

國立交通大學  
生化工程研究所  
碩士論文

I. 與哈威弧菌結合之多胜肽適合體之篩選  
**Screening of *Vibrio harveyi*-Binding Peptide  
Aptamers**



II. 河流弧菌中推定的溶血素之純化  
**Purification of a Putative Hemolysin of *Vibrio  
fluvialis***

研究生：劉妍希

指導教授：吳東昆 博士

中華民國九十四年七月

I. 與哈威弧菌結合之多胜肽適合體之篩選  
Screening of *Vibrio harveyi*-Binding Peptide Aptamers

II. 河流弧菌中推定的溶血素之純化  
Purification of a Putative Hemolysin of *Vibrio fluvialis*

研究生：劉妍希

Student: Yen-Hsi Liu

指導教授：吳東昆 博士

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

國立交通大學

生化工程研究所



A Thesis

Submitted to Institute of Biochemical Engineering  
college of Biological Science and Technology

National chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biochemical Engineering

July, 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年七月

## I. 與哈威弧菌結合之多胜肽適合體之篩選

## II. 河流弧菌中推定的溶血素之純化

研究生：劉妍希

指導教授：吳東昆 博士

國立交通大學 生化工程研究所

### 中文摘要

I. *Vibrio harveyi* 對蝦業養殖及近海魚類來說為重要致病原，其傳統檢測方式十分費時、費力且結果易於誤判，因此本研究利用噬菌體展示方法篩選出可和 *V. harveyi* 結合之多胜肽適合體 (aptamer)，以發展另一種快速檢測方式。首先將噬菌體之七胜肽隨機多胜肽庫用於體外篩選過程，經過五次親和性選擇後挑選 31 個單一多胜肽噬菌體，將其單股 DNA 純化定序後發現共有四種胺基酸序列，分別為 HHPPWLP、HFDWLPLY、LPLNNRL 和 NSTAIMT，最後以酵素連結免疫吸附法及西方墨點法證明四種多胜肽皆會和 *V. harveyi* 結合。

II. *Vibrio fluvialis* 為人類及海洋生物之致病菌，其中溶血素被認為是最重要的致病因子。而 *V. furnissii* 之親源關係和 *V. fluvialis* 很相近，本實驗室於 *V. furnissii* 之胞外分泌液中純化出一具溶血性質的蛋白質，因此推測 *V. fluvialis* 可能也有此一性質相似之蛋白質。利用疏水性作用管柱層析分離由 *V. fluvialis* 所獲得之胞外分泌液後，經 SDS-PAGE 電泳分析發現在 20% Ethylene Glycol 的沖提液中有一約 59 kDa 的蛋白質，另外也發現此沖提液有溶血活性。進一步以 Native-PAGE 分析後貼在含血培養盤上，也發現具有溶血性質。隨後利用 *V. furnissii* 中 59 kDa 溶血素的抗體進行西方墨點法同樣可辨識到一大約 59 kDa 的蛋白質帶。因此推論 *Vibrio fluvialis* 之胞外分泌液經過管柱層析分離後，可分離出一具溶血活性的蛋白質。

# **I. Screening of *Vibrio harveyi*-Binding Peptide Aptamers**

# **II. Purification of a Putative Hemolysin of *Vibrio fluvialis***

Student: Yen-Hsi Liu

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

## **Abstract**

**I.** *Vibrio harveyi* is an important causative agent of vibriosis in penaeid aquacultures and estuarine fishes. Up-to-date, the traditionally methodologies of *V. harveyi* identification have been time-consuming, labor-intensive, and sometimes can show variable reliabilities. Therefore, we are interested in applying phage display technique for screening *V. harveyi*-binding peptide aptamers for rapidly medical detection. First, a heptapeptide phage library had been subjected to an *in vitro* selection process for the identification of *V. harveyi*-binding peptide aptamers. After five times of selection cycle, 31 phages bearing individually single type of peptide aptamers had been picked, and the single strand DNA from the phages had been purified and sequenced. The result of the selection process is four types of polypeptide sequence found out. Finally, using ELISA assay and Western blotting, the four types of polypeptides had been confirmed that all could bind with *V. harveyi*.

**II.** *Vibrio fluvialis* associates with human and marine organism diseases. And “Hemolysin” produced by *Vibrio fluvialis* has been known to be a most important virulence factor. On the other hand, a 59 kDa protein functioning hemolytic activity had been isolated from *V. furnissii* in our laboratory. And the relationship between *Vibrio furnissii* and *V. fluvialis* is highly close on the genetics classification. Thus, it is hypothesized that *V. fluvialis* maybe produces a similar hemolytic protein. Through phenyl sepharose chromatography, eluted proteins had been analyzed by SDS-PAGE and a 59 kDa protein within the 20% Ethylene Glycol fraction had been discovered. In addition to above analyses, the Native-PAGE gel of the fraction coated on blood agar plates had also revealed the hemolytic activity. Subsequently, an ~ 59 kDa protein had been monitored by Western blotting. Consequently, the expected 59 kDa hemolytic protein could indeed be isolated through phenyl sepharose chromatography.

## 謝誌

回首兩年來的研究生生活，發現這兩年是我成長最多的時光，不論是在待人處事上或者是追求科學的態度及方法上皆是如此，這期間接受了老師以及學長姐們的指導與幫助，使我得以更深一層的了解科學的奧秘，而最感謝的就是吳東昆老師，在實驗的邏輯及觀念上給予我許多啟發，使我了解科學需要「堅持」，也許在研究的路上並不是一帆風順，但這些累積的失敗經驗卻是無形的財富，將我們向成功更推進一步。除此之外，十分感謝李耀坤老師及鄭建中老師在百忙之中撥冗為我的論文進行審閱修改，使我的論文能更為完整。

此外要感謝實驗室中可愛的夥伴們在這兩年中對我生活上的照顧以及實驗上的指教，對於首次離家在外的我來說，他們就像是家人一樣能彼此關心鼓勵及照顧，令我不感到孤單寂寞。裕國學長在實驗技術上對我的指導，對於剛從公衛轉入生科領域的我來說實在是獲益良多，而學長俐落的操作技術也一直是我的學習目標；程翔學長一直扮演著實驗室頭頭的角色，總能幫助我解決許多疑難雜症；媛婷學姊像是大姐姐一樣在我心情低落的時候給予安慰；小芭和阿美總是在實驗上和我互相砥礪及當我心情低落時聽我吐苦水，可說是我的最佳戰友；另外，還有有食神之稱的宏城、帥氣的晉豪、體貼的文鴻、聰慧的大鳥、愛耍冷的宏明、開心果晉源、負責任的令宗、像天使一樣可愛的志駿及富有戲胞的小麒，都是我由衷感謝的實驗室夥伴，認識他們是我最大的收穫，因為有他們的陪伴與幫助我才能順利的完成此本論文，並且使我的實驗室生活更加多采多姿。

最後我要感謝的是最親愛的家人，永遠支持鼓勵我的父母，活潑可愛的妹妹，慈祥的乾爸乾媽，以及在我最辛苦的時候守候在旁給予我幫助及鼓勵的琮道，因為有他們我才能順利的完成學業，邁向人生的下個階段，在此，謹以此論文獻給他們。

劉妍希 謹於  
國立交通大學 生物科技學院  
生化工程研究所  
生物有機與分子演化實驗室  
2005/08/17



## Part I

與哈威弧菌結合之多胜肽適合體之篩選

Screening of *Vibrio harveyi*-Binding Peptide Aptamers



# 目錄 (I)

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
謝誌.....	iii
目錄 (I).....	v
目錄 (II).....	viii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
附錄.....	xi

## 第一章 緒論

1-1 弧菌 ( <i>Vibrio</i> spp.) 的簡介.....	1
1-1-1 弧菌症 (Vibriosis).....	5
1-1-2 毒性因子.....	6
1-1-3 哈威弧菌 ( <i>Vibrio harveyi</i> ).....	9
1-1-4 檢測的方式.....	11
1-2 噬菌體展示系統(Phage Display System)的簡介.....	13
1-2-1 絲狀噬菌體的生物特性.....	15
1-2-2 噬菌體展示系統的種類.....	18
1-2-3 噬菌體展示系統的應用.....	19
1-3 研究動機與目的.....	21

## 第二章 實驗材料與方法

2-1 實驗材料.....	22
---------------	----

2-1-1	化學藥品與材料.....	22
2-1-2	溶液與緩衝液.....	24
2-1-3	菌株.....	27
2-1-4	培養基.....	28
2-1-5	儀器.....	29
2-2	實驗方法.....	30
2-2-1	以 Ph.D.-C7C 作為胜肽來源，篩選對 <i>Vibrio harvey</i> 具親和力之系統.....	31
2-2-1-1	合成的 <i>Vibrio harvey</i> haemolysin 之製備.....	31
2-2-1-2	弧菌的培養及目標蛋白質的製備.....	31
2-2-1-3	生物親和性選擇 (Bio-panning).....	32
2-2-2	噬菌體效價的測定.....	34
2-2-3	單一胜肽噬菌體的放大製備.....	35
2-2-4	墨點法 (Dot Blotting).....	36
2-2-5	酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA).....	37
2-2-6	SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE).....	38
2-2-7	西方墨點法 (Western Blotting).....	39
2-2-8	噬菌體單股 DNA 模版之純化.....	40
2-2-9	DNA 定序 (DNA Sequencing).....	40

### 第三章 結果與討論

3-1	以 Ph.D.-C7C 作為胜肽來源，篩選對 <i>Vibrio harvey</i> 具親合力之多胜肽.....	42
3-1-1	以合成的 <i>Vibrio harveyi</i> 溶血素多胜肽序列當做篩選目標.....	42

3-1-2	以打破的 <i>Vibrio harveyi</i> 培養液作為篩選的目標蛋白.....	44
3-2	單一胜肽噬菌體的放大製備.....	45
3-3	噬菌體單股 DNA 模版之純化並定序.....	46
3-4	以 ELISA 觀察單一胜肽噬菌體和 <i>Vibrio harveyi</i> 結合的情形.....	47
3-5	以 Western Blotting 觀察單一胜肽噬菌體和弧菌結合的情形.....	50
第四章 結論與未來展望.....		55
參考文獻.....		78



## 圖目錄

圖 1-1	細菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 分子的圖示.....	6
圖 1-2	溶血素於膜上的次單元組裝.....	8
圖 1-3	蝦子生命週期，在成體以前之養殖蝦類容易受 <i>Vibrio harveyi</i> 感染.....	10
圖 1-4	噬菌體的簡圖.....	15
圖 1-5	噬菌體的生命週期.....	16
圖 1-6	噬菌體展示系統的三個種類；黑色代表的是基因 VIII，白色代表的是基因 III，灰色代表的是外來 DNA 以及外來蛋白質.....	18
圖 2-1	實驗流程設計.....	30
圖 2-2	負向選擇的示意圖.....	33
圖 2-3	點墨法的流程示意圖.....	37
圖 2-4	聚合酶連鎖反應定序程式.....	41
圖 3-1	以合成的 <i>V. harveyi</i> 溶血素多胜肽序列當做篩選目標，篩選五次後墨點法結果。.....	43
圖 3-2	打破的 <i>Vibrio harveyi</i> 培養液作為篩選目標，篩選五次後墨點法結果。.....	45
圖 3-3	四種多胜肽對 <i>V. harveyi</i> 的 ELISA 反應結果.....	48
圖 3-4	四種多胜肽對各部份 <i>V. harveyi</i> 培養液的 ELISA 反應結果.....	50
圖 3-5	十株弧菌之 SDS-PAGE 分析圖.....	52
圖 3-6	序列 I 對十株弧菌的結合情形.....	52
圖 3-7	序列 II 對十株弧菌的結合情形.....	53
圖 3-8	序列 III 對十株弧菌的結合情形.....	53
圖 3-9	序列 IV 對十株弧菌的結合情形.....	54

## 表目錄

表 1-1	和致病性弧菌相關的三種主要臨床症狀.....	3
表 1-2	噬菌體上五種主要的外殼蛋白.....	17
表 2-1	製作 12.5 % separating gel 及 4 % stacking gel 電泳膠片的配 方.....	39
表 3-1	31 個單一噬菌體之單股 DNA 的定序結果.....	46
表 3-2	四種多胜肽對 <i>V. harveyi</i> 的 ELISA 反應吸收值.....	48
表 3-3	四種多胜肽對各部份 <i>V. harveyi</i> 培養液的 ELISA 反應吸收 值.....	49
表 3-4	四種多胜肽與各部份 <i>V. harveyi</i> 培養液的 ELISA 反應吸收值 對負向控制組之比值.....	49



## 附錄

附錄一	弧菌的生化特性.....	83
附錄二	受限於雙硫鍵內的隨機七胜肽與 gIII 融合蛋白的 N 端序 列.....	84
附錄三	Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> library 中的胺基酸分佈.....	85

# 第一章 緒論

## 1-1 弧菌 (*Vibrio* spp.) 的簡介

弧菌 (*Vibrio* spp.) 在遺傳演化的分類上是屬於在原核生物界 (Kingdom Monera)，變形菌門 (Phylum Proteobacteria)，丙型變形菌綱 (Class Gammaproteobacteria)，弧菌目 (Order Vibrionales)，弧菌科 (Family Vibrionaceae) 下，種類至少有 50 種以上。所有的弧菌都是屬於革蘭氏陰性 (Gram-negative) 的兼性厭氧菌，可以同時具有執行發酵以及呼吸代謝的能力，顧名思義，其被稱為弧菌即是因為這類細菌在形態上皆為長 1.4~1.6  $\mu\text{m}$ 、寬 0.5~0.8  $\mu\text{m}$  的弧狀或桿狀，在培養液中可以靠著單極鞭毛 (single polar flagellum) 來移動，此外，大部分的弧菌都具有氧化酶 (oxidase-positive)，可以利用 D-glucose 當作單獨或主要的碳及能量的來源 [1]，另外，利用銨鹽當作氮源。

絕大多數的弧菌都是嗜鹽性的微生物，鈉離子的存在可刺激其生長，而且在其生長時需要大範圍的鹽濃度說明了弧菌可以生存於各種不同的鹽度中 [2]，像 *V. cholerae* 和 *V. metschnikovii* 就曾由淡水及鹹水中分離出來，而 *V. costicola* 甚至需要存活於高鹽濃度下；另外，弧菌對酸有高敏感度，必須在中性至鹼性的 pH 值 (pH 7~9) 下才具有良好的生長條件。

目前已知能夠感染人類並引發疾病的弧菌至少有二十種 [3]，另外有幾種對海洋中脊椎和無脊椎動物也具有致病性 [4]，而這些對水棲動物具致病性的菌株是非常重要的且具研究價值的，因為嚴重的弧菌感染有可能會被帶入養殖池中造成經濟上的損失 [5]。

在溫帶及熱帶地區，弧菌存在於海水、海岸及其他含鹽份的水中，並可依附在非生物或水中有機生物的表面，而主要影響弧菌分布的因素為水溫、鹽度和營養源的利用能力，另外，也和海洋的有機生物相關，其中以水溫為調節致病性弧菌分布的最主要因素，這也說明了為何弧菌在美國、亞洲及歐洲分佈會如此不同的原因 [6, 7]。

弧菌在生態學上和海水中具甲殼質的軟體動物以及貝類有關，因為在海水中和其有關聯的弧菌存活時間會比單獨存在 (free-live cell) 海水中的來得長，這說明了軟體動物和海水中有機生物扮演著重要的儲存宿主角色 [8, 9]，正因為如此，所以人類遭受感染常是經由攝取了遭受弧菌污染的食物或水，通常為生的魚肉或海鮮，以及經由傷口暴露在海水或有海洋動物的環境中而遭受感染 [10, 11]。

弧菌大致來看可以分為兩類，一類是霍亂弧菌，另一類是非霍亂弧菌。霍亂弧菌會引發霍亂造成非常劇烈的脫水性腹瀉，若無法及時給予藥物治療的話，甚至會造成死亡 [12]，自 1817 年以來，已有七次的大流行發生，而目前則只有在亞洲和非洲某些地區有區域性的流行，以及在美洲和澳洲有少數零星的病例發生，絕大多數的傳播媒介是經由遭人類排泄物所污染的水傳播；反觀另一類具致病力的非霍亂弧菌，所引發的疾病通常是經由傷口的暴露或魚類和海鮮食物的攝取所造成，而其病例遍佈已開發或開發中國家，包括有亞洲、歐洲、澳洲、中東地區、北美洲和南美洲 [13]。

弧菌的感染主要會造成三種臨床症狀：腸胃炎、原發性敗血症和傷口感染(表 1-1) [10]，腸胃炎和原發性敗血症通常是由於攝取遭污染的生海鮮或貝類所造成，腸胃炎一般會伴隨著腹瀉、嘔吐和腹痛，

可由糞便檢體中分離出弧菌病原體，需要給予抗生素治療。

<i>Vibrio</i> species	Primary septicaemia	Gastroenteritis	Wound infections
<i>V. cholerae</i> O1	*	+++	+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+++	++
<i>V. vulnificus</i>	+++	++	+++
<i>V. fluvialis</i>	*	++	*
<i>V. alginolyticus</i>	+	*	+++
<i>V. damsela</i>	*	*	+++
<i>V. furnissii</i>	*	+	*
<i>V. hollisae</i>	+	++	*
<i>V. mimicus</i>	*	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	*
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	*	*

+++ , most common association; ++, possible association; +, rare association.

\*, The association remains to be firmly established.

表 1-1 和致病性弧菌相關的三種主要臨床症狀

*V. parahaemolyticus* 及 *V. cholerae* non-O1 常和腸胃炎的發生有關，其中 *V. parahaemolyticus* 的致病力一般認為和熱穩定性溶血素 (thermostable direct haemolysin, TDH) 的產生有關，而 TDH 會造成人類紅血球有  $\beta$  溶血現象 ( $\beta$  haemolysis)，這個現象又稱做為 Kanagawa phenomenon [14]，除此之外的可能致病因子還包括有多醣類莢膜 (polysaccharide capsule)、TDH-related haemolysin (TRH)、細胞毒素和黏附性因子 [15]；至於 *V. cholerae* non-O1 則會產生幾種細胞外毒素如 cholera-like toxin。

第二種症狀—原發性敗血症是一種系統性的疾病，是因為細菌經由肝門靜脈或腸部淋巴系統進入血管中所造成，一般會伴隨有發燒、低血壓、疲憊、發冷、間斷性的腹痛、嘔吐和腹瀉 [16]。其中最常由血液中分離出來的就是 *V. vulnificus*，其毒性因子包含有多醣性莢

膜、溶血素、彈性蛋白酶 (elastase)、膠原蛋白酶 (collagenase)、脂肪酶 (lipase) 和蛋白酶 (protease) ，另外，從轉鐵蛋白 (transferrin) 獲取鐵的能力也是其致病的決定因素之一，一般人很少會引發敗血症，通常是本身帶有慢性疾病像肝臟或腎臟病、糖尿病和惡性腫瘤的人危險性較大 [10, 17]，雖然疾病的發生率低，但由於其高死亡率 (大於 50%) 使得其在醫學上具有很大的重要性。

最後一種症狀—傷口感染是一種腸外的疾病，是因為原本存在的傷口在接觸海水或其他的海洋生物後而遭感染，可以從感染者的傷口、血液以及其他原本應該是無菌狀態的部位中分離出弧菌，其中以 *Vibrio vulnificus* 的感染較為嚴重，是最猛烈及快速能使人致死的致病菌，感染後會有傷口水腫、紅斑及起水泡的情形發生，死亡率約為 20%~30%。



另一方面，弧菌對於養殖業來說也是很重要的致病菌，其中 *V. anguillarum*、*V. salmonicida* 和 *V. vulnificus* 是數種魚類的主要致病原 [18]，而 *V. harveyi* 的致病性則主要針對蝦子，包括有白蝦 (*litopenaeus vannamei*) 和草蝦 (*penaeus monodon*)，根據文獻記載其致病力又和噬菌體的存在與否有關 [19]。另外，弧菌的感染對處於幼苗期的養殖魚蝦影響很大，常會使其大量死亡，而感染魚類的方式大致分為三個階段 [18]：首先病菌先滲透進入宿主組織中，接著侵占宿主中鐵的運輸製造系統，最後藉著細胞外的產物像溶血素和蛋白酶來損害魚體。菲律賓的蝦子養殖業就曾在 1992~1994 年間遭逢弧菌感染，造成 60% 的蝦子死亡損失十分慘重 [20]，又像台灣曾經有草蝦王國的美譽，在 1987 年養殖量達到最高峰年產量有 8 萬公噸之多，但 1987 年後產量驟減，1988 年的產量還不到 1987 年產量的一半，主要就是受

到弧菌及蝦白點病毒感染之故，導致草蝦的肝胰臟發炎萎縮，進而妨礙其生長甚至死亡，也使得台灣的草蝦養殖瀕臨崩盤，因此，了解及探討弧菌的致病因子或機制對於人類或是海洋生物的疾病預防都很具重要性。

### 1-1-1 弧菌症 (Vibriosis)

海洋生物和近海魚類在遭受弧菌的感染後會引發弧菌症 (Vibriosis)，這是一種系統性的細菌感染疾病 [21]，早在幾個世紀前就被發現，目前已知最早的流行發生在 1500 年的義大利海岸邊，此症在之前又被叫作 red boil、red pest、red plague 或 saltwater furunculosis。魚類感染後依症狀可分為兩型，一為皮膚炎型，另一種為腸炎型，皮膚炎型的感染通常會在魚體表面形成潰瘍，不論是頭部、軀幹或鰭部都有可能發生，而腸炎型的感染由體表則完全看不出病變，但經解剖後會發現在腸部會有發炎、出血的現象，嚴重時甚至會有腸黏膜壞死或在肝、胰、腎臟形成潰瘍的情形發生，最後死於敗血症中，而蝦類在遭受感染後，則會在其鰓絲上出現小黑點，經解剖後會發現其中腸腺腫脹及淋巴系統的壞死，由於此症的發生遍佈全球，並且致死率又十分高，因此常造成養殖工業的經濟嚴重損失。

由於弧菌的感染危害人類健康和養殖漁業的發展，因此近年來有更多的學者投入此領域，期望進一步了解致病機制、疾病預防、菌種的檢測和疫苗開發，藉以改善及避免弧菌之感染而提昇人類的生活品質。

## 1-1-2 毒性因子

根據文獻，細菌的毒性因子依照其毒性機制與功能可粗略分為兩類分別是內毒素 (endotoxin) 和外毒素 (exotoxin)。

內毒素 (endotoxin) 和細菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 只存在於革蘭氏陰性菌中，在宿主中會活化宿主的補體系統並快速的引發發炎反應，LPS 是細菌外膜的成分之一，由三個部份所組成，一個是固定在外膜上的毒性脂質 (Lipid A)，一個是會引發免疫反應的多醣體 (polysaccharide core)，另一個則是 O 特異性多醣鏈 (O-specific polysaccharide chain) (圖 1-1)；內毒素對於大多數的哺乳類動物來說都是深具毒性的，尤其當濃度過高時會具有致死性，特別的是當 LPS 被釋放至宿主的循環系統中時，會促使 LPS 與 LPS-結合蛋白結合形成 LPS-binding complex，而這個複合物會和單核白血球 (monocyte) 及巨噬細胞 (macrophage) 上的 CD14 受體 (CD14 receptor) 有交互作用，進而促使和發炎反應相關的細胞激素 (cytokine) 釋放出來，最後造成補體系統和凝血階梯式 (coagulation cascades) 反應的活化 [22]。

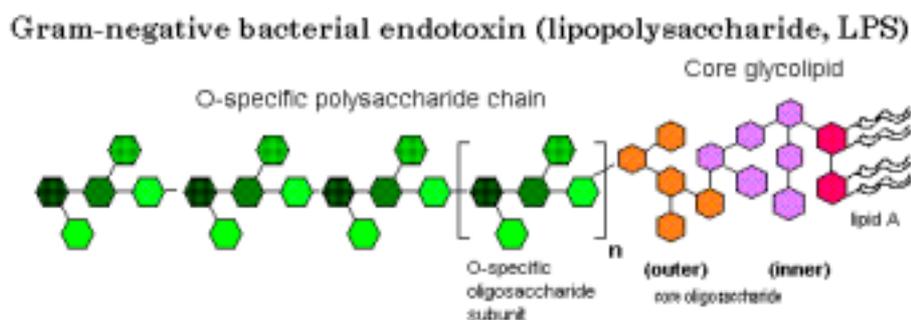


圖 1-1 細菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 分子的圖示 [23]

外毒素 (exotoxin) 是由活的致病菌所分泌，皆具有很強的抗原性，有些作用在宿主的表面是利用 subunit B 和膜上的受體結合在膜上，之後再將毒素的另一個部分 (subunit A) 直接運送至細胞質中 [24]。此外，外毒素另一種作用的形式可以直接結合在膜上並形成孔洞，而且一些外毒素還可以根據其生物活性在適當的細胞中結合在一起而發展為 leukotoxin、神經毒 (neurotoxin) 或其他的毒素。

當宿主內的含鐵量太低時並不適合細菌的生長，但細菌發展了一些系統來解決這個問題，像他們能夠和血紅素、鐵蛋白及轉鐵蛋白有很強的結合能力即是一個很好的例子，因此鐵的濃度就成了細菌感染的限制因子，而海洋中的細菌通常會產生 siderophore，這是一種低分子量的蛋白質，和鐵三價有很高的親和力可以形成螯合物以競爭有限的營養源，並且可以經由辨識膜上的受體及運輸系統來達到調解鐵質攝取的目的，另外，細菌的致病力必須仰賴由宿主中獲取鐵質，使得其可增殖至足夠的數量來引發疾病，現在已知除了 siderophore 系統外，還有血紅素結合蛋白和 hemin 結合蛋白也和鐵質的攝取相關 [25, 26]，像 *V. alginolyticus*、*V. fluvialis* 和 *V. parahaemolyticus* 就是利用血紅素和 hemin 作為鐵質的來源。

溶血素 (haemolysin) 一直以來一直被認為是弧菌中最重要毒性因子，依據其於含血培養盤上溶血的情形可大致分為三類，分別為具半溶血性質的  $\alpha$  型溶血素、具全溶血性質的  $\beta$  型溶血素以及不溶血的  $\gamma$  型溶血素。1965 年 Kato 從病人糞便檢體中分離出的 *V. parahaemolyticus*，發現在 Wagatsum medium 上具有溶血素的活性，並確認了其中包含有 TDH、TRH、熱不穩定性溶血素 (thermolabile hemolysin) 和 delta *V. parahaemolyticus* 溶血素，不同的溶血素在不同

的含血培養盤以及在 100 °C 下的活性皆不相同 [27]，目前已知一類的溶血素活性來自於許多次單元體 (subunit) 於膜上組裝形成孔洞 (圖 1-2)，使得許多小分子及離子經由膜上的孔洞溢散至細胞外，最後造成細胞的瓦解及死亡。

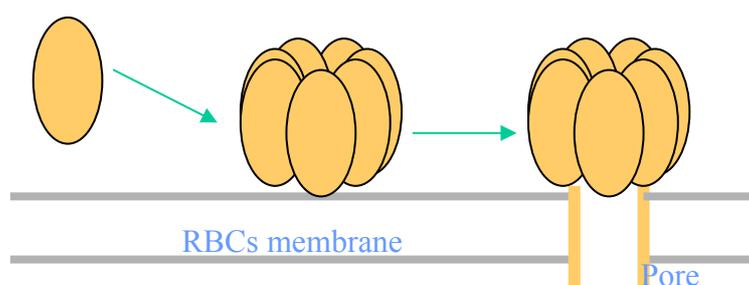


圖 1-2 溶血素於膜上的次單元組裝

蛋白酶是催化胜肽鍵水解的常見酵素，於生理上扮演著重要的角色，研究發現蛋白酶可直接或間接參與弧菌的致病機制，可以促使心臟的表皮細胞分解和瓦解宿主的防禦系統包括免疫球蛋白及補體，或者是活化和感染相關的膜蛋白。一般可將蛋白酶根據其作用位置分為胺基胜肽酶 (aminopeptidase) 及內胜肽酶 (endopeptidase) 兩種 [28]，其中常於弧菌中發現有四種內胜肽酶分別是絲胺酸蛋白酶 (serine protease)、天門冬胺酸蛋白酶 (aspartate protease)、半胱胺酸蛋白酶 (cysteine protease) 和金屬蛋白酶 (metalloprotease)。例如 *V. parahaemolyticus* 中就發現有一 43 kDa 的絲胺酸蛋白酶，其可被絲胺酸蛋白酶抑制劑所抑制，且為對熱不穩定但具溶血性質的蛋白酶。另外，其對許多細胞像中國倉鼠卵巢細胞 (CHO cell)、HeLa 細胞和 Caco-2 細胞都具有細胞毒性，因此認為其為 *V. parahaemolyticus* 中很重要的毒性因子 [29]。

除了以上幾種毒性因子外，其它像紅血球凝結素或是霍亂弧菌中的霍亂毒素 (cholera toxin, CT) 及 toxin-coregulated pilus (TCP) 也都是弧菌中非常重要的毒性因子，尤其 TCP 和霍亂弧菌能否在腸道中增長有相關性 [30]，而 CT 則為一腸毒素可造成嚴重的腹瀉，對於霍亂弧菌的致病力來說兩者缺一不可。

### 1-1-3 哈威弧菌 (*Vibrio harveyi*)

*Vibrio harveyi* 屬於革蘭氏陰性菌，且在其海洋生活環境中會發出生物冷光。在有水的環境中，此弧菌可自由地出現在水管、沉積物裡和海洋生物的表面 [31, 32]。*Vibrio harveyi* 內之 Luciferase 跟其發生物冷光有絕對之關聯性，目前已知 Luciferase 可催化以下之反應：



此酵素屬於異構雙體形式 (heterodimer)，由 40 kDa 的  $\alpha$  次單元體 (subunit) 和 37 kDa 的  $\beta$  次單元體 (subunit) 所構成。這兩個次單元體屬於同源性質，而  $\alpha$  次單元體則另外包含了額外之 29 個胺基酸。

根據文獻，*V. harveyi* 主要感染於鯊魚和蝦子。此外亦有少部分感染於 pearl-bearing oyster (maximum *Pinctada*)、snook olive、crystal pole (*Centropomus undecimalis*) 和養殖魚類身上 [33]。在蝦子的感染方面，*V. harveyi* 是白蝦 (*litopenaeus vannamei*) 和草蝦 (*penaeus monodon*) 的主要致病原，感染會造成蝦子的厭食，進而延遲其生長甚至死亡 (圖 1-3)，使得養殖蝦業嚴重的損失，特別是在南美洲和東南亞地區，有許多國家是以養殖業為主要的經濟來源，養殖蝦的大量死亡常造成其經濟上巨大的損失，甚至因此造成其養殖業的一蹶不

振，影響可謂十分的廣大。因此，目前的科學家無不希望能更了解其致病機制及因子，期能以此為基礎開發出更快速的檢測或治療方式。

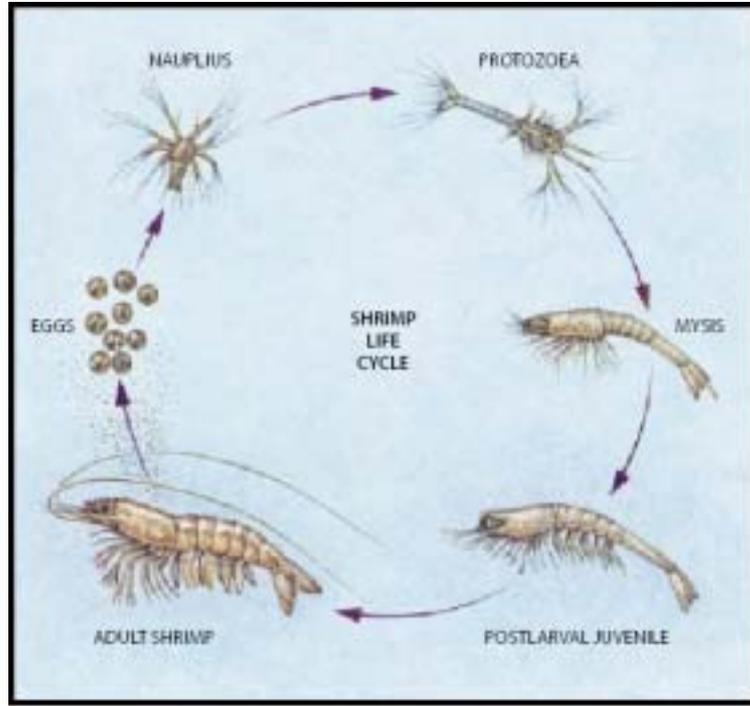


圖 1-3 蝦子生命週期，在成體以前之養殖蝦類容易受 *Vibrio harveyi* 感染。

之前有研究指出 *V. harveyi* 中重要的致病因子可能為蛋白酶、磷酸脂酶 (phospholipase) 和溶血素 [34]，其中胱胺酸蛋白酶和 LPS 已經被指出為對蝦 (penaeid shrimp) 的重要外毒素和致死性毒素，此外，溶血素也被認為是 *Vibrio harveyi* 重要的致命因子，通常會引起宿主出血性敗血症和腹瀉，而溶血素之基因 (*vhhA* 和 *vhhB*) 已被鑑別並且其重組蛋白在彩虹鱒魚血球培養盤上亦顯示出溶血活性 [35]。

## 1-1-4 檢測的方式

- 傳統生化檢測

傳統的生化檢測方式是利用基本的培養方法，將樣品塗在各種不同的選擇性固體培養基上，接著再從形態學、生化學和血清學的角度來觀察其特性，而這些培養基包括有 alkaline peptone water (APW)、thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS)、trypticase soya agar (TSA)、cellobiose polymyxin B colistin (CPC)、blood agar 等。通常會根據 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 來檢測其生化上代謝的特性。另外，有時也會根據不同菌株的特性而以不同的方式來進行檢測，像美國 FDA 在檢測 *V. parahaemolyticus* 時就會利用 Wagatsuma agar 來看是否會有 Kanagawa phenomenon，如此便可知樣品中是否具 *V. parahaemolyticus* 的 TDH，而在血清學方面，檢測弧菌時最常觀察的就是其細胞體抗原 O (somatic O) 以及莢膜抗原 K (capsular polysaccharide K)。傳統的檢測弧菌 (*Vibrio* spp.) 的方式十分的費時，需要數天才能完成，此外檢測的地點侷限在實驗室中才能操作，而且傳統 phenotype 分析的靈敏度很低，因此當樣品的量少時即不適用。

- 分子技術檢測

由於傳統檢測的方式靈敏度低，而分子技術檢測的靈敏度及專一性皆比較好，並且不受活而不長 (viable but not culturable) 的細菌所影響 [36-38]，因此現在有許多人漸漸的傾向以分子技術的方式來取代傳統的檢測方式。一個很重要的診斷標記 (marker) 為 16S rRNA，

這也是目前在研究演化或分類學上很重要的一個標記，因為從其多變區 (variable region) 可得知和其他物種親緣的遠近關係，因此也可根據不同菌株 16S rRNA 變異區的不同，設計具菌種專一性的引子 (primer) 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的方式來進行檢測。例如 Dorsch 在 1992 年根據十株不同弧菌的 16S rRNA 設計具專一性的核酸探針以 PCR 的方式來做辨識 [39]，除了 16S rRNA 外，依據不同菌株也可依據其毒性因子的基因設計具專一性的引子來做檢測。另外，Tada 在 1992 年根據 *V. parahaemolyticus* 的 *tdh* 及 *trh* 成功的檢測出 *V. parahaemolyticus* [40]，除此之外，還可利用此方式來分辨出具致病性及非致病性的菌株，2004 年時 Hernandez 利用 *V. harveyi* 的 *lunX* 設計引子利用 RAPD 的方式成功的辨識出致病性及非致病性的 *V. harveyi* [41]，而除了 PCR 的方法外，還有許多以 PCR 為基礎發展出的檢測技術，像 RFLPs、ERIC-PCR[42]及 AFLP[43]等技術，是目前發展蓬勃的一類檢測方式，但其缺點為依然需要在實驗室中操作。

## • 免疫學的檢測

另一種檢測的方式是利用免疫的原理，也就是利用抗原-抗體間能發生特異性免疫反應的原理來進行檢測，其中所應用的抗體有多株及單株抗體。多株抗體於製備上比較容易，但易發生血清交叉反應。單株抗體的優點則在於它對抗原決定位的特異性以及可保持細胞系重複獲得相同抗體的能力，它的特異性，敏感性皆比多株抗體高得多。而可利用的檢測平台可以是利用免疫螢光技術，也就是以接有螢光的抗體和菌體上的抗原決定位結合後，藉助螢光顯微鏡來做觀察，

除此之外也可使用酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA)、西方墨點法 (Western Blotting) 更甚至是用檢測試紙的方式來當做檢測的平台，像目前就有單株抗體可辨認 *V. vulnificus* 的細胞內蛋白質，因此可利用 ELISA 的方式進行檢測。

另外早在 1985 年 Honda 就利用 *V. parahaemolyticus* 的 TDH 抗體，以 ELISA 的方式檢測出 *V. parahaemolyticus* [44]，但抗體的製備不易，以傳統的單株抗體製備方法常會有細胞遭污染的風險。另外，細胞培養耗材昂貴且費時又費力，除此之外，在注重保育觀念的今日，動物權的維護常使得實驗操作上更形困難，而製備單株抗體的過程中常需要藉由犧牲動物來取得抗體，因此現在有許多研究者改以其他的方式來取代傳統製備抗體的方法，例如噬菌體展示系統 (phage display) 就是一個很適合的方式。

## 1-2 噬菌體展示系統 (Phage Display System) 的簡介

噬菌體展示系統的技術最早是在 1985 年由 George Smith 所發展出的一項技術。他將一段目標基因連接在 f1 絲狀噬菌體外殼蛋白 pIII 的基因 III 前端，使得該基因在 *E. coli* 中能以 pIII 融合蛋白質的形式和其他噬菌體基因一起表現，發展至今已成為一個用來辨識一個多胜肽新特性的一項非常有力的技術。同時噬菌體展示系統也被用在蛋白質工程及細胞生物學的領域上，用來解析蛋白質的功能和確認新的受體的配位體 (ligands) 和抗體 (antibodies)。簡單來說，噬菌體展示系統的技術就是在絲狀噬菌體 (filamentous phages) 上展示多胜肽

(polypeptide) 和蛋白質，用以在體外實驗 (*in vitro*) 中從其多樣性的特性篩選出具某種特定特性的多胜肽片段。

將有興趣的基因和噬菌體的外殼蛋白質作結合，使得噬菌體可以轉譯出蛋白質並且在噬菌體中包含此種基因，也就是說它直接的將表現型及基因型之間作了連結；主要利用噬菌體資料庫 (phage libraries) 來進行篩選的步驟，而回收的單一胜肽噬菌體可以經過序列的比對來做確認和經由再一次的放大以利用來做之後的篩選。

利用絲狀噬菌體來做選殖 (cloning) 的媒介以及特殊的展示都是很理想的。因為它的基因組 (genome) 很小而且對插入非必須的基因有很好的耐受性；而且它可以藉由將單股及雙股 DNA 分離出並且作為一個簡單有用的載體 (vector)，使得它可以更容易的建構選殖系統和資料庫 (library)；其外殼蛋白質可以被修飾且保有其感染的能力；另外，噬菌體能夠被大量的放大但不會使宿主細胞死亡；噬菌體對各種可能的篩選條件的穩定性很高，可以忍受的範圍很大。綜合以上特性，可以發現絲狀噬菌體是用來做篩選很好的工具。

使用噬菌體展示系統的好處為：1. 其具有很高的選擇性，在經過幾次的親和性選擇後可以將和目標蛋白質有強結合力的噬菌體大量放大；2. 建構噬菌體資料庫 (phage libraries) 時，其多樣性可以達到  $10^9 \sim 10^{10}$ ，而經過純化後最後可以得到高濃度的噬菌體 ( $> 10^{13}/\text{ml}$ )；3. 單一個噬菌體就可以直接將融合蛋白的表現型及基因型之間作連結，得到其基因序列及多胜肽序列的資訊，因此成為最近幾年來越趨普遍的技术 [45]。

## 1-2-1 絲狀噬菌體的生物特性

由於噬菌體展示系統是利用噬菌體來展示插入的一段隨機多肽，因此噬菌體的特性以及其結構就變得很重要，是我們必須要了解的部分。絲狀噬菌體構成了細菌病毒 (bacterial viruses) 的很大一個家族，會感染很多革蘭氏陰性菌，具有單股環狀的基因組，外面由數以千計的主要外殼蛋白包圍為長條的管狀 (圖 1-4)。不像其他的細菌病毒，絲狀噬菌體會在宿主細胞中大量複製並釋出，但不會使宿主細胞死亡，屬於潛溶性 (lysogenic) 的病毒，其生命週期如圖 1-5。噬菌體藉著 p 辨認 F-pilus 之後將噬菌體的單股 DNA 注入 *E. coli* 細胞中，利用宿主的酵素作用將單股 DNA 合成為具有複製能力的雙股 DNA (replicative form, RF)。單股 DNA 會與 p 形成複合體，運送到細菌細胞膜附近，當要突破細菌細胞膜時，pV 蛋白會被其他幾種噬菌體外殼蛋白所取代，而各種外殼蛋白和單股 DNA 組合起來就產生了新的噬菌體。絲狀噬菌體的特色在於離開細菌時，並不會將細胞破壞分解，因此這類的噬菌體屬於溫和型 (tempered)。，大多數絲狀噬菌體像 M13、f1、fd 所感染的宿主皆為 *E. coli*。

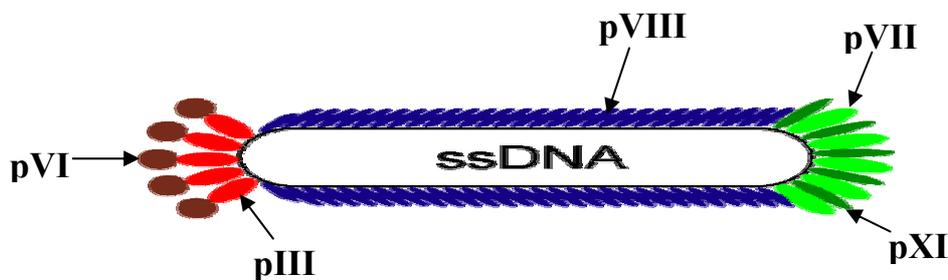


圖 1-4 噬菌體的簡圖

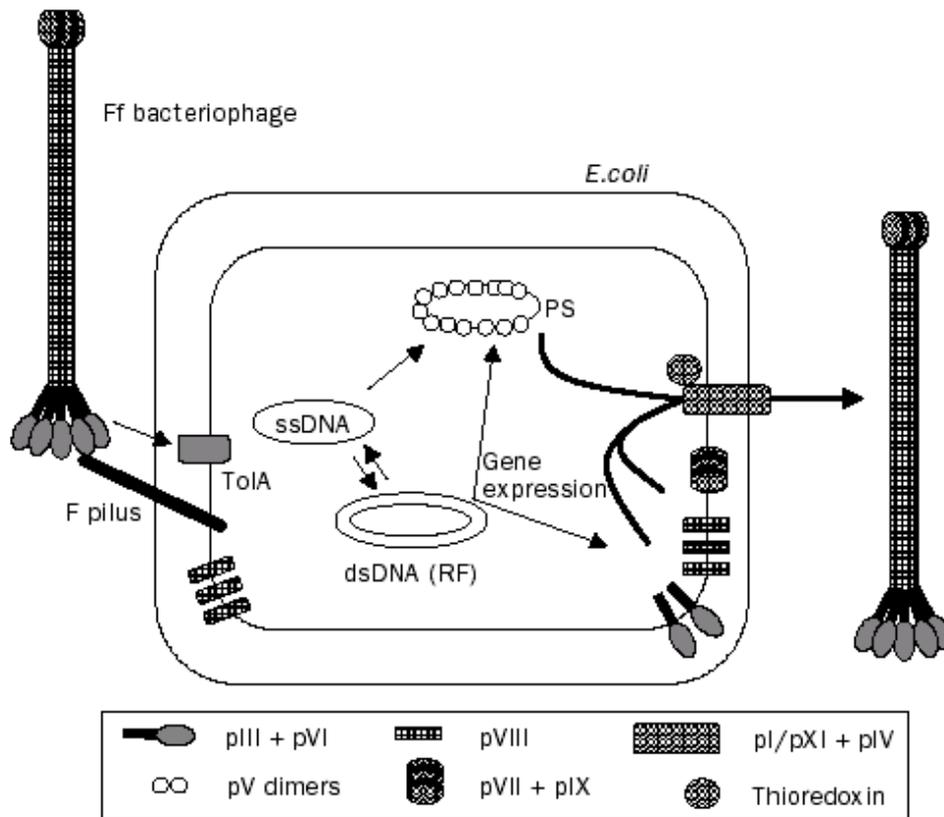


圖 1-5 噬菌體的生命週期

絲狀噬菌體的直徑寬為 6.5 nm，長度則隨著基因組的長度而改變，共有五種蛋白構成其外殼，分別為 pVIII、pVII、pIX、pIII、pVI，以下分別介紹 (表 1-2)：

- **pVIII**

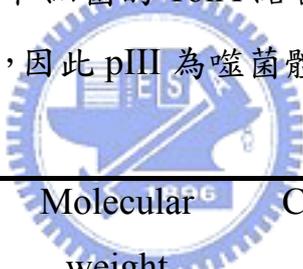
pVIII 是數目最多的外殼蛋白，其數以千計的圍繞在單股 DNA 週圍構成了噬菌體的主體。每個 pVIII 由 50 個胺基酸組成，pVIII 和噬菌體中心主軸呈 20° 的角度，彼此間以疏水性作用力作魚鱗狀的排列形成 right-handed helix [46]，其 N 端有四個帶正電的胺基酸和單股 DNA 的磷酸根有交互作用，可以在其 N 端或者是 C 端接上一段隨機的序列。

- **pVII 和 pIX**

pVII 和 pIX 位於絲狀噬菌體的一端，他們是外殼蛋白中最小的兩個，他們的結構目前仍然不清楚，但現在已知他們位於噬菌體最先被組裝的一端，缺少這兩個蛋白質噬菌體將無法被組裝。

- **pIII 和 pVI**

pIII 和 pVI 這兩個蛋白質在噬菌體中各有五個，是噬菌體要從宿主細胞膜釋出時所必須。pIII 共分為三個 domain，其中在 N 端有兩個 domain 分別為 N1、N2，會形成一個團塊，這三個 domain 是由兩段多甘胺酸序列 (glycine-rich sequence) 所連結，感染時 N2 會先和細菌的 F pilus 接合，N1 再和細菌的 TolA 結合，之後便把噬菌體的外殼蛋白蛻去，把核酸注入，因此 pIII 為噬菌體感染宿主的重要蛋白質。



protein	Number of amino acid	Molecular weight	Copies per phage	Type of display
pIII	406	42,500	5	N or C
pVI	112	12,300	5	C
pVII	33	3,600	5	N
pVIII	50	5,200	2700	N or C
pIX	32	3,600	5	N

表 1-2 噬菌體上五種主要的外殼蛋白

## 1-2-2 噬菌體展示系統的種類

噬菌體展示系統根據噬菌體外殼蛋白基因的排列來予以分類，大致可分為三類（圖 1-6）。

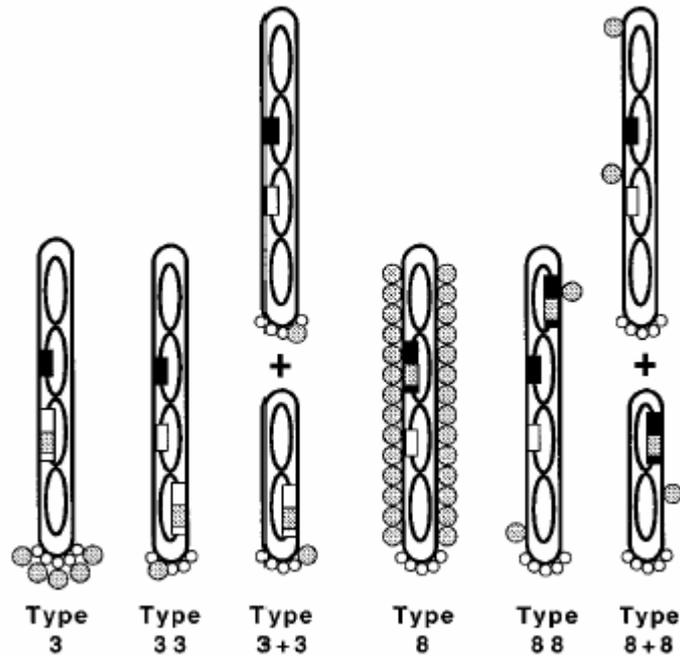


圖 1-6 噬菌體展示系統的三個種類；黑色代表的是基因 VIII，白色代表的是基因 III，灰色代表的是外來 DNA 以及外來蛋白質。[47]

第一類為 type 3、type 8。以 type 3 為例，type 3 的載體 (vector) 是由包含有接受外來 DNA 的基因 III 的單一噬菌體基因組所組成，而最後噬菌體所展現出的外殼蛋白形式會是五個 pIII 外殼蛋白上皆接有一外來蛋白質，但當外來的多胜肽太大的時候，宿主內的蛋白質水解酶即會將這些外來蛋白質移除，並且當外殼蛋白上充斥著大的外來蛋白質時，也會影響噬菌體的生理及生物特性 [48, 49]，因此只有當外來多胜肽比較短的時候才適用於此系統。

第二類為 type 33 和 type 88。以 type 88 為例，type 88 的載體為一包含兩種 VIII 基因的噬菌體基因組，而兩種 VIII 基因分別為接有外來 DNA 的 VIII 基因以及野生型 (wild-type) 的 VIII 基因，造成噬菌體的外殼蛋白會有野生型的 pVIII 及接有外來蛋白質的 pVIII 同時存在，這個系統使得噬菌體得以展示比較大的外來多肽。

第三類為 type 3+3 和 type 8+8。以 type 8+8 為例，其和 type 88 不同之處在於 type 8+8 的兩種 VIII 基因是分別位於不同的基因體中，野生型的 VIII 位於輔助噬菌體 (helper phage) 中，而接有外來 DNA 的 VIII 位於 phagemid 中，就像其他的質體 (plasmid) 一樣，phagemid 也帶有一個使其可以於 *E. coli* 中複製的起始位置 (origin) 以及一個抗抗生素基因使得帶有此 phagemid 的宿主能被篩選出來。除此之外，phagemid 還帶有另一個絲狀噬菌體的複製起始位置，但是當宿主被輔助噬菌體感染時，此起始位置會失去活性，因此最後兩種形式的 pVIII 都會被產生出來，且形成兩種帶有不同基因組的噬菌體 (helper phage DNA 和 phagemid DNA)。和 type 88 相同的是其外殼蛋白也是野生型的 pVIII 及接有外來蛋白質的 pVIII 同時存在。

### 1-2-3 噬菌體展示系統的應用

噬菌體展示系統在目前的應用範圍很廣，包括有尋找和受體結合的物質、找尋抗體辨識的抗原特定位、甚至是應用於藥物發展上，以及目前有許多人希望以此技術用以取代目前抗體的取得方法。我們知道抗體是生物為抵禦外來物的侵略而經由免疫系統產生的物質，其在醫學上不僅可被當作治療的藥物，此外也可被發展為一檢測的利器，

而傳統上抗體的取得通常是經由以目標抗原免疫實驗動物所取得，其過程十分的耗時，動輒需要三個月以上，並且也十分的耗費金錢，並不是所有的實驗室皆可負擔。此外，在細胞培養過程又常會有遭汙染的風險存在。因此，在 1990 年時首先有人藉由噬菌體展示技術，將抗體變異區(VH/VL) 以單鏈的方式 (single chain Fv, scFv) 表現於噬菌體上，用以模擬抗體之結構與功能，稱之為噬菌體抗體 (phage antibody) [50]。之後，於 1991 年時，另一個研究團隊成功的把抗體的 Fab 成功的表現在噬菌體的外殼蛋白上 [51]。根據這樣的技術，目前已經建構出人類的抗體基因庫，而其也被利用於和腫瘤細胞的表面抗原進行篩選，進而篩選出對腫瘤細胞具專一性的抗體，例如 2005 年 Marty 利用此抗體基因庫篩選出和腫瘤細胞表面抗原 Tumor endothelial marker 1 (TEM1)有專一性之抗體，並將其和 liposome 結合，使其可準確的攜帶藥物至腫瘤細胞中 [52]。除此之外，也可利用篩選到的抗體作為癌症篩選之用，期以降低居高不下的癌症死亡率。

### 1-3 研究動機與目的

由過去的研究發現，弧菌不但會引發人類的嚴重疾病，更會感染海洋生物，造成其感染弧菌症進而走向死亡，因此，弧菌也可說是近海養殖漁業的頭號敵人，如之前所述，台灣的養殖蝦業由 1987 年年產量 8 萬公噸的草蝦王國，到如今年產量不足還須由國外進口的情形看來，弧菌尤其是蝦子的主要致病原 *V. harveyi* 的影響實為甚鉅，而目前對於 *V. harveyi* 仍然缺乏快速檢測的方式，傳統的檢測方法又需要五至十個工作天，非常的耗費時間，常因此錯失治療或補救的黃金時期，因此希望能夠發展一個以免疫層析法 (immunochromatographic assay) 為平台的快速檢測方式。



要以此法做為檢測的方式，首要之務是必須取得具專一性的抗體，而目前常用以獲得單株抗體的方法為融合瘤細胞技術，但就如之前所述，這個方式十分費時且同時需要犧牲動物，因此我選擇使用目前發展快速的噬菌體展示系統來篩選出會和 *V. harveyi* 結合的多胜肽序列。由於目前已經知道溶血素為細菌中重要的致病因子之一，因此若要作為檢測養殖池是否遭致病性 *V. harveyi* 感染，除使用打破的 *V. harveyi* 培養液當做篩選的標的物外，另外也以合成的 *V. harveyi* 溶血素中的多胜肽序列當作標的物進行篩選，本實驗希望能由此篩選出和 *V. harveyi* 具專一性的多胜肽序列，用以作為之後發展快速檢測的工具。

# 第二章 實驗材料與方法

## 2-1 實驗材料

### 2-1-1 化學藥品與材料

#### **Alpha Biosciences, Inc**

Trypto Soy Broth (TSB)

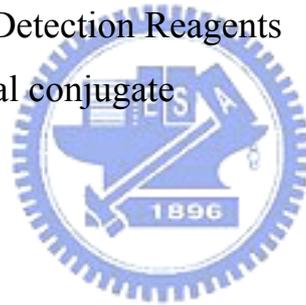
#### **Amersham Biosciences**

40%Acrylamide

ECL™ Western Blotting Detection Reagents

HRP/anti-M13 monoclonal conjugate

PVDF transfer membrane



#### **Amresco®**

Sodium Chloride

#### **BDH**

Glycerol

#### **DIFCO**

Bacto™ Agar

Tryptone Peptone

Yeast Extract

#### **Digital Gene**

多胜肽序列的合成

## **GeneMark**

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-  $\beta$ -D-Galactoside (X-Gal)

Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside (IPTG)

## **Gibco BRL**

Ammonium Persulfate (APS)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

## **Merck**

Dimethyl formamide

Glycine

Isobutanol

$\beta$ -Mercaptoethanol

Magnesium Chloride Hexohydrate

Methanol

Phenol chloroform

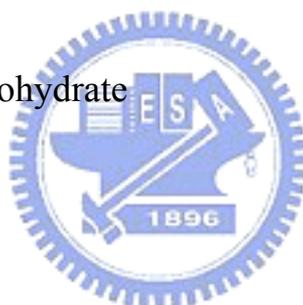
Sodium Azide

Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate

Sodium Hydrogen Carbonate

di-Sodium Hydrogen Phosphate dehydrate

Tween-20



## **New England BioLabs Inc.**

Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit

## **PIERCE**

ImmunoPure<sup>®</sup> TMB Substrate Kit

## **Sigma**

Acetic Acid

Albumin from bovine serum (BSA)

Bromophenol Blue

Diaminobensidine (DAB)

N,N'-Methylene-bis-acrylamide

Tetracycline

## **USB**

Tris

台灣菸酒股份有限公司

95 % Ethanol

## **2-1-2 溶液與緩衝液**



**Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside (IPTG / X-Gal) :**

取 1.25 g IPTG 和 1 g Xgal 溶於 25 ml 的 Dimethyl formamide 中，儲存於 -20 °C 中，避光。

**Tetracycline Stock :**

取 Tetracycline 溶於 ethanol 中，使其最後濃度為 20 mg/ml。

**TBS Buffer :**

50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 經高壓滅菌後儲存於室溫中。

**TBS+0.1 % Tween-20 :**

取經高壓滅菌的 TBS，加入 0.1 % Tween-20。

**TBS+0.5 % Tween-20 :**

取經高壓滅菌的 TBS，加入 0.5 % Tween-20。

**Blocking Buffer :**

取 BSA 加入 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.6) 中，使其最後濃度為 5 mg/ml，再加入 0.02 % NaN<sub>3</sub>，之後用 0.2 μm 的濾膜過濾，使其呈無菌狀態，儲存於 4 °C 中。

**Elution Buffer :**

取 BSA 溶於 0.2 M Glycine 中，使其最後濃度為 1 mg/ml，pH 2.2，再用 0.2 μm 的濾膜過濾，使其呈無菌狀態，儲存於 4 °C 中。

**1 M Tris (pH 9.1)****PEG/NaCl :**

20 % polyethylene glycol-8000，2.5 M NaCl，經高壓滅菌後，儲存於室溫中。

**TBS+0.02 % NaN<sub>3</sub> :**

取 TBS 加入 0.02 % NaN<sub>3</sub>，經高壓滅菌後，儲存於室溫中。

**30 % Polyacrylamide/1 % Bisacrylamide :**

5 g N,N'-Methylene-bis-acrylamide 加入 375 ml 40 % Acrylamide，125 ml 一次去離子水混合均勻。

### **20 % SDS Solution**

取 10 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ， 加入去離子水至 50 ml 。

### **1.5 M Tris (pH 8.8)**

取 91 g 的 Tris 加入去離子水至 500 ml ， 調整 pH 值至 8.8 。

### **1 M Tris (pH 6.8)**

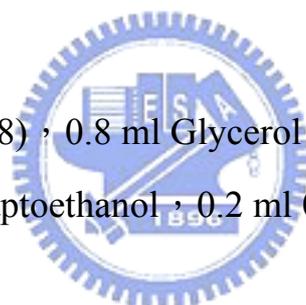
取 61g 的 Tris 加入去離子水至 500 ml ， 調整 pH 值至 6.8 。

### **10 % APS**

取 1 g Ammonium Persulfate ， 加入去離子水至 10 ml 。

### **5X Sample Buffer :**

取 0.5 ml 1 M Tris (pH 6.8) ， 0.8 ml Glycerol ， 0.8 ml 20 % SDS solution ， 0.4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol ， 0.2 ml 0.05 % Bromophenol Blue 加入去離子水至 10 ml 。



### **SDS Running Buffer :**

14.4 g Glycine ， 3 g Tris ， 1 g SDS 加入去離子水至 1 L 。

### **Gel Stain Buffer :**

1 g Coomassie Brilliant blue R250 ， 100 ml Acetic Acid ， 400 ml Methanol ， 加入去離子水至 1 L ， 再用 0.2  $\mu$ m 的濾膜過濾 ， 以去除不溶的物質 ， 儲存於室溫中 。

### **Gel Destain Buffer I :**

400 ml Methanol ， 100 ml Acetic Acid ， 加入去離子水至 1 L ， 儲存於室溫中 。

### **Gel Destain Buffer II :**

50 ml Methanol , 70 ml Acetic Acid , 加入去離子水至 1 L , 儲存於室溫中。

### **PBS :**

1.37 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 0.35 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 8.77 g NaCl , 加入去離子水至 1 L , 調整 pH 值至 7.4 , 儲存於室溫中。

### **PBS+0.1 % Tween-20**

取 1 ml Tween-20 , 加入 1 L 的 PBS 中。

### **Transfer Buffer :**

5 mM Tris-base , 192 mM Glycine 中加入 SDS , 使其最後濃度為 1 g/L , pH 8.3 , 儲存於 4 °C 中。



### **Diaminobensidine (DAB) 呈色劑 :**

取 1.25mg DAB , 50 $\mu$ l DMSO , 2.95ml 0.1M 的 PBS 混合均勻 , 要進行呈色時再加入 5 $\mu$ l 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 。

## **2-1-3 菌株**

*Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749)

*Vibrio anguillarum* (ATCC 19264)

*Vibrio damsela* (ATCC 33539)

*Vibrio furnissii* (ATCC 35016)

*Vibrio harveyi* (ATCC 14126)

*Vibrio hollisae* (ATCC 33564)

*Vibrio ordalli*

*Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802)

*Vibrio salmonicida* (ATCC 43839)

*Vibrio vulnificus* (ATCC 27562)

以上購自於財團法人食品工業發展研究所

*E. coli* ER2738 :

用來作為噬菌體感染的宿主，為 F<sup>+</sup> 的菌株，帶有一個含有抗 tetracycline 基因的 mini-transposon，所以有 F<sup>+</sup> 的菌株可以用含有 tetracycline 的 LB Plates 篩選出，將購自 New England BioLabs 的 phage display peptide library kit 中所附的 *E. coli* ER2738 塗盤培養於 LB-Tet Plates 上，37 °C 隔夜培養，之後放於 4 °C 作為儲存。

## 2-1-4 培養基



### **Trypto Soy Broth (TSB) + 1.5 % NaCl**

30 g TSB, 15 g NaCl 加入去離子水至 1 L, 經高壓滅菌後, 儲存於 4 °C 中。

### **LB Medium**

10 g Tryptone Peptone, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl 加入去離子水至 1 L, 經高壓滅菌後, 儲存於 4 °C 。

### **LB/IPTG/Xgal Plates**

取 10 g Tryptone Peptone, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g Bacto Agar 加入去離子水至 1 L, 經高壓滅菌後, 待其冷卻至 70 °C 以下再加入 1 ml IPTG/Xgal, 儲存於 4 °C 中, 避光。

### **Agarose Top**

取 10 g Tryptone Peptone, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 7 g Bacto Agar, 1 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 加入去離子水至 1 L, 經高壓滅菌後, 儲存於室溫中, 每次使用前以微波爐微波 2 分鐘使其熔化。

### **LB/Tet Plates**

取 10 g Tryptone Peptone, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g Bacto Agar 加入去離子水至 1 L, 經高壓滅菌後, 待其冷卻至 70 °C 以下後加入 1 ml Tetracycline Stock, 儲存於 4 °C 中。



## **2-1-5 儀器**

迴轉式震盪恆溫培養箱 (Firstek Scientific, orbital shaking incubator Model-S300R)

紫外光/可見光分光光譜儀 (Amersham Pharmacia Biotech, ultrospec 3100 pro)

高速離心機 (Beckman, Allegra 21 Series)

電泳槽 (Mightly Small II SE250/SE260)

DNA 定序儀 (Perkin Elmer, ABI Prism 377 DNA Sequencer)

半乾式轉漬槽 (Amersham Biosciences semi-dry transfer unit Hoffer TE 70)

震盪器 (LAB-LINE, orbit shaker)

PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700)

超音波細胞震碎機

微量旋轉式真空濃縮機 (EYELA, rotary vaccum evaporator N-N series)

## 2-2 實驗方法

實驗流程設計：

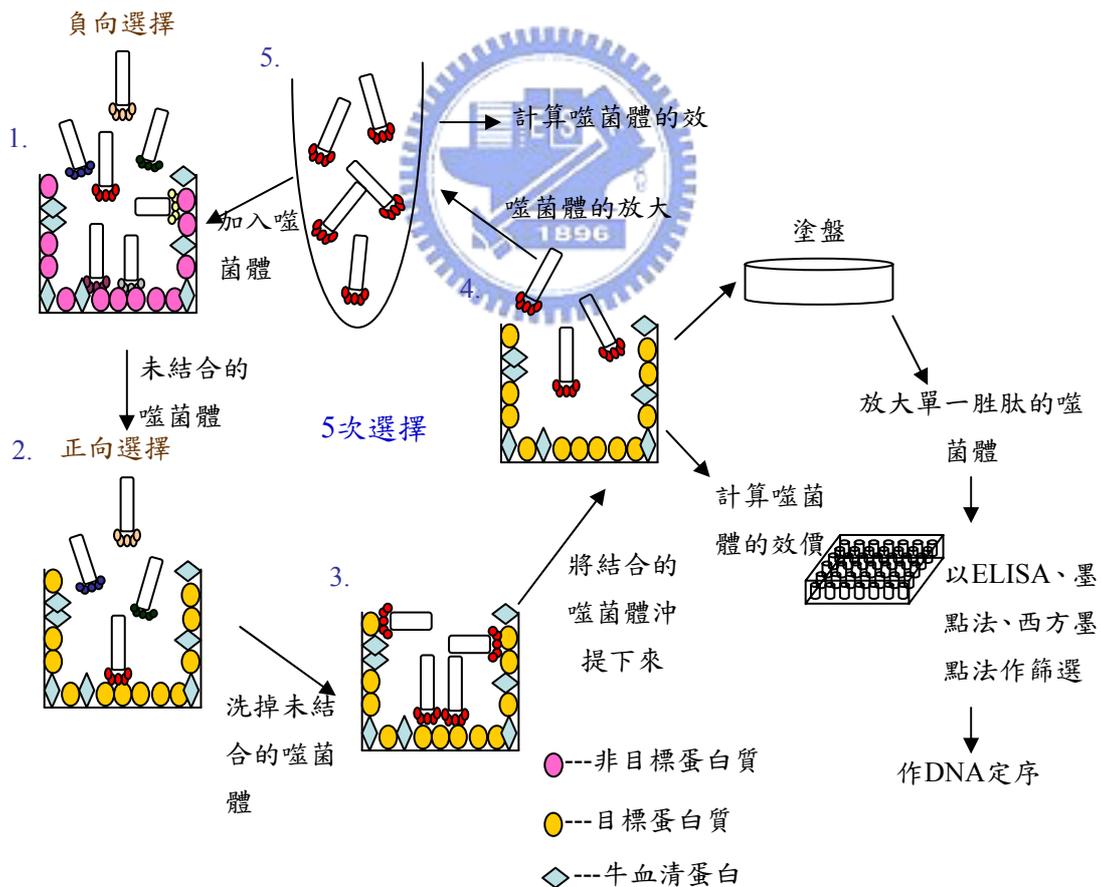


圖 2-1 實驗流程設計

## 2-2-1 以 Ph.D.-C7C 作為胜肽來源，篩選對 *Vibrio harvey* 具親和力之系統

Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library 從 New England BioLab 所購入 (NEB Cat. No. #E8120S)。其主要是將隨機合成的 DNA 序列插入噬菌體 M13mp19 的 gIII 前端產生噬菌體隨機胜肽庫，其涵蓋了  $20^7$  (約  $1.2 \times 10^9$ ) 種不同的多胜肽序列，並且在這段隨機多胜肽序列的前後各有一個半胱胺酸，這兩個半胱胺酸會自動形成雙硫鍵，使得噬菌體所表現出來的隨機多胜肽具有環狀的構形；而在第一個半胱胺酸前有一個丙胺酸，在第二個半胱胺酸之後則有一段 Gly-Gly-Gly-Ser 的序列，在此之後才是野生型的 pIII 序列，在購回的 Ph.D.-C7C 噬菌體隨機胜肽庫中，每一種多胜肽序列的濃度為  $\sim 200$  copies/10  $\mu$ l，而總濃度為  $2 \times 10^{13}$  pfu/ml。



### 2-2-1-1 合成的 *Vibrio harvey* haemolysin 之製備

根據 *V. harveyi* 的溶血素經由電腦進行比對後，選擇較具特異性的第 6 至第 26 個胺基酸交由 Digital Gene 公司進行合成，合成的 *Vibrio harveyi* 溶血素多胜肽序列如下：



溶於一次去離子水中，使其最後濃度為 100  $\mu$ g/ml。

### 2-2-1-2 弧菌的培養及目標蛋白質的製備

所有的弧菌皆培養於 TSB 含 1.5 % NaCl 中，在做親和性篩選的

前一天從-20 °C 中取出各菌株的 stock，分別接種於 3 ml 的 TSB 含 1.5 % NaCl 培養液中，經隔夜 37 °C 的培養後使其 OD<sub>600</sub> > 1，再以超音波細胞震碎機 (Sonicator) 分別將各個培養液內之菌體打破備用。

### 2-2-1-3 生物親和性選擇 (Bio-panning)

- 第一次的負向選擇 (Negative Selection)

將除了 *Vibrio harveyi* 外其他經超音波細胞震碎機打破的弧菌培養液，取 200 µl 分別加入 ELISA plate 的反應槽中，於室溫中放置一小時，再以 TBS 溶液洗 3 次，之後用 400 µl 封閉緩衝液 (blocking buffer) 將孔洞中未被抗原覆蓋的地方填滿，放於室溫中一小時，以 TBS + 0.1 % Tween-20 緩衝液洗 6 次後加入 10 µl Ph.D.-C7C phage display peptide library，加上 100 µl TBS + 0.1 % Tween-20 緩衝液使其最後噬菌體的量為  $2 \times 10^{11}$ ，放於室溫中震盪一小時，然後把未和非目標抗原結合的噬菌體移到下一個 well 中，放於室溫中震盪一小時，如圖 2-2 所示，重覆相同的動作直到噬菌體對九株弧菌皆進行過負向選擇後，將這些經過負向選擇的噬菌體取出，準備進行正向選擇。

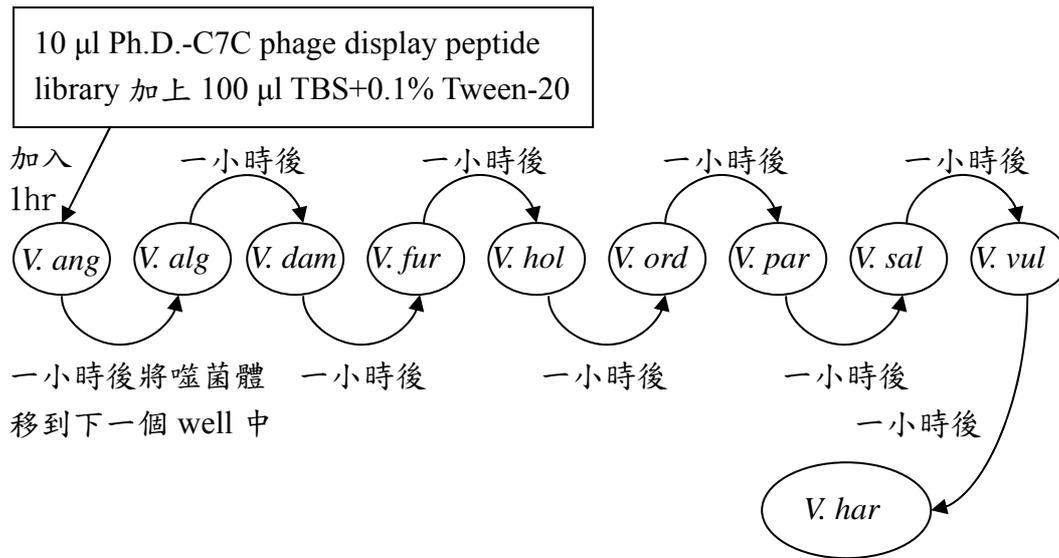


圖 2-2 負向選擇的示意圖

- 第一次的正向選擇 (Positive Selection)

將合成的 *Vibrio harveyi* 溶血素多肽及經過超音波細胞震碎機處理過的 *Vibrio harveyi* 培養液取 200  $\mu$ l/well 分別加入 ELISA plate 中，放於室溫中一小時，以 TBS 緩衝液洗 3 次，之後用 400  $\mu$ l 封閉緩衝液 (blocking buffer) 將未被抗原覆蓋的地方填滿，放於室溫中一小時，再以 TBS+0.1% Tween-20 緩衝液洗 6 次，之後加入經過負向選擇後的噬菌體，置於室溫中震盪一小時後，以 TBS+0.1% Tween-20 緩衝液洗 20 次，接下來以 100  $\mu$ l/well 沖提緩衝液 (elution buffer) 放於室溫中震盪 10 分鐘，再以微量吸管劇烈沖吸將和抗原結合的噬菌體沖提出，最後將沖提出的噬菌體以 15  $\mu$ l 1 M Tris (pH 9.1) 中和，準備進行噬菌體的放大以及噬菌體效價的測定。

- 噬菌體的放大

於前一天自 LB-Tet plate 中挑出單一菌落的 *E.coli* ER2738，養於 3 ml LB Medium 中，置於 37 °C 隔夜培養，之後將 *E.coli* ER2738 和 LB Medium 以 1:100 的比例稀釋成 20 ml (OD<sub>600</sub> 約為 0.1~0.3)，然後把經過正向選擇後的噬菌體加入，放於 37 °C 培養箱中培養 4.5 個小時，再以 10,000 rpm 在 4 °C 下離心 15 分鐘，取上清液加入 1/6 倍總體積的 PEG/NaCl，混合均勻後置於 4 °C 中隔夜，之後用 10,000 rpm 的轉速於 4 °C 下離心 20 分鐘，將上清液倒掉，以 1 ml TBS 將沉澱的細胞懸浮起來，再用 10,000rpm 的轉速於 4 °C 下離心 5 分鐘，取上清液加入 1/6 倍總體積的 PEG/NaCl 放置於冰上 1 個小時，之後以 10,000rpm 的轉速於 4 °C 下離心 20 分鐘，將上清液倒掉後再以同樣的轉速離心 2 分鐘，使用微量吸管確實將剩餘的液體去除，再用 200 µl TBS + 0.02 % NaN<sub>3</sub> 緩衝液把沉澱的細胞懸浮起來，最後以 10,000 rpm 離心 1 分鐘以去除不溶的雜質，將上清液取至新的微量試管中存於 4 °C 中備用。

## 2-2-2 噬菌體效價的測定

- 放大前的噬菌體效價測定

在前一天自 LB-Tet plate 中挑出單一菌落的 *E.coli* ER2738，養於 3 ml LB Medium 中在 37 °C 下隔夜培養，從其中取出 10 µl 的加入 3 ml LB Medium 中於 37 °C 培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.5，同時把 Agarose Top 用微波爐加熱，以 3 ml/tube 加於試管中，放於 50 °C 水浴槽中待用，而

經過正向選擇後的噬菌體以 LB Medium 用十倍稀釋法稀釋至  $10^5$ ，之後取稀釋  $10^1 \sim 10^5$  倍的噬菌體感染 200  $\mu\text{l}$  的 *E.coli* ER2738，靜置 5 分鐘後加入 3 ml Agarose Top 中混合均勻，再把其倒入 LB/IPTG/Xgal Plates 中搖晃均勻，待其凝固後放於 37 °C 培養箱隔夜培養。

### • 放大後的噬菌體效價測定

由於噬菌體在由 UV 波長 240 nm 至 320 nm 間在 269 nm 有一個比較大的吸收值，並且會隨著噬菌體濃度的改變而改變，可以由此波長下的吸收值帶入公式換算出實際上噬菌體的數目，因此我們使用紫外光/可見光分光光譜儀來測定放大後的噬菌體在波長 269 nm 下的吸收值。首先取 60  $\mu\text{l}$  放大後的噬菌體以 TBS 含 0.02 %  $\text{NaN}_3$  緩衝液稀釋為 600  $\mu\text{l}$ ，並以 TBS 含 0.02 %  $\text{NaN}_3$  緩衝液來歸零，最後將在波長 269 nm 下所測得的吸收值帶入以下公式，再換算回稀釋前的濃度，便可測定噬菌體的效價。

$$\text{噬菌體數目} = \frac{A_{269} \times (6 \times 10^{16})}{6407}$$

## 2-2-3 單一勝肽噬菌體的放大製備

於前一天自 LB-Tet plate 中挑出單一菌落的 *E.coli* ER2738，養於 3 ml LB Medium 中，置於 37 °C 隔夜培養，之後將 *E.coli* ER2738 和 LB Medium 以 1:100 的比例稀釋成 1 ml ( $\text{OD}_{600}$  約為 0.1~0.3)，再把經過正向選擇的噬菌體，以和噬菌體效價測定相同的方法塗盤，37 °C 隔夜培養 12~16 個小時後挑單一噬菌斑，放於 37 °C 培養 4.5 小時，

再以 10,000 rpm 在 4 °C 下離心 30 秒取上清液，儲存在 4 °C 中，準備用作 DNA 定序以及噬菌體的放大。

取 10 µl 離心後的上清液加入隔夜培養後經 LB Medium 以 1:100 的比例稀釋的 20 ml *E.coli* ER2738 中，以之前所述的噬菌體放大步驟進行放大。

## 2-2-4 墨點法 (Dot Blotting)

如圖 2-3 所示，PVDF 轉漬膜先以 100 % 甲醇活化 20 秒後，以去離子水洗三次，再把合成的 *Vibrio harveyi* 溶血素多胜肽、經超音波細胞震碎機打破的菌液或未被打破的菌液以 tip 點在膜上，其中以噬菌體做為 positive control，以 3 % BSA 作為 negative control，之後以 3 % 溶於 PBS 緩衝液的脫脂奶粉將膜上未覆蓋抗原的位置填滿，放於室溫中震盪一小時，以 PBS + 0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，接著加入 10 µl phage 與 500 µl 0.1 % TBST，置於室溫中震盪一小時，再以 PBS + 0.1 % Tween-20 洗 5 次，每次 5 分鐘，然後加入稀釋 5000 倍抗體 (anti-M13 conjugated-HRP antibody)，放於室溫中震盪一小時，以 PBS + 0.1 % Tween-20 洗 6 次，每次 5 分鐘，最後以 Diaminobensidine (DAB) 呈色劑進行呈色，待反應適當時間後，以一次去離子水將轉漬膜洗數次以終止反應。

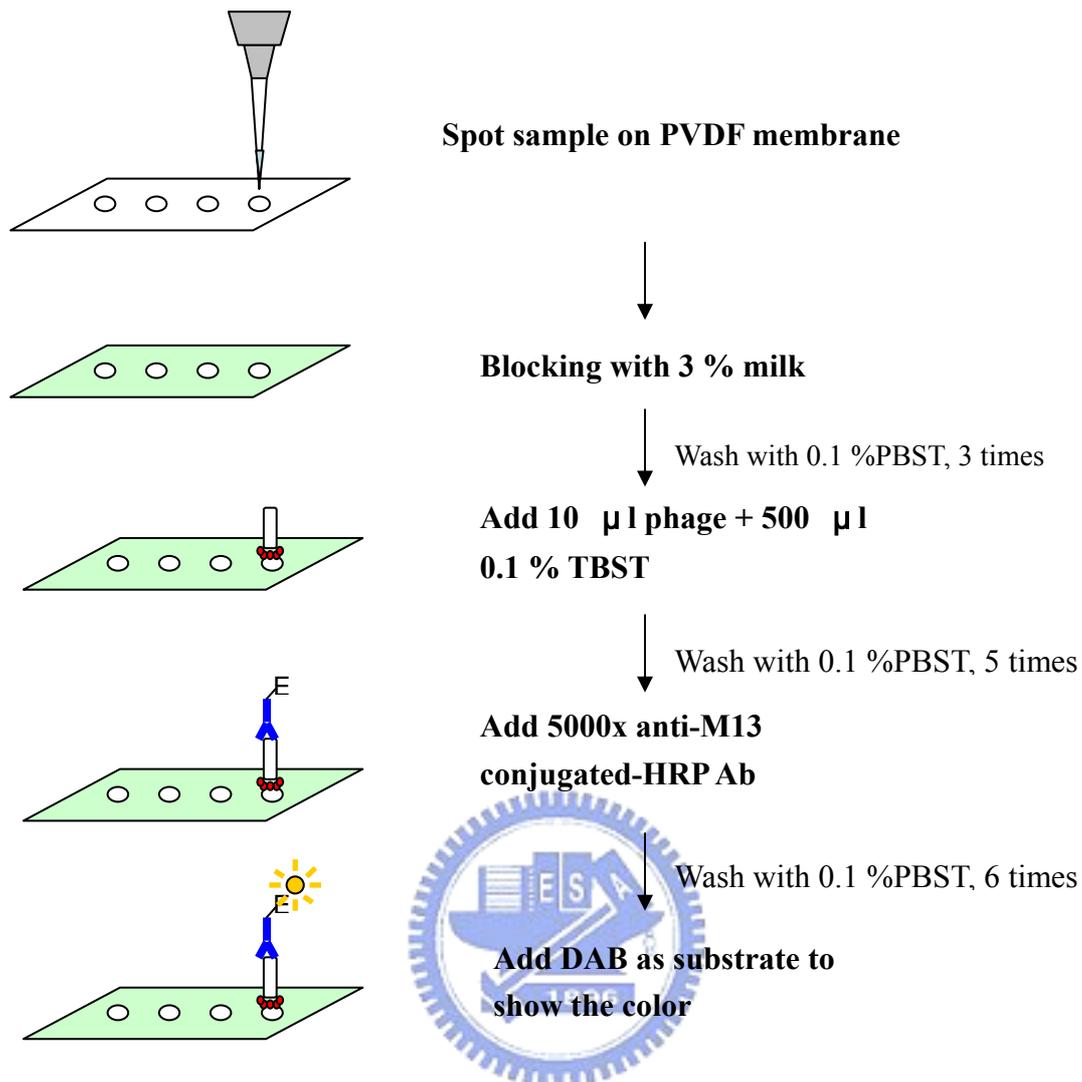


圖 2-3 點墨法的流程示意圖

## 2-2-5 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)

先將 200  $\mu$ l 經超音波細胞震碎機打破的菌液以及分別當作正向控制組 (positive control) 的噬菌體和負向控制組 (negative control) 的 3 % BSA 加進 ELISA plate 中，放於室溫一小時，之後將菌液回收後，接著以 PBS 洗 3 次並拍乾，再以 400  $\mu$ l 溶於 PBS 緩衝液中的 3 % 脫脂奶粉將未被抗原覆蓋的地方填滿，置於室溫中一小時，接著以 PBS+0.1 % Tween-20 洗 3 次並拍乾，再加入 100  $\mu$ l 的噬菌體 (噬菌

體：TBS+0.1 % Tween-20=1:10)，放於室溫中一小時，接著以 PBS+0.1 % Tween-20 洗 6 次並拍乾，再加入 100  $\mu$ l 稀釋 5000 倍的抗體 (anti-M13 conjugated-HRP antibody)，置於室溫中一小時，接著以 PBS+0.1 % Tween-20 洗 6 次並拍乾，最後將 ImmunoPure<sup>®</sup> TMB Substrate Kit 中所附的 TMB 及 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以一比一的比例混合加入 100  $\mu$ l/well，於 30 分鐘後以 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，並測定其在波長 450 nm 下的吸收值。

## 2-2-6 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE)

根據 1970 年由 Davis 和 Laemmli 所使用的系統 (mighty Small II SE250) 的方法來跑 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE)，根據表 2-1 的配方來配置適當比例的膠片，將打破後的菌液在室溫中加入 5x Sample buffer 混合均勻，接著在 95 °C 水浴下加熱 10 分鐘後，再放於冰上冰浴 2 分鐘，最後注入於膠片上端的樣品凹槽內，固定以 90 伏特的電壓進行電泳，再 running buffer 的環境下通電壓約 1.5~2 小時，待染劑 (Dye) 至膠片底端後即完成。

<b>12 % Seperating gel</b>	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	6.25 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.75 ml
20 % SDS	150 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	4.8 ml
10 % APS	45 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
Total Amount	15 ml

4 % Stacking gel	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	0.67 ml
1 M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
20 % SDS	50 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3 ml
10 % APS	27.5 $\mu$ l
TEMED	2.5 $\mu$ l
Total Amount	5 ml

表 2-1 製作 12.5 % separating gel 及 4 % stacking gel 電泳膠片的配方

## 2-2-7 西方墨點法 (Western Blotting)

將跑完 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE) 的膠片，利用半乾式轉漬槽將膠片上的蛋白質轉漬到事先以 100 % 甲醇活化的 PVDF 轉漬膜上，以固定 30 伏特的電壓轉漬 30 分鐘。轉漬後的轉漬膜浸泡在溶於 PBS 緩衝液的 3 % 脫脂奶粉中，放於室溫中震盪一小時，接著以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，之後將 10  $\mu$ l 噬菌體以 10 ml TBS 緩衝液稀釋並加入，放於室溫中震盪一小時，以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入稀釋 5000 倍抗體 (anti-M13 conjugated-HRP antibody)，放於室溫中震盪一小時，以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，最後於暗房內加入 Enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色劑呈色 1 分鐘，再以底片進行感光，並分別以發展液及固定液來顯色及固定，底片置於通風處陰乾。

## 2-2-8 噬菌體單股 DNA 模版之純化

如之前所述，從盤上挑選出單一噬菌體進行第一次放大離心後，取 500  $\mu\text{l}$  的噬菌體加入 200  $\mu\text{l}$  PEG8000/ NaCl 混合均勻，於室溫下放 10 分鐘，之後以 10,000 rpm 離心 10 分鐘並倒掉上清液，接著再稍微離心一次去掉殘餘的上清液，並以 200  $\mu\text{l}$  TE buffer 將沉澱的細胞懸浮起來，加入 200  $\mu\text{l}$  phenol chloroform (25 : 24)，混合均勻 30 秒，靜置，再混合 30 秒，之後以 13,200 rpm 離心 1 分鐘，取上清液到另一個微量試管中，再加入 200  $\mu\text{l}$  phenol chloroform 以相同方式混合，離心，取上清液，接著加入 2 倍體積的 ethanol 以及 1/10 倍體積的 sodium acetate (3 M, pH 5.2)，混合後放置於  $-70^{\circ}\text{C}$  中 30 分鐘，之後以 13,200 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，並加入 200  $\mu\text{l}$  70 % ethanol 再以 13,200 rpm 離心 10 分鐘，接著再加入 200  $\mu\text{l}$  70 % ethanol 以同樣的方式離心，最後使用微量旋轉式真空濃縮機以  $45^{\circ}\text{C}$  的溫度抽乾，並用 30  $\mu\text{l}$  的一次去離子水回溶備用。

## 2-2-9 DNA 定序 (DNA Sequencing)

依照 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 之手冊進行。於 PCR 微量反應管中加入 5  $\mu\text{l}$  噬菌體單股 DNA、啟動引子 1  $\mu\text{l}$ 、5X Sequence buffer 4  $\mu\text{l}$ 、二次無菌水 9  $\mu\text{l}$ 、Big Dye 1  $\mu\text{l}$  共 20  $\mu\text{l}$ ，以聚合酶連鎖反應定序程式 (圖 2-4) 進行反應。將 PCR 的產物加入 3  $\mu\text{l}$  sodium acetate (3 M, pH 5.2)、62.5  $\mu\text{l}$  95 % 酒精與 14  $\mu\text{l}$  二次無菌水混合均勻後，於室溫下放 20 分鐘，在 13,200 rpm 下離心 20 分鐘，小心的去除上清液。加入 170  $\mu\text{l}$  冰浴之 70 % 酒精，

混合均勻，再以 13,200 rpm 離心 10 分鐘後，放入微量真空減壓機，在 45 °C 下蒸乾 20 分鐘，標示清楚後送測。

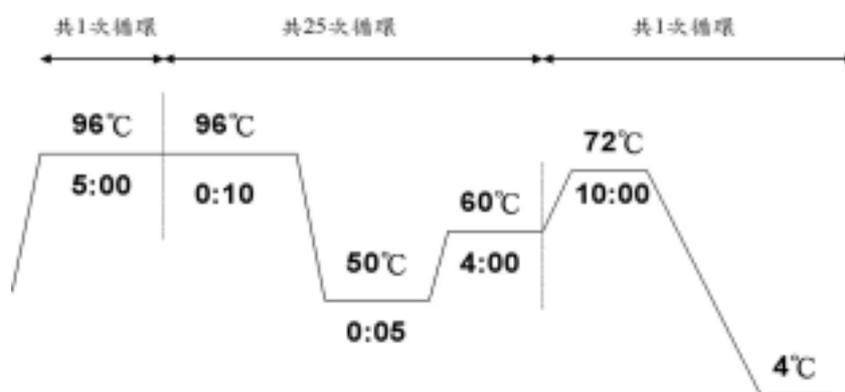


圖 2-4 聚合酶連鎖反應定序程式



## 第三章 結果與討論

### 3-1 以 Ph.D.-C7C 作為多胜肽庫來源，篩選對

#### *Vibrio harveyi* 具親合力之多胜肽

目前為止，噬菌體展示系統已被廣泛的應用於各領域之中，但至今以此系統針對 *V. harveyi* 進行篩選之相關文獻尚未被發表，而本研究目的是為篩選出和 *V. harveyi* 結合之多胜肽，因此在選擇篩選的目標蛋白質時，首先考慮的是 *V. harveyi* 中重要的毒性因子，由於溶血素為 *V. harveyi* 致病的決定因素 [50]，因此以實驗室已合成好的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽作為篩選目標，此段序列為 *V. harveyi* 溶血素 N 端前 25 個胺基酸所組成且其具有高特異性，除此之外，在本實驗中另外還採用 *V. harveyi* 之菌體及經過超音波細胞震碎機打破之 *V. harveyi* 培養液當做篩選的目標蛋白質。



#### 3-1-1 以合成的 *Vibrio harveyi* 溶血素多胜肽序列當做篩選目標

在本實驗中，首先採用合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽序列當做篩選的目標，在經過五次負向選擇、正向選擇及噬菌體放大的循環後，以墨點法 (Dot Blotting) 來確認所篩出的噬菌體中是否具有多胜肽是可以和合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽序列、去除菌體的 *V. harveyi* 培養液以及 *V. harveyi* 培養液結合，並以噬菌體當作正向控制組及 3 % BSA 當作負向控制組，將經過親合性選擇的噬菌體當作一抗，而二抗使用 anti-M13 conjugated-HRP antibody，結果如圖 3-1 所示，總共篩選出三個樣本 (s5-c7c-e1-1、s5-c7c-e1-2 及 s5-c7c-e1-3)，

此三個樣本皆明顯地和合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽序列結合，由於溶血素在 *V. harveyi* 中是分泌至細胞外之蛋白質，但結果中卻無法觀察到篩選出的多胜肽會和 *V. harveyi* 培養液以及去除菌體之 *V. harveyi* 培養液結合。如此之結果並不利於將其應用至 *V. harveyi* 的檢測上，推測此結果的原因可能為合成的溶血素多胜肽在完整的蛋白質結構中被包裹在裡面，因此我們所篩選出的多胜肽雖然會和其結合，而在完整蛋白質中並沒有將此段多胜肽暴露於外頭，所以無法藉由篩選出的多胜肽辨識到此溶血素的存在；造成如此結果的另一個原因可能是 *V. harveyi* 分泌至胞外的溶血素十分微量，造成篩選出的多胜肽可能會和此溶血素結合，但因為溶血素量太少，而使得最後訊號太過微弱以致無法辨識。由於利用多胜肽序列為篩選目標的策略失敗，因此，在之後的實驗中改以經超音波細胞震碎機打破之 *V. harveyi* 培養液作為篩選的目標蛋白。

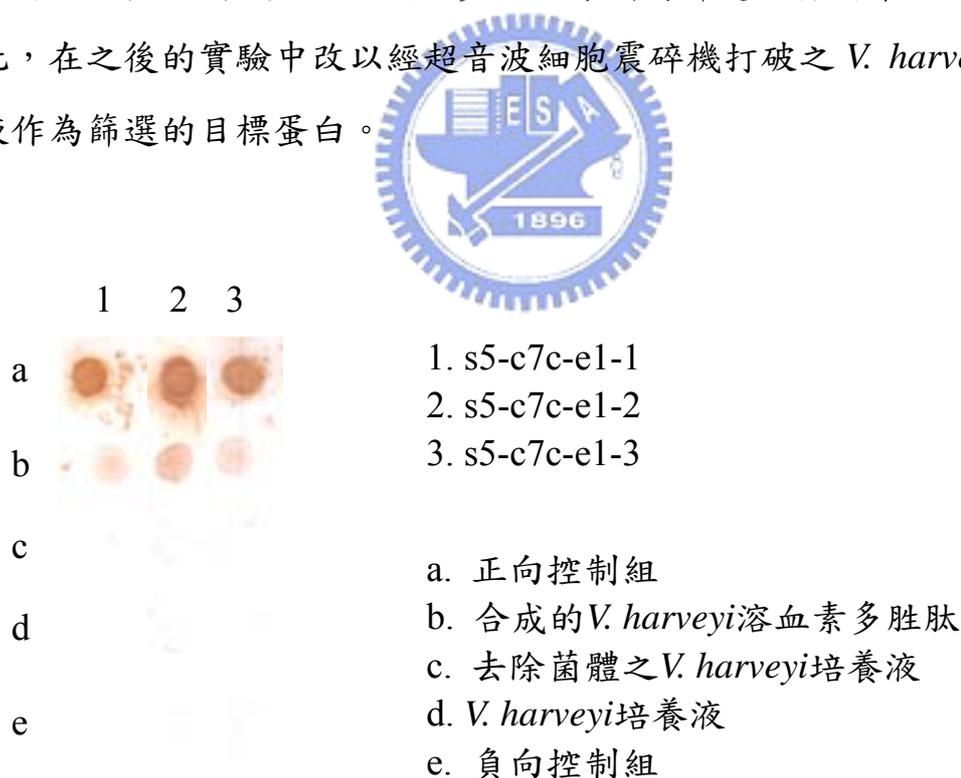


圖 3-1 以合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽序列當做篩選目標，篩選五次後墨點法結果。

### 3-1-2 以打破的 *Vibrio harveyi* 培養液作為篩選的目標 蛋白

由於以合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽作為篩選的目標蛋白質之策略失敗，因此改以 *V. harveyi* 之菌體做為篩選目標，期能從中篩選出和 *V. harveyi* 菌體表面物質具結合能力之多胜肽。依之前所述的方式，噬菌體多胜肽庫在經過五次的負向選擇、正向選擇及噬菌體放大後以墨點法來觀察其與 *V. harveyi* 結合之情形。結果發現所篩選出的多胜肽雖然會與 *V. harveyi* 菌體表面物質結合，但結合能力似乎不好以致於結果的訊號很微弱（未顯示數據），如此一來將不適合於之後作為檢測的應用，因此之後直接使用 *V. harveyi* 培養液（包含菌體及釋放至培養液之胞外物質）將其以超音波細胞震碎機打破菌體後作為篩選目標，以期從中篩選出具結合能力之多胜肽。

首先將 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. damsela*、*V. furnissii*、*V. hollisae*、*V. ordalli*、*V. parahaemolyticus*、*V. salmonicida* 和 *V. vulnificus* 分別以超音波細胞震碎機打破，並依照之前所述的負向選擇方法，將 Ph.D.-C7C 噬菌體逢機胜肽庫先進行負向選擇，之後再以打破的 *Vibrio harveyi* 培養液作為篩選目標物進行正向選擇，最後再將親合性選擇後的噬菌體予以放大，如此的步驟循環五次後，以墨點法來初步確認篩選的結果（圖 3-2），總共篩選出三個樣本（s5-c7c-vh-v、s5-c7c-vh-1 和 s5-c7c-vh-2），其結果顯示篩選到的噬菌體中確實具有和 *V. harveyi* 培養液結合的多胜肽。但由圖 3-2 的 b 和 c 看來似乎大多數的多胜肽皆和菌體內的物質結合，而造成此結果的可能原因為菌體內的蛋白質多樣性較菌體外高出許多，因此菌體內蛋白質和噬菌體之多

胜肽相逢而結合的機率自然高出許多，反應訊號因此較強烈。初步篩檢發現經過五次篩選後的噬菌體確實具有和 *V. harveyi* 培養液結合的多胜肽且反應訊號明顯，所以將此三個樣本塗佈於培養基上準備挑選並製備單一胜肽之噬菌體。

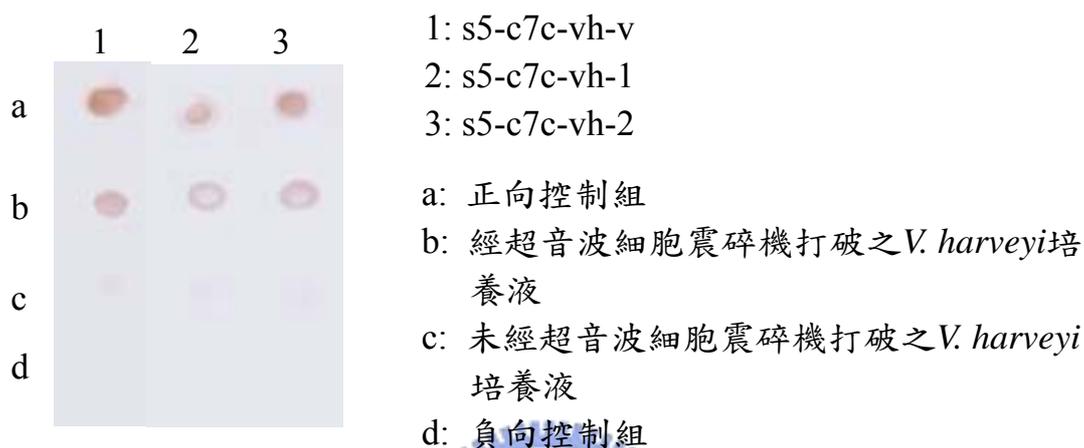


圖 3-2 打破的 *Vibrio harveyi* 培養液作為篩選目標，篩選五次後墨點法結果。



### 3-2 單一胜肽噬菌體的放大製備

將經過五次親合性選擇後未放大之噬菌體稀釋，以之前所述的方式加入 Agarose Top 中倒在 LB/IPTG/Xgal Plates 上培養 12~16 小時後，由於噬菌體中的 M13mp19 載體帶有 *lacZ* 基因，因此當其感染宿主於含 IPTG/Xgal 的培養盤上時會出現藍色的噬菌斑，而本實驗於三個樣本中共挑選 31 個單一胜肽噬菌體以之前所述的方式放大並純化。

### 3-3 噬菌體單股 DNA 模版之純化並定序

將已放大並純化的 31 個單一胜肽噬菌體經加入數次 phenol chloroform (25 : 24) 並離心去除蛋白質後，以酒精沉澱法萃取出噬菌體之單股 DNA，之後將萃取出之單股 DNA 依照 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 之手冊的步驟，以及使用 Ph.D.-C7C™ Phage Display Peptide Library Kit 中所附的-96 定序引子作為定序用的引子，經 PCR 反應處理後送測，定序結果經由比對之後發現其多胜肽序列共有四種，樣本 I 至 IV (表 3-1)。其中以樣本 I 和 II 所佔數目最多 (93.6%)，而且分析兩者的胺基酸序列可以發現皆為 HXXWLP，因此推測可和此兩者結合之物質在結構上可能是相同或類似的。

Sample	Peptide sequence	The number of phage particle
I	tgtcatcatcctccgtggcttccttgc C H H P P W L P C	21
II	tgtcattttgattggctgccttattgc C H F D W L P Y C	8
III	tgtctgccgcttaataatcggttgtgc C L P L N N R L C	1
IV	tgtaattcgactgctattatgacgtgc C N S T A I M T C	1
	<b>total number</b>	<b>31</b>

表 3-1 31 個單一噬菌體之單股 DNA 的定序結果

### 3-4 以酵素連結免疫吸附分析法觀察單一胜肽 噬菌體和 *Vibrio harveyi* 結合的情形

將打破之 *V. harveyi* 培養液以及當做正向控制組的噬菌體與當做負向控制組的 3 % BSA 加入酵素連結免疫吸附分析盤中，再以 blocking buffer 將未有抗原的地方填滿後，分別以四種多胜肽序列之噬菌體當作一抗，以 anti-M13 conjugated-HRP antibody 作為二抗，之後以四甲基聯苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 作為基質進行呈色，再以 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，最後讀取其於波長 450 nm 下之吸光值，反應結果如圖 3-3，經過與負向控制組比較後發現，所篩選到的四種多胜肽序列確實皆可與 *V. harveyi* 結合。另外，序列 I 似乎和 *V. harveyi* 中的物質結合能力較強，而使得其在酵素連結免疫吸附分析反應中呈現較佳之數值比 (如表 3-2，序列 I 之正向控制組：實驗組=1：1.15；實驗組：負向控制組=4：1)。有趣的是雖然序列 I 和 II 的序列如此相似，但酵素連結免疫吸附分析結果卻呈現序列 I 比序列 II (如表 3-2，序列 II 之正向控制組：實驗組=1.22：1；實驗組：負向控制組=2.28：1) 約有兩倍強的鍵結能力差異，且由表 3-1 中也可看出序列 I 被篩選出的機率似乎比較大，造成此差異的原因目前尚不清楚，不過可能和此兩多胜肽之構形有關，但仍待進一步證明。

	Peptide sequence	Positive control	sonicated- <i>V. harveyi</i> culture medium	Negative control
I	HHPWL P	2.244	2.588	0.648
II	HFDWL PY	3.354	2.736	1.198
III	LPLNNRL	2.684	2.374	1.076
IV	NSTAIMT	2.644	1.74	0.718

表 3-2 四種多胜肽對 *V. harveyi* 的 ELISA 反應吸收值

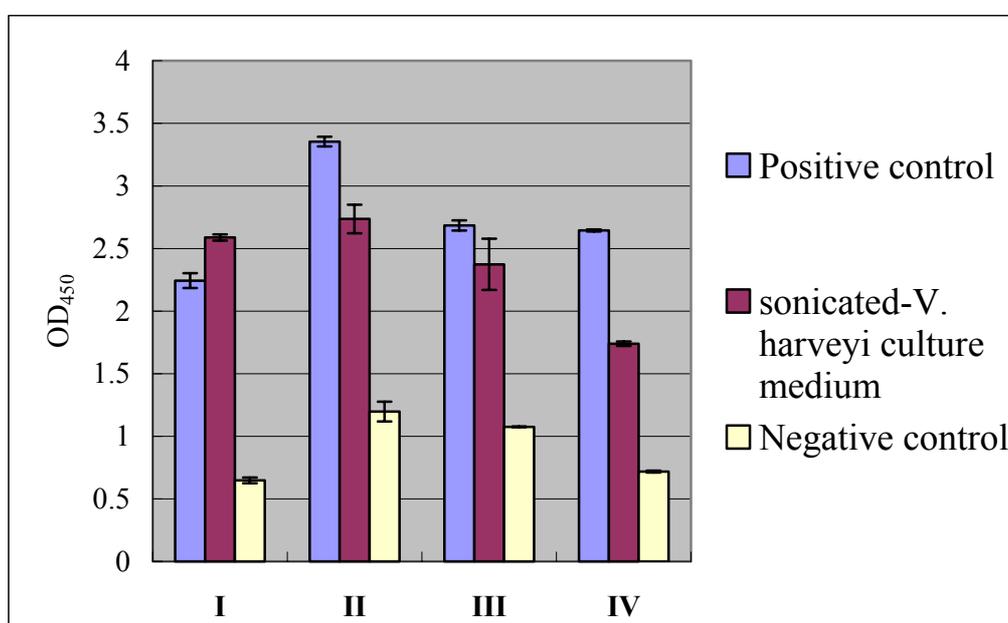


圖 3-3 四種多胜肽對 *V. harveyi* 的 ELISA 反應結果

另一方面，將 *V. harveyi* 的培養液做更細部的區分為細胞外之物質、細胞內的物質以及菌體，並將其對四種多胜肽序列進行 ELISA 的分析，結果如表 3-3、表 3-4、圖 3-4 所示，由表 3-4 可以看出序列 I 和各部份的 *V. harveyi* 培養液結合能力似乎是最強的，而四種序列和各部份的 *V. harveyi* 培養液間的結合情形以菌內的物質反應最強、菌體次之、和菌外之物質反應最弱，推測可能菌內的物質較多，因此篩

選到和這四種序列結合的物質機率較大，所以反應較強。此外序列 I 及序列 II 和細胞外物質結合的反應較另外兩種序列來得強，因此有利於之後作為快速檢測之工具，至於為何序列 I 和序列 II 在序列上如此相似，但和菌體以及菌內物質的結合能力卻如此不同，則需要更進一步的研究探討。

	A	B	C	D	E	F
	正向控制組	經超音波細胞震碎機打破之 <i>V. harveyi</i> 培養液	<i>V. harveyi</i> 之菌體	<i>V. harveyi</i> 細胞外之物質	<i>V. harveyi</i> 細胞內之物質	負向控制組
I	2.7675	2.155	2.2865	0.7305	2.6615	0.213
II	3.6485	2.3165	2.2095	1.553	2.305	0.514
III	2.884	1.6585	1.3665	0.6965	1.6855	0.2905
IV	3.4685	2.0825	1.741	0.8935	2.004	0.4875

表 3-3 四種多胜肽對各部份 *V. harveyi* 培養液的 ELISA 反應吸收值

	Peptide sequence	B/F	C/F	D/F	E/F
I	HHPPWLP	10.11737	10.73474	3.429577	12.49531
II	HFDWLPHY	4.506809	4.298638	3.021401	4.484436
III	LPLNNRL	5.709122	4.703959	2.39759	5.802065
IV	NSTAIMT	4.271795	3.571282	1.832821	4.110769

表 3-4 四種多胜肽與各部份 *V. harveyi* 培養液的 ELISA 反應吸收值對負向控制組之比值

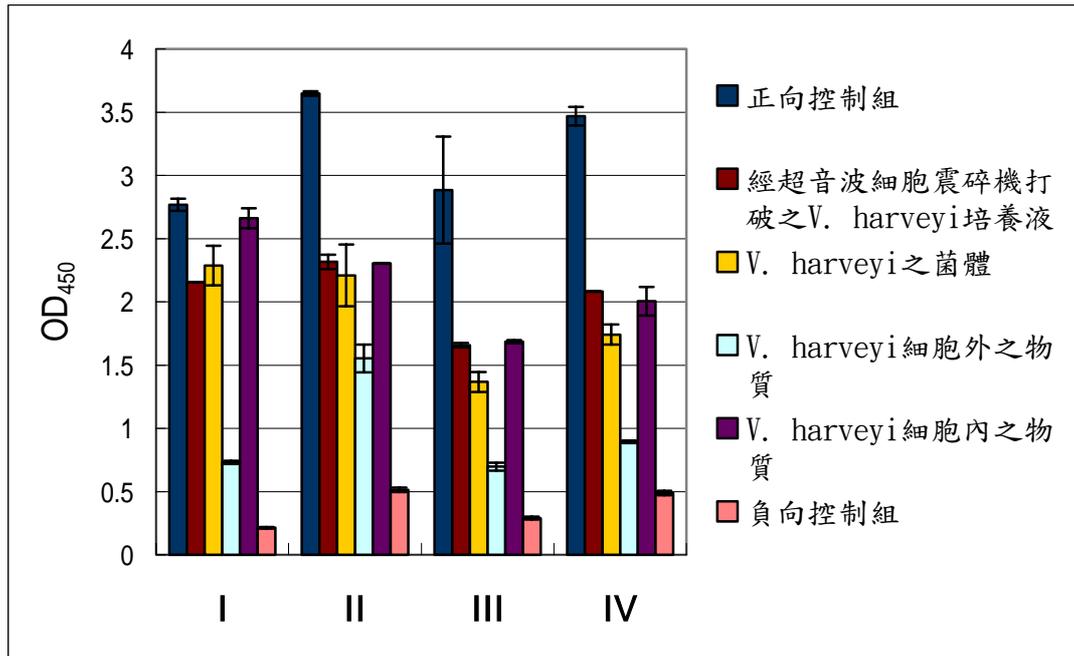


圖 3-4 四種多胜肽對各部份 *V. harveyi* 培養液的 ELISA 反應結果

### 3-5 以西方墨點法觀察單一胜肽噬菌體和弧菌結合的情形



將 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. damsela*、*V. furnissii*、*V. hollisae*、*V. ordalli*、*V. parahaemolyticus*、*V. salmonicida*、*V. vulnificus* 和 *V. harveyi* 分別以超音波細胞震碎機打破，之後打破之培養液依之前所述的方法進行 SDS-PAGE 電泳，然後經由半乾式蛋白質轉漬槽將膠片上之蛋白質轉漬到 PVDF 轉漬膜上，以 blocking buffer 將未有蛋白質吸附處填滿，分別使用四種具有單一胜肽的噬菌體作為一抗，之後以 anti-M13 conjugated-HRP antibody 作為二抗，最後於暗房中以 Enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色並以 X 光底片進行感光反應。西方墨點法結果如圖 3-5、圖 3-6、圖 3-7、圖 3-8 所示，另外十株弧菌破碎培養液之 SDS-PAGE 電泳對照圖如圖 3-4 所示。此結果發

現四種多胜肽序列皆會和十株弧菌結合，而且除了 *V. salmonicida* 外，四種多胜肽序列和每株菌皆可以結合至少一種蛋白質以上，且訊號皆相當明顯。

首先以序列 I 為例，十株弧菌最為明顯之結合蛋白質幾乎皆位於 40 kDa 處，但 *V. furnissii*、*V. ordalli*、*V. salmonicida* 卻觀察不到此蛋白質帶存在。再者雖然序列 II 與序列 I 之胺基酸順序非常類似（皆為 HXXWLP），理論上所結合之蛋白質樣式 (pattern) 應有其相似性存在，但根據西方墨點法呈色後卻非如此之結果，而是集中於 33 kDa 處，且 *V. harveyi*、*V. ordalli*、*V. salmonicida* 觀察不出此明顯之蛋白質帶。至於序列 III 和 IV，雖然此兩者序列表面上並無關連性存在，但和兩者結合的蛋白質樣式 (pattern) 卻是如此的相似，例如 *V. anguillarum*、*V. alginolyticus*、*V. damsela*、*V. furnissii*、*V. hollisae* 和 *V. vulnificus* 訊號較強之蛋白質帶（約位於 24~40 kDa）分佈皆相同，這點十分地有趣。因此進一步分析序列 III 和 IV 之胺基酸組成，發現到序列 III 之多胜肽以非極性胺基酸居多（L 和 P 共四個胺基酸），而序列 IV 之多胜肽則以極性胺基酸居多（N, S, T, M 共五個胺基酸）。兩序列雖有如此相反特性存在，但進一步計算單純七個胺基酸之等電點 (isoelectric point, pI) 發現皆相同，亦即同樣環境中帶有相等電荷數，或許也因為如此使得弧菌體內帶電荷之蛋白質同樣皆可和序列 III 和 IV 相結合，造成如此類似的蛋白質樣式。另外以上四種序列辨識到的重點蛋白質帶與 SDS-PAGE 電泳圖作比較，亦可發現在電泳膠片上相同之位置有非常明顯又廣泛的蛋白質存在。故推測弧菌體內的這些蛋白質扮演重要角色，因此大量存在，這也說明了我們篩選到的此四種單一多胜肽噬菌體可辨識弧菌體內之重要蛋白質。

綜合此四種多胜肽和十株弧菌之結合可知單一多胜肽序列所結合的蛋白質普遍存在於各弧菌之中，且這些蛋白質之相似性結構可和單一多胜肽噬菌體交互作用。究竟這些蛋白質有何功能、結構、電荷和極性之特性，抑或真如我們推測之弧菌生長代謝相關的重要蛋白質，這點令我們十分感興趣且非常值得進一步探討，以期加以應用至分子藥物或快速檢測之分析。

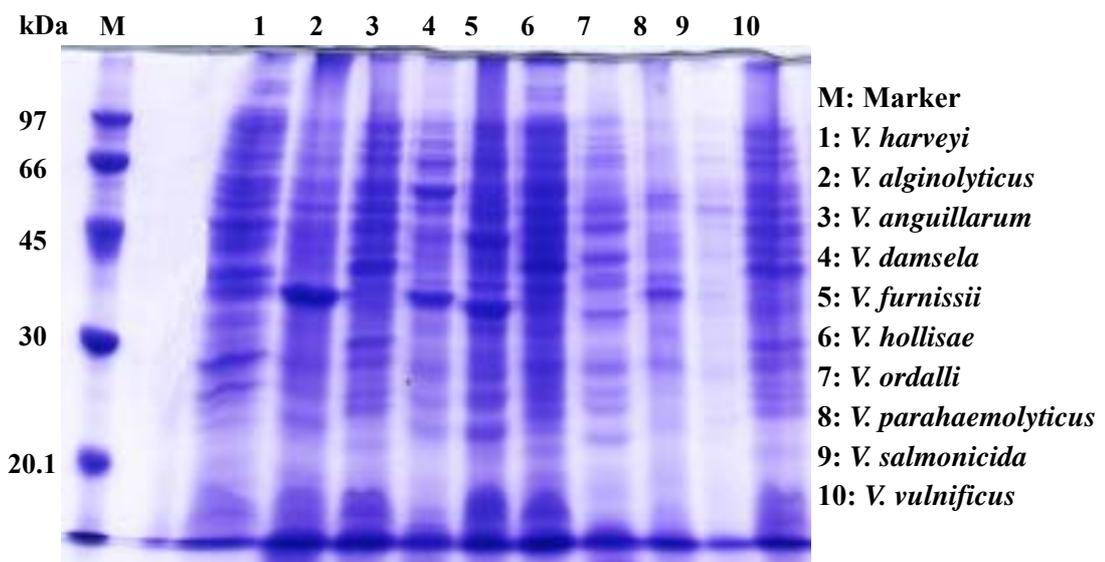


圖 3-5 十株弧菌之 SDS-PAGE 分析圖

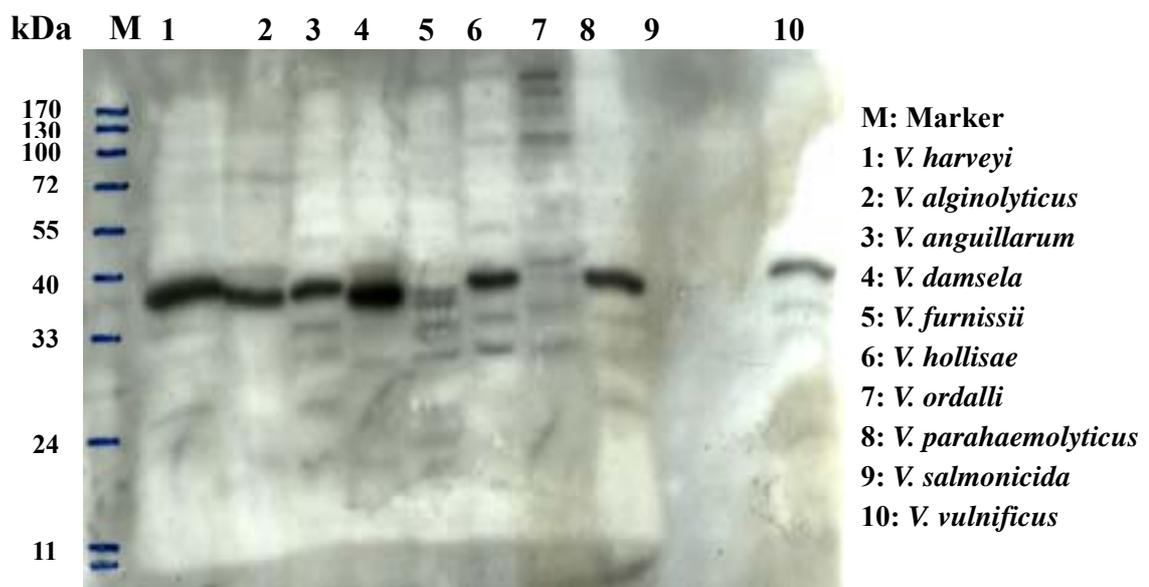


圖 3-6 序列 I 對十株弧菌的結合情形

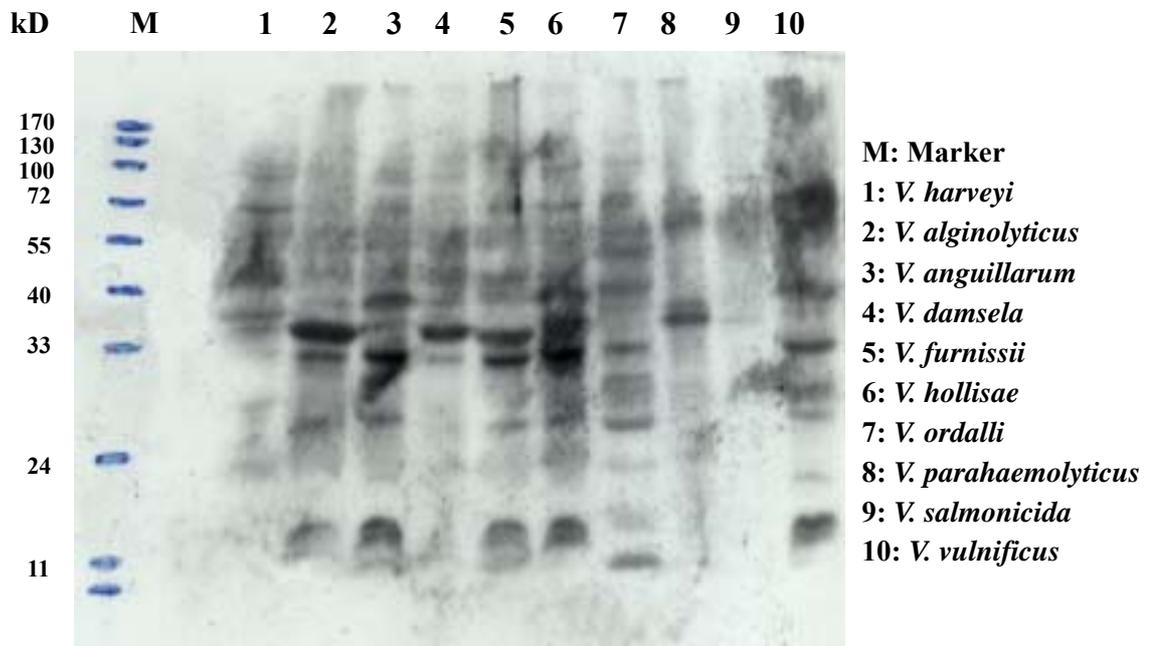


圖 3-7 序列 II 對十株弧菌的結合情形

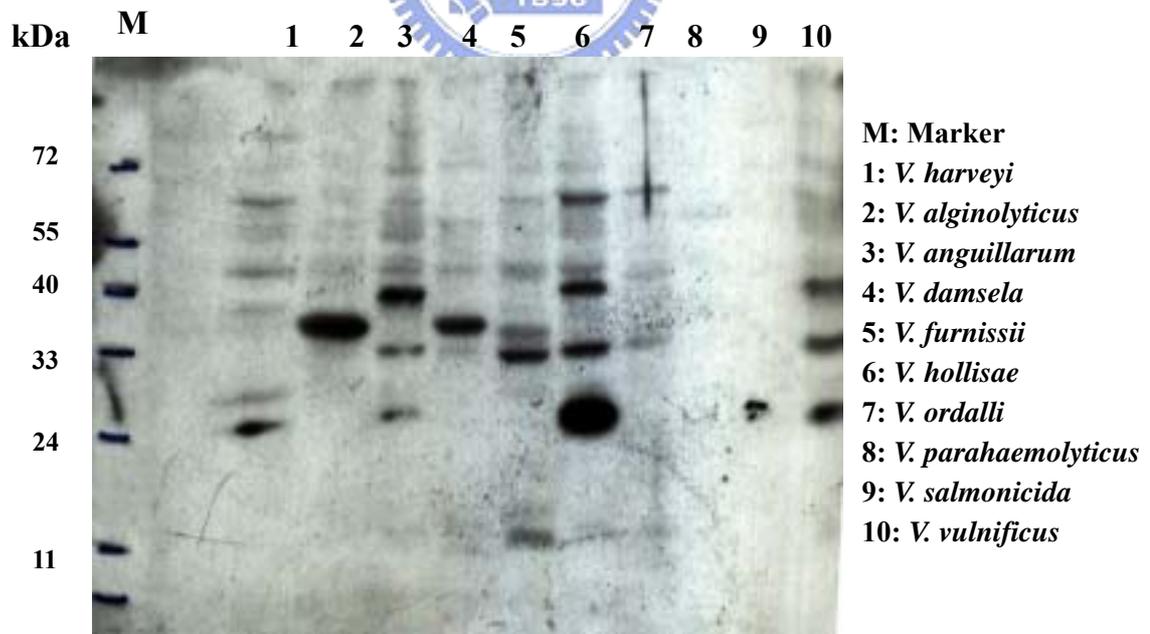


圖 3-8 序列 III 對十株弧菌的結合情形

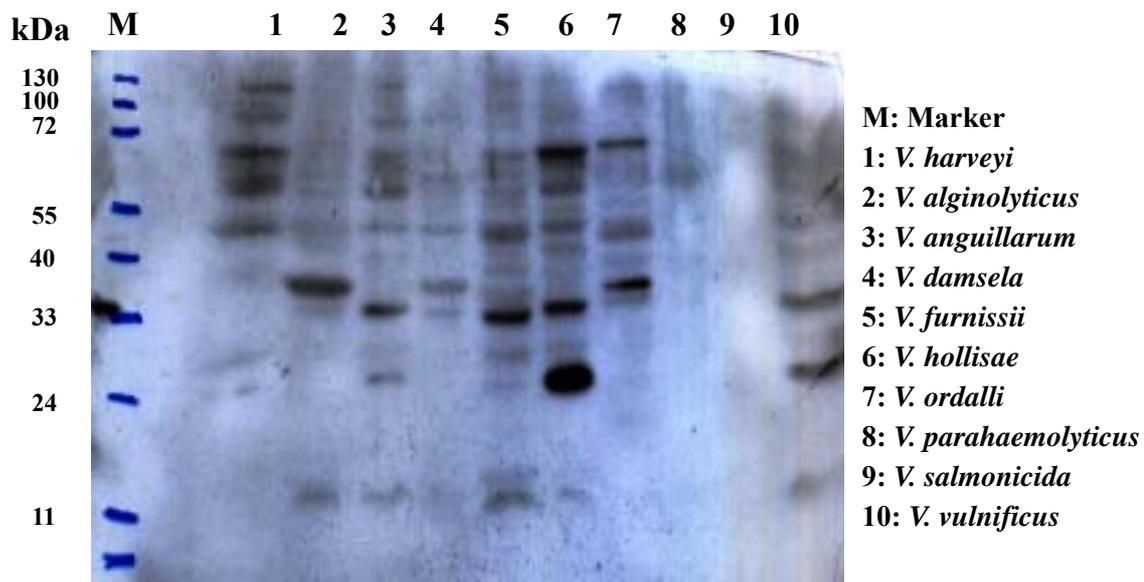


圖 3-9 序列 IV 對十株弧菌的結合情形



## 第四章 結論與未來展望

1. 以合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽序列作為篩選的目標蛋白質，經過五次的親和性選擇後，所篩選出的噬菌體的確會和所合成的 *V. harveyi* 溶血素多胜肽結合，但經由墨點法試驗後發現不會和 *V. harveyi* 分泌至細胞外的溶血素結合。
2. 以超音波細胞震碎機打破的 *V. harveyi* 培養液作為篩選的目標蛋白質，經過五次的親和性選擇後，所篩選出的噬菌體的確會和 *V. harveyi* 結合。
3. 挑出單一胜肽噬菌體經過放大及純化單股 DNA 後送定序，分析定序結果可以知道在挑出的 31 個噬菌體中，有四種多胜肽序列，分別為 HHPPWLP (21)、HFDWLPY (8)、LPLNNRL (1)和 NSTAIMT (1)，其中 HHPPWLP 和 HFDWLPY 皆為 HXXWLP 的序列，推測和兩者結合之物質在結構上可能是相同或類似的。
4. 從 ELISA 的結果知道此四種多胜肽序列皆會和 *V. harveyi* 結合，且和細胞內的物質反應最強，而比較序列 I 和序列 II 發現兩者約有兩倍強的鍵結能力差異。另外，西方墨點法的結果也證實四種多胜肽序列都可和 *V. harveyi* 結合，但除此之外這些序列也可和實驗室內其他九株弧菌 (*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. damsela*、*V. furnissii*、*V. hollisae*、*V. ordalli*、*V. parahaemolyticus*、*V. salmonicida*、*V. vulnificus*)結合，而且和單一多胜肽序列所結合的蛋白質存在於各弧菌之中，且這些蛋白質之相似性結構可和單一

多胜肽片段有交互作用，這點令我們十分感興趣且非常值得進一步探討。另外，雖然胜肽序列 III 和 IV 的序列找不出相似性，但和兩者結合的蛋白質樣式 (pattern) 卻是如此的相似，究竟這些蛋白質帶有何種序列或結構可和這些多胜肽結合值得深入了解。

5. 現階段的目標是希望能篩選出和 *V. harveyi* 結合之多胜肽，但由於篩選出的多胜肽序列並不單只和 *V. harveyi* 結合，因此可能不適合用於作為 *V. harveyi* 之檢測，但根據其和其他弧菌結合之情形，推測此大量存在且被辨識的蛋白質在弧菌體內扮演重要角色，若是其為弧菌本身代謝或生長所相關之蛋白質，則透過篩選出的多胜肽片段便可應用於探究是否抑制弧菌之生長或者抑制弧菌對於細胞的毒性作用，以期日後加以應用至分子藥物或快速檢測之分析。



## Part II

河流弧菌中推定的溶血素之純化

Purification of a Putative Hemolysin of *Vibrio fluvialis*

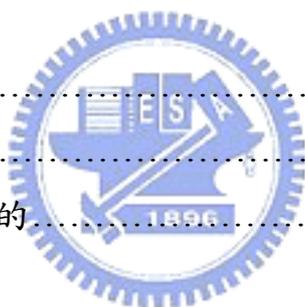


## 目錄 (II)

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
謝誌.....	iii
目錄 (I).....	v
目錄 (II).....	viii
圖目錄.....	xii
表目錄.....	xiii

### 第一章 緒論

1-3 <i>Vibrio fluvialis</i> .....	57
1-4 <i>Vibrio furnissii</i> .....	58
1-5 研究動機與目的.....	59



### 第二章 實驗材料與方法

2-1 實驗材料.....	60
2-1-1 化學藥品與材料.....	60
2-1-2 溶液與緩衝液.....	61
2-1-3 菌株.....	64
2-1-4 培養基.....	64
2-1-5 儀器.....	65
2-2 實驗方法.....	66
2-2-1 蛋白質的純化.....	66
2-2-2 溶血活性分析.....	67

2-2-3	SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE).....	67
2-2-4	西方墨點法 (Western Blotting).....	69
2-2-5	含血培養盤上的溶血測試.....	69

### 第三章 結果與討論

3-1	<i>Vibrio fluvialis</i> 中可能的溶血素之純化.....	71
3-1-1	<i>Vibrio fluvialis</i> 的培養以及細胞外蛋白質的粗萃取液.....	71
3-1-2	管柱層析純化分析.....	71
3-1-3	溶血活性的測定.....	72
3-2	含血培養盤上的溶血測試.....	74
3-3	西方墨點法之分析.....	75

第四章	結論與未來展望.....	77
參考文獻	.....	78



## 圖目錄

圖 2-1	實驗流程設計.....	66
圖 3-1	純化後各部份收集液的 SDS-PAGE 電泳圖.....	72
圖 3-2	各部份收集液的溶血活性.....	73
圖 3-3	各部份收集液於溶血後之吸收值.....	74
圖 3-4	Native-PAGE 後於含血培養盤上的溶血活性.....	75
圖 3-5	西方墨點法分析純化後蛋白質之結果.....	76



## 表目錄

表 2-1 製作 12.5 % separating gel 及 4 % stacking gel SDS-PAGE 電泳膠片的配方.....	68
表 2-2 製作 10 % separating gel 及 4 % stacking gel Native-PAGE 電泳膠片的配方.....	70



# 第一章 緒論

## 1-1 *Vibrio fluvialis*

其為弧菌屬的一員，因此為革蘭氏陰性菌，其種名 *fluvialis* 在拉丁文中意為河流，故中文有人將其翻作河流弧菌，於 1978 年首次被發表。*V. fluvialis* 分為兩種生物型：生物型一為自患者排泄物分離出來，會使人腹瀉；生物型二為對人無致病力之菌種。由於 *V. fluvialis* 為一嗜鹽性細菌，因此自然環境中多半存在於海岸邊及出海口中，此外也可在 65%~79% 的蠔或蜆中發現其存在，而在實驗室中培養發現其對營養需求簡單，但對鹽有絕對性的需求，最適合於 20~40 mM NaCl 下生長。



*V. fluvialis* 是人類的致病菌，會引發發炎性的腹瀉 [54] 及出血性蜂窩組織炎，而其症狀和遭霍亂弧菌感染的症狀很類似，皆會嘔吐、腹痛、水瀉和發燒，但不同之處在於 *V. fluvialis* 會造成血便 [54]。經由酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 試驗後發現其所產生的腸毒素在免疫學上和霍亂毒素十分的相近 [55]。目前已知 *V. fluvialis* 有幾種毒性因子決定其致病性，包括有 LPS、腸毒素、蛋白酶、細胞毒素和溶血素，此外在 1984 年，Wall 等人將 *V. fluvialis* 的內毒素對中國倉鼠卵巢細胞 (CHO cell) 進行體內 (*in vivo*) 的實驗，發現其具有數種毒性，包括有 CHO 細胞致死因子、細胞溶解素和蛋白酶，其中的 CHO 細胞致死因子是作用於細胞內破壞細胞的功能，最後造成細胞的死亡 [56]。在眾多毒性因子中溶血素被認為是最重要的一個，因為從許多臨床上分離出的微生物知道溶血素會引起出血性敗血症以及腹瀉，同時也能分解紅血球、

肥胖細胞和嗜中性白血球進而損害組織，目前已從 *V. fluvialis* 中純化出一個大小為 79 kDa 溶血素，其活性可被低濃度的  $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  抑制，且可在紅血球上形成直徑約為 2.8~3.7 nm 的孔洞，由於根據基因的 ORF 推測大小其應為 82 kDa，但經過 SDS-PAGE 分析後發現大小為 79 kDa，因此推測其在釋出細胞後會由 N 端切下 25 個胺基酸，使其成為一個成熟的溶血素 [55]。

*Vibrio fluvialis* 不僅為人類的致病菌，同時有研究指出其亦為海洋生物之致病菌，在 2003 年就有研究指出 *Vibrio fluvialis* 可能和龍蝦的疾病 (limp lobster disease) 有關 [57]，此病造成龍蝦養殖工業損失達 250 萬美元，因此對養殖業來說也是一株很重要的致病菌。

## 1-2 *Vibrio furnissii*



*V. furnissii* 是一株在遺傳學上和 *V. fluvialis* 很相近的菌種，在 1983 年以前 *V. furnissii* 一直被歸類為 *V. fluvialis* 的生物型二當中，之後由於發現兩者在 Glucose 發酵的過程中的產氣能力不同，因此才予以重新命名，其表現型和 *Aeromonas hydrophila* 很相似但無法生長於 6 % NaCl 中，通常人類的感染是經由攝取遭 *V. furnissii* 污染的海鮮食物所造成，感染後會引發急性的腹瀉，常可在出海口發現其存在，目前對其致病機制仍不了解，但已知 LPS 可能為其致病因子。

### 1-3 研究動機與目的

雖然目前對於 *V. furnissii* 的致病機制以及毒性因子不甚了解，但本實驗室於含血的培養盤中發現其具有很強的溶血活性，經純化後得到一大小為 59 kDa 且具溶血活性之蛋白質，之後經質譜儀的分析發現其有可能為 ATP-binding cassette transporter (ABC transporter)，這是很令人感到興趣的。因為目前對 ABC transporter 的了解只知道其為以 ATP 作為運輸能量，從事主動運輸之膜蛋白，而在病原體中和其抗藥性有關，之前並無文獻指出溶血素也有可能同時扮演 ABC transporter 的角色，因此 *V. furnissii* 內此具溶血活性且扮演 ABC transporter 之蛋白質為重大發現。



而既然 *V. fluvialis* 在遺傳演化上和 *V. furnissii* 是如此的相近，故推測在 *V. fluvialis* 中可能也有結構相似的蛋白質執行此功能，因此本研究希望從 *V. fluvialis* 內純化獲得相似於 59 kDa 且具溶血特性之蛋白質，並經由質譜儀分析其序列，比對資料庫以了解其可能功能，若是同樣為 ABC transporter 則為非常有趣之發現，究竟此溶血素為自我運輸到膜外，亦或幫助某種蛋白質之運輸？並且溶血功能和 transporter 有何關聯性存在？而 *V. fluvialis* 和 *V. furnissii* 內此兩種蛋白質有何相似度？在在都是有待著手研究加以釐清之課題，因此本研究之探討可了解此類蛋白質於細菌體內所扮演的特殊角色，對於 *V. fluvialis* 和 *V. furnissii* 兩弧菌之訊息傳遞與溶血關係將有更深一層的認識。

## 第二章 實驗材料與方法

### 2-1 實驗材料

#### 2-1-1 化學藥品與材料

##### **Alpha Biosciences, Inc**

Trypto Soy Broth (TSB)

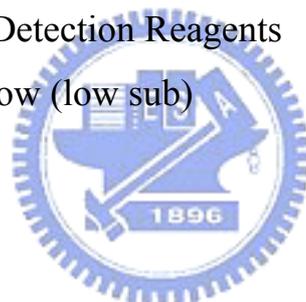
##### **Amersham Biosciences**

40 % Arcrylamide

ECL™ Western Blotting Detection Reagents

Phenyl sepharose 6 fast flow (low sub)

PVDF transfer membrane



##### **Amresco®**

Sodium Chloride

##### **BDH**

Glycerol

##### **Gibco BRL**

Ammonium Persulfate (APS)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

##### **Merck**

Coomassiebrilliant R250

Glycine

Isobutanol  
β-Mercaptoethanol  
Methanol  
Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate  
Sodium Hydrogen Carbonate  
di-Sodium Hydrogen Phosphate dehydrate  
Tween-20

### **Sigma**

Acetic Acid  
Albumin from bovine serum (BSA)  
Bromophenol Blue  
Diaminobensidine (DAB)  
N,N'-Methylene-bis-acrylamide



### **USB**

Tris

台灣菸酒股份有限公司

95 % Ethanol

## **2-1-2 溶液與緩衝液**

### **1 M Tris (pH 7.4)**

取 122 g 的 Tris 加入去離子水至 1 L，調整 pH 值至 7.4。

### **20 mM Tris (pH 7.4)**

取 2.44 g 的 Tris 加入去離子水至 1 L，調整 pH 值至 7.4。

### **10 mM Tris**

取 10 ml 1 M Tris (pH 7.4) 加入去離子水稀釋至 1 L。

### **10 mM Tris+10 % Ethylene Glycol**

取 500  $\mu$ l 1 M Tris，5 ml Ethylene Glycol，加入去離子水至 50 ml。

### **10 mM Tris+20 % Ethylene Glycol**

取 500  $\mu$ l 1 M Tris，10 ml Ethylene Glycol，加入去離子水至 50 ml。

### **10 mM Tris+30 % Ethylene Glycol**

取 500  $\mu$ l 1 M Tris，15 ml Ethylene Glycol，加入去離子水至 50 ml。

### **10 mM Tris+40 % Ethylene Glycol**

取 500  $\mu$ l 1 M Tris，20 ml Ethylene Glycol，加入去離子水至 50 ml。

### **10 mM Tris+50 % Ethylene Glycol**

取 500  $\mu$ l 1 M Tris，25 ml Ethylene Glycol，加入去離子水至 50 ml。

### **30 % Polyacrylamide/1 % Bisacrylamide :**

取 5 g N,N'-Methylene-bis-acrylamide 加入 375 ml 40 % Acrylamide，  
125 ml 一次去離子水混合均勻。

### **20 % SDS Solution**

取 10 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)，加入去離子水至 50 ml。

### **1.5 M Tris (pH 8.8)**

取 91 g 的 Tris 加入去離子水至 500 ml，調整 pH 值至 8.8。

### **1 M Tris (pH 6.8)**

取 61g 的 Tris 加入去離子水至 500 ml，調整 pH 值至 6.8。

### **10 % APS**

取 1 g Ammonium Persulfate，加入去離子水至 10 ml。

### **5X Sample Buffer :**

取 0.5 ml 1 M Tris (pH 6.8)，0.8 ml Glycerol，0.8 ml 20 % SDS solution，0.4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol，0.2 ml 0.05 % Bromophenol Blue 加入去離子水至 10 ml。

### **SDS Running Buffer :**

取 14.4 g Glycine，3 g Tris，1 g SDS 加入去離子水至 1 L。



### **Gel Stain Buffer :**

取 1 g Coomassiebrilliant R250，100 ml Acetic Acid，400 ml Methanol，加入去離子水至 1 L，再用 0.2  $\mu$ m 的濾膜過濾，以去除不溶的物質，儲存於室溫中。

### **Gel Destain Buffer I :**

取 400 ml Methanol，100 ml Acetic Acid，加入去離子水至 1 L，儲存於室溫中。

### **Gel Destain Buffer II :**

取 50 ml Methanol，70 ml Acetic Acid，加入去離子水至 1 L，儲存於室溫中。

### **PBS :**

取 1.37 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.35 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，8.77 g NaCl，加入去離子水至 1 L，pH 7.4，儲存於室溫中。

### **PBS+0.1 % Tween-20**

取 1 ml Tween-20，加入 1 L 的 PBS 中。

### **Transfer Buffer :**

取 5 mM Tris-base，192 mM Glycine 中加入 SDS，使其最後濃度為 1 g/1 L，pH 8.3，儲存於 4 °C 中。

### **DAB 呈色劑：**

取 1.25 mg DAB，50 μl DMSO，2.95 ml 0.1 M PBS 混合均勻，要進行呈色時再加入 5 μl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。



## **2-1-3 菌株**

*Vibrio fluvialis* (BCRC 12830)

以上購自於財團法人食品工業發展研究所

## **2-1-4 培養基**

### **TSB+1.5 % NaCl**

取 30 g TSB，15 g NaCl 加入去離子水至 1 L，經高壓滅菌後，儲存於 4 °C 中。

## Blood Agar Plate

購自 CMP

## 2-1-5 儀器

迴轉式震盪恆溫培養箱 (Firstek Scientific, orbital shaking incubator Model-S300R)

紫外光/可見光分光光譜儀 (Amersham Pharmacia Biotech, ultrospec 3100 pro)

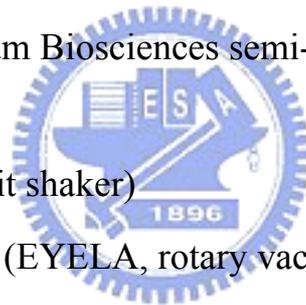
高速離心機 (Beckman, Allegra 21 Series)

電泳槽 (Mightly Small II SE250/SE260)

半乾式轉漬槽 (Amersham Biosciences semi-dry transfer unit Hoffer TE 70)

震盪器 (LAB-LINE, orbit shaker)

微量旋轉式真空濃縮機 (EYELA, rotary vacuum evaporator N-N series)



## 2-2 實驗方法

實驗流程設計：

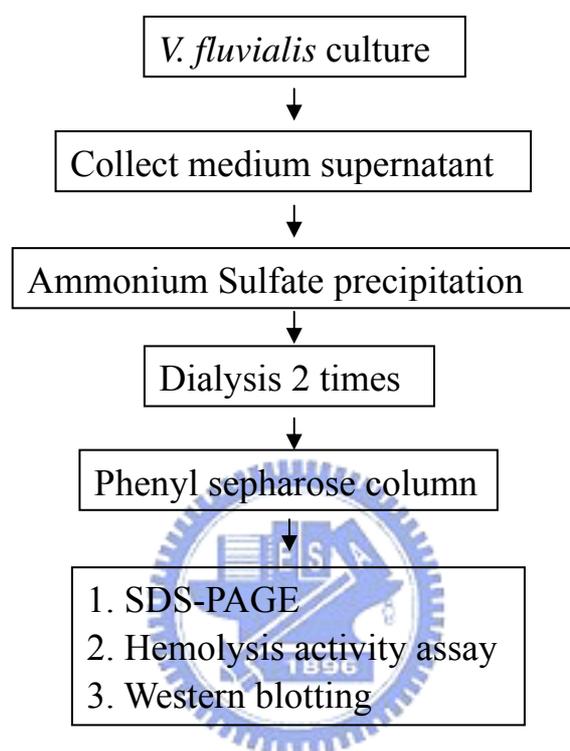


圖 2-1 實驗流程設計

### 2-2-1 蛋白質的純化

先取 100  $\mu$ l *Vibrio fluvialis* 從 -20 培養於 3 ml 含 1.5 % NaCl 的 TSB medium 中，放於 37 中隔夜培養，之後將其倒至 1 L 1.5 % NaCl 的 TSB medium 中，置於 37 培養 3 天，之後於 4 中以 6,500 rpm 離心 30 分鐘，取上清液，用蛋白質超過濾裝置濃縮至 70 ml，加入 39.68 g 的 Ammonium Sulfate 做蛋白質沉澱，分三次慢慢加，待全溶後，於 4 中以 9,100 rpm 離心 30 分鐘，之後將沉澱以 20 mM Tris (pH 7.4) 懸浮起來，再以 25 kDa 的透析膜於 10 mM Tris 中透析一天；以 5 倍

體積的 10 mM Tris 平衡管柱中的 Phenyl sepharose 6 fast flow，將透析完之粗萃取液倒入，同時開始收集流出物 (Flowthrough)，每 5 ml 收集為一管，以 50 ml 10mM Tris 將無法與樹脂結合的蛋白質沖洗出，同時收集流出物 (wash)，每 5 ml 收集為一管，接著分別以 50 ml 10%、20%、30%、40% 和 50% Ethylene Glycol 的 10 mM Tris 沖提，以每 5 ml 收集為一管，收集完畢後每兩管取一樣品做溶血活性分析以及跑 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳。

## 2-2-2 溶血活性分析

先將兔血以 3,000 rpm 離心 3 分鐘，之後將上清液吸除，再加入 1×PBS 小心的混合均勻，以同樣的方式離心，重覆相同的步驟直到上清液為透明無色後將上清液吸除，之後將血球以 1×PBS 緩衝液稀釋至 4% 的濃度；分別將經過管柱分離的各個部份收集液各取 100  $\mu$ l 加入微量試管中，以 0.1% Triton X-100 作為正向控制組，負向控制組則為 PBS 以及各梯度的緩衝液，再加入 100  $\mu$ l 稀釋好的血球放於 37  $^{\circ}$ C 中反應一小時，之後以 3,000 rpm 離心 3 分鐘，取 100  $\mu$ l 上清液至 96 微孔滴定盤中，測量波長 570 nm 下之吸收值，溶血活性愈高者其吸收值愈高。

## 2-2-3 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE)

根據 1970 年由 Davis 和 Laemmli 所使用的系統 (mighty Small II SE250) 的方法來跑 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS-PAGE)，根據表 2-1 的配方來配置適當比例的膠片，將經過管柱分離的各個部份收集液各

取 400  $\mu$ l 以微量旋轉式真空濃縮機濃縮，將濃縮後之樣品在室溫中加入 5 $\times$  Sample buffer 混合均勻，接著在 95  $^{\circ}$ C 水浴下加熱 10 分鐘後，再放於冰上冰浴 2 分鐘，最後注入於膠片上端的樣品凹槽內，固定以 90 伏特的電壓進行電泳，通電壓約 1.5~2 小時，待染劑 (Dye) 至膠片底端後即完成。

<b>12 % Seperating gel</b>	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	6.25 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.75 ml
20 % SDS	150 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	4.8 ml
10 % APS	45 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
Total Amount	15 ml

<b>4 % Stacking gel</b>	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	0.67 ml
1 M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
20 % SDS	50 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3 ml
10 % APS	27.5 $\mu$ l
TEMED	2.5 $\mu$ l
Total Amount	5 ml

表 2-1 製作 12.5 % separating gel 及 4 % stacking gel SDS-PAGE 電泳膠片的配方

## 2-2-4 西方墨點法 (Western Blotting)

取溶血活性高的收集液跑 SDS-PAGE，再利用半乾式轉漬槽將膠片上的蛋白質轉漬到事先以 100 % 甲醇活化的 PVDF 轉漬膜上，以固定 30 伏特的電壓轉漬 30 分鐘。轉漬後的轉漬膜浸泡在溶於 PBS 的脫脂奶粉中，放於室溫中震盪一小時，接著以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，之後加入實驗室先進所製備針對 *V. furnissii* 具溶血活性的蛋白質之抗體，放於室溫中震盪一小時，以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入稀釋 5000 倍抗老鼠 Ig G 的抗體，放於室溫中震盪一小時，以 PBS+0.1 % Tween-20 緩衝液洗 3 次，每次 5 分鐘，最後於暗房內加入 Enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色劑呈色 1 分鐘，再以底片進行感光，並分別以發展液及固定液來顯色及固定，底片置於通風處陰乾。

## 2-2-5 含血培養盤上的溶血測試

根據表 2-2 來配製 Native-PAGE 的電泳膠片。取溶血活性高的收集液加入 5× Native Sample Buffer，注入於膠片上端的樣品凹槽內，固定以 90 伏特的電壓進行電泳，通電壓約 1.5~2 小時，過程中皆接有冷卻系統，待染劑 (Dye) 至膠片底端後即完成。接著將跑好的膠放在事先已利用 37 °C 回溫的含血培養盤上，並在膠片上加上 20 mM Tris 緩衝液放於 37 °C 中兩小時，之後將培養盤放至 4 °C 中 20 分鐘，再把培養盤放回 37 °C 培養觀察之。

<b>10 % Seperating gel</b>	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	5 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.75 ml
ddH <sub>2</sub> O	6.04 ml
10 % APS	200 µl
TEMED	10 µl
Total Amount	15 ml

<b>4 % Stacking gel</b>	
30 % acrylamide/1 % bisacrylamide	0.67 ml
1 M Tris (pH 6.8)	1.25 ml
ddH <sub>2</sub> O	3.05 ml
10 % APS	27.5 µl
TEMED	2.5 µl
Total Amount	5 ml

表 2-2 製作 10 % separating gel 及 4 % stacking gel Native-PAGE 電泳膠片的配方

## 第三章 結果與討論

### 3-1 *Vibrio fluvialis* 中可能的溶血素之純化

目前已知溶血素為弧菌中非常重要的致病因子之一，而 *V. fluvialis* 中已有一個 79 kDa 的溶血素被純化出來 [55]，此外，實驗室曾於 *V. furnissii* 中純化出一 59 kDa 的溶血素，而由於 *V. fluvialis* 和 *V. furnissii* 在演化上十分的相似，因此推測於 *V. fluvialis* 中可能也具有一類似大小之溶血素，在參考過去的純化方法後，決定以 phenyl sepharose 6 fast flow 填充管柱進行層析分離。

#### 3-1-1 *Vibrio fluvialis* 的培養以及細胞外蛋白質的粗萃取液



培養 1 L *V. fluvialis* 於 37 °C 中，之後經由離心將菌體移除，再把取得的上清液以蛋白質超過濾裝置於 4 °C 中進行濃縮，隨後以硫酸銨鹽 (Ammonium Sulfate) 將蛋白質沉澱下來並以 20 mM Tris 回溶，最後使用 10 mM Tris 進行透析而得到深黃色的粗萃取液。經過這些適當處理的過程後，將繼續進行管柱層析的純化。

#### 3-1-2 管柱層析純化分析

純化方法選擇以 phenyl sepharose 6 fast flow 填充管柱進行管柱層析，並利用含 10 %、20 %、30 %、40 % 和 50 % Ethylene Glycol (EG) 的 10 mM Tris 緩衝溶液作為沖提液將蛋白質沖提分離出來，之後將

各個部份的收集液進行 SDS-PAGE 電泳分析，電泳結果如圖 3-1。結果發現利用 20 % Ethylene Glycol 沖提出來的收集液中具有一個大小約 59 kDa 的蛋白質，和預期中的大小相似，因此接下來便以各部份的收集液進行其溶血活性的測試。

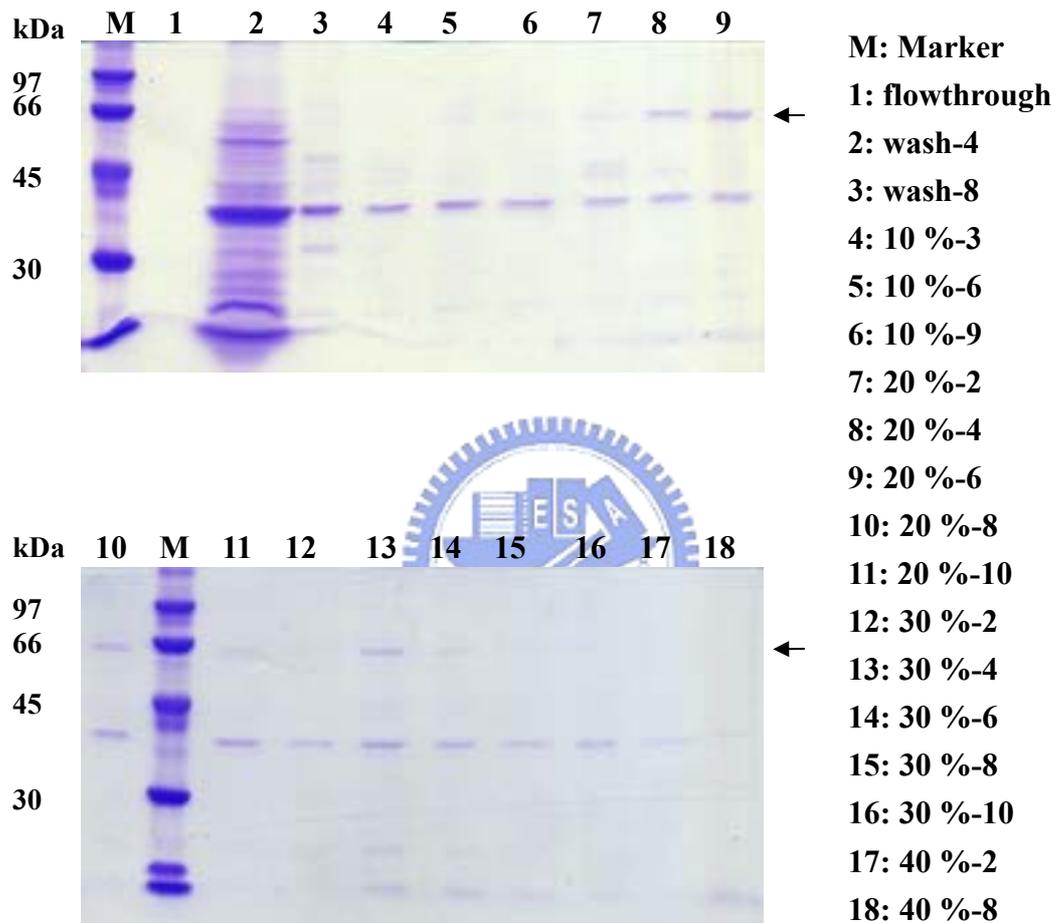


圖 3-1 純化後各部份收集液的 SDS-PAGE 電泳圖

### 3-1-3 溶血活性的測定

取各部份的收集液，加入經過適當處理的 4 % 血球溶液中，以 0.1 % Triton X-100 做為 positive control，PBS 以及各個梯度的沖提液作為 negative control，於 37 °C 反應一小時，之後經由離心去除血球

後，測量被釋放出的血紅素於波長 570 nm 的吸收值，吸收值愈高代表溶血活性愈高，而活性測定的結果如圖 3-2、圖 3-3，可以發現溶血活性高的區域集中在 20 % Ethylene Glycol 沖提出的收集液，此結果和 SDS-PAGE 的結果十分的吻合，因此推測欲純化出的可能溶血素可能存在於這些收集液中。

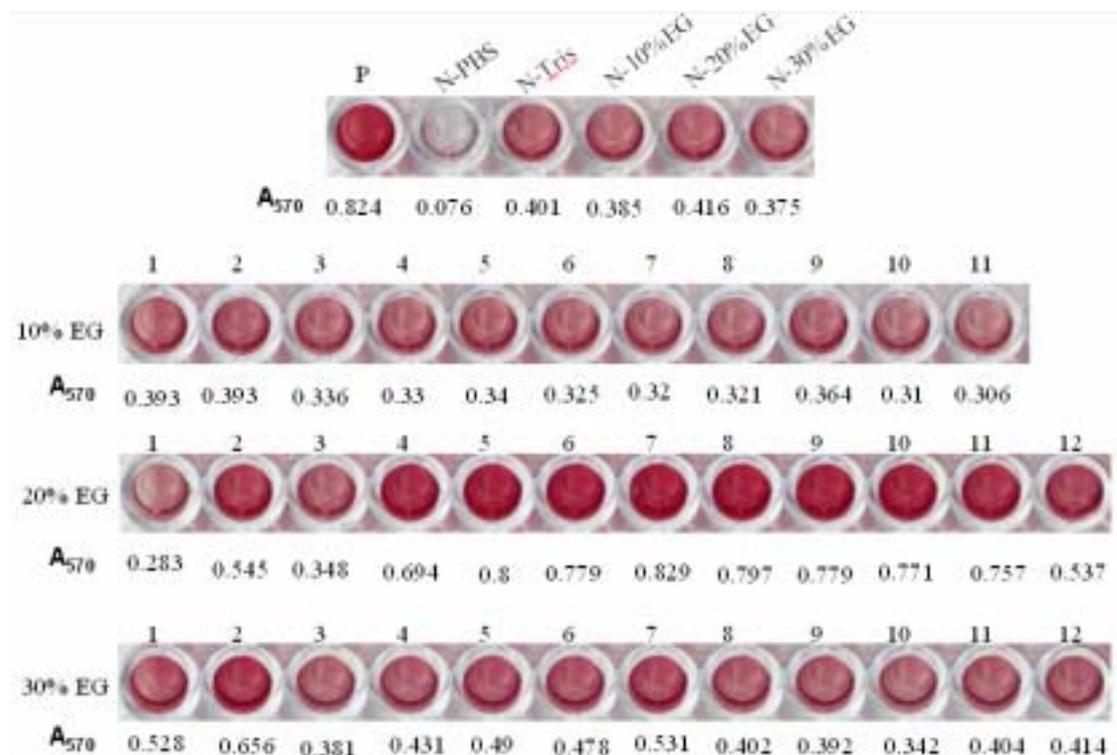


圖 3-2 各部份收集液的溶血活性

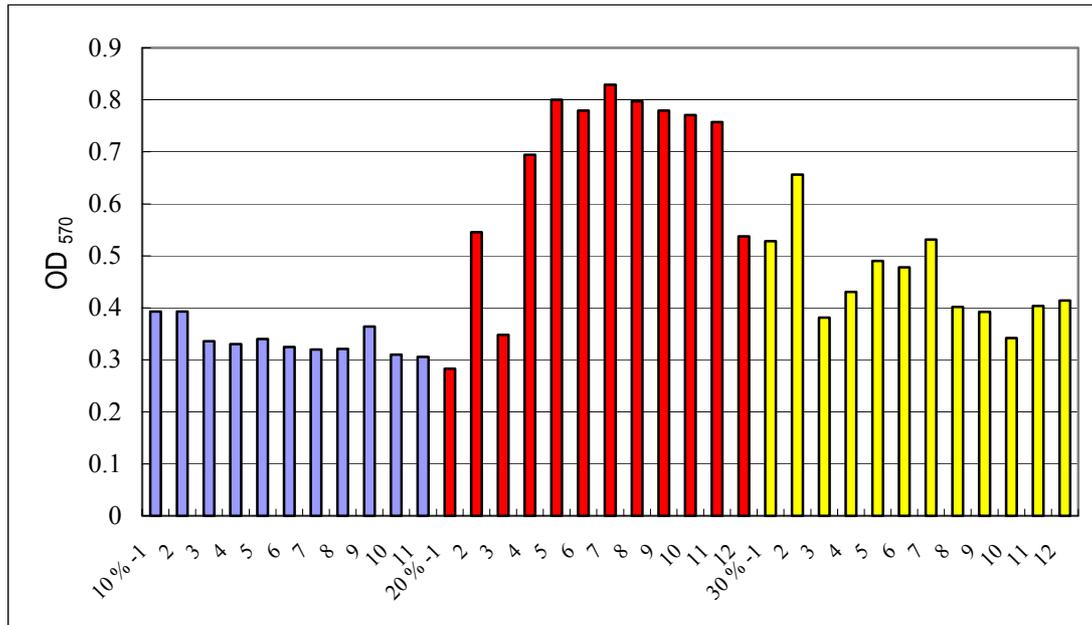


圖 3-3 各部份收集液於溶血後之吸收值

### 3-2 含血培養盤上的溶血測試

將溶血活性高的收集液集中混合，接著將其與透析後之粗萃液經過處理後跑 Native-PAGE，之後將膠片貼放於含血的培養盤上，放於 37 °C 中培養觀察，結果如圖 3-4 所示。發現收集液中確實具有溶血性質的蛋白質，根據蛋白質標準品對照分析其大小約為 120 kDa，這和所預期的 59 kDa 並不相同，但推測此蛋白質有可能為一個雙體組成 (dimer)，關於此部份則需進一步的研究分析才可確定。

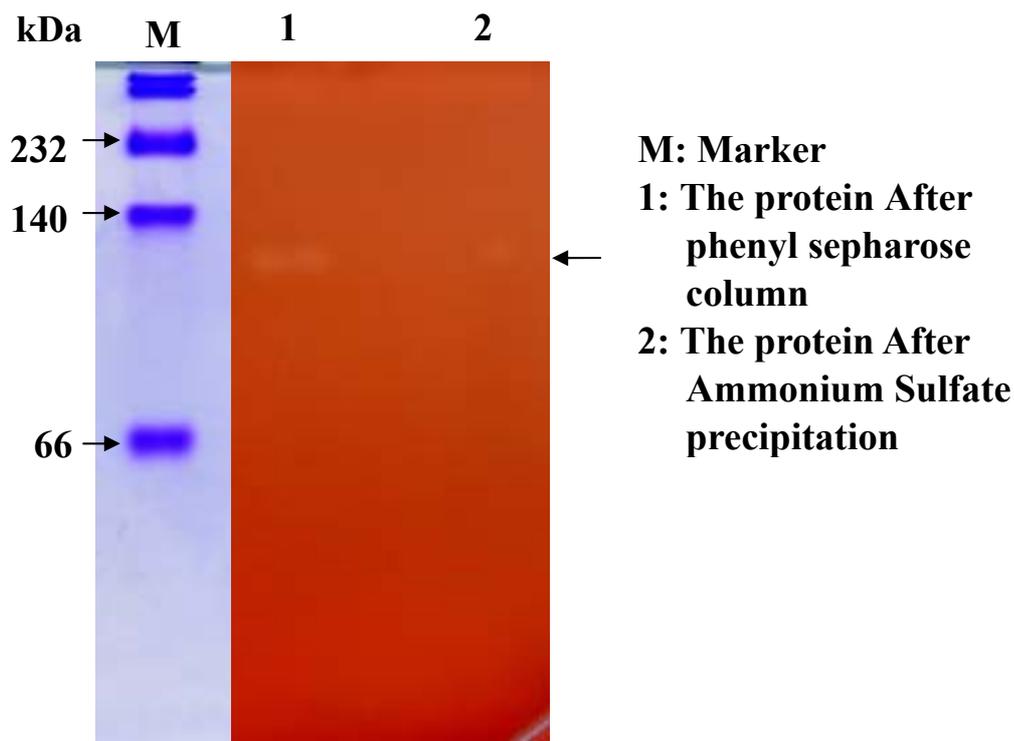


圖 3-4 Native-PAGE 後於含血培養盤上的溶血活性

### 3-3 西方墨點法之分析

取具溶血活性之集中收集液進行 SDS-PAGE 電泳，之後利用半乾式蛋白質轉漬槽將膠片上的蛋白質轉漬至 PVDF 轉漬膜上，經過 3% 脫脂奶粉填滿未有蛋白質之區域後，以實驗室現有之 *V. furnissii* 溶血素抗體作為一抗，而抗老鼠 IgG 之抗體作為二抗，之後於暗房中以 ECL 呈色並以底片感光，結果如圖 3-4 所示，可以發現純化後的收集液中的確具有一約 59 kDa 之變性 (denatured) 的蛋白質 (圖 3-5)，可被 *V. furnissii* 溶血素的抗體所辨認，因此更加證明經由純化後的收集液中確實存在著令我們感興趣之蛋白質。

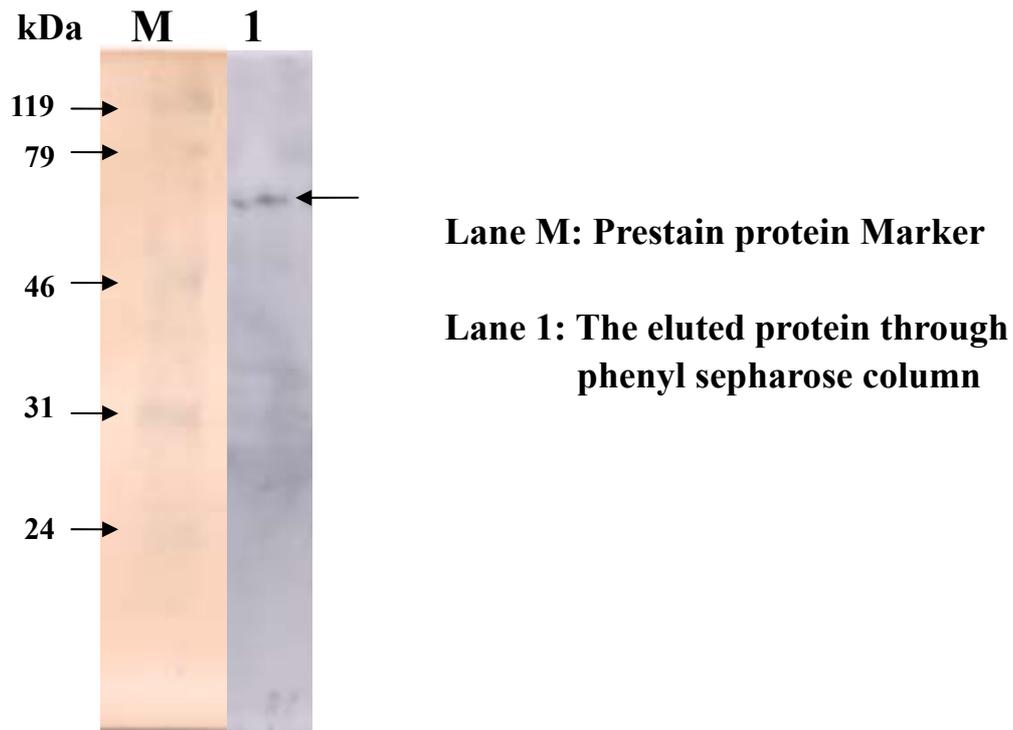


圖 3-5 西方墨點法分析純化後蛋白質之結果

由以上的分析結果可以得知，*V. fluvialis* 粗萃取液經過 phenyl sepharose 6 fast flow 管柱層析後，的確可以初步分離出具溶血活性的蛋白質，且分子量符合我們所預期之 59 kDa。雖然分離出感興趣之蛋白質，但每個部分亦同時存在著 35~40 kDa 之不純物 (圖 3-1)，因此之後若要獲得純度 90 % 以上的目標蛋白質，則需更進一步藉由不同性質的管柱加以層析分離出來，例如抗體親合性純化管柱 (antibody affinity column)。

## 第四章 結論與未來展望

1. *V. fluvialis* 培養液經由離心將菌體去除，樣品經過濃縮、硫銨沉澱及透析等適當處理步驟後，將其通入以 phenyl sepharose 6 fast flow 填充之管柱進行管柱層析，將沖提出的各管收集液以 SDS-PAGE 分析，發現在含 20% Ethylene Glycol 的沖提收集液中具有一大小約 59 kDa 的蛋白質帶，之後將各管進行溶血活性分析也發現含 20% Ethylene Glycol 的沖提收集液的活性最高，因次推測預期的蛋白質可能存在於此收集液中。
2. 接著將這些收集液進行 Native-PAGE 電泳後貼在含血培養盤上進行溶血活性分析，可以清楚發現其中含有一具溶血活性之蛋白質，位於約 120 kDa 處，推測此蛋白質可能為一雙體組合，但仍需進一步的研究探討才可確定。
3. 將這些收集液以西方墨點法分析，利用實驗室已製備好之 *V. furnissii* 中具溶血性質的 59 kDa 蛋白質之抗體做為一抗，結果可以發現在約 59 kDa 處有一蛋白質帶，因此確定經由 phenyl sepharose 6 fast flow 管柱層析分離後，可分離出所預測之大小約 59 kDa 的蛋白質。
4. 本研究已初步分離出所要之目標蛋白質，但由於仍存有其他的蛋白質，未來將可利用實驗室現有之 *V. furnissii* 溶血素抗體披覆在親合性管柱中，作為更進一步之專一性純化目標蛋白質。進而藉由質譜儀分析感興趣之蛋白質序列，比對是否同為 ABC transporter 相關蛋白質，加以探討其在弧菌體內所扮演的真正角色。

## 参考文献

1. Baumann P. and R.H.W. Schubert, Facultatively anaerobic Gram negativeticks, Family II. In *Vibrionaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. *Baltimore: Williams & Wilkins*. **1984**, 516-555.
2. Oliver J.D., Warner R.A., and Cleland D.R., Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, 45(3), 985-98.
3. Summer, John, Hazard Identification, Exposure Assessment and Hazard Characterization of *Vibrio* spp. In *Seafood*. *Joint FAO/WHO Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods*. **2001**, 1-105.
4. Dalsgaard A., The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *International Journal of Food Science and Technology*, **1998**, 33(2), 127-138.
5. Durborow R.M., Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. *Occup. Med.* **1999**, 14(2), 373-406.
6. Arias C.R., Macian M.C., Aznar R., Garay E., Pujalte M.J., Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, 86(1), 125-34.
7. Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommepuy M., Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, 92(6), 1123-35.
8. Dumontet S., Krovacek K., Baloda S.B., Grottoli R., Pasquale V., Vanucci S., Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.* **1996**, 19(3), 245-54.

9. Montanari M.P., Pruzzo C., Pane L., Colwell R.R., Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiology Ecology*, **1999**, 29(3), 241-247.
10. West P.A., The human pathogenic vibrios-a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*, **1989**, 103, 1-33.
11. Lee R.J. and Younger A.D., Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **2002**, 50(3-4), 177-183.
12. Madden J.M., McCardell B.A., and Morris J.G., Jr., *Vibrio cholerae*. In Foodborne Bacterial Pathogens. *New York: Marcel Dekker*. **1989**, 525-542.
13. Collier D.N., Cutaneous infections from coastal and marine bacteria. *Dermatologic Therapy*, **2002**, 15, 1-9.
14. Lee C. and Pan S.F., Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139(12), 3225-31.
15. Lee K.K., Liu .PC., Huang C.Y., *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes. Infect*, **2003**, 5(6), 481-5.
16. Tacket C.O., Brenner F., Blake P.A., Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect Dis.* **1984**, 149(4), 558-61.
17. Linkous D.A., Oliver J.D., Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 174(2), 207-14.
18. Austin B. and Austin D.A., Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. *Springer-Verlag KG, Berlin, Germany*. 1999.
19. Austin B., Pride A.C., Rhodie G.A., Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *J. Fish Dis.* **2003**, 26(1), 55-8.

20. Lavilla-Pitogo C.R. and L.D.d. Pena., Mortalities of pondcultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, **1998**, 164, 337-349.
21. Goarant C., Merien F., Berthe F., Mermoud I., Perolat P., Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65(3), 1145-51.
22. Samalouti V.T., Hamann L., Flad H.D., Ulmer A.J., The biology of endotoxin. *Methods Mol. Biol.* **2000**, 145, 287-309.
23. The Edward Jenner Institute for Vaccine Research web home page. <http://www.jenner.ac.uk/index.htm>
24. Aktories K. and Just I., Bacterial and Protein Toxins Handbook of Experimental Pharmacology. **2000**, 145.
25. Yamamoto S., Hara Y, Tomochika K., Shinoda S., Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron-repressible hemin-binding protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 128(2), 195-200.
26. Fouz B., Mazoy R., Vazquez F., Lemos M.L. and Amaro C., Isolation of a hemin and hemoglobin binding outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serogroup E). *FEMS Microbiol. Lett.*, **1997**, 156(2), 187-91.
27. Okuda J. and Nishibuchi M., Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. *Mol. Microbiol.* **1998**, 30(3), 499-511.
28. Prasad C., Robertson H.J., Jayaraman A. and Rao J.K., Pyroglutamate aminopeptidase activity in human cerebrospinal fluid decreases with age. *Neuropeptides*, **1987**, 9(1), 41-4.

29. Lee C.Y., Cheng M.F., Yu M.S., Pan M.J., Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2002**, 209(1), 31-7.
30. Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J., Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **1987**, 84(9), 2833-7.
31. Ramesh, A. and V.K. Venugopalan, Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish. *J. Appl. Bacteriol.*, **1989**, 66(6), 529-33.
32. Ruby, E.G. and J.G. Morin, Luminous enteric bacteria of the marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 38, 406-411.
33. Caccamo D., Di Cello F., Fani R., Gugliandolo C. and Maugeri T.L., Polyphasic approach to the characterisation of marine luminous bacteria. *Res. Microbiol.* **1999**, 150(3), 221-30.
34. Liu P.C., Lee K.K., and Chen S.N., Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, **1996**, 22, 413-416.
35. Zhang X.H., Meaden P.G. and Austin B., Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67(7), 3161-7.
36. Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J.R., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19(24), 6823-31.
37. Wong H.C., Lu K.T., Pan T.M., Lee C.L. and Shih D.Y., Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **1996**, 34(6), 1535-9.

38. Lee S.E., Kim S.Y., Kim S.J., Kim H.S., Shin J.H., Choi S.H., Chung S.S. and Rhee J.H., Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **1998**, 36(10), 2887-92.
39. Dorsch M., Lane D., Stackebrandt E., Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1992**, 42(1), 58-63.
40. Tada J., Ohashi T., Nishimura N., Shirasaki Y., Ozaki H., Fukushima S., Takano J., Nishibuchi M. and Takeda Y., Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes*, **1992**, 6(6), 477-87.
41. Hernandez G. and Olmos J., Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 63(6), 722-7.
42. Rivera I.G., Chowdhury M.A., Huq A., Jacobs D., Martins M.T., Colwell R.R., Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61(8), 2898-904.
43. Gomez-Gil B., Soto-Rodriguez S., Garcia-Gasca A., Roque A., Vazquez-Juarez R., Thompson F.L., Swings J., Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, **2004**, 150, 1769-77.
44. Honda T., Yoh M., Kongmuang U., Miwatani T., Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, 22(3), 383-6.

45. Clackson, T. and H.B. Lowman, Phage display. *1st ed.* Introduction to phage biology and phage display, *ed.* M. Russel, T. Clackson, and H.B. Lowman. *OXFORD* , **2004**, 1-2.
46. Marvin, D.A., Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8(2), 150-8.
47. Smith, G.P., *Gene*, **1993**, 128(1), 1-2.
48. Petrenko V.A., Smith G.P., Gong X., Quinn T., A library of organic landscapes on filamentous phage. *Protein Eng.* **1996**, 9(9), 797-801.
49. Kishchenko, G., H. Batliwala, and L. Makowski, Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* **1994**, 241(2), 208-13.
50. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **1990**, 348(6301), 552-4.
51. Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G., Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19(15), 4133-7.
52. Marty C., Langer-Machova Z., Sigrist S., Schott H., Schwendener R.A., Ballmer-Hofer K., Isolation and characterization of a scFv antibody specific for tumor endothelial marker 1 (TEM1), a new reagent for targeted tumor therapy. *Cancer Lett.* **2005**.
53. Zhang, X.H. and B. Austin, pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.*, **2000**, 23, 93-102.
54. Huq M.I., Alam A.K., Brenner D.J., Morris G.K., Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **1980**, 11(6), 621-4.

55. Han J.H., Lee J.H., Choi Y.H., Park J.H., Choi T.J., Kong I.S., Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1599(1-2), 106-14.
56. Wall, V.W., A.S. Kreger, and S.H. Richardson, Production and partial characterization of a *Vibrio fluvialis* cytotoxin. *Infect. Immun.* **1984**, 46(3), 773-7.
57. Tall B.D., Fall S., Pereira M.R., Ramos-Valle M., Curtis S.K., Kothary M.H., Chu D.M., Monday S.R., Kornegay L., Donkar T., Prince D., Thunberg R.L., Shangraw K.A., Hanes D.E., Khambaty F.M., Lampel K.A., Bier J.W., Bayer R.C., Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in limp lobster disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69(12), 7435-46.



**Table 1** Biochemical characteristics of some *Vibrio* species

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnisii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
TCBS	Y	Y	Y	G	Y	Y	N	Y	G	G	G
mCPC	N	P	nd	N	N	N	N	N	N	N	Y
AGS	KA	Ka	nd	nd	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA
Growth (0% NaCl)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Growth (3% NaCl)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth (6% NaCl)	+	-	+	V	+	+	+	+	-	+	+
Growth (8% NaCl)	+	-	-	-	V	+	-	V	-	+	-
Growth (10% NaCl)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	+	-	-	V	-	nd	V	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	V	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinose	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	V
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	V	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	V	-	-	-	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Sensitivity 0/129 (10 µg)	R	S	R	S	R	R	nd	S	S	R	S
Sensitivity 0/129 (150 µg)	S	S	S	S	S	S	nd	S	S	S	S
Gelatinase	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Urease	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-

Y, yellow; G, green; P, purple; N, no growth; nd, not determined; K, alkaline; A, acid; a, mildly acid; +, 80% (or more) of strains are positive; 80% (or less) of strains are negative; V, variable reaction; S, sensitive; R, resistant.

### 附錄一 弧菌的生化特性 [55]

pIII leader sequence Kpn I  
 5' - ...TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTG GTA CCT TTC TAT TCT CAC TCT  
 3' - ...AAT AAG CGT TAA GGA AAT CAC CAT GGA AAG ATA AGA GTG AGA  
     ...Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser

↓ Start of mature peptide-pIII fusion  
 GCT TGT NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK TGC GGT GGA GGT TCG  
 CGA ACA NNM NNM NNM NNM NNM NNM NNM ACG CCA CCT CCA AGC  
 Ala Cys Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Cys Gly Gly Gly Ser

Eag I  
GCC GAA ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA TCC CAT ACA GAA  
 CGG CTT TGA CAA CTT TCA ACA AAT CGT TTT AGG GTA TGT CTT  
 Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu  
     ← -28 sequencing primer

AAT TCA TTT ACT AAC GTC TGG AAA GAC GAC AAA ACT TTA GAT  
 TTA AGT AAA TGA TTG CAG ACC TTT CTG CTG TTT TGA AAT CTA  
 Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp

CGT TAC GCT AAC TAT GAG GGC...-3'  
GCA ATG CGA TTG ATA CTC CCG...-5'  
 Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly...  
 ← -86 sequencing primer

K = G or T; M = A or C

附錄二 受限於雙硫鍵內的隨機七胜肽與 gIII 融合蛋白的 N 端序列。

<u>Amino Acid</u>	<u>Codons</u>	<u>Expected frequency*</u>	<u>Observed frequency</u>
Arg	CGK, AGG	9.4%	5.2% (37/714) <sup>†</sup>
Leu	CTK, TTG	9.4%	10.4% (74/714)
Ser	TCK, AGT	9.4%	10.9% (78/714)
Ala	GCK	6.2%	6.4% (46/714)
Gly	GGK	6.2%	3.5% (25/714)
Pro	CGK	6.2%	12.7% (91/714)
Thr	ACK	6.2%	11.2% (80/714)
Gln	CAG, TAG <sup>‡</sup>	6.2%	4.6% (33/714)
Val	GTK	6.2%	2.1% (15/714)
Asn	AAT	3.1%	6.0% (43/714)
Asp	GAT	3.1%	2.1% (15/714)
Cys	TGT	3.1%	0.1% (1/714) <sup>†</sup>
Glu	GAG	3.1%	2.8% (20/714)
His	CAT	3.1%	5.2% (37/714)
Ile	ATT	3.1%	3.2% (23/714)
Lys	AAG	3.1%	3.9% (28/714)
Met	ATG	3.1%	3.5% (25/714)
Phe	TTT	3.1%	1.0% (7/714)
Trp	TGG	3.1%	1.4% (10/714)
Tyr	TAT	3.1%	3.6% (26/714)

### 附錄三 Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> library 中的胺基酸分佈