# การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของเลกตินที่จำเพาะต่อไดคิน จากผิวของผลและรากต้นกล้าบวบเหลี่ยม

(*Luffa acutangula* Roxb.)

นางสาว ปวีณา พงษ์ดนตรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2536

ISBN 574-583-152-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019571 i17155381

# PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITIN SPECIFIC LECTINS FROM FRUIT PERICARP AND SEEDLINGS' ROOT OF ANGLED LOOFAH (*Luffa acutangula* Roxb.)

MISS PAWEENA PONGDONTRI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1993

ISBN 974-583-152-2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| Thesis title | Purification and Characterization of Chitin-Specific Lectins from Fruit Pericarp and Seedlings Root of Angled Loofah (*Luffa acutangula* Roxb.) |
| By | Miss Paweena Pongdontri |
| Department | Biochemistry |
| Thesis advisor | Assistant Professor Tipaporn Limpaseni,Ph.D. |

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

Accepted by Graduate School of Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirement for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya,Ph.D.)

Thesis Committee

Jariya Boonjawat
..... Chairman

(Associate Professor Jariya Boonjawat,Ph.D.)

Tipaporn Limpaseni
..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni,Ph.D.)

Montri Chulavatnatol
..... Member

(Professor Montri Chulavatnatol,Ph.D.)

Patchara Ver
..... Member

(Assistant Professor Patchara Verakalasa,Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว


ปวีณา พงษ์ดนตรี : การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของเลกตินที่จำเพาะต่อไคตินจากผิวของผลและรากต้นกล้าบวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula* Roxb.) (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITIN-SPECIFIC LECTINS FROM FRUIT PERICARP AND SEEDLINGS ROOT OF ANGLED LOOFAH (*Luffa acutangula* Roxb.))
อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์, ๑๑๑ หน้า. ISBN 574-583-152-2

ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกเลกตินจากบวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula* Roxb.) จากบริเวณเปลือกของผล และผิวรากของต้นอ่อนอายุ 9 วัน ให้บริสุทธิ์ สำหรับเลกตินจากเปลือกของผลใช้วิธีชะแถบโปรตีนจากเจลในบริเวณที่พบว่าเป็นเลกตินหลังจากแยกด้วยวิธีอิเลกโตรโฟรีซิสที่ไม่ทำลายธรรมชาติของโปรตีน ในส่วนจากผิวรากของต้นอ่อนใช้เม็ดเลือดแดงจากกระต่ายที่ถูกย่อยโปรตีนที่บริเวณผิวด้วยทริพซินและตรึงด้วยฟอร์มาลดีไฮด์เป็นตัวจับเลกตินและชะออกด้วยไคติน จากนั้นได้นำเลกตินทั้งสองตัวมาศึกษาสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเลกตินจากเปลือกของผลมีน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์เท่ากับ 105,000 จากวิธีเจลฟิวเตรชั่น และจากวิธีเอส-ดี-เอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลกโตรโฟริซีส พบว่าเลกตินนี้มีหน่วยย่อย 3 หน่วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์เท่ากับ 41,680, 31,600 และ 26,300 และมีค่า pI เท่ากับ 6.25 จากโพลีอะคริลาไมด์เจลไอโซอิเลกทริคโฟกัสซิง จากการทดสอบพบว่าเลกตินจากเปลือกผลบวบมีความเสถียรต่อความร้อนถึง 90°C และที่ความเป็นกรด-ด่าง สูงสุดในช่วง 6-8 และพบว่าเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยน้ำตาลถึง 43% ส่วนเลกตินที่แยกได้จากบริเวณผิวรากของต้นอ่อนพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์เท่ากับ 28,000 จากวิธีเอส-ดี-เอส โพลีอะคริลาไมด์เจล-อิเลกโตรโฟริซิส มีค่า pI เท่ากับ 6.15 มีความทนทานต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่กว้างเช่นกัน และพบว่ามีส่วนประกอบของน้ำตาลอยู่ในโมเลกุลอยู่ 12% เลกตินจากบวบเหลี่ยมทั้งสองชนิดมีความจำเพาะต่อน้ำตาลที่เป็นโอลิโกเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine คือ ไคตินเหมือนกัน การศึกษาบทบาททางชีวภาพ พบว่าเลกตินที่แยกได้ทั้งสองชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดและมีสมบัติเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ปวีณา พงษ์ดนตรี

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ทิพาพร ลิมปเสนีย์

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## C225715 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: *Luffa acutangula* Roxb. / FRUIT PERICARP / SEEDLING ROOT / CHITIN - SPECIFIC LECTIN

PAWEENA PONGDONTRI : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITIN-SPECIFIC LECTINS FROM FRUIT PERICARP AND SEEDLINGS ROOT OF ANGLED LOOFAH (*Luffa acutangula* Roxb.). THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D. 111 pp. ISBN 574-583-152-2

Purification of lectins from fruit pericarp of angled loofah (*Luffa acutangula* Roxb.) and 9-day old seedling root surface were carried out. The pericarp lectin was purified by elution of lectin from gel slice after separation of protein on ND-PAGE and the lectin band identified. The seedling root surface lectin was purified by elution of lectin bound to formalinized-trypsinized rabbit erythrocytes with chitin. Study on some properties of the purified lectins revealed that the pericarp lectin had a native molecular weight of 105,000 by gel filtration and it appeared on SDS-PAGE as three subunits with molecular weight of 41,680, 31,600 and 26,300. Its relative pI value was shown to be 6.25 by polyacrylamide gel isoelectric focusing. The pericarp lectin was shown to be stable to heat and wide pH range, especially at pH 6-8 and shown to be a glycoprotein containing 43% (w/w) carbohydrate. The relative molecular weight of seedling root surface lectin was found to be 28,000 by SDS-PAGE. Its carbohydrate content was determined to be 12% (w/w) and its pI's value was 6.15. It was also stable to heat and wide pH range. Both lectins were found to be specific to oligomer of N-acetyl-D-glucosamine, and were found to be able to inhibit growth of some pathogenic fungi and contain superoxide dismutase like activity.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม —

## ACKNOWLEDGEMENT

I am greatly indebted to my advisor, Dr. Tipaporn Limpaseni, who never let me down in any situations with her excellent guidance, understanding and constant encouragement throughout my study in this Department of Biochemistry. I also appreciate for her patience she payed me during the preparation of this thesis. Without her generosity, this work could not be attainable.

I would like to expressed my gratefulness to Dr.Jariya Boonjawat, Dr.Patchara Verakalasa and Dr.Montri Chulavatnatol for serving as thesis commitee, for their valuable comments and useful suggestions.

My sincere gratitude belongs to all instructors at this department for giving me acadamic background, especially to Dr.Sanha Panichjakul, Dr.Peerada Mongkolkul and Dr.Vichien Rimpanichkit for their suggestion and encouragement.

I wish to acknowledge The National Science Technology and Development Agency, The National Centre of Genetic Engineering and Biotechnology and Chulalongkorn University Teaching Assistance Fund for their fellowships. This project was partially supported by the U.S. Agencyfor International Development (Grant No. DPE-5544-G-SS-7023-00).

The greatest appreciation would be expressed to all the staffs and members in the Department of Biochemistry for their assistance and friendship. Special thanks to Kay and Wut for their help in the latest experiment and also to Pee Nee, Mee, Nong Jeab, Toy-Ting, Mom, Ton and Jira. Furthermore, thanks for all the words of cheer.

Last but not least,thankfulness would be given to Mr.Petchpaitoon and all the members in my dormitory for their love and care during my study in Chulalongkorn University.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my parents, grandmother and my two brothers for their unlimited love and understanding.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT ..... IV

ENGLISH ABSTRACT ..... V

ACKNOWLEDGEMENT ..... VI

CONTENTS ..... VII

LIST OF FIGURES ..... XI

LIST OF TABLES ..... XIII

ABBREVIATIONS ..... XIV

CHAPTER

1 INTRODUCTION

1.1 Definition of lectin ..... 1

1.2 General properties of lectins ..... 2

1.2.1 Cell agglutination ..... 3

1.2.2 Specificity of carbohydrate-binding to lectins 4

1.2.3 Other biological properties of lectins ..... 6

1.3 Distribution of lectins ..... 6

1.4 Function of plant lectins ..... 9

1.5 Application of lectins ..... 12

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

2.1.1 Biological materials ..... 17

2.1.2 Chemicals

2.1.2.1 Chromatographic materials ..... 17

2.1.2.2 Chemicals for electrophoresis and isoelectric focusing ..... 18

2.1.2.3 Other chemicals ..... 18

2.1.2.4 Carbohydrates ..... 18

2.2 METHODS

2.2.1 Extraction of lectin from fruit pericarp ..... 19

2.2.2 Extraction of lectin from loofah seedling .... 19

2.2.3 Procedure of surface washing and homogenization of the washed roots ..... 21

2.2.4 Preparation of trypsinized rabbit erythrocytes 22

2.2.5 Hemagglutination assay ..... 22

2.2.6 Sugar inhibition test ..... 22

2.2.7 Ammonium sulfate fractionations ..... 23

2.2.8 Column chromatography

2.2.8.1 Chitin affinity column ..... 23

2.2.8.2 Triacetylchitotriose column ..... 24

2.2.8.4 Chromatofocusing column ..... 25

2.2.9 Non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

2.2.9.1 Identification of lectins on gel slices ..... 26

2.2.9.2 Purification by protein elution from gel slice ..... 26

2.2.9.3 Monitoring proteins in purification procedure ..... 27

2.2.10 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ..... 28

2.2.11 Preparation of soluble chitin ..... 28

2.2.12 Preparation of formalinized rabbit erythrocytes ..... 29

2.2.13 Purification using formalinized trypsinized rabbit erythrocytes ..... 30

2.2.14 MW determination by gel filtration on Sepharose 6B column ..... 30

2.2.15 Isoelectric focusing polyacrylamide gel ..... 31

2.2.16 Thermostability test ..... 32
2.2.17 pH stability test ..... 32
2.2.18 Inhibition of fungal growth by cellophane transfer technique ..... 32
2.2.18.1 Spore preparation ..... 33
2.2.18.2 Fungal growth inhibition test ..... 33
2.2.19 Detection of Superoxide dismutase (SOD) activity
2.2.19.1 Spectroscopic method ..... 34
2.2.19.2 SOD activity stain on ND-PAGE ..... 35
2.2.20 Protein determination ..... 35
2.2.21 Determination of carbohydrate ..... 36
3 RESULTS
3.1 Distribution of lectin in angled loofah fruit ..... 37
3.2 Distribution of lectin in angled loofah seedling ... 37
3.3 Release of seedling root surface agglutinin ..... 40
3.4 Sugar inhibition test of pericarp extract ..... 40
3.5 Sugar inhibition test of surface extract of root seedling ..... 43
3.6 Purification of chitin specific lectins
3.6.1 Ammonium sulfate precipitation ..... 43
3.6.2 Purification by column chromatographies
3.6.2.1 Chitin and chitotriose affinity columns ..... 45
3.6.2.2 Chromatofocusing column ..... 47
3.6.2.3 DEAE-Cellulose column ..... 47
3.6.3 Protein elution from ND-PAGE ..... 50
3.7 Purification of seedling root surface by fixed erythrocytes ..... 50
3.8 Monitoring of purification steps ..... 53

3.9 Characterization of purified lectins

3.9.1 Molecular weight determination

3.9.1.1 Gel filtration on Sepharose 6B .. 56

3.9.1.2 SDS-PAGE of pericarp lectin ..... 56

3.9.1.3 SDS-PAGE of root lectin ..... 61

3.9.2 pI determination ..... 61

3.9.3 Carbohydrate content in lectins ..... 61

3.9.4 Thermostability test ..... 66

3.9.5 pH stability test ..... 66

3.9.6 Some biological properties of lectins

3.9.6.1 Effect on fungal growth ..... 70

3.9.6.2 SOD-like activity ..... 78

4 DISCUSION

4.1 Study on surface agglutinin of angled loofah ..... 82

4.2 Purification of lectins from angled loofah ..... 84

4.3 Characteristics of lectins from angled loofah ..... 88

4.4 Biologigical roles of lectins from angled loofah ... 93

SUMMARY ..... 95

REFERENCES ..... 96

APPENDIX A ..... 103

APPENDIX B ..... 106

APPENDIX C ..... 107

APPENDIX D ..... 108

APPENDIX E ..... 109

BIBLIOGRAPHY ..... 111

# LIST OF FIGURES


| FIGURE | | PAGE |
|---|---|---|
| 1 | Angled loofah fruit and seedlings | 20 |
| 2 | Assay for hemagglutinating in loofah seedlings | 39 |
| 3 | Release of agglutinin from seedling root surface | 41 |
| 4 | Localization of lectin on ND-PAGE | 42 |
| 5 | Separation of angled loofah fruit pericarp lectin by chromatofocusing column | 48 |
| 6 | Chromatographic profile of angled loofah pericarp lectin by DEAE-Cellulose column | 49 |
| 7 | Protein pattern of ND-PAGE of pericarp lectin | 54 |
| 8 | Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of seedling root surface lectin | 55 |
| 9 | Elution profile of purified pericarp lectin on Sepharose 6B column | 57 |
| 10 | Molecular weight calibration curve for determination of molecular weight by gel filtration on sepharose 6B | 58 |
| 11 | Molecular weight determination of pericarp lectin by SDS-PAGE | 59 |
| 12 | Molecular weight calibration curve of standard proteins separated on SDS-PAGE | 60 |
| 13 | Molecular weight determination of purified root lectin by SDS-PAGE | 62 |
| 14 | Standard curve for determination of molecular weight of purified seedling root lectin by SDS-PAGE | 63 |
| 15 | Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis of purified pericarp and seedling root surface lectins | 64 |

16 Calibration curve of standard pI ..... 65

17 Thermostability of the lectins from angled loofah ..... 68

18 pH stability profile of lectins from angled loofah ..... 69

19 Effect of lectins on fungal growth ..... 73

20 Superoxide activity stain of pericarp extract on ND-PAGE ... 80

21 SOD activity of surface extracts of parts from seedlings ... 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF TABLES


| Table | | Page |
|---|---|---|
| 1 | Biological properties of lectins | 7 |
| 2 | Hemagglutinating activity in different parts of loofah fruit | 38 |
| 3 | List of carbohydrates used sugar inhibition test of lectin from *Luffa acutangula* Roxb. | 42 |
| 4 | Hemagglutinating activity in different fractions of ammonium sulfate precipitation of pericarp extract | 46 |
| 5 | Purification table of pericarp lectin | 51 |
| 6 | Purification table of seedling root surface lectin | 52 |
| 7 | Carbohydrate contents of loofah lectins | 67 |
| 8 | Fungal growth inhibition test | 72 |
| 9 | SOD activity in fruit pericarp and seedling root surface | 78 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATION

| | |
|---|---|
| A | Absorbance |
| AS-35 | 30-50% ammonium sulfate fraction |
| AS-57 | 50-70% ammonium sulfate fraction |
| BSA | Bovine serum albumin |
| Con A | Concanavalin A |
| DEAE- | Diethyl aminoethyl- |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| HA | Hemagglutinating activity |
| IEF | Isoelectric focusing |
| MW | Relative molecular weight |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| ND-PAGE | Non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| pI | Isoelectric point |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate or Luaryl sodium sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis |
| TEMED | N,N',N" - tetramethyl ethylene diamine |
| Tris | Tris (hydroxy methyl) aminomethane |
| WGA | Wheat germ agglutinin |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย