

臺灣水產養殖病原菌 *Edwardsiella tarda* 和 *Flavobacterium ranacida* 之致病因子

王成德、房錫廷、王 來

國立清華大學生命科學研究所

摘 要

針對鰻魚病原菌 *Edwardsiella tarda*，及本土水產養殖病原菌 *Flavobacterium ranacida* 兩種病原菌致病因子之研究，已建立之技術包括：外毒素蛋白分離；菌體胞膜分離；脂多醣分離；脂質分離等。外毒素鑑定分離的結果，得知 *E. tarda* 外毒素中溶血素含量低。而 *F. ranacida* 之外毒素已初步分離出溶血素，蛋白酶和磷脂酶。內毒素之脂多醣構成成分，經分析發現兩種菌之結構不同，包括 O-antigen 之醣類及 Lipid A 之脂肪酸。*E. tarda* 之 Lipid-A 可能為其主要致病因子之一。兩菌的磷脂質成分亦不相同，*E. tarda* 除含有 phosphatidylethanolamine (PE), diphosphatidylglycerol (DPG) 外，亦含有卵磷質，後者可能是 *E. tarda* 之致病因子。而 *F. ranacida* 只含 PE 類及醣脂質。*F. ranacida* 之主要脂肪酸成分為 12-methyl myristic acid，可能為其另一致病因子之一。兩菌之膜蛋白有不同，其中 *F. ranacida* 有 S-layer 蛋白質，而 *E. tarda* 則無。在缺鐵條件下培養，*E. tarda* 會誘發出一個 61 KDa 蛋白，而 *F. ranacida* 則是一個 38 KDa 蛋白。此研究提供應用於防治此二種病原菌之致病及其診斷上之基礎訊息。

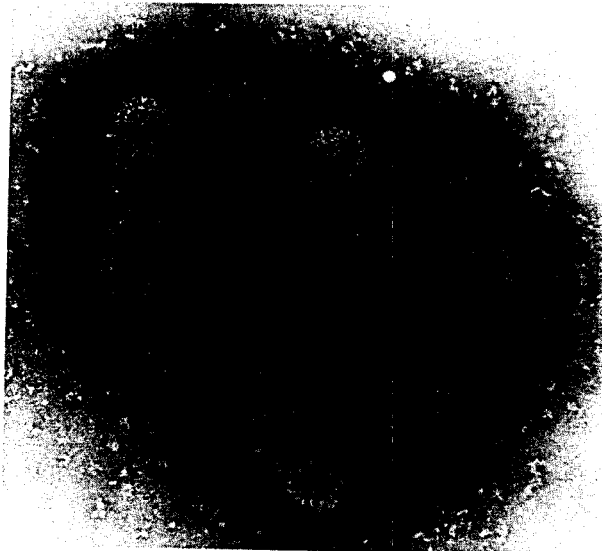
一、前 言

臺灣水產養殖業中，發現鰻魚感染革蘭氏陰性病原菌 *Edwardsiella*

tarda的致死率高達30% (Liu and Chien 1986)，而牛蛙感染革蘭氏陰性病原菌Flavobacterium ranacida的死亡率高達50% (Chung 1990, Chung et al. 1986)。E. tarda屬於腸內桿菌科(Ewing et al. 1965, Hoshina 1962)，菌體呈短桿型，大小為 $2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ ，有周鞭毛(圖一)。當魚受此菌感染後，導致腸胃潰瘍、皮膚紅腫、敗血及溶血等現象(Liu and Chien 1986, Roberts 1978)。而F. ranacida是台大鍾虎雲教授等人由病蛙分離出之新菌種(Chung et al. 1986)，其為不利用醣類之桿菌，大小為 $1.8-3.3 \times 0.7-0.9 \mu\text{m}$ (圖二)。經組織病理切片發現此菌可侵



圖一 電子顯微鏡負染法顯示病原菌Edwardsiella tarda之短桿狀型態(放大35,000倍)。



圖二 電子顯微鏡負染法顯示病原菌Flavobacterium ranacida之長桿狀型態(放大15,000倍)。

入神經、循環和消化系統，引起敗血、出血、臟器充血、潰瘍、眼睛白濁凸出及頭部歪斜等症狀(Chung et al. 1986)。

革蘭氏陰性病原菌的毒性因子可分為外毒素和內毒素。外毒素包括：溶解細胞的cytolysin及影響細胞生理機制的cytotoxin (Alouf and Freer 1991)。內毒素則為脂多醣(Raetz 1993, Hitchcock et al. 1986, Davis et al. 1981)。然近年來研究，已漸漸瞭解細胞膜之磷脂質能調理細胞生理功能(Carruthers and Melchior 1986)。所以脂質也漸被認為是cytotoxin (Braquest and Rola-Pleszczynski 1987, Denizot et al. 1986, Hanahan 1986)。針對此二種病原菌之致病因子，已鑑別其外毒素之溶血因子包括：磷質酶，蛋白酶之活性，並進行純化工作；已分析內毒素之脂多醣及脂質之成分，並分析膜蛋白成分。

二、材料與方法

(一)、外毒素

*E. tarda*的外毒素病原性，已有報告指出，具有hemolysin, protease和phospholipase的活性(Chung et al. 1991, Ullah and Aria 1983, Watson and White 1978)。然而我們將此菌培養在羊血培養基，觀察得知，在37°C，要培養五天，才能觀測到菌落外圍有淡黃色、半透明的區域。此暗示有溶血性，但活性不強（因一般觀測溶血性是以培養二天為準）。又者，將此菌在skim milk agar plate, 37°C，培養三天，仍觀察不到蛋白酵素活性。*E. tarda*培養於Brain Heart Infusion (BHI)培養液的分泌物用硫酸銨沈澱後，可使紅血球溶血(Chung et al. 1991)；並且測出有四種不同磷質酶的酵素活性，但含量很微少。因此，*E. tarda*的毒性因子，可能不是外毒素。

*F. ranacida*培養於羊血培養基和skim milk agar plate，在四十八小時就有clear zone出現。顯示有很強之hemolysin及protease活性。將此菌培養於BHI培養液，用硫酸銨沈澱其釋出之蛋白，經分析後，已鑑定出protease和sphingomylinase之活性。現正著手純化此二種酵素，以探討其分子結構及毒性之關係。

(二)、內毒素

1. 細胞膜分離

利用內外膜之間所含成分不同，造成密度相異性質，可用蔗糖梯度離心，將內外膜分離。*E. tarda*和*F. ranacida*內外膜分離技術已發表(Young et al. 1990, Faung et al. 1990, Lee et al. 1989, Chen et al. 1989)。表一比較此二種菌內外膜之性質，在淨力密度上及物理性質相似，然而蛋白質與磷脂質重量比(P/L)有明顯差異。*E. tarda*之P/L值，外膜是內膜的兩倍；而*F. ranacida*是內膜

表一 *Edwardsiella tarda*和*Flavobacterium ranacida*之內外膜性質¹

性質	<i>E. tarda</i>		<i>F. ranacida</i>	
	內膜	外膜	內膜	外膜
淨力密度(g/ml)	1.16±0.01	1.21±0.01	1.18±0.01	1.21±0.03
蛋白質/磷脂質 (重量比)(P/L) ²	3.60±0.25	7.21±0.53	5.00±0.35	3.25±0.21
顏色	黃橙	乳白	黃橙	粉紅

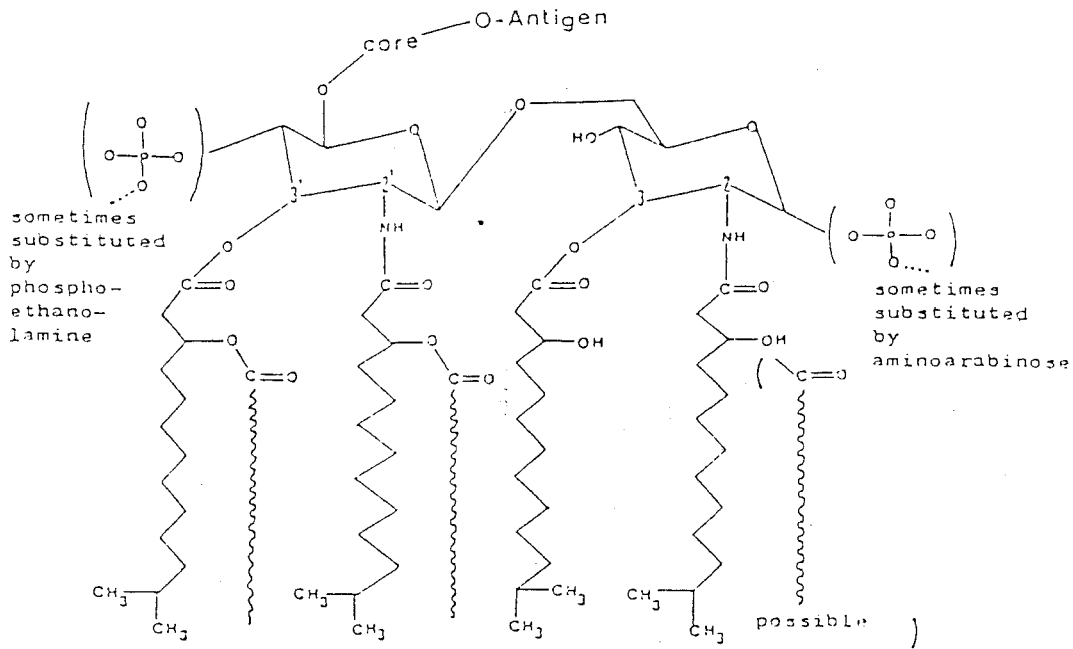
1. 細菌內膜及外膜是以蔗糖梯度密度離心分離(Faung et al. 1990, Chen et al. 1989).
2. 蛋白質質量以Lowry法測定(Lowry et al. 1959)磷脂質質量以磷呈色反應定量(Rower and Flisher 1967).

大於外膜。測定細胞膜P/L比值，是暗示細胞膜功能的指標。這已暗示兩菌在維持存活的生理功能之機制上有顯著不同。功能上，內膜因扮演較多不同角色，P/L值應該要比外膜高。而*E. tarda*卻是外膜之P/L值比內膜高。有一個可能是*E. tarda*外膜含有較多的Amino-sugar，而干擾蛋白質的定量。兩種細菌的內膜均呈黃橙色，但外膜顏色不同。*E. tarda*呈現乳白色，而*F. ranacida*呈現粉紅色。這也暗示兩種的脂多醣有顯著不同。

2. 脂多醣

當革蘭氏陰性菌感染宿主細胞後，宿主細胞吸收其內毒素而導致發熱，毛細管滲透性增加等病徵(Davis et al. 1981)。此內毒素即菌體瓦解後所釋放之脂多醣。脂多醣為長鏈醣類連接一段脂質，脂質為毒性其本所在，醣類則扮演抗原之角色，特定之菌株具有特定的脂多醣構造，整個分子結構簡式為 (O-antigen)-Core--(Lipid-A) (圖三)，其中：

- (1) O-抗原(O-antigen)：長鏈醣鏈，由重覆的相同單元組成，每一單元含數個以固定方式連接之糖分子。單一菌體上具長短不一之脂多醣分子，即O-抗原之單元重覆程度不一。此段長鏈碳水化合物即菌體之O-抗原。
- (2) 核心(Core)：介於O-抗原與Lipid-A之間約10個糖分子（最少者為2-3個）之寡糖。含特殊分子八碳去氧酮醣KDO (2-keto-3-deoxyoctonate, 3-deoxy-D-manno-octulosonate), KDO數目依



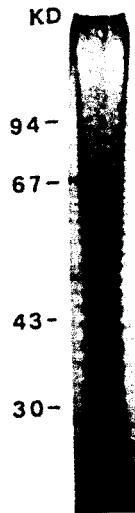
圖三 假設之的脂質-A結構

菌種之不同而不同。

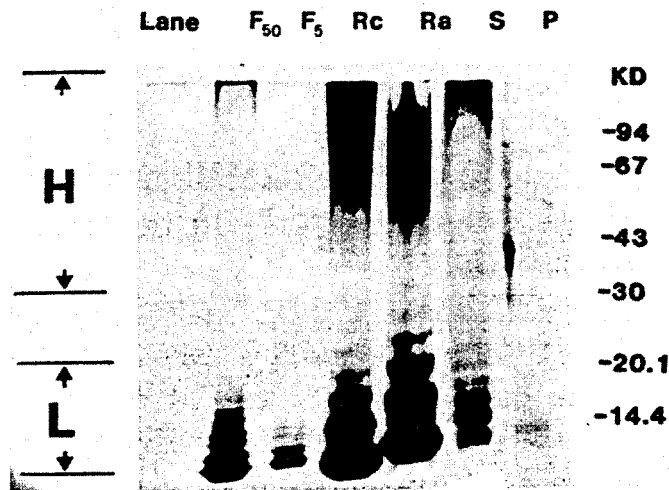
(3)脂質-A (Lipid-A)：構成外膜脂雙層所必須。於腸內菌科為 6 至 7 個分子的脂肪酸，連接在兩個胺糖(Glucosamine)上，不同的菌種有不同的脂肪酸組成。

*E. tarda*脂多醣由純化後之外膜抽取。分析其碳水化合物、磷、胺基、脂肪酸，得到其比值為28：2：2：6。以10% Polyacrylamide gel跑電泳後以銀染呈色（圖四），其階梯形升降表示分子大小規則變化，即脂多醣之O-抗原有重覆的糖鏈單元。由電泳所見分子量大小計算其糖鏈長度，最長為345個糖基，最短為68個糖基，每單元 9 個糖基。脂質-A部份以甲基支鏈化 β -Hydroxymyristic acid (14：0, OH) 為主要脂肪酸，佔 60%，其次為Myristic acid (14：0)及Palmitic acid (16：0) (Lee et al. 1989)。

由*F. ranacida*分離得到之脂多醣以SDS-PAGE 電泳後，經銀染呈色，發現脂多醣以短糖鏈者占大多數，且以不帶O-抗原者含量最高（圖五）。脂質-A為脂多醣毒性所在，分析脂質-A的脂肪鏈種類包括：(a)、不同碳鏈長度的飽合脂肪酸，(b)、長鏈醇類，(c)、具支鏈的脂肪酸，(d)、一系列 β -Hydroxy fatty acid的衍生物(Young et al. 1990)。其中以12碳醇(1-Dodecanol)含量最多，佔18.89%，而肉豆蔻酸(14：0)，棕櫚酸(16：0)及硬脂



圖四 10% SDS-PAGE分離*Edwardsiella tarda*之脂多醣後，以銀染法 (Tsai and Frash, 1982) 呈色



圖五 14.5% SDS-PAGE分離*Flavobacterium ranacida*之脂多醣後，以銀染法呈色。

Lane F50, 50 μg 之*F. ranacida*脂多醣

Lane F5, 5 μg 之*F. ranacida*脂多醣

Lane Rc, 從Rc變異型之*Salmonella typhimurium*取得之脂多醣

Lane Ra, 從Ra變異型之*Salmonella typhimurium*取得之脂多醣

Lane S, 從平滑型之*Salmonella typhimurium*取得之脂多醣

Lane P, Standard Maker

酸(18:0)三者的含量都接近10%。分析脂多醣的化學組成，得到脂多醣中，胺醣：七碳醣：磷：脂肪酸的莫耳數比為11:1:3:6。此菌不含去氧八碳酮醣(3-deoxy-D-manno-octulosonate; KDO)，此可為鑑定此菌的指標之一。

*E. tarda*和*F. ranacida*之脂多醣結構確實有很大差異。*E. tarda*之脂多醣，其O-抗原每單元是九個糖分子組成(Lee et al. 1989)，而*F. ranacida*之O-抗原為十八個糖基(Young et al. 1990)。脂質-A上的脂肪酸成分，兩種細菌亦有不同(表二)(Lee et al. 1989, Young et al. 1990)。Lipopolysaccharide構造含稀有糖分子及修飾官能基，脂質-A及緊鄰之數個核心部份八碳糖為維持細胞生命所必須。脂質-A之飽和脂肪酸提供外膜之屏障作用，如盤尼西林G (Penicillin G)不易進入革蘭氏陰性菌，而易進入革蘭氏陽菌阻止細胞壁之生合成。O-抗原之長鏈碳水化合物使得細菌表面變成高度親水性，降低對宿主吞噬作用的感受性。且由於各種菌株O-抗原之歧異，宿主往往不具備抗體，而得以躲避免疫系統追蹤。

有關Lipopolysaccharide之報告，以大腸桿菌(*E. coli*)、傷寒桿菌(*Salmonella typhimurium*)及*Salmonella minnesota*發表最多。目前已定出某些菌株之Lipopolysaccharide結構，其生理效應如刺激老鼠骨髓巨噬細胞產生腫瘤破壞因子(Holter et al. 1987, Sayer et al. 1987)，引導單核球細胞表現Interleukin II接

表二 比較不同致病菌之脂質 A 中脂肪酸與醇類所占的莫耳數比例

脂肪酸	<i>F. ranacida</i>	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Lauryl alcohol	2	0	0	0
3-hydroxymyristic acid	1	4	3	4
Lauric acid	0	0	1	1
Myristic acid	1	1	1	1
Pentadecaneic acid	1	0	0	0
Palmitic acid	1	1	1	0

資料來源：*E. tarda*取自Lee et al. (1989); *E. coli* (strain D31m4)取自Boman and Monner (1975); *S. typhimurium*取自Rick et al. (1977).

受器(Fuhlbrigge et al. 1987, Holter et al. 1987), 活化人類血清中之補體系統等免疫方面及構造-功能關係研究很多(Vukajlovich et al. 1987, Wentworth and Ziegler 1987, Jakway and DeFranco 1986), 另已了解Lipopolysaccharide在細胞膜上之生合成為脂質-A在內膜先合成好, 核心糖再以嚴謹的次序由特定的Glycosyl transferase將糖由糖-核酸複合物(Sugar-nucleotide complex)轉移到脂質-A上。O-抗原先以Undecaprenol-phosphate當攜帶物, 整個O-抗原合成好後再接到核心尾端, 轉位到外膜(Raetz 1993, Raetz 1990)。最新的進展為尋找針對Lipopolysaccharide生合成之抗生素。E. tarda之脂肪酸與E. coli和S. typhimurium相似(表二), 暗示其脂質-A可能也有毒性。而F. ranacida之脂肪酸則與前三者不同, 其脂質-A之毒性值得去探討。

3. 磷脂質

細菌的磷脂質主要存在於胞膜上。E. tarda和F. ranacida的極性脂質成分極為不同(表三)(Faung et al. 1990, Chen et al. 1989)。E. tarda極性脂質主要含有磷脂質。而F. ranacida則是磷脂質和醣脂質各一半。E. tarda內、外膜之磷脂質成分並無太大差異(表四), 主要的磷脂質有phosphatidylethanoamine (PE), lyso-phosphatidylethanoamine (lyso-PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG)和少量之phosphatidylcholine (PC)。而F. ranacida之磷脂質則只有PE和

表三 *Edwardsiella tarda*和*Flavobacterium ranacida*之脂質組成¹

脂質種類 ²	<i>E. tarda</i>	<i>F. ranacida</i>
	% of total cell lipid (w/w)	
中性脂質	14.4 ± 3.5	11.7 ± 2.3
極性脂質 ³	75.0 ± 5.8	81.3 ± 6.7
磷 脂 質	66.7 ± 7.5	36.2 ± 2.1
醣 脂 質	ND ⁴	48.8 ± 3.7

- 1.取自己發表之研究報告(Faung et al. 1990; Chen et al. 1989)。
- 2.由矽酸膠管柱分離, 由氫仿沖出之脂質為非極性, 接著由甲醇沖出之脂質為極性。
- 3.極性脂質中還含自由型脂肪酸。
- 4.ND=not detectable

表四 *Edwardsiella tarda*和*Flavobacterium ranacida*之磷脂質組成^{1,2}

磷脂質	<i>E. tarda</i>	<i>F. ranacida</i>
	% of total phospholipids	
PE	77.3 ± 1.25	80.99 ± 2.03
lyso PE	3.8 ± 0.05	19.00 ± 2.01
DPG	11.2 ± 0.21	ND ³
PG	6.9 ± 0.01	ND ³
PC	0.8 ± 0.01	ND ³

1. 收成之細菌直接用Bligh-Dyer法(Bligh and Dyer, 1959)萃取脂質所得。
2. 全部細胞膜是細菌經Lysozyme處理，超音波振盪打破後，離掉未破細菌，再經超高速離心所得之內膜和外膜混和的Vesicle。
3. ND = not detectable

PE: phosphatidy lethanolamine

Lyso PE: lysophosphatidy lethanolamine

DPG: diphosphatidy lglycerol

PC: phosphatidy lcholine

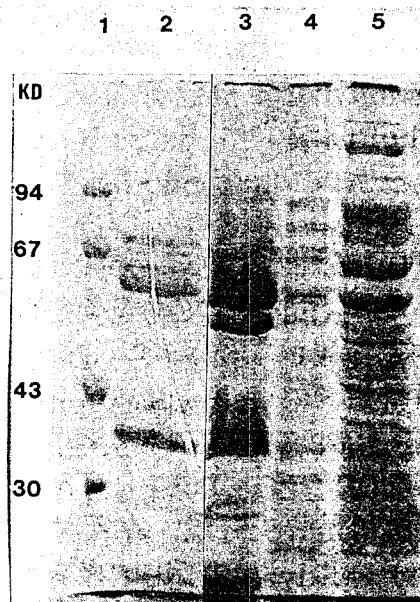
lyso-PE。在*E. tarda*細胞膜的磷脂質以PE含量最高，佔全部磷脂質的75%；PG、DPG和lyso-PE含量大約相等；但外膜lyso-PE遠較內膜為高，約是內膜的二倍。PG、DPG的含量，內膜較外膜為多。一般腸內菌科如：*E. coli*、*S. typhimurium*等菌，細胞膜上磷脂質的成分以PE (78%)為主，其次是PG、DPG，但*E. tarda*經分析發現其不僅含PE、PG、DPG，而且含lyso-PE和PC。這二種磷脂質在這一細菌科是鮮少發現。在探討*E. tarda*細胞膜上脂質可能具有的毒性分子，以lyso-PE和PC最有可能。因為lyso-PE是一種界面活性劑(Denizot et al. 1986, Helenius and Simons 1975)，它具有溶解細胞之特性；PC則是因為它的衍生物PAF (platelet activating factor)是anaphylaxix和hyperreactivity的potent mediator，可能參與post-ischemic disorder, central nervous system disorder，免疫反應的調節和引起血小板的凝集(Braquest and Rola-Pleszczynski 1987, Hanahan 1986)，而且近來*E. coli*被發現有PAF的釋放。分析各種磷脂質之脂肪酸組成(Chen et al. 1989)，知道*E. tarda*各種磷脂質之主要脂肪酸是

Palmitic acid (16: 0)(在全部磷脂質中佔60%)；而*F. ranacida*的PE和lyso-PE的主要脂肪酸為12-methyl myristic acid (c 15 : 0)。此12-methyl myristic acid也是*F. ranacida*之自由脂肪酸的主要成分。在動物的脂肪酸成分中，並無發現12-methyl myristic acid 的存在。而12-methyl myristic acid的分子結構上，有一甲基的分叉，可能扮演擾亂(perturb)細胞膜功能的作用，因此推測可能是致病因子。

總結來說，由脂質之成分分析，得知*E. tarda*之磷脂質組成成分與*E. coli*相近(Devaux and Seigneuret 1985)。而*F. ranacida*與*Halobacterium halobium*相似，均含有高量之醣脂質($\geq 30\%$ of total cell lipid)。 *F. ranacida*已知為eubacteria，但由脂質分析，暗示此菌在演化上屬於較原始種(primitive)。

4. 膜蛋白

*E. tarda*之內、外膜蛋白經電泳膠片觀察，內膜與外膜有兩主要蛋白質，其分子量分別為30 KDa與37 KDa (圖六)。內膜蛋白質組成比外膜複雜，在高分子量處有較多蛋白質(Lee et al.



圖六 10% SDS-PAGE分離*Edwardsiella tarda*膜蛋白。以2.5% coomassive blue染色。

Lane 1, Standard Maker

Lane 2, 缺鐵條件下之外膜

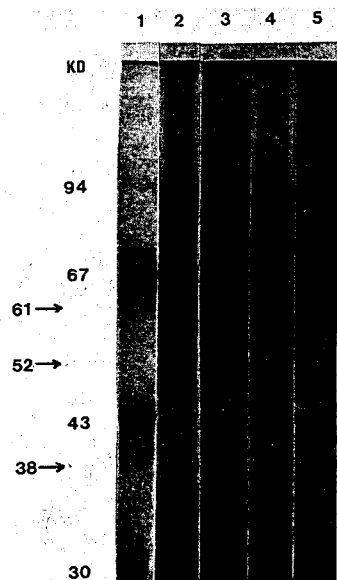
Lane 3, 正常條件下之外膜

Lane 4, 缺鐵條件下之內膜

Lane 5, 正常條件下之內膜

1989)。內膜具備很多酵素性蛋白質，為生合成場所，此與結果相當吻合。我們曾發現內膜具有DNase活性，這可以解釋細菌在抵抗DNA或噬菌體感染方面的可能防禦機制。腸內細菌科細菌特徵為32 KDa-37 KDa範圍有一至三個主要蛋白質，具porin功能(Aoki and Holland 1985, DiRienzo et al. 1978)。比較此株*E. tarda*與其他已報導之*E. tarda*菌株(Aoki and Holland 1985)，此30 KDa蛋白質即別文所報導之35 KDa porin，所得之37 KDa蛋白質相當於45.2-46.5 KDa之診斷蛋白。此外，將菌培養於缺鐵情況下，發現65 KDa蛋白質被引發合成，55 KDa蛋白質被抑制(Lee et al. 1989)。55-75 KDa群之蛋白質相對於*E. coli*之已報告之74-81 KDa群蛋白質，此群蛋白質分別為：feu 8 (81 KDa), Fe-enterochelin uptake; cit (80.5 KDa), Fe-citrate uptake; ton A (78 KDa), Fe-ferrichrom uptake; 83 KDa及cir (74 KDa)，皆可被鐵抑制(DiRienzo et al. 1978)。所以*E. tarda*之毒性與鐵吸收能力可能有關(Aoki and Holland, 1985)。

*F. ranacida*之內、外膜蛋白，以SDS-PAGE 展開，comassie blue呈色，分析蛋白質組成的差異(圖七)(Young et al.



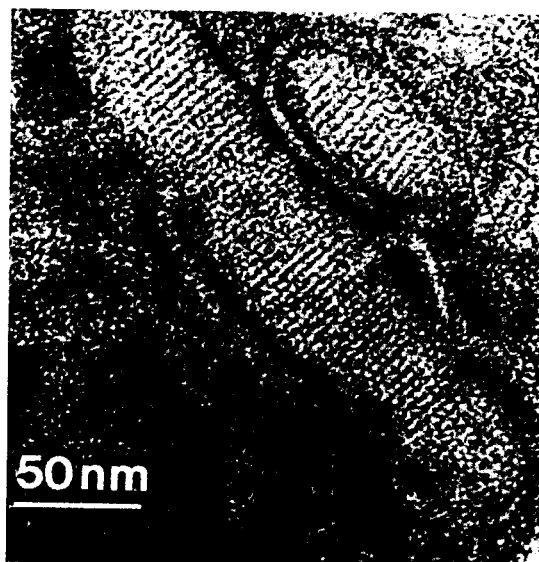
圖七 10% SDS-PAGE分離*Flavobacterium ranacida*膜蛋白。(以2.5% coomassie blue染色)

- Lane 1, Standard Maker
- Lane 2, 缺鐵條件下之外膜
- Lane 3, 正常條件下之外膜
- Lane 4, 缺鐵條件下之內膜
- Lane 5, 正常條件下之內膜

1990)，發現許多蛋白質彼此交互作用力強，使用Laemmli電泳系統的sample buffer會造成高分子量區眾多蛋白質分佈。在membrane fraction中含有五種以上與內膜和外膜成份不同的蛋白質，這些蛋白質可能存於periplasmic space中，用來當做外毒素；其中有一種52 KDa蛋白，限制鐵的生長條件下會大量增加，可為證明。外膜的蛋白質組成較內膜單純，主要種類不超過十種，其中含量最高為S-layer蛋白，其次為一76 KDa蛋白，而其功能未知。另外，在限制鐵離子的生長條件下，有一38 KDa的蛋白質被誘發產生，此蛋白質可能與攝取鐵離子複合物進入細胞有關(Young et al. 1990)。

從以上兩種細菌的膜蛋白研究中，我們可以證實，鐵離子對細菌的繁的確是必需(Young et al. 1990)。許多細菌在低鐵的環境下，會產生與鐵離子結合的配位基，即siderophore，及攝取“鐵離子—配位基”的複合物。這些增強毒性的系統，對許多微生物是必需的。而這些系統可經由plasmid transposon的產生而達到。例如：在E. coli的siderophore攝取系統，其染色體及plasmid主要由fur的基因產物所控制，此產物於鐵存在下，可抑制許多gene loci的轉錄作用，為一總體性調節因子。

此外，在F. ranacida分離所得之外膜，以負染色法染色，在穿透式電子顯微鏡下，可看到其表面具規則橫紋，寬度為3.5-4.5 nm，與外膜長軸相垂直，此即為S-layer蛋白質（圖八）。由於



圖八 電子顯微鏡負染法顯示病原菌Flavobacterium ranacida細胞外膜表面之S-layer結構。

S-layer厭水性高，於負染色時，使外膜不易附著於formvar薄膜上，而不易被染色，因此照片有染色不均的現象(Young et al. 1990)。在外膜蛋白質分析中，有一含量最高之蛋白質，且僅存在於外膜，分子量為61KDa (Young et al. 1990)，可能就是構成S-layer之蛋白質分子。而*Aeromonas hydrophila* (Dooly and Trust 1987)和其他同屬有病原性的菌株，及*Campylobacter fetus* (Dubreuil et al. 1988)都存在有此S-layer或paracrystalline surface protein。這種蛋白質以規則的結構排列在最外層，與宿主體內的細胞及體液接觸，可戰勝宿主的免疫系統，在病原性上有重要關係。其中*C. fetus*與*F. ranacida*的S-layer皆呈直線規則排列。*C. fetus*的S-layer蛋白質已經生化分析，得知胺基酸順序，分子量為131 KDa，沒有醣基存在，相對厭水性為41.2%，親水性胺基酸主要由酸性胺基酸組成，佔22%，鹼性胺基酸僅佔6%。完整蛋白質的pI值是6.35，但變性後升高到8.0。不同細菌間也無共同性。比較*C. fetus*與*F. ranacida*的S-layer蛋白質寬度比($8.75/4.0=2.18$)，約等於分子量比($131/61=2.15$)。由此亦可說明*F. ranacida*之S-layer蛋白質的寬度較窄的原因，是因為蛋白質單元體較小之故。而*F. ranacida*的S-layer蛋白質，可進一步用酸性緩衝液將其解離下來，再以管柱層析法純化蛋白質單元體後，分析結構及生化上的特性；並以之注射兔子，製備單株抗體，標示上螢光劑後，更可作為快速診斷試劑之用。

三、結 論

臺灣水產養殖兩種病原菌*Edwardsiella tarda*和*Flavobacterium ranacida*之致病因子，已鑑定出*E. tarda*之外毒素活性很低，可能非其致病因子。而*F. ranacida*之外毒素，則有明顯之蛋白酶及磷質酶活性。分析脂多醣之脂質-A，知*E. tarda*之脂多醣，可能是其重要致病因子之一。而*F. ranacida*之脂質-A是否具毒性，則尚待探討。*E. tarda*之脂質含有少量卵磷質，可能是其致病因子之一。而*F. ranacida*含有高量12-methyl myristic acid，可能是此菌致病因子之一。而*F. ranacida*之外膜具有S-layer蛋白(61 KDa)。這些探討，提供應用於此二種病原菌之感染及診斷上之基本訊息。

謝 辭

研究由農委會農糧處及漁業處計畫補助(計畫編號：82科技—

1.1-糧-56-69, 81農建-12. 2-漁-02 (11), 80農建-7.1-糧-121 (65), 79農建-7.1-漁-21 (6) 特此致謝。

參考文獻

- Alouf JE, Freer JH Eds. 1991. *Sourcebook of bacterial protein toxins* Academic Press, San Diego, CA. Chp. 12 p-518.
- Aoki T, Holland BI. 1985. The outer membrane proteins of the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Edwardsiella tarda*. FEMS Microbiology letters 27: 299-305.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Braquest P, Rola-Pleszczynski M. 1987. Platelet activating factor and cellular immune response. Immunol. Today 8: 345-352.
- Carruthers A, Melchior DL. 1986. How bilayer lipids affect membrane protein activity. Trends Biochem. Sci. 11: 331-335.
- Chen TZ, Faung ST, Wang CT. 1989. Characterization of membrane phospholipids of *Edwardsiella tarda*. Fish Dis. Res. 9: 16-22.
- Chung HY. 1990. On the bacterial disease of captive bullfrog. Proc. R.O.C.-Japan Symp. Fish Dis. p81-89.
- Chung HY, Lin IH, Hsu KH, Lin CK, Wen MT, Kou GH. 1986. Study on septicemic epizootic of culture bullfrog caused by *Flavobacterium* sp.. Fish dis. Res. 8: 18-27.
- Chung YW, Hsieh TF, Wang CT. 1991 Identification of phospholipase activities in the exotoxins of *Edwardsiella tarda*. Fish Dis. Res. 11: 39-46.
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. 1981. Microbiology. Haper and Row Publishers, Hagestown, Chp. 24 p559.
- Denizot TY, Dassa E, Bouillet C, Benveniste T. 1986. C. R. Acad. Sci. Paris 303: 699-702.
- Devaux FP, Seigneuret M. 1985. Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques. Biophys. J. 48: 63-125.
- DiRienzo J, Nakamura K, Inouye M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. Annu. Rev. Biochem. 47: 481-502.
- Dooley JSG, Trust TJ. 1987. Surface protein composition of

- Aeromonas hydrophila virulent for fish: identification of a surface array protein. J. Bacterol. 170: 499-506.
- Dubreuil JD, Logan SM, Cabbage S, Eidhin DN, McCubbin WD, Kay CM, Beveridge TJ, Ferris FG, Trust. 1988. Structure and biochemical analysis of a surface array protein of Campylobacter fetus. J. Bacterol. 8: 4165-4173.
- Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR Lubin A H. 1965. Edwardsiella a new genus of enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 15(1): 33-38.
- Faung ST, Hsieh TF, Wang CT. 1990. Membrane lipids of Flavobacterium sp. isolated from infected pond-culture bullfrog in Taiwan. Fish Dis. Res. 10: 80-89.
- Fuhlbrigge RC, Chaplin DD, Kiely JM, Unanue ER. 1987. Regulation of interleukin I gene expression by adherence and lipopolysaccharide. J. of Immunol. 138: 3799-3802.
- Hanahan DJ. 1986, Platelet activating factor: A biological active phosphoglyceride. Annu. Rev. Biochem. 55: 483-509.
- Helenius A, Simons K. 1975. Solubilization of membrane by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79.
- Hitchcock PJ, Leive L, Makela PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. 1986. Minireview, Lipopolysaccharide nomenclature-past, present and future. J. of Bacteriology 166: 705-720.
- Holter W, Goldman CK, Nelson CDL, Greene WC, Waldmann A. 1987. Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon- γ stimulated human monocytes J. Immunol. 138: 2917-2922.
- Hoshina T. 1962. On a new bacterium *Paracolobactrum anquillimortiferum*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 28(2): 162-164
- Jakway JP, DeFranco AL, 1986. Pertussis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. Science 234: 743-745.
- Lee YC, Young WJ, Wang CT. 1989. Characterization and reconstitution of lipopolysaccharide from Edwardsiella tarda. Fish Dis. Res. 9: 7-15.
- Liu CY, Chien MC. 1986 Studies on pathogenesis of Edwardsiella in experimentally infected eels. Fish Dis. Res. 7: 68-78.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Radll RJ. 1951. Protein

- measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Raetz CRH. 1993. Bacterial endotoxins: Extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J. of Bacteriology* 175: 5745-5753.
- Raetz CRH. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 129-170.
- Rick PD, Fung WM, Ho C, Osborn MJ. 1977. Lipid A mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 252: 4904-4912.
- Roberts RJ. 1978, *Fish Pathology* Builliere Tindall London, p190.
- Rosner MR, Tang JY, Barzilay I, Khorana HG. 1979. Structure of lipopolysaccharide from an *Escherichia coli* heptoseless mutant. *J. Biol. Chem.* 254: 5906-5917.
- Rower G, Flisher S. 1967. Isolation, characterization and determination of polar lipid of mitochondria. *Methods and Enzymology* 10: 385-406.
- Sayer TJ, Macher I, Chung J, Kugler E. 1987. The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophage in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monosaccharide precursor. *J. Immunol.* 138: 2935-2940.
- Tsai CM, Frash CE. 1982 A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.
- Ullah MA, Aria T. 1983. Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.* 18(2): 65-70.
- Vukajlovich SW, Hoffman J, Morrison DC. 1987. Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharide : Structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways. *Mol. Immunol.* 24: 319-331.
- Watson JJ, White FH. 1978. Hemolysins of *Edwardsiella tarda*. *Can. J. Comp. Med.* 43: 78-83.
- Wentworth PA, Ziegler HK. 1987. Induction of macrophage Ia expression by lipopolysaccharide and *Listeria monocytogenes* in congenitally athymic nude mice. *J. of Immunol.* 138: 3167-3173.

Young WJ, Hsieh TF, Wang CT. 1990. Isolation and characterization of lipopolysaccharide from *Flavobacterium* sp.. *Fish Dis. Res.* 10: 70-79.