

計畫編號 DOH90-DC-1025



行政院衛生署九十年度委託研究計畫

新 O3:K6 型腸炎弧菌致病因子之研究

Study on the Virulence Factors of the Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*
O3:K6 strains

研究報告

執行機構：東吳大學

計畫主持人：黃顯宗

協同主持人：盧政雄

研究人員：黃顯宗、盧政雄、鍾育君、陳紀先

執行期限：九十年二月九日至九十年十二月三十一日

本研究報告僅供參考用，不代表本署意見

誌 謝

本計畫的順利執行，很感謝行政院衛生署經費補助 (DOH DOH90-DC-1025)。本研究計畫是腸炎弧菌系列研究計畫之一，本系列計畫得到疾病管理局 (原預防醫學研究所) 的共同合作。感謝衛生署工作先進王添貴先生協助蒐集許多腸炎弧菌菌株，感謝邱秀櫻小姐協助確認血清型工作。

目 錄

誌 謝	2
圖表目錄	4
中文提要	5
英文提要	6
前 言	7
計畫目的	10
材料與方法	11
結果與討論	13
結論與建議	15
參考資料	16

圖表目錄

Table 1. <u>Vibrio parahaemolyticus</u> strains used in this study.....	21
Table 2. Killing of mice by new O3:K6 strains of <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	23
Table 3. The LD ₅₀ values of different new O3:K6 strains of <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	24
Fig. 1. Lethality of mice fed with different new O3:K6 strains of <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	25
Fig. 2. Analysis of protein profile of different <u>Vibrio parahemolyticus</u> strains after coomassie blue staining (1).....	26
Fig. 3. Analysis of protein profile of different <u>Vibrio parahemolyticus</u> strains after coomassie blue staining (2).....	27
Fig. 4. Analysis of protein profile of different <u>Vibrio parahemolyticus</u> strains after coomassie blue and silver staining (1).....	28
Fig. 5. Analysis of protein profile of different <u>Vibrio parahemolyticus</u> strains after coomassie blue and silver staining (2).....	29
Fig. 6. Analysis of protein profile of different <u>Vibrio parahemolyticus</u> strains after coomassie blue and silver staining (3).....	30
Fig. 7. Analysis of lipopolysaccharide of <u>Vibrio parahaemolyticus</u> strains.....	31

中文提要

腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 常造成大規模的食品中毒，自 1996 年起，特殊的血清型 O3:K6 更造成歷史上首次大流行，在台灣和其他國家造成流行。本計畫就動物致死特性、蛋白質圖譜、脂多醣等特性，分別分析新的 O3:K6、舊的 O3:K6、類 O3:K6 和環境菌株，試圖瞭解這大流行菌株的特性。從乳鼠致死實驗和半致死菌數等資料顯示和參考菌株相比並無不同，半數致死的菌數為 5.08-6.98Log 範圍，平均為 5.68 Log，菌株 1137 毒性遠低於其他菌株。LPS 的分析，顯示所有新的 O3:K6 菌株和其他腸炎弧菌菌株都具有 rough 型的 LPS，菌株之間並無顯著的差異。蛋白質圖譜的分析顯至菌株之間頗為相似，不過各類都不盡相同，來自義大利的三株和其他菌株差別較大。多數的新 O3:K6 菌株具有特殊的 32 kDa 蛋白質，其他致病菌株並不具有。這個特殊的蛋白質以 coomassie blue 和 silver stain 染色顯示有可能是醣蛋白，不過以 Schiff 染色卻無陽性反應，這個 32 kDa 蛋白質可能有特別的意義。這特異的蛋白質亦發現於部分的環境菌株中，圖譜與亞洲環境菌株較為相近，顯示新的 O3:K6 源自亞洲的環境菌株。

關鍵詞：腸炎弧菌、O3:K6、脂多醣、蛋白質、致病因子

英文提要

Study on the Virulence Factors of the Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains

Vibrio parahaemolyticus is a halophilic bacterium frequently involved in outbreaks of seafood associated gastroenteritis. New O3:K6 strains have been spreading rapidly in Asian and many other countries in 1996. In order to identify special factors associated with these pandemic O3:K6 strains, the infant mouse lethality, lipopolysaccharide and protein profiles of new O3:K6, old O3:K6, new O3:K6-like and environmental strains were examined in this study. Most of the selected new O3:K6 strains showed similar mouse lethality like reference strain ST550 and other strains, with LD₅₀ values ranging from 5.08 to 6.98Log, and strain 1137 was the least pathogenic one. The lipopolysaccharide analysis identified rough type in the selected strains belonging to the new O3:K6 and other categories. Most of the strains showed similar total protein profiles, except that the environmental strains from Italy were apparently different from other Asian strains. The new O3:K6-like strains, which were genetically close to new O3:K6 strains by pulsed-field gel electrophoresis and toxRS polymerase chain reaction, had at least two protein bands different from the new O3:K6 strains. A special 32 kDa protein band only existed in the new O3:K6 strains except strain 1134 and also presented in several environmental strains. This 32 kDa protein and some other protein bands changed to orange color when the gel was stained with coomassie blue, destained and restain with silver strain and suspected to be glycoprotein. However, Schiff staining did not show positive reaction. This study showed that the new O3:K6 strains are probably derived from the Asian environmental strains, and the special 32 kDa protein may have special role in pathogenicity and spreading of this pandemic strain.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, mouse lethality, virulence factor, protein profile, lipopolysaccharide, O3:K6

前 言

致病性弧菌

弧菌是國內非常重要的食品中毒菌，除了傳統的霍亂弧菌 (*V. cholerae*) O1 型引起霍亂外，1992 年孟加拉發生由 *V. cholerae* O139 菌株引起霍亂流行，鄰近的香港也發生旅客感染帶回的例子，致病性弧菌對國民健康的影響日益受到全球重視。O139 菌且日漸蔓延，近日台灣已經發生該菌污染事件。霍亂弧菌與腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 是食品界最重視的食品中毒菌之一，其中腸炎弧菌引發日本六至七成的中毒事件，在台灣地區也是歷年來中毒頻率最高的菌種 (Chiou et al., 1991)。

弧菌類是很重要的病源菌，特別是台灣地區四面環海，水海產食物中各類弧菌的檢出率很高(Wong et al., 1992)，且菌株中已知的毒素雖不多，但頗多能溶血、或有細胞或動物毒性 (Wong et al., 1993)。歷年來的食物中毒統計中，腸炎弧菌是中毒頻率最高的菌種 (Chiou et al., 1991)，八十三年更有多宗大型腸炎弧菌中毒案例，如澎湖中毒事件，民國 70-84 年的統計中，腸炎弧菌約佔細菌性中毒的半數 (陳，1996)。筆者等獲衛生署補助的研究結果，從食品中毒檢體中分離致病性弧菌，仍以腸炎弧菌為最多。此外台灣地區由於經濟的發展，使得旅遊、海空運輸非常發達，參加 WTO 或 APEC 等國際組織後，工商業以及農產的進出將更頻仍，當然也要考慮透過非正式管道進口者，台灣四周地區甚多衛生環境較差者，因此對致病性弧菌的檢驗控制，日益重要。

腸炎弧菌的特性

腸炎弧菌是海水生弧菌，常在海產食品中檢出。耐熱溶血素 (Thermostable direct hemolysin, TDH) 是腸炎弧菌最重要的致病因素，臨床菌株多具有這種溶血素，該毒素也具有腸毒性，可造成下痢。TDH 是由 189 個胺基酸組成(含 signal peptide 部份)，其基因 *tdh* 序列相當保守，菌株間有 97% 相似。在 Kanagawa phenomenon(KP) 陽性的菌株中，通常含有兩個 *tdh* 基因，分別為 *tdh1* 與 *tdh2*，分別在 1.3 與 2.7kb 的 *HindIII* 片段上(Nishibuchi and Kaper, 1990)，基因產物非常類似，只有七個胺基酸差異，但菌株所產生的毒素 TDH 與 *tdh2* 的基因產物較為類似(Nishibuchi et al., 1991; Nishibuchi and Kaper, 1995)。在其他 KP 陰性的菌株中，有 16% 具有 *tdh* 基因，可能只有一個基因，可能在染色體上，或在質體上，主要可能是表現的調控較弱，雖然毒素的蛋白質類似，但未能表現較高的溶血現象，所在的片段也可能不一樣，故有不同的編號(Yoh et al., 1991)。在分析 *tdh* 基因的鄰近區域序列後發現具有 insertion sequence-like elements，雖然已不具有跳

躍的能力，但是可能可證明在演化的過程中負責 *tdh* 基因轉移的意義(Terai et al., 1991)。近年又有 KP-菌株能產生致病性，在這些菌株中並不產生 TDH 而是產生類似的毒素 TDH related hemolysin (TRH)，而且與 urease 陽性菌株有密切的關連性(Okuda et al., 1997a)。TRH 基因與 *tdh* 基因約有近七成的相似度(Kishishita et al., 1992)。

O3:K6 型腸炎弧菌

從過去 82-84 年度所蒐集的臨床菌株分析(黃等, 1997)，發生率較多的血清型(單以 K 分型的話)為 K15(19%)、K8(14%)、K29(13%)、K56(9%)、K3(7%)等，K6 型只佔 0.96%。過去食品中毒的腸炎弧菌的血清型分布都較為平均，K15 與 K8 等少數血清型的分布也只是較多，唯 86 年入夏以來，所發生的腸炎弧菌食品中毒，幾乎都是血清型 K6 者，從南到北以及澎湖金門等外島都發生同樣是 K6 的中毒事件。對於 O3:K6 型腸炎弧菌而言，已經是全省性的分布。我們最近所完成的論文顯示並無法在環境耐受特性上分辨 O3:K6 與其他腸炎弧菌的特異性(Wong et al., 2000b)，同時合作者共同完成的論文顯示新的 O3:K6 菌株在 *toxRS* 的 1346-bp 核酸序列上，起碼有 7 個 base 與舊的 O3:K6 菌不同(Matsumoto et al., 2000)。在我們剛完成的計畫中，我們從印度、孟加拉、星加坡、泰國與本國獲得 10 株非 O3:K6 菌株，不過具有與 O3:K6 相同或相近的基因型，這可能說是該 pandemic 菌株的擴散。所以對於 O3:K6 菌株致病性因子的了解有助於分析其他基因型相近而血清型相異菌株廣泛流行之能力。

從文獻分析中得知，這些 K6 菌株(O3:K6)在 1996 年起已經在印度發生並高速地蔓延開，Okuda 等人(1997b)使用 arbitrary-primed(AP)-PCR 分析顯示這些在亞洲各國流行並帶回日本的菌株全都是屬於同樣一型，具有完全相同的血緣。我們主要使用較佳的 PFGE 分型方法。結果顯示分別從韓國與日本所獲得的 K6 菌株主要屬於 PFGE 的 I1 與 I5 兩型，與本土的菌株完全相同。資料顯示全東南亞正在流行同樣血緣的腸炎弧菌，而台灣便完全籠罩在這波流行下。不過我們分析從東南亞回國的旅客所帶菌株，與前述兩型血緣很近但是稍有差異，而且日本、韓國、國內的 K6 菌株的毒性有顯著的差別，韓國與國內的菌株的毒素產量遠比日本者為高，說明地理區域會產生少許的變異。這些 O3:K6 腸炎弧菌中毒事件說明了台灣已經處在四通八達的國際環境，致病菌可

能在極短的時間內從國外流入，進而蔓延全台。

O3:K6 或其他國家地區致病性腸炎弧菌入侵的可能途徑為：旅客與進口物品，特別是水產品。本國旅客、外國旅客與外籍勞工的進出日漸頻繁，去年度的研究中顯示東南亞回國旅客分離到的 O3:K6 菌株與 I1 或 I5 兩型十分接近。

從 O3:K6 的事件中我們以分子生物分型技術清楚地確立國外與國內致病菌的血緣關係，促使我們更需要加強長期國內外合作、加強進口與本地中毒菌的分型分析與控管工作，使能掌握動態訊息，增進預警的意義，降低往後中毒菌的入侵與蔓延。在剛完成的計畫中，我們更徵詢得日本、韓國與印度學者共同合作分析，總共蒐集到 160 株 O3:K6 與其他類型的菌株，分別自韓國、日本、印度、本國與少數其他亞洲國家蒐集菌株，在亞洲流行者仍然以 O3:K6 型為主。以 PFGE 分析，獲得 I type 的 108 株。I type 主要包括 O3:K6 的菌株，型號增加到 13 型，有 10 株其他血清型菌株，但 PFGE 型的表現屬於 I 型，說明 O3:K6 型在亞洲有擴散的趨勢。

由這些結果得知 O3:K6 菌株已經是大流行的菌株，影響亞洲各國，最近報導且擴展至美洲，至於這些 O3:K6 菌株都具有很相近的基因型，說明其源出自相同的 clone。根據與合作者 Nishibuchi 共同所完成的報告可知陸續出現基因型擴散的趨勢。

在弧菌中，從來只有 O1 型霍亂弧菌會造成大流行，在 1992 年起，O139 霍亂弧菌繼起造成新的霍亂流行，亞洲各國都有或多或少的案例發生，台灣亦不例外。腸炎弧菌僅是一般性的食品中毒腸炎菌，不過並無大流行（pandemic）的情形，不過自 1996 年之後在亞洲多國造成大流行，在台灣迅速造成四成至八成的感染，所以學者們對為何能夠造成大流行都深感興趣。

Lipopolysaccharide (LPS)

LPS 在沙門氏菌中與其他的細菌中是已知的 endotoxin，在弧菌中亦有多起研究，主要在創傷弧菌（*V. vulnificus*）與霍亂弧菌，Bahrani 與 Oliver（1990, 1991）分析創傷弧菌的 LPS 的成份與電泳圖譜（electrophoretic pattern），並未發現常常存在於腸道菌科的 2-Keto-3-oxo-octanoic acid (KDO)，lipid A 中主要的成份便是 Hexadecenoate (C16:1)；同時比較不同的萃取方式對 LPS 的影響，分析了 LPS 的成份與電泳圖譜顯示創傷弧菌菌株之間的差異，證實該菌並不具有一般腸道菌科菌的 smooth nature 性質，不過改以去磷酸處理後，Han 與 Chai（1991）發現弧菌如腸炎弧菌等是具有 KDO 的。將創傷弧菌的 LPS 注射進 mice 或 rat 中，造成死亡或其他反應，說明創傷弧菌和沙門氏菌一樣具有致病的性（McPherson

et al., 1991)。在霍亂弧菌方面，好些研究分析 O139 與 O1 的，並分析特別參與 LPS 形成的基因 (Stroehner et al., 1997; Waldor et al., 1994)。

腸炎弧菌有三類主要抗原，分別為 flagellar H 抗原、耐熱 somatic O 抗原 與耐熱 capsular K 抗原。K 抗原為一酸性多醣，包含 pentoses, hexoses, hexosamines 等，其比例在抗原中各異。若以 100°C 加熱 1-2 小時，則 K 抗原會自細胞表面釋出，此時 somatic O 抗原即暴露出來。O 抗原為一酯多醣，包含 glucose、galactose、glucosamine、heptose、phospholipids、fatty acid ester 等。在腸炎弧菌中，Han 與 Chai (1992) 曾進行分析，並不具有 O-specific 的側鏈，僅有 lipid A 和 core region。在電泳分析中顯示腸炎弧菌並無 doublet ladder band (如同腸道菌的 S-type LPS)，故所有的腸炎弧菌可能產生 R-type LPS (Iguchi et al., 1995)。LPS 的不同，可能會影響到致病性，所以當新的 O3:K6 形成流行時，他的 LPS 表面抗原等可能改變。我們最近測得多株血清型改變了，但 PFGE 的分子分型仍與新的 O3:K6 相同，說明表面的特性在改變中，分析 LPS 可多提供致病性與演變的訊息。

夾膜 Capsule

夾膜是多醣類物質，致病菌具有夾膜，可以抵禦宿主的免疫抗拒，例如補體、phagocyte，假如是弱的抗原反應時，較容易躲過宿主的抗體作用 (Jann and Jann, 1992)，夾膜對致病菌是非常重要的。在創傷弧菌的研究中，使用 transposon 造成夾膜的喪失，結果動物致死能力迅即降低，基因恢復後隨即恢復毒性 (Zupparado and Siebeling, 1998)。在新霍亂菌 O139 中，夾膜與 O 抗原在基因的位置上證明與原先的 O1 不同，顯然這兩種成份造成霍亂蔓延因素之一 (Comstock et al., 1995)。Waldor 等人 (1994) 使用電泳與免疫的方法辨識到霍亂菌 O139 三種 migrating patterns。O139 夾膜所形成的抗血清對於小白鼠致病性有保護的作用，顯示夾膜在致病上的意義 (Sengupta et al., 1996)。

計畫目的

O3:K6 型腸炎弧菌造成極為廣泛的流行，為何具有這樣的流行能力，學者們從不同的角度分析。從腸炎弧菌中了解到噬菌體可能負責遺傳訊息的傳遞 (Chang et al., 1998)，而最近發現 O3:K6 菌株也是具有類似的噬菌體 (Nakasone et al., 1999)。我們的研究亦指出最主要的致病因子耐熱溶血素 (TDH) 的 titer 並無差別 (Wong et al., 2000b)，合作研究亦指出調節毒素形成的 *toxRS* 有七個 bases 有改變，不過這也未能說明為何這新的血清型具有如此的能力，本計劃從三方面探討新型菌的致病因子：

- 一、比較新 O3:K6 乳鼠死亡活性：縱然 TDH 毒素的差異度不大，可能尚有其他致病特性，故本研究以乳鼠模型測試新 O3:K6 和其他菌株之間動物致死能力。
- 二、分析蛋白質圖譜的差異，試圖找出 O3:K6 菌株中的特異蛋白質，並嘗試進一步分析這些特異蛋白質的生化、分子生物與在致病上的意義。
- 三、表面 LPS 的差異：Liposaccharide(LPS)是細菌表面很主要的成分，是致病因子之一，在本計劃中將比較分析新舊 O3:K6 與其他與其他腸炎弧菌中 LPS 的差異，觀察 LPS 在成份上與致病性上是否為造成嚴重流行的原因。

這些致病因子的分析，除了有助於了解該菌何以會大流行外，利用這些因子我們可以發展出各種檢驗的方法，準確地掌握流行的趨勢，特別是已經有多株其他血清型具有同樣的分子分型特性。

材料與方法

一、菌株蒐集與培養

本計畫從過去所蒐集的菌種庫中抽出新型的 O3:K6 菌株、舊型的 O3:K6 菌株、其他菌株進行各項分析（表一）。菌株的保存使用 protect 管，保存菌株在-85°C 冷凍庫中。培養時使用 tryptic soy agar-3% NaCl 培養或 tryptic soy broth-3% NaCl，在 37C 震盪培養。

二、LPS 的分析

LPS的萃取：

將菌株在液體培養基培養過夜，離心取得菌體，冷凍乾燥後，或以acetone固定，在室溫中乾燥，以phenol-water法進行萃取，將水層搜集（和phenol層水洗）後進行透析，冷凍乾糙後溶於水中，後以proteinase K、Rnase、Dnase等處理，去除蛋白質和核酸的干擾，透析後，以105,000xg的速度離心沈澱，用蒸餾水懸浮，反覆兩回，冷凍乾燥後便得到純化的LPS樣品（Dooley et al., 1985; Han and Chai, 1992）。不過為了簡易地進行電泳分析，可仿照Hitchcock與Brown（1983）的方法，以粗的細胞萃取液或經過proteinase K處理過後的粗萃取液，再以專門染LPS的silver stain方法染色處理便可。

LPS電泳分析：

參考Han與Chai (1992) 的方法進行SDS-PAGE電泳分析，Separating gel為12.5% acrylamide和4M urea，Stacking gel 4.5%，sample buffer中含有4 mM EDTA。

Stacking gel 電泳110V，separating gel為250V，使用Silver stain進行LPS的染色 (Hitchcock and Brown, 1983)，照相保存。在電泳分析時加入沙門氏菌的rough和smooth type的LPS作為比較分析。

三、蛋白質圖譜分析

參考我們實驗室的方法進行 (Wong et al., 1998)。將菌體培養後，在對數期中離心取得菌體，當進行 1-D Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 分析時，菌體以緩衝劑 (per 100 ml) 10 ml TBS buffer (0.41M Tris, 0.4 M boric acid, 1% SDS, pH 8.64), 5 g glucose, 185 mg EDTA, 5 ml 2-mercaptoethanol, 1.9 g SDS, and 5 ml glycerol 等處理溶解 (Dascher et al., 1990)。boiling 處理五分鐘，離心取上清液為蛋白質萃取液，進行 PAGE 分析。

四、醣蛋白分析

採用 Schiff 染色方式，分析在蛋白質圖譜中醣蛋白的存在，Schiff reagent 的配製：1 g basic fuchsi add to 200 ml H₂O, heat in microwave oven; 5 ml 2N HCl; 3.4 g sodium metabisulfite, stir overnight at 4C in the dark; 5 g of activated charcoal added, for 1 h, remove the charcoal by filtration; 2-3 ml of 2N HCl added (until a small drop of reagent would dry to a metallic yellow by flaming on a glass side); stored at 4C in dark and used within 2 week。進行蛋白質電泳分析後，以 40% ethanol 和 5% acetic acid 固定蛋白質膠，20 分鐘以上。然後浸泡於 7.5% acetic acid 三十分鐘，以 0.2% periodic acid 在 4C 氧化一小時，倒掉氧化溶液。加入 Schiff reagent，在 4C 作用一小時或以上，靜待醣蛋白染成粉紅色，再以 bisulfite (10 g Na₂S₂O₅, 8.25 ml conc.HCl, 1 L H₂O) 清洗 7.5% acetic acid 處理膠體。

五、動物致病性分析

參考我們實驗室的方法進行 suckling mouse assay (Wong et al., 1996, 1998)，測定小白鼠死亡的情形與腸道腫脹的腸道毒性。取 0.1 ml 菌液樣品混合 Evans blue，注射至 2-4 天大的小白鼠 suckling ICR mice，在室溫放置，每組六隻，觀察記錄每隻動物死亡的時間，取六小時的死亡隻數，計算半數死亡的 LD₅₀ 值。

在在固定的時間，犧牲小白鼠，取得小腸，秤小腸與整身體的比值。

結果與討論

新型腸炎弧菌致病特性的研究

在本研究中，我們分級選取 10 新的 O3:K6 菌株、8 株環境菌株、6 株老的 O3:K6 菌株（1996 年以前所分離者）、12 株類似新的 O3:K6 的菌株（以專一性的 toxRS PCR 法和 PFGE 電泳分析證明過）（表 1）。在許多實驗中我們採用 ST550 菌株作為參考比較用（Dai et al., 1998）。

腸炎弧菌最重要的致病因子便是耐熱溶血素 TDH，在過去有關新 O3:K6 菌株 TDH 的測試時皆顯示頗高的 TDH 生成量（Wong et al., 2000），在本實驗室的研究中我們曾比較類 O3:K6 菌株和其他菌株的 TDH 形成量，結果顯示這些類 O3:K6 菌株的 TDH 顯著地低於其他菌株。我們挑選數株新的 O3:K6 菌株進行乳鼠的致死實驗，將不同的稀釋濃度的菌液注射至乳鼠的胃中，觀察各乳鼠的死亡時間，菌數減少時死亡的平均時間便會隨著增加（表 2），我們選定六小時的觀察點，計算在六小時的半數致死菌量，結果顯示半數致死的菌數為 5.08-6.98Log 範圍，平均為 5.68Log（表 3）。大多數的菌株半數致死率為 5log 值，但菌株 1137 遠低於其他菌株，半數致死菌數為 6.98（表 3）。當我們選取 6log 值的注射濃度，把不同時間死亡乳鼠數目畫成圖 1，菌株 1137 死亡遠慢於其他菌株。其他新的 O3:K6 菌株和 ST550 菌株的致死情況相似，所以新的 O3:K6 菌株，其乳鼠致死特性與其他菌株類似。

新 O3:K6 菌株蛋白質圖譜分析

本部分研究中，我們使用了六株新的 O3:K6 型菌株，主要屬於 I1 與 I5 的 PFGE 型號，使用七株環境菌株，四株來自東南亞海產分離株，三株來自義大利，使用五株老的 O3:K6 菌株，皆來自日本。使用十株其他血清型的腸炎弧菌，具有與新的 O3:K6 類似的 PFGE 類型 I（表 1）。我們分析了蛋白質圖譜、LPS 圖譜與醣蛋白等。

蛋白質圖譜分析，這幾類型的腸炎弧菌菌株都可以分成新 O3:K6、舊 O3:K6、環境菌株。我們先使用 coomassie blue 染色，結果見圖 2-3，最主要的不同是新 O:K6 大多數具有 32 kDa 的蛋白質 band，惟菌株 1134 並不具有，舊的和類 O3:K6 菌株等都不具有該蛋白質。

當 coomassie blue 染色後,我們使用原來染色過程中的退色(含有 methanol 和醋酸等)後,再以 silver stain 染色,這樣可以提高辨識度、降低樣品用量,而且一些蛋白質染成橘色或棕色,可能顯示為含醣類之蛋白質,原先在 coomassie blue 染色中清晰之 32 kDa 特殊蛋白質,在這樣的染色下,反而較弱,環境菌株如 1062(來自香港的水產品)(圖 4) 1413 和 1414(來自義大利的環境分離株)等都帶有 32 kDa 蛋白質(圖 6),其他的菌株並未有這蛋白質。

圖 5 的結果較能顯示菌株的差異性,在 35-55 kDa 範圍內的蛋白質 bands 比較有差異,其他大的或小的部分相異性不高,新的 O3:K6 菌株除了 1134 外,其他的菌株圖譜相似。舊的 O3:K6 菌株如 1181、1182、1184 等與新的 O3:K6 極為相似,僅是少掉 32 kDa 的蛋白質(圖 5-6) 類似新 O3:K6 菌株之間相當相似,與新的 O3:K6 相比卻有明顯的差別,如多了 35 kDa 少了 43 kDa 蛋白質(圖 5)

環境菌株中東南亞水產食品分離株所得到的圖譜之間較相似(圖 4),義大利來源的三株都不相同(圖 5),把兩地環境菌株比較發現兩地環境菌株的蛋白質圖譜並不相同。總蛋白質的圖譜頗能反應出基因型(血緣)的差異,可見新的 O3:K6 菌株和亞洲其他菌株較近。

菌株醣蛋白質分析

經過 coomassie blue 和 silver stain 後染成橘黃色者可能為 glycoprotein,而本 32kDa 蛋白質亦染成橘黃色,所以有可能是含醣的蛋白質。在微生物中,醣蛋白有許多功能,例如吸附作用等,所以此特別的蛋白質值得進一步分析。

我們繼續採用 Schiff base 的染色,試圖確認該 32kDa 是否為含醣的蛋白質,不過只有較大的蛋白質 bands 有隱約的紅色反應,而義大利菌株 1412 在約 80kDa 處(圖 6)有一明顯的粉紅色反應 band,可知為醣蛋白,在 32kDa 大小處並無陽性反應。因為 Schiff base 的染色不是很靈敏,可能是每一條 lane 中的蛋白質含量不足以產生陽性反應故,需再做分析,如經過初步純化以增進濃度後再試(data not shown)。

菌株 LPS 特性分析

我們亦進行 LPS 的圖譜分析,進行蛋白質分析後,採用專門染 LPS 的 Silver stain 進行染色,發現各類菌株的 LPS 圖譜頗為相同,並不形成 smooth 型的梯狀圖譜,近似 rough 型的圖譜,再電泳片的前沿處有明顯的二個陽性反應 band(圖 7)。新 O3:K6 菌株和其他菌株之間的 LPS 圖譜並無差異。

結 論 與 建 議

1. 新的 O3:K6 是腸炎弧菌第一株會引起大流行的菌株，雖然近年流行的比例已經降低，但其特性應該有更深入的研究，本計畫提供了部分特性分析。本研究結果顯示新的 O3:K6 菌株的動物致病性與一般的腸炎弧菌並無差別，去年我們分析了新 O3:K6 菌株的耐熱溶血素的產量顯示和其他菌株相比亦無顯著差異，所以縱然可以引起大流行，但幸好致病病狀並不特別增強。
2. 本研究進行蛋白質的分析，可以分辨新的 O3:K6、舊的 O3:K6、環境菌株和類 O3:K6 菌株。菌株之間頗為相似，來自義大利的三株和其他菌株差別較大。
3. 我們擔心類似新 O3:K6 菌株會否也引起大流行，從另外的研究發現不太可能。在本研究中顯示類 O3:K6 菌株內部同質性高，但與新 O3:K6 菌株相比，頗有不同，並不具有特殊的 32 kDa 蛋白質，和另外研究結果合併分析，顯示可能不會引起大流行。
4. 新的 O3:K6 從何而來？該菌株在 1996 年始在印度出現，與舊的 O3:K6 的基因型 (PFGE 分型) 並不相同，但從本研究蛋白質圖譜的分析中顯示新的 O3:K6 源自亞洲的環境菌株。
5. LPS 的分析，顯示所有新的 O3:K6 菌株和其他腸炎弧菌菌株都具有 rough 型的 LPS，菌株之間並無顯著的差異。
6. 蛋白質圖譜分析中最主要的發現是除了一株外，其於新的 O3:K6 菌株都含有 32 kDa 大小的蛋白質，該蛋白質僅存在於部分環境菌株，卻不存在於其他致病性的腸炎弧菌，該蛋白質是否顯示環境菌株的特性？是否顯示新 O3:K6 菌株來源自環境菌株？是否和大流行的能力有關？我們分析了新 O3:K6 菌株的產毒性、動物致病性、環境耐受性、抗藥性、LPS 等，皆無顯著性的結果足以說明大流行的原因，因此這個 32 kDa 蛋白質提可能有特別的意義。

參考資料

- 黃顯宗 潘子明 李智隆 施養志. 1997. 台灣地區食品中腸炎弧菌的分子生物分型分析. 衛生署食品衛生調查計畫. DOH86-TD-106.
- 黃顯宗、邱乾順、李永盛、劉定萍、王添貴. 2000. 最近國內外食品中毒腸炎弧菌關連性分析研究. 衛生署計畫編號 DOH89-TD-1053
- 陳陸宏. 1996. 我國食品中毒處理現況. 食品安全衛生研討會. P.10-17. 農委會.
- Apicella ,M.A., J.M.Griffiss, and H.Schneider. 1994. Isolation and characterization of lipopolysaccharides, lipooligosaccharides, and lipid A. In: Methods in Enzymology Vol.235. Ed. V.L.Clark and P.M.Bavoil. P. 242-252. Academic Press, New York.
- Bahrani, K., and J.D. Oliver. 1990. Studies on the lipopolysaccharide of a virulent and an avirulent strain of *Vibrio vulnificus*. Biochem.Cell Biol. 68:547-551.
- Bahrani, K.F., and J.D. Oliver. 1991. Electrophoretic analysis of lipopolysaccharide isolated from opaque and translucent colony variants of *Vibrio vulnificus* using various extraction methods. Microbios 66:83-93.
- Bonet, R., M.D. Simon-Pujol, and F. Congregado. 1993. Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*. Appl.Environ.Microbiol. 59:2437-2441.
- Chang, B., H. Taniguchi, H. Miyamoto, and S. Yoshida. 1998. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. J.Bacteriol. 180:5094-5101.
- Chiou, A., L.-H. Chen., and S.-K. Chen. 1991. Foodborne illness in Taiwan, 1981-1989. Food Australia 43:70-71.
- Comstock, L.E., D. Maneval, Jr., P. Panigrahi, A. Joseph, M.M. Levine, J.B. Kaper, J.G. Morris, Jr., and J.A. Johnson. 1995. The capsule and O antigen in *Vibrio*

- cholerae* O139 Bengal are associated with a genetic region not present in *Vibrio cholerae* O1. *Infect.Immun.* 63:317-323.
- Comstock, L.E., J.A. Johnson, J.M. Michalski, J.G. Morris, Jr., and J.B. Kaper. 1996. Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol.Microbiol.* 19:815-826.
- Dascher, C. C., K. S. Poddar, and J. Maniloff. 1990. Heat shock response in mycoplasmas, genome-limited organisms. *J.Bacteriol.* 172:1823-1827.
- Dooley, J.S.G., R. Lallier, D.H. Shaw, and T.J. Trust. 1985. Electrophoretic and immunochemical analysis of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J.Bacteriol.* 164:263-269.
- Garrote, A., R. Bonet, S. Merino, M.D. Simon-Pujol, and F. Congregado. 1992. Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol.Lett.* 74:127-131
- Han, T.J., and T.J. Chai. 1991. Occurrence of 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonic acid in lipopolysaccharides isolated from *Vibrio parahaemolyticus*. *J.Bacteriol.* 173:6303-6306.
- Han, T.J., and T.J. Chai. 1992. Electrophoretic and chemical characterization of lipopolysaccharides of *Vibrio parahaemolyticus*. *J.Bacteriol.* 174:3140-3146.
- Hitchcock, P.J. and T.M. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J.Bacteriol.* 154:269-277.
- Huebner, J., Y.Wang, W.A.Krueger, L.C. Madoff, G. Martirosian, S.Boisot, D.A.Goldmann, D.L.Kasper, A.O.Tzianabos, and G.B. Pier. 1999. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect.Immun.* 67:1213-1219.

- Iguchi, T., S. Kondo, and K. Hisatsune. 1995. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R- type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol.Lett.* 130:287-292.
- Jann, K., and B. Jann. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can.J.Microbiol.* 38:705-710.
- Matsumoto,C., J.Okuda, M.Ishibashi, M.Iwanaga, P.Garg, T. Rammamurthy, H.C.Wong, A.DePaola, Y.B.Kim, M.J.Albert, and M.Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J.Clin.Microbiol.* 38:578-585.
- McPherson, V.L., J.A. Watts, L.M. Simpson, and J.D. Oliver. 1991. Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Microbios* 67:141-149.
- Nakasone, N., M. Ikema, N. Higa, T. Yamashiro, and M. Iwanaga. 1999. A Filamentous Phage of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Isolated in Laos. *Microbiol.Immunol.* 43:385-388.
- Okuda, J., M. Ishibashi, S. L. Abbott, J. M. Janda, and M. Nishibuchi. 1997a. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J.Clin.Microbiol.* 35:1965-1971.
- Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997b. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J.Clin.Microbiol.* 35:3150-3155.
- Reddy, G.P., U. Hayat, C. Abeygunawardana, C. Fox, A.C. Wright, D.R. Maneval, Jr., C.A. Bush, and J.G. Morris, Jr. 1992. Purification and determination of

- the structure of capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus* M06-24. J.Bacteriol. 174:2620-2630.
- Sengupta, D.K., M. Boesman Finkelstein, and R.A. Finkelstein. 1996. Antibody against the capsule of *Vibrio cholerae* O139 protects against experimental challenge. Infect.Immun. 64:343-345.
- Stroeher, U.H., G. Parasivam, B.K. Dredge, and P.A. Manning. 1997. Novel *Vibrio cholerae* O139 genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis. J.Bacteriol. 179:2740-2747.
- Waldor, M.K., R. Colwell, and J.J. Mekalanos. 1994. The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91:11388-11392.
- Wong, H.C., S.H. Ting, and W.R. Shieh. 1992. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. J.Appl.Bacteriol. 73:197-202.
- Wong, H.C., W.R. Shieh, and Y.S.Lee. 1993. Toxigenic characterization of vibrios isolated from foods available in Taiwan. J. Food Prot. 56:980-982.
- Wong, H.C., C.C.Liu, C.M.Yu, and Y.S.Lee. 1996. Utilization of iron sources and its possible roles in the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol.Immunol. 40(11):791-798.
- Wong, H.C., K.T. Lu, T.M. Pan, C.L. Lee, and D.Y.C. Shih. 1996. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. J.Clin.Microbiol. 34:1535-1539.
- Wong, H.C., L.L.Chen, and C.M.Yu. 1995. Occurrence of vibrios in frozen seafoods and survival of psychrotrophic *Vibrio cholerae* in broth and shrimp homogenate at low temperatures. J.Food Prot. 58:263-267.
- Wong, H.C., P.Y. Peng, J.M. Han, C.Y. Chang, and S.L. Lan. 1998. Effect of mild acid treatment on the survival, enterotoxigenicity and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. Infect.Immun. 66:3066-3071.

- Wong,H.C., M.-C. Chen, S.-H.Liu, and D.-P. Liu. 1999a. Incidence of Highly Genetically Diversified *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood Imported from Asian Countries. *Int.J.Food Microbiol.* 52:181-188.
- Wong, H.C., C.Y. Ho, L.P. Kuo, T.M. Pan, T.K. Wang, and D.Y.C. Shih. 1999b. Ribotyping of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from food poisoning outbreaks in Taiwan. *Microbiol.Immunol.* 43(7):631-636.
- Wong, H.C., C.C. Liu, T.-M. Pan, T.-K. Wang, and D.Y.C. Shih. 1999c. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from food poisoning outbreaks in Taiwan by random amplified polymorphic DNA analysis. *J.Clin.Microbiol.* 37(6):1809-1812.
- Wong, H.C.,S.H.Liu, L.W.Ku, I.Y.Lee, T.K.Wang, Y.S.Lee, C.L. Lee, L.P.Kuo, and D.Y.C.Shih. 2000a. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from Food Poisoning Outbreaks during 1992-1995 in Taiwan. *J.Food Prot.* 63:900-906.
- Wong,H.C., S.H.Liu, T.K.Wang, C.L.Lee, C.S.Chiou, D.P.Liu, M.Nishibuchi, and B.K.Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl.Environ. Microbiol.* 66(9):3981-3986.
- Zuppardo, A.B. and R.J. Siebeling. 1998. An epimerase gene essential for capsule synthesis in *Vibrio vulnificus*. *Infect.Immun.* 66:2601-2606.

表 1、本研究所使用的腸炎弧菌菌株

Table 1. *Vibrio parahaemolyticus* strains used in this study.

strain no	serotype	outbreak-date	location	new rev3	TDHtiter	toxRS-PCR
New O3:K6 strains						
1092	O3:K6	5/13/97	Taichung	I5	256	ND
1094	O3:K6	5/13/97	Taichung	I1	ND	ND
1121	O3:K6	6/25/97	Miao-Li	I1	256	ND
1131	O3:K6	7/22/97	Yun-lin	ND	ND	ND
1132	O3:K6	7/22/97	Yun-lin	I1	512	ND
1134	O3:K6	8/17/97	Taichung	I1	512	ND
1137	O3:K6	9/7/97	Yun-lin	I5	256	ND
1211	O3:K6	Unknown	Unknown	I1	ND	ND
1285	O3:K6	5/4/99	Korea	I1	ND	+
1301	O3:K6	7/22/96	Taichung	I1	ND	+
Environmental strains						
1025	ND	11/22/97	Thailand	ND	0	ND
1036	ND	12/24/97	Hongkong	ND	0	ND
1051	ND	Unknown	Indonesia	ND	0	ND
1062	ND	Unknown	Hongkong	ND	0	ND
1074	ND	Unknown	Vietnam	ND	0	ND
1412	ND	Unknown	Italy	ND	ND	ND
1413	ND	Unknown	Italy	ND	ND	ND
1414	ND	Unknown	Italy	ND	ND	ND
Old O3:K6 strains						
1174	O3:K6	Unknown	Japan	A3	ND	ND
1180	O3:K6	Unknown	Japan	A3	ND	ND
1181	O3:K6	Unknown	Japan	A1	ND	ND
1182	O3:K6	Unknown	Japan	A1	ND	ND
1184	O3:K6	Unknown	Japan	A2	ND	ND
1304	O3:K6	8/11/96	Taichung	A8	0	-
New O3:K6-like strains						
1246	O4:K68	8/4/99	Japan	I12	64	+
1247	O4:K68	8/4/99	Japan	I2	64	+
1259	O1:K25	5/13/99	Kaohsiung	I1	64	+
1263	O1:K25	10/27/98	Singapore	I1	64	+

1264	O5:K68	10/27/98	Singapore	I10	64	+
1265	O5:K68	10/27/98	Kaohsiung	I10	64	+
1267	O1:K25	10/27/98	Kaohsiung	I1	32	+
1346	O1:K25	9/27/98	Taichung	I1	64	+
1347	O1:K25	9/27/98	Taichung	I1	128	+
1362	O5:K68	6/6/99	Taichung	I10	256	+
1363	O5:K68	6/6/99	Taichung	I10	128	+
1377	O4:68	7/5/99	Bangladesh	I10	256	ND

表 2、新 O3:K6 腸炎弧菌的小白鼠致死能力的試驗

Table 2. Killing of mice by new O3:K6 strains of *Vibrio parahaemolyticus*.

菌株	稀釋 倍數 10^N	注 射 至 死 亡 時 間 (隻/小時'分)						平均致死時間 (小時'分)
		1	2	3	4	5	6	
1092	0	1'30	4'00	4'15	4'30	4'30	4'45	4'24
	1	4'50	4'50	5'05	5'35	6'35	6'35	5'15
	2	5'40	6'40	8'25	9'10	10'40	11'25	8'40
	3	11'31	13'46	14'46	19'46	21'16	x	x
1121	0	3'45	4'00	4'00	4'30	4'30	4'45	4'15
	1	4'28	4'43	4'58	4'58	5'28	5'43	5'03
	3	8'37	8'52	9'52	x	x	x	x
1132	0	3'48	3'48	4'03	4'18	5'03	5'03	4'20
	1	3'57	3'57	4'27	4'42	5'27	5'42	4'42
	2	7'54	8'39	8'54	10'39	13'24	x	11'00
	3	8'50	9'35	11'20	13'50	x	x	x
1134	0	2'57	3'57	3'57	4'27	5'27	5'42	4'24
	1	3'53	4'08	5'08	5'23	5'23	5'23	5'05
	2	2'49	4'04	4'34	4'34	9'19	x	5'04
1137	0	5'40	5'55	5'55	6'40	6'40	6'55	6'17
	1	6'36	7'06	8'36	9'36	11'06	13'06	9'21
	2	8'46	11'29	13'01	14'16	x	x	x
ST550	0	3'27	3'46	3'50	4'11	4'15	4'10	4'12
	1	4'33	5'03	5'18	5'33	5'33	5'48	5'18
	2	6'24	6'24	7'09	7'24	7'39	7'39	7'13
	3	9'13	9'43	10'43	11'13	11'43	12'43	11'23
	4	10'23	10'53	11'08	15'23	x	x	x

當菌液為 0 稀釋度時其 OD_{600} 為一，經過 dilution plate count 方法計算菌數為每毫升 8Log 值，取 0.1ml 注射乳鼠。X，乳鼠在觀察時間內未死亡。

表 3 、新 O3:K6 腸炎弧菌的小白鼠致死能力

Table 3. The LD₅₀ values of different new O3:K6 strains of Vibrio parahaemolyticus.

菌株	PCR	LD ₅₀ ,Log 菌數
1092	+	5.61
1211	+	5.25
1132	+	5.49
1134	+	5.08
1137	+	6.98
ST550	ND	5.44
平均		5.68

PCR , 偵測新 O3:K6 型所專用之 PCR 反應。ND, not determined.

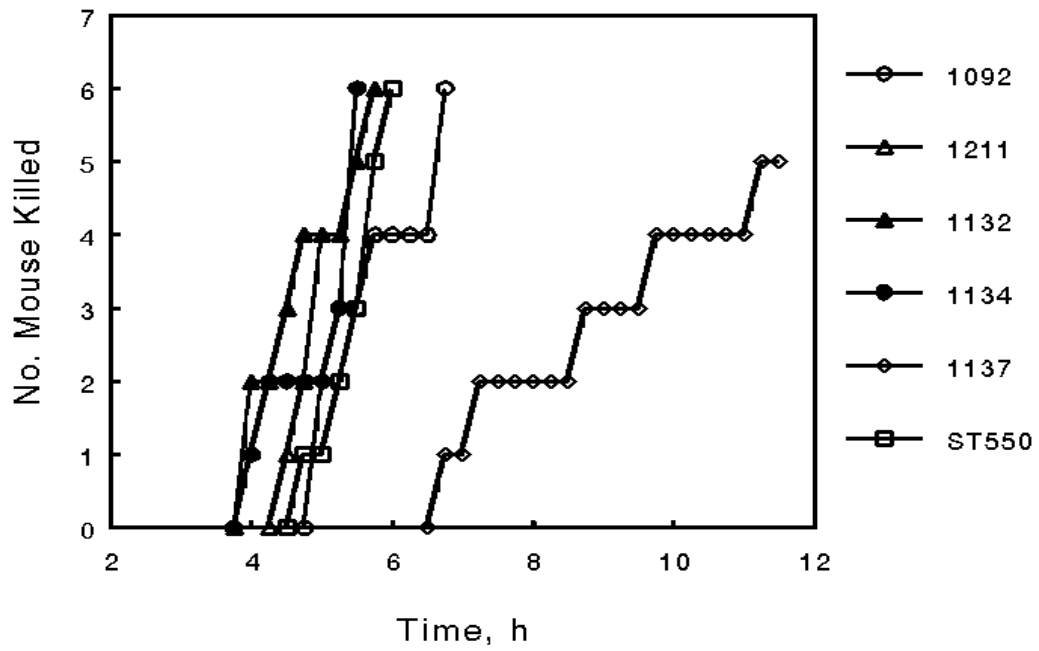


圖 1、新 O3:K6 腸炎弧菌小白鼠致死試驗

Fig. 1. Lethality of mice fed with different new O3:K6 strains of *Vibrio parahaemolyticus*.

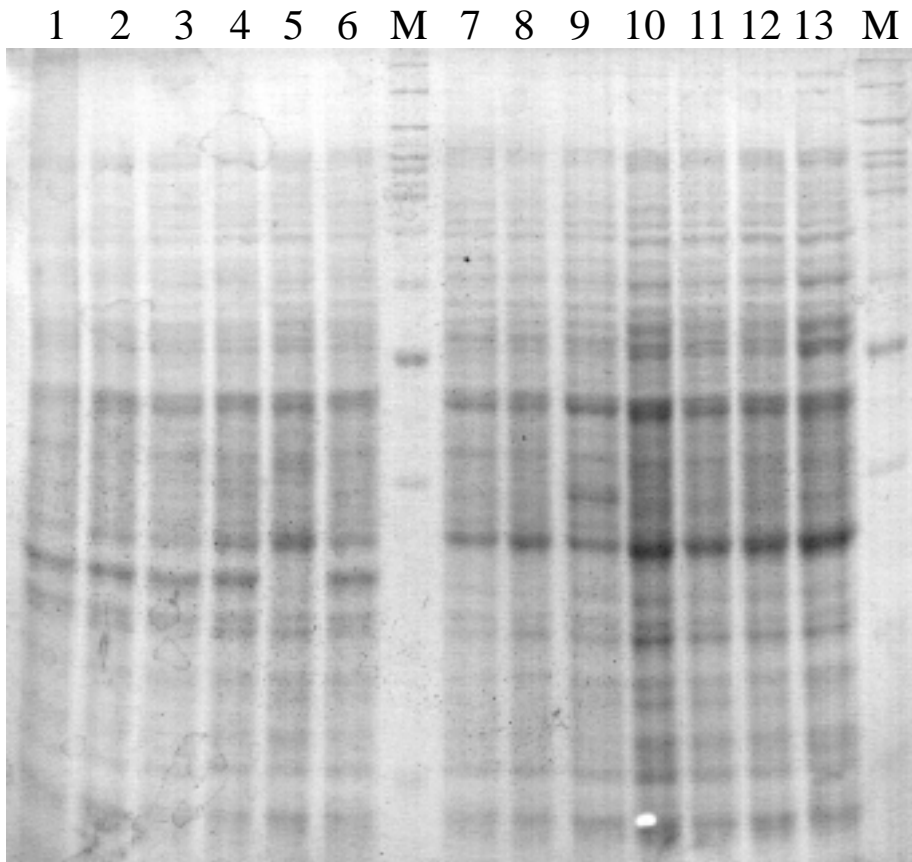


圖 2、腸炎弧菌新型致病菌株蛋白質經 coomassie blue 染色後之分析 (1)。

Fig. 2. Analysis of protein profile of different Vibrio parahemolyticus strains after coomassie blue staining (1).

Lane 1, 菌株 1094; 2, 1092; 3, 1121; 4, 1132; 5, 1134; 6, 1137; 7, 1181; 8, 1182; 9, 1184; 10, 1377; 11, 1363; 12, 1362; 13, 1265。 M, markers (Gibco BRL), 10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90, 100,120,160, 220kDa , 其中 20 和 50kDa 特別濃。
Lane 1-6, new O3:K6; 7-9, old O3:K6; 10-13, O3:K6-like strains。

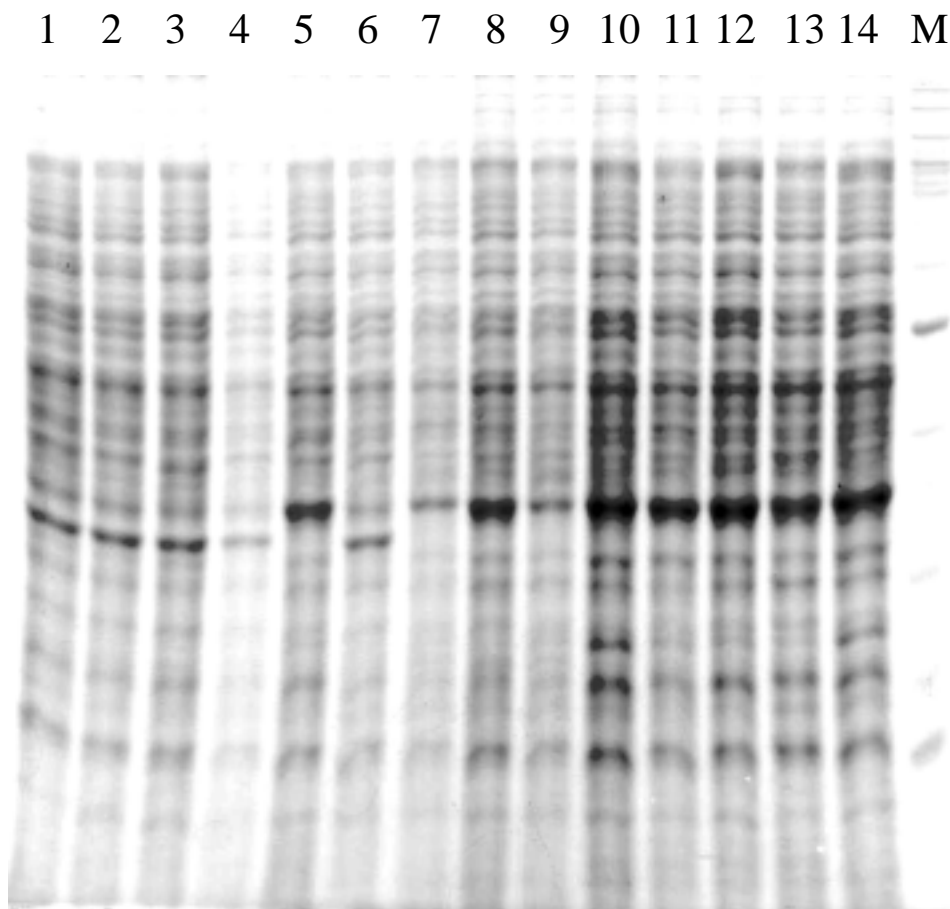


圖 3、腸炎弧菌新型致病菌株蛋白質經 coomassie blue 染色後之分析 (2)。

Fig. 3. Analysis of protein profile of different Vibrio parahemolyticus strains after coomassie blue staining (2).

Lane 1, 菌株 1094; 2, 1092; 3, 1121; 4, 1132; 5, 1134; 6, 1137; 7, 1181; 8, 1182; 9, 1184; 10, 1377; 11, 1264; 12, 1263; 13, 1259; 14, 1247。M, markers (Gibco BRL), 10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90, 100,120,160, 220kDa, 其中 20 和 50kDa 特別濃。
Lane 1-6, new O3:K6; 7-9, old O3:K6; 10-14, O3:K6-like strains。

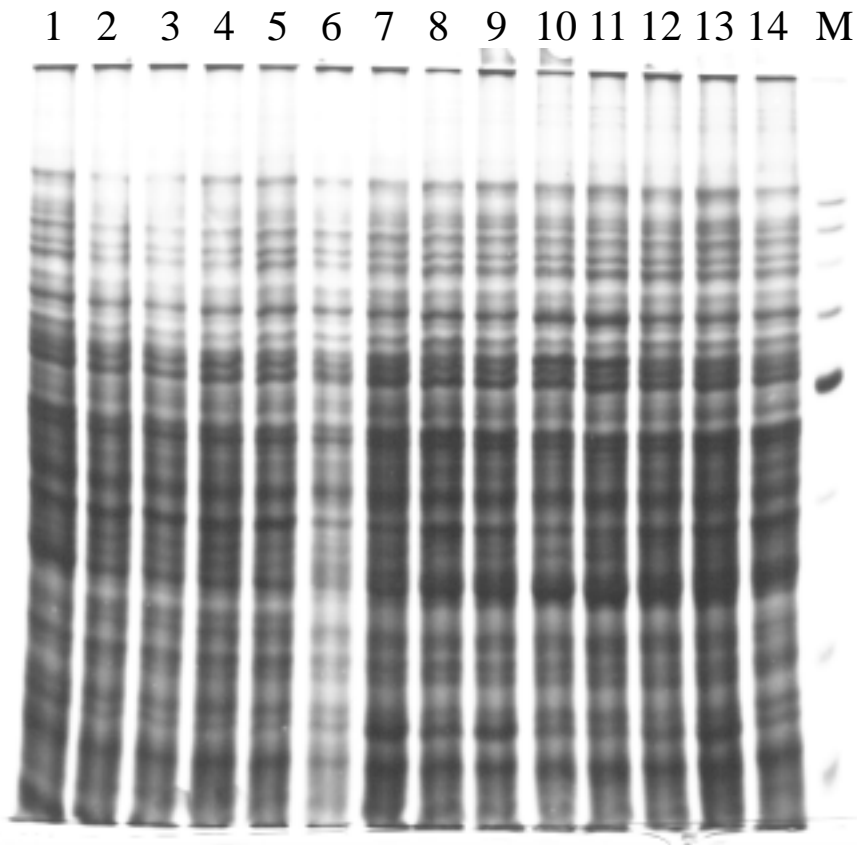


圖 4 腸炎弧菌新型致病菌株蛋白質經 coomassie blue 和 silver 染色後之分析(1)

Fig. 4. Analysis of protein profile of different *Vibrio parahemolyticus* strains after coomassie blue and silver staining (1).

Lane 1, 菌株 1134; 2, 1094; 3, 1092; 4, 1121; 5, 1062; 6, 1051; 7, 1025; 8, 1181; 9, 1182; 10, 1184; 11, 1377; 12, 1363; 13, 1263; 14, 1246。M, markers (Gibco BRL), 10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90, 100,120,160, 220kDa, 其中 20 和 50kDa 特別濃。
Lane 1-4, new O3:K6; 5-7, enviromental; 8-10, old O3:K6; 11-14, O3:K6-like strains。

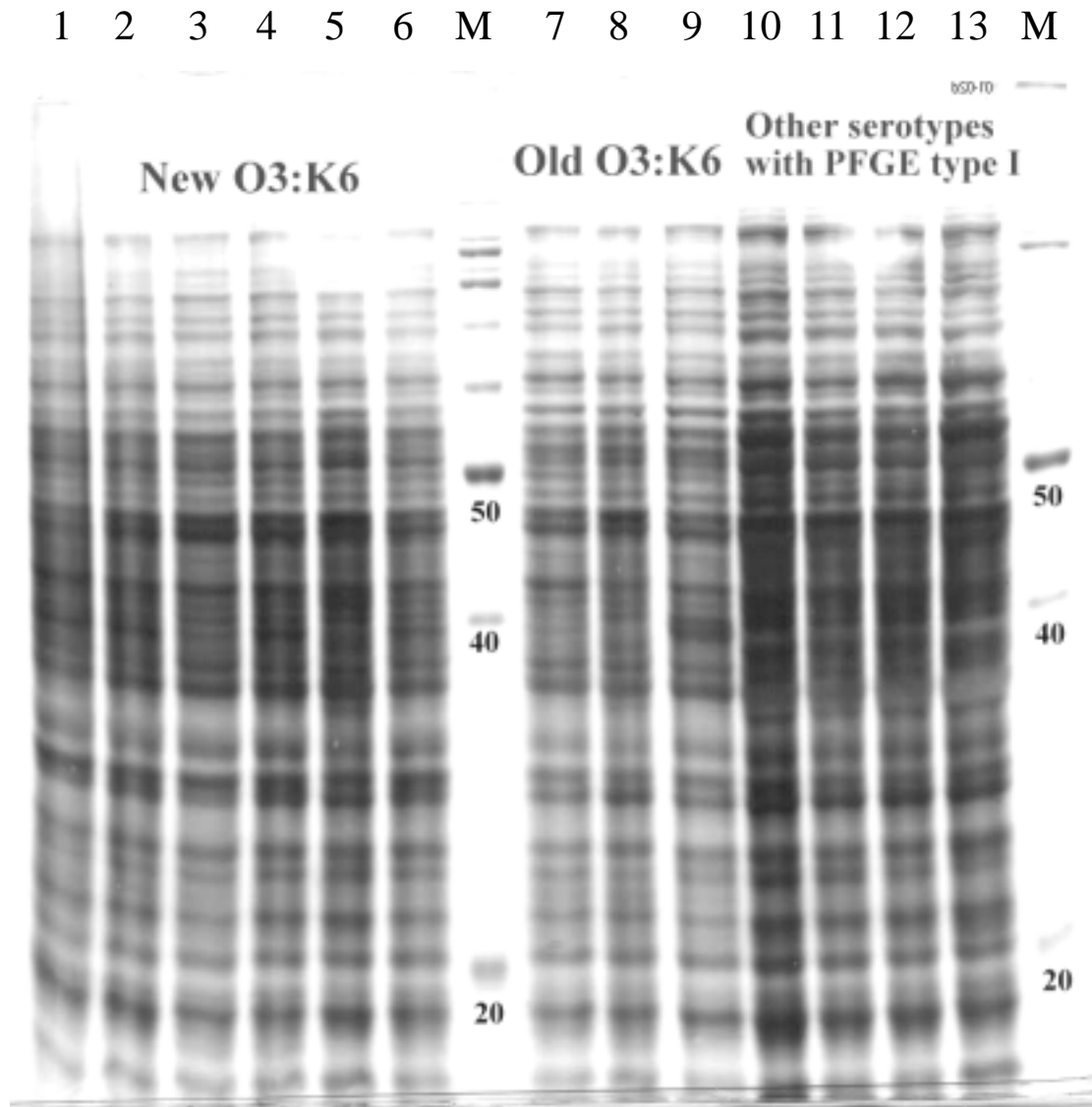


圖 5 腸炎弧菌新型致病菌株蛋白質經 coomassie blue 和 silver 染色後之分析(2)

Fig. 5. Analysis of protein profile of different *Vibrio parahemolyticus* strains after coomassie blue and silver staining (2).

Lane 1, 菌株 1094; 2, 1092; 3, 1121; 4, 1132; 5, 1134; 6, 1137; 7, 1181; 8, 1182; 9, 1184; 10, 1377; 11, 1363; 12, 1362; 13, 1265。M, markers (Gibco BRL), 10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90, 100,120,160, 220kDa, 其中 20 和 50kDa 特別濃。
Lane 1-6, new O3:K6; 7-9, old O3:K6; 10-13, O3:K6-like strains.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

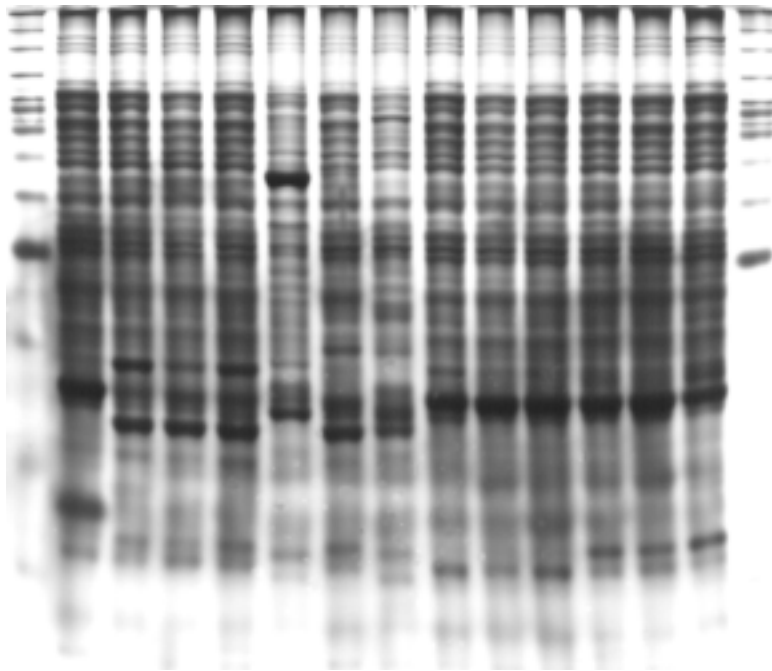


圖 6 腸炎弧菌新型致病菌株蛋白質經 coomassie blue 和 silver 染色後之分析 (3)

Fig. 6. Analysis of protein profile of different *Vibrio parahemolyticus* strains after coomassie blue and silver staining (3).

Lane 1, 菌株 1134; 2, 1121; 3, 1132; 4, 1137; 5, 1412; 6, 1413; 7, 1414; 8, 1377; 9, 1363; 10, 1362; 11, 1181; 12, 1182; 13, 1184。 M, markers (Gibco BRL), 10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,90,100,120,160, 220kDa , 其中 20 和 50kDa 特別濃。
Lane 1-4, new O3:K6; 5-7, environmental strain; 8-10, O3:K6-like strains; 11-13, old O3:K6。

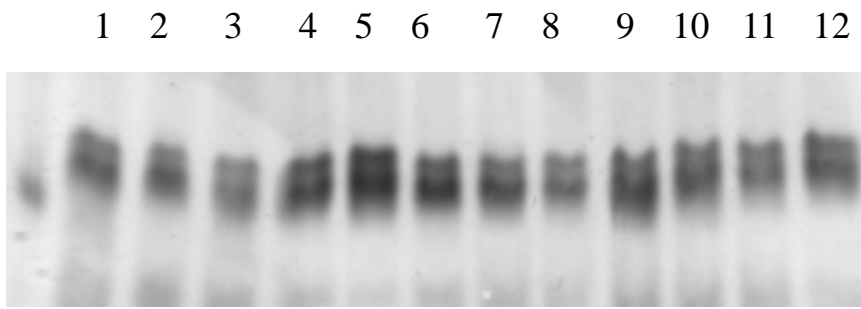


圖 7、腸炎弧菌 lipopolysaccharide 的電泳分析。

Fig. 7. Analysis of lipopolysaccharide of *Vibrio parahaemolyticus* strains.

Lane 1, 菌株 1094; 2, 1092; 3, 1121; 4, 1132; 5, 1134; 6, 1137; 7, 1181; 8, 1182; 9, 1184; 10, 1377; 11, 1363; 12, 1362。