



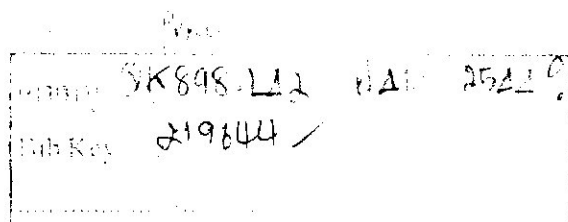
การประยุกต์ใช้เบื้องต้นของเลคตินจากเมล็ดจำปาตะ  
Preliminary Application of Lectin from Champaada  
(*Artocarpus integer*) Seeds

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทาร์พันธุ์  
นางสาวอุบล ต้นสม

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์  
ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์  
ประจำปี 2542



## บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับคาร์โบไฮเดรต พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เลคตินมีสมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากมีแหล่งจับอย่างน้อย 2 แห่ง จึงสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มและ/หรือตกตะกอนสารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้ เลคตินในพืชได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย

ในการศึกษานี้ได้สกัดเลคตินจากเมล็ดจำปาตะโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% และแยกสารสกัดเลคตินด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ตามด้วยคอลัมน์ N-Acetyl galactosamine-agarose ซึ่งแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ 2 แฉก ในโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบมีเอสดีเอส โดยโปรตีนแฉกเข้มน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดัลตัน และโปรตีนแฉกที่จางกว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน จึงคาดว่าเลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ 1 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดัลตัน และอีก 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดเท่ากัน คือ หน่วยย่อยละ 14,000 ดัลตัน เลคตินบริสุทธิ์ประกอบด้วยกลูโคส 27 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และ แมนโนส 23.4 ไมโครกรัม/มก.โปรตีน และมีกรดอะมิโนไกลซีน แอสปาร์เตทและกลูตาเมทเป็นจำนวนมาก ในขณะที่มีทริปโตเฟนและเมไทโอนีนเป็นจำนวนน้อย มีซิสเตอีนน้อยที่สุดเพียง 0.1% ของกรดอะมิโนทั้งหมด

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้สูงสุด (327,840 หน่วย/มก.โปรตีน) ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่เกาะกลุ่มได้ดีเท่ากัน และสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของหนู แกะ และหมูเกิดการเกาะกลุ่ม แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของแพะเกาะกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินบริสุทธิ์ทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์แล้ว การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์โดยน้ำตาลเมธิล-แอลฟา-ดี-กาแลคโตไซด์ เอ็นอะซีติล กาแลคโตซามีน และกาแลคโตส ที่ความเข้มข้น 3.12, 12.5 และ 25 mM ตามลำดับ ไควาเลนท์แคทไอออนซึ่งได้แก่  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$  หรือ EDTA ที่ความเข้มข้น 200 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคตินบริสุทธิ์ เลคตินบริสุทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีที่ pH 6-10 และไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 30°C นอกจากนี้สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับ IgA ของคน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG ของคน และกับโบวีนซีรัมอัลบูมินใน gel double diffusion

จากการคอนจูเกตเลคตินบริสุทธิ์กับเฮนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อนำเลคตินคอนจูเกตย้อมตัวอสุจิของหนู พบว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ย้อมติดสีของเลคตินคอนจูเกตเฉพาะส่วนหัว ในขณะที่ตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์มีการย้อมติดสีทั่วผิวเซลล์ทุกส่วน

## Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins. They are found in plants, animals and also in microorganisms. Lectins show specific binding to carbohydrates and bear at least 2 binding sites which allow them to agglutinate cells and/or precipitate glycoconjugates. Plant lectins are most extensively studied.

In this study, lectin was precipitated from the Champaada seeds extract with 80% saturated ammonium sulphate. Purification of lectin from the lectin extract was achieved by chromatography on Sephadex G-200 column followed by N-acetyl galactosamine-agarose column. The purified lectin was found to exist in 2 forms of proteins, one major and one minor bands with  $M_r$  of 14,000 and 16,800, respectively. It had a molecular weight of 46,000 Daltons, as determined by gel filtration. The purified lectin was estimated to consist of a monomer of  $M_r$  16,800 and a dimer of  $M_r$  14,000. The purified lectin had a total carbohydrate content of 27.0  $\mu\text{g}$  glucose/mg protein and 23.4  $\mu\text{g}$  mannose/mg protein. Amino acid analysis showed that it was characteristically enriched in glycine, aspartic acid and glutamic acid, whereas the level of both tryptophan and methionine was extremely low. The lowest amino acid content was found to be cysteine, being about 0.1% of the total amino acid residues.

The purified lectin contained the highest specific hemagglutinating activity against rabbit red blood cells (327,840 unit/mg protein). It demonstrated hemagglutinating activity equally among human erythrocytes of A, B, AB and O blood groups. The purified lectin could also agglutinate red blood cells of rat, sheep and pig, but not red cells of goat. It agglutinated rat immature caput sperm better than mature cauda sperm. Its hemagglutinating activity was completely inhibited by methyl- $\alpha$ -D-galactoside, N-acetyl galactosamine and galactose at 3.12, 12.5 and 25 mM, respectively. Divalent cation such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  or EDTA at 200 mM did not affect hemagglutinating activity of the purified lectin.

The purified lectin was labile at temperatures over 30°C. The optimal pH for its hemagglutination was 6-10. It was shown to selectively precipitate human IgA, but not IgG and BSA in gel double diffusion.

Conjugation of the purified lectin was performed. The lectin conjugate could stain rat epididymal sperm. It was found to distribute over the whole surface of the mature sperm whereas it was localized mainly in the head region of the immature sperm.