

Vibrio damsela 溶血素之純化與活性

王成德¹·王來¹

摘 要

將*Vibrio damsela*培養於兔血培養基48小時後, 觀測到在菌落週圍有透明的溶血區域(Clear zone), 顯示此菌會分泌出溶血素。此菌以Heart infusion broth (HIB)在30°C培養10小時後即進入穩定期(Stationary phase), 此時溶血素的釋放量也達到最大值。純化溶血素的步驟包括硫酸銨沉澱(最終飽和度為60%), 陰離子交換樹脂管柱(Q fast), 膠體管柱層析(Gel filtration) S-100-HR, 最後在10% SDS-PAGE 分析下, 可得分子量約為54kDa的溶血素。

將此部分純化的溶血素分別針對人血、兔血作溶血試驗時, 可發現兔血比人血易受溶血素破壞, 二者被破壞程度相差5-7倍, 顯示不同動物的紅血球對*V. damsela*溶血素的耐受性不同。此溶血素會造成人類血小板的乳酸去氫酵素(Lactate dehydrogenase, LDH)及酸性水解酵素(Acid hydrolase, AH)的漏出; 在掃描式電子顯微鏡(Scanning electron microscope, SEM)觀察下可看到血小板細胞膜被破壞, 此結果暗示*V. damsela*溶血素可能是一種分解細胞膜的酵素。

關鍵詞: 溶血素、細胞膜、血小板。

前 言

台灣水產養殖業中弧菌對海水魚, 甲殼類及蝦類的感染是一大隱憂, 不僅造成嚴重的養殖成本損失, 還可能導致食物中毒、傷口感染等問題。*Vibrio damsela*已被證實為台灣養殖蝦類病原菌之一 (Song et al., 1993), 當蝦類被感染後會出現生長遲緩、厭食、粗殼、肉質白化等病徵。從病理切片上可觀測到肝胰臟出現黑色潰爛斑點。一旦蝦類被此菌感染, 極易發生死亡。

*V. damsela*為格蘭氏陰性菌, 有報告指出此菌會產生細胞分解性外毒素(Cytolytic exotoxin) (Krger et al., 1981)。此類外毒素的特徵是它會破壞正常細胞的細胞膜, 使細胞破裂分解。也有人把這種由細菌產生能破壞細胞膜的毒素稱作溶血素。

關於溶血素與致病性關連上Kantor et al. (1972)發現*S. aureus*所分泌的溶血素與該菌的病原性有相當密切的關連, Cavalieri. et al. (1984)也發現*E. coli*的Alpha型溶血

¹國立清華大學生命科學系, 新竹, 台灣。

素也與致病性有關，另外*Cl. perfringens*的Alpha型毒素也有溶血特性。由此可知溶血素在細菌致病性上扮演著重要的角色。

溶血素破壞細胞膜的機制就目前已知的可歸納成下列三種：(1)毒素水解細胞膜上的磷脂質而使細胞分解(Arbuttmott et al., 1982)；如*Cl. perfringens*之Alpha型毒素為一種Phospholipase C，*S. aureus*之Beta型毒素為一種Sphingomyelinase；(2)毒素會與膽固醇結合，並將膽固醇從細胞膜抽離出來而破壞細胞膜的結構，造成細胞分解。這類毒素又稱作Thiol-Activated Cytolysin，如*B. cereus*之Cereolysin、*Streptococcus pyrogen*之Streptolysin *Cl. perfringens*之Theta型毒素(Smith et al., 1975)；(3)毒素會插在細胞膜上並在膜上形成一洞孔使得細胞破裂，這種作用方式與蜂毒中的Mellitin相似，如*S. aureus*之Delta型毒素(Kantor et al., 1972)。

為要達到防治*V. damsela*對蝦類養殖所造成的感染，需要先從毒素的分析純化著手，再擴展延伸到遺傳基因層次，以便能製造合適之診斷試劑。本報告乃由*V. damsela*培養液分離出溶血素，並以其對血小板形態之破壞推測此溶血素之作用型式(Mode of interaction)。

材料與方法

一、材料

菌種*Vibrio damsela*，CCRC 15428，購自食品工業研究菌種保存中心。培養細菌所用之培養基Heart infusion (HI)，Tryptic soy broth購自Difco。純化蛋白所需之Column和Gel購自Pharmacia (Uppsala, Sweden)。化學藥品，購自E. Merck chemicals (Darmstadt, German)。

二、方法

(一) 菌種之培養

將保存-20°C的*Vibrio damsela*先置於4°C回溫30分鐘之後將菌轉接於Tryptic Soybean Agar plate置於30°C予以活化。24小時後挑出單一菌落(Single colony)再轉接至5ml Heart infusion (HI) broth 30°C培養12-14小時其於600nm之吸光值(Optical density, O.D.)至0.6，再接種至1 L HI broth，的然後置於培養槽(Hotech 706)在30°C振盪(轉速200 RPM)培養16小時。

其生長曲線之測定乃以上述方法培養之*Vibrio damsela*，每隔1小時取出1ml測量O.D. 600nm之吸光值。量測超過8小時後改為每2小時測定一次至16小時測量最後一次。

(二) 以紅血球測定溶血活性

自健康成年人與紐西蘭大白兔抽出血液，立刻加入1/9倍體積的抗凝血劑(0.11mM Na-Citrate)，在室溫下離心(600x g) 15分鐘得紅血球。將其以5倍體積150 mM NaCl沖洗離心三次後備用。取0.5ml紅血球加入49.5ml 150 mM NaCl溶液將之稀釋成1% RBC。取定量細菌外毒素加入1ml 1% RBC懸浮液，溫培於37°C，在不同時間內以Eppendorf離心機(Sigma, model 202 CM)離心一分鐘，並取出上清液測定血紅素在波長540nm的吸光值(Backman, DU-62 Spectrophotometer)以決定是否有溶血現

象。溶血單位(Hemolytic unit; H.U.)之定義為使紅血球懸浮液在37°C反應120分鐘達50%溶血程度的酵素量(Honda et al., 1988)。

(三) 細菌溶血素之純化

純化方法先用硫酸銨鹽(Ammonium sulphate)沉澱，再經陰離子樹脂交換管柱層析Q-Sepharose Fast Flow，膠體過濾管柱層析S-100 HR取得溶血素。實驗步驟簡述如下。蛋白質定量乃依Lowry et al. (1951)的方法，Standard取Bovine Serum Albumin。

取6L培養16小時的菌液，離去菌體(Beckman J2-21, 4°C, 10000xg, 20分鐘)取上清液於4°C冰浴，緩慢加入硫酸銨鹽至60%的飽和狀態，此時溶液變濁，表示有蛋白沉澱出來。於4°C靜置12-16小時，將蛋白離心取出(Beckman J2-21, 4°C, 10000Xg 30分鐘)溶於100ml 20mM Phosphate buffer, pH 7.4, 可得蛋白540mg。以Amicon YM-10 membrane將100ml之蛋白液過濾濃縮至10ml再加入40ml之緩衝液，再過濾濃縮至10ml，如此重覆7次。上述操作須於4°C下進行。

將所得具溶血活性之蛋白57.82mg通入Q-Sepharose Fast Flow Column (16mm x 20 cm)以不同鹽濃度0-0.5M NaCl gradient沖洗，50mM Tris-HCl (pH 7.0)。流速為1.5 ml/min以Fraction collector收集5.25 ml/tube/3.5 min)。

再將所得具溶血活性之蛋白8.2mg冷凍乾燥後溶於2ml ammonium bicarbonate buffer，通入膠體過濾管柱S-100-HR，以50mM pH 7.0 ammonium bicarbonate沖洗，流速為0.6ml/min以Fraction collector收集(3.25ml/tube/30 min)。

SDS-PAGE電泳法:依Laemmli (1970)所載。

血小板之溶解測定:包括測定酵素LDH及AH之漏出SEM觀測其形態變化。

膠濾型血小板(Gel filtration platelet; GFP)之製備:其步驟是參考Lages等人(1981)之方法。以無菌採血套抽取健康捐血人之新鮮血液於預裝3.2% Sodiumcitrate之塑膠離心瓶(抗凝血劑:新鮮人血 = 1/9, v/v), 並輕搖使抗凝血劑與血液充份混合。在低速離心機中以1100rpm (250xg)於室溫離心15分鐘。待離心機自然靜止後，取出上層含血小板的血漿部分(Platelet-rich plasma; PRP)，每45ml血液約可取得20ml PRP。將20ml PRP輕輕置於以緩衝液飽和過的Sepharose 2B管柱頂端，開啓流通閥(流速為每3秒一滴)，至PRP全流入Sepharose 2B後，再以緩衝液緩慢填滿管柱，於40ml的Void volume後收集40ml的血小板懸浮液。在收集到的血小板懸浮液內加入500 μ l的0.2M EDTA(最終濃度2.5mM)、以2200rpm (1,000xg)於室溫中離心15分鐘。棄去上清液，並以緩衝液將沈降下的血小板輕輕沖散成懸浮液。以血小板凝集測定儀(Aggrecorder)測懸浮液在波長650nm之光濁度(O.D)至0.35 - 0.4(此時懸浮液中血小板數目約為 3×10^8 cells/ml)。置於攝氏37°C中溫浴30分鐘後，使其形狀恢復為扁平碟形，再行實驗研究(Tsai et al., 1988)。血小板被破壞之百分比可由(1)Aggrecorder測定透光值的變化，取其與原始吸光值之比值。(2)測定LDH和AH之漏出百分比而定。

乳酸去氫酵素(Lactate dehydrogenase; LDH)活性依Bergeyer and Bert法(1974)測定。測試步驟為:(1) 5ml之石英管中先加入3ml之甲溶液和50 μ l乙溶液。甲溶液含700mg K₂HPO₄; 90mg KH₂PO₄; 6.2mg sodium-pyruvate, 溶於90ml去離子水，置棕色暗瓶保存於4°C。乙溶液(使用前配製)含有14mg NADH sodium salt與15mg NaHCO₃溶於1.5ml去離子水。(2) 加入200 μ l之待測液後以石臘膜覆蓋搖晃均勻，測定在340nm之吸光值(即NAD之吸光)。

AH的測定則由光譜儀測量在波長410nm之吸收。測試步驟為600 μ l之緩衝液(成分為: 10ml 0.2M Citric acid 40ml 0.2M NaHPO₄, 調pH至4.5, 在加去離子水至100ml)和200ml受質溶液成分為: 10ml水含32.9mg p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine與87.66mg NaCl)混合並在37°C反應30分鐘。之後以1ml 0.08M NaOH停止反應, 再測量在波長410nm之吸收。

掃描式電子顯微鏡觀察溶血素對血小板形態之影響則將預溫的血小板以特定緩衝液濃度溶血素, 對照組以等體積(Buffer)處理, 37°C處理10分鐘後取出2.5ml血小板加入13.5ml 2.5% Glutaraldehyde使反應停止。於冰中靜置1小時, 以1,000xg在室溫中離心20分鐘。棄去上清液(收集於廢液瓶中), 沉降物以緩衝液沖散, 並移入小型離心管以3,500xg於室溫離心1分鐘。以尖利物小心地將沉降塊刮下, 並移入玻璃瓶中以冰冷緩衝液換洗三次。加入1ml 1% OsO₄, 將玻璃瓶置於冰中1小時(此時沉降塊會變黑)。吸去OsO₄溶液(收集於OsO₄廢液瓶), 並以緩衝液換洗三次。以50% Ethanol脫水再以70% Ethanol脫水。搖動樣品瓶將樣品倒入培養皿中, 以刀片將樣品切成0.1至0.2mm見方之小方塊, 以小竹片將樣品逐一移入已換成80%酒精之樣品瓶中。靜置10分鐘後, 以滴管將樣品瓶中的酒精吸去, 加入90%的酒精; 依此法陸續換至95%的酒精。樣品以95%酒精脫水10分鐘後, 以滴管將樣品瓶中的酒精吸出, 加入100%的酒精脫水15分鐘兩次, Acetone也是脫水15分鐘兩次, 在各個脫水過程要常搖樣品瓶, 使樣品脫水完全。經由臨界點真空乾燥機(Hitachi. model HCP-2)於二氧化碳乾燥, 再由離子覆磨機(Model IB-2; Eiko Engineering, Mito)作鍍金處理。再用Hitachi S-520在20 kV觀察。

結果

一、細菌的生長曲線與溶血素的分泌

*Vibrio damsela*在5%之兔血培養基37°C培養48小時後, 會產生明顯溶血斑(Clear zone), 因此推測其能分泌溶血素。此菌於Heart infusion broth 30°C培養所得的生長曲線如圖一(p.127), 其遲滯期(Lag phase)約120分鐘, 其間細菌並無明顯增生之現象; 自第2小時後細菌生長進入指數期(Log phase), 細菌於此時迅速生長分裂, 數目急劇增加。10小時後細菌生長分裂漸趨緩慢, 即進入靜止期(Stationary phase), 此時分裂速率與死亡速率幾乎相等。菌數和吸光值600nm成線性關係。以紐西蘭兔之紅血球懸浮液作溶血試驗時, 發現溶血素在細菌生長的遲滯期並未釋放到菌體外。當細菌生長進入指數期後, 溶血素的分泌量也隨時間呈線性增加; 當細菌培養至第10小時之後溶血活性達到最大值(每毫克蛋白6500溶血單位)。

二、*Vibrio damsela*溶血素之純化

將*Vibrio damsela*於HI broth培養16小時離心除去菌體, 將無菌體的培養液用硫酸銨鹽作蛋白質沉澱, 最終飽和度為60%。於4°C靜置16小時後以高速離心將蛋白質沉澱分離。以20mM Phosphate buffer將蛋白質沉澱溶解, 再用Ultrafiltration (Amicon YM-10 membrane)去鹽同時濃縮蛋白質。用YM-10過濾的目的是可增加去鹽速率同時也可濾除分子量小於10,000 dalton的蛋白質分子。用1%新鮮人類紅血球與兔血作溶血活性測試發現用Ultrafiltration處理的濾出液中並無任何溶血活性, 而上層液則有溶血活性。因此在本實驗中所有的去鹽步驟都以Amicon YM-10 membrane進行。

將硫酸銨鹽沉澱所得之具有活性的蛋白以50mM之Tris-HCl, pH 7.3用Amicon YM-10 membrane透析。繼之以陰離子交換樹脂Q-sepharose fast flow來進行純化。吸附管柱上的蛋白再以離子強度0-0.5 M NaCl將吸附在管柱上的蛋白洗出。所得之圖譜如圖二(p.127), 其中溶血活性主要分佈在第二支吸收峰, 約在0.18 M NaCl下被洗出。收集到的管數分別從第102-116支。所得之具有活性的蛋白經去鹽濃縮後以SDS-PAGE電泳分析結果顯示所含蛋白種類仍多無法判斷溶血素的位置。

為縮小溶血素可能的分子量分佈範圍, 因此在純化上繼之以膠體S-100-HR過濾管柱層析法。所使用的緩衝液為50mM pH 7.0之Ammonium bicarbonate (NH₄)₂CO₃流率為0.6ml/hr。在此條件下共可得5個在280nm的S-100吸收峰。如圖三(p.128)。經逐一溶血活性測試發現溶血活性的分佈集中在第二支吸收峰。把這些所得具有活性的蛋白經SDS-PAGE電泳分析可發現54KDa, 16 Kda等蛋白質的存在(圖四; p.128)。

三、*Vibrio damsela*之溶血素對人血與兔血的影響

取膠體過濾管柱層析S-100管柱純化所得之具有溶血活性的蛋白, 分別對人血與兔血作溶血試驗。由圖五(p.129)之結果可看出兔血受25ug *Vibrio damsela*之溶血素作用下會有70%紅血球被溶解。而人血在等量的溶血素作用下只有10%被溶解, 被溶解程度平均相差7倍。此結果顯示不同動物的紅血球對*Vibrio damsela*之溶血素耐受度不同。

四、*Vibrio damsela*之溶血素對人類血小板的影響

血小板的生理角色為參與止血, 在血小板細胞膜有許多受體(Receptor)可將細胞外信號傳進細胞。由圖六(p.129)的結果可以看出溶血素對血小板乳酸去氫酵素(LDH)以及酸性水解酵素(Acid hydrolase)漏出有濃度效應: 200 μg *Vibrio damsela*之溶血素會在5分鐘造成90%漏出, 100 μg之溶血素在15分鐘造成90%漏出。20 μg之溶血素則不造成酵素漏出, 此結果代表血小板細胞膜被破壞而使得細胞內酵素LDH, Acid hydrolase漏出。為了更進一步了解溶血素對人類血小板的破壞情況, 我們用掃描式電顯觀察*Vibrio damsela*之溶血素對人類血小板型態的影響(圖七; p.130)。不作任何處理的血小板其外型如鐵餅狀(圖七A; p.130)。加入20 μg溶血素與血小板作用60分鐘後血小板脹成圓球型(圖七C; p.130)。加入100 μg溶血素與血小板作用60分鐘後血小板產生破裂(圖七C; p.130)。在同樣條件下可觀察到紅血球由雙凹盤狀脹圓變成圓球型(圖七C; p.130)。顯示溶血素對血小板破壞比對紅血球強。

討 論

經過硫酸銨鹽沉澱, 陰離子交換樹脂Q-sepharose fast flow, 膠體過濾管柱層析S-100等純化過程, 可得部分純化之*Vibrio damsela*溶血素, 由SDS-PAGE估計其分子量約54Kda。

由部分純化之*Vibrio damsela*溶血素對人類與紐西蘭兔紅血球的溶解差異上可以知道溶血素對不同動物之紅血球會產生不一樣的影響。其原因可能出在不同動

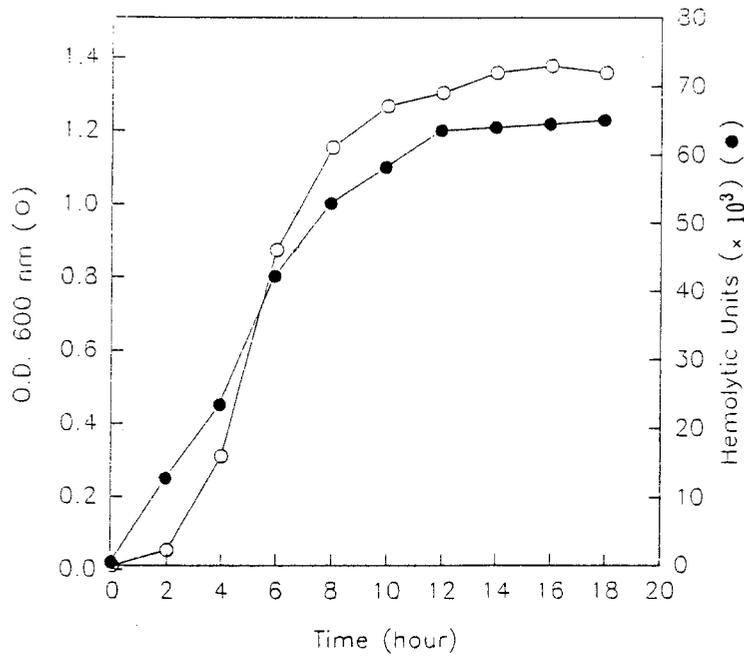
物之紅血球細胞膜磷脂質成分不同所造成。如Shingomyelin的含量在人類紅血球占全部磷脂質的27%，而在兔紅血球中占19%(Ikeazwa et al., 1980)。

由SEM觀察細胞形態的變化可以用來解釋破壞細胞膜物質的作用模式(Mode of action) (Shiao, 1989, 1993)。例如Octylglucoside之作用是使血小板脹圓脹破，而膽鹽則是使血小板長出Filopodia，再產生vesicle (Vesiculation)然後溶掉。磷質水解酵素A2破壞血小板也是經由Vesiculation (Wang et al., 1986)。在相同的作用時間，不同濃度溶血素對細胞之形態影響上可以觀察到20 μ g溶血素會使血小板脹圓；100 μ g溶血素會使血小板溶解。但是100 μ g溶血素只造成紅血球脹圓。造成細胞脹圓的可能機制為溶血素具有磷質水解酵素(Phospholipase)活性，例如Phosphatidylcholine (PC) lipase C，或Sphingomyelinase (SMase)。若根據Sheetz and Singer (1974)所提出之Bilayer couple hypothesis的說法，細胞受到磷質水解酵素C作用後細胞膜磷質的代謝產物如PC被水解成DG，Sphingomyelin被水解成Ceramide，會翻入細胞膜內側，令細胞脹圓。若是胞膜磷質被水解量過多，細胞便會破裂。另外一種可能的原因是溶血素的斥水區(Hydrophobic domain)插入細胞膜，造成細胞內外滲透壓不平衡使細胞破裂。此種作用機制像是蜂毒Mellitin (Kantor, 1972)。

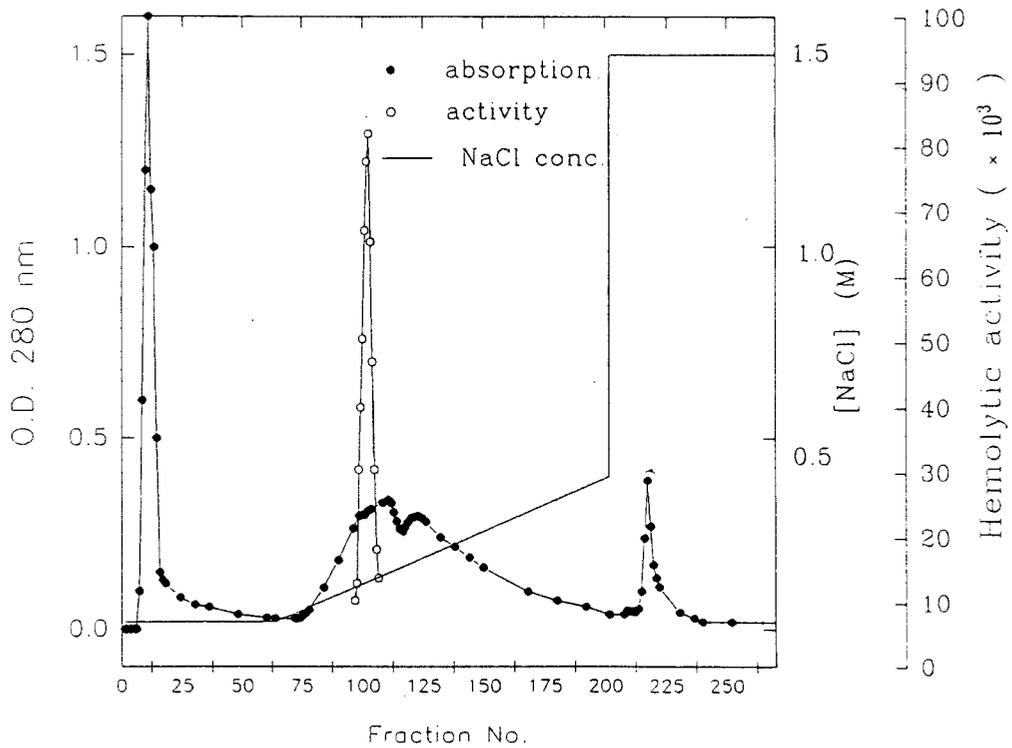
本報告提出溶血素之部分純化及其對血小板破壞之模式。血小板除了參與形成初級血塊(Primary plug)外，又參與Coagulation，在止血(Hemostasis)和血拴上扮演重要的角色，當其受到破壞時會造成出血(Bleeding)，比紅血球受到破壞更重要。*Vibrio damsela*溶血素對人類血小板溶解能力很強，極有可能造成Coagulation與Fibrinolytic clotting pathway無法進行。當蝦類被感染時有可能其凝血系統先遭破壞，再造成其它細胞壞死。因此在預防診斷上有必要從溶血素的偵測上著手。

謝辭

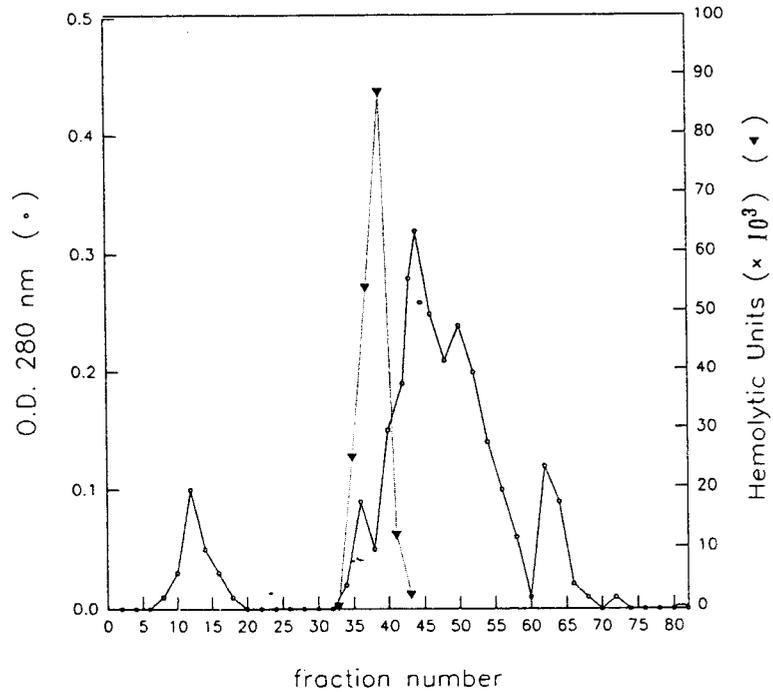
本研究由農委會計劃補助(計劃編號:83科技-1.1-糧-61(65-1,66)84科技-1.1-糧-62)，特此致謝。



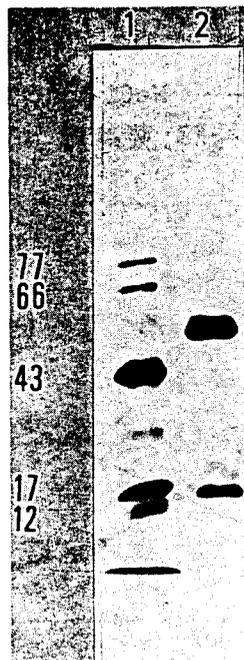
圖一、 *Vibrio damsela* 之生長曲線與溶血素釋出對應關連。培養液：Heart infusion；溫度30°C。(○)生長曲線。(●)溶血素分泌。



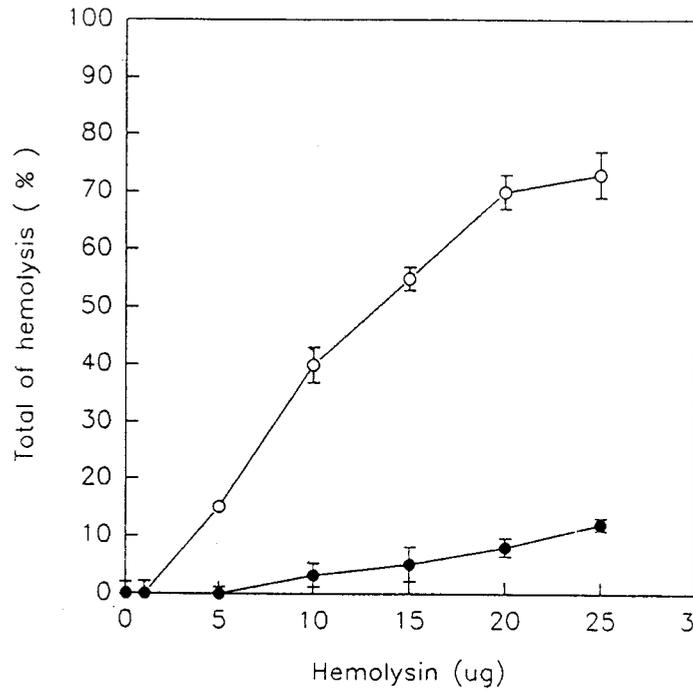
圖二、將硫氨沈澱所得54mg之有溶血活性蛋白以陰離子交換樹脂Q-fast flow純化之蛋白質分佈圖。管柱16mm x 20cm以50mM Tris-HCl (pH 7.4)，離子強度為0-0.5M NaCl沖洗。流速102 ml/hr。6.8ml/fraction。溶血活性分佈(○)在peak 2。



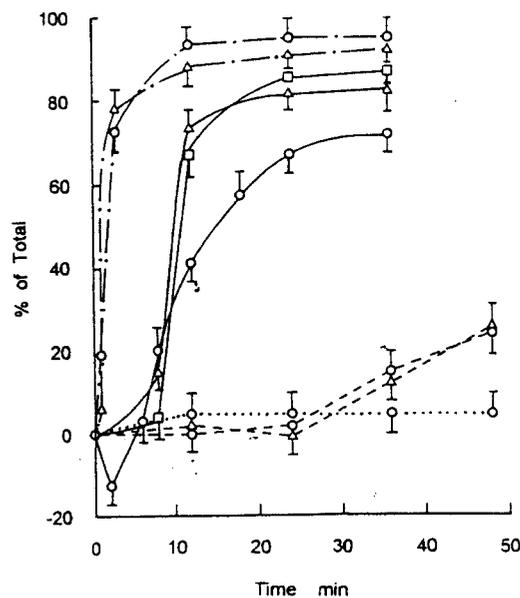
圖三、將4.1mg之Q-2以膠體過濾層析S-100純化之蛋白質分佈圖。管柱規格16/60。以50mM ammonium bicarbonate (pH 7.0)沖洗。流速為0.6ml/hr, 3ml/fraction收集。可得4支280nm吸收峰。溶血活性(▼)分佈於第二支吸收峰。



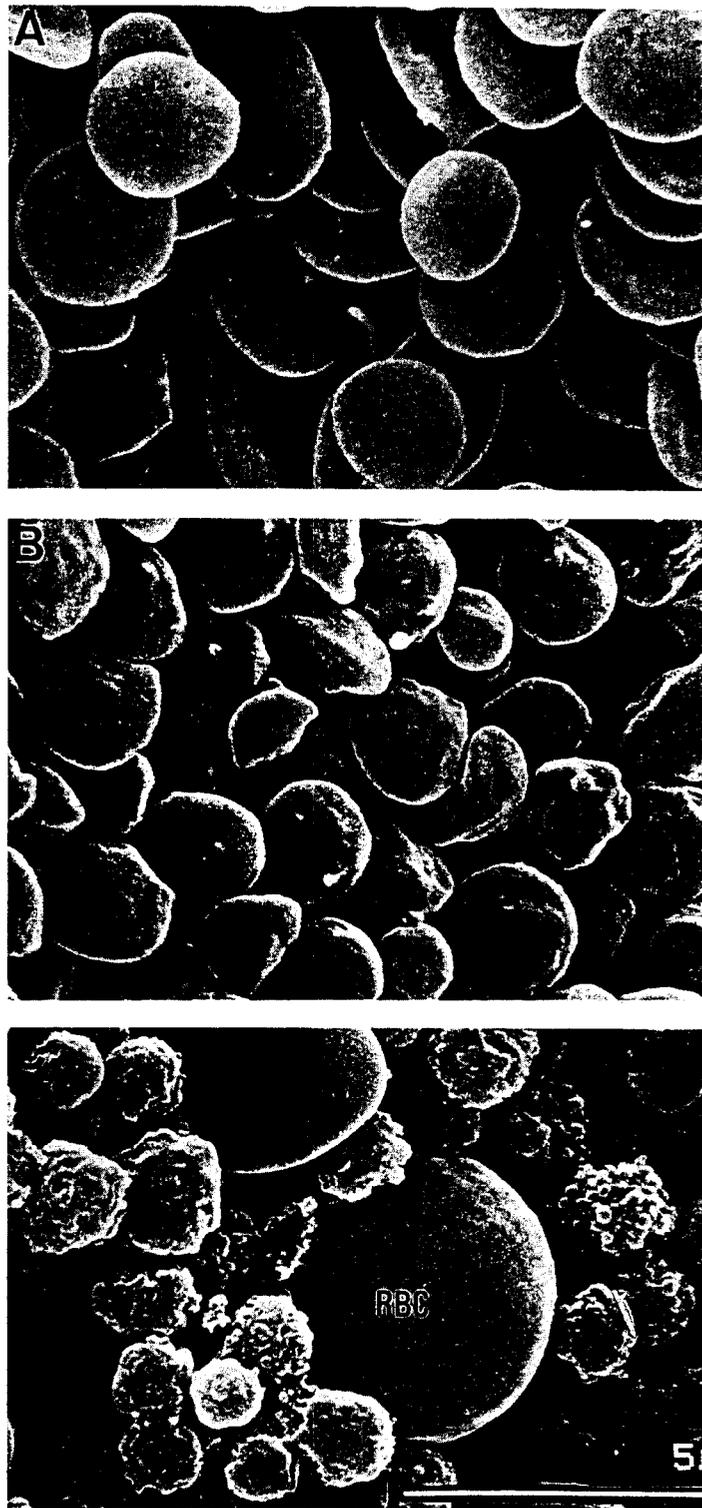
圖四、膠體過濾層析S-100-HR純化之蛋白質以10% SDS-PAGE分析(Silver stain)之電泳圖。Lane 1:marker; lane 2為有溶血活性之蛋白。估計其分子量為54Kda。



圖五、*Vibrio damsela*之溶血素對人類紅血球與紐西蘭兔紅血球的影響。紅血球以pH 7.4 PBS清洗過後配成濃度為1%紅血球懸浮液再與各種濃度溶血素於37°C作用120分鐘，於0.D. 540nm測量血紅素量。將紅血球以1% Triton X-100處理所釋出之血紅素量當作紅血球100%溶解。(●) 人類紅血球；(○) 紐西蘭兔紅血球。實驗數據至少得自3次以上之結果。



圖六、*Vibrio damsela*之溶血素對人類血小板溶解的影響。膠濾型血小板 (3×10^8 /ml) 與不同濃度溶血素作用。(· · ·) 200 μ g, (—) 100 μ g, (---) 50 μ g, (- · - ·) 20 μ g。(△) 血小板溶解, (□) 酸性水解酵素, (○) 乳酸去氫酵素(LDH)漏出。將血小板以1% Triton X-100完全溶解當作100%漏出。實驗數據至少得自3次以上之結果。



圖七、*Vibrio damsela*之溶血素對人類血小板型態影響之掃描式電顯圖。(A)為對照組。溶血素與血小板作用10 min (B); 30 min (C);放大倍率10.000X。溶血素用量50 μ g。

參考文獻

- Arbuthmott, J. P. (1982). Bacterial cytolysins. in Molecular Action of Toxins and Viruses. *Elsevier Biomedical press*, 107-129.
- Bergmeyer, H. U. and E. Bernt (1974). In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.O. ed.) Academic press, *New York*, 574-579,
- Cavalieri, S. J., J. Stephen, G. A. Bohach and I. S. Snyder (1984). *Escherichia coli* α -hemolysin : characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48 : 326-343.
- Hoshina, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobactrum anquillimortiferum*. n. sp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 28(2) : 162-164.
- Ikezawa, H., M. Mori and R. Taguchi (1980). Studies on sphingomyelinase of *Bacillus cereus*: hydrolytic and hemolytic actions on erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 199 : 572-578.
- Kantor, H. S., Temples, B. and W. V. Shaw (1972). *Staphylococcal* Delta Toxin : Purification and Characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 151 : 142-150.
- Kreger, A. and D. Lockwood (1981). Detection of extracellular toxin (S) produced by *Vibrio Vulnificus*. *Infect. Immun.* 33 : 583.
- Lages, B and H. J. Weiss (1981). Dependence of human platelet functional responses on divalent cations : Aggregation and secretion in heparin and hirudin-anticoagulated platelet rich plasma and the effects of chelating agents. *Thromb. Haemost.* 45 : 173.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680.
- Lowry, O. H., N. J. Resebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Sheetz, M. P. and S. J. Singer (1974). Biological membranes as bilayer couples: A mechanism of drug-erythrocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 : 4457-4461.
- Shiao, Y. J., J. C. Chen., C. N. Wang and C. T. Wang (1993). The mode of action pf primary bile salts on human platelets. *Biochim. Biophys, Acta* 1146 : 282-293.
- Shiao, Y. J., J. C. Chen and C. T. Wang (1989). The solubilization and morphological change of human platelets in various detergents. *Biochim. Biophys, Acta* 980 : 56-68.
- Smith, C. J., J. H. Freer and J. P. Arbuthmott (1975). Interaction *Clostridium Perfringens* θ -Hemolysin Contaminant of Commercial Phospholipase C, with Erythrocyte Ghost Membranes and Lipid Dispersion. *Biochim. Biophys. Acta.* 382 : 479-473.
- Song, Y. L., W. Chen and C. H. Wang (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invert. Pathol.* 61 : 24-31.
- Tsai, W. J., J. C. Chen and C. T. Wang (1988). Change in both calcium pool concentrations of calcium ion: Calcium-specific bleb formation on platelet-membrane surface. *Biochim. Biophys, Acta* 940 : 105-120.

Wang, C. T., W. J. Tsai, S. M. Chang, Y. J. Shiao and C. C. Yang (1986). Different susceptibilities of platelet phospholipids to various phospholipase and modifications induced by thrombin. Possible evidence of rearrangement of lipid domains. *Biochim. Biophys. Acta* 899 : 205-212.

The Hemolysin of *Vibrio damsela*: Partial Purification and Its Cytolytic Activity

Cheng-Teh Wang¹ and Lai Wang¹

Culture of *Vibrio damsela* on rabbit blood agar plate for 48 hours appeared to show the clear zone around colonies. It indicates that hemolysin was released from the pathogen. Culture of the bacteria in heart infusion broth (HIB) at 37°C found that the growth curve and release of hemolysin was comparable in a time dependent manner. The onset of stationary phase was at 10 hour and at that time there was maximal release of hemolysin. To isolate hemolysin, supernatant of culture of *V. damsela* in HIB for 14 hours was harvested. Using ammonia sulfate precipitation, we found that the hemolysin activity appeared in 60% ammonia sulfate saturation. Using anion exchange column chromatography (O-fast flow), hemolysin activity appeared at 0.18 M. This fraction was further purified by gel filtration (S-100-HR), and hemolysin appeared at second peak. SDS-PAGE (10%) revealed that the apparent molecular weight of hemolysin was 54 KDa.

The partially purified hemolysin exhibited differential activities against human and rabbit erythrocytes (RBC). Its lytic activity on rabbit RBC was 5 to 7 folds stronger than that on human RBC. The hemolysin caused lysis of human platelet by showing the leakiness of both lactate dehydrogenase and acid hydrolase. Scanning electron microscope revealed that the lytic action was via membrane area expansion. It implied that the hemolysin is a membrane hydrolytic enzyme.

Key words : Hemolysin, Cell membrane, Platelet.

¹ Department of Life Science, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan.