

嗜水性產氣單胞菌 α 溶血基因之選殖

陳昭德*、陳建宏、黃獻龍

國立台灣海洋大學水產養殖學系

摘 要

嗜水性產氣單胞菌 *Aeromonas hydrophila* 二十七病原菌株，由感染之水產生物病變部位分離出，用做篩選溶血基因之來源。以羊血培養基作溶血菌之表面培養時，可由其溶血毒素之徐徐釋出，所形成之溶血環的澄清或半透明，將之區別為 α 型（不完全溶血）及 β 型（完全溶血）。受篩檢之二十七嗜水性產氣單胞菌株，依此標準可分為三大類。三菌株之溶血表現型，於血液培養基表面，形成混濁之半透明狀溶血環，歸類於 α 型。十六菌株之溶血環為澄清且透明，因此可歸之於 β 型。但其中八菌株於血液培養基表面，不顯現溶血現象。

檢測二十七株嗜水性產氣單胞菌，是否攜有質體及帶抗藥性，於鹼性溶解法分離質體時，結果十菌株於 0.7% 洋菜膠電泳分離，以 EtBr 染色觀察證實帶有質體。其餘十七菌株則不帶質體。又每一個菌株，塗抹於 TSB 洋菜培養基添加不同抗生素之平板上，培養生長檢測抗藥性，結果就抗藥菌株數目而言，抗 streptomycin, ampicillin 及 novobiocin 抗藥菌株分別多達 17, 16 及 15 菌株，可視為嗜水性產氣單胞菌之自然抗藥性。其次 kanamycin, tetracyclin 及 erythromycin 抗藥菌株，分別為 11, 10 及 9 菌株。而 chloramphenicol 抗藥菌株最少，僅有 5 菌株。

表現 α 溶血型之嗜水性產氣單胞菌 AH20 菌株，不帶有質體，且僅對 ampicillin 及 erythromycin 具抗藥性，因此其溶血基因之緩慢釋出機制，適合用做替代基因選殖用，且易於用抗生素控制，因此由其染色體，利用 Hind III 酵素剪切，轉殖於 pJDC64 載體，選殖 α 溶血基因。由 2400 重組質體中，篩選出一 pAH20 α 3 於 *Escherichia coli* DH5 α 細胞轉

形篩選，仍可測得 α 溶血遺傳性狀重覆表現，顯示此Hind III DNA片段帶有 α 溶血基因。以羊血紅血球作溶血活性測定，僅菌體生長之未經純化之懸浮液，即可測得溶血值為4溶血單位。因此確定轉殖之Hind III DNA片段，確帶有 α 溶血基因，此pAH20 α 3所攜帶之DNA片段約為3.3 Kb。

一、前言

遺傳訊息的儲存，早已被證實位於染色體上。由於可切斷核苷酸之剪切酶(Restriction Enzyme)及其他修飾酶(Modification Enzyme)被發現，並大量開發製成商品，可利用來剪切染色體成不同大小之核苷酸片段，並可做任意隨機重複連結組合。設若核苷酸片段帶有遺傳訊息，當與另一能單獨於細胞內複製，而不受染色體複製控制之質體接合時，於外界給予一定之壓力條件下，諸如添加抗生素或營養物等，作為選殖基因時之標幟，能大量複製核苷酸片段，並表現所攜帶基因之遺傳訊息，此種近代生物技術之發展，導至對生命領域的研究，有更深一層的認知。於應用科技上，能將自然界，細胞內原始存在的單一基因，透過基因轉殖於適當之載體，以數倍至數十倍基因擴增(Gene Copy Number Amplification)，以達利用倍增基因產物之目的，其影響之深遠，自倍受矚目。

生物技術之應用於水產養殖，無論在促進魚體成長，生殖生理之控制，食性改變或誘導等等，利用遺傳基因之調控，以達實際利用或研究之目的，皆為提昇產業科技之必然趨勢。目前已轉殖成功之生長激素，應用於虹鱒*Salmo gairdneri* (Agellon et al. 1988)，已有實際成功之先例，選殖抗寒蛋白(Fletcher et al. 1988)，性腺促進激素(Sekine et al. 1989, Kuwana et al. 1988, Chang et al. 1988a, Chang et al. 1988b)等，也有利於水產養殖之發展，與實際上之應用。基因轉殖魚之開發(Fletcher and Davies 1991)，既能為水產養殖未來之展望開拓美麗的遠景，其應用之技術，勢必加以開發方能配合。目前能於實驗室完成基因之轉殖成功後，如何將基因帶入魚體細胞之技術，最成功者當為顯微針注射法(Penman et al. 1990, Chen and Powers 1990)，然實際上於人工養殖場之實施，則受限於技術之繁雜，設備之昂貴，及熟練之操作技巧，而不易推廣此法。因此設計另一簡便易行之方法，則有待建立。

分泌機制為細菌細胞，針對某些特定基因產物之需要，於基因表現後，將基因產物透過一定之程序，籍入細胞膜中，經由特定之分泌機制，再將之釋出細胞外(Wickner et al. 1991)。此種穿透細胞壁之過程，為分泌蛋白基因之特有機制(Howard and Buckley 1985a, Howard and Buckley 1985b)。因此若能選定某一特定之分泌基因，將其結構基因切除，利用遺傳工程酵素之轉接，將欲轉殖之促進生長基因加以取代，而仍

保有原分泌基因之分泌機制功能，則能透過細菌之適當分泌，而將基因產物釋出，達到基因轉殖利用之目的。

嗜水性產氣單胞菌 *A. hydrophila* 為養殖池水生常態菌 (Chen and Kou 1987)，其致病之原因，溶血毒素被認為是重要致病原因之一 (Howard and Buckley 1982)，因被感染之發病魚，魚體常呈溶血現象 (Egusa 1967)。然絕大部份由池水中分出之嗜水性產氣單胞菌，並未顯現病原性，因此又稱為條件性病原菌 (Snieszko 1964)。由於此一特性，因此溶血現象於生物技術之開發上，便有利用之價值。基本上，溶血基因產物之釋出，必須能穿透細胞壁，釋出細胞體外，方能有所作用。因此若能將所欲選殖之促進生長基因，取代溶血基因結構本體，但保留溶血基因促進子之控制基因產物釋出構造，理論上能將欲轉殖之促進生長基因產物，透過溶血基因釋出機制之功能，徐徐將選殖之基因產物釋出，因而達到基因轉殖利用之目的，同時又能去除溶血毒素之有害功能。然欲利用此機制之先決條件有二，其一為菌體本身，除溶血毒素外不具其他病原性，其二為菌體，需易為人為控制，並能利用抗生素加以消滅，以防造成生態上之後遺症。嗜水性產氣單胞菌之溶血基因，若能符合上述之要件，則於促進生長激素基因之選殖時，便有利用與開發之空間。本實驗之目的，即在選殖符合上述條件之溶血基因，以利開發水產養殖新技術。

二、材料與方法

(一)、菌株來源與培養基：

嗜水性產氣單胞菌 *A. hydrophila* 二十七菌株，為鍾虎雲教授 (台大動物系) 採集自1976至1989年間，由嗜水性產氣單胞菌感染之病魚患部，分離培養鑑定，並作成冷凍乾燥保存。用前以 1 ml TSB (1.78% tryptone; 0.3% soytone; 0.5% NaCl; 0.25% K_2HPO_4 ; 0.25% dextrose) 活化冷凍保存菌。並以千分之一稀釋於新鮮之 TSB broth (DIFCO)，於37°C下重新生長，並混入10%甘油，分裝保存於-80°C冷凍櫃中。菌株之培養皆為百分之一稀釋，生長於37°C下，至細胞濃度為 $2\sim 3 \times 10^8$ cfu/ml 時，用作各種試驗用途。轉殖用之 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α ，則生長於 LB broth (1.0% tryptone; 0.5% yeast extract; 1.0% NaCl) 於37°C下振盪培養。用作重組基因之載體，為攜有終結子之質體 pJDC64 (Chen and Morrison 1988, Chen and Morrison 1987)，為 pJDC9 之衍生質體。

(二)、質體與染色體之萃取：

染色體之萃取，依 Marmur (1961) 之方法，僅以 0.1% Triton-X-100 來取代 lysozyme 用於溶解嗜水性產氣單胞菌之細胞壁。少量質體之萃取，以鹼性溶解之方法 (Birnbain and Doly 1979) 萃取，用作

迅速檢定重組基因之片段。大量純化之質體，則需進一步透過CsCl-EtBr分層高速離心，並透析純化(Sambrook et al. 1989)。萃取之質體及染色體，均以分光光度計，於紫外光波長260 nm下，定其質量。

(三)、抗藥性之測定：

抗生素ampicillin (Ap), novobiocin (Novo), kanamycin (Km), streptomycin (Sm)皆溶於無菌去離子水中，chloramphenicol (Cm)溶於100%酒精，erythromycin (Em)溶於95%酒精，tetracycline (Tc)溶於50%酒精並以錫箔紙包裝遮光。經由0.2um 孔徑過濾除菌處理之抗生素，除Novo, Sm, Km保存於4°C下，其餘抗生素皆保存於-20°C。篩選抗藥菌時，於培養基中添加之濃度，分別為Ap 25 ug/ml, Cm 20 ug/ml，其餘皆為10 ug/ml。

(四)、溶血型之判定：

受檢測之菌株，於十倍連續稀釋至適當量後，塗抹於含2%羊血血液TSB 培養基表面，置於37°C培養箱中，於48小時內觀察，每一培養基之菌落數，介於50~150之間者，菌落外圍形成環狀帶之澄清透明者，視為 β 溶血型，呈混濁狀者，視為 α 溶血型。

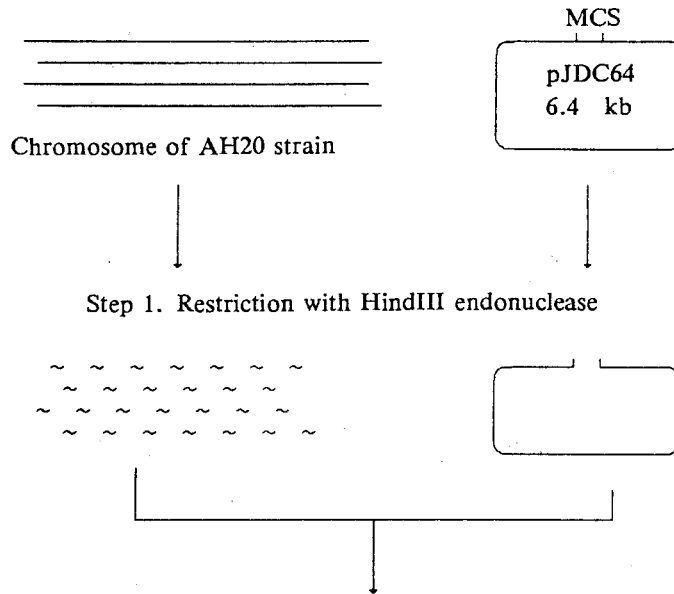
(五)、溶血基因選殖策略：

嗜水性產氣單胞菌株AH20之染色體製備已如前述。於限制酶Hind III剪切後，轉殖入載體pJDC64之Hind III位置，如圖一所示，以DNA質量，染色體：質體為5：1之比例，連結做重組質體。轉殖入DH5 α 細胞中，利用Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)及5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-Gal)誘導，以區別帶有原始載體之藍色菌落，及攜有重組質體之白色菌落。計算其菌落數目及轉形效率後，再塗抹於2%羊血血液培養基表面，於37°C下培養48小時，篩選有溶血環形成之菌落。將這些菌落挑出並做小量萃取其質體，並以Hind III剪切，釋出轉殖之DNA片段，量其大小，以萃取之重組質體再轉殖於新配製具有轉形能力(competence)之DH5 α 細胞，再篩選溶血環形成之遺傳特性，能重複表現者，再做純化，並保存於-80°C冷凍櫃中。

(六)、溶血活性之測定：

大腸桿菌DH5 α / pAH20 α 菌株生長於LB 培養液中，於37°C下培養40小時，浸漬細菌培養液於0°C，十分鐘後，再於4°C下10000 rpm離心十分鐘，其上層澄清液含有溶血毒素，取0.1 ml測溶血活性。於96小圓格免疫用小培養皿中，放置0.1 ml PBS緩衝液(10 mM磷酸鈉, pH 7.4; 150mM NaCl; 0.1% Bovine Serum Albumine)，以二倍連續稀釋方式，將含溶血毒素之澄清液稀釋，再添加等量之PBS緩衝液含1.6%羊血(Buckley and Howard 1988)，置於37°C觀察24小

圖一 Flow chart of isolation of haemolytic gene from *A. hydrophila* strain AH20.



Step 2. Ligation and transformation into DH5 α competent cells.

Step 3. Screening of blue/white colonies by IPTG and X-Gal induction.

Step 4. Screening of haemolytic phenotypes by plating on the surface of sheep blood agar.

Step 5. Extraction and determination of the size of HindIII DNA insert.

時，有血紅素釋出之最大稀釋倍數，則定為溶血單位。欲測得較高之溶血值時，將細胞培養之離心上澄液，移入透析膜中，外圍覆蓋 Polyethylene glycol (PEG) 6000 (Merck)，置於4°C下約2小時，以去離子水清洗去除膜外PEG 6000，剪開透析膜，抽取濃縮數倍之細胞培養離心上澄液，再取0.1 ml如上所述測溶血活性。

三、結 果

(一)、自然存在質體之分佈：

細胞溶解後，於鹼性溶解法去除大部份雙股螺旋染色體時，質體仍可容忍而存在。於洋菜膠上電泳分離核苷酸，並以EtBr染色脫色後，再於紫外燈檯下檢視，並記錄質體之存在與否，結果如表一所示。當以噬菌體 λ / HindIII作為測量核苷酸片段大小之依據時，十菌株AH3, AH9, AH13, AH16, AH17, AH19, AH21, AH23, AH25, AH27皆可觀察到21 Kb以下之質體存在。而其餘十七菌株，除染色體外，未能檢測到有質體存在之證據。

(二)、嗜水性產氣單胞菌菌株抗藥性之測定：

二十七菌株於TSB培養基中，振盪培養於37°C下，至總菌數為 $2 \sim 3 \times 10^8$ cfu/ml時，於帶有抗生素之TSB培養基表面作塗抹，各抗生素之定量，以基因重組時，用作篩選標幟之常用藥量為基準。於稀釋各菌株做TSB平板表面塗抹後，置於37°C培養箱中，觀察48小時，抗藥菌落之形成，為總數少於百萬分之一時，指 10^{-2} 稀釋平板培養基，無抗藥菌落形成，亦即少於300個抗藥菌落形成時，則視為對某一特定之抗生素具有感受性，以“-”表示，。若菌落數介於 $10^2 \sim 10^3$ 之間，則以“+ / -”表之。結果亦如表一所示。就七種抗生素之抗藥菌數分佈而言，streptomycin, ampicillin及novobiocin之抗藥菌株為最多，分別為17, 16及15菌株。其次為抗kanamycin, tetracyclin及erythromycin菌株，分別為11, 10及9株。而chloramphenicol之抗藥菌株最少，僅為5株。就每一個菌株之抗藥種類而言，三菌株AH14, AH15, AH25具有6種抗藥性，四菌株AH7, AH22, AH24, AH26具有5種抗藥性，六菌株AH3, AH13, AH16, AH17, AH18, AH19具有4種抗藥性，三菌株AH1, AH5, AH6具有3種抗藥性，五菌株AH4, AH9, AH20, AH23, AH27具有2種抗藥性，二菌株AH2, AH21具有1種抗藥性，四菌株AH8, AH10, AH11, AH12不具抗藥性。

(三)、溶血型之分佈：

溶血現象之觀察，以菌落周圍是否形成溶血環狀帶而判定。因溶血毒素由細胞釋出至細胞體外，方能溶解培養基上之紅血球。此點可視為溶血基因，具有分泌機制之依據。大腸桿菌之 α , β 及 γ 三溶血型，(Lovell and Rees 1960, Snyder and Koch 1966, Walton and Smith 1969)也是依此來判定。所得之結果，亦如表一所示。三菌株AH3, AH14, 及AH20為 α 溶血型。十六菌株AH2, AH4, AH5, AH7, AH9, AH10, AH11, AH12, AH13, AH15, AH16, AH18, AH22, AH24, AH25, AH26為 β 溶血型。餘八菌株AH1, AH6, AH8, AH17, AH19, AH21, AH23, AH27不顯現溶血特性。其中 β 溶血型之菌株，於24小時內，皆可觀察到澄清透明之溶血環狀帶。而 α 型之溶血環形成較遲，約40小時左右可明顯區別出。由於此一特性，AH20菌株，不具質體，除抗ampicillin及erythromycin外，不具其他抗藥性，且 α 溶血毒素之釋出，非常遲緩，因此其 α 溶血基因，可能適合本計劃欲利用其作基因轉殖之目的，故選AH20菌株之染色體，用作 α 溶血基因分離之來源。

(四)、AH20菌株之溶血基因：

經由載體pJDC64 / Hind III連結之AH20 / Hind III剪切之DNA片段，於接合酶(T4 DNA Ligase)作用下，將逢機接合之重組

表一 List of characteristics of the examined *A. hydrophila* strains.*

Strain	Genetic					Marker					Sources
	Plasmid	Ap	Cm	Novo	Km	Tc	Em	Sm	Haemolysis		
AH 1	-	-	+	-	-	+	+	-	-	soft-shelled turtle <i>Amyda sinensis</i> (Wiegmann)	
AH 2	-	-	-	-	-	-	-	+	β	colour carp <i>Cyprinus carpio</i> L.	
AH 3	+	+	-	+	+	-	-	+	α	eel <i>Anguilla japonica</i>	
AH 4	-	-	+	-	-	+	-	-	β	tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	
AH 5	-	+	+	-	-	-	-	+	β	tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	
AH 6	-	+	+	-	-	-	-	+	-	tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	
AH 7	-	+	-	+	+	+	-	+	β	tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	
AH 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tilapia <i>Oreochromis</i> spp.	
AH 9	+	-	-	-	-	+	-	+	β	soft-shelled turtle <i>Amyda sinensis</i> (Wiegmann)	
AH10	-	-	-	-	-	-	-	-	β	eel <i>Anguilla japonica</i>	
AH11	-	-	-	-	-	-	-	-	β	golden-fish <i>Carassius auratus</i> L.	
AH12	-	-	-	-	-	-	-	-	β	golden-fish <i>Carassius auratus</i> L.	
AH13	+	+	-	+	-	-	-	+	β	eel <i>Anguilla japonica</i>	
AH14	-	+	+	+	-	+	+	+	α	eel <i>Anguilla japonica</i>	
AH15	-	+	-	+	+	+	+	+	β	eel <i>Anguilla japonica</i>	
AH16	+	+	-	+	+	+	-	+	β	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH17	+	-	-	+	+	-	+	+	-	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH18	-	+	-	+	+	-	+	+	β	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH19	+	-	-	+	+	-	+	+	-	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH20	-	+	-	+	+	-	+	+	α	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH21	+	+	-	+	-	-	-	-	-	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH22	-	+	-	+	+	-	+	+	β	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH23	+	+	-	+	+	-	-	+	-	bronze catfish <i>Corydoras aeneus</i>	
AH24	-	+	+	+	+	+	+	+	β	large mouth bass <i>Micropterus salmoides</i>	
AH25	+	+	-	+	+	+	+	+	β	fish	
AH26	-	+	-	+	+	+	+	+	β	fish	
AH27	+	-	-	+	-	-	+	-	-	eel <i>Anguilla japonica</i>	

**A. hydrophila* strains were gifts from Professor Chung as mentioned in materials and methods. The plasmid detection and haemolytic assay were analyzed by the alkaline lysis method and diffusion of zonary formation on the surface of blood agar, respectively. The drug concentration of each antibiotics were Ap 25 ug/ml, Cm 20 ug/ml and 10 ug/ml of the rest.

質體，置於0.7%洋菜膠電泳分離下檢測。於確定重組質體存在後，以酚及氯仿純化重組質體，並於酒精冷凍沉澱後，真空乾燥重組質體，並溶解於去離子水中。再以電穿孔法(Electroporation)，於設定25000 volts/cm, 100 Ω , 25 μ F之情況下，進行重組質體之轉形(Transformation)。在轉殖入DH5 α 細胞時，於LB篩選培養基中，添加200 ug/ml erythromycin以抑制非轉形之細胞生長，並以IPTG及X-Gal誘導DH5 α 及pJDC64所攜帶之lacZ變體基因，以凸顯帶有pJDC64質體之DH5 α 藍色菌落，及獲得重組質體之白色菌落。經由2400帶有重組質體之白色菌落中，於血液培養基表面做塗抹培養，於37 $^{\circ}$ C培養條件下，觀察48小時。將形成溶血環之4菌落重新挑出，並重複塗抹於血液培養基表面，以確定溶血環可重複形成。其中一菌落，經由40小時37 $^{\circ}$ C培養後，呈現混濁之溶血環。於菌種純化後，再塗抹於血液培養基表面，於相同之培養條件下，仍呈現均勻之 α 溶血型。於分離此菌之重組質體，再轉殖入DH5 α 細胞時， α 溶血之遺傳特性，仍能於相同之培養環境下，重複呈現，因此可確定此Hind III DNA片段，確帶有溶血基因，因此定此重組質體為pAH20 α 3。做質體剪切比對後，以噬菌體 λ /Hind III之核苷酸片段之長短大小為依據，定出此DNA片段約為3.3 Kb。

(五)、溶血活性：

除血液培養基之觀察溶血環形成外，溶血活性之測定，為確定溶血毒素存在之直接證據。轉殖之3.3 Kb Hind III DNA片段，若帶有溶血毒素，且能分泌至細胞培養液中，則可定其溶血單位。當僅以DH5 α /pAH20 α 3非純化之菌培養液，利用羊血之紅血球作溶血試驗時，於37 $^{\circ}$ C 4小時觀察，即可測得4溶血單位，至24小時觀察，增為16最大溶血單位，此後即不再增大溶血單位(表二)。雖然溶血單位很低，但足以證明此Hind III DNA片段，確帶有 α 溶血基因。當以PEG 6000，將非純化之細胞培養之離心上澄液，濃縮12.5倍時，再測其溶血單位，於37 $^{\circ}$ C 24小時可觀察到最大溶血值，其溶血單位增為64，再濃縮至200倍，於相同之實驗條件下，溶血單位增為128。

四、討 論

水產用藥廣範被使用於水產養殖場，抗藥菌之分離，早已有人調查過，且其分佈之比例與使用抗生素之頻率成正比(Waltman and Shotts, 1986, Aoki et al. 1986, Aoki et al. 1987)。由於受檢測之嗜水性產氣單胞菌株，皆為由本省養殖場患*A. hydrophila*感染魚之病變部位篩選而得，因此其抗藥性之存在，應為預期。例如AH14, AH15及AH25菌株，其抗藥性即多達六種，AH7, AH22, AH24, AH26菌株之抗藥性也達五種

表二 Haemolytic activity of crude supernatant from DH5 α /pAH20 α 3 strain.

Concentration of supernatant	1 X	12.5 X	200 X
Haemolytic Units *	16	64	128

*Haemolytic units (HU) were defined by the maximal inversion of two folds serial dilution of the lysis of sheep blood.

之多。由於novobiocin為R-S Medium (Shotts and Rimler 1973)於設計上，用於直接篩選水生病原菌*A. hydrophila*之用途。又Aeromonas Agar Base (Ryan)為OXOID公司(Hampshire, England)開發之直接篩選*A. hydrophila*之合成培養基，篩選時需添加ampicillin，亦即ampicillin和novobiocin應視為*A. hydrophila*之天然抗藥性。另streptomycin雖無人利用其作篩選培養基中之主成份，本實驗發現其抗藥菌株數目很高，因此亦可視為此菌之天然抗藥性

R質體之存在，早已被人懷疑與抗藥性有關(Aoki and Kitao 1981)，台灣也曾作過抗藥性分佈之調查(Chen and Kou 1987)，因此欲利用做基因選殖之菌種，不具R質體，自為篩選條件之一。由於鹼性溶解法之迅速可萃取存在之質體，於洋菜膠電泳分離後，經由EtBr染色，即可在紫外光照射下，辨別質體之存在與否。二十七受檢*A. hydrophila*菌株，很容易便可判定是否帶有質體。至於質體與前述之抗藥性，是否有關聯，或抗藥性僅落於染色體中，由於本實驗篩選基因之條件，為菌體不具質體及不具或少抗藥性，因此質體是否帶有抗藥基因，則未作進一步之檢測。

溶血基因之最大特徵，在於基因表現後，存在於細胞中，經由分泌機制，釋出細胞外方有溶血功能。嗜水性產氣單胞菌之重要 β 溶血基因(Howard and Buckley 1986)，其產物aerolysin (Dooley and Trust 1988)已被分離出，且其核苷酸序列也已定出(Howard et al. 1987)，其生化上之最大特性，即在基因之原始產物並無溶血功能(Howard and Buckley 1985a)，需要經酵素切除C-terminus (Howard and Buckley 1985b)方有功能。於血液培養基表面培養時， β 溶血毒素之釋出，於37°C下，很快的於18小時便可觀察到，形成透明澄清之溶血環。而本實驗檢測之 α 溶血毒素，則遲至40小時，方可明顯區別出混濁狀溶血環。顯示 α 溶血基因產物之釋出與 β 溶血毒素不同。 α 溶血機制顯有延緩基因產物釋出之趨勢，因此將有高經濟價值之基因，透過緩慢釋出分泌機制，當比迅速釋出基因產物於外界環境中，可能更能有效被利用。

已轉殖之 β 溶血基因產物，經由液層分析、硫胺沉澱、去鹽等純化處理，可測得8192溶血單位(Howard and Buckley 1985b)。又Aoki及Hirono也分離出不同之 β 溶血基因AHH-1及AHH-2。其核苷酸序列也被定出(Aoki and Hirono 1991, Hirono and Aoki 1991)，其AHH-1溶血毒素經由50倍60%硫胺沉澱濃縮，其溶血活性可測得1024溶血單位。兩者之溶血活性測試，皆於37°C下觀察1小時，顯見 β 溶血毒素活性很強，能迅速打破紅血球膜，使血紅素釋出。但 α 溶血毒素相對比較之下，則顯得溶血反應遲緩。於37°C下24小時，方能完全觀察到最大溶血效應。由於測定之溶血活性為非純化 α 溶血毒素，因此不排除有抑制物的效應存在，故無法檢測到較高之溶血值。但其緩慢之溶血效應，應與由血液培養基，於40小時方能觀察到遲緩之溶血環形成吻合。又本實驗以吳郭魚與羊血做初步溶血試驗比較時，結果完全一致，由於去纖羊血容易購得，且量大，因此溶血菌之篩選，溶血單位之測定，皆以羊血為之。

由於AH20菌株之 α 溶血基因產物之緩慢釋出，及此菌不帶有質體，並不具多重抗藥性，符合預期基因利用之條件，故選其染色體用做分離溶血基因之來源。AH8菌株不具質體，也無抗藥性，然其無溶血現象，故排除篩選做為溶血基因之來源。AH10, AH11, AH12菌株，雖也不具質體，且無抗藥性，但其表現 β 溶血型，由於aerolysin已被分離出，且帶有 β 溶血基因之質體pPH4已由Dr. Buckley處獲得，故也未列入用做分離溶血基因之來源。

溶血基因之分離，除初步篩選，可由血液培養基，直接觀察到溶血環形成外，其生物活性之溶血功能，須能直接測得溶解紅血球，並釋出血紅素。由AH20菌株選殖之 α 溶血基因，經由轉殖於pJDC64載體中，並命名為pAH20 α 3，於轉形入DH5 α 細胞時，利用其溶血分泌機制，確定其溶血毒素分泌至細胞體外。因此於菌體培養40小時，離心取其上層澄清液含溶血毒素，利用羊血紅血球做指標，確可測得血紅素釋出，因而證實pAH20 α 3攜帶之DNA片段帶溶血基因。

當以PEG 6000濃縮細胞培養液之離心上澄液時，亦可增加單位體積內 α 溶血毒素之濃度。因此於12.5倍濃縮時，可觀察到溶血單位增為64自為預期。當以PEG 6000於200倍濃縮時，溶血單位增至128，與Aoki and Hirono (1991)測AHH-1於60%硫胺沉澱，濃縮50倍可得1024溶血單位相比，則顯的增加倍數偏低。其可能之原因，為 α 溶血毒素，其自然之溶血效應原本不高，何況為非純化時。當與硫胺沉澱之部份純化AHH-1溶血毒素相比，自顯得偏低。純化之 α 溶血毒素，其溶血單位之倍增，當為預期，以aerolysin為例，純化之 β 溶血毒素，可測得8192溶血單位，(Howard and Buckley 1985b)。當未純化時，僅於細胞上澄液加trypsin活化aerolysin溶血毒素時，僅測得32溶血單位(Howard and Buckley 1986)。

α 溶血基因已選殖成功，然其基因結構，核苷酸序列，尙未定出。欲利用此一基因之分泌功能，其基因結構之分析，則有先行了解之必要，且爲做下一步基因替換轉殖之重要依據。

謝 辭

本計劃承農委會81農建-12.1-糧-67-(57)之贊助，特此致謝。嗜水性產氣單胞菌*A. hydrophila*二十七菌株，爲台大動物系鍾虎雲教授分離鑑定並保存，在此懇謝其慷慨贈予，使實驗工作得以順利開展。又由Dr. Thomas Buckley之贈予，獲得攜有aerolysin之質體pPH4，亦一併致謝。養殖系顏學恆同學於實驗室，幫忙準備實驗器材及做抗藥菌試驗，亦一併致謝。

參考文獻

- Agellon, LB, CJ Emery, JM Jones, SL Davies, AD Dingle, TT Chen. 1988. Promotion of rapid growth of rainbow trout *Salmo gairdneri* by a recombinant fish growth hormone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 146-151.
- Aoki T, A Akashi, T Sakaguchi. 1986. Phylogenetic relationships of transferable R plasmids from *Edwardsiella tarda*. *Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 1173-1179.
- Aoki T, I Hirono. 1991. Cloning and characterization of the haemolysin determinants from *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Disease* 14: 303-312.
- Aoki T, T Kitao. 1981. Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathol.* 15: 277-281.
- Aoki T, T Sakaguchi, T Kitao. 1987. Multiple drugresistant plasmids from *Edwardsiella tarda* in eel culture ponds. *Jap. Soc. Sci. Fish.* 53: 1821-1825.
- Birmboin HC, J Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Buckley JT, SP Howard. 1988. Aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Meth. Enzymol.* 165: 193-199.
- Chang YS, FL Huang, CT Chen, TB Lo. 1988a. Isolation and properties of the pituitary gonadotropin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Int. J. Peptide Protein Res.* 31: 150-156.
- Chang YS, CJ Huang, FL Huang, TB Lo. 1988b. Primary structures of

- carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. *Int. J. Peptide Protein Res.* 32: 556-564.
- Chen HY, GH Kou. 1987. Studies on bacterial drugresistant in aquaculture—I. Drug resistance of bacteria in pond-reared eels (*Anguilla japonica*). *COA Fish. Ser.* 10: 12-24.
- Chen JD, GH Kou. 1987. Studies on bacterial distribution in kpond-cultured eels. *COA Fish. Ser.* 10: 25-42.
- Chen JD, DA Morrison. 1988. Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 64: 155-164.
- Chen JD, DA Morrison. 1987. Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA fragments in *Escherichia coli* requires vectors protected by strong transcription terminators. *Gene* 55: 179-187.
- Chen TT, DA Powers. 1990. Transgenic fish. *TIBTECH* 8: 209-215.
- Dooley, JSG, TJ Trust. 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish : Identification of a surface array protein. *J. Bacteriol.* 1770: 499-506.
- Egusa S. 1967. On the motile *Aeromonads*. *Fish Path.* 2: 36-49.
- Fletcher GL, PL Davies. 1991. Transgenic fish for aquaculture. *Genetic Engineering* 13: 331-370.
- Fletcher GL, MA Shears, MJ King. 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 352-357.
- Hirono I, T Aoki. 1991. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis* 11: 189-197.
- Howard SP, JT Buckley. 1982. Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry* 21: 1662-1667.
- Howard SP, JT Buckley. 1985a. Protein export by a gram-negative bacterium: production of aerolysin by *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 161: 1118-1124.
- Howard SP, JT Buckley. 1985b. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J. Bacteriol.* 163: 336-340.
- Howard SP, JT Buckley. 1986. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 289-295.

- Howard SP, WJ Garland, MJ Green, JT Buckley. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 169: 2869-2971.
- Kuwana Y, T Kuga, S Sekine, M Sato, H Kawauchi, S Itoh. 1988. Cloning and expression of cDNA for salmon prolactin in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1033-1039.
- Lovell R, TA Rees. 1960. A filterable haemolysin from *Escherichia coli*. *Nature* 188: 755-756.
- Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- Penman DJ, AJ Beeching, S Penn, N Maclean. 1990. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. *Aquaculture* 85: 35-50.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA. Sekine S, A Saito, H Itoh, H Kawauchi, S Itoh. 1989. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8645-8649.
- Shotts EB, R Rimler. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Applied Microbiol.* 26: 550-553.
- Snieszko DF. 1964. Remarks on some factors of epizootology of bacterial fish disease. *Rev. Ind. Microbiol.* 5: 97-100.
- Snyder IS, NA Koch. 1966. Production and characteristics of hemolysins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91: 763-767.
- Waltman WD, EB Shotts. 1986. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Vet. Microbiol.* 12: 277-282.
- Walton JR, DH Smith. 1969. New hemolysin (γ) produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 98: 304-305.
- Wickner W, AJM Driessen, F-U Hartl. 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 101-124.