



การประยุกต์ใช้เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ
Application of Lectin from Seeds of Champaada
(*Artocarpus integer* Merr.)

ปฐุม การัยภูมิ
Pathom Karaipoom

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biochemistry
Prince of Songkla University
2543

เลขหมู่	OK898.LA2 131 2543	น. 2
Order Key	28833	
Bib Key	177626	
	10 ก.ค. 2543	

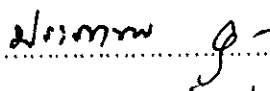
ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เเคคตินจากเมล็ดจำปาตะ

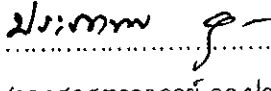
ผู้เขียน นายปฐม การัยภูมิ

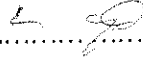
สาขาวิชา ชีวเคมี

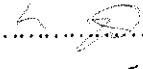
คณะกรรมการที่ปรึกษา

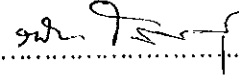
คณะกรรมการสอบ

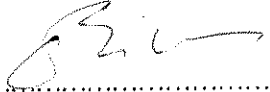
 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)


 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร ไตว์ฒนะ)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร ไตว์ฒนะ)

 กรรมการ
(ดร.รพีพร ไตว์ฒพันธุ์)

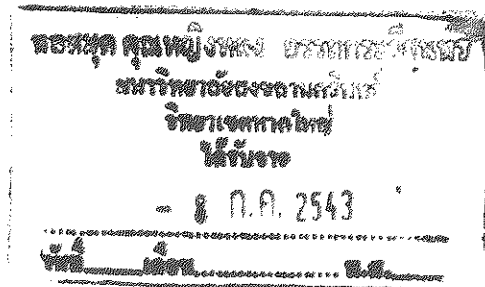
 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ นันทพงศ์กิตติกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ
ศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี


(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ
ผู้เขียน นายปฐม ภารักษ์ภูมิ
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2542



บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ ความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตเป็นการแสดงถึงคุณลักษณะของเลคติน เลคตินมีแหล่งจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตมากกว่า 1 ตำแหน่ง จึงสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม และ/หรือตกตะกอนสารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้ การจับของเลคตินกับน้ำตาลจะจับกันอย่างหลวมและแยกออกจากกันได้

ในการศึกษานี้ ได้สกัดเลคตินจากเมล็ดจำปาตะ (*Artocarpus integer* seeds) แล้วนำไปแยกสารสกัดเลคตินโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 ตามด้วยคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose เลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส โดยโปรตีนแถบเข้มมีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน และโปรตีนแถบที่จางกว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน เลคตินบริสุทธิ์มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูง และยังสามารถทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกิดการเกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์

การคอนจูเกตเลคตินบริสุทธิ์กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยการออกซิไดซ์ด้วย periodate แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่าเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุล 90,150 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน เม็ดเลือดแดงของคน ย่อมติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดส แต่เม็ดเลือดขาวของคนปกติและคนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวย่อมไม่ติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดส เมื่อนำเลคตินเปอร์ออกซิเดสย้อมตัวอสุจิของหนู พบว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ย่อมติดเฉพาะส่วนหัว ในขณะที่ตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ มีการย้อมติดสีหัวและหางเซลล์ทุกส่วน เมื่อนำสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ไปทำ

โพลีอะคริลาไมด์เจลอิลเล็กโทรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอสและ Western blot พบว่าสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบ (น้ำหนักโมเลกุล 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 และ 120,000 ดัลตัน) และสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบ (น้ำหนักโมเลกุล 32,000, 52,000, 85,000 และ 100,000 ดัลตัน) ที่ย้อมติดสีของเลคตินเปอโรออกซิเดส ในทำนองเดียวกัน จากการทำ Western blot พบเฉพาะอิมมูโนโกลบูลินชนิด A (IgA) ที่ย้อมติดสีของเลคตินเปอโรออกซิเดส แต่ IgG และ IgM ย้อมติดเฉพาะสีอะมิโดแบล็คบี

จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการจับระหว่างตัวอสุจิกับเลคตินเปอโรออกซิเดส พบว่าปริมาณการจับของเลคตินเปอโรออกซิเดสกับตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์เป็น 1.03×10^{-8} ไมโครกรัม/เซลล์ และกับตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์เป็น 0.58×10^{-8} ไมโครกรัม/เซลล์

ในการศึกษาความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินบริสุทธิ์ได้พัฒนาการทดสอบโดยวิธี Lectin Binding Assay (LBA) และวิธี Enzyme-Linked Lectin Binding Assay (ELLBA) เปรียบเทียบกัน วิธี LBA ใช้เลคตินบริสุทธิ์ที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตสเคลือบที่ผิวของไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ไบโอตินกาแลคโตส (ที่เตรียมได้จากการคอนจูเกตไบโอตินกับกาแลคโตส) จับกับเลคตินที่ถูกตรึงอยู่บนผิวของเพลท ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้ streptavidin-horseradish peroxidase วิธี ELLBA ใช้ streptavidin (SAV) เคลือบที่ผิวของไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ไบโอตินกาแลคโตสจับกับ SAV ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวของเพลท ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เลคตินเปอโรออกซิเดส จากการเปรียบเทียบค่าการยับยั้งสูงสุดและความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาสูงสุดได้ครึ่งหนึ่งของน้ำตาล 6 ชนิด พบว่า น้ำตาลที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้สูงสุดเรียงจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ methyl- α -D-galactoside, N-acetyl galactosamine, กาแลคโตส, N-acetyl glucosamine และ methyl- β -D-galactoside ส่วนน้ำตาลฟูโคสไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาและเลคตินจาก *Helix pomatia* สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ปานกลาง ขณะที่มิวซินและโบวินซีรัมอัลบูมินไม่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา ผลที่ได้จากการทดสอบทั้ง 2 วิธีนี้ มีค่าใกล้เคียงกันและมีความไวมากกว่าวิธีการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมาก

Thesis Title Application of Lectin from Seeds of Champaada
 (*Artocapus integer* Merr.)
Author Mr. Pathom Karaipoom
Major Program Biochemistry
Academic Year 1999

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins. They show specific binding to carbohydrates thus sugar specificity is basic characteristics of lectins. Lectins have more than one binding sites which allow them to agglutinate cells and/or precipitate glycoconjugates. The binding of lectins to carbohydrates is loose and reversible.

In this study, purification of lectin from the Champaada (*Artocapus integer*) seed extract was achieved by chromatography on Sephadex G-200 column followed by N-acetyl galactosamine-agarose column. The purified lectin was found to exist in 2 forms of proteins, one major and one minor bands with M_r of 14,000 and 16,800, respectively. It had a molecular weight of 46,000 Daltons, as determined by gel filtration. The purified lectin contained highly specific hemagglutinating activity for rabbit red blood cells. It also agglutinated rat immature sperm better than mature sperm.

Conjugation of the purified lectin to peroxidase was performed by periodate-oxidation and chromatography on Sephadex G-200 column. The lectin-peroxidase conjugate (LPC) had a molecular weight of 90,150 Daltons, as determined by gel filtration. It stained human red blood cells but neither white cells of normal nor leukemia blood. LPC could also stained rat epididymal sperm. It was found to distribute over the whole surface of the mature sperm whereas it was

localized mainly in the head region of the immature sperm. The membrane fractions were extracted from 2 types of the sperm and subsequently analyzed by SDS-PAGE following by Western blot. There are 5 protein bands (M_r 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 and 120,000) from the membrane fraction of the mature sperm and 4 protein bands (M_r 32,000, 52,000, 85,000 and 100,000) from the membrane fraction of the immature sperm which were stained by LPC. In addition, only immunoglobulin A (IgA) was stained by LPC while both IgG and IgA were stained by amido black B.

By using quantitatively binding analysis, the amount of LPC bound to rat sperm found to be 1.03×10^{-8} and 0.58×10^{-8} $\mu\text{g}/\text{cell}$ for the mature and the immature sperm, respectively.

To study carbohydrate specificity of lectin, lectin binding assay (LBA) and enzyme-linked lectin binding assay (ELLBA) were comparatively developed. LBA was employed by direct coating of microtiter plate with the purified galactose-binding lectins. Biotin-galactose conjugate (BG) was synthesized and used to bind to the immobilized lectins. The bound conjugate was then detected using streptavidin-horseradish peroxidase. ELLBA was performed by direct coating of microtiter plate with streptavidin (SAV). BG was used to bind to the immobilized SAV. The bound conjugate was then detected using LPC. The maximal inhibition and the concentration for half maximal inhibition values were compared among 6 sugars tested; 5 were inhibitory in the following decreasing order : methyl- α -D-galactoside, N-acetyl galactosamine, galactose, N-acetyl glucosamine and methyl- β -D-galactosamine. Fucose was non-inhibitory. The purified lectin and *Helix pomatia* agglutinin showed moderate inhibition whereas mucin and bovine serum albumin showed no inhibitory effect. The results obtained from these 2 binding assays are closely the same. Their sensitivity is almost equal and much higher than that of hemagglutination inhibition test.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยตลอดจนการเขียนและการพิมพ์วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นงพร ไตว์ธนะ และ ดร.รพีพร โสทธิพันธ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกุล กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลหาดใหญ่ที่เชื้อเพื่อตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการจัดหาและดูแลสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณคุณอุบล ตันสม ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อนๆ ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและการทำวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ วิทยานิพนธ์นี้ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

ปฐม การ์ยภูมิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(11)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการ	32
3. ผลการทดลอง	48
4. วิจารณ์	89
5. สรุป	103
เอกสารอ้างอิง	106
ภาคผนวก	120
ประวัติผู้เขียน	122

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	บทบาททางชีวภาพและน้ำตาลที่จำเพาะของเลคตินบางชนิด	7
2	สมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ของเลคตินบางชนิด	24
3	เลคตินบางชนิดที่มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงของคน	27
4	การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเมล็ดจำปาตะ	49
5	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ	76
6	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยโปรตีนและกาแลคโตส	76
7	ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ	87
8	ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ	87
9	เปรียบเทียบผลของการยับยั้งแอกทีวิตีของเลคตินด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ	100

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างและบทบาททางชีวภาพของคอลเลคติน(MBP และคอนกลูตินิน)	9
2	วิธีการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตของเลคตินโดยใช้ ไมโครไตเตอร์เพลท	15
3	การใช้เลคตินเป็นตัวนำยาเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย	28
4	การเตรียมไบโอตินกาแลคโตสคอนจูเกต	42
5	การทดสอบความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธี Lectin Binding Assay และวิธี Enzyme-Linked Lectin Binding Assay	44
6	การแยกเลคตินจากสารสกัดเมล็ดจำปาตะโดยคอลัมน์ Sephadex G-200	50
7	การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ N-Acetyl galactosamine-agarose	52
8	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส ของเลคตินบริสุทธิ์และกราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุล	53
9	การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และจากกราฟมาตรฐาน	54
10	การเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนูโดยเลคตินบริสุทธิ์	55
11	การแยกเลคตินเปอร้ออกซิเดสโดยคอลัมน์ Sephadex G-200	57
12	การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร้ออกซิเดสโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และจากกราฟมาตรฐาน	58
13	การย้อมตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์และยังไม่เจริญพันธุ์ของหนูด้วยเลคติน เปอร้ออกซิเดส	59

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	แบบแผนโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนตัวอสุจิหนูในโพลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส	61
15	การทำ Western blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี และย้อมด้วยเลคตินเปอร้ออกซิเดส	62
16	Scatchard plot ของการจับระหว่างเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับตัวอสุจิของหนู	63
17	การย้อมเซลล์เม็ดเลือดของคนด้วยสีไรท์และด้วยเลคตินเปอร้ออกซิเดส	65
18	การทำ Western blot ของอิมมูโนโกลบูลินเปรียบเทียบระหว่างการย้อม ด้วยสีอะมิโดแบล็คบีและย้อมด้วยเลคตินเปอร้ออกซิเดส	66
19	การหาน้ำหนักโมเลกุลของกาแลคโตสไปโอตินโดยคอลัมน์ Sephadex G-10 และจากกราฟมาตรฐาน	68
20	สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของ SAV-HRP ใน LBA	69
21	การจับของเลคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเพลท	71
22	การจับของไปโอตินกาแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเลคตินที่ ถูกตรึงในเพลท	72
23	ผลของการยับยั้ง SAV-HRP ในการจับกับเพลทด้วย 3% BSA และ 1% NFM	73
24	การจับของ SAV-HRP ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไปโอตินกาแลคโตส	74
25	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ	75
26	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยเลคติน, มิวซิน, HPA และ BSA	77
27	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยไปโอติน และกาแลคโตส	78
28	ผลของการยับยั้ง LBA ด้วย SAV และเปอร้ออกซิเดส	79
29	การจับของไปโอตินกาแลคโตสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ SAV ที่ถูกตรึงในเพลท	81

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
30	ผลของการยับยั้งเลคตินเปอร้ออกซิเดสในการจับกับเพปทด้วย 3% BSA และ 1% NFM	82
31	เวลาของการป่มเลคตินเปอร้ออกซิเดสในการจับกับไบโอดีนาแลคโตส	83
32	การจับของเลคตินเปอร้ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ ไบโอดีนาแลคโตส	84
33	ผลการยับยั้ง ELLBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ	86
34	ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยเลคติน, มิวซิน และ HPA	88

ตัวย่อและสัญลักษณ์

°ศ	= องศาเซลเซียส
มก.	= มิลลิกรัม
มล.	= มิลลิลิตร
A	= absorbance
BG	= biotinalactose conjugate
BSA	= bovine serum albumin
°C	= degree Celsius
CM-cellulose	= carboxymethyl-cellulose
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
ELLBA	= enzyme-linked lectin binding assay
g	= acceleration (cm/sec ²)
Gal	= galactose
GalNAc	= N-acetyl galactosamine
Glc	= glucose
GlcNAc	= N-acetyl glucosamine
HAI	= hemagglutination inhibition test
Ig	= immunoglobulin
K _{av}	= distribution coefficient
LBA	= lectin binding assay
LPC	= lectinperoxidase conjugate
M	= molar
mA	= milliampere
Met- α -Gal	= methyl- α -D-galactoside
Met- β -Gal	= methyl- β -D-galactoside

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
M_r	=	apparent molecular weight
mU	=	milliunit
NANA	=	N-acetyl neuraminic acid
NFM	=	non fat milk
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
OPD	=	<i>o</i> -phenylenediamine
PBS	=	phosphate buffer saline
pH	=	-log hydrogen ion concentration
pI	=	isoelectric pH
R_f	=	relative mobility
SAV	=	streptavidin
SAV-HRP	=	streptavidin-peroxidase conjugate
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	tris buffer saline
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

μg = microgram

μl = microliter

% = percent

α = alpha

β = beta

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เลคติน (lectin) เป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate binding protein) และไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ การจับของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ สามารถทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutinate) หรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรต (glycoconjugate) ตกตะกอน (precipitate) ได้ (Goldstein *et al.*, 1980) เนื่องจากเลคตินมีแหล่งจับจำเพาะ (binding site) กับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์มากกว่า 1 ตำแหน่ง จึงสามารถทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ การจับของเลคตินกับน้ำตาลจะจับกันอย่างหลวมๆ สามารถแยกออกจากกันได้ เลคตินแต่ละชนิดสามารถจับจำเพาะกับผิวเซลล์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เลคตินจึงสามารถทำให้เซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้

เลคตินมีบทบาทสำคัญหลายประการในระบบชีวภาพ เลคตินในพืชมีบทบาทต่อต้านจุลินทรีย์ (microorganism) ที่ทำให้เกิดโรคในพืช เช่น เชื้อรา (fungi) หรือจากแมลงทำลายพืช เลคตินที่ผิวรากพืชวงศ์ถั่ว (Leguminosae) มีบทบาทในการอยู่ร่วมกันกับแบคทีเรียไรโซเบียม (*Rhizobium* spp.) นอกจากนี้เลคตินในพืชยังเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดและการเติบโตของเซลล์พืช เลคตินในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่นทำหน้าที่เป็น sex pheromone ในโรติเฟอร (rotifer) (Snell and Nacionales, 1990) เลคตินที่พบในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีส่วนสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย (*bacteria*) *Vibrio vulnificus* และเลคตินนี้สามารถทำให้แบคทีเรียดังกล่าวเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) สำหรับเลคตินของสัตว์มีกระดูกสันหลังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับและขนย้ายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตระหว่างเซลล์ (Barondes, 1984) เลคตินของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เข้าจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) และนำไปสู่การติดเชื้อ ในขณะที่เลคตินของสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิดถูกหลั่งเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันการติดเชื้อ (Sharon and Lis, 1995)

จากการที่เลคตินมีบทบาททางชีวภาพหลากหลาย จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อหา เลคตินชนิดใหม่จากแหล่งต่างๆ เป็นเวลาติดต่อกันมานาน เลคตินถูกพบครั้งแรกในเมล็ด ฝัก (castor bean) ต่อมาพบว่ามียูอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืช จึงได้มีการศึกษาเลคตินจาก พืชกันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นแหล่งที่หาได้ง่ายพบได้ทั่วไป โดยเฉพาะพืชวงศ์ถั่วซึ่งพบ เลคตินมากที่สุดสะสมอยู่ในส่วนของโปรตีนสะสม (storage protein) (Pusztai, 1991) ปัจจุบันมีการศึกษาเลคตินจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และทำเลคตินให้ บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางชีวเคมีโดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography) ชนิด ต่างๆ

เลคตินถูกใช้เป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์ในการวิจัยด้านชีวภาพในหลายสาขา วิชา เช่น ชีวเคมี เซลล์วิทยา และวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นต้น อาศัยการทำปฏิกิริยาที่มีความ จำเพาะระหว่างเลคตินกับน้ำตาล ซึ่งคล้ายกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen) กับ แอนติบอดี (antibody) เลคตินถูกนำไปใช้ในรูปของสารละลายอิสระหรือในรูปที่ถูกตรึง (immobilized lectin) เนื่องจากเซลล์เมมเบรน (cell membrane) มีโมเลกุลของน้ำตาลซึ่ง อาจอยู่ในรูปไกลโคโปรตีน (glycoprotein) หรือไกลโคลิพิด (glycolipid) จึงทำให้เลคตินมี ความสามารถในการจับกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้น เลคตินจึงถูกนำไปใช้ ในการศึกษาเกี่ยวกับเมมเบรนของเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ เช่น ของสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดย อาศัยเลคตินคอนจูเกต (lectin conjugate) ซึ่งได้จากการยึดเลคตินกับสารที่เหมาะสม เช่น เอนไซม์ (enzyme) บางชนิด สารกัมมันตรังสี (radioactive) หรือกับสารประกอบเรืองแสง ซึ่งสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้สามารถใช้หาจำนวนตัวรับ (receptor) ของเลคตินบนผิวเซลล์ ธรรมชาติและชนิดของตัวรับ และการจับกันระหว่างเลคตินกับตัวรับ บนผิวเซลล์ได้ดีเพียงใด (Monsigny *et al.*, 1980)

จากการศึกษาสมบัติของเลคตินจากเมล็ดจำปาตะโดย อุบล ต้นสม (2541) พบ ว่าเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะซึ่งเป็นเมล็ดพืชท้องถิ่นทางภาคใต้ที่มีปริมาณ มากหาได้ง่าย มีสมบัติของการเป็นเลคตินที่ดี สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (hemagglutination) ได้ดีมากและยังสามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (immature sperm) และที่เจริญพันธุ์ (mature sperm) ของหนู (rat) ได้แตกต่างกัน (อุบล ต้นสม, 2541; Utarabhand, 1990b) ตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู จะมีการ เจริญพันธุ์ (maturation) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ตัวอสุจิโดยเคลื่อนที่ผ่าน

อพิดีไดมิส (epididymis) จากส่วนต้นไปเก็บสะสมไว้ในส่วนปลายเพื่อรอการหลั่ง ผลการวิจัยเบื้องต้นที่พบว่าเลคตินจากเมล็ดจำปาจะสามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ และที่เจริญพันธุ์ได้แตกต่างกัน (อุบล ต้นสม, 2541; Utarabhand, 1990b) แสดงถึงความสามารถของเลคตินในการจำแนกความแตกต่างระหว่างเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิดได้ งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาจะไปประยุกต์ใช้ศึกษาเซลล์เมมเบรนของเซลล์ตัวอย่าง รวมทั้งพัฒนาวิธีทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินโดยใช้เลคตินจากเมล็ดจำปาจะเป็นแบบจำลอง

การตรวจเอกสาร

1.1 เลคติน

1.1.1 ความหมายของเลคติน

ในทางศตวรรษที่ผ่านมา มีการค้นพบโปรตีนจากพืชที่มีสมบัติทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่ม ซึ่งเรียกโปรตีนเหล่านี้ว่าไฟโตฮีมีม แอกกลูตินิน (phytohemagglutinin) หรือฮีมีม แอกกลูตินิน (hemagglutinin) (Kocourek, 1986) ในปี 1954 Boyd ได้ให้คำนิยามของโปรตีนดังกล่าวว่าเลคติน ซึ่งมาจากภาษาลาติน คือ legere แปลว่าเลือก เนื่องจากสามารถจับกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่างชนิดได้ต่างกัน และเลคตินบางชนิดจับจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงแต่ละหมู่เลือด (blood group) ของคนได้ต่างกัน จากการที่ได้มีการศึกษาเลคตินกันอย่างกว้างขวางทำให้มีการค้นพบเลคตินจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ เลคตินจากพืช สัตว์ และจากจุลินทรีย์ ทำให้ความหมายของเลคตินครอบคลุมถึงโปรตีนที่ได้จากพืช สัตว์หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เลคตินอาจอยู่ในรูปสารละลายหรือส่วนประกอบของเมมเบรน มีความสามารถจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตและทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ (Sharon and Lis, 1972) คณะกรรมการตั้งชื่อของ International Union of Biochemistry ยอมรับคำจำกัดความของเลคตินซึ่งเสนอโดย Goldstein *et al.* (1980) ว่า เลคตินหมายถึงโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตซึ่งไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน สามารถทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มหรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เนื่องจากเลคตินมีแหล่งจับจำเพาะที่จับกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Kocourek and Horejsi, 1981) เลคตินจับกับน้ำตาลอย่างหลวมๆ สามารถผันกลับได้ เช่นเดียวกับความจำเพาะ

ของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (substrate) หรือการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Sharon, 1977) แต่เลคตินไม่ได้เป็นเอนไซม์หรือฮอร์โมน (hormone) เนื่องจากสารเหล่านี้มีแหล่งจับกับน้ำตาลเพียงตำแหน่งเดียว (Etzler, 1985) ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์หรือกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคติน (Sharon, 1977) ต่อมาพบว่าเลคตินสามารถจับกับสารอื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตได้ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) หรือลิแกนด์ (ligand) อื่นๆ ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบได้อีกด้วย (Barondes, 1988)

1.1.2 แหล่งที่พบและโครงสร้างโมเลกุลของเลคติน

เลคตินพบได้ในแหล่งต่างๆ ทั้งในพืช สัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ (yeast) รา หรือไวรัส (virus) เลคตินมีสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มา มีการศึกษาเลคตินที่ได้จากพืชมากกว่าแหล่งอื่นๆ เพราะมีตัวอย่างอยู่ทั่วไป หาได้ง่าย ในปี ค.ศ. 1888 Herman Stillmark เป็นผู้ค้นพบเลคตินครั้งแรกจากเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เรียกว่าริซิน (ricin) ต่อมา มีการค้นพบว่าเลคตินคอนคานาวัลลิน เอ (concanavalin A) ซึ่งเป็นฮีโมแอกกลูตินินที่สกัดจากพืช *Canavalia ensiformis* มีความสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เนื่องจากมีสมบัติจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ด้วยพันธะแบบไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent bond) (Kocourek, 1986) เลคตินจากถั่วราชมาด (lima bean) มีความจำเพาะต่อเอ็น-อะซีติลกลาแลคโตซามีน (*N*-acetyl galactosamine, GalNAc) ทำให้เม็ดเลือดแดงหมู่ A รวมทั้งหมู่ AB เกิดการเกาะกลุ่ม ขณะที่สารสกัดจาก asparagus pea ซึ่งจำเพาะต่อฟูโคส (fucose) มีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเฉพาะหมู่ O เกิดการเกาะกลุ่ม (Sharon and Lis, 1995) トラバจนปัจจุบันได้มีการศึกษาเลคตินในพืชกันอย่างแพร่หลาย สามารถพบเลคตินได้ทั่วไปในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ราก ใบ ลำต้น เปลือก หรือในน้ำยาง เลคตินพบกระจายอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เลคตินที่มีการศึกษาและพบมากที่สุดคือเลคตินจากพืชวงศ์ถั่ว

เลคตินจากแหล่งต่างๆ มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น เลคตินจาก *Anguilla rostrata* มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000 ดัลตัน (dalton) เลคตินจากถั่วราชมาด มีน้ำหนักโมเลกุล 269,000 ดัลตัน (Gould and Scheinberg, 1970) และเลคตินจากแมงดา

ทะเล (horseshoe crab) มีน้ำหนักโมเลกุล 400,000 ดัลตัน (Sharon and Lis, 1972) บางครั้งเลคตินชนิดเดียวกันยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น คอนคานาวาลิน เอ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 55,000 ดัลตัน (Sharon and Lis, 1972) ไปจนถึง 100,000 ดัลตัน (Becker *et al.*, 1975) ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในการรวมตัวหรือแยกออกจากกันของหน่วยย่อย (subunit) ในเลคติน บางหน่วยย่อยอาจประกอบด้วยส่วนของสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) มารวมตัวกันเป็นหน่วยย่อย (Wang *et al.*, 1975)

เลคตินบางชนิดประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดียว เช่น เลคตินจากเมล็ดเหียง (Riang bean, *Parkia javanica*) (Utarabhand and Akkayanont, 1995) แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยย่อย เช่น เลคตินจาก garden snail ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย และจากแมงดาทะเลประกอบด้วย 18 หน่วยย่อย หน่วยย่อยในเลคตินชนิดต่างๆ อาจมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือแตกต่างกัน เลคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยเท่ากัน เช่น เลคตินจากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 160,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแต่ละหน่วยย่อยเท่ากันคือ 45,000 ดัลตัน (Hankins and Shannon, 1978) เลคตินจากแคลลัส *Helianthus tuberosus* (HTA I) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 17,000 ดัลตัน โดยมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 34,000 ดัลตัน (Nakagawa *et al.*, 1996) เลคตินจากขนุนอินเดีย (Indian jack fruit) มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 35,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 10,000 ดัลตัน (Appukuttan and Basu, 1985) เลคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยแตกต่างกัน เช่น เลคตินจากขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 62,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากันคือ 13,000 ดัลตัน จำนวน 2 หน่วยย่อย และอีก 2 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุล 16,000 ดัลตัน (Namjuntra *et al.*, 1985) เลคตินจากขนุน (*Artocarpus heterophyllus*, jacalin) มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 54,000 ดัลตัน มี 3 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12,000 ดัลตัน และ 1 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,000 ดัลตัน (Aucouturier *et al.*, 1987) เลคตินจากไตของต้นถั่วแดงหลวง (red kidney bean, *Phaseolus vulgaris*) มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 135,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดัลตัน และน้ำหนักโมเลกุล 34,200 ดัลตัน อีก 2 หน่วย (Kamemura *et al.*, 1996) นอกจากนี้บางหน่วยย่อยของเลคตินอาจจับกันโดยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) เช่น

พันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) หรือไม่ใช่พันธะนี้ อาทิเช่น เลคตินจากถั่วลิสง (peanut) ถั่วราชมารดา และจากถั่วเหลือง (soybean) เป็นไกลโคโปรตีนที่ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ส่วนเลคตินจากจมูกข้าวสาลี (wheat germ agglutinin, WGA) ไม่เป็นไกลโคโปรตีน มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลและมีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (Sharon, 1977)

เลคตินยังพบได้ทั่วไปบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โปรโตซัว (protozoa) ชนิด *Toxoplasma gondii* เป็นโปรโตซัวที่มีเลคตินบนผิวเซลล์ มีแหล่งจับจำเพาะกับโพลีแซคคาไรด์ที่มีซัลเฟต (sulphated polysaccharide) บนผิวเซลล์เจ้าบ้านได้อย่างจำเพาะ (Ortega-Barria and Boothroyd, 1999) เลคตินของแบคทีเรียมักอยู่ในรูปของพิลไล (pili) ดังเช่น *Escherichia coli* ชนิด I พิลไลจะมีเลคตินที่จำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส (mannose) ขณะที่ชนิด P พิลไลจะมีเลคตินที่จำเพาะต่อไดแซคคาไรด์ (disaccharide) คือ Gal(α 1-4)Gal (Gal= กาแลคโตส, galactose) (ตารางที่ 1) โดยปกติพิลไลประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์หลายหน่วยย่อยมาอยู่ด้วยกันมีลักษณะเป็นสายยาว 1 หน่วยย่อยในพิลไลจะมีแหล่งจับจำเพาะต่อน้ำตาล โดยอาจเป็นหน่วยย่อยในสายพิลไลหรืออยู่ตรงปลายพิลไล เพื่อทำหน้าที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน

อินฟลูเอนซาไวรัส (Influenza virus) เป็นไวรัสที่มีเลคตินซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิก (sialic acid) หรือ N-acetylneuraminic acid (NANA) (Wiley, 1987) ใน 1 หน่วยย่อยของเลคตินจากไวรัสชนิดนี้ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 สายจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และเกิดเป็นเตตระเมอร์ (tetramer) โดยไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ บนผิวของไวรัสมีแหล่งจับคาร์โบไฮเดรตอยู่ในสายใดสายหนึ่งของสายโพลีเปปไทด์ในแต่ละหน่วยย่อย และมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ในแต่ละสายพันธะของไวรัส โดยมีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านไม่เหมือนกัน ไวรัสสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนจะจับจำเพาะกับน้ำตาล NANA(α 2-6)Gal ซึ่งพบบนผิวเซลล์ของคน ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในสัตว์ปีกและในม้าจะจับจำเพาะกับ NANA(α 2-3)Gal ซึ่งต่างกันที่ตำแหน่งเชื่อมระหว่างน้ำตาล 2 หน่วย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 บทบาททางชีวภาพและน้ำตาลที่จำเพาะของเลคตินบางชนิด
(Sharon and Lis, 1995)

Lectin	Role	Carbohydrate specificity
Microorganisms		
Influenza virus		
Human isolation	Infection	NANA(α 2-6)Gal
Avian and equine isolation	Infection	NANA(α 2-3)Gal
Bacteria		
<i>E. coli</i> , type I	Infection	Mannose
<i>E. coli</i> , type P	Infection	Gal(α 1-4)Gal
Animals		
Galectin	Metastasis (?)	Gal(β 1-4)GlcNAc
C-type lectin		
Collectin (Mannose-binding protein)	Host antimicrobial defense	Mannose
L-selectin	Lymphocyte homing	
E-selectin	Leucocyte trafficking to sites of inflammation	SiaLe ^a , SiaLe ^x
P-selectin	Leucocyte trafficking to sites of inflammation	SiaLe ^a , SiaLe ^x

GlcNAc = N-acetyl glucosamine

SiaLe^a = NANA (α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc

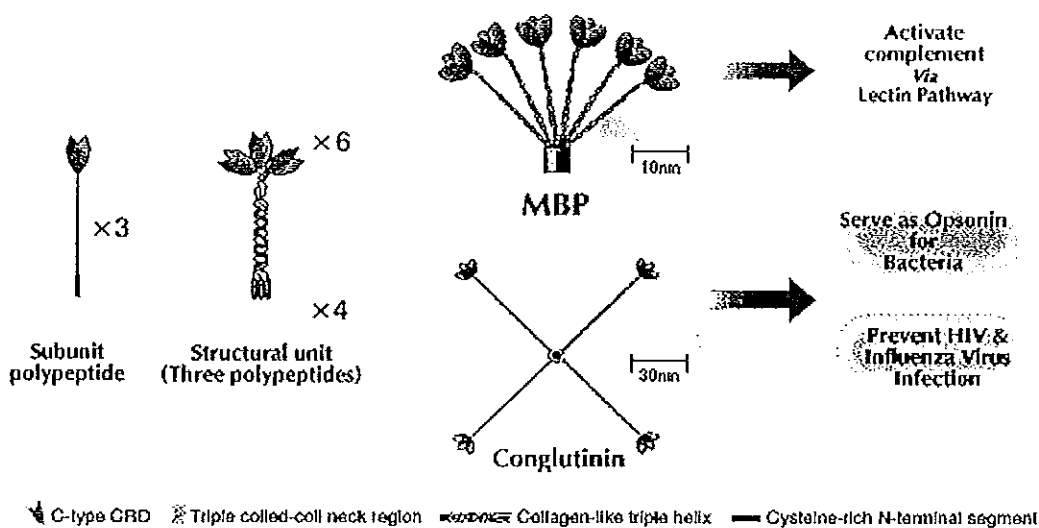
SiaLe^x = NANA (α 2-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc

ในการศึกษาโครงสร้างขั้นต้นของเลคตินจากสัตว์ ส่วนใหญ่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง เลคตินเหล่านี้มักประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีแหล่งจับกับคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนที่จดจำคาร์โบไฮเดรตเรียก CRD (carbohydrate recognition domain) จากการแบ่งเลคตินตามลักษณะ CRD แบ่งเลคตินออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 2 กลุ่มคือ แบบชนิด S (S-type) ซึ่งไม่ต้องการไอออนโลหะ (metal ion) ช่วยในการทำปฏิกิริยา และแบบชนิด C (C-type) ที่ต้องการ Ca^{2+} ช่วยในการจับกับคาร์โบไฮเดรต (Sharon and Lis, 1995) เลคตินแบบชนิด S ที่รู้จักกันดี คือ กาเลคติน (galectin) แม้ว่าส่วนใหญ่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่ยังพบในสัตว์อื่นๆ ด้วยเช่น ปลาไหลไฟฟ้า (electric eel) ฟองน้ำ (sponge) เป็นต้น พบเลคตินชนิดนี้ได้ในส่วนของไซโทพลาซึม (cytoplasm) และนิวเคลียส (nucleus) กาเลคตินแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ กาเลคติน 1 และกาเลคติน 2 เป็นไดเมอร์ (dimer) ที่ไม่จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ มีกรดอะมิโน 130 ตัว เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยพับเป็นทรงกลม (globular) เหมือนกับโครงสร้าง 3 มิติของเลคตินจากพืชวงศ์ถั่ว กาเลคติน 3 และกาเลคติน 4 เป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่มี CRD 1 หรือ 2 ตำแหน่งตามลำดับ (Sharon and Lis, 1995) เลคตินชนิดนี้จับกับน้ำตาลกาแลคโตสรูปแบบเบตา (β -form) เช่น lactose[Gal(β 1-4)Glc] และ GalNAc คือ [Gal(β 1-4)GlcNAc] และไม่ต้องการไอออนโลหะในการทำปฏิกิริยา (ตารางที่ 1) (Barondes *et al.*, 1994)

เลคตินแบบชนิด C เป็นกลุ่มใหญ่ของเลคตินที่พบในสัตว์ เลคตินชนิดนี้ต้องการ Ca^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยา พบได้ในซีรัม เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และในเมมเบรนของเซลล์สัตว์มีกระดูกสันหลัง หรืออาจพบได้บ้างในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอยเม่น (sea urchin) หรือ toxin ของ *Bacillus pertussis* เลคตินแบบชนิด C แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามโครงสร้าง ได้ 2 ชนิด เลคตินที่ฝังตัวในเมมเบรน (membrane-bound lectin) เช่น เอนโดไซติกเลคติน (endocytic lectin) และในรูปสารละลายได้แก่ คอลเลคติน (collectin) เอนโดไซติกเลคตินทำหน้าที่เป็นตัวรับที่ฝังตัวในเมมเบรน พบในเซลล์ตับ มีปลายด้านอะมิโน (N-terminal end) สั้น มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic part) กระจายอยู่ในเมมเบรนและส่วนปลายด้านคาร์บอกซิลิก (C-terminal end) ยื่นออกไปนอกเซลล์ซึ่งมี CRD อยู่ เลคตินชนิดนี้มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตสและ GalNAc ทำหน้าที่เป็นตัวรับบนเมมเบรนโดยจับกับไกลโคโปรตีนที่ไม่มีไซอะลิก (asialoglycoprotein) จากซีรัม แล้วขนส่งเข้าไปยังไลโซโซม (lysosome) เพื่อ

ทำลาย ในทำนองเดียวกันเลคตินบนผิวเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสจะมีส่วนปลายด้านคาร์บอกซิลิกอยู่ในไซโทพลาซึม และส่วนปลายด้านอะมิโนซึ่งมี CRD 8 ตำแหน่ง อยู่ด้านนอกของเซลล์ เลคตินนี้อาจมีส่วนร่วมในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยการจับกับน้ำตาลแมนโนสบนผิวเซลล์แบคทีเรียและนำไปสู่การทำลายแบคทีเรียด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) (Sharon and Lis, 1995)

คอลเลคติน เป็นเลคตินที่ต้องการ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาล คอลเลคตินมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนบางส่วนคล้ายคอลลาเจน (collagen) และถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ collagenase (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคณะ, 2529) เลคตินในกลุ่มนี้ได้แก่ ซีรัมโปรตีน (serum protein) 3 ชนิดคือ mannose-binding protein (MBP), คอนกลูตินิน (conglutinin) และ collectin-43 (CL-43) และโปรตีนเคลือบผิวปอด (lung surfactant protein) อีก 2 ชนิด คือ SP-A และ SP-D คอลเลคตินมีบทบาทที่สำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยไม่เกี่ยวข้องกับแอนติบอดี สามารถแยกชนิด คอลเลคตินได้ตามลักษณะโครงสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน (รูปที่ 1) ในแต่ละสายของโพลีเปปไทด์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 – 45,000 ดัลตัน มีกรดอะมิโน 222 – 355 ตัว ประกอบด้วยปลายด้าน



รูปที่ 1 โครงสร้างและบทบาททางชีวภาพของคอลเลคติน (MBP และคอนกลูตินิน)

(Sharon and Lis, 1995; Holmskov *et al.*, 1994)

อะมิโนที่มีกรดอะมิโนชนิดซิสเตอีน (cysteine) อยู่เป็นจำนวนมาก ต่อด้วยส่วนที่คล้าย คอลลาเจน, ส่วนเชื่อมขนาดสั้น และส่วนทรงกลมที่เป็นปลายด้านคาร์บอกซิลิก ซึ่งมี CRD หรือแหล่งจับ ดังแสดงในรูปที่ 1 คอลเลคตินประกอบด้วยหน่วยย่อย 3-6 หน่วยย่อยที่เหมือนกันจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ที่ปลายด้านอะมิโน โดย MBP หรือ SP-A มีโครงสร้างคล้ายช่อดอกไม้ คอนกลูตินินและ SP-D มีการรวมตัวของ 4 หน่วยย่อยเป็นเตตระเมอร์ การมี CRD หรือแหล่งจับกับน้ำตาลในแต่ละหน่วยย่อยของคอลเลคตินมารวมกันทำให้มีความจำเพาะสูง (รูปที่ 1) (Sharon and Lis, 1995; Holmskov *et al.*, 1994)

1.1.3 สมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตและความจำเพาะ

โมเลกุลเลคตินโดยทั่วไปมีแหล่งจับกับคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาลตั้งแต่ 2 หรือมากกว่า 2 ตำแหน่ง มักพบแหล่งจับหน่วยย่อยละ 1 ตำแหน่ง เลคตินจากจุมูกข้าวสาสีมีแหล่งจับ 2 ตำแหน่งบนแต่ละหน่วยย่อยซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ในขณะที่เลคตินจากขนุน (*Artocarpus integrifolia*) ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่มีแหล่งจับกับน้ำตาลเพียง 2 ตำแหน่ง (Appukuttan and Basu, 1985; Krishna-Sastry *et al.*, 1986) ริซินซึ่งมี 2 หน่วยย่อย คือสาย α (แอลฟา) และสาย β (เบตา) พบว่าเฉพาะสายเบตาของริซินมีแหล่งจับกับน้ำตาล 2 ตำแหน่ง (Lis and Sharon, 1977; Houston and Dooley, 1982) บางหน่วยย่อยของเลคตินชนิดเดียวกันประกอบด้วยแหล่งจับที่แตกต่างกัน เลคตินจากถั่วแดงหลวง ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่แตกต่างกันซึ่งรวมกันเป็นเตตระเมอร์ และไม่มีพันธะโควาเลนต์ หน่วยย่อยที่ต่างกันเรียกว่า E (erythroagglutinin) และ L (leukoagglutinin) หน่วยย่อย E มีกรดอะมิโนชนิด อะลานีน (alanine) อยู่ทางด้านปลายอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ มีค่า $pI = 5.95$ มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดง (Miller *et al.*, 1973; Yachnin, 1972) ขณะที่หน่วยย่อย L มี ซีรีน (serine) เป็นกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ ซึ่งมีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) มีค่า $pI = 5.25$ (Miller *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1973)

เลคตินส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) แต่เลคตินบางชนิดสามารถจับกับน้ำตาลที่มีขนาด 2-5 หรือ 6 หน่วยได้ (oligosaccharide) เช่น MBP มีความจำเพาะต่อแมนโนส อินฟูเอนซาไวรัสมีความจำเพาะต่อโดแซคคาไรด์ ในขณะที่ซีเลคติน (selectin) จับกับโอลิโกแซคคาไรด์บนผิวเซลล์ (ตารางที่ 1) การจับกับน้ำตาลขึ้นอยู่กับแหล่งจับบนโมเลกุลของเลคติน เลคตินบาง

ชนิดมีความจำเพาะอย่างกว้างๆ รวมไปถึงสามารถจับกับสารที่คล้ายน้ำตาลได้ หรือบางชนิดจะจับเฉพาะกับคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนผิวเซลล์เท่านั้น เนื่องจากเลคตินมีความจำเพาะต่อน้ำตาลทำให้สามารถแยกชนิดของเลคตินได้ตามความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตที่ต่างชนิดกัน รวมไปถึงใช้ในการจำแนกจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเซลล์สัตว์ได้ ได้มีการแบ่งเลคตินออกเป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะการจับจำเพาะกับน้ำตาล (Goldstein and Hayes, 1978) คือ

- เลคตินที่จับกับน้ำตาล glucose/mannose เช่น คอนคานาวัลลิน เอ, MBP
- เลคตินที่จับกับ N-acetyl galactosamine/galactose เช่น ริซิน jacalin,

เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ (Artocapus integer) (อุบล ต้นสม, 2541), กาเลคติน

- เลคตินที่จับกับน้ำตาล N-acetyl glucosamine เช่น เลคตินจาก gorse

(Ulex europeus)

- เลคตินที่จับกับน้ำตาล L-fucose เช่น เลคตินจาก asparagus pea
- เลคตินที่จับกับน้ำตาล sialic acid เช่น เลคตินจากแมงดาทะเล หรือกุ้ง

กุลาดำ

เลคตินบางชนิดมีความจำเพาะต่อน้ำตาลในรูปแบบเฉพาะเช่น คอนคานาวัลลิน เอ มีความจำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนสและกลูโคสในรูปแบบแอลฟา (α -form) แต่ไม่จับกับรูปแบบเบตา (β -form)

ได้มีการศึกษาลักษณะของหมู่เคมีในโมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยาและชนิดของพันธะที่เกิด เพื่อให้เข้าใจถึงการจับกันระหว่างเลคตินกับคาร์โบไฮเดรต ซึ่งในปัจจุบันทำได้ง่ายเพราะมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ เช่นการใช้ X-ray crystallography ชนิดมีคุณภาพการแยกสูง เพื่อศึกษาโครงสร้างของเลคตินในการทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ ทำให้สามารถศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ (Weis and Drickamer, 1996) จากข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ที่ได้จากการทำให้กลาย (mutation) ของสาย DNA (deoxyribonucleic acid) ทำให้เข้าใจถึงแหล่งจับที่มีรูปร่างแตกต่างกัน (Crenshaw *et al.*, 1995) และชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดพันธะกับคาร์โบไฮเดรต

ความเสถียรในการจับกับคาร์โบไฮเดรตของเลคติน เกิดเนื่องจากพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงวัน เดอร์ วาลส์ (van der Waals) (Becker *et al.*,

1975; Poretz and Goldstein, 1970; Kronis and Carver, 1985) เลคตินใช้พันธะไฮโดรเจนในการจับกับน้ำตาลและลิแกนด์อื่นๆ เนื่องจากมีความแข็งแรงในการจับน้อยทำให้สามารถแยกออกจากเลคตินได้ง่าย พันธะนี้เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) ของน้ำตาลกับหมู่ amide ของกรดอะมิโนแอสปาราจีน (asparagine) กลูตามีน (glutamine) และพบได้บ้างในหมู่ไฮดรอกซีของไทโรซีน (tyrosine), ซีรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลได้ แหล่งจับของเลคตินเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำตาลซึ่งต้องการความจำเพาะในการจดจำ และลักษณะความแตกต่าง คอนคานาวัลลิน เอ จับกับน้ำตาลได้ทั้งน้ำตาลแมนโนสและกลูโคส ซึ่งมีความจำเพาะในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลที่ตำแหน่ง 3-4- และ 6-OH แต่ไม่เกิดกับหมู่ไฮดรอกซีในตำแหน่งที่ 2-OH ซึ่งเป็นความแตกต่างของน้ำตาลทั้งสอง พืชวงศ์ถั่วมีกรดอะมิโนแอสปาราจีน และแอสปาร์เทต (aspartate) ที่แหล่งจับเพื่อใช้ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำตาล กาเลคตินใช้กรดอะมิโนกลูตาเมต (glutamate) ฮิสทีดีน (histidine) อาร์จีนีน (arginine) และแอสปาราจีน ในขณะที่เลคตินแบบชนิด C ใช้กรดอะมิโนแอสปาราจีนและกลูตาเมตที่แหล่งจับในการจับกับน้ำตาล (Sharon and Lis, 1995)

สมบัติที่จำเพาะของเลคตินไม่เพียงแต่จำแนกความแตกต่างของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์เท่านั้นแต่สามารถตรวจสอบความแตกต่างในระดับโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย และการจับของเลคตินต่อคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้นได้รวดเร็วและผันกลับได้ เลคตินโดยทั่วไปสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม การวิเคราะห์โดยทั่วไปที่นิยมกันจึงใช้การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็นการทดสอบสมบัติการเป็นเลคตินและวัดแอกทิวิตี (activity) ของเลคติน (ดูรายละเอียดตามข้อ 2.2) ในการทดสอบความจำเพาะของเลคตินต่อน้ำตาลได้จากการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ยับยั้งความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (hemagglutination inhibition, HAI) น้ำตาลชนิดใดก็ตามที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินได้ดีด้วยความเข้มข้นต่ำสะท้อนถึงความจำเพาะของแหล่งจับบนเลคตินต่อน้ำตาลชนิดนั้น แต่ความผิดพลาดของวิธีการนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและความแปรผันของการเตรียมแต่ละครั้ง รวมทั้งความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์โดยวิธีการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มยังไม่ดีมากนัก จึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งมีข้อดี

ข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น การใช้โครมาโทกราฟีแบบเลคตินจำเพาะ (lectin affinity chromatography) โดยการยัดเลคตินติดกับเม็ดเจล (gel bead) ซึ่งค่อนข้างทำได้ยาก และวิธีการนี้ใช้เวลานาน (Vretblad, 1976; Bartles and Frazier, 1980) หรือการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบจำเพาะ (affinity electrophoresis) ก็มีข้อจำกัด กล่าวคือโปรตีนต้องเคลื่อนที่ได้ดีในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งปกติการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ระหว่างเลคตินที่มีหลายแหล่งจับกับคาร์โบไฮเดรตจะมีขนาดใหญ่ ทำให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเกิดได้ไม่ดี การแยกตัวและวัดเชิงปริมาณยาก (So and Goldstein, 1967; Goldstein *et al.*, 1965)

ปฏิกริยาระหว่างอะวิดิน (avidin) และไบโอติน (biotin) ถูกใช้เป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์สารโดยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) อะวิดินเป็นโปรตีนที่พบในไข่ขาวของไก่ ทนต่อความร้อน เป็นไกลโคโปรตีนที่มีความเป็นเบส (basic glycoprotein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67,000 ดัลตัน ละลายได้ดีในน้ำ แต่องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มี 7% ทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะกับสารที่ต้องการทดสอบ (Guesdon *et al.*, 1979) ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้ streptavidin (SAV) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* แทน SAV เป็นโปรตีนที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มีความเป็นกลาง (neutral) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60,000 ดัลตัน มีสมบัติคล้ายอะวิดิน โดย 1 โมเลกุลจับได้กับ 4 โมเลกุลของไบโอติน (Wilchek and Bayer, 1983; Fraenkel-Conrat *et al.*, 1952; Chaiet and Wolf, 1964)

การวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์สารทางชีวภาพเพราะมีความไวสูง โดยปกติสารที่ถูกวิเคราะห์จะถูกดูดซับ (adsorb) หรือตรึงบนผิวภายในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลทที่เป็นพลาสติก จากนั้นสารที่ถูกดูดซับนี้จะถูกตรวจหาโดยการเติมโมเลกุลที่ยึดติดกับตัวตามรอย (tracer) เช่น แอนติบอดี เอนไซม์ หรือสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent compound) ผลผลิตที่เกิดในเพลทถูกวัดโดยตัวอ่าน (microtiter plate reader) ซึ่งสามารถวัดในเชิงปริมาณและคุณภาพได้ การเติมสารแข่งขันในการวิเคราะห์สามารถวัดการแข่งขันในเชิงปริมาณและคุณภาพได้ด้วย

ในการทดสอบความจำเพาะของเลคตินต่อน้ำตาลใน ไมโครโตะเตอร์เพลทได้มีการใช้วิธีต่างๆ แบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนี้ ประเภทแรกเรียกว่า enzyme-linked lectin binding assay หรือ ELLBA (Van der Schaal *et al.*, 1984) โดยการยัดเลคตินติดกับเอนไซม์ เป็นเลคตินเอนไซม์คอนจูเกต (lectin-enzyme conjugate) วิธีการนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ แบบที่ 1 ใช้ไกลโคโปรตีนดูดซับบนเพลทแล้วใช้เลคตินเอนไซม์คอนจูเกตตรวจหาความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตของไกลโคโปรตีนผ่านแอนติบอดีของเอนไซม์ แบบที่ 2 ดูดซับ SAV บนเพลท จากนั้นจับ SAV ด้วยไบโอดีตินที่คอนจูเกตกับคาร์โบไฮเดรตแล้ววิเคราะห์ความจำเพาะของน้ำตาลโดยใช้เลคติน-เอนไซม์คอนจูเกต (Shao, 1992; Shao and Chin, 1992) ประเภทที่ 2 คล้ายกับประเภทแรกแต่ใช้ไบโอดีตินคอนจูเกตกับเลคตินแทนเอนไซม์และคอนจูเกตนี้ถูกตรวจหาโดยผ่านการจับกับอะนติบอดีเอนไซม์ ซึ่งในปัจจุบัน streptavidin-horseradish peroxidase (SAV-HRP) ได้มีขายโดยทั่วไป (Duk *et al.*, 1994; Quill and Hedrick, 1996) ในวิธีการทั้ง 2 ประเภทนี้ การคอนจูเกตของเลคตินอาจมีผลกระทบต่อแอนติบอดีของเลคตินเองหรือต่อเอนไซม์ที่จับอยู่

ประเภทที่ 3 เป็นการให้เลคตินอิสระ แบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ แบบที่ 1 เลคตินถูกดูดซับบนผิวเพลทโดยความช่วยเหลือของแอนติบอดี (Ab) เลคตินนี้จะจับกับคาร์โบไฮเดรต-ไบโอดีตินคอนจูเกต แล้วถูกตรวจหาโดย SAV-HRP (Weitz-Schmidt *et al.*, 1996) แบบที่ 2 น้ำตาลแมนโนสหรือกาแลคโตสถูกคอนจูเกตกับเอนไซม์ เช่น malate dehydrogenase หรือ glucose-6-phosphate dehydrogenase จากนั้นดูดซับไว้บนเพลท การจับของเลคตินกับน้ำตาลที่ถูกดูดซับจะยับยั้งแอนติบอดีของเอนไซม์ ข้อเสียของวิธีนี้คือสับสเตรทที่ใช้ได้แก่ thio-NAD⁺ ไวต่อแสงและไม่เสถียรเท่า NAD⁺ (Kim *et al.*, 1994) และแบบที่ 3 เป็นการดูดซับเลคตินโดยตรงกับเพลท จากนั้นจับจำเพาะเลคตินที่ถูกดูดซับด้วยไบโอดีตินกาแลคโตสคอนจูเกต (biotin-galactose conjugate) และตรวจหาโดย SAV-HRP (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997) ข้อจำกัดของวิธีนี้คือเลคตินบางชนิดไม่สามารถถูกดูดซับบนเพลทได้โดยตนเอง และประเภทสุดท้าย เป็นการให้เพลทราคาแพง แบบ polystyrene ที่มีหมู่อะมิโน (NH₂ group) ซึ่งสามารถตรึงคาร์โบไฮเดรตไว้ได้ แล้วตรวจหาการจับของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ colloidal gold (Hatakeyama *et al.*, 1996)

<u>ประเภทที่ 1</u>	แบบที่ 1	<u>CHO</u> + Lectin-Enzyme
	แบบที่ 2	<u>SAV</u> + Biotin-CHO + Lectin-Enzyme
<u>ประเภทที่ 2</u>		<u>CHO</u> + Lectin-Biotin + SAV-HRP
<u>ประเภทที่ 3</u>	แบบที่ 1	<u>Ab</u> + Lectin + CHO-Biotin + SAV-HRP
	แบบที่ 2	<u>Mannose(Galactose)-Enzyme</u> + Lectin
	แบบที่ 3	<u>Lectin</u> + Biotin-Galactose + SAV-HRP
<u>ประเภทที่ 4</u>		<u>NH₂</u> + CHO + Lectin + Colloidal gold

รูปที่ 2 วิธีการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตของเลคตินโดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลท

_____ = เพลท ; CHO = คาร์โบไฮเดรต ; Ab = แอนติบอดี ;

SAV-HRP = streptavidin-peroxidase ;

NH₂ = polystyrene plate (amino type)

1.1.4 การจับกับลิแกนด์อื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต

เลคตินบางชนิดสามารถจับกับสารประกอบอื่นนอกจากคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาลได้ เช่น คอนคานาวัลลิน เอ สามารถจับกับโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์ เช่น 1,8-anilino-naphthalene-sulphonic acid (ANS) และ 2,6-toluidinyl-naphthalenesulphonic acid (TNS) แต่จะเป็นการจับกันอย่างหลวม ๆ คอนคานาวัลลิน เอ มีแหล่งจับที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ 3 ตำแหน่ง ซึ่งทำปฏิกิริยาจำเพาะกับหมู่ฟีนิล (phenyl group) ของ glycoside หรือ mannoside, แหล่งจับที่มีความจำเพาะสูงต่อสารฟลูออเรสเซนต์ (Yang *et al.*, 1974) ซึ่งอยู่ใกล้กับแหล่งจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต และแหล่งจับที่มีความจำเพาะต่ำซึ่งจับกับลิแกนด์อื่น เช่น ทริปโตเฟน (tryptophan), indoleacetic acid (Robert and Goldstein, 1983) และโมเลกุลที่ไม่มีขั้วเช่น *o*-iodobenzoic acid, *p*-hydroxy benzoate, phenyl phosphate และ dimethylmercury (Hardmand and Ainsworth, 1973) เลคตินจากถั่วราชมารดา มีค่า K_a (association constant) สำหรับ ANS ประมาณ $10^3 - 10^4 M^{-1}$ (Robert and Goldstein, 1983) แหล่งจับกับสารฟลูออเรสเซนต์ของเลคตินจากถั่วราชมารดาแตกต่างกับแหล่งจับคาร์โบไฮเดรต (Kella *et al.*, 1984) limulin (Robey and Liu, 1981) และ carcinoscorpion (Mohan *et al.*, 1982) เป็นเลคตินที่ได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกและจับจำเพาะได้กับ phosphorylcholine โดยอาศัยแหล่งจับที่แตกต่างจากแหล่งจับกรดไซอะลิก จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าเลคตินไม่เพียงจับกับคาร์โบไฮเดรตได้เท่านั้น แต่สามารถจับกับลิแกนด์อื่นได้ โดยแหล่งจับกับลิแกนด์เหล่านี้อาจอยู่ใกล้กับแหล่งจับคาร์โบไฮเดรตของเลคติน

1.1.5 ความต้องการไอออนของโลหะ

เลคตินบางชนิดต้องการไอออนโลหะในรูปของไดวาเลนต์แคตไอออน (divalent cation) เช่น Ca^{2+} , Mn^{2+} และ Mg^{2+} เพื่อช่วยในการจับกับคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นในการตรวจหาแอกทิวิตีของเลคตินจึงต้องมีการเติมไอออนเหล่านี้ลงไปด้วย อาทิเช่น Ca^{2+} และ Mn^{2+} ส่งเสริมการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินจากเมล็ดเหียง (Utarabhand and Akkayanont, 1995) และโดยเลคตินจากถั่วราชมารดา (Roberts and Goldstein, 1983) เลคตินบางชนิดมีไอออนโลหะเป็นองค์ประกอบ (metalloprotein) นอกเหนือจากการช่วยในการจับกับคาร์โบไฮเดรตแล้ว ไอออนโลหะเหล่านี้อาจช่วยรักษาโครงสร้างของเลคตินให้เสถียร ดังตัวอย่าง เช่น แต่ละหน่วยย่อยของคอนคานาวัลลิน เอ

ประกอบด้วย Ca^{2+} และ Mn^{2+} อย่างละ 1 ไอออน เมื่อเอาไอออนนี้ออกด้วยการเติม 0.1 M HCl แล้วไดอะไลซ์ (dialyse) ด้วย กรดน้ำส้ม (acetic acid) 1.0 M สามารถยับยั้งการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้ (Agrawal and Goldstein, 1968) การจับกับ Mn^{2+} ของคอนคานา วาลิน เอ ก่อให้เกิดแหล่งจับต่อ Ca^{2+} การจับกับ Ca^{2+} ทำให้โครงรูปธรรมชาติ (native conformation) ของเลคตินมีความเสถียรและคงแหล่งจับน้ำตาลไว้ (Becker *et al.*, 1975; Becker *et al.*, 1976) ในเลคตินจากพืชวงศ์ถั่วบางชนิดมีกรดอะมิโนบางชนิดถูกรักษาไว้ (conserve) เพื่อใช้จับกับ Ca^{2+} และ Mn^{2+} (Wang *et al.*, 1975; Hopp *et al.*, 1982)

1.2 บทบาททางชีวภาพของเลคติน

1.2.1 บทบาทของเลคตินในพืช

มีการศึกษาเลคตินในพืชเป็นจำนวนมาก พบว่าเลคตินในพืชแต่ละชนิดมีบทบาทแตกต่างกัน เช่น บทบาทในการป้องกันตัวของพืช เลคตินจาก stinging nettle (*Urtica dioica* agglutinin; UDA) มีความจำเพาะต่อน้ำตาลเอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum* และ *Phycomyces blakesleeianus* ได้และสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราร่วมกับเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitin) (Broekaert *et al.*, 1989) หรือเลคตินจากจมูกข้าวสาลีที่มีความจำเพาะกับไคติน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ (spore) และการเจริญของไฮฟา (hypha) ของเชื้อรา *Trichoderma viride* ได้ เนื่องจากเลคตินไปยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินที่ผนังเซลล์ของเชื้อรา (Mirelman *et al.*, 1975) สำหรับบทบาทในการอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (symbiosis) พบว่าแบคทีเรียในดินพวกไรโซเบียมซึ่งอาศัยและทำให้เกิดปมอยู่ในรากพืชวงศ์ถั่ว ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นปุ๋ยของพืช โดยมีเลคตินจากรากทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างผิวรากพืชกับแบคทีเรียให้เกาะติดกัน เลคตินจะจับกับแบคทีเรียในบริเวณแหล่งจับหรือมีแหล่งจับร่วมกันอย่างจำเพาะ (Gade *et al.*, 1981, Diaz *et al.*, 1989) เลคตินจากรากพืชวงศ์ถั่วแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแตกต่างกัน เช่น เลคตินจากรากถั่วเหลืองจับจำเพาะกับแบคทีเรีย *Rhizobium japonicum* ที่ทำให้เกิดปมรากในถั่วเหลือง แต่ไม่จับกับแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นที่ไม่ทำให้เกิดปมในรากถั่วเหลือง (Bohlool and Schmidt, 1974) นอกจากนี้เลคตินยังมีบทบาทเกี่ยว

ข้องกับการงอกของเมล็ด พบว่ามีการสะสมเลคตินในเมล็ดพืชวงศ์ถั่วมากในช่วงที่เมล็ดมีการเจริญเติบโต ปริมาณเลคตินจะลดลงและหายไปในขณะที่เมล็ดกำลังงอก โดยเลคตินอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการงอกของเมล็ดเช่นเดียวกับโปรตีนสะสมพืชวงศ์ถั่วจะมีการสะสมเลคตินมากในส่วนของใบเลี้ยง แล้วค่อยลดลงจนหายไปเมื่อเมล็ดงอก (Pusztai, 1991) เลคตินของเมล็ดเหรียญมีปริมาณลดลงตามเวลาของการงอกของเมล็ดไปเป็นต้นอ่อน (Utarabhand and Akkayanont, 1995) สำหรับบทบาทในด้านอื่นๆ เช่น เลคตินทำหน้าที่ในการจับกับสารคาร์โบไฮเดรตเพื่อลำเลียงหรือตรึงคาร์โบไฮเดรตไว้ในเมล็ด (Etzler, 1985)

1.2.2 บทบาทของเลคตินในจุลินทรีย์

บทบาทหลักของเลคตินจากจุลินทรีย์คือ การยึดติดกับเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อ (Ofek and Sharon, 1990) ไวรัสนิโอฟลูเอนซามีเลคตินที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกหรือ NANA ของเซลล์เจ้าบ้านไม่เหมือนกัน ไวรัสสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนจะจับกับน้ำตาล NANA(α 2-6)Gal ซึ่งพบบนผิวเซลล์ของคน ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในสัตว์ปีกและในม้าจะจับจำเพาะกับ NANA(α 2-3)Gal (ตารางที่ 1) เลคตินจากไวรัสนี้เข้าจับเซลล์ได้โดยการจับกับ NANA ที่อยู่ในคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นเกิดการรวมตัว (fusion) ของไวรัสกับเซลล์เมมเบรน ทำให้ไวรัสปล่อยจีโนม (genome) เข้าสู่ไซโทพลาซึมและเกิดการถ่ายแบบ (replication) เมื่อมีการนำเอา NANA ออกจากผิวเซลล์ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ sialidase ทำให้ไวรัสไม่สามารถจับกับเซลล์เป็นการป้องกันการติดเชื้อได้ ซึ่งเมื่อนำเอาไกลโคลิปิดที่มี NANA ไปเคลือบบนเซลล์ดังกล่าว พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสได้อีก ดังนั้นในการสร้างแหล่งจับอุปมานสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสของเซลล์ และสามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านไวรัสได้ (Wiley, 1987)

1.2.3 บทบาทของเลคตินในสัตว์

เลคตินในสัตว์มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การป้องกันการติดเชื้อ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง คอลเลคตินเป็นเลคตินที่สังเคราะห์ในสัตว์ (รูปที่ 1) ที่พบในซีรัมมี 3 ชนิดคือ MBP, คอนกลูตินิน และ CL-43 ที่พบในปอดมี 2 ชนิดคือ SP-A และ SP-D คอลเลคตินมีบทบาทป้องกันการติดเชื้อของเจ้าบ้านโดยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและไม่เกี่ยวข้องกับการแอนติบอดี (Holmskov *et al.*, 1994) MBP, คอนกลูตินิน และ CL-43 ถูกสังเคราะห์ที่ตับแล้วหลังเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด ใน

ขณะที่ SP-A และ SP-D สังเคราะห์ที่ปอดโดยเซลล์ถุงลม (alveolar cell) จากนั้นหลังเข้าสู่ช่องว่างภายในถุงลม ปริมาณ MBP ในซีรัมมีระดับสูงขึ้นหลังคลอดหรือเมื่อมีการติดเชื้อ MBP สามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) ภายในร่างกายได้ ระบบคอมพลีเมนต์ คือกลุ่มของโปรตีนปกติในซีรัมที่ทำงานรวมกันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 20 ชนิด ในขณะที่มีเซลล์แปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เลคติน MBP จะจับกับโปรตีนที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบซึ่งยึดติดกับเอนไซม์โปรตีเอส (protease) สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นโปรตีนในระบบคอมพลีเมนต์ให้ทำงาน โดยมีความสามารถจับและทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ กระบวนการกระตุ้นคอมพลีเมนต์โดย MBP เรียกว่า lectin pathway ซึ่งเป็นการจดจำเซลล์เป้าหมายโดยระบบคอมพลีเมนต์ ในภาวะที่ไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะ (Matsushita, 1996; Teria *et al.*, 1997) เป็นที่รู้กันว่าคอเลเลคตินทำหน้าที่คล้าย opsonin (Ikeda, *et al.*, 1987) โดยสามารถจดจำและจับกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์จุลินทรีย์แล้วชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจดจำเซลล์แปลกปลอมได้ดี และกำจัดเซลล์แปลกปลอมโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส ความสำคัญทางการแพทย์คือการวินิจฉัยกลุ่มโรคขาด MBP ที่เกิดจากการกลายของยีน (gene) ของ MBP ทำให้เกิดการขาด MBP ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดการติดเชื้อซ้ำได้บ่อยในเด็ก หรือจากการทำให้ยีนที่สังเคราะห์ SP-A ในหนูเมาส์ (mouse) ไม่สามารถสังเคราะห์ SP-A ได้ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Streptococcus* หมู่ B ในหนูเมาส์ บ่งชี้ว่าคอเลเลคตินที่เคลือบผิวปอดมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อในปอด (Sumiya *et al.*, 1991)

คอเลเลคตินมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยจับกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา ปรสิต (parasite) แล้วกำจัดต่อโดยกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ หรือนำไปกำจัดโดยฟาโกไซโทซิส (Kawasaki, *et al.*, 1994) นอกจากนี้คอเลเลคตินแล้วยังพบว่าเลคตินจากเมล็ดขนุนยังสามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในคน (Hiemstra, *et al.*, 1987) และป้องกันการติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-1) ของเซลล์ ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ชนิด CD4 ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างแอนติบอดีในร่างกาย โดยเลคตินจะเข้าไปจับกับส่วน gp120 ของ HIV-1 ทำให้ gp120 ไม่สามารถจับกับเซลล์ ที-ลิมโฟไซต์ชนิด CD4 ได้ (Corbeau *et al.*, 1994)

กาเลคตินมีความสำคัญในการควบคุมขั้นตอนการพัฒนา (development) อวัยวะต่างๆ เช่น มีการสร้างเลคตินเกิดในเนื้อเยื่อเมื่อมีการพัฒนาหรืออยู่ในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ แสดงถึงบทบาทที่มีความสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ กาเลคติน 1 มีหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ และเมทริกซ์นอกเซลล์ในกล้ามเนื้อ ซึ่งอาจมีความจำเป็นในการพัฒนาของกล้ามเนื้อ กาเลคติน 3 เป็นองค์ประกอบของ ribonucleoprotein และมีปริมาณมากในนิวเคลียสในระหว่างการเปลี่ยนแปลง (proliferation) ของเซลล์บางชนิด ซึ่งอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้าง RNA (ribonucleic acid) ในการตรวจวัดระดับเลคตินนี้พบว่ามีอยู่บริเวณผิวของเซลล์มะเร็งของคนและอาจมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการยึดติดของเซลล์เหล่านี้ต่ออวัยวะเป้าหมาย ที่เป็นขั้นตอนสำคัญของการเกิดการแพร่กระจายหรือการรุกรานของเซลล์มะเร็ง (metastasis) พบความสัมพันธ์ของปริมาณเลคตินที่แสดงออกมาในเซลล์มะเร็งชนิดมีลาโนมา (melanoma cell) และการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์นี้ที่รอดหลังจากฉีดเซลล์เข้าหนูเมาส์ เมื่อนำเซลล์มะเร็งดังกล่าวไปผสมกับสารประกอบที่มีน้ำตาลแลคโตส (lactose) จำนวนมากๆ แล้วฉีดเข้าตัวหนูเมาส์ พบว่าสามารถลดการแพร่ของเซลล์มีลาโนมาได้ ครั้งหนึ่ง การค้นพบครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่ายาที่ใช้ป้องกันการยึดติด (anti adhesive drug) สามารถใช้เป็นตัวป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (antimetastasis) ได้ (Barondes *et al.*, 1994)

ซีเลคตินเป็นเลคตินแบบชนิด C อีกชนิดหนึ่งที่พบบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดขาว (leucocyte) มีบทบาทสำคัญต่อเม็ดเลือดขาวในการเคลื่อนที่ไปสู่ตำแหน่งที่มีการอักเสบและการเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) (Lasky, 1992) ซีเลคตินเป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเมมเบรน ส่วนปลายด้านอะมิโนที่มี CRD อยู่ภายนอกเซลล์ เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ซีเลคตินบนเซลล์เม็ดเลือดขาวจะจับกับคาร์โบไฮเดรตที่มีฟูโคสและ NANA (SiaLe^o, SiaLe^x, ตารางที่ 2) ของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) แล้วเม็ดเลือดขาวบีบตัวเองผ่านเซลล์บุหลอดเลือดหลุดออกนอกหลอดเลือดไปสู่บริเวณที่มีการอักเสบ ซีเลคตินชนิด L เป็นตัวรับกลับ (homing receptor) พบได้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดมีบทบาทในการนำเม็ดเลือดขาวกลับไปต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย ซีเลคตินอีก 2 ชนิด E และ P ที่พบบนเซลล์บุหลอดเลือด ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารที่มาจากการอักเสบ เช่น cytokine (interleukin-2 และ tumor necrosis factor) cytokine จะถูก

หลังออกมาจากเนื้อเยื่อตอบสนองต่อการบาดเจ็บ หรือการติดเชื้อ (Lasky, 1992; Sharon and Lis, 1995) เลคตินทำหน้าที่ช่วยให้เม็ดเลือดขาวผ่านชั้นผนังหลอดเลือด โดยเคลื่อนที่เพื่อไปทำหน้าที่ต่อต้านการติดเชื้อ ทำให้เกิดสภาวะการรวมกันเนื้อเยื่อ ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย บวมและปวด ดังนั้นการอักเสบของโรครูมาตอยด์ (rheumatoid) สามารถป้องกันได้ด้วยการยับยั้งไม่ให้เม็ดเลือดขาวหลุดออกไปนอกหลอดเลือด ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการผลิตยา ในทางทฤษฎียาทุกชนิดที่มีผลต่อการยึดติดเม็ดเลือดขาวกับเซลล์บุหลอดเลือด เพื่อไม่ให้เกิดการหลุดออกนอกหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาวจะมีผลต่อต้านการอักเสบได้ อย่างไรก็ตามการยับยั้งการยึดติดจะสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อยานั้นสามารถทำให้เกิดการยับยั้งเม็ดเลือดขาวไม่ให้ออกนอกระบบหมุนเวียนเลือดได้และยังคงทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังที่ที่จำเป็นต้องใช้เม็ดเลือดขาวได้ ซึ่งเป้าหมายนี้สำเร็จได้ เพราะมีความแตกต่างในการจับอย่างจำเพาะของโมเลกุลต่อเนื้อเยื่อ จากการศึกษาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกจดจำโดยซีเลคติน สามารถป้องกันการกระตุ้นที่เกิดจากการบาดเจ็บที่ปอดได้ นอกเหนือจากการเกี่ยวข้องกับ การอักเสบแล้ว ซีเลคตินอาจมีบทบาทในการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งออกไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายได้ เพราะกระบวนการนี้ต้องมีการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านผนังหลอดเลือด พบว่าเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งของคนจับจำเพาะกับซีเลคตินชนิด E ได้ ดังนั้นการใช้ตัวยับยั้งต่อซีเลคตินอาจพัฒนาไปใช้เป็นยาต้านทานการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Sharon and Lis, 1995)

1.2.4 การทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม

เนื่องจากเลคตินสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ โดยที่เลคตินมีแหล่งจับมากกว่า 1 ตำแหน่ง สำหรับจับกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต การจับอาจมีผลทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือไม่ก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สมบัติของเลคติน ได้แก่ ชนิด, จำนวนแหล่งจับกับน้ำตาล หรือขนาดโมเลกุล สมบัติของเซลล์ที่เลคตินเข้าไปจับ ได้แก่ จำนวนแหล่งจับ, ตำแหน่งของแหล่งจับบนผิวเซลล์ และปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ไอออน หรือการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้ผิวเซลล์มีองค์ประกอบของน้ำตาลแตกต่างกัน มีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเซลล์โดยเลคตินได้แตกต่างกันด้วย สารสกัดเลคตินจากเมล็ดจำปาจะสามารถทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ (อุบลตันสม, 2541; Utarabhand, 1990b) ตัวอสุจิของหนูหลังจากถูกสร้างภายในอัณฑะ (testes) จะเคลื่อนที่ผ่านท่ออพิติโดมิสจากส่วนต้น (caput) ไปยังส่วนปลาย (cauda) ตัว

อสุจิที่ได้จากอภิติโดมิสส่วนต้นยังไม่เจริญพันธุ์ไม่สามารถปฏิสนธิไข่ ขณะที่ได้จากอภิติโดมิสส่วนปลายเจริญพันธุ์แล้วมีความสามารถปฏิสนธิไข่ได้ เนื่องจากการเจริญพันธุ์ของอสุจิในอภิติโดมิสเกิดควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมมเบรน โดยมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลบนผิวเซลล์อสุจิ (Utarabhand, 1990b) นอกจากนี้การที่โครงสร้างโมเลกุลของเลคตินหรือเซลล์ที่เลคตินเข้าไปจับมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารเคมี หรือเอนไซม์ก็มีผลต่อการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยเช่นกัน เม็ดเลือดแดงที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ เช่น นิวรามินิเดส (neuraminidase), ทริปซิน (trypsin) หรือโปรเนส (pronase) จะเกิดการเกาะกลุ่มโดยเลคตินได้ดีขึ้น เลคตินจากเมล็ดจำปาตะทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือเอนไซม์นิวรามินิเดส เกิดการเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงกระต่ายปกติ (อุบล ต้นสม, 2541) เลคตินบางชนิดต้องการไอออนโลหะ เช่น Ca^{2+} , Mn^{2+} เพื่อช่วยในการเกาะกลุ่มเซลล์ เลคตินจากจุมูกข้าวสาลีและคอนคานาวาลิน เอ สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (normal cell) (Sharon and Lis, 1972) เลคตินจากไขปลา Ayu (*Plecoglossus altivelis*) สามารถทำให้เซลล์ Ehrlich ascites carcinoma เกิดการเกาะกลุ่มได้แต่ไม่ทำให้เซลล์ ascites hepatoma AH109 หรือเซลล์ sarcoma 150 ของหนูเกิดการเกาะกลุ่ม (Sakakibara *et al.*, 1985) เลคตินจากเห็ด *Laccaria amethystina* มีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่อ และหมู่อ A2 เกิดการเกาะกลุ่มได้มากกว่าหมู่อ A1 (Genaud *et al.*, 1983) บทบาทของเลคตินในการเกาะกลุ่มเซลล์ นอกจากส่วนใหญ่พบในเซลล์ของสัตว์แล้ว สามารถพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา โปรโตซัว ไวรัส (Lis and Sharon, 1986)

1.2.5 การทำปฏิกิริยากับอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig)

เนื่องจากเลคตินมีความสามารถในการจับกับสารไกลโคโปรตีนได้ จึงพบว่าเลคตินบางชนิดมีสมบัติที่จับจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 82-96% และคาร์โบไฮเดรต 4-18% เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสารแปลกปลอม (แอนติเจน) และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนเท่านั้น (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคณะ 2529) สามารถทดสอบปฏิกิริยาการจับจำเพาะระหว่างเลคตินกับอิมมูโนโกลบูลินได้โดยการทำ immunodiffusion หรือ gel double diffusion (Ouchterlony, 1956) ซึ่งจะเกิดแถบโปรตีนตะกอน (precipitin band) จากปฏิกิริยาระหว่างเลคตินกับอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ

(Champedak, *Artocarpus integer*) สามารถทำปฏิกิริยากับ IgA1 จากซีรัมของคนและ sIgA (secretory IgA) จากน้ำนมได้ เช่นเดียวกับเลคตินจากเมล็ดขนุน (jacalin) (Skea, *et al.*, 1988; Kabir, 1993) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgA2, IgD, IgG และ IgM (Hashim, *et al.*, 1992) เลคตินจากเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) สามารถจับและตกตะกอน IgA จากซีรัมคนซึ่งสามารถใช้แยกชนิดของ IgA ได้ โดยเลคตินจากเมล็ดขนุนจับกับ IgA1 ได้ดีกว่า IgA2 และไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG, IgM, IgD และ IgE (Kondoh, *et al.*, 1987; Haun, *et al.*, 1989)

1.3 การนำเลคตินไปใช้ประโยชน์

จากอดีตจวบจนถึงปัจจุบันเลคตินเป็นที่สนใจศึกษากันมากเพราะสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugate) จากสมบัติการจับจำเพาะของเลคตินต่อคาร์โบไฮเดรตทำให้สามารถนำเลคตินไปจำแนกกลุ่มโครงสร้างของไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ได้ เลคตินยังสามารถใช้ในการแยกชนิดของเซลล์ได้ตามความแตกต่างของน้ำตาลบนผิวเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการต่างๆ เช่น การพัฒนาหรือการเจริญเติบโต หรือการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเซลล์ (Oda *et al.*, 1999; Sharon, 1977) สมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ของเลคตินบางชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

1.3.1 การใช้เลคตินในการแยกและศึกษาเซลล์

เลคตินสามารถนำไปใช้ในการแยกและวินิจฉัยเซลล์ชนิดต่างๆ โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำตาลบนผิวเซลล์ทำให้สามารถแยกเซลล์สัตว์, พืช หรือของจุลินทรีย์ได้ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินนั้นๆ ซึ่งน้ำตาลจะไปยังยังการจับของเลคตินกับเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ต้องการถูกปลดปล่อยออกมาเป็นอิสระ เลคตินจากถั่วเหลืองและจาก *Helix pomatia* ถูกนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Bacillus anthracis* และ *Bacillus mycoides* ได้ เลคตินจากจมูกข้าวสาลีสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัย *Neisseria gonorrhoeae* ได้และเลคตินที่ถูกตรึงสามารถนำไปใช้แยก *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. และ *E. coli* ได้ (Ballou, 1970) จากสมบัติการจับกันของเลคตินกับผิวเซลล์เมื่อมีเลคตินจับอยู่กับผิวเซลล์ย่อมแสดงถึงโครงสร้างของสายคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์นั้นได้ คอนคานาวาลิน เอ,

Lens culinaris agglutinin และ *Pisum sativum* agglutinin มีความจำเพาะต่อน้ำตาล ดี-แมนโนส และ ดี-กลูโคส ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ทั้งในเซลล์ยีสต์และเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ เลคตินจาก *Narcissus psuedonarcissus* และ *Lycoris radiata* มีความจำเพาะต่อน้ำตาล ดี-แมนโนส สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกิดการเกาะกลุ่มได้อย่างมากและทำให้เซลล์ยีสต์เกิดการเกาะกลุ่มได้อย่างอ่อนๆ เมื่อนำเอาเลคตินที่ยึดกับไบโอตินไปจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ยีสต์ จากนั้นติดตามเลคตินนี้ด้วย

ตารางที่ 2 สมบัติ และการนำไปใช้ประโยชน์ของเลคตินบางชนิด

(Sharon and Lis, 1972)

Property	Application
Specificity for human blood groups	Blood typing; structural studies of blood group substance; identification of new blood group types; diagnosis of secretors
Toxicity in animals	Studies of nutritional value of animal foodstuffs
Induction of mitosis in lymphocytes	Studies of chromosomal constitution of cells and detection of chromosome abnormalities
Agglutination of malignant cells	Investigation of architecture of cell surfaces, and its change upon transformation
Precipitation of polysaccharides and glycoprotein	Isolation, purification, and structural studies of carbohydrate-containing polymers; model for antigen-antibody reaction
Binding of sugar	Studies of specific combining sites on proteins

avidin- β -galactosidase โดยใช้ 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside เป็นสับสเตรท ตรวจวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของเลคตินที่จับอยู่ จำนวนของเลคตินที่จับอยู่กับเซลล์จะมีความแตกต่างกันตามสมบัติของการจับและการกระจายตัวของคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของยีสต์แต่ละชนิด (species) (Oda *et al.*, 1997) นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการใช้เลคตินติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วใช้เทคนิค flow injection ในการตรวจวัดเพื่อศึกษาการจับกันบนผิวเซลล์ของยีสต์และแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการแยกชนิดของเซลล์และศึกษาสมบัติต่างๆ เช่นการเกิดปฏิกิริยาหรือปริมาณการจับของเลคติน (Oda *et al.*, 1999)

1.3.2 การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ

ปฏิกิริยาระหว่างเลคตินกับน้ำตาล คล้ายกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี สามารถนำเลคตินไปใช้ในรูปสารละลายหรือรูปที่ถูกตรึงไว้กับตัวค้ำจุน เพื่อนำไปใช้แยกบริสุทธิ์สารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบได้ เนื่องจากเลคตินทำให้เกิดการตกตะกอนหรือดูดซับสารเหล่านี้ไว้ และปลดปล่อยออกมาเมื่อใช้น้ำตาลที่จำเพาะกับเลคตินนั้นๆ (Lis and Sharon, 1986) มีการนำเลคตินไปใช้แยกสารไกลโคโปรตีนให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบโครงสร้างและแยกคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ให้บริสุทธิ์ได้ โดยการใช้โครมาโทกราฟีแบบเลคตินจำเพาะ วิธีการนี้เลคตินจะถูกตรึงบนตัวค้ำจุนแล้วบรรจุในคอลัมน์ เมื่อผ่านสารละลายของเซลล์ที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ ส่วนของเซลล์ที่มีน้ำตาลจำเพาะกับเลคตินก็จะจับกับเลคตินในคอลัมน์ หลังจากนั้นจะถูกชะออกด้วยน้ำตาลอิสระที่จำเพาะกับเลคตินนั้น (Lis and Sharon, 1986) เช่น การใช้ jacalin ในการแยก IgA1 และ IgA2 ให้บริสุทธิ์ (Haun *et al.*, 1989), การใช้ *Ricinus communis* agglutinin ในการแยกไกลโคโปรตีนของ colonic adenocarcinoma ของคน (Tsao and Kim, 1978)

1.3.3 การศึกษาแหล่งจับของเลคตินบนเซลล์เมมเบรน

เลคตินสามารถนำไปใช้ศึกษาเมมเบรนของเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ เนื่องจากเซลล์เมมเบรนมีโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งอาจอยู่ในรูปของไกลโคโปรตีนหรือไกลโคลิปิด จึงทำให้เลคตินจับกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ได้ โดยอาศัยสารอนุพันธ์ที่เหมาะสมยึดติดกับเลคตินก่อน เช่น การใช้สารกัมมันตรังสี หรือสารประกอบซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่น สารฟลูออเรสซิน (fluorescein) ทำให้สามารถค้นหาจำนวนแหล่งจับของ

เลคตินบนผิวเซลล์ ความเหมือนกันของแหล่งจับ และการจับกันระหว่างเลคตินกับแหล่งจับบนผิวเซลล์ คอนคานาวาลิน เอ มีความจำเพาะต่อผิวเซลล์ตัวอสุจิของ *Drosophila melanogaster* เมื่อนำคอนคานาวาลิน เอ ไปติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate ทำให้สามารถศึกษาบริเวณอะโครโซม (acrosome) ซึ่งประกอบด้วยสายน้ำตาลแอลฟา-แมนโนส/แอลฟา-กลูโคสได้ (Perotti and Pasini, 1995) การใช้เลคตินซึ่งติดฉลากด้วย เอนไซม์ เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เมื่อเลคตินไปทำปฏิกิริยาบนผิวเซลล์ก็สามารถตรวจหาแหล่งจับของเลคตินบนผิวเซลล์ได้ โดยวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ สารสกัดเลคตินจากเมล็ดขนุนซึ่งทำให้เซลล์ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ เมื่อนำไปติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถใช้ศึกษาหาจำนวนแหล่งจับที่แตกต่างกันระหว่างตัวอสุจิทั้งสองชนิดได้ (Prapunpoj and Chulavatnatol, 1996) การใช้อนุพันธ์ต่างๆ ติดฉลากกับเลคตินเพื่อศึกษาแหล่งจับบนผิวเซลล์ ต้องคำนึงถึงขนาดโมเลกุลของเลคตินหลังการจับกับอนุพันธ์แล้วด้วย ซึ่งถ้ามีขนาดใหญ่เกินไปเลคตินอาจไม่สามารถเข้าจับกับแหล่งจับบนผิวเซลล์ได้ นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของเลคติน ความเข้มข้นของเซลล์ที่ศึกษา เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา pH ที่ใช้ หรือการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ ก็มีผลต่อการจับกันระหว่างเลคตินกับเซลล์ด้วย (Lis and Sharon, 1986)

1.3.4 การใช้ตรวจสอบหมู่เลือด

มีการใช้เลคตินตรวจสอบหมู่เลือดมาเป็นเวลานานแล้ว และยังคงนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน พบว่ามีเลคตินหลายชนิดมีความจำเพาะต่อหมู่เลือด A, B, O, M และ N และได้มีการนำเลคตินไปใช้ในการจำแนกชนิดหมู่เลือดที่ใช้ในธนาคารเลือด (Sharon and Lis, 1972) เลคตินจากไขปลาคา Ayu มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงคนหมู่ B ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ แต่ไม่มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงคนหมู่ A และ O (Sakakibara *et al.*, 1985) ตัวอย่างเลคตินที่จำเพาะต่อหมู่เลือด แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เลคตินบางชนิดที่มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงของคน
(Sharon and Lis, 1972)

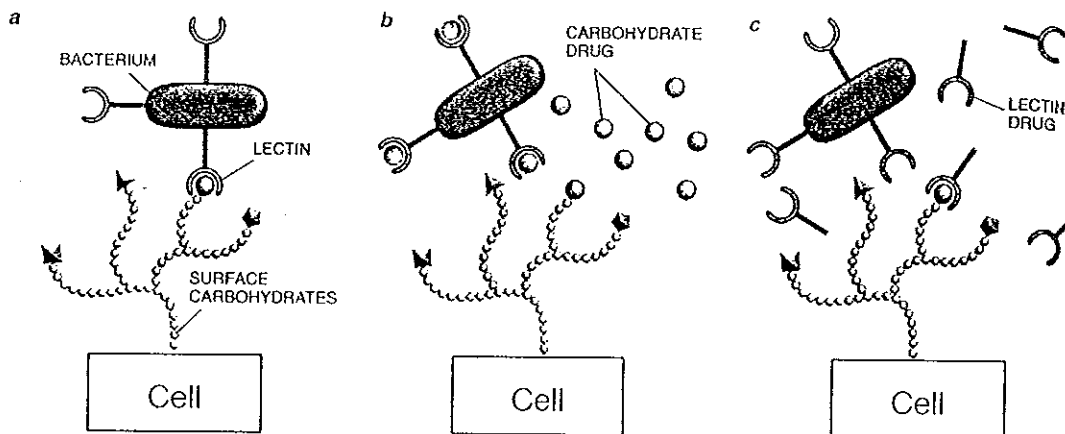
Blood group	Lectin
A	<i>Phaseolus limensis</i>
	<i>Vicia cracca</i>
	<i>Dolichos biflorus*</i>
	<i>Crotalaria aegyptiaca</i>
A + B	<i>Sophora japonica</i>
	<i>Calpurina aurea</i>
O (H)	<i>Cytisus sessilifolius</i>
	<i>Laburnum alpinum</i>
	<i>Lotus tetragonolobus</i>
	<i>Ulex europaeus</i>
M	<i>Iris amara</i>
N	<i>Vicia graminea</i>
	<i>Bauhinia purpurea</i>

* used in blood blank

1.3.5 การให้เลคตินเป็นตัวนำยาหรือสารเคมี

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก พบว่าการที่เม็ดเลือดขาวสามารถเคลื่อนไปยังตำแหน่งที่มีการอักเสบได้เนื่องจากมีตำแหน่งจับจำเพาะบนผิวเซลล์บุหลอดเลือด หรือจากการที่ไวรัสอินฟลูเอนซาซึ่งจำเพาะต่อน้ำตาล NANA บนผิวเซลล์เจ้าบ้านก่อให้เกิดการติดเชื้อ จึงมีการศึกษาเพื่อใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นยาในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียหรือป้องกันการอักเสบ (Karlsson, 1991) การที่แบคทีเรียเข้าจับเซลล์เจ้าบ้านเพื่อก่อให้เกิดการติดเชื้อ แบคทีเรียใช้เลคตินซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ในการจับกับน้ำตาลบนผิวเซลล์เจ้าบ้านที่มีความจำเพาะ เมื่อใช้ยาที่มีคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกับน้ำตาลบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน หรือยาที่มีแหล่งจับเช่นเดียวกับเลคตินบนผิวเซลล์แบคทีเรียก็สามารถยับยั้งการจับของแบคทีเรียต่อเซลล์เจ้าบ้านเป็นการป้องกันหรือรักษาการติดเชื้อได้ ดังแสดงในรูปที่ 3 (Sharon and Lis, 1993) เลคติน

บางชนิดมีความสามารถในการเข้าจับเซลล์ที่เจริญผิดปกติได้ จึงมีการใช้เลคตินเป็นตัวนำยาหรือสารเคมีเข้าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ เช่นการใช้คอนคานาวัลลิน เอ ยึดติดกับยาต่อต้านเซลล์เนื้องอก พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้ดีกว่าการใช้ยาอย่างเดียว โดยไม่มีเลคตินเป็นตัวนำยา (Kitao and Hattori, 1977)



รูปที่ 3 การใช้เลคตินเป็นตัวนำยาเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย

(Sharon and Lis, 1993)

1.4 เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ

จำปาตะ (Champaada) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus integer* Merr. อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ผลยืนต้นเช่นเดียวกับขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) (เต็ม สมิตินันท์, 2523) จำปาตะเป็นพืชที่ขึ้นได้ทั่วไป ผลจำปาตะมีลักษณะเรียวยาวและเรียบกว่าผลขนุน ประกอบด้วยเมล็ดจำปาตะที่มีลักษณะค่อนข้างกลมซึ่งสามารถรับประทานได้ทั้งส่วนของเนื้อและเมล็ดใน เมล็ดในของจำปาตะมีลักษณะกลม มีเปลือกนิ่มหุ้ม ถัดเข้าไปเป็นเปลือกสีน้ำตาลและเนื้อเมล็ดในสีเหลืองอ่อนมีลักษณะแข็ง พบจำปาตะได้ทั่วไปในเขตเอเชียใต้ สำหรับประเทศไทย จำปาตะนับได้ว่าเป็นพืชท้องถิ่นทางภาคใต้ของประเทศไทย (เปรมปรี ฌ สงขลา, 2540; อนุจิต พลบูรณ์การ และ อรุณพร อธิรัตน์, 2534) ที่พบได้ทั่วไปและมีราคาไม่แพง

อุบล ตันสม (2541) ได้ทำการศึกษาเลคตินจากเมล็ดจำปาตะพบว่า สารสกัดเลคตินมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูง เมื่อทำการแยกสารสกัดเลคตินให้

บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 ตามด้วยคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose แยกได้เลคตินบริสุทธิ์ 2 แยก ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) โดยโปรตีนแถบเข้มมีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน และโปรตีนแถบที่จางกว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อหาด้วยวิธีเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) เลคตินบริสุทธิ์ของเมล็ดจำปาตะประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ 1 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน และอีก 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดเท่ากันคือ หน่วยย่อยละ 14,000 ดัลตัน และไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างหน่วยย่อย เลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยกลูโคส 27 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และแมนโนส 23.4 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และมีกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) แอสปาร์เตท และกลูตาเมท อยู่เป็นจำนวนมาก มีซิสเตอีนน้อยที่สุดเพียง 0.1% ของกรดอะมิโนทั้งหมด

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีกว่าของหนูและของคน การย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซิน หรือนิวรามิเนส มีผลทำให้แอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ เลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีที่ pH 6-10 และมีความเสถียรที่ pH 6-10, แต่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินบริสุทธิ์ทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ เลคตินบริสุทธิ์ของจำปาตะมีความจำเพาะต่อน้ำตาล GalNAc และกาแลคโตส และจับได้ดีกับน้ำตาลเมธิล-ดี-กาแลคโตไซด์ (methyl-D-galactoside) ในรูปแบบแอลฟา แต่ไม่จับกับรูปแบบเบตา เลคตินนี้ไม่ต้องการ Ca^{2+} , Mn^{2+} หรือ Mg^{2+} ในการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงกระต่าย ยังพบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA ของคน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG ของคนและ BSA (bovine serum albumin) ใน gel double diffusion

จากการที่เมล็ดจำปาตะเป็นพืชท้องถิ่นทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีจำนวนมาก ราคาไม่แพง และมีปริมาณเลคตินเป็นจำนวนมาก ประกอบกับการทำให้เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำได้ไม่ยากและผลิตได้ปริมาณมาก วิทยานิพนธ์นี้จึงได้สนใจที่จะนำเลคตินของเมล็ดจำปาตะไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการศึกษาผิวเซลล์ตัวอย่างและพัฒนาวิธีการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลให้มีความไวมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะ
2. เพื่อเตรียมเลคตินคอกเทลจากเลคตินบริสุทธิ์และใช้ศึกษาผิวเซลล์ตัวอย่าง
3. เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินโดยใช้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะเป็นแบบจำลอง

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

เมล็ดจำปาคะ

เมล็ดจำปาคะที่ใช้ศึกษาเป็นพันธุ์พื้นเมือง ชื้อจากเกาะยอ จังหวัดสงขลา

สัตว์ทดลอง

กระต่ายที่ใช้ศึกษาเมล็ดเลือดแดงเป็นกระต่ายขาว น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน หนูตัวผู้ที่ใช้ศึกษาตัวอสุจิ น้ำหนัก 250-300 กรัม อายุ 2 เดือน สัตว์เหล่านี้เลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ชื้อจากบริษัทต่างๆ ดังนี้

จากบริษัท Ajax Chemicals ได้แก่ Citric acid

จากบริษัท Difco Laboratories ได้แก่ Heparin

จากบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.P.A. ได้แก่ Ammonium persulphate, N,N'-Dimethylformamide และ Sodium sulphite

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Ammonium sulphate, 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediaminetetraacetic acid, Glycine, Sodium (meta)periodate และ Sodiumborohydride

จากบริษัท Merck ได้แก่ Acetic acid, Acrylamide, Bromophenol blue, Bisacrylamide (N,N'-methylene diacrylamide), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, β -Mercaptoethanol และ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ Standard protein markers

จากบริษัท Sigma Chemical Co. ได้แก่ Amido black B, 3-Amino-9-ethyl carbazole, Bovine serum albumin, Biotinhydrazide, 3,3'-Diaminobenzidine, Dithiothreitol, Galactose, Glycerol, N-Acetyl galactosamine-agarose, o-Dianisidine, o-Phenylenediamine, Peroxidase, Sodium dodecyl sulphate, Sephadex G-200, Streptavidin, Streptavidin-peroxidase conjugate, Tris(hydroxymethyl)amino-methane และ Triton X-100

อุปกรณ์

Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6, Refrigerated super speed centrifuge ของ Beckman รุ่น J2-21, ELISA plate reader รุ่น ELx808 ของ Bio-Tek Instruments, Inc., Serofuge centrifuge ของ Clay Adams, UV-VIS spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A, Micropipette ของ Gilson และ Eppendoff, Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto, Automatic fraction collector ของ Gilson รุ่น 202, Microtube pump MP-3 ของ Eyla, Vortex ของ Scientific Industries, Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500, pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen, Nunc-Immuno[™] plate maxisorp surface ของ Nunc

วิธีการ

2.1 การทำให้เลือดบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะ

2.1.1 การเตรียมสารสกัดเลือดจากเมล็ดจำปาตะ

ล้างเมล็ดจำปาตะด้วยน้ำจนสะอาด ปอกผิวเปลือกออก ปล่อยให้แห้งซึ่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดในโถปั่น (blender) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.9% NaCl (TBS) ด้วยอัตราส่วนเมล็ดจำปาตะ 1 กรัม ต่อ TBS 3 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปคนที 4^๐ซ นาน 2 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านผ้าก๊อช 8 ชั้น จากนั้นเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) สารละลายด้วยความเร็ว 2,000 x g นาน 15 นาที ที่ 4^๐ซ นำส่วนใสหรือสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium

sulphate) ที่ความเข้มข้น 80% คนที่ 4^๑ซ ค้างคืน ตะกอนที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 22,600 x g เป็นเวลา 30 นาที นำไปละลายด้วย TBS แล้วไดอะไลซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่ 4^๑ซ นาน 18 ชั่วโมง ทั้งตะกอนที่อาจเกิดขึ้นโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเท่าเดิมอีกครั้ง นำสารสกัดไลโซหรือสารสกัดเลคติน (lectin extract) ที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนและทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงตามข้อ 2.2 แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.1.2. การทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และคอลัมน์ N-Acetyl galactosamine-agarose

ปรับคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 X 100 เซนติเมตร, มีปริมาตรเจล 180 มิลลิลิตร) ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดเลคติน 65.5 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) และทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงของพีค (peak) แรก (พีค S1) เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose และไดอะไลซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose (1.5 X 10 เซนติเมตร, มีปริมาตรเจล 17.7 มิลลิลิตร) ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้มีอัตราไหล 4 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M กาแลคโตสใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 แล้วทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ไดอะไลซ์ แล้วไปทดสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินโดยวิธีโพสิทีฟอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสตามวิธีการข้อ 2.11

2.2 การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

ดูดเลือดจากกระต่ายผสมกับเฮพาริน (heparin) เพื่อกันเลือดแข็งตัว จากนั้นนำไป เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว $700 \times g$ ที่ $4^{\circ}C$ นาน 5 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS โดยการ เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 2 ครั้ง แขนงลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS ให้ได้ความเข้มข้น 2% นำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์ตามวิธีของ Kilpatrick and Yeoman (1978) โดยผสม สารละลายเลือดที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรกับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทที่ อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนสารละลายเลือด

ไตเตอร์ (titer) ของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายมีค่าเป็นค่าการเจือจางสูงสุด ของสารละลายเลือด ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์ แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของ ไตเตอร์ต่อปริมาตรสารละลายเลือดที่ใช้ 50 ไมโครลิตร แอคทิวิตีจำเพาะของการเกาะ กลุ่มเม็ดเลือดแดง (specific hemagglutinating activity) มีค่าเป็นแอคทิวิตีของการเกาะ กลุ่มเม็ดเลือดแดงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.3 การทดสอบการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู

2.3.1 การเตรียมตัวอสุจิหนู

ตัวอสุจิที่ใช้ในการศึกษาคือตัวอสุจียังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งได้จากอภิตีโดมิส ส่วนต้น และตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ได้จากอภิตีโดมิสส่วนปลาย ตัดอภิตีโดมิสจากตัวหนู เลาะไขมันออกให้หมด ล้างอภิตีโดมิสให้สะอาดจากเลือดด้วย TBS ตัดอภิตีโดมิสส่วนต้น และส่วนปลายแยกออกจากกัน เจาะตัวอสุจิออกจากอภิตีโดมิสแต่ละส่วนโดยแทงด้วยเข็ม ขนาดเล็กใน TBS จำนวนน้อย ๆ ล้างอสุจิด้วย TBS 3 ครั้ง โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว $2000 \times g$ ที่ $4^{\circ}C$ นานครั้งละ 2 นาที จากนั้นแขวนลอยตัวอสุจิใน TBS นับจำนวนตัวอสุจิ และทำให้เจือจางจนได้ 40×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (กนกนาก ชูปัญญา, 2520) แล้วนำตัวอสุจิ ไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยสารละลายเลือดคนบริสุทธิ์ต่อไป

2.3.2 การทดสอบการเกาะกลุ่มตัวอสุจิ

ผสมสารละลายเลือดที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับเซลล์ตัวอสุจิจากข้อ 2.3.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 นาที

หยุดสารผสมลงบนแผ่นสไลด์ (slide) สังเกตการเกาะกลุ่มของเซลล์ตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ TBS แทนสารละลายเลคติน โดยให้คะแนนการเกาะกลุ่มเซลล์ตั้งแต่ 0-4 ดังนี้

คะแนน 0 คือ	ไม่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือมีน้อยกว่า 5	เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 1 คือ	กลุ่มขนาดเล็กมีการเกาะกลุ่ม	5-10 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 2 คือ	กลุ่มขนาดกลางมีการเกาะกลุ่ม	11-25 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 3 คือ	กลุ่มขนาดใหญ่มีการเกาะกลุ่ม	26-35 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 4 คือ	กลุ่มขนาดใหญ่มีการเกาะกลุ่มมากกว่า	36 เซลล์ต่อกลุ่ม

หาค่าไตเตอร์หรือค่าการเจือจางสารละลายเลคตินมากที่สุดที่ยังให้ผลการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยคะแนน 1 แอคติวิตีของการเกาะกลุ่มตัวอสุจิมีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์และแอคติวิตีจำเพาะของการเกาะกลุ่มตัวอสุจิเป็นแอคติวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.4 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

2.4.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส ตามวิธีของ Laemmli (1970) หลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐานและของแถบสีโบรโมเฟีนอลบลู (bromophenol blue) แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมเฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง \log น้ำหนักโมเลกุล กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสารตัวอย่างได้ โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ที่ใช้ได้แก่ ฟอสฟอริเลส บี (phosphorylase b, M, 94,000), BSA

(M_r 67,000), โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, M_r 30,000), ซอยบีนทรูปซินลินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, M_r 20,000) และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,000)

2.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 1.6 x 100 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเติมเลคตินบริสุทธิ์, K₂Cr₂O₇ (M_r 294), บลูเด็กซ์แทรน (blue dextran, M_r 2,000,000) และโปรตีนมาตรฐาน ลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A₂₈₀ แล้ววัดปริมาตรชะ (elution volume, V_e) ของแต่ละโปรตีน หาปริมาตรทั้งหมด (total volume, V_t) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของ K₂Cr₂O₇ ซึ่งได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือ void volume (V_o) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แทรน ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า distribution coefficient (K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$$

จากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ได้ โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ คาทาเลส (catalase, M_r 232,000), BSA (M_r 67,000), โอวัลบูมิน (M_r 43,000), ไคโมทริปซินอเจนเอ (chymotrypsinogen A, M_r 25,000) และ ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, M_r 13,700)

2.5 การเตรียมเลคตินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกต (Lectin peroxidase conjugate, LPC)

เตรียมเลคตินเปอร์ออกซิเดสคอนจูเกตซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้จะเรียกเลคตินเปอร์ออกซิเดส โดยยัดเลคตินบริสุทธิ์ให้ติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามวิธีของ O'Sullivan and Marks (1981) ดังนี้ ละลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 5 มิลลิกรัม ใน 0.3 M sodium bicarbonate, pH 8.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตัดส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์

ออกด้วย 1% dinitrofluorobenzene ในเอธานอล (ethanol) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.06 M NaIO_4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วเติม 0.06 M glycerol คนที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดอะไลซ์ที่ 4°C ด้วย 0.01 M sodium carbonate, pH 9.5 นำสารละลายที่ได้ 3 มิลลิลิตร ไปเติมเลคตินบรียูทรี 5 มิลลิกรัม คนให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเติม NaBH_4 5 มิลลิกรัม เก็บไว้ที่ 4°C นาน 3 ชั่วโมง และไดอะไลซ์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 กำจัดตะกอนโดยการเซนตริฟิวจ์ แล้วแยกเลคตินเปอร์ออกซิเดสให้บรียูทรีโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-200 (1.3 X 50 เซนติเมตร, มีปริมาตรเจล 61 มิลลิลิตร) ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (A403) รวมทั้งทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายและวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามวิธีการข้อ 2.6.2 รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์และมีแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose แล้วไดอะไลซ์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5

2.6 การศึกษาสมบัติของเลคตินเปอร์ออกซิเดส

2.6.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดสโดยวิธี

เจลฟิลเทรชัน

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดส ทำโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 1.3 x 50 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเติมเลคตินเปอร์ออกซิเดส, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, บลูเด็กซ์แตรน และโปรตีนมาตรฐาน ลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 สะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างตามวิธีการเดียวกับข้อ 2.4.2 โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ คาทาเลส, BSA, โอวัลบูมิน, ไคโมทริปซินเจนเอ และไรโบนิวคลีเอส

2.6.2 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส วัดได้โดยใช้ 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.4 ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร และ 10 mM o-dianisidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเลคตินเปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 0.1 M H₂O₂ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (A460) ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 2 นาที นำค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อเวลาที่มาคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยคำนวณจากค่าคงที่เฉพาะของสารที่ความยาวคลื่นที่กำหนด (extinction coefficient) ของ o-dianisidine ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.3 mM⁻¹cm⁻¹ ซึ่ง 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส หมายถึง เอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ (oxidise) 1 ไมโครโมล (μmole) ของ o-dianisidine ในเวลา 1 นาที (Saeki *et al.*, 1986)

2.7 การย้อมผิวเซลล์โดยเลคตินเปอร์ออกซิเดส

2.7.1 เซลล์ตัวอสุจิ

ศึกษาผิวเซลล์ของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งได้จากอพิติโดมิสส่วนต้น และตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ได้จากอพิติโดมิสส่วนปลายของหนู ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.3.1 ด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส โดยการนำสารแขวนลอยตัวอสุจิปริมาตร 10 ไมโครลิตร สเมียร์ (smear) บนแผ่นสไลด์ให้ได้พื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ตั้งไว้ให้แห้ง แล้วแช่สไลด์ใน 0.5% periodate-treated BSA (ดูภาคผนวก) นาน 30 นาที ย้อมเซลล์ด้วย 50 ไมโครกรัม เลคตินเปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นาน 30 นาที ที่ 4°C แล้วล้างสไลด์ด้วย 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 -0.9% NaCl (PBS) 3 ครั้ง จากนั้นย้อมในสารละลายที่มี 3-amino-9-ethylcarbazole 2 มิลลิกรัมใน N,N' dimethylformamide (DMSO) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 0.05 M acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติม 3% H₂O₂ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์ไปปิดด้วย coverslip ขนาด 22 x 22 มิลลิเมตร ซึ่งมีสารผสม PBS : glycerol (1:1) เป็นตัวยึด (Prapunpuj and Chulavatnalol, 1996) จากนั้นตรวจสอบการติดสีบนผิวเซลล์ของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกัน

2.7.2 เซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

การศึกษาผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ได้มาจากนำเลือดที่เจาะจากเส้นเลือดดำปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ให้ได้เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ลงบนปลายแผ่นสไลด์ด้านหนึ่ง นำสไลด์อีกแผ่นซึ่งมีขอบเรียบใช้สำหรับเป็นสไลด์ตัวไกล (spreader) และหยดเลือดให้กระจายตัวเต็มสไลด์ตัวไกล เอียงสไลด์ตัวไกลให้ทำมุมประมาณ 30-45 องศา แล้วไถเลือดไปทางด้านหน้าด้วยความเร็วสม่ำเสมอไปจนสุดสไลด์ ปล่อยให้เลือดที่สเมียร์แล้วไว้ให้แห้ง ตรึงในเมธานอล (methanol) เตรียมเลือดตัวอย่างอย่างละ 2 แผ่น แผ่นแรกนำไปย้อมสีไรท์ (Wright's stain) (ดูภาคผนวก) โดยหยดสีจนท่วมสไลด์ ทั้งไว้ 2-3 นาที แล้วจึงหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ปริมาตรเท่ากับสีให้เต็มพอดี เป่าเบาๆ ด้วยลูกยางเพื่อผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 4-5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แห้ง (ไพเกษม แสนยานุสิน, 2533) นำสไลด์แผ่นที่ 2 ไปย้อมด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส ตามวิธีการทำนองเดียวกับข้อ 2.7.1 จากนั้นตรวจสอบการติดสีบนผิวเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 2 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกัน

2.8 การทำปฏิกิริยาของเลคตินเปอร์ออกซิเดส

2.8.1 การศึกษาไกลโคโปรตีนในเมมเบรนของตัวอสุจิ

ทำการสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์และไม่เจริญพันธุ์ของหนู โดยการบ่มตัวอสุจิแต่ละชนิด (10^8 เซลล์) แยกกันใน 25 mM Tris-HCl, pH 9.0 ที่มี 0.1% Triton X-100, 0.1 M NaCl และ 2 mM dithiothreitol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ส่วนไลต์ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว $22,600 \times g$ นาน 15 นาที นำไปแยกต่อโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ตามวิธีของ Towbin *et al.* (1979) โดยการทำใน Towbin buffer (ดูภาคผนวก) และใช้กระแสไฟ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้อมแถบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส ที่มีสารละลาย 3,3'-diaminobenzidine 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 โดยเติม 0.005% H_2O_2 เป็นการเริ่มปฏิกิริยา เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่จับจำเพาะกับเลคตินเปอร์ออกซิเดสระหว่างเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด

จากการทดลองนี้สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนซึ่งจับจำเพาะกับเลคตินเปอร้ออกซิเดส ที่แตกต่างกันระหว่างเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ได้โดยทำการทดลองจนถ่ายให้เหมือนกัน 2 ส่วน แล้วนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสส่วนหนึ่งไปย้อมด้วยเลคตินเปอร้ออกซิเดส ตามวิธีการที่กล่าวมา อีกส่วนนำไปย้อมแถบโปรตีนด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (amido black B) (ดูภาคผนวก) แล้วเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่แตกต่างกันกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

2.8.2 การวิเคราะห์การจับเชิงปริมาณระหว่างเลคตินเปอร้ออกซิเดสและตัวอสุจิ

ทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการจับระหว่างตัวอสุจิกับเลคตินเปอร้ออกซิเดส ดังนี้ ตกตะกอนตัวอสุจิจากสารแขวนลอยตัวอสุจิจากข้อ 2.3.1 โดยการเซนตริฟิวจ์ตะกอนที่ได้ (1.2×10^6 เซลล์) ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 0.5% periodate-treated BSA นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแยก BSA ออกโดยการเซนตริฟิวจ์ แล้วเติมเลคตินเปอร้ออกซิเดส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีปริมาณเลคตินเปอร้ออกซิเดสต่างกันในช่วง 0 - 2 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้การจับสมบูรณ์ แล้วแยกตัวอสุจิออกจากเลคตินเปอร้ออกซิเดสอิสระโดยการปั่นล้างตะกอนด้วย PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที ที่ความเร็ว $2000 \times g$ ตะกอนที่ได้นำไปวิเคราะห์หาแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส ตามวิธีในข้อ 2.9.2 แล้วปั่นแยกตัวอสุจิออก ถ่ายส่วนใสใส่ในไมโครไตเตอร์เพลท นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณเลคตินเปอร้ออกซิเดสที่จับกับตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด โดยมีหน่วยเป็นปริมาณเลคตินเปอร้ออกซิเดส/เซลล์ตัวอสุจิเปรียบเทียบกัน โดยวิธี Scatchard plot (Scatchard, 1949)

2.8.3 การทำปฏิกิริยาของเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับอิมมูโนโกลบูลิน

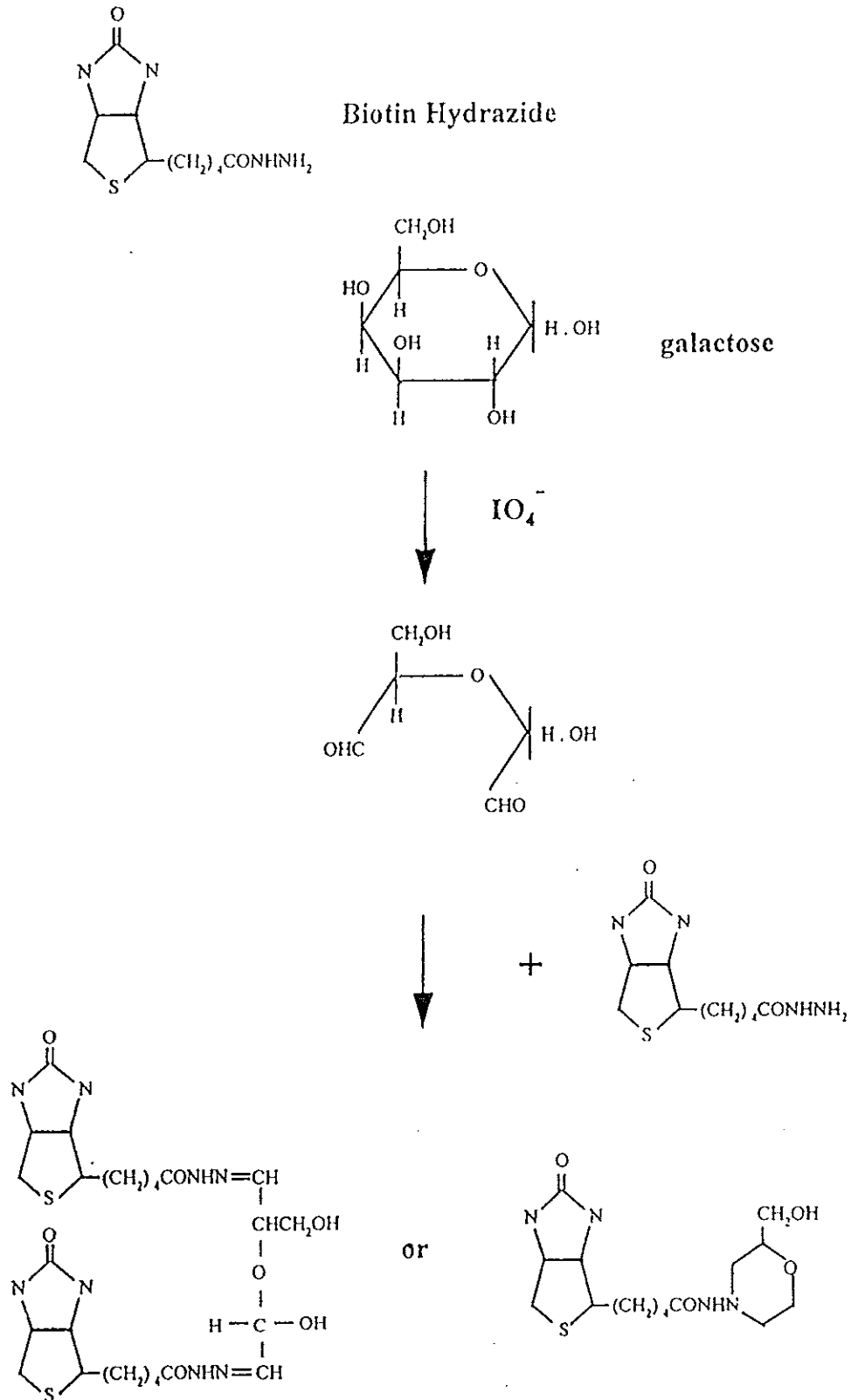
ทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งได้แก่ IgG หรือ IgA โดยการนำ IgG และ IgA อย่างละ 15 ไมโครกรัม ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลีกโทรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส แล้วขนถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสและทำการทดลองต่อตามข้อ 2.8.1

2.9 การวิเคราะห์สมบัติการจับจำเพาะต่อน้ำตาลโดยเลคตินเปอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาของอุบล ตันสม (2541) พบว่าน้ำตาลกาแลคโตสที่ความเข้มข้น 25 mM ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบรียูสที่เตรียมจากเมล็ดจำปาตะได้ 100% บ่งชี้ว่าเลคตินจากเมล็ดจำปาตะมีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตส เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินบรียูสโดยวิธี binding assay ให้มีความไวมากกว่าการทดสอบโดยการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง ดังไว้ในงานวิทยานิพนธ์ของอุบล ตันสม (2541) จึงได้ดัดแปลงวิธีของ Shao (1992) และ Wetprasit และ Chulavatnatol (1997) ดังนี้

2.9.1 การเตรียมไบโอตินกาแลคโตสคอนจูเกต (Biotin galactose conjugate)

เตรียมไบโอตินกาแลคโตสคอนจูเกตหรือไบโอตินกาแลคโตส (biotin galactose , BG) (รูปที่ 4) โดยละลายกาแลคโตสให้มีความเข้มข้นเป็น 25 mM ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ออกซิไดซ์กาแลคโตสในที่มีดด้วย 10 mM sodium (meta) periodate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 0°C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 80 mM sodium sulphite ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 20 mM ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม biotin hydrazide ความเข้มข้น 15 mM ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าตลอดเวลา นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-10 (1.0 x 60 เซนติเมตร, มีปริมาตรเจล 44 มิลลิลิตร) โดยใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 เป็นตัวชะ นำสารละลายแต่ละหลอดที่แยกได้ไปหาปริมาณน้ำตาลโดยวิธี phenol-sulphuric acid (Dubois *et al.*, 1956) โดยนำสารละลายแต่ละหลอดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% ฟีนอล 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (H₂SO₄) เข้มข้น 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร โดยใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน รวมสารละลายหลอดที่มีปริมาณน้ำตาลสูงเข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6°C เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 2.9.2 และ 2.9.3 และนำส่วนหนึ่งไปหาน้ำหนักโมเลกุลของไบโอตินกาแลคโตส โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-10 ขนาด 1.0 x 60 เซนติเมตร ปรับให้สมดุลย์ก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเติมไบโอตินกาแลคโตส, Na₂ATP (M_r 551), K₂Cr₂O₇ (M_r 294) และน้ำตาลกาแลคโตส (M_r 180) ลงใน



รูปที่ 4 การเตรียมไบโอตินกาแลคโตสคอนจูเกต

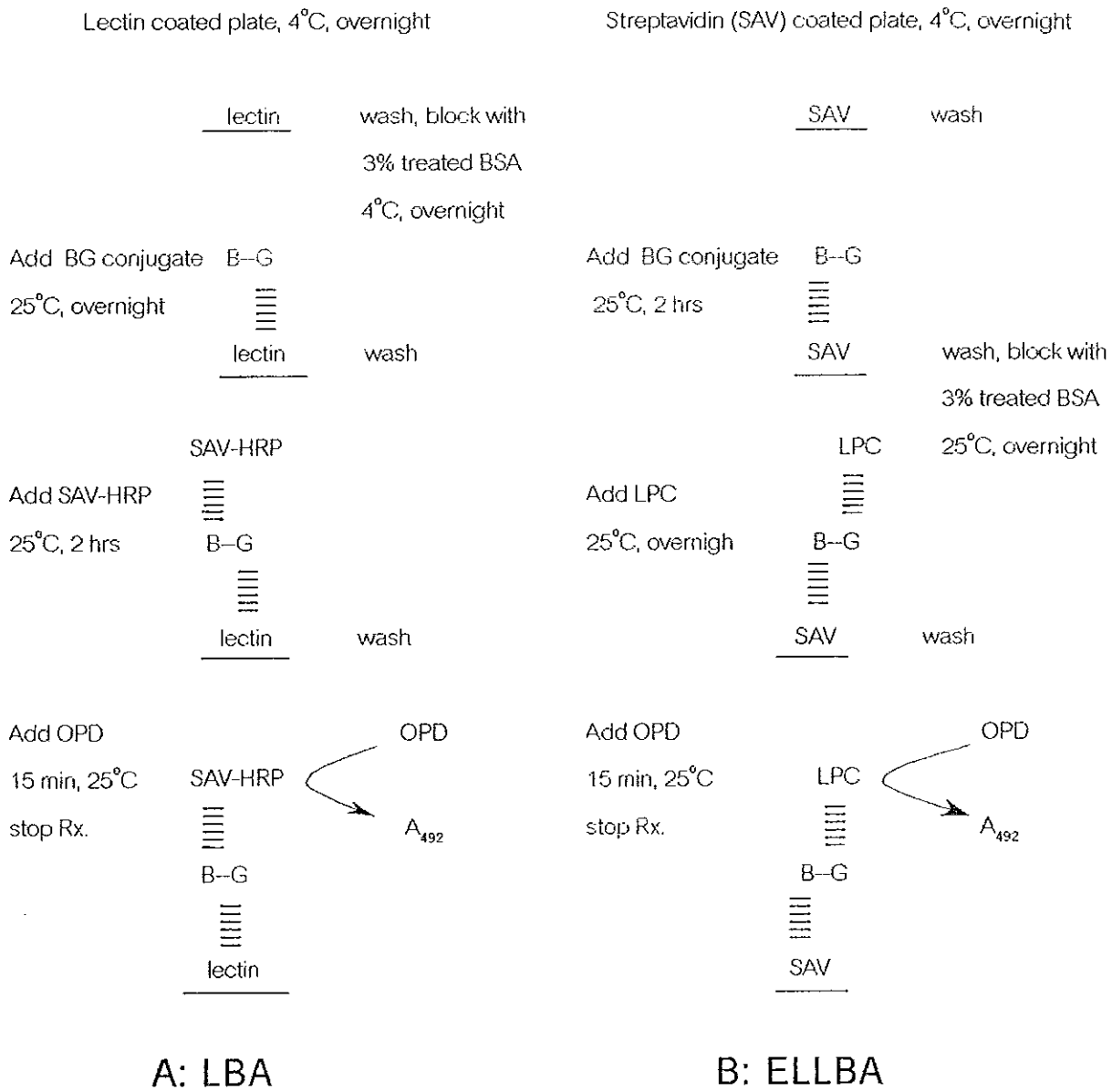
คอลัมน์ ซะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลาย หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดที่แยกได้ไปหาปริมาณน้ำตาลตามวิธีที่กล่าวข้างต้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Na_2ATP และ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของไบโอตินกาแลคโตสตามวิธีการเดียวกับข้อ 2.4.2

2.9.2 การทดสอบความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธี

Lectin Binding Assay (LBA)

ในการทดสอบความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์ โดยวิธี LBA ดัดแปลงวิธีการของ Wetprasit และ Chulavatnatol (1997) ดังแสดงในรูปที่ 5A ทำโดยการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลท (แบบ immuno™ maxisorp) ด้วยเลคตินบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มล. ใน 50 mM sodium carbonate buffer, pH 9.6 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน ล้างเพลทด้วย 50 mM PBS, pH 7.5 ที่มี 0.05% Tween 20 2 ครั้ง จากนั้นเติม 3% treated-BSA (ดูภาคผนวก) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน แล้วเติมไบโอตินกาแลคโตสความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ค้างคืน ล้างเพลทอย่างรวดเร็วด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม 2 ครั้ง จากนั้นเติม streptavidin-peroxidase (SAV-HRP) ความเข้มข้น 300 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร ใน TBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หลังการล้าง SAV-HRP ส่วนเกินออกจากเพลทด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม 3 ครั้ง เติมสับสเตรทคือ o-phenylenediamine (OPD) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 50 mM citrate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยมี 0.012% H_2O_2 เป็นการเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีเวลานาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดย ELISA plate reader

ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดต่างๆ ของเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะ ทำการทดลองแบบ LBA แต่เติมน้ำตาลแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน พร้อมกับไบโอตินกาแลคโตสในขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแย่งจับระหว่างน้ำตาลอิสระแต่ละชนิดกับไบโอตินกาแลคโตสต่อเลคติน



รูปที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธี Lectin Binding Assay (A) และวิธี Enzyme-Linked Lectin Binding Assay (B)

2.9.3 การทดสอบความจำเพาะของเลคตินเปอรัออกซิเดสโดยวิธี

Enzyme-Linked Lectin Binding Assay (ELLBA)

เคลือบไมโครไตเตอร์เพลท (แบบ immuno™ maxisorp) ด้วย streptavidin (SAV) 300 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน ล้างเพลท ด้วย 50 mM PBS, pH 7.5 ที่มี 0.05% Tween 20 2 ครั้ง จากนั้นเติมไบโอตินกาแลคโตส ความเข้มข้น 0.15 mM ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างเพลท ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นเติม 3% treated-BSA ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 4°C ค้างคืน ล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม 2 ครั้ง จากนั้นเติมเลคตินเปอรั ออกซิเดสความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ค้างคืน (รูปที่ 5B) หลังการล้างเลคตินเปอรัออกซิเดสส่วนเกินออกจากเพลทด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เติมซับสเตรท OPD ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยมี 0.012% H₂O₂ เป็นการเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดย ELISA plate reader

ในการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดต่างๆ ทำโดยการเติมน้ำตาลแต่ละ ชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน พร้อมกับเลคตินเปอรัออกซิเดสในขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแย่งจับระหว่างน้ำตาลอิสระแต่ละชนิดกับไบโอตินกาแลคโตสต่อ เลคตินเปอรัออกซิเดส

2.10 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยผสมสาร ตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na₂CO₃ ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% Cu₂SO₄ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-เฟินอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมตั้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสาร ตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่มี BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.11 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

2.11.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

โพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	18% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.60 ml	1.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 μ l	30 μ l	30 μ l
10% SDS	50 μ l	30 μ l	30 μ l
10% Ammonium persulphate	50 μ l	30 μ l	30 μ l
TEMED	5 μ l	3 μ l	3 μ l
น้ำกลั่น	3.10 ml	1.56 ml	0.36 ml

2.11.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

ในการเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 8 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 4% SDS (sodium dodecyl sulphate), 4% เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) และ 0.4% โบรโมไฟโนลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีการเดียวกัน ก่อนการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ไปต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที

2.11.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-1% SDS, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรมิเฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.11.4 การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วยสีค้อมาซีบลู (Coomassie blue) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.02% ค้อมาซีบลู- 50% เมทานอล -7.5% กรดน้ำส้ม นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 50% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

3. ผลการทดลอง

3.1 การทำให้เลือดดินบริสุทธิ์จากสารสกัดเมล็ดจำปาอะโดยคอลัมน์

Sephadex G-200 และ N-Acetyl galactosamine-agarose

3.1.1 การสกัดเลือดดินจากเมล็ดจำปาอะ

ในการสกัดเลือดดินจากเมล็ดจำปาอะน้ำหนัก 4 กรัม 3 การทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 4,915,218 หน่วย และ 35,437 หน่วย/มก.โปรตีน และมีปริมาณโปรตีน 138.7 มิลลิกรัม ดังแสดงผลในตารางที่ 4 เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนและเลือดดินจากสารสกัดหยาบ ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% พบว่าสารสกัดเลือดดินที่ได้มีปริมาณโปรตีน 65.5 มิลลิกรัม คิดเป็น 47.2% ของสารสกัดหยาบ และมีแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เป็น 64,535 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 4)

3.1.2 การแยกโดยคอลัมน์ Sephadex G-200

ในการแยกสารสกัดเลือดดิน 65.5 มิลลิกรัม ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 โดยชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค คือ พีค S1 และพีค S2 ตามลำดับ (รูปที่ 6) ซึ่งมีแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 102,560 และ 106 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เป็น 2.9 และ 0.003 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้นตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4 จากนั้นรวมสารละลายของพีค S1 ซึ่งมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose

3.1.3 การแยกโดยคอลัมน์ N-Acetyl galactosamine-agarose

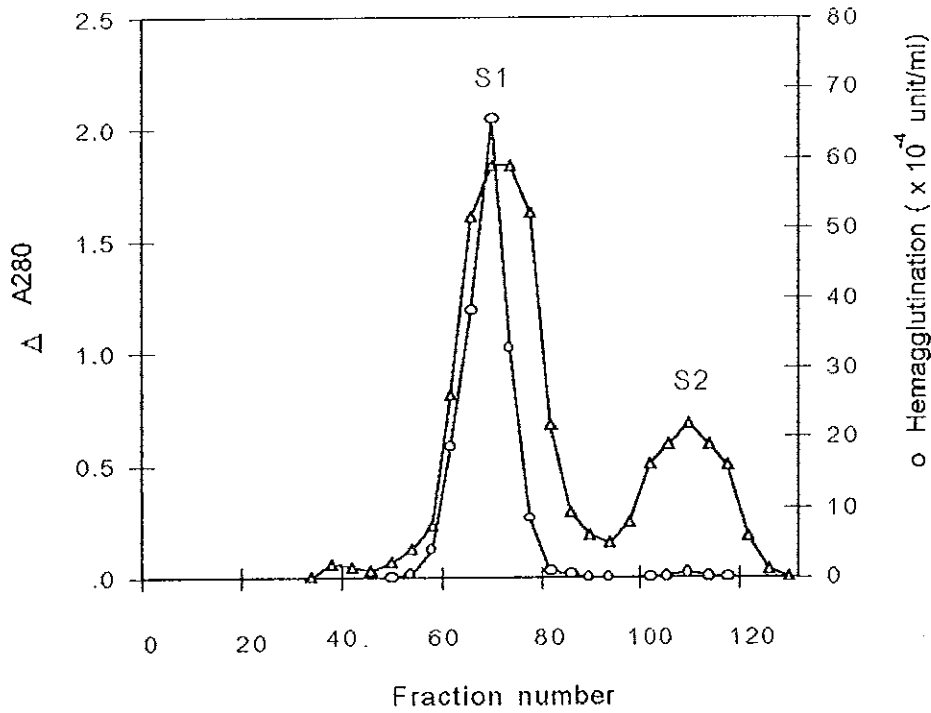
จากการผ่านสารละลายเลือดดินพีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณ 28.2 มิลลิกรัม (จากข้อ 3.1.2) ลงในคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (พีค GalA1) ซึ่งไม่มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 0.1 M กาแลคโตสโนบิฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีน (12.9 มิลลิกรัม)

ตารางที่ 4 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเมล็ดจำปาอะ

Sample	Protein		Hemagglutination			Purification
	mg	%	unit	%	unit/mg	fold
Crude extract	138.7	100.0	4,915,218	100.0	35,437	1.0
Lectin extract	65.5	47.2	4,227,087	86.0	64,535	1.8
Sephadex G- 200 eluate peak S1	28.2	20.3	2,892,192	58.8	102,560	2.9
N-Acetyl galactosamine- agarose eluate peak GalA2	12.9	9.2	2,523,627	51.3	195,630	5.5

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

unit/ mg = unit/mg protein



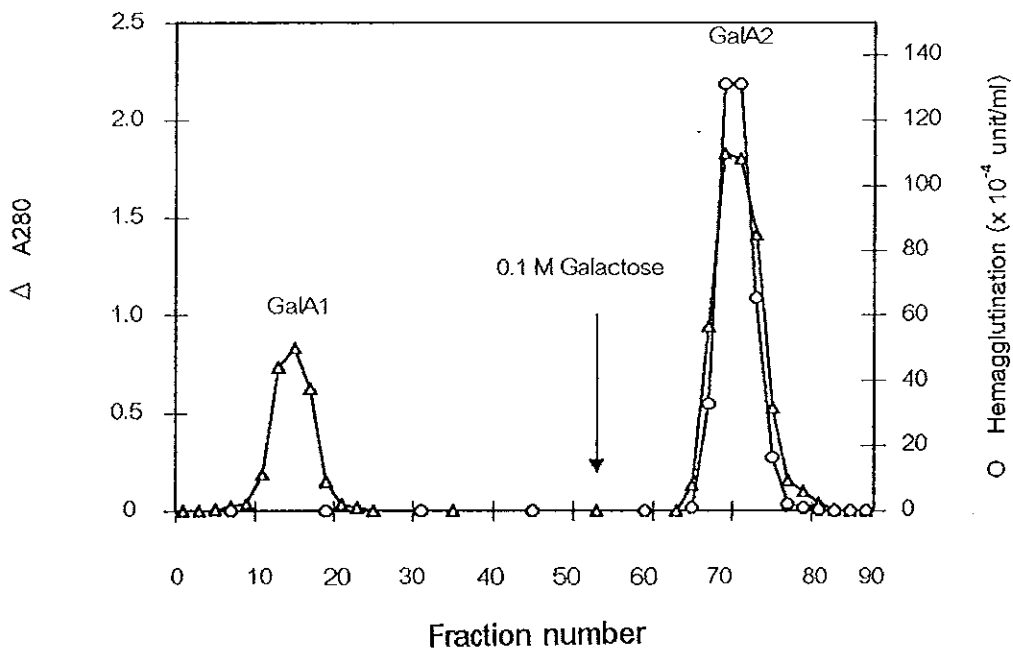
รูปที่ 6 การแยกเลคตินจากสารสกัดเมล็ดจำปาดะโดยคอลัมน์ Sephadex G-200
 นำสารสกัดเลคติน 65.5 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-200
 (1.6×100 เซนติเมตร) ที่ 4°C ใช้น้ำบัฟเฟอร์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บสารละลาย
 หลอดละ 1 มิลลิลิตร

ถูกชะออกมาอีก 1 พีค คือพีค GalA2 ซึ่งมีแอกทิวทิซของการเกาะกลุ่มเซลล์ 2,523,627 หน่วย และ 195,630 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 51.3% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.5 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้นตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4 และรูปที่ 7

3.2 สมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

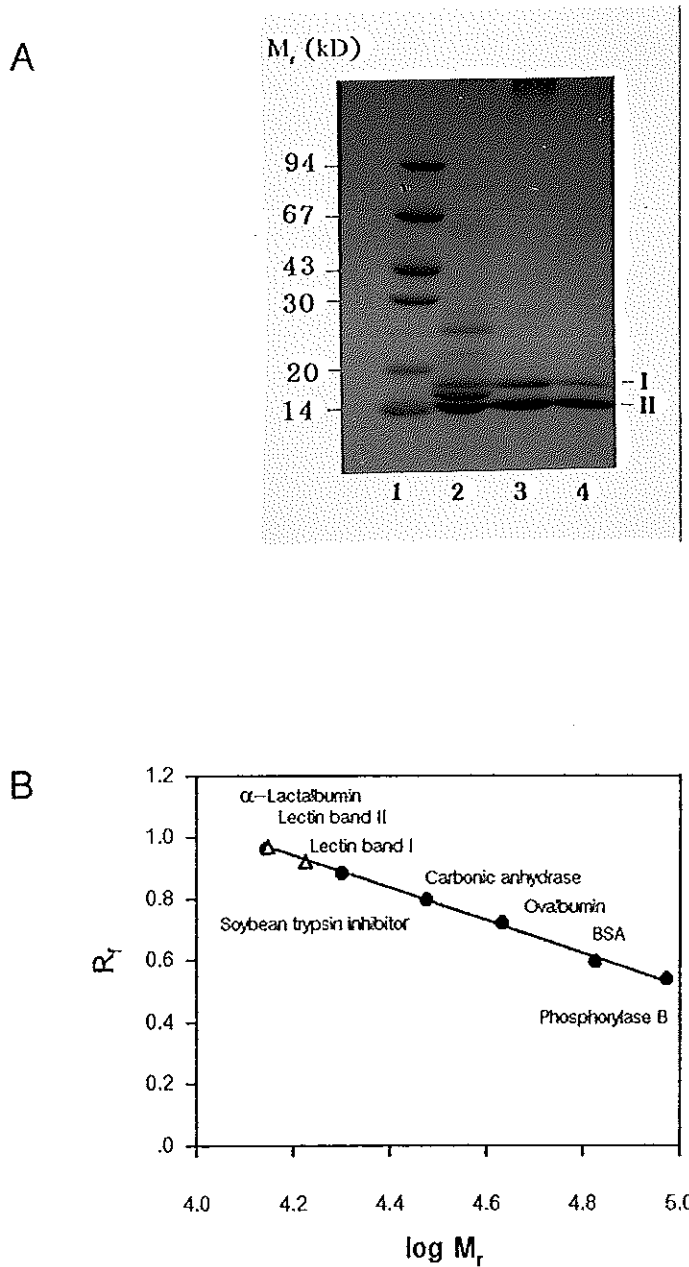
เมื่อติดตามการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ ซึ่งตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% แล้วแยกต่อกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 และคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose ตามลำดับ โดยการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส พบว่าขั้นตอนต่าง ๆ ที่ใช้ได้กำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปจนเหลือเฉพาะเลคตินในสารละลายเลคตินพีค GalA2 ซึ่งปรากฏแถบโปรตีนเพียง 2 แถบ (รูปที่ 8A) และเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ทั้ง 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส โดยเปรียบเทียบกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคตินทั้ง 2 แถบกับของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 8B พบว่าเลคตินแถบที่ I มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน เลคตินแถบที่ II มีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 8 เลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อนำโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (ตามวิธีในข้อ 2.6.1) ซึ่งได้แสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 9 จากงานวิทยานิพนธ์ของอุบล ตันสม (2541) ได้พิสูจน์แล้วว่าสารละลายเลคตินพีค GalA2 เป็นเลคตินบริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อนำโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน และประกอบด้วยแถบโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบเท่ากับที่รายงานในงานวิทยานิพนธ์นี้

เมื่อนำเลคตินบริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู ทั้งตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์และตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ได้ดีกว่าตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ โดยสามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ได้ 946 หน่วย/มก.โปรตีน และเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ได้ 573 หน่วย/มก.โปรตีน ในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิของหนูทั้ง 2 ชนิด โดยเลคตินบริสุทธิ์เกิดจากการที่ส่วนหัวของตัวอสุจิมาเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อนดังแสดงผลในรูปที่ 10



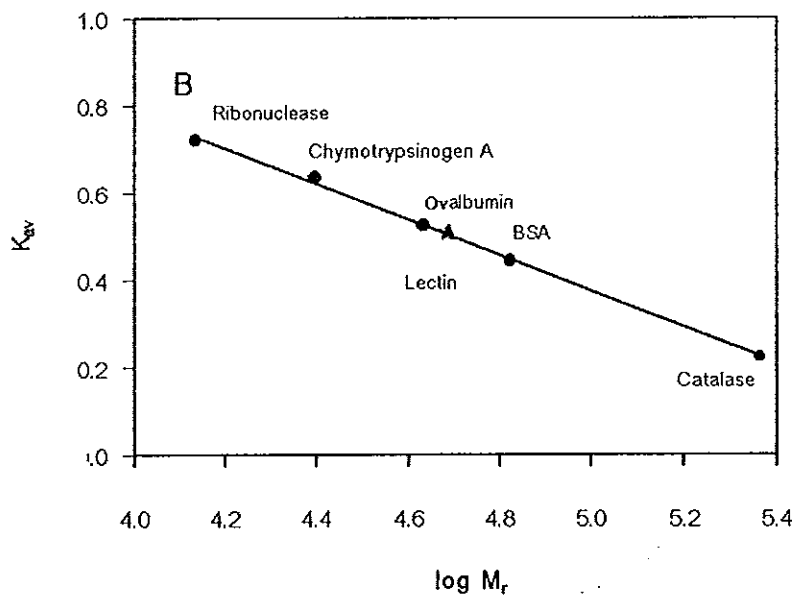
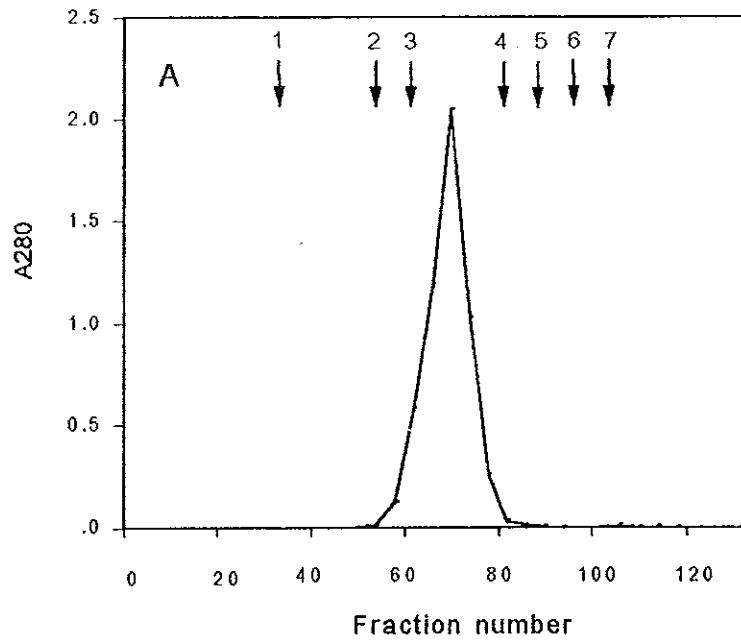
รูปที่ 7 การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ N-Acetyl galactosamine-agarose

รวมสารละลายเลคตินพีค S1 28.2 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 มาผ่านลงในคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose ขนาดคอลัมน์ ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราไหล 4 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย 0.1 M กาแลคโตสอินบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร



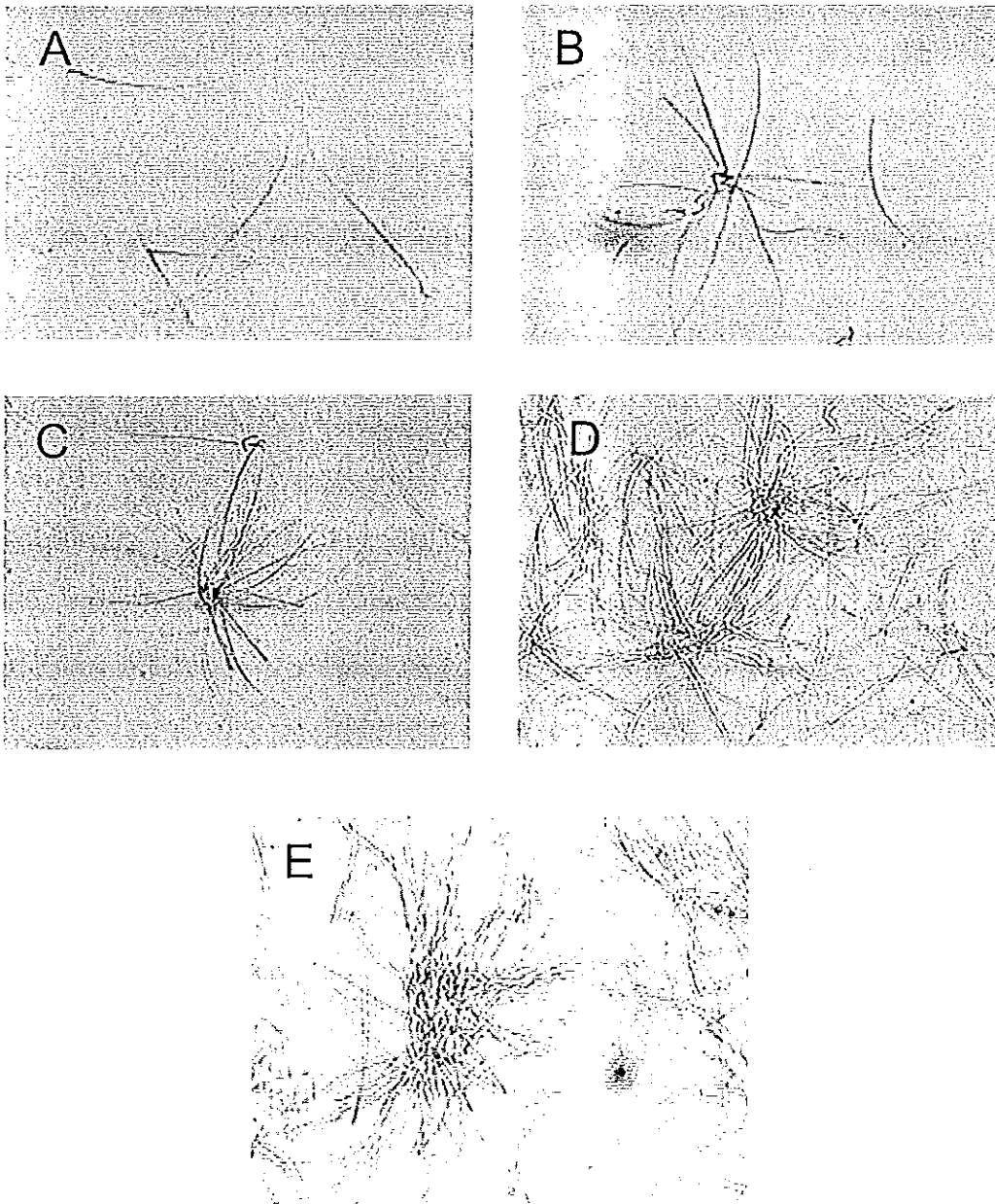
รูปที่ 8 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสของเลคตินบริสุทธิ์ (A) และกราฟมาตรฐานของการหาค่า R_f ของโมเลกุล (B)

A แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2 สารสกัดเลคติน
 แถวที่ 3 เลคตินพีค S1 แถวที่ 4 เลคตินพีค GalA2
 ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวอยู่ในช่วง 15-20 ไมโครกรัม



รูปที่ 9 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (A) และจากกราฟมาตรฐาน (B)

- 1 Blue dextran, 2 Catalase, 3 BSA, 4 Ovalbumin,
5 Chymotrypsinogen A, 6 Ribonuclease, 7 $K_2Cr_2O_7$



รูปที่ 10 การเกาะกลุ่มตัวของสัจิหนูโดยเลคตินปรีสุทธ์ (100x)

- A คะแนนการเกาะกลุ่มเท่ากับ 0
- B คะแนนการเกาะกลุ่มเท่ากับ 1
- C คะแนนการเกาะกลุ่มเท่ากับ 2
- D คะแนนการเกาะกลุ่มเท่ากับ 3
- E คะแนนการเกาะกลุ่มเท่ากับ 4

3.3 การเตรียมเลคตินเปอรัออกซิเดส

3.3.1 การแยกเลคตินเปอรัออกซิเดสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

จากการคอนจูเกตเลคตินบรืสุท์กับเอนไซม์เปอรัออกซิเดสตามวิธีในข้อ 2.5 แล้วแยกเลคตินเปอรัออกซิเดสออกจากเลคตินและเอนไซม์อิสระที่เหลือด้วยการนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 เมื่อชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ซึ่งเป็นพีคที่มีโปรตีนส่วนใหญ่ (พีค LPC) และพีคที่มีโปรตีนส่วนน้อยตามลำดับ (รูปที่ 11) ที่มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 81,920 และ 6,400 หน่วย ตามลำดับ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (A403) เพื่อติดตามเอนไซม์เปอรัออกซิเดส พบเฉพาะในสารละลายพีค LPC เท่านั้น และเมื่อวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอรัออกซิเดส พบเฉพาะในสารละลายในพีค LPC เช่นกัน จึงทำการรวมสารละลายพีค LPC ทำให้เข้มข้น แล้วใช้ศึกษาเป็นเลคตินเปอรัออกซิเดสต่อไป

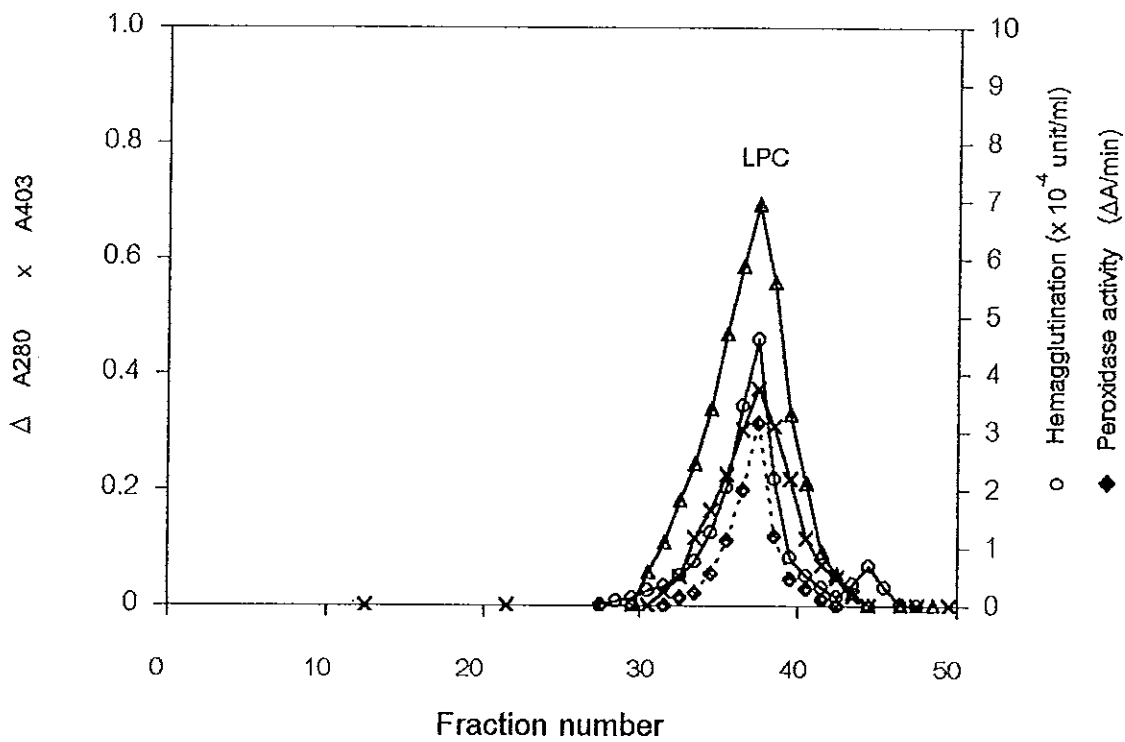
3.3.2 น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอรัออกซิเดสหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอรัออกซิเดส (พีค LPC) ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 โดยการทำให้โครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอรัออกซิเดสจากกราฟได้ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 90,150 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 12

3.4 การศึกษาตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์และไม่เจริญพันธุ์ด้วยเลคตินเปอรัออกซิเดส

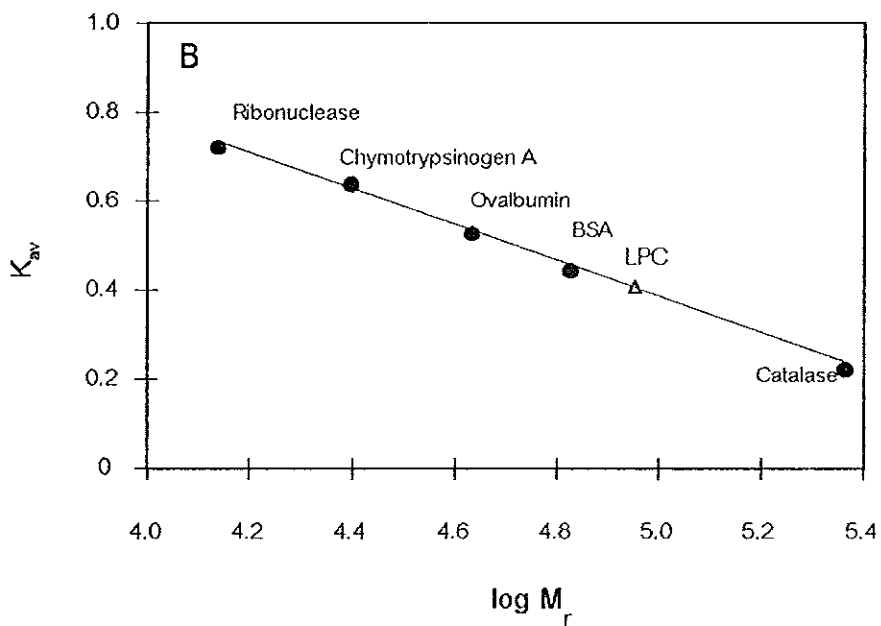
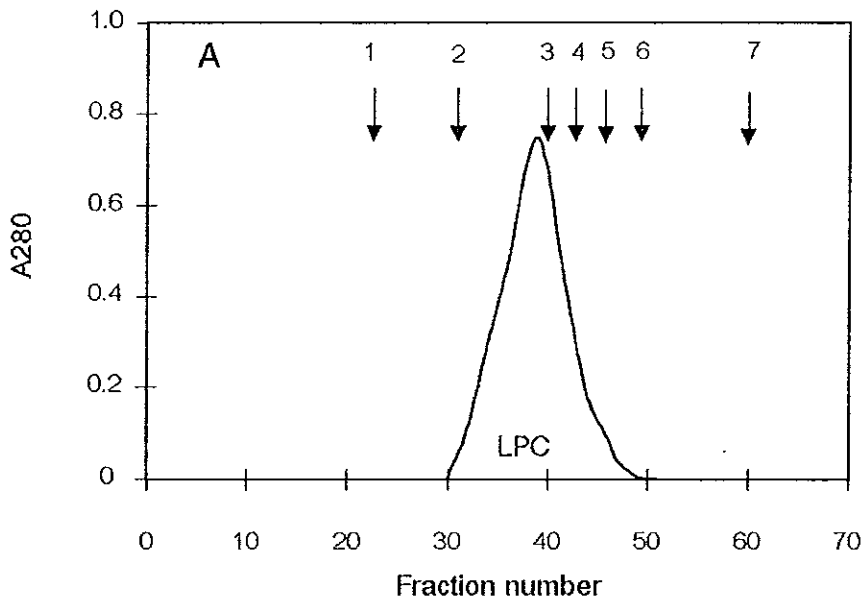
3.4.1 การย้อมเซลล์ตัวอสุจิ

ในการย้อมผิวเซลล์ตัวอสุจิหนูด้วยเลคตินเปอรัออกซิเดส ตามวิธีข้อ 2.7 จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการติดสีของเลคตินเปอรัออกซิเดสที่แตกต่างกันระหว่างผิวเซลล์ของตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์กับตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ กล่าวคือ มีการติดสีย้อมของเลคตินเปอรัออกซิเดสเฉพาะส่วนหัวของตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (รูปที่ 13B) แต่ตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์มีการติดสีทั่วผิวเซลล์ทุกส่วนคือส่วนหัว กลางลำตัวและส่วนหาง (รูปที่ 13A)



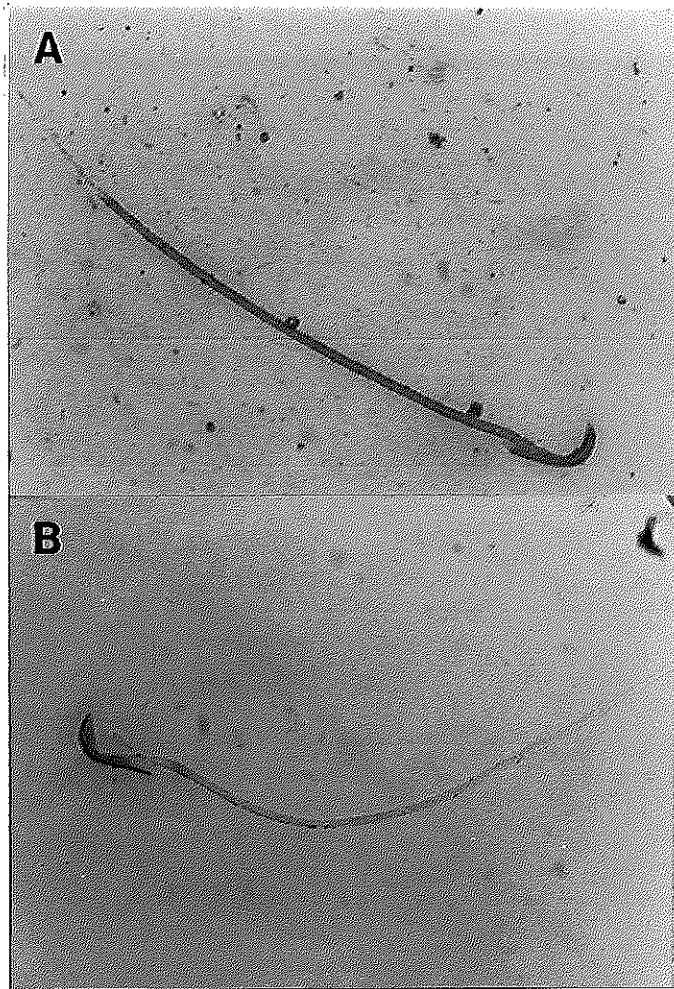
รูปที่ 11 การแยกเลคตินเปอร์ออกซิเดสโดยคอลัมน์ Sephadex G-200

นำเลคตินบริสุทธิ์ไปคอนจูเกตกับเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามวิธีการข้อ 2.5 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 ซะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 12 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดสโดยคอลัมน์
Sephadex G-200 (A) และจากกราฟมาตรฐาน (B)

1 Blue dextran, 2 Catalase, 3 BSA, 4 Ovalbumin, 5 Chymotrypsinogen A, 6 Ribonuclease, 7 $K_2Cr_2O_7$, LPC Lectin peroxidase conjugate



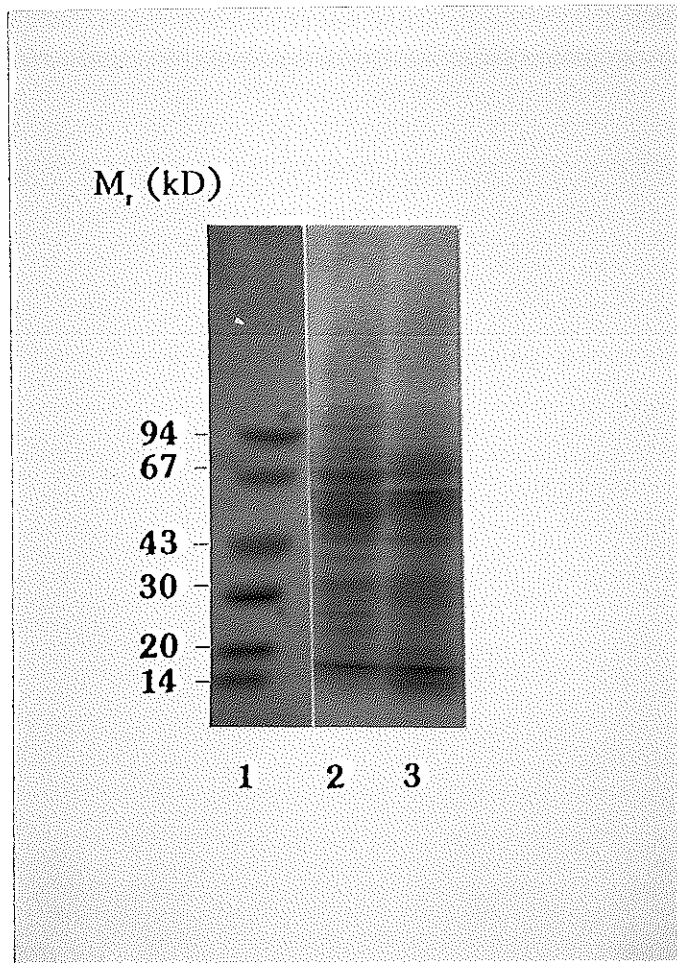
รูปที่ 13 การย้อมตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ (A) และยังไม่เจริญพันธุ์ (B) ของหนู
ด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส (1,000x)

3.4.2 แบบแผนโปรตีนในสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่จับกับเลคตินเปอรัออกซิเดส

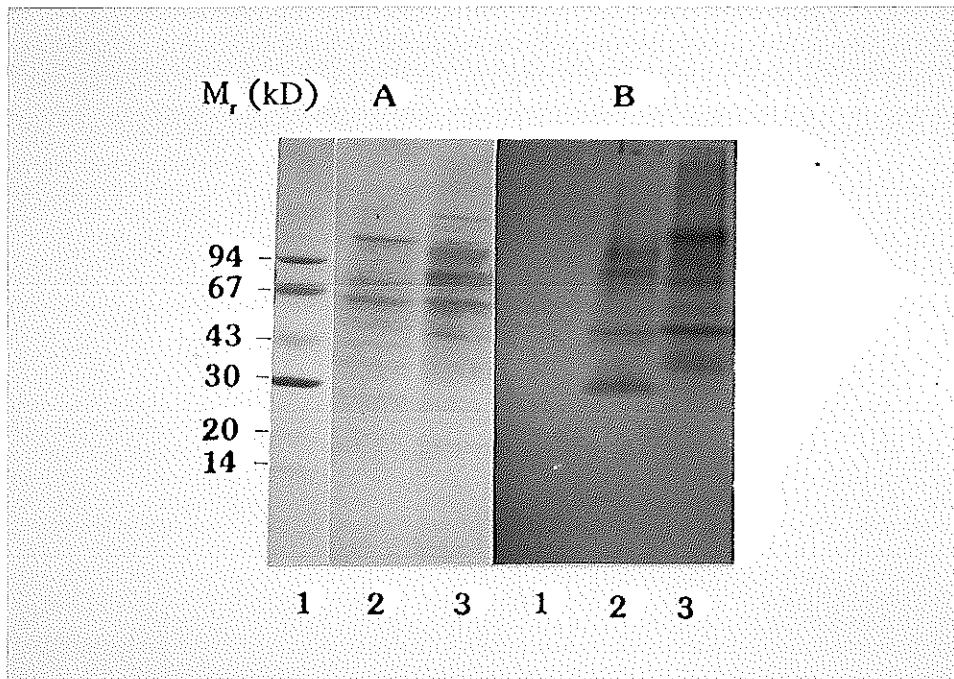
เมื่อทำการสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์และยังไม่เจริญพันธุ์ของหนูด้วย 0.1 % Triton X-100 ตามวิธีในข้อ 2.8.1 แล้วนำสารสกัดเมมเบรนไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู พบว่าสารสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิดปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบซึ่งสังเกตความแตกต่างได้ยาก (รูปที่ 14) เมื่อนำสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส จากนั้นขนถ่ายไปยังแผ่นไนโทรเซลลูโลสซึ่งจะทำเหมือนกันสองส่วน ส่วนที่ 1 นำไปย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (amido black B) ยังพบโปรตีนหลายแถบของสารสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ที่ถูกขนถ่ายไปยังแผ่นไนโทรเซลลูโลส (รูปที่ 15A) และส่วนที่ 2 นำไปย้อมด้วยเลคตินเปอรัออกซิเดส ที่มีสับสเทรทเป็น 3-amino-9-ethylcarbazole พบโปรตีนเพียงบางแถบเท่านั้นที่ย้อมติดสีเลคตินเปอรัออกซิเดส เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอรัออกซิเดสปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 และ 120,000 ดัลตัน ในขณะที่สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอรัออกซิเดสปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 32,000, 52,000, 85,000 และ 100,000 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 15B ในการทดลองนี้พบว่าโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ ฟอสฟอริเลสบี, BSA, โอวัลบูมิน, คาร์โบนิคแอนไฮเดรส, ซอยเป็นทริปซินอินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบี เท่านั้นแต่ไม่ย้อมติดสีสับสเทรทของเลคตินเปอรัออกซิเดส

3.4.3 การจับเชิงปริมาณของตัวอสุจิกับเลคตินเปอรัออกซิเดส

เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการจับระหว่างตัวอสุจิกับเลคตินเปอรัออกซิเดส ตามวิธีในข้อ 2.8.2 นำผลที่ได้ไปคำนวณ จากการเขียนกราฟแบบ Scatchard plot พบว่าปริมาณการจับของเลคตินเปอรัออกซิเดสกับตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์เท่ากับ 1.03×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์ และกับตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์เท่ากับ 0.58×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์ (รูปที่ 16)



รูปที่ 14 แบบแผนโปรตีนของสารสกัดเมมเบรนตัวอสุจิหนูใน
 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส
 แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
 แถวที่ 2 สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์
 แถวที่ 3 สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์

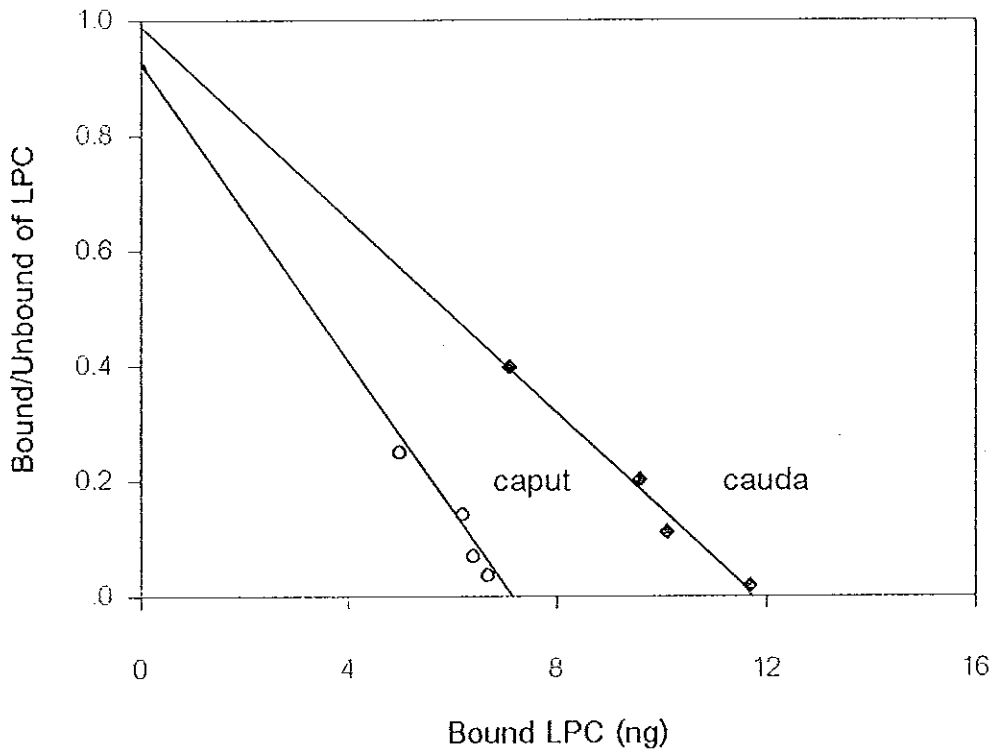


รูปที่ 15 การทำ Western blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสี
อะมิโดแบล็คบี (A) และย้อมด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส (B)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์

แถวที่ 3 สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์



รูปที่ 16 Scatchard plot ของการจับระหว่างเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับ
ตัวอสุจิของหนู

LPC เลคตินเปอร้ออกซิเดส ; caput ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์
และ cauda ตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์

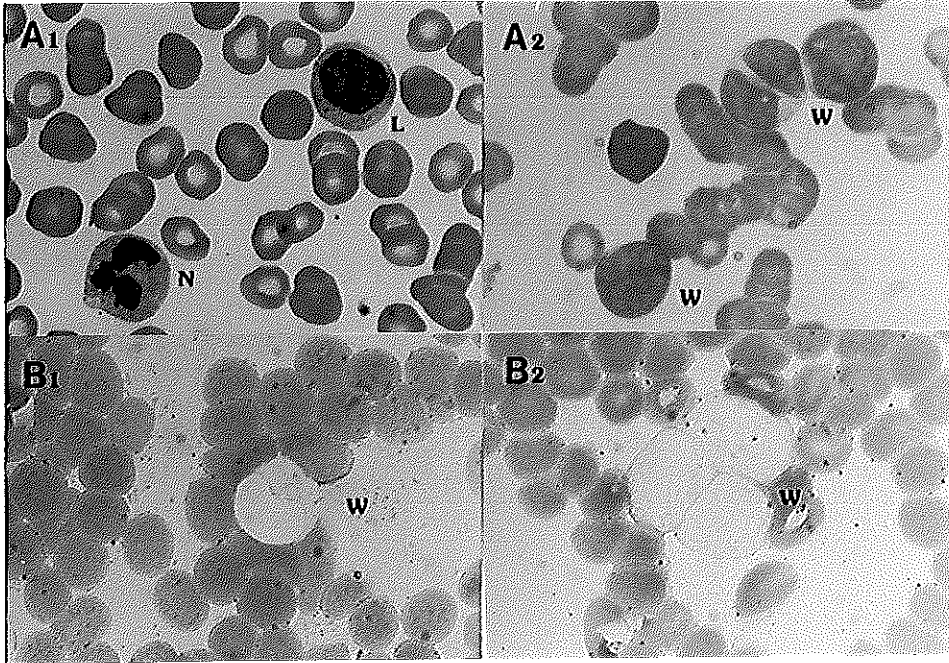
3.5 การทำปฏิกิริยาของเลือดดินเปอร์ออกซิเดส

3.5.1 การย้อมเซลล์เม็ดเลือด

ในการทดสอบย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของคนด้วยสีไรท์และด้วยเลือดดินเปอร์ออกซิเดส ตามวิธีข้อ 2.7.2 จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ถูกย้อมด้วยสีไรท์จะติดสีชมพูแดง (รูปที่ 17A1) และมีสีแดงอมส้มเมื่อย้อมด้วยเลือดดินเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 17B1) การย้อมเม็ดเลือดขาวด้วยสีไรท์ พบว่าเม็ดเลือดขาวปกติชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) มีนิวเคลียส 2 – 3 lobe ติดสีม่วงเข้ม แกรนูล (granule) จำเพาะมีขนาดเล็กละเอียดติดสีชมพูอมม่วง เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ นิวเคลียสเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ติดสีม่วงเข้ม ไฮโทพลาซึมติดสีฟ้าอ่อนและใส (รูปที่ 17A1) เม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิด ไม่ย้อมติดสีของเลือดดินเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 17B1) ส่วนในเลือดของคนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งมีตัวอ่อนของเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก นิวเคลียสของเซลล์ดังกล่าวติดสีชมพูอมม่วง ส่วนไฮโทพลาซึมติดสีฟ้าหรือสีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วยสีไรท์ ดังแสดงในรูปที่ 17A2 แต่เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่ย้อมติดสีของเลือดดินเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 17B2)

3.5.2 การทำปฏิกิริยากับอิมมูโนโกลบูลิน

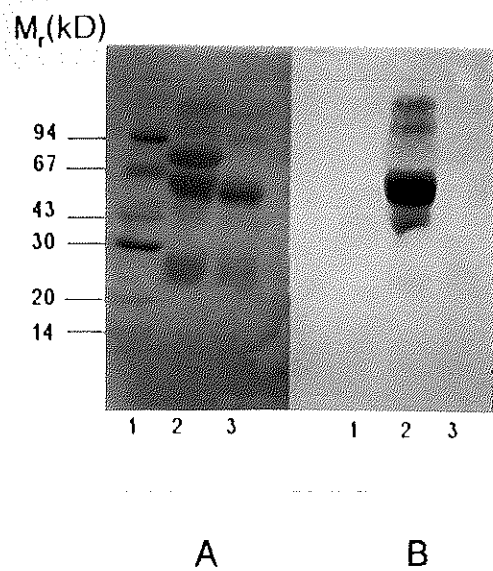
จากงานวิทยานิพนธ์ของอุบล ดันสม (2541) ที่พบว่าเลือดดินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาจะทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA ของคนใน gel double diffusion แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG ของคน เพื่อสนับสนุนผลงานวิจัยดังกล่าว ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้นำ IgG และ IgA ของคนไปทำโพลึอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส และขนถ่ายไปยังแผ่นไนโทรเซลลูโลสตามวิธีข้อ 2.8.2 พบว่าทั้ง IgG และ IgA ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบี แต่เฉพาะ IgA เท่านั้นที่ย้อมติดสีของเลือดดินเปอร์ออกซิเดส ดังแสดงผลในรูปที่ 18



รูปที่ 17 การย้อมเซลล์เม็ดเลือดของคนด้วยสีไรท์ (A) และด้วย
 เลคตินเปอร์ออกซิเดส (B) (1,000x)

1 เลือดของคนปกติ ; 2 เลือดของคนเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว

N neutrophil ; L lymphocyte ; W white blood cell



รูปที่ 18 การทำ Western blot ของอิมมูโนโกลบูลินเปรียบเทียบระหว่างการย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (A) และย้อมด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส (B)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 IgA ของคน

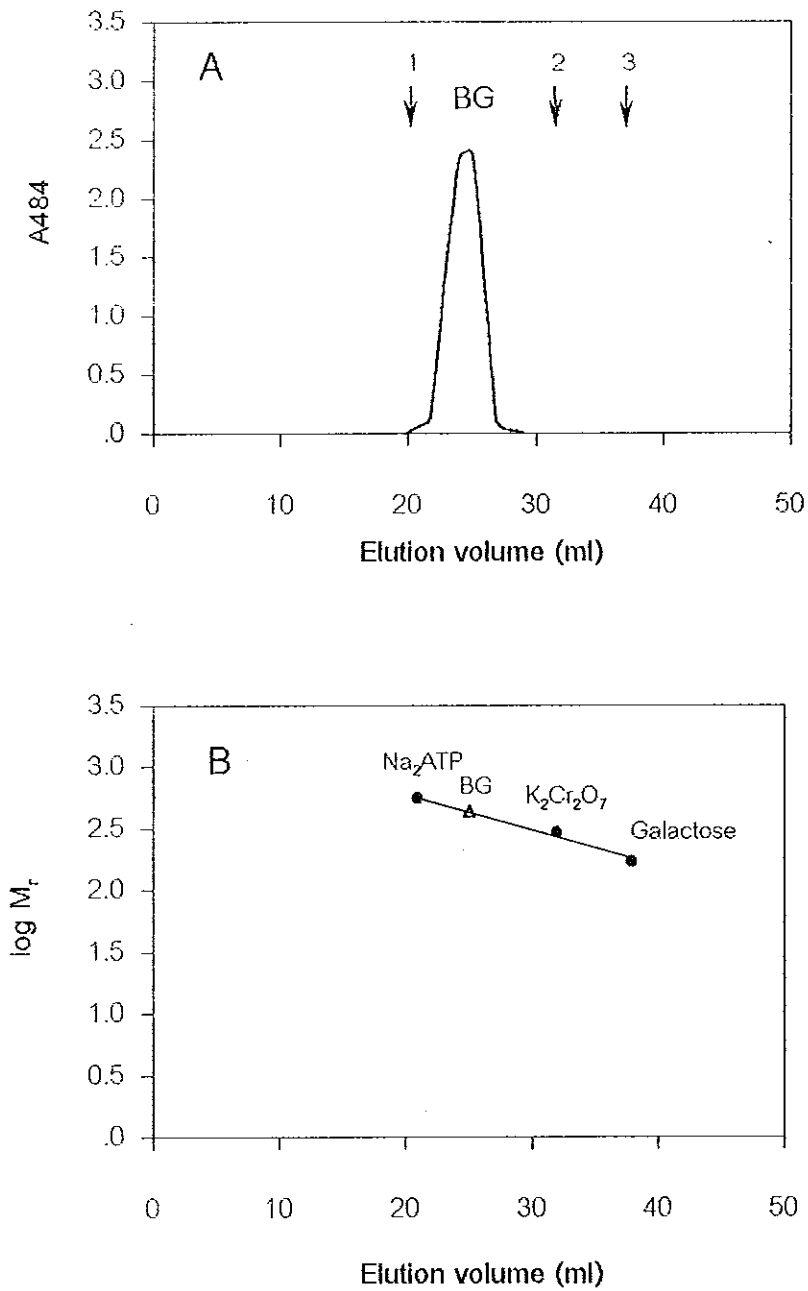
แถวที่ 3 IgG ของคน

3.6 การเตรียมไบโอตินกาแลคโตส

จากการคอนจูเกต biotin hydrazide กับน้ำตาลกาแลคโตส โดยการออกซิไดซ์ด้วย sodium (meta) periodate ตามวิธีในข้อ 2.9.1 แล้วแยกไบโอตินกาแลคโตสออกจากไบโอตินและน้ำตาลอิสระที่เหลือด้วยการนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-10 เมื่อชะด้วยบัฟเฟอร์แล้วทำการทดสอบหาน้ำตาลด้วยวิธี phenol-sulphuric acid พบว่ามีพีคที่มีน้ำตาลถูกชะออกมา 1 พีค เมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเจลฟิลเทรชัน โดยมี Na_2ATP (M_r 551), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (M_r 294) และน้ำตาลกาแลคโตส (M_r 180) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าพีคดังกล่าวซึ่งเป็นไบโอตินกาแลคโตสมีน้ำหนักโมเลกุล 440 ดัลตัน (รูปที่ 19)

3.7 การทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้วิธี LBA

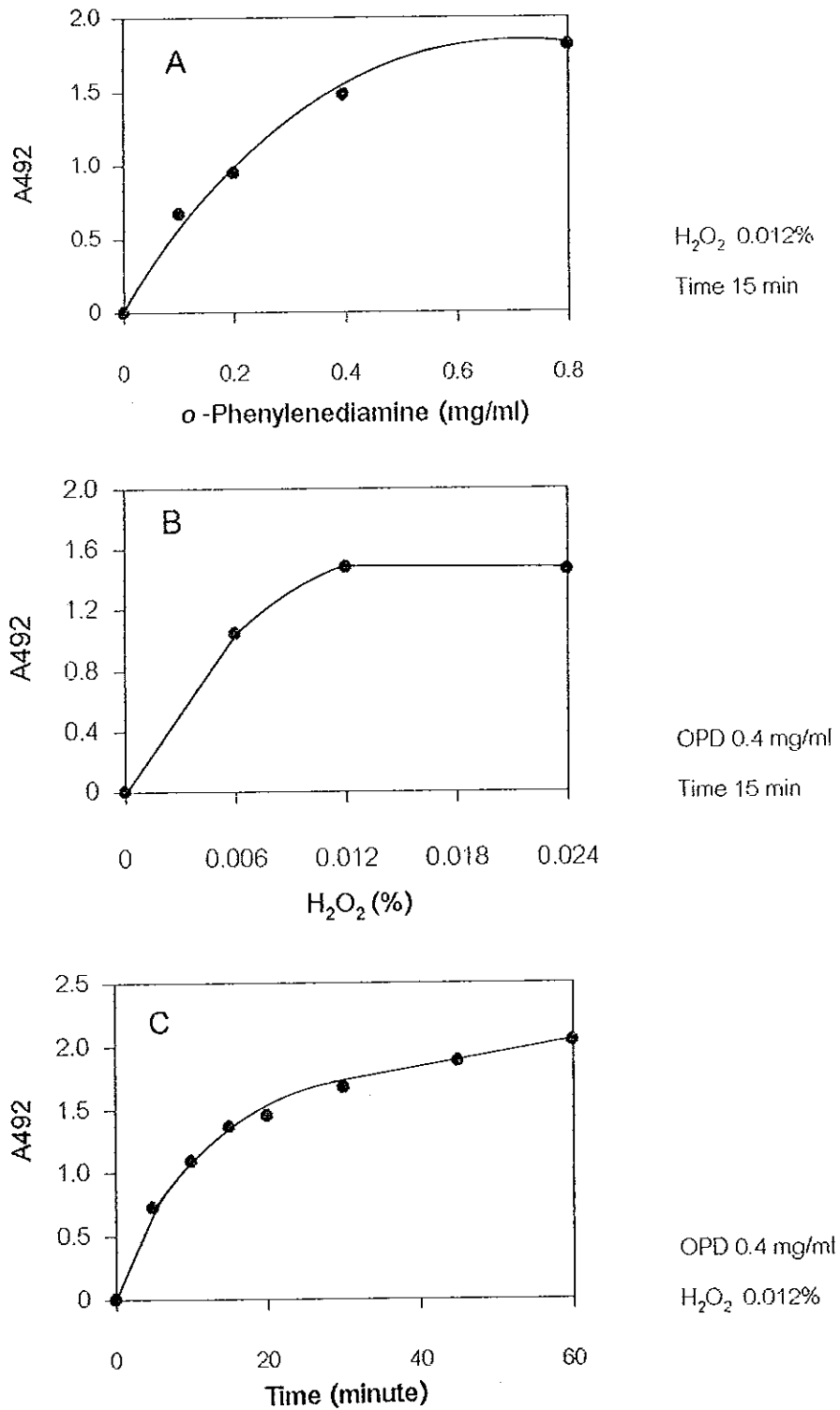
ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (SAV-HRP) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของการทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์โดยวิธี LBA (ตามวิธีการข้อ 2.9.2) พบว่าความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์ (A492) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 20 ที่พบว่า A492 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความเข้มข้นของ OPD ที่ใช้ในช่วงแรก และที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ เมื่อใช้ OPD 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพราะให้ค่า A492 ไม่สูงหรือต่ำเกินไป (รูปที่ 20A) และยังขึ้นกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ซึ่งความเข้มข้นที่ให้ค่า A492 มากที่สุดและเหมาะสมคือ 0.012% (รูปที่ 20B) ในขณะที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาและเริ่มค่อนข้างคงที่เมื่อใช้เวลา 15 นาที (รูปที่ 20C) ในที่นี้จึงเลือกเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเป็น 15 นาที ตามคำแนะนำของบริษัท Sigma Chemical Co. ซึ่งให้ค่า A492 ไม่ต่ำหรือสูงจนเกินไป ดังนั้นในการทดสอบโดยวิธี LBA ทั้งหมดในงานวิทยานิพนธ์นี้ จึงใช้ OPD 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร H_2O_2 0.012% และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาของ SAV-HRP นาน 15 นาที



รูปที่ 19 การหาน้ำหนักโมเลกุลของไบโอดีนาแกแลคโตสโดยคอลัมน์
Sephadex G-10 (A) และจากกราฟมาตรฐาน (B)

BG Biotingalacetose conjugate

1 Na₂ATP, 2 K₂Cr₂O₇, 3 Galactose



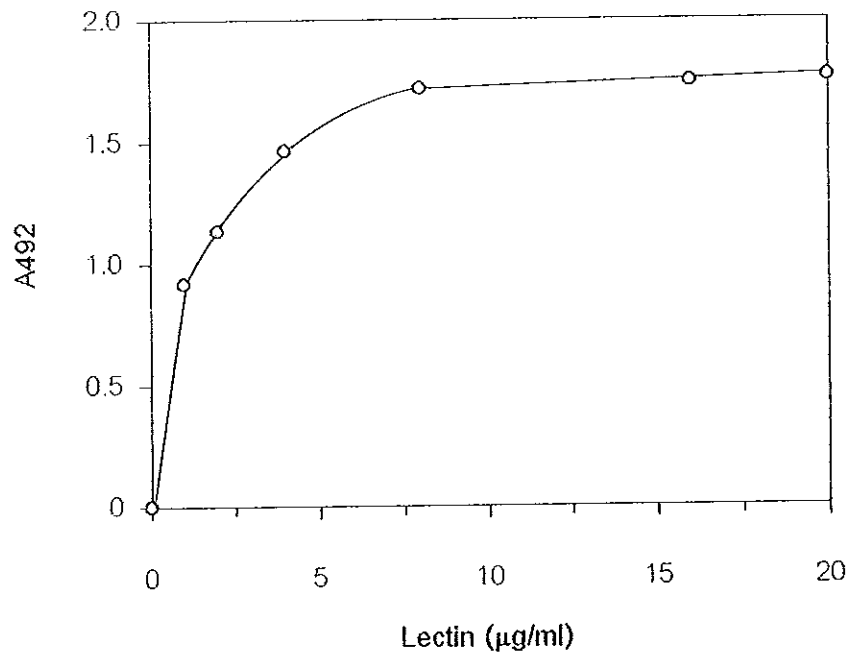
รูปที่ 20 สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยา SAV-HRP ใน LBA

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 μ g/ml, BG 0.15 mM และ SAV-HRP 300 mU/ml

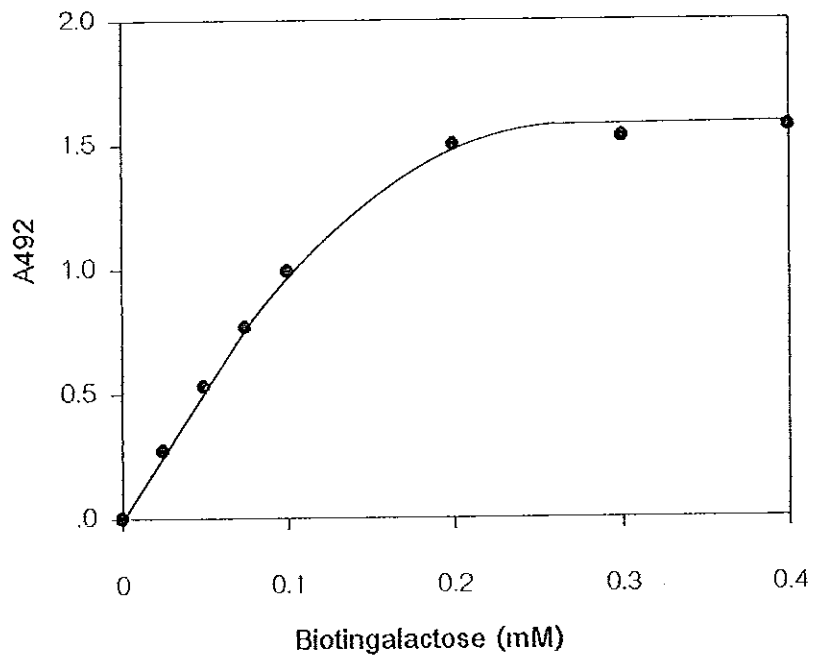
- A ผลของการใช้ OPD ที่ความเข้มข้น 0 - 0.8 mg/ml
- B ผลของการใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0 - 0.024%
- C ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 0 - 60 นาที

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลความเข้มข้นของเลคตินต่อการจับกับไมโครโตเตอร์เพลท ซึ่งพบว่า การจับของเลคตินกับเพลทที่ใช้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเลคตินจนมีค่าสูงสุดที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเริ่มคงที่ (รูปที่ 21) นั่นคือพื้นที่ผิวของเพลทจะจับกับเลคตินได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นของเลคตินมากกว่านี้จะทำให้มีเลคตินเหลือโดยไม่จับกับเพลท ในที่นี้ได้เลือกใช้เลคติน 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อจับกับเพลท เพราะเป็นช่วงที่ปฏิกิริยาการจับของเลคตินกับน้ำตาลมีความไวมากที่สุด (กราฟขั้นที่สูงสุดในรูปที่ 21) ในทำนองเดียวกัน ได้ทดสอบหาความเข้มข้นของไบโอตินกาแลคโตสให้มีความพอในการจับกับเลคตินที่ถูกตรึงไว้บนผิวหน้าของเพลท พบว่า ค่า A492 ของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นและแปรผันโดยตรงตามความเข้มข้นของไบโอตินกาแลคโตสที่ใช้จนมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.2 mM และมีค่าคงที่เมื่อความเข้มข้นสูงมากขึ้น บ่งชี้ว่าไบโอตินกาแลคโตสสามารถจับกับเลคตินที่ถูกตรึงบนเพลทได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.2 mM ในงานนี้ได้ใช้ไบโอตินกาแลคโตสความเข้มข้น 0.15 mM ในการทดสอบเพราะเป็นช่วงที่มีความไวของปฏิกิริยาดีที่สุด (รูปที่ 22)

เนื่องจาก SAV-HRP สามารถจับกับผิวของเพลทได้เป็นอย่างดี ดังแสดงในรูปที่ 23 (กราฟเส้นบน) จึงได้ลองยับยั้งการจับของ SAV-HRP กับเพลท โดย BSA และ non fat milk (NFM) พบว่าทั้ง 3% treated BSA และ 1% NFM สามารถยับยั้งการจับของ SAV-HRP กับเพลทได้มากกว่า 90% (รูปที่ 23) ในการทดลองต่างๆ จึงใช้ 3% treated BSA ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มในเพลทที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 คืน เพื่อเป็นการยับยั้งการจับของ SAV-HRP ต่อเพลท และเพื่อให้ SAV-HRP ที่ใช้ในการทดสอบ LBA มีปริมาณมากเพียงพอต่อการจับกับไบโอตินกาแลคโตส จึงได้ทดสอบหาความเข้มข้นของ SAV-HRP ต่อการทำ LBA พบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SAV-HRP ที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 24 และเริ่มมีค่าคงที่ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในที่นี้จึงเลือกใช้ SAV-HRP ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร เพื่อทำให้มี SAV-HRP ปริมาณมากเกินพอในการทดสอบ

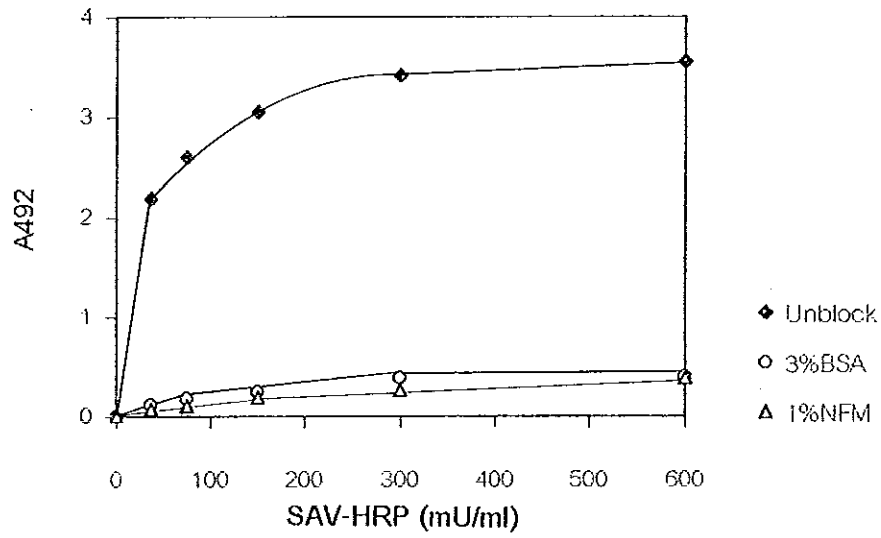


รูปที่ 21 การจับของเลคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเพลท
ในการทดสอบใช้ BG 0.15 mM และ SAV-HRP 300 mU/ml

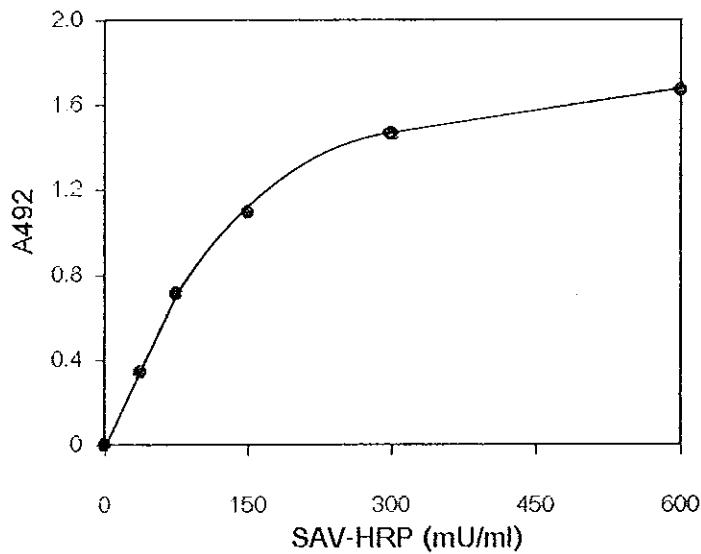


รูปที่ 22 การจับของไบโอดีนกาแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเลคตินที่ถูกตรึงในเพลท

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 $\mu\text{g/ml}$ และ SAV-HRP 300 mU/ml



รูปที่ 23 ผลของการยับยั้ง SAV-HRP ในการจับกับเพลทด้วย 3% BSA และ 1% NFM
ในการทดสอบใช้เลคติน 2 $\mu\text{g/ml}$ และ BG 0.15 mM

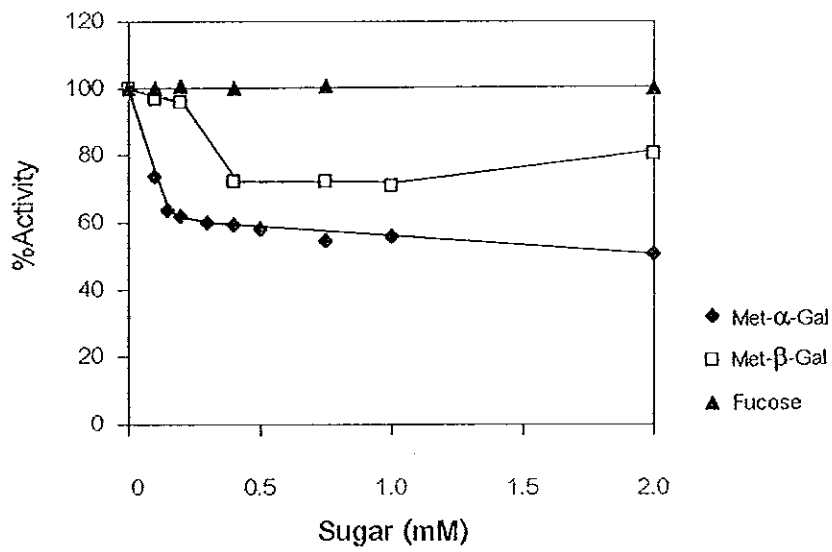
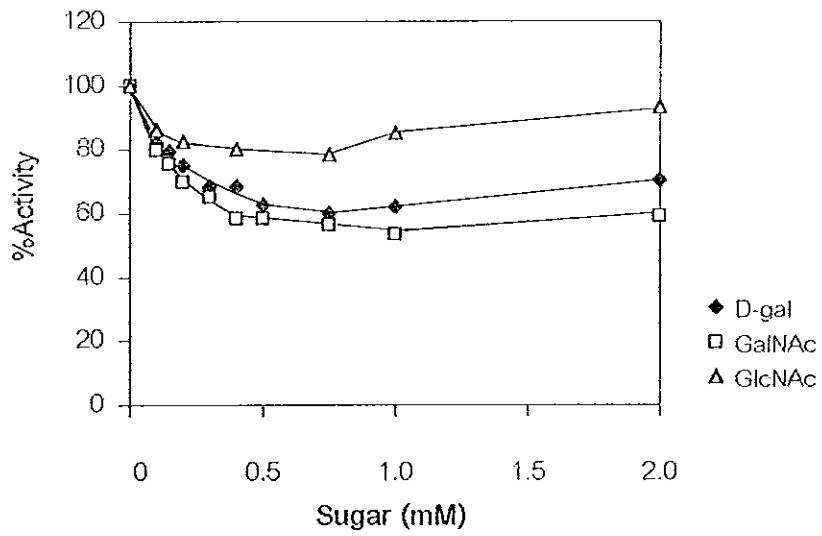


รูปที่ 24 การจับของ SAV-HRP ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับไบโอดีนกาแลคโตส
ในการทดสอบใช้เลคติน 2 $\mu\text{g/ml}$ และ BG 0.15 mM

ในการตรวจสอบความจำเพาะของน้ำตาลกับเลคติน ทำโดยการเติมน้ำตาลแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน พร้อมกับการบ่มของไบโอดีโนกาแลคโตส (รูปที่ 5A) พบว่า น้ำตาล Met- α -Gal (methyl- α -D-galactoside) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้สูงสุด 49.2% รองลงมาตามลำดับได้แก่ GalNAc (46.6%), กาแลคโตส (39.9%), Met- β -Gal (methyl- β -D-galactoside) (27.8%) และ GlcNAc (19.8%) ดังแสดงผลในรูปที่ 25 และ ตารางที่ 5 ในขณะที่ฟูโคส (รูปที่ 25) ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลในการยับยั้งปฏิกิริยาสูงสุดได้ครึ่งหนึ่ง (concentration for half maximal inhibition) เรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมากเป็นดังนี้ Met- α -Gal 0.08 mM เท่ากับ GlcNAc, GalNAc 0.12 mM, กาแลคโตส 0.13 mM และ Met- β -Gal 0.28 mM (ตารางที่ 5)

ในการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาการจับระหว่างเลคตินที่ถูกตรึงในเพลทกับไบโอดีโนกาแลคโตสโดยโปรตีนและเลคตินบางชนิด พบว่า เลคตินบิริสุทธ์และ HPA (*Helix pomatia agglutinin*) ยับยั้งปฏิกิริยาได้ใกล้เคียงกัน คือ 23.4 และ 29.1% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.25 และ 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 26A, B) ในขณะที่มีวซัน (mucin) (รูปที่ 26B) และ BSA (รูปที่ 26C) ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา ดังแสดงผลในตารางที่ 6

เมื่อทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาการจับระหว่าง SAV-HRP กับไบโอดีโนกาแลคโตสในขั้นตอนสุดท้ายของการทำ LBA ด้วยไบโอดีโน, SAV, เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และน้ำตาลกาแลคโตสที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไบโอดีโนอิสระสามารถยับยั้งปฏิกิริยานี้ได้สูงสุด 66.6% ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.2 mM (ตารางที่ 6) โดยไบโอดีโนจะยับยั้งปฏิกิริยาได้เร็วมากเกือบสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.012 mM ดังแสดงผลในรูปที่ 27A SAV สามารถแข่งขันการจับของ SAV-HRP ในการจับกับไบโอดีโนกาแลคโตส โดยสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้สูงสุด 50.2% ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 150 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร (รูปที่ 28A) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและน้ำตาลกาแลคโตสไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 28B และ 27B ตามลำดับ (ตารางที่ 6)



รูปที่ 25 ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 $\mu\text{g/ml}$, BG 0.15 mM ปุ่มพร้อม
กับน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0 - 2 mM และ SAV-HRP 300 mU/ml

ตารางที่ 5 ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

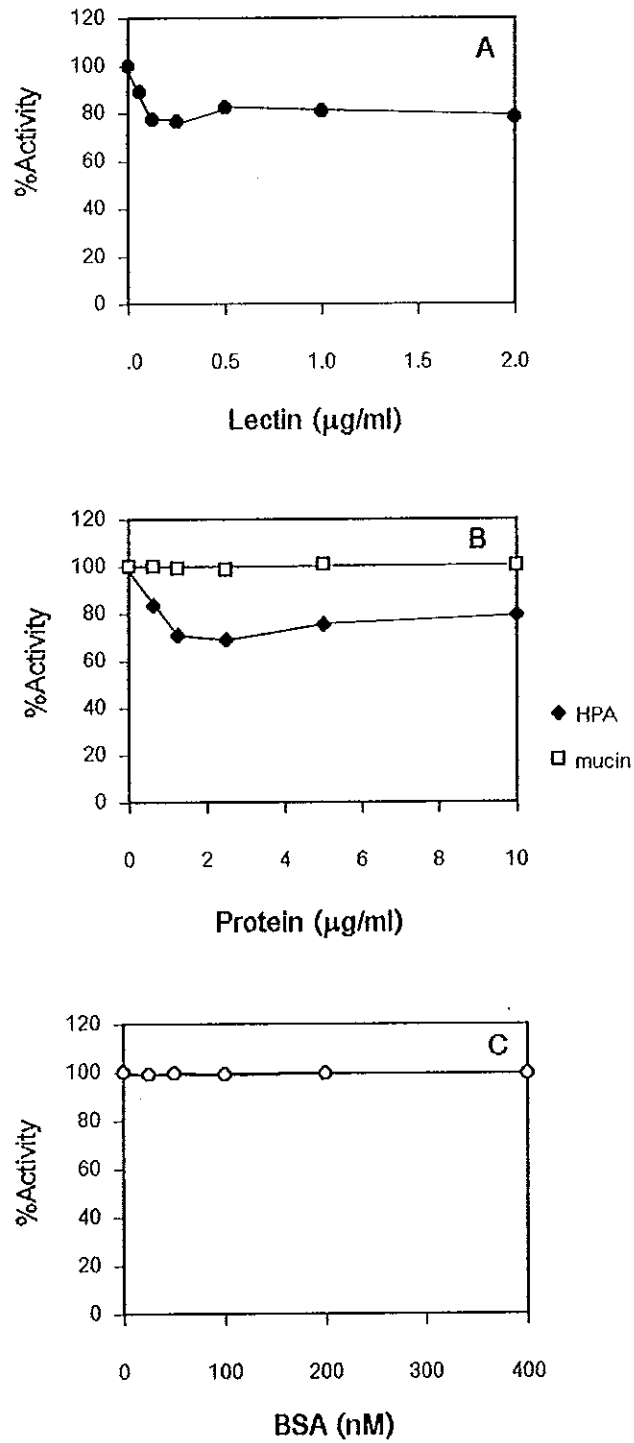
Sugar	Max. Inh. (%)	Conc. for half max. inh. (mM)
D-galactose	39.9	0.13
Methyl- α -D-galactoside	49.2	0.08
Methyl- β -D-galactoside	27.8	0.28
N-actyl-D-galactosamine	46.6	0.12
N-acetyl-D-glucosamine	19.8	0.08
Fucose	0	-

ตัวเลขในตารางได้จากการเฉลี่ย 2-3 การทดลอง

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้ง LBA ด้วยโปรตีนและกาแลคโตส

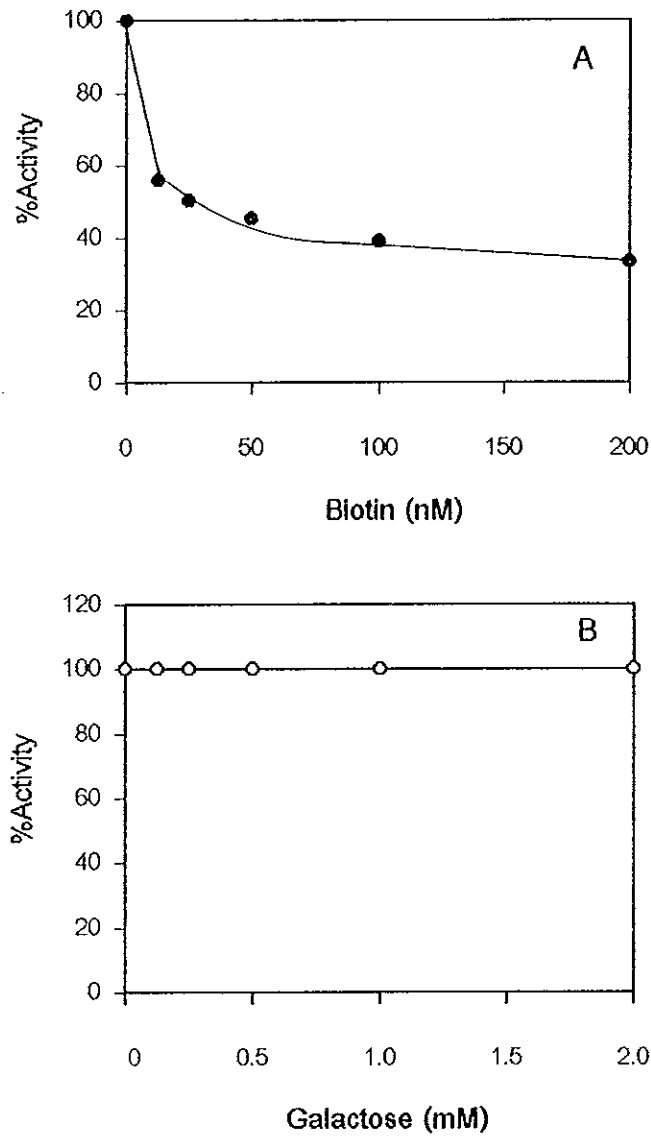
Inhibitor	Maximal Inhibition	
	%	Minimal concentration
<u>BG binding</u>		
Mucin	0	-
Lectin	23.4	0.25 μ g/ml
HPA (<i>Helix pomatia</i> agglutinin)	29.1	1.25 μ g/ml
BSA	0	-
<u>SAV-HRP binding</u>		
Biotin	66.6	0.2 mM
Streptavidin	50.2	150 mU/ml
Peroxidase	0	-
Galactose	0	-

ตัวเลขในตารางได้จากการเฉลี่ย 2-3 การทดลอง



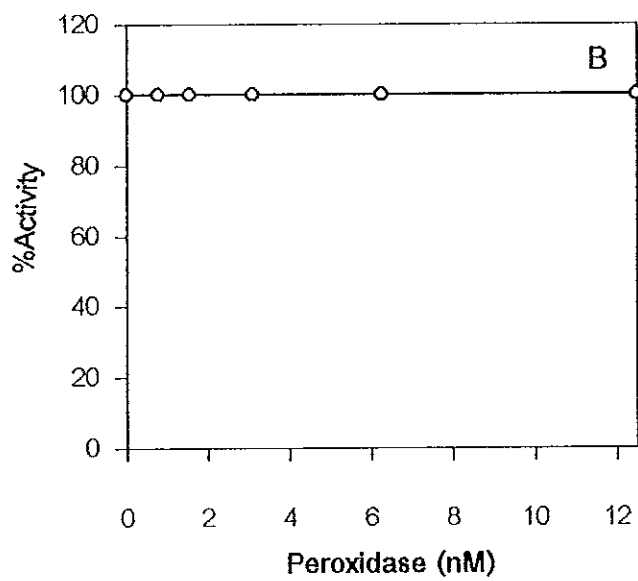
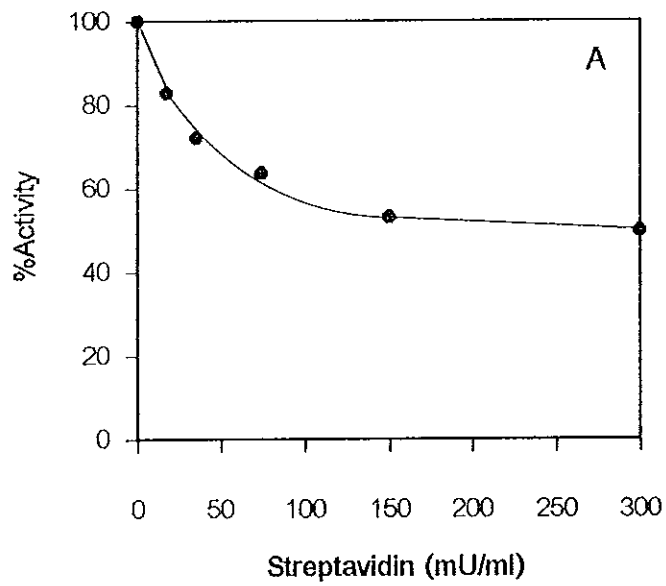
รูปที่ 26 ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยเลคติน (A) มิวซิน, HPA (B) และ BSA (C)

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 µg/ml, BG 0.15 mM บ่มพร้อมโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ และ SAV-HRP 300 mU/ml



รูปที่ 27 ผลของการยับยั้ง LBA ด้วยไบโอติน (A) และกาแลคโตส (B)

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 $\mu\text{g/ml}$, BG 0.15 mM และ SAV-HRP 300 mU/ml บ่มพร้อมไบโอตินหรือกาแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ



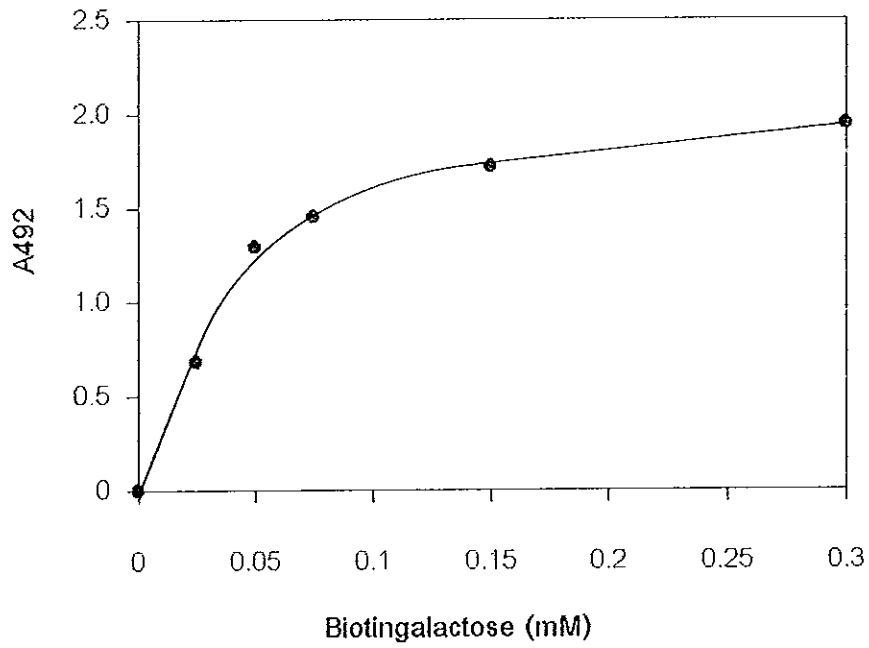
รูปที่ 28 ผลของการยับยั้ง LBA ด้วย SAV (A) และเปอร์ออกซิเดส (B)

ในการทดสอบใช้เลคติน 2 mg/ml, BG 0.15 mM และ SAV-HRP 300 mU/ml บ่มพร้อมกับโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

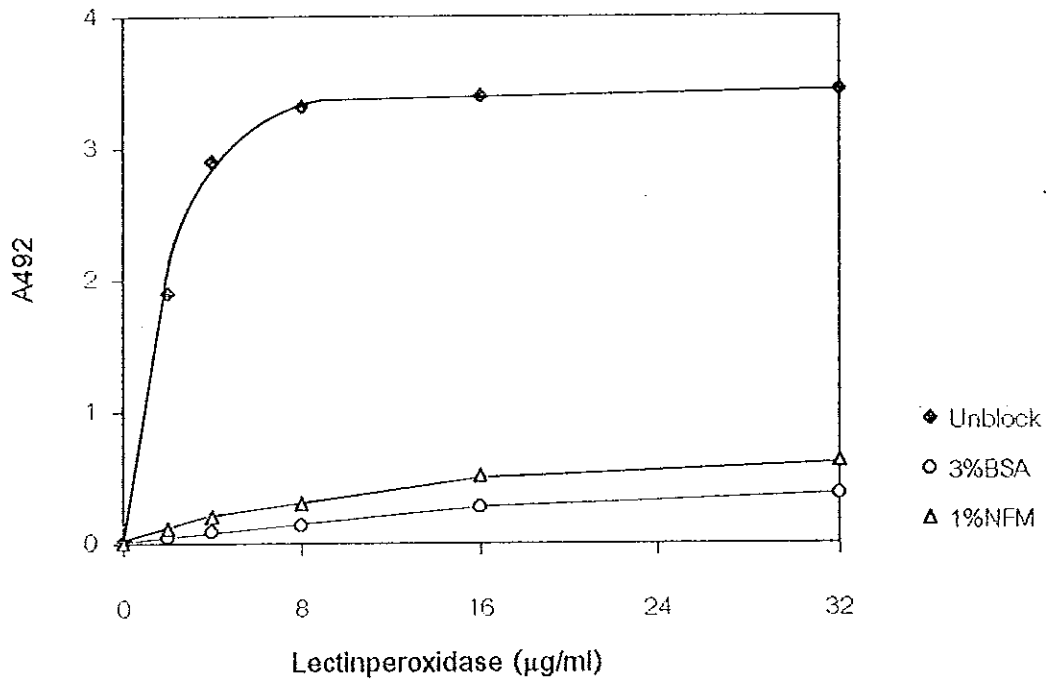
3.8 การทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินเปอร้ออกซิเดส โดยวิธี ELLBA

จากผลการทดสอบในวิธี LBA ได้เลือกใช้ SAV-HRP ความเข้มข้น 300 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในการทดลอง ในการทดสอบแบบ ELLBA จึงได้ใช้ SAV ความเข้มข้นเดียวกัน (300 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร) เพื่อจับกับเฟลท เมื่อหาความเข้มข้นของไบโอตินกาแลคโตสที่เหมาะสมในการจับกับ SAV ที่ถูกตรึงไว้ในเฟลท พบว่าผลผลิตของปฏิกิริยา (A492) มีค่าเพิ่มแปรผันเป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของไบโอตินกาแลคโตสที่ใช้ และมีค่ามากที่สุดและค่อนข้างคงที่ที่ความเข้มข้น 0.15 mM (รูปที่ 29) เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองกับการทดสอบแบบ LBA จึงเลือกใช้ไบโอตินกาแลคโตส 0.15 mM ในการทดสอบแบบ ELLBA

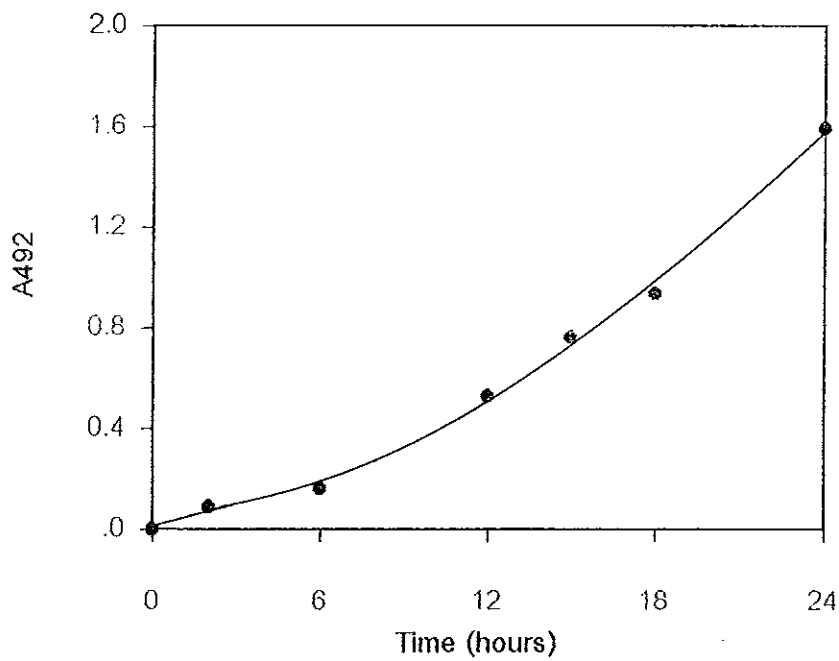
ในการทำงานเดียวกับ LBA ที่พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถจับกับเฟลทได้ เพื่อยืนยันไม่ให้เลคตินเปอร้ออกซิเดสซึ่งใช้ในขั้นตอนสุดท้ายของการทดสอบจับกับเฟลท จึงทดสอบการยับยั้งการจับของเลคตินเปอร้ออกซิเดสต่อเฟลท พบว่า 3% treated BSA หรือ 1% NFM สามารถยับยั้งเลคตินเปอร้ออกซิเดสไม่ให้จับกับเฟลทได้ใกล้เคียงกัน คือ ได้ประมาณ 90% (รูปที่ 30) โดย BSA ยับยั้งได้ดีกว่า NFM เล็กน้อย จึงใช้ 3% treated BSA ในการยับยั้งการจับของเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับเฟลท นอกจากนี้พบว่าในขั้นตอนการบ่มเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับไบโอตินกาแลคโตส นาน 2 ชั่วโมง เลียนแบบวิธี LBA พบว่าจะได้ค่า A492 ต่ำมาก จึงได้ทดสอบหาเวลาการบ่มที่เหมาะสมระหว่างสารทั้ง 2 ชนิด พบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 31 จึงได้เลือกใช้เวลาของการบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่า A492 สูงที่สุด และเพื่อให้การทดสอบแบบ ELLBA สมบูรณ์ ได้หาความเข้มข้นของเลคตินเปอร้ออกซิเดสที่มากเพียงพอในการจับกับไบโอตินกาแลคโตส รูปที่ 32 ได้แสดงให้เห็นว่า ค่า A492 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความเข้มข้นของเลคตินเปอร้ออกซิเดส และเริ่มเพิ่มขึ้นช้าที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รวมทั้งมีค่า A492 สูงมากเพียงพอ ดังนั้นในการทดสอบแบบ ELLBA จึงใช้เลคตินเปอร้ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดลองเพื่อเป็นการประหยัดเลคตินเปอร้ออกซิเดส



รูปที่ 29 การจับของไบโอดีนกาแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ SAV ที่ถูกตรึงในเพลท ในการทดสอบใช้ SAV 300 mU/ml และ LPC 4 μ g/ml

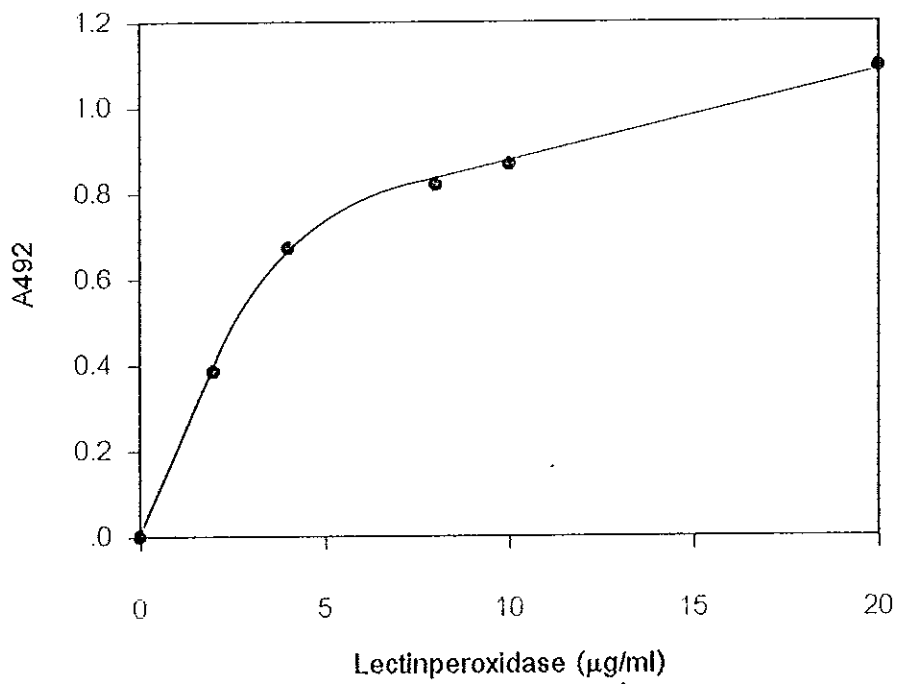


รูปที่ 30 ผลของการยับยั้งเลคตินเปอร์ออกซิเดสในการจับกับเพลทด้วย 3% BSA และ 1% NFM



รูปที่ 31 เวลาของการบ่มเลคตินเปอรัออกซิเดสในการจับ
กับไบโอดีทกานแลคโตส

ในการทดสอบใช้ SAV 300 mU/ml, BG 0.15 mM
และ LPC 4 μ g/ml บ่มที่เวลาต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 25^oซ

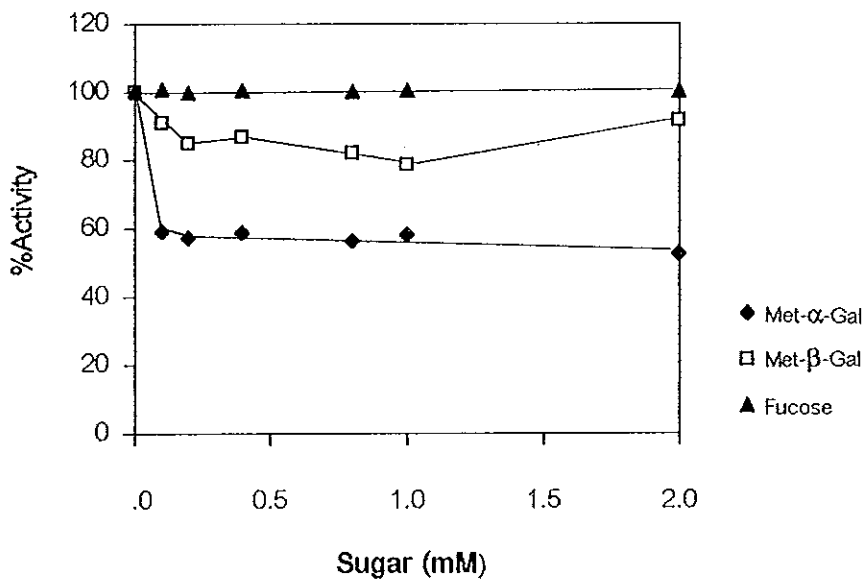
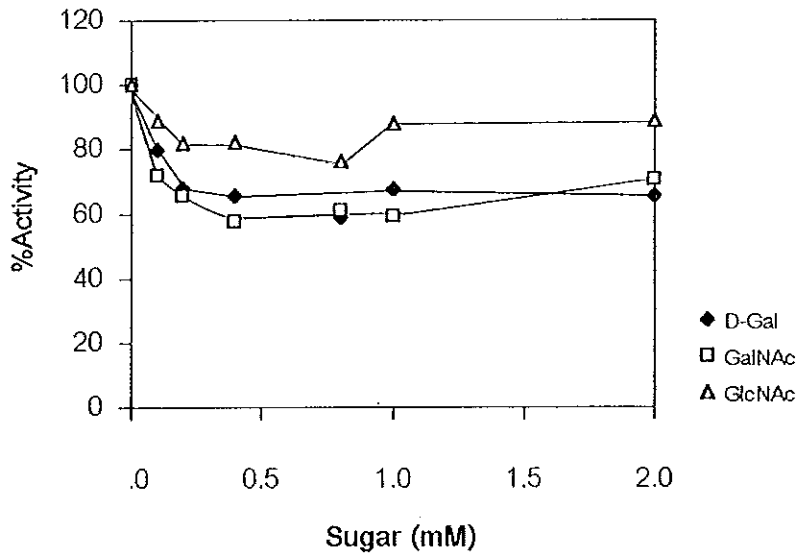


รูปที่ 32 การจับของเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ
ไบโอดีนาแกแลคโตส

ในการทดสอบใช้ SAV 300 mU/ml, BG 0.15 mM และ
LPC ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่ 25°C นาน 24 ชั่วโมง

เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินเปอร์ออกซิเดส โดยการเติมน้ำตาลแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปุ่มพร้อมกับเลคตินเปอร์ออกซิเดส พบว่า น้ำตาล Met- α -Gal สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ 47.5% โดยมีความเข้มข้นของการยับยั้งปฏิกิริยาสูงสุดได้ครั้งหนึ่งเป็น 0.035 mM น้ำตาลที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้มากรองลงมาตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของการยับยั้งสูงสุดได้ 50% เป็นดังนี้ GalNAc (42.3% ที่ 0.065 mM), กาแลคโตส (41.2% ที่ 0.11 mM), GlcNAc (23.8% ที่ 0.11 mM) และ Met- β -Gal (21.5% ที่ 0.12 mM) ตามลำดับ ขณะที่ฟูโคสไม่มีผลยับยั้ง ดังแสดงผลในรูปแบบที่ 33 และตารางที่ 7

นอกเหนือจากน้ำตาล เลคตินอิสระจากเมล็ดจำปาตะยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยาใน ELLBA ได้มากที่สุด 27.3% ด้วยความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 34A, ตารางที่ 8) เช่นเดียวกับ HPA ซึ่งยับยั้งปฏิกิริยาได้ 28.7% ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่มิวซินไม่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา ดังแสดงผลในรูปแบบที่ 34B และตารางที่ 8



รูปที่ 33 ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

ในการทดสอบใช้ SAV 300 mU/ml, BG 0.15 mM และ LPC 4 μ g/ml

, บ่มพร้อมกับน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0 - 2 mM

ตารางที่ 7 ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

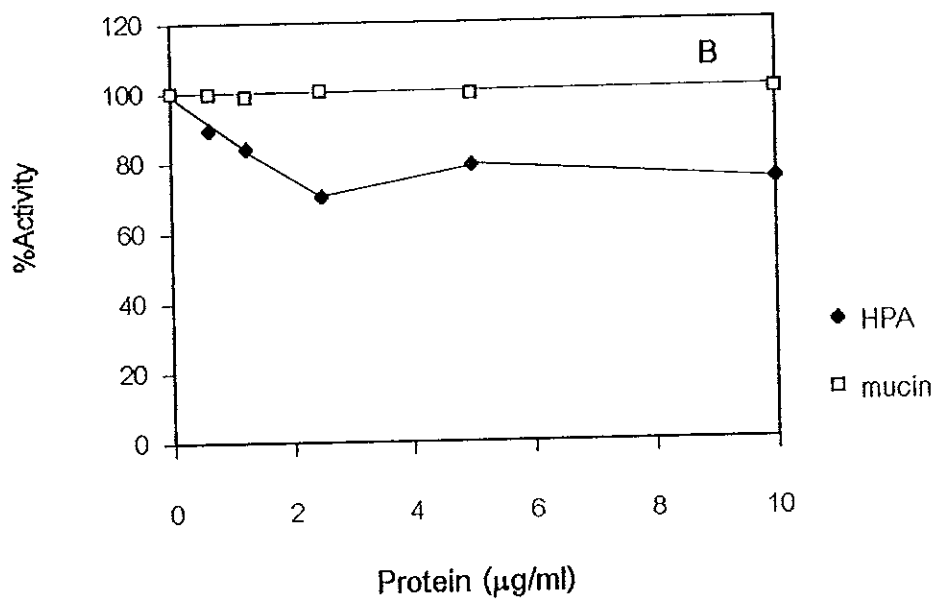
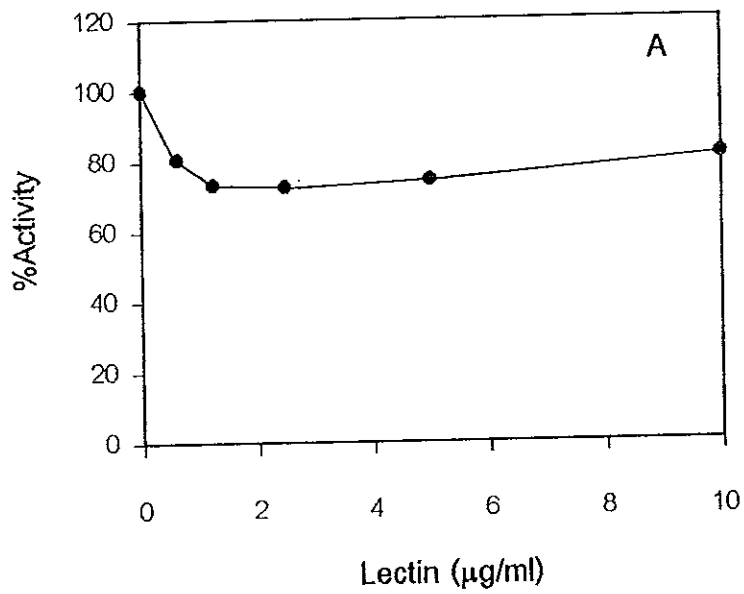
Sugar	Max. Inh. (%)	Conc. for half max. inh. (mM)
D-galactose	41.2	0.11
Methyl- α -D-galactoside	47.5	0.035
Methyl- β -D-galactoside	21.5	0.12
N-actyl-D-galactosamine	42.3	0.065
N-acetyl-D-glucosamine	23.8	0.11
Fucose	0	-

ตัวเลขในตารางได้จากการเฉลี่ย 2-3 การทดลอง

ตารางที่ 8 ผลการยับยั้ง ELLBA ด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ

Inhibitor	Maximal Inhibition	
	%	Minimal concentration
LPC binding		
Mucin	0	-
Lectin	27.3	1.25 μ g/ml
HPA (<i>Helix pomatia</i> agglutinin)	28.7	2.5 μ g/ml

ตัวเลขในตารางได้จากการเฉลี่ย 2-3 การทดลอง



รูปที่ 34 ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยเลคติน (A), มิวซินและ HPA (B)

ในการทดสอบใช้ SAV 300 mU/ml , BG 0.15 mM และ
LPC 4 µg/ml บ่มพร้อมโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

4. วิจารณ์

4.1 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเมล็ดจำปาตะ

ในการสกัดเลคตินจากเมล็ดจำปาตะน้ำหนัก 4 กรัม 3 การทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 4,915,218 หน่วยและ 35,437 หน่วย/มก.โปรตีน และมีปริมาณโปรตีน 138.7 มิลลิกรัม เมื่อคำนวณเทียบจากการใช้เมล็ดจำปาตะ 1 กรัม พบว่า สกัดโปรตีนออกมาได้ 34.7 มิลลิกรัม ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในครั้งนี้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับการสกัดโดย อุบล ตันสม (2541) ซึ่งมีค่า 30.0 ± 2.0 มิลลิกรัม เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนและเลคตินจากสารสกัดหยาบด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% พบว่าสารสกัดเลคตินที่ได้มีปริมาณโปรตีน 65.5 มิลลิกรัม คิดเป็น 47.2% ของสารสกัดหยาบ และมีแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 64,535 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.8 เท่าของสารสกัดหยาบ (ตารางที่ 4) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่รายงานโดย อุบล ตันสม (2541) ที่พบว่าการทำในสภาวะเดียวกันมีโปรตีนตกตะกอน $46.5 \pm 2.7\%$ และมีค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ± 0.2 เท่า ของสารสกัดหยาบเริ่มต้น ในการตกตะกอนโปรตีนและเลคตินจากพืชบางชนิดจะใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 60% เช่น เลคตินจากเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) ถูกตกตะกอนด้วยเกลือที่ความอิ่มตัว 60% (Namjuntra et al., 1985) และเลคตินจากเมล็ดเหียงถูกตกตะกอนด้วยเกลือที่ความอิ่มตัว 60% จะให้ค่าแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้น (Utarabhand and Akkayanont, 1995)

ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้วชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค คือ พีค S1 และพีค S2 ตามลำดับ (รูปที่ 6) พบว่าสารละลายโปรตีนพีค S1 มีแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงเป็น 102,560 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เป็น 2.9 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 4 เนื่องจากสารละลายพีค S1 มีความจำเพาะต่อน้ำตาล GalNAc จึงนำสารละลายพีค S1 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ N-acetyl

galactosamine-agarose แล้วชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีน ถูกชะออกมา 1 พีค (พีค GalA1) ซึ่งไม่มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 0.1 M กาแลคโตสในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีน (12.9 มิลลิกรัม) ถูกชะออกมาอีก 1 พีค คือพีค GalA2 ซึ่งมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์ 2,523,627 หน่วย และ 195,630 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 51.3% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.5 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้น ซึ่งในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และ N-acetyl galactosamine-agarose โดย อุบล ต้นสม (2541) พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7 เท่า เมื่อคิดเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง

4.2 สมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

เมื่อติดตามการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ ซึ่งตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 และคอลัมน์ N-acetyl galactosamine-agarose ตามลำดับ โดยการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส พบว่าขั้นตอนต่าง ๆ ที่ใช้ได้ กำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปจนเหลือเฉพาะเลคตินในสารละลายเลคตินพีค GalA2 ซึ่งปรากฏแถบโปรตีนเพียง 2 แถบ (รูปที่ 8) และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินทั้ง 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคตินทั้ง 2 แถบกับของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 8) พบว่าเลคตินแถบที่ I มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน เลคตินแถบที่ II มีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 46,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน จากงานวิทยานิพนธ์ของอุบล ต้นสม (2541) ได้พิสูจน์แล้วว่าสารละลายเลคตินพีค GalA2 เป็นเลคตินบริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชันและประกอบด้วยแถบโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบเท่ากับที่รายงานในงานวิทยานิพนธ์นี้ แบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเมล็ดขนุนที่เป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับเมล็ดจำปาตะ (Namjuntra *et al.*, 1985) และจากเมล็ด Champedak ที่แยกโดย Hashim *et al.* (1992) ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสเช่นกัน แต่เลคตินที่ทำให้

บริสุทธิ์จากเมล็ด *Champedak* (*Artocarpus integer*) โดย Lim *et al.* (1997) ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซิสแบบมีเอสดีเอส

เมื่อนำเลคตินบริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู ทั้งที่ยังไม่เจริญพันธุ์และที่เจริญพันธุ์ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ได้ดีกว่าตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ โดยสามารถเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ได้ 946 หน่วย/มก.โปรตีน และเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ได้ 573 หน่วย/มก.โปรตีน ในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิของหนูทั้ง 2 ชนิด โดยเลคตินบริสุทธิ์เกิดจากการที่ส่วนหัวของตัวอสุจิมาเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อน (รูปที่ 10) เช่นเดียวกับเลคตินจากเมล็ดขนุน (Namjuntra *et al.*, 1985) และเลคตินจากเมล็ดเหียง (Utarabhand and Akkayanont, 1995) ในขณะที่เลคตินจากเนียงนก (Niang Nok, *Pithecolobium bubalinum*) สามารถจับกลุ่มตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์แล้วได้ดีกว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (Utarabhand, 1990a) จากการศึกษาของอุบล ตันสม (2541) พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาตามลำดับคือเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่มาก A, B, AB และ O ซึ่งมีค่าเท่ากัน เม็ดเลือดแดงของหนู แกะ และหมู มีค่าเท่ากัน แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของแพะเกาะกลุ่มได้ แสดงว่าเลคตินสามารถทำให้เซลล์ต่างชนิดกันเกิดการเกาะกลุ่มได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสมบัติของผิวเซลล์แต่ละชนิดซึ่งมีความแตกต่างกัน การใช้เอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามิเนสย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายก่อนการนำมาทดสอบการเกาะกลุ่ม พบว่าทำให้แอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพิ่มขึ้น 4 และ 2 เท่าของเม็ดเลือดแดงที่ไม่ถูกย่อยตามลำดับ (อุบล ตันสม, 2541) เลคตินจากเมล็ดเหียงทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเพิ่มขึ้น 64 เท่า (ไพฑูรย์ อรรถยานนท์, 2536) เนื่องจากเอนไซม์ช่วยในการกำจัดโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตบางส่วนจากผิวเซลล์ซึ่งอาจปิดส่วนของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคติน ทำให้ปฏิกิริยาการจับกันระหว่างเลคตินและน้ำตาลบนผิวเซลล์เกิดได้ดีขึ้น

4.3 การเตรียมเลคตินเปอร์ออกซิเดส

จากการคอนจูเกตเลคตินบริสุทธิ์กับเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามวิธีในข้อ 2.5 เมื่อแยกเลคตินเปอร์ออกซิเดสออกจากเลคตินและเฮนไซม์อิสระที่เหลือด้วยการนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ซึ่งเป็นพีคที่มีโปรตีนส่วนใหญ่ (พีค LPC) และพีคที่มีโปรตีนส่วนน้อย ตามลำดับ (รูปที่ 11) และมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 81,920 และ 6,400 หน่วย ตามลำดับ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (A403) เพื่อติดตามเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดส เนื่องจากเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสมี prosthetic heme group ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร (Shannon *et al.*, 1966; Saeki *et al.*, 1986) พบค่านี้เฉพาะในสารละลายพีค LPC เท่านั้น และเมื่อวัดแอกทิวิตีของเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทพบเฉพาะในสารละลายพีค LPC เช่นกัน ซึ่งมีแอกทิวิตีของเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 17 หน่วย/มก.โปรตีน จึงบ่งชี้ว่าสารละลายพีค LPC เป็นเลคตินเปอร์ออกซิเดส (O'Sullivan and Marks, 1981)

เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดส (พีค LPC) โดยการทำให้โครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด โดยเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดสจากกราฟได้ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 90,150 ดัลตัน (รูปที่ 12) เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ที่ใช้เป็น 46,000 ดัลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใช้เท่ากับ 44,000 ดัลตัน ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ร่วมกับน้ำหนักโมเลกุลของเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดส บ่งชี้ว่าเลคตินจับกับเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดสในอัตราส่วน 1:1 (O'Sullivan and Marks, 1981)

4.4 การศึกษาชีวเซลล์ด้วยวิธีของหนูด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส

4.4.1 การย้อมเซลล์ด้วยวิธี

ตัวอสุจิของหนูหลังจากถูกสร้างภายในอวัยวะจะเคลื่อนที่ผ่านท่ออภิติโดมิสจากส่วนต้นไปยังส่วนปลาย ตัวอสุจิที่ได้จากอภิติโดมิสส่วนต้นยังไม่เจริญพันธุ์ไม่สามารถ

ปฏิสนธิไข่ ขณะที่จากอิพิดิโดมิสส่วนปลายเจริญพันธุ์แล้วมีความสามารถปฏิสนธิไข่ได้ เนื่องจากการเจริญพันธุ์ของตัวอสุจิในอิพิดิโดมิสเกิดควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์ (Koehler, 1981) เพื่อให้มีความเหมาะสมในการเข้าทำปฏิกริยาระหว่างตัวอสุจิและไข่ ในการย้อมผิวเซลล์ตัวอสุจิหนูด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดสแล้วดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่แตกต่างกันระหว่างผิวเซลล์ของตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์กับที่ยังไม่เจริญพันธุ์ กล่าวคือ มีการติดสีย้อมของเลคตินเปอร์ออกซิเดสเฉพาะส่วนหัวของตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (รูปที่ 13B) แต่ตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์มีการติดสีทั่วผิวเซลล์ทุกส่วนคือส่วนหัว กลางลำตัวและส่วนหาง (รูปที่ 13A) ผลการจับของผิวเซลล์ตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด กับเลคตินเปอร์ออกซิเดสสะท้อนให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลบนผิวเซลล์ตัวอสุจิ ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับผลการจับระหว่างเลคติน (จากเมล็ดขนุน) เปอร์ออกซิเดสกับตัวอสุจิหนูทั้ง 2 ชนิด (Prapunpoj and Chulavatnatol, 1996) แสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตและสมบัติในการจับผิวเซลล์ตัวอสุจิของเลคตินจะมีความจำเพาะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Perotti and Pasini, 1995)

4.4.2 แบบแผนโปรตีนในเมมเบรนของตัวอสุจิที่จับกับ เลคตินเปอร์ออกซิเดส

จากการสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์และยังไม่เจริญพันธุ์ของหนูด้วย 0.1% Triton X-100 (ตามวิธีในข้อ 2.8.1) แล้วนำสารสกัดเมมเบรนไปทำโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู พบว่าสารสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบมากมายซึ่งสังเกตความแตกต่างได้ยาก (รูปที่ 14) แต่เมื่อทำการขนถ่ายโปรตีนเหล่านี้จากโพลีอะคริลาไมด์ เจลไปยังแผ่นไนโทรเซลลูโลส พบโปรตีนหลายแถบของสารสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ที่ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบี (รูปที่ 15A) พบโปรตีนเพียงบางแถบเท่านั้นที่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส ปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบหลัก ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 และ 120,000 ดัลตัน ในขณะที่สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบหลัก ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 32,000, 52,000, 85,000 และ 100,000 ดัลตัน (รูปที่ 15B) ในการทดลองนี้พบว่าโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ซึ่งได้แก่

ฟอสฟอริเลสปี, BSA, ไอวัลบูมิน, คาร์โบนิคแอนไฮเดรต, ซอยบีปทริปซินอินฮิบิเตอร์ และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบีเท่านั้น แต่ไม่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 15) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่ไม่จับกับโปรตีนมาตรฐาน แต่จับจำเพาะกับโปรตีนในเมมเบรนของตัวอสุจิ และยังคงแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของไกลโคโปรตีนในเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามการเจริญพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการย้อมผิวเซลล์ (รูปที่ 13) และกับงานวิจัยที่มีการศึกษาแบบแผนโปรตีนในสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ย้อมด้วยเลคตินจากเมล็ดขนุนที่คอนจูเกตด้วยแอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดย Prapunpoj และ Chulavatnatol (1996) ซึ่งพบว่าสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 62,000, 99,000, 108,000 และ 118,000 ดัลตัน ในขณะที่สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ที่ย้อมติดสีเลคตินเปอร์ออกซิเดส ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 62,000, 118,000 และ 127,000 ดัลตัน

4.4.3 การจับเชิงปริมาณของตัวอสุจิกับเลคตินเปอร์ออกซิเดส

เมื่อทำการวิเคราะห์การจับเชิงปริมาณของเลคตินเปอร์ออกซิเดสต่อตัวอสุจิหนูทั้ง 2 ชนิด พบว่าตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์จับกับเลคตินเปอร์ออกซิเดสได้ 1.03×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์ ซึ่งมากกว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ที่จับกับเลคตินเปอร์ออกซิเดสได้ 0.58×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์ (รูปที่ 16) ผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกับการจับระหว่างเลคตินจากเมล็ดขนุนซึ่งจับกับตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ (4.3×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์) มากกว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (1.8×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์) (Prapunpoj and Chulavatnatol, 1996) และสอดคล้องกับผลการย้อมผิวเซลล์ (รูปที่ 13) ที่พบว่าตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์จะจับกับเลคตินเปอร์ออกซิเดสตลอดทั้งตัว ขณะที่ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์จับกับเลคตินเปอร์ออกซิเดสเฉพาะส่วนหัว แต่คำนวณผลการเกาะกลุ่มตัวอสุจิที่พบว่าเลคตินอิสระจะทำให้ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่ม (946 หน่วย/มก.โปรตีน) ได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ (573 หน่วย/มก.โปรตีน) (Utarabhand, 1990b; อุบล ตันสม, 2541) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความไวของการทดสอบทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันมาก กล่าวคือ การคำนวณหาแอกทิวิตีในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิได้จากการกำหนดคะแนนของการเกาะกลุ่มตามวิธีการข้อ 2.3.2 ซึ่งเป็น การวิเคราะห์เชิงกึ่งปริมาณ และจะเห็นว่าการเกาะกลุ่มที่เกิดได้จากการรวมกลุ่มของเฉพาะ

ส่วนหัวของตัวอสุจิเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 10) ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันทั้ง 2 ชนิด โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการใช้เลคตินเพื่อคำนวณหาแอกทิวที่อาจเป็นไปได้ที่ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ใช้เลคตินที่จับเฉพาะที่ส่วนหัวและเกิดการเกาะกลุ่มได้ง่าย ขณะที่ตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ใช้เลคตินปริมาณมากกว่าเพื่อจับทั้งตัว แต่บริเวณส่วนหัวอาจมีน้ำตาลหลายตำแหน่งทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเฉพาะส่วนหัว เมื่อคิดปริมาณเลคตินที่ใช้ในการเกาะกลุ่ม ตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ใช้เลคตินในการเกาะกลุ่มด้วยปริมาณน้อยกว่าจึงมีแอกทิวที่สูงกว่า ทำให้ผลของการทดสอบเช่นนี้ไม่สะท้อนถึงค่าที่แท้จริงของการจับและมีความไวต่ำ (ระดับไม่โครกรัมโปรตีนของเลคติน) ในขณะที่การใช้เลคตินเปอร์ออกซิเดสเป็นการวิเคราะห์ค่าการจับที่แท้จริงกับตัวอสุจิ (รูปที่ 16) และมีความไวสูงมากในระดับต่ำกว่านาโนกรัมโปรตีนของเลคติน

4.5 การทำปฏิกิริยาของเลคตินเปอร์ออกซิเดส

4.5.1 การย้อมเซลล์เม็ดเลือด

จากการศึกษาการย้อมผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของคนด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดสเปรียบเทียบกับกรย้อมด้วยสียไรท์ ซึ่งเป็นวิธีการจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดโดยทั่วไป (ไพเกษม แสนยานุสิน, 2533) พบว่าเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะย้อมติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดส แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงจับได้กับเลคติน สอดคล้องกับการที่เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนทุกหมู่เกิดการเกาะกลุ่มได้เท่ากับ 13,653 หน่วย/มก.โปรตีน (อุบล ต้นสม, 2541) ในขณะที่ทั้งเม็ดเลือดขาวที่เจริญเต็มที่ของคนปกติ หรือเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนที่พบจำนวนมากในคนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่ย้อมติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดส อาจเนื่องจากไม่มีแหล่งจับที่จำเพาะระหว่างผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเลคติน เป็นที่น่าเสียดายที่เลคตินจากเมล็ดจำปาจะไม่สามารถใช้จำแนกเม็ดเลือดขาวที่ต่างชนิดได้

4.5.2 การทำปฏิกิริยากับอิมมูโนโกลบูลิน

เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาจะสามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA ของคนใน gel double diffusion แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG ของคน (อุบล ต้นสม, 2541) เมื่อนำ IgG และ IgA ของคน ไปทำไฟลิ่งอะคริลไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส และขนถ่ายไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสตามวิธีข้อ 2.8.3 พบว่าส่วนโปรตีนของทั้ง IgG และ

IgA ย่อมติดสีอะมิโดแบล็คบี แต่เฉพาะ IgA เท่านั้นที่ย่อมติดสีของเลคตินเปออร์ออกซิเดส (รูปที่ 18) อิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นโกลโคโปรตีน มีสายน้ำตาลที่มีความจำเพาะต่อเลคตินที่แตกต่างกัน เลคตินจากเมล็ดจำปาดะ (Champedak) สามารถทำปฏิกิริยากับ IgA1 จากซีรัมของคุณและ sIgA จากน้ำนมได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgA2, IgD, IgG และ IgM (Hashim *et al.*, 1992) เช่นเดียวกันกับเลคตินจากเมล็ดขนุน (jacalin) (Skea *et al.*, 1988; Kabir, 1993)

4.6 การเตรียมไบโอตินกาแลคโตส

จากการคอนจูเกต biotin hydrazide กับน้ำตาลกาแลคโตส ตามวิธีในข้อ 2.9.1 พบว่าไบโอตินกาแลคโตสที่แยกได้จาก Sephadex G-10 มีน้ำหนักโมเลกุล 440 ดัลตัน เมื่อหาด้วยวิธีเจลฟิลเทรชัน ที่มี Na_2ATP , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ และน้ำตาลกาแลคโตส เป็นสารมาตรฐาน biotin hydrazide ที่ใช้น้ำหนักโมเลกุล 260 ดัลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของกาแลคโตสเป็น 180 ดัลตัน บ่งชี้ว่าไบโอตินกาแลคโตสได้จากการจับหว่างไบโอตินและกาแลคโตสด้วยอัตราส่วน 1:1 (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997; O'Shannessy *et al.*, 1987)

4.7 การพัฒนา Binding assay ในการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคติน

การตรวจหาโมเลกุลทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลทเป็นที่นิยมกันมาก ได้มีศึกษาการจับของเลคตินกับน้ำตาลหลายวิธี โดยการใช้เลคตินคอนจูเกตกับเอนไซม์ (McCoy *et al.*, 1983; Van der Schaal *et al.*, 1984; Shao, 1992) หรือใช้เลคตินคอนจูเกตกับไบโอติน (Duk *et al.*, 1994) วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เกิดกีดกันของเลคตินลดลงในขั้นตอนการคอนจูเกต โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเลคตินบริสุทธิ์มีปริมาณน้อย การคอนจูเกตอาจทำได้ยากและอาจจะไม่เหลือมากกลับมาใช้ การใช้น้ำตาลคอนจูเกตกับไบโอติน (Shao, 1992; Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; O'Shannessy *et al.*, 1987) เป็นทางเลือกที่หลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดกีดกันของเลคตินลดลง จากการศึกษาด้วยวิธี X-ray crystallography (Weis and Drickamer, 1996) พบว่าน้ำตาลจะจับกับเลคตินด้วยพันธะอ่อนๆ ระหว่างแหล่งจับของเลคตินกับน้ำตาล หากการคอนจูเกตไม่ได้รับกวนตำแหน่งสำคัญในการจับกันระหว่างน้ำตาลกับเลคติน น้ำตาลที่คอนจูเกตกับไบโอตินก็ยังคงถูก

จดจำโดยเลคตินได้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไบโอดีโนกาแลคโตสสามารถถูกจดจำและจับกับเลคติน (รูปที่ 22) หรือกับเลคตินเปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 32) ได้

4.7.1 การใช้ LBA ทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินบิริสุทธิ

ในการพัฒนาวิธี LBA เพื่อทดสอบความจำเพาะของเลคตินต่อน้ำตาล ทำโดยการเคลือบเพลทด้วยเลคตินบิริสุทธิ จากนั้นเติมไบโอดีโนกาแลคโตส แล้วติดตามปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสที่จับกับเลคติน โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อยู่ในรูปของ SAV-HRP ในวิธีการนี้ นอกเหนือจากการมีไบโอดีโนกาแลคโตสที่เหมาะสมโดยถูกจดจำและจับกับเลคตินได้แล้ว ยังต้องการการจับที่ดีระหว่างเลคตินกับผนังของไมโครไตเตอร์เพลท ซึ่งพบว่าเลคตินจากเมล็ดจำปาจะสามารถจับกับเพลทได้โดยตรง (รูปที่ 21) เช่นเดียวกับเลคตินจากเมล็ดขนุน (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997) ในขณะที่เลคตินแบบ E ต้องการโปรตีนอื่นเป็นตัวเชื่อมกับแอนติบอดี เพื่อถูกตรึงไว้ในเพลท (Weitz-Schmidt *et al.*, 1996) ในการใช้วิธี LBA เพื่อทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคติน โดยการใช้ น้ำตาลที่จำเพาะยับยั้งการจับของไบโอดีโนกาแลคโตส ต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเลคตินเพื่อใช้ในการเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทและของไบโอดีโนกาแลคโตส เพื่อให้ได้ความไวของ LBA ดีที่สุด ได้ใช้ความเข้มข้นของเลคติน 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ซึ่งมีความไวในช่วงกราฟขั้นที่สุด, รูปที่ 21) ไบโอดีโนกาแลคโตส 0.15 mM และ SAV-HRP 300 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร (รูปที่ 22 และ 24) ความเข้มข้นของเลคตินและไบโอดีโนกาแลคโตส ที่ต่ำกว่านี้ยังคงใช้ได้แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ของ ผลผลิตจะลดลง และเพื่อทำให้ A492 ของปฏิกิริยามีค่าสูงในระดับเชื่อถือได้ ได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดส คือใช้ความเข้มข้นของ OPD เป็น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, H_2O_2 0.012% และเวลาในการเกิดปฏิกิริยานาน 15 นาที การใช้ 3% treated BSA สามารถลดการจับแบบไม่จำเพาะของ SAV-HRP ต่อเพลทได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 23) (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997; Shao, 1992)

ค่าที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี LBA สำหรับการยับยั้งด้วยน้ำตาลหรือไกลโคโปรตีน คือ ค่าการยับยั้งสูงสุด (maximal inhibition) และความเข้มข้นในการทำให้เกิดการยับยั้งสูงสุดได้ครึ่งหนึ่ง (concentration for half maximal inhibition, $C_{0.5}$) ค่าการยับยั้งสูงสุดแสดงให้เห็นถึงความแรงในการจับกันระหว่างเลคตินกับน้ำตาลที่เข้ามายับยั้ง ขณะที่

ความเข้มข้นในการทำให้เกิดการยับยั้งสูงสุดได้ครั้งหนึ่ง แสดงถึงน้ำตาลชนิดนั้นมีความสามารถในการจับกับแหล่งจับของเลคตินได้ดีเพียงใด ดังตัวอย่าง เช่น น้ำตาล Met- α -Gal มีค่า $C_{0.5}$ เป็น 0.08 mM สามารถเข้าจับกับแหล่งจับของเลคตินได้ดีกว่าน้ำตาล GalNAc และกาแลคโตส ซึ่งมีค่า $C_{0.5}$ เป็น 0.12 และ 0.13 mM ตามลำดับ และน้ำตาล Met- α -Gal สามารถยับยั้งได้สูงสุด แสดงให้เห็นว่ามีการจับกับเลคตินแรงกว่าน้ำตาล GalNAc และกาแลคโตส ซึ่งยับยั้งได้สูงสุดเป็น 46.6 และ 39.9% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในการยับยั้ง LBA โดยน้ำตาล เกิดได้สูงสุดที่ 49.2% โดย Met- α -Gal หมายถึง ไบโอดีนกาแลคโตส สามารถจับกับเลคตินที่ตรึงอยู่ในไมโครไตเตอร์เพลทได้ 50.8% ซึ่งไม่ถูกแย่งจับโดยน้ำตาล Met- α -Gal อาจเป็นไปได้ที่ไบโอดีนกาแลคโตสอาจจับอยู่ระหว่างเลคตินกับผนังของไมโครไตเตอร์เพลท หรือระหว่างโมเลกุลของเลคตินที่ถูกตรึงกับผนังไมโครไตเตอร์เพลท แต่อย่างไรก็ตามโมเลกุลของไบโอดีนที่ถูกซ่อนอยู่ยังคงมีสมบัติในการจับกับ SAV-HRP ทำให้สามารถตรวจวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ใน LBA ได้ ดังนั้นการยับยั้งที่ไม่สมบูรณ์ที่เกิดระหว่างการจับของไบโอดีนกาแลคโตสกับเลคตินที่ถูกตรึงในเพลท มีผลต่อการแข่งขันระหว่างตัวยับยั้งกับไบโอดีนกาแลคโตสที่แหล่งจับเดียวกัน (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997)

นอกเหนือจากน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์แล้ว เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาตะและ HPA ซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตส ในรูปสารละลายอิสระสามารถยับยั้ง LBA ได้มากที่สุด 23.4 และ 29.1% ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.25 และ 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของเลคตินที่ถูกตรึงในเพลทต่อน้ำตาลกาแลคโตสหรือต่อไบโอดีนกาแลคโตสคอนจูเกต ในขณะที่ BSA หรือมีวซินซึ่งไม่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบไม่มีผลต่อปฏิกิริยาใน LBA นอกจากนี้ความจำเพาะของการจับระหว่าง SAV-HRP กับไบโอดีนกาแลคโตส ยังถูกแสดงโดยการยับยั้งด้วยไบโอดีนอิสระซึ่งพบว่า ไบโอดีนที่ความเข้มข้น 200 nM สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 66.6% และ SAV สามารถยับยั้ง LBA ได้ 50.2% ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงถึงความจำเพาะของปฏิกิริยาระหว่าง SAV-HRP กับไบโอดีนกาแลคโตส ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอิสระ ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาดังกล่าว (ตารางที่ 6)

ในการเปรียบเทียบผลของการยับยั้งเลคตินด้วยน้ำตาลโดยวิธี LBA และวิธีการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition test, HAI) ดังแสดง

ในตารางที่ 9 พบว่าเลคตินจากเมล็ดจำปาจะมีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสอนุพันธ์ต่างๆ มากกว่า GlcNAc บ่งชี้ว่าเลคตินต้องการหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่ง C2, C4 และ C6 ของน้ำตาลในการเกิดพันธะ ดังเช่น ฟูโคสซึ่งมีหมู่ไฮดรอกเจน (-H) แทนหมู่ไฮดรอกซีที่ C6 จะไม่สามารถจับกับเลคตินได้ การแทนที่หมู่ไฮดรอกซีที่ C2 ด้วยหมู่อะซิติล (acetyl group) เช่นใน GalNAc (ยับยั้ง LBA ได้ 46.6%) ทำให้เกิดการจับกับเลคตินได้ดีกว่ากาแลคโตส (C2 มีหมู่ไฮดรอกซี และยับยั้ง LBA ได้ 39.9%) (Hagiwara *et al.*, 1988; Ahmed and Chatterjee, 1989; Wetprasit and Chulavatnatol, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลกาแลคโตสที่มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซีที่ C1 ด้วยหมู่เมทิล (-CH₃) ในรูปแบบแอลฟา (Met- α -Gal) มีความจำเพาะต่อเลคตินดีที่สุดใน (ยับยั้ง LBA ได้ 49.2%) และมากกว่ารูปแบบเบตา (Met- β -Gal) ซึ่งยับยั้ง LBA ได้ 27.8% ที่สำคัญก็คือวิธี LBA เป็นการตรวจวัดเชิงปริมาณ ต้องการใช้น้ำตาลและเลคตินในการทดสอบในปริมาณที่น้อยกว่าวิธี HAI มาก แสดงถึงความไวของวิธี LBA มากกว่าวิธี HAI นอกจากนี้สามารถแก้ปัญหาความแปรผันของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายแต่ละชุดที่นำมาทดสอบ HAI เป็นการวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณและมีเซลล์เม็ดเลือดแดงมีคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

4.7.2 การใช้ ELLBA ทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของ เลคตินเปอรัออกซิเดส

ในการพัฒนาวิธี ELLBA เพื่อทดสอบความจำเพาะของเลคตินต่อน้ำตาล ทำโดยการตรึง SAV ในเพลท จากนั้นเติมไบโอดีนาแกแลคโตส เพื่อให้จับกับ SAV แล้วติดตามปริมาณไบโอดีนาแกแลคโตสที่จับกับ SAV ที่ถูกตรึงโดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอรัออกซิเดสที่จับอยู่กับเลคตินบริสุทธิ (เลคตินเปอรัออกซิเดส) จากผลงานวิจัยที่ทราบกันดีว่า SAV สามารถถูกตรึงบนผนังเพลทได้ (Shao, 1992) ในที่นี่ได้ใช้ SAV ความเข้มข้นเท่ากับ SAV-HRP ที่ใช้ในวิธี LBA คือ 300 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในการเคลือบเพลท และเพื่อให้ได้ความไวของการทดสอบที่ดีที่สุด ใช้ไบโอดีนาแกแลคโตส 0.15 mM (รูปที่ 29) และเลคตินเปอรัออกซิเดส 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 32) ในการวิเคราะห์ และเพื่อให้ผลผลิต (A492) มีค่าสูงในระดับที่น่าเชื่อถือได้ เนื่องจากเลคตินเปอรัออกซิเดสสามารถจับกับไมโครไโตเตอร์เพลทได้ด้วย (รูปที่ 30) ได้ยับยั้งการจับระหว่างเลคตินเปอรัออกซิเดสกับไมโครไโตเตอร์เพลทด้วย 3% treated BSA ซึ่งสามารถยับยั้งการจับกับเพลทได้มากกว่า 90%

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลของการยับยั้งแอกทีวิตีของเลคตินด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ

น้ำตาล	LBA		ELLBA		HAI ^a
	Max. Inh. (%)	C _{0.5} (mM)	Max. Inh. (%)	C _{0.5} (mM)	Min. Conc. for 50% inh.(mM)
D-galactose	39.9	0.13	41.2	0.11	40
Methyl- α -D-galactoside	49.2	0.08	47.5	0.035	3.12
Methyl- β -D-galactoside	27.8	0.28	21.5	0.12	0-200 No inhibition
N-actyl-D-galactosamine	46.6	0.12	42.3	0.065	18.5
N-acetyl-D-glucosamine	19.8	0.08	23.8	0.11	0-200 No inhibition
Fucose	0	0 - 2.0 No inh.	0	0 - 2.0 No inh.	-

C_{0.5} = concentration for half maximal inhibition

HAI^a = hemagglutination inhibition (อุบล ตันสม. 2541)

และเนื่องจากปฏิกิริยาการจับระหว่างเลคตินเปอร้ออกซิเดสกับไบโอตินกาแลคโตสเกิดได้ช้า จึงปล่อยให้ปฏิกิริยานี้เกิดนาน 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของ เลคตินเปอร้ออกซิเดสโดยการเติมน้ำตาลแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มพร้อมกับ เลคตินเปอร้ออกซิเดส ผลของการยับยั้ง ELLBA ด้วยน้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบ 6 ชนิด พบว่าน้ำตาลที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้สูงสุดเรียงตามการยับยั้งจากมากไปหาน้อยตาม ลำดับ เป็นดังนี้ น้ำตาล Met- α -Gal (47.5%), GalNAc (42.3%) และน้ำตาลกาแลคโตส (41.2%) โดยมีค่า $C_{0.5}$ เป็น 0.035, 0.065 และ 0.11 mM ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ในขณะที่น้ำตาล GlcNAc และ Met- β -Gal สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ 23.8 และ 21.5% ตามลำดับ โดยมีค่า $C_{0.5}$ เป็น 0.11 และ 0.12 mM ตามลำดับ การยับยั้ง ELLBA โดยน้ำตาลมีลักษณะเช่นเดียวกันกับวิธี LBA คือมีค่าการยับยั้งสูงสุดที่ใกล้เคียงกันใน น้ำตาลแต่ละชนิด แต่ค่า $C_{0.5}$ มีค่าต่ำกว่าวิธี LBA อาจเนื่องมาจากแหล่งจับของเลคติน ไม่ได้ถูกปิดไว้จากการตรึงในไมโครไตเตอร์เพลทเหมือนเช่นในวิธี LBA ในการทดสอบ ความจำเพาะของการจับระหว่างไบโอตินกาแลคโตสกับเลคตินเปอร้ออกซิเดส พบว่าเลคติน อีสระและ HPA ซึ่งจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตส สามารถแข่งขันการจับระหว่างไบโอติน กาแลคโตสกับเลคตินเปอร้ออกซิเดสได้ ในขณะที่มิวซินไม่มีผลต่อปฏิกิริยาดังกล่าว (ตาราง ที่ 8)

ในการเปรียบเทียบวิธีทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินจากเมล็ดจำปาตะ โดยวิธี LBA, ELLBA และ HAI สรุปได้ว่า เลคตินจากเมล็ดจำปาตะมีความจำเพาะต่อ น้ำตาลกาแลคโตสและอนุพันธ์ การยับยั้งของเลคตินโดยน้ำตาลเหล่านี้ให้ผลใกล้เคียงกัน มากในวิธี LBA และ ELLBA แสดงถึงความไวของวิธีทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าการ คอนจูเกตเลคตินกับเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส (ใน ELLBA) หรือการตรึงเลคตินกับผนังเพลท (ใน LBA) ไม่มีผลต่อแอกทิวิตีของเลคตินหรือต่อแหล่งจับต่อน้ำตาล ความไวของการ ทดสอบโดยวิธี LBA หรือ ELLBA มีค่าสูงกว่าวิธี HAI ประมาณ 90-300 เท่า ซึ่งแสดงโดย ค่า $C_{0.5}$ ที่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 9) และการใช้เลคตินหรือน้ำตาลในปริมาณที่น้อยกว่า มาก การยับยั้ง LBA หรือ ELLBA โดยน้ำตาล เช่น Met- α -Gal ที่ยับยั้งได้มากที่สุดเป็น 47.5 - 49.2% ที่ความเข้มข้น 0.035 - 0.08 mM สะท้อนให้เห็นถึงปริมาณน้ำตาลใน ไบโอตินกาแลคโตสซึ่งถูกซ่อนอยู่ดังกล่าวแล้ว การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลอีสระ

มากกว่าค่า $C_{0.5}$ กลับลดการยับยั้งลง (รูปที่ 25 และ 33) ดังเกิดเช่นกันในเลคตินจากเมล็ดขนุน (Wetprasit and Chulavatnatol, 1997) อาจเป็นเพราะมีแหล่งจับกับน้ำตาลในโมเลกุลเลคตินที่ถูกตรึงในเพลทหรือโดยการคอนจูเกต (เลคตินเปอร์ออกซิเดส) เกิดการเกาะกลุ่มกันเอง (aggregate) และแหล่งจับเหล่านี้ถูกกระตุ้นบางส่วนโดยน้ำตาลอิสระที่ความเข้มข้นสูงกว่า $C_{0.5}$ ทำให้จับกับไบโอตินกาแลคโตสได้เพิ่มขึ้น (ค่าการยับยั้งลดลง) อาจเป็นไปได้ที่เลคตินจากเมล็ดจำปาจะมีแหล่งจับหลายตำแหน่ง ซึ่งบางส่วนจับกับไบโอตินกาแลคโตส และบางส่วนเกาะกลุ่มกันเองก่อนจะเหลือบางส่วนให้จับกับไบโอตินกาแลคโตส เมื่อแทนที่ไบโอตินกาแลคโตสด้วยน้ำตาลอิสระ การเกาะกลุ่มของแหล่งจับอาจคลายตัวแล้วปล่อยแหล่งจับให้เป็นอิสระต่อการจับกับไบโอตินกาแลคโตส ทำให้พบการยับยั้งลดลงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า $C_{0.5}$ (รูปที่ 25 และ 33)

ในขั้นตอนการล้าง SAV-HRP (ใน LBA) หรือเลคตินเปอร์ออกซิเดส (ใน ELLBA) ที่เหลือออกจากเพลท พบว่าการล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3, 4 และ 5 ครั้ง ให้ค่า A492 ที่ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการล้างสารดังกล่าว 3 ครั้ง ก็สามารถล้างสารที่เหลืออยู่ได้เกือบหมด (มากกว่า 90%) ในการทดสอบทั้ง 2 วิธี จึงใช้การล้างเพียง 3 ครั้ง

อย่างไรก็ตามในการทดสอบความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตของเลคตินโดยวิธี binding assay ทั้ง 2 แบบ มีข้อควรคำนึง 2 ประการคือ น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่คอนจูเกตกับไบโอตินจะต้องถูกจดจำและจับกับเลคตินได้ และเลคตินจะต้องยึดติดกับผนังของเพลทได้โดยตรง (LBA) หรือการคอนจูเกตกับเอนไซม์ (เลคตินเปอร์ออกซิเดสใน ELLBA) จะต้องไม่มีผลกระทบต่อแหล่งจับของเลคติน

5. สรุป

จากการศึกษาการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเลคตินของเมล็ดจำปาตะ การเตรียมเลคตินคอนจูเกตจากเลคตินบริสุทธิ์ และประยุกต์ใช้เลคตินคอนจูเกตศึกษาผิวเซลล์ และความจำเพาะต่อน้ำตาล สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสารสกัดเลคตินของเมล็ดจำปาตะโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และ N-acetyl galactosamine-agarose สามารถแยกได้เลคตินที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.5 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้น

2. เลคตินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบมีเอสดีเอส ได้แก่ เลคตินแถบ I ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน ติดสีย้อมคумаซีบลู จางกว่าเลคตินแถบ II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน และมีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน จากการหาโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน

3. เลคตินบริสุทธิ์ทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่ม (946 หน่วย/มก. โปรตีน) ได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ (573 หน่วย/มก. โปรตีน)

4. เลคตินเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการคอนจูเกตเลคตินบริสุทธิ์กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่ามีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายและมีแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีน้ำหนักโมเลกุล 90,150 ดัลตัน เมื่อหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 บ่งชี้ว่าเลคตินเปอร์ออกซิเดสเกิดจากการคอนจูเกตของเลคตินบริสุทธิ์ (46,000 ดัลตัน) กับเปอร์ออกซิเดส (44,000 ดัลตัน) ด้วยอัตราส่วน 1:1

5. เมื่อย้อมผิวเซลล์ตัวอสุจิหนูด้วยเลคตินเปอร์ออกซิเดส พบว่าตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์มีการติดสีย้อมของเลคตินเปอร์ออกซิเดสเฉพาะส่วนหัว ในขณะที่ตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์มีการติดสีทั่วทั้งตัว แสดงว่าการเจริญพันธุ์ของตัวอสุจิในอูปีดิโดมิสเกิดควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลบนผิวเซลล์

6. เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในเมมเบรนของตัวอสุจิที่จับกับเลคตินเปอร์ออกซิเดส โดยการทำให้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสของสารสกัดเมมเบรนจากตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด แล้วย้อมด้วยสีคумаซีบลู ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบซึ่งสังเกตความ

แตกต่างระหว่างเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ได้ยาก เมื่อขนถ่ายแถบโปรตีนเหล่านี้ไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็คบี ยังปรากฏโปรตีนหลายแถบที่เห็นความแตกต่างยาก แต่การย้อมด้วยเลคตินเปอโรออกซิเดส พบว่าสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ย้อมติดสีเลคตินเปอโรออกซิเดส 5 แถบ (38,000, 53,000, 81,000, 95,000 และ 120,000 ดัลตัน) ในขณะที่สารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ย้อมติดสีเลคตินเปอโรออกซิเดส 4 แถบ (32,000, 52,000, 85,000 และ 100,000 ดัลตัน) และโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ที่ใช้ ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบีเท่านั้น แต่ไม่ย้อมติดสีของเลคตินเปอโรออกซิเดส

7. ในการวิเคราะห์การจับเชิงปริมาณของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด กับเลคตินเปอโรออกซิเดส พบว่าตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์จับกับเลคตินเปอโรออกซิเดส (1.03×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์) ได้ดีกว่าการจับของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (0.58×10^8 ไมโครกรัม/เซลล์)

8. จากการทดลองใช้เลคตินเปอโรออกซิเดสศึกษาผิวเซลล์ของเม็ดเลือดของคน โดยการย้อมเซลล์เปรียบเทียบกับที่ย้อมด้วยสีไรท์ พบว่าเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ถูกย้อมด้วยสีไรท์จะติดสีชมพูแดงและมีสีแดงอมส้มเมื่อย้อมด้วยเลคตินเปอโรออกซิเดส ในการย้อมเม็ดเลือดขาวด้วยสีไรท์ พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมีนิวเคลียสติดสีม่วงเข้มไซโทพลาซึมติดสีฟ้าอ่อนใส มีแกรนูลจำเพาะติดสีม่วง นิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ติดสีม่วงเข้ม ไซโทพลาซึมติดสีฟ้าอ่อนและใส ส่วนเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนที่พบจำนวนมากในเลือดของคนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่านิวเคลียสติดสีชมพูอมม่วง ส่วนไซโทพลาซึมติดสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน แต่เม็ดเลือดขาวทุกชนิดไม่ย้อมติดสีของเลคตินเปอโรออกซิเดส

9. ในการทำ Western blot ของ IgG และ IgA ของคน พบว่าทั้ง IgG และ IgA ย้อมติดสีอะมิโดแบล็คบี แต่เฉพาะ IgA เท่านั้นที่ย้อมติดสีของเลคตินเปอโรออกซิเดส

10. จากการเตรียมไบโอตินกาแลคโตส โดยการคอนจูเกต biotin hydrazide (260 ดัลตัน) กับน้ำตาลกาแลคโตส (180 ดัลตัน) พบว่าไบโอตินกาแลคโตสที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุล 440 ดัลตัน เมื่อหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-10 บ่งชี้ว่าเป็นการคอนจูเกตระหว่างไบโอตินกับกาแลคโตสด้วยอัตราส่วน 1:1

11. ในการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลโดย Lectin binding assay (LBA) สภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบใช้เลคติน 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ไบโอตินกาแลคโตส

0.15 mM, SAV-HRP 300 มิลลียูนิต/มิลลิลิตร, OPD 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, H₂O₂ 0.012% และเวลาของการเกิดปฏิกิริยา SAV-HRP นาน 15 นาที โปรตีนที่สามารถยับยั้ง LBA ได้จากมากไปหาน้อยตามลำดับคือ ไบโอติน (66.6%), SAV (50.2%), HPA (29.1%) และเลคตินบรียูสท์ (23.4%) แต่มีวซัน, BSA และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ไม่ยับยั้งปฏิกิริยา ในการทดสอบเช่นนี้

12. ในการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลโดย Enzyme-linked lectin binding assay (ELLBA) ใช้ SAV 300 มิลลียูนิต/มิลลิลิตร, ไบโอตินกาแลคโตส 0.15 mM และ เลคตินเปอร์ออกซิเดส 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และวัดแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดสในสภาวะเดียวกับ LBA และพบว่าเลคตินบรียูสท์และ HPA ยับยั้ง ELLBA ได้ 27.3 และ 28.7% ตามลำดับ ในขณะที่มีวซันไม่มีผลต่อ ELLBA

13. LBA และ ELLBA สามารถใช้ทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคติน ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยพบว่าเลคตินจากเมล็ดจำปาจะมีความจำเพาะอย่างสูงต่อน้ำตาล 3 ชนิด ซึ่งถูกยับยั้งได้มากที่สุดและมีค่า C_{0.5} เรียงตามลำดับจากความจำเพาะและวิธีการ (LBA, ELLBA) ดังนี้ Met- α -gal (49.2% ที่ 0.08 mM, 47.5% ที่ 0.035 mM), GalNAc (46.6% ที่ 0.12 mM, 42.3% ที่ 0.065 mM) และน้ำตาลกาแลคโตส (39.9% ที่ 0.13 mM, 41.2% ที่ 0.11 mM) ตามลำดับ ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธีการทดสอบความจำเพาะแบบ hemagglutination inhibition test (HAI) 90-300 เท่า

เอกสารอ้างอิง

- กนกนาค ชูปัญญา. 2520. *คู่มือการตรวจทางห้องปฏิบัติการเล่ม 1*. กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง)*. กรุงเทพฯ: หจก. ฟีนีทซ์บลิซซิ่ง.
- เปรมปรี ณ สงขลา. 2540. ค้นหาพืชสกุลขนุนพันธุ์ที่สงขลา. *วารสารเคหการเกษตร*. 21 (มกราคม): 112 – 117.
- ไพเกษม แสณยานุสิน. 2533. การตรวจสเมียร์เลือด. ใน *สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว, นันทรัตน์ ไชยมานะสิน (บรรณาธิการ), คู่มือปฏิบัติการจุลทรรศน์วินิจฉัย*. หน้า 79 – 91. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ไพฑูรย์ อรรถยานนท์. 2536. *การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหียง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี ทิมลพันธ์, นราธร บานชื่น และทัศนีย์ สุโกศล. 2529. *อิมมูโนวิทยา*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุภินันท์ สเป็ค-สายเชื้อ. 2534. *ภาพสีประกอบโลหิตวิทยา*. ขอนแก่น: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อนุชิต พลบูรณ์การ และ อรุณพร อีฐรัตน์. 2534. สมบัติทางเคมีและกายภาพของสารสกัดคาร์โบไฮเดรตจากเปลือกด้านในขนุนและจำปาตะ. *วารสารสงขลานครินทร์*. 15: 2 – 3.
- อุบล ต้นสม. 2541. *การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของเลคตินจากเมล็ดจำปาตะ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- Agrawal, B.B. and Goldstein, I.J. 1968. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin A-polysaccharide interaction. *Can. J. Biochem.* 46: 1147 – 1150.
- Ahemed, H. and Chatterjee, B.P. 1986. Purification and characterization of an α -D-galactosyl-binding lectin from the seed of jack fruit, *Artocarpus integrifolia*. *Lectins* 5: 125 – 133.
- Appukuttan, P.S. and Basu, D. 1985. Four identical subunits in jack fruit seed agglutinin offer only two saccharide binding sites. *FEBS Lett.* 180: 331 - 334.
- Aucouturier, P., Mihaesco, E., Mihaesco, C. And Preud'homme, J.L. 1987. Characterization of jacalin, the human IgA and IgD binding lectin from jackfruit. *Mol. Immunol.* 24: 503 – 511.
- Ballou, C.E. 1970. Study of the immunochemistry of three yeast mannans. *J. Biol. Chem.* 245: 1197 – 1203.
- Barondes, S.H. 1984. Soluble Lectins: A new class of extracellular proteins. *Science* 223: 1259 – 1264.
- Barondes, S.H. 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *TIBS* 13: 480 – 482.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N.W., Gitt, M.A. and Leffler, H. 1994. Galectins. *J. Biol. Chem.* 269: 20807 – 20810.
- Bartles, J. and Frazier, W. 1980. Preparation of ¹²⁵I-discoidin I and the properties of its binding to *Dictyostelium discoideum* cells. *J. Biol. Chem.* 255: 30 - 38.
- Becker, J.W., Reeke, Jr. G.N., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M. 1976. New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A. *Nature* 259: 406 – 409.

- Becker, J.W., Reeke, Jr. G.N., Wang, J.L., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 250: 1513 – 1524.
- Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science* 185: 269 – 271.
- Broekaert, W.F., Parijs, J.V., Leyns, F., Joos, H. and Peumans, W.J. 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* 245: 1100 – 1102.
- Chaiet, L. and Wolf, F.J. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 106: 1 – 5.
- Corbeau, P., Haran, M., Binz, H. and Devaux, C. 1994. Jacalin, a lectin with anti-HIV-1 properties, and HIV-1 gp120 envelope protein interact with distinct regions of the CD4 molecule. *Mol. Immunol.* 31: 569 – 575.
- Crenshaw, R.W., Harper, S.N., Moyer, M. and Privale L.S. 1995. Isolation and characterization of the a cDNA clone encoding a lectin gene from *Agaricus bisporus*. *Plant Physiol.* 107: 1465 – 1466.
- Diaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, J.J., Lugtenberg, B.J.J. and Kijne, J.W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *Nature* 338: 579 – 581.
- Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.K., Robert, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350 – 356.
- Duk, M., Lisowska, E., Wu, J.H. and Wu, A.M. 1994. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. *Anal. Biochem.* 221: 266 – 272.

- Etzler, M.E. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspect. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 209 – 234.
- Fraenkel-Conrat, H., Snell, S.N. and Ducay, E.D. 1952. Avidin II. Composition and mode of action of avidin. *Arch. Biochem. Biophys.* 39: 97 – 108.
- 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.
- Genaud, J.L., Gueugnot, J. and Damez, M. 1983. Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochemistry* 22: 5365 – 5369.
- Glass II, W.F., Briggs, R.C. and Hnilica, L.S. 1981. Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 115: 219 – 224.
- Goldstein, I.J. and Hayes, G.E. 1978. The lectins: carbohydrate binding protein of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127 – 140.
- Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. and Smith, E.E. 1965. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* 4: 876 – 883.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. *Nature* 285: 66.
- Gould, N.R. and Scheinberg S.L. 1970. Isolation and partial characterization of two anti-A hemagglutinin from *Phaseolus lunatus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 1 – 11.
- Guesdon, J., Ternyck, T. and Avrameas, S. 1979. The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic technique. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131 – 1139.

- Hagiwara, K., Collet-Cassart, D., Kobayashi, K. and Vaerman, J.P. 1988. Jacalin: isolation, characterization and influence of various factors on its interaction with human IgA₁, as assessed by precipitation and latex agglutination. *Mol. Immunol.* 134: 1740 – 1743.
- 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.
- Hashim, O.H., Gendeh, G.S. and Jaafar, M.I.N. 1992. Lectin extracts of Champedak seeds demonstrate selective stimulation of T-lymphocyte proliferation. *Biochem. Inter.* 27: 139 – 143.
- Hatakeyama, T., Murakami, K., Miyamoto, Y. and Yamasaki, N. 1996. An assay for lectin activity using microtiter plate with chemically immobilized carbohydrates. *Anal. Biochem.* 237: 188 – 192.
- Haun, M., Incledon, B., Alles, P. and Wasi, S. 1989. A rapid procedure for the purification of IgA₁ and IgA₂ subclasses from normal human serum using protein G and jackfruit lectin (jacalin) affinity chromatography. *Immunol. Lett.* 22: 273 – 280.
- Hiemstra, P.S., Gorter, A., Stuurman, M.E., Vanes, L.A. and Daha, M.R. 1987. The IgA-binding lectin jacalin induces complement activation by inhibition of C1-inactivator function. *Scand. J. Immunol.* 26: 111 – 117.
- Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B. and Jensenius, J.C. 1994. Collectin: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today* 15: 67 – 73.
- Hopp, T.P., Hemperly, J.J. and Cunningham, B.A. 1982. Amino acid sequence and variant forms of favin, a lectin from *Vicia faba*. *J. Biol. Chem.* 257: 4473 – 4483.

- Houston, L.L. and Dooley, T.P. 1982. Binding of two molecules of 4-methylumbelliferyl galactose or 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl galactosamine to the B chains of ricin and *Ricinus communis* agglutinin and to purified ricin B chain. *J. Biol. Chem.* 257: 4147 – 4151.
- Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. 1987. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 262: 7451 – 7454.
- Kabir, S. 1993. Simultaneous isolation of intestinal IgA and IgG from rabbits infected intraduodenally with *Vibrio cholerae* 01 by combined lectin affinity chromatography involving jacalin and protein A. *Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 153 – 161.
- Kamemura, K., Ozeki, M., Furuichi, Y., Umekawa, H. and Takahashi, T. 1996. Characterization of a lectin from the leaves of great northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 608 – 611.
- Karlsson, K.A. 1991. Glycobiology: a growing field for drug design. *TIPS* 12: 265 – 272.
- ← Kawasaki, N., Itoh, N. and Kawasaki, T. 1994. Gene organization and 5'-flanking region sequence of conglutinin: a C-type mammalian lectin containing a collagen-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198(2): 597 – 604.
- Kella, N.K., Roberts, D.D., Shafer, J.A. and Goldstein, I.J. 1984. Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. *J. Biol. Chem.* 259: 4777 – 4781.
- Kilpatrick, D.C. and Yeoman, M.M. 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem. J.* 175: 1151 – 1153.

- Kim, B., Buckwalter, J.M. and Meyerhoff, M.E. 1994. Adapting homogeneous enzyme-linked competitive binding assay to microtiter plates. *Anal. Biochem.* 218: 14 – 19.
- Kitao, T. and Hattori, K. 1977. Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature* 265: 81 -- 82.
- Kocourek, J. 1986. Historical background. In I.E. Liener *et al.* (eds.), *The Lectin*, pp.2 – 32. New York: Academic Press Inc.
- Kocourek, J. and Horejsi, V. 1981. Defining a lectin. *Nature* 290: 188.
- Koehler, J.K. 1981. Lectins as probes of the spermatozoa surface. *Arch. Androl.* 6: 197 – 217.
- Kondoh, H., Kobayashi, K. and Hagiwara, K. 1987. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. *Mol. Immunol.* 24: 1219 – 1222.
- Krishna-Sastry, M.V., Banarjee, P., Patanjali, S.R., Swamy, M.J., Swarnalatha, G.V. and Surolia, A. 1986. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (β -D-Gal 1,3 D-GalNAc). *J. Biol. Chem.* 261: 11726 – 11733.
- Kronis, K.A. and Carver, J.P. 1985. Thermodynamics of wheat germ agglutinin-sialyloligosaccharide interactions by proton nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 24: 834 – 840.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage-T. *Nature* 227: 680 – 685.
- Lasky, L.A. 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964 – 969.

- ✓ Lim, S.B., Chua, C.T. and Hashim, O.H. 1997. Isolation of mannose-binding and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integer*. *J. Immunol. Methods* 209: 177 – 186.
- Lis, H. and Sharon, N. 1977. Lectin: their chemistry and application to immunology. In M. Sela (ed.), *The Antigens*, (vol. 4), pp.429 – 529. New York: Academic Press Inc.
- Lis, H. and Sharon, N. 1986. Lectin as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35 – 67.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 – 275.
- ✓ Matsushita, M. 1996. The lectin pathway of the complement system. *Microbiol. Immunol.* 40: 887 – 893.
- McCoy, J.P., Varani, J. and Goldstein, I.J. 1983. Enzyme-linked lectin assay (ELLA) : use of alkaline phosphatase-conjugated *Griffonia simplicifolia* B₄ isolectin for the detection of α -D-galactopyranosyl end groups. *Anal. Biochem.* 130: 437 – 444.
- Miller, J.B., Hsu, R., Heinrikson, R. and Yachnin, S. 1975. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Sci. USA.* 72: 1388 – 1391
- Miller, J.B., Noyes, C., Heinrikson, R., Kingdon, H.S. and Yachnin, S. 1973. Phytohemagglutinin mitogenic proteins. Structural evidence for a family of isomitogenic proteins. *J. Exp. Med.* 138: 939 – 951.
- Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N. and Lotan, R. 1975. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* 256: 414 – 416.

- Mohan, S., Dorai, D.T., Srimal, S. and Bachhawat, B.K. 1982. Binding studies of a sialic acid-specific lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda* with various sialoglycoproteins. *Biochem. J.* 203: 253 – 261.
- Monsigny, M., Roche, A.C., Sene, C., Maget-Dana, R. and Delmotte, F. 1980. Sugar-lectin interactions: how does wheat germ agglutinin bind sialoglycoconjugate? *Eur. J. Biochem.* 104: 147 – 153.
- ✓ Nakagawa, R., Yasokawa, D., Ikeda, T. and Nagashima, K. 1996. Purification and characterization of two lectins from callus of *Helianthus tuberosus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 259 – 262.
- Namjuntra, P., Muanwongyathi, P. and Chulavatnatol, M. 1985. A sperm-agglutinating lectin from seeds of jack fruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Biochem. Biophys. Commun.* 128: 833 – 839.
- ✓ Oda, Y., Kinoshita, M. and Kakehi, K. 1997. Fluorometric assay of binding specificity of plant lectins to yeast cells by biotin-avidin system and its application to the classification of yeast cells. *Analy. Biochem.* 254: 41 – 48.
- ✓ Oda, Y., Kinoshita, M., Nakayama, K., Ikeda, S. and Kakehi, K. 1999. Flow injection analysis of binding reaction between fluorescent lectin and cells. *Anal. Biochem.* 269: 230 – 235.
- Ofek, I. And Sharon, N. 1990. Adhesins as lectinss: specificity and role in infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151: 91 – 113.
- Ortega-Barria, E. and Boothroyd, J.C. 1999. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J. Biol. Chem.* 274: 1267 – 1276.

- O'Shannessy, D.J., Voorstad, P.J. and Quarles, R.H. 1987. Quantitation of glycoproteins on electroblots using the biotin-streptavidin complex. *Anal. Biochem.* 163: 204 -- 209.
- O'Sullivan, M.J. and Marks, V. 1981. Method for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay. *Methods. Enzymol.* 73: 147 – 166.
- Ouchterlony, O. 1956. Antigen-antibody reactions in gel V types of reactions in co-ordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 32: 221 – 240.
- ✓ Perotti, M.E. and Pasini, M. 1995. Glycoconjugates of the surface of the spermatozoa of *Drosophila melanogaster*: a qualitative and quantitative study. *J. Exp. Zool.* 271: 311 – 318.
- Poretz, R.D. and Goldstein, I.J. 1970. An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and of the forces involved in complexation. *Biochemistry* 9: 2890 – 2896.
- ✓ Prapunpoj, P. and Chulavatnatol, M. 1996. Interaction between jackfruit lectin and rat epididymal sperm. *J. Sci. Soc. Thailand* 22: 21 – 30.
- Pusztai, A. 1991. *Plant lectins*, New York: Cambridge University Press.
- ✓ Quill, T.A. and Hedrick, J.L. 1996. The fertilization layer mediated block to polyspermy in *Xenopus laevis*: Isolation of the cortical granule lectin ligand. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 326 – 332.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 855 – 859.
- Roberts, D.D. and Goldstein, I.J. 1983. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J. Biol. Chem.* 258: 13820 – 13824.

- Robey, F.A. and Liu, T.Y. 1981. Limulin: a C-reactive protein from *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* 256: 969 – 975.
- Saeki, K., Ishikawa, O., Fukuoka, T., Nakagawa, H., Kai, Kakuno, T., Yamashita, J., Kasai, N. and Horio, T. 1986. Barley leaf peroxidase: purification and characterization. *J. Biochem.* 99: 485 – 494.
- Sakakibara, F., Kawauchi, H. and Takayanagi, G. 1985. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayu fish) eggs. *Biochem. Biophys. Acta* 841: 103 – 111.
- Scatchard G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660 – 672.
- Shannon, L.M., Kay, E. and Lew, J.Y. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* 241: 2166 – 2172.
- Shao, M.C. 1992. The use of streptavidin-biotinylglycans as a tool for characterization of oligosaccharide-binding specificity of lectin. *Anal. Biochem.* 205: 77 – 82.
- Shao, M.C. and Chin, C.C.Q. 1992. Method for the detection of glycopeptides at the picomole level in HPLC in peptide maps. *Anal. Biochem.* 207: 100 – 105.
- Sharon, N. 1977. Lectins. *Sci. American* 236: 108 – 119.
- Sharon, N. and Lis, H. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 177: 949 – 958.
- Sharon, N. and Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. American* 268: 74 – 81.
- Sharon, N. and Lis, H. 1995. Lectins-proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays in Biochemistry* 30: 59 – 75.

- Skea, D.L., Christopoulos, P., Plaut, A.G. and Underdown, B.J. 1988. Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, jacalin. *Mol. Immunol.* 25: 1 – 6.
- Snell, T.W. and Nacionales, M.A. 1990. Sex pheromone communication in *Brachionus plicatilis* (rotifer). *Comp. Biochem. Physiol.* 97A: 211 – 216.
- So, L.L. and Goldstein, I.J. 1967. Protein-carbohydrate interaction. IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide-concanavalin A interaction. *J. Biol. Chem.* 242: 1617 – 1622.
- Sumiya, M., Super, M. and Tabona, P. 1991. Molecular basis of defect in immunodeficient children. *Lancet* 337: 1569 – 1570.
- Teria, I., Kobayashi, K., Matsushita, M. and Fujita, T. 1997. Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1) determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 317 – 323.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350 – 4354.
- Tsao, D. and Kim, Y.S. 1978. Glycoproteins from human colonic adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.* 253: 2271 – 2278.
- Utarabhand, P. 1990a. Sperm-agglutinating lectins from seeds of local plants in southern Thailand. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 12: 29 – 30.
- Utarabhand, P. 1990b. Sperm-agglutinating lectins from Champaada seeds (*Artocarpus integer*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 12: 35 – 42.
- Utarabhand, P. and Akkayanont, P. 1995. Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochemistry* 38: 281 – 285.

- Van der Schaal, I.A.M., Logman, T.J.J., Diaz, L.C. and Kijne, J.W. 1984. An enzyme-linked lectin binding assay for quantitative determination of lectin receptors. *Anal. Biochem.* 140: 48 – 55.
- Vretblad, P. 1976. Purification of lectins by biospecific affinity chromatography. *Biochem Biophys. Acta* 434: 169 – 176.
- Wang, J.L., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J. and Edelman, G.M. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 250: 1490 – 1502.
- Weis, W.I. and Drickamer, K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 441 – 473.
- Weitz-Schmidt, G., Stokmaier, D., Scheel, G., Nifant'ev, N.E., Tuzikov, A.B. and Bovin, N.V. 1996. An E-selectin binding assay based on a polyacrylamide-type glycoconjugate. *Anal. Biochem.* 238: 184 – 190.
- Wetprasit, N. 1997. *Development of new methods for characterization of sugar-lectin interaction.* A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy (Biochemistry), Mahidol University.
- Wetprasit, N. and Chulavatnatol, M. 1997. Determination of sugar specificity of jackfruit lectin by a simple sugar-lectin binding assay using microtiter plate. *Biochem. Mol. Inter.* 42(2): 399 – 408.
- Wilchek, M. and Bayer, E.A. 1983. The avidin-biotin complex bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* 171: 3 – 32.
- Wiley, D.C. 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 365 – 394.
- Yachnin, S. 1972. Inhibition of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transforming by globulin; lack of correlation with phytohemagglutinin precipitation by serum proteins. *J. Immunol.* 180: 845 – 847.

Yang, D.C.H., Gall, W.E. and Edelman, G.M. 1974. Rotational correlation time of concanavalin A after interaction with a fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* 249: 7018 – 7023.

ภาคผนวก

การเตรียม periodate-treated BSA

นำ BSA 4.5 กรัม ละลายใน 0.1 M sodium acetate, pH 4.5 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติม sodium(meta)periodate 240 มิลลิกรัม ปั่นที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 6 ชั่วโมง จากนั้นเติม glycerol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 mM นำไปไดอะไลซ์ใน 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 ที่มี 0.9% NaCl หาปริมาณโปรตีนแล้วจึงปรับปริมาณโปรตีนให้ได้ตามที่ต้องการ (Glass II *et al.*, 1981)

การเตรียมสี Wright's

เตรียมโดยนำผงสี Wright's stain 9 กรัม บดสีใน glycerol 90 มิลลิลิตร ในโถงให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆ เติม เมทิลแอลกอฮอล์ (methylalcohol) ปริมาตร 2,910 มิลลิลิตร ทีละน้อย พร้อมกับบดไปด้วยจนเมทิลแอลกอฮอล์หมด กรองสีด้วยกระดาษกรอง เก็บใส่ขวดสีชาที่มีจุกปิดได้สนิท เพื่อป้องกันการระเหยของแอลกอฮอล์ เก็บสีที่เตรียมได้ไว้เป็นเวลา 1-2 เดือน ก่อนนำไปใช้ (สุภินันท์ สเป็ค-สายเชื้อ, 2534)

การเตรียม Towbin buffer, pH 8.3

เตรียมโดยใช้ Tris 6.056 กรัม และ glycine 28.82 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 20% เมธานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร (Towbin *et al.*, 1979)

การย้อมสี amido black B

ย้อมสีโปรตีนในแผ่นไนโทรเซลลูโลส โดยแช่แผ่นไนโทรเซลลูโลสในสารละลาย 0.1% amido black B -45% เมธานอล -10% กรดน้ำส้ม นาน 10 นาที แล้วนำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 90% เมธานอล -2% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน (Towbin *et al.*, 1979)

การเตรียม 1% non fat milk (NFM)

ละลาย NFM 0.3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ NFM ที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายปฐม ภารย์ภูมิ		
วัน เดือน ปีเกิด	23 พฤษภาคม 2511		
วุฒิการศึกษา			
<u>วุฒิ</u>	<u>ชื่อสถาบัน</u>	<u>ปีที่สำเร็จการศึกษา</u>	
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2536	