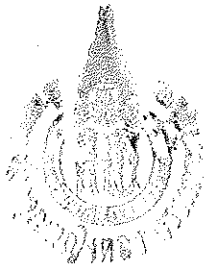
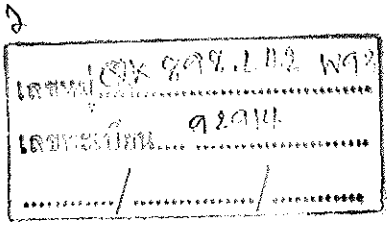
การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหรียง

Purification and Characterization of Lectin from Riang Beans *(Parkia javanica)*



ไพฑูรย์ อรรฆยานนท์

Paitoon Akkayanont



วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2536

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหรียง
ผู้เขียน	นายไพฑูรย์ อรรฆยานนท์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

.....กรรมการ
(ดร. รพีพร โสตถิพันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหรียง

ผู้เขียน นาย ไพฑูรย์ อรรฆยานนท์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2536

บทคัดย่อ

การสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียงให้ได้ผลดีที่สุด ทำได้โดยปั่นละเอียดเมล็ดเหรียงใน PBS และคนนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ แล้วนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สารสกัดเลคตินที่ได้จะมีความว่องไวจำเพาะสูงสุดในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เมล็ดเหรียงและเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการศึกษาการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง คือเมล็ดเหรียงที่เพาะเป็นเวลา 7 วัน และเม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมจากเลือดสด สารสกัดจากเมล็ดเหรียง สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มดีที่สุด (251.10 หน่วย/มก.โปรตีน) รองลงมา ได้แก่ เม็ดเลือดแดงของหนูขาว (3.92 หน่วย/มก.โปรตีน) แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคน แกะ หรือห่านเกิดการจับกลุ่ม

ทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเลคตินได้โดยใช้เทคนิคด้านคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ทำการแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex G 100, Sephadex G 200 และ DEAE-cellulose ตามลำดับ วิธีที่ 2 แยกสารสกัดเลคตินด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-mannose agarose ตามลำดับ โปรตีนที่ถูกดูดซับโดย Sephadex, DEAE-cellulose และ D-mannose agarose ถูกชะออกโดยน้ำตาลมอลโตส, โซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนโนส ตามลำดับ

เลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยโปรตีนสองชนิด ที่มีปริมาณไม่เท่ากัน เพราะเมื่อนำไปผ่านการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตฟอรีซิสทั้งแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ และแบบมีเอสดีเอส ได้ผลเช่นเดียวกันคือปรากฏโปรตีนสองแถบซึ่งย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน โปรตีนทั้งสองชนิดประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว โปรตีนชนิดที่มีมากมีน้ำหนักโมเลกุล 47870 ดัลตัน โปรตีนชนิดที่มีน้อยมีน้ำหนักโมเลกุล 45700 ดัลตัน

เลคตินบริสุทธิ์ มีความว่องไวจำเพาะในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (68,266 หน่วย/มก.โปรตีน) สูงกว่าการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงของหนูขาว (266 หน่วย/มก.โปรตีน) แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของ คน แกะ หรือห่านจับกลุ่ม ความว่องไวจำเพาะในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพิ่มกว่าเดิม 64 เท่า เมื่อย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายก่อนด้วยเอนไซม์ทริปซิน

ไดวาเลนท์แคทไอออน ซึ่งสามารถกระตุ้นการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ Ca^{2+}, Mn^{2+} และ Mg^{2+} ตามลำดับ ส่วนอีจีทีเอ ไม่มีผลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง น้ำตาลเมธิล-แอลฟา-ดี แมนโนซามีน และน้ำตาลแมนโนส ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งปฏิกริยาการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง โดยเลคตินได้ 100 % น้ำตาลชนิดอื่นๆมีผลยับยั้งน้อยหรือไม่ยับยั้งเลย น้ำตาลฟรุคโตส และ แซคคาโรส มีผลยับยั้งปฏิกริยาการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง น้อยกว่า 100 % ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ แต่น้ำตาล กาแลคโตส,เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน และน้ำตาลเอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน ไม่มีผลยับยั้งการจับกลุ่มเซลล์แต่อย่างใดที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์

เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 50° ซ ความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง ลดอย่างรวดเร็วเมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิระหว่าง 60-80° ซ เลคตินจะมีความเสถียรและมีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงดีที่สุดที่ pH 7 pH เป็นกรดหรือเบสมากขึ้น มีผลทำให้ทั้งความเสถียรและปฏิกริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงยิ่งลดน้อยลง

Thesis Title	Purification and characterization of lectin from riang beans *(Parkia javanica)*
Author	Mr. Paitoon Akkayanont
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1993

Abstract

The best condition for extracting lectin from riang beans was achieved by homogenization in PBS, stirring for 12 hours, removal of lipid by petroleum ether and precipitation with 60 % saturated ammonium sulphate for 6 hours. The lectin extract contained highest specific hemagglutinating activity for rabbit red blood cells. Riang seeds allowed to germinate for 7 days as well as red cells prepared from fresh whole blood were suitable for hemagglutination studies. The riang extract could mediate agglutination of red blood cells of rabbit (251.10 unit/mg protein) and less so for those of rat (3.92 unit/mg protein), while no hemagglutination of human, sheep or goose red blood cells was obtained.

Lectin was purified from the riang extract by column chromatography. Purification was performed by 2 methods. Firstly, the extract was chromatographed on Sephadex G 100, Sephadex G 200 and DEAE-cellulose,

respectively. Secondly, the extract was isolated by DEAE-cellulose, Sephadex G 100 and D-mannose agarose columns, respectively. Proteins adsorbed by Sephadex, DEAE-cellulose and D-mannose agarose were eluted by maltose, sodium chloride and D-mannose, respectively.

The purified lectin showed two species of protein, one intense and one faint bands both in non-denaturing-PAGE as well as in SDS-PAGE. Either of them was a single polypeptide chain with molecular weight of 47,870 daltons for the major form and 45,700 daltons for the minor form.

The purified lectin could mediate agglutination of red blood cells of rabbit (68,266 unit/mg protein) more effectively than those of the rat (266 unit/mg protein), while no hemagglutination of human, sheep or goose red cells was obtained. Treatment of rabbit red cells with trypsin increased the specific hemagglutinating activity of the purified lectin upto 64 folds. Divalent cations, in the following order, Ca^{2+}, Mn^{2+} and Mg^{2+} activated the hemagglutinating activity whereas EGTA showed no activatory effect. Both methyl-α-D-mannosamine and mannose, at the same concentration of 5 mM, caused 100 % inhibition of hemagglutination. Other sugars were less or not effective. Fructose and saccharose caused less than 100 % inhibition of hemagglutination at 200 mM, while galactose, N-acetyl galactosamine and N-acetyl-D-mannosamine showed no inhibitory effect at 200 mM.

The purified lectin was stable at temperature upto 50° C. The hemagglutinating activity rapidly decreased as the incubating temperature of the lectin in the range of 60-80° C. The optimal pH for both the stability and the hemagglutinating activity of the purified lectin was 7, the more acidic or basic pH the greater decreases in both.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียน ขอแสดงความขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล และ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ ที่ให้คำแนะนำ และให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ ในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์ รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมาและ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบ ตลอดจนขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการวิจัย ขอขอบคุณ นส.สาทิพย์ ทองนวล ที่ได้ช่วยเหลือพิมพ์ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการกองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ มารดา และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือตลอดจนจบการศึกษา

ไพฑูรย์ อรรฆยานนท์

สารบาญ

	หน้า
ตัวย่อและสัญลักษณ์	ช
รายการตาราง	ญ
รายการรูป	ฌ
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	46
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	47
วัสดุ	47
อุปกรณ์	48
วิธี	48
3. ผลการทดลอง	61
4. บทวิจารณ์	101
5. บทสรุป	113
6. เอกสารอ้างอิง	116
7. ภาคผนวก	138

ตัวย่อและสัญลักษณ์

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ก.	=	กรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
ชม.	=	ชั่วโมง
°ซ	=	องศาเซลเซียส
ml	=	millilitre
°C	=	degree Celcius
%	=	percent
α	=	alpha
β	=	beta
O.D.	=	optical density
nm	=	nanometer
MW	=	molecular weight
pH	=	hydrogen ion concentration
EGTA	=	ethylene glycol-bis (β-aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid
NaCl	=	sodium chloride
Gal	=	galactose
Glu	=	glucose
GalNAc	=	N-acetyl galactosamine
GlcNAc	=	N-acetyl glucosamine
PBS	=	phosphate buffer saline
M_r	=	relative molecular weight
M	=	molar
mM	=	millimolar
Ca^{2+}	=	calcium ion

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

Mg^{2+}	=	magnesium ion
Mn^{2+}	=	manganese ion
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
ND-PAGE	=	nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane
HCl	=	hydrochloric acid
Bis	=	bisacrylamide
BSA	=	bovine serum albumin
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณสมบัติทั่วไปของเลคติน ในพืชตระกูลถั่ว	8
2.	ตัวอย่างเลคติน จากพืชตระกูลถั่วที่ได้ศึกษาและทำให้บริสุทธิ์	9
3.	ตัวอย่างเลคติน จากพืชชั้นสูง	13
4.	ตัวอย่างเลคติน จากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ	14
5.	ตัวอย่างเลคติน จากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง	17
6.	ตัวอย่างเลคติน จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	19
7.	ตัวอย่างเลคติน ที่จับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ	21
8.	ตัวอย่างเลคติน ที่จับกับโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลชนิดต่างๆ	29
9.	ตัวอย่างเลคติน ที่จับจำเพาะกับแบคทีเรียบางชนิด	42
10.	ตัวอย่างเลคติน ที่จับจำเพาะกับหมู่เลือดชนิดต่างๆ	43
11.	ผลการสกัดและไม่สกัดไขมันจากสารสกัดเลคตินด้วย ปิโตรเลียมอีเธอร์	68
12.	ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ของสารสกัดเลคติน	70
13.	ผลความเข้มข้นของน้ำตาลต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยสารสกัดเลคติน	72
14.	ผลการยับยั้ง 100 % ของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยสารสกัดเลคติน	74
15.	การทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex และคอลัมน์ DEAE-cellulose	76
16.	การทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose	81

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17.	ความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ ของเลคตินบริสุทธิ์	96
18.	ผลของเอนไซม์ทริปซิน ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินบริสุทธิ์	97
19.	ผลความเข้มข้นของน้ำตาลต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์	98
20.	ผลการยับยั้ง 100 % ของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์	99
ตารางผนวกที่		
1.	การสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง ที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน	135
2.	ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง	136
3.	ผลการตกตะกอนโปรตีนของสารสกัดเลคตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 % ในช่วงเวลาต่าง ๆ	137
4.	ผลการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวเปอร์เซนต์ต่าง ๆ	138
5.	คะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ของเลคตินบริสุทธิ์ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 30-80° ซ	138

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	รูปแบบโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลชนิดต่างๆ	27
2.	ลักษณะช่อใบ และฝักของเหรียง *Parkia javanica*, Merr	45
3.	การสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง ที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน	62
4.	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมี เอสดีเอส ของเลคตินที่สกัดได้จากเมล็ดเหรียงที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน	63
5.	ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง	64
6.	ผลการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 % ในช่วงเวลาต่าง ๆ	66
7.	ผลความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการตกตะกอนโปรตีนของสารสกัดเลคติน	67
8.	ผลการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4° ซ ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดเลคติน	71
9.	การแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex G 100	75
10.	การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 100 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 200	77
11.	การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 200 ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose	79
12.	การแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose	80
13.	การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100	82
14.	การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 100 ด้วยคอลัมน์ D-Mannose agarose	84

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15.	แบบแผนโปรตีนของการทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex และ DEAE-cellulose	85
16.	แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose	86
17.	แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ	88
18.	กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน	89
19.	ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์	91
20.	ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ต่อ pH	92
21.	ผลของ pH ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย โดยเลคตินบริสุทธิ์	93
22.	ผลของความเข้มข้นของไดวาเลนท์ แคทไอออน และอีจีทีเอ ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย โดยเลคตินบริสุทธิ์	95

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารประกอบเลคตินได้มีการศึกษามานานกว่า 100 ปีแล้ว โดยช่วงแรกๆได้ศึกษาเลคตินในพืช เรียกโปรตีนดังกล่าวว่า phytohemagglutinin ต่อมาได้ค้นพบและศึกษาโปรตีนดังกล่าวในสัตว์ แบคทีเรีย ไวรัส รา จึงเรียกโปรตีนดังกล่าวว่า agglutinin (Kocourek, 1986) ค่าที่นิยมใช้ทั่วไปในปัจจุบันคือคำว่า เลคติน (lectin) ซึ่งถูกเสนอโดย Boyd ในปี ค.ศ.1954 โดยหมายถึง โปรตีนชนิดจับกับคาร์โบไฮเดรต (a carbohydrate binding protein) ที่ไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน สามารถทำให้เซลล์จับกลุ่ม หรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรต (glycoconjugates) ตกตะกอนได้ (Goldstein, *et al.*, 1980)

การศึกษาเลคตินเกิดขึ้นอย่างจริงจังเมื่อ 10-20 ปีมาแล้ว ทั้งนี้เพราะพบว่า เลคตินสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์ ในการวิจัยด้านชีวภาพในหลายสาขาวิชา เช่น ชีวเคมี เซลล์วิทยา และภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นต้น นอกจากนี้เลคตินยังมีบทบาทสำคัญหลายประการในระบบชีวภาพ เช่น เลคตินที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นสื่อชักนำ ในการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้าน (host) ของแบคทีเรีย เลคตินที่อยู่บนผนังเซลล์พืชทำหน้าที่ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา (Chrispeels and Raikhel, 1991) และเลคตินที่ผิวรากพืชตะกูลถั่ว ชักนำให้แบคทีเรียชนิดไรโซเบียม เข้าอาศัยในรากได้ (Harold, 1984) เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต และอาจช่วยย่อยสารประกอบไกลโคโปรตีน หรือเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Barondes, 1984) หรือเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆด้วย (Gabius, 1988; Kamiya, *et al.*, 1990) สำหรับเลคตินในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มีบทบาทเกี่ยวข้องในการสืบพันธุ์โดยเฉพาะในพวกครัสเตเชียน (crustacean) (Muramoto, 1991; Barnum and Brown, 1983;

Snell and Nacionales, 1990) เป็นต้น

จากที่กล่าวแล้วจะเห็นความสำคัญของเลคติน ที่เกี่ยวข้องหลากหลายในระบบชีวภาพ จึงทำให้มีการค้นคว้าวิจัย เพื่อหาเลคตินชนิดใหม่ๆและศึกษาคุณสมบัติของเลคตินที่ได้จากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะแหล่งที่ได้จากพืช โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วซึ่งมีการศึกษา และค้นพบเลคตินมากที่สุด (Rudiger, 1984) เลคตินที่ได้ศึกษาและค้นพบ ส่วนใหญ่จะมาจากแหล่งทางแถบตะวันตก สำหรับในประเทศแถบตะวันออกและในบ้านเรา มีการศึกษาและค้นพบเลคตินชนิดใหม่ๆไม่มากนัก ตัวอย่างเลคตินที่ได้ศึกษาเช่น เลคตินจากสะตอ (*Parkia sp.*) (Yadav and Ganasawaran, 1976; อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992) เลคตินจากเผือก (Taro, *Colocasia esculenta*) (Promplook, 1985) เลคตินจากสาเก (Bread fruit, *Artocarpus sp.*) (Promplook , 1985; Namjuntra, *et al.*, 1985)

สำหรับเหรียง (*Parkia javanica*) เป็นพืชตระกูลถั่วที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในตระกูลเดียวกับสะตอ และพบทั่วไปทางภาคใต้ของประเทศไทย ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นที่นิยมรับประทานทั่วไปเช่นเดียวกับสะตอ สรรพคุณทางด้านสมุนไพรในเหรียง จะมีค่าสูงกว่าสะตอ (กรมป่าไม้, 2526) และพบว่า เหรียงเป็นพืชที่มีเลคตินอยู่เช่นกัน (Utarabhand, 1990) โดยสารสกัดเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายจับกลุ่มได้ (Akkayanont and Utarabhand, 1992) แต่ก็ยังไม่มีผู้ใดได้ทำการแยกบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินชนิดนี้ ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงหยิบยกเอาหัวข้อนี้มาทำการศึกษา ซึ่งผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านการแพทย์ หรือ ทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่เกี่ยวข้องอื่นๆต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ความหมายและคุณสมบัติโดยทั่วไปของเลคติน

เลคติน ถูกค้นพบครั้งแรกในเมล็ดละหุ่ง (castor bean) เรียกว่า

ricin ต่อมาได้ค้นพบเลคตินตัวอื่น ได้แก่ crotin จากเมล็ด *Croton tiglium* , robin จากต้น *Robinia pseudoacacia* และ abrin เลคตินทั้ง 4 ตัวนี้มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มได้ จึงเรียกโปรตีนที่ได้จากพืชเหล่านี้ว่า hemagglutinin และเมื่อได้มีการค้นพบ phasin และคอนคานาวาลิน เอ (concanavalin A) จึงมีการเรียกโปรตีนดังกล่าวว่า phytagglutin หรือ phytoagglutinin หรือ phytohemagglutinin (PHA) (Kocourek, 1986)

นอกเหนือจากการค้นพบเลคตินในพืชแล้ว ยังค้นพบเลคตินจาก ไวรัส, แบคทีเรีย และสัตว์ ในช่วงแรกได้เรียกโปรตีนเหล่านี้ว่า แอนติบอดี (antibody) แต่ไม่เป็นที่ยอมรับส่วนใหญ่จึงนิยมใช้คำว่า agglutinin และ heteroagglutinin ซึ่งจะหมายถึงเฉพาะ เลคตินที่ได้จากสัตว์ (Kocourek, 1986) คำว่า เลคติน ซึ่งเป็นที่ยอมรับกว้างขวาง ได้ถูกเสนอโดย Boyd ในปี ค.ศ.1954 ซึ่งมาจากคำลาติน คือ lectus (legere) หมายถึง หยิบ (pick) หรือ เลือก (choose or select) ซึ่งคำจำกัดความนี้ ในตอนนั้นหมายถึง สาร agglutinins จากพืชซึ่งจับกลุ่มจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงของคน (Boyd, 1954) แต่จากการค้นพบโปรตีนจากแหล่งต่างๆ ซึ่งจับจำเพาะกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต คำว่า เลคติน จึงได้ยอมรับมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อหมายถึงโปรตีนที่ได้จากแหล่ง ต่างๆ ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปสารละลาย หรือเป็นส่วนประกอบของเมมเบรน ซึ่งสามารถจับกับน้ำตาลได้อย่างจำเพาะ การจับกันของเลคตินกับน้ำตาล จะจับกันอย่างหลวมๆ ซึ่งสามารถแยกจากกันได้ เมื่อสารที่ทำปฏิกิริยาตัวใดตัวหนึ่งมีมากเกินพอ คล้ายกับปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท หรือแอนติบอดีกับแอนติเจน ปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) ของเลคติน กับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต หรือสารประกอบไกลโคโปรตีน ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลเชิงเดี่ยวที่จำเพาะกับเลคติน คล้ายกับการยับยั้งปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติเจน กับ แอนติบอดีโดยแฮบเท็น (hapten) ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเล็ก และจับจำเพาะกับแอนติบอดี ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ จากการที่เลคตินสามารถทำให้ เซลล์เม็ดเลือดจับกลุ่ม หรือตกตะกอนสารประกอบคาร์โบไฮเดรต หรือสารประกอบไกลโค

โปรตีนได้ โมเลกุลของเลคติน จะต้องมีตำแหน่งที่จับกับโมเลกุลของน้ำตาล ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว หรือน้ำตาลเชิงซ้อนอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสัน (clefts) หรือร่อง (groove) บนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลชนิดใดชนิดหนึ่ง ขึ้นกับชนิดเลคติน จากคุณสมบัติอันนี้ทำให้สามารถใช้เลคตินศึกษา ชนิดน้ำตาลบนผิวเซลล์ ของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต และไกลโคโปรตีนได้ (Sharon, 1977)

เลคตินไม่ได้เป็นเอนไซม์ แต่มีเอนไซม์หลายชนิด ภายใต้อุณหภูมิ และ pH ที่ไม่เหมาะสมจะแสดงคุณสมบัติคล้ายเลคติน คือทำให้เซลล์จับกลุ่ม หรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ตกตะกอนได้ เช่น เอนไซม์กลูโคซิเดส (glycosidase) (Hankins and Shannon, 1978) เลคตินไม่ได้เป็นแอนติบอดี เพราะเลคตินเป็นโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในเซลล์ โดยเฉพาะพบมากในเซลล์พืช ไม่ถูกสร้างขึ้นอย่างแอนติบอดีโดยการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย แต่แอนติบอดีเป็นโปรตีน ที่ถูกสร้างขึ้นจากระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ชั้นสูง เมื่อมีสิ่งเร้าหรือสารภายนอกแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้การจับกันอย่างจำเพาะของแอนติบอดี กับสารที่แปลกปลอมเป็นไปอย่างกว้าง คือนอกจากจะจับกับน้ำตาลแล้ว ยังจับกับสารอื่นๆได้อีก เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลิอิก ในขณะที่เลคตินจะจับกับสารพวกคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลเท่านั้น นอกจากนี้แอนติบอดีจะมีรูปร่างเหมือนกัน แต่เลคตินจะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ ในแง่ขององค์ประกอบของกรดอะมิโน ขนาดโมเลกุล และ คุณสมบัติของโมเลกุล (Sharon, 1977)

ดังนั้น คำจำกัดความของเลคติน จึงหมายถึง สารโปรตีนซึ่งจับกับคาร์โบไฮเดรต (a carbohydrate binding protien) ซึ่งไม่ได้มาจาก ระบบภูมิคุ้มกัน สามารถทำให้เซลล์จับกลุ่ม หรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรต (glycoconjugates) ตกตะกอนได้ (Goldstein, *et al.*, 1980) เลคตินไม่ใช่เอนไซม์ โปรตีนที่เคลื่อนย้าย ฮอร์โมน หรือสารพิษ เนื่องจากสารเหล่านี้ มีตำแหน่งจับกับน้ำตาลได้เพียงตำแหน่งเดียว (Etzler, 1985)

1.2 แหล่งที่มาของเลคติน

เลคตินพบได้ในพืช สัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง และสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส เป็นต้น มีการศึกษาเลคตินที่ได้จากพืช ก้าวหน้ามากกว่าจากแหล่งอื่นๆ เนื่องจากศึกษาได้ง่าย และตัวอย่างมีอยู่ทั่วไป ดังนั้นข้อมูลของเลคตินที่ได้จากพืชจึงมีมากกว่าแหล่งอื่น

1.2.1 เลคตินจากพืช

เลคตินจากพืช เป็นเลคตินชนิดแรก ที่ได้ทำการศึกษามาตั้งแต่ ค.ศ.1887 เนื่องจากพบอยู่ทั่วไปในพืช และสามารถสกัดออกมาศึกษาได้ง่าย เลคตินจากพืชที่ได้ทำการศึกษามากที่สุด ได้แก่ เลคตินจากพืชตะกูลถั่ว (leguminoceae) และ ธัญญพืช (graminaceae) (Rudiger, 1984; Etzler, 1986) และมีการศึกษาในกลุ่มอื่นๆด้วย

1.2.1.1 เลคตินของพืชตระกูลถั่วกลุ่ม leguminoceae

เลคตินในกลุ่มนี้จะพบมากในเมล็ด ซึ่งอาจพบเลคตินถึง 10 % ของโปรตีนทั้งหมดของเมล็ดที่เจริญพันธุ์ (Liener, 1976) โดยจะพบอยู่ในส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) ซึ่งจะพบมากสุดในช่วงเมล็ดเจริญพันธุ์ และค่อยๆลดน้อยลงในขณะที่เมล็ดเริ่มงอกเป็นต้นอ่อน (Howard, *et al.*,, 1972; Pueppke, 1979; Pueppke, *et al.*, 1978; Rudiger, 1984)

จากการศึกษาแหล่งที่อยู่ของเลคติน ภายในเซลล์ในส่วนของใบเลี้ยง โดยการย้อมเลคตินจาก *Phaseolus vulgaris* ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (immmunoperoxidase-labeled antibodies) พบว่า เลคตินอยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์ใบเลี้ยง และโดยใช้วิธีการทำปฏิกริยากับอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งติดฉลากด้วยฟลูออเรสซีน ไอโซไธโอไซยาเนท (fluorescienisothiocyanate-labeled immunoglobulin) ศึกษาเลคติน คอนคานาวาลิน เอ และเลคติน *P. vulgalis* พบว่า อยู่ในส่วนไซโตพลาซึมเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า คอนคานาวาลิน เอ จะอยู่ร่วมกับส่วนโปรตีนบอดีของเซลล์ใบเลี้ยง และพบในชั้นนอกของผิวเมล็ดแป้งด้วย (Clarke,*et al.*, 1975) เช่นเดียวกับการศึกษาเลคติน *P. vulgalis* โดยวิธีการย้อมเลคติน E_4

และ L_4 ซึ่งเป็นไอโซเลคติน ด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยเม็ดทอง (gold labeled antibodies) พบว่า เลคตินทั้งคู่จะอยู่ในส่วนโปรตีนบอดี (Manen and Pusztai, 1982) และจากการศึกษาโดยการย้อมเลคตินจากถั่วเหลือง ด้วยวิธีเดียวกันนี้ พบว่า นอกจากจะพบเลคตินในส่วนโปรตีนบอดีแล้ว ยังพบในส่วนแกนยอดอ่อน (embryo axis) ด้วย (Horisberger and Vonlanthen, 1980)

ปริมาณของเลคตินในใบเลี้ยง ในขณะเมล็ดกำลังงอก อาจจะลดลงพร้อมๆกับการลดของโปรตีนอื่นๆในใบเลี้ยง เช่น เลคตินจากเมล็ด *Dolichos biflorus* (Tabot and Etzler, 1978) หรือจะค่อยๆลดลงหลังจากโปรตีนอื่นๆในใบเลี้ยงลดลงแล้ว เช่น เลคตินจากเมล็ด *Vicia faba* (Weber and Neumann, 1980) การลดน้อยลงของเลคตินในใบเลี้ยง ยังขึ้นกับอายุของใบเลี้ยงด้วย เช่น ไอโซเลคติน ของถั่วลิสง และ ไอโซเลคติน ของ *Griffonia simplicifolia* (Peuppke, 1979; Lamb, *et al.*, 1983)

เลคตินอาจจะพบในส่วนอื่นๆของพืช เช่น ในใบ ลำต้น และราก แต่ปริมาณที่พบมีน้อยกว่าในเมล็ด (Rudiger, 1984; Etzler, 1986) เลคตินในส่วนอื่นๆอาจจะเหมือนหรือต่างไปจากเลคตินในเมล็ด (Etzler, 1986) ความแตกต่างของเลคตินดังกล่าว เป็นผลจากการควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน ตัวอย่าง *Dolichos biflorus* มีเลคตินที่แตกต่างกันอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ เลคตินจากเมล็ด เลคตินจากราก และเลคตินจากลำต้นและใบ พบว่า เลคตินในรากจะประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างจากเลคตินของเมล็ด ทำให้ปฏิกิริยาการจับกลุ่มเซลล์ต่างกัน แสดงให้เห็นว่า เลคตินสองชนิดนี้มียีนควบคุมการสร้างโปรตีนต่างกัน (Quinnand and Etzler, 1983) สำหรับเลคตินจากส่วนลำต้น และใบ สามารถทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับเซลล์ได้คล้ายกับเลคตินจากเมล็ด ทั้งนี้เนื่องจาก มีความแตกต่างของกรดอะมิโนตรงปลายคาร์บอกซิลิค (carboxylic end) ของหน่วยย่อยอันใดอันหนึ่งของเลคตินทั้งสองชนิดซึ่งเป็นผลมาจาก การเปลี่ยนแปลงของยีนที่ควบคุม (Etzler,*et al.*, 1977; Jin, *et al.*, 1983; Talbot and Etzler, 1978)

เลคตินยังพบในบริเวณ รากอ่อน โดยเฉพาะรากขนอ่อน (root hair) ซึ่งพบอยู่บริเวณผิวเซลล์ ตัวอย่างในรากของถั่วลันเตา, clover และ ถั่วเหลือง (Etzler, 1985) แต่เลคตินจากรากมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเลคตินที่ได้จากเมล็ด และอาจจะเหมือนหรือต่างกันกับเลคตินจากเมล็ด ขึ้นอยู่กับชนิดของเลคติน เลคตินจากรากบางชนิดสามารถจับกับแบคทีเรียชนิดไรโซเบียมได้ แต่เลคตินจากเมล็ดไม่สามาถจับกับแบคทีเรียชนิดนี้ได้ (Gatehouse and Boulter, 1980; Gade, *et al.*, 1981; Law and Strijdom, 1984)

คุณสมบัติทั่วไปของเลคตินในพืชตระกูลถั่ว แสดงในตารางที่ 1 และตัวอย่างเลคตินที่ได้ศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ แสดงในตารางที่ 2

1.2.1.2 เลคตินจากธัญญพืชในกลุ่ม graminaceae

ธัญญพืชในกลุ่มนี้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั้งหมด ได้มีการศึกษาการพัฒนา แหล่งที่อยู่ และการกระจายของเลคติน wheat germ agglutinin (WGA) เลคตินชนิดนี้จะพบหลังจากออกดอก 25 วัน และหลังจากนั้นอีก 20 วันจะเพิ่มแบบ exponential (Peumans, *et al.*, 1982b) โดยจะพบบริเวณผิวนอกของโปรตีนบอดี้ ระหว่างเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ (Mishkind, *et al.*, 1983) และในส่วนของคัพภะ (embryo) บริเวณผิวนอก ในส่วนของรากและโคลีโอไรซ่า (coleorhiza) (Miller and Bowler, 1982; Mishkind, *et al.*, 1980)

เลคตินจาก ไรย์ (rye) บาร์เล่ย์ (barley) และข้าว (rice) พบอยู่ในส่วนของคัพภะ โดยเฉพาะบริเวณผิวนอกและในราก (Mishkind, *et al.*, 1983) เลคตินจากไรย์ และบาร์เลย์จะมีรูปแบบการเจริญ และการแปรสภาพ (differentiation) คล้ายกับเลคติน WGA จากข้าวสาลี (wheat) (Peumans, *et al.*, 1982a) สำหรับข้าว มีการสังเคราะห์ และเก็บสะสมเลคตินอย่างรวดเร็วในระหว่าง 8 และ 16 วัน หลังจากมีดอก หลังจากนั้นการสังเคราะห์เลคตินจะลดลง ในช่วงเมล็ดเจริญพันธุ์จะไม่มีการสังเคราะห์เลคติน (Peumans, *et al.*, 1983)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทั่วไปของเลคตินในพืชตะกูลถั่ว (Sharon and Lis, 1990)

หน่วยย่อย	
น้ำหนักโมเลกุล	25,000-30,000 ดัลตัน
จำนวน	2 หรือ 4
แหล่งจับ	
จำนวน	1 แห่งต่อหนึ่งหน่วยย่อย
น้ำตาลที่จำเพาะ	คล้ายกัน
ไอออนโลหะที่ต้องการ	Ca^{2+}, Mn^{2+}
รูปแบบกรดอะมิโน	มีไฮดรอกซีและคาร์บอกซีสูง มีซัลเฟอร์น้อยหรือไม่มี
ลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายกัน	มีมาก
น้ำตาลจับแบบ glycosylation	ปกติ
โครงสร้าง 3 มิติ	แบบ α helix มีน้อย หรือไม่มี แบบ β sheet เป็นโครงสร้างหลัก

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเลคตินจากพืชตะกูลถั่วที่ได้ศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Lis and Sharon, 1990)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
Abrus precatorius	jequirity bean
Amphicarpea bracteata	hog peanut
Arachis hypogaea	peanut
Bauhinia purpurea	–
Bowringia milbraedii	–
Canavalia ensiformis	jack bean
Canavalia gladiata	Japanese jack bean
Caragana arborescens	pea tree
Crotalalia juncea	sunn hemp
cytisus scoparius	–
Cytisius sessiforius	broom
Dioclea grandiflora	–
Dolichos biflorus	horse gram
Erythrina corallodendron	coral tree
Glycine max	soybean
Griffonia simplicifolia	–
Lathyrus ochrus	–
Lens culinaris	lentil
Lonchocarpus capassa	–
Lotus tetragonolobus	asparagus pea

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเลคตินจากพืชตระกูลถั่วที่ได้ศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
Maackia amurensis	–
Medicago sativa	alfalfa
Onobrychis viciifolia	sainfoil
Phaseolus vulgalis	kidney bean
Pisum sativum	garden pea
Psophocapus tetragonolobus	winged bean
Robina pseudoacacia	black locust
Sophora japonica	Japanese pagoda tree
Trifolium repens	white clove
Ulex europaeus	furz, gorse
Vicia cracca	common vetch
Vicia faba	fava bean
Vicia graminea	–
Vicia villosa	hairy vetch
Vigna radiata	mung bean
Wisteria floribunda	wisteria

1.2.1.3 เลคตินในกลุ่ม solanaceae

ตัวอย่าง เลคตินในกลุ่มนี้ได้แก่ มันฝรั่ง (potato) มะเขือเทศ (tomato) และ thorn apple (*Datura stramonium*) เลคตินในกลุ่มนี้ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูง เลคตินจากมันฝรั่งจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 50 % โดยน้ำหนัก และไกลโคเปปไทด์ที่พบเป็นชนิด hydroxyproline oligoarabinoside และ serine galactoside อยู่สูง (Ghanekar and Perombelon, 1980) เลคตินจาก thorn apple พบในส่วนไซโตพลาซึม และเซลล์เมมเบรนของต้นที่เจริญพันธุ์ แต่ไม่พบเลคตินในส่วนของลำต้นหรือใบของเมล็ดที่กำลังงอก พบเล็กน้อยในรากและดอก เลคตินชนิดนี้มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มเซลล์ เช่นเดียวกับเลคตินได้ที่จาก มันฝรั่ง และ มะเขือเทศ (Kilpatrick and Yeoman, 1978) สำหรับเลคตินจาก มะเขือเทศ พบในส่วนของ เมล็ด ใบ ลำต้น และผิวของผล ซึ่งมีความว่องไวในการจับกลุ่ม (agglutinating activity) เม็ดเลือดแดงต่ำ แต่เลคตินในส่วนของน้ำผลไม้ จะมีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงสูง เลคตินในส่วนนี้จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 50 % โดยน้ำหนัก คุณสมบัติของเลคตินจากมะเขือเทศ คล้ายกับเลคตินที่ได้จากมันฝรั่ง และ เลคตินจาก thorn apple (Kilpatrick, 1980)

1.2.1.4 เลคตินในกลุ่ม cucurbitaceae

ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ได้แก่ เลคตินจากฟักทอง (pumpkin, *Cucurbita maxima*) แตงกวา (cucumber, *Cucumis sativus*) และแตงโม (melon, *Cucumis melo*) เลคตินที่สกัดได้จากส่วนท่อลำเลียงอาหาร (phloem exudate) ของพืชทั้งสามชนิดนี้มีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงสูง และไม่พบเลคตินในส่วนเมล็ด หรือในต้นอ่อนที่กำลังงอกในระยะ 5 วันแรก พบว่าความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคตินกลุ่มนี้ ไม่ถูกยับยั้งโดยน้ำตาลเชิงเดี่ยวแต่จะถูกยับยั้งได้โดยสายของน้ำตาลเอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ซึ่งจับด้วยพันธะเบต้า (1-4) (Allen, 1979)

1.2.1.5 เลคตินในกลุ่ม euphorbiaceae

เลคตินในกลุ่มนี้ พบครั้งแรกในน้ำยาง (latex) ของพืช *Hura creptitan* ซึ่งมีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ ต่อมาได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ พบว่าประกอบด้วยเลคติน 3 ชนิด แต่ละชนิดมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (tetramer) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,900-37,500 ดัลตัน และมีความจำเพาะกับน้ำตาล กาแลคโตสเหมือนกัน เลคตินในน้ำยางของพืช *Euphorbia characias* มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดัลตัน มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสเช่นกัน (Barbieri, *et al.*,1983)

สำหรับพืชใบเลี้ยงคู่กลุ่มอื่นๆ ได้มีการศึกษาในส่วนท่อลำเลียง (sieve tube sap) ในพืช 21 กลุ่ม พบเลคตินที่มีความว่องไวในการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีความจำเพาะกับสายน้ำตาลเอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ซึ่งจับด้วยพันธะ เบต้า(1-4)ไกลโคซิดิค มีเพียง 15 ชนิด จากทั้งหมด 53 ชนิด (Gietl, *et al.*, 1979) ตัวอย่างเลคตินที่ได้จากพืชชั้นสูง แสดงในตารางที่ 3

1.2.2 เลคตินในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

ได้แก่ เลคตินที่พบในพืชชั้นต่ำ เช่น เห็ด รา ไลเคน สาหร่าย และ ยีสต์ เป็นต้น หรือเลคตินจากสัตว์ชั้นต่ำ เช่น แบคทีเรีย ฟองน้ำ (sponge) ประการัง (coral) ราเมือก (slime mold) ตัวอย่างเลคตินที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ แสดงในตารางที่ 4

1.2.3 เลคตินจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ เลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรน หรือ เมมเบรนเลคติน (integral membrane lectin) และ เลคตินที่ละลายได้ (soluble lectin)

1.2.3.1 เลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรน หรือ เมมเบรนเลคติน (integral membrane lectin)

เลคตินในกลุ่มนี้ เชื่อว่าฝังตัวอยู่ในส่วนของเซลล์เมมเบรน การสกัดเมมเบรนเลคติน อาจใช้อะซิโตนทำให้เมมเบรนเป็นผงหรือเก็บรวบรวมจากสารละลายที่สกัดจากเมมเบรน (crude membrane

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเลคตินจากพืชชั้นสูง

แหล่งที่มาของเลคติน	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
seed of Nigerian walnut (*Tetracarpidium canophorum*)	-	Sato, *et al.*, 1991
bark of Pagoda tree (*Sophora japonjca*)	mannose, galactose	Ueno, *et al.*, 1991
seed of *Crotalaria striata*	-	Khang, *et al.*, 1990
leaves of *Vicia unijugas*	-	Yangi, *et al.*, 1990
corn kernel (*Zea mays* L.)	mannose, galNAc	Jankovic, *et al.*, 1990
seed of *Erythrina americana*	-	Ortega, *et al.*, 1990
carrot (*Daucus carota*)	glcNAc	Soederhaell, *et al.*, 1990
seed of *Amaranthus caudatus*	galβ1,3 galNAc	Rinderle, *et al.*, 1989
seed of *Trichosanther kirilowii*	galactose	Falasca, *et al.*, 1989
winged bean tubers (*Psophocarpus tetragonolobus*)	galactose	Shet and Madaiah, 1989

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

แหล่งที่มาของเลคติน	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
พืชชั้นต่ำ		
mushroom (*Aleuria aurantia*)	fucose	Nagata, *et al.*, 1991
green alga (*Halimeda opuntia*)	galNAc	Carpenter, *et al.*, 1989
green alga (*Codium tomentofum*)	glcNAc	Fabregas, *et al.*, 1988
baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)	galactose	Kunda, *et al.*, 1987
สัตว์ชั้นต่ำ		
marine sponge (*Halichondria penicea*)	galactose	Kamiya, 1990
marine sponge (*Desmapsama anchorata*)	raffinose	Atta, *et al.*, 1990
tunicate (*Polyandrocarpa misakiensis*)	galactose	Suzuki, 1990
coral (*Gerardia savaglia*)	mannose	Kljajic, *et al.*, 1987

ตารางที่ 4 เลคตินที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (ต่อ)

แหล่งที่มาของเลคติน	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
แบคทีเรีย		
Bradyrhizobium japonica	galactose	Ho, *et al.*, 1990
Mycobacterium sanegmatis	arabinogalactan	Kundu, *et al.*, 1989

fraction) โดยใช้ดีเทอร์เจนท์ที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) เช่น triton X-100 ช่วยสกัดให้ละลายออกมา

การวัดหาความว่องไวของเมมเบรนเลคติน ทำโดยให้เลคติน ทำปฏิกริยากับสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่ละลายน้ำได้ เพื่อให้เกิดตะกอน เลคตินในกลุ่มนี้สามารถชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์ และต้องการ Ca^{2+} เพื่อกระตุ้นความว่องไวของปฏิกิริยาในการจับกลุ่มตกตะกอนกับคาร์โบไฮเดรต

เลคตินในกลุ่มนี้ จำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ แมนโนส ฟูโคส แมนโนส-6-ฟอสเฟต และ เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน (Barondes, 1981;1984; Lis and Sharon, 1986a)

1.2.3.2 **เลคตินที่ละลายได้ (soluble lectin)**

หมายถึง เลคตินที่ละลายได้ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบเลคตินในกลุ่มนี้ถูกสกัดจากเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ง่ายๆ และสามารถทดสอบความว่องไวของสารสกัดเลคติน โดยให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง เพื่อให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ถูกยับยั้งโดยน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรือสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (Barondes, 1981; 1984 ; Lis and Sharon, 1986a) ตัวอย่าง เมมเบรนเลคติน และเลคตินที่ละลายได้ แสดงในตารางที่ 5

1.2.4 **เลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง**

เลคตินที่ศึกษา ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ mollusca, arthropoda และ echinodermata โดยส่วนใหญ่จะพบเลคตินในส่วนของน้ำเลือด (hemolymph) และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น ต่อมเมือก (albumin glands) ไข่(eggs) (Yeaton, 1981) นอกจากนี้ยังพบในเซลล์เมมเบรน ของเซลล์ที่ทำหน้าก่าจัดเซลล์แปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (hemocyte) อย่างไรก็ตามการแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติเลคตินในกลุ่มนี้ยังไม่มากนัก (Lis and Sharon, 1986a) ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง

แหล่งที่มา	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
membrane lectin		
rabbit liver,rat liver	galactose, mannose,galNAc, glcNAc	Barondes, , 1986
human liver	galactose, galNAc	Barondes, , 1986
chicken liver	mannose, glcNAc	Barondes, , 1986
soluble lectin		
frog egg (*Rana catesbeiana*)	galactose	Ozeki, *et al.*, 1991a
Plasma of fish (*Channa punctatus*)	galNAc	Manihar and Das, 1990
chum salmon ova (*Oncorhynchus keta*)	L-rhamnose	Kamiya, *et al.*, 1990
venom of the snake (*Bothrops godmani*)	galactose	Lomonte, *et al.*, 1990
sheep hepatic, goat hepatic and buffalo hepatic	galactose	Ali and Salahuddin, 1989
skin mucus of the conger eel (*Conger myriaster*)	galactose	Shiomi, *et al.*, 1989

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (ต่อ)

แหล่งที่มา	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
human brain	galactose	Bladier, *et al.*, 1989
human serum	mannose,fucose	Taylor and Summerfield , 1987
sheep liver,goat liver and buffalo liver	asialofetuin	Ali and Salahuddin , 1989

ตารางที่ 6 ตัวอย่างเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

แหล่งของเลคติน	น้ำตาลที่จำเพาะ	แหล่งข้อมูล
hemolymph of crab (*Charybdis japonica*)	–	Umetsu, *et al.*, 1991
coelomic fluid of giant clam (*Tridacna derasa*)	galactose	Odo and Miyachi, 1991
sea urchin egg (*Anthocidaris crassispina*)	galactose	Ozeki, *et al.*, 1991b
hemolymph of ascidian (*Botrylloides leachii*)	lactose	Schluter and Ey, 1989
hemolymph of pearl (*Pinctada martensii*)	galactose	Suzuki and Mori, 1989
beetle (*Allomyrina dicchotoma*)	trisaccharide	Sueyoshi, *et al.*, 1988
hemolymph of blue crab (*Callineetes sapides*)	mannose,glucose, fucose,galNAc, glcNAc	Vella, 1987
hemolymph of chinese oak silk moth pupae (*Antheraca pernyi*)	galactose	Qu, *et al.*, 1987

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

1.3 การแบ่งชนิดของเลคตินในระดับโมเลกุล

เลคตินอาจถูกแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆโดยพิจารณาจาก น้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคตินซึ่งแตกต่างกัน เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลง configuration ของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่อะตอมคาร์บอนตัวที่ 3 และ 4 ของวงไพราโนส (pyranose ring) (Goldstein, *et al.*, 1986) หรือ โดยพิจารณาจากรูปแบบโครงสร้างของสายโซ่น้ำตาลที่เลคตินไปจับ (Osawa, *et al.*, 1988)

1.3.1 การแบ่งกลุ่มเลคตินตามน้ำตาลที่จำเพาะ

สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม คือ

1.3.1.1 เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส/กลูโคส

เลคตินในกลุ่มนี้พบมากในเลคตินจากพืชตระกูลถั่ว และเป็นกลุ่มที่ได้มีการศึกษากันมากที่สุด เลคตินในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ

ก. กลุ่มที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 4 หน่วยย่อย ตัวอย่าง เช่น คอนคานาวาลิน เอ

ข. กลุ่มที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น light (α) chain และ heavy (β)chain อย่างละ 2 สาย อยู่ในรูป $\alpha_2\beta_2$ ตัวอย่าง เช่น เลคตินจาก ถั่วลันเตา ถั่วแดง เป็นต้น

เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส/กลูโคส ต้องการไอออนโลหะเช่น Mn^{2+} และ หรือ Ca^{2+} เป็นตัวกระตุ้นความว่องไวของปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอน กรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบโปรตีนของเลคตินมีคุณสมบัติเป็นกรดและเบสสูง และมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่น้อย เลคตินในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟไซท์ ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 7

1.3.1.2 เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน

เลคตินในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยเลคตินมาจากหลายกลุ่ม นอกจากจะจำเพาะกับน้ำตาลเชิงเดี่ยวแล้ว ยังจำเพาะกับสายน้ำตาลสั้นๆ ที่จับกับน้ำตาล เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic linkage) ที่ตำแหน่งเบต้า(1-4) (chitin oligo-

ตารางที่ 7 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก Lis and Sharon, 1986)

ที่มาของเลคติน	ชื่อเรียกทั่วไป
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส/กลูโคส	
Canavalin ensiformis	concanavalin A
Dioclea grandiflora	-
Lathyrus odoratus (sweet pea)	-
Lathyrus sativus (chickling)	-
Lathyrus tingitanus (tangier)	-
Lens culivaris syn. *escentaul*	lentil
Onobrychis viciifolia (sainfoin)	
Pisum sativum (pea)	-
Vicia cracca (common vetch)	-
Vicia ervilia	-
Vicia faba	-
Vicia sativa	-
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน	
Brachypodium sylvaticum (false brome grass)	-
Cytisus sessilifolius	-
Datura stramonium (thorn apple,jimson weed)	datura
Griffonia Bandeirea simplicifolia	GS II
Hordeum vulgare (barley)	-

ตารางที่ 7 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ต่อ)

ที่มาของเลคติน	ชื่อเรียกทั่วไป
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน	
Lycopersicon esculentum (tomato)	-
Oryza sativa (rice)	-
Phytolacca americana (pokeweed,pigeon berry)	-
Secale cereale (rye)	-
Solanum tuberosum (potato)	-
Triticum vulgare (wheat)	wheat germ agglutinin (WGA)
Ulex europaeus (gorse,furze seed)	ulex II
Wisteria floribunda	-
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน/กาแลคโตส	
Phaseolus lunatus syn. *limensis* (lima bean)	lima bean lectin (LBL)
Vicia cracca (common vetch)	-
Helix pomatia (edible snail)	-
Vicia villosa (hairy vetch)	-
Glycine max (soybean)	soybean agglutinin (SBA)
Griffonia simplicifolia	GS I

ตารางที่ 7 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ต่อ)

ที่มาของเลคติน	ชื่อเรียกทั่วไป
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน/กาแลคโตส	
Erythrina species (coral tree)	erythrina lectin
Arachis hypogaea (peanut)	peanut agglutinin (PNA)
Phaseolus vulgaris (red kidney bean)	phyto-hemaglutinin (PHA)
Ricinus communis (castor bean)	ricin
Abrus precatorius (jequirity bean)	abrin
Adenia digitata (modecca flower)	modeccin
Viscum album (mistletoe)	viscumin
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลฟูโคส	
Lotus tetragonolobus (asparagus pea)	–
Ulex europaeus (gorse,furze seed)	ulex I
Anguilla (eel)	–
Griffonia simplicifolia	GS IV

ตารางที่ 7 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆ (ต่อ)

ที่มาของเลคติน	ชื่อเรียกทั่วไป
เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลไซอะลิค	
Carcinoscorpius rotunda cauda (indian horseshoe crab)	-
Limax flavus (slug)	-
Limulus polyphemus (horseshoe crab)	limulus

saccharide) ตัวอย่าง เลคตินในกลุ่มนี้ได้แก่ เลคตินในกลุ่ม gramineae ได้แก่ เลคตินจาก ข้าวสาลี บาร์เลย์ ไรย์ และ ข้าว เลคตินในกลุ่ม solanaceae ได้แก่ เลคตินจาก มันฝรั่ง มะเขือเทศ jimson weed sweet green pepper และ ยาสูบ และเลคติน ในกลุ่ม leguminoceae ได้แก่ *Griffonla simplicifolia* II, *Cytisus sessilifolius* และ *Ulex uropeus* II ตัวอย่าง เลคตินในกลุ่มนี้ แสดงใน ตารางที่ 7

1.3.1.3 เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน/กาแลคโตส

เลคตินในกลุ่มนี้ เป็นเลคตินที่ได้ทำการศึกษามานานกว่า 100 ปี และเป็นเลคตินชนิดแรกที่พบว่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนจับกลุ่มได้ ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ ได้แก่เลคตินที่มีคุณสมบัติเป็นสารพิษ ซึ่งได้จาก jequirity bean, *Ricinus communis*, *Abrus precatorius*, *Adenia digitata* และ *Viscum album* เลคตินทั้งหมดมีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส เลคตินในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างคล้ายกัน เมื่อพิจารณาจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนของโปรตีน แนวโน้มของน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินในกลุ่มนี้ พบว่าน้ำตาลเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน จะมีมากกว่าน้ำตาลกาแลคโตส ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 7

1.3.1.4 เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลฟูโคส

เลคตินในกลุ่มนี้ มีโครงสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน เนื่องจาก เป็นเลคตินที่ได้จากหลายแหล่ง ทั้งจากพืช และสัตว์ จากพืช ตัวอย่างเช่น *Lotus tetragonolobus* และ *Ulex europaeus* จาก รา ตัวอย่างเช่น *Aleuria aurantia* จากสัตว์ ตัวอย่างเช่น *Angiulla anguilla* ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 7

1.3.1.5 เลคตินที่จำเพาะกับกรดไซอะลิค

เลคตินในกลุ่มนี้ พบส่วนใหญ่ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง พบบ้างในพืช เช่น เลคตินจาก ข้าวสาลี (*Triticum vulgare*) เอลเดอเบอรี่ (*Sambucus sieboldiana*) Pagoda tree (*Sophora*

japonica) แต่ไม่พบในพืชตระกูลถั่ว ในพวกสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจะพบมากในส่วนของน้ำเลือด ตัวอย่างเลคตินที่ได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น เลคตินจากแมงดาทะเล (horseshoe crab) กุ้งมังกร (lobsters) หอมทะเล (tunicate) และ แมลง (beetle) เลคตินในกลุ่มนี้มีโครงสร้างระดับโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยถึง 24 หน่วย ตัวอย่างเลคตินในกลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 7

1.3.2 การแบ่งกลุ่มเลคตินตามรูปแบบโครงสร้างของสายโซ่น้ำตาลที่เลคตินจับ

การแบ่งกลุ่มเลคติน จะถือเอารูปแบบการจับของเลคตินกับสายโซ่น้ำตาล (sugar chain) ซึ่งมีรูปแบบต่างๆ จากการศึกษารูปโครงสร้างสายโซ่น้ำตาล บนผิวเซลล์ของสารประกอบไกลโคโปรตีน โดยใช้เทคนิคด้าน เลคติน-แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี พบว่า โครงสร้างสายโซ่น้ำตาลมี 2 รูปแบบ คือ

1.สายโซ่น้ำตาลที่จับกับกรดอะมิโนชนิดเซอรีน (serine) หรือ ธริโอนีน (threonine) เรียกว่า แบบมูซีน (mucine type)

2.สายโซ่น้ำตาลที่จับกับกรดอะมิโนชนิดแอสปาราจีน (aspar-agine) ซึ่งมี 3 แบบ ได้แก่ high mannose type, complex type และ hybrid type

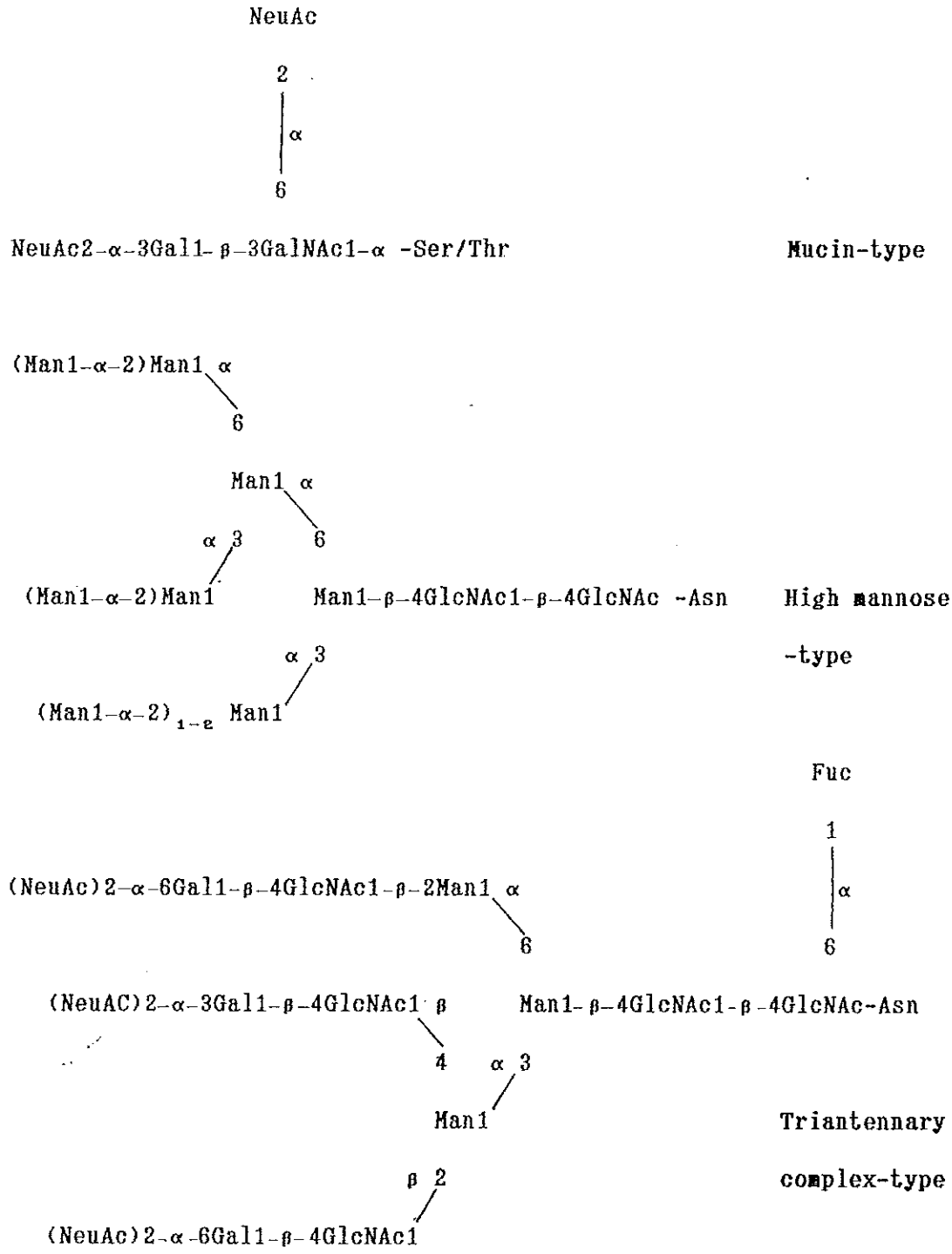
รูปแบบสายโซ่น้ำตาลแสดงในรูปที่ 1 เลคตินชนิดต่างๆจะจับกับโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลดังกล่าวแตกต่างกัน สามารถแบ่งเลคตินได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1.3.2.1 เลคตินที่จับกับสายโซ่น้ำตาลซึ่งจับอยู่กับกรดอะมิโนชนิดเซอรีน หรือธริโอนีน (สายโซ่น้ำตาลชนิดมูซีน)

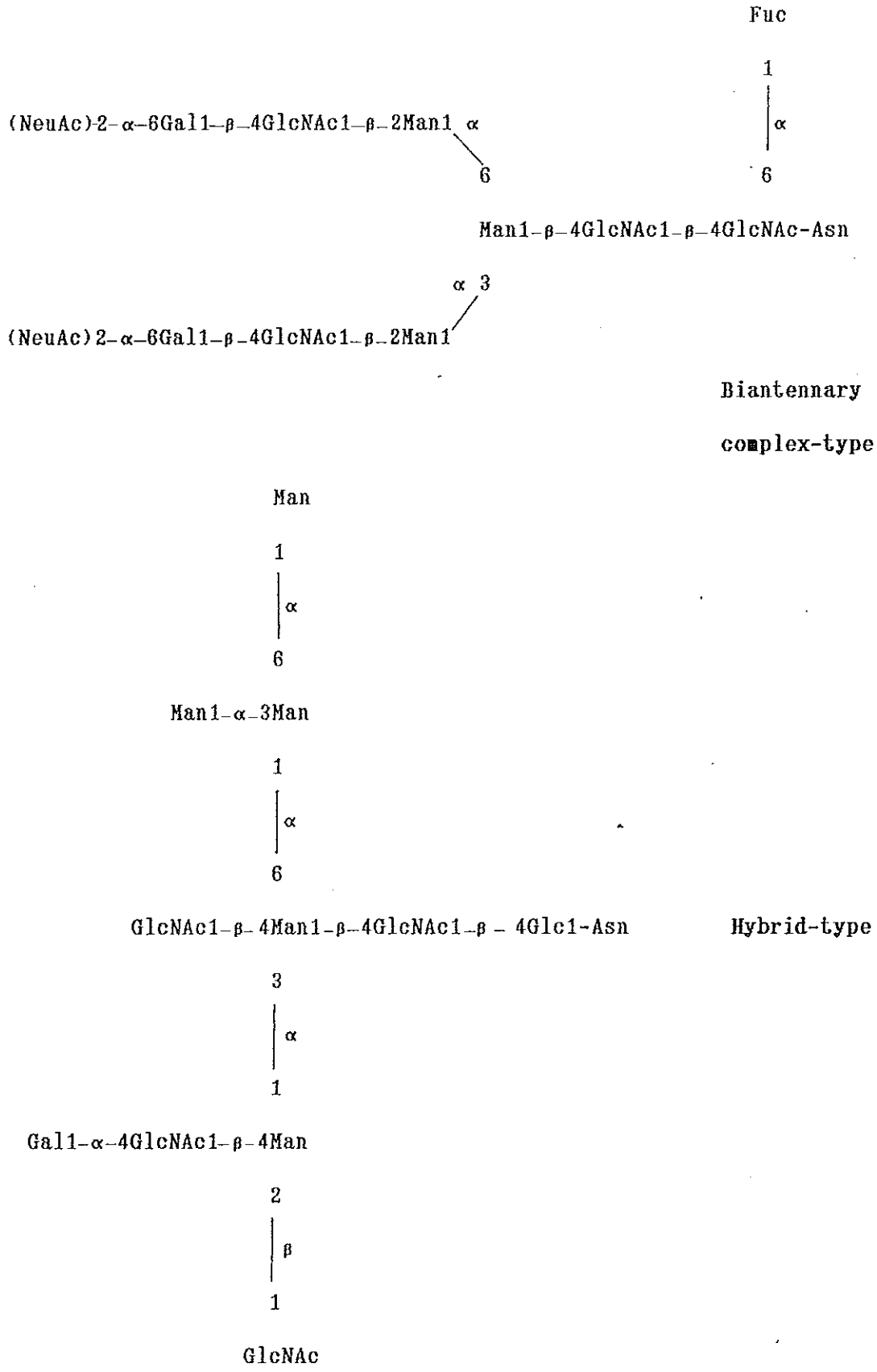
1.3.2.2 เลคตินที่จับกับสายโซ่น้ำตาลซึ่งจับอยู่กับกรดอะมิโนชนิดแอสปาราจีน

1.3.2.3 เลคตินที่จับกับสายโซ่น้ำตาลที่ไม่เจาะจงชนิดกรดอะมิโน

ตัวอย่างของเลคติน ที่จับกับสายโซ่น้ำตาลแบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่า เลคตินในกลุ่มเดียวกัน



รูปที่ 1 แสดงรูปแบบโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลชนิดต่างๆ (Osawa, 1989)



รูปที่ 1 แสดงรูปแบบโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลชนิดต่างๆ (ต่อ)

ตารางที่ 8 ตัวอย่างเลคตินที่จับกับโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลชนิดต่างๆ (Osawa, 1989)

รูปแบบโครงสร้างสายโซ่น้ำตาล	ชนิดเลคติน
1.กรดอะมิโนชนิดเซอรีน/ธรีโอนีนจับกับสายโซ่น้ำตาล (mucine type chain)	*Agaricus bisporus* (mushroom) *Arachis hypogaca* (peanut) *Bauhinia purpurea* *Iberis amara* *Maclura pomifera* *Vicia graminae* *Vicia villosa*
2.กรดอะมิโนชนิดแอสปาราจีนจับกับสายโซ่น้ำตาล	*Canavalia ensiformis* *Datura stramonium* *Lens culinalis* *Phaseolus vulgaris* *Phytolacca amurensis* *Pisum sativum* *Ricinus communis* *Vicia faba*
3.สายโซ่น้ำตาลแบบ ข้อ1. หรือ ข้อ2.	*Sophora japonica* *Triticum vulgare* *Wisteria floribunda*

ตำแหน่งที่จับกับน้ำตาลที่อยู่ในสายเดียวกัน อาจแตกต่างกันได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคทาง เลคติน-แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี

1.4 บทบาททางชีวภาพของเลคติน

1.4.1 บทบาทของเลคตินในพืช

เลคตินในพืช ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษากันมานานมากแล้วแต่หน้าที่ของเลคตินจริงๆ ที่เกี่ยวข้องในพืชยังรู้กันน้อย มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับหน้าที่ของเลคตินในพืชดังนี้

1.4.1.1 เป็นกลไกในการป้องกันตัวของพืช

เดิมเข้าใจว่า เลคตินทำหน้าที่เป็นแอนติบอดีในพืช (Boyd, 1963) ปัจจุบันทราบว่า เลคตินไม่ได้เป็นแอนติบอดี เพราะตำแหน่งจับกับน้ำตาล ที่จำเพาะบนผิวเลคตินไม่เปลี่ยน และเลคตินไม่ได้สร้างขึ้นมาจากการกระตุ้น โดยแอนติเจนในระบบภูมิคุ้มกัน (Etzler, 1985a)แต่เลคตินจากพืช สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และ พบว่า เลคตินมักกระจายอยู่หนาแน่นบริเวณส่วนของพืชที่สัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ดังนั้นเลคตินน่าจะมีบทบาทเป็นกลไกในการป้องกันจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช พบว่า เลคตินจากข้าวสาลี (WGA) ซึ่งจับจำเพาะกับไคติน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma viride* เนื่องจากเลคตินไปยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินของผนังเซลล์ (Mirelman, *et al.*, 1975) เลคตินจาก ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และ ข้าวสาลี สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicilium sp.* และ *Aspergillus sp.* ได้เช่นกัน (Barkai-Golan, *et al.*,1978)

เลคตินจากพืชอาจช่วยป้องกัน และยับยั้งการเกิดโรคพืช ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของเมล็ด พบว่า เลคตินจากเมล็ดพืชตระกูลถั่ว *Vicia cracca* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่บนเปลือกหุ้มเมล็ด (Jones,1964) และเลคตินจากเมล็ดบาร์เลย์สามารถตกตะกอน mosaic virus ทำให้สามารถลดการทำลายของเชื้อไวรัสต่อเมล็ดได้ (Partridge, *et al.*, 1976) เช่นเดียวกับเลคตินจาก *Phaseolus vulgaris* (PHA) สายพันธุ์ FM-RMC จะมีความต้านทานต่อ

mosaic virus และ bean rust ซึ่งพบอยู่ในเมล็ดที่กำลังเจริญเติบโต จนกระทั่งถึงขนาดความสูง 10 มม. หลังจากนั้นปริมาณเลคตินจะลดลง (Anon, 1990)

ปัจจุบันพบว่า เลคตินจาก *Phaseolus vulgaris* (PHA) ประกอบด้วยเลคตินที่มีโปรตีนคล้ายกัน 4 ชนิด คือ PHA-E, PHA-L, α-amylase inhibitor และ arcelin เป็นผลจาก การแปรสภาพของยีน ของเลคตินในพืชชนิดนี้ทางชีวภาพแตกต่างกัน เพื่อสร้างกลไกในการป้องกันตนเอง สำหรับเลคตินในกลุ่มธัญญพืช แม้ว่าจะพบปริมาณน้อย แต่พบสะสมอยู่มากในส่วนของคัพภะของเมล็ด เลคตินในกลุ่มนี้จับจำเพาะกับน้ำตาล เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน โดยเฉพาะในรูปโพลีเมอร์ของน้ำตาลชนิดนี้ ซึ่งเรียกว่า ไคติน เป็นผลทำให้เกิดกลไกในการป้องกันตนเองของพืชในกลุ่มนี้ โดยจะยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบในเซลล์ โดยเฉพาะพวกเชื้อราและแมลง (Chrispeels and Raikhel, 1991)

1.4.1.2 เป็นกลไกช่วยทำให้เกิดการอยู่ร่วมกัน แบบซิมไบโอซิส (symbiosis) ระหว่างแบคทีเรียชนิดไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่ว

ในรากพืชตระกูลถั่ว จะมีแบคทีเรียชนิดไรโซเบียมอาศัยอยู่ โดยแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในรากพืช จะเปลี่ยนเป็นแบคทีรอยด์ (bacteriods) สะสมอยู่ในรากทำให้เกิดเป็นปม แบคทีเรียพวกนี้จะได้รับอาหารจากพืช และในขณะเดียวกัน จะทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นปุ๋ยของพืช (Rudiger, 1984) ความสัมพันธ์ของเลคตินในรากพืชตระกูลถั่วกับแบคทีเรียไรโซเบียม ได้มีผู้ทำการศึกษาหลายท่าน เช่น Barondes (1981), Bauer (1981), Brill (1980), Schmidt and Bohlool (1981) เป็นต้น

ได้มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับบทบาทของเลคติน ที่ทำให้เกิดการอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิสระหว่าง แบคทีเรียไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่ว 2 แบบ คือ 1. เลคตินที่พบบริเวณผิวราก จะเป็นตัวจับแบคทีเรียในดินที่อยู่บริเวณราก โดยน้ำตาลที่จำเพาะกับแบคทีเรียที่บริเวณ

แหล่งจับ 2. เลคตินบริเวณผิวนอกของราก และแบคทีเรีย จะมีแหล่งจับร่วมกัน โดยอยู่ในลักษณะแอนติเจน-แอนติบอดี ทำให้เลคตินมีลักษณะคล้ายเป็นกาวทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างรากกับแบคทีเรีย (Rudiger, 1984)

ปัจจุบันเชื่อว่า เลคตินทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการทำให้เกิดขบวนการซิมไบโอซิส ระหว่างแบคทีเรียไรโซเบียมและรากพืชตระกูลถั่ว (Sharon and Lis, 1989) และพบว่าการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียไรโซเบียมชนิดหนึ่งๆ กับพืชตระกูลถั่วชนิดใดๆค่อนข้างจะเจาะจง ตัวอย่างเช่น ไรโซเบียมที่ทำให้เกิดปมรากในถั่วเหลือง จะไม่ทำให้เกิดปมรากในถั่วลันเตา หรือใน white clover ทั้งนี้เพราะเลคตินในพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด จะมีแหล่งจับกับน้ำตาลที่จำเพาะกับไรโซเบียมชนิดนั้นๆต่างกัน (Hamblin and Kent, 1973) จากความรู้เรื่องยีนในปัจจุบันทำให้ทราบว่าไรโซเบียมประกอบด้วย nod gene หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญในการทำให้เกิดปมรากของพืช nod gene ในไรโซเบียมแต่ละชนิดจำเพาะกับพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด โดยทำให้เกิดปมในรากพืชนั้นๆ nod gene จะเป็นตัวกำหนดทำให้เลคตินที่ผิวเซลล์ราก จดจำได้ในรูปสัญญาน เพื่อจะเหนี่ยวนำทำให้เกิดการจับและสร้างปมที่ราก โดยน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินชนิดนั้นๆไม่สามารถยับยั้งการจับของไรโซเบียมชนิดนั้นๆได้(Sharon and Lis, 1989)

1.4.1.3 **เป็นกลไกช่วยให้ผนังเซลล์(cell wall)พืชยืดขยายตัวยาวออก**

ปกติผนังเซลล์พืชมีโครงสร้างที่แข็ง เลคตินที่อยู่ร่วมในผนังเซลล์พืช จะทำหน้าที่คล้ายกาว ยึดจับผนังเซลล์ด้วยพันธะนอนโควาเลนท์ เชื่อว่า เลคตินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนออกซิน (auxin) ซึ่งฮอร์โมนนี้จะปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน ทำให้ผนังเซลล์มีสภาวะเป็นกรด เป็นผลทำให้ ความว่องไวของเลคตินซึ่งยึดจับผนังเซลล์ลดน้อยลง ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะอ่อนตัวลง และยืดยาวออกได้ ในขณะที่พืชกำลังเจริญเติบโต (Keegstra, *et al.*, 1973)

1.4.1.4 **เป็นกลไกในการทำงานร่วมกับเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม**

เลคตินจากถั่วเขียว (*Vigna radiata*)จะจับ

เม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นจะปลดปล่อยเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้เนื่องจากตอนแรกเลคตินจะจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้น เอนไซม์กาแลคโตซิเดสจะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลกาแลคโตสบริเวณแหล่งที่จับบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงอย่างช้าๆ ทำให้ความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงหมดไป (Hankins, *et al.*, 1979) แสดงให้เห็นการทำงานร่วมกัน ระหว่างเลคตินและเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท โดยเลคตินจะไม่ทำให้รูปร่างของสับสเตรทเปลี่ยน แต่เอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงสับสเตรทไปตามกระบวนการทางชีวเคมี (Goldstein, *et al.*,1980) เอนไซม์บางชนิดอาจทำให้เกิดการจับกลุ่มของสับสเตรทคล้ายเลคติน (Sharon, 1983) แต่เลคตินในสภาวะที่พบในห้องทดลอง จะไม่แสดงความสามารถเป็นเอนไซม์ ยกเว้นในสภาวะธรรมชาติอาจแสดงตัวเป็นเอนไซม์ได้ด้วย (Rudiger, 1984)

1.4.1.5 **บทบาทอื่นๆ**

นอกจากบทบาทดังกล่าวแล้ว ยังมีข้อสัณนิษฐานอื่นๆเกี่ยวกับบทบาทของเลคตินในพืช เช่น เลคตินทำหน้าที่เป็นตัวจับสารคาร์โบไฮเดรต เพื่อล่าเลียงหรือตรึงคาร์โบไฮเดรตไว้ในเมล็ด (Etzler, 1985a) หรืออาจทำหน้าที่ช่วยให้เมล็ดแก่ หรือช่วยในการงอกของเมล็ดและช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ต้นอ่อน (Howard, *et al.*, 1972)

1.4.2 **บทบาทของเลคตินในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง**

เลคตินที่ฝังในเซลล์เมมเบรน มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต และการขนย้ายหรือล่าเลียงสารประกอบ ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบระหว่างเซลล์ และอาจช่วยย่อยสลายสารประกอบไกลโคโปรตีนด้วย สำหรับเลคตินที่ละลายได้จะเคลื่อนย้ายอย่างอิสระทั้งภายในเซลล์ และระหว่างเซลล์ โดยสามารถจับกับสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ทั้งในรูปที่ละลายได้และที่จับกับเมมเบรนต่างๆ (Barondes, 1984)

นอกจากนี้มีข้อสัณนิษฐานว่า เลคตินในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆด้วย นอกเหนือจากการทำหน้าที่จับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Gabius,

1988) เช่น เลคตินในไข่ปลา chum salmon (*Oncorhynchus keta*) ที่ได้รับการผสม ปริมาณเลคตินและความว่องไวของเลคตินจะลดน้อยลง เมื่อไข่ปลามีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่สมบูรณ์มากขึ้น และความว่องไวของเลคตินจะหมดไป ก่อนหน้าที่ไข่ปลาจะฟักออกเป็นตัว (Kamiya, *et al.*, 1990)

1.4.3 บทบาทของเลคตินในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

บทบาทและหน้าที่ของเลคตินในกลุ่มนี้ ยังมีการศึกษากันน้อย ส่วนใหญ่จะศึกษาในสัตว์ทะเล ตัวอย่างบทบาทเลคตินที่ได้ทำการศึกษา เช่น

1.4.3.1 ช่วยในการผสมของไข่และตัวอสุจิของแมงดาทะเล (horseshoe crab) (*Limulus polyphemus*)

โดยเลคตินจะทำให้ไข่ และน้ำเชื้อสัมผัสกัน (primary attachment) ก่อนจะเกิดปฏิกริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ตามมา (Barnum and Brown, 1983)

1.4.3.2 เป็นตัวกำหนดในการเลือกหาที่เกาะตัวของลูกสัตว์น้ำเค็มพวก polychaete (*Dexiospira brasiliensis*) และ bryozoan

โดยเลคตินของลูกสัตว์น้ำ ชักนำให้ลูกสัตว์น้ำเข้าจับผิววัตถุซึ่งมีแบคทีเรีย ซึ่งมีน้ำตาลที่ผิวเซลล์เจาะจงกับเลคตินของลูกสัตว์น้ำนั้นๆ (Kirchman and Mitchell, 1984)

1.4.3.3 ทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนกับแบคทีเรียหลายชนิด

เช่น เลคตินจาก sea hare (*Aplysia depilans* และ *Aplysia fasciata*) ทำให้เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มตกตะกอนกับแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Zipris, *et al.*, 1986)

1.4.3.4 ทำหน้าที่เป็น sex pheromone

เช่น พบว่า เลคตินในสัตว์น้ำเค็มพวกโรติเฟอร์ (rotifer) (*Brachionus plicatilis*) ทำหน้าที่เป็น sex pheromone ในการกระตุ้นให้เกิดการผสมพันธุ์กันของโรติเฟอร์เพศผู้และเมีย โดยพบว่าถ้ายับยั้งเลคตินที่ทำหน้าที่เป็น sex pheromone โดยให้จับกับ

น้ำตาลที่จำเพาะกับ sex pheromone ชนิดนั้นๆก่อน โรติเฟอร์จะไม่มีการเข้าหาเพื่อผสมพันธุ์กัน (Snell and Nacionales, 1990)

1.4.3.5 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการพัฒนารังไข่

เช่น พบว่าปริมาณเลคตินในเพรียง acorn barnacle (*Megabalanus rosa*) จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการพัฒนารังไข่ และจะมีสูงสุดในฤดูที่เพรียงมีไข่แก่ (Muramoto, *et al.*, 1991)

1.4.4 บทบาทที่วไปของเลคติน

1.4.4.1 ทำให้เซลล์จับกลุ่มตกตะกอน

ปฏิกิริยาทำให้เซลล์จับกลุ่มตกตะกอน เกิดขึ้นโดยเลคตินซึ่งมีแหล่งจับ (binding site) กับน้ำตาลที่จำเพาะบนผิวเซลล์ จะเข้าจับ(bind)เซลล์ การจับอาจมีผลทำให้เซลล์ตกตะกอนหรือไม่ก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติของเลคติน (จำนวนแหล่งจับกับน้ำตาล, ขนาดโมเลกุล), คุณสมบัติของเซลล์ที่เลคตินเข้าไปจับ (จำนวนแหล่งจับ, ตำแหน่งของแหล่งจับบนผิวเซลล์) และปัจจัยภายนอกอื่นๆ (อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของเซลล์, ช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของเลคติน และ หรือเซลล์ที่เลคตินเข้าไปจับ โดยสารเคมีหรือเอนไซม์ ซึ่งไม่ไปขัดขวางการจับของน้ำตาลบนผิวเซลล์โดยเลคติน โดยเฉพาะเกี่ยวกับวาเลนซี่ และหรือขนาดของเลคติน จะทำให้ความสามารถในการตกตะกอนของเซลล์ เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ (Lis and Sharon, 1986b) เซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน จะมีผลในการจับกลุ่มตกตะกอนของเซลล์แตกต่างกัน เช่น เซลล์มะเร็งเกิดการจับกลุ่มตกตะกอนโดยเลคตินได้ดีกว่าเซลล์ปกติ บทบาทของเลคตินในการจับกลุ่มและตกตะกอนเซลล์ นอกจากพบส่วนใหญ่ในเซลล์สัตว์แล้ว ยังพบในเซลล์ชนิดอื่นๆด้วย เช่น แบคทีเรีย รา พืช โปรโตซัว ไวรัส เป็นต้น (Lis and sharon, 1986b)

1.4.4.2 กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์

เลคตินหลายชนิด มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์ การแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์จะเกิดขึ้นได้ดีหรือไม่ขึ้นกับชนิดของลิมโฟไซต์ การเปลี่ยนแปลงที่ผิวเซลล์ของลิมโฟไซต์ และโมเลกุลของเลคติน การกระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์โดยเลคติน ส่วนใหญ่จะเกิด

เฉพาะใน ที-ลิมโฟไซต์ (T-cell) จะไม่เกิดในกลุ่มอื่นเช่น บี-ลิมโฟไซต์ (B-cell) ยกเว้นในเลคตินบางชนิด เช่น เลคตินจาก ปู (*Homarus mericanus*) เลคตินจากเนื้อเยื่อไก่ และ เลคตินจากราเมือก (*Dictyostelium purpureum*) ซึ่งจะกระตุ้นการแบ่งตัวของบี-ลิมโฟไซต์ ของหนูขาวเล็ก (mouse) ไม่กระตุ้นการแบ่งตัวของที-ลิมโฟไซต์ สำหรับ เลคตินจาก ถั่วแดง (lentil) กระตุ้นการแบ่งตัวทั้ง ที-ลิมโฟไซต์ และ บี-ลิมโฟไซต์ ของคน และหนูขาวเล็ก (Lis and Sharon, 1986b) อย่างไรก็ตาม กลไกของเลคตินที่ไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ ยังไม่ทราบแน่ชัดในขณะนี้

1.4.4.3 **เป็นตัวกำหนดให้ลิมโฟไซต์ และมาโครเฟจ (macrophage) เข้าทำลายเซลล์แปลกปลอม**

ปกติเซลล์แปลกปลอมที่เข้าในร่างกายสัตว์ จะถูกทำลายโดย ที-ลิมโฟไซต์ โดยเอฟเฟคเตอร์เซลล์ของลิมโฟไซต์จะจับจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอม โดยการชักนำของแอนติบอดี แล้วเข้าทำลายเซลล์แปลกปลอม แต่ในกรณีที่มีเลคติน เลคตินสามารถชักนำให้ ที-ลิมโฟไซต์เข้าทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ โดยเอฟเฟคเตอร์เซลล์ไม่จำเป็นต้องจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอม (Lis and Sharon, 1986b) เลคตินทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวเชื่อมหรือเป็นกาว ทำให้เกิดการจับกันระหว่างเซลล์แปลกปลอม กับเอฟเฟคเตอร์เซลล์ หรือ เลคตินอาจจะเข้าไปเปลี่ยนแปลงผิวเซลล์ ของเซลล์แปลกปลอมนั้น ทำให้ ที-ลิมโฟไซต์จดจำ และเข้าทำลายได้ (Parker and Martz, 1980; Bonavida and Katz, 1985)

นอกจากนี้ เลคตินจะทำหน้าที่เป็นสื่อให้เซลล์มาโครเฟจเข้าจับ และทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ ซึ่งการทำลายจะเกิดได้ดีเพียงใด ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆเหล่านี้ร่วมด้วย ได้แก่ มีการสัมผัสกันระหว่างเซลล์มาโครเฟจ และเซลล์แปลกปลอม มีช่วงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอม และมีปริมาณของเอฟเฟคเตอร์ของเซลล์มาโครเฟจต่อเซลล์แปลกปลอมที่เหมาะสม การชักนำของเลคตินต่อเซลล์มาโครเฟจจะมีประสิทธิภาพดีกว่าแอนติบอดี เพราะเลคตินมีความจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอมได้ดีกว่าแอนติบอดี เนื่องจากการจับเซลล์แปลกปลอมโดยเลคตินจะขึ้น

กับน้ำตาลที่จำเพาะที่ผิวของเซลล์แปลกปลอม ทำให้เลคตินสามารถชักนำให้เซลล์มาโครเฟจ เข้าจับและทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ดีกว่า บางครั้งในกรณีที่เลคตินมีปริมาณมากๆ จะทำให้เซลล์มาโครเฟจปริมาณมากเข้าจับเซลล์แปลกปลอม ทำให้เกิดการเข้าทำลายเซลล์แปลกปลอม โดยการกลืนกิน (phagocytosis) ได้ (Lis and Sharon, 1986b)

1.4.4.4 เลียนแบบความว่องไวของฮอร์โมนอินซูลิน

พบว่าเลคตินหลายชนิด เช่น คอนคานาวาลิน เอ และ เลคตินจากข้าวสาลี (WGA) จะทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนอินซูลิน เช่น กระตุ้นการสร้างไขมัน กระตุ้นการขนส่งน้ำตาล และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและยับยั้งการสลายของไขมัน ซึ่งปฏิกริยาที่เกิดขึ้นสามารถศึกษาได้ในร่างกายสัตว์ทดลอง (in vivo) (Caro and Amatruda, 1980) ความเกี่ยวพันของแหล่งจับที่ผิวเซลล์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ระหว่างเลคตินที่เลียนแบบหน้าที่อินซูลินกับอินซูลินเอง ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นที่เชื่อว่าเลคตินที่เลียนแบบหน้าที่อินซูลิน จะจับกับแหล่งจับบนผิวเซลล์ตำแหน่งเดียวกับอินซูลิน ความว่องไวในการเลียนแบบหน้าที่อินซูลินของเลคติน จะเกิดได้ดีในเลคตินที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป เช่น การเปลี่ยนแปลงประจุ (Kahn, *et al.*, 1981)

1.4.4.5 ความเป็นพิษของเลคติน

เลคตินหลายชนิดจะเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลือดอุ่น เช่น คอนคานาวาลิน เอ, เลคตินจากข้าวสาลี (WGA) และเลคตินจากถั่วแดงหลวง (red kidney bean) (PHA) เป็นต้น (Olsnes, *et al.*, 1978; Stirpe, *et al.*, 1978) โดยปกติความเป็นพิษของเลคติน จะมีผลต่อการทำลายเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงผิดปกติจากเดิม เช่น เซลล์เนื้องอก เซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ (Brown and Hunt, 1978; Nicolson, 1974) จากสมบัติเลคตินเหล่านี้ ได้มีการพยายามศึกษาหาวิธีที่จะนำเลคตินเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอก หรือเซลล์มะเร็ง ตลอดจนใช้เป็นตัวนำยาไปทำลายเซลล์ผิดปกติเหล่านี้ด้วย (Lis and Sharon, 1986b)

1.5 การนำเลคตินไปใช้ประโยชน์

เลคติน เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มาก ในการนำไปศึกษาเกี่ยวกับคาร์โบไฮเดรต และอนุพันธ์คาร์โบไฮเดรต ทั้งในสภาพที่อยู่ในสารละลายและบนผิวเซลล์ ดังนั้นเลคตินจึงนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ในสาขาวิชาต่างๆ เช่น ชีวเคมี เซลล์วิทยา และ ภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นต้น การนำเลคตินไปใช้ประโยชน์สรุปได้ดังนี้

1.5.1 การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างของสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบและสารประกอบไกลโคโปรตีน

อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างเลคตินและน้ำตาล ซึ่งคล้ายกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เลคตินถูกนำมาใช้ในรูปสารละลายหรือในรูปที่ถูกตรึงไว้กับตัวจับ เพื่อนำมาใช้แยกบริสุทธิ์สารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลายชนิด ทั้งนี้เพราะเลคตินทำปฏิกิริยากับน้ำตาลออลิโกแซคคาไรด์, โพลีแซคคาไรด์ และสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดการตกตะกอนหรือดูดซับสารพวกนี้ไว้ และถูกปลดปล่อยออกมาได้ โดยการชะออกด้วยน้ำตาลที่เหมาะสม (Lis and Sharon, 1986b; Ito, 1985)

เนื่องจากเลคตินมีความเสถียร ในสารละลายที่มีดีเทอร์เจนท์ความเข้มข้นต่ำ จึงนำเลคตินมาใช้แยกบริสุทธิ์สารไกลโคโปรตีน ตรวจสอบโครงสร้างสายน้ำตาลและแยกบริสุทธิ์สายน้ำตาลบนผิวเซลล์ได้ โดยเทคนิคเลคติน-แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี โดยวิธีนี้สามารถตรวจสอบได้แน่นอนและรวดเร็ว โดยสามารถตรวจสอบถึงการจับของเลคตินกับน้ำตาล ในลำดับที่แตกต่างในสายเดียวกันได้ (Osawa, 1989) ตัวอย่างเช่น การศึกษาโครงสร้างสายน้ำตาล ในเซลล์ HLA-DR homozygous B-lymphoblastoid cell line (Neel, *et al.*, 1985), ในซีรัมโปรตีนของคน (O'Hare and Wisdom, 1990), ในฮอร์โมน thyrotropin (TSH) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน และหลั่งจากต่อมพิทูอิทารีส่วนหน้า (Gesondheit, *et al.*, 1987) เป็นต้น นอกจากเทคนิค เลคติน-แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟีแล้ว การใช้วิธี glycoprotien-lectin immunosorbent assay (GLIA) เป็นอีกวิธีที่ใช้ศึกษาโครงสร้างสายน้ำตาล และโปรตีนในสารละลายไกลโค

โปรตีนหลายชนิด (Koettgen, *et al.*, 1988)

1.5.2 ศึกษาแหล่งจับของเลคตินบนผิวเซลล์เมมเบรน

เนื่องจากเซลล์เมมเบรนมีโมเลกุลของน้ำตาล ซึ่งอาจอยู่ในรูปไกลโคโปรตีนหรือไกลโคลิพิด จึงทำให้เลคตินมีความสามารถในการจับกับแหล่งจับ บนผิวเซลล์ได้ ดังนั้นเลคตินจึงถูกนำไปใช้ศึกษาเกี่ยวกับเมมเบรนของเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น สัตว์ พืช และสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ โดยอาศัยสารอนุพันธ์ที่เหมาะสมจับกับเลคตินก่อน หรือการใช้เลคตินซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioactive labeled lectin) หรือ ด้วยสารประกอบซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่น ฟลูออเรสซีน สารฟลูออเรสซีน และสารกัมมันตรังสี สามารถใช้หาจำนวนแหล่งจับของเลคตินบนผิวเซลล์ ความเหมือนกันของแหล่งจับ และการจับกันระหว่างเลคตินกับแหล่งจับบนผิวเซลล์ได้ดีเพียงใด (Monsigny, *et al.*, 1980) จำนวนของเลคตินที่จับบนผิวเซลล์ หาได้จากการวัดกัมมันตภาพรังสี หรือคลื่นแสงฟลูออเรสเซนแล้วนำผลมาวิเคราะห์ โดยใช้สมการของสแคทชาร์ด (Scatchard equation) (Sharon and Lis, 1975) การศึกษาแหล่งจับของเลคตินบนผิวเซลล์ อาจดูได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยใช้เลคตินซึ่งติดฉลากด้วยสารประกอบพวกเฟอร์ริติน (ferritin) หรือ ฮีโมไซยานิน (hemocyanin) เมื่อเลคตินทำปฏิกิริยาบนผิวเซลล์แล้วก็สามารถตรวจนับสารประกอบเหล่านี้ได้ หรือการใช้เลคตินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อเลคตินทำปฏิกิริยาบนผิวเซลล์ ก็สามารถตรวจหาแหล่งจับของเลคตินบนผิวเซลล์ได้ โดยวัดความว่องไวของเอนไซม์ (enzyme activity) (Lis and Sharon, 1986b) การใช้อนุพันธ์ต่างๆ ติดฉลากกับเลคตินเพื่อศึกษาแหล่งจับบนผิวเซลล์ ต้องคำนึงถึงขนาดโมเลกุลของเลคตินหลังจากจับกับอนุพันธ์แล้วด้วย ซึ่งถ้ามีขนาดใหญ่เกินไป เลคตินอาจจะไม่สามารถเข้าจับกับแหล่งจับบนผิวเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของเลคติน pH เวลาที่ทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (Lis and Sharon, 1986b)

1.5.3 การแยกเซลล์

เลคตินถูกนำมาใช้ในการแยกเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำตาลบนผิวเซลล์ ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่ต้องการได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในสัตว์ พืช และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แยกเซลล์ที่จับอยู่กับเลคตินออกได้ โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินนั้นๆ น้ำตาลจะไปยับยั้งการจับของเลคตินกับเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ต้องการถูกปลดปล่อยออกมาได้ โดยอาศัยหลักการนี้ เลคตินจึงถูกนำมาใช้ในการแยกบริสุทธิ์สารพวกไกลโคโปรตีน และใช้ศึกษาคุณสมบัติเมมเบรนของเซลล์ชนิดต่างๆด้วย (Lis and Sharon, 1986b) เทคนิคของการแยกเซลล์ที่ใช้ได้แก่

1.5.3.1 การทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอน

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ โดยเซลล์ที่อยู่ในสภาพแขวนลอย จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับเลคติน หรือเลคตินที่ถูกตรึง หลังจากนั้นแยกเซลล์ออกโดยเทคนิคที่เหมาะสม โดยการคัดเลือกเซลล์ที่ตกตะกอน เซลล์ส่วนใหญ่ที่จับกับเลคตินได้ดีจะตกตะกอน ซึ่งแยกออกได้โดยนำไปตกตะกอนในสารละลายที่มีความหนืด หลังจากนั้นแยกเซลล์ที่ต้องการออก โดยละลายตะกอนในสารละลายน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินนั้นๆ เลคตินจะถูกดึงออกมาอยู่ในสารละลาย สามารถแยกเซลล์ออกได้ วิธีการนี้เหมาะที่จะใช้แยกเซลล์ที่มีปริมาณมากๆ (มากกว่า 10^{10} เซลล์) (Reisner, *et al.*, 1976)

1.5.3.2 โดยเลคติน-แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี

วิธีการนี้เลคตินจะถูกตรึงบนตัวค้ำจุนที่แข็ง โดยบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เมื่อผ่านสารละลายของเซลล์ที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ เซลล์ที่มีน้ำตาลจำเพาะกับเลคตินจะจับกับเลคตินในคอลัมน์ หลังจากนั้นจะถูกชะออกด้วยน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคติน (Lis and Sharon, 1986b) ตัวอย่างการแยกจุลินทรีย์ *Listeria monocytogenes* ออกจากสารละลาย โดยใช้เลคตินจากหอย *Helix pomatia* ตรึงบนอะกาโรส (agarose) จุลินทรีย์จะถูกดูดซับโดยเลคติน และถูกชะออกโดยน้ำตาลเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน (Patchett, *et al.*, 1991)

การนำเลคตินมาใช้แยกเซลล์ โดยใช้เทคนิคดังกล่าวข้างต้น สามารถแยกแบคทีเรียบางชนิดออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ ทั้งนี้เพราะเลคตินบางชนิด จะจับจำเพาะกับแบคทีเรียชนิดหนึ่งๆต่างกัน (Lis

and Sharon, 1986b) ตัวอย่างเลคตินบางชนิดที่จำเพาะกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 9

1.5.3.3 ใช้เป็นตัวนำยา สารเคมี หรือความเป็นพิษเข้าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ

เลคตินบางชนิด มีความสามารถในการเข้าจับเซลล์ที่มีการเจริญที่ผิดปกติ ดังนั้นจึงได้มีความคิดที่จะใช้เลคตินเป็นตัวนำยา หรือสารเคมี หรือความเป็นพิษด้วยตัวมันเอง เข้าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ เซลล์ที่สนใจศึกษากันมากได้แก่ เซลล์เนื้องอก (tumor) พบว่า การใช้เลคติน คอนคานาวาลิน เอ จับกับยาต่อต้านเซลล์เนื้องอกหลังจากเลคตินจับเซลล์เนื้องอก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกในห้องทดลอง (in vitro) ได้ดีกว่าการใช้ยาอย่างเดียว โดยไม่มีเลคตินเป็นตัวนำ (Kitao and Hattori, 1977; Lin, *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะใช้ ความเป็นพิษของเลคตินที่มีอยู่เฉพาะตัว หรือร่วมกับสารพิษอื่น เป็นตัวเข้าทำลายเซลล์ที่เจริญผิดปกตินี้ด้วย (Yamaguchi *et al.*, 1979) อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังไม่ยืนยันแน่ชัดในขณะนี้

1.5.3.4 ใช้ในการตรวจสอบหมู่เลือด

การใช้เลคตินในการตรวจสอบหมู่เลือด ได้มีการใช้มานานแล้ว และปัจจุบันก็ยังนิยมใช้กันอยู่ พบว่า เลคตินหลายชนิดจำเพาะกับหมู่เลือด A, B, O(H), M, N (Sharon and Lis, 1972) บางชนิด ได้นำมาใช้ในการจำแนกชนิดหมู่เลือดที่ใช้ในธนาคารเลือด (Lis and Sharon, 1986b) ตัวอย่างหมู่เลือดที่จำเพาะกับเลคติน แสดงในตารางที่ 10

1.6 เหรียง

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Parkia timoriana* Merr. Syn., *P. javanica* Merr. , *P. roxburghii* G.Don

เหรียง หรือ เรียง, สะเหรี่ยง, กะเหรี่ยง, นะกิง, นะริง เป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบขนาดใหญ่ อยู่ในตระกูลถั่ว (Family Leguminoceae, Subfamily minosaceae, Genus Parkia) เช่นเดียวกับสะตอ แต่

ตารางที่ 9 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับแบคทีเรียบางชนิด

ชนิดของเลคติน	ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งข้อมูล
Triticum vulgare (WGA)	*Neisseria gonorheae*	Lis and Sharon, 1986
Canavalia ensiformis (con A)	*Bacillus licheniformis*	——"——
	Escherichia coli	——"——
Codium fragile	*Salmonella typhimurium*	Patchett, *et al.*, 1991
Helix pomatia	*Listeria monocytogenes*	——"——
Glycine max (SBA)	*Bacillus anthracis*	Lis and Sharon, 1986
	Bacillus mycoides	——"——

ตารางที่ 10 ตัวอย่างเลคตินที่จับจำเพาะกับหมู่เลือดชนิดต่างๆ (Lis and Sharon, 1986)

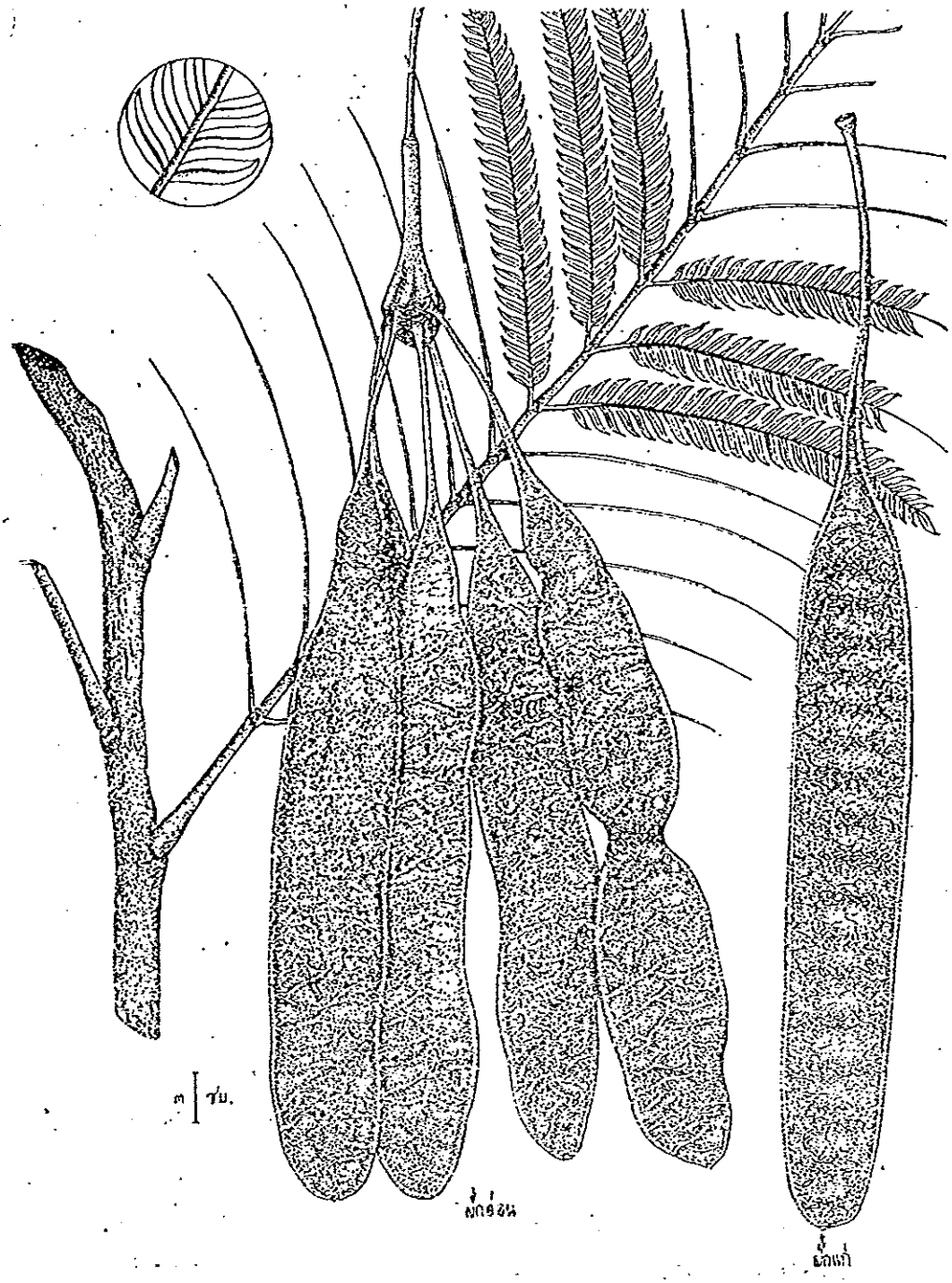
ชนิดหมู่เลือด	ชนิดของเลคติน
A	*Griffonia*
	simplicifolia I (A_4)
	Helix pomatia
	Phaseolus lunatus
	Vicia cracca
A_1	*Dolichos biflorus*
B	*Griffonia*
	simplicifolia (B_4)
O(H)	*Anguilla anguilla*
	Lotus tetragonolobus
	Ulex eurapeus
A+N	*Molucella laevis*
N	*Vicia graminca*
T	*Arachis hypogaea*
T_n	*Salvia sclarea*

ต้นมีขนาดสูงใหญ่กว่า ลำต้นตรง สูงถึง 50 เมตร มีพูพอนสูงถึง 7 เมตร ลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับสะตอ แต่แตกต่างกันตรงพุ่มใบ ของเหรียงมักจะเป็นพุ่มกลม ไม่แผ่กว้างนัก พุ่มใบแน่นและเป็นสีเขียวทึบกว่าสะตอ เปลือกเรียบ กิ่งก้านมีขนปกคลุมประปราย ก้านใบยาว 4-12 ซม. มีต่อมรูปมนยาว 3.5-5 มม. อยู่เหนือโคนก้าน แกนช่อใบยาว 25-40 ซม. มีช่อใบแขนงด้านข้าง 18-33 คู่ ใต้รอยต่อของก้านช่อใบแขนงด้านข้าง มักจะมีต่อมเล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. ช่อใบแขนงยาวประมาณ 7-12 ซม. แต่ละช่อมีใบย่อย 40-70 คู่ ใบย่อย รูปขอบขนานแคบๆกว้าง 5-7 มม. ยาว 5-1.8 มม. ปลายใบแหลมโค้งไปด้านหน้า ฐานใบมักจะยื่นเป็นติ่งเล็กน้อย เส้นแขนงใบด้านข้างไม่ปรากฏชัดเจน ดอกออกบนช่อกลมขนาด 2x5 ซม. ก้านช่อดอกยาว 20-25 ซม. ดอกย่อยมีก้านดอกสั้นๆ และใบประดับยาว 4-10 มม. รองรับกลีบรองกลีบดอกของดอกสมบูรณ์เพศ เชื่อมติดกันเป็นหลอดยาว 7-9 กลีบ กลีบดอกเชื่อมเป็นหลอดยาว 8-11 มม. ผลเป็นฝักกว้าง 3-4 ซม. ยาว 22-28 ซม. ตัวฝักตรงไม่บิดเวียน เมล็ดไม่นูนเด่นชัด แต่ละฝักมีเมล็ดรูปไข่ ขนาดประมาณ 11x20 มม. ประมาณ 20 เมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดหนา สีคล้ำ (รูปที่ 2 แสดงลักษณะใบ และช่อฝักของเหรียง)

เนื้อไม้มีสีขาวนวล ไม่มีแก่น อ่อนและเปราะ เสี้ยนตรงสม่ำเสมอ เลื่อยผ่าได้ง่าย แต่ใช้ได้ไม่ทนทาน นิยมใช้ทำเครื่องเล่น รองเท้าหีบใส่ของ

เหรียงออกดอก ระหว่างเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม ฝักแก่ ประมาณเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ ชอบขึ้นตามป่าดงดิบชื้น ที่สูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 100 เมตร พบทั่วภาคใต้ ชอบแสงสว่างและพื้นที่ค่อนข้างชุ่มชื้น มักจะผลัดใบในขณะที่ออกดอก และใบจะร่วงหล่นจนหมดต้น เมื่อผลเริ่มแก่ พร้อมๆ กับใบอ่อนที่ผลิออกมาใหม่

เมล็ด มีขนาดเล็กกว่าสะตอมีรสขมกว่า จึงไม่นิยมรับประทานกันแพร่หลาย เช่นสะตอ แต่เปลือก และเมล็ดเหรียงมีคุณค่าทางด้านสมุนไพรดีกว่าสะตอ ส่วนใหญ่เมล็ดใช้เป็นยาแก้อาการจุกเสียด ต้นอ่อนจากเมล็ดนิยมใช้เป็นผักดอง (กรมป่าไม้, 2526)



รูปที่ 2 ลักษณะช่อใบ และฝักของเหรียง *Parkia javanica*, Merr

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง
2. เพื่อศึกษาวิธีการทำให้เลคตินจากเมล็ดเหรียงบริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมี
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเลคตินบริสุทธิ์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

สารเคมี

เป็นชนิด analytical grade จากบริษัทต่างๆดังนี้

จากบริษัท Ajax chemical ได้แก่ acetic acid

จากบริษัท BDH Chemical Ltd. ได้แก่ maltose, glyceral, และ N,N'-methylene bisacryamide

จากบริษัท DIFCO ได้แก่ galactose

จากบริษัท Fluka ได้แก่ mannose, ammonium sulfate และ Coomassie brilliant blue R-250

จากบริษัท May & Baker Ltd. ได้แก่ copper sulfate, potassium sodium tartrate และ magnesium chloride

จากบริษัท Merck ได้แก่ glucose, saccharose, acrylamide, tetramethyl ethylenediamide, fructose, sodium dihydrogen orthophosphate-2-hydrate, disodium hydrogen phosphate-7-hydrate, bromophenol blue, hydrochloric acid, methanol, ethanol,glycine, calcium chloride และ ethylene diamine

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ sephadex G 100, sephadex G 200 และ standard protein markers

จากบริษัท Riedel-de Haen ได้แก่ manganese chloride และ petroleum ether

จากบริษัท Seelze-Hannover ได้แก่ ammonium persulfate

จากบริษัท Sigma ได้แก่ D-mannose agarose, DEAE-cellulose, trypsin, ethylene glycol-bis (β-aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid, sodium dodecyl sulfate, bovine serum albumin, N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosamine, N-acetyl mannosamine, methyl-α-D-mannosamine และ tris-(hydroxymethyl) aminomethane

เมล็ดเหรียงตัวอย่าง

เมล็ดเหรียงตัวอย่าง ที่ใช้สำหรับการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ซื้อจากท้องตลาด ส่วนเมล็ดเหรียงที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเลคตินได้จากการเพาะในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์

refrigerated superspeed centrifuge ของ Sorvall รุ่น RC-5B, centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6, uv-vis spectophotometer ของ Kontron, automatic fraction collector ของ Bucker Instruments รุ่น Alpha 200 และของ Gilson รุ่น 202, กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus , micropipette ของ Finn และ microtiter v-plate

วิธีการ

2.1 การเตรียมเซลล์ตัวอย่าง

2.1.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง

ดูดเลือดจากกระต่ายหรือของสัตว์อื่น ๆ ผสมกับ 5 mM EDTA ด้วยอัตราส่วน เลือดต่อ EDTA 5:1 เท่า เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วล้างเลือดด้วยบัฟเฟอร์ PBS (5 mM potassium phosphate,pH 7.4-0.9 % NaCl) โดยนำมาเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและล้างเม็ดเลือดด้วย PBS อีกครั้ง จากนั้นดูด PBS ทิ้ง วัดปริมาตรเม็ดเลือดแดง แล้วปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เป็น 2 %

2.1.2 การเตรียมตัวอสุจิหนูขาว

ตัวอสุจิที่ใช้ เพื่อการศึกษาการจับกลุ่มเซลล์โดยเลคติน ได้แก่ ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญตัว (immature caput sperm) และตัวอสุจิที่เจริญตัวแล้ว (mature cauda sperm) ซึ่งได้จากเอพิดิไดมิส (epididymis) ส่วนต้น (caput) และส่วนปลาย (cauda) ของหนูขาวสายพันธุ์ Wistar อายุ 3-5 เดือน น้ำหนัก 250-300 กรัม ซึ่งเตรียมโดยตัดส่วนเอพิดิไดมิส

ส่วนต้น และส่วนปลายออกจากกัน นำแต่ละส่วนมาเลาะไขมันออก ล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง เจาะแต่ละส่วนแยกกันด้วยเข็มขนาดเล็ก ใน PBS จำนวนน้อยๆ แล้วล้างตัวอสุจิด้วย PBS โดยนำมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4° ซ นับจำนวนอสุจิตามวิธีของ กนกนาศ ชูปัญญา (2520) และปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 4 X 10^7 เซลล์/มล.ใน PBS

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

หาความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของ Lowry, *et al.*(1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

สำหรับปริมาณโปรตีนของสารละลายที่เก็บจากคอลัมน์ ติดตามได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ($O.D._{280}$)

2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) และแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1963) บนเจลแผ่น (slab gel)

2.3.1 โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมี เอสดีเอส (SDS-PAGE)

2.3.1.1 การเตรียมเจล

ส่วนผสมของเจลแต่ละชนิด ปริมาตร 10 มล. ประกอบด้วยสารต่อไปนี้

	Stacking gel	Separating gel	
	3 %	8 %	12 %
30 % Acrylamide,0.8 % bis(ml)	1.0	2.67	4.0
1.5 M Tris-HCl,pH 8.8 (ml)	-	2.5	2.5

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	2.5	-	-
1 % SDS (ml)	1.0	1.0	1.0
10 % Ammonium persulphate (ml)	0.1	0.1	0.1
TEMED (µl)	5	5	5
น้ำกลั่น (ml)	5.4	3.8	2.4

เตรียมเจลส่วนล่าง (separating gel) 8-12 % และเจลส่วนบน (stacking gel) 3 % ในแผ่นกระจกขนาด 14x8x0.1 ซม.

2.3.1.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

ผสมสารตัวอย่าง 1 ส่วน กับบัฟเฟอร์ละลาย (solubilizing buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 4 mM EDTA, 20 % Glycerol, 2 % เบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) และ 2 % โบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) แล้วนำไปต้ม 2 นาที ก่อนการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส เตรียมโปรตีนมาตรฐานโดยวิธีการทำนองเดียวกัน

2.3.1.3 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycine, pH 8.3 และ 0.1 % SDS ใช้กระแสไฟ 200 โวลต์ นาน 4-5 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอล บลูเคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 0.5 ซม. ปิดกระแสไฟ

2.3.2 โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ (Non-denaturing PAGE, ND-PAGE)

เตรียมเจลเช่นเดียวกับ การทำอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (ข้อ 2.3.1.1) แต่ในเนื้อเจล และบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสไม่มีเอสดีเอส และในบัฟเฟอร์ละลายไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล และเอสดีเอส

ทำอิเล็กโตรฟอรีซิส ในเจลแผ่นขนาดเดียวกันกับข้อ 2.3.1.1 ที่มีเจลส่วนล่าง 6-9 % และ เจลส่วนบน 3 % สารตัวอย่างหลังจากผสมกับบัฟเฟอร์ละลายแล้ว ไม่ต้องต้มในน้ำเดือด

2.3.3 การย้อมสีโปรตีน

สีย้อมคือ 0.2 % คูมาซี บลู (coomassie blue R 250) ใน 50% เมธานอล (methanol)-10 % กรดน้ำส้ม ย้อมแผ่นเจลค้างคืนล้างสีที่ไม่จับกับโปรตีนออกด้วย 50 % เมธานอล -10 % กรดน้ำส้ม นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วล้างต่อด้วย 5 % เมธานอล-7.5 % กรดน้ำส้ม จากนั้นเก็บเจลไว้ในกรดน้ำส้ม 7.5 %

2.3.4 การหาน้ำหนักโมเลกุล

หาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้โดยทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมี เอส ดี เอส เทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 6 ตัว ได้แก่ ฟอสฟอริเลส บี (phosphorylase b, M_r 49,000), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, M_r 67,000) โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000), คาร์บอนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, M_r 43,000), ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, M_r 21,000) และแอลฟา แลคตัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,400) วัดระยะทางที่โปรตีนมาตรฐาน สารตัวอย่าง และสีโบรโมฟีนอล บลู เคลื่อนที่ได้ หาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ซึ่งมีค่าเท่ากับ ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนหารด้วยระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอล บลู เขียนกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Weber and Osborn , 1969)

2.4 การเตรียมสารสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

2.4.1 การเตรียมสารละลายโปรตีน

ล้างเมล็ดเหรียงสดจนสะอาด ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ชั่งน้ำหนักแล้วหั่นให้ละเอียด หลังจากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดในโถปั่น (blender) ใน PBS ด้วยอัตราส่วนเมล็ดเหรียง 1 กรัม ต่อ PBS 3 มล. สารละลายที่ได้นำไปคนต่อที่ 0° ซ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายผ่านผ้าก๊อซหนา 8 ชั้น จากนั้นเซนตริฟิวจ์สารละลายที่ได้ด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่อยู่ส่วนบนไปสกัดต่อด้วยไนโตรเลียมอีเธอร์

(petroleum ether)

2.4.2 การสกัดไขมัน

นำสารละลายโปรตีนจาก ข้อ 2.4.1 มาสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ที่เย็นจัดด้วยอัตราส่วน สารละลายโปรตีนต่อปิโตรเลียม อีเธอร์ 1:1 ทำการสกัดสองครั้งที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้สารละลายแยกชั้นในกรวยแยก นำสารสกัดส่วนล่างไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายโปรตีนใสที่อยู่ส่วนล่าง (PE) ไว้ทำการทดลองต่อไป

2.4.3 การตกตะกอนโปรตีน

ตกตะกอนสารละลายโปรตีนใสที่ผ่านการสกัดไขมันจาก ข้อ 2.4.2 (PE) ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% ตนที่ 4° ซ ค้างคืน จากนั้นเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 22,600 g เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย PBS ปริมาตรน้อย ๆ แล้วไดแอไลซ์ (dialyse) ใน PBS ที่ 4° ซ นาน 12-24 ชั่วโมง ทิ้งตะกอนที่อาจเกิดขึ้นโดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วเท่าเดิมอีกครั้ง นำสารละลายเลคตินที่ได้ (PE 60) ไปวัดหาปริมาณโปรตีนและเก็บไว้ศึกษาต่อไป

2.5 การทดสอบสมบัติในการจับกลุ่มเซลล์

2.5.1 คะแนนของการจับกลุ่มเซลล์

ผสมสารสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียงที่ได้จากข้อ 2.4 50 ไมโครลิตร กับเซลล์ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.1 คือ 2 % เซลล์เม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หรือ เซลล์ตัวอสุจิหนู ($4X10^7$ เซลล์/มล.) 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 นาที หยดสารผสมบนสไลด์ สังเกตการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือเซลล์ตัวอสุจิ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ PBS แทนสารสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง โดยให้คะแนนการจับกลุ่มเซลล์ตั้งแต่ 0-4 ดังนี้

คะแนน	0	คือ ไม่มีการจับกลุ่มของเซลล์หรือมี	5	เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน	1	คือ กลุ่มขนาดเล็กมีการจับกลุ่ม	5-10	เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน	2	คือ กลุ่มขนาดกลางมีการจับกลุ่ม	11-25	เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน	3	คือ กลุ่มขนาดใหญ่มีการจับกลุ่ม	26-35	เซลล์ต่อกลุ่ม

คะแนน 4 คือ กลุ่มขนาดใหญ่มีการจับกลุ่มมากกว่า 36 เซลล์ต่อกลุ่ม

2.5.2 ความว่องไว (Agglutinating activity) และความว่องไวจำเพาะ (Specific agglutinating activity) ของการจับกลุ่มเซลล์

หาความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์โดยวิธีของ Kilpatrick and Yeoman(1978)โดยทำการเจือจางสารสกัดเลคติน 1:2 เท่าตามลำดับ (1:2 serial dilution) แล้วนำแต่ละความเข้มข้นไปทดสอบสมบัติในการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์ตัวอสุจิหนู ตามข้อ 2.5.1 หาค่าไตเตอร์ (titer) ซึ่งคือค่าการเจือจางมากที่สุดที่ยังให้ผลการจับกลุ่มเซลล์ด้วยคะแนน 1 ความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์จะมีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ ดังตัวอย่างเช่น ถ้าไตเตอร์มีค่า 1:16 ความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์มีค่า 16 หน่วยต่อปริมาตร สารสกัดเมล็ดเหรียงที่ใช้ 50 ไมโครลิตร หรือ 320 หน่วย /มล. และความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์มีค่าเป็นหน่วยความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเลคติน

2.6.1 ผลของเวลาในการเพาะเมล็ดเหรียง

ตัดปลายเม็ดเหรียงแห้งที่จะนำมาเพาะเล็กน้อยแช่น้ำ 1 คืน แล้วนำลงเพาะในกะบะทราย เก็บเมล็ดเหรียงที่เพาะครั้งละ 50 กรัม ทุกวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เพื่อนำไปสกัดเลคตินตามวิธีในข้อ 2.4 นำสารสกัดเลคตินที่ได้ไปทดสอบหาความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย และตรวจแบบแผนโปรตีน (protein pattern) โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส (SDS-PAGE)

2.6.2 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด

นำเมล็ดเหรียงที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่น และปั่นให้ละเอียดใน PBS คนสารละลายที่ได้ที่ 4° ซ เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง แบ่งสารละลายที่เวลาของการคน 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 24 ชั่วโมง มากรองเซนตริฟิวจ์ และขจัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ ตามวิธีใน ข้อ 2.4.2 แล้วตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % ตลอดคืนที่ 4° ซ

ละลายตะกอนที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ที่ 22,600 g เป็นเวลา 30 นาที ด้วย PBS และไดแอไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน แล้วทำการเซนตริฟิวจ์ซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอน สารสกัดเลคตินที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

2.6.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

นำสารสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง ที่สกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ตามข้อ 2.4.2 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ตามวิธีการ ในข้อ 2.4.3 โดยใช้เมล็ดเหรียงในแต่ละการทดลอง 13 กรัม สารสกัดเลคตินที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

2.6.4 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต

ตกตะกอนสารสกัดจากเมล็ดเหรียงที่สกัดไขมันออกโดยปิโตรเลียมอีเธอร์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 20, 40, 60 และ 80 % เป็นเวลา 1 คืน ตามวิธีการในข้อ 2.4.3 สารสกัดเลคตินที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

2.6.5 ผลของการสกัดไขมัน

แบ่งสารละลายโปรตีนจากข้อ 2.4.1 ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ตามวิธีในข้อ 2.4.2 จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 % ในขณะที่อีกส่วนไม่สกัดไขมันออก แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเกลือเดียวกัน ที่ความอิ่มตัว 40 % ตะกอนที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ นำไปไดแอไลซ์ใน PBS เพื่อใช้หาปริมาณโปรตีนและความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ต่อไป

2.7 ความสามารถของเลคตินในการจับกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ

เตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดง 2 % ของเลือดชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ คน (หมู่ A,B,O และ AB) แกะ ห่าน กระต่ายและหนู ตามวิธีในข้อ 2.1.1 และเตรียมตัวอสุจิหนูขาว ที่เจริญตัวและยังไม่เจริญตัวตามข้อ 2.1.2 ทดสอบผลการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ และผลการจับกลุ่มตัวอสุจิหนูขาวตาม

วิธีการในข้อ 2.5.1โดยใช้สารสกัดเลคตินที่สกัดไขมันออกแล้วจากข้อ 2.4.3 ที่เจือจาง ให้มีความสามารถจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง 80 หน่วย/มล.

2.8 ผลของการเก็บเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ 4° ซ

ผสมเลือดกระต่ายสดกับ 5 mM EDTA ด้วยอัตราส่วน เลือด : 5 mM EDTA เท่ากับ 5:1 เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ จากนั้น นำเลือดกระต่ายที่เก็บไว้ทุกวันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 มาล้างและเตรียมเป็น 2% (ข้อ 2.1.1) แล้วนำไปทดสอบผลการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดเลคติน ตามวิธีการในข้อ 2.5.1 โดยเปรียบเทียบกับเลือดสด

2.9 การยับยั้งของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเซลล์ของสารสกัดเลคติน

2.9.1 ผลความเข้มข้นของน้ำตาล

เจือจางสารสกัดเลคตินที่ผ่านการสกัดไขมัน (ข้อ 2.4.3) ให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่ม 640 หน่วย/มล. ใช้สารสกัดเลคตินเจือจางนี้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำตาลที่ต้องการทดสอบความเข้มข้นต่างๆ กันในช่วง 0.5-200 mM ที่ 4° ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารผสมทั้งหมด ไปผสมกับเม็ดเลือดแดงกระต่าย 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบหาคะแนนในการทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่ม

2.9.2 การยับยั้ง 100 % โดยน้ำตาล

จากการทดลองในข้อ 2.9.1 สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยสารสกัดเลคตินได้ 100 %

2.10 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex และ DEAE-cellulose

2.10.1 คอลัมน์ Sephadex G 100

นำสารสกัดเลคติน 500 มก. ที่สกัดจากเมล็ดเหรียงตามวิธีการในข้อ 2.4 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G 100 (ขนาด 80 X 1.4

ซม.) ซึ่งถูกทำให้สมดุลย์ก่อน (pre-equilibrate) ด้วย PBS, pH 7.4 จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ด้วยอัตราเร็ว 40 มล./ซม. เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล. ชะจนค่า $O.D._{280}$ ของสารละลายน้อยกว่า 0.05 หน่วย จากนั้นชะคอลัมน์ต่อด้วยน้ำตาลมอลโตส (maltose) 0.1 M ใน PBS ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารปริมาตรเท่าเดิมจน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ หาความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของแต่ละหลอดตามวิธีการในข้อ 2.5ในกรณีสารละลายที่ได้จากการชะด้วยน้ำตาลจะถูกไดแอไลซ์ใน PBS,pH 7.4 ก่อนทดสอบหาความว่องไวจำเพาะ จากนั้นรวมสารละลายแต่ละหลอดที่มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose และทำการทดลองต่อในข้อ 2.10.2

2.10.2 คอลัมน์ Sephadex G 200

แยกสารละลายรวม ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G 100 ต่อโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G 200 (20 X 1.9 ซม.) โดยวิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 2.10.1 รวมสารละลายหลอดที่มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์สูง ทำให้เข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์ต่อในข้อ 2.10.3

2.10.3 คอลัมน์ DEAE-cellulose

ไดแอไลซ์สารละลายรวมที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G 200 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (5 mM phosphate buffer,pH 7.4) แล้วนำไปผ่านในคอลัมน์ DEAE-cellulose (8 X 2.6 ซม.) ซึ่งทำให้สมดุลย์ก่อนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม 120 มล.ด้วยความเร็ว 40 มล./ซม. เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล. จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ตัวเดิมที่มีความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (gradient) จาก 0-1 M (100 มล. + 100 มล.) ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารละลายแต่ละหลอดปริมาตรเท่าเดิม ไดแอไลซ์สารละลายที่ได้ด้วย PBS, pH 7.4 เพื่อขจัด NaCl ออก แล้วนำไปทดสอบหาความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมสารละลายหลอดที่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์สูง และทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีน ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ และทดสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ได้โดย อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

2.11 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose

2.11.1 คอลัมน์ DEAE-cellulose

ไดแอไลซ์สารสกัดเลคติน 300 มก. ที่สกัดได้จากเมล็ดเหรียง ตามวิธีในข้อ 2.4 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose (11 X 2.6 ซม.) จากนั้นชะด้วยบัฟเฟอร์ตัวเดิม 240 มล. ด้วยอัตราเร็ว 48 มล./ซม. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl อย่างต่อเนื่องจาก 0-1 M (200 มล. + 200 มล.) สารละลายที่ได้นำมาทดสอบความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือด ตามวิธีข้อ 2.5.2 หลังไดแอไลซ์ ใน PBS, pH 7.4 จากนั้นรวมสารสกัดเลคตินหลอดที่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดยใช้ CM-cellulose แล้วนำไปทำการทดลองต่อตามข้อ 2.11.2

2.11.2 คอลัมน์ Sephadex G 100

สารละลายรวมที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100 (80 X 1.4 ซม.)ซึ่งถูกทำให้สมดุลย์ก่อนด้วย PBS, pH 7.4 หลังจากผ่านสารละลายรวมลงในคอลัมน์แล้ว ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม 200 มล. ด้วยอัตราเร็ว 40 มล./ซม. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. หลังจากนั้นชะคอลัมน์ต่อด้วย 0.1 M มอลโตส ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม และเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิมจน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ ไดแอไลซ์สารที่ได้จากการชะด้วยน้ำตาลมอลโตสก่อนใน PBS, pH 7.4 แล้วทดสอบความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์ ตามวิธีข้อ 2.5.2 รวมสารหลอดที่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นแล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยคอลัมน์ D-Mannose agarose

2.11.3 คอลัมน์ D-Mannose agarose

ทำให้คอลัมน์ D-Mannose agarose (1.5 X 1.2 ซม.) สมดุลย์ก่อนด้วย PBS, pH 7.4 จากนั้นผ่านสารละลายรวม 0.648 มก. ที่ได้จากข้อ 2.11.2 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม 50 มล. ด้วยอัตราเร็ว

10 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล. หลังจากนั้นชะคอลัมน์ต่อโดยใช้น้ำตาลแมนโนส (D-mannose) 0.1 M ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม จน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ ไดแอไลซ์สารละลายที่ได้จากการชะด้วยน้ำตาลแมนโนสด้วย PBS ก่อนทดสอบหาความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมสารละลายหลอดที่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดยใช้ CM-cellulose แล้วนำไปหาความเข้มข้นโปรตีน ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์และดูความบริสุทธิ์ของเลคตินโดยอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

2.12 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการจับกลุ่มเซลล์ของเลคตินบริสุทธิ์

2.12.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

เจือจางเลคตินบริสุทธิ์ให้มีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เท่ากับ 320 หน่วย/มล. แล้วอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-80° ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยเร็วในน้ำแข็ง นำไปทดสอบหาคะแนนความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มเทียบกับเลคตินที่เก็บไว้ที่ -20° ซ ตามวิธีในข้อ 2.5.1

2.12.2 ความเสถียรต่อ pH

นำเลคตินบริสุทธิ์มาเจือจาง ให้มีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 320 หน่วย/มล. จากนั้นปรับเลคตินให้มี pH อยู่ในช่วง 3-11 โดยใช้ ยูนิเวอร์ซอล บัฟเฟอร์ (universal buffer) pH ต่าง ๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเลคติน 10 ไมโครลิตร เพื่อปรับให้เลคตินมี pH อยู่ในช่วง 3-11 ตามวิธีของ Mckenzie (1969) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้น ปรับ pH ของเลคตินตัวอย่างทุก pH ให้กลับไปเป็น 7.4 ด้วย 0.5 M Tris-HCl, pH 7.7 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเลคตินที่ปรับ pH เป็น 7.4 แล้วนี้ ไปทดสอบหาไตเตอร์ของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ชุดควบคุมได้จากการผสมเลคตินกับ PBS, pH 7.4 วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แทนยูนิเวอร์ซอล บัฟเฟอร์

2.12.3 ผลของ pH

เจือจางเลคตินบริสุทธิ์ ให้มีความว่องไวในการจับกลุ่มเม็ด

เลือดแดงกระต่ายเป็น 320 หน่วย/มล. แล้วปรับเลคตินให้มี pH อยู่ในช่วง 3-11 ด้วยยูนิเวอร์ซอล บัฟเฟอร์ pH 3-11 โดยผสมเลคตินเจือจาง 5 ไมโครลิตรกับยูนิเวอร์ซอล บัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นทดสอบหาคะแนนความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินที่มี pH ต่าง ๆ นี้ โดยเติมเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 20 % ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในสารละลายเลคติน ตามวิธีการในข้อ 2.5.1 ชุดควบคุมได้จากการใช้ PBS, pH 7.4 แทนยูนิเวอร์ซอล บัฟเฟอร์

2.12.4 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน (Divalent cation) และอีจีทีเอ (EGTA)

นำเลคตินบริสุทธิ์ที่เจือจางให้มีความสามารถ ในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่ม ด้วยคะแนน 1 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2} หรืออีจีทีเอ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-40 mM ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 50 ไมโครลิตร ของ 2% เม็ดเลือดแดงกระต่าย เพื่อทดสอบหาคะแนนความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ PBS แทนแคทไอออนหรืออีจีทีเอ

2.12.5 ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่เซลล์เม็ดเลือดแดง ดังที่ใช้ในข้อ 2.7 แต่ในการทดลองนี้ใช้เลคตินบริสุทธิ์แทนสารสกัดเลคตินที่ผ่านการสกัดไขมันจากข้อ 2.4.3 และทำการทดลองในทำนองเดียวกับวิธีการในข้อ 2.7

2.12.6 ผลของเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin)

นำเม็ดเลือดแดงของคน และกระต่าย เข้มข้น 10 % ปริมาตร 1 มล. มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทริปซิน (1 มก./มล. ใน PBS, pH 7.4) ปริมาตร 1 มล. ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมตัวยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitor) เข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. ล้างเม็ดเลือดแดงด้วย PBS, pH 7.4 หลาย ๆ ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นเป็น 2 % ก่อนนำไปทดสอบการจับกลุ่มโดยเลคตินบริสุทธิ์ เปรียบเทียบผลกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน

2.12.7 ผลการยับยั้งของน้ำตาล

ทดสอบหาชนิดของน้ำตาล ที่สามารถยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ โดยใช้เลคตินบริสุทธิ์แทนสารสกัดเลคตินจากข้อ 2.4.3 ทำการทดลองในทำนองเดียวกับวิธีการของข้อ 2.9.1 รวมทั้งคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาล ที่สามารถยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ได้ 100 % (ตามข้อ 2.9.2)

ผลการทดลอง

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

3.1.1 ผลของเวลาในการเพาะเมล็ดเหรียง

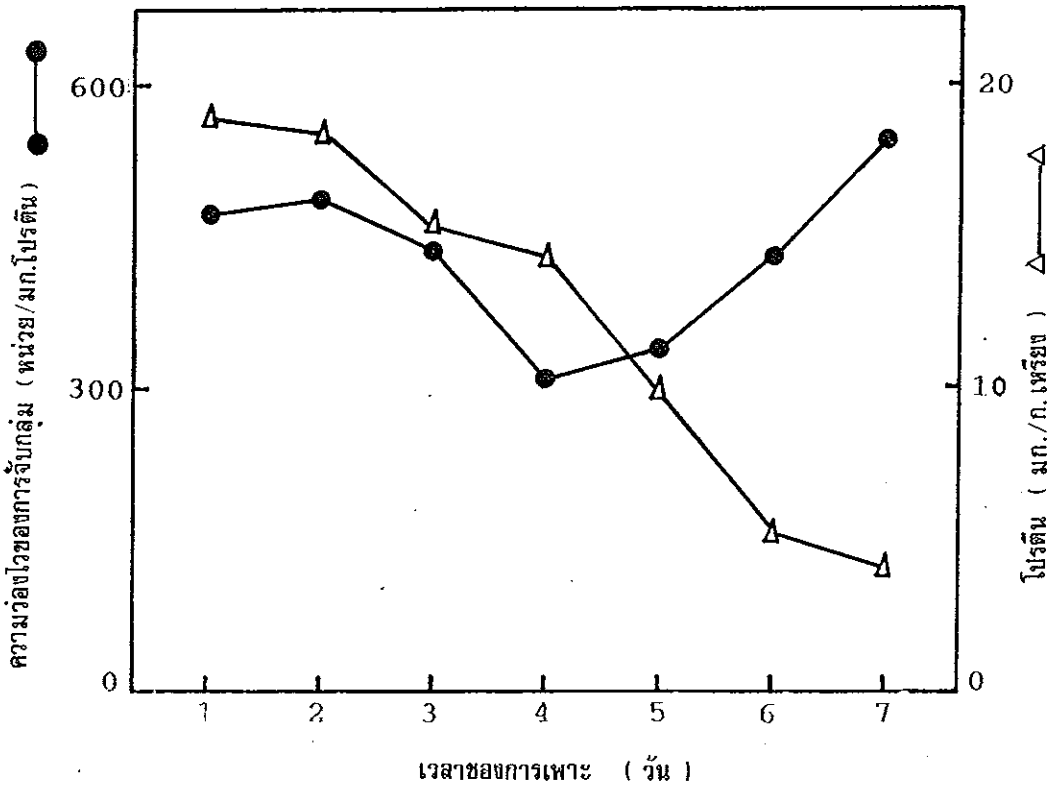
จากการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง ซึ่งเพาะในช่วงระยะเวลา 1-7 วัน พบว่าสามารถสกัดโปรตีนจากแต่ละกรัมของเมล็ดเหรียงได้มากถึง 19.02 มก./กรัมเหรียง จากเมล็ดเหรียงที่เพาะหนึ่งวัน และปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดเหรียงที่เพาะนานขึ้นจะค่อย ๆ ลดลง ตามลำดับ จนเหลือ 4.07 มก./กรัมเหรียง ในวันที่ 7 และสารสกัดเลคตินที่สกัดจากเมล็ดที่เพาะมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 และ 2 จากนั้นเริ่มลดลงในวันที่ 3 และ 4 แล้วกลับเพิ่มขึ้นอีกจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ดังแสดงผลในรูปที่ 3 และตารางผนวกที่ 1 แบบแผนโปรตีนของสารสกัดจากเมล็ดเหรียงที่เพาะในวันที่ 1-7 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4

3.1.2 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดเลคติน

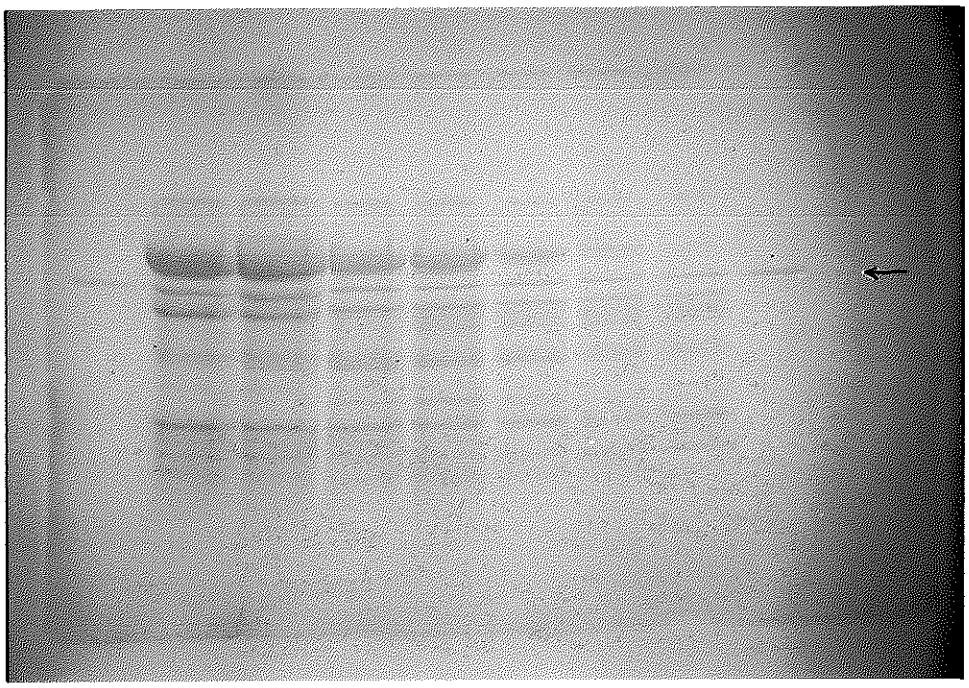
ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง โดยใช้เวลาในการสกัดต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละกรัมของเมล็ดเหรียงมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 (3.50 มก./กรัมเหรียง) และค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 9 ของการสกัด จากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลง และมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 (1.41 มก./กรัมเหรียง) ของการสกัด ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดเลคติน ที่สกัดที่เวลาต่าง ๆ นี้ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจากชั่วโมง ที่ 0 (360.06 หน่วย/มก. โปรตีน) และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 (1,127.13 หน่วย/มก.โปรตีน) หลังจากนั้นจะมีค่าลดต่ำลงจนมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 (501.47 หน่วย/มก. โปรตีน) (รูปที่ 5 และตารางผนวกที่ 2)

3.1.3 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 60% ตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินของเมล็ดเหรียงในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-36 ชั่วโมง พบว่าความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายจะคง



รูปที่ 3 การสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียงที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน

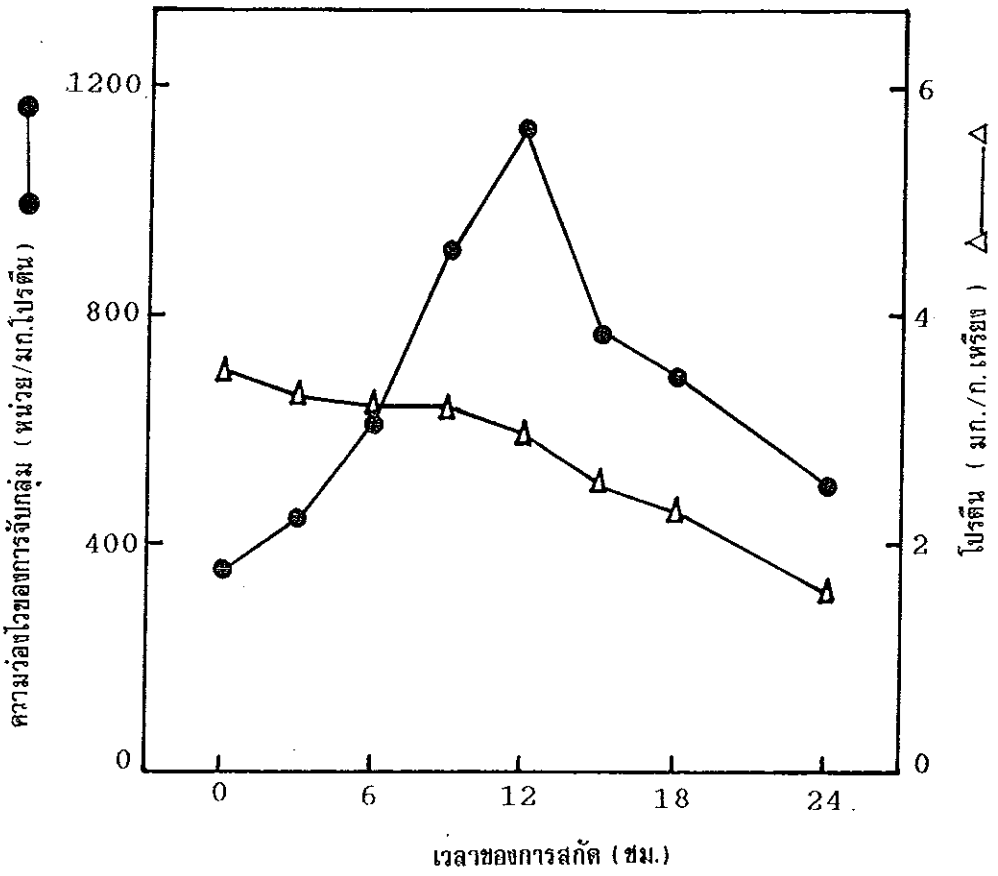


L 1 2 3 4 5 6 7 L

รูปที่ 4 แบบแผนโปรตีนใน โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอเรซิส แบบมี เอสดีเอส ของเลคตินที่สกัดได้จากเมล็ดเหรียงที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน

แถวที่ 1-7 เป็นสารสกัดเลคตินซึ่งสกัดได้จากเมล็ดเหรียงปริมาณเท่ากัน และเป็นเมล็ดที่เพาะในช่วงเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ

แถว L ลูกศรแสดงตำแหน่งของเลคตินบริสุทธิ์



รูปที่ 5 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

ที่ใน 0-3 ชั่วโมงแรก และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 (947.93 หน่วย/มก.โปรตีน) หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลง จนมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ถึงชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนด้วยเกลือที่มากขึ้นจนมีค่าคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 18 จนถึง 36 ดังแสดงผลในรูปที่ 6 และตารางผนวกที่ 3

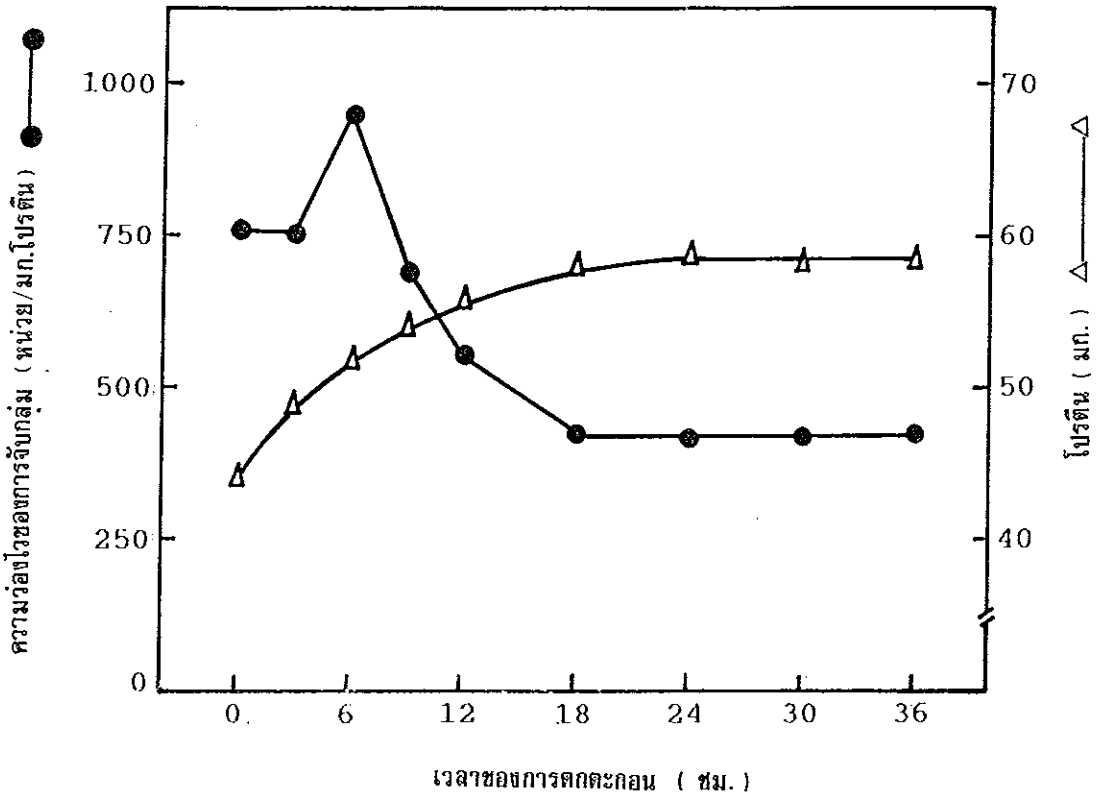
จากการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง 12.73 กรัม โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 20-80 % ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ปริมาณโปรตีนจะตกตะกอนได้น้อยที่สุด ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 20 % (0.68 มก./กรัมเหรียง) และตกตะกอนมากขึ้นจนมีค่ามากสุดที่ 60 % ความอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต (3.80 มก./กรัมเหรียง) และลดลงเมื่อความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 80 % ในขณะที่ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินมีค่าต่ำสุดที่ 20 % ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเช่นกัน และมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดจนคงที่ที่ 40 % และ 60 % ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (937.24 และ 931.12 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ) และจะลดลงที่ 80 % ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต (334.64 หน่วย/มก.โปรตีน) ดังแสดงผลในรูปที่ 7 และตารางผนวกที่ 4

3.1.4 ผลของการสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์

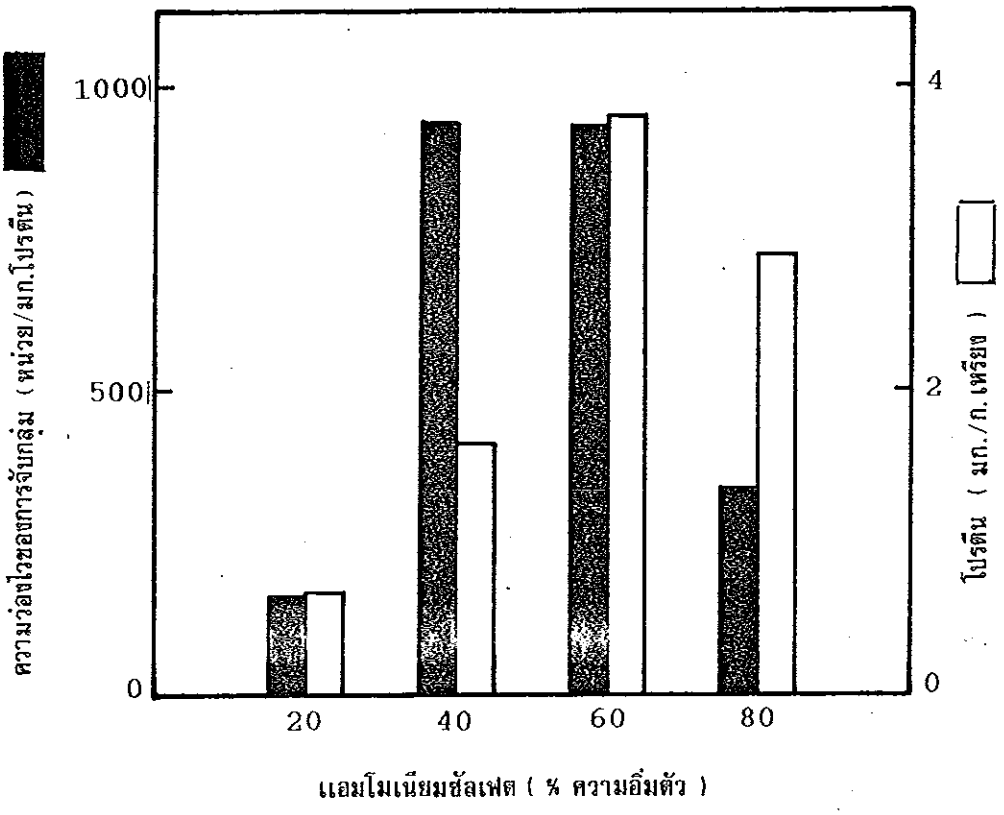
จากการสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ พบว่า โปรตีนของสารสกัดเลคตินจากเหรียงที่ผ่านการสกัดไขมันจะตกตะกอนได้มากสุด ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 60% ในขณะที่สารละลายโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านสกัดไขมันจะตกตะกอนได้มากสุดด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 40 % ความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์อสุจิทั้งที่เจริญตัวและไม่เจริญตัว และเม็ดเลือดแดงหนูของสารสกัดเลคตินที่ได้จากการสกัดไขมัน มีค่าสูงกว่าของสารสกัดเลคตินที่ไม่สกัดไขมันออกประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 11)

3.2 ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ของสารสกัดเลคติน

ในการทดสอบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่เม็ดเลือดแดงของคน (หมู่ A,B,O และ AB), แกะ,ห่าน, กระต่ายและหนูขาว พบว่า



รูปที่ 6 ผลการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 % ในช่วงเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 7 ผลความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการตกตะกอนโปรตีนของสารสกัดเลคติน

ตารางที่ 11 ผลการสกัดและไม่สกัดไขมันจากสารสกัดเลคตินด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์

	โปรตีน (มก./กรัมเหรียง)	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่ม (หน่วย/มก.โปรตีน)		
		ตัวอสุจิ		เลือดหนู
		ไม่เจริญตัว	เจริญตัว	
สกัดไขมัน	11.87	74.0	6.2	1.6
	8.60	118.4	26.7	6.7
ค่าเฉลี่ย± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน	10.2±2.3	96.2±31.4	16.4±14.5	4.2±3.6
ไม่สกัดไขมัน	9.9	24.8	4.6	1.2
	3.1	53.5	14.8	3.7
ค่าเฉลี่ย± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน	6.5±4.8	39.2±20.3	9.7±7.2	2.4±1.8

สารสกัดเลคตินทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มได้ดีที่สุด (251.10 หน่วย/มก.โปรตีน) รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของหนู (3.92 หน่วย/มก.โปรตีน) แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคน แกะ และ ห่านจับกลุ่มได้ สำหรับตัวอสุจิหนูขาว พบว่าสารสกัดเลคตินทำให้ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญตัวจับกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิที่เจริญตัวแล้วคือมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเป็น 125.55 และ 7.85 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

3.3 ผลของการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4° ซ

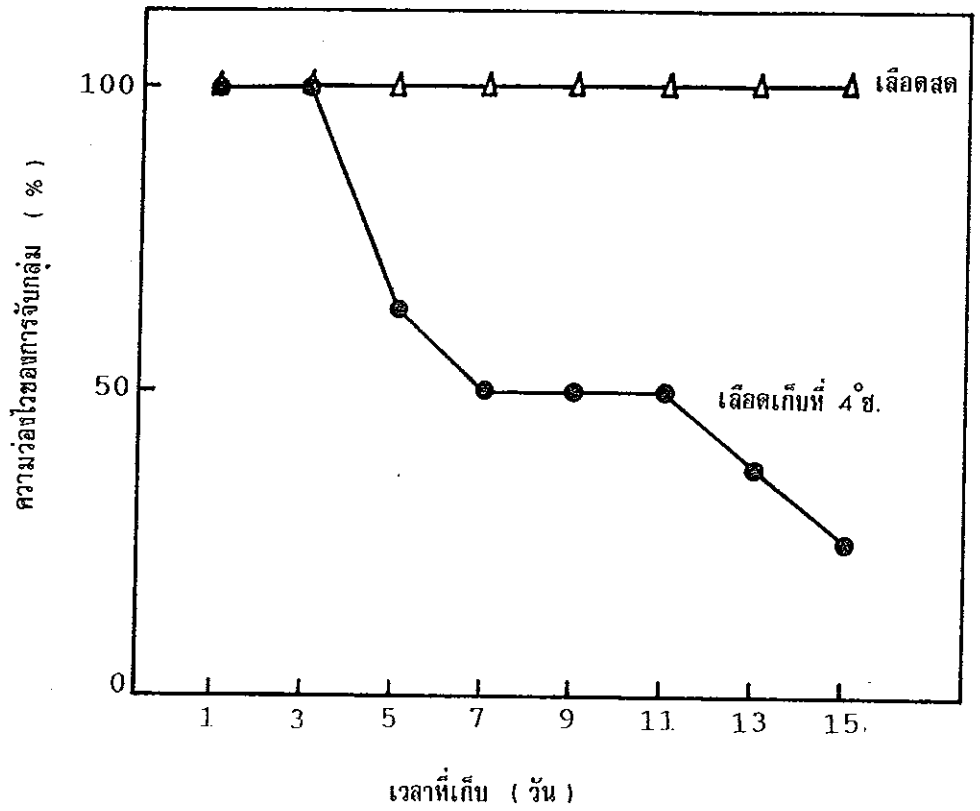
จากการเก็บเลือดกระต่ายในตู้เย็นที่ 4° ซ โดยมี 5 mM EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นาน 0-15 วัน แล้วทำการทดสอบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดเลคตินซึ่งเก็บไว้ที่ -20° ซ โดยทำควบคู่กับเม็ดเลือดแดงที่เตรียมจากเลือดสด พบว่าการเก็บเลือดไว้ที่ 4° ซ 3 วันแรกไม่มีผลแตกต่างต่อการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดเลคติน แต่การจับกลุ่มจะเริ่มลดลงในวันที่ 5 ของการเก็บโดยมีความว่องไวของการจับกลุ่มลดลงเหลือ 50 % ของเลือดสดและจะค่อย ๆ ลดลงอีกในวันที่ 11 จนเหลือ 25 % ในวันที่ 15 ของการเก็บ ดังแสดงผลในรูปที่ 8

3.4 ผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดเลคติน

ตารางที่ 13 แสดงผลการยับยั้งของน้ำตาลหลายชนิดต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยสารสกัดเลคติน น้ำตาลที่มีผลยับยั้งการจับกลุ่มได้ดีที่สุดคือ เมธิล-แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน (methyl-α-D-mannosamine) รองลงมาได้แก่ แมนโนส, มอลโตส, กลูโคส และ เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) ตามลำดับ สำหรับฟรุคโตส และเอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน (N-acetyl-D-mannosamine) จะมีผลยับยั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 mM กาแลคโตส และ แซคคาโรส มีผลยับยั้งน้อยมากในขณะที่เอ็น-อะซิติล-กาแลคโตซามีน (N-acetyl-galactosamine) ไม่มีผลยับยั้งเลย และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้ง 100 % ของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดเลคติน พบว่าน้ำตาลที่สามารถยับยั้งได้ดีเรียงตามลำดับ

ตารางที่ 12 ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ของสารสกัดเลคติน

ชนิดของเซลล์		ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ (หน่วย/มก.โปรตีน)
เม็ดเลือดแดงคน	หมู่ A	0
	หมู่ B	0
	หมู่ O	0
	หมู่ AB	0
เม็ดเลือดแกะ		0
เม็ดเลือดแดงห่าน		0
เม็ดเลือดแดงหนู		3.92
เม็ดเลือดแดงกระต่าย		251.10
ตัวอสุจิหนูขาว	ที่ยังไม่เจริญตัว	125.55
ตัวอสุจิหนูขาว	ที่เจริญตัวแล้ว	7.85



รูปที่ 8 ผลการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4° ซ ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดเลคติน

ตารางที่ 13 ผลความเข้มข้นของน้ำตาลต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยสารสกัดเลคติน

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้น (mM)										
	200	150	100	50	30	20	10	5	3	1	0.5
Mannose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3±0.6	1.8±0.3
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	0.5±0	1.0±0	1.8±0.3	2.2±0.3
Glucose	0	0	0	0	0	0.7±0.3	2.0±0.5	2.7±0.3	3.8±0.3	3.8±0.3	4.0±0
Fructose	0	0	0.03±0.03	1.2±0.3	1.5±0.5	2.0±0	3.2±0.3	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Galactose	2.2±0.3	3.7±0.3	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Saccharose	0.8±0.3	1.8±0.3	2.2±0.6	3.8±0.3	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Methyl-α-D-mannosamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0±0	2.8±0.8
N-Acetyl glucosamine	0	0	0	0	0.5±0	0.7±0.3	1.8±0.8	2.5±0.3	3.2±0.2	4.0±0	4.0±0
N-Acetyl-D-mannosamine	0	1.2±0.3	2.0±0.5	3.2±0.3	3.2±0.2	3.8±0.3	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
N-Acetyl galactosamine	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0

ความเข้มข้นน้อยที่สุดเป็นดังนี้ เมธิล แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน ซึ่งเท่ากับแมนโนส, รองลงมาตามลำดับได้แก่ มอลโตส, กลูโคส, เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามีน, ฟรุคโตส และ เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน ในขณะที่แซคคาโรสและกาแลคโตสมีผลยับยั้งได้น้อยกว่า 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM สำหรับเอ็น-อะซิติล-กาแลคโตซามีนไม่มีผลยับยั้งความสามารถของสารสกัดเลคตินในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM (ตารางที่ 14)

3.5 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.5.1 การใช้คอลัมน์ Sephadex และ DEAE-cellulose

เมื่อนำสารสกัดเลคตินที่ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และการตกตะกอนโปรตีน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 300 มก. ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G 100 แล้วชะด้วย PBS และ 0.1 M มอลโตส ตามลำดับ พบว่าก่อนชะด้วยน้ำตาลมอลโตส โปรตีนส่วนใหญ่ 99 % หลุดจากคอลัมน์โดยมีลักษณะแยกเป็น 3 พีค (peak) โปรตีนเหล่านี้มีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายต่ำ ในขณะที่โปรตีนส่วนน้อยถูกดูดซับโดยเจล และจะถูกชะออกมาด้วย 0.1 M มอลโตส โดยมีความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์สูงกว่าโปรตีนในกลุ่มแรก (รูปที่ 9)

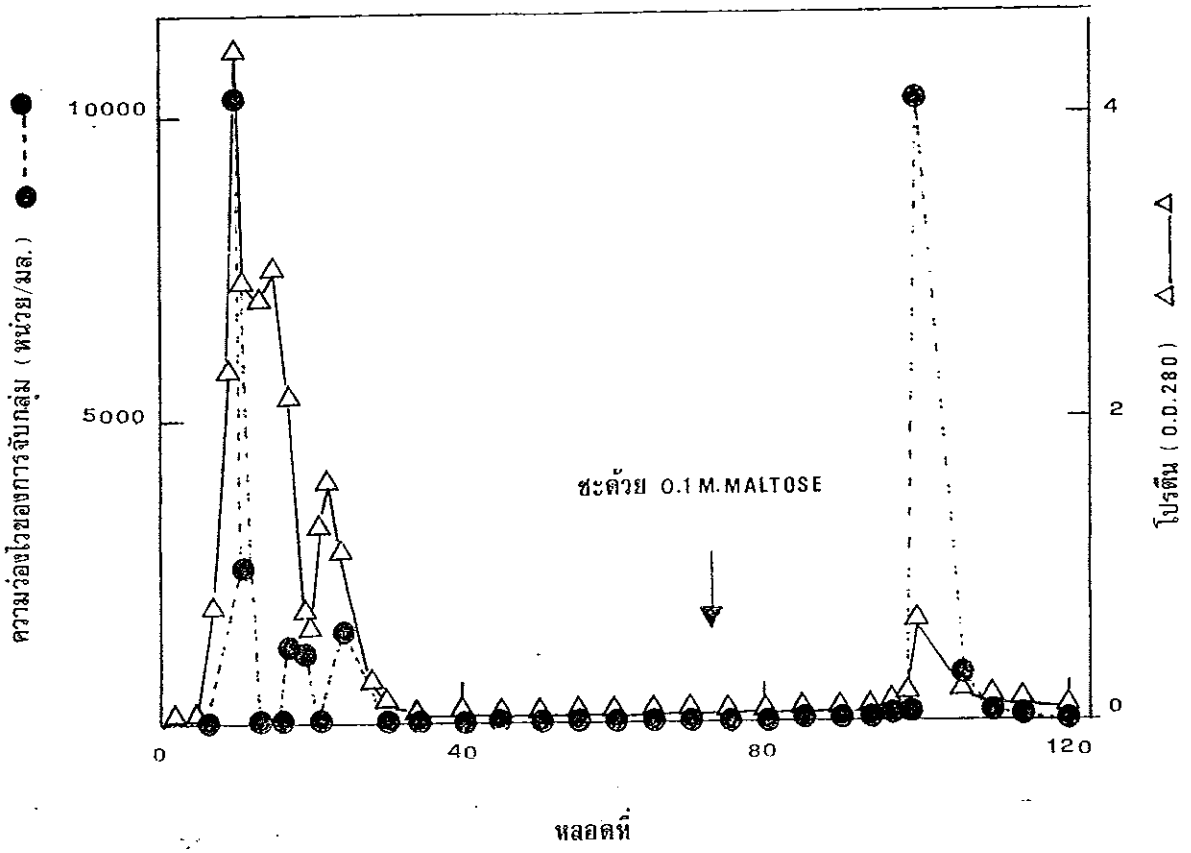
เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 99-105 ของคอลัมน์ Sephadex G 100 ซึ่งได้จากการชะด้วย 0.1 M มอลโตส จะได้โปรตีน 4.9 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 5,239.18 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 15) แยกสารละลายรวมนี้ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G 200 แล้วชะด้วย PBS และ 0.1 M มอลโตส ตามลำดับ โปรตีนส่วนมากประมาณ 68.7 % จะแยกออกจากคอลัมน์ในพีคแรก โปรตีนส่วนน้อย (31.2 %) จะถูกดูดซับโดย Sephadex G 200 และจะหลุดจากคอลัมน์หลังจากถูกชะด้วย 0.1 M มอลโตส โปรตีนพีคแรกที่แยกออกมาก่อนไม่สามารถจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ในขณะที่โปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วยน้ำตาลมอลโตส สามารถจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 10) เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 89-96 จะได้โปรตีน 1.53 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง 9,051.00 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ผลการยับยั้ง 100 % ของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย โดยสารสกัดเลคติน

น้ำตาล	ความเข้มข้นของน้ำตาล (mM) ที่ยับยั้งได้ 100 %
Mannose	3
Maltose	10
Glucose	30
Fructose	150
Galactose	NI
Saccharose	NI
Methyl-α-D-mannosamine	3
N-Acetyl glucosamine	50
N-Acetyl-D-mannosamine	200
N-Acetyl galactosamine	NI*

NI = การยับยั้งน้อยกว่า 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM

NI* = ไม่มีการยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 mM

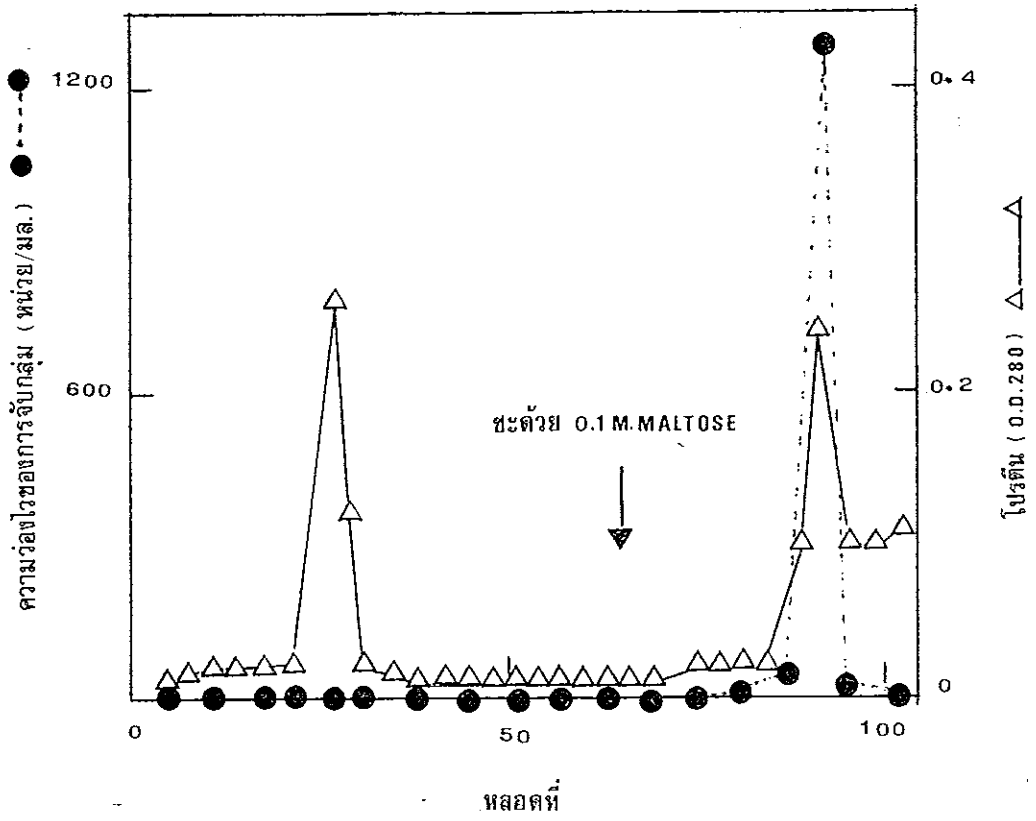


รูปที่ 9 การแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex G 100

ผ่านสารสกัดเลคตินที่ได้จากการสกัดไขมันและตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % (PE 60) (ข้อ 4) ปริมาณ 500 มก. ลงในคอลัมน์ Sephadex G 100 (1.4 X 80 ซม.) แล้วชะคอลัมน์ด้วย PBS, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็ว 40 มล./ชม. จน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ จึงชะต่อด้วย 0.1 M มอลโตสด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.

ตารางที่ 15 การทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex และคอลัมน์ DEAE-cellulose

	โปรตีน (มก.)	ความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	($\times 10^3$ หน่วย)	(%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดหยาบ (CE)	9,121.50	238.58	2,176.00	100.00	1.00
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ (PE)	3,594.45	331.34	1,190.40	54.73	1.39
ตกตะกอนแอมโมเนียม ซัลเฟต 60 % (PE 60)	2,241.45	465.98	1,044.48	48.00	1.95
คอลัมน์ Sephadex G 100	22.41	5,239.18	117.41	5.39	21.96
คอลัมน์ Sephadex G 200	6.86	9,051.00	62.09	2.85	37.94
คอลัมน์ DEAE-cellulose	2.81	13,120.00	36.87	1.70	55.00



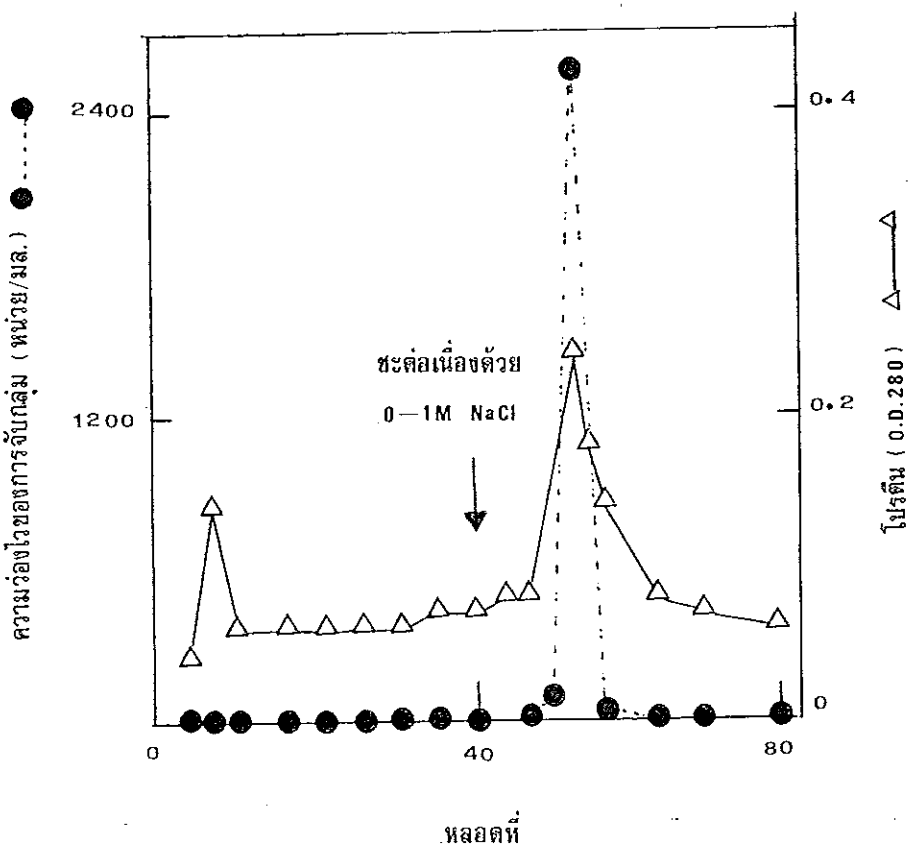
รูปที่ 10 การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 100 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 200

รวมสารละลายหลอดที่ 99-105 ปริมาณ 4.9 มก. จากคอลัมน์ Sephadex G 100 (รูปที่ 9) ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G 200 (1.9 x 20 ซม., ปริมาตร 60 มล.) แล้วชะด้วย PBS, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็ว 40 มล./ชม.จน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ ชะคอลัมน์ ต่อด้วย 0.1 M มอลโตส ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมเก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.

เมื่อแยกโปรตีนรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 200 1.53 มก. ต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่าโปรตีนประมาณ 59% จะหลุดออกมาก่อนไม่จับกับคอลัมน์ และไม่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ในขณะที่โปรตีนอีก 41 % ซึ่งจับกับคอลัมน์จะถูกชะออกมาด้วยเกลือ NaCl และมีความสามารถจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย หลังจากรวมโปรตีนพีคที่ถูกชะออกด้วยเกลือ NaCl หลอดที่ 50-58 (รูปที่ 11) พบว่ามีโปรตีน 0.63 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง 13,120.00 หน่วยต่อมก.โปรตีน (ตารางที่ 15)

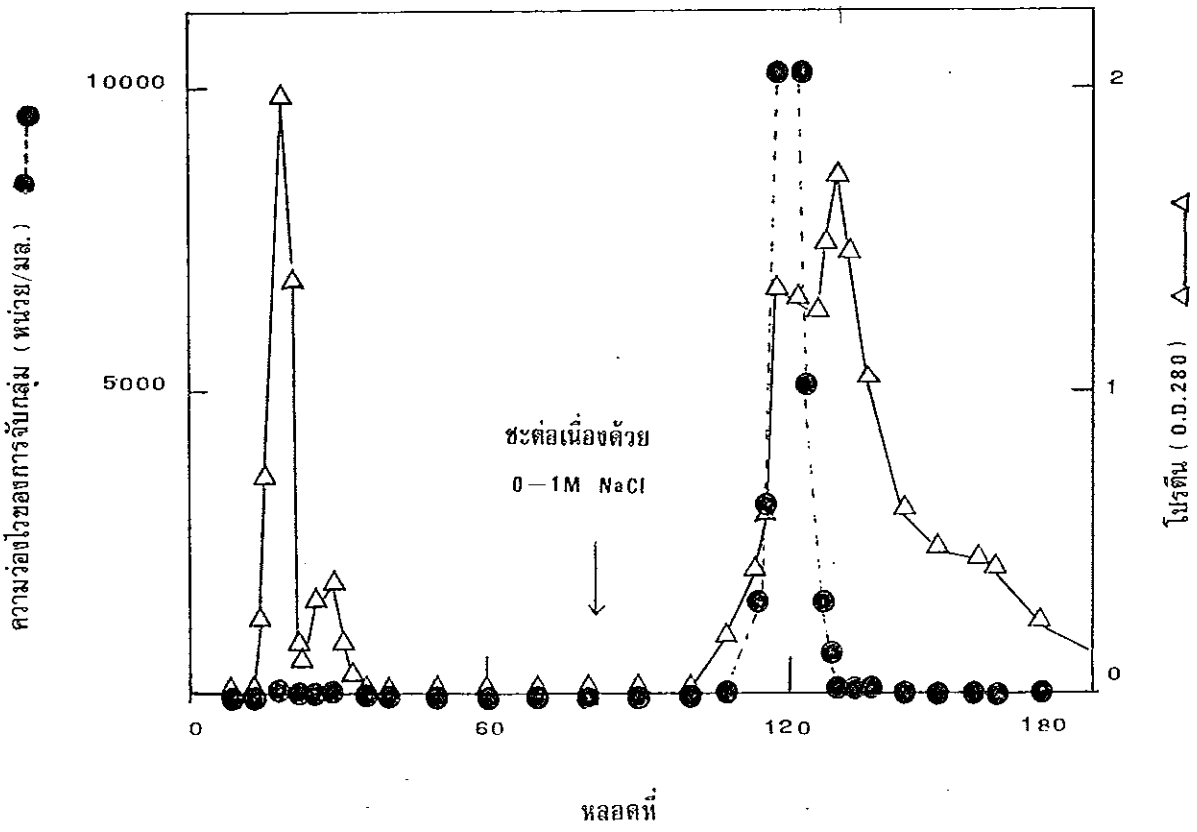
3.5.2 การใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose

เมื่อนำโปรตีน 260 มก. ที่ได้จากการสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ (87 %) ไม่จับกับคอลัมน์โดยจะหลุดออกจากคอลัมน์เป็น 2 พีค และมีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายต่ำ โปรตีนส่วนน้อย (13 %) ซึ่งจับอยู่กับคอลัมน์จะถูกชะออกมาด้วยเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.3 M โดยโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์แยกเป็น 2 พีคใหญ่ และ 1 พีคเล็ก เมื่อทดสอบหาความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย พบว่าโปรตีนพีคแรก (หลอดที่ 113-124) มีความว่องไวสูง (รูปที่ 12) เมื่อรวมสารละลายหลอดเหล่านี้เข้าด้วยกันจะมีโปรตีน 38.75 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง 2,624.51 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 16) เมื่อนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100 โปรตีนส่วนมาก (98 %) จะผ่านคอลัมน์ออกมาในช่วงแรกแยกเป็น 4 พีค และมีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงต่ำ โปรตีนส่วนน้อยประมาณ 2 % จะหลุดออกมาจากคอลัมน์หลังจากถูกชะด้วย 0.1 M มอลโตส โดยมีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดลือดแดงกระต่ายสูง ดังแสดงใน รูปที่ 13 เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 101-104 จะได้โปรตีนรวม 0.648 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 10,491.80 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 16) เมื่อนำสารละลายรวมนี้ไปทำให้บริสุทธิ์ ต่อโดยคอลัมน์ดี-แมนโนส-อะกาโรส



รูปที่ 11 การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 200 ด้วยคอลัมน์ DEAE-Cellulose

รวมสารละลายหลอดที่ 89-96 ปริมาณ 1.53 มก.จากคอลัมน์ Sephadex G 200 (รูปที่10) แล้วผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose (ขนาด 2.6 X 8 ซม., ปริมาตร 40 มล.) จากนั้นชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็ว 40 มล./ชม.จน $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะโดยเพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องด้วย 0-1 M NaCl (100 มล.+ 100 มล.) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.

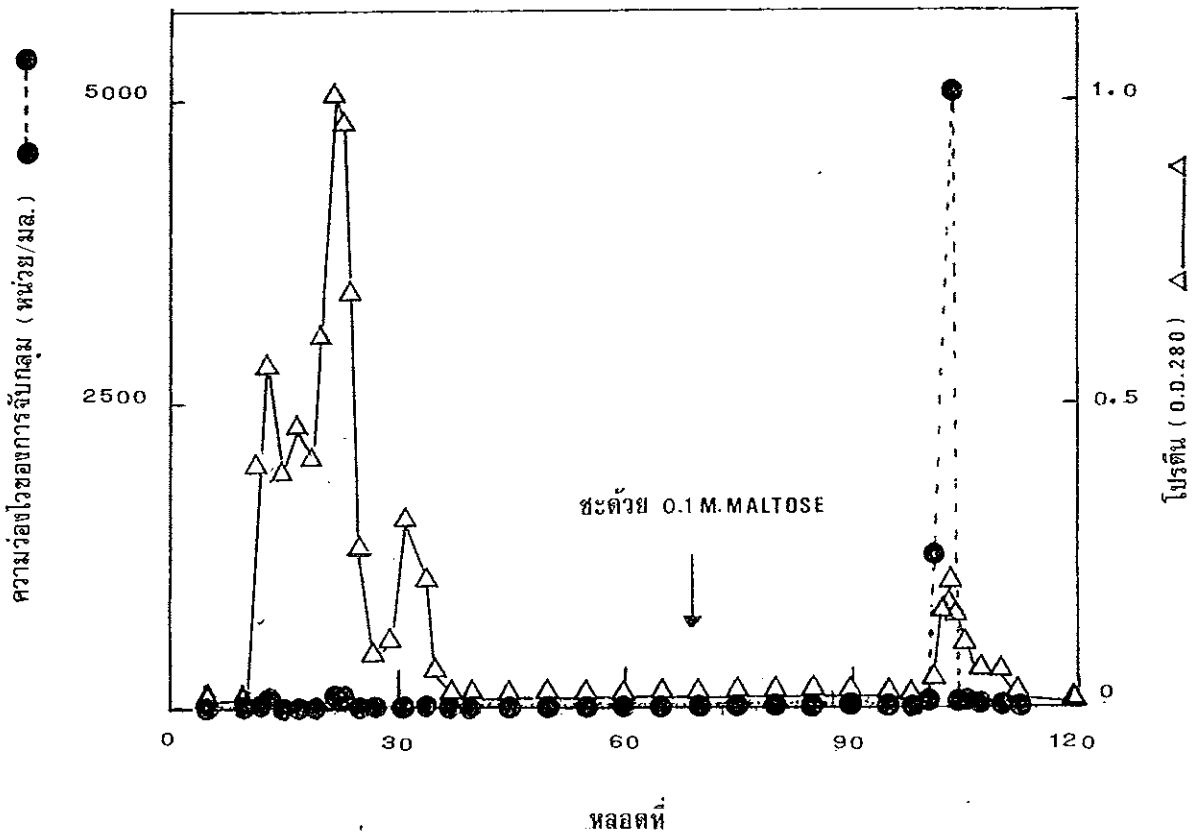


รูปที่ 12 การแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose

โปรตีน 300 มก. ของสารสกัดเลคตินที่ได้จากการสกัดไขมันและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % นำมาผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาด 2.6 X 11 ซม. (ปริมาตร 60 มล.)แล้วชะคอลัมน์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 ด้วยอัตรา เร็ว 45 มล./ชม.จนค่า $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วยเกลือ NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นต่อเนื่อง 0-1 M NaCl (200 มล. + 200 มล.) ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 3 มล.

ตารางที่ 16 การทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และคอลัมน์ D-Mannose agarose

	โปรตีน (มก.)	ความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	(x 10^3 หน่วย)	(%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดหยาบ (CE)	6,324.80	271.15	1,714.97	100.00	1.00
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ (PE)	2,427.60	376.09	913.00	53.24	1.38
ตกตะกอนแอมโมเนียม ซัลเฟต 60 % (PE 60)	1,414.14	544.50	769.29	44.86	2.00
คอลัมน์ DEAE-cellulose	182.71	2,624.51	479.52	27.96	9.68
คอลัมน์ Sephadex G 100	3.07	10,491.80	32.21	1.88	38.65
คอลัมน์ D-Mannose agarose	1.13	21,238.94	24.00	1.40	78.32



รูปที่ 13 การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100

สารละลายรวม หลอดที่ 113-124 จากคอลัมน์ DEAE-cellulose มีโปรตีน 38.75 มก. นำไปผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G 100 ขนาด 1.4 X 80 ซม.(ปริมาตร 120 มล.) แล้วชะคอลัมน์ด้วย PBS, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็ว 36 มล./ซม. จนค่า $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ ชะต่อด้วย 0.1 M มอลโตส ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารที่ถูกชะออกมา หลอดละ 3 มล.

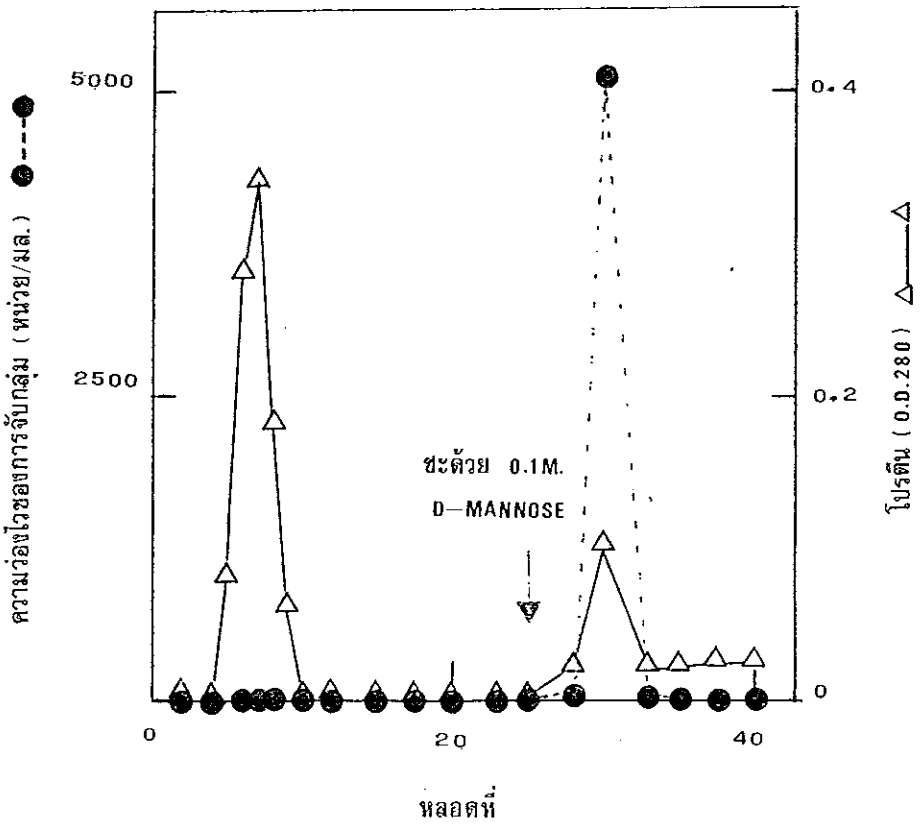
(D-mannose agarose) แล้วชะคอลัมน์ด้วย PBS, pH 7.4 โปรตีนส่วนมาก 63 % จะถูกชะออกมาเพียงพีคเดียว และไม่มีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ในขณะที่โปรตีนส่วนน้อย 37 % จะหลุดออกมาจากคอลัมน์หลังจากชะด้วย 0.1 M แมนโนส เป็นพีคเดียวเช่นกัน มีโปรตีน 0.24 มก. และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงถึง 21,238.94 หน่วย/มก.โปรตีน (รูปที่ 14 และตารางที่ 16)

3.6 การศึกษาแบบแผนโปรตีนโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส

เมื่อติดตามแบบแผนโปรตีนในอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการสกัด และการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสารสกัดเลคตินหยาบ (CE) สารสกัดเลคตินที่ผ่านการสกัดไขมันออก (PE) และสารสกัดเลคตินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % (PE 60) มีแบบแผนโปรตีนที่ไม่แตกต่างกันคือมีแถบโปรตีนประมาณ 12 แถบ โดยเฉพาะสารสกัด PE จะเห็นแถบได้ชัดเจน (รูป 15 แถวที่ 2,3,4)

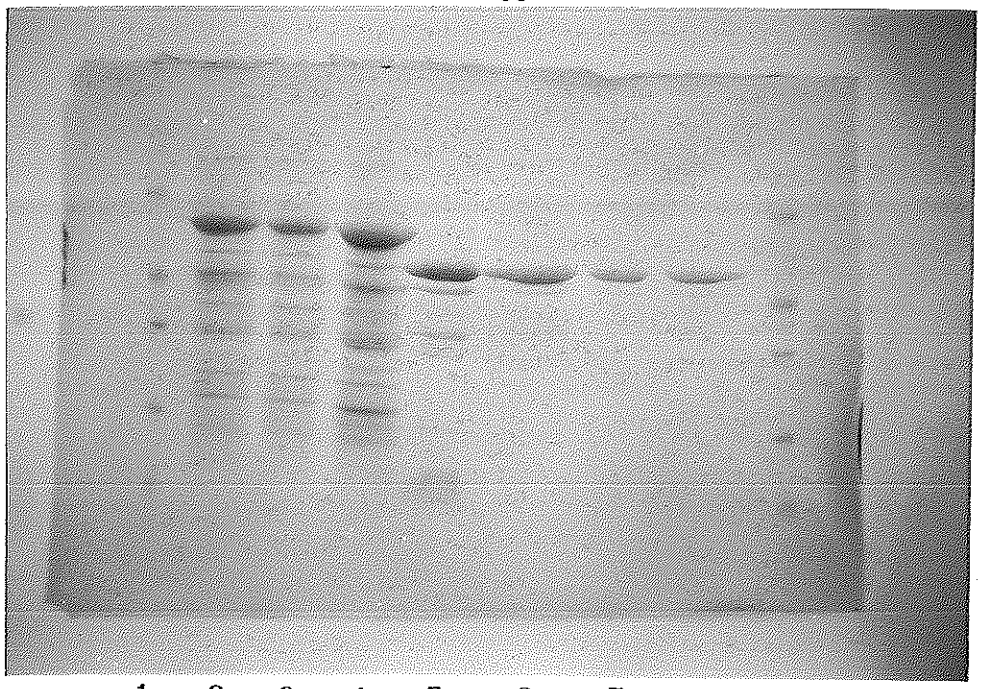
สำหรับโปรตีนในขั้นตอนการแยกโดยใช้คอลัมน์ต่าง ๆ นั้น ในการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เรียงลำดับดังนี้ คือ Sephadex G 100, Sephadex G 200 และ DEAE-cellulose พบว่าสำหรับโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100 จะเหลือโปรตีนประมาณ 7 แถบ (รูปที่ 15 แถวที่ 5) เมื่อนำโปรตีนนี้ไปผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G 200 หลังจากชะด้วยน้ำตาลจะมีแถบโปรตีนเหลือประมาณ 4 แถบ (รูปที่ 15 แถวที่ 6) และโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose จะเห็นแถบโปรตีน 2 แถบ (รูปที่ 15 แถวที่ 7)

ในการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส ของโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-mannose agarose ตามลำดับ พบว่าสารสกัดเลคติน PE 60 ก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีแถบโปรตีนประมาณ 12 แถบ (รูปที่ 16 แถวที่ 4) โปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose (รูปที่ 16 แถวที่ 5) มีแบบแผนแทบไม่แตกต่างไปจากสารสกัดเลคติน PE 60 ในขณะที่หลังจากการแยกโดยคอลัมน์ Sephadex G 100 โปรตีนที่ได้หลังจากชะด้วยน้ำตาล จะเห็นแถบโปรตีน 5



รูปที่ 14 การแยกสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G 100 ด้วยคอลัมน์ D-Mannose agarose

โปรตีน 0.648 มก. ที่ได้จากการรวมสารละลาย หลอดที่ 101-104 ของคอลัมน์ Sephadex G 100 นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ดี-แมนโนส อะกาโรส ขนาด 1.2 x 1.5 ซม. (1.5 มล.)จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย PBS, pH 7.4 ด้วยอัตราเร็ว 10 มล./ชม.จนค่า $O.D._{280}$ เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย 0.1 M แมนโนส ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารที่ถูกชะหลอดละ 1 มล.

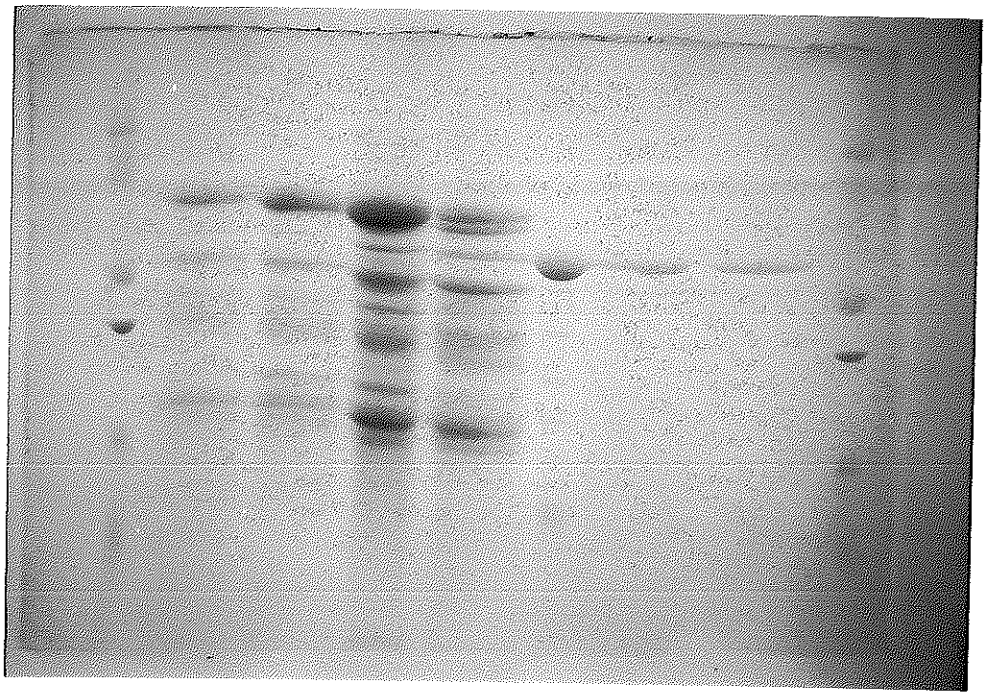


1 2 3 4 5 6 7 8 9

รูปที่ 15 แบบแผนโปรตีนของการทำให้บริสุทธิ์สารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex และ DEAE-Cellulose

ศึกษาแบบแผนโปรตีนของสารสกัดเลคตินซึ่งทำให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex G 100, Sephadex G 200 และ DEAE-cellulose ในเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส และย้อมสีโปรตีนด้วย สีคูมาซีบลู 0.2 %

แถวที่ 1,9	โปรตีนมาตรฐานได้แก่ ฟอสฟอริเลส บี, โบวีน อัลบูมิน, โอวัล บูมิน, คาร์บอนิค แอนไฮเดรส, ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา แลคตัลบูมิน	อย่างละ 10 ไมโครกรัม
แถวที่ 2	สารสกัดเลคตินหยาบ CE	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 3	สารสกัดเลคติน PE	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 4	สารสกัดเลคติน PE 60	70 ไมโครกรัม
แถวที่ 5	โปรตีนจากคอลัมน์ Sephadex G 100	25 ไมโครกรัม
แถวที่ 6	โปรตีนจากคอลัมน์ Sephadex G 200	10 ไมโครกรัม
แถวที่ 7	โปรตีนจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วยเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล	ซึ่งถูกรีดิวซ์ 20 ไมโครกรัม
แถวที่ 8	โปรตีนจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วยเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล	ซึ่งไม่ถูกรีดิวซ์ 20 ไมโครกรัม



1 2 3 4 5 6 7 8 9

รูปที่ 16 แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose

ศึกษาแบบแผนโปรตีนของสารสกัดเลคติน ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Cellulose, Sephadex G 100 และ D-mannose agarose ใน เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส (8-12 %)

แถวที่ 1,9 โปรตีนมาตรฐานได้แก่ ฟอสฟอริเลส บี, โบวีน อัลบูมิน, โอวัล บูมิน, คาร์บอนิค แอนไฮเดรส, ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา แลคตัลบูมิน อย่างละ 10 ไมโครกรัม

แถวที่ 2	สารสกัดเลคตินหยาบ CE	95 ไมโครกรัม
แถวที่ 3	สารสกัดเลคติน PE	95 ไมโครกรัม
แถวที่ 4	สารสกัดเลคติน PE 60	75 ไมโครกรัม
แถวที่ 5	โปรตีนจากคอลัมน์ DEAE-Cellulose	75 ไมโครกรัม
แถวที่ 6	โปรตีนจากคอลัมน์ Sephadex G 100	10 ไมโครกรัม
แถวที่ 7	โปรตีนจากคอลัมน์ D-Mannose agarose ซึ่งถูกรีดิวซ์ด้วยเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล	20 ไมโครกรัม
แถวที่ 8	โปรตีนจากคอลัมน์ D-Mannose agarose ซึ่งไม่ถูกรีดิวซ์ด้วยเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล	20 ไมโครกรัม

แถบ (รูปที่ 16 แถวที่ 6)และโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ D-mannose agarose จะมีแถบโปรตีนเพียง 2 แถบ (รูปที่ 16 แถวที่ 7,8) เลคตินบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกทั้งสองวิธีนี้ เมื่อไปนำทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ พบว่ามีโปรตีนสองแถบ อยู่ใกล้กัน แต่ย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน (รูปที่ 17 แถวที่ 7,8)

3.6.1 การศึกษาหน่วยย่อยของเลคตินบริสุทธิ์

เลคตินบริสุทธิ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 2.10 และตามวิธีการในข้อ 2.11 เมื่อนำมาศึกษาหน่วยย่อย (sub unit) โดยทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมี เอสดีเอส ที่มีและไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล เปรียบเทียบกัน พบว่าได้ผลเช่นเดียวกัน คือเลคตินที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองวิธี ต่างก็มีจำนวนโปรตีน 2 แถบ เหมือนกัน โปรตีนสองแถบนี้ย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน ดังผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 แถวที่ 7,8 และ รูปที่ 16 แถวที่ 7,8 ตามลำดับ

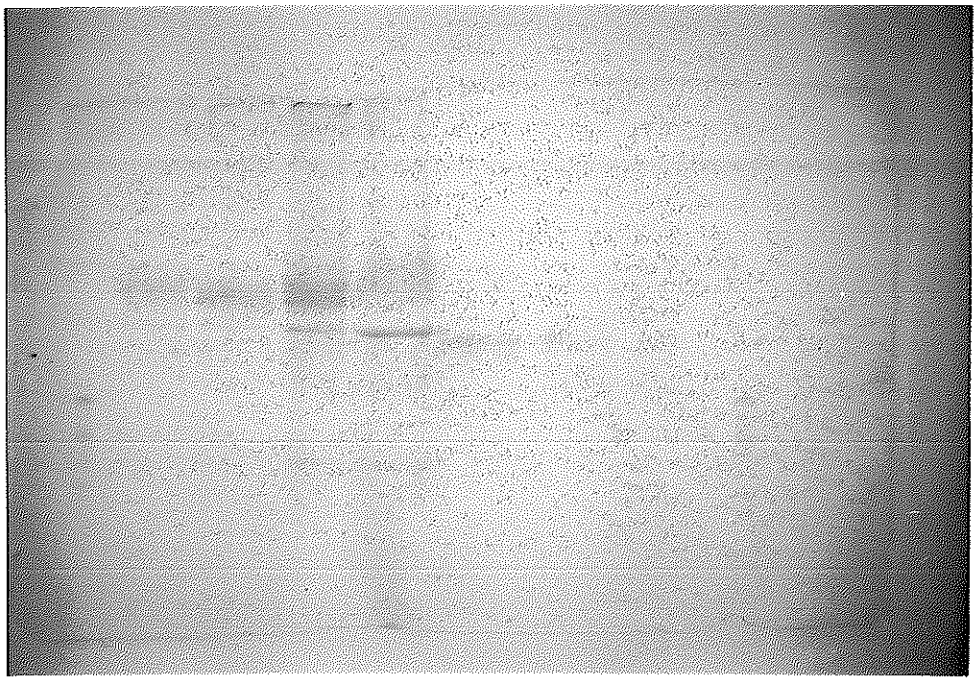
3.6.2 น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์

จากการหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของเลคตินบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส (รูปที่ 15 หรือรูปที่ 16) ตามวิธี ในข้อ 2.3.4 แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (รูปที่ 18) พบว่าโปรตีนทั้งสองแถบของเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 47,870 ดัลตัน (แถบเข้ม) และ45,700 ดัลตัน (แถบจาง)ในทำนองเดียวกัน เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์จากการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ (รูปที่ 17) โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว พบว่าโปรตีนทั้งสองแถบของเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 42,500 ดัลตัน (แถบเข้ม) และ 38,500 ดัลตัน (แถบจาง)

3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์

3.7.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-80° ซ เป็นเวลา



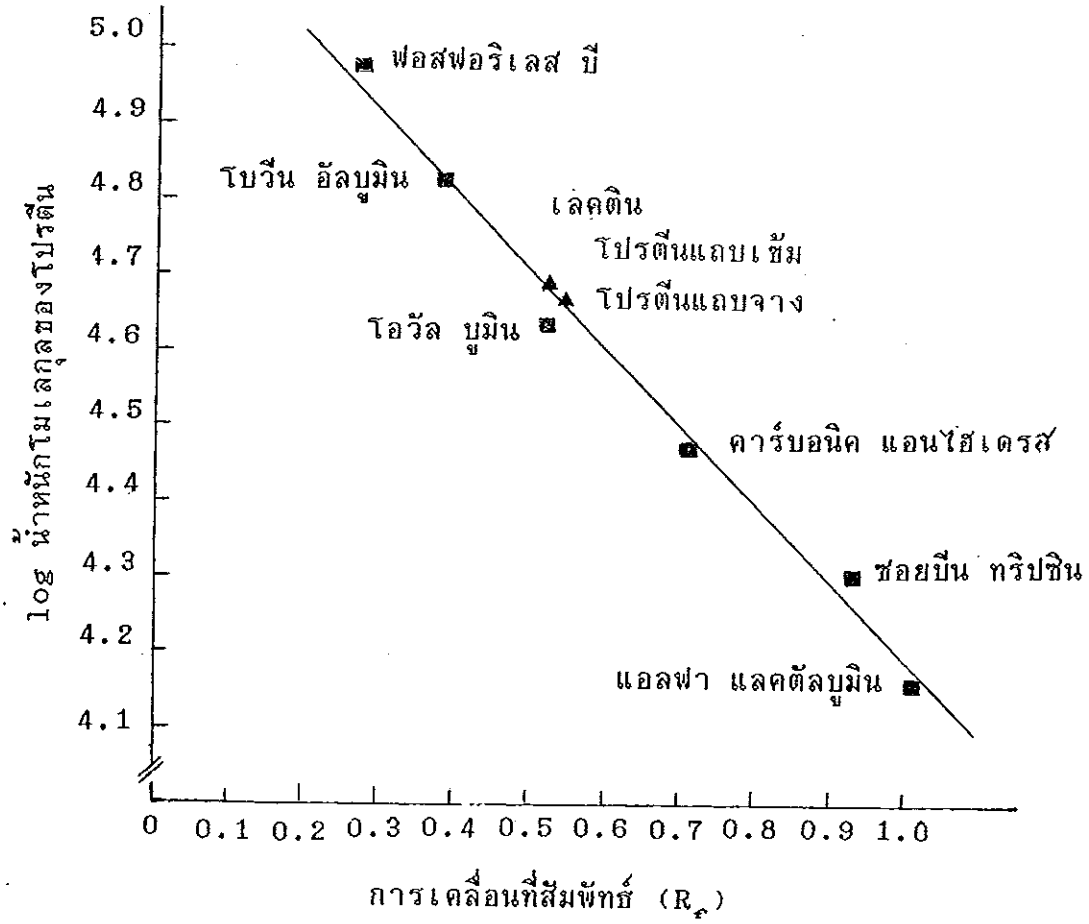
1 2 3 4 5 6 7 8 9

รูปที่ 17 แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการทำให้สารสกัดเลคตินบริสุทธิ์ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ

ศึกษาแบบแผนโปรตีนของสารสกัดเลคติน ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-mannose agarose ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส (6-9 %) แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ

แถวที่ 1,9 โปรตีนมาตรฐานได้แก่ ฟอสฟอริเลส บี, โบวีน อัลบูมิน, โอวัล บูมิน, คาร์บอนิค แอนไฮเดรส, ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา แลคตัลบูมิน อย่างละ 5 ไมโครกรัม

แถวที่ 2	สารสกัดเลคตินหยาบ CE	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 3	สารสกัดเลคติน PE	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 4	สารสกัดเลคติน PE 60	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 5	โปรตีนจากคอลัมน์ DEAE-cellulose	80 ไมโครกรัม
แถวที่ 6	โปรตีนจากคอลัมน์ Sephadex G 100	20 ไมโครกรัม
แถวที่ 7	โปรตีนจาก D-Mannose agarose	20 ไมโครกรัม
แถวที่ 8	โปรตีนจากการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex และ DEAE-cellulose	10 ไมโครกรัม



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่ได้จากการศึกษาโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอริซิส โปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว ที่ใช้คือ ฟอสฟอริเลส บี (M_r 94,000), โบวีน อัลบูมิน (M_r 67,000), โอวัล บูมิน (M_r 43,000), คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (M_r 30,000), ซอยบีน ทริปซิน (M_r 20,100) และ แอลฟา แลคตัลบูมิน (M_r 14,400)

15 นาที แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่ม เทียบกับเลคตินซึ่งเก็บไว้ที่ -20° ซ พบว่า การอุ่นเลคตินที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 50° ซ ไม่มีผลต่อการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย แต่ถ้าอุ่นเลคตินที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60° ซ ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มลดลงจาก คะแนน 4 ± 0 เป็น 0.5 ± 0.7 และถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจนถึง 70° ซ และมากกว่านี้ เลคตินบริสุทธิ์จะสูญเสียความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่ม ดังแสดงผลในรูปที่ 19 และตารางผนวกที่ 5

3.7.2 ความเสถียรต่อ pH

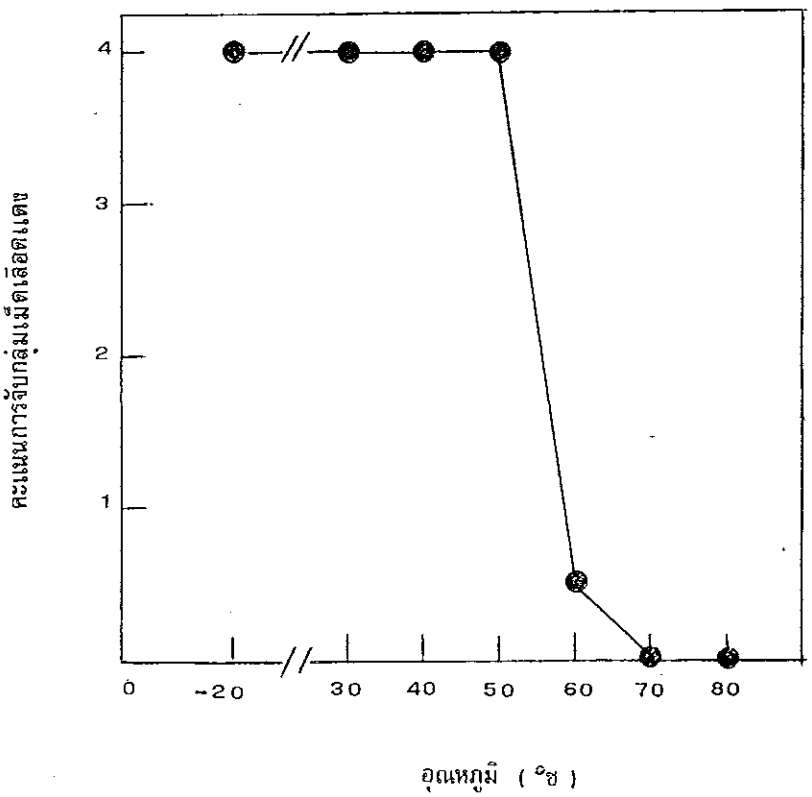
จากการศึกษาความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ ที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 3-12 พบว่า เลคตินบริสุทธิ์จะมีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7-10 โดยจะมีความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายดีที่สุด (160 หน่วย/มล.) ความเสถียรของเลคตินจะน้อยลงตาม pH ที่เป็นกรดมากขึ้น โดยความเสถียรจะหมดไปที่ pH 3 ที่ pH สูงกว่า 10 ความเสถียรของเลคตินลดลงเช่นกัน แต่ลดลงน้อยกว่าในช่วง pH ต่ำกว่า 7 (รูปที่ 20)

3.7.3 ผลของ pH

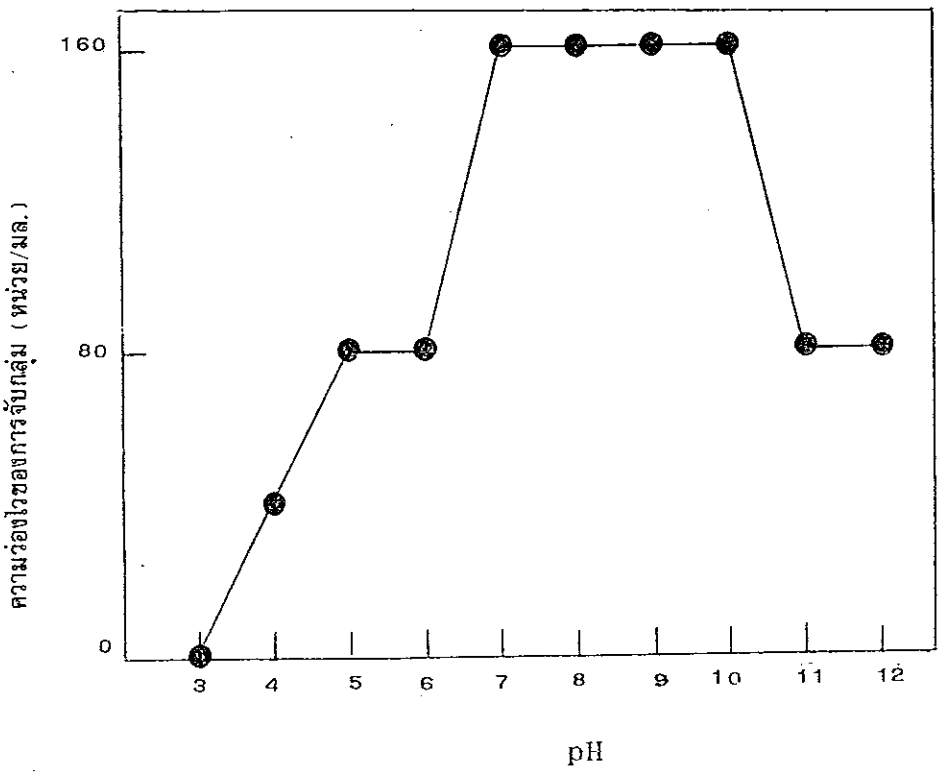
จากการศึกษาผลของ pH ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 2.12.3 พบว่าที่ pH 7 เลคตินจะทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มดีที่สุด (คะแนนการจับกลุ่มสูงสุดเป็น 4) ที่ pH สูงหรือ ต่ำกว่า 7 การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงลดลงตามความเป็นกรดหรือเป็นด่างที่มากขึ้นและลดลงเป็น 0 ที่ pH 4-5 และที่ pH 12 โดยที่ pH เหล่านี้เม็ดเลือดแดงจะแตก (รูปที่ 21)

3.7.4 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และอีจีทีเอ

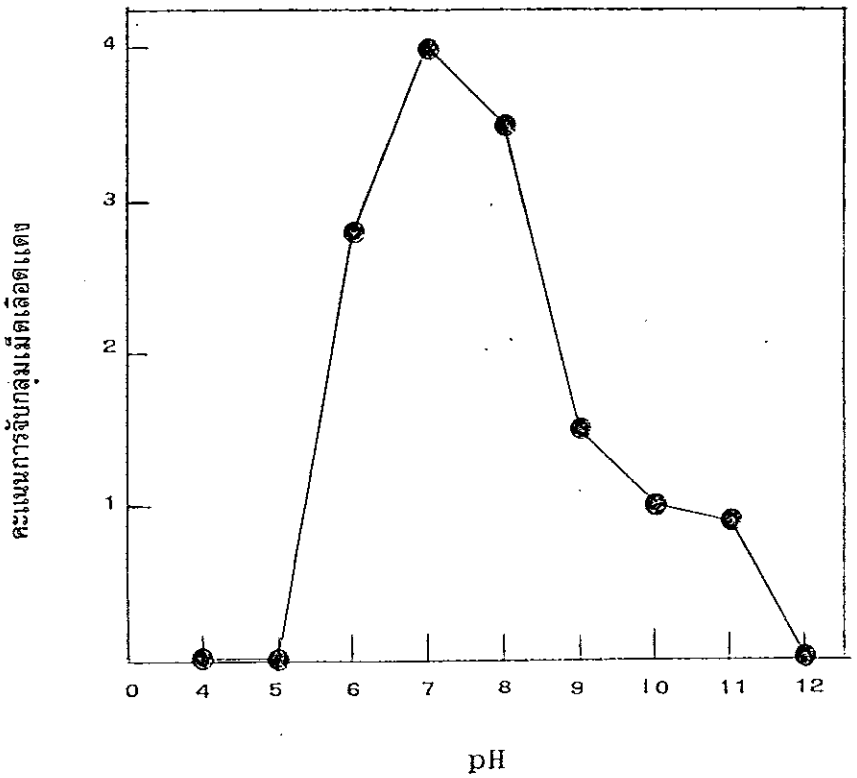
จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และอีจีทีเอในช่วงความเข้มข้น 0-40 mM ต่อความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย พบว่า Ca^{+2}, Mg^{+2} และ Mn^{+2} ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มีผลเพิ่มความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่ม โดยคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงจะค่อย ๆ สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไดวาเลนท์แคทไอออนสูงขึ้น Ca^{+2} มีผลเพิ่มคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือด



รูปที่ 19 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์



รูปที่ 20 ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ต่อ pH



รูปที่ 21 ผลของ pH ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

แดงดีกว่า Mn^{+2} และ Mg^{+2} ตามลำดับ สำหรับอีจีทีเอในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ไม่มีผลเพิ่ม หรือ ยับยั้งความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายจับกลุ่ม (รูปที่ 22)

3.7.5 ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง

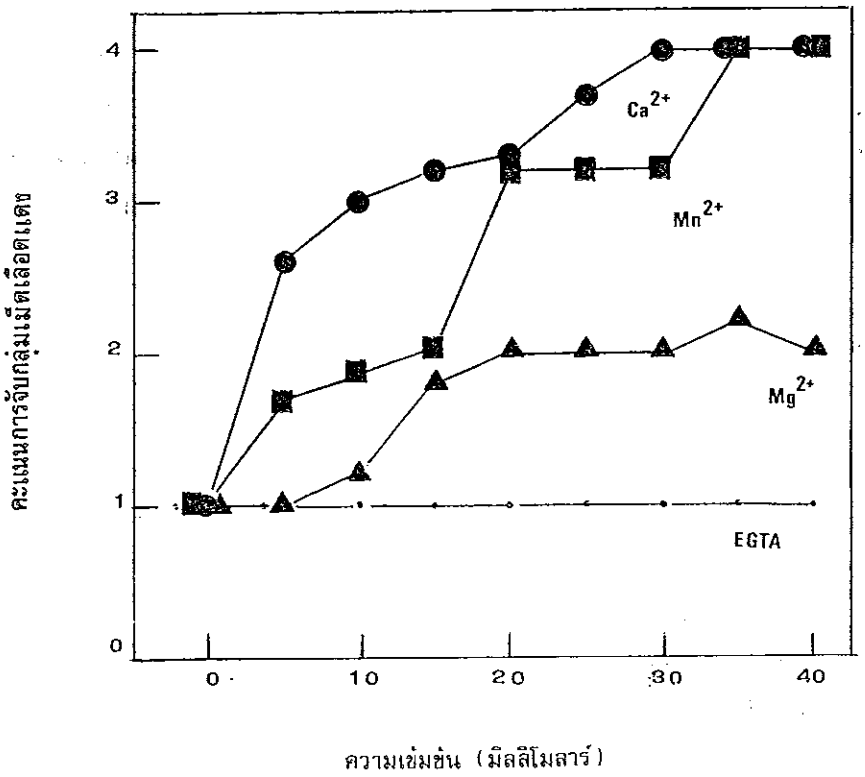
ในการทดสอบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มได้ดีที่สุด (68,266 หน่วย/มก.โปรตีน) รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของหนู (266 หน่วย/มก.โปรตีน) แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคน แกะ และ ห่านจับกลุ่มได้ (ตารางที่ 17)

3.7.6 ผลของการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซิน

เปรียบเทียบการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง โดยเลคตินบริสุทธิ์ของคนหมู่ A,B,O และของกระต่ายที่ย่อยและไม่ได้ย่อยด้วยทริปซิน พบว่า เม็ดเลือดแดง ของคนทั้งก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จะไม่มีการจับกลุ่มโดยเลคติน ส่วนเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง โดยเลคตินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากก่อนย่อย 64 เท่า โดยมีค่าความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มของก่อนและหลังย่อยเป็น 13,120 และ 780,190 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 18

3.7.7 ผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

ตารางที่ 19 แสดงผลการยับยั้งของน้ำตาลหลายชนิด ต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ น้ำตาลที่มีผลยับยั้งการจับกลุ่มได้ดีที่สุดคือ เมธิล แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน และ แมนโนส รองลงมาได้แก่ มอลโตส, กลูโคส และ เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ตามลำดับ สำหรับ ฟรุคโตส และแซคคาโรส มีผลยับยั้งน้อยมาก ในขณะที่ เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน และ เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่มีผลยับยั้งเลย และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้ง 100 % ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินบริสุทธิ์ (ตารางที่ 20) พบว่าน้ำตาลที่สามารถยับยั้งได้ดีเรียงลำดับความเข้มข้นน้อยที่สุดเป็นดังนี้ คือ เมธิล แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน ซึ่งเท่ากับแมนโนส



รูปที่ 22 ผลของความเข้มข้นของไดวาเลนท์ แคทไอออน และอีจีทีเอ ต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

ตารางที่ 17 ความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ ของเลคตินบริสุทธิ์

ชนิดของเม็ดเลือดแดง		ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ (หน่วย /มก. โปรตีน)
เลือดคนหมู่	A	0
	B	0
	O	0
	AB	0
เลือดแกะ		0
เลือดห่าน		0
เลือดกระต่าย		68,266
เลือดหนู		266

ตารางที่ 18 ผลของเอนไซม์ทริปซินต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยเลคติน บริสุทธิ์

ชนิดของเม็ดเลือดแดง	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (หน่วย/มก.โปรตีน)	
	ก่อนย่อยด้วยทริปซิน	หลังย่อยด้วยทริปซิน
เลือดคนหมู่ A	0	0
B	0	0
O	0	0
เลือดกระต่าย	13,120	780,190

ตารางที่ 19 ผลความเข้มข้นของน้ำตาลต่อคะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

น้ำตาล	ความเข้มข้น (mM)										
	200	150	100	50	30	20	10	5	3	1	0.5
Mannose	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0±0	3.7±0.6	4.0±0
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	1.0±0	2.0±0	3.0±0	4.0±0
Glucose	0	0	0	0	1.0±0	2.0±0	3.7±0.6	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Fructose	0.3±0.6	1.3±0.6	2.0±0	3.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Galactose	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Saccharose	0.5±0	0.8±0.3	1.7±0.5	2.7±0.6	3.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
Methyl-α-D-mannosamine	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0±0	2.3±0.6	3.7±0.6
N-Acetyl glucosamine	0	0	0	0.6±0.6	2.3±1.2	3.3±0.6	3.7±0.6	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
N-Acetyl-D-mannosamine	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0
N-Acetyl galactosamine	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0	4.0±0

ตารางที่ 20 ผลการยับยั้ง 100 % ของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย โดยเลคตินบริสุทธิ์

น้ำตาล	ความเข้มข้นของน้ำตาล (mM) ที่ยับยั้งได้ 100 %
Mannose	5
Maltose	10
Glucose	50
Fructose	NI
Galactose	NI*
Saccharose	NI
Methyl-α-D-mannosamine	5
N-Acetyl glucosamine	100
N-Acetyl-D-mannosamine	NI*
N-Acetyl galactosamine	NI*

NI = การยับยั้งน้อยกว่า 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM

NI* = ไม่มีการยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 mM

รองลงไปตามลำดับได้แก่ มอลโตส, กลูโคส และ เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ในขณะที่ ฟรุคโตส และ แซคคาโรส ยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ไม่ถึง 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM สำหรับ กาแลคโตส, เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน และ เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่มีผลยับยั้งความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM

บทวิจารณ์

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

4.1.1 เวลาของการเพาะเมล็ดเหรียง

เมล็ดเหรียงที่เพาะด้วยเวลาต่าง ๆ กัน จะมีปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายต่างกัน การเพาะเมล็ดเหรียงในช่วง 1-2 วันแรกจะมีปริมาณโปรตีนและความว่องไวจำเพาะไม่แตกต่างกัน เมื่อปล่อยให้เมล็ดเหรียงงอกนานขึ้น พบว่าจะมีโปรตีนลดลงตั้งแต่การงอกวันที่ 3 ไปจนถึงวันที่ 7 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากโปรตีนของเมล็ดเหรียงถูกนำไปใช้ในการงอก ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Rudiger (1984) ที่กล่าวว่าปริมาณเลคตินในใบเลี้ยงจะลดลงภายหลังการงอก สำหรับความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเหรียงก็ลดต่ำลง ในวันที่ 3 และต่ำสุดในวันที่ 4 จากนั้นความว่องไวจำเพาะกลับค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น จนสูงสุดในวันที่ 7 (รูปที่ 3) ดังนั้นในการสกัดเมล็ดเหรียงควรใช้เหรียงที่เพาะนาน 7 วันซึ่งมีค่าความว่องไวจำเพาะสูงสุดและมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณโปรตีนในเมล็ดเหรียงลดน้อยลงในขณะที่ปริมาณเลคตินค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4) หรือค่อย ๆ ลดลง เช่นเดียวกับเลคตินจากใบเลี้ยงของ *Vicia faba* (Broad bean) ซึ่งเลคตินจะค่อย ๆ ลดน้อยลงหลังจากโปรตีนอื่น ๆ ลดลงแล้ว (Weber and Neuman, 1980) และเลคตินจากต้นอ่อนของข้าวสาลี พบว่ายังมีเลคตินอยู่สูง แม้ว่าเมล็ดได้งอกไปแล้วนานถึง 34 วัน (Pusztai, *et al.*, 1983) และสอดคล้องกับ Goldstein and Hayes (1978) ซึ่งรายงานว่าเลคตินจะมีความต้านทานต่อการสลายตัวได้ดีกว่าโปรตีนตัวอื่น ๆ ในช่วงการงอก

4.1.2 เวลาของการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง โดยใช้เวลาในการสกัดต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-24 ชั่วโมง พบว่า ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงจะมีค่าสูงขึ้น เมื่อใช้เวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นความว่องไวจำเพาะจะมีค่าลดต่ำลง ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) การที่ความว่องไวจำเพาะมีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการสกัด

เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการที่เลคตินมีเวลามากพอที่จะถูกสกัดออกมาจาก ไซโตพลาซึม (Mialonier, *et al.*, 1973) หรือโปรตีนบอดี (Clarke, *et al.*, 1975 ; Mamen and Puzztai, 1982) ของเซลล์ใบเลี้ยง ทำให้เลคตินละลายออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากขึ้น และเมื่อสกัดนานเกิน 12 ชั่วโมง ความว่องไวจำเพาะมีค่าค่อย ๆ ลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากโปรตีนในสารละลายบางส่วนอาจถูกทำลายไป ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงเช่นกันเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ดังนั้นในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียงเพื่อให้ได้ผลดีที่สุด ควรใช้เวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง เพราะจะได้ค่าความว่องไวจำเพาะสูงที่สุด

4.1.3 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากผลการตกตะกอนโปรตีนของสารสกัดเลคติน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 20-80 % (รูปที่ 7) พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % สามารถตกตะกอนโปรตีนได้มากที่สุดดีกว่าที่ความอิ่มตัวอื่น ในขณะที่ความว่องไวจำเพาะมีค่าสูงสุดที่ความอิ่มตัว 40 และ 60 % ดังนั้นในการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินของเหรียง จึงควรใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 % อนึ่งที่ความอิ่มตัว 80 % ของแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าโปรตีนบางส่วนที่มีไขมันปะปนอยู่ มีความหนาแน่นน้อยกว่าความหนาแน่นของสารละลายเกลือ หลังจากการเซนตริฟิวจ์จึงลอยอยู่ในส่วนสารละลายชั้นบน ไม่สามารถตกตะกอนลงได้

เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % ด้วยเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-36 ชั่วโมง พบว่าความว่องไวจำเพาะในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายค่อนข้างคงที่ในเวลา 0-3 ชั่วโมง แรก และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นจะมีค่าลดต่ำลง ในขณะที่โปรตีนทั้งหมดจะเริ่มตกตะกอนได้มากสุดที่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (รูปที่ 6) แสดงให้ว่า เลคตินจะตกตะกอนได้สูงสุดในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจาก 6 ชั่วโมงไปแล้ว ความว่องไวจำเพาะของสารสกัดเลคตินจะค่อย ๆลดลง ในขณะที่โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จะตกตะกอนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการตกตะกอน เหตุที่ความว่องไวจำเพาะของสารสกัดเลคตินค่อย ๆ ลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารสกัดเลคตินได้ตกตะกอนเกือบหมดในระยะแรก ซึ่ง

Liener (1976) กล่าวว่า เลคตินจากพืชตระกูลถั่วจะมีประมาณ 10% ของสารสกัดโปรตีนทั้งหมด หลังจากนี้สารสกัดเลคตินจะเหลือปริมาณน้อยเป็นผลทำให้ความว่องไวจำเพาะลดน้อยลง ในขณะเดียวกับที่โปรตีนทั้งหมดยังตกตะกอนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จึงเป็นผลทำให้ความว่องไวจำเพาะน้อยลง จากชั่วโมงที่ 18-24 ของการตกตะกอน จะเห็นว่าความว่องไวจำเพาะที่ลดต่ำลงมีค่าค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนทั้งหมดที่ได้มีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงนี้เช่นกัน

4.1.4 การสกัดไขมันออกจากสารสกัดเลคตินด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ความอิ่มตัว 60 % ตกตะกอนโปรตีน พบว่าโปรตีนของสารสกัดเลคตินที่ผ่านการสกัดไขมัน (PE) จะตกตะกอนได้ดี เพราะโปรตีนไม่ถูกพยุงโดยอนุภาคไขมันที่ปนอยู่ ทำให้โปรตีนสามารถตกตะกอนได้มาก สำหรับสารสกัดเหรียงที่ไม่ได้สกัดไขมันออก โปรตีนจะตกตะกอนได้น้อยกว่า โดยโปรตีนบางส่วนจะลอยอยู่ชั้นบนของสารละลาย ซึ่งเป็นชั้นของไขมันหลังการเซนตริฟิวจ์ ดังนั้นสารสกัดเหรียงที่สกัดไขมันออกแล้ว สามารถตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวสูงถึง 60 % ได้ ในขณะที่สารสกัดเหรียงที่ไม่สกัดไขมันออกจะตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวเพียง 40 % เพราะถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวถึง 60 % โปรตีนส่วนใหญ่จะลอยอยู่ในชั้นบนของสารละลาย แทนการตกตะกอนที่ก้นหลอดหลังการเซนตริฟิวจ์ นอกจากนี้การสกัดไขมันออกจากสารสกัดเหรียงด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ยังทำให้มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ สูงกว่าของสารสกัดเลคตินที่ไม่ได้สกัดไขมันออก

4.2 การเก็บเลือดกระต่ายที่ 4° ซ

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการศึกษาการจับกลุ่มโดยเลคติน สามารถเก็บไว้ใช้ทดสอบปฏิกิริยาโดยเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° ซ ได้ไม่เกิน 3 วัน หลังจาก 3 วันไปแล้วคุณสมบัติของผิวเม็ดเลือดอาจจะเปลี่ยนไป ซึ่งได้แก่ น้ำตาลที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ซึ่ง Shinozuka, *et al.*, (1988) พบว่าในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุของคน คุณสมบัติในการจับกลุ่มกับเลคตินบางชนิดจะหมดไป ทำให้ความว่องไวของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินลดลงเมื่อเทียบกับเลือดสด โดยจะลดเหลือ 50% หลังจากเก็บไว้นาน 5 วันและเหลือ 25 %

หลังจากเก็บไว้นาน 15 วัน (รูปที่ 8)

4.3 ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ของสารสกัดเลคติน

สารสกัดเลคติน (PE 60) ซึ่งสกัดจากเมล็ดเหรียง ผ่านขั้นตอนการสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % จะทำให้เม็ดเลือดกระต่ายจับกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เม็ดเลือดแดงของหนู สำหรับเม็ดเลือดแดงของคน หมู่ O,A,B และ AB รวมทั้งของแกะและของห่านจะไม่จับกลุ่ม สำหรับตัวอสุจิของหนูขาวพบว่าสารสกัดเลคตินจับกลุ่ม ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญตัวได้ดีกว่าตัวอสุจิที่เจริญตัวแล้ว เช่นเดียวกับเลคตินจากเมล็ดสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992) และเลคตินจาก เมล็ดขนุน (jack fruit) (Namjuntra, *et al.*, 1985) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเลคตินทำปฏิกิริยากับผิวของเซลล์ต่างชนิดได้ดีต่างกัน ขึ้นกับว่าส่วนผิวของเซลล์ หรือแหล่งจับ (binding site) บนผิวเซลล์นั้นประกอบด้วยน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินชนิดนั้นมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังขึ้นกับว่าส่วนของแหล่งจับนั้น จะอยู่ลึกเข้าไปในผิวเซลล์มากน้อยเพียงใด และขึ้นกับตำแหน่งของแหล่งจับที่ผิวเซลล์ว่าเลคตินจะเข้าไปจับได้ยากง่ายเพียงใด เซลล์หนึ่ง ๆ อาจมีแหล่งจับได้หลายหลายตำแหน่ง เป็นผลทำให้เกิดการจับเชื่อมกันระหว่างเซลล์หลาย ๆ เซลล์ได้ดีมากน้อยต่างกันไป (Lis and Sharon, 1986b ; Sharon, 1977) นอกจากนี้ปัจจุบัน พบว่าการจับของเลคตินแต่ละชนิดกับน้ำตาลของสารประกอบไกลโคโปรตีนที่ผิวเซลล์ยังขึ้นกับโครงสร้างของสายโซ่น้ำตาลของสารประกอบไกลโคโปรตีนที่ผิวเซลล์ ซึ่งจับกับกรดอะมิโนชนิด เซอรีน หรือ ธรีโอนีน และแอสปาราจีน (Osawa, 1989)

4.4 ความจำเพาะต่อน้ำตาลของสารสกัดเลคตินและเลคตินบริสุทธิ์

ศึกษาความจำเพาะต่อน้ำตาลของสารสกัดเลคติน และเลคตินบริสุทธิ์ โดยดูผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 100% โดยสารสกัดเลคตินและเลคตินบริสุทธิ์ พบว่า ทั้งสารสกัดเลคตินและเลคติน

บริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อน้ำตาล เมธิล-แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน และ แมนโนส เหมือน ๆ กัน นั่นคือน้ำตาลทั้งสองยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 100 % ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นต่ำสุด เท่ากัน คือ 3 mM สำหรับสารสกัดเลคตินและ 5 mM สำหรับเลคตินบริสุทธิ์ แต่น้ำตาล เมธิล-แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน จะยับยั้งการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าเล็กน้อย เมื่อพิจารณาคะแนนการจับกลุ่มซึ่งมีค่าต่ำกว่าของน้ำตาลแมนโนสเล็กน้อย น้ำตาลที่ยับยั้งได้ดีรองลงมาคือ มอลโตส กลูโคส เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ฟรุคโตส เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส และแซคคาโรส มีผลยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM ได้ไม่ถึง 100 % โดยน้ำตาล แซคคาโรส จะให้ผลยับยั้งดีกว่า คือ มีคะแนนการจับกลุ่มต่ำกว่า ส่วนน้ำตาล เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่มีผลยับยั้งการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM

4.5 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์

เลคตินหลายชนิดเช่น เลคตินจากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992), คอนคานาวาลิน เอ (Lis and Sharon, 1973) และเลคตินจากเมล็ด *Lens culinaris* (Toyoshima, *et al.*, 1970) เป็นต้น สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) เพียงอย่างเดียวได้ ทั้งนี้เพราะเลคตินเหล่านี้จับกับ Sephadex gel ได้เป็นอย่างดี และถูกชะออกได้โดยน้ำตาลที่จำเพาะต่อเลคตินนั้น แต่การใช้คอลัมน์ Sephadex อย่างเดียวไม่สามารถทำให้เลคตินจากเมล็ดเหรียงบริสุทธิ์ได้

ทำให้เลคตินจากเหรียงบริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนการสกัดเป็นสารสกัด PE 60 แล้วใช้คอลัมน์ 3 แบบ แยกตามลำดับ ได้แก่ Sephadex G 100, Sephadex G 200 และ DEAE-cellulose พบว่า เลคตินจับได้ดีกับ Sephadex ทั้งแบบ G 100 และ G 200 และถูกชะออกมาได้ด้วยน้ำตาลมอลโตสในขณะที่โปรตีนอื่นส่วนใหญ่ไม่จับกับคอลัมน์ การแยกเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex G 100 แม้จะมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง

เพิ่มขึ้น แต่ก็พบว่าเลคตินที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ ทั้งนี้เพราะยังมีแถบโปรตีนอื่นๆ อยู่หลายแถบเมื่อนำไปทำอิเล็กโตรฟอรีซีส แต่แถบโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนนี้น้อยกว่าของสารสกัดเลคติน PE 60 แสดงว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยมีความบริสุทธิ์สูงกว่าสารสกัดเริ่มต้น (CE) 21.96 เท่า แม้เลคตินที่ได้เหลือเพียง 5.39 % เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนของสารสกัด CE และเมื่อแยกสารสกัดเลคตินจากคอลัมน์ Sephadex G 100 ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G 200 พบว่า เลคตินที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์เช่นกัน เพราะมีแถบโปรตีนอื่นอยู่หลายแถบ แต่แถบโปรตีนที่เห็นจะน้อยกว่าแถบโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G 100 แสดงว่าเลคตินที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยจะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าเลคตินที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G 100 1.73 เท่า และสูงกว่าสารสกัด CE 37.94 เท่า แต่เลคตินที่ได้จะเหลือเพียง 2.85 % ในขั้นตอนนี้ เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารสกัด CE การแยกเลคตินที่ได้นี้ต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose แล้วชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะได้เลคตินที่มีแถบโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส ทั้งชนิดที่มี และไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล และในอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ หรือไม่มีทั้งเอสดีเอสและเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอลจะเห็นโปรตีนของเลคตินสองแถบเช่นเดียวกัน ความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ได้สูงกว่าสารสกัด CE 45.99เท่า แต่ความว่องไวของการจับกลุ่มเซลล์ทั้งหมดของเลคตินเหลือเพียง 1.69 % เมื่อเทียบกับความว่องไวทั้งหมดของสารสกัด CE และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 13,120.00 หน่วย/มก. โปรตีน ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากคอลัมน์ 2.81 มก. คิดเป็น 0.031 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารสกัด CE (ตารางที่ 15)

ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose คอลัมน์ Sephadex G 100 และคอลัมน์ D-Mannose agarose ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกเลคตินได้บริสุทธิ์เช่นกัน เลคตินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ยังมีโปรตีนอื่นปะปนอยู่มาก เห็นได้จากจำนวนแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส ซึ่งมีหลายแถบ แต่ยังน้อยกว่าที่ได้จากสารสกัด PE 60 โดยมีความบริสุทธิ์สูงกว่าสารสกัด PE 60 4.82 เท่า

และสูงกว่าสารสกัด CE 9.68 เท่า ปริมาณเลคตินที่ได้เหลือเพียง 2.89 % เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารสกัด CE เมื่อแยกเลคตินที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100 เลคตินที่จับกับเจลคิดเป็น 1.68 % ของโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ทั้งหมด และเมื่อชะด้วยน้ำตาลมอลโตส เลคตินที่ได้ในขั้นตอนนี้ยังพบแถบโปรตีนอื่นปนอยู่ แต่ก็มีจำนวนน้อยกว่าของเลคตินที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose รวมทั้งมีความบริสุทธิ์สูงกว่าเลคตินที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose 4 เท่า และสูงกว่าสารสกัด CE 38.65 เท่า ปริมาณเลคตินที่ได้เหลือเพียง 0.048 % เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารสกัด CE การใช้คอลัมน์ D-Mannose agarose เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเมื่อชะโปรตีนซึ่งจับกับคอลัมน์ออกด้วยน้ำตาลแมนโนส จะได้เลคตินที่บริสุทธิ์ โดยมีโปรตีนสองแถบ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมี เอสดีเอส ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล และรวมทั้งใน โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งไม่มีทั้งเอสดีเอส และเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล จะปรากฏโปรตีน 2 แถบเช่นกัน ความบริสุทธิ์ของเลคตินที่ได้สูงกว่าสารสกัด CE 78.32 เท่า ปริมาณโปรตีนเลคตินที่ได้ทั้งหมด 1.13 มก. คิดเป็น 0.018 % เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนสารสกัด CE ทั้งหมด และมีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เป็น 21,238.94 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 16)

การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงโดย 2 วิธีการที่กล่าวมาจะได้เลคตินบริสุทธิ์ ทั้ง 2 วิธีการ แต่มีข้อดี -ข้อเสีย ต่างกันคือวิธีการแรกจะได้เลคตินปริมาณมากกว่า แต่มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายต่ำกว่า ในขณะที่วิธีการหลังได้เลคตินปริมาณน้อยกว่าแต่มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงสูงกว่า

4.6 แบบแผนของโปรตีนในขั้นตอนการทำให้เลคตินบริสุทธิ์

แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสของสารสกัดเลคติน แบบมีเอสดีเอส และ เบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล ก่อนการทำให้

บริสุทธิ์คือสารสกัดเริ่มต้น (CE) สารที่สกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ (PE) และผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% (PE 60) มีแถบโปรตีนจำนวนไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 15 และ 16) แต่ในส่วนของ PE 60 จะเห็นแถบโปรตีนชัดเจนขึ้น แม้ว่าจะใช้โปรตีนจำนวนน้อยกว่า เนื่องจากโปรตีนถูกตกตะกอนมากขึ้น ในการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G 100, Sephadex G 200 และ DEAE-cellulose ตามลำดับ แต่ละขั้นตอนสามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกได้ และได้เลคตินบริสุทธิ์เมื่อผ่าน DEAE-cellulose ขั้นสุดท้ายซึ่งจะปรากฏเพียงโปรตีนสองแถบ (รูปที่ 15) เช่นเดียวกับการใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G 100 และ D-Mannose agarose ตามลำดับ ซึ่งสุดท้ายหลังจากผ่านคอลัมน์ D-Mannose agarose จะได้เลคตินบริสุทธิ์มีโปรตีน 2 แถบ (รูปที่ 16) เช่นกัน โปรตีนทั้ง 2 แถบที่ปรากฏในรูปที่ 15 และ 16 นี้ ย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน โดยแถบหนึ่งหนาและเข้มกว่าอีกแถบ แสดงว่าแม้ขั้นตอนการทำให้เลคตินบริสุทธิ์นี้ทำให้เลคตินมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นมาก แต่ก็ไม่สามารถแยกเลคตินออกจากโปรตีนแถบบางที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยได้ โปรตีนแถบบางที่ปรากฏนี้ อาจเป็นเลคตินอีกชนิดหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเลคตินส่วนใหญ่หรือไม่ก็ได้ แต่จากการพิจารณาแบบแผนโปรตีนของแถบโปรตีนแถบบางนี้ พบว่าจะมีความเข้มหรือมีปริมาณสูงในขั้นตอนการสกัดขั้นต้น ๆ แถบนี้จะเล็กหรือจางลงเรื่อย ๆ หลังจากผ่านคอลัมน์ต่าง ๆ (รูปที่ 15 และ 16)

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์ จากทั้ง 2 วิธี ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ พบว่ามีแถบโปรตีน 2 แถบ อยู่ใกล้กัน แต่ย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน เนื่องจากแบบแผนโปรตีนในแผ่นเจลที่ทำได้ไม่ค่อยชัดเจน จึงเห็นโปรตีนแถบจางค่อนข้างยาก แบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์จากเหรียงคล้ายกับเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากสะตอ ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับเมล็ดเหรียง ที่ประกอบด้วยแถบโปรตีน 2 แถบ เช่นกัน (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992)

4.7 น้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเลคตินบริสุทธิ์

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียง โดยวิธีในข้อ 2.10 และ 2.11ในอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ซึ่งย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน แสดงถึงปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน โปรตีนแถบเข้มมีน้ำหนักโมเลกุล 42,500 ดัลตัน ในขณะที่โปรตีนแถบจางมีน้ำหนักโมเลกุล 38,500 ดัลตัน เมื่อนำเลคตินบริสุทธิ์นี้ไปศึกษาแบบแผนโปรตีนในอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส ทั้งที่มีและไม่มีเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล ให้ผลเช่นเดียวกันคือปรากฏโปรตีน 2 แถบ ซึ่งย้อมติดสีคูมาซี บลู เข้มไม่เท่ากัน โปรตีนแถบเข้มมีน้ำหนักโมเลกุล 47,870 ดัลตัน ในขณะที่โปรตีนแถบจางมีน้ำหนักโมเลกุล 45,700 ดัลตัน เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนและน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนเหล่านี้ จากผลการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสทั้งสองวิธีนี้ อาจพอสรุปได้ว่าในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงจะได้โปรตีนสองชนิดที่มีปริมาณไม่เท่ากัน แต่ละชนิดประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หรือหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียว โปรตีนชนิดที่มีมากมีน้ำหนักโมเลกุล 47,870 ดัลตัน โปรตีนชนิดที่มีน้อยมีน้ำหนักโมเลกุล 45,700 ดัลตัน โปรตีนทั้งสองชนิดนี้อาจเป็นเลคตินทั้งสองชนิด ซึ่งคล้ายกับเลคตินบริสุทธิ์จากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532) หรืออาจเป็นเลคตินและโปรตีนชนิดอื่นที่ติดมากับขบวนการทำให้บริสุทธิ์ การที่น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนทั้งสองแถบซึ่งคำนวณได้จากการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสทั้งสองวิธีดังกล่าว (แถบเข้ม 47,870 และ 42,500 ดัลตัน; แถบจาง 45,700 และ 38,500 ดัลตัน) มีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นเพราะการแยกของโปรตีนในอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ ขึ้นกับความแตกต่างของประจุ รูปร่างและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ในขณะที่การแยกของโปรตีน ในอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสและเบต้า-เมอร์แคปโตเอธานอล ขึ้นกับความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเพียงอย่างเดียว ถ้าโปรตีนทั้งสองชนิดที่แยกได้จากเมล็ดเหรียงเป็นเลคตินทั้งสองชนิด การอยู่รวมเป็นกลุ่มของเลคตินมากกว่าหนึ่งชนิดเช่นนี้ พบได้ในเลคตินจากพืชอีกหลายชนิดเช่นเลคตินจากเผือก (Promplook, 1985) เลคตินจากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532) และเลคตินจากถั่วลันเตา (Entlicher, *et al.*, 1970) เป็นต้น

4.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์

ปัจจัยหลายอย่างมีผลต่อเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่ม เช่น ความเสถียรต่ออุณหภูมิ, ความเสถียรต่อ pH,ผลของ pH, ผลของไดวาเลนท์แคทไอออนต่าง ๆ และสารที่จับกับไดวาเลนท์แคทไอออนได้, ชนิดของเม็ดเลือดแดง, การย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น

เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงมีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60° ซ ที่อุณหภูมิ 60° ซ ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มลดลง 78.5 % และที่อุณหภูมิ 70° ซ เลคตินจะสูญเสียความสามารถโดยสิ้นเชิง แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินต้องการส่วนโปรตีนในโมเลกุลช่วยในการทำงาน เพราะเมื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติโดยอุณหภูมิสูง ความสามารถในการจับกลุ่มเซลล์ของเลคตินก็ลดลงหรือหมดไปด้วย ดังนั้นการนำเลคตินมาใช้ศึกษาทางชีวภาพ สามารถกระทำได้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เสียสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับ เลคตินที่ได้จากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532) แต่ต่างกับเลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากสะตอโดย Yadav and Ganasawaran (1976) ซึ่งกล่าวว่าปฏิกิริยาการจับกลุ่มโดยเลคตินจะเกิดดีที่สุดที่อุณหภูมิ 4° ซ

เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงมีความเสถียรดีที่สุดในช่วง pH 7-10 ที่ pH สูงกว่า 10 ความเสถียรจะลดลงไปเหลือ 50 % ในทำนองเดียวกันที่ pH ต่ำกว่า 7 ความเสถียรจะลดลงจนเหลือ 50 % ที่ pH 5 และที่ pH 3 ความเสถียรจะหมดไป กล่าวคือเลคตินจะเสียสภาพธรรมชาติโดยสิ้นเชิง (รูปที่ 20) pH ยังมีผลต่อการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เลคตินจะจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงดีที่สุดที่ pH 7 การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ที่ pH น้อยกว่า 7 จะต่ำลงอย่างรวดเร็วกว่าที่ pH สูงกว่า 7 ที่ pH 5 และ pH 12 การจับกลุ่มจะเป็นศูนย์และเม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} ความเข้มข้น 5-40 mM จะมีผลส่งเสริมความสามารถของเลคตินในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย Ca^{2+} มีผลส่งเสริมการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงดีกว่า Mn^{2+} และ Mg^{2+} ตามลำดับ ซึ่ง

สอดคล้องกับ Sharon and Lis (1990) ที่กล่าวว่า Mn^{2+} และ Ca^{2+} เป็นไดวาเลนท์แคทไอออนที่สำคัญ ในการส่งเสริมปฏิกิริยา ของเลคตินในพืชตระกูลถั่ว นอกจากเลคตินจากเหรียงแล้วยังมีเลคตินจากพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ ที่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนในการช่วยให้การจับกลุ่มเซลล์ดีขึ้น เช่น คอนคานาวาลิน เอ (Kalb and Levitzki, 1968) เลคตินจากถั่วลันเตา (garden pea, *Pisum satirum*) (Kocourek, *et al.*, 1970) เลคตินจาก Lima bean *(Phasedlus lunatus)* (Roberts and Goldstein, 1984) เป็นต้น แต่ต่างจากเลคตินจากสะตอเพราะ Ca^{2+} และ Mn^{2+} ไม่มีผลส่งเสริมความสามารถของเลคตินจากสะตอ ในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992) สำหรับสารที่จับกับไดวาเลนท์แคทไอออนได้ เช่น อีจีทีเอ ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0-40 mM ไม่มีผลเพิ่ม หรือ ยับยั้งความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกับเลคตินจากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992) ทั้งนี้อาจเนื่องจากไดวาเลนท์แคทไอออน อาจจะจับฝังแน่นกับเลคติน จนสารที่จับกับไดวาเลนท์แคทไอออนไม่สามารถดึงออกได้ จึงทำให้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการจับกลุ่มเซลล์ของเลคติน (Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992)

จากการทดสอบการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ ของเลคตินบริสุทธิ์จากเหรียง พบว่าเลคตินจากเหรียงไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ (A,B,O และ AB) จับกลุ่มไม่ว่าก่อนย่อยหรือหลังการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซิน เช่นเดียวกับเลคตินจากสะตอ (อารีรักษ์ พืชไพบูลย์, 2532; Suvachittanont and Peutpaiboon, 1992; Yadav and Ganasawaran, 1976) หรือเลคตินจาก สาเก และเผือก (Promplook, 1985) ในขณะที่ คอนคานาวาริน เอ ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนจับกลุ่มได้ดี และจับกลุ่มได้ดียิ่งขึ้นหลังจากย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promplook, 1985) นอกจากนี้เลคตินบางชนิด เช่น เลคตินของถั่วลิสง *(Arachis*

hypogaea) (Lis and Sharon, 1977) และ เลคตินจาก *Cicer arietium* (Kolberg, *et al.*, 1983) ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนจับกลุ่ม แต่ถ้าย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซินจะทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่ม ทั้งนี้เพราะเอนไซม์จะไปช่วยขจัดโปรตีน หรือไกลโคโปรตีนจากผิวของเซลล์ ซึ่งอาจไปปิดซ่อนส่วนของน้ำตาลที่จับเจาะจงกับเลคติน ทำให้ปฏิกิริยาการจับกลุ่มเกิดไม่ได้ นอกจากนี้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของแกะ หรือ ห่านจับกลุ่ม ไม่ว่าก่อนย่อย หรือหลังย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน สำหรับเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและหนู จะมีการจับกลุ่มเมื่อทำปฏิกิริยากับเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียง โดยเม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มดีที่สุด มีค่าความว่องไวจำเพาะ 68,266 หน่วย/มก.โปรตีน และจากการย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซินทำให้ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มโดยเลคตินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 64 เท่า (ตารางที่ 17 และ 18)

บทสรุป

จากการศึกษาวิธีการทำให้เลคตินจากเมล็ดเหรียงบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ สามารถสรุปเป็นสาระสำคัญดังนี้

1. เมล็ดเหรียงที่เหมาะสมที่สุด ที่นำมาสกัดเลคตินควรเป็นเมล็ดเหรียงที่เพาะไว้เป็นเวลา 7 วัน ใช้เวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ แล้วนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % นาน 6 ชั่วโมง จะได้สารสกัดเลคติน (PE 60) ที่มีความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเซลล์ได้ดีที่สุด เพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. สารสกัดเลคติน ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของหนูขาว สำหรับเม็ดเลือดแดงของคน, แกะและห่าน จะไม่จับกลุ่ม สารสกัดเลคตินยังทำให้ตัวอสุจิหนูขาวจับกลุ่มเช่นกัน โดยตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญตัวจับกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิที่เจริญตัวแล้ว

3. เซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเลคตินโดยมี 1 mM EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ควรใช้เม็ดเลือดแดงสดหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ ได้ไม่เกิน 3 วัน ถ้านานกว่านี้มีผลทำให้การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงลดลง

4. น้ำตาลที่มีผลยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดเลคตินได้ 100 % เรียงตามลำดับความเข้มข้นน้อยสุดดังนี้คือ เมธิล-แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน ซึ่งมีผลเท่ากับ แมนโนส รองลงมาได้แก่ มอลโตส, กลูโคส, เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน ,ฟรุคโตส และ เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน ในขณะที่แซคคาโรส และกาแลคโตส มีผลยับยั้งได้น้อยกว่า 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM สำหรับเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่มีผลยับยั้งความสามารถของสารสกัดเลคตินในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM

5. สามารถทำให้เลคตินจากเมล็ดเหรียงบริสุทธิ์ ได้ 2 วิธีคือ

5.1 สารสกัดเลคติน (PE 60) ผ่านคอลัมน์ Sephadex G 100 ชะออกด้วย 0.1 M มอลโตส แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G 200 ชะด้วย 0.1 M มอลโตส เช่นกัน สุดท้ายนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-

cellulose แล้วชะอย่างต่อเนื่องด้วย 0-1 M NaCl เลคตินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ มากกว่าสารสกัดเริ่มต้น (CE) 55.0 เท่า และมีปริมาณโปรตีนเพียง 0.031 % ของโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด (CE)

5.2 สารสกัดเลคติน (PE 60) ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ชะอย่างต่อเนื่องด้วย 0-1 M NaCl แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G 100 ชะออกด้วย 0.1 M มอลโตส สุดท้ายนำมาผ่านคอลัมน์ D-Mannose agarose ชะออกด้วย 0.1 M แมนโนส เลคตินที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าสารสกัดเริ่มต้น (CE) 78.32 เท่า และมีปริมาณโปรตีนเหลือเพียง 0.018 % ของโปรตีนของสารสกัดทั้งหมด (CE)

6. การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงได้โปรตีนสองชนิดที่มีปริมาณไม่เท่ากัน โปรตีนแต่ละชนิดประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว โปรตีนชนิดที่มีมากมีน้ำหนักโมเลกุล 47,870 ดัลตัน โปรตีนชนิดที่มีน้อยมีน้ำหนักโมเลกุล 45,700 ดัลตัน

7. เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายจับกลุ่มได้ดีที่สุด การจับกลุ่มดียิ่งขึ้นหลังการย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซิน แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่และของห่านจับกลุ่มได้ถึงแม้จะย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซินก่อนก็ตาม

8. เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียง มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60° ซ ที่อุณหภูมิ 60° ซ ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มลดลง เลคตินจะสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยสิ้นเชิง ที่อุณหภูมิ 70° ซ เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรดีที่สุดในช่วง pH 7-10 ที่ pH สูงกว่า 10 และต่ำกว่า 7 ความเสถียรจะลดลง นอกจากนี้พบว่าที่ pH 7 เลคตินจะทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มดีที่สุด ที่ pH น้อยกว่าหรือมากกว่า 7 การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว

9. ไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลส่งเสริมความสามารถของเลคตินในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดย Ca^{2+} จะให้ผลดีกว่า Mn^{2+} และ Mg^{2+} ตามลำดับ ในขณะที่ อีจีทีเอไม่มีผลส่งเสริมหรือยับยั้งความสามารถของเลคตินในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง

10. ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ ในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มสามารถถูกยับยั้งได้ 100 % โดยน้ำตาลซึ่งเรียงลำดับความเข้มข้นน้อยที่สุดดังนี้ เมธิล-แอลฟา-ดี-แมนโนซามีน เท่ากับ แมนโนส, มอลโตส, กลูโคส และ เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน สำหรับ ฟรุคโตส และแซคคาโรส ยับยั้งการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ไม่ถึง 100 % ที่ความเข้มข้น 200 mM ในขณะที่ กาแลคโตส, เอ็น-อะซิติล-ดี-แมนโนซามีน และ เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่มีผลยับยั้งความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 200 mM

เอกสารอ้างอิง

กนกนาศ ชูปัญญา. 2520. คู่มือการตรวจทางห้องปฏิบัติการเล่ม 1. หน้า 81-87. กรุงเทพ : คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

กองบำรุง กรมป่าไม้. 2526. ไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ ตอนที่ 3 พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 166-168. กรุงเทพ : กรมป่าไม้.

อารีรักษ์ พืชไพบูลย์. 2532. "เลคตินจากเมล็ดสะตอ", วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Akkayanont, P. and Utarabhand, P. 1992. "Red Blood Cell-Agglutination of Lectin Extract from Riang Beans (*Parkia javanica*)", *Songkanakarin J. Sci. Technol.* 14(2), 141-147.

Ali, N. and Salahuddin, A. 1989. "Isolation and Characterization of Soluble Beta-Galactoside-Binding Lectin from Mammalian Liver", *Biochim. Biophys. Acta.* 992, 30-34.

Allen, A.K. 1979. "A Lectin from the Exudate of the Fruit of the Vegetable Marrow (*Cucurbita peppo*) that has a Specificity for -1,4-Linked N-Acetyl Glucosamine Oligosaccharides", *Biochem J.* 183, 133-137.

Allen, A.K., Desai, N.N. and Neuberger, A. 1978. "Properties of B Potato Lectin and the Nature of its Glycoprotien Lingkages", *Biochemistry* 171 , 665-674.

Anon. 1990. "Biosynthesis of Lectin in Developing Seed of Common Bean", *Food Chem.* 35, 237-242.

Atta, A.M., Menezes, E.P., Peixinho, S. and Sousa-Atta, M.B.L. 1990. "Isolation of a Lectin from the Marine Sponge *Desmapsama anchorata* by Affinity Chromatography on Raffinose-Sepharose 6B", *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 191-194.

Barbieri, L., Falasca, A., Franceschi, C., Licastro, F., Rossi, C.A. and Stripe, F. 1983. "Purification and Properties of Two Lectins from the Latex of Euphorbiaceous Plants *Hura repition* (Sand Box Tree) and *Euphorbia characias* (Mediterranean Spurge)", *Biochem. J.* 215, 433-439.

Barkai-Golan, R., Mirelman, D. and Sharon, N. 1978. "Studies on Growth Inhibition by Lectins of Penicillia and Aspergilli", *Arch. Microbiol.* 116, 119-124.

Barnum, S.R. and Brown, G.G. 1983. "Effect of Lectin and Sugars on Primary Sperm Attachment in Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*", *Dev. Biol.* 95, 352-359

Barondes, S.H. 1981. "Lecins : their Multiple Endo genous Cellular Functions", *Ann. Rev. Biochem.* 50, 207-231.

Barondes, S.H. 1984. "Soluble Lectins : A New Class of Extracellular Protiens", *Science* 223, 1259-1264.

Barondes, S.H. 1986. "Vertebrate Lectin : Properties and Functions In *The Lectins*, pp. 437-466. Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstien, I.J., eds. New York : Academic Press.

Bauer, W.D. 1981. "Injection of Legumes by Rhizobia", *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 407-449.

Bladier, D., Jubert, R., Avellana-Adalid, V., Kemeny, J. , Doinel, C., Amouroux, J. and Caron, M. 1989. "Purification and Characterization of a Galactoside-Binding Lectin from Human", *Brain* 269,433-439.

Bonavida, B. and Katz, J. 1985. "Studies on the Induction and Expression of T-Cell Mediated Immunity XV. Role of Non- MHC Papain-Sensitive Target Structures and Lyt-2 Antigens in Allogeneic and Xenogeneic Lectin-Dependent Cellular Cytotoxicity (LDCC)", *J. Immunol.* 135, 1616-1623.

Boyd, W.C. 1963. "The Lectins : their Present Status", *Vox Sang.* 8, 1-32.

Boyd, W.C. and Sharpleige, E. 1954. "Antigenic Relations of Blood Group Antigens as Suggested by Test with Lectins", *J. Immunol.* 73, 226-231.

Brill, W.J. 1980. "Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation", *Microbiol. Rev.* 44, 449-467.

Brown, J.C. and Hunt, R.C. 1978. "Lectin", *Int. Rev. Cytol.* 52, 277-349.

Caro, J.F. and Amatruda, J.M. 1980. "Insulin Recepters in Hepatocytes : Postrecepter Events Mediate Down Regulation", *Science* 210, 1029-1031.

Carpenter, B.G., Roger, D.J., Gibbs, R., Carabot, C.A., Andrade, E. and Mediana, G. 1990. "A Novel Lectin from the Green Alga *Halimeda opuntia*",

Phycol. J. 25, 85

Castro, V.M., Boman, H.G. and Hammarstroem, S. 1987. "Isolation and Characterization of a Group of Isolectins with Galactose/N-Acetylgalactosamine Specificity from Hemolymph of the Giant Silk Moth *Hyalophora cecropia*", *Insect Biochem.* 17, 513-523.

Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V. 1991. "Lectin, Lectin Genes, and their Role in Plant Defense", *Plant Cell* 3, 1-9.

Clarke, A.E., Knox, R.B. and Jermyn, M.A. 1975. "Localization of Lectins in Legume Cotyledons", *J. Cell Sci.* 19, 157-167.

Davis, B.J. 1964. "Disc electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Protein", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.

Diaz, C.L., Melchers, L.S. Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.I.J. and Kijne, J.W. 1989. "Root Lectin as a Determinant of Host-Plant Specific in the Rhizobium Legume Symbiosis", *Nature* 338, 579-581.

Entlicher, G., Kostir, J.V. and Kocourek, J. 1970. "Studies on Phytohemagglutinins III. Isolation and Characterization of Hemagglutinins from the Pea (*Pisum sativum*)", *Biochim. Biophys. Acta.* 221, 272-281.

Etzler, M.E. 1986. "Distribution and Function of Plant Lectin", In *The Lectins*, pp. 371-425. Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstien, I.J.,

eds. New York : Academic Press.

Etzler, M.E. 1985. "Plant Lectins : Molecular and Biological Aspect", *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 209-234.

Etzler, M.E., Tabot, C.F. and Ziaya, P.R. 1977. "NH_2-Terminal Sequences of the Subunits of *Dolichos biflorus* Lectin", *FEBS Lett.* 82, 39-41.

Fabregas, J., Munoz, A., Liova, J. and Carracedo, A. 1988. "Purification and Partial Characteriza -tion of Tomentine an N-Acetyl Glucosamine -Specific Lectin from the Green Alga *Codium tomentosum* (Huds.)", *J. Epx. Mar. Biol. Ecol.* 124, 21-30.

Falasca, A.I., Abbondanza, A., Barbieri, L., Bolognesi, A., Rossi, G.A. and Stripe, F. 1989. "Purifica -tion and Partial Characterization of a Lectin from the Seed of *Trichosanthes kirilowii*", *FEBS Lett.* 246, 159-162.

Gabius, H.J. 1988. "Mammalian Lectin : their Structure and their Glycobiological and Glycoclinical Roles", *Atlas Sci. Biochem.* 1, 210-214.

Gade, W., Jack, M.A., Dahl, J.B., Schmidt, E.L. and Wold , F. 1981. "The isolation and Characterization of a Root Lectin from Soybean (*Glycine max*)", *J. Biol. Chem.* 256, 12905-12910.

Gatehouse, J.A. and Boulter, D. 1980. "Isolation and Properties of a Lectin from The Root of *Pisum sativum* (Garden Pea)", *Physiol. Plant* 49, 437-442.

Gerundheit, N., Fink, D.L., Silverman, L.A. and Weintraub, B.D. 1987. "Effects of Thyrotropin Releasing Hormone on the Cabohydrate Structure of Secreted Mouse Thyrotropin : Analysis by Lectin Affinity Chromatography", *J. Biol. Chem.* 262, 5197-5203.

Ghanekar, A. and Perombelon, M.C.M. 1980. "Interactions Between Potato Lectin and Some Phytobacteria in Relation to Potato Tuber Decay Caused by *Erwinia carotovora*", *Phytopathol. Z.* 98, 137-149

Gietl, C., Kauss, H. and Ziegler, H. 1979. Affinity Chromatography of a Lectin from *Robinia pseudoacacia* and Demonstration of Lectin in Sieve Tube Sap from Other Tree Species", *Planta* 144, 367-371.

Goldstien, I.J. and Hayes, C.E. 1978. "The Lectins : Carbohydrate Binding Protien of Plants and Animals", *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127-340.

Goldstien, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. "What Should be Called a Lectin ?", *Nature* 285, 66.

Hamblin, J. and Kent, S.P. 1973. "Possible Role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris*", *Nature New Biol.* 245, 28-30.

Hankins, C.N. and Shannon, L.M. 1978. "The Physical and Enzymatic Properties of a Phytohemagglutinin from Mung Beans", *J. Biol. Chem.* 253, 7791-7797.

Hankins, C.N., Kindinger, J.I. and Shannon, L.M. 1979.

"Legume Lectins I. Immunological Cross Reactions Between the Enzymic Lectin from Mung Bean and other Well Characterized Legume Lectins", *Plant Physiol.* 64, 104-107.

Ho, S.C., Schindler, M. and Wang, J.L. 1990. "Carbohy drate Binding Activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II Isolation and Characterization of a Galactose Specific Lectin", *J. Cell Biol.* 111, 1639-1649.

Horisberger, M. and Vonlanthen, M. 1980. "Ultra structural Localization of Soybean Agglutinin on Thin Section of *Glycine max* (Soybean) by the Gold Method", *Histochem.* 65, 181-186.

Howard, I.K., Sage, H.J. and Horton, C.B. 1972. "Studies on the Appearance and Location of Hemagglutinins from a Common Lentil During the Life Cycle of the Plant", *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 323-326.

Ito, Y. 1985. "Interaction of Synthetic Glycoprotiens with Immobilized Lectins", *J. Chromatogr.* 330, 392-395.

Jankovic, M., Cuperlovic, M. and Hajdukovic, L. 1990. "Soluble Lectins of Corn Grain", *Plant physiol.* 93, 1659-1662.

Jin, Y.J. , Roberts, D.M. and Etzler, M.E. 1983. "Comparision of the Peptide Maps of Two Lectins from the *Dolichos biflorus*", *Plant. Fed. Proc.* 42, 2015.

Jones, D.A. 1964. "The Lectin in the Seeds of *Vicia cracca*.II a Population Study and a Possible Function for the Lectin", *Heredity* 19, 459-469.

Kahn, C.R., Baird, K.L. and Van Obberghen, E. 1981. "Role of Valence and Cytoskeleton in the Insulin Like Activity of Concanavalin A", *FEBS Lett.* 129, 131-134.

Kalb, A.J. and Levitzki, A. 1968. "Metal Binding Site of Concanavalin A and their Role in the Binding of α-Methyl-D-Glucopyranoside", *Biochem. J.* 109, 669-672.

Kamiya, H., Muramoto, K. and Goto, R. 1990. "Purification and Characterization of a Lectin from Marine Sponge *Halichondria panicea*", *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 56, 1159.

Keegstra, K., Taimadge, K.W., Bauer, W.D. and Albersheim , P. 1973. "The structure of Plant Cell Wall III. A Model of the Walls of Suspension Macromolecular Components", *Plant Physiol.* 51, 188-197.

Khang, N., Jean-luc, G. and John, H. 1990. "Blood Group A Specific Lectin from the Seeds *Crotaria striata*", *Biochem. Biophys. Acta.* 1033, 210-213.

Kilpatrick, D.C. 1980. "Purification and Some Properties of a Lectin from the Fruit Juice of the Tomato (*Lycopersicon esculentum*)", *Biochem. J.* 185, 269-272.

Kilpatrick, D.C. and Yeoman, M.M. 1978. "Purification of the Lectin from *Dutura stramonium*", *Biochem.*

J. 175, 1151-1153.

Kirchman, D. and Mitchell, R. 1982. "Possible Role of Lectins in the Settlement and Metamorphosis of Marine Invertibrate Larvae on Surfaces Coated with Bacteria", In *Proceedings of the International Symposium on Marine Bacteriology no.331, May 17-19,1982,* Marseille : CNRS.

Kitao, T. and Hattori, K. 1977. "Concanavalin A as a Carrier of Daunomycin", *Nature* 265, 81-82.

Kljajic, Z., Schroeder, H.C., Rottmann, M., Cuperlovic, Movsesian, M., Uhlenbruck, G., Gasic, M., Zahn, R.K. and Mueller, W.E.G. 1987. "A D-Mannose Specific Lectin from *Gerardia savaglia* that Inhibit Nucleocytoplasmic Transport of mRNA", *Eur. J. Biochem.* 169, 97-104.

Kocourek, J. 1986. "Historical Backgroud", In *The Lectin,* pp. 2-32 Liener, I.E., *et al.*, eds. New York : Academic Press.

Kocourek, J., Entlicher, G. and Kostir, J.V. 1970. Studies on Phytohemagglutinins, Isolation and Characterization of Hemagglutinins from the Pea (*Pisum sativum* L.)", *Biochem. Biophys. Acta.* 221, 272-281.

Kocourek, J. and Horejsi, V. 1981. "Defining a Lectin" , *Nature* 290, 118.

Koeppe, S.J. and Rupnow, J.H. 1988. "Purification and Characterization of a Lectin from the Seeds of Amarant (*Amaranthus cruentus*)", *J. Food Sci.* 53, 1412-1417.

Koettgen, E., Hell, B., Mueller, C. and Tauber, R. 1988. "Demonstration of Glycosylation Variants of Human Fibrinogen, Using the New Technique of Glycoprotien Lectin Immunosorbent Assay (GLIA)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 1157-1166.

Kolberg, J., Michaelsen, T.E. and Sletten, K. 1983. "Properties of a Lectin Purified from the Seeds of *Cicer arietinum*", *Z. Physiol. Chem.* 364 , 655-664.

Kunda, M., Basu, J. and Chakrabarti, P. 1989. "Purification and Characterization of an Extracellular Lectin from *Mycobacterium smegmatis*", *FEBS. Lett.* 256, 207-210.

Kunda, M., Basu, J., Ghosh, A., Ghakrabati, P. 1988. "Chemical Modification Studies on a Lectin from *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast)", *Biochem. J.* 244, 579-584.

Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of Structure Protein During Assembly of Head of Bacteriophage-T", *Nature* 227, 680-685.

Lamb, J.E., Shibata, S. and Goldstien, I.J. 1983. "Purification and Characterization of *Griffonia simplicifolia* Leaf Lectins", *Plant Physiol.* 71, 879-887.

Law, I.J. and Strijdom, B.W. 1984. "Properties of Lectins in the Root and Seed of *Lotononis bainesii*", *Plant Physiol.* 74, 773-778.

Liener, I.E. 1976. "Phytohemagglutinins (Phytolectins)" , *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 291-319.

Lin, J.Y., Li, J.S. and Tung, T. 1981. "Lectin Derivatives of Methotrexate and Chlorambucil as Chemotherapeutic Agents", *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 523-528.

Lis, H. and Sharon, N. 1973. "Biochemistry of Plants Lectins (Phytohemagglutinins)", *Ann. Rev. Biochem.* 42, 541-574

Lis, H. and Sharon, N. 1977. "Lectins : their Chemistry and Application to Immunology", In *The Antigens,* 4, 429-529. Sela, M.,ed. New York: Academic Press.

Lis, H. and Sharon, N. 1981. "Lectins in Higher Plants", In *The Biochemistry of Plant,* pp. 372-447. Marcus, A.,ed. New York : Academic Press.

Lis, H. and Sharon, N. 1986a. "Lectin as Molecules and as Tools", *Ann. Rev. Biochem.* 55, 35-67.

Lis, H. and Sharon, N. 1986b. " Application of Lectin", In *The Lectin*, pp. 294-357. Liener, I.E., Sharon , N. and Goldstien, I.J., eds. New York : Academic Press.

Lis, H. and Sharon, N. 1990. "Legume Lectins - a Large Family of Homologous Proteins", *FASEB J.* 4, 3198-3208.

Lomonte, B., Rojas, G., Gutierrez, I.M., Ramirez, G. 1990. "Isolation of a Galactose-Binding Lectin from the Venom of the Snake *Bothrops godmani* (Godmann's Pit Viper)", *Toxicon.* 28, 75-81.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall,

R.J. 1951. "Protien Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Manen, J.F. and Pusztai, A. 1982. "Immunocytochemical Localization of Lectins in Cells of *Phaseolus vulgalis* L. Seeds", *Planta* 155, 321-334.

Manihar, S.R. and Das, H.R. 1990. "Isolation and Characterization of a New Lectin from Plasma of Fish *Channa puntatus*", *Biochem. Biophys. Acta.* 1036, 162-165.

Mckenzie, H.A. 1969. "pH and Buffer" In *Data for Biochemical Research*, pp. 475-508. Dawson, R.M.C. *et al.*, eds. Ely House London : Oxford University Press.

Miller, R.C. and Bowles, D.J. 1982. "A Comparative Study of the Localization of Wheat Germ Agglutinin and its Potential Receptors in Wheat Grains", *Biochem.J.* 206, 571-576.

Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N., and Lotan, R. 1975. "Inhibition of Fungal Growth by Wheat Germ Agglutinin", *Nature* 256, 414-416.

Mishkind, M., Keegstra, K. and Palevitz, B.A. 1980. "Distribution of Wheat Germ Agglutinin in Young Wheat Plants", *Plant Physiol.* 66, 950-955.

Mishkind, M. , Palevitz, B.A. and Raikhel, N.V. 1983. "Localization of Wheat Germ Agglutinin-Like Lectins in Vareous Species of the Gramineae", *Science* 220, 1290-1292.

Mishkind, M., Raikhel, N.V. and Palevitz, B.A. 1980. "Immuno Cytochemical Location of Wheat Germ Agglutinin in Wheat", *J. Cell Biol.* 92, 753-64.

Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R. and Delmotte, F. 1980. "Sugar-Lectin Interactions : How Does Wheat Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates ?", *Eur. J. Biochem.* 104, 147-153.

Muramoto, K., Kado, R., Takei, Y. and Kamiya, H. 1991. "Seasonal Changs in the Multiple Lectin Compositions of the Acorn Banacle (*Megabalanus rosa*) as Related to Ovariant Development", *Comp. Biochem. Physiol.* 988, 603-607.

Nagata, Y., Fukumori, F., Sakai, H., Hagiwara, T., Hiratsuka,Y., Kochibe,N. and Kobata, A. 1991. "Crystallization and Characterization of a Lectin Obtained from a Mushroom *Alevria aurantia*", *Biochim. Biophys. Acta.* 1076, 187 -190.

Namjuntra, P. 1984. Lectins in Thai Plants : Purification and Characterization of a Lectin from Jack Fruit (*Artocarpus heterophyllus*). Master's Thesis in Biochemistry, Mahidol University.

Neel, D., Giner, M., Merlu, B., Turmel, P., Goussault, Y. and Charron, D.J. 1985. "Analysis of HLA-DR Antigen Glycosylation by Serial Lectin Affinity Chromatography", *Mol. Immunol.* 22, 1052-1059.

Nicoson, G.L. 1974. "The Interaction of Lectins With Animal Cell Surface", *Int. Rev. Cytol.* 39, 89-190.

Odo, S. and Miyachi, S. 1991. "Purification and Characterization of a Galactosyl-Binding Lectin from the Coelomic Fluid of Giant Clam *Tridacna derasa*", In *Program and Abstracts of Second International Marine Biotechnology Conference (IMBC'91)* p. 80. s.l. : s.n.

O'Hare, F.T. and Wisdom, G.B. 1990. "Glycoforms of Human Serum Protiens Identified by *Ricinus communis* Lectin", *Trans Biochem. Soc.* 18, 323.

Olsnes, S., Haylett, T. and Refsnes, K. 1978. "Purification and Characterization of the Highly Toxic Lectin Modeccin", *J. Biol. Chem.* 253, 5069-5073.

Olsnes, S. and Pihl, A. 1982. "Toxic lectins and related proteins.", In *Molecular Action of Toxins and Viruses,* 2, 51-105. Cohen, P. and Van Heyningen, S., eds. New York : Elsevier Press.

Ortega, M., Sanchez, C., Chacon, E., Rendon, J.L., Estrada, R., Masso, F., Montano, L.F. and Zenteno, E. 1990. "Purification and character -ization of a Lectin form *Erythrina americana* by Affinity Chromatography", *Plant Sci.* 72, 133-140.

Osawa, T. 1989. "Recent Progress in the Application of Plant Lectins Glycoprotein Chemistry", *Pure*

and Appl. Chem. 61, 1283-1292.

Ozeki, Y. Matsui, T., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y. and Titani, K. 1991a. "Purification and Characterization of Beta Galactoside Binding Lectin from Frog (*Rana catesbeiana*) Egg", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 407-413.

Ozeki, Y., Matsui, T., Suzuki, M. and Titani, K. 1991b. "Amino Acid Sequence and Molecular Characterization of a D-Galactoside Specific Lectin Eggs", *Biochemistry (WASH.)* 30, 2391-2394.

Parker, W.F. and Martz, E. 1980. "Lectin Induced Nonlethal Adhesions Between Cytolytic T - Lymphocytes and Antigenically Unrecognizable Tumors Cells and Nonspecific "Triggering" of Cytolysis", *J. Immunol.* 124, 25-35.

Partridge, J., Shannon, L. and Gumpl, D. 1976. "A Bar -ley Lectin that Binds Free Amino Sugars. I. Purification and Characterization", *Biochem. Biophys. Acta.* 451, 470-483.

Patchett, R.A., Kelly, A.F. and Kroll, R.G. 1991. "The Adsorption of Bacteria to Immobilized Lectins", *J. Appl. Bacteriol.* 71, 277-284.

Peumans, W.J., Stinissen, H.M. and Carlier, A.R. 1982a. "Isolation and Partial Characterization of WGA-like Lectins from Rye (*Secale cereale*) and Barley (*Hordeum vulgare*) Embryos", *Biochem. J.* 203, 239-243.

Peumans, W.J., Stinissen, H.M. and Carlier, A.R. 1982b. "Lectin Synthesis in Developing and Germinating Wheat and Rye Embryos", *Planta* 156, 41-44.

Peumans, W.J., Stinissen, H.M. and Carlier, A.R. 1983. "Specculations About a Physiological Role of Some Plant Lectins", In *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 3, 583-592. Bog-Hansen, T.C. and Spengler,G.A., eds. Berlin/ New York : DeGruyter.

Promplook, P. 1985. Lectin in Thai Plants : Taro (*Colocasia esculenta*) and Bread Fruit (*Artocarpus altilis*). Master's Thesis in Biochemistry, Mahidol Universiy.

Pueppke, S.G. 1979. "Distribution of Lectins in the Jumbo Virginia and Spanish Varieties of the Peanut, *Arachis hypogaea*", *Plant Phisiol.* 64, 575-580.

Pueppke, S.G., Bauer, W.D., Keegstra, K. and Ferguson, A.L. 1987. "Role of Lectins in Plant Micro Organism Interactions II. Distribution of Soybean Lectin in Tissues of *Glycine max* Merr", *Plant physiol.* 61, 779-784.

Pusztai, A., Croy, R.R.D., Grant, G. and Stewart, J.C. 1983. "Seed Lectins : Distribution, Location and Biological Role", In *Seed Protien*, pp. 53-82. Doussant, J., *et al.*, eds. New York : Academic.

Qu, X.M., Zhang, C.F., Kamanano, H. and Natori, S. 1987. "Purification of a Lectin from the Hemolymph

of Chinese Oak Silk Moth (*Antheraea pernyi*) Pupae. *J. Biochem. Tokyo.* 101, 545-551.

Quinn, J.M. and Etzler, M.E. 1983. "A Carbohydrate Binding Protien from the Roots of *Dolichos biflorus* that Differs from the Seed Lectin", *Fed. Proc.* 42, 2015.

Raikhel, N.V., Mishkind, M.L. and Palevitz, B.A. 1984. "Characterization of a Wheat Germ Agglutinin Like Lectin from Adult Wheat Plant", *Planta* 162, 55-61.

Reisner, Y., Ravid, A. and Sharon, N. 1976 b. "Use of Soybean Agglutinin for the Separation of Mouse B and T Lymphocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1585-1591.

Rinderle, S.J., Goldstein, I.J., Matta, K.L. and Ratcliffe, R.M. 1989. "Isolation and Charac -terization of Amaranthin, a Lectin Present in the Seeds of *Amaranthus caudatus*, that Recognizes the T-(or Cryptic T) Antigen", *J. Biol. Chem.* 264, 16123-16131.

Roberts, D.D. and Goldstien, I.J. 1984. "Isolation from Lima Bean Lectin of a peptide Containing a Cystien Residue Essential for Carbohydrate Binding Activity", *J. Biol. Chem.* 259, 909-914.

Rudiger, H. 1984. "On the Physiological Role of Plant Lectins", *BioSci.* 34,95-99.

Sato, S., Animashaun, T. and Hughes, R.C. 1991. "Carbohydrate Binding Specificity of *Tetracarpidium conophorum* Lectin", *J. Biol.*

Chem. 266, 11485-11494.

Schmidt, E.L. and Bohlool, B.B. 1989. "The Role of Lectins in Symbiotic Microbe Interactions", *Encyclopedia of Plant Physiol.* New Series 13 B, 648-677.

Schluter, S.F. and Ey, P.L. 1989. "Purification of Three Lectins from the Ascidian *Botrylloides lechii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 938, 145-155.

Shannon, L.M. 1983. "Structural Properties of Legume Lectins", In *Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins*, pp. 47-61. Goldstien, I.J. and Etzler, M.E. eds. New York : Liss.

Sharon, N. 1977. "Lectins", *Scientific American* 236, 108-119.

Sharon, N. and Lis, H. 1972. "Lectins : Cell Agglutina -ting and Sugar Specific Protiens", *Science* 177, 949-959.

Sharon, N. and Lis, H. 1975. "Use of Lectins for the Study of Membranes", *Methods Memb. Biol.* 3, 147-200.

Sharon, N. and Lis, H. 1989. "Lectins as Cell Recognition Molecules", *Science* 246, 227-234.

Sharon, N. and Lis, H. 1990. "Legume Lectins-a Large Family of Homologous Protiens", *FASEB J.* 4, 3198 -3208.

Shet, M.S. and Madaiah, M. 1989. "Physico-chemical Properties of the Lectin from Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Tuber", *Int. J.*

Peptide Protein Res. 33, 360-367.

Shiomi, K., Uematsu,S., Yamanaka, H., and Kikuchi, T. 1989. "Purification and Characterization of a Galactose Binding Lectin from the Skin Mucus of the Conger Eel *Conger myriaster*", *Comp. Biochem. Physiol.* 928 B, 255-261.

Shinozuka, T., Takei, S., Yanagida, H. and Okuma, S. 1988. "Binding of Lectins to "Young" and "Old" Human Erythrocytes", *Blut.* 57, 117-123.

Snell, T.W. and Nacionales, M.A. 1990. "Sex Pheromone Communication in *Brachionus plicatilis* (rotifer). *Comp. Biochem. Physiol.* 97 A, 211-216.

Soederhaell, I., Ergenstraehle, A. and Soederhaell, K. 1980. "Purification and Some Properties of a *Daucus carota* Lectin Which Enhaunces the Activation of Prophenoloxidase by $CaCl_2$", *Plant Physiol.* 93, 657-661.

Stripe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni , E, Montanaro, L., Sperti, S. and Bonetti, E. 1978. "Inhibition of Protein Synthesis by Modeccin, the Toxin of *Modecca digitata*", *FEBS Lett.* 85, 65-67.

Sueyoshi, S. ; Yamamoto, K. and Osawa, T. 1988. "Carbo -hydrate Binding Specificity of a Beetle (*Allomyrina dichotoma*) Lectin", *J. Biochem. Tokyo.* 103, 894-899.

Suvachittanont, W. and Peutpaiboon, A. 1992. "Lectin from *Parkia Speciosa* Seeds", *Phytochemistry* 31, 4065-4070.

Suzuki, T. and Mori, K. 1989. "A Galactose Specific Lectin from the Hemolymph of the Pearl Oyster, *Pintada fucata*", *Comp. Biochem. Physiol.* 92, 455-462.

Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K. and Nakauchi, M. 1990. "A Calcium Dependent Galactose Binding Lectin from the Tunicate (*Polyyandrocapa misakiensis*) Isolation, Charac -terization, and Amino Acid Sequence. *J. Biol. Chem.* 256, 1274-1281.

Talbot, C.F. and Etzler, M.E. 1978a. "Development and Distribution of *Dolichos biflorus* Lectin as Measured by Radioimmunoassay", *Plant Physiol.* 61 , 847-850.

Talbot, C.F. and Etzler, M.E. "1978b. "Isolation and Characterization of a Protein from Leaves and Stems of *Dolichos biflorus* that Cross Reacts With Antibodies to the Seed Lectin. *Biochemistry* 17, 1474-1479.

Taylor, M.E. and Summerfield, J.A. 1987. "Carbohydrate Binding Proteins of Human Serum: Isolation of Two Mannose/Fructose Specific Lectins", *Biochem. Biophys. Acta.* 915, 60-67.

Tazaki, K. and Shibuya, N. 1989. "Purification and Partial Characterization of a Lectin from the Bark of Japanese Elderberry (*Sambucus sieboldiana*)", *Plant cell Physiol.* 30, 899-903.

Toyoshima, S. ; Osawa, T. and Tonomura, A. 1970. "Some Properties of Purified Phytohemagglutinin from

Lens culinaris Seeds", *Biochim. Biophys. Acta.* 221, 514-512.

Ueno, M., Ogawa, H., Matsumoto, I. and Seno, N. 1991. "A Novel Mannose Specific and Sugar Spec -ifically Aggregatable Lectin from the Bark of Japanese Pagoda Tree (*Sophora japonica*)", *J. Biol. Chem.* 266, 3146-3153.

Umetsu, K. ; Yamashita, K. and Suzuki, T. 1991. "Purification and Carbohydrate Binding Specificities of a Blood Type B Binding Lectin from Hemolymph of a Crab (*Charybdis japonica*)", *J. Biochem. Tokyo* 109, 718-721.

Utarabhand, P. 1990. "Sperm-Agglutinating Lectin from Champada Seeds", *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 12(1), 35-42.

Vella, F.A. 1987. "Isolation and Characterization of a Hemagglutinin from the Hemolymph of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*", *Diss. Abst. Int.* 47, 137.

Weber, E. and Neumann, D. 1980. "Protein Bodies, Storage Organelles in Plant Seeds", *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 175, 279-306.

Weber, K. and Osborn, M. 1969. "The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl -Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis", *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.

Yadav, M. and Ganasawaran, V.K.C. 1976. "Phytomitogen of Tropical Legumes I. Isolation from *Parkia speciosa* and *Pitbecellobium jiringa*", *Malaysia*

J. Sci. 4A, 25-35.

Yamaguchi, T., Kato, R., Beppu, M., Terao, T., Inoue, Y. , Ikawa, Y. and Osawa,T. 1979. "Preparation of Concanavalin A-Ricin a Chain Conjugate and Its Biological Activity Against Various Culture Cells", *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 1387-1395.

Yanagi, K., Ohyama, K., Yamagawa, T., Hashimoto, K. and Ohkuma, S. 1990. "Purification and Character -ization of Anti-N Lectin from *Vicia unijuga* Leave", *Int. J. Biochem.* 22, 43-52.

Yeaton, RW. 1981. "Invertebeate Lectin: I. Occurrence." , *Dev. Comp. Immunol.* 5, 391-402.

Zhu, B.C.R. and Laine, R.A. 1989. "Purification of Acetyllactosamine Specific Tomato Lectin by Erythroglycan-Sepharose Affinity Chromatography" , *Prep. Biochem.* 19, 341-350.

Zipris, D., Gilboa-Garber, N. and Susswein, A.J. 1986. "Interaction of Lectins from Gonads and Haemolymph of the Sea Hare Aplysia with Bacteria", *Microbios.* 46, 193-198.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียงที่เพาะในช่วงเวลา 1-7วัน

วันที่ของการเพาะ	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	โปรตีน (มก./กรัมเหรียง)
1	473.80	19.02
2	488.78	18.43
3	431.25	15.40
4	309.83	14.54
5	338.70	9.98
6	431.16	5.22
7	552.92	4.07

ตารางผนวกที่ 2 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดเหรียง

เวลาของการสกัด (ชม.)	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	โปรตีน (มก./กรัมเหรียง)
0	360.06	3.50
3	447.55	3.22
6	615.98	3.13
9	914.52	3.20
12	1,127.13	2.97
15	767.39	2.52
18	692.83	2.22
24	501.47	1.41

ตารางผนวกที่ 3 ผลการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลดตินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60 % ในช่วงเวลาต่าง ๆ

เวลาของการตกตะกอน (ชม.)	โปรตีน (มก.)	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	โปรตีน (มก./กรัมเหรียง)
0	43.85	758.97	2.77
3	49.75	740.96	3.14
6	51.85	947.93	3.27
9	54.16	680.70	3.42
12	55.79	550.66	3.52
18	58.14	422.70	3.67
24	59.06	416.09	3.73
30	58.19	422.36	3.67
36	54.53	450.70	3.44
48	58.46	420.36	3.68

ตารางผนวกที่ 4 ผลการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเลคตินโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวเปอร์เซนต์ต่าง ๆ

แอมโมเนียมซัลเฟต (% ความอิ่มตัว)	โปรตีน (มก.)	ความว่องไวจำเพาะของการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (หน่วย/มก.โปรตีน)	โปรตีน (มก./กรัมเหรียง)
20	8.75	160.80	0.68
40	21.03	937.24	1.65
60	48.38	931.12	3.80
80	36.72	334.64	2.88

ตารางผนวกที่ 5 คะแนนการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 30-80° ซ

อุณหภูมิ	ไตเตอร์			
	1:16	1:32	1:64	1:128
-20° ซ	4 ± 0	2.5±0.7	1 ± 0	0
30° ซ 15 นาที	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	1 ± 0
40° ซ 15 นาที	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	1 ± 0
50° ซ 15 นาที	4 ± 0	4 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
60° ซ 15 นาที	0.5±0.7	0	0	0
70° ซ 15 นาที	0	0	0	0
80° ซ 15 นาที	0	0	0	0