

Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina de la semilla del poró, *Erythrina costaricensis* (Leguminosae)

C.I. Nanne Echandi y F. Aragón Ortiz

Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica.

(Rec. 25-V-1990. Acep. 20-VIII-1990)

Abstract: A lectin was isolated from the crude extract prepared from the seeds of *E. costaricensis*. It was purified by gel filtration on Sephadex G-100 followed by DEAE-Sephadex A-50 chromatography. PAGE revealed only one protein band, while analytical isoelectric focusing revealed four bands. The protein is a dimer with Mr 58kda not united by disulfide bridges. It is a glycoprotein with 6.5 % of neutral sugars, stable at 70 °C and at a pH range between 2 to 10. The protein exhibited a non specific agglutination of human erythrocytes, nevertheless it differentiated between erythrocytes of animal origin, agglutinating those of rabbit and chicken and not those from horse, goat, sheep or rat. Galactose, N-acetil-D-galactosamine, lactose and EDTA are inhibitors while Ca⁺⁺ and Mn⁺⁺ acted as activators of the agglutination. No change in the blood pressure was observed when the lectin was intravenously injected in rats.

Key words: *E. costaricensis*, lectin. Agglutination, erythrocytes, blood pressure.

Desde el punto de vista bioquímico, las lectinas son proteínas simples o glicoproteínas formadas por más de una subunidad proteica, con capacidad para enlazar carbohidratos (Kocourek y Horejsí 1980). El término lectina deriva del latín "legere" que significa escoger o seleccionar (Boyd 1954). Desde hace algunos años se ha estudiado sistemáticamente el género *Erythrina* como fuente de lectinas. En Costa Rica se han descrito, en el Valle Central Intermontano, seis especies: *Erythrina fusca*, *E. berteriana*, *E. costaricensis*, *E. cristagalli*, *E. lanceolata* y *E. poeppigiana* (Flores y Rivera 1984).

Desde el año 1983 se inició en forma sistemática el estudio de las lectinas del género *Erythrina* en Costa Rica, lográndose determinar la presencia de lectinas en las semillas de *E. costaricensis*, *E. poeppigiana* y *E. globoliz*. En el presente trabajo se realizó el aislamiento, purificación y caracterización de la lectina de la semilla de *E. costaricensis*.

MATERIAL Y METODOS

Sephadex G-100, DEAE-Sephadex G-50, marcadores de punto isoeléctrico y marcadores

de peso molecular se obtuvieron de Pharmacia Uppsala (Suecia). Cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, EDTA disódico, duodecil sulfato de sodio, glicina, azul de bromofenol, ácido barbitúrico, orcinol, ciclohexanona, galactosa, manosa, azul de dextran se obtuvieron de SIGMA, USA. Los anfólitos (Ampholine) fueron de LKB (Suecia). Todos los reactivos utilizados fueron calidad USP.

Se recolectaron semillas maduras de *E. costaricensis* en Santa Ana, Atenas y Esparza, en la época seca y se preparó con ellas un extracto crudo. 80 g de semillas secas se dejaron en agua destilada por 24 horas a 5 °C y se licuaron en 500 mL de solución salina de cloruro de sodio al 0.9 por ciento. El homogenizado se filtró y se centrifugó a 10,000 rpm durante 4 horas hasta tomar un aspecto transparente. Para precipitar las proteínas del filtrado se mezcló éste con cuatro volúmenes de acetona. El precipitado se recogió después de centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm y luego se dejó a temperatura ambiente 12 horas con el fin de eliminar la acetona. Se disolvió el precipitado libre de acetona en tres volúmenes de solución salina de NaCl al 0.9 por ciento y se centrifugó 30 minutos a

10,000 rpm. Se liofilizó el sobrenadante y se colocó éste a -20°C para su uso posterior.

La lectina se purificó de acuerdo al siguiente procedimiento: se disolvieron 100 mg del extracto crudo liofilizado en 7 mL de solución tampón (0.10 M TRIS + 0.1 M NaCl, pH 7.40) se centrifugó a 10,000 rpm y el sobrenadante se aplicó a una columna (2.50 x 100 cm) empacada con Sephadex G-100, equilibrada con la misma solución. Se aplicó un flujo de 25 mL por hora y se recogieron fracciones de 2.50 mL. A cada fracción se le determinó la densidad óptica a 280 nm y se le midió la actividad hemaglutinante. Aquellas fracciones que mostraron actividad hemaglutinante se concentraron y se equilibraron con una solución de 0.01 M TRIS + 0.05 M CaCl_2 , pH 7.30 por ultrafiltración, utilizando una membrana AMICON U2. La solución proteica concentrada se aplicó a una columna (2.70 x 36 cm), empacada con DEAE-Sephadex A-50, previamente equilibrada con la solución inicial. El material con actividad hemaglutinante, no adherido a la matriz, fue eluido con la solución tampón inicial. Cuando la densidad óptica a 280 nm fue menor de 0.06 unidades, se aplicó un gradiente lineal hacia una solución de 0.50 M NaCl en 0.01 M TRIS + 0.05 M CaCl_2 , pH 7.30 eluyendo la proteína contaminante en un solo pico.

La electroforesis en gel de acrilamida se efectuó en una solución tampón de 0.025 M TRIS + 0.192 M glicina, pH 7.30 por 90 minutos en un aparato CANALCO (Laemmli 1970). La electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio se efectuó en una solución tampón de 0.025 M TRIS, 0.192 M glicina y 0.10 por ciento de SDS, pH 8.30 por 258 minutos (Laemmli 1970). La determinación del punto isoeléctrico por electroenfoque preparativo se efectuó a 5°C en una columna LKB de 440 mL con una concentración final de 1 % de los anfolitos acarreadores con un ámbito de pH de 4 a 6 (Stewart-Tull y Arbuthnott 1971). El electroenfoque analítico se realizó en un gel de agarosa IEF con un gradiente de pH con anfolitos en dos ámbitos de pH (3.5-10) y (4-6) durante 95 minutos (Pharmacia Fine Chemicals, 1979-1980). El contenido de hexosas unidas a la proteína se determinó de acuerdo al método de Winzler (1961) y el de ácido siálico por el de Warren (1959). La determinación del peso molecular por filtración por gel se realizó según Whitaker (1963).

Los eritrocitos de conejo, camero, cabra, rata y pollo fueron suministrados por el Instituto Clodomiro Picado. Los eritrocitos humanos por la Sección de Laboratorio Clínico de la Oficina de Salud, Universidad de Costa Rica. La titulación de la aglutinación utilizando eritrocitos humanos y de origen animal se efectuó según el método de Cumsky y Zusman (1979), en un equipo de microtitulación de Cooke Laboratory Products. Se estudió el efecto de los iones divalentes sobre la aglutinación (CaCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , a la concentración de 0.1 M), así como el efecto del EDTA (0.1 M). La titulación de la inhibición de la aglutinación se realizó con 50 μL de solución de lectina (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), haciendo diluciones seriadas al doble con 50 μL (0.1 M) de carbohidrato. Después de una hora se agregó con agitación 25 μL de eritrocitos humanos al 6 por ciento. Al cabo de una hora se realizaron las correspondientes lecturas de aglutinación. El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad hemaglutinante de la lectina se determinó por el método de Broekaert et al. (1984). Se midió la presión arterial carótida de ratas Sprague-Dowley, inoculadas con 3.30 mg/kg de lectina, en un polígrafo fisiológico Hewlett-Packard, modelo 7754 A, equipado con un amplificador de presión modelo 8805 C.

RESULTADOS

El fraccionamiento del extracto crudo en Sephadex G-100 demostró la presencia de cuatro fracciones, de las cuales sólo la fracción II tuvo actividad hemaglutinante (Fig. 1). La purificación por intercambio iónico, en una columna empacada con DEAE-Sephadex A-50, se muestra en la Fig. 2. El material hemaglutinante fue eluido con la solución tampón inicial, quedando la proteína contaminante unida a la resina intercambiadora, la cual fue eluida posteriormente con el gradiente salino. En la Fig. 3 aparece el isoelectroenfoque preparativo del material hemaglutinante obtenido por filtración del gel (Fig. 1). La lectina presentó un pI en el ámbito de pH de 5.86 a 6.00. Los geles correspondientes a las electroforesis en acrilamida del extracto crudo y de la lectina purificada se presentan en la Fig. 4. En el extracto crudo se separaron 10 bandas (gel a). Una única banda correspondiente a la lectina purificada, se observa en el gel b. Mediante filtración por gel se obtuvo una masa relativa de 58 kDa. Por

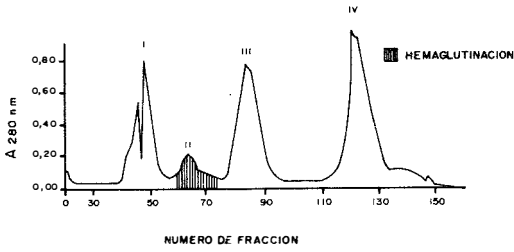


Fig. 1: Filtración por gel del extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis*. El material con actividad hemaglutinante se localizó en el pico II (fracciones 59-73)

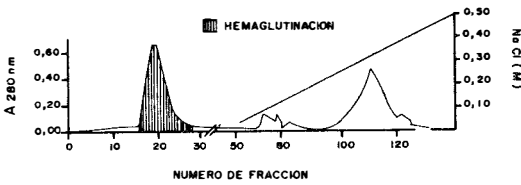


Fig. 2: Cromatografía por intercambio iónico en DEAE-Sephadex A- 50 de la fracción de lectina repurificada por filtración por gel. La línea recta indica el gradiente salino hacia 0.50 M NaCl. El material con actividad hemaglutinante se eluyó con la solución tampón inicial entre las fracciones 15 y 25.

electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS y B-mercaptoetanol se obtuvo una masa relativa de 29.5 kDa (Fig. 5). En el isoelectroenfoque analítico se detectaron cuatro bandas proteicas con puntos isoelectríficos de 5.70, 5.90, 6.13 y 6.50 (Figs. 6 y 7). El porcentaje de hexosas expresadas como manosa-galactosa en la molécula de lectina es de 6.5 por ciento, no se detectó presencia de ácido siálico. Se observó que tanto el $CaCl_2$ como el $MgCl_2$ son activadores que aumentan con la misma intensidad la capacidad hemaglutinante, mientras que el EDTA ejerce un efecto inhibitor. En la Fig. 8a. se aprecia la estabilidad de la lectina calentada a diferentes temperaturas por 5 minutos. Esta es estable entre 30 °C y 70 °C, perdiendo completamente su actividad a los 80 °C. La Fig. 8b. muestra la estabilidad de la lectina a diferentes valores de pH. La actividad se mantuvo igual en el ámbito de pH de 2 a 10, perdiéndose a pH 11.

La lectina aglutina inespecíficamente todos los grupos sanguíneos del sistema ABO Rh_0 (D)+ y Rh_0 (D)-. Respecto a los eritrocitos de origen animal, induce la aglutinación de los eritrocitos de conejo y pollo pero no así los de rata, perro, caballo ni camero. En el Cuadro 1 se muestra la titulación de la actividad aglutinante

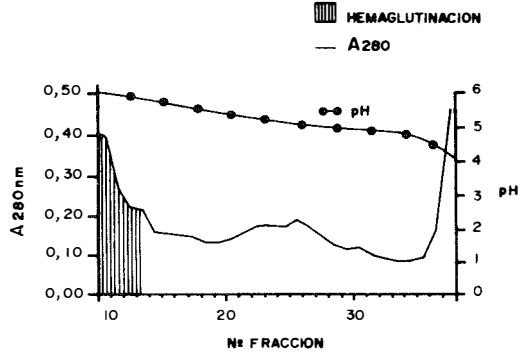
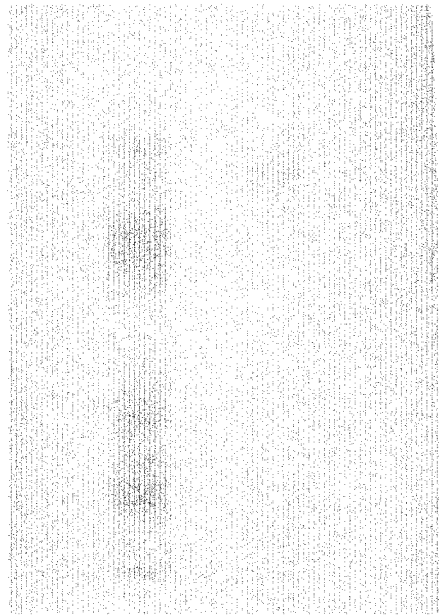


Fig. 3: Isoelectroenfoque preparativo de la fracción hemaglutinante obtenida por filtración por gel (Fig. 1, fracciones 59-73). La actividad hemaglutinante se localizó en el ámbito del gradiente de pH comprendido entre 5.86-6.00.



a + b

Fig. 4: Electroforesis en gel de acrilamida, pH 8.4. a) extracto crudo b) lectina.

de la lectina sobre los grupos sanguíneos humanos. En el Cuadro 2 se muestra el efecto inhibitor de diversos carbohidratos y de alcoholes cíclicos sobre la aglutinación de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO. Ratas Sprague-Dowley inoculadas con la lectina no mostraron cambios significativos en su presión arterial.

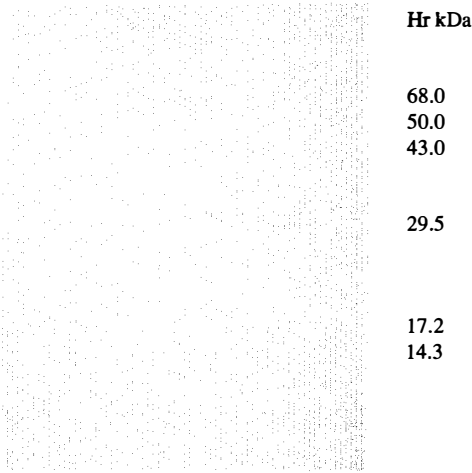


Fig. 5: Electroforesis en gel de acrilamida de la lectina pura en presencia de: a) SDS, b) ED+A c) B mercaptoetanol.

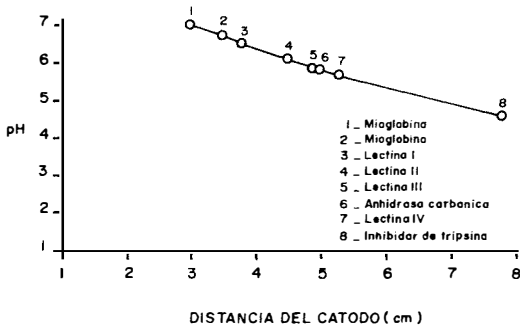


Fig. 6: Isoelectroenfoque analítico de la lectina de *E. costaricensis*. La lectina se localizó en los valores del punto isoelectrónico correspondiente a pH 5.70, 5.90, 6.13 y 6.50.

CUADRO 1

Titulación de la actividad aglutinante de la lectina de *E. costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh₀ (D) positivo y negativo

Título de la lectina	Grupo Sanguíneo			
	A	B	AB	O
1:2	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+
1:8	+	+	+	+
1:16	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-

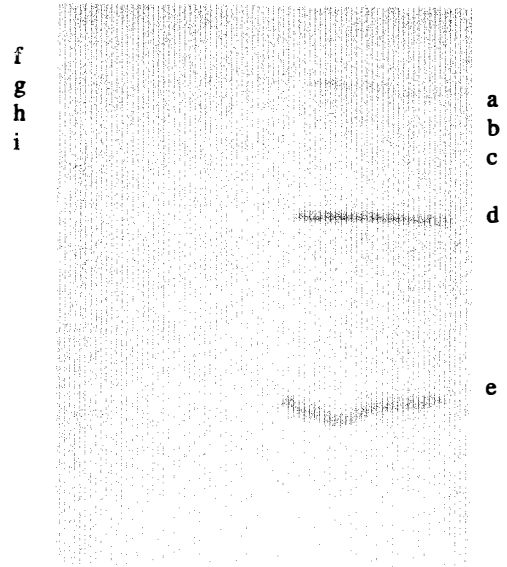


Fig. 7: Determinación del punto isoelectrónico por isoelectroenfoque analítico.

- a) Tripsinógeno (9.30)
- b) Mioglobina (7.16)
- c) Mioglobina (6.76)
- d) Anhidrasa carbónica (5.85)
- e) Inhibidor de tripsina (4.55)
- f) Lectina 1 (6.50)
- g) Lectina 2 (6.13)
- h) Lectina 3 (5.90)
- i) Lectina 4 (5.70)

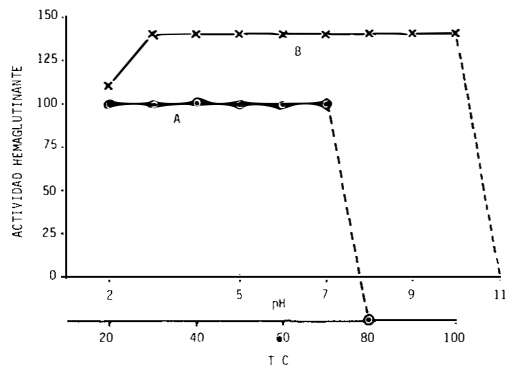


Fig. 8: Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) sobre la actividad hemaglutinante de la lectina de *E. costaricensis*.

DISCUSION

La lectina obtenida de la semilla de *E. costaricensis*, está constituida por una única cadena polipeptídica, con una masa relativa aproximada de 29.5 kDa a juzgar por la electroforesis en gel de acrilamida en condiciones reductoras con B-mercaptoetanol, en presencia de SDS y EDTA. Por el método de filtración por gel se

CUADRO 2

Inhibición de la actividad aglutinante de la lectina de E. costaricensis sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh₀(D) positivos y negativos

Carbohidrato o alcohol cíclico (0.1M)	Grupo Sanguíneo							
	A		B		Rh ₀ (D) +		Rh ₀ (D)-	
	A	B	AB	O	A	B	AB	O
Fucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil manosamina	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+

obtuvo una masa relativa de 58 kDa. Se puede inferir que la lectina es fundamentalmente un dímero, formado por dos subunidades aproximadamente del mismo peso molecular y no unidas entre sí por enlaces disulfuro. La unión entre las cadenas polipeptídicas puede estabilizarse a través de iones divalentes como el Ca⁺⁺ y el Mn⁺⁺. Estos resultados son similares a los reportados por Bhattacharyya *et al.* (1981, 1986) para las lectinas de *E. arborescens*, *E. lithosperma* y *E. suberosa*, por Pérez (1984) para la lectina de *E. edulis* y por Lis *et al.* (1985) para las lectinas de nueve especies de *Erythrina*, los cuales demostraron que las lectinas estudiadas eran dímeros con subunidades similares de masas moleculares relativas alrededor de 30 kDa, unidas en forma no covalente.

La técnica de isoelectroenfoque analítico, permitió demostrar la presencia de cuatro posibles isolectinas con puntos isoelectrónicos de 5.70, 5.90, 6.13, y 6.50. Otros autores han encontrado varias isolectinas. Bhattacharyya *et al.* (1981) detectaron tres componentes en la determinación del punto isoelectrónico de la lectina de *E. indica*. Pérez (1984) detectó dos isolectinas en la semilla de *E. edulis* con puntos isoelectrónicos de 5.40 y 5.50. La presencia de isolectinas en las semillas de *E. costaricensis*, permite pensar que este fenómeno se debe a que existe una glicosilación variable de las moléculas de proteína. Puede ser que estas isolectinas presenten diferencias en la composición o secuencia de aminoácidos o en la estructura cuaternaria de las moléculas. Se determinó que la lectina es una glicoproteína con un 6.5 por ciento de

carbohidrato. Este resultado concuerda con el análisis de las diferentes lectinas de *Erythrina* estudiadas: Pérez (1984) encontró una concentración de 7.8 por ciento de azúcares neutros, en la lectina de *E. edulis*. Lis, Joubert y Sharon (1985) en un estudio con nueve especies de *Erythrina*, encontraron que todas las lectinas aisladas eran glicoproteínas con un contenido entre 3 y 10 por ciento de carbohidratos. Bhattacharyya *et al.* (1986) trabajando con las lectinas de *E. indica*, *E. arborescens* y *E. lithosperma*, encontraron concentraciones de azúcar de 11.2, 6.7 y 5.7 respectivamente. Peña *et al.* (1988) determinaron un 10 por ciento de azúcares neutros en la molécula de *E. rubrinervis*.

El método de tiobarbitúrico de Warren no demostró la presencia de ácido N-acetilneuramínico. Este resultado concuerda con el hecho de que los ácidos siálicos detectados en la naturaleza, no se han encontrado en proteínas de origen vegetal.

La actividad hemaglutinante de la lectina de *E. costaricensis* es estimulada por iones divalentes del calcio y manganeso, y es inhibida por EDTA. Esta dependencia por cationes divalentes ha sido detectada en otras lectinas. Borrebaeck *et al.* (1981) encontraron que la lectina de *Dolichos biflorus*, requiere en forma absoluta de iones divalentes para unirse a la N-acetil-galactosamina. Alexander *et al.* (1983) encontraron que la lectina discoidina I de *Dictyostelium discoideum*, requiere para su actividad aglutinante de la presencia de iones divalentes. La lectina es muy estable a altas

temperaturas, perdiendo su actividad alrededor de los 80 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bhattacharyya *et al.* (1981) con la lectina de *E. indica*, la cual perdía gradualmente su actividad después de varios días a temperaturas superiores a los 50 °C, y la perdía completamente a los 80 °C. Se encontró que la lectina es estable en un ámbito de pH de 2 a 10, perdiendo su actividad por encima de ese valor. Roberson y Strenght (1983) y Cammue *et al.* (1985) reportaron que la lectina de la semilla de *Vigna unguiculata* y la de los tubérculos de *Eranthis hyemalis* mantienen su actividad hemaglutinante en el ámbito de pH comprendido entre 2-12 y 3-11 respectivamente.

La lectina aglutina inespecíficamente los eritrocitos humanos. La interacción lectina-proteínas eritrocitos no parece ser con el péptido Rho, pues la potencia aglutinante (1:8) es igual para A, B, AB y también par el O. No obstante, si se logró demostrar que la lectina es capaz de diferenciar entre algunos eritrocitos de origen animal. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos por Allen y Brillantine (1969), los cuales demostraron inespecificidad en la aglutinación de eritrocitos humanos en 711 variedades de plantas estudiadas. Iglesias, Lis y Sharon (1981) y Pérez (1989), demostraron que la lectina de *E. cristagalli* y *E. edulis* exhiben distinta especificidad respecto a la aglutinación de eritrocitos de origen animal.

El efecto inhibitorio mediado por los distintos carbohidratos y alcoholes estudiados mostraron que la galactosa, N-acetil-galactosamina y la lactosa inhiben la aglutinación de los grupos sanguíneos humanos por la lectina. Estos resultados nos permiten clasificar la lectina de la *E. costaricensis* como de tipo galactosafílica, en forma similar a la demostrada para la lectina de las semillas de *E. corallodendron* (Gilboa-Garber y Mizrahi 1981).

La lectina de *E. costaricensis* no demostró efecto fisiológico en la presión sanguínea en ratas al inyectárseles 3.30 mg/kg en contraposición con los resultados de Aragón *et al.* (1989), los cuales reportan hipotensión sostenida y muerte de ratas inoculadas intravenosamente con la lectina del veneno de *Lachesis muta*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Pedro León Azofeifa y Ana Sittenfeld Appel del Centro de Biología Celular y Molecular, a Jorge Rodríguez

Barquero del Dpto. de Bioquímica y a José Rafael Brenes Brenes del Dpto. de Fisiología, Escuela de Medicina, su valiosa ayuda. F. Aragón Ortiz es miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICIT.

RESUMEN

La lectina de la semilla de *E. costaricensis* se purificó a partir del extracto crudo mediante filtración por Sephadex G-100 y cromatografía por DEAE-Sephadex A-50. La electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) demostró la presencia de una única banda proteica. El isoelectroenfoque analítico demostró la presencia de cuatro isolectinas. La masa relativa obtenida por filtración en Sephadex fue de 58 kDa y por PAGE en condiciones reductoras de 29.5 kDa. La proteína es fundamentalmente un dímero no unido por enlaces disulfuro, con un contenido de 6.5 % de azúcares neutros. Es estable hasta 70 °C y en un ámbito de pH de 2 a 10. Aglutina indistintamente los eritrocitos humanos y diferencia entre eritrocitos de origen animal, aglutinando los de conejo y pollo y no los de caballo, cabra, carnero ni rata. La galactosa N-acetil-galactosamina, lactosa y el EDTA inhiben su acción aglutinante, los iones calcio y manganeso son activadores. No se encontró efecto vasopresor al inyectar la lectina intravenosamente en ratas.

REFERENCIAS

- Alexander, S., A. M. Cibulsky & R. A. Lerner. 1983. Ion dependence of the discoidin I lectin from *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* 2: 209-212.
- Allen, N. K. & L. Brillantine. 1969. A survey of hemagglutinins in various seeds. *J. Immunol.* 102: 1295-1299.
- Aragón, F., J.R. Brenes & F. Gubensek. 1989. Characterization of a Lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* Snake venom. *Rev. Biol. Trop.* 37: 79-84.
- Bhattacharyya, L., P.K. Das & A. Sen. 1981. Purification and properties of D-galactose binding lectins from some *Erythrina* species. Comparison of properties of lectins from *E. indica*, *E. arborecens*, *E. suberosa*, and *E. lithosperma*. *Arch. Biochem. Biophys.* 211: 459-470.
- Bhattacharyya, L., A. Ghosh & A. Sen. 1976. A comparative study on lectins from four *Erythrina* species. *Phytochemistry* 25: 2117-2122.

- Borrebaeck, C. A. K., B. Lonnerdal & M. E. Etzler. 1981. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry* 20: 4119-4122.
- Boyd, W. C. & E.E. Shapleigh. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119: 419.
- Broeckaert, W. F., M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters & W. H. Peumans. 1984. A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. *Biochem. J.* 221: 163-169.
- Cammue, B.P., B. Peeters & W. J. Peumans. 1985. Isolation and partial characterization of an N-acetylgalactosamine specific lectin from winter aconite (*Eranthis hyemalis*) root tubers. *Biochem. J.* 227: 949-955.
- Cumsky, M. & D. R. Zusman. 1979. Myxo bacterial hemagglutinin. A development specific lectin of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5506-5509.
- Flores, E. M., & D. I. Rivera. 1984. Clave para semillas y plántulas de las especies del género *Erythrina* en el Valle Central, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 32: 241-252.
- Gilboa-Garber, N. & L. Mizradi. 1981. A new mitogenic D-galactosaphilic lectin isolated from seeds of the coral tree *Erythrina corallodendron*. Comparison with *Glycine max* (Soybean) and *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Can. J. Biochem.* 59: 315-320.
- Iglesias, J. L., H. Lis & N. Sharon. 1982. Purification and properties of D-galactose/ N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli*. *Eur. J. Biochem.* 123: 247-253.
- Kocourek, J. & V. Horejsí. 1980. Defining a lectin. *Nature* 290:188.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lis, H., F. J. Joubert & N. Sharon. 1985. Isolation and properties of N-acetylgalactosamine- specific lectins from nine *Erythrina* species. *Phytochemistry* 24: 2803-2809.
- Peña, C., F. Villarraga & G. Pérez. 1988. A lectin from the seeds of *Erythrina rubrinervia*. *Phytochemistry* 27: 1045-1048.
- Roberson, B.J. & D.R. Strength. 1983. Characterization of a lectin from cowpeas. *Prep. Biochem.* 13: 45-56.
- Stewart-Tull, D. E. S. & J. P. Arbutnott. 1971. The separation of Guinea-pig serum proteins by a preparative isoelectric focusing method. *LKB Instrument J.* 18: 17-21.
- Warren, L. A. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 34: 1971-1975.
- Whitaker, J. K. 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.* 35: 1950-1958.
- Winzler, R. J. 1961. Determination of serum glycoproteins, p. 290 *In* D. Glick (ed.). *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 2. Interscience, Nueva York.