

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

新莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌二株噬菌體之分析
及建構K1莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌之報導噬菌體
Isolation and characterization of two bacteriophages of
two new capsular types & Construction of a reporter
phage for detection of *Klebsiella pneumoniae*

蘇曼華

Man-Hua Su

指導教授：王錦堂 教授

Advisor : Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：新型莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體之分析
& 建構 K1 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌之報導噬菌體

英文題目：Isolation and characterization of bacteriophage specific
for new capsular type(s) & Construction of a reporter
phage for detection of Klebsiella pneumoniae

本論文係蘇曼華君(學號 R04445109) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩(博)士學位論文，於民國 106 年 7 月 19 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王錦堂

(簽名)

(指導教授)

楊名志

賴信志


三番响

系主任、所長

鄧述謙

(簽名)

致謝



兩年的碩士班時光匆匆飛逝，回首這段歷程，由衷地認為能夠加入 739 這個大家庭的自己十分幸運。首先感謝王錦堂老師的指導和幫助，並讓我能夠在這麼好的實驗室環境中學習。謝謝口試委員楊宏志老師、賴信志老師、潘怡均老師和林稚容老師的蒞臨指教，給了我許多寶貴的建議，讓我的論文能夠更完整。特別感謝稚容學姊，學姊總是不厭其煩地給予溫柔、悉心的教導，如燈塔一般地指引我前進的方向。怡均學姊和佩芳學姊開朗的性格和豐富的學識，也讓我在實驗生活中有所獲益。感謝學長姊依吟、伊翔、俐吟以及一瑋和艾琳，你們在實驗、課業上的熱心指導和提點都帶给了我莫大的幫助。也感謝同學怡柔與芷華一路上的扶持與照應，很幸運可以和妳們一起走過這段研究生生活。感謝學弟妹婉婷、柏勳、彥溥的陪伴，你們為實驗室帶來的歡快氛圍對我來說彌足珍貴。最後感謝家人的支持，以及為我碩班生活帶來許多精彩的親友們。祝福大家在日後的人生旅途上都能平安、順遂。

中文摘要



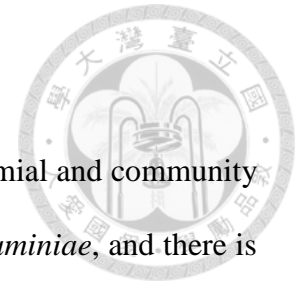
克雷伯氏肺炎桿菌為造成院內感染與社區型感染常見的細菌之一，可引發肺炎、泌尿道感染、敗血症、化膿性肝膿瘍等症狀，並可能伴隨高死亡率。其外圍的莢膜是關鍵的致病因子，能保護菌體免於受到宿主的免疫攻擊，且莢膜的型態與致病力之間具高度的相關性，因此莢膜的分型在臨床治療上扮演重要的角色。

本實驗室以基因分型法分類而獲得新莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌(KN6、KN7)，接續自原水中分離出兩株克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體，分別為以 KN6 莢膜型菌株為特異宿主之 Can0533-KN6-1，以及以 KN7 莢膜型為特異宿主的 My-17-2-KN7-1，並分析此兩株新莢膜型噬菌體是否帶有莢膜分解酵素。接著經由高通量定序得到兩株噬菌體之基因組序列，長度分別為 76,578 和 70,397 bp，並且在進行分析與比對後，發現 Can0533-KN6-1 的基因組上有兩段可能為莢膜分解酵素之開放閱讀框架，分別為 ORF30 以及 ORF15；於 My-17-2-KN7-1 基因組則找到其基因組上可能為莢膜分解酵素之開放閱讀框架 ORF12。表現、並純化這三段可能為開放閱讀框架序列所編譯之產物後，發現 Can0533-KN6-1 的 ORF30 具有莢膜分解酵素活性，而另外兩段基因之產物則沒有觀察到酵素活性。

於本篇研究中我們另外建構出以克雷伯氏肺炎桿菌為宿主之報導噬菌體，以增加噬菌體分型系統的效益。莢膜型 K1 菌株在台灣地區是造成化膿性肝膿瘍的主因，於是我們首先建構以莢膜型 K1 菌株為專一宿主之報導噬菌體。此報導噬菌體以哈維氏弧菌的 *luxAB* 基因作為報導基因，利用同源重組方法插入 K1 莢膜型噬菌體的基因組中，最後獲得冷光酶報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)。測試該報導噬菌體之偵測特異性與敏感性，結果顯示該同源重組報導噬菌體仍保留原噬菌體之特異性，偵測極限則為 10^3 CFU。本研究探討新莢膜型莢膜分解酵素以及報導噬菌體之特性，期望能對克雷伯氏肺炎桿菌感染之診斷與治療有所貢獻。

關鍵字：克雷伯氏肺炎菌、莢膜分解酵素、高毒力莢膜型、報導噬菌體、冷光酶

ABSTRACT



Klebsiella pneumoniae is one of the pathogens causing nosocomial and community acquired infection. Capsule is the critical virulence factor of *K. pneumoniae*, and there is strong correlation between the capsular type and pathogenicity. Although there are limitations of traditional serotyping, utilization of genotyping and phage typing methods could support the typing system.

Bacteriophage Can0533-KN6-1 and My-17-2-KN7-1 specific for new capsular type *K. pneumoniae*, KN6 and KN7 respectively, had been isolated from untreated water. The genomic DNA of these two phages was analyzed by high throughput sequencing and alignment of the predicted open reading frame in online database. Two open reading frames on the phage Can0533-KN6-1 genome and one on My-17-2-KN7-1 genome, were recognized as putative capsule depolymerase gene. After expression and purification of the protein encoded by these putative capsule depolymerase genes, only the ORF30 of Can0533-KN6-1 exhibited the enzymatic activity.

Furthermore, in order to improve the phage typing system, a luciferase reporter phage specific for capsular type K1 *K. pneumoniae* was constructed as a model for rapid detection. The *luxAB* gene from *Vibrio harveyi* under the promoter of lac operon (P_{lac}) was cloned into the genome of K1 phage as a reporter gene. Bioluminescence signal could be detected during the reporter phage infection, following the addition of substrate. Based on current results of experiments, the original specificity of the phage was retained, and the sensitivity of this reporter phage NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*) is 10^3 colony-forming-units. In summary, the characterization of depolymerase and bioluminescence reporter phage in this study is expected to be applicable for diagnosis and treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection.

Keywords: capsular type, depolymerase, hyper-virulent, *Klebsiella pneumoniae*, luciferase, reporter phage



目錄

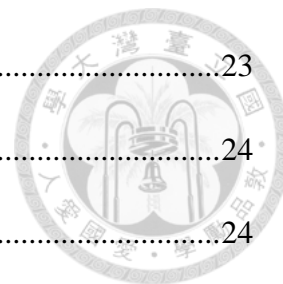


口試委員審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
ABSTRACT	iv
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	x
第一章、緒論	1
1.1 克雷伯氏肺炎桿菌介紹	1
1.2 克雷伯氏肺炎桿菌分型法	1
1.3 噬菌體莢膜分解酵素	2
1.4 報導噬菌體	3
1.5 實驗目的	4
第二章、材料與方法	5
2.1 菌株與載體	5
2.2 培養基	5
2.3 聚合酶連鎖反應	5
2.4 噬菌體增殖	7
2.5 塗點試驗	7
2.6 噬菌斑試驗	8



2.7	噬菌體基因組純化	8
2.8	限制性核酸內切酶切割	10
2.9	載體建構	10
2.9.1	蛋白表現載體	10
2.9.2	基因置換載體	10
2.10	蛋白質表現純化	11
2.11	十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)	12
2.12	西方墨點法	14
2.13	勝任細胞製備	15
2.13.1	氯化鈣處理 (熱休克法)	15
2.13.2	ddH ₂ O 處理 (電穿孔法)	15
2.14	電穿孔	16
2.15	噬菌體同源序列重組	16
2.16	冷光試驗	17
第三章、	實驗結果	18
3.1	新型莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌	18
3.2	噬菌體 Can0533-KN6-1 和 My17-2-KN7-1 宿主範圍	18
3.3	噬菌體 Can0533-KN6-1 和 My17-2-KN7-1 基因組定序及分析	19
3.4	表現與純化噬菌體 Can0533-KN6-1 之莢膜分解酵素 ORF30	20
3.5	報導基因 <i>luxAB</i> 表現測試	21
3.6	同源重組報導噬菌體之建構	21
3.7	報導噬菌體專一性與效能測試	22

3.8	報導噬菌體於複雜檢體偵測能力之測試	23
第四章、	討論.....	24
4.1	新型莢膜型噬菌體	24
4.2	報導噬菌體	24
第五章、	參考文獻.....	45



圖目錄



圖一、Can0533-KN6-1 及 My-17-2-KN7-1 之點試驗.....	28
圖二、Can0533-KN6-1 基因體序列圖譜.....	29
圖三、My-17-2-KN7-1 基因體序列圖譜.....	30
圖四、Can0533-KN6-1 之 ORF30 胺基酸序列比對.....	31
圖五、表現與純化噬菌體 Can0533-KN6-1 之莢膜分解酵素 ORF30.....	32
圖六、測試於勝任細胞中 LuxAB 表現.....	33
圖七、報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} - <i>luxAB</i>) 建構流程.....	34
圖八、同源重組噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} - <i>luxAB</i>).....	35
圖九、NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} - <i>luxAB</i>) 之 <i>luxAB</i> 表現以及特異性.....	36
圖十、NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} - <i>luxAB</i>) 效能測試.....	37
圖十一、報導噬菌體於含菌糞便樣本中之效能測試.....	38
圖十二、報導噬菌體於含菌血清樣本中之效能測試.....	39

表目錄



表一、 本研究使用之菌株與載體	40
表二、 研究所使用引子	41
表三、 KN6 與 KN7 莢膜型菌株來源與盛行率	43
表四、 Can0533-KN6-1 與 My-17-2-KN7-1 開放閱讀框架及其可能編譯之產物...	44

第一章、緒論



1.1 克雷伯氏肺炎桿菌介紹

克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)為革蘭氏陰性菌，屬於腸內桿菌科(Enterobacteriaceae)，兼性厭氧，不具運動性，存在於自然界的土壤與地表水中[1]。克雷伯氏肺炎桿菌細胞外圍由多醣組成的莢膜(capsule)包覆，具有高黏性，可幫助其抵禦宿主的吞噬作用、補體介導溶解、血清毒殺等免疫攻擊[2]。克雷伯氏肺炎桿菌的莢膜含有由莢膜多醣體組成的莢膜抗原(K antigen)以及脂多醣體組成的體抗原(O antigen)，目前的莢膜分型共有 82 種以上[3]。

克雷伯氏肺炎桿菌為造成院內感染的常見的細菌之一，可見於人類的皮膚、呼吸道及消化道，易伺機性引發肺炎、泌尿道感染、敗血症等，並可能伴隨高致死率[2]。近幾十年來，克雷伯氏肺炎桿菌更是造成社區型感染化膿性肝膿瘍(pyogenic liver abscess, PLA)最主要的原因，在歐洲、日本、北美、韓國等都有相關的病例報導，但主要集中在台灣地區，且多數為莢膜型 K1 所引起[4, 5]。克雷伯氏肺炎桿菌的莢膜型與致病性之間有很大的關聯性，如 K1 與 K2 莢膜型的菌株之莢膜表現量較多，有利於抵抗宿主的免疫系統，因此被認為是具有高毒力的菌株[2, 4, 6]。

1.2 克雷伯氏肺炎桿菌分型法

目前所使用之莢膜分型方法主要為血清型分型(serotyping)、基因型分型(molecular genotyping)與噬菌體分型(bacteriophage typing)。傳統的血清型分型法至今仍廣泛地被使用，但卻有敏感性及專一性不佳等問題，在不同莢膜型間可能會有交叉反應(cross-reactions)；而後發展出基因型分型法，例如本實驗室所建立之 *wzc* 分型法，利用聚合酶連鎖反應獲得莢膜生成相關基因之序列片段，再針對 *wzc* 基因的變異區進行比對，便可依據不同莢膜型之基因相似度進行莢膜型判別[7]。另外，噬菌體分型法雖然在使用上有特異性的限制，但透過不同分型法之間的交互印證，也能輔助傳統血清型分型法以達到更精確、更有效率地分型[4]。

本實驗室使用 wzc 分型法將臨床檢體中所分離出之克雷伯氏肺炎桿菌進行莢膜型分型，若發現不同於既有的傳統 77 種血清型莢膜型以及本實驗室先前分離出之 KN1-KN5 莢膜型之菌株，則視為新莢膜型[7, 8]。於本研究中我們發現兩種新莢膜型，分別為 KN6 及 KN7 型菌株。由於一種莢膜分解酵素只能辨識特定結構的多醣，所以具有很高的特異性，使噬菌體及其莢膜分解酵素具有應用於噬菌體分型的潛力。若能在新莢膜型噬菌體之基因組上找到莢膜分解酵素基因，將有助於新莢膜型菌株的分型。

1.3 噬菌體莢膜分解酵素

噬菌體是以細菌為宿主的病毒，具有專一性，並廣泛存在於自然界中。克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體多屬有尾噬菌體目(Caudovirales)，而有尾噬菌體的生命週期約可分為五個階段：吸附(absorption)、核酸物質穿透(penetration)、生合成(synthesis)、組裝(assembly)、釋放(release)。噬菌體的吸附過程是決定噬菌體特異性的重要步驟，噬菌體尾部需辨認細胞壁、鞭毛等部位表面之特異受器，產生不可逆的結合，並藉由溶菌酶在細胞壁上穿孔，再將遺傳物質自孔洞送入宿主細胞內，進行接續的複製、合成[7]。噬菌體感染革蘭氏陰性菌時，在辨認細胞壁上的特異受器並穿孔將核酸物質注入的過程中，常會受到細胞外多醣體(extracellular polysaccharide, EPS)的阻擋。為了順利接近宿主細胞本體，許多噬菌體演化出細胞外多醣體分解酵素(EPS depolymerase)，能夠特異性地辨認細胞外多醣體，以細胞外多醣體作為噬菌體吸附過程中的初級受器(primary receptor)，並分解掉細胞外層結構，噬菌體才能接近並辨識細胞壁上或鞭毛近端等結構上的次級受器(secondary receptor)，產生不可逆的結合，並注入核酸物質[9]。

克雷伯氏肺炎桿菌的莢膜上具有許多的莢膜抗原，以克雷伯氏肺炎桿菌為宿主的噬菌體，可能也會帶有可辨認莢膜抗原的莢膜分解酵素(capsular polysaccharide depolymerase, CPS)。莢膜分解酵素依作用的不同，大致上分為水解酶及莢膜裂解酶兩種；雖有少數莢膜分解酵素是可自由擴散的形式，但大多數莢膜分解酵素是組成噬菌體顆粒的一部分，如尾部刺突(tail spike)或尾絲蛋白(tail fiber proteins)[9]。

噬菌體莢膜分解酵素的應用包含商業食品的去汙以及醫療器材的滅菌等，因噬菌體莢膜分解酵素可以幫助消滅生物膜(biofilm)的完整性，預防生物膜的形成；

若在感染時給予莢膜分解酵素治療，可減弱致病菌的致病力；莢膜分解酵素也可應用於接合型疫苗(conjugate vaccine)的製程，因其具有將大片段的多醣體分解為小片段的能力；另外的應用也包含前段提到的莢膜型分型與細菌的偵測[4, 10-12]。

1.4 報導噬菌體

在 1910 年代後期，噬菌體被 Frederick Twort 和 Felix d'Herelle 發現後，關於噬菌體的研究便迅速地發展，在當時已初步地將噬菌體應用於細菌感染的治療或宿主細菌的辨認[13]。而後因戰爭以及對噬菌體分子生物學知識仍為不足等因素，再加上抗生素的發現，噬菌體療法便在西方國家沉寂了幾十年。但在抗生素被廣泛使用後伴隨抗藥性的產生，學界對於噬菌體在臨床應用的關注始日漸回升[10, 14]。在 1987 年，Ulitzur 與 Kuhn 的團隊發表了新穎的以噬菌體偵測細菌的方法，他們將 *luxAB* 的基因送入大腸桿菌噬菌體 λ Charon 30 的基因體中，建構出第一隻冷光報導噬菌體[15]。

報導噬菌體(reporter phage)是經基因工程改造後帶有可發光或顯色的基簇，例如帶有綠色螢光蛋白(GFP)、冷光酶(luciferase)或 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)等基因的噬菌體，在辨認特定宿主後，將帶有基因組的核酸物質注入其宿主細胞內，並經宿主表現後，即產生可被偵測的訊號[16]。報導噬菌體於宿主細菌偵測上具快速、高特異性等優勢，且在宿主細胞內的增生過程也會放大報導訊號，可以節省傳統培養檢測法所需的時間。除此之外，噬菌體還具有只會感染活細胞的特性，且對外在環境的刺激有一定的耐受性，方便用於樣本檢測[17]。許多研究團隊也相繼建構了不同的報導噬菌體，如帶有螢火蟲冷光酶基因的分枝桿菌報導噬菌體(phAE142)、帶有細菌冷光酶基因的李斯特菌報導噬菌體(A511::*luxAB*)、帶有綠色螢光蛋白基因的大腸桿菌報導噬菌體(PP01-GFP/SOC)等[18-21]。

報導噬菌體感染宿主後，將其所帶基因送入宿主細胞內，報導基因在宿主內被表現時，會產生可觀測之訊號。常見的報導基因來源之一為來自哈維氏弧菌(*V. harveyi*)的 *lux* 操縱子，包含 *luxCDABE* 五個開放閱讀框架。其中 *luxA* 與 *B* 會轉譯成由 α 和 β 亞基組合而成的冷光酶(luciferase)；*luxC*、*D* 和 *E* 則負責轉譯出含還原酶、合成酶及轉移酶的脂肪酸還原酶複合體，用以製造細菌冷光酶產生冷光所需的基質(substrate)--脂肪醛[22, 23]。除了帶有整段 *lux* 操縱子的報導噬菌體，先前也

有許多研究團隊只將 *luxAB* 序列做為報導基因插入噬菌體基因組中。因欲插入目標噬菌體基因組的報導基因序列片段越短，在分生技術操作上會較為容易，對目標噬菌體的基因體影響也較小，且只要在報導噬菌體感染宿主過程中再另外加入細菌冷光酶發光所需之基質，便可成功使冷光酶產生冷光[15]。

報導噬菌體目前的應用包含偵測食源性致病菌，如牛奶、果汁、自來水、生菜、絞肉中的大腸桿菌，以及雞蛋上的沙門氏菌，與肉類加工品、海鮮、乳製品、生菜中的李斯特菌等，另外也可應用於臨床檢體的病原菌檢測的試驗，如檢測病人痰液樣本中的結核分枝桿菌[24-28]。

1.5 實驗目的

莢膜型的鑑別於臨床上具重大意義，本實驗室使用基因型分型法分類自臨床檢體分離出之新莢膜型的克雷伯氏肺炎桿菌，分別為 KN6 與 KN7 莢膜型，並於原水中得到以其為相對應宿主的噬菌體 Can0533-KN6-1 與 My-17-2-KN7-1。本篇研究目的則為探尋兩隻新莢膜型噬菌體之莢膜分解酵素，並進而將可能的莢膜分解酵素表現、純化，並測試該噬菌體莢膜分解酵素之特性。

在本篇研究的另一個部分，為增加莢膜型分型系統的效益，我們嘗試建構出以克雷伯氏肺炎桿菌為宿主之報導噬菌體。由於報導噬菌體具備原噬菌體之專一性，並可產生具擴增效果之報導訊號，有利於進行快速且精確地偵測。在克雷伯氏肺炎桿菌中，K1 莢膜型具有較厚的莢膜，屬高致病力菌株，所以我們首先選用可感染 K1 莢膜型之噬菌體來建構報導噬菌體。我們將哈維氏弧菌之冷光酶基因利用同源重組方式插入 K1 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌之噬菌體 NTUH-K2044-K1-1 之基因組中，建構出專一感染 K1 莢膜型之報導噬菌體，並進一步測試其特性與效能。

第二章、 材料與方法



2.1 菌株與載體

本研究所使用菌株、載體之來源及用途，如[表一]所示。克雷伯氏肺炎桿菌菌株包含由台大醫院臨床分離之造成肝膿瘍的菌株(K1: NTUH-K2044、K2: A4528)，以及 KN6 菌株: Can0533、Can0515、Can0534，以及 3701N； KN7 菌株: My-17-2、0418、Can0513、3827E、3229566，作為噬菌體宿主以進行增殖、宿主範圍測試、分解酵素活性測試、冷光試驗等。大腸桿菌 DH10B 以及 BL21(DE3)則分別用於基因轉殖與蛋白表現。帶有抗生素抗性之菌株，以含相對應抗生素之培養液或培養基於 37°C 培養；若所帶質體有溫度需求，則於 30°C 培養。

2.2 培養基

LB 培養基(Luria-Bertani agar Lennox, Bioshop, Taipei, Taiwan)成分為每一公升含 10 克胰水解蛋白(tryptone)、5 克氯化鈉(NaCl)、5 克酵母菌提取物(yeast extract)；固態培養基則於每一公升液態 LB 培養基中添加 15 克瓊脂(agar)。本研究所使用之抗生素為 Ampicillin，100 µg/ml； Kanamycin，50 µg/ml； Trimethoprim，75 µg/ml。

2.3 聚合酶連鎖反應

實驗說明：放大目標基因片段

試劑：

LA Taq polymerase (Takara Bio, Japan)	
forward primer	1 µl
reverse primer	1 µl
10× buffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
2.5 mM dNTPs	5 µl
template	5 µl
LA Taq	0.5 µl

ddH ₂ O	27.5 μl
	50 μl
KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen®)	
forward primer	1 μl
reverse primer	1 μl
2× buffer	25 μl
2.5 mM dNTPs	10 μl
template	5 μl
KOD Xtreme	1 μl
ddH ₂ O	7 μl
	50 μl



實驗流程:

PCR Program	
96°C	3 分鐘
96°C	30 秒
52°C	30 秒
72°C	2-4 分鐘 (依據欲放大片段大小調整)
72°C	5 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 30 個循環



2.4 噬菌體增殖

實驗說明: 放大噬菌體效價，以便實驗操作或儲存

實驗流程:

- Step. 1 以液態 LB 培養基將增殖用之噬菌體宿主(克雷伯氏肺炎桿菌)作 1:50 倍稀釋，37°C 震盪培養至 O.D. 600 = ~0.5
- Step. 2 於 5 ml 新鮮菌液中加入 100 μ l 噬菌體原液，於 37°C 隔夜震盪培養
- Step. 3 每 5 ml 裂解菌液中加入 200 μ l 1% (w/v) 三氯甲烷，於 37°C 震盪 30 分鐘使破菌更完全，接著於 4°C 以 13,420 \times g 離心 20 分鐘
- Step. 4 抽取上清液並通過 0.45 μ m 過濾器過濾去除菌體殘骸等雜質，將純化後的噬菌液於 4°C 保存，或加入最終濃度為 5% 的 DMSO 並於 -80°C 保存

2.5 塗點試驗

實驗說明: 噬菌體或莢膜分解酵素對於特定莢膜型宿主作用活性之初步測試

實驗流程:

- Step. 1 以液態 LB 培養基將增殖用之噬菌體宿主(克雷伯氏肺炎桿菌)作 1:50 倍稀釋，37°C 震盪培養至 O.D. 600 = ~0.5
- Step. 2 將 200 μ l 的新鮮菌液 4 ml 的 LB 瓊脂培養基(0.7%)，混勻後平鋪於固化之 LB 瓊脂培養基(1.5%)上
- Step. 3 待冷卻凝固後，取適量噬菌體(2-10 μ l)或預測之樣本(例:莢膜分解酵素)滴於此含菌之培養基上，於 37°C 靜置隔夜培養



2.6 噬菌斑試驗

實驗說明： 測試噬菌體對特定宿主之感染活性、對噬菌體效價進行定量或用以純化出單一株落之噬菌體

試劑：

SM buffer

NaCl	5.8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
1M Tris · Cl (pH=7.5)	50 ml
ddH ₂ O	950 ml
<hr/>	
	1000 ml

實驗流程：

- Step. 1 將噬菌體原液以 SM 緩衝液作 1:10 倍序列稀釋
- Step. 2 將 200 µl 的稀釋噬菌體原液加入 200 µl 新鮮菌液，均勻混合於後 37°C 靜置 15 分鐘，再取 200 µl 的混合液加入 4 ml 的 LB 瓊脂培養基 (0.7%)，混勻後平鋪於固化之 LB 瓊脂培養基(1.5%)上，待冷卻後將培養皿靜置 37°C 隔夜培養

2.7 噬菌體基因組純化

實驗說明： 取得噬菌體基因組，以進行高通量定序

試劑：

a. Buffer L1	300 mM
NaCl	300 mM
Tris-HCl (pH=7.5)	100 mM
EDTA	10 mM
BSA	0.2 mg
RNase A(Roche Applied Science, Germany)	20 mg

DNase I (Roche Applied Science, Germany)	20 mg
b. Buffer L2	
Polyethylene glycerol 6000	30%
NaCl	3 M
c. Buffer L3	
NaCl	100 mM
Tris-HCl	100 mM
EDTA	25 mM
d. Buffer L4	
Sodium dodecyl sulfate, SDS	4%
e. 酚-三氯甲烷(phenol-chloroform)	
f. 異丙醇(isopropanol)	
g. 醋酸鈉(sodium acetate), pH=5.2	
h. 70% 乙醇(ethanol)	



實驗流程:

- Step. 1 加入 60 μ l 的 DNase I (in Buffer L1)與 60 μ l 的 RNase A (in ddH₂O) 20 ml 的噬菌體懸浮液中，於 37 $^{\circ}$ C 震盪反應
- Step. 2 加入 4 ml buffer L2，輕柔翻轉混勻，於 4 $^{\circ}$ C 靜置兩小時或過夜
- Step. 3 待噬菌體顆粒沉澱，於 4 $^{\circ}$ C 13,420 \times g 離心 20 分鐘，除去上清液，以棉棒擦拭管壁上之殘餘液體（不可碰到沉澱物），倒扣離心管待管壁乾燥
- Step. 4 加入 500 μ l Buffer L3 回溶沉澱噬菌體顆粒，再加入 500 μ l Buffer L4，輕柔翻轉，並分置於兩個 1.5 ml 離心管
- Step. 5 每一離心管各加入 500 μ l 酚-三氯甲烷，用力混合後，於 4 $^{\circ}$ C 13,420 \times g 離心 15 分鐘，抽取水層移至新的離心管；重複此步驟
- Step. 6 於抽取出之水層加入等體積的異丙醇，及 1/10 體積的 3 M 醋酸鈉(pH=5.2)，混合後置於-80 $^{\circ}$ C 以沉澱 DNA
- Step. 7 於 4 $^{\circ}$ C 13,420 \times g 離心 30 分鐘，丟棄上清液
- Step. 8 加入 800 μ l 70%酒精潤洗沉澱物，於 4 $^{\circ}$ C 13,420 \times g 離心 15 分鐘
- Step. 9 盡量完全去除上清液，至於 65 $^{\circ}$ C 加熱器，並勤查看，當沉澱物由白

轉透明，立即取出並以 ddH₂O 回溶



2.8 限制性核酸內切酶切割

實驗說明：切割雙股 DNA，以利作基因轉殖等操作

試劑：

- a. 限制酶：HindIII、NotI-HF、EcoRI、Hinp1I、NheI-HF
- b. CutSmart® Buffer (NEB) or NEB buffer 2.1

實驗流程：

DNA	1-2 µg
10× buffer (依不同酵素選擇)	5 µl
enzyme	1 µl
ddH ₂ O	補至 50 µl

50 µl，37°C 作用 2 小時或隔夜 16 小時

2.9 載體建構

2.9.1 蛋白表現載體

針對各開放閱讀框架設計引子對[表二]，以聚合酶連鎖反應放大開放閱讀框架之序列。接著將質體 pET-28(c+)以 NheI 限制酶切割，再以 Klenow fragment 做 blunting。最後將放大後之開放閱讀框架片段加上磷酸基團，並以鈍端接合方式接上 pET-28(c+)。

2.9.2 基因置換載體

選定欲插入冷光酶的目標位置，取其 5'端即 3'端往外各約 1,000 bp 作為同源序列區域，設計引子對以聚合酶連鎖反應將該片段放大，並將放大後的片段以鈍端接合方式，使用 T4 DNA ligase 將其與 pJET1.2/blunt 接合。以用來做 inverse PCR 的引子對做聚合酶連鎖反應，可將建構中之載體自欲插入冷光酶位置反向打開，

再於以聚合酶鏈鎖反應放大的冷光酶基因片段加上磷酸基團，並使用 T4 DNA ligase 接合，冷光酶基因序列就會落於同源序列區域之間。接著對置換載體加上所需之篩選標記，即可送入帶有 pKD46::DHFR 的勝任細胞中誘導同源重組步驟。



2.10 蛋白質表現純化

實驗說明: 以具有 Ni 層析膠體之磁珠，進行帶有組胺酸標記之蛋白產物小量純化
試劑:

a. IPTG	300 mM
b. Lysis buffer	
NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imiddazole	10 mM
c. His Mag Sepharose™ Ni (GE Healthcare)	
d. Wash buffer	
NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imiddazole	20 mM
e. Elution buffer	
NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
Imiddazole	100 mM

實驗流程:

- Step. 1 將蛋白質表現載體以熱休克法送入勝任細胞 BL21(DE3)中，於含 Kanamycin (50 µg/ml)瓊脂培養基上塗盤，放置 37°C 隔夜培養
- Step. 2 以無菌 tip 尖端將菌落挑起，並加入 200 ml 的 Km (50 µg/ml)液態 LB 培養基中，於 37°C 震盪培養至 O.D. 600 = 0.3-0.5
- Step. 3 加入最終濃度為 0.1 mM 之 IPTG，於 16°C 隔夜培養，誘導 lac 啟動子下游基因表現
- Step. 4 將誘導過後之菌液於 4°C，以 4,800×g 離心 10 分鐘，丟棄上清液後

- 以 Lysis buffer 重新懸浮離心沉澱 (200 ml 菌液共加 20 ml Lysis buffer)，並置於-80°C 使其結凍再進行解凍，以利破菌
- Step. 5 使用超音波震盪器破菌至菌液澄清，取出 1 ml 上清液作為誘導後裂解菌液，再將其餘菌液於 4°C 以 16,400×g 離心 20 分鐘，分離上清液與沉澱
- Step. 6 取 1 ml 上清液作為誘導後上清液組，並將其餘上清液加入潤洗後的 His Mag Sepharose™ Ni (20 ml 的上清液取 200 μl，磁珠先以 10 ml Lysis buffer 潤洗兩次，將原保存液置換為 Lysis buffer)，於室溫搖晃作用 1 小時
- Step. 7 用 Wash buffer 潤洗三次洗去非目標結合物後，以 50 μl 之 Elution buffer 洗脫帶有組胺酸標記之蛋白產物，可洗脫數次以獲得不同純度或不同濃度之蛋白產物

2.11 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

實驗說明: 利用膠體電泳，使蛋白質依其分子量大小分離

試劑:

- a. 2× SDS sample dye

Tris-HCl (pH=6.8)	0.09 M
Glycerol	20%
SDS	2%
Bromophenol blue	0.02%
Dithiothreitol (DTT)	0.1 M
- b. SDS-PAGE (Stacking gel, 5% acrylamide)

H ₂ O	3.7 ml
1M Tris (pH=6.8)	630 μl
20% SDS	25 μl
10% APS	50 μl
40% acrylamide	625 μl
TEMED	5 μl



c. SDS-PAGE (Separating gel, 12% acrylamide)	
H ₂ O	6.525 ml
1.5 M Tris (pH=8.8)	3.75 ml
20% SDS	75 μ l
10% APS	150 μ l
40% acrylamide	4.5 ml
TEMED	8 μ l
d. Tris-glycine running buffer (pH=8.3)	
Tris	15.1 g
Glycine	94 g
20% SDS	25 ml
ddH ₂ O	975 ml
e. Coomassie Blue	
Commassie Brilliant Blue R-250	0.25 g
Methanol	45 ml
Acetic acid	10 ml
ddH ₂ O	45 ml
f. Destain buffer	
Methanol	75 ml
Acetic acid	100 ml
ddH ₂ O	925 ml

實驗流程:

- Step. 1 將樣品添加等量 2× SDS sample dye，於 90°C 加熱 10 分鐘
- Step. 2 將樣品移入樣本槽，於 running buffer 中以 250 V，50 mA 進行電泳
- Step. 3 將膠體取下，以 Coomassie Blue 搖盪染色 10 分鐘
- Step. 4 再將膠體置於 Destain buffer 中搖盪過夜，進行脫色



2.12 西方墨點法

實驗說明:

試劑:

- a. Western transfer buffer (pH=8.3)

Tris-HCl (pH=6.8)	5.8 g
Glycine	2.9 g
20% SDS	1.85 ml
Methanol	200 ml
ddH ₂ O	975 ml
- b. Blocking buffer (0.5% Tween 20 +5% milk powder in 1× PBS)
- c. Wash buffer (0.5% Tween 20 in 1× PBS)
- d. anti-His tag mouse antibody
- e. HRP-tagged goat anti mouse IgG
- f. ECL-1、ECL-2 (Western blotting detection reagents) (Amersham, Bioscience)

實驗流程:

- Step. 1 將經過電泳之膠體以半乾式轉漬法，將樣品轉印至 Amersham Protran Supported 0.45 NC membrane 上
- Step. 2 將 membrane 置於含 blocking buffer 中溫和搖晃，室溫作用 1 小時
- Step. 3 移去 blocking buffer，加入含有 anti-His tag mouse antibody 之 blocking buffer (1:10,000 稀釋)，室溫作用 1 小時或 4°C 過夜
- Step. 4 用 Wash buffer 洗三次，每次 10 分鐘
- Step. 5 加入含有 HRP-tagged goat anti mouse IgG 之 blocking buffer (1:10,000 稀釋)，室溫作用 1 小時或 4°C 過夜
- Step. 6 用 Wash buffer 洗三次，每次 10 分鐘
- Step. 7 在 membrane 上加入 ECL 呈色劑 (ECL-1 及 ECL-2 各 500 μ l 均勻混合)，作用 3 分鐘，即可於暗房壓片、洗片



2.13 勝任細胞製備

2.13.1 氯化鈣處理 (熱休克法)

實驗流程:

- Step. 1 將欲製成勝任細胞之菌株加入液態 LB (若菌株有抗性則加入對應抗生素)，37°C 隔夜震盪培養
- Step. 2 將菌液以不加任何抗生素之液態 LB 作 100 倍稀釋，37°C 震盪培養至 O.D. 600 = 0.3~0.5
- Step. 3 4°C，1,500×g 離心 5 分鐘
- Step. 4 丟棄上清液，以 10 ml 冰過的 100 mM CaCl₂ 重新懸浮，於冰上靜置 30~60 分鐘
- Step. 5 4°C，1,500×g 離心 5 分鐘
- Step. 6 丟棄上清液，加入 1 ml 冰過的 100 mM CaCl₂ 重新懸浮，再加入 400 μl 之 60% glycerol，混勻後每 100 μl 分裝至 1 離心管，於 -80°C 保存

2.13.2 ddH₂O 處理 (電穿孔法)

實驗流程:

- Step. 1 將克雷伯氏肺炎桿菌加入 20 ml 液態 LB 培養基，於 37°C 隔夜震盪培養 (若帶有特殊質體則於 30°C 培養)
- Step. 2 丟棄上清液，加入 10 ml iced ddH₂O 重新懸浮，再以 4°C，10,000×g 離心 20 分鐘，重複此步驟 2-3 次
- Step. 3 加入 10 ml iced 10% glycerol 以重新懸浮，4°C，10,000×g 離心 20 分鐘，丟棄上清液
- Step. 4 加入 600 μl 10% glycerol，混勻後每 200 μl 分裝於一離心管



2.14 電穿孔

實驗說明: 外加強大電場，增加細胞膜通透性，使外源 DNA 能進入宿主細胞

實驗流程:

- Step. 1 將用於電穿孔法之勝任細胞放置冰上解凍，將 cuvette 置於冰上預冷
- Step. 2 在勝任細胞中加入~1 μg 的質體，稍微混勻後加到 cuvette 當中
- Step. 3 以 2,500 V，200 Ω ，50 μF 進行電脈衝
- Step. 4 電脈衝結束後，以最快速度加入 200 μl 的液態 LB 培養基到 cuvette 當中，再將 cuvette 當中的菌液移至含 1 ml 液態培養基之離心管當中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪培養 1-2 小時（若質體有溫度需求，例：pKD46::DHFR，則於 30 $^{\circ}\text{C}$ 中培養 2-3 小時）
- Step. 5 10,000 \times g 離心 5 分鐘，於帶有適當抗生素之培養基塗盤，37 $^{\circ}\text{C}$ 過夜培養(有需求之質體於 30 $^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養)


2.15 噬菌體同源序列重組

實驗說明: 在噬菌體宿主細菌中同時送入 pKD46::DHFR 及置換載體，以阿拉伯糖誘導 pKD46::DHFR 上的重組酶表現，再以野生株噬菌體感染宿主細菌，便可促使置換載體上的同源序列與噬菌體基因組的同源區域進行重組，以獲得突變噬菌株

實驗流程:

- Step. 1 將同時帶有質體 pKD46::DHFR 和基因置換載體的克雷伯氏肺炎桿菌菌液以液態 LB 培養基做 10 倍稀釋，加入最終濃度為 1 mM 之 Arabinose，於 30 $^{\circ}\text{C}$ 震盪培養 3 小時，誘導 pKD46::DHFR 重組蛋白酶之表現
- Step. 2 將野生株噬菌體懸浮液以 SM buffer 進行序列稀釋，取適當稀釋倍率之噬菌體懸浮液與誘導後的菌液混合，放置室溫 15 分鐘，待噬菌體吸附至宿主細菌表面
- Step. 3 吸取 200 μl 混合液加入 4 ml 液態 Top agar，混勻平鋪於 LB agar 培養

基，放置 30°C 隔夜培養，使野生株噬菌體之基因組於宿主細菌內與欲置換序列進行同源重組步驟

- 
- Step. 4 挖取單一噬菌斑，溶於 200 μ l 的 SM buffer 當中並以在噬菌體基因組上配合欲置換序列之引子對進行聚合酶連鎖反應，來挑選出含有成功進行同源重組並產生突變噬菌株之噬菌斑溶液
- Step. 5 將含有突變株噬菌體之噬菌斑溶液進行序列稀釋，並加入同英膜型但不含載體 pKD46::DHFR 之宿主細菌，進行第二次感染之噬菌斑試驗；挖取單一噬菌斑，溶於 200 μ l 的 SM buffer 當中並以引子對進行聚合酶連鎖反應挑選出含突變株之噬菌斑
- Step. 6 再接著進行第三次感染之噬菌斑試驗，挑許含突變株噬菌體之噬菌斑，重複感染直至挑選出之噬菌斑所含之子代噬菌體皆為突變株
- Step. 7 將純化後之突變株噬菌體進行增殖放大效價，以進行後續實驗

2.16 冷光試驗

實驗說明：於報導噬菌體感染宿主時外加基質，並以冷光儀偵測報導訊號

實驗流程：

- Step. 1 將報導噬菌體宿主細菌以液態 LB 培養基作 1:50 倍稀釋，37°C 震盪培養至 O.D. 600 = ~1，
- Step. 2 將新鮮宿主菌液進行序列稀釋，分別得到 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/ml 的新鮮菌液，依序加入 100 μ l 菌液至 96 孔白盤中
- Step. 3 稀釋報導噬菌體原液至適當濃度(10^7 PFU/ml)，加入 100 μ l 噬菌體液至含有不同稀釋倍率之菌液的孔格當中
- Step. 4 每個含混合液之孔格另加入最終濃度為 1 mM 的 IPTG 誘導蛋白表現，並且加入 0.1% 的正癸醛 10 μ l 作為冷光酶的基質
- Step. 5 均勻混合後於室溫靜置 10 分鐘(白盤蓋子包覆鋁箔紙避光)，使噬菌體進行初始的感染循環
- Step. 6 將白盤置入冷光儀測冷光，每五分鐘測一次冷光值

第三章、 實驗結果



3.1 新型莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌

本實驗室成員收集自不同來源的臨床檢體中，所分離出之克雷伯氏肺炎桿菌菌株，並進行莢膜型分型。將來自丹麥 Statens Serum Institute 的 77 種血清型代表菌株，以及本實驗室分離出之新莢膜型 KN1-KN5 菌株作為參考菌株，針對莢膜生成基因(*cps gene*)序列保留區域設計引子對，經聚合酶連鎖反應後可獲得含有 *wzc* 基因(*cps synthesis-related tyrosine kinase gene*)之片段，用以進行莢膜型分型。將臨床菌株與參考菌株之 *wzc* 基因片段定序，再以軟體比對後發現，在多數情況下相同莢膜型菌株之 *wzc* 序列會有高於 94% 的相似度，而不同莢膜型間的 *wzc* 序列相似度會小於 80%；如有臨床菌株之 *wzc* 片段不和任一參考菌株之 *wzc* 基因相符，則另外比對 *wzy* (O-antigen polymerase gene) 基因或 *cps* 基因之其他片段，以排除屬於參考菌株但無法為 *wzc* 分型法所辨別之可能性。若比對結果與所有參考菌株莢膜型皆不相同者，視為新莢膜型菌株[7]。在進行分型後，本實驗室獲得兩類新莢膜型之菌株，分別為 KN6 莢膜型與 KN7 莢膜型。分類為 KN6 與 KN7 莢膜型之菌株及其來源如[表三]所示，KN6 莢膜型之菌株包含: Can0533、Can0515、Can0534，在加拿大菌血症檢體中所佔比例共為 3.7%；以及 3701N，在泌尿道感染檢體中所佔比例為 0.7%。而分類為 KN7 莢膜型之菌株則有: My-17-2，在台大醫院菌血症檢體所佔比例為 0.9%；Can0518、Can0513，在加拿大菌血症檢體中所佔比例共為 2.5%；5827E，在泌尿道感染檢體中所佔比例為 0.7%；以及 3229566，在健檢檢體中所佔比例為 0.9%。

3.2 噬菌體 Can0533-KN6-1 和 My17-2-KN7-1 宿主範圍

經分型而獲得 KN6 及 KN7 莢膜型之克雷伯氏肺炎桿菌後，實驗室成員自原水中分離出可感染此兩型新莢膜型菌株之噬菌體。取未處理之原水與宿主細菌共同培養，經過濾後於含有宿主細菌之培養基進行塗點試驗(spot test)，若有噬菌斑產生則得到可成功感染該細菌之噬菌體。於此過程發現三株噬菌體，分別為可以 KN6

莢膜型菌株為宿主之噬菌體--Can0533-KN6-1，以及可以 KN7 莢膜型菌株為宿主之噬菌體 My-17-2-KN7-1 (中 1)、My-17-2-KN7-1 (中 2) [圖一]。欲測試此兩株噬菌體之宿主範圍，我們是使用丹麥血清型代表菌株共 77 株，以及本實驗室分離出之新莢膜型 KN1-KN5 進行塗點試驗，發現 Can0533-KN6-1 可以感染目前所知的 KN6 莢膜型之菌株，包括 Can0533、Can0515、Can0534、3701N 共四株克雷伯氏肺炎桿菌；而 My-17-2-KN7-1 可以感染目前所知為 KN7 莢膜型的 My-17-2、0518、0513、5827E、3229566，共五株克雷伯氏肺炎桿菌。以上所操作的 My-17-2-KN7-1 噬菌體又分為兩株，分別是 My-17-2-KN7-1(中 1)和 My-17-2-KN7-1(中 2)，因初步比對兩者基因組經限制酶切割並進行膠體電泳之基因圖譜後，推測兩噬菌體株基因組成十分相似，在後續的定序分析及實驗將只選用 My-17-2-KN7-1(中 1)。

觀察兩隻新莢膜型噬菌體溶菌斑型態，發現 Can0533-KN6-1 在進行相對應宿主之塗點試驗時，有較明顯的雙圈溶菌斑，即外圍環繞半透明環(halo)、中心為透明溶菌斑(clear zone)。推測是因噬菌體 Can0533-KN6-1 帶有莢膜分解酵素，在噬菌體裂解宿主後擴散而出並分解周遭細菌的莢膜，但周遭細菌的本體並沒有實際地被裂解，而產生較朦朧的半透環[29]。然而，在 My-17-2-KN7-1 塗點試驗後，於目前已知的五株宿主菌株都沒有觀察到明顯的雙圈溶菌斑。

3.3 噬菌體 Can0533-KN6-1 和 My17-2-KN7-1 基因組定序及分析

使用酚-三氯甲烷法純化噬菌體基因組 DNA，送交廠商進行高通量定序 (Illumina)，Can0533-KN6-1 和 My-17-2-KN7-1 的定序結果各得到一段組裝完整的 DNA 片段重疊群(contig)，大小分別為 76,578 和 70,397 個鹼基配對。接著使用 VectorNTI 軟體將包含起始密碼子(start codon)與終止密碼子(stop codon)，且長度大於 500 鹼基配對之序列，預估為開放閱讀框架，再於線上資料庫(Blastx, NCBI)比對兩隻噬菌體基因組所含開放閱讀框架可能編譯之蛋白產物[圖二圖三]。

進行線上比對後，兩隻新莢膜型噬菌體可能為莢膜分解酵素之開放閱讀框架比對結果詳見[表四]。我們發現在 Can0533-KN6-1 的基因中，有兩段開放閱讀框架 ORF30 (2,845 bp)與 ORF15 (816 bp)，可比對到噬菌體尾絲蛋白與尾部蛋白，所以將這兩段序列視為 Can0533-KN6-1 可能的噬菌體莢膜分解酵素基因。將長度為

2,845 bp 的 ORF30 於線上資料庫進行比對，結果包含本實驗室先前曾分離出之 KN2 莢膜型噬菌體(0507-KN2-1)基因組上可能的尾絲蛋白基因；兩者胺基酸相似度為 38%，如[圖四]所示。而依據 My-17-2-KN7-1 的比對結果，基因組上的 ORF12 (746 bp)，可比對到噬菌體尾部蛋白，將該序列視為 My-17-2-KN7-1 可能的莢膜分解酵素基因。

另外也發現比對結果中一些和 Can0533-KN6-1 和 My-17-2-KN7-1 基因組成較為接近的噬菌體，多屬短尾噬菌體科(Podoviridae)，因此推測 Can0533-KN6-1 和 My-17-2-KN7-1 也同屬短尾噬菌體科。

3.4 表現與純化噬菌體 Can0533-KN6-1 之莢膜分解酵素 ORF30

依照 Can0533-KN6-1 及 My-17-2-KN7-1 兩株噬菌體基因組中，可能為莢膜分解酵素的三個開放閱讀框架序列設計引子組，並將這些片段經聚合酶連鎖反應放大後轉殖至蛋白表現載體 pET-28c(+)。將建構好之質體經轉形作用送入勝任細胞 BL21(DE3)中，以 IPTG(Isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside)誘導蛋白表現，此時的目標蛋白產物在質體上表現時 N 端會帶有 His-tag 以利純化。將細菌以超聲波震盪破菌後離心並收取上清液，若再加入磁珠(His Mag Sepharose Ni)進行結合，最後將目標蛋白產物自磁珠上洗脫，即可得到小量純化後的蛋白。將三個預測為莢膜分解酵素表現後之產物分別點於含有 KN6 及 KN7 克雷伯氏肺炎桿菌的培養基上，結果發現 Can0533-KN6-1 的 ORF30 經表現後以 anti-His 抗體偵測，可在產物的預期位置(~105 kDa)發現相符的條帶；且不論是破菌後離心所得之上清液，或是將上清液純化後之洗脫產物，皆可於含四株 KN6 菌株之培養基上產生朦朧圓圈，顯示 ORF30 具有莢膜分解酵素活性，應為噬菌體 Can0533-KN6-1 之莢膜分解酵素。而 My-17-2-KN7-1 的 ORF12 以及 Can0533-KN6-1 的 ORF15 雖然在進行 SDS-PAGE 後以 Coomassie blue 染色，可觀察到大量表現之條帶，但破菌後離心之上清液並沒有在點試驗中觀察到酵素活性，所以沒有進一步進行純化實驗[圖五]。




3.5 報導基因 *luxAB* 表現測試

於報導噬菌體的部分，為建構帶有 *luxAB* 基因的冷光酶報導噬菌體，先行測試在沒有 *luxCDE* 基因製造冷光酶所需基質的情況下，外加基質是否也能讓 *LuxAB* 冷光酶產生冷光。首先將 *luxAB* 基因轉殖到質體 pGEMT-Easy 上，並在 *luxAB* 片段前分別接入 *lac* 啟動子和 *hsp60* 啟動子，使用熱休克法將質體轉形入以氯化鈣處理後之大腸桿菌勝任細胞 BL21(DE3)。培養帶有含冷光基因質體菌株， P_{lac} -*luxAB* 之組別培養條件又分為有無加入 IPTG 進行誘導、放置於 30 °C 或 37 °C 培養。接著使用超聲波震盪(sonication)將菌體打破，得到內含冷光酶之裂解液。將裂解液加入白色 96 孔盤中，再加入冷光酶之基質—正癸醛(n-decanal)至裂解液中[18]，並以帶有 *luxCDABE* 片段、單於培養過程中就可發出冷光的 BL21 菌株作為控制組，將白盤送入冷光儀測量冷光表現。實驗結果發現，在 *luxAB* 前端帶有 *lac* 啟動子的組別可偵測到明顯的冷光訊號，且有加入 IPTG 誘導之組別冷光訊號較強。相對地，在 *luxAB* 前端帶 *hsp60* 啟動子的組別所偵測到之冷光訊號則較不理想[圖六]。

3.6 同源重組報導噬菌體之建構

確認在外加冷光酶基質的情況下，單只有 *LuxAB* 表現也能產生冷光後，下一步便是將 *luxAB* 基因插入以 K1 英膜型為宿主之噬菌體 NTUH-K2044-K1-1 的基因體中。於先前的冷光測試結果顯示，在 *luxAB* 上游帶有 *lac* 啟動子的組別，*LuxAB* 之表現效果較佳，因此於後續的實驗皆選擇此組合(P_{lac} -*luxAB*)進行操作。

首先選取欲插入 *luxAB* 之目標噬菌體基因位置，本研究選定噬菌體 NTUH-K2044-k1-1 之第 34 與第 35 個編碼區(coding region)之間的序列，設計引子，並將欲插入位點前後各 1,000 bp 之序列轉殖到質體 pJET1.2/blunt 上，作為同源重組序列的側翼區(flanking region)。接著將 P_{lac} -*luxAB* 以 inverse PCR 方式接入側翼區的中央，使 P_{lac} -*luxAB* 序列片段前後各被約 1,000 bp 的同源區域包夾，加上合適之篩選抗性後即完成置換載體。將帶有同源區域及 *luxAB* 片段之置換載體 pJET-34- P_{lac} -*luxAB* 以電穿孔方式電入 NTUH-K2044/pKD46::DHFR 勝任細胞中，並加入阿拉伯糖(arabinose)誘導質體 pKD46 上的 λ red 同源重組酶系統表現，接著再以野生株噬菌體 NTUH-K2044-K1-1 感染帶有置換載體之勝任細胞。同源重組酶



會在菌體內促使置換載體上所帶片段與宿主細胞中的噬菌體基因體之同源區域發生同源重組。接下來，將噬菌體與宿主共同培養後，進行噬菌斑試驗(plaque assay)。挖取單一噬菌斑，並以噬菌體基因體上、同源重組區上游的引子搭配 *luxAB* 片段內的引子進行聚合酶連鎖反應，以確認 *luxAB* 片段是否成功插入噬菌體之基因體中，如[圖七]所示。因溶菌斑內所含之噬菌體也包含未發生同源重組的野生株 NTUH-K2044-K1-1，於是將溶菌斑內含的噬菌體感染野生株 NTUH-K2044，再次經噬菌斑試驗(plaque assay)獲得單一噬菌斑，並以聚合酶連鎖反應確認突變株噬菌體所含的比例。重複數次後，即獲得子代均帶有 *luxAB* 基因之突變噬菌株[圖八]，將此突變噬菌體株命名為 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)。

3.7 報導噬菌體專一性與效能測試

測試報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)是否於感染宿主後產生冷光訊號以及其宿主專一性。分別以 K1 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 和 K2 莢膜型的 A4528 作為共同培養之細菌，加入新鮮菌液至 96 孔白盤中，並加入野生株及同源重組報導噬菌體，再於每孔格加入 20 μ l 之基質—1% (v/v) 正癸醛 (以 70% 酒精為溶劑)。結果顯示，加入 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)的組別可以偵測到明顯的冷光訊號，但以野生株噬菌體感染 K1 莢膜型菌株、或以報導是菌體感染 K2 莢膜型菌株的組別皆無冷光產生，我們認為 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)仍保有對 K1 莢膜型雷伯氏肺炎桿菌之宿主專一性[圖九]。

確認報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)的特異性(specificity)後，接著進行報導噬菌體之敏感性(sensitivity)測試。經過多次試驗，結果顯示以總量 10^7 的報導噬菌體 100 μ l，感染不同稀釋倍率的菌液 100 μ l，加入最終濃度為 1 mM 的 IPTG 誘導 *LuxAB* 表現，再加入濃度為 0.1% (v/v) 的正癸醛 10 μ l 作為基質，此實驗條件下會得到本噬菌體最佳敏感度。NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)的偵測極限則為：在一小時內可使濃度 10^3 CFU/100 μ l 之菌液產生有別於基準值的冷光訊號[圖十]。



3.8 報導噬菌體於複雜檢體偵測能力之測試

為了要測試報導噬菌體在含有其他物質的樣本中的偵測能力是否受影響，我們將小鼠糞便溶於 SM 緩衝液中，再外加不同稀釋倍率之克雷伯氏肺炎桿菌，以模擬將報導噬菌體應用於臨床檢體之情形。混合含菌之糞便懸浮液以及報導噬菌體，並加入誘導用的 IPTG 和作為基質的正癸醛之後測量冷光訊號，結果顯示在小鼠糞便與菌液混合物中，報導噬菌體的偵測能力會下降至 10^5 CFU[圖十一]。另外於血清中外加不同稀釋倍率之克雷伯氏肺炎桿菌，再以報導噬菌體做偵測的實驗中，發現報導噬菌體的偵測能力也會下降至 10^5 CFU。雖依據冷光訊號的值來看，在血清中的偵測效果仍有比在糞便混合物中好一些，但偵測極限都比在純菌檢體中降低了 100 倍[圖十二]。

第四章、 討論




4.1 新型莢膜型噬菌體

在新莢膜型噬菌體 Can0533-KN6-1 以及 My-17-2-KN7-1 之基因分析過程中，可發現兩隻噬菌體基因體上，由起始密碼子和終止密碼子預估而獲得大於 1,000 bp 之開放閱讀框架，只有各約 20 個左右；接著以 500 bp 的條件去篩選開放閱讀框架，兩株噬菌體基因體上也只各含約 40 個開放閱讀框架。原本猜想噬菌體基因體上之開放閱讀框架數量會更多一些，並且排列緊密；因此無法確定本實驗所設定之預估條件是否能夠完整囊括該噬菌體所有之開放閱讀框架。此外，依據實驗室以往的研究經驗，莢膜分解酵素的基因序列長度通常約為 1,500-2,000 bp 左右，Can0533-KN6-1 的 ORF30 可比對到噬菌體尾絲蛋白，長度為 2,845 bp，符合多數莢膜分解酵素基因片段大小之範圍。而 Can0533-KN6-1 第 ORF15 也可比對到噬菌體尾部蛋白，長度為 816 bp；My-17-2-KN7-1 的 ORF12 可比對到噬菌體尾部蛋白，長度為 746 bp。雖這兩段開放閱讀框架長度不足 1,000 bp，較不符合預期中莢膜分解酵素基因之長度，但於實驗初始仍將兩段之視為可能的酵素基因。

我們將三段可能的莢膜分解酵素基因轉殖入質體，並在其編譯產物之 N 端位置接上組胺酸標記(His-Tag)，藉由質體將可能之莢膜分解酵素基因送入勝任細胞中表現。重組蛋白被大量表現後，經裂解並離心可獲得含大部分可溶性物質的上清液，再利用蛋白末端的組胺酸標記純化目標蛋白。我們發現表現 Can0533-KN6-1 之 ORF30 的裂解上清液以及其純化過後之產物，皆具有莢膜分解酵素活性，但 Can0533-KN6-1 的 ORF15 與 My-17-2-KN7-1 的 ORF12 在表現過後雖然可在 PAGE 上產生明顯的條帶，但卻幾乎沒有莢膜分解酵素活性。雖然 ORF15 和 ORF12 有比對到尾部蛋白的基因，但這兩者的序列長度較短，並且依據表現結果來看，推測這兩個片段並非莢膜分解酵素基因。

4.2 報導噬菌體

本研究建構出以 K1 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌為宿主之報導噬菌體，利用同源重組方法將細菌冷光酶基因插入噬菌體 NTUH-K2044-K1-1 基因體中，以產生重組



噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)。在選定插入 *luxAB* 之基因位置時，原本有三處作為候選，第一處為 NTUH-K2044-K1-1 基因體上第 2 個編碼區(coding region)上游；第二處則位在第 22 個編碼區下游；第三處則為本研究目前建構出之 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)所使用的第 34 編碼區下游。參考其他研究團隊先前所建構之報導噬菌體，報導基因較適用的插入位置為噬菌體的構造蛋白基因之後，如衣殼(capsid)蛋白基因的下游。此外，在啟動子基因的選用上，也有研究指出使用噬菌體啟動子的效果會比宿主啟動子好[9, 15, 18, 26, 30]。本研究所建構之報導噬菌體所使用啟動子為細菌之 *lac* 啟動子，經誘導後確實可加強產生冷光訊號的產生。有文獻指出，若建構報導基因時搭配噬菌體啟動子，有可能會進一步增強冷光訊號表現或提高偵測敏感性，所以我們想將報導基因插入噬菌體基因組上自有的啟動子下游區域[26]。我們發現在噬菌體 NTUH-K2044-K1-1 之第 2 個編碼區前方有三段可能的宿主啟動子基因，還有一段可能的噬菌體啟動子基因，將第二編碼區末端視為有潛力提高報導訊號的基因插入位點[19]。但將該段基因序列轉殖到質體的過程花了許多時間，我們推測是因為在噬菌體基因組前端的部分在噬菌體基因表現上佔有重要地位，該片段容易產生特殊的結構，或是和其他物質結合等未知原因而導致。最後將終於建構好之置換載體送入細胞中，並誘導置換片段與野生株噬菌體之同源重組後，在第一輪噬菌斑試驗便已無法挑到成功進行置換的突變噬菌株。


另外，第 22 編碼區於線上比對後的結果，顯示其有可能為衣殼蛋白之基因，所以在第 22 編碼區下游插入報導基因，也可能會增益冷光的表現。但此組別進行到同源重組步驟之後，卻始終挑不到完成正確同源重組的純變異噬菌株。我們推測在第 22 編碼區下游插入基因，可能會影響變異噬菌體組裝釋放後感染宿主的能力，所以可於同源重組步驟後以 PCR 偵測到帶有重組基因的噬菌體，卻無法將該噬菌株予以增殖放大。

另一方面，我們也嘗試建構以 *luxCDABE* 作為報導基因之報導噬菌體，因為若有 *luxCDE* 基因表現，冷光試驗的過程便無需外加基質，亦可即時將基質供應給冷光酶作用，相較於只有 *luxAB* 基因會有更高的冷光表現。我們選定建構 *luxAB* 報導噬菌體之報導基因插入位點--第 34 編碼區下游，並將 *luxCDABE* 置換到噬菌體基因組上。在進行同源重組後，第一輪感染產生的噬菌斑能以 PCR 的方式偵測

到突變株噬菌體，但在欲分離突變株的第二輪感染，卻無法偵測到含有突變株噬菌體的噬菌斑。經多次實驗之後，仍只有將 *luxAB* 報導基因插入第 34 個編碼區之報導噬菌體可成功置換基因、純化出突變株，並具備噬菌體原有之增殖能力。

建構出報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)之後，進行專一性測試。結果發現，只有將報導噬菌體感染 K1 莢膜型菌株的組別會有冷光訊號產生；且不論以野生株噬菌體感染 K1 莢膜型菌株，或以報導噬菌體感染 K2 莢膜型菌株，都不會產生冷光訊號，顯示此報導噬菌體在偵測上具有特異性。接著測試報導噬菌體之效能，經幾次試驗後發現，就算不在宿主與報導噬菌體的混合液中加入基質正癸醛(n-decanal)，也會產生冷光訊號，訊號強度甚至比有加基質的組別高。我們推測是因為正癸醛為高揮發性物質，正癸醛揮發後再溶入未加基質的組別，也能間接使無添加基質的組別產生冷光。因此我們發現少量的基質便足以供冷光酶產生冷光，添加過多的基質並不能使冷光訊號隨之增強。參考先前的文獻，發現其他研究團隊於冷光酶試驗中加入基質的量變異相當大，於 200 μ l 細菌和噬菌體混合液中加入基質的濃度可為 0.25% 到 1% (v/v)，加入的總量也不盡相同。經過多次測試，最終發現使用 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)偵測 K1 莢膜型菌株時，在 200 μ l 細菌和噬菌體混合液中只加入 0.1% 基質 10 μ l，在冷光表現及敏感度上效果最好。另外也有文獻提到使用過高濃度的噬菌體會降低冷光訊號的產生，可能因為當過多噬菌體同時感染，會加快宿主的裂解，減少噬菌體基因在宿主內的表現[18]。目前於本研究中，以 10^7 PFU/ml 報導噬菌體感染、加入最終濃度 1 mM IPTG 誘導，再加入 0.1% 基質作為偵測最適條件。接下來的實驗，我們將報導噬菌體應用於含菌之小鼠糞便或人血清樣本，卻發現偵測極限只能達到用於純菌樣本的百分之一。可能的原因為噬菌體感染宿主能力會受到糞便和血清之內容物影響，另外也可能是因冷光酶作用受到雜質干擾。

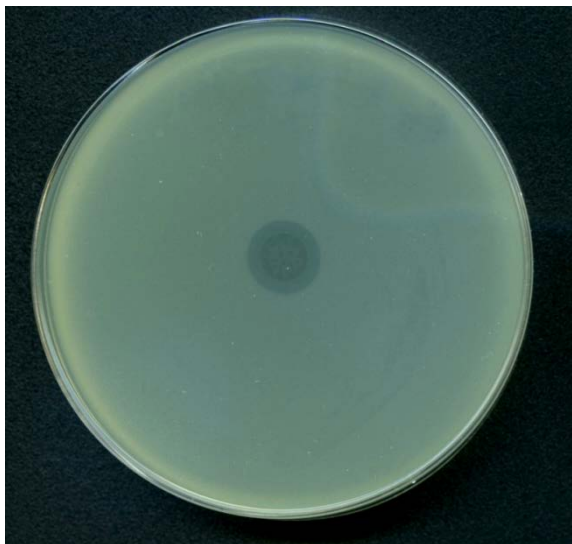
本篇研究中使用之報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)之偵測極限落在 10^4 CFU/ml，與許多以細菌冷光酶為報導基因之報導噬菌體十分相近。其中有研究團隊使用報導噬菌體偵測 *Listeria monocytogenes*，會將待測樣本先行培養一段時間(2-6 小時)，再進行冷光試驗，如此而得的偵測極限可達 10^3 CFU/ml；或加入報導噬菌體後定時偵測冷光，於數小時後終可於 10^3 CFU/ml 的樣本獲得冷光訊號[19, 28]。另外也有研究團隊建構出之報導噬菌體能夠達到較高的偵測極限，例如 *B.*



anthracis 的報導噬菌體，可於含菌 3×10^3 CFU/ml 的樣本中偵測到冷光訊號[18]；而可感染 *Yersinia pestis* 的報導噬菌體，可在一小時內偵測到 10^2 CFU/ml 組別的冷光訊號[20]。還有文獻指出，使用綠色螢光蛋白作為報導基因，建構出之 *Mycobacterium tuberculosis* 報導噬菌體可在含 $<10^2$ CFU/ml 宿主細胞的樣本中產生與背景值區別的冷光訊號 [26]。本研究建構出之報導噬菌體，其宿主為克雷伯氏肺炎桿菌，生長速度快，所以若將待測樣本先行培養一段時間，可能得以在菌量較少的樣本中偵測到冷光訊號，但同時也會失去報導噬菌體快速偵測的優勢。因此，未來若欲將此噬菌體應用於臨床檢體，還需要探討使用其他報導基因或改變插入位點之效果，更進一步增強冷光訊號的表現及測試最佳偵測條件。



A.



B.

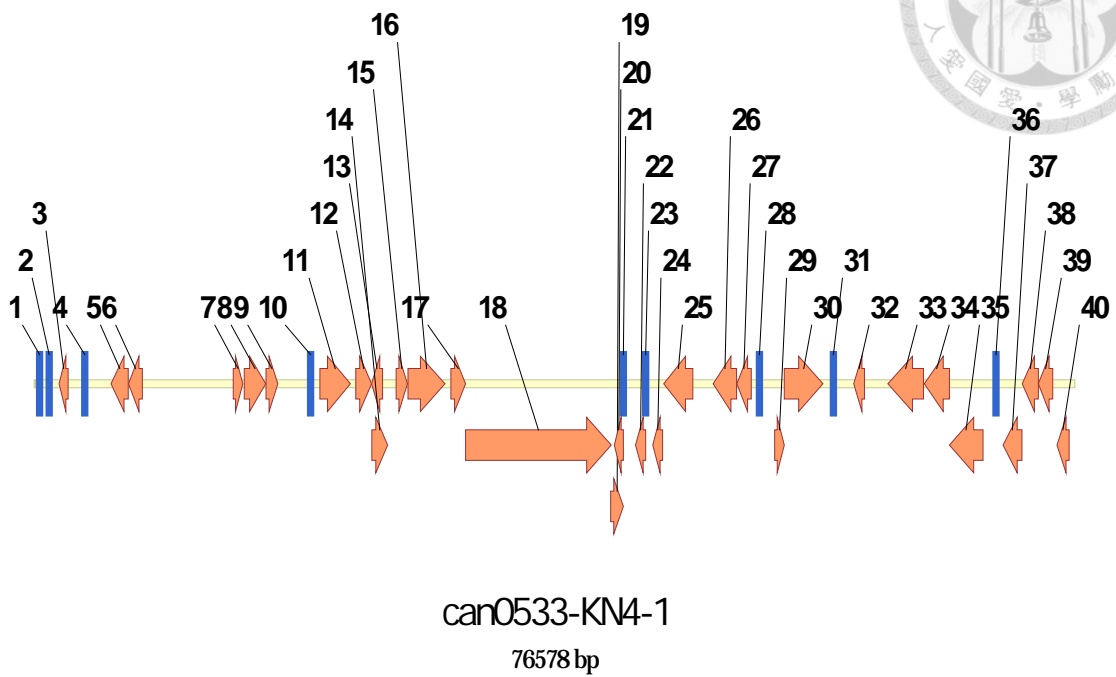


圖一、Can0533-KN6-1 及 My-17-2-KN7-1 之點試驗

A 圖: Can0533-KN6-1 感染莢膜型 KN6 菌株 Can0533 之點試驗，形成明顯的雙圈溶菌斑，顯示該噬菌體可能帶有莢膜分解酵素。

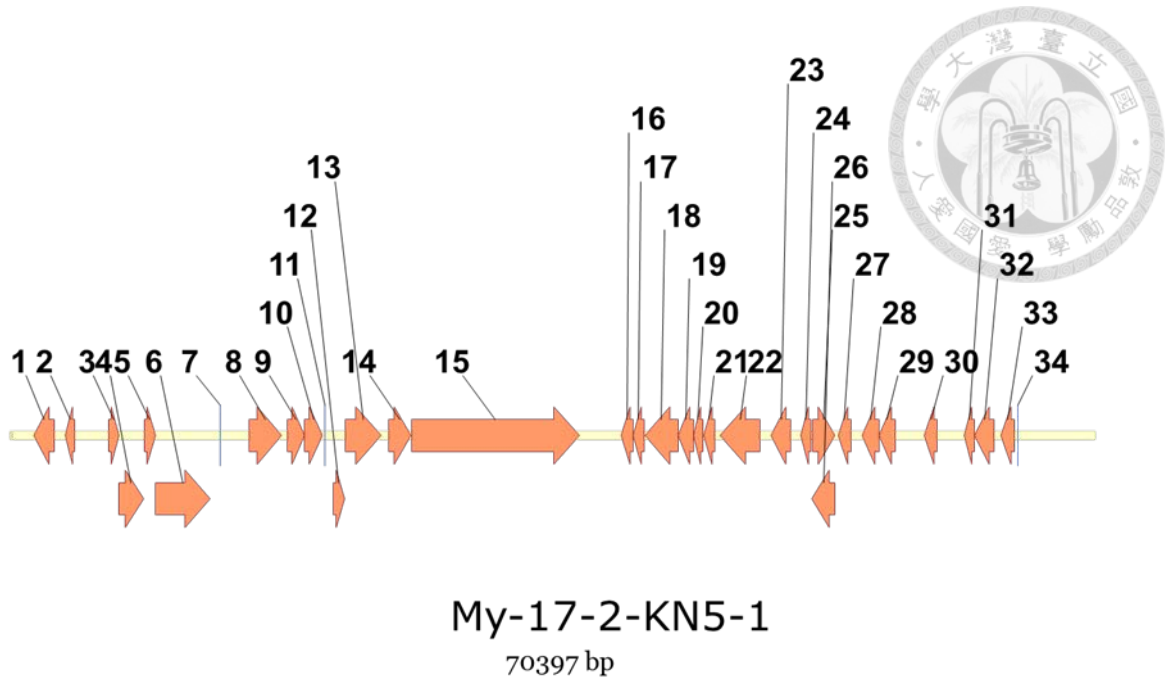
B 圖: My-17-2-KN7-1 感染莢膜型 KN7 菌株 My-17-2 之點試驗，

▲為 My-17-2-KN7-1 (中 1)，★為 My-17-2-KN7-1 (中 2)。



圖二、Can0533-KN6-1 基因體序列圖譜

經高通量定序而得 Can0533-KN6-1 基因體序列，長度為 76,578 bp。上圖標示出共 40 個大於 500 bp 之開放閱讀框架，其中 ORF15 及 ORF30 經比對視為可能的莢膜分解酵素，如[表四]所示。

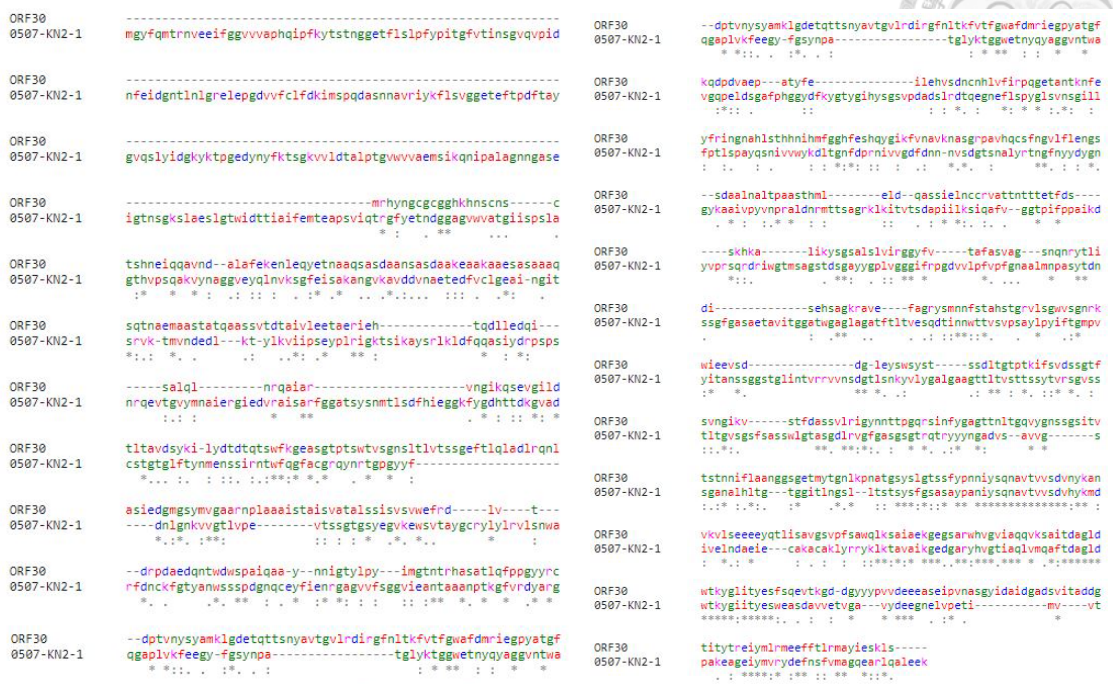


圖三、My-17-2-KN7-1 基因體序列圖譜

經高通量定序而得 My-17-2-KN7-1 基因體序列，長度為 70,397 bp。上圖標示出共 34 個大於 500 bp 之開放閱讀框架，其中第 12 個開放閱讀框架經比對視為可能的莢膜分解酵素，如[表四]所示。

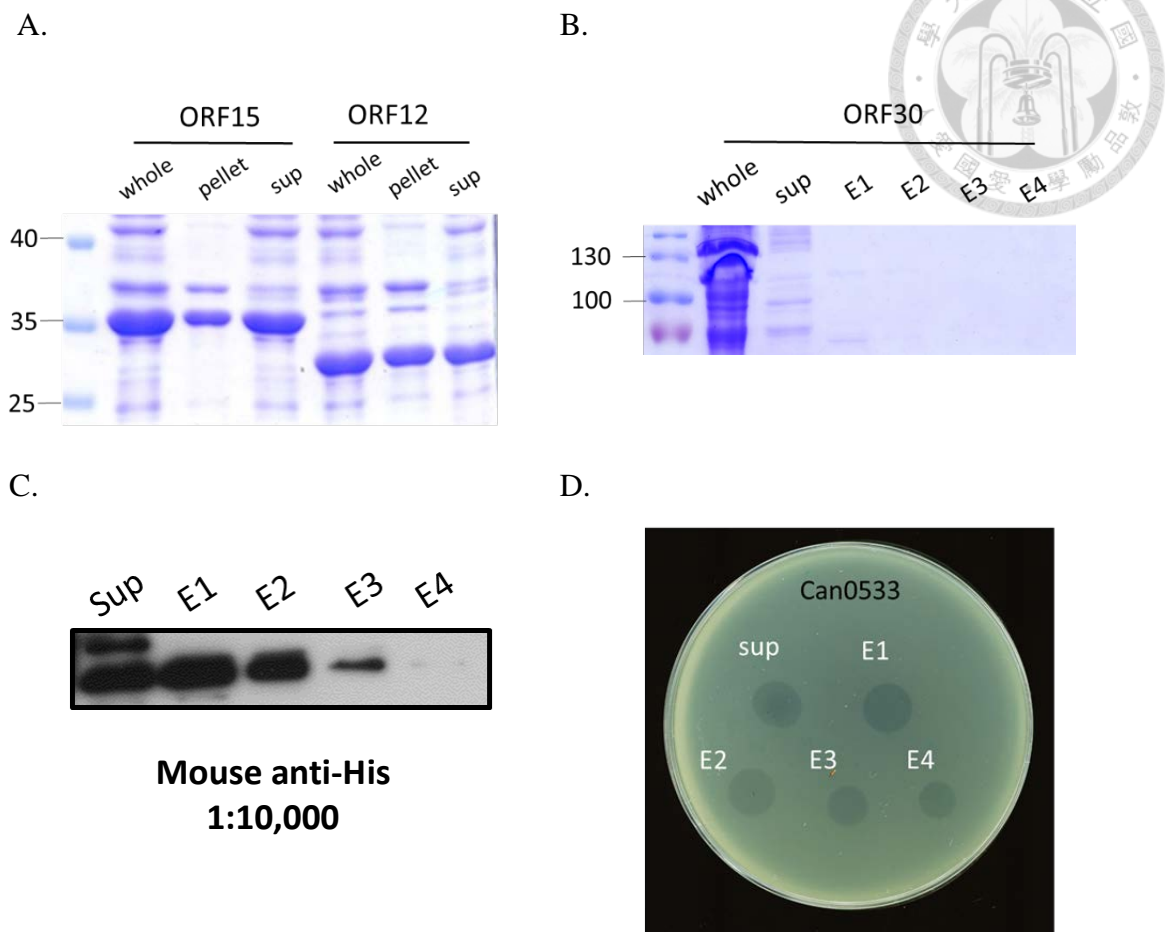


CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment



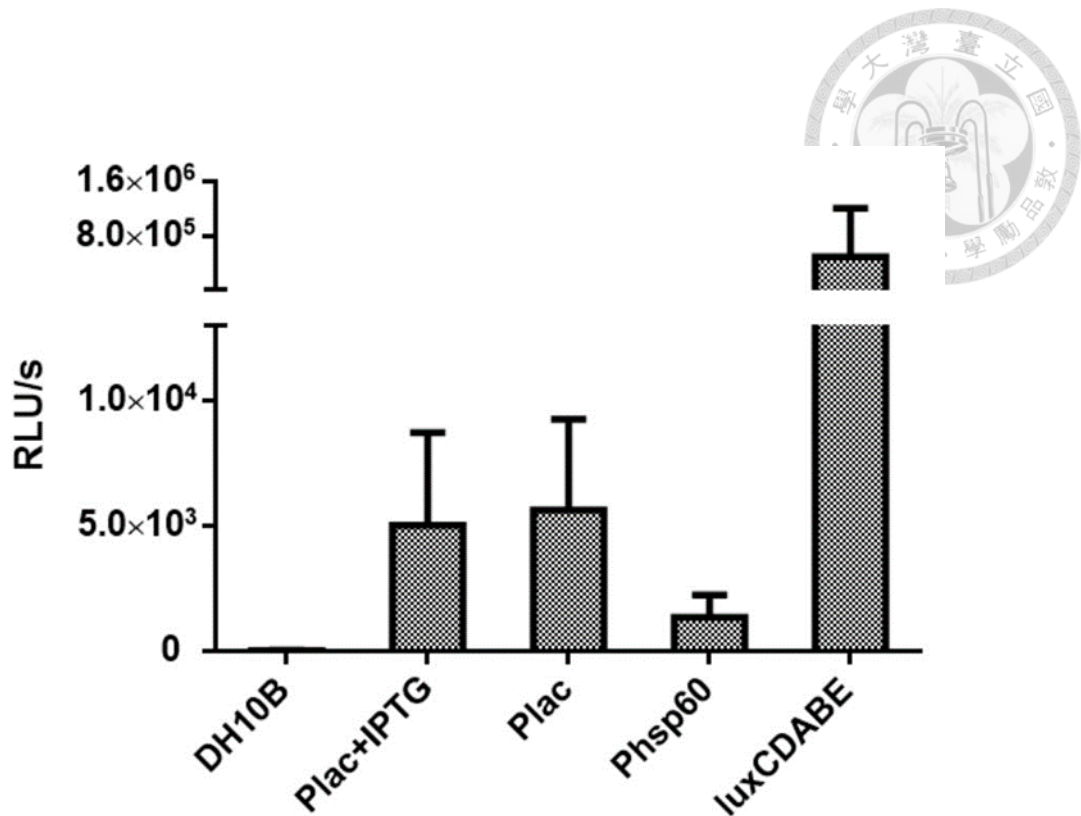
圖四、Can0533-KN6-1 之 ORF30 胺基酸序列比對

將 Can0533-KN6-1 之 ORF30 與 KN2 莢膜型噬菌體 0507-KN2-1 的 putative tail fiber protein 胺基酸序列，以線上比對程式 Clustal 進行分析。於線上資料庫 blast 比對結果顯示 ORF30 的胺基酸序列與 0507-KN2-1 之 putative tail fiber protein (Sequence ID: YP_008532047.1)之相似度為 38%。



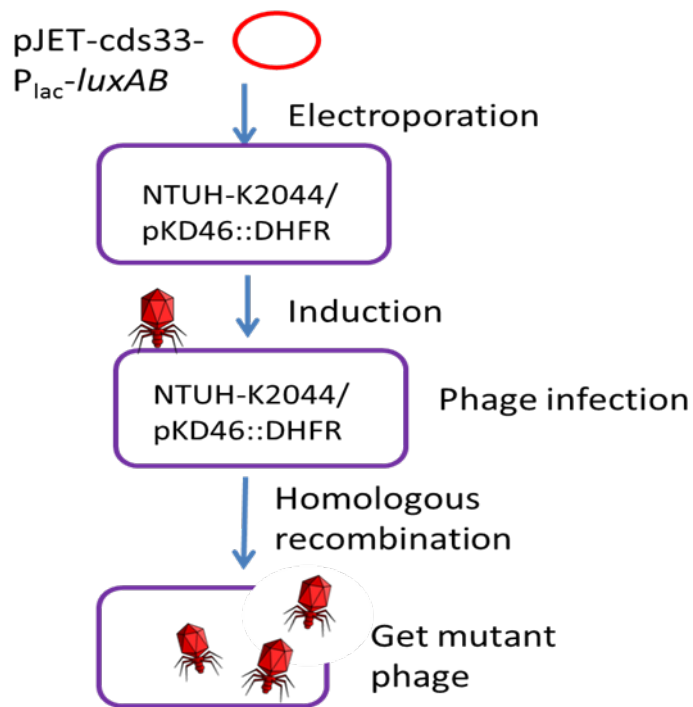
圖五、表現與純化噬菌體 *Can0533-KN6-1* 之莢膜分解酵素 ORF30

- A. 大量表現 *Can0533-KN6-1* 之 ORF15 以及 *My-17-2-KN7-1* 之 ORF12，跑 SDS-PAGE 之後分別可於 35 kDa 和 30 kDa 附近的位置觀察到明顯的條帶。
- B. 大量表現 *Can0533-KN6-1* 之 ORF30 及純化後之洗脫產物，預估之 ORF30 大小為 105 kDa 左右，經大量表現後在裂解上清液和洗脫液的組別只能看到較淡的條帶。
- C. 以抗體偵測 N 端帶有 His-tag 的 ORF30，可於 ORF30 預估位置 (~105 kDa) 產生訊號。
- D. 將誘導蛋白表現之勝任細胞破菌後上清液及純化過後之產物 (E1~E4) 點於含有克雷伯氏肺炎桿菌 *Can0533* 之培養基上。結果顯示，雖然在大量表現後無法於 SDS-PAGE 經由 Coomassie blue 染色直接觀察到明顯條帶，但此上清液和洗脫液皆具有良好的莢膜分解酵素之活性。



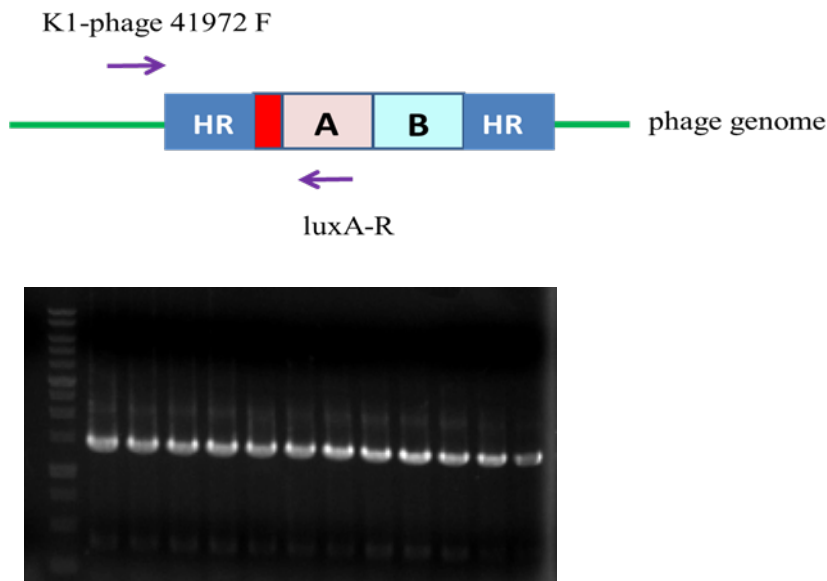
圖六、測試於勝任細胞中 LuxAB 表現

將帶有 *luxAB* 基因之質體送入 BL21 中表現，並外加基質(n-decanal)，可以成功地使冷光酶發出冷光訊號。實驗結果發現，在 *luxAB* 前端帶有 *lac* 啟動子的組別會有強度較高的冷光訊號，但於 *luxAB* 前端帶 *hsp60* 啟動子的組別所偵測到之冷光訊號相對較低。



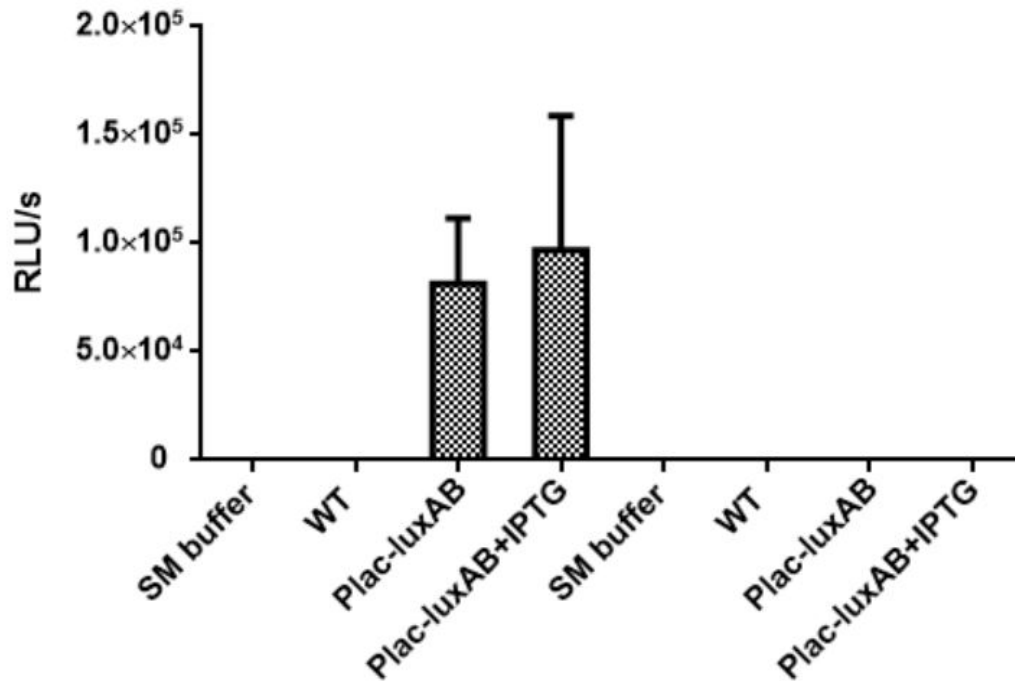
圖七、報導噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac}-*luxAB*) 建構流程

本研究將帶有以 NTUH-K2044-K1-1 同源序列為側翼包夾 *luxAB* 基因之質體電入含有 pKD46::DHFR 之 NTUH-K2044，並以野生株 NTUH-K2044-K1-1 同時感染，再誘導同源重組發生，即可獲得帶有 *luxAB* 片段的基因重組噬菌體。



圖八、同源重組噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)

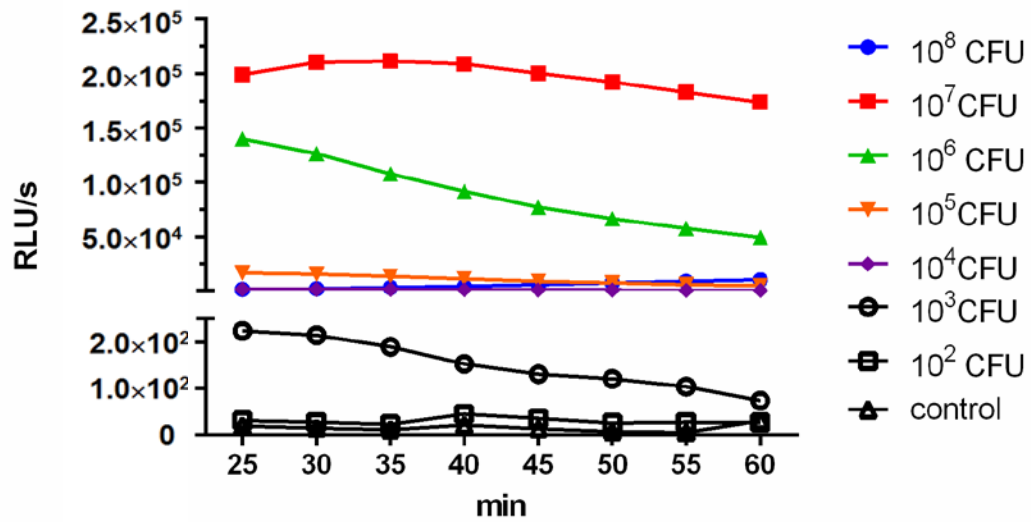
在以野生株噬菌體感染送入帶有 *luxAB* 及同源重組片段質體的 NTUH-K2044/pKD46::DHFR 並誘導同源重組後，挖取單一溶菌斑，以噬菌體基因上同源序列外的引子 K1-phage 41972-F 加上 *luxAB* 片段內的引子 luxA-R 做聚合酶連鎖反應，並跑洋菜膠電泳(上圖為所使用之引子配對示意圖)。目標產物約為 1,200 bp。挑取有成功進行同源重組之單一溶菌斑，並重複感染 NTUH-K2044 野生株以確保所獲噬菌體皆為同源重組株。如圖六所示，在第四次重複感染後，所挑選之單一溶菌斑內皆為 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*) 同源重組株。



圖九、NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*) 之 *luxAB* 表現以及特異性

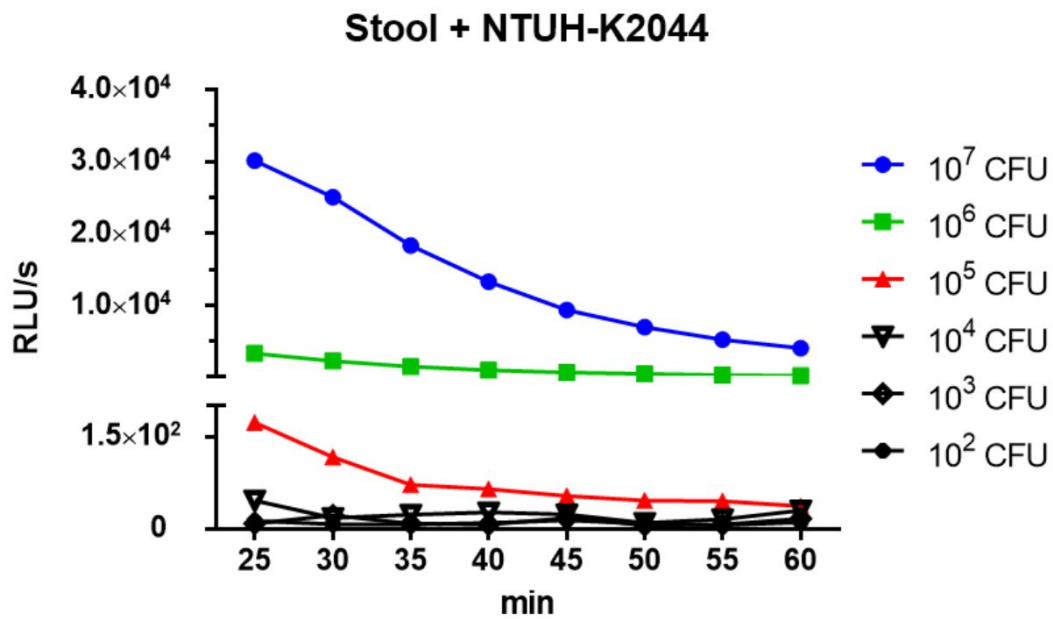
測試 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)感染宿主後之冷光表現情形，發現以報導噬菌體感染 NTUH-K2044 的組別，不論有無另加 IPTG 誘導，皆有偵測到冷光訊號的產生。而以野生株 NTUH-K2044-K1 感染兩莢膜型菌株之組別，或是以噬菌體 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)感染 K2 莢膜型菌株 A4528 之組別，都不會有冷光的產生，顯示本報導噬菌體仍保留原噬菌體之宿主特異性。

10⁷ NTUH-K2044-K1-1(P_{lac}-*luxAB*) infection + 0.1% decanal



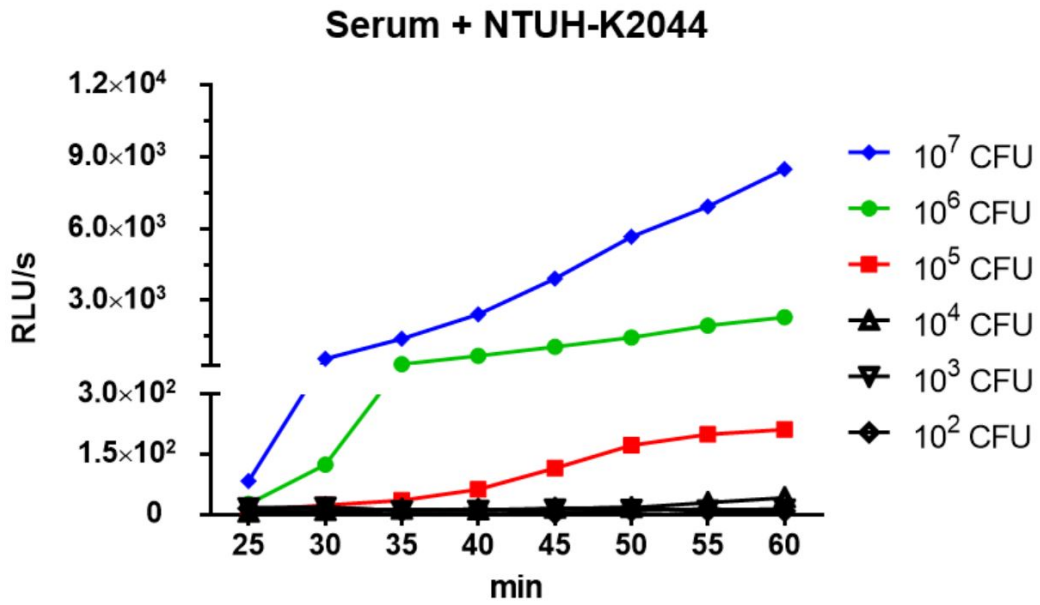
圖十、NTUH-K2044-K1-1(P_{lac}-*luxAB*) 效能測試

以總量 10⁷ 的 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac}-*luxAB*) 感染不同稀釋倍率的 NTUH-K2044，並給予 0.1% 基質(n-decanal) 10 μl，會有較好的偵測敏感性。將噬菌體與待測樣本混合，25 分鐘後測冷光，最低可以於 10³ CFU/100 μl 的菌量偵測到高於基準的冷光訊號。



圖十一、報導噬菌體於含菌糞便樣本中之效能測試

以總量 10^7 的 NTUH-K2044-K1-1($P_{lac-luxAB}$)，混合加入不同稀釋倍率 NTUH-K2044 之小鼠糞便懸浮液，並給予 0.1% 基質(n-decanal) $10 \mu\text{l}$ 。將噬菌體與待測樣本混合，25 分鐘後測冷光，最低可於 10^5 CFU/ $100 \mu\text{l}$ 的菌量偵測到高於基準的冷光訊號。



圖十二、報導噬菌體於含菌血清樣本中之效能測試

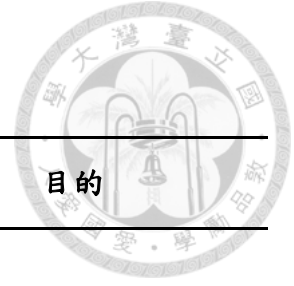
以總量 10^7 的 NTUH-K2044-K1-1(P_{lac} -*luxAB*)，混合外加入不同稀釋倍率 NTUH-K2044 之血清，並給予 0.1% 基質(n-decanal) 10 μ l，會有較好的偵測敏感性。將噬菌體與待測樣本混合，25 分鐘後測冷光，最低可以於 10^5 CFU/100 μ l 的菌量偵測到高於基準的冷光訊號。

表一、本研究使用之菌株與載體




菌株	說明	來源
克雷伯氏肺炎桿菌		
NTUH-K2044	K1 莢膜型菌株，自患有肝膿瘍併發腦膜炎之中年男性患者血液檢體分離	臺大醫院臨床菌株[30]
KN6 莢膜型	Can0533、Can0515、Can0534、3701N	[表三]
KN7 莢膜型	My-17-2、0518、Can0513、5827E、3229566	[表三]
大腸桿菌		
DH10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL nupG λ - tonA (confers resistance to phage T1)	Invitrogen, U.S.A
BL21(DE3)	F- ompT hsdSB (rBmB-) gal dcm (DE3)	Novagen, Germany
質體		
pJET1.2/blunt	Blunt-end vector	Thermo Scientific, U.S.A
pET-28c(+)	Protein expression vector with lac operator, T7 promoter, N' and C' 6X His-tag coding sequence and Kanamycin cassette.	Novagen, Germany
pGEMT-easy	T-A cloning vector	Promega, U.S.A
pKD46	Lambda Red recombinase expression plasmid , oriR101 w/repA101ts, araBp-gam-bet-exo, bla(ApR)	[31]

表二、 研究所使用引子



引子名稱	序列 (5'→3')	目的
pJET F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	
pJET R	CCGAACATCCATTTTCCATGGCAG	基因選殖
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
K1 phage 428 F	GCACACTCAGCACACTCAGC	
K1 phage 1080 F1	GAGGCCCAGTACCTTGACC	cds2 置換
K1 phage 1828 R1	AATGCACCTCGTTGATTGG	載體建構
K1 phage 1829 F2	ATGACCCATTCAACTGATAAAG	
K1 phage 2998 R2	GGTTGCAACTGCACT	
K1 phage 24844 F	ACTACCAGGATGACTGGACC	
K1 phage 24882 F	GAGATGGGTCAGAACAACG	cds22 置換
K1 phage 25743 R	GTAGCATCAGCGGCTACG	載體建構
K1 phage 25744 F	GGAAGAGTAGTACACGCACC	
K1 phage 26546 R	GGTACACCTGTGCAGTGG	
K1 phage 41972 F	TGCTTCTACAACATCGGAT	
K1 phage 42011 F	GGCTGCTCAGAGGACACGG	cds34 置換
K1 phage 43018 R	TTAGAGATATACCTCCCAG	載體建構
K1 phage 43019 F	GTAGCTCTAAGTAGTTCTAAG	
K1 phage 43871 R	GAGCGCACCCCTATGGCCCAC	

luxD F	CTTGCATGCCTGCAGGTC	 luxAB 基因轉殖
luxA R	GTCTGAGATAGCTCAGGTGGC	
luxB F	CAGCAAGGGCAGAAGCTC	
luxB R	ACGTTACGAGTGGTATTTGACG	
luxC-100R	GAGAGTCATTCAATATTGGCAGGT	<i>luxCDABE</i> 置換載體建構

表三、 KN6 與 KN7 荚膜型菌株來源與盛行率



荚膜型	來源	Percentage of clinical specimen collected
KN6		
Can0533, Can0534, Can0515	Canada (Bacteremia)	3.7%
3701N	UTI	0.7%
KN7		
My-17-2	NTUH (Bacteremia)	0.9%
Can0518, Can0513	Canada (Bacteremia)	2.5%
5827E	UTI	0.7%
3229566	Physical examination	0.9%

表四、 Can0533-KN6-1 與 My-17-2-KN7-1 開放閱讀框架及其可能編譯之產物

噬菌體	開放閱讀框架	位置	基因長度(bp)	可能之蛋白產物	相似度
Ca10533-KN6-1	ORF15	265567-27382	816	Putative tail protein	27%
	ORF30	55181-58027	2845	Putative tail fiber protein	38%
My17-2-KN7-1	ORF12	20876-21622	746	Putative tail protein	34%



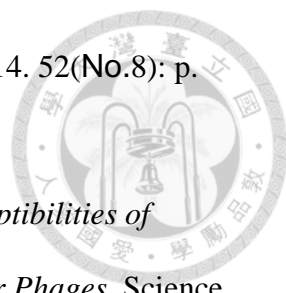
第五章、 參考文獻

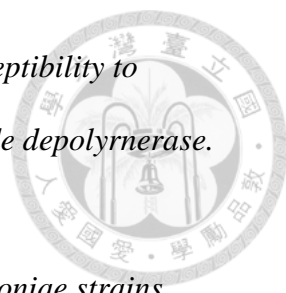


1. Sikarwar, A.S. and H.V. Batra, *Identification of Klebsiella Pneumoniae by Capsular*. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 2011. 2(No 2): p. 130-134.
2. Paczosa, M.K. and J. Meccas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. 80(3): p. 629-61.
3. Pan, Y.J., et al., *Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of Klebsiella spp.* Sci Rep, 2015. 5: p. 15573.
4. Hsu, C.R., et al., *Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of Klebsiella pneumoniae and characterization of its polysaccharide depolymerase*. PLoS One, 2013. 8(8): p. e70092.
5. S. J. CRYZ, J., et al., *Seroepidemiology of Klebsiella Bacteremic Isolates and Implications for Vaccine development*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. Vol. 23(No. 4): p. 687-690.
6. Yu, W.L., et al., *Comparison of prevalence of virulence factors for Klebsiella pneumoniae liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. 62(1): p. 1-6.
7. Pan, Y.J., et al., *Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc sequencing*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e80670.
8. Drulis-Kawa, Z., et al., *Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications*. Current Protein and Peptide Science, 2012. 13(8): p. 699-722.
9. Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska-Skrobek, and B. Maciejewska, *Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches*. Current Medicinal

- Chemistry, 2015. 22: p. 1757-1773.
10. Mushtaq, N., *Treatment of experimental Escherichia coli infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. 56(1): p. 160-165.
11. Scorpio, A., et al., *Capsule depolymerase overexpression reduces Bacillus anthracis virulence*. Microbiology, 2010. 156(Pt 5): p. 1459-67.
12. Duckworth, D.H., "Who Discovered Bacteriophage?". Bacteriological Reviews, 1976. 40(No. 4): p. 793-802.
13. Housby, J.N. and N.H. Mann, *Phage therapy*. Drug Discovery Today, 2009. 14(11-12): p. 536-40.
14. Ripp, S., et al., *Linking bacteriophage infection to quorum sensing signalling and bioluminescent bioreporter monitoring for direct detection of bacterial agents*. J Appl Microbiol, 2006. 100(3): p. 488-99.
15. Smartt, A.E. and S. Ripp, *Bacteriophage reporter technology for sensing and detecting microbial targets*. Anal Bioanal Chem, 2011. 400(4): p. 991-1007.
16. Schmelcher, M. and M.J. Loessner, *Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens*. Bacteriophage, 2014. 4(1): p. e28137.
17. Schofield, D.A., et al., *Bacillus anthracis diagnostic detection and rapid antibiotic susceptibility determination using 'bioluminescent' reporter phage*. J Microbiol Methods, 2013. 95(2): p. 156-61.
18. Lossener, M.J., et al., *Construction of Luciferase Reporter Bacteriophage A511::luxAB for Rapid and Sensitive Detection of Viable Listeria Cells*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(No. 4): p. 1133-1140.
19. Vandamm, J.P., et al., *Rapid Detection and Simultaneous Antibiotic Susceptibility Analysis of Yersinia pestis Directly from Clinical Specimens by*



- 
- Use of Reporter Phage*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. 52(No.8): p. 2998-3003.
20. William R. Jacobs, J., et al., *Rapid Assessment of Drug Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis by Means of Luciferase Reporter Phages*. Science, 1993. 260: p. 819-822.
 21. Klumpp, J. and M.J. Loessner, *Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2014. 144: p. 155-71.
 22. Bai, J., et al., *Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins*. Front Microbiol, 2016. 7: p. 474.
 23. Ulitzur S, K.J., *Introduction of lux genes into bacteria, a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility*. . Bioluminescence and chemiluminescence, new perspectives. , 1987: p. 463-72.
 24. Ripp, S., et al., *Bacteriophage-amplified bioluminescent sensing of Escherichia coli O157:H7*. Anal Bioanal Chem, 2008. 391(2): p. 507-14.
 25. Jain, P., et al., *phi(2)GFP10, a high-intensity fluorophage, enables detection and rapid drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum samples*. J Clin Microbiol, 2012. 50(4): p. 1362-9.
 26. Chen, J., and Griffiths, M. W. , *Salmonella detection in eggs using Lux(+)* bacteriophages. J. Food Prot, 1996. 59: p. 908-914.
 27. Lossener, M.J., M. Rudolf, and S. Scherer, *Evaluation of Luciferase Reporter Bacteriophage A511::luxAB for Detection of Listeria monocytogenes in Contaminated Foods*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(No. 8): p. 2961–2965.
 28. Stirm, S., et al., *Isolation of Spike-Formed Particles from Bacteriophage Lysates*. Virology, 1971. 46(1): p. 303-308.

- 
29. Hughes, K.A., I.W. Sutherland, and M.V. Jones, *Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of phage-borne polysaccharide depolymerase*. Microbiology, 1998. 144: p. 3039-3047.
30. Fang, C.T., et al., *A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications*. J Exp Med, 2004. 199(5): p. 697-705.
31. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. PNAS, 2000. 97(12): p. 6640–6645.