

## 魚病細菌 *Edwardsiella tarda* 內外膜磷脂質之分析

### Characterization of Membrane Phospholipids of *Edwardsiella tarda*

陳調榮·房錫廷·王成德

Tiao-Zoan Chen, Shyin-Tyng Faung and Cheng-Teh Wang

#### Abstract

The cell envelope of *E. tarda* was separated into cytoplasmic and outer membrane fractions by the isopycnic sucrose density gradient centrifugation. The analysis of lipid content showed that both outer and inner membrane similarly consisted of 80% polar lipid and 14% neutral lipid. Of total phospholipid, phosphatidylethanoamine (PE) was 75%. The others were phosphatidylglycerol (PG), 7%, diphosphatidylglycerol (DPG), 10%, lysophosphatidylethanoamine (lyso-PE), 7.5%, and trace phosphatidylcholin (PC). Although the phospholipid compositions between the outer and inner membrane were respectively similar, lyso-PE was preferably in the outer membrane, while DPG and PG were in the inner membrane. Lyso-PE and PC were not generally found in the membrane of enteric bacteria. It is possible that these two kinds of phospholipid in *E. tarda* contribute the toxic factor in fish pathology.

#### 緒 論

*E. tarda* 屬於腸內細菌科 (Ewing W. H. *et al.* 1965, Hoshina T. 1962)，是一種革蘭氏陰性有周鞭毛的短桿菌，當魚受此菌感染後常造成腸胃潰瘍症，症狀通常是皮膚紅腫、敗血、溶血等現象 (Liu L. Y. and Chien M. C. 1986; Roberts R. J. 1978)。革蘭氏陰性菌的外套是包括外膜、內膜和介於二者間的莖醣。每一層表現的形態及化學性質都有所不同 (Gluert A. M. and Thornley M. J. 1969, Osborn M. J. 1969)。外膜和內膜都含有一般胞膜所具備的蛋白質和脂質，但外膜則多出一種高量而特別的脂多醣。

組成胞膜的脂質，幾乎都是磷脂質，所以說磷脂質是構成生物膜的基質，細胞膜上的蛋白質則以鑲入或附着表面的形式和磷脂質結合在一起 (Robertson J. D. 1981)。細胞膜上的磷脂質還具有生理功能，其組成除了會影響胞膜的物理性質 (Jost P. C. *et al.*, 1977; Nagle J. E. and Scott H. L. 1978; Sanwal B. D. 1979)，且會因磷脂質 head group 及 acyl chain 的改變而影響到蛋白質的活性 (Carruthers A. and Melchior D. L. 1986)。又者磷脂質本身也扮演細胞刺激物，例如，platelet activating factor (PAF) 是 PC 的衍生物，可調節免疫反應，並促進血小板凝集；lyso-PE 是一種界面活性劑，可使細胞溶解 (Helenius A. and Simons K. 1975; Hanahan

D. J. 1986; Braquest P. and Rola P. M. 1987; Denizot T. Y. *et al.* 1986)。所以分析膜上磷脂質成分，不僅可以了解 *E. tarda* 內外膜的成分，增進對胞膜基質的知識，進而可提出在漁病上預防 *E. tarda* 感染或治療的方法。

## 材料與方法

### 材 料

本實驗所使用之菌株由臺大漁料所鍾虎雲教授提供，編號為 strain 8200123-6K，是從鰻池之愛德華氏病自然感染之病鰻體內分離得來。而化學藥品、有機溶劑、silica gel 60-H、薄層色層分析片均購自 E. Merk Inc. Sodium lauryl-sarcosinate 購自 Sigma. Chem. Comp.，有機溶劑如甲醇氯仿等使用前須先蒸餾。

磷質標準樣品購自 Serva. Chem. Comp.，酵素 (lysozyme) 購自 Boehringer Mannheim GmbH (Made in West-Germ)，培養基：Sallmonella Shigella agar 購自 DLV Becton Dickinson & Co. R-D Lockey Svilleil, Brain Heart Infusion 則購自 Difco Lab。

### 方 法

#### 細菌培養

將 *E. tarda* 培養於 Sallmonella Shigella agar 培養基上 (60 克 S. S. agar 與 1 升去離子水混合均勻，加熱至 50°C 後，經高溫滅菌後，倒入消毒過之培養皿，每個約裝 20cc 讓其冷卻凝固)。在 35°C，培養 24 小時，取一個菌落種於 2 cc B. H. I. (Brain Heart Infusion) 培養液，在 35°C 經 10~12 小時培養後，將其轉換至大體積相同培養液 (滅菌處理過) 繼續培養，當 O. D.<sub>600</sub> 讀值為 0.5~0.6 時，將培養液急速冷卻至 4°C，以便作菌體收集及進一步分析。

#### 細菌內外膜分離

將細菌培養液中的細菌，以 10000 rpm (Beckman J<sub>2</sub>-21，離心機，Rotor JA-14) 的速度在 4°C 離心 5 分鐘，所得細菌用冷的 STE 緩衝液 (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.8) 清洗一次後，將所得乾淨細菌重新懸浮於冷的 0.75 M Sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 7.8 緩衝液 (每升菌液所得菌約需溶於 20 毫升)。然後迅速加入 lysozyme，最終濃度 100 µg/ml，並置於冰浴中。然後緩慢且攪拌地加入冷的 1.5 mM EDTA-Na<sup>+</sup> pH 7.5 緩衝液 (時間 10~15 分鐘，量為 Sucrose 緩衝液二倍)。經 lysozyme 處理過的細菌，已變成 spheroplast，再利用超音波振盪器將 spheroplast 打破，直到細菌 O. D. 值降至原先的 5% 以下。然後以 3400 rpm 離心 20 分鐘 (Rotor JA-21)，取上清液再以 54000 rpm 4°C，離心 2 小時 (Beckman L8-80M 超高速離心機，Rotor Ti 70.1) 再將沉澱物懸浮於 1~6 毫升含 5 mM EDTA pH 7.4 之冰冷 25% (w/w) 蔗糖溶液，以便進一步做密度梯度離心。

蔗糖密度梯度離心，其每一梯度的濃度依序為含有 5 mM EDTA pH 7.4 的 50%、45%、40%、35%、30% (w/w) 之 1.9 毫升蔗糖溶液，並以 0.454 毫升 55% 的蔗糖溶液為基底，細胞膜的懸浮液 (濃度約為 8 mg 蛋白質/ml) 置於梯度最上層，在 4°C 以 25000 rpm，離心 22 小時 (Rotor SW41)，經蔗糖梯度離心，可得到外膜和內膜。為避免外膜被內膜污染，可將得到之外膜稀釋 10 倍，並加入 0.2~0.3% 離子性界面活性劑 Sodium-Lauryl Sarcosinate，在室溫下反應 20 分鐘，以溶解存在的內膜成份，再以 54000 rpm 4°C 離心 2 小時 (Rotor Ti 70.1)，以除掉 Sodium-Lauryl Sarcosinate 及溶解掉的內膜沉澱物即為純的外膜 (Osborn M. J. *et al.* 1972, Hindahl M. S. and Iglew B. H. 1984)。蛋白質定量是利用 Lowry *et al.* (1951) 的方法，以 BSA 做標準。

### 極性與中性脂質的分離

萃取脂質是利用 Bligh 和 Dyer (1959) 所設計的方法，將萃取到的脂質利用矽膠管柱方法分離，可將其分為極性與中性脂質 (Pond J.L. *et al.*, 1986)。

### 極性脂質的定性與定量

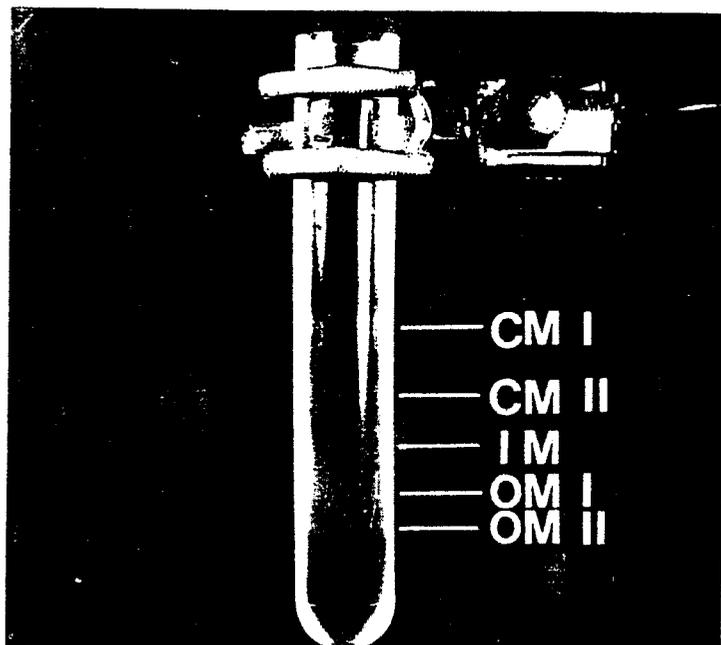
內外膜磷脂質的定性是採用薄層色層分析法，薄層片由矽膠 60 覆蓋，厚 0.25 mm，層析實驗中二度空間展開液系統為：第一度空間液 65:25:4:4=氯仿:甲醇:氨:水，第二度空間液 65:25:10=氯仿:甲醇:醋酸 (Shibuya I. *et al.* 1985)。跑完的薄層片吹乾後，置入含碘晶體的玻璃槽中，利用碘蒸氣顯色，並與標準樣品比較。利用 Nihydrin 染色法 (Spies J.F. 1957)，可測定磷脂質上的胺基。磷脂質的定量是採 Rouser 和 Fleisher (1967) 的方法，利用磷的呈色反應做測定。

## 結果與討論

### 細菌內外膜分離

*E. tarda* 在 B.H.I. 培養液 35°C 下生長，首先以 5 ml 始培養源培養 8 小時，再把始養源用 B.H.I. 培養液稀釋 100 倍，其生長情況為：前 2 小時為遲滯期 (lag phase)，細菌無明顯增加，培養 3~8 小時為指數期 (log phase)，細菌數增至  $3.5 \times 10^9$  個，培養 8 小時以後進入靜止期 (stationary phase)。在指數期，*E. tarda* 30 分鐘完成一個世代。實驗細菌取指數期末端。

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 (圖一)。細菌經過 lysozyme-EDTA 處理後，介於內外膜間的莖醯被破壞，變成 spheroplast, spheroplast 經超音波振盪將打破成 vesicle，接著經蔗糖梯度離心，就可得如圖一五個 membrane fractions，且這五個 fractions 的蛋白質，磷脂質比值 (蛋白質/磷脂質) 隨密度增加而增加 (表一)。每個



圖一 蔗糖密度梯度離心得到的 fractions of *E. tarda* membrane vesicle. *E. tarda* 經 lysozyme, 超音波振盪處理後的懸浮液置於 rotor SW 41 的離心管中，以 25000 rpm 4°C 作蔗糖密度梯度離心，22 小時，所得到的實際照像圖。(實驗步驟參閱方法)

表一 *E. tarda* 內外膜特性

	CMI	Membrane CMII	Fraction <sup>1</sup>		
			IM	OMI	OMII
淨力密度 (g/ml)	1.163	1.180	1.191	1.206	1.213
蛋白質/磷脂質 (w/w)	3.600	4.390	5.890	6.320	7.210
顏色	橙黃	橙黃	乳白	乳白	乳白

## 1. 分離之 Fractions 參閱圖一

membrane fraction 在蔗糖梯度中表現顏色也有差別。主因在 OMI、OMII 所含 LPS 量遠高於 CMI、CMII。因為 LPS 利用 phenol-water 方法 (Cain B. D. *et al.* 1981) 萃取出來，呈顯乳白色，而利用電泳分析知 CMI 含 LPS 量最少，是最純的內膜。此外，可利用 sodium-laury sarcosynate 處理 (Filip C. *et al.* 1973) 能選擇性溶解細菌內膜，而得到純的外膜的 vesicle。

Sodium-laury sarcosynate 可選擇性溶解內膜 vesicle 的原因可能在於外膜的 vesicle 含大量 LPS，而此分子帶有很多的氫氧基，這些氫氧基能在 vesicle 外形成一親水性空間，使得 sodium-laury sarcosynate 無法穿越此空間接觸到 vesicle 表面；但在內膜形成的 vesicle 因為無 LPS 造成親水性空間，所以可輕易接觸 vesicle，並溶解它。

## 內外膜脂質成分的組成

由表二知內膜脂質含量遠較外膜為高，蛋白質含量也是較外膜高。此現象是外膜含有大量的 LPS，相對的脂質和蛋白質量就減少。內外膜的脂質/蛋白質 (w/w) 比值分別為 0.41, 0.23。利用矽膠酸管柱分離中性和極性脂質 (Pond J. L. *et al.* 1980)，知內外膜脂質有 80% (w/w) 為極性脂質，且幾乎是磷脂質。中性脂質所佔比例為總量 15%。

表二 *E. tarda* 內外膜脂質組成

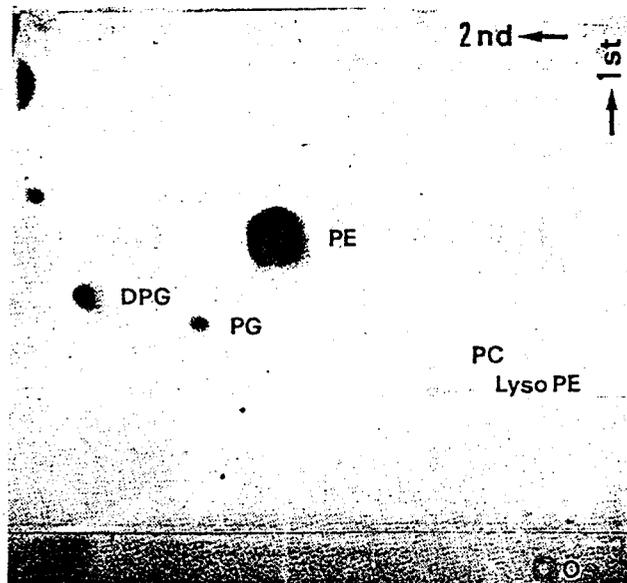
		脂質種類			
		總脂質	極性脂質 <sup>2</sup>	中性脂質 <sup>2</sup>	磷脂質 <sup>3</sup>
脂質含量 <sup>1</sup>	全部細胞膜	0.36±0.02	0.27±0.02	0.052±0.002	0.24±0.01
	外膜	0.23±0.02	0.19±0.02	0.032±0.002	0.18±0.01
	內膜	0.41±0.02	0.30±0.02	0.064±0.002	0.28±0.01

1. (mg/mg 蛋白質) 指每一毫克蛋白質約有  $1.19 \times 10^{10}$  個細菌，以此萃取所得到之脂質量。
2. 極性及中性脂質是利用矽膠酸管柱分離所得並稱重。
3. 磷脂質的重量是先以定磷呈色反應定量，再以 700 當作磷脂質平均分子量換算所得。

外膜含有大量的 LPS 和較低的脂質/蛋白質比值，可能是其密度較內膜高的原因。由表二所示，內膜和外膜的磷脂質/蛋白質比值不同，內膜較外膜高出約 0.1，此結果和其他細菌如 *E. coli*、*S. typh* (Mirra T. and Mizushima S. 1968, Filip L. *et al.* 1973) 一樣，外膜都有較低的磷脂質/蛋白質極性脂質中磷脂質佔了絕大多數，剩餘部份可能是醣脂質 (glycolipid)，但一般而言，*E. tarda* 和其它相關的革蘭氏陰性菌是不含有真核細胞所含有的 glycosphingolipid (Curatolo W. 1987)。

內外膜磷脂質組成

由二度空間薄層色層分析內外膜的磷脂質，並與標準樣品比較，得知 *E. tarda* 內外膜磷脂質成分並無差異（圖二），主要的磷脂質有 PE、lyso-PE、PG、DPG 和少量 PC。利用 ninhydrin 測試，確知只有 PE、lyso-PE 呈現紫色反應。從表三可知細胞膜的磷脂質中以 PE 含量最高，佔全量的 75%，PG、DPG 和 lyso-PE 含量大約相等。外膜上 lyso-PE 量較內膜約高二倍。PG 和 DPG 則是內膜含量較高。從分析中發現，*E. tarda* 含有 lyso-PE、PC；一般而言在腸內細菌科如 *E. coli*, *S. typh*，等，是鮮少發現這二種磷脂質；而 lyso-PE 又是一種界面活性劑 (Helenius A. and Simons K. 1975)，具溶解細胞能力；PC 則可以產生一種衍生物：platelet activity factor (PAF)，其結構式為 1-alkyl-2-acetyl-glycerol-3-phosphochol 而其在 anaphylaxis, hyper-reactivity 的 potent mediator，可能參與 post-ischemic disorder，中樞神經系統失調，免反應調節、血小板凝集的反應 (Hanahan D. J. 1986, Braquest P. and Rola P. M. 1987)。近來在 *E. coli* 發現有 PAF 的釋放 (Denizot T. Y. 1986)。



圖二 二度空間薄層色層分析 *E. tarda* 磷脂質結果。磷脂質抽出後，置於 silica gel 60 H plate 上，經第一度空間展開液氯仿：甲醇：氨水：水 (65：25：4：4)，及第二度空間展開液氯仿：甲醇：醋 (65：27：8) 得到之結果。

PE: phosphatidylethanoamine      PG: phosphatidylglycerol  
 PC: phosphatidylcholin              DPG: diphosphatidylglycerol  
 lyso-PE: lysophosphatidylethanoamine

Lyso-PE 是 PE 經 phospholipase 水解一個 acyl side chain 而轉變來的，而 lyso-PE 又幾乎在外膜，所以這個 phospholipase 可能位於外膜之上，例如 Osborn (1972) 發現 *S. typh* 的外膜有 phospholipase A 和 lysopholipase; Scanedell 和 Karnberg 從 *E. coli* 外膜純化出 phospholipase A (Raetz C. R. H. 1978)。又從表三所示經 lysozyme，超音波振盪處理過的細菌細胞膜，其 lyso-PE 含量較未經處理的高二倍，可能是在分離內外膜時，經超音注振盪處理過程中，誘發細菌 phospholipase 的活性，而切掉一個 PE 的 acyl side chain。PG 和 DPG 在一般真核細胞中幾乎很少發現，但在粒腺體的胞膜上含有相當量，且 DPG 在內膜量約為外膜二~4 倍

表三 *E. tarda* 內外膜磷脂質種類百分比

		磷 脂 質				
		PE <sup>4</sup>	LPE <sup>4</sup>	PG <sup>4</sup>	DPG <sup>4</sup>	PC <sup>4</sup>
生長 期	全細菌 <sup>2</sup>	77.3±1.6	3.8±0.6	6.9±1.4	11.2±0.8	0.8±0.1
	全部細胞膜 <sup>3</sup>	72.7±2.6	9.1±0.8	6.4±1.6	10.8±1.4	1.0±0.2
	外膜	70.8±1.4	18.8±2.0	3.7±0.6	5.8±1.1	0.9±0.1
	內膜	73.0±2.1	5.4±1.1	6.9±0.5	14.3±1.2	1.4±0.1
區 間 <sup>1</sup>	全細菌 <sup>2</sup>	78.5±1.8	4.1±0.5	7.6±0.8	8.6±0.6	1.2±0.2
	全部細胞膜 <sup>3</sup>	76.5±2.4	7.6±1.1	7.2±0.9	6.8±0.8	1.4±0.1
	外膜	69.8±1.2	20.6±1.5	6.0±0.4	4.2±0.4	0.6±0.1
	內膜	76.3±1.7	5.0±0.7	9.6±0.6	7.7±0.8	1.4±0.1

1. 利用 O.D.<sub>600</sub> 及 Coulter counter 測量細菌生長曲線，所顯示的生長狀態。
2. 收成之細菌直接用 Bligh-Dyer 方法萃取脂質所得。
3. 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合的 Vesicles。
4. PE: phosphatidylethanoamine      LPE: lysophosphatidylethanoamine  
PG: phosphatidylglycerol      DPG: diphosphatidylglycerol  
PC: phosphatidylinositol

，常於內膜一些酵素結合，具活化作用 (Daum G. 1985) 因此在 *E. tarda*, DPG 也可能對內膜蛋白質的功能有所貢獻。

內外膜磷脂質不對稱性分佈，其負責的機制尚未為人所知，但磷脂質合成酵素是位在內膜 (Osborn M. J. *et al.* 1972<sup>a</sup>; Osborn M. J. *et al.*<sup>b</sup> 1972)，在 *E. tarda* 細胞膜中 PG、DPG 的量外膜較少，可能是所需要維持蛋白質功能的量較少。在不同生長期細菌內外膜除 PG、DPG 有明顯不同外，餘無很大變化，在指數期 PG 佔總磷脂質的 6.9%，DPG 則為 11.2%；到靜止期，PG 升到 7.2%，DPG 則降為 6.8%，在一般革蘭氏陰性菌，在靜止期 cardiolipin 的量會增加，PG 則會減少 (Finnerty W. R. and Makula R. A. 1975; Hirschberg C. B. and Kennedy E. P. 1972)，因為是由 PG 四成 cardiolipin，且不需要能量，但合成 PG 却要耗能，本實驗的結果和一般菌不太一樣值得深入研究。

### 摘 要

*E. tarda* 內外膜經 lysozyme-EDTA 處理後變成 spheroplast，再經超音波振盪器打破後，便可利用蔗糖密度梯度離心將細菌內外膜分離。細菌外膜和內膜含有 80% 極性脂質及 14% 中性脂質，而極性脂質中幾乎完全是磷脂質，在磷脂質中以 PE 含量最高，佔全量 75%，次為 PG, 7%, DPG 10%, lyso-PE 7.5%，還有非常少量的 PC，雖然內外膜磷脂質成分相似，但 lyso-PE 幾乎完全位在外膜，PG, DPG 在內膜量較多。而在腸內細菌科的細胞膜上，很少發現 lyso-PE 和 PC，它們很有可能是 *E. tarda* 對魚類致病的重要因子之一。

### 致 謝

本研究承蒙農委會資助研究經費 (77 農建—7.1—漁—12(5))，特表謝忱；又於實驗期間臺大漁病室，鍾虎雲教授提供菌種及資料等諸多支持，謹此致謝。

## 參 考 文 獻

- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) "A rapid method of total-lipid extraction and purification." *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37: 811-917.
- Braquest, P. and Rola-Pleszczynski, M. (1987) "Platelet-activating factor and cellular immune responses." *Immunology Today*, 8: 345-352.
- Cain, B. D., Deal, C. D., Fraley, R. T. and Kaplan, S. (1981) "In vivo intermembrane transfer of phospholipids in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*." *J. Bacteriology*, 145: 1154-1166.
- Daum, G. (1985) "Lipids of mitochondria." *Biochim. Biophys. Acta*, 822, 1-42.
- Denizot, T. Y., Dassa, E., Boulet, C. and Benveniste, T. (1986) *C.R. Acad. Sci. Paris*, 303, 699-702.
- Ewing, W. H., McWhorter, A. C., Escobar, M. R. and 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.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. and Earhart, C. F. (1973) "Solubilization of cytoplasmic membrane of *E. coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate." *J. Bacteriology* 115(3), 717-722.
- Glauert, A. M. and Thornley, M. J. (1969) "The topography of the bacterial cell wall." *Ann. Rev. Microbiol.*, 23: 159-198.
- Hanahan, D. J. (1986) "Platelet activating factor: A biological active phosphoglyceride." *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 483-509.
- Hoshina, T. (1962) "On a new bacterium, *Paracolobactrum anquillimortiferum*." n. sp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 28(2). 162-164.
- Hindahl, M. S. and Iglewski, B. H. (1984) "Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane." *J. Bacteriology*, 159: 107-113.
- Helenius, A. and Simons, K. (1975) "Solubilization of membrane by detergents." *Biochim. Biophys. Acta*, 415: 29-79.
- Liu, C. Y. and Chien, M. C. (1986) "Studies on pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* in experimentally infected eels." *C. O. A. Fisheries Services No. 4 Fish Disease Research (VII)*, 68-78.
- Lowry, O. H., Roserrough, N. J., Furr, A. L. and Randall, A. L. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mivra, T. and Mizushima, S. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 150: 159-161.
- <sup>a</sup> Osborn, M. J. (1969) "Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall." *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 501-538.
- <sup>b</sup> Osborn, M. J., Gander, J. E., Paris, E. and Carson, J. (1972) "Mechanism of assembly of the outer membrane *Salmonella typhimurium*: Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane." *J. Biol. Chem.*, 247: 3962-3972.
- Pond, J. L., Langworthy, T. A. and Holzer, G. (1986) "Long chain diols: A new class of membrane lipids from a thermophilic bacterium." *Science*, 231: 1134-1136.
- Roberts, R. J. (1978) "Fish Pathology"—Builliere Tindall London pp. 190.
- Robertson, J. D. (1981) "Membrane structure." *J. Cell Biol.* 91(3), 189-204.