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

Sudarat Chaichomlert

17 มี.ค. 2532

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

Faculty of Graduate studies
Mahidol University
1988

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

Copyright by Mahidol University

12068

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสารพิษฮีโมไลซินที่สร้างจากเชื้อ แอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า
ผู้วิจัย	สุดารัตน์ ฉายโฉมเลิศ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	นายธนิต คูสำราญ
	นายวิชัย บุญแสง
	นายกวี รัตนบรรณางกูร
วันที่สำเร็จการศึกษา	26 พฤษภาคม 2531

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารพิษฮีโมไลซินจากเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า ที่แยกจากปลาช่อนและปลาบู่ทราย โดยการสกัดสารฮีโมไลซินที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยวิธีการตกตะกอนด้วยกรดซัลฟูริคที่ pH 4 หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารนั้นเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ฮีโมไลซินที่ได้จากการตกตะกอน ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีโดยใช้ QAE-Sephadex A-50 column พบว่าปริมาณฮีโมไลซินของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อนและปลาบู่ทรายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วคงเหลืออยู่ประมาณ 7.1% และ 18% ตามลำดับ ฮีโมไลซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วนั้น ยังคงมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่มากเมื่อนำมาทดสอบโดย SDS-PAGE แต่อย่างไรก็ตามความบริสุทธิ์ของสารพิษทั้งสองชนิด ก็มากเพียงพอที่จะนำไปศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ จากการศึกษาพบว่าฮีโมไลซินทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างกัน เช่น ฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อนมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 46,000 ส่วนฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจาก

Copyright by Mahidol University

ปลาบู่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 53,000 ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อนจะถูกกระตุ้นโดย reduced glutathione, DTT และ mercaptoethanol แต่จะถูกยับยั้งโดย oxidized glutathione และ iodoacetamide ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดของฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาบู่ จะถูกยับยั้งโดยสารเคมีทั้งหมดที่กล่าวมา ความสามารถในการทำลายเม็ดเลือดแดงของฮีโมไลซินทั้งสองชนิดจะไม่ถูกทำลายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า แต่จะถูกทำลายโดยความร้อนและสารเคมีบางชนิด ฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาบู่มีความคงทนต่อความร้อน การเก็บรักษาและเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนมากกว่าฮีโมไลซินจากแบคทีเรียที่แยกจากปลาช่อน นอกจากนี้สารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน เช่น phosphatidyl choline และ phosphatidyl ethanolamine ยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของฮีโมไลซินที่แยกจากปลาช่อน แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของฮีโมไลซินที่แยกจากปลาบู่

จากการศึกษาคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยาของฮีโมไลซินทั้งสองชนิด โดยใช้แอนติบอดี้ที่เตรียมจากฮีโมไลซินของแบคทีเรียแยกจากปลาบู่ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า แอนติบอดี้ที่ได้มีความจำเพาะและไม่ทำปฏิกริยากับฮีโมไลซินที่แยกได้จากปลาช่อนทั้งโดยการทดสอบโดย immunodiffusion และ Western blot immunoperoxidase.

จากการศึกษาครั้งนี้อาจสรุปได้ว่าฮีโมไลซินที่สร้างจากเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า ที่แยกได้จากปลาช่อนและปลาบู่แตกต่างกันทั้งคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและอิมมูนวิทยา

Copyright by Mahidol University

Thesis Tittle Comparison and characterization of two different hemolysins from *Aeromonas hydrophila*

Name Sudarat Chaichomlert

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee Thanit kusumran

Vichai boonsaeng

Kavi Ratanabannangkoon

Date of Graduation May 26, 1988

Abstract

Biochemical properties of purified hemolysins secreted by two different cultures of *Aeromonas hydrophila* were compared. The bacterial cultures have been isolated from infected fresh-water fishes, snakehead (*Ophicephalus striatus*, AH-1) and sand goby (*Oxyeleotris mamoratus*, GH-1). The two hemolysins have previously been demonstrated by other investigators to be unidentical. The toxins were purified in the present studies from stationary phase cultures grown in Luria-bertani medium at 37°C. Preliminary purification involved sulfuric acid precipitation at pH 4.0 followed by QAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography. 7.1% and 18% of the total hemolytic activities were recovered at the final step of purification from AH-1 and GH-1 isolates, respectively. Both preparations were found to consist of a single major protein at 46 K and 53K, respectively with other minor protein bands following SDS-PAGE analysis.

Copyright by Mahidol University

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

Copyright by Mahidol University

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.

Copyright by Mahidol University