تنقية وتوصيف الهيمولايسين المنتج من عزلة محلية لبكتريا الهيضة

محمد إبراهيم نادر*   عامر هاني رزاق الشمري*   مثنى عبد ألقادر صالح المهداوي**

* فرع التقنية الإحيائية\ معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا\جامعة بغداد

** قسم علوم الحياة \ كلية العلوم – جامعة ديالى

الخلاصة

استخلص الهيمولايسين من مزروع بكتريا الكوليرا المنماة على وسط نقيع القلب والدماغ باستخدام الطرد المركزي المبرد (4°م) بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة، ونقي الهيمولايسين بخطوات عدة شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع % 75 و كروموتوغرافيا التبادل ألايوني باستخدام المبادل ألايوني DEAE-Cellulose والترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephadex G-100، بلغت عدد مرات التنقية 24.26 و مقدار الحصيلة الهيمولايسينية 32.47%. كان الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى 19490 دالتون. الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الهيمولايسين كان 6 و 6-8 على التوالي. أحتفظ الهيمولايسين بكامل فعاليتـه عند حضنه لمدة 15 دقيقة بمدى من درجات الحرارة بين 20-45 °م ، وانخفضت الفعالية الهيمولايسينيه بعد الحضن عند درجة حرارة 45 °م، كما لوحظ أن أقصى فعالية للأنزيم كانت عند درجة 30 °م.

الكلمات المفتاحية: ضمات الكوليرا،تنقية الهيمولايسين، توصيف الهيمولايسين.

Purification and characterization of Hemolysin produced by local isolates of *Vibrio cholera*

Mohammed Ibrahem Nader , Amer Hani Razaq AL.Shammary
Muthanna Abdulkhader Al-Mahdawi,

Abstract

The Hemolysin was Extracted from *Vibrio cholera* cultured on Brain Heart infusion by cold centrifugation 5000 r/min for 15 min at 4°C, and purified by several steps, including precipitation with 75% saturation ammonium sulphate, ion exchange chromatography using DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-100 column. The obtained purification fold

and recovery were 24.26 unit /ml and 32.47% respectively. The molecular weight of the enzyme is about 19490 Dalton as determined by gel filtration. The optimum pH for activity and stability was 6 and 6-8 respectively. The enzyme retained its original activity when incubated at 20-45ºC for 15 min, the activity of the enzyme decreased after enzyme incubation at 45ºC. The maximum enzyme activity observed at 30ºC.

Key wards: Vibrio cholera, haemolysin purification, haemolysin characterization.

المقدمة

تمتلك بكتريا الهيضة العديد من عوامل الضراوة التي تؤهلها لأحداث للإصابات المعوية والتسبب بمرض الإسهال الكوليري، ومن هذه العوامل قابليتها على إنتاج العديد من الذيفانات الداخلية و الذيفانات الخارجية. الذيفانات الداخلية تتمثل بمتعدد السكرايد ألدهني LPS الذي يوجد ضمن تركيب الجدار الخلوي[1]، ويتصف هذا الذيفان بثباته الحراري والذي يمثل التركيب المستضدي لهذه البكتريا الذي يكسبها صفة التخصص. و الذيفانات الخارجية تتضمن أنواع عديدة أهمها Enterotoxin و هي عبارة عن مادة بروتينية حساسة للحرارة ، كما تعد ذيفانات Cytotoxins و Hemolysin من الذيفانات المهمة التي تفرزها بكتريا الهيضة[2].

وينتج الهيمولايسين من أنواع كثير من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام مثل *E. coli, Staphylococcus, Shigella, Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Clostridium*[5,6].و يختلف في أساسه الجزيئي من بكتريا لأخرى، ويرتبط إنتاجه غالبا بالعزلات المرضية فقد اعتبرت من عوامل ضراوة البكتريا[3]. ينتمي الهيمولايسين إلى مجموعة من البروتينات المحللة لخلايا الدم الحمراء ويعد من الذيفانات الخارج خلوية الخطيرة، ولها تأثيرات على أغشية الخلايا المتأثرة وتحللها، وان من أهم خلايا الهدف لهذه الذيفان هي خلايا الدم الحمراء للإنسان والحيوانات مسببة تحلل كريا الدم الحمراء كما إن لبعض أنواعها تأثيراً ساما على خلايا الدم البيضاء[4].

استخدمت طريقه النبذ المركزي المبرد Cooling centrifuge لاستخلاص الهيمولايسين من المزروع البكتيري من قبل اغلب الباحثين[7,8,9]. و نقي بإتباع سلسلة من الخطوات و التي تتضمن طرائق فصل متنوعة الغرض منها فصل الهيمولايسين عن الهيمولايسينات و المواد الخلوية الأخرى الموجودة في المستخلص الخام[10,11].هدفت هذه الدراسة استخلاص وتنقية و توصيف الهيمولايسين المنتج من عزلة محلية من بكتريا الكوليرا[12].

المواد وطرائق العمل

- **استخلاص الهيمولايسين :** نشطت العزلة المختارة[12] بزرعها في وسط نقيع القلب والدماغ (حضر وفق تعليمات الشركة المجهزة) وحضنت بدرجة 37م ولمدة 24ساعة، بعدها لقحت أربع دوارق سعة ا لتر حاوية كل منها 200 مل من نفس الوسط ألزرعي بإضافة 1% مل من المزروع المنشط بتركيز للقاح 5×10^8 خلية/ مل لكل دورق، حضنت الدوارق بدرجة 30م لمدة 48 ساعة ثم نبذ المزروع البكتيري بمنبذه مبردة بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة. جمع الرائق في قناني، وقدرت الفعالية الهيمولايسينية وتركيز البروتين في رائق المزرعة.
- **تقدير فعالية الهيمولايسين:** اعتمدت طريقة Namdari and Bottone[13] لتقدير فعالية الهيمولايسين وكالاتي:

أضيف 1 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر إلى 0.5 مليلتر من طافي المزروع البكتيري و حضن في درجة حرارة 37م°لمدة 60 دقيقة، ثم قرئت بجهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 544 نانومتر لقياس الخلايا المتحللة من كريات الدم الحمر. حضر المحلول الكفء (Blank) بإضافة عالق كريات الدم الحمر إلى 0.5 مليلتر من محلول دارئ الفوسفات. سجلت الفعالية التحليلية (Hemolytic unit) على إنها الحد الأدنى من الأنموذج اللازم لإنتاج 50% من التحلل.

- **تقدير تركيز البروتين:** اتبعت طريقة برادفور Bradford[14] لتقدير تركيز البروتين باستخدام المنحنى القياسي لبروتين ألبومين المصل ألبقري (BSA) باستخدام محلول ألبومين مصل ألبقري.
- **تنقية إنزيم الهيمولايسين:** شملت خطوات تنقية إنزيم الهيمولايسين المنتج من العزلة المختارة على تركيز الهيمولايسين باستعمال كبريتات الأمونيوم و كروماتوغرافيا التبادل الأيوني والترشيح الهلامي [15; 16]، وفيما يأتي ملخص لخطوات التنقية.

ا ـ الترسيب بكبريتات الأمونيوم

أضيفت بلورات كبريتات الأمونيوم إلى المستخلص الخام بنسبة إشباع 25% تدريجيا في حمام ثلجي مع التحريك المستمر لمدة نصف ساعة، ثم نبذ المحلول بسرعة 10000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4°م لمدة 30 دقيقة. أخذ الرائق وأضيفت له بلورات كبريتات الأمونيوم لتصل نسبة الإشباع 50% تحت الظروف نفسها، ثم نبذ المحلول بسرعة 10000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4°م لمدة 30 دقيقة، اخذ الرائق و أضيف له كبريتات الأمونيوم لتصل نسبة الإشباع لـ 75 %، ثم نبذ المحلول بسرعة 10000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4°م لمدة 30 دقيقة، أهمل الرائق، أذيب الراسب في أقل حجم من دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز0.2 مولار ذي الرقم الهيدروجيني7.5. أجرت عملية الديلزه حيال عدة تبديلات من المحلول دارئ فوسفات البوتاسيوم لمدة 24 ساعة ، تم تقدير الفعالية الهيمولايسينية وتركيز البروتين في النموذج.

2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE–Cellulose

مرر الهيمولايسين الخام الناتج من الخطوة السابقة (تركيز بكبريتات الأمونيوم) على عمود التبادل الأيوني DEAE-sepharose ذي أبعاد 3×12 سم وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Whiteker and Bernhard[17] بعد غسل العمود بضعف حجمه بنفس محلول الموازنة، استرد الهيمولايسين بوساطة التدرج الملحي الخطي باستعمال ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مولار بواقع 3 مل/جزء وبسرعة جريان مقدارها 20 مل/ساعة. جمعت الأجزاء الحاوية على فعالية إنزيمية و أجريت لها عملية التنافذ الغشائي حيال دارى فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولار ذي أس هيدروجيني مقداره 7.5.

3- كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex–G100

أضيف محلول الهيمولايسيني المنقى جزئيا بعد خطوة التبادل الأيوني إلى عمود الترشيح الهلامي Sepharose-4B بأبعاد 1.5×35 سم، واستردت الأجزاء من العمود باستخدام 0.2 مولار دارئ فوسفات البوتاسيوم ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان 12 مل/ساعة حيث جمعت الأجزاء النافذة بواقع 5 مل/أنبوبة. قيست الامتصاصية للأجزاء النافذة على طول موجي 280 نانومتر، ورسمت العلاقة مابين الامتصاصية و الأجزاء النافذة . اختبرت الفعالية للأجزاء المفصولة والتي شكلت القمم في منحنى العلاقة وجمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية وتم تركيزها باستخدام أنابيب الديلزه و السكروز بدرجة حرارة 4 °م ثم قيست الفعالية والحجم وتركيز البروتين، وحفظ النموذج في درجة -20°م لإجراء التجارب اللاحقة.

- **تقدير الوزن الجزيئي:** تم جمع الأجزاء الفعالة الناتجة من خطوة الترشيح الهلامي بعد تركيزها حيث مررت مرة ثانية خلال عمود الترشيح الهلامي نفسه باستعمال هلام السيفادكس Sephadex–G100 حيث استردت الأجزاء من العمود باستخدام 0.2 مولار من فوسفات البوتاسيوم ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 وبنفس سرعة الجريان12 مل/ساعة وبواقع 3 مل/جزء وقيست الامتصاصية للأجزاء النافذة على طول موجي 280 نانوميتر ورسمت العلاقة مابين الامتصاصية و الأجزاء النافذة. اختبرت الفعالية للأجزاء المفصولة والتي شكلت قمة واحدة في منحني العلاقة وجمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية وتم تركيزها باستخدام أنابيب الديلزه و السكروز بدرجة 4°م ثم استخدمت لتحديد الوزن الجزئي للإنزيم الذي حدد بتقنية الترشيح الهلامي وباستعمال نفس العمود والمحلول الدارئ فوسفات البوتاسيوم 0.2 مولار ذي الرقم الهيدروجيني 7.5 في خطوتي الموازنة والاسترداد للعمود. استرد كل من الدكستران الأزرق والبروتينات القياسية و الهيمولايسين بسرعة جريان 12 مل/ساعة بواقع 5 مل للجزء الواحد. قدر حجم الفراغ (Vo) للعمود بإمرار الدكستران الأزرق واحتساب حجم الاسترداد له بقياس الامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر، أما أحجام الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية و الهيمولايسين فقدرت بقياس الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر بشكل مستقل لكل

بروتين، عين الوزن الجزيئي للإنزيم من المنحنى القياسي للعلاقة بين نسبة حجم استرداد البروتين القياسي إلى حجم الدكستران الأزرق (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية.

- **تعين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الهيمولايسين المنقى:** مزجت أحجام متساوية من المحاليل الدارئة المحضرة بأرقام هيدروجينية مختلفة من 4-10 مع مادة التفاعل، وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة 30°م لمدة 30 دقيقة ثم أضيف محلول الهيمولايسين إلى محاليل مادة التفاعل وحضن لمدة 30 دقيقة ثم أوقف التفاعل وقدرت الفعالية الهيمولايسينية ورسمت العلاقة بين الفعالية الهيمولايسينية حيال الرقم الهيدروجيني لمحلول الهيمولايسين.
- **تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الهيمولايسين المنقى:** مزجت أحجام متساوية من محلول الهيمولايسين المنقى مع المحاليل الدارئة ذات الأرقام الهيدروجينية المختلفة 4-10 وحضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة 30°م لمدة 30 دقيقة ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي وقدرت الفعالية. رسمت العلاقة بين الفعالية المتبقية (%) حيال الرقم الهيدروجيني لمحلول الهيمولايسين لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الهيمولايسين.
- **تعين درجة الحرارة المثلى لفعالية الهيمولايسين المنقى:** حضن محلول مادة التفاعل برقم هيدروجيني 6 وبدرجات حرارية مختلفة تراوحت من 20-80°م لمدة 15 دقيقة، ثم أضيف إليه محلول الهيمولايسين وقدرت الفعالية. رسمت العلاقة بين درجة الحرارة المئوية والفعالية الهيمولايسينية لتحديد درجة الحرارة المثلى لفعاليته.
- **تحديد درجة الحرارة لثبات الهيمولايسين المنقى:** حضن 0.2 مل من محلول الهيمولايسين المنقى بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 20-80°م وبتدرج مقداره 5 درجات حرارية من محلول لآخر لمدة 15 دقيقة. بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي وقدرت الفعالية الهيمولايسينة المتبقية (%). رسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية ودرجة الحرارة.

النتائج والمناقشة

استخلص الهيمولايسين الخام من المزروع البكتيري بوساطة النبذ بمنبذة مبردة بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، إذ بلغت الفعالية النوعية للهيمولايسين 69 وحدة/ملغم بروتين. تعد طريقة الاستخلاص بوساطة النبذ المركزي المبرد من أكثر الطرائق شيوعاً في استخلاص هذا الهيمولايسين[11].

نقي الهيمولايسين بعدة خطوات شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 75% وأعقبها كروماتوغرافيا التبادل الأيوني والترشيح الهلامي. في الخطوة الأولى للتنقية (الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 75%) بلغت الفعالية النوعية 10.63 وحدة/ملغم وبلغ عدد مرات التنقية 6.27 مرة وبحصيلة إنزيمية 54.75%. أول خطوات التنقية الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم لغرض تركيز الهيمولايسين و عزله من طافي المزروع البكتيري و يحدث الترسيب نتيجة معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين ومن ثم ترسيبه[15]. ، فقد استخدم الباحثان Honda و Finklestein[10] الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع قدرها 50%،

إذ بلغت قيمة الفعالية الكلية 417.600 وحده وعدد مرات التنقية3.64. أما Yamamoto وجماعته[8] فقد استخدم الترسيب بنسبة إشباع مقدارها 60%, وكانت قيمة الفعالية الكلية 2×10^6 وحده وعدد مرات التنقية 1. ثم يتبع هذه الخطوة إجراء عملية الديلزه ضد دارئ Tris-hydrochloride buffer ذي رقم هيدروجيني 8 لمدة 18 ساعة[11].

في خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني استعمل المبادل الأيوني ثنائي اثيل امينو اثيل سليسلوز DEAE-cellulose، إذ مرر الهيمولايسين المنقى بالخطوة الاولى في العمود ولوحظ ظهور أربعة قمم بروتينية عند قراءة الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر (شكل 1) وبقياس الفعالية للإنزيم تركزت الفعالية في الأجزاء 8-22، تم تجميعها وتركيزها وقد أعطت فعالية نوعية بلغت 16,95 وحدة/ملغم بروتين. ثم مررت هذه الأجزاء في عمود الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفادكس G100 كمرحلة ثالثة للتنقية، وعند قراءة الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر للأجزاء النافذة تم الحصول على ثلاثة قمم بروتينية، وبقياس الفعالية تركزت الفعالية في الأجزاء 14-24، تم تجميع هذه الأجزاء وتركيزها وقد أعطت فعالية نوعية بلغت 41.12 وحدة/ملغم. سجل زيادة الفعالية النوعية في جميع خطوات التنقية.

تحديد بعض صفات الهيمولايسين المنقى

استخدمت عدة تقنيات لتحديد صفات الهيمولايسين المنقى ومنها :-

1- تحديد الوزن الجزيئي للإنزيم.

جمعت الأجزاء الفعالة من خطوة الترشيح الهلامي بعد تركيزها ومررت ثانية خلال عمود الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس G100 ولوحظ انفصال قمة واحدة للبروتين ذات فعالية محصورة بين الأجزاء 14-24 (الشكل2) ثم ركزت واستخدمت لتقدير الوزن الجزيئي.

يوضح الشكل(3) المنحنى القياسي للوغاريتم الوزن الجزيئي مقابل نسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية المستعملة في عمود الترشيح الهلامي، وقدر الوزن الجزيئي للهيمولايسين من خلال هذه العلاقة إذ بلغ 19490 دالتون، وان النتيجة مقاربة لما توصل إليه الباحثان Honda و Finkelstein[16] عند تقدير الوزن الجزيئي للهيمولايسين المنتج من بكتريا الهيضة، إذ بلغ 20000 دالتون.

2- تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الهيمولايسين

تم دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الهيمولايسين المنقى عند قيم أرقام هيدروجينية تراوحت بين 4-10 فظهر إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الهيمولايسين هو 6 إذ أعطى أعلى قيمة للفعالية بلغت 193 وحدة/مل شكل(4)، ولوحظ حدوث انخفاض في الفعالية عند قيم الأرقام الهيدروجينية القاعدية و الحمضية وهذا ربما يعود إلى تغير في تركيبه الثلاثي.

وعند دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الهيمولايسين المنقى، بينت النتائج إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الهيمولايسين يقع ضمن مدى يتراوح بين 6-8، إذ أحتفظ الهيمولايسين بما يقارب 96.6%-100% من فعاليته عند هذه القيم. وانخفضت الفعالية عند الأرقام الهيدروجينية البعيدة عن هذا المدى، إذ انخفضت الفعالية المتبقية بشكل ملحوظ في الرقم الهيدروجيني 10 (احتفظ الهيمولايسين بـ 20.3% من فعاليته الأصلية عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية)، وكذلك انخفضت الفعالية عند قيم الرقم الهيدروجيني الأقل من5-4 (بلغت الفعالية المتبقية الهيمولايسين حوالي 25 % عند الرقم الهيدروجيني 5) (الشكل5). ربما يعود هذا الانخفاض إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في تغير التركيب الثالثي والثانوي لجزيئه الهيمولايسين وتغير الحالة الأيونية للموقع الفعال، كما قد يحدث مسخ عكسي في المحاليل الحمضية والقاعدية المتطرفة[18].

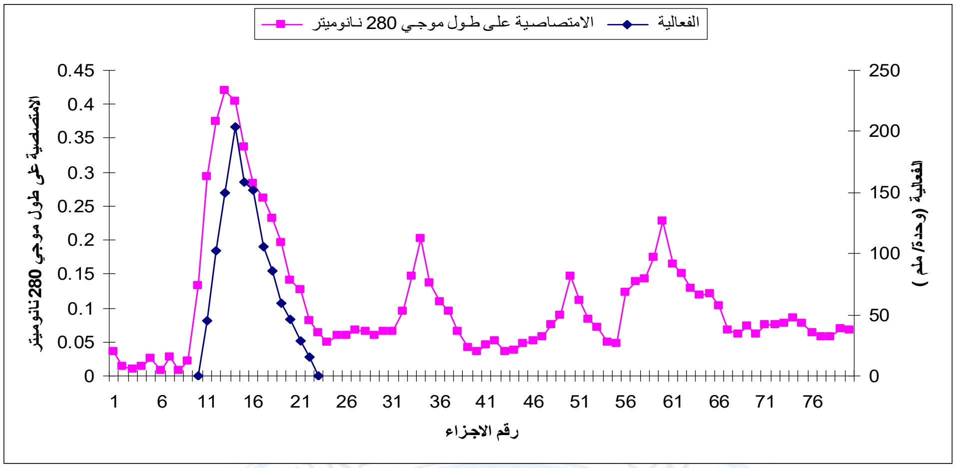
3- تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الهيمولايسين المنقى

يلاحظ من النتائج الموضحة في الشكل (6) تأثير درجات الحرارة المختلفة في فعالية الهيمولايسين. حيث تزداد الفعالية مع ارتفاع درجات الحرارة لحد 30م°، إذ بلغت الفعالية حوالي 192 وحدة/مل بعدها انخفضت الفعالية حتى وصلت إلى 12 وحدة/مل عند درجة حرارة 80م°.

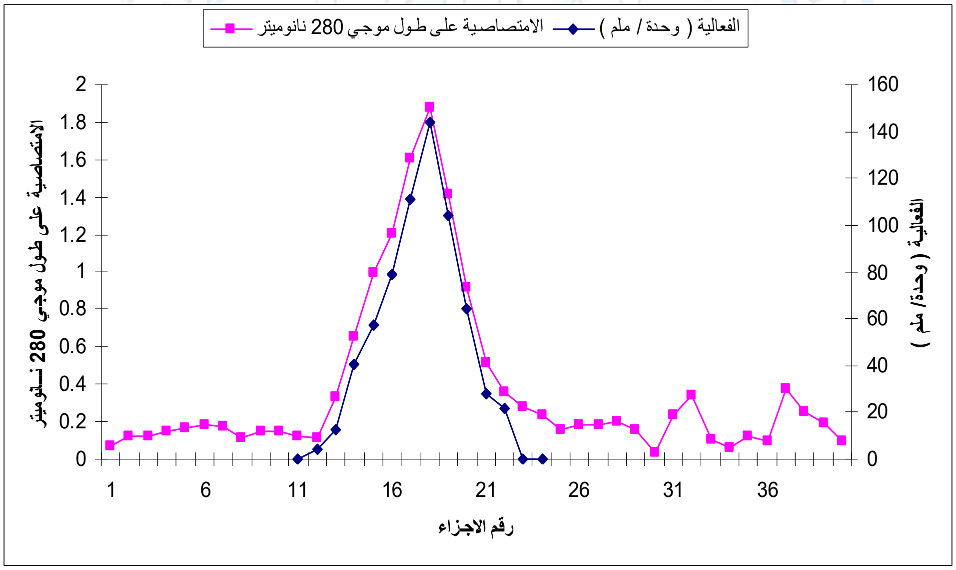
بيد إن نتائج حضن الهيمولايسين بدرجات حرارية مختلفة 20-80°م بفارق 5 درجات بين درجة وأخرى لمدة 15 دقيقة، بينت إن الهيمولايسين احتفظ بكامل فعاليته عند درجات الحرارة 20-45م°، بعدها بدأت الفعالية بالانخفاض تدريجيا" مع ارتفاع درجات الحرارة إذ بلغت الفعالية المتبقية لإنزيم الهيمولايسين حوالي 11% عند حضنها بدرجة حرارة 60°م الشكل (7). إن انخفاض الفعالية الهيمولايسينية عند رفع درجات الحرارة ربما يعود إلى تأثيرها في التركيب الثلاثي مما يؤدي إلى مسخ الهيمولايسين وفقدان فعاليه.

الجدول (1) تنقية الهيمولايسين المنتج من عزلة محلية لبكتريا الهيضة

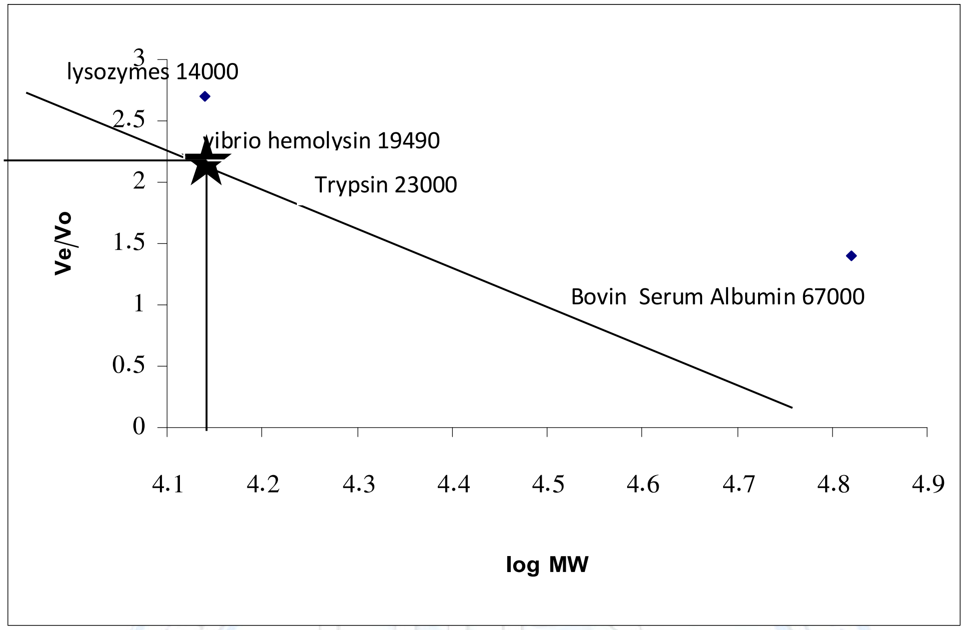
الخـــــطوة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الخام	100	117	69	1.695	11700	1	100
التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 75%	20	320	30.1	10.63	6400	6.27	54.70
كروماتوغرافيا التبادل الايوني	20	234	13.80	16.95	4680	7.31	40.0
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	20	190	4.62	41.12	1900	24.26	32.47



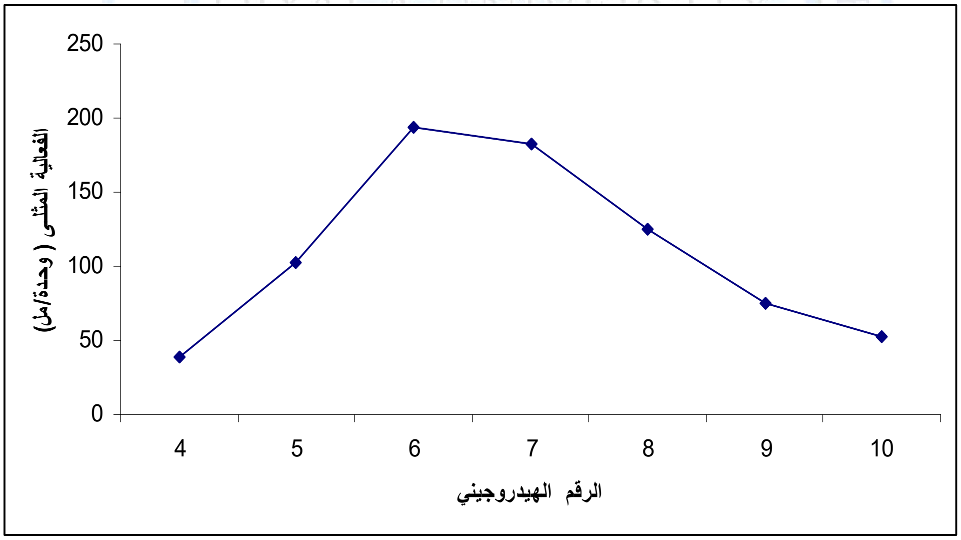
شكل (1) كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود المبادل DEAE-cellulose بابعاد 12x3 سم لتنقية انزيم الهيمولايسين ، بسرعة جريان 20 مل /ساعة وبواقع 5 مل / جزء.



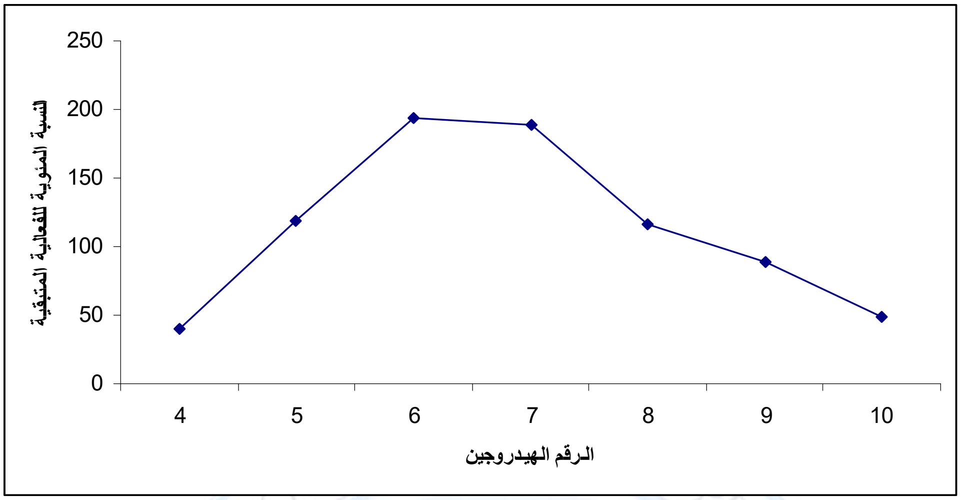
الشكل(2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للهيمولايسين باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex-G100 بابعاد 35X1.5 سم . تم الغسل بمحلول 0.2 مولار من دارئ الفوسفات ذي رقم هيدروجيني 7.5 وبسرعة جريان 12 مل/ساعة وبواقع 4 مل / ساعة.



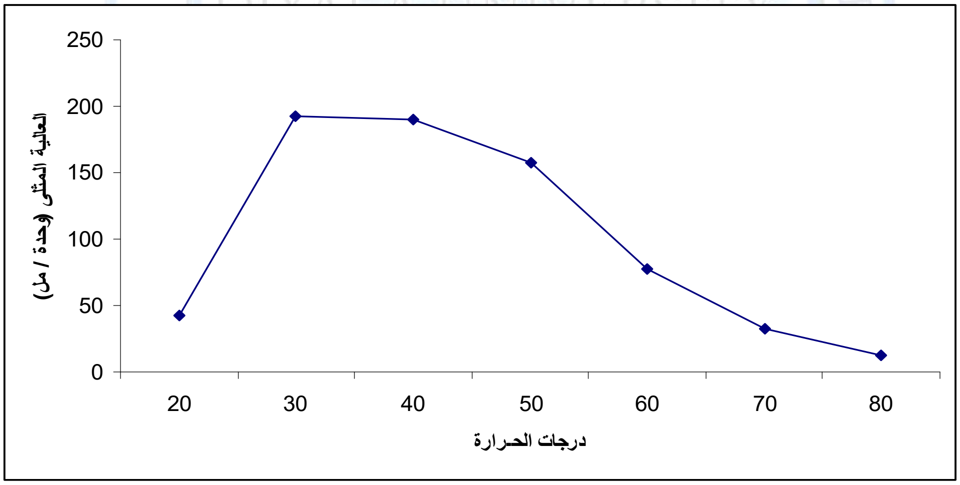
الشكل(3) تحديد الوزن الجزيئي للهيمولايسين المنتج من العزلة المحلية لبكتريا الهيضة باستخدام الترشيح الهلامي



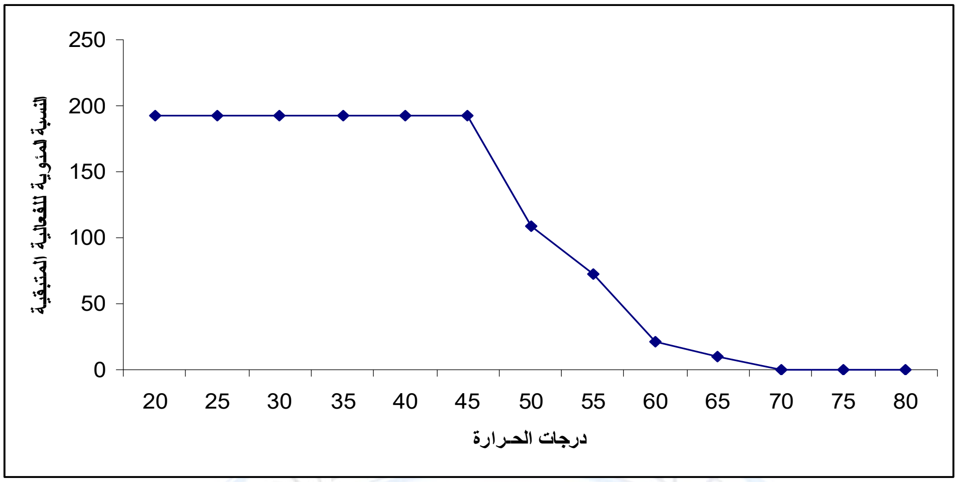
الشكل (4) تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4-10) في فعالية الهيمولايسين المنقى من العزلة المحلية لبكتريا الهيضة



الشكل (5) تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (5-12) في ثبات الهيمولايسين المنقى من العزلة المحلية لبكتيريا الهيضة



الشكل(6) تأثير درجات الحرارة المختلفة(20-80)م°في فعالية االهيمولايسين المنقى من بكتريا الهيضة



الشكل (7) الثبات الحراري للهيمولايسين المنقى من العزلة المحلية لبكتريا الهيضة بتعريضها لدرجات حرارة مختلفة (20 -80) م

المصادر

1. Fauci,A.S; Braunwal,E.; Isselbecher,K.J.; Wilson,J.S.; Martin,J.B.; Kasper,d.L.; Hauser,S.L. and Longo,D.L.(1998).**Harrison's Principle of Internal Medicine.** 14th ed. Vol.2. McGraw–Hill, Health Professions Oivision, New York. P. 962 – 968.
2. Forbes,B.A.; Sahn,D.F. and Weissfeld,A.S.(1998).Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed . Mosby. st. Louis, Baltemore, Baston and New York.
3. William,P.S.(1986).**Presence of Hemagglutinin/Protease and other potential virulence factors in O1 and Non- O1. Vibrios.** J. Infect. Disease. (154) : 183 – 185 .
4. Tomita,T. and Kamio,Y.(1997).**Molecular Biology of pore–forming cytolysine from *Staphylococcus aureus*, alpha and gamma–hemolysin and leukocidin**. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol 61 (4) : 565 .
5. Takahashi,Y.; Sato,Y.; Shiomi,V.V.; Cantraelli,T.(2000).**Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line**. J. Med.Microbiol. (49) : 801 – 810 .
6. Talaro,K. and Talaro,A.(1996).**Foundation in Microbiology. Basic principle**. (2nd ed). United States of America.

7. Honda,T.; Arita,M.; Takeda,T.; Yoh,M. and Miwatani,T.(1985).**Non-O1 *Vibrio cholerae* produces two newly identified toxins related to *Vibrio Parahaemolyticus* hemolysin and *Esherichia coli* heat-stable enterotoxin**. Lancet. p:163-164.
8. Yamamoto,K.; AL-omani,M.; Honda,T.; Takeda,Y. and Miwatani,T. (1984).**Non-O1 Vibrio cholera Hemolysin :Purification ,Partical characterization, and Immunological Relatedness to El Tor Hemolysin.** J.Infection and Immunity.Vol45(1):192-196.
9. Finklestein,R.A.; Boesman,M.; Chang,Y.; Hase,C.(1992).***Vibrio cholerae* Hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment**. J. Infet. Immun. (2) : 472 – 488 .
10. Honda,T. and Finkelstein,A.R.(1979).**Purification and Characterization of a Hemolysin Produced by *Vibrio cholera* Biotype El Tor :Another Toxic Substance Produced by Cholera Vibrios.** J. Infection and Immunity.Vol 26(3):1020-1027.
11. Yamamoto,K.; Ichinose,Y.; Naksone,N.; Tanabe Iwanaga,M.(1986). **Identity of Hemolysins Produced by *Vibrio cholera* Non-o1 and V .cholera O1,Biotype El Tor**. J.Infection and Immunity .Vol51(3):927-931.
12. Nader, Mohammed Ibrahem; Al-Mahdawi, Muthanna Abdulkhader; Yousf, Inas (2012). **production of hemolysin enzyme from local isolated of vibrio cholerae bacteria isolated from diarrhea patients**.Diyala J. for pure Scince; Vol: 8, No:2, 8-33.
13. Namdari,H. and Bottone,E.**J.**(1990).**Microbiologic evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen**. J. Clin. Microbiol. 28:837-840.
14. Bradford,M.(1976).**A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein using the principle of protein–dye binding**. Anal. Biochem. 72:248-254.
15. Secades,P. and Guijarro,J.A.(1999).**Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production.** Appl. Environ. Microbiol. 65:3969-3975.
16. White,A.; Handler,P. and Smith,E.(1973).**Principle of Biochemistry.** McGraw Hill Book Company. Al-Paktan publication . New York .
17. Whitaker,J.R. and Bernhard,R.A.(1972).**Experiments for: An Introduction to Enzymology.** The Whiber press.
18. Fullbrook,P.D.(1983).**Practical limits and prospects .In Industrial enzymology. The application of enzymes**.T.Godfery and J.Reichelt,eds. The Natural press .London.