

사람중성구 Cathepsin G의 분리와 Anti-Human Cathepsin G Antibody의 in vivo 합성 및 분리

고신대학 의학부 약리학교실

배성준, 김사열, 강구일

Purification of Human Neutrophil Cathepsin G and in vivo Synthesis and Purification of Anti-human Cathepsin G Antibody

Sung Jun Bae, Sa-Youl Ghim, Kooil Kang

Department of Pharmacology

Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea

= Abstract =

Human neutrophil cathepsin G was purified by two step procedure involving ultrogel AcA54 gel filtration and CM-Sephadex ion exchange chromatography. Highly purified human neutrophil cathepsin G was injected to rabbit for in vivo synthesis of anti-human cathepsin G antibodies. For purification of Ab, precipitation by ammonium sulfate, DEAE-cellulose ion exchange chromatography and CNBr-activated sepharose 4B affinity chromatography was applied. Purified Antibodies detected by immunoprecipitation showed specificity against human neutrophil cathepsin G but not human neutrophil elastase.

I. 서론

Polymorphonuclear leukocyte(PMN)의 중요한 기능은 microbial pathogen의 성장을 조절하여 염증반응의 생성과 조절에 관여하는 것을 들 수 있으며¹⁾ 흡입한 병원체를 사멸(killing), 소화(digestion)시키고, 또한 염증소(inflammatory site)에서의 교원질 조직의 파

괴 및 재형성(connective tissue remodeling)에도 관여한다고 알려져 있다²⁾. 이러한 일련의 과정을 수행하는데는 사람중성구의 azurophil granule 내에 존재하는³⁾ serine neutral protease인 elastase와 cathepsin G가 중요한 역할을 한다. 또한 사람의 혈액 내에는 이들 효소에 대한 억제인자가 존재하여서 이들 효소의 과도한 분비에 의한 조직의 파괴를 막는다^{12, 21)}.

Protease와 억제인자 사이의 조화가 깨어진 상황에서는 이들 효소에 의한 교원질 파괴가 과다 증가하여서 여러가지 질병을 야기하게 된다⁹⁾. Cathepsin G는 또한 angiotensinogen과 angiotensin I을 직접적으로 angiotensin II로 변화시킴으로써 고혈압을 유발시키며^{14,20)} myosin을 토막내서 muscle catabolism을 증가시키는데도 관여한다²²⁾. 또한 elastase와 더불어 관절연골의 proteoglycan backbone을 불가역적으로 파괴시켜서 류마티스 관절염을 일으킨다¹³⁾.

Cathepsin G는 이렇게 많은 질병과 관련되어 있고 또한 다양한 기질 즉, casein, azocasein, histone, fibrinogen, hemoglobin, collagen 등에 특이성을 가짐에도 불구하고 elastase나 collagenase에 비해 미진한 연구진척을 보이고 있다. 따라서 cathepsin G에 대한 더욱 많은 연구가 요구되며, 이를 위해서는 순수 cathepsin G의 분리와, 분리된 cathepsin G의 분자 생화학적 연구가 요구됨과 동시에 cathepsin G에 대한 연구도구로써 이 효소에 대한 항체의 생체 내 합성과 분리가 반드시 필요하다. 본 연구에서는 cathepsin G의 순수분리와 이 항원을 이용하여 항체를 in vivo 합성하고 또한 분리한 것을 보고한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

Ultrogel AcA54는 LKB, CM-sephadex, DEAE-cellulose 25, CNBr-activated sepharose 4B,

L-Benzoyl-DL-phenylalanine- β -naphthylamine(BPNE), Fast Garnet GBC base, Brij 35, N-Succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Alanine-p-Nitroanilide(SANA)는 Sigma, Spectrapore dialysis membrane은 Spectramedical사로부터 각각 구입하였다. 그리고 그 밖의 시약도 모두 특급을 사용하였다.

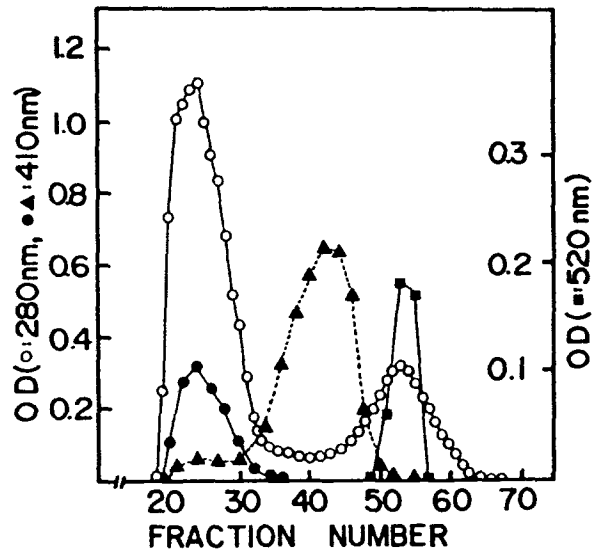


Fig. 1. Gel filtration of human leukocyte extract on Ultrogel AcA 54

The column(2.5 X 90 Cm) was equilibrated with 50mM Tris-Cl(pH 7.3) containing 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂ and 0.1% Brij 35. After sample from leukocyte extract was applied, the column was washed with same buffer at flow rate of 1drop/7sec, and 8ml/fraction were collected (○-○) : protein profile(280nm), (●-●) : haemoglobin profile(410nm), (▲-▲) : elastase activity with SANA(410nm), (■-■) : cathepsin G activity with BPNE(520nm)

2. 실험방법

1) Cathepsin G의 분리

이전의 본교실에서 이용한 방법⁸⁾에 따라서 건강한 공여자로부터 채취한 신선전혈 1, 400ml를 원심분리하여 백혈구 추출물을 얻었으며, ultrogel AcA54 gel filtration에 의해서 일차적으로 cathepsin G를 백혈구 추출물로부터 분리하였다. Ultrogel AcA54로부터 얻어진 cathepsin G 분획을 4°C에서 50mM NaAc, 150mM NaCl, 0.1% Brij를 함유한 buffer(pH 5.4)에 spectrapore 막을 이용하여

충분히 평형(equilibration)시킨 다음, 동일한 buffer로 미리 형평시킨 CM-sephadex column (1.5 X 20Cm)에 주입하였다. Colume부피의 약 2배에 해당하는 동일한 buffer로 비특이적으로 존재하고 있는 단백질을 세척한 후, 0.15M에서 1M까지의 NaCl을 linear gradient로 유출시켰으며, 각 분획은 매 2ml로 나누어 모았다. 각 분획에 대한 elastase와 cathepsin G의 효소활성도를 측정한 후(Fig. 2) cathepsin G의 활성이 높은 분획만을 모았으며 이를 다시 반복하여 ion exchange chromatography를 시행하여 완전히 순수한 cathepsin G로 만들어서 항체분리를 위한 affinity chromatography의 ligand로 이용하였다.

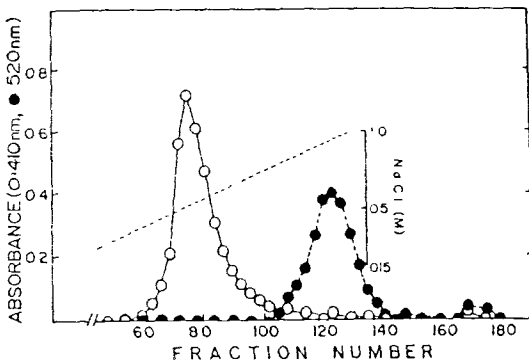


Fig. 2. Ion-exchange chromatography of cathepsin G on CM-sephadex C-25

The column(1.5 X 20 Cm)was equilibrated with 50mM NaAc(pH 5.5) containing 150mM NaCl and 0.1% Brij 35. After concentrated and dialysed sample from ultrogel AcA54 was applied. NaCl gradient(0.15-1M)was started. 2ml of fractions were collected at flow rate of 1drop/20sec. (○-○) elastase activity at 410nm, (●-●) cathepsin G activity at 520nm.(---) linear gradient of NaCl

2) 효소활성도 측정

1. elastase

각 분획을 pH 7.3으로 조절한 후, 0.1ml의

분획을 50mM Tris-Cl, 150mM NaCl로 조절 한 최종부피 0.6ml의 반응용액에 넣고 최종농도 0.3mM이 되도록 SANA를 첨가한 뒤 잘 혼합하여 37℃에서 100분간 반응시킨 후, 410nm에서 흡광도를 읽어 elastase의 효소활성도를 측정했다.

2. cathepsin G

각 분획을 pH 7.3으로 조절한 다음 각 분획 0.1ml를 0.3ml의 반응용액(50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 7.3)에 가한 후 10μl의 substrate stock용액(1mg BPNE/ml DMSO)를 가하여 잘 혼합한 뒤 37℃에서 100분간 반응시키고, 발색시약 0.6ml를 가한 후 2,500rpm에서 5분간 원심분리하여 그 상층액을 취해서 520nm에서 흡광도를 읽어 cathepsin G의 효소활성도를 측정했다.

3) Cathepsin G의 분자량 결정

Ultrogel AcA54 gel filtration과 CM-sephadex ion exchange chromatography에서 얻어진 cathepsin G를 각각 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(Laemmli, 1970)¹⁷에 의해서 분자량을 측정했다.

4) 항체의 분리

1) 면역글로부린의 분리

토끼에 Ultrogel AcA54에서 얻어진 cathepsin G 0.5ml와 Freund's complete adjuvant 0.5ml를 혼합하여 2일 간격으로 4번 복강내 주사한 후, 1주일 간격으로 2번 buster injection했다. 이들 토끼를 ether로 마취시킨 다음 경부절개 후 경동맥(carotid artery)를 통해서 각각의 토기에서 50ml-60ml의 혈액을 채취하였다. 여기서 얻어진 혈액을 실온에서 1시간, 그리고 4℃에서 하룻밤을 방취한 뒤, 4℃에서 2,600rpm의 속도로 30분간 원심분리해서 그 상층액을 취하여 ammonium sulfate로 침전시켰다. 이상에서 얻어진 침전물을 면역 글로부린으로 간주하여 소량의 BBS(Borate Buffered Saline, pH 8.2)로 녹인 후 4℃에서

BBS로 spectrapore 2 막을 통해 투석하여 평형에 도달시킨 후, 다음 사용할 때까지 -20°C 에 냉동 보관하였다.

II) DEAE-Cellulose 25 ion exchange column을 통한 IgG의 분리

상기에서 얻어진 면역 글로부린을 0.01M Phosphate buffer(pH 8.0)에 투석한 후 2ml를 취하여 DEAE-Cellulose 25 ion exchange chromatography column(1 X 20Cm)에 주입하여 column부피의 약 3배에 해당하는 buffer로 비특이적으로 존재하는 단백질을 세척한 후, 0.01M phosphate buffer(pH 8.0)에서부터 0.3M phosphate buffer(pH 5.4)까지 liner gradient를 시행했다. 이후에 column을 원래의 0.01M phosphate buffer(pH 8.0)로 세척했으며 전체 단계중에 각 분획은 7초 당 한방울의 속도로 분획당 3ml로 모았다. 이들 분획을 단백질 농도를 측정하여 단백질의 분포를 확인한 후 특이성있게 분리된 면역 글로부린을 포함한 분획을 모아 다음 실험을 위해 0.5M NaCl을 함유한 0.1M borate buffer에 투석하여 -20°C 에 냉동보관하였다.

III) CNBr-activated sepharose 4B affinity chromatography를 이용한 항체의 분리

1gm의 CNBr-activated sepharose 4B gel bead를 200ml의 1mM HCl에 세척하여 부풀려서 3.5ml의 gel bead를 얻은 후 2번의 연속된 ion exchange chromatography를 통해서 얻어진 순수한 cathepsin G를 Dunn등(1986)⁴⁾의 방법을 응용하여 $100\mu\text{g}$ cathepsin G/ml gel의 비율로 0.5M NaCl을 함유한 0.1M borate buffer(pH 8.2) 하에 ligand로 gel bead에 결합시킨 후 실온에서 2시간 혼합시키고, 0.5M NaCl을 함유하는 0.2M glycine buffer(pH 8.2)로 실온에 1시간 방치했다. 다음 0.5M NaCl을 함유하는 0.1M borate buffer(pH 8.2)와 0.5M NaCl을 함유하는 0.1M acetate buffer(pH 4.0)로 4번을 번갈아 세척하여 잔존하는 ligand를 제거한 후 1mM DiPF solution을 가하여 실온에 1시간 방치하였으며, 광량의

DiPF를 0.5M NaCl을 함유하는 0.1M borate buffer(pH 8.2)로 세척한 후 칼럼(용량 5ml)에 packing하여 4°C 로 온도를 유지했다.

다음으로, DEAE-sepharose 25 ion exchange chromatography에서 얻어진 IgG 2ml를 취하여 affinity column에 주입하여 분획 20까지 0.5M NaCl을 함유하는 0.1M borate buffer(pH 8.2)로 비특이적인 IgG를 세척한 후 분획 40까지 0.5M NaCl을 함유하는 0.1M gly-

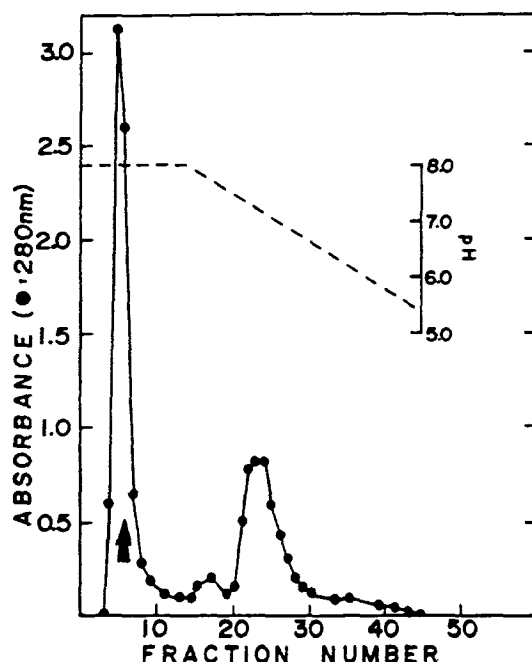


Fig. 3. Ion-exchange chromatography of antihuman-cathepsin G antibody on DEAE-cellulose

The column(1 X 20 Cm)was equilibrated with 0.01M phosphate(pH 8.0) After sample(rabbit Immunoglobulins) was applied, liner gradient(0.01M phosphate, pH8.0 to 0.3M phosphate, pH 5.4) was started (---). 3ml of eluent was collected in each fractions at flow rate of 1drop/7sec.(↑) : IgG,(●-●) : protein profile(280nm)

cine-HCl buffer(pH 2.8)를 유출시켰다. 이때까지의 각 분획은 14초당 1방울의 속도로 0.4ml씩 모았다. 각 분획에서 각각 20ul을 취하여 Bradford방법¹⁾에 의해서 각 IgG를 정량했다.

5)면역침전시험

DEAE-Cellulose 25 ion exchange chromatography에서 얻어진 면역 글로부린 G(IgG)

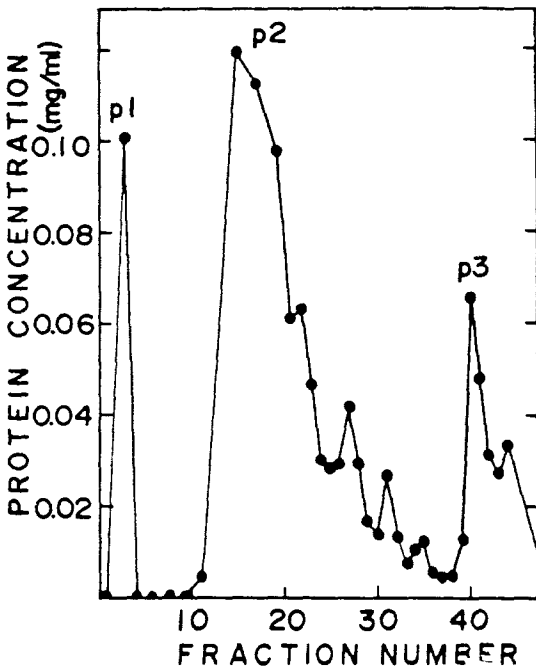


Fig. 4. Affinity chromatography of antihuman cathepsin G antibody on sepharose-cathepsin G

The column(0.3 X 5 Cm) was equilibrated with 0.1M borate(pH 8.0) containing 0.5M NaCl. After sample from DEAE ion-exchange chromatography was applied, column was washed with starting buffer until fraction 20, then eluted with 0.5M NaCl. 0.1M glycine(pH 2.8) 0.4ml of eluent was collected at flow rate of 1drop/14sec

(Fig. 3)와 affinity chromatography에서 얻어진 항체분획중 Fig. 4에 표시된 바와 같이 3개의 peak를 선정하여(Fig. 4 p1, p2, p3)이들을 각각 30 μ l씩 취하여 270 μ l의 생리식염수로 10배 희석한 후 이를 다시 생리식염수로 10,240배까지 희석하였으며 50 μ l의 순수분리된 cathepsin G를 가하여 실온에서 하룻밤 방치하였다. 침전된 항원-항체 복합체를 통해서 595nm에서 흡광도를 읽어 면역 침전의 정도를 측정했다.

III. 결과

1. cathepsin G의 분리

Ultrogel AcA54를 이용하여 WBC extract로부터 분리한 cathepsin G는 Fig. 1에서와 같이 분획의 후반부에서 분리된다. cathepsin G의 분획의 전반부에서 일부의 elastase가 혼합되어 나타나지만 비교적 깨끗한 분리 양상을 보여준다. 더 나은 분리를 얻기 위해서 ultrogel AcA54로부터 얻어진 cathepsin G를 CM-sephadex ion exchange chromatography를 수행한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 0.15M부터 1M까지의 NaCl linear gradient중 elastase는 0.4M NaCl의 유출에서부터 분리되기 시작하며, cathepsin G는 0.75M NaCl 유출로부터 분리되기 시작하여 0.95M NaCl 유출에서 최고 peak를 나타내어 elastase와 완전히 분리된 cathepsin G를 얻었다.

2. Anticathepsin G antibody의 분리

1) DEAE-Cellulose 25 ion exchange chromatography를 이용한 면역 글로부린의 분리

Ultrogel AcA54 gel filtration으로부터 얻어진 cathepsin G를 토끼에 주입하여 얻은 혈액을 ammonium sulfate 침전을 거쳐 헤모글로빈과 알부민 및 ferric acid 등을 제거할 수 있었고, DEAE-Cellulose 25 ion exchange chro-

matography를 통해 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다.

IgG는 pH gradient를 거치기 전인 분획의 첫 peak에 존재하고 있으며^{5,7,23)} 이는 면역 침전법에 의해서 확인되었다.

2) CNBr-activated sepharose 4B affinity chromatography에 의한 항체의 분리

상기한 이온교환법에 의하여 분리된 IgG를 sample로 하여 cathepsin G를 ligend로 붙인 CNBr-activated sephadex 4B affinity chromatography를 수행한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. cathepsin G와 특이적으로 결합하는 항체를 확인하기 위해 세개의 peak(Fig. 4 p1, p2, p3)를 cathepsin G와 반응시켜 면역침전법을 시행한 결과 0.5M NaCl을 함유한 0.1M Glycine-HCl buffer(pH 2.8)로 유출시켜 얻어진 세번째 peak(p3)에 cathepsin G에 대한 항체가 존재함을 알 수 있었다. 0.5M NaCl을 함유한 0.1M borate buffer(pH 8.2)의 세척시에 얻어진 앞쪽 분획의 두 peak(p1, p2)에서는 고려하지 않아도 될 만한 정도의 미세한 침전물이 측정되었다. 면역 침전법을 각 peak를 10배부터 10,240까지 생리식염수로 희석하여 시행한 결과 항원-항체결합은 2,560배 희석된 IgG에서 형성되었다.

IV. 고찰

Cathepsin G에 대한 항체는 cathepsin G와 관련되어 발생하는 여러가지 질병의 진단적 방법을 제공할 수 있을 뿐만 아니라²⁾ 또한 이들 질병을 연구하는 수단으로 중요하기 때문에, 이에 대한 선행단계로써의 cathepsin G에 대한 항체의 합성과 순수분리는 중요한 이정표가 되는 연구단계이며, 이를 위해서는 순수한 cathepsin G의 분리 또한 필수적이다.

여러 실험실에서 비록 cathepsin G의 분자량이 27,000에서 31,000까지 서로 다른 차이를 보이는 결과를 보고 한 바 있으나^{6), 18), 21)}

Fig. 5에서 보이는 것과 같이 분자량이 28,500 29,500 30,500사이의 3개의 밴드(band)를 가지고 있으며, 이는 분자량 31,000에서 33,000 사이에서 3개의 밴드를 나타내는 elastase와는 매우 근소한 차이를 보이는 동일 계통의 neutral protease이다(이것에 대한 세밀한 연구는 별개의 논문에 보고한다). 분자량에 있어서의 elastase와 cathepsin G의 이러한 근소한 차이에 의해서 Ultrogel AcA54에 의한 cathepsin G의 분리는 분획의 전반부에서 일부 elastase와의 혼합을 나타낸다(Fig. 1). 그러나 본 교실에서 사용한 Ultrogel AcA54에 의한 cathepsin G의 분리는 다른 gel bead 즉, sepharose-trasytol, ultrogel AcA44, CM-cellulose, aprotonin-sepharose, sephadex G 100을 사용한 경우^{6, 15, 16)} 보다 더 나은 분리양상을 나타냈다.⁸⁾ CM-sephadex ion exchange chromatography를 통한 2차 분리에서 cathepsin G는 0.95M NaCl 유출시 하나의 peak를 보이면서 elastase와 완전히 분리되어 cathepsin G의 순수한 분리를 할 수 있었으며, 또한 여기에 결과를 보여주지는 않았지만, linear gradient를 이용하지 않고 step gradient로 유출시킴으로써 순수한 cathepsin G를 분리할 수도 있다. 이 방법은 직접 0.5M NaCl을 유출시킴으로써 elastase를 분리시키고, 다음으로 1M NaCl을 유출시킴으로써 cathepsin G를 순수하게 분리시키는 방법으로써 본 교실에서의 연구결과에 의하면 시간과 노력을 절약할 수 있는 장점을 가진다.

CNBr-activated sepharose 4B chromatography에서 얻어진 peak(Fig. 4)를 순수항체와 면역 침전시켜 본 결과 0.1M Glycine-HCl buffer(pH 2.8) 유출 후에 나타난 peak(Fig. 4 p3)에서 가장 강한 침전을 이룬 것을 보면 cathepsin G 항원에 의한 affinity chromatography가 효과적으로 항체를 분리할 수 있음을 보여주었으며 이 때의 항체 희석비율은 약 2,560배인 것으로 보아, 항원-항체복합체 형성 비율은 1mg의 cathepsin G가 1.5×10^{-4} mg의

항체와 결합하여 면역 복합체를 이룸을 알 수 있다. 분획의 앞쪽에서 형성된 peak/p1, p2,는 항원과 약한 면역 침전물을 형성하는데, 이는 affinity column 내에 주입한 면역 글로부린의 과다한량을 주입시킨 결과에서 비롯된 것으로 사료된다.

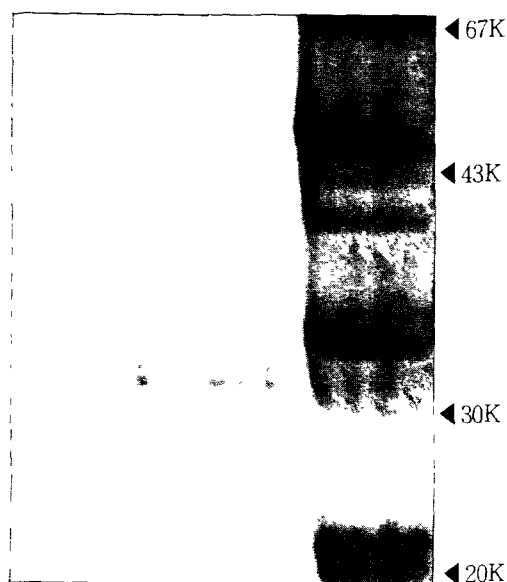


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of human neutrophil cathepsin G

Lane 1 cathepsin G fractions from ultrogel AcA54

Lane 2 cathepsin G Fractions from CM-sephadex C-25

이상의 연구에서 Ultrogel AcA54와 CM-sephadex ion exchange chromatography의 두 단계를 거쳐서 고순도의 cathepsin G를 분리할 수 있었으며, 여기서 얻은 효소를 이용하여 cathepsin G에 대한 항체를 in vivo방법에 의하여 합성하였고, 이 항체를 ammonium sulphate에 의한 침전법, DEAE-ion exchange chromatography, CNBr-activated affinity chromatography를 이용하여 순수하게 분

리할 수 있었다. 이들 항체는 human neutrophil elastase와는 전혀 반응이 없었으며 다만 cathepsin G에 대해서만 특이성있게 침전반응을 보이므로, 이를 이용하여 다음 단계의 연구에 대한 중요한 기여를 기대한다.

REFERENCES

1. Bradford MM : A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem 72 : 284, 1976.
2. Crocker J. Jenkins R Burnett D : Immunohistochemical localization of cathepsin G in human tissues Amer J Surg Patho 9 : 338, 1985.
3. Dewald B. Rindler-Ludwig R Bretz U Baggioni M : Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocyte J Exp Med 141 : 702, 1975.
4. Dunn TL Black WD. Koopman WJ. Heck LW : Solid-Phase radioimmunoassay for human neutrophil elastase : a sensitive method for determining secreted and cell associated enzyme Anal Biochem 150 : 15-18, 1986.
5. Garvey JS Cremen NE. Sussdorf DH : Method in immunology 3rd ed London Benjamin Inc 1987, pp 218-219.
6. Heck LW. Rostand KS Hunter FA Bhowm A : Isolation, characterization, and amino-terminal amino acid sequence analysis of human neutrophil cathepsin G from normal donors Anal biochem 158 : 217-227, 1986.
7. Johnstone A Thorpe A : Immunochemistry in practice 2nd ed Oxford. Blackwell scientific publication 1987, pp30-33
8. Jung HY Ghim SY Kang K : Purification of human neutrophil granular pro-

- teases by liquid chromatography, *J of Kosin Med Col* 3 : 9, 1987.
9. Kang K : The role of neutral proteinases in cellular invasion *J of Kosin Med Col* 2 : 187, 1986.
10. Laennli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680, 1970.
11. Lisiewicz J : Human neutrophils. Bowie MD, Charles, 1980.
12. Marko DV, Davril M, Laime A, Hayem A : Interaction of human alpha 1-proteinases inhibitor with human leukocyte cathepsin G. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 336 : 665, 1985.
13. Oronsky AI, Buerman CW : Granulocyte neutral proteases in arthritis In : Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocyte Havemann K and Janoff A, eds, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1978, pp 361-371.
14. Reilly CG, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J : Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases *J Biol Chem* 257 : 8619, 1982.
15. Schmidt W, Havemann K : Chymotrypsin like neutral proteases from lysosomes of human polymorphonuclear leukocyte In : Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes Havemann K and Janoff A, eds, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1978, pp 150-160.
16. Shafer WM, Onunka VC, Martin LE : Antagonistic activity of human neutrophil cathepsin G. *Infect and Immunity* 54 : 184, 1986.
17. Starky PM, Barrett AJ : Human cathepsin G : catalytic and immunological properties *Biochem* 155 : 273, 1976.
18. Starky PM, Barrett AJ : Neutral proteinases of human spleen ; purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem* 155 : 255, 1976.
19. Starky PM : Elastase and cathepsin G : The serine proteases of human neutrophil leukocytes and spleen In : Proteases in mammalian cell and tissues Barrett AJ ed., New York, North Holland Co, 1979, pp 58-89.
20. Tonnesen MG, Klenpne MS, Austen KF, Wintrob BU : Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G *J Clin Invest* 69 : 25, 1982.
21. Travis J, Baugh R, Giles PJ, Johnson D, Bowen J, Reilly CF : Human leukocyte elastase and cathepsin G ; isolation, characterization and interaction with plasma proteinase inhibitors. In : Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocyte. Havemann K and Janoff A, eds, Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1978, pp 118.
22. Travis J, Giles PJ, Porcelli L, Reilly CF, Baugh R, Power J : Human leukocyte elastase and cathepsin G ; structural and functional characteristics *Ciba Found Symp* 75 : 51, 1979.
23. Weir DM : Hand book of experimental immunology, Vol 1, *Immunochemistry* 3rd ed Oxford. Blackwell Scientific publications, 1978, pp 4.1-8.15