

방울토마토 열매로부터 분리된 lectin의 생화학적 특성

박나영 · 이삼빈¹ · 노광수*

계명대학교 생물학과, ¹계명대학교 식품가공학과

Received November 3, 2006 / Accepted November 22, 2006

Biochemical Characterization of Lectin Isolated from Cherry Tomato Fruit. Na Young Park, Sam Pin Lee¹ and Kwang Soo Roh*. Department of Biology, ¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea – Biochemical characterization of lectin isolated from fruit of cherry tomato through neutral saline extraction, ammonium sulfate precipitation, and affinity chromatography on Sephadex G-200 was studied. The lectin was agglutinated by trypsin-treated human ABO erythrocytes, and the most pronounced activity of agglutination was observed at B type erythrocyte. The analysis of the lectin by SDS-PAGE showed the high intensity band with molecular weights of 10.7 kDa. The optimal temperature and thermal stability of the lectin was 40°C and 40-60°C, respectively. The maximal pH of this lectin was pH 7.2.

Key words – Agglutination, cherry tomato fruit, lectin

서 론

Lectin이 피마자의 추출물에서 처음 발견된 이후, 1,000여 종의 식물에서 발견되었으며 현재는 식물계뿐만 아니라 미생물계, 무척추동물, 어류와 같은 하등 척추동물에서도 발견된다[29]. Lectin은 생체 내에서 영양물질의 수송 및 저장기능을 담당하는 물질로서 자연계에 널리 분포되어 있다[30]. 특히 식물은 동물과는 달리 면역체계를 가지고 있지 않기 때문에 lectin이 표면에 붙어서 항체와 유사한 작용을 하는 생체 방어수단의 물질로 추측되고 있다[16,17].

Lectin은 면역체를 통해 생성된 물질이 아니면서 적어도 두개 이상의 당 결합부위를 가지고 있음으로 인해 세포 표면에 끼어져 나와 있는 당 분자와 결합하여 세포들을 연결시키고 당과 결합하는 당단백질로서[28], 이 결합력은 이온, 이온의 세기, pH 등에 의해 영향을 받는다[5]. Lectin은 적혈구뿐만 아니라 임파구, 섲유아세포, spermatozoa, 박테리아, 곰팡이 등의 세포들을 응집시키고 당 화합물을 침전시킨다[7]. 이러한 성질을 이용하여 lectin은 혈액형의 결정, 당을 함유하고 있는 화합물의 분리·정제와 세포막의 구조 구명 등에 널리 이용되고 있다[18].

Lectin과 구조적으로 유사한 물질인 ricin과 *Ricinus communis agglutinin*은 서로 다른 생물학적인 특성을 가진다[4]. Ricin은 ribosome에 결합하여 단백질 합성을 억제함으로써 [6] 암세포의 성장을 제해하며[32], 세포에 대해 매우 독성이 강하지만 적혈구에 대한 응집력은 약하다. 반면에 *Ricinus communis agglutinin*은 독성은 약하나 응집력은 강하다. 이와 같이 여러 가지 lectin들은 적혈구 및 각종세포를 응집하

고, 세포에 대한 독성을 나타낼 뿐만 아니라, 생물학적, 화학적 및 면역학적 성질이 매우 다양하다.

현재 자연에 존재하는 여러 차원에서 새로운 성질의 lectin을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 하나가 곰팡이나 세균에 대한 항균성 물질[24]로 작용하는 식물성 lectin이다. 이러한 차원에서 본 연구의 재료인 방울토마토 (cherry tomato, *Lycopersicum esculentum* var.)는 일반토마토에 비해 당도가 2-3도 높고, 유기산의 함량도 많으며 맛이 농후하고 비타민 C와 미네랄 함량도 풍부하다. 또한 과실의 크기가 15~20 g정도로 작아 생식과 셀러드용으로 적당하며, 일반토마토에 비해 소비량이 나날이 증가하고 있다. 이에 본 연구에서는 방울토마토 lectin이 가질 수 있는 항균작용의 가능성이 대한 연구 일환의 하나로서, 방울토마토 열매로부터 분리한 lectin의 생화학적 특성을 연구하기 위해 이의 분자량, 적혈구 응집력, 열 안정성, 온도 및 pH를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 재료는 대형 마트에서 구입한 방울토마토 열매를 사용하였다.

방울토마토 lectin의 분리

Lectin의 분리는 Kilpatrick[12]의 방법을 변형하여 시행하였다. 방울토마토 열매 1 kg을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 1,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상동액을 모아 동량의 0.15 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer를 넣어 교반시키고, 이에 최종농도가 50%가 되도록 (NH₄)₂SO₄를 천천히 넣어 용해시킨 후, 밤새 교반하였다. 이 용액을 40,000 xg에서 1시간 원심분리 한 후, 침전물을 neutral saline(Na₂HPO₄

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5207, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : rks@kmu.ac.kr

를 사용하여 pH 7.0으로 조절된 0.9% NaCl) 용액으로 용해시킨 다음, 이를 neutral saline으로 24시간 주기로 교환하면서 48시간 투석하였다.

Sephadex G-200을 neutral saline으로 평형화시킨 column(1.6 × 40 cm)에 투석한 용액을 주입시킨 후, neutral saline을 사용하여 0.2 ml/min의 유속으로 280 nm의 파장에서 흡광도가 0.03 이하가 될 때까지 각 분획 당 3 ml를 얻었다. 각 분획의 활성을 trypsin으로 처리한 사람의 B형 혈액을 사용하여 혈구 응집반응을 측정하였다.

각 분획의 단백질 함량은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford[1] 방법에 따라 microplate reader(Bio-Rad)를 사용하여 단일파장 595 nm에서 측정하여 계산하였다.

모든 분리과정은 단백질의 변성을 막기 위해 4°C에서 수행하였다.

적혈구 응집력 측정 및 lectin의 활성 측정

적혈구 응집력(hemagglutination activity)은 Takatsy[31]의 방법을 변형하여 측정하였다. Microtiter plate의 well에 neutral saline 25 µl에 분리된 lectin 용액 25 µl를 2배수로 연속 희석한 후, trypsin으로 처리한 B형 혈액을 25 µl 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이때 혈액은 0.9% NaCl을 함유한 neutral saline에 0.25% trypsin을 포함시켜 활성화시킨 2% 적혈구 부유액을 사용하였다.

적혈구의 응집 여부는 먼저 육안으로, 그리고 현미경을 사용하여 최종적으로 확인하였으며, lectin의 활성은 혈구 최종 응집을 나타내는 희석 배수를 역수로 계산하여 나타내었다.

혈액의 특이성 조사

Lectin을 neutral saline(pH 7.0)으로 2배수로 연속 희석 한 다음, 사람의 ABO형 혈액을 사용하여 각각의 혈구응집반응을 확인함으로서 어떤 형의 혈액에 특이적으로 반응하는지 조사하였다.

SDS-PAGE 및 분자량 측정

Laemmli[15]의 방법에 따라, 15% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 40 mA에서 4시간 동안 전기영동하였으며, gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고, 7.5% acetic acid로 탈색시켰다.

분자량은 Weber & Osborn[34] 방법에 따라 측정하였다. 전기영동한 lectin과 표준 단백질에 대한 상대이동도(Rf)와 단백질 분자량에 대한 대수값으로 분자량을 구하였으며, 이 때 표준 단백질은 rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa)를 사용하였다.

최적 반응 온도의 측정

분리한 lectin의 최적 반응 온도를 조사하기 위해 온도 변화에 따른 활성을 측정하였다. 이때 정제된 lectin을 2배수로 연속 희석하였고, 20-70°C의 온도에서 혈구 응집 반응을 이용하여 최대 희석 배수의 residual activity를 100%로 하여 잔존하는 lectin의 상대적인 활성을 측정하였다.

열 안정성 측정

분리한 lectin의 열 안정성을 조사하기 위해 40-80°C 사이 온도에서 적혈구 응집 반응을 이용하여 잔존하는 상대적인 lectin의 활성을 측정하였다. 이때 분리된 lectin은 10 분간 열 처리한 후, 급냉시킨 상태에서 사용하였다.

pH 안정성 측정

분리한 lectin의 pH 변화에 따른 활성을 조사하기 위해서 pH 2.0-10.0 사이 buffer를 사용하여 4°C에서 4 시간 투석시킨 후, 혈구 응집 반응을 이용하여 잔존하는 상대적인 lectin의 활성을 측정하였다. 이때 완충액은 0.025 M glycine-HCl buffer (pH 2.0), 0.2 M acetate buffer (pH 3.2, 4.2), 0.01 M phosphate buffer (pH 6.2, 7.2), 0.2 M Tris buffer (pH 8.0, 9.1), 0.2 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0)를 사용하였다.

결 과

Lectin의 분리

여러 농도의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 첨가 하였을 때, 50%의 최종 농도에서 침전시켜 얻은 분획이 가장 높은 활성을 보였으며, neutral saline으로 투석된 용액을 Sephadex G-200 affinity chromatography하여 lectin을 분리하였다. 이 때 2-5번 째 분획에서 활성을 나타냈으며, 이중 3번 째의 분획이 가장 높은 단백질 함량과 활성을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 이 분획을 사용하여 lectin의 분자량, 최적 반응온도, 열 안정성 및 pH 안정성을 측정하였다.

혈액의 특이성과 응집반응 정도

정제된 lectin을 neutral saline(pH 7.0)으로 2배수로 연속 희석한 다음, trypsin으로 처리된 사람의 ABO 혈액을 사용하여 각각의 혈구 응집반응을 측정한 결과, A, B, O, AB형 모두에서 응집반응이 일어났으며, B형 혈액이 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 2). 따라서 최적 반응온도, 열 안정성 및 pH 안정성 조사에 B형 혈액을 사용하였다.

SDS-PAGE와 lectin의 분자량

활성이 가장 높은 분획을 SDS-PAGE한 결과, gel 상에 강도가 높은 두꺼운 band를 확인할 수 있었으며(Fig. 3), 이

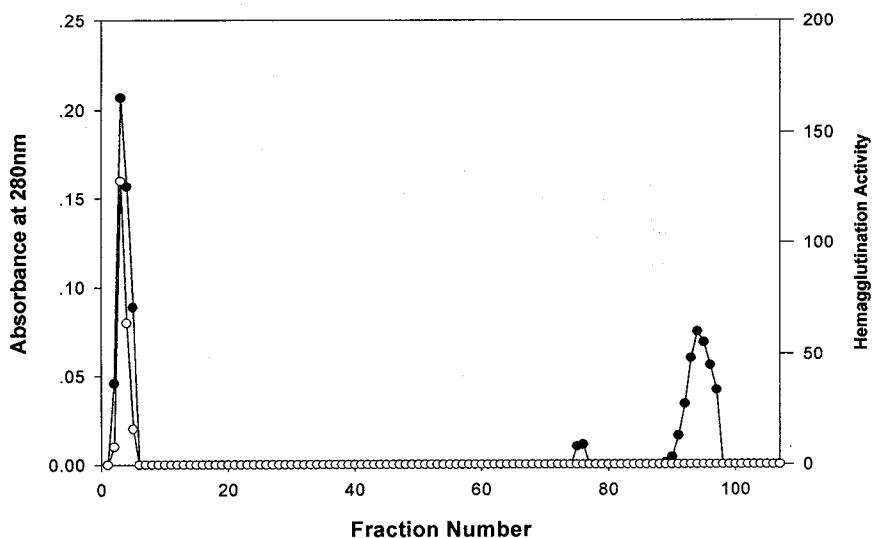


Fig. 1. Elution profile for protein (●) and hemagglutination activity of lectin (○) isolated from cherry tomato fruit by affinity chromatography on Sephadex G-200. The bound lectin was eluted with neutral saline. Hemagglutination activity was determined using the human B type erythrocyte.



Fig. 2. Effect of lectin of cherry tomato fruit on hemagglutination activity by human ABO blood type.

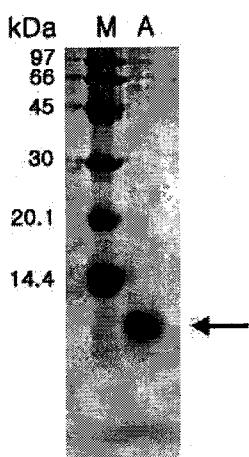


Fig. 3. 15% SDS-PAGE of lectin isolated from cherry tomato fruit. The gels were run at 40 mA for 4 hr and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Arrow indicate lectin isolated by affinity chromatography on Sephadex G-200. Lanes : M, molecular weight markers; A, purified lectin. The molecular weight markers were rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa).

band의 분자량을 표준 단백질에 대한 상대이동도와 비교하여 측정한 결과, 10.7 kDa의 저분자량이었다(Fig. 4).

Lectin의 최적 반응 온도

Lectin의 최적 반응온도를 측정하기 위하여, 20-70°C의 범위에서 1시간 반응시켜 활성을 측정한 결과, 분리된 lectin의 가장 안정적인 반응온도는 40°C로서 이 온도에서 활성이

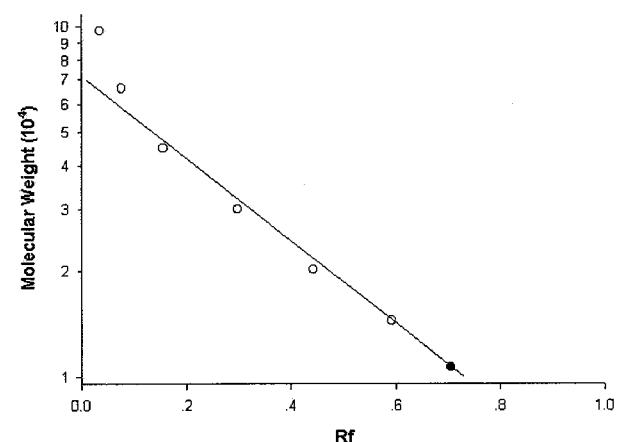


Fig. 4. Determination of molecular weight of cherry tomato fruit lectin on SDS-PAGE. Closed black circle (●) indicates lectin isolated by affinity chromatography on Sephadex G-200. The molecular weight markers (O) were rabbit muscle phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg white ovalbumin (45 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa).

100%로 가장 높았다. 50°C부터는 활성이 떨어지기 시작하여 60°C 이상에서는 매우 낮은 활성을 보였으며, 30°C 이하에서도 같은 경향을 보였다(Fig. 5).

Lectin의 열 안정성

Lectin의 열 안정성을 측정하기 위하여, 분리한 lectin을 40-80°C 범위에서 적혈구 응집을 통한 활성을 측정한 결과, lectin은 50°C까지는 활성이 매우 안정적이었으며, 60°C 온도에서도 80% 정도의 활성으로 안정적이었다. 그러나 70°C 이상에서는 활성이 현저히 떨어져, 80°C에서는 전혀 혈구 응집 반응을 보이지 않았다(Fig. 6).

Lectin의 pH 안정성

Lectin의 pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여, 분리된 lectin을 2.0-10.0까지의 pH에 대해 적혈구 응집 반응을 통한

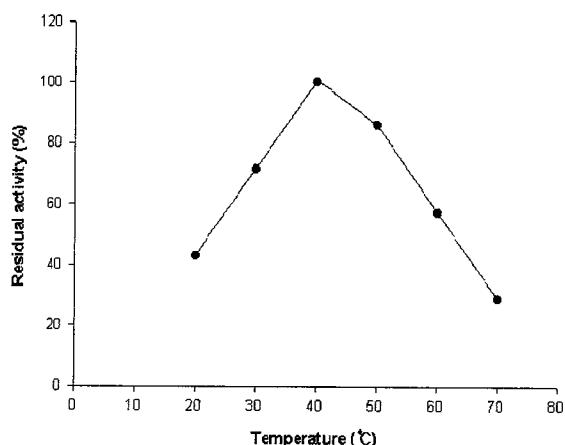


Fig. 5. Effect of temperature on hemagglutination activity of lectin isolated from cherry tomato fruit. The lectin activity was tested by incubation at 20-70°C, respectively.

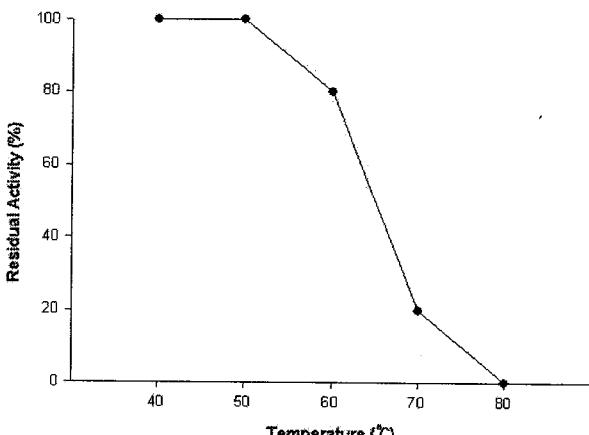


Fig. 6. Thermal stability of lectin isolated from cherry tomato fruit. The lectin was preheated for 10 min at 40-80°C, respectively.

활성을 측정한 결과, phosphate buffer를 사용한 pH 7.2에서 활성이 가장 높았으며, acetate buffer와 phosphate buffer를 사용한 pH 4.2-6.2까지의 약산성과, tris buffer를 사용한 pH 8.0의 약알칼리에서 비교적 안정적이었다. Acetate buffer의 pH 3.2와 pH 9.1에서는 활성이 현저히 떨어져, glycine-HCl을 사용한 pH 2.0과 tris buffer의 pH 10.0에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 7).

고 칠

방울토마토에서 neutral saline, ammonium sulfate, Sephadex-G 200을 이용한 affinity chromatography에서 neutral saline으로 용출시켜 lectin을 분리하였다. 식물성 lectin은 N-acetyl-D-glucosamine의 올리고당에 특이적으로 결합하는 성질을 이용하거나[22], mannose[10]나 glucose[26]와 같은 단당류를 사용하여 추출하기도 한다.

Lectin은 혈액에 응집을 나타내는 물질이므로[28] 응집력 측정은 lectin의 활성 측정을 위한 중요한 과정으로서, 분리·정제한 lectin을 적혈구 응집력을 통하여 활성을 측정한다. 이 과정에 정상 적혈구뿐만 아니라 trypsin이나 neuramidase로 활성화시킨 적혈구를 사용하여 확인한다. 이 방법은 세포에 손상을 주지 않고 세포응집 반응을 일으키므로 많이 이용된다[2]. 이에 본 실험에서는 trypsin으로 처리한 사람의 적혈구를 사용하였다. 그 결과, A, B, O, AB형 모두에서 응집반응이 일어났으며, 4개의 혈액형에 따른 응집 반응 정도를 측정한 결과, B형 혈액이 가장 높은 활성을, A와 O형은 같은 활성을, AB형은 가장 낮은 활성으로서, 서로 다른 혈구응집 반응을 나타냈다.

Artocarpus incise[21]와 *Dioclea reflexa*[13] 종자 lectin은 본 연구 결과와 같이 사람의 ABO 적혈구 모두에서 응집반응이 일어나지만, winged bean 종자 lectin은 사람의 혈액 중에서

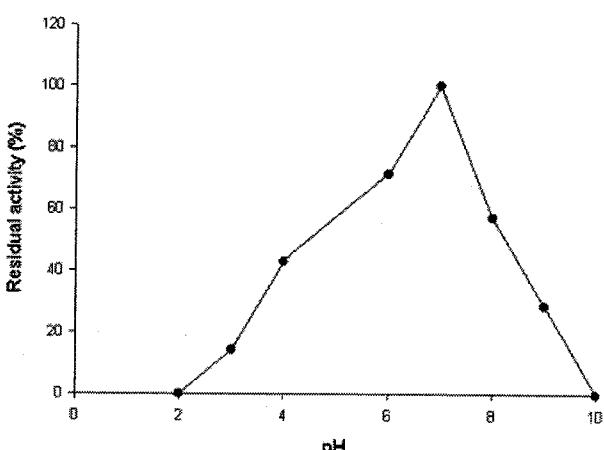


Fig. 7. Effect of pH on hemagglutination activity of lectin isolated from cherry tomato fruit. The lectin was incubated in different pH for 4 hr at 4°C.

O형을 제외한 나머지 적혈구에서 모두 반응이 일어나며, 방울토마토 lectin과는 달리 A형에서 가장 높은 활성이 조사되었다[9]. 그러나 *Neoregelia flandria* 잎[34], 작두콩 종자[25]와 shoot[26] lectin은 토끼의 적혈구에는 응집반응이 일어나나 사람의 혈액형에는 반응이 일어나지 않는다. 이와 같이 식물에 따라 서로 다른 종류의 적혈구에 대해 응집 반응이 다르게 나타남으로 lectin은 적혈구에 대한 종 특이성을 가진다.

Lectin의 분자량은 다양하며, 대체로 dimer 또는 tetramer의 subunit를 가진다. 활성이 가장 높은 분획을 전기영동한 결과, gel 상에서 강도가 높은 두꺼운 band가 나타났는데, 이는 polyacrylamide gel의 농도를 높여 전기영동하면 이동 거리가 달라져 band사이가 벌어지므로 몇 개의 band가 존재하는지 확인할 수 있을 것으로 생각되는 바, 아마 2개의 band가 모여 있는 것으로 추측된다. Gel 상에 나타난 이 band에 대한 분자량을 측정한 결과, 10.7 kDa 크기로 조사되었다. 벼 lectin은 단일 band의 15 kDa로서[36] 방울토마토 lectin과 같이 저분자량이었으며, *Kalanchoe crenata* 잎 lectin은 단일 band를 보였으나 분자량은 비교적 큰 44 kDa로 다르게 나타났다[14]. Oguri 등[23]은 토마토 종자 lectin의 분자량은 4와 8 kDa의 12 kDa로서, S-S 결합으로 연결된 2개의 subunit로 구성되어 있다고 하였으나, 29 kDa 및 22 kDa의 작두콩 종자 lectin[25]과, 32 kDa와 30 kDa의 한국산 겨우살이 lectin[3], 34.5 kDa와 29 kDa[19]의 유럽산 겨우살이 lectin보다는 분자량이 작았다.

방울토마토 lectin의 최적 반응 온도를 알아내기 위해 20-70°C의 범위에서 활성을 측정한 결과, 40°C에서 100%의 활성으로 최적 반응 온도임을 알 수 있었으며, 50°C에서도 80% 이상의 활성으로 비교적 안정적이었으나, 20°C-30°C와 60°C 이상에서는 비교적 낮은 활성을 관찰할 수 있었다. 이는 각각 70°C와 80°C에서도 안정한 winged bean lectin[9]과 *Dioclea altissime* 종자 lectin[20] 보다는 비교적 낮은 온도이었으나, 작두콩 종자 lectin[24] 보다는 방울토마토 lectin의 온도에 비교적 안정적인 lectin임을 알 수 있었다.

방울토마토 lectin의 열 안정성을 알아보기 위해 40°C-80°C의 범위에서 활성을 측정한 결과, 본 실험의 방울토마토 lectin은 50°C까지는 매우 안정적인 활성을 보였으나, 60°C에서부터 활성능이 감소하기 시작하여 70°C 이상에서 활성이 현저하게 감소되었으며 80°C에서는 활성을 보이지 않았다. 이는 *Ptilota filicina* lectin[27]의 열안정성과 유사하게 나타났으나, Winged bean lectin[9]과 *Kalanchoe crenata* 잎 lectin[14]이 각각 70°C와 90°C에서 안정한 것보다는 매우 낮은 것으로 조사되었다.

방울토마토 lectin의 pH에 의한 안정성 측정결과, pH 7.2에서 가장 안정적이었으며, pH 6.2의 약산성과 pH 8.0의 약 알칼리에서도 비교적 안정적으로 나타났으나, pH 4.2 이하와 pH 9.1 이상에서 점차 활성능이 떨어져 pH 2.0과 pH

10.0에서는 반응을 전혀 보이지 않았다. 산성에서 안정적인 *Kalanchoe crenata* 잎 lectin[14]과 비교하였을 때, 방울토마토 lectin은 산성에는 비교적 약한 lectin임을 보여주었다. 땅콩 뿌리[11], *Parkia javanica* 콩[32], *Ziziphus mauritiana* 종자 lectin[8] 등 식물성 lectin이 pH 7.0-7.5에서는 안정적인 것으로 보아, 이는 본 실험의 방울토마토 lectin을 비롯하여 많은 종류의 lectin이 중성에서 가장 안정적이라는 것을 보여준다.

요약

Neutral saline 추출, ammonium sulfate 침전 및 Sephadex G-200을 사용한 affinity chromatography 과정을 통해 방울토마토 열매에서 분리된 lectin의 생화학적 특성을 연구하였다. 트립신을 처리한 사람의 ABO형 적혈구 모두에서 응집반응이 일어났으며, 이 중 B형 적혈구에서 가장 높은 응집반응이 관찰되었다. 전기영동 분석에 의해 분자량 10.7 kDa의 강도가 높은 밴드가 확인되었다. 분리된 lectin의 최적 반응온도는 40°C이며, 40-60°C 범위에서 열에 대해 안정하였다 또한 최적 pH는 7.2로 조사되었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물 자원개발 및 산업체 연구센터의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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.
- Burger, M. M. 1967. Assays for agglutination with lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **57**, 359-367.
- 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.
- Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**, 1-9.
- Etzler, M. E. 1986. Distribution and function of plant lectins. pp 371-435. In Liener, I. E. and N. Sharon (eds.). *The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, NY, USA.
- Frigerio, L. and L. M. Roberts. 1998. The enemy within: ricin and plant cells. *J. Exper. Botany* **49**, 1473-1480.
- Golestein, I. J., R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa and N. Sharon. 1980. What should be called a lectin?. *Nature* **285**, 66-70.
- Gupta, N. and P. S. Srivastava. 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary

- callus of *Zizyphus mauritiana*. *Plant Cell Rep.* **17**, 552-556.
9. Higuchi, M. and K. Owai. 1985. Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds. *Agr. Biol. Chem.* **49**, 391-398.
 10. Hirano, K., T. Teraoka, H. Yamanaka, A. Harashima, A. Kunisaki, H. Takahashi and D. Hosokawa. 2000. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible *salT* gene. *Plant Cell Physiol.* **41**, 258-267.
 11. Kalsi, G., H. R. Das, C. R. Babu and R. H. Das. 1992. Isolation and characterization of a lectin from peanut roots. *Biochem. Biophys. Acta* **1117**, 114-119.
 12. Kilpatrick, D. C. 1980. Purification and some properties of a lectin from the fruit juice of the tomato. *Biochem. J.* **185**, 269-272.
 13. Kuku, A., M. Stoppini, A. Cobianchi, G. Minetti, C. Balduini and A. Aboderin. 2000. The complete primary structure of a mannose/glucose specific lectin from the seeds of *Dioctria reflexa* (Hook. F.) Nig. *J. Biochem. Mol. Biol.* **15**, 115-119.
 14. Kuku, A. and O. B. Eretan. 2004. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 229-233.
 15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 16. Liener, I. E., N. Sharon and I. J. Golestein. 1986. *Lectins: Properties and functions and applications in biology and medicine*. p. 1-60, Academic Press, New York, USA
 17. Lis, H. and N. Sharon. 1977. *Lectins. Their chemistry and application to immunology, in the antigens*. pp. 429-529, Academic Press. New York, USA
 18. Lis, H. and N. Sharon. 1981. *Lectin in higher plant. Biochemistry of plant*. pp. 371-477, Academic Press, New York, USA
 19. Luther, P., H. Theise, B. Chatterjee, D. Karduck and G. Uhlenbrück. 1980. The lectin from *Viscum album* L. Isolation, characterization, properties and structure. *Int. J. Biochem.* **11**, 429-435.
 20. Moreira, A. R., A. C. O. Monteiro, A. C. G. Horta, J. T. A. Oliveira and B. S. Cavada. 1997. Isolation and characterization of *Dioctria altissima* var. *Megacarpa* seed lectin. *Phytochem.* **46**, 139-144.
 21. Moreira, A. R., C. C. Castelo-Branco, A. C. O. Monteiro, R. O. Tavares and L. M. Beltramini. 1998. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incise* seed. *Phytochem.* **47**, 1183-1188.
 22. Nachbar, M. S., J. D. Oppenheim and J. O. Thomas. 1980. Isolation and characterization of a lectin from the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Biol. Chem.* **255**, 2056-2061.
 23. Oguri, S., M. Kamoshida, Y. Nagata, Y. S. Momonoki and H. Kamimura. 2003. Characterization and sequence of tomato 2S seed albumin: a storage protein with sequence similarities to the fruit lectin. *Planta* **216**, 976-984.
 24. Peumans, W. J. and E. J. M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109**, 347-352.
 25. 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.
 26. Roh, K. S. and N. Y. Park. 2005. Characterization of the lectin purified from *Canavalia ensiformis* shoots. *Biotechnol. Bioproc. Engineer.* **10**, 334-340.
 27. Sampaio, A. H., D. S. J. Rogers and C. J. Barwell. 1998. A galactose-specific lectin from the red marine algae, *Ptilota filicina*. *Phytochem.* **38**, 281-285.
 28. Sharon, N. 1977. Lectins. *Sci. American* **236**, 108-119.
 29. Sharon, N. and H. Lis. 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949-959.
 30. Sharon, N. and H. Lis. 1987. Century of lectin research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.* **12**, 488-491.
 31. Takatsy, G. 1967. The use of a microtitrator in serological procedures. In *International Symposium on Immunological Method of Biological Study*. **4**, 275-280.
 32. Utarabhand, P. and P. Akkayananont. 1995. Purification of a lectin from *Parkia javanica* beans. *Phytochem.* **38**, 281-285.
 33. Vitetta, E. S., H. A. Krolick, M. W. Cushley and J. W. Uhr. 1983. Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. *Science* **219**, 644-650.
 34. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
 35. Yagi, F., M. Hidaka, Y. Minam and K. Tadera. 1996. A lectin from leaves of *Neoregelia flandria* recognizes D-glucose, D-mannose and N-acetyl D-glucosamine, differing from the mannose-specific lectins of other monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1007-1012.
 36. Zhang, W., W. J. Peumans, A. Barre, C. H. Astoul, P. Rovira, P. Rouge, P. Proost, P. Truffa-Bachi, Ali A. H. Jalali and Els J. M Van Damme. 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oriza sativa*) plants. *Planta* **210**, 970-978.