

計畫編號：DOH98-DC-1013

行政院衛生署疾病管制局九十八年度委託科技研究發展計畫

腸病毒 71 型類病毒顆粒疫苗開發

研究報告

執行機構：國立清華大學、生物技術中心、國立台灣大學

計畫主持人：胡育誠、紀威光、江伯倫

研究人員：林藹寧

研究人員：賴玲玉

研究人員：邱心怡

研究人員：呂宥盈

研究人員：羅文宜

研究人員：盧佳昕

研究人員：陳繼元

研究人員：李慧君

研究人員：郭銀杰

研究人員：姜為棟

研究人員：陳錫航

研究人員：張能賢

研究人員：黃世偉

研究人員：張孔仁

研究人員：潘奕璿

研究人員：林郁里

研究人員：余俊億

研究人員：侯欣妙

研究人員：蔡澤濬

研究人員：郭宛瑄

執行期間：98 年 5 月 12 日至 98 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

※中文摘要.....	3
※英文摘要.....	4
※前言.....	5
※材料與方法.....	7
※結果.....	14
※結論.....	33
※參考文獻.....	36
※圖表.....	37
※附件.....	64
※回覆審查意見.....	115

中文摘要

本計畫總目標為『發展類病毒顆粒(VLP)為腸病毒 71 型疫苗的技術』。我們希望建立生產與純化 VLP 的製程，建立分析其特性的方法與免疫學平臺，並進行台灣獼猴動物實驗，以評估 VLP 作為疫苗的潛力。本整合型計劃共分為三個子計畫。子計畫一首先確認生產 VLP 的病毒株並建立其病毒種庫。本計畫也已建立實驗室級反應器的 VLP 生產與純化流程，以及以 Dynamic Light Scattering (DLS) 粒徑分析儀檢驗 VLP 穩定性的方法。配合電子顯微鏡觀察，我們證實 VLP 在不同的緩衝液、溫度及穩定劑內均有相當好的穩定性，保存 4 週粒徑也無明顯變化，有利未來 VLP 的應用及保存。我們也改良 ELISA 各步驟所使用的材料及方法，使 ELISA 對 VLP 偵測具有良好的專一性與再現性。子計畫二已放大生產製程至 20 L 生物反應器，並已發展其純化製程，使 VLP 純度達 92% 以上。子計畫二也已建立 in-process 與 final drug substance 純度檢驗方法及規格，以及建立 VLP 蛋白特性之分析與方法。子計畫三已製備數種單株與多株抗體，並在小鼠實驗中測試不同種類的佐劑效果。子計畫三也已建立體液免疫反應、細胞免疫反應及記憶免疫檢測系統。在第一次的獼猴免疫實驗中我們發現，獼猴經由施打 EV71 VLP 可產生高抗體效價及中和效價，並會產生細胞免疫反應及免疫記憶反應。第二次實驗猴測試於 98 年 11 月 10 日進行疫苗施打並進行採血，預計於 12 月完成實驗。

關鍵詞：重組桿狀病毒，昆蟲細胞、類病毒顆粒、腸病毒 71 型、疫苗、製程技術

英 文 摘 要

The primary objective of the present study is to develop enterovirus 71 (EV71) vaccine based on the virus-like particle (VLP). We aimed to develop the VLP production and purification processes, establish the characterization methods and immunological platform, as well as perform monkey immunization experiments to evaluate the potential of VLP as a vaccine. The whole project is divided into 3 sub-projects. In sub-project 1 we determine the appropriate production system and develop the lab-scale production and purification processes. Sub-project 1 also develops the Dynamic Light Scattering method to evaluate the VLP stability and attests that VLP is reasonably stable. Sub-project 1 also fine tunes the ELISA procedures to enhance the reliability. Sub-project 2 scales up the production process to 20 L and develops the purification process to achieve a purity greater than 92%. Sub-project 2 also establishes the methods for in-process and final drug substance evaluation and determines the specifications. Sub-project 3 has prepared a panel of antibodies and tested the effects of several adjuvants. Moreover, sub-project 3 has established the platform to evaluate the immune responses, and confirmed that monkeys immunized with VLP develop humoral, cell-mediated immune responses and memory immunity.

Key words: recombinant baculovirus, insect cell, virus-like particle, enterovirus 71, vaccine, bioprocess

前 言

腸病毒71型在腸病毒屬中屬於腸病毒A種(Enterovirus A species)，其病毒顆粒包含了無外套膜的外殼(non-enveloped capsid) 以及正性單股RNA。自從腸病毒71型首先在1969年至1973年美國加州的一次流行中被分離，並在1974年第一次被報導出來後，在世界各地就都有相關疫情報告，包括紐約、澳洲、保加利亞、香港、日本等地。臺灣在1980-1981年也曾經流行過。根據美國所作的調查，自1977年至1991年間，每年都有腸病毒71型被分離出來，但個案數的多少每年稍有不同，可見腸病毒71型在全世界許多地方都是廣泛且一直持續性地存在，且在所有腸病毒中，除了小兒麻病毒以外，腸病毒71型發生神經併發症的比率特別高。

自1998年台灣爆發大流行以後，雖然之後幾年的重症案例有下降的趨勢，但腸病毒並非銷聲匿跡。在2008年的腸病毒大流行中，直至7/14止，台灣已經傳出了346例腸病毒病發重症，由於感染腸病毒71型而引發的重症案例高達九成，且2008年的10名死亡案例全是起因於腸病毒71型的感染。除了台灣以外，中國方面的腸病毒疫情也是不容小覷，根據中華人民共和國衛生部的資料，在2008年，共通報手足口病489097例，包括死亡個案126例，報告發病數居前五位的省份是廣東、浙江、河北、山東和湖南。在港澳地區，香港已經傳出73例的腸病毒71型重症，澳門也有56例的腸病毒71型重症。蒙古自5/8起爆發EV71手足口病疫情以來，截至7/7共診斷2618人罹病。截至7月12日，新加坡也至少有16379例的手足口病病例。在2009年，中國的腸病毒疫情有更加升溫的趨勢，自1月到7月，共通報手足口病77070例，包括死亡個案255例。到目前為止，公共衛生監護和檢疫仍然是防止並且控制EV71感染的唯一方法，然而若要進行有效的預防或治療，開發疫苗或抗病毒藥物是勢在必行的。

類病毒顆粒(virus-like particle, VLP)是由病毒的外殼蛋白質組成的粒子。與其他 subunit vaccine 相比較，VLP 結構非常類似於真實的病毒，因此包含更多的引起抗體的 epitopes。由於類病毒顆粒不具有真實病毒的遺傳物質，作為疫苗後續不會有感染的危險，因此類病毒顆粒疫苗確實有其發展優勢。

先前的研究中，我們利用同時表現腸病毒71型P1及3CD水解酶的重組桿狀病毒感染昆蟲細胞，能夠得到自組裝的類病毒顆粒(Hu *et al.*, 2003)。我們利用電子顯微鏡也觀察到與真實病毒結構大小相似的類病毒顆粒。在後續的動物免疫分析，以純化後的VLP 施打BALB/c小鼠，進行體液性與細胞性免疫測試，實驗中以去活化腸病毒(inactivated EV71) 為正對照組，比較真實病毒顆粒與VLP在免疫效果上的差異。結果顯示類病毒顆粒的免疫效果約等同於於去活化腸病毒(Chung *et al.*, 2008)。且由不同方式所純化出來的類病毒顆粒，皆能誘發小鼠體內強烈的中和抗體，顯示以類病毒顆粒作為疫苗的潛力。

由以上所提之資訊，高致病力的腸病毒71型對於世界公共衛生依然是極大的威脅。為了有效地控制腸病毒71型大流行，最好的方式即是開發有效的腸病毒71型疫苗。根據類病毒顆粒能有效誘發小鼠體內體液性及細胞性免疫之事實，本研究主要目的即為發展以昆蟲細胞生產及純化類病毒顆粒作為抗腸病毒EV71疫苗之技術。藉由各個子計畫間的分工合作，希望能進一步提高VLP產量，大量純化出類病毒顆粒，並用以評估類病毒

顆粒在台灣彌猴中的免疫效力。

本整合型計劃共分為三個子計畫，子計畫一目標為EV71 VLP疫苗實驗級技術平臺之建立。我們首先尋找最佳重組桿狀病毒和*Pichia*酵母菌表現系統，以生產VLP並做產量的比較，進而建立病毒種庫。我們也建立實驗室級反應器VLP生產流程，並建立確認與量化之相關檢驗技術，最後再建立SOP。子計畫二目標為VLP疫苗量產級技術平臺之開發。我們建立昆蟲細胞種庫或酵母菌種庫，再建立VLP的生物反應器量產技術，並尋求最適化之量產純化條件和建立純度指標相關檢驗平臺。同時我們計畫建立VLP蛋白特性之分析與方法以及CMC相關資料。最後我們生產適量之雛型VLP疫苗供動物試驗。子計畫三目標為VLP疫苗免疫學平臺之建立。我們進行小鼠及猴子動物實驗，以評估雛型VLP疫苗之中和抗體效價與對不同年代與不同genotype病毒中和效價。此外我們也製備檢驗用的相關抗體以及建立體液、細胞與記憶免疫反應檢測系統，並且測試最佳之佐劑以提升免疫效果。

材 料 與 方 法

Pichia 表現系統

實驗中所使用的酵母菌株為 *Pichia pastoris*/GS115，而表現 P1 及 3CD 蛋白的質體則是分別選擇 pPIC9 及 pGAPZ α A。其中，前者以強勢 AOX1 啟動子，後者則以較弱的 GAP 啟動子來進行目標蛋白的表現，兩者皆含有 α -factor 訊息序列，因此可將兩種目標蛋白一起分泌至胞外。首先，我們利用 PCR 反應將 P1 及 3CD 基因序列 (*neu strain*) 的片段放大，再以 XhoI/EcoRI 及 EcoRI/NotI 之切位分別插入 pPIC9 及 pGAPZ α A 的表現載體中。所得到的質體分別命名為 pPIC9-P1 及 pGAPZ α A-3CD。接著，利用電轉化法將兩種重組質體導入 GS115 細胞，而建構之重組表現菌株命名為 GS115-P1-3CD。

重組桿狀病毒製備及放大

本研究使用 Bac-To-Bac[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) 桿狀病毒表現系統來進行病毒製備，並以系統中的 pFastBac DUAL 質體作為基因骨架，建構重組桿狀病毒。此質體具有兩個桿狀病毒的後期強勢啟動子，分別為 polyhedrin 及 p10 啟動子，可將外來基因殖入表現外來基因。根據已發表的腸病毒株 TW/2272/98 的序列 (Shih *et al.*, 2000)，我們將帶有病毒外殼蛋白的 P1 基因接至 polyhedrin 啟動子下游，將 3CD 基因接至 p10 啟動子下游，並命名此一病毒為 Bac-P1-3CD。此外，我們也將 3CD 基因接至弱勢啟動子下游，分別為 IE-1 啟動子 (baculovirus immediate early promoter) 及 CMV 啟動子 (cytomegalovirus) 下游，命名為 Bac-P1-I3CD 及 Bac-P1-C3CD。重組病毒篩選及放大以先前所提之方法實行 (Hu *et al.*, 2003)。VLP 生產實驗所用均為第二代 (passage 2, P2) 病毒。Sf9 細胞於搖瓶培養 24 h，細胞數達 1.2×10^6 cells/ml，接種 P1 重組病毒液 (Bac-P1-3CD, MOI 0.01~0.05)，感染 120 h 出現細胞病變後收成 P2 病毒液。收集之病毒液以 3000 rpm 離心去除細胞碎屑，取上清病毒原液 (即 P2 病毒) 分裝至冷藏管內，保存於 4°C 冷房，並於一個月內使用完畢。重組病毒感染效價是使用終點稀釋法 (endpoint dilution method) 測定 (Hu *et al.*, 2003)，並以每毫升病毒斑形成單位元 (PFU/ml) 表示。

細胞及培養基

本研究中所使用的兩種昆蟲細胞分別是 Sf-9 及 High Five (Hi-5, Invitrogen, Carlsbad, CA)。Sf-9 細胞株分別以 Sf-900 II (GIBCO, Grand Island, NY) 及帶有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS, GIBCO) 的 TNM-FH 兩種培養基進行培養，並於 spinner flask 中以轉速 90 rpm 懸浮培養於 27°C 恆溫培養箱中。Hi-5 細胞株則以 Sf-900 II 無血清培養基進行培養，放置於 27°C 恆溫培養箱以搖瓶 (shake flask) 或轉速 90 rpm 在 spinner flask 懸浮培養。

SDS-PAGE 凝膠電泳及西方點墨法 (Western blot)

我們利用 12% separation gel 與 5% stacking gel，以 Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD) 系統進行蛋白質凝膠分離，完成後以 Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD) 染色。亮

帶的強度則以掃描器掃描後藉由 Scion Image Shareware 或 ImageJ 分析。在西方點墨法中，先將樣品進行 12 % SDS-PAGE 凝膠電泳後，再轉移到硝化纖維紙(PVDF)上。轉印完成的 PVDF 膜放入 blocking buffer (3% BSA 在 PBST (1X PBS+0.05% Tween 20)) 於室溫下反應 30 分鐘，接著放入含有 rabbit-anti-VP1 (3000X dilution) 的 blocking buffer，室溫下反應 120 分鐘。反應完成後以 PBST buffer 清洗四次(每次五分鐘)。再加入含有 Goat-anti-rabbit-IgG-AP (Jackson Laboratories, 3000X dilution) 的 blocking buffer，室溫下反應 60 分鐘。反應完成後以 PBST buffer 清洗四次(每次五分鐘)。將 PVDF 膜置於 15 ml wash buffer (0.1 M Tris/ 0.1 M NaCl/ 0.05 M MgCl₂/ pH 9.5) 搖晃十分鐘。以呈色溶液(100 μl NBT/BCIP in 10 ml wash buffer) 呈色約三至五分鐘後，使用 10 ml stop buffer (10 mM Tris/ 1 mM EDTA/ pH 8.0) 終止反應三至五分鐘。

蛋白質定量及類病毒顆粒(VLP) ELISA 定量

純化後的 VLP 標準品依 Bradford 法來定量蛋白質總量，所使用的套組為 BioRad Protein Assay (BioRad)，以 BSA 作為蛋白質標準品。在定量 VLP 時，我們以本計畫純化的 rabbit anti-VLP 多株抗體作為吸附用抗體，以 PBS 稀釋 10000 倍後，置於 96 孔盤中(100 μl/well)，於 4°C 作用隔夜。以清洗液(PBST)清洗 3 次後，我們加入含有 1 % BSA 的 PBST 並在室溫作用 1 小時，使孔中底部的所有空隙都填補上蛋白質，接著以清洗液重複清洗 3 次。接著，我們加入待測樣品於室溫反應下反應 2 小時。清洗 3 次後，加入稀釋 4-5 倍的偵測用抗體(結合生物素的老鼠抗 EV71 單株抗體; Chemicon, Temecula, CA)，於室溫作用 1.5 小時。清洗 3 次後，我們加入稀釋 200 倍的 streptavidin-HRP (100 μl/well)，於室溫下反應 30 分鐘。清洗 3 次後，加入 100 μl/well TMB 試劑進行呈色反應約 10 分鐘。待結果呈現明顯藍色後，加入 100 μl/well 的 2 N H₂SO₄ 以中止呈色反應，並讀取波長 450 nm 的吸光值。

粒徑分析儀 (Dynamic light scattering ; DLS)

我們將純化的後 EV71 VLP 樣品稀釋至 50 μg/ml，取 250 μl 的樣品與待測的鹽類、穩定劑等混合，再將樣品稀釋至 500 μl 進行反應，反應完成後將樣品放入粒徑分析用 Y 型拋棄式樣品室 (FEBRA)，以粒徑分析儀 (Malvern zetasizer nanozs) 分析。

穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy, TEM)

我們將 5 μl 溶有 EV71 VLP 的樣品以漂染的方式附著於 TEM 銅網 (support films formvar / carbon 200 mesh copper grids, TED Pella Inc.) 上 10 分鐘。再以相同方式將銅網覆蓋於 20 μl PBS (pH 7.4) 液滴上清洗三次，每次 5 分鐘。最後以 2 % phosphotungstic acid (PTA, Sigma) 進行負染 3~5 分鐘，以濾紙吸除多餘染劑後，將銅網樣品面朝上，置於除濕的冷氣房中，待隔夜風乾後即可利用以穿透式電子顯微鏡(H-7500, Hitachi) 觀察純化後的 VLP。

反應器操作與細胞大量培養

Hi-5 細胞株在生物反應器內係以無血清之 SF900 II 培養基培養，使用 2-20 L，水夾層控溫槽體，具有檔板葉片設計之 bioreactor，working volume 為槽體體積的六至九成，溫度控制在 27°C，溶氧(dissolved oxygen)控制在 65%。Head space 使用空氣幫浦控制最大流量循環，酸鹼控制使用 7.5% NaHCO₃ 控制於 pH 6.1~6.4 之間。

最終VLP生產方式

VLP 生產時，我們先將 150 ml Hi-5 細胞(5×10^5 cells/ml) 接種至 1000 ml 搖瓶，在細胞濃度到達 $3-4 \times 10^6$ cells/ml 時接種至生物反應器，並控制起始細胞濃度在 5×10^5 cells/ml。當細胞生長到達 Mid-log phase (約 $1-3 \times 10^6$ cells/ml)時，開始以 P2 病毒(Bac-P1-3CD)以 MOI 10 進行感染，感染 72 h 當細胞存活率降至 30%左右時收成細胞液。接著使用高速離心機離心(9500 rpm, Beckman) 30 min 並收集上清液，再以 0.2 μ m filter 過濾，儲存於 4°C，待後續純化。

類病毒顆粒 (VLP) 的回收純化

(a) 超過濾濃縮法(ultrafiltration)

含 VLP 的細胞上清液是利用切向流過濾系統，配合反覆循環過濾方式進行濃縮過濾(ultrafiltration/diafiltration, UF/DF)。所用過濾卡匣的 molecular weight cut-off (MWCO)為 1000 kD，濾膜面積為 0.5 m²，分別以 WFI (water for injection)與 50 mM sodium citrate/ 0.1M NaCl (pH6.5)緩衝溶液清洗及平衡。之後我們將 VLP 樣品通入匣膜濃縮，流速設定 200 至 300 ml/min，控制 P1 閥壓力 0.6 bar，P2 閥壓力 0 bar，P3 閥壓力 0.4 bar，PER 流速約 70 至 80 ml/min，樣品濃縮至體積約 1.0 L，再以 15 L 緩衝溶液置換樣品至 pH、導電度與緩衝溶液相同，再以約 500 ml 緩衝溶液，將 VLP 濃縮樣品洗出，最終體積約 1.4~1.5L。若需濃縮樣品至更小體積則繼續選用濾膜面積較小(0.1 m²)之 1000 kD 過濾卡匣 濃縮至約 300 ml 體積備用。。

(b)分子篩層析純化法(size exclusion chromatography (SEC))

自行配製一支 5 cm×95.5 cm (1875 ml) 的 Sephacryl S-400 管柱，並以 50 mM sodium citrate /0.1M NaCl, pH 6.5 的緩衝液平衡之。管柱平衡後 load 約 80 ml~100 ml 濃縮 VLP 醱酵液，利用 10 ml/min 流速之 50 mM sodium citrate/ 0.1M NaCl, pH 6.5 的緩衝液進行分離。在第 910 ml 至 1060 ml (最前面兩個波峰)間，每管收集 14 ml 分液進行分析。

(c) CHT-Ceramic Hydroxyapatite 層析純化法 (CHT-HA chromatography)

我們自行配製一支 2.6 cm×10cm (53 ml) CHT-HA 管柱，並以 5 mM 磷酸鈉緩衝液(0.18 g/L Na₂HPO₄ + 0.52 g/L NaH₂PO₄.H₂O, pH 6.5)平衡管柱。管柱平衡後 load 約 20 mg，置換成 5 mM 磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)，而後利用不同濃度磷酸鈉緩衝液 (50 mM (2.55g/L Na₂HPO₄ + 4.42 g/L NaH₂PO₄.H₂O), 100 mM(5.10g/L Na₂HPO₄ + 8.84 g/L NaH₂PO₄.H₂O)及 500 mM (38.46 g/L Na₂HPO₄ + 31.62 g/L NaH₂PO₄.H₂O))沖提，流速 20 ml/min，當 OD₂₈₀ 值上升時，收集約 0.8~1.5 個管柱體積，之後將每個不同磷酸鈉濃度的分液，作進一步分析。

d. 離子交換濾膜 Q5F 純化法 (Q5F membrane chromatography)

Q5F MA5 濾膜先以 100 mM 磷酸鈉緩衝液浸潤後，再將需要去除內毒素之純化後 VLP 直接以重力過濾方式通過濾膜。我們回收濾過的分液存放於 4°C 並進行分析。

高效能分子篩液相層析 (SEC-HPLC)

我們將 200 µl 樣品注入 TSK G4000S 管柱 (7.8 mm×30 cm, TOSOH)，以 50 mM sodium citrate/ 0.1 M NaCl (pH 6.5) 緩衝液分析樣品的 VLP 比例(流速 0.4 ml/min，偵測波長 280 nm)。

大腸桿菌表現腸病毒外鞘蛋白製備

首先將帶有腸病毒外鞘蛋白(VP1、VP0、VP3)表現序列之 pET28α 質體轉型至 ECOS1 大腸桿菌中，並以 kanamycin 篩選轉型成功之菌落，培養後以 IPTG 誘發蛋白的產生(VP1 為 0.4 mM 1.5 小時、VP0 為 0.1 mM 4 小時、VP3 為 0.1 mM 1.5 小時)。為了進行純化，我們收取 250 ml 菌液後離心去除培養液，加入 Denaturing binding buffer 沖散沉澱物，加入 1 mg/ml lysozyme 及蛋白酶抑制劑於 4°C 作用 0.5 小時。之後以超音速震盪、液態氮、及 40°C 水浴冷凍解凍各三次將菌體打破，再加入 30 µg/ml DNase I 及 10 µg/ml RNase A 於 4°C 作用 0.5 小時。離心後去除上清液，再以 10 ml Denaturing binding buffer 沖散沉澱物，於 4°C 作用 0.5 小時。之後我們將以 immobilized metal affinity chromatography 純化蛋白，並將蛋白質溶液分裝於透析膜中，放入含有 6 M urea 之溶液中進行透析，於 4°C 進行 16 小時後依序換置於 4 M、2 M、1 M urea。

去活化病毒製備與純化

我們以 α-MEM 培養液(含 10% FBS)培養 RD 細胞於 15 cm 培養皿中，於細胞約 7-8 成滿時置換培養液為 15 ml 2% FBS 之 α-MEM，並加入 15 µl EV71 病毒液，3 天後細胞產生 CPE，我們收取細胞液至 50 ml 離心管，以 3000 rpm 離心 10 分鐘去除細胞，再以 0.22 µm filter 過濾雜質及細胞碎片，取部分病毒液保存至 -80°C 以供下次使用。接下來以 100 kDa cut-off Amicon (Millipore)濃縮管將 500 ml 病毒液濃縮至 50 ml 以下，再將濃縮後的病毒液加至 65%-20%之 sucrose gradient 上，以 25,000 rpm 離心 4 小時，吸取蔗糖液間之白色物質(即病毒蛋白質)。以 11 ml PBS 沖洗蛋白質沉澱物，以 25,000 rpm 離心 2 小時，以 5.5 ml PBS 溶解沉澱物與 5.5 ml 60% CsCl 均勻混合後加至超高速離心管中以 31,000 rpm 離心 16 小時，以針頭吸出密度約 1.26 的白色物質與 PBS 混合後總體積約 3 ml 以 0.9% NaCl 的 normal saline 分別透析 2 小時、2 小時、16 小時後取出，以 Pierce BCA protein assay kit 偵測其濃度。最後我們將純化後的蛋白加入最終濃度為 1/4000 的福馬林，於 37°C 中作用 24 小時以達到去活化效果，且測試其感染力已降低 99.9%。

單株與多株抗體製備

1. 多株抗體：

我們採用五週大之雌性紐西蘭大白兔，分別於第一劑注射後之第 2、4、5~10 週加強注射(booster injection)，每次注射 100 µg 蛋白液輔以佐劑 complete Freund's adjuvant (CFA) (加強注射採用 incomplete Freund's adjuvant (IFA))等比例混合，最終體積為 1000 µl，以皮下注射方式將病毒蛋白注入實驗兔背部。於每次注射病毒蛋白前以及 1 至 2 週後，我們進行耳部採血，血液靜置於室溫 2 小時，待凝集後離心 3,000 rpm 10 分鐘。血清收取後，離心 12,000 rpm 10 分鐘，含抗體的上清液分裝並保存於-80°C。

2. 單株抗體收集：

我們採用五週大之雌性 BALB/c 小鼠，於第一劑注射後第 2、4、6、8 週加強注射，每次注射 10 µg 蛋白液，佐劑為 CFA(加強注射採用 IFA)等比例混合，最終體積為 100 µl，以腹腔注射施打病毒蛋白於小鼠腹部。

於最後一劑施打後三天內，我們將小鼠以 CO₂ 犧牲，取出脾臟置於 DMEM 培養液中，以無菌之鑷子及剪刀剝離沾黏物，以 18G 針頭在脾臟上進行數次穿刺後吸取 DMEM 培養液注入脾臟將細胞沖出，重複數次直到脾臟由深紅色轉為淡紅色。我們將含有細胞之培養液離心後，加入 SP2/0 細胞(ATCC #CRL 1581)及加入 PEG 促使細胞融合。之後我們換置培養液為 HAT 篩選存活細胞，待非成功融合細胞死亡，融合細胞(hybridoma)成長成單一群落。我們以 ELISA 於 96 孔盤中篩選表現單一抗體之融合細胞，若仍為兩群以上細胞，則需要進一步稀釋並重新篩選。

最後我們將融合細胞注射至小鼠腹腔內誘發產生腫瘤，再以針頭抽取腹水取得大量之單株抗體。

佐劑試驗(Adjuvant test)

我們以 6 至 8 週大的 BALB/c 小鼠測試不同佐劑對 VLP 致敏效果的影響。第一次致敏只注射佐劑，之後每三週進行加強注射，每兩週進行採血測試免疫反應。每組小鼠有 5 至 6 隻，實驗分組如下所示：

第一組：注射 saline

第二組：注射 200 µg aluminium alhydrogel (alum, Brenntag Biosector, Denmark)

第三組：注射 10 µg VLP (經子計畫二純化後)

第四組：注射 10 µg VLP 及等量 CFA

第五組：注射 10 µg VLP 及 200 µg aluminium alhydrogel

第六組：注射 10 µg VLP 及 20 µg saponin (Brenntag Biosector)

第七組：注射 10 µg VLP 及 100 µg poly I:C (Invivogen)

第八組：注射 10 µg VLP 及 25 µg MPLA (Invivogen)

第九組：注射 10 µg VLP 及 20 µg Imiquimod (Invivogen)

第十組：注射 10 µg VLP 及 10 µg CpG (Invivogen)

接下來我們以 ELISA 測試採血所得血清的 VLP 專一性。首先我們在 96 孔培養盤中加入 5 µg/ml VLP，於 4°C 靜置隔夜再加入含 1% BSA 的 TBST 以覆蓋盤底的空隙，再加入採血取得的血清於室溫反應 2 小時，沖洗後加入 0.2 µg/mL goat anti-mouse IgG

HRP conjugated (Bethyl)以偵測 IgG 抗價；若是偵測 IgG1 或 IgG2a 則加入 1 µg/ml 的 biotinylated anti-mouse IgG1 (A85-1, BD)或 anti-mouse IgG2a (R19-15, BD)再加入 HRP conjugated streptavidin (R&D Systems)，處理 1 小時後沖洗並於每孔加入 100 µl TMB 進行呈色 20 分鐘，之後加入 100 µl 1 M H₂SO₄ 終止呈色反應，再分析 450 nm 的吸光值 (OD₄₅₀)。

台灣獼猴接種 VLP 及抗體測試

第一次猴子試驗：

本實驗已委託農委會家衛所進行 VLP 疫苗接種，實驗時分為三組實驗組(n=3)及一組對照組(注射去活化病毒蛋白, n=2)，共需台灣獼猴 11 隻：

第一組：注射去活化病毒蛋白, 20 µg/dose

第二組：注射 VLP, 20 µg/dose

第三組：注射 VLP, 50 µg/dose

第四組：注射 VLP, 200 µg/dose

佐劑採用 Aluminum 與疫苗等比例混合，最終體積 1000 µl，注射於實驗猴之肌肉。於第一劑注射(97 年 12 月 9 日)後之第 2、6 及 34 週後，我們進行加強注射(booster)及採血。所得血液將以 ELISA 進行抗體測試。

第二次猴子試驗：

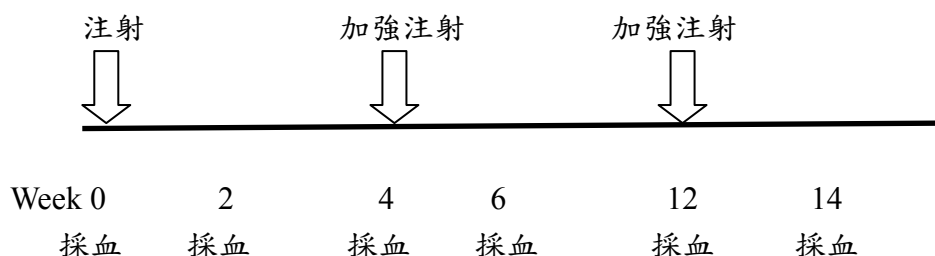
本次實驗共使用 12 隻實驗猴，分為兩組注射不同量 VLP 之實驗組(n=4)及一組注射去活化病毒蛋白之對照組(n=4)：

第一組：注射去活化病毒蛋白, 20 µg/dose

第二組：注射 VLP, 20 µg/dose

第三組：注射 VLP, 100 µg/dose

本實驗所用 VLP 為經二步管柱層析(SEC+CHT-HA)及最後離子交換濾膜 Q5F 過濾以去除內毒素，純度超過 92%。佐劑乃是採用 GMP 等級的 aluminium hydroxide gel (Alhydrogel 2% “85”, Brenntag Biosector, Denmark)，每劑疫苗體積為 0.5 ml，其最終組成包含抗原以及 800 µg aluminium 溶解於生理食鹽水中。第一次注射(肌肉注射)已於 98 年 11 月 10 日進行，預計將於 4、12 週進行加強注射。注射及採血時間如下所示：



測定抗去活化腸病毒蛋白及 VP1 蛋白之 specific IgG

我們利用 pH 9.6 之碳酸鈉/碳酸氫鈉緩衝液 (Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer) 將去活化腸

病毒蛋白或 VP1 蛋白稀釋為 5 µg/ml，取 100 µl 此蛋白溶液加入 ELISA 盤之樣品槽中，於 4°C 靜置 16 小時使腸病毒外殼蛋白質附著於樣品槽中，以清洗液 TBST (TBS with 0.05 % Tween 20) 清洗 4 次將多餘的蛋白質清除，接著加入 200 µl 含有 0.5 % BSA 之 PBST (blocking buffer) 溶液於室溫靜置 2 小時。以 TBST 清洗 4 次，接著加入 100 µl 以 TBST 溶液稀釋之待測血清，並於室溫作用 1 小時後，以 TBST 清洗 4 次。加入 1:50000 倍以 TBS 溶液稀釋之抗兔子 IgG 多株抗體 200 µl 於室溫靜置 1 小時後，以 TBST 清洗 4 次，加入 100 µl 之 TMB 受質溶液，於室溫靜置反應 5 分鐘後，加入 50 µl 之 2N 硫酸溶液中斷反應，並利用 ELISA reader 測 O.D.₄₅₀ 之數值。

$$\text{ELISA UNIT (E.U.)} = \frac{\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}}{\text{O.D.}_{\text{positive control}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}}$$

中和測試(Neutralization test)

我們利用 DMEM (2% FBS) 將待測血清以 2 倍序列稀釋後，取 50 µl 加入 96 孔之培養盤中，每孔再加入 50 µl 之 EV71 病毒(100 TCID₅₀，以含有 2 % FBS 之 DMEM 稀釋)，於 37°C 作用 2 小時。2 小時後我們加入以 DMEM (10% FBS) 稀釋之 100 µl RD 細胞 (8×10⁴ cell/ml)，置於 37°C 培養約 72 小時，每日紀錄觀察 RD 細胞之細胞病變病理效應 (cytopathic effect, CPE)。另一盤未加入血清之陽性對照組，則取 50 µl 之 DMEM (2% FBS) 與 50 µl 之 EV71 病毒(100 TCID₅₀) 於 37°C 作用 2 小時。其餘步驟與上述相同。

ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot)

首先我們將 10 µg/ml 的 goat anti-monkey IgG (Bethyl)、純化的去活化病毒蛋白或是 VLP 加至 96 孔 ELISPOT 讀盤(Millipore)，中於 4°C 靜置隔夜，再加入含有 3% BSA 的 PBS 作用。接下來每孔加入 200,000 個稀釋於 RPMI 培養液(10% FBS)的周邊血單核球細胞(PBMCs)，在 37°C 作用 16 小時。沖洗後加入 0.5 µg/mL goat anti-monkey IgG conjugated with HRP 於室溫靜置 2 小時，再次沖洗後每孔以 100 µl AEC substrate (BD) 進行 5 至 10 分鐘的呈色。用清水終止呈色反應待乾燥後，我們以 Immunospot 讀值機(CTL) 進行分析。本實驗中每五個孔中的 spots (共 1,000,000 個 PBMCs) 作為一個讀值。

結 果

子計畫一：腸病毒 71 型 VLP 疫苗實驗級技術平臺之建立

1. 確認 VLP 生產系統

在過去的計畫中，我們所採用的 EV71 VLP 生產策略為使用 Bac-P1-3CD 病毒(以 P10 啟動子驅動 3CD)，以高病毒劑量(MOI 10)感染培養於無血清培養基的 High Five (Hi-5)昆蟲細胞，在感染四天後收集其胞外的 VLP 顆粒。為了進一步提昇 VLP 產量以供後續的多種實驗使用，我們從兩個方向改善生產策略：(1) 開發酵母菌生產系統；(2) 改變病毒載體基因設計與感染條件。

我們首先測試使用 *Pichia pastoris* 生產 VLP 的可行性。我們成功將 P1 與 3CD 基因轉殖至 *P. pastoris* 的轉殖載體，並將基因轉染至細胞。PCR 分析證實我們確實將 P1 與 3CD 插入 *P. pastoris* 染色體內(圖 1)。但目前無法在胞外或胞內測得 VLP 結構蛋白 VP1 的表現(圖 2)。由於計畫時間短暫，因此暫時擱置此系統之研發，並以桿狀病毒感染昆蟲細胞為主要開發重點。

以往的實驗結果顯示，降低 3CD 的表現可顯著提昇 VLP 的產量。因此我們利用在昆蟲細胞中為弱勢表現的 CMV 啟動子，取代強勢的 P10 啟動子來驅動 3CD 表現，建構出 Bac-P1-C3CD 病毒，並與 Bac-P1-3CD 感染 Hi-5 細胞所能生產的 VLP 產量比較(圖 3)。ELISA 結果顯示，使用高 Bac-P1-C3CD 病毒劑量(MOI 10)，在 Sf-9 細胞濃度達到 4×10^6 cells/ml 時感染，於感染後四天收成可得最大單位體積產量約 43 mg/L。因 Hi-5 細胞較不易生長至高密度，我們是以 Bac-P1-3CD 在 Hi-5 細胞密度達 2×10^6 cells/ml 時感染，其單位體積產量約 26 mg/L。兩者相比，Bac-P1-C3CD 感染 Sf-9 細胞的產量增加約 65%，因此我們進一步使用此系統生產 VLP。

所得 VLP，我們以超高速離心純化後進行小鼠免疫實驗。實驗中，我們以六週大的母鼠(BALB/c)做為動物模型，並以 10 mg protein/mouse 的劑量，與 complete Freund's adjuvant (CFA)或 incomplete Freund's adjuvant (IFA)混合，分別於第 0 週及第 4 週進行 prime 及 boost 腹腔注射。實驗組別包括以下五組：(1) PBS 組：為了消除佐劑對於實驗數值的影響，我們將 PBS 混合佐劑後進行相同注射，並以此組所收集的血清作為數值評估的依據。(2) 負對照組(rBV)：為了瞭解抗體反應是否確實來自類病毒顆粒，而非其他雜蛋白質所造成的誤差，我們以一株未帶有任何外源蛋白基因的重組桿狀病毒感染 Sf-9 細胞後，利用與實驗組相同的純化程式進行純化，收集相同位置的蛋白質，以此作為負對照組。(3) 正對照組(EV71)：以蔗糖不連續梯度離心法所純化而得到的腸病毒，純化後的腸病毒尚具有感染力，因此以 56°C 加熱 30 分鐘去活化。(4) 正對照組(Bac-P1-3CD)：以 Bac-P1-3CD 感染 Hi-5 細胞所生產出 VLP。(5) 實驗組(Bac-P1-C3CD)：以 Bac-P1-C3CD

感染 Sf-9 細胞所生產出 VLP。每一組實驗動物隻數為四隻。

七週後我們收集抗血清進行後續分析。ELISA 結果發現以 Bac-P1-C3CD 生產的 VLP 能誘發相當高的抗 EV71 抗體效價(約 2^{13}) (圖 4)，且中和實驗結果(圖 5)顯示抗體可有效中和 2 種病毒株: TW/2272/98 (C2 基因亞型, 為 1998 年流行的病毒株)與 20080738 (B5 基因亞型, 為 2008 年流行的病毒株), 中和效價約為 2^{10} - 2^{12} 。此結果與以 Bac-P1-3CD 生產的 VLP 作為疫苗類似, 且數據在統計上並無顯著差異, 顯示新系統產生的 VLP 可誘發良好免疫反應, 且應具有交叉保護效果。

使用 Bac-P1-C3CD 感染 Sf-9 細胞的生產系統, 產量有大幅的提升, 且病毒種庫與 VLP 均以 Sf-9 細胞生產, 具有可簡化細胞種庫為單一 Sf-9 細胞的優點, 在實驗室初期的西方點墨法分析時, 也發現有完整的切割 (圖 6A)。然而在計畫執行中期, 因先前自何美鄉教授實驗室所得 anti-VP1 單株抗體用罄, 因而我們改採用子計畫三所生產, 子計畫二純化的多株抗體(rabbit anti-VP1 polyclonal antibody)進行西方點墨法分析 VLP。我們意外發現以 Bac-P1-C3CD/Sf-9 系統生產 VLP 時, 細胞在感染後期(感染後 3-4 天)產生很多 VP1 降解產物(圖 6B)。這些降解物經 N-terminal sequencing 分析發現確實為 VP1 蛋白質的片段(data not shown), 且會被抗體偵測到, 因此利用 ELISA 分析 VLP 產量時, 可能會因為這些降解物的影響, 而使得 ELISA 偵測到的 VLP 產量大幅提昇。為證實這項推論, 子計畫二以低劑量 (MOI 0.00001) 的 Bac-P1-C3CD 病毒感染 Hi-5 細胞, 在感染後第 6.8 天收成並以 ELISA 分析 VLP 產量, 得到的產量高達 130-500 mg/ml, 但此時 VP1 的 band intensity 降低, 反而是其降解產物的 band intensity 大幅增加, 顯示 VP1 的降解物確實會被 ELISA 偵測到, 影響到正確分析 VLP 產量。因此我們先前所偵測到的高產量 Bac-P1-C3CD 生產條件, 可能是因為這些降解物所造成的效果, 並非真實的 VLP 產量。

除了對產量的分析造成誤判外, 這些降解物的產生也使 VLP 的純化更為困難。我們利用超高速離心純化 Bac-P1-C3CD/Sf-9 生產出來的 VLP 時, 發現回收率(小於 1%)及純度(低於 60%)都比過去以超高速離心純化由 Bac-P1-3CD/Hi-5 生產出來的 VLP 低。子計畫二以管柱層析法純化利用 Bac-P1-C3CD/Sf-9 系統所生產出的 VLP 時, 也遇到了相當大的困難, 先前所建立的純化 VLP (以 Bac-P1-3CD 生產)方式用在純化這些帶有大量 VP1 降解物的 VLP 樣品時, 無法達到要求的純度及產量。基於時間緊迫的考量, 並在評審委員的建議下, 我們暫時放棄利用 Bac-P1-C3CD 生產 VLP 做為疫苗的作法, 改回利用 **Bac-P1-3CD** 生產 VLP 以作為後續純化及免疫實驗所需。

2. 建立病毒種庫

為提供子計畫二大量生產所需, 我們已於清華大學與生物技術開發中心兩地建立研究用病毒種庫。目前已保存 Bac-P1-C3CD 第一代病毒(passage 1)兩批共 38 ml, 效價各為 2.5×10^7 PFU/ml 及 1.2×10^8 PFU/ml; 以及 Bac-P1-3CD 一代病毒 19 ml, 病毒效價為 3.2×10^8 PFU/ml。這些一代病毒做為初步的病毒種庫, 陸續用於生產 VLP 之用。

為了進一步更新之前生產的零代(passage 0)病毒，並確認植入病毒中的外源基因 P1 與 3CD 的穩定存在，我們利用已建構保存的 pBac-P1-3CD 與 pBac-P1-C3CD 兩個質體重新轉染 Sf-9 昆蟲細胞，製備新的 Bac-P1-3CD 與 Bac-P1-C3CD 兩種病毒。我們分別獲得各四株零代病毒(各約 450 μ l)加以保存，並且抽取其所生產的一代病毒的 genomic DNA，以 PCR 確認 P1 與 3CD 基因的存在。這些新的零代病毒將做為保存用病毒種庫，並用於生產一代病毒供給 VLP 生產之用。

3. 建立實驗室級反應器 VLP 生產流程

目前實驗室級攪拌式反應器(BIOSTAT® B, 2 liter)生產 VLP 已進入可量產階段，所建立的反應器控制條件為葉片攪拌轉速 100 rpm、溫度 27°C，使用無氣泡通氣系統，利用電子氣體混合裝置調控氮氣、氧氣與空氣的混合比例。為測試溶氧(dissolved oxygen)對 VLP 產量的影響，實驗時我們將溶氧(設定空氣充滿培養槽空間時，細胞培養液內溶氧為 100%)控制在 15, 30 或 60%。依照兩次獨立細胞培養實驗結果，感染後反應器內溶氧為 30%-60%時，可得較好的 VLP 單位產量約 35 mg/L(圖 7)，此產量大約是旋轉角瓶(無控制溶氧量)的 VLP 產量(約 15 mg/L)的 2 倍。

4. VLP 穩定性與量化之相關檢驗技術之建立

為瞭解我們所生產出來的 VLP 是否會有穩定性不足而在長期儲存時崩解成 subunit，或聚集在一起，我們也建立使用 Dynamic Light Scattering (DLS)粒徑分析儀檢驗 VLP 穩定性的方法。以 DLS 檢驗 VLP 樣品時，我們以 PBS 為分散劑、將 VLP 樣品(以 Bac-P1-3CD 生產，經 SEC 純化，純度約為 50%)稀釋到 50 mg total protein/L，以 DLS 分析儀偵測到 VLP 的平均粒徑大小為 30 nm 左右(圖 8)。此粒徑與電子顯微鏡下所觀察到 EV71 VLP 大小(約 27 nm)接近，顯示 DLS 確實可用於分析 VLP 的粒徑變化。因此我們進一步以 DLS 測試不同變數對 VLP 穩定性的影響。目前已測試數項影響穩定性的參數，包含添加 NaCl 的濃度、緩衝溶液、溫度及穩定劑。

許多文獻指出可利用 NaCl 增加 VLP 的穩定度(Mach *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2005)，而在後續的 VLP 純化步驟中也有相當多的步驟使用不同濃度的 NaCl，因此實驗中首先探討不同的鹽類濃度對於 VLP 穩定度的影響。VLP 樣品(50 μ g/ml)置於含有不同 NaCl 濃度(0 M (對照組), 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M 以及 2.0 M)的 PBS 溶液中，在 4°C 保存不同時間，再以 DLS 分析 VLP 粒徑大小是否改變。由實驗結果(圖 9)可知，在第 4 週後對照組的粒徑約為 33 nm，與原粒徑大小差異在機器的誤差範圍內，而所有實驗組別也顯示 VLP 在不同 NaCl 濃度保存 4 週後，其粒徑也無明顯變化，此結果雖然不能確認 NaCl 是否能夠加強 VLP 的穩定度，但顯示 VLP 保存於高濃度 NaCl 也能夠保持其粒徑大小，這現象有利於後續純化應用。

由於 VLP 在生產及純化的過程中會接觸到不同的緩衝液，因此探討不同的緩衝液對穩定度的影響也是重要的一環。我們將 VLP (50 μ g/ml)置於不同的緩衝液(PBS、Tris、

Phosphate 及 TE+ (40 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4)) 並保存在 4°C 不同時間。由 DLS 分析(圖 10)可知，保存在上述 4 種緩衝溶液中的 VLP 在第 4 週時的粒徑與第 0 天時的粒徑相似，其差異都在機器的誤差範圍內，顯示 VLP 能夠穩定地保存於這些緩衝液中。除了以 DLS 分析，我們也利用 TEM 觀察 VLP 的外觀及顆粒是否在保存一段時間後仍能保持完整，並以之相互輔佐 DLS 的分析數據。如圖 11 所示，VLP 剛自 -80°C 解凍時(第 0 天)，外觀為一結構完整之圓型顆粒(圖 11A)，在 PBS、Tris 及 Phosphate 緩衝液保存 3 週後，VLP 的外觀仍能保持結構完整性(圖 11B-D)。

接著我們測試溫度對 VLP 穩定性的影響。我們將 VLP (50 µg/ml) 溶於 PBS 緩衝液中，並保存於不同的溫度(4°C、25°C 及 37°C) 長達 4 週。DLS 分析結果顯示(圖 12)，VLP 在 4°C、25°C 或 37°C 的環境下保存 4 週，粒徑也無明顯變化。在上述實驗中，以 DLS 量測不同條件保存下的 VLP 粒徑，結果都顯示 VLP 在粒徑上並無顯著的變化。為了確認 DLS 確實能偵測到 VLP 粒徑的變化，我們以不同的方式處理 VLP，再以 DLS 分析 VLP 粒徑的變化。DLS 實驗結果(圖 13A)發現將 VLP 加熱到 70 °C 反應 30 分鐘後，VLP 的確有 aggregation 的現象。加熱至 70°C 會使得 DLS 偵測到的平均粒徑增大為~240 nm，粒徑分佈的 peak 也有明顯性地位移，與加熱前所測得之 VLP 平均粒徑(30 nm) 有顯著差異。此外，若添加 2% 的 PS80 至 VLP 中，並於室溫下反應 1 天，則 DLS 偵測到的粒徑會縮小為 6 nm 以下(圖 13B)。此結果顯示 VLP 與過量的介面活性劑(2% 的 PS80) 接觸，會分裂成小碎片，無法再維持 VLP 的完整結構。這些 VLP 粒徑受不同溫度或介面活性劑的影響均與文獻報導 HPV VLP 粒徑與溫度或過量介面活性劑的關係吻合(Mach *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2005)，顯示 DLS 確實能夠反映出 VLP 粒徑的變化。

穩定劑對於疫苗的保存與應用具有相當重要的影響，因此我們利用能夠使 VLP 產生粒徑變化的條件來快速篩選較合適的保存緩衝液及有效的穩定劑。疫苗常用的穩定劑可分為非離子型表面活性劑，醣類，醇類，鹽類以及胺基酸等，因此我們分別加入不同種類的穩定劑至 VLP (50 µg/ml) 中，接著加熱至 70°C 反應 30 分鐘後，置於 25°C 兩天，再以 DLS 分析 VLP 粒徑大小改變幅度是否因添加穩定劑而縮小，以做為穩定劑有效與否的判斷依據。實驗結果(圖 14)顯示，未添加穩定劑的 PBS 組別在加熱處理後粒徑增大為 240 nm，而添加不同穩定劑則可減少粒徑的增加(亦即穩定劑可減少 VLP 的聚集)。其中 NP40 及 sucrose 的組別能夠將粒徑減低至約 75 nm，顯示 NP40 及 sucrose 的添加能夠增加 VLP 的熱穩定性。另外值得注意的是，VLP 與 0.01% PS80 混合時也有增加穩定性的效果，跟與 2% PS80 混合時造成 VLP 崩解的結果相反。此結果顯示 VLP 與介面活性劑之間的濃度比對 VLP 穩定性有很大影響。

本研究中最主要的定量方法為酵素免疫偵測法(sandwich ELISA)，用於測量 VLP 濃度，因此開發穩定、可靠的 ELISA 非常重要。但本計畫執行初期因抗體來源不穩定，且每一批標準品的生產量少，常需要更換不同批次生產的 VLP 作為標準品，抗體和標準品的品質不一，造成定量分析結果再現性不佳。因此我們改良各步驟所使用的材料及方法，以提高穩定性與一致性。目前實驗所使用的吸附抗體(capture antibody)為子計畫

三所製備的兔子抗 VLP 多株抗體(rabbit anti-VLP polyclonal antibody)，偵測用抗體(detection antibody)則為市售的老鼠抗 EV71 單株抗體(Chemicon, Temecula, CA)經自行反應連結生物素(biotin)後的複合抗體，其中實驗材料及方法均詳述於附錄的 ELISA SOP 內。根據我們修正後的實驗步驟和統一抗體及標準品來源，在三次獨立的實驗中，其標準曲線的 R^2 值都在 0.99 以上，其斜率也都非常相近(圖 15)，顯示在線性偵測範圍內(0-0.25 $\mu\text{g/ml}$)具有良好的再現性。

實驗中我們以高純度的 VLP(純度高於 80%，保存於 PBS 中)作為 ELISA 的標準品，但用以檢測的樣品多為未經純化或是純化不完全的 VLP。為了釐清樣品中的不純物質是否會對 ELISA 檢測造成干擾(例如提高實驗數據的背景值或是影響實驗結果的再現性)，因此我們設計實驗來探討樣品中所含雜質是否會對 ELISA 偵測 VLP 時造成影響。樣品中所含之非 VLP 雜質大致可分為：血清、細胞培養液及感染病毒後破碎的細胞碎片，其中血清的來源為病毒液(生產病毒的培養液含血清)。於血清的干擾測試中，我們使用剛加入病毒液且未產生 VLP 的細胞液作為樣品；在培養基的干擾測試中，我們直接對新鮮的培養液(Sf 900II, serum free)進行檢測；而細胞碎片的干擾測試，我們以不表現 EV71 VLP 的桿狀病毒感染昆蟲細胞數天，收集含有破碎死亡細胞的細胞液作為樣品。上述樣品經由 ELISA 檢測後，顯示的偵測數據均與背景值相當(data not shown)，證明這些樣品中所含雜質並不會影響 ELISA 對 VLP 的偵測，同時也表示我們所使用的抗體對 VLP 偵測具有良好的專一性。

接著我們評估 ELISA 所使用的抗體對 VLP 結構的完整性是否能有效辨認，並以蛋白質變性後的 VLP 及崩解後的 VLP 作為實驗對象。我們將純化後的 VLP (0.002-0.25 $\mu\text{g/ml}$)加熱至 95°C，使其在此高溫下維持五分鐘，而後放至室溫，此時的 VLP 即為蛋白質變性後的 VLP 樣品。此外，在先前利用 DLS 檢測 VLP 穩定性的實驗發現，低濃度的 VLP (< 10 $\mu\text{g/ml}$)在含有 2% PS80 的環境下，所測得的粒徑(6.8 nm)小於 VLP 的原始粒徑(≈ 30 nm)，推測可能是 VLP 在此環境下崩解碎裂。因此我們將純化後的 VLP (0.002-0.25 $\mu\text{g/ml}$)加入 2%的 PS80 定義為崩解後的 VLP 樣品，用來進行 ELISA 檢測。從圖 16 中可看出，經過高溫處理使蛋白質變性後的 VLP 經由 ELISA 偵測所得數值與背景值相當，顯示 ELISA 抗體不會偵測到蛋白質結構被破壞的 VLP；但另一方面，在 2% PS80 環境下的破碎 VLP 卻仍會被 ELISA 所偵測，且其數值與未處理的 VLP 相當，顯示 ELISA 對於完整與否的 VLP 顆粒不具有辨識能力。綜合以上實驗，我們得知：ELISA 所使用的抗體對於 VLP 的結構蛋白質具有專一性，不過無法判斷 VLP 顆粒的完整性。

5. 建立標準操作程式 SOP

子計畫一所有用到的標準操作程式(SOP)及工作表單(worksheet)均附於附錄中。

子計畫二、腸病毒 71 型 VLP 疫苗量產級技術平臺之開發

1. 建立昆蟲細胞庫及病毒種庫

本研究所用昆蟲細胞包括 High Five (Hi-5) 及 Sf-9 (Invitrogen 11496-015, lot 529869)，均以 SF-900 II 培養基培養於搖瓶，每 2~3 天繼代一次（每次接種細胞濃度約 5×10^5 cells/ml），待細胞生長穩定(10-30 天)，我們將細胞分裝至 20 根小管中凍存，已建立昆蟲細胞種庫(Master Cell Bank)。病毒種庫則已由子計畫一建立。

2. 建立 VLP 發酵槽量產(2 L-20 L)製程技術

A. 以 Bac-P1-3CD 病毒株進行 VLP 生產系統最適化

前期計畫中，EV71 VLP 的生產策略為使用清大建構之 Bac-P1-3CD 病毒，以高病毒劑量(MOI 10)感染培養於無血清培養基之 Hi-5 細胞，於感染四天後收集其胞外的 VLP 顆粒。因此本子計畫首先以子計畫一發展的策略進行 EV71 VLP 生產製程放大。

我們以 5-20 L 的生物反應器培養 Hi-5 細胞，再以 Bac-P1-3CD 病毒株以不同劑量(MOI 0.0001 到 MOI 10)感染細胞生產 EV71 VLP。當細胞存活率低於 40%時，我們收取含 VLP 的細胞液，以 ELISA 分析產量。如表 1 所示，以 MOI 10 感染時(細胞濃度 3×10^6 cells/mL)，VLP 單位產量最高為 14 mg/L (batch no. 3CD-98B002)。若以低病毒劑量(0.01-0.0001 MOI)感染 Hi-5 細胞(細胞濃度 5×10^5 cells/mL)，當細胞存活率低於 40%時，VLP 單位產量最高為 9.7 mg/L (batch no. 3CD-98B008)。其他多數 2-20 L 生物反應器之 VLP 產量介於 5-10 mg/L。由於低病毒劑量對產量未顯著提升，卻於純化後伴隨其他不純物出現(data not shown)，我們最後決定採取高病毒劑量感染之生產策略。

另外，自反應器收成含 VLP 的細胞液後均須先進行濃縮以減少體積。初期我們以 90%生物反應器體積作為工作體積(working volume)生產 VLP 時，發現以 1000K (molecular weight cut-off = 1000 kDa)超濾膜(0.5 m^2)濃縮過濾時，多數的 VLP 均會通過過濾膜而出現在其濾出液(filtrate)，需要以 100K 超濾膜(0.1 m^2)進行細胞培養液之濃縮及置換緩衝液，VLP 才不會流失(圖 17)。但以 100 K 超濾膜(0.1 m^2)進行濃縮過濾時，過濾完的樣品中所含之血清蛋白及其他不純物殘留甚多。因 Hi-5 細胞需氧量大，因此我們降低工作體積至反應器體積的 60-70%以增加通氣量(如 batch no. 98B014-1、-2)。經過改變工作體積，VLP 以 1000 K 超濾膜過濾後，就不會流失到濾出液(圖 17)，暗示工作體積或通氣量對於 VLP 顆粒大小的影響。目前樣品濃縮後最小體積約為原體積之 1/40 (12L 濃縮至 0.3L)，VLP 最佳回收率約為 7-8 成。

此外我們測試以離心(Beckman/JA-10, 9500 rpm)及深層過濾膜(depth filter)回收 EV71 VLP 效率，回收後 VLP 濃度分別為 2.1 mg/L 與 2.7 mg/L，效果相當。接著我們再測試深層過濾膜及離心回收之 VLP 顆粒大小，以 1000 kD/ 0.5 m^2 超濾膜之通透率及

SEC-HPLC 分析作為回收效果之判斷依據。20 L 生物反應器產出之細胞培養液 (3CD-98B015) 以深層過濾器處理後，VLP 無法存留在 1000 kD/0.5 m² 超濾膜的 retentate；我們須以離心處理細胞培養液，其上清液中之 VLP 才不會流失到超濾後的 filtrate。ELISA 結果與 SEC-HPLC 結果一致，顯示深層過濾可能影響 VLP 顆粒大小(造成 VLP 流過 1000 kD/0.5 m² 超濾膜)。

B. 以高產量 Bac-P1-C3CD 病毒株進行 VLP 生產系統最適化

子計畫一建構了 Bac-P1-3CD，以高病毒劑量(MOI 10)感染培養於無血清培養基之 Sf-9 細胞(細胞濃度 4×10⁶ cells/mL)，感染四天後離心回收 EV71 VLP (細胞存活率為 40%)，其最大單位產量約為 35 mg/L。為了在反應器中有較高的 VLP 產量，子計畫二自 98 年 6 月中起使用 Bac-P1-C3CD 病毒株進行測試。

為排除以高病毒劑量感染需大量體積之病毒(總體積之 15%)，及其所衍生之儲存等問題，我們先在搖瓶實驗測試，以低劑量病毒(MOI 0.1-0.00001)感染不同昆蟲細胞株(Sf-9 及 Hi-5)生產 VLP 的產量。ELISA 分析顯示以 MOI 0.001 感染 Sf-9 細胞之 VLP 單位產量可達 65 mg/L，以 MOI 0.00001 感染 Hi-5 細胞之 VLP 單位產量更高達 98 mg/L (圖 18)，暗示以低病毒劑量感染可減少接種病毒體積(<1 μl P1 virus/1 L culture)，避免病毒種庫儲存的問題。

我們進一步以 5 L 生物反應器進行生產製程放大，目前所建立反應器控制條件為轉速 100 rpm、溫度 27°C，使用環狀通氣，以純氧控制溶氧在 50%，並在細胞培養液的表面通入空氣以趕走多餘 CO₂。圖 19 顯示以低劑量病毒感染 Sf-9 (0.001 MOI, batch C3CD-98B102)，或 Hi-5 細胞(0.00001 MOI, Batch C3CD-98B103)生產 EV71 VLP，於細胞存活率介於 40-70%之 VLP 產量為 18.8-130 mg/L，與以高劑量病毒(10 MOI)感染 Sf-9 昆蟲細胞之產量(26.4 mg/L, batch C3CD-98B101)相近或更高。

不過如子計畫一與圖 19 所發現，以 Bac-P1-C3CD 病毒感染昆蟲細胞之潛在問題為此病毒株產出之 VP1 降解產物較多，可能造成 ELISA 分析產生的數值過高，並干擾純化的流程。這問題可能是由於 Bac-P1-C3CD 使用 CMV 啟動子驅動 3CD 的表現。CMV 為早期啟動子，與 Bac-P1-3CD 以 p10 啟動子(為晚期啟動子)驅動 3CD 的表現相比，Bac-P1-C3CD 感染細胞後可能造成 3CD 更早表現(如感染後 12 小時)。3CD 為一種蛋白水解酶(protease)，過早表現可能造成細胞毒性，進而啟動細胞內分解外來蛋白的機轉，造成 VP1 更容易被分解。經審查委員建議，目前已暫停以此病毒進行 VLP 生產。

3. 利用親和力管柱層析方法純化 anti-VLP 相關抗體

本計畫目標之一為製備能偵測 EV71 蛋白或 VLP 的抗體，以供 ELISA 及 Western 分析。子計畫三利用純化後的 VLP 進行兔子免疫，並取得兔子血清(≈50 ml)後，本計畫以已具有的抗體純化平臺進行抗體純化。我們首先以 50% 硫酸銨沉澱、以 G25 column

進行去鹽(desalt)及緩衝液置換，最後利用親和力管柱 protein A column 進行純化。所得 anti-VLP 抗體經 SDS-PAGE (lane 4, 圖 20)分析發現純度相當高，總量約 260 mg，已提供計劃之 ELISA 與 Western 分析使用。目前另有兩批 VLP、VP0、VP3 抗體血清在進行純化中。

4. 建立最適化管柱層析搭配膜過濾之純化製程

EV71 VLP 是含有 VP1, VP0 與 VP3 蛋白質，直徑為 25-27 nm 的二十面體聚合大分子，推估 EV71 VLP 分子量大約為 5800 kDa。在前期計畫中我們已初步建立以 Sephacryl S-400 分子篩管柱層析(size exclusion chromatography, SEC)純化 VLP 的流程，不過以一步 SEC 管柱層析純化，所得的 VLP 純度還不夠高。因此我們進一步結合陰離子交換樹脂及 hydroxyapatite (HA)樹脂管柱層析法，測試能進一步提升 VLP 純度之操作條件及純化程式。

我們首先測試以陰離子交換樹脂(Q-Sepharose FF)管柱作為第二步管柱層析步驟的可行性。樣品為利用 Bac-P1-3CD 感染 Hi-5 細胞所生產的 VLP，且已經過 S-400 SEC 管柱層析法進行純化。圖 21 的 SDS-PAGE 結果顯示，許多 VLP 會出現在 flow thru fraction 中(lane 3)，且與通入管柱的樣品相比(lane 2)純度明顯提高。不過以不同濃度 NaCl (0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M, 0.5 M, 1 M)的 phosphate buffer (pH 7.4)沖提時，VLP 會在 0-0.35 M NaCl 濃度(lanes 4-7)被沖提出，導致整體回收率偏低。這些結果顯示在此操作條件下 VLP 結合至陰離子交換樹脂的效果不佳。

此外，CHT-Ceramic Hydroxyapatite 樹脂(簡稱為 HA)為 Bio-Rad 公司出品之純化用層析膠，搭配流動相中不同濃度的磷酸，可將吸附在膠體上的蛋白質與雜質分離達到純化效果，因此我們也利用 HA 樹脂搭配不同梯度的 sodium phosphate buffer 用於純化 VLP。實驗結果將依序在 5 L 和 20 L 規模純化製程中作進一步詳述。

雖然陰離子交換樹脂 Q-Sepharose FF 用於純化的效果(回收率)不佳，但在 flow thorough fraction 中純度有提高，顯示陰離子交換樹脂可吸附其他雜質。事實上，一般移除內毒素(endotoxin)最常使用的方式就是利用陰離子交換樹脂去除，因此我們使用分離機制與陰離子交換樹脂相同的 Q5F anion adsorber membrane (過濾膜)測試移除內毒素的效果。表 2 顯示，VLP 在以 SEC 純化後(樣品 VLP-SEC F2)內毒素含量高達 13,490 EU/mg，在經過 HA 管柱純化後(樣品 VLP-SEC-HA)內毒素降為 3400 EU/mg，移除率約為 75%，此時樣品經過濃縮，體積降為 45 ml，濃度增加為 1.19 mg/ml。經過 Q5F 過濾後(樣品 VLP-SEC-HA-Q5F)，體積為 42 ml，此步驟蛋白質回收率約 91%，內毒素含量降為 1966 EU/mg，移除率約 40%。因此 Q5F 過濾膜可用於移除內毒素。

5 L 規模純化製程:

a. 以 1000K 超過濾膜濃縮細胞液並去除雜質

在初步測試不同管柱層析法後，我們進一步建立 5 L 與 20 L 產程的完整純化流程。以 5 L 反應器生產 EV71 VLP 完收成的細胞上清液體積約為 4 L，以 1000 K 的超過濾膜濃縮收成液後，僅小部份 VLP 會通過膜，但大部份 VLP 分子均可於濃縮液中回收。由表 3 蛋白質定量資料可知，經過超過濾濃縮並置換緩衝液(樣品 VLP-5L-UF/DF)後，體積由 4000 ml 降為 270 ml，濃縮 15 倍，並且此步驟之總蛋白質回收率為 54.8%，代表一半左右的雜質被移除(圖 22)，對後續純化步驟產品純度的提升助益極大。而且由 pH 相對 VLP protein 沉澱測試顯示(data not shown)，將濃縮操作時緩衝液由原來的 50 mM Tris buffer (pH 7.4)更改為 50 mM sodium citrate/0.1 M NaCl (pH 6.5)，可以減少沉澱的產生，也減少了 VLP 的損失。

b. 放大 Sephacryl S-400 分子篩層析管柱以增加批次純化 VLP 量

我們試圖以離子交換樹脂或 HA 當作第一步管柱純化步驟，以純化濃縮 15 倍體積並置換緩衝液後的 VLP 樣品(≈270 ml)，但純化後 SDS-PAGE 均無法偵測到 VLP。因此我們仍利用 S-400 SEC 管柱搭配 50 mM sodium citrate/0.1 M NaCl (pH 6.5)緩衝液進行純化。所用管柱 5×95.5 cm 相較於之前所用管柱(2.6×95 cm S-400 SEC)等比放大了約 3.7 倍。所有濃縮液(270 ml，共 1965 mg)分三次操作，每操作一次會得到三個區塊的分液，我們再將三次同樣區塊的產物收集合併(見圖 23)。由過去實驗結果，我們瞭解 VLP 主要會分佈在第二個區塊(F2)。所有濃縮液(共 1965 mg)經過 S-400 SEC 管柱純化之後，共得到 32.76 mg 之 F2 粗產物，佔原蛋白質量的 1.67% (表 3，樣品 VLP-5L-S-F2)。後續的純化是以此 F2 粗產物繼續進行。

c. 利用 CHT-HA column 進行第二步管柱層析純化以提升純度

由於在 CHT-Ceramic Hydroxyapatite (簡稱為 HA)管柱層析法中流動相必須是磷酸鹽類水溶液，所以在進行第二步純化前，我們再次利用 1000 K 超過濾膜系統將經過 SEC 純化後的 VLP 樣品的緩衝液置換為磷酸鹽溶液。表 4 以 Bradford assay 分析的蛋白質含量顯示，此緩衝液置換步驟蛋白質回收率僅 23.25%，也許一些雜質被去除了，但日後可考慮改用別種分子切割(MWCO)大小的膜以提高產品回收率。

我們將 7.62 mg 過濾後的產物利用 HA column (2.6×10 cm) 搭配 250 mM 及 500 mM 的磷酸鈉溶液沖提(圖 24)，發現 VLP 在 250 mM 磷酸鈉濃度(peak A)下會被沖提純化出來，而 500 mM 磷酸鈉沖提液(peak B)中只有不純物，證明瞭 HA column 步驟的確有更進一步純化 VLP 的效果。不過從 SDS-PAGE 圖中可發現 250 mM 磷酸鈉沖提的分液仍可看到不純物與 VLP 共存(data not shown)。之後的純化若再添加一步濃度較 250 mM 低的磷酸鹽溶液先行沖提，應可得到純度更高的 VLP。此步驟在 250 mM 磷酸鈉沖提液的回收率約為 48% (總蛋白質量由 7.62 mg 降為 3.66 mg, 表 3)。

之後我們再將這個分液通過 Q5F anion adsorber membrane，再次去除雜質，表 3 顯示總蛋白質量由 3.66 mg 降為 1.49 mg，表示此步驟的回收率為 40.6% (樣品 VLP-5L-S-HA-Q5F)。最後純化的 VLP 以 Bradford assay 分析所得 total protein concentration 為 0.054 mg/ml (表 3)，乘以總體積 27.5 ml，可得其總蛋白質量為 1.49 mg。純化的 VLP 以 ELISA 分析則可得濃度為 9.605 $\mu\text{g/ml}$ ，換算其 specific activity (ELISA 所測濃度與 Bradford assay 所測濃度的比值)為 177.8 $\mu\text{g/mg}$ 。

20L 規模純化製程

a. 以超過濾膜濃縮細胞液並去除雜質

以 20 L 反應器進行 EV71 VLP 生產完收成的細胞液體積約為 12.8 L。我們測試以 100 kD 或 1000 kD 的超過濾膜(0.5 m^2)濃縮過濾細胞液，並同時將緩衝液置換為適用於 SEC 管柱層析純化的 50 mM Na-citrate/0.1 M NaCl (pH 6.5)。由 SDS-PAGE (圖 25)和 SEC-HPLC (圖 26)分析可發現，以 1000 kD 膜處理的過濾樣品，其雜質少於 100 kD 膜處理的過濾樣品。因此我們後續均以 1000 kD 的超過濾膜濃縮過濾細胞液，不但可明顯改善沉澱問題，亦可增加下一步 SEC 管柱層析純化的效率。

b. 放大 Sephacryl S-400 分子篩層析管柱以增加批次純化 VLP 量

在第一步中我們先以 1000 kD 的超過濾膜濃縮過濾細胞液，將體積濃縮 \approx 40 倍(由 \approx 12.8 L 降到 \approx 326 ml)，並置換緩衝液為 50 mM Na-citrate/0.1 M NaCl (pH 6.5)。這些含 VLP 的樣品(VLP-20L-UF/DF, 表 4)蛋白質總濃度約為 21.0 mg/ml，換算總蛋白質量為 6849.6 mg，濃縮過濾步驟的回收率約為 51%，表示約有 49%的蛋白質被濾除。

這些 VLP 樣品以 SEC 管柱 S-400 (5 \times 95.5 cm)進行純化，每次處理 80 ml 至 100 ml 樣品，可以得到三個區塊的分液，再將三次同樣區塊的產物收集合併(見圖 27)。如前所述，VLP 主要位於 F2 分液，其總蛋白質含量約為 157 mg (VLP-20L-S-F2, 表 4)，與前依步驟所含的 6849.6 mg 相比，回收率約為 2.3%。以 ELISA 分析發現其濃度約為 34.7 $\mu\text{g/ml}$ ，換算其 specific activity 約為 97.5。

c. 利用 CHT-HA column 做為第二步管柱層析純化以提升純度

經由 SEC 管柱初步純化的 F2 分液，經置換緩衝液為 5 mM 磷酸鈉(pH 6.5)後，再以 CHT-HA 管柱(2.6 \times 10 cm)作第二步純化；總蛋白質 loading 量一次約 20 mg。Loading 之後我們以 50 mM、100 mM、500 mM 磷酸鈉梯度方式分別沖提，其 chromatograph 顯示於圖 28。TSK-G4000 SEC-HPLC 分析發現，50 mM (圖 29c) 與 100 mM (圖 29d) 磷酸鈉分液中都有 VLP 的波峰(retention time (RT) \approx 19 min)，但 50 mM 分液在其他位置有一個小波峰，純度上比 100 mM 分液差。

圖 30 的 SDS-PAGE 分析亦顯示，在經過 S-400 SEC 管柱純化後，F2 分液(lane 2)

中還有許多雜質，但大小約在 60 kD 附近的雜質已大部份被移除，因此 SEC 雖然批次處理的體積受到限制，但仍能有效去除雜質，獲得初步純化的 VLP 樣品。利用 CHT-HA 純化 VLP 時，flow through (lane 3)中並沒有 VLP，顯示 VLP 可有效結合到 CHT-HA 樹脂。以 50 mM 跟 100 mM 磷酸鈉沖提都會有 VLP 被沖出，但 50 mM 磷酸鈉分液(lane 4) 含有分子量約為 95 kD 與>170 kD 的明顯雜質，經 scanning densitometry 分析，純度約 86%。100 mM 磷酸鈉分液(lane 5)則是含有少量分子量約為 72 kD 與 170 kD 的雜質，經分析純度>92%。SDS-PAGE 分析結果與 SEC-HPLC 分析結果吻合，並顯示以磷酸鈉梯度沖提(stepwise elution)方式，可以在 100 mM 磷酸鈉分液中得到純度最高之 VLP。另外許多雜質則會在 500 mM 磷酸鈉 (lane 6)被沖出。

表 4 顯示，將 20 L 反應器生產的 EV71 VLP (以 Bac-P1-3CD 感染 Hi-5 細胞)，經 1000 kD 超濾膜濃縮並置換緩衝液，再以 SEC 及 CHT-HA 兩步管柱層析步驟純化，最後以 100 mM 磷酸鈉沖提所得 VLP (VLP-2-L-S-HA 100 mM)的分液體積約 7.5 ml，總蛋白質量約為 2.6 mg，以 ELISA 分析所得濃度約為 90.4 µg/ml，換算所得 specific activity 為 261 µg/mg，且純度大於 92%。我們已提供此純化的 EV71 VLP 供作猴子動物試驗。

5. 建立製程 in-process & final drug substance bulk 產品相關檢驗方法及規格

為了得知 VLP 產品在不同的純化階段及成為最終產物時的品質，我們一一建立不同測定產品濃度、純度及不純物的檢驗方法，已建立之方法摘述如下：

(a) 蛋白質濃度之測定—Bradford assay

取樣品及不同濃度 Bovine Serum Albumin 之標準液 800 µl，置入 1.5 ml 微量離心管中，加入 Bradford reagent 200 µl，震盪反應 5 分鐘，以波長 595 nm 測定其吸光值，再以 BSA 標準濃度曲線回歸得知樣品中蛋白質濃度。

(b) 純度--凝膠電泳 (SDS-PAGE)

如材料與方法所述

(c) 西方點墨法 (Western-blot)

如材料與方法所述

(d) 分子量分佈--高效能分子篩液相層析 (SEC-HPLC)

我們利用 TSK G4000swXL 管柱(TOSOH, 7.8 mm × 30 cm)，注入 200 µl 樣品，以 50 mM sodium citrate/ 0.1 M NaCl (pH 6.5)，流速 0.4 ml/min，分析樣品的 VLP (detection wavelength: 280 nm)。

(e) ELISA 活性測試

如材料與方法所述

(f) 內毒素測試:

內毒素測量方法是利用樣品與 *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) 在 37°C 反應後，樣品其中所含的 endotoxin 多寡會使試劑渾濁，造成吸光值的差異。與標準 endotoxin 樣品相比，可以算出樣品中所含有的 endotoxin 濃度。

(g) 殘留 host DNA 分析

殘留 host DNA concentration 是利用 Threshold total DNA assay (Molecular Devices Threshold System) 分析. Single-strand DNA 和 single-strand DNA binding protein (SSB) and urease-conjugated monoclonal anti-DNA antibody 反應後, 會形成 DNA complex。分析 urease 酵素活性可得殘留 DNA 濃度。

(h) 殘留 HCP (host cell protein) 分析

測量產品中剩餘之 Hi-5 細胞蛋白不純物是利用三明治 ELISA 法，應用已純化過的親和性捕捉抗體與待測物中 Hi-5 細胞蛋白結合，再利用可以辨識 Hi-5 細胞蛋白的抗體與整個複合物結合，因後者帶有 HRP 酵素，所以能與 TMB 反應而產生顏色。藉由讀取特定波長吸光值回推並與標準曲線比較，可以得知樣品中 Hi-5 細胞蛋白不純物殘餘量。

(i) 圓二色光譜 (circular dichroism) 分析

我們取 300 μ l 之 highly purified VLP (0.1 mg/ml, purity > 92%) 於 0.1 mm 光徑石英管，利用 Circular dichroism spectropolarimeter (JASCO model J815) 於遠紫外光波段 260 nm 至 190 nm 照射下的旋光度分析樣本，以比較其二級結構。我們使用網路上所提供的蛋白質二級結構分析軟體 DICHROWEB 來分析 VLP 的二級結構組成，套用分析程式 CDSSTR 和資料庫 Set 4 比對出 VLP 的二級結構百分組成。

(j) RP (reverse phase)-HPLC/MS 分析

我們將約 11.7 μ g 的 highly purified VLP 樣品，加入最終濃度為 6 M 的 Guanidine-HCl 及最終濃度 0.2 % formic acid，再與最終濃度 40 mM 的 TCEP (Tri(2-carboxyethyl)phosphine)，在 45°C 反應 1 小時。反應後樣品經 Zorbax C8 管柱 (2.1 \times 150 mm)，以緩衝溶液 A (0.05% trifluoroacetic acid (TFA)) 及緩衝溶液 B (0.05% TFA/90% acetonitrile) 分離後，分析產品純度並經質譜 (Finnigan LTQ XL linear ion trap mass spectrometer) 進行分子量分析。

(k) Peptide mapping & identification of disulfide bond position 分析

VLP 混合於 6M Guanidine-HCl 後，在 45 °C 反應 1 小時進行 denature，隨後利用 50 mM Tris buffer (pH 8) 進行兩倍稀釋，接著加入 1/50 (w/w) Endoproteinase Lys-C 於室溫下反應隔夜進行水解反應；最後加入 0.2% formic acid 終止反應(或加入 80 mM TCEP 於 37°C 反應 1 小時以打斷雙硫鍵)；之後將樣本進行 RP-HPLC-MS 分析。

上述建立的分析方法，可用於檢測不同批次純化出的 VLP 產品，以確保產品的品質。現階段我們就純化所得 EV71 VLP 訂定了產品規格如下：

Test item	Specification
pH	6.5 ±0.1
Protein concentration	0.3 mg/ml
Specific activity	0.15-0.3 mg/mg
Purity by SDS-PAGE	>90%
Identity by SEC-HPLC	RT= 19min
Particle size (light scattering)	30 nm
TEM	Icosahedral, 25-27 nm
Endotoxin	< 3000 EU/mg
Residual DNA	Ongoing
Residual HCP	Ongoing

6. VLP 蛋白特性之分析

(a) 圓二色光譜分析

圓二色光譜是利用左圓、右圓的平面偏振光照射有平面異構的光學分子，使不同的結構產生不同的圖形，為廣泛使用在研究勝肽和蛋白質二級結構構型的技術。我們依前述方法分析 VLP 的旋光度，以比較其二級結構。圖 31 顯示在遠紫外光波段 260 nm 至 190 nm 照射下，於 208 nm 及 216.5 nm 有波谷存在，因此推測其二級結構兼俱 α -helix 和 β -sheet，且 β -sheet 比例(28%)稍高於 α -helix (14%)。

(b) RP-HPLC/MS 分析

我們初步利用 RP-HPLC 連接 MS 進行 VLP 之純度與分子量分析時，發現天然的 VLP 分子量太大，無法吸附於 RP-HPLC column，皆於 flow through fraction 析出，而無法進行後續純度與分子量分析。因此我們將約 11.7 μ g VLP 先行還原使成 VP1, VP0, VP3，再注入 Zorbax C8 管柱搭配緩衝溶液 A 及緩衝溶液 B 分離後，經質譜分析 peak 之分子量。圖 32 顯示樣品中存在約 5 種不同分子量的蛋白質：A (34232 Da), B (28224 Da), C (35253 Da), D (35256Da), E (26416 Da)。依照 VLP 所含 subunit 蛋白質的胺基酸序列，VP0 的理論分子量為 35181.42 Da；VP1 的理論分子量為 32606.52 Da；VP3 的理論分子量為 26373.27 Da。peak C 與 D 應代表 VP0，peak E 代表 VP3，

但何者代表 VP1 待進一步分析確認。

(c) Peptide mapping & identification of disulfide bond position 分析

由於 VLP 包含 VP1, VP0 and VP3 三個蛋白質，進行勝肽圖譜分析並不容易，現正嘗試將純化後的 VLP 變性(denature)，然後與水解酵素反應，以進行雙硫鍵氧化及還原態之逆向層析勝肽圖譜實驗。

7. CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)相關資料之建立

本研究計畫執行至今，針對 EV71 VLP drug substance 原料藥部分以下列架構建立 CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)資料。由於部分實驗及分析尚未完全完成，目前先附上 CMC 資料目錄，詳細內容將於後續報告修正時附上。

Chemistry, Manufacturing and Control

Table of contents

- Introduction
- 1.1 Drug substance
 - 1.1.1 Characterization of the drug substance
 - 1.1.1.1 Structure
 - 1.1.1.1.1 primary structure
 - » DNA structure
 - » MW
 - » N-/C-terminal structure
 - » Peptide mapping
 - 1.1.1.1.2 *disulfide structure*
 - 1.1.1.1.3 Secondary CD analysis
 - 1.1.1.2 Solution properties
 - 1.1.1.2.1 Measurement of extinction coefficient
 - 1.1.1.2.2 light scattering
 - 1.1.1.2.3 Size exclusion chromatography
 - 1.1.1.3 Purity
 - 1.1.1.3.1 SDS-PAGE analysis
 - 1.1.1.3.2 Reversed phase HPLC
 - 1.1.1.3.3 Reference Standard
 - 1.1.2 Molecular biology
 - 1.1.2.1 Design, construction, and expression of the structural gene
 - 1.1.2.1.1 Sequence encoding the structure gene

- 1.1.2.1.2 Sequence encoding the full-length human structure gene
- 1.1.2.2 Construction and design of the expression vector
- 1.1.2.2.1 Construction of the structural gene
- 1.1.2.2.2 Description of the functional regions with the expression vector
- 1.1.3 production strain
 - 1.1.3.1 History of the parental Sf9, Hi5 cell line
 - 1.1.3.2 preparation of BacP1-3CD, recombinant baculovirus
 - 1.1.3.3 Cell banking system
 - 1.1.3.3.1 Research cell bank
 - 1.1.3.3.2 Research virus bank
- 1.1.4 Cell culture process: introduction and cell culture media
 - 1.1.4.1 Cell culture process flow chart
 - 1.1.4.2 Detail cell culture process description
 - 1.1.4.3 Cell culture raw materials
- 1.1.5 Purification process
 - 1.1.5.1 Purification process flowchart
 - 1.1.5.2 Detail purification process description
 - 1.1.5.3 Process reagents
 - 1.1.5.5 Purification raw materials
- 1.1.6 Drug substance specifications and test methods
 - 1.1.6.1 Specifications and test methods for bulk harvest
 - 1.1.6.1.1 Specification
 - 1.1.6.1.2 Description of bulk harvest test methods
 - » ELISA
 - » Western
 - 1.1.6.2 Specifications and test methods for purified bulk
 - 1.1.6.2.1 Specification
 - 1.1.6.2.1 Description of purified bulk test methods
 - » pH determination
 - » Protein concentration
 - » Specific activity
 - » SDS-PAGE
 - Identity by SEC- HPLC
 - » Particle size-dynamic light scattering (DLS)
 - » TEM
 - » Endotoxin

- » Residual DNA
- » Residual HCP

- 1.1.7 Drug substance stability

- Lot number
- Fill volume
- Container
- Strength (mg/ml)
- Manufacture date
- Most recent time point tested
- Analytical Method
 - pH
 - Protein
 - Osmolarity
 - SDS-PAGE
 - Particle size-dynamic light scattering (DLS)
 - TEM
 - ELISA

子計畫三、 腸病毒 71 型 VLP 疫苗免疫學平臺之建立

1. 製備檢驗用的單株與多株抗體

(a) 抗原製備

為製備用以檢測 VLP 的多株抗體以及作為抗原的腸病毒蛋白，我們用蔗糖梯度及氯化鈉梯度進行超高速離心分離出腸病毒顆粒。純化出的腸病毒顆粒分別以 SDS-PAGE 佐以西方點墨法來偵測病毒的純度以及專一性。我們再採用負染色於穿透式電子顯微鏡辨別腸病毒顆粒(圖 33)，結果顯示純化出的腸病毒為具有均一性，完整的 20 面體顆粒，其直徑約為 25-27 nm。

另外我們以帶有 pET28 α -VP1, 0, 3 之 ECOS1 大腸桿菌進行大量培養，並以 IPTG 誘發產生 VP1, VP3 或 VP0，以 SDS-PAGE 及西方點墨法偵測其蛋白表現情況，並進行純化。

(b) 兔子致敏及血清收集

我們接下來以純化後的抗原(EV71 病毒顆粒、VLP、VP1、VP3 或 VP0)施打實驗兔，在首次注射後第 2、4 週進行加強注射(booster injection)。注射後我們自耳部採血，經過不同倍率稀釋後，以 ELISA 測量每次加強注射後血清中抗體對病毒蛋白之力價變化。於加強注射後，病毒蛋白之專一抗體力價有上升的現象。再經過多次加強注射後，待抗體力價到達高點後，大量收取實驗兔多株抗體血清，所收集的各種血清交由子計畫二以

管柱層析法純化並定量。結果如表 5 所示。

(c) 單株抗體製備

為了能提供適當的檢測以及對腸病毒的定量，我們針對腸病毒的病毒蛋白製備單株抗體。小白鼠經過多次的抗原注射產生高量的專一性抗體，我們取得脾臟細胞與 SP2/0 細胞做融合，融合瘤細胞的培養上清液收集後，以 ELISA 篩選出含有專一辨識 VP3 的融合細胞，由於此時的細胞含有大量非專一性的融合瘤細胞(Hybridoma)，我們採用限數稀釋(Limiting Dilution)的方式來選取出專一性的單株融合瘤細胞，其篩選流程見圖 34A。在經過細胞融合後，我們選出了 5 群具有專一性的融合瘤細胞冷凍保存，其中的三群融合瘤細胞(30, 38, 54)，在經過限數稀釋後，針對其融合瘤細胞上清液中含有 VP3 專一性抗體做測試，我們根據 OD₄₅₀ 的結果選出含有最多專一性融合瘤細胞的細胞群(圖 34B; 30-86, 38-153, 54-90)，同樣的我們也對每一階段的融合瘤細胞冷凍保存與進行單株化的篩選。

老鼠免疫實驗及尋找最佳之佐劑

目前許可用於人類的佐劑有 aluminum salts 與 oil-in-water emulsion MF59，但目前尚有多種佐劑在研發中。為探討那一種佐劑用於 EV71 VLP 疫苗的效果較好，我們以小鼠實驗測試不同種類的佐劑。這些佐劑皆經過研究發表並進入臨床使用階段，包括 aluminum alhydrogel (alum, 為用於一般用途的 NALP3 促效劑); saponin 與 poly I:C (TLR3 促效劑); MPLA (TLR4 促效劑); imiquimod (TLR7 或 TLR8 促效劑)及 CpG (TLR9 配體)。這些佐劑都具有造成感染訊號並活化樹突細胞的能力。為測試每種佐劑對疫苗施打的效果，我們以單獨 VLP，或以 VLP 混合 complete Freund's adjuvant (CFA, 正對照組)或不同佐劑作為疫苗，施打小鼠並分析他們所引發的免疫反應。此外我們也單獨注射 saline 或 alum 作為負對照組。施打疫苗的時程表列於圖 35A。第二次施打後 2 週我們以 ELISA 測試小鼠血清內具 VLP 專一性的 IgG 含量(圖 35B 與 C)。圖 35C 顯示，在多種佐劑中 alum 及 saponin 誘發 IgG 的效果最佳，不但比單獨注射 VLP 要好($p < 0.01$)，也與 CFA 的效果相近。

此外我們以中和測試分析各組小鼠血清內的中和抗體效價(圖 35D)。與 IgG 結果吻合，alum 與 saponin 在多種佐劑中產生的中和效價最佳。與單獨施打 saline 的對照組比較，施打 VLP 混合 alum ($p < 0.01$)或 saponin ($p < 0.01$)的小鼠血清中和抗體均有顯著增加。由於佐劑可能影響 T helper 免疫反應，我們分析了血清中 IgG1 對 IgG2a 的比例。圖 35E 顯示 alum 會造成較高的 IgG1 對 IgG2a 的比例，表示以 alum 作為佐劑主要誘發 IgG1，其反應傾向 Th2 反應。其他佐劑包括 saponin ($p < 0.01$)、poly I:C ($p < 0.01$)、MPLA ($p < 0.01$)、imiquimod ($p < 0.05$)以及 CpG ($p < 0.01$)則是產生較相似量的 IgG1 和 IgG2a，顯示其反應較傾向 Th1 反應。因此 saponin 可以有效的產生具 VLP 專一性偏向 Th1 的免疫反應，而傳統使用的佐劑 alum 則可以有效的產生偏向 Th2 的免疫反應。

VLP 之疫苗效果測試(猴子實驗)

由于計畫二生產及純化之 VLP 已委由農委會家衛所注射至實驗猴上，第一次實驗猴測試於 97 年 12 月 9 日開始，並於第 2、6 及 34 週進行加強注射。我們利用軟體 ImageJ 分析 VLP 樣品的 SDS-PAGE 圖，可以得到純化後的 VLP 樣品純度約為 40.1 %。電子顯微鏡結果顯示，施打進入實驗猴體內的 VLP 其粒徑均一，約為 27 nm。實驗以去活化 EV71 作為正對照組實驗並以不同劑量(20, 50 或 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$)VLP 混和佐劑(Alum)注射至實驗猴之肌肉。

第二次猴子免疫實驗已於 98 年 11 月 10 日開始，預計於第 4 及第 12 週進行加強注射。本次實驗所用樣品為純度大幅提升的 VLP (純度 $>92\%$)，分別以不同劑量(20 或 100 $\mu\text{g}/\text{dose}$)VLP 混和佐劑(Alhydrogel)注射至實驗猴之肌肉。正對照組則是 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$ 去活化 EV71。我們已於免疫前抽取血清，並預計於注射疫苗後第 4 週及不同時間點採血，以進行各項體液免疫反應、細胞免疫反應及免疫記憶分析。

體液和細胞免疫反應檢測系統之建立

第一次猴子免疫實驗時，我們在不同時間點採血並以 ELISA 測試血清抗體力價(圖 36)。由結果可以觀察到實驗猴經注射去活化 EV71 及 VLP 蛋白後抗體力價均有提升的現象，且明顯看出 VLP 誘發的 IgG 抗體強度遠高於去活化 EV71 對照組。此外，注射 VLP 疫苗產生的抗體效價可維持至少 32 週，並且在 34 週加強注射後很快就快速上升，暗示注射的 VLP 疫苗應有產生免疫記憶。

接下來我們進行中和抗體力價實驗(neutralization assay) 來確認由 VLP 所誘發的抗體能否成功預防不同基因型腸病毒的感染。首先我們將不同倍率稀釋之實驗猴血清與 100 TCID₅₀ EV71 病毒液混合反應(中和)2 小時，再加入 RD 細胞進行中和測試。圖 37 顯示以腸病毒 C2 基因型進行的實驗結果，可看出經第一次加強注射後，施打去活化 EV71 組明顯比 VLP 組力價較高，但經第二次加強注射後，施打 50 $\mu\text{g}/\text{dose}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$ VLP 的組別，其中和病毒力價明顯升高，且與施打去活化 EV71 組的中和病毒力價相當。我們也以腸病毒 B5 基因型進行相同實驗，可以得到類似的結果(圖 38A)。值得注意的是，中和抗體力價與 IgG 抗體力價有相同的 time course profile, 均可維持一定力價至 34 週，且在 34 週進行加強注射後很快就快速上升。接下來我們測試在施打第一次疫苗 8 週後，血清中抗體針對往年主要流行 EV71 病毒株(包括 C2、B4、C4、C5、B5 基因型)的中和力價(圖 38B)。結果顯示，不論何種腸病毒基因型都可被實驗猴施打 VLP 後血清中的抗體中和，而避免 RD 細胞產生細胞病變。

為測試細胞免疫反應，我們取注射疫苗 11 天後的實驗猴的周邊單核細胞，進行細胞增生實驗及細胞激素測定。我們以 RPMI 培養基(對照組)、去活化 EV71 或 VLP 刺激周邊單核細胞中 T 細胞使其增生。第 5 天後我們分析其增生指數(stimulation index)，發現相較於 RPMI 控制組，以去活化 EV71 或 VLP 刺激實驗猴周邊單核細胞均可刺激其顯著增生(圖 39)。此外我們也發現以 VLP 或去活化 EV71 的實驗組比起 RPMI 控制組，可以刺激較多細胞激素 IFN- γ 與 IL-5 表現(圖 40 A, B)。

記憶免疫反應檢測系統之建立

為了建立記憶免疫反應檢測系統，並測試 B 細胞是否能產生對 EV71 的記憶反應，我們取得施打疫苗之後 11 天的實驗猴靜脈血，並以 ELISPOT 實驗測試血液中分泌 EV71 專一性 IgG 抗體的細胞(antibody-secreting cells, ASCs)含量。在本實驗中以 IgG 抗體分泌細胞總量作為內控制組，並偵測對 EV71 及 VLP 均具專一性的 IgG 抗體分泌細胞含量。圖 41A 乃是 ELISPOT 實驗所呈現的結果，每一個在硝基纖維素膜(nitrocellulose membrane)上的紅點代表一顆 IgG 抗體分泌細胞，至於此顆 IgG 抗體分泌細胞的專一性乃是由膜上所吸附的抗體或抗原所做決定。圖上乃是未施打疫苗與施打 VLP 疫苗的代表性結果，當膜上沒有吸附任何抗體時則沒有紅點產生；當膜上吸附了抗人的 IgG 抗體則會有許多的紅點產生，代表了每一顆可分泌 IgG 的細胞(total IgG ASC)；至於當膜上吸附了 VLP 或 EV71 時，其所偵測的乃是可辨識 VLP 或 EV71 的專一性 IgG 抗體分泌細胞(VLP-IgG-ASC or EV71-IgG-ASC)。由此結果可辨識未施打疫苗的猴子血液中並沒有 VLP 或 EV71 的專一性 IgG 抗體分泌細胞。至於施打 VLP 疫苗的猴子則可以偵測到可辨識 VLP 或 EV71 的專一性 IgG 抗體分泌細胞。經過計算可得知各組 IgG 抗體分泌細胞的總量，在比較各種疫苗對 IgG 抗體分泌細胞的總量的影響，可以得知未施打疫苗與施打去活化 EV71 疫苗 (inEV71)或 VLP 疫苗的實驗猴血液中所含有的 IgG 抗體分泌細胞總量並不會因為疫苗的不同而有所差異(圖 41B)。由於未施打疫苗的實驗猴不會偵測到對 VLP 具專一性的 IgG 抗體分泌細胞，因此我們偵測到的可辨識 VLP IgG 抗體分泌細胞為經過疫苗施打後所產生的具有專一性的細胞。相對於施打 VLP 的實驗猴，施打去活化腸病毒蛋白的實驗猴血液中含有可辨識 VLP 的 IgG 抗體分泌細胞量較低。在施打 200 μ g VLP 的實驗猴，其 IgG 分泌細胞總量最多可到達 10%是對 VLP 具有專一性的(圖 41C&E)。由於疫苗的保護力是在辨識病毒並中和其感染力，因此我們也偵測了 IgG 抗體分泌細胞具有可辨識結構完整的 EV71 病毒，結果顯示施打過 VLP 疫苗可以引起實驗猴對於完整結構的腸病毒產生明顯免疫反應，在施打 200 μ g VLP 的實驗猴，其 IgG 分泌細胞總量最多可到達 9%是對 EV71 具有專一性的(圖 41D&F)。此外，比較施打去活化腸病毒蛋白以及不同量的 VLP (20 μ g、50 μ g 或 200 μ g)各組的結果，其所產生具專一性的 IgG 抗體分泌細胞以施打 200 μ g VLP 的效果最佳，然而在統計上由於樣品數量太低，分析結果並無明顯差異(圖 41 C-F)。

結 論

子計畫一首先評估使用 *Pichia pastoris*、Bac-P1-3CD/Hi-5 或 Bac-P1-C3CD/Sf-9 系統生產 VLP 的優缺點。*Pichia pastoris* 無法成功表現 VLP，而 Bac-P1-C3CD/Sf-9 系統生產的 VLP 可有大量表現，且在小鼠中誘發的抗體反應與以 Bac-P1-3CD/Hi-5 所生產的 VLP 產生的抗體反應相似，但在生產時會有較嚴重降解問題，因此最後我們選擇應用 Bac-P1-3CD 感染 Hi-5 細胞以生產 VLP。我們也已重新製備新的 Bac-P1-3CD 零代病毒做為保存用病毒種庫。目前實驗室反應器的 VLP 生產與純化流程也已建立，可供實驗室持續生產 VLP 之用。本計畫也建立以 Dynamic Light Scattering (DLS) 粒徑分析儀檢驗 VLP 穩定性的方法。配合電子顯微鏡觀察，我們證實 VLP 在 PBS 及不同的緩衝液、溫度(高達 37°C)及穩定劑內均有相當好的穩定性，保存 4 週粒徑也無明顯變化。有利未來 VLP 的應用及保存。我們也改良 ELISA 各步驟所使用的材料及方法，使各獨立實驗中的標準曲線有相近斜率， R^2 值都在 0.99 以上，顯示在線性偵測範圍內(0-0.25 $\mu\text{g/ml}$)具有良好的再現性。且 ELISA 對 VLP 偵測具有良好的專一性。我們也針對子計畫一所開發的各實驗流程建立標準操作程式(SOP)及工作表單。

子計畫二以 Bac-P1-3CD 生產 EV71 VLP 的製程，已由 250 ml 搖瓶逐步放大至 2 L、5 L 及 20 L 生物反應器，生物反應器中之產量均可達 5-10 mg/L。VLP 回收及樣品濃縮係以離心及 1000 kD 超濾膜進行，濃縮倍數最高可達 40 倍，回收率可達 70-80%。目前最佳管柱層析搭配膜過濾之純化製程，為以 1000 kD 超濾膜進行 VLP 細胞上清液的濃縮並將緩衝液置換為 50 mM sodium citrate/0.1 M NaCl (pH 6.5)，而後在相同的緩衝溶液中利用分子篩層析膠體進行第一步管柱層析純化，收集 F2 分液並置換緩衝液為 5 mM sodium phosphate (pH 6.5)後，利用 hydroxyapatite 膠體進行第二步管柱層析純化。利用不同磷酸鈉濃度梯度沖提，於 100 mM 磷酸鈉濃度沖提出的 VLP 純度可達 92%以上。此製程所生產純化所得的高純度 VLP 已提供子計畫三用於新的猴子實驗。子計畫二也已建立 in-process 與 final drug substance 純度檢驗方法及規格，以及建立 VLP 蛋白特性之分析與方法。

子計畫三已製備數種可偵測 EV71 蛋白或 VLP 的單株與多株抗體，並在小鼠實驗中測試不同種類的佐劑效果。初步結果顯示 aluminium alhydrogel 以及 saponin 能提供最佳的輔助效果，不過 aluminium alhydrogel 引發的細胞免疫反應較傾向 Th2，saponin 所引發的反應較偏向 Th1。由於兩者皆可產生等量具中和腸病毒的抗體，我們目前正朝著它們在黏膜組織上的差異做比較，分析兩者在可分泌至腸胃道中的並且具專一性的 IgA 是否有差異。子計畫三也已建立體液免疫反應、細胞免疫反應及記憶免疫檢測系統。在第一次的獼猴免疫實驗中我們發現，獼猴經由施打 EV71 VLP 產生的抗體效價遠高於施打去活化 EV71 病毒所產生的抗體效價。血清中和試驗也顯示 VLP 誘發的抗體對病毒的中和能力與以去活化 EV71 病毒誘發的抗體能力相當，並具有廣效性的抗體可中和不同

基因型的腸病毒 EV71。針對白血球所作的分析，我們也可以偵測到專一性分泌 IFN- γ 的 T 細胞與分泌 IgG 的 B 細胞，顯示施打 VLP 疫苗後的獼猴已建立抗腸病毒的記憶反應。第二次實驗猴測試於 98 年 11 月 10 日進行疫苗施打並進行採血，於 11 月 24 日採血測試 IgG 抗體力價以及進行中和測試，預計於 12 月完成實驗。

總結來說，為達成『發展類病毒顆粒為抗腸病毒 EV-71 疫苗的技術』此一目標，本計畫之所有相關人員皆盡心盡力完成相關製程開發，相信藉由子計畫間的努力及合作，能夠使得腸病毒 71 型類病毒顆粒疫苗的發展大幅前進，使得我國對於未來可能爆發的腸病毒 71 型疫情能夠具備完善且主動的應變能力。目前已達成多數執行目標與里程碑，但有少部分里程碑(如第二次獼猴實驗及 CMC 資料建立)因時間緊迫而尚未完全達成目標，目前正加速進行中，希望能於 2 月底前完成。本計畫所列各里程碑及完成情形請見下表。

子計畫一：腸病毒 71 型 VLP 疫苗實驗級技術平臺之建立

項次	項 目	完成時間
1	確認 VLP 生產系統	已完成
2	建立病毒種庫	已完成
3	建立實驗室級反應器 VLP 生產流程	已完成
4	VLP 穩定性與量化之相關檢驗技術之建立	已完成
5	建立標準操作程序 SOP	已完成

子計畫二：腸病毒 71 型 VLP 疫苗量產級技術平臺之開發

項次	項 目	完成時間
1	昆蟲細胞種庫(及桿狀病毒工作種庫)之建立	已完成
2	提供約 20 mg 高純度 VLP (純度高於 90%) 以供動物實驗及相關實驗	已完成部分並持續進行中
3	最適化 VLP 生物反應器量產(2 L-20 L)製程技術	已完成
4	最適化管柱層析搭配膜過濾之純化製程，並建立純度檢驗方法及規格	已完成
5	VLP 蛋白特性之分析與方法之建立	已完成部分並持續進行中
6	CMC 相關資料之建立	已完成部分並持續進行中

子計畫三：腸病毒 71 型 VLP 疫苗免疫學平臺之建立

項次	項 目	完成時間
1	腸病毒 71 型蛋白多株及單株抗體製備	已完成部分並持續 進行中
2	小鼠及兔子免疫實驗及免疫反應(體液及細胞 反應)分析	已完成
3	最佳佐劑之測試	已完成
4	猴子免疫實驗及其免疫反應(體液及細胞反 應)分析	已完成部分並持續 進行中

參考文獻

- Chung Y-C, Ho M-S, Wu J-C, Chen W-J, Huang J-H, Chou S-T, Hu Y-C. 2008. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 26: 1855-1862.
- Hu Y-C, Hsu T-A, Huang J-H, Ho M-S, Ho Y-C. 2003. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett* 25: 919-925.
- Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, Shi L. 2006. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci* 95: 2195-2206.
- Shi L, Sanyal G, Ni A, Luo Z, Doshna S, Wang B, Graham TL, Wang N, Volkin DB. 2005. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *J Pharm Sci* 94: 1538-1551.
- Shih SR, Li YS, Chiou CC, Suen PC, Lin TY, Chang LY, Huang YC, Tsao KC, Ning HC, Wu TZ, Chan EC. 2000. Expression of capsid protein VP1 for use as antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection. *J Med Virol* 61: 228-234.

圖 表

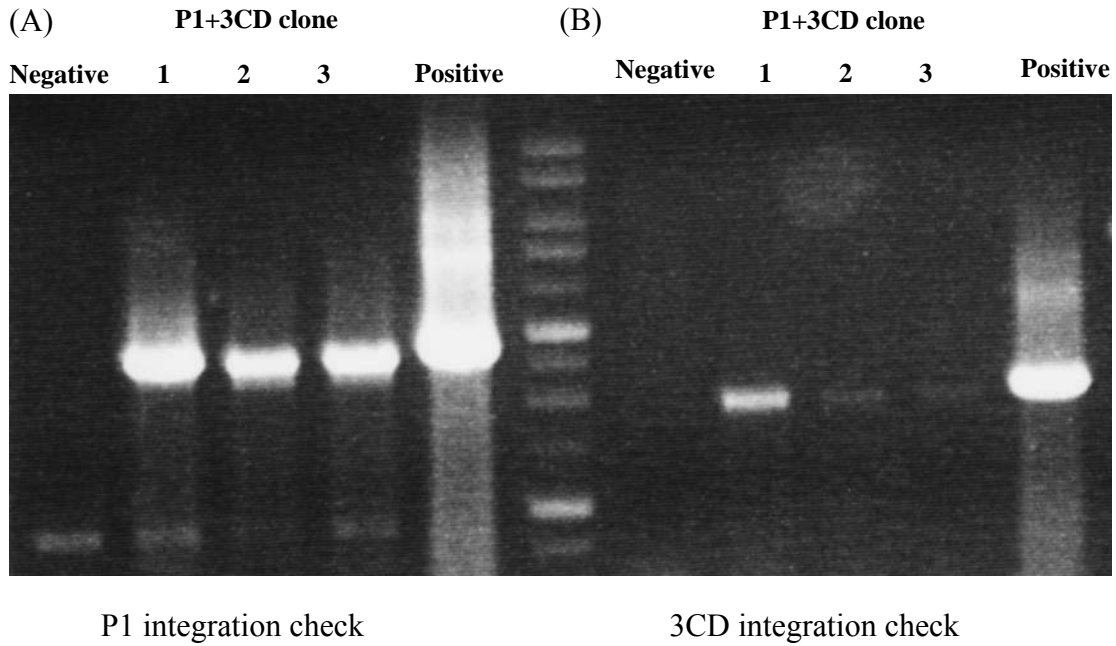


圖 1、使用 PCR 檢測 3 個植入 P1-3CD 基因的 *Pichia pastoris* 酵母菌株。(A) P1 基因確實有嵌入 3 個 clone 的染色體中。(B) 3CD 基因確實有嵌入 3 個 clone 的染色體中。

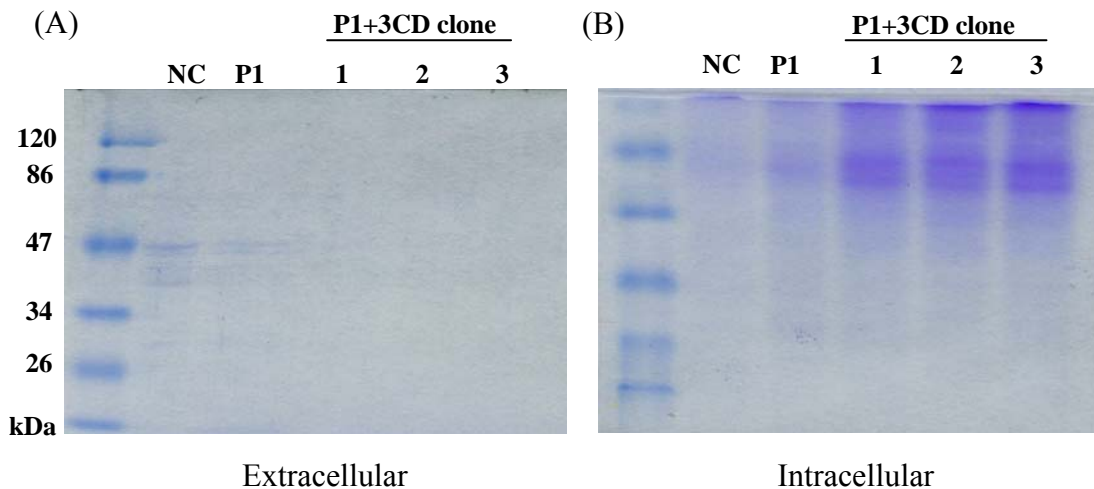


圖 2、使用 SDS-PAGE 檢測 3 個植入 P1-3CD 基因的 *Pichia pastoris* 酵母菌株是否有生產 VLP 的能力。(A) 三個 clone 的胞外細胞培養液中並未偵測到 VLP 的結構蛋白質 VP1。(B) 三個 clone 的細胞萃取液(cell lysate)也未偵測到 VLP 結構蛋白質 VP1。此結果另外也以西方點墨法確認(data not shown)。

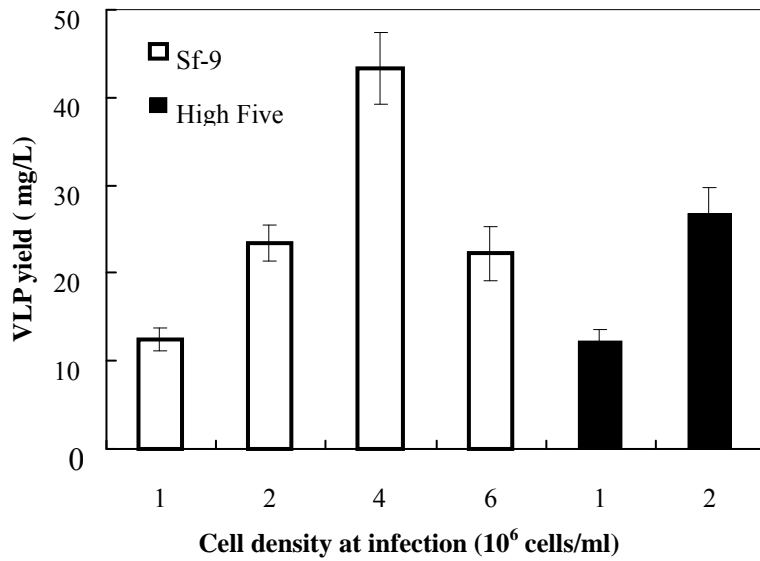


圖 3、不同細胞濃度對於腸病毒 71 型類病毒顆粒產量的影響。當 Sf-9 細胞 (□) 濃度約達 1-, 2-, 4-或 6×10^6 cells/ml 時，我們以 Bac-P1-C3CD 感染細胞(MOI 10)。或者當 Hi-5 細胞(■)濃度達 1-或 2×10^6 cells/ml 時，我們以 Bac-P1-3CD 感染細胞(MOI 10)。

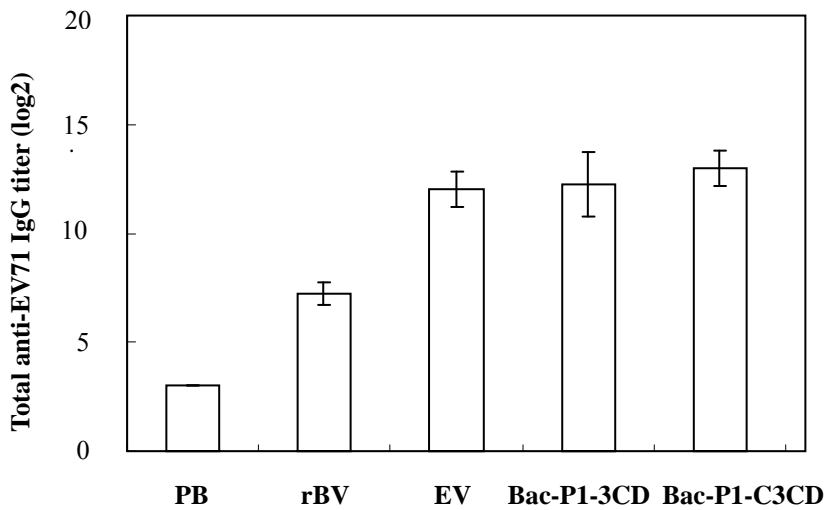


圖 4、純化後類病毒顆粒注射於小鼠所引發的血清中 anti-EV71 IgG 抗體效價分析。

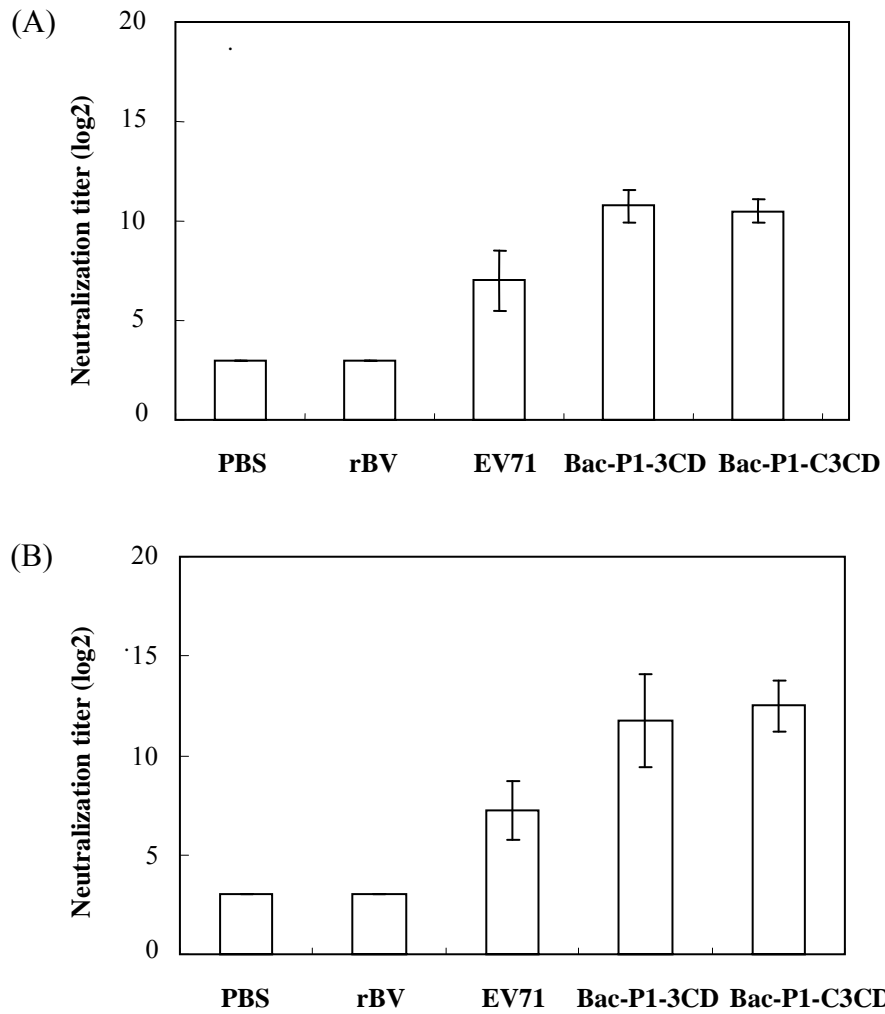


圖 5、類病毒顆粒所誘發的抗體對於不同腸病毒株的中和效價測試。(A) 血清對於腸病毒株 TW/2272/98 (genogroup C2)的中和效價。(B) 血清對腸病毒 71 型 20080738 (genogroup B5)的中和效價。

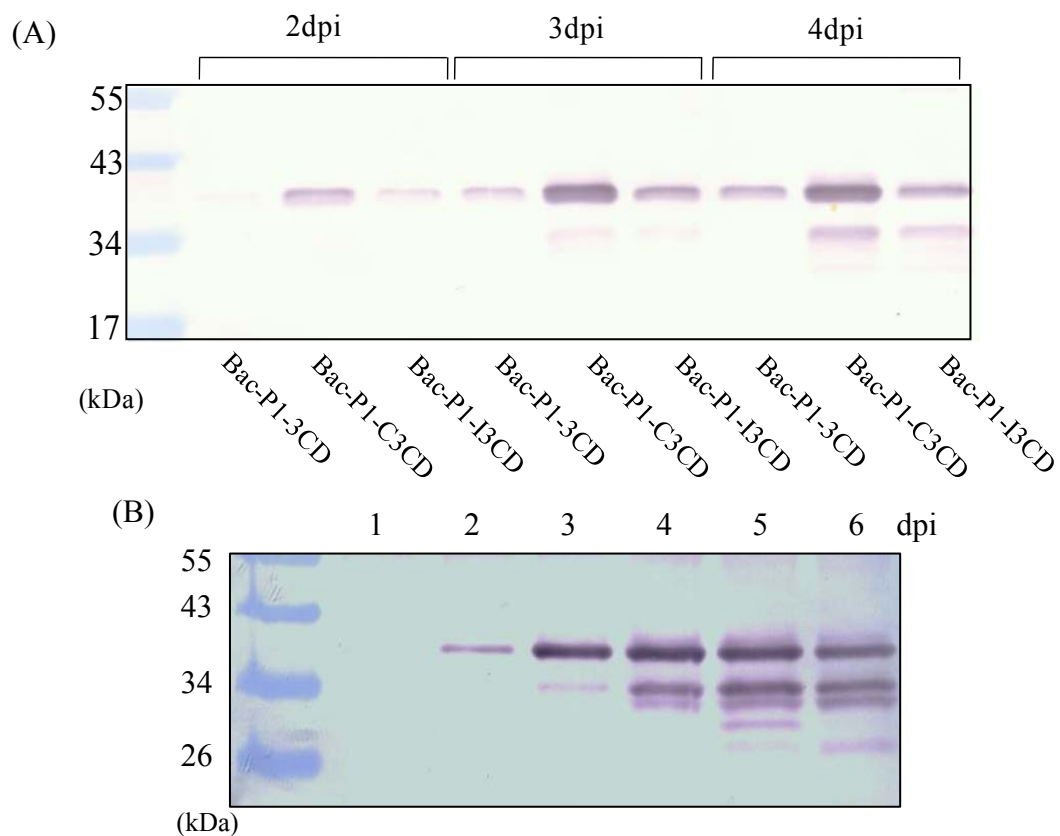


圖 6、不同生產系統與抗體偵測 VLP 的差異。(A) 以三種病毒株(Bac-P1-3CD, Bac-P1-C3CD, Bac-P1-I3CD)感染 Sf-9 細胞，在感染後 2, 3 或 4 天(days post-infection, dpi)以 anti-VP1 抗體(感謝何美鄉教授提供)進行西方點墨法分析;(B) 以 Bac-P1-C3CD 感染 Sf-9 細胞，在感染後 1 至 6 天以 anti-VP1 (由子計畫三江伯倫教授提供)抗體進行西方點墨法分析。上述的實驗皆於 100 ml spinner flask 操作，當細胞濃度約達 1×10^6 cell/ml 時，以 MOI 10 感染細胞，在特定時間點上收取細胞液，以低速離心將細胞離心下來，收取上清液作為胞外 VLP 樣品，實驗中所使用的培養基皆為 SF-900II。

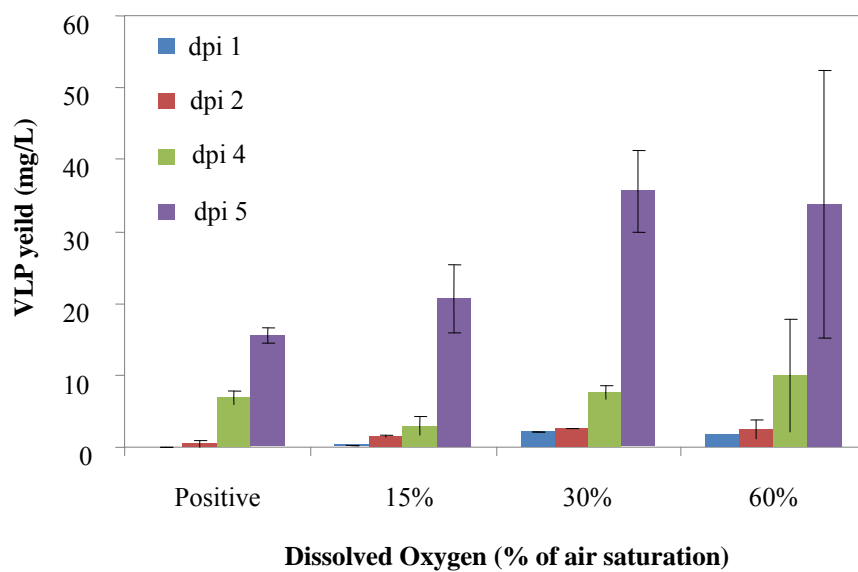


圖 7、BIOSTAT[®] B 反應器內不同溶氧量對於 VLP 產率的影響。感染條件： 4×10^6 cells/ml, MOI 10。實驗正對照組(positive)是於旋轉角瓶(無控制溶氧量)內以相同感染條件生產的 VLP 產量。實驗結果為兩次獨立細胞培養實驗的產量。

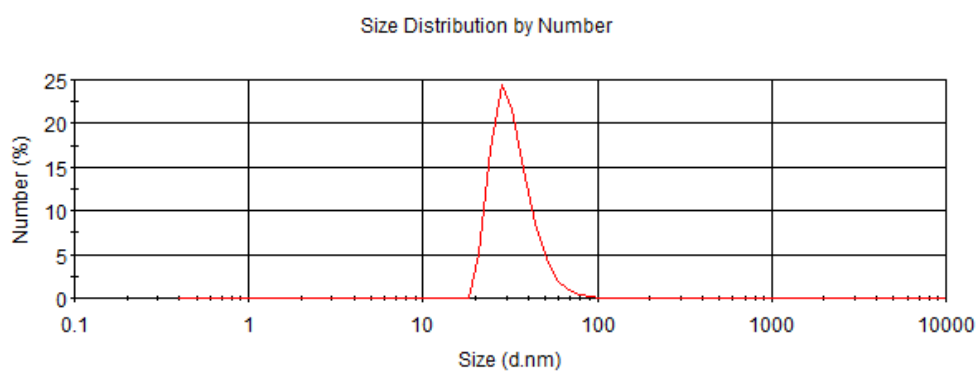


圖 8、VLP 以 DLS 量測所得之粒徑分佈圖，其平均粒徑約為 30 nm。

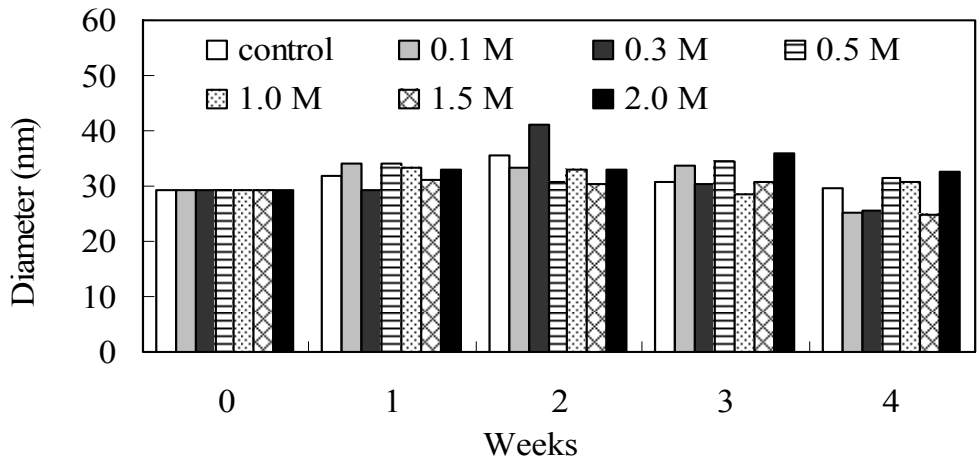


圖 9、VLP 在不同 NaCl 濃度中的穩定性測試。將 VLP 樣品(50 $\mu\text{g/ml}$)置於含有不同 NaCl 濃度的 PBS 溶液中，鹽類濃度分別為: 0 M (control), 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M 以及 2.0 M，並將樣品置於 4°C 冰箱。接著以 DLS 在不同的時間點量測 VLP 粒徑大小。

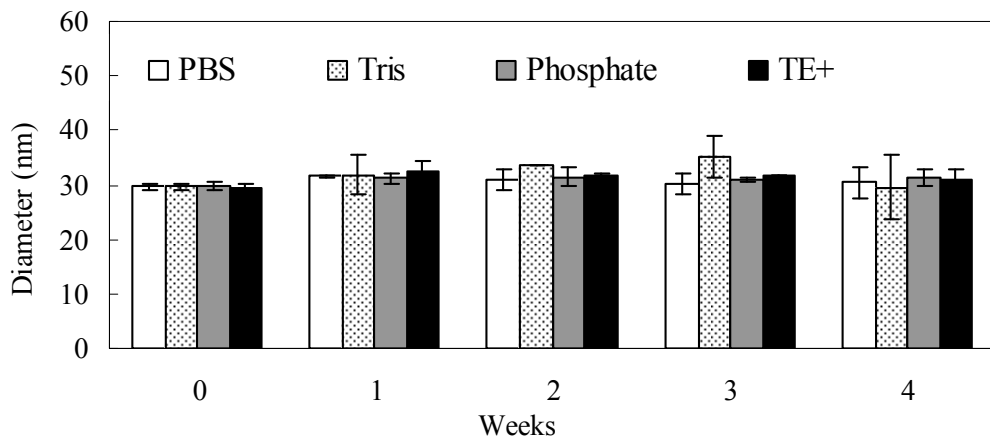


圖 10、VLP 在不同保存緩衝液的穩定性測試。將 VLP (50 $\mu\text{g/ml}$)置於不同的緩衝液中，分別為: PBS (pH 7.4)，Tris (50 mM, pH 7.4)， Phosphate (50 mM, pH 7.4)及 TE⁺ (40 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4)，再將樣品保存於 4°C 冰箱，以 DLS 量測不同的時間點 VLP 粒徑大小。

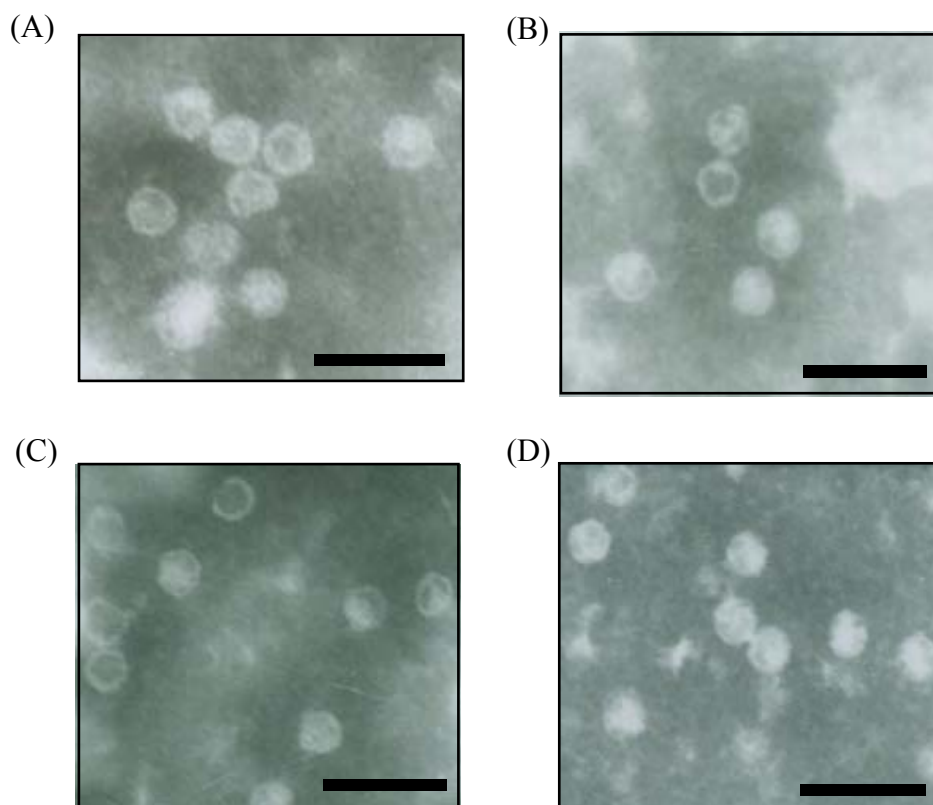


圖 11、以 TEM 觀察 VLP 的顆粒完整性。對照組: (A) 保存在 PBS 緩衝液第 0 天(剛解凍於-80°C)之 VLP。實驗組: (B) 保存在 PBS 緩衝液第 3 週之 VLP。(C) 保存在 Tris 緩衝液第 3 週之 VLP。(D) 保存在 Phosphate 緩衝液第 3 週之 VLP。實驗組所有 VLP 樣品的保存環境皆為 4°C。黑色 bar: 100 nm。

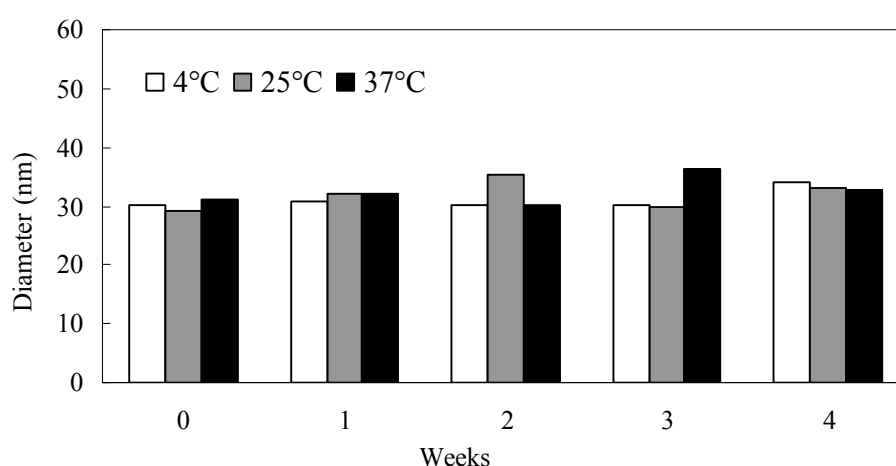


圖 12、VLP 在不同保存溫度下的穩定性測試。將 VLP (50 µg/ml)溶於 PBS 緩衝液中，並保存 4°C、25°C 或 37°C，實驗的時間為 4 週，以 DLS 量測不同時間點 VLP 粒徑的大小。

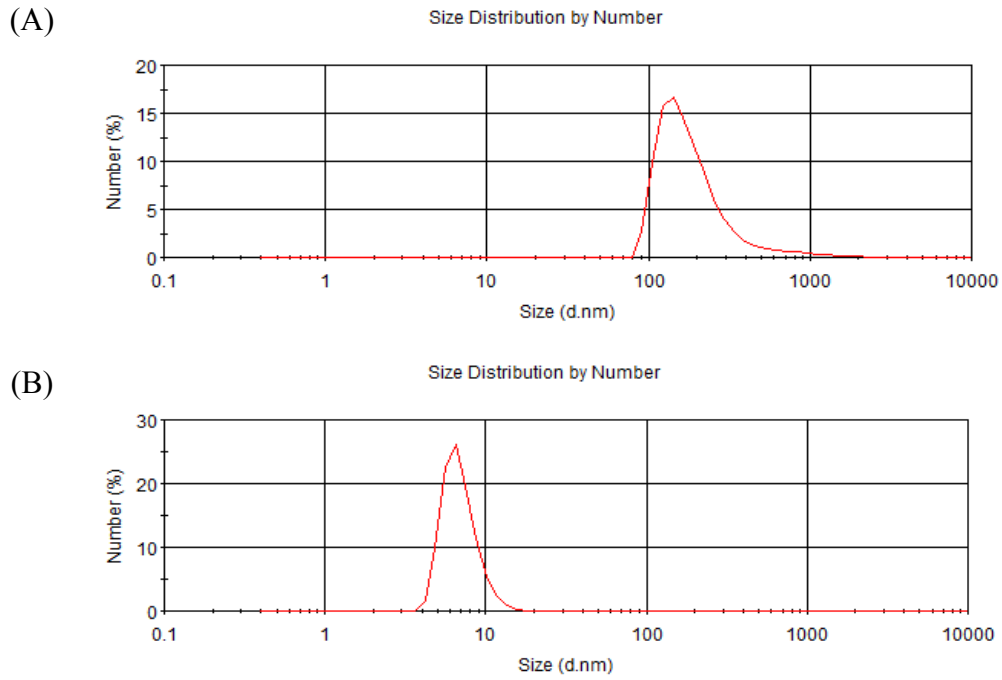


圖 13、VLP 經不同條件處理的粒徑變化。(A) 將保存於 PBS 緩衝液中之 VLP 加熱至 70°C 反應 30 分鐘，並於 25°C 靜置兩天，以 DLS 量測 VLP 粒徑為 240 nm。(B) 添加 2% 的 PS80 至 VLP 中，於室溫下反應 1 天後以 DLS 量測，VLP 粒徑為 6 nm。

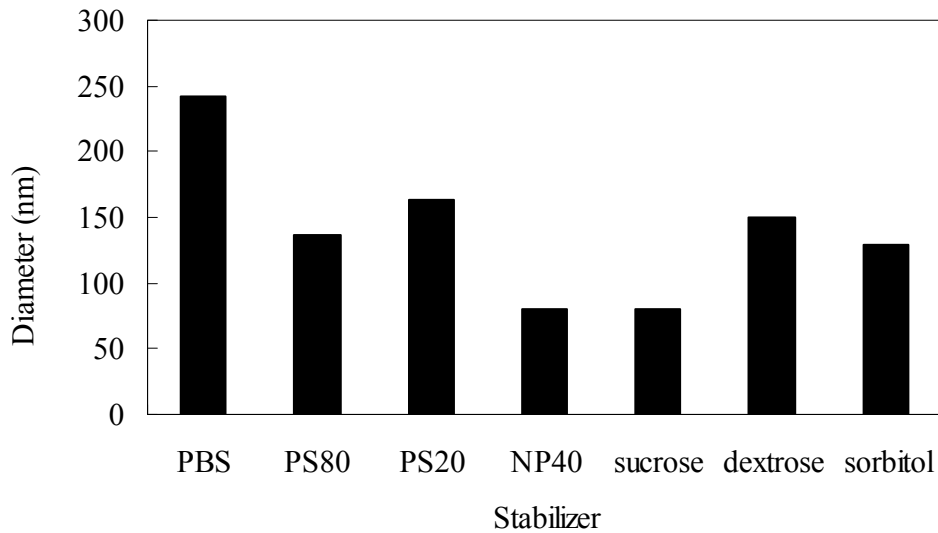


圖 14、VLP 在不同保存緩衝液的穩定性測試。VLP (50 µg/ml) 置於含有不同穩定劑 (0.01 % PS80、0.01 % PS20、0.01 % NP40、10 % sucrose、10 % dextrose 及 10 % sorbitol) 的 PBS 緩衝液中，並加熱至 70 °C 反應 30 分鐘，接著於 25°C 靜置兩天，最後以 DLS 量測 VLP 粒徑大小。

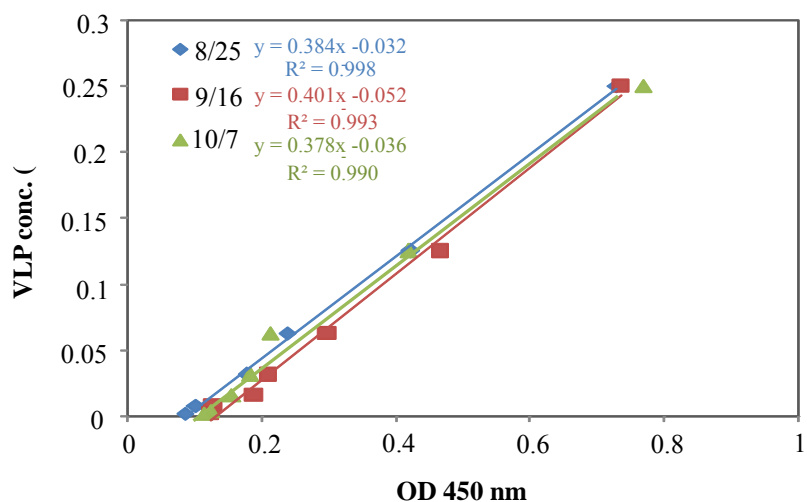


圖 15、三次獨立 ELISA 實驗(分別於 8/25、9/16 及 10/7 進行)的標準曲線。

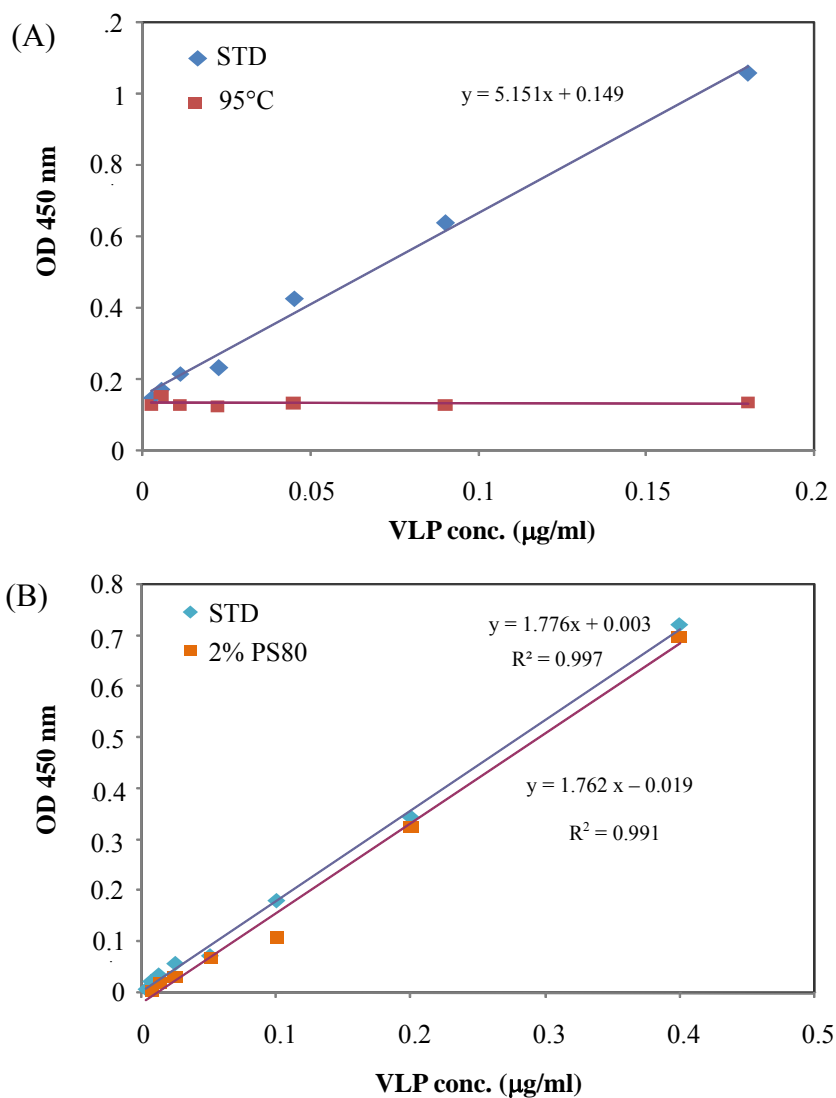


圖 16、ELISA 對於變性後 VLP 的蛋白結構及顆粒完整性之辨認性。

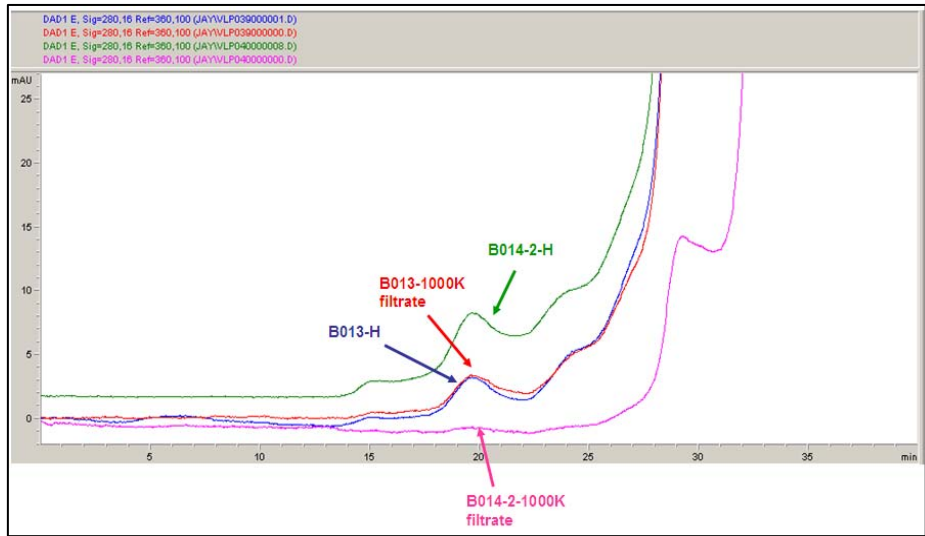


圖 17、以生物反應器槽體九成(3CD-98B013)或七成(3CD-98B014)為工作體積，測試不同工作體積之 VLP 回收率。移除細胞後之 VLP 以超濾膜(MWCO:1000K) / 0.5m² 濃縮過濾，再以 SEC-HPLC (TSK G4000 SWXL)分析其濾出液，VLP 應位於 RT ~20 min 之樣品峰。以槽體九成之工作體積操作之樣品，其收成(B013-H)與超濾膜處理後之濾出液(B013-1000K filtrate)相似，顯示 VLP 無法以超濾膜回收；而以槽體七成之工作體積操作之樣品，VLP 出現於收成時(B014-2-H)而未出現於超濾膜處理後之濾出液(B014-2-1000K filtrate)，表示工作體積可能會影響 VLP 顆粒大小。

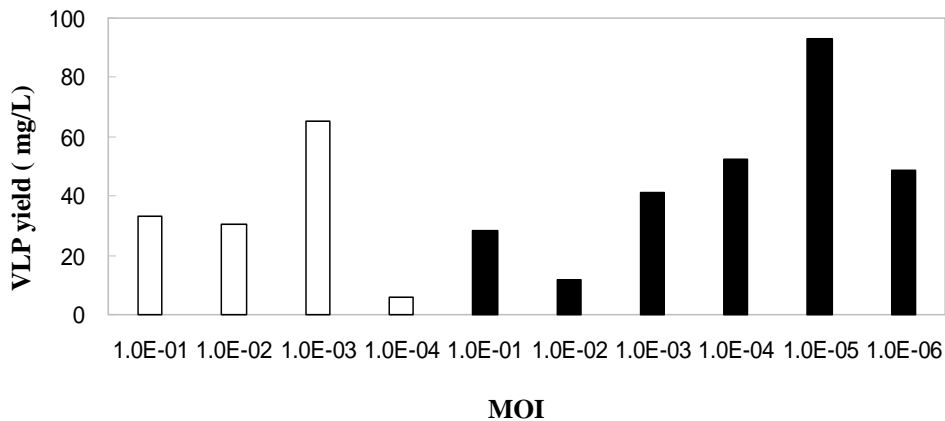


圖 18、於搖瓶中以不同 MOI 之 Bac-P1-C3CD 病毒株感染 Sf-9 (white bars)與 Hi-5 (back bars)細胞株所生產 VLP 之產量。以 0.001 MOI 感染 Sf9 細胞得到最高 VLP 產量(65 mg/L)，以 0.00001 MOI 感染 Hi-5 細胞得到最高 VLP 產量(98 mg/L)。

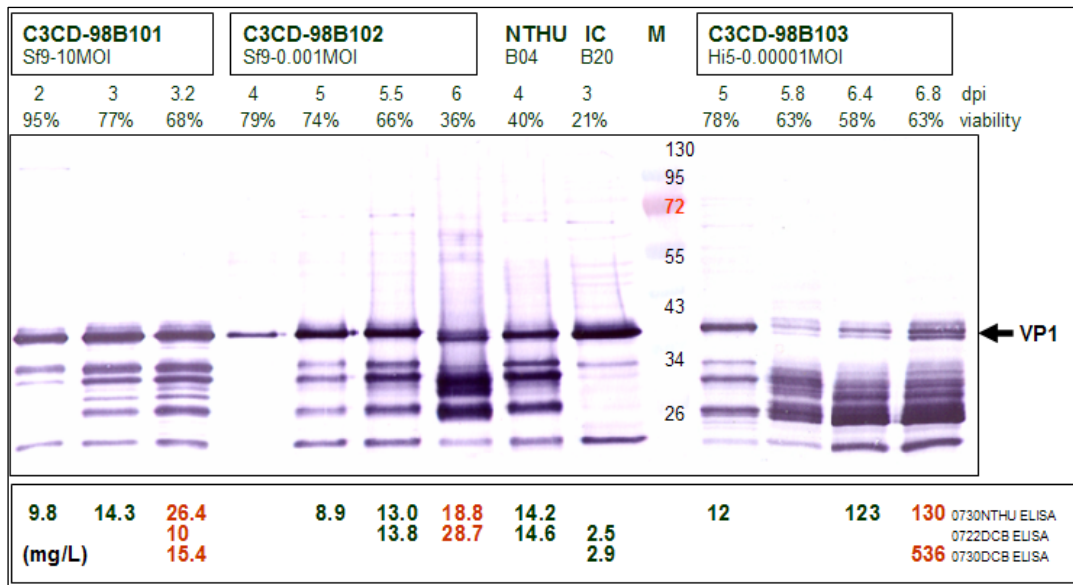


圖 19、以西方點墨法及 ELISA 分析 5 L 生物反應器之 EV71 VLP 產出情形。共分析 C3CD-98B101, 102, 103 三槽，以清大提供之樣品(NTHU B04)及 P1-3CD (IC B20)作為對照。西方點墨法之一次抗體為 mouse-anti-VP1 多株抗體，二次抗體為 goat-anti-mouse IgG-AP conjugate。ELISA 之吸附抗體為 rabbit-anti-VLP 多株抗體，偵測抗體為結合生物素(biotin)的 anti-EV71 單株抗體。dpi: day post-infection; viability:收成細胞液時的昆蟲細胞存活率。西方點墨法下方的數字為分別為清大或生技中心以 ELISA 分析所得的 VLP 濃度。

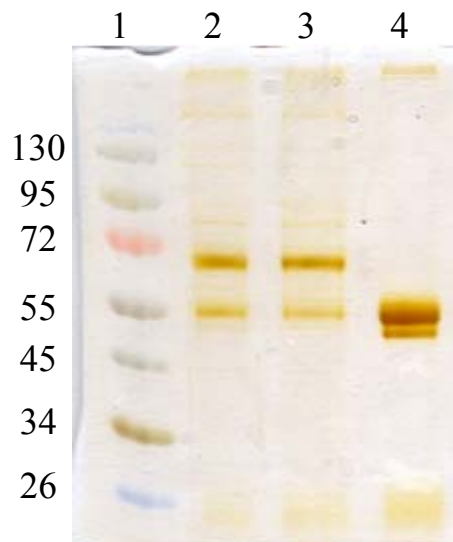


圖 20、利用 SDS-PAGE 分析 anti-VLP 抗體之純度。Lane 1: Prestain marker; Lane 2: G25 load; Lane 3: Protein A loading sample; Lane 4: Purified anti-VLP antibody

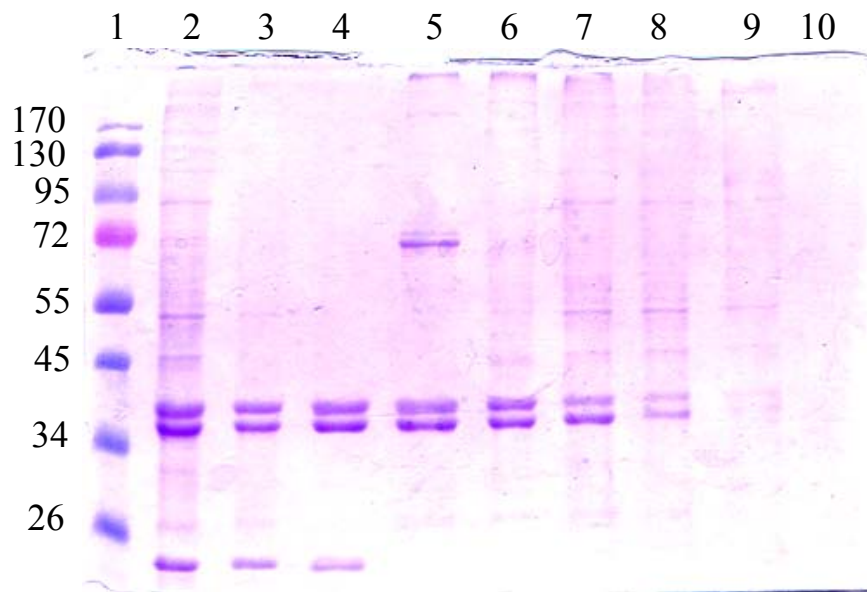


圖 21、以 SDS-PAGE 分析以陰離子交換樹脂 Q column 進行第二步純化所得各分液。Lane 1: Prestain marker; Lane 2: load; Lane 3: Flow through (FT); Lanes 4-10: 以不同濃度 NaCl (0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.35M, 0.4M, 0.5M, 1M) 沖提下來的樣品。

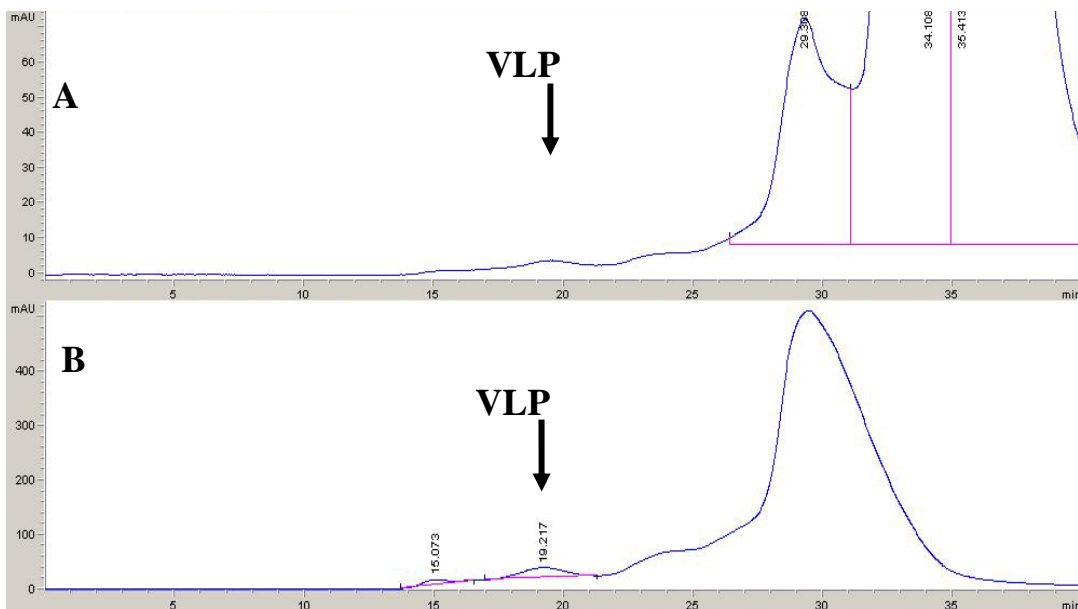


圖 22、以 TSK-G4000swXL 分析培養收成液經由 1000 K 超過濾膜濃縮後的 VLP。A: 細胞上清液; B: 濃縮及置換緩衝液後之樣品液。

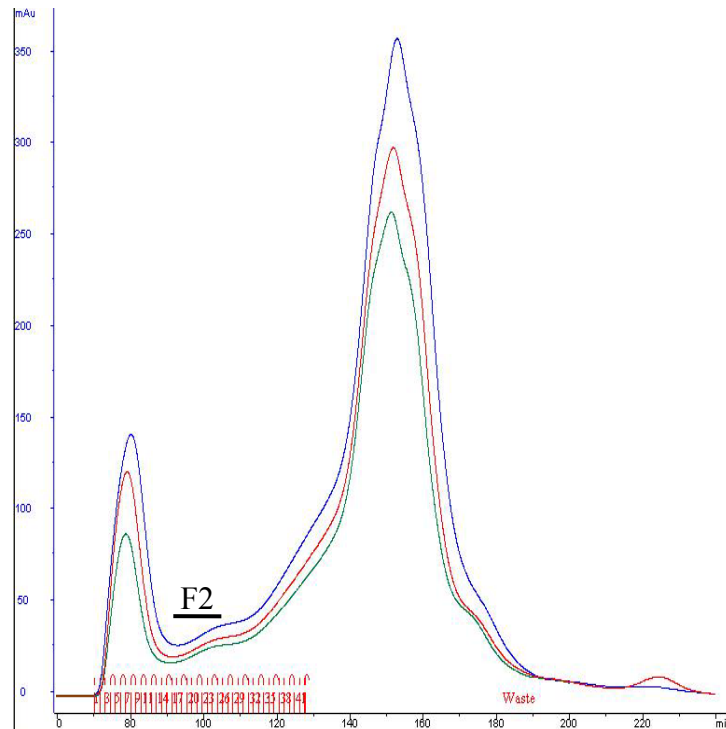


圖 23、S-400 SEC 管柱層析法之 chromatograph。純化用管柱為 5×95.5 cm，純化樣品為以 Bac-P1-3CD 感染的 Hi-5 細胞培養液(5 L)，經由 1000 K 超過濾膜濃縮。收集 F2 部份進行後續純化步驟。

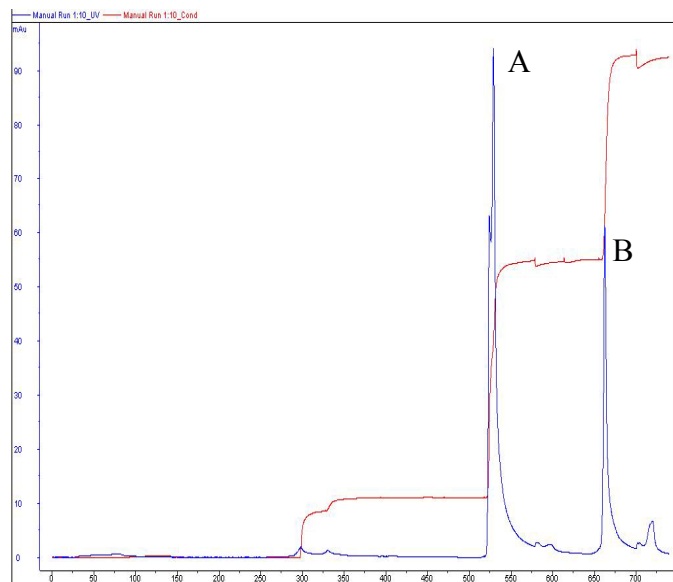


圖 24、CHT-HA 管柱層析法之 chromatograph。純化用管柱為 2.6×10 cm CHT-HA column，純化所用的樣品為圖 23 中所收集的 F2 部份置換緩衝液而來。A: 250 mM 磷酸鈉沖提物； B: 500 mM 磷酸鈉沖提物。

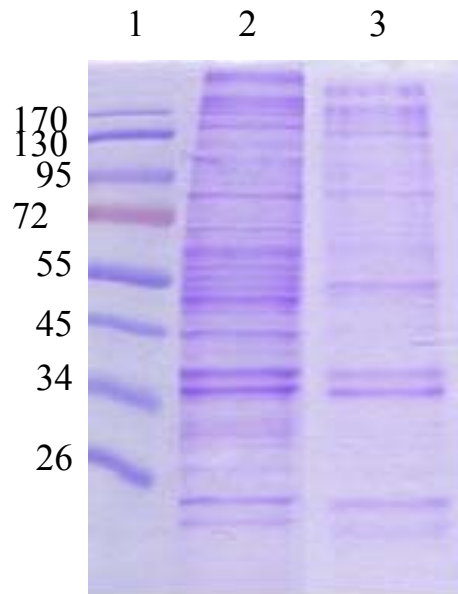


圖 25、利用 SDS-PAGE 分析以 1000 KD 與 100 KD 過濾膜濃縮及緩衝溶液置換後的樣品。Lane 1: Prestain marker; Lane 2:細胞上清液經 100 KD 過濾膜處理; Lane 3: 細胞上清液經 1000 KD 過濾膜處理。

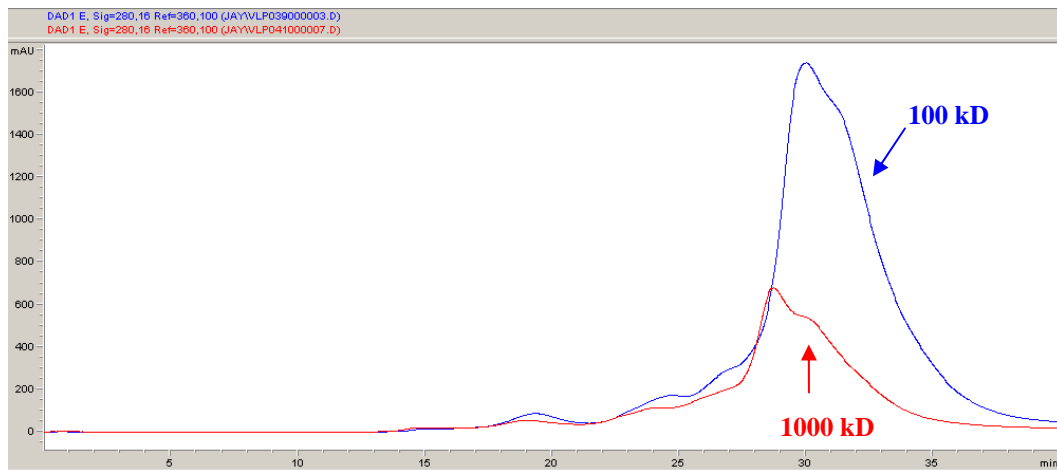


圖 26、以 TSK-G4000swXL 分析利用 1000 kD 與 100 kD 過濾膜濃縮及緩衝溶液置換後的樣品。峰值較大者為 100 kD 過濾膜，峰值較小者為 1000 kD 過濾膜。

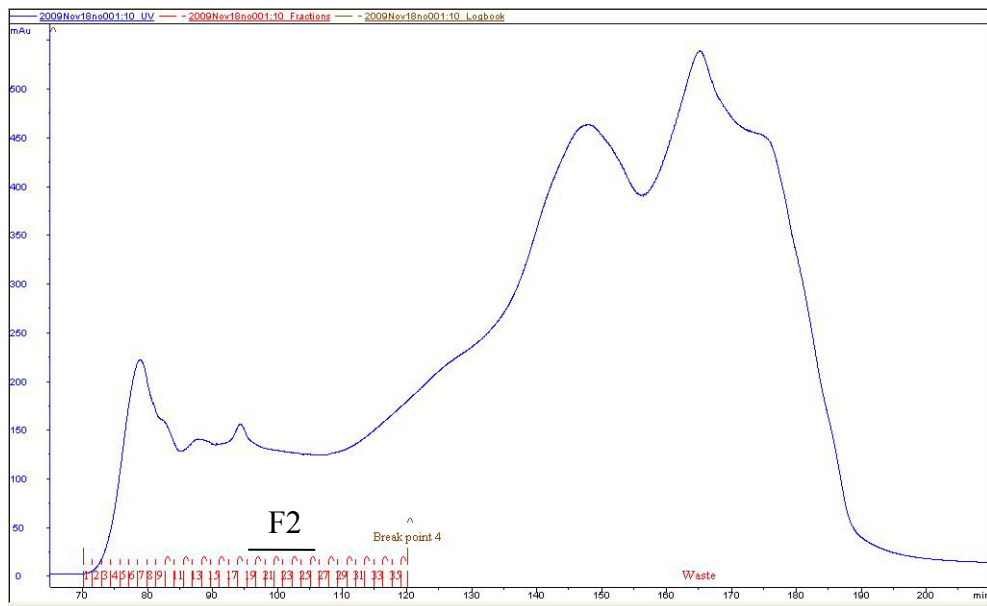


圖 27、S-400 SEC 管柱層析法之 chromatograph。純化用管柱為 5×95 cm，純化樣品為以 Bac-P1-3CD 感染的 Hi-5 細胞培養液(20 L)，經由 1000 kD 超過濾膜濃縮。收集 F2 部份進行後續純化步驟。

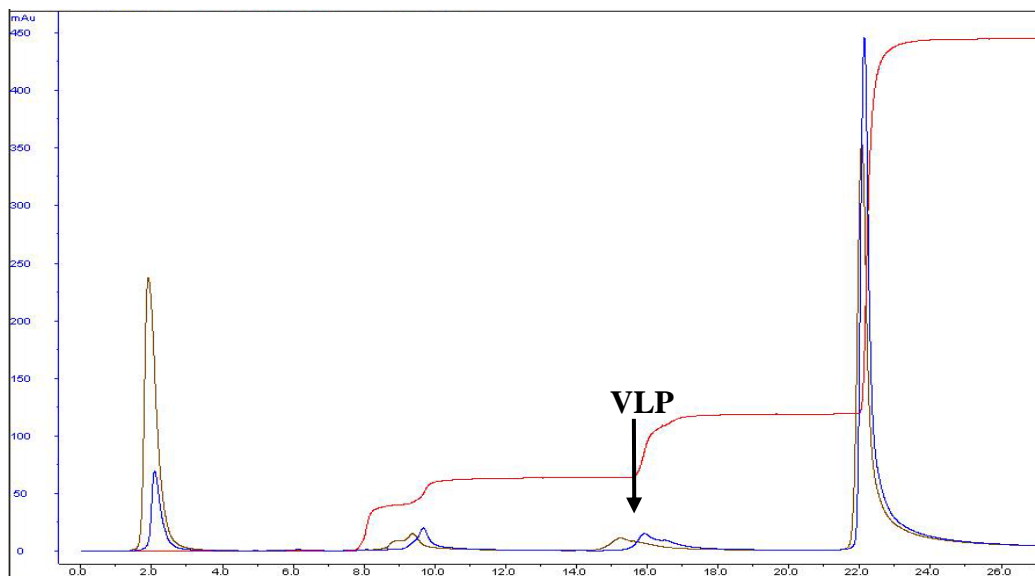


圖 28、CHT-HA 管柱層析法之 chromatograph。純化用管柱為 2.6×10 cm CHT-HA column，純化所用的樣品為圖 27 中所收集的 F2 部份置換緩衝液而來。箭頭指示處為 100 mM 磷酸鈉沖提液。

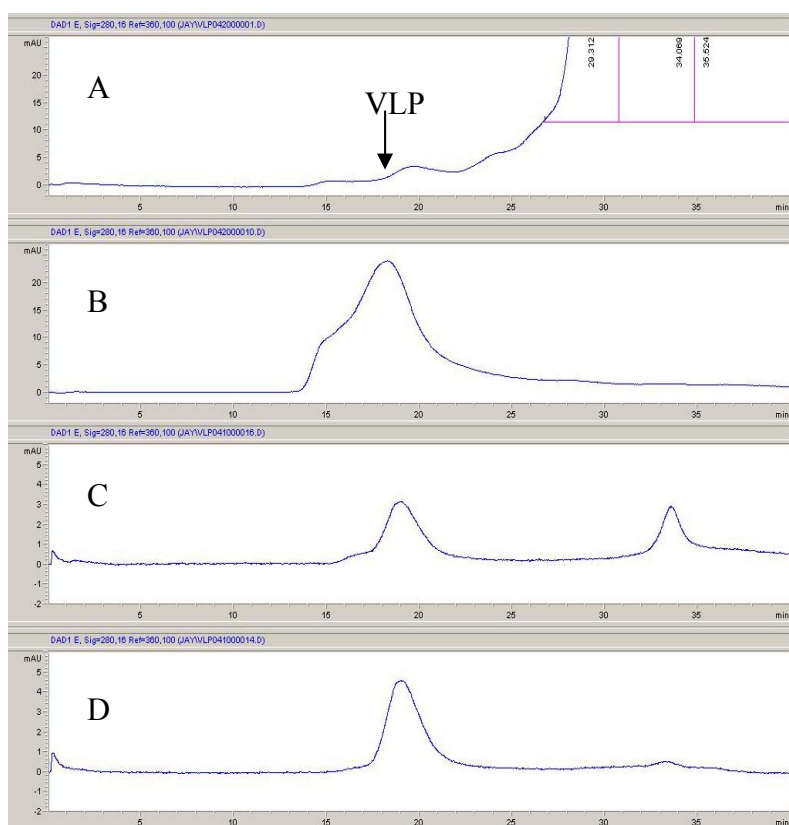


圖 29、以 TSK-G4000swXL 分析純化步驟中各分液。A: 自 20 L 反應器收集的細胞上清液, B: S-400 F2 分液 C: HA 管柱 50 mM 磷酸鈉分液, D: HA 管柱 100 mM 磷酸鈉分液。

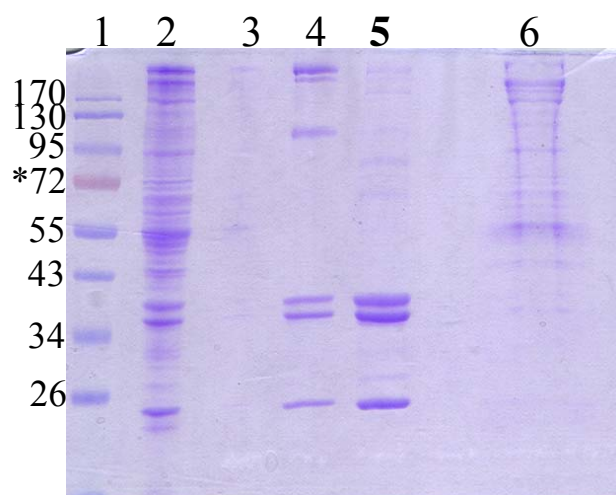
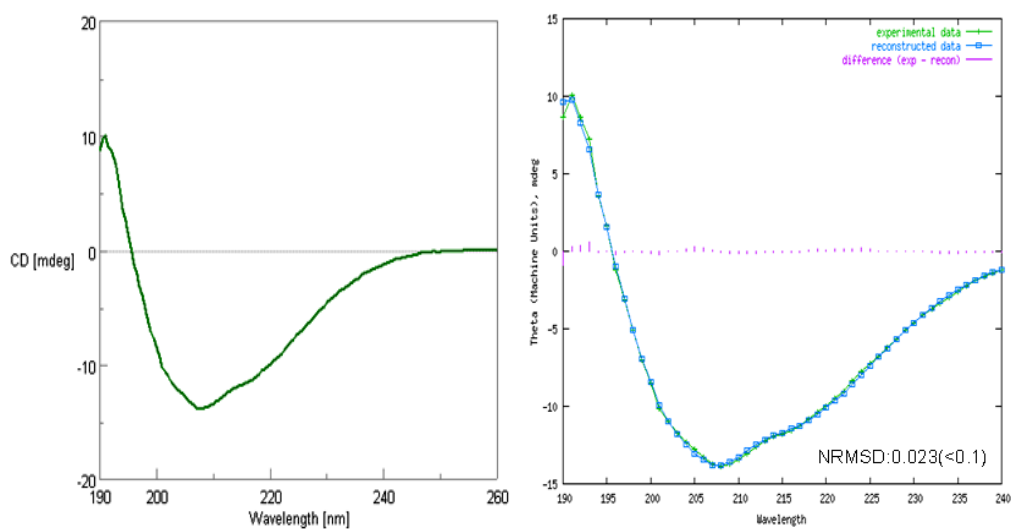


圖 30、以 SDS-PAGE 分析純化步驟中各分液。Lane1: Prestain marker, Lane 2: S-400 F2 region, Lane3: HA column flow through, Lane 4: HA 管柱 50 mM 磷酸鈉分液, Lane 5: HA 管柱 100 mM 磷酸鈉分液, Lane 6: HA 管柱 500 mM 磷酸鈉分液。



Name	Helix	Strand	Turns	Unordered
VLP2	14%	26%	26%	35%

圖 31、圓二色光譜分析 VLP 二級結構

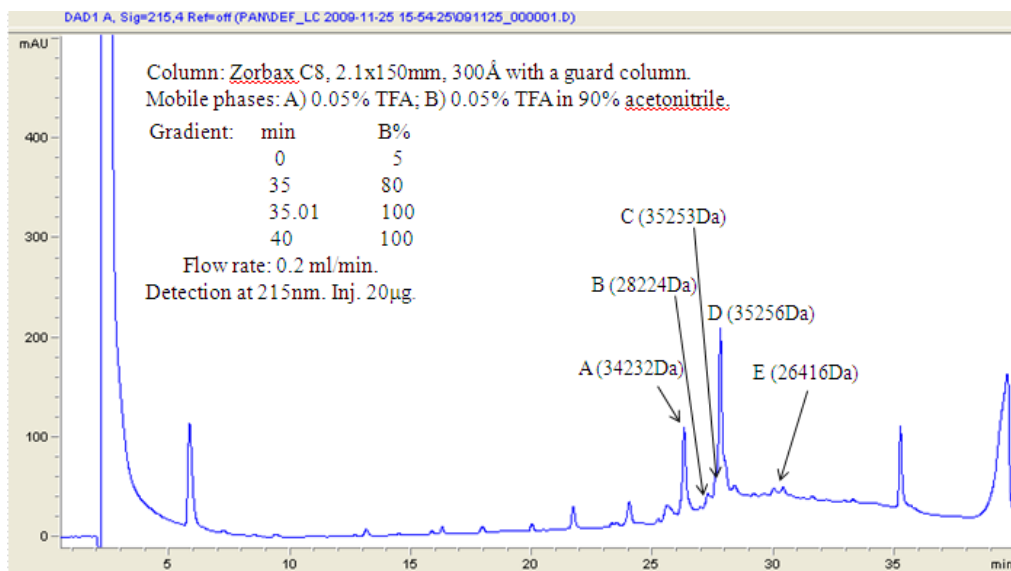


圖 32、RP-HPLC MS 分析 VLP 分子量。

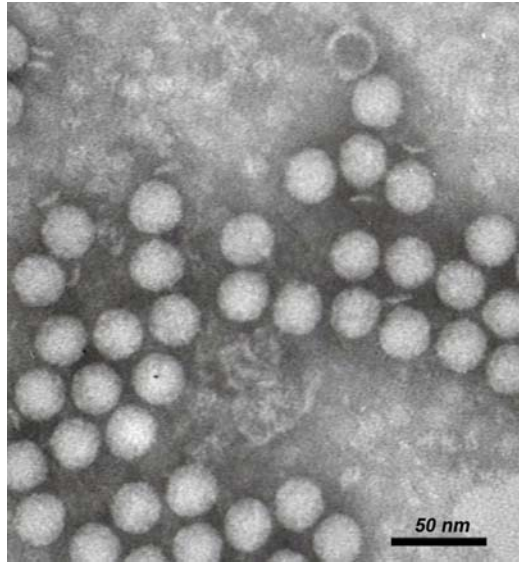


圖 33、穿透式電子顯微鏡下所觀察到經純化後、負染色的腸病毒 71 型病毒顆粒，直徑約 25-27 nm。

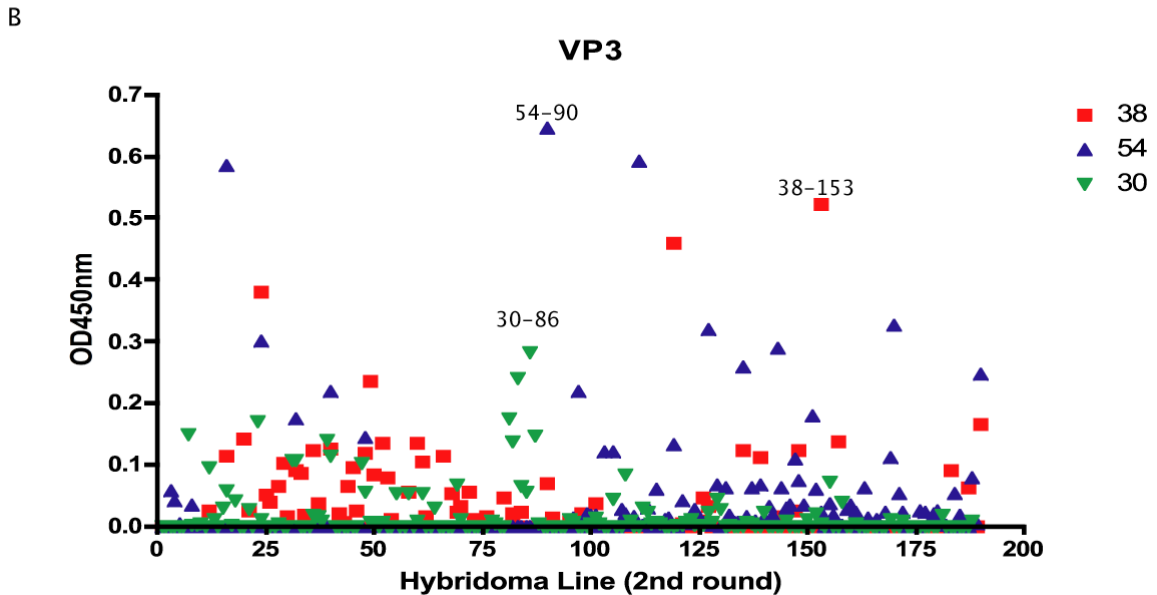
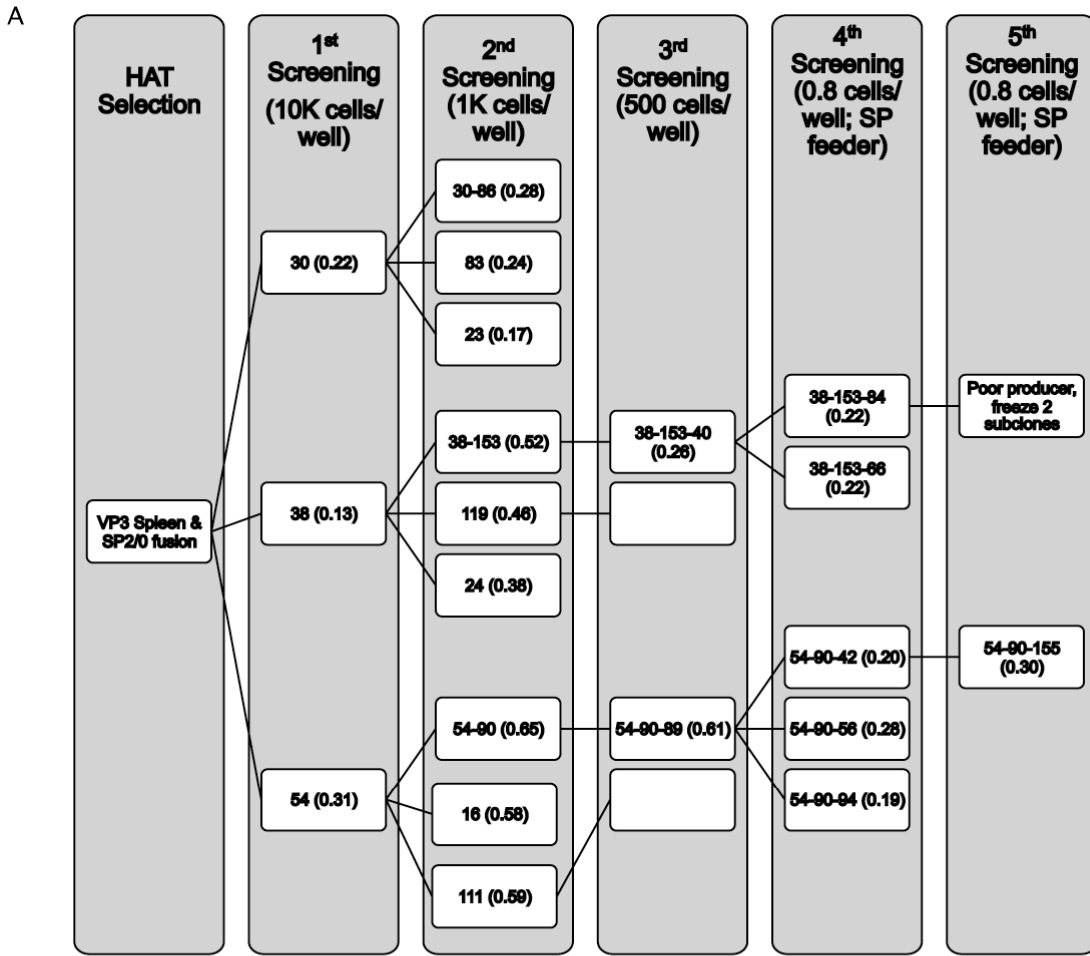


圖 34、腸病毒 71 型 VP3 單株抗體的製備。(A) 專一辨識 VP3 單株融合細胞篩選流程圖。(B) 專一辨識 VP3 多株融合細胞採用 ELISA 的方式篩選單株融合細胞。

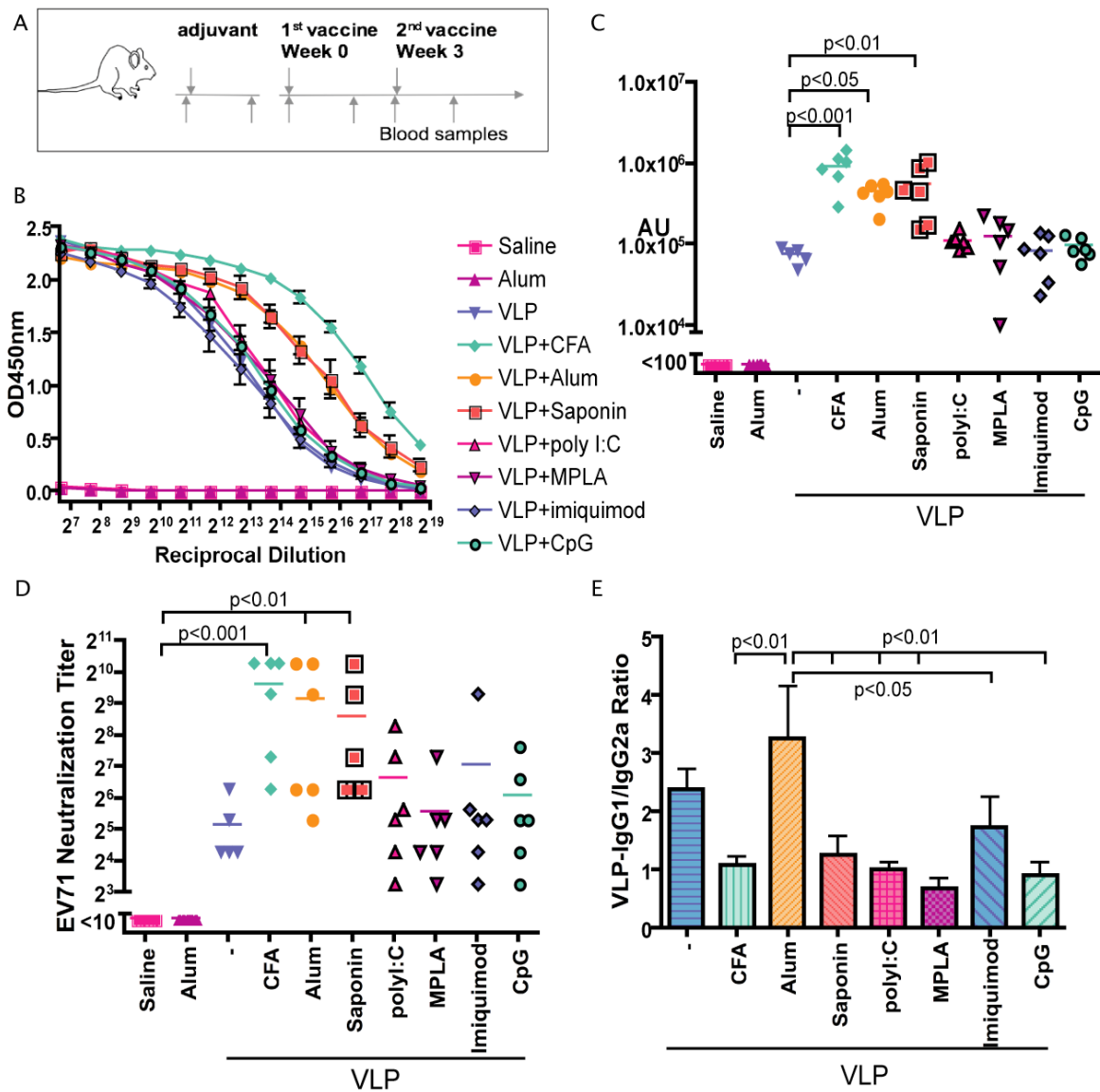


圖 35、小鼠實驗中測試不同佐劑對於 VLP 專一免疫反應的效果。(A) 小鼠施打 VLP 與採血的流程表。(B) (C) 於第二次施打兩週後，用 ELISA 測試小鼠血清中 VLP 專一性 IgG 含量(AU: arbitrary unit)。(D) 測試小鼠血清中的中和抗體效價。(E) 小鼠血清中具 VLP 專一性 IgG1 與 IgG2a 比例。數據分析採用單向 ANOVA。

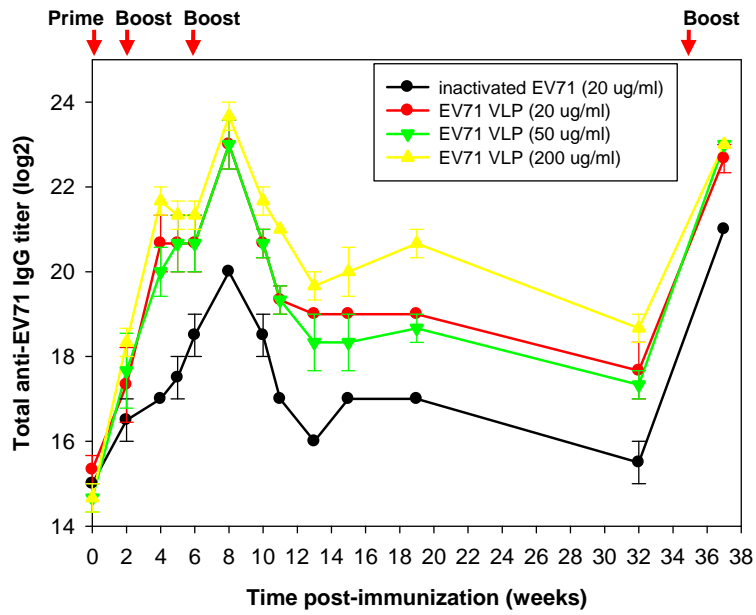


圖 36、猴子施打腸病毒疫苗後，以 ELISA 測得之血清中抗腸病毒 C2 基因型專一性抗體的效價。

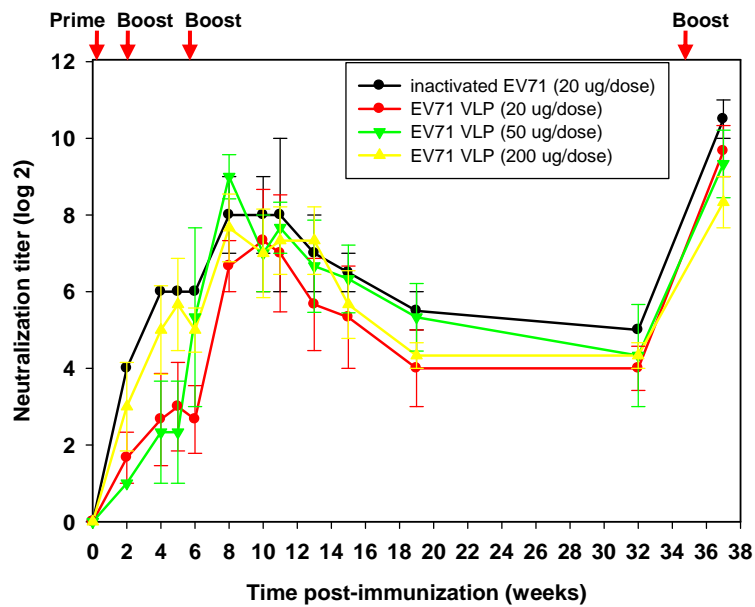


圖 37、猴子在施打疫苗後不同時間點所測得血清中抗腸病毒 C2 基因型中和抗體的效價。

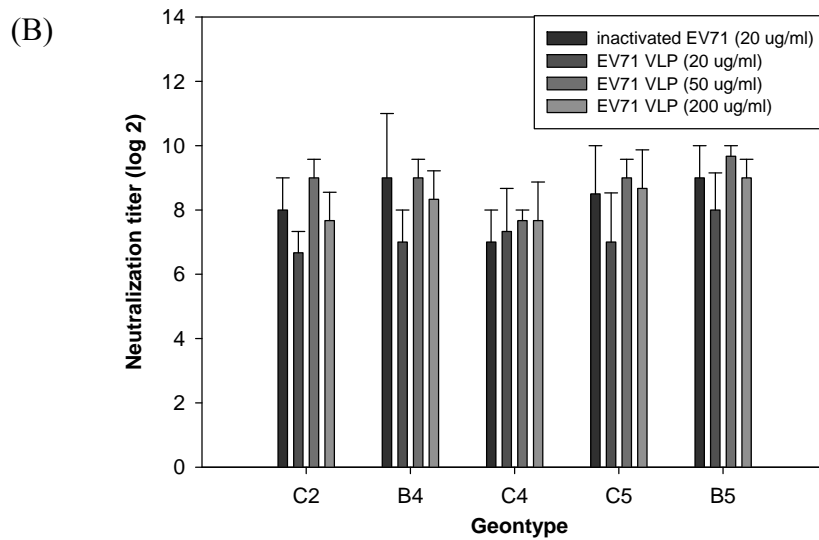
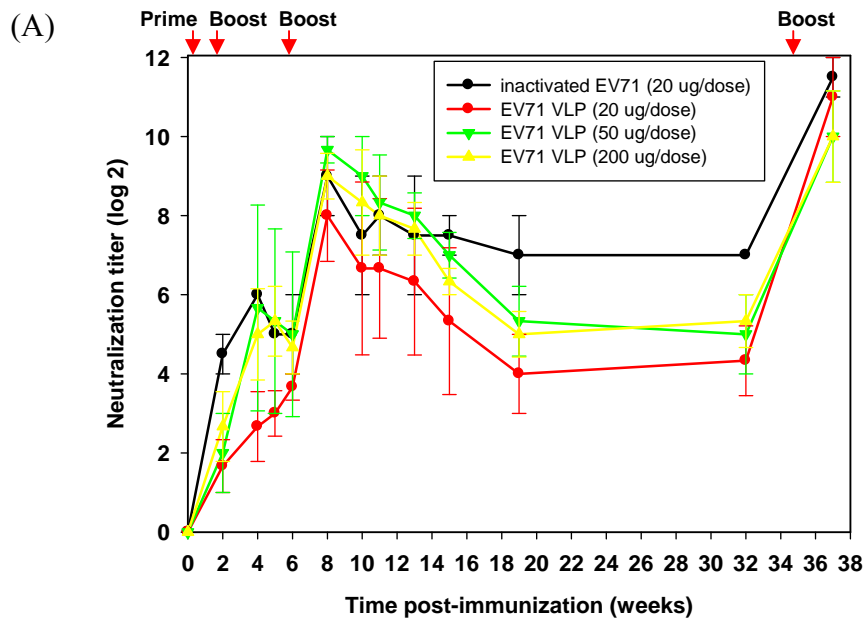


圖 38、猴子在施打疫苗後血清中抗不同腸病毒基因型中和抗體的效價 (A) 猴子在施打疫苗後不同時間點採樣後測得血清中抗腸病毒 B5 基因型中和抗體的效價。(B) 在施打三次疫苗後於第 8 週採血，測試不同腸病毒基因型中和抗體的效價。

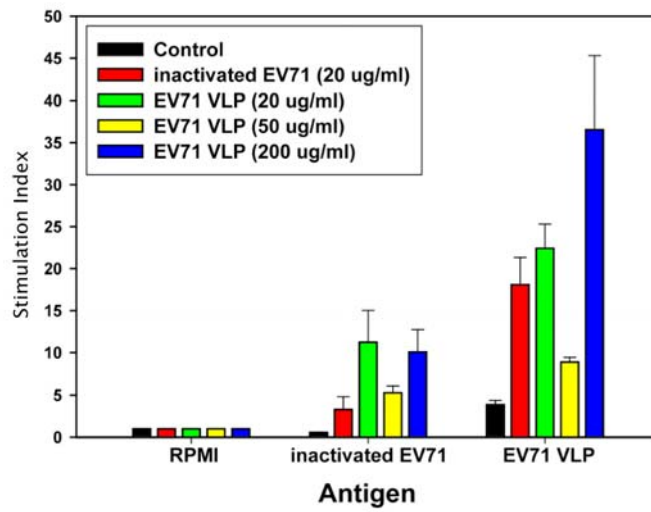


圖 39、猴子體內腸病毒抗原專一性免疫球 T 細胞增生能力分析。於疫苗施打後第 11 天採集猴子血液，並讓血液中周邊白血球於體外經過抗原刺激至第 5 天所測得細胞的增生指數。

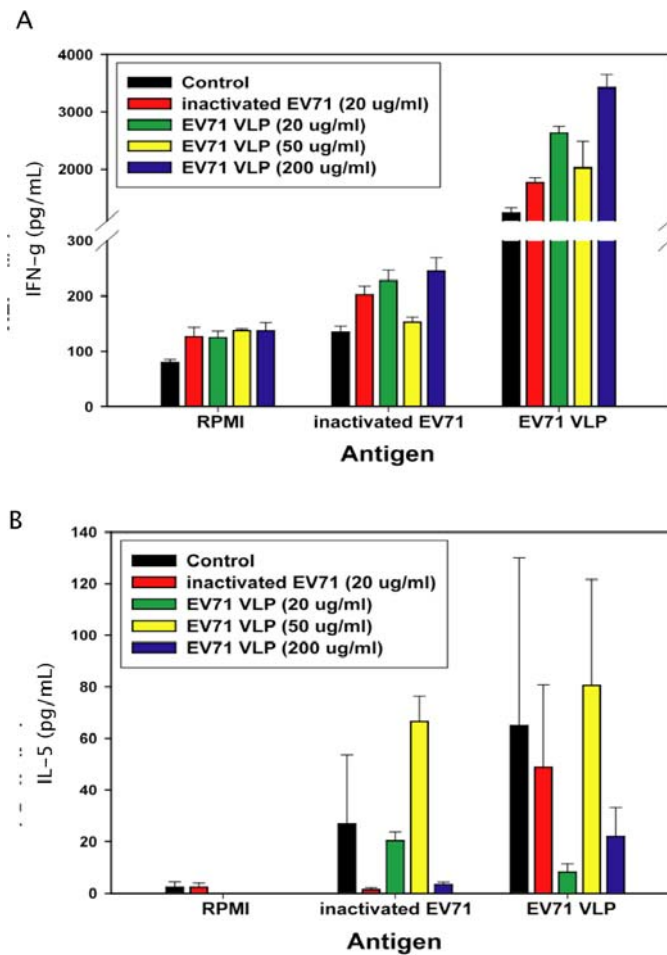


圖 40、猴子體內腸病毒抗原專一性細胞激素分泌活性分析。於疫苗施打後第 11 天採集猴子血液，並讓血液中周邊白血球於體外經過抗原刺激至第二天所測得細胞激素 IFN- γ (A)與 IL-5 (B) 的產生量。

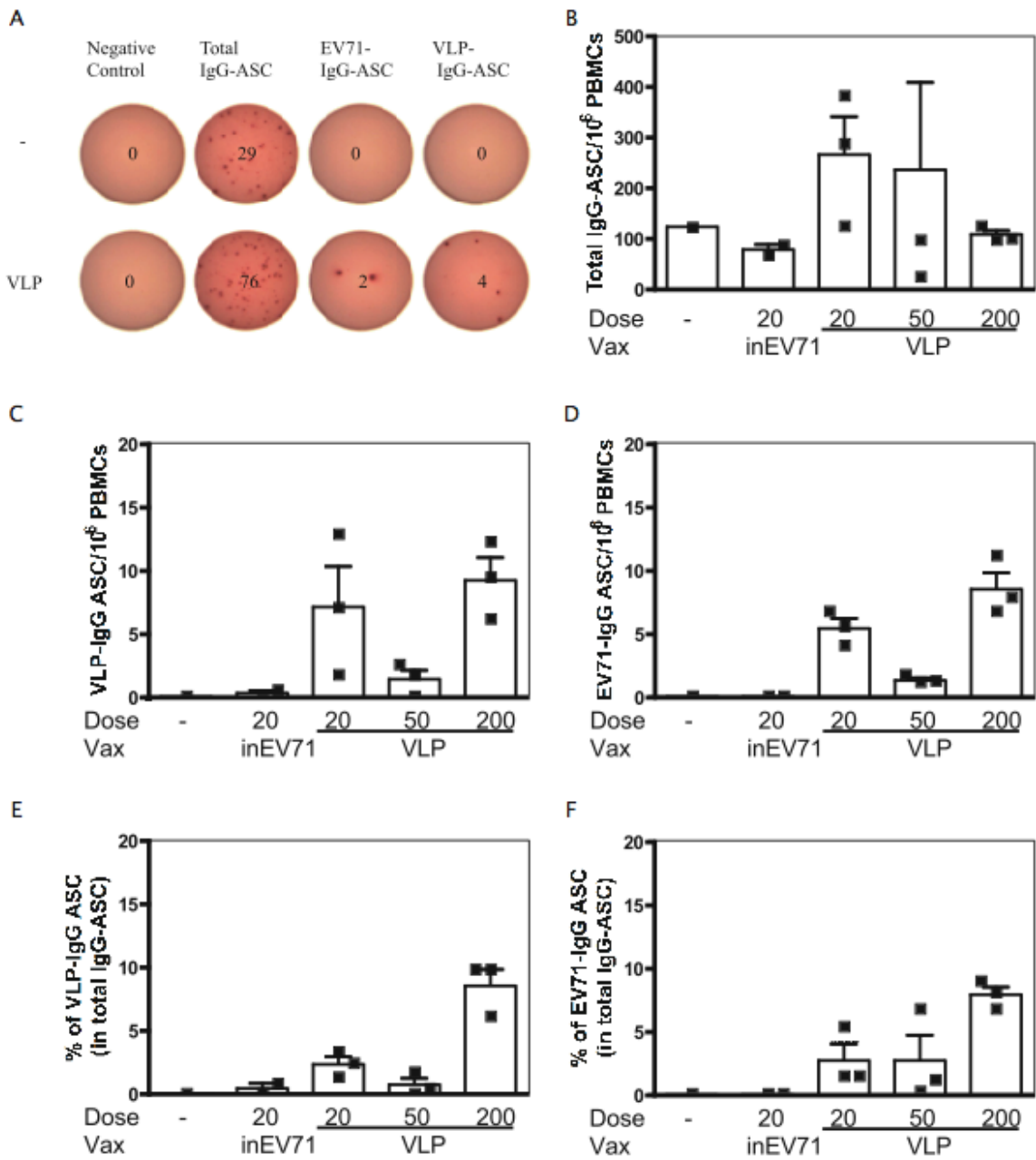


圖 41、實驗猴血液中具 EV71 或 VLP 專一性 IgG 抗體分泌細胞的含量。(A) ELISPOT 讀盤中觀察到膜上的點狀表示未施打 VLP 或施打 20 μ g VLP 後 11 天，實驗猴血液中的 IgG 抗體分泌細胞含量。(B) IgG 抗體分泌細胞總量。(C) (D) 具 VLP 或去活化腸病毒蛋白專一性的 IgG 抗體分泌細胞含量。(E) (F) 以具 VLP 或去活化腸病毒蛋白專一性的 IgG 抗體分泌細胞與 IgG 抗體分泌細胞總量進行標準化(normalize)的結果。

Bioreactor No.	Vessel (L)	Cell line	Peak cell density (cells/ml)	MOI	Yield ¹ (mg/L)
EV71-3CD-VLP-98B002	5	Hi-5	2.8×10^6	10	14.4
EV71-3CD-VLP-98B003	20	Hi-5	3.1×10^6	7.5	11.8
EV71-3CD-VLP-98B005	5	Hi-5	1.3×10^6	1.0	2.3
EV71-3CD-VLP-98B006	5	Hi-5	4.0×10^6	10^{-2}	10.8
EV71-3CD-VLP-98B008	5	Hi-5	5.4×10^6	10^{-4}	9.7
EV71-3CD-VLP-98B009	5	Hi-5	3.9×10^6	10^{-4}	9.2
EV71-3CD- VLP-98B010-1	5	Hi-5	3.9×10^6	10^{-4}	4.5
EV71-3CD- VLP-98B010-2	5		3.8×10^6		2.5
EV71-3CD- VLP-98B010-3	5		3.5×10^6		2.6
EV71-3CD- VLP-98B011	5	Hi-5	3.1×10^6	11	4.1
EV71-3CD- VLP-98B012-1	5	Hi-5	3.6×10^6	22	6.3
EV71-3CD- VLP-98B012-2	5		3.5×10^6		
EV71-3CD- VLP-98B012-3	5		3.3×10^6		
EV71-3CD- VLP-98B013-5L	5	Hi-5	2.8×10^6	15	4.6
EV71-3CD- VLP-98B013-20L	20		3.1×10^6		3.3
EV71-3CD- VLP-98B014-1	5	Hi-5	2.9×10^6	15	4.0
EV71-3CD- VLP-98B014-2	5		3.1×10^6		4.3
EV71-3CD- VLP-98B015	20	Hi-5	2.8×10^6	11	4.3
EV71-3CD- VLP-98B016	20	Hi-5	2.9×10^6	11	4.3

¹ Measured by ELISA

表 1、以 Bac-P1-3CD 病毒感染 Hi-5 細胞於生物反應器進行 EV71 VLP 製程放大測試及生產。

Sample	Volume	Protein	Tot. Protein	Recovery	Endotoxin	Endotoxin	Endotoxin
	(ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)	(EU/ml)	(EU/mg)	Removal rate (%)
VLP-SEC F2	1100	0.1	145.2		1770	13490	
VLP-SEC-HA	45	1.2	53.5	36.9%	4043	3400	75%
VLP-SEC-HA- Q5F	42	1.2	48.7	91.1%	2280	1966	42%

表 2、內毒素移除效率表

Sample	Volume	Protein	Tot. Protein	Recovery	ELISA	Specific Activity
	(ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/mg}$)
VLP-5L-Harvest	4000	0.9	3588	100%		
VLP-5L-UF/DF	270	7.3	1965.3	54.8%		
VLP-5L-S F2	420	0.1	32.8	1.7%	7.6	97.5
VLP-5L-S-HA load	56	0.1	7.6	23.3%		
VLP-5L-S-HA 250mM	60.5	0.1	3.7	48.0%		
VLP-5L-S-HA Q5F	27.5	0.1	1.5	40.6%	9.6	177.9

表 3、5 L 樣品於各純化步驟中之分液體積、總蛋白濃度、蛋白總量、及總蛋白回收率資料，蛋白質定量採 dye-binding Bradford assay 測量所得之蛋白質濃度，並乘以體積計算總蛋白質含量 (Tot. Protein)。總蛋白回收率計算方式均以兩相鄰步驟之蛋白總量比率為基準。

Sample	Volume	Protein	Tot. Protein	Recovery	ELISA	Specific Activity
	(ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/mg}$)
VLP-20L-Harvest	12869	1.0	13396.6	100%		
VLP-20L-UF/DF	326	21.0	6849.6	51.1%		
VLP-20L-S F2	420	0.4	157.5	2.3%	34.7	97.5
VLP-20L-S-HA load	75	1.5	115.6	73.4%		
VLP-20L-S-HA 100 mM	7.5	0.3	2.6	2.3%	90.4	261.1

表 4、20 L 樣品於各純化步驟中之分液體積、總蛋白濃度、蛋白總量、及總蛋白回收率資料，蛋白質定量採 dye-binding Bradford assay 測量所得之蛋白質濃度，並乘以體積計算總蛋白質含量 (Tot. Protein)。總蛋白回收率計算方式均以兩相鄰步驟之蛋白總量比率為基準。

Antigen	No. of Rabbit Immunized	Collected Antiserum	Purified Ab (DCB)
EV71	2	90 mL	222 mg
VLP	2	122 mL	260 mg
VP1	2	21 mL	189 mg
VP0	1	150 mL	-
VP3	1	130 mL	-

表 5、腸病毒以及其外鞘蛋白具專一性的多株抗體製備。

附件

A 標準操作程序 (SOP)

A-1 以生物反應器 BIOSTAT[®] B 生產 EV71 VLP

1 PURPOSE:

This protocol describes the procedure for culturing insect cells in BIOSTAT B[®] Reactor to produce enterovirus 71 virus-like particle (EV71 VLP) with baculovirus/insect cell expression system.

2 MATERIAL:

Instruments:

- BIOSTAT[®] B Reactor (B. Braun Biotech, Sartorius group)
 1. Control Unit
 2. Cooler (FIRSTTEK, model-B401L)
 3. Drive Motor
 4. Gas Mixing Unit
 5. Culture Vessel
- 空壓機 (FACON, Italy)
- 小型打氣馬達 (HEXA SP-120)

Materials:

- Polyurethane tube 6 mm × 8 mm
- Silicon hose (masterflex[®] 96400-16)
- Silicon hose (masterflex[®] 96410-15)
- Air Filter (Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)
- Air Filter (Millex-FG, PTFE 0.2 μm, Millipore)
- 鐵夾
- 橋接金屬管
- 1 L 血清瓶
- 1 L 雙管接種瓶
- 1 L 雙管儲水瓶
- Manual Sampling Tube (SCHOTT GL25)
- 25 ml Syringe

- 50 ml Syringe
- 50 ml Pippet
- 瓦斯噴槍，
- 鋁箔紙
- 脫脂棉花
- Kimwipes 拭紙
- pO₂ electrode 電解液
- Cell Culture Medium (Sf-900II, Invitrogen) or (TNM-FH, Sigma)
- 壓力計

3 PROCEDURE:

Assembling the Culture Vessel and Connecting to BIOSTAT[®] B Reactor:

3-1 氣體鋼瓶與 Gas Mix Unit 的組裝：

1. 將氮氣鋼瓶的 Polyurethane tube 接上 Gas Mix Unit 的 N₂ 接口。
2. 將氧氣鋼瓶的 Polyurethane tube 接上 Gas Mix Unit 的 Air 接口。
3. 將空壓機的 Polyurethane tube 接上 Gas Mix Unit 的 Aux 接口。
4. 將 Gas Mix Unit 的 Gas 出口的 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16)與 Control Unit 的 Air in 連接。

3-2 儲水瓶之組裝：儲水瓶為一雙管出口之血清瓶，瓶上雙出口接 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，IN 端朝外。於瓶底有一入口可進水，且不同於接種瓶，無軟管伸至瓶底。

3-3 接種瓶之組裝(Fig. 1a)：

1. 瓶內的一管接口接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)(7)，長度約至瓶底，此管瓶外接口接上長的 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)(6)，並橋接金屬管，再接另一 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)與 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，IN 端朝外。
2. 雙管接口的另一管在瓶外接口處接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)與 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)(5)，IN 端朝外。
3. 將組裝好的雙管接口 1 L 血清瓶備妥數個做為接種瓶，以高溫高壓兩次滅菌備用。

Note：至少需要兩個，一個接種細胞，一個接種病毒。

3-4 取樣管之組裝(Fig. 1b)：

1. 取樣瓶有一長管(9)伸至瓶底提供樣品採取，此長管出口端接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16)(5)，在收集樣品時會接上收集樣品用的 25 ml 針筒。
2. 取樣瓶的另外兩個出口，連接 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16)後，一個將與 Culture Vessel 取樣出口 N11(Fig. 2)連接進行取樣(1)，另一個則連接 Air Filter(Millex-FG, PTFE 0.2 μm, Millipore)(7)與 50 ml 針筒(4)對 Culture Vessel

3-5 Culture Vessel 的組裝(Fig. 2)：

1. 將冷凝管裝於 N1 的位置，冷凝管上端通氣孔接上 Silicon 軟管 (masterflex[®] 96410-15)與 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，注意 Filter 的 IN 端朝冷凝管端。
2. N2 為不拆除之 Temperature Sensor。
3. N3 為 Sparger 通氣管，接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16) 與 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，以鐵夾夾緊。
4. 將 pO₂ electrode 裝入 N4 的位置。
5. N5 為注水管，接上 Silicon 軟管 (masterflex[®] 96410-15)後與儲水瓶相接，並以鐵夾夾緊。
6. N6、N7 分別為細胞與病毒接種管，接上 Silicon 軟管 (masterflex[®] 96410-15) 後相接橋接金屬管，再接上 Silicon 軟管 (masterflex[®] 96410-15)與 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，注意 IN 端朝外。接好後將靠 Vessel 軟管端以鐵夾夾緊。
7. N8 為通氣孔，接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)後再接上 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)，IN 端朝外。
8. N11 為取樣管，以 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16)與取樣管連接並夾上鐵夾。
9. N14、N15 為無氣泡通氣系統蛇管，出口端接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96410-15)後再接上 Air Filter(Midisart[®] 2000, 0.2 μm PTFE, Sartorius group)。N14 為進氣，IN 端朝外；N15 為排氣，IN 端朝內。N15 的 Filter 之後再加上壓力計。
10. 確定 N3、N5~7、N11 之軟管有夾緊，將無用的 N9、N12 及取樣管收集樣品端以鋁箔紙密封。
11. Temperature Sensor、pO₂ electrode 的電極以脫脂棉花包覆後再以鋁箔紙密封。
12. 將槽體裝 DI 水約蓋過蛇管高度，以高溫高壓滅菌爐兩次滅菌備用。

3-6 Culture Vessel 與 Control Unit 的連接(Fig. 3)：

1. 將滅過菌的 Culture Vessel，取樣管收取樣品端的鋁箔解開，浸入含 75%酒精的燒杯，保持無菌。
2. 將 Temperature Sensor 的線路接上 Control Unit 13 的位置。
3. 將 pO₂ electrode 的線路接上，並接於 Control Unit 12 的位置。
4. 將 Control Unit 的 Air out 接上 Silicon 軟管(masterflex[®] 96400-16)與 Vessel 的 N3 Sparger 相接。
5. 將 Control Unit 的 Exhaust Cooler 的兩個管路與 Vessel 上冷凝管的兩個管路相接，有防呆不會接錯。
6. 將 Control Unit 的 Thermostat in 與 out 的兩個管路與 Vessel 上的兩個冷卻水管路相接，out 接於下方管線，in 接於上方管線(亦有防呆不會裝錯)。

7. 將 Cooler 的出口管與 Control Unit 的 Cooling Water in 相接，並將 Cooling Water out 接回 Cooler。
8. 將 Stir 的 Drive Motor 裝上 Culture Vessel 的上方。

Operation of Control Unit:

- 3-7 開啟 Control Unit 總電源。
Note：從”0”轉至”1”位置
- 3-8 按 **Control Loops** 鍵數次進入 TEMP 選單，移動游標至”SETP”處，使用數字鍵更改成適合的培養溫度後，按 **Enter** 確認。移動游標至”MODE”處，按 **Alter** 鍵更改成”auto”後，按 **Enter** 確認
- 3-9 按 **Control Loops** 鍵數次進入 STIRR 選單，移動游標至”SETP”處，使用數字鍵更改成適合的旋轉速度後，按 **Enter** 確認。移動游標至”MODE”處，按 **Alter** 鍵更改成”auto”後，按 **Enter** 確認。
- 3-10 完成後按 **Process Values** 鍵，可觀察目前系統狀況。

Calibration of the Dissolved Oxygen (DO):

- 3-11 按 **Control Loops** 鍵數次進入 pO₂ 選單，確定 pO₂ 選單中的”MODE”為 off。若不是，移動游標至”MODE”處，按 **Alter** 鍵更改成 off 後，按 **Enter** 確認。
Note：將 Gas Mix Unit 自動控制 DO 的功能關閉以進行以下之校正。
- 3-12 開動空壓機，使空氣進入 Culture Vessel 中。
- 3-13 持續打氣至面板顯示 pO₂ 至 99.0 % 以上。
- 3-14 連按兩次 **Calibration** 鍵，進入 pO₂ 校正選單。
- 3-15 確認游標位於”Temp auto/man”的位置，若是顯示”man”，按 **Alter** 鍵更改成”auto”，使能夠自動控制 culture vessel 中的溫度。
- 3-16 按下 **Enter** 鍵確認，並控制 **▲** **▼** 使游標移動到”AIR”的位置。
- 3-17 調整”AIR”選項為 100 %，按下 **Enter** 確認，並等候 10 秒。
- 3-18 再按一次 **Enter**，可由控制面板看見 pO₂ 顯示為 100.0 %。
Note：以 Culture Vessel 打滿空氣定義為溶氧量 100.0 % (滿點校正)。
- 3-19 關閉空壓機，使空氣停止進入 Culture Vessel。
- 3-20 打開氮氣鋼瓶壓力閥，使氮氣進入 Gas Mix Unit。
- 3-21 將 Gas Mix Unit 上 N₂ 面板的開關開至”man”的位置，使氮氣進入 Culture Vessel 中。
Note：”man”表手動進氣，開至此位置時 Culture Vessel 不斷進氣。
“auto”表自動進氣，由 Gas Mix Unit 控制進氣。
開關至中間為停止進氣。
- 3-22 拉開大旋扭，逆時針旋轉為降低進氣，順時針旋轉為提高進氣，調整進氣壓力至 0.5 bar (圓形壓力表)，壓回大旋扭。
- 3-23 旋轉小旋扭，逆時針為增加出氣，順時針為降低出氣，調整出氣壓力至 2.0 bar

(直條壓力表)。

3-24 可觀察到面板上的 pO₂ 值緩慢下降，降到零約需 5 分鐘到 10 分鐘。

3-25 待面板上的 pO₂ 值降到接近零且幾乎不再下降 (約 1.0 % 左右)。將游標移到 "NITR" (Nitrogen) 的位置，調整數值為 000.0 %，按下 **Enter** 鍵確認，等候 10 秒。

3-26 再按一次 Enter，可見 pO₂ 顯示為 0.0 %。

Note：以 Culture Vessel 打滿氮氣定義為溶氧量 0.0 % (零點校正)。

3-27 移動游標向下，可見 ZERO 與 SLOPE 兩個數值，以 nA 表示此次校正的零點與斜率。ZERO 數值不可超過 15 nA，SLOPE 數值在 25 nA ~ 200 nA 之間為合理範圍。

Note：目前 ZERO 值約為 0 ~ 1 nA 間，SLOPE 約為 30 ~ 40 nA 間。

3-28 至此完成校正，關掉 Gas Mix Unit 上的 N₂ 控制開關，關閉鋼瓶上的壓力閥，停止對 Vessel 供應氮氣。並重複滿點校正 3-12 到 3-18 步驟，確認 pO₂ 顯示為恆定且接近 100 %，表示校正正確。

Note：在 Culture Vessel 開始培養細胞前，可持續使用空壓機打氣並觀察 pO₂ 的穩定度，以正負 5 % 為佳。

Culture of Insect Cells in the Vessel:

3-29 開始培養之前，先備妥 1 L 雙管接種瓶。

3-30 預先將在旋轉瓶或搖瓶培養至適當濃度的昆蟲細胞，在 Laminar Flow Hood 中，使用 Pipet 移轉至 1 L 血清瓶中，並添加培養基，稀釋細胞濃度至接種濃度。

Note：一般昆蟲細胞約培養至 2.0×10^6 cells/ml 後，稀釋成 0.5×10^6 cells/ml 接種。

3-31 旋開已滅菌的接種瓶雙管接口瓶蓋，以右手抓緊外接軟管，緩緩抽出瓶內軟管，離開原血清瓶，注意不可讓軟管碰觸任何東西，避免污染。

3-32 以左手旋開內含接種細胞的血清瓶，將右手的雙管接口瓶蓋內接的軟管緩緩放入瓶內，放妥後以左手旋緊瓶身。

3-33 瓶蓋與瓶身接合處以 Parafilm 密封。

3-34 接種細胞進入 Culture Vessel 之前，需將 Vessel 中用來校正氣體的水打出。

1. 封閉所有對外通氣孔 (N14、N15 無氣泡通氣系統除外)，僅保留出水孔 N5 (有長管向下延伸至 Culture Vessel 底部)。

Note：N14、N15 不直接與 Vessel 內相通故不影響充氣。

2. 若空壓機在之前已先關閉，打開空壓機使空氣進入 Vessel 中。

3. Culture Vessel 中的水會慢慢的回流至儲水瓶中。

3-35 確認 Vessel 內的水完全打出，將出水孔軟管以鐵夾夾緊封閉並關閉空壓機。

3-36 將 N3 Sparger 與 Control Unit 的 Air out 接口處拆開，將 Air out 軟管接上 N14 的無氣泡通氣系統進氣孔。

Note：校正 DO 值時使用 Sparger，而細胞培養時大量的氣泡對細胞生長有不良影響，因此改用無氣泡通氣系統進氣。

- 3-37 將 N6 接口的軟管與金屬管接合處以鐵夾夾緊，同時將內含細胞的接種瓶的出口軟管與金屬管接合處也以鐵夾夾緊。
- 3-38 點燃瓦斯噴槍，將 N6 接口軟管金屬管後端的軟管接口稍微灼燒，並旋鬆(此後端軟管接 Air Filter)，同時灼燒接種瓶金屬管前端軟管接口並旋鬆。
Note：絕對注意瓦斯噴槍周圍不可有易燃物，並打開 Culture Room 的門維持空氣流通。
- 3-39 拆下 N6 接口軟管金屬管後端軟管部分，置於火焰前灼燒，將接種瓶的金屬管連同後端軟管與 Air Filter 一同拆下，將接種瓶的軟管與 N6 接口金屬管在靠近火源處接合。
- 3-40 將金屬管置於火焰前燒紅，使系統保持無菌。關掉瓦斯噴槍並等待金屬管冷卻。
- 3-41 待金屬管冷卻後，拆開兩端鐵夾，並將接種瓶雙管出口另一管外接的 Air Filter 接上小型打氣馬達，此時接種瓶的細胞液將緩緩流入 Culture Vessel 中。
- 3-42 待細胞液完全進入 Vessel 後，將小型打氣馬達關閉並拆下，防止 Vessel 內產生過多氣泡。
- 3-43 將接種瓶與 N6 接口的軟管以鐵夾夾緊，即完成細胞接種。
- 3-44 按 **Control Loops** 鍵數次進入 pO₂ 選單，移動游標至"SETP"處，使用數字鍵更改成欲控制的 DO 值後，按 **Enter** 確認。移動游標至"MODE"處，按 **Alter** 鍵更改成"auto"，按 **Enter** 確認。
- 3-45 打開氧氣鋼瓶與氮氣鋼瓶之壓力閥，使氣體進入 Gas Mix Unit，將 N₂ 與 Air 面板開關開向"auto"，使 Gas Mix Unit 自動控制溶氧量。

Sampling of the Cultured Cells from the Vessel:

- 3-46 鬆開 N11 取樣軟管的鐵夾，拉動真空吸引用針筒活塞，使樣品從 Culture Vessel 中注入取樣瓶。吸引數次取得體積約為 10 ml。
- 3-47 將鬆開的鐵夾夾回取樣軟管 N11。再接上收集樣品用的針筒，吸出取樣瓶中約 10 ml 的樣品，丟棄不用。
Note：這些樣品可能是管線中的殘留，因此在取樣品前需先抽出丟棄。
- 3-48 重複步驟 3-46 與 3-47，從取樣管中吸出適量樣品，並排出至容器供後續分析使用。
Note：每完成一個動作，需注意將鐵夾再夾好，以保持無菌狀態。

Virus Infection of the Cultured Cells in the Vessel:

- 3-49 根據取出來的細胞樣品，計算細胞濃度與死亡率等資料，並依照實驗條件，根據所需要感染細胞的 MOI (Multiplicity of Infection)與細胞濃度、細胞總培養體積來計算所需要感染的病毒液用量。
Note：通常若是感染高 MOI，由於使用的病毒液體積較多，加入後會稀釋細胞

濃度，因此會將細胞濃度培養至比目標濃度稍高，待加入病毒液後剛好可稀釋為目標濃度。低 MOI 則無此顧慮。

3-50 將一個已滅菌的 1 L 血清瓶與一個已滅菌的接種瓶放入 Laminar Flow Hood 中，可於開始操作前照射 UV 約五分鐘，保持無菌。

Note：病毒接種過程中，所有動作需以無菌操作進行。且病毒液需盡可能避光。

3-51 將含病毒液的血清瓶放入 Hood 中操作，並使用 50 ml Pippet 移轉需要接種的病毒液體積至 1 L 無菌血清瓶中。

3-52 旋開已滅菌的接種瓶雙管接口瓶蓋，以右手抓緊外接軟管，緩緩抽出瓶內軟管，離開原血清瓶，注意不可讓軟管碰觸任何東西，避免污染。

3-53 以左手旋開內含接種病毒液的血清瓶，將右手的雙管接口瓶蓋內接的軟管緩緩放入瓶內，放妥後以左手旋緊瓶身。

3-54 瓶蓋與瓶身接合處以 Parafilm 密封。

3-55 將 N7 接口的軟管與金屬管接合處以鐵夾夾緊，同時將內含病毒液的接種瓶的出口軟管與金屬管接合處也以鐵夾夾緊。

3-56 點燃瓦斯噴槍，將 N7 接口軟管金屬管後端的軟管接口稍微灼燒，並旋鬆(此後端軟管接 Air Filter)，同時灼燒接種瓶金屬管前端軟管接口並旋鬆。

Note：絕對注意瓦斯噴槍周圍不可有易燃物，並打開 Culture Room 的門維持空氣流通。

3-57 拆下 N7 接口軟管金屬管後端軟管部分，置於火焰前灼燒，將接種瓶的金屬管連同後端軟管與 Air Filter 一同拆下，將接種瓶的軟管與 N7 接口金屬管在靠近火源處接合。

3-58 將金屬管置於火焰前燒紅，使系統保持無菌。關掉瓦斯噴槍並等待金屬管冷卻。

3-59 待金屬管冷卻後，拆開兩端鐵夾，並將接種瓶雙管出口另一管外接的 Air Filter 接上小型打氣馬達，此時接種瓶的病毒液將緩緩流入 Culture Vessel 中。

3-60 待病毒液完全進入 Vessel 後，將小型打氣馬達關閉並拆下，防止 Vessel 內產生過多氣泡。

3-61 將接種瓶與 N7 接口的軟管以鐵夾夾緊，並以鋁箔紙將 Culture Vessel 包圍避光，即完成 Vessel 內細胞的病毒感染。

Harvesting the Cultured Cells from the Vessel:

3-62 關閉 Gas Mix Unit 上 N₂ 與 Air 控制開關，使氮氣與氧氣停止進入 Culture Vessel 中。

3-63 按 **Control Loops** 鍵數次，進入 pO₂ 選單，游標移至 "MODE" 處，按 **Alter** 鍵將模式改為 "off"，後按 **Enter** 鍵確定。

3-64 再按 **Contorl Loops** 鍵，進入 TEMP 選單，將 "MODE" 更改為 "off"。

再按 **Contorl Loops** 鍵，進入 STIRR 選單，將 "MODE" 也更改為 "off"。

Note：將細胞從 Vessel 中打出時，溶氧量與溫度變化很大，因此需先關閉自動控制系統。

- 3-65 將小型打氣馬達接上 N8 通氣孔，以鐵夾封閉其他所有對外通氣管(N14、N15 除外)，僅保留當初接種細胞的 N6 管路。
- 3-66 將 N6 管路的鐵夾鬆開，打開小型打氣馬達，使空氣進入 Culture Vessel 中，此時細胞液會經由 N6 管路慢慢回流至當初用來接種的接種瓶中。
- 3-67 待細胞液完全進入接種瓶後，關閉小型打氣馬達並卸下。將接種瓶與 Vessel 間的 N6 管路拆開，即完成細胞收成，可進行後續實驗使用。
- Note：若需保持收成的細胞為無菌狀態，可逆向操作當初接種時灼燒金屬管的步驟，將接種瓶的軟管與 Vessel N6 管路拆開後，接上無菌的 Air Filter，移入 Laminar Flow Hood 中進行後續的無菌操作。

Disassembling and Cleaning the Culture Vessel:

- 3-68 關閉 Control Unit 總電源。
- Note：從”1”轉至”0”位置。
- 3-69 將儲水瓶的出口軟管以鐵夾夾緊後，拆開其與 Vessel N5 接口軟管中間連接閥，避免水在拆開過程中漏出。
- 3-70 拆開 Vessel N7 接口的病毒接種瓶。
- 3-71 拆掉抽取 Sample 用的針筒。
- 3-72 拆開 Control Unit 的 Air Out 管線與 N14 無氣泡通氣系統接口軟管 Air Filter 間的連接。
- 3-73 拆開冷凝管與 Control Unit 的兩個接點。
- 3-74 拆開 Vessel 端與 Control Unit Thermostate 的兩條循環水管的連接閥。
- 3-75 從 Control Unit 端拆下 Temperature sensor 與 Control Unit 的連接，管線上的接點以鋁箔紙包覆做為保護。
- 3-76 從 Vessel 端將 pO₂ electrode 與 Control Unit 間的管線拆下。
- 3-77 將 pO₂ electrode 從 Culture Vessel 旋開，緩緩抽出，小心勿碰撞。
- 3-78 將 pO₂ electrode 先置於桌上。後續處理請見 3-88。
- 3-79 將整個 Culture Vessel 總成移至水槽進行清洗。
- 3-80 將所有夾緊之鐵夾鬆開，並將所有 Air Filter 拆除以利後續清洗。
- 3-81 拆除取樣管管體，拆開以清水沖洗。注意 Silicon 軟管內一樣需以清水通過來沖洗。
- 3-82 冷凝管上方之通氣軟管拆開清洗。
- 3-83 N3 Sparger、N5~N8 進料管、N11 取樣管線內以清水沖洗。
- Note：N14、N15 無氣泡通氣系統之蛇管、外接之軟管與 Air Filter 可不拆除，因無生物污染，亦不用清洗，待高溫高壓滅菌即可。
- 3-84 鬆開 Culture Vessel 蓋子的三個旋鈕，將蓋子小心打開，抽出蓋子下方管路小心平放於水槽進行清洗。
- 3-85 將 Culture Vessel 玻璃槽體及蓋子下方管線以海綿輕輕刷洗，並使用清水沖乾淨。

Note：注意需確實將槽體及所有管線清洗乾淨。

3-86 玻璃槽體夾層間的 Thermostate 冷凝水空間亦可接水管清洗。

Note：若玻璃夾層間太髒，可以滴管滴入 10 %醋酸充滿槽體夾層，置於室溫一天，再以清水沖洗乾淨。

3-87 同時可拆開清洗使用過之雙管出口接種瓶及儲水瓶。注意 Silicon 軟管內一樣需以清水通過來沖洗。

3-88 pO₂ electrode 的處理：

1. 將 electrode 下方蓋子小心旋開，倒掉內部的電解液。

Note：電解液 pH 值相當高，具有腐蝕性，請小心操作。

2. 以清水沖洗蓋子與電極。

3. 以 Km wipes 拭紙將露出的電極輕輕擦拭乾，並將蓋子裡的水扣乾。

4. 以 pO₂ electrode 的電解液輕微潤洗電極與蓋子。

5. 滴 15 滴電解液至蓋子中，將電極以 45 度角旋入蓋子中，過程中會溢出電解液。稍微以清水沖洗掉溢出的電解液。

Note：每次清洗槽體皆要更換電解液。

Sterilization of the Culture Vessel by Autoclave:

3-89 清洗完成後，將 Culture Vessel 的蓋子小心的蓋回玻璃槽體，並將三個旋鈕旋緊。

3-90 將取樣瓶正確接回取樣管線 N11。

Note：以未伸至瓶底的短管端與 Vessel 相接。

3-91 將 N3 Sparger、N8 進氣管、N14 與 N15 無氣泡通氣蛇管以及冷凝管上方的通氣軟管接上 Air Filter。

3-92 N6、N7 進料軟管以金屬管與有 Air Filter 的軟管相接。

Note：注意 Air Filter 有方向性，進氣端為 IN，出氣端為 OUT。N3、N8、N14 為向 Vessel 通氣，IN 端朝外。N15 與冷凝管通氣軟管為 Vessel 向外排氣，IN 端朝內。

其他接種瓶以及含金屬管的 Air Filter 皆以 IN 端朝外進行濾氣。

3-93 將儲水瓶接上 N5 進水軟管中間的连接閥。

3-94 將 N3 Sparger、N5~N7 進料管、N11 連接取樣管處的軟管以鐵夾夾緊。

3-95 將 Temperature Sensor 的管線接點以棉花包妥，再外包鋁箔紙，以確保滅菌時不會損壞。

3-96 沒有使用的 N9、N12 接口也要用鋁箔包妥。

3-97 取樣管連接取樣針筒的軟管以鐵夾夾緊，出口也用鋁箔密封。

Note：不用夾的管線包括 N8 進氣管、N14 與 N15 無氣泡通氣系統、冷凝管通氣管及取樣瓶的通氣管。

3-98 裝置好之 Culture Vessel 從 pO₂ electrode 的孔洞注入 DI 水，蓋過蛇管即可。將所有管線整理纏繞後以高溫高壓滅菌爐進行第一次滅菌。

Note：這些水在經過兩次滅菌後，直接作為之後氣體校正使用，等到接種細胞

前才由 Vessel 中打入儲水瓶。

3-99 第二次滅菌時需同時裝上 pO_2 electrode，將電子接點處以棉花包覆，，外包鋁箔紙以進行滅菌。

3-100 將清洗好之 1 L 雙管出口接種瓶正確組裝並進行兩次滅菌備用。

4 Figures

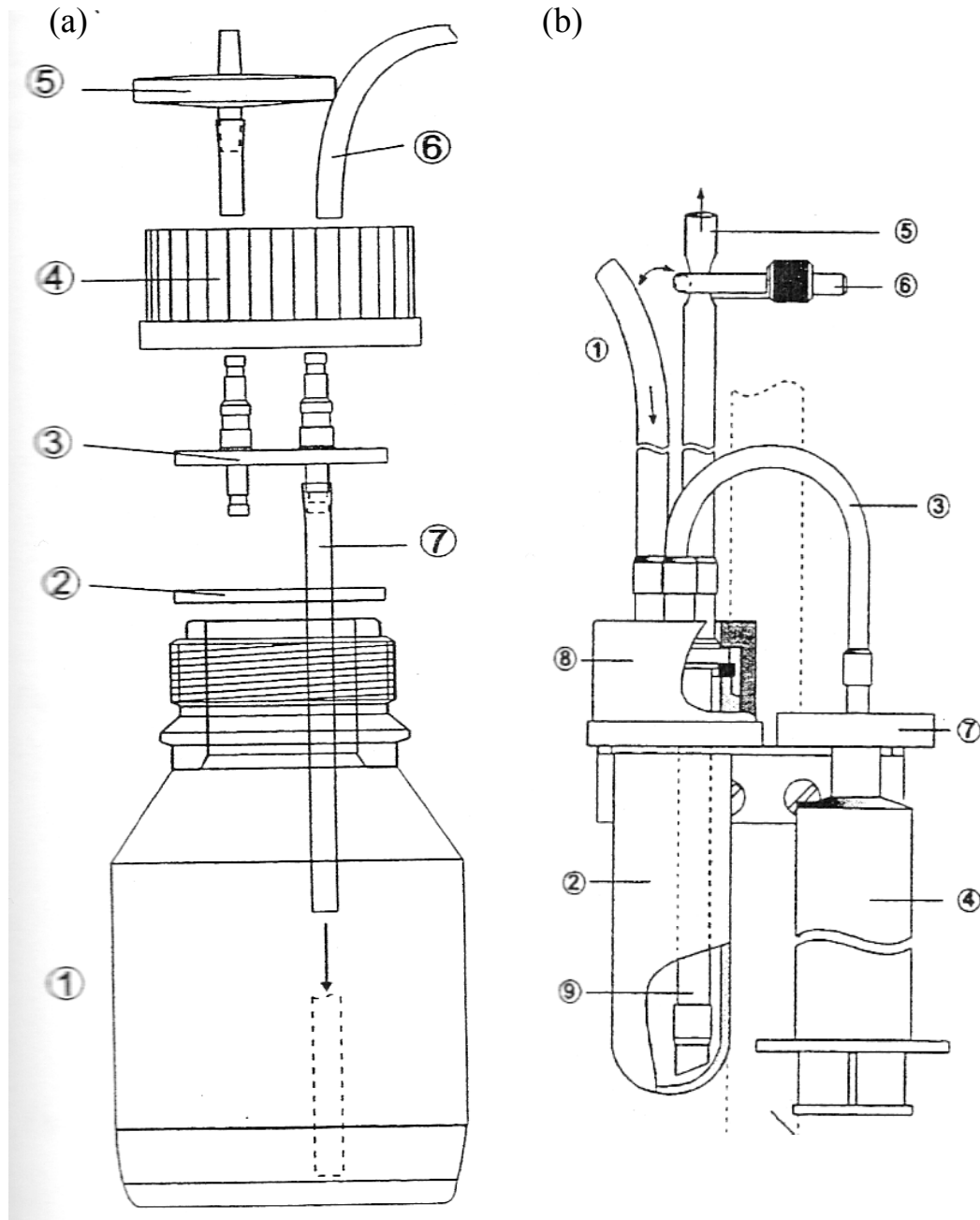


Fig. 1 接種瓶(a)與取樣管(b)之組裝。(a)：1 瓶身 2 墊圈 3 雙管鐵片 4 瓶蓋 5 Air Filter 6 矽膠管 7 矽膠管。

(b)：1 矽膠管接培養槽 2 管身 3 矽膠管接 4 抽氣針筒 5 矽膠管接取樣針筒 7 Air Filter 8 瓶蓋 9 長管伸至管底。

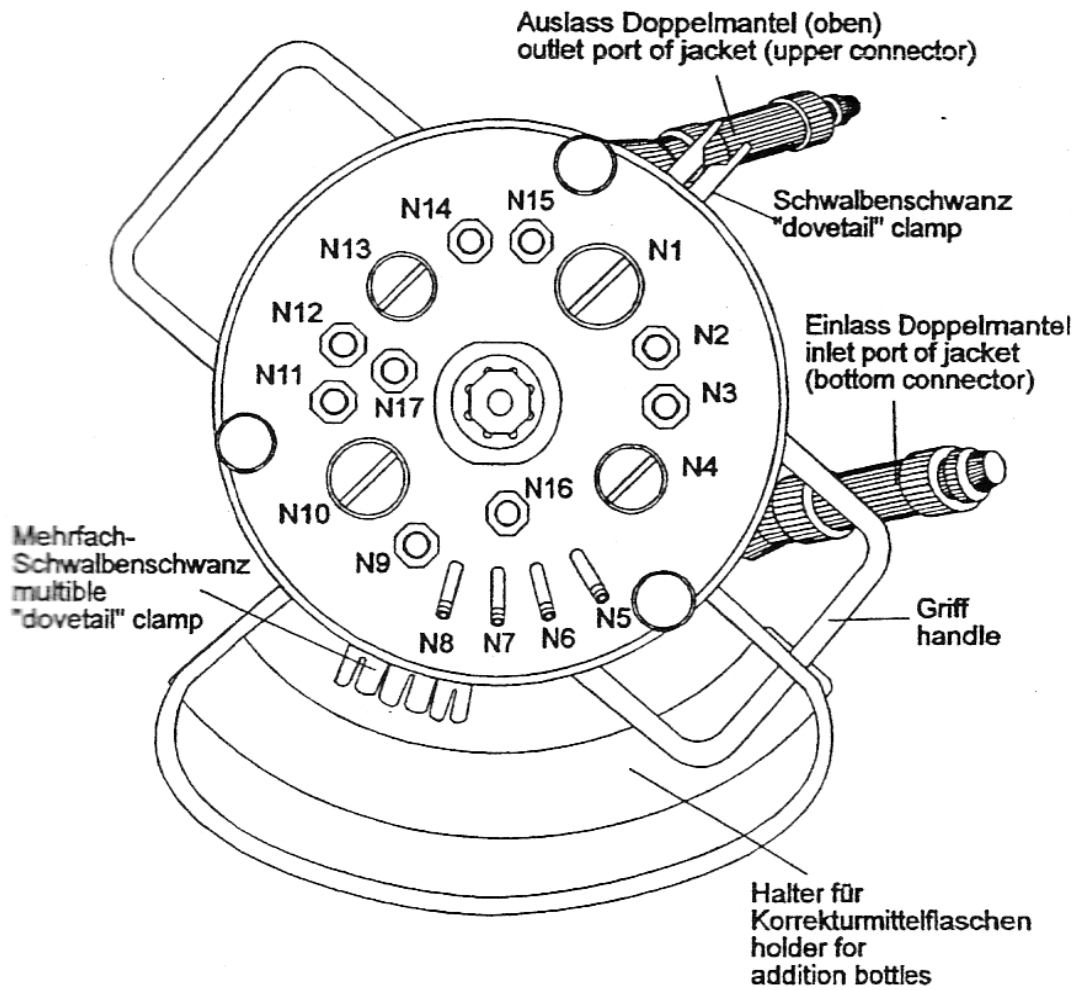


Fig. 2 Culture Vessel 上方俯視。N1 冷凝管，N2 Temperature Sensor，N3 Sparger，N4 pO₂ electrode，N5 注水孔，N6 細胞接種管，N7 病毒接種管，N8 通氣孔，N11 取樣管，N14、N15 無氣泡通氣蛇管。其餘接口無使用。

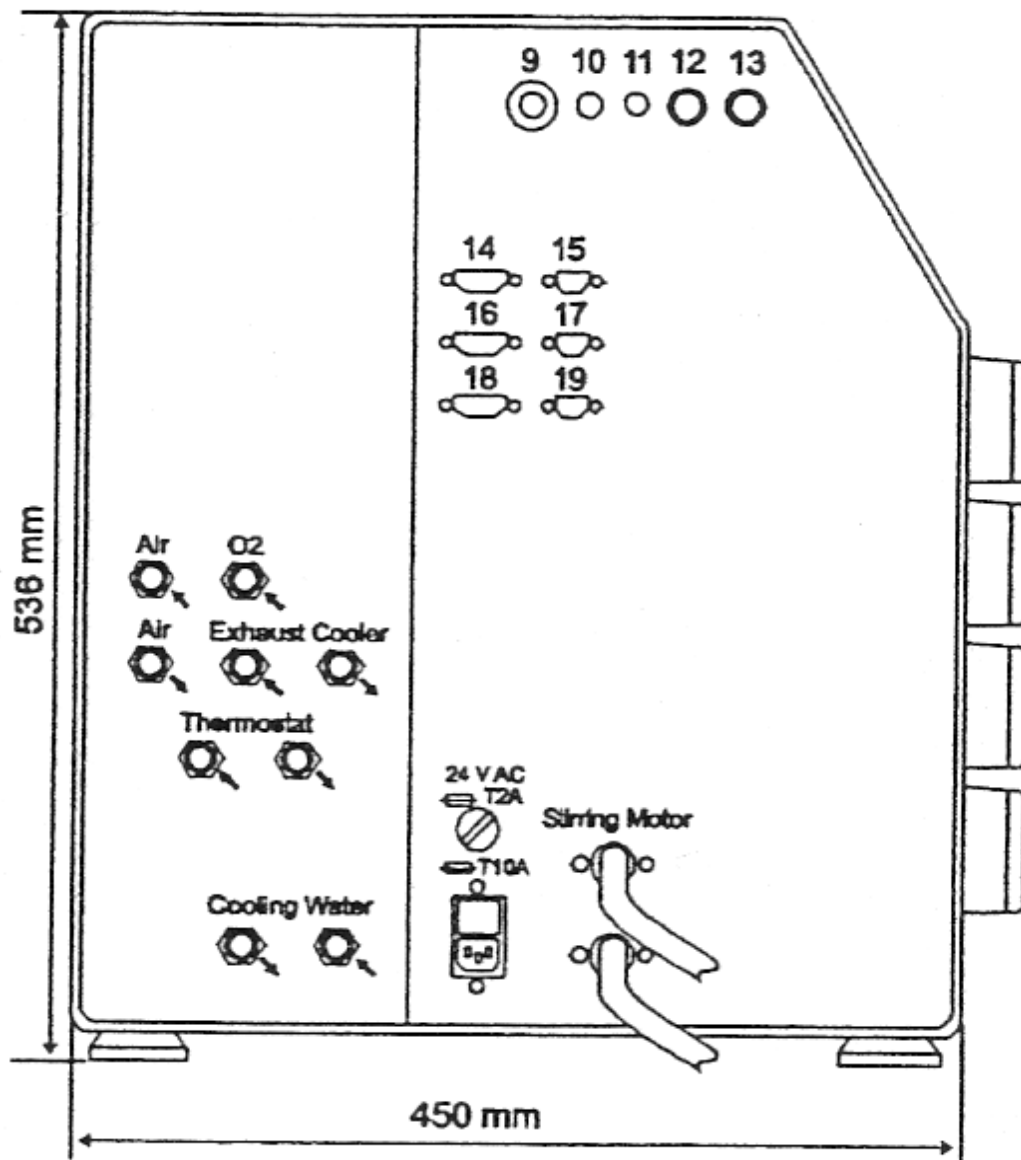


Fig. 3 Control Unit 側面接點示意圖。

5 Attachment/Reference

1. Operation Manual of BIOSTAT[®] B, B. Braun Biotech, Sartorius group

6 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091129

A-2 以切向流過濾系統濃縮 EV71 VLP

1 PURPOSE:

This protocol describes the procedure for concentrating and dialyzing the cell culture media containing EV71 VLP by Tangential flow filtration (TFF) system .

2 MATERIALS

Materials and Instruments:

- Peristalsis pump (Cole-Parmer, MASERFLEX[®])
- Millipore-TFF system (Millipore)
- Millipore PELLIOCN[®] XL FILTER (Millipore, Biomax, 1000kDa)
- Tris (J. T. Baker, Cat No. 4109-01)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Sigma, Cat No. E5134)
- NaCl (Sigma, Cat No. 13423)
- MgCl₂ (Sigma, Cat No. M8266)
- NaOH (AMRESCO, Cat No. 1310-73-2)
- NaClO (SHOWA, Cat No. 0152-1250)
- Tergazyme (Alconox, Cat No. 1304)

Reagent preparation:

➤ 10X stock Tris-EDTA buffer (TE buffer)

Add 12.114 g Tris, 3.632 g EDTA to about 950 ml ddH₂O, adjust the pH to 7.4 by HCl and then make up with ddH₂O to 1000 ml. Sterilize the solution with a 0.22 micron filter and store at room temperature in a closed container for no longer than 6 months at 4 °C.

➤ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)

Mix 100 ml of 10X stock Tris-EDTA buffer with 900 ml ddH₂O to make 1 L TE buffer; prepared freshly.

➤ 2 M MgCl₂ stock

Carefully and slowly dissolve 9.521 g MgCl₂ in 80 ml TE buffer followed with adding TE buffer to 100 ml. Store at 4 °C in a closed container for no longer than 6 months.

➤ TE⁺ buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl and 2 mM MgCl₂, pH 7.4)

Dissolve 5.85 g NaCl in 800 ml TE buffer and add 1 ml 2 M MgCl₂ following with adding TE

buffer to 1 L; store at 4°C and should be used within 6 months.

Note: TE⁺ buffer 只比 TE buffer 多了 NaCl 及 MgCl₂，而加此二成分會使 VLP 更穩定。

➤ **0.5 N NaOH**

Dissolve 40 g NaOH in 2 L ddH₂O. Sterilize the solution with a 0.22 micron filter and store at room temperature (RT) in a closed container for no longer than 6 months.

➤ **250 ppm NaClO**

Mix 500 µl NaClO with 2 L ddH₂O. Sterilize the solution with a 0.22 micron filter and store at RT in a closed container for no longer than 6 months.

➤ **0.2 % Tergazyme**

Add 4g Tergazyme in 2 L ddH₂O. Sterilize the solution with a 0.22 micron filter and store at RT in a closed container for no longer than 6 months.

3 PROCEDURE:

The structure of Millipore-TFF system:

1. **Cover** : 樣品槽的上蓋，蓋上時可使得容器完全密閉
2. **Vent port** : 真空閥，操作時都是密閉的
3. **Millex vent filter** : 因 Vent port 操作時都是密閉的，所以不加 filter
4. **Tank out port** : 樣品槽內溶液流出口，通常直接連接軟管，再連接蠕動幫浦
5. **Reservoir shut-off valve** : 通常不加此開關
6. **Feed in port** : 通常直接連接軟管，蠕動幫浦送過來的溶液由此進入
7. **Feed pressure gauge** : 溶液流入過濾膜的壓力
8. **Perm 1 out** : 通過過濾膜的溶液出口 1，通常是封住的
9. **Retentate pressure gauge** : 過濾膜出口的壓力
10. **Permeate tubing** : 通過過濾膜的溶液流通管
11. **Perm 2 out** : 通過過濾膜的溶液出口 2，通常溶液由此出口流出
12. **Ret out port** : 未通過過濾膜的溶液出口
13. **Dia recirc** : 當操作 dialysis 時，此入口通入 dialysis buffer；當用於 wash 沖洗時，則連接 Permeate tubing 使得 wash buffer 持續回流
14. **Retentate tubing** : 未通過過濾膜的溶液流通管
15. **Ret in port** : 未通過過濾膜的溶液回流入儲存槽的入口
16. **Retentate back pressure valve** : 調整過濾膜出口的壓力的流量閥

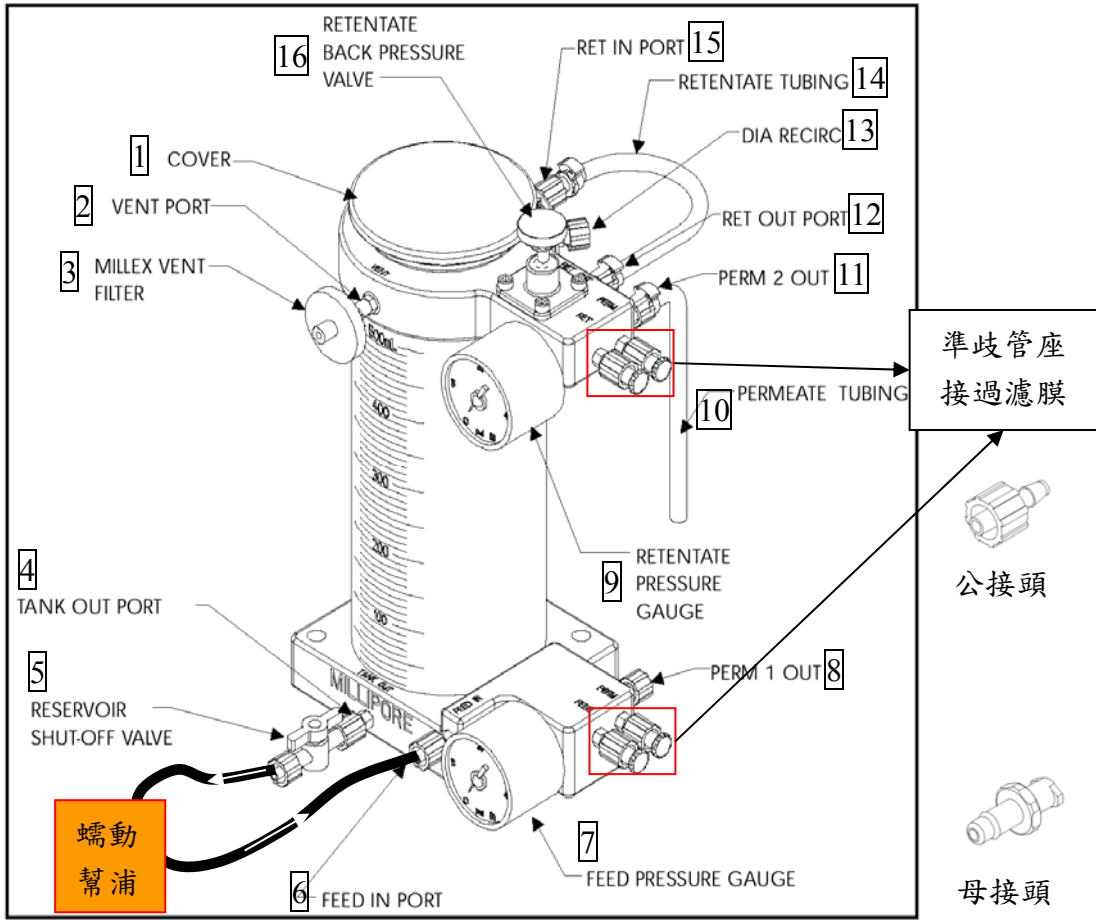


Fig. 1

TFF 系統的架設與前處理

1. 架設 TFF 系統：將管匣上四個塞子移開將管匣上標有 FEED、RET、PERM 1 及 PERM 2 的接對準歧管座相同名稱之相對位置 bad.(如圖 2 所示)。

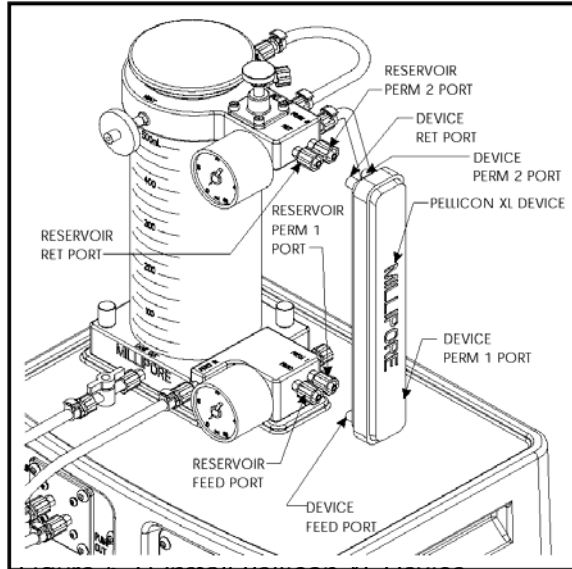


Fig. 2

2. 切一段軟管約 15 cm 並安裝 2 個接頭移開標有 RET OUT 及 RET IN 的位置上之塞子。將母接頭插入 RET OUT，母接頭插入 RET IN，在插入的同時旋轉接頭使其牢固鎖住(如圖 3 及 4 所示)

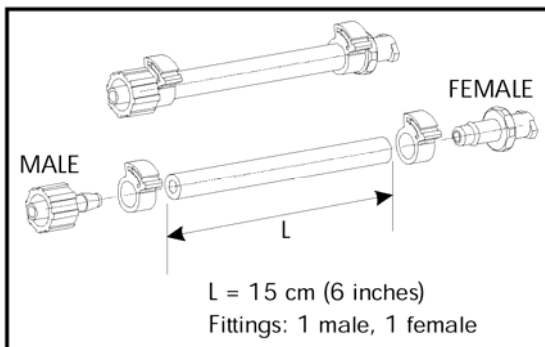


Fig. 3

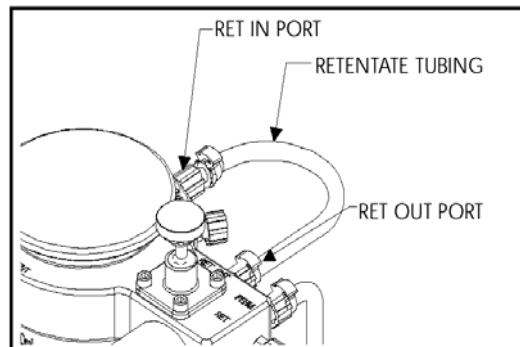


Fig. 4

3. 切一段軟管使之足以放入收集瓶中，並安裝接頭於其上。並將上述公接頭鎖入 PERM 2 之接頭中(如圖 5 及 6 所示)。

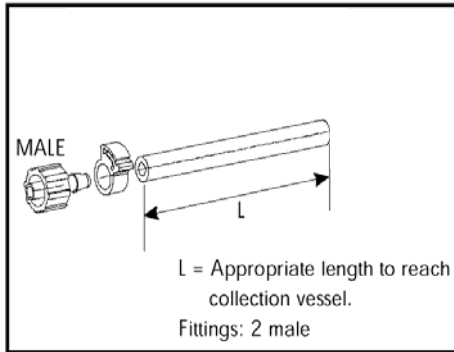


Fig. 5

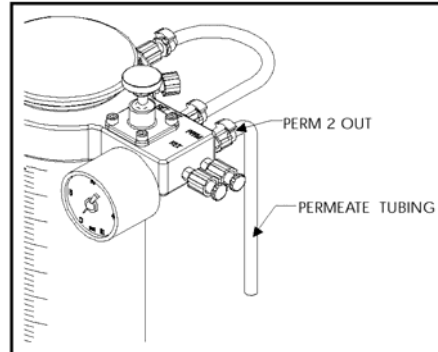


Fig. 6

4. 將 RET IN 接頭上之軟管移開，連接另一較長的軟管於其上，使其長度足夠放入廢液收集瓶。將 PERMEATE 軟管放入廢液收集瓶(如圖 7 所示)。

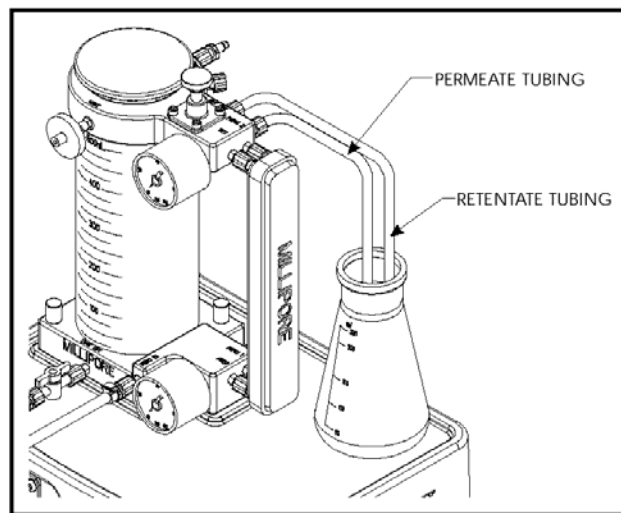


Fig. 7

5. 開樣品槽上蓋，注入 500 mL 純化水啟動 PUMP、增加轉速直到進口壓力錶指針為 20 psi。進口壓力錶所顯示之壓力為樣品經過 PUMP 輸送至 Pellicon XL 超過濾膜管匣(Feed)之壓力→ P_{IN} 。出口壓力錶所顯示之壓力為樣品流經 Pellicon XL 超過濾膜管匣之後出口端 (Retentate) 之壓力→ P_{OUT} ，而其壓力乃由上岐管座之調壓閥 (Retentate back pressure valve) 來控制(如圖 8 所示)。

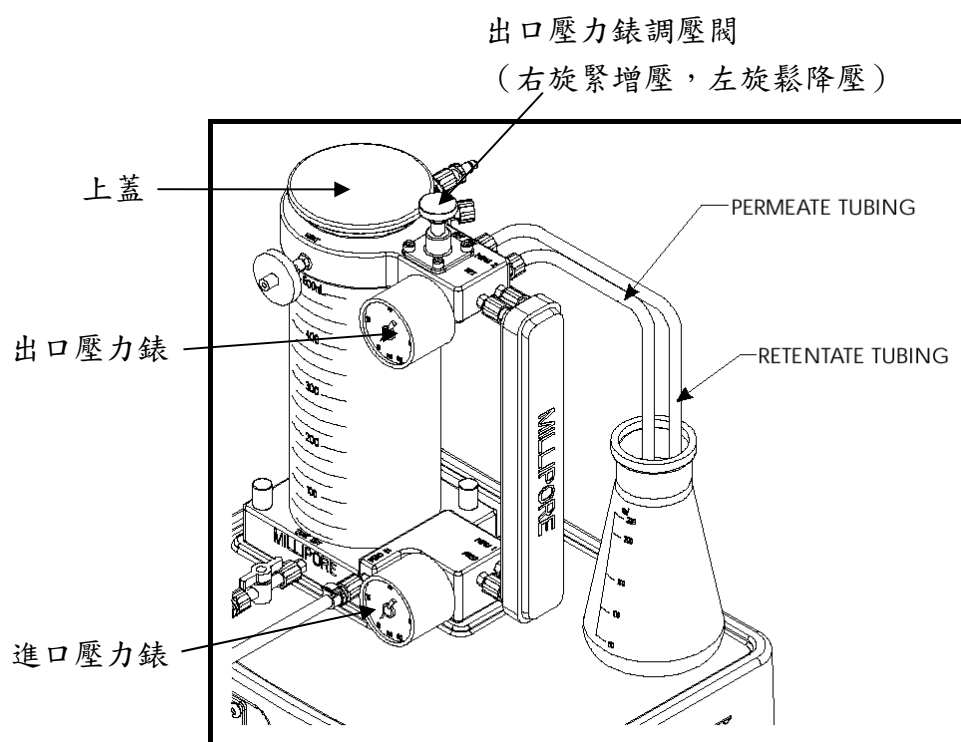


Fig. 8

6. 待樣品槽之液位為 250 mL 時，測定清水通透率(以量筒量測 Permeate Tubing 每分鐘流速，紀錄清水通透率及當時的溫度於紀錄本中，當清水通透率低於 50 ml/min 時，則考慮更換過濾膜，否則可能會使得過濾及透析的時間拉長，可能對樣品造成不良影響。)
7. 將 RET IN 接頭軟管接回原來位置，啟動 PUMP、增加轉速直到進口壓力錶指針為 20 psi (如圖 4 所示)
8. 慢慢調整 Retentate valve (回流閥)(順時針方向)，直到出口壓力錶指針達到 10 psi。
9. 調整 PUMP 轉速及回流閥使進口壓力達到 30 psi 及回流壓力 10 psi。
10. 檢查各接頭及管線，若有滲漏請將接頭或軟管鎖緊。
11. 待樣品槽之液位為 50 mL 時，將 PUMP 關掉，倒掉樣品槽內殘餘的水。

TFF 系統的操作

12. 移開樣品槽之上蓋，放入欲濃縮之樣品(例如以 Bac-P1-C3CD 感染 Sf-9 後，離心收取的胞外 VLP)，啟動 PUMP，增加 PUMP 轉速使進口壓力錶達到 20 psi。
13. 緩慢調整蠕動幫浦 PUMP 轉速，使進口壓力達到 30 psi，再調整回流閥(順時針方向)使回流壓力達到 10 psi。
14. 持續在相同條件下操作，直到預定濃縮之體積時(濃縮的倍率為 20 倍)，結束濃縮程序，將 PUMP 關閉。
15. 取一段約 50 cm 之軟管並安裝 1 個公接頭於其上，確認軟管長度足夠放入透析液容器內(如圖 9 所示)。

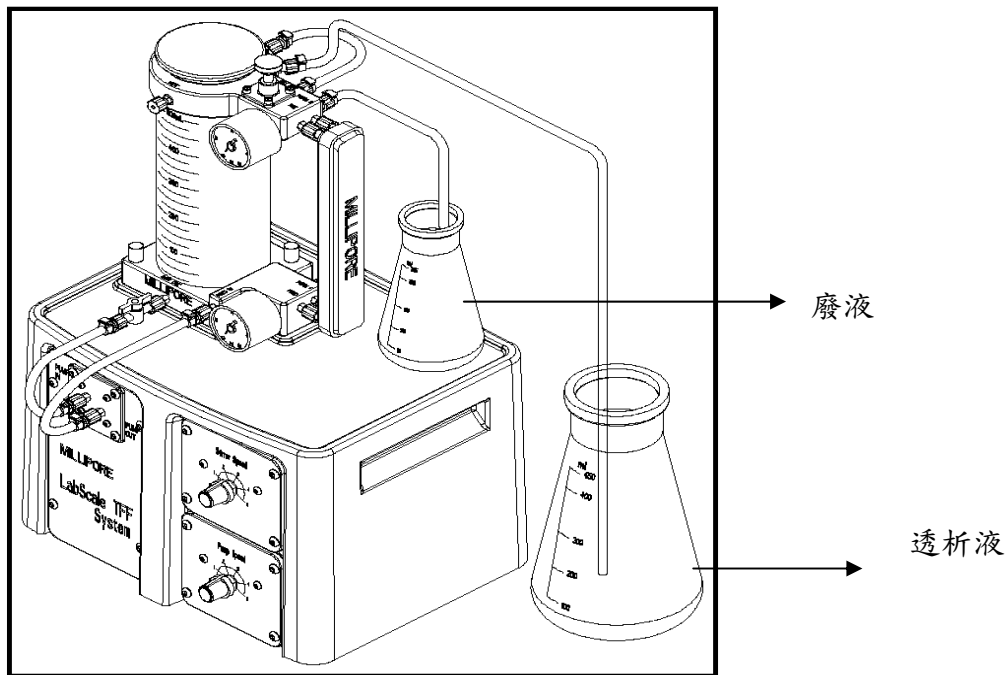


Fig. 9

16. 將上述軟管接頭鎖入位於樣品槽上端標有 DIA/RECIRC 之接頭中，將 VENT 接頭鎖上塞子。務必確認樣品槽上蓋有蓋緊，否則將使得樣品槽內無法形成負壓，造成透析液無法吸入樣品槽內而使整個系統乾掉。
17. 取一容器注入 500 ml 透析液 TE⁺ 並將透析軟管放入透析液中，開啟 PUMP 使進口壓力達到 30 psi 及回流壓力 10 psi。
Note: 若純化類病毒顆粒最為後續超高速離心純化用途則透析液為 TE⁺，若要使用膠體過濾層析法則透析為其他溶液。若軟管底部在液面之上則會因為吸不到透析液而造成系統乾掉。
18. 當系統開始操作時，滲透軟管開始流出滲透液(不含有類病毒顆粒的溶液)，此時樣品槽便會產生負壓，將 TE⁺ buffer 吸入樣品槽。
19. 持續在相同條件下操作，直到透析至最終濃縮液的 8 倍體積以上(例：原始含有 VLP

的上清液有 1L，首先進行濃縮到 50 ml，在以 400 ml 的 TE⁺ buffer 透析)，將 PUMP 關閉結束透析步驟。

20. 樣品回收：將標有 FEED IN 上之接頭取下放進收集瓶中，啟動 PUMP 調整轉速使樣品槽含有 VLP 之液體排出至一 50 ml 離心管當中凍存於-80 °C。

Note: 可以取一些經過透析步驟的 VLP 溶液來測 ELISA，與原本未濃縮透析前的 VLP 溶液的 ELISA 值比較算出回收率，一般而言根據韋蓁學姐的實驗結果回收率都可以在 50-60% 左右。若低於 50-60%則可能生產出來的 VLP 有問題。

TFF 系統的清洗

21. 以水浴槽加熱清洗液(0.5 M NaOH, 250 ppm NaClO, 0.2% Tergazyme)至 47 °C。
22. 將 RET IN 接頭上之軟管移開，連接另一較長的軟管於其上，使其長度足夠放入廢液收集瓶（如圖 9 所示）。
23. 移開樣品槽上蓋，注入 500 mL 的 250 ppm NaClO (47 °C)，開啟 PUMP 使進口壓力達到 30 psi 及回流壓力 10 psi。
24. 待樣品槽之液位為 250 mL 時，將 PUMP 關掉，將滲透軟管之出口安裝於 DIA/RECIRC 之接頭上並將 RET IN 接頭軟管接回原來位置（如圖 10 所示），啟動 PUMP 使進口壓力達到 30 psi 及回流壓力 10 psi，循環清洗系統 30 分鐘。
25. 清洗完 30 分鐘後，將 RET IN 接頭上之軟管移開，連接另一較長的軟管於其上，使其長度足夠放入廢液收集瓶（如圖 9 所示）。
26. 啟動 PUMP 使樣品槽內的溶液都流入廢液桶中，待樣品槽之液位為 50 mL 時，將 PUMP 關掉，倒掉樣品槽內殘餘的溶液。
27. 重複步驟 23、24、25 及 26，但更換清洗液為 0.2 % Tergazyme (47 °C)。
28. 重複步驟 23、24、25 及 26，但更換清洗液為 0.5 NaOH (47 °C)。
29. 待清洗步驟完成後，加入 500 ml RO water，使管匣溫度回復到室溫。
30. 重複步驟 5 及 6 方式測定清水通透率，紀錄於紀錄本中。若清水通透率未達使用前通透率之九成則重複清洗系統步驟，清洗完畢後倒掉剩餘的水。
31. 在樣品槽加入 500 ml 的保存液(0.1 N NaOH)，重複步驟 23、24、25 及 26，讓系統循環清洗 30 分鐘。
32. 將管匣拔除，並保存於 4 °C 中。以自來水清洗整個系統後以 RO water 潤洗整個系統後完成實驗。

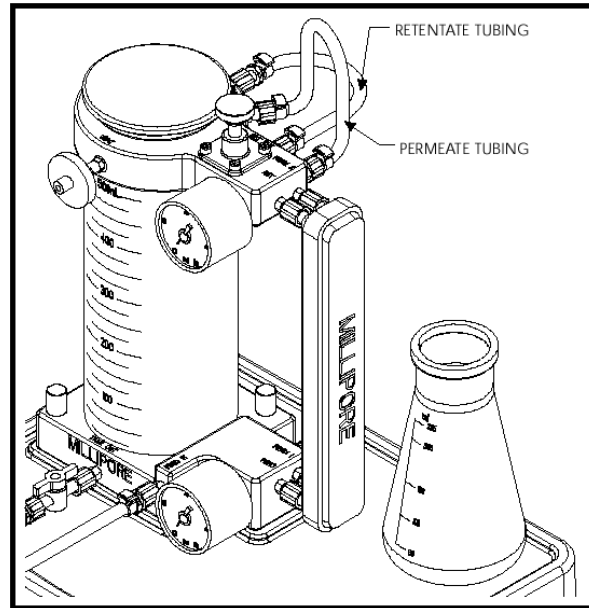


Fig. 10

4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

A-3 以 SDS-PAGE 分析 EV71 VLP

1 PURPOSE:

This protocol describes the procedure for analyzing the samples containing enterovirus 71 virus-like particle (EV71 VLP) by SDS-PAGE.

2 MATERIAL:

Materials and Instruments:

- Rocking platform shaker (15 cycle/min)
- Vortex mixer (Scientific Industries)
- Pipettes (Eppendorf Research)
- 0.22 micron filter (Sartorius, Cat No. 16534)
- ddH₂O
- TEMED (Sigma, T9281)
- 30% Acrylamide / Bis solution, 29:1(BIO-RAD, Cat No. 161-0156)
- Ammonium Persulfate (Sigma, Cat No. A-9164)
- Sodium Dodecyl Sulfate (J.T.Baker Cat No. 4095-04)
- Glycerol (瑞豐化工)
- 2-mercaptoethanol (Sigma, Cat No. M-7154)
- Coomassie Brilliant Blue (Sigma, Cat No. B-0149)
- Tris-base (J.T.Baker, Cat No. 4109-01)
- Glycine (J.T.Baker, Cat No. 4059-2)
- Methanol (Mallinckrodt Baker, Cat No. 3016-22)
- Bromphenol Blue (Sigma, Cat No. B-8026)
- Glacial Acetic Acid (聯工化學製藥)

Buffer preparation:

- **4x Sample Buffer** (0.25 M Tris-HCl, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue)
Mix 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH6.8), 4.0 mL of 10% SDS, 2.0 mL glycerol, 1.0 mL concentrated 2-mercaptoethanol, and 0.4 mg bromphenol blue (you may use less but don't add more than 0.4 mg). QS to 10 mL with ddH₂O. Transfer to 1 mL aliquots and store at -20°C.

- **5x Tris-Glycine Electrophoresis Buffer (1 L)**
Dissolve 15.1g Tris base, 94g glycine, and 50 mL 10% SDS in 700 mL ddH₂O, and then adjust the volume to 1L with ddH₂O.
- **Staining Solution (1L)**
Mix 2.5g Coomassie Brilliant Blue, 450 mL methanol, and 100ml glacial acetic acid; adjust the volume to 1L with ddH₂O.
- **Fast Destaining Solution (1 L)**
Mix 400mL methanol, and 100mL glacial acetic acid; adjust the volume to 1L with ddH₂O.
- **Slow Destaining Solution (1 L)**
Mix 70mL Methanol, and 50 mL glacial acetic acid; adjust the volume to 1L with ddH₂O.

3 PROCEDURE:

Gel preparation: (for 2 pieces)

Gel compositions for 12% resolving gel and 4% stacking gel

Component	Running gel(10 mL)	Stacking gel (4 mL)
ddH ₂ O	3.3 mL	2.7 mL
Acrylamide:Bis (29:1) (30% w/v)	4 mL	0.67 mL
1.5M Tris pH8.8	2.5 mL	-
1M Tris pH6.8	-	0.5 mL
SDS (10% w/v)	0.1 mL	0.04 mL
APS (10% w/v)	0.1 mL	0.04 mL
TEMED	0.006 mL	0.004 mL

Running gel: Before adding APS and TEMED, swirl the tubes gently. Pipette the solution to the gel sandwich to a level of 4 cm from the top. Add about 0.5 mL of isopropanol on it. A very sharp liquid interface will be visible.

Stacking gel: Fill the gel sandwich with stacking gel solution and insert a comb (0.75 mm; 10 wells/15 wells) into each place taking care not to trap any bubbles bellow the teeth.

Sample preparation:

- 3-1 Mix 30 μL sample and 10 μL 4X sample buffer. Boil the mixture at 95°C for 5 min.
*(*DO NOT* leave the sample in sample buffer without heating; endogenous proteases are very active in SDS sample buffer and can cause severe degradation. Once heated, sample could sit at RT for a short time until loading or at -20°C for a long time.)
- 3-2 Incubate the samples in -20°C for a while, and then spin down with 13000 rpm for 2 min.

Gel electrophoresis:

1. Assemble the running chamber; dilute the 5X Tris-Glycine Electrophoresis Buffer to 150 mL with ddH₂O and pour into the spaces between two pieces of gel sandwiches.
2. Load the sample to each well. (15 μL for 15 wells/ 20 μL for 10 wells)
3. Use blank to fill the useless well. Load the prestained protein marker lastly.
4. Apply 70V for 25 min, and then raise the voltage to 110V for 60 min.

Stain and De-stain:

1. Disassemble the apparatus and take out the gel.
2. Remove the stacking gel and wash the gel with RO water.
3. Place the gel in a plastic plate and make it soaked in adequate staining solution for 1 hour under extensive agitation.
4. Soak the gel in adequate fast destaining solution for 1 hour under extensive agitation.
5. Use slow destaining solution to wash the gel under extensive agitation not until the protein bands are clearly seen with little background staining of the gel.
6. Use RO water to wash the gel overnight under extensive agitation.

4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

A-4 以 Western-blot 分析 EV71 VLP

1 PURPOSE:

This protocol describes the procedure for measuring the samples containing enterovirus 71 virus-like particle (EV71 VLP) by Western Blot.

2 MATERIAL:

Materials and Instruments:

- Rocking platform shaker (15 cycle/min)
- Vortex mixer (Scientific Industries)
- Pipettes (Eppendorf Research)
- ddH₂O
- 0.22 micron filter (Sartorius, Cat No. 16534)
- TEMED (Sigma, T9281)
- 30% Acrylamide / Bis solution, 29:1(BIO-RAD, Cat No. 161-0156)
- Ammonium Persulfate (Sigma, Cat No. A-9164)
- Sodium Dodecyl Sulfate (J.T.Baker Cat No. 4095-04)
- Glycerol (瑞豐化工)
- 2-mercaptoethanol (Sigma, Cat No. M-7154)
- Coomassie Brilliant Blue (Sigma, Cat No. B-0149)
- NaCl (Sigma, Cat No. 13423)
- KCl (Sigma, Cat No. 31248)
- Tris-base (J.T.Baker, Cat No. 4109-01)
- Glycine (J.T.Baker, Cat No. 4059-2)
- Methanol (Mallinckrodt Baker, Cat No. 3016-22)
- Glacial Acetic Acid (聯工化學製藥)
- Amido Black 2X concentrate (Sigma, Cat No. A-8181)
- Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate; Sigma, Cat No. P1379)
- Skim milk (Anchor)
- Purified rabbit anti EV71 VP1 polyclonal antibody (supplied by Pro. Bor-Luen Chiang in NTU)
- Goat anti-rabbit monoclonal antibody, alkaline phosphatase (AP) conjugated (Chemicon, Cat No. 3324)
- BCIP/NBT (Sigma. Cat NO. B5655)

Buffer preparation:

➤ **10X stock Transfer Buffer:**

Add 30.3 g Tris and 144.1 g glycine to about 950 mL ddH₂O, adjust the pH to 8.3 and then make up with ddH₂O to 1000mL. Store at 4°C.

➤ **1X Transfer Buffer:**

Mixed 100 ml 10X stock transfer buffer with 700 mL ddH₂O and 200 mL CH₃OH, stored at 4°C.

➤ **5X Tris Buffered Saline:** (TBS for 1 L)

Add 40g NaCl, 1.5g Tris, and 1g KCl to 900 mL ddH₂O, adjust the pH to 7.4 with HCl and then make up with ddH₂O to 1000mL.

➤ **1X Tris Buffer Saline with Tween 20:** (TBST for 1L)

Mix 200 mL TBS with 800 mL ddH₂O, add 500 µL Tween 20.

➤ **Blocking buffer:**

Add 5% (w/v) of skim milk to TBST, stir to suspend completely.

➤ **1st antibody solution:** add purified rabbit anti EV71 VP1 polyclonal antibody (1:2500) to blocking buffer.

➤ **2nd antibody solution:** add goat anti-rabbit monoclonal antibody (1:2500) to blocking buffer.

➤ **BCIP/NBT solution:** use about 9 mL ddH₂O to dissolve the BCIP/NBT tablet and make up with ddH₂O to 1000mL.

3 PROCEDURE:

3-1 Separate proteins by SDS-PAGE.

3-2 Assemble the transfer sandwich in a tray large enough to hold the plastic transfer cassette. Fill with transfer buffer so that the cassette is covered. The black side should be down, submerged to start the sandwich. The transfer cassette should be assembled under buffer to minimize trapping of air bubbles.

3-3 On bottom half of the plastic transfer cassette, place a fiber pad, followed by two piece of filter paper prewet with transfer buffer.

3-4 When SDS-PAGE is complete, disassemble the gel sandwich and remove the stacking gel. Briefly equilibrate the gel in transfer buffer for a while.

3-5 Place the gel on top of filter paper. Remove any air bubbles between gel and filter paper by gently rolling a test tube or glass rod over the surface of the gel. *Protein will not transfer where there are air bubbles.*

3-6 Moisten surface of the gel with transfer buffer. Place NC membrane directly on top side of gel and remove all air bubbles as in step 5. Some proteins will transfer as soon as the gel is placed on the membrane; *repositioning the gel or membrane can result in a smeared or double image on the developed blot*

- 3-7 Wet another piece of filter paper, place over the membrane and remove all air bubbles. Place a fiber pad on top.
- 3-8 Complete the assembly by locking the top half of the transfer cassette into place (white side). Fill the tank with transfer buffer and place transfer cassette containing sandwich into electroblotting apparatus in correct orientation
- 3-9 Run at 100V for 1 hour. Put the tank on a stir plate and insert a stir bar. *Stirring is important for preventing hot spots in the tank.*
- 3-10 Take out the NC membrane after transfer. Use of amido black staining can be helpful to cut NC membrane into the size as required.
- 3-11 Put the NC membrane into blocking buffer for 0.5 hr at R.T. with extensive agitation. (or 4°C overnight)
- 3-12 Block the NC membrane in blocking buffer for 0.5 hour at room temperature with gentle rocking. (or 4°C overnight)
- 3-13 Incubate the NC membrane in 1st antibody solution for 1 hour at room temperature (or 4°C overnight). This is done using a heat-sealable pouch. Make sure the membrane is completely covered and no bubbles exist. Use a minimal volume of antibody solution (5 ml per blot).
- 3-14 Wash the NC membrane with TBST for 3 times for 5 minutes under extensive agitation, each in fresh TBST.
- 3-15 Incubate the NC membrane in 2nd antibody solution for 1 hour at room temperature. This is also done using a heat-sealable pouch. Make sure the membrane is completely covered and no bubbles exist. Use a minimal volume of antibody solution (5 ml per blot).
- 3-16 Wash the same as for the primary antibody, in step 14.
- 3-17 Move the NC membrane to a clean plastic plate; add 500 µL BCIP/NBT solutions on the membrane to detect the band to and fro. As there are some bands appear, use another 500 µL fresh BCIP/NBT solutions to color the membrane.
- 3-18 Use some RO water to wash the membrane until all the bands are clear enough.
- 3-19 Air-dry the membrane. Preserve in a heat-sealable pouch.

4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

A-5 以 ELISA 分析 EV71 VLP 濃度

1 PURPOSE:

This protocol describes the procedural for measuring the samples containing enterovirus 71 virus-like particle (EV71 VLP) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

2 MATERIAL:

Materials and Instruments:

- 96 wells microtiter plates (Nunc Maxi-Sorp).
- Rocking platform shaker (15 cycle/min)
- Vortex mixer (Scientific Industries)
- 8-channel pipette (Eppendorf Research)
- Pipettes (Eppendorf Research)
- ELISA reader with 450 nm filter (Thermo, Multiskan EX[®])
- 0.22 micron filter (Sartorius, Cat No. 16534)
- NaHCO₃ (Sigma, Cat No.S3817)
- (+)-Biotin (N-hydroxy-succinimide ester; Sigma, Cat No. H1759)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma, Cat No. D2650)
- NaCl (Sigma, Cat No. 13423)
- Na₂HPO₄ (Sigma, Cat No. 04273)
- KH₂PO₄ (Sigma, Cat No. 30407)
- KCl (Sigma, Cat No. 31248)
- BSA (Bovine serum albumin, fraction V; Sigma, Cat No. A7030)
- Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate; Sigma, Cat No. P1379)
- TMB substrate solution (Sigma, Cat No. T0440)
- H₂SO₄ (Sigma, Cat No.)
- VLP Standard Stock Solution (highly purified VLP, 1 µg/ml in PBS in -70°C)
- Rabbit anti VLP polyclonal Antibody (Ab), 3.8 mg/ml, used as Capture Ab (supplied by Pro. Bor-Luen Chiang in NTU)
- Mouse anti-EV71 monoclonal Ab, used as Detection Ab (Chemicon, Cat No. 3324)

Reagent preparation:

- **10X stock phosphate buffered-saline (PBS):**
Add 80 g NaCl, 22.6 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ and 2 g KCl to about 950 mL ddH₂O, adjust the pH to 7.4 and then make up with ddH₂O to 1000mL. Sterilize the solution with

a 0.22 micron filter and store at room temperature in a closed container for no longer than 6 months.

- **Coating Buffer** (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7.4):
Mix 100 ml 10X stock PBS with 900 mL ddH₂O; prepared freshly.
- **Blocking Buffer** (PBS with 0.5% BSA and 0.05% Tween 20):
Add 100 ml 10X stock PBS, 5 g bovine serum albumin (BSA; fraction V) and 0.5 ml Tween 20 to 800 mL ddH₂O, mix the solution until all BSA and Tween 20 were dissolved and then make up with ddH₂O to 1000mL. Sterilize the solution through 0.22 micron filter and store the solution at 2-8°C in a closed container for no more than 3 months.
- **100 mM NaHCO₃ buffer** (pH 9):
Add 8.4 g NaHCO₃ to about 950 mL ddH₂O, adjust the pH to 9 by NaOH and then make up with ddH₂O to 1000mL. Sterilize the solution with a 0.22 micron filter and store at room temperature; prepared freshly.
- **Capture Ab** (Rabbit anti VLP polyclonal Ab):
Dilute Capture Ab to Blocking Buffer at ratio of 1:10000. For 1 plate analysis, dilute 1 µl of Capture Ab to 10 ml of Blocking Buffer.
- **Biotin solution (1mg/ml)**:
Dissolve 100 mg of biotin into 100 ml DMSO, aliquote the biotin solution into 1 mL/eppendrof and store the solution at -80°C.
- **Detection Ab** (biotin conjugated mouse anti-EV71 monoclonal Ab):
Add 1 ml mouse anti-EV71 monoclonal Ab (chemicon Cat. No 3324) to 19 ml NaHCO₃ buffer in a 50 ml tube. Pre-wet the suitable size (about 4-5 cm) of dialysis bag in NaHCO₃ buffer, dialyze the Ab against NaHCO₃ buffer at 4°C overnight. Mix the Detection Ab (20 ml) with 1/8 volume (2.5 ml) of biotin solution (1 mg/ml) and react at 4°C overnight. After reaction, dialyze the solution against 1 L PBS at 4°C overnight. Aliquote the biotin-conjugated monoclonal EV71 Ab into 1 mL/eppendrof (about 22-23 eppendrofs) and store at -80 °C.
- **Wash Solution** (PBS with 0.5% BSA and 0.05% Tween 20):
Add 100 ml 10X stock PBS and 0.5 ml Tween 20 to 800 ml ddH₂O, mix the solution until all Tween 20 dissolved and then make up with ddH₂O to 1000 ml. Sterilize the solution through 0.22 micron filter and store the solution at 2-8°C in a closed container for no more than 3 months.
- **Stop Solution** (1N H₂SO₄):
Add 10 ml 36N H₂SO₄ to 350 ml ddH₂O, store it at room temperature (RT) and use it within 6 months.

3 PROCEDURE:

Coating of the plate with capture Ab:

- 3-1 Determine the number of ELISA plate(s) needed for the assay. One ELISA plate needs 10 ml capture Ab solution.
- 3-2 Prepare the capture Ab solution by diluting 1 μ l of thawed Rabbit anti-VLP Ab stock solution (3.8 mg/ml) into 10 ml of Coating Buffer. This preparation is enough for one ELISA plate application
- 3-3 Add 100 μ l of the capture Ab solution into each of the 96-well plate.
- 3-4 Incubate the plate at RT for 2 hours with a slow rocking on the rocking platform or 4°C overnight.

Note: Each rocking platform may have different speed setting. The setting at 15 cycle/min rocking platform is sufficient for slow rocking speed.

- 3-5 Remove the capture Ab solution and block the plate by adding 200 μ l Blocking Buffer to the plate, then reacting at RT for 60 min in rocking platform shaker.

Note: If the coated plate is not to be used for testing on the same day, it can be stored at 2-8°C for 10 days.

Preparation of the standard and samples:

ng/ml Standard	(μ l) of Standard	(μ l) of Blocking Buffer
31.25	150 of #1	150
15.63	150 of #2	150
7.81	150 of #3	150
3.91	150 of #4	150
1.95	150 of #5	150

Note: Preparation of the standard and samples freshly is best for the experiment, so step 3-6 to 3-8 are insert to this. It may take a lot of time to prepare the sample dilutions, so samples could be dilute before the experiment, and use the sample as soon as possible.

- 3-6 Remove a vial of VLP Standard Stock Solution from -80°C storage and thaw to RT.
- 3-7 Dilute the VLP standard stock solution (1 μ g/ml) with Blocking Buffer to a final concentration of 62.5 ng/ml by adding 20 μ L of VLP Standard Stock Solution into 300 μ l Blocking Solution and it is served as Standard dilution #1. Vortex to mix. Prepare standard dilution #2, #3, #4, #5 and #6 by serially two-fold dilution as follows.

3-8 Dilute the VLP samples with the Blocking Solution, according to type of samples as follows:

3-8-1 The culture media from the infected cells contained about 0-50 µg/ml VLP, the dilution ratio should be 1:100 to 1:800 (Sample:Blocking Solution)

3-8-2 The concentrated samples or the samples come from purified processes should be dilute more depending on the concentration ratio.

Note: If any first test result of sample is not within the linear range of the standard curve, re-test the sample, using the dilutions that give OD reading within linear range of the standard curve.

Sample incubation:

3-9 Remove the Blocking Buffer at step 3-5

Note: In this and all wash steps, remove any excess liquid in each well by turning the plate upside down and gently tap 2-3 times on clean paper towels. Assure that there is no air bubble remaining in any well. Quickly reverse the plate to remove the wash solution is a skilled technique, **contamination between wells may occur in un-practiced operation.**

3-10 Wash the plate four times with 150 µl washing solution per well. Make sure all wells are filled with wash solution during each wash cycle. Remove all buffers after washing steps.

3-11 Transfer 100 µl of each VLP Standard and sample dilutions into a coated plate well and each dilution in duplicate (optimal: triplicate) wells.

3-12 Cover the plate with a plate sealer and incubate at room temperature for 2 hours with slow rocking.

3-13 Repeat step 3-10

Adding the Detection Ab:

3-14 Thaw the 3 tube (for one plate) of Detection Ab (Biotin conjugated mouse anti-EV71 monoclonal Ab solution) from -80°C storage and dilute with 3X volume of Blocking Solution. Prepare a minimum of 10 ml Detection Ab dilution for each assay plate.

3-15 Add 100 µl per well of diluted Detection Ab to the plate. Incubate at RT for 1 hour with slow rocking.

3-16 Repeat step 3-10.

3-17 Add 100 µl of TMB Substrate Solution into each well, allow color to develop in the dark place at RT for 5 minutes.

3-18 Add 50 µl of Stop Solution into each well.

Note: Plate should be read within 30 minutes after adding Stop Solution.

Reading the optical density (OD):

- 3-19 Read the OD on the Microplate Reader at 450 nm.
- 3-20 If the OD data of any unknown sample are out of the linear range of standard curve, comment on the “Dilution Record for Standards and Samples” sheet that the particular sample is to be re-tested with the corrected dilutions.

For data analysis and acceptance criteria:

- 3-21 Save all raw data for each assay plate with the assay date, time, plate number and operator’s name.
- 3-22 Record and analyze all the Standard OD₄₀₅ reading with its assigned concentration into Microsoft Excel program for standard curve.
- 3-23 Calculate the final concentration of unknown samples, using Microsoft Excel Spreadsheet program for statistical analysis.

The assay is valid when:

- The coefficient of determination for the standard curve (r^2) must be ≥ 0.95 for the test to be valid. If the standard curve r^2 is less than 0.95, report to supervisor to investigate and determine whether the assay is to be repeated.

4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

A-6 以 TEM 觀察 EV71 VLP 的型態

1 PURPOSE:

以 TEM 觀察 VLP 顆粒的外觀形狀及大小。

2 MATERIAL:

Materials and Instruments:

- VLP 樣品液：待分析之 VLP 樣品濃度需為 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 。
- TEM 用鍍碳銅網 200 mesh copper grids (TED Pella Inc. , Cat No.01800-F)。
- phosphotungstic acid (PTA, Sigma, Cat No. HT152) 以 ddH₂O 作為溶劑稀釋至 1%，並以 1 N NaOH 將 pH 調至 7.4，配製完成後以 0.22 micron filter 過濾並靜置於室溫。
- 反式鑷子 (PELCO, Cat No. 525)。
- 0.22 micron filter (Sartorius, Cat No. 16534)
- Transmission electron microscope (TEM): 清華大學貴重儀器中心，清大生科一館 115 室(Hitachi, H-7500)

3 PROCEDURE:

3-1 於室溫下，將 TEM 鍍碳銅網樣品面(暗面)朝上，並置於石蠟封口膜(parafilm)上，取 10 μl 純化後的 VLP 樣品液滴在銅網上，待靜置吸附 10 分鐘後，以棉紙自銅網邊緣吸除多餘液滴。

Note: VLP 樣品液需垂直滴落於銅網樣品面上，樣品液需以棉紙完全吸乾後再進行負染步驟。

3-2 取 500 μl 的 1% PTA 染劑裝入 eppendorff 中，以桌上型離心機離心 13000 rpm 15 分鐘。

3-3 離心完成後，取靠近液面的 PTA 染劑，將 10 μl 的 1% PTA 滴在銅網上，進行負染 3-5 分鐘後，再以棉紙吸除多餘染劑。

Note: 為避免吸取到染劑析出物，盡量吸取離心後靠近液面之染劑為佳。此外，負染的時間可能會因樣品的不同而有所差異。以類病毒顆粒為例，負染 3-5 分鐘可以將染劑染上。若負染樣品在 TEM 視野下，發現背景不夠深或是染到的區塊不多，可以將負染的時間再拉長。

3-4 銅網樣品面朝上，置於除濕下的冷氣房中風乾兩天隔夜，即為 TEM 樣品。

Note: 已經製備完成的 TEM 樣品，適當保存可至少存放數個月，但製備完成後盡快照 TEM 為佳。

3-5 使用 TEM 觀察類病毒顆粒大小及完整性。

Note: TEM 儀器為委託操作，預約時間請電洽(03) 5715131 ext 62241 張小姐。

4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

A-7 以粒徑分析儀分析 EV71 VLP 的粒徑

1 目的:

以粒徑分析儀分析樣品溶液中之 VLP 粒徑分佈。

2 材料:

- VLP 樣品液：待分析之 VLP 樣品濃度至少為 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上。
- PBS (phosphate buffered- Saline): 0.2 g/L KCl (Sigma), 0.2 g/L KH_2PO_4 (Sigma), 8 g/L NaCl (Sigma), 2.86 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 溶於 dd H_2O 中，以 pH meter 將 pH 調至 7.4，並以 0.22 micron filter 過濾。
- 0.22 micron filter (Sartorius, Cat No. 16534)
- 粒徑分析儀 (Malvern zetasizer nanozs)
- 粒徑分析用 Y 型拋棄式樣品室 (FEBRA, Cat No. 1310056)

3 方法:

3-1 開機，電源開關位於儀器的右後方，熱機至少 10 分鐘。

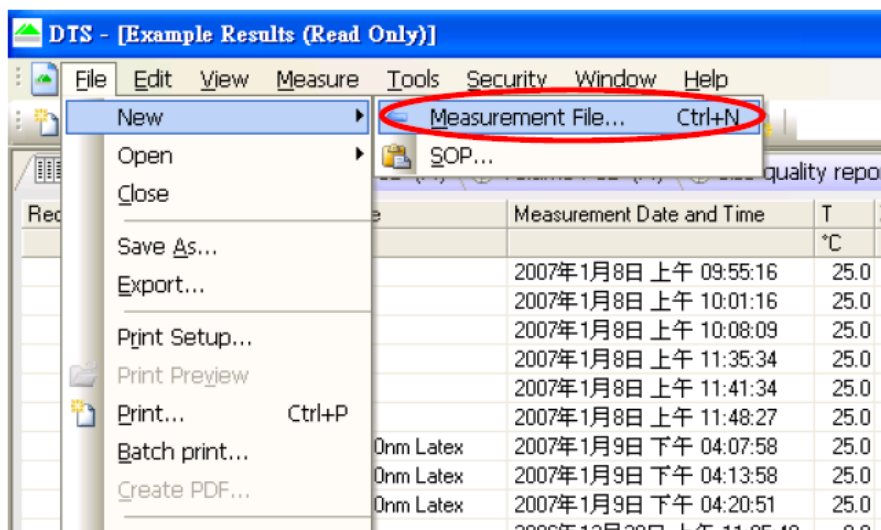
3-2 取一粒徑分析用拋棄式樣品室，將 VLP 樣品液滴入樣品室中，樣品體積至少為 0.5 ml，高度需介於 0.5~0.6 cm，將樣品室置入機器，準備分析。

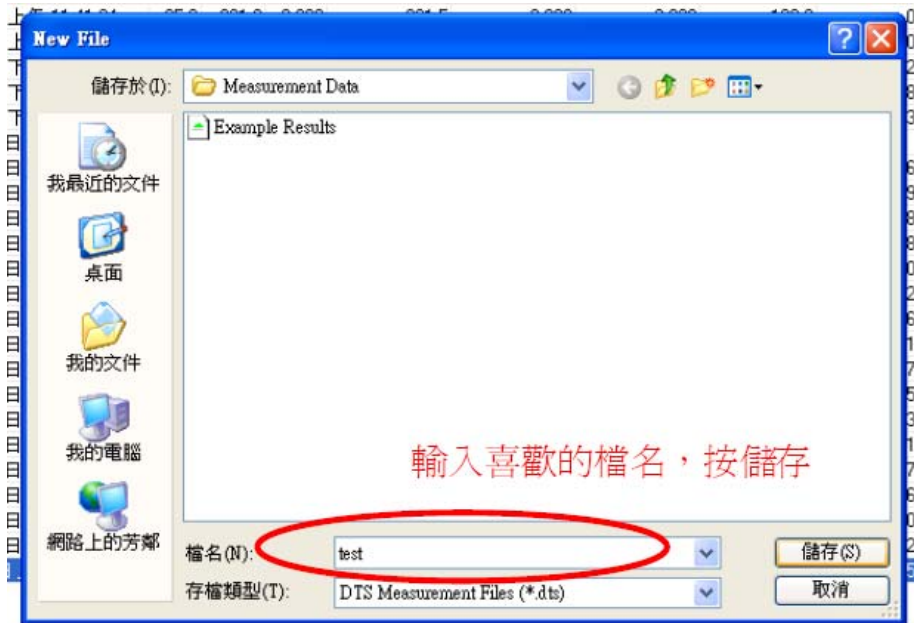
Note: VLP 樣品先以 PBS 於 eppendorf 中稀釋，濃度至少稀釋為 25 $\mu\text{g/ml}$ ，再滴入樣品室中。

3-3 電腦開機，點選桌面捷徑 DLS (Nano)。

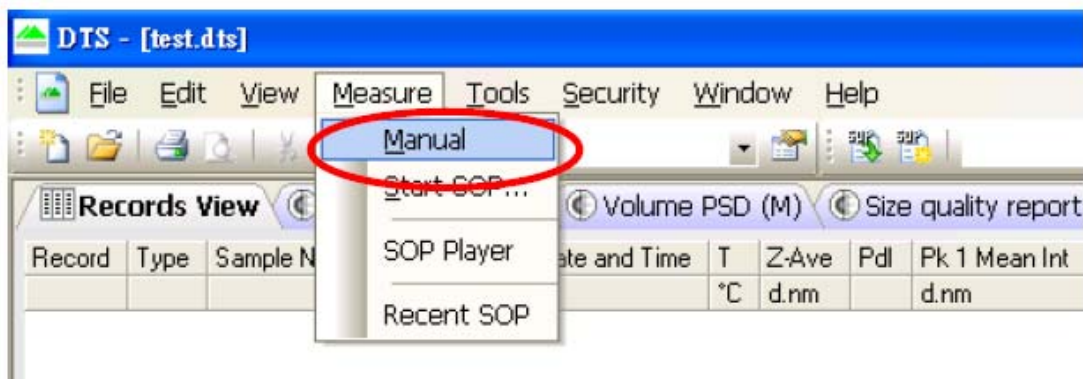
3-4 輸入 User name，可自行設定。

3-5 將畫面中按下 File→New→Measurement File... 中輸入檔案名稱，並儲存。

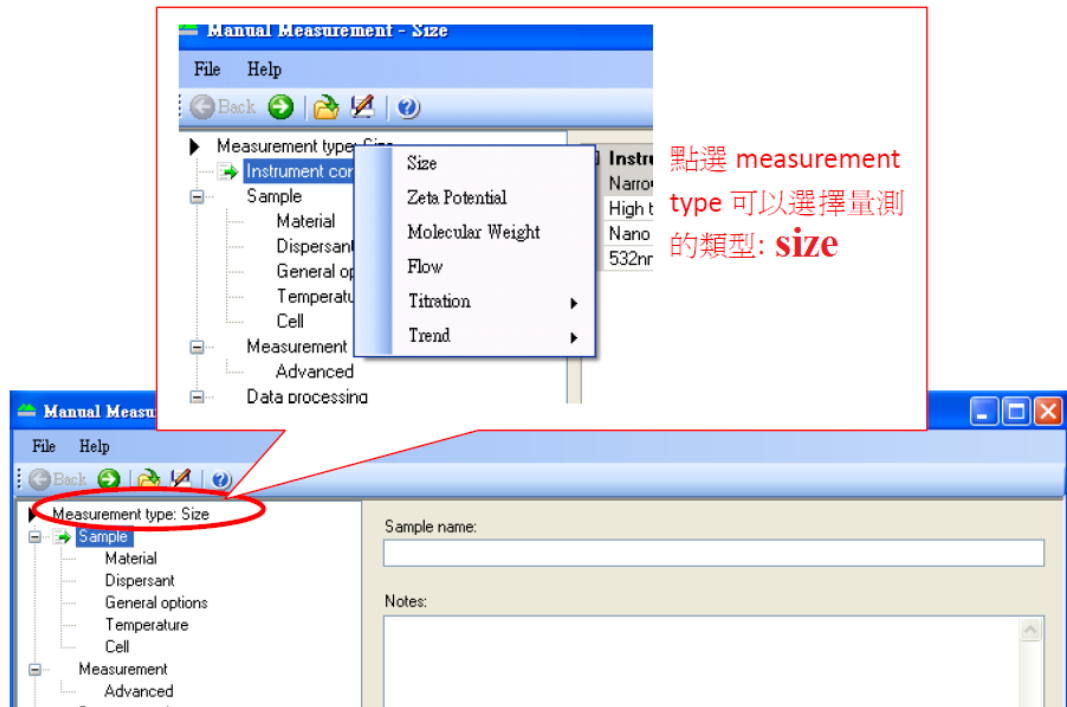




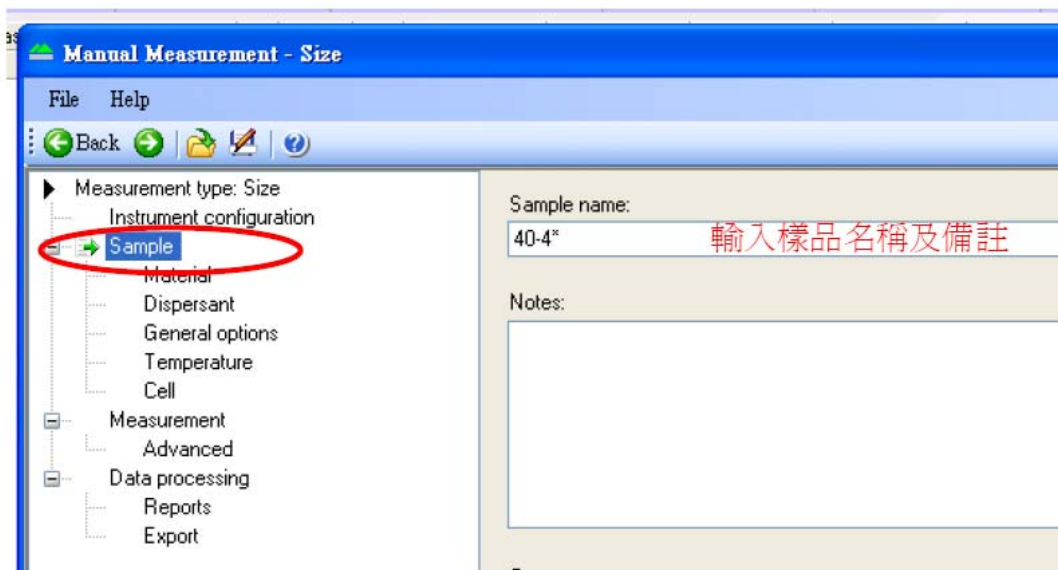
3-6 點選畫面上方 Measure→Manual，則進入設定分析資料的畫面。



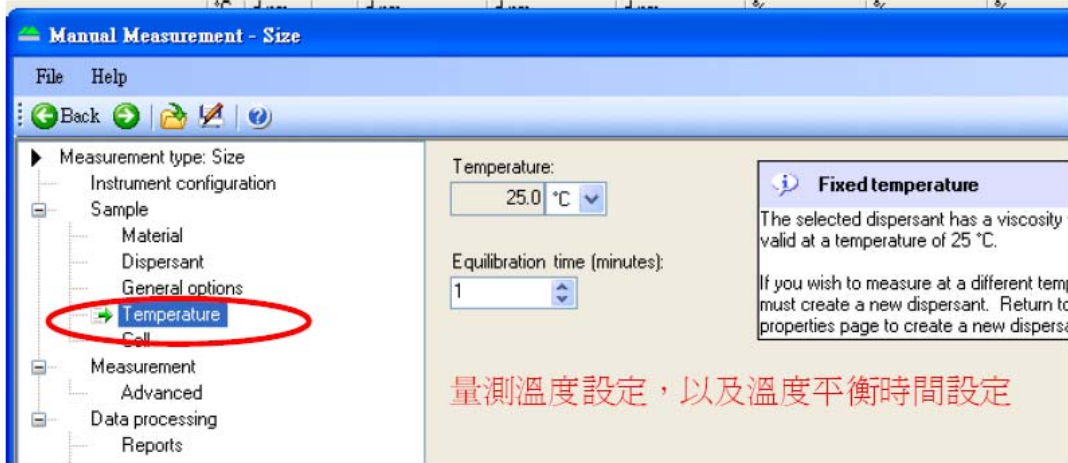
3-7 將滑鼠移至畫面中” Measurement type :” 處按下滑鼠左鍵，選取 Size。



3-8 將滑鼠移至畫面中” Sample ”處按下滑鼠左鍵，於畫面中之右欄鍵入樣品名稱及相關訊息。



3-9 將滑鼠移至畫面中” Temperature ”處按下滑鼠左鍵，於畫面中之右欄設定溫度為 25°C 及平衡時間為 1 分鐘。

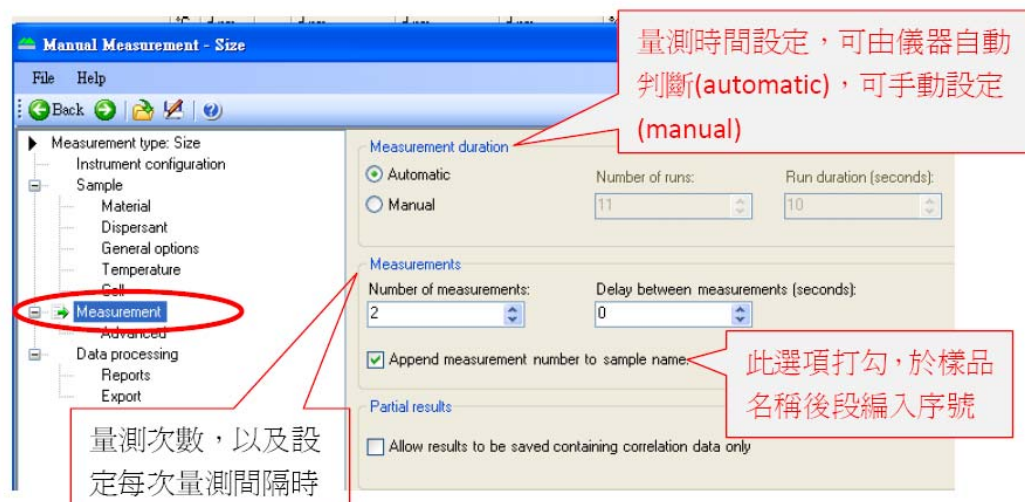


3-10 將滑鼠移至畫面中” Cell ”處按下滑鼠左鍵，於畫面中之右欄下拉頁面選擇樣品室: ZEN0112 - Low volume disposable sizing cuvette 。

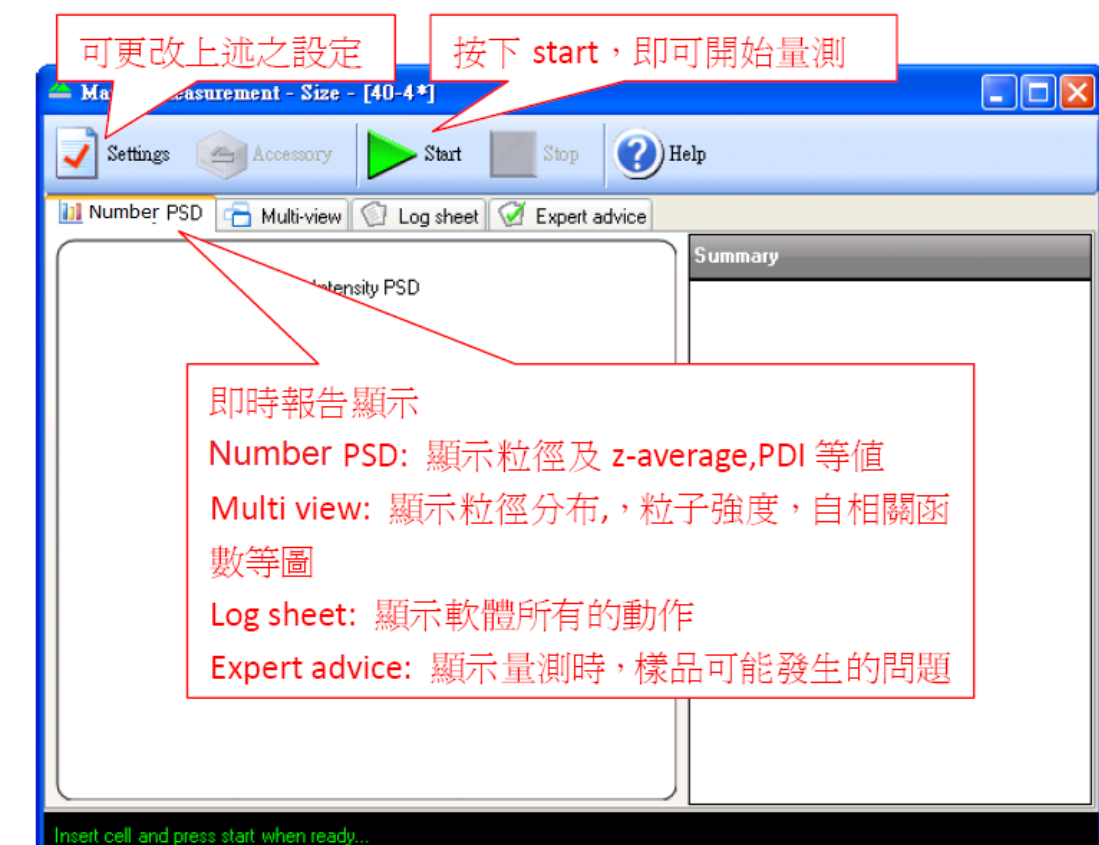
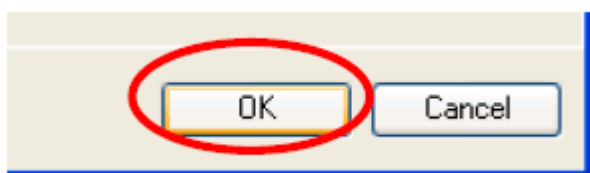


3-11 將滑鼠移至畫面中” Measurement ”處按下滑鼠左鍵，於畫面中之右欄 Measurement Duration 點選 Manual，Number of runs 設定為 10，Measurement 欄中鍵入 Number of measures (分析次數)，該設定值至少為 5。

Note: VLP 平均粒徑為五次測量值之平均值。



3-12 完成以上設定後，按下畫面中右下角之 OK 鍵，則進入分析畫面，按入畫面中 Start，則開始進行量測。



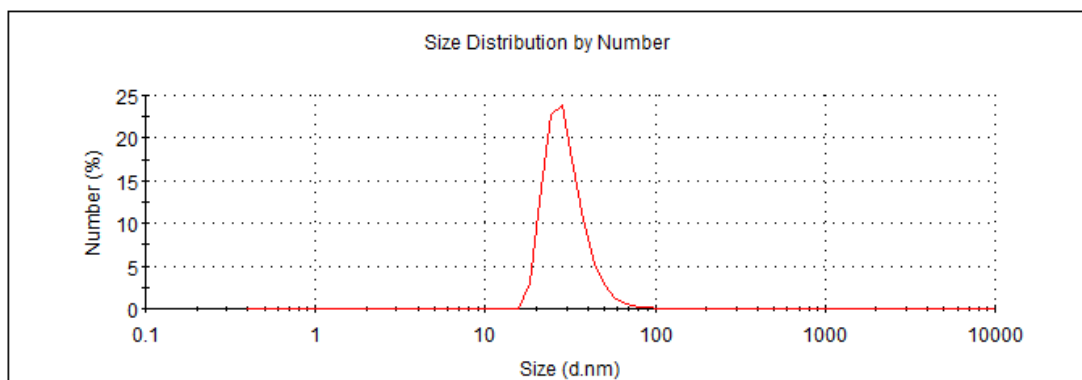
3-12 聽到一聲” 嘩...” ，表示分析完成，量測報告如圖，可知分析物之平均粒徑為 30.14 nm。

Sample Name: 20090918-VLP-4C-3w 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: 20091008.dts
Record Number: 2
Material RI: 1.45
Material Absorbtion: 0.00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1.330
Viscosity (cP): 0.8862
Measurement Date and Time: 2009年10月8日 上午 11:04:5

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 360.8
Cell Description: Low volume disposable sizing cuv...
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4.65
Attenuator: 10

	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 72.87	Peak 1: 30.14	100.0	9.214
PdI: 0.327	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.940	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good



4 Revision History

Version Number	Description of Change	Last Version Issue Data
1	New	20091120

B 工作紀錄表 (Worksheet)

B-1 細胞培養

Exp. #	Name:	Data:	Note:
--------	-------	-------	-------

Cell source			
Cell condition	Cell: _____; Passage No: _____ Media: _____ Culture container: _____ ml _____ flask at _____ rpm; (OD: _____%) Cell seeding density: _____ × 10 ⁶ cells/ml Cell viability: _____% Volume: _____ ml		
Culture condition	Time (month/day hr:min):	Cell density(× 10 ⁶ cells/ml):	Viability (%)
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

Infection			
Infection condition	Cell density: _____ × 10 ⁶ cells/ml Cell culture volume: _____ ml Virus: _____ (titer: _____ pfu/ml) Virus infection volume: _____ ml MOI: _____ MOI: _____		
Cell condition after infection	Time (month/day hr:min):	Cell density(× 10 ⁶ cells/ml):	Viability (%)
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

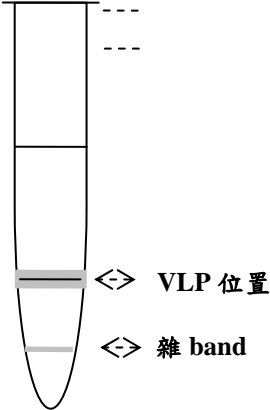
Harvest	
Harvest condition	Harvest timing: _____ (month/day hr:min); _____ hours post infection Cell density: _____ × 10 ⁶ cells/ml Cell culture volume: _____ ml Viability: _____ %
Storage condition	Infected Cell: _____ × 10 ⁶ cells in _____ ml _____ buffer at _____ °C Culture supernatant: _____ ml at _____ °C

B-2 超高速離心純化

Exp. #	Name:	Data:	Note:
Cell source			
Infection condition	Cell: _____ Cell density: _____ $\times 10^6$ cells/ml volume: _____ ml Virus: _____ (titer: _____ $\times 10^8$ pfu/ml) MOI: _____		
Harvest condition	Harvest timing: _____ hours post infection Viability: _____ % Cell number: _____ $\times 10^6$ cells re-suspended in _____ ml TE ⁺ buffer Storage: _____ °C		

Extraction of VLP	
Cell lysis	1. Sample used for purification: _____ $\times 10^6$ cells 2. <input type="checkbox"/> Freeze (-80 °C) and thaw (37 °C) three times 3. <input type="checkbox"/> Dilute the sample to $1-2 \times 10^7$ cells/ml by TE ⁺ buffer 4. <input type="checkbox"/> French Press by passing though #20 needle twice 5. <input type="checkbox"/> Add NP-40 to 1% (final concentration) and store at ice for 30 min
Debris removal	1. Centrifuge at 13000 rpm (CR22G, R20A2 rotor) for 30 min at 4°C 2. Remove _____ ml supernatant (contain VLP) to a new tube

1st Ultra-centrifugation	
Ultracentrifugation	1. Centrifuge at 30000 rpm (CP 100MX, P40ST rotor) for 5 hours at 4 °C

	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Sample (5 ml)</p> <p>20% CsCl (4 ml)</p> <p>30% CsCl (2 ml)</p> </div> <div style="width: 45%;">  <p>Note:</p> </div> </div> <ol style="list-style-type: none"> 2. Collect the fractions from bottom (0.6 ml/fraction), fraction numbers are defined from _____ to _____. 3. Check the location of VLP by anti-VLP western-blot
CsCl removal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pool the fractions (# _____) that contain VLP (confirm by western-blot), total was _____ ml 2. Add 4 times of above sample volume TE⁺ buffer (_____ ml) 3. Centrifuge at 30000 rpm (CP 100MX, P40ST rotor) for 2 hours at 4 °C 4. Re-suspend the pellet in _____ ml TE⁺ buffer

2nd Ultra-centrifugation	
Ultracentrifugation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Centrifuge at 38000 rpm (CP 100MX, P40ST rotor) for 24 hours at 4 °C 2. Collect sample form bottom (0.6 ml/fraction), fraction numbers are defined from _____ to _____. 3. Check the location of VLP by anti-VLP western-blot
CsCl removal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pool the fractions (# _____) that contain VLP (confirm by western-blot), total was _____ ml 2. Add 4 times of above sample volume TE⁺ buffer (_____ ml) 3. Centrifuge at 30000 rpm (CP 100MX, P40ST rotor) for 2 hours at 4 °C 4. Re-suspend the pellet in _____ ml TE⁺ buffer 5. Centrifuging at 6000 rpm (HERMLE Z200 M/H) for 30min, collect the supernatant _____ ml (most pure product) 6. Re-suspend all the pellet by another _____ ml TE⁺ buffer

Characterization	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Use SDS-PAGE to check the concentration and purity 2. Use western-blot and ELISA to calculate the recovery 	

B-3 蛋白質定量分析

Exp. #	Name:	Data:	Note:
--------	-------	-------	-------

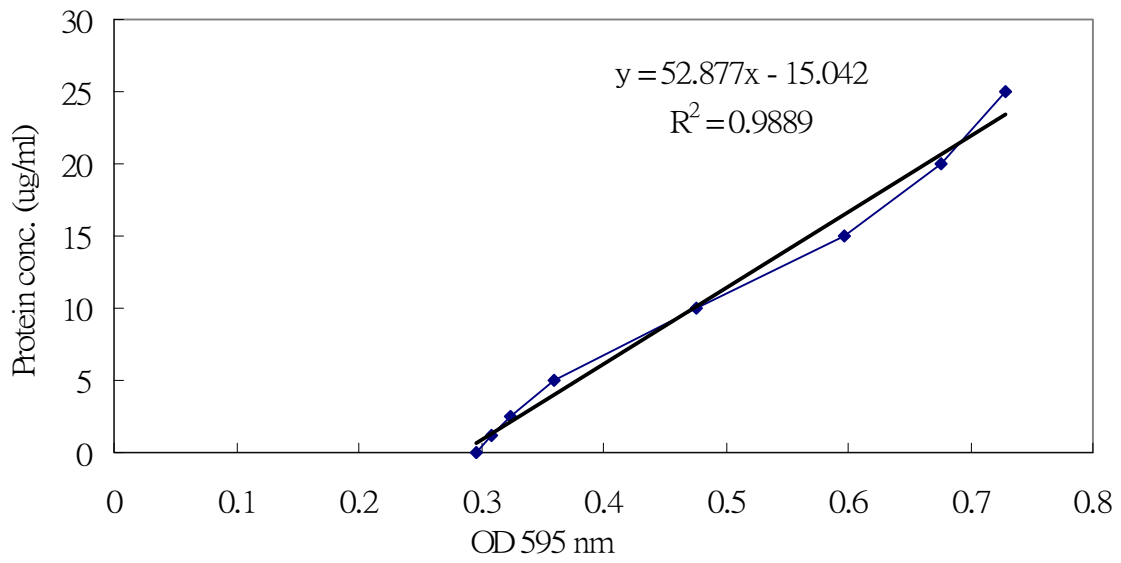
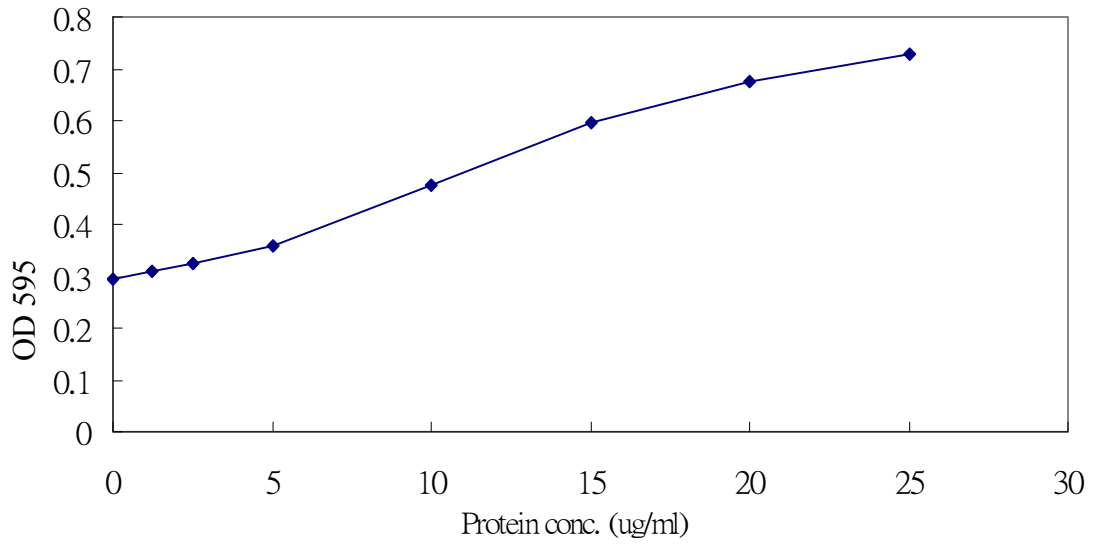
Sample source	
Batch No. :	_____
Production date:	_____
Volume:	_____ ml
VLP concentration (ELISA):	_____ $\mu\text{g/ml}$
VLP purity (SDS-PAGE):	_____ %

Preparation of Standard Line	
Standard source	<input type="checkbox"/> Commercial _____ Cat. # _____ Lot. # _____ concentration _____ mg/ml <input type="checkbox"/> Dissolve BSA powder in water, concentration _____ mg/ml
Standard line	Concentration range: _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$, _____ $\mu\text{g/ml}$.

Preparation of Diluted Samples	
Dilution fold	Dilution: _____ fold, add _____ μl sample into _____ μl water. _____ fold, add _____ μl sample into _____ μl water. _____ fold, add _____ μl sample into _____ μl water. _____ fold, add _____ μl sample into _____ μl water. _____ fold, add _____ μl sample into _____ μl water.

Result									
Standard line	Protein Conc. ($\mu\text{g/ml}$)								
	OD 595 nm								
Samples	Dilution fold								
	OD 595 nm								
	Protein Conc.								
	Average Protein Conc. ($\mu\text{g/ml}$)								

Plot



Note:

B-4 ELISA 分析

Exp#:	Date:	Name:
Purpose:		

Sample list

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Dilution fold

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Steps:	Volume (ml)	Reaction Time	Temperature (°C)	Times
1. Coating Capture Ab				
2. Blocking				
3. Wash				
4. Add Samples				
5. Wash				
6. Add Detection Ab				
7. Wash				
8. Add Streptavidin-HRP				

9. Wash				
10. Add TMB				
11. Add H ₂ SO ₄				

Dilute Method:

OD 450 nm reading-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

OD 450 nm reading-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

OD 450 nm Avg.

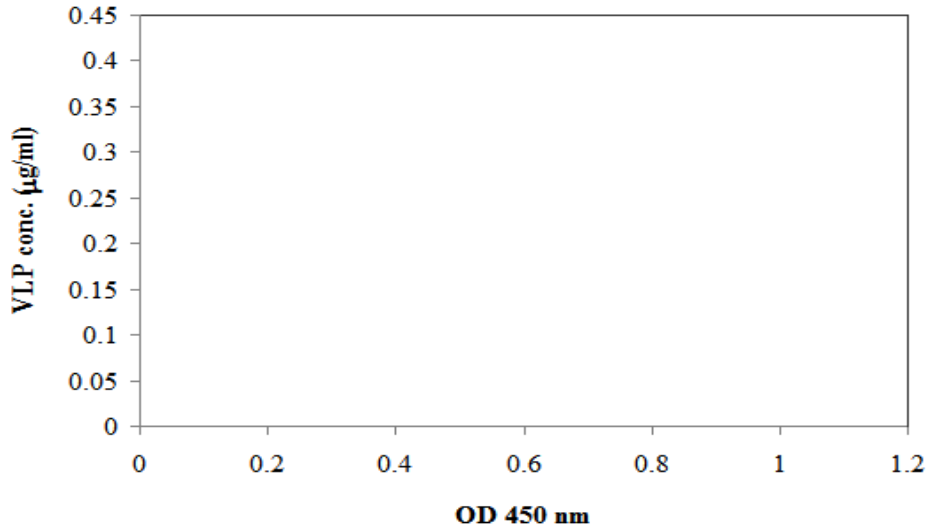
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Dilute fold

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Standard Curve

OD 450 nm										
VLP conc. (µg/ml)	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	0.003125	0.001563	



Sample list

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

VLP conc. (µg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

B-5 TEM 觀察 VLP 型態

Exp#:	Date:	Name:
Purpose:		

Sample	
VLP source	_____, Purity: _____%
Sample Number	_____
Concentration	_____ $\mu\text{l/ml}$
Temperature	_____ $^{\circ}\text{C}$

Mophology of VLP
Note:

B-6 以 DLS 分析 VLP 粒徑

Exp#:	Date:	Name:
Purpose:		

Sample	
VLP source	_____, Purity: _____ %
Dispersant	PBS (pH 7.4)
Incubated conditions	Volume: _____ ml
	Concentration: _____ μ l/ml
	Temperature: _____ $^{\circ}$ C, _____ days
	pH value: _____

Measurement	
Sample Number	Diameter (nm)
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____
	1 st . _____ 2 nd . _____ 3 rd . _____ 4 th . _____ 5 th . _____ Avg: _____

Note :

98 年度計畫期中報告具體建議及意見答覆

1. 請儘速決定採用之疫苗種籽株，並提供選株之 criteria。

回覆：我們已確認使用 Bac-P1-3CD 生產 VLP，其理由如報告內容所述。

2. 純化過程的純度與產率均應改進，請 DCB 加強。在下次報告時宜有改善資料。並將 VLP 與不活化病毒疫苗產程之純度與產率做比較。

回覆：DCB 已修改管柱層析法的純化流程，並大幅改善 VLP 的純度至 >92%。

3. 免疫分析方法應予以標準化，特別是 ELISA 與中和反應所採用的抗體。

回覆：子計畫一已改善並建立標準 ELISA 分析方法，大幅增加其再現性。目前所使用抗體為子計畫三生產，有足夠量供後續使用。ELISA 標準操作程序請見附件。

4. 依主持人意見，在今年 10 月應決定採用之疫苗種籽株。

回覆：我們已確認使用 Bac-P1-3CD 生產 VLP，其理由如報告內容所述。

5. 利用熱處理去活化病毒是否已證實不會影響病毒結構和抗原性？

回覆：熱處理去活化病毒已證實不會影響病毒結構和抗原性。

6. 建議以後動物實驗請用一致的佐劑。

回覆：第二次猴子及老鼠試驗，佐劑採已統一使用 Alhydrogel 2% "85" (GMP 等級), 800 µg/dose。

7. 猴子試驗所使用之 Amjet Alum，最終鋁含量是多少？建議利用老鼠實驗找出最適劑量。另外進行下次猴子試驗建議能將病毒劑量以 10 倍差分不同組別。

回覆：第一次猴子試驗所使用的佐劑為氫氧化鋁與氫氧化鎂(aluminum hydroxide and magnesium hydroxide) (實驗等級)，最終佐劑的濃度為 aluminum hydroxide (20 mg/dose) and magnesium hydroxide (20 mg/dose)。第二次猴子試驗，佐劑改採使用 Alhydrogel 2% "85" (GMP 等級)，最終含量為 800 µg/dose，此劑量是 FDA 建議於人體的最適劑量(請參考文獻 E.B. Lindblad. Immunology & Cell Biology (2004) 82, 497-505)。第一次猴子試驗已做 10 倍差的組別 (VLP 20 µg/dose, 50 µg/dose 和 200 µg/dose)，但 50 µg/dose 與 200 µg/dose 產生的免疫效果差異並不明顯。而第二次猴子試驗因 VLP 純度提高，所以做 5 倍差的組別 (VLP 20 µg/dose 和 100 µg/dose)。

8. 在小鼠免疫試驗中，分別增加 inactivated EV71 和 VLP 不同劑量免疫之組別，可有效幫助設計猴子免疫實驗。

回覆：98 年度計畫書中的小鼠免疫試驗，主要是在探討不同佐劑對 VLP 致敏效果的影響。未來計畫繼續進行時，可考慮分別增加 inactivated EV71 和 VLP 不同劑量免

疫之組別，以幫助設計猴子免疫實驗。

9. 以 100KD 做 UF/DF 後，再 0.2 μ m menbrance 的回收率急降為 77% ，需找出原因。

回覆： 在最後確認的製程中，我們已捨棄以 100 kD 超濾膜進行 UF/DF，因此我們並未繼續以實驗探討原因。不過回收率驟降的原因有可能是許多 VLP 或雜質都被卡在 1000 kD 濾膜上。