

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 18, set/97, p.1-10

DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PROTEÍNA EM ESTADO SÓLIDO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Rubens Bernardes Filho^{1,2}
Lucimara Aparecida Forato²
Luiz Alberto Colnago¹

Nesta última década a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared - FTIR) tem sido largamente usada para determinar as ESP (Estruturas Secundárias de Proteínas), como alternativa ao método de dicroísmo circular (circular dichroism - CD) (1-12). A maioria dos espectros de FTIR eram obtidos a partir de amostras em solução aquosa, D₂O, solventes orgânicos e membranas. Nestas condições o espectro de FTIR sofre grande influência do solvente (1-5). O espectro de proteína é obtido somente após a subtração do espectro do tipo de solvente utilizado. Esse procedimento de extração pode introduzir distorções espectrais desde que a concentração de solvente é várias ordens de magnitude maior do que a da proteína (5,6). Em solução aquosa a situação é bastante crítica pois o sinal da água sobrepõe fortemente a banda de amida I (1700-1600 cm⁻¹), que contém a maior quantidade de informação sobre as estruturas secundárias. O processo de subtração deve ser realizado cautelosamente para evitar distorções espectrais (8). Um modo de reduzir esses problemas tem sido o uso de filmes hidratados em dispositivo de ATR (Attenuated Total Reflectance) (6,9). Estes problemas podem ser completamente eliminados usando outras formas de preparação de amostra como filmes secos, dispersão de pó sobre janelas ou pastilhas de KBr (5,7,10-12). Estas técnicas são raramente usadas, pois, na maioria dos casos a proteína tem que ser liofilizada e submetida à pressão, durante o processo de pastilhamento, (com KBr) o que pode desnaturalizá-la.

O efeito de liofilização em proteínas tem sido interpretado como uma redução da atividade ou inativação das mesmas enzimas. A redução da atividade ou inativação pode ser explicada pela aglutinação (reduzindo a solubilidade e área de superfície) ou mesmo por pequenas mudanças na estrutura terciária e quaternária. (11).

¹ Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Instrumentação Agropecuária
² Aluno de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos - USP

CT/18, CNPDIA, set/97, p.2

A influência da liofilização na estrutura secundária da proteína tem sido motivo de vários estudos e controvérsias (7,10-15). O principal problema é a limitação nos de alta resolução para o estudo desse problema. A difração de raios X, método mais preciso, não pode ser usada nesse caso pois as proteínas são amorfas. Os métodos físicos usados para avaliar a estrutura de proteínas amorfas são a ressonância de spin eletrônico (electron spin resonance - ESR), dicroísmo circular (CD) e FTIR.

A ESR é uma das técnicas mais utilizadas para estudar desidratação de proteínas(14-15). Os espectros de ESR de lisozimas marcada com duas sondas de spin não apresentaram alterações em função do nível de hidratação (15). Os espectros de ESR do Fe (III) da hemoglobina apresentaram grandes modificações em função do nível de hidratação, isso foi interpretado como uma ruptura da ligação de histidina com o átomo de ferro, implicando que o processo de hidratação induz deslocamento e torção da hélice. Como se vê, uma pequena mudança é suficiente para explicar os resultados de ESR e não é necessário que uma mudança drástica ocorra nas proporções das ESP (14).

As estruturas secundárias de proteínas em filme sólido foram estudadas com a técnica de CD (13). Os espectros de CD da mioglobina, ribonuclease A e concancavalina A, em solução e filme são similares não indicando mudanças nas ESP. Os espectros de FTIR mostram grandes diferenças entre espectros de proteínas em solução e estado sólido (7,10-12). Como pode-se ver a seguir, essas diferenças são suposta por vários autores como mudança nas estruturas secundárias.

Em vários trabalhos (3, 5, 10-12) as diferenças nos espectros da banda de amida I em estado sólido e em solução são associados às mudanças conformacionais nas proteínas, sendo usado os métodos da segunda derivada ou deconvolução de Fourier (FSD) para quantificação. É bem conhecido o fato de que a quantificação baseada em métodos de redução de largura de linha são bem conhecidos (segunda derivada e deconvolução de Fourier (FSD)) é altamente dependente das larguras de linha e que as atribuições das bandas às ESP não são bem conhecidas mesmo em solução. Embora essas técnicas não sejam indicadas para estudar esse tipo de problema uma vez que fatores como deslocamento de banda devido à pequenas variações nas ligações de hidrogênio ou solvatação de C=O poderiam explicar diferenças espectrais observadas em solução e estado sólido, sem mudanças drásticas nas proporções das ESP.

Para investigar se a diferença entre os espectros em estado sólido e solução é devido à mudanças nas ESP ou à sensibilidade da técnica de FTIR ao ambiente da amostra, analisou-se as ESP de 13 proteínas em pastilhas de KBr com métodos de reconhecimento de padrões.

Os métodos de reconhecimento de padrões tem sido usados para quantificar as ESP de proteínas em solução como uma alternativa aos métodos de aumento de resolução(1,2,5). Os métodos de reconhecimento de padrões usam decomposição de valor singular, análise de fator, análise de mínimos quadrados e outros métodos estatísticos para obter uma matriz de calibração dos espectros de FTIR e suas respectivas proporções de ESP determinadas a partir de dados de raios X (2,9,16,18-22).

CT/18, CNPDIA, set/97, p.3

As vantagens desses métodos sobre os de aumento de resolução é que não dependem da atribuição das bandas às diferentes ESP, eles são menos sensíveis ao ruído e vapor de água, dependem somente da correlação dos espectros de FTIR das proteínas e suas ES (1,2,16,18-22).

As proteínas utilizadas no experimento foram adquiridas da Sigma Chemical são elas: Concanavalina A (semente de jaca, Sigma C-2010), tripsinogênio (pâncreas bovino, Sigma T-1143), -quimotripsina (Bos taurus, Sigma 7762, lisozima (clara de ovo de galinha, Sigma L-6876), inibidor de tripsina (semente de soja, Sigma T-90003), papaína (látex de papaia, Sigma P-4762), citocromo c (coração eqüino, Sigma c-7782), ribonuclease A (pâncreas bovino, Sigma I-5500), -lactalbumina (leite humano, Sigma L-7269), tripsina (pâncreas suíno, Sigma T-0134), elastase (pâncreas suíno, Sigma E-0258) e álcool desidrogenase (fígado eqüino, Sigma A-6128). Estas proteínas não sofreram qualquer purificação ou desidratação adicional. As amostras foram preparadas triturando-se em almofariz 1 mg de proteína e 100 mg de KBr, a seguir sofreram pressão de 10 tons por 1 minuto, para a formação de pastilha.

Todos os espectros de infravermelho foram obtidos num espetrômetro de FTIR da Perkin Elmer, modelo Paragon 1000, o sistema foi purgado com nitrogênio super-seco durante todo o processo de aquisição dos espectros. Estes foram coletados como média de 64 interferogramas e a resolução espectral usada foi de 4 cm⁻¹ na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹.

Os espectros sofreram correção de linha de base pela subtração de uma linha reta entre 2100 e 900 cm⁻¹. No processo de normalização o valor da absorbância cada espectro, na faixa de 1800 a 1200 cm⁻¹ foi dividindo pela soma dos valores de absorbância na mesma região. Os espectros foram formatados em 3 matrizes independentes com os valores de absorbância de 1800 a 1200 cm⁻¹ (301 x 13); de 1800 a 1400 cm⁻¹ (201 x 13) e 1800 a 1600 cm⁻¹ (101x 13).

O método de reconhecimento de padrões usado para quantificar as ESP foi a decomposição de valor singular (SVD) discutida por outros autores (18). Utilizou-se a notação de Sarver & Kruger (16) onde R, são os espectros de IV; F as proporções das ESP; X, a matriz de calibração, calculada pela equação 3 e B, os espectros reconstruídos das estruturas secundárias puras, calculados pela equação 4 (16).

Todos os cálculos foram realizados no Matlab (Math Works Inc. 1994, Natick, Mass.). As proporções das ESP obtidas dos dados de raios X foram obtidas pelo método de Levitt e Greer (19,22) ou calculadas pelo algoritmo de Kabsch & Sander Melhorado (Secondary structure calculation program - by David Keith Smith, 1989 for VAX/VMS) a partir dos dados fornecidos pelo Brookhaven Protein Data Bank (PDB).

Como exemplo, a figura 1 mostra um espectro típico de FTIR para uma proteína liofilizada (tripsinogênio) em pastilha de KBr sem qualquer interferência do solvente. As principais bandas de proteínas são as de amida A, I, II e III.

CT/18, CNPDIA, set/97, p.4

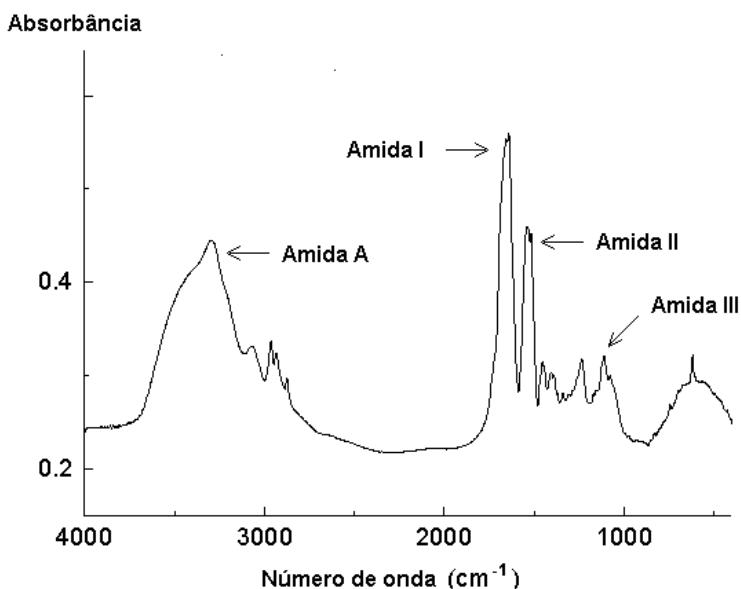


Figura 1- Espectro de FTIR do tripsinogênio liofilizado em pastilha de KBr.

Na figura 2 são apresentados os espectros da região da banda de amida I para a insulina (rica em hélice - "-helix") e para a concanavalina A (rica em folha - "-sheet") mostrando características similares observadas para essas proteínas em solução (19). A banda para a insulina é simétrica e centrada em 1656 cm^{-1} indicando seu alto conteúdo de hélice e para a concanavalina A o sinal tem pico mais intenso na região de 1620 e 1640 cm^{-1} indicando predominância de estrutura b nessa proteína . A principal diferença observada nesses espectros quando comparados àqueles em solução é a maior largura de linha com o sinal e estendendo para além de 1700 cm^{-1} . Essa diferença é mais facilmente observada nos espectros de segunda derivada e FSD e foram usados por vários autores para avaliar a desnaturação de várias proteínas (1, 10-12).

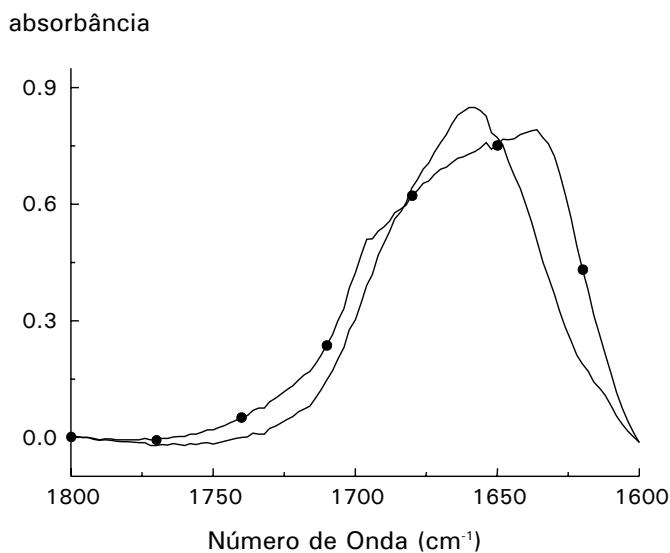


Figura 2 - Espectro de FTIR da Insulina (-) e concanavalina (●) na região da amida I

CT/18, CNPDIA, set/97, p.5

No lugar de usar métodos de aumento de resolução para verificar a correlação entre os espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr e as ESP calculadas dos dados de raios X como outros autores, utilizou-se métodos de reconhecimento de padrões. As vantagens do métodos de reconhecimento de padrões sobre os de aumento de resolução são: não requererem atribuição dos picos às ESP (existem controvérsias quanto a essas atribuições mesmo para espectros em solução e não são bem investigadas em amostras em estado sólido), não há necessidade de melhorar a resolução espectral evitando-se possíveis distorções tanto na área como na intensidade e, ainda, o ajuste das bandas individuais para formas de banda específicas se torna desnecessário (1-2,11,12,18,20-22). Os métodos de reconhecimento de padrões usam um grupo de espectros de FTIR de proteínas e as quantidades das ESP determinadas por métodos cristalográfico a para calcular a matriz de calibração. Com a matriz de calibração é possível calcular as proporções das ESP dos seus espectros.

Dentre os métodos de reconhecimento de padrões usou-se a decomposição de valor singular (SVD) pois há uma publicação (18) com dados espetrais de FTIR em solução, proporções das ESP determinadas por raios X e as ESP obtidas com dados de FTIR (18). Desse modo correlacionou-se os resultados obtidos em estado sólido com os de solução.

Para usar o método de SVD, considere o espetro de FTIR de cada proteína (R) como uma combinação linear dos espetros das ESP puras (B) contra suas concentrações (F), determinadas por cristalografia.

$$R = BF \quad (1)$$

Portanto as concentrações das ESP de qualquer proteína de estrutura desconhecida podem ser calculadas de seus espetros conhecendo-se matriz X que ajusta os dados de FTIR (R) às concentrações (F).

$$F = XR \quad (2)$$

Desde que a matriz X não é conhecida para os espetros em pastilhas de KBr é necessário calcular a mesma a partir de um número de espetros de FTIR de proteínas, R , e suas respectivas concentrações de ESP calculadas a partir de dados cristalográficos F . Para realizar isso usou-se a teoria de decomposição de valor singular que reduz a dimensão da matriz em nível consistente com a informação contida na mesma, bem como para calcular sua inversa (18).

Onde:

$$R = USV^T \quad (3)$$

S é uma matriz diagonal com valores singulares na diagonal e zeros fora da diagonal; U uma matriz ortogonal de autovetores nas linhas da matriz e V , uma matriz ortogonal de coeficientes (19).

Desse modo,

CT/18, CNPDIA, set/97, p.6

$$X = F(VS^{-1}UT) \quad (4)$$

onde $(VS^{-1}UT)$ é inversa da matriz R.

Para calcular a matriz X, foram usados 13 espectros de proteínas, matriz R (101 valores de absorbância para as 13 proteínas na região de 1800 a 1600 cm⁻¹, por exemplo) e as respectivas concentrações das ESP, e a matriz F (4x13) calculada dos dados cristalográficos (tabela 1).

Tabela 1 - Matriz F contendo as concentrações de para: α-hélice, folha-β, volta-β (β-turn) e estruturas desordenadas calculadas a partir de dados cristalográficos usando algoritmos de Levitt & Greer (19,23) e Kabsch & Sander.

Proporções de Estruturas secundárias (%)				
proteína	hélice-α	folha-β	volta-β	desordenada
tripsina	9	44	24	23
alcool dehidr.	29	40	19	12
citocromo c	49	11	22	18
concanavalina A	3	65	22	10
elastase	10	46	28	16
inibidor de tripsina	26	45	16	13
insulina	61	15	12	12
α lactalbumina	56	14	24	6
lisozima	46	19	23	11
papaína	28	29	18	25
α quimotripsina	11	50	25	14
ribonuclease A	23	46	21	10
tripsinogênio	6	38	27	29

Após calcular os valores da matriz X, é possível obter as concentrações das ESP das proteínas desconhecidas (F) pelo produto de seu espectro com a matriz X (equação 1). Desse modo calculou-se as concentrações das ESP para cada proteína da matriz R. Para isso excluiu-se a proteína analisada da matriz de dados usada no cálculo da matriz X (validação cruzada).

A tabela 2 mostra os resultados da validação cruzada para as proteínas usando a região da amida I.

A matriz de calibração (X) foi obtida e as concentrações foram calculadas para as quatro ESP (α hélice, folhas β, voltas β e outras estruturas como Sarver e Kruger (18) da região de 1800-1200 cm⁻¹ (bandas de amida I, II e III), 1800-1400 cm⁻¹ (bandas de amida I e II) e de 1800-1600 cm⁻¹ (banda de amida I). Realizou-se uma avaliação até 1800 cm⁻¹ no lugar de 1700 cm⁻¹ como em solução, pois a banda de amida I em estado sólido vai até aproximadamente 1800 cm⁻¹ (figura 2).

CT/18, CNPDIA, set/97, p.7

Tabela 2: Proporções obtidas usando método de validação cruzada.

Proporções de Estruturas secundárias (%)				
proteína	hélice- α	folha- β	volta- β	desordenada
trypsinase	20	42	23	14
alcool dehidr.	19	42	22	17
citocromo c	46	18	18	12
concanavalina A	0	57	27	19
elastase	20	41	22	14
inibidor de tripsinase	16	47	25	17
insulina	53	3	28	22
α lactalbumina	48	25	19	14
lisozima	40	31	16	18
papaína	36	31	20	8
α quimotripsinase	6	53	23	20
ribonuclease A	32	29	19	17
tripsinogênio	16	50	21	16

A tabela 3 mostra as correlações entre as ESP calculadas a partir dos dados de FTIR. A tabela 3 mostra as correlações entre as ESP calculadas a partir das correlações as ESP calculadas utilizando as regiões da amida I, II e III do espectro de FTIR e os cálculos das ESP a partir dos dados de raios-X.

Tabela 3 - Correlações obtidas utilizando o método de validação cruzada na matrix de dados

Região (cm^{-1})	hélice- α	folha- β	volta- β	desordenada
1800-1200	0.67	0.73	-0.40	-0.63
1800-1400	0.71	0.77	-0.52	-0.69
1800-1600	0.90	0.84	-0.44	-0.51

A tabela 3 mostra que a correlação para α hélice e folhas β melhora com a redução da região que está sendo analisada. A correlação é melhor sem as bandas de amida II e III. Esses resultados têm sido também observados em solução (18-19). As voltas β e outras estruturas têm fraca influência para todas as regiões. essas correções negativas para voltas β e outras estruturas não são observadas em solução (18).

A informação de maior relevância nessa tabela é a indicação da correlação da α -hélice e folhas- β para os espectros de proteínas em KBr e que são da mesma ordem de magnitude que os espectros em solução (16-18,22). Isso é uma forte indicação que essas 13 proteínas têm suas ESP mantidas em "dried state" esse resultado não confere com o obtido com métodos de aumento de resolução (7,11,14).

Outra informação importante sobre os espectros de FTIR de proteínas em KBr são o gráfico da matriz X e os espectros reconstruídos das ESP puras (figura 4). Comparando-se os dados da matriz X (figura 3) com aqueles obtidos em

CT/18, CNPDIA, set/97, p.8

solução 918), é possível ver uma grande diferença entre eles. As oscilações periódicas na figura 3 têm 5 picos e 5 áreas nodais contra e 3 e 4 para solução (18). Os picos e nodos estão, também, ocorrendo em números de onda diferentes.

Isso é uma forte indicação que as absorbâncias das amostras liofilizadas ("dried state") não estão ocorrendo nos mesmos números de onda que em solução como proposto por Dong et al (12).

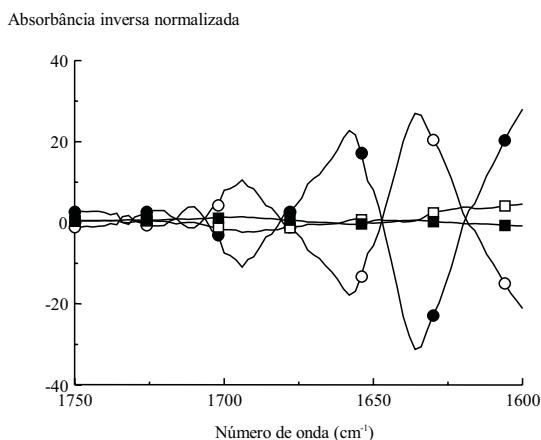


Figura 3 - Espectro inverso para região da amida I (matrix X) para as quatro estruturas

(● → α -hélice, ○ → folha-β, □ → volta β, ■ → desordenadas)

Isso é confirmado pelos espectros das ESP puras (figura 4). Os espectros das ESP puras (B) foram calculados aplicando a teoria SVD à equação 1, com a decomposição da matriz F (dados da matriz de raios X).

$$B = R(VS^{-1}V^T) \quad (5)$$

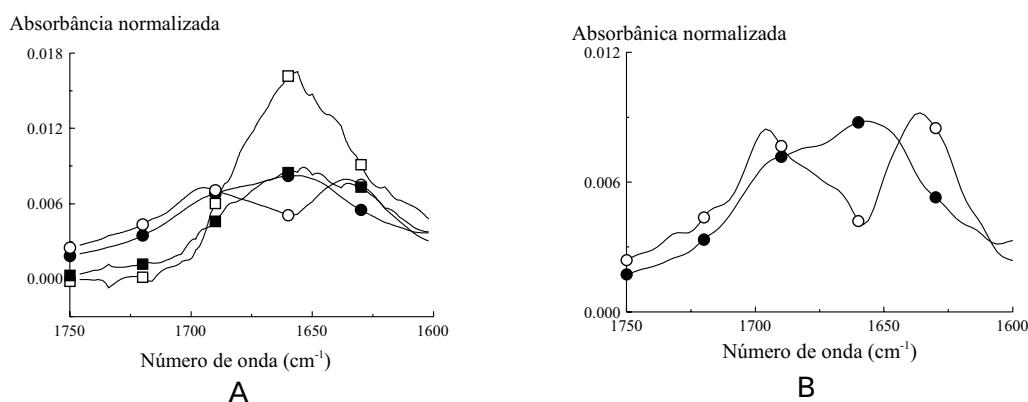


Figura 4. A) banda de amida I reconstruída a partir dos quatro autovalores mais importantes (matriz B) para as quatro estruturas secundárias (●, hélice-α; ○, folha-β; □, volta-β; ■, desordenada); B) banda de amida I com aumento de resolução resultado da reconstrução utilizando os dois autovalores mais importantes (matriz B) (●, hélice-β; ○, folha-β). O espectro (R) foi processado com a função de Kauppinen et al (23) antes do cálculo da matriz B (equação 4).

CT/18, CNPDIA, set/97, p.9

Quando os espectros da figura 4A são comparados aos espectros das ESP puras em solução, (18) algumas diferenças são observadas. O espectro da α -hélice é mais larga do que aquele em solução e tem um pico em torno de 1656 cm^{-1} e um ombro em 1695 cm^{-1} . Esse ombro é mais evidente em espectros deconvoluídos (figura 4B). Essa figura é o espectro com aumento de resolução usando a função de Kauppinen et al (24) com $L=0,1$ e largura de linha de 8 cm^{-1} .

A presença de mais de um sinal no espectro de alfa hélice não tem sido observada em proteínas globulares em solução (91-5, 16-19).

O espectro de folha beta (figura 4a) mostra 2 picos com intensidades similares em 1637 e 1696 cm^{-1} . O pico em torno de 1637 cm^{-1} é facilmente visível em solução mas o pico em número de onda superior não é bem definido e possui intensidade pequena. No espectro com aumento de resolução (figura 4b) existe outro ombro em torno de 1679 cm^{-1} .

O espectro das voltas β e outras estruturas não foram similares aos em solução como as alfa hélice e as folhas beta.

A presença de mais de um pico para alfa hélice e folhas beta é uma forte indicação que a atribuição em solução não pode ser usada em espectros em estado sólido, como sugerido por Dong et al, 1995 (12). Os resultados obtidos neste trabalho também demonstraram que as proteínas em pastilhas de KBr, ao menos para este grupo de proteínas, têm sua estrutura secundária mantida. Esse resultado está de acordo com os de CD (13) que mostram pequenas diferenças espectrais para algumas proteínas em solução e estado sólido. As diferenças observadas nos espectros em estado sólido e em solução e melhorados por aumento de resolução (1,12) são certamente devido aos deslocamentos de banda e diferenças nas larguras de linha observadas em ambos ambientes. Sendo assim, essas diferenças não podem ser relacionadas diretamente à mudanças conformacionais em estado sólido.

A principal conclusão deste trabalho foi que as proteínas em pastilhas de KBr, pelo menos com esse grupo de proteínas, têm suas estruturas secundárias mantidas em oposição aos resultados obtidos por métodos de aumento de resolução (7,10-12). Portanto o uso de matriz de KBr e métodos de reconhecimento de padrões podem ser usados em análise das ESP uma vez que não requerem um especialista para obter resultados confiáveis. A pastilha de KBr é mais fácil de preparar e não é necessário subtrair o sinal do solvente como em solução. Para obter as proporções das ESP é necessário usar uma matriz de calibração, X, e multiplicar o espectro da proteína desconhecida para obter as proporções das ESP. Para usar a matriz de dados deste trabalho (a matriz está disponível na "world wide web" via ftp "anonymous" em <ftp://cnpdia.embrapa.br/pub/SVDMATRIX/xmatrix.asc>) deve-se ter cautela com as condições experimentais. O espectro deve ser adquirido usando as mesmas condições, resolução de 4 cm^{-1} de 2100 a 900 cm^{-1} , normalização e mesma região espectral de X (1800 - 1600 cm^{-1}).

A análise por FTIR de estruturas secundárias de proteínas em estado sólido é o melhor modo de estudar proteínas insolúveis em água, como proteínas fibrosas e de reserva de cereais do que uma solubilização em solventes orgânicos ou por digestão parcial. A FTIR também pode ser uma ferramenta útil para estudar filmes

CT/18, CNPDIA, set/97, p.10

finos que tem sido estudados para preparar novos materiais para eletrônica molecular, sensores etc (26).

Referências Bibliográficas

- MANTSCH, H.H., CHAPMAN, D. (1995) *Infrared Spectroscopy of Biomolecules.*, John Wiley & Sons, New York.
- SUREWICZ, W.K, MANTSCH, H.H, CHAPMAN D. (1992) *Biochemistry* **32**, 289-394.
- HARIS, P.I, CHAPMAN, D. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 328-333.
- PARVEZ, H.I., CHAPMAN,D. (1995) *Biopolymers* **37**, 251-253.
- JACKSON, M., MANTSCH, H.H. (1995) *Critical Review Biochem. Mol. Biol.* **30**, 95-120.
- de JONGH, H.H.J., GOORMAGHTIGH,E. RUYSSCHAERT, J.M. (1996) *Anal. Biochem.* **242**, 95-103.
- DONG, A., MATSURA, J. ALLISON, S.D., CHRISMAN, E., MANNING, M.C., CARPENTER, J.F. (1996) *Biochemistry* **35**, 1450-1457.
- DOUSSEAU, F., THERRIEN,M. PÊZOLET, M. (1989), *Appl. Spectrosc.*, **43**, 3, 538-542.
- CABIAUX, V., OBERG, K.A., PANCOSKA, P., WALZ, T., AGRE, P., ENGEL, A. (1997) *Biophys. J.* **73**, 406-417.
- LAMBA, O.L., BORCHMAN, D. SINHA, S.K., SHAH, J., RENUGOPALAKHRISAN, V., YAPPERT, M.C. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 113-123.
- PRESTRELKI, S.J., TEDESCHI, N., ARAKAWA, T., CARPENTER, J.F. (1993) *Biophys. J.* **65**, 661-671.
- DONG, A., PRESTRELKI, S.J., DEAN ALLISON, S., CAPENTER, L.F. (1995) *J. Pharmac. Sci.* **84**, 415-424.
- SAFAR, J., ROLLER, P.P., RUBEN,G.C., GAJDUSEK, C.D. GIBBS, C.J., Jr. (1993) *Biopolymers* **33**, 1461-1476.
- MARTIN NETO, L., TABAK, M., NASCIMENTO, O.R., (1990) *J. Inorg. Biochem.* **40**, 309-321.
- RUPLEY, J.A., CARERI, G. (1991) *Adv. Protein Chem.* **41**, 37-172.
- DOUSSEAU, F., PÊZOLET, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 8771-8779.
- BYLER, D.M, SUSI,H. (1986) *Biopolymers* **25**, 469-487.
- SARVER JR, R.W., KRUEGER, W.C. (1991) *Anal. Biochem.* **199**, 61-67.
- LEE, D.C., HARIS, P.I., CHAPMAN, D., MITCHELL, R.C. (1990) *Biochemistry* **29**, 9285-9293.
- KALNIN, N.N, BAIKALOV, I.A., VENYAMINOV, S.Y. (1990) *Biopolymers* **30**, 1273-1280.
- MILLOT, J.M, ALLAM, N.,MANFAIT.M. (1994) *Anal. Chim. Acta* **295**, 233-241.
- PRIBIÉ, R., STKKUM, H.M., CHAPMAN, D., HARIS, P.I., BLOEMENDAL, M. (1993) *Anal. Bichem.* **214**, 336-378.
- LEVITT, M., GREER, J. (1977) *J. Mol. Biol.* **114**, 181-239.
- KAUPPINEN, J.K, MOFFATT, D.J., MANTSCH, H.H., CAMERON, D.G. (1981) *Anal. Chem.* **53**, 1454-1457.
- MRKSICH, M., WHITESIDES, G.M., (1995) *Trends in Biohecnol.* **13**, 228-234.