خالص سازی ایزوآنزیم جدید از آلفا مانوزیداز سرم انسانی

دکتر محمد آبرومند[1]، دکتر شابها نابیده[2]

[1] استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

[2] استاد بیوشیمی، دانشگاه پونای هندوستان

نشانی نویسنده مسؤول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، دکتر محمد آبرومند

E-mail: aberumand@yahoo.com

وصول: ۸۵/۱/۲۰ ، اصلاح:۸۵/۲/۱۲ ، پذیرش: ۸۵/۷/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم آلفامانوزیداز آنزیمی است که در گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها به علت جدا نمودن اتصال مانوز به پروتئین و لیپید دارای اهمیت فراوان می‌باشد چرا که گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها جزء ترکیبات به کار رفته در دیواره سلولی (سلول‌های اعصاب) می‌باشند. کمبود آنزیم آلفامانوزیداز باعث بیماری عصبی روانی می‌شود. هدف از خالص‌سازی این آنزیم، مقایسه این آنزیم با سایر ایزوآنزیم‌های آن در سرم انسان برای مطالعه آینده در رابطه با بیماری‌های عصبی روانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: آنزیم آلفامانوزیداز توسط فیلتراسیون ژلی روی سفادکس G_{200} و کروماتوگرافی با میل ترکیبی با استفاده از ستون Con-A CL Seralose خالص گردید.

یافته‌ها: آنزیم آلفامانوزیداز ۱۳۸٤/٦ بار خالص گردید. وزن ملکولی این آنزیم با روش‌های فیلتراسیون ژلی و الکتروفورز (pH= ۸/۳) به ترتیب ۳٥٤۸۱۳ و ٤۲۳۷۹۰ دالتون به‌دست آمد. مقدار کربوهیدرات این آنزیم ۱۰/٦ درصد بود و مشاهده گردید که pH و دمای بهینه برای این آنزیم به ترتیب ٤/۲ و ٤۰ درجه سانتی گراد است. K_m برای این آنزیم مساوی ۲۷/٥ میکرومول برای سوبسترای پارانیترو فنیل آلفادی مانو پیرانوزید بود. همچنین معلوم شد که V_{max} این آنزیم مساوی ۱۰۱ واحد بر دقیقه بر میلی‌مول سوبسترا می باشد.

نتیجه‌گیری: این آنزیم خالص شده از نظر وزن ملکولی و دیگر خصوصیات آنزیمی با ایزوآنزیم های دیگر در سرم انسانی متفاوت است.

(مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۳/شماره۳ / صص۱۱۵-۱۰۸).

واژه‌های کلیدی: *سرم؛ آنزیم آلفامانوزیداز؛ خالص‌سازی؛ سفادکس G_{200}*

مقدمه

سرم انسانی دارای آنزیم‌های گلیکوزیداز و اسید فسفاتاز می‌باشد (جدول ۱). آلفامانوزید مانوهیدرولاز (آلفامانوزیداز EC:3.2.1.24) از گونه‌های گوناگون مانند گیاهان (۱,۲)، حیوانات (۳) و میکروارگانسیم‌ها (٥,٦) خالص شده و خصوصیت آن مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنزیم به‌طور گسترده در طبیعت پخش شده و در فرآیند مانوپروتئین نقش دارد. در بیماری مانوزیدوزیس که یک بیماری ارثی می باشد، بیماران با کمبود این آنزیم مواجه می‌شوند (٤,۷)، مانوزیداز در گلیکو پروتئین ها و گلیکو لیپیدها به علت جدا نمودن اتصال مانوز به پروتئین و لیپید دارای اهمیت فراوان می-

باشد چرا که گلیکو پروتئین‌ها و گلیکو لیپیدها جزء ترکیبات به‌کار رفته در دیواره سلولی می‌باشند (۸,۱۰).

سرم انسانی دارای گلیکوزیدازهای متعدد می‌باشد. دو ایزو آنزیم مانوزیداز از سرم انسانی جدا شده (۲۱,۲۲) و با خصوصیات این آنزیم خالص شده جدید متفاوت می‌باشد. آنزیم جدید با استفاده از کروماتوگرافی با میل ترکیبی با استفاده از کربوهیدرات موجود در آنزیم و ژل کنکوناوالین آ خالص گردید.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی لازم:

۱- مواد مورد استفاده از شرکت Sigma عبارتند از سفادکس $G_{۲۰۰}$، DEAE cellulose، اتانل ۹۸٪، کوماسی بریلیانت بلو $G_{۲۵۰}$ ، استاندارد پروتئین با وزن ملکولی بالا، اکریل آمید، بیس آکریل آمید، کربنات سدیم.

۲- مواد مورد استفاده از شرک Pharmacia عبارتند از کلرور سدیم، تریس اسیدکلریدریک، اسیدکلریدریک گلاسیال، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سوکروز، فسفات پتاسیم، بوتانل نرمال،استن، تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMD)، برمو فنل بلو، ۲- مرکاپتو اتانل، معرف فولین سیو کالتو، سولفات مس متبلور، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم.

۳- مواد مورد استفاده از شرکت Merk آلمان عبارتند از سود، آلبومین سرم گاوی، کیسه دیالیز، آمونیم پر سولفات، فسفات منو سدیک، فسفات دی سدیک. سرم انسانی تهیه شده از بیمارستان پونا از کشور هندوستان آورده شده بود.

حذف لخته‌های خونی از سرم: ۵۰ میلی‌لیتر سرم را در جعبه حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل نموده و سریعاً سپس توسط کلرور منیزیم ۲ میلی مولار لخته های خونی را با استفاده سانتریفوژ از سرم جدا می‌نماییم.

مرحله رسوب با بوتانل سرد (منهای ۲۰ درجه): محلول رویی فوق را حجم نموده و هم حجم آن بوتانل منهای ۲۰ درجه سانتی گراد را به صورت قطره قطره در شرایط سرد ٤ درجه سانتی‌گراد در حالی که محلول با همزن مغناطیسی به هم می‌خورد به محلول اضافه می‌کنیم، سپس آن‌را با دور g ۱۲۰۸۵ و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط ٤ درجه حرارت سا نتریفوژ می‌نماییم، در لوله سانتریفوژ سه لایه مشاهده گردید. لایه پایینی رسوب، لایه وسط حاوی آنزیم مانوزیداز و لایه رویی الکل حاوی رنگدانه‌ها همراه با چربی بودند. لایه رسوبی و لایه رویی دور ریخته شدند (۲۳,۲٤). فاز مایع را جدا نموده و دو باره با همان شرایط به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید.

مرحله رسوب با استن سرد: حجم محلول به‌دست آمده از مرحله قبل را اندازه گیری نموده و هم حجم آن از استن سرد منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به صورت قطره قطره در حالی که محلول با هم زن مغناطیسی به هم می-خورد، در شرایط ٤ درجه سانتی گراد اضافه گردید. سپس محلول به‌دست با همان شرایط سانتریفوژ گردید (۲٤).

استخراج توسط سولفات آمونیم: محلول به‌دست آمده از مرحله قبل را با ۷۵ درصد سولفات آمونیم اشباع نموده و به مدت ۲ ساعت با همزن مغناطیسی مخلوط نموده و سپس درهمان شرایط سانتریفوژ می‌کنیم. رسوب حاصل را در کمترین حجم سرم فیزیولوژیکی حل نموده و به مدت ۷٦ ساعت در مقابل سرم فیزیولوژیکی دیالیز کرده و در طول این مدت سرم فیزیولوژیکی ٤ بار تعویض می-کنیم (۱).

مرحله عبور از ستون سفادکس: محلول حاوی آنزیم آلفا مانوزیداز در شرایط ٤ درجه سانتی گراد از ستون ۵۰ سانتی متری ژل سفادکس $G_{۲۰۰}$ عبور داده شد (۱۰)، سرعت خروج محلول از ستون کروماتوگرافی بر روی ستون سفادکس $G_{۲۰۰}$ مساوی با ۳ میلی‌لیتر در ۱۰ دقیقه بود که در این شرایط، لوله‌های حاوی مقدار زیاد آنزیم آلفا مانوزیداز جمع آوری گردید (شکل ۱).

مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی با میل ترکیبی (Con A-CL-Seralose Chromatography): در این مرحله از کنکوناوالین آ (Con A) خالص شده از دانه‌های جک بین (Canavalia gladiata) استفاده گردید (۱). مقدار ۷ میلی‌گرم پروتئین که از لوله‌های غنی از آنزیم از ستون کروماتوگرافی سفادکس به‌دست آمده بود، بر روی ستون کروماتوگرافی با میل ترکیبی قرار داده و سپس با عبور محلول سرم فیزیولوژی با گرادیانت از صفر تا یک مولار گلوکز در نمک طعام برای جدا نمودن همه پروتئین‌ها از محلول آنریمی استفاده گردید و در نهایت برای جداسازی آنزیم آلفا مانوزیداز از یک مولار متیل گلوکز در ٤٠٪ اتیلن گلایکول استفاده شد (۱) (شکل ۲). سرعت خروج محلول از ستون کروماتوگرافی بر روی ستون کروماتوگرافی مساوی با ۳ میلی‌لیتر در ۱۰ دقیقه بود.

تخمین پروتئین: غلظت پروتئین به وسیله روش لوری با جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۱۱,۱۲). Bovine Serum Albumin (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. ضریب جذب نوری برای BSA به‌عنوان استاندارد مساوی ٦/٤ مورد استفاده قرار گرفت ($A^{۲۸۰}_{۱٪}$ =٦/٤).

تخمین کربوهیدرات در آنزیم: از روش فنل سولفوریک اسید برای اندازه‌گیری کربوهیدرات استفاده شده و گلوکز به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

اندازه‌گیری آنزیم: فعالیت آلفا مانوزیداز (EC: 3.2.1.24) در سیتم حاوی ٥٠٠ µL شامل ۲۰۰ µL پارانیترو فنیل آلفادی مانو پیرانوزید (۲mM) در بافر سیترات (٤/٦ pH، ۰/۱mM)، ۱۰۰ µL از آنزیم، µL ۲۰۰ از بافر سیترات (٤/٦ pH،۰/۱mM) که در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود، اندازه‌گیری شد. واکنش آنزیمی آن بعد از مدت ۳۰ دقیقه با اضافه کردن ۲/٥ میلی‌لیتر بافر بورات (۹/٥ pH، ۰/۱mM) متوقف گردید. پارانیترو فنیلات آزاد شده در طول موج ٤٠٥ نانومتر با استفاده از ضریب جذب ۱۷۷۰۰ برای پارانیترو فنیلات با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیم عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند در مدت یک دقیقه یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل بکند (١٤).

الکتروفروز پلی اکریل آمید ژل صفحه ای با سدیم دودسیل سولفات(SDS- PAGE): نمونه مراحل استخراج از ستون کروماتوگرافی توسط الکتروفورز بر پایه ژل ۱۰ درصد اکریل آمید در حضور و عدم حضور SDSبه روش Ornstein L کنترل شد. همچنین وزن ملکولی آنزیم و ساب یونیت‌های آن با استفاده از پروتئین‌های استاندارد ملکولی به‌دست آمد (١٤,١٥,١٦).

اثر pH و حرارت بر آنزیم آلفا مانوزیداز: اثر pH بر روی فعالیت آنزیم با استفاده از بافر سیترات یک دهم مولار در pH هایی در دامنه ٦-۳ انجام گردید و برای اندازه گیری حرارت مناسب آنزیم در دامنه(۱۰۰-۰) درجه سانتی‌گراد از بافر سیترات یک دهم مولار در ٤/٦= pH استفاده گردید. آنزیم خالص شده برای مدت ۳۰ دقیقه در حرارت های مختلف از صفر تا صد اینکوبه شده بود.

اثر غلظت سوبسترا: مطالعه اثر غلظت سوبسترا بر سرعت واکنش آنزیمی از پارانیترو فنیل آلفادی مانو پیرانوزید در دامنه ۱/۲٥-۱ میلی مول سوبسترا استفاده گردید.

اثر EDTA و فلزات بر سرعت آنزیمی: آنزیم آلفا مانوزیداز خالص شده با EDTA ۱۰ میلی مولار در pH مساوی ۷ برای مدت ١٦ ساعت اینکوبه شده و سپس غیر فعال بودن آنزیم چک گردید. آنزیم غیر فعال شده را با فلزات Cu^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} و Zn^{+2} با غلظت ٥ میلی مولار به مدت ۲ ساعت اینکوبه گردید و در نهایت فعالیت آن اندازه گیری شد.

اثر مواد شیمیایی بر آنزیم برای تعیین اسید های آمینه

موجود در جایگاه فعال آنزیم: این مطالعه بروی آنزیم آلفا مانوزیداز خالص شده با استفاده از N-برموسوکسینامید (NBS) در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH مساوی ۳، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (DNBS) در متانول، دی تیو بیس ۲- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH مساوی ۸، فنیل گلایکول (PG) در بافر بی کربنات ۰/۱ مولار با pH مساوی ۸، ان استیل ایمیدازول (NAL) در بافر تریس کلریدریک اسید ۰/۰۵ مولار با pH مساوی ۸ و دی پیروکربنات (DEPC) در بافر فسفات اسید ۰/۱ مولار با pH مساوی ۷/۲ انجام گردید. مشاهده گردید که اسید آمینه تریپتوفان در محل فعال آنزیم وجود دارد.

یافته‌ها

مقدار پروتئین تام برای فراکشن تولید شده توسط سولفات آمونیم، ستون های کروماتو گرافی با فیلتراسیون ژلی (سفادکس) و میل ترکیبی به ترتیب مساوی با ۱۳۱۵، ۳۶۳/۸ و ۱/٤٤ میلی‌گرم بود. این آنزیم با ٦ /۱۳۸٤ برابر خالص گردیده و میزان فعالیت مخصوص این آنزیم ۲۱٦۰ میلی گرم بر پروتئین به‌دست آمد (جدول شماره ۲). میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بین المللی بیان شده است.

جدول ۱: فعالیت گلیکوزیداز و اسید فسفاتاز از سرم انسانی

آنزیم	فعالیت واحد آنزیم بر میلی‌لیتر سرم
آلفا مانوزیداز	۱/۲
بتا گالاکتوزیداز	۲
ان استیل گلوکوسامینیداز	۵/۵
اسید فسفاتاز	٤

اکثر پروتئین‌ها در فراکشن A که شامل همه آنزیم‌های گلیکوزیداز بودند، توسط کنکوناوالین آ (Con A) به صورت رسوب در آمدند. به همین دلیل برای جدا سازی آنزیم از کروماتوگرافی با میل ترکیبی از کنکوناوالین آ استفاده گردید. بعد از عبور پروتئین ها از این ستون کروماتوگرافی مشاهده گردید که β-گالاکتوزیداز در ستون باقی نماند و با عبور سرم فیزیولوژی خارج گردید. با استفاده از عبور محلول گلوکز یک مولار از ستون N-استیل گلوکوزیداز و اسید فسفاتاز نیز خارج گردیدند که در نهایت با عبور محلول یک مولار متیل گلوکز در اتیلن گلوکز(٤۰ v/v٪) بر روی ستون کروماتوگرافی داده آلفا مانوزیداز خالص گردید (۱۸,۱۹). فیلتراسیون ژلی از فراکشن های غنی آلفا مانوزیداز بر روی سفادکس $G_{۲۰۰}$ ثابت نمود که آنزیم آلفا مانوزیداز خالص گردیده است. آلفا مانوزیداز خالص شده در نهایت توسط PAGE با به‌دست آمدن یک باند بر روی الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت (۱٦,۱۷) (شکل۳).

وزن ملکولی آنزیم خالص شده با استفاده از کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی و SDS-PAGE به ترتیب مساوی ۳٥٤ و ٤۲۳ کیلو دالتون به‌دست آمد. در SDS-PAGE، ۳ باند برای آنزیم آلفا مانوزیداز خالص به‌دست آمده که این باندها دارای وزن ملکولی ۱۸٦ ، ۱۲٥ و ۱۱۲ کیلو دالتون بودند (شکل ٤ و جدول شماره ۳). مقدار هیدروکربور در این آنزیم برابر با ۱۰/۲ درصد بود. در ٤/٦ pH بیشترین فعالیت مانوزیداز با ۲ میلی مول از پارانیترو فنیل آلفا دی مانو پیرانوزید به عنوان سوبسترا به‌دست آمد. حرارت مناسب برای آنزیم مساوی با ٤۰ درجه سانتی گراد می باشد. مقدار ارزش K_m برای آنزیم ۲۸/٥ میلی مولار بر اساس منحنی لینور و برگ به‌دست آمد. EDTA با غلظت ۱۰ میلی مولار باعث غیر فعال نمودن آنزیم گردید.

۸۰ درصد فعالیت آنزیمی از آنزیم غیر فعال شده توسط Zn^{2+} به آنزیم برگشته شد (۲۰). نتیجه اثر مواد شیمیایی بر آنزیم خالص شده نشان داد که ۹۸ درصد فعالیت آنزیم با NBS غیر فعال گردید که این امر نشان می دهد اسید آمینه تریپتو فان در جایگاه فعال آنزیم وجود دارد.

بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده، تا کنون آنزیم‌های زیر از انسان خالص شده است که با آنزیم جدید خالص سازی شده متفاوت می‌باشد:

الف) مانوزیداز لیزوزومی نوع بتا از جفت انسانی حدود ده هزار برابر خالص شده است که وزن ملکولی آن برابر ۱۱۰ کیلو دالتون بوده و pH و K_m این آنزیم به ترتیب ٤/٥، ٥٦/. میلی مولار می‌باشد (۲۱).

ب) آنزیم مانوزیداز از کبد انسان با کروماتوگرافی کانکلووالینآ با ۱٤۰۰ بار با pH مناسب مساوی با ٥/٥ خالص شده است (۲۲).

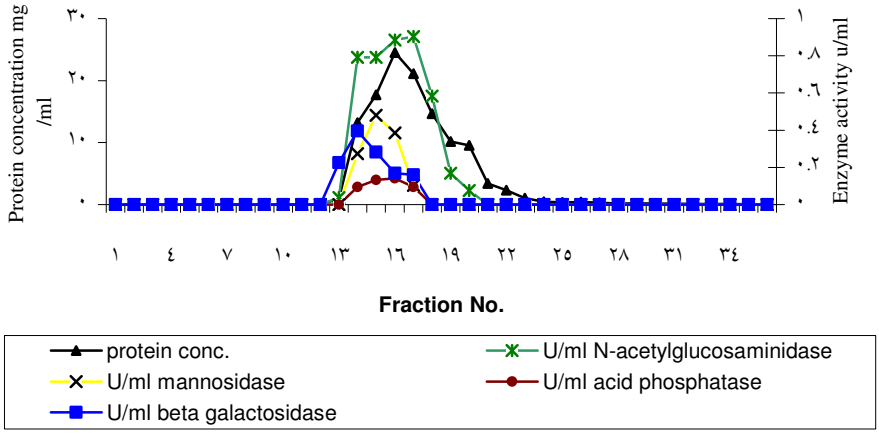
خالص سازی آنزیم جدید مانوزیداز از سرم انسان در چهار مرحله، رسوب با حلّال‌های آلی (بوتانل واسن سرد)، رسوب با سولفات آمونیم، مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی با سفادکس G۲۰۰ و مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی با میل ترکیبی انجام گردید و توسط الکتروفورز و ژل فیلتراسیون، خالص بودن آن به اثبات رسیده است. در جایگاه فعال آنزیم، اسید آمینه تریپتو فان وجود دارد.

جدول شماره ۲: مراحل خالص‌سازی آلفا مانوزیداز سرم انسانی

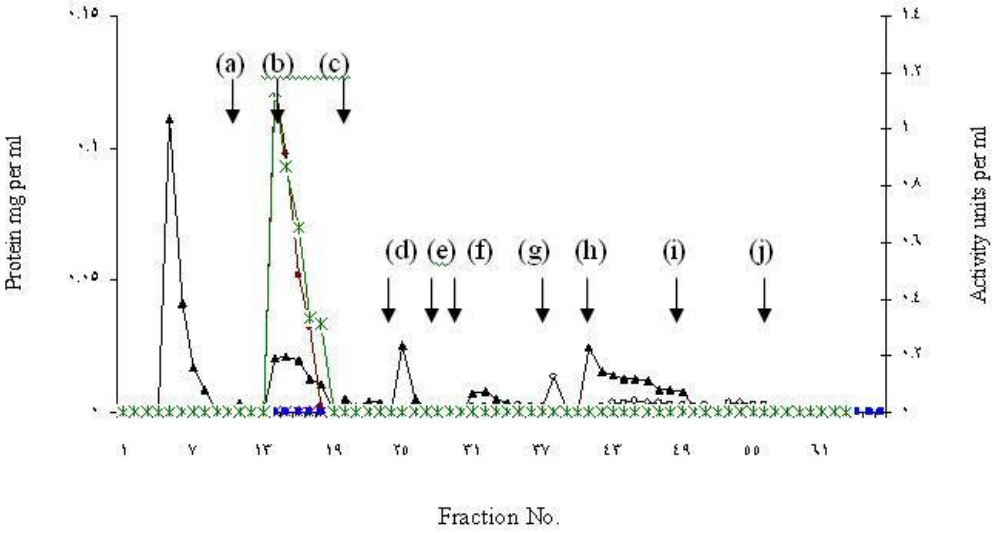
مراحل خالص سازی	حجم نمونه میلی لیتر	میلی‌گرم کل پروتئین	غلظت پروتئین میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	فعالیت آنزیمی واحد بر میلی‌لیتر	کل واحد آنزیمی	فعالیت مخصوص (واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین)	درصد برگشت آنزیم (ریکاوری آنزیمی)	درجه خلوص آنزیمی
استخراج با سرم فیزیولوژی	٥۰	۳۹۲۱	۷۸/٤	۱/۲۳	۶۱/٥	۰/۱٥	۱۰۰	۱
فراکشن T	۳۰	۱۳۱٥	٤۳/۸	۱/۲۸	۳۸/٤	۰/۰۲۹	۶۲/٤	۱/۸
سفادکس G200	۱۲۰	۳۶۳/۸	۳	۰/۳۱	۳۷/۲	۰/۱۰۲	۶۰/٤	۶/٥
کروماتوگرافی با کنکوناوالین T	۱۸	۱/٤٤	۰/۰۱	۱/۲	۲۱/۶	۲۱۶۰	۳٥/۱	۱۳۸٤/۶

جدول ۳: وزن ملکولی α – مانوزیداز خالص شده از سرم انسان

آنزیم	وزن ملکولی با SDS -PAGE	وزن ملکولی با سفادکس G_{100}	تعداد ساب یونیت	وزن ملکولی ساب یونیت
آلفا مانوزیدار	٤۲۳۷۹۰ دالتون	۳٥٤۸۱۳ دالتون	۳	۱۸۶۲٥۰ ۱۲٥۳۱٤ ۱۱۲۲۰۲

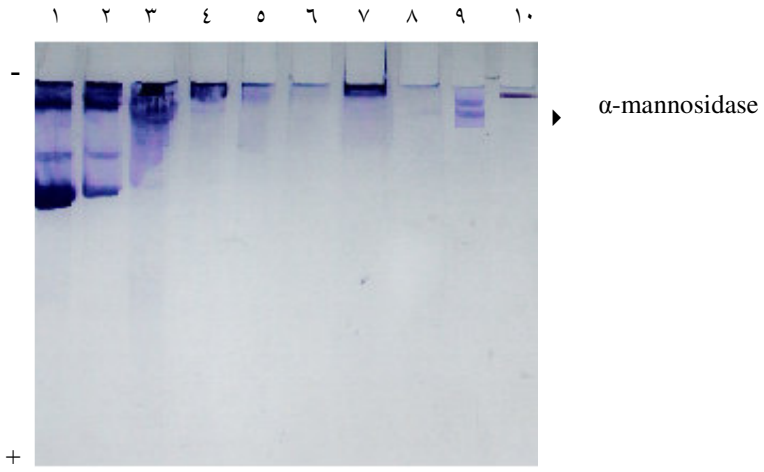


تصویر ۱ : منحنی فیلتراسیون ژلی از فراکسیون آ از آنزیم مانوزیداز سرم انسانی روی سفادکس G200



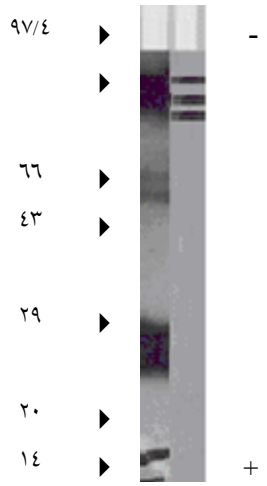
تصویر ۲: منحنی خالص سازی آنزیم های سرم بر روی ستون کنکاناوالین آ

Saline I wash (a), 0.01 M glc. (b), 0.02 M glc. (c), 0.03 M glc. (d), 0.004 M glc. (e), 0.005 M glc.(f), 0.1 M glc (g), 0.5 M glc. (h), 1 M methyl glc. (i),1 M methyl glc. in saline in 40% ethylene glycol.(j)
Protein concentration -▲-▲-, N-acetyl glucosaminidase -*-*-, Acid phosphatase - - -
Beta galactosidase -■-■-, Alpha mannosidase -o-o-



تصویر ۳ : الکتروفورز از α – مانوزیداز خالص شده از سرم انسان در بافر تریس با pH = ۸.۳

تصویر الکتروفورز از سرم انسان، (۱) سرم انسان، (۲) فراکسیون آ، (۳) فراکسیون سفادکس جی ۲۰۰ ، (٤) محلول خارج شده با شستشو با سرم فیزیولوژی از ستون کروماتوگرافی کن آ، (٥) فراکسیون با عبور گلوکز ۰/۰۰۳ مولار، (٦) فراکسیون با عبور گلوکز ۰/۰٥ مولار، (۷) فراکسیون با عبور گلوکز ۰/۱ مولار، (۸) فراکسیون با عبور گلوکز ۰/٥ مولار فراکسیون با عبور گلوکز ۱ مولار، (۹) فراکسیون با عبور ۱ مولار متیل گلوکز ، (۱۰) فراکسیون با عبور گلوکز یک مولار متیل گلوکز در اتیلن گلایکول



تصویر ٤: SDS PAGE از α – مانوزیداز خالص شده از سرم انسان

شماره ۱ ملکول‌های مارکر فسفوریلاز ب (۹۷٤۰۰ دالتون)، آلبومین سرم گاو (٦٦۰۰۰ دالتون) ، آو آلبومین (٤۳۰۰۰ دالتون) ، کربنیک انهیدراز (۲۹۰۰۰ دالتون)، مهار کننده سویا (۲۰۱۰۰) و لیزوزیم (۱٤۳۰۰) و شماره ۲ آلفا مانوزیداز در بتا مرکاتو اتانول

References

1. Saith, S. M, Characterization of Jack-Bean α-D-mannosidase as a Zinc Metalloenzyme: (1975),. Biochem. J. 14**:** 83-90.
2. Sethu, K. M. P and Prabha, T. N., α-D-Mannosidase from Capsicum annuum: (1997),.Photochemistry ,44**:** 383-387.

3. Forsee WT, Palmer CF, Schutzbach JS. Purification and characterization of an alpha-1,2-mannosidase involved in processing asparagine-linked oligosaccharides. J Biol Chem. 1989 ;264(7): 3869-76.

4. Porwoll S, Fuchs H, Tauber R. Characterization of a soluble class I alpha-mannosidase in human serum. FEBS Lett. 1999;449(2-3): 175-8.

5. Yoshihisa T, Ohsumi Y, Anraku Y. Solubilization and purification of alpha-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membranes in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 1988; 263(11): 5158-63

6. Gaikwad SM, Keskar SS, Khan MI. Purification and characterization of alpha-D-mannosidase from Aspergillus sp. Biochim Biophys Acta. 1995 ; 1250(2):144-8

7. Ockerman, P A. Ageneralized storage disorder resembling Hurler's syndrome. Lancet. 1967; 231**:** 239-41.

8. Agrawal KM, Bahl OP. Glycosidases of Phaseolus vulgaris. II. Isolation and general properties. J Biol Chem. 1968; 243(1): 103-11.

9. Chin L, Ali Z, Lazan H, Cell wall modifications, degrading enzymes and softening of carambola fruit during ripening. J Exp Bot. 1999; 50**:** 767-75.

10. Hase S, Natsuka S, Oku H, Ikenaka T. Identification method for twelve oligomannose-type sugar chains thought to be processing intermediates of glycoproteins. Anal Biochem. 1987; 167(2): 321-6

11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. J Biol chem.. 1951; 193**:** 265-75.

12. Sawhney S Y, Bhide S V. Immobilized Mucin: an affinity matrix for the isolation of winged bean acidic and basic lectins. J. Chromtogr. 1990; 503**:** 2272-2765.

13. Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers, P A, Smith F, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28**:** 350-56.

14. Li YT. Studies on the glycosidases in jack bean meal. I. Isolation and properties of alpha-mannosidase. J Biol Chem. 1967; 242(23): 5474-80

15. Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann N Y Acad Sci. 1964; 121**:** 321-49.

16. Reisfeld, RA, Lewis U J, Williams D E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. Nature. 1962; 195**:** 281-283.

17. Williams D E, Reisfeld R A, Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new conditions of PH and buffer. Annal N Y Acad. Sci. 1964; 121**:** 373-81.

18. Ogata, S., Muramatsu, T., and Kobata, A.; Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on Concanavalin A-Seralose: (1975), J. Biochem. (Tokyo) 78**:** 687-696.

19. Wongvithoonyaporn P, Bucke C, Svasti J. Separation, characterization, and specificity of alpha-mannosidases from Vigna umbellata. Biosci Biotechnol Biochem. 1998; 62(4): 613-21.

20. Agrawal, B18. Ogata S, Muramatsu T, Kobata A. Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-sepharose. J Biochem (Tokyo). 1975; 78(4): 687-96.

21. Iwasaki Y, Tsuji A, Omura K, Suzuki Y. Purification and characterization of beta-mannosidase from human placenta. J Biochem (Tokyo). 1989; 106(2): 331-5.

22. Phillips NC, Robinson D, Winchester BG. Characterization of human liver alpha-D-mannosidase purified by affinity chromatography. Biochem J. 1976; 153(3): 579-87.

23. Aberomand M. and Soltanzahdeh M. Purification and Characterization of pseudocholinesterase from Sheep liver: 2007; Biochemical and Cellular Archives, 6: 186-7.

24. Sawhney SK, Singh R. Isolation and Purification of enzymes. In: Introduction. Practical Biochemistry. P. 114.