การศึกษาโปรตีนและเอนไซม์อมิเลสในรา Candida albicans ด้วยดิสอีเล็คโตรฟอริซีส

หอสมุดกลาง

นางสาวอังคณา ปลั่งพัฒนะพานิชย์

006484

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2519

I 15231875

A STUDY OF PROTEINS AND AMYLASE ENZYME IN *Candida albicans* (ROBIN) BERKHOUT BY DISC ELECTROPHORESIS

Miss Angkana Plangpatanapanichya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1976

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

.....Visid Prachuabmoh.

(Professor Dr. Visid Prachuabmoh)

Dean

Thesis Committee .....Kasin Suvatabandhu..... Chairman

(Professor Kasin Suvatabandhu)

.....Sumalee Pichyangkura..... Advisor

(Dr. Sumalee Pichyangkura)

....Kawee Pupaibul..... Member

(Assistant Professor Kawee Pupaibul)

.....Suthaphun Triratana..... Member

(Mrs. Suthaphun Triratana)

Thesis Advisor: Dr. Sumalee Pichyangkura

Copyright 1976

by

The Graduate School

Chulalongkorn University

Thesis Title: A Study of Proteins and Amylase Enzyme in Candida albicans (Robin) Berkhout by Disc Electrophoresis.

By : Miss Angkana Plangpatanapanichya

Department : Botany

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาโปรตีนและเอนไซม์อมิเลสในรา
Candida albicans (Robin) Berkhout
ด้วยดิสอีเล็คโตรฟอริซีส
ชื่อ นางสาว อังคณา ปลั่งพัฒนะพานิชย์
แผนกวิชา พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา 2519

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Candidosis เป็นโรคที่เกิดจากราประเภทยีสต์กลุ่มหนึ่ง ปรกติมักจะเป็น Candida albicans ราชนิดนี้สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งอวัยวะภายนอกและภายในของร่างกายคนและสัตว์

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อจะดู ความสัมพันธ์ระหว่าง soluble protein pattern กับความสามารถของราที่ทำให้เกิดโรคเฉพาะที่บนส่วนต่างๆ ของร่างกายคน และศึกษาเอนไซม์อมิเลสที่สกัดได้จากยีสต์เซลของ Candida albicans โดยวิธี disc electrophoresis

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาเก็บรวบรวมมาจากโรงพยาบาล 3 แห่งในกรุงเทพฯ นำมาจัดจำแนกเลือกเฉพาะรา Candida albicans โดยอาศัยลักษณะการสร้าง chlamydospore การสร้าง germ tube และการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นเครื่องตัดสินซึ่งเก็บมาทั้งหมดประมาณ 200 สายพันธุ์ พบว่าเป็น C. albicans เพียง 42 สายพันธุ์ จากจำนวนนี้ได้เลือกมา 23 สายพันธุ์เพื่อศึกษาโปรตีนและเอนไซม์ โดยมีราที่ใช้เปรียบเทียบอีก 2 ชนิดคือ C. krusei ซึ่งทำให้เกิดโรคได้ในบางครั้ง และ C. utilis เป็นยีสต์ที่ไม่ได้ทำให้เกิดโรค อีกอย่างละ 1 สายพันธุ์มาทดลองควบคู่ไปด้วย

ราทั้งหมด25 สายพันธุ์ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร Sabouraud ชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา72 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลของราโดยวิธีนำไปปั่นสกัดโปรตีนจากเซลตามวิธีของ Gunsalus นำไปศึกษา protein pattern และเอนไซม์อมิเลสโดยวิธีทำdisc electrophoresis ตามเทคนิคของDavis และ Shechter การย้อมดูแถบของโปรตีนใช้เทคนิคของ Fairbanks ส่วน amylase activity ศึกษาโดยใช้แป้งเป็น substrateตรวจดูแถบของเอนไซม์หลังจากขบวนการdisc electrophoresis โดยย้อมด้วย Gram's iodide ตำแหน่งแถบบนแท่ง gel ที่ไม่ปรากฏสีแสดงว่า เป็นตำแหน่งที่มีเอนไซม์ activity

จากผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มของ C. albicans มีจำนวนแถบโปรตีนที่มีค่า Rf เท่ากันอยู่ 9 แถบ มีจำนวนแถบโปรตีนที่Rf เท่ากันกับ C. krusei 6 แถบ และเหมือนกับC. utilis 4แถบ ซึ่งผลนี้ทำให้กล่าวได้ว่าC. albicans มีความใกล้เคียงกับ C. krusei มากกว่า C. utilis

สำหรับผลของการศึกษา protein patternในกลุ่มของรา C. albicans พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำให้เกิดโรคในบริเวณใดบริเวณหนึ่งโดยเฉพาะ

จากการศึกษา protein pattern ของ C. albicans 23 สายพันธุ์ โดยพิจารณาแถบโปรตีนที่มีค่า Rf ชนิดเดียวกัน หรือเท่ากัน สามารถแบ่งราออกได้เป็น2 กลุ่ม กลุ่มแรกมี 14 สายพันธุ์ มีโปรตีน 9 แถบ ซึ่งเหมือนกันตลอดโดยถือค่า Rf ที่เท่ากัน และไม่มีความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนให้เห็น กลุ่มที่สองมี 9 สายพันธุ์ กลุ่มนี้มีแถบโปรตีนแตกต่างกันไปบ้าง ซึ่งพิจารณาตามการศึกษาของ Hasenclever กลุ่มแรกควรจัดอยู่ใน C. albicansกลุ่ม B และกลุ่มที่สองควรจัดไว้ใน C. albicans กลุ่ม A

จากการศึกษาพบว่ากลุ่ม A และ B มีความสามารถไม่ต่างกันในการทำให้เกิดโรคที่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย จากผลการทดลองนี้พบว่า เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 61.35% ควรเป็น C. albicans กลุ่ม B และมีเพียง 38.65% ที่เป็นกลุ่ม A ซึ่งผลนี้ตรงกันข้ามกับที่ได้มีผู้ศึกษามาแล้วในประเทศเขตหนาว เหตุผลที่พบกลุ่ม B ปริมาณสูง อาจเนื่องจากการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่ม B มากกว่ากลุ่ม A หรือ C.albicans กลุ่ม B ชอบสภาพแวดล้อมของเขตร้อนจึงเจริญเติบโตได้ดี

การศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า เชื้อที่แยกได้จาก systemic cases ให้ผลแตกต่างจากเชื้อที่แยกได้จากบริเวณผิวของร่างกาย คือการใช้น้ำตาล sucrose พบว่าให้ปฏิกริยาการสร้างกรดออกมาอยู่ในอาหารได้รวดเร็วกว่าเชื้อที่แยกได้จากบริเวณผิวของร่างกายซึ่งเกิดปฏิกริยาค่อนข้างช้า จนถึงกับไม่แสดงปฏิกริยาเลย

การศึกษาเอนไซม์อมิเลสพบว่า ในราที่ใช้ทดลองปริมาณของเอนไซม์ถูกสร้างค่อนข้างต่ำและมีเพียงแถบเดียว ทั้ง pathogen และ saprobe ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์อมิเลสในรา C. albicans เป็นเอนไซม์ชนิดที่ต้องการ substrate เป็นตัวชักนำ แต่เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้เป็นสูตร Sabouraud ซึ่งมี dextrose เป็น carbon source จึงไม่เหมาะในการชักนำให้ราสร้างเอนไซม์อมิเลสได้อย่างสมบูรณ์

อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อดูว่า เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งความเข้มข้นต่างๆ กัน จะให้จำนวนแถบของเอนไซม์ที่เกิดปฏิกริยาเท่าไร และการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ราสร้างและขับออกมาภายนอก จะช่วยเพิ่มพูนความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับรานี้มากขึ้น นอกจากนี้จากการเก็บรวบรวมเชื้อพบว่า เชื้อที่จัดจำแนกไว้เป็น C. albicans ที่ถูกต้องตามลักษณะมีเพียง 21% เท่านั้น ส่วนอีก 79% ที่เหลือนั้นเป็นยีสต์ชนิดไหน น่าจะได้รับความสนใจและควรที่จะมีการศึกษาจัดจำแนกลงไปให้ถึงขั้น species เช่นกัน

Thesis Title A Study of Proteins and Amylase Enzyme in *Candida albicans* (Robin) Berkhout by Disc Electrophoresis.

Name Miss Angkana Plangpatanapanichya

Department of Botany

Academic Year 1976

ABSTRACT

Candidosis is a common mycoses caused by species of Candida usually *C. albicans*. The fungus has an ability to infect various parts of the human body as well as animal one.

This study was designed to determine the relationship of the soluble protein and amylase activity in intraspecies of *C. albicans* to the ability of the fungus to infect in different lesions of the body.

Pathogenic strains of the fungus were collected from three hospitals in Bangkok, and the identification of these isolates which was based on their specific characteristics, chlamydospore production, germ tube formation and sugar fermentation. Out of the total number of isolates, twenty-three strains of pathogen, *C. albicans* and each of *C. krusei* and *C. utilis* from NRRL were chosen for further study on soluble

protein character and amylase enzyme activity by disc gel electrophoresis.

The twenty-five isolates of the fungal strains were cultured in Sabouraud liquid medium, at 30°C on rotary shaker. After 72 hrs. the yeast cells were harvested by centrifugation. Protein extract was obtained by the method of Gunsalus. The technique of amylase activity detection and the study of protein was based on Davis' method. Fairbanks' technique was used in staining and destaining general soluble protein pattern. Gram's iodide solution was used in amylase activity detection of gel column. The clear band shown on gel column indicated amylase activity.

The result of disc electrophoretic protein pattern of intraspecies, C. albicans showed nine common bands, between C. albicans and C. krusei showed six common bands while, C. albicans and C. utilis showed four matching bands. It could be concluded that C. krusei was more closely related to the pathogenic species, C. albicans than C. utilis.

In addition to the protein patterns processes on different isolates it was proved that relationship of soluble protein of C. albicans to the ability of infection was of no significance.

In comparing the matching bands of protein pattern in gel column among isolates of intraspecies, C. albicans, the matching bands arranged into two groups, A and B. There were 14 strains that showed nine matching bands without variation of protein in between common bands and were considered to be C. albicans antigenic B group. The other nine isolates which showed nine common bands and together with some variations in between matching bands were of course A group.

It is very likely that group A and B of C. albicans had ability to infect at any parts of the body. The result reported on the occurrence of candidosis in Thai patients - 61.35% B group, 38.65% A group. The reason may be due to the ability in mode of distribution of group B was more wildly than the other. Certainly the fungus B group was a dominant strain over A group in tropical countries.

The result of the study on sucrose fermentation was variable. The strains isolated from systemic cases showed active sucrose fermentation while strains from superficial ones showed only slightly and more slightly fermentative activities. This study suggested that the strains which showed active sucrose fermentation were closely related to systemic infection.

The study of intracellular amylase activity showed only a single band of the amylase activity with low concentration of enzyme and there was no difference between pathogen and saprobe. This might be concluded that amylase enzyme in C. albicans was an inducible one.

Furthermore it would be of interesting to study amylase activity of this fungus in different concentrations of starch medium. Again the study of extracellular enzyme activity of the fungus might be considered for further investigation.

Finally it would be benefitial to know the remained 79% of the unidentified yeast organisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation to Dr. Sumalee Pichyangkura for her advice, guidance, understanding and encouragement not only in the preparation of this thesis, but throughout the entire course of my graduate training, without which this work would not have been possible.

Sincere thank is also expressed to Assistant Professor Kawee Pupaibul, Department of Microbiology Chulalongkorn Hospital in providing some strains of fungi studied and had kindly served in the thesis committee.

Special thanks for Dr. Amaret Bhumiratana, Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University and Dr. Jariya Boonjawat Department of Biochemistry, Professor Thavorn Vajrabhaya Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, in providing either advice, facilities and equipments.

The author is indebted to Col. Somnuk Vibulyasekha and Lt. Col. Chatchaval Rochananonda, Skin department, The Royal Thai Army Hospital and Associate Professor Merani Tienprasit, Uraiwan Yongjaiyut, Dermatological section, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for the permission to collect the cultures.

Unforgetable thanks are also due to Professor Kasin Suvatabandhu and Mrs. Suthaphun Triratana who are kindly served in the thesis committee.

Thanks are also due to Chulalongkorn University, Graduate School for providing grant and the scholarship throughout the research program.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

Abstract in Thai iv

Abstract in English vii

Acknowledgements xi

List of Figures xiv

List of Tables xvi

Chapter ....

1. Introduction 1

2. Literature Review 4

-Historical Review 5

-Geographical Distribution Review 8

-Pathological Review 8

-Immunological and Serological Review 10

3. Materials and Methods 13

-Collection and Isolation 13

-Identification 14

-Extraction of Water Soluble Proteins 19

-Protein Preparation and Disc Electrophoresis 20

4. Result 29

-Identification 29

-Protein Preparation and Disc Electrophoresis 29

5. Discussion 47

6. Conclusion 54

Bibliography 56

Appendix 64

Vita 67

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Differential characteristics of Candida species encountered in human disease. 6
2. Chlamydospores formation at terminal of pseudo-hyphae of C. allbicans growing on Corn Meal Agar. 15
3. Cut slit method by Kligman 1950. 16
4. Germ tube of C. albicans when incubated for 3 hrs. in serum at 37° C. 18
5. Standard curve of soluble protein with using bovine serum albumin (BSA). 21
6. Disc-gel electrophoretic apparatus (Hoefer Scientific Instruments Model DE I02). 26
7. Shown typical protein bands in the gel column of C. albicans which recorded by Densitometer. 36
8. Photograph of electrophoretic acrylamide gel column of C. albicans staining with coomassie blue. 37
9. Diagram of acidic electrophoretic protein pattern of nine strains of C. albicans, vaginal isolates. 39

Figure Page

10. Diagram of acidic electrophoretic protein pattern of seven strains of C. albicans, sputum isolates. 40

11. Diagram of acidic electrophoretic protein pattern of seven strains of C. albicans from various locations. 41

12. Electrophoretic pattern of soluble protein of twenty-three pathogens, Candida albicans and two saprobes arrangement in group based on isolated lesions. 42

13., Pattern of gel column arrangement based on common protein bands of 23 strains of C. albicans and two saprobes. 44

14. Photograph of gel column showed amylase activity when incubated with specific starch substrate. 46

LIST OF TABLES

Table — Page

1. Sugar fermentation patterns of twenty-three strains of C. albicans. 30

2. Average Rf values x 10 of soluble protein bands by electrophoresis of twenty-three strains of pathogens, C. albicans, and two strains of C. krusei, C. utilis saprobes. 32