

計畫編號：MOHW108-CDC-C-114-123503

衛生福利部疾病管制署 108 年委託科技研究計畫

以重組桿狀病毒表現系統開發蟲媒病毒傳染病診斷試劑之研究

## 年度/全程研究報告

執行單位：中原大學生物科技學系

計畫主持人：吳宗遠

研究人員：陳俊中

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 壹佰伍拾貳 萬元整

## 目錄

頁碼

封面

中文摘要 (3)

英文摘要 (4)

本文

(1) 前言 (5-6)

(2) 材料與方法 (7-9)

(3) 結果 (10-15)

(4) 討論 (16-17)

(5) 結論與建議 (18)

(6) 計畫重要研究成果及具體建議 (19)

(7) 參考文獻 (20-24)

圖次

表次

共 (24)頁

## 中文摘要

蚊蟲 (mosquito) 是人類公共衛生最大的威脅，除傳播瘧疾外也是蟲媒病毒的媒介，例如黃熱病毒 (yellow fever viruses, YFV)、登革病毒 (dengue virus)、茲卡病毒 (Zika virus)、西尼羅病毒 (West Nile virus) 等黃病毒科 (Flaviviridae) 黃病毒屬 (Flavivirus) 病毒；屈公病毒 (Chikungunya virus)、羅斯河病毒 (Ross River virus)、歐尼恩病毒 (O'nyong-nyong virus)、東方馬腦炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus) 等的披膜病毒科 (Togaviridae) 的阿爾發病毒屬 (Alphavirus) 病毒。由於人口膨脹 (目前全球已有 76 億人) 使得耕地面積需求增加而往林地擴張，畜牧業的農場也擴張到林地等，使得侷限於林地間傳播的蟲媒病毒有機會進入都市並以人類為主要宿主，此外日益頻繁的國際交通往來也使得蟲媒病毒在全世界散播的情形更為快速且發生頻率日益頻繁與嚴重。因此，如何進行防治蟲媒病毒是一不可避免且急迫的公共衛生議題。本計畫製備與生產可呈現登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒，在其所生產的結構蛋白與登革病毒結構蛋白在結構上或許有些許差異，因此在血清抗體檢測上並不適用，未來將製作呈現日本腦炎病毒之結構蛋白的重組桿狀病毒並結合先前所開發成功之呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒，開發安全簡易的血清抗體檢測套組。

**關鍵詞：**蟲媒病毒；重組桿狀病毒；血清抗體檢測試劑

## 英文摘要

Mosquito is the greatest threat to human public health, apart from malaria, arboviruses such as the yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), West Nile virus, Chikungunya virus (CHIKV), Ross River virus, O'nyong-nyong virus, Eastern equine encephalitis virus are also wide spread in the world and emerged as new challenge. Due to population growth (currently has more than 7.6 billion people worldwide) of arable land to forest expansion to meet increased demand, livestock farms to expand into the forest, making an already limited forests spread of insect-borne virus have access to the city and with the human as the main host. Beside, growing international traffic also makes more of the insect-borne virus spread all over the world fast. Therefore, how to control insect-borne virus is inevitable and urgent public health issues. This proposal produces recombinant baculoviruses that display the structural proteins of dengue virus, but the structural proteins produced by baculovirus may differ from the dengue virus structural proteins in nature structure form, and therefore are not suitable for serum antibody detection. In the future, a recombinant baculovirus that display a structural protein of Japanese encephalitis virus will be produced and a safe and simple serum antibody detection kit will be developed with previously developed recombinant baculoviruses that display the structural proteins of chikungunya virus.

**Keyword :** arboviruses; recombinant baculoviruses; serum antibody detection reagents

## 前言

登革熱是台灣目前最嚴重的蟲媒病毒傳染病，屈公病及茲卡則為新興並具威脅的蟲媒病毒傳染病，雖然目前並非本土病 (endemic)但每年皆有境外移入之病例，登革熱甚至會造成社區性感染的大流行威脅。登革熱及屈公病歸類為第二類法定傳染病，茲卡感染症則歸類為第五類法定傳染病，依疾病防治規定，發現疑似病例應於二十四小時內通報衛福部。

而蚊蟲 (mosquito) 是人類公共衛生最大的威脅，除傳播瘧疾外也是許多蟲媒病毒的媒介，例如黃熱病毒 (yellow fever viruses, YFV)、登革病毒 (dengue virus)、茲卡病毒 (Zika virus)、西尼羅病毒 (West Nile virus) 等黃病毒科 (Flaviviridae) 黃病毒屬 (Flavivirus) 病毒；屈公病毒 (Chikungunya virus)、羅斯河病毒 (Ross River virus)、歐尼恩病毒 (O'nyong-nyong virus)、東方馬腦炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus) 等的披膜病毒科 (Togaviridae) 的阿爾發病毒屬 (Alphavirus) 病毒。由於人口膨脹 (目前全球已有 76 億人) 使得耕地面積需求增加而往林地擴張，畜牧業的農場也擴張到原本的林地等，使得原本侷限於林地間傳播的蟲媒病毒有機會進入都市並與人類為主要宿主，此外日益頻繁的國際交通往來也使得蟲媒病毒在全世界散播的情形更為快速且發生頻率日益頻繁與嚴重。因此，如何進行防治蟲媒病毒是一不可避免且急迫的公共衛生議題。

本計畫的目的為製備與生產可以呈現蟲媒病毒之結構蛋白的重組桿狀病毒，以取代具生物危險性之蟲媒病毒，包括屈公病毒、茲卡病毒、登革病毒及日本腦炎病毒等，提供疾管署科技研究計畫（計畫名稱：蟲媒病毒傳染病創新安全快速檢驗試劑之開發與應用）開發安全簡易的血清抗體檢測試劑套組。

## 材料與方法

### (一) *Sf21* 昆蟲細胞 (*Spodoptera frugiperda* 21 cell line)

秋行軍蟲卵巢細胞所分化出來的細胞株，也稱為 IPLB-Sf21AE。此細胞的外觀呈圓形飽滿，以半懸浮的方式生長，不完全貼壁，約 18-24 小時進行增生，培養基為 TNMFH (Gibco)加 10 %胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)，培養環境為 27 °C 恆溫，不需額外注入 CO<sub>2</sub>，此細胞和同為秋行軍蟲卵巢細胞分化出來的 Sf9 cell line 皆常被用於桿狀病毒表現系統中。

### (二) 以 **Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統 (Bac-to-Bac bi-cistronic baculovirus expression system)** 製備呈現蟲媒病毒結構蛋白之重組桿狀病毒

Bac-to-Bac baculovirus expression system (購自 ThermoFisher Scientific)，此系統特點為可快速且高效率的生產重組桿狀病毒，改良了傳統以共轉染的方式在昆蟲細胞內製作重組病毒的繁雜與耗時過程 (Polaves et al., 1996)。此產品為 Monsanto 公司所販售，在專用的傳送載體 (transfer plasmid)上具有轉位子 (transposable elements)Tn7，再配合專用的勝任細胞中的輔助質體 (helper plasmid)，其可於勝任細胞中生產轉位酶 (transposase)，並協助將傳送載體上的目標基因以專一性位置跳躍重組 (site-specific recombination)的方式嵌入勝任細胞中的桿狀病毒 DNA (Bacmid)上，由於嵌入的位置是在

LacZ  $\alpha$  基因上，所以後續可以透過菌落進行藍白篩選 (Blue-white selection) 挑出白色菌落 (含有目標基因的重組桿狀病毒 DNA)，之後將重組桿狀病毒 DNA 純化出來並轉染至昆蟲細胞中後就能生產出所需的重組桿狀病毒。而本實驗室以 Bac-to-Bac<sup>®</sup> 桿狀病毒表現系統中所使用的傳送載體 pFastBac<sup>™</sup>1 為框架，並加入了紅螢光基因 DsRed2 以及我們實驗室所製作的 Liu IRES 所形成的 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現載體作為我們的傳送載體。本實驗室已證實 Liu IRES 其在昆蟲細胞以及哺乳類細胞皆具有高轉譯活性 (Liu et al., 2015)。

### (三) 免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay ; IFA)

將 Sf21 昆蟲細胞分至 24 well plate 中 ( $2 \times 10^5$  cells/well)，以 M.O.I=2 (Dengue virus 1 and 2) 或 M.O.I=0.5 (Dengue virus 3 and 4) 的病毒量來感染 Sf21 昆蟲細胞，在病毒感染後第 3 天時以螢光顯微鏡觀察感染情形，確認完每顆細胞都被病毒感染後將病毒液移除，並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗一次，潤洗完後加入 350  $\mu$ l 的 4% formaldehyde 進行固定 (固定條件為室溫下 15 分鐘)，待 15 分鐘後，移除 4% formaldehyde，並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350  $\mu$ l，濃度為 5% 的 BSA 進行 blocking (blocking 的條件為在室溫中一小時)，一小時後將 blocking Buffer 移除並加入 350  $\mu$ l 以 1:500 稀釋比例所調配的一抗 (1<sup>°</sup>Ab)，接著置於 4  $^{\circ}$ C 冰箱過夜 (overnight)，



隔日移除一抗並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350  $\mu$ l 以 1:250 稀釋比例所調配的二抗 ( $2^{\circ}$ Ab)，接著置於室溫並避光作用一小時，一小時後移除二抗並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 mounting Buffer 以利於後續在螢光顯微鏡下觀察與保存。

#### (四) 西方墨點法 (western blotting)

取 25  $\mu$ g 的蛋白質樣品與 sample buffer 在 100  $^{\circ}$ C 乾浴槽中煮 6 分鐘，將樣品置入 SDS-PAGE 的 well 中，於蛋白質電泳裝置 (Bio-Rad) 先以 70 V 進行電泳約半小時後再以 110 V 進行電泳 1.5 小時，在電泳結束後於 transfer buffer 中將 SDS-PAGE 所分離的蛋白質以 0.34 安培約 2 小時轉漬到 PVDF 轉漬膜上。轉漬完成後的 PVDF 膜以含有 7% 脫脂奶粉的 Tris-buffered saline buffer (TBS : 100 mM Tris, pH = 7.4、100 mM NaCl 與 0.1% Tween-20) 在室溫中進行 blocking 作用一小時。一小時後將 blocking buffer 移除並加入以 TTBS 稀釋，稀釋比例為 1:5000 的一抗 ( $1^{\circ}$ Ab) 在 4  $^{\circ}$ C 冰箱過夜 (overnight)。隔天以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。然後移除 TTBS 並加入稀釋比例為 1:5000 的二抗 ( $2^{\circ}$ Ab ; anti-rabbit HRP antibody) 於室溫下輕輕搖晃作用一小時。接著再以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。最後進行 PVDF 膜化學冷光呈色後再上機 (Fusion-SOLO 冷光系統暗箱設備)。

## 結果

### (一) 登革病毒之結構蛋白區基因序列分析

我們首先進行分析登革病毒第一到第四型之結構蛋白基因序列，分別呈現於圖 1、圖 2、圖 3 與圖 4，其中衣殼蛋白基因在四型病毒中長度皆為 330 bp，而在膜蛋白的前驅物基因中第一型登革病毒長度為 477 bp，第二型與第三型登革病毒為 459 bp，至於第四型登革病毒則為 474 bp，而在封套蛋白基因長度的部分第一型與第二型登革病毒長度為 1485 bp，第三型登革病毒為 1476 bp，第四型登革病毒則為 1482 bp。分析完 4 型登革病毒結構蛋白之基因序列後，我們分別合成第一型與第二型登革病毒的膜蛋白的前驅物基因加上封套蛋白基因的部分，合成基因片段大小分別為 1962 bp (於第一型登革病毒)與 1944 bp (第二型登革病毒)，另外合成第三型與第四型登革病毒的衣殼蛋白基因外加膜蛋白的前驅物基因再加上封套蛋白基因的部分，合成基因片段大小分別為 2265 bp (於第三型登革病毒)與 2286 bp (第四型登革病毒)。

### (二) 登革病毒結構蛋白基因之合成與構築

在分析完登革結構蛋白之基因序列後，我們分別合成第一到第四型登革病毒的結構蛋白基因，並利用 Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統中的傳

送載體分別構築出 pFastBac-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 pFastBac-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 共四個傳送載體，圖 5 中的圖 5 A.到圖 5 D.為第一到第四型登革結構蛋白基因分別呈現於 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現載體之示意圖。圖 6 中的圖 6 A.到圖 6 D.則是以圖 5 中所展現的限制酶切位分別對 pFastBac-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 pFastBac-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 四個傳送載體進行酵素作用與電泳分析後之電泳圖，如此可確認我們所篩選到之傳送載體為正確無誤。

### **(三) Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統 (Bac-to-Bac bi-cistronic baculovirus expression system)**

Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統為以 Bac-to-Bac® 桿狀病毒表現系統所使用的載體 pFastBac™1 為框架，加入紅螢光基因 DsRed2 以及我們實驗室製作的 Liu IRES 形成的 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現載體。Liu IRES 是以人類腸病毒 71 型的 IRES (EV71 IRES) 前端的 1 至 645 基因序列和蚜蟲病毒 (RhpV5' IRES) 中段 309 至 418 序列結合形

成的 IRES。本實驗室已證實其在昆蟲細胞以及哺乳類細胞皆具有高轉譯活性。

我們利用 Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統中的傳送載體分別構築出 pFastBac-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 pFastBac-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 四傳送載體，圖 7 為第一到第四型登革結構蛋白分別呈現於 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現傳送載體之示意圖。在完成此四種傳送載體的構築後再分別將其轉型 (transform) 進入 DH10Bac 大腸桿菌中以將登革病毒結構蛋白基因重組進入桿狀病毒 DNA (Bacmid) 中，接著利用 pUC/M13 的引子對進行 colony PCR 可初步確認第一型登革病毒與第二型登革病毒結構蛋白基因的序列或第三型登革病毒與第四型登革病毒結構蛋白基因的序列有重組進入桿狀病毒 DNA (Bacmid) 中形成重組桿狀病毒，如圖 8 的 DNA 電泳圖中所呈現，成功重組的桿狀病毒 DNA 可利用 PCR 方法增幅出大小約 5713 bp (於登革第一與第二型) 或 6043 bp (於登革第三與第四型) 的 DNA 片段。

#### (四) 分離與純化呈現登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒

我們在之前的研究顯示可以核糖體內轉譯子 (internal ribosome entry

site, IRES) 共表現標的蛋白 (targeting protein) 與螢光蛋白 (fluorescent protein) 而利於重組桿狀病毒的製作與力價測定。圖 9 為我們以核糖體內轉譯子 Lir (Lir IRES) 共表現紅螢光蛋白以利於透過螢光顯微鏡觀察重組病毒於昆蟲細胞 (*Sf21*) 的感染狀況，圖 9 A.、圖 9 B.、圖 9 C.與圖 9 D.分別為感染第一型、第二型、第三型與第四型登革病毒結構蛋白重組病毒後第三天，病毒的感染狀況以及紅螢光蛋白 (DsRed2) 的表現情形。

#### **(五) 重組桿狀病毒感染昆蟲細胞表現登革病毒結構蛋白基因之分析-IFA 與 Western blot**

藉由免疫螢光染色分析與西方墨點法來分析登革病毒結構蛋白的表現，昆蟲細胞在感染重組桿狀病毒 vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2、vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、vbAc-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 後的第三天，以 CytoBuster 細胞裂解液收取胞內蛋白，使用抗登革 E 結構蛋白抗體 (GTX127277, GeneTex) 在第二型登革病毒中可以辨認到預期大小約 55 kDa 的登革 E 結構蛋白 (圖 10)，而感染後第三天的昆蟲細胞，使用抗登革 E 結構蛋白抗體 (GTX127277, GeneTex) 最後再加入帶有綠螢光染料的二級抗體 (Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG)，結果顯示在分別感染 4 型登革重組桿狀病毒後的昆蟲細胞上皆能辨識到其所呈現

的登革重組結構蛋白 E (圖 11)。另外我們使用抗登革 PrM 結構蛋白抗體 (GTX128092 與 GTX128093, GeneTex)來進行 Western 與 IFA，在 Western 方面此兩支抗體皆無法辨認到預期大小約 21 kDa 的登革 PrM 結構蛋白 (圖 12)，然而在 IFA 方面結果顯示在分別感染 4 型登革重組桿狀病毒後的昆蟲細胞上，抗體 GTX128092 皆能辨識到其所呈現的登革重組結構蛋白 PrM (圖 13)，而抗體 GTX128093 也能辨識到在感染第一、第二與第三型登革重組桿狀病毒後的昆蟲細胞上所呈現的登革重組結構蛋白 PrM (圖 14)，綜合以上實驗結果顯示我們利用桿狀病毒可以成功表現登革病毒結構蛋白作為抗原所使用。

#### (六) 測試表現登革病毒結構蛋白基因之桿狀病毒是否可用於檢測病人血清中抗登革病毒之 IgM 抗體

我們將重組桿狀病毒 vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2 、 vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2 、 vbAc-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 製備放大完成後提供給疾管署舒博士之實驗室以 IgM-antibodies capture ELISA (Mac-ELISA) 檢驗平台進行實驗，結果顯示其不適用於檢測病人血清中抗登革病毒之 IgM 抗體 (圖 15)。

**(七) 以疾管局所提供之抗體 (4G2 與 D56)來對重組桿狀病毒感染昆蟲細胞表現登革病毒結構蛋白基因之分析-IFA**

藉由免疫螢光染色法來分析登革病毒結構蛋白的表現，昆蟲細胞在感染重組桿狀病毒 vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2 、 vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2 、 vbAc-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 後的第三天，使用疾管屬所提供的抗登革結構蛋白抗體 (4G2 與 D56) 作為一抗使用，最後再加入帶有綠螢光染料的二級抗體 (Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG)，結果顯示在分別感染 4 型登革重組桿狀病毒後的昆蟲細胞上，4G2 抗體皆能辨識到其所呈現的登革重組結構蛋白 (圖 16)，而 D56 雖也能辨識到登革重組結構蛋白，但相對於 4G2 來說明顯較為微弱 (圖 17)。

## 討論

傳統用於檢疫病人血清中抗體的偵測方法主要為病毒蛋白：其可為重組蛋白或自病毒純化或重組之類病毒粒子等，此方法雖無安全之疑慮，但蛋白之純化與生產皆是非常費工與費時的製程，因此成本高昂。另一方面，若用完整之病毒粒子則會有安全上的疑慮，尤其是安全等級 3 以上的病毒於操作上並不適用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等。再則，於大量生產這些具傳染性之病毒液存在一定的安全風險，而若要以 UV 或  $\gamma$  射線進行消毒則會有未達 100% 滅毒的風險，因此本計畫期待能以重組桿狀病毒呈現技術一舉解決生產成本與安全檢測的問題，若能順利開發將會是一重要的檢測方法突破。

一般而言，桿狀病毒最常用於生產重組之抗原蛋白用於檢測，但以病媒蚊傳播之病毒諸如登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒與日本腦炎病毒等皆為有 envelop 之病毒，因此其可做為檢測用之抗原蛋白皆為膜蛋白，本計畫將表現登革病毒 C、PrM 和 E 蛋白等，當以桿狀病毒進行表現時會呈現於細胞膜上，而當桿狀病毒進行 budding off 時會將其昆蟲細胞膜上的蛋白也呈現在重組桿狀病毒的 envelop 上，因此只要將重組桿狀病毒進行收集即可進行檢測，此法可避免桿狀病毒或大腸桿菌或酵母菌表現系統要大量表現具有 epitope 之抗原時的難度並降低生產所需之成本。



本計畫利用桿狀病毒表現登革重組結構蛋白，在對單一蛋白偵測上尚能以專一性之抗體證實其存在，但在病人血清陽性反應上其未能成功檢測，其顯示由桿狀病毒表現登革重組結構蛋白在病人血清試驗上各蛋白在組裝甚或蛋白整體結構組成上或許需成特定之結構方能受血清之抗體所辨。另在以 IFA 測試疾管署所提供之抗體 (4G2 與 D56) 試驗中，其結果顯示桿狀病毒表現第三型登革結構蛋白相較於其他表現第一、第二與第四型登革結構蛋白，其所能被抗體所辨認之強度皆較為強，未來將先選擇第三型登革結構病毒來做啟動子的置換測試，將晚期啟動子 Ph 置換成早期啟動子 HR1-PAG，比較其在結果上能否有差異。

## 結論與建議

本計畫主要目標為以桿狀病毒呈現系統開發具有生物安全性且成本較低之蟲媒病毒傳染病抗體檢測方法。我們證實以生物安全性之重組桿狀病毒呈現登革病毒表面抗原，可應用於抗體之檢測上，未來將有希望組成具有生物安全性之診斷試劑而可適用於各區域醫院進行檢測。本計畫之最終目標是希望以此重組桿狀病毒呈現技術所開發之蟲媒病毒傳染病檢驗試劑直接應用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等，進行包括日本腦炎、登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病之檢驗，而目前因此本計畫所開發之技術將可及早實施防疫工作，對病人實施即時正確的醫療照顧，將可對傳染病的防治工作發揮極大的裨益。

## 計畫重要研究成果及具體建議

### 1. 計畫之新發現或新發明

本計畫之目標為發展具有生物安全性與成本競爭力之蟲媒病毒傳染病抗體 ELISA 快速檢測試劑。我們已證實以具有生物安全性之重組桿狀病毒表現屈公病毒結構蛋白與茲卡病毒結構蛋白於桿狀病毒表面將可直接用於血清抗體之檢測上，而在呈現登革結構蛋白於桿狀病毒表面在血清抗體之檢測應用上則不佳，未來將測試呈現日本腦炎結構蛋白於桿狀病毒表面進行測試，如成功證實呈現日本腦炎結構蛋白於桿狀病毒表面亦可用於血清抗體之檢測上將可將之與屈公、茲卡結合開發出三合一血清抗體檢測之套組。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫之研究人員於中原大學生物科技系所開之蛋白質表現系統課程中介紹桿狀病毒表現系統之創新應用。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

在氣候變遷與交通便捷下，病媒病毒傳染病如登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病等在台灣很可能會發生共同流行。我們建議應加強進行機場與區域醫院之監測並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行病媒病毒傳染病的監測、檢驗與流行病學研究才能有效的因應可能的公衛風險。

## 參考文獻

- Belyaev AS, Roy P (1993) Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors : co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucleic Acids Res* 21 : 1219-23.
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI (2015) Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21 : 1885-6.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D (2014) Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20 : 1085-6.
- Chang SF, Yang CF, Hsu TC, Su CL, Lin CC, Shu PY (2016) Laboratory-based surveillance and molecular characterization of dengue viruses in Taiwan, 2014. *Am J Trop Med Hyg* 94 : 804-11.
- Chen YJ, Chen WS, Wu TY (2005) Development of a bi-cistronic baculovirus expression vector by the *Rhopalosiphum padi* virus 5' internal ribosome entry site. *Biochem Biophys Res Commun* 335(2) : 616-23.
- Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, Krougliak VA (2001) A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther* 8 (11) : 846-54.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360 :

2536-43.

Huang AS, Shu PY, Yang CH (2016) A new reportable disease is born : Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. *J Formos Med Assoc* 115 : 223-5.

Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY (2007) Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005 : a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 77(5) : 903-9.

Hu YC, Yao K, Wu TY (2008) Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines* 7(3) : 363-71.

Ikeda M, Hamajima R, Kobayashi M (2015) Baculoviruses : diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomol Sci* 18 : 1-20.

Iswardy E, Tsai TC, Cheng IF, Ho TC, Perng GC, Chang HC (2017) A bead-based immunofluorescence-assay on a microfluidic dielectrophoresis platform for rapid dengue virus detection. *Biosens Bioelectron* 95 : 174-80.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23 : 567-75.

Liu MK, Lin JZ, Jinn TR, Chan HL, Wu TY (2015) Identification of Rhopalosiphum Padi Virus 5' Untranslated Region Sequences Required for Cryptic Promoter Activity and Internal Ribosome Entry. *Int J Mol Sci* 16 : 16053-66.

Luckow VA (1991) Cloning and expression of heterologous genes in insect cells

- with baculovirus vectors, p. 97-152. In A. Prokop, R.K. Bajpai and C. Ho (Eds.), *Recombinant DNA Technology and Applications*. McGraw Hill, New York.
- Luckow VA (1996) Insect cell expression technology, p. 183-218. In J.L. Cleland and C.S Craik (Eds.), *Protein Engineering : Principles and Practice*. Wiley-Liss, New York.
- Lum FM, Ng LF (2015) Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res* 120 : 165-74.
- Maeda S (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 34 : 351-72.
- O'Reilly D, Miller L, Luckow V (1992) *Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual*. New York : WH Freeman and Co.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7 : 319-27.
- Possee RD (1997) Baculovirus as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8 : 569-72.
- Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, Ho MS, Lin TH, Huang JH (2005) Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis* 11 : 460-2.
- Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH (2009) Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007 : geographic distribution and genotype shift. *Am J*

- Trop Med Hyg 80 : 1039-46.
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3 (12) : 2156-65.
- Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C (2009) Replication cycle of chikungunya : a re-emerging arbovirus. *Virology* 393 (2) : 183-97.
- Sumathy S, Palhan VB, Gopinathan KP (1996) Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Protein Expr Purif* 7 (3) : 262-8.
- Tham HW, Balasubramaniam VR, Chew MF, Ahmad H, Hassan SS (2015) Protein-protein interactions between *A. aegypti* midgut and dengue virus 2: two-hybrid screens using the midgut cDNA library. *J Infect Dev Ctries* 9 (12) : 1338-49.
- Utomo DIS, Hirono I, Kato T, Park EY (2019) Formation of Virus-Like Particles of the Dengue Virus Serotype 2 Expressed in Silkworm Larvae. *Mol Biotechnol* 61 (11) : 852-9.
- van Oers MM, Pijlman GP, Valk JM (2015) Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression : from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol* 96 : 6-23.
- Wu TY, Wu CY, Chen YJ, Chen CY, Wang CH (2007) The 5' untranslated region of *Perina nuda* virus (PnV) possesses a strong internal translation activity in

baculovirus-infected insect cells. FEBS Lett 581 : 3120-26.



## 圖次

```
Dengue virus 1 sequence.
Dengue virus 1 strain D1/Taiwan/806KH1405a polyprotein gene, complete cds,
KU365900.
Region identified from AJQ21329.2.
C(330bp)-pr(255bp)-M(222bp)-E(1485bp)- total(2328).
.
atgaacaaccaa.
cgaaaaagacggctcgaccgtcttcaata tctgaaacgcgcgagaaaccgcgtcaactgtttcacagttggcgaa
gagattctcaaaagga ttgctctcaggccaaggacccta gaaactgg tga tggctttca tagcat tcc taaga t tctag
cca tacccccaacagcaggaattttggctaga tggggctcat tcaagaagaa tggagcga tcaaatgct tacggggtttc
aagaaagaaatc tcaagca t g t t gaata taa t gaa tagaaggaaaaga t c t g t g a c c a t g c t c t t a t g c t g a t g c c t a c
agccttggca.
ttccattgactaca.
cgaggggagagccgcacatga tag t c a g c a a g c a g g a a a g a a g t c a c t t t t g t t t a a g a c c t c a g c a g g t g t c a a
c a t g t g c a c c c t c a t a g c g a t g g a t t t g g g a g a g t a t g t g a g g a c a c a a t g a c t t a c a a a t g t c c t c g a a t c a c t a g g
c g g a a c c a g a t g a c t t g a t t g t t g g t g c a a t g c c a c a g a c a c a t g g g t g a c c t a t g g a a c a t g t t o c c a a a c t g g c g a g
c a c c g a c g a g a c a a a .
cgttcc.
gttgacttggccccacagctgggacttgggttggaaacaagaaccgaaacgtggatgtctccgaaggcgcttggaaaca
gatcaaaagagtgaggacttgggccttagacacccaggatlcacgg tga tagccctttttc tagcaca t g c c a t a g g a a
c a t c a t c a c c c a g a a a g g g a t t a t c t t c a t t t t g t t a a t g c t g g t t a c a c c a t c c a t g g c c .
atg.
cga t g c t g g g a a t a g g c a g c a g g a c t c g t g g a a g g a c t g t c a g g a c a a c t t g g g t a g a t g t g g t g t t g g a a c a t g g
a a g t t g c g t a c t a c c a t g g c a a a g a c a a c c a a c a t t g g a c a t t g a a c t c t t g a a g a c g g a a g t c a c a a a c c c t g c t g
t c c t g c g c a a a c t g t g c a t t g a a g c t a a a a t a t c a a a c a c c a c c a c c g a t t c a a g a t g t c a a c a c a a g g a g a a g c c a c a
c t g g t g g a a g a a c a a g a c g c g a a c t t t g t g t c g a c g a a c g t t t g t g g a c a g a g c t g g g g c a a t g g c t g t g g g c t c t t
t g g a a a g g a a g c c t t a t a a c g t g t g a a a g t t c a a g t g t g t g a c a a a a c t g g a a g g a a a a t a g t g c a a t a t g a a a a c t
t g a a a t a t c a g t a a t a g t c a c c g t c a c a c t g g a g a c c a g c a c c a g g t g g g a a t g a a a g c a g a a c a t g g g a c a a c t
g c a a c c a t a a c a c c t c a a g c t c c t a c g a c a g a a a t a c a g c t g a c c g a c t a c g g a g c t c t t a c a t t g g a t t g t t c a c c a g
a a c a g g a c t g g a c t t c a a t g a a a t g g t g t t g t t g a c a a t g a a g a a a a t c a t g g c t a g t c c a c a a c a a t g g t t t c t a g
a c c t a c c a c t g c c t t g g a c c t c g g g a g c t t c a a c a t c a c a a g a a a c t t g g a c a g a c a a g a t t t g c t g g t g a c a t t t a a g
a c a g c t c a t g c a a g a a g c a g g a a g t a g t c g t a c t a g g a t c a c a a g a a g g a g c a a t g c a c a c t g c g t t g a c c g g a g c g a c
g g a a a t c c a a a c g t c t g g a a c g a c a a c a a t t t t g c a g g a c a c t t g a a g t g t a g a c t a a a g a t g g a c a a a c t g a c t c t a a
a a g g g a t g t c a t a t g t g a t g c a c g g c t c a t t c a a g c t a g a g a a a g a a g t g g c t g a g a c c c a g c a t g g a a c a g t t c t a
g t g c a g a t t a a a t a c g a a g g a a c a g a t g c a c c a t g c a a g a t c c c t t t t c g a c c c a a g a t g a a a a g g a g t a a c c a g a a
t g g g a g a t t g a t a a c a g c c a a c c c a t a g t c a c t g a c a a a g a a a a c c a g t c a a c a t t a g g c a g a a c c c c t t t t g g t g
a g a g t t a c a t c g t g a t a g g a c a g g t g a a a a a g c t t t g a a a c t a a g c t g g t t c a a g a a a g g a a g c a g c a t a g g g a a a t g
t t t g a g g c a a c t g c c a g a g g a g c a c a g a a g g a t g g c a t a c t g g g a g a c a c c g c a t g g g a c t t t g g t t c t a t a g g a g g a t
g t t c a c g t c t g t t g g a a a t t a g t a c a c c a g a t t t c g g a a c t g c a t a t g g a g t t t t g t t c a g c g g t g t t t c c t g g a c c a
t g a a a a t a g g a a t a g g g g t t c t g c t g a c a t g g c t a g g a t t a a a c t c a a g g a g c a c g t c c c t t t c g a t g a c g t g c a t t g c a
g t c g g c c t a g t a a c g c t a t a c t t a g g a t t c a t g g t t c a g g c g g a t .
```

圖 1. 第一型登革病毒之結構蛋白基因序列

**C** (330 bp) : capsid protein。 **Pr-M** (477 bp) : Pre-membrane protein。 **E** (1485 bp) : envelope protein。

Dengue virus 2 sequence.  
Dengue virus 2 strain D2/Taiwan/704TN1505a polyprotein gene, complete cds...  
KU365901.

Region identified from AES93115.1.  
C(330bp)-pr(237bp)-M(222bp)-E(1485bp)- total(2328).

```
..
atgaataaccaa.
cggaaaaaggcgagaaa tacgcctt tcaa ta tctgaaacgcgagagaaaaccgctg tcaactgtgcagcagctgacaaa
gagatctcacttggaa tgc tacagggacgaggacctgaaactgt tca tggcoctgg tggcat tcc tctg tttcc taa
caa tcccgccaacagcagggg ta ttaaaaaga tggggaacaa tcagaaaa tcaaaggc ta tcaatg tct taagaggg ttc
aggaaagaga ttggaagga tgc tgaaca tct tgaacaggagacgcagaac tgcaggta taa t tat ta tga tga tccaac
ag tga tggcg.
ttccatttaaccacagcaacggagaaccacac.
atgacgtcag tagacaagagaaagggaaaag tct tctgt tcaaaacagagaacgggtg tgaacatgtg taocctca tggc
ca tggaccttgg tgaactgt tgaagacacaa tcaact ta taactgt tcc tct tctcaggcgagaa tgaaccagaagaca tag
actgt tgg tgc aac tccacg tctacatggg taact ta tgggaca tgcaccgccacaggagaacacagaagggaaaaa..
aga tca.
gtggcac tct tccaca tgtgggaa tgggac tggagacacgaactgaaaca tggatg tca tcagaaggggccc tggaaaa
tgccagagaa ttgaaact tggg tct ttagaca tccagccttccaca taa tggcagcaa tcc tggcc tacac ta taggaa
cgaca ta tttccaaagag tct tga ttt tca tct tac tgcacagc tgc tctct tcaa tga ca..
atg.
cgtt gta taggaa ta tcaaa tagagact t t tggaaaggggtt tcaggaggaagc tgggt tgcacatag tct tggaaaca tgg
aagctgtgtgcagcaga tggcgaaaaa taaaccaaca ttgga ttt tgaac tga ttaaaacagaagccaacaccccccca
ctc taaggaag ta t t gta tagaggcaaagc tgaacaacacaacaacagca tctcgtgcccaacacaaggagaacctagc
ctaaa tgaagaacaggacaaaaga tttg tctg taaacac tca tgg tagacagagga tggggaaa tggatcggga t t a t t
tggaaagggagg ta tctg tacc tgtgcaa tgt tca tgc aaaaagaaca tggaaagaaaa tct tgcaccagaaaaact
tggag tacacca ttgtga taacacc tca ctcagggaggagaa tgcag tggaaa tgcacagga aacacggcaaggaa
a ttaaag taacaccacagat tcca tcacagaagcagaac taacagc ta tggcaccg tcaatgtggag tgc tctccag
aacgggccc tga c tcaa t gaga tgggt t tgc t gaaa tggaaacaaggct tggctgg tgcacagga tgg tct tag
acc t gcca t tacca tggc tgc cggagcagacacacaaggatcaaa ttgga tacagaaggagaca tgg tca c t t tcaaa
aa tcccc tgc aaaaacaggagc t t g t g t t t tagga tccaaagaagggc ta tgcacacagc ac tca caggggccac
ggaaa tccaga tgc tca tca gaaac t t a c t g t t c a c a g g a c a t c t t a a g t g c a g g c t g a g a a t g g a c a a a c t a c a g c t c a
a a g g a a t g t c a t a t t c c a t g t g t a c a g g a a a g t t t a a a g t t g t g a a g g a a t a g c a g a a a c a c a c a t g g a a c a a t a g t c
a t c a g a g t a c a a t a t g a a g g g a c g g t t c c c g t g t a a g a t c c c t t t t g a a a t a a t g g a t t t g g a a a a a g a c a t g t c o t
a g g t c g c t t g a t t a c a g t c a c c c a a t t g t c a c a g a a a a g a c a g c c c a g t c a a c a t a g a a g c a g a a c c t c a a t t c g g g g
a c a g c t a c a t c a t t a t a g g a g t a g a a c c a g g a c a a c t g a a g c t a g c t g g t t t a a a a a g g a a g t t c t a t t g g c c a a a t g
t t t g a g a c a a c a a t g a g a g g a g c g a a g a g a a t g g c c a t t t a g g t g a c a c a g c t t g g a t t t g g a t c c t t g g g a g g g g t
g t t c a c a t c a t a g g a a a g c c c t c c a c c a a g t c t t t g g a g c a a t c t a t g g g c t g c c t t c a g t g g g g t t c a t g g a c t a
t g a a a a t c c t c a t a g g a g t c g t c a t c a t a g g a t g a a t t c a c g c a g c a c c t c a c t g t c t g t g c a c t a g t a t t a
g t g g g g g t c g t g a c a t t g t a t t t g g g a g t t a t g g t c a g g c c a t .
```

圖 2. 第二型登革病毒之結構蛋白基因序列

**C** (330 bp) : capsid protein。 **Pr-M** (459 bp) : Pre-membrane protein。 **E** (1485 bp) : envelope protein。

Dengue virus 3 sequence .

Dengue virus type 3 strain Taiwan-739079A polyprotein gene, complete cds .

AY776329 .

Region identified from AAW23129.1 .

C(330bp)-pr(237bp)-M(222bp)-E(1476bp)-total(2265) .

```
ATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGAAAACCGTCTATCAATATGCTGAAACGCGTGAGAAAC
CGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGATTGCTGAACGGCCAAGGA
CCAATGAAATTGGTTATGGCCTTCATAGCTTTCTCAGATTTCTAGCCATTCCACCAACAGCAGG
AGTCTTGGCTAGATGGGAAACCTTTAAGAAGTCGGGAGCTATTAAGGTCCTGAGAGGCTTCAAG
AAGGAGATCTAAACATGCTGAGCATTATCAACAGACGAAAAAAGACATCGTTTTGTCTCATGA
TGATGTTACCAGCAACACTTGCTTCCACTTGACTTACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTG
GGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCTCTACTTTTAAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACAC
TCATAGCCATGGATTTGGGAGAGATGTGTGATGACACGGTCACTTATAAATGCCCCCTCATTCTG
AAGTGGAGCCTGAAGACATCGACTGCTGGTGCAACCTCACATCGACATGGGTGACCTACGGAA
CGTGCAATCAAGCTGGAGACATAGACCGGACAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCATGTCGG
CATGGGACTGGACACACGCCAACCCAAACCTGGATGTCGGCTGAGGGAGCTTGGAGACAAGTCGA
GAGGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACAATACTAGCCCTATTTCTTGCCCAT
ACATAGGCACTTCCTTGACCCAGAAAAGTGGTCATTTTCATACTACTAATGCTGGTCAACCCATCCA
TGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAAACAGAGATTTGTGGAAGGCCTATCAGGAGCTACGTG
GGTTGACGTGGTGCTCGAGCACGGTGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAAACAAGCCCAAGCT
GGATATAGAGCTCCAGAAGACCGAGGCCACCCAACTGGCTACCCTAAGGAAAATATGCATTGAG
GGAAAAATTACCAACGTAAACAACCGACTCAAGGTGTCCCACCAAGGGGAAGCGATCTTACCT
GAGGAGCAGGACCAGAACTCGTGTGTAAGCACACATACTGGACAGAGGCTGGGAAAACGGT
TGTGGTCTGTTGGCAAGGGAAGCTTGGTAACATGCGCGAAATTTCAATGTTTGAATCAATAGA
GGAAAAAGTGGTGCAGCATGAGAACCTCAAATACACCGTCATCATCACAGTGCACACAGGAGA
CCAACACCAGGTGGGAAATGAAACGCAGGGAGTCACGGCTGAGATAACACCCAGGCATCAAC
CGTTGAAGCCATCTACCTGAATATGGGACCCCTGGGCTAGAATGCTCACCAACGAACAGGTTAG
ATTTCAATGAAATGATTTTGTGACAATGAAGAACAAGCATGGATAGTGCATAGACAATGGTTT
TTTGACCTACCTCTACCATGGACATCAGGAGCTACAACAGAAAACACCAACCTGGAATAAGAAA
AGCTTCTGTGACATCAAAAACGCACATGCAAAAAAGCAAGAAGTAGTAGTTCTTGGATCGCA
AGAGGGAGCGATGCACACAGCACTGACAGGAGCCACAGAGATCCAGACCTCAGGAGGCACAA
GTATTTTTGCGGGGCACTTAAAATGTAGACTCAAGATGGACAAATTGGAACCTCAAGGGGATGAG
CTATGCAATGTGCTTGAATGCCTTTGTGTTGAAGAAAGAAGTCTCCGAAACGCAACATGGGACA
ATACTCATTAAAGTTGAGTACAAAGGGGAAGATGCACCTTGAAGATCCCTTCTCCACGGAGGA
TGGACAAGGAAAAGCCACAATGGCAGACTGATCACAGCAAACCCAGTGGTGACCAAGAAGG
AGGAGCCTGTCAATATCGAGGCAGAACCTCCTTTGGGGAAAAGTAATATAGTATTGGAATTGGA
GACAAAGCCTTAAAATTAAGTATAAGAAGGGAAGCTCGATTGGGAAAGATGTTGAGAGGCCA
CTGCCAGAGGTGCAAGGCGCATGGCTATCCTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTAGG
TGGTGTTTTAAATTCATTAGGGAAAATGGTGCACCAATATTTGGAAGTGCTTACACAGCCTTATT
TAGTGGAGTCTCCTGGATAATGAAAATGGAATAGGTGTCCTCTAACCTGGATAGGGTTGAATT
CAAAAAACACTTCTATGTCATTTTCATGCAATTGTGATAGGAATCATTACACTCTATCTGGGAGCCG
TGGTGCAAGCTTAA .
```

圖 3. 第三型登革病毒之結構蛋白基因序列

**C (330 bp)** : capsid protein 。 **Pr-M (459 bp)** : Pre-membrane protein 。 **E (1476 bp)** : envelope protein 。

Dengue virus 4 sequence .

Dengue virus type 4 strain Taiwan-2K0713 polyprotein gene, complete cds .

AY776330 .

Region identified from AAW30973.1 .

C(330bp)-pr(255bp)-M(219bp)-E(1482bp)-total(2286) .

```
ATGAACCAACGAAAAAAGGTGGTTAGACCACCTTCAATATGCTGAAAACGCGAGAGAAAACCGC
GTATCAACCCCTCAAGGGTGGTGAAGAGATTCTCAACCGGACTTTTCTCCGGGAAAGGACCCT
TACGGATGGTGTAGCATTACATTACGTTTTTTCGAGTCTTCCATCCCGCCAACAGCAGGGATT
CTGAAAAGATGGGGACAGTTGAAAAAGAATAAGGCCATCAAGATACTGATTGGATTACAGGAAG
GAGATAGGTCGCATGTTAAACATCTTGAATAGGAGAAGAAGGTCAACAATGACATTGCTGTGTTT
GATTCCCACCGTAATGGCGTTTACCTGTCAACAAGAGACGGCGAACCCCTCATGATAGTGGCA
AAGCACGAAAGGGGGAGACCTCTTTGTTAAGACAACAGAAGGAATCAACAAATGCACCCTC
ATTGCCATTGGACCTGGGTGAAATGTGTGAAGACACTGTACGTATAAATGTCCTCTACTAGTTAA
CACCACTGGAAGACATTGATTGCTGGTCAATCTCACGTCCACCTGGGTCACTACGGGACA
TGCACCCAGAACGGAGAACGGAGCGAGAGAAGCGCTCAGTAGCTTTAACACCACATTACAGGA
ATGGGATTGGAAACAAGAGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAACATGCTCAG
AGAGTGGAAAGCTGGATACTCAGAAACCCAGGATTGCGCTTCTGGCAGGATTTATGGCTTACA
TGATTGGGCAAACAGGAATTACGCGAAGCTTTTTCTTTGTCTAATGATGCTAGTCGCCCATCC
TACCGAATGCGATGCGTAGGGGTAGGGAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCGGGTGGAGCA
TGGGTGACCTGGTGTAGAACATGGAGGATGTGCACAACCATGGCCAGGGAAAACCAACC
TTGGATTTGAACTGACCAAGACAACAGCTAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCATTG
AAGCTTCGATATCAAAACATAACCAACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGAGAGCCTTATCTCAA
AGAGGAACAAGACCAACAGTACATTTGCCGAGAGACGTGGTAGACAGGGTGGGCAATG
GCTGTGGCTTGTGGAAAAGGAGGAGTTGTGACGTGTGCGAAGTTTTATGCTCGGGGAAGAT
AACAGGCAATCTGGTCCAAATTGAAAACCTTGAATATACGGTAGTTGTGACAGTCCACAATGGA
GACACCCATGCAGTAGGAAATGACACATCCAATCATGGAGTGACAGCTACGATAACTCCCAGGT
CACCATCGGTAGAAGTTAAATTGCCGACTATGGGGAACCTAACACTCGATTGTGAACCCAGGTC
CGGAATTGATTTCAATGAGATGATTCTGATGAGAATGAAAAAGAAAACGTGGCTTGTGCACAAA
CAATGGTTTTGGACCTACCTTACCATGGACAGCAGGAGCAGACACATCAGAAGTTCATTGGA
ATTATAAAGAGAGAATGGTGACATTCAAAGTTCCTCATGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCT
AGGATCTCAGGAGGGAGCTATGCATTCTGCCCTCGCCGGAGCCACAGAAGTGGATTCTGGCGAT
GGAAATCACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAAGTTCGTATGGAGAAATTGAGAATTAAGG
GAATGTCATACACGATGTGTTACAGGAAAGTCTCAATTGACAAAAGAGATGGCAGAAACACAGCA
TGGGACAACAGTAGTGAAAGTCAAGTATGAAGGCGCTGGAGCTCCGTGCAAAGTCCCATAGA
GATAAGAGATGTGAACAAGGAAAAAGTAGTTGGGCGCATCATCTCATCCACCCCTTTTGTGAG
AGTACCAACAGCGTAACCAACATAGAATTAGAACCCCTTTTGGGGACAGCTACATAGTGATAG
GTGTTGGAGACAGTGCTTAAACTCCATTGGTTCAGGAAAGGGAGCTCCATTGGCAAGATGTT
TGAGTCCACATACAGAGGTGCAAAACGAATGGCCATTCTAGGTGAAACAGCTTGGGATTTGGT
TCTGTTGGTGGACTGTTACATCACTGGGAAAGGCTGTACACCAAGTTTTTGGAAAGTGTGTATAC
AACCATGTTTGGAGGGTCTCATGGATGATTAGAATCCTAATTGGGTTCTTAGTATTGTGGATTGG
CACGAATCAAGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAATTACTCTGTTTC
TAGGTTTCACAGTTCAAGCATAA|
```

圖 4. 第四型登革病毒之結構蛋白基因序列

**C (330 bp)** : capsid protein 。 **Pr-M (474 bp)** : Pre-membrane protein 。 **E (1482 bp)** : envelope protein 。

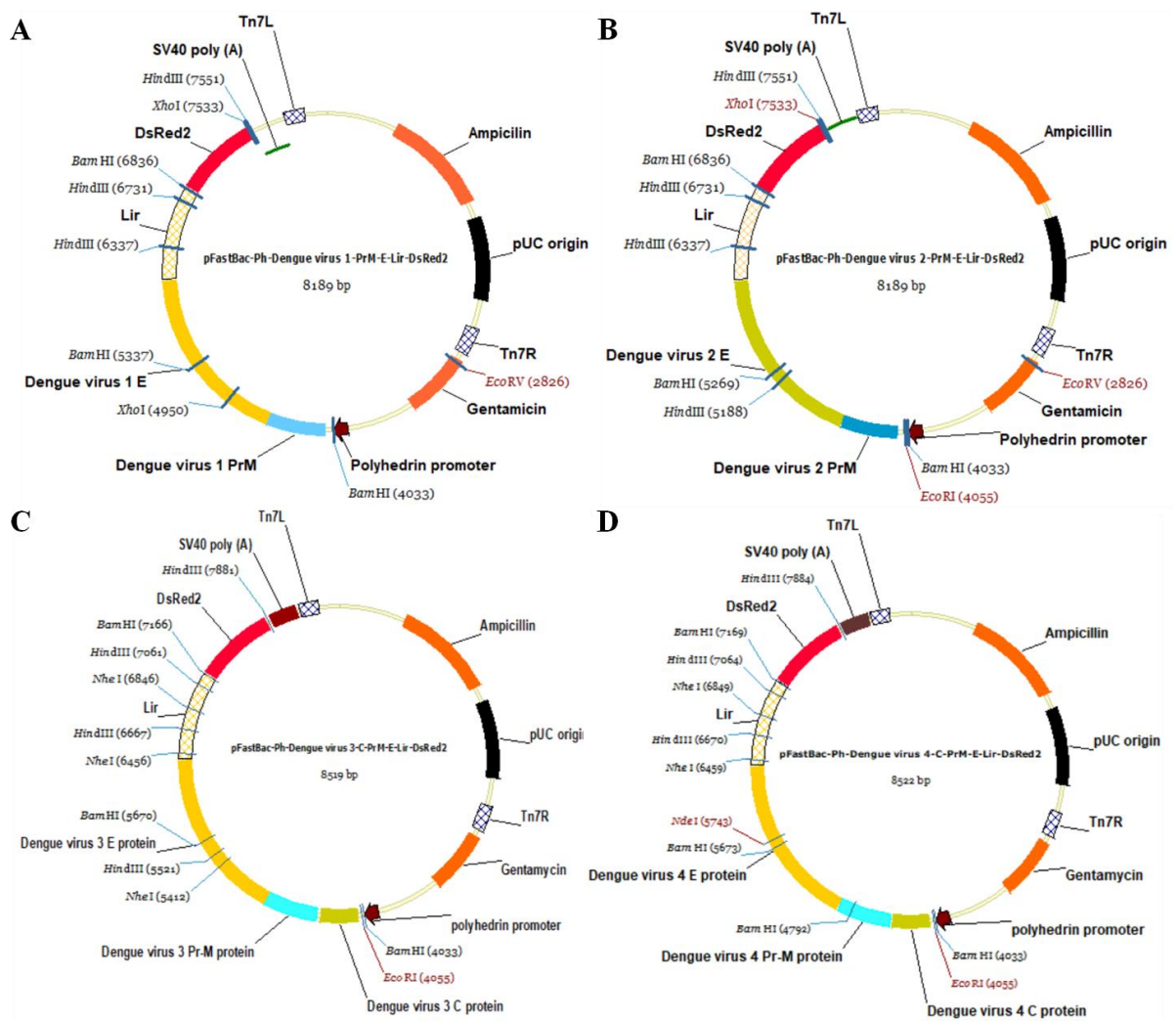


圖 5. 呈現登革病毒結構蛋白之傳送載體。圖 5 A.、圖 5 B.、圖 5 C.與圖 5 D. 分別為 pFastBac-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 pFastBac-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 之傳送載體示意圖。

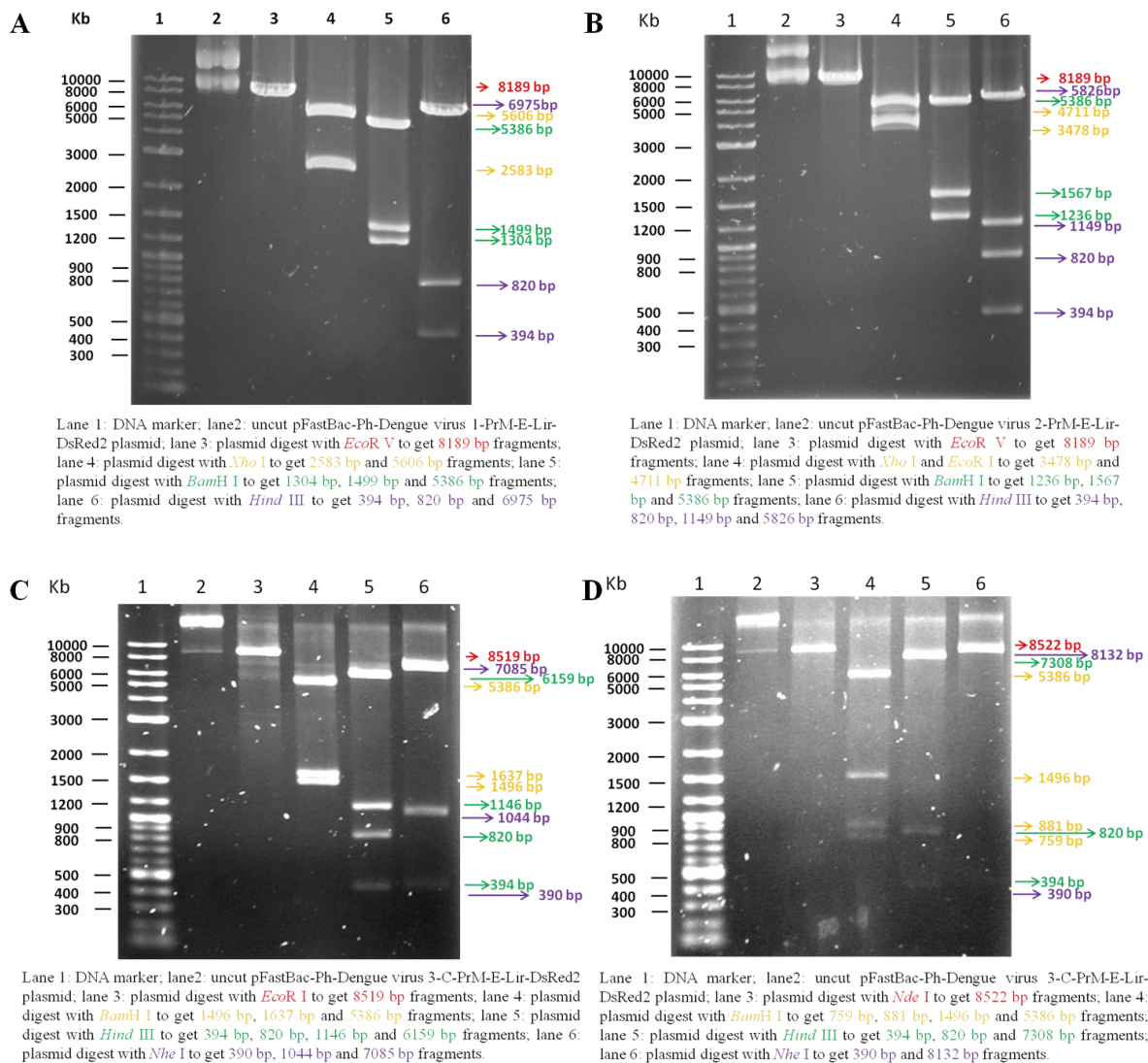


圖 6. 利用限制酵素對傳送載體作用並進行電泳確認。圖 6 A、圖 6 B、圖 6 C 與圖 6 D. 分別為質體 pFastBac-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed、pFastBac-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2、pFastBac-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 pFastBac-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 經酵素作用後之 DNA 電泳圖。

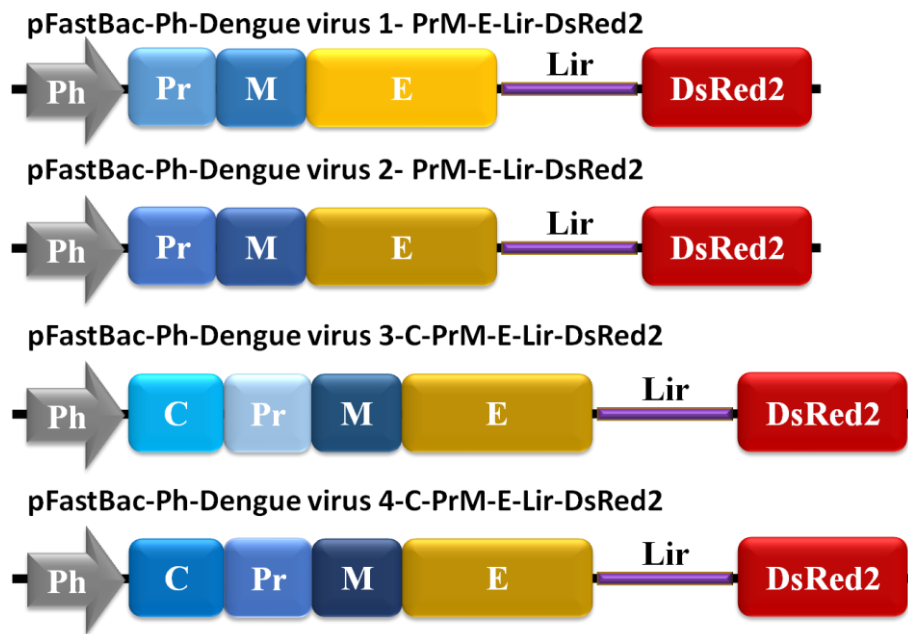
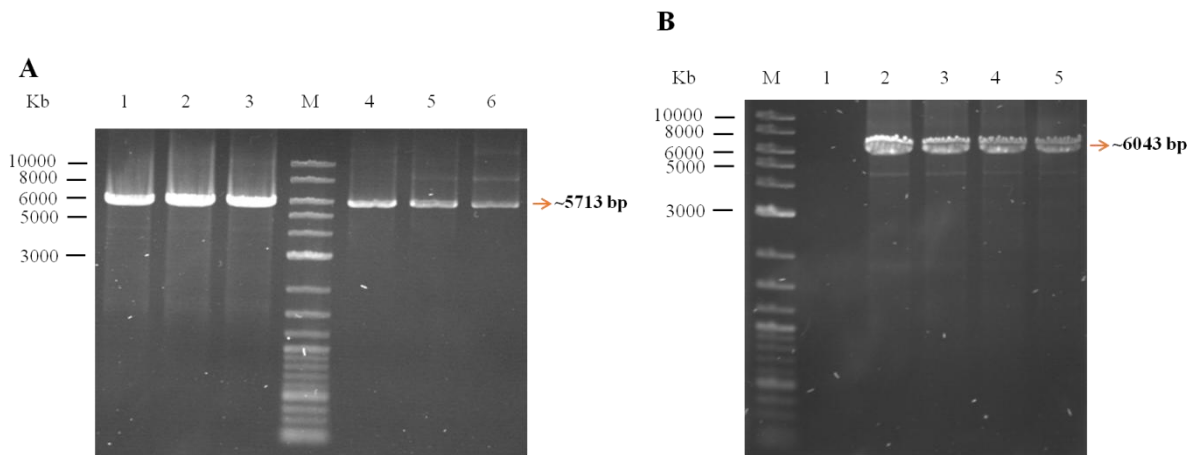


圖 7. 登革病毒結構蛋白之傳送載體示意圖。Ph：*Polyhedron* 啟動子，為昆蟲桿狀病毒的極晚期啟動子。Dengue virus C：登革病毒的結構蛋白 Capsid 基因。Dengue virus PrM：登革病毒的結構蛋白 Propep-M 基因。Dengue virus E：登革病毒的結構蛋白 E 基因。Lir：Lir IRES (Internal ribosome entry site)。DsRed2：紅螢光基因。



**圖 8. 利用 pUC/M13 引子對進行 PCR 確認重組桿狀病毒 DNA 之電泳圖。**

圖 8 A. 利用聚合酶連鎖反應確認登革第一與第二型結構蛋白基因有重組至桿狀病毒 DNA 之病毒質粒上。M：DNA marker。Lane 1-3：vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2。Lane 4-6：vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2。圖 8 B. 利用聚合酶連鎖反應確認登革第三與第四型結構蛋白基因有重組至桿狀病毒 DNA 之病毒質粒上。M：DNA marker。Lane 1：NTC (no template control)。Lane 2-3：vbAc-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2。Lane 4-5：vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2。使用的引子如下：pUC/M13 Forward：5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' 及 pUC/M13 Reverse：5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'。



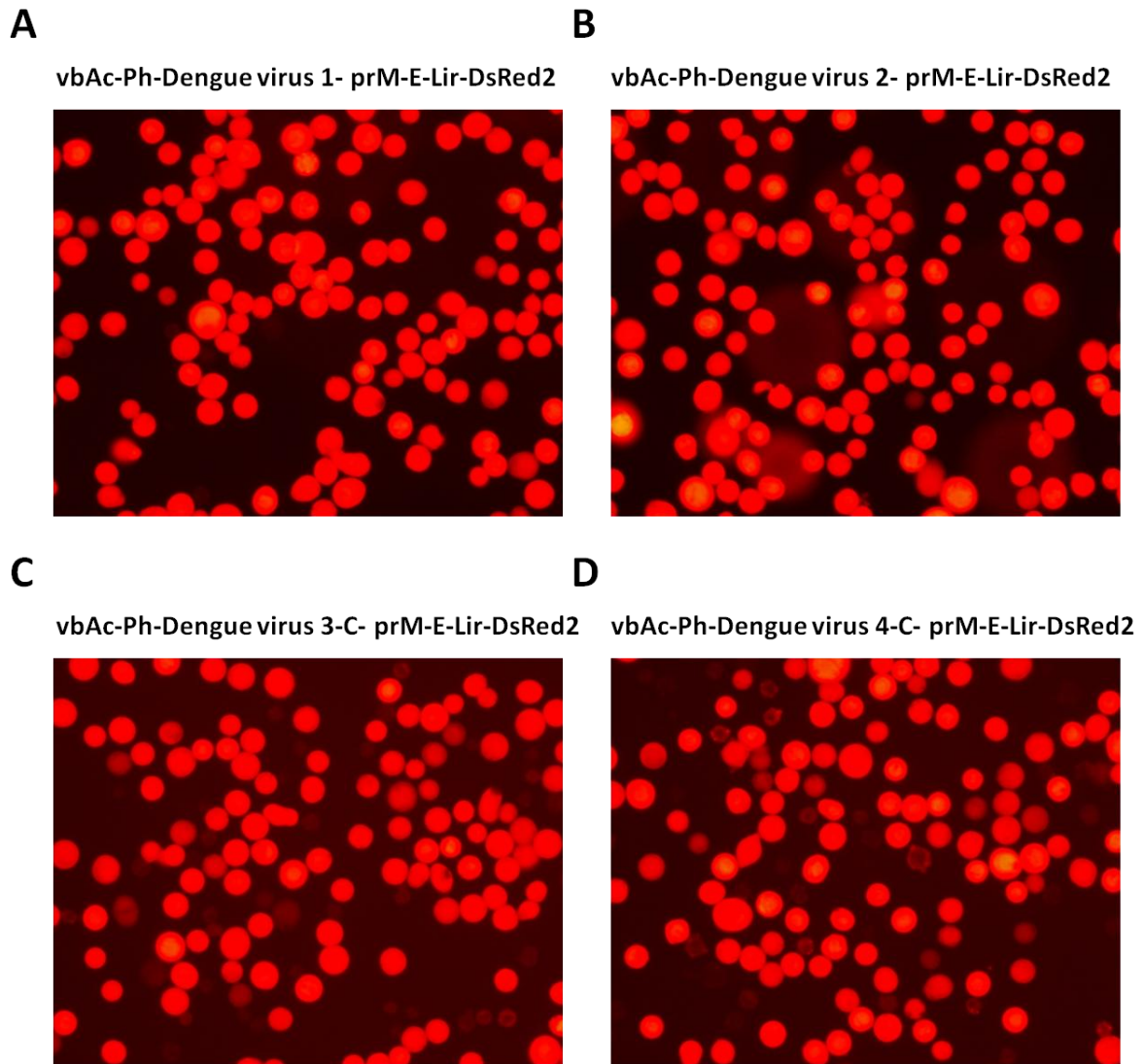
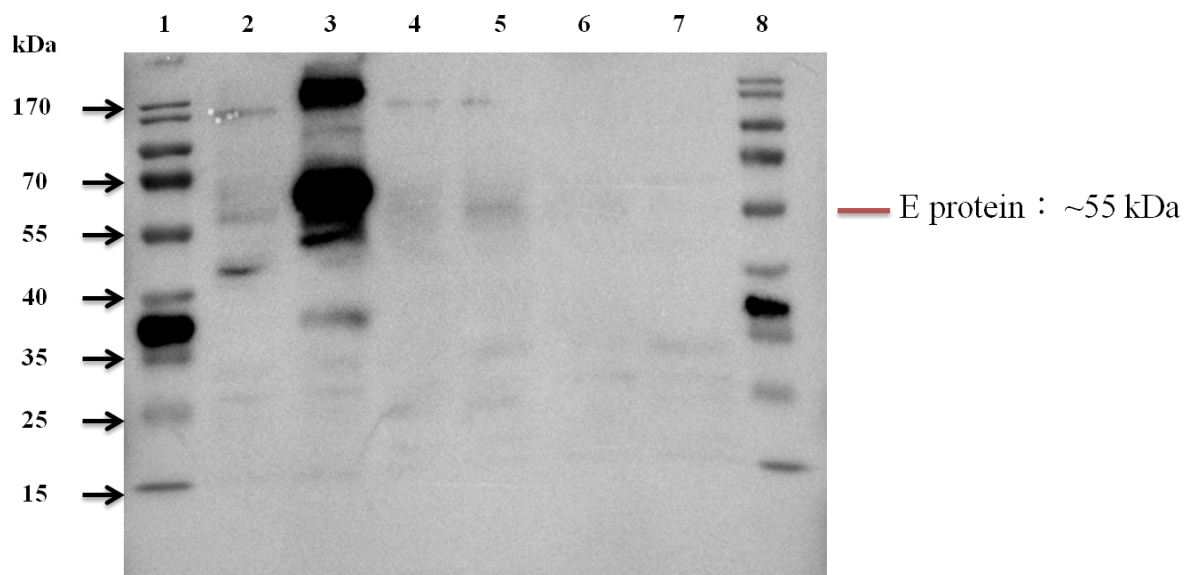


圖 9. 呈現登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒。圖 9 A.與 B.為分別為感染 vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2 與 vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2 的 *Sf21* 昆蟲細胞，M.O.I = 2，d.p.i = 3 天，放大倍率：200X。圖 9 C. 與 D. 為分別為感染 vbAc-Ph-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2 與 vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2 的 *Sf21* 昆蟲細胞，M.O.I = 0.5，d.p.i = 3 天，放大倍率：200X。



**圖 10.** 以西方墨點法分析登革病毒重組結構蛋白 E 的表現

使用西方墨點法確認是否表現登革病毒的結構蛋白 E，抗體：anti-Dengue Envelope (GTX127277, GeneTex)，稀釋比 1：5000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。Lane 1 and 8：Protein Marker，Lane 2：vbAc-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 3：vbAc-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 4：vbAc-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 5：vbAc-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 6：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組，Lane 7：感染了重組桿狀病毒 vbAc-Zika virus -PrM-E-Lir-DsRed2 的組別，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。

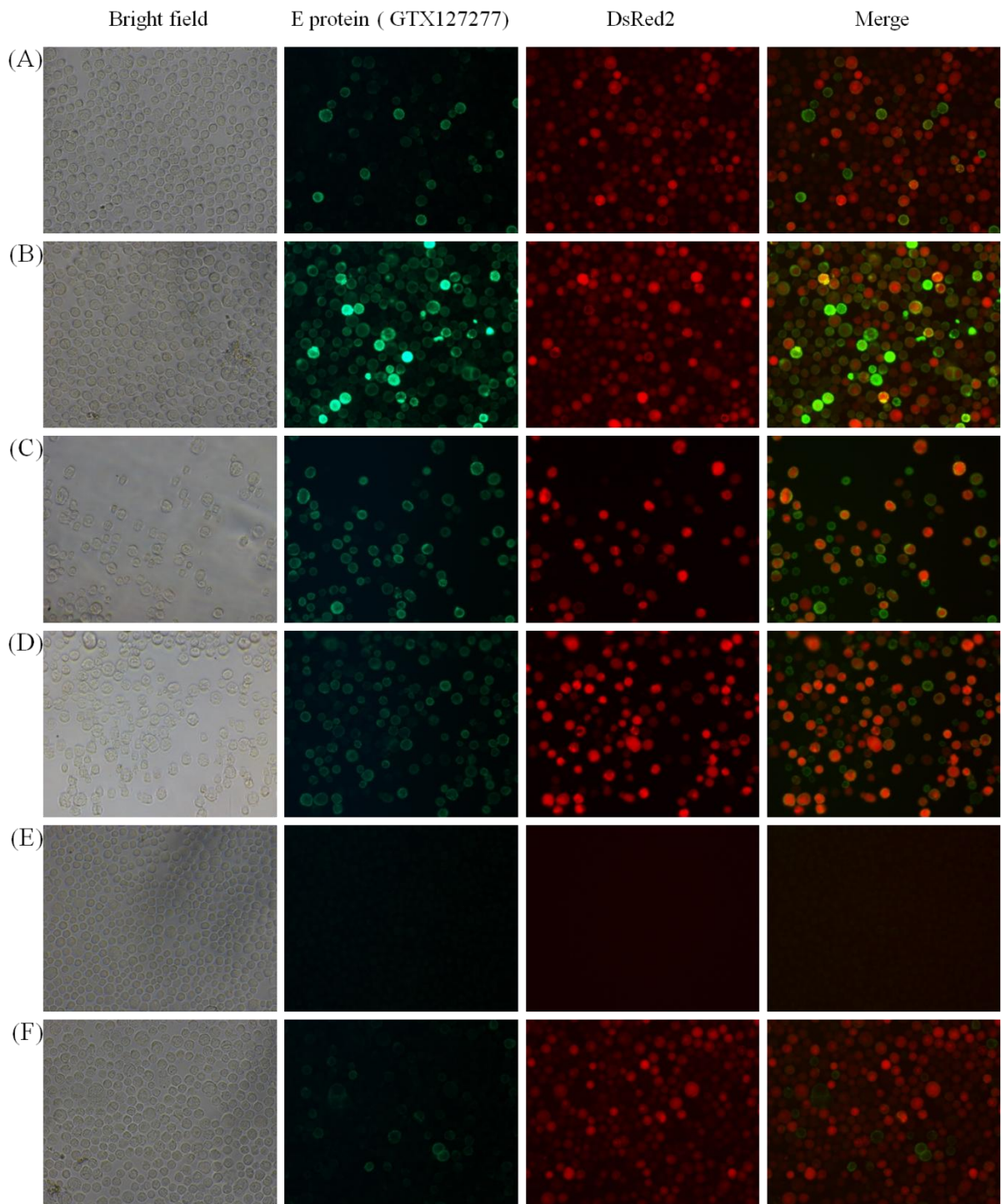
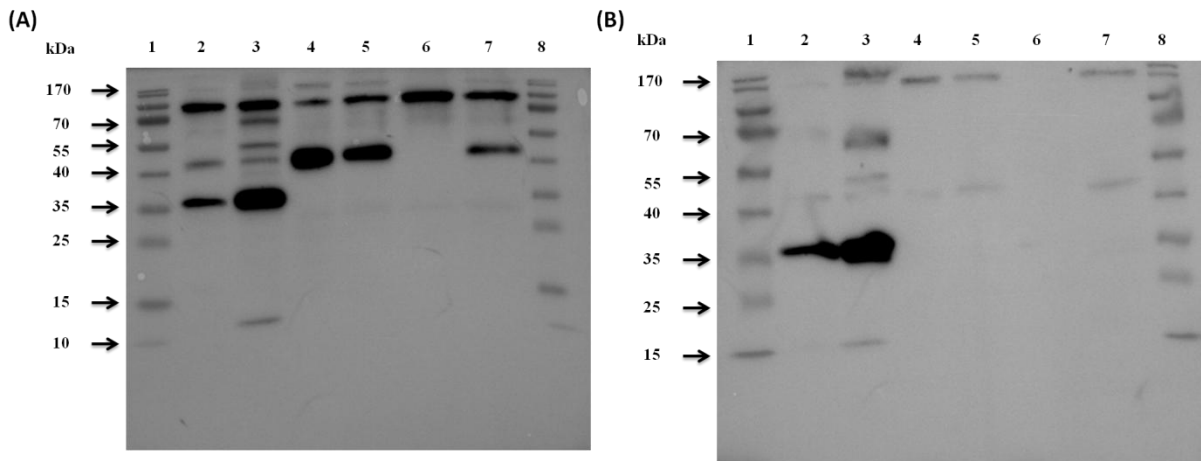


圖 11. 以免疫螢光分析登革病毒重組結構蛋白 E 的表現

重組桿狀病毒以 M.O.I = 0.5 或 2 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第

3 天進行實驗。圖 A. 為感染含第一型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 B. 為感染含第二型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 C. 為感染含第三型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 D. 為感染含第四型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 E. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 F. 為感染含茲卡病毒結構蛋白基因之桿狀病毒，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。使用抗登革 E 結構蛋白抗體 (GTX127277, GeneTex) 確認登革病毒的結構蛋白 E 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1:500。二抗皆為 anti-rabbit Alexa Fluor® 488- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1:250，放大倍率：200X，白光 (Bright field) 曝光時間：15 ms，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：800 ms，綠螢光染料 (Alexa Fluor® 488) 曝光時間：1.5 s。



**圖 12. 以西方墨點法分析登革病毒重組結構蛋白 PrM 的表現**

使用西方墨點法確認是否表現登革病毒的結構蛋白 PrM，圖 A 抗體：anti-Dengue Pre-membrane (GTX128092, GeneTex)與圖 B 抗體：anti-Dengue Pre-membrane (GTX128093, GeneTex)，稀釋比 1：5000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。Lane 1 and 8：Protein Marker，Lane 2：vbAc-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 3：vbAc-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 4：vbAc-Dengue virus 3-C-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 5：vbAc-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2，Lane 6：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組，Lane 7：感染了重組桿狀病毒 vbAc-Zika virus -PrM-E-Lir-DsRed2 的組別，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。

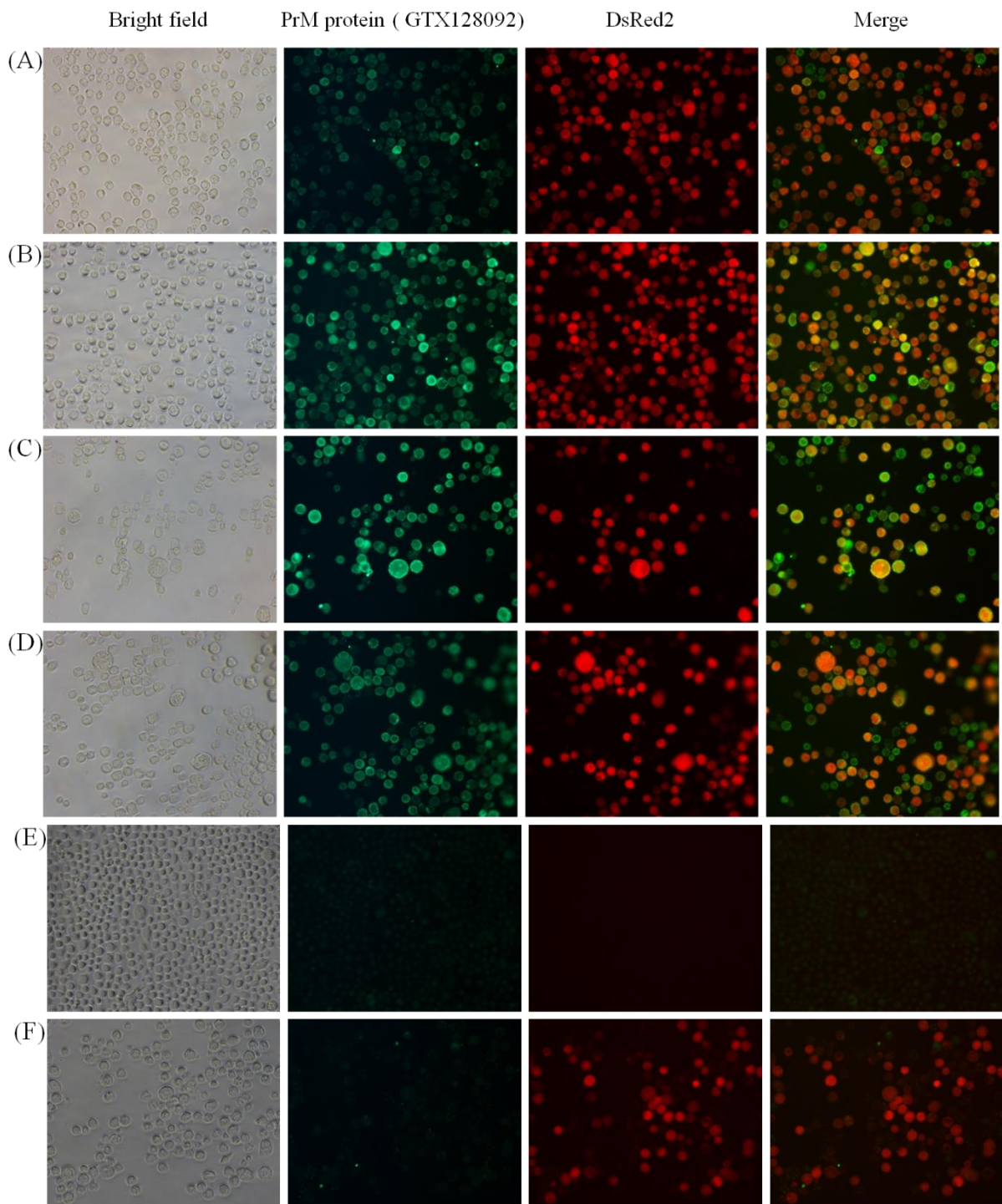


圖 13. 以免疫螢光分析登革病毒重組結構蛋白 PrM 的表現 (GTX128092)

重組桿狀病毒以 M.O.I = 0.5 或 2 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第

3 天進行實驗。圖 A. 為感染含第一型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 B. 為感染含第二型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 C. 為感染含第三型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 D. 為感染含第四型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 E. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 F. 為感染含茲卡病毒結構蛋白基因之桿狀病毒，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。使用抗登革 PrM 結構蛋白抗體 (GTX128092, GeneTex) 確認登革病毒的結構蛋白 PrM 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1：500。二抗皆為 anti-rabbit Alexa Fluor® 488- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1：250，放大倍率：200X，白光 (Bright field) 曝光時間：15 ms，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：800 ms，綠螢光染料 (Alexa Fluor® 488) 曝光時間：1.5 s。

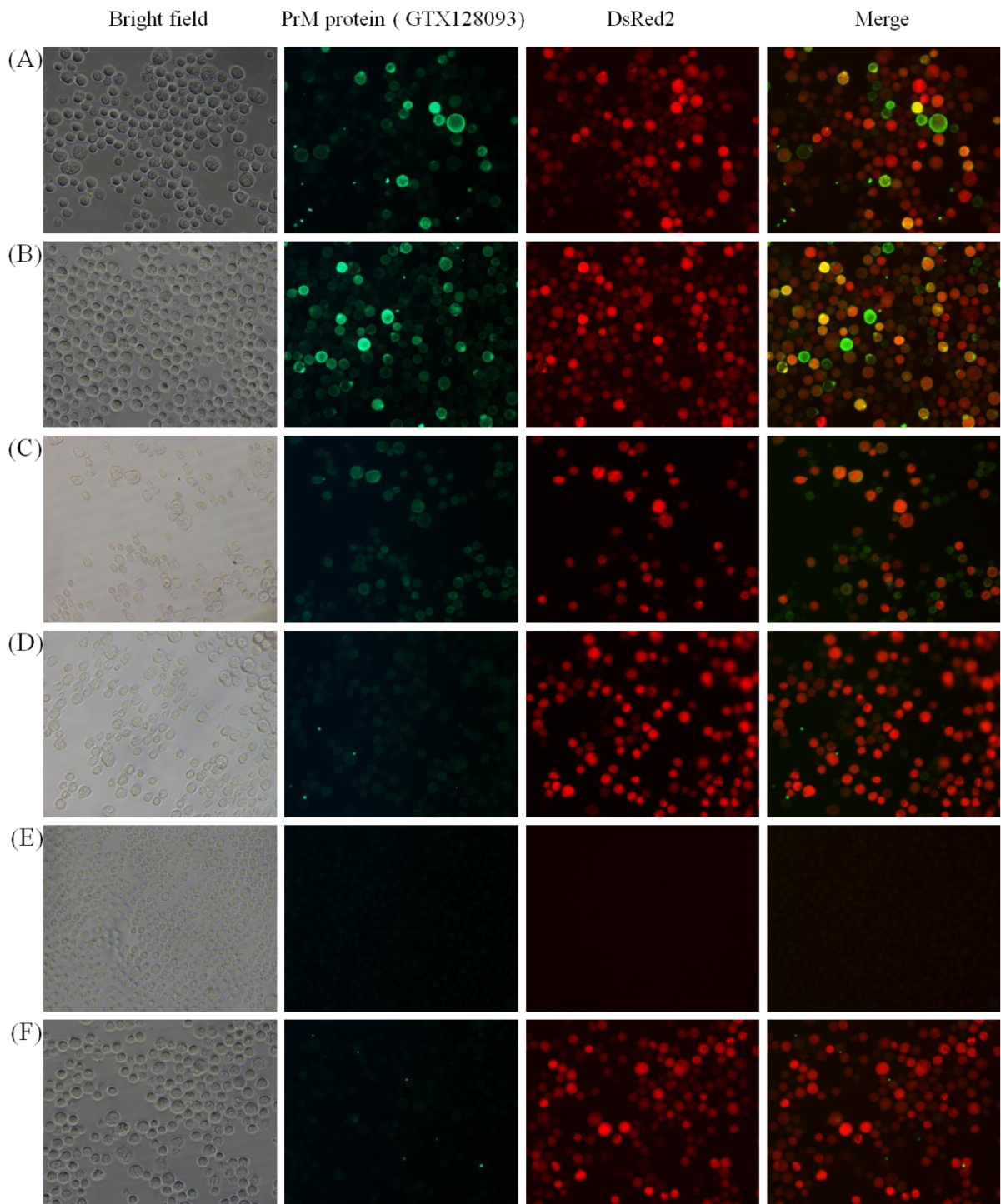


圖 14. 以免疫螢光分析登革病毒重組結構蛋白 PrM 的表現 (GTX128093)

重組桿狀病毒以 M.O.I = 0.5 或 2 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第



3 天進行實驗。圖 A. 為感染含第一型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 B. 為感染含第二型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 C. 為感染含第三型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 D. 為感染含第四型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 E. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 F. 為感染含茲卡病毒結構蛋白基因之桿狀病毒，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。使用抗登革 PrM 結構蛋白抗體 (GTX128093, GeneTex) 確認登革病毒的結構蛋白 PrM 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1：500。二抗皆為 anti-rabbit Alexa Fluor® 488- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1：250，放大倍率：200X，白光 (Bright field) 曝光時間：15 ms，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：800 ms，綠螢光染料 (Alexa Fluor® 488) 曝光時間：1.5 s。

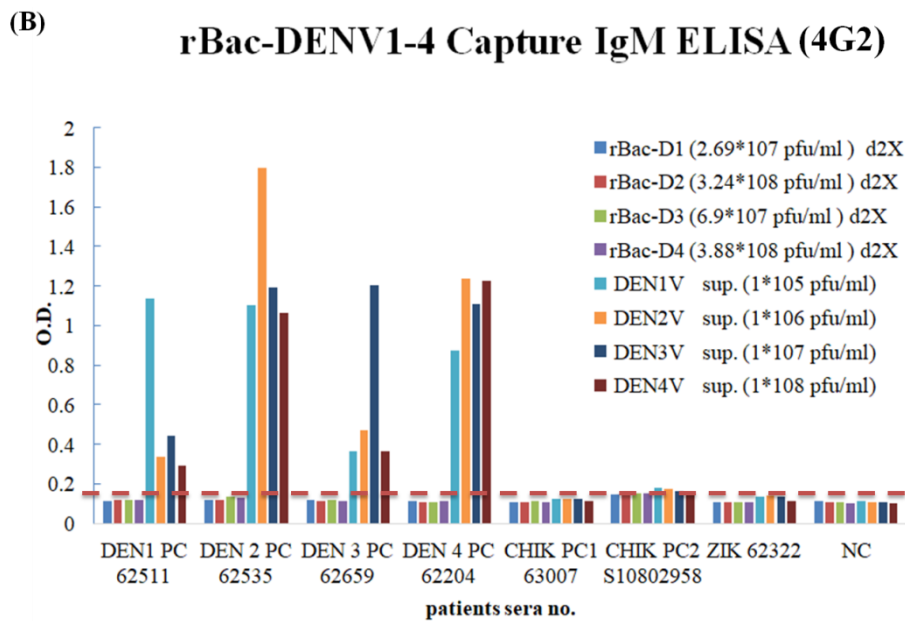
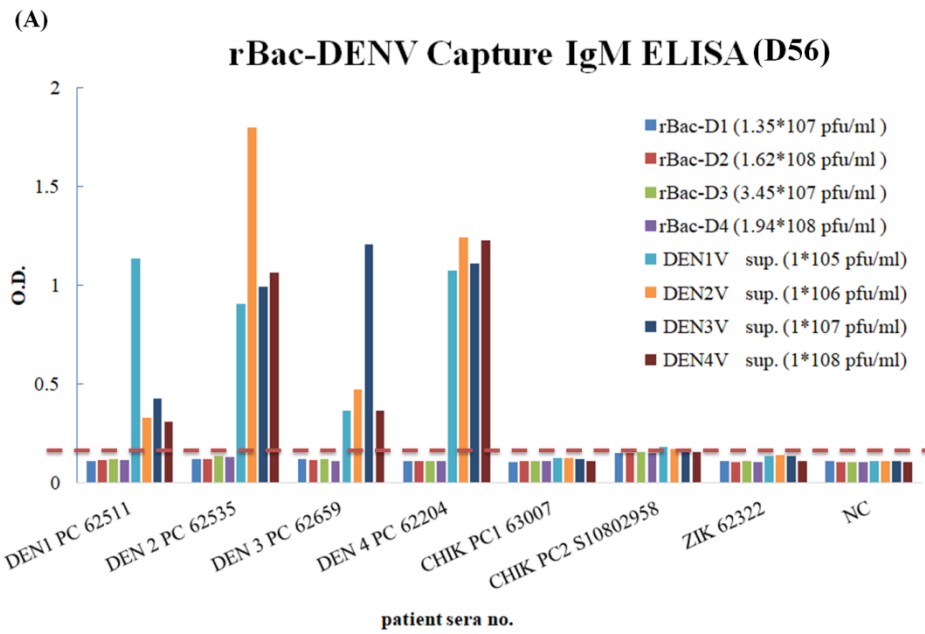


圖 15. 以重組桿狀病毒 *vbAc-Ph-Dengue virus 1-PrM-E-Lir-DsRed2* 、  
*vbAc-Ph-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2* 、*vbAc-Ph-Dengue virus*  
*3-C-PrM-E-Lir-DsRed2* 與 *vbAc-Ph-Dengue virus 4-C-PrM-E-Lir-DsRed2*  
 取代登革病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗。圖(A)做 Mac-ELISA 時所使用的

抗體為 D56：為抗黃熱病毒科之抗體。圖 B 做 Mac-ELISA 時所使用的抗體為 4G2：為抗黃病毒之抗體。DEN1 PC 62511：受第一型登革病毒感染之人的血清樣品。DEN2 PC 62535：受第二型登革病毒感染之人的血清樣品。DEN3 PC 62659：受第三型登革病毒感染之人的血清樣品。DEN4 PC 62204：受第四型登革病毒感染之人的血清樣品。CHIK PC1 63007 與 CHIK PC2 S10802958：受屈公病毒感染之人的血清樣品。ZIK 62322：受茲卡病毒感染之人的血清樣品。NC：正常、未受蟲媒病毒感染之人的血清樣品。rBac-D1：為呈現第一型登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒。rBac-D2：為呈現第二型登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒。rBac-D3：為呈現第三型登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒。rBac-D4：為呈現第四型登革病毒結構蛋白之重組桿狀病毒。DEN1V：為第一型登革病毒。DEN2V：為第二型登革病毒。DEN3V：為第三型登革病毒。DEN4V：為第四型登革病毒。

表次

表一、總結抗登革病毒結構蛋白之抗體於 IFA 與 western 實驗上之應用

PrimaryAntibody	Virus type	(IFA)	Immunofluorescence assay (IFA)	(WB)	Western blot (WB)
GTX127277	Dengue virus 1	+	This antibody can use to detect Dengue virus 1, Dengue virus 2, Dengue virus 3, Dengue virus 4 or Zika virus E protein when using baculovirus system to over-expression the E protein.	-	This antibody can use to detect Dengue virus 2 E protein when using baculovirus system to over-expression the E protein.
	Dengue virus 2	+		+	
	Dengue virus 3	+		-	
	Dengue virus 4	+		-	
	Zika virus	+		-	
GTX128092	Dengue virus 1	+	This antibody can use to detect Dengue virus 1, Dengue virus 2, Dengue virus 3 or Dengue virus 4 PrM protein when using baculovirus system to over-expression the PrM protein.	-	-
	Dengue virus 2	+		-	
	Dengue virus 3	+		-	
	Dengue virus 4	+		-	
	Zika virus	-		-	
GTX128093	Dengue virus 1	+	This antibody can use to detect Dengue virus 1, Dengue virus 2 or Dengue virus 3 PrM protein when using baculovirus system to over-expression the PrM protein.	-	-
	Dengue virus 2	+		-	
	Dengue virus 3	+		-	
	Dengue virus 4	-		-	
	Zika virus	-		-	

+：抗體可偵測到結構蛋白

-：抗體無法偵測到結構蛋白

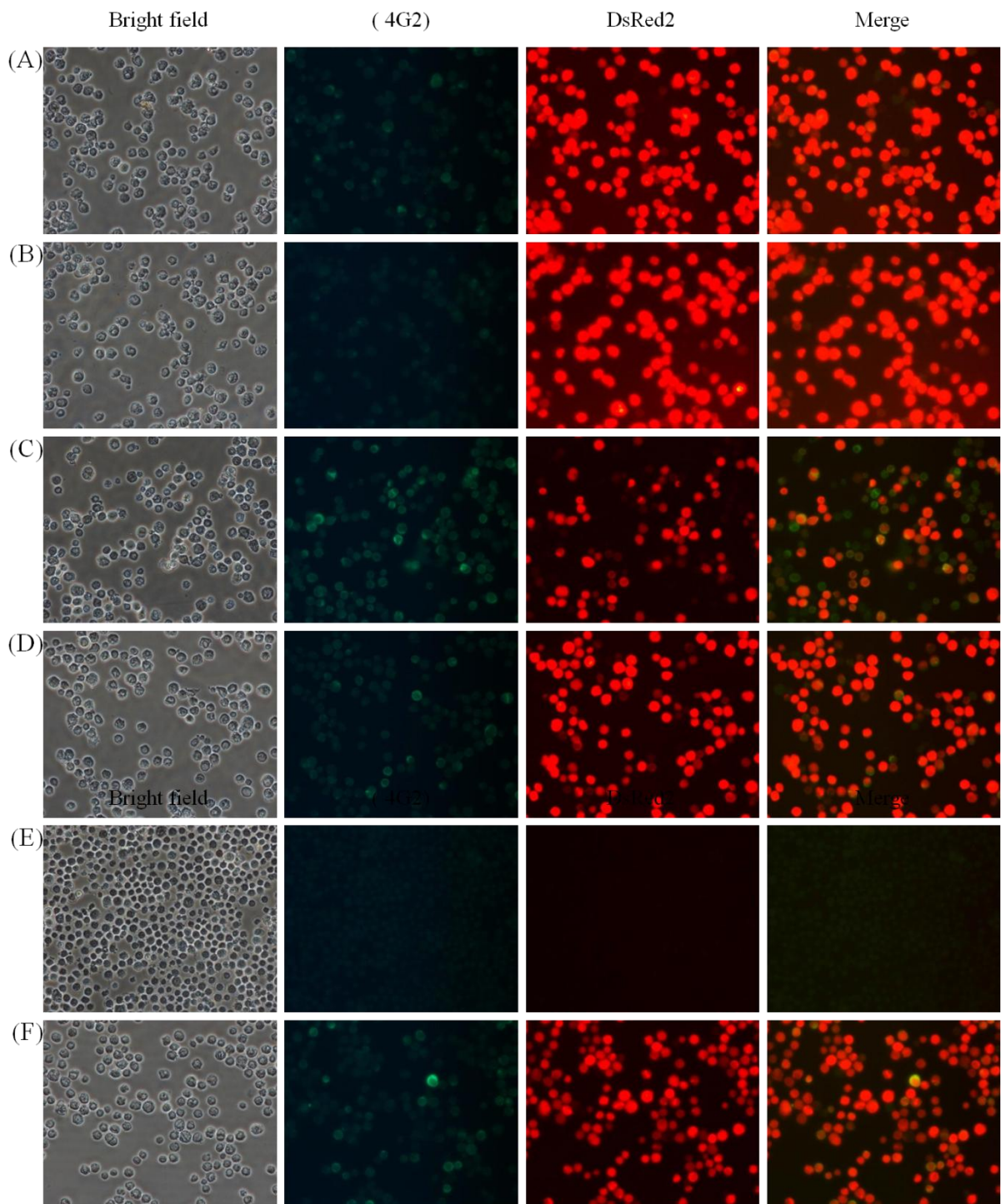


圖 16. 以免疫螢光分析登革病毒重組結構蛋白的表現 (4G2)

重組桿狀病毒以 M.O.I = 0.5 或 2 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第

3 天進行實驗。圖 A. 為感染含第一型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 B. 為感染含第二型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 C. 為感染含第三型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 D. 為感染含第四型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 E. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 F. 為感染含茲卡病毒結構蛋白基因之桿狀病毒，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。使用抗登革結構蛋白抗體 (4G2) 確認登革病毒的結構蛋白是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1:100。二抗皆為 anti-mouse Alexa Fluor® 488- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1:250，放大倍率：200X，白光 (Bright field) 曝光時間：15 ms，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：800 ms，綠螢光染料 (Alexa Fluor® 488) 曝光時間：1 s。

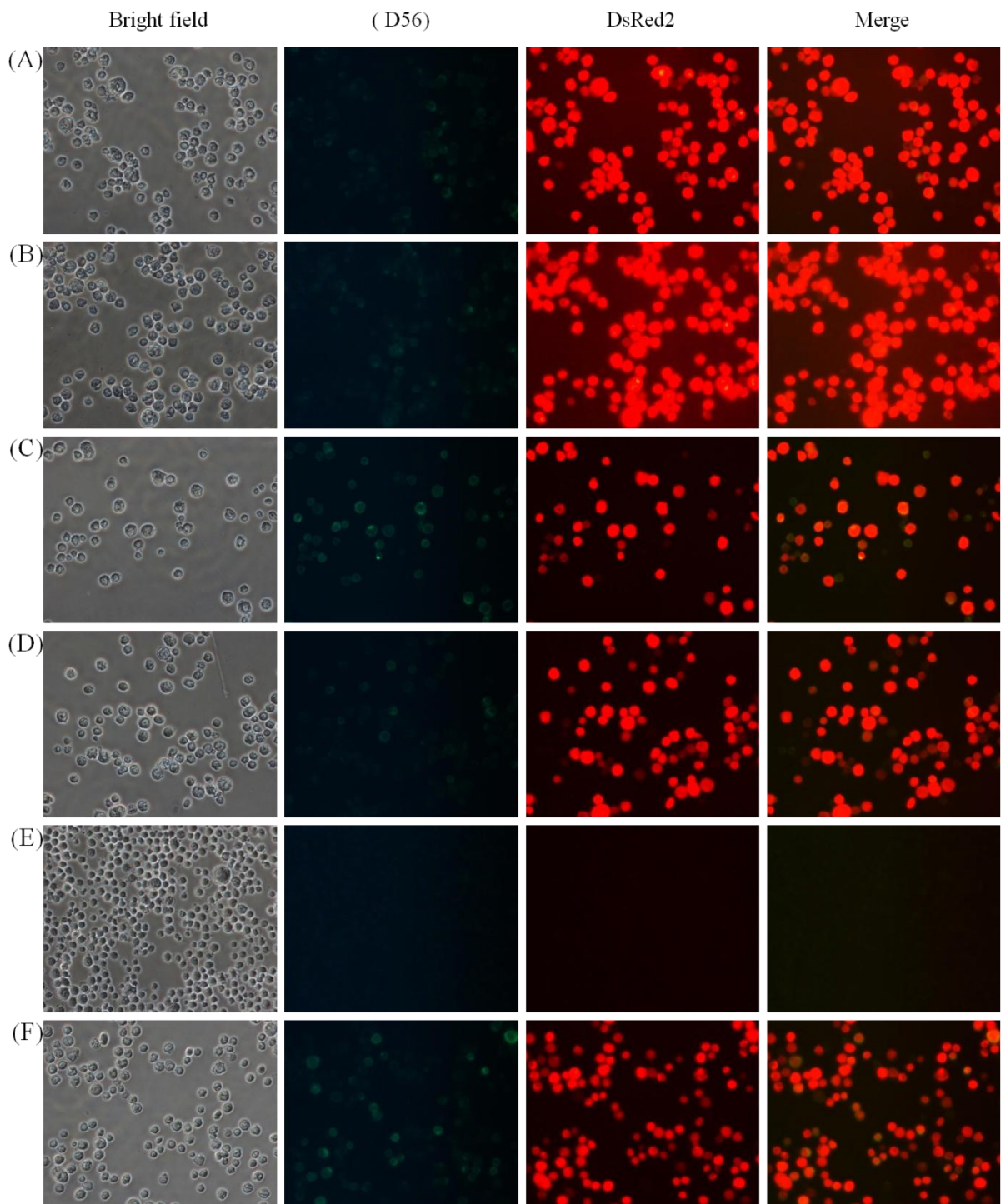


圖 17. 以免疫螢光分析登革病毒重組結構蛋白的表現 (D56)

重組桿狀病毒以 M.O.I = 0.5 或 2 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第

3 天進行實驗。圖 A. 為感染含第一型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 B. 為感染含第二型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 C. 為感染含第三型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 D. 為感染含第四型登革結構蛋白基因之桿狀病毒。圖 E. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 F. 為感染含茲卡病毒結構蛋白基因之桿狀病毒，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。使用抗登革結構蛋白抗體 (D56) 確認登革病毒的結構蛋白是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1:100。二抗皆為 anti-mouse Alexa Fluor® 488- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1:250，放大倍率：200X，白光 (Bright field) 曝光時間：15 ms，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：800 ms，綠螢光染料 (Alexa Fluor® 488) 曝光時間：1 s。



**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-114-123503

計畫名稱：以重組桿狀病毒表現系統開發蟲媒病毒傳染病診斷試劑之研究

計畫主持人：吳宗遠

\*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	本年度可以順利表現登革腦炎病毒蛋白，但是未能成功檢測病人血清陽性反應，是非常可惜的事。但是這個結果也點出核多角體病毒表現系統，可能會有蛋白結構組成的問題，提供未來採用此策略重要參考依據。	本年度順利表現登革腦炎病毒蛋白，但未能成功檢測病人血清陽性反應，這結果也點出核多角體病毒表現系統可能會有蛋白結構組成的問題，將此要點加入於成果報告中討論。	17
2	針對利用昆蟲桿狀病毒表現系統產生之登革病毒標的蛋白，何以未能應用於血清樣本檢測應有所討論。尤其是不同細胞株是否在蛋白表現出來後會有不同的 protein conformation，應加以探討、分析。尤其是如果有文獻曾經遇到這種問題，其原因何在？他們又如何解決問題等。如果能找出原因，除有利於未來病毒蛋白外源表現的掌握外，對於病媒、宿主與各蟲媒病毒的生物學關係、演化關係等研究亦可以有所啟發。	不同物種細胞所用來表現相同一個蛋白質其在摺疊構型上差異不大，惟部分在轉譯後蛋白質的修飾上，如醮基化等較為豐富。	
3	昆蟲多角體蛋白表現系統可以順利表達登革病毒、屈公病毒結構蛋白，為一個值得發展的方向。為安全檢測試劑，甚至安全疫苗的研發都能有所助益。	謝謝委員肯定。	
4	屈公病毒蛋白可以用這個系統表	屈公病毒結構蛋白表現後在	17

	現，也可以發揮預期功能，而登革病毒卻有不同結果，可有比較過其差異所在的可能原因。	昆蟲細胞中會誘使細胞融合現象發生，而登革結構蛋白表現後則無此現象，另外在登革結構蛋白的表現量也有可能較少，或許可嘗試另一啟動子 HR1-PAG 來試試。	
5	Dengue 4型的envelope放在桿狀病毒載體，並有Red fluorescence為感染的 reporter，IFA (GTXAb 對 DV2)，也可以染出，Western blot 有些可以做出來。	謝謝委員肯定。	
6	ELISA(CDC-in-house)都無法測到表現DV結構蛋白的重組桿狀病毒，結構的問題？或是proteolysis的問題。	ELISA(CDC-in-house)都無法測到表現DV結構蛋白的重組桿狀病毒的確有可能是結構組成上的問題。	
7	可試用病人來的高效價抗體來做 Western blot，看有無切下來的抗原。	謝謝委員提示，實驗已用 genetex 所生產之抗體做過 western，並且偵測的到登革第二型中的 E protein，而如有病人病人高效價之抗體，的確可再嘗試看看。	
8	於 Trials in Vaccinology Volume 4，2015中有一篇也有執行過相似的研究，是否在amino acid 表現的 worm cell 上有mutation？或許是可以檢查的部分。	由桿狀病毒所表現的登革結構蛋白在 IFA 與部分 western blot 試驗上可被 genetex 之抗體所辨認，如 amino acid 有突變將可使所有抗體皆辨認不到其所表現之結構蛋白。	

備註:請將此表單附在期末報告後方,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。