

ОЦЕНКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ, СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

В. А. Королева¹, М. Г. Холявка^{2,3}, В. Г. Артюхов²

1 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

2 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

3 - ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 3 сентября 2020 г.

Аннотация. Многие растения содержат латекс, который выделяется при повреждении листьев. В латексе обнаруживается ряд белков и ферментов, в том числе протеаз. Латекс защищает органы растений от хищников, паразитов или патогенов. Для понимания полной картины механизмов действия цистеиновых протеаз в растительном организме необходимо изучение их субстратной специфичности. Цистеиновые протеазы растений играют важную роль во внутриклеточных и внеклеточных процессах, таких как развитие и созревание плодов, расщепление запасного белка в проросших семенах, активация проферментов и гидролиз дефективных белков. В дополнение к их важной физиологической роли, цистеиновые протеазы нашли широкое применение в пищевой промышленности, биотехнологии и других отраслях из-за их способности быть активными в широком диапазоне температур и значений pH среды. Кроме того, они применяются в фармацевтической промышленности для изготовления лекарств.

В настоящей работе была проанализирована субстратная специфичность фицина, папаина и бромелина по отношению к бычьему сывороточному альбумину (БСА), липазе, казеину молока, казеину молока по Hammerstein, амилазе, фосфатазе, гемоглобину человека, яичному альбумину, цитохрому с, сывороточному альбумину человека (САЧ), каталазе, коллагену.

Показано, что наиболее предпочтительными субстратами для фицина являются фосфатаза, амилаза, яичный альбумин и коллаген; с наименьшей скоростью он гидролизует цитохром с, сывороточный альбумин человека и казеин молока. Выявлено, что папаин наиболее активен по отношению к коллагену и цитохрому с, наименьшую каталитическую способность фермент проявляет по отношению к казеину молока, яичному альбумину, амилазе и гемоглобину человека. Бромелин с высокой скоростью гидролизует амилазу, каталазу, яичный альбумин и коллаген; активность энзима минимальна при таких субстратах: цитохром с, казеин молока, бычий сывороточный альбумин и гемоглобин человека. Наблюдалось снижение каталитической способности иммобилизованных ферментов по сравнению со свободными, вероятно, связанное с обусловленными матрицей хитозана стерическими ограничениями доступа высокомолекулярных субстратов (белков) к активному центру цистеиновых протеаз.

Ключевые слова: фицин, папаин, бромелин, хитозан, иммобилизация, субстратная специфичность

Протеазы играют ключевую роль в регуляции биологических процессов у растений, таких как распознавание патогенов и вредителей и индукция эффективных защитных реакций. Важным источником растительных протеаз, используемых в традиционной медицине и промышленности, является латекс. Известно, что более 110 видов латексов разных семейств растений содержат, по

крайней мере, один протеолитический фермент. Большинство из них принадлежат к семейству цистеиновых или сериновых эндопептидаз [1].

Протеолитические ферменты растений участвуют почти во всех аспектах роста и развития организма, включая прорастание семян, старение и апоптоз клеток [1]. Присутствие протеолитических ферментов в латексах растений разных семейств известно много лет. Некоторые из них

сразу выделяют латекс при повреждении листьев, стеблей и плодов. Процесс коагуляции жизненно важен для защиты растений от возможного повреждающего действия различных патогенов. Латекс сам по себе может предохранять камбиальную меристему и содержимое ситовидных трубок от хищников и паразитов [2, 3]. Латексные протеазы защищают созревающие плоды от насекомых и грибов [4]. Исходя из их природных свойств, цистеиновые протеиназы из плодов и латекса растений были предложены в качестве новых антигельминтных средств [5-8].

Для понимания полной картины действия цистеиновых протеаз необходимо изучение субстратной специфичности данных ферментов. Фицин, папаин и бромелин обладают широкой субстратной специфичностью [9-16].

Фицин (КФ 3.4.22.3) предпочтительно гидролизует в белках пептидные связи, образованные фенилаланином и тирозином. Не наблюдается расщепления по связям аргинина и лизина [9]. По сведениям других авторов, фицин гидролизует белки по карбоксильной группе глицина, серина, триптофана, метионина, тирозина, аланина, аспарагина и валина [17].

Папаин (КФ 3.4.22.2) с наибольшей скоростью расщепляет связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина, замещенными α -аминными группами [9]. Другие авторы сообщают, что папаин гидролизует пептидные связи, образованные лейцином или глицином, а также сложные эфиры и амиды. Не наблюдается расщепления ферментом образованных валином связей [18].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) демонстрирует эффективный гидролиз по связям аргинин-аланин и аланин-глутаминовая кислота, он отдает предпочтение связям, образованным глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой, лизином и аргинином, но оставляет нетронутыми связи аргинин-аргинин и лизин-тирозин [19].

На получение дополнительных сведений о субстратной специфичности указанных белков в свободном и иммобилизованном состояниях и направлена наша статья.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин и бромелин фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – кислоторастворимые среднемолекулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высоко-

молекулярный хитозаны ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%) фирмы ЗАО «Био-прогресс».

Для исследования субстратной специфичности растительных ферментов использовались следующие белки: бычий сывороточный альбумин (БСА) (*Bos taurus*, 66 кДа), липаза из поджелудочной железы (*Sus scrofa*, 48 кДа), α_{s1} -казеин молока (*Bos taurus*, 22-23 кДа), казеин молока по Hammerstein (*Bos taurus*, 22-23 кДа), α -амилаза из поджелудочной железы (*Sus scrofa*, 51-54 кДа), фосфатаза (*Bos taurus*, димер ~160 кДа), гемоглобин (*Homo sapiens*, 66.8 кДа), яичный альбумин (*Gallus gallus*, 44-45 кДа), цитохром с (*Homo sapiens*, ~15 кДа), сывороточный альбумин человека (САЧ) (*Homo sapiens*, 66.4 кДа), каталаза (*Bos taurus*, тетрамер ~250 кДа), коллаген (*Homo sapiens*, ~300 кДа).

Активность ферментов определяли методом Лоури (по разности между содержанием белка в растворе субстрата без и с 30 минутной инкубацией с ферментом при 37 °C) [20].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основываясь на литературных данных о предпочтительных и избегаемых связях для гидролиза цистеиновыми протеазами [9, 17-19], мы составили таблицу, в которой для фицина, папаина и бромелина привели абсолютные и относительные значения, а также соотношение предпочитаемых и избегаемых пептидных связей для гидролиза.

Установлено, что наиболее высокое сродство растворимого фицина выявлено по отношению к фосфатазе (отношение предпочитаемых и избегаемых связей составляет 7.0), амилазе (6.1), яичному альбумину (5.8) и коллагену (6.0). Средние (из измеренных нами) значения активности фицина, свободного и сорбированного на хитозане, обнаруживаются по отношению к бычьему сывороточному альбумину (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 2.8), липазе (5.5), гемоглобину (5.4), каталазе (4.0) и казеину молока по Hammerstein (4.2). Минимальная каталитическая способность нативного и иммобилизованного на матрицах хитозана фицина выявлена по отношению к казеину молока (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 4.2), цитохрому с (2.4) и сывороточному альбумину человека (2.8) (рис. 1, табл. 1).

Таблица 1

Количество предпочтительных и избегаемых связей для гидролиза

Субстрат	Физиин			Папаин			Бромелин		
	Предпоч. связи (абсолют. знач. / %)	Избегаемые связи (абсолют. знач. / %)	Отношение предпоч. и избегаемых связей	Предпоч. связи (абсолют. знач. / %)	Избегаемые связи (абсолют. знач. / %)	Отношение предпоч. и избегаемых связей	Предпоч. связи (абсолют. знач. / %)	Избегаемые связи (абсолют. знач. / %)	Отношение предпоч. и избегаемых связей
Бычий сывороточный альбумин [Bos taurus] 607 aa GenBank: CAA76847.1	239 / 39	86 / 14	2.8	168 / 28	38 / 6	4.4	190 / 31	7 / 1	31.0
Липаза [Sus scrofa] 465 aa GenBank: ADD71520.1	233 / 50	43 / 9	5.5	120 / 26	37 / 8	3.2	99 / 21	2 / 0.43	49.5
Казеин молока [Bos taurus] 214 aa GenBank: ACG63494.1	89 / 42	21 / 10	4.2	53 / 25	13 / 6	4.2	54 / 25	1 / 0.46	54.0
Амилаза [Sus scrofa] 511 aa GenBank: AAF02828.1	279 / 55	48 / 9	6.1	131 / 26	41 / 8	3.2	101 / 20	1 / 0.2	101.0
Фосфатаза [Bos taurus] 533 aa GenBank: AAA30571.1	290 / 54	41 / 8	7.0	137 / 26	42 / 8	3.3	95 / 18	2 / 0.37	47.5
Гемоглобин [Homo sapiens] 574 aa PDB: 1SI4_A PDB: 1SI4_B PDB: 1SI4_C PDB: 1SI4_D	308 / 54	58 / 10	5.4	164 / 29	60 / 10	2.9	114 / 20	4 / 0.7	28.5
Яичный альбумин [Gallus gallus] 386 aa GenBank: AAB59956.1	202 / 52	35 / 9	5.8	86 / 22	31 / 8	2.8	87 / 23	1 / 0.26	87.0
Цитохром с [Homo sapiens] 105 aa NCBI Reference Sequence: NP_061820.1	48 / 46	20 / 19	2.4	39 / 37	3 / 2.8	13.0	32 / 30	1 / 0.9	32.0
Сывороточный альбумин человека [Homo sapiens] 609 aa GenBank: AAN17825.1	254 / 42	89 / 15	2.8	166 / 27	43 / 7	3.9	197 / 32	5 / 0.8	39.4
Каталаза [Bos taurus] 527 aa NCBI Reference Sequence: NP_001030463.1	240 / 46	60 / 11	4.0	132 / 25	36 / 7	3.6	126 / 24	1 / 0.2	126.0
Коллаген [Homo sapiens] 1678 aa GenBank: BAA04809.1	844 / 50	140 / 8	6.0	739 / 44	51 / 3	14.5	253 / 15	3 / 0.17	84.3

Аминокислотные последовательности субстратов были взяты из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

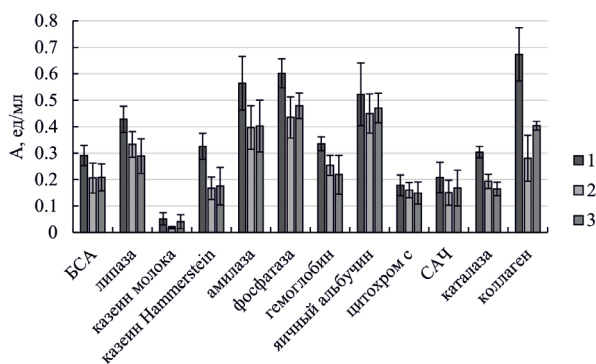


Рис. 1. Субстратная специфичность фицина по отношению к различным белкам, где 1 – растворимый фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

Растворимый папаин наиболее активен по отношению к коллагену (отношение предпочитаемых и избегаемых связей равно 14.5) и цитохрому с (13.0). Средние (из измеренных нами) значения активности папаина, нативного и адсорбированного на матрице хитозана, обнаруживаются по отношению к бычьему сывороточному альбумину (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 4.4), липазе (3.2), сывороточному альбумину человека (3.9), каталазе (3.6), фосфатазе (3.3) и казеину молока по Hammerstein (4.2). Казеин молока (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 4.2), яичный альбумин (2.8), амилаза (3.2) и гемоглобин (2.9) меньше всего подвержены протеолизу папаином в свободной и иммобилизованной формах (рис. 2, табл. 1).

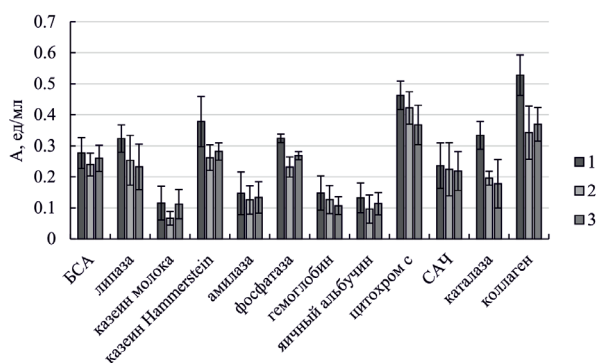


Рис. 2. Субстратная специфичность папаина по отношению к различным белкам, где 1 – растворимый папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

Коллаген (отношение предпочитаемых и избегаемых связей составляет 84.3), амилаза (101.0), яичный альбумин (87.0) и каталаза (126.0) оказа-

лись наиболее предпочтительными субстратами для гидролиза растворимым бромелином. Средние (из измеренных нами) значения активности бромелина, свободного и сорбированного на хитозане, обнаруживаются по отношению к липазе (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 49.5), казеину молока по Hammerstein (54.0), фосфатазе (47.5), сывороточному альбумину человека (39.4). Минимальная каталитическая способность нативного и иммобилизованного на матрицах хитозана бромелина выявлена по отношению к цитохрому с (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 32.0), казеину молока (54.0), бычьему сывороточному альбумину (31.0) и гемоглобину (28.5) (рис. 3, табл. 1).

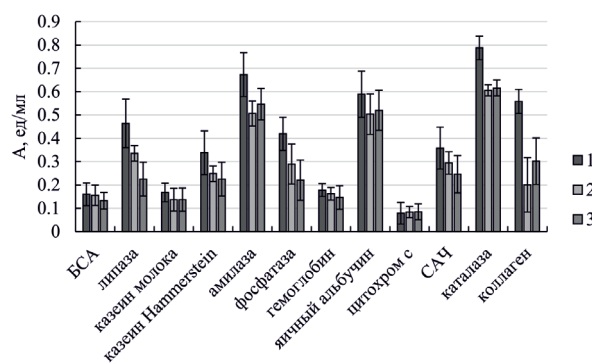


Рис. 3. Субстратная специфичность бромелина по отношению к различным белкам, где 1 – растворимый бромелин, 2 – бромелин, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане, 3 – бромелин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

На всех графиках наблюдается значительная разница в активности растительных протеаз по отношению к казеину молока и казеину молока по Hammerstein. Это связано с тем, что казеин молока хуже растворяется в буферных растворах по сравнению с модифицированным казеином молока по Hammerstein.

Анализируя данные рисунков и таблицы, можно сделать вывод о том, что уровень активности по отношению к тому или иному субстрату связан с соотношением предпочитаемых для гидролиза и избегаемых пептидных связей. Чем выше процентное содержание предпочитаемых и ниже количество избегаемых связей в субстрате, тем выше активность фермента по отношению к нему. Снижение каталитической способности иммобилизованных ферментов по сравнению со свободными, вероятно, связано со стерическими ограничениями доступа высокомолекулярных

субстратов (белков) к активному центру цистеиновых протеаз, обусловленными матрицей хитозана.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Domsalla A., Melzig M. // *Planta Medica*. 2008. Vol. 74(07). P. 699-711.
2. Liggieri C., Arribère M.C., Trejo S.A., Canals F., Avilés F.X., Priolo N.S. // *Protein J.* 2004. Vol. 23. P. 403-411.
3. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. // *The Plant Journal*. 2003. Vol. 37(3). P. 370-378.
4. Patel B.K., Jagannadham M.V. // *J Agric Food Chem.* 2003. Vol. 51. P. 6326-6334.
5. Stepek G., Behnke J.M., Buttle D.J., Duce I.R. // *Trends Parasitol.* 2004. Vol. 20. P. 322-327.
6. Stepek G., Buttle D.J., Duce I.R., Lowe A., Behnke J.M. // *Parasitology*. 2005. Vol. 130. P. 203-211.
7. Stepek G., Lowe A.E., Buttle D.J., Duce I.R., Behnke J.M. // *Parasitology*. 2007. Vol. 134. P. 103-112.
8. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O. L., Berenguer-Murcia Á., Fernández-Lafuente R. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 162. P. 394-404.
9. Мосолов В.В., Протеолитические ферменты. Москва, Наука, 1971, 404 с.
10. Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., Secundo F., Fernandez-Lafuente R. // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018. Vol. 17, P. 412-436.
11. Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suarez J.C., Yada R.Y. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018. Vol. 58, P. 2147-2163.
12. Feijoo-Siota L., Villa T.G. // *Food Bioprocess Technol.* 2011. Vol. 4. P. 1066-1088.
13. Zare H., Moosavi-Movahedia A.A., Salamia M., Mirzaei M., Sabourya A.A., Sheibanid N., Moosavi-Movahedi A.A., Salami M., Mirzaei M., Sabourya A.A., Sheibani N. // *Phytochemistry*. 2013. Vol. 87. P. 16-22.
14. Domsalla A., Melzig M.F. // *Planta Med.* 2008. Vol. 74. P. 699-711.
15. Sheldon R.A., van Pelt S. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42. P. 6223-6235.
16. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Y., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2019. Vol. 201. P. 111681-111688.
17. Filippova I.Y., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 143(2). P. 293-297.
18. Abachi S., Bazinet L., Beaulieu L. // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17(11). P. 613-651.
19. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 98(17). P. 7283-7297.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 19. P. 265-275.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

**Королева В. А., ассистент кафедры биологии
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru*

*Воронежский государственный университет
Холявка М. Г., доктор биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет*

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

*Voronezh State Medical University N.N. Burdenko
*Koroleva V. A., Assistant Professor, of
Department of Biology*

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

*Voronezh State University
Holyavka M. G., PhD., DSci. Associate Professor
Biophysics and Biotechnology Department, Full
Professor of Physics Department, Sevastopol State
University, E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Artyukhov V.G., PhD., DSci., Full Professor, Head
of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

ESTIMATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF PLANT CYSTEINE PROTEASES, FREE AND IMMOBILIZED ON THE CHITOSAN MATRIX

V. A. Koroleva¹, M. G. Holyavka^{2,3}, V. G. Artyukhov²

¹Voronezh State Medical University after N.N. Burdenko

²Voronezh State University

³Sevastopol State University

Abstract. Many plants contain latex, which is released when the leaves are damaged. A number of proteins and enzymes, including proteases, are found in latex. Latex protects plant organs from predators, parasites or pathogens. To understand the complete picture of the action mechanisms of cysteine proteases in a plant organism, it is necessary to study their substrate specificity. Plant cysteine proteases play an important role in intracellular and extracellular processes, such as fruit development and ripening, breakdown of storage protein in germinated seeds, activation of proenzymes, and hydrolysis of defective proteins. In addition to their important physiological role, cysteine proteases are widely used in the food industry, biotechnology, and other industries due to their ability to be active over a wide range of temperatures and pH values. In addition, they are used in the pharmaceutical industry for the manufacture of medicines.

In this work, we analyzed the substrate specificity of ficin, papain, and bromelain in relation to bovine serum albumin (BSA), lipase, milk casein, milk casein of Hammerstein, amylase, phosphatase, human hemoglobin, ovalbumin, cytochrome c, human serum albumin, catalase, collagen.

It has been shown that the most preferred substrates for ficin are phosphatase, amylase, ovalbumin and collagen; it hydrolyzes cytochrome c, human serum albumin and milk casein at the lowest rate. It was found that papain is the most active in relation to collagen and cytochrome c, the enzyme exhibits the least catalytic ability in relation to milk casein, ovalbumin, amylase and human hemoglobin. Bromelain hydrolyzes amylase, catalase, ovalbumin and collagen at a high rate; enzyme activity is minimal with such substrates: cytochrome c, milk casein, bovine serum albumin and human hemoglobin. A decrease in the catalytic ability of immobilized enzymes compared to free enzymes was observed, probably due to the steric restrictions on the access of high-molecular substrates (proteins) to the active center of cysteine proteases caused by the chitosan matrix.

Keywords: ficin, papain, bromelain, chitosan, immobilization, substrate specificity

REFERENCES

1. Domsalla A., Melzig M., *Planta Medica*, 2008, Vol. 74(07), pp. 699-711.
2. Liggieri C., Arribere M.C., Trejo S.A., Canals F., Avilés F.X., Priolo N.S. *Protein J*, 2004; Vol. 23, pp. 403-411.
3. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K., *The Plant Journal*, 2003, Vol. 37(3), pp. 370-378.
4. Patel B.K., Jagannadham M.V., *J Agric Food Chem*, 2003, Vol. 51, pp. 6326-6334.
5. Stepek G., Behnke J.M., Buttle D.J., Duce I.R., *Trends Parasitol*, 2004, Vol. 20, 322-327.
6. Stepek G., Buttle D.J., Duce I.R., Lowe A., Behnke J.M., *Parasitology*, 2005, Vol. 130, pp. 203-211.
7. Stepek G., Lowe A.E., Buttle D.J., Duce I.R., Behnke J.M., *Parasitology*, 2007, Vol. 134, pp. 103-112.
8. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O. L., Berenguer-Murcia Á., Fernández-Lafuente R., *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, Vol. 162, pp. 394-404.
9. Mosolov V.V., *Proteoliticheskie fermenty*. Moskva, Nauka, 1971, 404 s.
10. Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., Secundo F., Fernandez-Lafuente R., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2018, Vol. 17, pp. 412-436.
11. Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suarez J.C., Yada R.Y., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2018, Vol.58, pp. 2147-2163.
12. Feijoo-Siota L., Villa T.G., *Food Bioprocess Technol*, 2011, Vol. 4 pp. 1066-1088.
13. Zare H., Moosavi-Movahedia A.A., Salamia M., Mirzaei M., Sabourya A.A., Sheibanid N., Moosavi-Movahedi A.A., Salami M., Mirzaei M., Saboury A.A., Sheibani N., *Phytochemistry*, 2013, Vol. 87, pp. 16-22.
14. Domsalla A., Melzig M.F., *Planta Med*, 2008, Vol. 74, pp. 699-711.
15. Sheldon R.A., van Pelt S., *Chem. Soc. Rev.*, 2013, Vol. 42, pp. 6223-6235.

16. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Y., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V., J. Photochem. Photobiol. B Biol., 2019, Vol. 201, pp. 111681-111688.

17. Filippova, I.Y., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M., Anal. Biochem., 1984, Vol. 143(2), 293-297.

18. Abachi S., Bazinet L., Beaulieu L. Marine Drugs 2019, Vol. 17(11), 613-651.

19. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 201498(17), pp. 7283-7297.

20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., J. Biol. Chem., 1951 Vol. 19, pp. 265-275.