ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย
ผู้เขียน นางสาวนิษา ไพจิตร
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะและมีแหล่งจับมากกว่า 1 ตำแหน่ง สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เลคตินพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่าง ๆ

ซีรัมเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงสุด มีความจำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิค มิวซิน และฟีทูอินมากที่สุด มีความเสถียรที่อุณหภูมิถึง 50 °ซ และที่ pH 7.5 รวมทั้งสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดที่ pH 7-8

เมื่อทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมโดยใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose เพียงขั้นตอนเดียว พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล 316,200 ดัลตัน จากการหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชันและโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เลคตินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 32,300 และ 30,900 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล ผลการทดลองนี้แสดงว่าเลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด อย่างละ 5 หน่วยย่อย ซึ่งไม่ได้ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เลคตินบริสุทธิ์มีกลูโคสและแมนโนสเป็นองค์ประกอบด้วยปริมาณ 180 และ 260 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน ตามลำดับ

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคน การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์โดยมิวซิน, ฟีทูอินและกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิค ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/มล., 1.5 มก/มล.

และ 1.56 mM ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน, เอ็น-อะซิติลกาแลคโตซามีน และเอ็น-อะซิติลแมนโนซามีน เลคตินบริสุทธิ์ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง EGTA, เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลและเอสดีเอสที่ความเข้มข้น 0.075, 0.39 และ 0.097 mM ยับยั้งแอคทิวิทีของเลคตินบริสุทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์

เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรที่ pH 7.5-8 สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดที่ pH 7.5-8 แต่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ ยกเว้นเมื่อมี 50 mM Ca^{2+} ช่วยทำให้เลคตินบริสุทธิ์เสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 65 °ซ เลคตินบริสุทธิ์ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgA และ IgG ของคน รวมทั้งกับโบวีนซีรัมอัลบูมิน ใน Ouchterlony double diffusion

ทั้งเลคตินบริสุทธิ์และซีรัมเลคตินสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้งได้แก่ *Vibrio harveyi*, *V. parahemolyticus* และ *V. vulnificus* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้ง *V. cholerae*, *Samonella typhi* และ *Escherichia coli* เกาะกลุ่ม ระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีค่าสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 1.62 เท่า ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ที่เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อซึ่งอาจเป็นกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วย

ระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศเมียตัวเต็มวัยซึ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์สูงกว่าของกุ้งเพศผู้ 1.55เท่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศเมียมีส่วนเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่กุ้งแชบ๊วย เหมือนกับในเพรียงหรือปลากะรัง

Thesis Title	Characterization of lectin from hemolymph of banana prawn (*Penaeus merguiensis* de Man)
Author	Miss Nisa Paijit
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2001

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins. They show specific binding to carbohydrates and have more than one binding sites which allow them to agglutinate cells and/or precipitate glycoconjugates. Lectins are found in plants, animals and also in microorganisms.

Serum lectin from hemolymph of banana prawn contained the highest specific hemagglutinating activity against rabbit red blood cells. It was strongly specific to N-acetyl neuraminic acid, mucin and fetuin. It was stable at temperatures up to 50 °C and at pH 7.5. The optimal pH for its hemagglutination was 7-8.

Purification of lectin from banana prawn hemolymph was achieved by one-step chromatography on Fetuin-agarose column. The purified lectin showed a single band in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under nondenaturing condition. It had a molecular weight of 316,200 Daltons, as determined by gel filtration and nondenaturing-PAGE. When analysed by SDS-PAGE in the presence or absence of β-mercaptoethanol, the purified lectin was found to exist in 2 forms of proteins, with M_r of 32,300 and 30,900. It was estimated to consist of pentamers of each of M_r 32,300 and M_r 30,900, and contain no disulphide linkage between subunits. The purified

lectin had a total carbohydrate content of 180 μg glucose/mg protein and 260 μg mannose/mg protein.

The purified lectin expressed higher specific hemagglutinating activity against rabbit red blood cells than human red blood cells. Its hemagglutination was completely inhibited by mucin, fetuin and N-acetyl neuraminic acid at 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml and 1.56 mM, respectively. N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine and N-acetyl mannosamine were less potent inhibitors. Hemagglutination of the purified lectin was Ca^{2+} dependent. EGTA, β-mercaptoethanol and SDS at 0.075, 0.39 and 0.097 mM, respectivety, completely inhibited its activity.

The purified lectin was stable at pH 7.5-8. The optimal pH for its hemagglutination was 7.5-8. The purified lectin was labile at temperatures over 50 °C. Its stability was increased upto 65 °C in the presence of 50 mM $CaCl_2$. It was shown to precipitate neither human IgA, IgG nor BSA in Ouchterlony double diffusion.

Both the purified lectin and serum lectin could agglutinate pathogenic bacteria of some *Penaeus* prawns such as *Vibrio harveyi*, *V. parahemolyticus* and *V. vulnificus*, but not their non pathogenic *V. cholerae*, *Samonella typhi* or *Escherichia coli*. In addition, lectin level in hemolymph of banana prawns infected with *V. harveyi* was 1.62 folds higher than that of controls which were injected with 0.9% NaCl instead. These results indicate that the increased lectin level in hemolymph may respond to the infection as a defense mechanism in banana prawns.

Female mature prawns contained lectin level in hemolymph at 1.55 folds higher than those of mature males. It seems that hemolymph lectin of females may be involved in ovarian maturation as shown in acorn barnacle or grouper.