

感染牛蛙之細菌 *Flavobacterium* sp. 的脂質分析

Membrane Lipids of *Flavobacterium* sp. Isolated from Infected Bullfrog Pond-cultured in Taiwan

房錫廷·謝宗甫·王成德

Shyi-Tyng Faung, Tzung-Fu Hsieh
and Cheng-Teh Wang

Abstract

The envelope of *Flavobacterium* sp., a gram-negative bacterium, was disrupted and separated into cytoplasmic and outer membrane fractions. The composition of lipids in these membrane fractions was analyzed. These membrane fractions all consisted of a similar composition of more-polar lipid (87% of total lipid) and less-polar lipid (17% of total lipid). The content of phospholipid in cytoplasmic membrane was 92% of more-polar lipid, and that of phospholipid in outer membrane was only 42%. A glycolipid appeared in more-polar lipid fraction. This glycolipid was more in the content in outer membrane than in cytoplasmic membrane. The composition of acyl side chains in PE, lyso-PE and glycolipid appeared to be palmitic acid, myristic acid, lauric acid and their methyl-derivatives. In less-polar lipid, the major compound was free fatty acids.

緒 言

1987年2月左右，臺灣省屏東地區牛蛙養殖池中，牛蛙因細菌感染而大量死亡。經臺大漁業科學研究所鐘虎雲教授等人，解剖病蛙，作病理切片，最後分離，純化出一新菌種：因生化分析，(G+C)含量鑑定，此菌暫時定名為：*Flavobacterium* sp.。它屬於革蘭氏陰性菌，是一種不利用醣類的桿菌，大小為 $0.7-0.9 \times 1.8-3.3 \mu\text{m}$ 。在組織的病理切片，發現它們可以侵入神經，循環和消化系統；引起敗血，出血，臟器充血，潰瘍，眼睛白濁凸出及頭歪斜等症狀 (Chung *et al.* 1986)。

一般革蘭氏陰性菌的細胞外套，包括：外膜 (outer membrane)，細胞質膜 (cytoplasmic membrane) 和介於二者間的 peptidoglycan，且每層的組成成分及生理功能各有不同。外膜和細胞質膜的組成成份為蛋白質及脂質。外膜除蛋白質及脂質，還含有一特別又多量的成份：脂多醣 (lipopolysaccharide) (Braun & Hantke 1974; Loretta & Bernard 1981; Gluvert & Thornly 1969; Osborn 1969; Hiroshi & Marti 1985; Lodish & Rothman 1979)。因為內外膜各成份組成比例不同，造成胞膜在密度上有差異，內外膜密度不同可利用這個差異，在蔗糖密度梯度離心 (sucrose density gradient centrifugation)，把細胞質膜與外膜分開 (Osborn *et al.* 1972; Filip *et al.* 1973)。在細胞膜結構上磷脂質是構成生物膜的基質並形成脂雙層，而蛋白質則是以鑲入

或附著於膜表面的形式和磷質結合 (Robertson 1981)。所以生物膜上的磷脂質與蛋白質之間是具有功能 (function) 和結構 (structure) 的密切關係 (Jost *et al.* 1977; Nagle & Scott 1978; Narindrasorasak *et al.* 1979)。除了脂質的物理特性會影響蛋白質功能之外，不同的磷脂質成份或不同的脂肪酸支鏈 (acyl sidechain) 也會影響蛋白質的功能。例如 *E. coli* 的細胞質膜比外膜多出 10 到 20 個百分比的不飽和脂肪酸支鏈，因此細胞質膜的象轉變溫度就比外膜低 (Goldfine 1984; Nakayama *et al.* 1980)。除了影響到物理性質，蛋白質活性也會因磷脂質的頭基(head group)和脂肪酸支鏈的改變而改變(Carruthers & Melchior 1986)。例 *E. coli* 細胞質膜上的乳糖傳遞蛋白與各種不同的磷質重建，結果發現，利用原細胞質膜的磷脂質成份所重建的蛋白微脂粒 (proteoliposomes) 活性最大，其它的組成活性就較為減低 (Chen & Wilson 1984)。所以分析脂質與蛋白質之間作用，其先決條件就是分析細胞膜脂質組成情形。因此本篇報告便對 *Flavobacterium sp.* 的細胞質膜與外膜脂質作定性暨定量分析。

材 料 與 方 法

材 料

Flavobacterium sp. 菌種是由臺灣大學動物研究所，鍾虎雲教授提供與鑑定。編號為 870424-1L。

化學藥品包括：1) 有機溶劑，如甲醇，氯仿等購自 E. Merck Inc. (使用前須先蒸餾)。2) 脂質標準樣品：Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylethanoamine, Lysophosphatidylethanoamine, Triacylglycerol, Free fatty acid 等，購自 Sigma Chem. Co. 3) 培養基：Tryptic Soy Broth 及 Agar 購自 DIFCO LAB. 4) 水解酵素 (lysozyme) 購自 Boehringer Mannheim GmbH.

一般材料，如：DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Kieselgel 60H, Ninhydrin, Diethyl ether 等，購自 E. Merck Inc.。Sodium-lauryl Sarcosinate 購自 Sigma Chem. Co.。透析膜袋採用 Spectrapor R，孔徑為 3.5 KD，購自 Spectrum Medical Inc.。使用之細胞計數器是 Coulter Counter ZM, Model TSS II, England；積分儀是 Hewlett Packard Integrator, Model 3390A, USA 記錄。

方 法

細菌培養

將 *Flavobacterium sp.* 菌種種於 Tryptic Soy Agar 上，在 35°C 培養 24 小時後，取一個菌落植入 5 ml Tryptic Soy Broth (TSB) 中，同溫狀態，培養 10 小時，再轉入大體積 TSB 中大量培養。當培養液的 O.D.₄₅₀ 為 2.0 時，急速冷卻培養液至 4°C，以減緩菌體生長，便於做菌體收集。

細菌細胞質膜與外膜分離

將 4°C 培養液，在 4°C 下以 10,000 rpm 離心 10 min (Beckman J₂-21 離心機，JA-14 Roter) 所得細菌用冷的 STE (Saline, 0.1 M; Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM/1 l, H₂O, pH = 7.8) 緩衝液清洗後，所得乾淨細菌懸浮於 0.75 M sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 7.8 之緩衝液 (一升培養液所得細菌溶於 20 ml 緩衝液)。迅速加 lysozyme 於懸浮液至最終濃度為 300 μg/ml，攪拌均勻後靜置 2 分鐘。接着緩慢並攪拌地加入冷的 EDTA 溶液 (1.5 mM, pH 7.5)。量為懸浮液體積二倍。經 lysozyme 處理的細菌，轉變成原生質球體 (spheroplast)，此時利用超音波振盪器將原生質球體打破 (輸出功率為 70%)，直到 450 nm 的吸光值降至原來的 5% 以下。以上步驟皆在 4°C

下操作。超音波振盪器處理過的溶液經離心於 4°C (5,000 rpm, 20 分鐘, Beckman J₂-21 離心機, JA-21 Roter), 以除去未打破的原生質球體和細菌沉澱。取上清液在 4°C 下離心 (54,000 rpm, 1.5 小時, Beckman, L7-65 超高速離心機, Ti-70.1 Roter)。沉澱物 (pellet) 懸浮於 25% (w/w) sucrose, 5 mM EDTA (pH 7.4) 的溶液中, 進行蔗糖密度梯度離心, 蔗糖梯度密度離心之梯度濃度由上而下順序為 30%, 35%, 40%, 45%, 55% (w/w), 的 sucrose, 5 mM EDTA (pH 7.4), 溶液。每一個梯度體積為 1.9 ml, 55% 部份做基底, 其體積為 0.454 ml。然後將細胞膜懸浮液 (稀釋至 8 mg protein/ml) 置於蔗糖梯度溶液最上層, 接著在 4°C 下離心 (36,000 rpm, 18 小時, Beckman, L8-80M 超高速離心機 SW-41 Roter), 可得細胞質膜與外膜。為避免細胞質膜污染外膜, 可將所得外膜稀釋十倍, 加入 sodium lauryl sarcosinate 至濃度為 0.2~0.3 (w/v), 在室溫下, 反應 20 分鐘。如此可以溶解細胞質膜成份。反應後的外膜溶液, 以 54,000 rpm, 在 4°C 離心 1.5 小時, 以回收外膜部份 (Lodish & Rothman 1979; Hindahl & Iglewski 1984)。

較極性與較中性脂質分離

脂質萃取是採用 Bligh & Dyer 所設計的方法 (Bligh & Dyer 1959), 萃取所得脂質, 利用矽膠管柱 (silicic acid column) 分離, 以不同比率之氯仿/甲醇溶液通過, 可以得到較極性 (more polar), 較中性 (less polar) 及游離脂肪酸 (free fatty acids), 三種脂質 (Pond *et al.* 1986; Stein & Simth 1982)。

成份之定性與定量

蛋白質定量是利用 Lowry Method, 以 BSA (Bovine Serum Albumin) 做標準。磷脂質定量, 是利用磷呈色反應做測定 (Rower & Flisher 1967)。磷脂質定性方法乃利用: 薄層色層分析法 (Thin Layer Chromatography)。薄層色層分析片是使用 1. 購買的 DC-Fertigplatten Kieselgel 60, 厚 0.25 mm。2. 將矽膠酸 60H (30 g) 磷於硫酸鎂 (10 ml) 和去離子水 (60 ml) 中, 自行拉片。所使用展開溶液有三: 1. 二度空間展開液, 第一度展開溶液為, 氯仿: 甲醇: 水: 氨=60:30:4:4; 第二度展開溶液為, 氯仿: 甲醇: 醋酸=60:27:8 (Wang *et al.* 1986)。2. 二度空間展開液, 第一度展開溶液為, 氯仿: 甲醇: 水: 氨=60:30:4:2; 第二度展開溶液為, 氯仿: 甲醇: 醋酸=60:27:8。3. 是一度空間展開液為, 氯仿: 甲醇: 醋酸: 水=65:25:8:4。顯色是利用碘蒸氣, 並與標準樣品比較; 或用 Ninhydrin 染色法: 將 Ninhydrin 溶入 95% 乙醇中, 至濃度為 0.2% (w/v), 噴灑於薄層色層分析片上, 吹熱風至薄層片乾了顯色止, 以測定氨基 (Spies 1957)。醯脂質定性與磷脂質方法相同, 皆以薄層色層分析法。唯染色方法, 在醯脂質是利用 Resorcinol-HCl 染色法 (George *et al.* 1971)。將 10 ml 2% Resorcinol 加 80 ml 35% 濃鹽酸, 0.63 ml 1% 硫酸銅和 9.73 ml 去離子水。搖晃均勻後, 噴灑到薄層片上, 接著薄層片蓋上乾淨玻璃片, 在加熱板上加熱至 110°C 即可顯色。醯脂質定量是利用 George *et al.* (1971) 所提出的方法進行。

較中性脂質定性

細胞質膜與外膜中性脂質定性是利用, 一度空間薄層色層分析法 (Blank & Snyder 1975)。薄層片使用 DC-Fertigplatten Kieselgel 60, 厚 0.25 mm; 展開溶液系統有二: 一是用己烷: 乙醚: 醋酸=80:20:1 的溶液, 另一則是己烷: 乙醚=95:5 的溶液。顯色是將薄層片置入含碘晶體之玻璃槽, 以碘蒸氣顯色, 並與標準樣品比較 Rf 值。

脂肪酸定性與定量

磷脂質, 中性脂質的脂肪酸及游離脂肪酸, 是利用氣體層析儀 (GC-9A, Gas Chromatograph) 和氣體層析一質譜儀 (GC-MASS, HP5985B) 做定性與定量分析。首先將薄層色層分析片上的斑點刮下, 和 1 ml CH₃OH-BF₃, 在 85°C, 進行甲醇化 30 分鐘。甲醇化的脂肪酸以正己烷和水 (1:1)

的混合溶液萃取，經濃縮後再以氣體層析—質譜儀和氣體層析儀分析。氣體色層分析儀的管柱，由10% SP-2330 on Chromosorb WAW 80/100 填充，長 3 m，直徑 2 mm 操作程式如下：管柱內攜帶氣體 (carrier gas) 為氮氣，維持流速在 45 ml/min，起始溫度 (initial temperature) 170°C 維持 10 分鐘，然後以 1°C/min 的速率升溫至 210°C，並維持 20 分鐘。利用 C_{17:0} (heptadecanoic acid) 做內標準 (internal standard)，以校正注射量，並與標準樣品比較由積分儀 (H. P., 3390A Integrator) 計錄積分 Peak 面積。質譜儀的管柱是 CP-52CB，長 50 m，直徑 0.32 mm，操作程式如下：起始溫度 120°C，維持 10 分鐘，以 2°C/min 的速率升溫至 210°C 並維持 65 分鐘，攜帶氣體為氮氣，流速維持 1.5 ml/min，電子強度保持在 75 eV，電壓則保持在 2600 V。

結果與討論

細菌內外膜分離

在細菌生長的指數期收穫所得菌體，利用 lysozyme-EDTA 處理後，菌體轉變成原生質球體。這時用超音波振盪可將原生質球體打破成小囊胞 (vesicles)。這些囊胞分別由細胞質膜或外膜組成，造成密度上的差異，利用這個差異，在蔗糖梯度密度離心時，能夠將由細胞質膜或外膜形成的囊胞分開而得到的四個漂浮在不同密度的 membrane fractions，由上而下各別是：細胞質膜-I (cytoplasmic membrane-I，漂浮密度=1.170)，細胞質膜-II (cytoplasmic membrane-II，漂浮密度=1.187)，混合膜 (mixed membrane)，外膜 (outer membrane，漂浮密度=1.210)。另外分析各個 membrane fractions 的生化成分，除了密度不同，蛋白質/磷脂質的比值及蛋白質/糖的比值也不同 (表一)，在細胞質膜，蛋白質含量較外膜高；而糖含量則是外膜多於細胞質膜。這是因為外膜有含量很高的脂多醣之故。利用電泳分析，也證實在外膜，混合膜含有大量脂多醣 (楊文君碩士論文，清華大學，1989)，而細胞質膜-I 的脂多醣含量偵測不到，細胞質膜-II 則含有少量脂多醣，因為分離過程污染較嚴重。所以梯度離心後，可以直接從細胞質膜-I 得到純的細胞質膜。外膜部份，將離心所得外膜囊胞以 sodium lauryl sarcosinate 處理 (Filip *et al.* 1973)，即可獲得純的外膜，因為 sodium lauryl sarcosinate 能選擇性地溶解細胞質膜。

細胞質膜與外膜脂質組成

拿到分開的細胞質膜與外膜囊胞，利用 Bligh & Dyer 的方法萃取脂質；所得脂質再以矽膠酸管

表一 Membrane fractions isolated from *Flavobacterium sp.*

Properties	Membrane fractions			
	Cytoplasmic memb. I	Cytoplasmic memb. II	Mixed memb.	Outer memb.
Bouyant density	1.170	1.187	1.194	1.210
Vesicle size ¹ (100 nm)	1.24±0.21	0.80±0.26	4.67±2.85	3.20±1.43
Protein/PL ² (w/w)	5.00	3.43	3.23	3.25
Protein/Sugar ³ (w/w)	39.85	27.30	ND ⁴	12.15
Color	orange	orange	pink	pink

¹ 平均觀測值。

² 細胞質膜與外膜經蔗糖梯度密度離心，所得各 membrane fraction 以 Lowry method 定蛋白質含量；Phospholipid (PL) 是利用磷呈色反應定量，並以 700 作 Phospholipids 平均分子量。

³ 糖含量以 George W. J. *et al.* (1971) 提出之方法決定。

⁴ ND: not detectable.

表二 Compositions of lipid in the membrane of *Flavobacterium* sp.

Lipids ¹	Whole cell	Outer membrane	Cytoplasmic membrane
% of total lipid weight (w/w)			
Less-polar lipids	11.71±0.67	8.75±0.56	6.71±0.44
Free fatty acids	10.51±0.71	5.58±0.50	8.42±0.41
More-polar lipids	77.27±1.62		
Phospholipids	ND ²	36.18±1.21	73.02±1.82
Others	ND	48.78±1.81	5.86±0.76

¹ Lipids were fractionated by silica gel column chromatography as detailed in *Materials and Methods*.

² ND: not detetable.

柱分離後；結果顯示，細胞質膜或外膜其較極性脂質 (more-polar lipids)，其重量組成，平均佔有全部脂質的 83%，而較中性脂質 (less-polar lipids)，含游離脂肪酸，只佔有 17% (表二)，這和 *Edwardsiella tarda* 的脂質分佈情形相似 (Chen *et al.* 1989)。其中細胞質膜的較極性脂質有 90% 的磷脂質；外膜則只擁有 40% 的磷脂質。這點可能因為外膜上所含短糖鏈的脂多醣，在萃取及分離的過程中，進入氯仿層造成的結果。

細胞質膜與外膜較極性脂質組成

經由薄層色層片展開分析，發現細胞質膜與外膜的較極性脂質組成成分相似，主要磷脂質成分可能是 phosphatidylethanolamine (PE), lysophosphatidylethanolamine (lyso-PE), phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG)。利用 ninhydrin 染色；因 ninhydrin 可和氨基反應，反應產物會呈現紫色，能辨識樣品中有無氨基存在。結果在薄層片上有四個斑點呈現紫色。將此和原始薄層片 (利用碘蒸氣顯色) 比較，證實其中一點為 PE，另一點為 lyso-PE，剩餘的二點則未鑑定。

接著把以碘蒸氣顯色之薄層片上的斑點刮下，進行磷呈色反應，以分析磷脂質的含量 (表三)。在細胞質膜與外膜的磷脂質中，PE 分別佔了 85.08 及 81.29 個百分比；lyso-PE 則分別佔了 14.91, 18.70 個百分比。除了這二點外，其他斑點均不含磷，因此推測該菌不含 PG 及 DPG。

在一般原核生物，例如：*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Edwardsiella tarda* 皆以 PE 為構成細胞膜主要脂質 (Hiroshi & Marti 1985; Andrew & Stephen 1989; Chen *et al.* 1989)，另外還有小量的 PG, DPG；而在 *Edwardsiella tarda* 的細胞膜還存有 lyso-PE 及 PC (Chen *et al.* 1989)。分析 *Flavobacterium* sp. 細胞膜脂質却發現，細胞膜主要脂質成分仍是 PE，但沒有 PG, DPG 的存在；不過和 *Edwardsiella tarda* 類似的 *Flavobacterium* sp.，也含有 lyso-PE，而且

表三 Composition of phospholipids in the membranes of *Flavobacterium* sp.¹

Phospholipid species	Whole cell	Outer membrane	Cytoplasmic membrane
% of total phospholipid			
PE	80.99±2.00	81.29±1.60	85.08±1.60
Lyso-PE	19.00±2.01	18.70±1.20	14.91±1.40

¹ PE: phosphatidylethanolamine.

Lyso-PE: lyso-phosphatidylethanolamine.

兩個細菌所含 PE, lyso-PE 的比率非常接近，差別只是 *Edwardsiella tarda* 的 lyso-PE 都在外膜，*Flavobacterium sp.* 則平均分佈在細胞質膜與外膜上。這可能和細菌的病原性有關。因為 *Edwardsiella tarda* 被懷疑是利用釋放 lyso-PE 而致病 (Jen *et al.* 1988)，所以外膜的 lyso-PE 含量較高。含有 lyso-PE 的情形，也可能暗示，兩個細菌在細胞質膜與外膜上存在 Phospholipase A₂，能夠切除 PE 其中一支脂肪酸支鏈，而轉變成 lyso-PE；事實上在 *E. coli* 和 *S. typhimurium* (Filip *et al.* 1973) 的外膜已經分離出 Phospholipase A₂，所以未來可以進行此類工作。但是這種把脂質轉變的生理意義，目前仍不能圓滿地被解釋。除了這個特點，*Flavobacterium sp.* 細胞膜也不含有 PG, DPG，更不像 *Edwardsiella tarda* 含有 Phosphatidylcholine (PC)，頗令人驚訝。因為一般原核生物細胞膜，都有 PG 或 DPG (Andrew & Stephen 1989; Cronan 1978)，用以幫助細胞膜之結構形成及維持蛋白質功能 (Daum 1985)。若單純以倒圓錐狀之 PE, lyso-PE 來構成細胞膜，則不易形成平坦的細胞膜面，除非有適當蛋白質填補空隙 (Brian 1985; Hiroshi & Marti 1985)。再者，這種趨於簡單化及單一性 (高含量 PE) 的脂質組成的細胞膜，表示著該菌不僅缺乏合成 PG，和 DPG 等脂質的酵素系統；而且也簡化細胞膜蛋白活性的調控機制。

薄層片展開分析，以碘蒸氣，Ninhydrin 染色，確知 *Flavobacterium sp.* 的較極性脂質有 PE，和 lyso-PE 外；還存在一些未知的斑點。有趣的是在 Ninhydrin 染色後顯現的紫色斑點，在前文已提到是因 Ninhydrin 是和氨基反應造成紫色。這個結果表示該菌除 PE，和 lyso-PE，還有其他成分帶有氨基，而且溶於氯仿。什麼物質具有這些性質？第一個被考慮的是含醯基的脂質。因此選擇 Resorcinol-HCl 染色方法進行測試，結果出現呈色反應。這個結果顯示，在較極性脂質中含有某成分，可能是醯脂質，帶有 Sialic acid。如果將斑點刮下，以 George *et al.* (George *et al.* 1971) 的方法測量 Sialic acid 總量，發現外膜所含量較高 (表一)。而在細菌較常出現的醯脂質 (glycolipid) 多是 Glycosyldiacylglycerol，且所接醯基是中性醯，例如：Monoglucosyldiacylglycerol, Diglucosyldiacylglycerol, Monogalactosyldiacylglycerol 及 Digalactosyldiacylglycerol (Curatolo 1987; William 1987)。但是該菌的醯脂質，所含有的醯基帶有 Sialic acid；不過這個醯脂質，也不排除是在萃取過程中，被捉到的短醯鏈的脂多醯；因為分析的結果，顯示外膜此種成份比細胞質膜多了三倍以上 (表一)。

細胞質膜與外膜較中性脂質組成

利用矽膠管柱分離脂質後，所收集到的較中性脂質，以一度空間薄層色層片展開分析，結果顯示在外膜的較中性脂質組成和細胞質膜非常相似。使用二種不同展開溶液系統，所得到的結果與標準樣品比較 Rf 值，推測較中性脂質可能為 cholesteryl palmitate, triacylglycerol，和 tocopherol；和游離脂肪酸。為證實推測，利用銀鏡反應及氣相色層分析儀，分析薄層片上的條紋 (band)，其中被懷疑為 tocopherol 者並無反應出現，且在氣相層析中也偵測不到脂肪酸；而被懷疑為 cholesteryl palmitate 和 triacylglycerol 者在甲酯化和未甲酯化的狀態，其氣相層析結果都無任何反應。游離脂肪酸經 BF₃-CH₃OH 甲酯化後，以氣相色層分析顯示含有 palmitic acid, myristic acid 和 lauric acid 等脂肪酸。所以在薄層色層分析上觀測到的可能不是 cholesteryl palmitate, triacylglycerol。

脂肪酸組成分析

經薄層色層片分析的較極性脂質中的磷脂質，醯脂質的脂肪酸支鏈和較中性脂質的游離脂肪酸，以 BF₃-CH₃OH 甲酯化，在氣相色層分析儀分析，並與標準樣品比較，知道脂肪酸組成包括 Palmitic acid, Myristic acid, Lauric acid 和 Capric acid 等成分。進一步將脂肪酸利用氣相色層分析質譜儀分析。因為甲酯化的脂肪酸，在電子轉擊下，非常容易形成特殊碎片，再根據這些碎片吸收形成的

表四 Composition of fatty acid in the membrane lipids of *Flavobacterium* sp.

Fatty acid species ¹	Lipids in outer membrane				Lipids in cytoplasmic membrane			
	PE	LPE	GL	FFA	PE	LPE	GL	FFA
Capric acid (10:0)	0.57							
Lauric acid (12:0)				22.43				
10-methyl LA ² (13:0)	2.49			0.41	3.99			6.28
Myristic acid (14:0)	1.28			2.96	1.23			2.95
12-methyl MA ² (15:0)	75.97	99.98		28.29	72.24	99.98		42.45
2-methyl MA ² (15:0)				1.02				
2,12-dimethyl MA ² (16:0)					0.01			
5,9,12-trimethyl MA ² (17:0)			45.13	5.59				9.06
Palmitic acid (16:0)	14.11			36.57	15.44			34.11
14-methyl PA ² (17:0)	6.54			2.72	7.08			5.13
Unknown			54.86				99.98	

¹ Parathesis followed fatty acid species indicates the chain length.

² Abbreviations: PE=Phosphatidylethanolamine
LPE=Lyso-phosphatidylethanolamine
GL=Glycolipid
FFA=Free Fatty Acid
LA=Lauric acid
MA=Myristic acid
PA=Palmitic acid

圖譜和標準樣品質譜圖譜比較，除證實已知的 Palmitic acid, Myristic acid, Lauric acid 和 Capric acid 之外，其餘分子則部份被解出，包括有：10-methyl lauric acid, 12-methyl myristic acid, 2-methyl myristic acid, 2, 12-dimethylmyristic acid, 5, 9, 12-trimethyl myristic acid, 14-methyl palmitic acid。從這個分析中，可以看到 *Flavobacterium* sp. 在胞膜的脂肪酸有三個特徵：1. 全是飽和脂肪酸；2. 短鏈居多，最短是 C_{10:0}；3. 不論是較中性或是較極性脂質，含有甲烷基側鏈 (methyl side chain group) 的脂肪酸，平均佔了六十個百分比以上 (表四)。

將 *Flavobacterium* sp. 的磷脂質脂肪酸和 *Edwardsiella tarda*, *E. coli*, *S. typhimurium* 和 *Pseudomonas cepacia* 的脂肪酸組成作比較 (Hindahl & Iglewski 1984; Andrew & Stephen 1989; Cronan 1978), *Flavobacterium* sp. 的組成有不同的特點；尤其帶有甲烷基側鏈的脂肪酸含量，幾乎佔去較極性脂質量已知的脂肪酸支鏈的一半以上；而一般常見的 Palmitic acid 含量只有游離脂肪酸較多。這種特異的脂肪酸分佈，是否配合 PE, lyso-PE 的單純化，形成功能上特殊用處，則需進一步加以探討。另外，短鏈的脂肪酸 (14 碳以下) 是否用以替代雙鏈的功能，來維持 membrane fluidity；也是我們下一個研究的目標。

總結說來，*Flavobacterium* sp. 細胞膜脂質的特性包括有：1) 細胞質膜與外膜磷脂質分佈差異 (表二)，細胞質膜的磷脂質佔較極性脂質的 90%，而外膜的磷脂質只佔較極性脂質 40%；但磷脂質中皆以 PE 和 lyso-PE 為主 (表三)。2) 可能含有 glycosyldiacylglycerol 形式的脂質。3) 脂肪酸以短鏈並帶有甲烷基側鏈的脂肪酸為主。4) 缺少 DG, DPG 可能是缺少合成系統。這些特徵也可以用來鑑定該菌。

摘 要

Flavobacterium sp., 它屬於革蘭氏陰性菌, 是一種不利用醣類的桿菌。在組織的病理切片, 發現它們可以侵入牛蛙神經, 循環和消化系統; 引起敗血, 出血, 臟器充血, 潰瘍, 眼睛白濁凸出以及頭部歪斜等症狀。其細胞膜利用 Lysozyme-EDTA 和蔗糖梯度密度離心已分離成細胞質膜與外膜, 進一步使用薄層色層分析, 磷呈色反應分析細胞質膜與外膜的脂質組成成分, 實驗結果顯示二者的較極性脂質 (佔全脂質 83%) 和較中性脂質 (佔全脂質 17%) 組成成分相似。而其中細胞質膜的較極性脂質中含有 92% 的磷脂質, 外膜的較極性脂質只含有 42% 的磷脂質。磷脂質則只有 PE 和 lyso-PE 兩種成分。較極性脂質中還存在醣脂質, 而且是外膜多於細胞膜。在 PE, lyso-PE 和醣脂質的脂肪酸支鏈有: Palmitic Acid, Myristic Acid, Lauric Acid 和它們的衍生物。較中性脂質中的主要成分是由游離脂肪酸構成。

致 謝

本研究承蒙農委會資助研究經費 (78 農建-7.1-漁-05), 特表謝忱; 又於實驗期間, 蒙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

- Andrew, D. C. and Stephen, G. W. (1989) "Polar Lipids and Fatty Acids of *Pseudocepacia*." *Biochim. Biophys. Acta* 1001: 60-67.
- Blank, M. L. and Snyder, F. (1975) In *Analysis of Lipids and Lipoproteins* (Perkins E. G. ed.) pp. 63-69, American Oil Chemists Society. Champaign.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Braun, V. and Hantke, K. (1974) "Biochemistry of Bacterial Cell Envelopes." *Annu. Rev. Biochem.* 43: 89-114.
- Brian, L. S. (1985) In *The Physical Chemistry of Membranes* pp. 63-66, New York, The Solomon Press.
- Carruthers, A. and Melchior, D. L. (1986) "How Bilayer Lipids Affect Membrane Protein Activity." *Trends Biochem. Sci.* 11: 331-335.
- Chen, C. C. and Wilson, T. H. (1984) "The Phospholipid Requirement for Activity of Lactose Carrier of *E. coli*." *J. Biol. Chem.* 259: 10150-10158.
- Chen, T. Z., Faung, S. T. and Wang, C. T. (1989) "Characterization of Membrane Phospholipids of *Edwardsiella tarda*." *Fish Disease Res.* 9: 16-22.
- Chung, H. Y., Lin, I. H., Hsu, K. H., Liu, C. K., Wen, M. T. and Kou, G. H. (1986) "Study on Septicemic Epizootic of Culture Bullfrog Caused by *Flavobacterium sp.*" *Fish Disease Res.* VIII: 18-27.
- Cronan, J. J. (1978) "Molecular Biology of Bacterial Membrane Lipid." *Annu. Rev. Biochem.* 47: 163-183.
- Curatolo, W. (1987) "The Physical Properties of Glycolipid." *Biochim. Biophys. Acta* 906: 113-136.
- Daum, G. (1985) "Lipids of Mitochondria." *Biochim. Biophys. Acta* 822: 1-42.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. and Earbart, C. F. (1973) "Solubilization of Cyto-

- plasmic Membrane of *E. coli* by the Ionic Detergent Sodium-lauryl Sarcosinate." *J. Bacteriol.* 115(3), 717-722.
- George, W. J., Lawrence, D. and Saul, R. (1971) "The Sialic Acid." *J. Biol. Chem.* 246: 430-435.
- Glauert, A. M. and Thornly, M. J. (1969) "Topography of the Bacterial Cell Wall." *Annu. Rev. Microbiol.* 23: 159-198.
- Goldfine, H. (1984) "Bacterial Membrane and Lipid Packing Theory." *J. Lipid Res.* 25: 1501-1507.
- Hindahl, M. S. and Iglewski, B. H. (1984) "Isolation and Characterization of *Legionella pneumophila* Outer Membrane." *J. Bacteriol.* 159: 107-113.
- Hiroshi, N. and Marti, V. (1985) "Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability." *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Jen, H. H., Chen, J. C., Fang, S. T. and Wang, C. T. (1988) "The Morphological Changes of Human Erythrocytes in the Culture of *Edwardsiella tarda*." *Fish Disease Res.* 9: 1-7.
- Jost, P. C., Nadakavukaren, K. K. and Griffith, O. H. (1977) "Phosphatidylcholine Exchange between the Boundary Lipid and Bilayer Domains in Cytochrome Oxidase Containing Membrane." *Biochem. J.* 16: 3110-3114.
- Lodish, H. F. and Rothman, J. E. (1979) "The Assembly of Cell Membranes." *Sci Am.* 481: 58-67.
- Loretta, L. L. and Bernard, D. D. (1981) In *Microbiology* (Bernard *et al.* eds.) pp. 82-85, Happer & Row Publishers Inc.
- Nagle, J. E. and Scott, H. L. (1978) "Lateral Compressibility of Lipid Mono and Bilayers: Theory of Membrane Permeability." *Biochim. Biophys. Acta* 513: 236-243.
- Nakayama, H., Mitusi, T., Nishihara, M. and Kito, M. (1980) "Relation between Growth Temperature of *E. coli* and Phase Transition Temperature of its Cytoplasmic and Outer Membrane." *Biochim. Biophys. Acta* 601: 1-10.
- Narindrasorasak, S., Goldie, A. H. and Sauwal, B. D. (1979) "Characteristics and Regulation of a Phospholipid-activated Malate Oxidase from *E. coli* Membrane." *J. Biol. Chem.* 254: 1540-1545.
- Osborn, M. J. (1969) "Structure and Biosynthesis of the Bacterial Cell Wall." *Annu. Rev. Biochem.* 38: 501-538.
- Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E. and Carson, J. (1972) "Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium*." *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 Thermophylic Bacterium." *Science* 231: 1134-1136.
- Robertson, J. D. (1981) "Membrane Structure." *J. Cell Biol.* 91: 189-204.
- Rower, G. and Flisher, S. (1967) "Isolation, Characterization and Determination of Polar Lipid of Mitochondria." *Methods Enzymo.* 10: 385-406.
- Spies, J. F. (1957) In *Methods in Enzymology* (Sidney P. C. and Nathan O. K. eds.) Volumn 3, Academic Press, Inc. New York, London.

- Stein, J. and Simth, G. (1982) In *Techniques in Life Sciences* (Heskth T.R. *et al.* eds.) pp. B403/1-B403/15, Elsevier/North Holland Scientific Publishers Ltd.
- Wang, C. T., Shaio, Y. J., Tsai, W. I. Yang, C. C. (1986) "Estimation of the Phospholipid Distribution in the Human Platelet Plasma Membrane Based on the Effect of Phospholipase A₂ from *Naja nigricollis*." *Biochim. Biophys. Acta* **856**: 244-258.
- William, C. (1987) "Glycolipid Function." *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 137-160.