

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-123505

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：

流感病毒報告病毒系統與流感病毒跨物種感染研究

年度研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：劉銘燦

協同主持人：楊季融

研究人員：黃湘怡

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面

第 1 頁

目錄

第 2 頁

摘要

第 3 頁

本文

前言

第 5 頁

材料與方法

第 6 頁

結果

第 9 頁

討論

第 11 頁

計畫重要研究成果及具體建議

第 13 頁

參考文獻

第 14 頁

圖、表

第 16 頁

三、摘要

關鍵詞：流感病毒；報告病毒；病毒感染

流感病毒每年引起季節性人類呼吸道疾病流行，而流感大流行的發生嚴重衝擊人類健康和經濟。研究流感病毒時，無論在體外或體內，需要使用費時與費力的方法來鑑定病毒感染細胞的過程。為了能即時、方便且定量的偵測流感病毒感染過程，攜帶易於追蹤的報告蛋白的流感病毒已成一有力工具。本計畫，開發和應用具不同報告蛋白(螢光與生物冷光基因)流感病毒，在病毒基因組的神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 或非結構蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)區域，置入報告蛋白，且讓攜帶報告蛋白的流感病毒仍具感染複製能力。具報告蛋白的流感病毒可應用於體外和體內研究，如病毒感染向性(tropism)、跨物種感染評估、動物感染模式、檢測抗體價位與病毒感染動力學等，流感報告病毒的開發與應用將可加速流感研究與有助於流感防治。

Abstract

keywords : influenza virus; reporter virus; viral infection

Influenza viruses cause annual seasonal human respiratory disease epidemics and have been implicated in occasional pandemics with excessive health and economic consequences. Studying influenza viruses, *in vitro* or *in vivo*, requires time-consuming and laborious methodologies to identify virus-infected cells. In order to understand the infection processes of influenza viruses in a real-time, convenient and quantitative manner, influenza viruses carrying an easily traceable reporter protein have become a powerful tool. In this project, we have developed and applied influenza viruses harboring diverse fluorescent or bioluminescent reporter genes in different locations of the viral genome, neuraminidase (NA) or nonstructural protein 1(NS1). These influenza viruses carrying reporter protein keep the ability of infection and replication-competent. These viruses can be employed for *in vitro* and *in vivo* studies, such as viral tropism, adaptation of across species, infection of animal model, antibody titer and viral infection dynamics. Development and application of reporter influenza viruses will accelerate influenza research and benefit the control of influenza.

四、本文

(1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

流感為流感病毒引起的季節性疾病，世界衛生組織(World Health Organization, WHO)估計全球每年流感侵襲率在兒童約 20-30%、成年人約 5-10%，流感主要導致嬰兒、老人或慢性病患等高危險群者住院和死亡，估計每年約造成 3~5 百萬例嚴重病例，約有 25-50 萬人死亡(WHO, Fact sheet on influenza, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>)。流感病毒，屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，病毒基因體為 8 個負單股 RNA，病毒產生 10-14 個蛋白質[1,2]。流感病毒外套膜上的二種醣蛋白，血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 和神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 為病毒主要的表面抗原，可引發中和抗體。HA 與細胞表面的受體唾液酸結合，使病毒進入細胞內，HA 與不同種類受體唾液酸結合，影響病毒感染細胞特異性。NA 則具有切斷醣蛋白及細胞受器上的唾液酸的酵素活性，與病毒自細胞釋出的作用有關[1]。感染人類之流感病毒可分 A, B, C 三亞型，A 型流感病毒可再分次亞型，HA 的次亞型有 18 種 (H1 至 H18) 與 NA 有 11 種 (N1 至 N11) [2-5]，H1-H16 以及 N1-N9 亞型病毒可感染禽類，H17N10 與 H18N11 為存在蝙蝠的亞型[2,4]，人類則較易受到 H1, H2 及 H3 亞型的感染[1]。H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型也有零星人類案例[6-9]，但仍無法有效人與人之間傳播。人類歷史上曾發生過四次有記載可驗證的流感大流行，分別是 1918 年的西班牙型流感 (H1N1)，1957 年的亞洲型流感 (H2N2) 及 1968 年的香港型流感 (H3N2)，以及 2009 年來自墨西哥與美國 H1N1，其所引起的全球大流行，都讓數以千萬計的人類遭受感染，甚至死亡[1,10,11]。1997 年以來 H5N1 病毒感染人類案例持續出現，2013 年在中國大陸爆發 H7N9 感染案例[7]，H5N1 與 H7N9 兩亞型病毒持續改

變，具引起大流行之潛能，需密切注意。流感病毒基因具有高突變的特性，可經由突變及基因重配(reassortment)二種方式來產生新型病毒。病毒基因每年所累積的點突變造成抗原小部分的改變，稱為抗原漂移 (antigenic drift)，至於抗原轉移 (antigenic shift)，則涉及基因段的互換[1,11]，例如當不同來源的病毒株同時感染同一宿主時，病毒於複製過程就可能產生基因段互換及重新排列組合(reassort)，導致抗原分子的大幅改變，進而形成全新的流感病毒。此高突變率的特性造成其抗原變異較快，人類無法獲得持久的免疫力，且當新型病毒出現，大部分人類族群對新型病毒皆無免疫力時，易進而造成全球性的大流行。

流感報告病毒系統可應用於在體外和體內流感病毒研究，如病毒感染向性(tropism)、跨物種感染評估、動物感染模式、檢測抗體價位與病毒感染動力學等[12,13]。流感病毒嚴重威脅人類健康，不同亞型的禽流感病毒感染人類的案例出現，讓人憂心這些病毒是否會進一步突變，造成全球大流行。故須有好的工具平台，即時探究流感病毒生長複製與感染特性，快速且準確地分析抗體價位，瞭解新型流感病毒基因位點改變對病毒生長複製與感染的影響，厚實防治流感的科學基礎。

(2)材料與方法

1. 流感病毒培養與細胞培養: 季節性流感包含自臨床分離株與實驗室病毒株 PR8 (H1N1)以 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞，培養流感病毒。MDCK 細胞以 EMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培養基(內含 10%胎牛血清)於 34°C，5%CO₂ 下繼代培養。
2. RT-PCR 流感基因片段: 利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science)進行樣品核酸萃取。將所得的 11 µl RNA

加入 25 μ l 之 RT-PCR 試劑中，並混以 0.5 μ l Enzyme mixture、一對各 0.5 μ l 10 μ M 的引子、12.5 μ l 2X RT-PCR Master Mix，其反應條件如下：42°C、1 h，94°C、3 min，40 cycles (95°C、30 sec，45°C、1 min，72°C、3 min)，72°C、10 min。進行 DNA 片段分析且萃取後，將流感基因片段的 DNA 接入 TA cloning 的質體中 (pGEM®-T Easy Vector Systems, Madison, Wisconsin)。

3. 質體 DNA 的建構:以 PCR 擴增 EGFP 與 Luciferase DNA 片段 (分別來自 pLAS5w-Luc-2A-eGFP 與 pNiFty3-Lucia)，並將 DNA 片段嵌入流感病毒 NS 與 NA 基因中，並在病毒基因與報告蛋白基因置入 2A autoproteolytic site (19 個胺基酸, ATNFSLLKQAGDVEENPG/P)(來自 pLAS5w-Luc-2A-eGFP)，避免病毒蛋白與報告蛋白形成同一融合蛋白，如圖一與圖二。
4. 反轉基因法產生流感報告病毒: 先取 1 μ g 的構築好 NS-GFP 或 NS-Luci 質體、以及 PR8 病毒株的其餘質體各 1 μ g，加入 OPTIMEM 至總體積為 50 μ l，再另外取 8 μ l 的 LipofectAMINE 2000 加入 242 μ l 的 OPTIMEM，混合後在室溫下靜置 5 分鐘。將兩種液體混合並靜置 20 分鐘。接著將混合液加入 2 ml 的 293T 細胞懸浮液中，轉染 16-24 小時後，移除上清液，再加入 2 ml 含 0.5% FBS DMEM，培養 48 小時後，再將病毒液以 MDCK 細胞進行增殖後，取 100 μ l 上清液利用 MDCK 細胞做病毒斑分析。
5. 病毒核酸檢測 real-time RT-PCR 與基因序列分析之步驟與引子、探針序列，詳見之前文獻[14,15]。
6. 血球凝集試驗:
 - a. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 μ L 的 PBS 溶液，於第一列加入 100 μ l 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100

μL PBS 取代抗原。

- b. 取第一列的抗原 50 μL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 μL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列，抗原呈現 2 倍～128 倍稀釋。
- c. 每孔分別加入 50 μl 的天竺鼠紅血球 (0.75%)，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4 °C 下靜置 30—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

7. 血球凝集抑制試驗

- a. 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至每 50 μL 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。
 - b. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 μL 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 μL 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25μL PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 μL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 μL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。抗血清呈現 2 倍～128 倍稀釋。抗血清須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。
 - c. 分別加入 25 μL (8 HA unit/50 μL) 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10—15 分鐘。
 - d. 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μL /well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。
8. 報告蛋白檢測:GFP 訊號直接以螢光顯微鏡觀察，冷光酶 (Luciferase) 定量分析，以 luciferase assay system 的試劑組來反應偵測冷光，將被流感病毒感染的細胞，加入酵素 受質 100μl 混合後以 冷光檢測儀器

偵測 luciferase 活性。

9. 即時動態流感病毒生長複製與感染特性: pNiFty3-Lucia 產出的 luciferase 是一分泌型蛋白, 可分集培養液檢測酵素活性, 將具報告蛋白 luciferase 流感病毒感染細胞後, 不同時間點收集培養液, 檢測 luciferase 活性。

(3)結果

1. 質體 DNA 的建構:

以 PCR 擴增 EGFP 與 Luciferase DNA 片段 (分別來自 pLAS5w-Luc-2A-eGFP 與 pNiFty3-Lucia), 並將 DNA 片段嵌入流感病毒 NS 與 NA 基因中, 並在病毒基因與報告蛋白基因置入 2A autoproteolytic site (19 個胺基酸, ATNFSLLKQAGDVEENPG/P)(來自 pLAS5w-Luc-2A-eGFP), 避免病毒蛋白與報告蛋白形成同一融合蛋白, 如圖一與圖二。

因流感病毒的 NS 基因片段會產生 NS1 與 NS2 蛋白, 且 NS2 蛋白經 spliced mRNA, 其蛋白質 N 端 10 個胺基酸與 NS1 重複 (圖一紅色方形), 在構築 plasmid 時經 PCR 將此段 DNA 與 NS2 ORF 連接, 並將原 NS splice acceptor site (CCAGGA, SA site) 突變成 CCCGGA, 終止 NS2 spliced mRNA 產生, 並以 polyproteins 方式產生 NS1-2A-reportor (GFP or Luciferase)-2A-NS2, 再經 autocleaved 2A 產生 NS1, reportor (GFP or Luciferase), NS2 蛋白。

將 reporters 置入 NA 基因時, 因 NA 除了的 5' 與 3' untranslated region 為病毒 packaging signal 外, 轉譯蛋白的 ORF, 5' 端 187 nt 與 3' 157 nt 也是病毒 packaging signal, 故在構築 reporter-NA 質體 DNA 時, 除了 NA ORF 的完整外, 須置入 NA 3' ORF 157 nt 與 28 nt untranslated sequences。

2. 反轉錄基因法產生流感報告病毒: 先取 1 μg 的構築好 NS-GFP 質體、以及 PR8 病毒株的其餘質體各 1 μg ，加入 OPTIMEM 至總體積為 50 μl ，再另外取 8 μl 的 LipofectAMINE 2000 加入 242 μl 的 OPTIMEM，混合後在室溫下靜置 5 分鐘。將兩種液體混合並靜置 20 分鐘。接著將混合液加入 2 ml 的 293T 細胞懸浮液中，轉染 16-24 小時後，移除上清液，再加入 2 ml 含 0.5% FBS DMEM，培養 48 小時後，再將病毒液以 MDCK 細胞進行增殖後。反轉錄基因法產生 NS-GFP 與 NA-GFP 流感報告病毒可感染 MDCK 細胞，造成 CPE，且帶有 GFP 螢光蛋白(圖三與圖四)。

3. 流感報告病毒複製能力: 測試 NS-GFP 與 NA-GFP 流感報告病毒，複製能力是否仍與親代野生株相同，將流感報告病毒與親代野生株感染 MDCK 細胞，不同時間收取病毒液，測量病毒之 HA 價位，結果發現 NS-GFP 與 NA-GFP 流感報告病毒與親代野生株產生的病毒量，感染後 24 小時，NA-GFP 流感報告病毒產生的病毒較多，感染後 48, 72, 96 小時三者產生的病毒量相似(圖 5)，這結果顯示 NS-GFP 與 NA-GFP 流感報告病毒，置入 GFP 後其病毒複製能力與親代野生株相同。

4. 建立具綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)與冷光素酶(luciferase)dual reporter 流感病毒: 為了易於視覺觀察與病毒複製定量，建立具綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)與冷光素酶(luciferase)dual reporter 流感病毒，將 GFP-NA 與 luciferase-NS 片段同時經轉錄基因法置入流感病毒基因體內。先取 1 μg 的構築好 NA-GFP 與 NS-Luci 質體、以及 PR8 病毒株的其餘質體 6 個各 1 μg (圖 6)，加入 OPTIMEM 至總體積為 50 μl ，再另外取 8 μl 的 LipofectAMINE 2000 加入 242 μl 的 OPTIMEM，混合後在室溫

下靜置 5 分鐘。將兩種液體混合並靜置 20 分鐘。接著將混合液加入 2 ml 的 293T 細胞懸浮液中，轉染 16-24 小時後，移除上清液，再加入 2 ml 含 0.5% FBS DMEM，培養 48 小時後，再將病毒液以 MDCK 細胞進行增殖後。反轉基因法產生流感報告病毒可感染 MDCK 細胞，造成 CPE，且帶有 GFP 螢光蛋白(圖 7)。

5. GFP-Luci dual reporter 流感病毒複製曲線:測試 GFP-Luci dual reporter 流感病毒複製曲線，比較 luciferase 定量與傳統 HA 定量，將流感報告病毒感染 MDCK 細胞，不同時間收取病毒液，測量 luciferase 量與病毒之 HA 價位，結果發現 luciferase 活性 72 小時明顯升高，HA 價位 120 小時升高(圖八)，這結果顯示使用 luciferase 活性可提早檢測病毒複製。

6. 構築不同 clade A/H1N1pdm09 HA 質體，進行流感反轉錄實驗，製備不同 clade A/H1N1 reporter 病毒，建立 reporter 流感病毒血清學抗體分析平台，並比較與傳統中和試驗的差異。台灣 2018-2019 年流行的 A/H1N1pdm09 病毒為 6B.1A clade，可再細分 183P-2, 5, 6，。選殖 subclade 183P-2, 183P-5, 183P-6 HA 基因，製備不同 clade A/H1N1pdm09 reporter 病毒(圖九)。

(4)討論

流感病毒每年引起季節性人類呼吸道疾病，而流感大流行的發生嚴重衝擊人類健康和經濟。疫苗與抗病毒藥物目前仍是流感防治主要手段方法，開發疫苗與抗病毒藥物，常需使用到體外或體內流感病毒感染實驗，也需要來測量感染後產生的病毒。為了能即時、方便且定量的偵測流感病毒感染過程，攜帶易於追蹤的報告蛋白的流感病毒已成一有力工具。本計畫，開發具不同報告蛋白(螢光與生物冷光基因)流感病毒，在病毒基因組的

神經胺酸酶(neuraminidase, NA)或非結構蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1) 區域，置入報告蛋白，且讓攜帶報告蛋白的流感病毒仍具與親代野生株相同的感染複製能力。流感病毒常因置入外來基因造成病毒無法複製或複製能力，主要是病毒的 8 個基因片段 packaging signals 複雜，除了的 5'與 3'untranslated region 為病毒 packaging signal 外，轉譯蛋白的 ORF 也是病毒 packaging signal，刪除或增加基因序列常造成該段病毒基因無法被包裹組裝進病毒顆粒內，導致無法正常產生病毒。先前的研究者，已成功將報告蛋白基因嵌入 PB2 [16], PA [17], NA [18], NS [19,20] 基因片段。構築流感報告病毒，必須注意三點，否則無法順利獲得具感染與複製的報告病毒。第一，流感病毒各基因片段長度為 2.4-09 kb，不能容忍插入太長報告基因。第二，嵌入報告基因時，應避免破壞位於病毒基因片段的 3'或 5'末端包裝信號(packaging signal)，這些包裝信號是病毒顆粒裝配所必需的。第三，病毒蛋白與報告蛋白形成同一融合蛋白，可能干擾正常病毒蛋白功能。為了避免嵌入報告蛋白後，影響流感病毒正常感染與複製，因 NS 基因為流感病毒各基因片段中最短，可容許插入較長報告基因，故以嵌入 NS 基因中報告最多，也較易成功。本計畫，將螢光或酵素冷光基因嵌入 NS 與 NA 基因片段中，並在病毒基因與報告蛋白基因置入 2A autoproteolytic site (19 個胺基酸, ATNFSLLKQAGDVEENPG/P) [12]，避免病毒蛋白與報告蛋白形成同一融合蛋白。

不同報告蛋白(螢光與生物冷光基因)流感報告病毒可應用於體外和體內研究(表一)，後續將使用流感報告蛋白建立病毒感染向性(tropism)、跨物種感染評估、動物感染模式、檢測抗體價位與病毒感染動力學等，流感報告病毒的開發與應用將可加速流感研究與有助於流感防治。

(5)結論與建議:

1. 完成綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)或冷光素酶(luciferase)之置入流感病毒 NA 與 NS 基因片段內之質體構築。
2. 完成流感反轉錄實驗，建立具冷光素酶(luciferase)或綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)報告蛋白之流感病毒。
3. NS-GFP 與 NA-GFP 流感報告病毒與原始病毒複製能力相同。
4. 本計畫設計與構築 NS-GFP 與 NA-GFP DNA 質體，報告蛋白的置入，不影響流感病毒的複製能力，適合進行後續研究。 NS-GFP 與 NA-GFP DNA 質體，可轉換成不同顏色螢光的報告蛋白，為流感報告病毒的工具箱。這些工具將有助於流感疫苗與藥物的研發。

(6)計畫重要研究成果及具體建議

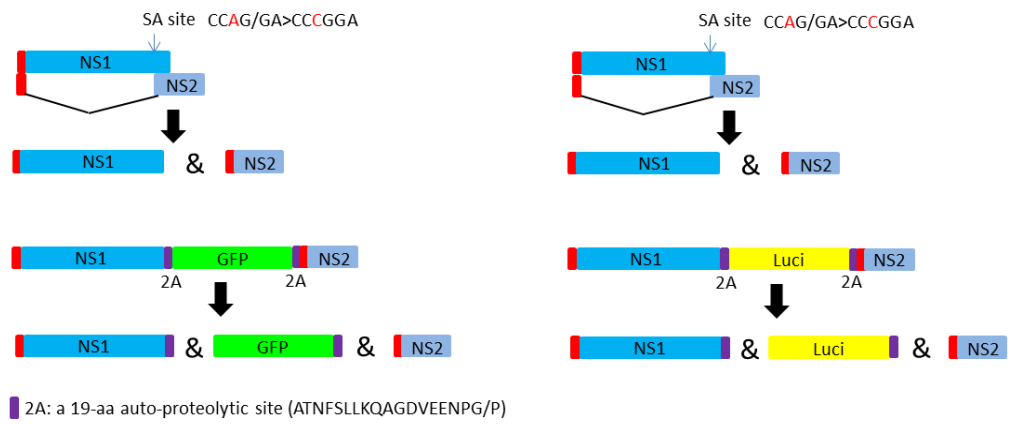
成功設計與置入報告蛋白在流感病毒NS與NA基因片段中，且不影響流感病毒的複製能力，此報告蛋白在NS與NA基因片段質體中，可轉換成不同顏色螢光的報告蛋白，為流感報告病毒的工具箱。這些工具將有助於流感疫苗與藥物的研發。

(7)參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

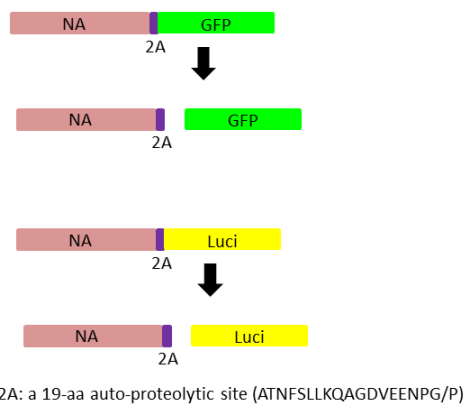
1. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nature reviews*. 2007;8(3):196-205.
2. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 2014;22(4):183-191.
3. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005;79(5):2814-2822.
4. Tong S, Li Y, Rivaitter P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(11):4269-4274.
5. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza a viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657.
6. Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*. 2014;383(9918):714-721.
7. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1888-1897.
8. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. 1999;354(9182):916-917.
9. Wei SH, Yang JR, Wu HS, et al. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med*. 2013;1(10):771-778.
10. CDC. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(17):467-470.
11. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003;362(9397):1733-1745.
12. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, Garcia-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(25):11531-11536.
13. Breen M, Nogales A, Baker SF, Martinez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*. 2016;8(7).
14. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, et al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:76-82.
15. Yang JR, Huang YP, Chang FY, et al. New variants and age shift to high fatality groups contribute to severe successive waves in the 2009 influenza pandemic in Taiwan. *PloS one*. 2011;6(11):e28288.

16. Avilov SV, Moisy D, Naffakh N, Cusack S. Influenza A virus progeny vRNP trafficking in live infected cells studied with the virus-encoded fluorescently tagged PB2 protein. *Vaccine*. 2012;30(51):7411-7417.
17. Spronken MI, Short KR, Herfst S, et al. Optimisations and Challenges Involved in the Creation of Various Bioluminescent and Fluorescent Influenza A Virus Strains for In Vitro and In Vivo Applications. *PLoS One*. 2015;10(8):e0133888.
18. Li F, Feng L, Pan W, et al. Generation of replication-competent recombinant influenza A viruses carrying a reporter gene harbored in the neuraminidase segment. *J Virol*. 2010;84(22):12075-12081.
19. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, et al. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun*. 2015;6:6600.
20. Reuther P, Gopfert K, Dudek AH, Heiner M, Herold S, Schwemmle M. Generation of a variety of stable Influenza A reporter viruses by genetic engineering of the NS gene segment. *Scientific reports*. 2015;5:11346.

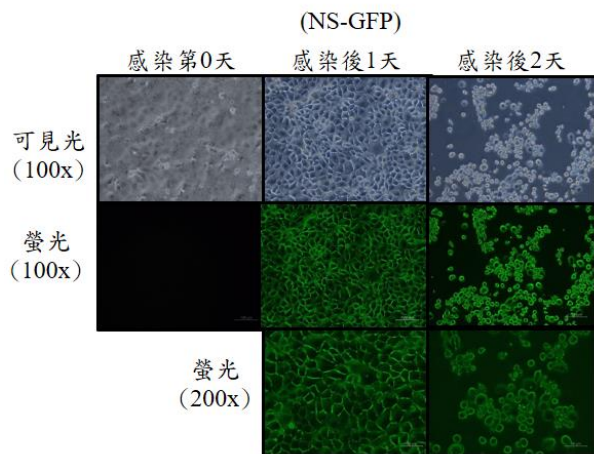
(8)圖、表



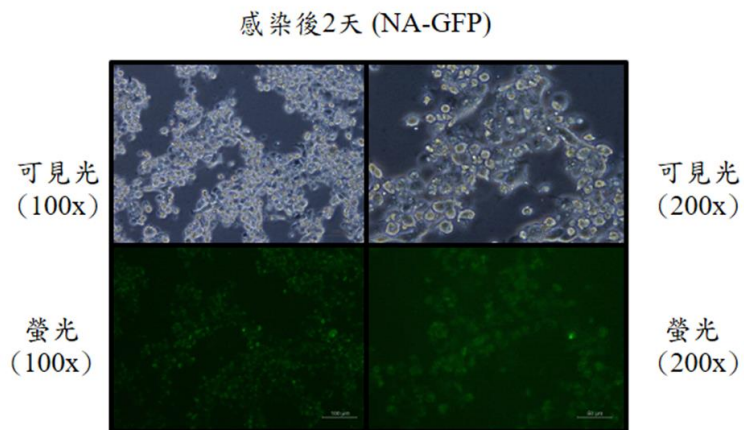
圖一、報告蛋白 EGFP 和 Luciferase 與 NS1, NS2 基因相對位置圖示。



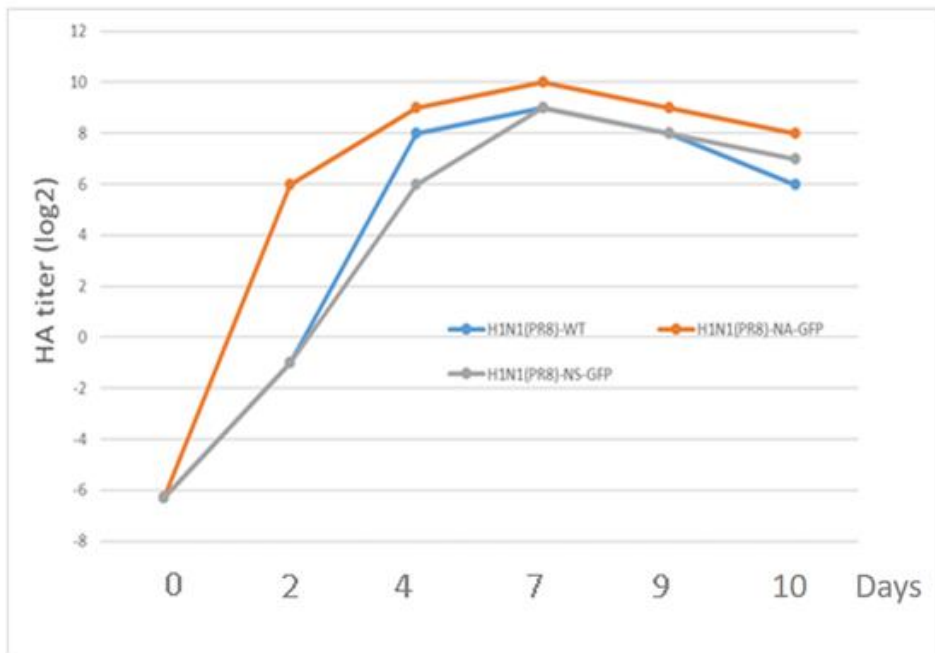
圖二、報告蛋白 EGFP 和 Luciferase 與 NA 基因相對位置圖示。



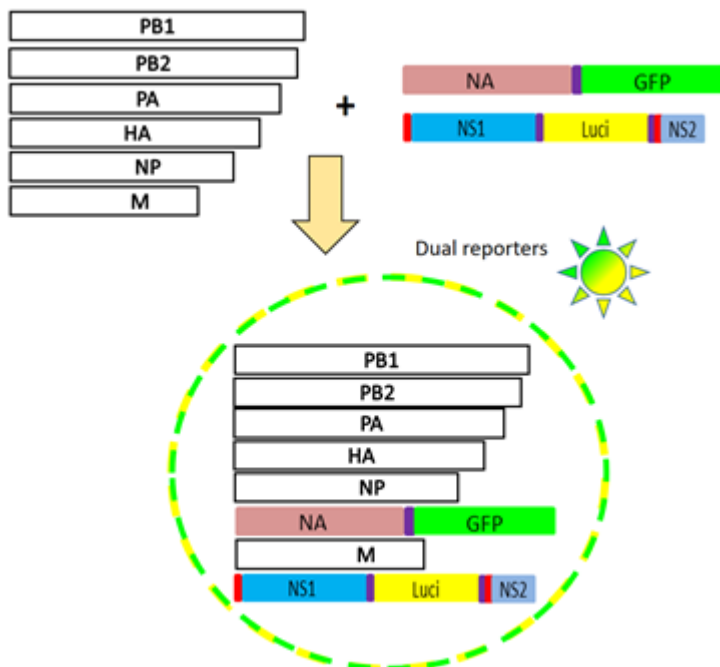
圖三、influenza GFP(NS-GFP)報告病毒感染 MDCK 細胞產生 CPE。



圖四、influenza GFP(NA-GFP)報告病毒感染 MDCK 細胞產生 CPE。

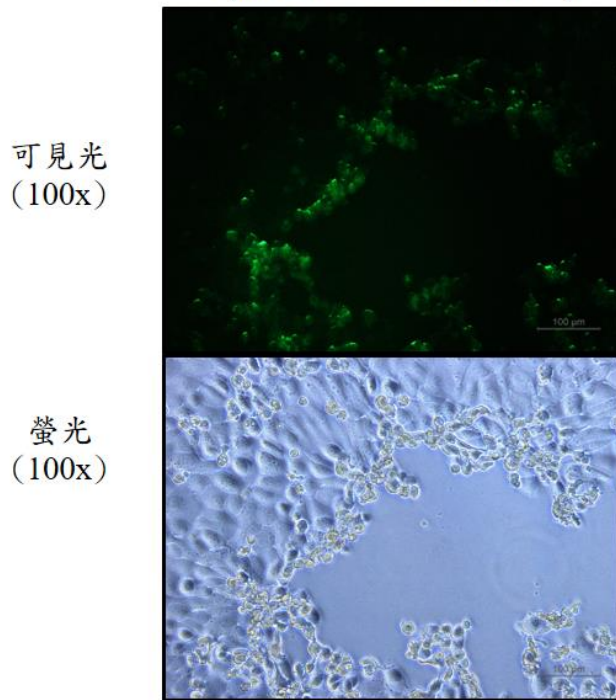


圖五、 influenza GFP (NS-GFP 與 NA-GFP)報告病毒感染 MDCK 細胞，病毒複製曲線圖，兩種 GFP 流感報告病毒，病毒複製能力與親代野生株相似。

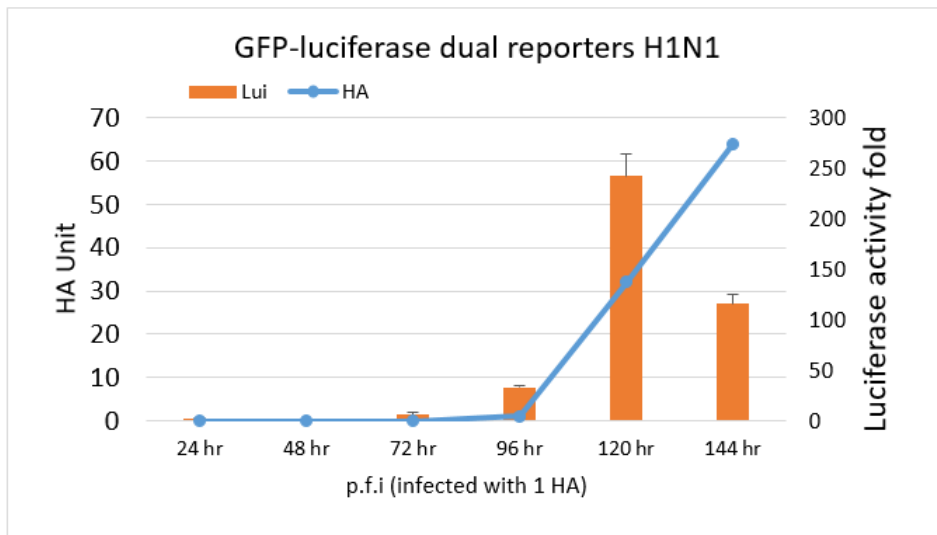


圖六、製備具 GFP 與 luciferase dual reporters 流感病毒。

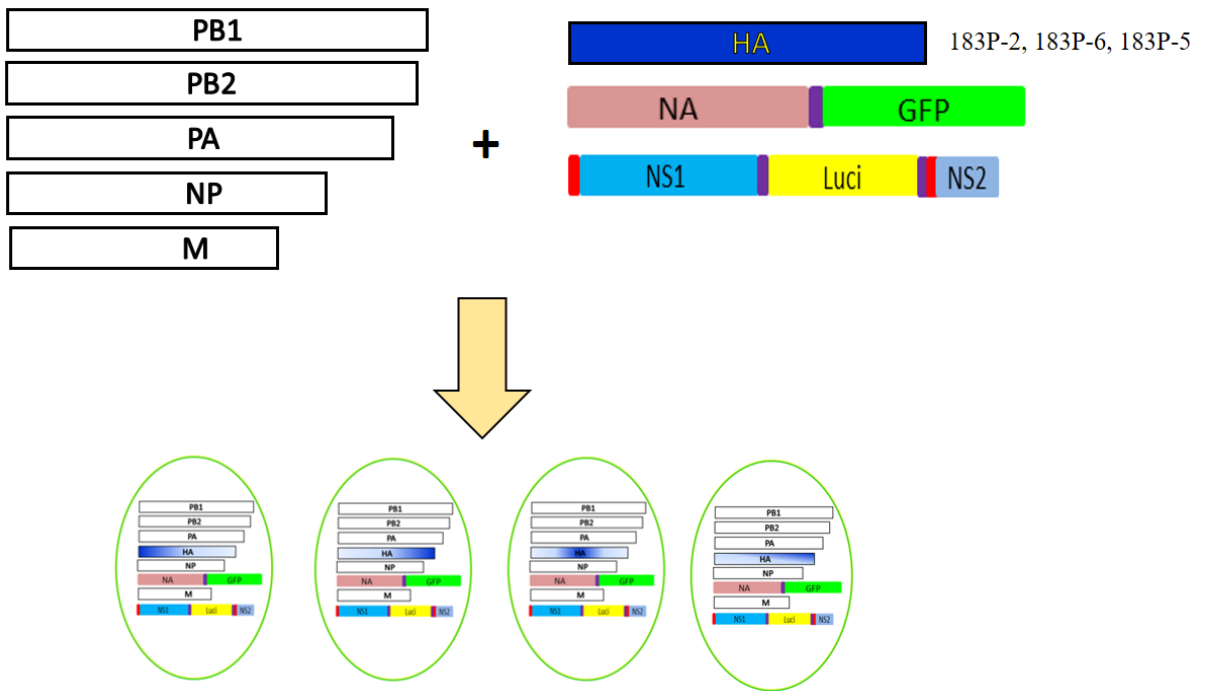
感染後3天
(NA-GFP+NS-Luciferase)



圖七、GFP 與 luciferase dual reporters 流感報告病毒 MDCK 細胞產生 CPE。



圖八、GFP 與 luciferase dual reporters 流感報告病毒複製曲線圖。



圖九、構築不同 clade A/H1N1pdm09 HA 質體，進行流感反轉錄實驗，製備不同 clade A/H1N1pdm09 reporter 病毒。

表一 1. 流感報告病毒 (螢光或生物冷光)之特性與應用

Properties	螢光, Fluorescence	冷光, Bioluminescence
Enzymatic amplification of signal	NO	YES
Substrate required for assay	NO	YES

表一 1. 流感報告病毒 (螢光或生物冷光)之特性與應用

Properties	螢光, Fluorescence	冷光, Bioluminescence
Enzymatic amplification of signal	NO	YES
Substrate required for assay	NO	YES
High Reproducibility	YES	YES
FACS-compatible	YES	NO
In vitro applications	YES	YES
Ex vivo applications	YES	YES
In vivo applications	YES	YES
Analysis of individual cells	YES	NO
High-Throughput Screening	YES	YES
Analysis of intermolecular interactions	YES	NO

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
108 年度計畫重要研究成果及具體建議
(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：流感病毒報告病毒系統與流感病毒跨物種感染研究

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-123505

1.計畫之新發現或新發明

成功設計與置入報告蛋白在流感病毒 NS 與 NA 基因片段中，且不影響流感病毒的複製能力，並建立 GFP+Luci dual reporters 系統，以利流感病毒定性、定量、位置分析。報告蛋白在 NS 與 NA 基因片段質體中，可轉換成不同顏色螢光的報告蛋白，為流感報告病毒的工具箱。這些工具將可有助於流感病毒特性分析、流感疫苗與抗病毒藥物的研發。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

流感病毒引起人類與其它物種嚴重疾病流行，嚴重衝擊人類健康和經濟，應加強對流感病毒研究與了解，將有助於流感防治。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

流感病毒引起人類與其它物種嚴重疾病流行，嚴重衝擊人類健康和經濟，應加強對流感病毒研究與了解，將有助於流感防治。

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-123505

計畫名稱：流感病毒報告病毒系統與流感病毒跨物種感染研究

計畫主持人：劉銘燦

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	非 CDC 所需，已同意明年終止，請切實執行。	明年計劃已終止。	無

備註：請將此表單附在計畫書後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。