

19 JUL 1991



MONODIN, A NEW SIALIC ACID-SPECIFIC LECTIN FROM
BLACK TIGER PRAWN (*PENAEUS MONODON*)

SUNANTA RATANAPO

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

With compliments
of
ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1991

TH
9954 m
'91

Copyright by Mahidol University

310198



ชื่อวิทยานิพนธ์ โมโนดิน เลคตินตัวใหม่ที่จำเพาะต่อกรดเซียลิกจากกุ้งกุลาดำ

ผู้วิจัย สุนันทา รัตนาโก

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มนตรี จุฬารัตนเทล, Ph.D.

ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D.

สถิตย์ สิริสิงห, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 22 มิถุนายน พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ ในจำนวนเลคตินที่พบหลายร้อยตัวมีเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิก เลคตินที่จำเพาะต่อกรดเซียลิกส่วนใหญ่พบในพวกสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่หน้าที่ของเลคตินในสัตว์เหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจ ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกเลคตินตัวใหม่ชื่อ "โมโนดิน" จากฮีโมลิมพ์ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยวิธีแอฟฟิเนตี้โครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์เพออิน-อะกาโรส และฟาสท์โปรตีนลิควิดโครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์ ซุปเปอร์โรส 12 และโมโนคิว โมโนดินมีน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์เท่ากับ 420,000 และมีหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์เท่ากับ 27,000 พบว่าโมโนดินเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นกลาง 3.89% และถูกทำลายได้ด้วยความร้อนจากอะกาโรสไอโซอิเล็กตริกโฟคัสซิง พบว่าโมโนดินมีค่า pI เท่ากับ 8.2

แอกทิวิตีในการจับกับคาร์โบไฮเดรตของโมโนดิน ศึกษาได้จากการยับยั้งแอกทิวิตีด้วยน้ำตาล พบว่าโมโนดินมีความจำเพาะต่อ N-acetylneuraminic acid ซึ่งสามารถยับยั้งแอกทิวิตีของโมโนดินได้ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ จากการยับยั้งแอกทิวิตีของโมโนดินโดยโอลิโกแซคคาไรด์ และเซียโลไกลโคโปรตีน แสดงว่าการจับของโมโนดินกับคาร์โบไฮเดรตต้องอาศัยพันธะชนิด $\alpha 2 \rightarrow 3$ และหรือ $\alpha 2 \rightarrow 6$ glycosidic linkage ที่เชื่อมกรดเซียลิกที่ปลายกับน้ำตาลตัวถัดมาและพันธะที่เชื่อมสายคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนต้องเป็นชนิด O-glycosidic linkage แอกทิวิตีในการจับกับคาร์โบไฮเดรตของโมโนดินนี้ต้องการแคลเซียมไอออน 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความต้องการนี้สามารถทดแทนได้ด้วยสตรอนเดียมไอออนเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

แอนติโมโนดินได้จากกระดาษที่ฉีดด้วยโปรตีนหน่วยย่อยของ โมโนดินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสัมพันธ์เท่ากับ 27,000 ที่แยกโดย SDS-PAGE โดยเทคนิค immunoblotting พบว่ามีสารที่ ทำปฏิกิริยากับแอนติโมโนดิน ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นโมโนดินอยู่ในรังไข่ และกล้ามเนื้อของกึ่งกุลาคำ การที่พบโมโนดินในฮีโมไซท์ที่ส่วนของเมมเบรน, ไซโตซอล และไมโทคอนเดรีย แสดงว่าฮีโมไซท์ น่าจะเป็นที่สังเคราะห์โมโนดิน นอกจากนี้ยังพบโมโนดินในซีรัมของกึ่งชนิดอื่นที่มี species และ genus ใกล้เคียงคือ กุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis*) และ กุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) ปริมาณโมโนดินในกึ่งกุลาคำพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ แต่มีความแตกต่างกันตามอายุและวงจรการลอกคราบ โมโนดินจะมีระดับต่ำในกึ่งวัยอ่อน (75 วัน) ในวงจรการลอกคราบของกึ่งกุลาคำ กึ่งหลังลอกคราบ (stage A) จะมีระดับโมโนดินต่ำกว่าระยะอื่น ระดับโมโนดินจะสูงสุดในช่วงหลังลอกคราบ (stage B) จนถึงก่อนจะลอกคราบ (stage D₀) ได้เสนอแนะบทบาทที่เป็นไปได้ของ โมโนดินในการลอกคราบ

ในกึ่งที่เป็นโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีปริมาณของ โมโนดินในฮีโมลิมฟ์สูงกว่าปกติ ทำให้เสนอแนะว่า โมโนดินอาจมีบทบาทเป็นสารต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของ โมโนดิน แสดงให้เห็นจากความสามารถอย่างจำเพาะของ โมโนดินในการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียที่พบมากจากกึ่งที่เป็นโรคติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* จับกลุ่มตกตะกอน การที่เลคตินตัวอื่นที่จำเพาะต่อกรดเซียลิกได้แก่ Limulin, LFA และ WGA สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียจับกลุ่มตกตะกอนได้ เป็นการยืนยันว่าโมโนดินจับกับ N-acetylneuraminic acid บนแบคทีเรียนี้.

Thesis Title: Monodin, a New Sialic Acid-Specific Lectin from Black Tiger Prawn
(*Penaeus monodon*)

Name: Sunanta Ratanapo

Degree: Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Bhinyo Panijpan, Ph.D.

Stitaya Sirisingha, Ph.D.

Date of Graduation 22 June B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Although hundreds of lectins which are multivalent carbohydrate-binding are known, only few are specific for sialic acids. Sialic acid-specific lectins are mostly found among invertebrates but their roles are speculative. In this study, a new lectin, called monodin, was purified from the hemolymph of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) by affinity chromatography using a fetuin-agarose column and fast protein liquid chromatography using Superose 12 column and Mono Q column. Its native Mr was 420,000 and its subunit Mr was 27,000. Monodin was found to be a heat-labile glycoprotein containing 3.89% neutral sugars. By agarose gel isoelectric-focusing, its relative pI value was shown to be 8.2.

The carbohydrate-binding activity of monodin was found to specific to N-acetylneuraminic acid because it was inhibited by the sugar at 3.12 mM. Its activity was also inhibited by other N-acetylamino sugars, GalNAc and GlcNAc, at 6.25 mM and ManNAc at 12.5 mM. The inhibition of the monodin activity by oligosaccharides and sialoglycoproteins suggested

that the binding activity of monodin required the $\alpha 2 \rightarrow 3$ and/or $\alpha 2 \rightarrow 6$ linkage of NeuNAc to subterminal sugars and also the O-glycosidic linkage to the protein. Its binding activity required 1 mM Ca^{2+} which can be substituted by Sr^{2+} at 20 mM.

Anti-monodin was raised in rabbits against the 27,000 Mr protein subunit of monodin obtained from SDS-PAGE. Using immunoblotting, anti-monodin reactive material, presumably monodin, was found in the ovary and muscle of *P. monodon*. The presence of monodin in the prawn hemocytes was detected in the hemocyte membrane, cytosol and mitochondrial fractions, suggesting the hemocyte as a possible site of monodin synthesis. In addition, immunoreactive monodin was detected in serum of other prawns of closely related species and genus, *Penaeus merguensis* and *Metapenaeus monoceros*. The monodin contents in the serum of *P. monodon* did not differ between the sexes but varied depending on age and molting cycle. Monodin level was low in the young prawn of 75 days old. During a molting cycle, a lower amount of monodin was detected in the prawn of stage A (postmolt) and a higher amount was noted in other stages with highest amount in stage B (postmolt) through stage D_o (pre-molt). A possible role of monodin in molting was suggested.

The monodin contents in the hemolymph of most prawns with bacterial infection were higher than that of the uninfected prawns, suggesting its role as an antibacterial agent. The antibacterial activity of monodin was demonstrated by its ability to induce specific agglutination of *Vibrio vulnificus*, the major infective bacteria in the prawn. The binding specificity of monodin to NeuNAc of the bacterium was confirmed by the ability of other sialic acid-specific lectins, limulin, LFA and WGA in inducing the bacterial agglutination.