

計劃編號：DOH93-DC-1006

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

台灣腸病毒 NPEV 檢驗分型及分子生物學及抗原
性之研究

研究報告

執行機構：高雄醫學大學醫學系

計劃主持人：林貴香

研究人員：林貴香、柯冠銘、許郁停、王珠鳳、黃潔盈、董宜青、
褚佩瑜、周麗秋、蘇慧茹、林儀英、林玉華

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

目錄	頁碼
一. 中文摘要	(2)
二. 英文摘要	(4)
三. 計劃內容	
(一) 前言	(6)
(二) 材料與方法	(8)
(三) 結果	(32)
(四) 討論	(36)
(五) 參考文獻	(37)
(六) 圖表	(39)

摘要

腸病毒為一單股 RNA 病毒，極容易產生變異、若其變異發生在抗原決定位，往往會造成診斷的困難，近年來無論是台灣各病毒合約實驗室或國外相關研究，非 polio 之未分型腸病毒 (NPEV) 都佔了極大之比率。本研究建立台灣腸病毒 VP4 基因資料庫及以 VP4 基因分型腸病毒之方法，提供 NPEV 分型時比對之用。分析比對腸病毒 VP4 基因變異情形，並與世界各國的基因型加以比較以瞭解台灣地區腸病毒流行狀況。自 1999~2003 年共分析 84 株 NPEV，結果顯示各年之 NPEV 之主要型別均不相同，2003、2000、1999 以 CA16 為主，2002 以 E6 為主，2001 以 E30 為主。2004 年則以 CA4 為主 (CDC 資料)。以上結果顯示變異性已出現於多種病毒中而無法以市售之單株抗體加以鑑定。

2004 年 EV71 之分子流行病學分析發現與 1998 年相同的 genotype C 又浮現了，而 1999~2003 年卻是流行 genotype B，建議相關單位應密切注意 EV71 之再爆發流行。

選取台灣本地分離之 EV71 Genotype B 及 C 各一株 (5033、7008)、及無法以市售 (CHEMICON-3315) 及 CA16 (CHEMICON -3323) 單株抗體偵測之 E30 及 CA16 病毒株製備單株抗體，於 EV71 已完成九株單株抗體之製備，九株單株抗體皆能與 EV71 良好的結合，在與其它腸病毒交差反應方面，發現其中六株與 EV70、CA9、CA10、CA16、CB1~CB6、E6、E7、E9、

E30 皆無結合反應。此外，本研究嘗試以 *E coli* (pET32a) 及哺乳動物細胞表現系統 pcDNA3.1，表現 EV71 之 VP1 基因，並以免疫墨點及螢光抗體染色測試。結果顯示，此二系統表現之 VP1 蛋白與 EV71 抗血清、市售單株抗體及自製之單株抗體皆能特異性結合，顯示此九株單株抗體之標的蛋白皆為 VP1 蛋白。本研究將進一步以此表現系統進行抗原決定位之定位。本研究針對台灣本地分離 CA16 及 E30 製備單株抗體分別得到 3 株及 12 株單株抗體，其特性分析尚在進行中。

Abstract

Enterovirus (EV) is a RNA virus. Mutation was often found in enterovirus isolates due to the lack of RNA proof reading. The EVs that can not be typed by FA test had increased since 1999. The NT test is laborious and time consuming. Besides, the NT antibodies are expensive and are running out worldwide. To address the typing of EVs in recent years and to study the molecular epidemiology of EVs in the last two decades, the sequences of the VP4 region were analyzed. The monoclonal antibody(mAb) against EV71, CA16 and E30 were prepared. Eighty four strains of NPEV from 1999 to 2004 were analysed by sequence analysis. The results revealed that the major identified serotype of NPEV in each year were different. CA4 was the major type in 2004 (from CDC data) CA16 was the major type in 2003,2000,1999. E6 was the major type in 2002. E30 was the major type in 2001. The molecular epidemiological study of EV71 isolated in 2004 suggested the reemergence of genotype C instead of the genotype B that predominated in 1999-2003. It is suggested to keep alert on this reemerged EV71 genotype.

For the preparation of monoclonal antibodies (mAbs) one each strains of EV71 from the genotype B and genotype C and one each strains of CA16 and E30 were prepared for the immunization of BALB/c mouse. Both CA16 and E30 strains did not react with the commercialized monoclonal antibody. Nine, three and twelve clones of mAb of EV71, CA16 and E30 were found, respectively. The nine mAb of EV71 react very well with EV71 VP1 antigens by FA and WB or immunodot. The isotype of immunoglobulin is IgG₁. Six of the nine mAbs showed with the following viruses : no cross reaction CA16, EV70, CA9, CA10, CB3~CB6, E6, E7, E9, E30. A NT titer of 1 : 2 was found in clone E611G2G. The analysis of the location of antigen determinant will be further studied using the VP1 expression systems constructed in our lab i.e. *E coil* (pET32a) and

pcDNA3.1. The characterization of the mAbs of CA16 and E30 are in progress.

Key word : Enterovirus (EV)、 monoclonal antibody(mAb)、 immunoglobulin

前言

腸病毒的感染遍及全世界，主要是經由飛沫、糞口及接觸等途徑感染，感染所造成的疾病包括有：呼吸道症狀、手口足病、無菌性腦膜炎、腦膜腦炎、急性肢體麻痺、出血性結膜炎等 (Melnick, 1996)。

腸病毒共有 67 個血清型，以抗原性區分 (Rotbart, 1995) 可將腸病毒區分為 Polioviruses (PV)、Coxsackieviruses A (CA)、Coxsackieviruses B (CB)、Echoviruses (E) 以及 Enterovirus (EV) 68-71。近年來的研究以分子生物學的方法 (Hyypia et al., 1997; Poyry et al., 1996) 可將 EV 分為五個基因型 (1) PV 包括 Poliovirus type 1、2 及 3；(2) EV-A 包含 11 型 Coxsackieviruses A 及 EV71；(3) EV-B 包含所有 Coxsackieviruses B、所有的 Echovirus、EV69 及 CA9；(4) EV-C 包含其他 12 型 Coxsackieviruses A；(5) EV-D 包含 EV68 及 EV70 (Pringle, 1999)。此外 E22 及 E23 歸類為一新的 genus *Parechovirus* 的兩個血清型 (Hyypia et al., 1992; Mayo and Pringle, 1998)。

傳統腸病毒的鑑定以中和試驗 (Neutralization test; NT) 為主，但 NT 費時費力且往往受限於 antiserum pools，無法偵測抗原性變異及新的病毒株，故在臨床上發現許多 EV 無法正確分型。近代分子生物學研

究顯示腸病毒之基因結構約有 7500 個鹼基，包含 5' 及 3' non-coding region (NCR) 及單一個 open reading frame (ORF)，其中 5' NCR 及 VP2 基因為高度保留區，常用以作為 RT-PCR 臨床診斷腸病毒標的位置 (Romero, 1999)，但無論 5' NCR 或 VP2 之序列與血清型別均無關聯性 (Oberste et al., 1998)，VP1 為 EV 表面結構蛋白，包含了誘導中和抗體之抗原決定位，分析 VP1 基因發現其序列與血清型有非常密切的關聯 (Valerie Caro et al., 2001)，另有研究顯示 VP4 基因亦與血清型有密切關係。吾人認為由於 VP4 之變異性較 VP1 少，因此以 VP4 序列做定型之依據其確定性應優於 VP1 序列 (Ishiko et al., 2002)。並用以取代 NT 及 FA，作為 EV 分型及分子流行病學分析之用 (Heroaki et al., 2002)。以避免病毒基因因不同地區、不同年代造成同一血清型病毒基因差異過大，於 VP1 比對時造成誤判。日後當分析此胺基酸位置時，便可了解為何有些變異株無法以 FA 或 NT 診斷 (抗原決定位改變)。

材料與方法

(一)病毒分離株

病毒株為高雄醫學大學及台大醫學院（約 2000 株）附設醫院病毒室（2087 株）1980~2002 年間所分離出之病毒共約 4000 株,取其中 NPEV 佔 1/5(約 800 株)進行研究。

(二)細胞與病毒培養及培養基

RD 及 HeLa 兩種細胞株以添加 10% fetal calf serum 之 Hanks' minimum essential medium (HMEM) 作為生長培養基培養，在接種病毒前則換成含 2 % fetal calf serum 的 EMEM 為維持培養基。所分離之腸病毒株，儲存於-70°C。細胞及病毒之培養環境為 36°C，5 % CO₂。

(三)病毒活性定量試驗 (50% Tissue Culture Infective Dose ; TCID₅₀)

將 HeLa 細胞株經 0.05% trypsin-EDTA 作用 2 分鐘後，以生長培養基沖散細胞並調整細胞濃度到 1×10^5 /ml，將細胞培養於 96 孔盤中（每孔加入 100 μ l 細胞），在細胞八分滿時將生長培養基換成維持培養基。病毒以維持培養基作連續十倍稀釋，然後將 25 μ l 各稀釋倍數的病毒稀釋液加入 96 孔盤中，每個稀釋倍數做 4 個穴孔。同時也做病毒對照組及細胞對照組。放入 36°C，CO₂ 培養箱。每天觀察並記錄 cytopathic effect (CPE) 程度至第五天。以 Reed-Muench 公式算出其

TCID₅₀。

(四)病毒鑑定

1.免疫螢光染色 (Immunofluorescence antibody test, IFA)

將病毒接種於 RD 或 HeLa 細胞中，待細胞株被腺病毒感染產生 95% 以上的 CPE 時，將該細胞培養管經磷酸緩衝液清洗三次。將細胞培養管中之細胞刮下，與培養管中之 PBS 混合作成細胞懸浮液，取出 10 μ l 的細胞懸浮液作成抹片，室溫中乾燥，然後再以冰的 Acetone 固定 10 分鐘，取出在室溫中乾燥，以單株抗體進行直接或間接染色。

2.微量中和試驗 (micro neutralization test, micro NT)

病毒濃度調成 100 TCID₅₀，取 25 μ l 100 TCID₅₀ 的病毒液與腸病毒 antiserum pools (A-H 及 J-P 購自 ATCC，自行調配) 25 μ l (20 U) 在 96 孔盤中混合均勻後，於 37°C 一小時進行中和反應，反應後加入 RD 細胞 (4×10^4 /well)，於 36°C 培養 5 天後判讀，若抗血清能夠抑制腸病毒所造成的細胞病變現象，則此腸病毒即和抗血清屬於同一種血清型的腸病毒。

(五)病毒 RNA 之萃取

核酸萃取試劑組 (TRIzol LS Reagent; Invitrogen)：

將 multiplicity of infection (m.o.i.) 為 1 到 10 的腸病毒加入培養於 3

ml tube 的 HeLa 或 RD 細胞中培養，待細胞產生 95% 以上 CPE 後用細胞刮勺將細胞刮下，取 250 μ l 細胞液，加入 750 μ l TRIzol 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘，加入 200 μ l chloroform 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘； 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置於一新的 1.5cc 離心管，再加入 500 μ l 之 Isopropanol，13000 rpm 離心 10 分鐘，丟棄上清液，再加入 1000 μ l 75% 酒精，13000 rpm 離心 15 分鐘，丟棄上清液，待風乾後，加入 50 μ l 滅菌水存於-70 $^{\circ}$ C 備用。

(六)RT-PCR 放大 VP4 基因

1. 引子

Primer	Sequence	Gene	Position
OL68-1	5' GGTAAC (C/T) TTCCACCACCA (A/T/G/C) CC-3'	VP2	1178-1197
MD91	5' -CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT-3'	5'NCR	444-468
EVP4	5' -CTATCTTGGGTGTCCGTGTT-3'	VP4	541-560

2. 反轉錄作用

primer random	1
OL68	1
RNA	20
RT(MMLV)	1
5X buffer	10
d NTP(2.5mM)	10
RNasin	2

H2O	5
Total	50

37°C 作用 60 分鐘

3.PCR

c DNA	5
primer OL68	0.5
MD91	0.5
Taq Mix	5
DDW	14
Total	25

94°C, 2 min.

Then 35cycles of : 95°C, 30 sec. ; 55°C 30 sec., ; 72°C, 1 min,

followed by holding at 4°C

4.Nested PCR (條件同上)。

(七)VP4 基因之選殖

1. PCR 產物 3' 端補平

10X buffer	5
d NTP(0.5 mM)	5
Klenow enzyme	1
DNA	30
H ₂ O	
<hr/>	
	50

37°C 作用 2 小時，P/C/I 純化，酒精沉澱

2. Insert 5' 端加磷酸根

DNA	20
T4 kinase	1
10X Buffer	5
ATP(1mM)	4
H ₂ O	20
<hr/>	
	50

37°C 作用 2 小時

65°C 作用 5 分鐘，P/C/I 純化，酒精沉澱

3. Ligation

Vector	3 μ l
Insert	1.5 μ l
DDW	3.5 μ l
Buffer	1 μ l
Ligase	1 μ l
<hr/>	
總量	10 μ l

14°C，感作 overnight

4. Transformation

a. 將 Competent cell (*E. coli Top 10F'*) 由 -70°C 取出，放在冰上回溫約 10 分。

b. 解凍取 50 μ l 至新的滅菌過 1.5 ml 的 eppendorf 要溫和的動作。

c. 加入純化的質體 $5\ \mu\text{l}$ ，溫和的邊加邊用 tip 攪拌

d. 靜置冰上 30 分鐘使其充份感作。

e. 42°C 感作(heat shock) 2 分鐘

f. 冰上 5 分鐘

g. 加入 $250\ \mu\text{l}$ LB，再溫和的移至 50 ml 離心管， 37°C 度振盪培養一個小時

h. Plate out 在含 ampicillin 之 LB plate。

5. Plate out

取 $150\ \mu\text{l}$ ，用 L 型玻璃棒，均勻塗於 plate 上

upside down 置於 37°C 培養箱中培養 18 小時左右

(不可超過 20 個小時，不然會有衛星菌)

6. 重組基因之確認(小量質體 DNA 抽取)

取得含重組基因之單一菌落，於 5 ml 的 LB 培養液，隔夜培養，翌日於無菌操作取菌液 1 ml。

a. 菌液 1 ml to 1.5ml 離心管以 10000 rpm 離心 10 分鐘抽去上清培養液

體加上 $100\ \mu\text{l}$ solution I resuspend and vortex at room temperature for 5 min。

b. 加上 $200\ \mu\text{l}$ solution II 溫和反轉數次(7~8 次)，室溫 5 分鐘。

c. 加上 $150\ \mu\text{l}$ solution III，溫和反轉數次(7~8 次)，呈白色沉澱物 on ice

for 5 min 以 13000 rmp 離心 15 分鐘。

d. 收集上清液 (即 plasmid DNA)，置新試管加入等量的 P/C/I 混合至乳糜狀以 13000 rmp 離心，15 分鐘取上清液 400 μ l 至新管子(*小心勿抽到下層的有機層)。

e. 加入 3M sodium acetate 40 μ l

加入 propanol 400 μ l

放入冰箱 -70°C，1hr，以 13000 rmp 離心 30 分鐘

*(小心抽去上清液，保留白色 pellet)

f. 加入 70% ethanol 1000 μ l (洗去鹽離子)，以 13000 rmp 離心 10 分鐘

小心抽去上清液後風乾加入 15 μ l sterile DDW*(小心勿將 DNA 洗掉)

7. Check Insert

-抽取菌中的質體，使用 *Eco* R I 及 *Hind* III 限制酶切割，並加入 RNase

加以消化 RNA。

DNA 15 μ l

Eco R I 1 μ l

Hind III 1 μ l

RNase 1 μ l

10X Buffer 2 μ l

總量 20 μ l

37°C，感作 3 小時

(八)將選殖成功之菌株定序其 VP4 序列，定序後之資料以 DNA star 軟體作

基因序列及胺基酸序列比對，並作親緣關係及演化速率之分析。

(九)RT-PCR 放大 VP1 基因

1. 引子	Sequence	Gene
Position		
008 2411-2430	GCRTGCAATGAYTTCTCWGT	VP3
009 3409-3391	NGCNCCDGATTGNTGSCC	2A
011 3408-3389	GCICCGAYTGITGICCRAA	2A
050 3513-3494	GTRCTYACIAIAGRTCYCT	2A
051 2429-2448	TSAARYTGTGCAARGACAC	VP3
052 2413-2430	STGYCCAGATTCAGTGT	VP3
053 2216-2235	GGNACNCAYRTNATHTGGGA	VP3
054 3408-3389	GCCITRTTITGRTGICCRAA	2A
055 2216-2235	GGIACICAYRTIRTITGGGA	VP3

2. One-step RT-PCR : 50ul Reactions

RNA	2ul	
Primer 1 (20uM)	1ul	
Primer 2 (20uM)	1ul	
<u>H₂O</u>	<u>16ul</u>	
		20ul

mix. heat to 75°C 2min, Cool to 4°C.

10x PCR Buffer	5ul
dNTP (25mM)	5ul
RT (20 μ /ul)	0.5ul
Taq polymerase (5 μ /ul)	0.25ul
RNase Inhibitor	0.25ul (40 μ /ul)
25mM .MgCl ₂	5ul
10mM.DTT	5ul
<u>H₂O</u>	<u>9ul</u>
	30ul

Thermocycler conditions : 42°C, 30 min. ; 94°C, 2 min.

Then 35cycles of : 94°C, 1 min. ; 48°C, 1 min. ; 68°C, 1.5 min,

followed by holding at 4°C

3. Run gel and reading the result

以 1.5% agarose gel , 100V 進行洋菜膠體電泳 , 40 分鐘後取出 ,

以 Ethidium bromide 染色 5 分鐘 , 再以清水 destain5 分鐘 , 進行

判讀。

4.PCR 產物之純化

RT-PCR 產物經低熔點膠 elute 後以 PROTECH 公司 DNA

Extraction Kit 純化 DNA,

其餘步驟同(七)

(十) 融合瘤細胞之製備

1、實驗動物： BALB/c 小鼠。

2、免疫計劃：取 6-8 週之 BALB/c 小鼠進行免疫。以 sucrose gradient 純化之 EV 用 1X PBS 稀釋後取 500 μ g 溶液與 Freund' s 完全佐劑 1：1 混合，經三向閥(three-way stopcock)均質化後進行腹腔注射。基礎免疫兩週後，取 500 μ g 溶液(EV 加 1X PBS)與 Freund' s 不完全佐劑 1：1 混合，進行腹腔內注射，此乃第二次補強免疫。在第二次補強免疫後兩週，以斷尾法採血進行抗體分析，並進行第三次補強免疫，以不含佐劑之病毒液行腹腔注射，待 5-7 天後進行骨髓瘤細胞與小鼠脾臟細胞融合。或以外科手術方式將 6-8 週之 BALB/c 小鼠腹腔打開，將純化後之打入脾臟，再加以縫合，給予抗生素預防感染。待 5-7 天後進行骨髓瘤細胞與小鼠脾臟細胞融合。

3、骨髓瘤細胞培養：在小鼠預定進行融合前一週，取出先前保存在液態氮中的骨髓瘤細胞(Myeloma cell , P3-NS-A-Ag4/1 , NS-1)，進行細胞解凍。細胞保存瓶由液態氮中取出，迅速置於 37°C 回溫，待細胞接近完全溶解，以 30ml 不含血清之 RPMI 1640 培養液懸浮，離心 600rpm，5 分鐘，然後去上清液，以 10ml 含 15%胎牛血清之 RPMI 1640 培養液懸浮骨髓瘤細胞，培養於 25cm² 細胞培養瓶(25T，cell culture flask)中，置入含 5%CO₂ 之培養箱進行培養。經 16-24 小時

後，待其長滿細胞培養瓶後繼續繼代至 75T 或 175T 細胞培養瓶，並持續以一比一的繼代以保持細胞的生長活性。多餘之 NS-1 細胞將其離心後，加入含 10% DMSO 之胎牛血清中以緩慢降溫方式冷凍至液態氮中。

4、細胞融合：經病毒免疫之小鼠以酒精棉消毒胸、腹部，以 24G 針頭行心臟採血，血液靜置後收集血清進行抗體分析。利用頸椎脫離法犧牲老鼠後，以酒精、碘酒擦拭胸、腹部後置於無菌操作台。使用無菌器械脫去皮毛，再以另一套器械剪開肌肉打開腹腔。小心鈍剝取出脾臟，置於不含血清之 RPMI 1640 培養液之無菌培養皿，並以 10ml 注射器抽吸 RPMI 1640 培養液，並重複將 RPMI 1640 培養液注入小鼠脾臟，將脾臟細胞沖出。處理好的脾臟細胞離心 800rpm，5 分鐘。棄除上清液，再重複上述動作一次，將雜質去除。將活性良好的骨髓瘤細胞自培養瓶拍下。離心 800rpm，5 分鐘，去上清液，加入不含血清之 RPMI 1640 培養液懸浮，此動作共重複上述步驟兩次。取二支 175T 大角瓶量之骨髓瘤細胞及兩隻處理好的小鼠脾臟細胞混合，離心 800rpm，5 分鐘，棄除上清液，此動作重複一次。將離心下來的細胞敲鬆，在 60 秒內加入 37°C 預熱之 1ml PEG 1400，同時保持在 37°C 中並搖晃均勻。繼續在 37°C 水浴中搖晃 90 秒，接著在 30 秒內加入 1ml 不含血清之 RPMI 1640。30 秒內

加入 3ml 不含血清之 RPMI 1640。60 秒內加入 16ml 不含血清之 RPMI 1640。最後緩慢地以不含血清之 RPMI 1640 培養液加至 5ml，靜置 5 分鐘。而後離心 600rpm，5 分鐘，棄除上清液，以 150ml HAT 培養液懸浮融合瘤細胞，並加至 96 孔微量培養盤上(Microwell-plate) 進行融合瘤細胞培養。

5、融合瘤細胞的培養：經融合完成之細胞各滴兩滴(約 100 μ l)懸浮液在 96 孔微量培養基內，共十盤。隔日觀察有無污染並固定取一盤作為觀察用，其他的培養基則儘量不去移動，5-7 天後視情況換液。另取未經融合之骨髓瘤細胞培養於本次使用之 HAT 培養液中，作為陰性對照組。融合瘤細胞培養 7-10 日後，視其培養液之酸鹼度換液。換液時抽出 80-100 μ l，以不超過原體積之二分之一為原則，再加入新的含有 HAT 及血清之 RPMI 1640 培養液。第一次換液後 2-3 天視培養液之酸鹼度進行第二次換液。換液進行三次後始進行抗 EV 單株抗體之篩選。

6、融合瘤之篩選：進一步進行分析融合瘤細胞是否具有對抗 EV 的抗體產生即為融合瘤篩選(screening)。所用方法如下：酵素免疫連結吸附試驗

(Enzyme-Linked Immunosorbant Assay ; ELISA)

免疫墨點反應(Immuno-dot assay)

西方墨漬反應(Western blot)

7、融合瘤細胞單株化：融合瘤單株化係利用極限稀釋法進行。確定 96 孔微量培養基中具分泌抗 EV 單株抗體的融合瘤細胞株，以 1000P tip 懸浮細胞，取 100 μ l 至另一 96 孔微量培軌基的第一個孔，以兩倍稀釋的方式稀釋至最後一個孔，再以 12 爪之 pipette 由第一行列連續兩倍稀釋至第八列。最後各加入 100 μ l 之小鼠脾臟細胞或巨噬細胞做為伴飼細胞(feeder cell)，10-14 天觀察有無單株化形成。

(十一) 單株抗體之生產及純化：

1、腹水之生產：取 12-15 週齡 BLAB/C 小鼠腹腔注射 pristane 0.5ml，7-10 日後，取 4×10^6 /ml 單株化完成之融合瘤細胞，行腹腔注射 0.5ml 至小鼠，待 2-3 週後小鼠腹部膨大產生腹水，隨即利用無面注射器將腹水抽出。經離心 4500rpm，10 分鐘，取上清液，分裝至 1.5ml eppendorf 置 -20°C 備用。

2、飽和硫酸銨純化抗體

Protein G 親和性管柱(Protein G Affinity column)純化抗體

(十二) 單株抗體分析：

1. 單株抗體亞型分析(isotyping)

用 Mouse-hybridoma subtyping Kit (Boehringer Mannheim) 方式進行分析。取已 coating 好的全病毒蛋白及 block 完全之免疫測試盤，

加入稀釋500倍之腹水，行37°C感作30分鐘，經washing buffer (KPL) 洗五次後，分別加入有過氧化酶酵素抗鼠源各亞型 (peroxidase標示兔抗鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM亞型IgG)及兩輕鍵(κ 、 λ)之二抗，經37°C感作30分鐘，洗五次後加入ABTs，於37°C下呈色30分鐘，以肉眼判讀。

2. 競爭性酵素連結免疫吸附試驗 (Competitive ELISA)

採用Kimura-kuroda & Yasui (1983) 之方法進行。Coating全病毒蛋白之免疫測試盤與HRP-Mabs在ELISA反應中OD405值約為2.0之稀釋倍數，取其二分之一稀釋倍數，體積50 μ l。未標定氧化酶之單株抗體(unlabeled-Mab)做為競爭者(competitor)先行稀釋成200ng/ μ l後，以連續2倍稀釋至15.6ng/ μ l後，各取50 μ l之HRP-Mabs及50 μ l競爭者單株抗體混合後，加入100 μ l ABTs，37°C感作30分鐘後，加入100 μ l ABTs stop solution，以ELISA reader 在波長405下測其吸光值，並依下列公式計算其競爭性：

$$\text{Competition (\%)} = \frac{(A-n)}{(A-B)} \times 100\%$$

A：HRP-Mab 單獨感作之OD₄₀₅

B：HRP-Mab 與同源性競爭者一同感作之OD₄₀₅

3. 單株抗體與腸病毒蛋白交互反應(Cross reaction)

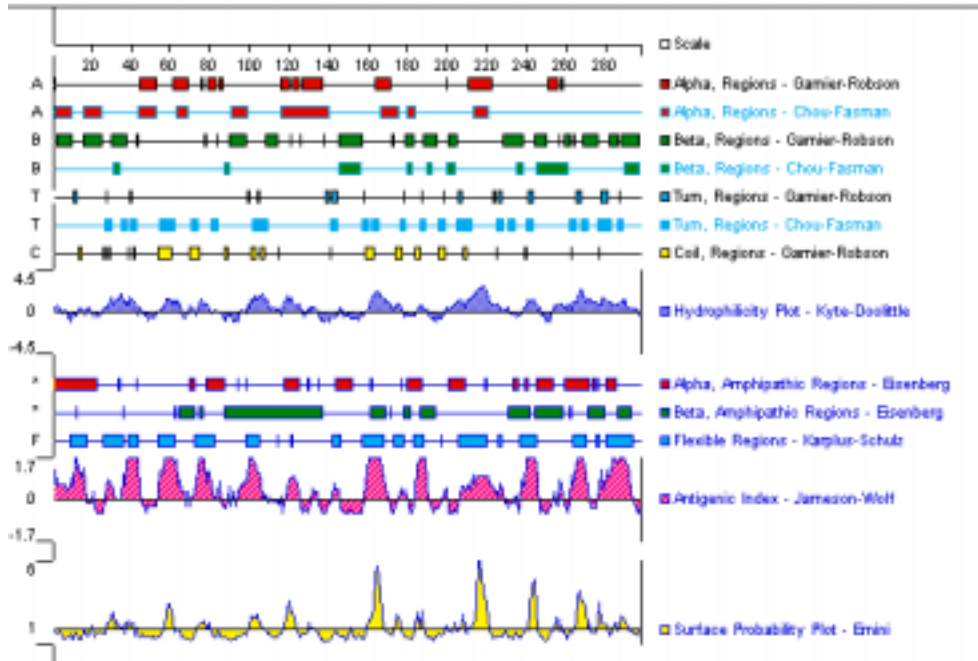
製備各血清型腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液。每30cm²細胞加入1ml之coating buffer經冰凍刮下懸浮後細胞萃出液離心 (Model Biofuge fresco；Heraeus) 1200rpm，4°C 20分鐘；取上清液製成病毒蛋白細胞萃出液。利用小鼠抗表現蛋抗體 (polyclonal

antibody)以 coating buffer 稀釋 1000 後塗鍍 100 μ l 在免疫測試盤上，4 $^{\circ}$ C 隔夜感作。隔日並以 5%脫脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 隔夜 blocking 感作。加入腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘，以 washing buffer 洗 5 次，加入 250 倍稀釋之鼠抗病毒蛋白抗體作為陽性對照組，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘後，洗五次，加入 100 倍稀釋隻 HRPO-標示之山羊抗老鼠 IgG 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘，洗五次，加入 100 μ l ABTs，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘後，加入 ABTs stop solution 100 μ l，以 ELISA reader 在波長 405nm 下測其吸光值進行分析。實驗組同樣取利用小鼠抗重組 EV 之多價抗體塗鍍 blocking 完全之免疫測試盤，加入腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘後。另取 2000 倍稀釋之 HRP-MAb，行 37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘，經 washing buffer 洗 5 次後，加入 100 μ l ABTs，37 $^{\circ}$ C 感作 30 分鐘，再經 washing buffer 洗 5 次後，加入 ABTs stop solution 100 μ l，以 ELISA reader 在波長 405nm 下測其吸光值進行分析。兩者之值依下列公式換算成親和性百分比；

$$\text{Cross reactivity}\% = \frac{\text{各血清型 EVOD405—未感染病毒細胞 OD405}}{\text{用以製備 mAb 之 EVOD405—未感染病毒細胞}}$$

(十三) 表現 VP1 蛋白及各基因缺損蛋白：

1. 引子選擇策略：參考下圖 VP1 基因之抗原性指標選擇引子。



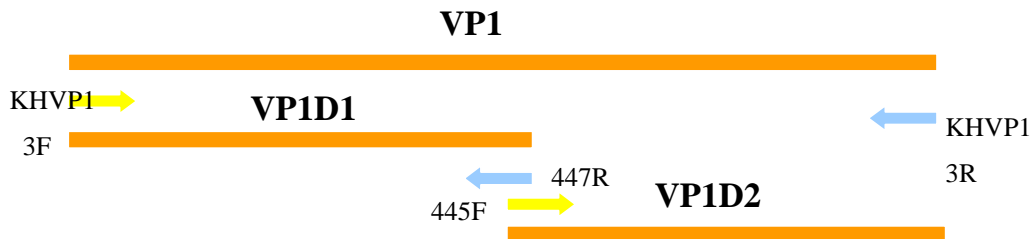
2. Primer :

KHVP1-3F:5'-AGCGATATCGGAGATAGGGTGGCGGATGTG-3'

KHVP1-3R:5'-AGCGCGGCCGCTCAAAGGGTGGTGATCGCCGTGC-3'

VP1-447R : 5'-AGCAAGCTTTCCTACTGTGGAACAACCTGACC-3'

VP1-445F : 5'-GTTGATATCATGGAGTTACTCCAGTATATG-3'

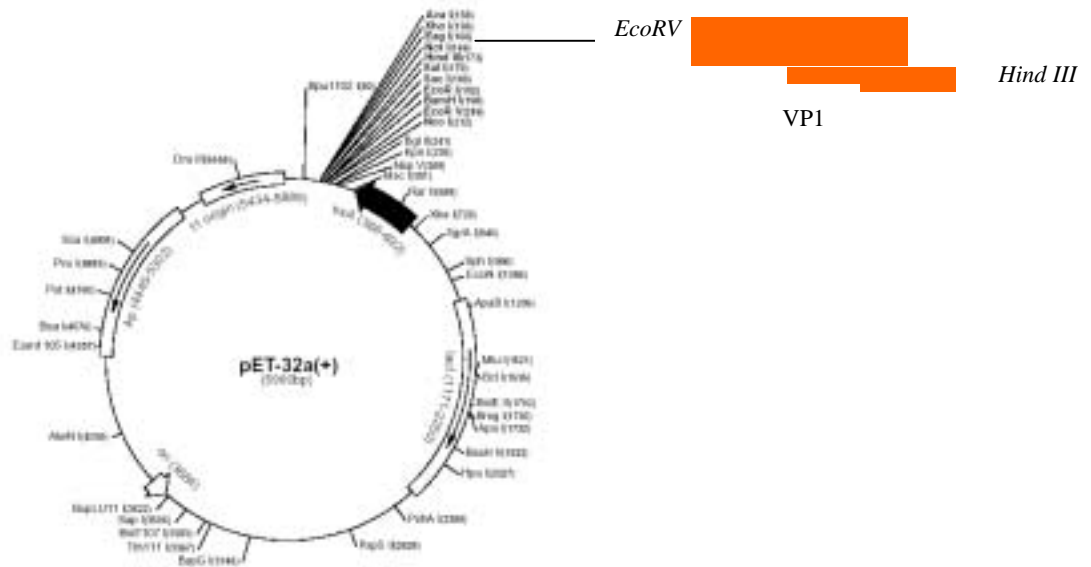


(十四) 載體選擇及選殖策略

1. 選擇 pET32a 及 pcDNA3.1- (圖九)

2. 將 PCR 產物經其相對之限制酵素切割後，以 Ligase 與載體連接後 transformation 到 *Ecoli* Top10F' 中，plate out 於 LB Agar，挑選從組成功之菌落大量增殖於 LB broth 抽取質體備用。
3. 將質體轉殖於 *Ecoli* BL21DE3 細菌進行原核系統表現。
4. 將質體轉染於 Vero cell 進行真核系統表現。

(A)

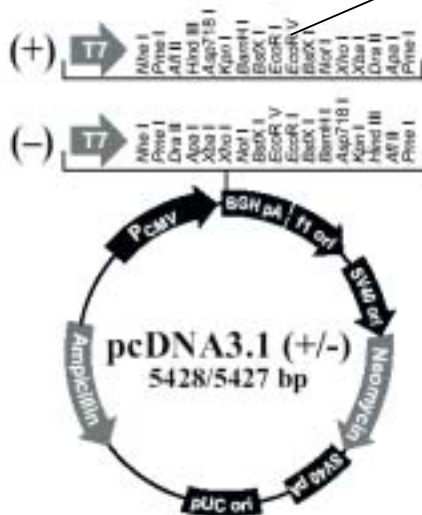


Map of pcDNA3.1(+/-) and pcDNA3.1(-)

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1(+/-) and pcDNA3.1(-) vectors. The complete sequences for pcDNA3.1(+/-) and pcDNA3.1(-) are available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 13). Details of the multiple cloning sites are shown on page 3 for pcDNA3.1(+/-) and page 4 for pcDNA3.1(-).



(B)



本研究選用之表現載體 (A) pET32 ; (B) pcDNA3.1 及選殖策略。

(十五) Transient Transfection of Adherent Cells 短暫轉染

1. 轉染的前一天, 於 60 mm dish in 5 ml 適當的生長 medium 接種 vero 或 Cos-7 細胞($2-8 \times 10^5$ cells).
2. 使轉染當天細胞達 40-80% confluence(generally 37°C and 5%CO₂).
3. 轉染當天,稀釋 5 μ g DNA 於 TE buffer(最低限量的 DNA 濃度: 1 μ g/ μ l)
4. 加入不含血清,蛋白質及抗生素的 150 μ l MEM.(於 1.5ml tube)
5. 加入 25 μ l SuperFect Transfection Reagent 至上述之 DNA solution.
6. 以 pipetting 數次混合或利用 vortexing for 10 秒, 將上述之 reaction tube 置室溫 5-10mins(15-25°C), 緩慢的吸棄細胞培養盤上的 MEM 且以 4ml PBS wash 細胞, 加入 3 ml 的細胞生長培養液至 reaction tube。
7. 以 pipetting 兩次混合,立即轉移至細胞培養盤上, 置 37°C and 5% CO₂ 培養箱培養 2-3 小時, 移去反應液並以 4ml PBS wash 細胞.(洗淨), 加入新的細胞生長培養液(包含血清).
8. 置 37°C and 5%CO₂ 培養箱培養約 24-48 小時分析其基因的表現.

(十六)蛋白質表現

1. 選殖的大腸桿菌,鈎單一菌落先培養於 5 ml 含 ampicillin 抗生素的

LB 培養液中培養 12 個小時。

2. 在將菌液移殖到含有 ampicillin 抗生素的 20 ml LB 的 500 ml 大錐形瓶中培養
3. 約三小時後，測菌液 OD₆₀₀ 值達 0.5~1 時，到達最佳菌量濃度
4. 給予 1 M IPTG 20 μ l，置 37°C 誘導三小時大腸桿菌表達蛋白。
5. 表達完後將錐形瓶，放置冰上 10 分鐘後收集菌液，每 1 ml 分成一管，共分 5 管其餘裝至 50ml 離心管【-20°C 保存】。

以 5000 rpm 離心 10 分鐘，使大腸桿菌沈殿於底部，然後棄上清液取 pellet。

(十七) 溶解菌體

1. 1ml 菌液加入 ependorf 中，以 5000 rpm 離心 10 分鐘，以便沈殿下大腸桿菌
2. 加入 TE buffer 100 μ l 震盪懸浮
加入 1 μ l lysozyme 和 10 μ l 1% Triton X-100，在 RT 感作 15 分鐘
3. 用小燒杯裝入碎冰，ependorf on ice，超音波震盪每次 5 秒共 2 次
*(因超音波震盪會產生高溫故要 on ice)
4. 以 13000 rpm 離心 15 分鐘 取上清液至新的 ependorf 放置 -20 度保存。

(十八) SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)蛋白質電泳

1. 材料：SDS 模組，70°C 恆溫槽，浮板，50 ml 離心管，直立式電泳槽，蛋白質 sample

SDS 膠的製備

12% Separating gels (下膠) 5ml

H ₂ O(D ₃ W)	2150 μ l
40% acrylamide mix(有毒)	1500 μ l
1.5M Tris-Hcl (pH 8.8)	1250 μ l
10% SDS	50 μ l
10% ammonium persulfate	50 μ l
TEMED	2.0 μ l

(TEMED 加入後膠會快速凝固，故最後加入混合後立刻加入模子中)

5% Stacking gels (上膠)	2ml
H ₂ O(D ₃ W)	1492.5 μ l
40% acrylamide mix(有毒)	247.5 μ l
1.0M Tris-Hcl (pH 6.8)	250 μ l
10% SDS	20 μ l
10% ammonium persulfate	20 μ l
TEMED	2 μ l

*(TEMED 加入後膠會快速凝固，故最後加入混合後立刻加入模子中)

Loading buffer 2X(1ml)

H ₂ O(D ₃ W)	80 μ l
100 mM Tris-HCl(pH 6.8)	100 μ l
4% SDS	400 μ l
0.2% bromophenol blue	20 μ l
20% glycerol	200 μ l
200 mM DTT(dithiothreitol)	153.8 μ l

染色液(500 ml)

coomassie blue R250	1.25 g
methanol	225 ml
H ₂ O(D ₃ W)	225 ml
Glacial acetic acid	10 ml

再以 Whatman NO.1 filter 過濾

脫色液(1000ml)

H ₂ O(D ₃ W)	600 ml
Methanol	300 ml
Glacial acetic acid	100 ml

Running buffer(500 ml) 5X

Tris-Base	7.55 g
Glycine	47 g
H ₂ O(D ₃ W)	400 ml(溶開)
	【PH 調至 8.3】
10% SDS	25 ml
H ₂ O(D ₃ W)	加至 500 ml

2. 泡製下膠放入玻璃片中間，至 8 分滿後加入水(DW)整平下膠的上緣
(注意有無漏出)，待約管中剩餘的下膠凝固後，即可知玻璃片中的下膠
也已凝固倒去整平用的水，吸乾多餘水份，準備齒梳
3. 配製上膠，加入玻片中到 9 分滿，放入齒梳，再將上膠加到玻璃片中
到滿到張力出現
4. 待上膠凝固後在模組凹處加入 running buffer，到覆蓋過短玻璃

小心拔去齒梳

5.使用 Tip，吸取模組凹槽中的 buffer 沖洗膠的凹陷部

SDS 膠製備即完成。

6.在 ependorf 放入，蛋白質 sample $10\ \mu\text{l}$ + loading buffer $10\ \mu\text{l}$ (含 DTT)
於 100°C 中加熱 10 分鐘

7.將模組放入電泳槽中 running buffer 的量需超過使用線

8.把加熱完的 sample 混合物，放到上膠的凹槽中，緩緩加入

9.設定 121V (65 mA)，電泳約 1~2 個小時後即可見藍色的 loading dye
跑至膠的底部

10.關閉電泳槽電源，取出模組，倒去模組凹槽內 running buffer
取下玻璃，由縫打開雙面玻璃

11.切去上膠，保留下膠，小心取下 SDS 下膠到染色盤中

12.加入染色液，蓋上保鮮膜，放到震盪機去搖動染色 2-3 個小時(膠已變
的較脆弱)

13.時間到後倒去染色液，加入脫色液，10 分鐘後換脫色液，20 分鐘再換
一次往後每 20 分換一次，至膠無蛋白質部份呈透明狀。

(十九) 免疫墨點法(Immunodot assay)

1.戴上手套，用剪下一小塊的 NC paper

2.使用 DDW 潤濕 paper 後，放置於衛生紙上吸取多餘水份

3.點上 $1\ \mu\text{l}$ 表達的蛋白質，置於 55°C 烘箱烘乾後 (30min)，用以完
全固定蛋白質於 paper 上

4.以 blocking buffer 搖動感作.30 分鐘後以 PBS 洗三次,每次 10 分鐘

5.加入 1^0 單株抗體(以 Blocking buffer 500x 稀釋)感作 30 分鐘搖動

6.以 PBST 搖動洗三次，每次 10 分鐘

- 7.取出 paper，再放入新的 blocking buffer
- 8.加入 2^0 抗體標示有 AP(以 Blocking buffer 2000x 稀釋)，
再搖動感作 30 分鐘
- 9.以 PBST 洗三次，每次 10 分鐘
- 10.加入 detection buffer 10 ml，5 分鐘感作倒掉
- 11.最後加 $200 \mu\text{l}$ NBT/BCIP 於 10ml detection buffer 中呈色，待呈色
度足夠時
- 12.放入滅菌水 DDW 中，終止呈色反應

(二十) 西方轉漬(Western blotting)

1. 將表現之 VP1 缺損蛋白先進行 SDS-PAGE 電泳
2. 組好轉漬用模組，加入 transfer buffer，再以 Hoefer® mini VE blot
module (pharmacia)將蛋白質轉漬至(Nitrocellulose membrane)上，轉
漬反應在 25V/350 mA 進行 2 小時 (or25V/400 mA 1 小時)
3. 置烘箱烘乾，使 paper 呈彎曲狀
4. 以 5%脫脂奶粉進行 blocking 以覆蓋背景，室溫下搖晃感作 1 小時
以 PBS 洗三次,每次 10 分鐘
5. 加入以 Dilution buffer500 倍稀釋之老鼠抗腸病毒抗體，以 washing
buffer 洗三次，每次 10 分鐘，以洗去非特異性結合
6. 接著加入以 Dilution buffer2000 倍稀釋 AP 標示之山羊抗老鼠
IgG，搖晃感作 1 小時，以 washing buffer 洗三次，每次 10 分鐘
7. 加入 detection buffer 10 ml，5 分鐘感作倒掉
8. 最後加 $200 \mu\text{l}$ NBT/BCIP 於 10ml detection buffer 中呈色，

待呈色度足夠時

9. 放入滅菌水 DDW 中，終止呈色反應

(二十一)冷光壓片西方墨點分析(Western blot analysis)

1. SDS-PAGE 電泳結束後,將蛋白質轉漬以甲醇浸潤過的 PVDF membrane 上於 RT 用含 5% non-fat milk 之 PBS buffer 搖晃 blocking 1-2 小時
2. 以 0.1%Tween20 in PBS 清洗 3 次,每次 10-20 min
3. 加入以 0.1% non-fat milk 之 PBS buffer 及適當稀釋之 1⁰ 抗體
4. 4°C 下反應 18 小時 (RT 2-3 小時)
5. 於 RT 用適量 wash buffer(0.1% Tween-20 in PBS),清洗三次,每次 10-20 min
6. 加入以 0.1% non-fat milk 之 PBS buffer 及適當稀釋之 2⁰ 抗體
7. 於 RT 下反應 2 小時以上。
8. 於 RT 用適量 wash buffer(0.1% Tween-20 in PBS),清洗三次,每次 10-20 min。
9. 再用二次水清洗三次,夾出 membrane,稍晾乾,置保鮮膜,混合體積 1:1 之 ECL detection solution **1ml**, 在暗房中以底片曝光後顯影。

結果

回溯調查本研究室自成立以來於南台灣地區所分離之腸病毒結果顯示，台灣地區分別於 1985-1987(EV71)、1987-1989(E30、CA24v)、1992-1994(E30)、1993-1995(CB1)、1997-1999(EV71 及 CA16)、1998-2000(CB3)、1999-2001(EV71 及 CA16)、2001-2003(CB5)及 2002-2004(CA16 及 E11)幾波大流行(圖一)。在分子流行病學分析方面，本研究室於 1987 年首次分離到 E30，於 1992-1994 及 2001 年再度爆發大規模流行，1993 及 2001 年所分離之 E30 屬同一個基因型，但於基因樹上有明顯分群，2001 年本研究室分離到無法以螢光抗體鑑定其血清型之 NPEV 有 16 株經 VP4 基因比對結果為 E30 (圖二)。

分析本研究室所分離 EV71 結果顯示，2000 至 2002 年分離株基因型屬 Genotype B4 (圖三)，其彼此間核酸序列的差異極小 (0-1%)。EV71 於 1998 年於台灣地區發生大流行，本研究室曾撰文發表研究結果指出當時之主要流行族群為 Genotype C2，但 Genotype B4 亦可分離到，然而 2000 年所分析之 EV71 皆屬 Genotype B，並未發現 Genotype C 之 EV71。1998 年後間隔 1 年便再度爆發 EV71 之流行可見 C2 與 B4 兩基因型間無足夠之交叉保護，1998 年 EV71 造成之群體免疫並不能阻止 2000 年 B4 亞型之 EV71 之流行。取本研究室自 1980-2003 年所分離之 23 株 CB-5 及原型株 Faulkner，分析其 VP4 核酸序列及氨基酸序列結果顯示，台灣地區所分離

之 CB5 可區分為 3 個基因型，而 Genotype C 又可分為 C1 及 C2 兩亞型，1995 年以來每年都有分離到 CB5 病毒，可能與 C1 及 C2 兩亞型交替流行有關，CB5 於 2002 年底到 2003 年初則成為台灣地區腸病毒流行之主要族群，本次流行 C1 及 C2 皆可分離到，與發生地區有關（圖四）。

CA16 於 1997-1999、1999-2002、2002-2004 發生大規模之流行（圖一），在 VP4 基因親緣關係分析結果顯示，此三波流行之 CA16 於親緣樹有明顯之分群（圖五）。本研究將探討此三基因亞型之 CA16 於抗原性是否有明顯差異，造成此病毒自 1997 至今持續流行於台灣地區。在 2001 年分析 41 株 NPEV 中有 6 株為 CA16，本研究室另分離到 12 株 CA16 無法以螢光抗體鑑定分型，其造成抗原改變之原因有待 VP1 及 VP4 基因完全定序後將做進一步分析。

由於病毒不斷產生變異。使得市售螢光抗體及中和試驗之抗血清無法分型之病毒株(NPEV)逐年增加。1999 年佔 10%，2000 佔 16.4%，到 2001 年則增加至 30%；而 2002 年則達到了 35%；2003 年 9%；2004 年 32%。本研究定序分析 1980~2004 年間無法以螢光抗體及中和試驗分型的 NPEV 之 VP4 基因，2003 年 NPEV 定序分析 6 株，結果 CA16 有 3 株、E9 有 1 株及 CB3 有 2 株；2002 年 NPEV 定序分析 16 株，結果 E6 有 11 株、Polio3 有 2 株、Polio2、E3、EV71 各 1 株；在 2001 年分析 41 株 NPEV，其中含有 16 株 E30、CA16 及 E6 各有 5 株、Polio1, Polio3, CA24v 各 2 株及 CB4, Polio2, E3

皆 1 株；2000 年 NPEV 中取 18 株做分析，結果為 13 株 CA16、且 CA4, CA5, CA9, E30, EV71 各 1 株；分析 1999 年 3 株 NPEV，結果分別為 2 株 CA16 和 1 株 EV71。

取台灣本地分離之 EV71 Genotype B 及 C 各一株（5033、7008）及無法以市售 E30(CHEMICON-3315)及 CA16(CHEMICON -3323)單株抗體偵測之 E30 及 CA16 病毒株製備單株抗體。

本研究針對台灣本地分離 EV71 製備單株抗體得到九株單株抗體（35D4F、39D4C5F、511D10C、511D3C、34EE10、E211F、E211F2B、E410G2B 及 E611G2G），其 Isotyping 結果皆為 IgG1，以螢光分析染色分析及 ELISA 所製備之單株抗體皆能與 EV71 結合，但其中 511D10C、511D3C、E211F、E211F2B、E410G2B 及 E611G2G 與台灣分離之各基因型 EV70、CA16、CA9、CA10、CB1~CB6、E6、E7、E9、E30 皆無結合能力（35D4F、39D4C5F、34EE10 尚未完成分析）。嘗試以 *E coli* (pET32a) 及哺乳動物細胞表現系統 pcDNA3.1，表現 EV71 之 VP1 基因，以免疫墨點及螢光抗體染色。結果顯示，此二系統表現之 VP1 蛋白與 EV71 抗血清、市售單株抗體及自製之單株抗體皆能特異性結合（圖六、圖七），顯示此九株單株抗體之標的蛋白皆為 VP1 蛋白（表一）。本研究將進一步以此表現系統進行抗原決定位之定位。本研究針對台灣本地分離 CA16 製備單株抗體共得到 3 株單株抗體，其 Isotyping 結果 4F8 及 6C10 為 IgG1 而 5H12 為 IgM，以螢光染色及 ELISA

分析所製備之單株抗體皆能與 CA16 結合但與台灣分離之各基因型 EV71、EV70、CA9、CA10、CB1~CB6、E6、E7、E9、E30 皆無結合能力。其他特性分析尚在進行中。本研究針對台灣本地分離 E30 製備單株抗體共得到 12 株單株抗體 (7B5、5D2、5B3、4A2、4H12、4A8、4D9、3F4、3D9、2E9、2E12 及 2F12)，其特性分析正在進行中。

討論

本研究針對 EV71、CA16 及 E30 製備單株抗體，以取代市售單株抗體用於鑑定抗原性差異甚大之台灣流行株，以期能提供臨床病毒診斷之用；此外更進一步以此單株抗體為工具，進行抗原簇之研究，以釐清腸病毒抗原性改變，即引發大流行之原因。單株抗體是極為有用之診斷及病毒學研究工具，但其製備過程極為繁瑣耗時，製備能否成功的關鍵除對 BALB/c 小鼠之病原性及抗原性外，融合瘤細胞產生之抗體是否對細胞有毒性亦會影響抗體之產生。E30 對 BALB/c 小鼠病原性較強，免疫之後常造成 BALB/c 小鼠的死亡，融合瘤細胞產生之抗 E30 單株抗體對細胞亦有較明顯之毒性，常導致融合瘤細胞死亡或抗體停止分泌之現象，而 EV71 及 CA16 之單株抗體製備則無此現象。分析本研究所製備之九株抗 EV71 單株抗體其標的蛋白皆為 VP1 蛋白，根據過去文獻對 Polio virus 的研究顯示，VP1 蛋白為其結構蛋白中暴露在最外部的蛋白，故其抗原簇多位於 VP1 蛋白上，本研究下年度計劃則將對這些單株抗體所辨識的抗原簇進行定位。

參考文獻

- Azar R, Varsano N, Mileguir F, Mendelson E: Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: identification of two new genome types, Ad7k and Ad7d2. *J Med Virol* 54 (4): 291-9, 1998
- Beby-Defaux A, Maille L, Chabot S, Nassimi A, Oriot D, Agius G. Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemliopitz syndrome. *J Medical Virology Methods* 65:66-69, 2001
- Gjoen, K., Bruu, A. L. &Orstavik, I.(1996). Intratypic genome variability of echovirus type 30 in part of the VP4/VP2 coding region. *Archives of Virology* 141, 901-908.
- Hyypia, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. & Stanway, g.(1992). A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 8847-8851.
- Hyypia, T., Hovi, T., Knowles, N. J. & Stanway, G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology* 78, 1-11.
- Jean-Luc Bailly, Aline Beguet, Martine Chambon, Cecile Henquell, Helene Peigye-Lafeuille (2000) Nosocomial transmission of echovirus 30: molecular evidence by phylogentic analysis of the VP1 encoding sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2889-2892.
- Melnicj, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J. & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equinr antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses.

Bulletin of the World Health Organization 48, 263-268.

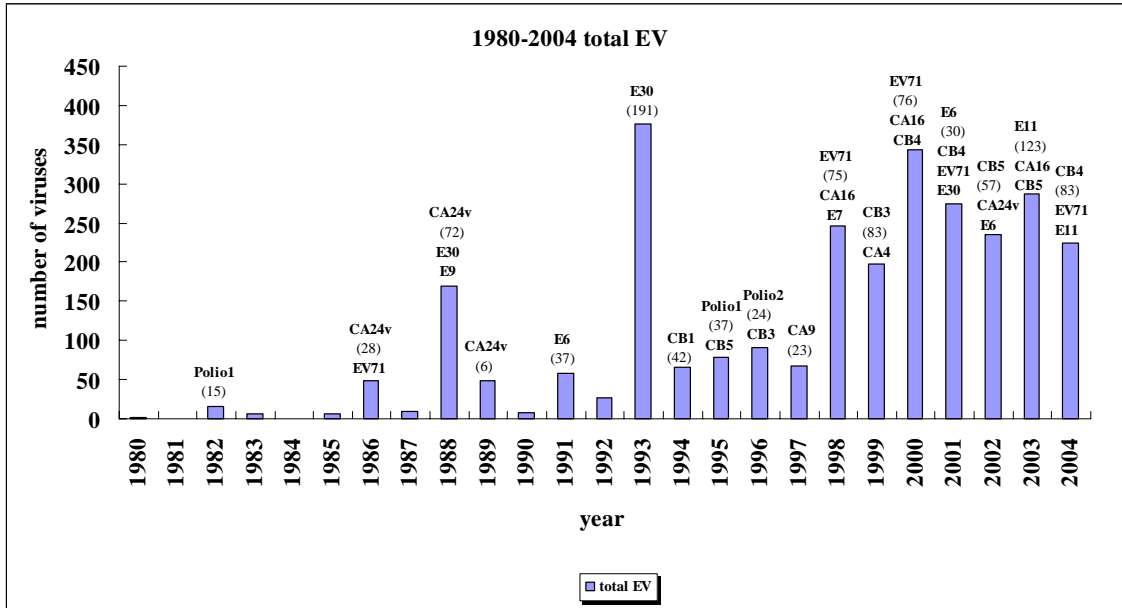
P.-Y. Chu, K.-H. Lin, K.-P. Hwang, L.-C. Chou, C.-F. Wang, S.-R. Shih, J.-R. Wang, Y. Shimada, and H. Ishiko (2001) Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan. *Archives of Virology* 146, 589-600.

Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, Itoh N, Isobe K, Uchio E, Ohno S, Nakajima H, Hata K, Ishiko H: Rapid Diagnosis of Adenoviral Conjunctivitis by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* 34 (9): 2113-6, 1996

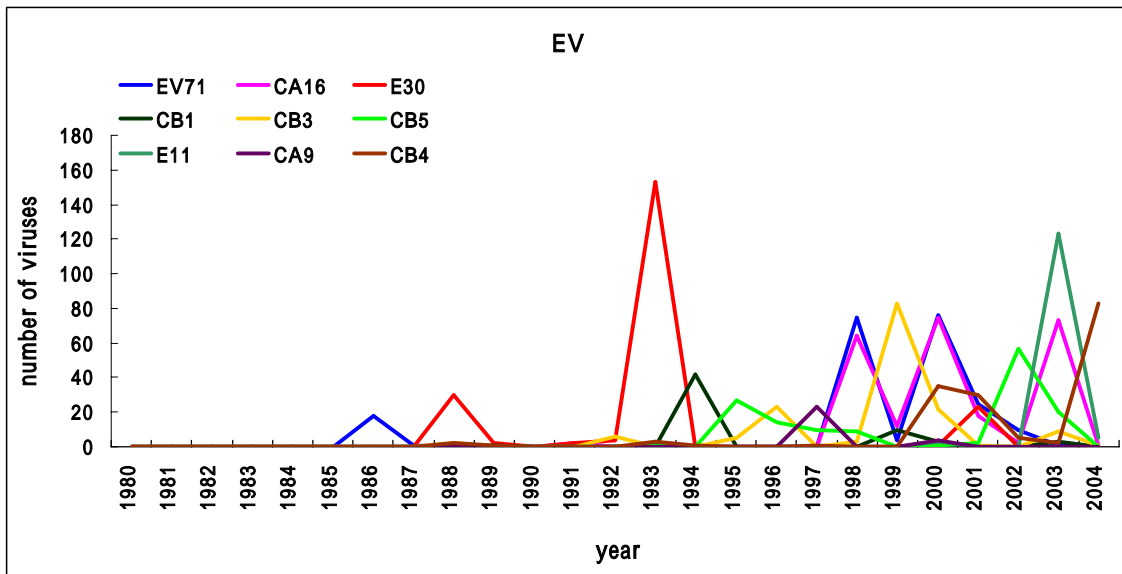
Tai FH, Grayston JY, Johnston PB and Woolridge RL: Adenovirus infections in Chinese army recruits on Taiwan. *J Infect Dis* 107: 160-4, 1960

Wadell G, Allard A, Hierholzer JC: Adenovirus .In: *Manual of Clinical Microbiology*. Chapter 76: 970-982, 2000

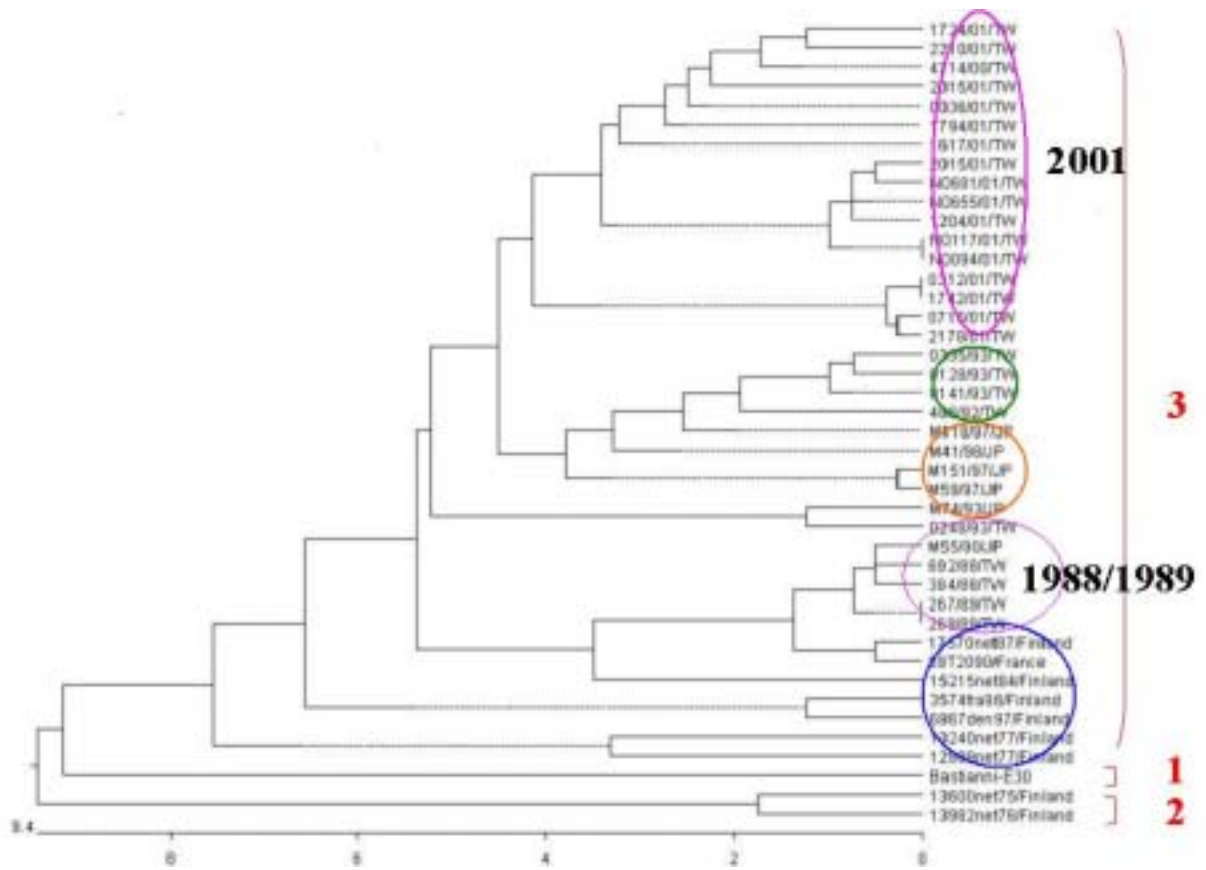
(A)



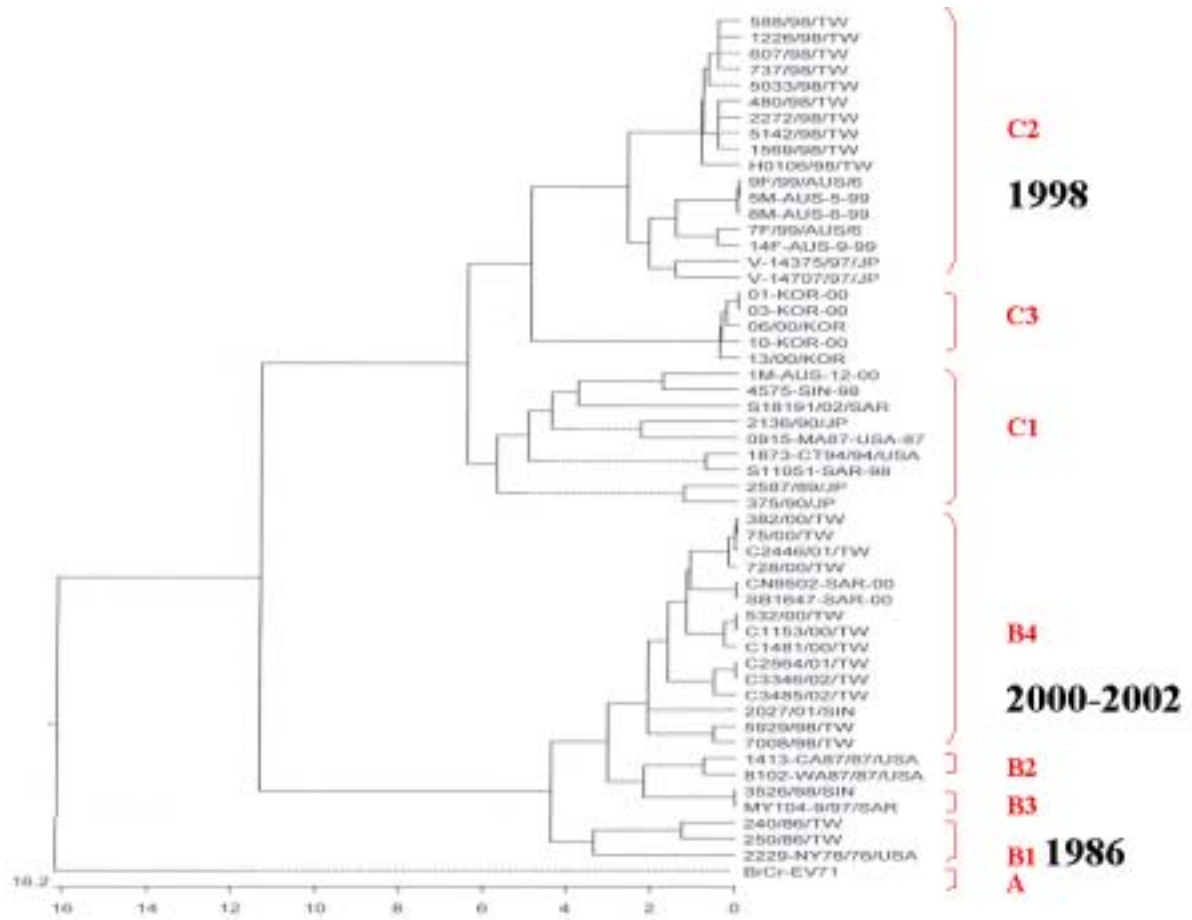
(B)



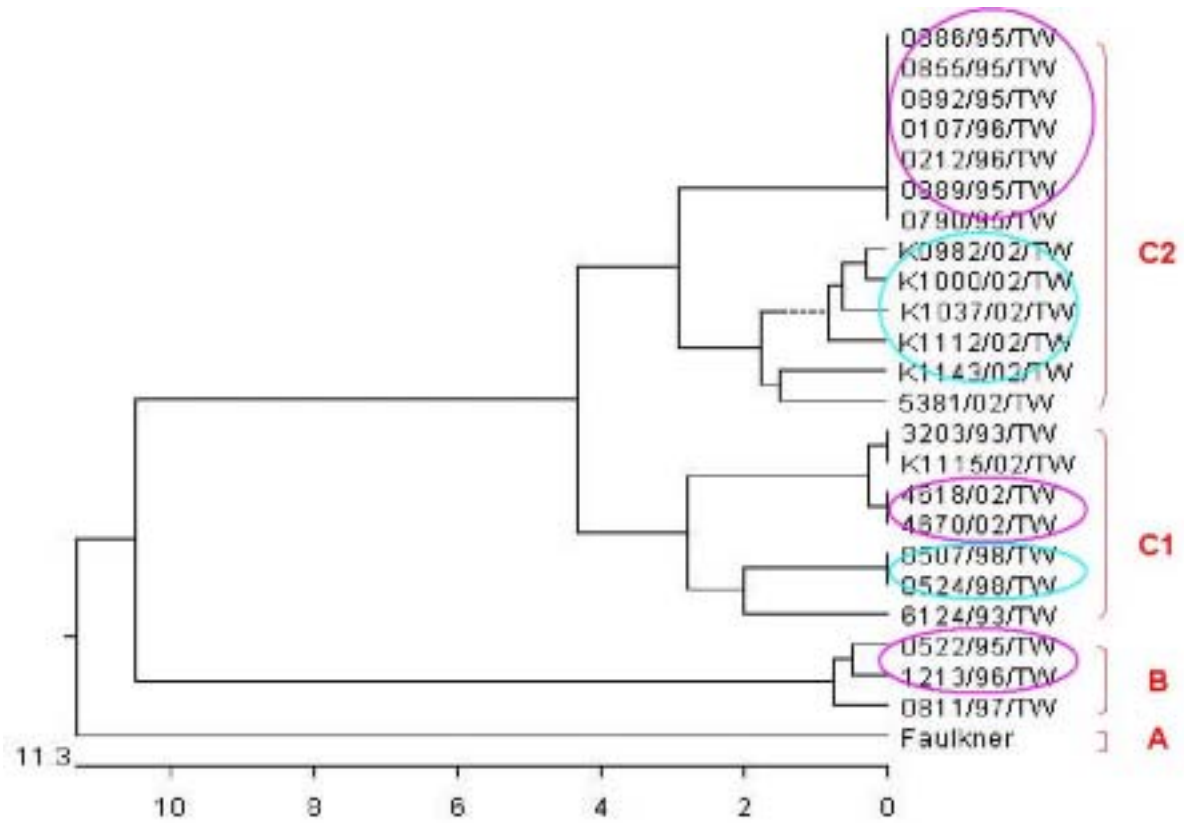
圖一、1980-2004 年南台灣地區腸病毒分離情形。(A) 歷年來腸病毒總分離數，上方標示為主要流行型別。(B)



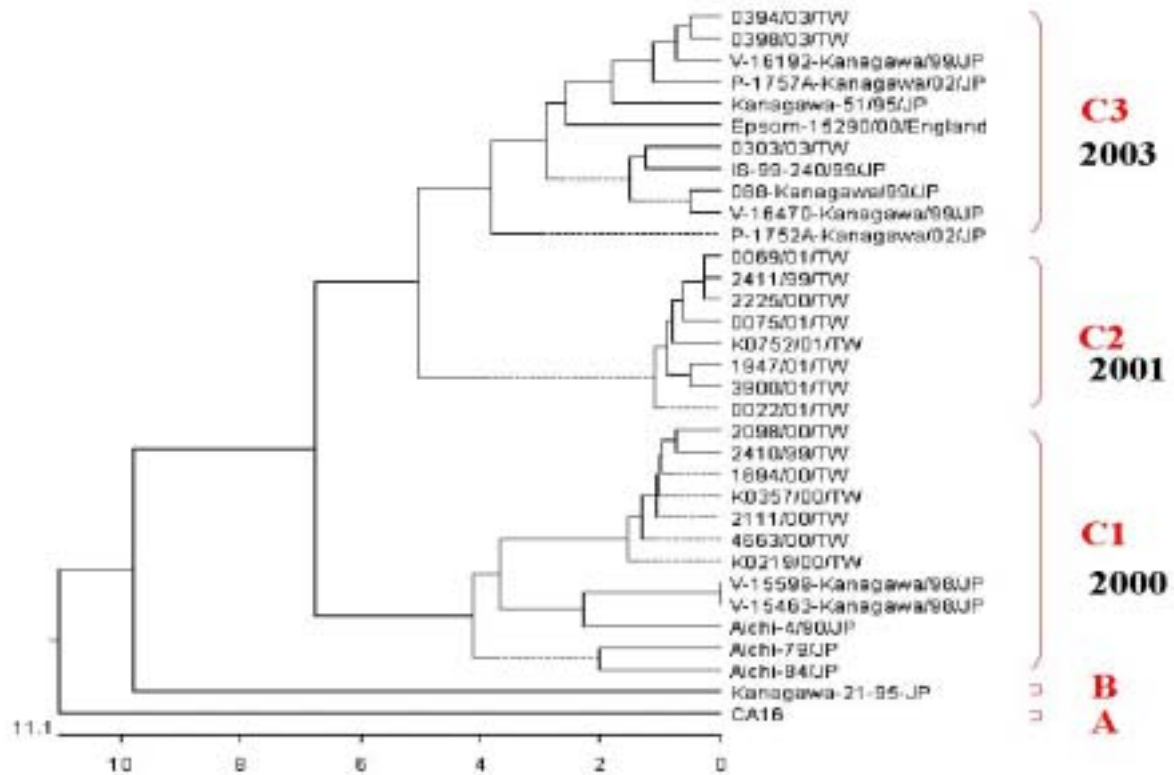
圖二、E30 之 VP4 基因核酸序列比對之親緣關係圖。



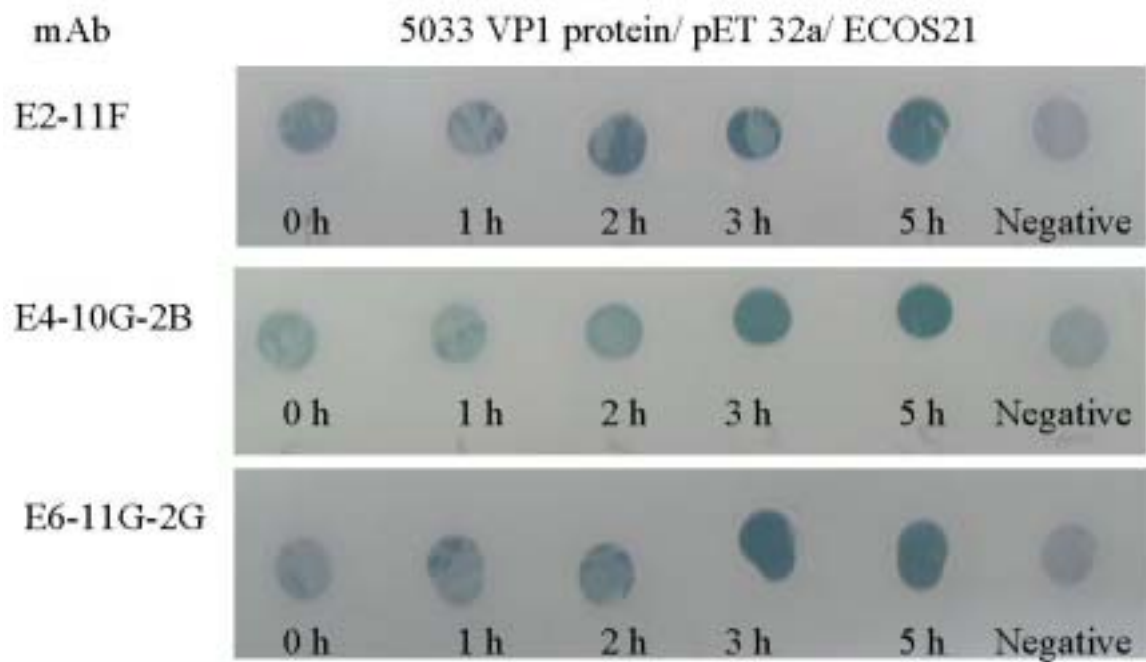
圖三、EV71 之 VP4 基因核酸序列比對之親緣關係圖。



圖四、CB5 之 VP4 基因核酸序列比對之親緣關係圖。

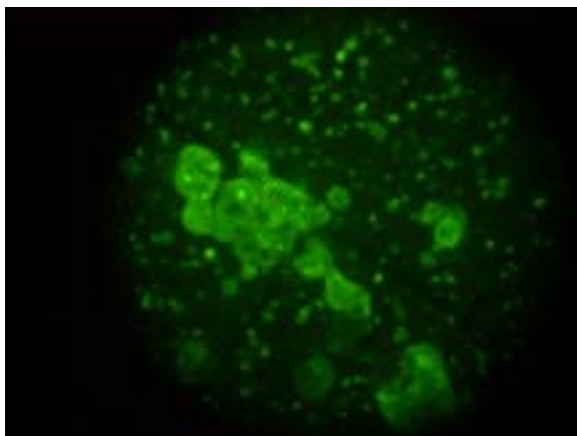


圖五、CA16 之 VP4 基因核酸序列比對之親緣關係圖。

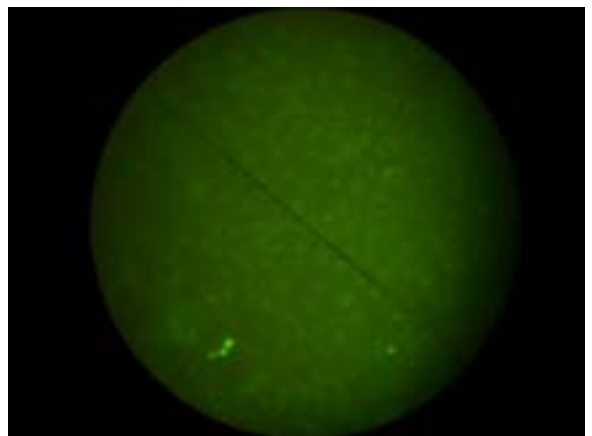


圖六、以免疫墨點鑑定 *Ecoli* 表現之 EV71 VP1 蛋白。

(A)



(B)



圖七、(A) 以螢光抗體鑑定 vero cell 表現之 EV71 VP1 蛋白 (400X)，
(B) Negative control (100X)

表一、本研究製備之抗 EV71 單株抗體特性分析

mAb	isotyping	FA (EV71)	FA (cross reaction)	Target protein	NT (100TCID50)
35D4F	nd	+	nd	VP1	nd
39D4C5F	nd	+	nd	VP1	nd
511D10C	nd	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	nd
511D3C	nd	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	nd
34EE10	nd	+	nd	VP1	nd
E211F2B	IgG ₁	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	-
E410G2B	IgG ₁	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	-
E611G2G	IgG ₁	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	2X
E211F	IgG ₁	+	EV70,CA9,CA10,CB1~CB6, E6, E7, E9,E30 皆(-)	VP1	-

+：陽性

-：陰性

nd：尚未完成