

Таким образом, в настоящем сообщении приведено 55 пептидов, включающих 384 остатка аминокислот (57 % всей полипептидной цепи каталазы [3]). При сравнении наших данных с «рентгеноструктурной» последовательностью каталазы *P. vitale*, опубликованной в 1986 г. [1], мы пока не нашли явного сходства исследованных нами пептидов с какими-либо участками «рентгеноструктурной» последовательности.

Работа по выяснению полной аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale* продолжается.

Авторы благодарят В. М. Харченко за выполнение анализов на аминокислотном анализаторе.

TRYPTIC PEPTIDES OF *Penicillium vitale* CATALASE. 3. THE STRUCTURE OF SOME PEPTIDES

*N. M. Gusak, T. L. Levitina, S. A. Atepalikhina, M. T. Kirilenko,
L. V. Gudkova, E. A. Kozlov*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Partial or complete amino acid sequence of tryptic peptides was determined. 55 unique peptides comprise 384 amino acid residues and account for 57 % of the catalase polypeptide chain.

1. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2 Å resolution / V. K. Vainshtein, W. R. Melik-Adamyant, V. V. Barynin et al. // *J. Mol. Biol.*—1986.—188, N 1.— P. 49—61.
2. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов / Э. А. Козлов, М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина и др. // *Биополимеры и клетка*.—1987.—3, № 5.— С. 240—245.
3. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Разделение и аминокислотный состав нерастворимых пептидов / М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина, Л. В. Гудкова и др. // Там же.— № 6.— С. 318—324.
4. Структура некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // Там же.—1986.—2, № 1.— С. 30—35.
5. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил—Эдман / Н. М. Гусак, М. Н. Овандер, Л. Б. Дробот, С. Б. Серебряный // *Методы молекуляр. биологии*.— Киев: Наук. думка, 1979.— С. 142—153.
6. Woods K., Wang K. Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer chromatography // *Biochim. et biophys. acta*.—1967.—133, N 2.— P. 369—370.
7. Хроматография в тонких слоях полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмудов, А. С. Пышкин // *Химия природ. соединений*.—1971.— № 1.— С. 66—68.
8. Eastley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping technique // *Biochim. et biophys. acta*.—1965.—107, N 3.— P. 386—388.
9. Сухомлинов Б. Ф., Дробот Л. Б. Первичная структура многоглобина бобра (*Castor fiber*). 1. Растворимые пептиды триптического гидролизата // *Биорг. химия*.—1980.—6, № 3.— С. 372—378.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 09.04.87

УДК 581.19:577.1

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЛЕКТИНАМИ

Е. Л. Саенко, В. В. Басевич, А. И. Ярополов

Введение. Исследованию свойств церулоплазмينا (ЦП) — полифункционального медьсодержащего гликопротеида плазмы крови — посвящено много работ. В частности, достаточно хорошо изучена его окси-

дазная активность, описаны антиоксидантная и транспортная функции [1—3].

Регуляторное действие ЦП в живом организме включает стадии взаимодействия с мембранами клеток различных тканей [4, 5]. В большинстве работ, посвященных связыванию ЦП с лектинами, постулируется, что процесс связывания ЦП определяется только двумя факторами — строением его углеводной части, состоящей из двух двухантенных и одной трехантенной цепей [6], и гликозидной специфичностью лектина [7—10]. И хотя феноменологическое связывание десалирированного и нативного ЦП описано, параметров связывания при этом не определяли [8, 11]. Согласно данным [12, 13], у растительных лектинов конканавалина *A* (*ConA*) и *Lens culinaris agglutinin* (*LCA*) установлено наличие гидрофобных центров, которые наряду с углеводсвязывающим центром могут взаимодействовать с молекулами больших гликопротеидов.

Цель данной работы — определить параметры (Q_0 , K_g), характеризующие процессы связывания, описать взаимодействие нативного и десалирированного ЦП с иммобилизованными лектинами растительного происхождения *ConA*, *LCA*, лектином из *Bandeirea simplicifolia* (*BS*), *Wheat germ agglutinin* (*WGA*), установить влияние pH, ионов Ca^{2+} . Одновременно поставлена задача выяснить вклад, который вносит гликозидная часть ЦП во взаимодействие с иммобилизованными лектинами.

Материалы и методы. Использовали ЦП из донорской крови, полученный из НИИ эксперим. медицины им. Л. Пастера (Ленинград), и иммобилизованные на сефарозе 4В лектины *ConA*, *LCA*, *WGA*, *BS* («Pharmacia», Швеция).

Определение связанного и свободного ЦП проводили двумя способами: по начальной скорости ферментативного окисления пирокатехина и по удельной радиоактивности.

1. Была построена калибровочная прямая зависимости начальной скорости окисления пирокатехина церулоплазмином (при концентрации пирокатехина больше $5 \cdot 10^{-3}$ М скорость зависит только от концентрации ЦП). После достижения равновесного связывания ЦП с лектином пробу надосадочной жидкости (100 мкл) прибавляли к пирокатехину и концентрацию ЦП в пробе определяли по калибровочной прямой.

Зная общее содержание и концентрацию свободного ЦП, количество связанного ЦП определяли по разности.

2. ЦП метили иодом-125 с использованием хлорамина Т («Sigma», США) по методу Хантера—Гринвуда [14]. Меченый ЦП отделяли от радиоактивного иода гель-фильтрацией на сефадексе G-25 («Pharmacia», Швеция). Радиоактивность измеряли на счетчике Сопри Gamma («ЛКВ», Швеция). Удельная радиоактивность меченого ЦП составляла 2500—4500 имп/пмоль в 1 мин. Измеряя радиоактивность пробы надосадочной жидкости, определяли концентрацию ЦП, не связанного с иммобилизованным лектином. В контрольных экспериментах без добавления иммобилизованного лектина определяли количество адсорбированного на стенках меченого ЦП при различных концентрациях (от 10 нМ до 1 мкМ) немеченого ЦП. Количество меченого ЦП, связанного с лектином, определяли, вычитая из общего количества внесенного меченого ЦП свободный и сорбированный на стенках меченый ЦП.

Получение десалирированного ЦП. Для десалирирования ЦП многократно пропускали при 37 °С через колонку, содержащую иммобилизованную на ВгCN-активированной сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) α -нейроаминидазу [15], выделенную из нехолерного вибриона (Ин-т вирусологии АМН СССР). Полноту десалирирования контролировали, определяя концентрацию сиаловой кислоты по методу Уоррена [16].

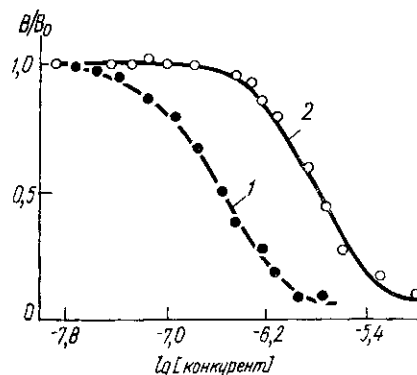
Получение дегликозилированного ЦП. Отщепление гликозидных цепей ЦП осуществляли действием трифторметансульфокислоты в анизоле [17]. Дегликозилированный белок очищали диализом и определяли концентрацию по методу Лоури [18].

Эксперименты по связыванию меченого ЦП лектинами. В микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл («Eppendorf», ФРГ) добавляли им-

мобилизованные лектины в концентрациях 0,4; 0,04; 0,12 и 0,14 мг/мл для *ConA*, *LCA*, *WGA* и *BS* соответственно. Для достижения оптимального связывания в пробирки прибавляли 10 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂ и 1 мМ MnCl₂ [17]. Объем смеси доводили до 1 мл, добавляя буферный раствор 100 мМ CH₃COONa, pH 5,5, и перемешивали в течение 16–18 ч. Процесс взаимодействия ЦП с лектинами изучали при 20 °С, получая изотермы конкурентного вытеснения меченого ЦП (8–30 нМ) дегликозилированным (6–180 нм), десалированным и нативным ЦП (0,01–6 мкМ). Связанную и свободную формы меченого ЦП разделяли, осаждая иммобилизованный лектин центрифугированием при 10000 *g* в течение 3 мин. Зависимость параметров связывания ЦП от

Рис. 1. Изотермы конкурентного вытеснения I¹²⁵-ЦП (10 нМ) немечеными нативным (1) и десалированным (2) ЦП для *ConA* (0,4 мг/мл). Условия: *t* = 20 °С, 100 мМ ацетатный буфер, pH 5,5, 100 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MnCl₂. *B* и *B*₀ — концентрация связанного меченого ЦП в присутствии и отсутствии конкурента соответственно

Fig. 1. Displacement curves of I¹²⁵-CP (10 nm) from its complex with *ConA* (0.4 mg/ml) by native (1) and asialo CP (2). Conditions: *t* = 20 °С, 100 mM acetate buffer, pH 5.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂. *B* and *B*₀ — concentration of bound I¹²⁵-CP in the presence or absence of concurrent, respectively



величины pH исследовали при значениях pH 5,5; 7,4 и 8,0. Отсутствие влияния природы буферного раствора на связывание было показано в специальных опытах.

Математическая обработка экспериментальных данных. Изотермы конкурентного вытеснения меченого ЦП немеченым обрабатывали методом нелинейного регрессионного анализа на ЭВМ Apple-IIe по алгоритму Манкварта—Левенберга [19]. Статистические веса точек принимали обратно пропорциональными квадрату дисперсии. В качестве начального приближения для неспецифического связывания использовали величину связывания при 100-кратном избытке немеченого ЦП. Кривые конкурентного вытеснения меченого ЦП сглаживали в координатах концентрации связанного меченого ЦП от логарифма концентрации немеченого конкурента при помощи кубического сплайна [20]. Константу связывания дегликозилированного и десалированного ЦП определяли по методу конкурентного отношения лигандов, используя сглаженные кривые вытеснения [21].

Результаты и обсуждение. Для выяснения тождественности меченого и немеченого ЦП сравнивали параметры их связывания с лектином *ConA* с использованием двух методов определения концентрации: по ферментативной активности и удельной радиоактивности меченого ЦП. Изотерма связывания, полученная первым методом, хорошо спрямляется в координатах Скотчарда, что свидетельствует о наличии одного типа центров связывания и низком неспецифическом связывании. При обработке данных методом наименьших квадратов была получена константа диссоциации комплекса *ConA* — ЦП, равная $33 \pm \pm 6$ нМ. Изотерма конкурентного вытеснения меченого ЦП немеченым, полученная вторым методом (рис. 1, кривая 1), интерпретирована в рамках одноцентровой модели с неспецифическим связыванием, которая описывается формулой

$$B^*(\alpha + 1) = \frac{Q_0(\alpha + 1)L_{св}^*}{K_g + (\alpha + 1)L_{св}^*} + N(\alpha + 1)L_{св}^*$$

где *B** — концентрация связанного меченого ЦП; α — отношение концентрации добавленного в инкубируемую смесь немеченого ЦП к концентрации меченого ЦП (фактор разбавления меченого лиганда немеченым); *Q*₀ — концентрация гомогенных центров связывания ЦП с лектином; *L**_{св} — равновесная концентрация свободного меченого ЦП; *K*_g — константа диссоциации комплекса I¹²⁵ — ЦП — лектин; *N* — константа неспецифического связывания [21]. Изотерма вытеснения мече-

ного ЦП нативным для *ConA*, представленная на рис. 1 (кривая 1), хорошо описывается приведенной формулой. Как видно из таблицы, константы диссоциации комплекса ЦП — *ConA* и концентрации центров связывания, полученные двумя различными методами, довольно близки, что свидетельствует об отсутствии детектируемых различий в свойствах нативного и меченого ЦП. Таким образом, доказана корректность использования меченого ЦП для описания связывания ЦП с лектинами.

Для изучения связывания дегликозилированного ЦП с *ConA* получена изотерма конкурентного вытеснения нативного ЦП дегликозили-

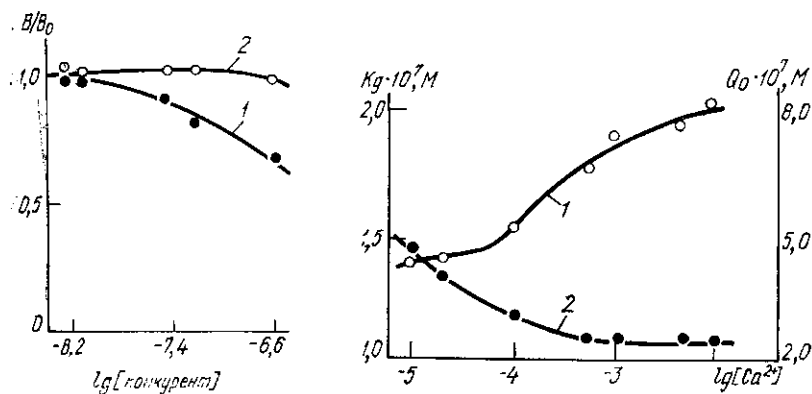


Рис. 2. Изотермы конкурентного вытеснения ^{125}I -ЦП (8 нМ) немечеными нативным (1) и дегликозилированным (2) ЦП для *ConA* (0,4 мг/мл). Условия, как на рис. 1

Fig. 2. Displacement curves of ^{125}I -CP (8 nM) from its complex with *ConA* by native (1) and deglycosylated (2) CP. Conditions: see Fig. 1

Рис. 3. Зависимость концентрации центров связывания Q_0 (1) и константы K_d диссоциации комплекса ЦП — *ConA* (2) от концентрации ионов Ca^{2+}

Fig. 3. The dependence of binding centres concentration and CP-*ConA* complex dissociation constant on Ca^{2+} -concentration

рованным (рис. 2, кривая 2). Видно, что дегликозилированный ЦП вытесняет меченый ЦП существенно слабее, чем нативный. При этом константа диссоциации комплекса дегликозилированного ЦП с *ConA* примерно на два порядка выше, чем нативного (для определения значений констант использовали метод конкурентного отношения лигандов [21]).

Приведенные данные показывают, что определяющий вклад в связывание вносит углеводная часть ЦП. Предположив, что любое изменение гликозидной части ЦП, в том числе и отщепление сиаловой кислоты, будет существенно влиять на связывание, мы изучили связывание лектина *ConA* с десиалированным ЦП.

Параметры связывания нативного и десиалированного ЦП с лектинами

The binding parameters of native and asialo ceruloplasmin with lectins

| Параметры | <i>ConA</i> | | LCA | WGA | BS |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | По калибровочной прямой (метод 1) | По удельной радиоактивности (метод 2) | | | |
| Q_0 , мкмоль на 1 мг лектина | 0,47±0,05 | 0,44±0,04 | 12,2±2,6 | 8,4±0,70 | 2,46±0,16 |
| K_d нативного ЦП, нМ | 33±6 | 26±6 | 90±23 | 120±20 | 118±20 |
| Константа неспецифического взаимодействия, N | — | 0,09±0,03 | 0,06±0,03 | 0,07±0,02 | 0,04±0,01 |
| K_d десиалированного ЦП, нМ | — | 330±60 | 90±23 | 36±6 | 390±30 |

Примечание. Условия приведены в подписях к рисункам.

Изотерма вытеснения меченого ЦП десиалированным представлена на рис. 1 (кривая 2). Полученная для десиалированного ЦП константа диссоциации комплекса ЦП — *ConA* примерно в 12 раз больше, чем для нативного.

Для изучения процессов взаимодействия ЦП с лектинами *LCA*, *WGA* и *BS* были получены изотермы вытеснения меченого ЦП нативным и десиалированным ЦП. *LCA*, как и *ConA*, имеет высокую специфичность к трем маннозным остаткам цепи гликопротеида, отличаясь от него тем, что наибольшую специфичность *LCA* проявляет к гликопептидам, содержащим α -1,6-связанную с β -GlcNAc фукозу [13, 17]. Кривые вытеснения меченого ЦП десиалированным и нативным ЦП, полученные для *LCA*, совпадают, что свидетельствует о близких значениях и соответствующих констант диссоциации.

Сглаженные с помощью сплайна кривые вытеснения меченого ЦП немеченым и десиалированным ЦП имеют вид, характерный для гомогенных центров связывания одного типа. Как уже отмечалось, они хорошо описываются формулой. Равенство констант диссоциации комплексов нативного и десиалированного ЦП с *LCA* (таблица) согласуется с результатом, полученным в работе [8], где показано, что связывание нативного и десиалированного ЦП на иммобилизованном *LCA* практически одинаково.

Известно, что *WGA* имеет сродство к β -GlcNAc и в гораздо большей степени к $[\beta$ -GlcNAc (1 \rightarrow 4)]₂-фрагментам углеводной части ЦП, которые вносят основной вклад в связывание ЦП с этим лектином [22]. Константа диссоциации комплекса десиалированного ЦП с *WGA* в 3,4 раза меньше (таблица), чем нативного. Возможно, это связано с большей доступностью фрагментов β -GlcNAc и $[\beta$ -GlcNAc (1 \rightarrow 4)]₂ в молекуле десиалированного ЦП.

Лектин из *BS* имеет α -галактопиранозильную специфичность [22]. Константы диссоциации нативного ЦП с *BS* и *WGA* (таблица) имеют близкие значения, однако в отличие от константы диссоциации десиалированного ЦП с *WGA* константа диссоциации десиалированного ЦП с *BS* в 3,2 раза больше, чем нативного, что, по всей вероятности, объясняется плохим связыванием этим лектином биополимеров с концевыми β -галактозильными группами [22], к которым и относится десиалированный ЦП.

Специфическое связывание углеводов лектинами зависит от присутствия ионов Mn^{2+} и Ca^{2+} [17]. Поскольку в нативном *ConA* содержатся ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} [23], для изучения их влияния на процесс связывания мы удалили ионы этих металлов инкубированием *ConA* с ЭДТА [24].

Зависимость константы диссоциации и числа центров связывания от концентрации Ca^{2+} приведена на рис. 3. Уменьшение константы диссоциации комплекса ЦП — *ConA* в 1,4 раза при концентрации Ca^{2+} до $2,5 \cdot 10^{-5}$ М, по-видимому, связано с переходом от несвязывающего углевода деметаллизированного *ConA* (*Aprocon*) к форме *Aprocon*· Ca^{2+} с полностью экспонированным углеводсвязывающим центром [25].

При концентрации Ca^{2+} , превышающей $5 \cdot 10^{-4}$ М, все углеводсвязывающие центры оказываются экспонированными, поэтому при дальнейшем увеличении концентрации Ca^{2+} до 10^{-2} М константа диссоциации уже не меняется, а возрастает лишь число связывающих центров, что может быть обусловлено стабилизацией углеводсвязывающих центров присоединением второго иона Ca^{2+} и образованием из металлосодержащих форм нативного *ConA* [24].

Поскольку специфическое связывание углеводов лектинами зависит также от pH среды, мы определили параметры связывания ЦП с *ConA* для трех значений pH. Константа диссоциации комплекса ЦП — *ConA* при pH 5,5; 7,4 и 8,0 равна соответственно 28; 23,2 и 21,8 нМ. При этом использовали следующие буферные растворы: pH 5,5 — 100 мМ NaCl, 100 мМ Na-ацетатный буфер; pH 7,4 — 50 мМ трис-HCl, 50 мМ CH_3COONa , 100 мМ NaCl; pH 8,0 — 50 мМ трис-HCl, 50 мМ

CH₃COONa, 100 mM NaCl. Выбор этого диапазона pH был обусловлен тем, что при pH < 3 *ConA* начинает терять ионы Ca²⁺ и, как следствие этого, способность связывать углеводы [26], а при увеличении pH выше 8,0 возможна денатурация *ConA* [27].

Из сравнения изотерм конкурентного вытеснения меченого ЦП немеченым найдено, что при изменении pH концентрация центров связывания ЦП (Q_0) не меняется, а константа диссоциации с увеличением pH уменьшается. Это можно объяснить тем, что при pH от 3 до 8 *ConA* существует в димерной и тетрамерной формах [28], а при pH > 7 равновесие димер — тетрамер сдвинуто в сторону тетрамера, способность которого специфически связывать углеводы выше, чем у димера [27].

Таким образом, в работе количественно описано взаимодействие ЦП с *ConA*, *LCA*, *WGA* и *BS*. Установлено, что определяющий вклад в связывание вносит углеводная часть молекулы ЦП.

INTERACTION OF HUMAN CERULOPLASMIN WITH IMMOBILIZED PLANT LECTINS

E. L. Saenko, V. V. Basevich, A. I. Yaropolov

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The specific binding of native and asialo human ceruloplasmin (CP) with immobilized plant lectins *ConA*, *WGA*, *LCA* and *BS* was investigated using I¹²⁵-CP. The binding parameters were determined and interpreted.

More than 100-fold difference in dissociation constants of native and deglycosylated CP complexes with *ConA* has permitted concluding that CP carbohydrate chains play the major role in binding with *ConA*.

The dependences of parameters of CP binding with *ConA* on pH Ca²⁺-concentration were investigated and interpreted.

1. *Кинетическое* исследование оксидазной реакции церулоплазмينا / Е. Л. Саенко, О. Б. Сиверина, В. В. Басевич, А. И. Ярополов // Биохимия.— 1986.— 51, № 6.— С. 1017—1022.
2. *Механизм* антиоксидантного действия церулоплазмينا / А. И. Ярополов, А. Г. Сергеев, В. В. Басевич и др. // Докл. АН СССР.— 1986.— 291, № 1.— С. 237—241.
3. *Hsieh H. S., Frieden E.* Evidence for ceruloplasmin is a copper transport protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1975.— 67, N 4.— P. 1326—1331.
4. *Barnes G., Frieden E.* Ceruloplasmin receptors on erythrocytes // *Ibid.*— 1984.— 125, N 1.— P. 157—162.
5. *Stevens M. D., Di Silvestro R. A., Harris E. D.* Specific receptor for ceruloplasmin in membrane fragments from aortic and heart tissues // *Biochemistry.*— 1984.— 23, N 2.— P. 260—266.
6. *Endo M., Suzuki K., Schmid K.* The structures and microheterogeneity of the carbohydrate chains of plasma ceruloplasmin // *J. Biol. Chem.*— 1982.— 257, N 15.— P. 8755—8758.
7. *Hudkin R. L., Pricer W. E., Ashwell G.* The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins // *Ibid.*— 1974.— 249, N 17.— P. 5536—5543.
8. *Kolberg J., Michaelsen T. E., Jantzen E.* Interaction of purified human ceruloplasmin with *Lathyrus odoratus*, *Lens culinaris* and *Canavalia ensiformis* lectins // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*— 1983.— 364, N 2.— P. 111—118.
9. *Bezouska K., Taborsky O., Kubrycht J.* Carbohydrate-structure-dependent recognition of desialylated serum glycoproteins in the liver and leucocytes // *Biochem. J.*— 1985.— 227, N 2.— P. 345—354.
10. *Goldstein I. J., Haues C. E.* The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals // *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.*— 1978.— 35.— P. 127—140.
11. *Horisberger M.* Assessment of polysaccharide and glycoprotein interaction with lectin at a liquid/solid interface // *Biochim. et biophys. acta.*— 1980.— 632, N 1.— P. 298—309.
12. *Waseem A., Salahuddin A.* Relevance of hydrophobic interactions in specific binding of multivalent ligands to *ConA* — effect of organic solvents // *Indian J. Biochem. and Biophys.*— 1983.— 20, N 5.— P. 253—258.
13. *Goldstein I. J.* Structural basis for the affinity of four insolubilized lectins with a specificity for α -D-mannose // *J. Biosci.*— 1983.— 5, N 1.— P. 93—100.
14. *Hunter W. M., Greenwood F. C.* Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity // *Nature.*— 1962.— 194, N 4827.— P. 495—496.

15. Parker T. L., Gorfield A. P., Veh R. W. Immobilized *Clostridium perfringens* Neuraminidase // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.—1977.—358, N 7.—P. 789—795.
16. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids // J. Biol. Chem.—1959.—234, N 8.—P. 1971—1975.
17. Edge A. S. B., Faltynex C. R. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid // Anal. Biochem.—1981.—118, N 1.—P. 131—137.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
19. Munson P. J., Rodbard D. Ligand: a versatile computer approach for characterization of ligand-binding systems // Anal. Biochem.—1980.—107, N 2.—P. 220—239.
20. Thakur A. K., Munson P. J., Hunston D. L. Characterization of ligand-binding systems by continuous distributions of arbitrary shape // Ibid.—103, N 1.—P. 240—254.
21. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т. Физико-химические исследования действия физиологически активных соединений. Рецепция // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1985.—С. 60—70. (Биоорг. химия; Т. 3).
22. Goldstein I. J., Hammarstrom S. Precipitation and carbohydrate-binding specificity studies of Wheat Germ agglutinin // Biochim. et biophys. acta.—1975.—405, N 1.—P. 53—61.
23. Pandolfino E. R., Appel D. M., Christie D. J. Location of Mn²⁺ in concanavalin A containing only a Mn²⁺ ion // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1980.—96, N 3.—P. 1248—1252.
24. Fitzgerald P. C., Farina R. D., Behnke W. D. Kinetic studies of demetallization and inactivation of ConA // Biochim. et biophys. acta.—1983.—743, N 1.—P. 43—51.
25. Sophianopoulos J. A. Manganese, calcium and saccharide binding to concanavalin A, as studied by ultrafiltration // Arch. Biochem. and Biophys.—1983.—223, N 2.—P. 350—359.
26. Auer H. E., Schilz T. Denaturation of ConA by urea and acid pH // Int. J. Peptide and Protein Res.—1984.—N 4.—P. 569—579.
27. Salahuddin A., Waseem A. Functional properties of divalent derivatives of ConA // Indian J. Biochem. and Biophys.—1984.—21, N 3.—P. 93—98.
28. Chapman A. J., Gallagher J. T., Bearwell C. G. Lack of binding of serum glycoprotein hormone subunit to ConA-sepharose reflect increased branching of the oligosaccharide chains // J. Endocrinol.—1984.—103, N 1.—P. 111—116.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Получено 24.05.87