ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเลคตินจากถั่วฝักยาว
ผู้เขียน นายทรงศักดิ์ แสงศิริ
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เม็ดเลือดแดง สำหรับเลคตินที่ศึกษาในพืชส่วนใหญ่จะเป็นในพืชตระกูลถั่วและเป็นเลคตินชนิดละลายน้ำได้ แต่ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาเลคตินชนิดไม่ละลายน้ำจากถั่วฝักยาว และเรียกชื่อเลคตินชนิดนี้ว่า *Vigna susquipedalis* agglutinin (VSA) โดยได้ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์ VSA ด้วยวิธีการสกัดโปรตีโอลิปิดจากถั่วฝักยาวอบแห้งโดยใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) แล้วนำส่วนที่ระเหยแห้งได้จากชั้นคลอโรฟอร์ม ไปสกัดต่อด้วย 0.2% Triton X-100 และตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน จากผลการวิเคราะห์ VSA บริสุทธิ์ด้วยวิธีทำ SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 25,000 ดาลตัน และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลรวมโดยวิธีเจลฟิลเตรชันพบว่า VSA มีน้ำหนักโมเลกุล 100,000 ดาลตัน เมื่อศึกษาสมบัติของ VSA พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ดีเท่ากับหนู แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน (A, B, AB, O) และพบว่าแอคติวิตีของ VSA ไม่สามารถยับยั้งด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ ยกเว้นน้ำตาล N-acetylglucosamine ที่ระดับความเข้มข้น 200 mM สามารถยับยั้งได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่พบว่าแอคติวิตีของเลคตินสามารถยับยั้งได้โดยไกลโคโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ mucin, C-serum *Hevea* latex lectin binding protien (CS-HLLBP), asailofetuin และ fetuin โปรตีโอลิปิดจากถั่วฝักยาวที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ VSA การศึกษาสมบัติของ VSA พบว่าไม่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดเมื่อ pH ต่ำกว่า 6 แต่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดอ่อนและด่างได้ดีในช่วง pH 6-10 และทนต่อความร้อนได้ดีโดยที่อุณหภูมิ 100°ซ VSA มีแอคติวิตีลดลงไปเพียง 25% และ VSA ยังทนต่อการย่อยของเอนไซม์ทริปซิน และโปรเนส นอกจากนี้ VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากต้นยางพารา รวมทั้งจากพืชสร้างน้ำยางชนิดอื่น ๆ ได้

การทำบริสุทธิ์ตัวยับยั้งการทำงานของเลคติน VSA สามารถโดยทำการสกัดโปรตีโอลิปิดจากส่วนสารละลายใสที่แยกได้จากการนำถั่วฝักยาวไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้

โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย ด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) แล้วเก็บเฉพาะส่วนของโปรตีนที่อยู่ใน aqueous phase ไปทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตนจากนั้นนำสารละลายตะกอนโปรตีนที่ช่วงความอิ่มตัว 40-60% ไปแยกผ่านคอลัมน์ไคตินที่ตรึงด้วยเลคติน VSA ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าตัวยับยั้งมีน้ำหนักโมเลกุลย่อยเท่ากับ 14,000 ดาลตัน โดยมีขนาดโมเลกุลรวม 54,000 ดาลตัน เมื่อทำด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน เมื่อศึกษาสมบัติของตัวยับยั้งต่อความเป็นกรด-ด่าง พบว่าสามารถทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ดีในช่วง pH 6-8 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 100°ซ พร้อมทั้งพบว่าตัวยับยั้ง VSA สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางพาราที่เหนี่ยวนำด้วย VSA และ HLL ซึ่งเป็นโปรตีโอลิปิดเลคตินจากยางพาราได้ด้วย

Thesis Title	Purification and Characterization of Lectin from *Vigna susquipedalis*
Author	Mr. Songsak Saengsiri
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

Lectins are proteins or glycoproteins, generally found in all living organisms. They are known for their ability to agglutinate erythrocytes in vitro. Hydrophilic lectins had been extensively studied in the leguminous family. In this study, a hydrophobic lectin (proteolipid) was purified and characterized from yard long bean *(Vigna susquipedalis)*. The *Vigna susquipedalis* agglutinin (VSA) was extracted from dry homogenized powder of yard long bean by using lipid solvent containing chloroform/methanol at a 2:1 (v/v) ratio. The bottom chloroform phase was then collected and dried under rotary evaporator. The dry powder was solubilized in 0.2% Triton X-100 solution. Under SDS-PAGE, the purified VSA was found to have a molecular weight of 25,000 dalton. Its native molecular weight of 100,000 dalton was obtained from gel filtration chromatography. The VSA was found to agglutinate erythrocytes both from rabbit and mouse but no effect was shown on all human blood types. Several mono sugars were used to test for their inhibitory effect on the hemagglutination-induced by VSA. Mostly none, except for N-acetylglucosamine which showed slight inhibitory effect at 200 mM, was found to be effective inhibitor. However, several glycoproteins including mucin, C-serum, *Hevea* latex lectin binding protien (CS-HLLBP), asailofetuin, fetuin and VSA inhibitor were found to be effective inhibitors in inhibiting the hemagglutination-induced by VSA. The VSA was found to be stable under a wide pH range of 6-10 but labile under pH 6. It is heat stable with a loss of only 25% of the activity upon boiling at 100 $^{\circ}$C. It was resistant to protease and trypsin digestion. The purified VSA was able to induce aggregate formation among rubber particles obtained from latex of the rubber

tree as well as other latex producing plants (*Ficus elastica* Roxb*, Euphorbia mili* DesMoulin*, Plumeria rubra* Linn*, Calotropis gigantea and Argyreia capitiformis).*

A VSA inhibitor was purified from the supernatant fraction isolated from fresh homogenate of *V. susquipedalis* by subjecting to proteolipid extraction under chloroform/methanol solution, ratio 2:1 (v/v). The upper aqueous phase was collected and precipitated by acetone fractionation. The pellet from 40-60% acetone saturated fraction was further purified by employing VSA immobilized-chitin column. The VSA inhibitor possesses approximate molecular weight of 14,000 dalton, as estimated by SDS-PAGE. Its native molecular weight calibrated by gel filtration chromatography was 54,000 dalton. It is stable under the pH range of 6-8 and stable to heat treatment up to 100 ^{o}C. The VSA inhibitor was also found to inhibit both VSA- and HLL- induced *Hevea* rubber particle aggregation.