การวิเคราะห์คุณสมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง

Characterization of Lectin from Plasma of Grouper

(*Epinephelus malabaricus*)

โดย

รศ.ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

นางสาวอุไรวรรณ ไพชำนาญ

Order Key.....

BIB Key 168771

เลขหมู่ SL 698.S48 U46 2542

เลขทะเบียน 16 1

...../...../.....

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2540 - 2541

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตซึ่งไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกัน มีความสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เลคตินพบและมีบทบาททางชีวภาพในพืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ต่างๆ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเลคตินจากพลาสมาของปลากะรังมีแอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงสุด 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 หน่วยย่อยที่เหมือนกันและไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ยึดระหว่างหน่วยย่อย

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีที่สุด รองลงมาคือของหนูและของหมู ตามลำดับ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและของแพะเกาะกลุ่มได้ การย่อยเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยเอนไซม์ทริปซินหรือนิวรามินิเดสมีผลทำให้แอคทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เพิ่มขึ้น 4 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายถูกยับยั้งได้ 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

ระดับเลคตินในพลาสมาถูกกระตุ้นได้โดยการฉีดปลาด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออล นอกจากนี้ระดับของเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาของปลากะรังเพศเมีย มีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกันในระหว่างเดือนสิงหาคม 2540 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2541 ระดับเลคตินและไวเทลโลจีนินในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากเดือนตุลาคมจนมีค่าสูงสุดก่อนไข่สุกและลดลงอย่างรวดเร็วหลังปลาวางไข่ในเดือนธันวาคม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระดับไวเทลโลจีนินในพลาสมามีความสัมพันธ์กับพัฒนาการเจริญของรังไข่ในปลากะรังเพศเมีย ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าพลาสมาเลคตินมีส่วนเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญของรังไข่ของปลากะรัง

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. 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 agglutinate red blood cells of either 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°C. The optimum pH for its hemagglutination was 7.5 - 8.

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 decreased 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 involves in ovarian development of grouper.