (Canada, Toronto 市 Connaught 研究所) は、新鮮なものでなければならない。低温室で保存する必要がある。古い澱粉で作ったゲルは、構造的に弱く、満足な結果が得られない。

澱粉ゲルは、澱粉30.0 g, Electrostarch (米国, Wisconsin 州, Madison 市, Hiller 街) 26.0 g, 及び 1 N NaOH によって pH 6.70 に調整した 0.005 M Histidine-HCl 緩衝液 500 ml を混合して作る。澱粉が沈澱するまで放置し、約 1 時間後、この緩衝液を除去し、pH 6.70 の同量の新鮮な緩衝液と取り替える。これで澱粉は煮沸に供する。

ブリッジ緩衝液は、0.02 M クエン酸で陰極を 1 N NaOH によって pH 6.2 に調整し、陽極を同じく pH 6.9 に調整した。3.7 V/cm で 19 時間、垂直式電気

*Preparation of 3% Dextran Solution: Thirty grams of Dextran T500 (Pharmacia, MW~500,000) are added to 970 ml of balanced salt solution. The mixture is stirred vigorously until all of the dextran has dissolved. The solution is then filtered twice through a 1.0 cm thick layer of activated charcoal. It is stored at +4°C.

注：3%デキストラン溶液の作成：デキストラン T 500 (Pharmacia, MW—500,000) 30 g を平衡化食塩水 970 ml へ加える。デキストランが完全に溶解するまで強く攪拌する。次に、この溶液を、厚さ 1.0 cm の活性炭を通して 2 回濾過し、+4°C で貯蔵する。

electrophoresis was carried out at 3.7 V/cm for 19 hours. A 34 cm gel was used in these experiments.

Staining of CDA was carried out using a mixture of cytidine, MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H tetrazolium), and dithiothreitol (DTT) in agar. This method of staining depends upon the ability of DTT to reduce MTT non-enzymatically when there is an increase in pH. In this case, the pH rise is due to ammonia production during the deamination of cytidine.

The use of various staining mixtures was attempted. Staining mixtures, as given in the literature, were not satisfactory due to either intense background staining or faint enzyme staining. In all staining mixtures, 10 ml of 2% Ionagar and 15 mg of cytidine in 9 ml of distilled H₂O were used. DTT was varied from 3 mg to 10 mg and MTT was varied from 3 mg to 15 mg. The most satisfactory staining was obtained by the following method: 10 ml of 2% Ionagar was heated until the agar dissolved. Heating was discontinued and 15 mg of cytidine in 9 ml of H₂O was then added with swirling. Immediately, 8 mg of DTT (0.8 ml of 1% DTT) was added, quickly followed by 9 mg of MTT (1.8 ml of 0.5% MTT). The solution was swirled and allowed to cool to approximately 45°C, then poured over the sliced gel. The staining dish was then covered and, after solidification of the agar, incubated in the dark for 2 hours at 37°C. Photographs were taken. A saran wrap underlay was used for each gel. Observation indicated that direct contact of tape with the staining mixture increased background staining. The accuracy of this observation was not evaluated.

Storage of Cell Extracts

Distilled water (0.1 ml) was added to the white cell pellets obtained after lysing the red cells with distilled water¹ and to the red cell-leukocyte pellets obtained directly from dextran sedimentation. The samples were then stored for 2 days at -4°C. Extracts from the pellets were obtained by rapidly freezing and thawing the pellets three times then centrifuging the mixture for 10 minutes at 1,600×g to remove insoluble cell fragments from the solution. The supernatants were electrophoresed. As a control, fresh extract from a person of known CDA phenotype was applied to the gel along with stored samples from the same individual.

泳動を行った。これらの実験には34 cmゲルを用いた。

CDA 染色は、cytidine, MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H tetrazolium) 及び dithiothreitol (DTT) の混合物を寒天中で用いた。この染色法は pH 増加がある場合の MTT を非酵素的に還元させる能力に依存している。この場合の pH 上昇は、cytidine の脱アミノ化中に生ずるアンモニアに由来する。

各種の染色用混合液の使用を試みたが、文献に掲載されているような染色用混合液は、バックグラウンドの染色が濃くなったり、酵素の染色が弱かったりするため、満足なものではなかった。染色用混合液はすべて、2% Ionagar 10 ml と cytidine 15 mg を蒸留水 9 ml に溶かした液を用いた。DTT の量は 3-10 mg, MTT は 3-15 mg の間で変えてみた。最も満足すべき染色は、次の方法によって得られた。すなわち、まず 2% の Ionagar 10 ml を寒天が溶解するまで加熱し、次に加熱を止めて cytidine 15 mg を 9 ml の水に溶かしたものを加え、渦状にかきまぜた。直ちに DTT 8 mg (1% DTT 0.8 ml) を加え、更に速やかに MTT 9 mg (0.5% MTT 1.8 ml) を加えた。この溶液を渦状にかきまぜて約 45°C まで冷まし、スライスしたゲルの上に注ぎかけた。染色皿にふたをし、寒天の凝固後、37°C の暗い恒温室に 2 時間保った後、写真撮影が行われた。各ゲルには、サランラップを下に敷いた。観察したところ、テープと染色用混合液が直接接触した場合は、バックグラウンドの染色度が増加した。この観察の正確性については評価しなかった。

細胞抽出物の保存

蒸留水で赤血球を溶血した後の白血球ペレット,¹ 並びにデキストラン沈降物から直接得られた赤血球-白血球ペレットに、蒸留水 (0.1 ml) を加えた。次いでこれらの検体を -4°C で 2 日間保存した。これらのペレットを急速冷凍と融解の操作を 3 回繰り返して、次にその混合液を 1,600×g で 10 分間遠心して、混合液中から不可溶性の血球片を除去して、ペレットから抽出物を得たのち、上澄について電気泳動を行った。対照として、既知の CDA 表現型を有する者から得た新鮮な抽出物と同一人から得た保存標本とをゲルに添加した。

RESULTS

CDA Screening

At this point, the CDA phenotype of only 18 persons has been determined. The results were as follows:

CDA 1	CDA 1-2	CDA 2
12	5	1

It is much too early to draw any conclusion, but CDA 1 appears to be the most prevalent. A satisfactory estimate of the allele frequency is not possible on the basis of these preliminary studies.

Storage of Cell Extracts

Electrophoresis of stored white cell pellets showed no activity, probably due to the lysis of some white cells during the process of lysing erythrocytes with distilled water. Electrophoresis of stored red cell-leukocyte pellet extracts exhibited bands which were displaced toward the anode. The strong staining of the enzyme, although anodally displaced, indicated that there was little or no loss of activity after storage. This phenomenon which has been observed in other enzyme systems will be discussed.

DISCUSSION

CDA Screening

The screening of CDA can now be done routinely on starch gel. Allele frequencies for the Japanese population could be easily determined in a few weeks.

The practicality of incorporating CDA into the BGS program is questionable. The evaluation of a single white cell enzyme would probably not justify the costs involved. Preparation of leukocyte extracts is certainly more time consuming than erythrocyte or plasma extracts. If one or two other white cell systems, in addition to CDA, could be screened, the practicality of studying leukocyte enzymes electrophoretically would greatly increase.

Storage of Cell Extracts

The anodal displacement of CDA after storage is a phenomenon which has been noted in several other enzyme systems.⁵ Adenosine deaminase

結果

CDA スクリーニング

現在 CDA 表現型が確認されたのはわずか18人にすぎない。結果は次のとおりであった。

結論を出すにはあまりに早すぎるが、CDA 1は最も頻繁に認められるようである。これらの予備調査によって、対立遺伝子を満足に推定することは不可能である。

細胞抽出物の保存

保存された白血球ペレットの電気泳動では活性が認められなかったが、これは恐らく、蒸留水による赤血球の溶血の過程で若干の白血球が溶血したためと思われる。保存された赤血球-白血球ペレット抽出物の電気泳動では、バンドが陽極の方へ移動しているのが認められた。酵素の染色が強いため、陽極側へ移動していても、保存後の活性がほとんど又は全然消失していないことを示した。他の酵素系でも認められているこの現象については後に述べる。

考察

CDA スクリーニング

CDA スクリーニングは、通常の作業として澱粉ゲルを用いて行うことができる。日本人集団における対立遺伝子の頻度は、数週間容易に確認できる。

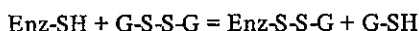
CDA スクリーニングを BGS 調査に加えることが実用的であるかどうかは疑問である。1個の白血球酵素の評価に要する経費は、恐らく正当化できないであろう。白血球抽出物の作成は、赤血球や血漿の抽出物の作成よりも時間がかかる。もし CDA のほかに一つか二つ白血球系をスクリーニングするのであれば、白血球酵素の電気泳動検査を行える可能性は大いに増大するであろう。

細胞抽出物の保存

保存後に CDA が陽極側へ移動することは、他の幾つかの酵素系でも認められている。⁵ Adenosine

(ADA) (3.5.4.4) is an enzyme which has been well studied in this regard.⁶ The principal changes which occur after storage are: 1) diminution in the relative staining intensities of the slower isozymes, 2) an increase in the intensities of the faster isozymes, and 3) appearance of extra isozymes anodal to the usual components. These changes are progressive with storage time and, in the case of ADA, are similar in all three phenotypes. Further, enzyme activity is not generally affected by the changes which occur during storage.

Harris and Hopkinson⁵ explain the phenomenon as a reaction between the free sulphhydryl groups of certain cysteine residues on the isozyme and oxidized glutathione, known to accumulate in red cell lysates, to form a mixed disulfide:



The reaction increases the net negative charge on the enzyme by one unit for each sulphhydryl group which participates in the reaction. They also state that when sulphhydryl reagents such as mercaptoethanol or DTT are added to older samples, isozyme patterns usually revert to those seen with fresh samples. Thus, it would appear that addition of DTT to fresh samples should effectively protect against the progressive change in the electrophoretic pattern. Unfortunately, time did not permit this to be examined experimentally. It is suggested that DTT be incorporated into cell extracts as a 2.5×10^{-3} M ~ 5×10^{-3} M solution by adding 0.1 ml of DTT solution to the red cell-leukocyte pellet rather than distilled water.^{2,5} This should protect the enzyme and allow prolonged storage of white cell extracts. Also, prolonged storage should be carried out at -70°C rather than -4°C which was used for the preliminary studies.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Resolution of enzymes using polyacrylamide gel has generally been optimum using some of the standard buffers and a pH of approximately 8.2-8.4. CDA, using the present staining solution, would not be adaptable to polyacrylamide since the staining reaction would proceed rapidly at this pH even in the absence of enzyme activity. An alternative staining system, now being used at The Galton Laboratory, London University College, utilizes glutamate dehydrogenase.^{7,8,9}

deaminase (ADA) (3, 5, 4, 4) は、この点で十分に研究されている酵素である。⁶ 保存後に起こる主要な変化は、1) 移動度の遅いアイソザイムの相対的染色濃度の減少、2) 移動度の早いアイソザイムの染色濃度の増加、及び3) 別のアイソザイムが通常の成分より陽極に近く現われる、などである。これらの変化は、保存時間と共に進行し、ADA の場合は、三つの表現型に類似して見られる。更に一般には、酵素活性は保存中に生じる変化には影響されない。

Harris 及び Hopkinson⁵ は、この現象をアイソザイム上のある特定のシステイン残基の遊離 SH 基 (sulphydryl groups) と赤血球溶血液に蓄積することが知られている酸化型グルタチオンとが反応しジスルフィド結合混合物を形成すると説明している。すなわち、

反応に関与する 1 個当たりの SH 基は酵素の負電荷を 1 単位増加させる。彼らはまた、mercaptoethanol 又は DTT のような SH 基試薬を古い検体に加えた場合は、酵素のパターンは通常新鮮な検体で見られるものに戻るとも述べている。したがって、新鮮な検体に DTT を加えると、電気泳動のパターンにおける経時変化から効果的に保護されるようである。残念ながらこれを実験する時間はなかった。DTT を細胞抽出物に 2.5×10^{-3} M ~ 5×10^{-3} M 溶液として加えること、すなわち、赤血球-白血球ペレットに蒸留水の代わりに 0.1 ml の DTT 液を加えることも提案する。^{2,5} これにより、酵素を保護し、白血球抽出物の長期保存を可能にする。また、長期保存は、予備調査で用いた -4°C でなく、 -70°C で実施すべきである。

ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動

ポリアクリルアミド・ゲルと幾つかの標準的緩衝液を pH 約 8.2-8.4 で使用した場合、酵素の分離はおおむね至適に進んでいる。現行の染色液を用いた場合、染色反応は酵素活性がない場合でもこの pH では急速に進行するので、CDA はポリアクリルアミドに適応しなかった。それに代る染色方法としては、現在 London University College の Galton Laboratory で用いられているグルタミン酸脱水素酵素を用いたものがある。^{7,8,9}

Briefly, the method depends upon the ability of CDA to produce ammonia which triggers the glutamate dehydrogenase reaction in the presence of alpha ketoglutarate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH). Areas of NADH conversion to NAD are seen as defluorescent zones under ultraviolet light.

Using this staining method and buffers in the pH range of 8.2-8.4, CDA should be demonstrable using polyacrylamide gel. The gel would, of course, need to be flushed free of ammonia residues before electrophoresis.

簡単に説明すると、この方法は、CDA のアンモニアを産生する能力に依存し、そのアンモニアはアルファ・ケトグルタル酸及びニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド還元型 (NADH) のある場合にグルタミン酸脱水素酵素反応を開始させる。NADH から NAD への転換の領域は、紫外線灯のもとでは、脱蛍光の部分である。

この染色法及び pH 領域 8.2—8.4 における緩衝液を用いれば、ポリアクリルアミド・ゲルによって CDA が検出できるはずである。もちろん、電気泳動の前にゲル中のアンモニアを洗い出しておく必要がある。

REFERENCES

参考文献

1. TENG Y, ANDERSON JE, GIBLETT ER: Cytidine deaminase. A new genetic polymorphism demonstrated in human granulocytes. *Am J Hum Genet* 27:492-7, 1975
2. CHABNER BA, JOHNS DG, COLEMAN CN, DRAKE JC, EVANS WH: Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. *J Clin Invest* 53:922-31, 1974
3. FARRON F: Arginase isozymes and their detection by catalytic staining in starch gel. *Anal Biochem* 53:264-8, 1973
4. HARRIS H, HOPKINSON DA: *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. New York, American Elsevier Pub Co, 1976. Chapter 4
5. HARRIS H, HOPKINSON DA: *Ibid*. Chapter 5
6. HOPKINSON DA, HARRIS H: The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. *Studies on red cell adenosine deaminase*. *Ann Hum Genet* 33:81-7, 1969
7. GIBLETT ER: Personal communication
8. NELSON RL, POVEY S, HOPKINSON DA, HARRIS H: Electrophoresis of human L-glutamate dehydrogenase; Tissue distribution and preliminary population study. *Biochem Genet* 15 (1/2): 87-91, 1977
9. NELSON RL, POVEY S, HOPKINSON DA, HARRIS H: Detection after electrophoresis of enzymes involved in ammonia metabolism using L-glutamate dehydrogenase as a linking enzyme. *Biochem Genet* 15(11/12):1023-35, 1977