

3. ผลการทดลอง

3.1 สมบัติทางกายภาพของสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง

3.1.1 ปริมาตร

ในการสกัดพืชตัวอย่างด้วย PBS เพื่อนำมาใช้ศึกษาเลคตินนั้นจะใช้อัตราส่วนของน้ำหนักพืชต่อปริมาตร PBS เป็น 1 : 5 กรัม/มล. เสมอ จากการวัดปริมาตรสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง 14 ชนิด ดังแสดงในตาราง 3.1 พบว่าอัตราส่วนของน้ำหนักพืชต่อปริมาตรสิ่งที่สกัดได้สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ อัตราส่วน 1 : 3.6 ได้แก่ ก่อต่าง ๆ กวาวเครือ ชุน และเครือเขาปู่ อัตราส่วน 1 : 2.4 ได้แก่ ถั่วลายและถั่วยาง อัตราส่วน 1 : 1.8 ได้แก่ ถั่วราชมาษ ถั่วแดง และคำบุซา แสดงว่าส่วนของพืชที่นำมาสกัดนี้มีน้ำอยู่ในปริมาณไม่เท่ากัน

3.1.2 ความเป็นกรดต่าง

ในการสกัดพืชตัวอย่างด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งที่สกัดได้ไปวัด pH ได้ค่าดังแสดงในตาราง 3.1 จะเห็นได้ว่าสิ่งที่สกัดได้จากพืชทั้งหมดมี pH อยู่ในช่วง 6.2 - 6.7 ยกเว้นสิ่งที่สกัดได้จากชุนมี pH 7.1 และสิ่งที่สกัดได้จากมะขมมี pH 5.6 ในขณะที่ pH ของ PBS ที่ใช้สกัดเป็น 7.0 (ข้อ 2.5) แสดงว่าส่วนของพืชตัวอย่างที่นำมาสกัดมีสภาพเป็นกรดอ่อน ๆ ยกเว้นชุนซึ่งมีสภาพเป็นกลาง นอกจากนี้เมื่อทดลองเพิ่มน้ำหนักพืชต่อปริมาตร PBS เป็น 1 : 2 กรัม/มล. พบว่าสิ่งที่สกัดได้มี pH ลดลงอีกเล็กน้อยเท่านั้น (ตาราง 3.1) แสดงว่าส่วนของพืชตัวอย่างมีสภาพเป็นกรด และ PBS ที่ใช้สกัดมีประสิทธิภาพการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ

3.1.3 ความขุ่น

การวิเคราะห์ความขุ่นของสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างทำได้โดยนำสิ่งที่สกัดได้ไปวัดค่าการกระเจิงแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สารใดมีความขุ่นมากจะวัดค่าการกระเจิงแสงได้สูง และสารใดมีความขุ่นน้อยจะวัดค่าการกระเจิงแสงได้ต่ำ

ในการสกัดพืชตัวอย่างด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. แล้วนำสิ่งที่สกัดได้ไปวัดการกระเจิงแสงได้ค่าดังแสดงในตาราง 3.1 จะเห็นได้ว่าสิ่งสกัดจากคำบุซามีความขุ่นมากที่สุด เพราะวัดค่าการกระเจิงแสงได้ 5.80 ในขณะที่สิ่งสกัดจากกวาวเครือ และก่อบ้านมี

ตาราง 3.1 สมบัติทางกายภาพ ปริมาณโปรตีนและเลคตินในสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง

ลำดับที่	ชื่อพืช	น.น. พืช: ปริมาณPBS (กรัม/มล.)	น.น. พืช (กรัม)	ปริมาณสิ่งที่ สกัดได้ (มล.)	pH ของ สิ่งที่สกัดได้	การกระเจิง แสงของสิ่งที่ สกัดได้ (AU)	ปริมาณโปรตีน(มก./มล.)		ความสามารถ ในการทำให้ เม็ดเลือดแดง เกาะกลุ่ม
							ไม่โดอะไลซ์	โดอะไลซ์	
1	ก่อนเคี้ยว	1:5	20	70	6.7	0.26	0.75	0.90	-
		1:2	25	ไม่ได้วัด	6.6	0.52	1.14	0.60	-
2	ก่อนปั่น	1:5	20	70	6.5	0.08	1.00	0.90	-
		1:2	25	ไม่ได้วัด	6.4	0.29	1.10	0.63	-
3	ก่อนหลอม	1:5	20	72	6.6	0.26	1.50	1.20	-
		1:2	25	ไม่ได้วัด	6.5	0.62	1.89	1.01	-
4	กวางเครือ	1:5	30	114	6.5	0.07	0.50	0.42	-
		1:2	35	ไม่ได้วัด	6.2	0.06	0.60	0.60	-
5	ขนุน	1:5	30	110	7.1	0.45	3.00	3.04	+
6	เครือเขาปู้	1:5	20	72	6.4	0.80	0.52	0.50	-
7	คำบุซา	1:5	30	53	6.4	5.80	48.16	47.60	+
8	ถั่วแดง	1:5	20	36	6.3	0.26	11.60	5.70	-
9	ถั่วแปบ	1:5	30	98	6.3	0.52	27.30	27.00	+
10	ถั่วราชมาช	1:5	20	38	6.3	0.52	4.30	4.40	+
11	ถั่วลาย	1:5	20	47	6.2	0.48	5.85	2.52	+
12	ถั่วยาง	1:5	20	47	6.3	0.25	13.00	6.00	+
13	มะขม	1:5	20	32	5.6	0.14	0.34	0.20	-
14	ไมยราพยักษ์	1:5	30	ไม่ได้วัด	6.2	0.52	0.55	0.42	+

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
+ หมายถึง ตรวจพบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ความขุ่นน้อยที่สุดเพราะวัดค่าการกระเจิงแสงได้ 0.075 นอกจากนี้สิ่งสกัดจากก้อเต็อย ก้อแหลม ถั่วแดง และถั่วยางมีค่าการกระเจิงแสงเท่ากับ 0.26 และสิ่งสกัดจากขุ่น ถั่วแปบ ถั่วราชมาข ถั่วลายและไมยราบยักษ์มีค่าการกระเจิงแสงอยู่ในช่วง 0.45 - 0.52

3.2 ปริมาณ โปรตีน ในสิ่งที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง

3.2.1 การศึกษาปริมาณ Coomassie ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

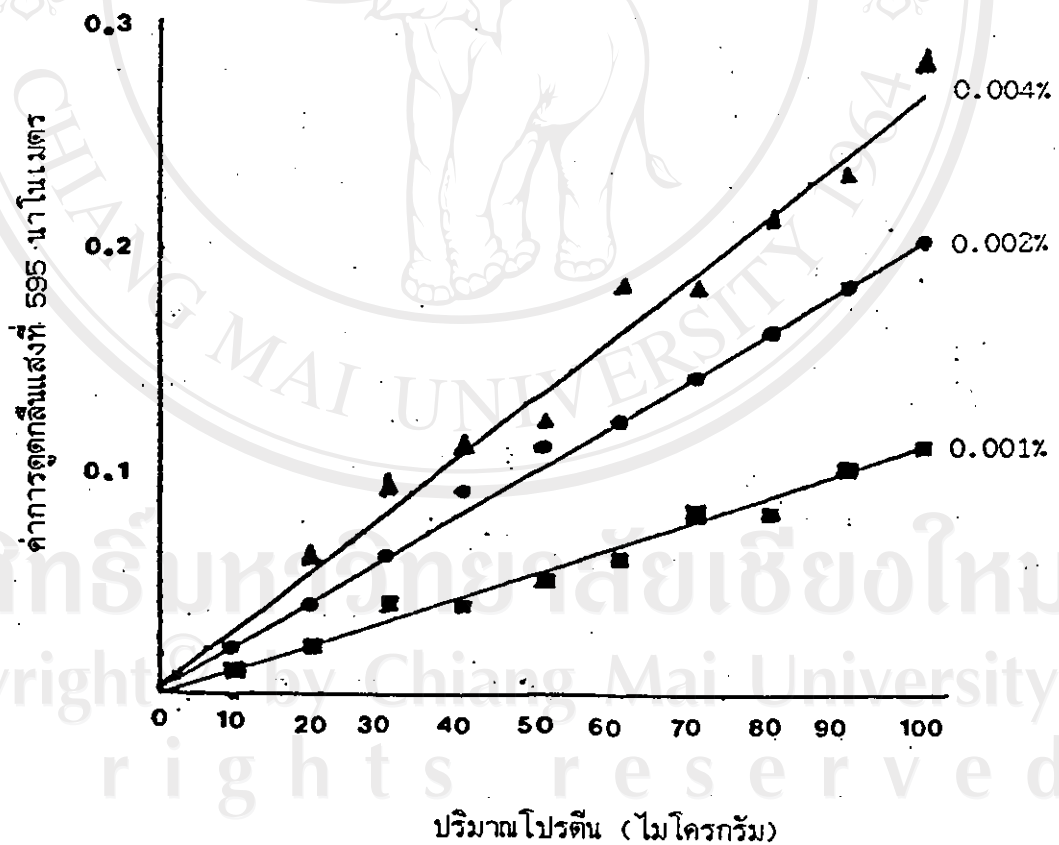
เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford ใช้สารละลาย Coomassie ที่มี Coomassie brilliant Blue G-250 เข้มข้น 0.01%⁽³⁰⁾ และเมื่อนำมาทดลอง ทำกราฟมาตรฐานพบว่า Blank มีค่าการดูดกลืนแสงสูงมากจนตั้งศูนย์ของเครื่อง Spectronic 21 ไม่ได้ ดังนั้นจึงทดลองลดความเข้มข้นของ Coomassie ลงและศึกษากราฟมาตรฐานได้ผลดังแสดงในรูป 3.1 กราฟที่ได้จากการใช้ 0.002% Coomassie มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.8 เท่าของกราฟที่ได้จากการใช้ 0.001% Coomassie ในขณะที่กราฟที่ได้จากการใช้ 0.004% Coomassie มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.3 เท่าของกราฟที่ได้จากการใช้ 0.002% Coomassie ทำให้สรุปได้ว่า 0.002% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Coomassie สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสภาวะที่ทำการทดลอง

ดังนั้นสารละลาย Coomassie ที่ใช้จึงประกอบด้วย 0.002%(W/V) Coomassie Brilliant Blue G-250 , 4.7%(W/V) ethanol และ 85%(W/V) phosphoric acid

3.2.2 การศึกษาเสถียรภาพของสารละลาย Coomassie

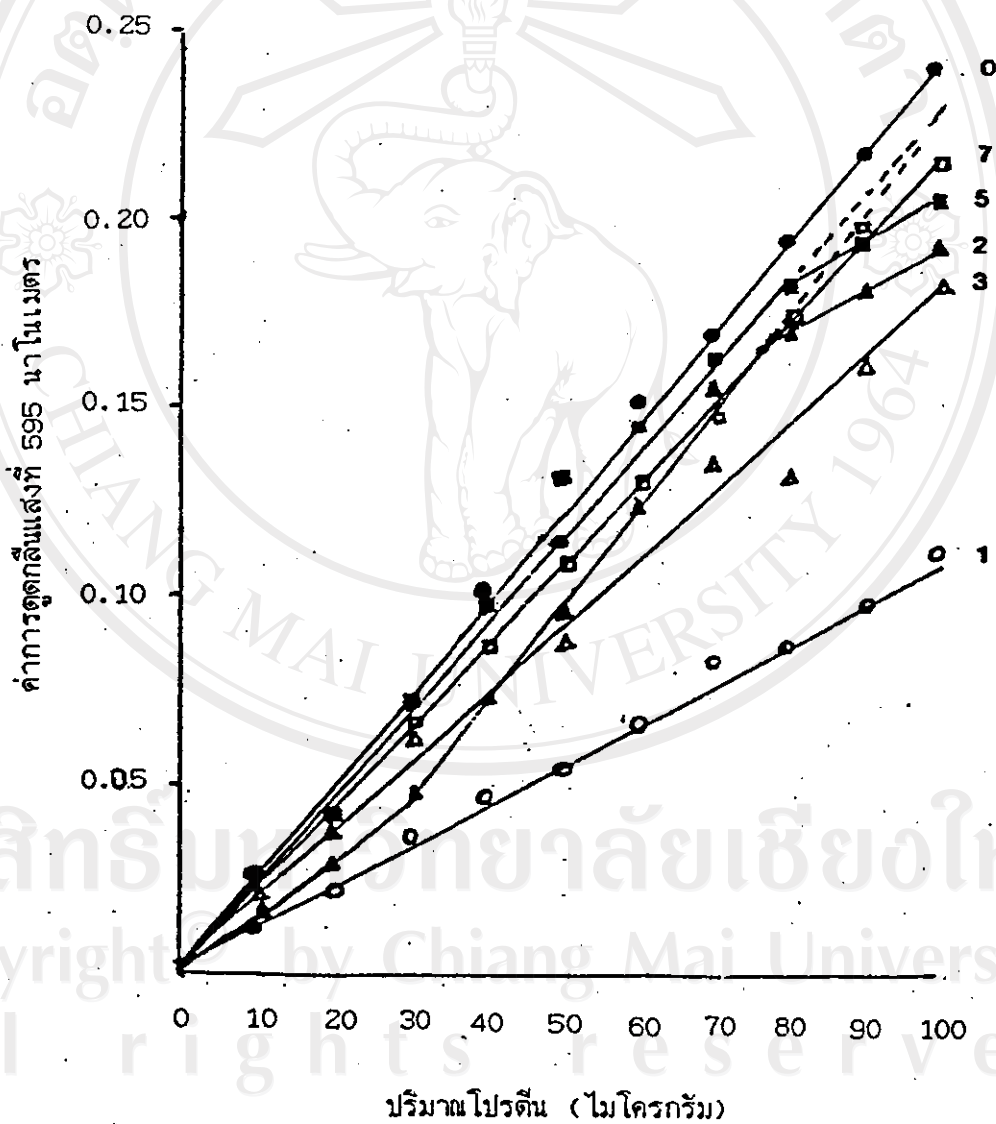
จากการทดลองเตรียมสารละลาย Coomassie เก็บไว้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในช่วง 0 - 7 วันพบว่าสารละลาย Coomassie มีประสิทธิภาพเปลี่ยนไปเพราะให้กราฟมาตรฐานที่มีค่าการดูดกลืนแสงขึ้น ๆ ลง ๆ ดังแสดงในรูป 3.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้สารละลาย Coomassie ที่เตรียมใหม่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดในขณะที่กราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้สารละลาย Coomassie ที่เตรียมแล้วเก็บไว้หนึ่งวัน มีค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุด และค่าการดูดกลืนแสงจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอีกเมื่อใช้สารละลาย Coomassie ที่เตรียมแล้วเก็บไว้นานขึ้นจนกระทั่งถึง 5 - 7 วัน จะให้กราฟมาตรฐานที่มีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้สารละลาย Coomassie เตรียมใหม่ตั้งนั้น เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานที่มีค่าการดูด-

กลืนแสงไม่ต่างกันมากนักในแต่ละการทดลอง จึงใช้สารละลาย Coomassie ที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง และใช้ภายในวันเดียวเท่านั้น



รูป 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ โปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำน้ำที่มีความเข้มข้นของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ต่างกัน

ตัวเลขที่แสดงคือเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ในสารละลาย Coomassie



รูป 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน กับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้สารละลาย Coomassie ที่มีอายุต่างกัน
ตัวเลขที่แสดงคือวันที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้สารละลาย Coomassie ที่เตรียมในวันที่ 0

3.2.3 ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดได้ทั้งก่อนและหลังการไดอะไลซ์

ในการสกัดพืชตัวอย่างด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล. นำสิ่งที่สกัดได้ไปไดอะไลซ์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับสิ่งที่สกัดได้ก่อนไดอะไลซ์ ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.1 จะเห็นได้ว่าสิ่งสกัดจากพืชแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนก่อนไดอะไลซ์ และหลังไดอะไลซ์ใกล้เคียงกันยกเว้นสิ่งสกัดจากถั่วแดง ถั่วลาย และถั่วยางเท่านั้นที่มีปริมาณโปรตีนก่อนไดอะไลซ์เป็นสองเท่าของปริมาณโปรตีนหลังไดอะไลซ์ ทั้งนี้อาจเกิดจากสารโมเลกุลเล็กในสิ่งสกัดจากถั่วดังกล่าว สามารถให้สีน้ำเงินกับสารละลาย Coomassie และถูกกำจัดออกไปในระหว่างการไดอะไลซ์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสิ่งที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ ก่อนทำการไดอะไลซ์พบว่า สิ่งสกัดจากคําบูชามีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 48 มก./มล. และสิ่งสกัดจากกวาวเครือ เครือเขาปู้ มะขม และ ไผ่รวกมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดคือ 0.3-0.5 มก./มล. นอกจากนี้สิ่งสกัดจากถั่วชนิดต่าง ๆ เช่น ถั่วราชมาฆ และถั่วลาย มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 1-5 มก./มล. และสิ่งสกัดจากถั่วแดง ถั่วแปบ และถั่วยางมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 10-30 มก./มล.

ในกรณีของสิ่งสกัดที่มีปริมาณโปรตีนน้อย และวิเคราะห์ไม่พบเลคติน เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ และกวาวเครือ ได้ทดลองเพิ่มอัตราส่วนของน้ำหนักรวมต่อปริมาตร PBS ในการสกัด เป็น 1 : 2 กรัม/มล. เพื่อให้ได้สิ่งสกัดที่มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น จากข้อมูลในตาราง 3.1 แสดงว่าปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากเมล็ดถั่ว ก่อนทำการไดอะไลซ์เป็นสองเท่าของปริมาณโปรตีนหลังไดอะไลซ์ ส่วนปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากกวาวเครือก่อนและหลังไดอะไลซ์ใกล้เคียงกัน ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากพืชดังกล่าวก่อนทำการไดอะไลซ์อยู่ในช่วง 1.1-1.5 เท่าของปริมาณโปรตีนเมื่อสกัดด้วยอัตราส่วน 1 : 5 กรัม/มล.

3.3 เลคตินในสิ่งสกัดที่ได้จากพืชตัวอย่าง

3.3.1 การตรวจพบเลคตินในพืชตัวอย่าง

จากการสุ่มตัวอย่างพืชที่อยู่ในตระกูลถั่ว ตระกูลถั่วและตระกูลอื่น ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดตาก โดยนำเฉพาะส่วนที่เป็นเมล็ดหรือหัวมาสกัดด้วย PBS แล้วนำสิ่งที่สกัด

ได้ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงใน ตาราง 3.1 เม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบเป็นเม็ดเลือดแดงธรรมชาติซึ่งยังไม่ได้รับการปรับปรุงด้วยเอนไซม์ใด ๆ ทั้งสิ้น จากพืชตัวอย่าง 14 ชนิดที่นำมาทดสอบพบว่าพืช 7 ชนิด มีเลคตินเพราะสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ได้แก่ ขนุน คำบุซา ถั่วแปบ ถั่วราชมาษ ถั่วลาย ถั่วยาง และไมยราบยักษ์ ส่วนพืชที่เหลืออีก 7 ชนิดนั้น ตรวจไม่พบเลคติน

ในการเตรียมสิ่งที่สกัดได้จากพืชเพื่อตรวจหาเลคตินนั้น โดยปกติใช้อัตราส่วนของน้ำหนักพืชต่อปริมาตรของ PBS เป็น 1 : 5 สำหรับกรณีของพืชที่ตรวจไม่พบเลคติน ได้ทดลองเพิ่มอัตราส่วนในการสกัดเป็น 1 : 2 แล้วก็ยังคงตรวจไม่พบเลคตินอีก เช่นในกรณีของถั่วชนิดต่าง ๆ และกวาวเครือ เป็นต้น (ตาราง 3.1)

3.3.2 ความจำเพาะต่อหมู่เลือดของเลคติน

จากการนำสิ่งที่สกัดได้จากพืชทั้ง 7 ชนิดที่ตรวจพบเลคตินไปทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เพื่อวิเคราะห์หาค่าไตเตอร์ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.2 เม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบแบ่งเป็น 3 ชนิด ตามระบบเอบีโอ จากการเปรียบเทียบความสามารถของเลคตินจากพืชแต่ละชนิดในการทำให้เม็ดเลือดแดง 3 ชนิดเกาะกลุ่มพบว่า เลคตินจากพืชทุกชนิดยกเว้นถั่วราชมาษสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่เท่ากันทั้งหมด เอ บี และ โอ แสดงว่าเลคตินเหล่านั้น ไม่มีความจำเพาะกับหมู่เลือด ในขณะที่เลคตินจากถั่วราชมาษสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงหมู่เอเกาะกลุ่มได้มากกว่าหมู่บีถึงร้อยเท่า และไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงหมู่โอเกาะกลุ่มได้เลย แสดงว่าเลคตินจากถั่วราชมาษมีความจำเพาะต่อเลือดหมู่เอ ดังนั้นเลคตินที่ตรวจพบในพืชตัวอย่างจึงมีทั้งชนิดที่มีความจำเพาะและไม่จำเพาะต่อหมู่เลือด ทั้งขึ้นกับแหล่งที่ได้มาของเลคตินเหล่านั้น

3.3.3 ปริมาณเลคตินในสิ่งที่สกัดได้ทั้งก่อนและหลังการไดอะไลซ์

จากการเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของ เลคตินในสิ่งที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดก่อนและหลังทำการไดอะไลซ์พบว่าค่าไตเตอร์เท่ากัน (ตาราง 3.2) ทั้งนี้ไม่ว่าจะใช้เลือดหมู่เอ บี หรือโอ ในการทดสอบก็ตาม ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในเมล็ดหรือหัวของพืชสามารถกระทำได้ในสิ่งที่สกัดมาโดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องทำการไดอะไลซ์ เพราะสารโมเลกุลเล็กในสิ่งที่สกัดไม่ได้รับกวนความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ตาราง 3.2 ปริมาณเลดดินและปริมาณโปรตีน ในสิ่งสกัดได้จากพืชตรวจพบเลดดิน

พืช	ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (โคเตอร์)						ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)		Specific activity* (โคเตอร์/มก.)	
	ไม่โคอะไลซ์			โคอะไลซ์			ไม่โคอะไลซ์	โคอะไลซ์	ไม่โคอะไลซ์	โคอะไลซ์
	A	B	O	A	B	O	-	-	A	A
ขนุน	65,536	65,536	32,768	65,536	65,536	32,768	3.00	3.04	218,453	215,579
คำมูซา	128	128	128	256	128	128	48.16	47.60	26	54
คำมูซา(อ่อน)	16	16	16	16	16	16	6.72	6.02	24	26
ถั่วมถ	512	512	512	512	512	512	27.30	27.00	188	190
ราชมาษ	1,024	8	0	1,024	16	0	4.30	4.40	2,381	2,327
ถั่วลาย	128	128	128	128	128	128	5.85	2.52	219	508
ถั่วยาง	2	4	4	2	4	4	13.00	6.00	2	3
ไมยราบยักษ์	8	4	16	8	8	8	0.55	0.42	145	190
ถั่วเน่า	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	128	128	128	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	-	-
ถั่วลิสง	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	0	0	0	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	-	-
ถั่วเหลือง	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	2	2	2	ไม่ได้วัด	ไม่ได้วัด	-	-

* Specific activity = ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (โคเตอร์/0.1 มล.) X 10

ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าไต่เตอร์ของ เลคติน ในสิ่งที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ พบว่า เลคตินจากขนุนมีค่าไต่เตอร์ต่อ มล. ของสิ่งสกัดมากที่สุดคือ 6.6×10^5 เลคตินจากถั่วราชมาษ และถั่วแปบมีค่ารองลงมาคือ $(0.5-1.0) \times 10^4$ เลคตินจากถั่วลายและค้ำชูามีค่า 1.3×10^3 เลคตินจากไมยราบยักษ์และถั่วยางมีค่าน้อยที่สุดคือ 40 - 80 นั่นคือขนุนมีปริมาณเลคตินมากที่สุด และถั่วยางมีปริมาณ เลคตินน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าไต่เตอร์ของ เลคตินต่อมิลลิกรัมของ โปรตีน ในสิ่งที่สกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เลคตินจากขนุนมีค่ามากที่สุดคือ 2.2×10^5 เลคตินจากถั่วราชมาษมีค่ารองลงมาคือ 2.3×10^3 เลคตินจากถั่วลาย ถั่วแปบและไมยราบยักษ์มีค่า $(1.5-2.2) \times 10^2$ เลคตินจากค้ำชูาและถั่วยางมีค่าน้อยที่สุดคือ 2 - 30 นั่นคือเลคตินจากขนุนมีค่า Specific activity หรือมีความบริสุทธิ์สูงสุด ในขณะที่ เลคตินจากถั่วยางมีความบริสุทธิ์ต่ำที่สุด

ในกรณีของค้ำชูา พิจารณาปริมาณเลคตินที่สกัดได้จากเมล็ดแก่ และเมล็ดอ่อน (ตาราง 3.2) พบว่า เมล็ดค้ำชูาแก่ให้ปริมาณเลคตินมากกว่าเมล็ดค้ำชูาอ่อนถึงแปดเท่า แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเลคตินต่อปริมาณ โปรตีนแล้วทั้ง เมล็ดแก่และ เมล็ดอ่อนให้ เลคตินที่มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เมล็ดพืชแก่จัดในทุกการทดลอง ยกเว้นไมยราบยักษ์ที่จำเป็นต้องใช้เมล็ดอ่อนเพราะเมล็ดแก่ นั้นแข็ง เกินกว่าที่จะสามารถทำให้แตกได้โดยใช้ เครื่องบดที่มีอยู่

3.4 ผลของโลหะไอออนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลือด

เนื่องจากเลือดบางชนิดที่มีโลหะไอออนเป็นส่วนประกอบของโมเลกุล โลหะไอออนนี้ทำหน้าที่สำคัญในการจับของเลือดกับคาร์โบไฮเดรต และช่วยรักษาโครงสร้างตติยภูมิของเลือดให้คงรูปอยู่เสมอ โลหะไอออนเหล่านี้ได้แก่ Ca^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} และ Cu^{2+} ตัวอย่างของเลือดที่ต้องการโลหะไอออนได้แก่เลือดจากถั่วแฉะ ซึ่งในหนึ่งหน่วยย่อยจะมี Ca^{2+} และ Mn^{2+} อยู่อย่างละหนึ่งไอออน ดังนั้นการเติมโลหะไอออนลงในสิ่งที่สกัดได้จากพืชอาจช่วยเพิ่มความสามารถของเลือดในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งที่สกัดได้จากพืชซึ่งไม่สามารถตรวจพบเลือด

ผลการเติมโลหะไอออน 3 ชนิดคือ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงในสิ่งที่สกัดจากพืช 7 ชนิดที่ตรวจไม่พบเลือดเปรียบเทียบกับสิ่งที่สกัดจากถั่วแฉะ และค้ำชูชา แสดงในตาราง 3.3 สิ่งที่สกัดได้จากพืชซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ชุดควบคุม) เมื่อนำมาเติมโลหะไอออนแล้วก็ยังไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ชุดทดสอบ) ดังนั้นการตรวจไม่พบเลือดในพืชทั้ง 7 ชนิดดังกล่าวไม่ได้มีสาเหตุมาจากการขาดโลหะไอออนที่จำเป็นสำหรับเลือดในขณะทำการตรวจสอบ ทั้งนี้อาจยืนยันได้จากการเติมโลหะไอออนลงในสิ่งที่สกัดจากถั่วแฉะแล้วไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน ในขณะที่การเติมโลหะไอออนลงในสิ่งที่สกัดจากค้ำชูชาเพิ่มความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้เล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับโลหะไอออนอีก 2 ชนิดคือ Zn^{2+} และ Cu^{2+} ไม่สามารถนำมาทำการตรวจสอบได้ เพราะโลหะไอออนทั้งสองทำให้เม็ดเลือดตกตะกอนได้โดยไม่มีเลือด และตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นเกล็ดสีคล้ำ

ตาราง 3.3 ผลการเติม Ca^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงในสิ่งที่สกัดได้จากพืชที่ตรวจไม่พบโลหะดิน

ชื่อพืช	ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)					
	A		B		O	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
ก้อเด็อย	0	0	0	0	0	0
ก้อมัน	0	0	0	0	0	0
ก้อแหลม	0	0	0	0	0	0
กวาวเครือ	0	0	0	0	0	0
เครือเขาปู่	0	0	0	0	0	0
ถั่วแดง	0	0	0	0	0	0
มะขม	0	0	0	0	0	0
ถั่วแฉ็ค	128	128	128	128	128	128
ค้ำบู่ซ่า	128	256	128	256	128	256

3.5 เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งปรับปรุงด้วยนิวรามิเนส

เนื่องจากเลคตินบางชนิดเช่น เลคตินจากถั่วลิสง ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกาะกลุ่ม แต่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสแล้ว เกิดการเกาะกลุ่มได้ โดยที่นิวรามิเนสเป็นแอนไซม์ที่เร่งการตัดกรด Sialic ออกจากปลายอิสระของคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงนำสิ่งที่สกัดได้จากพืช 7 ชนิดซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกาะกลุ่มได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสแล้ว ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.4 เม็ดเลือดแดงที่ใช้เป็นเม็ดเลือดหมู่เอทั้งในสภาพปกติและสภาพที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสในขณะที่ถั่วลิสง ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกาะกลุ่ม แต่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสแล้วเกาะกลุ่ม สิ่งที่สกัดได้จากถั่วชนิดต่าง ๆ เครือเขาปู่ ถั่วแดง หรือมะขมไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้เลยทั้งสองสภาพแต่ที่สกัดจากกวาวเครือมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสแล้วเกาะกลุ่มกันได้ เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสิ่งที่สกัดจากกวาวเครือมีเลคติน

นอกจากนี้ สิ่งที่สกัดได้จากถั่วลายมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติถึงแปดเท่าแสดงว่าสิ่งที่สกัดจากถั่วลายมีเลคตินอย่างน้อย 2 ชนิด ชนิดหนึ่งจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตที่ผิวของเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติ และอีกชนิดหนึ่งจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตที่ผิวของเม็ดเลือดแดงตรงส่วนที่กรด Sialic ถูกตัดออกไป

ตาราง 3.4 ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดสแล้ว
เกาะกลุ่ม

ชื่อพืช	ความสามารถทำให้ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)	
	เม็ดเลือดแดงสภาพปกติ	เม็ดเลือดแดงปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดส
ก้อเต็อย	0	0
ก้อแป้น	0	0
ก้อแหลม	0	0
กวาวเครือ	0	8
เครือเขาปู้	0	0
ถั่วแดง	0	0
ถั่วลาย	128	1024
มะขม	0	0
ไมยราพยักษ์	8	8
ถั่วลิสง	0	1024

3.6 เลคตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งปรับปรุงด้วยทริปซิน

เนื่องจากเลคตินบางชนิดเช่น เลคตินจากถั่วเหลือง สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินแล้วเกิดการเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติถึงร้อยเท่า โดยที่ทริปซินเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงนำสิ่งที่สกัดได้จากพืช 7 ชนิด ซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกาะกลุ่มได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินแล้วได้ผลดังแสดงใน ตาราง

3.5 เม็ดเลือดแดงที่ใช้เป็นเม็ดเลือดแดงหมู่อะ ทั้งในสภาพปกติและสภาพที่ปรับปรุงด้วยทริปซิน ในขณะที่สิ่งสกัดจากถั่วเหลือง ทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกือบพันเท่า สิ่งสกัดจากถั่วชนิดต่าง ๆ ถั่วแดง หรือมะขมไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้เลยทั้งสองสภาพ แต่ทว่าสิ่งสกัดจากกวาวเครือหรือเครือเขาปู่มีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินแล้วเกาะกลุ่มกันได้ เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าทั้งกวาวเครือและเครือเขาปู่มีเลคติน

นอกจากนี้ สิ่งที่สกัดได้จากถั่วลาย หรือถั่วยางมีความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินเกิดการเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติถึง 64 หรือ 16 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่การปรับปรุงเม็ดเลือดแดงด้วยทริปซิน ไม่ได้มีผลต่อความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดโดยเลคตินจากไมยราบยักษ์

ตาราง 3.5 ความสามารถของเลิศดินในการทำให้เม็ดเลือดแดงที่รับปรุงด้วยทรีปซินแล้ว
เกาะกลุ่ม

ชื่อพืช	ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)	
	เม็ดเลือดแดงสภาพปกติ	เม็ดเลือดแดงปรับปรุงด้วยทรีปซิน
ก่อเต็อย	0	0
ก่อแป้น	0	0
ก่อแหลม	0	0
กวาวเครือ	0	16
เครือเขาปู่	0	4
ถั่วแดง	0	0
ถั่วลาย	128	8192
ถั่วยาง	2	32
มะขม	0	0
ไมยราบยักษ์	8	8
ถั่วเหลือง	2	1024

3.7 ความจำเพาะของเลคตินต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต

ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่จับจำเพาะกับเลคตินจะเป็นชนิดเดียวกับคาร์โบไฮเดรตที่สามารถยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินนั้น (ข้อ 2.13) สำหรับเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบความจำเพาะนี้จะใช้เม็ดเลือดแดงหมู่เอเท่านั้น เพราะเลคตินส่วนใหญ่ที่ตรวจพบไม่มีความจำเพาะต่อหมู่เลือดยกเว้นเลคตินจากถั่วราชมาซึ่งมีความจำเพาะต่อเลือดหมู่เอ (ตาราง 3.2) การทดสอบกระทำกับสิ่งที่สกัดได้ทั้งก่อนและหลังการไดอะไลส์

3.7.1 เลคตินจากขนุน

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของสิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดขนุนสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย methyl- α -D-galactopyranoside, α -D-melibiose, N-acetyl-D-galactosamine และ D-galactose ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย methyl- β -D-galactopyranoside, α -D-fucose, D-glucose, D-mannose และ น้ำตาลอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3.6 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากเมล็ดขนุนจับจำเพาะกับปลาย α -D-galactosyl

3.7.2 เลคตินจากค้ำชูชา

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของสิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดค้ำชูชาสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย α -lactose, α -D-melibiose, D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, D-raffinose และ α -D-fucose ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย D-glucose, D-mannose และ น้ำตาลอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3.7 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากเมล็ดค้ำชูชาจับจำเพาะกับปลาย D-galactosyl

ตาราง 3.6 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคตินจากขนุน

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (mM)	
	ไม่ไดอะไลซ์	ไดอะไลซ์
methyl- α -D-galactopyranoside	6.25	ไม่ได้ทดสอบ
α -D-melibiose	12.5	12.5
N-acetyl-D-galactosamine	50	50
D-galactose	100	100

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

methyl- β -D-galactopyranoside	D-fructose	D-arabinose
α -D-fucose	D-maltose	D-ribose
D-glucose	Sucrose	D-xylose
D-mannose		

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 167 mM

α -lactose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 133 mM

N-acetyl-D-glucosamine

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 70 mM

D-raffinose

ตาราง 3.7 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคติน จากค้ำชูชา

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม(mM)	
	ไม่ไดอะไลซ์	ไดอะไลซ์
α -lactose	0.04	0.08
α -D-melibiose	0.10	0.10
D-galactose	0.20	0.20
N-acetyl-D-galactosamine	0.39	0.39
methyl- β -D-galactopyranoside	1.56	ไม่ได้ทดสอบ
D-raffinose	2.19	ไม่ได้ทดสอบ
α -D-fucose	3.12	ไม่ได้ทดสอบ
methyl- α -D-galactopyranoside	3.12	ไม่ได้ทดสอบ

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่มีความเข้มข้น 200 mM

D-arabinose

D-fructose

D-maltose

D-ribose

D-glucose

sucrose

D-xylose

D-mannose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่มีความเข้มข้น 133 mM

N-acetyl-D-glucosamine

3.7.3 เลคตินจากราชมาษ

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ของสิ่งที่สกัดได้จากถั้วราชมาษ สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย N-acetyl-D-galactosamine , α -D-melibiose , D-galactose และ methyl- α -D-galactopyranoside ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย methyl- β -D-galactopyranoside , α -D-fucose , D-glucose , D-mannose และ น้ำตาลอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3.8 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั้วราชมาษจับจำเพาะกับปลาย N-acetyl-D-galactosamine

3.7.4 เลคตินจากถั้วแปบ

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ของสิ่งที่สกัดได้จากถั้วแปบ สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย methyl- α -D-mannopyranoside = D-mannose , N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucose ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย D-galactose และน้ำตาลอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3.9 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั้วแปบจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl หรือ D-glucosyl

3.7.5 เลคตินจากถั้วยาง

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ของสิ่งที่สกัดได้จากถั้วยาง สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย methyl- α -D-mannopyranoside , D-mannose , D-glucose = D-maltose = sucrose และ D-fructose ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย D-galactose และน้ำตาลอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3.10 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั้วยางจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl หรือ D-glucosyl

ตาราง 3.8 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคติน จากถั่วราชมาษ

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม(mM)	
	ไมโดอะโลซ์	โดอะโลซ์
N-acetyl-D-galactosamine	12.5	25
α -D-melibiose	50	50
D-galactose	200	200
methyl- α -D-galactopyranoside	200	ไม่ได้ทดสอบ

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

methyl- β -D-galactopyranoside D-fructose D-arabinose
 α -D-fucose D-maltose D-ribose
D-glucose Sucrose D-xylose
D-mannose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 167 mM

α -lactose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 133 mM

N-acetyl-D-glucosamine

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 70 mM

D-raffinose

ตาราง 3.9 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคติน จากถั่วแปบ

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (mM)	
	ไม่ไดอะไลซ์	ไดอะไลซ์
methy- α -D-mannopyranoside	6.25	ไม่ได้ทดสอบ
D-mannose	6.25	12.5
N-acetyl-D-glucosamine	8.3	16.7
D-glucose	25.0	25.0
3-O-methyl-D-glucopyranose	100	ไม่ได้ทดสอบ
D-fructose	100	100
sucrose	100	100
D-maltose	200	200

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

D-galactose

D-arabinose

D-ribose

N-acetyl-D-galactosamine

α -D-melibiose

D-xylose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 167 mM

α -lactose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 110 mM

D-cellobiose

ตาราง 3.10 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคติน จากถ้วยยาง

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม(mM)	
	ไมโดอะโลซ์	โดอะโลซ์
3-O-methyl-D-glucopyranose	0.78	ไม่ได้ทดสอบ
methyl- α -D-mannopyranoside	0.78	ไม่ได้ทดสอบ
D-mannose	3.12	1.56
D-glucose	6.25	6.25
D-maltose	6.25	3.12
sucrose	6.25	6.25
D-fructose	12.5	12.5
N-acetyl-D-glucosamine	16.7	8.3

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

N-acetyl-D-galactosamine D-arabinose D-ribose

D-galactose α -D-melibiose D-xylose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 167 mM

α -lactose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 110 mM

D-cellobiose

3.7.6 เลคตินจากกวาวเครือ

เลคตินจากกวาวเครือไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพปกติเกาะกลุ่ม แต่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสแล้วเกาะกลุ่ม (ข้อ 3.5) ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม (ข้อ 3.6) ดังนั้นการศึกษาความจำเพาะของเลคตินจากกวาวเครือต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรตต้องทำการทดสอบความสามารถของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงทั้งชนิดที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสและชนิดที่ปรับปรุงด้วยทริปซิน โดยเม็ดเลือดแดงที่เลือกใช้ในทั้งสองกรณีเป็นเม็ดเลือดแดงหมู่เอ และเลคตินที่ใช้ทดสอบเป็นสิ่งที่สกัดได้จากกวาวเครือก่อนทำการไตอะไลซ์

การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนส โดยเลคตินจากกวาวเครือกระทำการทดลองเปรียบเทียบกับเลคตินจากถั่วลิสง ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.11 ในขณะที่เลคตินจากกวาวเครือถูกยับยั้งด้วย methyl- α -D-galactopyranoside , α -D-melibiose และไม่ถูกยับยั้งด้วย N-acetyl-D-galactosamine เหมือนเลคตินจากถั่วลิสง แต่เลคตินจากถั่วลิสงสามารถถูกยับยั้งด้วย α -lactose , D-galactose , methyl- β -D-galactopyranoside และ α -D-fucose ซึ่งไม่สามารถตรวจพบการยับยั้งเลคตินจากกวาวเครือ ดังนั้น จึงยังไม่อาจสรุปชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคตินจากกวาวเครือ เพราะข้อมูลที่ได้ยังน้อยเกินไป หรือความจำเพาะของเลคตินจากกวาวเครือต่อชนิดของน้ำตาลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยนิวรามิเนสมีค่าต่ำมาก อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้ในตาราง 3.11 ทำให้สรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วลิสงจับจำเพาะกับปลาย D-galactosyl

การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซิน สำหรับเลคตินจากกวาวเครือและเลคตินจากถั่วเหลือง แสดงในตาราง 3.12 ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเลคตินจากกวาวเครือสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย methyl- α -D-galactopyranoside , α -D-melibiose , D-galactose , α -lactose และ methyl- β -D-galactopyranoside ตามลำดับจากยับยั้งมากไปหาน้อย และไม่ถูกยับยั้งด้วย D-glucose , D-mannose และ D-maltose ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากกวาวเครือจับจำเพาะกับปลาย α -D-galactosyl

ตาราง 3.11 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วย นิวรามิไนเตส สำหรับเลคตินจากถั่วเขียวและเลคตินจากถั่วลิสง

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม(mM)	
	ถั่วเขียว	ถั่วลิสง
methyl- α -D-galactopyranoside	25	12.5
α -D-melibiose	100	25
D-galactose	ไม่ยับยั้งที่ 200 mM	25
α -lactose	ไม่ยับยั้งที่ 167 mM	10.4
methyl- β -D-galactopyranoside	ไม่ยับยั้งที่ 200 mM	25
D-raffinose	ไม่ยับยั้งที่ 70 mM	35
α -D-fucose	ไม่ยับยั้งที่ 200 mM	50
D-Cellobiose	ไม่ยับยั้งที่ 110 mM	100

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

N-acetyl-D-galactosamine	D-fructose	D-arabinose
D-glucose	D-maltose	D-ribose
D-mannose	sucrose	D-xylose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 133 mM

N-acetyl-D-glucosamine

ตาราง 3.12 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซิน สำหรับเลคตินจากถั่ววาวเครือและเลคตินจากถั่วเหลือง

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (mM)	
	ถั่ววาวเครือ	ถั่วเหลือง
methyl- α -D-galactopyranoside	0.39	ไม่ได้ทดสอบ
α -D-melibiose	0.78	0.78
N-acetyl-D-galactosamine	1.56	ไม่ได้ทดสอบ
D-galactose	6.25	1.56
α -lactose	25	6.25
methyl- β -D-galactopyranoside	25	ไม่ได้ทดสอบ
D-raffinose	100	12.5

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 200 mM

α -D-fucose

D-mannose

D-glucose

D-maltose

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 110 mM

D-cellobiose

3.7.7 เลคตินจากถั่วลาย

สารละลายน้ำตาลต่อไปนี้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 400 mM ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติ โดยเลคตินจากถั่วลายได้แก่ D-arabinose , D-xylose , D-fructose , α -D-fucose , D-galactose , N-acetyl-D-galactosamine , methyl- α -D-galactopyranoside, methyl- β -D-galactopyranoside, D-glucose , D-mannose , D-maltose , α -D-melibiose และ sucrose สำหรับ N-acetyl-D-glucosamine ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 267 mM D-cellobiose ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 220 mM α -lactose ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 167 mM และ D-raffinose ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 70 mM

เนื่องจากเลคตินจากถั่วลายทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วย นิวรามิเนส หรือ ทริปซิน เกิดการเกาะกลุ่มได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติถึง 8 หรือ 64 เท่า ตามลำดับ (ข้อ 3.5 และ 3.6) จึงทำให้การทดสอบความสามารถของน้ำตาลตามรายชื่อในตาราง 3.12 ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินแล้ว ผลปรากฏว่าไม่มีน้ำตาลตัวใดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วลายได้เลย

3.7.8 เลคตินจากไมยราบยักษ์

สารละลายน้ำตาล ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติ โดยเลคตินจากไมยราบยักษ์เป็นชนิดเดียวกับสารละลายน้ำตาลที่ใช้ทดสอบเลคตินจากถั่วลาย (ข้อ 3.7.7) และผลที่ได้คือ ไม่มีน้ำตาลตัวใดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากไมยราบยักษ์ได้เลย

3.7.9 เลคตินจากเครือเขาญี่ปุ่น

สารละลายน้ำตาล ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยทริปซินสำหรับเลคตินจากเครือเขาญี่ปุ่นเป็นน้ำตาลชุดเดียวกับที่ระบุในตาราง 3.12 และผลที่ได้คือ ไม่มีน้ำตาลตัวใดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากเครือเขาญี่ปุ่นได้เลย

3.7.10 เลคตินจากถั่วแฉะเปรียบเทียบกับเลคตินจากถั่วยางและเลคตินจากถั่วแปบ

ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ของสิ่งที่สกัดได้จากถั่วแฉะ สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย methyl- α -D-mannopyranoside , D-maltose = sucrose , D-mannose = D-glucose = D-fructose และ N-acetyl-D-glucosamine ตามลำดับ จากยับยั้งมากไปหาน้อย ดังแสดงในตาราง 3.13 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วแฉะจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl , D-glucosyl และ D-fructosyl ในขณะที่เลคตินจากถั่วยางจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl , D-glucosyl (ข้อ 3.7.5) และเลคตินจากถั่วแปบก็จับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl , D-glucosyl (ข้อ 3.7.4) เหมือนกัน

จากการเปรียบเทียบความสามารถของน้ำตาลหลายชนิด ที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคตินจากถั่วแฉะ เลคตินจากถั่วยาง และเลคตินจากถั่วแปบ (ตาราง 3.13) พบว่า methyl- α -D-mannopyranoside เป็นน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุดต่อเลคตินทั้งสามชนิด ในขณะที่ D-mannose = D-glucose = D-fructose สำหรับเลคตินจากถั่วแฉะ D-mannose > D-glucose > D-fructose สำหรับเลคตินจากถั่วยาง และ D-mannose > D-glucose > D-fructose สำหรับเลคตินจากถั่วแปบ 3-O-methyl-D-glucopyranose มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเลคตินจากถั่วยาง แต่มีประสิทธิภพต่ำในการยับยั้งเลคตินจากถั่วแปบและถั่วแฉะ ส่วนประสิทธิภาพโดยทั่ว ๆ ไปของน้ำตาลทั้งหมดจะสามารถยับยั้งเลคตินจากถั่วแฉะได้มากกว่าเลคตินจากถั่วยางซึ่งมากกว่าเลคตินจากถั่วแปบ ข้อมูลที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด ชี้ให้เห็นชัดว่า เลคตินจากถั่วแฉะ เลคตินจากถั่วยาง และเลคตินจากถั่วแปบ เป็นเลคตินคนละชนิด ทั้ง ๆ ที่เลคตินทั้งสามชนิดมีความจำเพาะต่อน้ำตาลบางอย่างเหมือนกัน

ตาราง 3.13 ความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเลคติน จากถั่วแฉะ เลคตินจากถั่วยาง และเลคตินจากถั่วแปบ

สารละลายน้ำตาล	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (mM)		
	ถั่วแฉะ	ถั่วยาง	ถั่วแปบ
methyl- α -D-mannopyranoside	0.10	0.78	6.25
D-maltose	3.12	6.25	200
sucrose	3.12	6.25	100
D-mannose	6.25	3.12	6.25
D-glucose	6.25	6.25	25
D-fructose	6.25	12.5	100
N-acetyl-D-glucosamine	16.7	16.7	8.3
3-O-methyl-D-glucopyranose	50	0.78	100

3.8 การจับเม็ดเดกซ์ทรานของเลคตินที่จับจำเพาะกับกลูโคส

จากการศึกษาน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคติน (ข้อ 3.7) พบว่าสิ่งที่สกัดได้จาก ถั่วแปบและถั่วยางมีเลคตินที่จับจำเพาะกับปลาย D-glucosyl เช่นเดียวกับเลคตินจากถั่วแฉะ เนื่องจากเม็ดเดกซ์ทรานเป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่มาต่อกันด้วยพันธะ $\alpha(1\rightarrow6)$ และเลคตินจากถั่วแฉะก็สามารถจับเม็ดเดกซ์ทรานได้⁽³⁴⁾ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการจับเม็ดเดกซ์ทรานของเลคตินจากถั่วแปบและเลคตินจากถั่วยาง ได้ผลดังตาราง 3.14 เม็ดเดกซ์ทรานที่ใช้ทดสอบมี 2 สภาพคือ สภาพธรรมชาติ และสภาพที่อุ้งกับกรดเพื่อสลายพันธะบางพันธะในโพลิเมอร์ของเม็ดเดกซ์ทรานทำให้เพิ่มปริมาณปลายกลูโคสอิสระมากขึ้น นอกจากนั้นยังทำการทดสอบสภาวะ ในขณะที่เลคตินจับเม็ดเดกซ์ทรานด้วยว่าต้องการความแรงอิออนปกติ (0.15 โมลาร์เกลือแกง) หรือความแรงอิออนสูง (1.0 โมลาร์เกลือแกง)

จากการทดสอบพบว่า เลคตินจากถั่วแฉะจับเม็ดเดกซ์ทรานได้ดี ทั้งสภาพธรรมชาติ และสภาพที่อุ้งกับกรดแล้ว และความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสมคือ 0.15 โมลาร์ สำหรับเลคตินจากถั่วยางจับเม็ดเดกซ์ทรานได้ดีทั้งสภาพธรรมชาติและสภาพที่อุ้งกับกรดแล้ว และความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสมคือ 0.15 โมลาร์ ส่วนเลคตินจากถั่วแปบ ไม่สามารถจับเม็ดเดกซ์ทรานได้เลย ไม่ว่าจะใช้เม็ดเดกซ์ทรานสภาพธรรมชาติหรือสภาพที่อุ้งกับกรดแล้ว หรือใช้สภาวะที่มีเกลือแกงเข้มข้น 0.15 หรือ 1.0 โมลาร์ก็ตาม

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการจับเม็ดเดกซ์ทรานของเลคตินจากถั่วลายและเลคตินจากไมยราบยักษ์ด้วย โดยใช้สภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับเลคตินจากถั่วแฉะและตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในสภาพปกติ ผลการทดสอบพบว่าเลคตินจากพืชทั้งสองชนิดไม่จับเม็ดเดกซ์ทรานเลย

ข้อเสนอแนะในการแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดของถั่วแฉะหรือถั่วยาง ควรใช้เม็ดเดกซ์ทรานในสภาพธรรมชาติจับเลคตินในสภาวะที่มี 0.15 โมลาร์เกลือแกง ส่วนการแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดของถั่วแปบ ถั่วลาย หรือเมล็ดไมยราบยักษ์ควรใช้วิธีอื่น

ตาราง 3.14 การจับเม็ดเดกซ์ทรานของเลคตินจากถั่วแฉะ ถั่วยาง และถั่วแปบ

แหล่งของ เลคติน	เม็ดเดกซ์ทราน		ความสามารถในการเกาะกลุ่ม(ไตเตอร์)		%การจับ
	สภาพ	เกลือแกง (โมลาร์)	ก่อนจับ	หลังจับ	
ถั่วแฉะ	ธรรมชาติ	0.15	8	0	100
	ธรรมชาติ	1.0	8	2	75
	อุ่นกับกรด	0.15	8	0	100
	อุ่นกับกรด	1.0	8	2	75
ถั่วยาง	ธรรมชาติ	0.15	2	0	100
	ธรรมชาติ	1.0	2	1.4	30
	อุ่นกับกรด	0.15	2	0	100
	อุ่นกับกรด	1.0	2	2	0
ถั่วแปบ	ธรรมชาติ	0.15	32	32	0
	ธรรมชาติ	1.0	32	32	0
	อุ่นกับกรด	0.15	32	32	0
	อุ่นกับกรด	1.0	32	32	0

3.9 การจับเม็ดอะกาไรสของเลคตินที่จับจำเพาะกับกาแลคโตส

จากการศึกษาน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคติน (ข้อ 3.7) พบว่าสิ่งที่สกัดได้จาก เมล็ดขนุน เมล็ดค้ำบูซา ถั่วราชมาษ และหัวกวาวเครือ มีเลคตินที่จับจำเพาะกับปลาย D-galactosyl เนื่องจากมีอะกาไรสเป็นโพลิเมอร์ของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose ที่ต่อสลับกันด้วยพันธะ $\beta(1\rightarrow4)$ และ $\alpha(1\rightarrow3)$ ตามลำดับ และเลคตินจากค้ำบูซาสามารถจับกับเม็ดอะกาไรสที่อุณหภูมิต่ำแล้วและมี 1.0 โมลาร์เกลือแกงอยู่ด้วย⁽¹⁷⁾ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการจับเม็ดอะกาไรสของเลคตินจากขนุน เลคตินจากถั่วราชมาษ และเลคตินจากกวาวเครือ ได้ผลดังแสดงในตาราง 3.15 เม็ดอะกาไรสที่ใช้ทดสอบมีทั้งในสภาพธรรมชาติ และสภาพที่อุณหภูมิต่ำแล้ว เพื่อสลายพันธะบางพันธะในโพลิเมอร์ของเม็ดอะกาไรส ทำให้เพิ่มปริมาณปลายกาแลคโตสอิสระมากขึ้นรวมทั้งทดสอบสภาวะการจับของเลคตินกับเม็ดอะกาไรสใน 0.15 และ 1.0 โมลาร์เกลือแกงด้วย

จากการทดสอบพบว่า เลคตินจากค้ำบูซาไม่จับเม็ดอะกาไรสในสภาพธรรมชาติแต่สามารถจับกับเม็ดอะกาไรสในสภาพที่อุณหภูมิต่ำแล้วได้ และความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสมคือ 1.0 โมลาร์ สำหรับเลคตินจากขนุนไม่สามารถจับเม็ดอะกาไรสได้เลย ไม่ว่าจะในสภาพธรรมชาติหรืออุณหภูมิต่ำแล้ว หรือใช้สภาวะที่มีเกลือแกงเข้มข้น 0.15 หรือ 1.0 โมลาร์ก็ตาม ส่วนเลคตินจากถั่วราชมาษจับเม็ดอะกาไรสได้ทั้งสภาพธรรมชาติและสภาพที่อุณหภูมิต่ำแล้ว แต่ความเข้มข้นของเกลือแกงที่เหมาะสมคือ 1.0 โมลาร์ สำหรับเลคตินจากกวาวเครือซึ่งตรวจสอบปริมาณจากการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปรับรูปร่างด้วยนิวรามินิเดสแล้วพบว่า สามารถจับกับเม็ดอะกาไรสในสภาพธรรมชาติได้มากกว่าเม็ดอะกาไรสที่อุณหภูมิต่ำแล้ว และการจับกับเม็ดอะกาไรสไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือแกงในสารละลาย

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการจับเม็ดอะกาไรสของเลคตินจากถั่วลิสง และเลคตินจากถั่วลาย โดยใช้สภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับเลคตินจากกวาวเครือ ผลการทดสอบพบว่าเลคตินจากพืชทั้งสองชนิดไม่จับเม็ดอะกาไรสเลย การทดสอบการจับเม็ดอะกาไรสของเลคตินจากถั่วลาย และเลคตินจากไมยราบยักษ์นี้โดยใช้สภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับเลคตินจากค้ำบูซาพบว่าเลคตินจากพืชทั้งสองชนิดไม่จับเม็ดอะกาไรสเช่นกัน

ตาราง 3.15 การจับเม็ดอะกาโรสของเลคตินจากเมล็ดขนุน เมล็ดคำบู้ชา ถั่วราชมาษ และหัวกวาวเครือ

แหล่งของ เลคติน	เม็ดเดกซ์ทราน		ความสามารถในการเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)		%การจับ
	สภาพ	เกลือแกง (โมลาร์)	ก่อนจับ	หลังจับ	
คำบู้ชา	ธรรมชาติ	0.15	16	16	0
	ธรรมชาติ	1.0	32	32	0
	อุ่นกับกรด	0.15	16	8	50
	อุ่นกับกรด	1.0	32	0	100
ขนุน	ธรรมชาติ	0.15	4096	4096	0
	ธรรมชาติ	1.0	4096	4096	0
	อุ่นกับกรด	0.15	4096	4096	0
	อุ่นกับกรด	1.0	4096	4096	0
ราชมาษ	ธรรมชาติ	0.15	128	64	50
	ธรรมชาติ	1.0	128	16	87.5
	อุ่นกับกรด	0.15	128	64	50
	อุ่นกับกรด	1.0	128	32	75
กวาวเครือ	ธรรมชาติ	0.15	2	1.4	30
	ธรรมชาติ	1.0	4	2	50
	อุ่นกับกรด	0.15	2	2	0
	อุ่นกับกรด	1.0	4	4	0

ข้อเสนอแนะในการแยกเมล็ดออกจากสิ่งสกัตของค้ำบูชา ควรใช้เมล็ดอะกาโรสที่
อุ่นกับกรดแล้ว และอยู่ใน 1.0 ไมลาร์เกลือแกง สำหรับการแยกเมล็ดออกจากสิ่งสกัตของถั่ว
ราชมาษ ควรใช้อะกาโรสในสภาพธรรมชาติ และอยู่ใน 1.0 ไมลาร์เกลือแกง ส่วนการแยก
เมล็ดออกจากสิ่งสกัตของกวาวเครือ ควรใช้เมล็ดอะกาโรสในสภาพธรรมชาติและอยู่ใน 0.15
ไมลาร์เกลือแกง แต่อย่างไรก็ตามการแยกเมล็ดออกจากสิ่งสกัตของถั่วราชมาษและกวาวเครือ
โดยวิธีดังกล่าว ไม่สามารถแยกเมล็ดออกมาได้ทั้งหมด ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการแยก
ยังไม่เหมาะสม และ/หรือ ในสิ่งสกัตแต่ละชนิดมีเมล็ดมากกว่าหนึ่งชนิด และเมล็ดชนิดหนึ่ง
สามารถจับเมล็ดอะกาโรสได้ ส่วนเมล็ดชนิดอื่นจับไม่ได้