

Flavobacterium sp. 脂多醣之純化與分析

Isolation and Characterization of Lipopolysaccharides from *Flavobacterium* sp.

楊文君·謝宗甫·王成德

Win-Jing Young, Tzung-Fu Hsieh
and Cheng-Teh Wang

Abstract

Lipopolysaccharides in *Flavobacterium* sp. were isolated. SDS-PAGE of lipopolysaccharides revealed that O-polysaccharides were of short chain length. The major acyl chain of lipid A of lipopolysaccharide was 1-dodecanol (18.89%), which linked to lipid A via an ether linkage. Chemical analysis showed that lipopolysaccharides contained aminosugar, heptose, phosphate, and fatty acid with a molar ratio of 11:1:3:6. 3-keto-2-deoxy-octonate (KDO), which is universal to almost all gram-negative bacterial core structure, is undetectable in this bacterium.

緒 言

1987年三月間，於屏東地區的養殖牛蛙場發生一種疫病，引起牛蛙敗血症，死亡率極高(>50%)。病蛙的症狀包括體色轉變，身體失去平衡的迴旋游動。解剖檢視，可見內臟皆有嚴重的充血，淤血現象。臺灣大學動物系鍾虎雲教授等人由病蛙的神經系統及內臟分離出一種獨特的革蘭氏陰性，無運動性，不利用醣類之桿菌。測定其DNA的G+C%為34.42%歸類為*Flavobacterium* sp. (Chung *et al.* 1986)。

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致發熱，毛細管滲透性增加等病徵(Davis *et al.* 1986)。此內毒素即菌體瓦解後所釋放之脂多醣(Lipopolysaccharide)。脂多醣為長鏈醣類連接一段脂質，脂質為毒性其本所在，醣類扮演抗原之角色，特定的菌株具有特定的脂多醣構造，整個分子結構為

O-antigen—Core—Lipid A 其中：

(一)O-抗原(體—抗原)：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體抗原。

(二)核心(Core)：介於O-抗原與脂質A之間約10個糖分子之寡醣。

含特殊分子八碳去氧酮醣KDO(2-keto-3-deoxyoctonate, 3-deoxy-D-manno-octulosonate), KDO數目依菌種不同而不同。

(三)脂質A(lipid A)：構成外膜脂雙層所必須。於腸內菌科為6至7分子的脂肪酸連接在兩個胺

Water System, Ei Paso, Texas, USA) 裝置過濾至電阻值 17 MΩ 以上。膠體過濾 (Gel-filtration) 所用的玻璃管柱，玻璃填充物 (Sephadex G-75, Sephadex G-200, 及 Blue dextran 2000) 等購自 Pharmacia Fine Chemical (Uppsala, Sweden)。

Salmonella typhimurium 不同菌株的脂多醣及反應試劑如牛血清蛋白 (BSA), 3-keto-2-deoxyoctonate (KDO), 胺糖及脂肪酸標準試劑購自 Sigma Chemical Company (ST. Louis, Mo, USA)。

方 法

菌種培養及收集

Flavobacterium sp. 由冷凍乾燥管取出，直接劃於 CASO agar plate (含 1.4% 的 Bacto-agar) 上，於 35°C 下培養 16~20 小時後，觀察菌落 (Colony) 形態是否皆相同，以確定無雜菌污染。欲進行各項實驗時，先挑五個菌落接種於 5~10 毫升培養液中，於 35°C 下培養 7~10 小時後，再以 100 倍體積的比例稀釋到三公升的培養液中作大規模的培養，14 小時後收成。欲使細菌在缺鐵情況下生長，加入 1/2000 倍培養液體積的 2,2-Dipyridyl 20 mg/ml (最終濃度為 10 μg/ml) (Aoki *et al.* 1985)。

將培養液冷卻至 4°C，以 12,000×g 4°C 下離心 5 分鐘，離下的菌塊呈粉紅色。將上清液倒掉，以預冷於 4°C 下，½ 倍原有體積的 Phosphate buffered saline (PBS) 將菌塊沖散，均勻懸浮於液中，再離心收集之。依此法，以 PBS 洗 2 次，再以蒸餾水洗一次，然後懸浮於少量水中，置於冷凍乾燥瓶內，進行冷凍乾燥。18 小時後，可將水份完全抽乾，取出菌塊稱重，此即菌塊乾重。然後置於密封容器內，於 4°C 下保存。

脂多醣的純化

以 Hot-phenol 法來萃取脂多醣 (Wu *et al.* 1987)。依下列步驟進行純化：

(1) 收集菌體乾重達 20 克，懸浮於 200 毫升的 40 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0—5 mM EDTA—0.3 克 Lysozyme 於 4°C 下攪拌過夜。經 Lysozyme 處理後的溶液加熱到 68°C，再加入等體積 68°C 熱的 Phenol，攪拌 15 分鐘。於此溫度下，酚與水形成乳液狀對萃取蛋白質具最佳效果。置於冰上五分鐘後離心 4,000×g 15 分鐘，將水層與酚層分開，取水層。以同樣方式，加入等體積的水再萃取一次 (Westphal & Jann 1965)。

(2) 收集兩次的萃取液，加入 2% Cetavlon—0.5 M NaCl 於室溫下作用 15 分鐘，可將大部份核酸及其它酸性物質沈澱下來。再以 3,000 rpm 低速離心將沈澱物質離去。

(3) 上層液以 37°C 減壓蒸餾縮小體積後，加入兩倍體積的 Acetone，於 4°C 下放置兩小時，脂多醣會沈澱下來，再離心 10,000×g 收集之。

(4) 為進一步純化脂多醣，須經過 DNase 50 μg/ml, RNase 50 μg/ml 37°C 下作用一小時。擴大體積後以酚萃取，除去酵素，離心後的水層於 0.5 M NaCl 中透析隔夜 (Leive & Morrison 1971) 及蒸餾水中透析兩天，經冷凍乾燥即可得純度 95% 以上的脂多醣。

脂多醣的電泳分析

Flavobacterium sp. 的脂多醣與 *Salmonella typhimurium* 不同 Strain (包括 TV119 Ra mutant, SL684 Rc mutant, SL1181 的脂多醣) 以 14.5% 140×100×0.7 mm 的 Polyacrylamide slab gel 參考 Laemmli SDS-PAGE 電泳分析系統。樣品加入 1/3 倍體積的 4×Reduced sample buffer (0.2 克 SDS, 2 毫升 β-Mercaptoethanol, 2 毫升 Stacking gel buffer, 0.01% Bromophenol blue) 於 100°C 下加熱 5 分鐘，取 10 μl Sample 跑電泳，以固定電流方式於 Stacking 時保存 8 mA/slab gel 及 Separating 時保持 16 mA/slab gel，直到 Bromophenol

blue 移動到距底端 1 公分爲止，時間約須 3.5 小時。跑完電泳後，須以銀染色法 (Tsai & Frasch 1982) 或過碘酸-Schiff 染色法 (Dubray & Bezard 1982) 呈色。

脂多醣的化學成分分析

(A) 脂肪酸氣相層儀/質譜儀的分析：

脂多醣中的脂肪鏈 (Acyl chain) 可用強鹼水解下來再以氣相層儀/質譜儀分析。依下列步驟進行：

1. 取 0.1 克脂多醣溶於 2 毫升 4 N KOH 中，充氮氣密封後，置於 100°C 中加熱 4 小時可完全釋放脂多醣中的脂肪鏈，再以 2 毫升的 6 N HCl 酸化之，以氯仿萃取之。

2. 再以氯仿：甲醇：水=3：48：47 洗去有機層中水溶性物質取有機層以氮氣吹乾後，可得脂肪鏈，秤重即可知脂多醣中含脂肪鏈的百分比。

3. 取部份脂肪鏈加入 1 毫升 20% BF₃-methanol 85°C 下反應 30 分鐘將脂肪酸甲酯化，以 4 毫升己烷：水=1：1 萃取，取己烷層 (上層)。將己烷以氮氣吹乾，重新溶於少量己烷中，取 1 μl 跑氣相-液相層析儀 (Shimadzu GC-8A, CP-wax-52 CB 管柱長 50 米，寬 0.32 毫米，程式設計爲初溫 120°C，每分鐘升高 4°C 末溫 220°C 維持 30 分鐘，攜帶氣體爲氫氣，流速 40 ml/min) 分析脂肪鏈組成。

4. 爲進一步確定脂肪鏈組成時以氣相層析/質譜儀分析 (Hewlett Packard 5985B 機型 CP-wax-52CB 管柱，50 米長，0.32 毫米寬，70 eV，加這電壓 2600 V, Interface 溫度爲 200°C，攜帶氣體爲氫氣，流速 1.5 ml/min，程式設計爲初溫 120°C，維持 5 分鐘，每一分鐘增高 4°C，末溫 200°C 維持 60 分鐘。

(B) 磷含量測定，採用 Ascorbic acid 法 (Ames 1970)。

(C) 糖濃度測定，依照 Dubois *et al.* (1951) 的方法。

(D) 八碳去氧酮糖 (3-Keto-2-deoxytonate; KDO) 含量的測定，依照 Brade *et al.* (1983) 的方法。

(E) 七碳糖 (Heptose) 的測定，則根據 Osborn (1963) 的方法。

結果與討論

脂多醣的純化

收集菌體乾重達 20 克，進行純化脂多醣的工作。經丙酮沈澱後得粗重爲 2.97 克，再進一步經酵素分解殘餘的核酸及蛋白質並利用透析將分子量小於 3.5 KD 的物質除去，最後的水溶液經冷凍乾燥後得脂多醣 1.12 克，產率爲 5.72% 比所發表的 *E. Coli* B/r cell 中的脂多醣占菌體乾重 3.4% 高 68%。可能在抽取脂多醣前，先以 Lysomyze 分解細胞壁因而提高產率 (Wu *et al.* 1987)。由 20 克菌體抽取脂多醣 1.12 克，經計算後得知每隻菌的外膜外層帶有 1.31×10^6 個脂多醣分子。脂多醣可以冷凍乾燥形式長期保存於 -20°C，因反覆冷凍解凍對脂多醣沒影響，可經由電泳型式皆相同而證明。

脂多醣的電泳分析

Flavobacterium sp. 的脂多醣與 *Salmonella typhimurium* 的野生型及突變種 Ra 及 Rc strain 的脂多醣標準試劑共同作 SDS-PAGE 並以銀染法呈色 (圖一)。

比較 *Flavobacterium* sp. 與 *Salmonella typhimurium* 的脂多醣電泳型式得知 *Flavobacterium* sp. 脂多醣最小的分子，分子量界於 *Salmonella typhimurium* Ra 及 Rc strain 之間，O-抗原的重覆糖基的分子量也較之爲小。

由 *Salmonella typhimurium* Ra 及 Rc 的脂多醣已知結構計算兩者的分子量各爲 4558 及 3707

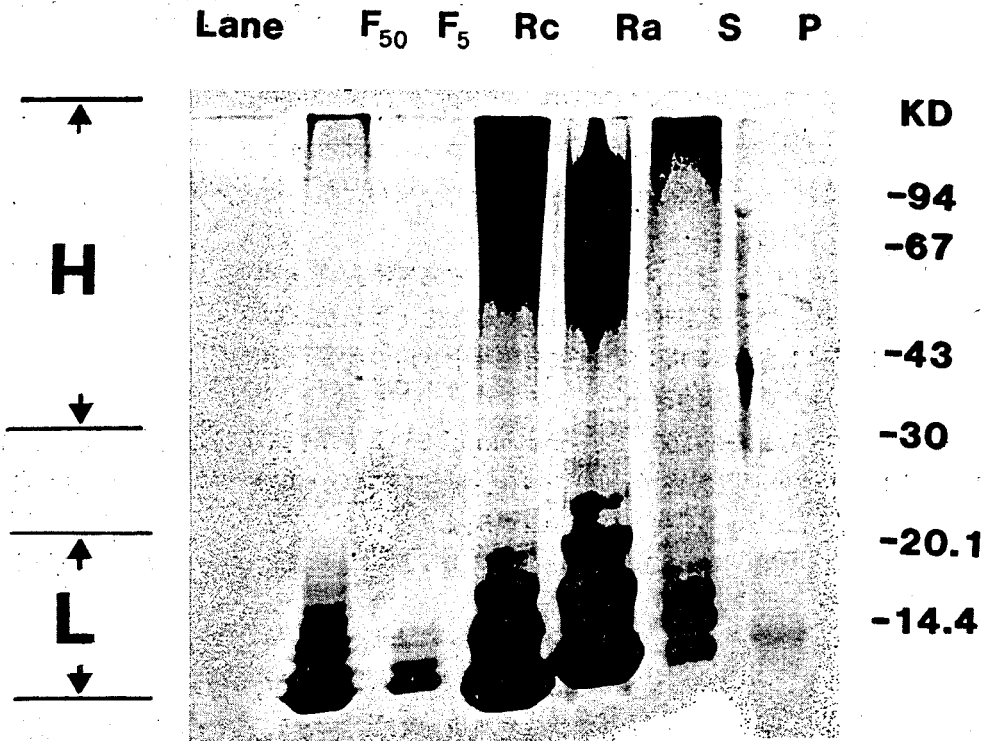


Fig. 1. SDS-PAGE of lipopolysaccharides (LPS) purified from *Flavobacterium* sp. Lanes F₅₀ and F₅ represent the separation of 50 μg and 5 μg of LPS isolated from *Flavobacterium* sp. Lanes Rc, Ra, and S are the standard LPS of *Salmonella typhimurium* Ra mutant, Rc mutant and smooth type, respectively (50 μg each). Lane P is the standard protein marker with indicated molecular weight (KD). H and L on the left margin indicate the high and low molecular weight regions of LPS.

dalton (Lehmann *et al.* 1977)。取電泳移動距離對分子量作圖，可得一標準曲線。*Flavobacterium* sp. 脂多醣的分子量可經由移動距離對標準曲線外插後換算而得。電泳片上，可看出脂多醣分子羣大小分佈，約分為兩區：

(一)高分子量區，其分子量分佈由 170 KD 到 38 KD，O-抗原計算結果約含 18 個糖基。此區的脂多醣並非具有很長的 O-抗原糖鏈，而是脂多醣分子的 Multimer (Peterson & McGroarty 1985)，可用 Two dimension SDS-PAGE 證明。因為不同 O-抗原長度增加時，脂多醣會出現在第二度空間 SDS-PAGE 的對角線上，比較高低分子量區的移動速度可發現二者在第二度空間 SDS-PAGE 的移動速度相同，且不在同一直線上得知。此外當 SDS 對脂多醣的濃度提高時，會增加低分子量區的脂多醣而高分子量區的脂多醣幾乎消失。

(二)低分子量區，此區的脂多醣分子量由 13.9 KD 到 4.2 KD，尤其以 4.2 KD 分子所佔比列最高，經由與 Ra, Rc 分子量比較後，推論此分子可能為 Lipid A-core sugar 的結構而不帶有重覆的 O-抗原，此區其他分子的 O-抗原的糖基數目平均為 9 個，與 *E. tarda* 的 LPS 的重覆單原一樣 (Lee *et al.* 1989)。

Flavobacterium sp. 的脂多醣所帶的糖鏈很短，為 Rough type lipopolysaccharide，如何逃過宿主免疫系統，並且具有如此高的感染率及死亡率？於電子顯微鏡下發現 S layer 可充分解釋這個問題 (楊文君碩士論文，1989 年；清大生科所)。S layer 包圍在菌體外圍，利用菌落的聚集所以

可侵犯全身各部位組織。其附著於外膜上與脂多醣有很強的作用存在，脂多醣的糖鏈太長 (Smooth type) 或太短 (Rough type) 時，S layer 都無法附著，像 *Flavobacterium* sp. 的脂多醣結構，糖鏈很短，且大小較均勻可提供 S layer 良好的附著條件。

脂多醣之脂質 A (Lipid A) 之脂肪酸分析

0.1 克脂多醣經鹼水解及酸化後，放出游離脂肪鏈 (Acyl chain)，以氯仿萃取並用氮氣吹乾後稱重的 0.016 克，由此可知脂肪鏈佔脂多醣的 16%。並以氣相層析—質譜儀分析可得四大類結構 (Table 1)：

Table 1. The composition of fatty acids and alcohols in LPS of *Flavobacterium* sp.

Components	Chain length	M. W.	Area percentage ¹
Lauric acid	(C 12:0)	200	4.53
Myristic acid	(C 14:0)	228	9.96
Pentadecanoic acid	(C 15:0)	242	14.23
Palmitic acid	(C 16:0)	256	10.74
Heptadecanoic acid	(C 17:0)		1.42
Stearic acid	(C 18:0)	284	11.51
Lauryl alcohol	(C 12:0 1-ol)	186	18.89
n-Decyl alcohol	(C 10:0 1-ol)	158	3.49
3-Hydroxytridecanoic acid deriv.			8.39
3-Hydroxymyristic acid deriv.		231.5	11.02
Pentadecanoic acid isomer		242	1.42
Unknown		269	4.41

¹ Area percentage was calculated from the chromatograms by gas chromatography. M. W.=molecular weight obtained from GC-Mass.

(一)不同碳鏈長度的直鏈脂肪酸，包括Lauric acid (12:0), Myristic acid (14:0), Pentadecanoic acid (15:0), Palmitic acid (16:0), Heptadecanoic acid (17:0), Stearic acid (18:0)。

(二)長鏈醇類，包括 1-decanol, 1-dodecanol，可能以 ether bond 連接到脂質A上。

(三)具支鏈的脂肪酸。

(四)一系列 β -Hydroxy-myristic acid 及 β -Hydroxy-tridecanoic acid 的衍生物，其詳細的結構尚未確定。

其中含量最高並非脂肪酸而是 12 碳醇 (1-dodecanol) 占 18.89%。飽合脂肪酸 Myristic acid, Palmitic acid 及 Stearic acid 三者含量都接近 10%，可能在脂多醣中以等莫耳數存在。

從已經發表有關細菌脂質A的脂肪酸種類中，未見有醇類存在 (Table 2)。而此菌含高量之長鏈醇，12 碳醇可能經由 Ether linkage 連接到脂質A上。猜測其存在可能與脂多醣在細菌中的結構特性或對宿主的生理角色有關。12 碳醇的熔點低，當作細菌外膜成份結構時，會使外膜臨界點 (Critical point) 降低，使細菌在低溫下，仍可維持膜上蛋白質的活性，於實驗中可觀察到細菌置於冰箱中仍有生長現象。蛙類冬眠時，也會受到此菌感染而死亡。12 碳醇的存在，可能與脂多醣的毒性有關，已知脂多醣會引起宿主免疫系統強烈的反應，在白血球表面可能有脂質 A 的結合部位 (Hampton *et al.*

Table 2. Comparison of the molar ratio of fatty acids and alcohol in lipid A of various pathogens

Fatty acid	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>E. tarda</i> ¹	<i>E. coli</i> ¹	<i>S.</i> <i>typhimurium</i>
	Molar ratio			
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
Pentadecanoic acid	1	0	0	0
Palmitic acid	1	1	0	0

¹ Data of *Edwardsiella tarda* were taken from Lee *et al.* (1989); those of *E. coli* strain (D31m4) were from Boman and Monner (1975); and those of *S. typhimurium* were from Rick *et al.* (1977).

1988)。當白血球受脂多醣刺激後會被活化產生腫瘤破壞因子，Interleukin-2，血小板活化因子 (Platelet activating factor; PAF)，FAF 在血小板的活化因子與此菌的脂質 A 結構上有一點類似，即兩者都有 Long hydrocarbon chain 及 Ether linkage 的存在。在血小板活化因子的結構與活性的實驗中證明 12 個碳至 20 個碳長度的 Alkyloxy group 活性最佳並且與 PAF receptor 結合是利 Long hydrocarbon chain 插入細胞膜後，再以 Ether group 來改變細胞膜的流動性及代謝。可能脂多醣中脂肪鏈的生理角色也是如此，而增加 Etherbond 可使脂質 A 的活性更高。

化學成份分析

分析各種成份時，採用呈色法 (Colorimetric method) 來定量。待測物濃度，皆在標準濃度與吸光度呈直線相關的範圍內測量由標準試劑濃度與吸光度之標準曲線，欲測物之濃度可由內插法而得，由此數值可換算欲測物佔樣品的百分比 (Table 3)。以重量百分比除以分子量，可得莫耳數比為

Table 3. Composition of lipopolysaccharide components in *Flavobacterium* sp.

Components	% of total LPS weight ¹	Molar ratio ²
Carbohydrate		
Total	26.94	
Aminosugar	22.57	11.35 (11)
KDO	0.61	0.002 (0)
Heptose	3.13	1.34 (1)
Phosphate	1.04	3.02 (3)
Fatty acids and alcohols	15.90	5.87 (6)

¹ The components were quantitated by various methods as detailed in Materials and Methods. While the weight of total LPS was obtained by weighing.

² Molar ratio of each components in LPS was obtained by using the following molecular weight: 31 for phosphorus; 230 for average fatty acid and alcohol; 179 for aminosugar; 210 for heptose; and 402 for KDO (3-deoxy-D-manno-octulose). Numbers in parenthesis are rounded-off molar ratio.

Aminosugar : Heptose : Phosphate : Fattyacyl chain = 11.35 : 1.34 : 3.02 : 6.21, 約為 11 : 1 : 3 : 6。

Lipid A 為 Gram negative 細菌內毒素的毒性所在，具有 Mitogenic stimulation，補體活化，誘導發熱及其他許多的生物活性。為了解其毒性與結構的關係將 *Flavobacterium sp.* 的脂多醣中 Lipid A 的結構與 *Salmonella typhimurium* (Rick *et al.* 1977; Rick & Osborn 1977); *E. coli* (Rosner *et al.* 1979) 作比較，三者的含磷量相近，磷存在於 Lipid A, Core 及 Polysaccharide backbone 中。在腸科細菌的脂多醣，Inner-core 含 Heptose 及 3-keto-2-deoxy-octulosonic acid (KDO) oligosaccharide。KDO 的位置在核心內與 Lipid A 相連之醣基，以分支三醣存在，此分子乃許多種菌類維持外膜功能的完整性所必備者，幾乎所有革蘭氏陰性菌的脂多醣具 Lipid A 及 KDO，於腸科菌中無 KDO 的脂多醣例子，僅見於 *Escherichia coli* temperature-sensitive mutant (Rosner *et al.* 1979)。*Flavobacterium sp.* 可能不具 KDO。其脂肪酸的 Molar ratio 與腸科菌的脂多醣相近，但是由氣相層析—質譜儀的結果顯示在組成上差異很大。

摘 要

一種新分離的 *Flavobacterium sp.* 為一革蘭氏陰性 (Gram negative) 牛蛙病原菌，菌體瓦解後釋放出內毒素脂多醣。由 *Flavobacterium sp.* 分離得到之脂多醣以 SDS-PAGE 電泳後經銀染呈色，發現脂多醣短糖鏈者占大多數，以不帶 O-抗原者含量最高。脂質 A 為脂多糖毒性所在，分析脂質 A 的脂肪鏈 (Acyl chain) 種類包括(1)不同碳鏈長度的飽合脂肪酸(2)長鏈醇類(3)具支鏈的脂肪酸(4)一系列 β -Hydroxy fatty acid 的衍生物。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糖 (3-deoxy-D-manno-octulosonate; KDO)，此可為鑑定此菌之指標之一。

致 謝

本研究承蒙農委會資助研究經費 (78 農建-7.1-漁-06)，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

- Ames, B. N. (1971) "Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase." *Method. Enzymol.* 9: 115-118.
- Aoki, T., Nomma, J. and Crosa, J. H. (1985) "Virulence of *Vibrio anguillarum* with particular emphasis on the outer membrane components." *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries* 51(8): 1249-1254.
- Boman, H. G. and Monner, D. A. (1975) *J. Bacteriol.* 121: 455-464.
- Brade, H., Galanos, C. and Luderitz, O. (1983) "Differential determination of the 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residues in lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* rough mutants." *Eur. J. Biochem.* 131: 195-200.
- Chung, H. Y., Lin, I. H., Hsu, K. H., Lin, C. K., Wen, M. T. and Kou, G. H. (1986) "Study on Septicemic Epizootic of Culture Bullfrog Caused by *Flavobacterium sp.*" *COA Fisheries Series No. 8 Reports on Fish Disease Research (VIII)*: 18-27.
- Csako, G., Suba, E. A. and Elin R. J. (1988) "Endotoxin-induced platelet activation in human whole blood in vitro." *Thrombosis and Haemostasis* 59(3): 378-382.

- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. and Ginsberg, H. S. (1986) "Microbiology" Harper and Row. Publishers, Hagestown, chap. 24, p. 559.
- Dubois, M., Gilies, K., Hamilton, J. K., Rfebers, P. A. and Smith, F. (1951) "A colorimetric method for the determination of sugar." *Nature* 168: 167.
- Dubray, G. and Bezar, G. (1982) "A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels." *Anal. Biochem.* 119: 325-329.
- Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T. and Westphal, O. (1977) "New aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides with special reference to their lipid A component" pp. 239-335. in Goodwin, T. W. (ed.) *International review of biochemistry, vol. 14, Biochemistry of lipids II.* University Park Press, Baltimore.
- Hampton, R. Y., Golenbock, D. T. and Raetz' C. R. H. (1988) "Lipid A binding sites in membranes of macrophage tumor cells." *J. Biol. Chem.* 264: 14802-14807.
- Hitchcock, P. J., Leive, L., Makela, P. H., Rietschel, E. T., Strittmatter, W. and Morrison, D. C. (1986) "Minireview, lipopolysaccharids nomenclature-past, present and future." *J. Bacteriol.* 166: 4165-4173.
- Holter, W., Goldman, C. K., Nelson, C. D. L., Greene, W. C. and Waldmann, A. (1987) "Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-r stimulated human monocytes." *J. Immunol.* 138: 2917-2922.
- Jackway, J. P. and DeFranco A. L. (1986) "Pertusis toxin inhibition of B cell and macrophage response to bacterial lipopolysaccharide." *Science* 234: 743-745.
- Lee, Y. C., Young, W. J. and Wang, C. T. (1989) "Characterization and reconstitution of lipopolysaccharide from *Edwardsiella tarda*." *Fish Disease Res.* 9: 7-15.
- Lehmann, V., Rupprecht, E. and Osborn, M. J. (1977) "Isolation of mutants conditionally block in the biosynthesis of the 3-keto-2-deoxy-D-manno-octulosonic acid-lipid A part of lipopolysacchdides derived from *Salmonella typhimurium*." *Eur. J. Biochem.* 76: 41-49.
- Leive, L. and Morrison, D. C. (1970) "Isolation of lipopolysaccahrdes from bacteria." *Method Enzymol.* 23: 254-262.
- Old, L. J. (1988) "Tumor necrosis factor." *Sci. Amer.* 258: #5, 41-51.
- Osborn, M. J. (1963) "Studies on the Gram-negative cell wall, I: Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 50: 499-506.
- Peterson, A. A. and McGroarty, E. J. (1985) "High-molecular-weight components in lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 5: 738-745.
- Rick, P. D., Fung, W. -M., Ho, C. and Osborn, M. J. (1977) "Lipid A mutants of *Salmonella Typhimurium*." *J. Biol. Chem.* 252: 4904-4912.
- Rick, P. D. and Osborn, M. J. (1977) "Lipid A mutants of *Salmonella Typhimurium*." *J. Biol. Chem.* 252: 4895-4903.

- Rosner, M. R., Tang, J.-Y. and Khorana, H. G. (1979) "Structure of lipopolysaccharide from an *Escherichia coli* heptose-less mutant." *J. Biol. Chem.* **254**: 5906-5917.
- Saba, H. I., Saba, S. R., Morelli, G., Hartmann R. C. (1984) "Endotoxin-mediate inhibition of human platelet aggregation." *Thrombosis Research.* **34**: 19-33.
- Sayer, T. J., Macher, I., Chung, J., Kugler, E. (1987) "The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monossaccharide precursor." *J. Immunol.* **138**: 2935-2940.
- Tsai, C. M. and Frasch, C. E. (1982) "A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels." *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.
- Vukujlovich, S. W., Hoffman, J. and Morrison D. C. (1987) "Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structure requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways." *Molecular Immunol.* **24**: 319-331.
- Westphal, O. and Jann, K. (1965) "Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further application of the procedures." *Methods Carbohydr. Chem.* **5**: 83-91.
- Wu, I., Tsai, C. M. and Frasch, C. E. (1987) "A method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharide (oligosaccharides)." *Anal. Biochem.* **160**: 281-289.