# 1. บทนำ

## 1.1 ความหมายของเลคติน

เลคตินคือ โปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับจำเพาะคาร์โบไฮเดรต และต้องไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกัน หรือเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตที่จับอยู่ [1] เลคตินสามารถทำให้เซลเกาะกลุ่มและ/หรือตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบได้และการเกาะกลุ่มของเซลโดยเลคตินนั้นสามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย [2]

## 1.2 ประวัติของเลคติน

คำว่า "เลคติน" ที่ใช้กันในปัจจุบันนี้เดิมเรียกว่า Phytohemagglutinin หรือ agglutinin จนกระทั่ง ค.ศ. 1954 Boyd และ Sharpleigh ได้เริ่มต้นใช้คำว่าเลคติน โดยดัดแปลงมาจากคำในภาษาลาติน คือ Legere ซึ่งแปลว่าเลือก นั่นคือเลคตินเลือกชนิดของเซลที่ทำให้เกาะกลุ่ม เช่นเซลเม็ดเลือดแดงของคนบางกลุ่ม หรือเซลเม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดเป็นต้น

ค.ศ. 1888 H.Stillmark ค้นพบปรากฏการณ์ที่สารสกัดจากเมล็ดละหุ่ง (Ricinus communis) ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่ม และสารพิษในสิ่งสกัดนี้เป็นโปรตีน พร้อมกับให้ชื่อว่า ricin ในเวลาเดียวกัน H.Hellin ได้พบสารพิษอีกชนิดหนึ่งในเมล็ดมะกล่ำตาหนู (Abrus precatorius) ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงของคนเกาะกลุ่มเช่นเดียวกัน และให้ชื่อสารพิษนี้ว่า abrin

ค.ศ. 1891 Paul Ehrlich ทดลองฉีด ricin ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายเข้าใต้ผิวหนังของหนูถีบจักรหลาย ๆ ครั้ง พบว่าหนูนั้นมีภูมิต้านทานต่อสารพิษในปริมาณที่ทำให้เกิดอันตรายได้ โดยสารพิษนี้ถูกล้างพิษด้วยสารในซีรัมของหนูเองการทดลองโดยใช้ abrin ก็ให้ผลเช่นเดียวกับ ricin แต่ abrin ไม่สามารถล้างพิษด้วยสารในซีรัมของหนูที่ฉีด ricin และ ricin ก็ไม่สามารถล้างพิษด้วยสารในซีรัมของหนูที่ฉีด abrin เช่นกัน สำหรับปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า ricin และ abrin เป็นสารผสมของสารพิษกับสารที่จับจำเพาะกับน้ำตาล และสารที่จับจำเพาะกับน้ำตาลเท่านั้นที่ทำให้เซลเกาะกลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค.ศ. 1908 Karl Landsteiner รายงานว่าเลคตินมีสมบัติเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยา เพราะเลคตินจากถั่วแดง (Lens culinaris หรือ Lens esculenta) ทำให้เม็ดเลือดแดงของหนูเกาะกลุ่ม แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของนกพิราบเกาะกลุ่มเลย แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงเท่าใดก็ตาม

ค.ศ. 1919 James B.Sumner สามารถเตรียมเลคตินให้บริสุทธิ์และทำเป็นผลึกได้ครั้งแรกเลคตินนี้คือ Concanavalin A หรือ Con A ที่สกัดได้จากถั่วแจ๊ค (Canavalia ensiformis)

ค.ศ. 1936 James B.Sumner และ Stacey F.Howell พบว่า Con A สามารถทำให้ไกลโคเจนตกตะกอน และการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดย Con A ถูกยับยั้งได้ด้วยซูโครส จึงเสนอว่า Con A ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้โดย Con A จับกับคาร์โบไฮ-เดรต ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง

ค.ศ. 1952 Winifred M.Watkins และ Walter J.T. Morgan พบว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาล เพราะน้ำตาลจะไปแย่งเลคตินที่จับกับน้ำตาลที่ผิวเซล จึงสรุปว่าเลคตินจับกับน้ำตาลที่ผิวของเม็ดเลือดแดง จึงทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ ตัวอย่างเช่นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดย Con A ถูกยับยั้งโดย แมนโนส และกลูโคส แสดงว่า Con A จับกับแมนโนสและกลูโคสที่ผิวของเม็ดเลือดแดงนั่นเอง

ค.ศ. 1960 Peter C.Nowell พบว่าเลคตินจากถั่วแดงหลวง (Phaseolus vulgaris) สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวแบ่งเซลได้

ค.ศ. 1963 Joseph C. Aub พบว่าเลคตินจากงอกข้าวสาลี (Triticum vulgaris) สามารถทำให้เซลมะเร็งเกาะกลุ่ม และไม่มีผลต่อเซลปกติ ต่อมาเลคตินจึงใช้ประโยชน์ในการแยกเซลต่างชนิดออกจากกัน และในการศึกษาพื้นที่ผิวของเยื่อหุ้มเซล

ค.ศ. 1965 Irwin J. Goldstien และ B.B.L. Agrawal เริ่มต้นใช้โครมาโตกราฟีแบบแอฟฟินิตี ในการทำเลคตินให้บริสุทธิ์

ค.ศ. 1972 Gerald M. Edelman และคณะรายงานลำดับของกรดอะมิโนใน Con A และเสนอโครงร่างสามมิติของ Con A ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.3 แหล่งของเลคติน**

ในระยะแรกเลคตินที่พบจะอยู่ในพืชโดยเฉพาะพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae)[4] ตามรายงานของ Tom และ Western พบว่า 95% ของเลคตินที่พบตั้งแต่ ค.ศ.1948 ถึง 1971 ได้จากเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว ปริมาณเลคตินในเมล็ดพืชตระกูลถั่วมีค่อนข้างสูง[5] ตัวอย่างเช่น Con A มีปริมาณ 2 - 3% ของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากถั่วแจ็ค เลคตินในถั่วเหลืองมีประมาณ 1 - 1.5% ของโปรตีนทั้งหมด เป็นต้น

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบแน่ชัดว่า เลคตินมีทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์[6] ตัวอย่างแหล่งของเลคตินบางชนิดแสดงในตาราง 1.1

ส่วนของพืชที่พบเลคตินมากที่สุดคือ ส่วนที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร[4] เช่น เมล็ดของพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะเมล็ดที่สุกและแก่จัด รากสะสมอาหารของมันฝรั่ง (Solanum tuberosum)[8] เผือก (Colocasia esculenta)[9] หรือหัว aconite (Eranthis hyemalis)[10] นอกจากนี้เลคตินในเมล็ดข้าวสาลีพบมากในต้นอ่อนจนถึงงอกแล้ว 34 วัน เลคตินในถั่วลิสง (Arachis hypogaea) ที่กำลังงอกพบมากในใบเลี้ยง เลคตินจาก Phytolacca americana พบมากในใบและลำต้นของพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.1 ตัวอย่างของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่มีเลคติน[7]

| | |
|---|---|
| **พืชตระกูลถั่ว** | **สัตว์ชั้นสูง** |
| Arachis hypogaea (peanut) | Rabbit |
| Canavalia ensiformis (jack bean) | **สัตว์ชั้นต่ำ** |
| Dolichos biflorus (horse germ) | Anguilla anguilla (eel) |
| Glycine max (soybean) | Geodia cydonium (sponges) |
| Lens Curinaris (lentil) | Helix pomatia (garden snail) |
| Lotus tetragonolobus(winged bean) | Limulus polyphemus (horse shoe crab) |
| Phaseolus lunatus (lima bean) | |
| Phaseolus vulgaris (red kidney bean) | |
| Pisum sativum (garden pea) | **ราเมือก** |
| Vicia Cracca | Dictyosteleum discoidium |
| Vicia faba (broad bean) | Dictyosteleum purpureum |
| Vicia gramineae | **แบคทีเรีย** |
| | Pseudomonus aeroginosa |
| **พืชอื่น ๆ** | |
| Phytolacca americana (pokeweed) | |
| Solanum tuberosum (potato) | |
| Triticum vulgaris (Wheat) | |
| Wisteria floribunda | |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.4 การตรวจหาเลคติน**

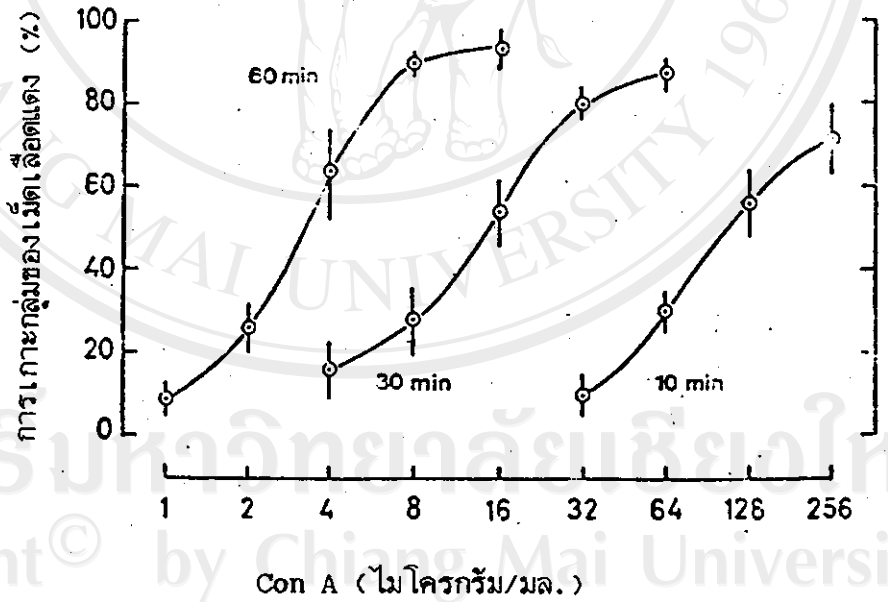
การตรวจหาเลคตินอาศัยความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Hemagglutination) การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคติน ขึ้นกับความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของเลคติน เวลา อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างในขณะที่เลคตินจับกับเม็ดเลือดแดง[11] อย่างไรก็ตามโดยทั่ว ๆ ไปนิยมใช้ความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง $10^6$ - $10^8$ เซล/มล. ที่อุณหภูมิห้องและในสารละลายที่เหมาะสมสำหรับเม็ดเลือดแดง ในการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินมักทำการเจือจางสารละลายเลคติน ครั้งละสองเท่าหลาย ๆ ครั้ง แล้วตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะมีกราฟการไตเตรทที่ขึ้นกับเวลา ดังแสดงในรูป 1.1 เมื่อให้เวลาในการตรวจสอบนานขึ้นจะได้กราฟที่ชันขึ้น และเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด โดยเลคตินที่มีความเข้มข้นน้อยลง ดังนั้นในการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเลคตินในสารตัวอย่างจึงนิยมเปรียบเทียบการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่มได้ในเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีการตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมี 2วิธี วิธีแรกเป็นการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงที่เกาะกลุ่มในสภาวะที่กำหนด และวิธีที่สองเป็นการวิเคราะห์ปริมาณของสภาวะเพื่อให้ได้การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็น 50% สำหรับวิธีแรกสามารถทำได้โดยการนับจำนวนเม็ดเลือดที่เป็นอิสระและเม็ดเลือดที่เกาะกลุ่มเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือการวัดปริมาณเม็ดเลือดที่เกาะกลุ่มโดยใช้เครื่องนับอนุภาคอัตโนมัติ สำหรับวิธีที่สองสามารถทำได้โดยการจับเวลาที่ใช้ในการทำให้ครึ่งหนึ่งของเม็ดเลือดที่มีอยู่เกาะกลุ่มโดยเลคตินปริมาณคงที่หรือการหาความเข้มข้นของเลคตินที่ใช้ในการทำให้ครึ่งหนึ่งของเม็ดเลือดที่มีอยู่เกาะกลุ่มได้ในเวลาคงที่ การกำหนดเวลาที่คงที่นี้จะใช้เวลาที่เม็ดเลือดอิสระทั้งหมดต้องการในการตกลงนอนก้นหลุมจนหมด ซึ่งทำให้ไม่สามารถจะจับกับเลคตินได้อีกต่อไป

ตัวอย่างวิธีการตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงวิธีที่หนึ่ง[12] เป็นการวัดความขุ่นของสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดง โดยมีหลักการคือ เม็ดเลือดในสารแขวนลอยจะค่อย ๆ ตกลงสู่ก้นหลอดทดลอง โดยใช้ระยะเวลาช่วงหนึ่ง ในระหว่างนี้สารแขวนลอยจะมีลักษณะเป็นชั้น 3 ชั้น คือ ชั้นบนจะใสและไม่มีเม็ดเลือดแดงอยู่เลย ชั้นกลางมีเม็ดเลือดแดงที่กำลังตกลงสู่ก้นหลอด จึงมีความหนาแน่นสม่ำเสมอ และชั้นล่างเป็นชั้นของเม็ดเลือดที่ตกลงสู่ก้นหลอดแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้นการวัดความขุ่นของชั้นกลางในสารแขวนลอย จะสามารถบอกปริมาณของเม็ดเลือดแดงที่ไปเกาะกลุ่มได้และค่าการกระเจิงแสงของชั้นกลางในสารแขวนลอยนี้จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเลคตินที่เติมลงไป ความเข้มข้นของเลคตินที่จุดยุติ หรือที่ปริมาณการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเป็น 50% คือค่าหนึ่งหน่วยของการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด




**รูปที่ 1.1** ผลของเวลาและความเข้มข้นของ Con A ต่อการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ผสมเม็ดเลือดแดงของคนซึ่งปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดสแล้ว กับ Con A ที่ความเข้มข้นต่างกันในไมโครไตเตอร์เพลทเป็นเวลา 10, 30 หรือ 60 นาทีแล้วนำเม็ดเลือดไปส่องดูปริมาณที่เกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างวิธีการตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงวิธีที่สอง[13] เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมรูปตัววีของไมโครไตเตอร์เพลท เจือจางสารละลายเลคตินครั้งละสองเท่าหลาย ๆ ครั้ง เติมสารละลายเลคติน 5 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นลงในแต่ละหลุม โดยเริ่มต้นจากความเข้มข้นน้อยที่สุดไปหาความเข้มข้นมากที่สุดเติม 1% เม็ดเลือดแดง 5 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 22° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นวงแหวนสีแดงเป็นขอบของก้นหลุม แต่หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะไม่เห็นวงแหวนสีแดงเพราะเม็ดเลือดแดงนอนก้นในลักษณะเป็นก้อน ๆ ตรวจดูจุดยุติหรือไตเตอร์ของการเกาะกลุ่ม ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของเลคตินที่สามารถทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่ม การวิเคราะห์ไตเตอร์ของเลคตินมักทำ 3 ครั้ง แล้วใช้ค่าเฉลี่ยซึ่งจะสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในช่วง ±33% หนึ่งหน่วยของการเกาะกลุ่มคือปริมาณเลคตินในหลุมที่จุดยุติ และการเกาะกลุ่มจำเพาะคือจำนวนหน่วยของการเกาะกลุ่มต่อน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของเลคติน ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดโดยเลคตินนั้น ให้เติมสารละลายน้ำตาลที่เจือจางครั้งละสองเท่าหลาย ๆ ครั้งลงในแต่ละหลุม 5 ไมโครลิตร เติมเลคตินที่มีความเข้มข้นคงที่ 5 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมแล้วตั้งไว้ที่ 22 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเติม 1% เม็ดเลือดแดง 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วตั้งไว้อีก 30 นาที จึงนำไปส่องดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดูจุดยุติของการเกาะกลุ่มซึ่งหมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดโดยเลคติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

### 1.5 โครงสร้างโมเลกุลของเลคติน

ในขณะที่เลคตินทุกชนิดเป็นโปรตีน เลคตินแต่ละชนิดก็มีโครงสร้างโมเลกุลไม่เหมือนกัน ความแตกต่างส่วนใหญ่นั้นอยู่ที่ส่วนประกอบของโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จำนวน และโครงสร้างของหน่วยย่อย และจำนวนที่จับจำเพาะต่อน้ำตาลในหนึ่งโมเลกุลของเลคติน

ส่วนประกอบในโมเลกุลของเลคตินอาจเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน[3] เลคตินส่วนมากที่พบเป็นไกลโคโปรตีนและส่วนของคาร์โบไฮเดรต ในโมเลกุลมักประกอบด้วยน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคซามีน แมนโนส และกาแลคโตส สำหรับน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5

อะตอมอาจพบบ้างเช่น อะราไบโนส และไซโลส เป็นต้น ตัวอย่างของเลคตินที่เป็นไกลโคโปรตีน ได้แก่ เลคตินจากถั่วแดงหลวงมีคาร์โบไฮเดรต 4.1 - 8.9% เลคตินจากถั่วเหลืองมี 5% เลคตินจากถั่วราชมาษมี 4% และเลคตินจากมันฝรั่งมี 5.2% เป็นต้น สำหรับเลคตินบางชนิดเป็นโปรตีนอย่างเดียว ตัวอย่างเช่น เลคตินจากถั่วแจ๊ค[3] เลคตินจากงอกข้าวสาลี[14] และเลคตินจากถั่วลิสง[15] เป็นต้น โปรตีนที่อยู่ในเลคตินจากพืชตระกูลถั่วส่วนใหญ่จะไม่มีกรดอะมิโนชนิดซีสเตอีน[16] ในขณะที่เลคตินจากมันฝรั่งและเลคตินจาก pokeweed มีปริมาณซิสเตอีนสูง

น้ำหนักโมเลกุลของเลคตินส่วนใหญ่อยู่ในช่วงหนึ่งหมื่นถึงหลายแสน[7] เลคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดคือ 10,000 เป็นเลคตินจากปลาไหล (Anguilla rostrata) และเลคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดคือ 420,000 เป็นเลคตินจากแมงดาทะเล (Limulus polyphemus) นอกจากนี้ก็มีเลคตินจากเมล็ดคำบูชา มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000[17] และเลคตินจากเมล็ดขนุนมีน้ำหนักโมเลกุล 62,000[18] เป็นต้น

เลคตินส่วนใหญ่มีหลายหน่วยย่อยในหนึ่งโมเลกุล[7] เช่น โมเลกุลของเลคตินจากงอกข้าวสาลีมี 2 หน่วยย่อย โมเลกุลของเลคตินจากหอยทากมี 6 หน่วยย่อย และโมเลกุลของเลคตินจากแมงดาทะเลมี 18 หน่วยย่อย เป็นต้น หน่วยย่อยเหล่านี้อาจเหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ ตัวอย่างเช่นโมเลกุลของเลคตินจากถั่วแจ๊คมี 4 หน่วยย่อย และแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนัก 27,000 โมเลกุลของเลคตินจากเมล็ดขนุนมี 4 หน่วยย่อย สองหน่วยย่อยมีน้ำหนัก 18,000 เหมือนกัน และอีกสองหน่วยย่อยมีน้ำหนัก 13,000 เหมือนกัน โมเลกุลของเลคตินจากหัว aconite มี 2 หน่วยย่อย[10] และแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักต่างกันคือ 32,000 และ 30,000 นอกจากนี้หน่วยย่อยทั้งสองในโมเลกุลของเลคตินจากหัว aconite ยังเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดยทั่ว ๆ ไป หนึ่งหน่วยย่อยของเลคตินจะมีบริเวณที่จับจำเพาะกับน้ำตาลหนึ่งแห่ง ยกเว้นเลคตินบางชนิด เช่น หนึ่งหน่วยย่อยของเลคตินจากงอกข้าวสาลี มีบริเวณที่จับจำเพาะกับน้ำตาลสองแห่ง

เลคตินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีโลหะอิออนประจุบวกสองอยู่ในโมเลกุล โลหะอิออนส่วนมากจะเป็น $Ca^{2+}$ $Mn^{2+}$ และ $Mg^{2+}$ และส่วนน้อยจะเป็น $Zn^{2+}$ และ $Cu^{2+}$ Lönnerdal และคณะ[19] ได้วิเคราะห์ปริมาณโลหะอิออนในเลคติน 18 ชนิด ได้ผลดังแสดงในตาราง 1.2 ภายหลังการนำโลหะอิออนเหล่านี้ออกจากเลคตินแล้วพบว่าเลคตินเหล่านั้น ไม่สามารถจับกับน้ำตาลได้อีกต่อไป แสดงว่าความสามารถในการจับน้ำตาลของเลคตินขึ้นกับปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 ปริมาณโลหะอิออนในเลคตินธรรมชาติและเลคตินที่นำโลหะอิออนออกโดยการไดอะไลซ์[19]

| Latin name | Common name | Specificity | Metal ion content (native)* | | | | Metal ion content (demetallized)* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Ca | Mn | Mg | Zn | Ca | Mn | Mg | $Zn^{2+}$ |
| Phaseolus vulgaris | red kidney bean | (GalNAc) | 0.72 | 1.20 | 0.20 | 0.20 | 0.36 | 0.74 | 0.11 | 0.04 |
| Phaseolus limensis | lima bean | GalNAc (GlcNAc, Gal) | 0.48 | 0.28 | 0.10 | 0.07 | 0.44 | 0.05 | 0.14 | 0.05 |
| Vicia cracca | - | GalNAc | 1.72 | 0.80 | 0.53 | 0.42 | 0.40 | 0.00 | 0.00 | 0.02 |
| Helix pomatia | garden snail | GalNAc | 0.72 | 0.00 | 0.25 | 0.03 | 0.52 | 0.00 | 0.07 | 0.05 |
| Triticum vulgare | wheat germ | GlcNAc | 0.38 | 0.00 | 0.12 | 0.02 | 0.40 | 0.00 | 0.08 | 0.02 |
| Vicia villosa I | - | GalNAc | 2.70 | 1.76 | 0.67 | 0.26 | 1.38 | 0.48 | 0.24 | 0.12 |
| Crotalaria juncea | sunn hemp | Gal | 1.56 | 0.90 | 0.66 | 0.30 | 1.40 | 0.14 | 0.32 | 0.20 |
| Arachis hypogaea | peanut | Gal | 2.44 | 0.27 | 1.30 | 0.20 | 1.68 | 0.00 | 0.58 | 0.05 |
| Vicia faba | horse, broad or fava bean | Man, Glu | 1.74 | 0.10 | 0.66 | 0.26 | 0.44 | 0.06 | 0.06 | 0.14 |
| Lens culinaris | lentil | Man, Glu | 1.80 | 2.60 | 0.13 | 0.05 | 1.48 | 2.38 | 0.12 | 0.08 |
| Vicia villosa II | - | Man, Glu | 2.44 | 2.60 | 0.40 | 0.11 | 2.32 | 2.10 | 0.28 | 0.08 |
| Vicia ervilia | bitter vetch | Man, Glu | 1.36 | 1.86 | 0.11 | 0.06 | 1.36 | 1.42 | 0.14 | 0.24 |
| Canavalia ensiformis | jack bean | Man, Glu | 1.82 | 2.18 | 0.21 | 0.12 | 0.50 | 0.00 | 0.06 | 0.03 |
| Pisum sativum | pea | Man, Glu | 2.40 | 2.04 | 0.48 | 0.07 | 2.06 | 1.54 | 0.13 | 0.12 |
| Vicia sativa | common vetch | Man, Glu | 2.22 | 2.52 | 0.40 | 0.08 | 2.26 | 1.98 | 0.12 | 0.12 |
| Laturus odoratus | sweet pea | Man, Glu | 1.22 | 0.81 | 0.34 | 0.08 | 1.22 | 0.76 | 0.07 | 0.09 |
| Lotus tetragonolobus | asparagus or winged pea | L-Fuc | 1.72 | 1.10 | 0.54 | 0.23 | 0.26 | 0.00 | 0.04 | 0.03 |
| Ulex europaeus | gorse seed | L-Fuc | 1.16 | 0.72 | 0.22 | 0.42 | 0.64 | 0.10 | 0.03 | 0.17 |

* g metal ion/mg protein



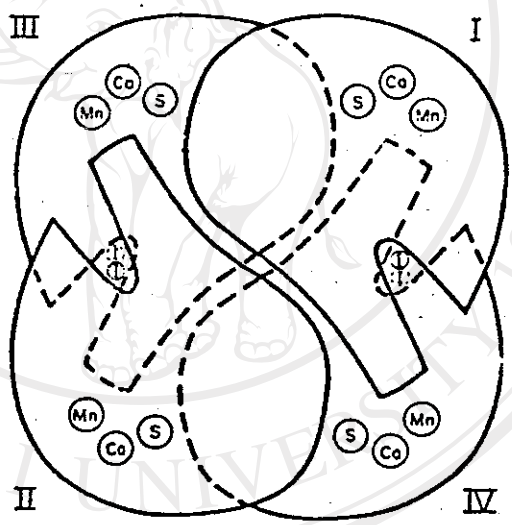
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โลหะอิออนในโมเลกุลของเลคติน กลไกในการจับน้ำตาลโดยโลหะอิออนในเลคตินจากถั่วแจ็คคือ แมงกานีสอิออน หรือแมกนีเซียมอิออน จะช่วยให้เลคตินจับแคลเซียมอิออน แล้วแคลเซียมอิออนจึงจะช่วยให้เลคตินจับกับน้ำตาลได้[20]

เลคตินที่มีข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของโมเลกุลมากที่สุดคือ Con A จากถั่วแจ็ค[20] Con A หนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 4 หน่วย (รูป 1.2) หนึ่งหน่วยย่อยประกอบด้วยกรดอะมิโน 237 ตัว แคลเซียมหนึ่งอิออน แมงกานีสหนึ่งอิออน และบริเวณจับจำเพาะกับน้ำตาลหนึ่งแห่ง น้ำตาลที่สามารถจับได้กับบริเวณนี้คือ กลูโคส แมนโนส หรือฟรุคโตสตัวใดตัวหนึ่ง หน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยจะหันส่วนฐานเข้าจับกัน และจับกับอีก 2 หน่วยย่อย โดยหันส่วนหลังเข้าหากันได้เป็น Con A หนึ่งโมเลกุล ในโมเลกุลของ Con A ไม่มีคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุดคือ 13.1% ของกรดอะมิโนทั้งหมดเป็นเซรีนและไม่มีซิสเตอีน ลำดับของกรดอะมิโนทั้ง 237 ตัว ชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ชอบน้ำส่วนใหญ่จะอยู่ที่ผิวของหน่วยย่อย และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำส่วนใหญ่จะอยู่ภายในของหน่วยย่อย กรดอะมิโนที่มีประจุจะรวมกันอยู่บริเวณที่จับโลหะอิออนและบริเวณที่จับกันเองระหว่างหน่วยย่อย การขดตัวของสายโพลีเปปไทด์มากกว่าครึ่งของความยาวทั้งหมดมีโครงสร้างแบบ β-pleated sheet จึงทำให้ Con A มีเสถียรภาพสูงบริเวณที่จับแมงกานีสอิออนและบริเวณที่จับแคลเซียมอิออนอยู่ใกล้กัน เพราะอิออนแต่ละตัวจับกับแขนงข้างของโปรตีน 4 แขนง และน้ำอีก 2 โมเลกุล ด้วยพันธะโคออร์ดิเนต และแขนงข้าง 2 ใน 4 แขนงนั้นจับกับทั้งแมงกานีสและแคลเซียมอิออน บริเวณที่จับ $Mn^{2+}$ สามารถจับ $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$ หรือ $Cd^{2+}$ ได้ แต่บริเวณที่จับ $Ca^{2+}$ มีความจำเพาะสูงต่อ $Ca^{2+}$ การจับของแมงกานีสอิออนจะเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณที่สามารถจับกับแคลเซียมอิออนได้ บริเวณที่จับจำเพาะกับน้ำตาลอยู่ใกล้บริเวณที่จับแคลเซียมอิออน น้ำตาลจับกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างแขนงข้างของโปรตีนกับออกซิเจน และกลุ่มไฮดรอกซิลในน้ำตาล α - anomer จับได้แน่นกว่า β-anomer และกลุ่มไฮดรอกซิล C - 2 ในตำแหน่ง axial จับได้แน่นกว่าตำแหน่ง equatorial กลุ่มไฮดรอกซิลของ C - 3 และ C - 4 ในตำแหน่ง equatorial และกลุ่มไฮดรอกซีเมธิลของ C - 6 เป็นสิ่งที่จำเป็นมากที่สุดในการจับกับ Con A Con A ที่ pH 7.4 มี 4 หน่วยย่อย แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Con A ที่ pH ต่ำกว่า 6 มี 2 หน่วยย่อย และอนุพันธ์สังเคราะห์ของ Con A มี 2 หน่วยย่อย แม้ที่ pH สูงกว่า 6 แรงส่วนใหญ่ที่จับหน่วยย่อยไว้ด้วยกันเป็นพันธะไฮโดรเจนระหว่าง β - pleated sheet ของแต่ละหน่วยย่อย และไม่มีพันธะโควาเลนท์ระหว่างหน่วยย่อยใน Con A




**รูป 1.2** ภาพวาดแสดงโครงสร้างโมเลกุลของ Con A

เลขโรมันแสดงหน่วยย่อย 4 หน่วยในโมเลกุล Mn , Ca , S และ I แสดง บริเวณในหน่วยย่อยที่จับกับแมงกานีสอิออน แคลเซียมอิออน น้ำตาลจำเพาะ และ β-(o-iodophenyl)-D-glucopyranoside

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 1.6 สมบัติของเลคติน

### 1.6.1 การเกาะกลุ่มของเซล (Cell agglutination)

เนื่องจากเลคตินเป็นโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต และในโมเลกุลของเลคตินมีบริเวณที่จับกับคาร์โบไฮเดรตได้มากกว่าหนึ่งแห่งขึ้นไป เลคตินจึงมีความสามารถทำให้เซลเกาะกลุ่มได้โดยเป็นตัวเชื่อมส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดตรที่ผิวของเซลหลาย ๆ เซลเข้าด้วยกัน เลคตินแต่ละชนิดสามารถทำให้เซลเกาะกลุ่มได้ไม่เท่ากัน และเลคตินชนิดเดียวกันก็สามารถทำให้เซลต่างชนิดกันเกาะกลุ่มได้ไม่เท่ากันด้วย เช่น เลคตินบางชนิดทำให้เซลมะเร็งหรือเซลเนื้องอกเกาะกลุ่มกันได้มากกว่าเซลปกติ[5] เป็นต้น

ชนิดของเซลที่ใช้กันมากในการศึกษาการเกาะกลุ่มโดยเลคติน คือเซลเม็ดเลือดแดง เลคตินแต่ละชนิดสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจากสัตว์ต่างชนิดกันเกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน[4] เช่น เลคตินจากถั่วราชมาษสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของหมูเกาะกลุ่มกันได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู หรือแกะ เลคตินจากถั่ว Pinto ทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะกลุ่มกันได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงของหนูหรือคน เป็นต้น เลคตินส่วนใหญ่ไม่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือดของคนยกเว้นเลคตินบางชนิดเท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือดในระบบเอบีโอหรือเอ็มเอ็น ดังแสดงตัวอย่างในตาราง 1.3 ในการสำรวจเลคตินจากเมล็ดพืช 2663 ชนิด[22] พบว่า 61% ของพืชทั้งหมดไม่มีเลคติน 27% ของพืชมีเลคตินที่ไม่จำเพาะกับหมู่เลือด 9% ของพืชทำให้เซลเม็ดเลือดแตก และ 3% ของพืชเท่านั้นที่มีเลคตินที่จำเพาะกับหมู่เลือด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.3 เลคตินที่จับจำเพาะกับหมู่เลือดของคน[21]

| หมู่เลือด | แหล่งของเลคติน | น้ำตาลยับยั้งการเกาะกลุ่ม |
|---|---|---|
| A | Crotalaria aegyptica | D-gal |
| | Dolichos biflorus | D-galNAc |
| | Phaseolus lunatus | D-galNAc |
| | Vicia cracca | D-galNAc |
| | Helix pomatia | D-galNAc |
| A+B | Sophora japonica | D-gal,D-galNAc |
| | Calpurina aurea | - |
| | Coronilla varia | - |
| B | Bandeiraea simplicifolia | D-gal |
| | Marasmius oreades | - |
| | Polyporus fomentarius | - |
| O | Anguilla anguilla | L-fucose |
| | Cystisus sessilifolius | $(GlcNAc)_2$ |
| | Lotus tetragonolobus | L-fucose |
| | Ulex europeus | L-fucose |
| M | Iberia amava | - |
| N | Vicia graminia | - |

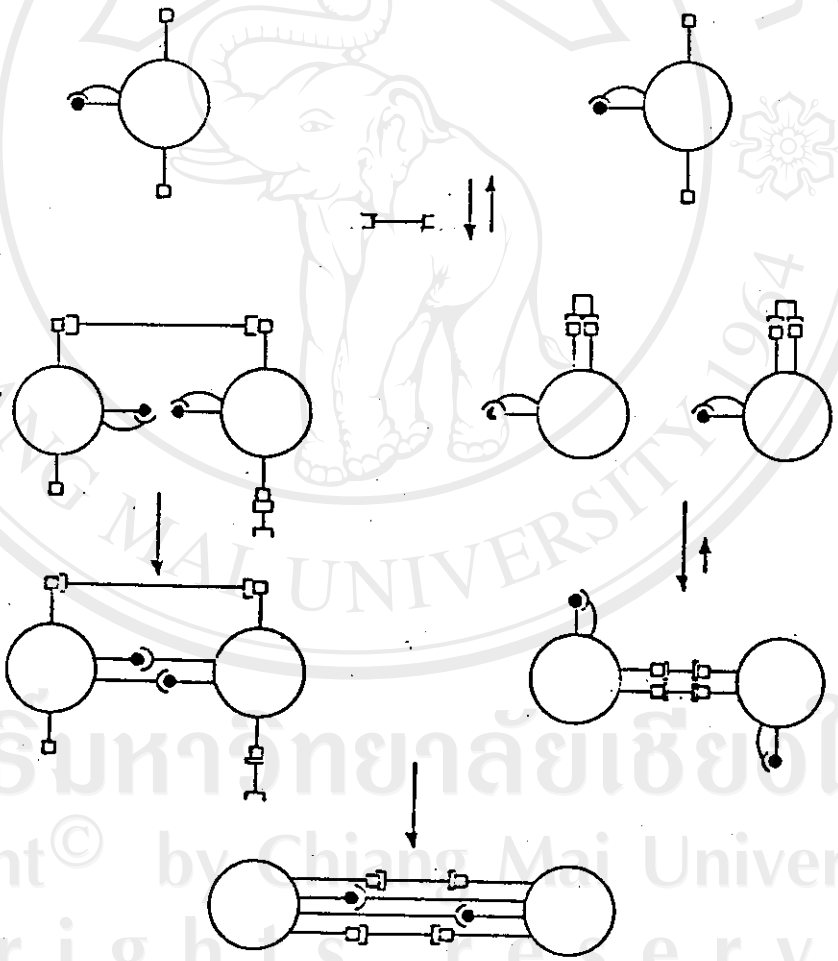
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) โดยเลคติน อาจใช้เม็ดเลือดแดงปกติหรือเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซน์ เพราะเลคตินบางชนิด เช่น เลคตินจากถั่วลิสงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดปกติเกาะกลุ่ม แต่ทำให้เม็ดเลือดที่ปรับปรุงด้วยนิว-รามินิเดสแล้วเกาะกลุ่มกันได้[15] เลคตินจากถั่วเหลืองสามารถทำให้เม็ดเลือดที่ปรับปรุงด้วย ทริปซินเกาะกลุ่มกันได้มากกว่าเม็ดเลือดปกติถึงร้อยเท่า[23] ทั้งนี้อธิบายได้ว่าการกำจัดกรด ไซอาลิคโดยนิวรามินิเดส หรือการสลายโปรตีนโดยทริปซิน ทำให้คาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลมีปลาย อิสระพอที่จะจับเลคตินได้

นอกจากเม็ดเลือดแดงแล้วเลคตินบางชนิดยังสามารถทำให้เซลต่อไปนี้เกาะกลุ่มได้ เช่น เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ แบคทีเรีย รา และยีสต์ เป็นต้น

กลไกในการเกาะกลุ่มของเซลโดยเลคตินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดในบรรดารูปแบบ ต่าง ๆ ที่เสนอขึ้นมาอธิบายนั้น Membrane Receptor Mobility[24] เป็นกลไกที่ได้รับความ เชื่อถือมากที่สุด สมมุติฐานวิถีการเกาะกลุ่มของเซลเกิดได้ทั้งสองทางพร้อม ๆ กัน ดังแสดงใน รูป 1.3 การจับของเลคตินกับตัวต้อนรับที่ผิวเซล จะทำหน้าที่เป็นสะพานเหนี่ยวนำให้ตัวต้อนรับ อื่น ๆ เคลื่อนที่เข้ามาใกล้เช่น ตัวต้อนรับที่จะจับเลคตินโมเลกุลต่อไป และองค์ประกอบที่จะเกิด การยึดเหนี่ยวระหว่างเซล (adhesive bond) ในที่สุดเซลจะเกาะติดกันได้ด้วยสะพานเลคติน รวมกับ adhesive bond ที่เคลื่อนที่มารวมกันเป็นกระจุกบนผิวเซล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 1.3 กลไกการเกาะกลุ่มของเซลโดย Con A[24]

Con A

Con A receptor

Two adhesive components

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6.2 ความจำเพาะกับน้ำตาล (Sugar specificity)

เนื่องจากการจับระหว่าง เลคตินกับน้ำตาล หรือการจับระหว่างเลคตินกับเม็ดเลือดแดง เป็นการจับแบบย้อนกลับได้ ชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคตินจึงหาได้จากความสามารถของน้ำตาลนั้น ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination inhibition) โดยเลคตินน้ำตาลชนิดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้โดยใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุดจะมีความจำเพาะต่อเลคตินสูงที่สุด

เลคตินแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับน้ำตาลแตกต่างกัน ดังนั้น Kristiansen[25] จึงได้จำแนกเลคตินออกเป็น 9 กลุ่ม ตามชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะ ดังแสดงในตาราง 1.4 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอย่างกว้าง ๆ จะสามารถรวมเลคติน 9 กลุ่มนั้นให้เป็น 3 พวกใหญ่ ๆ ได้คือ

1. เลคตินที่จับ D-glucose , D-mannose (เลคตินกลุ่ม 2,6,7,8)
2. เลคตินที่จับ D-galactose (เลคตินกลุ่ม 3,4,5)
3. เลคตินอื่น ๆ (เลคตินกลุ่ม 1,9)

โดยทั่ว ๆ ไปโมโนแซคคาไรด์สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับโอลิโกแซคคาไรด์ ยกเว้นในบางกรณีเช่นเลคตินจากหอย (Helix pomatia) ซึ่งจับจำเพาะกับเลือดหมู่เอ สามารถยับยั้งด้วย methyl-∝-D-GalNAc ได้มากกว่าเพนตะแซคคาไรด์ที่จำเพาะของเลือดหมู่เอ เลคตินจากถั่ว (Phaseolus vulgalis) สามารถยับยั้งด้วยไกลโคโปรตีน จากเยื่อเซลเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า โมโนแซคคาไรด์แต่ละตัว ที่เป็นองค์ประกอบของไกลโคโปรตีนนั้นถึง 60,000 เท่า เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.4 การแบ่งกลุ่มของเลคตินโดยอาศัยชนิดของน้ำตาลที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง[25]

| กลุ่ม | น้ำตาล | แหล่งของเลคติน |
|---|---|---|
| 1 | L-fucose | Lotus tetragonolobus |
| | | Ulex europaeus (gorse) |
| | | Ulex parviflorus |
| 2 | N-Acetyl-D-glucosamine | Triticum vulgare (wheat germ) |
| | | Solanum tuberosum (potato tuber) |
| 3 | N-Acetyl-D-galactosamine | Dolichos biflorus (horse gram) |
| | | Phaseolus lunatus (lima bean) |
| | | phaseolus vulgaris (red kidney bean, black kidey bean, yellow wax bean) |
| | | Viccia cracca |
| | | Euonymus europaeus |
| | | Helix pumatia (snail) |
| 4 | D-Galactose (กลุ่มนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย L-arabinose, D-fucose, lactose, raffinose และ melibiose | Crotalaria juncea (sunn hemp), β-specific |
| | | Ricinus communis (castor bean) |
| | | Abrus precatorius |
| | | Griffonia simplicifolia |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.4 (ต่อ)

| กลุ่ม | น้ำตาล | แหล่งของเลคติน |
|---|---|---|
| 5 | N-Acetyl-D-galactosamine และ D-Galactose (น้ำตาลทั้งสองสามารถยับยั้งได้เท่ากัน) | Sophora japonica(japanese pagoda tree)<br>Glycine max(soybean), α-specific<br>Caragona arborescens<br>Bandaeirea simplicifolia, α-specific<br>Bauhinia variegata,var. Candida<br>Momordia Charantia<br>Erythrina subrosa<br>Coronilla varia, α-specific<br>Crotalaria zanzibarica<br>Arachis hypogea, β-spectific |
| 6 | D-Glucose | Sesamum indicum<br>Pisum sativum (garden pea)<br>D-mannose ยับยั้งได้ดีกว่า D-glucose สี่เท่า |
| 7 | β-Glycosides และ β-N-Acetylglucosaminides (กลุ่มนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย salicin,phenyl-β-D-gluco-pyranoside,cellobiose และ lactose) | Ulex europaeus (gorse)<br>Ulex galli<br>Ulex nanus<br>Cytisus sessilifolius<br>Laburnum alpinum<br>Clerodendum viscosum |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.4 (ต่อ)

| กลุ่ม | น้ำตาล | แหล่งของเลคติน |
|---|---|---|
| 8 | Methyl-α-D-mannoside | Pisum sativum (garden pea) |
| | D-Mannose,D-Glucose, | Lens culinaris (lentil) |
| | N-Acetyl-D-glucosamine | Canavalia ensiformis (jack bean) |
| | และ L-sorbose (ความสามารถ | Vicia cracca |
| | ในการยับยั้งลดลงตามลำดับ) | Lathyrus sativus L. |
| 9 | N-Acetylneuraminic Acid | Limulus polyphemus (horseshoe |
| | (NANA) | crab) |
| | | Triticum vulgaris (wheat germ) |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6.3 การตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรต (Precipitation of glucoconjugates)

เลคตินมีสมบัติในการตกตะกอนสารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุลได้อย่างเฉพาะเจาะจง เลคตินที่ศึกษากันมากในกรณีนี้คือ Con A[26] Con A สามารถตกตะกอนคาร์โบไฮเดรต พวก $\alpha$-D-glucan เช่น glycogen , amylopectin และ dextran พวก $\alpha$-D-mannan เช่น Yeast mannan และ phosphomannan พวก $\beta$-D-fructan เช่น levan ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีการแตกกิ่งทั้งสิ้น สำหรับคาร์โบไฮเดรตทั้งสามพวกดังกล่าวแต่ไม่แตกกิ่งจะไม่ตกตะกอน โดย Con A เช่น amylose และ inulin เป็นต้น นอกจากนี้ Con A ยังสามารถตกตะกอนกรด teichoic , arabinogalactan และลิโปโพลีแซคคาไรด์บางชนิดได้ด้วย

Con A สามารถตกตะกอนไกลโคโปรตีนต่อไปนี้คือ myeloma protein , immunoglobulin และ ovalbumin

1.6.4 การกระตุ้นการแบ่งเซล (Mitogenic activity)

เลคตินหลายชนิดสามารถกระตุ้นเซลต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ให้แบ่งเซลได้[7] ตัวอย่างเช่นเลคตินจากถั่วแดงหลวง เลคตินจากถั่วราชมาษ และเลคตินจาก pokeweed เป็นต้น สำหรับเลคตินจากถั่วแดงหลวงกระตุ้นเฉพาะเซลชนิด T เลคตินจากถั่วราชมาษกระตุ้นเฉพาะเซลชนิด B แต่เลคตินจาก pokeweed กระตุ้นทั้งชนิด T และ B

กลไกการกระตุ้นเริ่มโดยเลคตินจับน้ำตาลที่เป็นตัวต้อนรับที่ผิวเซล[5] ทำให้มีการสร้าง cAMP ขึ้นภายในเซล เพิ่มการขนส่งกลูโคส กรดอะมิโน $K^+$ และ $Ca^{2+}$ เข้าสู่เซล เติมกลุ่มอะเซติลให้กับฮิสโตน เติมกลุ่มฟอสเฟตให้กับโปรตีนในนิวเคลียสและเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิสมของลิปิดและคาร์โบไฮเดรต ต่อจากนั้นจะมีการสร้างโปรตีน RNA และ DNA ซึ่งจะนำไปสู่การแบ่งเซลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.7 เทคนิคการทำเลคตินให้บริสุทธิ์**

การทำเลคตินให้บริสุทธิ์ส่วนใหญ่ ใช้วิธีทั่วไปในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เช่นวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน และเจลฟิวเตรชัน อย่างไรก็ดีในระยะหลังนี้มีการนิยมใช้โครมาโตกราฟีแบบแอฟฟินิตีทำเลคตินให้บริสุทธิ์กันมากขึ้น เพราะประหยัดเวลา และได้ความบริสุทธิ์มากกว่า[27] ในโครมาโตกราฟีแบบแอฟฟินิตี เลคตินจะจับกับตัวดูดซับที่เหมาะสมและใช้น้ำตาลที่มีความจำเพาะเป็นตัวชะ ตัวดูดซับ ที่ใช้ในการทำเลคตินให้บริสุทธิ์มี 3 ประเภทคือ

1. โพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติหรือสภาพที่ถูกปรับปรุงโดยอุ่นกับกรด
2. ตัวค้ำจุนเชื่อมกับลิแกนด์ที่เป็นไกลโคโปรตีนหรือไกลโคเปปไตด์
3. ตัวค้ำจุนเชื่อมกับลิแกนด์ที่เป็นโมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์

ตัวอย่างของการดูดซับเหล่านี้มีให้ดูในตาราง 1.5

เลคตินบางชนิดเมื่ออยู่ในสิ่งสกัด (Crude extract) จะมีปฏิกิริยาได้ดีกว่าเมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วเพราะเลคตินบริสุทธิ์ขาดปัจจัยที่ช่วยให้เกิดปฏิกิริยา เรียกเลคตินประเภทนี้ว่า "Incomplete lectin" ตัวอย่างเลคตินชื่อ Taglin ที่บริสุทธิ์จะสามารถจับน้ำตาลได้เมื่อเติมอัลบูมินจากน้ำเลือดวัว (BSA) ลงไปด้วย[28] เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1.5 ตัวอย่างของตัวดูดซับที่ใช้ในการทำเลคตินให้บริสุทธิ์[27]

| Matrix | Ligand | Source of Lectin |
|---|---|---|
| Type I Polysaccharides | | |
| Sephadex | - | ถั่วแจ๊ค |
| Sepharose | - | เมล็ดละหุ่ง |
| Acid-treated Sepharose | - | เมล็ดคำบูชา |
| Type II Matrix-bound glyco-proteins and glyco-peptides | | |
| Sepharose | Thyroglobulin | ถั่วแดงหลวง |
| | Ovomucoid | มันฝรั่ง |
| Type III Matrix-bound mono and disaccharides | | |
| Sepharose | p-Aminophenyl-GalNAc | ถั่วเหลือง |
| CH-Sepharose | Galactosamine | ถั่วเหลือง |
| | 3-O-Methyl-gluco-samine | ถั่วยาง |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 1.8 ประโยชน์ของเลคติน [3,5]

1.8.1 การตรวจหมู่เลือด

เนื่องจากเลคตินบางชนิดมีความจำเพาะต่อหมู่เลือดในระบบเอบีโอและระบบเอ็ม-เอ็น จึงสามารถใช้เลคตินในการตรวจหมู่เลือดได้โดยเฉพาะในกรณีของเลือดหมู่โอนั้นไม่สามารถใช้แอนติซีรัมตรวจได้ตามปกติเพราะเลือดหมู่โอไม่มีแอนติเจน นอกจากนี้เลคตินยังเตรียมได้ง่ายและเก็บได้นานกว่าแอนติซีรัมด้วย

1.8.2 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลต่างกัน จึงจับกับเลคตินได้ไม่เหมือนกันตัวอย่างเช่น เลคตินจากงอกข้าวสาลีทำให้เซลของ Neisseria gonorrhoeae และ Neisseria meningitidis เกาะกลุ่มในขณะที่ไม่ทำให้เซลของ Neisseria ชนิดอื่น ๆ เกาะกลุ่ม จึงสามารถใช้เลคตินช่วยในการตรวจสอบโรคโกโนเรียได้ เป็นต้น

1.8.3 การวิจัยมะเร็ง

เลคตินหลายชนิดสามารถจับกับเซลที่ transform แล้วได้ โดยไม่จับกับเซลนั้นเมื่ออยู่ในสภาพปกติ ถึงแม้ในปัจจุบันยังไม่สามารถใช้เลคตินบ่งบอกว่าเซลนั้นเป็นมะเร็งหรือไม่แต่สามารถใช้เลคตินช่วยในการวิจัยสาเหตุของมะเร็ง ใช้เลคตินแยกเม็ดเลือดขาวที่เป็นมะเร็งออกจากเม็ดเลือดขาวปกติในขบวนการถ่ายไขกระดูก หรือใช้เลคตินจากถั่วแดงหลวงวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวว่าเป็นชนิดเรื้อรังหรือฉับพลัน เป็นต้น

1.8.4 การศึกษาผิวเซล

เนื่องจากเซลชนิดต่าง ๆ เช่นเม็ดเลือดแดง แบคทีเรีย และเซลร่างกาย มีส่วนที่เป็นน้ำตาลอยู่ที่ผิวเซลจึงสามารถใช้เลคตินศึกษาจำนวนและการกระจายของตัวต้อนรับ (receptor) ที่ผิวเซลได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาตัวต้อนรับของเลคตินจากถั่วแดงหลวงบนเยื่อหุ้มเซลเม็ดเลือดแดง พบว่าตัวต้อนรับนั้นอยู่กระจัดกระจายอย่างเป็นระเบียบ เป็นต้น

1.8.5 โครมาโตกราฟีแบบแอฟฟินิตี

เทคนิคนี้ใช้เตรียมสารให้บริสุทธิ์ได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง เพราะอาศัยความจำเพาะทางชีวภาพของสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ จับลิแกนด์ของตัวดูดซับในโครมาโตกราฟีลิแกนด์ที่มีประโยชน์ในการทำสารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุลให้บริสุทธิ์ได้คือเลคติน ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่น การใช้ Con A -Sepharose ในการทำเปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ การใช้ Lentil lectin-Sepharose ในการแยก $\alpha_2$-macroglobulin และ IgM ออกจากน้ำเลือด และการใช้ WGA-Sepharose ในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวแบบ I สองชนิดออกจากกันได้ เป็นต้น

1.8.6 ความรู้ทางโภชนาการ

การรับประทานเลคตินมากทำให้ภาวะการดูดซึมอาหารบกพร่อง จึงควรแก้ไขโดยไม่บริโภคดิบ ๆ เมื่อทำให้สุกแล้วเลคตินจะกลายเป็นสารอาหารโปรตีนที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อย่างไรก็ตาม เลคตินเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพต่ำเพราะขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด จึงไม่ควรรับประทานมากอยู่ดี

## 1.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน[29]

โปรตีนเป็นมหโมเลกุลที่ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวนมาก มาต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจึงทำได้โดยตรวจสอบส่วนที่เป็นกรดอะมิโน และ/หรือพันธะเปปไทด์ วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนมีหลายวิธี และแต่ละวิธีจะแตกต่างกันที่จุดตรวจสอบในโปรตีน ความไวในการตรวจสอบ ข้อดีและข้อเสียในการตรวจสอบ เป็นต้น วิธีที่นิยมใช้กันมากได้แก่

1.9.1 วิธีเจลดาล์ (Kjeldahl method)

วิธีเจลดาล์เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของสาร โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเมื่อนำมาต้มกับกรดซัลฟูริคเข้มข้นโดยมี $CuSO_4$ เป็นตัวเร่ง และ $K_2SO_4$ เป็นตัวช่วยทำให้ความร้อนของสารละลายเพิ่มขึ้น ไนโตรเจนจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไบซัลเฟต และเมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป เกลือแอมโมเนียมจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งสามารถกลั่นออกมาในรูปของกาซแอมโมเนีย เก็บกาซไว้ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริค ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในปริมาณมากเกินพอ จากนั้นจะวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียได้ โดยไตเตรตกรดที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนและใช้ methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วนำปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นทั้งหมดไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ วิธีนี้ให้ปริมาณโปรตีนที่แน่นอน แต่ต้องใช้สารตัวอย่างปริมาณมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.9.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

กรดอะมิโนชนิดทริปโตเฟน และไทโรซีน สามารถดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โปรตีนซึ่งปกติมีกรดอะมิโนทั้งสองชนิดในโมเลกุลจึงสามารถดูดกลืนแสงได้ด้วย จากการนำสารละลายที่มีโปรตีนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณปริมาณโปรตีนจากค่า extinction coefficient ของโปรตีนมาตรฐานบริสุทธิ์ จะได้ปริมาณโปรตีนเป็นค่าโดยประมาณ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ทำได้ง่ายและสารละลายโปรตีนที่ใช้ยังคงสภาพเดิม

1.9.3 วิธีไบยูเรต (Biuret method)

หลักในการวิเคราะห์คือ สารที่มีพันธะเปปไทด์ตั้งแต่สองพันธะขึ้นไปทำปฏิกิริยากับทองแดงซัลเฟตในสารละลายด่าง แล้วให้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร สีที่เกิดขึ้นต่อปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่ จึงใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ ปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดยวิธีนี้จะอยู่ในช่วง 1 - 20 มก. และสารละลายโปรตีนที่นำมาวัดต้องไม่มีเกลือแอมโมเนียม เพราะจะรบกวนปฏิกิริยา

1.9.4 วิธีโฟลินเลาวรี (Folin - Lowry method)

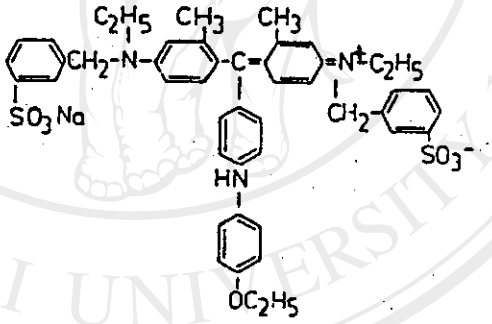
หลักในการวิเคราะห์คือ พันธะเปปไทด์ในโปรตีนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับทองแดงอิออนในด่าง แล้วสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับไทโรซีน และทริปโตเฟนในโปรตีนจะรีดิวซ์ฟอสโฟโมลิบเดทในสารละลายโฟลิน ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงได้ดีที่ 750 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณโปรตีนที่ใช้ และปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดยวิธีนี้จะอยู่ในช่วง 10 - 100 ไมโครกรัม สารละลายโปรตีนที่นำมาวัดต้องไม่มีสารรีดิวซ์อย่างอื่นอยู่ด้วย เพราะจะรบกวนปฏิกิริยา

1.9.5 วิธีแบรดฟอร์ด (Bradford method)[30]

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด อาศัยหลักการที่ Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่ออยู่เป็นอิสระและเมื่อจับกับโปรตีนจะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นต่างกันคือ 465 และ 595 นาโนเมตร ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร แปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนที่เติมลงไป ดังนั้นจึงสามารถใช้การจับโคแมสสีของโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ จากสูตรโครงสร้างของโคแมสสี ดังแสดงในรูป 1.4 จะเห็นว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมเลกุลมีความเป็นอโรมาติคสูง จึงสามารถจับกับโปรตีนบริเวณที่มีแขนงข้างซึ่งไม่ชอบน้ำมารวมกันอยู่เป็นกลุ่ม แขนงข้างที่ไม่ชอบน้ำในโปรตีนเป็นแขนงข้างของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติค และอลิฟาติค คือ เฟนิลอะลานีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ไกลซีน อะลานีน เวลีน ลูซีน และไอโซลูซีน นอกจากนี้ในโมเลกุลของโคแมสลีย์ยังมีประจุลบซึ่งสามารถจับกับโปรตีนตรงแขนงข้างของกรดอะมิโนชนิดเบส คือ ไลซีน อาร์จินีน และฮิสติดีน ได้ด้วยเพราะโปรตีนอยู่ในสารละลายกรด จึงทำให้แขนงข้างเหล่านี้มีประจุเป็นบวกดังนั้นแรงส่วนใหญ่ที่ใช้ในการจับระหว่างโปรตีนกับโคแมสลีคือแรงไม่ชอบน้ำ และแรงส่วนน้อยคือ แรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้าม




**รูปที่ 1.4** สูตรโครงสร้างของ Coomassie Brilliant Blue G-250[31]

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ในช่วง 10 - 100 ไมโครกรัม ดังนั้นความไวในการวัดจึงใกล้เคียงกับวิธีโฟลินเลาวรี แต่วิธีแบรดฟอร์ดมีข้อดีกว่าวิธีโฟลินเลาวรีหลายประการดังนี้

ประการแรก วิธีแบรดฟอร์ดทำได้ง่าย เพราะใช้น้ำยาเพียงชนิดเดียวและใช้เวลาเพียง 2 นาทีก็ตรวจวัดได้ ในขณะที่วิธีโฟลินเลาวรีต้องใช้น้ำยา 3 ชนิด และใช้เวลา 30 - 40 นาที

ประการที่สอง ค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ได้จากวิธีแบรดฟอร์ดค่อนข้างเสถียรกว่าวิธีโฟลินเลาวรี ดังนั้นวิธีแบรดฟอร์ดจึงไม่จำเป็นต้องวัดในช่วงเวลาสั้น ๆ เหมือนวิธีโฟลินเลาวรี

ประการที่สาม วิธีแบรดฟอร์ดมีสารรบกวนปฏิกิริยาน้อยกว่าวิธีโฟลินเลาวรี เช่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$K^+$ , $Mg^{2+}$ , EDTA , Tris , Thiol ,Carbohydrate และ detergent ให้สีกับวิธีแบรดฟอร์ดน้อยกว่าวิธีโฟลินเลาวรีมาก

จากวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนดังกล่าวมาแล้วทั้ง 5 วิธี สามารถสรุปข้อดีและข้อเสียในการตรวจสอบได้ ดังแสดงในตาราง 1.6 ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากเมล็ดหรือหัวสะสมอาหารของพืชจะเลือกใช้วิธีแบรดฟอร์ด เพราะมีความไวในการตรวจสอบสูง สารรบกวนน้อย และเทคนิคในการทำง่าย จึงเหมาะสำหรับสารตัวอย่างจำนวนมาก และโปรตีนที่วิเคราะห์ไม่ใช่โปรตีนบริสุทธิ์

ตาราง 1.6 ข้อดีและข้อเสียในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีต่าง ๆ

| Method and Sensitivity | Chemical Interference | Protein/ Protein Variation | Technique: Speed Complexity |
|---|---|---|---|
| Bio-Rad (Bradford) 1 μg | Slight | Significant | Rapid Simple (one reagent) |
| Lowry 1 μg | Great | Significant | Moderate Moderate |
| Biuret 100 μg | Moderate | Low | Moderate Simple |
| Kjeldahl 1 μg | Moderate | Low | Slow Complex |
| Absorbance[a] 10 μg | Moderate | Significant | Rapid Simple |

*a. At 280 nm.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.10 วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

เพื่อศึกษาเลคตินใหม่ที่มีอยู่ในพืชภาคเหนือ โดยเฉพาะในส่วนของพืชที่เป็นเมล็ดและหัวสะสมอาหาร โดยจะศึกษาการจับกับเซลเม็ดเลือดแดงของคน ความจำเพาะกับชนิดของน้ำตาล และปริมาณเลคตินในโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้ รวมทั้งสำรวจแนวทางการทำเลคตินให้บริสุทธิ์อย่างง่าย ๆ ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved