農委會漁業特刊第十五號、魚病研究專集(九)
COA Fisheries Series No. 15, Fish Disease Research (IX), 7-15, 1989, 6

Edwardsiella tarda 細胞膜脂多醣之分析及其重建

Characterization and Reconstitution of Lipopolysaccharide From *Edwardsiella tarda*

李右軍・楊文君・王成德

Yiu-Chun Lee, Win-Jing Young, Cheng-Teh Wang

Abstract

Lipopolysaccharide of *Edwardsiella tarda* was isolated from outer membrane preparation. The molar ratio of carbohydrate to phosphate to amino-sugar to fatty acid was analyzed to be 24:2:2:6. The major fatty acid composition of lipid A of lipopolysaccharide was methyl-branched β-Hydroxymyristic acid (14:0, OH) (60%), the myristic acid (14:0) and palmitic acid (16:0). For the vaccine application, the method of reconstitution of lipopolysaccharide vesicles was developed. Three reconstituted lipopolysaccharide vesicles of different density were obtained. The vesicles with buoyant density of 1.189 g/cm³ was found to contain a specific 38 KD molecules.

緒　　言

有關 *Edwardsiella tarda* 之研究報告，如細菌之分離、鑑定 (Kuo *et al.*, 1977; Chen and Kou, 1978)、治療 (Chen and Kou, 1985; Chen *et al.*, 1984)，及許多血清學研究和螢光抗體診斷等方面（劉和王，1986），已有良好之研究成果，惟其致病機制方面之研究則較欠缺。

毒素是細菌的主要致病分子 (Waltman *et al.*, 1986; Ullah and Arai, 1983；簡和劉，1986)。已知許多革蘭氏陰性細菌感染宿主細胞後，宿主細胞吸收其內毒素而致發熱、毛細管滲透性增加等病徵 (Davis *et al.*, 1981)。此內毒素即菌體瓦解之後所放出之脂多醣 (Lipopolysaccharde) (Davis *et al.*, 1981; Hitchcock *et al.*, 1986)。革蘭氏陰性菌外膜雙脂層之外脂脂半層大部分組成為 Lipopolysaccharide (Dirienzo *et al.* 1978)。

Lipopolysaccharide 為長鏈醣類連接一段脂質，脂質為毒性基本所在，醣鏈扮演抗原之角色，特定的菌株 (Strain) 具其特定之 Lipopolysaccharide 構造，整個分子可大分為三部分：㈠ O- 抗原㈡核心㈢脂質 A (Lipid A)。

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分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性菌阻止細胞壁之生合成，而 O- 抗原之長鏈碳水分子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 (*Escherichia coli*)，傷寒桿菌 (*Salmonella*

國立清華大學生命科學研究所 (Institute of life science National Tsing Hua University)

typhimurium) 及 *Salmonella minnesota* 發表較多。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 (Sayers *et al.*, 1987)，引導單核球細胞表現 Interleukin-II 接受器 (Holter *et al.*, 1987; Fuhlbrigge *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; Jakway *et al.*, 1986; Wentworth *et al.*, 1987)，另已了解 Lipopolysaccharide 在細胞膜上之生成合成爲脂質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 當携帶物，整個 O- 抗原合成好後再接到核心尾端，轉位到外膜 (Finean and Michell, 1981)。最新的進展爲尋找針對 Lipopolysaccharide 生合成之抗生素 (Goldman *et al.*, 1987)。

爲了解 *Edwardsiella tarda* 致病機轉，本實驗由 Lipopolysaccharide 之組成分析著手，進而進行其與細菌本身之脂質重建，以期達到純化特定 Lipopolysaccharide 分子及探討其與脂質之交互作用。

材料與方法

材　料

Edwardsiella tarda 800123-6K 菌種由臺大動物系魚病研究室鍾虎雲教授提供。養菌培養基 Tryptic Soybean Broth (TSB) 及 Bacto-agar 購自 DIFCO (Detroit, Michigan, USA)。Salmonella-Shigella agar (SS agar) 購自 BBL R (Div. Becton, Dickinson & Co. B-D Cockeysville, MD 21030 USA)。化學藥品及有機溶劑購自 E. Merck Chemicals (Darmstadt, Germany)。有機溶劑爲避免雜質的污染，使用前必須經過蒸餾。純化細胞膜及脂多醣 (Lipopolysaccharide) 所需酵素 Lysozyme 購自 Boehringer Mannheim GmbH (West Germany)。反應試劑如牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)，界面活性劑 Sodium N-Lauroylsarcosinate (Sarkosyl) 及脂肪酸標準劑購自 Sigma Chemicals (st. Louis, MO, USA)。脂質標準劑 2-Hydroxymyristic acid 購自 SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. (D-6900 Heidelberg 1)。透析膜採用 Spectrapor R (Spectrum Medical Industries, INC., Los Angeles, USA)，孔徑篩選大小約 3.5 K daltons。所有去離子蒸餾水均由 Millipore R (Continental Water Systems, Ei Paso, Texas, USA) 裝置過濾至電阻值 17 MΩ 以上。

方　法

菌種培養

Edwardsiella tarda 800123-6 K 由冷凍乾燥管中取出，以 Tryptic soybean broth 沖散使之懸浮均勻，畫於 Salmonella-Shigella agar，培養溫度 35°C，培養時間 12 至 24 小時後，挑取單一菌落種於 5 毫升 Tryptic soybean broth 培養 6 小時，可轉接到大量培養基大規模培養。

Lipopolysaccharide 之純化

Lipopolysaccharide 由已分離之細胞外膜抽取，細胞膜之純化及分離採用 chen *et al.* method (1988) 取分離出之外膜再以 Westphal's phenol-water method (1963) 抽取 Lipopolysaccharide。

銀　染

Lipopolysaccharide 以 10% SDS-Polyacrylamide Gel 電泳後須以染醣之銀染法呈色 (Wu *et al.*, 1987)，呈色後以水沖洗乾淨保存在 50%甲醇中，即可進行膠片乾燥及照相。

化學定量

蛋白質定量採 Lowry *et al.* (1951) 的方法，總醣量以 phenol-sulfuric acid 法 (Dubois *et al.*, 1951)，無機磷以 Ascorbic acid 法 (Rouser and Fleischer, 1967)，胺醣以 Ninhydrin (Spies, 1957) 和游離胺基反應而定量。

氣相層析／質譜儀分析

純化之 Lipopolysaccharide 以 4N NaOH, 50°C 水解 5 小時，酸化至 pH 2.0-2.5 後，以氯仿萃取游離脂肪酸，將氯仿以氮氣吹乾，加 1 毫升 BF_3- 甲醇加熱至 85°C，脂化半小時以上。待冷却後，以 Hexane: H_2O=2:2 萃取，靜置後取 Hexane 層，即得甲基脂化脂肪酸 (Salati and Kusuda, 1985)。將之溶於少量 hexane 中，取 1 μl 即可打入氣相層析儀 (Shimadzu GC-9A 機型，管柱充填 SP2330，程式設計爲初溫 120°C，維持 5 分鐘，每一分鐘增高 1°C，末溫 240°C，維持 10 分鐘。或氣相層析／質譜分析儀 (Hewlett Packed 5985B 機型，CP-52 CB 管柱，70eV，加速電壓 2600V，Interface 溫度 200°C，程式設計爲始溫 120°C，維持 5 分鐘，每一分鐘增高 2°C，末溫 210°C)。

Lipopolysaccharide 重建

重建所用脂質由 *Edwardsiella tarda* 以 Bligh and dyer 法 (1959) 萃取而得，萃取所得脂質進一步以 Silica gel 60-H 管柱層析法分離磷脂質及中性脂質。磷脂質先以氮氣吹乾有機溶劑，置於眞空下 3 小時去除殘餘有機溶劑，加 2 mM Mercaptoethanol/1.4% (w/v) n-Octylglucoside，以超音波振盪至澄清，Lipopolysaccharide 加 1/10 體積 1M Potassium phosphate buffer (pH=7.2) 及 n-Octylglucoside 至終濃度 1.4% (w/v), 25°C，反應 20 分鐘。脂質用量取相對於 Lipopolysaccharide 之數倍與之重建。通常 Lipopolysaccharide 控制約 788 μl，脂質 200 μl. Lipopolysaccharide 與脂質混合相加，放置 20 分鐘後，在室溫中透析 4 小時以去除界面活性劑 (Levitzki, 1985)。準備 25% (w/w) 至 50% (w/w) 蔗糖連續梯度，蔗糖溶液也含 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH=7.2)。以 Beckman SW41 rotor 轉速 35,000 rpm 離心 8 小時，分離各種不同密度之胞膜 (Wang *et al.*, 1979)。

結 果 與 討 論

Lipopolysaccharide 成份分析

純化後之外膜以 Westphal's phenol-water 方法抽取 Lipopolysaccharide，以氯仿及甲醇萃取脂質，分析其碳水化合物、磷、胺基、脂肪酸，得到其 molar ratio 比值，碳水化合物：磷：胺基：脂肪酸約爲 28:2:2:6。醣鏈部分與磷之重量比爲 93.16，與 1985 年魚病研究雜誌所發表之另一 *Edwardsiella tarda* EF-1 strain 之 244 相差 2.6 倍 (Salati and Kusuda, 1985)。但 Lipopolysaccharide 分子構造變異性大，可能磷酸化由來爲 Pyrophosphate 或 Phosphoethanolamine，胺基部分來自 ethanolamine，所以目前尚視之爲組成之量的訊息。

Lipopolysaccharide 經鹼水解及酸化後，放出游離脂肪酸，以氯仿萃取出加以甲脂化處理，最後溶於己烷 (Hexane) 中，以氣相層析 (Gas Chromatography) 分析與標準脂肪酸之滯留時間比對，初步判斷有Lauric acid (12:0), Myristic acid (14:0), Palmitic acid (16:0), Palmitoleic acid (16:1), Stearic acid (18:0) 及 Heneicosanoic acid (21:0)。由 Heptadecanoic acid (17:0) 之滯留時間知 Lipopolysaccharide 之脂肪酸組成無之，因此以之爲內在標準定量。以 Hewlett 3390 A 積分儀積分各脂肪酸相對量如表 1。

進一步以氣相層析／質譜儀分析 (GC/Mass) 解析未知結構，由以上之定性及定量，參考 *E. coli* 傷寒桿菌、*Shigella flexneri* (Carlin *et al.*, 1987) 等數種菌之研究報告，提出圖 1 之假設結構。

Table 1. *Edwardsiella tarda* 中 lipopolysaccharide 的脂肪酸組成

Common name	Abbreviation	*Area%
3-OH-12-methyl-tridecanoic acid	($C_{14:0}$,OH)	60.83
Palmitic acid	($C_{16:0}$)	15.27
Myristic acid	($C_{14:0}$)	9.44
Stearic acid	($C_{18:0}$)	1.56
3-OH, C_{18} deri.		1.23
3-OH, C_{16} deri.		0.74
Tridecanoic acid	($C_{13:0}$)	0.52
Others ($C_{12:0}$, $C_{15:0}$, $C_{21:0}$, etc.)		3.76
Unknown		5.71

* Area% 是由 Gas chromatography 所測定

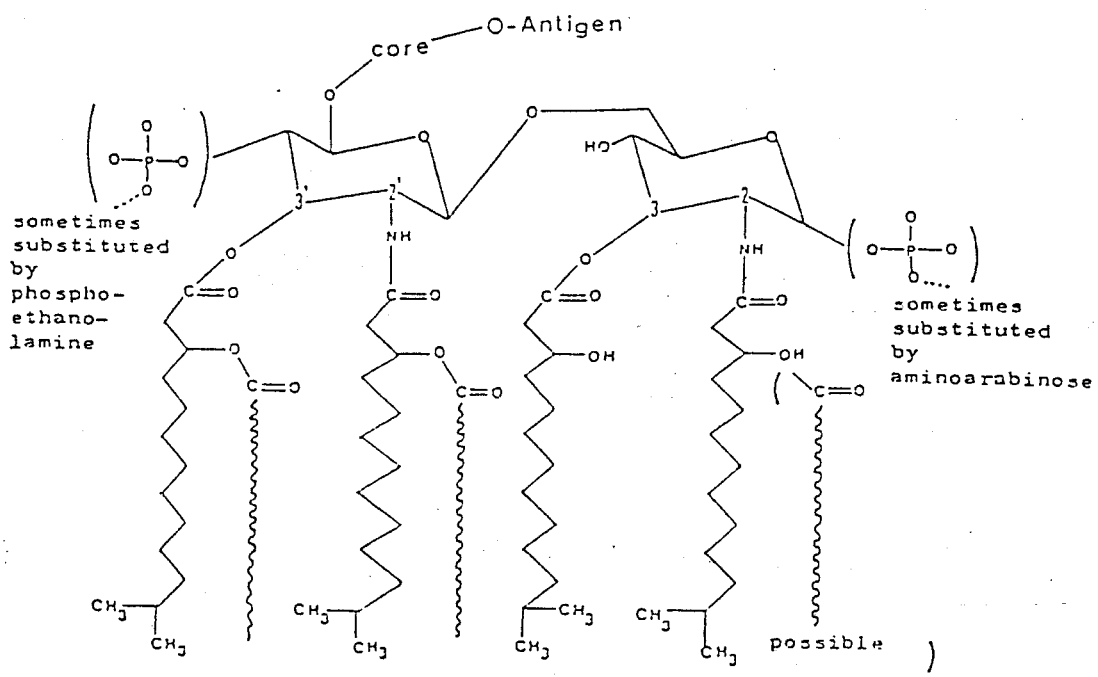

圖1. 假設 *Edwardsiella tarda* 的 lipid A 之結構。

酯多醣 (Lipopolysaccharide) 電泳分析

以 10% Polyacrylamide gel 跑電泳後以銀染呈色（圖2），其階梯形升降表示分子大小規則變化，即酯多醣之 O- 抗原有重覆的醣鏈單元。由電泳所見分子量大小計算其醣鏈長度，最長爲 345 個糖基，最短爲 68 個糖基，每單元 9 個糖基（見附錄）。

酯多醣分子量大小不等，是因培養所得菌年齡不等，或是粹取方法導致醣鏈斷裂，也由不同 O. D. 所粹取之酯多醣，及由全細胞溶解跑電泳證明形式相同，即一個菌上的酯多醣即具歧異性分布。其低分子量者較多，有每兩格階梯一跳量多的現象，由此推測其 O- 抗原單元重覆不是以 1, 3, 5, 7, 9... 單數即是以 2, 4, 6, 8, 10... 複數重覆爲多數。

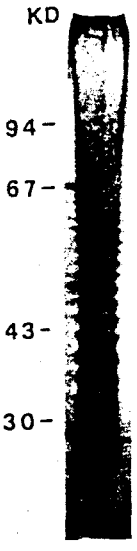

圖 2. *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide 的電泳圖。30 μg 純化的脂多醣經由 10% SDS-PAGE 電泳 7 小時後以銀染法呈色。指標數目代表分子量。

Lipopolysaccharide 重建

由成份分析推算 1 個 Lipopolysaccharide 對 2.29 個磷脂分子。本實驗所選用重建脂質量爲 21.4 個磷脂質 (Phosphatidylethanolamine: Phosphatidylglycerol=4.83:1) 對 1 個 Lipopolysaccharide 分子。經 25% (w/w)-50% (w/w) 連續蔗糖梯度離心後，得到三種 Vesicles (圖 3)：最輕的 Vesicles (Uppest, Faint) 懸浮於 25%蔗糖溶液之上；次輕的 (Upper band) 位於 25% (w/w) 蔗糖頂部，即密度小於 1.1278 g/cm³；最重的 (Lower band) 密度爲 1.1892 g/cm³。

三種 Vesicles 之 Lipopolysaccharide 組成以電泳展開經銀染後 (圖 4)，發現密度最大之 Vesicles 中，38KD Lipopolysaccharide 分子被局部濃縮，此分子依附錄算法爲 192 個糖基長。可能其可形成最安定的 Vesicles，或由於分子長度與 Vesicles 之自由能關係，或由於脂質A之脂肪酸種類和 PE 及 PG 有較大親和力。另較低分子量及 60K 左右之 Lipopolysaccharides 也出現在此 Vesicles 中。最輕之懸浮與次輕之 Vesicles 之 Lipopolysaccharide 組成和重建前一樣，無任何特異性，仍保持原兩格一跳量多的關係。

由此重建技術，快速地達到純化特定 Lipopolysaccharide 的目的，由於脂質A是 Lipopolysaccharide 對組織產生毒性之主要部分，如以酵素切掉 Nonhydroxylated 脂肪酸，組織毒性降低而仍不失其免疫刺激能力 (Munford and Hall, 1986)。如能修飾此分子之脂質A部分，或人工合成低毒性高免疫力之脂質A (Sayers *et al.*, 1987)，則可施之於疫苗。且我們預估 Lipopolysaccharide 與脂質形成 Vesicle 後其抗原效價將提高。對此在重建中被濃縮的分子其脂肪酸組成，醣鏈序列及對血小板的作用是我們繼續研究的方向。

附　　錄

Lipopolysaccharide 之脂質 A (Lipid A) 部分，以 Methylated Tridecanoic acid (14:0, OH) 爲主要脂肪酸。其次爲 myristic acid 及 Palmitic acid。由此脂質A之分子量計算如下：

14 : 0, OH, 分子量 258 daltons
14 : 0, 分子量 242 daltons
16 : 0, 分子量 270 daltons

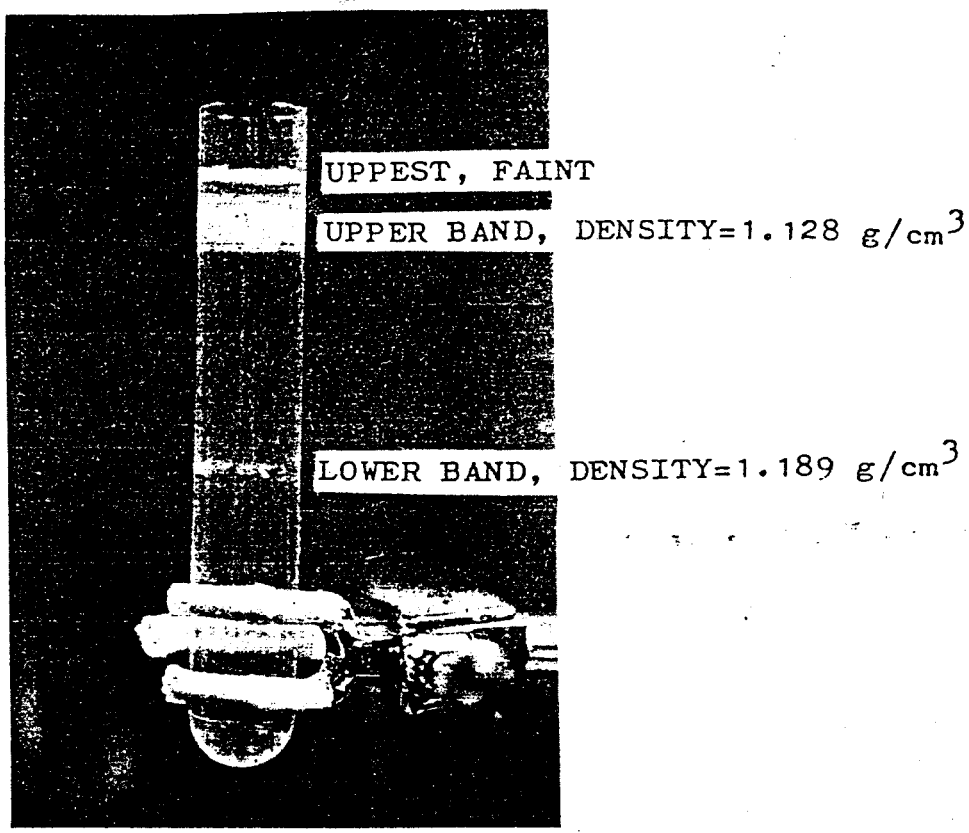

圖 3. 蔗糖梯度分離經重建後的 Lipopolysaccharide vesicles。

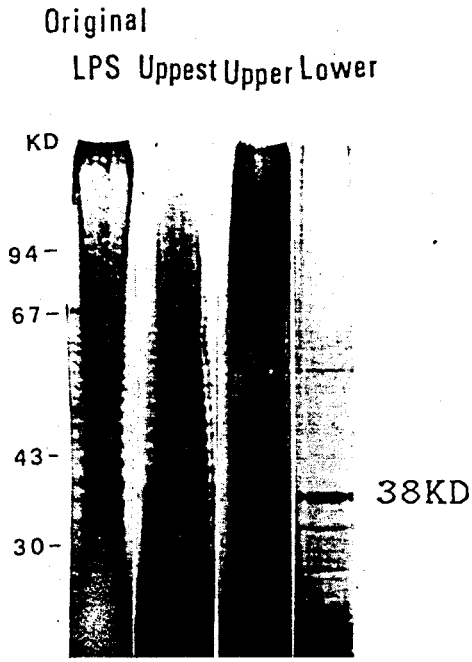

圖 4. 重建後的三種 Lipopolysaccharide vesicles 的電泳圖。upperest, upper, lower 代表不同密度的 vesicles（參閱圖 3）。

由氣相層析積分而得 14:0, OH 佔 60% 14:0 佔 9.44% 16:0 佔 15.27%。餘爲其他種脂肪酸，計算時，以 14:0 及 16:0 爲 20%計算，即每一 Lipopolysaccharide 分子具 6 個脂肪酸，分別爲 4 個 14:0, OH, 1 個 16:0, 1 個 14:0 所以脂質A分子量爲：

$258\times4+242\times1+270\times1=1544$ (daltons)$=1.544$ KD

以 190 daltons 爲糖基分子量。則 67KD 之 Lipopolysaccharide 分子之糖基共有：

67KD (總重) −1.544 KD (脂質A) =65.194 KD (總碳水合合物)

65.194 KD (總碳水化合物) +0.19 KD (糖基平均分子量)

=344.5 (糖基)

≒345 糖基

14.4 KD 之 Lipopolysaccharide 分子之糖基共有：

14.4 KD (總重) −1.544 KD (脂質A) =12.856 KD (總碳水化合物)

=67.66 (糖基)

≒68 糖基

自 67 KD 至 14.4 KD 有 30 個階梯形帶。也就是每階梯相差如下糖基：

345 糖基−68 糖基=277 糖基

277 糖基+30 階梯=9.23 糖基／階梯

即 O- 抗原每單元由 9 個糖分子組成。

摘　　要

Edwardsiella 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，得到其比值約爲 28:2:2:6，脂質A部分以甲基支鏈化 β- Hydroxymyristic acid (14:0, OH) 爲主要脂肪酸佔 60%，其次爲 Myristic acid (14:0) 及 Palmitic acid (16:0)。

由於脂多醣可當作抗原生產疫苗之遠景，因此嘗試以重建達純化目的。脂多醣和脂質重建得到三種密度不同之胞膜，其中比重最輕之一種，1.189 g/cm³，有脂多醣分子分子量爲 38 KD 特異性被濃縮。

致　　謝

本研究承農委會 77 農建 -7.1- 糧 -110 (48) 之經費補助得以完成。於研究期間承蒙臺大動物系鍾虎雲教授提供菌株及寶貴意見，謹此致謝。

參 考 文 獻

Carlin, N.I.A., D.R. Bundle and A.A. Lindberg (1987) "Characterization of five *Shigella flexneri* variant Y-specific monoclonal antibodies using defined saccharides and glycoconjugate antigens" J. of Immunology, 138: 4419-4427.

Chen, C.C. and T.H. Wilson (1986) "Solubilization and functional reconstitution of the proline transport system of *Escherichia coli* "J. Biol. Chem., 261: 2599-2604.

Chen, J.D. and G.H. Kou (1978) "Studies on bacterial distribution in pond-cultured eels" JCRR Fisheres Series No. 34, Reports on Fish Disease Research (II), 15-32.

Chen, S.C., M.C. Tung, C.F. Lu and S.T. Huang (1984) "Sensitivity in vitro of various chemotherapeutic agents to *Edwardsiella tarda* of pond-cultured eels" COA Fisheries Series No. 10, Reports on Fish Disease Research (VI), 100-106.

Chen, S.N. and G.H. Kou (1985) "Results of field test on vaccination trails against Vibriosis of milkfish (*Chanos chanos*) and Edwardsiellosis of eel (*Anguilla japonica*)" COA Fisheries Series No. 4, Reports on Fish Disease Research (VII), 52-56.

Chen, T.Z., S.T. Faung, C.T. Wang, (1989) "Characterization of membrane phospholipids of *Edwardsiella tarda*" JCRR Fisheries Series, Reports on Fish Disease Research.

簡茂盛，劉正義 (1986) "Studies on pathogenesis of Edwardsiellosis in experimentally-infected eels" COA Fisheries Series No. 4, Fish Disease Research (VII), 68-78.

Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen and H.S. Ginsberg, (1981) "Microbiology" Harper and Row. Publishers, Hagestown, chp. 24. p. 559. 10. Dion, A.S., and A.A. Pomenti (1983) "Ammonical silver staining of proteins: mechanism of glutaraldehyde enhancement" Analytical Biochemistry, 129: 490-496.

Dirienzo, J., K. Nakamura and M. Inouye (1978) "The outer membrane protenis of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions" Ann. Rev. Biochem., 47: 481.

Dubois, M., K. Gilies, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith (1951) "A colorimetric method for the determination of sugars" Nature, 168, 167.

Finean, J.B. and R.H. Michell (1981) "Membrance Structure" Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Birmingham.

Fuhlbrigge, R.C., D.D. Chaplin, J.M. Kiely and E.R. Unanue (1987) "Regulation of interleukin I gene expression by adherence and lipopolysaccharide" J. of Immunology, 138: 3799-3802.

Goldman, R., W. Kohlbrenner, P. Lartey and A. Pernet (1987) "Antibacterial agents specifically inhibiting lipopolysaccharide synthesis", Nature 329, 162-164.

Hitchcock, P.J., L. Leive, P.H. Makela, E.T. Rietschel, W. Strittmatter and D.C. Morrison (1986) "Minireview, Lipopolysaccharide nomenclature—past, present and future" J. of Bacteriology, 166-705.

Holter, W., C.K. Goldman, L. Casabo, D.L. Nelson, W.C. Greene and T.A. Waldmann (1987) "Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-γ stimulated human monocytes" J. of Immunology, 138: 2917-2922.

Jakway, J.P. and A.L. DeFranco (1986) "Pertusis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide" Science, 234: 743-745.

Kuo, S.C., H.Y. Chung and G.H. Kou (1977) "*Edwardsiella anguillimortiferum* isolated from Edwardsiellosis of cultured eel" JCRR Fisheries Series No. 29, Reports on Fish Disease Research (I), 1-6.

Levitzki, A (1985) "Reconstitution of membrance receptor systems" Biochim. Biophys. Acta, 822: 127-153.

劉朝鑫，王健雄 (1986) "分佈於養殖環境中之 *Edwardsiella tarda* 的血清型及病原性" J. Chinese Soc. Vet. Sci., 12: 235-244.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Redall (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent" J. Biol. Chem., 193: 265-275.

Munford, R.S. and C.L. Hall (1986) "Detoxification of bacterial lipopolysaccharides

(endotoxins) by a human neutrophil enzyme" Science, 234: 203-205.

Rouser, G. and S. Fleischer (1967) "Isolation, characterization and determination of polar lipids of mitochondria" Methods Enzymo., 10: 385-406.

Salati, F. and R. Kusuda (1985) "Chemical composition of the lipopolysaccharide from *Edwardsiella tarda*" Fish Pathology, 20: 187-191.

Sayers, T. J., I. Macher, J. Chung and E. Kugler (1987) "The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monosaccharide precursor" J. of Immunology, 138: 2935-1940.

Spies, J. R., (1957) "Ninhydrin method", Methods in Enzymology, 3: 468-471.

Ullah, M. A. and T. Arai, (1983) "Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*" Fish Pathology, 18(2): 65-70.

Vukajlovich, S. W., J. Hoffman and D. C. Morrison (1987) "Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structural requirements for antibody independent activation of thh classical and alternative pathways" Molecular Immunology, 24: 319-331.

Waltman, W. D., E. B. Shotts and T. C. Hsu (1986) "Biochemical and enzymatic characterization of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan" Fish Pathology, 21(1): 1-8.

Wang, C. T., A. Saito and S. Fleischer (1979) "Correlation of ultrastructure of reconstituted sarcoplasmic reticulum membrance vesicles with variation in phospholipid to protein ratio" J. Biol. Chem., 254: 9209-9219.

Wentworth, P. A. and H. K. Ziegler (1987) "Induction of macrophage Ia expression by lipopolysacchride and *Listeria monocytogenes* in congenitally athymic nude mice" J. of Immunology, 138: 3167-3173.

Westphal, O. and K. Jann (1963) "Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedures" Carbohydrate Chemistry, 5: 83-91.

Wu, L., C. M. Tsai and C. E. Frasch (1987) "A method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharides (lipooligosaccarides)" Analytical Chemistry, 160: 281-289.