การเตรียมและการใช้ประโยชน์เลคตินคอนจูเกต จากเลคตินของเมล็ดจำปาดะ

Preparation and The Use of Lectin Conjugate from Lectin of Champaada Seeds (*Artocarpus integer*)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์

นายปฐม การัยภูมิ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2543

สมอ

เลขหมู่ QK898.L42 ป46 2543 ฉ.1

Bib Key 315454

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ ความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตเป็นการแสดงถึงคุณลักษณะของเลคติน เลคตินมีแหล่งจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตมากกว่า 1 ตำแหน่ง จึงสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม และ/หรือตกตะกอนสารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้ การจับของเลคตินกับน้ำตาลจะจับกันอย่างหลวมและแยกออกจากกันได้

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

การคอนจูเกตเลคตินบริสุทธิ์กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยการออกซิไดซ์ด้วย periodate แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่าเลคตินเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุล 90,150 ดัลตัน จากการหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน เมื่อนำเลคตินเปอร์ออกซิเดสย้อมตัวอสุจิของหนู พบว่าตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ย้อมติดเฉพาะส่วนหัว ในขณะที่ตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์มีการย้อมติดสีทั่วผิวเซลล์ทุกส่วน เมื่อนำสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิทั้ง 2 ชนิด ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสและ Westem blot พบว่าสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ปรากฏแถบโปรตีน 5 แถบ (น้ำหนักโมเลกุล 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 และ 120,000 ดัลตัน) และสารสกัดเมมเบรนของตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ปรากฏแถบโปรตีน 4 แถบ (น้ำหนักโมเลกุล 32,000, 52,000, 85,000 และ 100,000 ดัลตัน) ที่ย้อมติดสีของเลคตินเปอร์ออกซิเดส

จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการจับระหว่างตัวอสุจิกับเลคตินเปอร์ออกซิเดส พบว่าปริมาณการจับของเลคตินเปอร์ออกซิเดสกับตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์เป็น 1.03×10^{-8} ไมโครกรัม/เซลล์ และกับตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์เป็น 0.58×10^{-8} ไมโครกรัม/เซลล์

ในการศึกษาความจำเพาะต่อน้ำตาลของเลคตินบริสุทธิ์ได้พัฒนาการทดสอบโดยวิธี Enzyme-Linked Lectin Binding Assay (ELLBA) โดยใช้ streptavidin (SAV) เคลือบที่ผิวของไมโครไตเตอร์เพลทและใช้ไบโอตินกาแลคโตสจับกับ SAV ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวของเพลท ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เลคตินเปอร์ออกซิเดส จากการเปรียบเทียบค่าการยับยั้งสูงสุดและความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาสูงสุดได้ครึ่งหนึ่งของน้ำตาล 6 ชนิด พบว่าน้ำตาลที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้สูงสุดเรียงจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ methyl-α-D-galactoside, N-acetyl galactosamine, กาแลคโตส, N-acetyl glucosamine และ methyl-β-D-galactoside ส่วนน้ำตาลฟูโคสไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ เลคตินบริสุทธิ์จากเมล็ดจำปาดะและเลคตินจาก *Helix pomatia* สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ปานกลาง ขณะที่มิวซินและโบวีนซีรัมอัลบูมินไม่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา การทดสอบด้วยวิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธีการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมาก

Abstract

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

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

Conjugation of the purified lectin to peroxidase was perfomed by periodate-oxidation and chromatography on Sephadex G-200 column. The lectin-peroxidase conjugate (LPC) had a molecular weight of 90,150 Daltons, as determined by gel filtration. LPC could stained rat epididymal sperm. It was found to distribute over the whole surface of the mature sperm whereas it was localized mainly in the head region of the immature sperm. The membrane fractions were extracted from 2 types of the sperm and subsequently analyzed by SDS-PAGE following by Western blot. There are 5 protein bands (M_r 38,000, 53,000, 81,000, 95,000 and 120,000) from the membrane fraction of the mature sperm and 4 protein bands (M_r 32,000, 52,000, 85,000 and 100,000) from the membrane fraction of the immature sperm which were stained by LPC.

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

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