

# 泥鳅血清凝集素的研究

姚东瑞<sup>1,2</sup> 盘赛昆<sup>1</sup> 周鸣谦<sup>1,2</sup> 葛荣荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

(<sup>2</sup>江苏海洋资源研究院, 连云港 222005)

**摘 要** 采用 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析和 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤层析技术, 从泥鳅血清中分离出两种天然凝集素 MSL-I 和 MSL-II。SDS-PAGE 检测表明, MSL-I 及 MSL-II 均显示两条蛋白质着色带。采用凝胶过滤法测得 MSL-I 相对分子质量为 25 000, MSL-II 相对分子质量为 82 000。根据凝胶过滤测定及 SDS-PAGE 检测结果可知, MSL-II 由相对分子质量分别为 29 000 和 13 600 两种亚基组成, MSL-I 的亚基组成有待进一步研究。MSL-II 能结合多种糖, 其中对乳糖的亲和力最强。MSL-II 具有较强的热稳定性, 在 pH 4~11 范围内具有凝集活性, 最适 pH 为 6~8。

**关键词** 泥鳅 血清 凝集素 分离纯化

**中图分类号** Q965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0043-07

## Preliminary study on lectins from serum of loach *Misgurnus anguillicaudatus*

YAO Dong-rui<sup>1,2</sup> PAN Sai-kun<sup>1</sup> ZHOU Ming-qian<sup>1,2</sup> GE Rong-rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

(<sup>2</sup>Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222005)

**ABSTRACT** Two lectins with different molecular mass, designated as MSL-I and MSL-II, were isolated from serum of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. The purification procedure consisted of separation on DEAE-Sepharose FF anion exchange column followed by gel filtration chromatography on Superdex 200 10/300 GL. Determination showed that MSL-I and MSL-II had a nature molecular weight of 25,000 and 82,000 respectively. The denatured SDS-PAGE showed that both MSL-I and MSL-II had two bands on the gel. We proposed that MSL-II was constituted with two subunits with molecular mass of 29,000 and 13,600 respectively. The subunit composition of MSL-I was to be further studied. Sugar-binding specificity test showed that glucose, D-galactose, D-fructose, D-xylose, L-arabinose and lactose had inhibitory effect on MSL-II, and among them lactose was most effective. Thermal stability test showed that MSL-II had a strong thermal stability even treated at 60°C for 30min. The optimum pH of MSL-II was 6~8.

江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2010399)、江苏省农业科技自主创新基金项目[CX09-627;CX(10)328]和连云港市科技基础设施建设设计划项目(CK0935)共同资助

收稿日期:2011-05-09;接受日期:2011-08-29

作者简介:姚东瑞(1966-),男,教授,博士,主要从事水产品加工及渔业经济研究。E-mail:yaodr@hhit.edu.cn;Tel:(0518)85895000

**KEY WORDS** Loach *Misgurnus anguillicaudatus* Serum Lectin Purification

凝集素(Lectin)是一种非免疫来源的糖蛋白或蛋白质,具有使细胞凝集和糖缀合物沉淀的能力,其功能涉及细胞生长、分化、发育和免疫等(王镜岩等 2002)。凝集素在鱼体内有非常广泛的分布,主要存在于鱼类的胸腺、肾脏(Savan *et al.* 2004)、脾脏等主要免疫器官及血液中(Fock *et al.* 2000; Jensen *et al.* 1997; Stratton *et al.* 2004)。凝集素是鱼类主要的抗菌相关因子和非特异性免疫因子,具有与细胞结合、介导吞噬、免疫反应等生理作用,已被广泛地用于提高鱼类的抗菌免疫能力。

已发现的鱼类凝集素属于多种类型。如胡瓜鱼(Shishamo smelt, *Osmerus lanceolatus*)卵凝集素(Hosono *et al.* 2005)、鲤(Common carp, *Cyprinus carpio*)头肾凝集素(Savan *et al.* 2004)属 C-型凝集素;河鲈(Perch, *Perca fluviatilis* L.)卵凝集素(Bazil *et al.* 1999)属于 F-型凝集素。鱼类凝集素表现出一些与其他动物凝集素不同的特征,如从日本鳗 *Anguilla japonica* 分离到一种凝集素 AJL-2,具有 C-型凝集素高度保守序列,但其活性却不依赖  $Ca^{2+}$  (Tasumi *et al.* 2002)。因此,鱼类是新型凝集素的重要来源。

泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus* 是一种生长潜力大、营养丰富、具有多种药理功能的淡水鱼类,素有“水中人参”之称,是很有发展前途的养殖品种,仅连云港市已具有 1 066.67hm<sup>2</sup> 的养殖水面,年产泥鳅 8 万余 t,生物量很大。10 余年来,国内外对泥鳅中生物活性成分如泥鳅素(Misgurin)、超氧化物歧化酶、泥鳅多糖、牛磺酸和透明质酸的研究报道较多,但对泥鳅血清凝集素的研究尚未见报道。因此,研究泥鳅血清中凝集素的结构与功能对于探讨泥鳅的免疫机制及规模加工中血液的综合利用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

泥鳅:2011 年 3~4 月购于连云港大润发超市,经淮海工学院海洋学院水产养殖系程汉良教授鉴定为泥鳅。

供血动物:日本长耳兔购于南京青龙山实验动物养殖场。

主要试剂:DEAE-Sepharose Fast Flow;Pharmacia 公司产品;Superdex 200 10/300 GL;Amersham Biosciences 产品;转铁蛋白、核糖核酸酶 A、牛血清白蛋白、卵清蛋白、蓝色葡聚糖 2000;Merk 公司产品。相对分子质量 Marker(1.44~98kD):生工生物工程(上海)有限公司产品。

主要仪器:CR22G 高速冷冻离心机:日本 HITACHI 公司;蛋白质层析系统(Biologic Duoflow Pathfinder™ 20/80)、凝胶成像系统(ChemiDoc XRS);美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血清采集

将泥鳅放在蒸馏水中静养 3 d,取出泥鳅,用刀子划开尾部,用胶头滴管吸出流出的血液放入装有抗凝剂(Ballarín *et al.* 1999; 盘赛昆等 2009)的离心管中,将取出的血液离心(3 000 r/min, 15 min),取上清液, -40 °C 保存备用(Fock *et al.* 2000)。

#### 1.2.2 凝集素血凝活力的测定

本研究对凝集素的鉴定及血凝活力测定采用血凝试验法,参照文献(孙 册等 1986;盘赛昆等 2009)的方法进行,以产生凝集反应的最高稀释倍数的倒数表示凝集素的血凝活力(单位为 HU,以 2<sup>n</sup> 表示)。比活力定义为每 mg 蛋白质中含有的血凝活力(HU/mg)。

#### 1.2.3 泥鳅血清凝集素的分离纯化

取泥鳅血清 15 ml 上经流动相 A (0.025 mol/L Tris-HCl, pH 7.5)平衡的 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱( $\phi$ 1 cm×17 cm),先用流动相 A 将未吸附的蛋白洗脱,然后用流动相 B(0.025 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含 1 mol/L NaCl)和流动相 A 进行梯度洗脱,流速 1.5 ml/min,Quadtec™ 检测器检测,检测波长为 280

nm,自动收集器分管收集(2 ml/管),检测各管血凝活力,按峰合并活性组分。取15 ml活性组分,用离心超滤管(Centriplus YM-10,截留分子量10kD)浓缩至1.5 ml,离心(10 000 r/min,4 °C,20 min),取上清液0.5 ml上经PBS(50 mmol/L,含0.15 mol/L NaCl,pH 7.0)平衡的Superdex 200 10/300 GL预装柱,用PBS洗脱,流速为0.5 ml/min,检测各管血凝活力,按峰合并活性组分,-40 °C保存备用。

#### 1.2.4 相对分子质量测定

天然分子相对分子质量采用凝胶过滤柱层析法测定,参照盘赛昆等(2009)的方法进行。凝胶柱为Superdex 200 10/300 GL,平衡及洗脱缓冲液为50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0,含0.15 mol/L NaCl),上样量0.5 ml,流速0.5 ml/min。以下物质被用于制作标准曲线:转铁蛋白(Transferrin,80kD)、牛血清白蛋白(BSA,67kD)、卵清蛋白(Albumin egg,45kD)核糖核酸酶A(RNase A,13.7kD)。牛血清白蛋白用缓冲液配成8 mg/ml,其余物质配成5 mg/ml。蓝色葡聚糖2000(Dextran blue 2000)用于测定 $V_0$ 。根据各物质的保留时间,计算出 $K_{av}$ ,以相对分子质量的对数(logMr)为横坐标,分配系数( $K_{av}$ )为纵坐标,绘制标准曲线。根据各分离组分的保留时间,由标准曲线计算相对分子质量。

#### 1.2.5 纯度分析及亚基相对分子质量测定

凝集素的纯度鉴定及亚基相对分子质量测定采用SDS-PAGE,参照文献(汪家政等 2004;郭尧君 2005;盘赛昆等 2009)的方法进行。浓缩胶T=5%,分离胶T=12.5%,C均为5%,电泳后用考马斯亮蓝R-250染色,ChemiDoc XRS凝胶成像系统拍照分析。

#### 1.2.6 糖结合专一性测定

参照半抗原法进行(Hori *et al.* 2000; Sato *et al.* 2000)。分别配制0.2 mol/L葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖和乳糖。取25  $\mu$ l纯化后的泥鳅血清凝集素样品于96孔“V”型血凝板中与等量的红细胞缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5,含0.15 mol/L NaCl)倍比稀释后,每排加入25  $\mu$ l糖溶液,最后每孔加入50  $\mu$ l的2%的兔红细胞悬浮液,以不加凝集素的最后两孔作为对照组,室温静置1 h后检测其效价。

#### 1.2.7 热稳定性测定

参照文献(Leite *et al.* 2005)方法进行,以室温(20 °C)时样品的血凝活力为100%计算各处理的相对活力。

#### 1.2.8 pH稳定性测定

参照文献(Otta *et al.* 2002; Suseelan *et al.* 2002)的方法进行,以pH 8.0处理的样品的血凝活力为100%计算各处理的相对活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析

泥鳅血清经DEAE-Sepharose FF离子交换层析后分为4个峰(图1),经检测1~3号峰均有血凝活力(表1)。

如表1及图1所示,经DEAE-Sepharose FF层析后,活性集中在梯度洗脱开始后出现的组分中,说明凝集素能有效地吸附在DEAE-Sepharose FF层析介质上。因此,阴离子交换层析是捕获、分离泥鳅血清凝集素的一种有效分离手段。

### 2.2 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤层析

离子交换层析1~3号峰经Superdex 200 10/300 GL预装柱分离,结果见图2~图4。

图2及图4显示,峰1及峰3经Superdex 200 10/300 GL凝胶过滤层析分离后得到单一的色谱峰,且峰形对称,分离效果较好,说明经DEAE-Sepharose FF分离得到的这两种组分具有一定的纯度,经检测均具有凝集素活性,分别命名为MSL-I(*Misgurnus anguillicaudatus* Serum lectin-I)和MSL-II,比活力分别为4 697和

27 080HU/mg, 纯化倍数分别为 2.7 及 4.2 倍。而峰 2 经 Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤层析分离后被分为 4 个组分, 经检测各组分均没有凝集素活性, 具体原因有待进一步分析。

表 1 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析各峰比活力

Table 1 Specific activity of peaks separated by DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography

峰号 Peak No.	血凝活力 HU Hemagglutinating activity(HU)	蛋白质浓度 Concentration of protein(mg/ml)	比活力 Specific activity (HU/mg)
穿透峰 Unabsorbed peak	2 <sup>4</sup>	1.536	10
峰 1 Peak 1	2 <sup>10</sup>	0.590	1 735
峰 2 Peak 2	2 <sup>14</sup>	0.580	28 248
峰 3 Peak 3	2 <sup>12</sup>	0.634	6 460
峰 4 Peak 4	—	0.745	—

注：“—”表示没有凝集素活性

Note: — means no hemagglutinating activity

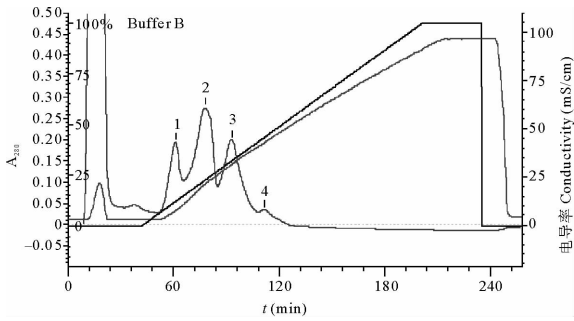


图 1 pH 7.5 时泥鳅血清中凝集素的 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析色谱

Fig. 1 Ion-exchange chromatography of lectin from serum of Loach on DEAE-Sepharose FF using 0~1 000mmol/L NaCl gradient in 25mmol/L Tris-HCl buffer(pH 7.5)

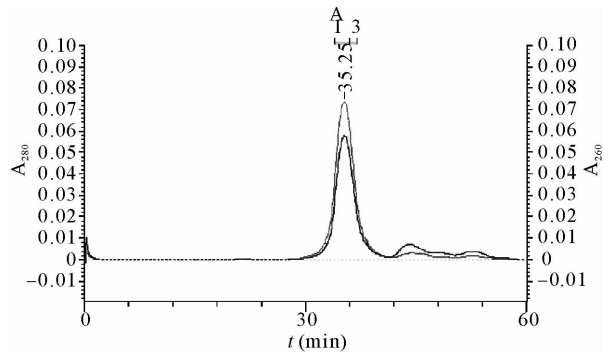


图 2 DEAE-sepharose FF 峰 1 经 Superdex 200 10/30GL 分离的色谱

Fig. 2 Gel-filtration chromatography on Superdex 200 of peak 1 from DEAE-Sepharose FF

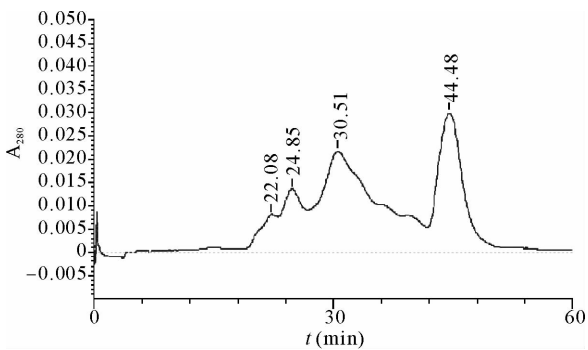


图 3 DEAE-sepharose FF 峰 2 经 Superdex 200 10/30GL 分离的色谱

Fig. 3 Gel-filtration chromatography on Superdex 200 of peak 2 from DEAE-Sepharose FF

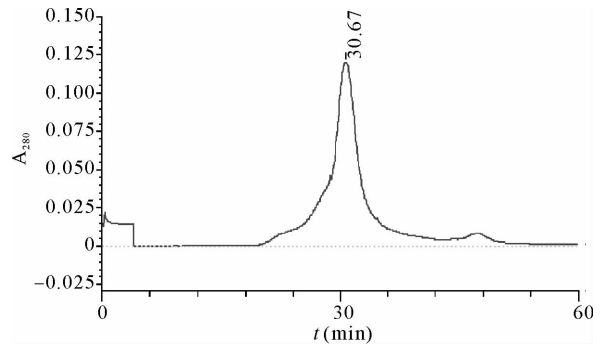


图 4 DEAE-sepharose FF 峰 3 经 Superdex 200 10/30GL 分离的色谱

Fig. 4 Gel-filtration chromatography on Superdex 200 of peak 3 from DEAE-Sepharose FF

### 2.3 纯度及相对分子质量测定结果

MSL-I 和 MSL-II 经 SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示。

根据凝胶成像系统的分析作图 6,经计算 MSL-I 泳道上的两条着色带对应的相对分子质量分别为  $67\ 800 \pm 560$  ( $\bar{x} \pm SD, n=2$ , 下同) 和  $13\ 000 \pm 130$ , MSL-II 泳道上的两条着色带对应的相对分子质量分别为  $29\ 000 \pm 530$  和  $13\ 600 \pm 360$ 。

Superdex 200 10/300 GL 凝胶过滤层析测定天然分子相对分子质量的标准曲线见图 7。

根据保留时间计算,得 MSL-I 相对分子质量为  $25\ 000 \pm 350$  ( $\bar{x} \pm SD, n=3$ ), MSL-II 相对分子质量为  $82\ 000 \pm 580$  ( $\bar{x} \pm SD, n=3$ )。由于 MSL-I 泳道上相对分子质量为  $67\ 800$  的组分显然大于天然凝集素分子的相对分子质量( $25\ 000$ ),可能是聚集体,因此,MSL-I 的亚基组成尚未能确定,有待进一步研究。而 MSL-II 是由两个相对分子质量为  $29\ 000 \pm 530$  和两个相对分子质量为  $13\ 600 \pm 360$  的 4 个亚基组成。由于 MSL-I 的分子组成及纯度尚未能确定,因此作者仅报道 MSL-II 的一些物理化学性质。

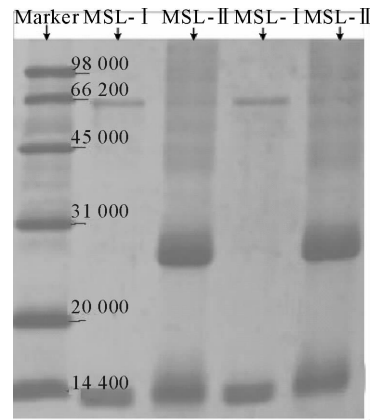


图 5 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 5 SDS-PAGE of lectin from serum of Loach

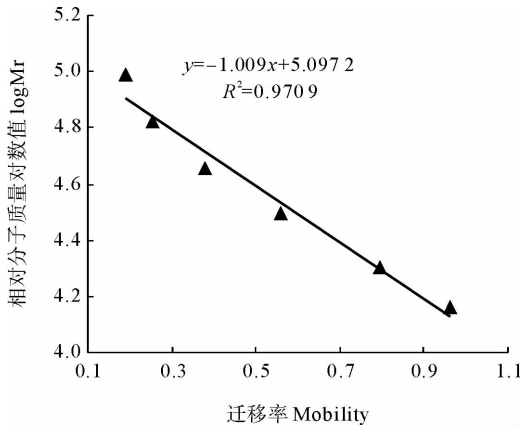


图 6 相对分子质量 Marker 迁移率标准曲线

Fig. 6 Mobility standard curve of molecular marker

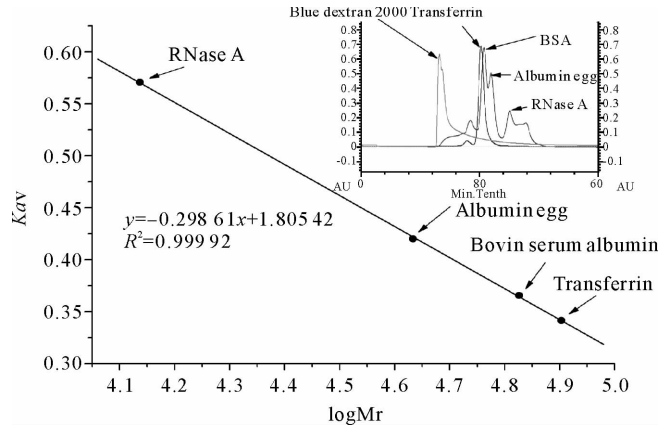


图 7 Superdex 200 10/30GL 层析柱测分子量的标准曲线

Fig. 7 Standard curve of molecular mass determined by gel filtration chromatography on Superdex 200 10/300 column

### 2.4 糖专一性抑制试验

MSL-II 的糖抑制试验结果见表 2。葡萄糖、D-果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖和乳糖对泥鳅血清的凝集活性均有抑制作用,其中乳糖的抑制作用最强。

### 2.5 热稳定性

图 8 显示,MSL-II 经  $60\ ^\circ\text{C}$  加热 30 min 仍能保持全部凝集素活性,但高于  $60\ ^\circ\text{C}$  的温度使活性迅速下降,说明 MSL-II 具有较强的热稳定性,但温度过高会引起活性的急速下降,可能是因为高温打破了凝集素的结构而导致的。

表 2 供试的单糖及双糖对 MSL-Ⅱ 凝集活性的抑制作用

Table 2 Hemagglutination-inhibition test about MSL-Ⅱ with tested carbohydrates

糖类 Carbohydrate	血凝活性 Hemagglutinating activity(2 <sup>n</sup> )										空白对照 Negative control
	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>	
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D-半乳糖 D-galactose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-果糖 D-fructose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D-木糖 D-xylose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阳性对照 Positive control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

注：“+”表示有凝集现象；“-”表示没有凝集现象

Note: “+” means hemagglutination; “-” means no hemagglutination

## 2.6 pH 稳定性

图 9 显示,MSL-Ⅱ 在 pH 4~11 范围内具有凝集活性,最适 pH 为 6~8,同时说明 MSL-Ⅱ 对酸性环境较敏感,在中性及碱性条件下则相对较稳定。

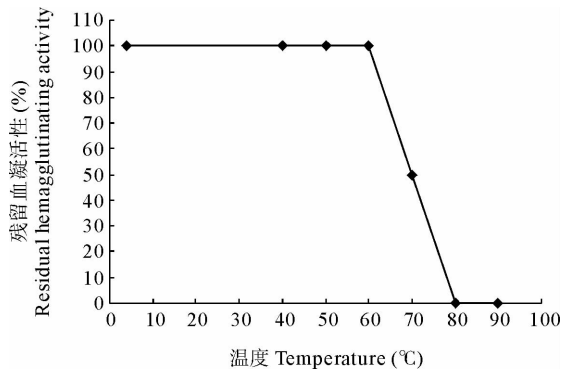


图 8 MSL-Ⅱ 的热稳定性

Fig. 8 Thermal stability of MSL-Ⅱ from loach

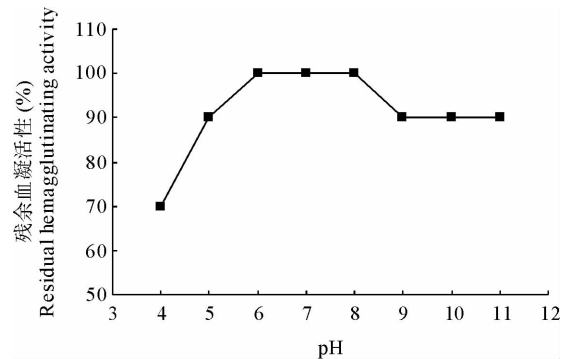


图 9 MSL-Ⅱ 的 pH 稳定性

Fig. 9 pH stability of MSL-Ⅱ from serum of loach

## 3 讨论

泥鳅是生命力很强的一种鱼类,虽然人工高密度养殖已取得了成功,但对于泥鳅的免疫系统还不十分清楚。鱼类免疫系统不像高等动物那样完善,在正常情况下,鱼类通过先天性防御系统及获得性免疫阻止环境中微生物的粘附、入侵和在组织里的繁殖来维持机体的健康。存在于鱼类血液和黏液中的非特异性免疫因子包括凝集素、干扰素、补体、蛋白酶、溶菌酶、C 反应蛋白、转铁蛋白、抗蛋白酶等。本研究从泥鳅血清中分离纯化到两种相对分子质量存在显著差异的凝集素,说明凝集素是泥鳅血清非特异性免疫的重要因子。因此,泥鳅血清凝集素的相关研究将有利于了解泥鳅非特异性免疫系统,为健康养殖提供一定的依据。

不同来源凝集素的理化性质及生物活性差别较大,本研究发现泥鳅血清凝集素具有一些突出的特点。首先,MSL-I 及 MSL-Ⅱ 的相对分子质量分别为 25 000 和 82 000,其中 MSL-Ⅱ 由两种相对分子质量不同的亚基组成的四聚体。目前,豆科凝集素的构效关系是研究得比较深入的一类凝集素,研究表明豆科凝集素在生理条件下大多是以二聚体或四聚体的形式存在,这种低聚物的形式给予豆科凝集素较强的糖专一性和大分子结构

的稳定性(殷晓丽等 2011),因此也得到了广泛的应用。本研究报道的两种凝集素均属于相对分子质量较小的低聚凝集素,可能在稳定性方面也有一定优势,在应用上可能具有一定意义。

其次,凝集素的热稳定性差别较大,特别是鱼类来源的凝集素,即便是同一来源的凝集素耐热性也存在较大的差别,如从硬头鳟(Steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss*)卵中分离到的两种凝集素 STL1 和 STL2 (Tateno *et al.* 1998)。耐热的凝集素对于应用具有重要意义,MSL-II 具有较高耐热性,在查明其生物学活性后将可能具有一定的应用前景。

## 参 考 文 献

- 王镜岩,朱圣庚,徐长发主编. 2002. 生物化学(上册). 第3版. 北京:高等教育出版社,65~66
- 汪家政,范明. 2004. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社,77~110
- 郭尧君. 2005. 蛋白质电泳实验技术. 北京:科学出版社,92~118
- 孙册,朱政,莫庆汉. 1986. 凝集素. 北京:科学出版社,1~2
- 盘赛昆,汤坚,顾小红,杨超. 2009. 鳙鳊凝集素的分离纯化及理化性质的研究. 水产科学, 28(12): 745~751
- 殷晓丽,李婷婷,刘东亮,王燕,孙素荣. 2011. 豆科凝集素研究进展. 中国生物工程杂志, 31(7): 133~139
- Ballarin, L., Tonello, C., Guidolin, L., and Sabbadin, A. 1999. Purification and characterization of a humoral opsonin, with specificity for D-galactose, in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 123(1): 115~123
- Bazil, V., and Entlicher, G. 1999. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(3-4): 431~442
- Fock, W. L., Chen, C. L., Lam, T. J., and Sin, Y. M. 2000. Isolation and characterisation of a serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish & Shellfish Immunology*, 10(6): 489~504
- Hori, K., Matsubara, K., and Miyazawa, K. 2000. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474(2): 226~236
- Hosono, M., Sugawara, S., Ogawa, Y., Kohno, T., Takayanagi, M., and Nitta, K. 2005. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression of asialofetuin-binding C-type lectin from eggs of shishamo smelt (*Osmerus [Spirinchus] lanceolatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725(2): 160~173
- Jensen, L. E., Thiel, S., Petersen, T. E., and Jensenius, J. C. 1997. A rainbow trout lectin with multimeric structure. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem Mol. Biol.* 116(4): 385~390
- Leite, Y. F. M. M., Silva, L. M. C. M., Amorim, R. C. D. N., Freire, E. A., Jorge, D. M. D. M., Grangeiro, T. B., and Benevides, N. M. B. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724(1-2): 137~145
- Otta, Y., Amano, K., Nishiyama, K., Ando, A., Ogawa, S., and Nagata, Y. 2002. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. *Phytochemistry*, 60(2): 103~107
- Sato, Y., Murakami, M., Miyazawa, K., and Hori, K. 2000. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem Mol. Biol.* 125(2): 169~177
- Savan, R., Endo, M., and Sakai, M. 2004. Characterization of a new C-type lectin from common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Immunology*, 41(9): 891~899
- Stratton, L., Wu, S., Richards, R. C., and Ewart, K. V. 2004. Oligomerisation and carbohydrate binding in an Atlantic salmon serum C-type lectin consistent with non-self recognition. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(4): 315~323
- Suseelan, K. N., Mitra, R., Pandey, R., Sainis, K. B., and Krishna, T. G. 2002. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 407(2): 241~247
- Tasumi, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Suetake, H., Suzuki, Y., and Aida, K. 2002. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. of Biol. Chem.* 277(30): 27305~27311
- Tateno, H., Saneyoshi, A., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. 1998. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 273(30): 19190~19197