

해양 패류 렉틴성분 연구(V)

반지락조개의 렉틴성분 분리정제에 관한 연구

정 시 련 · 김 장 환 · 전 경 희*

영남대학교 약학대학 · 이과대학*

(Received January 14, 1987)

Studies on Lectins from Marine Shells (V)

Isolation and Purification of Lectin from *Tapes philippinarum*.

See Ryun Chung, Jang Hwan Kim and Kyung Hee Jeune-Chung

College of Pharmacy and College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea

Abstract—The result of the screening of lectins on 28 species of marine shell fishes(mollusks) showed that 10 species (*Tapes philippinarum*, *Cyclosunetta menstrualis*, *Neptunea arthritica cumingii*, *Omphalius pfeifferi carpenteri*, *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*, *Chlorostoma argyrostoma lischkei*, *Semisulcosira corea*, *Neptunea polycosta*, *Babylonica japonica*, *Noverita didyma*) were present hemagglutinating properties to human A, B, and O group, and animal blood erythrocytes.

A new lectin from *Tapes philippinarum*. was isolated and partially characterized The lectin was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and ion exchange chromatography on DE 53 column.

Six fractions were obtained from DE 53 column by salt gradient elution but only 0.3M, and 0.4M NaCl fraction had strong lectin activity. On its 0.3M NaCl fraction, purity was identified by polyacrylamide gel electrophoresis. This lectin was inhibited by N-acetyl-D-galactosamine.

It seems that two kinds of lectin react as antigen by immunochemical studies.

오래전부터 혈구세포를 응집시키는 물질이 여러 종의 식물에서 발견되었는데 이 물질을 1954년 Boyd¹⁾는 lectin이라고 명명하였다.

최근 Goldstein²⁾들은 lectin을 “당과 결합하는 단백질 또는 당단백질로서 면역적 경로에 의해서 생기는 물질이 아닌 것으로서 적혈구, 림프구, fibroblast, 세균, 및 균류등의 세포표면에 있는 당과 특이적인 결합을 함으로써 이들 세포를 응집시키고 당화합물을 침전시키며 적어도 두개 이상의 당과의 결합부위(sugar binding site)를 갖는 것”으로 정의하였다.

렉틴은 세포막의 구조연구, 세포분열 촉진효과, 면역학적인 연구등에 이용되어지며 최근에 이르러서는 어떤 종류의 암이나 종양세포의 진단 및 치료에까지 응용되고 있다.³⁾

렉틴은 자연계에 널리 분포되어 있는데 지금

까지는 주로 식물계를 대상으로 연구되어 왔으며 무척추동물, 하등척추동물, fungi, bacteria 등에 대한 연구보고도 있으나 해양동물 중 패류에 대한 연구보고는 1966년 Tripp⁴⁾ 등의 굴(*Crasosterea virginia*) 렉틴과 1982년 Tatsumi⁵⁾ 등의 개조개(*Saxidomus purpuratus*) 렉틴, 1985년 Muramoto⁶⁾ 등의 삿갓조개(*Megabalanus rosa*) 렉틴, Chung⁷⁾ 등의 조각매물고둥(*Neptunea inter-sculpta*) 렉틴에 대한 연구보고등의 소수가 있을 뿐이다.

이에 본 연구에서는 해양패류 28종을 대상으로 렉틴성분의 검색시험을 실시하여 렉틴성분의 함유 여부를 알아보고 그 중 렉틴 활성이 비교적 높은 반지락조개(*Tapes philippinarum*)로부터 렉틴성분을 분리정제하여 순도검정, 단백질정량, 당류확인, pH에 따른 활성변화등에 대하여

알아보고 토끼로부터 항혈청을 얻어 면역화학적 시험을 실시하는 등 몇가지 생물, 물리, 화학적 성상을 구명해보았다.

재료 및 시약

동물재료—살아있는 해양패류 28종을 부산 미포해변 및 자갈치시장에서 수집하여 실험재료로 사용하였다.

시약—DEAE-cellulose 53은 Whatman, Freund's complete와 incomplete adjuvant는 Difco Lab, Aquacid II-A는 Cal Biochem-Behring Co.의 것을, 그리고 Tris(Tris-(hydroxymethyl) aminoethane), TEMED(N,N,N',N'-tetra-methylethylene diamine), Bis(N,N'-methylene-bisacrylamide), TCA(Trichloroacetic acid), acrylamide, glucose, Coomassie brilliant blue R-250, anthrone, phenol reagent(Folin-ciocaltau reagent), Amido Black 10B, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, D-fructose, L-fucose, D-galactose, D-mannose, lactose, sucrose 등은 Wako, Hayashi, Nakarai, Junsei chemical에서, bovine serum albumin은 sigma의 제품을 구입하였으며, 기타 일반시약은 시중에서 구입한 특급 내지 일급품을 사용하였다.

실험 방법

검색 시험—패류 28종을 대상으로 렉틴성분 검색 시험을 사람 및 몇종의 동물혈액으로 Burger⁶⁾ 등의 방법에 따라 실시하였다.

렉틴성분의 분리—28종의 시료중 렉틴활성이 비교적 강하게 나타난 반지락조개(*Tapes philippinarum*)으로부터 진보⁷⁾와 같은 방법으로 실시하였다.

Ion exchange chromatography에 의한 정제—전향에서 얻은 crude 렉틴을 상법^{7,9)}에 따라 25mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 평형시킨 DEAE-cellulose 53 column(1.6×20)에 주입한 후 같은 buffer로 세척한 다음 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M NaCl를 함유한

25mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 Salt gradient method로 유출시켰다. 유출속도는 60ml/hr로 하였으며 렉틴활성을 나타내는 분획은 pooling하여 증류수에서 투석시켜 Aquacid II-A(Cal Biochem-Behring Co.)로 농축시켰다.

적혈구 응집력시험—Burger⁸⁾의 방법에 따라 human blood A group으로부터 적혈구를 얻고 0.15M NaCl를 가하여 3% 적혈구용액을 만든 다음 Microtiter plate(Cooke system M 2204)를 사용하여 실시하였다. 먼저 titration plate의 각 well에 10mM CaCl₂를 함유한 0.15M NaCl 50μl 적 취하여 넣고 첫번 well에 sample 50μl씩 넣은 다음 연속 2배 희석법으로 희석한 뒤 3% 적혈구용액을 50μl씩 가한 다음 상온에서 1시간동안 반응시킨 후 육안 또는 현미경으로 그 응집현상을 관찰하였다.

단백질 정량—반지락렉틴의 단백질정량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry¹⁰⁾ 등의 방법으로 정량하였다.

순도검정—각 단계별 반지락렉틴의 순도를 확인하기 위해 Davis¹¹⁾의 방법에 따라 7.5% polyacrylamide disc gel electrophoresis를 실시하였다.

Anthrone 시험에 의한 당의 확인—반지락렉틴의 당함유여부를 알아보기 위하여 anthrone 시험을 실시하였다.

당에 의한 응집력 저해효과—당류에 의한 응집력 저해효과를 알아보기 위해 Miller 등¹²⁾의 방법을 응용하여 렉틴활성 시험때와 같은 방법으로 Sample을 희석한 뒤 N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, D-fructose, L-fucose, D-galactose, D-mannose, lactose, sucrose 등 8가지 당의 100mM, 50mM, 25mM, 10mM, 1mM, 0.5mM, 0.25mM 용액을 50μl씩 가한 다음 3% 적혈구용액을 50μl씩 가하여 1시간동안 반응시킨 후 그 결과를 육안 또는 현미경으로 관찰하였다.

pH변화에 따른 렉틴활성 조사—반지락렉틴의 pH와 렉틴활성과의 관계를 알아 보고자 pH3~10에서(4°C) 1시간동안 투석시켜 적혈구 응집력을 조사하였다.

Immunization—반지락렉틴을 Millipore (5.0

Table I—Immunization with 0.3M NaCl fraction of DEAE cellulose 53 column.

Dates (day)	Sample dose(ml)	Freund's adjuvant(ml)		Route
		Complete	Incomplete	
1	0.5	0.5	—	Popliteal node
2	0.5	0.5	—	Popliteal node
3	0.5	0.5	—	Popliteal node
∴		Rest, no injection		
21	0.5	—	0.5	Popliteal node
22	0.5	—	0.5	Popliteal node
23	0.5	—	0.5	Popliteal node
∴		Rest, no injection		
27		Bleeding		

μ m Millipore Co.)을 통과시켜 불순물을 제거하여 체중 2kg 이상되는 집토끼의 넓적다리의 lymph node에 Shannon¹³⁾ 등의 방법 (Table I)으로 면역시켰다. 마지막 추가면역 1주일 후 토끼 귀 정맥으로 부터 혈액을 채취하여 항혈청을 분리한 뒤 냉동보관하여 사용하였다.

Immunodiffusion—Agar 분말을 barbital Buffer (pH8.2)에서 1% agar 용액으로 만든 후 slide glass위에 agar gel를 형성시켜 well을 만

들어 진행에서 얻은 항혈청과 여러가지 항원을 10 μ l씩 넣은 다음 Ouchterlony 등¹⁴⁾의 방법에 따라 면역확산시험을 수행하였다.

결과 및 고찰

검색시험—해양패류 28종을 대상으로 검색시험한 결과는 Table II와 같다.

28종의 시료중 반지락 (*Tapes philippinarum*), 비단백합 (*cyclosunetta menstrualis*), 갈색띠매물고둥 (*Neptunea arthritica cumingii*), 바다방석고둥 (*Omphalius pfeifferi carpenteri*), 구멍뚫고둥 (*Chlorossoma argyrostoma turbinatum*), 뚫고둥 (*chlorostoma argyrostoma lischkei*), 참다슬기 (*Semisulcospira coreana*)는 사람 및 동물혈액에 대하여 비특이적으로 적혈구응집현상을 나타내었다. 그리고 북방매물고둥 (*Neptunea polycosta*), 수랑 (*Babylonica japonica*) 큰구슬우렁이 (*Neverita didyma*)는 동물혈액에 대해서만 특이적으로 적혈구응집현상을 나타내었다.

렉틴성분의 분리—강한 적혈구응집력이 있는 반지락 (*Tapes philippinarum*) crude extract의 0

Table II—Blood group specificity of shells

Family	Shells		Blood							
	Scientific name	Common name	Human				Rabbit	Pig	Cattle	Rat
			A	B	O	AB				
Veneridae	<i>Tapes philippinarum</i>	반 지 락	8	4	8	8	4	16	0	0
	<i>Cyclina sinensis</i>	가 무 락 조 게	0	0	0	0	0	2H*	0	64
	<i>Meretrix petachialis</i>	말 백 합	1H	2H	2H	2H	2	1H	1H	2
	<i>Cyclosunetta menstrualis</i>	비 단 백 합	16	8	16	32	0	0	0	2
	<i>Meretrix lusoria</i>	백 합	2	2	0	0	0	0	0	2
Acmaeidae	<i>Patelloida pygmaea</i>	애 기 배 말	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Collisella heroldi</i>	애기두드러배말	0	0	0	0	0	0	0	0
Buccinidae	<i>Neptunea arthritica cumingii</i>	갈색띠매물고둥 근육	0	4	8	4	0	0	0	32
		내장	3H	3H	3H	5H	4H	4H	3H	
	<i>Babylonica japonica</i>	수 랑 근육	0	0	0	0	4	0	0	2
		내장	0	0	0	0	0	3H	0	2H
	<i>Neptunea polycosta</i>	북방매물고둥 근육	0	0	0	0	16	16	0	16
		내장	0	0	0	0	0	3H	0	2H
Busyconidae	<i>Hemifusus ternatanus</i>	털 탐 고 둥 근육	0	0	0	0	0	0	0	0
		내장	4H	4H	4H	5H	4H	4H	4H	

Fascioliariidae	<i>Fusinus forceps</i>	큰 긴 빨 고 등 근육	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		내장	4H	3H	5H	6H		4H	4H	4H	
Muricidae	<i>Rapana venosa</i>	피 빨 고 등 근육	0	0	0	0		0	0	0	
		내장	3H	4H	4H	4H		0	0	2H	
	<i>Ceratostoma rorifluum</i>	맴 사 리	0	0	0	0		0	0	0	
Naticidae	<i>Neverita didyma</i>	큰구슬우렁이 근육	0	0	0	0		0	0	0	
		내장	0	0	0	0		8	2	32	
Turbinidae	<i>Batillus cornutus</i>	소 라 근육	2H	2H	2H	3H		1H	2H	0	
		내장	3H	4H	4H	5H		3H	2H	3H	
Arcidae	<i>Scapharca broughtonii</i>	피 조 개	0	0	0	0		0	0	2	
Mytilidae	<i>Mytilus coruscus</i>	홍 합	3H	3H	3H	4H		4H	3H	2	
Pinnidae	<i>Atrina pectinata japonica</i>	키 조 개	0	0	0	0		4	1H	0	
Trochidae	<i>Omphalius pfeifferi capenteri</i>	바다방석고등 근육	4	2	8	4		0	3H	4H	
		내장	0	0	0	0		4	0	4	
	<i>Chlorostoma argyrostoma turbinatum</i>	구멍뱀고등 근육	0	2	0	0		0	0	2	
		내장	32	8	64	64		32	0	2	
	<i>Chlorostoma argyrostoma lischkei</i>	밤 고 등	16	16	16	16		ND ^b	2	16	
	<i>Monodonta labio</i>	올타리고등	0	0	0	0		0	0	0	
Pleuroceridae	<i>Semisulospira coreana</i>	참 다 슬 기	16	32	16	16	5H	32	4	16	
	<i>Semisulospira bensoni</i>	다 슬 기	1H	4	2H	2H		2	2H	0	
Loricidae	<i>Lepidozona coreanica</i>	줄 군 부	4H	4H	4H	6H		2H	2H	3H	
	<i>Lepidozona fuliginatus</i>	등 꼬 부 리	1H	1H	1H	2H		0	2H	0	

a. H: Hemolysis. b. ND: Not detected.

~30%, 0~60%, 0~90%, 30~60%, 60~90% (NH₄)₂SO₄ 포화침전 중 0~60% (NH₄)₂SO₄ 포화침전물이 강한 직혈구응집현상을 나타내었다. 그래서 이 분획을 취하여 25mM Tris-HCl buffered saline 용액에 투석시켜 crude렉틴으로 하였다.

Ion exchange chromatography에 의한 정제—Crude렉틴을 DE53 column에 주입하여 0.05 M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M NaCl을 함 유한 25mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 유출시킨 결과는 Fig. 2와 같았다. 이들 6개의 분획 중 0.3M, 0.4M NaCl 유출 분획에서 렉틴활성을 나타내었다.

단백질 정량—각 단계별 단백질함량은 crude extract 29.4mg/ml, crude렉틴 17.4mg/ml, DE53 column의 0.3M NaCl 분획은 0.24mg/ml의 단백질을 함유하고 있었다.

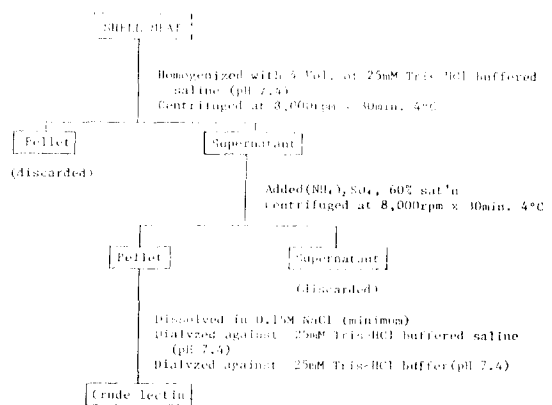


Fig. 1—Extraction and isolation of crude lectin.

순도검정—각 단계별 반지락렉틴의 순도를 7.5% polyacrylamide disc gel electrophoresis로 확인한 결과는 Fig. 3과 같았다. crude extract는 13개의 band, crude렉틴은 11개의 band, DE53 column의 0.3M NaCl분획은 4개의 band를 나타

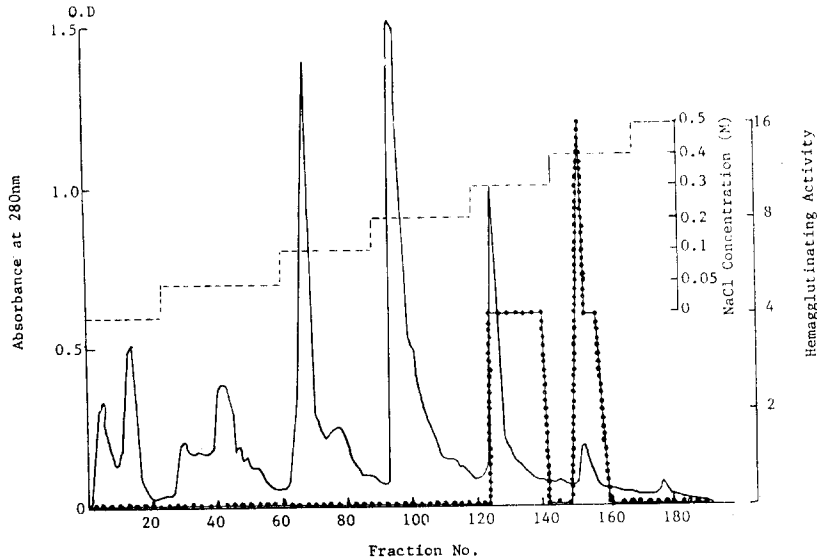


Fig. 2—Elution profiles of *Tapes philippinarum* crude lectins on DEAE cellulose 53 column (1.6×20cm) chromatography.

Absorbance at 280nm, —————; lectin activity, - - - - -; salt gradient, ·······; flow rate, - · - · - ·.

내어 정제단계에 따라 점차 정제되어 짐을 나타내주었다.

Anthrone 시험에 의한 당의 확인—반지락렉틴의 당 함량을 anthrone 시험으로 측정된 결과 표준당으로 사용한 glucose 0.001% 보다 미약한 비색을 나타내므로 이 렉틴은 당이 함유되지 않았거나 또는 지극히 미량을 함유한 것으로 추정된다.

당에 의한 응집력 저해효과—실험방법에서 언급된 6가지 당을 농도별로 inhibition test를 실시한 결과는 Table III과 같았다. 여기서 반지락렉틴은 N-acetyl-D-galactosamine에 대해서 1mM 이상에서는 100%, 0.5mM에서는 83%, 0.25mM에서는 50%의 inhibition이 일어났다. 이로써 반지락렉틴은 N-acetyl-D-galactosamine 특이성이 있음을 확인할 수 있었다. N-acetyl-D-galactosamine 특이성을 나타내는 렉틴을 살펴보면 식물 렉틴으로는 제비콩(*Dolichos biflorus*)렉틴, 대두(*Glycine max*), 붉은 강남콩(*Phaseolus vulgaris*)렉틴이 있으며, 동물렉틴으로는 달팽이(*Helix pomatia*)렉틴, chicken heparin렉틴, Ratheparin렉틴 등이 있다.^{15,16)}



Fig. 3—Polyacrylamide gel electrophoresis of *T. philippinarum* lectin.

A : Crude extract

B : Crude lectin

C : 0.3M NaCl fraction

Table III—Inhibition of *Tapes philippinarum* lectin human A erythrocyte by carbohydrates (% inhibition)

Carbohydrate	Concentrations, mM						
	100	50	25	10	1	0.5	0.25
N-Acetyl-D-galactosamine	100	100	100	100	100	83	50
N-Acetyl-D-glucosamine	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructose	0	0	0	0	0	0	0
L-Fucose	0	0	0	0	0	0	0
D-Mannose	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactose	0	0	0	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0	0	0	0
Sucrose	0	0	0	0	0	0	0

* inhibition(%) = $\frac{\text{agglutination with } \textit{Tapes philippinarum} \text{ lectin plus carbohydrate}}{\text{agglutination with } \textit{Tapes philippinarum} \text{ lectin alone}} \times 100$

pH변화에 대한 렉틴활성조사—반지락렉틴의 pH변화에 대한 안정성을 알아본 결과는 Fig. 4와 같았다. 반지락렉틴은 pH 3~7에서는 pH증가에 따라 적혈구 응집력도 증가하였으며 pH 7~10에서 가장 높은 렉틴활성이 나타났다.

면역화학적 시험—DE53 column 0.3M NaCl 분획의 antiserum과 각 단계별 반지락렉틴성분을 immunodiffusion한 결과는 Fig. 5와 같았다. Fig. 5-A는 중앙 well에 preimmuneserum을 넣고 바깥 well에는 반지락 crude extract, crude렉틴, DE53 column의 0.3M, 0.4M NaCl 분획, 구멍밤고둥, 참다슬기의 crude extract를 차례로 넣은 다음 37°C에서 24시간동안 immunodiffusion한 결과이다. Fig. 5-A와 같이 preimmuneserum은 어느 것 과도 precipitin band를 형성하지 않았다. 이로서 실험에 사용한 토끼는 순수한 토끼임을 확인할 수 있었다. Fig. 5-B는 중앙 well에 반지락렉틴의 항혈청을, 바깥 well에는 Fig. 5-A와 같은 시료를 넣은 다음 immunodiffusion한 결과이다. 여기서 반지락렉틴의 항혈청은 crude extract, crude 렉틴, DE53 column의 0.3M NaCl 분획과는 서로 이어지는 짧은 precipitin band를 형성 하였으며 0.4M NaCl 분획은 이어지지 않은 2개의 precipitin band를 형성하였다. 이로서 0.3M NaCl 유출분획은 두 종류의 antigen으로 작용하였음을 알 수 있었으며 0.4M NaCl 유출분획과는 서로 다른 종류의 렉틴성분임을 알 수 있었

다. 한편 구멍밤고둥과 참다슬기 렉틴성분과는 아무런 반응이 일어나지 않았으므로 반지락 렉

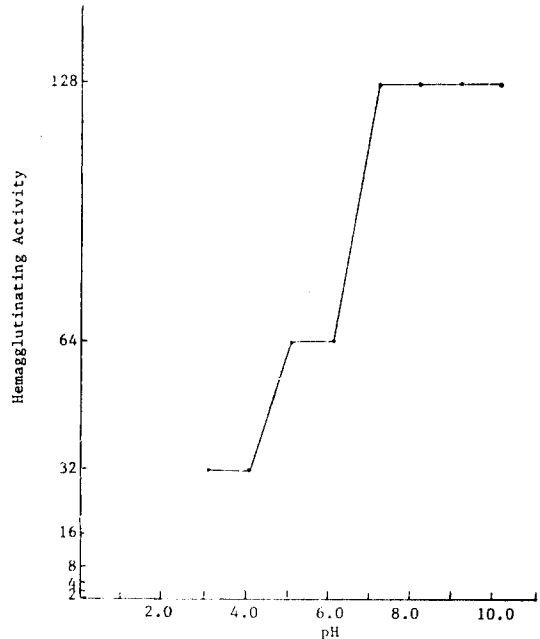


Fig. 4—Stability at different pH of the purified *Tapes philippinarum* lectin. The purified lectin was preincubated in buffers, with different pH (pH 3 to 10) for 1hr at 4°C and remaining activity was determined in saline containing 10M CaCl₂ by the serial 2-fold dilution method.
 pH 3-5 : Citrate buffer.
 pH 6-7 : Phosphate buffer.
 pH 8-9 : Tris-HCl buffer.
 pH 10 : Carbonate-Bicarbonate buffer.

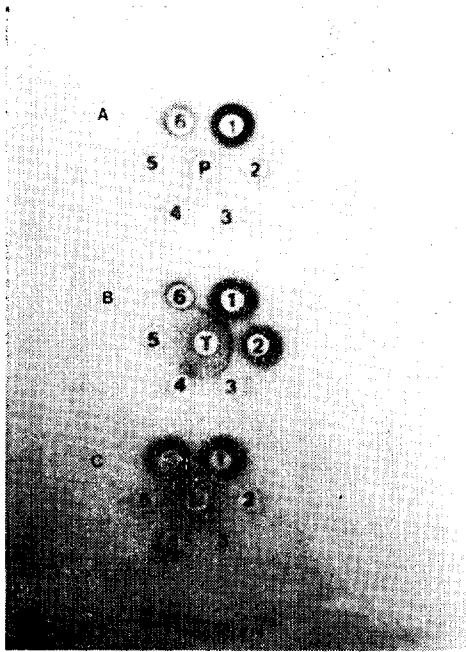


Fig. 5—Immunodiffusion precipitin patterns by *T. philippinarum* lectin.

- A : P : Preimmuneserum
 1 : Crude extract
 2 : Crude lectin
 3 : 0.3M NaCl fraction
 4 : 0.4M NaCl fraction
 5 : *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* crude extract
 6 : *Semisulcospira coreana* crude extract
- B : T : *T. philippinarum* antiserum
 1 : Crude extract
 2 : Crude lectin
 3 : 0.3M NaCl fraction
 4 : 0.4M NaCl fraction
 5 : *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* crude extract
 6 : *Semisulcospira coreana* crude extract
- C : N : *N. intersculpta* antiserum
 1 : Crude extract
 2 : Crude lectin
 3 : 0.3M NaCl fraction
 4 : 0.4M NaCl fraction
 5 : *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* crude extract
 6 : Crude NI extract

틴과는 면역화학적인 상관관계가 없음을 알 수 있었다. Fig. 5-C는 반지락 렉틴과 본 실험실에서 분리정제된 조각매물고둥(*Neptunea inters-*

culpta) 렉틴과의 상관성을 알아보기 위하여 중앙 well에 NI렉틴 항혈청을 넣고 바깥 well에는 Fig. 5-A의 ⑥번 대신 crude NI렉틴을 넣어 immunodiffusion한 결과이다. 여기서 NI 렉틴의 항혈청은 crude NI 렉틴과만 하나의 precipitin band를 형성하였으며 다른 항원과는 아무런 precipitin band를 형성하지 않았다. 이로써 반지락렉틴은 NI 렉틴과 면역학적으로 상관성이 없음이 확인되었다.

결 론

해양패류 28종을 대상으로 렉틴검색시험을 실시한 바 10종의 패류에서 적혈구응집현상을 나타내었다.

이 중 반지락렉틴을 부분정제하여 몇가지 특성을 알아본 결과 반지락렉틴은 N-acetyl-D-galactosamine 특이성이 있었으며 미량의 당이 함유되었거나 함유하지 않은 것으로 추정되었다 또한 pH 7~10에서 가장 활성이 높았으며 면역화학적인 시험 결과 NI 렉틴과는 상관성이 없음이 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1986년도 영남대학교 교비연구비의 지원으로 이루어 졌기에 감사를 표하는 바입니다.

문 헌

- 1) Sharon, N.; Lectins. *Sci. Am.* 6, 108 (1977).
- 2) Goldstein, I.J., Hugin, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N.: What should be called a lectin? *Nature* 285, 66 (1982).
- 3) Lis, H. and Sharon, N.: Lectins: Their chemistry and application. in *The Antigens*, Academic Press, pp. 429-529 (1977).
- 4) Acton, R.T., Weinheimer, P.F., and Niedermeir, W.; The carbohydrate composition of invertebrate hemagglutinin subunits isolated from the lobster *Panulirus argus* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B, 185 (1973).
- 5) Tatsumi, M., Arai, Y. and Itoh, T.; Purification

- and characterization of a lectin from the shellfish, *Saxidomus purpuratus*. *J. Biochem.* **91**, 1139 (1982).
- 6) Muramoto, K., Ogata, K. and Kamiya, H., Comparison of the multiple agglutinins of the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 85 (1985).
- 7) Chung, S.R., Kim, J.H. and Jeune-Chung, K.H.; Isolation, purification and characterization of lectin from shellfish, *Neptunaea intersculpta*. *Korean Biochem. J.* **18**, 429 (1985).
- 8) Burger, M.M.: Assay for agglutinating and lectins. in *Method in Enzymology*, Academic Press, **32**, pp. 615-621 (1974).
- 9) Monsigny, M. and Jeune-Chung, K.H.; Separation and biological properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Biochimie* **60**, 1315 (1978).
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 11) Davis, B.J.; Disc electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 720 (1972).
- 12) Miller, R.L., Collawn, J.F. and Fish, W.W.; Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J. Biol. Chem.* **257**, 2574 (1982).
- 13) Shannon, L.M. and Mills, S.E.; Purification of immunoabsorption chromatography of the normal and a mutant form of the B₂ subunit of *E. coli* tryptophan synthase. *Eur. J. Biochem.* **63**, 563 (1976).
- 14) Ouchterlony, O. and Nilsson, L.A.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. in *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publication. **19**, pp. 1-19 (1973).
- 15) Sharon, N. and Lis, H.: Lectins; Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949 (1972).
- 16) Barondes, S.H.; Soluble Lectins: A new class of extracellular proteins. *Science* **223**, 259 (1984).