

計畫編號：DOH90-DC1006

行政院衛生署九十年  
科技研究發展計畫

腸病毒 71 型感染動物模式之建立及疫苗之研發

研究報告

執行機構：中央研究院生物醫學科學研究所

計畫主持人：何美鄉

研究人員：何美鄉 周盈廷 林雅菁 吳正男

執行期間：90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 31 日

\* \* 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 \* \*

# 目 錄

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 目 錄 .....                          | 1  |
| 中文摘要 .....                         | 2  |
| 一.背景介紹 .....                       | 5  |
| 流行病學特徵-1998 年的流行型態及重要性.....        | 5  |
| 病毒學特徵.....                         | 7  |
| 神經毒性及組織嗜性.....                     | 10 |
| 動物模式與細胞病毒受體.....                   | 11 |
| 二. 材料與方法 .....                     | 14 |
| 材料.....                            | 14 |
| 腸病毒 71 型.....                      | 14 |
| 細胞株.....                           | 14 |
| 一般實驗方法.....                        | 14 |
| 1. 病毒的培養.....                      | 14 |
| 2 . 細胞株培養.....                     | 15 |
| 3. 病毒的定量 - $TCID_{50}$ .....       | 15 |
| 4. 免疫螢光染色 ( I F A ).....           | 15 |
| 5. 病毒抗體中和試驗.....                   | 16 |
| 6 . 病毒感染抑制試驗.....                  | 16 |
| 7 . 受體 - 病毒結合試驗 ( V O P B A )..... | 16 |
| 人類細胞上病毒 receptor 特性研究實驗設計 : .....  | 17 |
| 三. 結果 .....                        | 17 |
| (1)人體細胞上病毒受體基因鑑定.....              | 19 |
| (2) 病毒 VP1 與細胞結合蛋白質之結合試驗.....      | 21 |
| (3) 以重組病毒 VP1-CBP 捕捉細胞結合蛋白質.....   | 22 |
| 結論: .....                          | 22 |
| 四.參考文獻 .....                       | 23 |
| 五. 附錄 .....                        | 33 |

# 中文摘要

**關鍵詞：**腸病毒 71 型 病毒細胞受體 基因轉殖鼠

**背景：** 腸病毒與其他 4 屬 Picornaviridae 是危害人類與畜牧業的重要病源。依腸病毒特一組織嗜性、病毒毒性及宿主免疫反應等的多種因素，69 種血清型腸病毒能產生多種臨床症狀。近年來腸病毒 71 型在世界各地造成數次幼童神經性疾病的爆發流行。因而腸病毒 71 型已被認為是小兒麻痺滅絕後最重要的嗜神經性病毒。腸病毒 71 型在 1998、2000 及 2001 年於台灣的數次爆發疫情，引發腸病毒 71 型抗病毒藥物及疫苗發展的迫切性。近年來人類及微生物的基因研究，已創造了更多藉由對病毒-宿主互動的分子機制之瞭解，並依理論來設計性抗病毒藥物。人類小兒麻痺病毒(PV)接受器(PVR)的基因轉殖鼠已被利用於評估小兒麻痺病毒疫苗的使用，所以基因轉殖鼠對腸病毒疫苗的發展將是非常重要的工具。本研究計劃的進行需要病毒學、蛋白化學、分子生物學、獸醫學及免疫學等專業參與。

**目標：** 針對腸病毒 71 型的細胞受體 (receptor)或協受體 (coreceptor) 的研究，繼而來執行基因轉殖、並對此重組基因所表現出來的蛋白質進行研究。尤其將對此蛋白質與 哺乳類細胞的交互作用深入瞭解，且可藉由基因轉殖動物 (小鼠) 之建立，而作為疫苗及抗病毒之測試。

**結果：** 以病毒-受體蛋白結合試驗 (VOPBA)，已鑑定出三個細胞膜上的蛋白質，分子量分別為 70KD、60 KD 和 34 KD。我們也發現到新生老鼠的橫紋肌細胞膜上表現有能與腸病毒 71 型結合的蛋白(Binding protein)，但成鼠的肌肉細胞則無。此現象與注射新生鼠和成鼠的結果相符，我們也認為此結合蛋白可能是受體或協和受體。我們利用病毒重組基因蛋白 VP1 (係為一與 calmodulin 結合蛋白融合的雜交病毒蛋白) 可結合到 60KD 細胞蛋白。此 60KD 細胞蛋白並已經從 RD 細胞中純化出大約 10 ug 的量，現在正在以 MALDI-TOF 分析中。

**重要性：** 受體和協受體的鑑定和特性化將有助於

- (1). 進一步解開病毒-宿主互相作用的分子機制。
- (2). 可依理論設計抗病毒性的藥物。
- (3). 可建立轉殖鼠之感染模式以用於病毒藥物和疫苗之試驗。

# 英文摘要

**Key word:** enterovirus71, receptor, transgenic mouse

**Background:** Enteroviruses are human pathogens that, along with other 4 genera of picornaviridae, contribute to a significant morbidity and mortality of human and livestock. The 69 serotypes of enteroviruses are etiological agents of a wide spectrum of clinical diseases depending on the combination factors related to tissue tropism, virulence of each virus, and immunological responses of the host. Several recent outbreaks of neurological diseases in children throughout the world have singled out enterovirus 71 (EV71) to be the most important neurotropic enterovirus during the post poliomyelitis eradication era. The recent recurrence of EV71 outbreaks (1998, 2000, and 2001) in Taiwan has highlighted the urgency in developing antiviral and/or vaccines against EV71. Recent advances in human and microbial genome studies have created ample opportunities for rationale antiviral drug design by delineating the virus-host interactions during viral infection. The conduct of this proposed study will require expertise in virology, protein chemistry, molecular biology, veterinarian science, and immunology.

**Aims:** To identify, clone, express, and characterize mammalian cell receptor or coreceptors to EV71 for use in delineating host-virus interaction, and transgenic mouse model for vaccine testing and antiviral testing.

**Results:** By virus overlay protein binding assay (VOPBA), three cell-membrane proteins, sized 70KD, 60KD and 34KD, have been identified. It is also found that the striated muscle cells of newborn mice express EV71 binding proteins while the muscle cells of adult mice do not, a phenomenon compatible with *in vivo* infection pattern of the newborn and adult mice. The recombinant viral protein – VP1, that is fused with a calmodulin binding protein, is able to bind to the 60KD cellular protein. We have been able to obtain from RD cell membrane preps approximately 10 ug of the purified 60KD-cellular protein, which is now undergoing MOLDI-TOF analysis.

**Experimental design:** The study will be undertaken by reverse engineering methodology. Mainly, the 60KD membrane protein will be captured by VP1

and affinity calmodulin-resin column and analyzed by MALDI-TOF. Cloning and expression of this protein will be followed by *in vitro* and *in vivo* functional study. The hypothesis of a receptor/coreceptor complex will be tested. .

**Significance:** Identification and characterization of the cellular receptors and co-receptors will lead to (1) further unveiling of pathogenic and immunopathogenic mechanism, as well as molecular mechanisms of viral/host interaction, (2) development of a transgenic mouse model (Small, easy and accessible) for *in vivo* animal to fulfill the needs of antiviral and vaccine testing.

# 一. 背景介紹

## 流行病學特徵--1998 年的流行型態及重要性

腸病毒為一常見的小兒病毒，共有七十多種。幼兒受腸病毒感染後多數呈現無症狀，或因感染的病毒不同而有各種輕重不同的症狀，例如：手口足症、咽峽炎、心肌炎、角膜炎、腦炎等。1998 年以前，腸病毒感染的疾病並未列入衛生系統的通報疾病，對於腸病毒流行的趨勢也從未以流行病學的方法有系統的調查。根據臺大醫院李慶雲醫師所提供的資料，台灣在 1986 至 1987 年時曾經發生腸病毒與蟲媒腦炎病毒合併的流行爆發，只可惜當時缺乏良好的流行病學統計。

1998 年腸病毒在台灣流行以手足口症及咽峽炎為多。衛生署統計資料顯示 1998 年 3 月至 12 月手足口症及咽峽炎的報告病例高達 129,106 例(疫情報導)此次感染的主要症狀除手足口症、咽峽炎、消化道症狀、皮疹等外，更有 405 位手足口症病童出現嚴重中樞神經以及心肺血管受損的症狀而需要住院治療。此次腸病毒爆發除了導致嚴重症狀之外，病程惡化快速也是造成死亡的重要因素，在病童住院或至急診室就診後數小時內，突然出現休克與肺水腫後急速死亡，總共造成 78 名病童死亡。

死亡與重症病例的分析資料中顯示，年齡是一個重要的危險因子：6 個月以下的嬰兒致死率為 15.8% (葉彥伯等人)，6 個月至 12 個月的嬰兒致死率可達 43.1%，1 歲至 3 歲的幼兒致死率也達 20.3%。405 位重症病例中，3 歲以下佔 70%，78 位死亡病例中，3 歲以下佔 85%。由以上的資料顯示，6 個月至一歲的嬰兒是高危險群，然而，除了年齡之外，目前並沒有其他的危險因子被報導。年齡在腸病毒感染機轉中的角色釐清，可能對於其致病機轉的了解會有很大的助益。

腸病毒感染的途徑為消化道感染與呼吸道感染，亦可由直接接觸或間接接觸病人分泌物傳染。從流行中發病的小孩的咽喉或糞便中，都可以檢驗出腸病毒 71 型，但是咽喉檢體的檢出率較糞便高，由此可推測，咽喉分泌物在此次流行中傳播病毒的重要性可能比糞便為重要。

此次手口足症與咽峽炎的流行經過實驗室病毒分離以及血清學檢驗後證實：部分的病童是由克沙奇 A16 病毒感染所致，1/3 病童由腸病毒 71 感染所致；但死亡病例的實驗室診斷都是腸病毒 71 型。由此可以推測，腸病毒 71 型是導致這次嚴重病例的元兇。

回顧自 1969 年以來各地區腸病毒 71 型的流行，主要的臨床

病癥都與時間及地區的差異而不同。例如：1975 年保加利亞的腸病毒流行(Chumakov et al.,1979)，雖然出現中樞神經感染症狀、類小兒麻痺症狀以及心肺症狀，但確無手口足症狀，當時一度被誤認為是小兒麻痺的感染；1978 年匈牙利流行的症狀為：腦炎、類小兒麻痺症狀以及無菌性腦膜炎，但並未紀錄心肺症狀；然而，1997 年馬來西亞(AbuBakar et al., 1999)、1979 年法國里昂的流行中除了腦炎與無菌性腦膜炎等中樞神經感染症狀外，也出現了心肺症狀，但卻無類小兒麻痺症狀。其他歷史中較嚴重的腸病毒 71 型流行分別為：1969-73 年美國(Alexander et al., 1994)、1986 年澳洲(McMinn et al., 1999)、1973 年瑞士以及 1978 年日本(Hagiwara et al., 1979; Hagiwara et al., 1978; Tagaya et al., 1981)。這些爆發疫情的特徵以及其相異之處是否因病毒基因型的差異或是診斷的差異所造成是值得探討的方向。

但無論如何，腸病毒 71 型可導致中樞神經病變，且也被認為是繼小兒麻痺後最主要的小兒神經病變的病原。

## 病毒學特徵

腸病毒為小 R N A 病毒屬的一員，在此家族中尚包括了常見



的小兒麻痺病毒，科沙奇病毒，以及腸病毒 68 - 71 型等，為一重要的人類致病性病毒。在酸性環境下，病毒的感染力可被穩定的保留下來(Salo and Cliver, 1976)，所以可以經由腸胃道感染，而不被消化液所殺死。此一類病毒的外鞘不含包膜，大小約為 28 - 30 nm，其基因體結構，為一正向之單股 RNA，此單股 RNA 可直接在所感染的細胞中轉譯出病毒蛋白質。其完整的基因體序列，已在多種的腸病毒中分析完成，包括小兒麻痺病毒、科沙奇病毒、以及腸病毒 71 型等。所有的腸病毒均具有類似的基因體結構，其同源性高達 55%，整個病毒基因體包括開放閱讀區約 7500 個核苷酸(Brown and Pallansch, 1995)，其被轉譯及促使核糖核酸合成的位置位於蛋白質譯碼區域，並且需要來自於非轉譯區的信號誘發蛋白質轉譯區表現(Pestova et al., 1991; Schmid and Wimmer, 1994)。另外病毒基因體的 5' 端的非轉譯區域提供了特殊的蛋白質接著位置給特定的宿主細胞蛋白質接著，因此 5' 端對決定易感性宿主及病毒的神經毒性扮演重要的角色(Hellen et al., 1994a; Hellen et al., 1994b)。在克沙奇 B3 及小兒麻痺病毒的研究中，若突變這些非轉譯區域不只改變病毒核糖核酸的二級結構且還會影響其合成、轉譯、病毒核糖核酸體的包裹，造成神經毒性有所改變(Pestova et al., 1994; Tu et al., 1995)。

小兒麻痺病毒及克沙奇病毒的病毒多蛋白分解機制已經被研究的很透徹,這些病毒在轉譯時多蛋白會被分解成 VP1 到 VP4 四種蛋白質以及 VPg 蛋白質(Adler et al., 1983; Kiehn and Holland, 1970)。病毒蛋白質被分解的過程是由三種病毒蛋白酵素所負責,包含 M 蛋白酵素 初期 2A 蛋白酵素及 3C 蛋白酵素(Krausslich et al., 1987; Nicklin et al., 1988; Nicklin et al., 1987; Pallansch et al., 1984; Semler et al., 1987; Ypma Wong et al., 1988a; Ypma Wong et al., 1988b) , 而 VP0 蛋白質分解變為 VP4 及 VP2 蛋白質則是成為具有感染性病毒的必要步驟(Basavappa et al., 1994; Blair et al., 1990; Larsen et al., 1982)。有關病毒蛋白鞘的三級結構則在 1985 年由 Hogle 等人首先將小兒麻痺病毒的三級結構研究出來 , VP1、VP2、及 VP3 三種蛋白質皆會摺疊形成 ”swiss roll” 的構造 , 使其可形成三倍、五倍緊密的接合。在立體構造上 VP1、VP2、及 VP3 蛋白質會暴露於病毒表面而 VP4 蛋白質則被包裹在內部(Yeates et al., 1991) , 因此除了 VP4 蛋白質外其他的蛋白質都與誘發中和性抗體的產生有關(Emini et al., 1982; van der Marel et al., 1983; van der Werf et al., 1983a; van der Werf et al., 1983b; van Wezel et al., 1983)。一些研究中指出 , 用以對抗小兒麻痺病毒的中和性抗體位置(Emini et al., 1983a; Emini et al., 1983b; Emini et al., 1983c; Wimmer et al., 1984a; Wimmer et al.,

1984b), 位於 VP1、VP3 蛋白質的 BC loop 及 VP2 蛋白質的 EF loop。而與其他的結構蛋白質次單位比較, VP1 蛋白質具有最高的變異, 也常做為病毒分型的依據, 因此 VP1 蛋白質為主要作為中和抗體對抗的免疫抗原。

## 神經毒性及組織嗜性

研究表現人類小兒麻痺病毒(PV)接受器(PVR)的基因轉殖鼠, 顯示該基因轉殖鼠能夠被 PV 所感染(Ren et al., 1990), 且這些老鼠顯現的臨床症狀與受感染的人類及注射病毒的猴子相似。被病毒感染中樞神經系統的基因轉殖鼠, 病毒抗原或病毒 RNA 基因體只能在神經細胞中測出, 而無法在血管內皮細胞及膠質細胞中測出。但在西方式雜交分析中發現包括不能被病毒感染的組織, PVR 可以在人類及基因轉殖鼠的很多組織中表現, 這些觀察顯示病毒的組織嗜性不只由 PVR 的表現所控制, 而且與該細胞與病毒是否能接近有關。而比較小兒麻痺沙賓疫苗(Sabin 1)與原始具神經毒力病毒株發現, 在 55 個點突變中有兩個位置的突變顯示與病毒毒力減弱最有關係(Stanway et al., 1984), 在病毒基因 5' 端非譯碼區 480 位置由 A 變 G 的點突變被指出為最主要的減毒位置(Evans et al., 1985)。另外近來的研究指

出小兒麻痺病毒 RNA 在核糖體進入位置(IRES)的突變與決定易感受宿主有關(Shiroki et al., 1997)。

Theiler's 病毒在 VP1 的 loop I 位置的突變，會造成病毒嗜性及致病力有所改變(McCright et al., 1999)，其中一株 Threonine 變 Aspartate 的突變株(T81D)在實驗中會形成較大的溶菌斑且細胞複製較慢。此種突變株種接種於基因轉殖鼠會造成在急性期病毒嗜性改變，但是病毒不會在慢性髓鞘脫失病中產生。這些突變在克沙奇病毒、小兒麻痺病毒及鼻病毒等的 5'端與 VP4 蛋白突變的研究中也被發現(Andino et al., 1990; Chumakov et al., 1994; Dildine et al., 1991; Gutierrez et al., 1997; Meerovitch et al., 1991; Muzychenko et al., 1991; Schultz et al., 1996; Silveira Carneiro et al., 1995; Yang et al., 1997)，因此 5'端及結構蛋白質與宿主蛋白質相接有關，對於決定易感性宿主及其神經毒力扮演特殊意義。

## 動物模式與細胞病毒受體

自 1950 年代小兒麻痺病毒的去活化疫苗在美國施用以來，長期採用猴子進行動物實驗做為疫苗的安全評估。而後發展的減毒疫苗，也以猴子進行相同的評估工作。1990 年利用小兒麻痺病毒人類細胞受體之基因轉殖鼠試驗，成功的建立了良好之老鼠

小動物感染模式(Ren et al., 1990)。故 1993 年起，世界衛生組織開始評估以基因轉殖鼠來進行疫苗的安全性測試，其結果顯示在基因轉殖鼠與以猴子為陽性控制組的實驗中，基因轉殖鼠與猴子具有相類似的實驗數據，達到統計上顯著的意義(Furesz and Levenbook, 1998)。故使用基因轉殖鼠取代猴子以進行疫苗的安全評估工作，將更為簡便，也符合動物保育之原則。基於此，腸病毒 71 型的基因轉殖鼠的發展有其必然性。

分離自保加利亞流行的腸病毒 71 型可以在新生的白老鼠、綿鼠、敘利亞大鼠及猴子中繁殖及造成神經毒性(Chumakov et al., 1979)。而在日本的研究則指出只有猴子能被 71 型腸病毒的 BrCr 及 Nagoya 病毒株所感染且造成神經系統疾病(Hagiwara et al., 1979; Hagiwara et al., 1983; Hagiwara et al., 1984; Hashimoto and Hagiwara, 1983; Hashimoto and Hagiwara, 1982a; Hashimoto and Hagiwara, 1982b; Hashimoto et al., 1978; Hashimoto et al., 1983; Hashimoto et al., 1984; Hashimoto et al., 1985)。由於 RNA 病毒突變的機率較高(Hayward et al., 1989)，不同病毒株造成可感染的宿主差異可能與各病毒株間的一些基因差異有關，因此應經由比對這些病毒株的差異，找出造成宿主易感性的決定位置。人類細胞上病毒受體 (receptor)

腸病毒經由受體進入細胞，已經在小兒麻痺病毒，鼻病毒，克沙奇病毒中得到證實(Bergelson et al., 1997; Bergelson et al., 1992; Bernhardt et al., 1994; Hovi and Stenvik, 1994; Kaplan et al., 1996; Kuhn, 1997; Tomassini and Colonno, 1986; Zibert et al., 1991)。這些受體的組成上皆為免疫球蛋白超基因家族( Supergene family ) 之一員。1990年利用細胞受體之基因轉殖鼠試驗，成功的建立了良好之動物感染模式，來以小兒麻痺病毒感染老鼠(Ren et al., 1990)。將小兒麻痺病毒人類細胞受體轉殖進入老鼠，發現這些人類細胞受體可以普遍的表現在各個不同的組織器官間。以可致病性的小兒麻痺病毒第一型和沙賓疫苗分別感染這些基因轉殖鼠，結果顯示小兒麻痺病毒第一型可以感染老鼠並引起麻痺病徵，而以沙賓疫苗感染之老鼠，不會有病徵的出現。所以小兒麻痺病毒的人類細胞受體基因轉殖鼠試驗，可以做為研究腸病毒致病性，神經毒性，疫苗效用上的的一個良好範本。

## 二. 材料與方法

### 材料

#### 腸病毒 71 型

Neu strain : 由 1998 年台灣死亡幼兒脊椎中分離之病毒

YN3-3 : 將 Neu strain 經由實驗室培養之適應株病毒

#### 細胞株

RD cell : 人類橫紋肌肉瘤細胞株

Vero cell : 綠猴腎細胞株

### 一般實驗方法

#### 1. 病毒的培養

Neu strain 病毒由長庚醫學院自 1998 年台灣腸病毒 71 型的死亡小孩脊椎中所分離，Der strain 病毒相同的由長庚醫學院自 1998 年台灣所流行手口足病症小孩之水泡中分離得到，而用以分離病毒的細胞株為 M R C - 5。將 Neu strain 經由在 Vero 細

胞培養，經噬菌斑純化後，而得到一實驗室適應株 YN3-3。

## 2 . 細胞株培養

Vero 細胞被培養在含 5%胎牛血清之 M199 培養基中，培養於溫度為 37° C 含 5%CO<sub>2</sub> 之培養箱，若要進行病毒繁殖時，胎牛血清的含量將下降至 2%。

## 3. 病毒的定量 - T C I D<sub>50</sub>

將腸病毒以系列稀釋的方法，接種於 96 well 細胞培養盤中的 R D 細胞或是 Vero 細胞。經由 5 - 7 天的培養，觀察細胞之 C P E 現象，並經由結晶紫染色，或是免疫螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形。T C I D<sub>50</sub> 由最高一個具有 50% CPE 的效價而決定。

## 4. 免疫螢光染色 ( I F A )

受病毒感染的細胞，固定於 Acetone 和 Methanol 以 3:2 比例混合之固定液中。將固定好之細胞，以腸病毒 71 型單株抗體作用 30 分鐘後清洗乾淨，再以含 FITC 之二次抗體結合作用後，利用螢光顯微鏡觀察螢光的產生。



## 5. 病毒抗體中和試驗

先將欲測試的血清檢體作二倍的系列稀釋，並與 100 個 TCID<sub>50</sub> 的病毒混合。在 37°C 作用 30 分鐘後，接種於 96 well 細胞培養盤中的 RD 細胞或是 Vero 細胞。經由 5 - 7 天的培養，觀察細胞之 CPE 現象，並經由結晶紫染色，或是免疫螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形。抗體中和效價以血清在最高稀釋下，仍可抑制病毒感染細胞的倍率來決定。

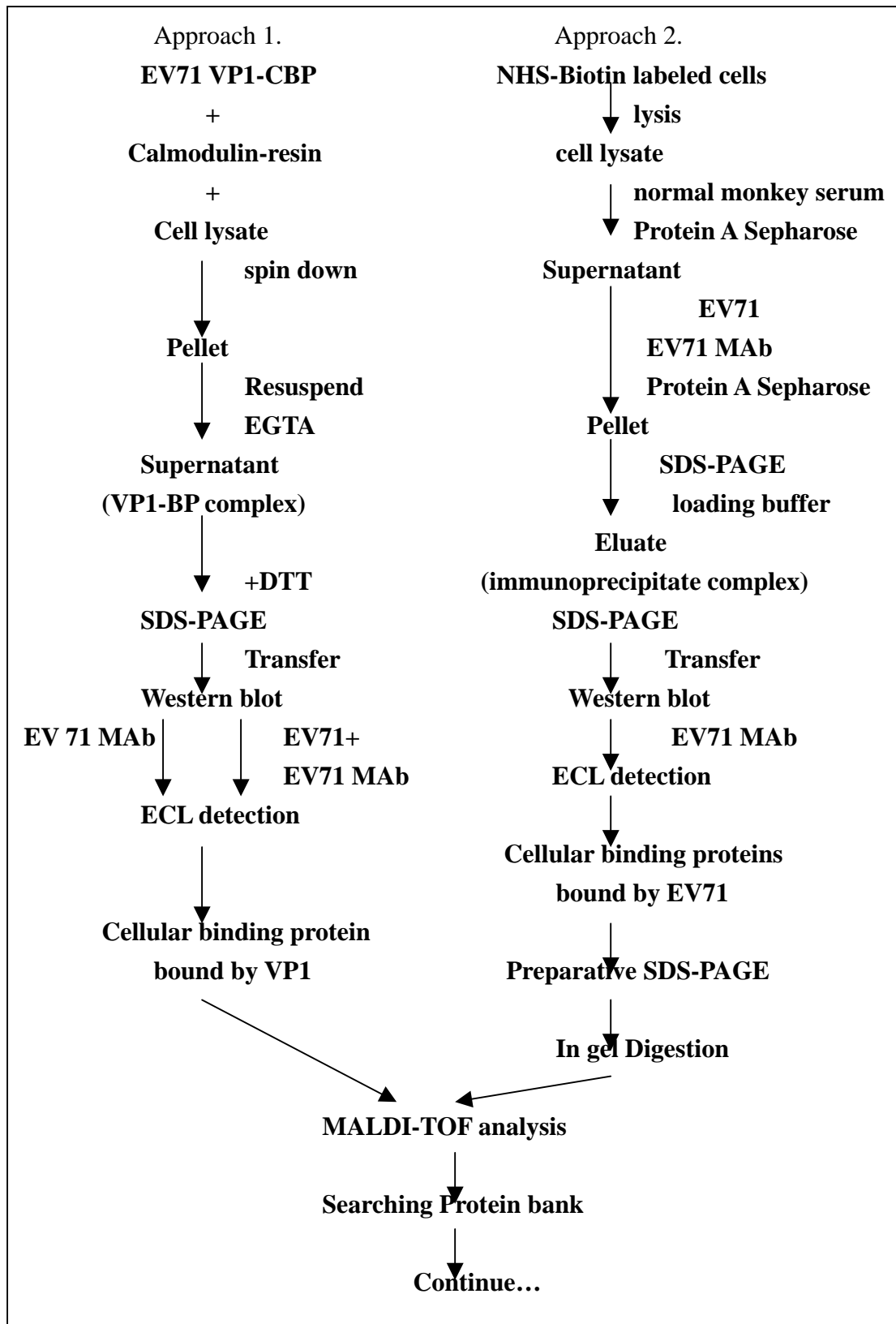
## 6. 病毒感染抑制試驗

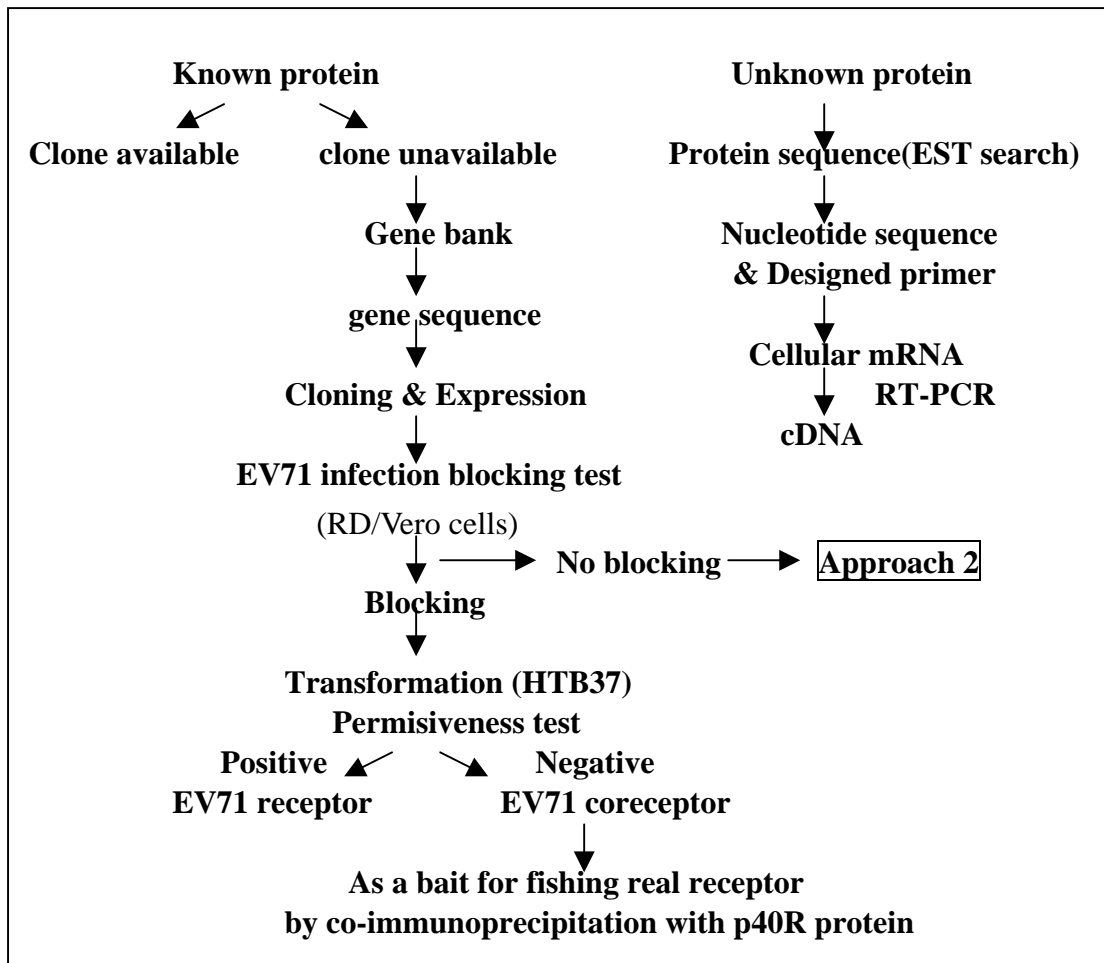
分別利用可被腸病毒 71 型感染的 Vero 細胞膜蛋白質和不被感染的 N18 細胞膜蛋白質，與病毒量為 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 腸病毒 71 型混合，於 37°C 作用 45 分後感染細胞，經 3 - 5 天培養後經由免疫螢光染色測試病毒的感染與否。

## 7. 受體 - 病毒結合試驗 (VOPBA)

於 SDS-PAGE 中分開可被腸病毒 71 型感染的人類 RD 細胞膜蛋白質，轉漬到纖維膜上後，將纖維膜上的蛋白質重新摺疊在適當的緩衝液中，再以 <sup>35</sup>S 標示的病毒顆粒，於 25°C 下進行受體蛋白質與病毒的結合，結合完畢後將纖維膜經由適當的沖洗過程，於 X 光片上進行同位素放射曝光工作。

## 人類細胞上病毒 receptor 特性研究實驗設計：





## 三． 結果

### (1)人體細胞上病毒受體基因鑑定-

在基因轉殖鼠建立前, 首先人體細胞上病毒受體基因將被鑑定. 利用可被腸病毒 71 型感染的 Vero 細胞膜蛋白質, 與病毒進行感染抑制試驗, 結果顯示腸病毒 71 型的感染可被 Vero 細胞膜蛋白質所抑制, 由此可知 Vero 細胞上, 確實存在了一個病毒受體。這結果與之前所進行的細胞易感受性實驗相符合。

另外, 使用小兒麻痺病毒的 VP1 蛋白質為範本, 模擬的腸病毒 71 型 X 射線繞射結晶三級結構分析中, 將 VP1 蛋白質的各個點突變標示於此一結構上。觀察到這些點突變的發生, 可以被局限在二個重要的位置區上。一組突變發生在胺基酸 58, 106, 114, 141, 143, 145 等處, 這些位置在小兒麻痺病毒的研究中指出為重要的免疫抗原決定基 (附錄圖一)。另一組位置的突變發生在 160, 161, 216, 217 等處 (附錄圖二), 而這些位置在 poliovirus 的研究中, 已知為一重要的細胞受體結合位 (附錄圖三)。分析所有腸病毒結構蛋白質上的預測受體結合位與已知的腸病毒受

體基因的資料中顯示，腸病毒 71 型與 coxsackie A16 病毒皆屬於同為一個族群，此一族群之病毒在哺乳類細胞上之受體，目前尚未有任何病毒已被鑑定 (附錄圖四)。

進一步於 SDS-PAGE 中分開可被腸病毒 71 型感染的 Vero 細胞或 RD 細胞膜蛋白質，轉漬到纖維膜上後，以病毒顆粒進行受體 - 病毒結合試驗 ( VOPBA: Virus Overlay Protein Binding Assay ), 結合完畢後的纖維膜，經由腸病毒 71 型單株抗體偵測，可在 70kD, 60 kD, 與 34 KD 處各得到一個專一性的蛋白質結合 (附錄圖七)。此蛋白質的詳細特性，將在之後的研究中分析。

幼鼠的橫紋肌肌肉細胞已被證實可被病毒感染,而成鼠則不會(附錄圖六).為了瞭解病毒的感染力在成鼠與幼鼠中，為何有著顯著的不同,成鼠與幼鼠的橫紋肌肌肉細胞蛋白質分別以 SDS-PAGE 分離後，以病毒顆粒做病毒與蛋白質結合試驗(附錄圖五)，其結果顯示，幼鼠細胞中確實存在了較多可與病毒結合之蛋白質，此蛋白質是否即為受體蛋白質尚有待證實，但此一結果說明了老鼠的病毒結合蛋白質會隨著老鼠的分化成熟而有不同量的表現。

## (2) 病毒 VP1 與細胞結合蛋白質之結合試驗

腸病毒 71 型的 VP1 蛋白質基因經由 RT-PCR 合成後，被接於一個可與鈣離子結合蛋白融合的質體中，此一腸病毒 71 型的重組 VP1 蛋白質在先前的阻斷病毒感染實驗中，已被證明可以阻斷病毒對細胞的感染，此一現象說明了單獨 VP1 蛋白質即具有與細胞受體結合的能力。因此我們進行 VP1 與細胞蛋白質的結合試驗，首先 RD 細胞的細胞溶解液與重組的 VP1 蛋白質，經混合作用後，以 SDS-PAGE 分離後，以 VP1 的抗體測試 VP1 的存在(附錄圖八)，其結果顯示病毒的 VP1 蛋白質出現了分子量由 40KD 移動到 60KD 的位移現象。此結果為重組 VP1 與細胞蛋白質結合的結果。因此為利用重組 VP1 蛋白質自 RD 細胞的細胞溶解液中捕捉腸病毒 71 型的細胞受體進行小量捕捉試驗。重組的 VP1 在鈣離子的存在下先與接在樹脂上的鈣調節子結合，再與 RD 細胞的細胞溶解液混合捕捉腸病毒 71 型的細胞受體，經由鈣離子的去除，釋放出被結合的重組 VP1 與細胞蛋白的複合體，經由西方墨點法分析後，找到一個分子量為 60KDa 的細胞結合蛋白質，可以與重組 VP1 發生結合。

### **(3) 以重組病毒 VP1-CBP 捕捉細胞結合蛋白質**

腸病毒 71 型的 VP1 蛋白質基因經由 RT-PCR 合成後，被接於一個可與鈣離子結合蛋白融合的質體中，此一腸病毒 71 型的重組 VP1 蛋白質在先前已被證明可以單獨 VP1 蛋白質即具有與細胞受體結合的能力。因此 VP1 被用來捕捉細胞結合蛋白質。首先 RD 細胞的細胞溶解液與重組的 VP1 蛋白質，經混合作用後，以 SDS-PAGE 分離後，以 VP1 的抗體測試 VP1 的存在。其結果顯示病毒的 VP1 蛋白質捕捉到結合蛋白質(附圖九)。經由西方墨點法分析後，證明一個分子量為 60KDa 的細胞結合蛋白質(附圖十)，可以與重組 VP1 發生結合。此 60KDa 的細胞結合蛋白質已被取出進行 MALDI-TOF 分析

## **結論：**

1. 本實驗室利用 VOPBA 之方式，在 VERO 和 RD 細胞上，皆找到了一個 60 KDa 的人類腸病毒 71 型受體候選蛋白質。分析所有腸病毒結構蛋白質上的預測受體結合位與已知的腸病毒受體基因的資料中顯示，腸病毒 71 型與 coxsackie A16 病毒皆屬於同為一個族群，此一族群之病毒在哺乳類細胞上之受體，目前尚未有任何病毒已被鑑定(附錄圖四)。

## 四. 參考文獻

AbuBakar, S., Chee, H. Y., Al Kobaisi, M. F., Xiaoshan, J., Chua, K. B., and Lam, S. K. (1999). Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. *Virus Res* 61, 1-9.

Adler, C. J., Elzinga, M., and Wimmer, E. (1983). The genome-linked protein of picornaviruses. VIII. Complete amino acid sequence of poliovirus VPg and carboxy-terminal analysis of its precursor, P3-9. *J Gen Virol* 64, 349-55.

Alexander, J. P., Jr., Baden, L., Pallansch, M. A., and Anderson, L. J. (1994). Enterovirus 71 infections and neurologic disease--United States, 1977-1991. *J Infect Dis* 169, 905-8.

Andino, R., Rieckhof, G. E., Trono, D., and Baltimore, D. (1990). Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J Virol* 64, 607-12.

Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J., and Hogle, J. M. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1651-69.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-3.

Bergelson, J. M., Shepley, M. P., Chan, B. M., Hemler, M. E., and Finberg, R. W. (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1 [see comments]. *Science* 255, 1718-20.

Bernhardt, G., Harber, J., Zibert, A., deCrombrughe, M., and Wimmer, E. (1994). The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology* 203, 344-56.



**Blair, W. S., Hwang, S. S., Ypma Wong, M. F., and Semler, B. L. (1990). A mutant poliovirus containing a novel proteolytic cleavage site in VP3 is altered in viral maturation. *J Virol* 64, 1784-93.**

**Brown, B. A., and Pallansch, M. A. (1995). Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res* 39, 195-205.**

**Chiba, Y., and Hara, M. (1997). [Polio vaccine and polio eradication initiative--progress of polio eradication in China]. *Uirusu* 47, 15-23.**

**Chumakov, M., Tsyka, E., Robinson, I., Frolova, M., Bashkirtsev, V., Martiyanova, L., and Rodin, V. (1979).[ Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria]. *Arch. Virol* 60, 329-340**

**Chumakov, K. M., Dragunsky, E. M., Norwood, L. P., Douthitt, M. P., Ran, Y., Taffs, R. E., Ridge, J., and Levenbook, I. S. (1994). Consistent selection of mutations in the 5'-untranslated region of oral poliovirus vaccine upon passaging in vitro. *J Med Virol* 42, 79-85.**

**Dildine, S. L., Stark, K. R., Haller, A. A., and Semler, B. L. (1991). Poliovirus translation initiation: differential effects of directed and selected mutations in the 5' noncoding region of viral RNAs. *Virology* 182, 742-52.**

**Dove, A. W., and Racaniello, V. R. (1997). The polio eradication effort: should vaccine eradication be next? *Science* 277, 779-80.**

**Eichner, M., and Haderler, K. P. (1995). Deterministic models for the eradication of poliomyelitis: vaccination with the inactivated (IPV) and attenuated (OPV) polio virus vaccine. *Math Biosci* 127, 149-66.**

**Emini, E. A., Jameson, B. A., Lewis, A. J., Larsen, G. R., and Wimmer, E. (1982). Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 43, 997-1005..**

**Emini, E. A., Dorner, A. J., Dorner, L. F., Jameson, B. A., and Wimmer, E. (1983a). Identification of a poliovirus neutralization epitope through use of neutralizing antiserum raised against a purified viral structural protein.**

**Virology 124, 144-51**

**Emini, E. A., Jameson, B. A., and Wimmer, E. (1983b). Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature* 304, 699-703.**

**Emini, E. A., Kao, S. Y., Lewis, A. J., Crainic, R., and Wimmer, E. (1983c). Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. *J Virol* 46, 466-74.**

**Evans, D. M., Dunn, G., Minor, P. D., Schild, G. C., Cann, A. J., Stanway, G., Almond, J. W., Currey, K., and Maizel, J. V., Jr. (1985). Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314, 548-50.**

**Furesz, J., and Levenbook, I. (1998). New assays for the quality control of live oral poliovirus vaccine. *Acta Microbiol Immunol Hung* 45, 391-9.**

**Gutierrez, A. L., Denova Ocampo, M., Racaniello, V. R., and del Angel, R. M. (1997). Attenuating mutations in the poliovirus 5' untranslated region alter its interaction with polypyrimidine tract-binding protein. *J Virol* 71, 3826-33.**

**Hagiwara, A., Tagaya, I., and Komatsu, T. (1979). Seroepidemiology of enterovirus 71 among healthy children near Tokyo. *Microbiol Immunol* 23, 121-4.**

**Hagiwara, A., Tagaya, I., and Yoneyama, T. (1978). Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. *Intervirology* 9, 60-3.**

**Hagiwara, A., Yoneyama, T., and Hashimoto, I. (1983). Isolation of a temperature-sensitive strain of enterovirus 71 with reduced neurovirulence for monkeys. *J Gen Virol* 64, 499-502.**

**Hagiwara, A., Yoneyama, T., Takami, S., and Hashimoto, I. (1984). Genetic and phenotypic characteristics of enterovirus 71 isolates from patients with encephalitis and with hand, foot and mouth disease. *Arch Virol* 79, 273-83.**

**Hashimoto, I., and Hagiwara, A. (1983). Comparative studies on the**

neurovirulence of temperature-sensitive and temperature-resistant viruses of enterovirus 71 in monkeys. *Acta Neuropathol Berl* 60, 266-70.

Hashimoto, I., and Hagiwara, A. (1982a). Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 8, 149-56.

Hashimoto, I., and Hagiwara, A. (1982b). Studies on the pathogenesis of and propagation of enterovirus 71 in Poliomyelitis-like disease in monkeys. *Acta Neuropathol Berl* 58, 125-32.

Hashimoto, I., Hagiwara, A., and Kodama, H. (1978). Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patient with hand, foot and mouth disease. *Arch Virol* 56, 257-61.

Hashimoto, I., Hagiwara, A., and Komatsu, T. (1984). Ultrastructural studies on the pathogenesis of poliomyelitis in monkeys infected with poliovirus. *Acta Neuropathol Berl* 64, 53-60.

Hashimoto, I., Hagiwara, A., and Uchino, I. (1985). Ultrastructural changes of motoneurons in monkeys infected with enterovirus 71. Brief report. *Arch Virol* 86, 137-42.

Hashimoto, I., Komatsu, T., and Kohara, T. (1983). Variation in virulence of Coxsackie virus B3 in the heart of mice, II. Pathological comparison. *Microbiol Immunol* 27, 335-45.

Hashimoto, I., Tatsumi, M., and Nakagawa, M. (1983). The role of T lymphocytes in the pathogenesis of Coxsackie virus B3 heart disease. *Br J Exp Pathol* 64, 497-504.

Hashimoto, I., Tomita, M., Kohara, T., Uchino, I., and Harasima, A. (1985). Steatitis in mice infected with Coxsackie virus B3. *Microbiol Immunol* 29, 371-6.

Hayward, J. C., Gillespie, S. M., Kaplan, K. M., Packer, R., Pallansch, M., Plotkin, S., and Schonberger, L. B. (1989). Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. *Pediatr Infect Dis J* 8, 611-6.

Hellen, C. U., Pestova, T. V., Litterst, M., and Wimmer, E. (1994a). The cellular polypeptide p57 (pyrimidine tract-binding protein) binds to multiple sites in the poliovirus 5' nontranslated region. *J Virol* 68, 941-50.

Hellen, C. U., Pestova, T. V., and Wimmer, E. (1994b). Effect of mutations downstream of the internal ribosome entry site on initiation of poliovirus protein synthesis. *J Virol* 68, 6312-22.

Ho, M., Chen, E. R., Hsu, K. H., Twu, S. J., Chen, K. T., Tsai, S. F., Wang, J. R., and Shih, S. R. (1999). An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group [see comments]. *N Engl J Med* 341, 929-35.

Hovi, T., and Stenvik, M. (1994). Selective isolation of poliovirus in recombinant murine cell line expressing the human poliovirus receptor gene. *J Clin Microbiol* 32, 1366-8.

Joseph McCarthy, D., Hogle, J. M., and Karplus, M. (1997). Use of the multiple copy simultaneous search (MCSS) method to design a new class of picornavirus capsid binding drugs. *Proteins* 29, 32-58.

Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., and Feinstone, S. M. (1996). Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J* 15, 4282-96.

Kiehn, E. D., and Holland, J. J. (1970). Synthesis and cleavage of enterovirus polypeptides in mammalian cells. *J Virol* 5, 358-67.

Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Toyoda, H., Etchison, D., and Wimmer, E. (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J Virol* 61, 2711-8.

Kuhn, R. J. (1997). Identification and biology of cellular receptors for the coxsackie B viruses group. *Curr Top Microbiol Immunol* 223, 209-26.

Larsen, G. R., Anderson, C. W., Dorner, A. J., Semler, B. L., and Wimmer, E. (1982). Cleavage sites within the poliovirus capsid protein precursors. *J Virol* 41,

**340-4.**

**Macadam, A. J., Ferguson, G., Arnold, C., and Minor, P. D. (1991). An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of the poliovirus type 3 vaccine strain. *J Virol* 65, 5225-31.**

**McCright, I. J., Tsunoda, I., Whitby, F. G., and Fujinami, R. S. (1999). Theiler's viruses with mutations in loop I of VP1 lead to altered tropism and pathogenesis. *J Virol* 73, 2814-24.**

**McMinn, P., Stratov, I., and Dowse, G. (1999). Enterovirus 71 outbreak in Western Australia associated with acute flaccid paralysis. Preliminary report. *Commun Dis Intell* 23, 199.**

**Medeiros R. B., Rasochova L., German T. L.(2000). Simplified, rapid method for cloning of virus-binding polypeptides via the far-western screening of a cDNA expression library using purified virus particles. *J. Virol Methods* 86, 155-166.**

**Meerovitch, K., Nicholson, R., and Sonenberg, N. (1991). In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements within the poliovirus type 2 5' untranslated region. *J Virol* 65, 5895-901.**

**Melnick, J. L. (1982). Toward eradication of poliomyelitis by combined use of killed and live vaccines. *Cardiovasc Res Cent Bull* 20, 49-60.**

**Montagnon, B. J., Nicolas, A. J., Fanget, B., and Peyron, L. (1981). Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. *Dev Biol Stand* 47, 151-5.**

**Muzychenko, A. R., Lipskaya, G., Maslova, S. V., Svitkin, Y. V., Pilipenko, E. V., Nottay, B. K., Kew, O. M., and Agol, V. I. (1991). Coupled mutations in the 5'-untranslated region of the Sabin poliovirus strains during in vivo passages: structural and functional implications. *Virus Res* 21, 111-22.**

**Nicklin, M. J., Harris, K. S., Pallai, P. V., and Wimmer, E. (1988). Poliovirus proteinase 3C: large-scale expression, purification, and specific cleavage activity on natural and synthetic substrates in vitro. *J Virol* 62, 4586-93.**

**Nicklin, M. J., Krausslich, H. G., Toyoda, H., Dunn, J. J., and Wimmer, E. (1987). Poliovirus polypeptide precursors: expression in vitro and processing by exogenous 3C and 2A proteinases. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 4002-6.**

**Pallansch, M. A., Kew, O. M., Semler, B. L., Omilianowski, D. R., Anderson, C. W., Wimmer, E., and Rueckert, R. R. (1984). Protein processing map of poliovirus. J Virol 49, 873-80.**

**Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Wimmer, E. (1994). A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo. Virology 204, 729-37.**

**Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Wimmer, E. (1991). Translation of poliovirus RNA: role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5' nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein. J Virol 65, 6194-204.**

**Ren, R. B., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J., and Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. Cell 63, 353-62.**

**Rezapkin, G. V., Norwood, L. P., Taffs, R. E., Dragunsky, E. M., Levenbook, I. S., and Chumakov, K. M. (1995). Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. Virology 211, 377-84.**

**Salk, D. (1980a). Eradication of poliomyelitis in the United States. I. Live virus vaccine-associated and wild poliovirus disease. Rev Infect Dis 2, 228-42.**

**Salk, D. (1980b). Eradication of poliomyelitis in the United States. II. Experience with killed poliovirus vaccine. Rev Infect Dis 2, 243-57.**

**Salk, D. (1980c). Eradication of poliomyelitis in the United States. III. Poliovaccines--practical considerations. Rev Infect Dis 2, 258-73.**

**Salk, D. (1981). Herd effect and virus eradication with use of killed poliovirus**

vaccine. *Dev Biol Stand* 47, 247-55.

Salo, R. J., and Cliver, D. O. (1976). Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Arch Virol* 52, 269-82.

Schmid, M., and Wimmer, E. (1994). IRES-controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus. *Arch Virol Suppl* 9, 279-89.

Schultz, D. E., Honda, M., Whetter, L. E., McKnight, K. L., and Lemon, S. M. (1996). Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* 70, 1041-9.

Semler, B. L., Johnson, V. H., Dewalt, P. G., and Ypma Wong, M. F. (1987). Site-specific mutagenesis of cDNA clones expressing a poliovirus proteinase. *J Cell Biochem* 33, 39-51.

Shiroki, K., Ishii, T., Aoki, T., Ota, Y., Yang, W. X., Komatsu, T., Ami, Y., Arita, M., Abe, S., Hashizume, S., and Nomoto, A. (1997). Host range phenotype induced by mutations in the internal ribosomal entry site of poliovirus RNA. *J Virol* 71, 1-8.

Silveira Carneiro, J., Equestre, M., Pagnotti, P., Gradi, A., Sonenberg, N., and Perez Bercoff, R. (1995). 5' UTR of hepatitis A virus RNA: mutations in the 5'-most pyrimidine-rich tract reduce its ability to direct internal initiation of translation. *J Gen Virol* 76, 1189-96.

Stanway, G., Hughes, P. J., Mountford, R. C., Reeve, P., Minor, P. D., Schild, G. C., and Almond, J. W. (1984). Comparison of the complete nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon 12a1b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1539-43.

Taffs, R. E., Chumakov, K. M., Rezapkin, G. V., Lu, Z., Douthitt, M., Dragunsky, E. M., and Levenbook, I. S. (1995). Genetic stability and mutant selection in Sabin 2 strain of oral poliovirus vaccine grown under different cell culture conditions. *Virology* 209, 366-73.

Tagaya, I., Takayama, R., and Hagiwara, A. (1981). A large-scale epidemic of

hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection in Japan in 1978. *Jpn J Med Sci Biol* 34, 191-6.

Tomassini, J. E., and Colonno, R. J. (1986). Isolation of a receptor protein involved in attachment of human rhinoviruses. *J Virol* 58, 290-5.

Tu, Z., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J. R., Barry, W. H., Zhao, L., Currey, K., and Shapiro, B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol* 69, 4607-18.

van der Marel, P., Hazendonk, T. G., Henneke, M. A., and van Wezel, A. L. (1983). Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides VP1, VP2 and VP3. *Vaccine* 1, 17-22.

van der Werf, S., Dreano, M., Bruneau, P., Kopecka, H., and Girard, M. (1983a). Expression of poliovirus capsid polypeptide VP1 in *Escherichia coli*. *Gene* 23, 85-93.

van der Werf, S., Wychowski, C., Bruneau, P., Blondel, B., Crainic, R., Horodniceanu, F., and Girard, M. (1983b). Localization of a poliovirus type 1 neutralization epitope in viral capsid polypeptide VP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5080-4.

van Wezel, A. L., van der Marel, P., Hazendonk, T. G., Boer Bak, V., and Henneke, M. A. (1983). Antigenicity and immunogenicity of poliovirus capsid proteins. *Dev Biol Stand* 55, 209-15.

Wang, S. M., Liu, C. C., Tseng, H. W., Wang, J. R., Huang, C. C., Chen, Y. J., Yang, Y. J., Lin, S. J., and Yeh, T. F. (1999). Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clin Infect Dis* 29, 184-90.

Wimmer, E., Emini, E. A., and Jameson, B. A. (1984a). Peptide priming of a poliovirus neutralizing antibody response. *Rev Infect Dis* 6 *Suppl* 2, S505-9.

Wimmer, E., Jameson, B. A., and Emini, E. A. (1984b). Poliovirus antigenic sites and vaccines [letter]. *Nature* 308, 19.



Wong, K. T., Chua, K. B., and Lam, S. K. (1999). Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis [letter]. *Ann Neurol* 45, 271-2.

Wu, T. N., Tsai, S. F., Li, S. F., Lee, T. F., Huang, T. M., Wang, M. L., Hsu, K. H., and Shen, C. Y. (1999). Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5, 458-60.

Yang, D., Wilson, J. E., Anderson, D. R., Bohunek, L., Cordeiro, C., Kandolf, R., and McManus, B. M. (1997). In vitro mutational and inhibitory analysis of the cis-acting translational elements within the 5' untranslated region of coxsackievirus B3: potential targets for antiviral action of antisense oligomers. *Virology* 228, 63-73.

Yeates, T. O., Jacobson, D. H., Martin, A., Wychowski, C., Girard, M., Filman, D. J., and Hogle, J. M. (1991). Three-dimensional structure of a mouse-adapted type 2/type 1 poliovirus chimera. *Embo J* 10, 2331-41.

Ypma Wong, M. F., Dewalt, P. G., Johnson, V. H., Lamb, J. G., and Semler, B. L. (1988a). Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology* 166, 265-70.

Ypma Wong, M. F., Filman, D. J., Hogle, J. M., and Semler, B. L. (1988b). Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs. *J Biol Chem* 263, 17846-56.

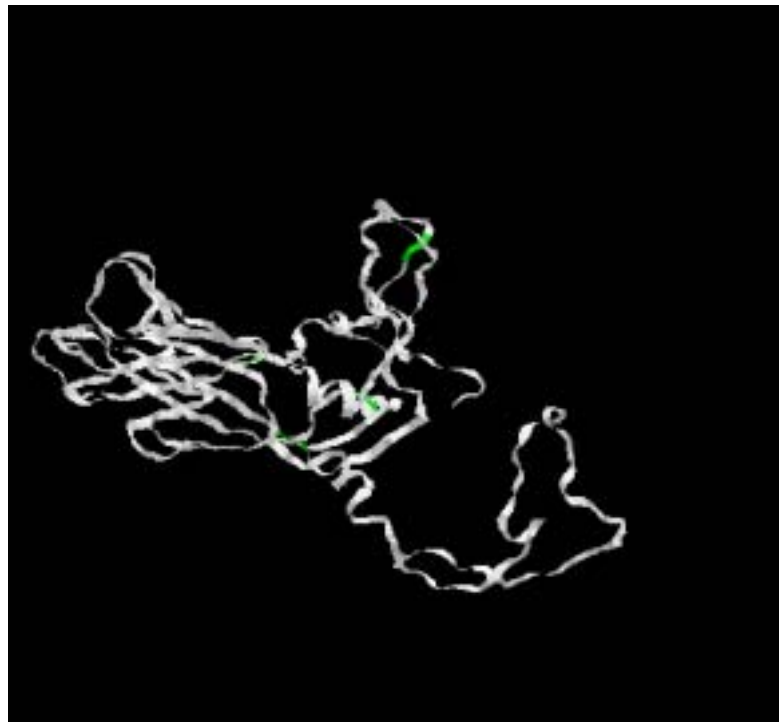
Zibert, A., Selinka, H. C., Elroy Stein, O., Moss, B., and Wimmer, E. (1991). Vaccinia virus-mediated expression and identification of the human poliovirus receptor. *Virology* 182, 250-9.

## 五. 附錄

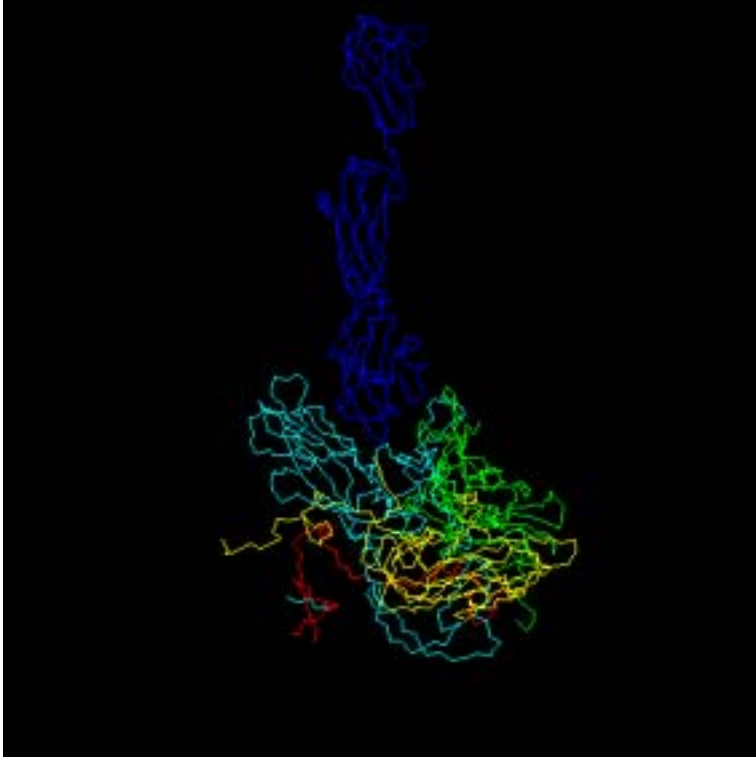
圖一 3D 結構模擬腸病毒 71 型之 VP1 蛋白質與胺基酸變異分析(I)



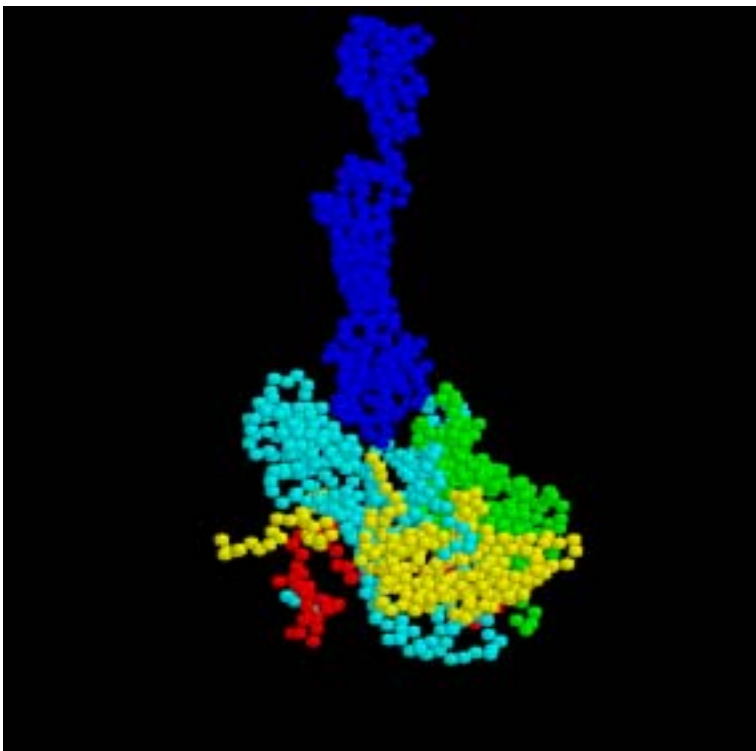
圖二 3D結構模擬腸病毒71型之VP1蛋白質與胺基酸變異分析(II)



圖三. Poliovirus receptor 與病毒蛋白質結合位分析

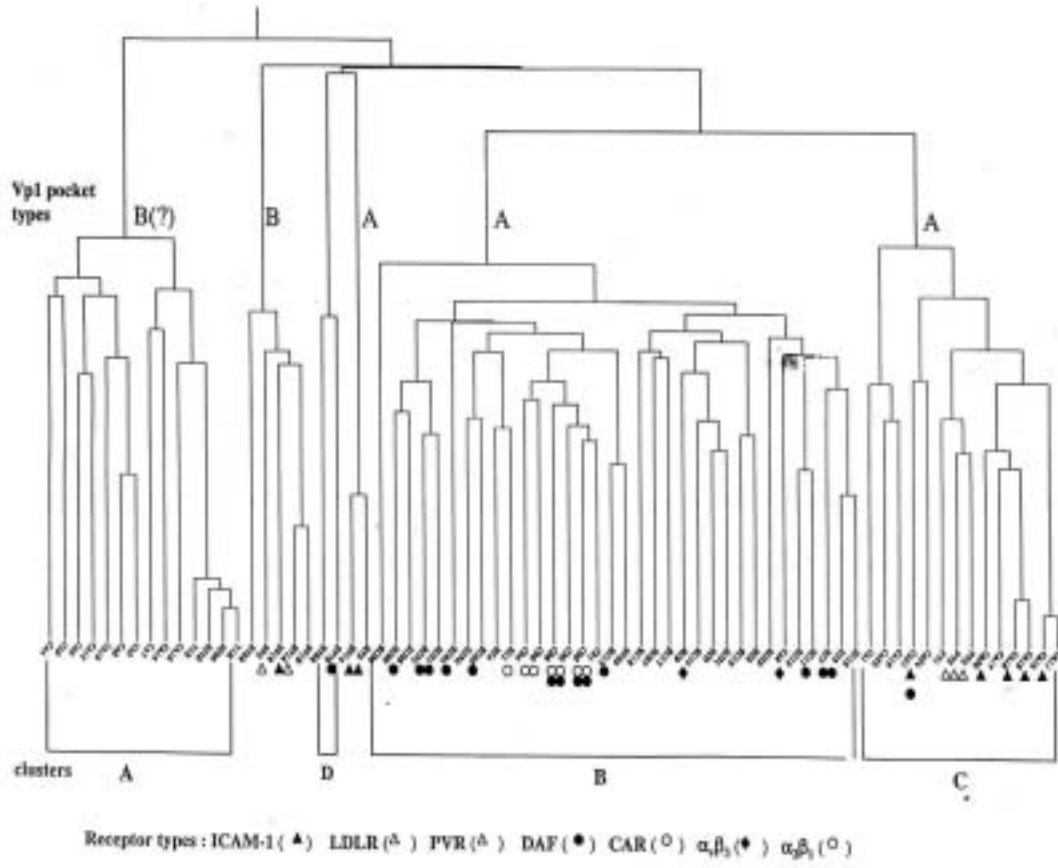


**Blue: CD155**  
**Cyanine: VP1**  
**Green: VP2**  
**Yellow: VP3**  
**Red: VP4**

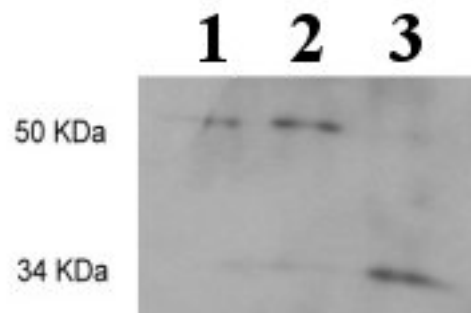


**Blue: CD155**  
**Cyanine: VP1**  
**Green: VP2**  
**Yellow: VP3**  
**Red: VP4**

圖四. 腸病毒的細胞病毒受體分析

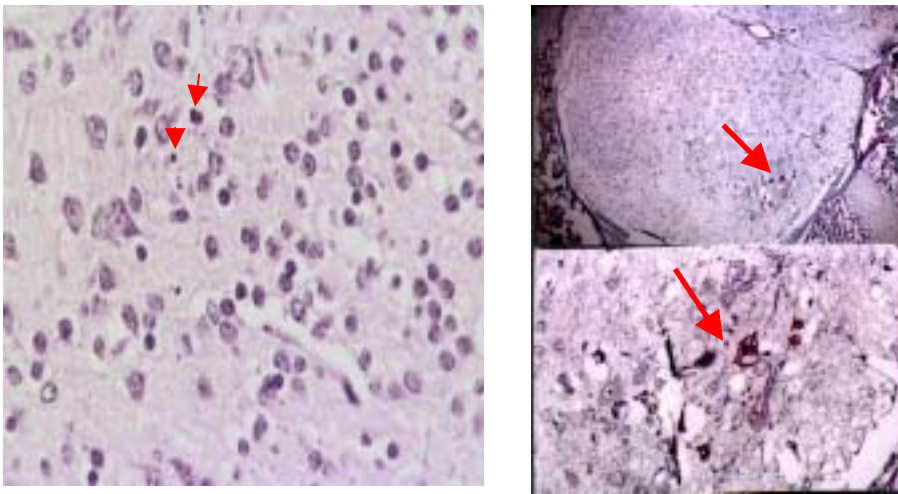


圖五 以腸病毒 YN3-4a.偵測橫紋肌細胞表面之腸病毒結合蛋白質



Cell lysate of newborn ICR mouse leg muscle (Lane 1 and 2) and adult ICR mouse leg muscle (Lane 3). All samples were loaded with a non-reducing buffer in 10% SDS-PAGE minigel. After separation, the proteins were transferred onto the PVDF membrane for virus overlay protein binding assay with YN3-4a. Detection was done with ECL detection kit.

圖六 病毒致病機轉

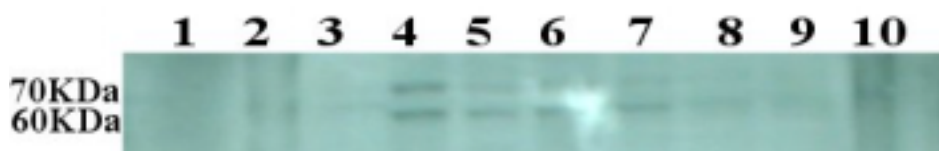


6a. Single cell necrosis (apoptosis) are noted in the ventral neuron of spinal cord (arrow), similar lesions are also noted in the cerebral cortex as well as hippocampus.

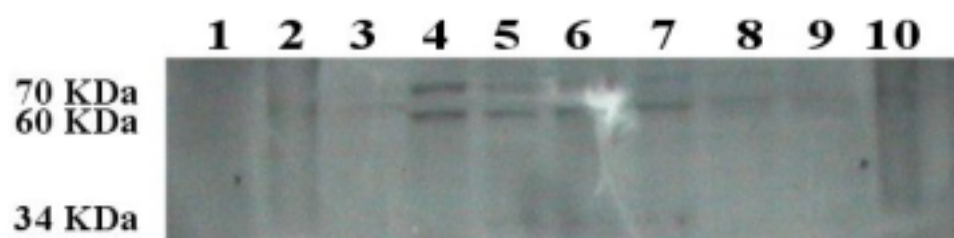
6b. Immunohistochemical staining (using mAb against EV71) of EV71 in motor neuron of the spinal cord.

圖七 以腸病毒 YN3-4a.偵測橫紋肌細胞表面之腸病毒結合蛋白質

七 A

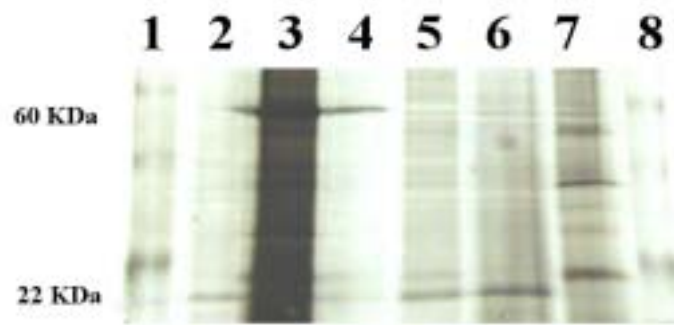


七 B



(A) YN3-4a and (B) neu were used as binding virus. Molecular weight marker (Lane 1& 10); Whole cell lysate of RD (Lane 2), ICR mouse brain (Lane4), ICR mouse leg (Lane 5 & 6), ICR mouse tongue(Land 7). The cell lysates were run in 12% SDS-PAGE without using reducing agent, before transferred onto PVDF membrane. After blocking, the membrane was allowed to bind with either YN3-4a or neu virus. Monoclonal antibody against EV71 VP1 (Chemicon) was used to detect virus. The cellular binding proteins were detected with ECL detection kit after reacting with HRP-conjugated anti-mouse antibody

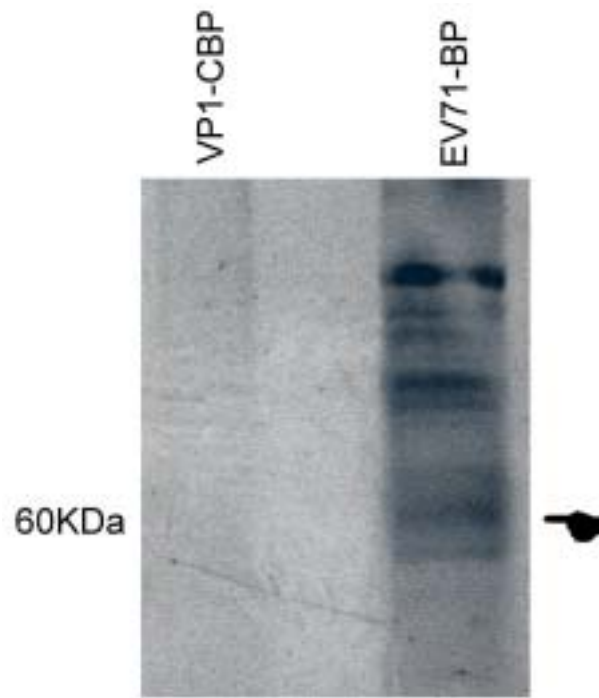
圖八 以 EV71 VP1 偵測 EV71 的細胞結合蛋白質



Molecular weight marker in Lane 1 and 8. RD cell lysate (Lane 3 and 7); Pellet of reactions of RD cell lysate with VP1-CBP and Calmodulin-resin (Lane 4, 5 and 6); VP1-CBP only (Lane 2). The samples were run in 10% SDS-PAGE under non-reducing condition and stained with silver stain.



圖九 以 EV71 VP1-CBP 捕捉 EV71 的細胞結合蛋白質



圖十 以 EV71 VP1-CBP 捕捉 EV71 的細胞結合蛋白質，用西方轉漬法偵測

