

哈維氏弧菌細胞外產物中蛋白分解酵素純化、特性分析及其對白蝦血淋巴之影響

李沛珊^{1*} · 李國誥² · 許博淵³ · 劉秉忠²

¹行政院農委會水產試驗所東部海洋生物研究中心

²國立臺灣海洋大學水產養殖系

³高雄醫學大學

摘要

本研究以蝦類常見之病原菌－哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 作為研究對象，首先分離純化其胞外產物之蛋白分解酵素，進而分析細胞外產物及其純化之蛋白分解酵素對南美白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 之凝血因子與血藍素之影響。研究分離純化一種蛋白分解酵素，其分子量約為 22 kDa、等電點為 4.15，在 pH 為 6 及 60 °C 時具最大活性，屬熱不穩定型，會受到 AEBSF、bestatin、EDTA 和 EDTA-2Na、1,10-phenanthroline、iodoacetic acid、pepstatin A、phosphoramidon、PMSF 及 L-cysteine 等抑制，屬於兼具絲氨酸型及金屬型特性的蛋白質分解酵素。哈維氏弧菌細胞外產物和純化之蛋白分解酵素對白蝦 (5 ± 0.5 g) 的 LD₅₀ (48 hr) 分別為 1.52 及 0.52 µg protein / g shrimp，當白蝦注射細胞外產物及純化之蛋白分解酵素後，皆會造成白蝦血淋巴之凝血蛋白質質量下降，但對血藍素的影響不明顯。

關鍵詞：哈維氏弧菌、細胞外產物、蛋白分解酵素、凝血蛋白、血藍素

前言

哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 屬於革蘭氏陰性短桿菌，具側鞭毛，有運動性，並會發出螢光，菌體大小長度為 1.4 ~ 2.6 µm，寬度為 0.5 ~ 0.8 µm，培養需添加 1 ~ 9% 之 NaCl，在 thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) 培養基中多為綠色菌落。此菌是造成蝦類及貝類弧菌症的病原菌之一，常導致水產養殖生物嚴重損失。

一般而言，細菌之致病性與細菌的表面相關成分 (cell surface associated properties) 及細胞外產物 (extracellular products, ECP) 有關 (Lee and Ellis, 1991; Santos *et al.*, 1992; Toranzo and Barja, 1993; Thune *et al.*, 1993; De la Cruz and Muroga,

1989; Lee and Ellis, 1990)。細菌之細胞外產物是一群組成複雜的物質，包括有蛋白分解酵素 (proteases)、磷脂質分解酵素 (phospholipase)、溶血素 (hemolysins)、血凝集素 (hemagglutinins)、細胞毒素 (cytotoxins)、殺白血球素 (leukocytolysins) 及脂多醣 (lipopolysaccharides, LPS) 等 (Lee and Ellis, 1990)。不同種的 *Vibrio* spp. 之細胞外產物，常被認為是引起養殖蝦類的致病毒力因子，研究指出哈維氏弧菌之毒力因子有 proteases、haemolysins、chitinase 和 phospholipase (Liu *et al.*, 199)，其中以 proteases 較為重要。

Protease 依據其活性部位、作用機制以及 3-D (three-dimension) 立體結構的不同，可劃分為 4 大類 (Barrett, 1980; Travis and Salvesen, 1983)：serine proteases、cysteine proteases、aspartic proteases 及 metallo proteases。根據 Goguen *et al.* (1995) 之研究，推測 protease 與細菌致病之關係可能有四種模式：1. 分解宿主組織蛋白，得到自

*通訊作者 / 臺東縣臺東市知本路 2 段 291 巷 299 號，
TEL: (089) 514362 轉 207; FAX: (089) 514366; E-mail:
pslee@mail.tfrin.gov.tw

己所需的養分；2. 抑制宿主的發炎反應，使細菌不受到傷害；3. 活化宿主不適當的調控反應，干擾宿主的抵抗；4. 活化自己的毒素，達到破壞宿主細胞的目的。

Lee *et al.* (1999) 指出哈維氏弧菌細胞外產物中的 protease (38 kDa) 會對草蝦 (*Penaeus monodon*) 血淋巴之凝血蛋白造成影響；吳 (2005) 推測哈維氏弧菌細胞外產物會破壞白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 凝血機制及呼吸作用。Liu *et al.* (1997, 1999) 已自哈維氏弧菌細胞外產物分離純化出一 38 kDa 之 cysteine protease，本研究擬以該哈維氏弧菌菌株 (820514) 為研究對象，純化分離其具有活性且蛋白量較多之細胞外蛋白質產物，分析其分子量、等電點、最適作用環境 (pH 及溫度)、熱穩定性、抑制劑及二價金屬對其影響及對白蝦的致死效果，並進行體外細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦血漿、凝血蛋白及血藍素影響，及細胞外產物及純化蛋白分解酵素攻擊白蝦後，其體內血淋巴中蛋白質之變化，以了解哈維氏弧菌對白蝦之致病機制。

材料與方法

一、菌株來源、活(強)化及鑑定

菌株 (strain 820514) 為分離自臺灣宜蘭養殖區罹病草蝦之肝胰臟，以 MSWCA (modified seawater complete agar) 活化，觀察其生長狀態與發光特性，並培養於 TCBS 上，同時應用 API 20E Kit (API system)、Biolog GN2 (Biolog system) 及 Microgen GN-ID strip (Microgen Bioproducts, England) 輔助菌株之鑑定。

二、哈維氏弧菌細胞外產物 (extracellular products, ECP) 之製備

將活化於 MSWCA plate 上之菌株，製備成菌懸液，均勻塗佈於覆蓋有 cellophane 之 MSWCA 鐵盤上培養 30 hr，製成菌懸液，離心取上層液並以 0.22 μm 濾膜過濾，所得濾液即為細胞外產物 (Lee and Ellis, 1990)。

三、蛋白質含量的測定

採用 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, U.S.A)，以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, Sigma) 為標準蛋白質，製作標準曲線。取 25 μl 樣品加入 1.25 ml 之 bio-rad protein assay kit，反應 5~15 min，使用波長 595 nm 測定吸光值，以直線迴歸方法算出蛋白質含量 (Bradford, 1976)。

四、蛋白質分解酵素活性測定

採用 hide powder azure digestibility assay，取 30 μl 樣品加入含有 7.5 mg hide powder azure (HPA, Sigma) 之 720 μl PBS 混合均勻。空白組則直接加入含 7.5 mg HPA 之 750 μl PBS。同時置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反應，15 min 後加入 750 μl 10% trichloroacetic acid (TCA) 終止反應，以 850 $\times g$ 離心 10 min，取上清液於波長 600 nm 測其吸光值。以吸光值改變 0.01 為 1 單位。

五、哈維氏弧菌細胞外產物蛋白分解酵素之純化步驟及一般分析

(一) 硫酸銨沉澱

硫酸銨粉末緩慢添加至 ECP 中，直至硫酸銨飽和度達 70%，攪拌均勻，靜置約 30 min，以 25,000 $\times g$ 離心 1 hr，取沉澱物並溶於蒸餾水中透析直到完全溶解，再以等體積 100 mM 磷酸緩衝液(含 2 M 的硫酸銨)和樣品均勻混合，使樣品濃度相當於 50 mM 磷酸緩衝液(含 1M 的硫酸銨)。

(二) 疏水性作用層析 (hydrophobic interaction chromatography; HIC)

先將 phenyl sepharose high performance 填充於 C-16/20 column (Pharmacia)，於 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography System, Pharmacia) 中，以 50 mM 磷酸緩衝液 (含 1M 的硫酸銨) 平衡。將經硫酸銨作用過之樣品注入管柱後，以 50 mM 磷酸緩衝液緩慢注入，直到管柱內不含硫酸銨為止。取具有蛋白質吸光值 (Abs 280 nm) 波峰之樣品管子進行蛋白質分解酵素活性測定及白蝦

攻擊試驗，將所需樣品收集、透析及濃縮。

(三) 樣本的過濾與濃縮

將上述之樣品以自製 10% Native-PAGE 分離，切下具活性部位 (已事先進行 casein 壓片活性測試)，裝入半透膜中，以電泳方式將樣品自膠體中提出、過濾及濃縮。

(四) 陰離子交換 - DEAE column chromatography

將 DEAE Sephacel 填充於 C-10/20 column (Pharmacia) 中，並以 20 mM Tris 緩衝液平衡，使用 FPLC 系統純化，將樣品注入管柱中，以 20 mM Tris 緩衝液 (含 0.5M 氯化鈉) 緩慢注入，直到管內氯化鈉濃度達到 1M 為止。取具有蛋白質吸光值 (Abs 280 nm) 波峰之樣品管子進行蛋白質分解酵素活性測定及白蝦攻擊試驗，將所需樣品收集、透析及濃縮後再進行一次 DEAE 陰離子交換法，將具有活性之樣品收集，冰凍於 -80 °C 備用。

(五) 電泳及染色

純化之樣品連同 Marker (Amersham Biosciences RPN 756) 以自製 15% SDS (sodium dodecyl sulfate) - PAGE 進行電泳分析 (staging 階段以 80V 進行 15 min，接著 running 階段以 125V 進行，直到 dye 到底端)，電泳結束後膠片採用 silver staining kit, Protein (Amersham Biosciences) 觀察其純化程度及估計其分子量大小。

(六) 純化蛋白分解酵素活性位置之測定

添加 0.1% casein 及 1% agarose 於 9 ml PBS 中配製成 casein-agarose solution，將其煮沸微冷卻即傾倒於 gelbond film 上，待其凝固，覆蓋於跑完自製 15% SDS-PAGE (未還原及未煮) 上，1.5 hr 後，烘乾以 coomassie brilliant blue R-350 染色，呈透明者則代表此處之 casein 被蛋白分解酵素分解。

(七) 西方點墨分析 (Western blotting)

西方點墨法是利用特定抗體能夠專一結合其

抗原蛋白質的原理來對樣品進行呈色之方法，實驗大至分為鑄膠、跑膠、轉印、接一級抗體、接二級抗體及顯色等步驟。本試驗是先將所有純化步驟的樣品以電泳分離後，以 PVDF 膜轉印，以 rabbit anti-*V. harveyi* 82 ECP IgM 為一級抗體，goat anti-rabbit IgM-AP 為二級抗體，以 NBT/BCIP 呈色，並以含有 EDTA 之 TBS 終止反應。

(八) 蛋白質定序

純化蛋白分解酵素跑蛋白質電泳，以 coomassie brilliant blue R-350 染色，切下所需目標 band，以 LC-MS/MS (液相層析串聯式質譜儀) 進行定序分析。

六、純化蛋白分解酵素之特性分析

(一) 等電點 (isoelectric point, pI) 之測定

採用 Invitrogen 電泳系列產品進行等電聚焦 (isoelectric focus) 電泳以測定樣品之等電點。膠片採用 pH 3-10 IEF 1.0 (Invitrogen)。標準蛋白採用 isoelectric focusing calibration kit broad range pI 3-10 (Pharmacia)。

(二) 最適 pH 值、最適作用溫度及熱安定性之測定

1. 最適 pH 值

將 PBS buffer 之 pH 調整為範圍 3~10，再依 buffer : sample = 9 : 1 相混合後置於 37 °C 水浴槽作用 1 hr，以 HPA 測定活性，活性最高者為 100%，其他則以相對百分比表示之。

2. 最適作用溫度

將純化蛋白分解酵素與 HPA 混合置於 4、10、20、30、40、50、60、70 及 80 °C 反應，觀察活性之變化，活性最高者為 100%，其他則以相對百分比表示之。

3. 熱安定性之測定

取純化蛋白分解酵素 0.25 ml，分別置於 4、10、20、30、40、50、60、70 及 80 °C 作用 30 min

迅速移入 4 °C 內冷卻，以 HPA 測定活性，4 °C 蛋白分解酵素活性為 100%，其他則以相對百分比表示之。

(三) 抑制劑及二價金屬對純化蛋白分解酵素之影響

將純化蛋白分解酵素與 10 mM 抑制劑或二價金屬離子水溶液等量混合，置於 37 °C 水浴槽作用 1 hr，以 HPA 測定剩餘活性。抑制劑包括：AEBSF、antipain-dihydrochloride、bestatin、L-cysteine、E-64、EDDA、EDTA、EDTA-2Na、EDTA-4Na、EGTA、N-ethylmaleimide、iodoacetic acid、leupeptin、2-mercaptoethanol、pepstatin A、1,10-phenanthroline、phosphoramidon、PMSF、SDS、TPCK 及 trypsin inhibitor(soybean) 共 21 種；二價金屬包括：ZnCl₂、MgCl₂、CuCl₂·2H₂O、CdCl₂·H₂O 及 CaCl₂ 共 5 種。

七、哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦之毒性試驗

將哈維氏弧菌 ECP (濃度為 0、53、80、114、133 及 200 µg/ml) 及純化蛋白分解酵素 (濃度為 0、27、55、75、93 及 146 µg/ml) 分別注射體重 5.0±0.5 g 之白蝦，使每克蝦子之接收哈維氏弧菌 ECP 注射劑量為 0、0.53、0.88、1.14、1.33 及 2 µg，純化蛋白分解酵素注射劑量為 0、0.27、0.55、0.75、0.93 及 1.46 µg，注射採肌肉注射方式，從蝦體背部第三、第四節之間注入，注射後觀察二天並記錄死亡數目，以求得 48 hr 之 LD₅₀。

八、交叉免疫電泳

(crossed immunoelectrophoresis, CIE)

樣本先做單向帶狀電泳，接著將膠片轉 90 度進行第 2 方向電泳，使第一方向電泳所分離的各種物質進入含有抗血清的膠體。本試驗使用的抗血清為兔子抗哈維氏弧菌 ECP 抗血清、兔子抗白蝦血漿抗血清、兔子抗白蝦凝血蛋白抗血清及兔子抗白蝦血藍素抗血清。

結 果

一、哈維氏弧菌之鑑定

採集疑似哈維氏弧菌之菌株 820514，依其在 MSWCA 生長菌落形狀、產生螢光、在 TCBS 生長菌落為綠色，及經 API 20E Kit、Biolog GN2 及 Microgen GN-ID strip 三種套組之鑑定分別與哈維氏弧菌有 96%、99% 及 97% 相似度，結果確認為哈維氏弧菌。

二、哈維氏弧菌細胞外產物之蛋白分解酵素之純化結果及相關特性分析

(一) 蛋白分解酵素之純化結果

哈維氏弧菌之細胞外產物經由硫酸銨沉澱，以 HIC 管柱分離之結果如 Fig. 1，主要有 4 個波峰位於第 68 ~ 148 ml 收集管，收集具有較強的蛋白分解酵素活性並會導致白蝦死亡之第 96 ~ 148 ml 收集管並濃縮。先取少量濃縮樣品以 10% Native-PAGE 進行電泳，將 PAGE 分成對稱左右兩部分，一半以含 0.1% casein 之 agarose 壓片，一半以 coomassie blue 染色，確定目標蛋白帶的位置，結果如 Fig. 2，膠片最下面一條蛋白帶會分解 casein 具有酵素活性。將剩餘 sample 以 10% Native-PAGE (不染色) 進行電泳，切下具有活性相對位置膠體，以電泳方式將蛋白質從膠體趕出並濃縮，接著以陰離子交換法 (DEAE column) 分離，結果有 3 個波峰位於第 12 ~ 24、38 ~ 50 及 66 ~ 75 ml 收集管，其中 66 ~ 75 ml 收集管具有較強的蛋白分解酵素活性及對白蝦有致死性，收集並濃縮，再經第 2 次陰離子交換法分離結果只在 68 ~ 73 ml 收集管具有活性之大波峰 (Fig. 3)，將此純化物進行分子量及活性位置之測定結果為原 ECP 是由非常多種蛋白質組成 (Fig. 4A)，隨著每個純化步驟逐漸減少，最後經第二次 DEAE 管柱層析僅有單一蛋白帶出現，分子量約為 22 kDa。研究顯示分離的哈維氏弧菌菌株其 ECP 具有 2 個明顯活性位置 (22 及 38 kDa)，本研究純化物為 22 kDa 蛋白質 (Fig. 4B)。

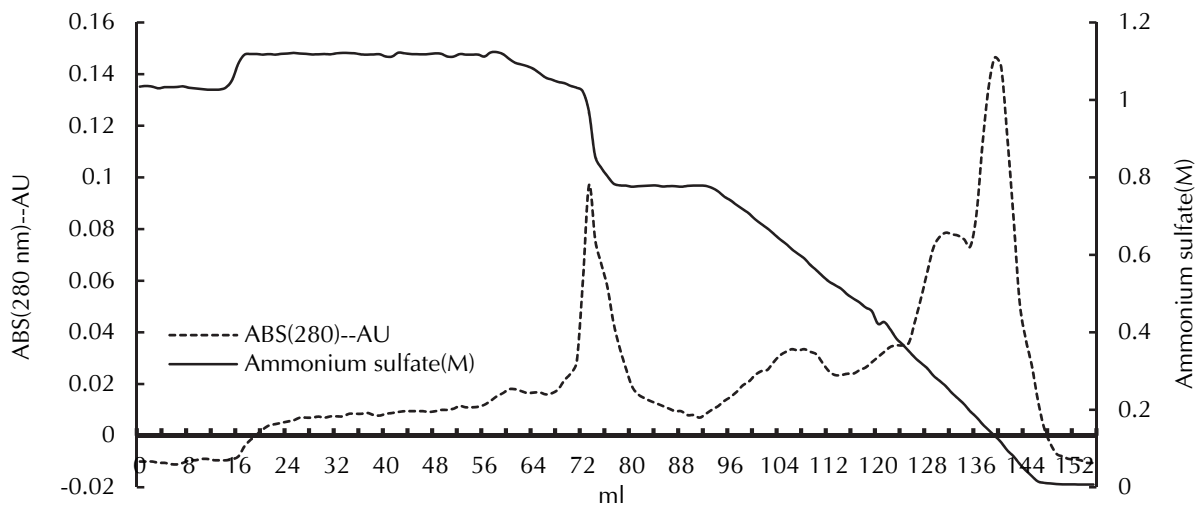


Fig. 1 Profile of FPLC-hydrophobic interaction chromatography (FPLC-HIC) of *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP. Sample was applied to Phenyl Sepharose High Performance column and eluted with stepped gradient of 1 to 0 M ammonium sulfate 50 mM phosphate buffer pH 7.0 at a rate of 1 ml/min.

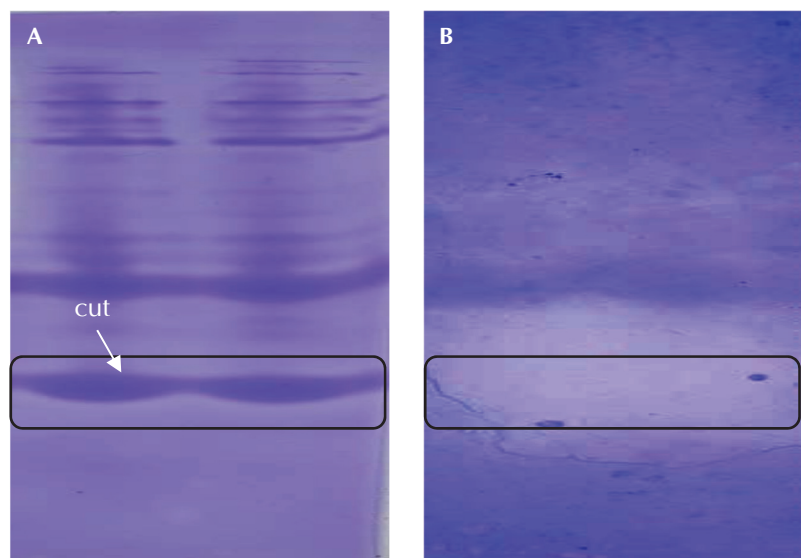


Fig. 2 Protein profile and protease activity distribution of pool of fraction 25-37 from FPLC-HIC on 10% Native-PAGE. (A) 10% Native-PAGE of pool of fraction 25-37 from FPLC-HIC; (B) Zymogram of 0.1% casein of (A).

(二) 純化蛋白分解酵素純度測試結果

1. CIE 方法

以哈維氏弧菌 (strain 820514) ECP 及純化蛋白分解酵素為抗原，兔子抗哈維氏弧菌 ECP 之抗血清為抗體，以 CIE 分析結果為哈維氏弧菌 ECP 具有許多大小不同之沉澱弧 (Fig. 5A)，而純化蛋白分解酵素僅在同一個位置上，出現一個大沉澱弧及小沉澱弧 (Fig. 5B)，顯示此純化蛋白分解酵素之蛋白質種類非常單純。

2. Western blotting 方法

先以原始樣品 (ECP) 及各個純化步驟所收集之樣品當作抗原，兔子抗哈維氏弧菌 ECP 之抗血清為抗體，以 western blotting 分析的結果顯示其作用反應隨著各個純化步驟，出現反應的位置有逐漸減少且有越來越專一的現象 (Fig. 6A)。而以純化蛋白分解酵素為抗原，兔子抗哈維氏弧菌 ECP 之抗血清為抗體，以 western blotting 分析的結果僅在 22 kDa 位置有反應 (Fig. 6B)，顯示此純化蛋白分解酵素純度很高。

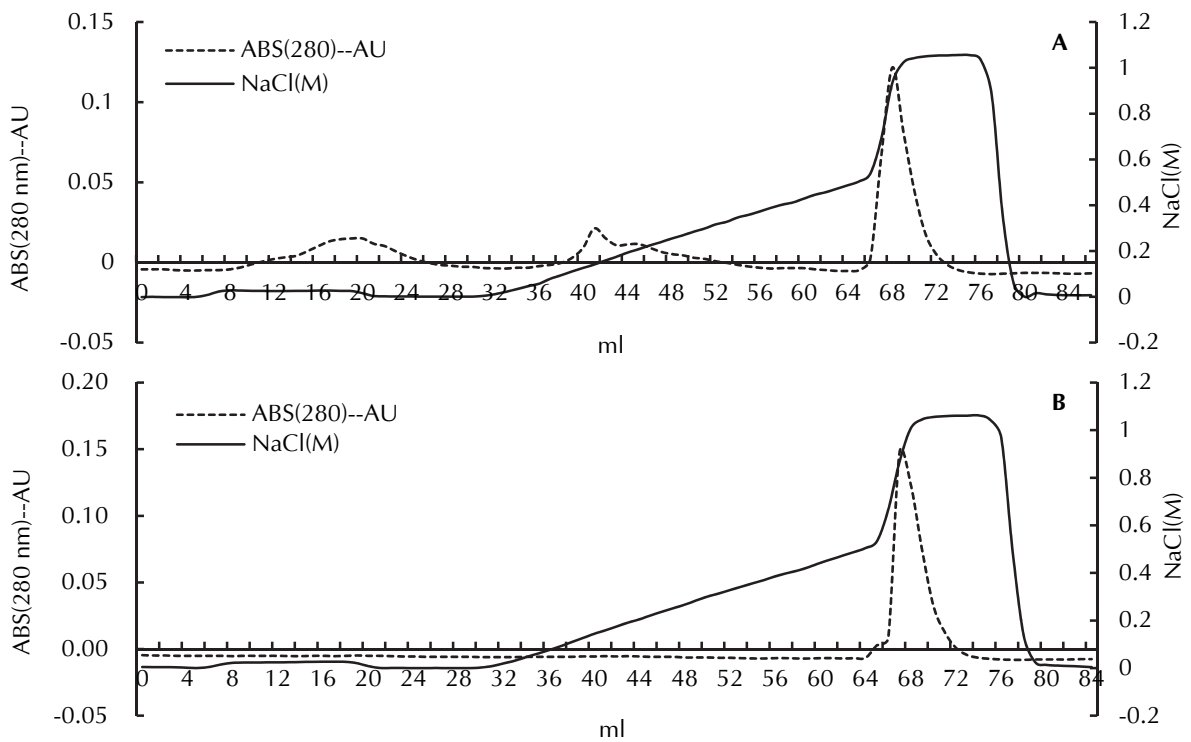


Fig. 3 Profile of FPLC – anion exchange chromatography (A) 1st FPLC-DEAE of pool of cut gel (10% Native PAGE). (B) 2nd FPLC-DEAE of fractions 66-75 from the 1st FPLC-DEAE. Sample was applied to DEAE column and eluted with stepped gradient of 0 to 1 M NaCl 50 mM Tris buffer pH 8.0 at a rate of 1 ml/min.

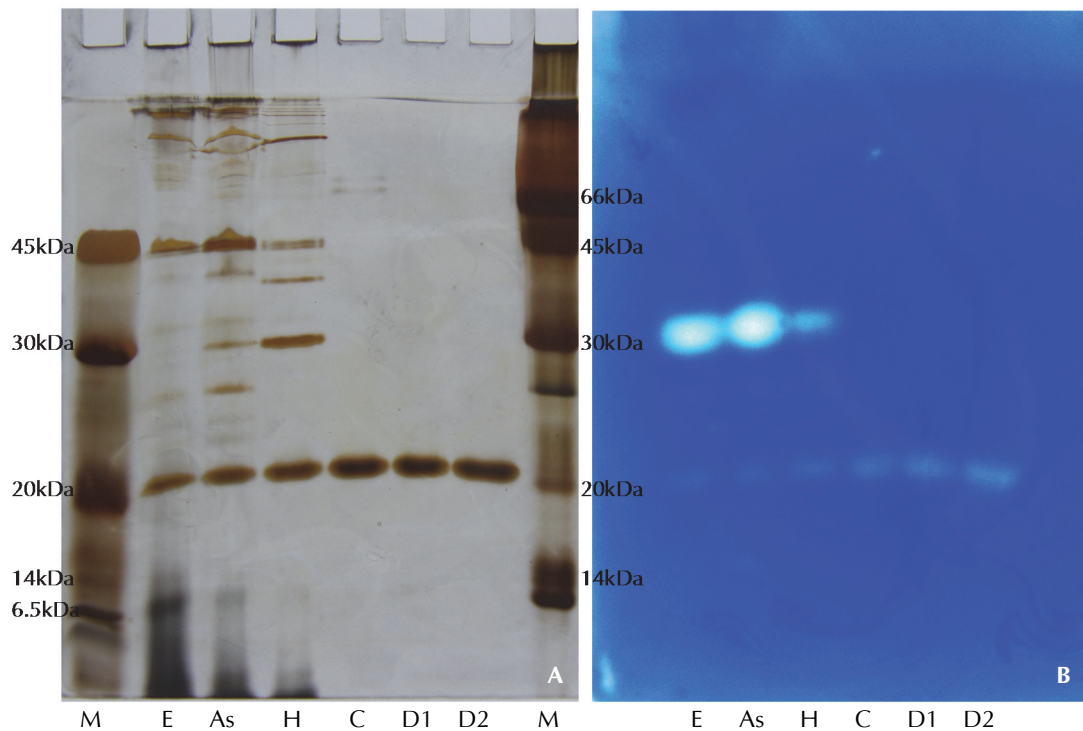


Fig. 4 Protein profile and purified protease (22 kDa) activity distribution of each purification step of ECP of *Vibrio harveyi* (strain 820514) on 15% SDS-PAGE. (A) 15% SDS-PAGE of each purified steps. (B) Zymogram of 0.1% caesin of (A). M: marker protein; E: ECP; As: ECP (70 % ammonium sulfate); H: HIC partially purified protease; C: Cut Gel; D1: 1st DEAE partially purified protease; D2: 2nd DEAE purified protease.

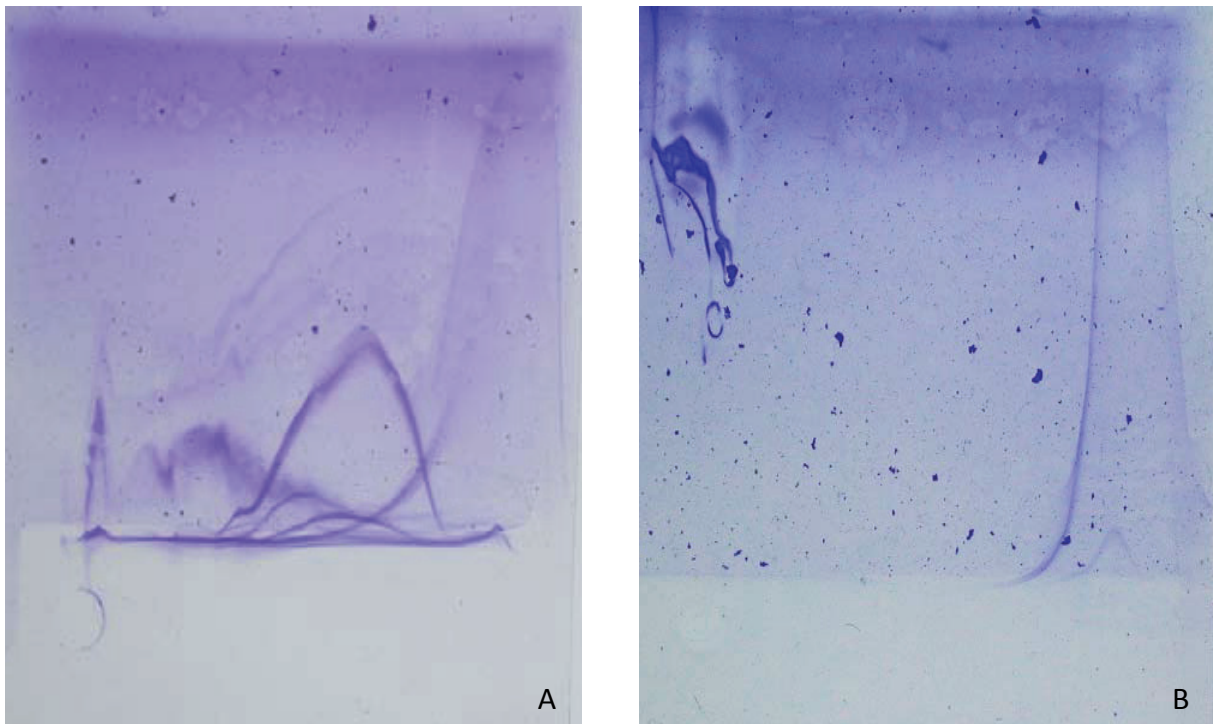


Fig. 5 Crossed immunoelectrophoresis gel. (A) *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP against R α *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP. (B) Purified protease (22 kDa) against R α *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP.

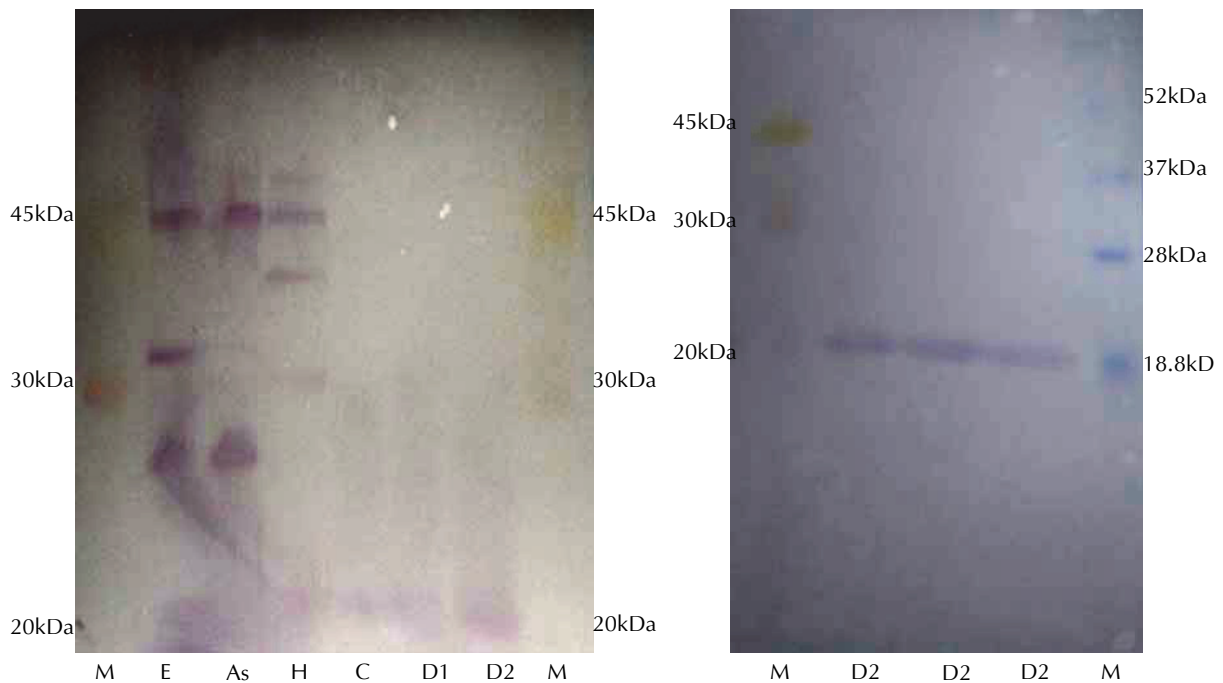
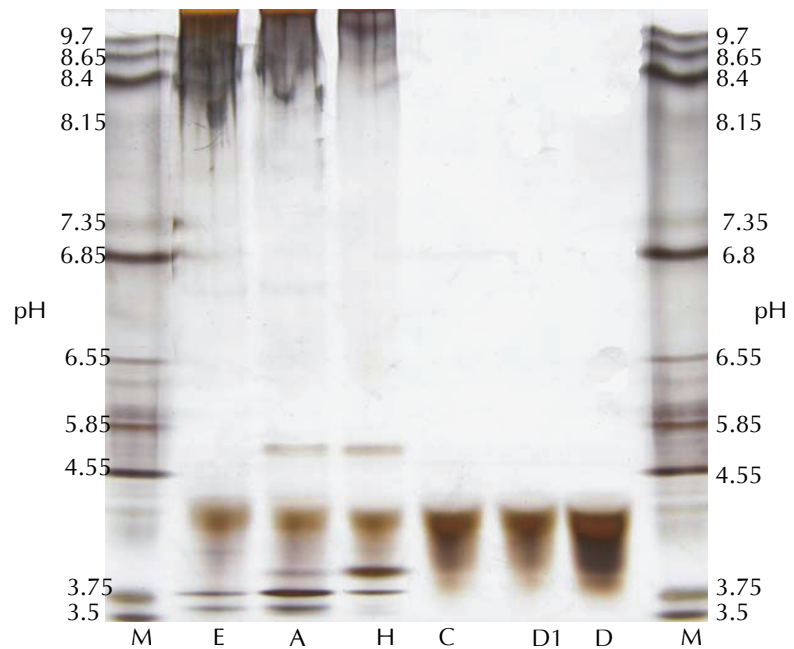


Fig. 6 Western blotting each purification step of *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP. (A) Each purification step of ECP of *Vibrio harveyi* (strain 820514) against R α *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP. (B) Purified protease (22 kDa) against R α *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP. M: marker protein; E: ECP; As: ECP (70 % ammonium sulfate); H: HIC partially purified protease; C: Cut Gel; D1: 1st DEAE partially purified protease; D2: 2nd DEAE purified protease.

Fig. 7 Isoelectric focusing gel profiles of each purification step of *Vibrio harveyi* (strain 820514) (pH 3-10 IEF 1.0 Gel (Invitrogen) ECP. M: marker protein; E: ECP; As: ECP (70 % ammonium sulfate); H: HIC partially purified protease; C: Cut Gel; D1: 1st DEAE partially purified protease; D2: 2nd DEAE purified protease.



(三) 純化蛋白分解酵素之特性分析結果

1. 一般特性分析

使用 pH 3 ~ 10 IEF 1.0 Gel (Invitrogen) 進行等電點之試驗，電泳方向為單一方向由上往下垂直進行，結果發現此純化蛋白分解酵素等電點為 4.25 (Fig. 7)；在 pH 6 ~ 9 時，具有較高的酵素活性 (Fig. 8A)；最適作用溫度為 60 °C (Fig. 8B)；熱安定性試驗結果顯示，在 60 °C 時其活性僅為 4 °C 之 45%，因此，該酵素應屬熱不穩定性蛋白質 (Fig. 8C)。

2. 抑制劑及二價金屬對純化蛋白分解酵素之影響

此純化蛋白分解酵素會受到多種抑制劑影響，包括 AEBSF、bestatin、EDTA、EDTA-2Na、1,10-phenanthroline、iodoacetic acid、pepstatin A、phosphoramidon、PMSF 及 L-cysteine 會完全抑制活性。而 EDDA、EGTA 及 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 也可抑制一半以上的活性 (Table 1)，推測此純化蛋白分解酵素可能同時具有 metalloprotease 及 serine protease 相關特性。

(四) 純化蛋白分解酵素定序結果

純化蛋白分解酵素經 LC-MS/MS 定序結果顯示和哈維氏弧菌 VhpA 之相似性僅為 12% (Fig. 9)。

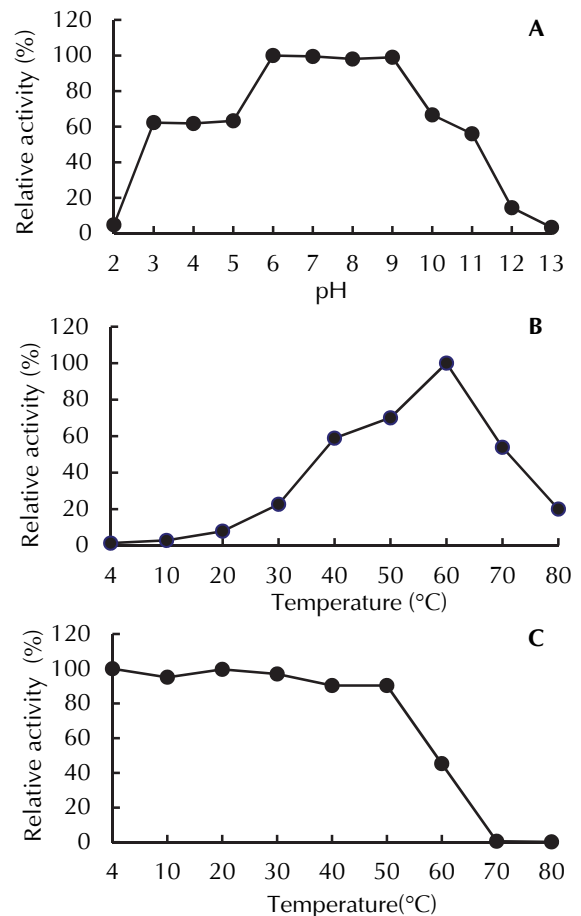


Fig. 8 General characteristics of purified proteinase (22 kDa) of *Vibrio harveyi* (strain 820514). (A) The optimum pH; (B) The optimum temperature; (C) Thermostability. Hide power azure (HPA) was used as the substrate.

Table 1 Effects of various inhibitors, chelating agents and divalent metal ions on the purified protease activity of 22 kDa of *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity of 22 kDa (% of control)
None	0	100
Inhibitor		
AEBSF	5	2.69
Antipain-dihydrochloride	5	103.17
Bestatin	5	0
E-64	5	107.68
EDDA	5	20.08
EDTA	5	1.54
EDTA-Na ₂	5	3.27
EDTA-Na ₄	5	54.56
EGTA	5	38.42
N-Ethylmaleimide	5	83.29
L-Cysteine	5	4.43
Leupeptin	5	102.69
2-mercaptoethanol	5	122.39
Methanol	---	70.99
Iodoacetic acid	5	0.77
Pepstatin A	5	0.67
1,10-phenanthroline	5	0.96
Phosphoramidon	5	1.34
PMSF	5	0
SDS	5	112.67
TPCK	5	87.42
Trypsin inhibitor, Soybean	-	115.75
Divalent metal ion		
CaCl ₂	5	120.66
CdCl ₂ · H ₂ O	5	98.28
CuCl ₂ · 2H ₂ O	5	22.51
HgCl ₂	5	86.84
ZnCl ₂	5	96.92

三、哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦之毒性試驗

哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素 (22 kDa) 對白蝦 48 hr 之 LD₅₀ 分別為每克蝦體重 1.52 µg 及 0.52 µg，實驗中兩組注射 PBS 對照組，皆無死亡情形產生 (Table 2)。

四、哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦血淋巴之影響

以哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦血漿進行體內外試驗，使用交叉免疫電泳及 3 ~ 8% Tris-acetate Gel 觀察血漿、血淋巴中凝血蛋白及血藍素之變化。

(一) CIE 分析試驗

1. 兔子抗白蝦血漿抗血清組

(1) *In vitro* 試驗

血漿與 PBS 作用 30 min，經交叉免疫電泳分析，具有三個沉澱弧，包括 arc 1 為血藍素，arc 2 為凝血蛋白及 arc 3 推測為另一種形式的血藍素或脫殼相關物質；細胞外產物及純化蛋白分解酵素皆會使血漿中凝血蛋白 (arc 2) 之沉澱弧有下降及位移之趨勢；純化蛋白分解酵素雖然會造成血藍素 (arc 1) 之沉澱弧有升高之趨勢，但以面積來評估卻是與 PBS 及細胞外產物組無差異。

(2) *In vivo* 試驗

每克白蝦分別注射細胞外產物 2.0 µg 或純化蛋白分解酵素 0.7 µg，收集垂死白蝦之血淋巴進行交叉免疫電泳分析，結果顯示 PBS 組也具有上述相同三個沉澱弧；細胞外產物及純化蛋白分解酵素組皆會使血漿中凝血蛋白 (arc 2) 之沉澱弧有下降及位移之趨勢；純化蛋白分解酵素會使血藍素 (arc 1) 之沉澱弧有些微升高之趨勢 (Fig. 10)。

2. 兔子抗白蝦凝血蛋白抗血清組 (arc 2)

(1) *In vitro* 試驗

PBS 組結果顯示具有二個沉澱弧，包括 arc 2 為凝血蛋白及另一沉澱弧；細胞外產物會使血漿中凝血蛋白 (arc 2) 之沉澱弧有下降及位移之趨勢；而純化蛋白分解酵素僅會讓凝血蛋白 (arc 2) 產生位移。

(2) *In vivo* 試驗

發現細胞外產物及純化蛋白分解酵素皆會使血漿中凝血蛋白 (arc 2) 之沉澱弧有下降及位移之趨勢 (Fig. 11)。

Protein View

Match to: gi|49823288 Score: 369

VhpA [Vibrio harveyi]

Found in search of C:\Temp\masE0.tmp

Nominal mass (M_r): 85726; Calculated pI value: 4.84NCBI BLAST search of [gi|49823288](#) against nrUnformatted [sequence string](#) for pasting into other applicationsTaxonomy: [Vibrio harveyi](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Carboxymethyl (C),Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 12%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MRIKKRLIAV AVAGVMTMSV HAGESVILTK FVNFTNFSGL NSQLGVNNAS
51  SFRQVRSIHL KKRGVYKVKI QQNVWVFPVW GHSLNATQSF KGGALKTVQG
101 SYLRVNDLDR SFVKPKLNRA DALKVASKNL QDKGFAVKFL RNVEDELFIY
151 QDGKTRLVY VVSYLLANSL QPSRPFTMLD AHSGEVIDRW EGIAHAQIGT
201 GPGGNEKTGM YEYGTDYHFL DVQEDGTNCV MESENVVTVN LNGGTEGSTP
251 YSYECPRNEF QEINGAYSPL NDAHYFGNIV FDMYKNWEDT APLTFKLMMR
301 VHYGTGYENA FWDGQAMTFG DGESEYFPLV SLDVSAHEVS HGFTEQNSGL
351 VYANQSGGMN EAFSDIAGEA AEYMKGENE WMVGKDIFKE DGALRYMDDP
401 SRDGSSINHA QDYDGLNVH YSSGVFNKAP YHLATTDGWD TKKAFELFVL
451 ANQIYNSQDS NFWEGACGVK SAATDLGYDA SAVVNAFGIV GVEPCAEPPL
501 PPEPEYQRLE NGTAVTISGG TGSRTYFDIE VPEGKSQLTI NLAVPNGDPD
551 IYVGLDYAPS PTENICSSLS VSDEVCVIEN PEQGRYTINV FGYAGYDDAE
601 LSATYDDSSA NVPEVASFDQ SVSGKTVQLR STSSDSDGNI VSYQWSLGDG
651 NSQTGETVSH TYAAAGDYSV TLTVIDDAGS ATSTIQTVTI EEGQTDAPFL
701 KLNFGNKFPN GKARVRLSWK YSTDYFIVK RDGKNVGATD FQSYVDQFEH
751 NGTIDVEYQV CTSGNVCSET KRYRFLKPNK

```

Fig. 9 Purified proteinase (22 kDa) on mass spectrometry report.**Table 2** Lethal test of at 48 hr (A) ECP and (B) purified proteinase (22 kDa) of *Vibrio harveyi* (strain 820514) for *Litopenaeus vannamei* (5.0 ± 0.5 g) by intramuscular injection

(A)

Dosage (μ g protein/g shrimp)	Death number of 1 st day	Death number of 2 nd day	Total death / Total number	LD ₅₀ (μ g protein/g shrimp)
0	0	0	0/6	
0.53	0	0	0/6	
0.80	0	0	0/6	
1.14	0	1	0/6	1.52
1.33	2	0	2/6	
2.00	6	—	6/6	

(B)

Dosage (μ g protein/g shrimp)	Death number of 1 st day	Death number of 2 nd day	Total death / Total number	LD ₅₀ (μ g protein/g shrimp)
0	0	0	0/6	
0.27	1	0	1/5	
0.55	1	1	2/6	0.52
0.75	3	2	5/6	
0.93	5	0	5/6	
1.46	5	1	6/6	

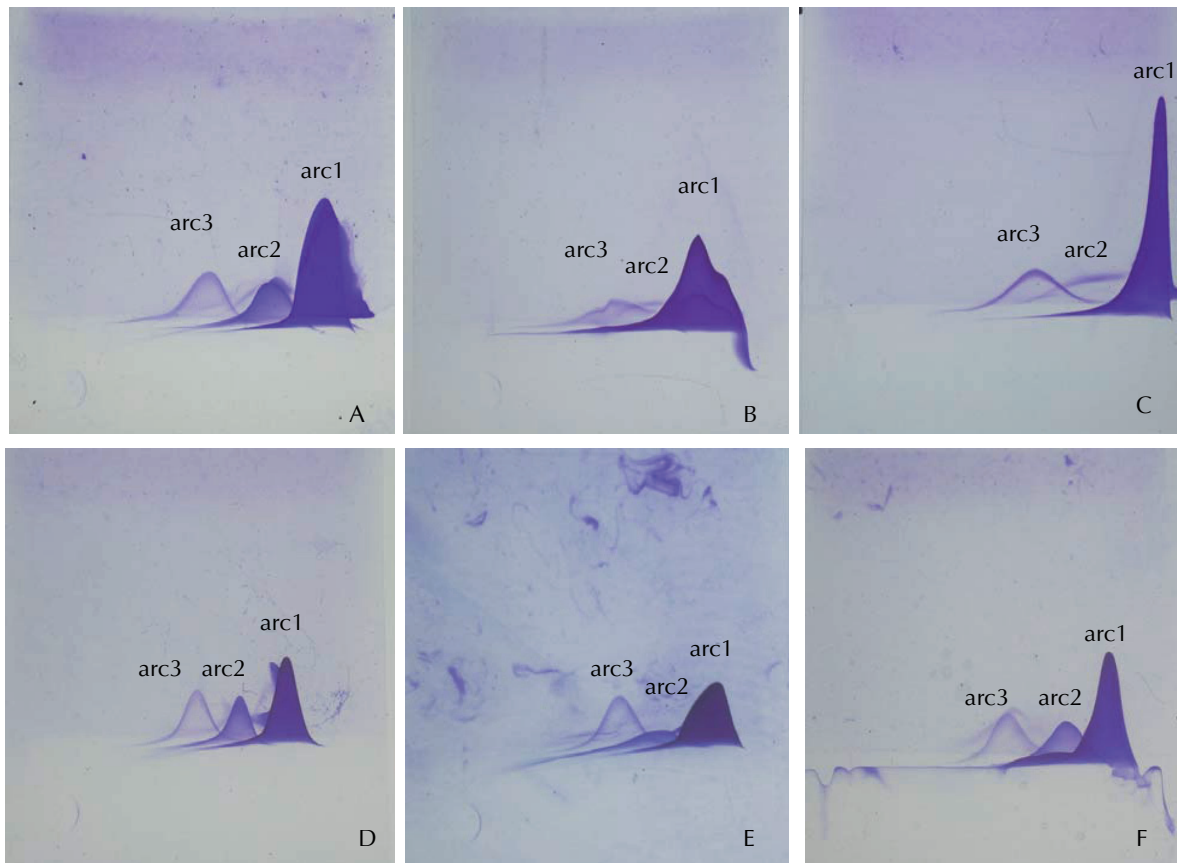


Fig. 10 Profiles of CIE gels of normal prawn plasma pre-incubated or pre-challenged with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa) against R α plasma. (A) Pre-incubated with PBS (control); (B) Pre-incubated with ECP for 30 min; (C) Pre-incubated with purified protease for 30 min; (D) Re-challenged with PBS (control); (E) Re-challenged with ECP (2.0 μ g protein/g body weight); (F) Re-challenged with purified protease (0.7 μ g protein/g body weight).

3. 兔子抗白蝦血藍素抗血清組 (arc 1)

(1) *In vitro* 試驗

PBS 組僅有一個沉澱弧為血藍素 (arc 1)；細胞外產物及純化蛋白分解酵素對血藍素 (arc 1) 皆無顯著影響。

(2) *In vivo* 試驗

結果顯示細胞外產物及純化蛋白分解酵素對血藍素 (arc 1) 並無明顯影響 (Fig. 12)。

(二) 3 ~ 8% Tris-Acetate Gel 分析

1. *In vitro* 試驗

(1) 作用時間

PBS、細胞外產物 (100 μ g/ml) 及純化蛋白分解酵素 (100 μ g/ml) 在體外和白蝦血淋巴作用 10、

20、30、48 及 60 min，結果顯示白蝦血淋巴隨著細胞外產物及純化蛋白分解酵素作用時間越久，290 ~ 500 kDa 之蛋白帶濃度漸漸降低，甚至消失，而 66 ~ 160 kDa 之間的蛋白帶則相對增加許多，尤其以純化蛋白酵素作用 60 min 影響最為明顯，160 kDa 以上的蛋白帶幾乎完全消失，而 66 ~ 160 kDa 之間卻多了好幾條蛋白帶 (Fig. 13)。

(2) 作用濃度

隨細胞外產物及純化蛋白分解酵素 (25、50、75、100、125、200、300 及 400 μ g/ml) 之添加濃度提高，對白蝦血淋巴之影響越大，兩者皆顯示 160 kDa 以上的蛋白帶逐漸變淡，甚至是消失，而 66 ~ 240 kDa 之間在作用濃度為 100 μ g/ml 以下蛋白帶有變多的趨勢，但在作用濃度 125 μ g/ml 以上，蛋白帶變淡，並逐漸消失，而細胞外產物的作用更甚純化蛋白分解酵素 (Fig. 14)。

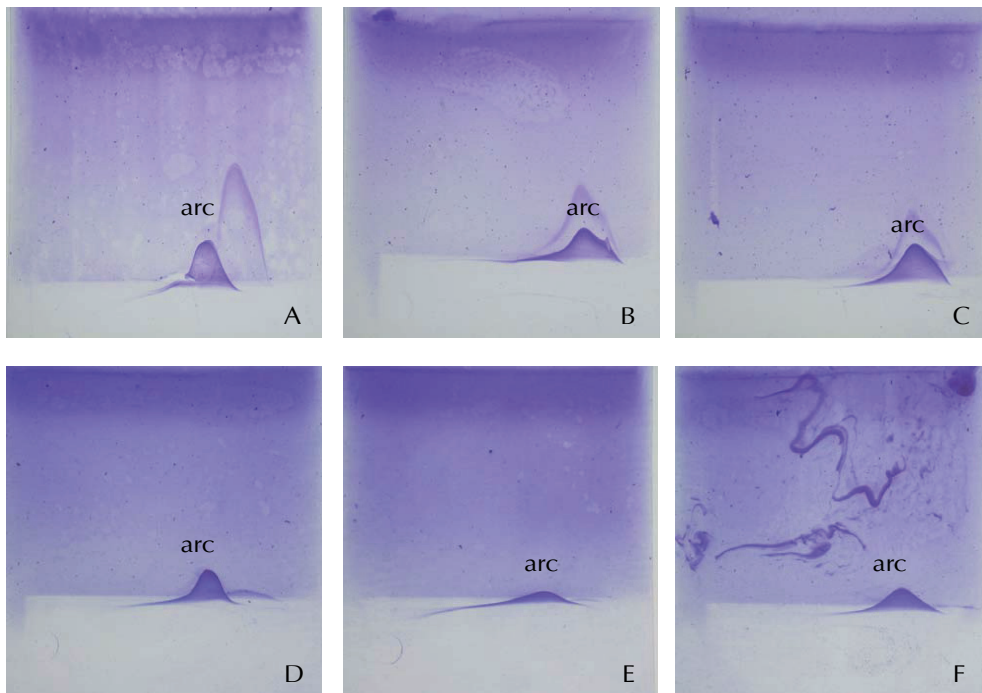


Fig. 11 Profiles of CIE gels of normal prawn plasma pre-incubated or pre-challenged with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa) against R α coagulogen. (A) Pre-incubated with PBS (control); (B) Pre-incubated with ECP for 30 min; (C) Pre-incubated with purified protease for 30 min; (D) Re-challenged with PBS (control); (E) Re-challenged with ECP (2.0 μ g protein/g body weight); (F) Re-challenged with purified protease (0.7 μ g protein/g body weight).

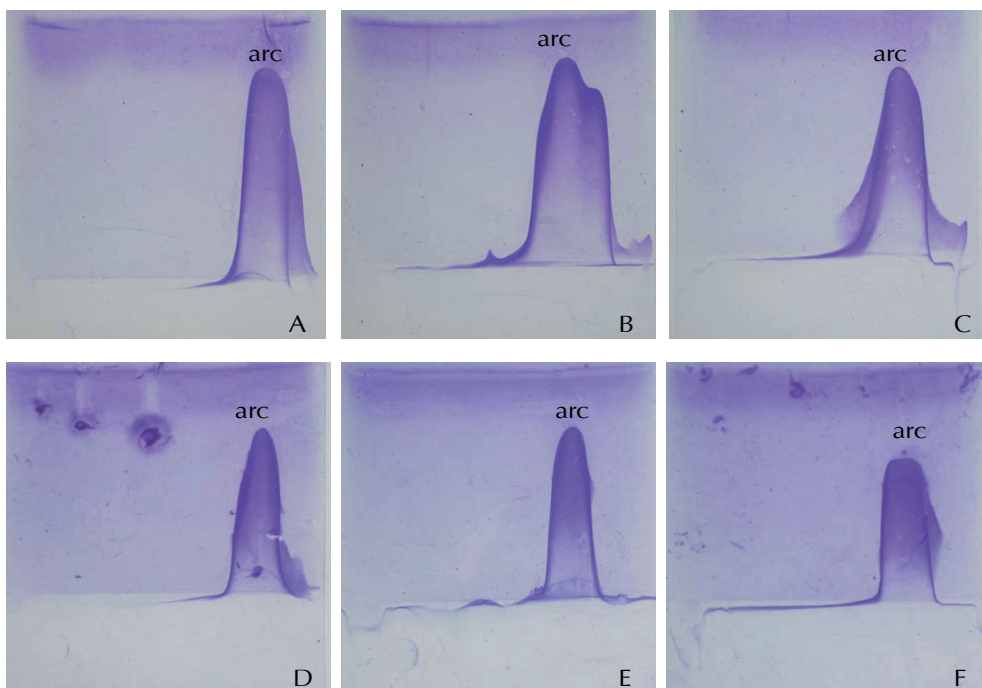


Fig. 12 Profiles of CIE gels of normal prawn plasma pre-incubated or pre-challenged with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa) against R α hemocyanin. (A) Pre-incubated with PBS (control). (B) Pre-incubated with ECP for 30 min. (C) Pre-incubated with purified protease for 30 min. (D) Re-challenged with PBS (control). (E) Re-challenged with ECP (2.0 μ g protein/g body weight). (F) Re-challenged with purified protease (0.7 μ g protein/g body weight).

Fig. 13 3-8% Tris-Acetate Gel of *Litopenaeus vannamei* plasma pre-incubated with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa). Lane 1: pre-incubated with PBS (control) for 60 min; lanes 2-5: pre-incubated with ECP for 10, 20, 30 or 60 min; lanes 6-9: pre-incubated with purified protease for 10, 20, 30 or 60 min; lane 10: marker.

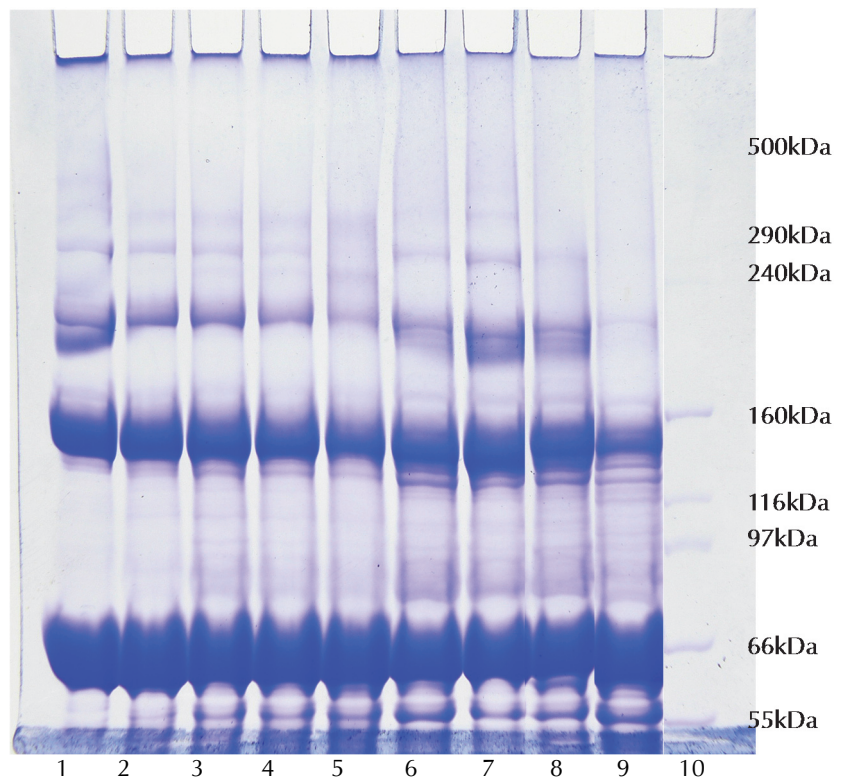
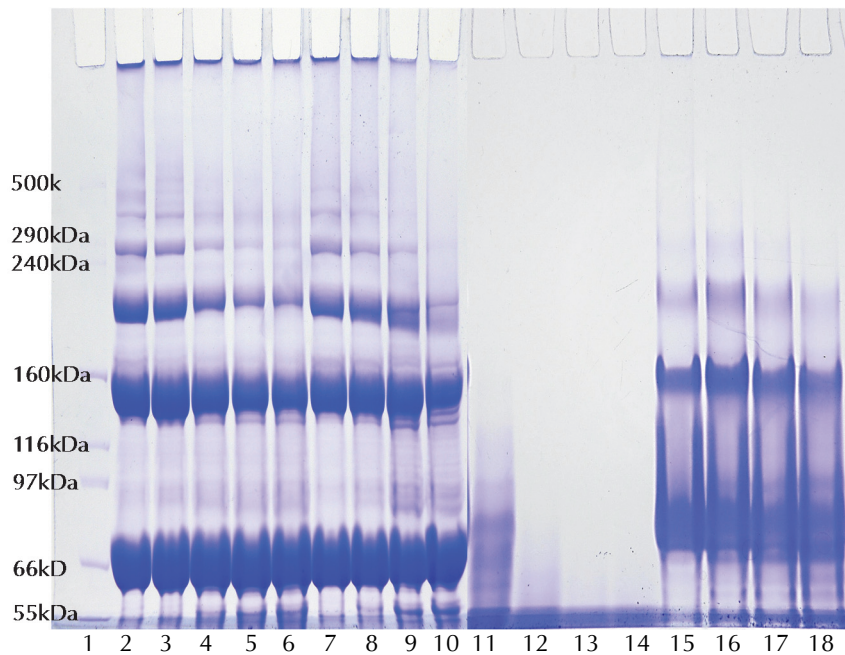


Fig. 14 3-8% Tris-Acetate Gel of *Litopenaeus vannamei* plasma pre-incubated with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa). Lane 1: marker; lane 2: pre-incubated with PBS (control); lanes 3-6 and 11-14: pre-incubated with ECP (25, 50, 75, 100, 125, 200, 300 or 400 μ g protein/ml) for 30 min; lanes 7-10 and 15-18: pre-incubated with purified protease (25, 50, 75, 100, 125, 200, 300 or 400 μ g protein/ml) for 30 min..



2. *In vivo* 試驗

將注射細胞外產物及純化蛋白分解酵素後之白蝦血漿蛋白量調整為 10 mg/ml，結果發現白蝦血淋巴中 500 kDa 以上蛋白帶消失，且在 300~500 kDa 之蛋白質帶增多，而在 250 kDa 以下之蛋白帶則無明顯變化 (Fig. 15)。

討 論

一、純化蛋白分解酵素

以往研究曾從分離自海水哈維氏弧菌 FLA-11 及 FLN-108 之細胞外產物中發現三種不同分子量之金屬螯合敏感 (metal-chelater-sensitive) 鹼

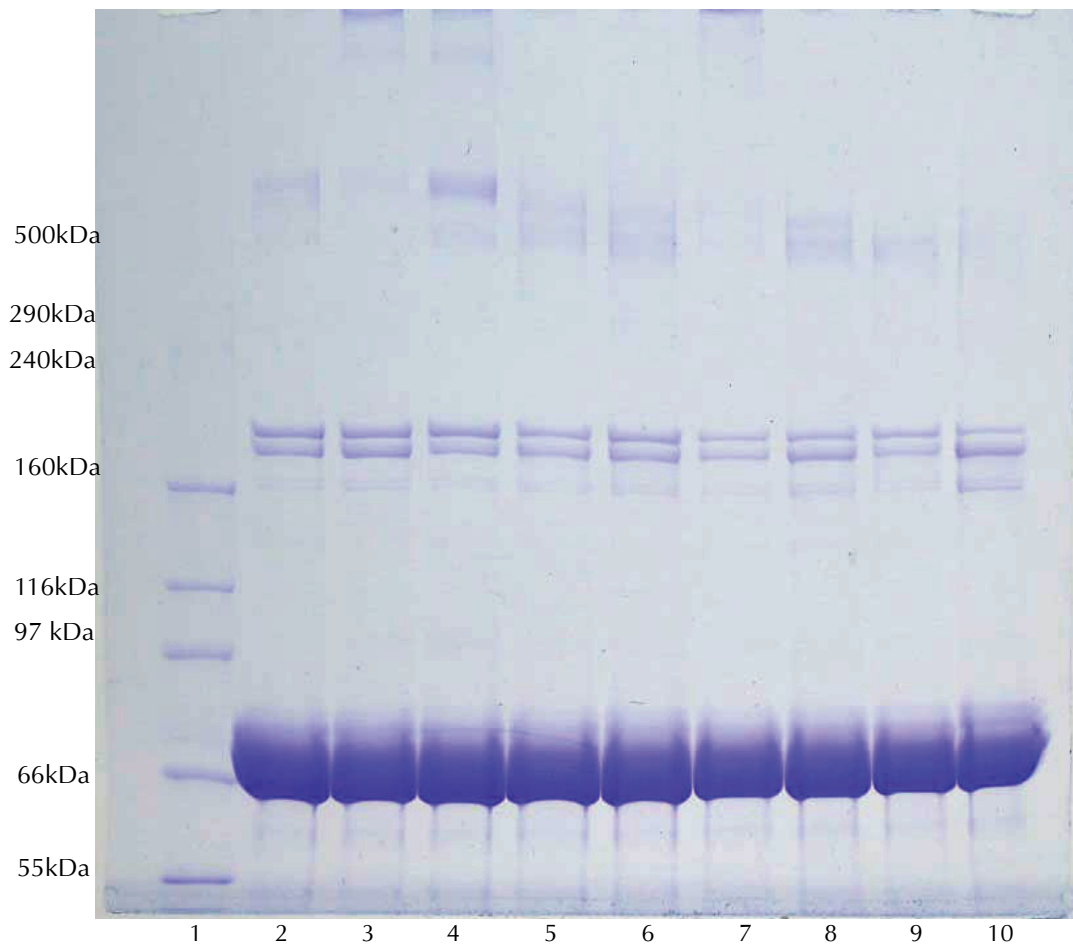


Fig. 15 3-8% Tris-Acetate Gel of *Litopenaeus vannamei* plasma prechallenged with *Vibrio harveyi* (strain 820514) ECP and purified protease (22 kDa). Lane 1: marker; lanes 2-4: pre-challenged with PBS (control); lanes 5-7: pre-challenged with ECP; lanes 8-10: pre-challenged with purified protease.

性蛋白分解酵素 (alkaline protease)，分子量分別為 84 kDa (21 kDa 之四聚體)、49 及 46 kDa (23 kDa 之二聚體)。84 kDa 蛋白分解酵素在 pH 8.0 及 55 °C 時具最大活性，於 40 °C 下穩定性高 (Fukasawa *et al.*, 1988a)，49 及 46 kDa 蛋白分解酵素在 pH 8.0 及 50 °C 時有最大活性，於 45 °C 下穩定性高 (Fukasawa *et al.*, 1988b)；Liu *et al.* (1997) 也曾從分離自罹病草蝦之哈維氏弧菌 (strain 820514) 純化出一種半胱氨酸型蛋白分解酵素，分子量為 38 kDa，其在 pH 8.0 及 50 °C 時有最大活性，屬熱不穩定型，且在凍乾過程中易自家分解 (autodigestion)；自印尼爪哇東海岸水域分離之哈維氏弧菌 (strain AP6) 可選殖與純化出一種鋅離子依賴型之金屬型蛋白純化酵素 (Zinc-metalloprotease)，分子量為 35 kDa，其在 pH 9.0 及 37 °C 時有最大活性 (Jeanette *et al.*, 2003)。本

試驗從哈維氏弧菌 (strain 820514) 之細胞外產物純化分離出一種分子量為 22 kDa 帶高陰電性之蛋白質分解酵素，其在 pH 6.0 及 60 °C 時有最大活性，於 50 °C 下穩定性高，兼具絲氨酸型及金屬型之特性，和前述之蛋白分解酵素皆不同，若要確定類型，需再進一步將其氨基酸序列完全解碼後才可得知。雖然本研究中純化得到的蛋白分解酵素之毒性 (0.52 µg protein / g) 比 Liu *et al.* (1997) 所純化之蛋白分解酵素之毒性及活性 (0.3 µg protein / g) 來的低，但因為在致病菌中含量豐富，並會造成蝦子急速死亡，推測是哈維氏弧菌 (strain 820514) 另一種毒力因子。本研究之純化蛋白分解酵素分子量為 22 kDa，pI 為 4.25，經 LC/MS/MS 定序，顯示與哈維氏弧菌 VhpA 相似度為 12%，且在第 258~296、377~395 及 403~443 amino acid 為相同序列，而 VhpA 之

分子量為 86 kDa，pI 為 4.84，是和 quorum sensing systems 調控基因表現有關之蛋白質 (Mok *et al.*, 2003)，因兩者分子量有倍數關係，且等電點相近，推測兩者之間有關連性。

二、哈維氏弧菌細胞外產物及純化之蛋白分解酵素對白蝦血淋巴之影響

(一) 哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦凝血蛋白之影響

在體外試驗中，斑節蝦血漿因 *Vibrio alginolyticus* 細胞外產物與純化之致死蛋白分解酵素的作用，造成蝦血淋巴中凝血蛋白減少 (Chen, 1999)。白蝦以哈維氏弧菌菌體、細胞外產物及部分純化之致死蛋白分解酵素做體內外試驗，發現病蝦血淋巴在採集時，通常會發現血淋巴有不凝集或凝集緩慢的現象，且皆以細胞外產物對血淋巴及凝血蛋白影響最為明顯 (簡, 2002)。吳 (2005) 以哈維氏弧菌菌體、細胞外產物對白蝦做體內外實驗，結果以細胞外產物對血淋巴及凝血蛋白影響最甚。楊 (2006) 以 *V. alginolyticus* 菌體及細胞外產物對白蝦血淋巴凝血蛋白做研究，菌體及細胞外產物皆會造成凝血蛋白下降。本試驗以哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素 (22 kDa) 對白蝦凝血蛋白進行體內外試驗，發現注射細胞外產物之白蝦，其血淋巴常有不凝集或凝集緩慢現象產生，而純化蛋白分解酵素的作用卻不明顯，但兩者皆會造成凝血蛋白沉澱弧下降或者位移之趨勢，推測是和破壞了凝血蛋白的結構有關，白蝦的凝血蛋白除參與血淋巴的凝固過程外，還具有運送色素、脂質、碳水化合物和飢餓時當作蛋白質來源等功能 (Durlat, 1985; Martin *et al.*, 1991)，若其被破壞，將導致凝血功能下降等其他功能喪失，進而使免疫功能降低較易導致白蝦發生疾病。

(二) 哈維氏弧菌細胞外產物及純化蛋白分解酵素對白蝦血藍素之影響

Lee *et al.* (1999) 指出草蝦血漿受到哈維氏弧菌細胞外產物作用，顏色會由原本因血藍素中含有銅離子而呈現藍色，轉化成因銅離子還原成氧化銅的粉紅色。斑節蝦血漿與 *V. alginolyticus* 細

胞外產物及純化之致死蛋白分解酵素作用後，發現其對血藍素之含量無明顯的影響，但皆會造成蝦血漿顏色由藍轉變成紅褐色 (Chen, 1999)。另外，遭桃拉病毒 (Taura syndrome virus) 感染之白蝦，也發現蝦血漿顏色由藍轉變成紅褐色，作者推測是由於蝦體血淋巴中的血藍素及銅離子降低所造成的 (Song, 2003)。楊 (2006) 也發現經 *V. alginolyticus* 活菌或細胞外產物攻擊的白蝦，其血淋巴顏色會有偏紅色的現象。本試驗則發現只有經細胞外產物攻擊之白蝦血淋巴有變紅現象，而純化之蛋白分解酵素則無此現象，且經兩者攻擊之白蝦血藍素含量皆並無明顯變化和吳 (2005) 之結果相同。導致此差異推測是由於細胞外產物的成分較為複雜，而本研究之純化蛋白分解酵素僅是其中的一項，而造成白蝦血淋巴由藍變紅的因子，是由細胞外產物的其他成分所導致。

(三) 3 ~ 8% Tris-Acetate Gel 分析之探討

體外試驗發現，血漿與細胞外產物和純化之蛋白分解酵素作用，會隨著作用時間或細胞外產物和純化之蛋白分解酵素濃度的增加，而有更明顯之影響；細胞外產物比同劑量之純化蛋白分解酵素作用更是明顯，然而，兩者似乎是具相同模式，在低劑量 (100 µg/ml 以下) 時，僅會對凝血蛋白 (400 kDa) 造成破壞，還不足以影響到血藍素 (由 75 和 82 kDa 次單元所構成)，但在高劑量 (200 µg/ml 以上) 則會使血藍素受到破壞。體外試驗對白蝦血漿造成之影響遠比體內來的劇烈，這可能是由於蝦體體內有很多因子或免疫反應，會去破壞或干擾細胞外產物及純化蛋白分解酵素 (22 kDa)，而造成其影響較為不明顯，若要確切了解哈維氏弧菌的致病機制，除了要繼續研究所有可能導致白蝦產生疾病的其他致病因子外，並需要探討其進入白蝦體內的感染路徑和作用情形及白蝦體內免疫機制等相關研究。

參考文獻

- 吳育甄 (2005) 哈威弧菌影響白蝦凝血機制相關因子及血藍素之研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖系碩士論文, 基隆, 臺灣.
- 楊宇雯 (2006) 溶藻弧菌影響白蝦凝血因子及血藍素之

- 研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖系碩士論文, 基隆, 臺灣.
- 簡聿君 (2002) 哈威弧菌對白蝦及草蝦血漿影響之研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖系碩士論文, 基隆, 臺灣.
- Barrett, A. J. (1980) Protein degradation in health and disease. *In* Ciba Found. Symp. 75 (D. Evered and J. Whelan eds.), 1-13.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye 65 binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Chen, F. R., P. C. Liu and K. K. Lee (1999) Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios*, 98: 95-111.
- Dela-Cruz, M. C. and K. Muroga (1989) The effects of *Vibrio anguillarum* extracellular products on Japanese eels. *Aquaculture*, 80: 201-210.
- Durliat, M. (1985) Clotting processes in crustacea decapoda. *Biol. Rev.*, 60: 473-498.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, A. Kamii, Y. Ohyam and M. Osumi (1988a) Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* Strain FLA-1 1. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (2): 435-441.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, M. Miyahira and M. Kurata (1988b) Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* Strain FLN-108. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (12): 3009-3014.
- Goguen, B. and N. Kedersha (1995) Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation. *Nature*, 363: 189-190.
- Jeanette, W. P., Teo, L. H. Zhang and C. L. Poh (2003) Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene*, 303: 147-156.
- Lee, K. K. and A. E. Ellis (1990) Glycerophospholipid : cholesterol acyltransferase complexed with lipopoly-saccharide (LPS) is major exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.*, 172: 5382-5393.
- Lee, K. K. and A. E. Ellis (1991) Interactions between salmonid serum components and the extracellular haemolytic toxin of *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 207-216.
- Lee, K. K., Y. L. Chen and P. C. Liu (1999) Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cell Mol. Dis.*, 25: 180-192.
- Liu, P. C., K. K. Lee and S. N. Chen (1996) Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 413-416.
- Liu, P. C. and K. K. Lee (1999) Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 426-430.
- Liu, P. C., K. K. Lee, C. C. Tu and S. N. Chen (1997) Purification and characterization of cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 35: 32-39.
- Martin, G. G., J. E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbhoy and N. Mckrell (1991) Location and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 517-522.
- Mok, K. C., N. S. Wingreen and B. L. Bassler (2003) *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.* 17, 22 (4) : 870-81.
- Santos, Y., I. Bandin, S. Nunez, M. Montero, A. Silva and A. E. Toranzo (1992) Comparison of the extracellular biological activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 107: 259-270.
- Song, Y. L., C. I. Yu, T. W. Lien, C. C. Huang and M. N. Lin (2003) Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 317-331.
- Thune, R. L., L. A. Stanley and R. K. Cooper (1993) Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3: 37-68.
- Toranzo, A. E. and J. L. Barja (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwaterfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3: 5-36.
- Travis, J. and G. S. Salvesen (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 655-709.

The Purification and Characterization of *Vibrio harveyi* Extracellular Products and Its Effects on Hemolymph of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Pei-Shan Lee^{1*}, Kuo-Kau Lee², Po-Yuan Hsu³ and Ping-Chung Liu²

¹Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

³Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

A common pathogen of shrimp, *Vibrio harveyi*, was used in the present study. Firstly, the protease of *V. harveyi* extracellular products was isolated and purified to then be used in the subsequent evaluation of their effects on clotting factors and hemocyanin in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The isolated and purified protease, being unstable in hyperthermal condition, possessed a molecular weight of about 22 kDa, an isoelectric point of 4.15, and its maximum activity was at pH 6 and 60°C. It is able to be inhibited by AEBSF, bestatin, EDTA, EDTA-2Na, 1,10-phenanthroline, iodoacetic acid, pepstatin A, phosphoramidon, PMSF, and L-cysteine, revealing characteristics of serine and metal forms. The 48 hours LD₅₀ of *V. harveyi* extracellular products and purified protease injected into *L. vannamei* (5 ± 0.5 g) are 1.52 and 0.52 µg protein/g shrimp. The decreased coagulogen levels in haemolymph were observed in shrimps injected with of *V. harveyi* extracellular products and its purified protease; however, the effect on haemocyanin was insignificant.

Key words: *Vibrio harveyi*, extracellular products, protease, coagulogen, hemocyanin

*Correspondence: 299 Lane 291 Sec. 2 Zhiben Rd., Taitung, Taitung 950, Taiwan. TEL: (089) 514-362 ext. 207; FAX: (089) 514-366; E-mail: pslee@mail.tfrin.gov.tw