

강낭콩 유식물로부터 분리한 Lectin의 생화학적 특성

노 광 수

계명대학교 생물학과

(접수 : 2006. 12. 16., 게재승인 : 2007. 2. 21.)

Biochemical Characterization of Lectin Purified from Kidney Bean Seedling

Kwang Soo Roh

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received : 2006. 12. 16., Accepted : 2007. 2. 21.)

We have studied biochemical characterization of lectin purified from kidney bean seedling through PBS extraction, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, and Sephadex G-100 affinity chromatography. The lectin was agglutinated by rabbit erythrocytes. This lectin analyzed by SDS-PAGE is a tetramer composed of two subunits with molecular weights of 46 and 44 kDa. The optimal temperature and thermal stability of the lectin was 30°C and 40-80°C, respectively. The maximal pH of this lectin was pH 8.2.

Key Words : Hemagglutination activity, kidney bean seedling, lectin

서 론

Lectin은 세포 표면에 존재하는 당단백질, 다당류 및 당 지질에 특이적으로 결합하거나 이들을 인식하는 능력을 가진 탄수화물 결합 단백질로서(1), 당 화합물을 침전시키고 적혈구 세포나 이외의 세포들로서 림프구와 섬유아세포뿐만 아니라 세균이나 곰팡이 등도 응집시킨다(2). 탄수화물에 대한 lectin의 결합은 세포의 확산을 자극하거나 세포의 증식 과정에 세포 표면에서 일어나는 변화를 감지하게 하며(3), lectin은 세포와 세포 사이 및 개체 사이를 인식하는 분자로서 작용하는 능력도 가지고 있다(4).

Wheat germ agglutinin이 정상세포보다 종양세포를 더 잘 응집시킨다는 것이 보고된 후(5, 6), concanavalin A와 soybean agglutinin도 종양세포에 대한 응집효과가 있음이 확인됨으로서, lectin은 종양세포의 진단과 치료에 응용되고 있다(3). 이외에도 lectin은 인슐린과 유사한 능력(7), 항균성에 의한 방어(8), 영양물질의 수송 및 저장(9) 등과 같은 많은 생물학적 활성을 가지고 있다.

Lectin은 식물종자에 가장 풍부하게 존재하며, 잎, 줄기, 뿌리, 근경, 나무껍질 등과 같은 기관이나 조직에도 많이

들어있다(10). 대부분의 식물성 lectin은 분비성단백질로서 소포체 막 표면에서 합성된 후, 액포나 세포벽 및 세포간 공간에 축적되며(11), 종자가 발육될 때 합성된 다음, 발아 과정에서 유식물의 생장에 필요한 아미노산을 제공하기 위해 분해된다(12).

Lectin은 혈액에 따라 적혈구에 대한 응집 반응이 다르게 나타나는 종 특이성을 가지고 있는 바, 한국산 식물에 대한 lectin의 존재 여부와 활성을 측정된 결과, 다수의 식물에서 사람의 ABO 혈액형과 토끼의 혈액에 대한 응집 반응 현상이 관찰되었다(13, 14).

강낭콩에는 우리 몸에 필요한 거의 모든 영양소가 들어 있는데, 특히 각기병 이외에도 식욕 부진, 피로, 신경염, 심장 장애 및 부종 등을 예방하는 비타민 B1, B2 및 B6가 많아 쌀밥을 주식으로 하고 있는 한국인에게는 탄수화물 대사를 순조롭게 하는 식품이다. 또한 식물성 섬유도 풍부하게 함유되어 있어 변비 개선이나 대장암 예방, 동맥경화 개선 등에도 효과가 있다. 본 실험에서는 자연 친화적인 항균제나 의약품 제품의 개발에 대한 높은 가능성을 가지는 실용성 식물로서 강낭콩의 기능을 연구하기 위한 목적의 일환으로, 강낭콩을 발아시켜 얻은 유식물로부터 lectin을 분리하고, 이의 분자량, 적혈구 응집반응, 열 안정성, 최적 온도 및 최적 pH 등의 생화학적 특성을 조사하였다.

† Corresponding Author : Department of Biology, Keimyung University, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5207, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : rks@kmu.ac.kr

재료 및 방법

식물재료

시장에서 구입한 강낭콩 (*Phaseolus vulgaris*) 종자를 받아서 4주째의 유식물을 본 실험의 재료로 사용하였다. Roh와 Park(15)의 방법에 따라, 강낭콩 종자를 vermiculite, perlite 및 peat moss가 4 : 1 : 1로 들어있는 화분에 파종하여 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 압조건 하의 배양실에서 받아시켰다.

Lectin의 분리

Lectin은 Gupta와 Srivastava(16)의 방법에 따라 분리하였으며, 모든 정제과정은 4°C 에서 수행하였다. 강낭콩 유식물을 이의 질량에 3배나 되는 PBS에 넣어 마쇄한 다음, 이를 거즈로 여과한 후, 40,000 g에서 30분간 원심분리를 하였다. 상등액은 모아두고 침전물은 다시 소량의 PBS에 녹여 6시간 교반한 후, 동일 조건으로 원심분리하여 상등액을 또 한번 얻었다. 모아진 상등액에 25~50%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분말을 서서히 가하면서 교반 하여 용해시킨 후, 160,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 PBS에 녹인 다음, 12시간마다 교환하면서 증류수에서 48시간, PBS에 24시간 연속적으로 투석하였다.

PBS로 활성화시킨 Sepadex G-100 gel을 column (1.6 × 40 cm)에 충전하고 평형시켰다. 추출물을 column에 주입하고 PBS로 세척한 다음, 0.1 M D-glucose 용액으로 0.2 mL/min 유속으로 유출시켜 분획하였다. 분리된 분획들은 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, lectin의 활성은 2% 토끼 적혈구를 통한 혈구 응집반응으로 확인하였다.

단백질 함량 측정

Lectin의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford(17) 방법에 의해 595 nm에서 측정하여 계산하였다.

전기영동에 의한 분자량 측정

Laemmli(18)의 방법에 따라 전기영동을 하였다. Separating gel 12%, stacking gel 6%로 하였으며 100 V에서 2시간 전개시켰다. Gel의 염색은 Coomassie brilliant blue R-250을, 탈색은 7.5% acetic acid 용액을 사용하였다. Weber와 Osborn(19)의 방법에 따라 전기영동한 lectin의 분자량은 표준 단백질에 대한 상대이동도 (Rf)와 단백질 분자량에 대한 대수값으로부터 계산하였다. 표준 단백질로서는 β -galactosidase (124.0 kDa), bovine serum albumin (80.0 kDa), ovalbumin (49.1 kDa), carbonic anhydrase (34.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), lysozyme (20.6 kDa) 및 aprotinin (7.1 kDa)을 사용하였다.

적혈구 응집력 측정

Takatsy(20)의 방법에 따라, microtiter well plate에 0.01 M PBS (pH 7.2) 25 μl 를 넣고 분리된 lectin 25 μl 를 첨가하여 2배수로 단계적 희석한 후, 2% 토끼 적혈구 용액을 25 μl 를 가하였다. Microtiter plate를 37°C 에서 반응시킨 후, 육안과 현미경 (100 X)으로 관찰하여 lectin 활성의 유무와

효과의 정도를 판정하였다. 이때 소량의 heparin을 처리한 혈액은 0.15 M NaCl을 함유한 PBS로 세척하고 원심분리하여 적혈구를 분리한 다음, 이를 PBS로 2%의 혈구용액을 조제하여 사용하였다.

최적 반응 온도의 측정

정제된 lectin의 최적 반응 온도를 조사하고자 온도 변화에 따른 활성을 측정하였다. 분리된 lectin을 2배 연속 희석법으로 희석한 다음, 20°C 에서 70°C 범위에서 혈구 응집 반응을 측정하여 잔존하는 상대 적인 lectin의 활성을 조사하였다. 이때 최대 희석 배수를 100%의 residual activity로 하였다.

열 안정성 측정

열 안정성을 조사하기 위해, 분리된 lectin을 2배 연속 희석법으로 희석한 다음, 40°C 에서 90°C 범위에서 각각 10분간 열처리하고 식힌 후, 혈구 응집 반응을 이용하여 잔존하는 상대적인 lectin의 활성을 조사하였다.

pH 안정성 측정

pH 변화에 따른 lectin의 활성을 조사하기 위해서, 분리된 lectin을 2배 연속 희석법으로 희석한 다음, pH 2.2에서 10.0 사이의 buffer를 사용하여 혈구 응집 반응을 이용한 잔존하는 상대적인 lectin의 활성을 조사하였다. 사용한 완충액은 glycine-HCl buffer (pH 2.2), acetic-sodium acetate buffer (pH 4.2), phosphate buffer (pH 6.2, 7.0), tris buffer (pH 8.0, 9.1), sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0)이다.

결과 및 고찰

Lectin의 분리

강낭콩 유식물로부터 crude extract를 0.15 M NaCl을 함유한 PBS용액으로 얻고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 이용하여 침전시킨 후, 투석에 의해 얻은 단백질을 Sepadex G-100 affinity gel에 통과시키면서 gel에 결합된 lectin을 0.1 M D-glucose로 유출시켜 가장 높은 활성을 보인 분획을 얻었다(Fig. 1). 이 분획을 사용하여 lectin의 분자량, 최적반응온도, 열안정성 및 pH 안정성을 측정하였다.

전기영동에 의한 lectin의 분자량

12% SDS-PAGE를 통한 결과, 2개의 band로 나타났다(Fig. 2). 이 band에 대한 분자량을 측정한 결과, 각각 46 kDa과 44 kDa의 값을 갖는 것으로 계산되었다(Fig. 3). 따라서 이 lectin은 두개의 subunit로 구성된 tetramer로 구성된 것을 알 수 있었다.

Lectin의 최적 반응 온도

Lectin 활성의 최적 반응 온도를 알아내기 위해, $20\sim 70^\circ\text{C}$ 의 범위에서 15분 반응시켜 활성을 측정한 결과, 정제된 lectin의 안정적인 반응온도는 $20\sim 60^\circ\text{C}$ 이며, 30°C 에서 91%

로 가장 높은 활성을 나타내었다. 60°C 이후에 활성능이 현저히 떨어져 70°C에서는 혈구 응집반응을 보이지 않았다(Fig. 4).

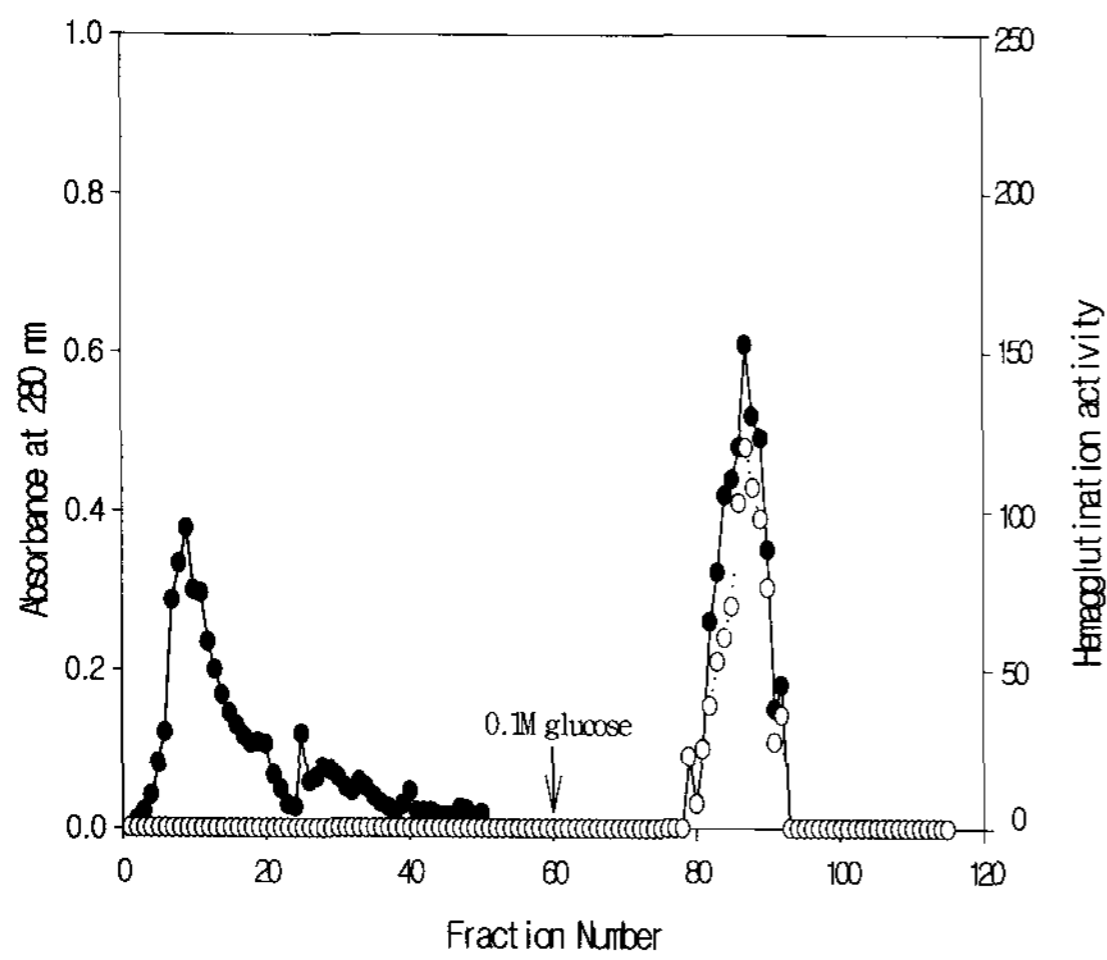


Figure 1. Elution profile for protein (●) and hemagglutination activity of lectin (○) purified from *Phaseolus vulgaris* seedling by affinity chromatography on Sephadex G-100. The bound lectin was eluted with 0.1 M D-glucose. Arrow indicates the start of elution with 0.1 M D-glucose. Hemagglutination activity was determined using the rabbit erythrocyte.

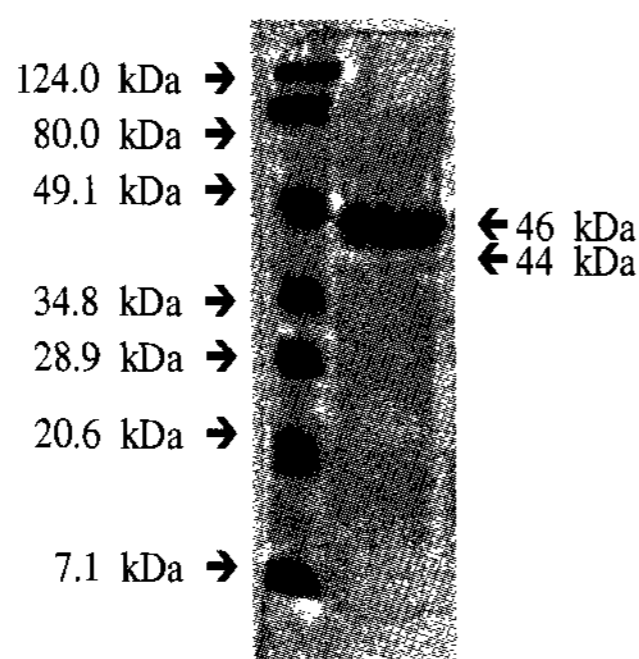


Figure 2. 12% SDS-PAGE of lectin purified from *Phaseolus vulgaris* seedling. The gels were run at 100 A for 2 hrs and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Arrows indicate lectin purified by affinity chromatography on Sephadex G-100. Lane: M, molecular weight markers; A, purified lectin. The molecular weight markers were β -galactosidase (124.0 kDa), bovine serum albumin (80.0 kDa), ovalbumin (49.1 kDa), carbonic anhydrase (34.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa), lysozyme (20.6 kDa), and aprotinin (7.1 kDa).

Lectin의 열 안정성

Lectin의 열 안정성을 측정하기 위하여, 40~90°C를 각각 10분간 열처리한 다음, 냉각시킨 후 적혈구 응집반응을 통한 활성을 측정한 결과, lectin은 40~80°C에서 열안정성을 가졌으며, 80°C 이상의 온도에서는 활성이 떨어지기 시작하여 90°C에서는 혈구 응집반응을 보이지 않았다(Fig. 5).

Lectin의 pH 안정성

Lectin의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 정제된

lectin을 pH 2.0~10.0의 범위에서 적혈구 응집반응을 통한 활성을 측정한 결과, tris buffer를 사용한 pH 8.2에서 활성능이 가장 높았으며, phosphate buffer를 사용한 pH 6.2에서도 비교적 안정적이었다. Acetic-sodium acetate buffer를 사용한 pH 4.2 이하와 tris buffer를 사용한 pH 9.0 이상에서는 비교적 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 6). 따라서, lectin은 약한 산성과 약한 알칼리성 사이에서는 안정성이 강한 것을 알 수 있었다.

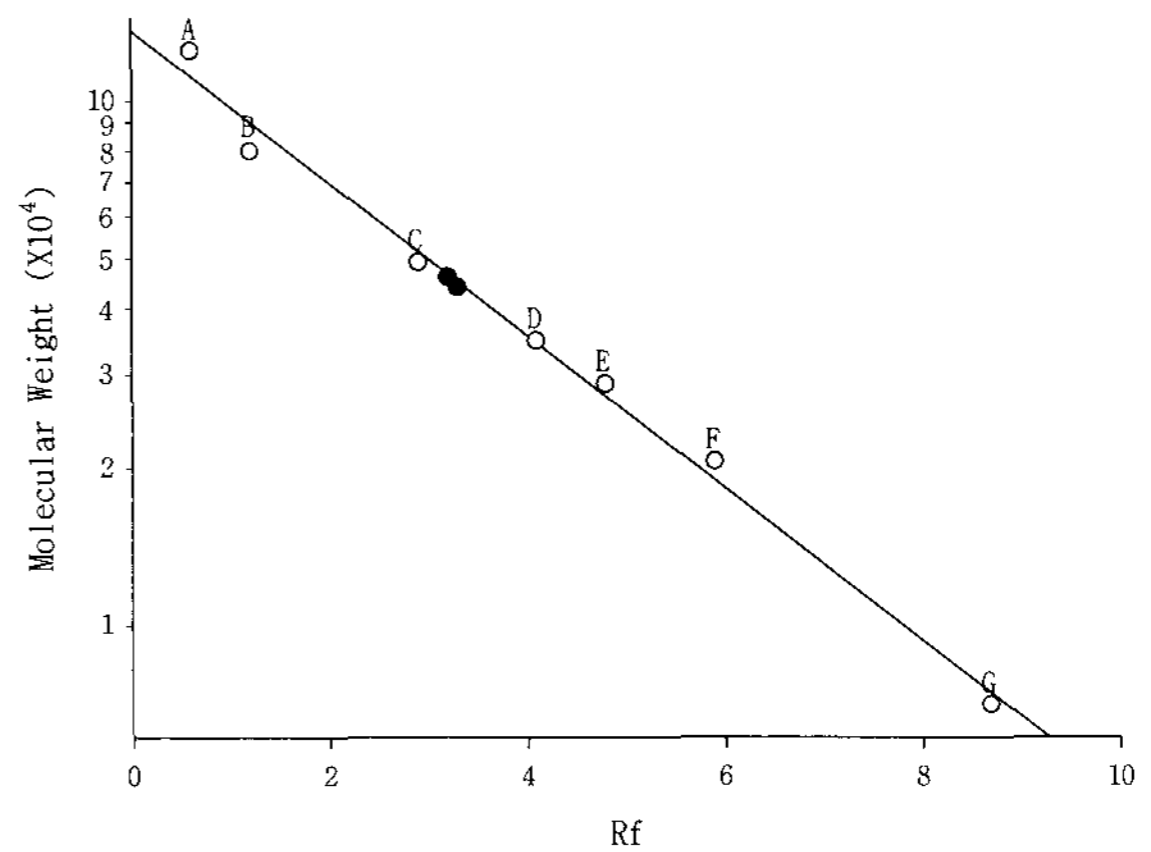


Figure 3. Determination of molecular weight of lectin purified from *Phaseolus vulgaris* seedling on SDS-PAGE. Closed black circles (●) indicate lectin purified by affinity chromatography on Sephadex G-100. The molecular weight markers were β -galactosidase (A, 124.0 kDa), bovine serum albumin (B, 80.0 kDa), ovalbumin (C, 49.1 kDa), carbonic anhydrase (D, 34.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (E, 28.9 kDa), lysozyme (F, 20.6 kDa), and aprotinin (G, 7.1 kDa).

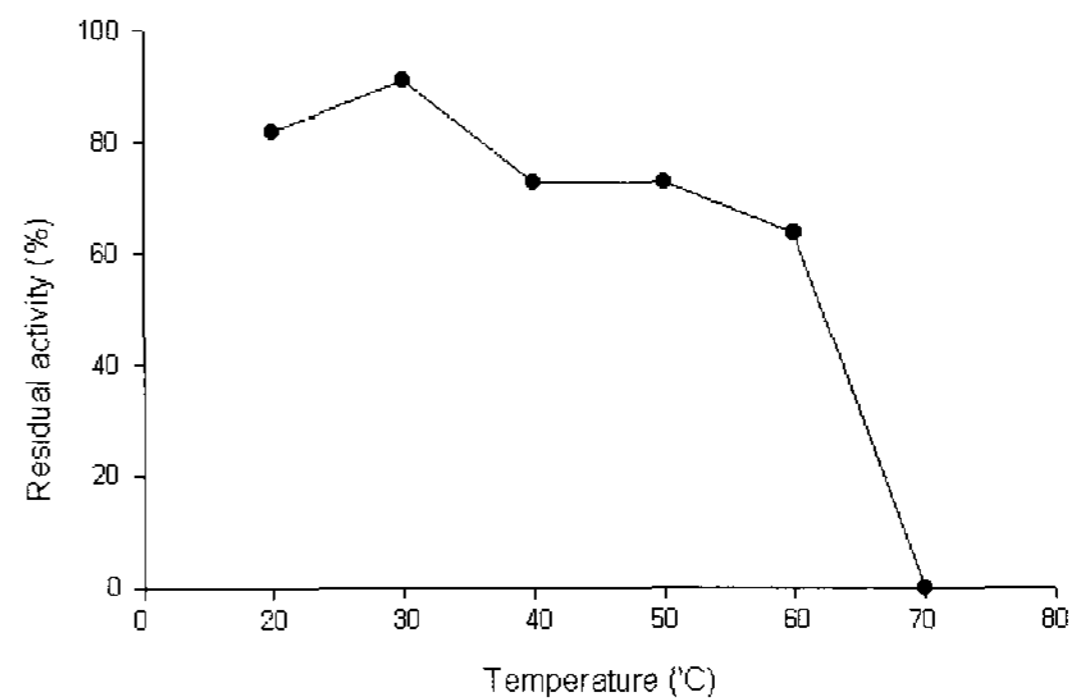


Figure 4. Effect of temperature on the activity of lectin purified from *Phaseolus vulgaris* seedling. The lectin activity was tested by incubation at 20~70°C, respectively.

고찰

Lectin의 분리과정은 0.15 M NaCl을 함유한 PBS buffer를 이용하여 추출하고, 이렇게 얻은 crude extract를 (NH₄)₂SO₄를 이용해 밤새 침적시킨 후 정제하였다. Lectin의 정제 방법으로는 gel filtration, ion exchange chromatography, affinity chromatography, absorbant chromatography등이 있는데, affinity chromatography는 탄수화물의 특이성을 이용하여 single step으로 lectin을 분리하는 가장 표준이 되는 방법으로서(21), 본

실험에서는 Sepadex-G100을 이용한 affinity chromatography로 glucose에 대한 친화력을 이용하여 lectin을 분리하였다.

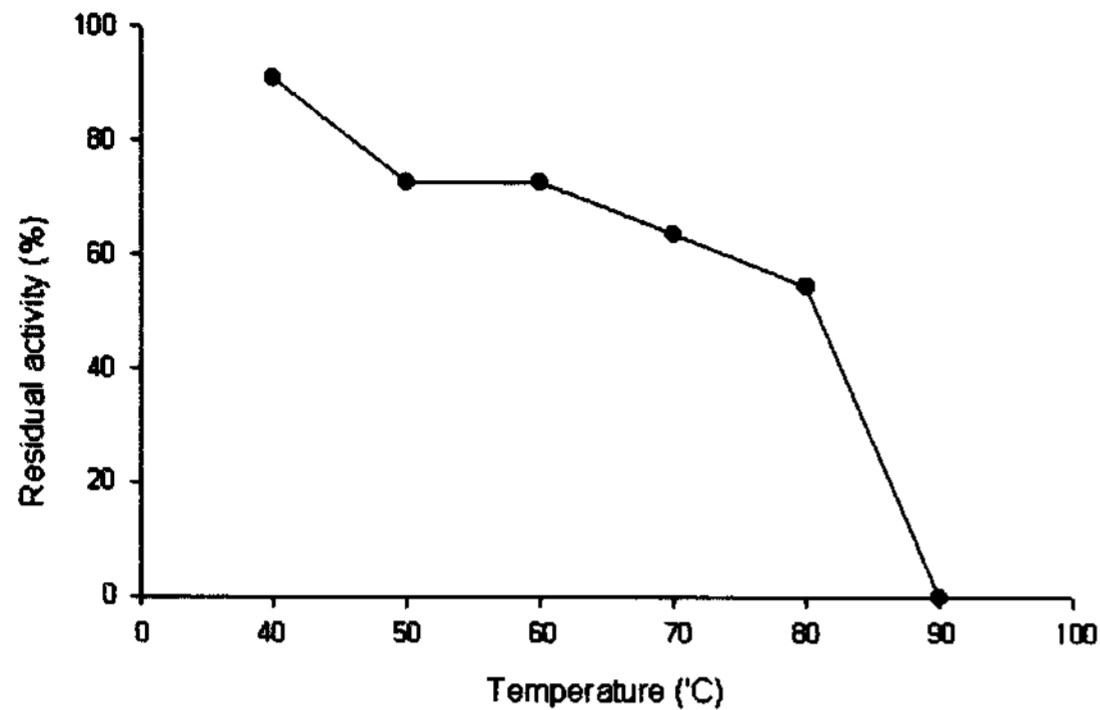


Figure 5. Thermal stability of lectin purified from *Phaseolus vulgaris* seedling. Purified lectin was preheated for 10 min.

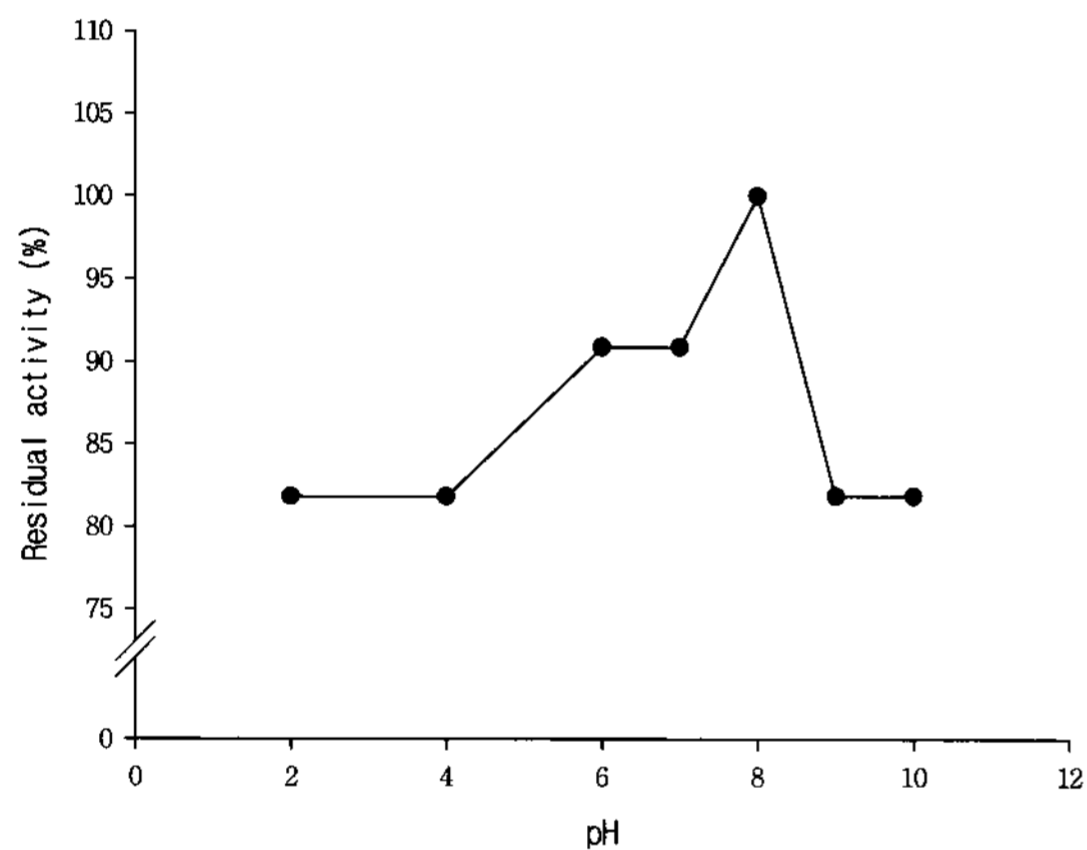


Figure 6. The pH stability of lectin purified from *Phaseolus vulgaris* seed. Purified lectin was incubated at different pH for 4 hr at 4°C.

생화학적 특성을 연구하기 위해서는 적혈구의 응집 반응을 이용하여 측정한다. 응집 반응은 lectin의 활성 측정을 위한 중요한 과정으로, 정상 적혈구나 trypsin을 처리한 적혈구를 사용한다(22). Lectin은 사람, 토끼, 양, 말 등의 적혈구와 반응시 서로 다른 혈구응집 반응을 나타내므로 적혈구에 대한 종 특이성이 있다(23). 또한 혈액형에 대해 특이적 또는 비특이적인 lectin의 성질을 이용하여 다당류, 당단백질 및 당지질 등의 분리 및 특성연구에 사용되고 있다(14). 본 실험에서는 토끼의 정상적혈구를 사용하였으며(24), 이 혈구 응집 반응 측정은 2배 연속 희석한 다음, 응집여부를 육안으로 확인한 후 현미경하에서 최종 확인하여 최종점을 측정하였다.

Lectin의 분자량은 20 kDa부터 120 kDa로, 동일한 lectin이라도 서로 다른 값을 가지며, 2개 이상의 subunit로 구성된 dimer 또는 tetramer의 형태로, SDS존재 하에서 비가역적이다. 본 연구에서 lectin의 분자량을 측정한 바, 12% SDS-PAGE 전기영동상에서 2개의 band로 나타났으며, 이의 분자량을 표준 단백질로부터 확인한 결과, 각각 46 kDa와

44 kDa의 값을 갖는 것으로 계산되었다. 따라서 이 lectin은 2개의 subunit으로 구성된 tetramer로서 180 kDa의 분자량을 갖는 단백질임을 확인하였다. 말의 배로부터 분리된 germ agglutinin은 분자량 36 kDa으로 oligomer이며, 열대콩과 작두 concanavalin A는 분자량 104 kDa의 tetramer이다(25). Winged bean 종자로부터 분리·정제된 lectin의 분자량은 27 kDa으로서 dimer의 형태를 가진다(26). 따라서 식물 종에 따라 lectin의 분자량과 subunit의 수가 다른 것으로 생각된다.

Lectin 활성능의 최적 반응 온도를 알아내기 위해, 항온수조 20~70°C의 범위에서 활성능을 측정한 결과, 20°C부터 활성이 높아지다 30°C에서 91%로 활성능이 가장 높아 최적 반응 온도임을 알 수 있었다. 일반적으로 40°C 이상에서 불안정한 다른 lectin들(27)과는 달리, 본 시료의 lectin 활성은 40~50°C까지 안정하였으며, 60°C부터 점점 낮아져 70°C 이상에서는 활성이 떨어져 응집반응이 전혀 나타나지 않았다. 작두콩 종자에서는 40°C에서 상대적인 활성이 100%로 가장 높은 적혈구 응집 반응을 보여 최적 반응 온도는 40°C이었으며, 60°C 이상에서는 현저히 활성이 떨어져 응집반응을 전혀 보이지 않았는데(24), 이는 작두콩 신초에서도 같은 현상을 보였다(15). *Zizyphus mauritiana* 종자 lectin에서는 80~100°C의 고온에서 완전하게 활성이 상실되었다(16).

Lectin의 열안정성은 winged bean lectin의 경우 70°C까지 안정하였고(26), 80°C에서는 활성이 소멸되었다. 고무나무의 bark lectin은 60°C까지 열에 안정하며(28), 유럽산 겨우살이 lectin은 50°C까지는 활성이 유지되었으나, 60°C 이상에서는 활성이 완전 소멸되었다(29). 본 실험의 강낭콩 유식물 lectin에서는 40~80°C에서 비교적 열안정성을 가졌는데, 이는 작두콩 신초 lectin의 50~60°C(15)보다 비교적 넓은 안정성을 나타냈으며, 80°C 이상의 온도에서는 활성능이 떨어지기 시작하여 90°C에서는 활성을 보이지 않았다. 단백질은 높은 온도에서 쉽게 변성이 일어나지만, 본 lectin은 비교적 열에 대한 안정성이 높은 단백질로 판단되었다.

pH에 의한 안정성 조사에서 *Parkia javanica* bean lectin은 pH 7.0에서 최대의 활성을 가지며(30), winged bean lectin은 pH 1.8-10.0까지의 범위에서 모두 높은 활성도를 보였다(26). 겨우살이 lectin의 경우 pH 4.0~7.0 사이의 약산성 및 중성에서 안정적이었으며, pH 4.0 이하 및 pH 9.0 이상에서는 75% 이상이 소실되었다(14). 작두콩 종자(24)와 신초 lectin(15)에서는 pH 6.0~8.0에서 비교적 안정적이었으며, 이 중 pH 7.2에서 가장 안정하였으나, 산성에서는 비교적 약하지만 활성을 보였으나 상대적으로 알칼리성인 pH 10.0에서는 활성이 소멸하였다. 본 실험의 강낭콩 유식물 lectin에서는 pH 6.0~8.0에서 안정적으로, 작두콩 종자 lectin의 결과와 일치하였으나 최적 pH는 pH 8.0으로 다르게 나타났으며, pH 4.2 이하와 pH 9.0 이상에서는 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 강낭콩 유식물로부터 분리된 lectin은 약산성 및 약알칼리성에서는 안정적이거나, 강산성과 강알칼리성에는 비교적 약한 단백질임을 알 수 있었다.

요 약

강낭콩 유식물로부터 PBS에 의한 추출, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전, Sepadex G-100 column chromatography에 의해 lectin을 분리한 다음, 이들의 생화학적 특성으로서 분자량, 적혈구 응집반응, 열 안정성, 최적 온도 및 최적 pH를 연구하였다. 이 과정에 토끼 혈액의 적혈구를 이용하여 활성을 측정하였다. 이 lectin의 분자량은 46 kDa와 44 kDa로서, 각각 2개의 subunit를 갖는 tetramer이다. 정제된 이 lectin의 최적 반응 온도는 30°C 이며, $40\sim 80^\circ\text{C}$ 에서 열 안정성을 보였다. 또한 이 lectin의 최적 pH는 pH 8.2이다.

REFERENCES

- Goldstein, I. J. and C. E. Hayes (1978), The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **35**, 127-340.
- Golestein, I. J., R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, and N. Sharon (1980), What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66-70.
- Lis, H. and N. Sharon (1977), Lectins. Their chemistry and application to immunology, in the antigens. M. Sela Ed.; Academic Press. New York, pp429-529.
- Etzler, M. E. (1986), Distribution and function of plant lectins. In *The Lectins: Properties, Functions, and Application in Biology and Medicine*. I. E. Liener, and N. Sharon Eds.; Academic Press, New York, pp371-435.
- Aub, J. C., C. Tieslau, and A. Lankester (1963), Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **50**, 613-619.
- Sharon, N. and H. Lis (1972), Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins, *Science* **177**, 949-959.
- Howard, M. K., P. V. Pasquale, A. M. Richard, and G. G. Barbara (1981), Evidence that the insulin-like activities of concanavalin A and insulin are mediated by a common insulin receptor linked effector system, *Biochemistry* **20**, 5800-5809.
- Peumans, W. J. and E. J. M. Van Damme (1995), Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiol.* **109**, 347-352.
- Sharon, N. and H. Lis (1987), Century of lectin research (1888-1988), *Trends Biochem. Sci.* **12**, 488-491.
- Van Damme, E. J. M. and W. J. Peumans (1990), Developmental changes in the tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* cv. Calton, *Planta* **182**, 605-609.
- Cerioti, A., A. Vitale, and R. Bollini (1989), Lectin-like proteins accumulate as fragmentation products in bean seed protein bodies, *FEBS Lett.* **250**, 157-160.
- Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel (1991), Lectins, lectin genes, and their role plant defense, *Plant Cell* **3**, 1-9.
- Chung, S. R. and K. H. Jeune-Chung (1981), Isolation, purification and partial characterization of new lectins from Korean plant resources (I), *Kor. Biochem.* **14**, 199-208.
- Chang, C. S., M. J. Oh, and K. S. Roh (1999), Purification and biochemical characterization of lectin from *Viscum album*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 578-584.
- Roh, K. S. and N. Y. Park (2005), Characterization of the lectin purified from *Canavalia ensiformis* shoots, *Biotechnol. Bioproc. Engineer.* **10**, 334-340.
- Gupta, N. and P. S. Srivastava (1998), Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*, *Plant Cell Reports* **17**, 552-556.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Weber, K. and M. Osborn (1969), The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Takatsy, G. (1967), The use of a microtitrator in serological procedures, In *International Symposium on Immunological Method of Biological Study.* **4**, 275-280.
- Seshagirirao, K., C. Leelavathi, and V. Sasidhar (2005), Cross-linked leucaena seed gum matrix: An affinity chromatography tool for galactose-specific lectins, *J. Biochem. Mol. Biology* **38**, 370-372.
- Burger, M. M. (1967), Assays for agglutination with lectins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **57**, 359-365..
- Boyd, W. C. and R. M. Reguelra (1949), Hemagglutinating substances in various plants, *J. Immunol.* **62**, 333-339.
- Roh, K. S. and D. J. Lee (2002), Purification and some properties of lectin from *Canavalia ensiformis* L, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 484-489.
- Hopkins, W. G. (1995), Lectins-proteins with a sweet tooth. In *Introduction to Plant Physiology*, J. Wiley and Sons Eds.; New York, pp106-107.
- Higuchi, M. and K. Iwai (1985), Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 391-398.
- Olsens, S., F. Stirpe, K. Sandvig, and A. Phil (1982), Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe), *J. Biol. Chem.* **257**, 13263-13270.
- Wittsuwannakul, R. D., Wittsuwannakul, D., and C. Sakulborirug (1998), A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Phytochem.* **47**, 183-187.
- Ziska, O., Franz, H., and A. Kindt (1978), The lectin from *Viscum album* L. purification by biospecific affinity chromatography, *Experientia* **34**, 123-124.
- Utarabhand, P. and P. Akkayanont (1995), Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans, *Phytochem.* **38**, 281-285.