

計畫編號：DOH90-DC-1046

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

日本腦炎病毒基因重組蛋白生產系統之建立  
Recombinant protein production for Japanese Encephalitis Virus

## 委 託 研 究 成 果 報 告

執行機構：國立清華大學生命科學系

研究主持人：吳夙欽

研究人員：

執行期間：90年2月26日至90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

	頁次
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
前言.....	6
材料與方法.....	8
壹、構築重組日本腦炎病毒基因載體.....	8
貳、大腸桿菌重組蛋白的製備.....	8
參、重組桿狀病毒之製備與表現.....	9
肆、聚丙醯氨膠體電泳及西方墨點法分析重組蛋白.....	9
伍、製備 His-trap 親和管柱及純化方式.....	10
陸、動物免疫實驗.....	11
柒、中和反應及保護試驗.....	11
結果.....	11
壹、日本腦炎重組套膜蛋白的表現.....	11
貳、利用生物反應器培養昆蟲細胞生產重組蛋白.....	12
參、日本腦炎重組套膜蛋白製備、純化與抗原性鑑定.....	12
肆、日本腦炎重組套膜蛋白的免疫性.....	13
伍、免疫實驗動物保護試驗.....	13
討論.....	14
結論與建議.....	15
參考文獻.....	15

# 圖目次

圖一：日本腦炎病毒基因圖及本實驗所施打的日本腦炎套膜基因示意圖 .....	21
圖二：大腸桿菌 pET32a 載體構築流程圖 .....	22
圖三：桿狀病毒置換質體構築流程圖.....	23
圖四：以西方墨點法鑑定大腸桿菌表現 E 融合重組蛋白之抗原性 圖.....	24
圖五：以西方墨點法鑑定重組桿狀病毒表現 E 重組蛋白之抗原性 圖.....	25
圖六：以生物反應器培養 Sf-9 細胞 圖.....	26
圖七：日本腦炎 E 重組蛋白的純化結果與抗原性鑑定 圖.....	27
圖八：日本腦炎病毒桿狀病毒表現重組套膜蛋白的免疫性 圖.....	28
圖九：免疫後的實驗小白鼠經日本腦炎病毒進行攻毒試驗後的存活情形。 圖.....	29

## 中文摘要

日本腦炎病毒為黃質病毒(flavivirus)之一種，其病毒基因體包含三段結構蛋白基因[包含蛋白殼 (C)，前膜蛋白/膜蛋白 (prM/M)，套膜蛋白 (E)]，七段非結構蛋白基因及二段非轉譯基因區。以重組 DNA 技術表現 E 套膜蛋白及 NS1 非結構蛋白可引起免疫保護能力，但各表現系統的重組蛋白特性可能不同。本計劃構築重組日本腦炎病毒 E 抗原，分別利用大腸桿菌表現系統、昆蟲細胞桿狀病毒表現系統表現這些重組日本腦炎病毒蛋白並且製備純化來了解免疫抗原的差異性，應用於診斷試劑及基因蛋白日本腦炎疫苗的開發上。在大腸桿菌表現的重組 E 蛋白以內涵體形式產生，然而以昆蟲細胞桿狀病毒表現系統生產重組 E 蛋白能簡易純化出可溶性重組蛋白。如以 2 升生物反應器培養，估計每公升培養液約可生產 4.5mg 的重組 E 蛋白。日本腦炎重組套膜蛋白的免疫血清，對日本腦炎病毒產生高達 80 PRNT<sub>50</sub> 的中和效果。由攻毒試驗的結果得知，以 LE(10ug)注射的存活率高達 80%。以 LE(50ug)、LE(100ug)的存活率高達 100%。由此可知，重組套膜蛋白可誘發保護性免疫作用。本研究對於開發新一代的基因工程日本腦炎次單元蛋白疫苗，應有實質的助益。

關鍵詞: 重組蛋白、日本腦炎病毒、大腸桿菌、昆蟲細胞。

## 英文摘要

Japanese encephalitis virus (JEV) belongs to the family Flaviviridae, genus flavivirus. The JEV genome contains three structural proteins: a core nucleocapsid protein (C), a pre-membrane protein or membrane protein (prM/M), an envelope protein (E), seven nonstructural proteins : NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B and NS5 and two nontranslated regions. The E protein is believed to be the major antigen to induce neutralization antibodies and protective immune responses. This study was aimed to establish recombinant protein production systems in *E. coli* and baculovirus/insect cells. Recombinant E protein expressed in *E. coli* was formed within inclusion bodies. The expression level of this baculovirus/insect cell culture system in a 2L bioreactor was around 4.5 mg/L. Immunization of the full-length recombinant E protein expressed in baculovirus/insect cell system coupled with FCA/FIA gave a neutralization titer of PRNT<sub>50</sub> = 80. After further challenges, the survival rate of the immunized mice reached 80-100%, suggesting the recombinant E proteins expressed in baculovirus/insect cells can induce an effective protective immune response. These results can provide important information for further development of JEV recombinant protein vaccines.

Keyword: recombinant protein, JEV, *E. coli*, Insect cell

## 前言

日本腦炎病毒屬於黃病毒科中之黃病毒屬，是一種經由節肢動物媒介的病毒。日本腦炎病毒能傳染給人，並導致嚴重的疾病如死亡或造成永久性神經損壞( Burke and Leak, 1988)。雖然目前使用的去活化鼠腦疫苗被證實是有效的( Hoke et al., 1988)，但是仍然有一些報告指出，在接受疫苗接種的人群中每年仍有零星感染日本腦炎病毒的病例( Huang, 1982; Yoshinobu et al., 1990)。由於日本腦炎病毒只有一種血清型，病毒抗原些許的變異性應該不會影響接種疫苗的成效。

近年來由於基因工程技術的突破，已能利用基因重組的技術來大量表現許多的外源蛋白。這個方法已成功應用於生產 B 型肝炎疫苗與非細胞性百日咳疫苗的製程上。因此利用這類基因工程的方法來生產日本腦炎病毒疫苗，如仍能繼續維持疫苗的免疫抗原力，將能大幅提高使用日本腦炎疫苗的安全度，並可進一步降低疫苗生產的成本。以目前所發展出來之蛋白分子表達系統中，細菌(譬如大腸桿菌)表現的重組日本腦炎病毒套膜 E 蛋白，因不具蛋白質後轉譯修飾的功能，其免疫性一般並不佳(Mason et al.,1987; Mason et al.,1989)，但其高表現量仍可用於一般診斷試劑之抗原製備。以酵母菌表現的重組日本腦炎病毒套膜 E 蛋白，雖然能誘使中和抗體的產生，但功效仍差(Fujita et al.,1987)。然而日本腦炎病毒套膜 E 蛋白基因，若利用較高等細動物細胞(如昆蟲細胞)表現出來的重組蛋白(Matsuura et al.,1989; McCown et al.,1990)，或是利用重組痘病毒表現(Yasuda et al.,1990; Jan et al.,1993)與重組 chimeric 病毒表現(Guirakhoo et al.,1999)，其免疫抗原性均佳並具免疫保護力。

日本腦炎病毒為單股，正性，基因組大小接近 11kb 的 RNA 病毒。病毒的基因組包含一個轉譯成單一多蛋白的開放閱讀框構(open-reading-frame)，兩側是 5' 及 3'端的非轉譯區域。開放閱讀框構轉譯成單一的多蛋白，此多蛋白會被切割成包括鞘蛋白( capsid:C)、前膜蛋白/膜蛋白 (prM/M)和套膜蛋白(envelope: E)等三種結構蛋白，及 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5 等七種非

結構蛋白(Rice, 1996)。前驅穿透膜蛋白(prM)是穿透膜蛋白的醣化前驅物，被認為是和細胞表面相互作用的部分，並且會誘發中和抗體的產生(Heinz, 1986)。此外相關文獻指出 prM 蛋白可幫助日本腦炎病毒套膜 E 蛋白在細胞內正確的生合成(Konishi and Mason,1993)。套膜蛋白由 500 個胺基酸組成，其中包含六對維持形態構造的雙硫鍵。套膜蛋白被認為和病毒附著細胞、與細胞膜產生融合及進入細胞的過程有關，而且會引起血球凝集反應、誘發中和抗體反應及保護性免疫反應的產生。其中套膜蛋白第三抗原決定區域為三個抗原決定區域中唯一能單獨折疊的抗原決定區域，可誘發宿主產生病毒專一性中和性抗體(Winkler et al., 1987; Mason et al., 1989)，被視為中和性抗原決定區域(neutralization epitope)。第三抗原決定區域含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列及胺基酸突變影響病毒的毒力及細胞趨性(cell tropism) (Rey et al , 1995)，因此也被推論為病毒與細胞貼附有關係的區域。病毒產生的非結構蛋白 NS1 是和細胞膜相連的醣蛋白，但是可能會被受感染的細胞分泌到細胞外(Fan and Mason, 1990)。非結構蛋白 NS1 的功能不但被包含在病毒的早期複製過程內，並且和誘發保護性免疫反應有關(Schlesinger et al., 1986; Falgout et al., 1990; Lin et al., 1998)。

為了解 E 蛋白和 NS1 蛋白在不同表現系統中表現量及免疫抗原的差異，以利應用於診斷試劑甚至重組次單元疫苗之開發，我們將構築一系列重組日本腦炎病毒抗原(如 E 及 NS1)。並且分別利用大腸桿菌表現系統、昆蟲細胞桿狀病毒表現系統來表現這些重組日本腦炎病毒蛋白。我們並且將進一步純化這一系列重組蛋白。應用於 ELISA 檢驗及免疫小鼠，希望能了解不同蛋白表現系統在免疫抗原的差異性。此研究成果並可進一步推展至建立相關技術，並有助於開發重組日本腦炎蛋白疫苗。

## 材料及方法

### 壹、構築重組日本腦炎病毒基因載體

日本腦炎病毒台灣野生株 CH2195LA cDNA(GenBank accession no. U92644) 已先前利用反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 製備，而且與 pUC18 載體重組為 pUC-prME、pUC-LE、pUC-NS1 載體 (Wu et al, 1997)。本計畫使用 pET32a 載體於大腸桿菌使用。專一的引子配對 (primer) (prME: PrMED1 5'-ATGCGGGATCCATGGGAAATGAAGCCTCAATG -3' 及 JE-E<sub>reverse</sub> 5'-GGGGAAGCTTAGCATGCACATTGGTGG -3'; E: JE-E<sub>forward</sub> 5'-ATGCGCGGATCCTTCAACTGTCTGGGAAT -3' 及 JE-E<sub>reverse</sub> 5'-GGGGAAGCTTAGCATGCACATTGGTGG-3'; NS1: JNS1P5 5'-GGGGGGATCCATGGACCGATCAATTGCTTTGGCC 及 NSP6' 5'-GGGGAAGCTTAGCATCAACCTGTGATCTGAC -3')。另外使用 pBluBac4 載體於重組桿狀病毒系統。其專一的引子配對(primer) (prME: PrMED1 5'-ATGCGGGATCCATGGGAAATGAAGCCTCAATG -3' 及 J EVP4: 5'-ATGCGCGAATTCCTAAGTGTCAGCATGCACATTGG-3'; E: J EVP3 5'-ATGCGCGGATCCATGATGCTTGGCAGTAACAACGGTCAACGCG-3' 及 J EVP4: 5'-ATGCGCGAATTCCTAAGTGTCAGCATGCACATTGG-3'; NS1: JNS1P5 5'-GGGGGGATCCATGGACCGATCAATTGCTTTGGCC-3' 及 JNS1P6: 5'-GGGGGAATTCCTATAGCACCACATACCTCGCC-3' )。

### 貳、大腸桿菌重組蛋白的製備

含重組質體的 *E. coli* BL21(DE3)菌落生長於含 100 ug/ml ampicillin 的 LB 培養液。隔夜，取菌液以 1:50 稀釋倍數加入新的含 100 ug/ml ampicillin 的 LB 培

養液，培養於 37 的溫箱三小時(濁度約 OD600nm = 0.5)後，再加入 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 培養於 37 的溫箱四至五小時。最後將培養液經離心，取得細菌沉澱物，並且用無菌水打散細菌沉澱物，保存於-20 冰箱。

### 參、重組桿狀病毒之製備與表現

構築好的重組載體和桿狀病毒共同轉移感染昆蟲細胞(Sf-9)，進行同源重組交換(homologous recombination)產生的重組病毒。因重組病毒帶有完整的 lacZ gene，藉由 X-gal 初步測試是否得到重組病毒。經 X-gal 測試,已得到所有重組桿狀病毒，並以溶斑檢定法(plaque purification)重覆三次得到純化病毒。經三次溶斑挑選法(plaque assay)純化和初步 dot blot 和 western blot 確認重組蛋白的表現。將感染重組病毒之 Sf-9 細胞於適當天數時收取細胞及細胞培養液。在細胞部份以 lysis buffer 打破細胞膜，離心後收取上清液而細胞培養液則直接儲存於-80 冰箱中。

### 肆、聚丙烯酰胺膠體電泳及西方墨點法分析重組蛋白(SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, and Western Blot Analysis)

製作 8cm×10cm×0.4cm 的 polyacrylamide gel, 分為上層 5%的 stacking gel[1M Tris-HCl(pH6.8) 0.25 ml, 30% acrylamide 0.33ml, 10% SDS 20λ, ddH<sub>2</sub>O 1.4ml, ammonium persulfate 15 λ, TEMED 2 λ] 與下層 12%的 separating gel[1.5M Tris-HCl(pH8.4) 0.94ml, 30% acrylamide 1.5ml, ddH<sub>2</sub>O 1.24ml, 10% SDS 37.5 λ, ammonium persulfate 28 λ, TEMED 3.75 λ]，先將 separating gel 製備好後注入兩片玻璃片中，約注入到距離玻璃片上緣 3cm 處(電泳梳 2cm 與 stacking gel 1cm)，再注入一些 ddH<sub>2</sub>O 將界面壓平，經過約 15 分鐘等 gel 凝固後將 ddH<sub>2</sub>O

移除，再注入 stacking gel 到滿，同時將電泳梳(comb)插進 gel 中，經過約 15 分鐘等 gel 凝固後將 comb 移走。將 gel 架設於電泳槽中。將前述之大腸桿菌重組蛋白或重組桿狀病毒表現之重組蛋白的細胞溶解液 15 $\mu$ l 和 non-reducing protein loading buffer 5 $\mu$ l 混合後，95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，再把此 sample 加進電泳槽中，先以 80V 跑到 separating gel 與 stacking gel 界面處再改以 120V，直到 Bromophenol blue 染劑跑出膠體為止。將跑完 SDS-PAGE 的 acrylamide gel 蓋上一層硝化纖維膜(Nitrocellulose paper)，在電泳槽中注滿 western blot transfer buffer，以 15V,120mA 轉漬 1.5 小時，取出轉漬後的 NC paper 以 5%脫脂奶粉(用 TBST 配製)淹蓋並搖 1.5 小時之後加入具抗原專一性的單株抗體( anti-E or anti-NS1) 1:100 稀釋倍數反應一小時 用 PBS/0.01% Tween 20 的沖洗緩衝液(washing buffer) 清洗三次，再與 1:1000 稀釋倍數的 goat anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase 抗體(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD)反應一小時。再用 PBS/0.01% Tween 20 的沖洗緩衝液(washing buffer)清洗三次後，以 BCIP/NBT substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories)呈色。

## 伍、製備 His-trap 親和管柱及純化方式

先用去離子水將 His-trap 膠體混合均勻，注入管柱，利用重力緩慢來裝填管柱，約 30 分鐘後，將幫浦的流速定為 1ml/min，以利進一步置備 His-trap 親和管柱。首先用十倍管柱體積的 strip buffer(pH7.9)清洗管柱，再用十倍管柱體積 charge buffer 將連接子-鎳和膠體結合，再用五倍管柱體積的 binding buffer(pH7.9)清洗，此時已置備好 His-trap 親和管柱。接著用含有大腸桿菌表現的重組蛋白溶液通過濾膜後，再通過先前置備好的 His-trap 親和管柱，接著用五倍管柱體積的 washing buffer(pH7.9)再清洗一次，最後用約十倍管柱體積的 elute buffer 將抗原沖洗下來。收集的樣本經透析一天後利用 SDS-PAGE 來確定純化效果。

## 陸、動物免疫實驗

此實驗使用五隻，四星期大的純系 BALB/c 雌性老鼠，以腹膜內(i.p)免疫注射大腸桿菌重組蛋白與桿狀病毒重組蛋白，每隻老鼠每次注射均注射 100  $\mu$ g 的重組蛋白量。取等量的 Freund's complete adjuvant(FCA)和重組蛋白混合乳化後，取 200  $\mu$ l 注射老鼠。為要求實驗數據的完整性和確定性及統計上的要求，每種重組蛋白均注射一籠(五隻)，並以一籠注射 PBS 為對照組，第二星期打一劑，一星期後抽血;第五星期再打一劑，一星期後抽血;第七星期再打一劑，一星期後抽血，得到免疫血清。

## 柒、中和反應及保護試驗

利用大腸桿菌重組蛋白與桿狀病毒重組蛋白免疫的 BALB/c 純系株母老鼠將抽血得到免疫血清。將 200  $\mu$ l 稀釋的免疫血清和 200  $\mu$ l JEV 相對 400 病毒斑單位(P.F.U.)混合在滅菌過的 1.5 ml 離心管，室溫下孵育一小時後，將 100 $\mu$ l 的反應液加入培養 BHK-21 細胞的 6 孔培養盤，在 37°C 下孵育 90 分鐘；再鋪上含有 1.1%甲基纖維素(methylcellulose)的 MEM 培養基孵育三天。用奈酚藍黑染色劑染色並計數。

## 結果

### 壹、日本腦炎重組套膜蛋白的表現

套膜蛋白是日本腦炎病毒粒子上主要的表面抗原，由圖 4,5,7 的結果得知，大腸桿菌表現的 E 融合重組蛋白，以及昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白，均會被單株抗體 E3.3 所辨識。因此，表示大腸桿菌與昆蟲細胞桿狀病毒仍能表現具抗原性之日本腦炎套膜 E 基因相關重組蛋白。另外，從大腸桿菌表現情形來看，只在 inclusion bodies 產生，在 cytoplasm 中並不會產生（見圖 4），表示 E 融合重組蛋白是以 insoluble form 存在。在昆蟲細胞桿狀病毒表現系統中，E 重

組蛋白只存在於細胞內，並未釋放至細胞外（見圖 5）。

## 貳、利用生物反應器培養昆蟲細胞生產重組蛋白

昆蟲細胞可以適應懸浮培養，並可逐步放大其培養體積至生物反應器內。利用生物反應器培養 1L 體積之 Sf-9 細胞至  $1 \times 10^6$  cells/ml 細胞密度後，重組 E 蛋白之桿狀病毒以 MOI=1 感染細胞，其細胞密度與細胞存活率如圖 6(a)所示。細胞密度於感染後略有上升，至 24 小時後細胞開始死亡且於 48 小時後存活率降至 60%以下。以病毒感染細胞後調整溶氧供給至 50%，其溶氧值與酸鹼值變化如圖 6(b)所示。溶氧值與酸鹼值於感染 24 小時後達到最低點，顯示感染 24 小時內細胞消耗大量溶氧，然後因細胞開始死亡而使溶氧逐漸回升。酸鹼值的下降顯示養分經生化代謝產生酸性代謝物，並因細胞的死亡而停止代謝造成酸鹼值回升。

## 參、日本腦炎重組套膜蛋白製備、純化與抗原性鑑定

在製備重組蛋白時，必須先瞭解重組蛋白的表現情形，才能做進一步純化分離的工作。從之前的日本腦炎重組套膜蛋白表現的結果來看，雖然大腸桿菌表現載體中具有融合蛋白的基因，可增加表現的重組蛋白水溶性。但表現的 E 融合重組蛋白則是以 insoluble form 存在於 inclusion bodies 中。為避免利用化學方法從 inclusion bodies 中取得重組蛋白，造成重組蛋白的構形改變，因此本實驗選擇以 non-denaturing 的方式，進行重組蛋白液的製備。另外，雖然昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白存在於細胞內，但仍可以超音波細胞粉碎機予以打破後取得。

為了從收集的試管中，取得純度較佳的重組蛋白，因此取出在 UV 圖譜中出現 peak 附近的試管，進行 12% 的 SDS-PAGE 電泳測試。從圖 7a 的 UV 圖譜中發現，昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白在第 20 隻試管(相當 200mM 的 imidazole 濃度處)附近出現 peak。因此，取出收集 E 重組蛋白第 13 隻試管至第

26 隻試管，進行電泳分析。由電泳圖 7b 得知，在第 20 隻試管，相當 200mM 的 imidazole 濃度處，可得較純的 E 重組蛋白(見圖 7b)。

為了測試 E 重組蛋白，在純化以及透析後的抗原性，將純化後的 E 重組蛋白液，及透析後的重組蛋白液進行西方墨點法分析。從圖 7 的結果中也發現，昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白，在純化透析處理後，也會被單株抗體 E3.3 所辨識。由以上結果得知，在經由純化及透析處理後，昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白仍具有抗原性。另外，實驗中曾進行大腸桿菌表現的 E 融合重組蛋白在純化透析後的抗原性鑑定，但效果不佳。

為了昆蟲細胞製造重組蛋白之產量，將純化透析後的重組蛋白，以 Bio-Rad Protein Assay Kit 測定重組蛋白含量。由減量線推算測得每公升昆蟲細胞(約  $10^6$  cell/ml)可生產約 4.5mg 的 E 重組蛋白。

#### 肆、日本腦炎重組套膜蛋白的免疫性

為瞭解日本腦炎重組套膜蛋白的免疫性，因此將純化透析後的 E 重組蛋白，注射實驗小白鼠。從圖 8 的血清中和試驗結果得知，施打 PBS 所取得的免疫血清，不具中和日本腦炎病毒的效果。將免疫血清做 1:5 的稀釋比例，注射昆蟲細胞桿狀病毒感染表現的全長 E 重組蛋白的免疫血清，可中和 84% 的日本腦炎病毒。而去活化鼠腦疫苗的免疫血清，可中和 95% 的日本腦炎病毒。昆蟲細胞桿狀病毒表現的 E 重組蛋白的免疫血清，其 PRNT<sub>50</sub> 約 80。然而去活化鼠腦疫苗的免疫血清，其 PRNT<sub>50</sub> 高達 320。由此可知，全長的 E 重組蛋白的免疫性仍比去活化鼠腦疫苗差。

#### 伍、免疫實驗動物保護試驗

為了瞭解重組套膜蛋白是否會誘發保護性免疫作用，因此將免疫後的實驗小白鼠進行攻毒試驗。從圖 9 的結果得知，以 PBS 免疫的實驗小白鼠的存活率為 20%。以 LE(10ug)注射的存活率高達 80%。以 LE(50ug)、LE(100ug)及去活

化鼠腦疫苗注射的存活率高達 100%。由此可知，重組套膜蛋白可誘發保護性免疫作用。

## 討論

利用大腸桿菌表現系統，將日本腦炎病毒套膜相關基因，以重組蛋白的形式表現。就重組蛋白的表現而言，儘管大腸桿菌表現載體 pET32a 中含有一段融合蛋白(thioredoxin, Trx)的基因，可促進表現的重組蛋白之水溶性。但由西方墨點法的結果顯示，卻只能存在於 inclusion bodies 中。在實驗中曾以降低溫度，以及改變誘導物濃度的方式，來誘導 E 重組蛋白，但是仍無法在 cytoplasm 中產生 E 重組蛋白。從昆蟲細胞桿狀病毒表現系統來看，以重組桿狀病毒表現全長 E 重組蛋白具有抗原性，可被中和性單(株)抗體 E3.3 所辨識。

日本腦炎病毒套膜 E 蛋白是病毒粒子上主要的結構蛋白，扮演一個引發中和性抗體，及保護性免疫反應的重要角色。從免疫動物實驗結果得知，重組桿狀病毒感染昆蟲細胞表現的 E 重組蛋白可引發中和性抗體，對日本腦炎病毒有 84% 的中和性效果。此外，在動物免疫實驗中，曾施打過大腸桿菌表現的 E 重組蛋白，但是效果不佳。從之前的研究發現，經由昆蟲細胞表現的重組蛋白，其抗原性和醣化作用，與病毒在哺乳動物細胞產生的 E 蛋白和 prM 蛋白類似，而大腸桿菌屬原核細胞，並未有轉譯後的修飾作用。因為 E 蛋白本身是個醣蛋白，在經由醣化作用後，會更接近病毒原始的 E 蛋白構形，故其免疫抗原性會更佳。

## 結論與建議

國內目前採用去活化鼠腦疫苗作為防治日本腦炎病毒的策略。然而鼠腦組織來源的疫苗，儘管經過多步純化處理，仍可能含有殘留的鼠腦髓鞘蛋白，容易引起過敏。雖然重組桿狀病毒表現 E 蛋白的 PRNT<sub>50</sub> 約 80，較去活化鼠腦疫苗的 PRNT<sub>50</sub> 約 320 略差。但對於新型日本腦炎病毒疫苗製作，應有其工業應用上的潛能。

## 參考文獻

Burke, D.S., Leake, C.J., Japanese encephalitis. In: T.P. Monath (Ed.) The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, FL 1998; pp.69-92.

Falbout, B., Bray, M., Schelsinger, J.J., Lai, C.-J. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus non-structural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virology* 1990;64:4356-4363.

Fan, W.F., Mason, P.W. Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. *Virology* 1990;177:470-476.

Fujita, H., Sumiyoshi, H., Mori, C., Manbe, S., Takagi, M., Yoshida, I., Morita, K., Fuke, I., Fukai, K., Igarashi, A. Studies in the development of Japanese encephalitis vaccine: expression of virus envelope glycoprotein V3 (E) gene in yeast. 1987 *Bull. W. H. O.* 65, 303-308.

Guirakhoo, F., Zhang, Z.-X., Chambers, T.J., Delagrave, S., Arroyo, J., Barrett, A.D.T., Monath, T.P. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology* 1999;257:363-372.

Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S., Kobayashi, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 1992 191:158-165.

Heinz, F.X. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.* 1986;31:103-168.

Hiramatsu, K., Tadano, M., Men, R., Lai, C.-J. (1996) Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein – monoclonal antibody resistant DEN1/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* 1996 224:437-445.

Hoke, C.H., Nisalak, A., Sangawhip, N., Jatanasen, S., Laorakapongse, T., Innis, B.L., Kotchasene, S.-O., Gingrich, J.B., Latendresse, J., Fukai, K., Burke, D.S., Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *New Engl. J. Med.* 1988;319:608-614.

Holzmann, H., Heinz, F.X., Mandl, C., Guirakhoo, F., Kunz, C. A single amino acid

substitution in envelope protein of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J. Virol.* 1990;64:5156-5159.

Holzmann, H., Stiasny, K., Ecker, M., Kunz, C., Heinz, F.X. (1997) Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis with reduced neuroinvasiveness in mice. *J. Gen. Virol.* 1997; 78:31-37.

Huang, C. Studies of Japanese encephalitis in China. In: Lauffer, M., Bank, K., Smith, K. (Eds.), *Advances in Virus Research*, vol. 27. Academic Press, New York, 1982; pp.72-100.

Jan, L.-R., Yang, C.-S., Henchal, L.S., Sumiyoshi, H., Summers, P.L., Dubois, D.R., Lai, C.-J. Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 48:412-423.

Konish, E, Mason, P.W. Proper Maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J. Virol.* 1993;67:1672-1675.

Lai, C.-J., Zhao, B., Hori, H., Bray, M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Processing of the National Academy of Sciences, USA* 1991;88:5139-5143.

Lin, Y.-L., Chen, L.-K., Liao, C.-L., Yeh, C.-T., Ma, S.-H., Chen, J.-L., Huang, Y.-L.,

Chen, S.-S. , Chiang, H.-Y. (1998) DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J. Virology* 1998;72:191-200.

Mason, P.W., McAda, P.C., Dalrymple, J.M., Fournier, M.J., Mason, T.L. Expression of Japanese encephalitis virus antigens in *Escherichia coli*. *Virology* 1987;158:361-372.

Mason, P.W., McAda, P.C., Centry, M.K., McCown, J.M., Hoke, C.H., Burke, D.S., Fournier, M.J., Mason, T.L. Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1989;70:2037-2049.

Matsuura Y, Miyamoto M, Sato T, Morita C, Yasui K. Characterization of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* 1989;173(2):674-82

McCown J., Cochran, M., Putnak, R., Feighny R., Burrous, J., Henchal, E., Hoke, C. Protection of mice against lethal Japanese encephalitis with a recombinant baculovirus vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990;42: 491-499.

Monath, T.P., Heinz, F.X. Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> edn, pp. 961-1034.

Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Muylaret, I.R., Chambers, T.J., Galler, R., Rice, C.M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication

and mouse neurovirulence. *Virology* 1996;222:159-168.

Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 1995;375:291-298.

Rice, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed, 1996; pp. 961-1034. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott- Raven.

Sanchez, I.J., Ruiz, B.H. A single nucleotide change in the E protein of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J.Gen. Virol.* 1996;77: 2451-2545.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Cropp, C.B., Monath, T.P. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J.Virology* 1986;60:1153-1155.

Sumiyoshi, H., Tignor, G.H., Shope, R.E. Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:1141-1151.

Tsai, T.F. and Yu, Y.X. Japanese encephalitis vaccines in *Vaccines*, 2<sup>nd</sup>. 1994 ;edited By S.A.Plotkin and E.A. Mortimer, Jr. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, USA.

Westway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S.Y., Horzinek, M.C., Igarashi, A.,

Kaariainen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russel, P.K., Trent, D.W. Flaviviridae. Intervirology 1985;24:183-192.

Winkler, G., Heinz, F. X., and Kunz, C. Characterization of a disulfide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein. J. Gen. Virol. 1987;68:2239-2244.

Wu, S.-C., Lian, W.-C., Hsu, L.-C., Liao, M.-Y. Japanese encephalitis virus variants with characteristic differences in neutralization resistance and mouse virulence. Virus Research 1997;51: 173-181.

Wu, S.-C., Lian, W.-C., Hsu, L.-C., Wu, Y.-C., Liao, M.-Y. Antigenic characterization of nine wild type Taiwanese isolates of Japanese encephalitis virus as compared with two vaccine strains. Virus Research 1998;55:83-91.

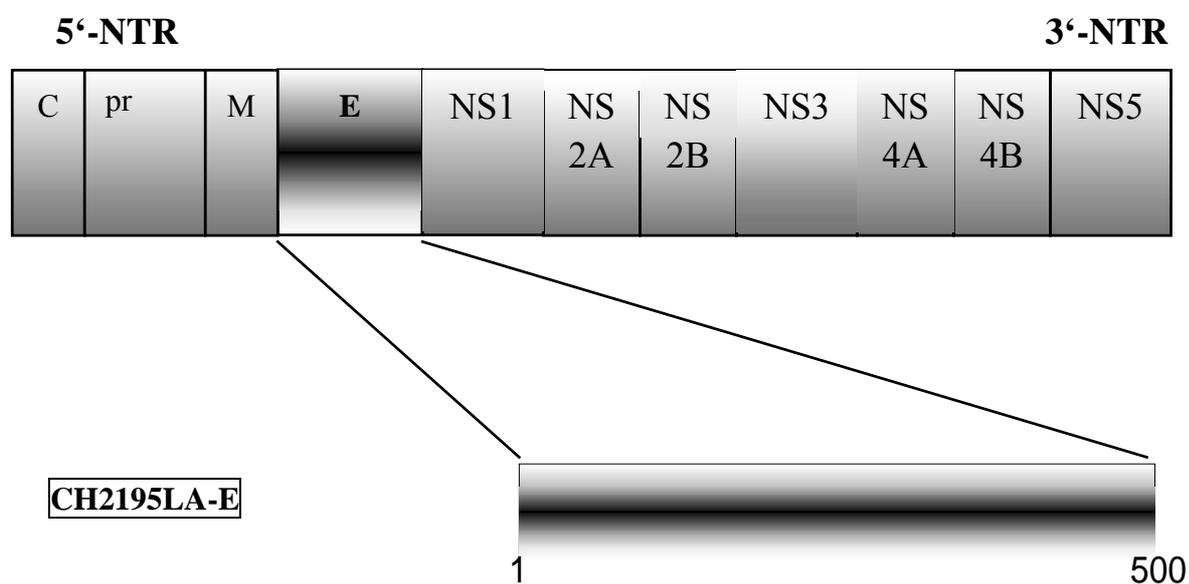
Yasada, A., Kimura-Kuroda, J., Ogimoto, M., Miyamoto, M., Sata, T., Sato, T., Takamura, C., Kurata, T., Kojima, A., Yasui, K. (1990) Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express PreM and E glycoproteins of Japanese encephalitis virus. J. Virol. 1990;64:2788-2795.

Yoshinobu, O., Yutaka, O., Akiro, Y., Koichi, B., Hyakuji, Y. (1990) Effect of current Japanese encephalitis vaccine on different strains of Japanese encephalitis virus. Vaccine 1990; 5:128-132.

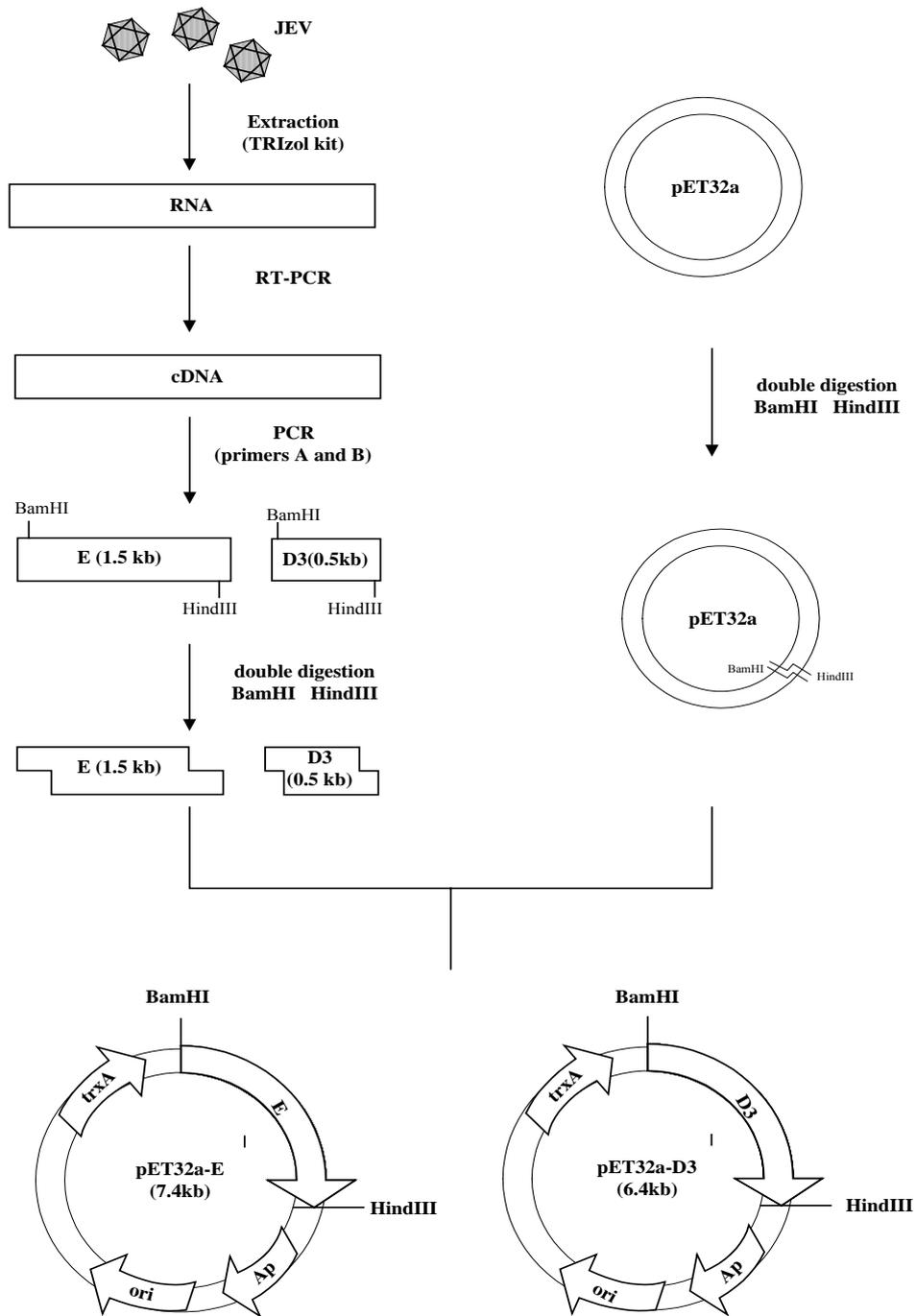


## Structural

## Nonstructural

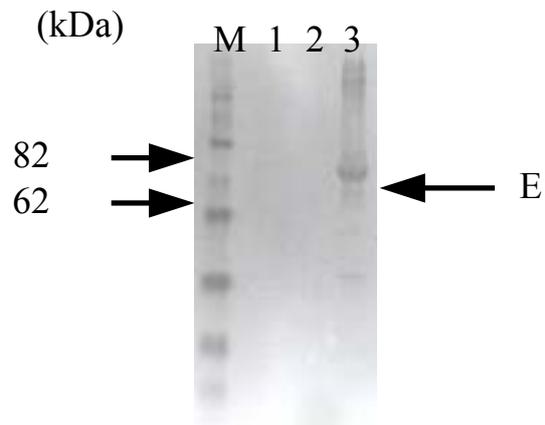


圖一：日本腦炎病毒基因圖及本實驗所施打的日本腦炎套膜基因示意圖。

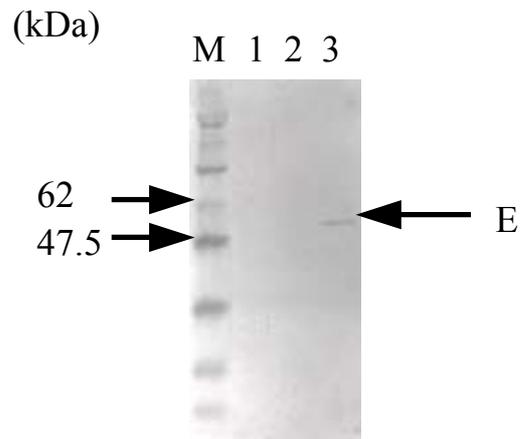


圖二：大腸桿菌 pET32a 載體構築流程圖

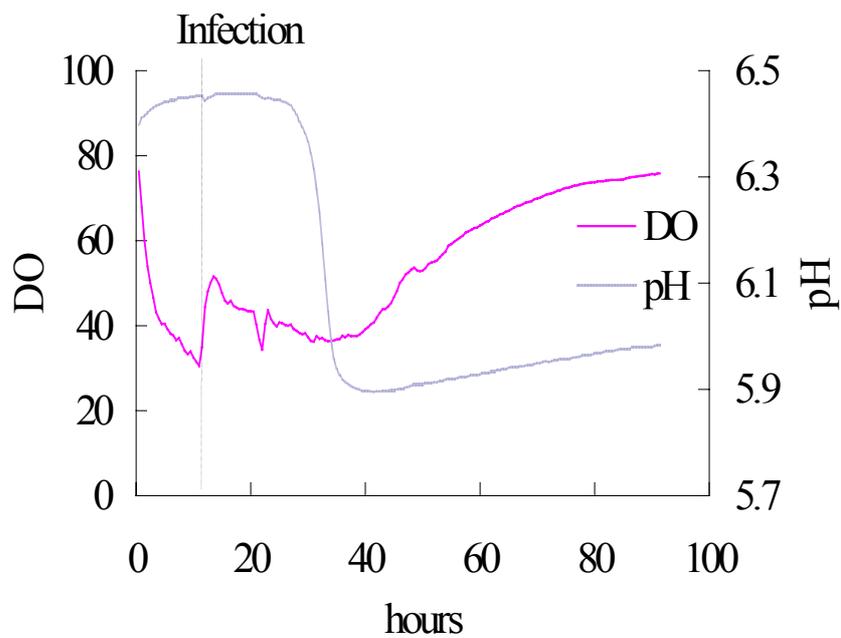
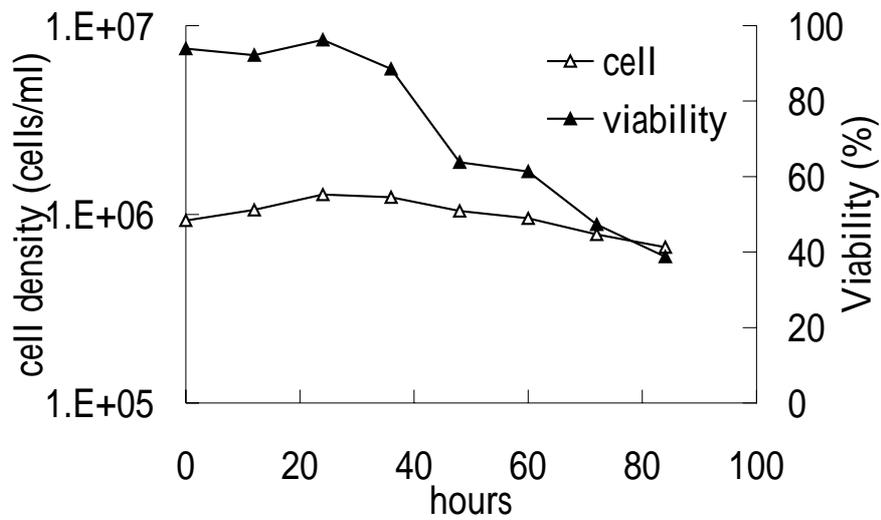




圖四：以西方墨點法鑑定大腸桿菌表現E融合重組蛋白之抗原性。  
M為marker，lane1 代表未誘導的菌液，lane 2 代表在37℃，  
0.1mM IPTG誘導後的上清液，lane3 代表在誘導後的pellet。

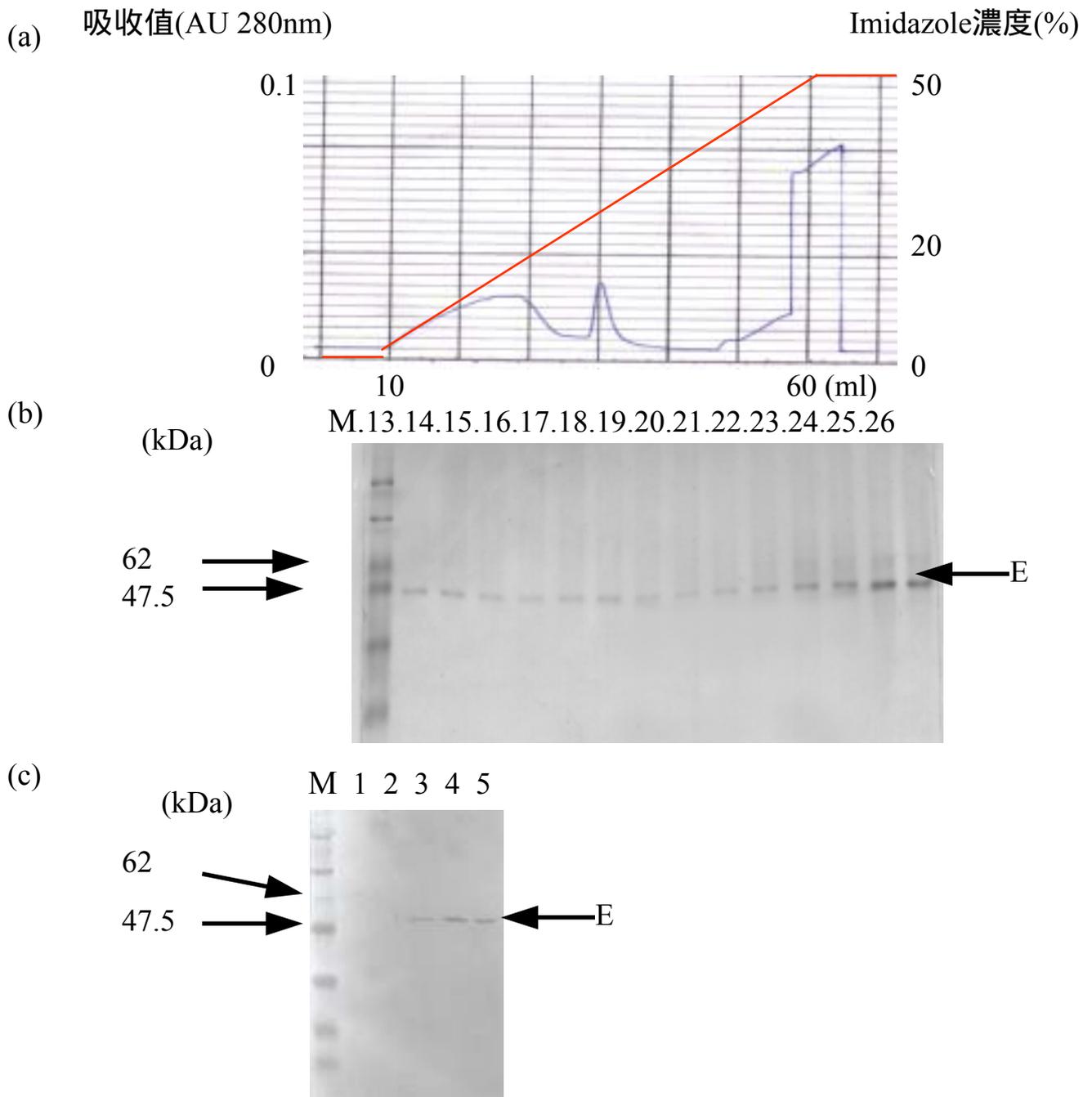


圖五：以西方墨點法鑑定重組桿狀病毒表現E重組蛋白之抗原性。M為marker，lane 1 代表未感染重組桿狀病毒的昆蟲細胞，lane2 代表感染後的上清液，lane3 代表感染後的pellet。



圖六:(a)以生物反應器培養 Sf-9 細胞，經重組 E 蛋白之桿狀病毒感染細胞後，其細胞密度與細胞存率。

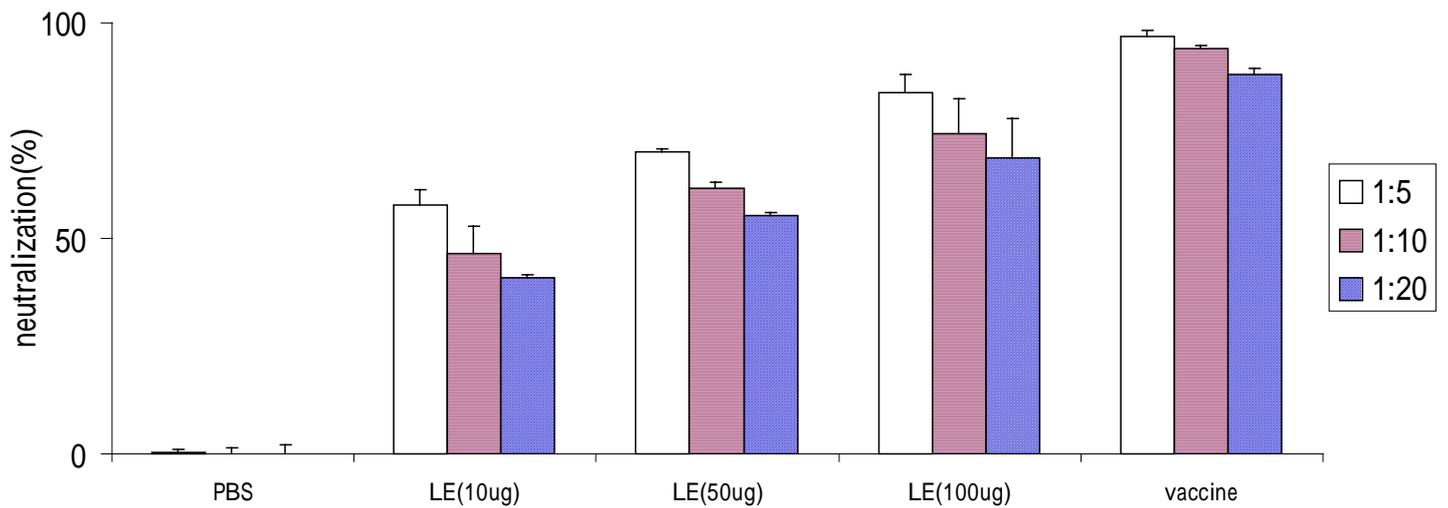
(b)以生物反應器培養 Sf-9 細胞，經重組 E 蛋白之桿狀病毒感染細胞後，其溶氧值與酸鹼值之變化。實線所標定處為病毒感染之起始點。



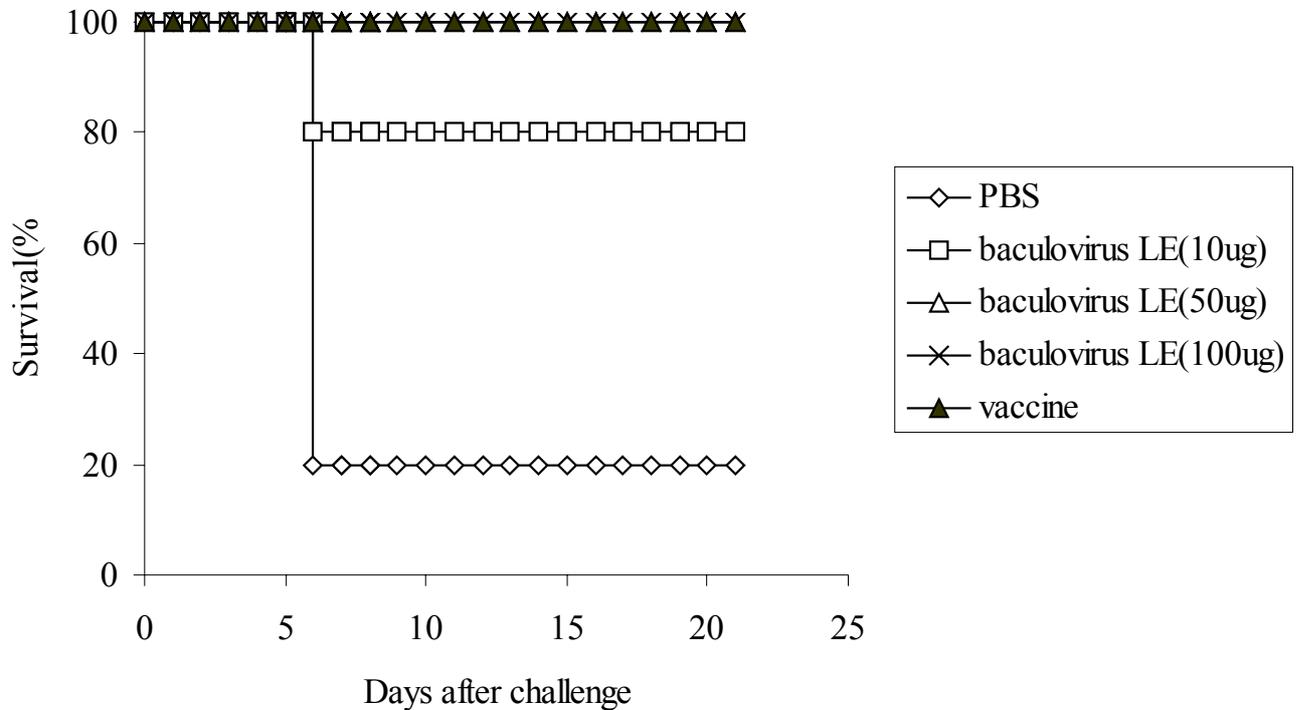
圖七:在重組桿狀病毒表現系統，日本腦炎E重組蛋白的純化結果與抗原性鑑定。

(a) 利用AKTA-prime純化系統，在吸收值280nm偵測E重組蛋白。橫軸為純化下來的每個樣本量，左邊的縱軸為吸收值，右邊的縱軸為 imidazole的濃度。

(b) 以12% SDS-PAGE分析每個fraction收集的樣本，M為marker。(c)以西方墨點法進行E重組蛋白純化透析後的抗原性鑑定。M為marker，lane1為未感染的細胞，lane2為感染後的上清液，lane3為感染後的pellet，lane4為純化後的E，lane5為透析後的E。



圖八:日本腦炎病毒桿狀病毒表現重組套膜蛋白的免疫性。將日本腦炎病毒套膜基因相關重組蛋白,分別以10ug、50ug及100ug,以FCA/FIA乳化後施打實驗小白鼠。血清以1:5, 1:10, 1:20的稀釋倍數進行血清中和試驗。PBS 和vaccine(純化去活化鼠腦疫苗)為對照組。



圖九：桿狀病毒表現重組套膜蛋白免疫後的實驗小白鼠，經日本腦炎病毒進行攻毒試驗後的存活情形。每組實驗均以 5 隻 ICR 雜系雌性小白鼠進行日本腦炎病毒 Beijing-1 攻毒試驗。 ◊ 為 PBS， ◻ 為 baculovirus LE(10ug)， ◻ 為 baculovirus LE(50ug)， × 為 baculovirus LE(100ug)， ▲ 為 vaccine(純化去活化鼠腦疫苗)注射。