

計畫編號：DOH90-DC-2007

行政院衛生署九十年度  
自行研究計畫

登革熱病毒純化系統之建立

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： 黃偉倫、陳瑞萍  
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	( )
四、討論	(7 )
五、結論與建議	(12)
六、參考文獻	(13)
七、圖、表	(14)

## 壹、摘要：

研究目的本計畫擬製備高純度登革熱病毒抗原，藉以開發高敏感性、特異性且精確之血清學檢測方法，供早期確認主要病毒 anti-E 抗體及以 NS1 抗原鑑別不同血清型病毒之感染，並進一步研發成檢驗試劑套組。

研究方法建立適用登革熱病毒純化之液相層析系統，依登革熱病毒與日本腦炎病毒相似之特性，選擇並評估利用分子凝膠樹脂分離抗原之效果。共評估四種分子量分離範圍各異之樹脂：Sephacryl S-100HR ( $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$ )、Sepharose 6FF ( $1 \times 10^4$ - $4 \times 10^6$ )、Sepharose 4FF ( $6 \times 10^4$ - $2 \times 10^7$ )、Sepharose CL-2B ( $7 \times 10^4$ - $4 \times 10^7$ )。首先評估同批等量之第四型登革熱病毒於四種分子凝膠管柱之層析流洗結果。所使用最適化純化條件為：磷酸緩衝液 pH7.4、管柱流洗速度 2 ml/min、室溫操作。當凝膠可分離分子量範圍漸增時，E 抗原與病毒培養液中之其他成份之分離效果愈佳。但因考量擬同時回收 NS1 抗原，所以確定將以 Sepharose 6FF 做為分離登革熱病毒 E 及 NS1 抗原最佳介質。實驗結果顯示，四種不同血清型登革熱病毒，各可運用分子凝膠 Sepharose CL-6FF 以單一步驟於 ÄKTA 液相層析純化系統上，同步順序分離 E 及 NS1 抗原。抗原並經蛋白質分析、SDS-PAGE、西方墨點法及 ELISA 等生化與免疫方法確認。

主要發現四種不同血清型登革熱病毒，各可藉用 Sepharose CL-6FF 分子凝膠管柱，以單一步驟於 ÄKTA 液相層析純化系統上，同步順序分離登革熱病毒 E 及 NS1 抗原。並由 ELISA 血清學檢測方法證實，該兩抗原仍保有既有結構及具生物活性，不與日本腦炎病毒交叉反應，當可運用於登革熱臨床血清檢體檢測。

結論及建議事項為降提昇傳染病檢測品質以迅速確認傳染病之發生，宜製備血清抗體檢測所需之高純度抗原試劑。於是利用可標準化、易確效、批間一致性高之液相層析技術，純化去除病毒培養液中非必要抗原之蛋白等雜質，藉以開發高敏感性、特異性且精確之血清學檢測方法。本計畫已順利研發以 Sepharose6 FF 分子凝膠單一純化步驟搭組合 ÄKTA 液相層析系統，同步順序分離登革熱病毒 E 及 NS1 抗原。此項純化生物技術原理可運用於其他病原體抗原或抗體之純化製備，以改進檢驗方法進而發展成試劑套組；並可配合推展行政院「生物產業推動方案」政策中，加強本土性重要傳染病及新興傳染病之檢驗診斷生物技術研究開發計畫，逐步降低過度依賴商業檢驗套組織缺點。朝向建立準確快速診斷方法目標邁進，以迅速正確掌握疾病疫情，提供防治措施擬定，期有效控制疫情並落實防疫科技化。

關鍵詞：黃病毒、檢驗試劑、登革熱病毒純化

## 貳、本文

### 一、 前言：

登革熱 (Dengue or Dengue fever) 亦稱為斷骨熱(break bone fever) 是由登革熱病毒 (Dengue virus) 感染所導致，早在 1779 年埃及開羅與印尼雅加達發現，約 10-40 年流行一次。在我國屬於法定傳染病，且是二十四小時內必須通報的傳染病。登革熱病毒與日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus)、黃熱病 (yellow fever) 同為黃病毒屬 (Flavivirus) 的一員。雖然，主要流行於東南亞及中南美洲之熱帶地區，1970 年代更轉為出血性登革熱之流行。1994 年始，登革熱被正式宣佈為人類目前最重要之病毒性蟲媒傳染病，全球預計約有 20 億人口居住於疫區，每年感染病例約 1 千萬人，其中出血性患者佔 1-10 萬人【林鼎翔, 2000】。

台灣雖於光復前有數次流行，但於 1942 年之大流行後即沉寂 40 年之久。近年來，由於觀光旅遊蓬勃發展，台灣地區登革熱自 1987 年於南部爆發流行後(1,123 例)，歷年在嚴密疫情監控下，仍均有報告病例發生：1988 年，10,420 例；1989 年，594 例；1990 年，136 例；1991 年，804 例；1992 年，確定 23 例；1993 年，確定 13 例【Wu, 1993】；1994 年，確定 244 例；1995 年，1,808 例；1996 年，1,081 例；1997 年，754 例；1998 年，1,430 例；2000 年至 8 月底共 36 確定例，病毒四種血清型別皆曾發生流行。

埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 或白線斑蚊(*Aedes albopictus*) 是散播登革熱的主要病媒蚊之一【Bauer, 1928】。由於，亞洲國家登革熱呈高度的地方性流行，病毒是以長時間並伺機爆發流行之型態存在。更由於登革熱或出血性登革熱 (DHF) 雖然登革熱尚無有效的疫苗問世，疫病監測與控制極為重要。登革熱之監測包含：病毒學監測、流行病學監測、

臨床監測、血清學監測【Monath, 1984】及昆蟲學監測等。其中血清學監測，是根據病人發病 5 天後病毒消失而抗體產生，血液檢體經確認後，配合環境因子以推斷傳播疫區。至於，血清學檢驗方法有血球凝集抑制試驗、蝕斑減少中和試驗及較快速之 IgM 抗體酵素免疫吸附法 (MAC-ELISA) 等。目前，本局已具相當能力檢測登革病毒感染後患者抗體，但為降低檢測時與其他黃病毒屬產生交叉反應 (cross-reaction) 並迅速確認傳染病之發生，宜由改進檢測所需試劑之品質，建立準確度與敏感度均佳之實驗室檢驗系統著手。

層析純化技術已經被普遍使用於高純度生物治療藥品 (biotherapeutics)、檢驗試劑及其他生物製劑之製備。一般而言，病毒發酵液之下游純化為一複雜之化工單元操作組合，包含：細胞分離、離心過濾前處理或初步濃縮、液相層析法及再精製 (polish) 程序。目前，液相層析已被公認為最有效率之純化工具。有鑑於一般臨床檢驗實驗室中病毒之製備仍以沉澱、過濾、離心、透析技術為主，費時且回收率偏低，更造成品質管理與品質保證上之困難，因此擬將液相層析技術運用於登革熱病毒純化。

本計畫擬執行四型登革熱病毒抗原之純化分離製備，以提供本局相關業務單位進行疫病之監測及新一代血清學快速檢驗方法之開發，期能早期偵測病毒特異性抗體與鑑別不同血清型之病毒感染。

## 二、 材料與方法

### (一) 病毒液製備

#### 1、 非洲綠猴腎細胞 (Vero cell) 培養及繼代【李淑英, 1998】

利用細胞株(Vero cell, ATCC CCL81)為登革熱病毒培養之基質，將細胞於T型培養瓶每隔一周以1:10比例繼代，先倒盡培養基後，以PBS清洗一次後在加入0.05% Trypsin，於下37°C作用5分鐘後，以含5% FCS之M199培養基中和並計算細胞濃度。繼代後3-4天更換含5% FCS培養基。

## 2、病毒之繁殖【李淑英, 1998】

當細胞培養達90%confluence後，以0.1MOI之病毒感染細胞。病毒繁殖用培養基是以M199為主添加FCS，培養約72小時後收穫病毒液。

## (二) 層析純化

### 1.材料

分子凝膠、離子交換或其他適當樹脂，層析管柱可由Pharmacia Biotech公司購得。層析系統為Pharmacia AKTA explorer。

### 2. 層析技術方法評估(method scouting)與方法最適化

#### (1) 決定樹脂

主要依據樹脂對病毒液樣品容量(Capacity)、分離解析度(Resolution)、速度(Speed)及回收率(Recovery)，決定使用種類。所有程序將以 pH mapping 方式於Pharmacia ÄKTA explorer進行後，並用SDS-PAGE及蛋白質試驗結果，判定樹脂使用種類。

#### (2) 最適化純化條件

藉由ÄKTA explorer層析系統中Unicorn包含控制軟體，最適化進樣量、進樣、黏度、pH、溫度、離子強度、流速等條件，確立平衡(equilibration)、吸附(adsorption)、清洗(washing)、沖提(elution)與清洗(clean-in-place)步驟並建立標準操作程序。以蛋白質含量、SDS-PAGE及ELISA結果做為參考指標。

### (三) 分析方法

#### 1、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。

#### 2、細胞濃度監測

細胞之計數是先將細胞經 crystal violet 染色後，以 Coulter Multisizer II 計算  $3\mu\text{m}$  大小之細胞核。

#### 3、病毒斑測定法

於六孔穴培養皿中，每孔加入  $4 \times 10^5$  之 BHK 細胞，培養 48 小時使成均勻單層，吸除培養基後加入 0.1ml 病毒稀釋液。於  $37^\circ\text{C}$  下培養 1 小時後，每孔加 2ml Methyl Cellulose overlay 培養基。再於  $37^\circ\text{C}$  下培養 72 小時後，以 0.9%NaCl 清洗一次並加入 2ml Naphthal Blue Black 染料染色，計算病毒斑數目。

#### 4、酵素連結免疫反應法(IgM-ELISA)

九十六孔微量滴定盤先吸附  $60\mu\text{l}$  人 IgM 抗體，密封置於  $4^\circ\text{C}$  下過夜。使用前先清洗，在加入 4%牛血清白蛋白(BSA)，於  $37^\circ\text{C}$  作用 15 分鐘，加入病毒液，於  $4^\circ\text{C}$  下過夜，取出清洗後，加入  $50\mu\text{l}$  生物素/登革熱抗體，於  $37^\circ\text{C}$  作用 50 分鐘。清洗後加入  $50\mu\text{l}$  抗生物



素蛋白/山葵過氧化酵素，於 37°C 作用 15 分鐘，清洗後加入 100  $\mu$ l 含 0.1% o-phenylene-diamine (OPD) 之 pH5.0 檸檬酸鈉緩衝液及 0.03% 過氧化氫，置於室溫下暗處呈色 30 分鐘，以 100  $\mu$ l 之 2N 硫酸液終止反應。讀取 A<sub>490</sub> 吸光值。

### 5、膠片電泳(SDS-PAGE)

將膠片(polyacrylamide gel, 10%, pre-casted)裝置於電泳槽中，倒入電泳緩衝液(running buffer)備用。取適量樣品與等體積 loading 緩衝液混勻，加上防爆帽後置於水浴後，樣品隨即加入膠片中。先以 60V 電泳 10 分鐘，再以 120V 電泳 90 分鐘。電泳完成後取出膠片，進行染色及照相分析【Laemmli, 1970】。

### 6、西方墨點法

將 SDS-PAGE 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 0.125ml/cm<sup>2</sup>) 在室溫下反應 1 分鐘，立即以 X-ray 底片攝影。

## 三、 結果

### (一) 登革熱病毒

四種血清型登革熱病毒細胞培養液之蛋白質含量及病毒濃度各為：第一型 3.6mg/ml，3.34x10<sup>4</sup>pfu/ml；第二型 4.5mg/ml，

1.87x10<sup>5</sup> pfu/ml；第三型4.5mg/ml，4.66x10<sup>3</sup> pfu/ml；第四型3.5mg/ml, 2.54x10<sup>6</sup> pfu/ml。病毒經紫外光輻射或以0.05%(V/V)福馬林不活化處理後備用。

## (二) 層析純化

依據登革熱病毒結構(如E)與非結構(如NS1)醣蛋白抗原及病毒最適酸鹼度(pH 8.0)特性，選擇並評估DEAE陽離子交換樹脂在分離抗原之可行性。先以病毒濃度較高之第四型病毒，利用pH mapping (pH 7-9)方式進行最適條件選擇。雖然以含0.85%NaCl之1/75M磷酸緩衝液於pH7.4可具較佳分離效果。唯依ELISA分析結果顯示DEAE管柱雖然可進行E及NS1抗原分離，但無法集中於一特定鹽濃度流洗峰，造成回收率差及專一性低之缺點。遂再依其與另一黃病毒日本腦炎病毒相似之特性，選擇並評估利用分子凝膠樹脂分離抗原之效果。共評估四種分子量分離範圍各異之樹脂：Sephacryl S-100HR (1x10<sup>3</sup>-1x10<sup>5</sup>)、Sepharose 6FF (1x10<sup>4</sup>-4x10<sup>6</sup>)、Sepharose 4FF (6x10<sup>4</sup>-2x10<sup>7</sup>)、Sepharose CL-2B (7x10<sup>4</sup>-4x10<sup>7</sup>)。首先，評估同批等量之第四型登革熱病毒於四種分子凝膠管柱之層析流洗結果如圖一。SDS-PAGE分析顯示，四種凝膠中之第一個流洗峰中，皆含E抗原(55-60KD)(圖二)。所使用最適化純化條件為：1/75M磷酸緩衝液pH7.4、管柱流洗速度2 ml/min於室溫下操作。當凝膠可分離分子量範圍漸增時，E抗原與病毒培養液中之其他成份之分離效果愈佳。但因考量擬同時回收NS1抗原，所以確定將以Sepharose 6FF分子凝膠做為分離登革熱病毒E及NS1抗原最佳介質。重複以Sepharose 6FF管柱分離四型血

清型登革熱病毒試驗結果證實，該分子凝膠管柱穩定度良好、純化系統再現性佳(圖三)。SDS-PAGE分析顯示，四種凝膠中之第一個流洗峰中，皆含E抗原(55-60KD)；第二個流洗峰中，主要含BSA蛋白質及NS1抗原(45KD)(圖四-六)。

### (三) 免疫方法分析結果

#### 1. 西方墨點法

以兔子抗DN4登革熱病毒抗體與E抗原經SDS-PAGE處理後之膠片進行轉漬後，結果如圖七所示。證明第一個流洗峰中，確實含有E抗原(55-60KD)。

#### 2. ELISA

分別以IgM-ELISA測定E及NS1抗原結果，Sephacrose 6FF分子凝膠管柱第一個流洗峰中僅具E之活性；而第二個流洗峰中僅為具NS1之活性；第三個流洗峰，蛋白質測定值極低，ELISA測驗亦證明不具E或NS1之活性(圖八)。

### 四、 討論

現有登革熱血清學檢驗方法有血球凝集抑制試驗、蝕斑減少中和試驗及較快速之IgM抗體酵素免疫吸附法(MAC-ELISA)等。其中，病毒為ELISA最重要之試劑。現有方法病毒之製備未經純化，進行檢體分析時易造成背景值過高之缺點。建立適用登革熱病毒純化之液相層析系統，利用分子凝膠、離子交換等層析純化技術，評估最佳操作條件組合，期能分離登革熱病毒E及NS1抗原。純化後之抗原需經蛋白質分析、SDS-PAGE、西方墨點法及ELISA等方法確認。四種不同

血清型登革熱病毒，各可運用分子凝膠 Sepharose CL-6FF 以單一步驟於 ÄKTA 液相層析純化系統上，同步分離 E 及 NS1 抗原。並由 ELISA 血清學檢測方法證實，抗原仍保有既有結構及具生物活性，當可運用於臨床檢驗。

## 五、 結論與建議

為降提昇傳染病檢測品質以迅速確認傳染病之發生，宜製備血清抗體檢測所需之高純度抗原試劑。於是利用可標準化、易確效、批間一致性高之液相層析技術，純化去除病毒培養液中非必要抗原之蛋白等雜質，藉以開發高敏感性、特異性且精確之血清學檢測方法。本計畫已順利研發以 Sepharose6 FF 分子凝膠單一純化步驟搭組合 ÄKTA 液相層析系統，同步順序分離登革熱病毒 E 及 NS1 抗原。此項純化生物技術原理可運用於其他病原體抗原或抗體之純化製備，以改進檢驗方法進而發展成試劑套組；並可配合推展行政院「生物產業推動方案」政策中，加強本土性重要傳染病及新興傳染病之檢驗診斷生物技術研究開發計畫，逐步降低過度依賴商業檢驗套組織缺點。朝向建立準確快速診斷方法目標邁進，以迅速正確掌握疾病疫情，提供防治措施擬定，期有效控制疫情並落實防疫科技化。

## 六、參考文獻

1. Bauer, J.H., Transmission of yellow fever by mosquitoes other than *Aedes aegypti*, *Am. J. Trop. Med.*, 8,261, 1928.
2. Monath, T.P., nystrom, R.R., Detection of yellow fever in serum by enzyme immunoassay, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 151-157, 1984.
3. Lowery, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
4. 林鼎翔，台灣地區登革熱流行情形與防治，*疫情報導*，第十六卷第六期，2000。
5. Wu, Y.C., Lien, J.C., Chen, H.Y., Recent outbreak of dengue in Taiwan, *Trop. Med.*, 35 (4), 201-207, 1993.
6. 吳盈昌、黃耀雄、周玲、石玲如，高雄市登革熱血清學監視，*疫情報導*，第九卷第十二期，1993。
7. 生物製劑製造與檢定，行政院衛生署預防醫學研究所編印，1983。
8. Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680, 1970.
9. 周如文，廖明一，邱愛菁。Improvement of the Purification of Japanese Encephalitis Virus。中華民國，86103948；美國08/823, 989, 2000。
10. 李淑英，郭子傑，陳國緯，廖美慧，廖明一。於生物反應器發展日本腦炎無血清產成之探討。

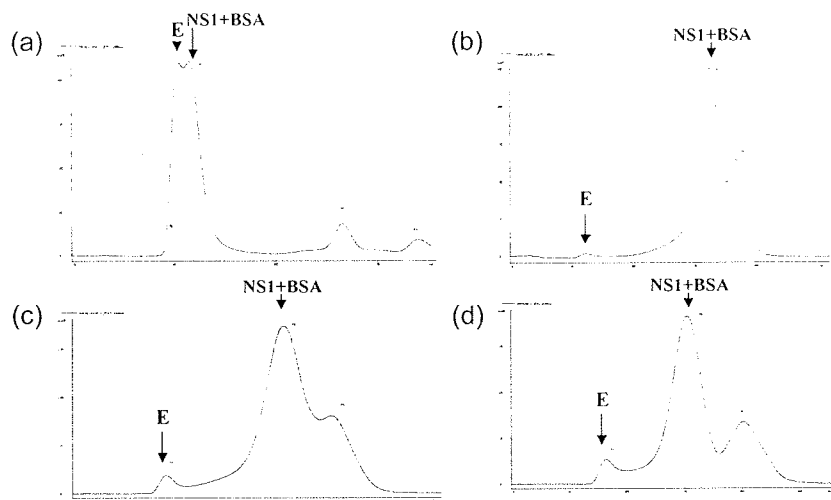


Fig 1 : Dengue DN4 Viruses Purified by Various Gel Filtration Column  
 Columns (a) Sephacryl S-100 (b) Sepharose CL-2B  
 (c) Sepharose CL-4B (d) Sepharose CL-6FF

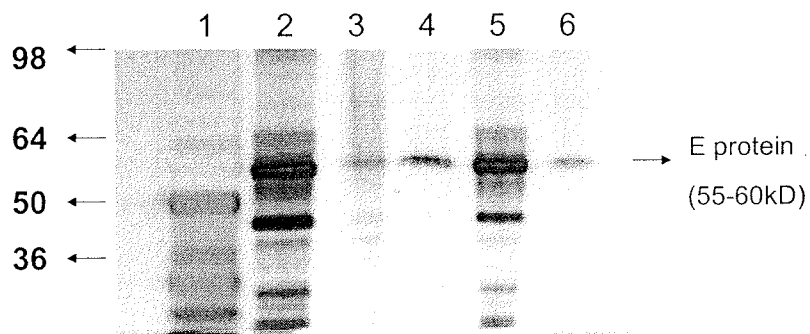


Fig 2 : SDS-PAGE of DN4 Dengue Virus Purified by Various Gel Media  
 Lane1.Marker, Lane2. Dengue Harvest, Lane3.Sepharose 6FF,  
 Lane4.Sepharose CL-2B, Lane5.Sephacryl S-100,  
 Lane6.Sepharose 4FF

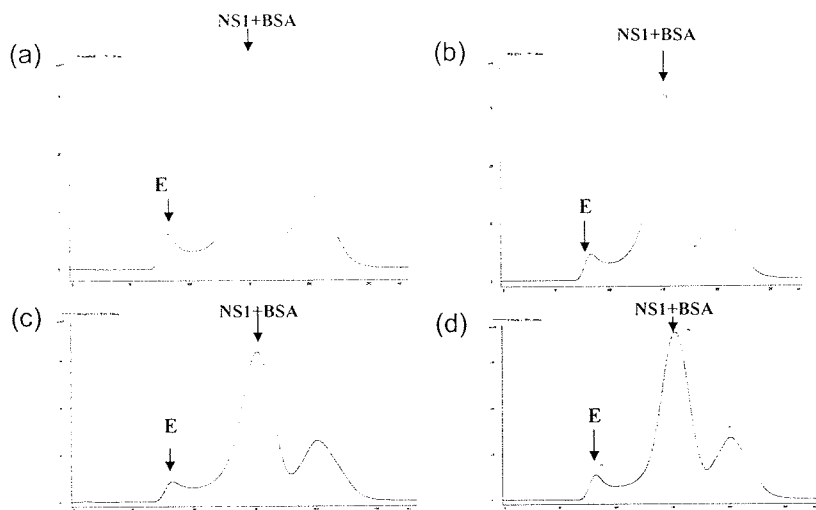


Fig 3 : Sepharose 6FF Gel Filtration Column Chromatography  
 (a) DN1 (b) DN2 (c) DN3 (d) DN4 Dengue Virus

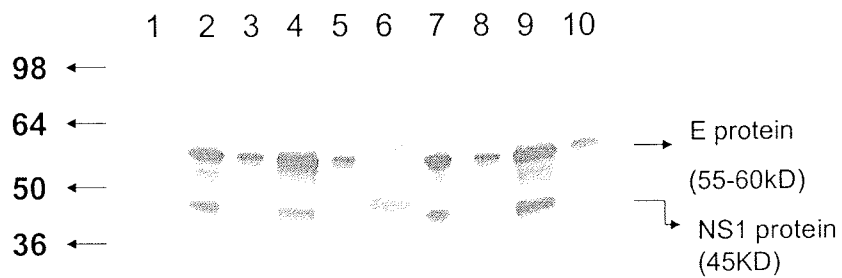


Fig 4 : SDS-PAGE of DN1 and DN4 Dengue Viruses

Lane1.Marker; Lane2.DN1 original sample., Lane3.DN1peak1;  
 Lane4.DN1 peak 2; Lane 5.DN1peak3; Lane6.Marker; Lane7.DN4  
 original sample; Lane 8.DN4 peak1; Lane 9.DN4 peak2;  
 Lane10.DN4 peak3.

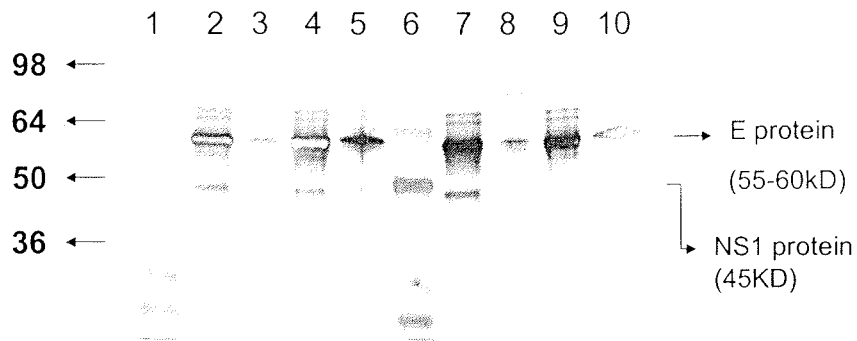


Fig 5 : SDS-PAGE of DN2 and DN3 Dengue Viruses

Lane1.Marker; Lane2.DN2 original sample., Lane3.DN2peak1;  
 Lane4.DN2 peak 2; Lane 5.DN2 peak3; Lane6.Marker; Lane7.DN3  
 original sample; Lane 8.DN3 peak1; Lane 9.DN3 peak2;  
 Lane10.DN3 peak3.

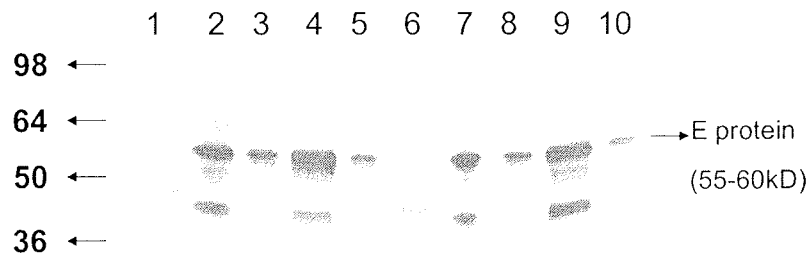


Fig 6 : SDS-PAGE of Peak-1 Fractions of DN-1,2,3 & 4

Lane1.Marker, Lane2.DN1 original sample; Lane3.DN1peak1,  
 Lane4.DN2 original sample; Lane 5.DN2 peak 1 fraction;  
 Lane6.Marker, Lane7.DN3 original sample; Lane 8.DN3 peak 1  
 fraction, Lane 8.DN3 peak 1 fraction; Lane 9.DN4 original sample,  
 Lane10.DN4 peak 1 fraction.





Fig 7 : Results of Western Blotting of DN4 Dengue Virus  
 Lane1.Marker, Lane2.DN4 original sample; Lane3.DN4 peak1 fraction; Lane4.DN4 peak 2 fraction; Lane 5.DN4 peak 3 fraction

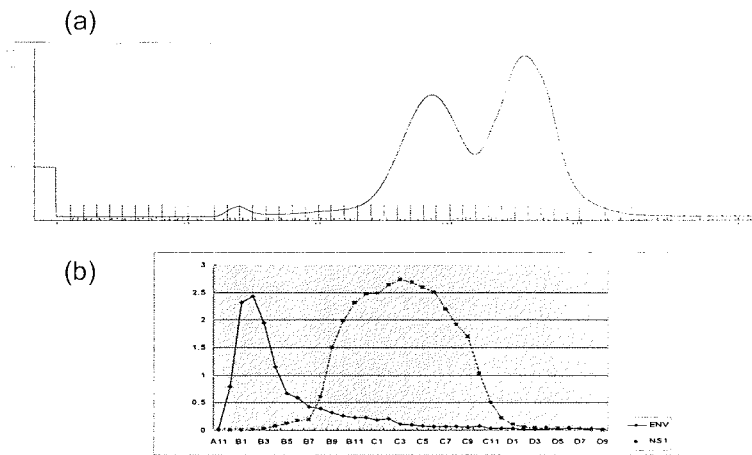


Fig 8 : Results of ELISA Assay  
 (a) represents purification profile of dengue viruses and (b) represents envelope and NS1 protein titer in each fractionation