توصيف لكتين جنين الحنطة

محمد عمر محي الدين[1] إيناس مظفر العبادي[2] علي عبد الرحمن طه[3]
1، 2 قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد – العراق
3 مركز بحوث التقانات الاحيائية – جامعة النهرين- الجادرية- بغداد – العراق

المستخلص

استهدف البحث الحالي دراسة خواص لكتين جنين الحنطة (ملازن جنين الحنطة) النقي حد التجانس كما تم التاكد منه بالترحيل الكهربائي وبينت النتائج ان وزنه الجزيئي يبلغ 17800 دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي تحت الظروف المماثلة باستخدام SDS وبوجود المادة المختزلة 2- ميركابتوايثانول. وبلغت نقطة تعادله الكهربائي 8.7 بطريقة التبئير الكهربائي المتشابه مما يشير انه بروتين قاعدي الشحنة . تبين خلو اللكتين المنقى من الكاربوهيدرات عند إجراء التقدير بطريقة الفينول- حامض الكبريتيك ويختلف اللكتين قيد الدراسة في هذه الخاصية عن اللكتينات الأخرى التي تتميز بكونها من البروتينات السكرية . تراوح الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللكتين بين 6.5 – 7.0 في حين لوحظ انعدام فعالية التلازن عند الأسس الهيدروجينية الاوطا من 5.5 وأعلى من 8.5 على حد سواء. واحتفظ اللكتين بكامل فعاليته عند حضنه مدة 15 دقيقة في درجات الحرارة 20- 60 م فيما احتفظ بمعدل 50 % من فعاليته الأصلية عند حضنه بالمدة نفسها بدرجة الحرارة 70م وانخفضت الفعالية إلي أوطأ مستوى لها عند 80 م إذ فقد اللكتين 93.75% من فعاليته وفقد كامل فعاليته عند درجة الحرارة 90 م. احتفظ اللكتين بفعاليتة كاملة عند الخزن بدرجة حرارة -18 م لغاية الأسبوع السادس من الخزن ثم تدهورت الفعالية قليلا في الأسبوعين السابع والثامن إذ فقد اللكتين 50 % من فعاليته الأصلية بعد هذه المدة . فيما شهدت الفعالية التلازنية انخفاضا واضحا بعد الأسبوع الأول من الخزن بدرجة الحرارة 25 م وبعد الأسبوع الثاني من الخزن بدرجة الحرارة 4 م.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (3) : 94-103 (2008) Muhyaddin et. al.

CHARACTERIZATION OF WHEAT GERM LECTIN

Mohamed O. Muhyaddin[1] Inas M. Al-Aubadi[2] Ali A. Taha[3]
1 , 2 Department of Food Sci &Biotechnology, College of Agriculture, Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.
3 Biotechnology Recerch Center, Al-Nahrain Univ.

ABCTRACT

This reserch was aimed to study the characters of purified Wheat germ lectin (Wheat germ agglutinin) which comfirmed by electrophoresis. It was shown that the molecular weight was 17800 Dalton as determined by polyacrylamid gel electrophoresis under denaturing conditions and presence of the reducing agent 2-mercaptoethanol . The isoelectric point was found to be 8.7 as determined by Isoelectric focusing which indicating the lectin under study is basic protein. No carbohydrate was found in purified lectin using Phenol-Sulfuric acid method so the lectin under study differ from other lectins in this struactural property because the other ones are glycoprotein. The optimum pH for lectin activity was found to have ranged from 6.5-7.0 while agglutinating activity was found to be lost completely at pH lower than 5.5 and more than 8.5 . The lectin retained its original activity when incubated at 20-60°C for 15 minutes, while it had retained half of its original activity after incubation for the same time at 70 °C the activity was decreased to lowest level at 80°C that it was lost 93.75 % of its original activity and became completely inactive at 90°C. It found that the lectin has not lost any of its activity until six week of storage at –18 °C , but the agglutinating activity was decreased partly of seventh and eighth week of storage under the same condition, as it lost just 50% of the activity . It was found that the activity decline so quickly after the first week at 25 °C and after the second week when held at 4 °C.

Part of Ph.D. thesis of the second author بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقدمة

بدأت الدلائل تتراكم، مع نهاية القرن التاسع عشر، حول وجود بروتينات في الطبيعة تمتلك قدرة على ملازنة كريات الدم الحمر البشرية وعرفت هذه البروتينات بالملازنات الدموية hemagglutinins أو phytoagglutinins لأنها اكتشفت أصلا في المستخلصات النباتية (25).

وأطلق Boyd عام 1954م مصطلح اللكتين المستنبط من الكلمة اللاتينية *legere* التي تعني انتقاء To choose أو To pick out على تلك الجزيئات نظرا لارتباطها المتخصص بالسكريات الأحادية Monosaccharides أو السكريات المتعددة القصيرة Oligosaccharides إلا ان تلك الجزيئات لا تملك فعالية حفزية وتبين انها تملك خصوصية تجاه فصائل الدم (23 ، 24). ويعرف اللكتين بأنه " بروتين رابط للسكر أو بروتين سكري من اصل غير مناعي له القدرة على ملازنة الخلايا agglutination و/ أو ترسيب المقترنات السكرية glycoconjugetes" (20) ويستثنى من هذا التعريف البروتينات الرابطة للكاربوهيدرات مثل الانزيمات المتخصصة تجاه الكاربوهيدرات والبروتينات الناقلة للسكر والهرمونات والذيفانات البكتيرية والانترفيرونات التي تحتوي على موقع واحد فقط لربط الكاربوهيدرات (17).

صنفت لكتينات النبات معظمها إلى سبع عوائل على أساس تركيبها وتطورها شملت لكتينات البقول Legume والبروتينات الرابطة للكايتين Chitin-binding protein والبروتينات المثبطة للرايبوسوم نمط 2 Type 2 ribosom-inactevating protein (RIPs) واللكتينات الرابطة للمانوز Monocot mannose group of lectins و-binding lectins(MMBLs) Amaranthins و Jacalin- related lectins(JRLs) و Curcurbitaceae phloem Lectins (13 ، 16).

يعد ملازن جنين الحنطة Wheat germ agglutinin (WGA) أحد لكتينات الحبوب وتشترك لكتينات هذه العائلة جميعها في صفة خصوصيتها تجاه N-acetylglucosamine و-N (GlcNAc) acetylneuraminic acid (NeuNAc) وتتألف أيضا من وحدتين ثانويتين متماثلتين إلا انها تختلف بشكل ملحوظ عن لكتينات البقول. إذ تنفرد بمحتواها العالي من cysteine الذي ينعدم وجوده في لكتينات البقول فضلا عن خلوها من المعادن (24).

يختلف WGA عن لكتينات العائلة البقولية في أنها تمتلك أكثر من موقع واحد لربط الكاربوهيدرات لكل وحدة واحدة وتمثل الحقول الأربعة التي تشكل الوحدة الواحدة حقل تمييز الكاربوهيدرات وتبين ان مواقع الارتباط الأولية يمكن ان تشغل من قبل (GlcNAc) فضلا عن (NeuNAc)، فيما تتمكن مواقع الارتباط الثانوية من تمييز (GlcNAc) فقط (26).

استخدم WGA في مجالات عدة لعل من أبرزها ا الكشف عن تلوث منتجات الطماطة بالفطريات الخيطية بناء على امتلاك هذا اللكتين ألفة انتقائية تجاه الكايتين الذي يدخل في تركيب جدران خلايا الفطريات (22) ويأتي WGA في مقدمة اللكتينات المستخدمة في أعمدة الألفة إذ وظفت كروماتوكرافيا الألفة الحاوية على ذراع من WGA لتنقية البروتين السكري Glycophorin في كريات الدم الحمر البشرية(18) واستخدمت ايضا لتنقية مجموعة من البروتينات السكرية لفايروس Bovine herpes virus ا لتي تشترك بوظائف حيوية مهمة مثل آلية التداخل بين الفايروس والعائل والاستجابة المناعية لخلية العائل للإصابة ، تمهيدا لاستخدام هذه البروتينات السكرية لقاحا ضد الفايروس (6) . ويعد WGA أحد اكثر اللكتينات النباتية استخداما في تنميط البكتريا لاسيما المرضية منها مثل *Compylobacter concisus* (2) و *Helicobacter pylori* (15).

ولأهمية لكتين جنين الحنطة في المجالات التطبيقية فقد هدف هذا البحث إلى دراسة بعض الصفات التركيبية للكتين لاتمام بحث سابق شمل استخلاص لكتين جنين الحنطة وتنقيته بطريقة مبسطة (1).

المواد وطرائق العمل

1- **تهيئة مسحوق جنين الحنطة :** تم الحصول على جنين الحنطة من الشركة العامة لتصنيع الحبوب / مطحنة الدورة إذ استخدم بوصفه مصدرا للكتين وجرى طحنه وغربلته في طاحونة كهربائية مختبرية للحصول على مسحوق ناعم حفظ في أكياس بولي اثيلين جافة ونظيفة

ومحكمة الإغلاق بدرجة حرارة – 18 م لحين الاستخدام.

2- **استخلاص اللكتين وتنقيته :** جرى تحضير المستخلص للكتين بازالة الدهن بالهبتان وفق طريقة Zeng و (29) Ruckenstein وتم استخلاص اللكتين من جنين الحنطة مزال الدهن بمحلول حامض HCl بتركيز 0.05 مولار ونقي المستخلص الحامضي بسلسة من الخطوات تضمنت تركيز اللكتين بالترشيح الفائق وكروماتوكرافيا التبادل الايوني باسلوب الوجبة باستخدام المبادل DEAE-Cellulose وكروماتوكرافيا الألفة بعمود الكايتين المحضر مختبريا من مخلفات الروبيان المذكورة تفاصيلها في (1).

3- تقدير الوزن الجزيئي: عين الوزن الجزيئي للكتين بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد بوجود المواد الماسخة SDS (SDS-PAGE) وحضرت المحاليل وأجريت عملية الترحيل الكهربائي تبعا للطريقة الموصوفة من قبل Garfin (14) واشتملت البروتينات القياسية Lysozyme و Carbonic anhydrase و Ovalbumin و Bovine serum albumin ذات أوزان جزيئية 14400 و30000 و 43000 و 67000 دالتون على التوالي. قيست المسافة التي قطعتها صبغة البروموفنيول الأزرق من السطح العلوي للهلام إلى مركز حزمة الصبغة لاستخراج الوزن الجزيئي للكتين كما قيست المسافات من السطح العلوي للهلام إلى مركز حزم البروتينات القياسية المنفصلة واستخرجت قيمة الحركة النسبية Relative mobility (Rm) لكل بروتين ورسمت العلاقة بين الحركة النسبية (Rm) ولوغارتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية، وقدر الوزن الجزيئي لـ WGA بعد أستخرج قيمة (Rm) للكتين وإسقاطها على المنحنى القياسي.

4- تعيين نقطة التعادل الكهربائي للكتين(pI) Isoelectric point : اتبعت طريقة Wrigley (27) في إجراء عملية التبئير الكهربائي المتشابه Isoelectric focusing (IEF) لتحديد نقطة تعادل الشحنة للكتين المنقى.

5- تعيين المحتوى الكاربوهيدراتي للكتين : قدر تركيز الكاربوهيدرات في اللكتين المنقى باستخدام طريقة الفينول- حامض الكبريتيك المركز، طبقا للطريقة المذكورة من قبل Chaplin (9) حضر المنحنى القياسي لتقدير الكاربوهيدرات باستخدام تراكيز متدرجة من سكر الكلوكوز.

6- تعيين الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللكتين : حضر عالق كريات الدم الحمر باستخدام محلول خلات الصوديوم الدارئ بمدى أرقام هيدروجينية من 4-5.5 و محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بمدى أرقام هيدروجينية من 6-7.5 و محلول Tris-HCl الدارئ بمدى أرقام هيدروجينية من 8-9 وبتركيز 0.05 مولار.

7- تعيين الثبات الحراري للكتين : عرض 2 مل من محلول اللكتين لدرجات حرارة مختلفة تراوحت من (20-90) م بفارق 10 درجات مئوية من محلول لأخر،باس هيدروجيني 7 لمدة 15 دقيقة، بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت النسبة المئوية لفعالية اللكتين المتبقية .

8- تعيين الثبات الخزني للكتين : حضن اللكتين المنقى في دارئ فوسفات الصوديوم باس هيدروجيني 7 وخزن بدرجات حرارة مختلفة وهي –18 م و4 م و 25 م لمدة شهرين جرت خلالها متابعة أسبوعية للنسبة المئوية لفعالية اللكتين المتبقية .

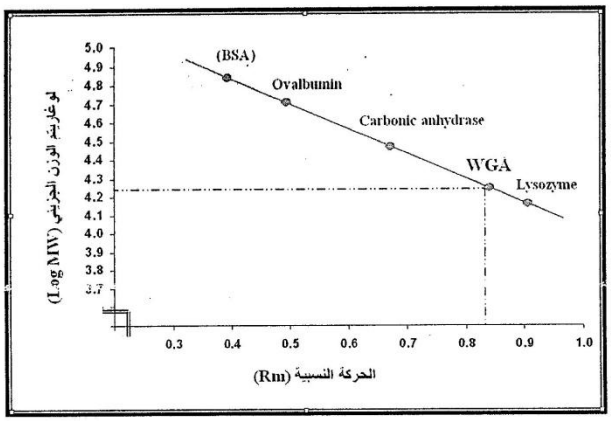
9- تقدير فعالية اللكتين : قدرت فعالية اللكتين بطريقة التلازن الدموي Hemagglutination assay باستخدام أطباق المعيار الدقيق Microtiter plates على وفق طريقة Zeng و Ruckenstein (29) إذ قدرت فعالية التلازن الدموي للكتين بطريقة التخفيف المتسلسل بتخفيف 50 مايكرولتر من الأنموذج مع حجم مساو من محلول الملح الفسلجي Phosphate buffer saline(PBS) (حضر من فوسفات الصوديوم بتركيز 0.01 مولار الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولار بأس هيدروجيني 6.8) في أطباق المعيار الدقيق ذات قاعدة بشكل حرف U وبعدد حفر 8 ×12 ثم خفف نصف المحلول الأخير مع حجم مساو من محلول PBS وهكذا. أضيف 50 مايكرولتر من عالق كريات الدم الحمر البشرية A^+ لكل حفرة ،مزج الطبق جيدا وقيم التلازن الدموي بعد مرور ساعة واحدة من وضع الأطباق بدرجة حرارة 25 م وعبر عن الفعالية التلازنية بـ (وحدة /مل) واحتسبت الفعالية من مقلوب أخر تخفيف حدث

فيه التلازن مقسوما على الحجم الكلي للمستخلص المستخدم في الاختبار.

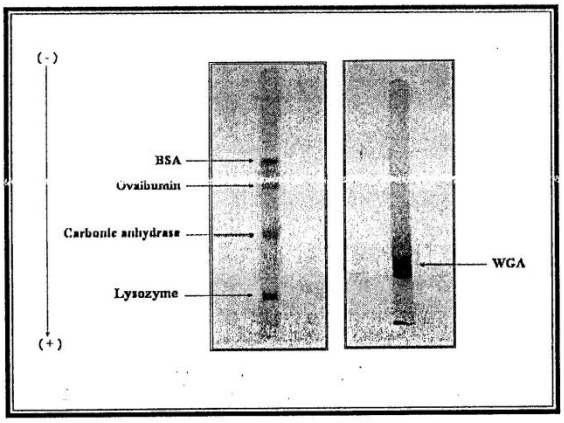
النتائج والمناقشة

1 – تعيين الوزن الجزيئي للكتين

يوضح الشكل 1 المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية Relative mobility (Rm) للبروتينات القياسية في هلام الاكريلامايد المتعدد بوجود SDS والميركابتوايثانول إذ لحساب الوزن الجزيئي للكتين المنقى بطريقة الترحيل الكهربائي ، فوجد ان الوزن الجزيئي للكتين قيد الدراسة يبلغ 17800 دالتون. كما قدر الوزن الجزيئي للكتين جنين الحنطة – قيد الدراسة – بطريقة SDS-PAGE بغياب المواد المختزلة باستخدام البروتينات القياسية ذاتها فوجد انه يبلغ 21300 دالتون (الشكل 2).



شكل 1. المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للكتين جنين الحنطة المنقى بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود الماده الماسخة للبروتين SDS-PAGE

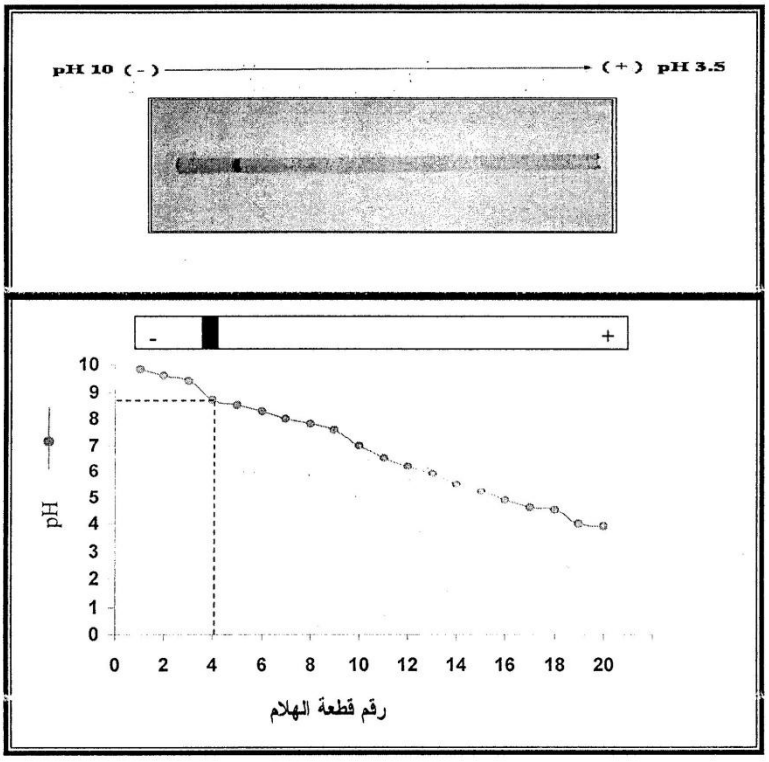


شكل 2 . تقدير الوزن الجزيئي للكتين جنين الحنطه المنقى بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد بوجود الماده الماسخة SDS-PAGE

2- تعيـــين نقطــــة التعــــادل الكهربـــائي للكتـــين (pI) Isoelectric point

استعملت طريقة التبئير الكهربائي المتشابه IEF لتعيين نقطة التعادل الكهربائي pI للكتين جنين الحنطة المنقى في هذه الدراسة ويلاحظ من الشكل 3 ظهور حزمة بروتين واحدة في هلام متعدد الاكريلامايد بتركيز 7.5% بعد تصبيغه بصبغة البروتين Coomassie Brilliant Blue R- 250 كما أتضح ان قيمة نقطة التعادل الكهربائي لـــ WGA بلغت 8.7 أي انه بروتين قاعدي الشحنة . وعد ظهور اللكتين على شكل حزمة واحدة في هلام التبئير دليلا إضافيا لتنقية اللكتين حد التجانس.

وفي أبحاث أخرى أظهرت نتائج تقدير نقطة التعادل الكهربائي للكتين المعزول من عصارة نبات *Chelidonium majus* L. وجود ثلاثة أشكال جزيئية isoforms بلغت نقاط تعادلها الكهربائي 7.4 و 8.2 و 8.5 (12).



شكل 3. تقدير نقطة التعـــادل الكهربائي للكتين جنين الحنطة بطريقة التبئير الكهربائي المتشابه(IEF)

3- تعيين المحتوى الكاربوهيدراتي للكتين

أوضح تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي بطريقة الفينول – حامض الكبريتيك خلو اللكتين المنقى من الكاربوهيدرات، وفي ضوء هذه النتيجة نستنتج انه يختلف عن اللكتينات معظمها كونه ليس من البروتينات السكرية Glycoproteins.

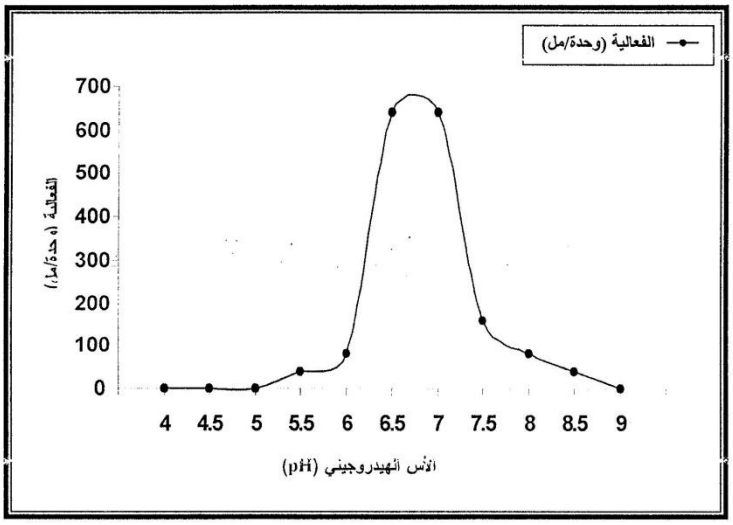
ويتشابه لكتين جنين الحنطة مع لكتينات من مصادر نباتية أخرى مثل لكتين Con A المعزول من بذور فاصوليا جاك واللكتين المعزول من بذور البازلاء وبذور فستق الحقل واللكتين المعزول من بذور نبات *Dioclea virgata* (8) ومع لكتينات من مصادر حيوانية مثل اللكتين المعزول من اللمف الدموي للروبيان الأبيض (5) التي تعد من ابرز الأمثلة على طبيعة اللكتينات البروتينية في خلوه من الكاربوهيدرات

4- تعيين الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللكتين

بينت النتائج الموضحة في الشكل 4 ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية اللكتين تراوح بين 6.5 –7.0 في حين لوحظ انعدام فعالية التلازن عند الأسس الهيدروجينية الاوطا من 5.5 وأعلى من 8.5 على حد سواء ،بسبب تحلل كريات الدم الحمر(Hemolytic) (7).

تجدر الإشارة إلى ضرورة إنجاز اختبار الفعالية التلازنية للكتينات التي تتطلب استخدام كريات الدم الحمر البشرية بمدى من الأسس الهيدروجينية يتراوح بين 5 –8.5 في محاليل ملحية ذات تراكيز متعادلة الضغط الازموزي (Isotonic) بدرجات حرارة تتراوح بين 0–40 م وتؤدي معاملة كريات الدم الحمر البشرية بانزيم Neuraminidase إلى اتساع هذا المدى ليتراوح بين 4–9 مما يحول دون تحللها (7) .

أكد Da Silva و آخرون (10) ان أقصى فعالية تلازنية للكتين المعزول من نبات *Bauhinia pentandra* كانت عند الاس الهيدروجيني 7.6. وأظهرت بعض الدراسات ان اللكتينات قد تمتلك مدى واسعا من الأس الهيدروجيني الأمثل ،مثل اللكتين المنقى من جذور العشب الصيني *Astragalus mongholicus* إذ تراوح بين 4.5 –7.5 (28).



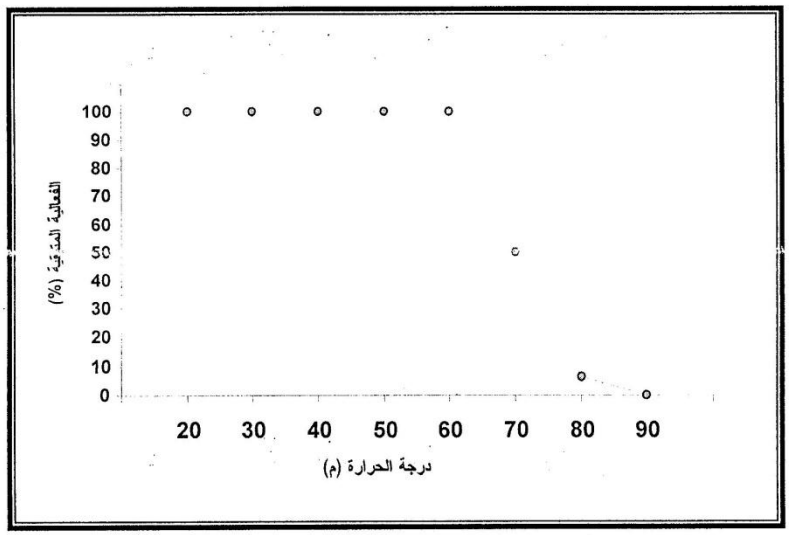
شكل 4. منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية لكتين جنين الحنطة المنقى

5- تعيين الثبات الحراري للكتين

أظهرت نتائج حضن لكتين جنين الحنطة بـدرجات حرارة تراوحت بين 20-90 م لمدة 15 دقيقة، (الشكل 4) ان اللكتين يحتفظ بكامل فعاليته بمدى واسع من درجات الحرارة تتراوح بين 20 - 60 م. وأخذت بعدها الفعاليـة التلازنيـة بالتناقص تدريجيا عند رفع درجة الحرارة إلى 70 م إذ احتفظ اللكتين بـ 50% من فعاليته عند هذه الدرجة وبلغت الفعالية أوطأ مستوى لها عند 80 م إذ فقد اللكتـين 93.75% مـن فعاليته حتى بلغت الفعالية المتبقية صفرا عند درجة حـرارة 90 م. وتعزى ثباتية اللكتين المرتفعة نسبيا إلى احتواء جزيئة البروتين على عدد مرتفع من جسور ثنائية ألكبريت مما يجعل جزيئة اللكتين ثابتة تحت ظروف مختلفة من الحرارة والأس الهيدروجيني (21).

يذكر ان الثبات الحراري للكتين يتاثر بعوامل عـدة لاسيما الأس الهيدروجيني والقوة الايونية وطبيعـة المحلـول الدارئ ووجود المنشطات والمثبطات فضلا عن مدة الحضن وتركيز اللكتين واحتواء الوسط على ملازنات أخـرى غيـر اللكتين، إذ بقيت الفعالية التلازنيـة الملاحظـة للكتـين فـي المـستخلص الملحـي للغـلاف الخـارجي لقرنـات *Caesalpinia tinctoria* بعد تعرضه لدرجة حرارة 90 م لمدة 15 دقيقة في حين فقد اللكتين المنقى فعاليتـه التلازنيـة الكلية في المستخلص الخام (11).

وجد Ali و آخرون (4) ان أقصى فعالية لمشابهات اللكتين CSL-1 و CSL-2 و CSL-3 المعزولة من بذور نبات *Cassia fistula* تراوحت بين 20-35 °م وانخفضت بسرعة عند رفع درجة الحرارة وفقدت الفعالية التلازنية تماما بدرجة حرارة 70 م.

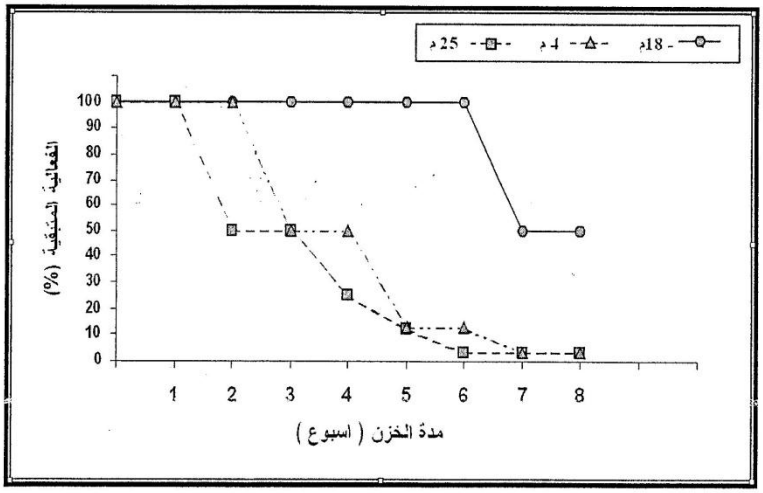


شكل 4. منحنى الثبات الحراري للكتين جنين الحنطة المنقى

6- تعيين الثبات الخزني للكتين

اختبر تأثير الخزن بدرجات حرارة مختلفة شملت – 18 م و4 م و25 م لمدة 8 أسابيع في فعالية لكتين جنين الحنطة ويظهر من خلال الشكل 5 احتفاظ اللكتين بفعالية قصوى عند الخزن بدرجة حرارة –18 م لغاية الأسبوع السادس من الخزن ثم تناقصت الفعالية قليلا في الأسبوعين السابع والثامن إذ احتفظ اللكتين بـ 50 % من فعاليته الأصلية بعد هذه المدة. وشهدت الفعالية التلازنية انخفاضا تدريجيا بعد الأسبوع الثاني من الخزن بدرجة الحرارة 4 م، وكما موضح في الشكل 5 ، فيما لوحظ انخفاض واضح بعد الأسبوع الأول من الخزن بدرجة حرارة 25 م حتى بلغت أدنى مستوى لها بعد الأسبوع السادس من الخزن.

وذكر عدد من الباحثين إمكانية المحافظة على فعالية محاليل اللكتينات في أثناء خزنها، من خلال إضافة مواد كيمياية مثل ازايد الصوديوم بنسبة 0.05 % لمنع النمو البكتيري في أثناء الخزن بدرجة حرارة 4 م (19) أو إضافة الكلوكوز أو مشتقه المثيلي Metheyl D-glucopyranoside للكتين Con A من بذور فاصوليا جاك، فضلا عن مركبات أخرى مثل 2-Mercaptoethanol أو السستين أو المثيونين إلى محلول اللكتين المنقى من شانها المحافظة على الفعالية التلازنية مدة طويلة (3) ،مع ضرورة الأخذ بالاعتبار نوع اللكتين وتركيز المادة المضافة إذ يحدث تفكك للكتين جنين الحنطة عند خزنه بوجود تركيز عال من مادة 2-Mercaptoethanol .



شكل 5. الثبات الخزني للكتين جنين الحنطة المنقى بدرجات حرارة -18 م و 4 م و25 م لمدة 8 أسابيع.

المصادر

1. العبادي ، إيناس مظفر ومحي الدين ، محمد عمر و طه ، علي عبد الرحمن .(2008). طريقة مبسطة لتنقية لكتين جنين الحنطة بطريقة كروماتوكرافيا الألفة. مجلة العلوم الزراعية العراقية . 39 (2) ع ص 44-53 .

2. Aabenhus, R.; S. O. Hynes ; H. Permin ; A. P. Moran and L. P. Andersen. 2002. Lectin typing of *Compylobacter concisus*. J. Clin.Microbiol. 40(2): 715-717.

3. Agrawal, B. B. and I. J. Goldstein .1972. Cancanavalin A. The jack bean (*Cancanavalia ensiformis*) phytohemagglutinin. In V. Ginsoury (ed.). Methods In Enzymology. Academic press. New York. p.313-318.

Caesalpinia tinctoria Domb, ex Dc fruits. Braz. J. Plant Physiol. 15(2): 119-122.

12. Fik, E.; Dalgalarrondo, M.; Haertle, T. and Gozdzicka-Jozefak, A. 2000. Comparative biochemical analysis of lectin and nuclease from *Chelidonium majus* L. Acta Biochimica Polonica. 47(2): 413

13. Gaidamashvilli, M.; Ohizumi, Y.; Iijma, S.; Takayama,T.; Ogawa,T. and Muramoto, K. 2004. Characterization of the Yam tubr storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities . J. Biol. Chem. 279(25): 26028-26035.

14. Garfin, D. E. 1990. Purfication procedures: Electrophoretic Method. In E. D. Murray and P. Dentscher (ed.). Method In Enzymology. Vol. 182 . p. 425-441.

15. Hynes, S. O.; N. Broutet ; E. S. Group ; T. Wadstrom ; M. Mikelsaar ; P. W. O. Toole ; J. Telford ; L . Engstrand ; S . Kamiya ; A. F. Mentis and A. P. Moran. 2002. Phenotypic variation of *Helicobacter pylori* isolates from geographically Distinct regions detected by lectin typing. J. Clin. Microbiol. 40(1): 227-232.

16. Kong, W.; Z. Dong ; J. Fei ; Q. Wang; X. Sun and K. Tang, 2006. Characterization of a mannose-binding lectin gene from *Typhonium divaricatum* (L.) Dece. Africam J. Biotechnol. 5(10): 793-799.

17. Liener, I. E.; N. Sharon and I. J. Goldstein. 1986. The Lectins: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine . Academic Press, Inc., London. Ltd.

18. Lis, H. and N. Sharon. 1986. Biological properties of lectins. In I. E. Liener; N. Sharon and I. J. Goldstein (ed.). The Lectins. Properties , Functions and Applications in Biology and Medicine . Academic Press, Inc., London. Ltd. p. 266-285.

4. Ali, M. A.; M. Abu Sayeed and N. Absar. 2004. Purification and characterization of three lectins extracted from *Cassia fistula* seeds and effect of various physical and chemical agents on their stability. J. Chinese Chemical Society. 51: 647-654.

5. Alpuche, J.; A. Pereyra; C. Agundis ; C. Rosas ; C. Pascual ; M. Slomianny ; L. Vazquez and E. Zenteno. 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (*Crustacea decapoda*) hemolymph. Biochimica et Biophysica Acta. 1724(1-2): 86-93.

6. Badia, M. and E. Querd. 1988. Detection and purification of bovine herpesvirus 1 glycoproteins by lectin afinity . J. Virological Methods. 22: 23-29.

7. Beeley, J. G. 1985. Laboratory Techniques. In R. H. Burdon and P. H. Knippenberg (ed.). Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, New York. Vo.16 p.301-364.

8. Cavada, B. S.; M. V. Ramos ; E. F. Cordeiro ; T. B. Grangeiro ; J. T. A. Oliveira ; A. D. F. U. De Carvalho and R. A. Moreira .1996. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* benth seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegtal. 8(1): 37- 42.

9. Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides . In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (ed.). Carbohydrate analysis a practical approach. IRL Press. Oxford. Washington DC. p.2

10. Da Silva, A. L. C.; C. G. Horta and R. D. A. Morerira . 2001. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. steua. 13 (3): 262-269.

11. De Oliveira, M. L. ; L. M. Beltramini ; S. G. desimone ; M. H. N. Brumano ; R. A. Silva-Lucca ; M. K. K Nakaema ; C.V. Pires and M. G. A. Oliveira. 2003. Purification and partial characterization of a lectin from

19. Miller, R. L. 1987. Properties of sialic acid –specific lectin from the slug (*limax flavus*). In V .Ginsburg (ed.). Methods In Enzymology Academic Press. New York. Vol.138. p.527-530.

20. Moreira, R. de-A. ; I. L. Ainouz ; J. T. De-oliveira and B. S. Cavada. 1991. Plant lectins , chemical and biological aspect. Mem. Inst. Oswaldo.Cruzo. 86 suppl. 2: 211-218.

21. Nagata, Y. and M. M. Burger. 1974. Wheat germ agglutinin molecular characterization and specificity for sugar binding. J.Biol.Chem. 249(10): 3116-3122.

22. Potts, S. J.; D. C. Slaughter and J. F. Thompson. 2000. A fluorescent lectin test for mold in raw tomato juice. J. Food Sci. 65 (2): 346-350.

23. Sharon, N. 2005. Memories of a senior scientist. A life with lectins. Cell. Mol. Life. Sci. 62:1-6.

24. Sharon, N. and H. Lis. 2001. Lectins. Encyclopedia of Life Sciences.

25. Sharon, N. and H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinations to biological recognition molecules. Glycobiol. 14(11): 53-62.

26. Wright, C. S. 1992. Crystal stracture of a wheat germ agglutinin / glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex structural basis for cooperative lectin-cell binding. J. Biol. Chem. 267(20): 14345-14352

27. Wrigley, C. W. 1971. Electro-Focusing. In W. B. Jokby (ed.). Methods In Enzymology. Academic Press, New York. Vol. 22.

28. Yan, Q., Z. Jiang, S. Yang, W. Deng and L. Han. 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. Arch. Biochem. Biophys. 442(1): 72-81.

29. Zeng, X. and Ruckenstein, E. 1999. Macroporous chitin affinity membrane for wheat germ agglutinin purification from wheat germ.. J. Membrane Sci. 156: 97-107.