

計畫編號: DOH 94 - DC - 1012

行政院衛生署 九十四 年度委託研究計畫

登革病毒非結構性蛋白之昆蟲細胞大量表現系統

計畫名稱

委託研究成果報告

執行機構：國立陽明大學

研究主持人：胡小婷

研究人員：

執行期間: 94年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
(1) 前言	(5-7)
(2) 材料與方法	(7-8)
(3) 結果	(9)
(4) 討論	(10)
(5) 結論與建議	(10)
(6) 參考文獻	(10-14)
(7) 圖、表。	(15-20)

共 (20) 頁

中文摘要：

關鍵詞：登革病毒、非結構蛋白質三(NS3)、非結構蛋白質五(NS5)、貝庫勒病毒(Baculovirus)、昆蟲細胞。

在熱帶及亞熱帶地區肆虐的登革熱病毒，是以蚊蟲（mosquito）為媒介的節肢動物病毒（Arbovirus）。近年來由於全球溫室化效應影響，登革熱的疫情在世界各地都有增加趨勢，東南亞各國更是主要疫區。因此開發快速、準確的檢驗方法，能早期診斷登革熱感染，對疫情的監視與防治十分重要。有關登革熱的檢驗試劑目前的发展多著重在以登革病毒之結構性蛋白質如外套膜蛋白質(E/M)和非結構蛋白質一(NS1)為抗原，來偵測感染者之IgM、IgG抗體，本計畫之協同研究主持人黃智雄博士，更建立了一系列快速ELISA檢驗方法，能大量的分析血清檢體，早期診斷出登革熱感染。其中外套膜蛋白質(E/M)特異性IgM與IgG抗體能鑑別診斷登革熱感染，並能區分第一次或第二次登革熱感染；而非結構蛋白質一(NS1)特異性IgG抗體除了區分第一次或第二次登革熱感染外，更能鑑別第一次感染者之登革病毒血清型別。依據Western Blot 及 MIA的分析，登革病毒與日本腦炎病毒及西奈爾病毒的NS1、NS3、與NS5蛋白質應是引發抗體反應最重要的抗原。Valdes, K等人研究十個初級和十個二級登革熱急性期血清中抗登革病毒二型及四型之抗體發現，大多數的血清中存在anti-E、-NS3及-NS5之抗體。此表示E、NS3及NS5 抗原很有潛力作為早期診斷登革熱及DHF之工具。

為了獲得這些細胞內表現之NS3及NS5 抗原，本實驗室曾經利用大腸桿菌系統表現登革病毒NS3及NS5等基因重組蛋白質及其片段，然而細菌能大量表現之蛋白質大小通常低於100 kD，且因缺少醣化作用、醯化作用及完整之磷酸化作用，所產生之蛋白質可能會影響其抗原性，故本研究打算建立昆蟲細胞大量表現系統，以貝庫勒病毒(Baculovirus)為載體表現NS3及NS5等基因重組蛋白質及其片段蛋白質，予以大量生產後，再以HiTrap chelating column 來純化。結果總計得到NS3₃₂₈₋₆₁₅、NS5₂₆₁₋₆₅₆與NS5₂₆₁₋₉₀₀三種純化蛋白，雖然這些純化蛋白是由變性試劑純化出來，但是因此裸露出來的氨基酸序列仍可能被病人血清中的抗體所辨認，故這些純化蛋白質仍可用來做登革熱病毒感染之檢測試劑。未來還可再利用緩衝液透析法將其回復自然構型後再行開發新的檢測試劑。雖然本計畫最初目的也希望得到大量表現之全長NS3及NS5蛋白，但由於其基因之特殊性因此常造成載體變異及刪除。有趣的是，完整的NS3與NS5基因雖無法完整裝到蛋白表現載體，但是只要將NS3與NS5基因的上下游各約40個核甘酸包含在內就可以裝載於基因選殖載體上。因此可以考慮將NS3與NS5蛋白多融合一些上游氨基酸，也許可以得到完整的NS3與NS5蛋白。

Abstract:

Keywords: Dengue virus, NS3, NS5, baculovirus, insect cell.

Dengue virus, a member of arbovirus that is transmitted by mosquito, is prevalent in tropic and subtropic area. The infection of dengue virus increases due to the effect of global warming, therefore, the development of early diagnostic reagents is very important to the prevention and treatment of dengue viral disease. In developed diagnostic kits, the envelope protein (E/M) and non-structural protein NS1 of dengue virus have been used as the antigens to detect IgM and IgG antibodies of patients. Dr. J.H. Huang, the cooperator of this project, has established an ELISA assay to analyze the patient's serum for early diagnosis. The IgM and IgG antibodies against E/M protein of dengue virus can distinguish primary and secondary infections. The IgG antibody against NS1 not only distinguished primary and secondary infections but also differentiated the serotypes of dengue virus from primary infection. According to the analysis of western blot and MIA, the NS1, NS3, and NS5 are the most important proteins to cause antibody reactions to dengue, Japanese encephalitis, and west Nile viruses. Valdes, K *et al.*, found that anti-E, -NS3, and -NS5 antibodies were present in the serum of patients that were infected by dengue virus type 2 and 4 in the primary or secondary stage. This indicates that NS3 and NS5 can be potential tools for the development of kits to diagnose dengue fever and dengue hemorrhagic fever.

To obtain the intracellular antigens NS3 and NS5, we had used *E. coli* system to express and isolate these proteins. However, these bacteria synthesized protein are not modified by glycosylation, acetylation, and phosphorylation, which may affect the antigenicity of protein. To solve this problem, in this project we established the baculovirus-insect system to overexpress NS3 and NS5 proteins and purified these proteins by HiTrap chelating column. As a result, NS3₃₂₈₋₆₁₅, NS5₂₆₁₋₆₅₆, and NS5₂₆₁₋₉₀₀ containing portion of NS3 and NS5 proteins were obtained. Although these proteins are in denatured form, these exposed amino acid sequences still can be recognized by patient's antibodies. Therefore, these purified proteins are useful for the establishment of the diagnostic kits for dengue viral infection. In fact, through dialysis buffer, these denatured proteins also can be renatured to native form for diagnosis usage in future. Although obtaining the full-length NS3 and NS5 protein is one of our specific aims, the characteristics of rearrangement and deletion of these gene sequences in the expression vectors frustrated our plan. However, an interesting finding that the fusion of 40 bp at the upstream of these genes would not cause the instability of cloning vector suggested that the fusion of extra amino acid sequences at the upstream of NS3 and NS5 proteins might be the way to get the expression of full-length NS3 and NS5 proteins.

(1) 前言

登革病毒與日本腦炎病毒同屬於黃病毒科(*Flaviviridae*)。登革病毒計有第一到第四共四種血清型(DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4)，隨著登革熱於全世界病例數的增加、以及不同血清型的交互出現，登革出血熱的病例數則逐年增加。根據世界衛生組織所收集的資料，1960年之前，原本僅限於少數熱帶國家有登革出血熱的病例在短短約四十年之間（1960年到1999年）便已擴及到整個熱帶以及大部份亞熱帶的國家(WHO, 2000)。原本不具生命威脅性的登革熱，逐漸伴隨著嚴重的登革出血熱，以及其所引起致命的登革休克症狀(dengue shock syndrome; DSS)，造成亞熱帶與熱帶人民揮之不去的夢魘。據世界衛生組織估計，在邁入2000年後，每年約會有400,000個出血性登革熱病例、1,000,000個登革熱病例，全世界將會有2,500,000,000人生活在登革熱的威脅下 (WHO, 2000)。在東南亞許多地方,包括台灣，是登革病毒與日本腦炎病毒重合流行的地區。臺灣地區在1915、1931、1942年有三次全島性登革熱流行的記錄(Gubler, 1997)。其後，約有40年沒有相關的病例報告。直到1981年，屏東縣離島的小琉球又爆發了第二型登革熱，80%的居民受到波及，約有1萬人感染(謝維詮等，1981；吳盈昌，1986)。1987年高雄屏東地區再度爆發了以第一型登革病毒為主的流行，1989年至1993年只有少數的病例或小規模的流行。1994年起，高雄市左營區爆發第三型登革病毒的流行，接著在臺南市有第一型登革病毒的感染發生，並出現臺灣第一名因登革出血熱死亡的病例，迄此年年底共有11名符合世界衛生組織登革出血熱標準的病例發生(衛生署預研所83年登革熱偵測年報，1995)。1995年，台灣本島的北、中、南地區，曾分別發生四型登革病毒之流行，全年共計有369名確定病例，其中329例為本土病例，而且四型登革病毒皆已出現本土性病例(衛生署預研所84年登革熱偵測年報，1996)。登革熱流行的擴及全島以及嚴重臨床病例的出現增加，已使其成為臺灣公共衛生界的重要防疫問題。

登革病毒顆粒大小約100 nm，中間是半徑30 nm左右的核心蛋白外鞘(nucleocapsid)，由核心蛋白(capsid protein; C)及單股核糖核酸構成的基因體(vRNA genome)所組成，外面則包覆著含有膜蛋白(membrane protein; M)、包膜蛋白(envelope protein; E)以及磷脂層的外套膜(Henchal & Putnak, 1990, Russell *et al.*, 1980)。在登革病毒感染寄主細胞後，會作出一條含有3,391個胺基酸的前驅蛋白(polyprotein) (Deubel *et al.*, 1988)，待寄主細胞之訊息酵素(signalase)及病毒本身之蛋白酶(protease)作用後，可切出多個次單位蛋白，包括結構性蛋白如C、M、E及至少七個非結構性蛋白NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b及NS5 (Cahour *et al.*, 1992, Hase *et al.*, 1989, Henchal & Putnak, 1990, Preugschat *et al.*, 1990, Zhang *et al.*, 1992)。第三非結構蛋白(NS3)為病毒主要的蛋白酶，負責進一步之蛋白切割(processing)，其也為解雙股核糖核酸酶(RNA helicase)，在核糖核酸複製時，負責解開雙股之核糖核酸 (Hase *et al.*, 1989, Henchal & Putnak, 1990)。第五非結構蛋白(NS5)為登革病毒蛋白中最大的蛋白，分子量大約有104 kD，負責核糖核酸之複

製。其胺端368個殘基中，包含與S-adenosyl methionine transferase (SAM)相似的功能區域 (Koonin, 1993)，此一區域已在活體外被證實為形成RNA Cap時所需的(nucleoside-2'-O-)-methyltransferase (Egloff *et al.*, 2002)。而其後自第455殘基至末端，則含有GDD聚合酶功能序列、以及8個保留性高且與許多以核糖核酸為模版之核糖核酸合成酶相似度甚高的功能區域(POL domain) (Koonin, 1993)。利用大腸桿菌所生產的重組NS5蛋白，的確可以核糖核酸為模版在活體外進行核糖核酸之合成 (Tan *et al.*, 1996)。當登革病毒感染細胞後，除了磷酸化程度較低的NS5蛋白會進入細胞核，大部份NS5蛋白主要會分佈於宿主細胞核的周圍，與同樣會結合在3'端UTR上的NS3蛋白結合而構成病毒複製體 (Johansson *et al.*, 2001, Kapoor *et al.*, 1995)。其相互的結合更會提高NS3之核糖核苷酸分解酶的活性 (Cui *et al.*, 1998)。另外，介於SAM與POL功能區域之間的蛋白片段，包含了兩個二段式的細胞核導向序列，其上含有CK II磷酸激酶的磷酸位置。當其被宿主的磷酸化後，其進核的能力則大受抑制，反應出細胞核外的NS5蛋白 所受的磷酸化程度較高 (Forwood *et al.*, 1999)。

較常使用的登革熱實驗室檢驗方法，包括病毒分離、聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 及核酸定序、連接酵素免疫分析法 (ELISA)、中和抗體分析法等。病毒分離及RT-PCR主要在測定急性期血清檢體中的病毒抗原或RNA。以連接酵素免疫分析法測定登革病毒特異性IgM (capture IgM ELISA) 及IgG (capture IgG ELISA) 抗體，其中IgG抗體分析可用以區分是初次或二次 (多次) 登革病毒感染。以中和抗體分析法測恢復期血清登革熱中和抗體，若中和抗體效價比急性期者有4倍或4倍以上上升者，即判定為確定病例。中和抗體分析法有極高的特異性，能鑑定登革病毒感染之血清型別。由於檢驗技術的不斷改進，新的登革熱檢驗方法也陸續被開發出來，包括：1) 同步螢光定量聚合酵素連鎖反應 (real time fluorescence quantitative PCR)；2) 登革病毒抗原連接酵素免疫分析法 (antigen ELISA)；及3) 快速免疫色析法 (immunochromatographer)；4) 非結構性蛋白質一的連接酵素免疫分析法(NS1-specific IgM and IgG ELISA) ；及5) 以基因重組蛋白質為基礎的免疫分析法。同步螢光定量聚合酵素連鎖反應是最新的定量PCR檢驗方法，在靈敏度 (可偵測到小於100-1000 copy RNA per mL) 及速度上 (8小時內可完成) 都較傳統的PCR方法優越，而且有自動化的優點，可操作大量檢體及減少污染的機會，未來將逐漸取代傳統的PCR方法。登革病毒抗原連接酵素免疫分析法是美國Globio公司新開發的方法，利用三明治ELISA原理可測定急性期血清中的登革病毒，其優點為快速及成本較低，且可以做血清型鑑定，但缺點則為靈敏度與特異性較PCR方法稍差，比較適合做初步篩選用。快速免疫色析法則是利用色析原理，進行抗原與抗體反應，可以同時測定IgM及IgG抗體，此試劑之靈敏度與特異性較差，但全部反應時間只需15分鐘是其最大優點，也較適合做初步篩選用。非結構性蛋白質一的連接酵素免疫分析法是台灣疾病管制局所研發出的新檢驗方法，可以分別測定急性期血清中的登革病毒非結構性蛋白質一抗原及恢復期血清中的IgM、IgA、IgG抗體。此方法可以區分初次或二次 (多次) 登革病毒感染，並能鑑定登

革病毒初次感染時之血清型別，因此當應用於血清流行病學研究時，可取代中和抗體分析法，進行快速、大量的血清檢體分析。

以基因重組蛋白質為基礎的免疫分析法是近年來血清學檢驗的重要方法之一，近年來由於基因工程的快速進展，且應用於病毒學與免疫學之研究，使得抗病毒血清學和疫苗的開發脫離傳統的模式，有突破性的發展。在診斷試劑的發展方面，C型肝炎病毒(HCV)，人類免疫不全病毒(HIV)，B型肝炎病毒(HBV)，與漢它病毒(Hantaviruses) 等都有成功的例子。事實上，澳洲的PanBio公司已推出以基因重組外套膜(envelope)蛋白質為抗原的第二代登革熱檢驗試劑。開發其他基因重組蛋白質為抗原的檢驗試劑，應有助於未來登革病毒的檢驗。雖然相關的研究並不多，但依據Western Blot 及 MIA的分析，登革病毒與日本腦炎病毒及西奈爾病毒的NS1、NS3、與NS5蛋白質應是引發抗體反應最重要的抗原 (Kuno et al., 1990, Churdboonchart et al., 1991; Patarapotikul et al., 1993; Se-Thoe et al., 1999; Wong et al., 2003)。Valdes, K等人研究十個初級和十個二級登革熱急性期血清中抗登革病毒二型及四型之抗體發現，大多數的血清中存在anti-E, -NS3及-NS5之抗體。此表示E, NS3及NS5 抗原很有潛力作為早期診斷登革熱及DHF之工具 (Valdes et al., 2000)。另外，由Wong等人之研究得知，NS5-based assay很可靠的區分西奈爾病毒與登革病毒或與聖路易氏腦炎病毒之感染 (Wong et al., 2003)。根據上述之報導，發展登革病毒NS3及NS5 抗原抗體檢驗試劑應該很有前景。此外，登革病毒NS3及NS5蛋白質會形成複合物進入細胞核(Kapoor et al., 1995)，其對細胞之影響尚有許多值得探討，所以進行登革病毒NS3及NS5蛋白質之研究一定有其學術上之價值。

傳統上都利用哺乳類動物細胞製備抗原，由於產量不佳使得製造成本昂貴又費時。故本實驗室曾經嘗試使用大腸桿菌系統來製備基因重組之NS3 (圖一)及NS5抗原，然而細菌能大量表現之蛋白質大小通常低於100 kD，且因缺少糖化作用、醃化作用及完整之磷酸化作用，所產生之蛋白質可能會影響其抗原性。為了解決這種問題，PHARMINGEN公司已發展出利用貝庫勒病毒(Baculovirus)為載體於昆蟲細胞中大量表現基因重組抗原之系統。此外，為減少由細胞內萃取基因重組蛋白時所伴隨的細胞蛋白質之污染，該公司亦發展出一套可以將蛋白質分泌至細胞外之表現質體，故本研究打算利用該公司發展之系統來製備基因重組之NS3及NS5抗原，希望能製備出大量且抗原性佳之純化蛋白質，以之開發出高特异性及高靈敏度的血清學檢驗試劑以供免疫檢驗使用，並進一步分析患者對這類病毒抗原之抗體反應，以應用於疾病之臨床診斷及致病機轉之研究。

(2) 材料與方法

一、蛋白表現之病毒載體建立

將含NS5、NS3相關片段的pFastBac™ HTA質體，轉殖到DH10BAC (Invitrogen, 10361-012)進行轉位重組，選取對Gentamycin有抗性之白色菌落，再以PCR方式進

行確認是否為專一轉位重組。將專一轉位重組之菌落以200毫升含相關抗生素之LB培養液培養20小時後，利用殖體純化套組將質體分離出，最終溶於300 μ l無菌水中。

二、昆蟲細胞轉殖

將1毫升昆蟲細胞（約 2×10^6 ）置於3公分培養皿靜置1小時。此時準備兩個微量離心管，一管取5~10 μ l的質體溶液與100 μ l培養液（Sf-900 II SFM, Invitrogen, 10902-096），另一管取6 μ l CellFECTIN (Invitrogen, 10362-010)轉殖輔助溶液與100 μ l培養液混合。之後將兩管一起混合均勻後靜置45分鐘，之後加入0.8毫升培養液混合均勻。將混合液加至昆蟲細胞上置於28 $^{\circ}$ C靜置4個小時，之後加入1毫升新鮮細胞培養液再持續培養3天。培養3天後蒐集含病毒之上清液。

三、檢測蛋白質表現

將轉殖培養3天後的昆蟲細胞刮下並溶於50 μ l細胞溶解液，均勻混合後以每分鐘14,000 轉速將上清液與不溶的細胞碎片分離。不溶的細胞碎片再以100 μ l sample buffer經100 $^{\circ}$ C處理。上清液與sample buffer萃取液分別取10 μ l做電泳分析，並以anti-His6的抗體做西方墨點分析。

四、蛋白表現之病毒載體大量製備

將第一次取得含病毒之上清液以百分之一比例加入100毫升對數期生長之昆蟲細胞（約每毫升 2×10^6 個細胞），搖晃培養5天。以每分鐘1,500轉的轉速將細胞與病毒溶液分離。此高濃度病毒溶液避光儲存於4 $^{\circ}$ C。

五、大量蛋白表現

取10毫升病毒儲備液，加至100毫升對數期生長之昆蟲細胞液，混合培養72小時。以每分鐘1500轉的速度將細胞沈降，分離出之昆蟲細胞以10毫升細胞溶解液混合均勻置放於-80 $^{\circ}$ C約30分鐘，將冰凍過的細胞放置37 $^{\circ}$ C水浴槽急速解凍。再以10,000 xg的離心力將上清液與不溶的細胞碎片分離。不溶的細胞碎片再以10毫升8 M尿素溶液萃取蛋白。將上清液與8M尿素萃取液各取10 μ l做蛋白質電泳分析。

六、蛋白質純化與分析

將10毫升8M尿素萃取之His6標示的融合蛋白與Probond resin (Invitrogen, 46-0019)混合，並置於4 $^{\circ}$ C旋轉混合8小時。利用每分鐘7000轉離心將resin分離出。再加入50毫升A緩衝液清洗（20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 30 mM imidazole）。最終再以2毫升B緩衝液（20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole）將蛋白質沖出。取20 μ l做電泳分析。

(3) 結果

一、登革病毒NS3、NS5基因之複製及定序：

本計畫利用RT PCR合成DEN2病毒株（編號：454009）之cDNA，再利用PCR合成各含NS3與NS5全長之基因序列並予以定序。結果如圖一及圖二。經與其它DEN2病毒株相互比較，發現有多處變異但仍具有完整之蛋白質轉譯序列。

二、登革病毒NS3、NS5基因表現質體之建構：

為表現全長或部份之NS3、NS5蛋白質，首先利用PCR合成含全長或部份基因之NS3/NS5，並將之選殖至yT&A載體。再由此載體利用適當限制酶切出含NS3/NS5之DNA片段並裝載至pFastBac™ HTA質體，其後再利用轉位子將欲表現之NS3/NS5基因轉位重組至Baculovirus之基因體（Bacmid）。結果如圖三：計得到帶有NS3/NS5基因之yT&A載體共7個，pFastBac™ HTA共5個，Bacmid共5個（以“+”表示建構成功，“-”表示未建構成功）。

三、登革病毒NS3、NS5蛋白表現檢測

本次計畫利用Baculo病毒為表現載體於昆蟲細胞內表現登革病毒非結構蛋白NS3與NS5，因為完整NS3與NS5基因裝載於yT&A載體時會發生基因重組的現象，無法得到完整的基因片段進行表現，因此將NS3基因分成兩片段分別為NS31-335與NS3328-615，而NS5基因分成三片段，分別為NS51-656，NS5261-656與NS5261-900。如此我們順利得到可表現部份片段的病毒表現載體。

在所得到的蛋白質表現載體中帶有NS31-335與NS51-656基因片段的病毒載體無法在Sf9細胞內表現，無論是在上清液或是不溶的細胞碎片部份都無法檢測到蛋白質表現，如圖四A（西方墨點法）與圖四B（Coomassie blue染色圖）之Lane 1、3、5和Lane 7。帶有NS3328-615，NS5261-656及NS5261-900基因片段的病毒載體則可以在Sf9細胞表現，不過這些基因片段所表現的蛋白質都形成inclusion body而不溶於上清液。如圖四A、B之Lane 2、4、6與8，及圖四C、D之Lane 2、4所示。

四、登革病毒NS3、NS5蛋白之大量表現與純化

因為所表現之NS3328-615，NS5261-656及NS5261-900三個蛋白質片段都形成inclusion body，因此我們利用8M尿素溶液將不溶蛋白變性萃取出來，再經ProBond (Invitrogen) resin管柱純化後得到純度較高的蛋白質，如圖五A與B所示。經純化後各片段蛋白濃度為 NS3328-615 40 µg/ml，NS5261-656 120 µg/ml，NS5261-900 40 µg/ml。

(4) 討論

完整的NS3與NS5基因片段無法完整裝載入表現載體，但是只要將NS3與NS5基因的上下游各約40個核苷酸包含在內就可以裝載於yT&A載體上。因此可以考慮將NS3與NS5蛋白多融合一些上游氨基酸，也許可以得到完整的NS3與NS5蛋白。

此外大量表現蛋白質（100-200毫升）時再經純化的結果發現NS3₃₂₈₋₆₁₅及NS5₂₆₁₋₉₀₀兩個蛋白質有瓦解的現象（如圖五A與B所示），與少量表現時不同。因此在大量表現蛋白質的後續萃取純化過程須加入多種蛋白水解酵素抑制劑，並儘量縮短操作時間以期蛋白質崩解現象的減緩，如此可以得到更多的抗原。

由於本系統所表現之蛋白質量大所以容易形成inclusion body，目前得到的蛋白雖然為變性狀態，但可經由緩衝液透析使其再回復自然構型。

(5) 結論與建議

本計畫總計得到NS3₃₂₈₋₆₁₅、NS5₂₆₁₋₆₅₆與NS5₂₆₁₋₉₀₀三種純化蛋白，雖然這些純化蛋白是由變性試劑純化出來，但是因此裸露出來的氨基酸序列仍可能被病人血清中的抗體所辨認，故這些純化蛋白質仍可用來做登革熱病毒感染之檢測試劑。未來還可再利用緩衝液透析法將其回復自然構形後再行開發新的檢驗試劑。

本計畫最初目的也希望得到大量表現之全長NS3及NS5蛋白，但由於其基因之特殊性因此常造成載體變異及刪除。有趣的是，完整的NS3與NS5基因雖無法完整裝載到蛋白表現載體，但是只要將NS3與NS5基因的上下游各約40個核苷酸包含在內就可以裝載於基因選殖載體上。因此可以考慮將NS3與NS5蛋白多融合一些上游氨基酸，也許可以得到完整的NS3與NS5蛋白。

(6) 參考文獻

1. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antiserum. *J. Gen. Virol.* 1989; 70:37-43.
2. Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K. E., and Padmanabhan, R. *J. Biol. Chem.* 270, 19100-19106(1995)
3. Shope R. Medical significance of Togaviruses: An overview of diseases in

- man and in domestic and wild vertebrate animals. In "The Togaviruses" (R. W. Schlesinger, Ed.), Academic Press, New York/London. 1980: 47-82.
4. Monath TP. Pathobiology of flaviviruses. In: S.Schlesinger and M. Schlesinger. eds. The Togaviruses and Flaviviruses. New York: Plenum Press, 1986: 375-440.
 5. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:418-427.
 6. Makino Y, Tadano M, Saito M, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38:951-955.
 7. Oya A. Japanese encephalitis vaccine. *Acta. Paediatr. Jpn.* 1988; 30:175.
 8. Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, Mumford J, Binns M. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of Anti-NS1 antibody in post infection. *J. Virol. Methods* 1997; 65:255-263.
 9. Bougrine SI, Fihri OF, Fehri MM. Western immunoblotting as a method for the detection of African horse sickness virus protein-specific antibodies: differentiation between infected and vaccinated horses. *Arch. Virol. Suppl.* 1998; 14:329-336.
 10. Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, et al. Differentiation infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, nonstructural proteins in ELISA. *Vaccine* 1998; 16:446-459.
 11. Patarapotikul J, Pothipunya S, Wanotayan R, Hongyantarachai A, Tharavanij S. Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections. *Southeast Asean J. Trop. Med. Public Health* 1993; 24:269-276.
 12. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; 44:649-688.
 13. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. *Virology* 1989; 171:302-305.
 14. Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 1989; 169:354-364.
 15. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath T. Protection against yellow fever virus in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J. Virol.* 1986; 60:1153-1155.

16. Cane PA, Gould EA. Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized nonstructural protein (NS1) fragment. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:1241-1246.
17. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 1987; 68:853-857.
18. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69:2101-2107.
19. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1990; 64:4356-4363.
20. Qu X, Chen W, Maguire T, Austin F. Immunoreactivity and protective effects in mice of a recombinant dengue 2 Tonga virus NS1 protein produced in baculovirus expression system. *J. Gen. Virol.* 1993; 74:89-97.
21. Kreil TR, Maier E, Fraiss S, Eibl MM. Neutralizing antibodies protect against flavivirus challenge but allow for the development of active humoral immunity to a nonstructural virus protein. *J. Virol.* 1998; 72:3076-3081.
22. Lin YL, Chen LK, Liao CL, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J. Virol.* 1998; 72:191-200.
23. Falkler WA, Diwan AR, Halstead SB. Human antibody to dengue soluble complement-fixing (SCF) antigens. *J. Immunol.* 1973; 111:1804-1809.
24. Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gomez I. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J. Med. Virol.* 1990; 32:102-108.
25. Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44:481-493.
26. Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu YC. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 1999; 57:1-8.
27. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Dengue NS1-specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Med. Virol.* 2000; 62: 224-232.
28. Pei-Yun Shu, Li-Kuang Chen, Shu-Fen Chang, Yi-Yun Yueh, Ling Chow, Li-Jung Chien, Chuan Chin, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang.

- Antibody to the Nonstructural Protein NS1 of Japanese Encephalitis Virus: Potential Application of mAb-based Indirect ELISA to Differentiate Infection from Vaccination. *Vaccine*. 2001; 19:1753-1763.
29. Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20:784-790.
 30. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7:561-573.
 31. Lanciotti, RS, Calisher, CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:545-551.
 32. Chen LK, Liao CL, Lin CG, et al. Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 1996; 217:220-229.
 33. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 1967; 99:285-290.
 34. Burke DS, Nisalak A, Ussery MA. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 17:283-292.
 35. Bundo K, Igarashi A. Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue haemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods* 1985; 11:15-22.
 36. Han XY, Ren QW, Xu ZY, Tsai TF. Serum and cerebrospinal fluid immunoglobulin M, A, and G in Japanese encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:976-978.
 37. Gubler DJ. Serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bull.* 1996; 20:20-23.
 38. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Vaughn DW, et al. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Japanese encephalitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3738-3741.
 39. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, et al. Comparison of PanBio dengue duo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MRL dengue fever virus immunoglobulin M capture ELISA for diagnosis of dengue virus infections in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6:705-712.
 40. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, et al. Rapid serological diagnosis of

- dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60:693-698.
41. Ku CC, King CC, Lin CY, et al. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J. Med. Virol.* 1994; 44:122-131.
 42. Se-Thoe SY, Ng MML, and Ling AE. Retrospective study of western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. *J. Med. Virol.* 1999; 57:322-330.
 43. Wong SJ, Boyle RH, Demarest VL, Woodmansee AN, et al. Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infection and from flavivirus vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:4217-4223.
 44. Wang SH. and Hu ST. Expression and characterization of the NS3 protein of dengue virus. Master Thesis, 1994.
 45. Chen CJ and Hu ST. Protein expression and antibody preparation of dengue virus type 2 NS5 protein. Master Thesis, 1995.
 46. Valdes, K., Alvarez, M., Pupo M., Vaquez, S., Rodriguez, R, and Guzman, M. G. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin and Diag Lab Immunol* 2000; 7: 856-7.

(7) 圖、表。

圖一、NS3 sequence (618 a.a. 1,854 nt)

GCTGGAGTATTGTGGGACGTCCCTTCACCCCAACCCGTGGGAAAGGCCGAACTGGAAGATGGAGCCTATAG
AATCAAGCAAAAAGGGATTCTTGGATACTCCAGATTGGAGCCGGAGTTTACAAAAGAAGGAACATTCCA
TACAATGTGGCACGTACACGTGGCGCTGTTCTGATGCATAGAGGGAAGAGGATTGAACCATCATGGGCG
GACGTCAAGAAAGACCTAATATCATATGGAGGAGGCTGGAAAACCTCGAAGGAGAATGGAAGGAAGGAGA
GGAAGTCCAAGTCCTGGCATTGGAACCTGGAAAAAATCCAAGAGCTGTCCAAACGAAACCTGGACTTTTC
AAAACCAACACCGGAACCATAGGCGCCGTATCTCTGGACTTTTCCCCTGGAACGTCAGGATCTCCAATTGT
CGATAGAAAAGGAAAAGTTGTGGGTCTTTATGGCAATGGTGTGTCACAAGGAGTGGAGCATAACGTGA
GTGCTATAGCCAGACCGAAAAAGCATTGAAGACAATCCAGAGATCGAAGATGACATTTTCCGAAAGA
AAAGATTGACTATCATGGACCTCCATCCAGGAGCGGGAAAGACAAAAAGATACCTTCCAGCCATAGTTA
GAGAGGCCATAAAACGTGGCTTAAGAACATTAATCTGGCCCCACTAGAGTCGTGGCAGCTGAAATGGA
GGAAGCTCTTAGAGGACTTCCAATAAGATACCAAACCCAGCCATCAGAGCCGAGCATACCGGGCGGGAG
ATTGTGGACCTAATGTGTCATGCCACATTTACTATGAGGCTGCTATCACCAGTCAGAGTGCCAAATTACA
ACCTGATCATCATGGATGAAGCTCACTTCACAGACCCAGCAAGTATAGCAGCTAGAGGATACATTTCAAC
TCGAGTAGAGATGGGTGAAGCAGCTGGGATTTTCATGACAGCCACTCCTCCGGGAAGTAGAGACCCATTT
CCTCAGAGCAATGCACCAATCATGGATGAGGAAAGAGAAATCCCTGAGCGCTCGTGGAACCTCTGGACATG
AATGGGTACGGATTTTAAAGGGAAGACTGTTTGGTTTGTTCCAAGTATAAAAGCGGGAAATGACATA
GCAGCTTGTCTCAGGAAAAATGGAAAGAAAGTGATACAACCTCAGTAGGAAGACCTTTGACTCTGAGTAT
GTTAAGACTAGGACCAATGATTGGGACTTTGTGGTCACAACCGACATTTTCAGAAATGGGTGCCAACTTC
AAGGCTGAGAGGGTTATAGACCCAGACGTTGCATGAAACCAGTTATACTAACAGATGGTGAAGAGCGG
GTGATCTTGGCAGGACCCATGCCAGTAACCCACTCTAGTGCAGCGCAAAGAAGAGGGAGAATAGGAAGA
AATCCAAAAAATGAAAATGACCAGTACATATACATGGGGGAACCTCTGGAAAATGATGAAGACTGTGC
GCATTGGAAAAGAAGCTAAAATGCTCCTAGATAACATCAACACACCTGAAGGAATCATTCCTAGTATGTT
CGAACCAGAGCGTGAAAAGGTGGATGCCATTGATGGTGAATACCGCTTGAGAGGAGAAGCAAGGAAAAC
CTTTGTGGACCTAATGAGAAGAGGGGACTTACCAGTCTGGTTGGCCTACAGAGTGGCAGCTGAAGGCATC
AACTACGCAGACAGAAGGTGGTGTTTTGTGATGGAGTTAAGAATAACCAAATACTGGAAGAAAACGTGGA
AGTGGAAATTTGGACAAAAGAAGGGGAAAGGAAGAAATTAACCAACAGATGGTTGGACGCTAGGATCT
ATTCTGACCCACTGGCACTAAAAGAATCCAAGGAATTTGCAGCTGGAAGAAAG

圖二、NS5 sequence

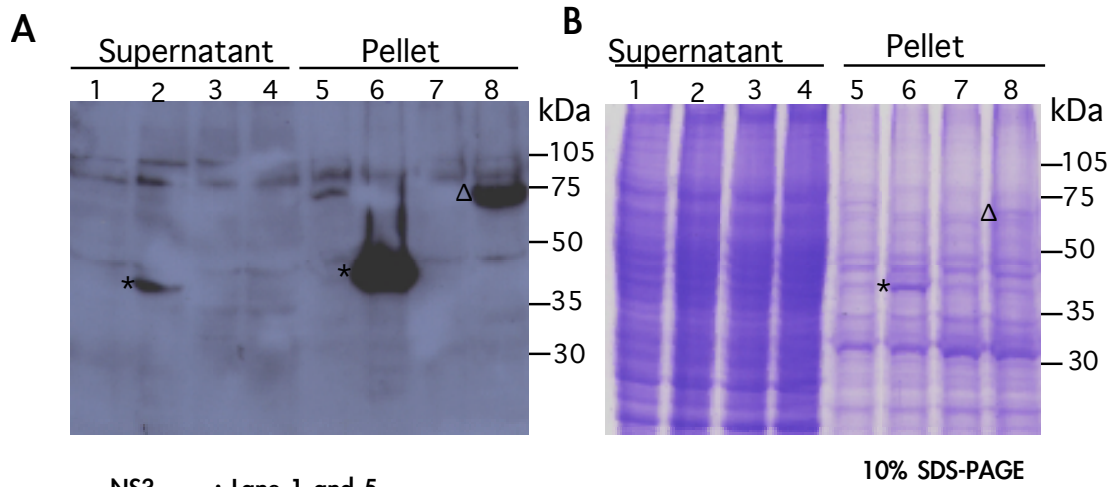
GGAAGTGGCAACATAGGAGAGACGCTTGGAGAGAAAATGGAAAAGCCGATTAAACGCACTGGGAAAAAG
TGAATTTTCAGATCTACAAGAAAAGTGGAAATCCAGGAAGTGGATAGAACCTTAGCAAAAAGAAGGCATCA
AAAGAGGAGAAAACGGACCACCACGCTGTGTTCGCGAGGCTCAGCAAAACTGAGATGGTTCGTCGAGAGAA
ATATGGTTCACACCAGAAGGGAAAAGTGGTGGACCTCGGTTGCGGCAGAGGGGGCTGGTCATACTATTGTGG
GGGACTAAAAGAATGTAAGAGAAGTCAAAGGCCTGACAAAAGGAGGACCAGGACACGAAGAACCTATCCC
CATGTCAACATATGGGTGGAATCTAGTACGTCTGCAGAGTGGAGTTGATGTTTTCTTCACTCCGCCAGAA
AAGTGTGACACACTGTTGTGTGACATAGGGGAGTCGTCACCAAATCCCACGATAGAAGCAGGACGAACAC
TCAGAGTCCCTCAGCTTGGTGGAAAAATGGTTGAACAATGACACCCAATTTTGCATAAAAGGTTCTCAACCC
ATACATGCCCTCAGTTATAGAAAAAATGGAAACACTGCAAAGGAAATATGGAGGAGCCTTAGTGAGGA
ATCCACTCTCACGAAACTCCACACATGAGATGTACTGGGTATCCAATGCTACTGGGAACATAGTGTTCATC
AGTGAACATGATTTCAAGGATGCTGATTAACAGATTCACAATGAAACACAAGAAAGCTACCTACGAGCC
AGATGTTGACCTAGGGAGCGGAACCCGCAACATTGGAATTGAAAGTGAGATACCAAATCTAGACATAAT
AGGAAAGAGAATAGAGAAAAATAAAGCAAGAGCATGAAACATCATGGCACTATGACCAAGACCACCCAT
ATAAAACATGGGCTTGCCATGGCAGCTATGAAACAAAACAGACTGGATCAGCATCATCCATGGTGAACG
GAGTGGTTCAGACTACTGACAAAACCTTGGGACGTCGTCCTATGGTAACACAAAATGGCAATGACAGACAC
GACTCCATTTGGACAACAGCGCTTTTCAAAGAGAAAAGTGGACACGAGAACCAAGAACCGAAGGAAGG
CACAAAGAAAAGTATGAAAATCACGGCAGAGTGGCTTTGGAAAAGAACTAGGAAAGAAAAAGACACCCA
GGATGTGTACCAGAGAAGAATTCACAAGAAAAGTGAGAAGCAATGCAGCCTTGGGGGCCATATTTCACTG
ATGAGAACAAAATGGAAGTCGGCACGCGAGGCTGTTGAAGATAGTAGGTTTGGGAGCTGGTTGACAAGG
AAAGAAAATCTCCATCTTGAAGGAAAAGTGTGAAACATGTGTGTACAACATGATGGGAAAAGAGAGAAAAG
AAACTAGGGGAGTCCGGCAAGGCAAAAAGGTAGCAGAGCCATATGGTACATGTGGCTTGGAGCACGCTTCT
TGGAGTTTGAAGCCCTGGGATTCTTGAATGAAGATCACTGGTTCTCTAGAGAGAACTCCCTGAGTGGAG
TGGAAGGAGAAGGGCTGCACAAGCTAGGCTACATTCTAAGAGACGTGAGCAAGAAGGAAGGAGGAGCA
ATGTACCCGATGATACAGCAGGATGGGACACAAGAATCACACTAGAGGACTTAAAAAATGAAGAAAT
GGTGACAAAACCACATGGAAGGAGAACACAAGAGACTAGCCGAGGCCATATTTAAATTAACGTACCAAAA
CAAGGTGGTGCCTGTGCAAAGACCAACACCAAGAGGCACAGTAATGGATATCATATCGAGAAGAGACCA
AAGAGGCAGTGGGCAAGTCGGCACCTATGGCCTTAACACTTTCACCAATATGGAAGCCCAATTAATTAGA
CAGATGGAGGGAGAAGGAATTTTCAAAAAGCATTCAGCACCTGACAGTTACAGAAGAAATCGCTGTACAG
AACTGGTTAGCAAGAGTGGGGCGTGAAAGGCTATCAAGAAATGGCCATCAGTGGAGATGATTGTGTTGTA
AAACCTTTAGATGACAGATTTGCAAGTGCTTTAACAGCTCTAAATGACATGGGAAAAGTTAGGAAAAGA
CATAACAATGGGAACCTTCAAAAAGGATGGAACGATTGGACACAAGTGCCTTTCTGTTTACACCATTTT
CATGAGTTAATCATGAAAGACGGCCGCTGCTCGTGGTTCCATGCAGAAAACCAAGATGAACTGATTGGCA
GGGCCCAATTTCCAGGGAGCTGGGTGGTCTTTGAAGGAGACGGCCTGTTTGGGGAAGTCTTACGCCCA
AATGTGGAGCCTGATGTACTTCCACAGACGTGACCTCAGGCTGGCGGCAAAATGCTATTTGCTCGGCAGTCC
CGTCACATTTGGGTTCCAACAAGTCGAACAACCTGGTCTATACACGCCAAACATGAATGGATGACGACGGA
AGACATGCTGACAGTCTGGAACAGGGTGTGGATCCAAGAAAACCCATGGATGGAAGACAAAACCTCCAGT

GGAGTCATGGGAGGAAGTCCCATATTTGGGAAAAAGAGAAGACCAATGGTGCGGCTCATTGATTGGGCT
AACAAAGCAGGGCTACCTGGGCAAAGAACATCCAAACAGCAATAAATCAAGTCAGATCCCTTATAGGCAA
TGAAGAATACACAGATTACATGCCATCCATGAAGAGATTTCAGAAGGGAAGAGGAAGAGGCAGGTGTCCT
GTGGTAG

圖三、本計畫建構之質體及其所含之NS3、NS5氨基酸區域。(以“+”表示建構成功，“-”表示未建構成功) yT&A、pFastBac™ HTA為*E. coli*之選殖載體，Bacmid為在昆蟲細胞表現之載體。

	NS3	yT&A	pFastBac™HT A	Bacmid
NS3 ₁₋₆₁₅	1 ————— 615	+	-	-
NS3 ₁₋₃₃₅	1 ————— 335	+	+	+
NS3 ₃₂₈₋₆₁₅	328 ————— 615	+	+	+
NS5				
NS5 ₁₋₉₀₀	1 ————— 900	+	-	-
NS5 ₁₋₆₅₆	1 ————— 656	+	+	+
NS5 ₂₆₁₋₆₅₆	261 ————— 656	+	+	+
NS5 ₂₆₁₋₉₀₀	261 ————— 900	+	+	+

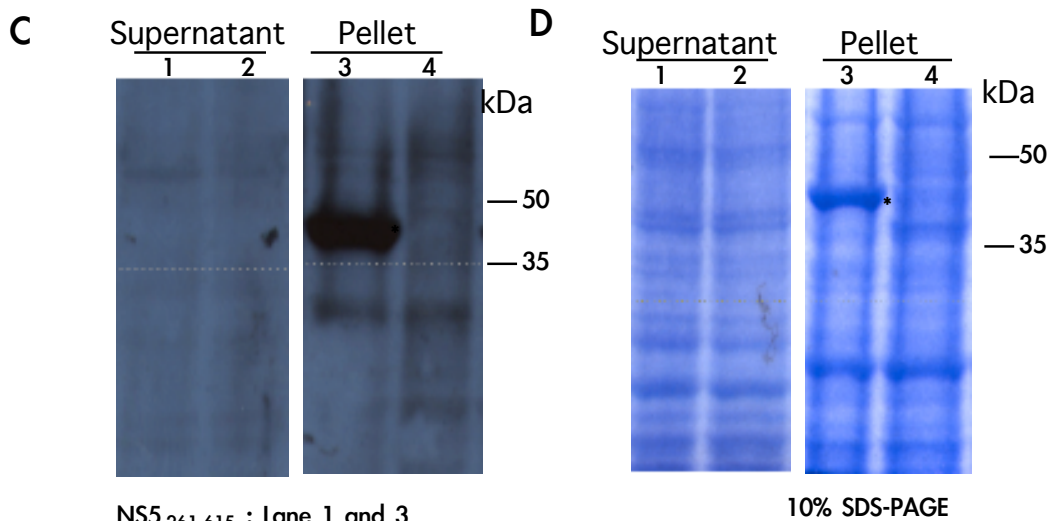
圖四、NS3、NS5蛋白表現之電泳分析圖



NS3₁₋₃₃₅ : Lane 1 and 5
 NS3₃₂₈₋₆₁₅ : Lane 2 and 6
 NS5₁₋₆₅₆ : Lane 3 and 7
 NS5₂₆₁₋₉₀₀ : Lane 4 and 8
 *: 病毒表現之NS3₃₂₈₋₆₁₅
 Δ: 病毒表現之NS5₂₆₁₋₉₀₀

圖A:以 α -His6抗體做西方墨點法結果。

圖B:為Coomassie blue染色圖

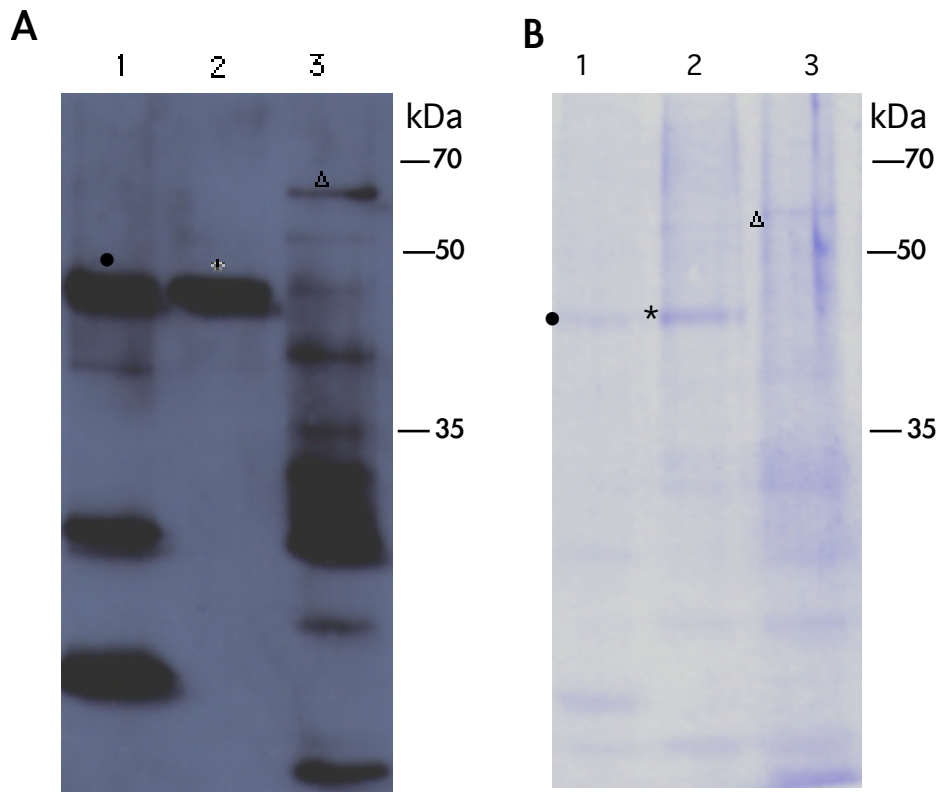


NS5₂₆₁₋₆₁₅ : Lane 1 and 3
 NS3₁₋₃₃₅ : Lane 2 and 4
 *: 病毒表現之NS5₂₆₁₋₆₁₅

圖C:以 α -His6抗體做西方墨點法結果。

圖D:為Coomassie blue染色圖

圖五、大量表現及純化之NS3、NS5蛋白電泳分析圖



NS3₃₂₈₋₆₁₅ : Lane 1

NS5₂₆₁₋₆₅₆ : Lane 2

NS5₂₆₁₋₉₀₀ : Lane 3

● : 病毒表現之NS3₃₂₈₋₆₁₅

* : 病毒表現之NS3₃₂₈₋₆₁₅

△ : 病毒表現之NS5₂₆₁₋₉₀₀

圖E:以 α -His6抗體做西方墨點法結果。

圖F:為Coomassie blue染色圖