

結果

一、噬菌體的分離

為了篩選能分解具 ESBL 的克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 之噬菌體, 我們以本實驗室先前篩選到的具 ESBL 之克雷伯氏肺炎桿菌的一些菌株如 K6、K55 等, 和可以作為噬菌體宿主細胞的 *Klebsiella pneumoniae* 10693 當作 indicator cell, 將中國醫藥學院附設醫院所收集之液體 (如尿液、脊椎液、膽液、痰液、廢液等等.....) 之上清液, 利用點測試法 (spot test) 大量篩選噬菌體。在 254 個液體檢體中, 我們分離到 12 隻暴裂型噬菌體 (lytic bacteriophage), 分別命名為 KPP2, KPP3, KPP4, KPP5, KPP6, KPP7, KPP10, KPP11, KPP30, KPP42, KPP50 和 KPP95。

二、暴裂型噬菌體的基本性質

1. 感染宿主的能力：

為了測試這些噬菌體在相同情況下 (在菌液相同濃度下, 感染相同 MOI 的噬菌體), 感染宿主的能力差別 (即測 titer), 所以取含 3 ml LB broth 的小空瓶 12 個, 各加入隔夜培養後 OD₅₅₀ 約 3-4 的 *K. pneumoniae* 10693 菌液 100 μ l, 然後繼續培養至 OD₅₅₀ 約 0.3 後分別加入噬菌體, 使每個 MOI 都是 0.1, 接著培養至細菌細胞裂解 (lysis), 各從中取 1 ml 出來, 離心後取其上清液系列稀釋測 titer。各個 titer 之結果如 Table 2, 從表中可以看出這 12 隻暴裂型噬菌體感染宿主的能力差異不大, 其 titer 大約為 $1-5 \times 10^9$ PFU/ml。

2. 電子顯微鏡下的外形 (Morphology)：

接著我們取這些暴裂型噬菌體中的 KPP3, KPP30, KPP42 和 KPP95, 以 2% UA (Uranyl acetate) 負染後照電子顯微鏡, 這些噬菌體的外形於電子顯微鏡下 (Fig. 1.), 可看到具有略長 (moderately elongated) 之二十面體的頭部 (icosahedral head), 接著連接含有一圈圈 tail sheath 的 tail, tail 下接著一個 base plate。其大小分別為：

KPP3 有一長 101.2 nm, 寬 65.8 nm 的 icosahedral head, 接著連接含有一圈圈 tail sheath 的 tail (長 89.8 nm, 寬 15.2 nm), tail 下接著一個 base plate。 KPP30 的 icosahedral head 長為 103.8 nm, 寬為 73.4 nm, 連接著含有一圈圈 tail sheath 的 tail (長 101.3 nm, 寬 18.9 nm), tail 下接著一個 base plate。 KPP42 具有一長 91.1 nm, 寬 57 nm 的 icosahedral head, 接著為長 88.6 nm, 寬 17.7 nm 含有一圈圈 tail sheath 的 tail, 然後是一個 base plate。 而 KPP95 的 icosahedral head 則長 107 nm, 寬 72 nm, 接著連接含有一圈圈 tail sheath 的 tail (長 100 nm, 寬 13 nm), base plate 再接於其下。 由這些電顯圖呈現出的結果, 我們發現噬菌體 KPP3, KPP30, KPP42 和 KPP95 的外形類似 T4-type 噬菌體 (T4 噬菌體是一被廣泛了解的 *E. coli* lytic coliphage)。

3. 限制? *EcoRV* 切割暴裂型噬菌體的 DNA 之結果:

我們抽取各個噬菌體的 DNA 後, 取 5 μ l 以 *EcoRV* 切取隔夜, 接著以 1% agarose gel 進行電泳分析如 Fig. 2. 所示, 因為全部都可被限制? *EcoRV* 切割成大大小小的 DNA 片段, 所以這些噬菌體應該都是具有雙股 (double-stranded) DNA 的遺傳物質, 而從中也可看出切取的形式 (pattern) 都非常相似。

4. 暴裂型噬菌體的 genome 大小:

因為這 12 隻暴裂型噬菌體感染宿主的能力差不多 (其 titer 都在 10^9 PFU / ml 左右), 而且他們的 DNA 以限制? *EcoRV* 切取的結果形式 (pattern) 也很相像, 加上 KPP3, KPP30, KPP42 和 KPP95 其外形大小在電顯下都與 T4 噬菌體相似, 所以我們推論這 12 隻暴裂型噬菌體應該是同一類的噬菌體, 而 T4 噬菌體其 genome 大小約為 168 kb, 所以我們推論他們的 genome 大小也與 T4 噬菌體相似, 又因為一般電泳約可決定 20 kb 以下的 DNA 大小, 但是 20 kb 以上的 genome 就必須以脈衝電泳法 (PFGE) 來決定; 脈衝電泳法是一種分離大片段 DNA 分子的電泳方式, 其原理跟一般電泳分析一樣, 只是電泳期間會週期性改變電場方向, 強迫 DNA 分子放鬆及拉長來進行數千 kb 的 DNA 片段分離。 所以我們取各個噬菌體液 (titer: 約 10^9 PFU / ml) 與 1% low melting temperature agarose 混合凝固成 agarose insert, 經 ESP solution 於 50 去除蛋白質 24 小時並於 0.5 M EDTA 清洗完後, 以電壓 200 V, initial time 為 1 秒, final time 為 40 秒, 在 14 下連續跑電泳 16 小時, 經 EtBr 染液染色及去離子水退染後, 於 UV 光下觀察的結果如 Fig. 3. 所示; 由圖中我們可

看出這 12 隻暴裂型噬菌體的 gemone 大小都差不多，估計約介於 170-180 kb 之間，與 T4 噬菌體 genome 大小相近。

5. 總結：

由這 12 隻暴裂型噬菌體的基本性質，如相似的 titer (約 10^9 PFU/ml) 相似的限制? *EcoRV* 切取之形式 (pattern) 相似的 gemone 大小 (約 170-180 kb) 及部分噬菌體相似的外形結構，我們推論 KPP2, KPP3, KPP4, KPP5, KPP6, KPP7, KPP10, KPP11, KPP30, KPP42, KPP50 及 KPP95 應屬同一類噬菌體。於是我們隨機取 KPP95 進行更深一步的特性研究。

三、噬菌體 KPP95 之特性研究

KPP95 如於 400 ml LB broth 中培養，其 titer 可高達每毫升約有 3×10^{10} PFU (plaque forming units) KPP95 噬菌體之外形及 genome 大小如同前面所述。其外形於電子顯微鏡下 (Fig. 1., D and E), 可看到與 T4-type 噬菌體有相似的結構與型態; 而 KPP95 genome 大小可利用脈衝電泳法如 Fig. 4. 所示, 估計約介於 170-180 kb 之間, 與 T4 噬菌體 genome 大小相近。

1. *K. pneumoniae* 10693 之生長與細菌烈解 (bacteriolysis) 之曲線：

為了了解 KPP95 感染其宿主後細菌烈解 (bacteriolysis) 的情形，於是我們測試 *K. pneumoniae* 10693 之生長與細菌烈解 (bacteriolysis) 之曲線，實驗分兩組，一組在 37°C 下於 40 ml LB 培養液中以起始 OD_{550} 是 0.05 時開始培養 *K. pneumoniae* 10693，並測時間 0 點和每 30 分鐘後之 OD 值，直達到 stationary phase 為止 (此時吸光值不再上升)。同時另一組在上述情況下培養 1.5 小時後 (OD_{550} 約 0.5) 感染適量噬菌體 KPP95 (titer: 10^9 - 10^{10} PFU/ml) 使 MOI 達到 0.1，繼續每隔 30 分鐘測試其 OD 值並觀察 OD 值變化的情形，最後將兩組測得數據製成圖表 (time-log OD_{550} 之半對數曲線) 如 Fig. 5. 所示, *K. pneumoniae* 10693 於 log phase 時每隔半個小時其 OD_{550} 的數值就變為原來的兩倍，顯示其生長速度為約每 30 分鐘複製一子代，與 *Escherichia coli* 差不多，而於 7 個小時後， OD_{550} 的數值差不多就不再增加，約為 5 左右，此時即達 stationary phase。*K. pneumoniae* 10693 在培養 1.5 小時被噬菌體

KPP95感染後，OD₅₅₀值緩慢增加，然而於2小時的時間點即可看出其OD₅₅₀值與沒有感染KPP95的控制組有些微差異，接著在2.5小時後就不再上升，數值也漸漸往下掉，與控制組的數值差異也愈大，而且可看到培養液逐漸澄清，而於7小時後OD₅₅₀維持在最低值，培養液也已達澄清，所以由噬菌體 KPP95可強烈的造成其宿主細胞的裂解情形，我們也可證實其為一隻暴裂型噬菌體，但是培養液在8.5小時後OD₅₅₀值又漸回升，此現象可能與產生可抵抗噬菌體 KPP95的 *K. pneumoniae* 突變株，藉由改變與噬菌體結合的細胞表面接受體有關。

2. 噬菌體 KPP95 的宿主分布：

KPP95 噬菌體宿主分布的決定是以點測試法 (spot test) 來分析 93 個臨床分離到的菌株(當 Indicator cells, 如 Table 1.所列, 包括有 25 株 具 ESBL 之 *Klebsiella pneumoniae*、24 株具 ESBL 之 *Enterobacter cloacae*、29 株在臨床上抗第三代頭孢菌素 cefotaxime 的 *Serratia marcescens*、13 株 *Escherichia coli*、1 株在臨床上抗第三代頭孢菌素 cefotaxime 的 *Klebsiella oxytoca* 和 1 株具 ESBL 之 *Enterobacter agglomerans*) 對 KPP95 噬菌體之敏感性，若測試之菌株可被噬菌體感染則可見澄清的溶菌斑；反之，則不會有溶菌斑出現。KPP95 在 25 株 具 ESBL 之 *Klebsiella pneumoniae* 中可感染 10 株，比例為 10/25；另外 1 株 *Klebsiella oxytoca* 和 1 株 *Enterobacter agglomerans* 也可被 KPP95 感染；然而 *Enterobacter cloacae* 24 株、*Serratia marcescens* 29 株及 *Escherichia coli* 13 株則都不被 KPP95 感染。

3. 限制？切割 KPP95 的 DNA 之圖譜：

為了分析限制？切割 KPP95 的 DNA 之情形，我們抽取其 DNA，每次取 5 µl 出來與不同的限制？於 37 進行切割反應後做電泳分析，並在 UV 光下觀察並拍照，結果如 Fig. 6.及 Fig. 7.所示，由此兩張圖中可看出只有 *SspI* *AseI* *DraI* *EcoRV* 和 *NdeI* 這五個限制？可把 KPP95 的 DNA 切割下來，其他的酵素如 *EocRI* *PstI*、*HindIII* 及 *HincII* 等，則都不能將 KPP95 的 DNA 切割下來；而且 KPP95 的 DNA 可被 *SspI* *AseI* *DraI* 和 *EcoRV* 此四個酵素切成大大小小的片段，相較之下 *NdeI* 則是切成比較大的 DNA 片段，顯示前四個酵素切位可能廣泛分布在 KPP95 的 genome 裡，而每個 *NdeI* 的酵素切位則相隔較遠；另外，因為可被這些限制？切割

下來，所以我們可以證明 KPP95 應該具有雙股 (double-stranded) DNA 的遺傳物質。

4. 噬菌體 KPP95 基因體 DNA 片段的選殖與定序：

為了得到更進一步有關 KPP95 的 DNA 的訊息，我們進行其 genomic DNA 的選殖 (採用 shot-gun cloning 的方法) 與定序 (sequence) 工作。首先我們取經限制酶 *SspI* 切割後的噬菌體 DNA 之大小不一之片段，與經 *EcoRV* 切割過後的 pOK12 質體於 16°C 下進行長達 16 小時以上的黏接反應 (ligation)，然後送入 *E. coli* 菌株 DH5α 中進行轉形作用 (transformation)，以 IPTG 及 X-gal 進行藍白篩選，即挑選白色菌落，抽取其質體 DNA 並用 *PstI* 及 *XbaI* 切割以確定挑選到的白色菌落是否有接入噬菌體 DNA 之片段後，我們選了五個轉形株 (transformants) 分別稱為 pOS 1、pOS 2、pOS 3、pOS 11 和 pOS 21 並進行定序；定序後的核糖核酸序列經適當整理後 (如去掉 vector pOK12 的序列等)，得到插入 (insert) 的 KPP95 之各 DNA 片段，各片段經 Clone 程式分析得到的限制酶圖譜，及利用 NCBI blastx 程式來與其 database 比對的結果分別列於 Fig. 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14. 和 Table 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11.。

pOS 1 之嵌入片段長 678 bp，由其序列中含有一些限制酶切位如 *HincII*、*AccI*、*HpaI* 和 *NsiI* 及 *SspI* 等，在這些切位中，已如前述，只有 *SspI* 能將 KPP95 DNA 切割 (Fig. 8.) 而利用 NCBI blastx 比對結果，發現和一些 T4-type 噬菌體 (T4 AR1、Ox2、RB43、RB49 及 Aeh1) 的 Fibrin (gp wac) (Whisker antigen control protein) (Collar protein) 呈現約 34%-38% 不等的一致度 (identity)，顯示選殖於 pOS 1 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其基因 wac 之中段序列 (Table 3.)。

pOS 2 全長有 1197 bps，經比對後發現含有類似 T4 噬菌體其 gene 34 與 gene 37 的部分片段，但因為此兩基因並非相鄰，所以推斷 pOS 2 為 gene 34 與 gene 37 的部分片段相接的結果，或 gene 34 有一小片段和 gene 37 相近，於是我們將其分成 pOS 2-34 與 pOS 2-37 此兩部分；pOS 2-34 全長共 859 bps，限制酶圖譜中含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制酶切位如 *HindIII* 和 *PstI* 等，及能切下 KPP95 之 DNA 的限制酶 *SspI*、*EcoRV* 和 *AseI* 切位 (Fig. 9.)。而利用 NCBI blastx 比對結果和 T4-type 噬菌體如 T4 和 RB49 的 tail fiber protein 有部分相似性，顯示選殖於

pOS 2-34 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其 tail fiber 基因之部分序列 (Table 4.) pOS 2-37 全長有 338 bps , 限制? 圖譜中含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *HincII* 和 *EcoRI* , 及能切下 KPP95 之 DNA 的限制? *SspI* 和 *DraI* 切位 (Fig. 10.) 比對結果與一些 T4-type 的噬菌體 (T4、K3、PPO1、Ac3 及 AR1) 的 long tail fiber protein gp37 (Receptor recognizing protein) 有 29%-50% 不等的一致度 (identity) , 顯示選殖於 pOS 2-37 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其 gene 37 之部分序列 (Table 5.)

pOS 3 全長共有 1031 bps , 含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *HincII*、*ScaI*、*HindIII*、*PstI* 和 *NsiI* 等等 , 及能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *SspI*、*AseI*、*DraI* 和 *EcoRV* (Fig. 11.) 而比對結果與 T4-type 的噬菌體 T4 和 RB49 的 Primase-helicase (即 Protein Gp41) 分別有 68% 和 53% 的一致性 , 顯示選殖於 pOS 3 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其 gene 41 之前段序列 (Table 6.)

pOS 11 有 906 bps , 含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *HincII*、*KpnI*、*ClaI* 和 *NsiI* 等 , 及能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *SspI* 和 *DraI* (Fig. 12.) 而比對結果與 T4-type 噬菌體 (T4、RB49、KVP40 和 KVP20) 的 DNA packaging protein Gp17 (Terminase) 呈現 60%-91% 不等的一致度 , 顯示選殖於 pOS 11 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其 gene 17 全長之中段序列 (Table 7.)

pOS 21 全長共有 3788 bps , 含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *HincII*、*KpnI*、*ClaI*、*NsiI*、*AccI*、*HpaI*、*ScaI*、*HindIII*、*PstI*、*EcoRI*、*StuI* 和 *NaeI* 等等 , 及能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *SspI*、*AseI*、*DraI*、*EcoRV* 和 *NdeI* (Fig. 14.) 而利用 NCBI blastx 比對結果發現選殖於 pOS 21 的 KPP95 DNA 片段含有類似 T4-type 噬菌體其 gene 17 後段序列 , gene 18、gene 19 的全部序列以及 gene 20 的前段序列 ; 其中 gene 17 後段序列經 NCBI blastx 比對與 T4-type 噬菌體 (T4、RB49、KVP40 和 KVP20) 的 DNA packaging protein Gp17 (Terminase) 有 51%-81% 不等的一致性 (Table 8.) Gene 18 全長共 1974 個 bps , 當中中段 1482 個 bps 是依據先前發表的期刊報告中所使用的引子 FT18-N2 和 FT18-C1 (Francoise Tetart et al., 2001) 進行 PCR 及定序後得到的 , gene 18 全部序列經比對後得知與 T4-type 噬菌體 (T4、42、RB42、RB49、KVP40 和 nt-1) 之 tail sheath protein (Gp18)

有 49%-71% 不等的一致性，其中與 T4 有最高的一致性(71%)(Table 9.) Gene 19 全長共 489 個 bps, gene 19 全部序列經比對後顯示與 T4-type 噬菌體(T4、T6、42、RB49、KVP40 和 nt-1) 之 tail tube protein (Gp19) 有 57%-69% 不等的一致性，其中與 42 噬菌體有最高的一致性(69%)(Table 10.) Gene 20 前段序列經 NCBI blastx 比對與 T4-type 噬菌體(T4、RB49 和 KVP40) 的 portal vertex protein of head (Gp20) 有 39%-64% 不等的一致性 (Table 11.)

由以上各 KPP95 的 DNA 片段(pOS 1、pOS 2-34、pOS 2-37、pOS 3、pOS 11、pOS 21) 的限制? 圖譜結果看出，那些不能將 KPP95 的 DNA 切割下來的限制? 切位確實存在於 KPP95 的 DNA 序列中；而且由這些 DNA 片段轉譯成的胺基酸序列之比對結果得知其與 T4-type 噬菌體的基因 17、18、19、20、wac、34、37 和 41 等都具有相似的序列。

5. KPP95 的蛋白質分析：

因為欲分析 KPP95 於 SDS-PAGE 電泳分析下蛋白呈現的情形，所以將大量噬菌體液利用超高速離心(Ultracentrifugation) 透析(dialysis)及音波振盪(sonicated) 後得到蛋白樣品，接著以 Hoefer (Pharmacia) SE 600 series 裝置將煮沸離心過的蛋白樣品取其 20 μ l 之上清液進行 15% SDS-PAGE 之電泳分析，經孔雀藍染液 (Coomassie Blue R250) 染色及褪染後所得結果如 Fig. 15. 所示。約有 25 個蛋白片段在 SDS-PAGE 下可清楚的被看到，而 SDS-PAGE 上最多量的蛋白片段可能是 KPP95 的主要外套蛋白 (major coat protein)，估計約為 46 kDa。

接著我們欲知此 46 kDa 的蛋白片段是否為 KPP95 的主要外套蛋白(major coat protein)，於是將其進行 N-端定序，同上所述取煮沸離心後之上清液 200 μ l 載入凝膠齒溝槽中以 15 % SDS-PAGE 將蛋白質分離後，利用濕式轉漬法將蛋白質由膠體上轉漬到經由甲醇處理過的 PVDF 轉漬膜上，轉漬約 24 小時後，轉漬膜以 Coomassie blue G-250 staining solution 染色，再以含 50% methanol and 10 % glacial acetic acid 的 Destain buffer 清洗直至可看見清楚的蛋白，以去離子水清洗及自然風乾後，以剪刀剪下欲定序之可能為主要外套蛋白 (major coat protein) 之片段，然後進行 N-端定序。定序後得到的 15 個 N-端胺基酸序列為 AEIGGDHGYDAQNIA，經 NCBI blastp 比對之結果列於 Table 12. 中，此可能是

KPP95 之主要外殼蛋白的 15 個 N 端序列與 T4-type 噬菌體 (SV14、RB69、AR1、T4 和 T6) 的 major coat proteins (gp23) 皆有高達 86%-93% 的一致性。

6. 噬菌體 KPP95 之 gene23 的 PCR 產物 (PCR23) 及其比對：

由上述 N-端定序比對的結果，知道可能為 KPP95 的主要外套蛋白與 T4-type 噬菌體其 gene 23 轉譯出來的主要外套蛋白(gp23) 相似，我們欲得到 gene 23 核? 酸序列，於是參考先前發表的期刊報告中所使用的引子 Mz1a 和 CAP8 (Francoise Tetart et al., 2001) 來設計 degenerate primer, 進行 PCR 及定序, 得到中段部位的 gene 23 序列 (稱為 PCR 23), 共有 789 bps, 含有一些不能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *Cla*I、*Hind*III 和 *Pst*I 等, 及能切下 KPP95 之 DNA 的限制? 切位如 *Dra*I 和 *Eco*RV (Fig. 13.) 經 NCBI blastx 比對結果顯示與 17 個 T4-type 噬菌體 (T4、T6、RB69、KC69、Tu1a、42、1、SV14、AR1、RB49、RB43、44RR、KVP40、KVP20、65、Aeh1 和 nt-1) 的 major capsid protein (gp23) 有 53%-83% 不等的一致性 (Table 13.)

7. KPP95 之 gene23、18、19 的比對 (alignment)：

我們將 PCR 23 此 DNA 片段經 NCBI blastx 比對到的 17 個 T4-type 噬菌體之主要外套蛋白的胺基酸序列，與 PCR 23 其 DNA 序列轉譯成的胺基酸序列彼此之間利用 ClustalX 做比對 (alignments), 結果如 Fig. 18. 所示，雖然由圖中可以很清楚的看出這些噬菌體的主要外套蛋白彼此之間胺基酸序列的重要差異，但是一些區域 (blocks) 的胺基酸序列卻是普遍地一致，尤其是從序列 250 到 324 最是顯著。

接著我們又將 KPP95 其整個 PCR 23 所轉譯出來的蛋白序列 (即 T4 其 gp23 胺基酸序列的 99-354) 與 T4 的 gp23 利用 NCBI blastp 作比較，並分別比較相對於 T4 其 gp23 胺基酸序列之 162-209 殘基區域 N 端和 C 端部分，所得結果如 Fig. 19. 所示，整個 PCR 23 轉譯成的蛋白序列與 T4 的 gp23 比起來只有 17% 的變異性，然而在 T4 的 gp23 近中間序列的 50 個胺基酸區域 (序列 162-209), KPP95 卻有 48% 的變異性，兩端 (N 端與 C 端) 序列與 T4 比起來則各只有 10% 的變異性

先前我們由 KPP95 其 genome 的選殖與定序工作得到了 DNA 片段 pOS 21, 而 pOS 21 含有類似 T4-type 噬菌體其 gene 17 後段序列, gene 18、gene 19 的全部序列

以及 gene 20 的前段序列。現在既然我們已取得 KPP95 的 DNA 中類似 T4-type 噬菌體其 gene 18 的全部序列，則利用同樣的方法，將此 gene 18 序列轉成胺基酸序列後則與比對到的 T4-type 噬菌體之 gp18 蛋白序列一起作 alignment，所得結果如 Fig. 20.所示，整個看起來很像之前所做的 gene 23 的 alignment 結果，而保留區域較集中在 gene 18 的前端與尾端部分。

因為也有取得 KPP95 的 DNA 中類似 T4-type 噬菌體其 gene 19 的全部序列，於是也是利用同樣的方法，將此 gene 19 序列轉成胺基酸序列後則與比對到的 T4-type 噬菌體之 gp19 蛋白序列一起作 alignment，所得結果如 Fig. 21.所示可以看出保留序列呈現比較一致性的分布，不過整體看起來還是和 gene 18 及 gene 23 的 alignment 結果很類似。

8. 選殖的各 KPP95 DNA 片段之 G+C content :

我們利用 frameplot 將 KPP95 之各 DNA 片段的 G+C content 計算出來，分別為 pos1 : 37.8% ; pos2-34 : 41.8% ; pos2-37 : 39.6% ; pos3 : 37.9% ; pos11 : 41.6% ; pos21 : 41.2% ; PCR23 : 48.5% , 由這些數值似乎可推測噬菌體 KPP95 其整個 genome 的化學組成 (chemical composition) 應是屬於低 G+C content 的情形，與 T4 噬菌體整個 genome 的低 G+C content (35.3%) 情況相似。

9. 總結 :

KPP95 噬菌體之外形於電子顯微鏡下與 T4-type 噬菌體有相似的結構與型態，genome 大小利用脈衝電泳法估計約介於 170-180 kb 之間，與 T4 噬菌體 genome 大小 (169 kb) 相近，而且可能具有與 T4 噬菌體同屬於低 G+C content 的化學組成性質。由其 genome 的選殖與定序工作得到的 KPP95 之各 DNA 片段 (pOS 1、 pOS 2-34 pOS 2-37 pOS 3 pOS 11、 pOS 21) 經 NCBI blastx 比對結果發現都與 T4-type 噬菌體之蛋白質有相似的部分，之間的一致性與有些 T4-type 噬菌體還可高達 80%-90% 左右；另外，可能為 KPP95 之主要外套蛋白 (gp23) 的 N-端序列與藉由 PCR 得到其 gene (為 gene 23) 序列經 NCBI 比對結果也皆顯示與部分 T4-type 噬菌體之主要外套蛋白呈現高度一致性，於是我們由上述諸多事實中推論 KPP95 噬菌體應也屬於 T4-type 噬菌體的一員。

四、*klebsiella pneumoniae* 10693 之染色體 DNA 的限制？切割

我們將 KPP95 的宿主細菌即 *klebsiella pneumoniae* 10693 之染色體 DNA (chromosome DNA) 抽取出來，然後選取一些不能切割 KPP95 的 DNA 之限制？如 *EocRI*、*PstI*、*HindIII* 及 *HincII* 來切割，結果如 Fig. 16.所示，發現這四個限制？皆可將 *klebsiella pneumoniae* 10693 的染色體 DNA 切割下來。

五、轉型株 pOS 1、pOS 2、pOS 3 其質體 DNA 的限制？切割

我們分別將之前由 KPP95 其 genome 的選殖所得到的三個轉型株 (transformants) pOS 1、pOS 2、pOS 3 (宿主是 *E. coli* DH5a) 中的質體 DNA 抽取出來，接著用 *HincII* 限制？進行 pOS 1 切割，用 *EocRI* 限制？進行 pOS 2 切割，而 pOS 3 則用 *PstI* 限制？來進行切割，經電泳分析及染色照相後所得結果如 Fig. 17 所示，在凝膠上，pOS 1 經 *HincII* 切割後可看到被分成一約 0.3 kb，另一約 2.1 kb 的兩個片段，pOS 2 經 *EocRI* 切割後可被分成一約 0.9 kb 和另一約 2.5 kb 的兩個片段，而 pOS 3 經 *PstI* 切割後則可被分成一約 1 kb 和另一約 2.1 kb 的兩個片段。