

Comparison and Characterization of two different
hemolysins from *Aeromonas hydrophila*



Sudarat Chaichomlert

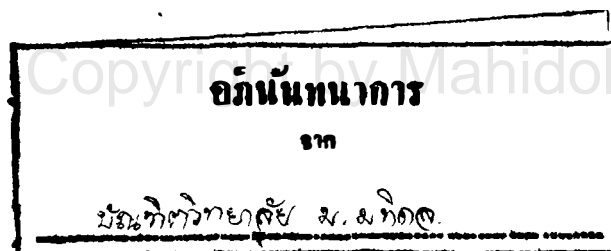
๒๗ ส.ค. ๒๕๓๒

A thesis submitted in partial fulfillment of
The requirements for the degree of
Master of Science
(Biochemistry)

Faculty of Graduate studies

Mahidol University

1988



12008

ปลาบู่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 53,000 ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของฮีโมโกลินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อนจะถูกกระตุ้นโดย reduced glutathione, DTT และ mercaptoethanol แต่จะถูกยับยั้งโดย oxidized glutathione และ iodoacetamide ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของฮีโมโกลินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาบู่ จะถูกยับยั้งโดยสารเคมีทั้งหมดที่กล่าวมา ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของฮีโมโกลินทั้งสองชนิดจะไม่ถูกทำลายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า แต่จะถูกทำลายโดยความร้อนและสารเคมีบางชนิด ฮีโมโกลินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาบู่มีความคงทนต่อความร้อน การเก็บรักษาและ เอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนมากกว่าฮีโมโกลินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อน นอกจากนี้สารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน เช่น phosphatidyl choline และ phosphatidyl ethanolamine ยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของฮีโมโกลินที่แยกจากปลาช่อน แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของฮีโมโกลินที่แยกจากปลาบู่

จากการศึกษาคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยาของฮีโมโกลินทั้งสองชนิด โดยใช้แอนติบอดีที่เตรียมจากฮีโมโกลินของแบคทีเรียแยกจากปลาบู่ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะและไม่ทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลินที่แยกได้จากปลาช่อนทั้งโดยการทดสอบโดย immunodiffusion และ western blot immunoperoxidase.

จากการศึกษาครั้งนี้อาจสรุปได้ว่าฮีโมโกลินที่สร้างจากเชื้อแอโรโมแนสไฮโดรฟิลล่า ที่แยกได้จากปลาช่อนและปลาบู่แตกต่างกันทั้งคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและอิมมูโนวิทยา

Pure hemolysin of GH-1 (53K) was obtained by further purification on SDS-PAGE. The toxin was free from other protein contamination and immunoreactive to homologous anti-hemolysin after transferring onto a nitrocellulose paper by Western blotting. In comparison, the AH-1 hemolysin (46 K) was always contaminated with the other protein which could not be completely removed by similar procedure.

GH-1 hemolysin was more stable than AH-1 hemolysin on both heat treatment and storage. Hemolytic activity of GH-1 could be observed *in situ* following nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Oxidizing and alkylating agents of sulhydryl group partially inhibited the hemolytic activity of both GH-1 and AH-1 hemolysins . Surprisingly, the two hemolysins were affected oppositely by sulhydryl reducing compounds. GH-1 activity was significantly inhibited whereas AH-1 activity was markedly enhanced by 2-mercaptoethanol, dithiothreitol and reduced glutathione .

Rabbit antiserum obtained from purified GH-1 hemolysin immunization was specific. Immunoperoxidase staining following SDS-PAGE and transferring onto nitrocellulose by Western blotting was positive to only GH-1 hemolysin but not to AH-1 hemolysin .The results clearly indicated immunochemical difference between the two hemolysins. In addition, GH-1 activity was completely insensitive to cell membrane components, phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine, but AH-1 activity was markedly inhibited by the two components suggesting

possible different mechanism of the hemolysins in facilitating red cell membrane lysis.

The present studies indicated that hemolysins secreted by *A. hydrophila* from different sources were not identical.

