

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's Thesis

分離及鑑定一金黃色葡萄球菌噬菌體之溶菌酶

Isolation and characterization of a
Staphylococcus aureus phage putative endolysin

李惠萱

Huei-Hsuan Lee

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July 2024



致謝

首先感謝王錦堂教授給予我機會進入實驗室，並不吝嗇的給予指導和研究方向，讓我能順利完成兩年學業。謝謝佩芳學姊在繁忙之際，仍為我們解答實驗中遇到的大小問題，在我進實驗室的第一年中帶給我莫大的幫助。謝謝已經畢業的柏佑和大庭萱教導我們基礎的實驗技巧，也謝謝你們包容不熟練、常常污染的我，此外想特別謝謝大庭萱畢業前花了一段時間帶我做實驗，並把實驗記錄本撰寫的非常清楚，讓我在承接金黃色葡萄球菌的相關實驗時輕省不少。謝謝曉蝶、佳育、士瑄、漢甡為實驗室帶來歡樂的氣氛，並在我們為課業、報告、seminar 焦慮時鼓勵我們，因為有你們傳承經驗，讓我們的學習之路更加平順，也謝謝你們在撥穗典禮送來的花束和祝福，讓人覺得很溫暖，很高興能成為你們的學妹。謝謝宗璇，成為 R739 最 carry 的學姊，從處理環安衛到處理火災，不管事情多驚悚妳總是能 hold 住一切，也謝謝妳願意花時間陪我們 rehearsal，甚至幫我們批改論文，讓我從一個什麼都不懂的實驗小白，到現在也能完成每一關並如期畢業。謝謝禦寒，身為實驗室唯二的 T 人，有些事會覺得只有妳也懂，雖然在半路被我 binding 時會想逃走，但還是謝謝妳願意聽我的問題並給予建議。謝謝同期的彥茹、庭萱和好軒，雖然功課、考試跟報告都很困難，但有大家的陪伴，不知不覺就關關過了。很喜歡大家在實驗室營造沒有很正確，但是很快樂的氣氛。謝謝彥茹常關心我報告、考試的預備狀況，碩一時甚至在考試前夕把筆記借我，也謝謝妳陪伴力氣小的我一起當開滅菌鍋二人組。庭萱，雖然妳比我還要晚開始做金黃色葡萄球菌的實驗，但真的是進度飛快，很欣賞妳在課業、報告上都有優秀的表現，還有雙做實驗的巧手，我相信以妳的能力，進入職場後一樣會被重用的！祝福妳未來的生涯一路順利。好軒，謝謝妳在路過趕報告快爆炸的我時都會跟我說聲加油，感受得到妳的熱心，在我心目中妳真的是大 E 人一個 XD。祝福妳接下來的實驗都順順利利，半年後光榮畢業～謝謝成詣，看見大家的需要時總是默默填補空缺，無論是幫忙插 tips、幫忙提水或是一起下樓取餐拿飲料等，欣賞你的積極和熱心，還有謝謝你撥穗時的諸般預備，真的非常用心。希望你下一波定序順順利利，往後的各種實驗也都輕鬆過。最後謝謝我的父母，因為有你們的支持，我才能沒有後顧之憂的完成學業。也謝謝大學的朋友、教會的朋友一路上的陪伴，讓這兩年成為人生中美好的回憶之一。

中文摘要



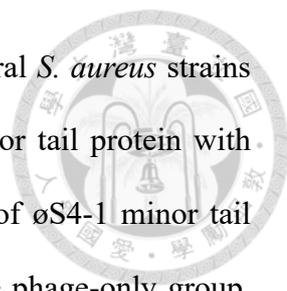
金黃色葡萄球菌屬革蘭氏陽性球菌，在近 10 年台灣醫療院所常見的感染症病原常居前 10 名，層出不窮的抗藥性菌株也顯示需要可替代或輔助傳統療程的新策略。噬菌體為可辨認細菌表面構造，並感染、殺死菌株的病毒，故有治療細菌感染症的潛力。本實驗目的為分離、鑑定宿主範圍廣、殺菌能力亦佳的金黃色葡萄球菌噬菌體，表現、純化具抑菌活性的溶菌蛋白（lytic proteins），並討論其應用於醫療用途的可能性。我們自 13 種水源分離出 9 株噬菌體，從其中選擇 ϕ S4-1，與 MRSA 菌株 *S. aureus* SA055 進行噬菌體殺菌試驗（killing assay），其於 $MOI = 1 \times 10^3$ 時可將菌株存活率下降至 57.9%， $MOI = 1 \times 10^4$ 時則可下降至 1.6%。限制片段長度多型性（restriction fragment length polymorphism）顯示 ϕ S4-1 的切割圖譜未與之前所發現的噬菌體的重複，顯示其為尚未被我們分離的噬菌體。全基因體定序（whole genome sequencing, WGS）顯示 ϕ S4-1 屬於尾狀噬菌體目（*Caudovirales*）的 *Rountreeviridae* 科，與比對到最為相似的噬菌體 PSa3 相似度為 92.82%。爾後挑選 ϕ S4-1 基因上三種可能具溶菌蛋白活性的蛋白進行表現，分別命名為 ϕ S4-1 endolysin、 ϕ S4-1 tail protein-1 及 ϕ S4-1 minor tail protein，且經數據庫比對後，相似蛋白的研究顯示 ϕ S4-1 minor tail protein 可能具有溶菌酶之活性。 ϕ S4-1 endolysin 在破菌後僅分佈於離心的沉澱物，並未分布在上清液中， ϕ S4-1 tail protein-1 具高水溶性，但不能夠結合上磁珠，故此兩蛋白無法完成純化。 ϕ S4-1 minor tail protein 則可被表現與純化，且在點試驗中對數種金黃色葡萄球菌株皆具抑菌效果。然而使用該蛋白與噬菌體 ϕ S4-1 混合，共同執行殺菌試驗後，發現相較於只有噬菌體的組別，添加 ϕ S4-1 minor tail protein 並不能降低 SA055 的存活率。本實驗所分離之噬菌體 ϕ S4-1，以及所純化出的 ϕ S4-1 minor tail protein 在多株金黃色葡萄球菌株，包含數株 MRSA 上皆表現出抑菌效果，顯示他們具有廣泛的宿主範圍。與他種溶菌蛋白共同使用，或與抗生素做合併治療，皆有機會提升治療效果。因此噬菌體 ϕ S4-1，以及所純化出的 ϕ S4-1 minor tail protein 對輔助現有療法，或提供替代療法上仍具有發展潛力。

關鍵字：金黃色葡萄球菌、噬菌體、溶菌蛋白、溶菌酶、尾纖維蛋白

Abstract



Staphylococcus aureus, a Gram-positive bacterium, has been among the top 10 common pathogens for causing infections over the past decade in Taiwan. The proliferating emergence of antibiotic-resistant strains also indicates the urgency to develop alternative therapies to strengthen traditional antibiotic treatments. Bacteriophages are viruses that can specifically recognize bacterial surface structures, infect them, and eventually lysis the host strains, thus they are potential for treating bacterial infections. This study aims to isolate and characterize *S. aureus* phages which bear a broad host range and good bactericidal activity, purify their hypothetical lytic proteins, and discuss their potential applications for the implications in medicine. We isolated 9 phages from 13 sewage samples and selected øS4-1 for conducting killing assays against *S. aureus* SA055. At an MOI of 1×10^3 , øS4-1 could reduce the survival rate of the bacterial strain to 57.9% and reduced to 1.6% at an MOI of 1×10^4 . The result of restriction fragment length polymorphism did not repeat with other phages isolated by our lab, indicating that øS4-1 may be a novel phage to our laboratory. Results of whole genome sequencing (WGS) indicated that øS4-1 belongs to the *Rountreeviridae* family from *Caudovirale*, and shared 92.82% identity with PSa3, the most closely matched phage in the NCBI database. Among all the sequences of øS4-1, we selected three hypothetical lytic protein sequences for further expression and named them as øS4-1 endolysin, tail protein-1, and øS4-1 minor tail protein. Research about one similar protein of øS4-1 minor tail protein indicated that it may possess endolysin activity. After protein expression, øS4-1 endolysin did not distribute in the centrifuged supernatant but only distributed in precipitate after cell lysis. Tail protein-1 exhibited high solubility but couldn't bind to magnetic beads. Therefore, these two proteins could not carry out the purification process. The øS4-1 minor tail protein can be expressed and purified



successfully, and it also exhibited bacteriostatic effects against several *S. aureus* strains in the result of the spot test. However, after combining øS4-1 minor tail protein with phage øS4-1 for killing assay, the result showed that the addition of øS4-1 minor tail protein couldn't reduce the survival rate of SA055 compared to the phage-only group. The isolated phage øS4-1 and the purified øS4-1 minor tail protein both can present anti-microbial activity among multiple *S. aureus* strains, including several MRSA strains, suggesting that they have a broad host spectrum. If combined with other lytic proteins or antibiotics, it has the potential to enhance therapeutic effects. Therefore, phage øS4-1 and the øS4-1 minor tail protein still have potential applications for serving as alternative therapies for antibiotics treatment or as adjuncts for existing therapies.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bacteriophages, lytic proteins, endolysin, tail fiber proteins

目次



致謝	I
中文摘要	II
Abstract	III
目次	V
圖次	VII
表次	VIII
第一章、緒論	1
1.1 金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 基本特性	1
1.2 金黃色葡萄球菌治療現況	2
1.3 噬菌體 (bacteriophage) 基本特性	2
1.4 噬菌體療法 (phage therapy)	3
1.5 噬菌體的溶菌蛋白 (lytic protein)	3
1.6 金黃色葡萄球菌的噬菌體	4
1.7 研究動機	4
第二章、實驗材料與方法	5
2.1 實驗材料	5
2.1.1 本實驗使用之培養基、培養液、緩衝液	5
2.1.2 本實驗使用之菌株、噬菌體	5
2.2 實驗方法	5
2.2.1 水源檢體之前處理	5
2.2.2 點試驗 (spot test)	6
2.2.3 噬菌斑檢定 (plaque assay)	6
2.2.4 噬菌體的增殖	7

2.2.5	測量噬菌體效價 (titer)	7
2.2.6	噬菌體殺菌試驗 (killing assay)	7
2.2.7	萃取噬菌體 DNA.....	8
2.2.8	限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism)	9
2.2.9	建立噬菌體溶菌蛋白表現質體 (expression plasmid)	9
2.2.10	溶菌蛋白的蛋白表現	10
2.2.11	øS4-1 endolysin、tail protein-1 的蛋白純化	11
2.2.12	øS4-1 minor tail protein 的蛋白純化.....	11
2.2.13	測試 øS4-1 minor tail protein 的宿主範圍.....	12
2.2.14	測定 øS4-1 minor tail protein 蛋白濃度.....	12
第三章、實驗結果.....		14
3.1	自水源分離金黃色葡萄球菌噬菌體	14
3.2	噬菌體殺菌試驗	14
3.3	限制片段長度多型性	14
3.4	噬菌體全基因體定序	15
3.5	表現與純化 øS4-1 溶菌蛋白.....	15
3.5-1	建構 øS4-1 溶菌酶、尾纖維蛋白的表現載體.....	15
3.5-2	表現 øS4-1 endolysin.....	16
3.5-3	表現 øS4-1 tail protein-1	16
3.5-4	表現與純化 øS4-1 minor tail protein.....	16
3.5-5	併用 øS4-1 與 øS4-1 minor tail protein 執行殺菌試驗	16
第四章、討論與未來展望		18
參考資料.....		22

圖 次



圖一、噬菌體的宿主種類範圍測試.....	36
圖二、 ϕ S4-1 噬菌體殺菌試驗結果.....	37
圖三、 ϕ S4-1 限制片段長度多型性.....	38
圖四、 ϕ S4-1 全基因體定序結果.....	39
圖五、 ϕ S4-1 endolysin 之比對結果.....	40
圖六、 ϕ S4-1 tail protein-1 之比對結果.....	41
圖七、 ϕ S4-1 minor tail protein 之比對結果.....	42
圖八、擴增欲表現之 ϕ S4-1 溶菌酶及尾纖維蛋白基因.....	43
圖九、接合目標基因與質體 pET-28c，以熱休克轉移至菌株中.....	44
圖十、 ϕ S4-1 endolysin 蛋白的表現與純化.....	45
圖十一、 ϕ S4-1 tail protein-1 蛋白的表現與純化.....	46
圖十二、 ϕ S4-1 minor tail protein 蛋白的表現與純化.....	47
圖十三、 ϕ S4-1 minor tail protein 的宿主種類範圍測試.....	48
圖十四、併用 ϕ S4-1 與 ϕ S4-1 minor tail protein 執行殺菌試驗.....	49

表 次



表一、本實驗使用之培養基、培養液	28
表二、本實驗使用之緩衝液	29
表三、本實驗使用之菌株	30
表四、本實驗使用之噬菌體	31
表五、實驗使用之水源檢體	32
表六、點試驗陽性之水源及分離的噬菌體	33
表七、本實驗使用菌株之醣基轉移酶基因型，標準噬菌體、實驗室已發現之噬菌體、 本實驗分離之噬菌體與所表現蛋白之宿主種類範圍	34
表八、本實驗使用之引子	35

第一章、緒論



1.1 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 基本特性

金黃色葡萄球菌為葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*) 革蘭氏陽性的球菌，具有耐高鹽、兼性厭氧 (facultative anaerobic)、過氧化氫酶 (catalase) 陽性、凝固酶 (coagulase) 陽性等特性，菌落在培養基上呈黃色或金色，在血液瓊脂培養基 (blood agar plate, BAP) 呈 β 溶血。金黃色葡萄球菌為皮膚、粘膜的常在菌，但當菌體進入血流或內部組織，便可能誘發感染，引起心內膜炎、骨髓炎、腦膜炎等疾病。除了人與人間的直接接觸，金黃色葡萄球菌也能透過置入型的醫療器具，例如人工關節、靜脈注射的針頭等傳播，且可在病灶處形成由胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 聚集而成的生物膜，阻擋免疫細胞和藥物的作用，加深治療難度[1]。金黃色葡萄球菌的致病因子包含多種外毒素，如腸毒素、溶血素 (hemolysin)、表皮剝落毒素 (exfoliative toxin)、毒性休克症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin 1, TSST-1) 等[2]。除此之外，菌體表面的莢膜 (capsule) 及細胞壁的結構，如肽聚糖 (peptidoglycan, PG)、磷壁酸 (teichoic acid, TA) 亦是菌體生存和感染宿主的重要結構[3]。以莢膜多醣 (capsular polysaccharide, CPS) 來區分，金黃色葡萄球菌一共有 13 個血清型，其中臨床上最常見的為第五型 (CP5) 和第八型 (CP8)，基因座分別為 *cap5* 和 *cap8*[4]。

金黃色葡萄球菌的細胞壁有兩種磷壁酸，分別為連結於細胞膜的脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA)，以及鑲嵌於肽聚糖間的壁磷壁酸 (wall teichoic acids, WTA)，由於磷壁酸大量表現在細胞壁中，它也是免疫細胞、抗體主要的作用標的。文獻指出多數金黃色葡萄球菌的噬菌體需透過結合壁磷壁酸以感染宿主。*tagO* 基因為壁磷壁酸合成所需的基因，TagO 蛋白可生成由核糖醇-磷酸 (ribitol-phosphate, RboP) 組成的線性主鏈，再經由數種醣基轉移酶 (glycosyltransferases) 修飾，最終形成壁磷壁酸。TarS、TarM 和 TarP 參與在 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 的醣基化修飾，TarS 可進行 β -1,4-GlcNAc 修飾，TarM 則是進行 α -1,4-GlcNAc 修飾，TarP 進行 β -1,3-GlcNAc 修飾。TarS 是金黃色葡萄球菌的高度保留序列之一，TarM 與 TarP 則僅存在於部分菌株的基因中。且當菌株同時具備兩種轉移酶時，TarM、TarP 的修飾將優先於 TarS 的修飾[5]。



1.2 金黃色葡萄球菌治療現況

依據台灣醫院感染管制與抗藥性監測管理系統 (THAS 系統) 的監視報告, 自 2014 到 2023 年, 台灣各大醫療院所的加護病房中, 金黃色葡萄球菌感染常居所有細菌感染症的前 10 名。層出不窮的抗藥性菌株也是治療上的一大挑戰, THAS 系統的報告指出, 2023 年第 3 季中, 台灣醫療院所之金黃色葡萄球菌感染案例有 58.0% 為抗甲氧苯青黴素金黃色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 引起, 而儘管以萬古黴素 (vancomycin) 作為治療 MRSA 的用藥, 卻也接連出現抗萬古黴素金黃葡萄球菌 (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)。VRSA 改變了細胞壁上肽聚糖的結構, 使萬古黴素難以結合[6]。抗生素的開發難以跟上抗藥性的發展速度, 因此越來越多研究者投身尋找代替抗生素的治療方案。

1.3 噬菌體 (bacteriophage) 基本特性

噬菌體屬於病毒, 可專一性的結合、感染細菌, 並利用宿主細胞內的酵素進行複製。噬菌體感染後的生命週期可分兩種, 分別為裂解循環 (lytic cycle) 與溶源循環 (lysogenic cycle)。裂解性噬菌體 (lytic phages) 進行裂解循環, 在感染宿主後, 後將大量複製自身 DNA, 並轉譯出外殼蛋白, 組裝子代後裂解宿主細胞而出, 造成宿主死亡。溫帶噬菌體 (temperate phages) 則可進入裂解循環或溶源循環。在溶源循環中, 噬菌體並不會馬上複製自體 DNA, 而是會將自身基因插入宿主的基因體中, 使自體基因被保留在宿主的子代中[7]。當環境營養充足, 或有許多可供噬菌體感染的宿主時, 溫帶噬菌體才會進入裂解循環[8]。

依據外型, 可將噬菌體分為具尾纖維 (tail fiber) 與不具尾纖維者, 有尾纖維者具頭部 (head)、頸部 (neck)、尾纖維、尾板 (base plate) 等構造, 外型酷似登月小艇, 無尾纖維者則有絲狀、十二面體或其他外型。噬菌體的基因體可能為雙股 DNA、單股 DNA、雙股 RNA 或單股 RNA, 其中雙股 DNA 者最常見。已發表的噬菌體中, 基因體為雙股 DNA 且具尾纖維的尾狀噬菌體目 (*Caudovirales*) 佔大宗 (93.6%), 尾狀噬菌體目可再依尾部構造細分為長尾噬菌體科 (*Siphoviridae*)、肌尾噬菌體科 (*Myoviridae*) 和短尾噬菌體科 (*Podoviridae*) [9]。2021 年, 國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 自原隸屬

於短尾噬菌體科的病毒中分出三個新的科，分別為 *Salasmaviridae*、*Rountreeviridae* 和 *Guelinviridae*，*Rountreeviridae* 主要由基因體大小為 17 到 19 kb 的金黃色葡萄球菌噬菌體所組成[10]。



1.4 噬菌體療法 (phage therapy)

噬菌體療法指是透過噬菌體專一性辨認、殺死特定宿主的特性，以噬菌體治療細菌引起的感染症。早在 1930 年代，在第一個廣效抗生素—盤尼西林 (penicillin) 問世以前，噬菌體療法便被用於人類及動物的感染症。然而，噬菌體的感染具專一性，治療範圍較侷限，因此當抗生素被大量發現後，噬菌體療法便逐漸式微[11]。然而，因抗藥性的問題，近年噬菌體療法重獲關注，不少研究者投入尋找有治療潛能的噬菌體，並在體外試驗、動物實驗都看到顯著的成果。一篇乳腺炎 (mastitis) 的研究中，作者使用乳腺炎主要的致病菌—金黃色葡萄球菌作為宿主，來篩選生乳檢體中的噬菌體，以體外試驗確認噬菌體殺菌、去除生物膜的效果後，再以乳腺炎小鼠模型確認噬菌體的治療效果，結果小鼠乳腺發炎情形明顯改善，不僅發炎因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 降低，也減緩了免疫細胞浸潤的情形[12]。

噬菌體亦被應用於臨床，多項研究顯示，當抗生素無法除滅感染菌時，配搭使用噬菌體療法可達到顯著的治療效果。一則綠膿桿菌感染的案例中，當抗生素 ceftazidime 僅能除去游離的菌體，無法消除生物膜時，配搭使用噬菌體 OMKO1 便能有效的去除生物膜，使抗生素能針對生物膜下的菌體作用，發揮更佳的治療效果[13]。另一臨床研究指出，將金黃色葡萄球菌噬菌體 AB-SA01 搭配常規用藥使用，可改善 62% 感染症患者的預後，並有 54% 患者的發炎因子下降[14]。越來越多研究結果顯示以噬菌體作為主要或輔助的治療方式是突破治療瓶頸的解方之一。

1.5 噬菌體的溶菌蛋白 (lytic protein)

噬菌體可產生能破壞菌體結構的酵素，這些酵素稱為噬菌體的溶菌蛋白。噬菌體的溶菌蛋白有水解酶 (hydrolases)、裂解酶 (lyases)、解脂酶 (lipases) 等，它們可分解細菌表面的多醣物質，或是分解細菌的結構。溶菌蛋白可以位於噬菌體結構上，例如尾纖維及尾板，這些部位的溶菌蛋白常具備分解莢膜多醣的能力，能協助噬菌體靠近、結合菌株，而這種功能的溶菌蛋白也被稱為解聚酶

(depolymerase)。有些溶菌蛋白則會在噬菌體即將裂解宿主時才釋出，例如能夠打斷肽聚醣鍵結，破壞細胞壁的溶菌酶 (endolysin) [15]。

相較於使用整株噬菌體，若能使用純化後的溶菌蛋白進行治療，除了能更好的掌控具抗菌活性之物質劑量，且因其不受數種細菌之防禦機制，如 CRISPR-Cas system、限制修飾系統 (restriction modification systems) 的影響，且較不會因細菌之自發突變 (spontaneous mutations) 影響其結合活性，因此比起一般的噬菌體療法，使用溶菌蛋白能降低治療時遇到的噬菌體抗性 (phage resistance) [16, 17]。

研究顯示溶菌酶能破壞細胞壁上的肽聚醣，破壞細胞壁結構[18]，且多項研究指出溶菌酶能破壞生物膜[19-22]。在一金黃色葡萄球菌噬菌體相關的研究中，作者自噬菌體 P68 中分離、純化出一溶菌蛋白 protein 17。實驗發現此蛋白有分解胞壁質 (murein) 的活性，且在噬菌體 P68 感染時共同加入純化的 protein 17，可縮短噬菌體裂解細菌所需的時間，顯示 protein 17 有助於噬菌體進入與感染宿主細胞，且相較於噬菌體 P68，protein 17 具有更廣泛的宿主範圍，顯示 protein 17 具有製備成抑菌製劑的潛力[23]。

1.6 金黃色葡萄球菌的噬菌體

目前所分離出的金黃色葡萄球菌噬菌體皆屬於尾狀噬菌體目，其中多數的溫帶噬菌體隸屬長尾噬菌體科，其餘科別則以裂解性噬菌體為大宗。噬菌體辨認、結合宿主的構造稱為 RBPs (receptor binding proteins)，而目前發現的金黃色葡萄球菌噬菌體，其 RBPs 大多是辨認細胞壁表面上由 *tagO* 基因介導所生成的壁磷壁酸 [24]。

1.7 研究動機

實驗室先前發現數株可感染金黃色葡萄球菌的噬菌體，然而，目前發現的噬菌體，可感染的宿主範圍以及體外試驗的殺菌效果皆弱於標準噬菌體株，且皆未完成全基因體定序 (whole genome sequencing, WGS)，故無法探討噬菌體的品種、基因序列並純化溶菌蛋白。本實驗致力於尋找宿主範圍廣，殺菌能力亦佳的金黃色葡萄球菌噬菌體，並完成噬菌體 DNA 萃取及全基因體定序，以表現具有抑菌活性的溶菌蛋白。



第二章、實驗材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 本實驗使用之培養基、培養液、緩衝液

本實驗使用之培養基、培養液列於表一。實驗使用的金黃色葡萄球菌皆以胰蛋白大豆培養液 (tryptic soy broth, TSB) 或胰蛋白酶大豆瓊脂 (tryptone soy agar, TSA) 進行培養。建立蛋白質表現載體及基因選殖 (DNA cloning) 時使用 LB 培養液及培養基。本實驗使用之緩衝液列於表二。噬菌體相關實驗中，我們使用 SM 緩衝液進行噬菌體的保存和序列稀釋。抽取噬菌體 DNA 時使用 buffer L2 沉澱噬菌體顆粒，buffer L3 回溶噬菌體顆粒，buffer L4 破壞噬菌體外殼，使 DNA 釋出。電泳實驗中使用 TAE buffer 做電泳槽的緩衝液，TAE buffer 亦作為製備 1% 的洋菜膠的溶劑。Lysis buffer、wash buffer、elution buffer 用於重組蛋白的表現與純化。為避免 ϕ S4-1 minor tail protein 於純化的過程中凝集， ϕ S4-1 minor tail protein 所使用的 lysis buffer、wash buffer 和 elution buffer 皆添加 10% 的丙三醇 (BioShop, Canada)。Coomassie brilliant blue 用於 SDS-PAGE 染色，destain buffer 則用於 SDS-PAGE 的退染。

2.1.2 本實驗使用之菌株、噬菌體

本實驗使用的菌株列於表三，使用的噬菌體列於表四。

2.2 實驗方法

2.2.1 水源檢體之前處理

研究所使用的水源檢體列於表五。本實驗使用之水源包含桃園茄苳溪的溪水，以及台大醫院周邊排放的污水，台大醫院的水源於不同時間點採集了兩次。自實驗室已分離的金黃色葡萄球菌株中，以其中 8 種 (SA055、SA042、SAV09、SAV13、SAV14、SAW01、SAW02、 Δ tagO SA055) 進行噬菌體的篩選。菌液當日新鮮培養至 $O.D._{600}=0.5$ 後，將八種菌之菌液各取 1 mL 均勻混合，製成等比例的混菌菌液。我們將 7 mL 的水源檢體、2 mL 的 5 倍 TSB，以及 1 mL 的混菌菌液均勻混合，並於 37°C 培養箱 (orbital shaking incubator C-300, FIRSTEK, Taiwan) 隔夜震盪培

養，將水源與菌株的共同培養，以增殖水源中可感染此 8 種菌株的噬菌體。隔日將培養後的水源檢體平衡置入離心機中（universal refrigerated centrifuge 5922，KUBOTA，Japan），於室溫 10,000×g 離心 20 分鐘，再取上清液通過 0.45 μm 過濾膜，便完成水源檢體的前處理。我們將濾液用於點試驗，以視檢體中是否含有可感染特定宿主之噬菌體。

2.2.2 點試驗（spot test）

點試驗可判別水源檢體是否含有可感染特定宿主之噬菌體。將用於增殖水源噬菌體之菌株個別於 37°C 震盪培養至 O.D.₆₀₀=0.5，取 200 μL 菌液與 4 mL TSA top agar 混合，再均勻平鋪在 TSA 表面上，待風乾凝固後，取 10 μL 經前處理的水源檢體滴於盤上，待濾液風乾後置入培養箱，於 37°C 隔夜培養。若檢體滴加處有透明溶菌圈，表示濾液含有可感染該宿主的噬菌體，若未能生成溶菌圈則顯示該檢體未含可感染該宿主的噬菌體。點試驗時，菌盤上產生的溶菌圈越透明，代表該檢體的噬菌體可能對該宿主有較佳的感染效果，故將選用此宿主作日後噬菌斑檢定及噬菌體增殖的宿主菌株。本實驗分離到的噬菌體皆對菌株 SA055 產生最佳的感染效果，因此使用 SA055 作為噬菌斑檢定及增殖噬菌體的宿主菌株。

2.2.3 噬菌斑檢定（plaque assay）

以點試驗確認水源含有針對特定宿主之噬菌體後，需以噬菌斑檢定分離、純化出水源中不同種類的噬菌體。以 SM 緩衝液序列稀釋水源檢體，並 37°C 震盪培養宿主菌液至 O.D.₆₀₀=0.5，再將稀釋的噬菌體與菌液以 20：180 的比例混合於微量離心管中，於 37°C 靜置培養 20 分鐘，隨後將培養液混合進 4 mL TSA top agar，均勻平鋪在 TSA 表面上，待風乾凝固後，將菌盤於 37°C 隔夜培養。噬菌體在與菌株共同培養時，將吸附在菌株上，並在菌盤上形成由單一噬菌體感染所形成的噬菌斑，且不同噬菌體將形成不同型態的噬菌斑，可由此區別不同種類的噬菌體。將單一的噬菌斑從菌盤上取下，浸泡入 300 μL 的 SM 緩衝液中 24 小時，使噬菌斑內的噬菌體溶解進緩衝液中。以浸泡噬菌斑的緩衝液重複進行稀釋、共同培養、鋪盤，及取下噬菌斑的步驟，重複 5 次，至同一菌盤上只有單一型態的噬菌斑時，即完成噬菌體的分離與純化。



2.2.4 噬菌體的增殖

完成噬菌體的純化後，將單一的噬菌斑從菌盤取下，浸泡入 300 μL 的 SM 緩衝液中 24 小時，使噬菌體釋出在緩衝液中。將增殖使用的宿主菌液新鮮培養至 $\text{O.D.}_{600}=0.5$ ，取 200 μL 菌液混合 4 mL TSA top agar，鋪平至 TSA 上，待風乾後，將浸泡噬菌斑的緩衝液滴加到菌盤的表面，待緩衝液也風乾後，將菌盤置於 37°C 隔夜培養。隔天將 3 mL 的 SM 緩衝液加至菌盤表面，於 4°C 搖晃 3 小時，使菌盤上溶菌圈的噬菌體釋出。隨後吸取上層的緩衝液，經 10,000 $\times g$ 離心 10 分鐘，再通過 0.45 μm 的過濾膜，此濾液便含有增殖的噬菌體，隨後將 900 μL 的濾液與 100 μL DMSO (Sigma-Aldrich, U.S.A.) 均勻混合，於 -80°C 長期保存。若欲萃取噬菌體 DNA，可以使用液態培養的方式來獲得大體積、高效價的噬菌體。將噬菌體濾液、宿主菌液與 TSB 混合，使噬菌體濾液佔總體積的 5 分之 1，並調整菌液與 TSB 的比例，使混合後的最終 $\text{O.D.}_{600}=0.5$ 。接著在 37°C 震盪培養 2 至 4 小時，至管內的液體由混濁反應至澄清，即可離心 10,000 $\times g$ ，20 分鐘，取上清液通過 0.45 μm 過濾膜，便取得大體積、增殖完成的噬菌體。

2.2.5 測量噬菌體效價 (titer)

將待測的噬菌體濾液與 SM 緩衝液以 20 : 180 做 10 倍序列稀釋，並將宿主菌株新鮮培養至 $\text{O.D.}_{600}=0.5$ ，取 200 μL 菌液混合 4 mL TSA top agar，鋪平至 TSA 上且風乾後，以類似點試驗的方式，將不同稀釋倍數的噬菌體濾液各滴加 10 μL 至菌盤表面，濾液風乾後，將菌盤置於 37°C 隔夜培養。隔天於菌盤上找出形成可辨識之單一噬菌斑的稀釋倍數，以噬菌斑數量回乘稀釋倍數，便能計算每毫升濾液中含有多少隻噬菌體，由此方法算出的效價單位為 PFU/mL。

2.2.6 噬菌體殺菌試驗 (killing assay)

噬菌體殺菌試驗能定量噬菌體在單位時間內可感染致死的細菌數量，以瞭解噬菌體殺菌的能力。實驗前一日需測量噬菌體效價，至實驗當天計算效價後，便可計算該次殺菌試驗要操作的病毒感染劑量 (multiplicity of infection, MOI)。病毒感染劑量的定義是噬菌體對應菌數的比例，即一單位細菌可被多少單位的噬菌體感染[25]。此研究操作的病毒感染劑量為 1×10^3 與 1×10^4 ，操作的菌株皆為 SA055。SA055 菌液之 $\text{O.D.}_{600}=0.1$ 時，菌量約為 1×10^8 CFU/mL，而此實驗需將菌液稀釋

至 1×10^4 CFU/mL，因此需將菌液調至 $O.D._{600} = 0.1$ ，再以 SM 緩衝液序列稀釋至 10^{-4} 倍。殺菌試驗的控制組中，需將 100 μ L 的 SM 緩衝液與 100 μ L 1×10^4 CFU/mL 的菌液於微量離心管混合，以計算無噬菌體影響下的原始菌數。感染組中，在病毒感染劑量為 $MOI = 1 \times 10^3$ 時，需將噬菌體稀釋至 1×10^7 PFU/mL，當病毒感染劑量為 $MOI = 1 \times 10^4$ 時則需稀釋至 1×10^8 PFU/mL，完成稀釋後再將噬菌體與 1×10^4 CFU/mL 的菌液各取 100 μ L 於微量離心管混合。完成控制組與感染組的配製後，於 37°C 靜置培養 30 分鐘，隨後將管內菌液震盪混合。控制組，以及劑量為 $MOI = 1 \times 10^3$ 的感染組需先做 10 倍稀釋，再取 100 μ L 於 TSA 上塗盤，劑量為 $MOI = 1 \times 10^4$ 的感染組則不需稀釋，可取原液 100 μ L 塗盤。隔日計算控制組、感染組盤上的菌落數，回乘稀釋倍數後，計算該病毒感染劑量下的細菌存活率 (survival rate)，計算方式如下：

$$\text{存活率 (\%)} = \frac{\text{噬菌體組存活菌數}}{\text{控制組菌數}} \times 100\%$$

2.2.7 萃取噬菌體 DNA

為進行噬菌體的定序，需萃取噬菌體 DNA。首先進行噬菌體增殖，使用液態培養的方式得到 90 mL，效價高於 1×10^{11} PFU/mL 的噬菌體濾液。將濾液分裝為每離心管 30 mL，每管加入 750 μ L 氯仿 (chloroform, Sigma-Aldrich, U.S.A.)，使氯仿佔總體積的 2.5%。混合均勻後，於室溫搖晃一個晚上。隔日於 4°C 離心 $10,000 \times g$ ，30 分鐘，取上清液通過 0.45 μm 過濾膜，再每管加入 6 mL 的 buffer L2，混合均勻後隔夜靜置於 4°C 。隔天於 4°C 離心 $10,000 \times g$ ，30 分鐘，去除上清液並保留管壁的沉澱物，將管壁殘留液體吸乾後，以 20 mL SM 緩衝液將三管的沉澱物全數回溶至同一管，並加入 60 μ L，濃度為 20 mg/mL 的 DNase I 和 RNase A (Roche, Switzerland)，於 37°C 搖晃反應 4 至 6 小時。反應完成後，加入 4 mL 的 buffer L2，混合均勻後隔夜靜置於 4°C 。隔日於 4°C 離心 $10,000 \times g$ ，30 分鐘，去除上清液後，加入 500 μ L 的 buffer L3 回溶沉澱物，再加 500 μ L 已先於 55°C 預溫，並已充分溶解至透明的 buffer L4。在 70°C 加熱 10 分鐘後，分裝至微量離心管，並加入等體積的苯酚-氯仿-異戊醇混合物 (phenol/chloroform/isoamyl alcohol, 25 : 24 : 1, Sigma-Aldrich, U.S.A.)， 4°C 離心 $10,000 \times g$ ，30 分鐘，避開中間白色的蛋白

層，吸取上層水層，並重複進行加入苯酚—氯仿—異戊醇混合物以及離心的步驟，此步驟共重複三次，以充分去除蛋白質。最後將抽到的水層加入等體積的異丙醇 (isopropanol) 及 10%體積的 3M 醋酸鈉 (sodium acetate) 溫和混合並觀察有無 DNA 聚集而成的棉絮狀物質，再於 -80°C 靜置一晚。隔日 4°C 離心 $10,000\times\text{g}$ ，30 分鐘，去除上清液後加入 $800\ \mu\text{L}$ 70%酒精來潤洗沉澱物，於 4°C 離心 $10,000\times\text{g}$ ，15 分鐘後去除上清液，重複此潤洗步驟 3 次，最後離心 30 分鐘，去除上清液後，於真空濃縮離心機 (savant speed vac SPD111V, Thermo fisher Scientifics, U.S.A.) 濃縮 2 小時，至沉澱物乾燥透明，即可以 $50\ \mu\text{L}$ 70°C 的 ddH₂O 回溶 DNA 沉澱物，靜置一晚後，於隔日以超微量分光光度計 (NanoDrop TMLite spectrophotometer, ND-LITE-PR, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 測量樣品的 DNA 濃度。

2.2.8 限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism)

因限制酶可辨認序列上的特定切位，在不同序列切出不同的片段大小，故可視限制酶切出的片段差異判別序列間的相似度。本實驗使用的限制酶有 *Bam*HI、*Eco*R I、*Hind* III、*Hpa* I (New England BioLabs, U.S.A.)，取 300 ng 的 DNA 檢體，將 DNA 檢體、限制酶、緩衝液、ddH₂O 依比例混合，於 37°C 反應一晚，再以 1% 洋菜膠電泳分析 ($150\ \text{V}$ ， $400\ \text{mA}$)。

2.2.9 建立噬菌體溶菌蛋白表現質體 (expression plasmid)

為從噬菌體的基因序列中表現特定的蛋白質，須先設計針對該段序列，且具特定限制酶切位的前置引子 (forward primer, 含有 *Nco*I 切位) 與反置引子 (reverse primer, 含有 *Xho*I 切位)，以 KAPA EvoPlus kits (Roche, Switzerland) 進行 PCR，增幅目標基因片段，再以 1% 洋菜膠電泳分析。切下正確大小的目標基因後，以 EasyPure PCR/Gel extraction kit (BIOMAN, Taiwan) 純化目標基因片段。使用 CloneJET PCR cloning kit (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 接合 (ligation) 純化的目標基因片段與載體 pJET1.2/blunt vector。將載體、目標基因與兩倍緩衝液按說明書所提供之比例混合，於室溫靜置反應 2 小時後以熱休克 (heat shock) 將質體送入勝任細胞 DH5 α (Bioscience, Taiwan) 中。將 ligation mixture 加入 DH5 α 中均

勻混合，於冰上靜置 20 分鐘，再於 42°C 水浴中 90 秒進行熱休克反應，隨後轉移至冰上靜置 2 分鐘，之後將菌液加入 1 mL LB 培養液中，於 37°C 混合震盪一小時，隨後於含有 ampicillin (100 µg/mL, BioShop, Canada) 之培養基塗盤以進行篩選。挑選單一菌落進行 PCR 確認後，將菌液檢體送至明欣生技公司定序以確認目標基因序列是否正確。

確認序列正確後，培養菌液至 60 mL 以上，並以 EasyPure plasmid DNA mini kit (BIOMAN, Taiwan) 萃取帶有目標基因的質體。將帶目標基因的質體，以及質體 pET-28c 分別等比例混合限制酶 *NcoI*、*XhoI*，以及反應緩衝液 CutSmart buffer (New England BioLabs, U.S.A.)，於 37°C 隔夜反應，隨後以 1% 洋菜膠電泳分離切割後不同大小的基因片段。切取並純化切下的目標基因與 pET-28c 質體後，使用 50 ng 左右的 pET-28c 質體，將目標基因與質體以莫耳比 (molar ratio) 5:1 的比例進行混合，再依比例加入 T4 DNA ligase 與 reaction buffer (New England BioLabs, U.S.A.)，於室溫靜置至隔日。將 ligation mixture 以熱休克的方式轉型至 DH5α 中，並於含有 kanamycin (50 µg/mL, BioShop, Canada) 之培養基塗盤以進行篩選，隨後挑選單一菌落進行 PCR 確認。自轉型成功的單一菌落培養 60 mL 以上的菌液，並萃取帶有目標基因的質體，此質體便可用於之後的蛋白表現。

2.2.10 溶菌蛋白的蛋白表現

將帶有目標基因的 pET-28c 質體以熱休克轉型進入勝任細胞 BL21 中 (Bioscience, Taiwan)，於含有 kanamycin 之培養基進行篩選，並以 PCR 確認後，挑選單一菌落培養菌液至 50 mL 且 O.D.₆₀₀ 至 0.5 左右，並於此階段取樣 1 mL 菌液，離心 6,800×g，8 分鐘，再以 lysis buffer 100 µL 回溶，此即為未經 IPTG 誘發的菌液檢體 (pre-induction)。其餘菌液加入總濃度為 0.5 mM 的 IPTG (BioShop, Canada)，隨後使 σ S4-1 endolysin 於 25°C 反應 5 小時， σ S4-1 tail protein-1 於 16°C 反應 5 小時， σ S4-1 minor tail protein 則於 16°C 隔夜反應，反應完成後取樣 1 mL，離心 6,800×g，8 分鐘，並以 lysis buffer 100 µL 回溶，此即為經 IPTG 誘發的菌液檢體 (post-induction)。其餘菌液離心 10,000×g，10 分鐘，去除上清液後，將離心沉澱物於 -80°C 靜置隔夜。

隔日使用 5 mL lysis buffer 回溶沉澱物， σ S4-1 minor tail protein 則以 5 mL 含 10% 丙三醇的 lysis buffer 回溶，隨後以超音波細胞均質機 (sonicator XL2020 CL4，

MISONIX, U.S.A.) 進行破菌。將菌液破菌至透明透光後，離心 10,000×g，10 分鐘，取上清液通過 0.45 μm 過濾膜，此檢體包含菌體經破菌後，可釋出之水溶性成分 (flowthrough)。由於 σ S4-1 endolysin 未能釋出在上清液中，為確認此結果是因蛋白的低水溶性，或是因破菌不佳導致，離心沉澱物以 500 μL 4% SDS 回溶，並於 70°C 加熱 20 分鐘，使沉澱物被完全破菌。隨後將檢體離心 13,000×g，30 分鐘，取上清液通過 0.22 μm 過濾膜，以去除非水溶性的物質。過濾後的檢體包含菌體以超音波破菌時未能釋出的水溶性物質 (SDS-lysed supernatant)。離心沉澱物則以 100 μL lysis buffer 回溶，此檢體內之物質在菌體完全破菌後仍未溶解，故為菌體內之非水溶性物質 (SDS-lysed pellet)。

2.2.11 σ S4-1 endolysin、tail protein-1 的蛋白純化

收集兩蛋白的 flowthrough 檢體，加入經 lysis buffer 潤洗後的磁珠 (His Mag Sepharose™ Ni, Merck, Germany) 中，於 4°C 混合震盪一晚，隨後去除上清液，使用 5 mL 的 wash buffer 將磁珠潤洗 3 次，並收取 200 μL 第一次潤洗後的液體 (wash)。潤洗後將上清液吸乾，並以 200 μL elution buffer 沖提、純化出磁珠所結合的蛋白質，此沖提的步驟將重複三次 (E1、E2 與 E3)。取 10 μL 檢體與 2.5 μL 5 倍 SDS-PAGE loading dye (BioShop, Canada) 均勻混合，於 99°C 反應十分鐘，再取 10 μL 檢體進行聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)，至條帶移動至合適位置後，以考馬斯亮藍 (Coomassie brilliant blue) 染色十分鐘，再以 destain buffer 退染至能清楚觀察蛋白質條帶為止。

2.2.12 σ S4-1 minor tail protein 的蛋白純化

將 600 μL 含有 10% 丙三醇的 lysis buffer 加入 Ni-NTA spin columns (QIAGEN, Germany)，於 16°C 離心 890×g，2 分鐘以進行管柱平衡 (equilibrate)。取經超音波破菌、離心，並通過 0.22 μm 過濾膜之檢體，加入 600 μL 檢體至管柱中，於 16°C 離心 270×g，5 分鐘，使目標蛋白結合在管柱上，收集第一次通過管柱之濾液 (flowthrough)。重複執行加入檢體與離心的步驟，並丟棄通過管柱之濾液，直至總量為 5 mL 的檢體全部過濾完畢，再加入 600 μL 含 10% 丙三醇的 wash buffer，於 16°C 離心 890×g，2 分鐘以潤洗管柱，收取潤洗後的濾液 (wash)，並重複潤洗的步驟一次。隨後加入 300 μL 含 10% 丙三醇的 elution buffer，於 4°C 離心 890×g，

2 分鐘以沖提、純化出管柱所結合的目標蛋白。重複此步驟五次，並收集含有純化蛋白的濾液（E1 至 E5）。取檢體與 5 倍 SDS-PAGE loading dye 混合，於 99°C 反應十分鐘，再取 10 μ L 檢體進行聚丙烯醯胺膠體電泳。隨後以考馬斯亮藍染色，再以 destain buffer 退染至能清楚觀察蛋白質條帶。

2.2.13 測試 ϕ S4-1 minor tail protein 的宿主範圍

本實驗以點試驗測試 ϕ S4-1 minor tail protein 的宿主範圍。為使 ϕ S4-1 minor tail protein 產生的溶菌圈更加明顯，先以超濾離心管（Vivaspin[®] 500, Cytiva, U.S.A.）將純化後的蛋白進行濃縮。取 6 mL 的純化後的蛋白檢體加入超濾離心管中，於 16°C 離心 6,000 \times g，5 分鐘，並觀察尚未通過過濾膜的液體體積。至液體體積縮減至 600 μ L 左右，即完成 ϕ S4-1 minor tail protein 的濃縮。取濃縮後之蛋白檢體 5 μ L 滴加於菌盤上，並使用以質體未包含目標基因之菌液，經相同表現與純化步驟所產生之 elution buffer 沖提濾液（pET-28c E1）作為陰性對照組，使用含 ϕ S4-1 之噬菌體濾液作為陽性對照組，陰性對照組與陽性對照組同樣取 5 μ L 滴加於菌盤上。待濾液風乾後置入培養箱，於 37°C 隔夜培養。為使產生的溶菌圈更加明顯並易於觀察，自 37°C 培養箱取出菌盤後，將菌盤於室溫再放置一晚，隨後觀察溶菌圈的生成情形。

2.2.14 測定 ϕ S4-1 minor tail protein 蛋白濃度

本實驗以 Bradford protein assay 測定所純化之蛋白濃度。為計算標準曲線，以 ddH₂O 將牛血清白蛋白（Sigma-Aldrich, U.S.A.）配置為 10 mg/mL 之溶液，再序列稀釋以產生 15 μ g/mL、10 μ g/mL、7.5 μ g/mL、5 μ g/mL、3.75 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL 等 7 種濃度的牛血清白蛋白溶液。待測檢體則做 50 倍和 100 倍稀釋，產生兩不同稀釋倍率的檢體。將 7 種濃度的牛血清白蛋白溶液，50 倍和 100 倍稀釋的待測檢體，以及計算空白試驗值的 ddH₂O 各取 160 μ L 加入平底 96 孔盤中，再於每個孔洞加入 40 μ L 的 Quick Start[™] Bradford dye reagent（Bio-Rad, U.S.A.），於室溫靜置反應 5 分鐘，最後以微量盤分光光度計（Multiskan SkyHigh microplate spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.）測量檢體在 O.D.₅₉₅ 下的吸光值，同次實驗中所有檢體皆須作三重複測試。隨後計算標準曲線，將牛血清白蛋白的吸光值減去空白試驗值，並取每檢體三重複試驗的平均值。因加入 Bradford 試

劑時，將檢體做了 0.8 倍稀釋，故將牛血清白蛋白濃度回乘 0.8，使 7 個吸光值數據對應的濃度分別為 12 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 及 1 $\mu\text{g/mL}$ 。使用 7 種牛血清白蛋白濃度，以及其對應的吸光值計算回歸曲線，並將待測檢體的吸光值帶入曲線公式，最後回乘檢體的稀釋倍數，便可知道待測檢體之蛋白濃度。若 50 倍與 100 倍稀釋的檢體讀值皆未超過線性範圍，且回乘後濃度相近，則取兩者之平均作為測試結果。



第三章、實驗結果

3.1 自水源分離金黃色葡萄球菌噬菌體

自實驗室分離出的金黃色葡萄球菌株中挑選八株篩選噬菌體，分別為完成全基因體定序的 SA055，先前實驗中較少噬菌體能感染的 SAV09、SAV13、SAV14，多數金黃色葡萄球菌噬菌體皆能感染的 SA042，來自人類鼻腔拭子的 SAW01、SAW02，以及實驗室先前所建立，剔除 *tagO* 基因的 $\Delta tagO$ SA055。

我們採集兩次台大醫院周邊六處污水，以及一次桃園茄苳溪溪水，最終以 13 項水源進行篩選（表五）。將水源前處理，增殖噬菌體後，以點試驗確認水源是否含有可感染特定菌株的噬菌體，並以噬菌斑檢定做噬菌體的純化，最終於 4 處水源初步分離 9 株噬菌體（表六）。我們以 30 株實驗室已分離的金黃色葡萄球菌株測試此 9 株噬菌體的宿主種類範圍（host range），發現相較於實驗室先前分離的噬菌體（S1~S10），此 9 株噬菌體可感染的宿主範圍更廣，且能感染實驗室先前建構的 *tagO* 基因剔除株（圖一）（表七）。此外，也發現此 9 株噬菌體對帶有 *tarM* 基因的菌株 ATCC35556、SA015、SA060、SA057、SA053、SA059、SAV02、SAV05 及 SAV12 皆表現較弱的溶菌圈，對帶有 *tarP* 基因的菌株 SAV09、SAV13、SAV14 則幾乎無法產生溶菌圈。此 9 株噬菌體宿主種類範圍非常相近，可能為同一種噬菌體，因此僅挑選其中的 $\phi S4-1$ 進行後續實驗。

3.2 噬菌體殺菌試驗

$\phi S4-1$ 在 *S. aureus* SA055 能產生明顯的溶菌圈，推測其在 *S. aureus* SA055 上有一定的殺菌效果，故對 *S. aureus* SA055 進行噬菌體殺菌試驗。當 $\phi S4-1$ 的 MOI = 1×10^3 時，*S. aureus* SA055 的存活率分為 57.9%，MOI = 1×10^4 時則剩下 1.6%（圖二）。

3.3 限制片段長度多型性

抽取 $\phi S4-1$ 噬菌體 DNA，並進行限制片段長度多型性，所用的限制酶包含 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind* III、*Hpa* I，得到了該噬菌體 DNA 的切割圖譜（圖三）。與實驗室他種噬菌體比對後，並沒有找到重複的圖譜，顯示 $\phi S4-1$ 並未被本實驗室分離過，隨後將 DNA 檢體委託圖爾思生技公司以 Illumina 平台進行全基因體定序。



3.4 噬菌體全基因體定序

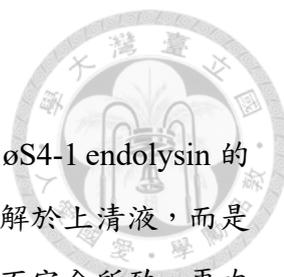
øS4-1 的序列可被組裝成一個 contig，其大小為 17547 bp，GC(%) 為 29.48%。在 øS4-1 的序列上有數個可能為溶菌蛋白的編碼序列 (CDS) (圖四 A)。將 øS4-1 的序列與 NCBI 數據庫進行比對，皆比對到金黃色葡萄球菌的噬菌體，其中最相近者為噬菌體 Psa3，兩者的 percent identity 為 92.82% (圖四 B)。øS4-1 比對到的前五名噬菌體皆屬於尾狀噬菌體目的 *Rountreeviridae* 科，*Rountreeviridae* 主要由基因體大小為 17 到 19 kb 的金黃色葡萄球菌噬菌體所組成，此也與 øS4-1 相符，因此推測 øS4-1 屬於 *Rountreeviridae*。

3.5 表現與純化 øS4-1 溶菌蛋白

3.5-1 建構 øS4-1 溶菌酶、尾纖維蛋白的表現載體

自 øS4-1 基因體中挑選三個可能為溶菌蛋白之基因進行表現，分別為 øS4-1 endolysin、tail protein-1 及 minor tail protein。øS4-1 endolysin 基因長度為 759 個鹼基對，與數據庫比對後，其與另一噬菌體 vB_SA_STAP152 的 endolysin 最為相近，兩者之 percent identity 為 92.86% (圖五 A)，胺基酸序列上有 18 個錯位 (mismatch) 胺基酸 (圖五 B)。øS4-1 tail protein 基因長度為 1446 個鹼基對，其序列與噬菌體 Psa3 的 tail protein 最為相近，兩者之 percent identity 為 97.3% (圖六 A)，胺基酸序列上有 13 個錯位胺基酸 (圖六 B)。øS4-1 minor tail protein 基因長度為 1941 個鹼基對，其序列與噬菌體 LSA2366 的 minor tail protein 最為相近，兩者之 percent identity 為 97.37%。此外，øS4-1 minor tail protein 亦能比對到來自噬菌體 P68 的 minor tail protein，兩者之 percent identity 為 97.06% (圖七 A)，胺基酸序列上有 20 個錯位胺基酸 (圖七 B)。先前已發現噬菌體 P68 的 minor tail protein 具有溶菌酶之活性，可分解細菌之胞壁質，並在研究中被命名為 protein 17[23]，因此推測 øS4-1 minor tail protein 可能也具有溶菌酶之活性。

以先前抽取的噬菌體 DNA 作為模板，設計帶有限制酶 *NcoI*、*XhoI* 切位的引子 (表八)，以 PCR 擴增欲表現之基因序列。在 TAE 瓊脂凝膠上看見符合預期大小的序列片段 (圖八 A、B、C)，顯示目標基因有成功擴增。經過純化基因片段、定序、及限制酶切割等步驟，我們成功接合目標基因與質體 pET-28c，並轉移進 DH5 α 菌株中 (圖九 A、B、C)。



3.5-2 表現 ϕ S4-1 endolysin

自成功轉移的 DH5 α 菌株萃取質體進行蛋白的表現與純化。 ϕ S4-1 endolysin 的預期大小為 27.9 kDa，膠圖的條帶顯示破菌後，目標蛋白並未溶解於上清液，而是滯留於離心後的沉澱物中（圖十 A）。為確認此結果是否為破菌不完全所致，再次操作 ϕ S4-1 endolysin 的表現後，以 4% SDS 回溶、加熱以完全破壞沉澱物中的菌體，以釋出菌體內所有水溶性物質，然而膠圖顯示菌體被完全破壞後，目標蛋白仍只分布在沉澱物中，並未釋出至上清液，顯示其所表現出的蛋白可能屬於低水溶性（圖十 B）。

3.5-3 表現 ϕ S4-1 tail protein-1

ϕ S4-1 tail protein-1 之預期大小為 54.75 kDa。在破菌後，其可大量存在於離心後的上清液，顯示其屬於水溶性的蛋白質，然而此蛋白卻無法被磁珠抓取，故無法表現在純化後的檢體中（圖十一）。將含有 tail protein-1 的上清液檢體以 0.45 μ m 過濾膜過濾，再以點試驗的方式滴加於菌株 SA055、SA042 之菌盤上，結果顯示 tail protein-1 無法在滴加處產生溶菌圈，顯示 tail protein-1 並未表現抑菌活性，故推測其可能僅為噬菌體的結構蛋白，不具有破壞細菌結構的功能。

3.5-4 表現與純化 ϕ S4-1 minor tail protein

ϕ S4-1 minor tail protein 之預期大小為 71.82 kDa，實驗發現一略大於 60 kDa 之蛋白可被 IPTG 誘發表現，其為水溶性蛋白並能夠被純化（圖十二 A）。以 Bradford protein assay 測量後，以回歸曲線確認最初兩次純化的蛋白濃度分別為 214.6 μ g/mL 及 288.0 μ g/mL（圖十二 B），經濃縮後的濃度則到達 2.02 mg/mL。點試驗顯示此蛋白在多個金黃色葡萄球菌株上皆可形成半透明溶菌圈（表七、圖十三），顯示 ϕ S4-1 minor tail protein 具有抑制細菌生長，或破壞細菌結構的潛力，並可在數種金黃色葡萄球菌上產生作用。

3.5-5 併用 ϕ S4-1 與 ϕ S4-1 minor tail protein 執行殺菌試驗

確認 ϕ S4-1 minor tail protein 具有破壞細菌結構的潛力後，欲測試其是否有助於降低細菌的存活率，故將 10 μ g/mL、25 μ g/mL 及 50 μ g/mL 三種濃度的 ϕ S4-1 minor tail protein 與噬菌體 ϕ S4-1 混合，並共同對 SA055 執行殺菌試驗。以觀察相較於只有噬菌體，添加 ϕ S4-1 minor tail protein 能否提升整體殺菌效果。結果顯示無論在

MOI = 1×10^3 和 1×10^4 中，添加三種濃度的蛋白皆無法使 SA055 的存活率降的更低（圖十四），顯示 ϕ S4-1 minor tail protein 應不具備殺死 SA055 的能力。





第四章、討論與未來展望

本實驗自水源分離 9 株噬菌體，並可在宿主範圍測試中感染大部分的待測菌株，顯示這些噬菌體具有廣泛的宿主範圍。金黃色葡萄球菌噬菌體感染時，主要的辨識受體為壁磷壁酸。本次實驗的宿主範圍結果顯示所分離、純化的噬菌體與溶菌蛋白在不同菌株上具備不同的感染力，而多項研究指出在壁磷壁酸的生成中，醣基轉移酶的修飾將影響菌株的噬菌體抗性。剔除 *tarS* 將降低噬菌體的感染力，顯示 TarS 為噬菌體感染所需。而當菌株具備 *tarM*，或對僅有 *tarS* 之菌株補回 *tarM* 時，將減弱噬菌體的感染能力[26]。*tarP* 的存在亦可增強菌株的噬菌體抗性[27]，而這可能是因噬菌體感染針對的受體為 TarS 修飾後的結構，當 TarM 或 TarP 存在時，其修飾會優先於 TarS[5]，導致噬菌體辨認的受體結構改變，進而引起噬菌體抗性。本實驗的宿主範圍測試結果亦可發現 9 株新分離的噬菌體對帶有 *tarM* 基因的菌株 ATCC35556、SA015、SA060、SA057、SA053、SA059、SAV02、SAV05 及 SAV12，以及帶有 *tarP* 基因的菌株 SAV09、SAV13、SAV14 感染力較弱，再次證實壁磷壁酸的醣基修飾將影響噬菌體的感染能力。此外也發現 ϕ S4-1 minor tail protein 無法在這 12 株帶有 *tarM* 或 *tarP* 基因的菌株，以及無法形成壁磷壁酸的 Δ *tagO* SA055 菌株上形成溶菌圈，並在其餘的待測菌株上則皆能形成溶菌圈，故認為能提出假說，推測 ϕ S4-1 minor tail protein 破壞細菌結構的機制可能與壁磷壁酸上的 TarS 修飾有關，但此部分還需要更深入的實驗方能驗證。

從 9 株噬菌體中選擇 ϕ S4-1 與 SA055 進行噬菌體殺菌試驗，結果顯示 ϕ S4-1 在 $MOI = 1 \times 10^3$ 時可將菌株的存活率下降至 57.9%， $MOI = 1 \times 10^4$ 時則下降至 1.6%。若想測試噬菌體是否適合做噬菌體療法，除了考量體外試驗的數值，亦須考量噬菌體應用於體內的可能性。在由腹腔注射和靜脈注射所引起的金黃色葡萄球菌全身性感染（systemic infection）的小鼠模型上，實驗使用的致死劑量通常為 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ CFU/mice[28-31]，但每株金黃色葡萄球菌明確的致死劑量皆有差異，需實際測試才能證實。本實驗室先前測試 SA055 的致死劑量，發現此菌株在 3.9×10^8 CFU/mice 下，對 5 週齡大的 BALB/c 母鼠有 80% 的致死率。此劑量下若欲使噬菌體在體內的 MOI 到達 1×10^4 ，須將噬菌體培養至 3.9×10^{12} PFU/100 μ L，然而在本研究中，常規培養下此噬菌體的效價最高僅能達到 1×10^9 PFU/100 μ L，顯示若欲以

øS4-1 執行噬菌體療法，需能在有限體積內提升噬菌體效價，否則應搭配他種噬菌體或抗生素合併治療。參考數篇相關研究後，發現以單獨的噬菌體進行金黃色葡萄球菌全身性感染的噬菌體療法中，多數噬菌體的 MOI 落在 0.1~10 之間即可有顯著的治療效果[32-36]，顯示若想單獨用於治療，需分離出殺菌效果更佳的噬菌體。

經過限制片段長度多型性與全基因體定序後，發現 øS4-1 可能屬於 *Rountreeviridae* 科，並與 NCBI 數據庫中最為相近的噬菌體 PSa3 的 percent identity 為 92.82%。øS4-1 包含多個可能為溶菌蛋白的編碼序列，我們從其中選擇了 øS4-1 endolysin、tail protein-1 以及 minor tail protein 進行後續的重組蛋白表現。在表現、破菌與純化後，øS4-1 endolysin 僅分佈於離心後的沉澱物中，無法釋出在上清液裡。使用 4% SDS 進一步裂解菌體後，發現其仍無法釋出進上清液中。數種原因都可能導致目標蛋白的沉積，例如蛋白的低水溶性，或是蛋白在生物體內聚合而產生包涵體 (inclusion body)。多種因素皆會影響蛋白的水溶性，例如環境的酸鹼值、離子強度 (ionic strength)、溫度等外來因素，以及組成蛋白表面的胺基酸種類[37]。因酸鹼值會對蛋白的電荷產生影響，通常低酸鹼值 (pH=2.0) 或高酸鹼值 ($8.0 \leq \text{pH} \leq 10.0$) 的環境可使蛋白帶有電性，故具有較高的水溶性[38, 39]。緩衝液中適量濃度的鹽類則可提升環境的離子強度，增加蛋白質的溶解度[40]。除此之外，在緩衝液中添加離散劑 (chaotropic agents) 或洗滌劑 (detergents) 可阻隔蛋白與周遭分子的疏水性鍵結，也是提升水溶性的方法[41]。而包涵體的產生通常來自於大量錯誤折疊蛋白的聚合。當表現蛋白時的溫度偏高，添加的 IPTG 較多，或基因的啟動子 (promoter) 活性強時，都可能導致目標蛋白的產生速度過快，使宿主無法做正確折疊[42]。除了調整實驗條件，也可以透過共同表現其伴護蛋白 (chaperone protein) 協助蛋白質的正確折疊，以避免包涵體的產生[43]。

本實驗表現蛋白所使用的緩衝溶液，其成分與酸鹼值皆參考自廠商的建議以及其他已發表之研究。本實驗也曾以添加 0.5% Tween-20 及 1% Triton X-100 兩種洗滌劑，或是降低表現溫度、降低 IPTG 濃度等方式調整實驗，但可能是未達合適的條件，這些方法皆無法明顯改善目標蛋白的沉積的現象。若想瞭解蛋白表面的胺基酸是否影響其水溶性，可以進行蛋白結構的相關研究。表現伴護蛋白亦是一種能夠嘗試的策略。

ϕ S4-1 tail protein-1 屬於水溶性的蛋白質，在表現與破菌後可大量釋出在上清液中，然而與磁珠混合震盪後發現該蛋白並無法被磁珠所結合，故無法被分離與純化。此實驗所使用的表現載體為 pET-28c，其可在重組蛋白的 N-端與 C-端產生可結合磁珠之組胺酸標籤 (His-tag)。然而，倘若蛋白質在表現時發生不當折疊 (misfolding)，則可能將組胺酸標籤包覆在蛋白質內部，導致蛋白無法結合上磁珠[44, 45]。若想確認是否為不當折疊所致，可使用胍鹽酸鹽 (guanidinium chloride) 或尿素 (urea) 等變性劑 (denaturants) 破壞蛋白的折疊，使組胺酸標籤露出，隨後再經由透析 (dialysis) 等方式將蛋白質複性以恢復其正常折疊[45]。然而，將含有重組蛋白之檢體過濾後進行點試驗，發現該重組蛋白並無表現出抑菌活性，加上尚無序列相近的其他蛋白有抑菌活性相關的研究發表，推測該尾纖維蛋白僅為噬菌體的結構蛋白之一，故未進行更進一步的研究。

ϕ S4-1 minor tail protein 為具有抑菌活性的蛋白質，然而所表現出的蛋白卻比預期小了 10 kDa 左右。研究指出蛋白生成後可能會在宿主細胞內進行轉譯後修飾 (posttranslational modifications)，包含蛋白酶的切割，醣基、甲基、乙醯基等修飾，被磷酸化，或是加上額外的胺基酸分子等[46]，使蛋白的大小改變。除此之外，蛋白若發生降解，或是因選擇性剪接 (alternative splicing) 產生蛋白異構體 (protein isoform)，都可能使目標蛋白的分子量下降。然而 ϕ S4-1 minor tail protein 自 IPTG 活化後，每一步驟中目標蛋白的條帶位置並未改變，且若有降解或異構體，應仍能觀察到符合預期大小的蛋白，這在結果中亦未發現。故推測比起後兩者，轉譯後修飾較可能是導致此結果的原因。此外，SDS-PAGE 並非判斷蛋白大小的準確方式。文獻指出 SDS-PAGE 所呈現的蛋白大小僅有約 95% 至 100% 的準確度，特別是當蛋白經醣基修飾 (glycosylated) 後，醣基影響蛋白與 SDS 的作用，將影響蛋白於膠體的移動距離[47]。 ϕ S4-1 minor tail protein 之大小差異位於此誤差範圍內，而若想確認蛋白之實際大小，可利用質譜測定法 (mass spectrometry) 進行鑑定。點試驗之結果顯示 ϕ S4-1 minor tail protein 帶有抑菌活性，然而以蛋白與噬菌體 ϕ S4-1 共同執行殺菌試驗，卻發現添加蛋白並無法使 SA055 的存活率降低，甚至相較於只有噬菌體的組別，添加蛋白後存活率反而提升了。為確認蛋白中是否有細菌污染，取了 100 μ L 同等稀釋倍率的 ϕ S4-1 minor tail protein 進行塗盤，但隔夜培養後並沒有菌落產生，顯示此結果應非細菌污染導致，而是操作手法上的疏失。然而，本殺



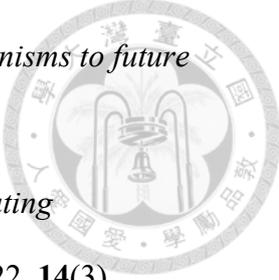
菌試驗亦存在設計上的疏失。本實驗將自噬菌體所分離，具溶菌酶活性的蛋白 ϕ S4-1 minor tail protein 與 ϕ S4-1 噬菌體共同進行殺菌試驗，即使此蛋白能破壞菌株表面的細胞壁結構，但並不會直接導致菌株的死亡，仍需倚靠噬菌體的感染方能使菌株裂解。 ϕ S4-1 minor tail protein 既是從 ϕ S4-1 分離，點試驗也顯示其宿主範圍較 ϕ S4-1 小，可作用的菌株亦皆與 ϕ S4-1 重複，顯示其無法補足 ϕ S4-1 感染上的不足，故無法提升 ϕ S4-1 之殺菌能力。若想以此溶菌蛋白提升噬菌體的殺菌效果，應選擇結合受體與 ϕ S4-1 minor tail protein 不同的其他噬菌體，以測試是否能為這些噬菌體開闢新的感染途徑，或選擇宿主範圍比 ϕ S4-1 minor tail protein 小的噬菌體進行測試。

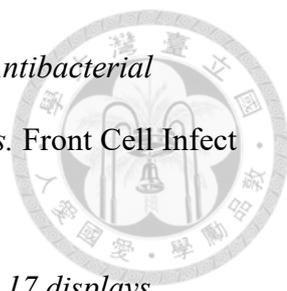
本實驗所分離出之噬菌體 ϕ S4-1 於多株金黃色葡萄球菌株上，包涵數株 MRSA 中皆能形成溶菌圈，顯示它們皆具有廣泛的宿主範圍。儘管噬菌體 ϕ S4-1 單獨使用時殺菌效果不佳，minor tail protein 的溶菌圈也未達透明，顯示其可能只能破菌體的結構，而無法殺死病原，但若與其他殺菌效果強，宿主範圍窄的溶菌蛋白共同使用，便有機會提升整體治療效果。合併抗生素共同使用亦是提升治療效果的方式，噬菌體之感染途徑若與抗生素作用途徑不同，共同治療時，便可從兩不同途徑破壞宿主細胞，並有機會提升治療效果。而倘若溶菌蛋白可破壞細菌表面結構，或是分解生物膜，則有機會削弱菌株之免疫力，這也能使抗生素的療效更為顯著[48-50]。整體而言，本實驗所分離出的噬菌體 ϕ S4-1，以及純化出的溶菌酶 ϕ S4-1 minor tail protein 若應用得當，對輔助現有的感染症療法，或提供替代療法上仍具有發展潛力。

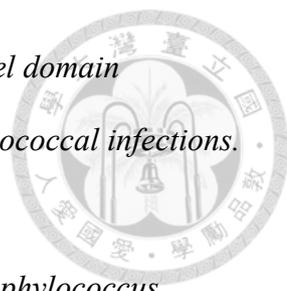
參考資料

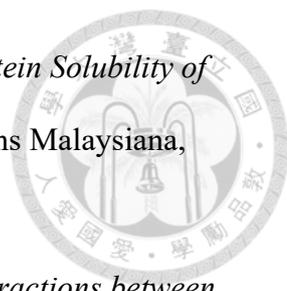


1. Taylor TA, U.C., *Staphylococcus aureus Infection*. 2022 Jul 18, StatPearls [Internet]: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
2. Ahmad-Mansour, N., et al., *Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments*. Toxins (Basel), 2021. **13**(10).
3. Nikolic, P. and P. Mudgil, *The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of Staphylococcus aureus and Their Role in Antibiotic Resistance*. Microorganisms, 2023. **11**(2).
4. O'Riordan, K. and J.C. Lee, *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 218-34.
5. van Dalen, R., A. Peschel, and N.M. van Sorge, *Wall Teichoic Acid in Staphylococcus aureus Host Interaction*. Trends Microbiol, 2020. **28**(12): p. 985-998.
6. David, M.Z. and R.S. Daum, *Treatment of Staphylococcus aureus Infections*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **409**: p. 325-383.
7. Sharma, S., et al., *Bacteriophages and its applications: an overview*. Folia Microbiol (Praha), 2017. **62**(1): p. 17-55.
8. Erez, Z., et al., *Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 488-493.
9. Dion, M.B., F. Oechslin, and S. Moineau, *Phage diversity, genomics and phylogeny*. Nat Rev Microbiol, 2020. **18**(3): p. 125-138.
10. Wakinaka, T., et al., *Ribitol-Containing Wall Teichoic Acid of Tetragenococcus halophilus Is Targeted by Bacteriophage phiWJ7 as a Binding Receptor*. Microbiol Spectr, 2022. **10**(2): p. e0033622.

- 
11. Strathdee, S.A., et al., *Phage therapy: From biological mechanisms to future directions*. Cell, 2023. **186**(1): p. 17-31.
 12. Teng, F., et al., *Efficacy Assessment of Phage Therapy in Treating Staphylococcus aureus-Induced Mastitis in Mice*. Viruses, 2022. **14**(3).
 13. Chan, B.K., et al., *Phage treatment of an aortic graft infected with Pseudomonas aeruginosa*. Evol Med Public Health, 2018. **2018**(1): p. 60-66.
 14. Petrovic Fabijan, A., et al., *Safety of bacteriophage therapy in severe Staphylococcus aureus infection*. Nat Microbiol, 2020. **5**(3): p. 465-472.
 15. Pires, D.P., et al., *Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(5): p. 2141-51.
 16. Oechslin, F., *Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy*. Viruses, 2018. **10**(7).
 17. Wang, H., et al., [Not Available]. Acta Pharm Sin B, 2024. **14**(1): p. 155-169.
 18. Sitthisak, S., et al., *Antibacterial activity of vB_AbaM_PhT2 phage hydrophobic amino acid fusion endolysin, combined with colistin against Acinetobacter baumannii*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 7470.
 19. Fursov, M.V., et al., *Antibiofilm Activity of a Broad-Range Recombinant Endolysin LysECD7: In Vitro and In Vivo Study*. Viruses, 2020. **12**(5).
 20. Yuan, Y., et al., *The endolysin of the Acinetobacter baumannii phage vB_AbaP_D2 shows broad antibacterial activity*. Microb Biotechnol, 2021. **14**(2): p. 403-418.
 21. Guo, M., et al., *A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 293.

- 
22. Lu, Y., et al., *Phage Endolysin LysP108 Showed Promising Antibacterial Potential Against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 668430.
23. Takac, M. and U. Blasi, *Phage P68 virion-associated protein 17 displays activity against clinical isolates of Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(7): p. 2934-40.
24. Azam, A.H. and Y. Tanji, *Peculiarities of Staphylococcus aureus phages and their possible application in phage therapy*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019. **103**(11): p. 4279-4289.
25. Abedon, S.T., *Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI)*. *Bacteriophage*, 2016. **6**(3): p. e1220348.
26. Li, X., et al., *An accessory wall teichoic acid glycosyltransferase protects Staphylococcus aureus from the lytic activity of Podoviridae*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17219.
27. Missiakas, D., *Staphylococcus aureus TarP: A Brick in the Wall or Rosetta Stone?* *Cell Host Microbe*, 2019. **25**(2): p. 182-183.
28. Liu, H., et al., *LysSYL: a broad-spectrum phage endolysin targeting Staphylococcus species and eradicating S. aureus biofilms*. *Microb Cell Fact*, 2024. **23**(1): p. 89.
29. Rauch, S., et al., *Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of Staphylococcus aureus peritoneal infection*. *Infect Immun*, 2012. **80**(10): p. 3721-32.
30. Rauch, S., et al., *Vaccine protection of leukopenic mice against Staphylococcus aureus bloodstream infection*. *Infect Immun*, 2014. **82**(11): p. 4889-98.

- 
31. Roehrig, C., et al., *MEndoB, a chimeric lysin featuring a novel domain architecture and superior activity for the treatment of staphylococcal infections*. mBio, 2024. **15**(2): p. e0254023.
32. Capparelli, R., et al., *Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(8): p. 2765-73.
33. Hsieh, S.E., et al., *Wide host range and strong lytic activity of Staphylococcus aureus lytic phage Stau2*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(3): p. 756-61.
34. Matsuzaki, S., et al., *Experimental protection of mice against lethal Staphylococcus aureus infection by novel bacteriophage phi MR11*. J Infect Dis, 2003. **187**(4): p. 613-24.
35. Oduor, J.M., et al., *Efficacy of lytic Staphylococcus aureus bacteriophage against multidrug-resistant Staphylococcus aureus in mice*. J Infect Dev Ctries, 2016. **10**(11): p. 1208-1213.
36. Sunagar, R., S.A. Patil, and R.K. Chandrakanth, *Bacteriophage therapy for Staphylococcus aureus bacteremia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Res Microbiol, 2010. **161**(10): p. 854-60.
37. Kramer, R.M., et al., *Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility*. Biophys J, 2012. **102**(8): p. 1907-15.
38. Santos, C.T., et al., *Protein solubility of jackfruit seed flour: pH and salt concentration influence*. Research, Society and Development, 2020. **9**(10): p. e7579108896.
39. Pelegri, D.H.G. and C.A. Gasparetto, *Whey proteins solubility as function of temperature and pH*. LWT - Food Science and Technology, 2005. **38**(1): p. 77-80.

- 
40. Nahar, M., et al., *Effect of pH and Salt Concentration on Protein Solubility of Slaughtered and Non-Slaughtered Broiler Chicken Meat*. *Sains Malaysiana*, 2017. **46**: p. 719-724.
41. Salvi, G., P. De Los Rios, and M. Vendruscolo, *Effective interactions between chaotropic agents and proteins*. *Proteins*, 2005. **61**(3): p. 492-9.
42. Singh, A., et al., *Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process*. *Microbial Cell Factories*, 2015. **14**(1): p. 41.
43. Estabragh, A.M., H.M.M. Sadeghi, and V. Akbari, *Co-Expression of Chaperones for Improvement of Soluble Expression and Purification of An Anti-HER2 scFv in Escherichia Coli*. *Adv Biomed Res*, 2022. **11**: p. 117.
44. Bornhorst, J.A. and J.J. Falke, *Purification of proteins using polyhistidine affinity tags*. *Methods Enzymol*, 2000. **326**: p. 245-54.
45. Clark, E.D.B., *Refolding of recombinant proteins*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998. **9**(2): p. 157-63.
46. Ramazi, S. and J. Zahiri, *Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods*. *Database (Oxford)*, 2021. **2021**.
47. Wang, G., et al., *Enhancing Accuracy in Molecular Weight Determination of Highly Heterogeneously Glycosylated Proteins by Native Tandem Mass Spectrometry*. *Anal Chem*, 2017. **89**(9): p. 4793-4797.
48. Chen, X., et al., *Phage-Derived Depolymerase as an Antibiotic Adjuvant Against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*, 2022. **13**: p. 845500.
49. Guo, Z., M. Liu, and D. Zhang, *Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms*. *Virulence*, 2023. **14**(1): p. 2273567.

50. Wang, H., et al., *Translating bacteriophage-derived depolymerases into antibacterial therapeutics: Challenges and prospects*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2024. **14**(1): p. 155-169.
51. 林庭萱, 分離與鑑定二株金黃色葡萄球菌之噬菌體. 2022, 國立台灣大學.



表一、本實驗使用之培養基、培養液



培養基 / 培養液	說明 (每公升內容物)	來源
Tryptic soy broth (TSB)	Enzymatic digest of casein 17 g, enzymatic digest of soybean 3 g, K ₂ HPO ₄ 2.5 g, NaCl 5 g, glucose monohydrate 2.5 g	Neogen, U.S.A.
Tryptone soy agar (TSA)	TSB broth added with 1.4% agar	TSB: Neogen, U.S.A. Agar: BioShop , Canada
Tryptone soy top agar (TSA top agar)	TSB broth added with 0.7% agar	TSB: Neogen, U.S.A. Agar: BioShop, Canada
Luria-Bertani broth (LB broth)	Trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g	BioShop, Canada
Luria-Bertani agar (LB agar)	Trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g	BioShop, Canada

表二、本實驗使用之緩衝液



緩衝液	說明	來源
SM buffer	100 mM NaCl, 10 mM MgSO ₄ , 50 mM Tris-HCl	MgSO ₄ : Sigma-Aldrich, U.S.A. Tris-HCl : BIOMAN, Taiwan
buffer L2	30% PEG 8000, 3M NaCl	PEG 8000 : BioShop, Canada
buffer L3	100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 25mM EDTA	EDTA : BioShop, Canada
buffer L4	4% SDS	SDS : BioShop, Canada
50× TAE buffer	2M Tris-base, 1M acetic acid, 50 mM EDTA	BIOMAN, Taiwan
lysis buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0	NaH ₂ PO ₄ : BioShop, Canada Imidazole : BioShop, Canada
wash buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0	
elution buffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0	
Coomassie brilliant blue	Acetic acid 50 mL, methanol (99.9%) 250 mL, ddH ₂ O 200 mL, Coomassie blue 1.25 g	Acetic acid : Honeywell, U.S.A. Methanol : Honeywell, U.S.A. Coomassie blue : BioShop, Canada
destain buffer	Acetic acid 100 mL, methanol (99.9%) 75 mL, ddH ₂ O 825 mL	

表三、本實驗使用之菌株



菌株	是否為 MRSA	莢膜型	來源
BCRC14832		CP5	BCRC, Taiwan
ATCC35556		CP5	ATCC, U.S.A.
SA015	(MRSA)	CP5	台大醫院
SA039	(MRSA)	CP5	
SA060	(MRSA)	CP5	
SA042	(MRSA)	CP5	
SA057	(MRSA)	CP5	
SA045	(MRSA)	CP8	
SA041	(MRSA)	CP8	
SA053	(MRSA)	CP8	
SA055	(MRSA)	CP8	
SA059	(MRSA)	CP8	
SAV02	(MRSA)	CP5	
SAV05	(MRSA)	CP5	
SAV07		CP5	
SAV12	(MRSA)	CP5	
SAV01		CP8	
SAV03	(MRSA)	CP8	台北榮民總醫院
SAV04	(MRSA)	CP8	
SAV06		CP8	
SAV08		CP8	
SAV09	(MRSA)	CP8	
SAV10	(MRSA)	CP8	
SAV11		CP8	
SAV13		CP8	
SAV14	(MRSA)	CP8	
SAV15	(MRSA)	CP8	
SAW01		CP8	人類鼻腔拭子檢體
SAW02		CP8	
<i>ΔtagO</i> SA055		CP8	本實驗室建構

表四、本實驗使用之噬菌體



噬菌體	描述	來源
44AHJD	<i>Podoviridae</i>	BCRC, Taiwan
S1~S10	實驗室先前分離出之 金黃色葡萄球菌噬菌體	實驗室分離出
øS1-1~øS6-4	本實驗分離出之金黃色葡萄球菌噬菌體	污水檢體
øS4-1	本實驗分離出之金黃色葡萄球菌噬菌體	污水檢體

表五、實驗使用之水源檢體



檢體編號	來源	採檢日期
1	桃園茄苳溪	08/15/2022
2	台大醫院總院區	10/27/2022
3	公共衛生學院	10/27/2022
4	急診醫學部	10/27/2022
5	兒童醫療大樓正門	10/27/2022
6	兒童醫療大樓停車場	10/27/2022
7	牙科部	10/27/2022
8	台大醫院總院區	11/03/2022
9	公共衛生學院	11/03/2022
10	急診醫學部	11/03/2022
11	兒童醫療大樓正門	11/03/2022
12	兒童醫療大樓停車場	11/03/2022
13	牙科部	11/03/2022

表六、點試驗陽性之水源及分離的噬菌體



檢體編號 菌株	1	8	11	13
SA055	++	++	++	++
SAV09	-	-	-	-
SAV13	-	-	-	-
SAV14	-	-	-	-
SA042	++	-	++	-
SAW01	-	-	-	-
SAW02	-	-	-	-
$\Delta tagO$ SA055	-	-	-	-
分離出的噬菌體	$\phi 2208$	$\phi S1-1$	$\phi S4-1$ $\phi S4-2$ $\phi S4-3$	$\phi S6-1$ $\phi S6-2$ $\phi S6-3$ $\phi S6-4$

註：

「++」表示有澄清透明的溶菌圈，「-」表示無法生成溶菌圈。SA055、SA042 為來自台大醫院的 MRSA 菌株，SAV09、SAV13、SAV14 來自台北榮民總醫院，其中 SAV09、SAV14 屬於 MRSA，SAV13 屬於 MSSA，SAW01、SAW02 為自鼻腔拭子檢體分離的 MSSA， $\Delta tagO$ SA055 為實驗室建構的 *tagO* 基因剔除株。

表七、本實驗使用菌株之醣基轉移酶基因型，標準噬菌體、實驗室已發現之噬菌體、本實驗分離之噬菌體與所表現蛋白之宿主種類範圍



Strain	<i>tarS</i>	<i>tarM</i>	<i>tarP</i>	44AHJD	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S1-1	S4-1	S4-2	S4-3	S6-1	S6-2	S6-3	S6-4	S2208	S4-1 MT protein					
BCRC14832	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
ATCC35556	+	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SA015	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SA039	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SA060	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SA042	+	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SA057	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SA045	+	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SA041	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SA053	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SA055	+	-	-	++	+	-	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SA059	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SAV02	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SAV05	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SAV07	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV12	+	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
SAV01	+	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV03	+	-	-	++	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV04	+	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV06	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
SAV08	-	-	-	++	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV09	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
SAV10	+	-	-	++	-	-	++	-	+	-	-	-	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV11	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAV13	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
SAV14	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
SAV15	+	-	-	++	-	-	++	-	+	-	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+				
SAW01	N/A			N/A											++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SAW02	N/A			N/A											++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ΔtagO</i> SA055	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-				

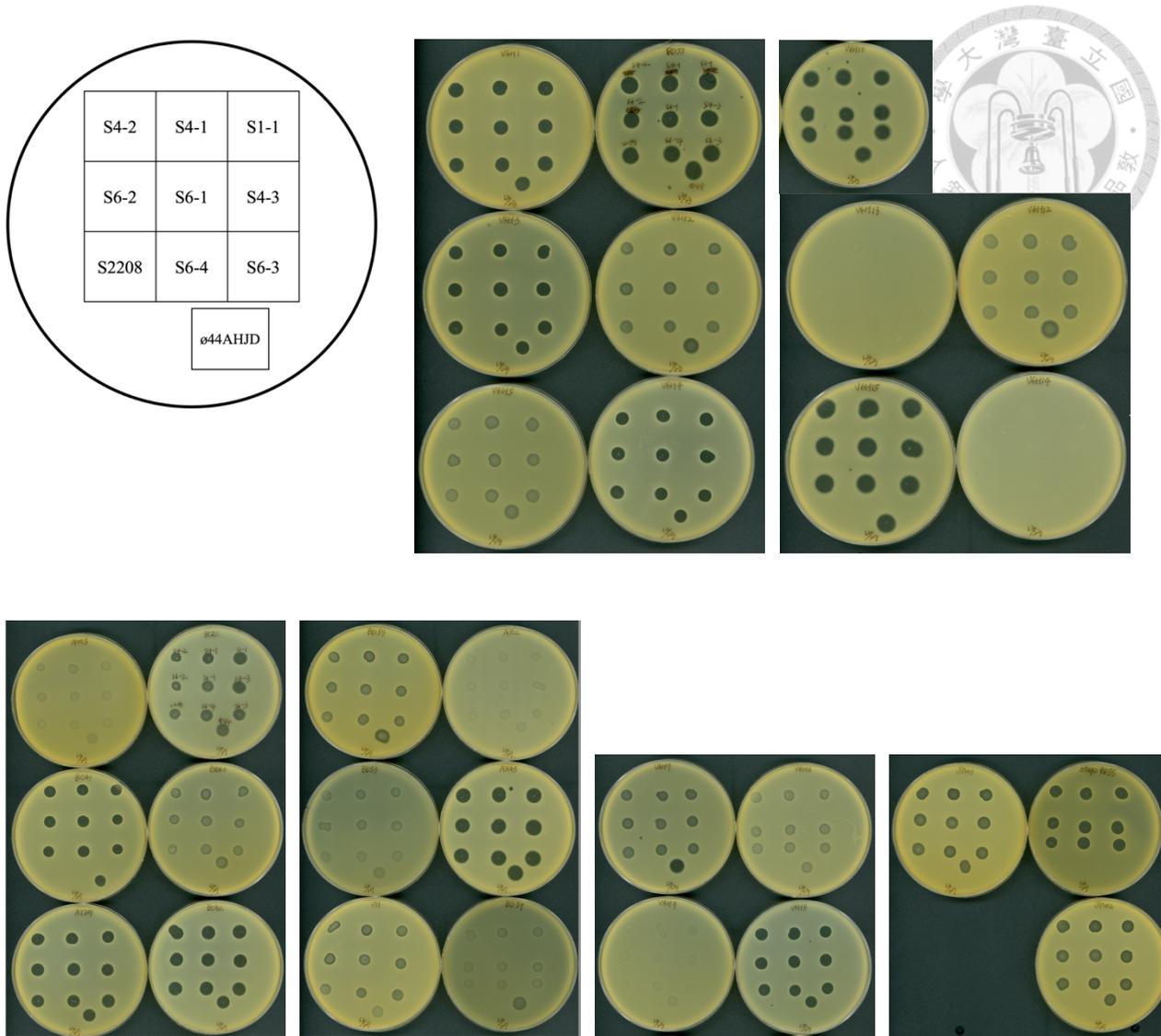
註：

左半部（灰底）為本實驗使用菌株之醣基轉移酶基因型，「+」表示菌株帶有該基因，「-」表示菌株不具有該基因，此部分資料引用自本實驗室已畢業學生—林庭萱同學的碩士論文[51]。右半部（橘底）為宿主種類範圍之測試結果，「++」表示有澄清透明的溶菌圈，「+」表示較為弱、混濁的溶菌圈，「-」表示無法生成明顯的溶菌圈。44AHJD（黃底）為標準噬菌體株，S1~S10（藍底）為先前實驗室分離的金黃色葡萄球菌噬菌體，S1-1~S2208（淺綠底）為本實驗分離的噬菌體，S4-1 minor tail protein（深綠底）為本實驗所表現、純化的蛋白。

表八、本實驗使用之引子



引子名稱	序列 (5'-3')	用途
S4-1 endolysin-NcoI new1	5' GGAGATGAAACCATGGAGTCATTACA ACAAGC 3'	選殖 ϕ S4-1 endolysin 基因， 建構表現質體
S4-1 endolysin-XhoI	5' GAAAAAAACCTCGAGTACCCATTATG AGAACACCCC 3'	選殖 ϕ S4-1 endolysin 基因， 建構表現質體
S4-1 tail protein-1 NcoI new1	5' GAGGTGTAAACCATGGCTGATAGAAT CG 3'	選殖 ϕ S4-1 tail protein-1 基因， 建構表現質體
S4-1 tail protein-1 XhoI new1	5' CGACTATTATACTCGAGTTATTCAATG ATTTG 3'	選殖 ϕ S4-1 tail protein-1 基因， 建構表現質體
S4-1 mTP-NcoI new	5' CAAATTTGGTAAAGCTAGCAAATTATG GC 3'	選殖 ϕ S4-1 minor tail protein 基因， 建構表現質體
S4-1 minor tail protein-XhoI	5' GACTTCATTGTTTCTCGAGCTATTTAT GTTTTGC 3'	選殖 ϕ S4-1 minor tail protein 基因， 建構表現質體

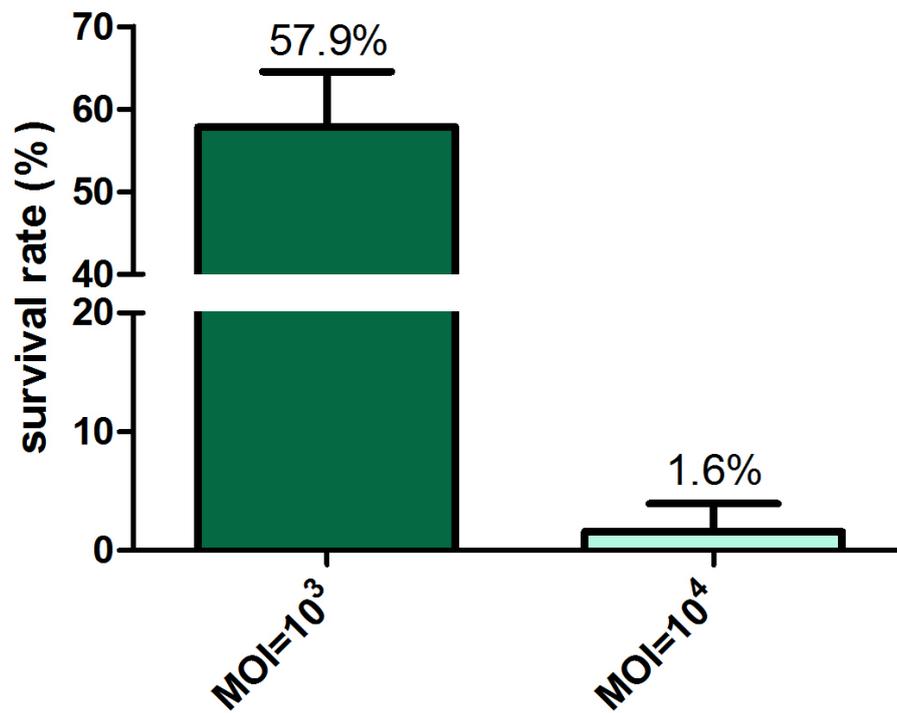


圖一、噬菌體的宿主種類範圍測試

將噬菌體增殖至效價至 1×10^9 PFU/mL 以上，再取 $10 \mu\text{L}$ 噬菌體以點試驗的方式滴加於 30 種不同金黃色葡萄球菌株的鋪盤上，隔夜培養後視溶菌圈透明程度給予價數（表七）。左上方為滴加位置的示意圖，本實驗使用 9 株自水源分離的噬菌體（S1-1~S2208），以及標準噬菌體株 44AHJD 進行測試。

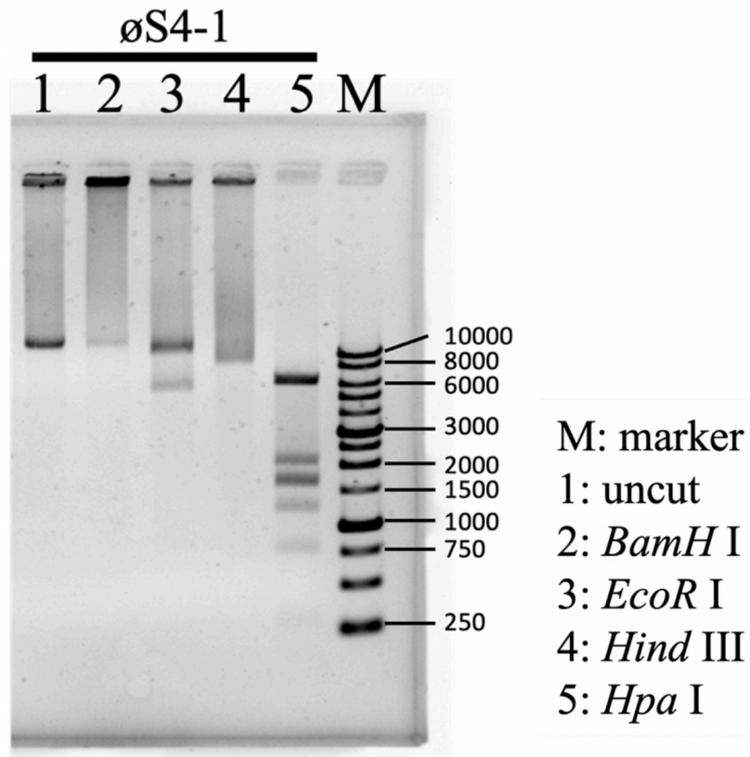


S4-1 killing assay on SA055



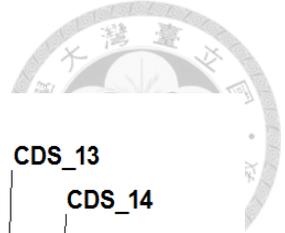
圖二、 ϕ S4-1 噬菌體殺菌試驗結果

測試 ϕ S4-1 於 $MOI=1 \times 10^3$ 和 $MOI=1 \times 10^4$ 時針對 SA055 的殺菌能力，Scale bar 上顯示每組細菌存活率之平均值 (%)。兩組皆執行三次獨立試驗，每次試驗皆為二重複。

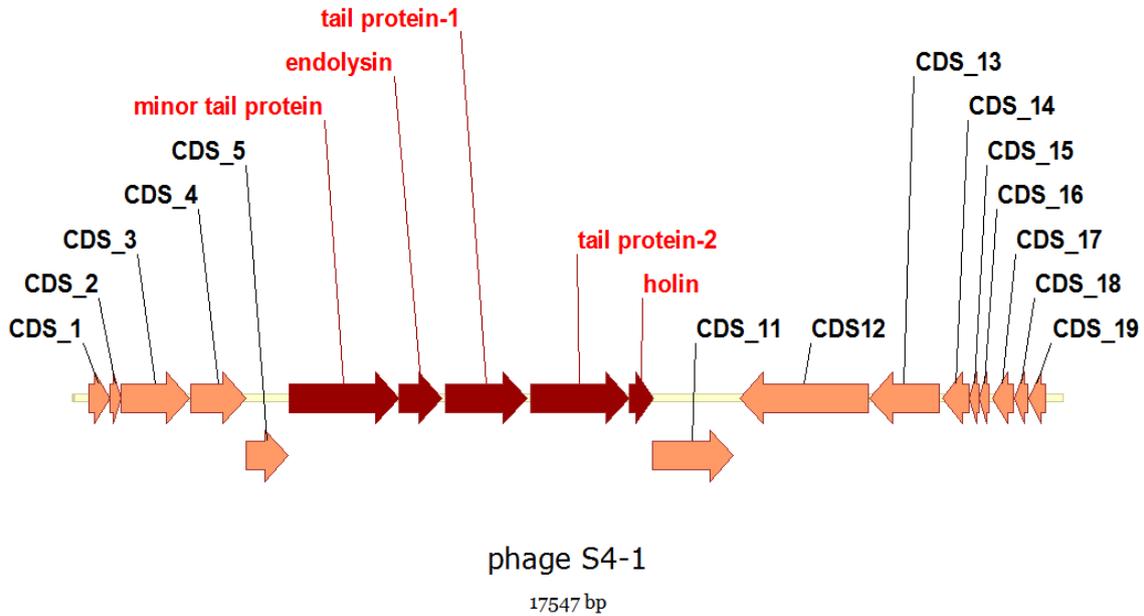


圖三、øS4-1 限制片段長度多型性

將 øS4-1 的 DNA 以限制酶 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind* III、*Hpa*I 切割，再以電泳分離不同大小的片段。右端列出每個槽使用之限制酶或 DNA ladder，其中 uncut 為未加入限制酶的原始 DNA 檢體。



(A)



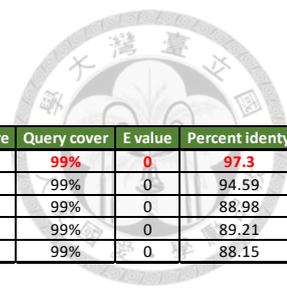
(B)

No	Description	Scientific Name	Max score	Total score	Query cover	E value	Percent identity
1	Staphylococcus phage PSa3 complete sequence	Staphylococcus phage PSa3	25411	25873	100%	0	92.82
2	Staphylococcus phage SLPW, complete genome	Staphylococcus phage SLPW	24077	26971	99%	0	93.75
3	Staphylococcus phage vB_SA_STAP152, complete genome	Staphylococcus phage vB_SA_STAP152	23364	25031	97%	0	93.28
4	Staphylococcus phage TSP, complete genome	Staphylococcus phage TSP	22556	23980	97%	0	92.07
5	Staphylococcus phage vB_SauP-436A1, complete genome	Staphylococcus phage vB_SauP-436A1	22282	24202	99%	0	91.72

圖四、 ϕ S4-1 全基因體定序結果

(A) ϕ S4-1 的序列大小為 17547 bp，其中除了有噬菌體的基本結構，亦有幾個可能為溶菌蛋白的編碼序列，在圖上以紅色標記。這些編碼序列有 minor tail protein、endolysin、tail protein-1、tail protein-2 以及 holin。

(B) 將 ϕ S4-1 序列與 NCBI 數據庫比對，圖上顯示 Max score 最高的前五名結果。與 ϕ S4-1 最相近的前五名皆為金黃色葡萄球菌噬菌體，其中最為相近者為噬菌體 PSa3(以紅字標記)，兩者 percent identity 為 92.82%。



(A)

No	Description	Scientific Name	Max score	Total score	Query cover	E value	Percent identity
1	tail protein [Staphylococcus phage PSa3]	Staphylococcus phage PSa3	896	896	99%	0	97.3
2	tail protein [Staphylococcus phage vB_SauP_EBHT]	Staphylococcus phage vB_SauP_EBHT	863	863	99%	0	94.59
3	tail protein [Staphylococcus phage Portland]	Staphylococcus phage Portland	834	834	99%	0	88.98
4	tail fiber protein [Staphylococcus phage vB_SA_STAP152]	Staphylococcus phage vB_SA_STAP152	832	832	99%	0	89.21
5	tail fibers protein [Staphylococcus phage TSP]	Staphylococcus phage TSP	829	829	99%	0	88.15

(B)

Section 1		Section 10	
Translation of S4-1 P1 cut (1) 1 10 20 38	MADRIVRSLRVEDI NRLADFLTEENDLISTSDGHIYV	Translation of S4-1 P1 cut (343) 343 350 360 370 380	QSKSEIQNFNQKINS AKLQFNDTGWQDISLES GIVAS
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (1) MADRIVRSLRVEDI RLADFLTEENDLISTSDGHIYV		tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (343) QSKSEIQNFNQKINS AKLQFNDTGWQDISLES GIVAS	
Consensus (1) MADRIVRSLRVEDI RLADFLTEENDLISTSDGHIYV		Consensus (343) QSKSEIQNFNQKINS AKLQFNDTGWQDISLES GIVAS	
Section 2		Section 11	
Translation of S4-1 P1 cut (39) 39 50 60 76	RTDSSYYKLTFFYNDLKTLDKYS GQIDKHDIAIN NKE	Translation of S4-1 P1 cut (381) 381 390 400 418	DSNGGYP PQYRIVTINGFKT IQLKGVLGKIKKNGDIK
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (39) RTDSSYYKLTFFYNDLKTLDKYS SQIEHHDIAIN NKE		tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (381) DSNGGYP APQYRIVTINGFKT IQLKGVLGKIKKNGDIK	
Consensus (39) RTDSSYYKLTFFYNDLKTLDKYS QID HDIAIN NKE		Consensus (381) DS GGP PQYRIVTINGFKT IQLKGVLGKIKKNGDIK	
Section 3		Section 12	
Translation of S4-1 P1 cut (77) 77 90 100 114	KISTFLEKIKKFPQIMDSNKNDIDALKEKDIILNESLE	Translation of S4-1 P1 cut (419) 419 430 440 456	LGSINANLKRSTHHTQCAIDSKMINTRLYLNF YNELYF
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (77) KISTFLEKIKKFPQIMDSNKNDIDALKEKDIILNESLE		tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (419) LGSINANLKRSTHHTQCAIDSKMINTRLYLNF NELHF	
Consensus (77) KISTFLEKIKKFPQIMDSNKNDIDALKEKDIILNESLE		Consensus (419) LGSINANLKRSTHHTQCAIDSKMINTRLYLNF NELHF	
Section 4		Section 13	
Translation of S4-1 P1 cut (115) 115 120 130 140 152	QHQTQLNEFEKSMQYDDKYHTLQSLNATKDSVGRNT	Translation of S4-1 P1 cut (457) 457 470 482	VSNYSDELNGDKRFVDTQIEI
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (115) QHQTQLNEFEKSMQYDDKYHTLQSLNATKDSVGRNT		tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (457) VSNYSDELNGDKRFVDTQIEI	
Consensus (115) QHQTQLNEFEKSMQYDDKYHTLQSLNATKDSVGRNT		Consensus (457) V SNYSDEL NGDKRFVDTQIEI	
Section 5			
Translation of S4-1 P1 cut (153) 153 160 170 180 190	NDINLIKANTGAENIDALKRELAEVKRSVNLDKIKEIE		
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (153) NDINLIKANTGAENIDALKRELAEVKRSVNLDKIKEIE			
Consensus (153) NDINLIKANTGAENIDALKRELAEVKRSVNLDKIKEIE			
Section 6			
Translation of S4-1 P1 cut (191) 191 200 210 228	QQIELLKAKPTNDNIQEIQEDINQLKQNS SAGKLESI		
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (191) QQIELLKAKPTNDNIQEIQEDINQLKQNS SAGKLESI			
Consensus (191) QQIELLKAKPTNDNIQEIQEDINQLKQNS SAGKLESI			
Section 7			
Translation of S4-1 P1 cut (229) 229 240 250 268	EQTINDIKANANLDKIKELESKINSINPKDYQDINSI		
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (229) EQTINDIKANANLDKIKELESKINSINPKDYQDINSI			
Consensus (229) EQTINDIKANANLDKIKELESKINSINPKDYQDINSI			
Section 8			
Translation of S4-1 P1 cut (267) 267 280 290 304	KSEIATLKSNNDKISKIENEIQELKKNRPVVDSDG VDL		
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (267) KSEIATLKSNNDKISKIENEIQELKKNRPVVDSDG VDL			
Consensus (267) KSEIATLKSNNDKISKIENEIQELKKNRPVVDSDG VDL			
Section 9			
Translation of S4-1 P1 cut (305) 305 310 320 330 342	SKYDNDISELQKQSSTNESNISLSNKVDNLDNIDTKIA		
tail protein [Staphylococcus phage PSa3] (305) SKYDNDISELQKQSSTNESNISLSNKVDNLDNIDTKIA			
Consensus (305) SKYDNDISELQKQSSTNESNISLSNKVDNLDNIDTKIA			

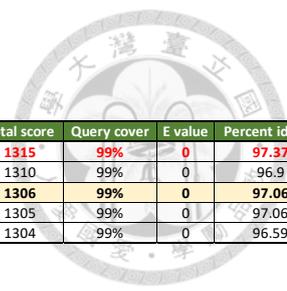
圖六、øS4-1 tail protein-1 之比對結果

(A) 將 øS4-1 tail protein-1 序列與 NCBI 數據庫比對，圖上顯示 Max score 最高的前五名結果。

其中相似度最高者為來自金黃色葡萄球菌噬菌體 PSa3 的 tail protein (以紅字標記)，兩者序列的 percent identity 為 97.3%。

(B) øS4-1 tail protein-1 與噬菌體 PSa3 的 tail protein 之胺基酸序列比對結果，兩者有 13 個錯位

胺基酸。圖上黃底紅字處表示兩者相同的胺基酸序列，白底黑字處表示錯位胺基酸。



(A)

No	Description	Scientific Name	Max score	Total score	Query cover	E value	Percent identity
1	minor tail protein [Staphylococcus phage LSA2366]	Staphylococcus phage LSA2366	1315	1315	99%	0	97.37
2	putative major teichoic acid biosynthesis protein C [Staphylococcus phage SAPYZU_16]	Staphylococcus phage SAPYZU_16	1310	1310	99%	0	96.9
3	Chain A, Tail Fiber of phage P68 [Staphylococcus phage P68]	Staphylococcus phage P68	1306	1306	99%	0	97.06
4	minor tail protein [Staphylococcus phage phi44AHJD]	Staphylococcus phage phi44AHJD	1305	1305	99%	0	97.06
5	minor structural protein [Staphylococcus phage STPX-6]	Staphylococcus phage STPX-6	1304	1304	99%	0	96.59

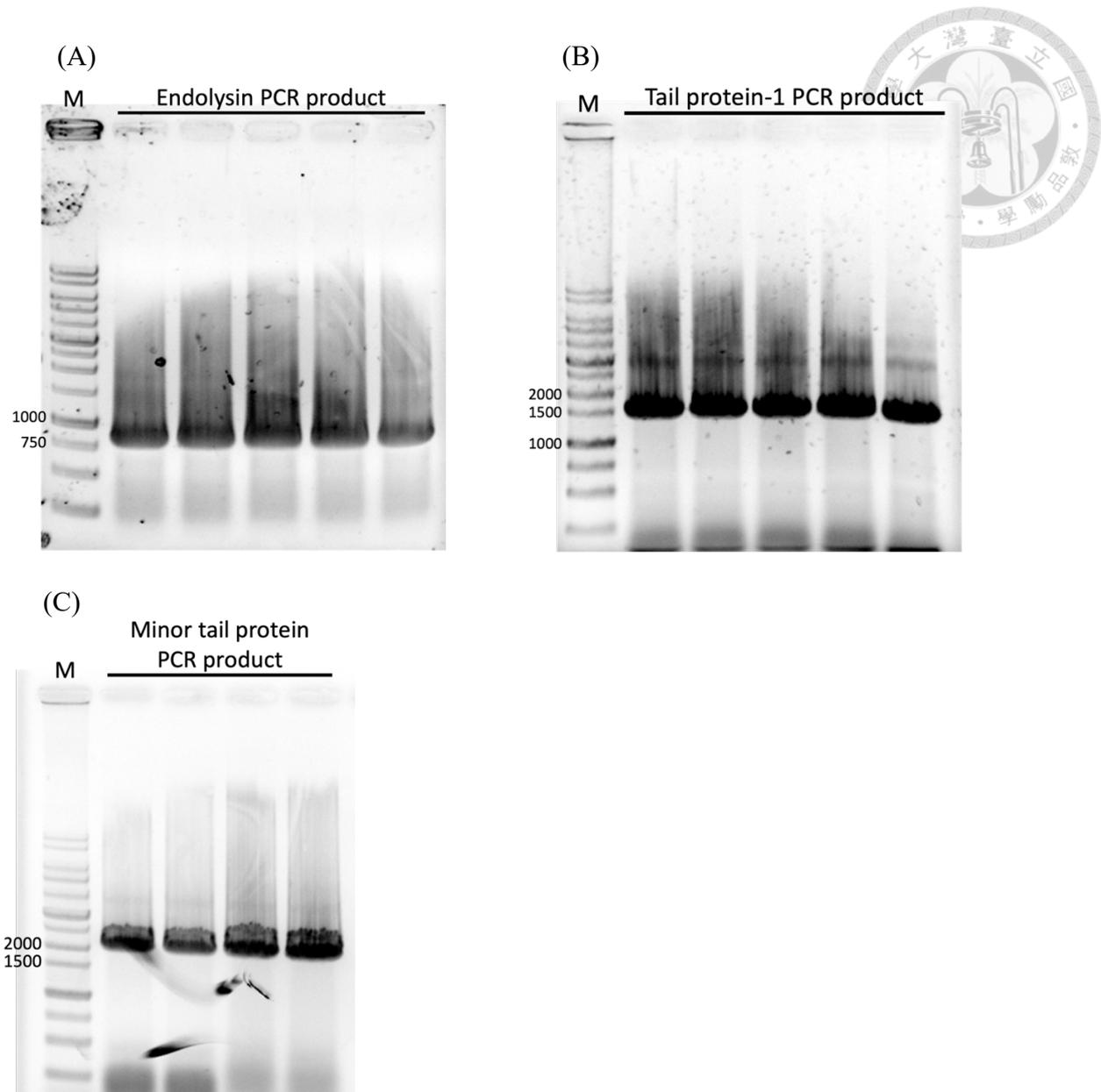
(B)

<p>Section 1 34 Translation of S4-1 minor tail protein cut (1) MAYNENDFKYYFDDIRFFLDEIYKTRRERYTFYDD Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (1) MAYNENDFKYYFDDIRFFLDEIYKTRRERYTFYDD Consensus (1) MAYNENDFKYYFDDIRFFLDEIYKTRRERYTFYDD</p> <p>Section 2 68 Translation of S4-1 minor tail protein cut (35) RADYNTNSKSYDYISRLSKLIEVLAIRINDYDS Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (35) RADYNTNSKSYDYISRLSKLIEVLAIRINDYDN Consensus (35) RADYNTNSKSYDYISRLSKLIEVLAIRINDYD</p> <p>Section 3 102 Translation of S4-1 minor tail protein cut (69) ELKKRFKNWDLMKAFPEQAKDLFRGWLNDGDI Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (69) ELKKRFKNWDLMKAFPEQAKDLFRGWLNDGDI Consensus (69) ELKKRFKNWDLMKAFPEQAKDLFRGWLNDGDI</p> <p>Section 4 136 Translation of S4-1 minor tail protein cut (103) NIHDEFKYSAGLTSAFALFKVAEMKQMNDFKA Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (103) SIHDEFKYSAGLTSAFALFKVTEMKQMNDFKA Consensus (103) IIHDEFKYSAGLTSAFALFKVEMKQMNDFKA</p> <p>Section 5 170 Translation of S4-1 minor tail protein cut (137) EVKDLIKIDRFVNGFELNELEPKFVMGFGGIRN Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (137) EVKDLIKIDRFVNGFELNELEPKFVMGFGGIRN Consensus (137) EVKDLIKIDRFVNGFELNELEPKFVMGFGGIRN</p> <p>Section 6 204 Translation of S4-1 minor tail protein cut (171) AVNQSIINDKETHHMYSTQSDSQTFEGFWINKLT Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (171) AVNQSIINDKETHHMYSTQSDSQTFEGFWINKLT Consensus (171) AVNQSIINDKETHHMYSTQSDSQTFEGFWINKLT</p> <p>Section 7 238 Translation of S4-1 minor tail protein cut (205) FSGDLISSMRIVQGGHGTITGLERQNGEMKIWL Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (205) FSGDLISSMRIVQGGHGTITGLERQNGEMKIWL Consensus (205) FSGDLISSMRIVQGGHGTITGLERQNGEMKIWL</p> <p>Section 8 272 Translation of S4-1 minor tail protein cut (239) HHDGVAKLLQVAYKDNVLDLEEAKGLDYTEPQS Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (239) HHDGVAKLLQVAYKDNVLDLEEAKGLDYTEPQS Consensus (239) HHDGVAKLLQVAYKDNVLDLEEAKGLDYTEPQS</p> <p>Section 9 306 Translation of S4-1 minor tail protein cut (273) LNKHHTTFLIDEANDRLILRFQDGTIQVSRAD Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (273) LNKHHTTFLIDEANDRLILRFQDGTIQVSRAD Consensus (273) LNKHHTTFLIDEANDRLILRFQDGTIQVSRAD</p>	<p>Section 10 340 Translation of S4-1 minor tail protein cut (307) VKNHIDNVEKEMTIDNSENNDRNMWQGIADVSD Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (307) VKNHIDNVEKEMTIDNSENNDRNMWQGIADVSD Consensus (307) VKNHIDNVEKEMTIDNSENNDRNMWQGIADVSD</p> <p>Section 11 374 Translation of S4-1 minor tail protein cut (341) LYWLSGNSSVNSHVQIGKYSLTGTGKIYDYPFKL Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (341) LYWLSGNSSVNSHVQIGKYSLTGTGKIYDYPFKL Consensus (341) LYWLSGNSSVNSHVQIGKYSLTGTGKIYDYPFKL</p> <p>Section 12 408 Translation of S4-1 minor tail protein cut (375) SYQDGINFRDNFKPEEGICITYNPKTRRKSLLL Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (375) SYQDGINFRDNFKPEEGICITYNPKTRRKSLLL Consensus (375) SYQDGINFRDNFKPEEGICITYNPKTRRKSLLL</p> <p>Section 13 442 Translation of S4-1 minor tail protein cut (409) AMTNGGGKRRFNLYGFFQLGEYEHFEALRARG Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (409) AMTNGGGKRRFNLYGFFQLGEYEHFEALRARG Consensus (409) AMTNGGGKRRFNLYGFFQLGEYEHFEALRARG</p> <p>Section 14 476 Translation of S4-1 minor tail protein cut (443) QNYKLTDDGRALSIPIHDIDLNDLTQAGFYIID Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (443) QNYKLTDDGRALSIPIHDIDLNDLTQAGFYIID Consensus (443) QNYKLTDDGRALSIPIHDIDLNDLTQAGFYIID</p> <p>Section 15 510 Translation of S4-1 minor tail protein cut (477) GGTA8KLKNIIPMNGSKRIIDAGCFINVVPTQT Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (477) GGTA8KLKNIIPMNGSKRIIDAGCFINVVPTQT Consensus (477) GGTA8KLKNIIPMNGSKRIIDAGCFINVVPTQT</p> <p>Section 16 544 Translation of S4-1 minor tail protein cut (511) STVQELTRFSTGRKVMKVRGMLDVFLLKWDYG Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (511) STVQELTRFSTGRKVMKVRGMLDVFLLKWDYG Consensus (511) STVQELTRFSTGRKVMKVRGMLDVFLLKWDYG</p> <p>Section 17 578 Translation of S4-1 minor tail protein cut (545) LWTTIKTDAPYQYELASQYNNWIAVYTTPEY Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (545) LWTTIKTDAPYQYELASQYNNWIAVYTTPEY Consensus (545) LWTTIKTDAPYQYELASQYNNWIAVYTTPEY</p> <p>Section 18 612 Translation of S4-1 minor tail protein cut (579) ITGNQMLFRDAPPEIKKVGAWLVRVSSNAVGEV Translation of phiP68 gene17 minor tail protein (579) ITGNQMLFRDAPPEIKKVGAWLVRVSSNAVGEV Consensus (579) ITGNQMLFRDAPPEIKKVGAWLVRVSSNAVGEV</p>
---	---

圖七、øS4-1 minor tail protein 之比對結果

(A) 將 øS4-1 minor tail protein 序列與 NCBI 數據庫比對，圖上顯示 Max score 最高的前五名結果。其中相似度最高者為來自金黃色葡萄球菌噬菌體 LSA2366 的 minor tail protein (以白底紅字標記)，兩者序列的 percent identity 為 97.37%。øS4-1 minor tail protein 與另一來自金黃色葡萄球菌噬菌體 P68 的 minor tail protein (以黃底黑字標記) 之 percent identity 為 97.06%。

(B) øS4-1 minor tail protein 與噬菌體 P68 的 minor tail protein 之胺基酸序列比對結果，兩者有 20 個錯位胺基酸。圖上黃底紅字處表示兩者相同的胺基酸序列，白底黑字處表示錯位胺基酸。



圖八、擴增欲表現之 ϕ S4-1 溶菌酶及尾纖維蛋白基因

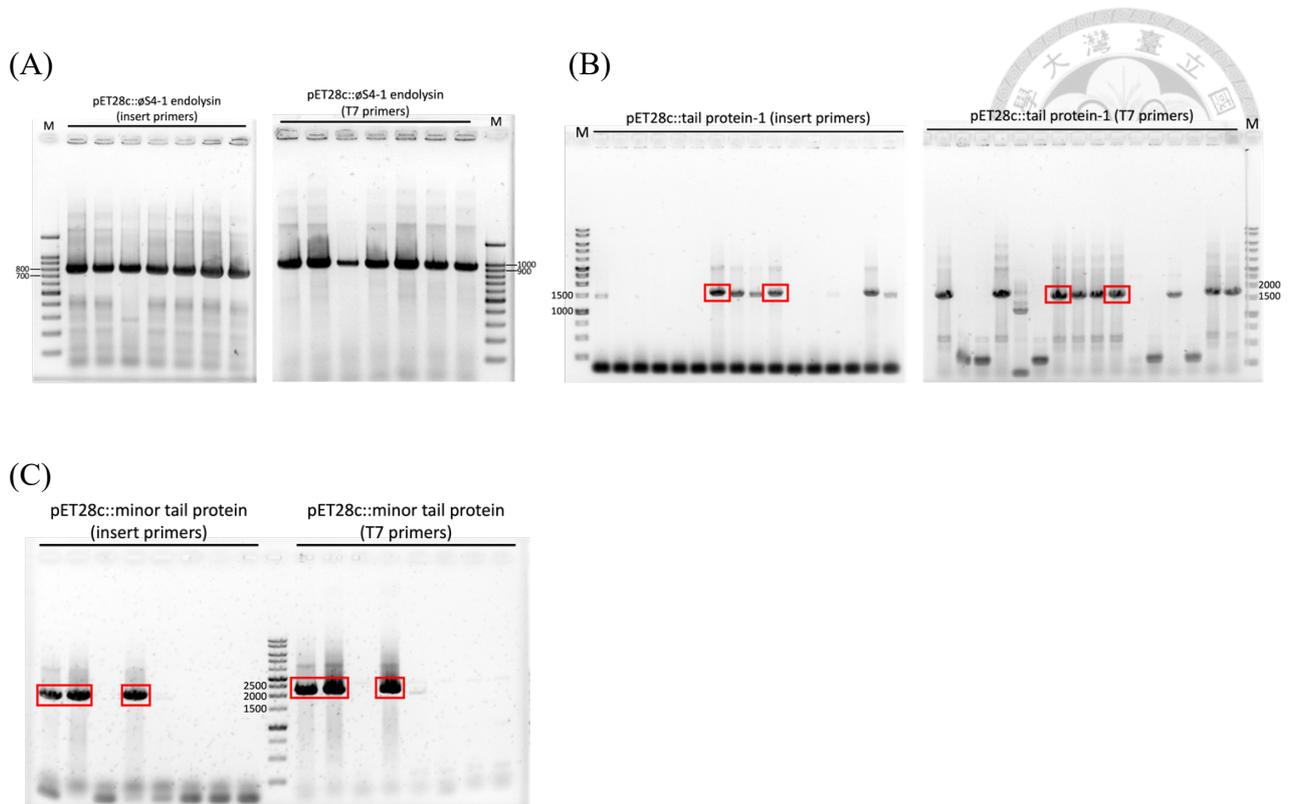
以 40 ng ϕ S4-1 DNA 檢體為模板進行 PCR 反應，再以 1%TAE 瓊脂凝膠電泳確認 PCR 產物大小。

(A) ϕ S4-1 endolysin，預計產物大小為 792 bp。

(B) ϕ S4-1 tail protein-1，預計產物大小為 1475 bp。

(C) ϕ S4-1 minor tail protein，預計產物大小為 1977 bp。

M：1 kb DNA ladder。



圖九、接合目標基因與質體 pET-28c，以熱休克轉移至菌株中

以兩對引子進行 PCR，以確認目標基因是否接合上質體 pET-28c，並成功轉移至菌株中。Insert primers 針對目標基因的頭尾所設計，T7 primers 則分別設計在 pET-28c 質體之多種限制酶酵素切位（multiple cloning site）的兩端，可確認目標基因是否成功接合上 pET-28c。

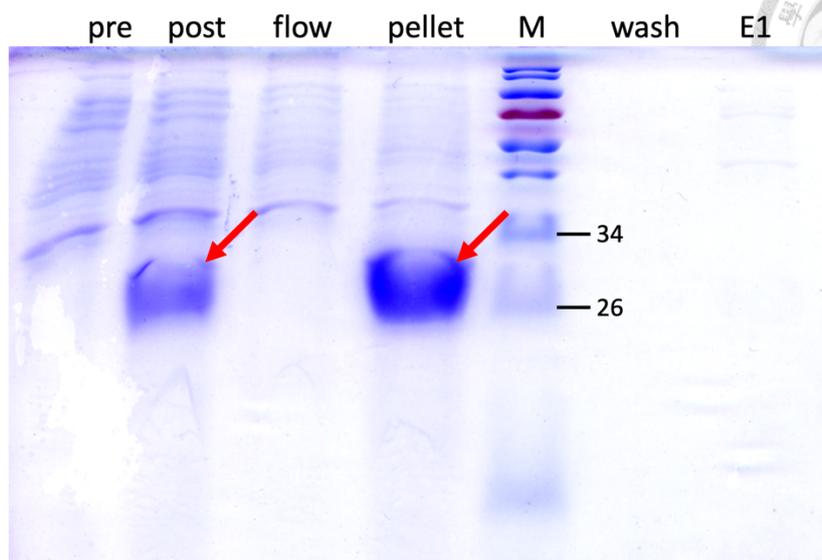
(A) øS4-1 endolysin 熱休克後的 PCR 結果，左圖使用 insert primers，預期大小為 792 bp，右圖使用 T7 primers，預期大小為 972 bp。

(B) tail protein-1 熱休克後的 PCR 結果，左圖使用 insert primers，預期大小為 1475 bp，右圖使用 T7 primers，預期大小為 1655 bp。符合預期大小的產物以紅框標示。

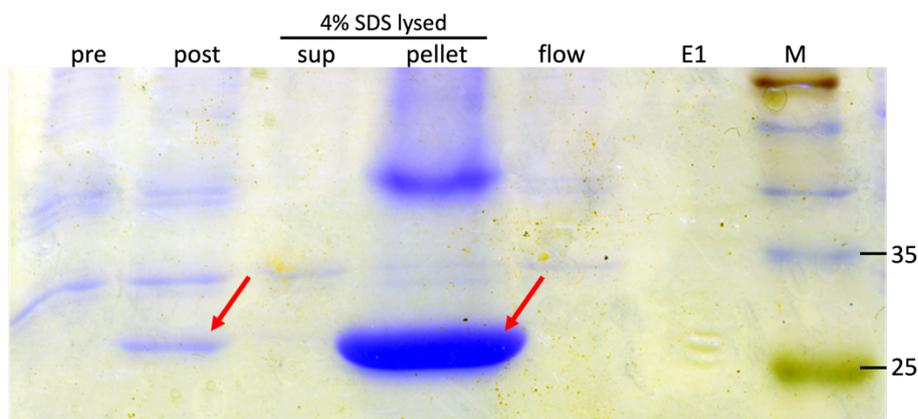
(C) øS4-1 minor tail protein 熱休克後的 PCR 結果，左圖使用 insert primers，預期大小為 1977 bp，右圖使用 T7 primers，預期大小為 2157 bp。符合預期大小的產物以紅框標示。



(A)



(B)

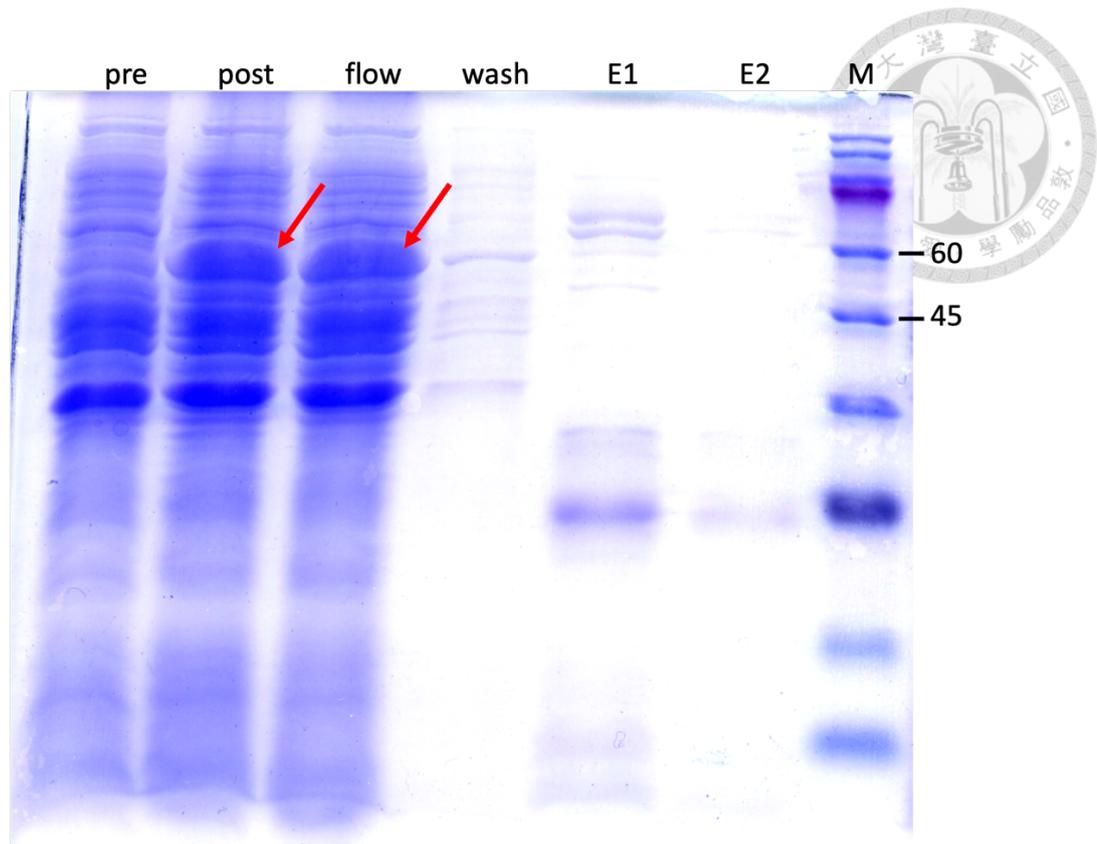


圖十、 σ S4-1 endolysin 蛋白的表現與純化

(A) σ S4-1 endolysin 的預期大小為 27.9 kDa。IPTG 可誘導預期大小之蛋白質生成 (post-induction, 以紅色箭頭標示), 然而破菌、離心後, 上清液所萃取之檢體如 flowthrough、wash、E1 上皆未觀察到該蛋白質, 僅離心沉澱物可觀察到 (pellet, 以紅色箭頭標示)。

(B) 重複操作 σ S4-1 endolysin 的表現與純化, 並以 4% SDS, 70°C 加熱處理破菌後之沉澱物。本次實驗有使預期大小之蛋白生成 (post-induction, 以紅色箭頭標示), 然而經 SDS 破菌後, 目標蛋白仍僅存在於沉澱物中 (4% SDS lysed pellet, 以紅色箭頭標示), 未能釋出到上清液中, 顯示其可能為非水溶性的蛋白。

M: SDS protein ladder、pre: pre-induction、post: post-induction、flow: flowthrough、sup: 4% SDS lysed supernatant。



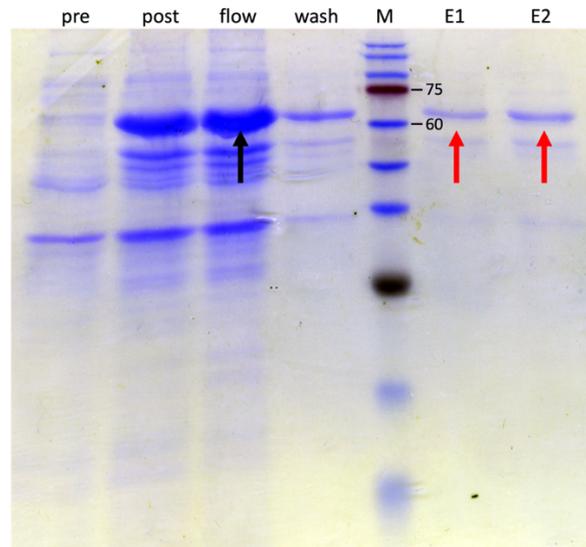
圖十一、øS4-1 tail protein-1 蛋白的表現與純化

øS4-1 tail protein-1 之預期大小為 54.75 kDa，IPTG 可誘發符合大小之蛋白質表現（post-induction 處，以箭頭標示），且此蛋白為水溶性，故能存在於離心後的上清液中（flowthrough 處，以箭頭標示）。然而此蛋白無法被磁珠抓取，故經沖提磁珠所收取的檢體（E1、E2）皆未觀察到該蛋白。

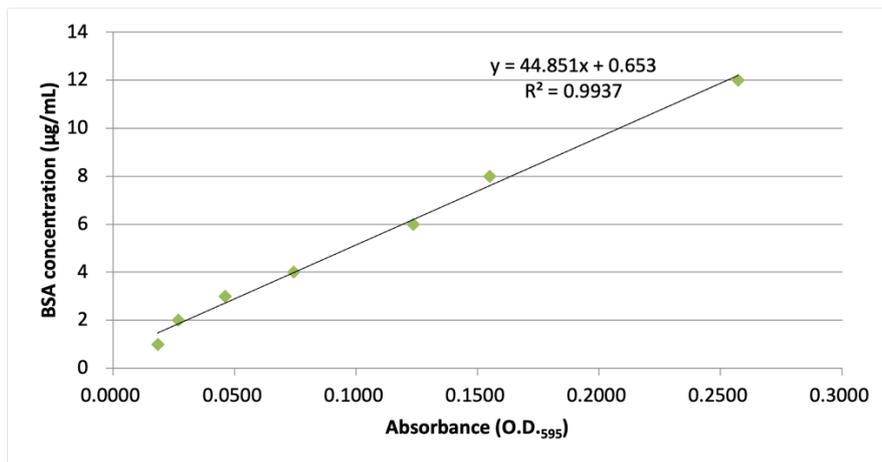
M：SDS protein ladder、pre：pre-induction、post：post-induction、flow：flowthrough。



(A)



(B)

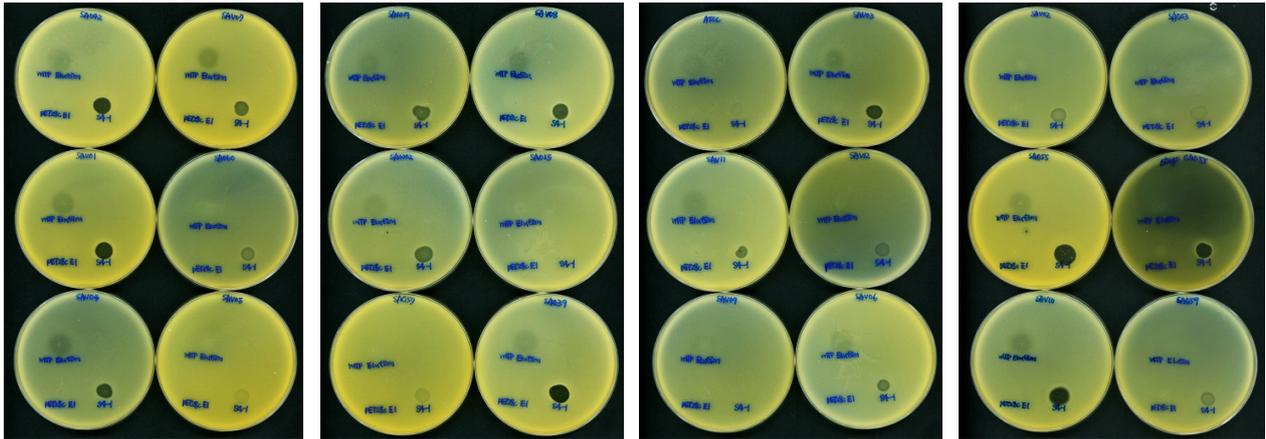
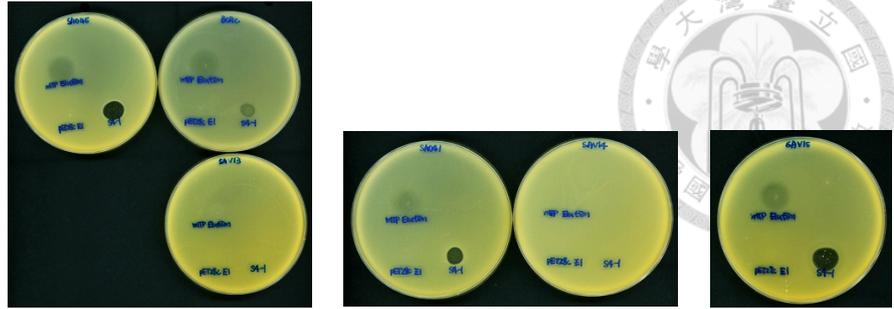
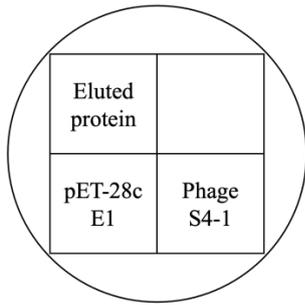


圖十二、 σ S4-1 minor tail protein 蛋白的表現與純化

(A) σ S4-1 minor tail protein 之預期大小為 71.82 kDa，結果顯示一接近 60 kDa 之蛋白被誘發表現，且此蛋白為水溶性，可釋出在離心後的上清液中（flowthrough 處，以黑色箭頭標示）。以 elution buffer 沖提後，該蛋白可被順利純化，產生符合誘發大小的條帶（E1 與 E2 處，以紅色箭頭標示）。

(B) 測量 σ S4-1 minor tail protein 所使用的標準曲線。橫軸為 O.D.₅₉₅ 下牛血清白蛋白溶液的吸光值，縱軸則為對應的蛋白濃度(µg/mL)，綠色方塊分別代表 1 µg/mL、2 µg/mL、3 µg/mL、4 µg/mL、6 µg/mL、8 µg/mL、12 µg/mL 之數值，計算出的判定係數為 0.9937。

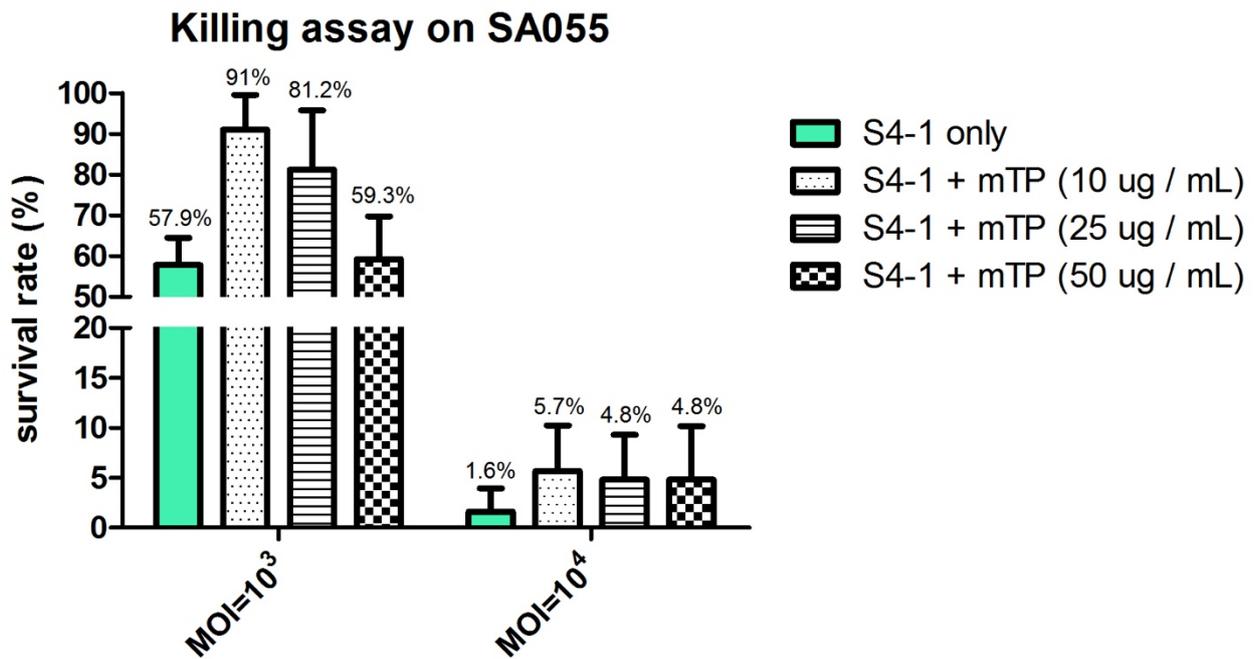
M：SDS protein ladder、pre：pre-induction、post：post-induction、flow：flowthrough。



圖十三、øS4-1 minor tail protein 的宿主種類範圍測試

取 øS4-1 minor tail protein 經表現、純化與濃縮後的蛋白檢體對 30 株金黃色葡萄球菌菌株進行點試驗，測試蛋白的抑菌活性。同時以質體未包含目標基因，且經相同表現與純化步驟所產生之 elution buffer 沖提液 (pET-28c E1) 作為陰性對照組，使用含 øS4-1 之噬菌體濾液作為陽性對照組。每種檢體取 5 μ L，以點試驗的方式滴加於 30 種不同金黃色葡萄球菌株的鋪盤上，隔夜培養後視溶菌圈透明程度給予價數 (表七)，左上方為滴加位置的示意圖。

Eluted protein : øS4-1 minor tail protein sample



圖十四、併用 ϕ S4-1 與 ϕ S4-1 minor tail protein 執行殺菌試驗

以 10 μ g/mL、25 μ g/mL 及 50 μ g/mL 三種濃度的 ϕ S4-1 minor tail protein 與噬菌體 ϕ S4-1 混合，執行 MOI = 1×10^3 、MOI = 1×10^4 兩劑量下的殺菌試驗。同時操作 MOI 相同，但只有噬菌體 ϕ S4-1 的組別做為對照。Scale bar 上顯示每組細菌存活率之平均值 (%)。兩種 MOI 皆執行三次獨立試驗，每次試驗皆為二重複。