



УДК 577.112.088.3 : 577.152.351*52.01

© 1990 г.

*Е. Н. Калиберда, В. В. Шемякин, В. К. Антонов***ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПЕПТИДАЗЫ ИЗ СЛАДКОГО МИНДАЛЯ
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ЕЕ БЕЛКОВОЙ ЧАСТИ***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Осуществлены выделение и очистка гликопептидазы из сладкого миндаля по модифицированной методике, включающей в себя на заключительной стадии гидрофобную хроматографию на Butyl-TSK 650S. Получен гомогенный белок с молекулярной массой 71 кДа по гель-фильтрации на Sephacryl S-200 и удельной ферментативной активностью 203 ед/мг. Установлена N-концевая последовательность белковой части фермента, состоящая из 10 аминокислотных остатков.

Многие белки эукариот являются гликопротеинами. Присоединение олигосахаридов к пептидной части белка осуществляется через амидную группу аспарагинового остатка (N-гликозилирование) и через гидроксильную группу остатков серина или треонина (О-гликозилирование). Ферменты, метаболизирующие сложные углеводы, — очень ценный инструмент в структурных исследованиях гликановой части гликопротеинов. Особый интерес среди этих ферментов представляют гликопептидазы (пептид-N⁴-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)-I-аспарагин-амидазы, КФ 3.5.1.52).

Гликопептидазы гидролизуют N-гликозидную связь между аспарагиновым остатком пептида, превращая его в остаток аспарагиновой кислоты, и гликаном, высвобождая последний в виде олигосахарида с хитобиозой на восстанавливающем конце [1, 2]. Для проявления специфической активности фермента важна как гликановая часть, достаточно протяженная и состоящая не менее чем из углеводного кора (два N-ацетилглюкозамина и три маннозы), так и пептидная последовательность, состоящая не менее чем из 5 аминокислотных остатков [3, 4]. Если гликан присоединен по N-концевой аминокислоте пептида, активность фермента уменьшается в несколько раз, а по C-концевой — уменьшается на 1–2 порядка [4]. Источниками этих ферментов являются растения (сладкий миндаль, некоторые бобовые) и микроорганизм *Flavobacterium meningosepticum* [5–7]. При выделении гликопептидазы из сладкого миндаля авторы многих исследований [1, 5] отмечали большие трудности при очистке фермента и тестировании его активности, особенно в сыром экстракте [5, 8]. Молекулярная масса гликопептидазы определена в 68 кДа по электрофорезу в 12,5% ПААГ в восстанавливающих условиях [5].

В данной работе приведена усовершенствованная методика выделения и получения гомогенного препарата гликопептидазы из сладкого миндаля и определена N-концевая последовательность белка. Для выделения фермента из зерен сладкого миндаля по методу [9] был получен сырой эмульсин миндаля. Этот препарат содержал разнообразные экзогликозидазы с большими удельными активностями (таблица). Тестирование активности гликопептидазы, особенно на ранних стадиях очистки, представляет большие трудности. Поэтому в отличие от предыдущих исследователей

Сокращения: PMSF — фенолметилсульфонилфторид, Dns — дансильная группа, AMK — 7-амино-4-метилкумарин, SDS — додецилсульфат натрия, TEMED — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин.

Выделение гликопептидазы из сладкого миндаля *

Номер стадии	Стадия	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность экзо-гликозидаз, мкмоль п-нитрофенола/мин			Специфическая активность гликопептидазы, нмоль Dns-пептида/мин·мг
				α -маннозидаза	β -галактозидаза	β -N-ацетилгексозаминидаза	
1	Эмульсин миндаля	1500	6200	1466	5965	2515	—
2	Экстракция трис-HCl-буфером	49	313	1390	5403	2300	—
3	DEAE Toyopearl, пик I, рис. 1	52	31	6,3	0,74	3,78	—
4	Sephacryl S-200 фракции 17–19, рис. 2	27	11,6	0,02	0,1	0,01	—
5a	CM Bio-Gel A, фракция 0,05 NaCl	0,5	0,207	0,01	0,05	0,005	135
5б	Butyl-TSK 650S, фракция 18, рис. 3	1	1,35	0,001	0,001	0,000	203

* Стадии 5a и 5б — параллельная очистка препарата после Sephacryl S-200, разделенного на две равные части. На стадиях 1—4 гликопептидазную активность не определяли.

этого фермента мы отказались от определения его специфической активности на начальных стадиях его выделения и очистки. Как известно, активность экзогликозидаз на 2—3 порядка выше гликопептидазной, что приводит к последовательному расщеплению олигосахаридной части субстрата на моносахариды «коктейлем» экзогликозидаз, присутствующим в эмульсине миндаля. Было предложено [8] измерять активность гликопептидазы после 1,5 ч преинкубации белкового препарата в 0,75 M NaSCN, что приводит к необратимой потере активности экзогликозидаз. Однако воспроизведение нами этой методики показало сохранение после инкубации в препарате как экзогликозидазной, так и гликопептидазной активностей. Такое расхождение в результатах мы можем объяснить недостаточной изученностью концентрационного и временного влияния хаотропных солей на гликопептидазную активность. В дальнейших исследованиях мы более детально представим этот вопрос. Основываясь на том, что белок имеет молекулярную массу 68 кДа и хорошо проявляется при электрофорезе, мы оценивали содержание гликопептидазы методом электрофореза в 12,5% ПААГ и использовали на дальнейших стадиях очистки фракции, содержащие максимальное количество белка с молекулярной массой 68 кДа.

Экстракцию суммарного белка из сырого эмульсина миндаля проводили при встряхивании в течение 1 сут в трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем ингибитор протеиназ PMSF. После центрифугирования полученной суспензии супернатант наносили на колонку с DEAE Toyopearl TSK 650M. Колонку промывали трис-HCl-буфером, использовавшимся для уравнивания сорбента (рис. 1), до достижения поглощения 0,01 OE₂₈₀. После этого сорбированный белок элюировали раствором NaCl в градиенте концентрации. Как представлено на хроматограмме этого процесса, профиль элюции имеет четыре пика. Фракции каждого белкового пика объединяли, как указано на рис. 1, и анализировали на содержание белка с молекулярной массой 68 кДа электрофорезом в 12,5% ПААГ [10]. При анализе фракций четырех пиков на содержание ферментов было установлено, что первый пик содержал целевой белок и имел в сумме 10,82 ед. экзогликозидаз на 31 мг общего белка (таблица). Уменьшение после DEAE-хроматографии общего количества белка в 10 раз привело к понижению в 840 раз содержания экзогликозидаз (таблица). Пики II—IV профиля элюции содержали только экзогликозидазы, причем II — в основном β -N-ацетилгексозаминидазу, III — β -галактозидазу и α -маннозидазу, IV — β -галактозидазу. Фракции градиентной элюции в дальнейшей работе не использовались.

Белок, элюировавшийся при промывке колонки исходным буфером, высаливали сульфатом аммония в концентрации 70% от насыщения. Оса-

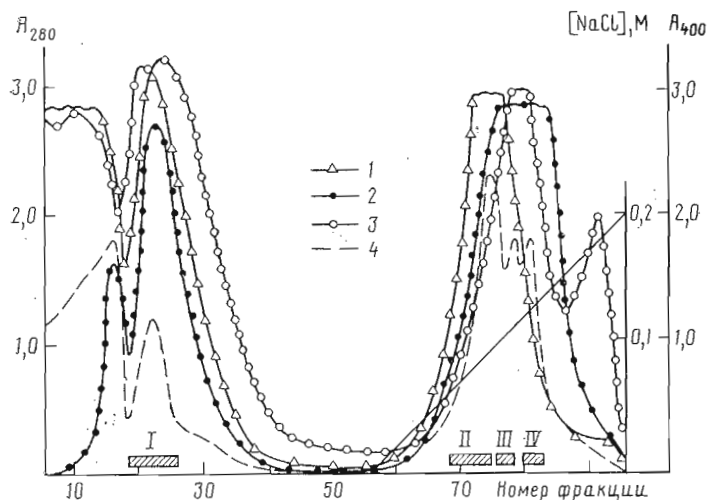


Рис. 1. Выделение гликопептидазы из сладкого миндаля хроматографией на DEAE Тоуорепарл 650М. В качестве субстратов для определения β -N-ацетилгексозаминидазы (1), α -маннозидазы (2) и β -галактозидазы (3) использованы соответствующие *p*-нитрофенилгликозиды. 4 — контроль A_{280} . Отмечены выделяемые фракции

док отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме трис-HCl-буфера, pH 7,5, и диализовали против него же. Отдиализованный раствор белка перед нанесением на колонку с Sephacryl S-200 концентрировали ультрафильтрацией через мембрану PM 10. На профиле элюции белков с Sephacryl S-200 (рис. 2) наблюдали три пика: фракции пика II содержали наибольшее количество белка, в том числе 68 кДа-белок (электрофорез в ПААГ). Проверка экзогликозидазной активности выявила основное количество α -маннозидазы во фракциях пика I, β -галактозидазы при удельной активности $8 \cdot 10^{-3}$ мкмоль/мин·мг — в пике II, β -N-ацетилгексозаминидазы — в пике III (таблица). Кроме того, было выяснено, что основной белок, полученный во фракциях пика II профиля элюции, имел молекулярную массу 71 кДа. Таким образом, гель-хроматографией на Sephacryl S-200 мы отделили целевой белок от значительных примесей α -маннозидазы и β -N-ацетилгексозаминидазы.

Для эффективного отделения гликопептидазы от примесей экзогликозидаз использовались ионообменная (CM Bio-Gel A) и гидрофобная (Butyl-TSK 650S) хроматографии. Белковый раствор фракций 17—19, полученный на предыдущей стадии, был разделен на две равные части. При хроматографии на CM Bio-Gel A одной части белка $\frac{2}{3}$ этого количества не связалось с сорбентом. Полученные при дальнейшей элюции фракции содержали несколько полос белков при электрофорезе в ПААГ и достаточно высокий уровень активности экзогликозидаз (таблица). Таким образом, мы не имели эффективного разделения катионообменной хроматографией белкового раствора для получения гомогенного препарата нашего фермента.

Вторую часть белкового раствора после гель-фильтрации мы диализовали против 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0, и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану PM 10. Полученный белковый раствор использовали для гидрофобной хроматографии на колонке с Butyl-TSK. При нанесении весь белок связался со смолой. Фракции, полученные при промывке начальным буфером, не имели белков. И только раствором, содержащим $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в нисходящем градиенте концентрации, мы элюировали белки, разделившиеся на три пика (рис. 3). Третий пик содержал гликопептидазу, выявленную нами электрофорезом в виде одной белковой полосы в ПААГ (68 кДа) и реакцией на специфическую активность фермента. Мы получили целевой белок в количестве 1,35 мг. Активность фермента составила 203 ед./мг при общей экзогликозидазной активности

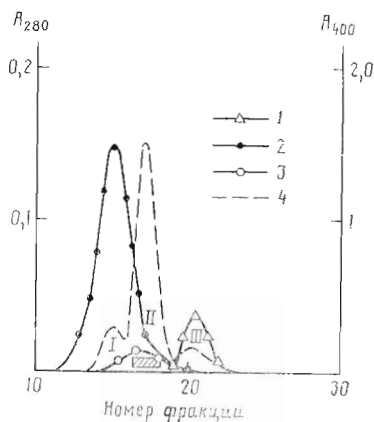


Рис. 2

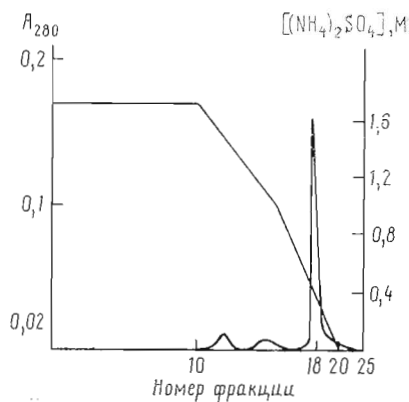


Рис. 3

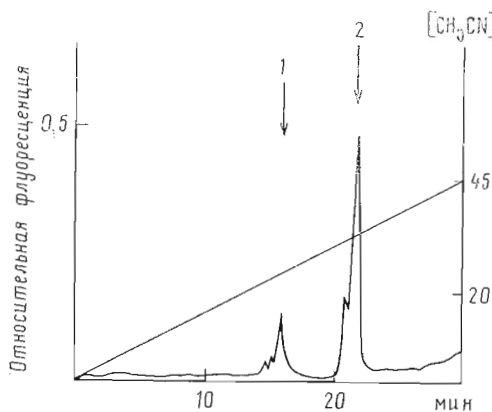


Рис. 4

Рис. 2. Хроматография белка пика I рис. 1 на Sepharosyl S-200. Обозначения кривых см. в подписи к рис. 1. Отмечена выделяемая фракция

Рис. 3. Хроматография белка фракций 17—19 рис. 2 на Butyl-TSK 650S

Рис. 4. Исследование ферментативной активности гликопептидазы по реакции расщепления Dns-гликопептида овальбумина методом ВЭЖХ: 1 — Dns-гликопептид; 2 — продукт реакции

менее 0,001 ед./мин (таблица). Кроме того, гидрофобная хроматография показала (рис. 3), что гликопептидаза более гидрофобна, чем экзогликозидазы.

Важным моментом тестирования активности фермента является создание специфического субстрата. В качестве субстрата для гликопептидазы были получены гликопептиды из овальбумина по известному методу [4] с некоторыми изменениями, указанными в «Экспериментальной части». После всех реакций расщепления белковой части овальбумина выделяли пул гликопептидов гель-хроматографией на биогеле Р4, определяя углеводы во фракциях фенол-сернокислотным методом [11]. Анализ гликопептидного пула методом ТСХ выявил только одно вещество, содержащее и углеводы, и пептид. Определение моносахаридного состава с помощью ВЭЖХ АМК-меченых моносахаров показало, что гликопептидная фракция содержала галактозу, маннозу и N-ацетилглюкозамин в мольном отношении 1,06 : 8 : 3,48, что отвечает составу суммарного пула гликана овальбумина. Полученный пул гликопептидов использовали в реакции мечения дансилхлоридом (Dns) по N-концу пептида [12], а затем разделяли Dns-гликопептиды с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на вещества, характеризующиеся определенным временем удерживания. Dns-гликопептиды, полученные после ВЭЖХ (в «Экспериментальной части» представлены времена удерживания тех меченых гликопептидов, которые использовались в дальнейшем исследовании), содержали углеводы: первые два из указанных имели гибридные олигосахариды, вторые два — маннозобогатые олигосахариды. Для определения ферментативной активности проводили инкубацию с ферментом 45 нмоль Dns-гликопептида (одного из выделенных методом ВЭЖХ, см. «Экспериментальную часть») и анализировали реакционную смесь методом ВЭЖХ в условиях, примененных

для характеристики Dns-гликопептидов. В результате получили два пика (рис. 4): первый — остаток субстрата Dns-гликопептида, использованного в реакции, второй — продукт реакции, Dns-пептид. При анализе вещества, полученного во втором пике, не было обнаружено углеводов, N-концевой аминокислотой был определен Dns-тирозин. Данные анализа реакционной смеси позволяют заключить, что второй пик — это дегликозилированный пептид, высвобожденный гликопептидазой.

Для изучения структуры гликопептидазы нами было проведено секвенирование белковой части фермента с N-конца. Белковый раствор, полученный после гидрофобной хроматографии, был помещен непосредственно в реакционную камеру секвенатора. Из белкового раствора после гель-фильтрации электрофорезом в 12,5% ПААГ была выделена белковая полоса с молекулярной массой 68 кДа, которую электроблоттингом сорбировали на PVDF-мембрану. Детекцию белков, сорбированных за счет гидрофобных взаимодействий, легко осуществляли с помощью кумасси R-250, присутствие которого не мешает секвенированию. В результате двух последовательных секвенирований (самого белка и белка с мембраны) получили абсолютно одинаковую N-концевую последовательность аминокислот: Ile-Asp-Pro-Arg-Val-Val-Xaa-Ala-Xaa-Leu-. В обоих случаях удалось сделать 10 последовательных отщеплений фенилтиогидантоиновых производных аминокислот с N-конца без снижения постадийного выхода, наблюдаемого при уменьшении количества наносимого образца. В число остатков, не идентифицированных на уровне 70 пкмоль, входит прежде всего фенилтиогидантоин цистеина, поскольку не была проведена предварительная модификация образцов винилпиридином по SH-группам для устойчивого выявления этих производных. Данными, полученными в результате определения аминокислотной последовательности, мы доказали гомогенность выделенного и очищенного белкового препарата гликопептидазы из сладкого миндаля, а также достоверно определили N-концевую последовательность белка.

Авторы выражают благодарность В. А. Маркину за выполнение анализа по моносахаридному составу олигосахаров гликопептидов, полученных из овальбумина.

Экспериментальная часть

В работе использовались DEAE Toyopearl 650M, Butyl-TSK 650S (TOSOH Corp., Япония), Sephacryl S-200 (Pharmacia, Швеция), CM Bio-Gel A, биогель P4, 200—400 меш, кумасси G-250, трис, глицин, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, TEMED, персульфат аммония, SDS (Bio-Rad, США), карбонат лития (Merck, ФРГ), PVDF-мембрана Immobilion P (Millipore, США), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Calbiochem, США), PM 10, PM 30 (Amicon, США), 1-диметиламино-5-нафталинсульфохлорид (дансилхлорид), кумасси R-250 (Serva, ФРГ). Реактивы, примененные при секвенировании, получены от фирмы Applied Biosystems (США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже х.ч. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Altex 110A (США), снабженном проточным флуориметром Gilson 121 (Франция) и интегратором Shimadzu CR3A (Япония), на аналитических колонках Ultrasphere ODS (Altex, США).

Выделение фермента. Все операции по выделению фермента проводили при 4° С. Размельченные орехи сладкого миндаля (311 г) экстрагировали в 1500 мл 1,1% раствора $ZnSO_4$ в течение ночи, суспензию фильтровали через ткань, хорошо отжимали. К фильтрату небольшими порциями приливали 160 мл 0,28% раствора таннина, оставляли на 2 ч для образования осадка и центрифугировали (20 мин, 5000 об/мин). К супернатанту медленно приливали небольшими порциями 160 мл 3% раствора таннина, через 2 ч центрифугированием получали осадок, который быстро диспергировали в холодном ацетоне, осадок промывали эфиром и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Получили порошок сырого эмульсина миндаля 6,2 г [9].

Полученный сырой эмульсин миндали в течение 1 сут экстрагировали встряхиванием в 70 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,0, содержащего 2 мМ PMSF, центрифугировали (15 мин, 10 000 об/мин) и получили 49 мл супернатанта (313 мг белка). В дальнейшей очистке все буферы содержали 2 мМ PMSF.

Супернатант наносили на колонку (2 × 9 см) со смолой DEAE Toyo-pearl 650M, уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 8,0 (20 мл/ч, объем фракции 4 мл). Сорбированный белок элюировали тем же буфером, а затем в градиенте концентрации NaCl 0—0,2 М (общий объем 800 мл). Объем фракции при градиентной элюции 20 мл. Фракции, содержащие 68 кДа-белок, объединяли (52 мл), добавляли сульфат аммония (500 г/л), через 10 ч центрифугировали (20 мин, 5000 об/мин), осадок растворяли в минимальном объеме 20 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,5, и диализовали против того же буфера. Отдиализованный белковый раствор концентрировали ультрафильтрацией на мембране PM 10 до 4,5 мл (31 мг белка).

Полученный раствор белка подвергали гель-фильтрации на колонке (2 × 10 см) с Sephacryl S-200 в 0,02 М трис-НСl-буфере, рН 7,5 (39 мл/ч, объем фракции 9,2 мл). Фракции 17—19, содержащие 68 кДа-белок, объединяли, как указано на рис. 2, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану PM 30 до 14 мл (11,6 мг белка).

Половину белкового раствора диализовали против 0,01 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, и наносили на колонку (1 × 4 см) с CM Bio-Gel A, уравновешенным тем же буфером (48 мл/ч, объем фракции 3,2 мл). После промывания сорбента основным буфером осуществляли элюцию ступенчатым градиентом концентрации раствора NaCl: 0,05; 0,1 и 0,2 М (все по 50 мл). Собирали фракции, полученные при элюции 0,05 М (207 мкг общего белка) и 0,1 М (80 мкг) растворами NaCl, и использовали для последующего анализа.

Вторую половину белкового раствора диализовали против 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,0, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану PM 10 до 1,5 мл, наносили на колонку (1 × 10 см) со смолой Butyl-TSK 650S, уравновешенной 0,1 М фосфатным буфером, содержащим 1,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Элюцию проводили буфером, содержащим сульфат аммония в нисходящем градиенте концентрации, от 1,7 до 0 М (72 мл/ч, объем фракции 7 мл). Собирали фракции, элюируемые при 0,5 — 0,3 М сульфате аммония (рис. 3), и использовали для дальнейшего исследования.

Электрофорез в полиакриламидном (ПААГ) геле в восстанавливающих условиях проводили по методу Лэммли [10] в пластинках с 12,5% разделяющим и 4% концентрирующим гелями. В качестве белков-свидетелей использовали (приведена молекулярная масса в килодальтонах): фосфорилразу В (94), бычий сывороточный альбумин (67), яичный альбумин (43), карбоангидразу (30), триптический ингибитор (20) (Serva, ФРГ).

Получение гликопептидов из овальбумина. 1 г овальбумина (Олайне, СССР) расщепляли бромцианом и трипсином по методу [4], после гидролиза трипсином реакционную смесь фракционировали на колонке (1,5 × 90 см) с биогелем P4, уравновешенным Na-ацетатным буфером, рН 3,0. Фракции, поглощающие при длине волны 280 нм и одновременно содержащие углеводы [11], объединяли и лиофилизовали. Гомогенность гликопептидной фракции контролировали при помощи ТСХ в системе хлороформ — вода — изопропанол, 3 : 6 : 12 (R_f 0,57). Флуоресцентное мечение полученных гликопептидов осуществляли введением дансильной группировки по методу [12] и Dns-гликопептиды очищали гель-хроматографией на биогеле P4 (1,5 × 40 см), уравновешенном 0,1 М Na-ацетатным буфером, рН 4,5. Последующие разделение и характеристику дансильрованных гликопептидов проводили ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке (4,6 × 250 мм) Ultrasphere ODS в градиенте концентрации ацетонитрила (0—45%) в воде, содержащей 10% изопропанола и 0,1% трифторуксусной кислоты (1 мл/мин, 25° С, 30 мин). Для определения активности гликопептидазы использовали Dns-гликопептиды, полученные ВЭЖХ со следующими временами удерживания: 14,3; 15,6; 17,3; 18,5 мин.

Углеводы во фракциях при получении гликопептидов определяли методом [11].

Активность экзогликозидаз определяли при 37° С. В пробирку помещали 0,2 мл 3 мМ раствора соответствующего *p*-нитрофенилгликозида (*p*-нитрофенил-*N*-ацетил- β -*D*-глюкозаминид для определения активности β -*N*-ацетилгексозаминидазы; *p*-нитрофенил- α -*D*-маннопиранозид — для α -маннозидазы; *p*-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозид — для β -галактозидазы), 0,1 мл 1 М β -меркаптоэтанола, 0,1 мл 0,5 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0, и 0,1 мл исследуемого раствора, инкубировали 30 мин, затем добавляли 1 мл 1 М NaHCO₃ и измеряли поглощение раствора при 400 нм, $\epsilon = 1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое высвобождает 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 мин при указанных условиях.

Активности гликопептидазы определяли при 37° С. В микропробирку помещали 95 мкл 0,25 М Na-ацетатного буфера, pH 5,1, содержащего 2 мМ PMSF, 100 мкл дансильированного гликопептида (45 ммоль), 5 мкл раствора фермента, инкубировали 2,5 ч, затем упаривали в вакууме, растворяли в 150 мкл смеси метанол — 1 М уксусная кислота, 4 : 1, и аликваты по 100 мкл анализировали ВЭЖХ в условиях, описанных для характеристики Dns-гликопептидов из овальбумина. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое высвобождает 1 нмоль Dns-пептида за 1 мин при указанных условиях.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд, используя реагент фирмы Bio-Rad (США) [13].

Электроблоттинг белка с геля после электрофореза в ПААГ [10] в восстанавливающих условиях на PVDF-мембрану проводили по методу [14]. Для 12,5% ПААГ толщиной 0,7 мм время электроблоттинга составляло 12 ч при напряжении 12 В. Окраску белков, сорбированных на PVDF-мембране, высушивание и хранение осуществляли как описано в работе [15].

Секвенирование белка проводили на газожидкостном секвенаторе 477 Applied Biosystems (США). Измельченную мембрану с перенесенным белком укладывали на тефлоновую подложку, покрывали стеклянным фильтром либо белковый раствор непосредственно вносили в реакционную камеру секвенатора и секвенировали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 4. P. 1194—1201.
2. Risley J., Van Etten R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 29. P. 15488—15494.
3. Takahashi N., Nishibe N. // J. Biochem. 1978. V. 84. № 5. P. 1467—1473.
4. Plummer T., Jr., Tarentino A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 20. P. 10243—10246.
5. Taga E., Waheed A., Van Etten R. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 5. P. 815—822.
6. Sugiyama K., Ishihara N., Tejima S., Takahashi N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 112. № 1. P. 155—160.
7. Tarentino A., Gomez C., Plummer T. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 17. P. 4665—4671.
8. Plummer T., Phelan A., Tarentino A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 167—173.
9. Hestrin S., Feingold D., Schramm M. // Meth. Enzymol. 1955. V. 1. P. 234—240.
10. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
11. Mc Kewy D., Lee Y. // Arch. Biochem. and Biophys. 1969. V. 132. № 1. P. 99—100.
12. Tapuhi Y., Schmidt D., Lindner W., Karger B. // Anal. Biochem. 1981. V. 115. № 1. P. 123—129.
13. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1/2. P. 248—254.
14. Matsudaira P. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 21. P. 10035—10038.
15. Левина Н. Б., Саеняк В. З., Русаев О. Г., Шемякин В. В., Хозлаев А. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24—31.

Поступила в редакцию
14.XI.1989

После доработки
12.XII.1989

ISOLATION OF A GLYCOPEPTIDASE FROM SWEET ALMOND AND
DETERMINATION OF THE N-TERMINAL SEQUENCE OF ITS PROTEIN MOIETY

*M. M. Shemyakyn Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A glycopeptidase was isolated from sweet almond and purified by a modified approach including hydrophobic chromatography on Butyl-TSK 650 S as the final step. The homogeneous protein (molecular mass 71 kD) was obtained by gel-filtration on Sephacryl S-200, its specific activity being 203 units/mg. The sequence of ten N-terminal amino acid residues of the enzyme's protein moiety was determined.