สมบัติของเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

Properties of Lectin from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguiensis* de Man)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์
นางสาวนิษา ไพจิตร

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์
ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์
ประจำปี 2544

สธ
เลขหมู่ QL 444.M33 พ่ A6 ... ...
Bib Key 22784
.../.../...

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะและมีแหล่งจับมากกว่า 1 ตำแหน่ง สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เลคตินพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่าง ๆ

ซีรัมเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis* de Man) มีแอ๊คทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงสุด มีความจำเพาะต่อกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิค มิวซิน และฟีทูอินมากที่สุด สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดที่ pH 7-8

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

เลคตินบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่มได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคน การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์โดยมิวซิน, ฟีทูอิน และกรดเอ็น-อะซิติลนิวรามินิค ที่ความเข้มข้น 1.0 มก/มล., 1.5 มก/มล. และ 1.56 mM ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ เอ็น-อะติซิลกาแลคโตซามีน, เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน และเอ็น-อะซิติลแมนโนซามีน เลคตินบริสุทธิ์ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง ethylene-glycoltetraacetic acid ที่ความเข้มข้น 0.075 mM ยับยั้งแอคทิวิทีของเลคตินบริสุทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์

เลคตินบริสุทธิ์มีความเสถียรที่ pH 7.5-8.0 สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดที่ pH 7.5-8.0 แต่ไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ ยกเว้นเมื่อมี 50 mM $CaCl_2$ ช่วยทำให้เลคตินบริสุทธิ์เสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 65 °ซ

ทั้งเลคตินบริสุทธิ์และซีรัมเลคตินสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้งได้แก่ *Vibrio harveyi*, *Vibrio. parahemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้งคือ *Vibrio cholerae*, *Samonella typhi* และ *Escherichia coli* เกาะกลุ่ม ระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีค่าสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.9% NaCl 1.62 เท่า ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ที่เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อซึ่งอาจเป็นกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วย

ระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศเมียตัวเต็มวัยสูงกว่าของกุ้งเพศผู้ 1.55 เท่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งเพศเมียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของรังไข่กุ้งแชบ๊วย เหมือนกับในเพรียงหรือปลากะรัง

Abstract

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

Serum lectin from hemolymph of banana prawn (*Penaeus merguiensis* de Man) contained the highest specific hemagglutinating activity against rabbit red blood cells. It was strongly specific to N-acetyl neuraminic acid, mucin and fetuin. The optimal pH for its hemagglutination was 7-8.

Purification of lectin from banana prawn hemolymph was achieved by one-step chromatography on Fetuin-agarose column. The purified lectin showed a single band in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under nondenaturing condition. It had a molecular weigh of 316,200 Daltons, as determined by gel filtration. When analysed by SDS-PAGE in the presence or absence of β-mercatoethanol, the purified lectin was found to exist in 2 forms of proteins, with M_r of 32,300 and 30,900. It was estimated to consist of pentamers of each of M_r 32,300 and M_r 30,900, and contain no disulphide linkage between subunits. The purified lectin had a total carbohydrate content of 180 μg glucose/mg protein and 260 μg mannose/mg protein.

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

The purified lectin was stable at pH 7.5-8.0. The optimal pH for its hemagglutination was 7.5-8.0. The purified lectin was labile at temperatures over 50 °C. Its stability was increased upto 65 °C in the presence of 50 mM $CaCl_2$.

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

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