

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

佳作

040704

超級注射筒 — 噬菌體

學校名稱：臺北市立成功高級中學

作者： 高一 薛舜中	指導老師： 洪敬承
---------------	--------------

關鍵詞：噬菌體、克雷伯氏肺炎桿菌、特異性

摘要

克雷伯氏肺炎桿菌是引起社區型肝膿瘍主要感染源，其莢膜型與致病力密切相關。這些克雷伯肺炎桿菌可能源自病人本身，亦可能來自家禽之排泄物。研究現，克雷伯肺炎桿菌可以存在雞的排泄物中，雞排泄物及附近環境汗水內的噬菌體可以殺死並抑制感染雞隻身上分離的沙門氏桿菌和大腸桿菌。這些異性的噬菌體可以用來當作雞隻感染這些細菌治療的方法之一。

本實驗包括了自雞糞內分出克雷伯氏肺炎桿菌以及自雞糞及市場雞攤旁之汗水分離出特異性之噬菌體。從十九個市場的雞糞和八個汗水檢體共分離出四株非人類常見之血清莢膜型克雷伯肺炎桿菌和十二株特異性的噬菌體。這些分離出之特異性噬菌體可提供日後作為克雷伯氏桿菌感染雞隻治療之用途。

研究動機

克雷伯氏肺炎桿菌為是引起社區型肝膿瘍主要感染病源，其莢膜型與致病力密切相關，且不同血清型在臨床感染上嚴重程度不一。傳統判別克雷伯氏菌莢膜型之方法是藉由抗血清免疫診斷，然而抗血清不僅來源有限，診斷程序費時，價格也十分昂貴，容易造成判讀困難，而延誤了黃金搶救時間。此外，在教授的實驗室與國外報告均發現使用血清進行莢膜型判定有很大的比例（約50%）為無法判定，包括沒有反應或與兩種以上血清均有反應，因此容易造成判讀上的困難。教授的實驗室希望進行新的莢膜定型方法(噬菌體分解莢膜型醣類)，以改進上述莢膜型之鑑定的缺點。

克雷伯氏肺炎桿菌是引起社區型肝膿瘍菌株中最常見為莢膜型K1, K2型。這些克雷伯肺炎桿菌可能源自病人本身（腸胃道），亦可能來自家禽（如雞）之排泄物。亦有研究指出，雞排泄物及附近環境汗水內的噬菌體可以殺死並抑制感染雞隻身上分離的彎曲桿菌，沙門氏桿菌，和大腸桿菌。這些特異性的噬菌體可以用來當作雞隻感染此三種細菌治療的方法之一。

第一部分之實驗為分離汗水中對克雷伯氏肺炎桿菌 K2 血清型特異性之噬菌體。而這次的先前實驗目的，是試著找出，單一對克雷伯氏肺炎桿菌 K2 感染的噬菌體，藉以熟悉克雷伯氏肺炎感菌噬菌體之相關研究方法和步驟。第二部份的實驗包括了自雞糞內分離出克雷伯氏肺炎桿菌以及嘗試自雞糞及市場雞攤旁之廢水中分離出特異性之噬菌體，以作為日後雞隻感染或人類感染時診斷與治療此菌感染之依據。

研究目的

第一部分之實驗目的，是試著找出，單一對 K2 感染的特異性噬菌體。

第二部份的實驗收集不同地點之雞糞以及市場雞攤旁之汗水分離出克雷伯氏肺炎桿菌以及嘗試自雞糞及汗水中分離出特異性之噬菌體，以作為日後雞隻感染或人類感染時診斷與治療此菌感染之依據。

研究設備及器材

微量吸管 (Pipetman)



恆溫培養箱 (Incubator)



離心機 (Centrifuge)



酒精燈

研究過程或方法

第一部分：分離汗水中對克雷伯氏肺炎桿菌 K2 血清型特異性之噬菌體

壹、收集汗水，將目標菌株和汗水一起培養

目的：增加汗水中潛在克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體的數量

- 一、採集汗水水樣(原水)
- 二、取隔夜培養之克雷伯氏肺炎桿菌 K2 血清型菌液，以 1:100 的比例加入新鮮培養液在 37°C 培養約兩小時 (O.D₆₀₀ 值約為 0.5)
- 三、取 0.5 mL 5X LB broth、2 mL 未經人為處理原水、以及 0.25 mL 新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液混合在 37°C 隔夜培養。

貳、自培養液中分離噬菌體

目的：去除培養基中的克雷伯氏肺炎桿菌，保留噬菌體

- 一、加入 1% (v/v) 三氯甲烷，於 37°C 搖晃 30 分鐘，再以 10,000g 離心 20 分鐘。
- 二、取上清液經 0.45 μm 針頭式過濾器過濾之。

參、塗點試驗

目的：確認汗水中是否含有克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體

- 一、新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液培養至 OD₆₀₀ 值約為 0.5~0.6。取 200 μL 菌液與 3 mL top agar (47 °C~50 °C) 混合後，倒於 LB agar 培養基上，等待凝固。
- 二、取 5 μL 噬菌體懸浮液，滴在前述之培養基上，待其乾燥後，置於 37 °C 隔夜培養，觀察溶菌斑生成情形。

肆、純化單一噬菌體株

目的：挑選不同型態的溶菌斑，確定純化後的噬菌體為單株

- 一、自噬菌體懸浮液中取 100 μL，進行連續稀釋(10⁻¹~10⁻⁵)。各稀釋過後之濾液取出 100 μL，分別與 100 μL 新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液共同培養靜置於 37 °C，15~20 分鐘
- 二、加入 3 mL top agar (47 °C~50 °C) 混合，並倒於 LB agar 培養基上，等待凝固後，置於 37 °C 隔夜
- 三、觀察溶菌斑(plaque)是否形成，若有，將單株挑起，並加入 0.5 mL SM buffer，在室溫下混合 1~2 小時，再加入數滴三氯甲烷，即可得到含有噬菌體之懸浮液。

伍、進行噬菌體增生

目的：使噬菌體感染宿主並於體內複製增生，取得高濃度噬菌體以利往後實驗

- 一、將 5 mL 新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液培養到測量 OD₆₀₀(波長 600 nm)的吸光值約為 0.5~0.6，加入 250 μ L 含有噬菌體之懸浮液混合後，置於 37 °C 隔夜培養。
- 二、加入 200 μ L 三氯甲烷，於 37°C 搖晃 15~20 分鐘。
- 三、於 4°C，10,000 g 離心 15 分鐘。收取上清液並以 0.45 μ m 針頭式過濾器過濾之。隨後加入 1% (v/v)三氯甲烷，保存於 4°C，或加入 DMSO，保存於 -80 °C。

陸、噬菌體溶菌斑效價分析

目的：為了解噬菌體增生情形或對於菌株的感染力，利用溶菌斑效價分析來計數噬菌體數目。

- 一、將經過數代增殖所得之含噬菌體懸浮液，以 SMbuffer 進行連續稀釋 (10^{-1} ~ 10^{-10})，取出 100 μ l 稀釋過後之各濾液，分別與 100 μ l 新鮮克雷伯氏肺炎桿菌液共同培養靜置於 37 °C，15~20 分鐘。
- 二、加入 3mL top agar，(47 °C~50 °C)混合後，倒於 LB agar 培養基上，等待凝固後置於 37 °C 隔夜培養，觀察並記錄溶菌斑生成數，並回推原始噬菌體懸浮液中噬菌體數目。

柒、專一性測試

目的：將純化過後之噬菌體感染各種不同血清型的克雷伯氏肺炎桿菌以測試噬菌體的專一性。

- 一、將各種不同血清型的新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液培養至 OD₆₀₀ 值約為 0.5~0.6。取 200 μ l 菌液與 3mL top agar(47 °C~50 °C)混合後，倒於 LB agar 培養基上，等待凝固。
- 二、取 3 μ l 噬菌體懸浮液，滴在前述之培養基上，待其乾燥後，置於 37 °C 隔夜培養，觀察溶菌斑生成情形。

第二部分:自雞糞及市場雞攤旁之汙水分離克雷伯氏肺炎桿菌和純化克雷伯氏肺炎桿菌特異性噬菌體

目的:收集雞糞以及市場雞攤旁之汙水,從中出克雷伯氏肺炎桿菌,將菌和雞糞水共同培養,分離出可能含有噬菌體的水層,以塗點試驗確認是否含有克雷伯氏噬菌體,純化單一噬菌體株,進行噬菌體增生,噬菌體溶菌斑效價分析。

壹、自雞糞及汙水中分離克雷伯氏肺炎桿菌

目的:確認雞糞中是否有克雷伯氏肺炎桿菌存在,若有則作為純化噬菌體的目標菌株。

- 一、採集雞糞檢體以及市場雞攤旁之汙水。
- 二、將檢體以及汙水種在 eosin methylene blue (EMB) agar 上並在 37°C 隔夜培養。
- 三、取粉紅色黏稠狀的菌落,接種於 Enterotube 並在 37°C 隔夜培養。
- 四、觀察 Enterotube 生化反應結果並對照克雷伯氏肺炎桿菌之標準確認是否為該菌株。

貳、將菌和汙水共同培養,分離出可能含有噬菌體的水層(市場一至五的汙水與 KP1 培養,市場六汙水與七種血清型之標準菌株以及 KP1, KP2 與 KP3 培養,市場七和八與七種血清型之標準菌株以及 KP1, KP2, KP3 及 KP4 培養)

目的:增加汙水中潛在克雷伯氏桿菌噬菌體的數量。

- 一、取隔夜培養之克雷伯氏桿菌菌液,以 1:100 的比例加入新鮮培養基在 37 °C 培養約兩小時(OD600 值約為 0.5)。
- 二、取 0.5mL 5X LB broth、2mL 未經人為處理原水、以及 0.25mL 新鮮克雷伯氏肺炎桿菌菌液混合在 37°C 隔夜培養。

參、自培養基中分離噬菌體

目的:去除培養基中的克雷伯氏桿菌,保留噬菌體。

- 一、加入 1% (v/v) 三氯甲烷,於 37°C 搖晃 30 分鐘,再以 10,000g 離心 20 分鐘。
- 二、取上清液經 0.45 μm 針頭式過濾器過濾之

肆、塗點試驗

目的:確認汙水中是否含有克雷伯氏桿菌噬菌體。

- 一、新鮮克雷伯氏桿菌菌液培養至 OD600 值約為 0.5~0.6。取 200 μl 菌液與 3mL top agar (47 °C~50 °C) 混合後,倒於 LB agar 培養基上,等待凝固。
- 二、取 5 μl 噬菌體懸浮液,滴在前述之培養基上,待其乾燥後,置於 37 °C 隔夜培養,觀察溶菌斑生成情形。

伍、純化單一噬菌體株（同上）

陸、進行噬菌體增生（同上）

柒、噬菌體溶菌斑效價分析（同上）

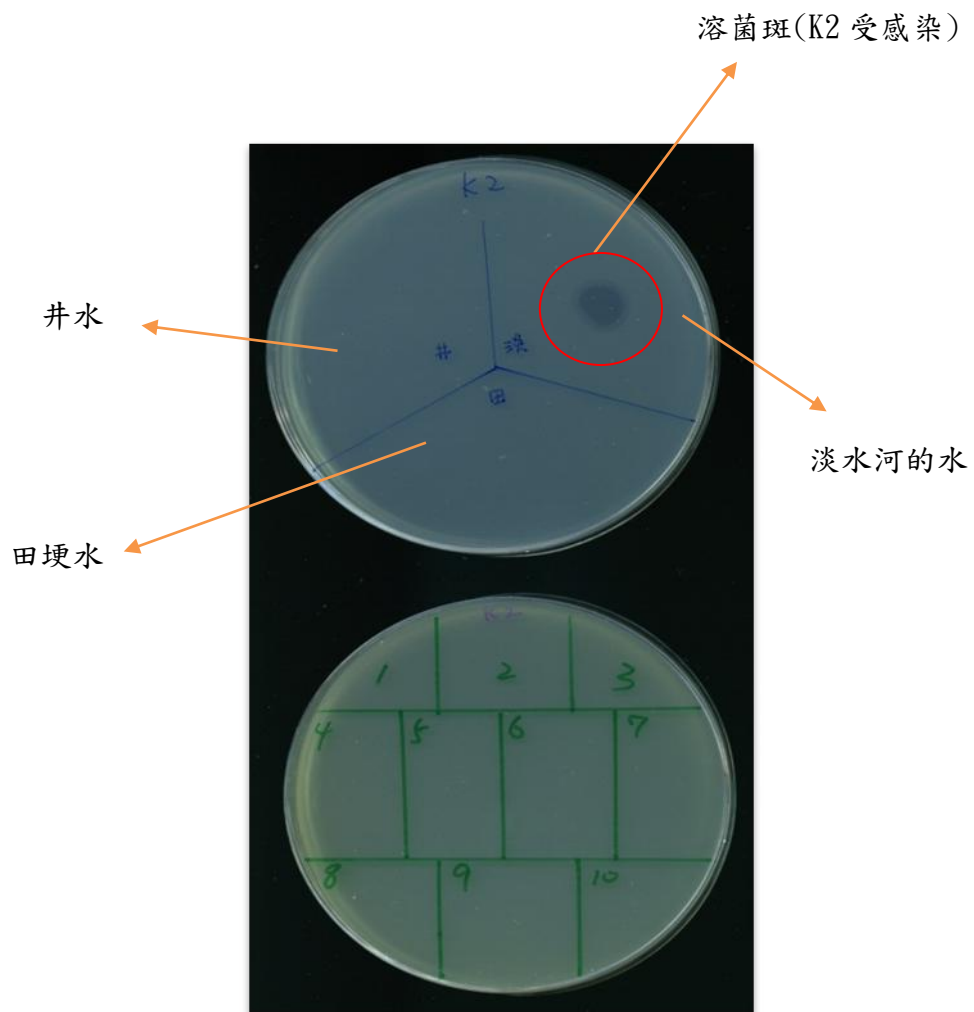
捌、專一性測試（同上）

研究結果

第一部分：分離汗水中對克雷伯氏肺炎桿菌 K2 血清型特異性之噬菌體

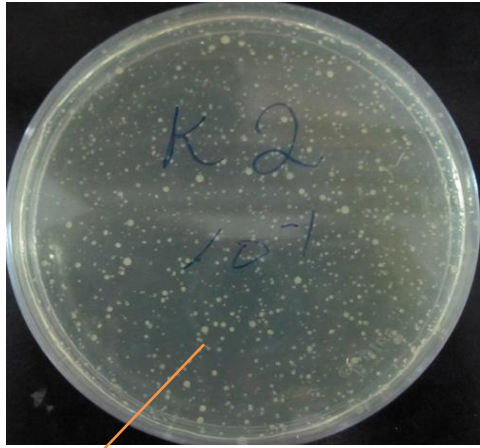
參. 塗點試驗

目的： 確認汗水中是否含有克雷伯氏肺炎桿菌噬菌體



肆. 純化單一噬菌體株

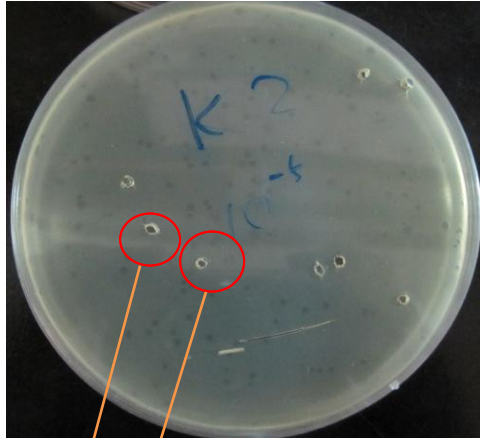
目的：挑選不同型態的溶菌斑，確定純化後的噬菌體為單株



無法清楚分辨單株溶菌斑



稀釋不夠(噬菌體過多)



將單株挑起，進行噬菌體純化

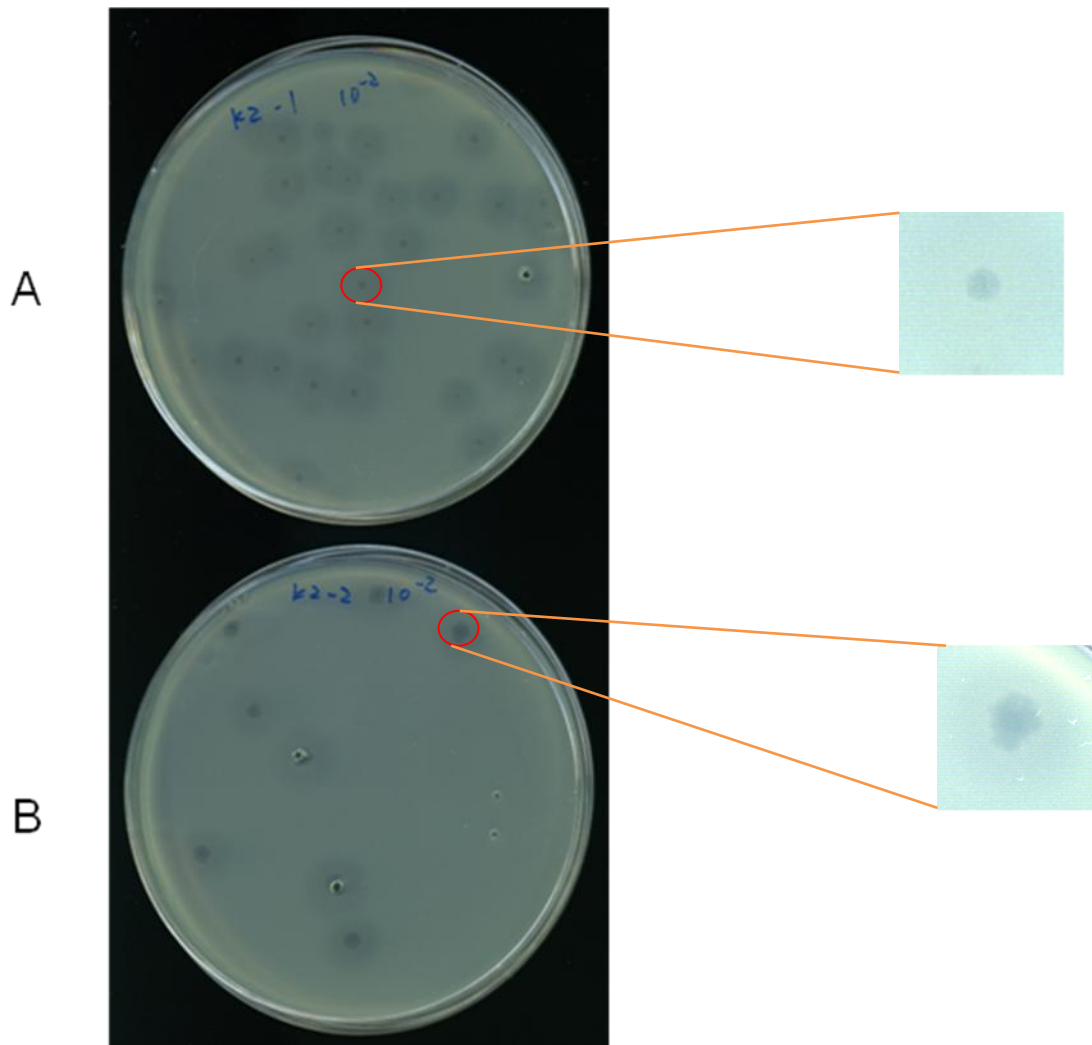


單株溶菌斑清楚分開



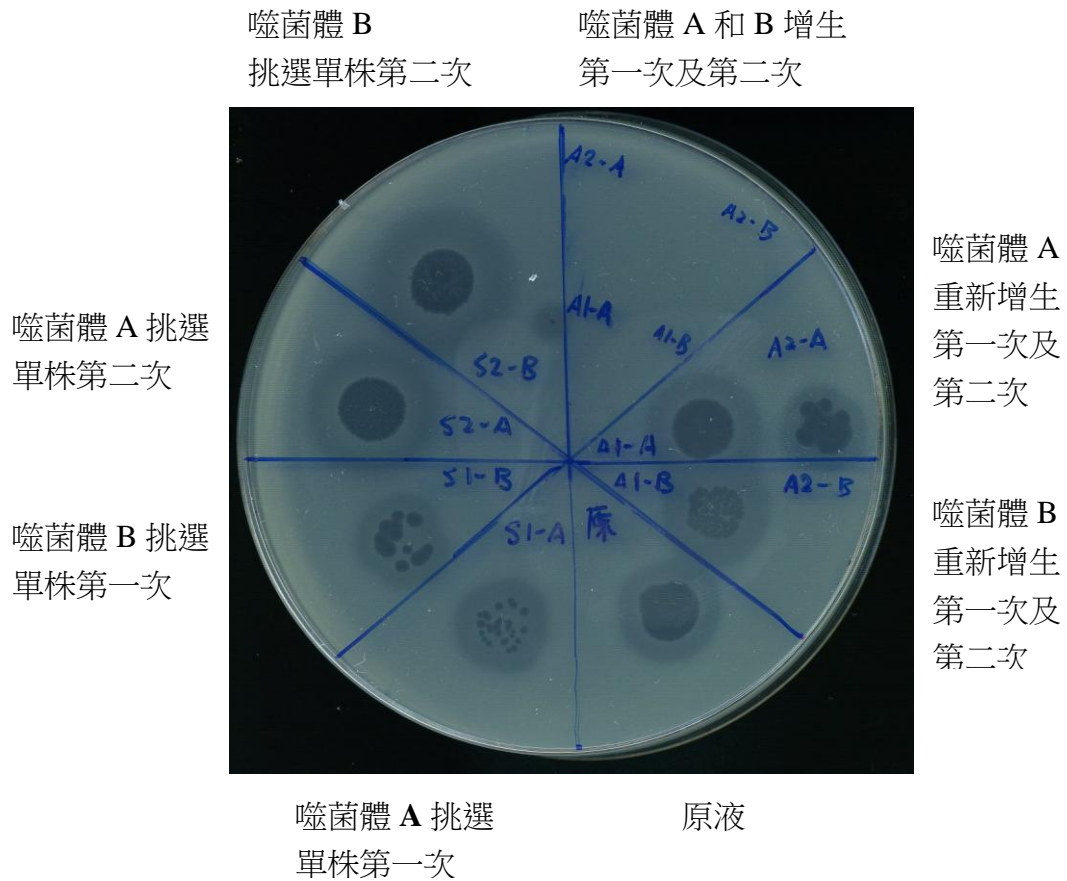
稀釋過多

接續肆、三、步驟挑選出兩株溶菌斑型態不同的噬菌體株，一株之溶菌斑中心較小，溶菌斑邊緣呈圓形(A)；另一株中心較大，溶菌斑邊緣呈不規則波浪形(B)。



陸、噬菌體溶菌斑效價分析

目的：為了解噬菌體增生情形或對於菌株的感染力，利用溶菌斑效價分析來計數噬菌體數目。



噬菌體A(溶菌斑較小者)及B進行增生，每回連續進行增生步驟兩次(標示為A1, A2)第一回放大後進行效價分析，發現每組連續稀釋並無溶菌斑產生，顯示噬菌體效價並沒有放大；重新自單株懸浮液再放大，之後進行塗點分析，觀察溶菌斑大小，結果顯示放大後之效價並無提高。

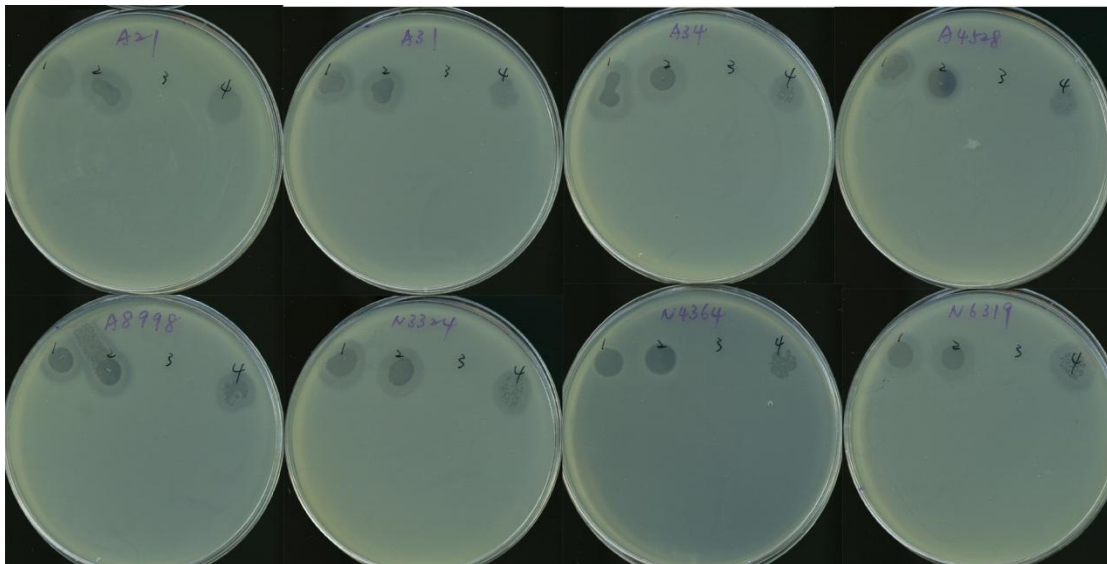
柒、專一性測試

目的：將純化過後之噬菌體感染各種不同血清型的克雷伯氏肺炎桿菌以測試噬菌體的專一性。

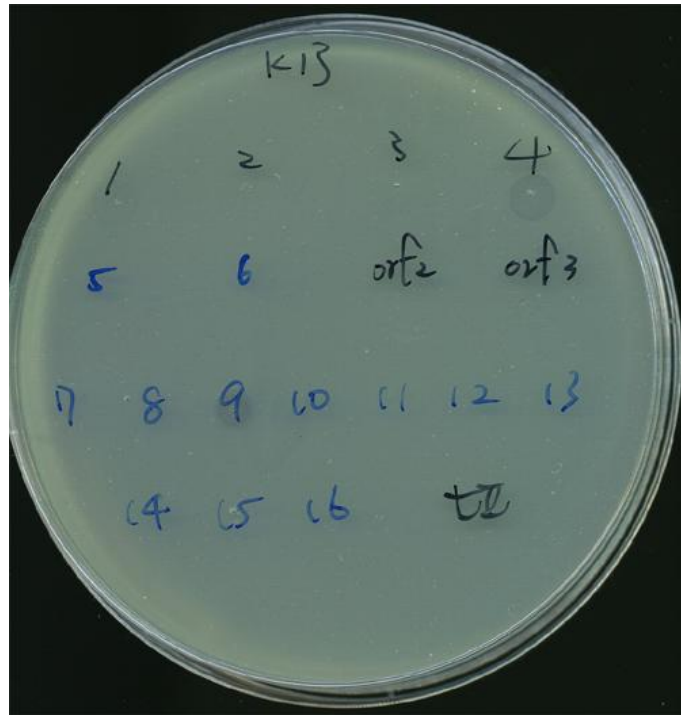


1 為噬菌體 A

2 為噬菌體 B

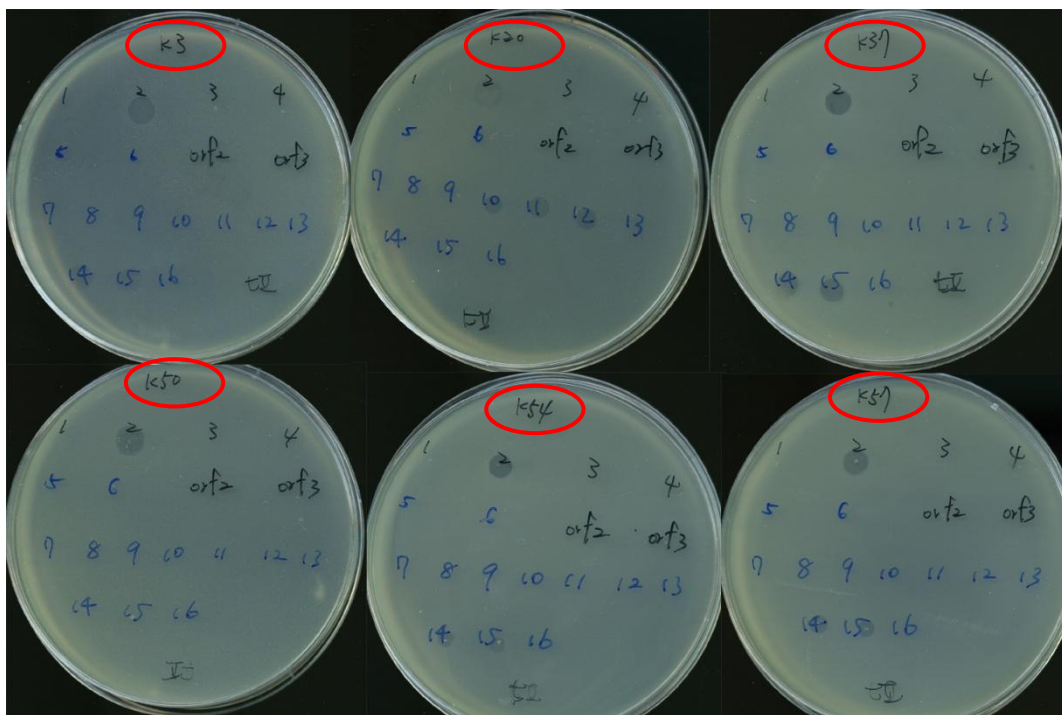


以上八株皆為血清型 K2 的菌株，噬菌體 A 和 B 皆可感染血清型 K2 菌株。



噬菌體 A 另可感染血清型 K13

噬菌體 B 則可感染血清型 K3, K20, K37, K50, K54 和 K57



第二部分:自雞糞及市場雞攤旁之汙水分離克雷伯氏肺炎桿菌和純化克雷伯氏肺炎桿菌特異性噬菌體

表一. 雞糞檢體及汙水來源

	市場 1	市場 2	市場 3	市場 4	市場 5	市場 6	市場 7	市場 8
雞糞	1 (KP1)	3	6	8	9	11	14 (KP4)	17
	2	4	7		10	12	15	18
		5				13	16	19
汙水		A	B	C	D	F (KP2, KP3)	G	H
					E			

壹、自雞糞及場雞攤旁之汙水中培養克雷伯氏肺炎桿菌

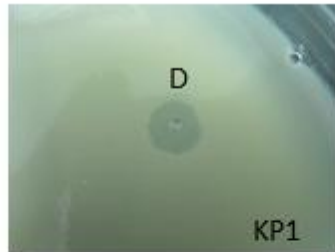
採集之 19 個雞糞檢體以及 8 處雞糞水水樣，有 4 個檢體培養出克雷伯氏肺炎桿菌(KP-1, KP-2, KP-3, KP4)。這些菌株部分 (KP1, KP2,和 KP3) 對常用抗生素如磺胺類和奎諾酮類或胺基醣酐類抗生素有抗藥性。

分離克雷伯氏肺炎桿菌



雞糞接種於EMB agar上,取呈現粉紅色的菌,再次接種於EMB agar上確認為單一菌株

貳、 汗水 D 中含有針對克雷伯氏肺炎桿菌 KP1 之特異性噬菌體，汗水 F 中含有針對血清型 K54, K57, N1 以及 KP2 和 KP3 之特異性噬菌體，汗水 H 中含有針對血清型 K1, K2, K57, N1 以及 KP1 和 KP3 之特異性噬菌體。



汗水D與KP1培養後過濾之濾液進行塗點試驗可在鋪好KP1之培養基上產生溶菌斑

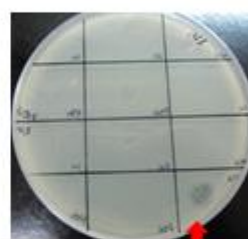
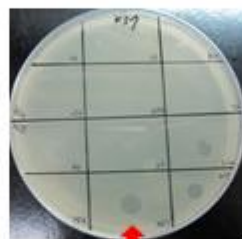
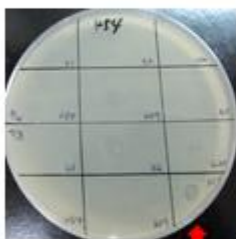


1: 汗水F與KP2菌液共同培養之噬菌體濾液
 2: 汗水F與KP3菌液共同培養之噬菌體濾液
 兩濾液分別可在當初共同培養之菌產生溶菌斑

K54

K57

N1



照片中箭頭處由左至右分別是血清型N1, K57以及N1與汗水F培養後所得濾液分別滴在鋪好K54, K57以及N1菌的培養基上



照片中由左至右箭頭所指處分別是K1, K2和K57與汗水H培養後之濾液分別滴在鋪好K1, K2和K57的培養基上



照片中由左至右箭頭所指處分別是N1, KP1和KP3與汗水H培養後之濾液分別滴在鋪好N1, KP1和KP3的培養基上

表二. 各個來源之汗水得到之噬菌體溶液編號

汗水	分離出的噬菌體 No.(與不同血清型 KP 培養純化之噬菌體溶液)
D	4 (KP1)
F	1 (K54), 2 (K57), 3 (N1), 5 (KP2), 6 (KP3)
H	7 (K1), 8 (K2), 9 (K57), 10 (N1), 11 (KP1), 12 (KP3)

參、將各噬菌體濾液進行連續稀釋後挑選單株，並且觀察溶菌斑型態是否相同確保所得為單株噬菌體

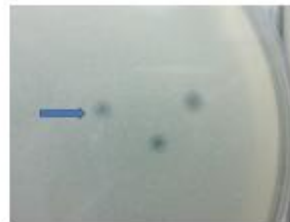
挑選單株後的噬菌體溶菌斑



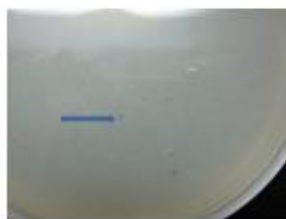
1(K54)



2(K57)



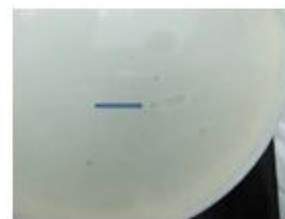
3(N1)



4(KP1)



5(KP2)



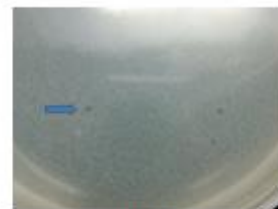
6(KP3)



7(K1)



8(K2)



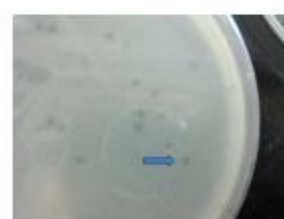
9(K57)



10(N1)



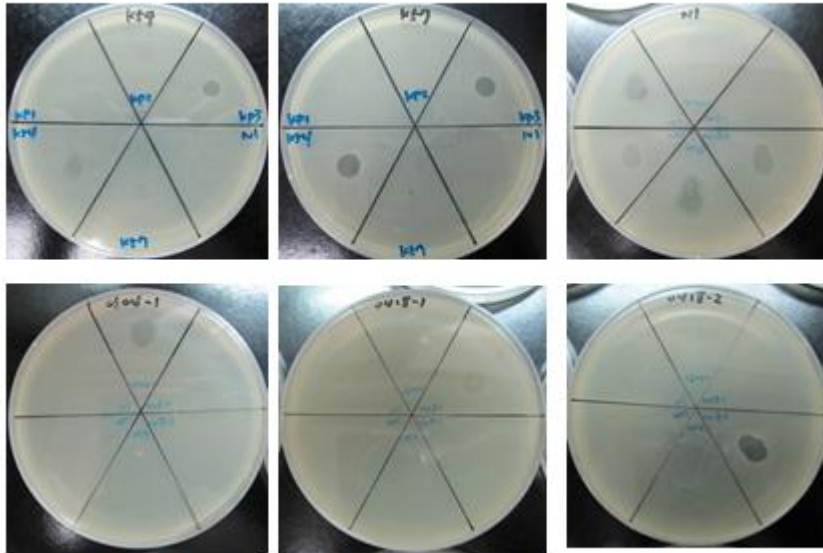
11(KP1)



12(KP3)

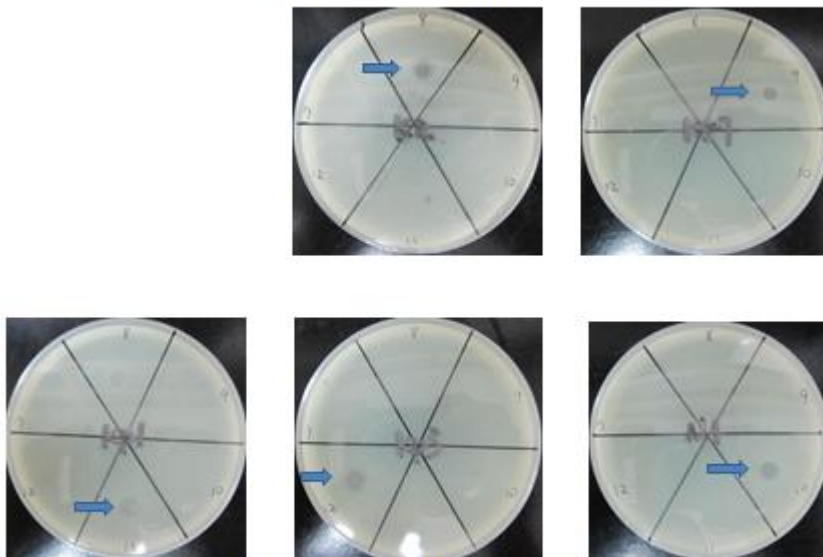
肆、將所得之噬菌體單株溶液分別滴在不同血清型以及自雞糞或汙水分離之 KP 菌上測試其專一性

噬菌體專一性測試(No.1~6)



各培養皿鋪好不同血清型K.P., 劃分區域後在各區滴入純化過後的噬菌體溶液 (1-6)

噬菌體專一性測試(No.7~12)



各培養皿鋪好不同血清型K.P., 劃分區域後在各區滴入純化過後的噬菌體溶液 (7-12)

表三. 各噬菌體溶液之專一性

	K1	K2	K5	K20	K54	K57	N1	KP1	KP2	KP3	KP4
1	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
2	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
6	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	-
7	1										
8	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

討論

- 壹、 從十九個市場的雞糞和八個汗水檢體共分離出四株非人類常見之血清莢膜型 (非 K1, K2, K5, K20, K54, K57 和 N1) 克雷伯氏肺炎桿菌和十二株特異性的噬菌體，其中一株噬菌體 (編號 7) 在實驗過程中無法存活而無法完成該株噬菌體之特異性分析，只知此株可以分解 K1 的克雷伯氏肺炎桿菌。
- 貳、 經由特異性測試發現其中三種噬菌體 (編號 1,2,6) 可以感染多種不同莢膜型的克雷伯氏肺炎桿菌(K54,K57 和 N1)，推測此噬菌體可能具有多種分解不同莢膜之糖解酵素。
- 參、 從汗水分離出來的噬菌體 (編號 4, 5, 11 和 12) 可以分別感染由雞糞分離出來的克雷伯氏肺炎桿菌，如編號 4 和 11 的噬菌體可以感染 KP1，編號 5 的噬菌體可以感染 KP2，編號 12 之噬菌體可以感染 KP3，代表這四株噬菌體可以用來做為由雞糞及汗水分離出來的克雷伯氏肺炎桿菌之分型用。編號 8 噬菌體對人類分離的克雷伯氏肺炎桿菌 K2 型有特異性；編號 9 噬菌體對人類分離的克雷伯氏肺炎桿菌 K57 型有特異；編號 10 噬菌體對人類分離的克雷伯氏肺炎桿菌 N1 型有特異，代表這三株噬菌體可能可以用來做為人類分離出的克雷伯氏肺炎桿菌莢膜型 K2, K57 和 N1 之分型用

結論

第一部分之實驗為分離汗水中對克雷伯氏肺炎桿菌 K2 血清型特異性之噬菌體。透過了對噬菌體之認識與實驗方法之熟悉，第二部份的實驗包括了自雞糞內分出克雷伯氏肺炎桿菌以及嘗試自雞糞及市場雞攤旁之汗水檢體中分離出特異性之噬菌體。本實驗從十九個市場的雞糞和八個汗水檢體共分離出四株非人類常見之血清莢膜型 (非 K1, K2, K5, K20, K54, K57 和 N1) 克雷伯肺炎桿菌和十二株特異性的噬菌體，日後會增加雞糞和汗水檢體的數量，找出更多的克雷伯氏肺炎桿菌和特異性的噬菌體。這些分離出之特異性噬菌體可提供日後作為日後雞隻感染或人類感染克雷伯氏桿菌時診斷與治療此菌感染之依據感染雞隻治療之用途。

希望未來進一步解開特異性噬菌體基因體序列後，可再深入研究分解糖類的基因，最後應用於臨床診斷，對人類醫療以及科學發展能有所貢獻。

參考資料及其他

1. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 50:589-603.
2. Sahly, H., & Podschun, R. (1997) Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4:393-399.
3. Pan, Y. J., Fang, H. C., Yang, H. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Tsai, F. C., Keynan, Y., & Wang, J. T. (2008). Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol*, 46:2231-2240.
4. Gaston, M. A., Ayling-Smith, B. A., & Pitt, T. L. (1987). New bacteriophage typing scheme for subdivision of the frequent capsular serotypes of *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*, 25:1282-1232.
5. Kim, S. H., Wei, C. I., Tzou, Y. M., & An, H. (2005). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J Food Prot*, 68:2022-2029.
6. Vandeplass S, Dubois Dauphin R, Beckers Y, Thonart P, Théwis A. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *J Food Prot*. 2010;73:774-85.
7. Oliveira, A., Sillankorva, S., Quinta, R., Henriques, A., Sereno, R., & Azeredo, J. (2010). Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *J Appl Microbiol*, 106:1919-1927.
8. Lau, G. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Hair-Bejo, M., Jalila, A., & Ho, Y. W. Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens. *Poult Sci*, 89:2589-2596.
9. Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., & Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 71:6554-6563.

(以上文獻對於自己閱讀不易，所以請教授與學姊擷取重點翻譯口述)

感謝

感謝教授，老師和研究室學長學姊的指導。

【評語】 040704

此作品從雞糞，污水中分離出克雷伯氏肺炎桿菌及噬菌體。其結果發現九株非莢膜型克雷伯肺炎桿菌及 25 株特異性的噬菌體。建議應以電子顯微鏡觀察這些噬菌體的構造型態、測量這些噬菌體感染細菌的生長曲線，鑑定其為 DNA 或 RNA 病毒。若能進行克雷伯氏桿菌所感染雞隻之噬菌體治療的動物實驗，則此研究更有價值。