

國立臺灣大學動物學研究所

碩士論文

Institute of Zoology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

天蠱素防治海鱸巴斯德桿菌症之適用性評估

Evaluation of Cecropin A, in Cobia (*Rachycentron canadum*)

Pasteurellosis Prevention

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a bell and two torches, surrounded by the university's name in Chinese and English. The text '國立臺灣大學' (National Taiwan University) is at the top, and '國家勳品' (National Merit) is at the bottom. The name '陳瑞谷' (Chen Ruei-Gu) is written across the bottom of the seal.

陳瑞谷

Ruei-Gu Chen

指導教授：宋延齡 博士

Advisor: Yen-Lin Song, Ph.D.

中華民國九十八年一月

January, 2009

## 誌謝

本論文得以完成，必須感謝許多人的幫助。

首先必須特別感謝動物所齊肖琪老師，以及齊老師實驗室的夥伴。因為，從實驗不可或缺的菌株和魚苗，都是經由齊老師的協助才得以順利取得，養殖空間也完全寄生在齊老師已經建置完善的感染室中，這方面問題沒法解決，還真不知道實驗該怎麼進行下去。還得特別感謝玉軒學長與宜鈞學妹，因為我在操作活體方面是完全的陌生，cobia這魚又特別不好養，因此從怎麼接魚到換水時機、觀察魚的狀況都得慢慢學，養魚很重要的確實是態度和原則，再來就是要認命這很花時間，雖說我們會互相留意一下彼此魚的狀況，但大部份還是在麻煩他們，實在很不好意思。怎麼抽血、進行腹腔感染與檢驗病徵也都是學長和宜鈞的指導，得之者眾，施之者寡，更別說我還常常去借東借西，從BHIA到無菌操作台等等，實驗能夠在時間內完成真的得感激齊老師家的全方面協助。

實驗室的戰友們閒聊則是抒解壓力之道，同時也帶給自己不少的啟發，讓自己重新思考面對實驗是否有偏見，聊著聊著，心情會好很多。夢怡學姐不僅是學問上豐富，人生的修養更是令我佩服，更是常常安撫我們三個碩士班小朋友的情緒，閒聊未來與人生，是詩琬學長離開後最佳的心靈導師；君儀是很聰明的學妹，微生物知識無人能及，常常是她教我的多；俊弘則是真正的戰友，兩個人都是剛退伍來念，更有當兵時的氣氛，不過俊弘的心地非常好，比起我來樂觀進取許多，擁有不計較的美德。

陳俊宏老師對待學生的真誠與關懷，我在大學部時其實不太懂，只知道老師的實驗室充斥著有趣的事，念了這個碩士才有深刻的感觸，老師對我的寬容我會永遠感激的。

最後，感謝潛藏在這間系館的學長姊們與我的大學同學，沒有你們，我找不到這麼多的協助，借不到這麼多儀器，也感謝生科系壘球隊的大家，每個禮拜可以去盡力發洩一下累積的怒氣，對身體很好。

## 摘要

巴斯德桿菌 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) 是台灣箱網養殖海鱺 (*Rachycentron canadum*) 主要的細菌性病原菌，感染力與致死率均高，以抗生素為主的治療方式已出現不少抗藥性的案例。天蠶素是一種發現已久的抗菌肽，由37個胺基酸組成簡單的雙極性 $\alpha$ 螺旋結構，具有廣效的殺菌作用。目前普遍認為其殺菌機制為膜電位喪失、裂解細菌細胞膜、滲透壓失調或胞質流失，是一種細菌不易產生抗性的殺菌機制。

天蠶素對巴斯德桿菌的最低抑菌濃度約為0.7  $\mu\text{M}$ ；天蠶素對巴斯德桿菌的最低殺菌濃度與半致死劑量經平板計數測定分別為0.9  $\mu\text{M}$ 和0.7  $\mu\text{M}$ ；天蠶素殺死巴斯德桿菌所需的時間經平板計數發現會隨著天蠶素濃度增加而縮短。利用錐藍排開法測定64  $\mu\text{M}$ 的天蠶素對海鱺肌肉細胞作用8小時才會產生細胞毒性；利用血紅素吸光值測定天蠶素對海鱺紅血球的半溶血效應濃度 (effective concentration,  $\text{EC}_{50}$ ) 遠大於1000  $\mu\text{M}$ ；上述結果顯示天蠶素對海鱺細胞傷害力低，會差異性選擇巴斯德桿菌而裂解。

以抑菌圈分析法發現海鱺胃粗萃取液不會影響天蠶素抑菌活性，但前腸的粗萃取液會使天蠶素活性與時遞減，作用兩小時後已偵測不出，顯示天蠶素在海鱺腸道中不穩定。天蠶素在血液中亦不穩定，推測可能是遭血中蛋白酵素的分解，這使得天蠶素將無法藉由血液送至表皮等感染點。

將天蠶素與巴斯德桿菌同時注射入海鱺腹腔，12小時後追加天蠶素，七天內海鱺存活率為100%，未注射天蠶素的感染組存活率為25%，統計分析顯示兩組存活率有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。海鱺同時注射天蠶素與巴斯德桿菌但未追加注射天蠶素組存活率為44%，未注射天蠶素的感染組存活率為17%，兩組存活率無顯著差異。天蠶素與巴斯德桿菌同時灌食，僅每尾魚 (體重20 g) 灌食2 mg天蠶素組的存活率 (75%) 與感染組存活率 (0%) 比較才有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。建議海鱺遭受巴斯德桿菌感染時，需即時給予高劑量天蠶素才能徹底殺菌、顯著減少死亡。包裹之天蠶素即便在腸道中釋放亦沒有預期殺死巴斯德桿菌的效果。

總結，天蠶素在離體實驗上殺菌劑量低且需時短，對巴斯德桿菌十分有效；但在活體實驗上對酵素不穩定易失去活性。除非受感染當下即時注射並追加天蠶素、或餵食高劑量天蠶素才可顯著降低海鱺被巴斯德桿菌感染所造成的死亡率。

關鍵詞：海蠶、天蠶素、巴斯德桿菌、酵素、活體實驗



## Abstract

The major bacterial pathogen of cage-cultured cobia (*Rachycentron canadum*) in Taiwan is *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, which is highly infectious and causes massive mortality. Resistance of the bacteria in field against antibiotics had reported. Cecropin A is a wide-spectrum antimicrobial peptide with 37 a.a., and structured as a simple amphipathic alpha-helix. The killing mechanism of cecropin is thought to lyse bacterial cell membrane, causing permeability unbalanced or cytoplasm loss. Acquisition of resistance may thus involve alternation of bacterial membrane composition, which may be more complex than a single step mutation.

In the present study, the minimal inhibition concentration of cecropin to *Ph. damsela piscicida* was demonstrated to be nearly 0.7  $\mu\text{M}$ . Measured by plate counting, minimal bactericidal concentration and  $\text{LD}_{50}$  were 0.9 and 0.7  $\mu\text{M}$  respectively. Killing *Ph. damsela piscicida* by cecropin was concentration-dependent measured by plate count. Evaluated by trypan blue exclusion, there was a significant cytotoxicity of cecropin to cobia muscle cells until 64  $\mu\text{M}$  after 8 hours treatment. Hemolysis effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of cecropin to cobia erythrocytes was more than 1000  $\mu\text{M}$ . Conclusively, cecropin is showed considerably selective for *Ph. damsela* subsp. *piscicida* over cobia cells.

With inhibition zone assay, the observed bacteriostatic activity of cecropin was not changed after 4 hours incubation with cobia stomach crude extraction, but the bacteriostatic activity disappeared gradually within 2 hours incubation with intestine crude extraction. This suggests that cecropin is not stable in cobia intestine. Antibacterial activity of cecropin was unstable in cobia blood matrix especially whole blood and plasma. Loss of antibacterial activity may be due to protease digestion. This instable property limits efficient transportation of cecropin to infected area, such as skin, in blood.

To test the protection in an *in vivo* experiment, we introduced *Ph. damsela* subsp. *piscicida* and cecropin concurrently by intraperitoneal (*i.p.*) inoculation. Survival rate was 100% when we boost the same dose cecropin 12 hr after infection. In the infection control without giving any cecropin, survival rate was 25%. Survival rate in boost group compared with infection control group was significantly higher ( $p < 0.05$ ). But the survival rates of just one time *i.p.* injection of cecropin and infection control were 44% and 17%, and there was no significantly increase.

To test the protection in the feeding experiment, we introduced pre-mixed *Ph. damsela* subsp. *piscicida* and cecropin (or encapsulated cecropin) into esophagus by plastic tube. The survival rate in which every 20 g fish fed 2 mg cecropin was 75%, significantly higher than infection control (0%,  $p < 0.05$ ). We suggested inoculating high dose cecropin concurrently to cobia infected by *Ph. damsela* subsp. *piscicida* can completely kill bacteria and significantly reduce death rate. The bactericidal activity of released cecropin from capsulated particle was not appeared as our purpose.

The bactericidal activity of cecropin to *Ph. damsela* subsp. *piscicida* was powerful *in vitro*, with low working concentration and rapid effect. But cecropin was not stable to enzymatic digestion and easily to lost bactericidal activity *in vivo*. The death rate can significantly reduce unless we boost cecropin by *i.p.* injection or feed high dose cecropin concurrently to cobia infected by *Ph. damsela* subsp. *piscicida*.

Key words: cobia, cecropin, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, enzyme, antimicrobial peptide, evaluation



# 目 錄

頁數

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖表目錄.....	vi
序言.....	1
文獻回顧.....	2
材料與方法.....	16
結果.....	23
討論.....	29
表.....	34
圖.....	39
參考文獻.....	50



## 圖表目次

頁數

表

Table 1 Pathogens of cobia found in Taiwan .....	34
Table 2 Characteristics of some digestive protease in fish.....	35
Table 3 Amino acid sequence of cecropin A and the acting sites of fish protease .....	36
Table 4 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> strains used in the present study.....	37
Table 5 Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of cecropin for <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> strains.....	38

圖

圖一 天蠶素對巴斯德桿菌的半致死劑量 ( $LD_{50}$ ) .....	39
圖二 天蠶素對巴斯德桿菌的殺菌時程.....	40
圖三 天蠶素對海鱷紅血球的溶血活性與對海鱷肌肉細胞株的毒性.....	41
圖四 海鱷消化道粗萃取液對天蠶素抑菌活性的影響.....	42
圖五 牛胰蛋白酶會使天蠶素抑菌活性消失.....	43
圖六 海鱷血液會使天蠶素抑菌活性消失.....	44
圖七 活體實驗腹腔注射結果.....	45
圖八 活體實驗餵食結果.....	46
圖九 巴斯德桿菌PCR-RFLP鑑定結果.....	47



圖十 活體實驗腹腔注射魚隻死亡日程圖·····	48
圖十一 活體實驗餵食部份魚隻死亡日程圖·····	49



## 緒言

人類發現抗生素已有半個世紀，降低了細菌性疾病對生命財產所造成的傷害與損失。然而，近四十年來，細菌產生抗藥性的報導持續不斷，研發以醫療用的新抗生素卻很少，未來，在面對日益猖獗的多重抗藥菌我們可能將束手無策。水產養殖與畜牧業也大量使用抗生素對抗細菌性疾病，因為缺乏規範與約束，抗藥性基因經由食物鏈或是病菌間共域轉移的結果，更使得許多一線的抗生素被迫退出人類醫療體系。新抗生素研發的滯礙與抗藥性問題層出不窮促使了抗菌胜肽站上舞台，不斷有新的抗菌胜肽被發現，學者們也不斷篩選與測試抗菌胜肽的能耐，以及實用的方法，以期面對多重抗藥菌時足以應對。

本研究分成兩部份，一是先在離體評估天蠶素的抗菌活性，研判有沒有進行 *in vivo* 實驗的價值，並獲取 *in vivo* 實驗需要的參數與資訊，以期可以設計較可能成功的使用方式；第二部份則為魚體內實驗。

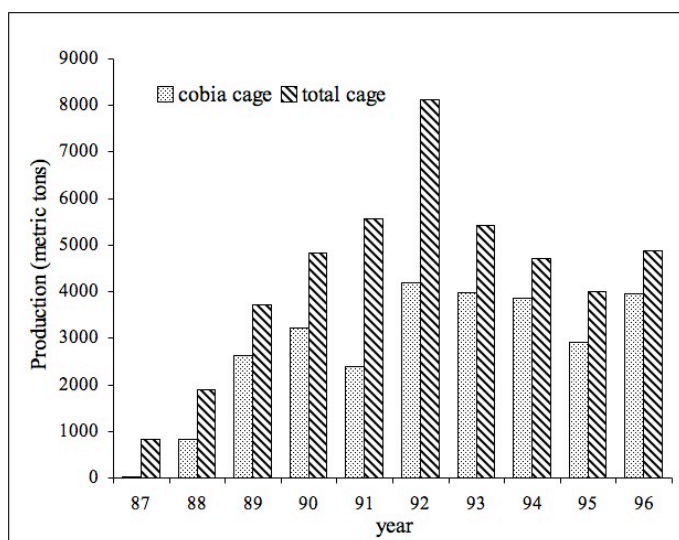


## 文獻回顧

### 養殖海鱺概況與主要疾病

海鱺 (*Rachycentron canadum*) 屬於海鱺科，在分類上僅一屬一種，是一種分佈很廣的大洋性魚類，廣泛分佈於熱帶與亞熱帶水域，從印度太平洋到南大西洋海域都可以發現他的蹤跡。海鱺的肉質為白肉且口感佳，換肉率高，生長速度很快，一年到一年半可以長成上市 (6~8公斤)，約兩年後即性成熟可人工繁殖，挪威的鮭魚卻需三年才能長成上市 (5公斤)。相對於其他魚種來說，更可以耐受環境壓力而可高密度養殖，成為未來最被看好的潛力養殖魚種。在台灣，海鱺的養殖在民國79年就已經開始，在86年因人工繁殖突破，開始可以大量生產仔魚以供陸上養殖場與近岸箱網養成使用。在魚苗生產技術成熟下，海鱺的養殖是越來越發達，現在全部是以海水箱網養殖的方式畜養在近海，部份漁獲內銷，大部份則是外銷，主要是賣到日本 (Liao *et al.*, 2004)。

因為陸域面積狹小加上淡水資源遭受污染，且來源有限，箱網養殖在台灣是越來越興盛，雖然許多海水魚種都適用於箱網養殖，海鱺以其快速成長、較低的生產成本與高價位，從民國93年起年總產量約佔七到八成，成為台灣海水箱網養殖的主要物種，海鱺可說是箱網養殖的代名詞。海鱺的產量在88年是820公噸，到90年成長到3224公噸，但在91年因為疾病大爆發與颱風，又減少到2395公噸，92-94年皆維持在4000公噸左右，95年又降至3000公噸 (見下圖，資料來自漁業署87-96年報)。



以往有關於野生海鱺的疫病報導很少，但近年來，如同其他新興的養殖魚種，有關養殖海鱺疾病爆發的報導時有所聞，部分疾病也導致了2002年產量大大幅滑落，使得相關單位開始研究有關的病原、傳染途徑與防治方法（Liao *et al.*, 2004）。Lin *et al.*（2006）提到，在海鱺養殖的所有階段都有疾病的發生，特別是小於四個月的幼魚（小於500 g），這些病原包括病毒性、細菌性與寄生蟲。

依據澎湖縣家畜疾病防治所在86至91年間在澎湖的病例統計結果，箱網養殖的主要病原以細菌為主，佔63.3%，其次是寄生蟲，佔28.57%，接下來則是病毒的感染，佔7.47%，黴菌感染的病例僅有偶發的幾例；蔡信雄在89年1月至92年6月針對海鱺在南部的病例統計也有類似的結果，同樣以細菌性疾病最多（50.60%），寄生蟲次之（26.20%），緊接著仍是病毒性疾病，佔18.6%。

在細菌性疾病方面，蔡信雄指出，分離鑑定出的病原以*Photobacterium damsela* spp. *piscicida*最多，佔65.5%，而後依序為產氧單胞菌（*Aeromonas hydrophila*，20.7%），瓶鼻海豚鏈球菌（*Streptococcus iniae*，11.5%），弧菌症（*Vibrio* sp.）與產黃桿菌（*Flavobacterium columnaris*）所佔比例皆為8.1%。從這個統計結果可以看出，感染海鱺的細菌除鏈球菌外，其餘皆為格蘭氏陰性菌。在寄生蟲方面，主要以白肌蟲、車輪蟲與卵圓鞭毛蟲為主。病毒則仍以海水魚常見的虹彩病毒為最大宗。

這些疾病當中，以細菌性疾病最為嚴重，尤其是*Photobacterium damsela* spp. *piscicida*的感染力與死亡率均高，嚴重時死亡率可達50-80%（古等，2001）。針對這些細菌性病原已有不少研究單位開始發展疫苗。另外在免疫賦活劑方面也有所進展（Leaño *et al.*, 2003）。但是目前主要防病對策仍為早期診斷與正確餵食抗生素，但也已經出現不少抗藥性的報導（古等，2001）。

### 細菌性疾病

魚類細菌性疾病廣泛發生於全球各地，是海水、半海水與淡水養殖魚蝦貝類最嚴重的疾病之一，同樣在國內養殖業也不斷遭受細菌性疾病爆發而蒙受損失，對產業造成嚴重威脅。以往以各式弧菌症最為頻繁（劉等，2005），依蔡信雄在2000-2003年間在台灣南部的病例調查統計，海鱺細菌性疾病的案例約佔

所有疾病的50.6%，主要有巴斯德桿菌、嗜水氣單胞菌、瓶鼻海豚鏈球菌、弧菌與產黃桿菌等，當中以巴斯德桿菌最多，佔65.5%，而後依序為嗜水氣單胞菌（20.7%），瓶鼻海豚鏈球菌（11.5%），弧菌症與產黃桿菌所佔比例皆為8.1%。

台灣養殖海鱺最易發病而引起大量死亡損失的階段是在幼魚由陸上養殖池送至海上箱網階段，一方面可能是輸送過程緊迫造成免疫力下降，一方面則是面對新環境尚未完全適應（劉等，2005）。

#### 巴斯德桿菌（*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*）

屬於格蘭氏陰性菌，舊名*Pasteurella piscicida*，因此所造成的病徵通稱為巴斯德桿菌症，會引起細菌性敗血症。此細菌在許多野外及養殖海水魚種均造成大量的死亡，在世界各地都有案例報導，西班牙的Magariños研究此菌已有相當長的時間，詳細的菌種特性介紹請見作者在1996年發表的文獻（Magariños *et al.*, 1996）。在此摘錄部份重要內容：巴斯德桿菌造成的死亡率往往都超過50%，造成嚴重的經濟損失。在受感染的魚體表外部的特徵並不明顯，一般不會有潰爛的現象出現，只有少數會有體色變黑的現象或是在頭部與鰓有輕微出血，所以無法從外觀判定病魚是否遭受巴斯德桿菌感染。經解剖後，內部器官的病變會有急性與慢性的不同，但是仍舊沒有一個徵狀足以斷定為巴斯德桿菌症。在急性感染時，整體說來只看得出一些病理上的改變，而在組織學上，在肝、腎、脾會出現壞灶，在微血管與組織間隙可以看到細菌的聚集（吞入許多細菌的吞噬細胞彼此聚集或是細菌自成菌落）。慢性感染的徵狀為在許多內部臟器（如腎與脾）出現直徑約0.5-3.5 mm的白色結節，但也不是所有病魚皆會出現。本菌可以在寄主巨噬細胞的吞噬胞中生存而不會被降解掉，當巨噬細胞移行時就有可能造成病菌擴散至其他器官。另一個造成寄主死亡的傷害則是造成鰓部細胞死亡進而影響呼吸功能。目前的證據與研究結果，並沒有辦法得知確切的感染途徑與散播模式。巴斯德桿菌似乎沒有寄主專一性，經由人工感染實驗指出，巴斯德桿菌感染力非常強，不只是針對原本分離出該菌的寄主魚種，對於其他魚種也有很強的感染力與毒性。

Do Vale *et. al* (2005 and 2007) 研究發現，巴斯德桿菌會分泌一種外毒素，稱為AIP56，本基因攜帶在質體上，是一個56 kDa的蛋白質，僅毒性株會分泌，非毒性株則不會。AIP56的主要作用是引起寄主的巨噬細胞與嗜中性球等吞噬細胞進行細胞凋亡（apoptosis），衰弱了寄主清除細菌的能力而利於巴斯德桿菌擴展，造成敗血症。當太多吞噬細胞進行細胞凋亡，產生太多細胞凋亡體，吞噬細胞來不及清除，凋亡體破裂後，釋放太多細胞激素至血液中，這當中許多分子都會對組織造成傷害，也會引起更多免疫細胞死亡，作者將這個過程稱為post-apoptotic secondary necrosis，這是一個非常有效率且會自我放大的機制，可以由血液中caspase-3與neutrophil elastase大量增加得知。最終寄主因多重器官衰竭而死亡。

目前用於巴斯德桿菌診斷的商用套組包括API-20E system、BIONOR system。在API-20E的核心目錄中，並沒有巴斯德桿菌的資料，但是因為不同分離株的巴斯德桿菌經分析後都會出現相同的訊號模式 (no. 2 005 004)，不會有錯誤產生，因此仍可以使用。BIONOR則是Norwegian diagnostic company的商業產品，利用EIA的方式，是目前現行最快速（1 hr）且正確性高的檢測方法，可專一性的檢測巴斯德桿菌（<http://www.bionor.com/>）。

本菌是箱網養殖海鱺幼魚最易感染的疾病，特別是當時序轉入冬季之初，大流行時會造成嚴重的損失，與弧菌症並列台灣養殖海鱺兩大感染性細菌（Liao *et al.*, 2004）。Tung *et al.* (2000) 第一次發表本菌在台灣海水箱網養殖海鱺流行的報告，該次大爆發主要是1999年九月十月發生在屏東，主要是感染剛由陸上育苗池送進近海箱網兩週的幼魚（約30 g），在嚴重感染的案例中，可以造成99%的幼魚死亡，受感染的魚外表沒有任何明顯的臨床症狀，解剖後發現脾臟與腎臟上出現白色結節。本次分離株的半致死劑量為22 CFU/g fish。

在2001年，古鎮鈞教授也對澎湖海水箱網養殖海鱺巴斯德桿菌症做了詳細的病原分析、檢測與流行病學研究，並提出了一套快速檢測與給藥的防治方法，該文中建議，對於可能感染的案例，立即進行病理解剖觀察肝、脾是否出現腫大與白點，同時由脾及腎臟進行細菌分離培養後，立刻進行藥物敏感性測試，以建議養殖業者適當用藥，最後才進行鑑定工作，該文中亦提及，受感染的海鱺痊癒後若可以長成至500公克就算脫離危險期，大苗抵抗力較小苗強。較不幸

的消息是，因大量使用抗生素結果，在調查過程中已經發現一種抗生素若平常隨意使用則隔年就失效。

Liu *et al.* (2003) 針對巴斯德桿菌的致病力來探討，發現該分離株的胞外分泌物具有分解酪蛋白、磷脂質、脂質的酵素活性與溶血能力，胞外分泌物對於海鱸（10 g）半致死劑量為1.26 µg/g fish，該分離株對於海鱸（10 g）的半致死劑量為1.03 x 10<sup>4</sup> CFU/g fish。

### 巴斯德桿菌可能的傳染途徑

Magariños在1996年針對巴斯德桿菌的文獻回顧中有提到，對於巴斯德桿菌的感染途徑尚沒有定案，只能依一些現象來猜測。第一點是巴斯德桿菌脫離魚體後只能在海水中存活約四到五天，但是卻可以休眠的方式存在水體中更久，一旦有機會接觸宿主即可恢復正常生理狀態而具有感染力，因此水體是不可忽略的感染途徑。在幾個爆發案例中，即懷疑是因為水體中菌濃度太高引起，同時，浸泡感染實驗也證實活菌可以經水體感染魚體。第二點是巴斯德桿菌亦可以餵食高濃度帶菌雜魚或是病、死魚而感染健康魚，表示腸胃道黏膜也可能是入侵管道之一。螢光標定追蹤發現巴斯德桿菌可以經由鰓與表皮直接入侵魚體。

Magariños在體外實驗時，發現巴斯德桿菌對魚腸黏膜組織附著力相當高，但巴斯德桿菌對許多魚類細胞株（Epithelioma papillosum of carp, chinook salmon embryo, rainbow trout mesothelioma and striped bass larvae）附著力與侵入力均弱（Magariños *et al.*, 1996-2）。但該文章並沒有對其他組織（如鰓、表皮等）的附著力提出研究成果以供比較，而同樣的，也沒有提出巴斯德桿菌對腸表皮細胞株附著力與入侵力均高的證據。

古鎮鈞（2001）提到死亡的小海鱸不會浮在水面上，而是沉在箱網底部，當發現魚群總食量下降且出現體色變黑個體時要派人潛水下去檢查，清除死魚，以免死魚中的細菌不斷散佈出來。表示水體確實是巴斯德桿菌感染途徑之一，同時，養殖魚的體表受傷者易感染。

Sea bass（2-5 g）以浸泡方式給予免疫原巴斯德桿菌時，發現主要的免疫反應是由鰓來執行，產生的抗體分泌細胞（antibody secreting cells）相對於頭腎與脾臟來得多，表示以浸泡方式給予疫苗（巴斯德桿菌）並不易引起全身性免疫

反應。腸道的免疫反應強度與頭腎和脾臟相近，顯著低於鰓。這表示鰓在浸泡給予疫苗時是主要的免疫反應器官，相對的，全身性的免疫反應（脾臟和頭腎）並不易由浸泡方式活化。在Santos研究中，也認為在浸泡給予疫苗時，鰓和皮膚是主要接受抗原的地方，這些抗原僅有很少量會被後送至脾臟與頭腎，這也說明了為何血清中抗體濃度幾乎沒有改變，支持了黏膜組織中的抗體並不是經由血液運送過來而是黏膜組織中的免疫細胞製造的說法。最後，基於鰓部有明顯強於頭腎、脾與腸道的免疫反應產生，作者認為鰓部應該是魚類在自然感染下重要的免疫器官（Santos *et al.*, 2001）。

巴斯德桿菌亦可經帶原卻無症狀的種魚傳給子代（gilthead seabream），在水溫低時（15°C）子魚死亡率低，但當水溫升到18-20°C時就易發病，死亡率升高，養殖時維持魚種生長於低水溫有助降低死亡率（Magariños *et al.*, 2001）。

在研究三種海水魚（turbot, seabream and seabass）的體表皮膚黏液時，發現turbot的黏液可以抑制巴斯德桿菌的生長，但是seabream和seabass的黏液都不行，但巴斯德桿菌對三種魚的黏液都有很強的附著力。暗示了巴斯德桿菌是可以黏附於體表皮膚後入侵宿主，但這並不是巴斯德桿菌唯一的入侵機制，因為turbot的黏液對巴斯德桿菌有抑制作用，巴斯德桿菌雖可附著卻沒有辦法感染。Magariños統計發現，在目前已知對於巴斯德桿菌易感的魚種（有爆發文獻報導者）中，在歐洲，最常見的即是seabream和seabass，而不是turbot（Magariños *et al.*, 1995）。

Fouz *et al.*（2000）發現同種但不同亞種的*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*是透過水體傳染，而且皮膚就是入侵的門戶。作者以turbot and eel這兩種魚種分別浸泡不同濃度的巴斯德桿菌培養懸浮液進行感染，與腹腔感染法皆有典型的症狀。進一步研究發現*P. damsela damsela*對這兩種魚體表黏液的附著力同樣很高，而這兩種魚的體表黏液同樣沒有辦法抑制*P. damsela damsela*的生長，呼應了上述Magariños在1995年的發現。

綜合以上，可以確定巴斯德桿菌是經由水體傳染，可能的入侵門戶則包括體表與鰓，若食入細菌污染食物，腸道似乎也是可能的途徑，只是證據較薄弱且不知道自然狀況下會不會發生，在幾個疫病爆發描述中，並沒有聽說有取食病重衰弱個體現象，也沒有懷疑過是飼料的問題，台灣案例亦是，可能是食物衛



生這一環已相當重視。

### 巴斯德桿菌防治現況

巴斯德桿菌症被視為是全世界海水養殖最具威脅性的細菌性疾病之一，因為巴斯德桿菌的寄主廣泛無專一性、感染後死亡率高、廣佈全球沒有地理區隔、廣佈的抗藥性與缺乏有效的疫苗（Barnes *et al.*, 2005）。Romalde（2002）提到，在1980年以前，巴斯德桿菌症有不少抗生素可用於疾病控制，但隨著抗藥性增加，例如ampicillin和tetracyclin等都失去藥效，新的化學藥劑則以florfenicol和phosphomycin可用於控制巴斯德桿菌症的擴散，但是，如前所說，巴斯德桿菌症有一段時間是躲在巨噬細胞中，這些抗生素並沒有機會作用，由此，疫苗的發展仍是最好的防治方法。古等（2001）則提到在澎湖箱網養殖的海鱺感染巴斯德桿菌時會先以綠黴素處理，若無效則改用歐索林酸或SXT，flumequine和amoxiciline也有效，但使用幾次後綠黴素與氧化四環黴素都出現抗藥性現象，因此用藥前能先進行藥物敏感性測試為佳。

在疫苗方面，Hastein *et al.*（2005）提到，目前已有包含細胞性與可溶性抗原的死菌疫苗問世，可用於浸泡與腹腔注射，最有效的方式則是以油作為佐劑；sea bass和sea bream是主要以疫苗方式對抗巴斯德桿菌症的魚種，疫苗方式則為浸泡兩次，當魚約50 mg時浸泡第一次，一個月後追加浸泡一次；也有人提出可於2 g時以口服方式再追加一次以增加疫苗保護效果，目前已有五個國家（希臘、義大利、西班牙、土耳其與挪威）使用，且使用比例逐漸增加，約有50%的養殖魚有接受疫苗保護，但在義大利有效果不好的報導出現。活菌減毒疫苗也在發展當中（Romalde, 2002）。

疾病的爆發現在仍舊是台灣養殖海鱺面臨最大的衝擊，面對這些疾病的挑戰，目前主要防治法為適時使用有效的抗生素，研究方向主要有疫苗研發，針對主要的病原，包括巴斯德桿菌（Lin *et al.*, 2006; 劉秉忠等，2005）、溶藻弧菌（Lin *et al.*, 2006; 劉秉忠等，2005）、創傷弧菌（Lin *et al.*, 2006）與鏈球菌（Liao *et al.*, 2004），目前仍持續努力研發中；另外一個方向則是免疫賦活劑，用來強化魚體內非專一性的免疫反應，包括 $\beta$ -glucan and levamisole（Leaño *et al.*, 2003）等等；培育選種出更具抗病力的魚苗也可以有效減少因疾病造成的損

失，同時生長速度或效率更高也可以減少成本；另外一個重要的政策則是建立防疫體系，官方與業者合作，持續加強監控可能爆發的疾病流行，以期早期發現，儘速阻斷病原擴散的路徑，以減少損失（Liao *et al.*, 2004）。也有人提出階段性養殖，將幼魚在陸上較易控制環境馴養至具有較佳免疫抵抗力時再進入箱網來養殖，國外也不斷有研究如何在岸上可以高密度方式來養殖。

### 抗菌胜肽（antimicrobial peptides）與天蠶素（cecropin A）

抗菌胜肽是一種演化原始的武器，是許多不同組織和不同類型細胞都會製造出來的分子，種類繁多，普遍存在於各種無脊椎動物、植物和脊椎動物中，甚至許多單細胞生物也會分泌。這類分子屬於固有免疫系統（innate immunity），可以幫助宿主對抗環境中的微生物感染，目前發現的抗菌胜肽約一千多種。大部份抗菌胜肽是雙極性且帶正電荷的，這帶正電的特性有助於抗菌胜肽和細菌帶負電的細胞膜結合。部份抗菌胜肽是以破壞細菌細胞膜系的完整而達到殺菌目的，但部份的抗菌胜肽則會影響細菌的生理調節，例如抑制細胞壁合成與蛋白生成等，不同功用的抗菌胜肽會協同作用，以期殺死不同類型的病原（Brogden, 2005）。

抗菌胜肽有著許多優點，因而可吸引醫療界的眼光，主要優點有：一、抗菌胜肽殺死目標病原的速率很快；二、跟目前使用中的抗菌物質相較，微生物不容易產生抗藥性；三、部份抗菌胜肽被認為具有調理素的功用，可以促進免疫反應進行；四、可以和現行的抗生素協同作用對抗病原。但抗菌胜肽也有其缺點，限制了目前在醫藥上的進展，這些缺點包括：一、對於如何有效地在目標動物身上發揮最適效用仍不清楚；二、對於目標物種的毒性尚無完整的認知；三、缺乏可以商業量產的製程（Mygind *et al.*, 2005）。Marr *et al.*（2006）則提出抗菌胜肽具有抗內毒素作用（anti-endotoxin activity）與調節、促進固有免疫系統的能力，但易因蛋白水解導致半生期短是一大缺點，縮短胜肽長度以降低合成成本與增加穩定度是未來努力方向。

天蠶素是在1980年發現的抗菌胜肽，是由*Hyalophora cecropia*這種蛾類的血淋巴中分離出來（Hultmark *et al.*, 1980），有六種形式，由35-37個胺基酸組成，經實驗發現可以對抗許多不同種類的細菌，抗菌範圍廣。後來在其他許多

昆蟲與豬的腸中也有發現（cecropin P1）。經序列比對後發現，這群分子有著類似的胺基酸組成與結構，在N端部份都有著帶強正電性區域，後半部C端部份則由厭水性的長鏈組成，第二個胺基酸必須是帶苯環的tryptophan（W）才能維持分子具有殺菌活性（Sato and Feix, 2006）。天蠶素帶有訊息序列，合成出來的原胜肽有62-64個胺基酸，N端的24-26個胺基酸後來經血淋巴中的酵素切除，釋放出成熟有殺菌活性的天蠶素。天蠶素的立體結構為N端與C端各具有一個alpha-helix，中央由三個胺基酸組成鉸鏈部連結，N端是一個結構完美、雙極性的alpha-helix，C端也是雙極性的alpha-helix，但是結構上比較不對稱不完美（Boman *et al.*, 1991）。天蠶素可以同時對付革蘭氏陰性菌與陽性菌，但以陰性菌為主，對某些原生寄生蟲也有效（Sato and Feix, 2006）。天蠶素屬於殺菌物質（lytic activity）。前人研究發現天蠶素只會裂解細菌而不會破壞真核細胞（Boman *et al.*, 1991）。天蠶素對熱相當穩定，在60°C或是100°C下處理30 min後仍可保有抑菌活性（Hultmark *et al.*, 1980）。

這類帶正電alpha-helix的抗菌胜肽，目前認為主要的殺菌模式有三種：barrel-stave, toroidal-pore及carpet，可參見Sato and Feix（2006）所繪之圖。帶正電的抗菌胜肽受到帶負電的細菌細胞膜吸引，穿過細胞壁或其他胞外組成後，附著在細胞膜上，隨著越來越多的抗菌胜肽鑲嵌入膜中，細胞膜會不斷變薄且延展，到達一定比例後，抗菌胜肽會轉向變成垂直膜的方向，造成一個個穿透膜的小孔，先使膜內外的電化學梯度消失，呼吸作用失衡，而後滲透壓失調，水大量流入腫脹而裂解。

Barrel-stave的理論僅適用於alamethinin這種抗菌胜肽（Brogden, 2005）：孔道完全由胜肽分子自己組成，因此胜肽本身的長度必須夠長以穿透雙層磷脂質，親水端朝孔道，厭水端與膜相接，孔道大小會因參與分子多寡而改變。Toroidal-pore的理論為大多數抗菌胜肽所適用。孔道由胜肽與磷脂球共同組成，當太多雙極性胜肽沈澱在細菌膜上，會將磷脂球擠開，導致外膜張力增加，只好凹陷與內膜相接，降低張力回歸穩定。Toroidal-pore理論相較barrel-stave理論而言，孔道的生成需要的胜肽數量較少，而且胜肽本身長度不需要足以穿透內外膜。

Carpet理論適用於本實驗的天蠶素，當越來越多抗菌胜肽沈澱在外膜上，濃度高到足以包覆整個細胞，最後這些抗菌胜肽就可以類似清潔劑的作用機制將膜一塊塊拉掉，乳糜化使得細菌整個瓦解。但在Sato and Feix (2006-2) 的研究中，作者將不同直徑大小的分子添加入細菌培養基中，發現人造的cecropin-mellitin hybrid peptide (CM15) 對大腸菌的最低抑菌濃度在顆粒直徑大於3.8 nm 以上會增加，表示CM15對細菌造成的傷害並不是預期的carpet理論，而比較像toroidal-pore的模式，經估算後認為CM15所形成的孔道直徑約3.48 nm。Brogden (2005) 和Sato and Feix (2006) 也提出抗菌胜肽對細菌的傷害會依濃度高低而不同，在低濃度時可以toroidal-pore方式就足以殺死細菌，當濃度越高時越趨近carpet理論，carpet理論所需的胜肽數量遠高於足以使細菌死亡的濃度。

#### 抗菌胜肽的選擇性

在分子層次上還不是很清楚，為何抗菌胜肽可以專一地攻擊細菌，牽涉的細節很多，同時包含寄主、細菌與抗菌胜肽三方面，若能更進一步理解選擇機制，就可以設計出更完美的抗菌胜肽 (Brogden, 2005)。目前普遍的解釋為：真核與原核細胞的細胞膜在脂質的組成與拓撲排列上有顯著的不同，哺乳動物細胞膜外葉幾乎是由帶中性電荷的兩性磷脂質來組成，主要是phosphatidylcholine與sphingomyelin，然而細菌的細胞膜外葉，除了中性電荷磷脂質外，也有大量帶負電荷的磷脂質，包括phosphatidylglycerol與cardiolipin。真核細胞細胞膜也會有帶負電荷的磷脂質，但是主要分佈在內葉而非外葉上。就是這個膜系電性上的差異，讓天蠶素這類帶正電的抗菌胜肽能選擇性結合與攻擊細菌，細胞膜由越多負電荷磷脂質組成的細菌，就會越敏感 (Matsuzaki, 1999)。

抗菌胜肽與膜系的結合靠近是藉由非極性的胺基酸與厭水性磷脂基團互相吸引 (hydrophobic interaction)，接著，經由電性交互作用，帶正電的胺基酸與負電荷的磷脂質互相吸引，使抗菌胜肽可以穩定地結合在外膜上，抗菌胜肽穩定地沈積在膜上就會破壞膜的原始穩定結構，因而產生毒性，當細菌的細胞膜外葉帶越多負電荷，電性交互作用就越強，抗菌胜肽對該細菌的毒性就越高，毒性包括上述的表面張力增加、穿孔與膜電位消失等等破壞細胞正常生理活動。

厭水性交互作用的吸引力遠低於電性交互作用，不足以提供抗菌胜肽穩定地與原核細胞細胞膜結合，因此帶正電的抗菌胜肽對真核細胞的毒性遠低於原核細胞。真核細胞細胞膜上還帶有膽固醇可以穩定細胞膜結構，使得抗菌胜肽不易作用（Matsuzaki, 1999）。

### 細菌對抗菌胜肽的抗藥性

細菌會使用許多機制抵抗抗菌胜肽的攻擊，主要策略是減少抗菌胜肽與膜接觸機會、不讓抗菌胜肽嵌入膜中與使膜的通透性不改變。以天蠶素這類攻擊膜系的抗菌胜肽來說，發現的抗藥機制包括（Brogden, 2005）：一、在 *Morganella* 與 *Serratia* 這兩屬菌發現會改變細胞膜的磷脂質種類，以改變膜淨電荷，使抗菌胜肽不能穩定結合（Zasloff, 2002）；二、在 *Staphylococcus aureus* 這株革蘭氏陽性菌，則藉由改變 teichoic acid 上的基團，以減少細胞壁上的負電性，使抗菌胜肽不易靠近；三、在 *Salmonella* 這屬革蘭氏陰性菌，則是減少細胞壁上 core polysaccharide 的負電性，使抗菌胜肽不易靠近；四、*Salmonella* 也可藉由改變細胞壁 lipid A 結構，使得流動性減少、固性增加，以減少抗菌胜肽嵌入膜系的機會，並增加形成孔洞的困難度；五、*Klebsiella pneumoniae* 的莢膜，可以限制抗菌胜肽與目標膜系交互作用的機會，沒有莢膜的突變株會對抗菌胜肽更敏感；六、*Staphylococcus aureus* 與其他細菌也可以分泌蛋白水解酵素來破壞抗菌胜肽，但這會不會發生在活體感染時還沒有確定。

不同於常見的抗生素，對抗菌胜肽敏感的細菌要產生抗藥性是不大可能發生。不同細菌對於不同的抗菌胜肽有著差異很大的敏感度，背後的機制目前還不清楚，以化學致變劑誘使 *E. coli* 與 *Staphylococcus aureus* 對 pexiganan 產生抗藥性突變並沒有成功，而且，對抗生素有抗藥性的菌株對 pexiganan 仍舊是相當敏感的（Zasloff, 2002）。表示抗生素對細菌的選擇性與抗菌胜肽並沒有交集，細菌對抗生素的抗藥性無法平移 to 抗菌胜肽使用，反而是抗生素與抗菌胜肽可以協同作用，殺菌效果更好（Marr *et al.*, 2006）。也因此，抗菌胜肽就變成醫學界在面對日益猖獗的抗藥菌時的一線希望。

細菌要對帶正電荷的抗菌胜肽產生抗藥性困難很多，細菌面對抗生素產生抗藥性的機率大約是  $10^{-7}$  到  $10^{-10}$ ，或者在該抗生素 sub-MIC 濃度下繼代幾次即可篩

選到；但在面對抗菌胜肽時，大體說來沒有辦法經由篩選，可存活下來的就是抗藥菌，必須在sub-MIC濃度下繼代非常多次，才能誘使細菌對抗菌胜肽產生抗藥性。細菌必須重新規劃自己的細胞膜組成，茲事體大，因此抗藥性很難產生。另外，如前文所述確有不少抗藥機制被發現，但目前還沒有研究顯示有交叉抗藥性出現，也就是某細菌面對該抗菌胜肽的抗藥性僅適用於該抗菌胜肽，並不意味著某菌對其他抗菌胜肽都有抗藥性（Marr *et al.*, 2006）。

### 抗菌胜肽實用現況簡介

Marr *et al.* (2006) 提到，如同其它藥物，從發現一個抗菌物質到可以實用還需要經過修飾與最適化，以增強該藥物優點或改進其缺點，這當中多以縮短抗菌胜肽長度，僅保留核心作用區域為考量。Micrologix (Migenix; <http://www.migenix.com>)、Magainin Pharmaceuticals (<http://www.genaera.com>)與IntraBiotics (<http://www.intrabiotics.com>)就是這類公司，針對抗菌胜肽原始的胺基酸序列進行分析，在不影響抗菌活性的前提下，根基原本的序列改變幾個胺基酸以符合實用所需，這類醫療用第一代的抗菌胜肽可以pexiganan (MSI-78)為代表，本於magainin 2所演變而來，為一個22胺基酸長，帶有雙極性的合成胜肽，pexigana在傷口癒合上有效且毒性低，在通過Phase 3檢驗後，美國食品藥物管理局卻仍拒絕了pexigana的上市，因為藥效並沒有比現行使用策略來得好。MX-226是本於牛的indolicidin變化而來，可以用於避免導尿管被細菌污染，已經通過Phase 3的檢驗且統計上顯著的減少因導尿管造成的感染並且避免細菌在導尿管中形成菌落，詳情可見Cadence (<http://cadencepharm.com>)公司網站介紹。另一個通過Phase 2檢驗的MX594AN也是本於indolicidin變化而來，可以用於對付輕度到中度粉刺。

Polymyxin B 和 gramicidin 是兩個用於體表遭 *Pseudomonas aeruginosa* 與 *Acinetobacter baumannii* 感染的抗菌胜肽，在臨床上使用不僅安全有效且低抗藥性產生，但是用於全身性感染治療時卻有毒性太高的問題，儘管眾多的努力仍不能降低毒性，無法根基此產生新一代可用於全身的藥物；Polymyxin B 常與新黴素共用於體表感染，也可用於眼藥水或是耳藥水。Daptomycin 是一個 anionic lipopeptide 具有殺菌的能力，可用於處理皮膚遭 *Staphylococcus aureus*

(methicillin-resistance strains), *Straptococcus pyogenes*, *Straptococcus agalactiae*, *dysgalactina* subsp. *equisimilis*及*Enterococcus faecalis*感染 (Marr et al., 2006)。

近年來不斷嘗試著想將廣效性帶正電的抗菌胜肽推展至臨床使用，但進展很有限，主要關鍵是沒有辦法解決全身性使用上毒性與穩定性的問題，嘗試著簡短胜肽長度以降低成本也是努力目標。抗菌胜肽有著廣效性低抗藥性的優點足以成為絕佳的未來臨床抗菌藥物，不斷報導的抗藥菌更促使著醫學界儘速找到適用的抗菌胜肽已符合未來所需 (Marr et al., 2006)。

### 包裹保護天蠶素

cellulose acetate phthalate (CAP) 是一種相當好用的包裹物質，可用於將藥物製成藥錠或是膠囊，常用於保護藥品通過胃的酸性環境，因為CAP在胃的酸性環境下不會溶解，要等到進入小腸後，pH值高過5.5才會開始溶解釋放出內含物。CAP廣泛地用於口服藥品，一般認為是沒有毒性的聚合物，也不會有副作用。

### 抗菌物質的評估與選擇

Barrett (2005) 提出一套目前研發新抗生素的流程與評估指數，包括由尋找 (exploratory phase)、早期適用性測試 (early phase)、指標藥物最適化 (lead optimization)、篩選候選藥物 (candidate selection)、臨床前評估 (preclinical profiling)、臨床試驗 (clinical development)、綜合評估審查 (regulatory submission) 與批准上市 (approval and launch)。本實驗之目的為評估天蠶素是否適用於海鱷巴斯德桿菌症之防治，依照一套標準評估流程獲取可供比較的參數，對於未來後續抗菌胜肽在水產生物疫病上的研究會有較客觀的比較標準。

這些測試包括半致死劑量、最低殺/抑菌濃度、殺菌曲線及細胞毒性等，獲得這些參數後就可以評估該藥物是否有當作指標或是候選藥物的資格。在這些參數中，最低抑菌濃度與細胞毒性測試幾乎是所有抗菌胜肽研究中一定會取得的結果，但半致死劑量就比較少學者採用。從殺菌曲線中可以得知在足以殺死病原菌的藥物濃度下，殺死病原菌所需要的時間，當所施予藥物濃度提高時，殺

病原菌的時間會不會減少，意思就是說目標藥物對病原菌的作用方式是與作用時間相關（period dependent）還是與藥物濃度相關（dosage dependent），這對於接續的活體實驗提供了臆測的參考，讓設計給藥方式時更有所依據。

Barrett (2005) 提出，有領先優勢（lead minimum）的藥物為半致死劑量小於等於10  $\mu\text{M}$ 、最低抑菌濃度介於4到16  $\mu\text{g/mL}$ 、水溶性大於100  $\mu\text{g/mL}$ 與活體實驗時劑量小於20 mg/kg；具有候選資格（candidate optimum）為半致死劑量小於等於1  $\mu\text{M}$ 、最低抑菌濃度小於1  $\mu\text{g/mL}$ 、水溶性大於2 mg/mL與活體實驗時劑量小於10 mg/kg。篩選出適合的藥物後，便可針對該藥物缺點進行改進或是強化優點。

在水產養殖疫病防治所面臨的挑戰其實不亞於人類疾病，甚至更為困難，因為魚不會說話。在面對以萬計甚至十萬計數的魚群，餵食給藥，是唯一最經濟方便且不會造成緊迫的投藥方式；讓藥物可以利用目標物種血液循環，無疑是到達感染部位最有效率的方式（George and Abraham, 2006）。本實驗即先確認天蠶素的抗菌活性與細胞毒性，接著測試其在血液循環系統的穩定性與餵食的可能性，以期找出天蠶素防治巴斯德桿菌症最可行的方案。





## 材料與方法

### 實驗用細菌

巴斯德桿菌 (*Photobacterium damsela* spp. *piscicida*) 的液體培養基為 tryptic soy broth (TSB, BD) 額外添加1.5%氯化鈉，最終濃度含2%氯化鈉，培養在28℃。ATCC 51736與248皆是花蓮慈濟大學生命科學所陳俊堯老師贈送，Ku則來自澎湖科技大學水產養殖學系古鎮鈞老師（表一）。固體培養基tryptic soy agar (TSA) 則為TSB添加1.5%寒天末。

用於活體實驗用的巴斯德桿菌為經過一次腹腔注射感染海鱷後，由腎臟分離單一菌株，同樣依後述方式鑑定，放大後以甘油冷凍保存，往後每次感染皆由此同一批巴斯德桿菌繼代後進行。活體感染時細菌培養基改為brain heart infusion (BHI, BD)，額外添加1.5% NaCl，最終濃度含2% NaCl，由病死魚臟器分離巴斯德桿菌時使用BHIA (BHI添加1.5%寒天末)。

大腸桿菌 (*E. coli*, strain D21)，培養基為LB (Luria-Bertani broth, BD)。依本實驗室之前研究發現，此菌株對於天蠶素相當敏感，MIC值僅0.39  $\mu\text{M}$  (Ho *et al.*, 2002)，較容易分辨溶液中具活性天蠶素濃度的些微差異，且*E. coli* 培養在37℃中生長快速，可加速實驗進行。

### 巴斯德桿菌鑑定方式

參考Zappulli *et. al* (2005) 之PCR-RFLP方法，選用之引子對為P.dam-1a\_F (5'-CTTAACGCTACGTGGTGACAGTT-3') 與 P.dam-1a\_R (5'-AGACGATCGCCTGCAATAAC-3')，選用之限制酶為*Bst*UI。PCR部份最終總體積為50  $\mu\text{L}$ ，含1x PCR buffer (Yeastern Biotech Co.), 0.2  $\mu\text{M}$  1a\_F primer, 0.2  $\mu\text{M}$  1a\_R primer, 100  $\mu\text{M}$  dNTP + 1 U YEA Taq DNA polymerase (Yeastern Biotech Co.)。反應狀況為起始反應94℃ 2 min, 加上重複(94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min) 反應40次，最後72℃, 5 min終止反應。限制酶作用最終體積30  $\mu\text{L}$ ，含1x NEBuffer, 1/3x PCR product, 10 U *Bst*UI。DNA電泳使用4% agarous gel。經PCR後可以得到一201 base pair大小片段，經*Bst*UI作用後會出現125 base pair與76 base pair兩條亮帶，即可確認為巴斯德桿菌。

## 實驗用魚

海鱸 (cobia, *Rachycentron canadum* L.) 苗來自屏東養殖場，畜養於室內養殖缸中，海水鹽度維持在 $30 \pm 5$  ppt，每日以人工合成飼料餵食一次。從養殖場新引進之海鱸會馴養一星期後才用於實驗。用於消化酵素萃取的海鱸每隻約50克，用於感染實驗的海鱸每隻約20克。

## 天蠶素 (cecropin A)

實驗使用之天蠶素來自兩家化學合成公司。天蠶素之胺基酸序列為：N'-KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH<sub>2</sub>-C'，特色為N與C端皆有-NH<sub>2</sub>化學修飾。

每次新合成之天蠶素皆會以抑菌圈分析法確認活性是否相近，以避免誤差。

## 最低抑菌濃度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 與最低殺菌濃度 (Minimal bactericidal concentration, MBC)

主要參考Motyl *et al.* (2005) 的方法略做修改。將培養至中對數期的各測試菌以TSB (2% NaCl) 序列稀釋，使最終細菌濃度為 $10^5$  CFU/mL。在96孔盤中取100  $\mu$ L稀釋菌液與等體積不同濃度的天蠶素混合，巴斯德桿菌培養在28°C，20-24小時後以肉眼觀察是否有新生成菌體沈澱（四重複），沒有生成菌體沈澱的最低天蠶素濃度即為最低抑菌濃度。進一步從這些沒有生成菌體沈澱的盤孔中各取出100  $\mu$ L，直接散佈於TSA (2% NaCl) 上，將培養皿放置28°C培養箱中兩天，取30-300個菌落數的培養皿，計算生成的菌落數。生成菌落數小於原本種入菌數0.1%的最低天蠶素濃度即為最低殺菌濃度。

## 天蠶素對巴斯德桿菌的半致死劑量 (Lethal dose 50, LD<sub>50</sub>)

主要實驗方法參考Liu *et al.* (2002) 略作修改。將培養至中對數期的巴斯德桿菌以TSB (2% NaCl) 序列稀釋，使最終細菌濃度為 $10^5$  CFU/mL。在96孔盤中，取100  $\mu$ L稀釋菌液與等體積不同濃度的天蠶素混合，最終濃度為0  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、1  $\mu$ M、2  $\mu$ M 與4  $\mu$ M，每濃度三重複。在28°C震盪培養一小時後，分別取出100  $\mu$ L菌液，以TSB (2% NaCl) 適當稀釋後取100  $\mu$ L均勻散佈於TSA (2% NaCl)

上，28°C 培養兩天後，取30-300個菌落數的培養皿，計算所生成的菌落數，control plate即0  $\mu\text{M}$ 。半致死劑量為殺死溶液中一半細菌所對應之濃度。

### 抑菌圈分析 (inhibition zone assay; radial diffusion method)

主要參考Ho *et al.* (2002) 的方法略作修改。取8  $\mu\text{L}$ 生長至中對數期的*E. coli* D21 (OD value 0.6-0.7) 加到8 mL冷卻至45°C以下的LBA (1% agarous, AMRESCO) 中，使*E. coli* D21稀釋1000倍，約 $10^5$  cells/mL。以振盪器低速混勻後，迅速倒入9公分塑膠培養皿中，半掩蓋待其冷卻。凝固後上蓋，以封口袋密封後倒放在4°C冰箱中30分鐘，使膠變硬。接著準備打洞裝置，打洞器需先以70%酒精沖洗後待酒精揮發，其餘器材與桌面皆以酒精擦拭殺菌。以直徑4 mm的打洞器挖洞，各洞間維持等距集中在培養皿中央，以維持厚度均等。在每個洞內放入6  $\mu\text{L}$ 的測試液，37°C培養過夜，觀察並拍照紀錄。

### 天蠶素對巴斯德桿菌的殺菌曲線 (killing curve)

實驗方法主要參考Motyl *et al.* (2005) 與 Mygind *et al.* (2005) 而略作修改。將培養至中對數期的巴斯德桿菌以TSB (2% NaCl) 序列稀釋，使最終細菌濃度為 $10^5$  CFU/mL。每個250 mL錐形瓶中裝有上述稀釋菌液10 mL，取出1 mL置換成溶有天蠶素的TSB，使最終濃度為0  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 與5  $\mu\text{M}$ ，在28°C以190 rpm震盪培養。在0、0.5、1與2小時等時間點分別取出200  $\mu\text{L}$ 菌液，適當稀釋後取100  $\mu\text{L}$ 散佈於TSA (2% NaCl) 上，28°C培養兩天後計算生成菌落數。同時將此三測試菌液放置隔夜觀看是否有新生菌體沈澱。

### 天蠶素對海鱷紅血球的溶血活性

將針筒及針頭以50 mg/mL heparin sodium salt (from porcine intestinal mucosa, SIGMA-ALDRICH, cat. # H3400) 潤濕後，留少許 heparin於針筒尖端，由尾靜脈抗凝抽血取出海鱷血液置入1.5 mL預冷的eppendorf中，輕彈管壁數次使 heparin可與血液充分混勻，即刻放置冰上並儘速以三倍冰的等張PBS (390 mOsm，以NaCl調整) 稀釋，在4°C下以350 x g離心20分鐘，將紅血球由底部小心吸出後，再以10 mL冰的等張PBS懸浮後在4°C下離心，同法清洗三次。最後以冰的等張PBS將

紅血球重新懸浮後，以血球計數器計算紅血球數量，並確認血球仍完整，得知血球濃度為 $1.7 \times 10^5$  RBC/ $\mu\text{L}$ 。將血球懸浮液與等體積（60  $\mu\text{L}$ ）不同濃度的天蠶素混合，最終天蠶素濃度為0  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  與1000  $\mu\text{M}$ ，在28°C水浴槽中作用一小時後，將溶液在12,000  $\times$  g離心15秒（Conlon *et al.*, 2007），吸取100  $\mu\text{L}$ 上清液置入96孔盤中，以分光光度計在405 nm波長讀取血紅素吸光值（Lee *et al.*, 2007）。以1% Tween 20處理的紅血球吸光值作為100%溶血（Conlon *et al.*, 2007），0  $\mu\text{M}$ 天蠶素視為紅血球自然裂解出血紅素的背景值 $A_{\text{blank}}$ 。

$$\text{Hemolysis (\%)} = 100 \times [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/(A_{\text{Tween 20}} - A_{\text{blank}})]$$

Effector concentration ( $\text{EC}_{50}$ )表示導致50%紅血球被裂解所需要的天蠶素濃度。

### 天蠶素對海鱷肌肉細胞株的細胞毒性

海鱷肌肉細胞株來自國立台灣大學動物所齊肖琪老師實驗室。

以L15（Leibovitz' s L-15 medium, Gibco）+ 10% FBS（fetal bovine serum qualified, Gibco）為培養液（FBS/L-15），28°C繼代培養。取繼代後兩天的細胞，加入1 mL含0.1% trypsin的PBS/EDTA輕拍懸浮後，加入12 mL FBS/L-15混勻，使細胞濃度約為450 cells/ $\mu\text{L}$ ，平均分配至48孔盤中（250  $\mu\text{L}$ /well），放置 28°C培養24小時後，以顯微鏡檢察細胞生長附著狀況。吸去培養液後，以300  $\mu\text{L}$  PBS/EDTA潤洗兩次，吸乾溶液後改換200  $\mu\text{L}$ 含有天蠶素的FBS/L-15，濃度分別為0  $\mu\text{M}$ 、4  $\mu\text{M}$ 、16  $\mu\text{M}$ 與64  $\mu\text{M}$ ，放置28°C培養8小時，吸去培養液後，以300  $\mu\text{L}$  PBS/EDTA潤洗兩次，吸乾後加入70  $\mu\text{L}$  trypsin/PBS/EDTA使細胞懸浮，再加入60  $\mu\text{L}$  FBS/L-15並混勻細胞，在血球計數器上以錐藍排開法（trypan blue exclusion）計算活細胞數目。

### 天蠶素殺菌活性在海鱷消化道內的穩定性

#### I. 牛胰蛋白酶（bovine trypsin）

牛胰蛋白酶購自SIGMA（trypsin 1:250, from porcine pancrease, cat. # T-4799）。因胰蛋白酶是海鱷重要的消化酵素（Faulk *et al.*, 2007）之一，因此採用牛胰蛋白酶作為天蠶素對海鱷消化酵素是否穩定的參考。測試方法主要參考Faulk *et al.*（2007）的作法略加修改：使用的反應緩衝液為50 mM Trizma, 20 mM

CaCl<sub>2</sub> , pH = 8.2 , 胰蛋白酶與天蠶素皆以此緩衝液配製。將4 units胰蛋白酶與50 µL天蠶素 (256 µg/mL) 放在1.5 mL eppendorf中混勻 , trypsin: cecropin = 1: 815, w : w。在37°C水浴槽中作用0, 20, 40與60 min後 , 迅速加入10 µL, 140 µg/mL胰蛋白酶抑制劑 (trypsin inhibitor from soybean, sigma, cat. # T 9003) , 並放置冰上 , 以免蛋白水解反應繼續進行 , 造成時間點上有誤差。以抑菌圈分析的方法研判抑菌活性是否消失。

## II. 海鱷消化酵素粗萃取液

實驗方法主要參考Moyano and Savoie (2001) 的方法加以修改。餵食兩小時後將海鱷置入冰箱冷凍三小時 , 在碎冰上取下整個胃及前腸部份 , 清洗內含物後 , 將胃與前腸分別置入含有冰緩衝液 (Trizma 50 mM , CaCl<sub>2</sub> 20 mM , pH = 7.0) 的50 mL離心管中 , 以解剖剪粗略將組織切碎後 , 以均質機將組織徹底打碎 , 打一會後需放置冰中冷卻 , 以確保消化酵素不會因過熱變性失效。在4°C 中以16,000 x g離心30分鐘 , 取上清液 , 即為粗萃取液 , 將此粗萃取液保存在-30°C 中供後續實驗使用。以Bradford法測量粗萃取液中蛋白質含量 , 得知胃粗萃取液蛋白濃度0.4, 1.5, 2.5 mg/mL , 前腸粗萃取液蛋白濃度為1.5, 2.5, 3 mg/mL。以粗萃取液 : 天蠶素 = 1 : 100 (w : w) 混合 , 在28°C水浴槽作用。模擬胃消化組在pH = 2.0下作用0, 1, 2, 3小時 , 模擬前腸消化組在pH = 7.5下作用0, 1, 2, 3小時 , 消化道pH的決定是以廣用試紙沾濕後比色 , 分別經三人獨立判讀後取平均。使用的緩衝液同樣為Trizma 50 mM , CaCl<sub>2</sub> 20 mM , 粗萃取液的序列稀釋與天蠶素的配製皆以此緩衝液 (不同pH值) 。以抑菌圈分析的方法研判天蠶素殺菌活性是否在反應後消失。

## 天蠶素在海鱷血液中穩定性

實驗方法主要參考Lopez *et al.* (2007) 的作法作修改。

### I. 全血 (whole blood) 與血漿 (plasma) 部份 :

採血時採抗凝抽血 , 將1 c.c.針筒及針頭 (25G, 16 mm) 以50 mg/mL heparin sodium salt (from porcine intestinal mucosa, SIGMA-ALDRICH, cat. # H3400) 徹底來回潤濕後 , 留少許 heparin於針筒尖端 , 由尾靜脈抽血取出海鱷血液置入1.5 mL 預冷的eppendorf中 , 輕彈管壁數次使heparin可與血液充分混勻 , 即刻放置冰上 ,

此即為全血樣品，以此進行後續實驗。將剩餘全血在4℃下以350 x g離心25分鐘，上清液即為血漿樣品，以此進行後續實驗。

## II.血清 (serum) 與熱去活化血清 (heat-inactivated serum) 部份：

採血時不加抗凝劑，以1 mL針筒由尾靜脈抽血取出海鱷血液置入1.5 mL eppendorf中，放置桌上約一小時讓血液自然凝結，再放置冰上。將凝結的樣品在4℃下以1000 x g離心25分鐘，上清液即為血清樣品，以此進行後續實驗。取部份血清在50℃下處理20分鐘，待冷卻回溫後即為熱去活化血清。

實驗分為兩部份，第一部份為測試天蠶素在海鱷血液中穩定性，取22.1  $\mu$ L上述四種血液樣品先與1.3  $\mu$ L水混勻後，再與1.3  $\mu$ L, 500  $\mu$ M天蠶素，使最終天蠶素濃度為25  $\mu$ M。第二部份為找出影響天蠶素活性的可能因素，作法為先將上述血液樣品22.1  $\mu$ L與1.3  $\mu$ L綜合蛋白酶抑制劑（最終濃度為2倍建議劑量）混合後，再加入1.3  $\mu$ L, 500  $\mu$ M天蠶素，使最終天蠶素濃度為25  $\mu$ M。

混勻後立刻取出6  $\mu$ L樣品以抑菌圈分析法進行天蠶素抑菌活性測試，視為0小時處理，剩餘樣品則在28℃下處理1與24小時後，再分別取出6  $\mu$ L，同樣以抑菌圈分析法檢視天蠶素抑菌活性是否改變。

## 活體實驗

分為腹腔注射與餵食兩種方式。

### I. 腹腔注射

巴斯德桿菌在BHI中震盪培養至中對數期，離心收菌，倒去上清液後，以PBS懸浮，調整濃度至約3000 CFU/mL，取100  $\mu$ L與等體積天蠶素（2 mg/mL）混合（僅打入巴斯德桿菌者則與等體積水混合），再打入約20 g魚體腹腔中，使每隻魚接受約300 CFU與0.2 mg天蠶素。僅打入天蠶素組則為100  $\mu$ L PBS與等體積天蠶素（2 mg/mL）混合。

追加組則在12小時後，每隻魚再以腹腔注射方式打入水或是0.2 mg天蠶素。

六組皆為三重複，每組重複四隻，感染後觀察七天中的死亡情形，並取死亡魚體的腎、脾與肝臟進行細菌分離，擇一器官所分離到的顏色形狀疑似的單一菌落以上述PCR-RFLP法進行鑑定。

### II. 餵食

巴斯德桿菌在BHI中震盪培養至中對數期，離心收菌，倒去上清液後，以PBS懸浮，調整濃度至約 $3 \times 10^5$  CFU/mL，取100  $\mu$ L先與等體積天蠶素、以CAP包裹之天蠶素、天蠶素+以CAP包裹之天蠶素、水和CAP混合後，再以餵食管灌入約20 g魚體食道中，使每隻魚接受約30000 CFU巴斯德桿菌與天蠶素（0.2與2 mg/fish兩組）、以CAP包裹之天蠶素（0.2與2 mg/fish兩組）、天蠶素+以CAP包裹之天蠶素（1 mg天蠶素與1 mg包裹之天蠶素），僅灌食天蠶素組則為PBS與天蠶素混合（2 mg/fish）。

八組皆為三重複，每重複四隻，感染後觀察七天中的死亡情形，並取死亡魚體的腎、脾與肝臟進行細菌分離，擇一器官所分離到白色到淡黃色，形狀圓形直徑約1 mm的單一菌落以上述PCR-RFLP法進行鑑定。

### **鄰苯二甲酸乙酸纖維素（cellulose acetate hydrogen phthalate, CAP）包裹**

主要參考Milovanovic and Nairn (1986)的方法製備。概述如下：將1.85 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶於約150 ml水中，加熱至60°C，且不斷攪拌，再加入5 g CAP，持續加熱攪拌，並加入適當的NaOH幫助溶解，溶解後補水至180 mL，使最終CAP濃度為2.7%（w/v）。待冷卻後，以適當的體積比，在持續攪拌中加入高濃度天蠶素溶液，混勻後以針筒吸起，以25G針頭維持每秒一滴方式在固化溶液（1.5%醋酸）上方三公分處滴下，固化溶液需維持低速攪拌（80 rpm）。滴完後再攪拌十分鐘，即可以紗布過濾取出晶球，以純水徹底清洗晶球表面後，放置適溫烘乾。

### **統計分析**

所有實驗數據皆使用EXCEL軟體，進行one-way ANOVA統計分析，各組間均質差異比較以Scheffes' s S method分析。

## 結果

### 天蠶素對巴斯德桿菌的最低殺菌 (MIC)、最低抑菌劑量 (MBC) 與半致死劑量

天蠶素對三個巴斯德桿菌分離株的最低抑菌劑量在0.4-1  $\mu\text{M}$ 之間，低於最低抑菌劑量的菌液隔夜後會因細菌生長而渾濁，反之則呈澄清；最低殺菌劑量在0.8-1  $\mu\text{M}$ 之間（表二），高於此劑量菌液隔夜仍呈澄清，在TSA上不會生成菌落。其中，標準菌株（ATCC51736）與Ku株的最低抑菌濃度等於最低殺菌濃度，248株的最低殺菌濃度則為最低抑菌濃度的兩倍。

天蠶素在0  $\mu\text{M}$ 到1  $\mu\text{M}$ 之間對於巴斯德桿菌的殺菌力隨著濃度快速上升，在1  $\mu\text{M}$ 時已有76%的細菌被殺死，這個趨勢過了1  $\mu\text{M}$ 之後減緩，到達2  $\mu\text{M}$ 後轉為持平，所有的巴斯德桿菌在2  $\mu\text{M}$ 以上都被天蠶素殺死。 $\text{LD}_{50}$ 約等於0.7  $\mu\text{M}$ （圖一）。

### 天蠶素對巴斯德桿菌的殺菌曲線

計算生長於TSA上的菌落數發現，1  $\mu\text{M}$ 天蠶素在半小時後使總活菌數減少了七成，一小時後活菌數減少至五成，兩小時後所有的巴斯德桿菌都被殺死；2  $\mu\text{M}$ 天蠶素在一小時後使所有的巴斯德桿菌都被殺死；5  $\mu\text{M}$ 天蠶素在半小時後使總活菌數減少至接近0%，在一小時後已見不到任何菌落生成，表示所有的巴斯德桿菌都被殺死了。天蠶素濃度越高，殺菌所需時間越短。未添加天蠶素組（control）細菌生長正常且略有增加（圖二）。

### 天蠶素對海蠶紅血球的毒性

天蠶素對紅血球的毒性是以溶液中是否出現紅血球胞質內的血紅素來判斷，溶液中血紅素越多代表越多紅血球被破壞，表示天蠶素對紅血球傷害越高。在天蠶素濃度達1000  $\mu\text{M}$ 時與1, 10, 100  $\mu\text{M}$ 相比有顯著差異出現（ $p < 0.01$ , Scheffe's S test），在此濃度約有12%的紅血球被裂解， $\text{EC}_{50} \gg 1 \text{ mM}$ 。1, 10, 100  $\mu\text{M}$ 間相比沒有顯著差異出現（ $p > 0.05$ ）。作為基準質（ $A_{\text{blank}}$ ）的0  $\mu\text{M}$ 在波長405 nm下讀



值為0.100，與1, 10, 100  $\mu\text{M}$ 讀值相近，經統計分析後與1, 10, 100  $\mu\text{M}$ 相比沒有顯著差異，表示血球本身非操作性裂解情形小於2.5%（圖三 A）。

### **天蠶素對海蠶肌肉細胞株的毒性**

將錐藍染劑可進入細胞質使細胞染上深藍色的肌肉細胞視為死細胞，計算視野下活細胞時不列入。當培養液中天蠶素濃度達到64  $\mu\text{M}$ 時處理八小時後，活肌肉細胞數與0  $\mu\text{M}$ 處理八小時相比有顯著差異（ $p < 0.01$ , Scheffe's S test），細胞減少了39%。0, 4, 16  $\mu\text{M}$ 各組間沒有顯著差異（ $p > 0.05$ ）。肌肉細胞在培養液中（0  $\mu\text{M}$ ）8小時後有部份細胞死亡，較0小時數目略有減少，但沒有顯著差異，細胞自發性死亡不明顯（ $p > 0.05$ ），圖三 B。

### **牛胰蛋白酶會使天蠶素抑菌活性消失**

以抑菌圈的有無來判斷天蠶素的抑菌活性是否會因牛胰蛋白酶的分解而消失。牛胰蛋白酶在20分鐘內即可使天蠶素抑菌活性完全消失，故20, 40, 60分鐘處理組都見不到抑菌環的出現。抑菌環僅出現在0分鐘處理組（column 1，圖五），為將天蠶素與牛胰蛋白酶混勻後，立即取出6  $\mu\text{L}$ 填充入含大腸菌培養基的中央圓洞中，在短於兩分鐘的操作時間內，抑菌環大小已經比未添加牛胰蛋白酶者（well 5，圖五）略小，代表天蠶素已有部份被分解失去抑制細菌生長能力。天蠶素在37 $^{\circ}\text{C}$ 下（well 5，圖五）於緩衝液中60分鐘後抑菌活性相較於約28 $^{\circ}\text{C}$ 室溫下（well 6，圖五）沒有減少。

### **海蠶消化道粗萃取液對天蠶素抑菌活性的影響**

以抑菌圈的有無來判斷天蠶素的抑菌活性是否會因為海蠶消化道粗萃取液的分解而消失。海蠶胃粗萃取液不會影響天蠶素抑菌活性，0小時約有75.5%的活性，抑菌圈的面積大小在3小時的處理時間內沒有顯著差異，表示胃中的消化酵素對天蠶素抑菌活性影響較小。但前腸的粗萃取液則會影響天蠶素抑菌活性，0小時就僅餘44.1%，且抑菌圈大小有隨作用時間增加而逐漸變小現象，到2小時後已看不到抑菌圈出現，表示有抑菌活性的天蠶素濃度已減至抑菌圈分析法偵測下限。胃與前腸的粗萃取液與兩種不同pH值的實驗緩衝液本身是沒有抑菌活性的，沒有

抑菌環出現，不會出現天蠶素其實已失去活性但仍可見抑菌環現象（未呈現）。天蠶素在28℃於無菌水中作用3小時後仍有抑菌活性（未呈現）。圖四。

### **海鱷血液會使天蠶素抑菌活性消失**

以抑菌圈的有無來判斷天蠶素的抑菌活性是否會因為接觸海鱷血液而消失。

在0小時添加水組，天蠶素的抑菌活性在全血與血漿中類似且沒有顯著差異，分別為19%與29%；天蠶素的抑菌活性在血清與熱去活血清中類似且沒有顯著差異，分別為53%與60%；天蠶素的抑菌活性在全血與血漿都較血清與熱去活血清為低，有顯著差異（ $p>0.05$ ）。在0小時添加蛋白酶抑制劑組，天蠶素的抑菌活性在全血與血漿中類似且沒有顯著差異，分別為44%與51%；天蠶素的抑菌活性在血清與熱去活血清中沒有顯著差異，分別為74%與74%；天蠶素的抑菌活性在全血與血漿都較血清與熱去活血清為低，有顯著差異（ $p>0.05$ ）。

在1小時添加水組，天蠶素的抑菌活性在全血與血漿中類似且沒有顯著差異，分別為14%與27%；天蠶素的抑菌活性在熱去活血清中完全喪失，但在血清中仍有51%；天蠶素的抑菌活性在全血與血漿都較血清為低，有顯著差異（ $p>0.05$ ）。在1小時添加蛋白酶抑制劑組，天蠶素的抑菌活性在全血與血漿中類似且沒有顯著差異，分別為41%與43%；天蠶素的抑菌活性在血清與熱去活血清中類似且沒有顯著差異，分別為68%與71%；天蠶素的抑菌活性在全血與血漿都較血清與熱去活血清為低，有顯著差異（ $p>0.05$ ）。

在24小時添加水組，天蠶素的抑菌活性在全血、血漿、血清、熱去活血清中分別為6%、23%、21%、0%，四樣品間沒有顯著差異。在24小時添加蛋白酶抑制劑組，天蠶素的抑菌活性在全血與血漿中分別為31%與41%，沒有顯著差異；天蠶素的抑菌活性在血清與熱去活血清中沒有顯著差異，分別為69%與80%；天蠶素的抑菌活性在全血與血漿都較血清與熱去活血清為低，有顯著差異（ $p>0.05$ ）。

在0小時，四種血液樣品添加蛋白酶抑制劑後皆可增加天蠶素抑菌活性呈現，除熱去活血清組沒有顯著差異外，餘三種添加後皆有顯著增加（ $p>0.05$ ）；在1小時，同樣地，蛋白酶抑制劑可減少天蠶素抑菌活性喪失，四種血液樣品添加後抑

菌環面積皆有顯著增加 ( $p>0.05$ )。在24小時，同樣地蛋白酶抑制劑皆可使四種血液樣品再添加後抑菌環面積顯著增加 ( $p>0.05$ )。

本部份實驗結果發現天蠶素在海鱷血液中並不穩定，而添加蛋白酶抑制劑可增加天蠶素抑菌活性表現 (圖六)。

## 活體實驗

腹腔注射部份 (圖七、十)。

七天後計算存活的海鱷數目發現僅注射巴斯德桿菌感染組 (Pdp only) 在一次注射組平均存活率為16.7%，在追加組平均存活率為25%，感染後平均存活率沒有統計上的顯著差異。每隻魚僅注射0.2 mg天蠶素進入海鱷腹腔不會造成海鱷死亡 (cecropin only)，追加組注射兩次0.2 mg天蠶素的動作有相同結果，存活率皆為100%。

在一次注射組，天蠶素與巴斯德桿菌同時打入海鱷腹腔 (Pdp+cecropin) 的存活率為44.4%，與感染組相比沒有顯著差異。在追加組，天蠶素與巴斯德桿菌同時打入海鱷腹腔 (Pdp+cecropin) 的存活率為100%，與感染組相比有顯著差異出現 ( $p < 0.05$ )，與一次注射組相比也有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，代表在12小時後追加一劑天蠶素的設計有助降低海鱷因巴斯德桿菌感染的死亡率 (圖七)。

在一次注射組，感染巴斯德菌組 (Pdp only) 魚隻在感染後兩天開始死亡，感染六天後死亡現象停止，最終存活魚數為0, 1, 1隻。感染巴斯德菌同時給予天蠶素組 (Pdp+cecropin) 魚隻在四天後開始死亡，感染五天後死亡現象終止，最終存活魚數為1, 1, 2隻，但因以散菌環分離單一菌落時三個重複每重複各有一隻魚分離不出巴斯德桿菌，故每重複改視為三隻。只注射天蠶素組 (cecropin control) 在七天中則沒有魚死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻 (圖十 A)。

在追加組，感染巴斯德菌組 (Pdp only) 魚隻在感染後一天開始死亡，感染六天後死亡現象停止，最終存活魚數為1, 1, 2隻。感染巴斯德菌同時給予天蠶素組 (Pdp+cecropin) 魚隻在七天中都沒有死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻。只注射天蠶素組 (cecropin control) 在七天中則沒有魚死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻 (圖十 B)。

解剖與檢視病死魚發現，並非所有病死魚的脾臟、肝臟與腎臟都會出現典型的白色結節病徵，感染後兩天急性死亡個體大多沒有見到白色結節，以接種環進行巴斯德桿菌分離動作，都可生長出顏色與外型符合的菌落以進行PCR-RFLP，確認病死魚體內都可以分離出病原菌巴斯德桿菌。

餵食部份結果（圖八、十一）。

為確認CAP是否真屬鹼性溶液中溶解的聚合包裹物，先以血紅素作為內含物進行測試，發現血紅素/CAP在pH為2的酸性溶液中維持顆粒態，溶液為澄清，等離心後置換溶液為pH為9的鹼性溶液後，可以看到血紅素/CAP慢慢消失，溶液變成紅色，所有血紅素皆由CAP中釋放，此部份結果證實CAP確實可以保護內含物通過酸性環境，直到鹼性環境才釋放內含物（未呈現）。

結果發現僅餵食巴斯德桿菌感染組平均存活率為0%，所有魚隻在七天後皆死亡；餵食巴斯德桿菌與CAP組平均存活率為0%，所有魚隻在七天後皆死亡；餵食巴斯德桿菌與2 mg天蠶素組平均存活率為75%；餵食巴斯德桿菌與0.2 mg天蠶素組平均存活率為0%，所有魚隻在七天後皆死亡；餵食巴斯德桿菌與CAP包裹2 mg天蠶素組平均存活率0%，所有魚隻七天後皆死亡；餵食巴斯德桿菌與CAP包裹0.2 mg天蠶素組平均存活率0%，所有魚隻七天後皆死亡；餵食巴斯德桿菌與1 mg天蠶素與CAP包裹1 mg天蠶素組平均存活率0%，所有魚隻七天後皆死亡；僅餵食CAP包裹2 mg天蠶素組平均存活率為100%，所有魚隻都沒有死亡。

解剖與檢視病死魚發現，並非所有病死魚的脾臟、肝臟與腎臟都會出現典型的白色結節病徵，感染後兩天內急性死亡個體大多沒有見到白色結節，以接種環進行巴斯德桿菌分離動作，都可生長出顏色與外型符合的菌落以進行PCR-RFLP，確認病死魚體內都可以分離出病原菌巴斯德桿菌。

在統計分析上，2 mg天蠶素組和僅餵食巴斯德桿菌組相比有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示本組設計可以降低海鱷被感染的死亡率。2 mg天蠶素組和0.2 mg天蠶素組相比有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示天蠶素需較高濃度始可降低海鱷被感染的死亡率。2 mg天蠶素組和CAP包裹0.2 和 2mg天蠶素組相比有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示CAP包裹的天蠶素並無法降低海鱷被感染的死亡率。2 mg天蠶素組和1 mg天蠶素加上CAP包裹1 mg天蠶素組相比有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示天蠶

素需較高濃度才能降低降低海鱷被感染的死亡率，且CAP包裹的天蠶素並無法降低海鱷被感染的死亡率。每隻魚僅餵食CAP包裹2 mg存活率與各組（餵食巴斯德桿菌與2 mg天蠶素組除外）相比有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示天蠶素並不會造成海鱷死亡（圖八）。

在僅餵食巴斯德桿菌組，感染一天後開始出現死亡個體，三天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌與CAP組在感染後兩天開始出現死亡個體，六天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌與2 mg天蠶素組於感染三天後開始出現死亡個體，七天後存活魚隻為2, 3, 4隻；餵食巴斯德桿菌與0.2 mg天蠶素組於感染三天後開始出現死亡個體，七天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌與CAP包裹2 mg的天蠶素組於感染三天後開始出現死亡個體，五天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上CAP包裹0.2 mg天蠶素組於感染兩天後開始出現死亡個體，四天後無魚隻存活；餵食巴斯德菌加上1 mg天蠶素與CAP包裹1 mg天蠶素組於感染兩天後開始出現死亡個體，四天後無魚隻存活。 餵食CAP包裹2 mg天蠶素組七天中沒有魚隻死亡（圖十一）。



## 討論

本實驗的結果發現天蠶素可以殺死主要病原菌巴斯德桿菌，MBC值為0.9  $\mu\text{M}$ ，與MIC值0.7  $\mu\text{M}$ 相近。Mygind *et al.* (2005) 以plectasin (*Plectania nigrella*) 這種抗菌胜肽針對不同細菌（如*Streptococcus pneumoniae*）所得的結果也是MIC值近似MBC值。Cole *et al.* (1997) 所測試的魚類（*Pleuronectes americanus*）抗菌胜肽pleurocidin針對三株魚類病原菌（*Leucothrix mucor*, *Aeromonas salmonicidai* and *Cytophaga aquatilis*）、六株人類病原菌（*Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium I*, and *S. typhimurium II*）與一株環境菌（*E. coli*, strain D31），加上在2000年所測試針對四株人類病原菌（*Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*）都有MIC值等於MBC的結果。Motyl *et al.* (2005) 提出，當MBC值小於MIC的16倍，表示該抗菌物質為殺菌作用而非僅只抑制細菌生長，由此確認天蠶素對於巴斯德桿菌的作用開始後應是一個不可逆的破壞過程，不僅只是抑制其生長。天蠶素殺死巴斯德桿菌濃度僅需0.9  $\mu\text{M}$ ，也符合一般認定的裂膜殺菌類抗菌胜肽特性（Zasloff, 2002），這個現象表示天蠶素符合這類帶正電阿法螺旋抗菌胜肽是屬於裂解細胞膜的殺菌機制。MIC值與MBC值的比較，或許也可以幫助抗菌胜肽的進一步歸類，比值接近1者是不是在結構上或是殺菌機制上有所類似，值得進一步研究。

天蠶素對於巴斯德桿菌是致死的影响在殺菌曲線也可以看得出來，Motyl *et al.* (2005) 提到，一般認定的殺菌物質可在24小時內使得細菌數量下降3個log，天蠶素在1  $\mu\text{M}$ 時兩小時就可以殺死約 $10^5$ 的細菌，無疑可屬於公認的殺菌物質。Mygind *et al.* (2005) 認為這類裂膜抗菌胜肽一般說來殺菌所需時間很短。Zasloff (2002) 說到這類抗菌胜肽（濃度約MIC時）可在數秒到數分鐘內就殺死細菌。從本研究的殺菌曲線可以發現，不同濃度的天蠶素殺光巴斯德桿菌所需時間不同，隨著濃度增加有殺菌時間減少的現象，表示天蠶素殺死巴斯德桿菌的方式與藥物濃度相關，而非作用時間長短。Chang *et al.* (2005) 的實驗結果亦有類似發現，經修飾過的cathelicidin（rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*）對於*Aeromonas salmonicida*的單位時間減少的菌數也有隨濃度增加而增加的情形。

Boman *et al.* (1991) 曾經提出同樣的看法，認為天蠶素的殺菌效率是視天蠶素濃度而定。推論在1  $\mu\text{M}$ 劑量下，天蠶素主要是以打洞的方式破壞膜電位，慢慢使胞質流失，讓細菌的生理平衡失調終至死亡，但濃度到達5  $\mu\text{M}$ 時，更多的天蠶素可以更快組成蟲洞（worm-hole，膜上的孔洞），或產生更多蟲洞，或是以更近似清潔劑的方式瓦解膜，殺菌效率因而提高，Brogden (2005) 與Sato and Feix (2006) 後續推測的殺菌進程變化也都支持Boman的說法。

天蠶素對巴斯德桿菌的LD<sub>50</sub>為0.7  $\mu\text{M}$ ，具有候選資格；MIC約為1  $\mu\text{M}$  (4  $\mu\text{g/mL}$ ) 具有領先優勢。天蠶素本身水溶性佳 (8  $\text{mg/mL}$ ) 也是一個優勢。兼之細菌對抗菌肽的抗藥性不易產生 (Marr *et al.*, 2006)。就這些參數來說，天蠶素確實是有進一步研究與開發的意義。

天蠶素對海鱷肌肉細胞的毒性在64  $\mu\text{M}$ 就有顯著差異。Mygind在其plectasin的研究中對人類紅血球得到EC<sub>50</sub> > 400  $\text{mg/L}$ ，Lopez *et al.* (2007) MccJ25針對人類紅血球的 EC<sub>50</sub> > 900  $\mu\text{g/mL}$ ，皆視為低溶血活性。在本實驗中天蠶素對海鱷紅血球的EC<sub>50</sub>遠遠大於1  $\text{mM}$  (i.e. 4000  $\text{mg/L}$ )，表示天蠶素對海鱷紅血球的溶血活性相當低。Steiner *et al.* (1981) 提到天蠶素只會裂解細菌而不會裂解真核細胞，Steiner *et al.* (1988) 又提到，天蠶素會裂解帶負電或是不帶電的人造磷脂球。因此，天蠶素對海鱷細胞殺傷力低，會差異性選擇性破壞巴斯德桿菌。

海鱷胃粗萃取液雖不會分解天蠶素，但是前腸的粗萃取液會，推測胃中的消化酵素對天蠶素抑菌活性的影響較小，但是前腸中來自腸與肝胰臟的消化酵素就會影響天蠶素的抑菌活性，顯示天蠶素沒有辦法通過海鱷腸道而不被分解。在Hultmark *et al.*, (1980) 的實驗中認為天蠶素的抑菌活性對酸鹼值的變化並不敏感；但Wang *et al.* (1999) 針對cecropin B對酸鹼值的敏感度研究中卻指出，cecropin B在酸性環境下，結構、與膜黏附力與裂解磷脂膜的能力都較在鹼性環境中差。在本結果中，天蠶素在酸性環境中的抑菌環比在鹼性環境中略大。

從天蠶素預測的切位分析，胃蛋白酶 (pepsin) 主要的切位在phenylalanine以及tyrosine，天蠶素中僅在N端第五個為phenylalanine，恰好為開始形成alpha-helix結構中第一個胺基酸，或許是因為被胃蛋白酶作用後結構變化不大而不至於影響抑菌活性。前腸的消化酵素有三種，trypsin、chymotrypsin和elastase，以及諸多的exopeptidase，其中trypsin和chymotrypsin已經證實在海鱷消化系統中存在 (Faulk

*et al.*, 2007)。chymotrypsin主要切位tryptophan、tyrosine、phenylalanine、leucine以及methionine，在天蠶素中位在N端第二、四、五個胺基酸，因此chymotrypsin對天蠶素的活性傷害可能也不大。Trypsin主要切位為Lysine和arginine，都是帶正電的胺基酸，這是天蠶素殺菌選擇性的來源，在天蠶素分子中共有八個切位，N端第五到第十七個胺基酸所構成的alpha-helix會瓦解，剩餘C端的alpha-helix雖然結構還存在，但因為太短可能無法發揮作用。Sato（2006）研究cecropin-mellinin hybrid peptide的試驗結果，也發現天蠶素的前八個胺基酸是活性重要部位，同時，N端的alpha-helix與C端的alpha-helix必須藉由中間的鉸鍊序列相連才能發揮強大的殺菌活性。這些證據都指出，trypsin對於天蠶素整體結構與活性傷害很大。

在我們以牛胰蛋白酶進行的試驗結果發現，胰蛋白酶確實非常有效率地破壞天蠶素，小於二十分鐘就可以使天蠶素的抑菌活性完全消失，這呼應了針對胺基酸序列預測的結果。當然，前腸中還會有其他的胜肽外切酶也會逐步分解天蠶素。

天蠶素在海蠶血液中並不穩定。全血中的成份可能影響天蠶素活性最大，凝血後的血清對天蠶素抑菌活性的影響就比較小，但血清經熱去活化後似乎會緩慢活化某種蛋白水解酵素，在一小時後完全使天蠶素的抑菌活性消失，這部份機制並不清楚原因。當添加綜合蛋白酶抑制劑後，即可顯著恢復天蠶素在四種血液樣品中的抑菌活性，推斷天蠶素抑菌活性喪失是因為被不明的蛋白水解酵素分解，但凝血反應後的血清對天蠶素抑菌活性傷害較小，可能是因為在凝血過程中，酵素與血小板細胞膜相接而被離心除去因而減少（Spronk *et al.*, 2003）。另外由添加蛋白酶抑制劑後，血清樣品中天蠶素抑菌活性可以再顯著增加，與隨著時間增加天蠶素抑菌活性不斷下降得知，血清中並非沒有蛋白水解酵素，只是濃度較低罷了。由全血與血漿樣本添加蛋白酶抑制劑後對天蠶素抑菌活性傷害程度仍明顯大於血清可以推斷，全血與血漿中會影響天蠶素抑菌活性的並不只酵素，是否還有其他血液成份會影響活性，例如與大分子蛋白結合而無法接觸病菌，這部份尚不清楚。

在海蠶血液中不穩定的現象限制了活體感染後治療的方式，無法借助血液循環系統將天蠶素送至全身。當巴斯德桿菌處於胞內感染狀態時天蠶素無用武之地，因此期望天蠶素可以在巴斯德桿菌感染初期，或進入循環系統擴散時等胞外期發揮殺菌力，以減少魚體內菌數，協助宿主清除。



由圖二結果發現，5  $\mu\text{M}$ 的天蠶素在半小時內就可以殺死 $10^4$ - $10^5$  CFU/mL的巴斯德桿菌，且天蠶素濃度越高，殺菌時間越短。因此在活體實驗中，便務求在魚體可耐受範圍內盡可能加多天蠶素劑量，另一考量則是讓天蠶素可以越早接觸到巴斯德桿菌越好，如此便可在最短的時間內殺死病菌。在前置實驗中發現，0.2 mg/fish與2 mg/fish存活率相近，為省錢故選擇較低的劑量進行後續實驗。

當天蠶素與巴斯德桿菌先在體外混勻後立即打入海鱷腹腔中，可以提高存活率，但與感染組相比沒有顯著差異。12小時後再注射天蠶素，存活率達到100%，顯著的提高，表示即時給藥加上追加的模式可有效減低海鱷被巴斯德桿菌感染造成的死亡率。只是要抓到細菌感染初期就即時給藥並不容易，且每尾魚遭病菌感染的進展時程不會相同。

由餵食實驗結果中，僅在體外先將巴斯德桿菌與天蠶素（2 mg/fish）混好後同時灌食組有顯著降低海鱷被感染死亡率，表示，若天蠶素的濃度夠高，在胃中就可有效減少巴斯德桿菌數量，只是此劑量相當高，增加成本可能使業界望之生怯。天蠶素雖經CAP包裹保護進入腸道後才釋放，卻可能還是很快被腸道酵素分解，沒辦法殺死巴斯德桿菌。由同時餵食天蠶素加上包裹的天蠶素組結果得知，若天蠶素劑量無法及早降低巴斯德桿菌數量，腸道中釋放出的天蠶素也沒辦法將病菌濃度降至安全值。由圖四結果知道，天蠶素在胃中雖然略受酸性環境影響影響降低活性，但對胃消化酵素穩定，並不需要包裹保護，只要劑量夠高就可以達到增加存活率目標。

巴斯德桿菌以腹腔或是餵食感染都先經過前置實驗估量至約 $\text{LD}_{50} \sim \text{LD}_{90}$ ，腹腔注射法需約 $10^2$  CFU/20 g fish，而餵食法則需約 $10^4$  CFU/20 g fish，餵食法所需巴斯德桿菌量約為腹腔注射法100倍。這也呼應Margariños（1996）所說，巴斯德桿菌確實可經食物方式感染海鱷，養殖業餌食務須注意衛生。

Plectasin是一個由真菌中分離出來的抗菌肽，由40個胺基酸組成，結構類似已發現的defensin，帶有三對雙硫鍵，Mygind *et al.*（2005）年的研究發現，以腹腔注射方式感染 *Streptococcus pneumoniae*後一小時，同樣以腹腔注射方式讓 plectasin（10 mg/kg BW）進入老鼠體內，無論是僅注射一次或一天內注射兩次都可顯著提高老鼠存活率，在讓 *Streptococcus pneumoniae*由鼻腔感染，待24小時後肺炎症狀出現才以靜脈注射方式給予一劑plectasin（10 mg/kg body weight），發

現可以顯著減少肺部的活菌數量。Lopez *et al.* (2007) 在以MccJ25的研究中指出，MccJ25在血液中相當穩定，與全血、血漿、血清與熱去活化血清處理24小時後抑菌活性仍與0小時時相同，表示MccJ25可以利用循環系統到達細菌感染點，作者進一步的感染實驗中發現，MccJ25若是在感染2 hr後，以每天一次每隻30 g老鼠給予0.5 mg的方式給予六天，或將六次改為一天內給予，都可以顯著降低肝臟與脾臟中活的*Salmonella* Newport的數量。就本實驗結果相比，天蠶素若是與巴斯德桿菌體外混勻後同時給予，就可以增加海鱷存活率，表示天蠶素若可順利到達感染點是可以達成殺死細菌的目標，但是前述二種抗菌肽相比，天蠶素在血液中確實相當不穩定，無法利用循環系統的廣佈性到達各個感染點殊為可惜。

綜合研究結果，天蠶素在非生理環境下低濃度很快殺死巴斯德桿菌，細胞毒性低，可以說是很好的選擇。但在模擬海鱷生理環境下，在血液與腸道中都非常不穩定，對於蛋白水解酵素十分敏感，嚴重限制了天蠶素的實用性，這也是諸多肽類抗菌物質面臨的共通挑戰。改進天蠶素不穩定的性質是一個解決方式，例如可以進行氟化修飾 (Meng and Kumar, 2007) 或是作成D-form胺基酸 (Bland *et al.*, 2001)，或者將蛋白水解酵素切位點的胺基酸進行置換，但天蠶素分子中帶正電的胺基酸扮演重要的辨識細菌角色，也正好是trypsin切位，如何置換後仍有殺菌活性並不容易，另外蛋白水解酵素對天蠶素的切位太多，胺基酸置換方式相當不易執行。或許基因轉殖魚也是另一個選擇。

Table 1. Pathogens of cobia found in Taiwan.

Pathogens	1997-2002	2000-2003
	Penghu (%) <sup>a</sup>	Southern Taiwan (%) <sup>b</sup>
Parasite	29	26
Virus	8	18
Bacteria	63	56
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	ND	58
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ND	18
<i>Streptococcus iniae</i>	ND	10
<i>Vibrio</i> sp.	ND	7
<i>Flexibacter columnaris</i>	ND	7

ND, no data

a 澎湖縣家畜防治所；b 蔡信雄。

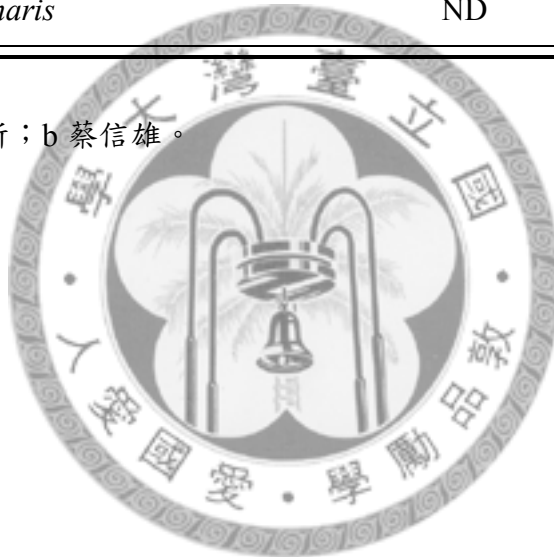


Table 2. Characteristics of some digestive protease in fish<sup>#</sup>.

Enzyme	Synthetic organ	Action site	Cutting site
Pepsin	stomach	stomach	aromatic amino acids <sup>*</sup> acidic amino acids <sup>*</sup>
Trypsin	pancreas	intestine and pyloric ceca	lysine (K) arginine (R)
Chymotrypsin	pancreas	intestine and pyloric ceca	aromatic amino acids <sup>*</sup>
Elastase	pancreas	intestine and pyloric ceca	glycine (G) <sup>#</sup> alanine (A) <sup>#</sup> aliphatic amino acids <sup>##</sup>

<sup>#</sup> Halver and Hardy (2002).

<sup>##</sup> Guillaume *et al.* (2001).

<sup>\*</sup> Silva and Anderson (1995).

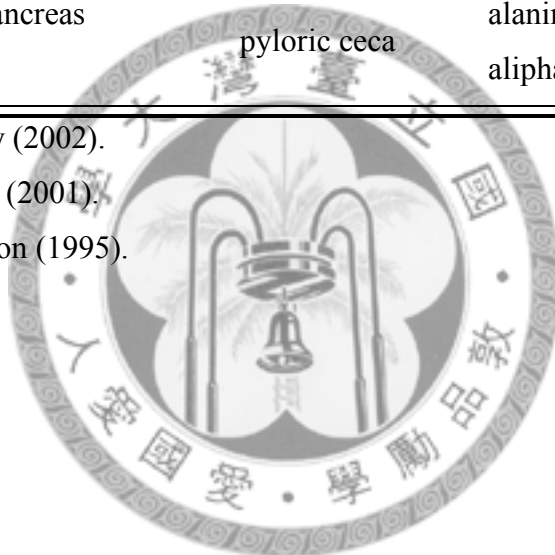


Table 3. Amino acid sequence of cecropin A and the acting sites of fish protease.

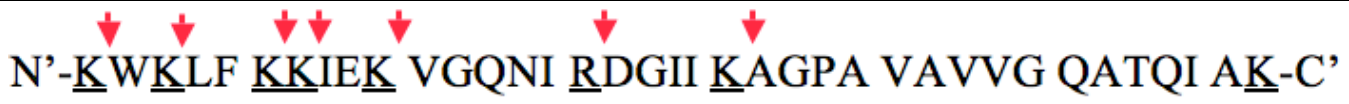
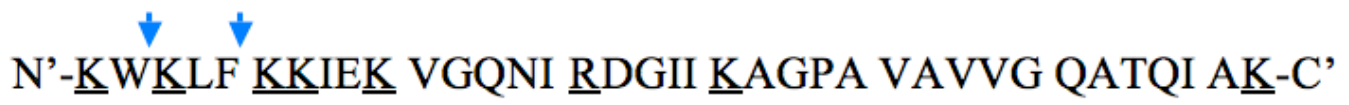


Red arrow: trypsin	
Blue arrow: chymotrypsin	
Black arrow: pepsin	
Green arrow: elastase	
Underline: amino acids of positive charge	

Table 4. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains used in the present study.

Bacteria	Strain Code	Year and Location of Isolation	Host
	ATCC51736	1995, Japan	Yellowtail ( <i>Seriola queradiata</i> )
<i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	248	2001, Penghu, Taiwan	Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> )
	Ku	2006, Penghu, Taiwan	Cobia ( <i>R. canadum</i> )

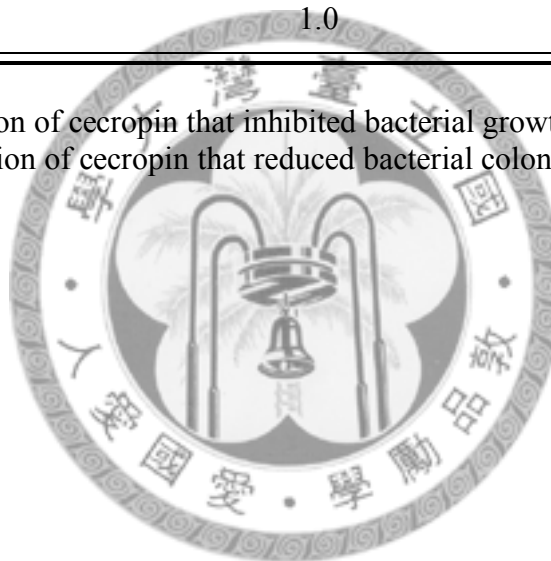


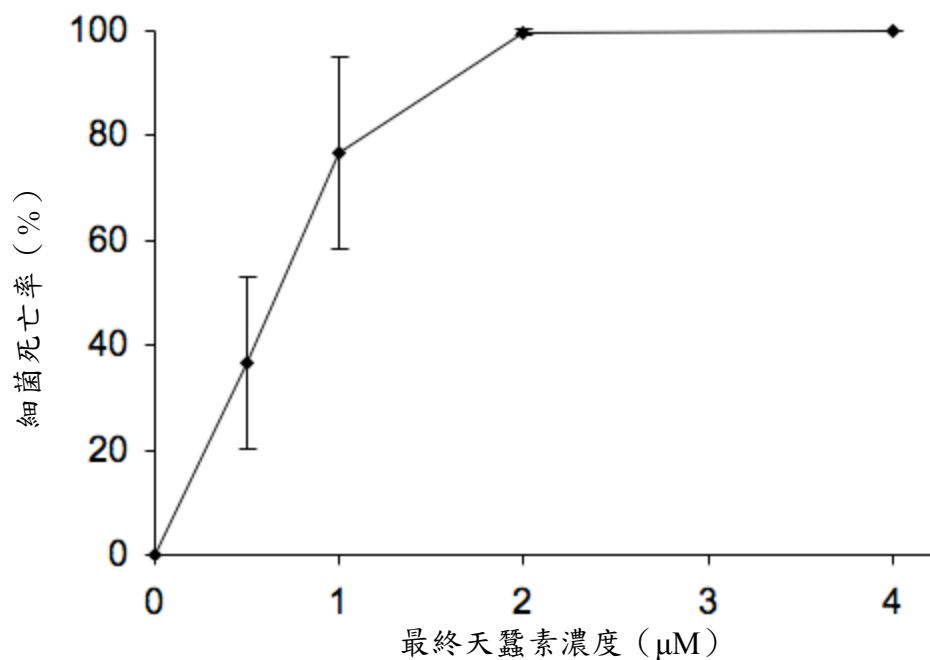
Table 5. Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of cecropin for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains.

Bacteria	Strain Code	MIC ( $\mu\text{M}$ )	MBC ( $\mu\text{M}$ )
	ATCC51736	0.8	0.8
<i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	248	0.4	0.8
	Ku	1.0	1.0

MIC was defined as the lowest concentration of cecropin that inhibited bacterial growth in the broth.

MBC was defined as the lowest concentration of cecropin that reduced bacterial colonies by 99.9%.

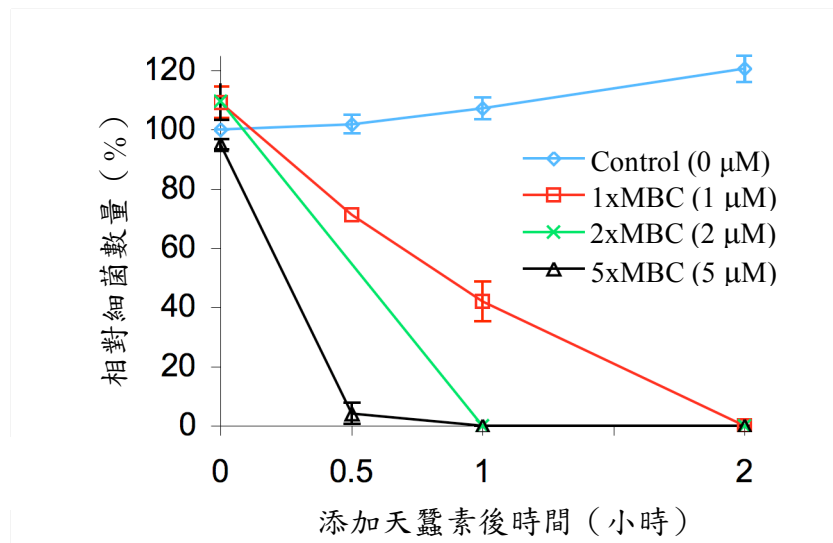




圖一 天蠶素對巴斯德桿菌的半致死劑量 ( $LD_{50}$ )。

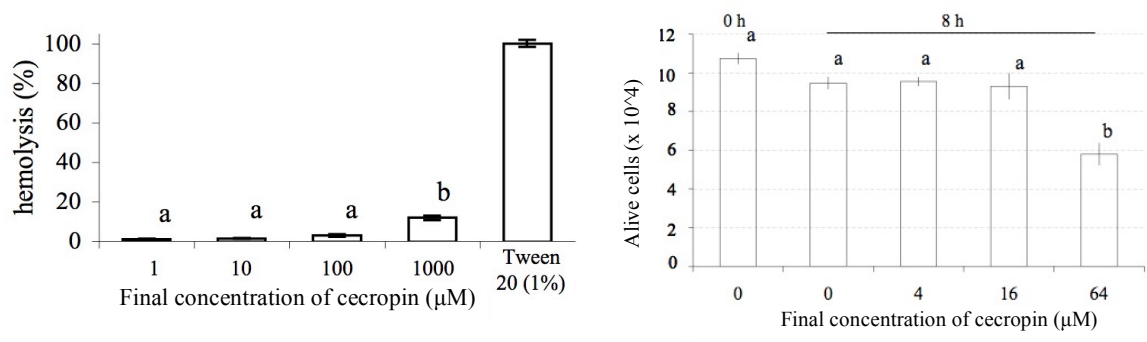
將約 $10^5$  CFU/mL的巴斯德桿菌 (Ku strain) 與等體積不同濃度的天蠶素混合，使天蠶素最終濃度為0 (以水取代)、0.5、1、2與4  $\mu$ M，在28°C 震盪培養一小時後，分別取出100  $\mu$ L菌液十分之一系列稀釋後取100  $\mu$ L塗抹於TSA (2% NaCl) 上，28°C 培養兩天後計算菌落總數。天蠶素在0  $\mu$ M到1  $\mu$ M之間對於巴斯德桿菌的殺菌力隨著濃度快速上升，此趨勢過了1  $\mu$ M之後減緩，到達2  $\mu$ M後持平，所有的巴斯德桿菌在2  $\mu$ M以上都被天蠶素殺死。 $LD_{50}$ 約等於0.7 $\mu$ M。





圖二 天蠶素對巴斯德桿菌的殺菌時程。

每個250 mL錐形瓶中裝有約 $10^4$ - $10^5$  CFU/mL巴斯德桿菌菌液10 mL，取出1 mL置換成溶有天蠶素的TSB，使最終濃度為0 (control)、1 (1xMBC)、2 (2xMBC) 與5 μM (5xMBC)，在28°C震盪培養。在不同時間點分別取出混合液，適當稀釋後取100 μL塗抹於TSA (2% NaCl) 上，28°C培養兩天後計算生成菌落數。巴斯德桿菌在1xMBC下兩小時後所有菌皆死亡，2xMBC下一小時菌皆死亡，在5xMBC下半小時菌皆死亡。殺菌所需時間隨天蠶素濃度增加而縮短。



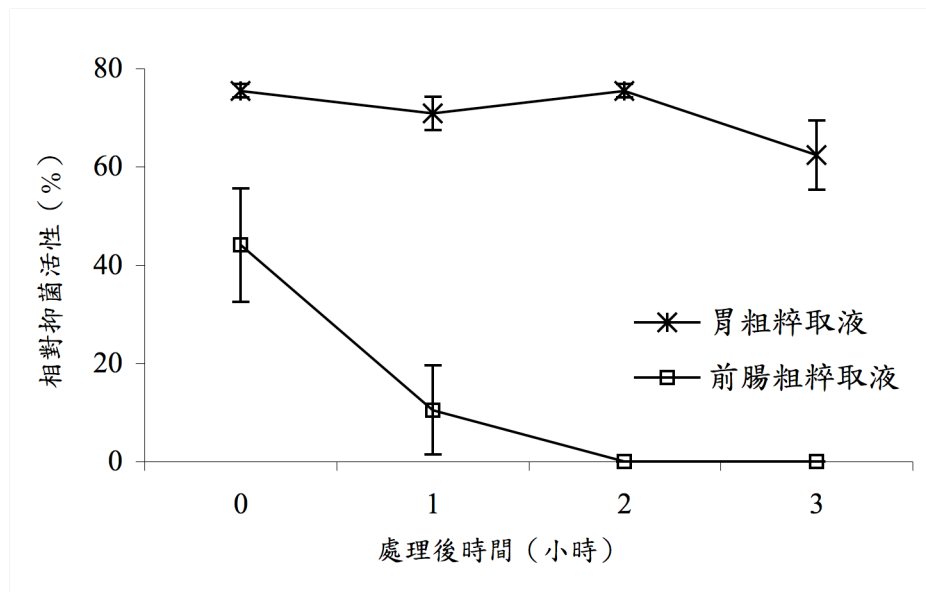
A

B

圖三 天蠶素對海鱷紅血球的毒性 (A) 與海鱷肌肉細胞株的毒性 (B)。

A. 將60  $\mu\text{L}$ ,  $1.7 \times 10^5$  RBC/ $\mu\text{L}$ 紅血球懸浮液與等體積不同濃度的天蠶素混合，使最終天蠶素濃度為0  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 與1000  $\mu\text{M}$ ，在28°C水浴槽作用一小時。離心後讀取上清液中懸浮血紅素吸光值（波長405 nm），Tween 20 作為100%溶血。經一小時後，天蠶素的濃度要到1000  $\mu\text{M}$ 才有顯著的溶血活性（ $p < 0.01$ , Scheffe's S test），此劑量約12%的紅血球被裂解。其餘各組沒有顯著差異。

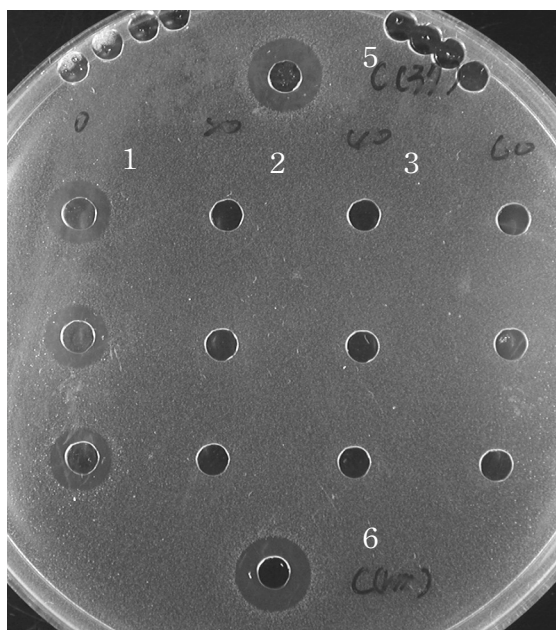
B. 將200  $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^2$  cells/ $\mu\text{L}$ 海鱷肌肉細胞以含0  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 64  $\mu\text{M}$ 天蠶素FBS/L-15處理，28°C培養八小時後，以錐藍排開法計算活細胞數。當培養液中天蠶素濃度達到64  $\mu\text{M}$ 時活肌肉細胞數與0  $\mu\text{M}$ 相比有顯著差異（ $p < 0.01$ , Scheffe's S test），其餘各組沒有顯著差異。圖中英文字母（a, b）不同表示有統計上顯著差異。



圖四 海蠶消化道粗萃取液對天蠶素抑菌活性的影響。

以粗萃取液與天蠶素重量比1:100混合，使天蠶素最終濃度為 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ， $28^{\circ}\text{C}$ 作用。模擬胃消化組在緩衝液（Trizma 50 mM， $\text{CaCl}_2$  20 mM, pH 2.0）下作用0, 1, 2, 3小時，模擬前腸消化組在相同緩衝液下（pH 7.5）下作用0, 1, 2, 3小時。以抑菌圈分析法檢測天蠶素抑菌活性。天蠶素在胃粗萃取液中0小時抑菌活性有76%，3小時後仍有抑菌活性，與0小時的抑菌環面積相比沒有顯著差異（ $p > 0.05$ ）。天蠶素在前腸粗萃取液中0小時抑菌活性僅餘44%，隨後迅速減少，2小時後完全失去抑菌活性。

每點實驗皆為三重複。



Column 1 : 0 min at 37°C (三重複)

Column 2 : 20 min at 37°C (三重複)

Column 3 : 40 min at 37°C (三重複)

Column 4 : 60 min at 37°C (三重複)

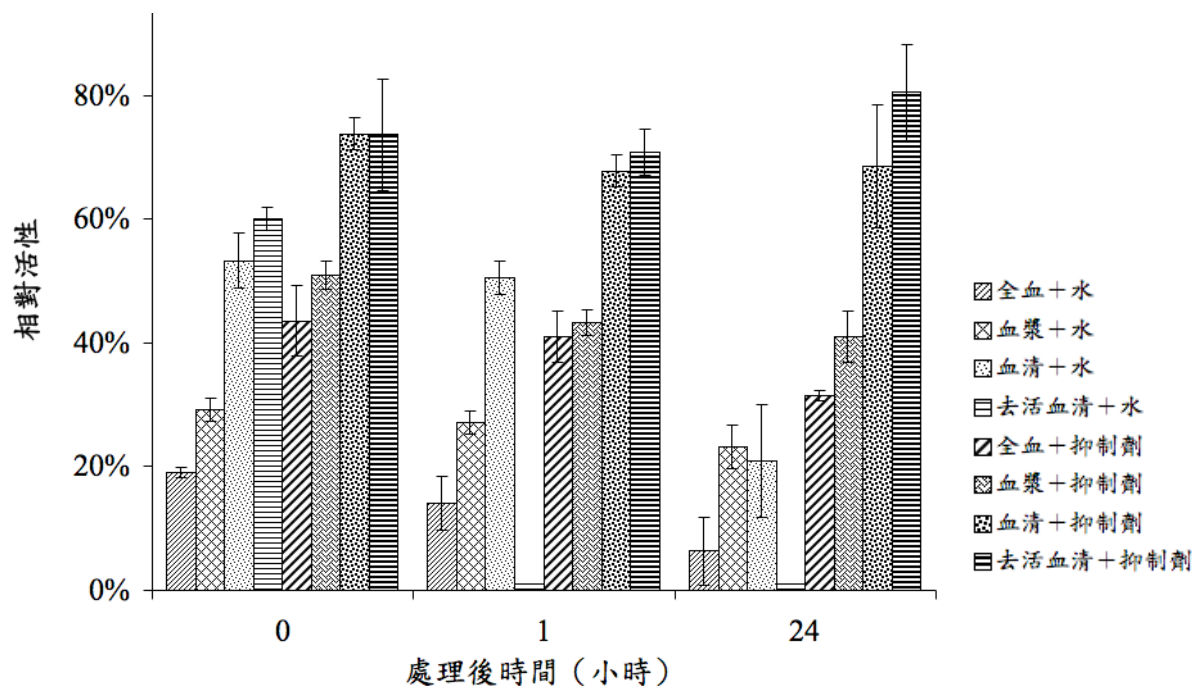
well 5 : cecropin A alone at 37°C

well 6 : cecropin A alone at RT

圖五 牛胰蛋白酶會使天蠶素抑菌活性消失。

將10  $\mu\text{L}$ 胰蛋白酶 (1.57  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4 units) 與50  $\mu\text{L}$ 天蠶素 (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 混合 (trypsin: cecropin = 1: 815, w : w) , 在37°C 中作用0, 20, 40, 60 min後, 加入胰蛋白酶抑制劑終止反應, 取6  $\mu\text{L}$ 混合液進行抑菌圈分析, 37°C培養隔夜後觀看天蠶素抑菌活性是否消失。

天蠶素在37°C下經牛胰蛋白酶作用二十分鐘後即完全失去抑菌活性, 看不到透明的抑菌環 (column 2) 。天蠶素在37°C下不會失去抑菌活性 (well 5) 。圖中透明區域表示大腸桿菌 (strain D21) 被抑制生長。中央圓洞直徑為4 mm。

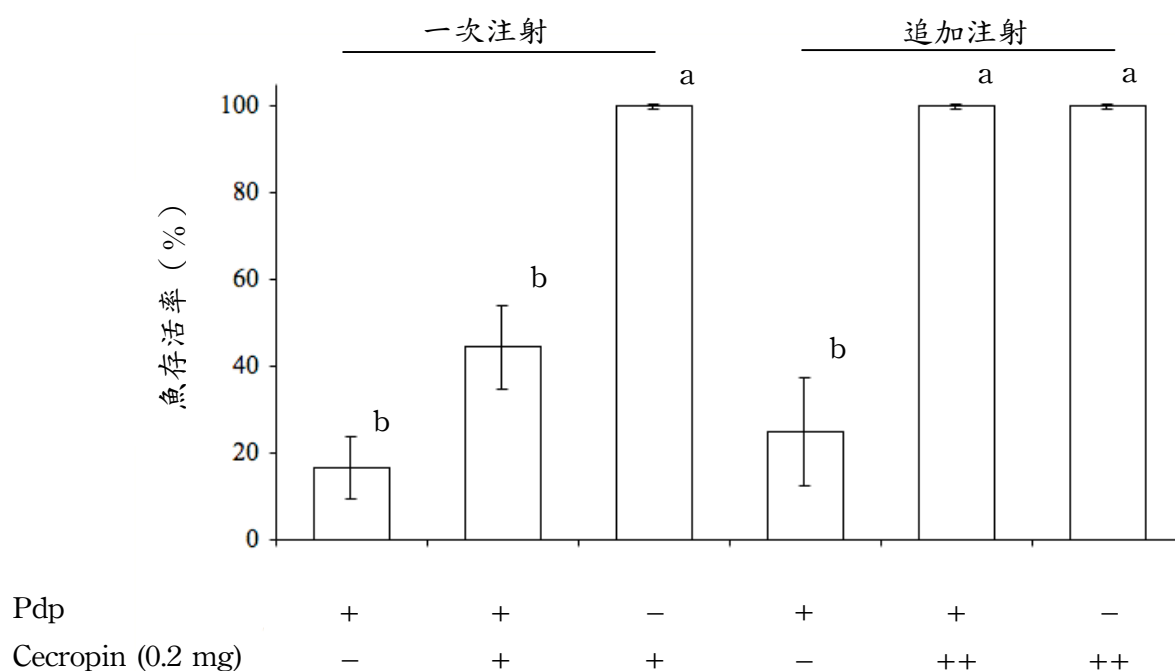


圖六 海鱷血液會使天蠶素抑菌活性消失。

將四種血液樣品（全血、血漿、血清與熱去活血清）先與水或蛋白酶抑制劑混勻後，再添加天蠶素，使天蠶素最終濃度皆為25  $\mu\text{M}$ 。所有樣品都放在28  $^{\circ}\text{C}$  中作用0, 1, 24 小時後，分別取出6  $\mu\text{L}$  混合液進行抑菌圈分析。

在0小時，天蠶素在全血與血漿中的抑菌活性下降無論是添加水還是抑制劑都較血清與熱去活血清為低，有顯著差異（ $p < 0.05$ ），全血與血漿相比沒有顯著差異，血清與熱去活血清相比沒有顯著差異；四種血液樣品添加蛋白酶抑制劑後可增加天蠶素抑菌活性呈現，除熱去活血清組沒有顯著差異外，餘三種添加後皆有顯著增加（ $p < 0.05$ ）。在1小時，熱去活血清組天蠶素活性完全消失，但抑制劑仍可顯著恢復天蠶素抑菌活性（ $p < 0.05$ ）；全血與血漿無論有無添加抑制劑，天蠶素抑菌活性顯著低於血清（ $p < 0.05$ ），全血與血漿相比沒有顯著差異，與0小時結果類似；同樣地，蛋白酶抑制劑可減少天蠶素抑菌活性喪失，四種血液樣品添加後抑菌環面積皆有顯著增加（ $p < 0.05$ ）。在24小時，天蠶素在全血、血漿與血清中的抑菌活性在添加水組相較沒有顯著差異；在添加抑制劑組，血清與熱去活血清中天蠶素抑菌活性較全血與血漿中為高，有顯著差異（ $p < 0.05$ ），全血與血漿相比沒有顯著差異，血清與熱去活血清相比沒有顯著差異；同樣地，四種血液樣品添加蛋白酶抑制劑後抑菌環面積都有顯著增加（ $p < 0.05$ ）。

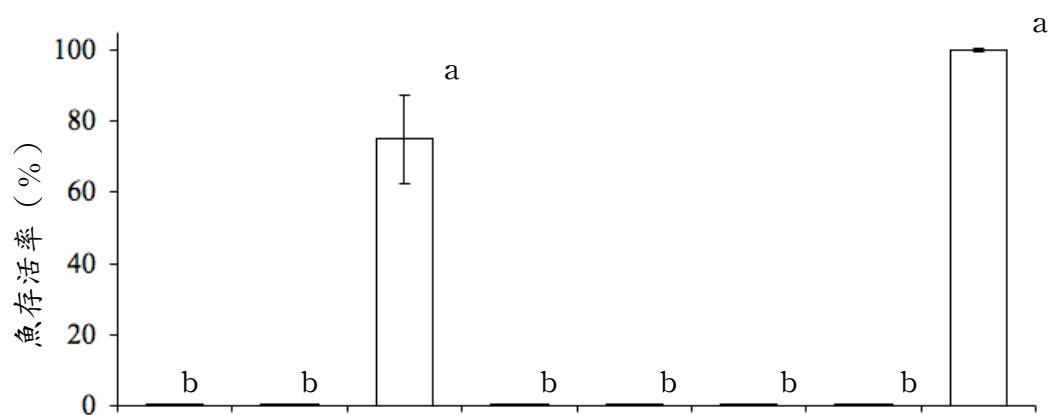




圖七 活體實驗腹腔注射結果。

將懸浮在PBS中的巴斯德桿菌與天蠶素（Pdp only則與水混合）在體外混勻後，再取200  $\mu$ L 打入20 g魚腹腔中，使最終細菌濃度為每隻魚接受約300 CFU Pdp與0.2 mg天蠶素（2500  $\mu$ M），cecropin only則為PBS與天蠶素混合。追加組（boost）則在12小時後，同樣以腹腔注射法打入0.2 mg天蠶素或水，每組三重複，每重複四隻。觀察七天後存活率。腹腔注射天蠶素不會對海鱺造成個體死亡，追加組的存活率亦為100%；在一次注射組，天蠶素與巴斯德桿菌同時打入海鱺腹腔（Pdp+cecropin）的存活率為44.4%，與感染組相比沒有顯著差異。在追加組，天蠶素與巴斯德桿菌同時打入海鱺腹腔（Pdp+cecropin）的存活率為100%，與感染組相比有顯著差異出現（ $p < 0.05$ ），與一次注射組相比也有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。圖中英文字母（a, b）不同表示有顯著差異（ $p < 0.05$ , Scheffe's S test）。

+ 表示給予；++ 表示追加給予兩次相同劑量；- 表示沒有給予。



Pdp	+	+	+	+	+	+	+	-
Cecropin (0.2 mg)	-	+	-	-	-	-	-	-
Cecropin (2 mg)	-	-	+	-	-	-	-	+
Cecropin in CAP (0.2 mg)	-	-	-	-	+	-	-	-
Cecropin in CAP (2 mg)	-	-	-	-	-	+	-	-
CAP	-	-	-	+	-	-	-	-
Cecropin (1mg)	-	-	-	-	-	-	+	-
Cecropin in CAP (1 mg)	-	-	-	-	-	-	+	-

圖八 活體實驗餵食結果。

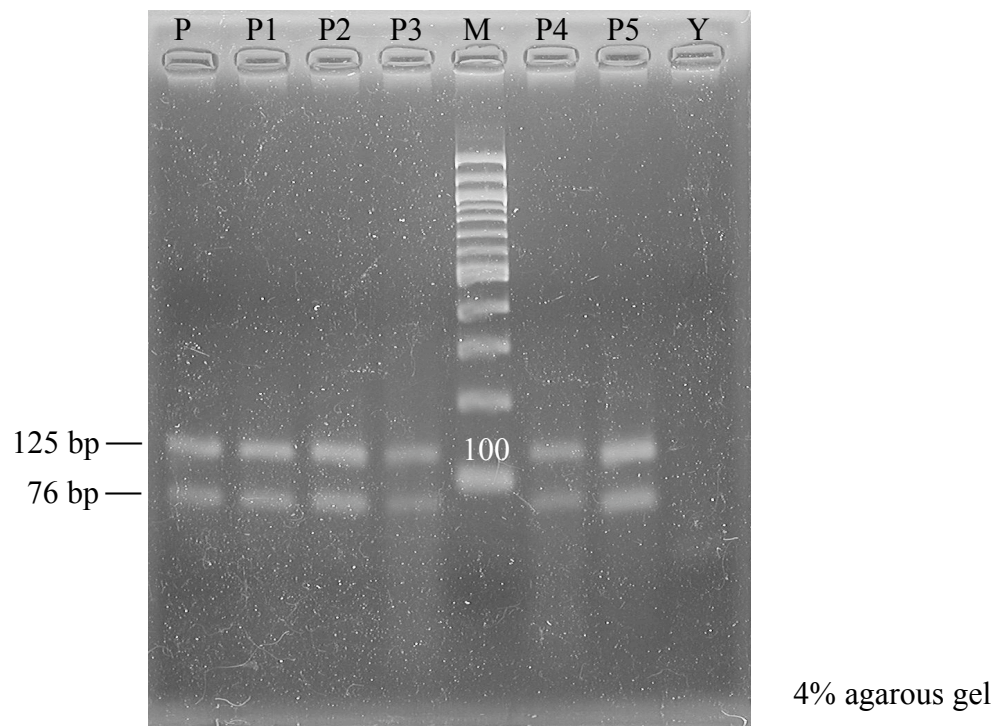
將懸浮在PBS中的巴斯德桿菌與水（Pdp）、CAP（Pdp+CAP）、天蠶素

（Pdp+cecropin，分為0.2 mg/fish與2 mg/fish）、以CAP包裹之天蠶素（Pdp+cecropin in CAP，分為0.2 mg/fish與2 mg/fish）、天蠶素+以CAP包裹之天蠶素

（Pdp+cecropin+cecropin in CAP，天蠶素1 mg/fish，以CAP包裹之天蠶素1 mg/fish）在體外混勻後，再取200 uL灌食入20 g魚食道中，使最終細菌濃度為每隻魚接受約30000 CFU。每處理三重複，每重複四隻。觀察七天後存活率。餵食2 mg天蠶素組和僅餵食巴斯德桿菌組、餵食0.2 mg天蠶素組、餵食CAP包裹天蠶素組、僅餵食CAP組、餵食1 mg天蠶素加上CAP包裹1 mg天蠶素組相比皆有顯著差異（ $p < 0.05$ ），表示僅本組設計可以降低海鱷被感染的死亡率，其餘各組存活率皆為0%。僅餵食CAP包裹2 mg天蠶素不會造成海鱷死亡。

圖中英文字母不同（a, b）表示有顯著差異（ $p < 0.05$ , Scheffe's S test）。  
+ 表示有給予；- 表示沒有給予。

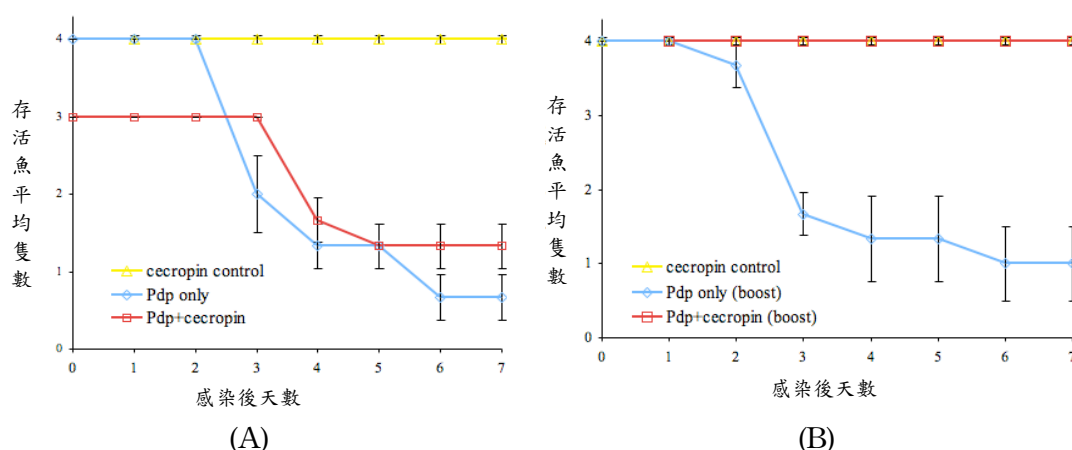
0.2 mg天蠶素相當於2500  $\mu\text{M}$ ；2 mg相當於5000  $\mu\text{M}$ 。



圖九 巴斯德桿菌PCR-RFLP鑑定結果。

挑取BHIA上單一菌落進行PCR-RFLP分析，會得到一條125 bp與一條76bp的亮帶，即可確認為巴斯德桿菌。無論是冷凍乾燥後活化菌株（P）或是病死魚身上分離到的新鮮菌株（P1，肝臟分離；P2, P3，腎臟分離；P4, P5，脾臟分離）都有相同訊號。病死魚身上分離到的黃色雜菌（Y，脾臟分離）不會有訊號。





圖十 活體實驗腹腔注射魚隻死亡日程圖。(A) 一次注射組；(B) 追加組。

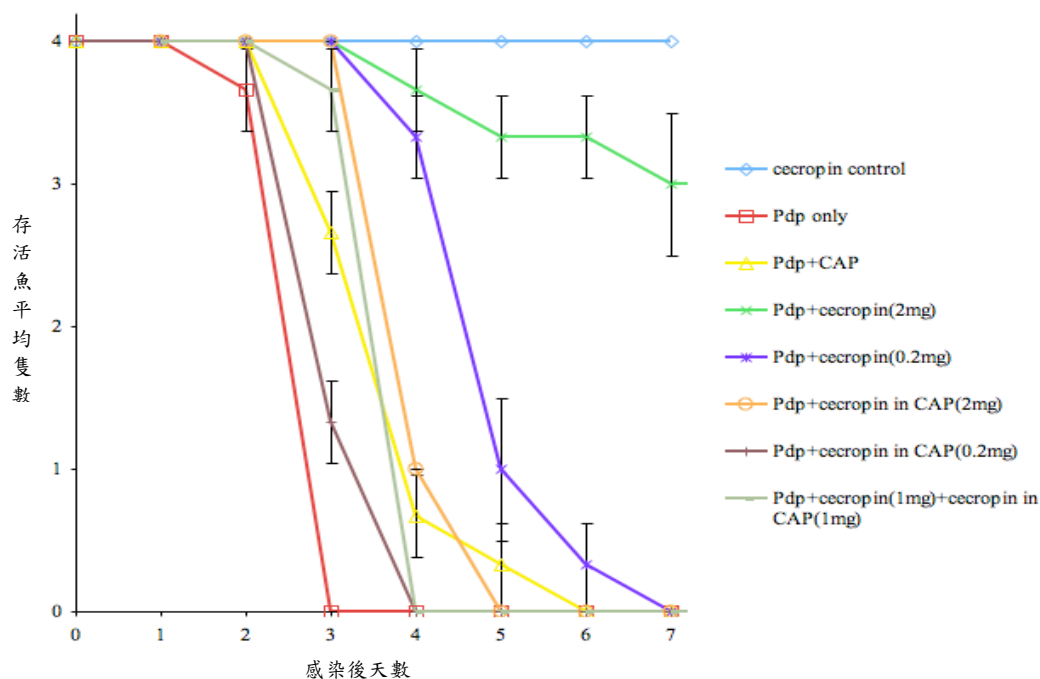
(A) 感染巴斯德菌組 (Pdp only) 為在感染同時給予等體積無菌水。魚隻在感染後兩天開始死亡，感染六天後死亡現象停止，最終存活魚數為0, 1, 1隻。感染巴斯德菌同時給予天蠶素組 (Pdp+cecropin) 魚隻在四天後開始死亡，感染五天後死亡現象終止，最終存活魚數為1, 1, 2隻。只注射天蠶素組 (cecropin control) 在七天中則沒有魚死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻。

(B) 感染巴斯德菌組 (Pdp only boost) 除在感染同時給予一劑天蠶素外，在十二小時後追加一劑天蠶素。魚隻在感染後一天開始死亡，感染六天後死亡現象停止，最終存活魚數為1, 1, 2隻。感染巴斯德菌同時給予天蠶素組

(Pdp+cecropin boost) 魚隻在七天都沒有死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻。只注射天蠶素組 (cecropin control) 在七天中則沒有魚死亡，最終存活魚數為4, 4, 4隻。

本部份實驗每組為三重複，每重複四隻魚。(A)圖中感染巴斯德桿菌同時給予天蠶素組因最後死亡原因確認時，每重複各有一隻魚分離不出巴斯德桿菌，故每重複視為三隻魚。感染菌數皆為300 CFU/fish，天蠶素一劑為0.2 mg/fish。

0.2 mg天蠶素相當於2500  $\mu$ M。



圖十一 活體實驗餵食部份魚隻死亡日程圖。

僅餵食CAP包裹2 mg天蠶素組七天內沒有魚隻死亡；僅餵食巴斯德桿菌組於感染一天後開始出現死亡個體，三天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上CAP組（Pdp+CAP）在感染後兩天開始出現死亡個體，六天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上2 mg天蠶素組（Pdp+cecropin 2 mg）於感染三天後開始出現死亡個體，七天後存活魚隻為2, 3, 4隻；餵食巴斯德桿菌加上0.2 mg天蠶素組（Pdp+cecropin 0.2 mg）於感染三天後開始出現死亡個體，七天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上CAP包裹2 mg天蠶素組（Pdp+cecropin in CAP 2 mg）於感染三天後開始出現死亡個體，五天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上CAP包裹0.2 mg天蠶素組（Pdp+cecropin in CAP 0.2 mg）於感染兩天後開始出現死亡個體，四天後無魚隻存活；餵食巴斯德桿菌加上1 mg天蠶素與CAP包裹1 mg天蠶素組（Pdp+cecropin 1 mg+cecropin in CAP 1 mg）於感染兩天後開始出現死亡個體，四天後無魚隻存活。

本部份實驗每組為三重複，每重複四隻魚。感染菌數皆為30000 CFU/fish。

0.2 mg天蠶素相當於2500  $\mu$ M；2 mg相當於5000  $\mu$ M。

參考文獻：

古鎮鈞，陸知慧，許慶興，陳秀男。海鱷在澎湖海水箱網養殖現況與疾病調查。

漁業署養殖特刊第一號、魚病研究專輯（二十）2000，35-45。

古鎮鈞，吳忠純，范余傑，鄭益成，陸知慧。海水箱網養殖海鱷巴斯德桿菌症之防治。漁業署養殖特刊第三號、魚病研究專輯二十一。2001，31-40。

郭光雄。養殖生物細菌性疾病防治。網頁資源。

曾士展。微生物的世界-微生物知識。網頁資源。

<http://microbiology.scu.edu.tw/micro/bacteria/A5.htm>

澎湖縣家畜疾病防治所，澎湖地區海水箱網養殖魚類疾病之疫情調查。網頁資源，水產簡介。[Http://www.phldcc.gov.tw/work/page\\_5.asp#c2](http://www.phldcc.gov.tw/work/page_5.asp#c2)

蔡信雄，海鱷疾病簡介。網頁資源。[Http://211.79.160.84/cobia/default1.html](http://211.79.160.84/cobia/default1.html)

劉秉忠、涂智欽、李國誥。造成養殖淡水魚皮膚潰瘍症病原菌（*Aeromonas hydrophila*）之分離及致病性。漁業署養殖特刊第九號、魚病研究專輯（二十二）2005，21-30。

劉秉忠，蔡俊男，李國誥。箱網養殖海鱷細菌性疫苗開發及有效性研究。漁業署養殖特刊第九號、魚病研究專輯（二十二）2005，41-50。

Barnes, A. C., dos Santos, N.M.S., and Ellis, A.E.. Update on bacterial vaccines: *photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Progress in fish immunology (2005) vol. 121, pp 75-84.

Barrett, John F. Overview of Anti-Infective Drug Development. Current protocols in pharmacology (2005) 13A.1.1-13A.1.8.

Bland, John M., Anthony J. De Lucca, Tom J. Jacks and Craig B. Vigo. All-D-cecropin B: Synthesis, conformation, lipopolysaccharide binding, and antibacterial activity. Molecular and Cellular Biochemistry 218 (2001), 105–111.

Boman, Hans G., Ingrid Faye, Gudmundur H. Gudmundsson, Jong-Youn Lee and Dan-Anders Lidholm. Cell-free immunity in cecropia, a model system for antibacterial proteins. *European journal of biochemistry* 201 (1991), 23-31.

Brogden, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology* 3-3 (2005), 238-250.

Chang, Chin-I, Olga Pleguezuelos, Yong-An Zhang, Jun Zou and Christopher J.

- Secombes. Identification of a Novel Cathelicidin Gene in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and immunity* 8 (2005), 5053-5064.
- Cole, Alexander M., Peddrick Weis and Gill Diamond. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *The journal of biological chemistry* 272 (1997), 12008-12013.
- Cole, Alexander M., Rabih O. Darouiche, Diana Legarda, Nancy Connell and Gill Diamond. Characterization of a Fish Antimicrobial Peptide: Gene Expression, Subcellular Localization, and Spectrum of Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (8) 2000, 2039–2045.
- Conlon, J. Michael, Nadia Al-Ghaferi, Bency Abraham, Jérôme Leprince. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods* 42 (2007), 349–357.
- Faulk, C. K., A. D. Benninghoff and G. J. Holt. Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *Journal of fish pathology* 70 (2007), 567-583.
- Fouz, B., A. E. Toranzo, M. Milan, C. Amaro. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of applied microbiology* 88 (2000), 531-535.
- George, Meera and T. Emilia Abraham. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release* 114 (2006), 1-14.
- Guillaume, Jean, Sadisivam Kaushik, Pierre Bergot and Robert Métailler. 2001. Nutrition and feeding of fish and crustaceans. 1<sup>st</sup> edition, p35-37. New York: Springer.
- Halver, John E. and Ronald W. Hardy. 2002. Fish Nutrition. 3<sup>rd</sup> edition, p 398-400. Boston: Academic Press.
- Hastein, T., R. Guddung and Ø. Evensen. Bacterial vaccines for fish - an update of the current situation worldwide. *Progress in fish vaccinology* vol 121 (2005), pp 55-74.
- Ho, Shih-Hu, Chia-Zong Lin, Yu-Chih Chen and Yen-Ling Song. Effects of cecropin peptides on aquatic animal pathogens and shrimp hemocytes. *Fish pathology* 37-1 (2002), 7-12.
- Hultmark, Dan, Hakan Steiner, Torgny Rasmuson, and Hans G. Boman. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from

- hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European journal of biochemistry* 106 (1980), 7-16.
- Leaño, Eduardo M., Guo, J.J., Chang, S.L., Liao, I.C. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 30-4 (2003), 321-330.
- Lee, Sung-Ah, Yu Kyoung Kim, Shin Saeng Lim, Wan Long Zhu, Hyunsook Ko, Song Yub Shin, Kyung-Soo Hahm, and Yangmee Kim. Solution structure and cell selectivity of piscidin 1 and its analogues. *Biochemistry* 46 (2007), 3653-3663.
- Liao, I.C., Huang, T.S., Tsai, W.S., Hsueh, C.M., Chang, S.L., Eduardo M. Leano. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture* 237 (2004), 155-165.
- Lin, H.Y., Chen, T.Y., Chen, M.S., Chen, H.E., Chou, R.L., Chen, T.I., Su, M.S., Yang, H.L. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture* 255 (2006), 125-132.
- Liu B, Rayment SA, Soares RV, Oppenheim FG, Offner GD, Fives-Taylor P, Troxler RF. Interaction of human salivary mucin MG2, its recombinant N-terminal region and a synthetic peptide with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of periodontal research* 37 (2002), 416-424.
- Liu, P.C., Lin, J.Y., Lee, K.K.. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of basic microbiology* 43-6 (2003), 499-507.
- Liu, P.C., Lin, J.Y., Chuang, W.H., Lee, K.K.. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World journal of microbiology and biotechnology* 20 (2004), 495-499.
- Liu, P.C., Lin, J.Y., Hsiao, P.T., Lee, K.K.. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of basic microbiology* 44-1 (2004), 23-28.
- Locke, Jeffrey B., Kelly M. Colvin, Anup K. Datta, Silpa K. Patel, Nandita N. Naidu, Melody N. Neely, Victor Nizet, and John T. Buchanan. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish. *Journal of Bacteriology* 189-4 (2006), 1279-87.
- Lopez, Fabian E., Paula A. Vincent, Ana M. Zenoff, Raúl A. Salomón and Ricardo N. Farías. Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella*

- infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2007), 676-680.
- Magariños, Beatriz, Francisco Pazos, Ysabel Santos, Jesús L. Romalde. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of aquatic organisms* 21-2 (1995), 103-108.
- Magariños, Beatriz, Alicia E. Toranzo, Jesús L. Romalde. Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual review of fish diseases*. 6 (1996), 41-64.
- Magariños, Beatriz, Jesús L. Romalde, Manuel Noya, Juan L. Barja, Alicia E. Toranzo. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS microbiology letters* 138 (1996-2), 29-34.
- Magariños, Beatriz, Norma Couso, Manuel Noya, Pilar Merino, Alicia E. Toranzo, Jesus Lamas. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195 (2001), 17-21.
- Marr, Alexandra K., William J Gooderham and Robert EW Hancock. Antimicrobial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology* 6 (2006), 468-472.
- Matsuzaki, Katsumi. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* 1462 (1999), 1-10.
- Meng, He and Krishna Kumar. Antimicrobial Activity and Protease Stability of Peptides Containing Fluorinated Amino Acids. *Journal of the American chemical society* 129-50 (2007), 15615-22.
- Milovanovic, D. and J. G. Nairn. Microencapsulation of sulfadiazine with cellulose acetate phthalate. *Drug development and industrial pharmacy* 12-8&9 (1986), 1249-1258.
- Motyl, Mary, Karen Dorso, John Barrett and Robert Giacobbe. Basic microbiological techniques used in antibacterial drug discovery. *Current protocols in pharmacology* 13 (2005), 13A.3.1-13A.3.22.
- Moyanoa, Francisco J., Laurent Savoie. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comparative biochemistry and physiology part A* 128 (2001), 359-368.
- Mygind, Per H. *et al.* Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437 (2005), 975-980.

- Rajan, P. R., Carmen Lopez, John Han-You Lin, Yang, H.L.. *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 21-6 (2001), 228-234.
- Ronalde, Jesús L. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. International microbiology 5 (2002), 3-9.
- Sato, Hiromi and Jimmy B. Feix. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1758-9 (2006), 1245-1256.
- Santos, Nuno M. S. Dos, J. J. Taverne Thiele, Andy C. Barnes, Willem B. van Muiswinkel, Anthony E. Ellis, Jan H. W. M. Rombout. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. Fish and shellfish immunology 11 (2001), 65-74.
- Silva, Sena S. De and Trevor A. Anderson. 1995. Fish nutrition in aquaculture. 1<sup>st</sup> edition, p113-116. New York : Chapman & Hall.
- Spronk, Henri M.H., Jose W.P. Govers-Riemslog, and Hugo ten Cate. The blood coagulation system as a molecular machine. Bioassay 25-12 (2003), 1220-1228.
- Tung, M.C., Chang, L.T., Tsai, S.S., Wang, D.H.. Mass mortality associated with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in sea-cage cultured cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1776) in southern Taiwan. 漁業署養殖特刊第一號、魚病研究專輯 (二十) 2000 , 133-145。
- Vale, Ana do, Manuel T. Silva, Nuno M. S. dos Santos, Diana S. Nascimento, Pedro Reis-Rodrigues, Carolina Costa-Ramos, Anthony E. Ellis, Jorge E. Azevedo. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. Molecular Microbiology 58-4 (2005), 1025-1038.
- Vale, Ana do, Carolina Costa-Ramos, Alexandra Silva, Daniela S. P. Silva, Fátima Gartner, Nuno M. S. dos Santos, Manuel T. Silva. Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. Cellular Microbiology 9-4 (2007), 988-1003.
- Wang, Wei, David Keith Smith, Hueih Min Chen. The effect of pH on the structure, binding and model membrane lysis by cecropin B and analogs. Biochimica et biophysica acta 1473 (1999), 418-430.

- Zappulli, V., T. Patarnello, P. Patarnello, F. Frassinetti, R. Franch, A. Manfrin, M. Castagnaro, L. Bargelloni. Direct identification of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* by PCR-RFLP analysis. *Diseases of aquatic organisms* 65 (2005), 53-61.
- Zasloff, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (2002), 389-395.

