การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง

Characterization of Lectin from Plasma of Grouper (*Epinephelus malabaricus*)

อุไรวรรณ ไพชำนาญ

Uraiwan Phaichamnan

Order Key 20162
BIB Key 160197

เลขหมู่ QL638.S48 อ79 2542 ฉ.2
เลขทะเบียน
24 ส.ค. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง
ผู้เขียน	นางสาวอุไรวรรณ ไพชำนาญ
สาขาวิชา	ชีวเคมี

คณะกรรมการที่ปรึกษา

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

......................................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

คณะกรรมการสอบ

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

......................................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

......................................กรรมการ
(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

......................................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง
ผู้เขียน	นางสาวอุไรวรรณ ไพชำนาญ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2541

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตซึ่งไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน มีความสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เลคตินพบและมีบทบาททางชีวภาพในพืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ต่าง ๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเลคตินจากพลาสมาของปลากะรังมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงสุด มีความเสถียรที่อุณหภูมิ -10°ซ นานอย่างน้อย 10 เดือน เมื่อทำเลคตินให้บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังเพศเมียโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-200 ตามด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose หรือการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม ตามลำดับ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล 851,100 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน เลคตินบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,100 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล ผลการทดลองนี้แสดงว่าเลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วย 10 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน และไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ยึดระหว่างหน่วยย่อย

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาคือของหนูและของหมู ตามลำดับ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและของแพะเกาะกลุ่มได้ การย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดส มีผลทำให้แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้น 4 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ การเกาะ

กลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายถูกยับยั้งได้ 50% โดยอะไซอะโลฟีทูอีน, ฟีทูอีน และกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค ที่ความเข้มข้น 0.63 มก./มล., 5 มก./มล. และ 50 mM ตามลำดับ ไดวาเลนท์แคทไอออนได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือ EDTA ที่ความเข้มข้น 200 mM รวมทั้งเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล ที่ความเข้มข้น 90 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคตินบริสุทธิ์ เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรที่ pH 7 - 9 แต่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเกิดได้ดีที่สุดที่ pH 7.5 - 8

แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรัง เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์, พลาสมา, สารละลายโปรตีนพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel และสารละลายโปรตีนพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-200 แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเลคตินบริสุทธิ์ เมื่อทดสอบโดย Ouchterlony double immunodiffusion ซึ่งบ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์และไวเทลโลจีนินจากพลาสมาของปลากะรังมีความแตกต่างกันในด้านความเป็นแอนติเจน

ระดับเลคตินในพลาสมาถูกกระตุ้นได้โดยการฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล นอกจากนี้ ระดับของเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียมีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกันในระหว่างเดือนสิงหาคม 2540 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2541 ระดับเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากเดือนตุลาคมจนมีค่าสูงสุดก่อนไข่สุกและลดลงอย่างรวดเร็วหลังปลาวางไข่ในเดือนธันวาคม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมามีความสัมพันธ์กับพัฒนาการเจริญของรังไข่ในปลากะรังเพศเมีย ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าพลาสมาเลคตินอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ของปลากะรัง

Thesis Title	Characterization of Lectin from Plasma of Grouper (*Epinephelus malabaricus*)
Author	Miss Uraiwan Phaichamnan
Major Program	Biochemistry
Academic Year	1998

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins of non-immune origin which are able to specifically agglutinate cells and precipitate glycoconjugates. They are found and show some biological roles in plants, animals and also in microorganisms.

In this study, lectin from plasma of grouper (*Epinephelus malabaricus*) contained highest specific hemagglutinating activity for rabbit red blood cells. It was stable at -10°C for at least 10 months. Lectin was purified from plasma of female grouper by chromatography on DEAE-Sephacel and Sephadex G-200 columns followed by Fetuin-agarose column or preparative polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The purified lectin showed a single band in polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing condition. It had a molecular weight of 851,100 Daltons, as determined by gel filtration. When analysed by SDS-PAGE in the presence or absence of β-mercaptoethanol, the purified lectin showed a single band with M_r of 85,100. It was estimated to consist of 10 identical subunits of M_r 85,100 and contain no disulfide linkage between subunits.

The purified lectin expressed the highest hemagglutinating activity against rabbit red blood cells and less so for these of rat and pig, respectively. It could not either agglutinate red blood cells of human or goat. Treatment of rabbit red blood cells

with trypsin or neuraminidase increased specific hemagglutinating activity of the purified lectin upto 4 and 2.5 folds, respectively. Its hemagglutinating activity was 50% inhibited by asialofetuin, fetuin and N-acetyl neuraminic acid at 0.63 mg/ml, 5 mg/ml and 50 mM, respectively. Divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} or EDTA at 200 mM as well as β-mercaptoethanol at 90 mM did not show any effect on the hemagglutinating activity of this lectin. The purified lectin was stable in pH 7 - 9 but labile at temperature over $50^{\circ}C$. The optimum pH for its hemagglutination was 7.5 - 8.

Antibody to the purified grouper vitellogenin reacted with the purified vitellogenin, plasma, peak D2 protein solution from DEAE-Sephacel column and peak S1 protein solution from Sephadex G-200 column but did not react with the purified lectin when tested by Ouchterlony double immunodiffusion. This result suggested that the purified lectin and vitellogenin of grouper were different in antigenicity.

Plasma lectin was induced by exogenous estradiol injection. In addition, the lectin and vitellogenin levels in plasma of female groupers showed a comparison pattern of change during August 1997 to November 1998. Both increased rapidly from October and reached maximal level just prior to oval maturation and decreases sharply after spawning in December. Since the change of vitellogenin level in plasma correlates well with ovarian development of female grouper, these results indicate that the plasma lectin may involve in ovarian development of grouper.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษา ค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการเขียนและการพิมพ์วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ และ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ คุณวิชัย วัฒนกุล ที่ได้เอื้อเฟื้อพลาสมาปลากะรังจนเสร็จสิ้นโครงการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการจัดหาและดูแลสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณ คุณอุบล ต้นสม และคุณพีระพงษ์ พึ่งแย้ม รวมทั้งเพื่อน ๆ ตลอดจนผู้ให้คำแนะนำซึ่งไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลที่ได้มอบทุนพัฒนาบุคลากรประจำปี 2539 เพื่อเป็นทุนการศึกษา

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และคุณวัฒนา วัฒนกุลที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิต

อุไรวรรณ ไพชำนาญ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	33
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	34
วัสดุ	34
อุปกรณ์	35
วิธีการ	35
3. ผลการทดลอง	50
4. วิจารณ์	86
5. สรุป	107
เอกสารอ้างอิง	110
ประวัติผู้เขียน	132

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างของเลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ	7
2	ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	10
3	ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง	16
4	ความสามารถของพลาสมาเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ	50
5	ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคตินได้ 50%	51
6	การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมา	56
7	ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ	70
8	ผลของเอนไซม์ทริปซินและนิวรามินิเดสต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์	71
9	ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ได้ 50%	73
10	ผลการไดวาเลนท์แคทไอออน, EDTA และเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์	77
11	ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อระดับเลคตินและโปรตีนในพลาสมา	81

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) น้ำหนัก 1.2 กิโลกรัม	29
2	ผลของการเก็บพลาสมาเลคตินที่ -10 °ซ	52
3	ผลการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4 °ซ ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยพลาสมาเลคติน	53
4	การแยกเลคตินจากพลาสมาโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	55
5	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของเลคตินที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-200	57
6	การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพีค D2 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-200	59
7	การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่แปลงสภาพของสารละลายโปรตีนพีค S1 และแอคทิวิตีของเลคตินในชิ้นเจล (A) และแถบโปรตีนเลคตินที่ได้จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (B)	61
8	การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose	63
9	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel, Sephadex G-200, Fetuin-agarose และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม	64
10	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสของเลคตินบริสุทธิ์	66

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (A) และจากกราฟมาตรฐาน (B)	68
12	กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส	69
13	ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์	74
14	ความเสถียรต่อ pH ของเลคตินบริสุทธิ์	75
15	ผลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์	76
16	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน	79
17	กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนิน (A) จากการทำร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิสของไวเทลโลจีนิน (B)	83
18	ปริมาณเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาและค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี	85

ตัวย่อและสัญลักษณ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
A	=	absorbance
BSA	=	bovine serum albumin
°C	=	degree Celsius
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-Sephacel
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	=	ethyleneglycoltetraacetic acid
g	=	acceleration (cm/sec^2)
HA	=	hemagglutinating activity
K_{av}	=	distribution coefficient
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
M_r	=	apparent molecular weight
NANA	=	N-acetyl neuraminic acid
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
pH	=	- log hydrogen ion concentration
PMSF	=	phenylmethylsulphonyl fluoride
pI	=	isoeletric pH

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

ppm	=	part per million
ppt	=	part per thousand
R_f	=	relative mobility
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
%	=	percent
α	=	alpha
β	=	beta
nm	=	nanometer
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบัน การศึกษาเลคติน (lectin) เริ่มจริงจังและแพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากเลคตินถูกใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัยด้านชีวภาพหลายสาขาวิชา ได้แก่ วิทยาภูมิคุ้มกัน ชีวเคมีและเซลล์วิทยา เป็นต้น โดยเลคตินถูกนำไปใช้ในการศึกษาสมบัติและการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์ด้วยวิธีการทางชีวเคมีและด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Aucouturier *et al.*,1989) เลคตินมีบทบาทสำคัญในระบบชีวภาพของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เลคตินในพืชมีบทบาทต่อต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืช หรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดและการเติบโตของเซลล์พืช เลคตินในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น ทำหน้าที่เป็นฟีโรโมนเพศ (sex pheromone) ระหว่างโรติเฟอร์ (rotifer) เพศผู้กับเพศเมีย (Snell and Nacionales, 1990) หรือกระตุ้นพัฒนาการเจริญของรังไข่เพรียง (Acorn barnacle) (Muramoto *et al.*, 1991) เลคตินที่พบในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีส่วนสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* เพราะพบระดับเลคตินในน้ำเลือดเพิ่มขึ้นมากหลังจากกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ และเลคตินนี้สามารถทำให้แบคทีเรียดังกล่าวเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) สำหรับเลคตินของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับและขนส่งสารประกอบคาร์โบไฮเดรตระหว่างเซลล์ (Barondes, 1984) เลคตินในปลามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์และพัฒนาการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ (Balakhnin and Savchenko, 1996) เลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เลคตินจากสาหร่ายสีแดง (red algae, *Gracilaria verrucosa*) สามารถยับยั้งปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬซึ่งมีผลต่อสัตว์น้ำและก่อให้เกิดน้ำเน่าเสียได้ (Tanabe *et al.*, 1993)

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับคาร์โบไฮเดรต หรือเรียกอีกอย่างว่าไกลโคโปรตีน ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในพืช สัตว์ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และอื่น ๆ โดยอาจอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้หรือเป็นส่วนประกอบของเมมเบรน (membrane) เลคตินมีสมบัติจับกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากเลคตินมีแหล่งจับจำเพาะ (binding site) กับน้ำตาลบนผิวเซลล์มากกว่า 1 ตำแหน่ง จึงสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ การจับของเลคตินกับน้ำตาลจะจับกันอย่างหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันได้ เลคตินแต่ละชนิดสามารถจับจำเพาะกับผิวเซลล์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เลคตินจึงสามารถทำให้เซลล์หลายชนิดนอกเหนือจากเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ จากสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาเลคตินชนิดใหม่จากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาเซลล์ชนิดต่าง ๆ แม้ว่าการศึกษาเลคตินในพืชจะเป็นที่แพร่หลายเพราะเป็นแหล่งที่หาได้ง่าย พบได้ทั่วไป แต่เลคตินในสัตว์ก็เป็นที่น่าสนใจศึกษาเพราะยังมีการศึกษากันไม่มากนักและเพื่อนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาททางชีวภาพของเลคตินเหล่านี้ในสัตว์ต่าง ๆ

ปลากะรังหรือปลาเก๋าเป็นปลาที่มีรสชาดดี ราคาแพง นิยมบริโภคทั้งในและนอกประเทศ จึงเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ได้รับการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางในประเทศไทย นอกเหนือจากผลงานวิจัยด้านชีววิทยาของปลากะรังแล้ว ปัจจุบันได้มีการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996; เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเลคตินของปลากะรัง รวมทั้งการศึกษาเลคตินในปลาชนิดอื่นก็ยังมีน้อยมาก งานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจที่จะศึกษาสมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง การทำเลคตินให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเลคตินบริสุทธิ์ ซึ่งผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่ความเข้าใจถึงบทบาทของเลคตินในปลาและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ความหมายของเลคติน

การศึกษาเลคตินได้มีแพร่หลายมากว่าหนึ่งศตวรรษแล้ว มีการค้นพบเลคตินครั้งแรกในเมล็ดละหุ่ง (castor bean) เรียกว่า ริซิน (ricin) ต่อมามีการค้นพบเลคตินจากพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถจับกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่างชนิดได้ต่างกัน เลคตินบางชนิดจับจำเพาะกับหมู่เลือด (blood group) ที่ต่างชนิดของคน เช่น เลคตินจากถั่วพู (*Lotus tetragonolobus*) มีความจำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงหมู่ O ของคน (Renkonen, 1948) เลคตินจากเมล็ดขนุน (jack fruit, *Artocarpus integrifolia*) จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ O (Sharon and Lis, 1972) เป็นต้น ความจำเพาะต่อหมู่เลือดถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลที่จำเพาะต่อเลคตินนั้น (Watkins and Morgan, 1952) เลคตินที่พบในพืชในขณะนั้นมีสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่าง ๆ เกาะกลุ่ม (agglutinate) ได้ จึงถูกเรียกว่า hemagglutinin หรือ phytohemagglutinin (Kocourek, 1986)

ต่อมามีการพบเลคตินในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น สัตว์ ไวรัส (virus) แบคทีเรีย (bacteria) เลคตินจึงถูกขยายเป็นโปรตีนที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ อาจอยู่ในรูปของสารละลายหรือส่วนประกอบของเมมเบรน (Barondes, 1986) เลคตินยังสามารถทำให้เซลล์อื่น ๆ นอกจากเม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast), ลิมโฟไซท์ (lymphocyte), เซลล์เนื้องอก (tumor cell), ตัวอสุจิ (sperm) และจุลินทรีย์ต่าง ๆ เป็นต้น

เลคตินเป็นโปรตีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตโดยธรรมชาติ มีความจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลของน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) (Sharon, 1977) การจับกันของน้ำตาลกับเลคตินจะจับกันอย่างหลวม ๆ สามารถแยกจากกันได้เมื่อสารที่ทำปฏิกิริยาตัวใดตัวหนึ่งมีมากเกินพอ คล้ายกับปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ (enzyme) กับสับสเตรท (substrate) หรือแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) เลคตินไม่ได้เป็นเอนไซม์ แต่มีเอนไซม์บางชนิดสามารถแสดงสมบัติคล้ายเลคตินได้เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสม เช่น เอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) (Hankins and Shannon, 1978) เลคตินไม่ได้เป็นแอนติบอดีเพราะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่แอนติบอดีถูกสังเคราะห์ขึ้นจากระบบ

ภูมิคุ้มกันในสัตว์ชั้นสูงโดยการกระตุ้นจากสิ่งเร้าหรือสิ่งแปลกปลอมภายนอกที่เข้าสู่ร่างกาย แอนติบอดีมีรูปร่างเหมือนกัน ส่วนเลคตินมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) และสมบัติของโมเลกุล การที่เลคตินทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรต (glycoconjugate) ตกตะกอน (precipitate) ได้ เนื่องจากโมเลกุลของเลคตินมีแหล่งจับซึ่งจับกับน้ำตาลได้อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Kocourek and Horejsi, 1981) แหล่งจับของโมเลกุลดังกล่าวอาจเป็นร่อง (groove) ซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นกับชนิดของเลคติน (Sharon, 1977) ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเลคตินกับเซลล์หรือกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตหรือสารประกอบไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ที่จำเพาะกับเลคติน (Sharon, 1977)

คำจำกัดความของเลคตินที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบัน จึงหมายถึงไกลโคโปรตีนหรือโปรตีนซึ่งจับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate binding protein) ที่ไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน มีความสามารถทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนหรือสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ (Goldstein *et al.*, 1980) เพราะโมเลกุลของเลคตินมีแหล่งจับจำเพาะที่จับกับน้ำตาลได้อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Kocourek and Horejsi, 1981) ความจำเพาะในการจับขึ้นกับชนิดของเลคติน (Sharon, 1977) นอกจากนี้เลคตินไม่ได้เป็นเอนไซม์ แอนติบอดี ฮอร์โมน (hormone) หรือสารพิษ เนื่องจากสารเหล่านี้มีแหล่งจับกับน้ำตาลได้เพียงตำแหน่งเดียว (Etzler, 1985)

1.2 แหล่งที่พบเลคติน

1.2.1 เลคตินจากพืช

พบเลคตินได้ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งในเมล็ด, ราก, ลำต้น, ใบ, ผล, เปลือกของลำต้นและในยางของพืช การศึกษาเลคตินในพืชมีมากกว่าการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ พืชแต่ละชนิดมีเลคตินอยู่ในปริมาณแตกต่างกัน เลคตินที่แยกได้จากส่วนต่างของพืชชนิดเดียวกันอาจมีได้มากกว่า 1 ชนิด แต่ละชนิดอาจมีสมบัติที่คล้ายกันหรือต่างกัน พืชที่พบเลคตินมากที่สุดคือพืชตระกูลถั่ว (Leguminoceae) โดยเฉพาะในส่วนของ

เมล็ด เลคตินถูกสะสมในรูปโปรตีนสะสมในส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) (Pusztai, 1991) และมีปริมาณมากที่สุดในเมล็ดที่เจริญเต็มที่ (Toms and Western, 1971; Pusztai, 1991) รายละเอียดของเลคตินจากพืชได้ถูกเสนอไว้ในงานวิทยานิพนธ์ของอุบล ตันสม (2541)

ปัจจุบันได้มีการนำเลคตินจากพืช ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และทางชีวภาพทั้งในคนและสัตว์ อาทิเช่น เลคตินที่สกัดได้จากถั่วลันเตา (garden pea, *Pisum sativum*) ถูกนำไปใช้แยกเซลล์ที-ลิมโฟไซท์ (T-lymphocyte) ออกจากเซลล์บี-ลิมโฟไซท์ (B-lymphocyte) ได้ (Whitehurst *et al.*, 1994) เลคตินจากเมล็ดขนุนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนย้ายเม็ดเลือดขาวในเยื่อบุช่องท้องหนู (Santos *et al.*, 1994) เลคตินจากถั่วเหลือง (soybean, *Glycine max*) ถูกใช้เป็นเครื่องมือตรวจเชื้อที่ก่อโรคในปลา เช่นสามารถตรวจจับเชื้อ *Sphaerospora* spp. ซึ่งก่อโรคทั้งในปลาแซลมอน (salmon) และปลาเทราท์ (trout) ได้ (Mateo *et al.*, 1996) หรือการใช้เลคติน GS-1 จากพืชตระกูลถั่ว (*Griffonia simplicifolia*) ตรวจหาเชื้อโปรโตซัว (protozoa) PKX ซึ่งก่อให้เกิดโรค PKD (proliferative kidney disease) ในไตของปลาแซลมอนได้ (Hedrick *et al.*, 1992)

1.2.2 เลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

พบเลคตินในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น แบคทีเรีย, รา (fungi), สาหร่าย (algae), ยีสต์ (yeast), ฟองน้ำ (marine sponge), เห็ด (mushroom) และปะการัง (coral) เป็นต้น ตัวอย่างของเลคตินที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำมีดังนี้

1.2.2.1 เลคตินจากสาหร่าย

เลคตินจากสาหร่ายทำหน้าที่เป็นตัวจดจำระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ขณะที่เกิดการผสมพันธุ์ (Ingram, 1985; Kim *et al.*, 1996) เลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria verrucosa*) มีน้ำหนักโมเลกุล 49,000 ดัลตัน (dalton) (Kanoh *et al.*, 1992) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน (plankton, *Chattonella antiqua*) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญก่อให้เกิดปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬ (red tide plankton) ที่มีผลเสียต่อสัตว์น้ำและทำให้ระบบนิเวศน์เสียสมดุลย์เนื่องจากการเติบโตของแพลงก์ตอนชนิดนี้เร็วและมากเกินไป (Tanabe *et al.*, 1993)

1.2.2.2 เลคตินจากเห็ด

พบเลคตินได้ทั้งในเห็ดที่เป็นพิษและเห็ดที่ไม่เป็นพิษ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 28,000-190,000 ดัลตัน และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินเหล่านี้ได้ด้วยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ เช่น กาแลคโตส (galactose) เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน (N-acetyl galactosamine) (Konska *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 1993; Crenshaw *et al.*, 1995) นอกจากนี้เลคตินจากเห็ดยังถูกนำไปใช้ในการแยกอิมมูโนโกลบูลิน เอ (immunoglobulin A, IgA) กลุ่มย่อย (subclass) โดยพบว่าเลคตินจากเห็ด *Agaricus bisporus* สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA ของคนในการทำ Ouchterlony double diffusion และ immunoelectrophoresis ได้ (Irazoqui *et al.*, 1992)

1.2.2.3 เลคตินจากปะการัง

เลคตินจากปะการังหินอ่อน (solf coral, *Lobophytum variatum*) ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของม้าเกาะกลุ่ม แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของกระต่ายหรือของคน มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีน มิวซิน (mucin) และมีน้ำหนักโมเลกุล 53,000 ดัลตัน (Goto-Nance *et al.*, 1996)

1.2.2.4 เลคตินจากแพลงก์ตอนสัตว์

ในการผสมพันธุ์ของแพลงก์ตอนสัตว์พวกโคพีพอด (copepod) และโรติเฟอร์พบว่าเลคตินบนผิวเซลล์ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนทำหน้าที่คล้ายฟีโรโมนในการสื่อสัญญาณระหว่างโคพีพอดหรือโรติเฟอร์เพศผู้และเพศเมียให้เข้ามาผสมพันธุ์กัน (Snell and Nacionales, 1990)

1.2.2.5 เลคตินจากฟองน้ำ

ตัวอย่างเลคตินจากฟองน้ำมีพิษ (*Halichondria okadai*) มีความจำเพาะกับน้ำตาล เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) และ เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน และมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 42,000-84,000 ดัลตัน (Kawagishi *et al.*, 1994)

1.2.2.6 เลคตินจากกลุ่มปรสิต

เลคตินในกลุ่มปรสิต (parasite) ส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค (N-acetyl neuraminic acid) เช่น เลคตินจากโปรโตซัว (*Tritrichomonas mobilensis*) มีขนาด 556,000 ดัลตัน (Babal *et al.*, 1994) เป็นต้น

1.2.2.7 **เลคตินจากยีสต์**

เลคตินในกลุ่มนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย และมีความจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (mannose) เช่น เลคตินจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีขนาด 13,000 ดัลตัน ซึ่งใกล้เคียงกันเลคตินจาก brewer's yeast ที่มีขนาด 10,000 ดัลตัน (Straver *et al.*, 1994; Shankar and Umesh-Kumar, 1994)

ตัวอย่างของเลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของเลคตินจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

Lectins from	Sugar specificity	Molecular weight	References
เห็ด (mushroom)			
Aleuria aurantia	fucose	-	Nagata *et al.*, 1991
Laetiporus sulfureus	N-acetyllactosamine	190,000	Konska *et al.*, 1994
Agaricus bisporus	-	58,000-64,000	Crenshaw *et al.*, 1995
Psilocybe barrerae	galactose	28,000	Hernandez *et al.*, 1993
สาหร่าย (algae)			
Green algae			
Codium tomentosum	GluNAc	-	Fabregas *et al.*, 1988
Halimeda opuntia	GluNAc	-	Carpenter *et al.*, 1990
Red algae			
Antithamnion sparsum	methyl-D-mannose	-	Kim *et al.*, 1996
Gracilaria verrucosa	fetuin	49,000	Kanoh *et al.*, 1992

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Lectins from	Sugar specificity	Molecular weight	References
<u>ฟองน้ำ (marine sponge)</u>			
Halichondria panicea	fetuin, L-fucose	-	Muller *et al.*, 1981
Halichondria panicea	galactose	-	Kamiya *et al.*, 1990
Halichondria okadai	GluNAc, GalNAc	42,000-84,000	Kawagishi *et al.*, 1994
<u>แบคทีเรีย (bacteria)</u>			
Bradyrhizobium japonicum	galactose	-	Ho *et al.*, 1990
Tritrichomonas mobilensis	sialic acid	-	Babal *et al.*,1994
Mycobacterium smegmatis	arabinogalactan	-	Kunda *et al.*,1989
<u>ยีสต์ (yeast)</u>			
Brewer' s yeast	mannose		Straver *et al.*, 1994
Baker' s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)	galactose	10,000	Stratford and Carter, 1993; Kunda *et al.*, 1988
Saccharomyces cerevisiae	mannose	13,000	Shankar and Umesh-Kumer, 1994
		-	
<u>ปะการัง (coral)</u>			
Coral (*Gerardia savaglia*)	mannose		Kljajic *et al.*, 1987
Solf coral	mucin Type I	-	Goto-Nance *et al.*, 1996
(*Labophytum variatum*)		53,000	
<u>แพลงก์ตอน (plankton)</u>			
Rotifer	-		Snell and Nacionales, 1990
		-	

1.2.3 เลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะพบในกลุ่ม echinodermata, arthropoda และ mollusca โดยจะพบในส่วนของน้ำเลือด (hemolymph) เมือก (mucus) น้ำในโพรงลำตัว (coelomic fluid) และเมมเบรนของเซลล์ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

หน้าที่ของเลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีความหลากหลาย ตัวอย่างเช่น เลคตินในน้ำเลือดจะทำหน้าที่เป็นสารออพโซนิน (opsonin) สำหรับการเกิดฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์แปลกปลอม (Yang and Yoshino, 1990a,b; Tripp, 1966; Martin *et al.*, 1993; Renwrantz and Stahmer, 1983) โดยช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจดจำและกำจัดเซลล์แปลกปลอมได้เร็วขึ้น (Vasta *et al.*, 1982; Weir, 1980) เลคตินในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากจุลินทรีย์แปลกปลอมได้ซึ่งคล้ายกับ IgG ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Komano *et al.*, 1980) เช่นเลคตินซะคิลลิน (scyllin) ที่แยกได้จากน้ำเลือดของปู *Scylla serrata* สามารถทำให้แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกเกาะกลุ่ม รวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยไปยับยั้งกระบวนการหายใจและการออกซิไดซ์กลูโคส (glucose oxidation) ของแบคทีเรีย (Chattopadhyay *et al.*, 1996)

เลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังส่วนมากต้องการ Ca^{2+} ช่วยในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มเช่น เลคตินจากปลิงทะเล (*Cucumaria echinata*) (Hatakeyama *et al.*, 1995) เลคตินชื่อ tachylectin-4 และ limulin จากแมงดาทะเล (Saito *et al.*, 1997; Armstrong *et al.*, 1996) และเลคตินจากกุ้งน้ำจืด (*Macrobrachium rosenbergii*) (Vazquez *et al.*, 1993) เป็นต้น เลคตินที่ไม่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนมีอยู่ส่วนน้อย เช่นเลคตินจากกุ้งมังกร (red lock lobster, *Jasus novaehollandiae*) (Imai *et al.*, 1994) และเลคตินจากแมงดาทะเลอเมริกัน (American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*) (Tsuboi *et al.*, 1996) นอกจากนี้เลคตินในกลุ่มนี้มักมีความจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค แมนโนส กาแลคโตส ฟูโคส (fucose) เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน และฟีทูอีน (fetuin) ดังนั้นการทำให้เลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังบริสุทธิ์มักใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity

column chromatography) เช่น Fetuin-agarose และ Asialofetuin-Sepharose เป็นต้น (ตารางที่ 2) เลคตินที่แยกได้จากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้างตั้งแต่ 4,800 ดัลตัน จากปู *Scylla serrata* (Chattopadhyay *et al.*, 1996) ไปถึง 1,700,000 ดัลตัน จากแมงดาทะเลอเมริกัน (Tsuboi *et al.*,1996)

ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังและน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินในกลุ่มนี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

Lectins from	Sugar specificity	Molecular weight	Chromatography	References
<u>กุ้ง (prawn)</u>				
Macrobrachium rosenbergii	sialic acid	19,000	Sephadex G-200	Vazques *et al.*, 1993
Penaeus monodon	sialic acid	420,000	Fetuin-agarose	Ratanapo and Chulavatnatol, 1990
Parapenaeus longirostris	sialic acid GalNAc	440,000-210,000	-	Fragkiadakis and Stratakis, 1995
Jasus novaehollandiae	fetuin, mucin	400,000	-	Imai *et al.*, 1994

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Lectins from	Sugar Specificity	Molecular Weight	Chromatography	References
<u>หอย (oyster)</u>				
Pinctada fucata martensii (หอยมุก)	galactose GalNAc	440,000	Bovine submaxillary mucin-sepharose 4B	Suzuki and Mori, 1989
Anadara granosa L. (หอยกาบ)	galactose	130,000	Asialofetuin-sepharose 4B	Dam *et al.*, 1992
Cepaea hortensis (หอยทาก)	sialic acid	80,000	Fetuin-agarose	Brossmer *et al.*,1992
<u>แมงดาทะเล (Horseshoe crab)</u>				
American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*)	glycophorin A^N	1,700,000	Glycophorin A^N, S-300	Tsuboi *et al.*, 1996
	sialic acid	-	Fetuin-agarose	Armstrong *et al.*, 1996
Japanese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*)	GluNAc	27,000 *	Lipopolysaccharide-immobilized agarose	Saito *et al.*, 1995
Asian horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*)	sialoglyco-protein	533,000	Glycophorin HA, S-300	Tsuboi *et al.*, 1993
<u>ปู (crab)</u>				
Scylla serrata	-	4,800-5,000	-	Chattopadhyay *et al.*, 1996

* Molecular weight of subunit

1.2.4 เลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง

ได้มีการศึกษาเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังหลากหลายชนิด มีรายงานการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากกว่าในสัตว์บกหรือสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ เลคตินของสัตว์มีทั้งชนิดที่ต้องการและไม่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนช่วยในการจับกับคาร์โบไฮเดรต และมีทั้งการเป็นเลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรนหรือเมมเบรนเลคติน (integral membrane lectin) หรือเลคตินที่ละลายได้ (soluble lectin)

สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในระยะแรกมีการค้นพบเลคตินจากเซลล์ตับหนู ซึ่งมีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสและเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Asialo-orosomucoid พบว่ามีหน่วยย่อยขนาด 48,000 ดัลตัน จำนวน 2 หน่วย และ 40,000 ดัลตัน จำนวน 4 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 260,000 ดัลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 283 หน่วย ปลายด้านอะมิโน (NH_2- terminal end) เป็นกรดอะมิโนชนิด hydrophilic และปลายด้านคาร์บอกซิลิค (COOH-terminal end) มีหมู่ไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharide) (Kawasaki and Ashwell, 1976) ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากตับคน (Baenziger and Maynard, 1980) ในปี คศ. 1982 Maynard and Baenziger (1982) แยกเลคตินซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสและเอ็น-อะซิติล กลูโคซามีนจากตับหนู พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อย 24,000 ดัลตัน และไม่ต้องการดีเทอร์เจนท์ (detergent) ในการสกัด บ่งชี้ว่าเลคตินชนิดนี้ไม่ได้เป็นส่วนหนึ่งของเมมเบรน แต่ต้องการดีเทอร์เจนท์ที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) เช่น Triton X-100 เพื่อทำให้เลคตินเสถียร (stable) ในขั้นตอนการเก็บ เลคตินที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส-6-ฟอสเฟต (mannose-6-phosphate) พบได้ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคน, เซลล์ของตับหมูและตับหนู โดยพบเลคตินนี้ภายในเซลล์สูงถึง 90% ส่วนอีก 10% พบที่เมมเบรน จากการทำให้เลคตินชนิดนี้บริสุทธิ์จากเมมเบรนของเซลล์ตับหมู พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 215,000 ดัลตัน (Barondes, 1986)

เลคตินของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังยังพบได้ในเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในระยะพัฒนาการเจริญ Cerra *et al.* (1985) ได้ทำการแยกเลคตินจากปอดของหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์และหนูวัยเจริญพันธุ์แล้ว ด้วยคอลัมน์ Asialofetuin-bead ได้เลคติน 3 ชนิด ที่มีขนาดโมเลกุล 14,500, 18,000 และ 29,000 ดัลตัน จึงให้ชื่อเลคตินเหล่านี้ว่า RL-14.5, RL-18 และ RL-29 ตามลำดับ RL-18 และ RL-29 พบในตับและกล้ามเนื้อของหนู

ที่ยังไม่เจริญพันธุ์ ส่วน RL-14.5 พบมากในเนื้อเยื่อของหนูวัยเจริญพันธุ์

ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ต้องการ Ca^{2+} ช่วยในการทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ คอนวัลซิน (convulxin) เป็นเลคตินที่แยกมาจากพิษงู (*Crotalus durissus terrificus*) ซึ่งเป็นงูในเขตร้อน มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 14,000 และ 16,000 ดัลตัน สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ด้านปลายอะมิโนสามารถชักนำให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet) ได้ (Polgur *et al.*, 1997) คอลเลคติน (collectin) เป็นเลคตินที่ได้จากซีรัมและของเหลวในปอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบ่งย่อยได้เป็น MBP (mannan binding protein) และคอนกลูตินิน (conglutinin) พบในพลาสมา (plasma) ส่วนชนิด SP-A, SP-D และ CL-43 พบในปอด คอลเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 600,000-1,000,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ซึ่งยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) แต่ละหน่วยย่อยมีหมู่จดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition domain, CRD) ที่ปลายด้านคาร์บอกซิลิคของสายโพลีเปปไทด์ และมีหมู่คอลลาเจน (collagen) ที่ปลายด้านอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ ความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินในกลุ่มนี้มีความหลากหลาย เช่น คอลเลคตินชนิด SP-A จำเพาะกับซีราไมด์ (ceramide) ที่จับอยู่กับกาแลคโตส กลูโคส (glucose) หรือแลคโตส (lactose) ในขณะที่คอนกลูตินินกับ MBP จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีนและฟูโคส ยังพบว่าคอนกลูตินินและ MBP จับกับน้ำตาลแมนโนสบนผิวของไวรัส HIV (human immunodeficiency virus) ซึ่งทำให้เกิดโรคเอดส์ได้ (Loveless *et al.*, 1995) ส่วนชนิด CL-43 จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส, เอ็น-อะซิติล แมนโนซามีน (N-acetyl mannosamine), ฟูโคส และกาแลคโตส เลคตินในกลุ่มคอลเลคตินสามารถจับกับโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) บนผิวเซลล์แบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้ (Reading *et al.*, 1997)

ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ไม่ต้องการ Ca^{2+} ได้แก่ กาแลพติน (galaptin) ซึ่งเป็นเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสและจำเพาะต่อตัวรับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate receptor) บนผิวเซลล์ เลคตินชนิดนี้ทำให้เซลล์มะเร็ง (cancer cell) เกาะกลุ่มได้ (Woynarowska *et al*, 1994) หรือเลคตินที่จับกับแลคโตส (lactose binding lectin) เป็นเลคตินอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเซลล์ พบได้ในลำไส้และลิ้นของหนู (Chiu *et al.*, 1994) และกาเลคติน (galactin) เป็นเลคตินที่ได้

แบ่งได้เป็น 8 กลุ่มย่อย เรียก กาเลคติน 1-8 โดย กาเลคติน 1 พบที่ผิวหนัง, กล้ามเนื้อ, เมือก, ไต, รกของคนและของหนู กาเลคติน 2 พบในตับ ส่วนกาเลคติน 3 พบในเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น มาโครฟาจ (macrophage), เบโซฟิล (basophils) และเซลล์มาสท์ (mast cell) กาเลคติน 4 พบในเยื่อบุผิวลำไส้ และกาเลคติน 8 แยกได้จากตับหนูมีขนาด 35,000 ดัลตัน (Hadari *et al.*, 1995) เป็นต้น เลคตินกลุ่มนี้จำเพาะกับน้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตส (Barondes *et al.*, 1994)

เลคตินบางชนิดของสัตว์ได้จากการหลั่งออกมาจากเซลล์เนื้อเยื่อจำเพาะเช่น เลคติน 3 ชนิด ที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสซึ่งแยกได้จากกบ (*Xenopus laevis*) ได้แก่ เลคติน XL-43 พบมากในไข่ที่ยังไม่เจริญเต็มที่และไข่ที่ไม่ถูกผสมโดยจะถูกหลั่งออกมาภายนอกหลังจากเกิดการผสมพันธุ์และการพัฒนาของเอมบริโอ (embryo) มีน้ำหนักโมเลกุลในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) เป็น 43,000 และ 45,000 ดัลตัน (Roberson and Barondes, 1982) เลคติน XL-69 ได้จากเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) ภายในตับ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) จะกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์และหลั่งเลคตินชนิดนี้ออกสู่กระแสเลือด มีน้ำหนักโมเลกุล 69,000 ดัลตัน (Roberson *et al.*, 1985) และเลคติน XL-16 ซึ่งพบในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ของเซลล์ที่ต่อมผิวหนังมีน้ำหนักโมเลกุล 16,000 ดัลตัน (Barondes, 1986)

สำหรับในปลา ได้มีการศึกษาเลคตินในระยะแรกจากซีรัม (serum) ปลาไหล (eel, *Anguilla rostrata*) (Springer and Desai, 1971) ตามด้วยเลคตินในซีรัมของปลาไหลยุโรป (European eel, *Anguilla anguilla*) พบว่ามีความจำเพาะกับน้ำตาลฟูโคส และมีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดหน่วยย่อยละ 20,000 ดัลตัน ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Kelly, 1984) ต่อมากมีการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมือกที่ผิวหนัง (skin mucus) ของปลาไหลคองเกอร์ (Conger eel, *Conger myriaster*) ซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสด้วยคอลัมน์ Galactose-Sepharose 6B พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 12,500 ดัลตัน ปลายด้านอะมิโนเป็นฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) (Shiomi *et al.*, 1989) ในขณะที่ เลคตินของปลาไหลไฟฟ้า (electric eel, *Electrophorus electricus*) ซึ่งแยกจาก

อวัยวะไฟฟ้า (electric organ) มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 16,500 ดัลตัน (Levi and Teichberg, 1981)

ในการศึกษาเลคตินในไข่ปลา ได้มีการศึกษาในปลาทะเลบางชนิด ตัวอย่างเช่น Bildfell *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาเลคตินบริสุทธิ์จากไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) โดยคอลัมน์ Rhamnose-Sepharose พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดัลตัน สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายและของคนหมู่ B เกาะกลุ่มได้ และมีความจำเพาะต่อน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) ไม่ถูกยับยั้งโดยน้ำตาลชนิดอื่นหรือโดย 100 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ซึ่งเป็นสารคีเลท (chelating agent) หรือโดย 100 mM เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) จากการทำ western blot ของแอนติบอดีต่อเลคตินบริสุทธิ์ พบว่าเกิดปฏิกิริยาได้กับสารสกัดโยล์ค (yolk extract) ซีรัมและเลคตินจากไข่ แสดงว่าเลคตินในไข่ปลาเรนโบว์เทราท์อาจเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเอง (host defence) หรือเกี่ยวกับการขนส่งไกลโคโปรตีนในเลือด นอกจากนี้ Yousif *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาเลคตินจากไข่ของปลาโคโฮแซลมอน (coho salmon) พบว่าสามารถจับเชื้อ *Aeromonas salmonicida* และมีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส, กาแลคโตซามีนและแรมโนส จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ D-galactose-Sepharose 4B พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 24,500 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ที่เป็นไดเมอร์ (dimer) และไม่มีพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) ยึดระหว่าง 2 หน่วยย่อย (Krajhanzl *et al.*, 1986) หรือเลคตินจากไข่ powan ในวงศ์ (family) Salmonidae ที่มีน้ำหนัก โมเลกุล 25,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (Krajhanzl *et al.*, 1978) แหล่งของเลคตินในไข่ปลาโคโฮแซลมอนไม่ทราบชัด (Yousif *et al.*, 1994) แต่จากผลวิจัยด้านเนื้อเยื่อวิทยา (histochemistry) บ่งชี้ว่าเลคตินในไข่ปลาพบในส่วนโยล์คเวซิเคิล (yolk vesicle) ของโอโอไซท์ (oocyte) ขนาดเล็กและพบในคอร์ทิคอล เอลวีโอไล (cortical alveoli) ของไข่สุกเพื่อป้องกันการปฏิสนธิของไข่โดยตัวอสุจิมากกว่า 1 ตัว (polyspermy) (Nosek *et al.*, 1983; Nosek, 1984)

ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง

Lectins from	Sugar specificity	References
Serum and plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	maltose, L-fucose, glucose, GluNAc,	Jensen *et al.*, 1997
Serum of catfish (*Clarias batrachus*)	melibiose	Dash *et al.*, 1993
Serum of European eel (*Anguilla anguilla*)	mannose	Gercken and Renwrantz, 1994
Plasma of Channa punctatus	galactose, GalNAc	Manihar and Das, 1990
Yolk of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)	galactose, L-rhamnose D-galactosamine	Yousif *et al.*, 1994
Ova of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	L-rhamnose	Bildfell *et al.*, 1992
Ova of chum salmon (*Oncorhynchus keta*)	L-rhamnose	Kamiya *et al.*, 1990
Egg of Ayu fish (*Plecoglossus altivelis*)	L-rhamnose, L-mannose	Sakakibara *et al.*, 1985
Ova of Japanese trout (*Oncorhynchus rhodurus*)	L-rhamnose, melibiose D-galactose	Ozaki *et al.*, 1983
Ova of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)	D-galactose, L-rhamnose	Voss and Fryer, 1978
Vitellogenic oocytes of roach (*Rutilus rutilus*)	L-rhamnose	Licastro *et al.*, 1991
Roe of catfish (*Silurus asotus*)	L-rhamnose	Hosono *et al.*, 1993
Egg of frog (*Rana catesbeiana*)	galactose,	Ozeki *et al.*, 1991
Skin mucus of the conger eel (*Conger myriaster*)	galactose	Muramoto and Kamiya, 1992

1.3 สมบัติของเลคตินจากสัตว์

เนื่องจากงานวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาเลคตินของปลากะรังซึ่งเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง จึงเน้นกล่าวถึงสมบัติระดับโมเลกุลของเลคตินของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลังเป็นหลัก

1.3.1 ความจำเพาะกับน้ำตาล

โมเลกุลของเลคตินโดยทั่วไปมีแหล่งจับกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง แหล่งจับของเลคตินสามารถจับกับน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) หรือสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ การที่เลคตินจับจำเพาะกับน้ำตาลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับแหล่งจับของเลคตินแต่ละชนิดมีขนาดและจำนวนของแหล่งจับกับน้ำตาลในเลคตินที่แตกต่างกัน เช่นเลคตินจากซีรัมของปลาเรนโบว์เทราท์มีความจำเพาะกับน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ เช่น ฟูโคส, กลูโคส, เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน และ แมนโนส (Jensen *et al.*, 1997) เลคตินจากซีรัมของปลาไหล มี 2 ชนิด ชนิดที่จำเพาะกับแมนโนส เรียก MBL (mannose binding lectin) และชนิดที่จำเพาะกับฟูโคสเรียก FBL (fucose binding lectin) (Gercken and Renwrantz, 1994) เลคตินจากไข่ปลาโคโฮแซลมอนจับจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส แรมโนสและ ดี-กาแลคโตซามีน (D-galactosamine) (Yousif *et al.*, 1994) เลคตินที่แยกได้จากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์มีความจำเพาะต่อกาแลคโตส กาแลคโตซามีน และน้ำตาลอื่น ๆ รวมทั้งไกลโคโปรตีน เช่นฟีทูอีน, อะไซอะโลฟีทูอีน (asialofetuin), มิวซิน โอโวมิวคอยด์ (ovomucoid) เป็นต้น (Shiomi *et al.*, 1989) และคอลเลคตินชนิด MBP มีความจำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส (Reading *et al.*, 1997) ตัวอย่างความจำเพาะของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

เลคตินจากสัตว์ประเภทครัสเตเชียน (crustacean) มักมีความจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคหรือสารประกอบที่มีกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคเป็นองค์ประกอบ เช่น ฟีทูอีน, อะไซอะโลฟีทูอีน, มิวซิน เป็นต้น อาทิเช่น เลคตินจากกุ้งกุลาดำ มีความจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค, ฟีทูอีน, มิวซิน เป็นต้น (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) เลคตินจากแมงดาทะเลอเมริกัน (Armstrong *et al.*, 1996) และจากหอยทาก (Brossmer *et al.*, 1992) จับจำเพาะกับกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคและฟีทูอีน

ในขณะที่แมงดาทะเลเอเชียน (Asian horseshoe crab, *T. tridentatus*) มีความจำเพาะกับ glycophorin (Tsuboi *et al.*, 1993b) จากการที่เลคตินมีความจำเพาะกับน้ำตาลแตกต่างกัน จึงใช้สมบัตินี้ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์

1.3.2 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์

เลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือเลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรนและเลคตินที่ละลายได้ เลคตินที่ละลายได้เป็นเลคตินที่ได้จากส่วนของเหลวของร่างกาย เช่นพลาสมา ซีรัม หรือถูกสกัดจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) และละลายได้ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ สามารถทดสอบแอคทิวิตี (activity) ของเลคตินเหล่านี้โดยการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มและปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หรือสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (Barondes,1984; 1986) เลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรนหรือเมมเบรนเลคตินฝังตัวอยู่ในส่วนของเมมเบรน สามารถสกัดเลคตินออกจากเมมเบรนได้โดยอาศัยดีเทอร์เจนท์ที่ไม่มีประจุ เช่น Triton X-100 หรือ Tween-20 หรืออาจใช้อะซีโตน (acetone) ทำเมมเบรนให้เป็นผง หรือได้จากสารละลายที่สกัดจากเมมเบรน (crude membrane fraction) (Barondes, 1986) ทดสอบแอคทิวิตีของเมมเบรนเลคตินได้โดยติดตามปฏิกิริยาการตกตะกอนกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต

ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์มักใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีได้แก่การแยกโดยอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration chromatography) แต่ที่นิยมใช้กันมากคือการแยกโดยอาศัยสมบัติการจับจำเพาะของเลคตินต่อน้ำตาลหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตมาใช้ในการแยกเลคตินออกจากโปรตีนชนิดอื่นโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) เนื่องจากการแยกมีความจำเพาะสูง ทำได้ง่าย รวดเร็ว ได้ปริมาณมาก และให้ความบริสุทธิ์สูง ดังเช่นการแยกเลคตินซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตสจากเซลล์ตับหนูด้วยคอลัมน์ Lactosyl-Sepharose (Hadari *et al.*, 1995) เลคตินจากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้าที่มีความจำเพาะกับกาแลคโตสและแลคโตส ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Lactosyl-Sepharose ได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 1,000 เท่า (Levi and Teichberg, 1981) ในขณะที่เลคตินจากซีรัมของปลาไหลชนิดที่

จำเพาะกับแมนโนส (MBL) ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Peptone-Sepharose และด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (preparative polyacrylamide gel electrophoresis) และชนิดที่จำเพาะกับฟูโคส (FBL) ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fucose-agarose (Gercken and Renwrantz,1994) เลคตินที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคสถูกแยกจากพลาสมาและซีรัมของปลาเรนโบว์เทราท์โดยคอลัมน์ Sepharose (Jensen *et al.*, 1997) เลคตินที่มีความจำเพาะต่อกาแลคโตสถูกทำให้บริสุทธิ์จากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์โดยคอลัมน์ Galactose-Sepharose (Shiomi *et al.*, 1989) เป็นต้น นอกจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังแล้ว ได้มีการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ดังตัวอย่างการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

1.3.3 โครงสร้างระดับโมเลกุลของเลคติน

เลคตินที่ได้จากสัตว์มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมากตั้งแต่ 4,800 ดัลตัน สำหรับเลคตินจากปู *Scylla serrata* (Chattopadhyay *et al.*, 1996) จนถึง 1,700,000 ดัลตัน สำหรับเลคตินจากแมงดาทะเลอเมริกัน (Tsuboi *et al.*, 1996) เลคตินส่วนใหญ่มีจำนวนหน่วยย่อยแตกต่างกัน หน่วยย่อยของเลคตินชนิดต่าง ๆ อาจเหมือนกันหรือแตกต่างกัน แต่ละหน่วยย่อยอาจมีแหล่งจับจำนวนแตกต่างกัน ได้มีการศึกษาแหล่งจับของเลคตินจากพืชตระกูลถั่วกันมาก พบว่าโมเลกุลของเลคตินจากพืชตระกูลถั่วมักประกอบด้วย 2 - 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีแหล่งจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต 1 ตำแหน่ง บริเวณแหล่งจับประกอบด้วยกรดอะมิโนเช่น กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) และแอสปาราจีน (asparagine) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกับคาร์โบไฮเดรต โดยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างหมู่โซ่ข้าง (side chain group) ของกรดอะมิโนกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของน้ำตาล กรดอะมิโนเหล่านี้ยังจับกับไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งจำเป็นต่อแอคทิวิตีของเลคติน เช่น Ca^{2+} และ/หรือ Mn^{2+} (Sharon and Lis, 1995) สำหรับแหล่งจับของเลคตินในสัตว์ มีการศึกษาบ้างในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าแหล่งจับของเลคตินเหล่านี้เป็นในทำนองเดียวกับของพืชตระกูลถั่ว กล่าวคือต้องการกรดอะมิโนที่เฉพาะและใช้พันธะไฮโดรเจนของหมู่โซ่ข้างในการจับกับน้ำตาล (Sharon and Lis, 1995) แต่สำหรับเลคตินในปลายังมีการศึกษาแหล่งจับกันน้อยมาก ตัวอย่างเช่น เลคตินที่แยกจากซีรัมปลาไหลยุโรปมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 40,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่เหมือนกัน มี

ขนาดหน่วยย่อยละ 20,000 ดัลตัน สายโพลีเปปไทด์ของแต่ละหน่วยย่อยไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ แต่มีพันธะไดซัลไฟด์ยึดระหว่างหน่วยย่อยทั้งสอง แต่ละหน่วยย่อยมีแหล่งจับกับน้ำตาลฟูโคส 2 ตำแหน่ง (Kelly, 1984)

เลคตินจากซีรัมและพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวนมาก โดยปรากฏแถบโปรตีนแบบขั้นบันไดหลายแถบในช่วงน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 200,000 ถึง 16,000 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสในสภาวะที่ไม่มีการรีดิวซ์ (non-reduction) แต่ปรากฏโปรตีนขนาด 16,000 ดัลตัน เพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสในสภาวะที่มีการรีดิวซ์ (reduction) (Jensen *et al.*, 1997) เลคตินส่วนมากไม่มีพันธะโควาเลนท์ยึดระหว่างแต่ละหน่วยย่อย เช่น เลคตินที่แยกได้จากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 2 หน่วย ซึ่งมีน้ำหนักหน่วยละ 12,500 ดัลตัน มีปลายด้านอะมิโนเป็นฟีนิลอะลานีน แต่มีกรดอะมิโนที่แหล่งจับกับน้ำตาลเป็นทริปโตเฟน (tryptophan) ระหว่างหน่วยย่อยไม่ได้ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เพราะไม่มีซิสเตอีน (cysteine) ในโมเลกุล (Shiomi *et al.*, 1989) เลคตินจากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้ามีน้ำหนักโมเลกุล 32,500 ดัลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 144 หน่วย และคาร์โบไฮเดรต 2.2% มี 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดหน่วยย่อยละ 16,500 ดัลตัน ไม่มีซิสเตอีนในสายโพลีเปปไทด์จึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ยึดระหว่างหน่วยย่อย และมีทริปโตเฟน 1 หน่วยในบริเวณแหล่งจับ (Levi and Teichberg, 1981) เลคตินจากซีรัมปลาไหลชนิดที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (MBL) มีน้ำหนักโมเลกุล 246,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 10 หน่วย มีขนาดหน่วยย่อยละ 24,000 ดัลตัน ระหว่าง 2 หน่วยย่อยยึดกันด้วยพันธะโควาเลนท์ มีค่า pI (isoelectric pH) อยู่ในช่วง pH 4.8 - 5.2 และถูกทำลายแอคทิวิตีที่อุณหภูมิสูงกว่า 55°ซ ในขณะที่ เลคตินชนิด FBL ซึ่งจำเพาะกับน้ำตาลฟูโคสมีน้ำหนักโมเลกุล 121,000 ดัลตัน ประกอบด้วยไดเมอร์ 4 หน่วย ที่มีขนาด 30,000 ดัลตัน ซึ่งจะถูกรีดิวซ์แยกเป็น 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน หน่วยย่อยละ 15,000 ดัลตัน มีค่า pI อยู่ในช่วง 5.5 - 6.2 และเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 75°ซ (Gercken and Renwrantz, 1994) เลคตินในซีรัมของคนที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสและเอ็น-อะซิติล กลูโคซามีนซึ่งถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Mannose-Sepharose พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 270,000 -

650,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 9-18 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 32,000 ดัลตัน (Holmskov *et al.*, 1994) นอกจากนี้เลคตินจากสัตว์เดียวกันมีรายงานของน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน เช่น เลคตินของแมงดาทะเลอเมริกันประกอบด้วย 18 หน่วยย่อย (Sharon and Lis, 1972) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 335,000 ดัลตัน (Roche and Monsigny, 1974), 460,000 ดัลตัน (Nowak and Barondes, 1975), 400,000 ดัลตัน (Marchalonis and Edelman, 1968) และ 1,700,000 ดัลตัน (Tsuboi *et al.*,1996)

1.3.4 ความต้องการไอออน

เลคตินบางชนิดต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน เช่น Ca^{2+}, Mn^{2+} และ Mg^{2+} ช่วยในการจับกับคาร์โบไฮเดรต ไอออนเหล่านี้จับกับหมู่โซ่ข้างของกรดอะมิโนที่แหล่งจับส่งผลทำให้ตำแหน่งของกรดอะมิโนสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้ดีขึ้น (Sharon and Lis, 1995) ไดวาเลนท์แคทไอออนบางครั้งเป็นองค์ประกอบของโมเลกุลเลคติน เช่นโมเลกุลของคอนคานาวาลินเอ (concanavalin A) ซึ่งเป็นเลคตินที่ได้จากพืช มี 1 Ca^{2+} และ 1 Mn^{2+} เป็นองค์ประกอบ ถ้ากำจัดไอออนเหล่านี้ออกจากคอนคานาวาลินเอด้วยการทำให้เป็นกรด (acidification) โดย 0.1 M HCl (Agrawal and Goldstein, 1968) จะทำลายความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตของเลคตินนี้ เช่นเดียวกับการกำจัด Ca^{2+} ออกอย่างสมบูรณ์จากโมเลกุลของเลคติน NKR-P1 ของหนูจะทำให้ความสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตสูญเสียไป (Bezouska *et al.*, 1994) การจับกับ Ca^{2+} ของเลคตินเป็นการช่วยทำให้โครงรูป (conformation) ของโมเลกุลและแหล่งจับกับน้ำตาลของเลคตินเสถียร (Becker *et al.*, 1975; 1976)

สำหรับเลคตินจากสัตว์หลายชนิดต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนช่วยในการทำงาน อาทิเช่น เลคตินจากซีรัมปลาเรนโบว์เทราท์ (Jensen *et al.*, 1997) หรือเลคตินของแมงดาทะเลอเมริกัน (Sharon and Lis, 1972) ต้องการ Ca^{2+} ในขณะที่ Ca^{2+} กระตุ้นแอคทิวิตีของเลคตินจากน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ แต่สารคีเลทเช่น EGTA (ethyleneglycolte-traacetic acid) ยับยั้งแอคทิวิตี (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) คอนวัลซินที่แยกจากพิษงู (Polgur *et al.*, 1997) และคอนเลคตินที่ได้จากซีรัมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Reading *et al.*, 1997) ต้องการไอออนเช่นกัน

1.4 บทบาททางชีวภาพของเลคติน

1.4.1 บทบาทของเลคตินจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง

1.4.1.1 ทำปฏิกิริยากับสารประกอบคาร์โบไฮเดรต

เลคตินที่ละลายได้จะเคลื่อนย้ายไปมาได้อย่างอิสระภายในเซลล์และระหว่างเซลล์จึงสามารถจับกับสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบได้ทั้งในรูปที่ละลายได้และที่จับกับเมมเบรนต่าง ๆ (Barondes, 1984) เช่น เลคตินจากตับไก่สามารถจับกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ยึดติดกับผิวเมมเบรนภายนอกเซลล์ได้ (Barondes, 1986) เลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับและขนส่งหรือลำเลียงสารประกอบคาร์โบไฮเดรตระหว่างเซลล์หรืออาจช่วยในการย่อยไกลโคโปรตีน (Barondes, 1986)

1.4.1.2 ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม

ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเซลล์เกิดขึ้นโดยเลคตินจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์และทำหน้าที่คล้ายสะพานเชื่อม (cross-bridge) ระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์ให้เกาะกลุ่มกันเพราะเลคตินมีแหล่งจับที่จำเพาะกับน้ำตาลบนผิวเซลล์มากกว่า 1ตำแหน่ง การเกาะกลุ่มเซลล์ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ สมบัติของเลคติน (ชนิดและจำนวนของแหล่งจับกับน้ำตาล, ขนาดโมเลกุล เป็นต้น) สมบัติของผิวเซลล์ที่เลคตินเข้าไปจับ (จำนวนและตำแหน่งของแหล่งจับบนผิวเซลล์, ความอ่อนตัวของเมมเบรน (membrane fluidity) เป็นต้น) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และปัจจัยภายนอกอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ, ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ไอออน, ช่วงเวลาการทำปฏิกิริยาและการถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยน้ำตาลที่จำเพาะ ล้วนมีผลต่อการจับของเลคติน เลคตินส่วนมากสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่าง ๆ เกาะกลุ่มได้ เลคตินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะกลุ่มได้ได้แก่เลคตินจากซีรัมปลาไหลที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (Gercken and Renwrantz,1994) จากคางคก (Elola and Fink,1996) เป็นต้น เลคตินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่ม ได้แก่ เลคตินจากไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ (Bildfell *et al.*, 1992) จากซีรัมของปลาไหลที่จำเพาะกับน้ำตาลฟูโคส (Gercken and Renwrantz, 1994) และจากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์ (Shiomi *et al.*, 1989) เป็นต้น เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเกาะกลุ่ม

ของเซลล์โดยเลคตินเกิดได้มากขึ้นหรือลดลง ดังเช่น เลคตินสามารถทำให้เซลล์มะเร็งเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (normal cell) (Lis and Sharon, 1986) หรือเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น โปรเนส (pronase) ไซอะลิเดส (sialidase) หรือนิวรามินิเดส (neuraminidase) หรือด้วยทริปซิน (trypsin) เกิดการเกาะกลุ่มโดยเลคตินได้ดีขึ้น เลคตินจากถั่วลิสง (peanut) ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่ม แต่เมื่อย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ไซอะลิเดส เพื่อกำจัดกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคบนผิวเซลล์ออกไปบางส่วนพบว่ามีการเกาะกลุ่มเกิดขึ้น (Lis and Sharon, 1986) ในทำนองเดียวกับการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยทริปซินที่ทำให้มีการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นโดยเลคตินจากเมล็ดเหรียง (Utarabhand and Akkayanont, 1995) จากเมล็ดขนุน (Sharon and Lis, 1972) และจากเมล็ดจำปาดะ (Champaada, *Artocarpus integer*) (อุบล ตันสม, 2541)

เลคตินชื่อกาแลพตินถูกหลั่งออกมาจากเยื่อบุช่องท้องในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งรังไข่ เป็นเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส สามารถทำให้เซลล์มะเร็งรังไข่ของคนชนิด A-121 เกาะกลุ่มได้ (Woynarowska *et al.*, 1994) เลคตินจากไข่ปลา Ayu สามารถทำให้เซลล์มะเร็ง Ehrlich ascites carcinoma เกาะกลุ่มได้ (Sakakibara *et al.*, 1985) ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากไข่ปลาดุก (catfish, *Silurus asotus*) ที่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในเนื้อเยื่อบุช่องท้องชนิด sarcoma 180 ascites เกาะกลุ่มได้ (Hosono *et al.*, 1993)

เลคตินในไข่ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus kisutch*) สามารถจับกับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* ซึ่งก่อให้เกิดโรคฟูรันคูโลซิส (furunculosis) ในปลาชนิดเดียวกันได้ การจับกันระหว่างเลคตินกับเชื้อ *A. salmonicida* เกิดจากผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียนี้มีส่วนของลิโพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นแหล่งจับกับเลคตินและปลายด้านอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ของเลคตินมีส่วนจดจำคล้ายกับแอนติบอดีหรือตัวรับเซลล์ (cell receptor site) (Yousif *et al.*, 1994; 1995)

1.4.1.3 เป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย

เนื่องจากเลคตินสามารถจับกับน้ำตาลบนผิวของไวรัสหรือแบคทีเรียและทำให้ไวรัสหรือแบคทีเรียเกาะกลุ่มได้ ด้วยสมบัตินี้จึงใช้เลคตินเป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อโดยไวรัสหรือแบคทีเรียได้ เช่น ในการตรวจวัดระดับเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza

virus) ของหนู โดยแยกเลคตินจากของเหลวภายในปอดหนู พบว่าระดับเลคตินในระยะที่หนูติดเชื้อรุนแรงมีค่าสูงกว่าระยะการติดเชื้อเริ่มแรก และถ้าบ่มของเหลวจากปอดหนูด้วยน้ำตาลที่สามารถยับยั้งแอคทิวิตีของเลคติน พบว่าระดับของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น จากข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าเลคตินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ (Reading *et al.*, 1997) นอกจากนี้เลคตินที่พบในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ มีระดับในน้ำเลือดเพิ่มขึ้นมากหลังกุ้งติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* และเลคตินนี้ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) นอกเหนือจากเลคตินจากสัตว์แล้ว เลคตินจากพืชหลายชนิดได้ใช้เป็นตัวตรวจวัดการติดเชื้อปลาหลายชนิด อาทิเช่น คอนคานาวาลินเอและริซินทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ในปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) ได้ (Ainsworth, 1993) เลคตินจากถั่วเหลืองสามารถตรวจจับเชื้อ *Sphaerospora* spp. ในปลาอิตาเลียนบราวน์เทราท์ (Italian brown trout, *Salmo trutta* L.) ส่วนเลคติน GS-I (*Griffonia simplicifonia*) สามารถจับเชื้อโปรโตซัว PKX ในระยะที่สร้างสปอร์ (sporogonic) และระยะที่ฟักตัวแล้ว (extrasporogonic) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค PKD ในไตของปลาบราวน์เทราท์และปลาแซลมอนได้ (Mateo *et al.*, 1997; Hedrick *et al.*, 1992; Mateo *et al.*,1993; 1996)

1.4.1.4 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย

เลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสของคน (MBL) กระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ (complement) ภายในร่างกายได้ โดยปกติแล้ว คอมพลีเมนท์คือกลุ่มของโปรตีนปกติในซีรัมที่ทำงานรวมกันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 20 ชนิด ในระยะที่มีเซลล์แปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เลคติน MBL จะเข้าจับกับโปรตีน MASP ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับแมนโนสและยึดติดกับเอนไซม์โปรตีเอส สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง MBL กับ MASP จะไปกระตุ้นโปรตีนในระบบคอมพลีเมนท์ให้ทำงานโดยมีความสามารถจับและทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ (Matsushita, 1996; Teria *et al.*, 1997)

เลคตินหลายชนิดทำหน้าที่เป็นสารออพโซนินโดยเป็นสะพานเชื่อมช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวกำจัดเชื้อโรคได้ดีขึ้น ในการกำจัดเซลล์แปลกปลอมในภาวะที่มีเลคติน CL-43 จากปอดหนู เกิดได้เร็วกว่าการที่ไม่มีเลคติน (Loveless *et al.*, 1995)

1.4.2 บทบาทของเลคตินจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

บทบาทของเลคติจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมักได้จากการศึกษาในสัตว์ทะเล ดังตัวอย่างต่อไปนี้

1.4.2.1 ช่วยในการผสมพันธุ์ของตัวอสุจิและไข่ของแมงดาทะเล

เลคตินจะช่วยให้ตัวอสุจิและไข่ของแมงดาทะเลอเมริกัน เข้ามาสัมผัสกันก่อนเกิดการปฏิสนธิตามมา (Barnum and Brown, 1983)

1.4.2.2 มีบทบาทต่อพัฒนาการเจริญของรังไข่

เลคตินในส่วนของเหลวในโพรงลำตัวของเพรียง มีปริมาณเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับพัฒนาการเจริญของรังไข่และจะมีค่าสูงสุดในช่วงที่เพรียงมีไข่แก่ บ่งชี้ว่าระดับเลคตินที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของไข่เพรียง (Muramoto *et al.*, 1991)

1.4.2.3 ทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่ม

เลคตินจากซีรัมของปูสีน้ำเงิน (blue crab, *Callinectes sapidus*) สามารถทำให้แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Cassels *et al.*, 1994) เลคตินจากน้ำเลือดของกุ้งน้ำจืด (*Macrobrachium rosenbergii*) สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเกาะกลุ่มได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella arizona* และ *Escherichia coli* (Vazquez *et al.*, 1993; 1996) เลคตินจากน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำทำให้เชื้อ *Vibrio vulnificus* เกาะกลุ่ม (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) ในขณะที่เลคตินจากน้ำเลือดของแมงดาทะเลทำให้เชื้อ *Stapphylococcus saprophyticus* เกาะกลุ่มได้ (Okino *et al.*, 1995)

1.4.2.4 เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เลคตินจากน้ำเลือดของแมงดาทะเล (*Limulus limulus*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิดคือ *E. coli, S. minesota, K. pneumonia* และ *S. aureus* ได้ ขึ้นอยู่กับน้ำตาลบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย (Saito *et al.*, 1995) เลคตินจากน้ำเลือดปู *Scylla serrata* ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Chattopadhyay *et al.*,1996)

1.4.2.5 เป็นตัวช่วยต่อต้านการเกิดโรค

เลคตินจากของเหลวในโพรงลำตัวของปลิงทะเล (*Cucumaria echinata*) ชื่อ CEL-III ที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส และเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน

สามารถทำให้เซลล์แปลกปลอมแตกได้ โดยเลคตินจับกับน้ำตาลกาแลคโตสบนผิวเซลล์ แล้วทำให้ผิวเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นรูและเซลล์แตก (Hatakeyama *et al.*, 1995) เลคตินจากปลาดาว (*Asterina pectinifera*) ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนในหลอดทดลองได้ (Jeune *et al.*, 1995) หรือเลคตินจากเพรียงหัวหอมญี่ปุ่น (Japanese ascidian) มีผลช่วยกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์เพื่อให้การกำจัดเชื้อแบคทีเรียเกิดได้ดีขึ้น (Xin *et al.*, 1997) การกำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือเซลล์แปลกปลอมอาจมีวิธีการคือการเกิดปฏิกิริยาออพโซไนซ์ (opsonization) ซึ่งเป็นการกำจัดเซลล์แปลกปลอมด้วยการที่เลคตินเป็นตัวชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจดจำเซลล์แปลกปลอมได้ดี แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถกำจัดเซลล์แปลกปลอมได้รวดเร็ว โดยพบสมบัตินี้ได้ในเลคตินจากน้ำเลือดของปู (*Scylla serrata*) (Mercy and Ravindranath, 1994) และเลคตินซึ่งได้จากน้ำเลือดของเพรียง (*Styela clava*) (Kelly *et al.*, 1992)

1.4.3 บทบาทอื่น ๆ ของเลคติน

1.4.3.1 กระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซท์

เลคตินหลายชนิดมีความสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซท์ได้ต่างกัน การแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซท์เกิดได้ดีขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเซลล์ ชนิดของลิมโฟไซท์และชนิดของเลคติน เลคตินบางชนิดไม่สามารถกระตุ้นให้ลิมโฟไซท์แบ่งเซลล์ได้ แต่เกิดได้ถ้าทำให้ผิวเซลล์เปลี่ยนแปลง เช่นการย่อยผิวเซลล์ลิมโฟไซท์โดยเอนไซม์ไกลโคซิเดสจะทำให้เลคตินกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ ตัวอย่างเช่น เลคตินจากถั่วเหลืองสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซท์ของหนูที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไกลโคซิเดสและนิวรามินิเดสได้ แต่ไม่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ปกติ (Liss and Sharon, 1986) เลคตินจากเมมเบรนของเซลล์ตับของกระต่ายที่เรียกว่า HBP (hepatic binding lectin) มีความจำเพาะกับอะไซอะโลไกลโคโปรตีน (asialoglycoprotein) สามารถกระตุ้นให้ลิมโฟไซท์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไซอะลิเดสแบ่งตัวได้ (Ashwell and Harford, 1982) เลคตินส่วนใหญ่กระตุ้นให้เซลล์ที-ลิมโฟไซท์ซึ่งผลิตจากต่อมไทมัส (thymus gland) แบ่งเซลล์ได้ แต่ไม่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของบี-ลิมโฟไซท์ ยกเว้นเลคตินบางชนิด เช่น เลคตินจากปู (*Homaru mericanus*) และจากเนื้อเยื่อไก่ซึ่งกระตุ้นการแบ่งเซลล์บี-ลิมโฟไซท์ของหนู

ขาวเล็ก (mouse) แต่ไม่กระตุ้นที-ลิมโฟไซท์ เลคตินบริสุทธิ์จากไข่ปลาน้ำจืด (roach, *Rutilus rutilus*) ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซท์ของคนได้ (Licastro *et al.*, 1991) นอกจากนี้มีสารหลายชนิดที่ไม่ใช่เลคตินแต่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลิมโฟไซท์ได้เช่น แอนติเจน, แอนติบอดีต่อผิวเซลล์ลิมโฟไซท์, สารพิษจากแบคทีเรีย สารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) เช่น periodate หรือเอนไซม์กาแลคโตสออกซิเดส (galactose oxidase) ซึ่งช่วยในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลบนผิวเซลล์ (Oppenheim and Rosenstreich, 1976)

การกระตุ้นให้ลิมโฟไซท์แบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวน เริ่มจากการที่เลคตินเข้าจับที่คาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ลิมโฟไซท์แล้วส่งสัญญาณผ่านเข้าไปในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เมมเบรน ด้วยการเพิ่มการซึมผ่านเข้าออกของสารที่จำเป็นต่าง ๆ เช่น กลูโคส กรดอะมิโน ไอออน เป็นต้น นำไปสู่การเพิ่มการสังเคราะห์ของ RNA (ribonucleic acid) และ DNA (deoxyribonucleic acid) ตามด้วยการแบ่งเซลล์ (Lis and Sharon, 1986)

1.4.3.2 ชักนำให้ลิมโฟไซท์และมาโครฟาจเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม

การเข้าทำลายเซลล์แปลกปลอมโดยที-ลิมโฟไซท์ในร่างกายของสัตว์เกิดโดยเอฟเฟคเตอร์เซลล์ (effector cell) ของลิมโฟไซท์จับจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอมโดยการชักนำของแอนติบอดีแล้วเข้าทำลายเซลล์แปลกปลอม ในกรณีที่มีเลคตินเลคตินสามารถชักนำให้ที-ลิมโฟไซท์เข้าทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ 2 แบบ แบบแรกเอฟเฟคเตอร์เซลล์ไม่จำเป็นต้องจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอม (Lis and Sharon, 1986) แต่มีเลคตินทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์แปลกปลอมกับเอฟเฟคเตอร์เซลล์ของลิมโฟไซท์เพื่อกระตุ้นลิมโฟไซท์ให้กำจัดเซลล์แปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง หรืออีกวิธีคือเลคตินเข้าไปเปลี่ยนแปลงผิวของเซลล์แปลกปลอมเพื่อให้เหมาะต่อการเข้าทำลายโดยลิมโฟไซท์ (Parker and Martz, 1980; Bonavida and Katz, 1985)

เลคตินยังเป็นสื่อชักนำให้มาโครฟาจเข้าจับและทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ เซลล์แปลกปลอมอาจหมายรวมถึงเซลล์ที่ผิดปกติ การชักนำของเลคตินต่อมาโครฟาจมีประสิทธิภาพดีกว่าแอนติบอดี เพราะเลคตินมีความจำเพาะกับเซลล์แปลกปลอมดีกว่าแอนติบอดี เนื่องจากการจับเซลล์แปลกปลอมโดยเลคตินขึ้นกับความจำเพาะ

ของน้ำตาลที่ผิวเซลล์แปลกปลอม ทำให้เลคตินสามารถชักนำให้มาโครฟาจเข้าจับและทำลายเซลล์แปลกปลอมได้ดีกว่าแอนติบอดี (Lis and Sharon., 1986)

1.4.3.3 **บทบาทในการกำจัดปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬ**

เลคตินจากสาหร่ายสีแดง (red algae, *Gracilaria verrucosa*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน *Chattonella antiqua* ซึ่งเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีธาตุอาหารสมบูรณ์หรือมีไนโตรเจนจากของเสียมาก ทำให้แพลงก์ตอนใช้ไนโตรเจนได้อย่างไม่จำกัดในการเจริญเติบโต เมื่อมีปริมาณมาก แพลงก์ตอนจะสร้างสารพิษและมีผลทำให้น้ำขาดออกซิเจน ซึ่งส่งผลทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจนและโดนสารพิษจากแพลงก์ตอนชนิดนี้จนตายได้ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬ ซึ่งส่งผลเสียต่อระบบนิเวศน์ในท้องทะเล พบว่าเลคตินจากสาหร่ายสีแดงที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งการเติบโตของแพลงก์ตอนได้ เนื่องจากเลคตินจากสาหร่ายสีแดงจับกับผิวเซลล์ของแพลงก์ตอนซึ่งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แพลงก์ตอน (Tanabe *et al.*, 1993)

1.5 ชีววิทยาของปลากะรัง

ปลากะรังปากแม่น้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Epinephelus malabaricus* มีชื่อสามัญว่า grouper ชื่อการค้าคือปลาเก๋าจุดแดง เป็นปลาขนาดกลาง รสชาดดี เนื้อนุ่ม มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นที่นิยมบริโภคของชาวเอเชีย มีราคาแพง ส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติมีขนาดไม่เกิน 50 เซนติเมตร รูปร่างยาว ลำตัวกลม แบนข้างเล็กน้อย ครีบต่าง ๆ กลมมน ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน มีแถบสีน้ำตาลเข้ม ไม่ชัดเจนพาดขวางลำตัว มีจุดสีเหลืองหรือสีส้มเล็ก ๆ ประอยู่ตลอดตัว (ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และ ดุสิต ตันวิไล, 2530) (รูปที่ 1)

ปลากะรังพบบริเวณชายฝั่งทะเลที่น้ำมีความเค็มอยู่ในระดับตั้งแต่ 15 - 30 ppt ลูกปลาที่มีความยาวประมาณ 2 - 6.5 เซนติเมตร มักพบมากในแถบชายฝั่งอ่าวไทยและแถบชายฝั่งทะเลอันดามัน ในฤดูมรสุมคือตั้งแต่ปลายเดือนพฤศจิกายนไปถึงเดือนธันวาคมจะพบลูกปลาขนาดเล็กประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร โดยพบมากในบริเวณจังหวัดสงขลา

รูปที่ 1 ปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) น้ำหนัก 1.2 กิโลกรัม

ปัตตานี และนราธิวาส แหล่งวางไข่ของปลากะรังอยู่บริเวณทะเลลึก มีความเค็มสูง ปลามีไข่แก่และวางไข่ในช่วงฤดูมรสุม เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวและโตจนมีขนาด 1 - 2 เซนติเมตร ลูกปลาสามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงความเค็ม และทนอยู่ในความเค็มน้อยลงได้ ปลากะรังที่มีขนาดเล็กกว่า 2 กิโลกรัม ยังไม่เจริญเพศจัดเป็นปลาเยาว์วัย (juvenile) เมื่อมีน้ำหนัก 3 - 5 กิโลกรัม ส่วนใหญ่เป็นเพศเมีย ปลาซึ่งมีน้ำหนักมากกว่า 6 กิโลกรัม ขึ้นไปมักพบเป็นเพศผู้

ในปลากะรังเพศเมีย รังไข่ของปลาเกิดจากเซลล์ส่วนผิวของผนังช่องท้อง (peritoneal wall) เจริญหนาเป็นสันตามยาวเรียกว่าคอร์เท็กซ์ (cortex) พัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่เกิดจากพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ระยะต่าง ๆ สามารถบ่งบอกระยะพัฒนาการเจริญของไข่ปลาเพศเมียได้ด้วยค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ (gonadosomatic index, GSI) ปลาที่มีค่า GSI ต่ำ จะมีพัฒนาการเจริญของไข่และรังไข่น้อย แต่ปลาที่มีค่า GSI มาก จะมีพัฒนาการเจริญของไข่และรังไข่มากด้วย การเจริญของไข่หรือโอโอไซท์ของปลากะรังเริ่มจากโอโอโกเนีย (oogonia) เจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เพิ่มจำนวนมากขึ้น มีการเพิ่มขนาดของเซลล์และขนาดของนิวเคลียส กลายไปเป็นโอโอไซท์ โอโอไซท์มีการเพิ่มขนาดโดยการสะสมโปรตีนโยล์ค (yolk protein) ในระยะที่โอโอไซท์มีการรับโยล์คจากภายนอก ฮอร์โมนเพศเมียโดยเฉพาะ17 เบตา-เอสตราไดออล (17 β-estradiol) ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นให้ตับสร้างไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) แล้วปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์จะรับไวเทลโลจีนินและเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนโยล์คสะสมอยู่ในโอโอไซท์ต่อไป การรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่โอโอไซท์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) (Fostier *et al.*,1983) เมื่อการสะสมโยล์คสิ้นสุดลง ระดับของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดจะลดลงทันที เมื่อโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโยล์ค จะมีการแบ่งเซลล์ จากนั้นมีการสลายของเยอร์มินัล เวซิเคิล (germinal vesicle breakdown) หรือนิวเคลียส เป็นการสิ้นสุดการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ ซึ่งได้กลายเป็นไข่สุก (ovum) อย่างสมบูรณ์ (Craik and Harvey, 1984) รอการกระตุ้นจากฮอร์โมนเพื่อให้เกิดการวางไข่และผสมพันธุ์กับตัวอสุจิภายนอกตัวปลา

ไวเทลโลจีนินเป็นพลาสมาโปรตีนที่มีฟอสเฟต (phosphate) ไขมัน (lipid) และคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินเกิดขึ้นในตับของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและถูกเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Wallace, 1978; Peterson and Common, 1972; Craik, 1978) จากการศึกษาการสะสมโปรตีนโยล์คในกบ พบว่าเนื้อเยื่อในรังไข่ของกบสามารถรับไวเทลโลจีนินได้เร็วกว่าซีรัมโปรตีนชนิดอื่นในอัตรา 5 หรือ 6 เท่า (Wallace *et al.*, 1972) แสดงว่ามีตัวรับที่จำเพาะ (specific receptor) ของไวเทลโลจีนิน ซึ่งอยู่ที่ผิวของไข่ ไวเทลโลจีนินเข้าสู่รังไข่ของปลาเรนโบว์เทราท์ผ่านขบวนการดูดกลืนของเหลว (pinocytotic uptake) (Tyler *et al.*,1990) Utarabhand and Bunlipatanon (1996) ได้ทำให้ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์โดยฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล แล้วแยกไวเทลโลจีนินจากพลาสมาปลาโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด คือ คอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 เมื่อนำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ไปฉีดกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน เพื่อนำแอนติบอดีไปใช้วิเคราะห์ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาโดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส (rocket immunoelectrophoresis) พบว่าระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (Utarabhand and Bunlipatanon, 1996; เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538) เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ได้ศึกษาระยะพัฒนาการเจริญของรังไข่ปลากะรังเพศเมีย พบว่าปริมาณไวเทลโลจีนินในเลือดของปลากะรังจะเปลี่ยนแปลงตามระยะพัฒนาการเจริญของไข่หรือเปลี่ยนแปลงตามขนาดของไข่ เมื่อไข่เริ่มเจริญมากขึ้นมีขนาดใหญ่ขึ้น ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาก็สูงขึ้นเช่นกัน (Pacoli *et al.*, 1990) นอกจากนี้ ปริมาณไวเทลโลจีนินของปลาเทราท์ทะเลจุด (spotted seatrout) เพศเมีย มีระยะพัฒนาการเจริญของรังไข่เพิ่มขึ้น ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน และเพิ่มสูงสุดเมื่อปลาเจริญพันธุ์เต็มที่ จากนั้นระดับจะลดลงเมื่อปลาวางไข่ (Copeland *et al.*, 1986) ในปลาที่วางไข่ปีละครั้ง พบว่าระดับความเข้มข้นของไวเทลโลจีนินในพลาสมามีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ไวเทลโลจีนินของปลาเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดก่อนฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ หรือก่อนที่รังไข่จะมีขนาดใหญ่สุด (GSI มีค่าสูงสุด) เพียง 1-2 เดือน หลังจากนั้นระดับไวเทลโลจีนินค่อย ๆ ลดลงก่อนปลาวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็ว

หลังปลาวางไข่แล้ว ดังเช่น จากการวัดระดับการเปลี่ยนแปลงพลาสมาไวเทลโลจีนินในรอบปีการสืบพันธุ์ของปลาดุกอัฟริกัน (African catfish) (Pacoli *et al.*, 1990) ปลาแอตแลนติคแซลมอน (Atlantic salmon) (So *et al.*,1985) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Idler and Campbell, 1980; Sumpter, 1985) พบว่าระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นจนถึงพีค (peak) สูงสุด ก่อนปลาวางไข่ประมาณหนึ่งเดือน แล้วลดลงหลังจากวางไข่แล้ว ในทำนองเดียวกัน ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินปลาของคอด (cod) เพิ่มขึ้นจาก 0.12 มก./มล. จนถึง 5.98 มก./มล. ในระยะ 4 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ค่า GSI เพิ่มขึ้นจาก 0.8% เป็น 2.6% และโอโอไซท์อยู่ในระยะสะสมไวเทลโลจีนินจากภายนอกเซลล์ (Plack *et al.*, 1971) ในปลากะรังซึ่งมีฤดูวางไข่ปีละครั้งในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ของปีถัดไป พบว่าระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้นควบคู่กับการเพิ่มของค่า GSI ยกเว้นในระยะหนึ่งเดือนก่อนปลาวางไข่ ระดับไวเทลโลจีนินเริ่มลดลงเรื่อย ๆ ขณะที่ค่า GSI ยังคงเพิ่มสูงขึ้น เป็นเพราะในระยะนี้การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินในตับลดลง ปริมาณไวเทลโลจีนินที่ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดจึงลดลงด้วย (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538)

นอกเหนือจากการศึกษาด้านชีววิทยาและพัฒนาการเจริญพันธุ์ของปลากะรังแล้ว ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเลคตินของปลากะรัง รวมทั้งของปลาชนิดอื่นก็ยังมีไม่มากนัก แม้มีการพบเลคตินในเลือดปลาที่ทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้ซึ่งคาดว่าเป็นระบบป้องกันตนเองของปลาต่อเชื้อโรคต่าง ๆ เช่นเดียวกับสารอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในปลา เช่น เมือก, เอนไซม์ไคติเนส (chitinase), ทรานสเฟอร์ริน (transferrin), ไลโซไซม์ (lysozyme) และ อินเทอร์ฟีรอน (interferon) เป็นต้น (Ingram, 1980) งานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจศึกษาสมบัติของเลคตินในพลาสมาของปลากะรัง โดยเน้นการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเลคตินบริสุทธิ์ รวมทั้งศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของเลคตินในพลาสมากับพัฒนาการเจริญของรังไข่ในปลากะรัง เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานที่จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงบทบาทของเลคตินในปลาและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสมบัติของเลคตินในพลาสมาของปลากะรัง
2. เพื่อทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรัง
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเลคตินบริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเลคตินในพลาสมากับพัฒนาการเจริญของรังไข่ปลากะรัง

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

สัตว์ทดลอง

ปลาที่ใช้ในการศึกษา คือ ปลากะรังปากแม่น้ำ (grouper, *Epinephelus malabaricus*) เป็นปลาเพศเมียที่มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 35 เซนติเมตร น้ำหนัก 3-6 กิโลกรัม เลี้ยงในกระชังที่เกาะหนู จังหวัดสงขลา ปลาตัวอย่างเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณวิชัย วัฒนกุล และกลุ่มชีววิทยาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง

กระต่ายที่ใช้ศึกษาเม็ดเลือดแดงเป็นกระต่ายขาว น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

จากบริษัท Difco Laboratories ได้แก่ Heparin, Complete Freund's adjuvant และ Incomplete Freund's adjuvant

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Ammonium sulphate, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediaminetetraacetic acid และ Glycine

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

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ Standard protein markers

จากบริษัท Sigma Chemical Co. ได้แก่ α1-Acid glycoprotein, Agarose, Ammonium persulphate, Asialofetuin, Bovine serum albumin, DEAE-Sephacel, Fetuin, Fetuin-agarose, Fructose, Galactose, Glycerol, Mannose, Methyl-α-D-galactoside, Methyl-β-D-galactoside, Mucin, N-Acetyl-D-glucosamine, N-Acetyl-D-galactosamine, N-Acetyl neuraminic acid, Neuraminidase, Phenylmethylsulphonyl fluoride, Quinadine, Sodium dodecyl sulphate, Sephadex G-200, Tris(hydroxymethyl)aminomethane และ Triton X-100

อุปกรณ์

Refrigerated superspeed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-20, Serofuge centrifuge ของ Clay Adams, UV-VIS spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A, Micropipette ของ Eppendoff และ Finn, Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto และของ Hoefer Scientific Instruments, Automatic fraction collector ของ Gilson รุ่น 202, Submarine gel electrophoresis ของ Biorad, Microtube pump MP-3 ของ Eyela, Centrifuge รุ่น TJ-b ของ Beckman, Vortex mixer ของ Scientific Industries, เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น P 1210 ของ Mettler, เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H-10 ของ Mettler, Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500 และ pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen

วิธีการ

2.1 การเตรียมพลาสมาเลคติน

ทำให้ปลาสลบในน้ำที่ผสมด้วยควินาดีน (quinadine) เข้มข้น 5-10 ppm เจาะเลือดจากเส้นเลือดใหญ่บริเวณเหงือก โดยใช้เฮพาริน (heparin) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4°ซ นาน 15 นาที ผสมพลาสมากับ 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) แล้วใช้ทันทีเพื่อหาปริมาณโปรตีนและทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือเก็บไว้ที่ -10°ซ

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

2.2.1 โดยวิธี Lowry

ทำการหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.2.2 โดยวิธี Bradford

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำควบคู่ไปกับโบวีนซีรัมอัลบูมินซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจางโบวีนซีรัมอัลบูมินให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0-30 ไมโครกรัม ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% เอธานอล (ethanol) - 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 1-2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2.2.3 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (A280)

วัดปริมาณโปรตีนของสารละลายที่เก็บจากคอลัมน์ (column) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280)

2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (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

2.3.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจล เป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	4% (3 ml)	7% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.40 ml	0.70 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 μl	30 μl	30 μl
TEMED	5 μl	3 μl	3 μl
น้ำกลั่น	3.82 ml	1.07 ml	0.77 ml

2.3.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% glycerol และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.3.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 18 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

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

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	17% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.60 ml	1.70 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
0.2M EDTA	50 µl	30 µl	30 µl
10 % SDS	50 µl	30 µl	30 µl
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
น้ำกลั่น	3.10 ml	1.56 ml	0.46 ml

2.3.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% glycerol, 4% SDS, 4% เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ให้ได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ เตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที ก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

2.3.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-1% SDS, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 18 mM นาน 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.3.3 การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในเจลแผ่นด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) แช่เจลในสารละลาย 0.02% คูมาซีบลู - 50% เมธานอล (methanol) - 7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.4 การทดสอบสมบัติในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

ดูดเลือดจากกระต่าย คนหรือจากสัตว์อื่น ๆ นำไปผสมกับเฮพาริน เพื่อกันเลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g ที่ 4 ^{o}ซ นาน 5 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.9% NaCl) โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 3 ครั้ง แขวนลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS ด้วยความเข้มข้น 2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงตามวิธีของ Kilpatrick and Yeoman (1978) โดยผสมกับสารละลายเลคตินที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) 50 ไมโครลิตร กับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ใน microtiter plate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนสารละลายเลคติน

แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ (titer) ที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารละลายเลคติน ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้สมบูรณ์ ดังตัวอย่างเช่น ถ้าไตเตอร์มีค่า 1:8 แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์มีค่า 8 หน่วยต่อปริมาตรสารละลายเลคตินที่ใช้ 50 ไมโครลิตร หรือ 160 หน่วย/มิลลิลิตร แอคทิวิตีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (specific hemagglutinating activity) มีค่าเป็นแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.5 ผลของการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4 °ซ

ผสมเลือดกระต่ายสดกับเฮพารินเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นนำเลือดกระต่ายที่เก็บไว้ทุกวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 มาล้างและเตรียมเป็น 2% (ตามข้อ 2.4) แล้วนำไปทดสอบผลของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกับพลาสมาเลคติน โดยเปรียบเทียบกับเลือดสด

2.6 การยับยั้งของน้ำตาลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคติน

เจือจางสารละลายเลคตินให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 320 หน่วย/ มิลลิลิตร ใช้เลคตินที่เจือจาง 25 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำตาลที่ต้องการทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (34 °ซ) เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย 2% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม จากการทดลองนี้ สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินได้ 100%

2.7 ผลของการเก็บพลาสมาเลคตินที่ -10 °ซ

แบ่งพลาสมาเลคตินที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 เก็บใส่ในหลอดเล็ก ๆ หลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -10 °ซ จากนั้นนำมาทดสอบหาค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายทุกเดือน เป็นเวลา 13 เดือน

2.8 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมา

2.8.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียมคอลัมน์ DEAE-Sephacel ขนาด 2.6 x 16 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) ในคอลัมน์เป็น 85 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วย 0.2 M sodium citrate - 0.2% Triton X-100 ตามวิธีของ Wallace (1965) แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุล (equilibrate) ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเรซิน จากนั้นนำพลาสมา

6 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ผ่านลงในคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 4 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ล้างคอลัมน์จนมีค่า A280 เป็นศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ที่มีความเข้มข้นเพิ่มแบบต่อเนื่องจาก 0 - 0.35 M (250 มิลลิลิตร + 250 มิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหลและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม วัดค่า A280 และแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารละลายแต่ละหลอด รวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์สูง (พีค D2) เข้าด้วยกัน ทำให้สารละลายรวมเข้มข้นในถุงไดแอไลซิส (dialysis bag) โดยใช้ CM-cellulose โรยรอบถุงไดแอไลซิส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนปริมาตรของสารละลายในถุงเหลือเพียงเล็กน้อย นำไปไดแอไลซ์ (dialyse) ใน TBS แล้วหาปริมาณโปรตีนและความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

2.8.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-200

ปรับคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 x 92 เซนติเมตร, มีปริมาตรเจล 185 มิลลิลิตร) ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ปริมาตร 750 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเลคตินพีค D2 ปริมาณ 60.6 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ข้อ 2.8.1 ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.2 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงของพีคแรก (พีค S1) เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose และไดแอไลซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF แล้วนำไปแยกต่อตามวิธีการข้อ 2.8.3 หรือ 2.8.4

2.8.3 โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)

2.8.3.1 การหาแถบโปรตีนเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจล

นำสารละลายเลคตินพีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แล้วตัดเจลเป็นแถบ

กว้างประมาณ 0.2 เซนติเมตร ตามยาวตลอดแผ่นเจล จากนั้นนำไปย้อมสีคูมาซีบลูเข้มข้น 2% ประมาณ 30 นาที เมื่อเห็นแถบโปรตีนต่าง ๆ บนแผ่นเจลนำไปเทียบตำแหน่งกับเจลแผ่นส่วนที่เหลือซึ่งไม่ได้ย้อมสี แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมสีตามขวางออกเป็นชิ้น ๆ ให้ตรงกับแถบโปรตีนที่ย้อมติดสี นำเจลแต่ละชิ้นไปบดให้ละเอียดในหลอดทดลองที่มี 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,000 x g นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ของเจลแต่ละชิ้นไปไดแอไลซ์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ที่ 4°ซ นาน 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

2.8.3.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

จากผลข้อ 2.8.3.1 เมื่อทราบตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีแอคทิวิตีของเลคตินในแผ่นเจลแล้ว นำสารละลายเลคตินพีค S1 ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณ 3.0 มิลลิกรัม ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมและไม่แปลงสภาพตามวิธีการเดียวกับข้อ 2.3.1 ในเจลแผ่นที่มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่างเพียงช่องเดียว ขนาด 0.1 x 10 เซนติเมตร หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ตัดเจลตามขวางเป็นแถบยาวให้ตรงกับแถบโปรตีนเลคติน นำชิ้นเจลนี้ไปชะเลคตินออกจากเนื้อเจลโดยใส่ในถุงไดแอไลซิส แล้วนำถุงไปวางตามแนวขวางในภาชนะสำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส แล้วทำอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอนซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมถุงแบบใต้น้ำ (submarine) โดยใช้กระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 12 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไปทำให้เข้มข้น ไดแอไลซ์และทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพต่อไป

2.8.4 โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose

ผ่านสารละลายเลคตินพีค S1 ปริมาณ 9.7 มิลลิกรัม ที่ได้จากข้อ 2.8.2 ลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose (ขนาด 1.2 x 15 เซนติเมตร มีปริมาตรเจล 17 มิลลิลิตร) ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 85 มิลลิลิตร แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บ

สารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 3 M $MgCl_2$ (Mock and Renwrantz, 1991) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 แล้วทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ไดแอไลซ์ แล้วนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

2.9 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

2.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 1 x 40 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF แล้วเติมเลคตินบริสุทธิ์, $K_2Cr_2O_7$ (M_r 294), บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000) และโปรตีนมาตรฐานลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.55 มิลลิลิตร วัดปริมาตรชะ (elution volume, Ve) ของแต่ละโปรตีน โดยนำสารละลายแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) หาปริมาตรทั้งหมด (total volume, Vt) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ซึ่งได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือ void volume (Vo) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แตรน ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า K_{av} (distribution coefficient) ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

$$K_{av} = (Ve - Vo) / (Vt - Vo)$$

จากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ได้

โปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, M_r 669,000), เฟอร์ริติน (ferritin, M_r 440,000), คาทาเลส (catalase, M_r 232,000) และ อัลโดเลส (aldolase, M_r 158,000)

2.9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยทำควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลสบี (phosphorylase b, M_r 94,000), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (M_r 67,000), โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, M_r 30,000), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, M_r 20,000) และ แอลฟา-แลคตัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,000) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐานและของแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

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

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแต่ละแถบโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินตัวอย่างได้

2.9.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

ทดสอบความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ต่ออุณหภูมิ โดยการอุ่นเลคตินในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 $^{\circ}$ซ นาน 15 นาที ทำให้เย็นโดยเร็วด้วยการแช่บนน้ำแข็ง กำจัดตะกอนที่อาจเกิดขึ้นโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,000 x g ที่ 4 $^{\circ}$ซ นาน 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเทียบกับเลคตินซึ่งเก็บไว้ที่ 0 $^{\circ}$ซ

2.9.4 **ความเสถียรต่อ pH**

ปรับเลคตินบริสุทธิ์ให้มี pH อยู่ในช่วง 3 - 11 ด้วยใช้บัฟเฟอร์ต่อไปนี้ 50 mM Na acetate, pH 3 - 6, 50 mM Tris-HCl, pH 6 - 9 และ 50 mM glycine NaOH, pH 9 - 11 นำแต่ละบัฟเฟอร์ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเลคติน 10 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ของเลคตินทุก pH กลับไปเป็น 7.5 โดย 0.5 M Tris-HCl, pH 7.7 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเลคตินที่ปรับ pH เป็น 7.5 แล้ว 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 2 % สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วดูผลการเกาะกลุ่มเซลล์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS, pH 7.5 แทนบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ

2.9.5 **ผลของ pH**

ทดสอบผลการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ในช่วง pH 3 - 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังนี้ 50 mM Na acetate, pH 3 - 6, 50 mM Tris-HCl, pH 6 - 9 และ 50 mM glycine NaOH, pH 9 - 11 ผสมบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร กับเลคติน 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วดูผลการเกาะกลุ่มเซลล์เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS, pH 7.5 แทนบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ

2.9.6 **ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และ EDTA**

นำเลคตินที่เจือจางให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 320 หน่วย/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{+2}, Mg^{+2} หรือ EDTA ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 50 ไมโครลิตร ของ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ TBS แทนไดวาเลนท์แคทไอออนหรือ EDTA

2.9.7 **ผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล**

นำเลคตินที่เจือจางให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 320 หน่วย/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับเบตา-เมอร์แคปโตเอธา

นอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำสารผสมทั้งหมดไปผสมกับ 50 ไมโครลิตร ของ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เปรียบเทียบผลกับเลคตินที่ใช้ TBS แทนเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล

2.9.8 ผลของเอนไซม์นิวรามินิเดส

ผสมเอนไซม์นิวรามินิเดส 0.4 หน่วย (unit) กับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 4% ใน TBS ให้ได้ปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ นาน 40 นาที จากนั้นเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS 5 ครั้ง ด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเท่าเดิม ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เป็น 2% ก่อนนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์โดยเลคตินบริสุทธิ์ เปรียบเทียบผลกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเดส

2.9.9 ผลของเอนไซม์ทริปซิน

นำเม็ดเลือดแดงกระต่ายเข้มข้น 4% เติมเอนไซม์ทริปซิน 2 มิลลิกรัม ในสารแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ นาน 40 นาที จากนั้นเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 x g นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS 5 ครั้ง ด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเท่าเดิม ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เป็น 2% ก่อนนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์โดยเลคตินบริสุทธิ์ เปรียบเทียบผลกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน

2.10 การเตรียมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

2.10.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง 2 ตัว น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ใช้ฉีดกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่ายเตรียมได้จากห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ ตามวิธีของ Utarabhand and Bunlipatanon (1996) นำไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ไป

ฉีดกระตุ้นกระต่ายโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 4 - 5 จุด โดยใช้ปริมาณไวเทลโลจีนินและระยะเวลาการกระตุ้นเป็นดังนี้ อาทิตย์ที่ 1 ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร 2 อาทิตย์ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 อาทิตย์ต่อมา ฉีดไวเทลโลจีนิน 0.5 มิลลิกรัม ผสมกับ TBS 0.5 มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้ง และหลังการฉีดไวเทลโลจีนินครั้งสุดท้าย 2 อาทิตย์ ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ -20°ซ เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดี

2.10.2 การทดสอบการมีแอนติบอดี

ทดสอบการมีแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน ด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้ เท 0.3% อะกาโรส (agarose) ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 80°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเท 1.5% อะกาโรส ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์แผ่นเดิม ทิ้งให้เย็น แล้วเจาะอะกาโรสให้เป็นหลุม ทดสอบการมีแอนติบอดีโดยเติมซีรัมของกระต่ายที่ฉีดไวเทลโลจีนินครบ 6 อาทิตย์ในหลุมกลาง หลุมข้างรอบ ๆ เติมไวเทลโลจีนิน แล้วเก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่ 4°ซ ค้างคืน ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย จะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดีระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมกับหลุมที่ใส่แอนติเจนซึ่งเห็นได้ชัดจากการย้อมสไลด์ด้วยสีคูมาซีบลู 0.02% นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 5% เมธานอล -7.5 % กรดน้ำส้ม ชุดควบคุมของการทดลองได้จากการใช้ซีรัมของกระต่ายก่อนการฉีดไวเทลโลจีนินแทน

2.10.3 การแยกแอนติบอดี

เมื่อตรวจสอบซีรัมของกระต่ายที่ฉีดไวเทลโลจีนินแต่ละครั้งแล้ว พบว่ามีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีสูง ทำการเก็บเลือดจากกระต่ายจำนวนมาก ทิ้งให้แข็งตัวที่ 4°ซ จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g นาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนซีรัมไปแยก

ตามวิธีของ Warden and Giese (1984) โดยนำซีรัมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 50% ข้ามคืน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g นาน 30 นาที ที่ 4°ซ ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วนำไปไดแอไลซ์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม 1 คืน นำสารละลายที่ได้ 16 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (ขนาด 2.6 x 10 เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร แอนติบอดี (IgG) จะหลุดออกมาในพีคแรก (Wallace, 1965) รวมสารละลายของพีคแรกเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose จนได้ปริมาตรเท่าปริมาตรซีรัมที่ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion

2.11 การทำร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซีส (Rocket immunoelectrophoresis)

ทำร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซีสโดยดัดแปลงวิธีของ Yano (1987) ดังนี้ หลอมเหลวอะกาโรส 1% ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 30 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 80°ซ แล้วตั้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 40°ซ จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน 0.6 มิลลิกรัม (2%) แล้วเทลงบนแผ่นกระจก ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เจาะหลุมใส่สารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

เตรียมสารตัวอย่างและไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ (4 มก./มล.) ซึ่งใช้เป็นไวเทลโลจีนินมาตรฐาน โดยการผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (0.1 M Tris - HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2 mM EDTA และ 0.2% โบรโมฟีนอลบลู) ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นหยอดสารตัวอย่างลงในหลุมใส่ตัวอย่าง หลุมละ 5 ไมโครลิตร และหยอดไวเทลโลจีนินมาตรฐานในแต่ละหลุมให้มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ใช้ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส จากนั้นเปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 50 โวลต์ หลังจากครบ 12 ชั่วโมง ปิดไฟ แล้วนำแผ่นอะกาโรสแช่ในสีย้อม 0.02% คูมาซีบลู นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบการตกตะกอนของโปรตีนชัดเจน

2.12 การศึกษาความสัมพันธ์ของพลาสมาเลคตินกับระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาและการเจริญพันธุ์ของรังไข่

2.12.1 การฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล

ฉีดปลากะรังด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล เตรียมโดยการนำฮอร์โมนซึ่งละลายอยู่ใน 95% เอธานอล ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จนเข้ากันดี แล้วนำไปฉีดปลาบริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างตัว โดยใช้ฮอร์โมน 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทำการฉีดทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง เก็บเลือดทุกครั้งก่อนฉีดปลาแต่ละครั้ง เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนและแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมา

2.12.2 การหาปริมาณเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังในรอบปี

ปลาที่ใช้ศึกษาเป็นปลากะรังเพศเมีย ซึ่งเลี้ยงไว้ในกระชังที่เกาะหนู จังหวัดสงขลา อายุประมาณ 3 - 5 ปี มีน้ำหนักประมาณ 4 - 6 กิโลกรัม ทำการสุ่มปลาตัวอย่าง 4 - 5 ตัว แล้วทำการเก็บเลือดบริเวณเส้นเลือดใหญ่ที่เหงือกของปลาดังกล่าวทุกเดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2540 - พฤศจิกายน 2541 เตรียมพลาสมาจากเลือดของปลาโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g นาน 15 นาที ที่ 4°ซ จากนั้นนำพลาสมาไปวิเคราะห์หาปริมาณไวเทลโลจีนินในแต่ละพลาสมาตัวอย่างโดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส ตามวิธีข้อ 2.11 พลาสมาอีกส่วนหนึ่ง นำไปหาแอคทิวิตีของเลคตินและปริมาณโปรตีนของแต่ละเดือน

จากแบบแผนระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาตลอดทั้งปี นำไปเทียบกับแบบแผนพลาสมาไวเทลโลจีนินและค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลาตัวอย่างในรอบปีที่รายงานโดยเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลาเพศเมียตัวอย่างสามารถคำนวณตามวิธีของ Hoar (1969) ได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่าดรรชนีการสืบพันธุ์} = \frac{\text{น้ำหนักของรังไข่ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)}} \times 100$$

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสมบัติของพลาสมาเลคติน

3.1.1 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

จากการทดสอบความสามารถของพลาสมาเลคตินต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ หนู แพะ หมูและกระต่าย พบว่าพลาสมาเลคตินสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุด (650 หน่วย/มก.โปรตีน) รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของหนู (162 หน่วย/มก.โปรตีน) และของหมู (81 หน่วย/มก. โปรตีน) ตามลำดับ พลาสมาเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเฉพาะหมู่ O เกาะกลุ่มได้ 6 หน่วย/มก. โปรตีน แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อื่น ๆ และของแพะเกาะกลุ่มได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถของพลาสมาเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

Red Blood Cell	Hemagglutination (unit/mg protein)
Human group A	0
group B	0
group AB	0
group O	6
Rabbit	650
Rat	162
Pig	81
Goat	0

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 - 5 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

3.1.2 ผลการยับยั้งโดยน้ำตาลและไกลโคโปรตีน

เมื่อทดสอบผลของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคติน พบว่าน้ำตาลหลายชนิดได้แก่ กลูโคส, กาแลคโตส, มอลโทส (maltose), แมนโนส, ฟรุคโตส (fructose), เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน และ เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ที่ความเข้มข้น 200 mM ในขณะที่ กรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค ยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 50% ที่ความเข้มข้น 50 mM ไกลโคโปรตีน ได้แก่ ฟีทูอีน และ อะไซอะโลฟีทูอีนสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 50% ที่ความเข้มข้น 5 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคตินได้ 50%

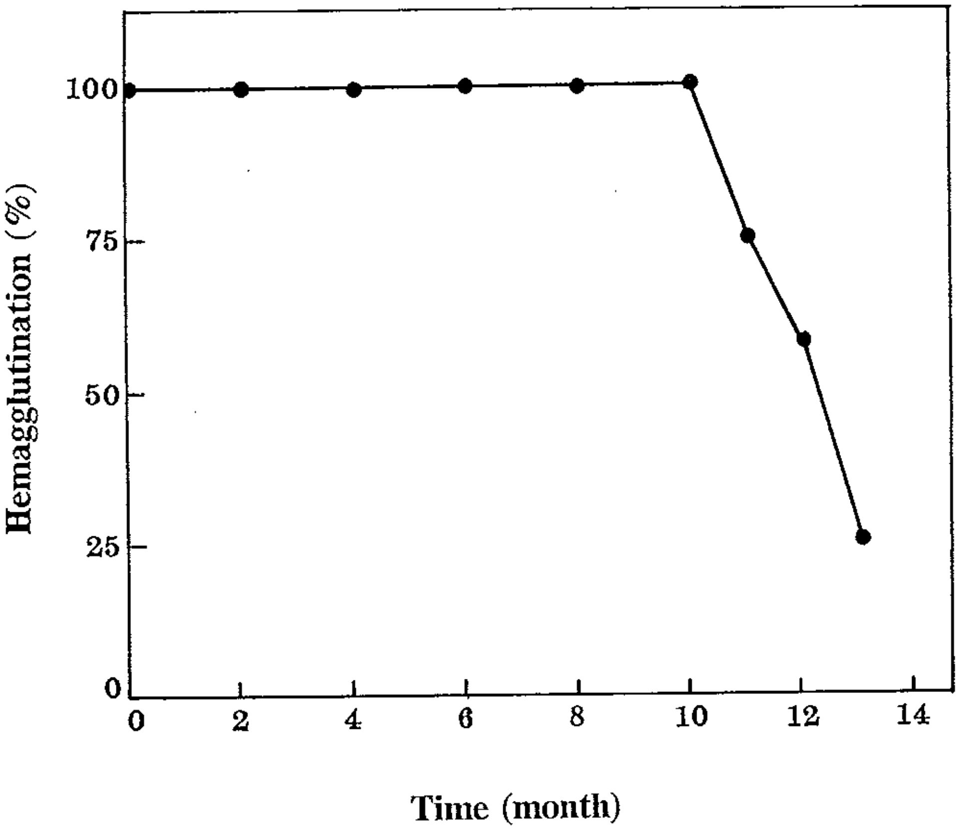
		Concentration
Sugar :	Fructose	No inhibition
	Galactose	No inhibition
	Glucose	No inhibition
	Maltose	No inhibition
	Mannose	No inhibition
	N-Acetyl galactosamine	No inhibition
	N-Acetyl glucosamine	No inhibition
	N-Acetyl neuraminic acid	50 mM
Glycoprotein :	Asialofetuin	1.25 mg/ml
	Fetuin	5.0 mg/ml

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

No inhibition = ไม่มีการยับยั้งโดยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 200 mM

3.1.3 **ความเสถียรของพลาสมาเลคตินที่ -10°ซ**

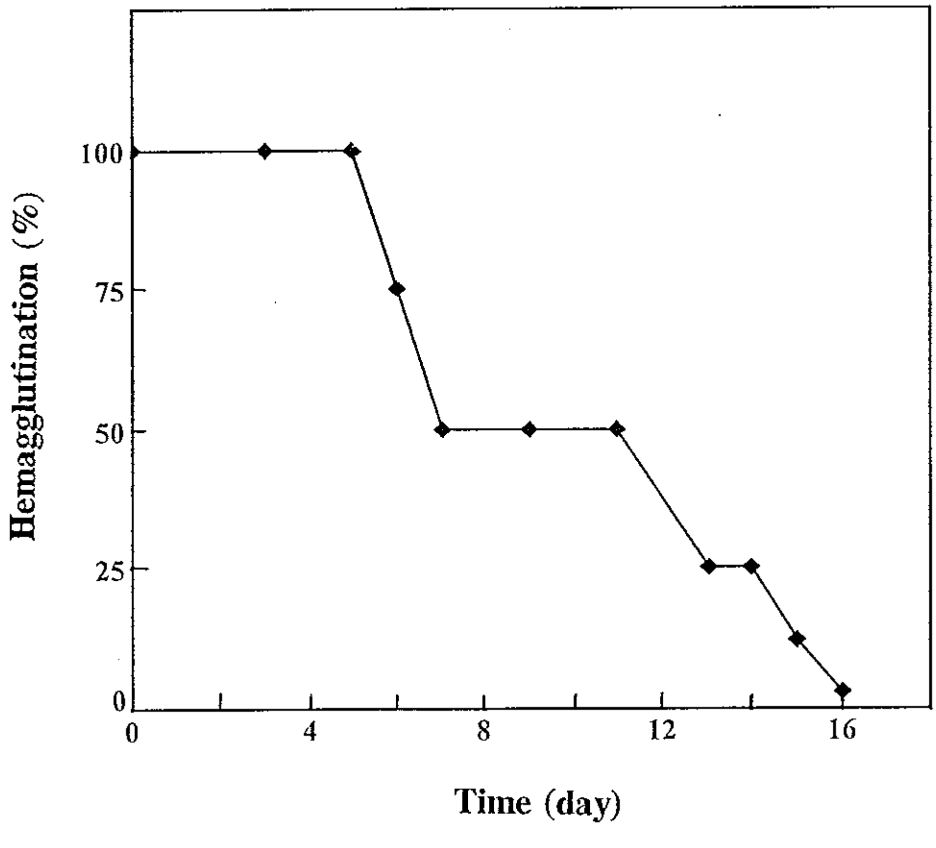
เมื่อนำพลาสมาซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -10°ซ ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายทุกเดือน เป็นเวลา 13 เดือน พบว่าความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายมีค่าคงเดิมเมื่อเก็บพลาสมาเลคตินไว้เป็นเวลานาน 10 เดือน ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงลดลงเหลือ 75% เมื่อเก็บไว้นาน 11 เดือน และจะลดลงเหลือ 58 และ 25% เมื่อเก็บไว้นาน 12 และ 13 เดือน ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของการเก็บพลาสมาเลคตินที่ -10°ซ

3.1.4 ผลของการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4 °ซ

เมื่อนำพลาสมาเลคตินไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายซึ่งเก็บไว้ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 16 วัน เปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่เตรียมจากเลือดสด พบว่าการเกาะกลุ่มของเซลล์ซึ่งเก็บไว้ที่ 4 °ซ นาน 1 - 5 วัน มีค่าเท่ากันกับเม็ดเลือดสด และลดลงเหลือ 50% เมื่อเก็บไว้นาน 7 - 11 วัน จากนั้นลดลงเหลือ 25% และ 12.5% ในวันที่ 13 - 14 และ 15 ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 3



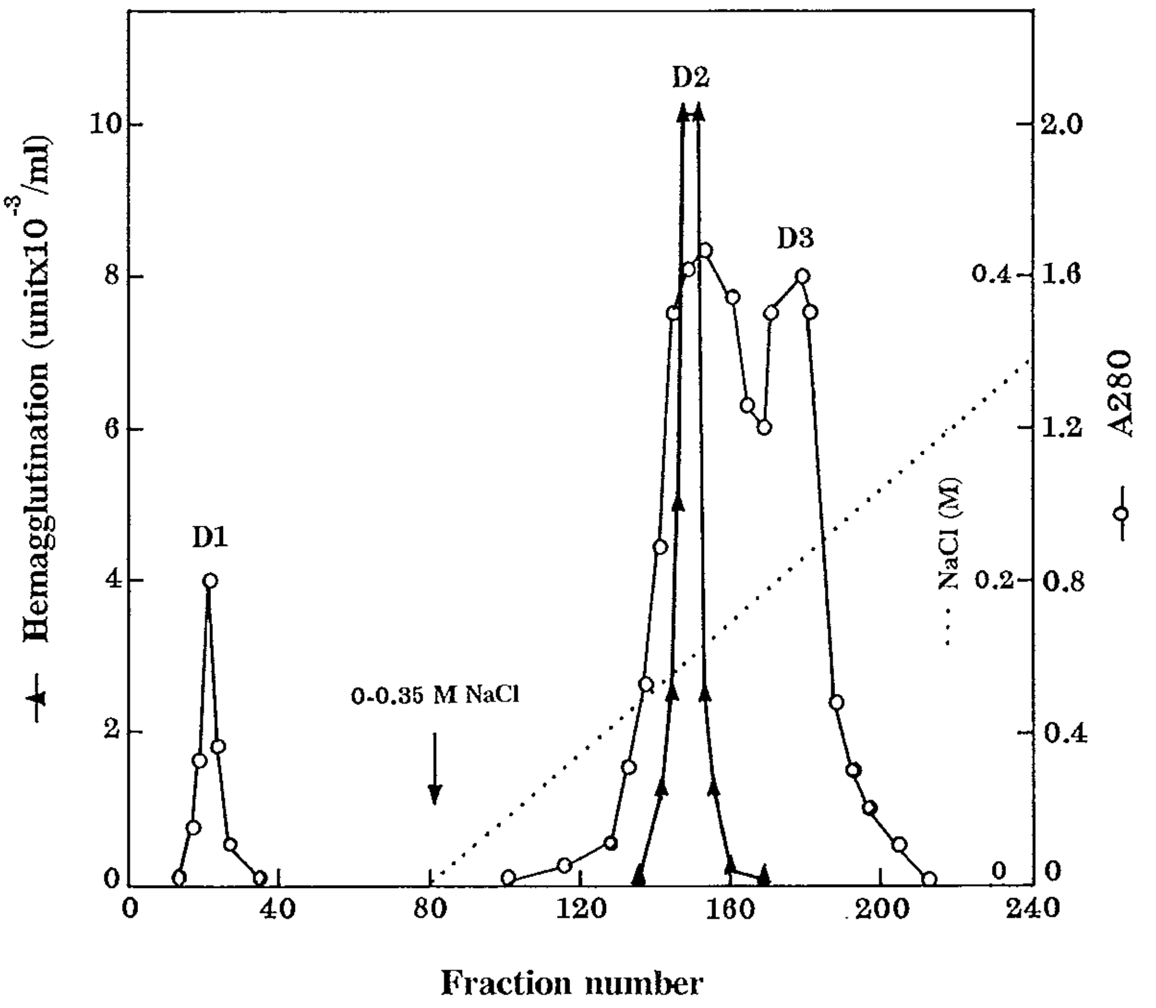
รูปที่ 3 ผลการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4 °ซ ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยพลาสมาเลคติน

3.2 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรัง

3.2.1 การใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel

เมื่อนำพลาสมาเลคตินปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris - HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (พีค D1) ซึ่งไม่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย เมื่อทำการชะคอลัมน์ด้วยเกลือ NaCl มีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค คือ พีค D2 และ D3 (รูปที่ 4) โดยพบว่าสารละลายหลอดที่ 142-160 ซึ่งถูกชะออกมาด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.15 M มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ในขณะที่สารละลายหลอดอื่น ๆ ที่เหลือ รวมทั้งสารละลายโปรตีนพีค D3 ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 144 - 152 ที่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์ใน 50 mM Tris - HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF พบว่าสารละลายโปรตีนพีค D2 นี้มีปริมาณโปรตีน 60.6 มิลลิกรัม มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์ 133,940 หน่วย และ 2,210 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็นโปรตีน 16.0% และแอคทิวิตี 54.5% ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์เป็น 3.4 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น (ตารางที่ 6)

เมื่อนำสารละลายโปรตีนพีค D2 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมเจลด้วยสีคูมาซีบลู พบว่าสารละลายโปรตีนพีค D2 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบเข้มมาก คือแถบโปรตีนที่อยู่บนสุด บริเวณกลางและล่างสุดของแผ่นเจล และยังปรากฏแถบโปรตีนจางอีกหลายแถบ (รูปที่ 5 แถวที่ 2)



รูปที่ 4 การแยกเลคตินจากพลาสมาโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ผ่านพลาสมา 6 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 x 16 เซนติเมตร) ที่ 4 ^{o}ซ ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0 - 0.35 M NaCl ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บสารละลายหลอดละ 4 มิลลิลิตร

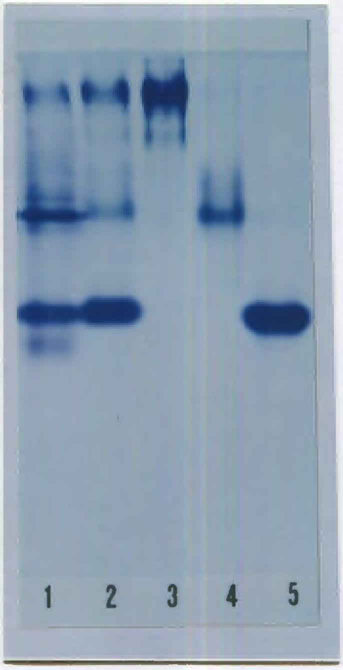
ตารางที่ 6 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมา

Sample	Protein		Hemagglutination			Purification
	mg	%	unit	%	unit/mg	fold
Plasma	378.0	100.0	245,760	100.0	650	1.0
DEAE-Sephacel eluate						
peak D2	60.6	16.0	133,940	54.5	2,210	3.4
Sephadex G-200 eluate						
peak S1	9.7	2.5	47,923	19.5	4,940	7.6
*Preparative PAGE	1.1	0.3	7,373	3.0	6,567	10.1
*Fetuin-agarose eluate						
peak F2	1.2	0.3	8,520	3.5	7,100	10.9

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 - 5 การทดลอง โดยใช้พลาสมาเริ่มต้น 6 มิลลิลิตร

unit/mg = unit/mg protein

* ทำการทดลองต่อจากคอลัมน์ Sephadex G-200



รูปที่ 5 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของเลคตินที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-200

แถวที่ 1 พลาสมา

แถวที่ 2 สารละลายพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 3 สารละลายพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-200

แถวที่ 4 สารละลายพีค S2 จากคอลัมน์ Sephadex G-200

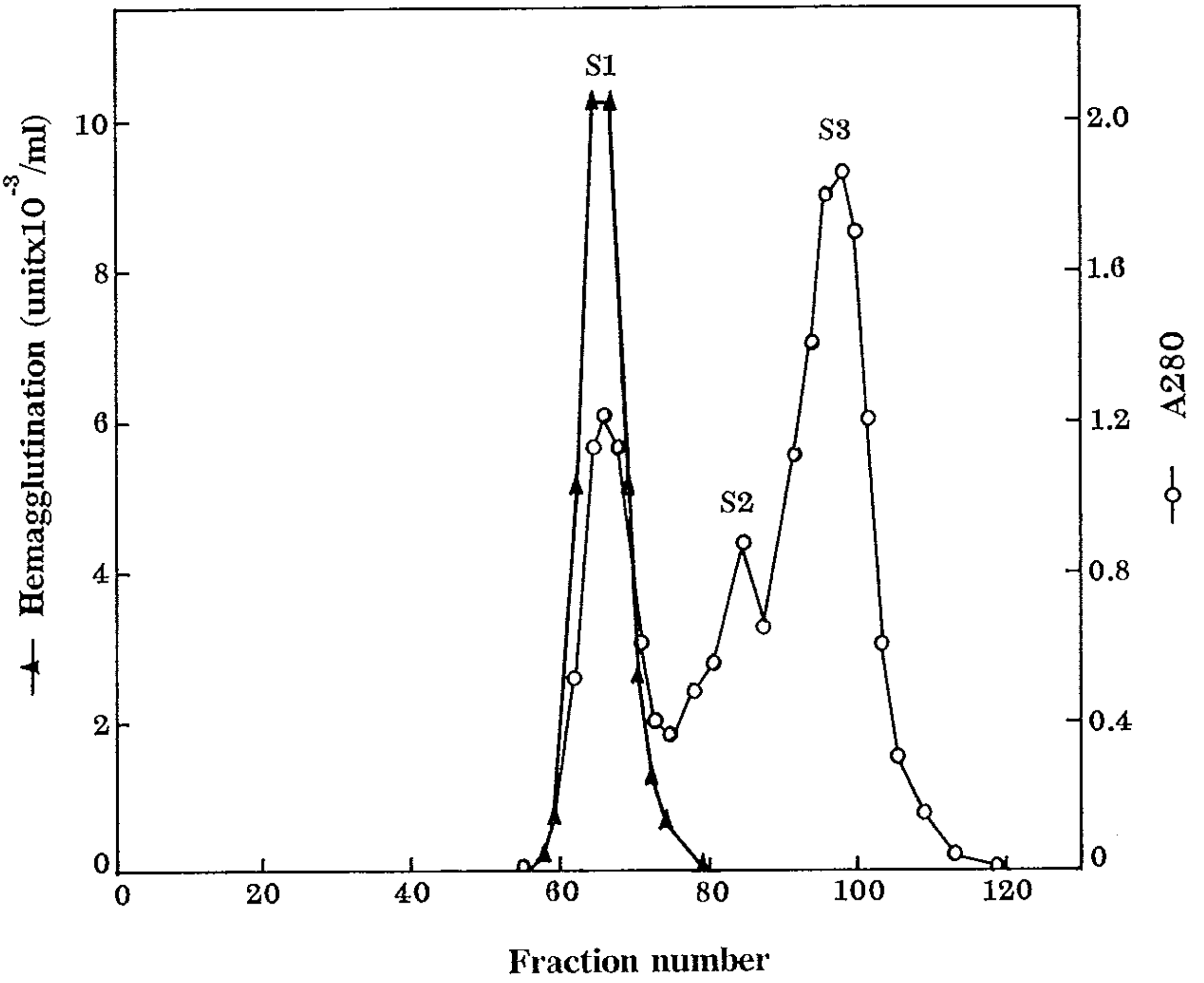
แถวที่ 5 สารละลายพีค S3 จากคอลัมน์ Sephadex G-200

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวอยู่ในช่วง 15 - 25 ไมโครกรัม

3.2.2 การใช้คอลัมน์ Sephadex G-200

ในการนำสารละลายโปรตีนพีค D2 60.6 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ซึ่งทำให้คอลัมน์สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris - HCl, pH 7.5 เมื่อทำการล้างคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มี 1 mM PMSF พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีค คือ พีค S1, S2 และ S3 ตามลำดับ (รูปที่ 6) เฉพาะสารละลายพีค S1 เท่านั้นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้โดยมีโปรตีนถูกชะออกมา 9.7 มิลลิกรัม คิดเป็น 2.5% ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น และมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 47,923 หน่วย และ 4,940 หน่วย/มก. โปรตีน คิดเป็น 19.5% และมีความบริสุทธิ์เป็น 7.6 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 6 จากนั้นรวมสารละลายโปรตีนของพีค S1 ซึ่งมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น ไดแอไลซ์ใน 50 mM Tris - HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF แล้วนำไปแยกต่อตามวิธีข้อ 2.8.3 หรือ 2.8.4

จากการนำสารละลายทั้ง 3 พีค ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าสารละลายโปรตีนพีค S1 ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบเข้มมาก ซึ่งอยู่บนสุดของแผ่นเจลและมีโปรตีนแถบจาง 2 แถบ (รูปที่ 5 แถวที่ 3) ในขณะที่สารละลายพีค S2 และ S3 ปรากฏโปรตีนแถบเข้มอย่างละแถบและโปรตีนแถบจางอีกเล็กน้อย (รูปที่ 5 แถวที่ 4, 5)

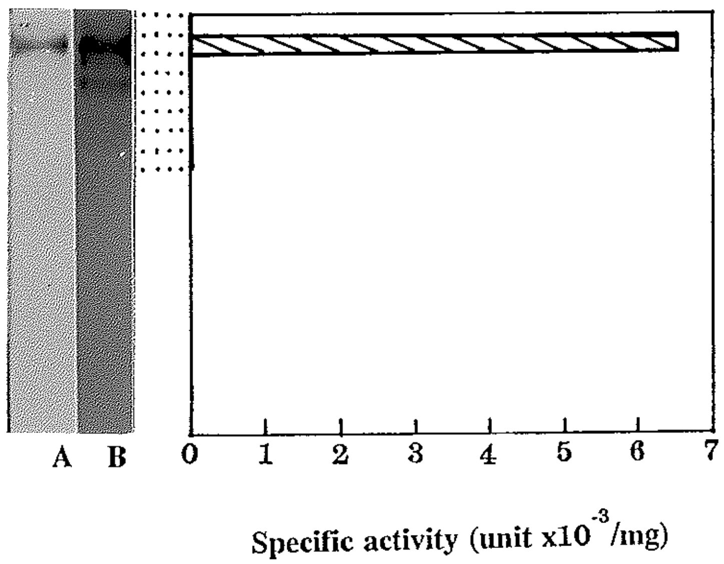


รูปที่ 6 การแยกเลคตินจากสารละลายโปรตีนพีค D2 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-200

นำสารละลายเลคตินพีค D2 ของคอลัมน์ DEAE-Sephacel ปริมาณ 60.6 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 x 92 เซนติเมตร) ที่ 4 ^{o}ซ ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 1.2 มิลลิลิตร

3.2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม

เมื่อตัดเจลของสารละลายโปรตีนพีค S1 ที่ไม่ได้ย้อมสีตามขวางออกเป็นชิ้นให้ตรงกับแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีคูมาซีบลู (รูปที่ 7A) แล้วนำเจลแต่ละชิ้นไปสกัดเลคตินออกจากชิ้นเจลตามวิธีการในข้อ 2.8.3.1 จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย พบเฉพาะโปรตีนแถบเข้มที่อยู่บนสุดของแผ่นเจลมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย โดยมีแอคทิวิตีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเซลล์ 6,567 หน่วย/มก.โปรตีน (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแถบเข้มที่อยู่บนสุดของแผ่นเจลเป็นเลคติน จึงได้ทำการแยกเลคตินจากสารละลายพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ต่อโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม แล้วตัดเฉพาะแถบโปรตีนเลคตินไปชะเลคตินออกจากชิ้นเจลตามวิธีการข้อ 2.8.3.2 เมื่อนำสารละลายเลคตินที่เตรียมได้โดยวิธีนี้ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ดังแสดงผลในรูปที่ 7B เลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 7,373 หน่วย และ 6,567 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 3.0% และมีความบริสุทธิ์เป็น 10.1 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น และมีปริมาณโปรตีน 1.1 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.3% ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 6

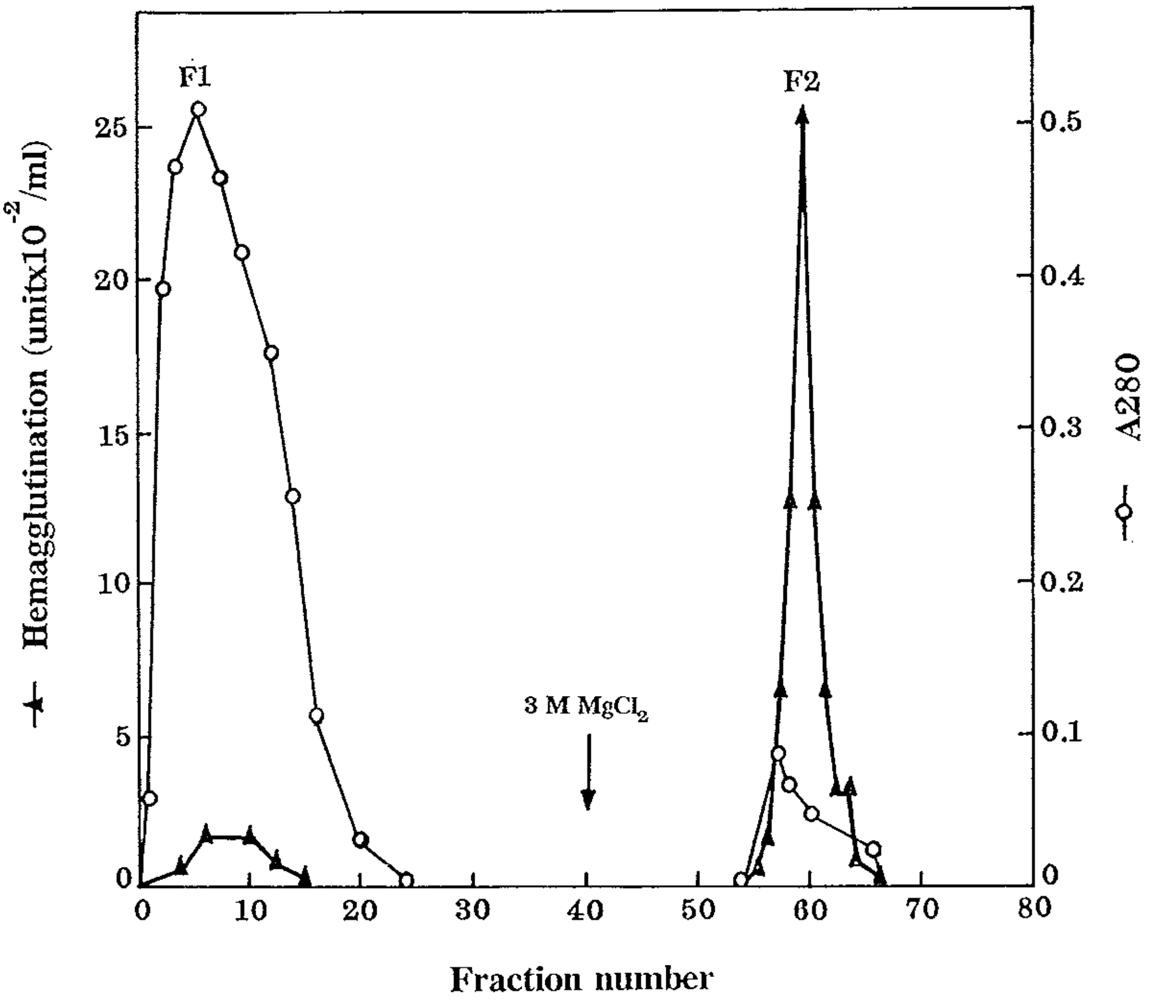


รูปที่ 7 การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่แปลงสภาพของสารละลายโปรตีนพีค S1 และแอคทิวิตีของเลคตินในชิ้นเจล (A) และแถบโปรตีนเลคตินที่ได้จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (B)

3.2.4 **การใช้คอลัมน์** Fetuin-agarose

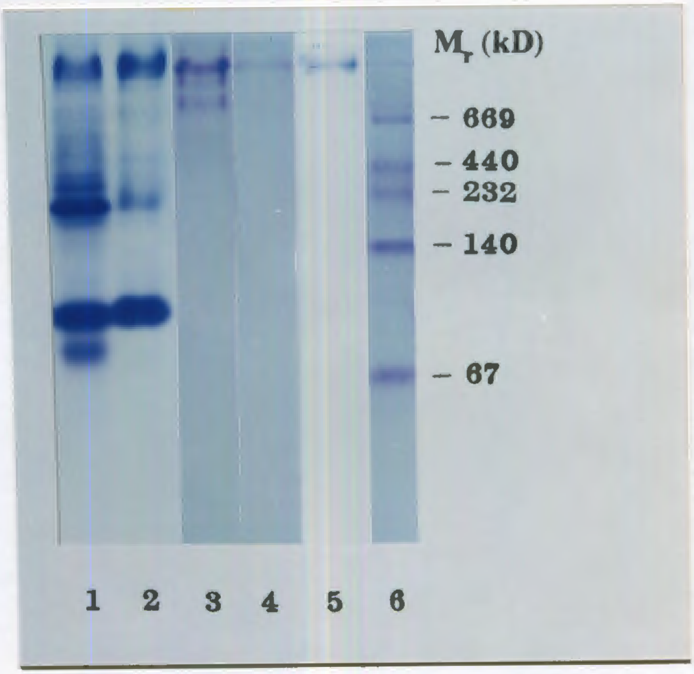
จากการผ่านสารละลายโปรตีนพีค S1 ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณ 9.7 มิลลิกรัม ที่ได้จากข้อ 3.2.2 ลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris - HCl, pH 7.5 - 1 mM PMSF พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (พีค F1) แต่ไม่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ดังแสดงผลในรูปที่ 8 เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 3 M $MgCl_2$ ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาอีก 1 พีค คือ พีค F2 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 1.2 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.3% ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น และมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 8,520 หน่วย และ 7,100 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 3.5% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.9 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 6 และรูปที่ 8

เมื่อนำสารละลายโปรตีนพีค F1 และ F2 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าสารละลายโปรตีนพีค F2 ปรากฏโปรตีนเพียงแถบซึ่งอยู่บนสุดของแผ่นเจล (รูปที่ 9 แถวที่ 4)



รูปที่ 8 การแยกเลคตินจากสารละลายเลคตินพีค S1 ของคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose

รวมสารละลายเลคตินพีค S1 9.7 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 มาผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin - agarose (1.6 x 92 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย 3 M $MgCl_2$ ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 9 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel, Sephadex G-200, Fetuin-agarose และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม

แถวที่ 1 พลาสมา

แถวที่ 2 สารละลายพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 3 สารละลายพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-200

แถวที่ 4 เลคตินบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Fetuin-agarose

แถวที่ 5 เลคตินบริสุทธิ์จากโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม

แถวที่ 6 โปรตีนมาตรฐาน

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวอยู่ในช่วง 15 - 25 ไมโครกรัม

3.3 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

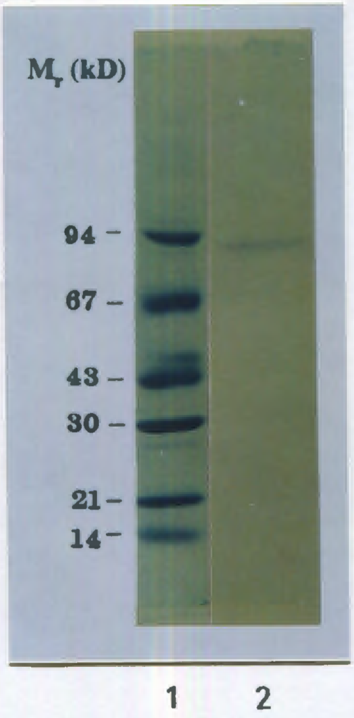
3.3.1 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ

ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรัง โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเลคตินที่เตรียมได้โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า พลาสมาเริ่มต้นที่นำมาศึกษาปรากฏแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมคูมาซีบลูเข้มมาก 3 แถบ และมีแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมเข้มรองลงมาอีกหลายแถบ (รูปที่ 9 แถวที่ 1) เมื่อแยกเลคตินจากพลาสมาโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel สารละลายโปรตีนพีค D2 ที่ได้แยกได้ปรากฏแถบโปรตีนเข้ม 3 แถบ และมีจำนวนแถบโปรตีนจางน้อยกว่าของพลาสมา (รูปที่ 9 แถวที่ 2) เมื่อทำการแยกเลคตินต่อพบว่าสารละลายโปรตีนพีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปรากฏโปรตีน 1 แถบเข้มมาก และมีแถบโปรตีนจางอีกประมาณ 2 แถบ (รูปที่ 9 แถวที่ 3) เฉพาะโปรตีนแถบเข้มเท่านั้นที่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (รูปที่ 7A) ดังนั้นเมื่อทำการแยกสารละลายโปรตีนพีค S1 ต่อด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม จึงแยกได้โปรตีนเพียงแถบเดียวที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนเลคติน (รูปที่ 7B และรูปที่ 9 แถวที่ 5) ในทำนองเดียวกัน เมื่อแยกสารละลายเลคตินพีค S1 ต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose สารละลายโปรตีนพีค F2 ที่ได้จากคอลัมน์นี้ ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ดังแสดงผลในรูปที่ 9 แถวที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเลคตินที่แยกได้จากทั้ง 2 วิธีนี้ เป็นเลคตินบริสุทธิ์ที่ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

3.3.2 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส

จากการนำเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม หรือโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ดังแสดงผลในรูปที่ 10 ในทำนองเดียวกันเลคตินบริสุทธิ์แสดงแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ณ ตำแหน่งเดียวกันในโพลีอะคริลาไมด์เจล

อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (ไม่ได้แสดงผลไว้)



รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสของเลคตินบริสุทธิ์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 เลคตินบริสุทธิ์ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวอยู่ในช่วง 15 - 25 ไมโครกรัม

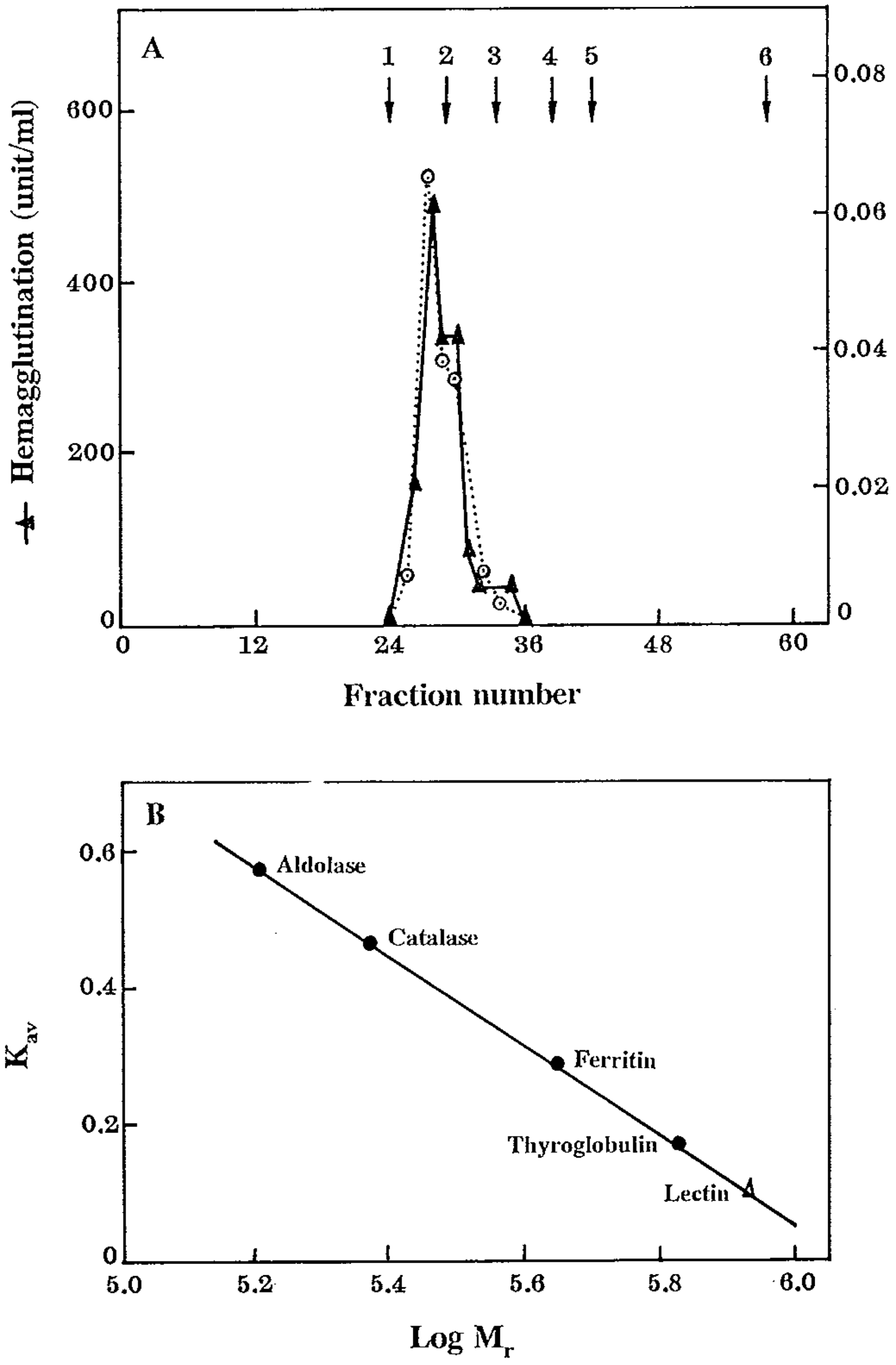
3.3.3 น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.3.1 การหาโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ถูกชะออกมาในพีคเดียว ดังแสดงผลในรูปที่ 11A เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์จากกราฟได้ โดยมีค่าเป็น 851,100 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 11B

3.3.3.2 การหาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส

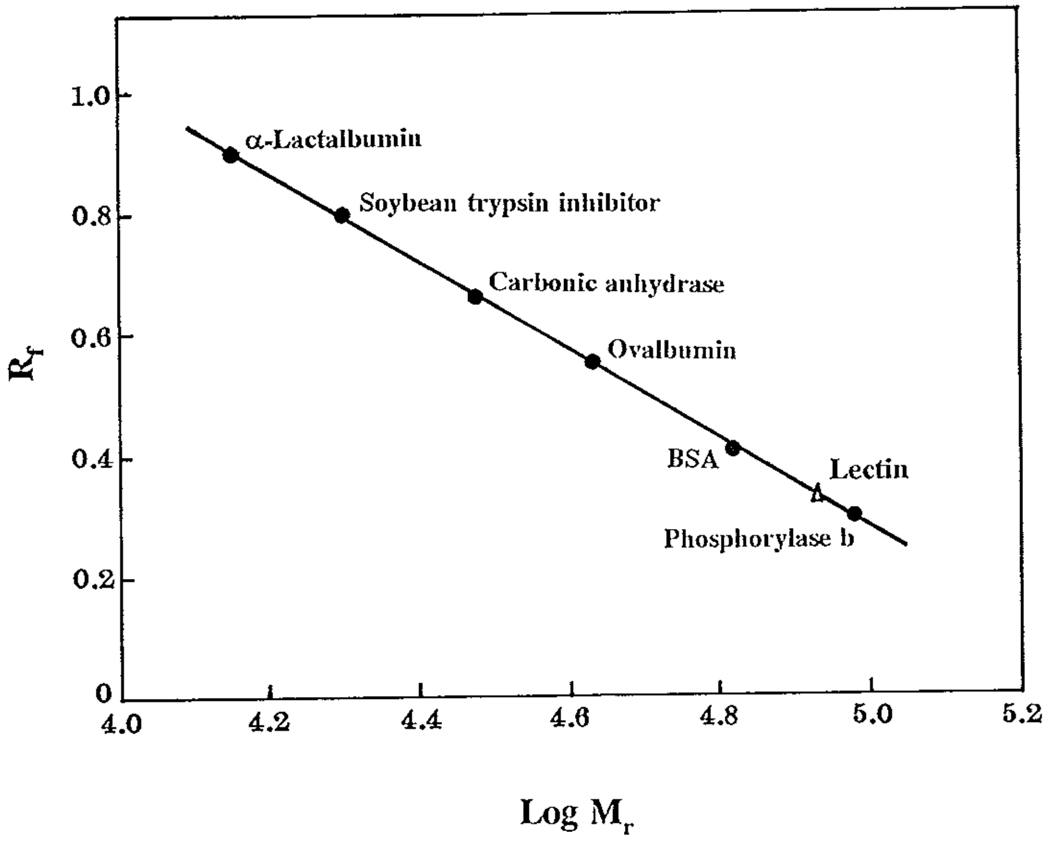
ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเลคตินบริสุทธิ์ (พีค F2) ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ด้วยการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเลคตินบริสุทธิ์กับของโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 12 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 85,100 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 10 และ 12



รูปที่ 11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (A) และจากกราฟมาตรฐาน (B)

1 Blue dextran, 2 Thyroglobulin, 3 Ferritin,

4 Catalase, 5 Aldolase, 6 $K_2Cr_2O_7$



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

3.3.4 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

จากการทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด (7,100 หน่วย/มก. โปรตีน) รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของหนู (1,775 หน่วย/มก.โปรตีน) และของหมู (888 หน่วย/มก.โปรตีน) แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ และของแพะเกาะกลุ่ม (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

Red Blood Cell	Hemagglutination (unit/mg protein)
Human group A	0
group B	0
group AB	0
group O	0
Rabbit	7,100
Rat	1,775
Pig	888
Goat	0

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 - 5 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

3.3.5 ผลของการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซินและนิวรามินิเดส

จากการนำเลคตินบริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดส พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินมีค่าเป็น 28,400 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 4 เท่า ของเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (7,100 หน่วย/มก.โปรตีน) สำหรับเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเดสมีแอคทิวิตีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเซลล์เป็น 17,750 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 2.5 เท่า ของเม็ดเลือดแดงที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของเอนไซม์ทริปซินและนิวรามินิเดสต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

Rabbit RBC	Hemagglutination (unit/mg protein)	Fold
Non-treated RBC	7,100	1
Trypsin treated RBC	28,400	4
Neuraminidase treated RBC	17,750	2.5

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

RBC = เม็ดเลือดแดง

3.3.6 ผลการยับยั้งของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

เมื่อทดสอบผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ด้วยไกลโคโปรตีนหรือน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วงต่าง ๆ (ตารางที่ 9) พบว่าไกลโคโปรตีนที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ 50% ได้แก่ อะไซอะโลฟีทูอีน ที่ความเข้มข้น 0.63 มก./มล. และฟีทูอีน ที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. มิวซิน และ แอลฟา 1-แอซิด ไกลโคโปรตีน (α1- acid glycoprotein) ที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. รวมทั้งน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ ยกเว้น กรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค ซึ่งยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ 50% ที่ความเข้มข้น 50 mM

ตารางที่ 9 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลและไกลโคโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ได้ 50%

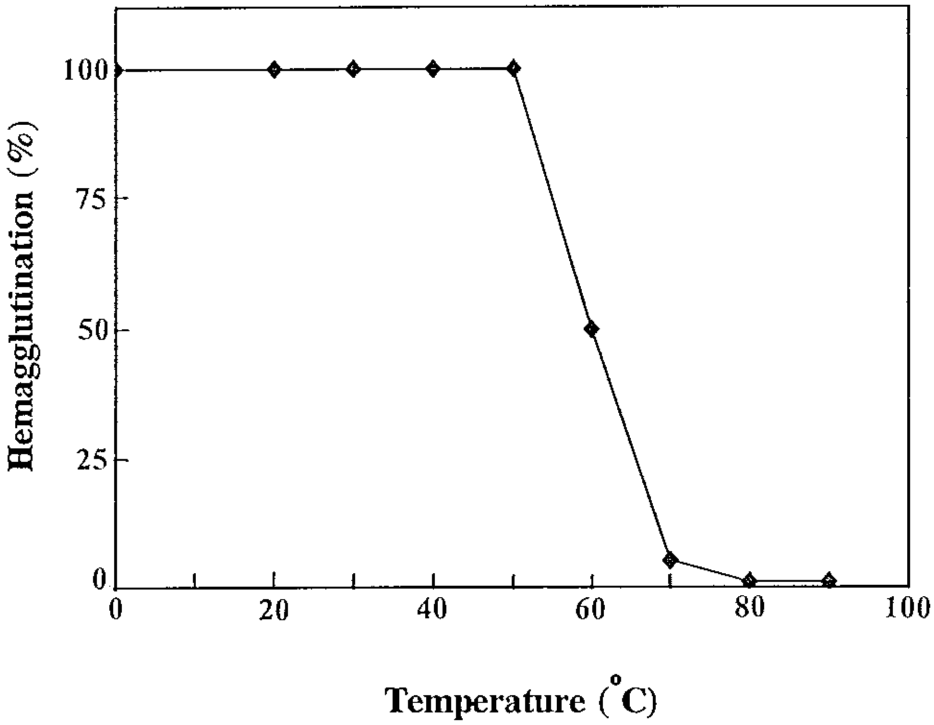
		Concentration
Sugar :	Fructose	No inhibition
	Galactose	No inhibition
	Glucose	No inhibition
	Maltose	No inhibition
	Mannose	No inhibition
	Methyl-α-D-galactoside	No inhibition
	Methyl-β-D-galactoside	No inhibition
	N-Acetyl galactosamine	No inhibition
	N-Acetyl glucosamine	No inhibition
	N-Acetyl neuraminic acid	50 mM
Glycoprotein :	Asialofetuin	0.63 mg/ml
	Fetuin	5.0 mg/ml
	Mucin	No inhibition at 5.0 mg/ml
	α 1 - Acid glycoprotein	No inhibition at 5.0 mg/ml

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

No inhibition = ไม่มีการยับยั้งโดยน้ำตาลที่ความเข้มข้น 200 mM

3.3.7 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

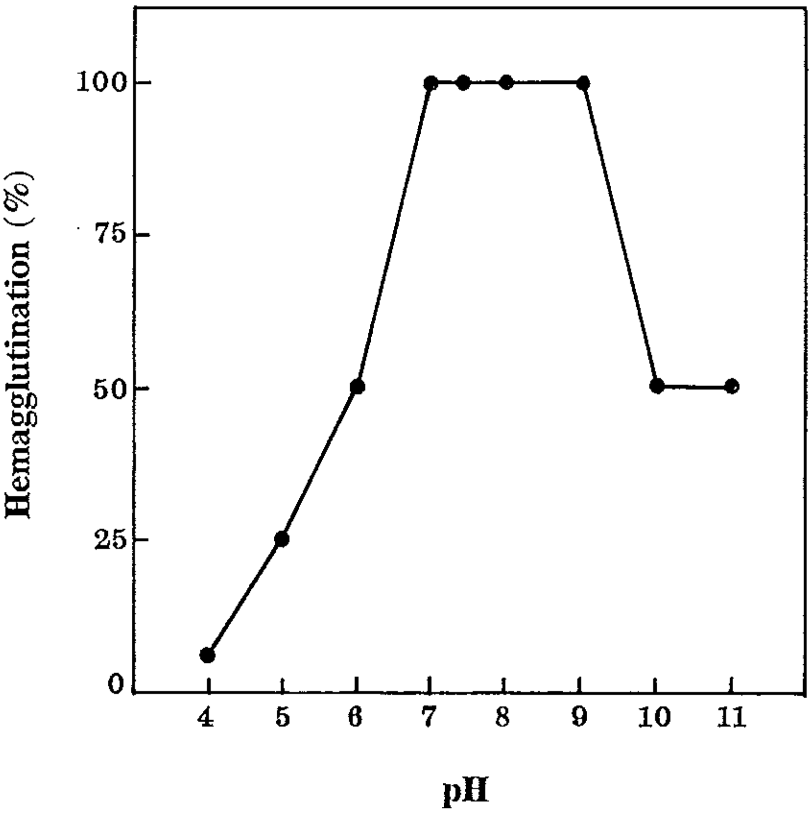
จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์ โดยการอุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 30 - 80°ซ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าเลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ค่าคงเดิม เมื่ออุ่นที่ 30 - 50°ซ แล้วลดลงเหลือ 50 และ 3.1% เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 60 และ 70°ซ ตามลำดับ และสูญเสียแอคทิวิตีอย่างสมบูรณ์เมื่ออุ่นเลคตินที่อุณหภูมิ 80°ซ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.8 ความเสถียรต่อ pH

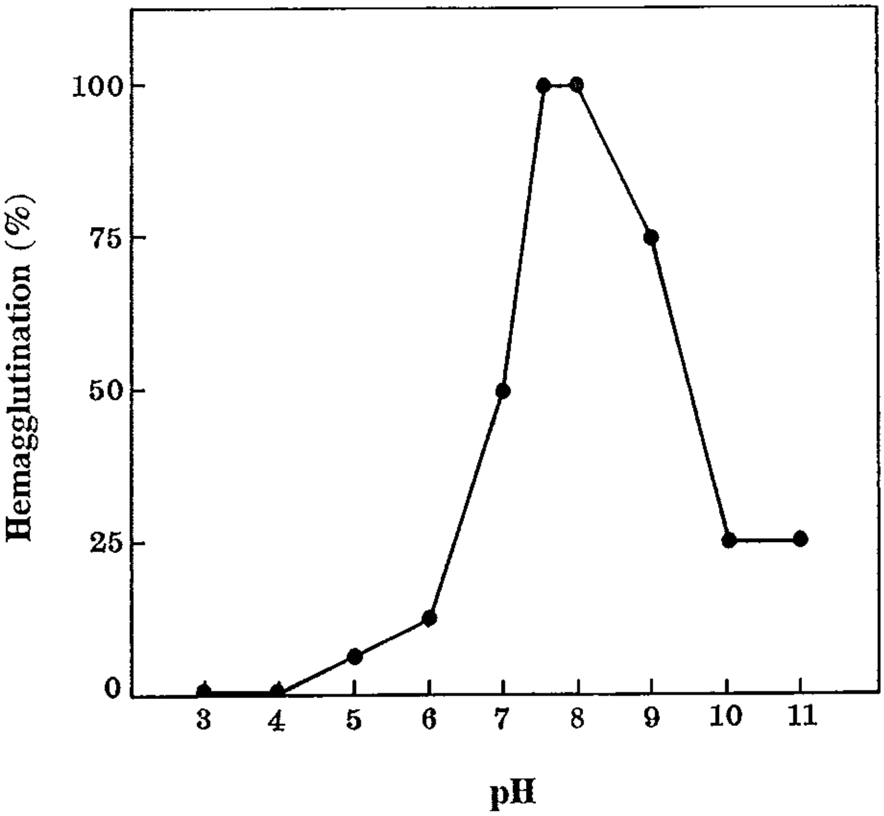
จากการทดสอบความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ต่อ pH โดยการผสมเลคตินบริสุทธิ์กับบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในช่วง 4 -11 แล้วหาแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH 7.5 พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 7 - 9 ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ลดลงเหลือ 50% ที่ pH 6 และ 10 - 11 และลดลงเหลือ 25% และ 6.3% ที่ pH 5 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ความเสถียรต่อ pH ของเลคตินบริสุทธิ์

3.3.9 **ผลของ pH**

ในการทดสอบความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 3 -11 พบว่าที่ pH 3 และ 4 เม็ดเลือดแตกไม่สามารถวัดการเกาะกลุ่มได้ เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุดในช่วง pH 7.5 - 8 และเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 75% ที่ pH 9, 50% ที่ pH 7, 25% ที่ pH 10 - 11 ตามลำดับ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ผลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

3.3.10 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน และ EDTA

จากการศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} หรือ EDTA เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนไดวาเลนท์แคทไอออนหรือ EDTA พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออน รวมทั้ง EDTA ที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ ดังแสดงผลในตารางที่ 10

3.3.11 ผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล

จากการทดสอบผลของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 90 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลสูงกว่า 90 mM จะทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายแตกวัดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ไม่ได้ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออน, EDTA และเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์

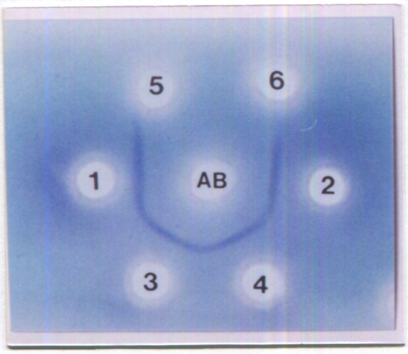
Agent	Concentration (mM)	Hemagglutination
Ca^{2+}, Mg^{2+}	0 - 200	100%
EDTA	0 - 200	100%
β-Mercaptoethanol	0 - 90	100%
	> 90	RBC lysis

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง การทดลองละ 2 ครั้ง

RBC = เม็ดเลือดแดง

3.4 การเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

จากการฉีดกระต่ายด้วยไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน จากนั้นทำการแยกแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel เมื่อทดสอบปฏิกิริยาตกตะกอนระหว่างไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์กับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ โดยจะเห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีกับหลุมที่ใส่ไวเทลโลจีนิน นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินยังเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะรัง และสารละลายโปรตีนพีค D2 และพีค S1 แต่ไม่ปรากฏแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีกับเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

หลุม AB แอนติบอดี

หลุม 1 ไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์

หลุม 2 พลาสมาของปลากะรัง

หลุม 3 สารละลายเลคตินพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

หลุม 4 สารละลายเลคตินพีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex G-200

หลุม 5 เลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose

หลุม 6 โบวีนซีรัมอัลบูมิน

ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลุมอยู่ในช่วง 10 - 25 ไมโครกรัม

3.5 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล

ในการทดสอบผลของการฉีดปลากะรังด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล (1.5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ต่อระดับเลคตินในพลาสมา ดังแสดงผลในตารางที่ 11 พบว่าแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมาของปลาก่อนฉีดฮอร์โมนมีค่าเป็น 76.0 ± 5.3 หน่วย/มก. โปรตีน แอคทิวิตีของพลาสมาเลคตินเพิ่มขึ้นเป็น 89.6 ± 5.7, 235.2 ± 12.8 และ 289.0 ±13.9 หน่วย/มก. โปรตีน หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น 1.2, 3.1 และ 3.8 เท่า ของพลาสมาก่อนการฉีดฮอร์โมน ตามลำดับ การเพิ่มของระดับเลคตินในพลาสมานี้ควบคู่กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในพลาสมาโดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 76.8 ± 3.0, 100.4 ± 5.7 และ 116.7 ± 5.7 มก./มล. หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาโปรตีนก่อนการฉีดฮอร์โมนที่มีค่าเป็น 53.4 ± 2.2 มก./มล. (ตารางที่ 11)

เมื่อเทียบผลการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อระดับโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาที่รายงานโดยเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ดังแสดงผลในตารางที่ 11 พบว่าการฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล 2.5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม 3 ครั้ง มีผลทำให้ทั้งระดับโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดฮอร์โมน โดยพบว่าระดับพลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 2.3, 3.4 และ 4.0 เท่า ของพลาสมาก่อนการฉีดฮอร์โมนตามลำดับ ในขณะที่ ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 55.0 ± 1.1, 10 6.4 ±1.0 และ 115.2 ±1.2 มก./มล. หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แต่ไม่พบไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลาเยาว์วัยก่อนฉีดฮอร์โมน

ตารางที่ 11 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อระดับเลคตินและโปรตีนในพลาสมา

Hormone Injection	Protein[1] (mg/ml)	Lectin[1] (unit/mg protein)	Protein[2] (mg/ml)	Vitellogenin[2] (mg/ml)
Before injection	53.4 ± 2.2	76.0 ± 5.3	49.6 ± 0.6	0
First injection	76.8 ± 3.0	89.6 ± 5.7	116.7 ± 2.2	55.0 ± 1.1
Second injection	100.4 ± 5.7	235.2 ± 12.8	170.0 ± 1.9	106.4 ± 1.0
Third injection	116.7 ± 5.7	289.0 ± 13.9	200.2 ± 1.7	115.2 ± 1.2

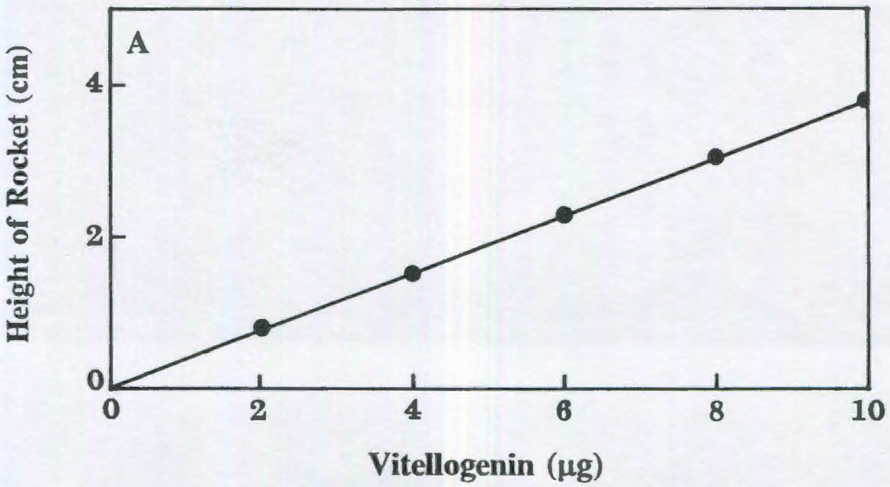
1 = ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน ของปลา 6-7 ตัว ที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม 3 ครั้ง

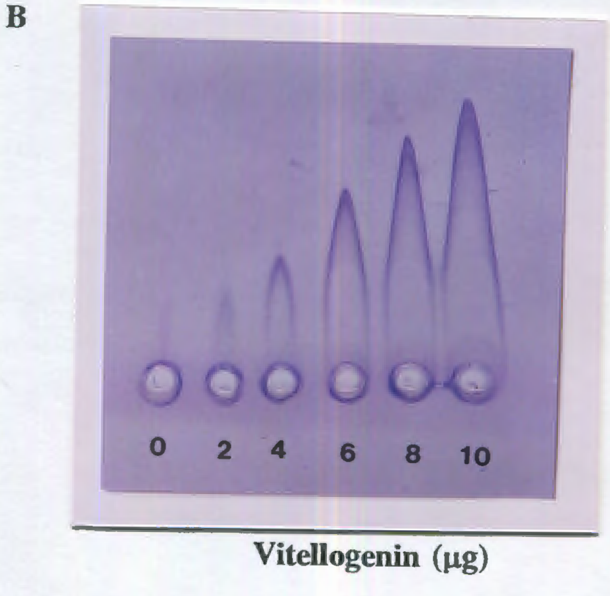
2 = ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน ของปลา 3 ตัว ที่ฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล 2.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม 3 ครั้ง และเป็นผลการทดลองของเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538)

3.6 การศึกษาความสัมพันธ์ของพลาสมาเลคตินกับระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาและพัฒนาการเจริญของรังไข่

3.6.1 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมา

หาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาตัวอย่างได้โดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยคำนวณปริมาณไวเทลโลจีนินจากกราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ทราบปริมาณแน่นอน (2 - 10 ไมโครกรัม) (รูปที่ 17B) จากความสูงของจรวดนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนินที่ใช้ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (รูปที่ 17A) จากนั้นคำนวณปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาตัวอย่างได้จากความสูงของจรวดของพลาสมาตัวอย่างนั้น ๆ



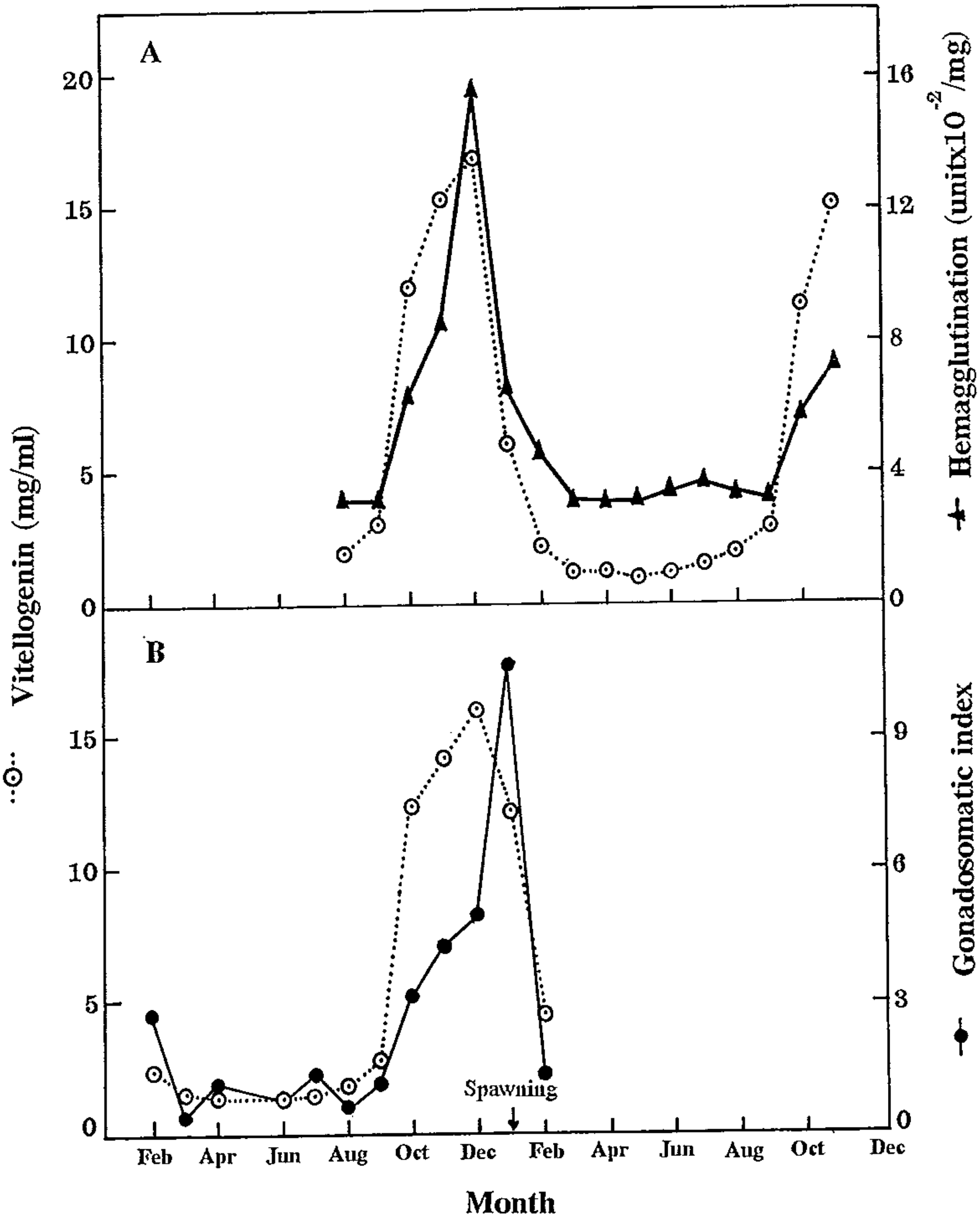


รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานระหว่างความสูงของจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนิน (A) จากการทำร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิสของไวเทลโลจีนิน (B)

3.6.2 ความสัมพันธ์ของเลคตินกับระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมา

ด้วยวิธีการตามข้อ 3.6.1 ทำการหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย 3 - 5 ตัว ทุกเดือน ในรอบปีตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2540 - พฤศจิกายน 2541 โดยทำควบคู่กับการวัดระดับแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมาตัวอย่างชุดเดียวกัน ดังแสดงผลในรูปที่ 18A พบว่า ในช่วงเดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ของปลากะรัง ระดับแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมาเริ่มเพิ่มขึ้นจากเดือนตุลาคม 2540 และเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุด (1,510 หน่วย/มก. โปรตีน) ในเดือนธันวาคม 2540 จากนั้นมีระดับลดลงเหลือ 450 หน่วย/มก. โปรตีน ในเดือนกุมภาพันธ์ 2541 และลดลงจนมีระดับค่อนข้างคงที่ในเดือนมีนาคม - กันยายน 2541 จากนั้นเริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 570 และ 720 หน่วย/มก.โปรตีน อีกครั้งในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน 2541 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน พบว่าแบบแผนของระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาจะเป็นเช่นเดียวกับของเลคติน กล่าวคือ เริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม 2540 และเพิ่มขึ้นสูงสุด (16.4 มก./มล.) ในเดือนธันวาคม 2540 และเริ่มลดลงในเดือนมกราคม 2541 และมีระดับค่อนข้างคงที่ในเดือนมีนาคม - กันยายน 2541 จากนั้นเริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นมากอีกครั้งในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน 2541 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนิน ซึ่งรายงานโดย เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ที่ได้ทำการศึกษาในปลากะรังเพศเมีย 3 ตัว ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 - กุมภาพันธ์ 2537 พบว่ามีแบบแผนในทำนองเดียวกัน ดังนี้ ระดับของพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าต่ำและคงที่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - กันยายน จากนั้นมีระดับเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับจากเดือนตุลาคม จนมีค่าสูงสุด (16.1 มก./มล.) ในเดือนธันวาคม หลังจากนั้นมีระดับลดลงตามลำดับในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ ในขณะที่ค่า GSI ซึ่งแสดงถึงระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่และรังไข่ จะมีค่าเปลี่ยนแปลงขนานไปกับแบบแผนของพลาสมาไวเทลโลจีนิน คือปลาเหล่านี้จะเริ่มมีพัฒนาการจริญของไข่และรังไข่ในเดือนตุลาคม โดยรับและสะสมไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือด ไปจนมีการพัฒนาของไข่ไปเป็นไข่สุก ซึ่งมีค่า GSI สูงสุดในเดือนมกราคม จากนั้นมีการวางไข่ในเดือนมกราคมซึ่งเป็นหนึ่งเดือนหลังจากระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม จึงทำให้ระดับ GSI ลดลงอย่างมากในเดือนกุมภาพันธ์



รูปที่ 18 **ปริมาณเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาและค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมียในรอบปี**

A ค่าเฉลี่ยของปริมาณเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย 4-5 ตัว ในช่วง ส.ค. 2540 - พ.ย. 2541

B ค่าเฉลี่ยของปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินและค่าดรรชนีการสืบพันธุ์ของปลากะรังเพศเมีย 3 ตัว ในช่วง ก.พ.2536 - ก.พ. 2537 และเป็นงานวิทยานิพนธ์ของเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538)

4. วิจารณ์

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของพลาสมาเลคติน

4.1.1 ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ

พลาสมาเลคตินของปลากะรังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด (650 หน่วย/มก.โปรตีน) รองลงมาได้แก่เม็ดเลือดแดงของหนู (162 หน่วย/มก.โปรตีน) และของหมู (81 หน่วย/มก.โปรตีน) ตามลำดับ เลคตินชนิดอื่นที่สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ ได้แก่ เลคตินจากไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ (Bildfell *et al.*, 1992) จากซีรัมของปลาไหลที่จำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (Gercken and Renwrantz, 1994) จากเพรียง (Muramoto *et al.*, 1991) และจากคางคก(*Bufo arenarum)* (Elola and Fink, 1996) เลคตินจากปู *Scylla serrata* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของหมูและกระต่ายเกาะกลุ่มได้ (Mercy and Ravindranath, 1994) สำหรับเลคตินจากปู *Liocarcinus depurator* ทำปฏิกิริยาได้กับเม็ดเลือดแดงของหนูขาวเล็กเท่านั้น (Fragkiadakis and Stratakis, 1997) พลาสมาเลคตินของปลากะรังไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B, AB ยกเว้นหมู่ O รวมทั้งเม็ดเลือดแดงของแพะเกาะกลุ่ม ซึ่งต่างจากเลคตินของไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ B เกาะกลุ่มได้ (Bildfell *et al.*, 1992) เลคตินจากซีรัมปลาไหลที่จำเพาะกับน้ำตาลฟูโคสทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเฉพาะหมู่ O เกาะกลุ่ม (Gercken and Renwrantz, 1994) ในขณะที่เลคตินจากปูมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ B และ O เกาะกลุ่มได้ (Mercy and Ravindranath, 1994) เลคตินจากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์ (Shiomi *et al.*, 1989) และเลคตินจากเพรียงหัวหอม (ascidian) สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนได้ทุกหมู่ (Mock and Renwrantz, 1991) แสดงให้เห็นว่าเลคตินแต่ละชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงต่างชนิดกันได้ดีต่างกัน ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง ความตื้นและลึกของแหล่งจับบนผิวเซลล์ รวมทั้งปริมาณและชนิดของน้ำตาลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะกับเลคติน ชนิดนั้น ๆ (Sharon and Lis, 1989; Sharon, 1977)

4.1.2 ความจำเพาะต่อน้ำตาลของพลาสมาเลคติน

ในการศึกษาผลการยับยั้งของน้ำตาลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคตินของปลากะรัง พบว่าน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ที่นำมาทดสอบหลายชนิด

เช่นกลูโคส, แมนโนส, ฟรุคโตส, กาแลคโตส, เอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามีน, เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 5 ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคตินได้ แม้ใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงถึง 200 mM ซึ่งต่างจากเลคตินของปลาชนิดอื่น ที่ส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ซึ่งอาจเป็นเพียง 1 ชนิด หรือหลายชนิด เช่นเลคตินจากซีรัมและพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์ (Bildfell *et al.*, 1992) และจากไข่ปลาโคโฮแซลมอน (Yousif *et al.*, 1994) เลคตินจากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้า (Levi and Teichberg, 1981) และเลคตินที่ได้จากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์ (*Conger myrister*) จะจำเพาะกับน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายชนิดและไกลโคโปรตีน (Shiomi *et al.*, 1989) ในขณะที่กรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยพลาสมาเลคตินของปลากะรังได้ 50% ที่ความเข้มข้น 50 mM เช่นเดียวกับฟีทูอีนและอะไซอะโลฟีทูอีนสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ได้ 50% ที่ความเข้มข้น 5 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ แต่มิวซินและแอลฟา 1- แอซิด ไกลโคโปรตีนที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ไม่มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ด้วยเหตุผลนี้งานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรัง พลาสมาเลคตินของปลากะรังมีความจำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค และไกลโคโปรตีน คล้ายกับเลคตินของสัตว์พวกครัสเตเชียน ซึ่งส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคและฟีทูอีนเช่นกัน ตัวอย่างเช่น เลคตินจากปู (Mercy and Ravindranath, 1994; Fragkiadakis and Stratakis, 1997) กุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) กุ้งทะเล *Parapenaeus longirostris* (Fragkiadakis and Stratakis, 1995; Vazquez *et al.*, 1996) และเลคตินจากแมงดาทะเลอเมริกัน (Armstrong *et al.*, 1996)

4.1.3 ความเสถียรของพลาสมาเลคตินที่ -10 $^{\circ}$ซ

จากการทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของพลาสมาเลคตินซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -10 $^{\circ}$ซ ทุกเดือนเป็นเวลา 13 เดือน พบว่าพลาสมาเลคตินมีความเสถียรโดยแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงมีค่าคงเดิมเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานถึง 10 เดือน แอคทิวิตีลดลงเหลือ 75 และ 58% เมื่อเก็บไว้นาน 11 และ

12 เดือน ตามลำดับ หลังจากนั้นจะลดลงเหลือ 25%ในเดือนที่ 13 (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บพลาสมาเลคตินไว้นานถึง 10 เดือน โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีหรือสมบัติของเลคติน ซึ่งจะเป็นผลดีในการทดลองเพราะทำให้การทดลองมีความต่อเนื่อง แม้ว่าจะใช้พลาสมาตัวอย่างที่เก็บไว้นาน รวมทั้งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการขาดพลาสมาตัวอย่างในช่วงฤดูมรสุมได้อีกด้วย เช่นเดียวกับเลคตินจากหลายแหล่งที่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่นที่ -10 $^{\circ}$ซ หรือ -20 $^{\circ}$ซ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน อาทิเช่นเลคตินจากไข่ปลาโคโฮแซลมอนจะเก็บที่ -20 $^{\circ}$ซ (Yousif *et al.*, 1995) หรือเลคตินจากหอยมุกเก็บที่ 4 $^{\circ}$ซ ได้นานประมาณ 1 เดือน (Suzuki and Mori, 1989)

4.1.4 ผลของการเก็บเลือดกระต่ายที่ 4 $^{\circ}$ซ

เมื่อนำเม็ดเลือดแดงกระต่ายซึ่งเก็บไว้ที่ 4 $^{\circ}$ซ มาทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเทียบกับเม็ดเลือดแดงสดโดยพลาสมาเลคติน พบว่าสามารถเก็บเลือดกระต่ายไว้ที่ 4 $^{\circ}$ซ ได้ไม่เกิน 5 วัน โดยที่แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มยังคงมีค่าเท่ากับเม็ดเลือดแดงสด หลังจาก 7 วัน ไปแล้ว แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงมีค่าลดลง การเก็บเม็ดเลือดแดงไว้เป็นเวลานานอาจทำให้สมบัติของน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์เปลี่ยนไปได้ (Shinozuka *et al.*, 1988) เพราะฉะนั้นควรใช้เม็ดเลือดแดงกระต่ายซึ่งเก็บไว้นานไม่เกิน 5 วัน ในการทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์

4.2 การทำให้เลคตินบริสุทธิ์

การทำให้เลคตินบางชนิดบริสุทธิ์ต้องอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีหลายแบบรวมกัน เช่น แบบแลกเปลี่ยนประจุ แบบเจลฟิลเตรชันหรือแบบจำเพาะ เช่นการทำให้เลคตินจากปลาไหลบริสุทธิ์อาศัยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะและแบบเจลฟิลเตรชัน (Kelly, 1984) จากไข่ปลาดุก (*Silurus asotus*) ใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose กับ Galactose-Sepharose (Hosono *et al.*, 1993) การแยกเลคตินจากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้าผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose, Sepharose 6B และ Lentil-Sepharose (Ivey *et al.*, 1993) รวมทั้งเลคตินจากซีรัมปลาเรนโบว์เทราท์ใช้คอลัมน์ Sepharose CL-4B กับเจลฟิลเตรชัน (Jensen *et al.*, 1997) ในขณะที่การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด ทำได้โดยผ่าน

ขั้นตอนการแยกเพียงขั้นตอนเดียว โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ ตัวอย่างเช่น เลคตินจากคางคกมีความจำเพาะกับน้ำตาลแลคโตสจึงใช้คอลัมน์ Lactose-agarose แยกเลคตินออกจากโปรตีนชนิดอื่น (Elola and Fink, 1996) ในการแยกเลคตินจากไข่ปลาแซลมอนใช้คอลัมน์ Galactose-Sepharose เพียงคอลัมน์เดียว (Bildfell *et al.*, 1992) เป็นต้น หรือการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากปลาไหลไฟฟ้าโดยคอลัมน์ Lactosyl-Sepharose เพียง 1 ขั้นตอนทำให้เลคตินบริสุทธิ์ได้สูงถึง 1,000 เท่า (Levi and Teichberg, 1981)

4.2.1 การแยกเลคตินโดยใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-200

สำหรับการแยกเลคตินจากพลาสมาปลากะรังในขั้นตอนแรกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยใช้พลาสมาเริ่มต้น 6 มิลลิลิตร (378 มิลลิกรัม) พบว่ามีโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ถูกชะออกมา 1 พีค (พีค D1) ซึ่งไม่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ส่วนโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ถูกชะออกด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์มี 2 พีค คือ พีค D2 และ D3 (รูปที่ 4) มีเพียงสารละลายโปรตีนพีค D2 เท่านั้น ที่มีแอคติทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 2,210 หน่วย/มก.โปรตีน และมีปริมาณโปรตีน 60.6 มิลลิกรัม คิดเป็น 16.0% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.4 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น (ตารางที่ 6) ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดเหรียงด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่ทำให้เลคตินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.4 เท่า (Utarabhand and Akkayanont, 1995) แต่จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส พบว่าสารละลายโปรตีนพีค D2 (รูปที่ 5 แถวที่ 2) มีแถบโปรตีนน้อยกว่าแถบโปรตีนของพลาสมา (รูปที่ 5 แถว 1) แต่ยังปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ โดยมีแถบโปรตีนเข้มมาก 3 แถบคือแถบที่อยู่บนสุด กลางและแถบล่างสุดของแผ่นเจล ส่วนที่เหลือจะปรากฏเป็นแถบจาง ๆ แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ DEAE-Sephacel สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนออกไปได้ แต่สารละลายพีค D2 ยังไม่บริสุทธิ์จึงต้องทำการแยกเลคตินต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

ในการแยกสารละลายโปรตีนพีค D2 ปริมาณ 60.6 มิลลิกรัมที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีค คือ

พีค S1, S2 และ S3 (รูปที่ 6) สารละลายพีค S1 เป็นพีคที่มีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย มีปริมาณโปรตีน 9.7 มิลลิกรัม คิดเป็น 2.5% ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น และมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เป็น 47,923 หน่วย และ 4,940 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็นแอคทิวิตี 19.5% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 7.6 เท่าของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น (ตารางที่ 6) ในขณะที่สารละลายพีค S2 และ S3 ไม่มีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง เมื่อนำสารละลายทั้ง 3 พีค จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าสารละลายโปรตีนพีค S1 ปรากฏแถบโปรตีนเข้มมากเพียง 1 แถบ เป็นแถบที่อยู่บนสุดของแผ่นเจล และมีโปรตีนแถบจาง 2 แถบ (รูปที่ 5 แถวที่ 3) ขณะที่สารละลายพีค S2 และ S3 ปรากฏโปรตีนแถบเข้มอย่างละแถบและโปรตีนแถบจางอีกเล็กน้อย โดยสารละลายพีค S2 มีแถบโปรตีนอยู่กึ่งกลางแผ่นเจล ส่วนสารละลายพีค S3 ปรากฏแถบโปรตีนเข้มอยู่ล่างสุดของแผ่นเจล (รูปที่ 5 แถวที่ 4,5) บ่งชี้ว่าคอลัมน์ Sephadex G-200 สามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าของเลคตินออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากสารละลายโปรตีนพีค S1 ยังปรากฏแถบโปรตีนถึง 3 แถบ จึงได้นำสารละลายพีค S1 ไปทดสอบหาแถบโปรตีนของเลคตินตามวิธีการตามข้อ 2.8.3.1 แล้วนำไปแยกต่อด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมหรือโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose

4.2.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม

จากการทดสอบหาแถบโปรตีนของเลคตินในสารละลายโปรตีนพีค S1 ตามข้อ 2.8.3.1 พบว่าโปรตีนแถบเข้มซึ่งเป็นแถบอยู่บนสุดของแผ่นเจลเป็นเลคติน โดยมีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 6,567 หน่วย/มก.โปรตีน (รูปที่ 7A) เมื่อทำการแยกเลคตินจากสารละลายพีค S1 ต่อโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม จากนั้นนำไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 7B และรูปที่ 9 แถวที่ 5) เลคตินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 7,373 หน่วย และ 6,567 หน่วย/มก.โปรตีน คิดแอคทิวิตีเป็น 3% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 10.1 เท่า ของพลาสมาเริ่มต้น (ตารางที่ 6)

4.2.3 **การใช้คอลัมน์** Fetuin-agarose

จากการนำสารละลายโปรตีนพีค S1 ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณ 9.7 มิลลิกรัม ไปแยกต่อโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose พบว่ามีโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์และมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายต่ำมากถูกชะออกมา 1 พีค (พีค F1) เมื่อทำการชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ออกมา พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (พีค F2) ซึ่งเป็นพีคที่มีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเป็น 8,520 หน่วย และ 7,100 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 3.5% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.9 เท่า ของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น (ตารางที่ 6) สารละลายโปรตีนพีค F2 ปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ ที่เป็นแถบอยู่บนสุดของแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่แปลงสภาพ (รูปที่ 9 แถวที่ 4) ซึ่งตรงกับแถบโปรตีนที่ได้จากการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (รูปที่ 9 แถวที่ 5) บ่งชี้ว่าสารละลายโปรตีนพีค F2 นี้เป็นเลคตินบริสุทธิ์

การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel, Sephadex G-200 และการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม หรือโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ตามลำดับ สามารถทำให้เลคตินจากพลาสมาปลากะรังบริสุทธิ์ได้ โดยเหลือโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เมื่อเปรียบเทียบการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose หรือโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม พบว่าทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกัน เพราะปริมาณโปรตีนและความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของเลคตินที่แยกได้มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่แอคทิวิตีและแอคทิวิตีจำเพาะของเลคตินที่ได้จากการแยกโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose มีค่าสูงกว่าการแยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมแม้จะไม่มากนัก ด้วยเหตุนี้การทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose มีข้อดีกว่าการทำโพลี อะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมเพราะทำได้ง่ายและสะดวก ในขณะที่การแยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมมีข้อจำกัดคือสามารถแยกได้โดยใช้โปรตีนครั้งละไม่มากนัก ในการตัดแถบโปรตีนเลคตินบนแผ่นเจลออกจากโปรตีนอีก 2 แถบ ที่อยู่ใกล้กัน (รูปที่ 7A) ต้องทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของโปรตีนแถบที่อยู่ติดกัน และในการชะเลคตินออกจากชิ้นเจลมีโอกาสสูญเสียโปรตีนไปบางส่วน

สำหรับการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากแหล่งอื่น ๆ อาจผ่านหลายขั้นตอนขึ้นอยู่กับสมบัติของเลคตินนั้น ๆ การแยกแต่ละขั้นตอนอาจแตกต่างกัน อาทิเช่น การแยกเลคตินจากน้ำเลือดของเพรียงหัวหอมอาศัยคอลัมน์ DEAE-cellulose ตามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 และ Sepharose 4B ตามลำดับ จึงจะแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (Schluter and Ey, 1989) การแยกเลคตินจากน้ำเลือดของกุ้งน้ำจืด (*Macrobrachium rosenbergii*) ใช้คอลัมน์ Sephadex G-25 เพียงขั้นตอนเดียวก็สามารถทำให้เลคตินบริสุทธิ์ได้ (Vazquez *et al.*, 1993) หรือการแยกเลคตินจากเยื่อบุผิวในปาก (oral epithelium) ของหมูที่ใช้เพียงคอลัมน์ Lactosyl-Sepharose อย่างเดียวก็แยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (Chiu *et al.*, 1994)

4.3 การศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์

4.3.1 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

การแยกเลคตินจากพลาสมาของปลากะรังโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนตามด้วยแบบเจลฟิลเตรชัน แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าพลาสมาเริ่มต้นที่นำมาศึกษาปรากฏแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมคูมาซีบลูเข้มมาก 3 แถบ และแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมรองลงมาอีกหลายแถบ (รูปที่ 9 แถวที่ 1) เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าสารละลายโปรตีนพีค D2 ที่มีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพียงพีคเดียว ปรากฏแถบโปรตีนเข้ม 3 แถบ แต่มีจำนวนแถบโปรตีนที่ติดสีจางน้อยกว่าของพลาสมาเลคติน (รูปที่ 9 แถวที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับความบริสุทธิ์ของสารละลายโปรตีนพีค D2 ที่เพิ่มขึ้น 3.4 เท่าของพลาสมาเริ่มต้น เมื่อนำสารละลายพีค D2 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบสารละลายโปรตีนพีค S1 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.6 เท่าของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น ปรากฏแถบโปรตีนเข้มมากเพียง 1 แถบ และมีโปรตีนแถบจางเหลืออีกเพียง 2 แถบ (รูปที่9 แถวที่ 3) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดอื่นถูกกำจัดออกไปได้ โดยเมื่อทดสอบหาแถบโปรตีนของเลคตินในสารละลายโปรตีนพีค S1 ด้วยการตัดเจลตามวิธีการข้อ 2.8.3.1 พบว่าโปรตีนแถบเข้มที่เป็นแถบอยู่บนสุดของเจลเท่านั้นที่มีแอคทิวิตีของ

การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบนี้เป็นเลคติน จากการนำสารละลายพีค S1 ไปแยกต่อด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมจะแยกได้โปรตีนเพียง 1 แถบ ที่อยู่ตรงกับแถบโปรตีนเลคติน (รูปที่ 7B และรูปที่ 9 แถวที่ 5) หรือการแยกสารละลายพีค S1 ต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose พบว่าสารละลายโปรตีนพีค F2 ที่แยกได้ ซึ่งมีค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (รูปที่ 9 แถวที่ 4) เช่นกัน แสดงว่าการใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose หรือการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้หมด เลคตินที่แยกได้ทั้ง 2 วิธี จึงเป็นเลคตินบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเพียงแถบเดียวปรากฏอยู่ตรงตำแหน่งเดียวกันในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งแบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะรังที่แยกได้นี้คล้ายกับแบบแผนโปรตีนของเลคตินที่แยกได้จากสัตว์ชนิดอื่นซึ่งปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ อาทิเช่น เลคตินจากม้าน้ำ (Mandal and Brewer, 1992) เลคตินจากปลาไหลไฟฟ้า (Ivey *et al.*, 1993) เลคตินจากต่อมพิษของงูหางกระดิ่ง (Tropical rattlesnake) (Polgur *et al.*, 1997) เลคตินจากไข่คางคก (Ahmed *et al.*, 1996) และเลคตินจากเพรียง (*Styela clava*) (Kelly *et al.* 1992)

4.3.2 แบบแผนโปรตีนของเลคตินในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

เลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพลาสมาปลากะรังปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (รูปที่ 10) การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาวะที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลให้ผลเช่นเดียวกัน คือปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว ณ ที่ตำแหน่งเดียวกัน (ไม่ได้แสดงผลไว้) ซึ่งคล้ายกับแบบแผนโปรตีนของเลคตินที่แยกได้จากเพรียง (*Polyandrocarpa misakiensis*) (Suzuki *et al.*, 1990) ปลาไหลยุโรป (Kelly, 1984) จากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้า (Levi and Teichberg, 1981) จากไข่ปลาแซลมอน (Yousif *et al.*, 1994;1995) และจากซีรัมของปลาไหล (Gercken and Renwrantz, 1994) ซึ่งเลคตินบริสุทธิ์เหล่านี้จะมีโปรตีนเพียง 1 แถบ แต่ต่าง

จากเลคตินของโปรโตซัว (*Tritrichomonas mobilensis*) ซึ่งมีแถบโปรตีน 3 แถบ (Babal *et al.*, 1994) เลคตินจากหอยทาก (*Helix pomatia*) ซึ่งปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ (Theopold *et al.*, 1996) หรือเลคตินของไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ ซึ่งมีโปรตีน 2 แถบ (Bildfell *et al.*, 1992) ในขณะที่เลคตินจากซีรัมของปลาเรนโบว์เทราท์มีโปรตีนหลายแถบ (Jensen *et al.*, 1997) ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

4.3.3 **น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์**

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิดคือ ไธโรโกลบูลิน, เฟอร์ริติน, คาทาเลสและอัลโดเลส พบว่ามีโปรตีนที่มีแอคทิวิตีของเลคตินถูกชะออกมาเพียงพีคเดียว (รูปที่ 11A) เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 11B พบว่ามีค่าเป็น 851,100 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรังมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าของเลคตินจากปลาชนิดอื่น ๆ เช่นเลคตินในซีรัมและพลาสมาของปลาเรนโบว์เทราท์มีน้ำหนักโมเลกุล 190,000 ดัลตัน (Jensen *et al.*, 1997) เลคตินจากซีรัมของปลาอาร์คติก (Arctic fish) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10,500 - 30,000 ดัลตัน (Osuga and Feeney, 1978) และเลคตินจากซีรัมของปลาไหลชนิด MBL มีขนาด 246,000 ดัลตัน และชนิด FBL มีขนาด 121,000 ดัลตัน (Gercken and Renwrantz, 1994) สำหรับเลคตินของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมักมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น เลคตินจากแมงดาทะเลอเมริกันต่างชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 1,700,000 ดัลตัน (Tsuboi *et al.*, 1996) หรือ 533,000 ดัลตัน (Tsuboi *et al.*, 1993)

เลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรังที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (รูปที่ 10) เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลสบี, โบวีนซีรัมอัลบูมิน, โอวัลบูมิน, คาร์บอนิคแอนไฮเดรส, ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ และแอลฟา-แลคตัลบูมิน (รูปที่ 12) พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 85,100 ดัลตัน จากการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินบริสุทธิ์ที่หาโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส สรุปได้ว่าเลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรังประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกัน 10 หน่วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ

85,000 ดัลตัน เมื่อคิดน้ำหนักโมเลกุลรวมของเลคตินบริสุทธิ์มีค่าเป็น 850,000 ดัลตัน ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 (851,100 ดัลตัน) นอกจากนี้หน่วยย่อยของเลคตินบริสุทธิ์ไม่ได้ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เพราะแบบแผนโปรตีนของเลคตินบริสุทธิ์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ซึ่งอยู่ ณ ตำแหน่งตรงกัน บ่งชี้ว่าเลคตินชนิดนี้ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย เนื่องจากมีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสทั้ง 2 แบบข้างต้น การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพเป็นการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของประจุ รูปร่างและน้ำหนักโมเลกุล ส่วนการแยกของโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสและมีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลขึ้นกับความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้คล้ายกับรายงานของเลคตินบริสุทธิ์จากปลาไหลซึ่งมีความจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส ที่ประกอบด้วย 10 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 24,000 ดัลตัน และมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 246,000 ดัลตัน แต่มีพันธะโควาเลนท์ยึดระหว่างหน่วยย่อย (Gercken and Renwrantz,1994) เลคตินจากซีรัมของปลาเรนโบว์เทราท์ (Jensen *et al.,* 1997) และจากซีรัมของปลาไหลยุโรป (Kelly, 1984) มีหลายหน่วยย่อยและมีพันธะโควาเลนท์ยึดระหว่างหน่วยย่อยเช่นกัน สำหรับเลคตินของปลาชนิดอื่นที่มีหลายหน่วยย่อยแต่ไม่มีพันธะโควาเลนท์ยึดระหว่างหน่วยย่อย ได้แก่ เลคตินจากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์ (Shiomi *et al.*, 1989) เลคตินจากอวัยวะไฟฟ้าของปลาไหลไฟฟ้า (Levi and Teichberg, 1981) เป็นต้น

4.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์ เกิดขึ้นได้ดีเพียงใดขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะเลคตินจากแต่ละแหล่งไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง มีสมบัติทางชีวภาพ กายภาพ และโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ปัจจัยเด่น ๆ ได้แก่ชนิดของเม็ดเลือดแดง, ผลของ pH, ผลของไดวาเลนท์แคทไอออนและสารคีเลท, ความเสถียรต่อ pH หรือต่ออุณหภูมิของเลคติน และการทำให้ผิวเซลล์เปลี่ยนแปลง โดยการย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ทริปซินและนิวรามิ

เดส รวมทั้งผลของน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตในการยับยั้งการเกาะกลุ่มเซลล์ เป็นต้น ล้วนมีผลต่อความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินทั้งสิ้น

เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรัง สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่เม็ดเลือดแดงของหนู และของหมูตามลำดับ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ และของแพะเกาะกลุ่มได้ (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆของพลาสมาเลคตินพบว่าให้ผลเหมือนกัน แต่ค่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินบริสุทธิ์มีค่าสูงกว่าถึง 10 เท่า ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มของเลคตินบริสุทธิ์คล้ายกับเลคตินจากแหล่งอื่น เช่น เลคตินจากสาหร่ายสีแดง (Kanoh *et al.*, 1992), เลคตินจากม้ามของลูกวัว (Mandal and Brewer, 1992) จากกบและคางคก (Ahmed *et al.*, 1996) รวมทั้งเลคตินจากเมือกที่ผิวหนังของปลาเฟลาน์เดอร์ (flounder) (Kamiya and Shimizu, 1980) ปลาไหลญี่ปุ่น (Suzuki, 1985) และปลาดุก (Al-Hassan *et al*, 1986) เป็นต้น ส่วนเลคตินจากเมือกที่ผิวหนังของปลาไหลคองเกอร์สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของม้า กระต่าย แพะ หมู ไก่ และของคนทุกหมู่ได้ (Shiomi *et al.*, 1989) เลคตินจากเพรียงหัวหอมมีความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงของหมู (Schluter and Ey, 1989) การที่เลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงต่างชนิดกันเกาะกลุ่มได้ต่างกันขึ้นอยู่กับสมบัติของผิวเซลล์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดสที่พบว่าแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดสเพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติซึ่งไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (ตารางที่ 8) ในทำนองเดียวกับเลคตินจากปลาไหลไฟฟ้าทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงที่ไม่ถูกย่อย (Levi and Teichberg, 1981) เลคตินจากพืชเช่นจากเมล็ดเหรียงทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ถูกย่อยด้วยด้วยเอนไซม์ทริปซินมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 64 เท่า (ไพฑูรย์ อรรฆยานนท์, 2536) ในขณะที่แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดสโดยเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกจากเมล็ดจำปาดะมีค่าเพิ่มขึ้น 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ (อุบล ต้นสม, 2541) นอกเหนือจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว ยังมีเอนไซม์ไซอะลิเดส, ฟูโคซิเดส (fucosidase) (Scocco *et al.*,

1996) และโปรตีเอสที่สามารถเพิ่มแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากสาหร่ายสีแดงขึ้นถึง 8 เท่า (Kanoh *et al.*, 1992) ทั้งนี้เพราะเอนไซม์เหล่านี้ช่วยกำจัดโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตบางส่วนจากผิวเซลล์ที่อาจปิดกั้นส่วนของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคติน ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งจับแล้วทำให้ปฏิกิริยาการจับระหว่างเลคตินกับผิวเซลล์เกิดได้ดีหรือมากขึ้น

สมบัติของเลคตินที่สำคัญคือเลคตินสามารถจับกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตหรือผิวเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ปฏิกิริยานี้ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรังไม่ถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM แต่ถูกยับยั้งได้ 50% โดยกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคที่ความเข้มข้น 50 mM รวมทั้งถูกยับยั้งได้ด้วยไกลโคโปรตีนคือ อะไซอะโลฟีทูอีนและฟีทูอีนที่ความเข้มข้น 0.63 และ 5 มก./มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 9) บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคหรือไกลโคโปรตีนที่มีกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคเป็นองค์ประกอบ คล้ายกับเลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน อาทิเช่น เลคตินจากกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) หรือเลคตินของเชื้อรา (*Sclerotium rolfsii*) มีความจำเพาะกับมิวซินและอะไซอะโลมิวซิน (asialomucin) แต่ไม่จำเพาะกับไกลโคโปรตีนชนิดอื่น (Inbar and Chet, 1994) แต่ความจำเพาะของเลคตินบริสุทธิ์ของปลากะรังต่อน้ำตาลและไกลโคโปรตีนต่างจากของเลคตินในปลาชนิดอื่นที่ส่วนใหญ่จะจำเพาะกับน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ มีบ้างที่จำเพาะกับไกลโคโปรตีน เช่นเลคตินจากซีรัมปลาไหลมีความจำเพาะต่ออะไซอะโลฟีทูอีน, มิวซิน, อะไซอะโลมิวซิน และน้ำตาลชนิดฟูโคส, ฟรุคโตส, อะราบิโนส (arabinose) เป็นต้น (Gercken and Renwrantz, 1994)

เลคตินบางชนิดต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนช่วยในการทำงาน แต่ไดวาเลนท์แคทไอออนได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} และสารคีเลทคือ EDTA ที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM ไม่มีผลในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์แสดงให้เห็นว่าเลคตินจากปลากะรังไม่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนเหล่านี้ช่วยในการทำงานซึ่งต่างจากเลคตินที่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนช่วยในการทำปฏิกิริยา เช่น เลคตินจากซีรัมปลาเรนโบว์เทราท์ (Jensen *et al.*, 1997) จากน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) จากแมงดาทะเล (Sharon and Lis, 1972) และคอน

วัลซินจากพิษงู (Polgur *et al.*, 1997) เป็นต้น

นอกจากนี้เบ่ตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-90 mM ไม่มีผลต่อในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ สอดคล้องกับผลของการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสในสภาวะที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลของเลคตินบริสุทธิ์ซึ่งปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ในตำแหน่งที่ตรงกัน บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์หรือหน่วยย่อยของเลคตินบริสุทธิ์ไม่ได้จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ดังนั้นจึงไม่พบผลการยับยั้งแอคทิวิตีของเลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรังโดยเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล

นอกเหนือจากสมบัติของผิวเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันแล้ว การเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ดังจะเห็นได้ว่าเลคตินบริสุทธิ์จากปลากะรังมีความสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงไม่เกิน 50 ^{o}ซ ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มลดลง 50% และสูญเสียแอคทิวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 ^{o}ซ (รูปที่ 13) แสดงให้เห็นว่าการเกาะกลุ่มเซลล์ของเลคตินบริสุทธิ์ต้องอาศัยโครงสร้างโมเลกุลส่วนที่เป็นโปรตีนช่วยในการทำงาน (Sharon and Lis, 1995) เมื่อทำให้โครงสร้างโปรตีนของเลคตินแปลงสภาพโดยการอุ่นที่อุณหภูมิสูง ความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์ลดลงหรือหมดไป จากผลการทดลองนี้สามารถทำการทดสอบหาแอคทิวิตีของเลคตินบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้องได้ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่ทำให้โปรตีนของเลคตินแปลงสภาพ เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิกับเลคตินจากแหล่งอื่น ๆ พบว่า เลคตินจากหอยมุก (*Pinctada fucata martensii*) จะแปลงสภาพที่อุณหภูมิ 80 ^{o}ซ (Suuzuki and Mori, 1989) ส่วนเลคตินจากปลิงทะเล (*Cucumaria echinata*) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 40 ^{o}ซ และแอคทิวิตีจะลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 ^{o}ซ จนเสียแอคทิวิตีอย่างสมบูรณ์ ที่ 70 ^{o}ซ (Hatakeyama *et al.*, 1995) แต่การอุ่นสารสกัดจากไข่ปลาโคโฮแซลมอนที่ 100 ^{o}ซ นาน 15 นาที ไม่ทำให้แอคทิวิตีของเลคตินลดลง (Yousif *et al.*, 1994) เลคติน 2 ชนิดจากซีรัมของปลาไหลคือ MBL กับ FBLจะเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55 ^{o}ซ และ 75 ^{o}ซ ตามลำดับ และสูญเสียแอคทิวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ และ 90 ^{o}ซ ตามลำดับ (Gercken and Renwrantz, 1994)

เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรังมีความเสถียรต่อ pH ดีที่สุดในช่วง 7-9 ความเสถียรของเลคตินบริสุทธิ์ลดลงเหลือ 50% ที่ pH 6 และ 10-11 และลดลงเหลือ 25% ที่ pH 5 ซึ่งจะต่างกับเลคตินจากปลิงทะเลซึ่งมีความเสถียรดีที่สุดที่ pH 5 และที่ pH อื่น ๆ ความเสถียรมีค่าลดลง (Hatakeyama *et al.*, 1995) นอกจากความเสถียรต่อ pH แล้ว pH ยังมีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรัง พบว่าความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเกิดได้ดีที่สุดในช่วง pH 7.5 - 8 ในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด (pH น้อยกว่า 7.5) หรือเป็นด่าง (pH มากกว่า 8) มีผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีนทำให้เลคตินบริสุทธิ์มีแอคทิวิตีลดลง (รูปที่ 15) ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากคางคกซึ่งมีแอคทิวิตีดีที่สุดอยู่ในช่วง pH 7.5 - 8.5 (Ahmed *et al.*, 1996) แต่ต่างจากเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลฟูโคสในปลาไหล ซึ่งสามารถทำงานได้ดีใน pH ช่วงกว้างคือช่วง 5 -10 (Gercken and Renwrantz, 1994)

4.4 การเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน

เมื่อนำไวเทลโลจีนิน ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรังเพศเมียตามวิธีของ Utarabhand and Bunlipatanon (1996) ไปฉีดกระต่าย 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน จากนั้นทำการแยกแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% และแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีจะหลุดออกมาในพีคแรกก่อนการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Warden and Giese, 1984) เมื่อนำแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินไปทดสอบปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์โดยจะเห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีกับหลุมที่ใส่ไวเทลโลจีนิน (รูปที่ 16 หลุมกลางและหลุมที่ 1) นอกจากนี้เมื่อนำพลาสมาของปลากะรัง สารละลายโปรตีนพีค D2 ที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel สารละลายโปรตีนพีค S1 และเลคตินบริสุทธิ์ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 และคอลัมน์ Fetuin-agarose ตามลำดับ มาทดสอบปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินเกิดแถบการตก

ตะกอนกับพลาสมาของปลากะรัง สารละลายโปรตีนพีค D2 และสารละลายโปรตีนพีค S1 แต่ไม่ปรากฏแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีกับเลคตินบริสุทธิ์ (รูปที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ที่พบว่าแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ กับพลาสมา สารสกัดจากรังไข่และสารสกัดจากตับของปลากะรังเพศเมียที่เจริญพันธุ์แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังเพศผู้ แสดงให้เห็นว่าไวเทลโลจีนินของปลากะรังเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในพลาสมาของปลาเพศเมียซึ่งสังเคราะห์โดยตับและส่งออกไปตามกระแสเลือดเพื่อไปสะสมเป็นโปรตีนโยล์คในไข่ (Mommsen and Walsh, 1988) จากการที่แอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินของปลากะรังเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังที่นำมาศึกษาเลคตินและกับสารละลายโปรตีนพีค D2 และพีค S1 แสดงให้เห็นว่าในพลาสมาของปลากะรังน้ำหนัก 4-5 กิโลกรัมที่นำมาศึกษามีไวเทลโลจีนินอยู่ด้วยจึงเป็นปลาเพศเมียและในการแยกเลคตินจากพลาสมาของปลาด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 ไม่สามารถแยกไวเทลโลจีนินออกจากสารละลายโปรตีนพีค D2 และพีค S1 ได้หมด จึงยังคงเห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมที่ใส่แอนติบอดีกับสารละลายโปรตีนพีค D2 และกับสารละลายโปรตีนพีค S1 ส่วนคอลัมน์ Fetuin-agarose สามารถแยกไวเทลโลจีนินและโปรตีนอื่น ๆ ออกจากเลคติน (พีค F2) ได้หมด ทำให้มีแถบของเลคตินบริสุทธิ์เพียงแถบเดียวปรากฏในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (รูปที่ 9 แถวที่ 4) และเลคตินบริสุทธิ์นี้ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนิน เพราะไม่มีไวเทลโลจีนินปนเปื้อนอยู่ (รูปที่ 16 หลุมที่ 5) บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์และไวเทลโลจีนินของปลากะรังมีโครงสร้างโปรตีนที่แตกต่างกันด้านความเป็นแอนติเจน สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าเลคตินถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.15 M ในพีค D2 ขณะที่ไวเทลโลจีนินถูกชะออกจากคอลัมน์เดียวกันด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.35 M ในพีค D3 (รูปที่ 4; Utarabhand and Bunlipatanon, 1996) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกัน

4.5 ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการสังเคราะห์พลาสมาโปรตีน

จากการฉีดฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออลในปริมาณ 1.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม 3 ครั้ง และวัดระดับแอคทิวิตีในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินในพลาสมา พบว่าแอคทิวิตีของพลาสมาเลคตินก่อนการฉีดฮอร์โมนมีค่าน้อยที่สุดคือ 76.0 ± 5.3 หน่วย/มก.โปรตีน แอคทิวิตีของพลาสมาเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 89.6 ± 5.7, 235.2 ± 12.8 และ 289.0 ± 13.9 หน่วย/มก.โปรตีน หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) การเพิ่มของระดับเลคตินในพลาสมาเกิดควบคู่กับการเพิ่มของปริมาณโปรตีนในพลาสมาซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นจากค่าก่อนการฉีดฮอร์โมน (53.4 ± 2.2 มก./มล.) เป็น 76.8 ± 3.0, 100.4 ± 5.7 และ 116.7 ± 5.7 มก./มล. หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) สอดคล้องกับผลการฉีดฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออลต่อการสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนที่รายงานโดย เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ที่พบว่าการฉีดฮอร์โมนในปริมาณ 2.5 มก./น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทำให้ปริมาณโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นเป็น 2.3, 3.4 และ 4.0 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณพลาสมาโปรตีนก่อนการฉีดฮอร์โมน (ตารางที่ 11) นอกจากนี้การฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลมีผลทำให้ไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังมีค่าเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดฮอร์โมนโดยพบว่าระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นเป็น 55.0 ± 1.1, 106.4 ± 1.0 และ115 ± 1.2 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบปริมาณไวเทลโลจีนินของปลาก่อนการฉีดฮอร์โมนครั้งแรกทั้งนี้เพราะปลาที่ เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) นำมาศึกษาเป็นปลากะรังที่ยังไม่เจริญพันธุ์มีน้ำหนัก 1 - 1.5 กิโลกรัม ซึ่งยังไม่มีการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิน เช่นเดียวกับปลาเยาว์วัยชนิดอื่น ๆ ซึ่งถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ไวเทลโลจีนินได้เมื่อฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลเช่นปลาทอง (goldfish) (de Vlaming *et al.*, 1980) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Van Boheman *et al.*,1981) ปลานิล (tilapia) (Chan *et al.*, 1991) และปลา Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) ในวงศ์ Salmonids (Hiramatsu *et al.*, 1997) ผลของการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออลต่อการเพิ่มระดับโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมาพบในทำนองเดียวกับการศึกษาในปลาแอทแลนติคแซลมอน (*Salmo salar*) (So *et al.*, 1985; Olin and Vonder Decken, 1989) ปลานิล (Chan *et al.*, 1991) ปลาไหล (*Anguillu japonica*) (Komatsu *et al.*, 1996) ปลาลิ้นหมา (sole, *Pleuronectes*

vetulus) (Roubal *et al.*, 1997) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Herman and Kincaid, 1988; Campbell and Idler, 1980) ผลงานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลเป็นตัวกระตุ้นให้ตับของปลาสังเคราะห์พลาสมาโปรตีนและไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้น (Mommsen and Walsh, 1988; Wangh, 1982) นอกเหนือจากการกระตุ้นให้ปลาสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินแล้ว ฮอร์โมนเอสตราไดออลยังกระตุ้นให้ปลาสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่น เช่น ที่พบในปลานิล (Chan *et al.*, 1991) หรือจากรายงานของ Devaraj *et al.* (1995) ที่พบว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งจำเพาะต่อมิวซินในไข่ปู ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นตัวรับไวเทลโลจีนินเข้าสู่ไข่ได้ ในทำนองเดียวกัน ระดับของเลคตินในพลาสมาปลากะรังที่เพิ่มขึ้นจากการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล บ่งชี้ว่าฮอร์โมนนี้เป็นตัวกระตุ้นให้ปลากะรังมีการสังเคราะห์เลคตินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนแล้วหลั่งออกมาในเลือด แต่เลคตินที่ถูกสังเคราะห์นี้อาจเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น (Barondes ,1984) ไม่น่าเกี่ยวข้องกับการขนส่งไวเทลโลจีนินไปยังไข่หรือรังไข่ ทั้งนี้เพราะเลคตินบริสุทธิ์ไม่เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ใน Ouchterlony double immunodiffusion เลคตินที่มีในพลาสมาของปลากะรังเพศเมียอาจมีบทบาทโดยทำหน้าที่เป็นสารต้นตอ (precursor) ของเลคตินที่พบในไข่ปลา หรืออาจเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเจริญของไข่/รังไข่ ในทำนองเดียวกับการที่ไวเทลโลจีนินในพลาสมาเป็นสารต้นตอของโปรตีนโยล์คในไข่ซึ่งนำไปสู่พัฒนาการเจริญของไข่และรังไข่ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลาชนิดต่าง ๆ หรือของกบ (Mommsen and Walsh, 1988)

4.6 ความสัมพันธ์ของพลาสมาเลคตินกับระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาและพัฒนาการเจริญของรังไข่

4.6.1 การวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมา

ในการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลากะรังโดยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส แล้วคำนวณหาปริมาณไวเทลโลจีนินจากกราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสของไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ที่ทราบปริมาณแน่นอน ในช่วง 2-10 ไมโครกรัม (รูปที่ 17B) จากความสูงของจรวดนำไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความสูง

ของจรวดกับปริมาณไวเทลโลจีนินที่ใช้ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (รูปที่ 17A) จากนั้นคำนวณปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาตัวอย่างได้จากความสูงของจรวดของพลาสมาตัวอย่างนั้น ๆ พบว่าการวัดปริมาณไวเทลโลจีนินโดยวิธีนี้สามารถวัดไวเทลโลจีนินได้ในระดับไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม

4.6.2 ความสัมพันธ์ของระดับเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมา

เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องของเลคตินในพลาสมากับพัฒนาการเจริญของรังไข่ต้องวัดระดับเลคตินในพลาสมาควบคู่ไปกับการติดตามพัฒนาการเจริญของรังไข่ซึ่งแสดงโดยค่าดรรชนีการสืบพันธุ์หรือ GSI ตลอดรอบปี ทั้งนี้เพราะปลากะรังมีฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ปีละครั้งในช่วงเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ของปีถัดไป และค่า GSI บ่งบอกถึงพัฒนาการเจริญของรังไข่ได้เป็นอย่างดี พัฒนาการเจริญของรังไข่เกิดน้อยในปลาที่มีค่า GSI ต่ำ ค่า GSI เพิ่มมากขึ้น แสดงถึงระยะการเจริญพันธุ์ของรังไข่มากขึ้น และปลาอยู่ในระยะเจริญพันธุ์เต็มที่เมื่อค่า GSI มีค่าสูงสุด ในทำนองเดียวกันพัฒนาการเจริญของรังไข่ของปลากะรังเกิดควบคู่ไปกับระยะพัฒนาการเจริญของไข่ กล่าวคือในช่วงที่ไข่ส่วนใหญ่ยังมีพัฒนาการเจริญต่ำ พัฒนาการเจริญของรังไข่ก็ต่ำด้วย เมื่อไข่มีการพัฒนามากขึ้นไปเป็นไข่แก่ พัฒนาการของรังไข่ก็จะเจริญเต็มที่ (เจนจิตต์ คงกำเนิด, 2538) เนื่องจากการหาค่า GSI ของปลากะรังเพศเมียซึ่งมีน้ำหนักตัวประมาณ 4 - 5 กิโลกรัม ตลอดรอบปีโดยวิธีเนื้อเยื่อวิทยาต้องมีการฆ่าแม่พันธุ์ปลาทุกเดือน เดือนละ 3 ตัว เป็นอย่างน้อย ทำให้สิ้นเปลืองแม่พันธุ์ปลาที่หาได้ยากและมีราคาแพงมาก ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ติดตามระดับปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของแม่พันธุ์ปลาตลอดรอบปีแทนค่า GSI ทั้งนี้เพราะในปลากะรังเพศเมียระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินจะแปรผันควบคู่ไปกับระยะพัฒนาการเจริญของรังไข่หรือค่า GSI กล่าวคือ เจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ได้ทำการศึกษาค่า GSI ของปลากะรังเพศเมียตลอดปีในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2537 พบค่านี้สูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป และมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม หลังช่วงนี้ปลาจะเริ่มวางไข่ผสมพันธุ์ ในขณะเดียวกันพบระยะพัฒนาการเจริญของไข่สอดคล้องกับค่า GSI กล่าวคือ ในช่วงเดือนที่มีค่า GSI ต่ำพบไข่อ่อนเป็นจำนวนมาก เมื่อค่า GSI เพิ่มมากขึ้นจนถึงค่าสูงสุดจะพบไข่เกือบทั้งหมดเป็นไข่สุก ในทำนองเดียวกัน ระดับไวเทลโลจี

นินในพลาสมาจะเพิ่มขึ้นช้า ๆ ควบคู่กับค่า GSI ที่สูงขึ้นหรือพัฒนาการของไข่ที่เจริญมากขึ้น พบระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นเวลาหนึ่งเดือนก่อนไข่สุกเต็มที่ และลดลงในช่วงไข่สุกเต็มที่กับหลังการวางไข่ (รูปที่ 18B) แบบแผนระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินกับระยะพัฒนาการเจริญของรังไข่เช่นนี้ พบได้เช่นกันในปลาแอทแลนติคแซลมอน (So, *et al.*, 1985) ที่พบระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นควบคู่กับค่า GSI ที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดก่อนปลาวางไข่หนึ่งเดือน จากนั้นปริมาณพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าลดลงช้า ๆ ก่อนการวางไข่ และลดลงอย่างรวดเร็วหลังการวางไข่ การศึกษาในปลา channel catfish (Pacoli, *et al.*, 1990; Cecily, *et al.*, 1980) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Copeland, *et al.*, 1986; Whitehead, *et al.*, 1983 Tyler, *et al.*, 1990; Riazi and fremont, 1988) ปลาคอด (*Gactus morhua*) (Kjesbu *et al.*, 1996) และในปลาแซลมอน (*Onchorynchus keta*) (Ureda et *al.*, 1984) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน จากผลงานเหล่านี้และระดับไวเทลโลจีนินที่เพิ่มสูงสุดก่อนช่วงไข่สุกในปลากะรัง สอดคล้องกับข้อสรุปของรายงานต่าง ๆ ที่ว่าไวเทลโลจีนินในเลือดเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนโยล์ค ระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในช่วงที่ไข่มีการสะสมโปรตีนโยล์ค เมื่อไข่สุกจึงพบระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินลดลง เพราะในช่วงไข่สุกไม่มีการสะสมโปรตีนโยล์คอีกต่อไป การสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินและหลั่งออกสู่กระแสเลือดจึงลดลง จากความสัมพันธ์ที่ได้นี้ ระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับบอกระยะพัฒนาการเจริญของรังไข่ได้เป็นอย่างดี

จากการหาปริมาณไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย 4 - 5 ตัว ทุกเดือนเริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2540 - พฤศจิกายน 2541 ด้วยวิธีร็อกเก็ตอิมมูโนอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยทำควบคู่ไปกับการวัดระดับแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมาของปลาตัวอย่างชุดเดียวกัน พบว่าในช่วงเดือนตุลาคม 2540 - กุมภาพันธ์ 2541 ซึ่งเป็นฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ของปลากะรัง ระดับแอคทิวิตีของเลคตินในพลาสมาเริ่มเพิ่มขึ้นจากเดือนตุลาคม 2540 และเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในเดือนธันวาคม 2540 หลังจากนั้นจะลดระดับลงในเดือนมกราคม 2541 จนมีค่าต่ำสุดและค่อนข้างคงที่ในเดือนมีนาคม - กันยายน 2541 จากนั้นเริ่มมีแบบแผนเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันอีกครั้งในเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2541 แบบแผนของ

ระดับเลคตินในพลาสมา จะสอดคล้องขนานไปกับระดับของไวเทลโลจีนินในพลาสมา (รูป 18A) กล่าวคือระดับไวเทลโลจีนินเริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม 2540 จนเพิ่มขึ้นสูงสุดในเดือนธันวาคม 2540 จากนั้นลดลงในเดือนมกราคม 2541 และมีระดับค่อนข้างคงที่ในเดือนมีนาคม - กันยายน 2541 จากนั้นจะเริ่มเพิ่มขึ้นอีกครั้งในเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2541 จากการเปรียบเทียบแบบแผนของระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินที่ได้จากงานวิทยานิพนธ์นี้ จะเป็นทำนองเดียวกับแบบแผนซึ่งรายงานโดยเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ซึ่งศึกษาในปลากะรังเพศเมีย 3 ตัว ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 - กุมภาพันธ์ 2537 (รูป 18 A) คือ ระดับของพลาสมาไวเทลโลจีนินมีค่าคงที่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - กันยายน หลังจากนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับตั้งแต่เดือนตุลาคม จนมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม และมีระดับลดลงในเดือนมกราคม ในขณะที่ค่า GSI มีค่าเปลี่ยนแปลงขนานไปกับแบบแผนของพลาสมาไวเทลโลจีนิน แสดงว่าปลาเริ่มมีพัฒนาการเจริญของรังไข่ในเดือนตุลาคม โดยรับและสะสมไวเทลโลจีนินจากกระแสเลือด ไปจนกระทั่งเป็นไข่สุก ซึ่งมีค่า GSI สูงสุดในเดือนมกราคมและเป็นช่วงที่ปลาวางไข่ ซึ่งเป็นหนึ่งเดือนหลังจากระดับไวเทลโลจีนินมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม จึงทำให้ระดับ GSI ลดลงในเดือนกุมภาพันธ์ (รูป 18B)

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับเลคตินในพลาสมาที่เพิ่มขึ้นควบคู่กับระดับไวเทลโลจีนิน และเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ปลากะรัง ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนในปลาต่าง ๆ ทั้งนี้มีรายงานกล่าวถึงเลคตินในไข่ปลาหลายชนิด แต่ก็ยังไม่มีรายงานที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างเลคตินในพลาสมา และเลคตินจากรังไข่ในสัตว์ชนิดเดียวกัน สำหรับในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ เพรียง (*Megabalanus rosa*) พบว่าเลคตินของเพรียงเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่โดยเลคตินมีระดับเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน และลดต่ำลงหลังจากเดือนมิถุนายนซึ่งเป็นหนึ่งเดือนก่อนไข่สุก ในขณะที่พัฒนาการเจริญของรังไข่จะเริ่มตั้งแต่ประมาณเดือนมีนาคม จนถึงช่วงไข่สุกในเดือนกรกฎาคม แต่บทบาทของเลคตินต่อพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่เพรียงก็ยังไม่เป็นที่ทราบชัด (Muramoto *et al.*, 1991) สำหรับในปลากะรัง ระดับของเลคตินในพลาสมาที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับระดับไวเทลโลจีนินและพัฒนาการเจริญของรังไข่ แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของเลคตินกับพัฒนาการเจริญของไข่/รังไข่ โดยเลคตินอาจ

เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในเลือด (Barondes, 1984) หรืออาจทำหน้าที่เป็นสารต้นตอของเลคตินในไข่ปลา เป็นที่น่าเสียดายที่งานวิทยานิพนธ์ที่ไม่สามารถทำการศึกษาความสัมพันธ์ของพลาสมาเลคตินกับไข่ปลากะรังได้ เพราะในช่วงปลายของงานวิทยานิพนธ์ซึ่งเป็นฤดูมรสุม (เดือนธันวาคม 2541) เกิดมรสุมทำให้กระชังเลี้ยงปลากะรัง ณ สถาบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นแหล่งอนุเคราะห์ปลาตัวอย่างที่สำคัญ เกิดการฉีกขาดเสียหาย ทำให้ปลากะรังทั้งหมดหนีหายลงทะเลไปหมดสิ้นจึงไม่มีปลาตัวอย่างในการศึกษาอีกต่อไป งานวิทยานิพนธ์นี้จึงไม่สามารถสรุปบทบาททางชีวภาพของเลคตินในพลาสมาปลากะรังได้อย่างแน่ชัด แม้จะมีผลการทดลองที่ชัดเจนของเลคตินในการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสตราไดออลหรือเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ก็ตาม

5. สรุป

ในการศึกษาเลคตินจากพลาสมาปลากะรัง ทำให้เลคตินบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. พลาสมาเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู หมูและของคนหมู่ 0 แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อื่น ๆ และของแพะเกาะกลุ่มได้

2. ไกลโคโปรตีนชนิดอะไซอะโลฟีทูอีนและฟีทูอีน ที่ความเข้มข้น 1.25 และ 5 มก/มล. ตามลำดับ และกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิคที่ความเข้มข้น 50 mM สามารถยับยั้งความสามารถของพลาสมาเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 50% ในขณะที่น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบไม่มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยพลาสมาเลคติน

3. พลาสมาเลคตินมีความเสถียรที่อุณหภูมิ -10°ซ นาน 10 เดือน แอคทิวิตีจำเพาะลดลงเหลือ 58% เมื่อเก็บไว้นาน 12 เดือน จึงควรใช้พลาสมาเลคตินซึ่งเก็บไว้ไม่เกิน 10 เดือน ในการศึกษาวิจัย

4. ควรใช้เม็ดเลือดแดงกระต่ายสดหรือที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ไม่เกิน 5 วัน ในการทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์โดยพลาสมาเลคติน เนื่องจากการเก็บไว้นานเกิน 5 วัน ความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์ของพลาสมาเลคตินลดลง

5. ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 แยกได้โปรตีนพีค S1 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.6 เท่าของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น โปรตีนพีค S1 นี้ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose หรือโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมซึ่งแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ที่มีค่าแอคทิวิตี 3.0-3.5% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.1-10.9 เท่าของพลาสมาเลคตินเริ่มต้น

6. เลคตินบริสุทธิ์จากพลาสมาปลากะรังปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล 851,100 ดัลตัน จากการหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-200 และปรากฏโปรตีน 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์

เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสทั้งที่มีและไม่มีเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 85,100 ดัลตัน บ่งชี้ว่าเลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วย 10 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละ 85,100 ดัลตัน ซึ่งไม่ได้ยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์

7. เลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เม็ดเลือดแดงของหนูและของหมู แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่และของแพะเกาะกลุ่มได้ เมื่อย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซินและนิวรามินิเดส จะทำให้แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้น 4 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ

8. ความสามารถของเลคตินบริสุทธิ์ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายถูกยับยั้งได้ 50% ด้วยกรดเอ็น-อะซิติล นิวรามินิค ที่ความเข้มข้น 50 mM, อะไซอะโลฟีทูอีน และฟีทูอีน ที่ความเข้มข้น 0.63 และ 5 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 mM รวมทั้งแอลฟา 1-แอซิด ไกลโคโปรตีน และมิวซินที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. ไม่มีผลยับยั้งแอคทิวิตีของเลคตินบริสุทธิ์

9. เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 50 $^{\circ}$ซ และมีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 7 - 9 รวมทั้งมีความสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่ pH 7.5-8

10. ไดวาเลนท์แคทไอออนได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} และ EDTA ที่ความเข้มข้น 200 mM รวมทั้งเบตา-เมอร์แคปโตเอธานอลที่ความเข้มข้น 90 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินบริสุทธิ์

11. จากการทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ของปลากะรังโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่าแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไวเทลโลจีนินบริสุทธิ์ พลาสมา สารละลายโปรตีนพีค D2 และสารละลายโปรตีนพีค S1 แต่ไม่ปรากฏแถบการตกตะกอนกับเลคตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose

12. แอคทิวิตีจำเพาะของพลาสมาเลคตินเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดปลากะรังด้วยฮอร์โมน 17 เบตา-เอสตราไดออล การฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีผลทำให้ระดับพลาสมาเลคตินเพิ่มขึ้น 1.2, 3.1 และ 3.8 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณก่อนการฉีดฮอร์โมน และการเพิ่มของพลาสมาเลคตินเกิดควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของ

ปริมาณโปรตีนในพลาสมาปลากะรัง ซึ่งสอดคล้องกับงานของเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) ที่พบว่าระดับโปรตีนและไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการฉีดฮอร์โมนเช่นกัน

13. แบบแผนของระดับเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาปลากะรังในรอบ 1 ปี หรือหนึ่งรอบของการสืบพันธุ์มีค่าเพิ่มขึ้นเป็นไปในทำนองเดียวกัน คือในช่วงฤดูวางไข่ผสมพันธุ์ทั้งระดับเลคตินและไวเทลโลจีนินเริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนตุลาคม จนมีค่าสูงสุดในเดือนธันวาคม 2540 เมื่อเทียบระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ จากรายงานของเจนจิตต์ คงกำเนิด (2538) พบว่าระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้นควบคู่กับพัฒนาการเจริญของรังไข่ ปลากะรังจะวางไข่หลังจากระดับพลาสมาไวเทลโลจีนินเพิ่มขึ้นสูงสุด 1 เดือน คือวางไข่ในเดือนมกราคมของปีถัดไป บ่งชี้ว่าระดับพลาสมาเลคตินที่เพิ่มขึ้นในทำนองเดียวกับการเพิ่มของระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมาอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญพันธุ์ของไข่ในปลากะรังเช่นเดียวกับไวเทลโลจีนิน

เอกสารอ้างอิง

เจนจิตต์ คงกำเนิด. 2538. พลาสมาไวเทลโลจีนินและการพัฒนารังไข่ของปลากะรัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพฑูรย์ อรรมยานนท์. 2536. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหรียง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์. 2537. ไวเทลโลจีนินของปลากะรัง : การแยกและคุณสมบัติ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และ ดุสิต ตันวิไล. 2530. ชนิดของปลากะรังที่พบในน่านน้ำไทยระหว่างปี 2524 - 2530 รายงานผลการประชุมทบทวนผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงปลากะรัง ณ. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ วันที่ 23 - 25 กุมภาพันธ์ 2530. หน้า 17 - 40.

อุบล ตันสม. 2541. การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของเลคตินจากเมล็ดจำปาดะ 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.

Ahmed, H., Pohl, J., Fink, N.E., Strobel, F. and Vasta, G.R. 1996. The primary structure and carbohydrate specificity of a β-galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 271 : 33083 - 33094.

Ainsworth, A.J. 1993. Carbohydrate and lectin interactions with *Edwardsiella ictaluri* and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), anterior kidney leucocytes and hepatocytes. J. Fish Dis. 16 : 449 - 459.

Al-Hassan, J.M., Thomson, M., Summers, B. and Criddle, R.S. 1986. Purification and properties of a hemagglutination factor from Arabian gulf catfish (*Arius thalassinus*) epidermal secretion. Comp. Biochem. Physiol. 85 : 31 - 39.

Armstrong, P.B., Swarnakar, S., Srimal, S., Misquith, S., Hahn, E.A., Aimes, R.T. and Quigley, J.P. 1996. A cytolytic function for a sialic acid-binding lectin that is a member of the pentraxin family of proteins. J. Biol. Chem. 271 : 14717 - 14721.

Ashwell, G. and Harford, J. 1982. Carbohydrate-specific receptors of the liver. Annu. Rev. Biochem. 51 : 531 - 554.

Aucouturier, P., Pineau, N., Brugier, J.C., Mihaesco, E., Duarte, F., Skvaril, F. and Preud' homme. J.L. 1989. Jacalin : a new laboratory tool in immunochemistry and cellular immunology. J. Clin. Lab. Anal. 3 : 244 - 251.

Babal, P., Pindak, F.F., Wells, D.J. and Gardner, W.A. 1994. Purification and characterization of a sialic acid-specific lectin from *Tritrichomonas mobilensis*. Biochem. J. 299 : 341 - 346.

Baenziger, J.U. and Maynard, Y. 1980. Human hepatic lectin. J. Biol. Chem. 255 : 4607 - 4613.

Balakhnin, I.A. and Savchenko, A.L. 1996. Influence of selection, domestication, and rearing conditions on the anti-B lectin level in the oocytes of cultured fish. J. Ichthyol. Vopr. Ikhtiol. 36 : 277 - 279

Barnum, S.R. and brown, G.G. 1983. Effect of lectin and sugars on primary sperm attachment in horseshoe crab *Limulus polyphemus*. Dev. Biol. 95 : 352 - 359.

Barondes, S.H. 1984. Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. Science 223 : 1259 - 1264.

Barondes, S.H. 1986. Vertebrate lectin : Properties and functions. In The Lectins. (Liener, I.E., *et al.*, eds.), pp 437 - 466, Academic Press Inc, New York.

Barondes, S.H., Cooper, D.N.W., Gill, M.A. and Leffer, H. 1994. Galectins. J. Biol. Chem. 269 : 20807 - 20810.

Becker, J.W., Reeke, G.N.Jr., 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, G.N., Wang, J.L., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M. 1975. The covalent and three-dimentional structure of concanavalin A. III Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. J. Biol. Chem. 250 : 1513 - 1524.

Bezouska,K., Vlahas, G., Horvath, O., Jinochova, G., Fiserova, A., Giorda, R.,Chambers, W.H., Feizi, T. and Pospisil, M. 1994. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. J. Biol. Chem. 269 : 16945 - 16952.

Bildfell, R.J., Markham R.J.F. and Johnson G.R. 1992. Purification and partial characterization of a rainbow trout egg lectin. J. Aquat. Anim. Health 4 : 97 -105.

Bonavida, B. and Katz, J. 1985. Studies on the induction and expression of T-cell mediated immunity XV. Role of non-MHC papain-sensitive target structures and Lyt-2 antigens in allogeneic and xenogeneic lectin-dependent cellular cytotoxicity (LDCC). J. Immunol. 135 : 1616 - 1623.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248 - 254.

Brossmer, R., Wagner, M. and Fischer, E. 1992. Specificity of the sialic acid-binding lectin from the snail *Cepaea hortensis*. J. Biol. Chem. 267 : 8752 -8756.

Campbell, P.M. and Idler, D.R. 1980. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fraction. Biol. Reprod. 22 : 605 - 617.

Carpenter, B.G., Roger, D.J., Gibbs, R., Carabot, C.A., Andrade, E. and Mediana, G. 1990. A novel lectin from the green alga *Halimeda opuntia*. Phycol. J. 25 : 85.

Cassels, F.J., Odom, E.W. and Vasta, G.R. 1994. Blue crab (*Callinectes sapidus*) lectins recognize selected serotypes of its facultative pathogen, *Vibrio parahaemolyticus*. The Third International Marine Biotechnology Conference Program, pp 55, Tromsoe University, Tomsoe Norway.

Cecily, Q.P., Grizzle, J.M. and Bradley, J.T. 1980. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 90 : 353 - 367.

Cerra, R.F., Gitt, M.A. and Barondes, S.H. 1985. Three soluble rat β-galactoside-binding lectins. J. Biol. Chem. 260 : 10474 - 10477.

Chan, S.L., Tan, C.H., Pang, M.K. and Lam, T.J. 1991. Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis nilotica*). J. Exp. Zool. 257 : 96 - 109.

Chattopadhyay, T., Guha, A.K. and Chatterjee, B.P. 1996. Novel antimicrobial activity of scyllin, a haemolymph lectin of the edible crab *Scylla serrata*. Biomed. Lett. 53 : 29 - 40.

Chiu, M.L., Parry, D.A.D., Feldman, S.R., Klapper, D.G. and O' Keefe, E.J. 1994. An adherens junction protein is a member of the family of lactose-binding lectins. J. Biol. Chem. 269 : 31770 - 31776.

Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, T.K. and Croft, M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) at various stages of the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. 83 : 487 - 493.

Craik, J.C.A., 1978. The effect of oestrogen treatment on certain plasma constituents associated with vitellogenesis in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula* L. Gen. Comp. Endrocrinol. 35 : 445 - 454.

Craik, J.C.A. and Harvey, S.M. 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. J. Fish Biol. 24 : 599 - 610.

Crenshaw, R.W., Harper, S.N., Moyer, M. and Privalle, L.S. 1995. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a lectin gene from *Agaricus bisporus*. Plant Physiol. 107 : 1465 - 1466.

Dam, T.K., Sarkar, M., Ghosal, J. and Choudhury, A. 1992. A novel galactosyl-binding lectin from the plasma of the blood clam, *Anadara granosa* (L.) and a study of its combinding site. Mol. Cell. Biochem. 117 : 1 - 9.

Dash, K., Saha, K., Sahu, A. and Gangal, S.V. 1993. Natural serum hemagglutinins (lectins) in fish: Physicochemical characterization. Fish Shellfish Immunol. 3 : 345 - 360.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 : 404 - 427.

Devaraj, H., Kumar, D.S., Thanislass, J. and Niranjali, S. 1995. Isolation and characterization of high molecular weight glycoproteins from embryonated eggs of *Emerita asiatica*. Comp. Biochem. Physiol. 110 : 175 - 181.

de Vlaming, V.L., Wiley, H.S., Delahunty, G. and Wallace, R.A. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. Comp. Biochem. Physiol. 67 : 613 - 628.

Elola, M.T. and Fink, N.E. 1996. Purification and partial biochemical characterization of an S-type lectin from blastula embryos of *Bufo arenarum*. Comp. Biochem. Physiol. 115 : 175 - 182.

Etzler, M.E. 1985. Plant lectins : molecular and biological aspect. Ann. Rev. Plant Physiol. 36 : 209 - 234.

Fabregas, J., Munoz, A., Liova, J. and Carracedo, A. 1988. Purification and partial characterization of tomentine an N-acetyl glucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 124 : 21 - 30.

Fostier, A., Jalabert, B., Billard, T., Breton, B. and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. In Fish Physiology (Hoar, W.S., *et al.*, eds.), Vol IX. pp 277 - 372, Academic Press Inc, New York.

Fragkiadakis, G.A. and Stratakis, E.K. 1995. Characterization of hemolymph lectins in the prawn *Parapenaeus longirostris*. J. Invert. Pathol. 65 : 111- 117.

Fragkiadakis, G.A. and Stratakis, E.K. 1997. The lectin from the crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids. Comp. Biochem. Physiol. 117 : 545 - 552.

Gercken, J. and Renwrantz, L. 1994. A new mannan-binding lectin from the serum of the eel (*Anguilla anguilla* L.): isolation, characterization and comparison with the fucose-specific serum lectin. Comp. Biochem. Physiol. 108 : 449 - 461.

Goldstein, I.J., Huges, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. Nature 285 : 66.

Goto-Nance, R., Muramoto, K., Zenpo, Y. and Kamiya, H. 1996. Purification and characterization of the lectins of the solf coral *Lobophytum variatum*. Fish Sci. 62 : 297 - 301.

Hadari, Y.R., Paz, K., Dekel, R., Mestrovic, T., Accili, D. and Zick, Y. 1995. Galectin-8. J. Biol. Chem. 270 : 3447 - 3453.

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.

Hatakeyama, T., Nagatomo, H. and Yamasaki, N. 1995. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 270 : 3560 - 3564.

Hedrick, R.P., Marin, M., Castagnaro, M., Monge, D. and Kinkelin, P.D. 1992. Rapid lectin-based staining procedure for the detection of the myxosporean causing proliferative kidney disease in salmonid fish. Dis. Aquat. Org. 13 : 129 - 132.

Herman, R.L. and Kincaid, H.L. 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. Aquaculture 72 : 165 - 172.

Hernandez, E., Ortiz, R., Lopez, F., Masso, F., Montana, L.F., Martinage, A. and Zenteno, E. 1993. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from *Psilocybe barrerae*. Phytochemistry 32 : 1209 - 1211.

Hiramatsu, N., Shimizu, M., Fukada, H., Kitamura, M., Ura, K., Fuda, H. and Hara, A. 1997. Transition of serum vitellogenin cycle in Sakhalin taimen *(Hucho perryi)*. Comp. Biochem. Physiol. 118 : 149 - 157.

Ho, S.C., Schindler, M. and Wang, J.I. 1990. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Cell Biol. 111 : 1639 - 1649.

Hoar, W.S. 1969. Reproduction. In Fish Physiology, (Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds.), vol III, pp 1 - 72, Academic Press Inc, New York.

Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B. and Jensenius, J.C. 1994. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. Immunol. Today 15 : 67 - 74.

Hosono, M., Kawauchi, H., Nitta, K., Takayanagi, Y., Shiokawa, H., Mineki, R. and Murayama, K. 1993. Purification and characterization of *Silurus asotus* (catfish) roe lectin. Biol. Pharm. Bull. 16 : 1 - 5.

Idler, D.R. and Campbell, C.M. 1980. Gonadotrophin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 41 : 384 - 391.

Imai, T., Goto, R., Kittaka, J., Kamiya, H., Booth, J.D., Phillips, B.F., Cobb, J.S. Quackenbush, L.S., Kanazawa, A., Collin, R., Bannister, A., Addison, J.T. and Breen, P.A. 1994. Lectins in the rock lobster *Jasus novaehollandiae* hemolymph. Crustaceana 66 : 121 - 126.

Inbar, J. and Chet, I. 1994. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* : purification, characterization and role in mycoparasitism. Microbiology 140 : 651 - 657.

Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. J. Fish Biol. 16 : 23 - 50.

Ingram, G.A. 1985. Lectin and lectin-like molecule in lower plant. 1. Marine algae. Dev. Comp. Immunol. 9 : 1 - 10.

Irazoqui, F.I., Zalazar, F.E., Chiabrando, G.A., Romero, O. and Vides, M.A. 1992. Differential reactivity of *Agaricus bisporus* lectin with human IgA subclasses in gel precipitation. J. Immunol. Methods 159 : 199 - 204.

Ivey, S., Thornhill, W.B. and Levinson, S.R. 1993. Detection of 180 kDa proteins in electroplax sodium channel preparations. Comp. Biochem. Physiol. 106 : 551 - 556.

Jensen, L.E., Thiel, S., Petersen, T.E. and Jensenius, J.C. 1997. A rainbow trout lectin with multimeric structure. Comp. Biochem. Physiol. 116 : 385 - 390.

Jeune, K.H., Park, C.S., Lee, Y.C., Song, Y.H. and Chung, S.R. 1995. Cancer cell agglutination and biophysicochemical properties of the lectins from *Asterina pectinifera*. Abstracts From The International Congress On Natural Products Research Held In Halifax (Chandler, R.F., Jurgens, T.M. and Jurgens, A.R. eds.) , July 31 - August 4 1994, pp. 229, Nova Scotia.

Kamiya, H. , Muramoto, K. and Goto, R. 1990. Purification and characterization of a lectin from marine sponge *Halichondria panicea*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 56 : 1159.

Kamiya, H. , Muramoto, K. Goto, R., Sakai, M. and Ida, H. 1990. Properties of a lectin in chum salmon ova. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 56 : 1139 - 1144.

Kamiya, H. and Shimizu, Y. 1980. Marine biopolymers with cell specificity II. Biochim. Biophys. Acta 622 : 171.

Kanoh, H., Kitamura, T. and Kobayashi, Y. 1992. A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. Comp. Biochem. Physiol. 102 : 445 -449.

Kawagishi, H., Yanawaki, M., Isobe, S., Usui, T., Kimura, A. and Chiba, S. 1994. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*. An N-acetyl-sugar-specific lectin (HOL-I) and an N-acetyllactosamine-specific lectin (HOL-II). J. Biol. Chem. 269 : 1375 - 1379.

Kawasaki, T. and Ashwell, G. 1976. Chemical and physical properties of an hepatic membrane protein that specifically binds asialoglycoproteins. J. Biol. Chem. 251 : 1296 - 1302.

Kelly, C. 1984. Physiochemical properties and N-terminal sequence of eel lectin. Biochem. J. 220 : 221 - 226.

Kelly, K.L., Cooper, E.L. and Raftos, D.A. 1992. Purification and characterization of a humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. Comp. Biochem. Physiol. 103 : 749 - 753.

Kilpatrick, D.C. and Yeoman, M.M. 1978. Purification of the lectin from *Dutura stramonium*. Biochem. J. 175 : 1151 - 1153.

Kim, G.H., Lee, T.K. and Fritz, L. 1996. Cell-cell recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion sparsum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). Plant Cell Physiol. 37 : 621 - 628.

Kjesbu, O.S., Kryvi, H. and Norberg, B. 1996. Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. J. Fish Biol. 49 : 1197 - 1215.

Kljajic, Z., Schroeder, H.C., Rottmann, M., Cuperlovic., Movsesian, M., Uhlenbruck, G., Gasic, M., Zahn, R.K. and Mueller, W.E.G. 1987. A D-mannose specific lectin from *Gerardia savaglia* that inhibit nucleocytoplasmic transport of mRNA. Eur. J. Biochem. 169 : 97 - 104.

Kocourek, J. 1986. Historical background. In The Lectin. (Liener, I.E., *et al.*, eds.), pp 2 - 32, Academic Press Inc., New York.

Kocourek, J. and Horejsi, V. 1981. Defining a lectin. Nature 290 : 188.

Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S. 1980. Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. J. Biol. Chem. 255 : 2919 - 2924.

Komatsu, M., Matsumoto, W. and Hayashi, S. 1996. Protease activity appeared often trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*. Comp. Biochem. Physiol. 113 : 561 - 571.

Konska, G., Guillot, J., Dusser, M., Damez, M. and Botton, B. 1994. Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. J. Biochem. Tokyo 116 : 519 - 523.

Krajhanzl, A., Horejsi, V. and Kocourek, J. 1978. Studies on lectins 41. Isolation and characterization of a blood group B specific lectin from the roe of the powan (*Coregonus lavaretus* maraena). Biochim. Biophy. Acta 532 : 209 - 214.

Krajhanzl, A., Horejsi, V. and Kocourek, J. 1986. Studies on lectins 42. Isolation, partial characterization and comparison of lectins from the roe of five fish species. Biochim. Biophys. Acta 532 : 215 - 224.

Krajhanzl, A. and Kocourek, J. 1986. Fish cortical vesicle lectins - a new group of carbohydrate binding proteins: a review. In Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Vol 5. (Bog-Hansen, T.C., *et al.*, eds.), pp 257 - 275, Walter de Gruyter, Berlin.

Kunda, M., Basu, J. and Chakrabarti, P. 1989. Purification and characterization of an extracellular lectin from *Mycobacterium smegmatis*. FEBS. Lett. 256 : 207 - 210.

Kunda, M., Basu, J., Ghosh, A. and Ghakrabati, P. 1988. Chemical modification studies on a lectin from *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast). Biochem.J. 244 : 579 - 584.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage-T. Nature 227 : 680 - 685.

Levi, G. and Teichberg, V.I. 1981. Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a β-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. J. Biol. Chem. 256 : 5735 - 5740.

Licastro, F., Barbieri, L., Krajhanzi, A., kocourek, J. and Stripe, F. 1991. A cortical lectin from the oocytes of *Rutilus rutilus* stimulates mitogenic activity and release of soluble factors from human lymphocyte cultures and inhibits protein synthesis in a cell-free system. Int. J. Biochem. 23 : 101 - 105.

Lis, H. and Sharon, N. 1986. Biological properties of lectins. In The Lectin. (Liener, I.E., *et al.*, eds.), pp 265 - 291, Academic Press Inc, New York

Loveless, R.W., Holmskov, U. and Feizi, T. 1995. Collectin-43 is a serum lectin with a distinct pattern of carbohydrate recognition. Immunology 85 : 651 - 659.

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.

Mandal, D.K., and Brewer, C.F. 1992. Cross-linking activity of the 14- kilodalton β-galactoside specific vertebrate lectin with asialofetuin: comparison with several galactose-specific plant lectins. Biochemistry 31 : 8465 - 8472.

Manihar, S.R. and Das, H.R. 1990. Isolation and characterization of new lectin from plasma of fish *Channa punctatus*. Biochim. Biophys. Acta 1036 : 162 - 165.

Marchalonis, J.J. and Edelman, G.M. 1968. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. J. Mol. Biol. 32 : 453 - 465.

Martin, G.G., Poole, D., Poole, Ch., Hose, J.E., Arias, M., Reynols, L., McKerell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaid shrimp *Sicyonia ingentis*. J. Invert. Pathol. 62 : 1 - 8.

Mateo, M.M., Adams, A., Richards, R.H., Castagnaro, M. and Hedrick, R.P. 1993. Monoclonal antibody and lectin probes recognize developmental and sporogonic stages of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease in European and North American salmonid fish. Dis. Aquat. Org. 15 : 23 - 29.

Mateo, M.M., Bovo, G., Comuzzi, M. and Adams, A. 1997. Lectin histochemical studies on *Sphaerospora* sp. (Myxosporea) from Italian brown trout, *Salmo trutta* L. J. Fish Dis. 20 : 51 - 58.

Mateo, M.M., McGeorge, J., Morris, D. and Kent, M.L. 1996. Comparative studies of PKX and *Sphaerospora* spp. from salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques. J. Fish Dis. 19 : 55 - 63.

Matsushita, M. 1996. The lectin pathway of the complement system. Microbiol. Immunol. 40 : 887 - 893.

Maynard, Y. and Baenziger, J.U. 1982. Characterization of a mannose and N-acetylglucosamine-specific lectin present in rat hepatocytes. J. Biol. Chem 257 : 3788 - 3794.

Mercy, S.P.D. and Ravindranath, M.H. 1994. Hemolysis and clearance of erythrocytes in *Scylla serrata* are related to the agglutination by the native sialic acid-specific lectin. Comp. Biochem. Physiol. 109 : 1075 - 1083.

Mock, A. and Renwrantz, L. 1991. Isolation and characterization of a lectin from the Cephalochordate *Branchiostoma lanceolatum* (pallas). Comp. Biochem. Physiol. 99 : 699 - 707.

Mommsen, T.P. and Walsh, P.T. 1988. Vitellogenin and oocyte assembly. In Fish Physiology. (Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds.), vol. XI, part A. pp 348 - 406. Academic Press Inc., New york.

Muller, W.E.G., Zahn, R.K., Kurelec, B., Lucu, C. Muller, I. and Uhlenbruck, G. 1981. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. J. Bacteriol. 145 : 548 - 558.

Muramoto,K., Kado, R., Takei, Y. and Kamiya, H. 1991. Seasonal changes in the multiple lectin compositions of the Acorn barnacle *Megabalanus rosa* as related to ovarian development. Comp. Biochem. Physiol. 98 : 603 - 607.

Muramoto,K. and Kamiya, H. 1992. The amino acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. Biochim. Biophys. Acta 1116 : 129 - 136.

Nagata, Y., Fukumori, F., Sakai, H., Hagiwara, T., Hiratsuka, Y., Kochibe, N. and Kobata, A. 1991. Crystallization and characterization of a lectin obtained from a mushroom *Aleuria aurantia*. Biochim. Biophys. Acta 1076 : 187 - 190.

Nosek, J. 1984. Biogenesis of the cortical granules in fish oocyte. Histochem. J. 16 : 435 - 437.

Nosek, J., Krajhanzl, A. and Kocourek, J. 1983. Studies on lectins 57. Immunofluorescence localization of lectins present in fish ovaries. Histochemistry 79 : 131 - 139.

Nowak, T.P. and Barondes, S.H. 1975. Agglutinin from *Limulus polyphymus*. Purification with formalinized horse erythrocytes as the affinity adsorbent. Biochim. Biophys. Acta 393 : 115 - 123.

Okino, N., Kawabata, S.I., Saito, T., Hirata, M., Takagi, T. and Iwanaga, S. 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning of a 27 - kDa lectin (L10) from horseshoe crab hemocytes. J. Biol. Chem. 270 : 31008 - 31015.

Olin, T. and Vonder decken, A. 1989. Vitellogenin synthesis in Atlantic salmon (*Salmo solar*) at different acclimation temperatures. Aquaculture 79 : 397 - 402.

Oppenheim, J.J and Rosenstreich, D.L., eds. 1976. Mitogens in Immunobiology. Academic Press, New York.

Osuga, D.T. and Feeney, R.E. 1978. Antifreeze glycoproteins from Arctic fish. J. Biol. Chem. 251 : 5338 - 5343.

Ouchterlony, O. 1956. Antigen-antibody reactions in gel. V type of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta Path. Microbial. Scand. 32 : 231 - 240.

Ozaki, H., Ohwaki, M. and Fukada, T. 1983. Studies on lectins of amago (*Oncorhyncus rhodurus*) 1. Amago ova lectin and its receptor on homologous macrophages. Dev. Comp. Immunol. 7 : 77 - 87.

Ozeki, Y., Matsui, T., Nittra, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y. and Titani, K. 1991. Purification and characterization of β-galactoside binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178 : 407 - 413.

Pacoli, C.Q., Grizzle, J.M. and Bradley, J.T. 1990. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 90 : 353 - 567.

Parker, W.F. and Martz, E. 1980. Lectin induced nonlethal adhesions between cytolytic T-lymphocytes and antigenically unrecognizable tumors cells and nonspecific triggering of cytolysis. J. Immunol. 124 : 25 - 35.

Peterson, A.J. and Common, T.H. 1972. Estrone and estradiol concentrations in peripheral plasma laying hens as determined by radioimmunoassay. Can. J. Zool. 50 : 395 - 404.

Plack, P.A., Pritchard, D.J. and Fraser, N.W. 1971. Egg proteins in cod serum. Biochem. J. 121 : 847 - 856.

Polgur, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C. and Clemeston, K.J. 1997. Platlet activation and signal transduction by Convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. J. Biol. Chem. 272 : 13576 - 13583.

Pusztai, A. 1991. Plant lectins. Cambridge University Press, New York.

Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodin, a new sialic acid specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97 : 515 - 520.

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. 102 : 855 - 859.

Reading, P.C., Morey, L.S., Crouch, E.C. and Anders, E.M. 1997. Collectin-mediated antiviral host defense of the lung: evidence rom Influenza virus infection of mice. J. Virol. 71 : 8204 - 8212.

Renkonen, K.O. 1948. Isolation and characterization of a lectin from winged bean (*Lotus tetragonolobus*). Ann. Med. Exp. Fenn. 26 : 66.

Renwrantz, L. and Stahmer, A. 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J. Comp. Physiol. 149 : 535 - 546.

Riazi, A. and Fremont, L. 1988. Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri* (Rich). Comp. Biochem. Physiol. 89 : 525 - 529.

Roberson, M.M. and Barondes, S.H. 1982. Lectin from embryos and oocytes of *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 257 : 7520 - 7524.

Roberson, M.M., Wolffe, A.P., Tata, J.R. and Barondes, S.H. 1985. Galactoside-binding serum lectin of *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 260 : 11027 -11032.

Roche, A.C. and Monsigny, M. 1974. Purification and properties of limulin: a lectin (agglutinin) from hemolymph of *Limulus polyphemus*. Biochim. Biophys. Acta 371 : 242 - 254.

Roubal, W.T., Lomax, D.P., Willis, M.L. and Johnson, L.L. 1997. Purification and characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. Comp. Biochem. Physiol. 118 : 613 -622.

Saito, T., Hatada, M., Iwanaga, S. and Kawabata, S.I. 1997. A newly identified horse-shoe crab lectin with binding specificity to O-antigen of bacterial lipopolysaccharides. 272 : 30703 - 30708.

Saito, T., Kawabata, S., Hirata, M. and Iwanaga, S. 1995. A novel type of limulus lectin - L6. J. Biol. Chem. 270 : 14493 - 14499.

Sakakibara, F., Kawauchi, H. and Takayanagi, G. 1985. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayu fish) eggs. Biochim. Biophy. Acta 841 : 103 - 111.

Santos, D.O.R., Dias, B.M., Thomaz, S.M.O., Beltramini, L.M. and Roque, B.M.C. 1994. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. J. Immunol. 153 : 1798 - 1807.

Schluter, S.F. and Ey, P.L. 1989. Purification of three lectins from the hemolymph of the ascidian *Botrylloides leachii*. Comp. Biochem. Physiol. 93 : 145 - 155.

Scocco, P., Ceccarelli, P. and Menghi, G. 1996. Glycohistochemistry of the *Tilapia* spp. stomach. J. Fish Biol. 49 : 584 - 593.

Shankar, C.S. and Umesh-Kumar, S. 1994. A surface lectin associated with flocculation in brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 140 : 1097 - 1101.

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. 1989. Lectins as cell recognition molecules. Science 246 : 227 - 246.

Sharon, N. and Lis, H. 1995. Lectins- proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. Essays in Biochemistry. 30 : 59 - 75.

Shinozuka, T., Takei, S., Yanagida, H. and Ohkuma, S. 1988. Binding of lectin to "young" and "old" human erythrocytes. Blut. 57 : 117 - 123.

Shiomi, K., Uematsu, H., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1989. Purification and characterization of a galactose-binding lectin from the skin mucus of the conger eel *conger myriaster*. Comp. Biochem. Physiol. 92 : 255 - 261.

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

So, Y.P., Idler, D.R. and Hwang, S.J. 1985. Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*salmo salar* Ouananiche) : Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. Comp. Biochem. Physiol. 81 : 63 - 71.

Springer, G.F. and Desai, P.R. 1971. Monosaccharides as specific precipitinogens of eel anti-human blood-group H(O) antibody. Biochemistry 10 : 3749 - 3761.

Stratford, M. and Carter, A.T. 1993. Yeast flocculation: lectin synthesis and activation. Yeast. 9 : 371 - 378.

Straver, M.H., Traas, V.M., Smit, G. and Kijne, J.W. 1994. Isolation and partial purification of mannose-specific agglutinin from brewer's yeast involved in flocculation. Yeast. 10 : 1183 - 1193.

Sumpter, J.P. 1985. The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *salmo gairdneri*. In Current Trends in Comparative Endocrinology (Lofts, B., *et al.*, eds.), Vol. 1, pp. 355 - 357. Hong Kong University Press, Hong Kong.

Suzuki, Y. 1985. Hemolysin and hemagglutinin in skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. Nippon Suisan Gak. 51 : 2083.

Suzuki, T. and Mori, K 1989. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Comp. Biochem. Physiol. 92 : 455 - 462.

Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K. and Nakauchi, M. 1990. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. J. Biol. Chem. 265 : 1274 - 1281.

Tanabe, H., Kamishima, H. and Kobayashi, Y. 1993. Inhibitory effect of red alga lectin and skipjack fat on the growth of the red tide plankton *Chattonella antiqua*. J. Ferment. Bioeng. 75 : 387 - 388.

Teria, I., Kobayashi, K., Matsushita, M. and Fujita, T. 1997. Human serum mannose-binding lectin (MBL)- assosiated serine protease -1 (MASP -1) determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. Clin. Exp. Immonol. 110 : 317 - 323.

Theopold, U., Samakovlis, C., Erdjument-Bromage, E., Dillon, N., Axelsson, B., Schmidt, O., Tempst, P. and Hultmark, D. 1996. *Helix pomatia* lectin, an inducer of *Drosophila* immune response, binds to hemomucin, a novel surface mucin. J. Biol. Chem. 271 : 12708 - 12715.

Toms, G.C. and Western, A. 1971. Phytohemagglutinins. In Chymotaxonomy of the leguminosae. (Harborane, J.B., *et al.*, eds.),pp 367 - 462, Academic Press, London.

Tripp, M.R. 1966. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. J. Invert. Path. 8 : 478 - 484.

Tsuboi, I., Matsukawa, M. and Sato, N. 1993. Isolation and chracterization of a sialic acid-specific lectin from the hemolymph of Southeast Asian horseshoe crab, *Tachypleus gigas*. Biosci. Biotech. Biochem. 57 :1237 - 1242.

Tsuboi, I., Matsukawa, M., Sato, N. and Kimura, S. 1993b. Isolation and chracterization of a sialic acid-specific binding lectin from the hemolymph of Asian horseshoe crab, *Tachyplèus tridentatus*. Biochim. Biophys. Acta 1156 : 255 - 262.

Tsuboi, I., Yanagi, K., Matsukawa, M., Kubota, H. and Yamakawa, T. 1996. Isolation of a novel lectin from the hemolymph of horseshoe crabs *Limulus polyphemus* and its hemagglutinating properties. Comp. Biochem. Physiol. 113 : 137 - 142.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P. and Bromage, N.R. 1990. An in vitro culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of rainbow trout., *Salmo gairdneri*. J. Ext. Zool. 255 : 216 - 231.

Ureda, H., Hiroro, O., Hara, A., Yamauchi, K. and Nagahama, Y. 1984. Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp. Endocrinol. 53 : 203 - 211.

Utarabhand, P. and Akkayanont, P. 1995. Purification of a lectin from *Parkia javanica* bean. Phytochemistry 38 : 281 - 285.

Utarabhand, P. and Bunlipatanon, P. 1996. Plasma vitellogenin of grouper *(Epinephelus malabaricus)*: isolation and properties. Comp. Biochem. Physiol. 115 : 101 - 110.

Van Boheman, C.G., Lambert, J.G.D. and Peutz, J. 1981. Annual cycles in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 44 : 94 - 107.

Van Weerd, J.H., Bongers, A.B.J., Van donk, M., Oosterbosch, H.P.M.C., Schulz, R. and Richter, C.J.J. 1991. Male-induced shifts in pattern of vitellogenesis during puberty and recrudescence of female African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture 94 : 99 - 120.

Vasta, G.R., Sullivan, J.T., Cheng, T.C., Marchalonis, J.J. and Warr G.W. 1982. A cell membrane associated lectin of the oyster hemocyte. J. Invert. Path. 40 : 367 - 377.

Vazquez, L., Jaramillo, L., Lascurain, R., Cooper, E.L.,Rosas, P. and Zenteno, E. 1996. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 113 : 355 - 359.

Vazquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montano, L.F. and Zenteno, E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea, decapoda) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 105 : 617 - 623.

Voss, E.W., Fryer, J.L. and Banowetz, G.M. 1978. Isolation, purification, and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. Arch. Biochem. Biophys. 186 : 25 - 34.

Wallace, R.A. 1965. Resolution and isolation of avian and amphibian yolk granule protein using TEAE-Cellulose. Anal. Biochem. 11 : 297 - 311.

Wallace, R.A. 1978. Oocyte growth in non-mammalian vertebrate. In The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution (Jones. R.E., ed.), pp. 469 - 502, Plenum, New York.

Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T. and Jared, D.W. 1972. Studies on amphibian yolk. The relative roles of autosynthetic and heterosynthetic processes during yolk protein assembly by isolated oocytes. Dev. Biol. 29 : 255 - 272.

Wangh, L.J. 1982. Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus laevis* vitellogenin, serum albumin and fibrinogen. Dev. Biol. 89 : 294 - 298.

Warden, B.A. and Giese, R.W. 1984. Soluble antigen antibody affinity chromatography techniques investigated with ultratrace ^{125}I-thyroxin. J. Chrom. 314 : 295 - 302.

Watkins, W.M. and Morgan, W.T.J. 1952. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. Nature 169 : 825 - 826.

Weir, D.M. 1980. Surface carbohydrates and lectins in cellular recognition. Immunol. Today (August) : 45 - 51.

Whitehead, C., Bromage, N.R. and Breton, B. 1983. Changes in serum levels of gonadotropin, oestradiol 17β and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. Aquaculture 34 : 317 - 325.

Whitehurst, C.E., Day, N.K., Gengozian, N. 1994. A method of purity feline T lymphocytes from peripheral blood using the plant lectin from *Pisum sativum*. J. Immunol. Methods 175 : 189 - 199.

Woynarowska, B., Skrincosky, D.M., Haag, A., Sharma, M., Matta, K. and Bernacki, R.J 1994. Inhibition of lectin-mediated ovarian tumor cell adhesion by sugar analog. J. Biol. Chem. 269 : 22797 - 22803.

Xin, J., Azumi, k., Sasaki, M. and Nonaka, M. 1997. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannose binding protein-associated serine protease from a urochrodate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. Proc. Natl. Acd. Sci. USA. 94 : 6340 - 6345.

Yagi, F., Sawada, R., Imada, T., Toyonaga, S., Tadera, K. and Ishihata, K. 1994. Two isolectins from leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Plant Cell Physiol. 35 : 1087 - 1095.

Yang, T. and Yoshino, T.P. 1990a. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea* I. Electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components. Dev. Comp. Immunol. 14 : 385 - 395.

Yang, T. and Yoshino, T.P. 1990b. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea* II. Isolation and characterization of a plasma opsonin with hemagglutinating activity. Dev. Comp. Immunol. 14 : 397 - 404.

Yano, I. 1987. Effect of 17α -hydroxy progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture 61 : 49 - 57.

Yousif, A.N., Albright, L.J. and Evelyn, T.P.T. 1994. Purification and characterization of a galactose specific lectin from the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with bacterial fish pathogens. Dis. Aquat. Org. 20 : 127 - 136.

Yousif, A.N., Albright, L.J. and Evelyn, T.P.T. 1995. Interaction of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* egg lectin with the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org. 21 : 193 - 199.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอุไรวรรณ ไพชำนาญ	
วัน เดือน ปีเกิด	5 ตุลาคม 2516	
วุฒิการศึกษา		
<u>วุฒิ</u>	<u>ชื่อสถาบัน</u>	<u>ปีที่สำเร็จการศึกษา</u>
วท.บ.	ม. สงขลานครินทร์ (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	2538