

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

植物凝集素分離、特性分析與對細菌影響性探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-041-007-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學餐旅管理系

計畫主持人：曾鑫順

計畫參與人員：研究生：劉健安

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 01 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

植物凝集素分離、特性分析與對細菌影響性探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-041-007-

執行期間：95年8月1日至96年7月31日

計畫主持人：曾鑫順

共同主持人：

計畫參與人員：劉健安

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學餐旅管理系

中華民國 96 年 10 月 31 日

中文摘要

凝集素為一群醣結合性蛋白質，廣泛存在於生物體中，具有結合細胞、生物體或分子表面所曝露的醣類，並凝集這些結合物的功能。此外，該蛋白質可刺激淋巴細胞有絲分裂、調節癌細胞生長與轉移、啟動免疫反應、感染與防禦、調節細胞生命週期與引導細胞連結，以及控制醣蛋白質生合成。因此，除了凝集紅血球的基本作用外，研究結果更指出植物性凝集素對於病毒、細菌、真菌與寄生蟲的感染、轉移，扮演著關鍵的角色。藉由酸處理 Sepharose 4B 親和性管柱可純化出甘藷塊莖凝集素，經 SDS-PAGE 分析分子量約為 54 kDa。該凝集素之溫度與 pH 安定性分別為 70°C、30 分鐘與 5.0~9.0，Ca、Mg 與 Mn 離子對於凝集活性並無影響性。醣類抑制凝集試驗顯示該凝集素結合 lactose 能力最高，其次為 methyl α -galactoside、D-galactose 與 methyl β -galactoside。

關鍵詞：甘藷、凝集素、純化、親和性管柱、特性分析

ABSTRACT

Lectin is a group of saccharide-binding protein. These proteins can specifically bind the outer saccharide moiety of cells, organs and molecules. The interaction could trigger some particular physiological conditions. There are lymphocytic mitosis, regulation of cancer growth and metastasis, initiation of immunosystem, infection and defense, regulation of cell cycle and directed the adhesion of cells, and controlling biosynthesis of glycoproteins. In addition to hemagglutination, plant lectins also play key role for the infections and transfers of viruses, bacteria, fungi and parasites in hosts. A lectin was purified to electrophoretic homogeneity from sweet potato tuber by using affinity chromatography on an acid-treated Sepharose 4B. The lectin protein was estimated to be about 54 kDa on SDS-PAGE and showed to be stable after 30 min heating at 70°C. No significant change in lectin activity at pH range of 5.0~9.0 was observed. The agglutinate activity of lectin kept unaltered in the presence of Ca, Mg and Mn ions. Sweet potato lectin showed strong binding toward lactose.

Keywords: Sweet potato, lectin, purification, affinity chromatography, characterization.

一、前言

凝集素(lectin)是一群醣結合性蛋白質(carbohydrate-binding protein)，它會結合細胞、生物體或分子表面所曝露的醣類，並凝集這些結合物，以發揮進一步的生物功能。因為凝集素只會結合特定的醣類，所以這類蛋白質可扮演辨識外來物的角色(Sharon and Lis, 2004; Knaus and El-Matbouli, 2005)。凝集素廣存於植物(Sharon and Lis, 1972)、動物以及細菌，種類繁多，而且也具有各自的生理功能，如刺激淋巴細胞有絲分裂(Morgan et al., 1976)、調節癌細胞生長與轉移(Danguy et al., 2000; Shimura et al., 2004; Ueda et al., 2004)、啟動免疫反應(Epstein et al., 1996; van de Wetering et al., 2004)、感染與防禦(Ofek and Sharon, 1988; Mulvey et al., 2001)、調節細胞生命週期與引導細胞連結以及控制醣蛋白質生合成(Sharon and Lis, 2004)；在寄生蟲、微生物的感染與轉移作用中，凝集素是最基本的媒介(Knaus and El-Matbouli, 2005)。

二、研究目的

凝集素是一具有相當多樣功能的蛋白質，在所有的免疫系統及作用中，都可發現它們的蹤跡；也因為該蛋白質的醣類結合特性，更使得醣生物學(glycobiology)的研究和應用，不能沒有它們。凝集素在研究與臨床醫學等方面的應用包括：細胞的辨識、分離與組織分佈，醣蛋白質的檢測、分離、結構分析、生合成途徑研究、定位神經傳遞途徑，誘發淋巴細胞有絲分裂，以及淨化移植用骨髓(Sharon and Lis, 2004)等。對於凝集素的多方面了解，將增加相關作用的深一層認識，更可擴展對抗病毒、細菌與寄生蟲的方法。

三、文獻探討

1. 動物來源

凝集素幾乎存在於所有的生物體中，從微生物、植物、無脊椎動物到哺乳動物，均可發現它的存在；由於來源繁雜，而且各具有不同的功能特性，因此依照分子大小、組成與生化特性等的性質，區分成下列族群：calnexin, L-、P-、C-、I-與 S-type lectins 以及 galectin (Dodd and Drickamer, 2001)。其中以 galectin 族群間的胺基酸序列較為相似，所以在進化過程中屬於保留性蛋白質，此外也遍存於大多數生物體(Cooper, 2002)。Galectin 屬於 β -半乳糖醣苷結合凝集素(β -galactoside-binding lectin)，因為結構上的差異，又可區分為 proto、chimera 與 tandem-repeat 等三種型態(Hirabayashi and Kasai, 1993)。其中 proto 型的每一單體(subunit)中只含有單一醣分子辨識區塊(carbohydrate-recognition domain, CRD)，完整的結構是以兩個相同單體，以非共價鍵結而成；chimera 型是由 C 端具有類似於 proto 型 CRD 的單體所構成，而 tandem-repeat 型 galectin 則為連結兩個 CRD 的單體所構成。大部分 galectin 是由 proto 及 tandem-repeat 兩種型態構成，在哺乳動物中已發現 14 種 galectin，而 galectin-1 (proto-type)與 galectin-3 (chimera-type)是研究最廣的凝集素(Dunphy et al., 2002)；它們藉由調控細胞的黏附與程式死亡(apoptosis)，進而在組織的形成、發育與免疫，以及癌細胞的生長和轉移等過程，扮演極為重要的角色。Ahmed et al. (2004)在斑馬魚中發現五種 galectin，其中三種為 proto 型，而 chimera 與 tandem-repeat 型各有一種；在斑馬魚胚胎形成過程中，發現這些蛋白質各具有不同的功能與角色，而 proto 型 galectin (Drgal1-L2)主要出現於脊索。

2. 植物來源

凝集素大多分佈於植物的儲存器官中，包括種子、塊莖、球莖、地下莖以及樹皮，因為這些部分長期為人類當成食物或藥材使用，故植物性凝集素在飲食中，即可視為重要的生理活性成分(Pusztai et al., 1989)。此外，凝集素也可作為植物體對抗外來生物的防護因子之一，包括抑制真菌與微生物活性，引發昆蟲死亡，更容易在哺乳類和鳥類體內產生毒害作用(Peumans and Van Damme, 1995)；因此人類在大量攝取富含凝集素的植物後，容易產生嘔吐、腹瀉等類似食物中毒的症狀(Gilbert, 1988)。除了防禦作用，凝集素的專一性醣類辨識與結合能力，也為植物本身帶來生存的益處，如豆科根部的凝集素，會與共生根瘤菌 *Rhizobium* 與 *Bradyrhizobium* sp.結合，以增加養分來源(Bohloul and Schmidt, 1974; Diaz et al., 1989)。

香蕉凝集素單體分子量為 15 kDa，具有激發人類 T 細胞增殖效用，而且會凝集兔子紅血球，但該反應易被甘露糖(mannose)抑制；但卻無法凝集人類與山羊紅血球(Koshte et al., 1990)。進一步分析發現，香蕉凝集素無法結合 α -1,4 或 α -1,6 鍵結的多糖，但對於酵母菌 α -mannan 的側鏈，以及含有 α -1,3 (如：肝糖、糊精、澱粉)、 β -1,3 (如：laminaribiose)與終端以 β -1,6 (如：gentiobiosyl groups)鍵結的葡萄糖聚合物，則具有顯著的結合能力(Goldstein et al., 2001; Mo et al., 2001)。

朝鮮薊(*Helianthus tuberosus*)凝集素具有甘露糖專一性，尤其是高度分支的甘露寡糖。該凝集素為四個相同的 15.5 kDa 單體構成，可是卻會在 Mono-S 管柱層析中，出現五個蛋白質波峰，顯示其結構中尚其他的異構聚合體存在；進一步的基因選殖也可發現，該蛋白質由單一基因家族調控，因此可能產生四個胺基酸部分取代的異構物(Van Damme et al., 1999)。

山藥(*Dioscorea batatas*)中的主要蛋白質包括：儲存蛋白質 dioscorin A、甘露糖結合凝集素(mannose-binding lectin)、麥芽糖結合凝集素(maltose-binding lectin)和幾丁質酶(chitinase)。Dioscorin A 是山藥中最主要的儲存蛋白質，約佔總蛋白質的 50%，由 31 kDa 單體構成，其與 *Dioscorea alata* 種山藥 dioscorins A、B 的胺基酸序列相似度分別為 93%及 90%。此外，batatas 種山藥甘露糖結合凝集素的分子量為 20 kDa，由兩個相同單體構成，佔山藥蛋白質 20%；麥芽糖結合凝集素(maltose-binding lectin)，分子量為 120 kDa，主要由 66 kDa 片段[2 個 31 kDa 單體(DB3L, 242 amino acids)以雙硫鍵結而成]與兩個 31 kDa 單體(DB3S, 241 amino acids)所組成的蛋白質，這兩種單元體間的胺基酸序列相似度為 72% (Gaidamashvili et al., 2004)。

雖然凝集素在一級結構上差異相當大，但在四級結構上卻極為相近(Barre et al., 1996; Sharon and Lis, 2004)，如 L-type lectin 與 galectin 的 CRD 即為相同的 β -sandwich 結構(Dodd and Drickamer, 2001)。

四、研究方法

1. 材料

乳糖(lactose)、半乳糖(galactose)、磷酸鹽類、鹽(NaCl)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine)及 Sepharose 4B 凝膠購自 Sigma 公司(MO, USA)。丙烯醯胺(acrylamide)、雙丙烯醯胺(bis-acrylamide)、染劑 Coomassie brilliant blue G-250、單氯醋酸鈉(sodium monochloroacetate)、硫氫基乙醇(β -mercaptoethanol)為 Merck 公司(Darmstadt, Germany)產品；電泳低分子量標準蛋白質組購自 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)。紅血球分離自健康捐贈者血液，並以 PBS (phosphate-buffered saline; 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 150 mM NaCl)調整成為血球含量 5%之懸浮液。甘藷(*Ipomoea batatas* [L.] Lam cv. Tainong 57)購自台南市傳統市場。

2. 純化

2-1. 酸處理 Sepharose 4B

Sepharose 4B 膠體依照 Ersson 等人(1973)的方法進行處理，膠體懸浮於 0.2 M HCl 溶液中，並於 50°C 恆溫靜置 2 小時後，以蒸餾水將 HCl 洗除，再以 PBS 進行平衡。

2-2. 萃取與管柱層析

經去皮之甘藷切成約 0.2 cm 薄片，加入 2 倍量之蒸餾水(2 mL/g sweet potato, containing 10 mM sodium ascorbate)均質。絞碎樣品先以 10 層細紗布擠壓出汁液，隨後以 15000 xg 離心汁液 10 分鐘；上澄液以 70°C 加熱 1 分鐘後，以 30000 xg 離心 10 分鐘去除沉澱物，並收集上澄液。經處理之甘藷萃取液以 10 倍 PBS 調整後，以 1.0 mL/min 之流速注入酸處理 Sepharose 4B 管柱(2.6 x 20 cm)，每 10 mL 的流出液收集成一管。未吸附蛋白質以 PBS 洗除，直至流出液之 280 nm 吸光質近似於 PBS，隨後以含有 3 M 乳糖之 PBS，將凝集素溶離出管柱。

3. 凝集素活性測定

在 U 型底(U-shaped bottom)微量滴定盤中先加入 50 μ L 紅血球懸浮溶液(5%紅血球細胞懸浮於 PBS 中)，隨後再加入 50 μ L 經 2 倍連續稀釋的凝集素樣品，搖動混合 30 秒後，置於室溫中反應 60 分鐘，控制組則以 PBS 溶液取代樣品。引發凝集反應的最高稀釋數之倒數，即

定義為滴定濃度(titer)。

4. 電泳分析

蛋白質溶於樣品緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 10% SDS, 8 M urea and 5% β -mercaptoethanol), 並於 95°C 水浴加熱 5 分鐘。冷卻後, 取 10 μ L 的上述樣品溶液混合同體積的染劑溶液(10%蔗糖、0.002% bromophenol blue), 注入電泳膠片樣品槽中, 以 SDS-PAGE 形式進行分析(Laemmli, 1970), 分離膠體(resolving gel)及凝集膠體(stack gel)之丙烯醯胺濃度分別為 15% 及 3.75%, 泳動完成後之膠片以 15% TCA (trichloroacetic acid) 進行固定, Coomassie brilliant blue G-250 染色, 最後以 25% 甲醇脫色。

5. 特性分析

5-1. 溫度安定性

將溶於 PBS 之凝集素, 分別置於各種溫度(0、25、40、50、60、70、80、90、100°C)的水浴槽中加熱 30 分鐘後, 立刻取出, 以冰浴冷卻約 30 分鐘, 隨後測定各加熱溫度處理後之凝集素活性。

5-2. pH 安定性

於 25 μ L 凝集素中分別加入 pH 3.0~5.0 (50 mM sodium citrate buffer)、pH 6.0~8.0 (50 mM sodium phosphate buffer)、pH 8.0~10.0 (50 mM Clark and Lubs solutions), 以及 pH 11.0~11.9 (50 mM disodium phosphate and sodium hydroxide solution) 的緩衝液, 並靜置於室溫中 30 分鐘後, 加入等體積的 0.2 M 磷酸鈉緩衝液(pH 7.0), 均勻混合後, 分別進行凝集素活性測定。

5-3. 金屬離子

溶於 PBS 之凝集素 25 μ L, 分別加入 25 μ L 的金屬鹽類溶液(CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnCl_2), 搖動 15 分鐘後, 加入 5% 紅血球懸浮液, 搖動混合 30 秒後, 置於室溫中反應 60 分鐘。控制組則以 PBS 取代金屬離子溶液, 金屬離子終濃度控制為 200、20、2、0.2 以及 0.02 μ M。

5-4. 醣類

在醣類抑制凝集反應的試驗中, 先將 25 μ L 的各種醣類[lactose、D-galactose、galactosamine、methyl α -galactoside、methyl β -galactoside、glucose 與 mannose 溶於 PBS 中]與 25 μ L 的凝集素溶液混合, 搖動 15 分鐘後, 加入紅血球懸浮液。抑制結果以避免凝集反應發生的最低醣類濃度來表示。

6. 蛋白質定量

蛋白質定量參考 Bradford (1976) 方法。取適量之樣品, 以二次蒸餾水定容至 800 μ L, 再加入 200 μ L Bio-Rad (Hercules, Ca., USA) 蛋白質染劑, 混合均勻, 反應 5 分鐘, 1 小時內測量反應液於 595 nm 之吸光值; 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin)作為參考蛋白質。

五、結果與討論

1. 純化與分子量

凝集素具有顯著的醣結合能力, 因此在分離純化時, 可利用多醣類膠體作為親和性管柱的媒材, 包括利用 Sephadex G-75 純化香蕉 BanLec-1 (Koshte et al., 1990)、Sephadex G-50 純化 *Canavalia grandiflora* 凝集素(Ceccatto et al., 2002)、Sephadex 4B 分離毒裸胸鯨(*Gymnothorax javanicus*)腸、胃和肝臟中凝集素(Kawagishi et al., 2001), 甚至以酸處理 Sepharose 6B 大量分離花生凝集素(Pujol and Cesari, 1986), 顯示植物中的凝集素蛋白質, 可利用相關的膠體來分離純化。如圖 1 所示, 甘藷萃取液注入酸處理 Sepharose 4B 管柱後, 凝集素活性明顯吸附於該管柱中, 先以 PBS 洗除不吸附的雜質後, 即可利用近似於 Sepharose 4B 材質之乳糖, 溶離出結合性蛋白質, 並出現一對稱之 280 nm 析光波峰。經 SDS-PAGE 分析, 出現一明顯的蛋白質染色帶, 推定該蛋白質為甘藷塊莖凝集素; 由標準蛋白質可推算出此凝集素之分子量約為 54 kDa (圖 2)。在其他植物, 凝集素也是一種重要的成分, Söderhäll et al. (1990) 由紅蘿蔔 (*Daucus carota*) 細胞培養液中分離出 58 kDa 凝集素; 而馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 則含有 100 kDa 凝集素, 經 SDS-PAGE 分析, 顯現出一 54 kDa 的蛋白質, 故合理推測馬鈴薯凝集素, 應

該由兩個相同的次單元體所構成(Matsumoto et al., 1983)。其他來源凝集素，如大紅豆 (*Phaseolus vulgaris*)，67 kDa 分子量包含兩個相同 31 kDa 單元體(Ye et al., 2001)；刀豆 (*Canavalia gladiata*)，含有兩個相同的 30 kDa 片段(Wong and Ng, 2005)；58 kDa EspecL (*Erythrina speciosa* 種子凝集素)之次單元體分子量為 27.6 kDa (Konozy et al., 2003)；花生 anti-T 凝集素為 110 kDa，由四個相同之 27.5 kDa 片段構成(Lotan et al., 1975)；香蕉 BanLec-1 含有兩個相同的 13 kDa 次單元體(Koshte et al., 1990)。除了以一致的次單元體構成完整凝集素外，其他如刺桐(*Erythrina indica*)葉，為 30 與 33 kDa 次單元體，以非共價鍵結組成 58 kDa 凝集素 (Konozy et al., 2002)；肉豆(hyacinth bean; *Dolichos lablab*)凝集素為 67 kDa，主要由 5 個 10~22 kDa 的蛋白質片段構成，這些片段可區分為 1 個 β -與 4 個 α -次單元體(包含 α -次單元體主要片段與其修飾產物) (Mo et al., 1999)。

2. 安定性

甘藷凝集素於 70°C、30 分鐘的加熱處理後，凝集活性並無顯著改變。當加熱溫度提高至 80°C，仍保有接近 90% 活性，但是於 90°C 加熱後，凝集素活性大幅下滑(圖 3)。於 pH 5.0~9.0 範圍中，甘藷凝集素相當安定，雖然在超出上述 pH 範圍後，活性明顯降低，可是仍保留約 68~78% 的起始活性(圖 4)。EspecL (*Erythrina speciosa* seed lectin)之 pH 安定性為 6~9.6，而且能承受 65°C、90 分鐘的加熱處理(Konozy et al., 2003)；另外，紅蘿蔔凝集素在經過 100°C、30 分鐘加熱，以及 pH 1.0 (0.1 M HCl)與 pH 12.0 (0.01 M NaOH)、3 小時的處理，活性仍無改變的趨勢(Söderhäll et al., 1990)。而刺桐(*Erythrina indica*)葉凝集素之最適作用 pH 與溫度，分別為 7.0 與 25~50°C (Konozy et al., 2002)。

3. 金屬離子

活性測試中添加 CaCl_2 、 MgCl_2 或 MnCl_2 對甘藷凝集素的影響並不顯著。 MgCl_2 與 ZnCl_2 不影響紅蘿蔔(*Daucus carota*)細胞凝集素活性表現，但加入 2 mM CaCl_2 與 MnCl_2 後，則活性降低 50-75% (Söderhäll et al., 1990)。此外，EspecL 的凝集活性表現，則需要 Ca^{2+} 與 Mn^{2+} 金屬離子(Konozy et al., 2003)。

4. 醣類

如表 1 所示，lactose 對甘藷凝集素的凝集活性抑制能力最強，最低的抑制濃度為 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ，其次為 methyl α -galactoside、D-galactose 與 methyl β -galactoside，而 galactosamine 的抑制作用則較為輕微；另一方面，glucose 與 mannose 在添加到終濃度達 200 mM 仍無法產生任何影響。顯示甘藷凝集素對於 lactose 與 galactose 的結合性較強。依照醣類結合特性可區分為 glucose/mannose、mannose、D-galactose、N-acetylglucosamine 與 sialic acid 專一性凝集素 (Wong and Ng, 2005)，Wong and Ng (2005)分離的 *Canavalia gladiata* 凝集素屬於 glucose/mannose/rhamnose 結合性，刺桐(*Erythrina indica*)葉 58 kDa 凝集素則為 D-galactose 專一結合 (Konozy et al., 2002)，香蕉 BanLec-1 屬於 mannose 結合凝集素(Koshte et al., 1990)，肉豆(hyacinth bean; *Dolichos lablab*)中 67 kDa 凝集素則為 mannose/glucose 專一性(Mo et al., 1999)。

Table 1. Effect of carbohydrates on the agglutination of sweet potato lectin

Carbohydrates	MIC ($\mu\text{g/mL}$)*
Lactose	0.25
D-Galactose	20
Galactosamine	150
Methyl α -galactoside	5
Methyl β -galactoside	20
Glucose	NI
Mannose	NI

*MIC, minimum inhibitory concentration;

NI, not inhibitory at a concentration of 200 μM .

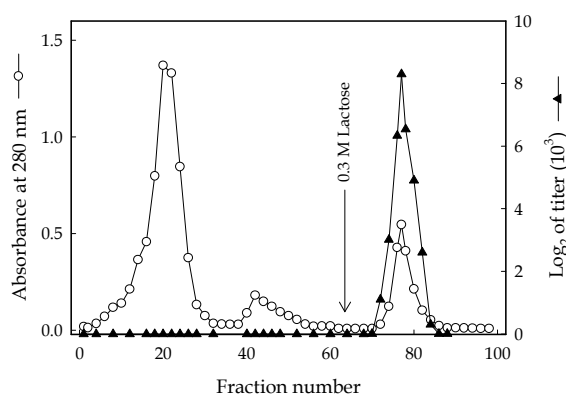


Figure 1. Purification of sweet potato lectin by affinity chromatography on an acid-treated Sepharose 4B (2.6 x 20 cm) equilibrated with PBS. After washing of unbound proteins, the lectin was eluted with PBS containing 0.3 M lactose at a flow rate of 1 mL/min. The collection was 10 mL/fraction.

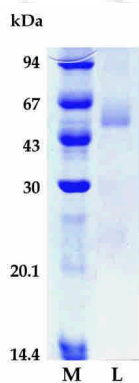


Figure 2. SDS-PAGE analysis of sweet potato lectin. The acrylamide concentration of stacking and resolving gels were 3.75 and 15%, respectively. Lane M, protein marker of low molecular mass calibration kit (phosphorylase b, 94 kDa; albumin, 67 kDa; ovalbumin, 43 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14.4 kDa); lane L, sweet potato lectin.

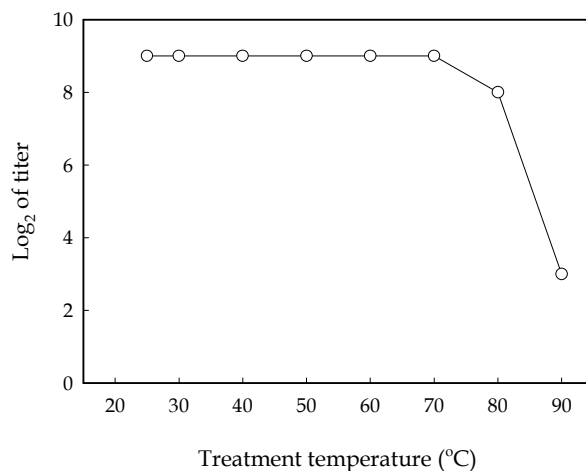


Figure 3. Thermal stability of sweet potato lectin.

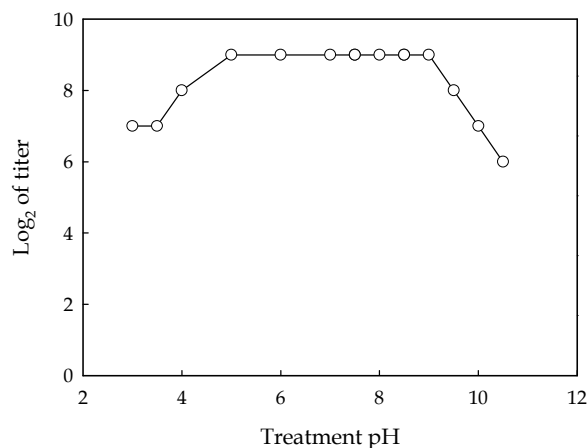


Figure 4. pH stability of sweet potato lectin.

六、参考文献

- Ahmed, H., Du, S. -J., O'Leary, N., and Vasta, G. R. 2004. Biochemical and molecular characterization of galectins from zebrafish (*Danio rerio*): notochord-specific expression of a prototype galectin during early embryogenesis. *Glycobiology* 14: 219-232.
- Barre, A., Van Damme, E. J., Peumans, W. J., and Rouge, P. 1996. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. *Plant Physiol.* 112: 1531-1540.
- Bohloul, B. B., and Schmidt, E. L. 1992. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science* 185: 269-271.
- Ceccatto, V. M., Cavada, B. S., Nunes, E. P., Nogueira, N. A., Grangeiro, M. B., Moreno, F. B., Teixeira, E. H., Sampaio, A. H., Alves, M. A., Ramos, M. V., Calvete, J. J., Grangeiro, T. B. 2002. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* benth. seeds. *Protein Pept. Lett.* 9: 67-73.
- Cooper, D. N. W. 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 209-231.
- Danguy, A., Camby, I., and Kiss, R. 2000. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 19: 285-293.
- Diaz, C., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J., and Kijne, J. W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338: 579-581.
- Dodd, R. B., and Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11:71R-79R.
- Dunphy, J. L., Barcham, G. J., Bischof, R. J., Young, A. R., Nash, A., and Meeusen, E. N. 2002. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J. Biol. Chem.* 277: 14916-14924.
- Ersson, B., Aspberg, K., and Porath, J. 1973. The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 310: 446-452.
- Epstein, J., Eichbaum, Q., Sheriff, S., and Ezekowitz, R. A. 1996. The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 29-35.
- Gaidamashvili, M., Ohizumi, Y., Iijima, S., Takayama, T., Ogawa, T., and Muramoto, K. 2004. Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. *J. Biol. Chem.* 279: 26028-26035.
- Gilbert, R. J. 1988. Healthy eating day. *Communicable Disease Report* 33:3-4.
- Goldstein, I. J., Winter, H.C., Mo, H., Misaki, A., Van Damme, E. J. M., and Peumans, W. J. 2001. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and β -glucans containing β 1,6-glucosyl end groups. *Eur. J. Biochem.* 268: 2616-2619.
- Hirabayashi, J., and Kasai, K. 1993. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3: 297-304.
- Kawagishi, H., Yasui, M., Uno, A., Murata, T., Usui, T., and Furukawa, S. 2001. Purification and characterization of two lectins from a toxic moray, *Gymnothorax javanicus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2437-2442.
- Knaus, M., and El-Matbouli, M. 2005. Characterisation of carbohydrate-binding sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis*. *Parasitol. Res.* 97: 505-514.
- Koshte, V. L., van Dijk, W., van der Stelt, M. E., and Aalberse, R. C. 1990. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochem. J.* 272: 721-726.
- Konozy, E. H. E., Mulay, R., Faca, V. Ward, R. J., Greene, L. J., Roque-Barriera, M. C., Sabharwal, S., Bhide, S. V. 2002. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. *Biochimie* 84: 1035-1043.
- Konozy, E. H., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L. J., and Ward, R. J. 2003. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of

- Erythrina speciosa*. Arch. Biochem. Biophys. 410: 222-229.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. Nature (London) 227: 680-685.
- Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D., and Sharon, N. 1975. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). J. Biol. Chem. 250: 8518-8523.
- Matsumoto, I., Jimbo, A., Mizuno, Y., Seno, N., and Jeanloz, R. W. 1983. Purification and characterization of potato lectin. J. Biol. Chem. 258: 2886-2891.
- Mo, H., Meah, Y., Moore, J. G., and Goldstein, I. J., 1999. Purification and characterization of Dolichos lablab lectin. Glycobiology 9: 173-179.
- Mo, H., Winter, H. C., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Misaki, A., and Goldstein, I. J. 2001. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. I. Novel recognition of internal α 1,3-linked glucosyl residues. Eur. J. Biochem. 268: 2609-2615.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R. 1976. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science, 193: 1007-1008.
- Mulvey, G., Kitov, P., Marcato, P., Bundle, D. R., and Armstrong, G. D. 2001. Glycan mimicry as a basis for novel anti-infective drugs. Biochimie, 83: 841-847.
- Ofek, I., and Sharon, N. 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infect. Immun. 56: 539-547.
- Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. M. 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. 109: 347-352.
- Pujol, F. H., and Cesari, I. M. 1986. A simplified methodology for purification of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. J. Biochem. Biophys. Methods 13: 131-134.
- Pusztai, A., Greer, F., and Grant, G. 1989. Specific uptake of dietary lectins into the systemic circulation of rats. Biochem. Soc. Trans. 17:481-482.
- Sharon, N., and Lis, H. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins. Science 177: 949-959.
- Sharon, N., and Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology 14: 53R-62R.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., and Raz, A. 2004. Galectin-3, a novel binding partner of β -catenin. Cancer Res. 64: 6363-6367.
- Söderhäll, I., Bergenstråhle, A., and Söderhäll, K. 1990. Purification and some properties of a *Daucus carota* lectin which enhances the activation of prophenoloxidase by CaCl₂. Plant Physiol. 93: 657-661.
- Ueda, S., Kuwabara, I., and Liu, F. T. 2004. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. Cancer Res. 64: 5672-5676.
- Van Damme, E. J., Barre, A., Mazard, A. M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rouge, P., and Peumans, W. J. 1999. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. Eur. J. Biochem. 259: 135-142.
- van de Wetering, J. K., van Golde, L. M. G., and Batenburg, J. J. 2004. Collectins. Players of the innate immune system. Eur. J. Biochem. 271: 1229-1249.
- Wong, J. H., and Ng, T.B. 2005. Isolation and characterization of a glucose/ mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. Arch. Biochem. Biophys. 439: 91-98.
- Ye, X. Y., Ng, T. B., Tsang, P. W., and Wang, J. 2001. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. J. Protein Chem. 20: 367-375.