Thesis Title Biochemical Study of Lectin from Marine Crabs

Author Mr. Surapong Pinitglang

M.Sc. Biochemistry

Examining Committee Assoc. Prof. Dr. Maitree Suttajit____Chairman

Assist.Prof. Dr. Vichai Wongchai_____Member

Assist.Prof. Dr. Lertlakana Bhoopat____Member

Assist.Prof. Dr. Nimit Martin_____Member

ABSTRACT

To detect the presence of sialic acid in serum and cellular glycoprotien, one can use 8 specific lectins, however it not being practiced due to the limited amount and the expensive price of lectins.

In this research new lectins specific to sialic acid were tested in hemolymph from marine crabs and were be used to estimate sialic acid level in serum by hemagglutination inhibition. The purified lectins were be conjugated with the enzyme,FITC and used for tissue staining.The comparison of sialic acid level between breast cancer, cervix cancer and healthy subjects was done. Hemolymph samples from 30 different kinds of marine crabs were checked for lectins. It was found that 4 kinds of marine crabs contained sialic acid specific lectins. To obtain purified lectin specific to sialic acid, Scylla serrata and Tachypleus gigas were used as the lectin sources. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

lectins were isolated and purified by affinity chromatography. The lectin obtained from Scylla serrata (scyllin) have a molecular weight of 200,000 daltons, consisted of two sub-units and contained 5 % carbohydrate indicating that the lectin is a glycoprotein.

Scyllin can cause hemagglutination with the same capacity at different temperatures : 4 °C, 28 °C and 37 °C. Optimum hemagglutinability occured at 7.5 to 8. Ca^{2+} ions are required for hemagglutination. The purified lectins,scyllin, tachyplin (from Tachypleus gigas), and Con A (from Canavalia ensiformis) were conjugated with horesradish peroxidase (R.Z. = 3.1,specific activity 140.17 units/mg protein) and FITC. The hemagglutination inhibition $titer^{-1}$ using lectins from Scylla serrata and Tachypleus gigas) were significantly higher in serum from cancer patients ($P < 0.001$) and were related to serum sialic acid concentrations $r = 0.353$ and 0.394 respectively. Sialic acid as sialoglycoconjugates in normal cells and cancer cells studied could be detected by the lectin conjugates.

The staining of cell surface glycoproteins in malignant cells was remarkably stronger than in normal ones. It indicates that the amount of sialoglycoproteins increase on the surface of cancer cells.

In conclusion,the natural lectins from crabs can be purified

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and practically distinguish the amount of glycoproteins which are components of serum and cell membrane between cancer and normal cells. The method was applied with sastisfactory results.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาทางชีวเคมีของเลคตินจากปูทะเล

ชื่อผู้เขียน นาย สุรพงษ์ พินิจกลาง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ ----------ประธานกรรมการ

ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย ----------กรรมการ

ผศ.พญ. เลิศลักขณา ภู่พัฒน์----------กรรมการ

ผศ.พญ. นิมิต มาร์ติน ----------กรรมการ

บทคัดย่อ

การตรวจสอบกรดไซอาลิคในโมเลกุล กลัยโคโปรตีน ในเซรุ่มและในเซลล์ทางชีว-วิทยาจะทำได้โดยการใช้เลคตินที่มีความจำเพาะแต่ก็ลำบากมีปัญหาในการปฏิบัติ เพราะว่ามีเลคตินดังกล่าวในปริมาณจำกัดและราคาแพงมาก

วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อหา เลคตินตัวใหม่ที่มีความจำเพาะต่อ กรดไซอาลิคจากปูทะเลและนำเลคตินมาใช้วัดระดับกรดไซอาลิคที่อยู่ในเซรุ่มโดย วิธีฮีแมกกลูติเนชั่น เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดเด้านม ปากมดลูก และในคนสุขภาพปกติ จึงตรวจหา เลคตินใน ฮีโมลิมฟ์ของปูทะเลชนิดต่างๆ 30 ชนิด และพบว่า ปูทะเล 4 ชนิดมีเลคติน ที่สามารถจับ กรดไซอาลิคได้ ได้นำฮีโมลิมฟ์จาก ปูเขียว *ชิลลา เซอราตา*, และ *ทาคีปิอุส จีจัส* มาแยกเอาเลคตินบริสุทธิ์โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟีและได้ทำการศึกษาคุณสมบัติ ทางชีวเคมี ของเลคตินจาก *ชิลลา เซอราตา* (ชิลลิน) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตันประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย มีคาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบ 5เปอร์เซนต์ แสดงว่าเป็นกลัยโคโปรตีน สามารถ เกิดฮีแมกกลูติเนชั่นได้เท่ากันที่ อุณหภูมิ 4°C 28°C และ 37°C มีค่าฮีแมกกลูติเนชั่น ไตเตอร์$^{-1}$ ที่ช่วง พี เอช 7.5 ถึง 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และต้องการ แคลเซี่ยมอิออน ในการเกิดฮีแมกกลูติเนชั่นด้วย เลคตินที่บริสุทธิ์คือ ซิลลิน จาก ซิลลา เซอราตา ทาคีปิน จาก ทาคีปิอุส จีจัส และ คอน เอ จาก คานาวาเลีย เอนซิฟอร์มิส ถูกนำมาคอนจูเกทกับ เปอร์ออกซิเดส และลีฟลู ออเรสซีน ไอโซไธโอไซยาเนตโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เตรียมเอง ในการยับยั้ง การเกิดฮีแมกกลูติเนชั่นในรูปเอชเอไอ ไตเตอร์$^{-1}$ ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ โอกับเลคตินจากปูทะเลชนิด ซิลลา เซอราตา และเลคตินจากแมงดาทะเลชนิด ทาคีปิอุส จีจัส ผลปรากฏว่าค่า เอชเอไอ ไตเตอร์$^{-1}$ ที่วัดได้ จากเซรุ่ม ผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆ สูงกว่าค่าที่ได้ จากเซรุ่มของคนสุขภาพปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ค่าไตเตอร์$^{-1}$ ดังกล่าวยังยังสัมพันธ์กับระดับกรดไซอาลิค (ที่วัดโดยวิธีทางเคมี) ในเซรุ่มด้วย (ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = 0.353 และ ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = 0.394 ตามลำดับ) สำหรับการตรวจ กรดไซอาลิคในเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งโดยใช้เปอร์ออกซิเดส ที่เตรียมเอง (R.Z.=3.1 มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 140.17 หน่วย ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) และลีฟลูออเรสซีน ไอโซไธโอไซยาเนต มาคอนจูเกทกับเลคติน พบว่าเลคติน สามารถติดกลัยโคโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งเข้มอย่างชัดเจนมากกว่าของเซลล์ปกติ แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณไซอาโลกลัยโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ

สรุปได้ว่าการนำ เลคตินธรรมชาติจากปูทะเลมาประยุกต์ใช้ในการวัดความแตกต่าง ของปริมาณ กลัยโคโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซรุ่มและที่ เยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างผู้ป่วย มะเร็ง และคนสุขภาพปกตินั้นเป็นไปได้และได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved