

ALKALEN FOSFATAZ

II. ALP izoenzimleri ve ayırımı (Elektroforetik ve kolon Kromatografik)

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

Ö Z E T

Morton ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen *i*-ALP enzimi, sephadex G-200 ve DEAE-sephadex kolon kromatografisi ile selüloz asetat elektroforezine tabi tutuldu. *i*-ALP'nin izoenzimleri araştırıldı. Aynı zamanda Kolondan daha saf enzim eldesi sağlandı.

Kolon kromatografisi ile önceden 564 kat olan saflaştırma derecesi 2077 değerine yükseldi. Verim ise ancak 2,3 % olabildi. *i*-ALP enziminin spesifik aktivitesi 116 İ.Ü./mg/protein idi.

Elektroforezle enzimin saflık derecesine bağlı olarak tek bant elde edildi. Kolon kromatografisinde *i*-ALP enzimi dört ayrı pik verdi.

G İ R İ Ş

Alkale fosfatazın bu çalışma ile saflığı ve heterojenitesi araştırılmıştır. Çeşitli kolon kromatografilerinden sephadex G-200 ve de DEAE-sephadex reçineleri ile yapılanlar tercih edilmişlerdir.

Bu suretle enzime ait proteinler birincisinde kolayca elimine edilmişlerdir. İkinci kromatografi ise enzimin heterojenitesini ortaya koymuştur.

Y Ö N T E M L E R

Sefadeks G-200 Kolon Kromatografisi (1):

0,9 x 30 cm.lik Pharmacia kolonu kullanıldı. (Vt = 19 ml.). 0,6 gr. sefadeks G-200, 20 ml. 0,05 M pH 7,7 tris tamponda 90°C'ta 5 saat bekletilerek şişirildi. Kullanılmadan önce bir gece buz dolabında bekletildi. Kolon vertikal o-

x : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi. Biokimya Kürsüsü Doçenti.

arak bir büret sporunda yerleştirildi. Hazırlanan jel, kolona yine vertikal olarak yavaş yavaş ilâve edildi. Jel, kolonun üstten bir cm. mesafesine kadar dolduruldu. Üst yüzeyi tam bir düzgünlükte elde edildi.

Kolonun üst kapağı kapatılarak polietilen boru ile peristaltik pompadan tampon akımı sağlandı. Bu akım önce yüksek tutuldu. Bu arada kapak üzerindeki hava çıkarma vidası gevşetilerek boşluğun yerine tamponun dolması sağlandı. Hava çıkarma deliğinden damla damla tampon atılırken peristaltik pompanın hızı, kolonun normal akış hızı na, 6 damla (0,24 cc)/ dakikaya ayarlandı. Ayarladıktan sonra bir damla daha atılarak hava vidası kapatıldı. Takriben 3 saat kadar tampon geçirildi. (40-50 ml. 0,05 M pH 7,7 Tris-HCl), elüent pH'sı ölçülerek kolon önceden pH 7,7 ye ayarlandı.

Bilhare kolonun kapağı açıldı ve peristaltik pompa durduruldu. Tatbik edilecek aktiviteyi havi protein sıvısından bir ml., üst yüzeyin üzerindeki tampon seviyesi 1-2 ml. ye geldiği anda yavaş yavaş üst yüzeyin düzgünlüğü bozulmadan ilâve edildi. Kolona absorpsiyonu esnasında aynı şekilde kolonun üst boşluğu 1 ml. tampon ilâve edilerek dolduruldu ve hemen kolonun üs kapağ kapatılarak peristaltik pompa aynı ayarda açıldı. Bu şekilde jelin üst yüzeyinin bozulmamasına dikkat edilerek ilâveler yapılabilir.

Protein ilâvesinden sonra fraksiyon toplayısı ile 50 damla (2,0 cc):8 dakikalık fraksiyonlar ALP ve protein tayini için toplandı. ALP'ı aktif fraksiyonlar birleştirilerek konsantre edildi. DEAE-selüloz kolon kromatografisine geçildi.

DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi (1):

1,0 x 30 cm. lik Pharmacia kolonu kullanıldı. DEAE-selüloz'dan 10 gr tartılarak bir lt. lik bir behere kondu. Üzerinde 250 şer ml. 0,5 M. NaOH ve 0,5 M NaCl ilâve edildi. İki-üç saat kadar yavaşça karıştırıldı. Sonra 15 dakika bekletilerek üstteki mayi dekante edildi. Bu arada jel haline geçmeyen hafif partiküller de uzaklaştırılmış olur. Jelin üzerine her defasında takriben yarım litre kadar distile su ilâve edilerek yıkama yapılır ve bagetle karıştırılır. Dibe çökmesi için 15 dakika beklendi ve tekrar dekante edildi. Bu işlem süper natan nötral olana kadar sürdü.

Bu şekilde hazırlanmış DEAE-selüloz kolona, dikey vaziyette dolduruldu. Ayarlı bir pompa ile kolona üstten 10 p. s.i. basınç tatbik edildi. Ancak her tatbikatte jelin üzerindeki sıvı seviyesi 1 cm'den aşağı düşmemelidir. Yeniden DEAE-selüloz ilâve ve basınç tatbik edilerek 1,0 x 30 cm'lik kolon üstten takriben 1 cm. mesafeye kadar paketlendi.

Paketlenmiş kolon, 0,05 M pH 7,7 Tris -HCl tampon ile dengeye getirmek üzere yıkandı. Kolonun tabiatına uygun akış hızı gözönüne alınarak tamponun hızı) 40 ml./saat'e ayarlandı. Kolon kapağı kapatılarak elüent pH'sı 7,7 olana dek yıkandı.

Dengelenmiş olan kolona enzim, (proteinimiz) absorbe ettirildi. Kolon tekrar tampon ile yıkandı.

Kolona absorbe ettirilen protein NaCl gradiyenti ile kolondan çıkarıldı. Bunun için gradiyent mikser vasıtasıyla, 0,00-0,10 M NaCl konsantrasyonları arasında bir gradiyant uygulandı. Eliüentlerde klorür tayarleri Buchler Cotlove klorürmetresi ile yapılmıştır. Beşer ml. lik fraksiyonlar toplandı.

Romel Elektroforez Yöntemi 2)

Ayrıraçlar :

1. Barbitol tampon pH 8,6 iyonik güç 0,025
2. Ponceau S Boyası
3. Asetik asit % 5 (w:v)
4. Fenolfitaleim monofosfat çözeltisi pH 10,15 ve 6,25 M
5. Alkalen gliserin çözeltisi

İşlem :

Soğuk barbitol tampon elektroforez hücreesine (700 ml) kondu ve dengelendi. Selüloz asetat kağıtları yeteri kadar küçük bir tepside aynı tampon ile doyoruldu. (Doyurma işlemi için normalde bir saat, acil halde 15 dakika yeterlidir). Günlük çalışmalarda, bir gün öncesi akşamdan tampona bırakılan sellüoz asetat kağıtları tampon tepsisinden alınır ve kurutma kağıtları (düzgün yüzeyli süzgeç kağıdı) arasına bırakılır, fazla tampon emdirilir. Süzgeç kağıdına bastırılmamalı ve aşırı kuruma olmamalıdır.

Nümune Tatbikatı :

0,006 ml. diüle enzim, dual nümune epliaktörü kulanılarak kurutma kağıdı üzerindeki selüloz asetat membranın katodik ucundan 1,5 cm içeride bulunan bir yere düzgünce emdirildi. Nümune kapiller bir emme ile membranda dar bir bant halinde kalır. Membran üzerinde tatbik yeri belli olmak üzere kenardan elektroforez kalemi ile ufak bir çizgi çizilir. Protein yürüyüşü takip edilmek üzere Amido Black 10 B ile diğer kenara küçük bir nokta konabilir.

Voltaj yavaşça yükseltılarak 300 V D.C.'ye ayarlandı. Bu akımda, 20 dakikalık süre uygulandı. Elektrik akımındaki dalgalanmalara bağlı aşırı ısınma meydana gelebilir. Bu durumu önlemek üzere voltaj regüle edildi.

Direkt boyama: Bir tepside yeteri kadar FFMP sübstratı için (elektroforez başlayınca) ayrıca temiz selüloz asetat membranlar bırakılarak doyoruldu. Son 5 dakika içerisinde sübstratlı membranlar pensle tepsi kenarına sıyırılarak

teker teker alınırken fazla süstratı süzüldü. Her bir süstrat membranı 20x25 cm boyutundaki temiz cam plak üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzgünce serildi.

Elektroforezden çıkan membranlar yatay olarak taşındı ve süstrat membranları üzerine nümune yüzeyleri hava kabarcığı kalmadan yerleştirilerek sandiviç edildi. İçerisinde az nemli sünger bulunan plastik bir torba veya kutuya cam plaklar yerleştirildi. Bu nemli atmosferde, 37°'de 2 saat süreyle inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda ALP ihtiva eden bantlar FFMP ile reaksiyona girerek fenolfitaleini açığa çıkarır. Açığa çıkan F.F. gözle görülebilir bantlar teşkil eder.

Membranlar inkübatörden alınır ve oda sıcaklığında kurutulur. Tamamen kuruduktan sonra 56°C'a ısıtılmış alkalin gliserin solüsyonu ihtiva eden, bir tepsinin içine yerleştirilir. Reaksiyon esnasında serbest kalan fenolfitalein gliserin içerisinde develope olur. Membranlar tamamen şeffaf olduğu zaman lâm üzerine yerleştirilir. Uzun uçları kesilerek yapıştırılır.

Samuel Elektroforez Yöntemi (3):

Ayrıaçlar :

1. Gelman High Resolution Buffer,
2. 2A2MIP Tampon, PH 10,15,0,625 M
3. Süstratlı selüloz asetat membranı
4. Fast Blue BB Boyası.

İşlem :

Romel elektroforez yöntemindeki membranın hazırlanması, nümune tâtbiyatı, elektroforez hücresinin doldurulması gibi işlemler yine Gelman Elektroforez aleti kullanılarak aynen yapılmıştır.

Tatbik edilen voltaj 5 ma/1 strip ve süre 45 dakikadır. İnkübasyon, nemli atmosferde, 37°C 'de 15 dakikadır.

Boyama : İnkübe olan mebranın yürüme yüzü, taze Fast Blue BB boyası üzerinde yüzdürülür. Tüm renkler 15 saniye içerisinde gelişir. Membran hemen boyadan uzaklaştırılır. Su ile yıkanır, saç kurutma makinası ile kurutulur. Bantlar mor olarak görünür.

B U L G U L A R

Sefadeks G-200 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografileri için sefadeks G-200 ile DEAE-selüloz kullanıldı. Önce sefadeks G-200 jelinden yöntemlerde anlatıldığı şekilde kolon kromatografisi

uygulandı. Protein elüatta 6 no'lu fraksiyonda çıkmağa başladı ve 19 no'lu fraksiyonda maksimal bir değere ulaştı, 32 inci fraksiyondan itibaren protein elüsyonu düşük ve sabit bir değerde devam etti. Aktiviteler 10 uncu tüpe kadar yavaş yavaş arttı. 15 inci fraksiyonda biraz daha büyük bir pik verdikten sonra 25 inci tüpte aktivite bitti. Değerler Şekil İ'de grafikenmiştir.

DEAE- Selüloz Kolon Kromatografisi:

DEAE- selüloz kolonunda protein ve aktivite elüentlerde dört ayrı fraksiyon şeklinde gözlendi. Çalışmada ikinci fraksiyon için elde edilen protein 22 no lu tüpe 280 nm de 0,270 absorbands verdi. Aktivite ise 25 nolu tüpe 0,21 İ.Ü./ml/dk değeri gösterdi. III no'lu aktivite piki için 40no'lu fraksiyon 0,113 İ.Ü./ml/dk değeri göstermesine karşın I ve IV no'lu aktivite pikleri az belirgin idi.

0,1 Molar sodyum klorür gradiyenti uygulamasında pik I 0,016 M, pik II 0,039 M. pik III 0,054 M., pik IV 0,085 M NaCl konsantrasyonlarında görüldü. Şekil 2 bulguları topluca göstermektedir.

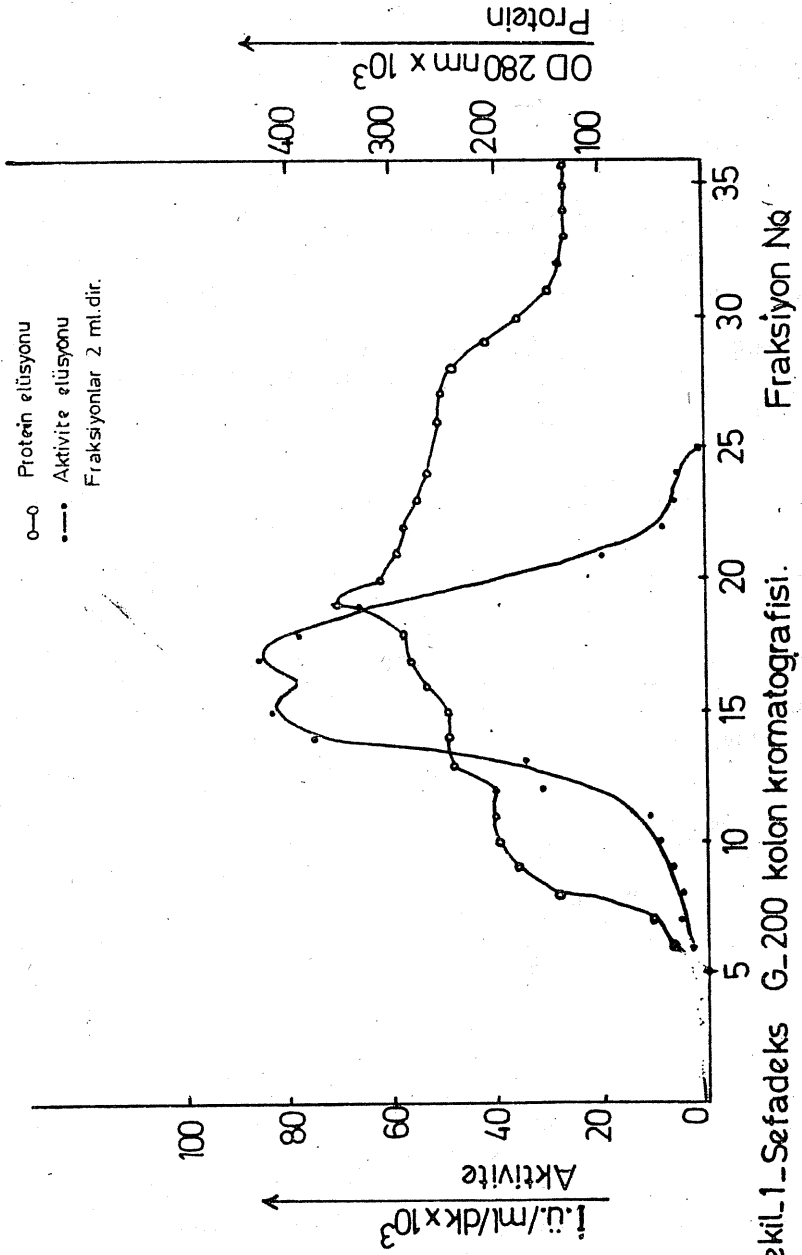
Tablo: I- Dana İnce Barsak Alkalen Fosfatazının Saflaştırılmasına Ait Bulgular

Kademe	V(ml)	Aktivite İ.Ü./ml/dk	Prot. T.Ü mg/ml.	Sp. Akt.		
				İ.Ü./mg.	Verim %	Saflaşma Oranı
1) Sefadeks G-200 Kolon Kromatografisi	4	29,1	115 0,40	72,660	7,6	1297,5
2) DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	1	39,5	35 0,30	116,330	2,3	2077,3

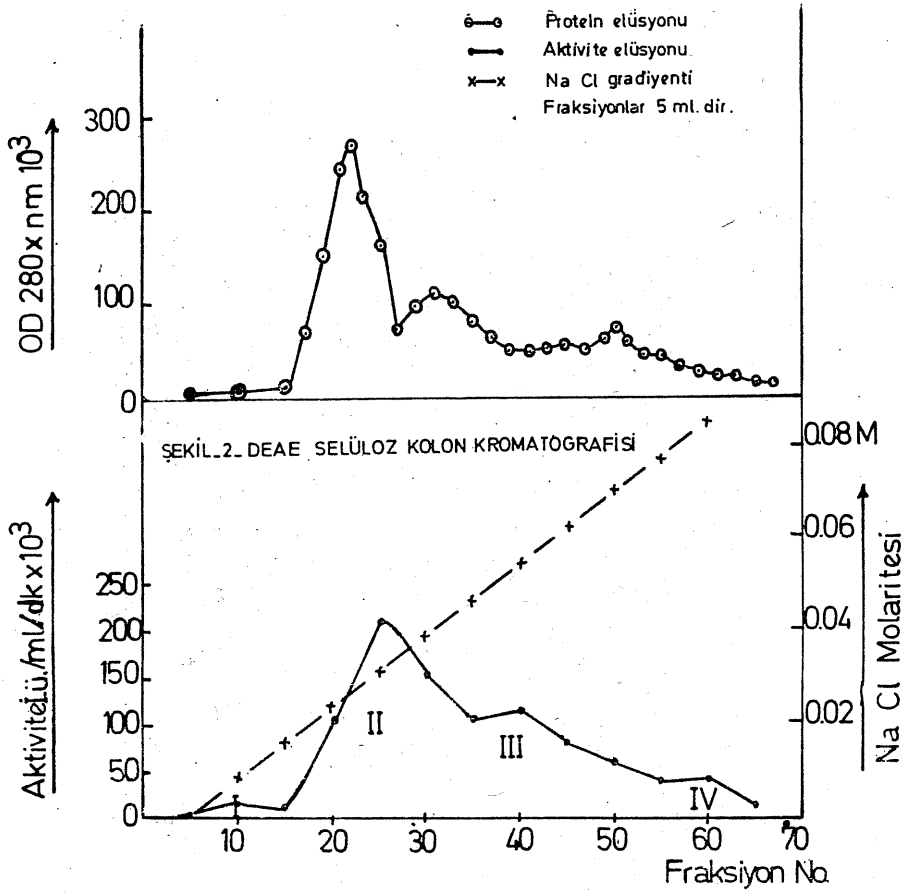
Açıklama : Sp. Akt. : Spesifik aktivite
 Prot. : Protein
 T.Ü. : Toplam aktivite, ünite olarak
 İ.Ü. : Uluslararası ünite, mikro M/ml/dk.

TARTIŞMA

Bizim safılaştırdığımız dana incebarsak-ALP İzoenzimi, 116 İ.Ü./ mg. Prot. lik spesifik aktiviteye sahiptir. Saflaşma oranı en son 2077 kat artmıştır. Ancak bu safılıkta enzimimizin elde edilmiş verimi % 2,3 gibi düşük miktardadır. Birinci amacımız olan saf bir enzim eldesi gayesiyle safılaştırma işlemleri kademelerde aktif olmıyan proteinleri uzaklaştıırken bunları rahat bir seçimle attık. Kolon kromatografisi kademelerinde elde edilen aktiviteler üzerinden muhtelif dilüsyonlar yaparak kinetik çalışmalara yeterince gereç sağladık.



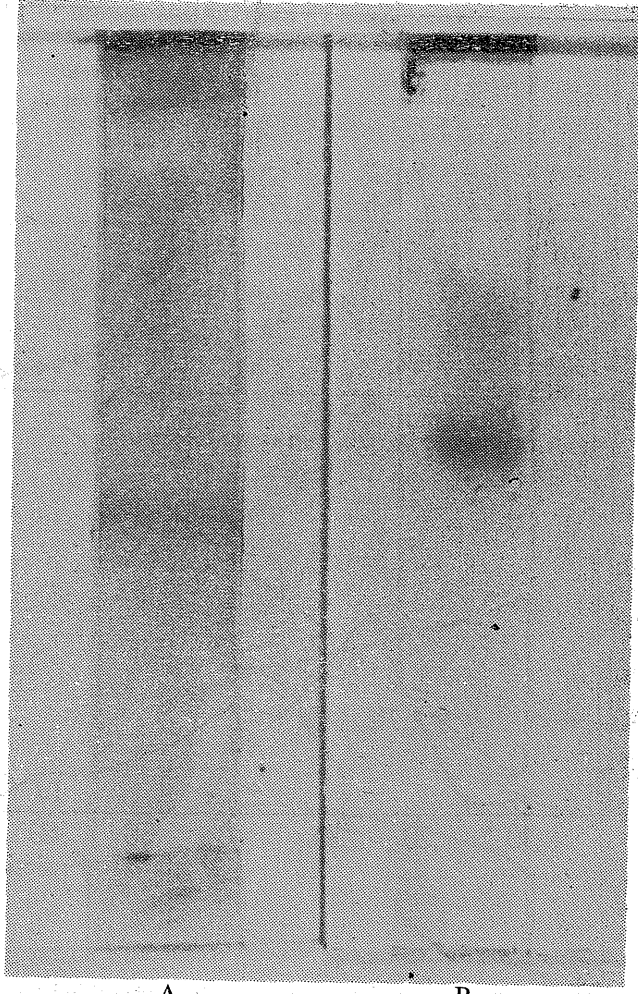
Şekil.1 -Sefadex G-200 kolon kromatografisi.



King ve arkadaşları elektroforetik saflaştırma yaptıklarında 102, 2. İ.Ü./mg Prot. spesifik aktivitede enzim elde ettiler. Dowex-50 kolonunda tek pik aktivitesi 158,4 İ.Ü./mg. Prot. dir. Saflaştırma oranı 1750 kat olan enzim ile çalıştılar. Morton'da bu kademedan sonra kolon kromatografik saflaştırma zaten yapılmıştır. Saflaştırma oranı 860 defadır (4).

Aminoff plazmadan, asetonla çöktürme yerine etanolle çöktürme işlemlerini protein ayırımında kullanarak ve de sefadex G-200 ve DEAE-selüloz kolon kromatografileri ile 2409 kat saflıkta ve 53 İ.Ü./mg. Prot. lik bir spesifik aktivite elde ettiler. Saflaştırmanın verimi ise % 1,9 dur. Saflaştırma oranı bizimkinden biraz fazla olmakla birlikte spesifik aktiviteleri düşüktür (1).

İnce barsak ALP izoenzimi, sefadex G-200 kolonu deaemelerimizde, birbirine çok yakın iki aktivite piki vermiştir. DEAE-Selüloz kolon kromatografi-



A

B

A= Romel Elektroferez Yönteminde Selüloz Asetat Membran Süre: 300 V D.C. akımda 20 Dakika (Protein Boyaması) PPE= Fenolfitalein mono fosfat, enzim

B= Samuel Elektroferez Yönteminde Selüloz Asetat Membran Süre: 5 m.a./1 strip akımda 45 Dakika (Protein Boyaması) NPE= 1- Naftil Fosfat, enzim

sinde 4 ayrı elüsyonda aktivite pikleri gözlemlendi. Piklerden I'in az II'nin en fazla III ve IV ün az olmakla beraber I 'den fazla aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Koyun serumu ile çalışılan Aalund sefadeks G-200 kolonunda (7x70 cm) tek bant şeklinde ALP aktivitesini ayırmıştır (5). Beyin ALP'ini saflaştırılan Bales-terileri ise sefadeks G-100 kolonunu (2,5x110 cm) kullandığında tek beyin ALP

piki elde etti, DEAE-selüloz kolonunda (1x12 cm) ALP aktivitesinin bir sahada çıktığını gözledi (6). Bu pik de sodyum klorür gradiyentinden önce çıkmıştır.

Komoda-1976 DEAE-Selüloz kolonunda (2x39cm) karaciğer ALP'ı için aktiviteyi, tek fraksiyon halinde elüentlerde gördü ve diğer çeşit kolon kromatog rafilerinde de bu tek bantın çoğalmadığını tesbit etti (7).

Lehmann-1975 ise sefadeks G-200 kolon kromatogfarisine (5x90 cm) ilâveten DEAE A-50 sefadeks kolon kromatografisi (5x65 cm) yaparak her ikisinde 3. aktivite piki elde etti. Karaciğer ALP'ı için bulunan bu değerler gibi önceki muhtelif kolon kromatografileri de yöntem bakımından göz önünde bulundurulmak üzere tartışmaya ilâve edildi (8). Engström, karaciğer ALP izoenzim elde edilışinde TEAE-Selüloz kolonunda (2,1x 29 cm ve 1,2x18 cm) I,II,III,IV piklerini (9), Fishmann karaciğer ALP'ı için sefadeks G-200 kolonunda tek fraksiyonlu ALP aktivitesi ayırdetmiştir (10).

İnsan ince barsak nekropsilerinden ALP saflaştırın Moss DEAE-sefadeks A-25 kolonlarından (1x21 cm 2,5x42 cm) küçüğünde A,B, diye iki aktivite elüsyonu gözledi. Büyük kolonda yine ince barsak aktivitelerini A ve B diye iki elüsyon toplamında inceledi. Büyük kolondaki elüsyonlarda B aktivite elüsyon toplamı (önce çıkan fraksiyonlar) tek piklidir. A, aktivite elüsyon toplamı ise 3 aktivite piki göstermiştir (11).

Moog, sıçan ince barsak ALP'ı için DEAE-selüloz kolon kromatografisinde, A,B,C,D olmak üzere elüentlerde sıçan ince barsak ALP'ı izoenziminin heterojen bir yapı gösterdiğini ortaya çıkardı (12).

Sığır ince barsak ALP izoenzimi saflaştırılması Behal (13) tarafından yapılp DEAE-selüloz kolonunda (1,5x40 Cm) 4 ayrı elüsyon alanında 4 pik elde ederek, ince barsak ALP'ının heterojenliğini kanıtladı.

Kolon kromatografik yöntemlerde görüldüğü gibi çoğunlukla işlemler ince barsak dokusu dışında yoğunluk kazanmaktadır. Kaynaklardan edinilen fikir odur ki ince barsak ALP izoenzimi heterojen bir yapıya sahiptir. Bizim bulgularımız da bu yönde olmuştur. Sefadeks kolon kromatografileri birçok parametreleri itibariyle kaynaklarda belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Anyon değıştirici kolon kromatografilerinde sodyum klorür gradiyenti olarak düşük molaritelerde enzim proteinlerinin kolondan çıkışı sağlanabilmektedir. Yukarıda verilen kaynak bilgiler ışığında kolon boyunun çok kısa tutulduğu veya NaCl molaritesinin yüksek değerlerde uygulandığı gradiyentlerde ALP aktivitesi yagradiyent başlar başlama kolondan çıkmakta veya yeteri ayırım sağlanmıyacak şekilde ayrılabilir. maktadır.

Elektroforez, klinik amaçlarda çok araştırmaya yönelik kalmıştır (14,15,16, 17).Elektroforez yapılagelen her çeşidiyle ALP izoenzimlerini birbirinden ayırabilmektedir. Selüloz asetat (18,19,2) poliakrilamid (20,) nişasta (21,22,23,24) agaroz

(25) ve bir çok elektroforetik jel veya membranların ALP izoenzimlerini birbirinden ayırdetmeleri farklıdır. Tashwell yönteminde (26) ince barsak ALP izoenzimleri d2 globulin bölgesinde elde edilirken Fritsche yönteminde (19) d2- B-bölgesinde elde edilebilmektedir. Yöntemlerin birbirinden farklı olmasına bağlanabilecek bu durum bazen aynı yöntem içerisinde ince barsak-ALP izoenzimi ile böbrek-ALP izoenziminin ve hatta safra-ALP izoenziminin aynı bölgeye çok küçük mobilite farkıyla (d2-B) göç ettikleri rapor edilmiştir. Son yıllarda tavsiye edilebilir ALP elektroforez yöntemlerini bulmak bazı durumlarda oldukça güçtür. (27. Biz elektroforezi, elde ettiğimiz dana ince barsağı ALP'nın saflığının bir göstergesi olarak kabul edip kullanmak istedik. Saf dana ince barsak-ALP izoenzimimizi d2-B bölgesi arasında tek ve saf bir bant halinde gördük.

S U M M A R Y

II. The ALP Isoenzymes and Seperations (Electrophoretic and

The enzyme i-ALP obtained by Morton extraction method was chromatographic subjected to sephadex G-200 and DEAE-sephadex column chromatography with cellulose acetate elektrophoresis. Izoenzymes of i-ALP were investigated. At the ssame time a purer enzyme was obtained from column.

The purification degree of that enzyme, which was 564 times earlier, has been risen up to 2077 times at present study. However, the yeield was only be able to be 2,3 %. The spesific activity of i-ALP enzyme has been found to be 116 I.U/mg-protein.

There was only one band on electrophoresis, depending on the purification degree of enzyme. It has been found that., in column chromatography, there were four distinct peak of i-ALP enzyme.

KAYNAKLAR

- 1- AMİNOFF, D., AUSTRİNS, M. and ZOLFAGHARİ, S.P. : Plasma alkaline phosphatase isoenzymes., *Biochim. Biophys. Acta.*, 242: 108, 122, 1971.
- 2- ROMEL, W.C., La MANCUSA, S.J. and DUFRENE, J.K.: Detection of serum alkaline phophatase isoenzymes with phenolphtalein monophosphate, following cellose acetate electrophoresis., *Clin. Chem.*, 14: 47-57, 1968.
- 3- CHU, S.Y., TURKİNGTON, V.E., VEA C., CHEUNG, P.: An improved electrophoretic method for alkaline phosphatase isoenzymes determination. *Clin. Biochem.* 8; 415-418, 1975.

- 4- MORTON, R.K.: The Purification of Alkaline Phosphatases of Animal Tissues.: *Excerpta Med. Biochem.*, 57: 595, 1954.
- 5- AALUND, O., RENDEL, J.: Freedland, R.A. Isolation and characterization of bovine serum alkaline phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, 110: 113-123, 1965.
- 6- BALESTRIERI, C., COLONNA, G., IRACE, G., CEDRANGOLD, F.: Purification and some properties of an alkaline phosphatase from beef brain. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50 B: 203-207, 1975.
- 7- KOMODA, T., SAKAGISHI, Y.: Partial purification and some properties of human liver alkaline phosphatase., *Biochimica et Biophysica Acta*. 438: 138-152, 1976.
- 8- LEHMAN, F.G.: New method for the isolation and crystallization of human liver alkaline phosphatase. *Digestion*. 12: 123-126, 1975.
- 9- ENGSTRÖM-L.: Studies on Calf-Intestinal Alkaline Phosphatase. I. Chromatographic Purification, Microheterogeneity and Some Other Properties of the Purified Enzyme. , *Biochim. Biophys. Acta*. 52: 36-48, 1961.
- 10- FISHMAN, L., INGLISH, N.R., FISHMAN, W.H.: Preparation of Two Antigens of Human Liver Isoenzymes of Alkaline Phosphatase. *Clin. Chim. Acta*. 34: 393-400, 1971.
- 11- MOSS, D.W.: Properties of Alkaline-Phosphatase Fractions in Extracts of Human Small Intestine. *Biochemical J.* 458-462, 1965.
- 12- MOOG, F. VIRE, H.H., GREY R.D.: The Multiple Forms of Alkaline Phosphatase in The Small Intestine of the Young Mouse. *Biochim. Biophys. Acta*. 113: 336-349, 1966.
- 13- BEHAL, F.J., CENTER, M.: Heterogeneity of Calf Intestinal Alkaline Phosphatase. *Arch. Biochem.* 110: 500-505, 1965.
- 14- BROHULT, J. , SUNDBLAD, L.: Isoenzyme patterns of serum alkaline phosphatase in ethanol induced liver injury. *Acta. Med. Scand.* 194: 497-499, 1973.
- 15- KRUSE-JARRES, J.D., HOLZER, L.: Routine procedure for the separation of the isoenzymes of alkaline phosphatase. *Z. Clin. Chem. Klin. Biochem.* 12: 258-259, 1974.
- 16- KRUSE-JARRES, J.D.: Routine procedure for the separation of the isoenzymes, of alkaline phosphatase *Z. Klin. Chem. Clin. Biochem.* 12: 258-259, 1974.

- 17- LEE, M.Y., KENNY, M.A.: Electrophoretic Method for Assessing the Normal and Pathological Distribution of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Serum. *Clin Chem.* 21 8: 1128-1135, 1975.
- 18- RHONE, D.P., MIZUNO, F.M., GIDASPOW, H.: Profiles of serum isoenzymes of alkaline phosphatase in hepatobiliary disorders using cellulose acetate electrophoresis and organ-specific inhibitors. *Ann. Clin. Laboratory Science.* 3: 353-361, 1973.
- 19- FRITSCHÉ, H.A., ADAMS, P.H.R.: Cellulose Acetate Electrophoresis of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Human Serum and Tissue. *Clinical Chemistry.* 18: 417, 1972.
- 20- SMITH, I., LIGHTSTONE, P.J., PERRY, J.D.: Separation of human tissue alkaline phosphatases by electroforesis on acrylamide disc gels. *Clin. Chim. Acta.* 19: 499-505, 1968.
- 21- CAPUTO, M.I., TAFT, D.M.: Separation of alkaline phosphatases by mikro starch gel electrophoresis., *Amer. J. Clin. Path.*, 56: 220-224, 1971.
- 22- MOSS, D.W., KING, E.J.: Properties of alkaline phosphatases fractions separated by starch gel electrophoresis. *Biochem. J.*, 84: 192-195, 1962.
- 23- SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels. *Biochem. J.* 61: 629-641, 1955.
- 24- ROSENBERG, I.N.: Zone electrophoretic studies of serum alkaline phosphatase. *J. Clin Invest.*, 38: 630-644, 1958.
- 25- DEMETRIÓN, J.A. and BEATTIE, J.M.: Electrophoretic separation on agarose thin film of isoenzymes of alkaline phosphatase from human serum and tissue, *Clin. Chem.* 17: 29-295, 1971.
- 26- TASHWELL, H.F.) JEFFERS, D.M.: Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in hepatobiliary and skeletal disease. *The American Journal of Clinical Pathology.* 40: 349-356, 1963.
- 27- HEALY , P.J.: Quantitative analysis of serum alkaline phosphatase isoenzyme activity., *Clin. Chim. Acta.* 55: 407-409, 1974.