

計畫編號：DOH90-DC-2001

行政院衛生署九十年度
自行研究計畫

檢驗腸病毒 VP 蛋白質及其抗體方法之建立

研究報告

執行機構： 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組
計畫主持人： 周如文
研究人員： 吳清錫、黃偉倫
執行期間： 九十年七月一日至九十年十二月三十日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、摘要	(3)
貳、本文	
一、前言	(4)
二、材料與方法	(5)
三、結果	(9)
四、討論	(9)
五、結論與建議	(11)
六、參考文獻	(12)
七、圖、表	(13)

壹、摘要：

研究目的發展檢測腸病毒七十一型病毒及其抗體的專一性分析方法，希望此方法的建立能幫助國內未來腸病毒七十一型的防治工作。

研究方法 VP 蛋白為病毒之表面結構蛋白，有四個蛋白分子 (VP1-4)，本研究將利用大腸桿菌來過量表現其中三個蛋白質，將其分別純化後，測試其專一性及靈敏度。計畫內亦合成抗 VP1、VP2 及 VP3 其中三段序列經合成 peptide 之後，接種兔子及老鼠並收集含有抗體之血清，進行抗體測試以利進一步 ELISA 檢驗套組製作的實驗。

主要發現抗 VP1、VP2 及 VP3 其中三段序列經合成 peptide 抗體，初步證實抗體專一性，敏感度最佳為 2000 分之一；與腸病毒七十一型中和 ELISA 試驗亦證明可行性。本年度亦完成 VP2 基因重組蛋白 (pET-23a-VP2) 製備與純化程序。

結論及建議事項本研究擬以腸病毒之 VP 蛋白質為目標，發展可專一腸病毒之檢測方法。把此些蛋白質固定於尼龍 (nylon) 濾膜上當做抗原，運用於分析疑似腸病毒感染者之檢體內是否含有 anti-VP 的抗體。此外，利用此專一抗體將可發展捕捉抗病毒抗體之 ELISA kit，以準確檢測感染病患之檢體。

本計畫之成果若能轉移至業界發展成檢驗試劑，可加強本本性重要傳染病及新興傳染病之檢驗診斷與醫療等生物技術研究開發，有助於國內生物技術產業之實質發展，並將有助於國內未來腸病毒之防治工作。

關鍵詞： 腸病毒、VP 蛋白質、檢驗試劑

貳、 本文

一、 前言：

腸病毒七十一型 (enterovirus 71) 是造成嬰兒及幼兒急性發燒、非細菌性髓膜炎、腦炎、麻痺、以及一些呼吸道病症的主要原因之一。此外，在已知的腸病毒中，七十一型經常是與大規模流行的手足口疾病 (head, foot, and mouth disease) 相關聯，曾經發生大規模流行地區包括澳洲 (Gilbert et al.,1988) 歐洲 (Chumakov et al.,1979) 美國 (Alexander et al.,1994) 以及最近的馬來西亞 (Lum et al.,1998) 和台灣 (Center for Disease Control and Prevention,1998 ; Liu et al.,2000)。腸病毒病例近年來在國內時有所聞，由於此疾病所影響之患者絕大部分為嬰兒及幼兒，因此，能夠及早且正確的診斷，是十分重要的。此外，由於目前尚無治療此傳染病的有效方法，因此早期且正確的診斷出病原，對於控制此病疫情而言，是極為必須的。所以，發展一靈敏度與專一性高的檢測腸病毒及抗該病毒抗體之技術，將有助於預防此傳染病之散播。

腸病毒屬於 *Picornaviridae* 家族之 RNA 病毒，而七十一型則是在眾多腸病毒家族成員中的一員，最早在 1974 年被發現 (Schmidt et al.,1974)。由於腸病毒家族包含了結構與序列相似的 Poliovirus、Coxsackievirus、以及 Echovirus，因此，正確的檢測與種類判定是十分的不易。現有的標準檢測方法為先做病毒培養，再以多種含抗病毒抗體的血清做檢測 (Neutralization test, (Hsiung,1994))，這樣的方法耗時而且判定不易。近來，腸病毒七十一型序列已被定出 (Brown and Pallansch,1995 ; Yan et al.,2000)，利用 RNA 序列所發展出來的 PCR (polymerase chain reaction) 檢測法可在少量的檢體中偵測並做病毒種類的判定 (Oberste et al.,1998a ; Oberste et al.,1999b)，可惜這樣的方法尚未能被廣泛的被使用，且無法偵測病患體內是否有抗體存在。於此，本研究擬以腸病毒七十一

型的結構蛋白為標的，備製具專一性的抗體，以發展出可準確檢測的系統。

腸病毒檢測所面臨的一個大問題是由於腸病毒家族成員眾多且相似，而無法取得具專一性的抗病毒血清。基於此，本研究擬針對腸病毒七十一型的特定蛋白，備製具專一性的抗體。由序列分析顯示，腸病毒七十一型與近親 Coxsackie A16 (CA16) 病毒約有 90 % 氨基酸序列相同 (Brown and Pallansch, 1995 ; Yan et al., 2000)，但是對個別蛋白做進一步分析則發現在結構蛋白 VP1-3 上，有較大的差異性 (約 80 % 氨基酸序列相同)，顯示著 VP1-3 可作為認定腸病毒七十一型的專一分子。VP1-3 為腸病毒表面的結構蛋白，一般而言，結構蛋白由於是位在病毒裡面，因此，抗結構蛋白抗體在體內較容易產生。於此，擬發展檢測腸病毒七十一型蛋白質及其抗體的分析方法，希望此方法的建立能助於國內未來腸病毒七十一型的防治工作。此外，利用此專一抗體將可發展捕捉抗病毒抗體之 ELISA 試劑，以檢測感染病患之檢體。

二、 材料與方法

(一) VP1, VP2, VP3 抗體製備

選擇 VP1、VP2 和 VP3 做為製備抗體的來源。首先選擇 VP1、VP2、VP3 內最有可能引起免疫抗原反應以及與克沙奇病毒序列差異較大之區域，分別是 VP1 (GAPKPDSRESLAWQTAT)、VP2 (YKQTQPGADGFELQH)、VP3 (LMERLRFPVSAQAGKG)。此三段序列經合成 peptide 之後，取 2mg 與 2.5 mg 的 KLH (keyhole limpet hemocyanin) 在 EDC 溶液中進行接合反應(室溫下持續充分震盪兩小時)，KLH 在此做為一攜帶蛋白，可以增強 peptides 引起的免疫反應。接

著以 KLH 接合好之 peptides 施打兔子及老鼠並收集含有抗體之血清。

(二) 質體的建構 (plasmid construction)

1. 以 PCR 備製 VP1,VP2 及 VP3 cDNA 片段

取含 VP1,VP2 及 VP3 cDNA 序列之質體 (50ng) 為模板 , 以 5' primer (含 *EcoRI* site) 及 3' primer (含 *NotI* site) 配對 , 使用 *Amplitaq* (Perkin Elmer) 進行 PCR 反應。以備製 N 端含 *EcoRI* site , C 端含 *NotI* site 的 VP cDNA 片段。此 VP cDNA 片段經 *deslting* 及適當的酵素 (*EcoRI* 及 *NotI*) 作用後 , 以 agarose gel electrophoresis 分離 , 再以乾淨的刀片將所需 VP cDNA 從膠體上切出 , 置於 1.5ml 的微離心管中秤重 , 加入 3 倍體積 *GeneClean III kit* (Bio 101) 的 NaI , 在 50 的水浴中將膠體溶解 , 再加入適量的 *EZ-Glassmilk* (1 至 2ug DNA/*EZ-Glassmilk*) 室溫下放置 15 分鐘 , 偶爾拿起輕拍管壁使混勻 , 以 13,000rpm (Kubota. KM-15200) 離心 10 秒 , 除去上清液後 , 沉澱物用 *New Wash* (20 至 50 倍 *EZ-Glassmilk* 的量) 清洗三次。最後一次清洗 , 取走上清液後再次以 13,000rpm (Kubota. KM-15200) 離心 , 吸走殘餘溶液 , 在空氣中乾燥 2 至 5 分鐘 , 加入三次水後 , 室溫下放置 10 分鐘 , 以 13,000rpm (Kubota. KM-15200) 離心 30 秒 , 收集上清液。

2. DNA 接合反應 (DNA ligation)

取先經 *EcoRI* 及 *NotI* 作用過之適量載體 (pGEX4T-1 或 pET-23a) 及純化之插入基因 (VP1-3) , 加水使體積為 9 μ l , 再加入 premixed solution (2 μ l Bio-Lab 的 10X 接合緩衝液 , 1 μ l Bio-Lab 的 DNA 接合酵素 , 及 8 μ l 三次水) 11 元 1 , 在 15 靜置 16 小時。後利用轉型將接合之質體送入 *E. coli* BL21 或 BL21pLysS 中。

(三) VP 重組蛋白的表現及純化 (Expression and purification of the

recombinant VP proteins)

1. 重組蛋白質的表現

將帶有能表現 VP 融合蛋白的質體 pGEX4T-1VP1, pGEX4T-1VP2, pGEX4T-1VP3 (表現 GST VP 融合蛋白) 及 pET-23a-VP1、pET-23a-VP2、pET-23a-VP3 (表現 6xHis-VP 融合蛋白) 之單一菌落接種到 2 至 3ml 含 ampicilline 的 LB 培養液中, 培養約 16 小時。取 1ml 菌液加至 60 至 100ml 含 ampicilline 的 LB 培養液中, 在 37 搖晃培養 1 小時 30 分鐘之後, 取 1ml 出來測 OD₆₀₀。當其達到 0.3 至 0.5 的數值時, 加入 1ml Misopropyl-thio- -D-galactoside (IPTG), 在 30 以 180rpm 搖晃培養, 以誘導融合蛋白的表現。誘導表現 2 至 3 小時後, 將全部菌液以 3,500rpm (Heraeus, Labofuge 400R.JA10), 4 的溫度下離心 15 分鐘, 倒掉上清液後以 PBS 回溶。再離心後, 上清液道乾淨, 菌體放在-70 冰箱保存, 或立即進行純化。在 IPTG 加入誘導融合蛋白表現之前及之後不同時間點, 各取 1ml 菌液, 以 5,000rpm (Heraeus Biofuge), 離心 10 分鐘。倒掉上清液, 菌體加入 60ul SDS sample buffer (500mM Tris , 2 % SDS , 0.1 % Bromophenol Blue 及 10 % glycerol), 跑 SDS-PAGE 以瞭解融合蛋白之表現情形。

2. GST 融合蛋白質的純化

每 100ml 菌液所收集得之菌體, 加入 6ml 萃取緩衝液(PBS, 5 % Glycerol, 0.5 % Triton X-100 , 1mM EGTA , 40 mg/ml Aprotinin , 50mg/ml Pepstatin , 1mM PMSF in 2-prpanol , 10 mM 14.3 M2-mercatoethanol), 做超音波震盪。用 electroprobe 以 4 瓦特的功率將細胞打破, 每次打 10 秒, 共打三次, 然後在 4 以 13,000rpm (Kubota. KM-15200) 離心 20 分鐘。收集上清液, 再加入萃取緩衝液溶解菌體, 同樣條件做超音波震盪之後離心, 沉澱物重新溶於萃取緩衝液中, 得到的第一次上層液、第二次上層液及超音波震盪後的沉澱物, 則以 SDS-PAGE 觀察融合蛋白的分布及超音波震盪的效果。純化時, 取上層液

和適量的 50 % glutathione-sepharose 4B beads 在 4 作用 1 小時，以 2,500rpm 轉速 (Kubota. KM-15200) 離心 5 分鐘，收集上層液，beads 則用萃取緩衝液清洗之後離心下來。重複清洗兩次，最後得到的 beads 存放在-70 冰箱保存。若要得到不具 GST 的蛋白，則取 1ml glutathione-sepharose 4B beads 加入 50ul thrombin 與 950ul PBS 在室溫下作用 2 小時，以 2,500rpm(Kubota. KM-15200), 4 離心 5 分鐘，吸取上清液，上清液即含所要的蛋白質。

3. His-tagged 融合蛋白質的純化

His-Bin resin 先以 3 倍體積的去離子水洗，再以 5 倍體積的 charge buffer (50 mM NiSO₄) 沖洗，將 Ni immobilize 至 resin, 最後以 3 倍體積的 binding buffer(5 mM imidazole, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)來平衡 菌體則以 4ml binding buffer 懸浮、超音波震碎，離心後，His-Bind resin 以 binding buffer 沖洗，再以 wash buffer (60 mM imidazole, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) 沖洗，最後以 elute buffer (1 mM imidazole, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)將 His-tagged NS3 沖提出，在透析(against 20 mM Tris-HCl, pH 7.9)即成。

4. 蛋白質濃度之測定

採用 Lowry(Lowry, 1976)的方法，以 BSA 為標準品做蛋白質濃度之定量分析。

(四) 西方點墨分析 (Western blotting)

1. SDS 聚丙烯醯氨凝膠電泳 (SDS-PAGE)

本實驗所用之電泳裝置購自 BioRad (Miniprotein II), 電泳裝置組合後，首先加入分離膠片溶液，在小心加水於上層；待膠片凝固後，除去上層的水，加入焦集膠片溶液，並插入 comb；待膠片凝固後，置於電泳槽中，並注入 1x tank buffer 混合，於 95 加熱 5 分鐘後，注入 well 中，固定電壓於 100 至 150 伏特進行電泳。當染劑跑至膠片底部，即取出膠片進行西方點墨分

析。

2. 西方點墨分析 (Western blotting)

將電泳後之膠片浸泡於轉印緩衝液中，以多孔性海綿-濾紙-膠片-nylon 濾膜-濾紙-多孔性海綿之組合裝置於”Mini Trans-Blot cell”(BioRad)內，膠片在負極，nylon 濾膜在正極，加入轉印緩衝液，固定電流於 300Ma 進行轉印一小時。轉印完之 nylon 濾膜以 blocking solution 浸泡 30 分鐘後。加入一次抗體(即稀釋過之登革熱患者的血清)，室溫反應 1 至 2 小時後，以 TTBS 洗三次後，每次 10 分鐘，再加二次抗體，室溫反應 1 至 2 小時後，以 TTBS 洗三次後，以 ECL reagent (solution I 及 solution II 等體積混合，需要量為 $0.125\text{ml}/\text{cm}^2$) 在室溫下反應 1 分鐘，立即以 X-ray 底片攝影。

(五) 酵素免疫分析

首先於九十六孔微量滴定盤先吸附抗 VP peptide 抗體，密封置於 4℃ 下過夜。使用前先清洗，在加入 5% 牛奶/PBS，於 37℃ 作用 60 分鐘，續加入 EV71 單株抗體(MAb979)，於 37℃ 下作用 60 分鐘。清洗後加入 50 μl 生物素/羊 MoIgG Fc HRP 抗體，於 37℃ 作用 60 分鐘。清洗後加入 50 μl 抗生物素蛋白/山葵過氧化酵素，於 37℃ 作用 30 分鐘，清洗後再加入 100 μl 含 0.1% o-phenylene-diamine (OPD) 之 pH5.0 檸檬酸鈉緩衝液及 30% 過氧化氫，置於室溫下暗處呈色 30 分鐘，最後以 100 μl 之 2N 硫酸液終止反應。讀取 A_{490} 吸光值。

三、結果

(I) VP1, VP2, VP3 抗體製備

為能快速地鑑別出腸病毒 71 型與克沙奇病毒之感染，我們選擇與克沙其病毒差異較大的腸病毒 71 型衣殼蛋白 (capsid protein) VP1、VP2 和 VP3 做為製備抗體的來源。首先選擇 VP1、VP2、

VP3 內最有可能引起免疫抗原反應以及與克沙奇病毒序列差異較大之區域，分別是 VP1 (GAPKPDSRESLAWQTAT)、VP2 (YKQTQPGADGFELQH)、VP3 (LMERLRFPVSAQAGKG)。此三段序列經合成 peptide 之後，接著以 KLH 接合好之 peptides 分別施打兔子並收集含有抗體之血清，進行抗體專一性與敏感度 (圖二) 測試，並進行 ELISA 檢驗套組製作的實驗 (圖三)。專一性試驗，是使用 500 倍稀釋之免疫前後血清，以西方墨點法與 VP1、VP2、VP3 peptide 中和實驗，結果證明抗血清專一性良好 (圖一)；再利用市售腸病毒七十一型單株抗體 (Mab979) 證明抗體特異性，發現 VP1、VP2、VP3 peptide 抗體與病毒中和後，於西方墨點法使用之凝膠上，各呈現不同之辨認位置，將可運用於特異性更高之試驗設計 (圖二)。敏感度測試，血清在 2000 倍稀釋下，仍具 peptide 中和能力，顯現效價 (titer) 良好 (圖三)。ELISA 檢驗實驗初步結果，血清在 100 倍稀釋情形下與腸病毒七十一型具中和效價 (圖四)。

(II) 製備 VP2 重組蛋白

除了使用合成的 peptide 進行抗體的製備外，另一方面我們也將進行重組蛋白的製備。由於腸病毒七十一型是 RNA 病毒，所以必須先使用 RT-PCR 的方法將所選定的基因大量表現，然後接到特定載體後，再送入特定的宿主細胞進行重組蛋白的表現。

1. 反轉錄—酵素聚合連鎖反應 (RT-PCR)

從資料庫中選取含括腸病毒七十一型 VP2 蛋白的核酸序列 954~1715 bp (cDNA)，以此為基礎設計出一負向引子 (P3): 5' CCCTTGCGTAACTGCTTGT -3' (1700 ~ 1718 bp)。此引子用於反轉錄實驗，將腸病毒七十一型 VP2 的 RNA 訊息轉錄成 cDNA。接著以此 cDNA 作為模版，設計一對引子來進行 DNA 聚合酵素連鎖反應 (PCR)，藉此方法大量表現欲得之 VP2 基因。酵素聚合連鎖

反應中之正向引子 (P1) 5' ATTCATATGTCTCCATCTGCTGAGA -3' , 含有 NdeI 限制酵素的序列 (劃底線的部分) ; 而負向引子 (P3) 為 5' ATTCTCGAGTTGCGTAACTGCTTGT -3' , 含有 XhoI 限制酵素序列 (劃底線部分) 。反轉錄之實驗過程 , 先取 1.72 μ g 之 RNA (正股) 和 0.54 μ g 之 P3 引子混合後 , 加入 M-MLV 反應溶液和 M-MLV 反轉錄酵素 (Promega) , 在 42 $^{\circ}$ 下作用 60 分鐘 , 得到 cDNA 產物。接著取適量之 cDNA 產物做為模版 , 加入酵素聚合連鎖反應所須知正負引子 , 和 *Tag* DNA 聚合酵素 , 進行 DNA 聚合連鎖反應。然後將所得之 DNA 產物經過去鹽、限制酵素切割作用後 , 進行電泳分離。續以 GENECLAN III kit 將 DNA 產物由瓊脂凝膠 (agarose gel) 上純化出來 , 以便進行質體構築實驗 (圖五、六) 。

2. 質體構築 (pET-23a-VP2) 及重組蛋白之表現

將純化所得之 VP2 基因產物結合至帶有 *NdeI* 及 *HhoI* 切點之質體 (pET-23a) 上 , 而接合好之質體在送回適當之勝任細胞進行大量表現。VP2 蛋白於 IPTG 作用 2 小時表現量最多 (圖七) , 由於該質體在 *XhoI* 序列後具有組氨酸標幟 (his-tag) 序列 , 因此表現所得之 VP2 蛋白將具組氨酸標幟。於是可利用 nickle-chelate-resin 將重組蛋白純化出 , 以便進行後續實驗。

四、結論與建議

本年度計畫進度為抗 VP1, VP2, VP3 抗體製備及 VP2 重組蛋白製備程序之建立。實驗結果證實 : 抗 VP1, VP2, VP3 抗體之專一性與敏感性皆具偵測腸病毒七十一型之可行性。抗體取得容易 , 可大量製備。VP2 重組蛋白技術建立後 , 可運用於其他 VP1 及 VP3 蛋白之製備。本計畫之成果若能轉移至業界發展成檢驗試劑 , 可加強本本性重要傳染病及新興傳染病之檢驗診斷與醫療等生物技術研究開發 , 有助於國內生物技術產業之實質發展 , 並將有助於國內未來腸病毒之防治工作。

五、主要參考文獻

Alexander, J. P., Baden, L., Pallansch, M.A., and Andersort, L.J. (1994). Enterovirus 71 infections and neurologic disease-United States, 1977-1991. *J. Infect. Dis.* *169*, 905-908.

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

Centers for Disease Control and Prevention (1998). Deaths among children during an outbreak of hand, foot and mouth disease-Taiwan, Republic of China, April-July 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report* *47*, 629-632.

Chumakov, M., Voroshilova, L., Shindarov, I., Gracheva, L., Koroleva, G., Vasilenko, S., Brodvarova, I., Nikolova, M., Gacheva, M., Mitov, G., Ninov, N., Tsyka, E., Robison, 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.

Gilbert, G. L., Dickson, K. E., Waters, M. J., Kennett, M. L., Land, S. A., and Sneddon, M. (1988). Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *7*, 484-488.

Hsiung, G. D. (1994). Picornaviridae. In Hsiung's Diagnostic Virology. G. D. Hsiung, C. K. Y. Fong, and M. L. Landry, eds. (New Haven and London: Yale University Press), pp. 119-140.

Liu, C.-C., Tseng, H.-W., Wang, S.-M., Wang, J.-R., and Su, I.-J. (2000). An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. *J. Clin. Virol.* *17*, 23-30.

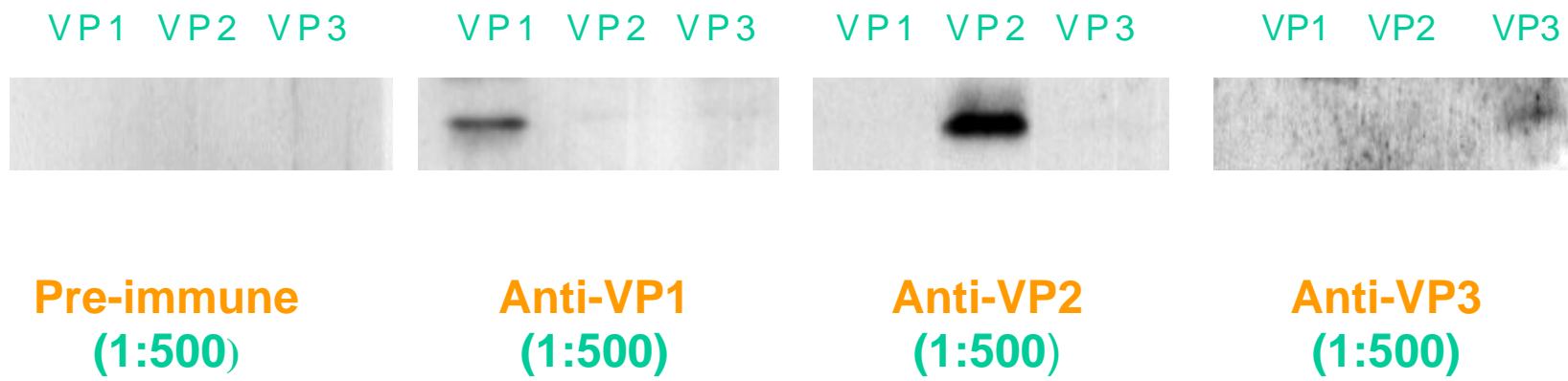
Lum, L. C. S., Wong, K. T., Lam, S. K., Chua, K. B., Goh, A. Y., Lim, W. L., Ong, B. B., Paul, G., AbuBakar, S., and Lambert, M. (1998). Fetal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J. Pediatr.* *133*, 795-798.

Oberate, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., and Pallansch, M. A. (1999b). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1288-1293.

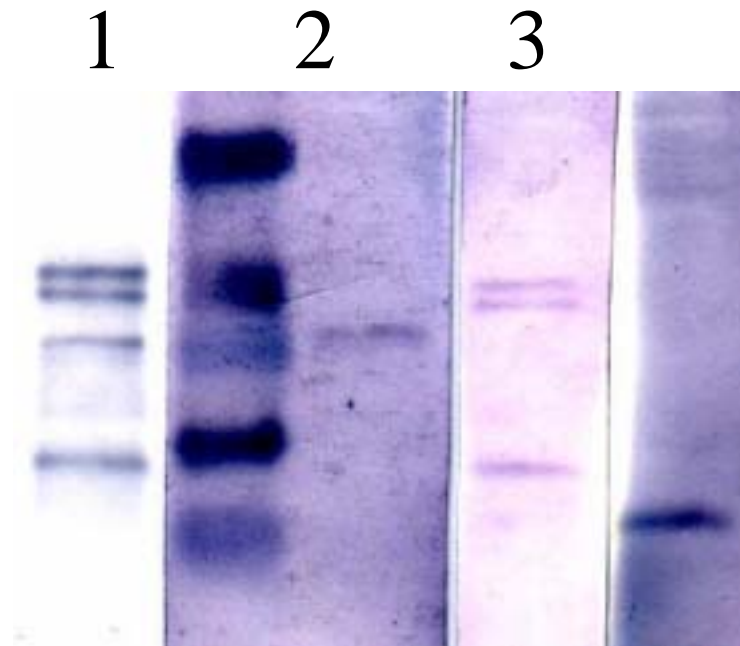
Oberate, M. S., Maher, K., and Pallansch, M. A. (1999a). Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res.* *58*, 35-43.

Schmidt, N. J., Lennette, E. H., and Ho, H. H. (1974). An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* *129*, 304-309.

Yan, J.-J., Wang, J.-R., Liu, C.-C., Yang, H.-B., and Su, I.-J. (2000) . An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998 : A comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *J. Clin. Virol.* *17*, 13-22.



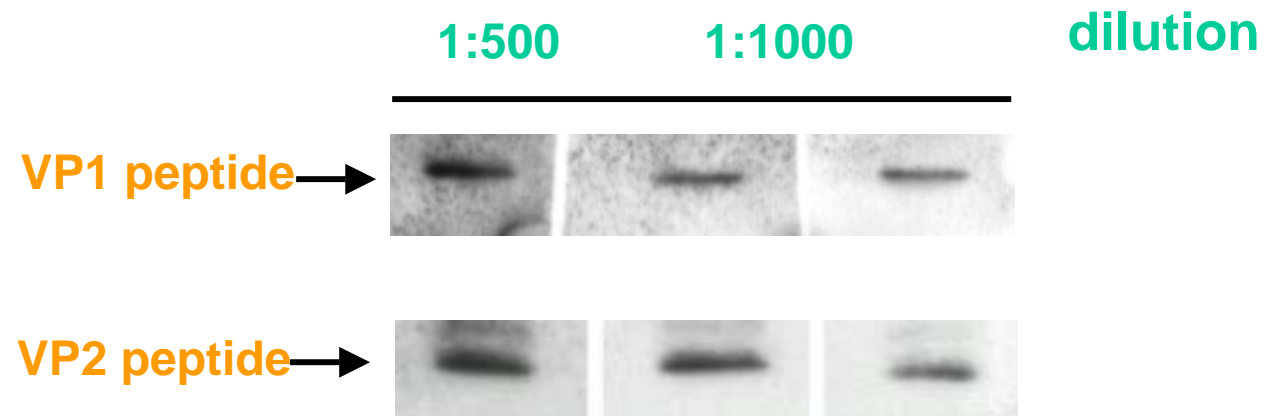
圖一 Determination of the specificity of anti-VP peptides anti-sera



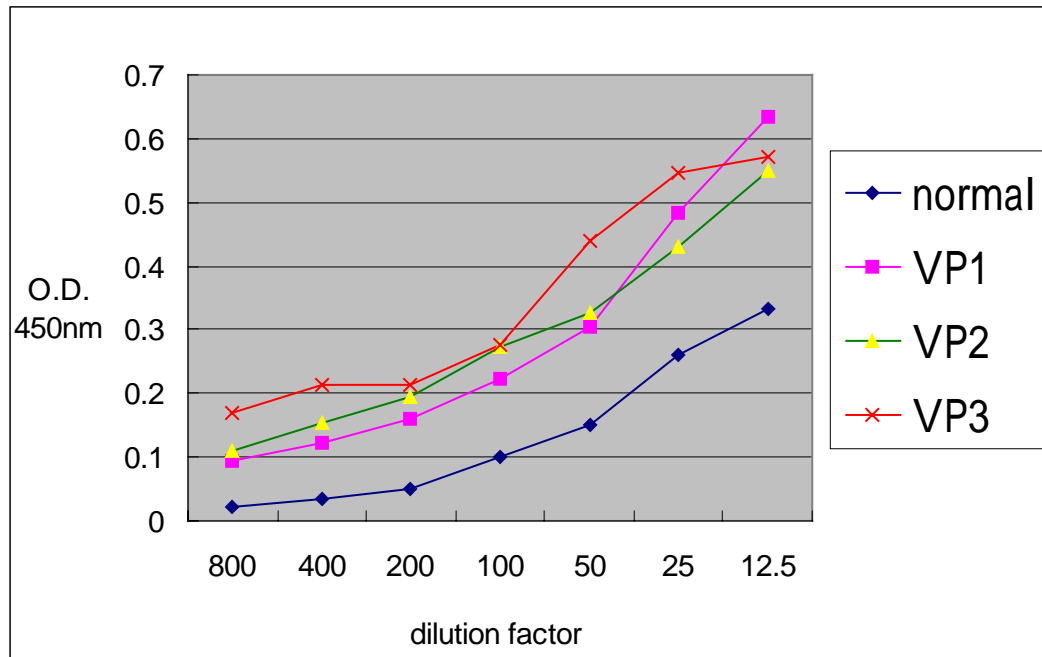
圖二 Determination of the specificity of anti-VP peptides

anti-sera:

Lane 1 MAb979, lane 2 marker, lane 3 anti-VP1, lane 4 anti-

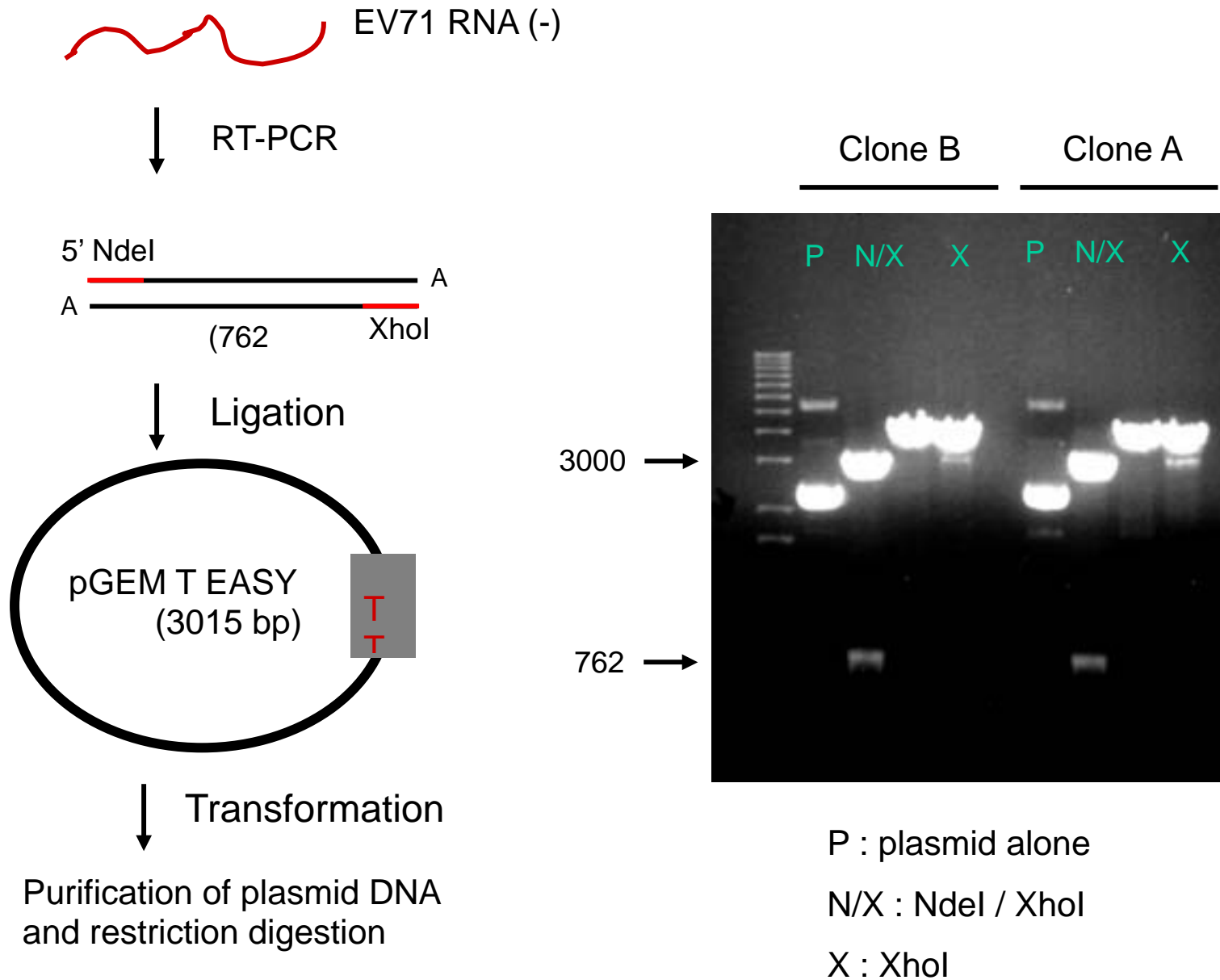


圖三 Titer determination of the anti-VP1 and anti-VP2

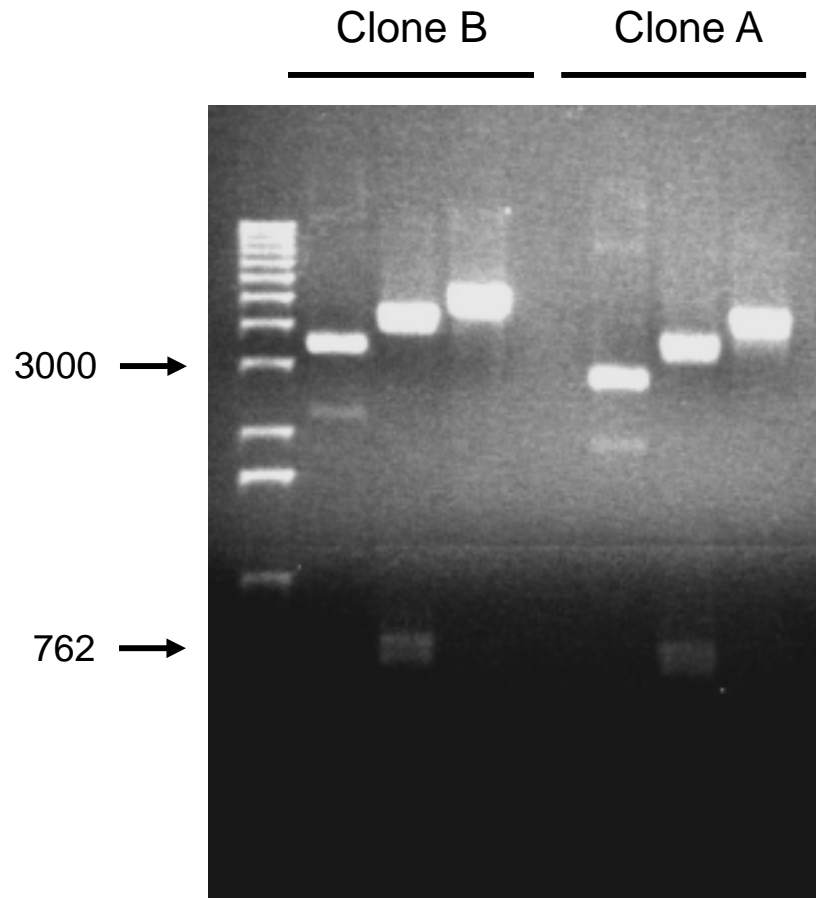
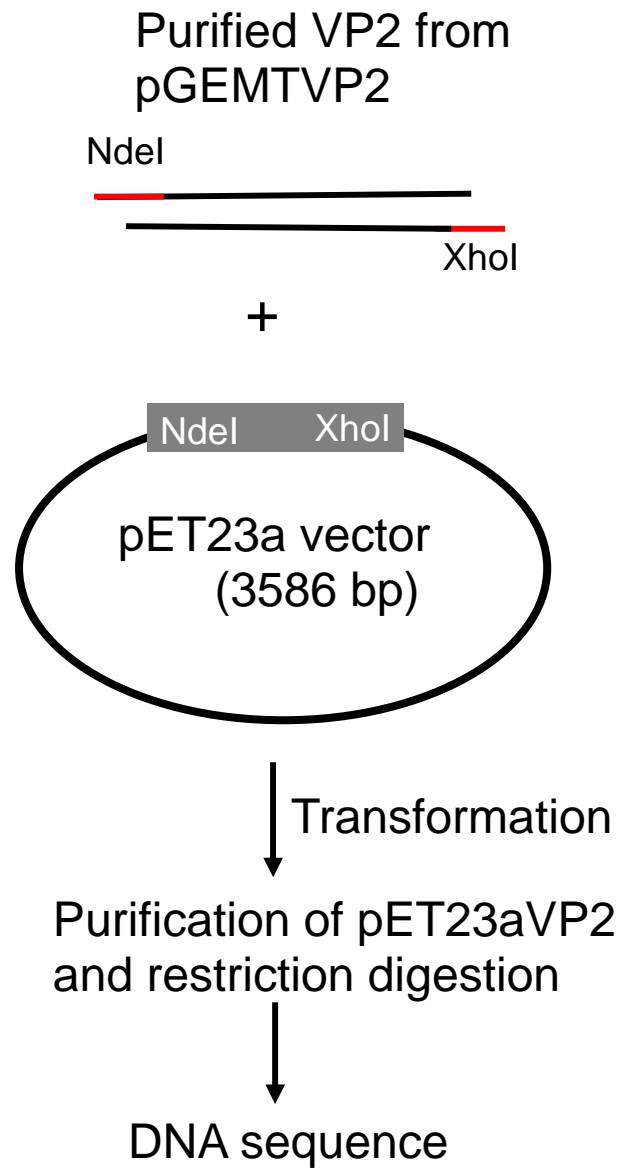


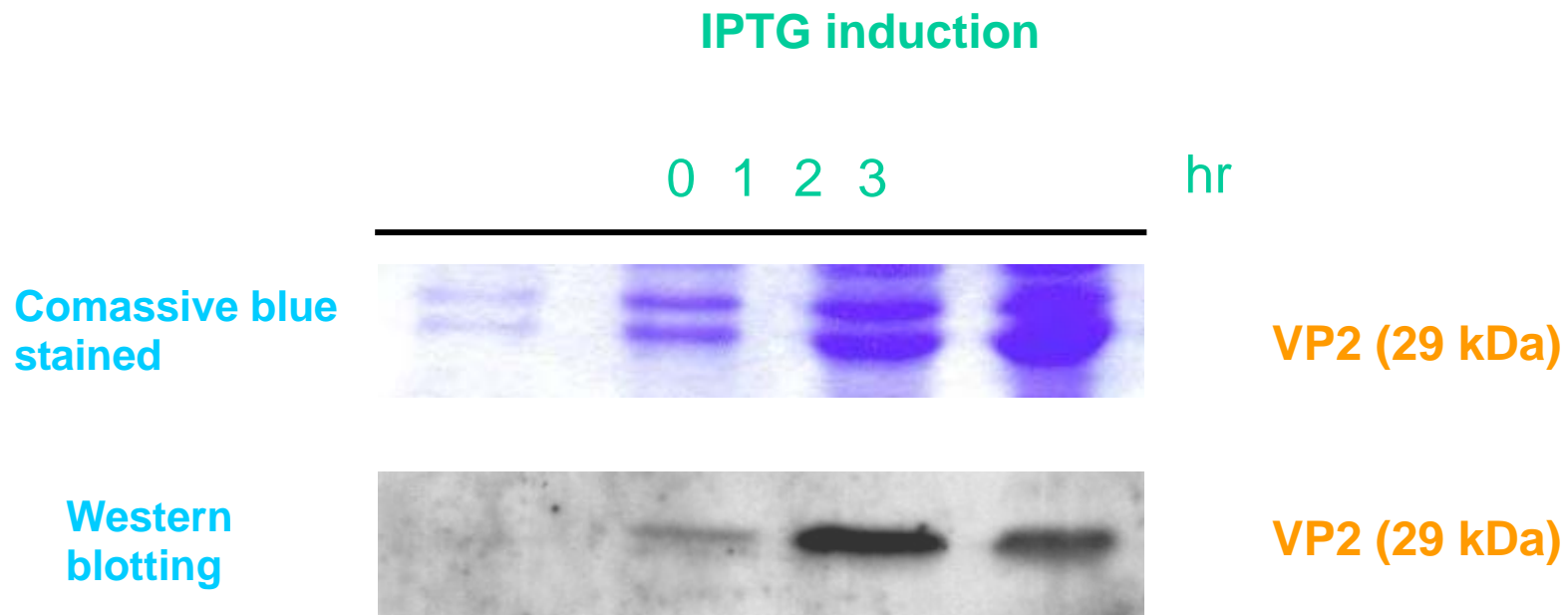
圖四 Titer determination of the anti-VP1, VP2 and VP-3 anti-sera

圖五 Construction and identification of pGEMTVP2



圖六 Construction and identification of pET23aVP2





圖七 Expression of His-VP2 protein by IPTG induction