計畫編號：DOH92-DC-2007

行政院衛生署疾病管制局九十二年自行研究計畫

B 型腦膜炎雙球菌之分子免疫學研究

自 行 研 究 成 果 報 告

執行機構：疾病管制局
研究主持人：李永盛
研究人員：楊秋英、盧政雄、黃蘭香、郭彥良、林瑋儒
執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日
＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目　　錄

頁　碼

封面
目錄　(2)
內文
一、摘要　(3)
二、前言　(5)
三、材料與方法　(5)
四、結果　(7)
五、討論　(8)
六、結論與建議　(8)
七、參考文獻　(9)
八、圖　(10)
九、表　(12)

共（ 12 ）頁

摘要

本計畫之目的是以抗體為工具，鑑定具有成為腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitides*, NM)疫苗潛力的表面抗原，作為疫苗研發的基礎本計畫的最終目標是找出具有模擬 B 群腦膜炎球菌 (Group B *Neisseria meningitides*, GBM)免疫優勢抗原決定位(immunodominant epitopes)之胜肽，作為疫苗研發的基礎。為了達到此目的，本研究以全菌作為免疫原，製備了一系列的抗 NM 表面抗原的單株抗體。西方轉漬分析，發現這些單株抗體所能辨認的抗原幾乎包括所有的表面抗原在內，含夾膜多醣、外膜蛋白、含脂多醣及線毛。蛋白質譜儀分析抗體 210-06 的目標抗原為第一型的主要外膜蛋白 PorA；以噬菌體展示技術探討 210-06 抗體所結合之抗原表位，結果篩選到的重組噬菌體展示的胜肽均為環狀構形。PorA 為穿膜蛋白，共有 8 個環(loop)暴露於胞外，其中第一與第四個環的氨基酸序列變異最大，分別稱為第一與第二變異區(VR1 與 VR2)，且為免疫優勢區域。為了了解 210-06 之專一性以及明確定出 210-06 之結合區，本計畫首先以 PCR 將免疫菌株之 PorA 基因選殖、定序，並送入 *E. coli* 表現，結果顯示免疫株(NMY)之 PorA 為 P1.5,2 亞型。進一步針對 210-06 能辨識的 55 株菌之 PorA 基因進行定序分析，結果顯示這些菌所表現的 PorA 之 VR2 均為 P1.2 亞型，因此 210-06 為血清亞型 P1.2 專一抗體。由其結合之重組噬菌體展示之胜肽序列判斷其結合位主要為第二變異區 VR2 的 QPTK。為了評估以模擬抗原表位之環狀胜肽為疫苗之可行性，分別以重組噬菌體 (phage-S)及製備含有重複的展示胜肽序列之重組蛋白免疫小鼠，以 ELISA 分析所得到之抗血清與腦膜炎雙球菌之結合力。結果顯示，抗噬菌體之抗血清與 NMY 有非常弱的結合能力。另一方面，可能因為重複胜肽的構形不夠複雜，因此並未得到明顯的抗體反應。

關鍵詞：奈瑟氏腦膜炎雙球菌、單源抗體、噬菌體展示技術、抗原表位、胜肽疫苗

Abstract

The ultimate goal of this project is to identify peptides that mimick the immunodominant epitopes of the *Neisseria meningitides* (NM) to be used as the basis for development of the peptide vaccine for NM. To achieve this goal, a panel of monoclonal antibodies (mAbs) specific for NM were generated. Western blot analyses revealed that the specificities of the mAbs generated in this study almost cover all surface antigens including capsular polysaccharide, outer membrane proteins, lipopolysaccharide, and pilus. Among the anti-OMP antibodies, only 210-06 possesses a good complement-dependent bactericidal activity. MALDI-TOF analysis, and recombinant genetic analysis indicated that the antigen recognized by 210-06 is PorA, a class Ⅰ OMP of *N. meningitidis*. By using phage display technology and sequence analysis of *por*A from 210-06 reactive and non-reactive strains, we conclude that 210-06 is specific to P1.2 PorA and the epitope contains the segment QTPK. The third amino acid residue within the tetrapeptide may not participate in the direct interaction with the antibody combining site of 210-06. The feasibility of using the mimotope isolated from the phage display peptide library to elicit antibodies against *N. meningitidis* expressing P1.2 PorA (NMY) was evaluated by generating antisera against the recombinant phage (phage-S) and the recombinant protein composed of 4.5 copies of the corresponding peptide. While the anti-phage-S bound weakly to NMY, no antibody response was obtained from mice immunized with the recombinant protein. The poor immunogenicity of the recombinant protein probably is due to its small size and low complexity.

Keyword: *Neisseria meningitides*, monoclonal antibodies, phage display, epitope, and peptide vaccine.

一、前言

奈瑟氏腦膜炎球菌*(Neisseria meningitides,* NM*)*為具有莢膜的格蘭氏陰性菌。根據莢膜多醣的化學組成與抗原性可分為 13 血清群(serotype)，其中血清群 A、B、C、Y 及 W-135 五群為人類病源菌，可引起致命的腦脊髓膜炎及敗血症，是造成第三世界國家高死亡率的主要因子(Griffiss et. al., 1984)。雖然在工業化的國家，腦膜炎球菌引起的病例不多；其中有 50%以上是 B 群菌感染所致，但在今日交通發達且旅遊興盛天涯若比鄰的時代，腦膜炎球菌感染可能造成的流行性或區域性腦脊髓膜炎，仍是目前亟待解決的一個全球性的健康問題(Frasch, 1987; Peltola, 1998)。例如：2000 年因前往沙烏地阿拉伯朝聖而受腦膜炎球菌感染的病例，到當年 5 月 12 日為止就有 390 件，其中有 71 人死亡(國際疫情報導)。根據 WHO 報告，1990-1997 年亞洲地區每年均有上萬個病例；其中中國大陸在 1993-1997 年間的病例數，分別為 5000、5863、5771、5730 及 4751。台灣的流行性腦脊髓膜炎歷年來均只有 B 型及 W135 型，2001 與 2002 年卻發現有 A、C 及 Y 型病例，其中以 Y 群病例最多，共有 14 個病例。

相較於血清群 A、B 及 C，以 Y 群為主的研究並不多。有鑑於此，本研究先前以 Y 群菌(NMY)為免疫原製備單株抗體，以全菌進行 ELISA 篩選出能與表面抗原結合的抗體。Western blot 分析顯示 66-01 與 23-08 兩株抗體為 natural polyreactive autoantibodies (Diaw et. al., 1997)；18-205 的目標抗原為非蛋白； 210-06 抗體主要辨識的蛋白位於分子量 40-kDa 左右；12-01 辨識 32-kDa 蛋白，54-07 辨識 17-kDa 蛋白；107-01 在 83-kDa 附近有多條的反應帶；24-03 之抗原分子量約為 30 kDa。以純化的外膜蛋白進行 Western blot 分析，並以質譜儀分析顯示 210-06 的抗原可能為 PorA 蛋白(Yang et. al., 2003)。

另一方面，以噬菌體展示技術搜尋與抗體 210-06 能結合的胜肽，藉以了解 PorA 蛋白之抗原表位，同時可作為研發胜肽疫苗之基礎。以純化的 210-06 抗體對 Ph.D-C7C 與 Ph.D-12 的混合胜肽庫進行親和選擇，再以免疫篩選共得到五株會抑制 210-06 與 NMY 結合的重組噬菌體。序列分析顯示這五株噬菌體顆粒上所展示的胜肽均為環狀構形，配合序列比對推測 210-06 辨識的區域可能是 P1.2 亞型 PorA 的第二變異區。本計畫透過 PorA 基因之選殖、表現與序列分析，確定 210-06 的目標抗原確實為 P1.2 亞型 PorA，配合展示胜肽序列進一步定出與抗體直接作用的區域，同時測試以帶有此區域之序列作為疫苗之可行性。

二、材料與方法

實驗菌株：本計畫使用的奈瑟氏腦膜炎雙球菌為 2001 及 2002 年分離之菌株。

PCR 增幅 porA 基因：依據 Saunders 等人(1993)的方法進行，直接以菌體為模板。以牙籤由隔夜培養於 37°C, 5%CO_2 的巧克力平板挑取單一菌落的菌至 5 μl 的無菌水中，上覆礦物油 95°C 處理 10 分鐘後，於此反應小管中直接加入 45 μl

反應溶液內含 20 μM 的引子(表一)各 1.25 μl、10 mM 的 dNTP 各 1 μl、5 μl 的 10X PCR 緩衝液、1.5 μl 的 50 mM $MgCl_2$、0.5 μl 的 Tag polymerase 及 34.5 μl 的水)，94°C 作用 5 分鐘後，進行 30 輪的增幅反應(每一輪的條件為 94°C 反應 1 分鐘、60°C 反應 1 分鐘接著 72°C 反應 2 分鐘)，最後再在 72°C 進行 5 分鐘的反應。取 5 μl 的 PCR 產物進行 agarose gel 的電泳分析。

porA 基因選殖與定序分析：將 PCR 產物與等體積的 phenol/chloroform 劇烈混勻，以離心將水溶液與有機溶液層分開，將水溶液層移至乾淨的微量小管，加入 1/10 體積的 3M NaOAc 溶液及 2 倍體積的 100%酒精把 DNA 沉澱下來，將沉澱下來的 DNA 回溶於 TE 緩衝液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)。取適量之 DNA 與 pGEM-T-Easy (Promega)在 DNA ligase 作用下進行黏接作用，利用熱休克法把 DNA 送入勝任的 *E. coli* (competent cell)。抽取轉型菌的質體 DNA，以 *EcoRI* 切割確定質體上帶有 porA 基因片段後，以位於 pGEM-T-Easy 質體上多選殖位(MCS)兩端之 T7 promoter 及 SP6 promoter 之互補序列為引子進行核酸定序。

PorA 蛋白在 *E. coli* 的表現：以 NMporA-Ex-F1-*Bam*HI 與 NMporA-EX-R2-*Hind*III 為引子(表一)，免疫菌株 NYM 染色體為模板進行 PCR，將完整的 porA 基因增幅後，以 *Bam*HI 及 *Hind*III 切割後選殖於 pET 表現載體，送入 *E. coli* BL21(DE3)。將菌養在含有 ampicillin 的 LB 培養液於 37℃ 培養至 OD_{600} 約為 0.8，加入 1 mM 的 IPTG 後置於 28℃ 震盪培養 2 小時。以離心收集菌體進行 SDS-PAGE 與 Western blot 分析(Sambrook et. al., 1989)。

小鼠對重組噬菌體之免疫反應：取 3 x 10^{12} p.f.u.的噬菌體 M13 顆粒對小鼠進行皮下注射，七天後再追加一劑，並於第二次免疫注射後的第五天與第十五天採血進行分析。

以重組 DNA 技術製備重覆胜肽(peptide repeats)抗原：將 10 pM 有互補序列之兩條核酸引子 phage #1.1 –A 與 phage #1.1 –B (表一)混合，以 *Pfu* DNA polymerase 進行 template-repeated PCR (TR-PCR)，反應條件為 94°C 、37°C、 72°C 各 30 秒，共 30 個循環。以 TP-PCR 產物為模板，帶有酵素切位之引子 phage #1.1 - Adapter A 與 phage #1.1 - Adapter B (表一)進行 PCR，反應條件為 94°C 、37°C、 72°C 各 1 分鐘。將所得到的 DNA 產物選殖於 pGEM-T-Easy 質體。以 EcoRI 篩選出帶有不同重複數目之殖系，抽取其質體 DNA，以 *Bam*HI 及 *Hind*III 切割後選殖至 pET21 系列載體，送入 *E. coli BL21*(DE3)菌株。將菌養在含有 ampicillin 的 LB 培養液於 37℃ 培養至 OD_{600} 約為 0.8，加入 1 mM 的 IPTG 後置於 28℃ 震盪培養 6 小時，收集菌體以超音波震盪將菌打破，以 Ni^{2+}親和管柱(His-Bind resin, Novagen)純化重組蛋白。

小鼠對重複胜肽之免疫反應：取 5-6 週齡之 Balb/c 小鼠，純化之抗原與等體積之佐劑(第一劑用 Freund's complete adjuvant；之後用 Freund's imcomplete adjuvant)混合後，以腹腔注射，每隔 10 – 14 天重複一次。在注射前取血分別以 ELISA 與 Western blot 分析各小鼠對免疫原產生之抗體反應。

三、結果

抗體 210-06 之目標抗原：雖然 Western blot 與蛋白質譜儀分析顯示 210-06 之目標抗原為 PorA，為了得到更直接確切的證據，利用引子 (NM porA Ex-F1-*Bam*H I 以及 NM porA Ex-R2-*Hind*III) 以 PCR 將完整的 *porA* 基因由免疫株 NMY 擴增並選殖於 pET21 表現載體，送入 *E. coli* BL21(DE3) 進行 PorA 蛋白的大量表現。以 210-06 進行 Western blot 分析 *porA* 之 *E. coli* BL21(DE3) 轉殖株，發現在預期的分子量位置 (約 43 kDa) 有明顯的條帶訊號 (圖 1)，此結果直接證明單株抗體 210-06 之抗原為腦膜炎球菌 NMY 之 PorA。

抗體 210-06 之專一性：PorA 為穿膜蛋白，位於胞外共有 8 個環狀區域 (van der Ley et al., 1991)，其中第一與第四個環變異最大，分別稱為 VR1 與 VR2（Derrick et al., 1999）。根據變異區之氨基酸序列，PorA 可分為不同亞型。為了釐清 210-06 的專一性以作為免疫分型之抗體，以 NMporA-F 及 NMproA-R (表一)為引子進行 PCR，將與 210-06 成正反應之菌株的 porA 基因選殖進行定序分析。比較不同菌株之 porA 基因主導之 VR1 與 VR2 序列(表二)，這些菌株之 VR2 序列完全相同，均屬於 P1.2 亞型。此結果顯示 210-06 為 P1.2 PorA 專一抗體。分析 P1.2 PorA 之 VR2 序列(HFVQQTPKSQPTLVP)發現其中包含了噬菌體展示技術篩選得到之胜肽序列(QTL/MK)，顯示此區域是直接與抗體結合的片段。

重組噬菌體之免疫力分析：圖二為 ELISA 分析免疫小鼠血清對免疫原 phage-S (展示 210-06 專一胜肽重組噬菌體)、phage-N (展示不相關胜肽之噬菌體顆粒)以及與 NMY 之反應情形。結果顯示兩隻小鼠對 phage-S 皆有明顯的抗體反應。由 phage-S 與 phage-N 的結合曲線顯示，phage-S 引發的抗體主要針對噬菌體蛋白，對展示胜肽具專一辨識能力的抗體在抗血清中所佔的比率很低，致使抗血清與全菌 NMY 的結合力較弱。儘管如此，本實驗結果初步證明以展示胜肽為疫苗的可行性。

重複胜肽抗原之製備：根據 210-06 篩選得到的重組噬菌體展示胜肽編號 1 序列，合成兩條有互補序列之核酸引子 phage #1.1 –A 與 phage #1.1 –B (表一)，進行 TR-PCR 組裝出主導重複胜肽序列的 DNA 片段，再以帶有 *Bam*H1 切位之引子 Adapter A 與 *Hind*III 切位之 Adapter B(表一)進行增幅反應。將所得到的 DNA 產物直接選殖於 pGEM-T-Easy 質體；以 *Eco*RI 切割篩選帶有插入不同大小 DNA 片段之質體(圖 3)。由插入之 DNA 片段大小推測編號 1 的質體帶有 4-5 個重複，編號 10 為 13-14 個重複。核酸序列分析結果顯示編號 1 主導的蛋白組成為 4.5 個

phago-1 序列，而編號 10 沒有預期蛋白表現是因為引子長短不一，造成組裝之 DNA 與預期不符。將編號 1 質體的 DNA 以 BamH1 及 HindIII 切割後選殖於 pET-21 系列載體，送入 *E. coli BL21*(DE3)菌株表現。SDS-PAGE 分析在大約 9 kDa 有一明顯的重組蛋白產生，分別以 anti-His Tag 與 210-06 進行 Western blot 分析，確定此蛋白為預期的重組蛋白(圖 4)，將此蛋白命名為 PorA-F。以 His-Bind 親和管柱進行重組蛋白純化，並以 SDS-PAGE 評估其純度(圖 4)。

重複胜肽抗原之免疫特性分析：為了探討以重複胜肽作為疫苗之可行性，以純化之 PorA-F1 對小鼠進行免疫注射，ELISA 分析免疫小鼠對 PorA-F1 產生之抗體反應之情形，結果發現不管是以 16 μg 或 80 μg 進行免疫注射，以及注射之次數，小鼠血清中均沒有明顯的 PorA-F1 專一抗體。

四、討論

本計畫主要針對先前製備的抗 Y 群腦膜炎球菌之單株抗體 210-06 進行進一步的分析。首先以重組 DNA 技術將 NMY 之 PorA 基因選殖於 *E. coli* 表現，Western blot 確認 210-06 之目標抗原為 PorA。繼而將 210-06 辨識之 NM 菌株中之 PorA 基因選殖並進行核酸定序。比對各 PorA 之氨基酸序列顯示 210-06 為亞型 P1.2 專一抗體；並以噬菌體展示技術定出其結合位。為了探討以 PorA 外露之環狀構造為疫苗之可行性，分別以展示 210-06 專一胜肽之噬菌體顆粒以及以重組 DNA 技術製備重複胜肽，進行小鼠免疫反應測試，結果以重組噬菌體顆粒產生之抗體可與 NMY 結合，雖然結合力不強。此結果是可預期的，因為 210-06 專一胜肽在整顆噬菌體顆粒上佔的比例非常小，其免疫優勢的抗原表位仍以噬菌體蛋白為主。

在疫苗研發上，胜肽為主的疫苗一直是一個非常吸引人的方式。由於單一的胜肽片段大小可能無法引發好的免疫反應，必須將胜肽與其他大分子共價結合。此方式得到的抗胜肽抗體反應，常受使用的接合大分子種類、接合的胜肽數目以及接合後之胜肽構形影響。為了改善此問題，本研究根據 Hsu 等人(2000)發表的 TR-PCR 方法，製備了含有 4.5 個 phage-1 序列的重組蛋白 PorA-F1 (~ 9 kDa)為抗原，由分子量考量，此重組蛋白的大小足以引發免疫反應，結果卻未能得到明顯的專一抗體反應。由於一物質引發免疫反應的能力除了大小之外，亦取決於其構造及組成的複雜度。PorA-F1 無法引發抗體反應可能是因為其構造及組成雜異度不夠所造成的結果。此問題可經由增加其重複數目得到改善，另一方面可加入不同亞型的 VR 序列，不但能增加其雜異度達到增加引發免疫反應之能力，亦可增加疫苗的效力，是一個值得嚐試的多價 PorA 疫苗之研發策略。

五、結論與建議

本計畫初步結果證明以模擬抗原表位為疫苗之可行性。未來之研究可針對其配方與免疫方式加以改進，例如進行 subtractive immunization (Sleister and Rao ,

2002)。此外，亦可嚐試將不同 PorA 之 VR 區域以環狀構形串聯成為一個多價的 PorA 疫苗。

四、參考文獻

Derrick, J.P., Urwin, R., Suker, J., Feavers, I.M. and Maiden, M.C. (1999) Structural and evolutionary inference from molecular variation in Neisseria porins. Infect Immun 67, 2406-13.

Diaw L, Magnac C, Pritsch O, Buckle M, Alzari PM, and Dighiero G. Structural and affinity studies of IgM polyreactive natural autoantibodies. J Immunol 1997; 158:968-976.

Frasch CE. Prospects for the prevention of meningococcal disease: special reference to group B. Vaccine 1987; 5:3-4.

Griffiss JM, Apicella MA, Greenwood B, and Baker CJ. Vaccines against encapsulated bacteria: a global agenda. Rev Infect Dis 1984; 1:176-188.

Hsu CT, Ting CY, Ting CJ, Chen TY, Lin CP, Whang-Peng J, and Hwang J. Vaccination against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using toxin receptor-binding domain-conjugated GnRH repeats. Cancer Res 2000; 60:3701-3705.

van der Ley, P., Heckels, J.E., Virji, M., Hoogerhout, P. and Poolman, J.T. (1991) Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp. Infect Immun 59, 2963-71.

Peltola H. Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. Drugs 1998; 55:347-366.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saunders NB, Zollinger WD, and Rao VB. A rapid and sensitive PCR strategy employed for amplification and sequencing of porA from a single colony-forming unit of *Neisseria meningitidis*. Gene 1993; 137:153-62.

Sleister HM, Rao AG. 2002. Subtractive immunization: a tool for the generation of discriminatory antibodies to proteins of similar sequence. J. Immunol. Methods 261:213-220.

Yang C.-Y., Y.-L. Kuo, Y.-S. Lee , and C.-H. Lu. 2003. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against *N. meningitidis serogroup* Y. The 37th Annual Meeting of The Chinese Society of Microbiology.

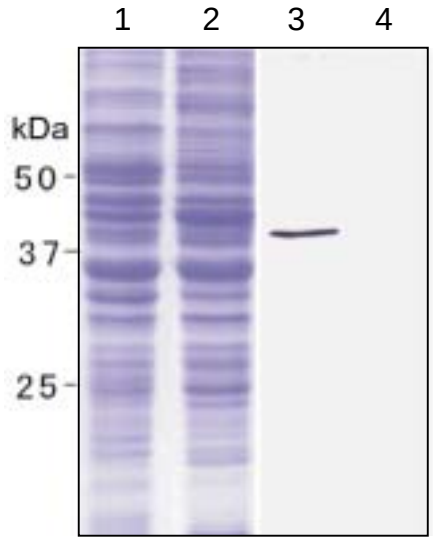


Fig. 1. SDS-PAGE (1 and 2) and Western blot (3 and 4) analyses of the total cell lysate from *E. coli* BL21(DE3) (2 and 4) and *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-21-porA plasmid (1 and 3).

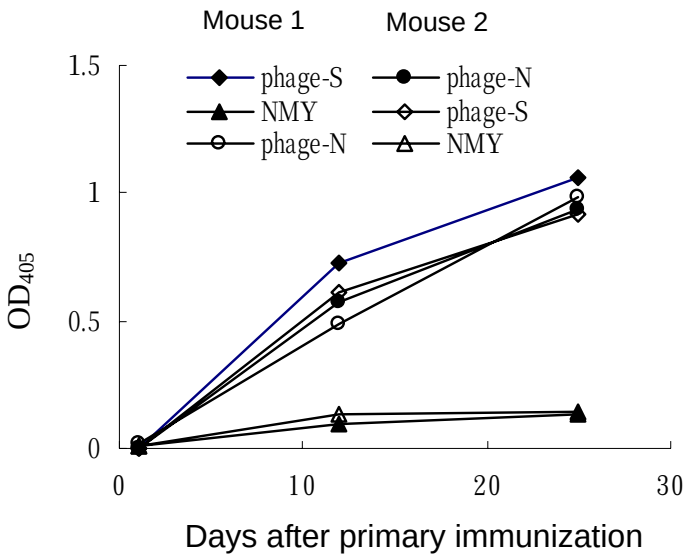
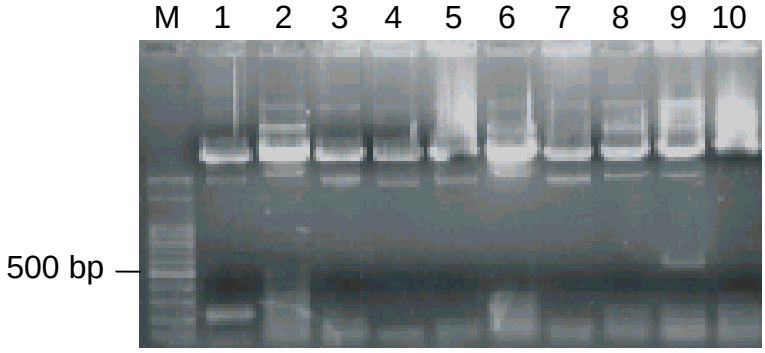


Fig. 2. Binding activities of sera obtained from mice immunized with the recombinant phage displaying the 210-06 specific peptide (phage-S) to phage-S, an unrelated peptide (phage-N), and *N. meningitidis* serogroup Y expressing P1,2 PorA (NMY).

(A)



(B)

AAG CTT CAG GGT CTG TTC ATG GCA CGC GCT GCC GCC GCC GCA GCG TTT CAG GGT CTG TTC ATG GCA CGC GCT GCC GCC GCC GCA GCG TTT CAG GGT CTG TTC ATG GCA CGC GCT GCC GCC GCC GCA GCG TTT CAG GGT CTG TTC ATG GCA CGC GCT GCC GCC GCC GCA GCG TTT CAG GGT CTG TTC ATG GCA CGC CGA ATT C

Fig.3. Electrophoresis of pGEM-T-TR-PCR plasmid DNAs digested with *Eco*RI (A) and the nucleotide sequence of the inserted DNA from clone 1 (B). M, 100-bp ladder. The cleavage sites of *Bam*HI and *Hin*dIII are underlined.

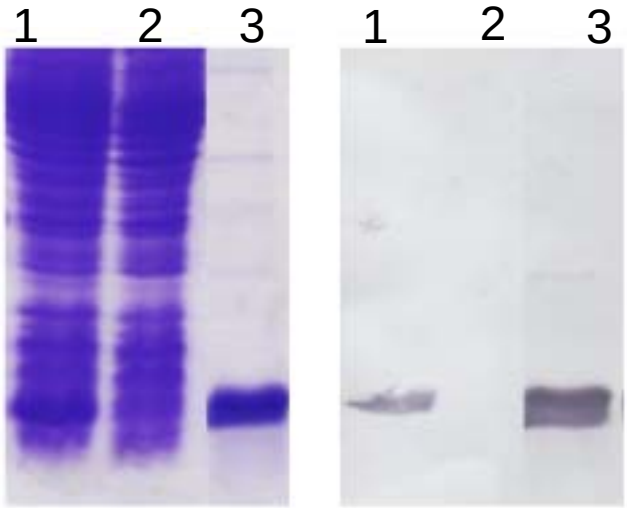


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analyses of the total cell lysates from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-PorA-F in the presence (lane 1) and absence (lane 2) of IPTG, and the purified protein (lane 3). Monoclonal antibody 210-06 was

used as the primary antibody for the Western blotting.

表一 本計畫所使用之核酸引子

Name	Sequence* (5’ to 3’)
NM porA Ex-F1-*Bam*H Ⅰ	ggtggtggatccTATGCGAAAAAAACTTACCGCCC
NM porA Ex-R2-*HindIII*	ggtggtaagcttGAATTTGTGGCGCAAACCGAC
NMporA-F	GTCAGCCYTCTACGGCGAAATCAAA
NMproA-R	GAATTTGTGGCGCAAACCGAC
phage #1.1 –A	gcgtgccatgaacagaccctGAAACGCTGCGGCGGCGGCAGC
phage #1.1 –B	cagggtctgttcatggcacgcGCTGCCGCCGCCGCAGCGTTTC
phage #1.1 - Adapter A	gaattcGGCGTGCCATGAACAGACCCTG
phage #1.1 - Adapter B	aagcttCAGGGTCTGTTCATGGCACGC

*大寫英文字母室與模板 DNA 黏合的序列；小寫英文字母為外加序列；底部畫線之區域為限制脢切位。

表二 PorA 蛋白 VR1 與 VR2 之氨基酸序列以及表現該序列之 NM 菌株數

VR1 sequence	Type	VR2	Type	Frequency*
PLQNIQPQVTKR	P1.5	HFVQQTPKSQPTLVP	P1.2	51/55
LLQNIQPQVTKR	P1.5-11	HFVQQTPKSQPTLVP	P1.2	1/55
QPQTANTQQGGKVKVTKA	P1.20	HFVQQTPKSQPTLVP	P1.2	2/55
PLQNIQQPQVTKR	P1.5-1	HFVQQTPKSQPTLVP	P1.2	1/55

*分母為總菌株數，分子為屬於該序列之菌株數。