計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-113502

衛生福利部疾病管制署 107 年委託科技研究計畫

計畫名稱：以重組桿狀病毒表現系統開發蟲媒病毒傳染病診斷試劑之研究

年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：中原大學生物科技學系

計畫主持人：吳宗遠

研究人員：蔡馥任、許君源

執行期間： 107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 壹佰伍拾 萬元整

目錄

目錄.....2

中文摘要.....5

英文摘要.....7

壹. 前言.....8

1.1 政策或法令依據.....8

1.2 狀況或發展需求.....8

1.3 計畫目標.....9

貳. 材料與方法.....10

2.1 *Sf*21 昆蟲細胞 (Spodoptera frugiperda 21 cell line).....10

2.2 以 Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統 (Bac-to-Bac bi-cistronic baculovirus expression system) 製備呈現蟲媒病毒結構蛋白之重組桿狀病毒.....10

2.3 免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay；IFA).....11

參. 結果.....12

3.1 製備呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CHIKV 26S.....12

3.2 測試 vAc-CHIKV 26S 能否用於檢測血清中抗屈公病毒 IgG 與 IgM.....13

3.3 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒專一性檢測.....14

3.4 茲卡病毒結構蛋白基因之分析及合成 15

3.5 vAc-ZIKV-ME 病毒感染昆蟲細胞表現茲卡病毒結構蛋白基因之分析-Western blot 與 IFA 15

3.6 測試 vAc-ZIKV-ME 是否可用於檢測血清中抗茲卡病毒之 IgG 與 IgM 抗體 16

3.7 測試可用於檢測血清中抗茲卡病毒 IgG 與 IgM 之 vAc-ZIKV-ME 之力價範圍 17

肆. 討論 18

伍. 結論與建議 20

陸. 計畫重要研究成果及具體建議 21

1. 計畫之新發現或新發明 21

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果 21

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議 21

柒、 參考文獻 22

捌、 圖表 26

圖 1.呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 26

圖 2. 重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 於其披膜上呈現屈公病毒之結構蛋白 E1 與 E2 的示意圖。 27

圖 3. 以重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗。 28

圖 4. vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒專一性檢測。 29

圖 5. 測試可用於檢測血清中抗屈公病毒 IgM 之 vAc-CMV-Ph-CHIKV-26S 之力價範圍 30

圖 6、製備呈現茲卡病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 31

圖 7、以西方墨點法分析茲卡病毒重組結構蛋白的表現 33

圖 8、以免疫螢光分析茲卡病毒重組結構蛋白的表現 35

圖 9、以重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV 和 vAc-IE-ZIKV 取代茲卡病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗。 37

玖、 期末經費使用狀況 38

拾、 107 年計畫重要研究成果及具體建議 39

拾壹、 期末審查意見回覆 40

中文摘要

蚊蟲 (mosquito) 是人類公共衛生最大的威脅，除傳播瘧疾外也是許多蟲媒病毒的媒介，例如黃熱病毒 (yellow fever viruses, YFV)、登革病毒(dengue virus)、茲卡病毒 (Zika virus) 、西尼羅病毒(West Nile virus)等黃病毒科(Flaviviridae) 黃病毒屬(Flavivirus)病毒；屈公病毒(Chikungunya virus)、羅斯河病毒(Ross River virus)、歐尼恩病毒(O'nyong-nyong virus)、東方馬腦炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)等的披膜病毒科(Togaviridae)的阿爾發病毒屬(Alphavirus)病毒。由於人口膨脹(目前全球已有 76 億人)使得耕地面積需求增加而往林地擴張，畜牧業的農場也擴張到原本的林地等，使得原本侷限於林地間傳播的蟲媒病毒有機會進入都市並與人類為主要宿主，此外日益頻繁的國際交通往來也使得蟲媒病毒在全世界散播的情形更為快速且發生頻率日益頻繁與嚴重。因此，如何進行防治蟲媒病毒是一不可避免且急迫的公共衛生議題。本計畫製備並生產可以呈現屈公病毒與茲卡病毒結構蛋白的重組桿狀病毒，以感染者之血清進行 MAC-ELISA 測試，證實表現屈公病毒的重組桿狀病毒可以具專一性的進行屈公病毒感染者 IgM 抗體的檢測，而表現茲卡病毒結構蛋白的重組桿狀病毒也可進行 MAC-ELISA 檢測，雖然結果不若表現屈公病毒的重組桿狀病毒來的佳。因此本計畫證實可以重組桿狀病毒呈現蟲媒病毒之結構蛋白之方式取代重組蛋白或類病毒

顆粒 (virus like particle, VLP) 等高生產成本的檢測方式；同時取代具生物危險性之病毒如屈公病毒 (生物安全等級 3) 而為一較安全的檢驗方法。

關鍵詞：蟲媒病毒; 重組桿狀病毒; 血清抗體檢測試劑

英文摘要

Mosquito is the greatest threat to human public health, apart from malaria, arboviruses such as the yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), West Nile virus, Chikungunya virus (CHIKV), Ross River virus O ' nyong-nyong virus, Eastern equine encephalitis virus are also wide spread in the word and emerged as new challenge. Due to population growth (currently has more than 7.6 billion people worldwide) of arable land to forest expansion to meet increased demand, livestock farms to expand into the forest, making an already limited forests spread of insect-borne virus have access to the city and with the human as the main host. Beside, growing international traffic also makes more of the insect-borne virus spread all over the world fast. Therefore, how to control insect-borne virus is inevitable and urgent public health issues. This proposal will produce recombinant baculoviruses that display the structural proteins of the arboviruses to replace the biological risk of viruses, including CHIKV virus, dengue virus, Japanese encephalitis virus and Zika virus, to develop safe and simple serum antibody detection reagents.

Keywords： arboviruses; recombinant baculoviruses; serum antibody detection reagents

壹. 前言

1.1 政策或法令依據

登革熱是台灣目前最嚴重的蟲媒病毒傳染病，屈公病及茲卡則為新興並具威脅的蟲媒病毒傳染病，雖然目前並非本土病 (endemic)但每年皆有境外移入之病例，登革熱甚至會造成社區性感染的大流行威脅。登革熱及屈公病歸類為第二類法定傳染病，茲卡感染症則歸類為第五類法定傳染病，依疾病防治規定，發現疑似病例應於二十四小時內通報衛福部。

1.2 狀況或發展需求

蚊蟲(mosquito)是人類公共衛生最大的威脅，除傳播瘧疾外也是許多蟲媒病毒的媒介，例如黃熱病毒 (yellow fever viruses, YFV)、登革病毒(dengue virus)、茲卡病毒 (Zika virus) 、西尼羅病毒 (West Nile virus)等黃病毒科 (Flaviviridae) 黃病毒屬(Flavivirus)病毒；屈公病毒(Chikungunya virus)、羅斯河病毒(Ross River virus)、歐尼恩病毒(O’nyong-nyong virus)、東方馬腦炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)等的披膜病毒科(Togaviridae)的阿爾發病毒屬 (Alphavirus)病毒。由於人口膨脹 (目前全球已有 76 億人)使得耕地面積需求增加而往林地擴張，畜牧業的農場也擴張到原本的林地等，使得原本侷限於林地間傳播的蟲媒病毒有機會進入都市並與人類為主要宿主，此外日益頻繁的國際交通往來也使得蟲媒病毒在全

世界散播的情形更為快速且發生頻率日益頻繁與嚴重。因此，如何進行防治蟲媒病毒是一不可避免且急迫的公共衛生議題。

1.3 計畫目標

本計畫的目的為製備與生產可以呈現蟲媒病毒之結構蛋白的重組桿狀病毒，以取代具生物危險性之蟲媒病毒，包括屈公病毒、茲卡病毒、登革病毒及日本腦炎病毒等，提供疾管署科技研究計畫(計畫名稱：蟲媒病毒傳染病創新安全快速檢驗試劑之開發與應用)開發安全簡易的血清抗體檢測試劑。

貳. 材料與方法

2.1 *Sf*21 昆蟲細胞 (Spodoptera frugiperda 21 cell line)

由草地夜蛾 (Spodoptera frugiperda) 的幼蟲—秋行軍蟲的卵巢細胞分化出的細胞株，也稱為 IPLB-Sf21AE。此細胞的外觀呈圓形飽滿，以半懸浮的方式生長，不完全貼壁，約 18-24 hrs 進行增生，培養基為 TNMFH (Gibco) 加 10%胎牛血清 (fetal calf serum；FCS)，培養環境為 27℃恆溫，不需額外注入 CO2，此細胞和同為秋行軍蟲卵巢細胞分化出來的 Sf9 cell line 皆常用於桿狀病毒表現系統中。

2.2 以 Bac-to-Bac 雙效桿狀病毒表現系統 (Bac-to-Bac bi-cistronic baculovirus expression system) 製備呈現蟲媒病毒結構蛋白之重組桿狀病毒

Bac-to-bac baculovirus expression system (購自 ThermoFisher Scientific) 是一種快速、高效率的重組桿狀病毒生產方式，改進了傳統以共轉染的方式在昆蟲細胞內製作重組病毒的繁雜與耗時的過程 (Polaves et al., 1996)。此產品為 Monsanto 公司所販售，在專用的載體上具有轉位子 (transposable elements) Tn7，並配合專用的勝任細胞中的輔助質體 (helper plasmid)，將載體上的目標基因以專一性位置重組 (site-specific recombination) 的方式嵌入勝任細胞中的桿狀病毒 DNA 上，由於嵌入的位置是在 LacZα 基因上，

所以後續可以透過菌落藍白篩選 (Blue-white selection) 挑出白色菌落 (含有目標基因的重組桿狀病毒 DNA)，之後將病毒 DNA 純化出來，轉染至昆蟲細胞中，就能生產所需的重組桿狀病毒。本實驗室以 Bac-to-Bac® 桿狀病毒表現系統所使用的載體 pFastBac™1 為框架，加入紅螢光基因 DsRed2 以及我們實驗室製作的 Liu IRES 形成的 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2 雙效桿狀病毒表現載體。本實驗室已證實其在昆蟲細胞以及哺乳類細胞皆具有高轉譯活性 (Liu et al., 2015)。

2.3 免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay；IFA)

先以 M.O.I = 5 下病毒到 96 well (4x /well)，在感染後第 3 天時以螢光顯微鏡觀察感染情形，之後移除病毒液，以 40 µl 的 4% paraformaldehyde 加入各個 well 中，待 10-15 分鐘後，移除 4% paraformaldehyde，並以 50 µl/well 1x PBS 潤洗 2 次，移除 1x PBS 後加入 3% BSA 進行 blocking，1 小時後再次以 50 µl/well 1x PBS 潤洗 2 次，移除 1x PBS 後加入一抗 (1˚Ab) 40 µl/well，作用於室溫中的搖盤上 1 小時，移除一抗，再次用 50 µl /well 1xPBS 潤洗 2 次，移除 1x PBS 後加入 40 µl/well 二抗 (2˚Ab)，作用於室溫中且需避光，在搖盤上搖 45 分鐘後移除二抗，最後以 50 µl/well 1x PBS 潤洗 3 次，移除 1x PBS 後再加入 50 µl/well 1x PBS 以便以顯微鏡觀察。

參. 結果

3.1製備呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CHIKV 26S

我們之前的研究顯示可以核醣體內轉譯子 (internal ribosome entry site, IRES) 共表現標的蛋白 (targeting protein) 與螢光蛋白 (fluorescent protein) 而利於重組桿狀病毒的製作與力價測定。圖 1-A 為可表現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 的示意圖。我們以核醣體內轉譯子 Lir (Lir IRES) 共表現綠螢光蛋白以利於透過螢光顯微鏡觀察重組病毒於昆蟲細胞 (*Sf*21) 的感染狀況，圖 1-B 為感染重組病毒後第三天，病毒的感染狀況以及綠螢光蛋白 (EGFP) 的表現情形，圖 1-B 中我們也觀察到當屈公病毒的封套蛋白表現時所造成的 *Sf*21 細胞融合現象。為進一步確認此 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 的製備是成功的我們接著以免疫螢光染色分析:使用疾管局提供的抗屈公病毒結構蛋白抗體 1B1.2.1 可以成功辨認到昆蟲細胞表面呈現的屈公病毒結構蛋白 E2。接著，藉由西方墨點法分析屈公病毒結構蛋白的表現，同樣使用抗體 1B1.2.1，將細胞裂解液離心後，在其上清液可以看到約 55 kDa，符合預期大小的 E2 蛋白。因此我們確認 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 可以成功表現屈公病毒結構蛋白。

3.2 測試 vAc-CHIKV 26S 能否用於檢測血清中抗屈公病毒 IgG 與 IgM

與本研究中我們假設於重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 於所感染的昆蟲細胞中所複製的重組重組桿狀病毒於 ”budding off” 出時於其病毒之披膜上將可呈現屈公病毒之結構蛋白 E1 與 E2 (圖 2)。為驗證重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 於其披膜上呈現屈公病毒之結構蛋白的假設，我們與疾管署之實驗室合作，利用其已發展成熟並用於檢測屈公病毒與登革病毒感染病人恢復期的血清中之抗屈公病毒與登革病毒之 IgM-antibodies capture ELISA (Mac-ELISA) 的檢驗平台進行實驗 (圖 3)。由圖 3 中的實驗顯示：正常、未受屈公病毒病毒感染之人的血清 (Nserum) 對重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP (BV-26S) 並無抗體結合捕捉反應。而受屈公病毒病毒感染之人的血清 (CV infected serum) 對屈公病毒病毒 (CV) 有明顯的抗體結合捕捉反應；受登革病毒感染之人的血清 (DV infected serum) 對登革病毒 (DV) 有明顯的抗體結合捕捉反應。在此以重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP (BV-26S) 取代屈公病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗之靈敏性試驗上顯示，其靈敏度可達屈公病毒的一半但為不含屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 (BV，控制組) 的 20 倍左右。因此重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP(BV-26S) 具有取代屈公病毒進行 Mac-ELISA 檢驗的靈敏性。而在專

一性的檢驗上，我們以重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP (BV-26S) 嘗試進行取代登革病毒 (DV) 的進行 Mac-ELISA 檢驗的實驗顯示其訊號比登革病毒要低 10 倍左右，顯示具有不錯的專一性。故由圖 3 的初步實驗結果顯示是可以重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒進行 Mac-ELISA 檢驗的。

3.3 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒專一性檢測

為進一步測定此方法的專一性，在疾管署舒博士實驗室的協助下，我們以 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 分別分析屈公病毒、登革病毒、和日本腦炎病毒感染之人類的血清樣品進行 Mac-ELISA 檢驗 (圖 4)。分別將屈公病毒 (CK+)、登革病毒 (DN+)、和日本腦炎病毒 (JE+) 感染之人類的血清樣品 (1：100 稀釋) 加入 coating 有 Coat anti-human IgM 的 ELISA plate 作用 1 小時 (37˚C) 後再將 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP ($3.3x10^7$ pfu/ml) 加入反應 1 小時。最後再以 mAb-Ap conjugate 之抗屈公病毒單株抗體配合 PNPP 受質進行檢測。此外我們也以 2 倍序列稀釋的 vAc-CMV-Ph-CHIKV-26S 分別對 3 個屈公病病人血清中 IgM 的進行檢測，結果顯示最低之重組桿狀病毒可被檢測之病毒力價約為 $1.36x10^7$～$6.81x10^7$ pfu/ml (圖 5)。

3.4 茲卡病毒結構蛋白基因之分析及合成

在分析了茲卡病毒結構蛋白的基因之後，我們選擇膜蛋白的前驅物 (pre-membrane protein：prM) 以及封套蛋白 (envelope protein；E) 這兩種呈現在病毒封套上的蛋白基因來製作重組桿狀病毒 vAc-ZIKV-prME，預期兩者能夠表現在 *Sf*21 昆蟲細胞膜上 (圖 6-A)。使用本實驗室改造的雙效表現載體 pFastBac-MCS-Lir-DsRed2，透過 Bac-to-Bac® 桿狀病毒表現系統製作含有茲卡病毒 prME 蛋白基因的重組桿狀病毒質粒，使用 pUC/M13 的引子進行聚合酶連鎖反應確認目標片段的大小為預計的，約 5 kbps (圖 6-B)，後續將其轉染至 *Sf*21 昆蟲細胞來製備重組桿狀病毒。使用螢光顯微鏡觀察 *Sf*21 昆蟲細胞重組桿狀病毒感染的狀況，感染後第三天，*Sf*21 細胞皆表現了紅螢光蛋白 (圖 6-C)，後續將透過西方墨點法與免疫螢光分析來確認封套蛋白 E 以及膜蛋白 prM 的表現。

3.5 vAc-ZIKV-ME 病毒感染昆蟲細胞表現茲卡病毒結構蛋白基因之分析-Western blot 與 IFA

藉由西方墨點法與免疫螢光染色分析茲卡病毒結構蛋白的表現，昆蟲細胞在感染重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 後的第三天 (圖 7-A)，以 RIPA 細胞裂解液收取胞內蛋白，使用抗茲卡 E 結構蛋白抗體

(GTX133314, GeneTex) 可以辨認到預期大小約 55 kDa 的茲卡 E 結構蛋白 (圖 7-B)，使用抗茲卡 PrM 膜蛋白抗體 (GTX133584, GeneTex) 可以辨認到預期大小約 18 kDa 的茲卡 PrM 膜蛋白 (圖 7-C)。感染後第三天的昆蟲細胞，分別使用抗茲卡 E 結構蛋白抗體 (GTX133314, GeneTex) 最後再加入帶有綠螢光染料的二級抗體，皆能辨識到昆蟲細胞上呈現的茲卡重組結構蛋白 E (圖 8-B) 與膜蛋白 M (圖 8-C)。因此我們確認 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 可以成功表現茲卡病毒結構蛋白。

3.6 測試 vAc-ZIKV-ME 是否可用於檢測血清中抗茲卡病毒之 IgG 與 IgM 抗體

疾管署舒博士之實驗室以 IgM-antibodies capture ELISA (Mac-ELISA) 檢驗平台進行實驗，驗證重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 (**vAc-Ph-ZIKV**) 於其披膜上呈現茲卡病毒之結構蛋白的假設 (圖 9)。結果顯示雖可檢測出茲卡病人血清中的 IgM，但效果並不是很好而當以較早期啟動子表現茲卡病毒結構蛋白時，可能是表現量較低的關係則無法明顯的檢測出。

3.7 測試可用於檢測血清中抗茲卡病毒 IgG 與 IgM 之 vAc-ZIKV-ME 之力價範圍

在測試 vAc-ZIKV-ME 是否可用於檢測血清中抗茲卡病毒之 IgG 與 IgM 抗體的實驗中，使用病毒力價為 $1.1x10^7$ pfu/ml 的重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 雖可檢測出茲卡病人血清中的 IgM，但效果不佳，所以要檢測血清中抗茲卡病毒 IgG 與 IgM 之 vAc-ZIKV-ME 的病毒力價要大於 $1.1x10^7$ pfu/ml (圖 9)。

肆. 討論

傳統用於檢疫的病人抗體偵測方法主要為病毒蛋白：可為重組蛋白或自病毒純化或重組之類病毒粒子此方法雖無安全之疑慮但蛋白之純化與生產皆是相當費工與費時的製程因此成本高昂。另一方面，若用完整之病毒粒子則會有安全的疑慮尤其是安全等級 3 以上的病毒於操作上並不適用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等。再則，於大量生產這些具傳染性之病毒液存在一定的安全風險而若要以 UV 或 -射線進行消毒責人有未達 100%減毒的風險，因此本計畫期待能以重組桿狀病毒呈現技術一舉解決生產成本與安全檢測的問題，若能順利開發將會是一重要的檢測方法的突破。

一般而言，桿狀病毒最常用於生產重組之抗原蛋白用於檢測，但以病媒蚊傳播之病毒諸如登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒與日本腦炎病毒等皆為有 envelop 的病毒，因此其可做為檢測用之抗原蛋白皆為膜蛋白如本計畫中所表現的屈公病毒 E1 與 E2 蛋白或茲卡病毒的 PrM 和 E 蛋白等。而桿狀病毒或大腸菌或酵母菌表現系統要大量表現具有 epitope 之抗原會有一定的難度而且膜蛋白的產量通常遠低於胞內蛋白或核蛋白，除有難度外生產的成本也會大大的提高。

本計畫之構想為將屈公病毒 E1 與 E2 蛋白或茲卡病毒的 PrM 和 E 蛋白以桿狀病毒進行表現時會呈現於細胞膜上而當桿狀病毒進行

budding off 時會將其昆蟲細胞膜上的蛋白也呈現在重組桿狀病毒的 envelop 上，因此只要將重組桿狀病毒進行收集即可進行檢測。我們的實驗證明只要以適當的抗體進行檢測時呈現抗原的重組桿狀病毒會是一極佳的標的，此一方法不但安全而且經濟。

伍. 結論與建議

本計畫主要目標為以桿狀病毒呈現系統開發具有生物安全性且成本較低之蟲媒病毒傳染病抗體檢測方法。我們證實以生物安全性之重組桿狀病毒表現屈公病毒表面抗原，可用於屈公病抗體之檢測。而以重組桿狀病毒表現茲卡病毒的結構蛋白也能檢測出感染茲卡病毒之病人的血清中之 IgM 抗體雖期果效未如屈公病抗體之檢測效果。因此我們於今年度的計畫中證實可以桿狀病毒呈現系統發展具安全性又低成本的蟲媒病毒傳染病抗體檢測方法，未來將有希望組合成具有生物安全性之診斷試劑而可適用於各區域醫院進行檢測。本計畫之最終目標是希望以此重組桿狀病毒呈現技術所開發之蟲媒病毒傳染病檢驗試劑可直接應用於機場發燒篩檢、診所、醫院及公衛調查等，進行包括日本腦炎、登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病之檢驗，而目前屈公病毒為安全等級 3 之病毒因此不可能以現有之方法用於機場、診所、或區域醫院進行檢測，因此本計畫所開發之技術將可及早實施防疫工作，對病人實施即時正確的醫療照顧，將可對傳染病的防治工作發揮極大的裨益。

陸. 計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫之目標為發展具有生物安全性與成本競爭力之蟲媒病毒傳染病抗體 ELISA 快速檢測試劑。我們以具有生物安全性之重組桿狀病毒表現屈公病毒和茲卡病毒表面抗原，並證明其具有高靈敏度與專一性的優點。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

推薦參與本計畫之研究人員參加中原大學創新育成中心的創新創業課程，在 9 月初的競賽中獲得第三名，預計於 107 年底會參加下一階段的報告。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

在氣候變遷與交通便捷下，病媒病毒傳染病如登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病等的在台灣很可能會發生共同流行。我們建議應加強進行機場與區域醫院之監測並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行病媒病毒傳染病的監測、檢驗與流行病學研究才能有效的因應可能的公衛風險。

柒、 參考文獻

Belyaev AS, Roy P (1993) Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors： co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. Nucleic Acids Res 21：1219-23.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI (2015) Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerg Infect Dis 21：1885-6.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D (2014) Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerg Infect Dis 20：1085-6.

Chang SF, Yang CF, Hsu TC, Su CL, Lin CC, Shu PY (2016) Laboratory-based surveillance and molecular characterization of dengue viruses in Taiwan, 2014. Am J Trop Med Hyg 94：804-11.

Chen YJ, Chen WS, Wu TY (2005) Development of a bi-cistronic baculovirus expression vector by the Rhopalosiphum padi virus 5' internal ribosome entry site. Biochem Biophys Res Commun 335(2)：616-23.

Wu TY, Wu CY, Chen YJ, Chen CY, Wang CH (2007) The 5’ untranslated region of Perina nuda virus (PnV) possesses a strong internal translation activity in baculovirus-infected insect cells. FEBS Lett 581： 3120-26.

Liu, M.-K., Lin, J.-Z., Jinn, T.-R., Chan, H.-L. & Wu, T.-Y. (2015). Int J Mol Sci. 16, 16053–16066.

Lum, F.M., and Ng, L.F. (2015). Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. Antiviral research 120, 165-174.

Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, Krougliak VA (2001) A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. Gene Ther 8(11)：846-54.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, et al. (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med 360：2536-43.

Huang AS, Shu PY, Yang CH (2016) A new reportable disease is born： Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. J Formos Med Assoc 115：223-5.

Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY (2007) Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005： a molecular epidemiologic study. Am J Trop Med Hyg 77(5)：903-9.

Hu YC, Yao K, Wu TY (2008) Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. Expert Rev Vaccines 7(3)：363-71.

Ikeda M, Hamajima R, Kobayashi M (2015) Baculoviruses： diversity, evolution and manipulation of insects. Entomol Sci 18： 1-20.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nat Biotechnol 23：567-75.

Luckow VA (1991) Cloning and expression of heterologous genes in insect cells

with baculovirus vectors, p. 97-152. In A. Prokop, R.K. Bajpai and C. Ho (Eds.), Recombinant DNA Technology and Applications. McGraw Hill, New York.Luckow VA (1996) Insect cell expression technology, p. 183-218. In J.L. Cleland and C.S Craik (Eds.), Protein Engineering： Principles and Practice. Wiley-Liss, New York.

Maeda S (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. Annu Rev Entomol 34：351-72.

O'Reilly D, Miller L, Luckow V (1992) Baculovirus Expression Vectors： A Laboratory Manual. New York： WH Freeman and Co.

Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis 7：319-27.

Possee RD (1997) Baculovirus as expression vectors. Curr Opin Biotechnol 8：569-72.

Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, Ho MS, Lin TH, Huang JH (2005) Fever screening at airports and imported dengue. Emerg Infect Dis 11：460-2.

Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH (2009) Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007： geographic distribution and genotype shift. Am J Trop Med Hyg 80：1039-46.

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol Cell Biol

3(12)：2156-65.

Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C (2009) Replication cycle of chikungunya： a re-emerging arbovirus. Virol 25;393：183-97.

Sumathy S, Palhan VB, Gopinathan KP (1996) Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. Protein Expr Purif 7(3)：262-8.

van Oers MM, Pijlman GP, Valk JM (2015) Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression： from dark horse to mainstream technology. J Gen Virol 96：6-23.

捌、 圖表

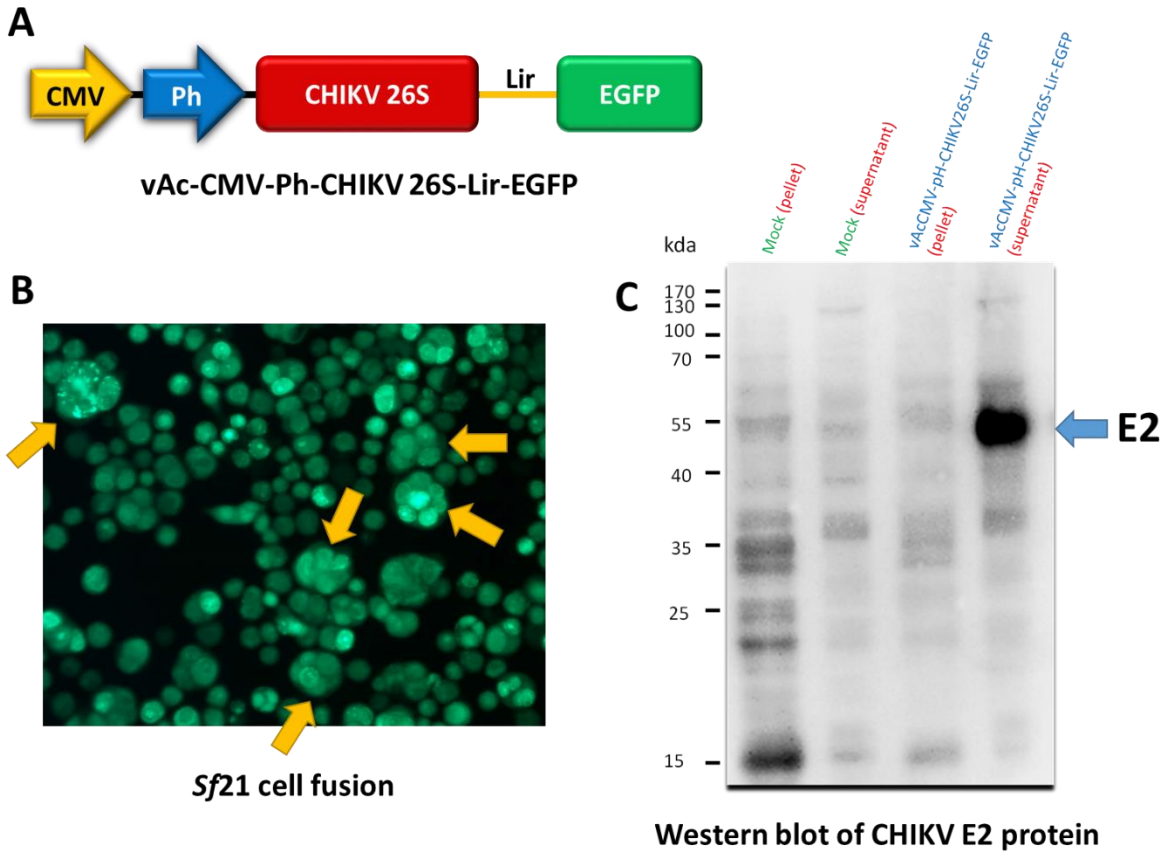


圖 1.呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP

圖 A. 呈現屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 的示意圖。CMV：來自人類巨細胞病毒 (*Cytomegalovirus*) 的啟動子。Ph：*Polyhedron* 啟動子，為昆蟲桿狀病毒的極晚期啟動子。CHIKV 26S：屈公病毒的完整結構蛋白基因。Lir：Lir IRES (Internal ribosome entry

site)。EGFP：綠螢光基因。圖 B. 感染 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 的 *Sf21* 昆蟲細胞，M.O.I = 5，d.p.i = 3 天，scale bar：50 μm。使用疾管局提供的抗屈公病毒結構蛋白抗體 1B1.2.1，稀釋比 1：100，二抗為 Alexa Fluor® 594 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Inc.) ，稀釋比 1：300。圖 C. 使用西方墨點法確認是否表現屈公病毒的結構蛋白，抗體：1B1.2.1，稀釋比 1：1000，二抗為 anti-mouse IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。

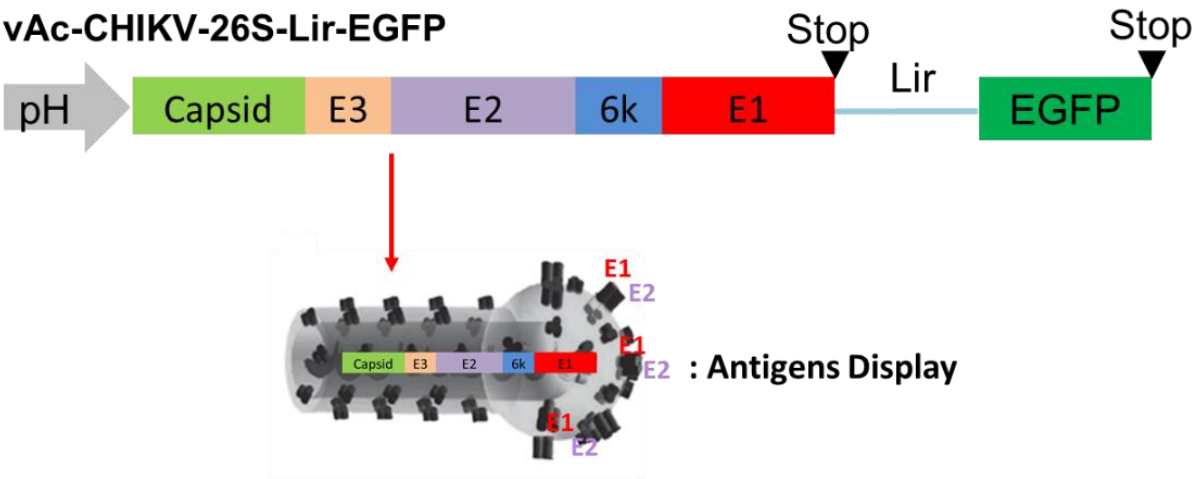


圖 2. 重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 於其披膜上呈現屈公病毒之結構蛋白 E1 與 E2 的示意圖。

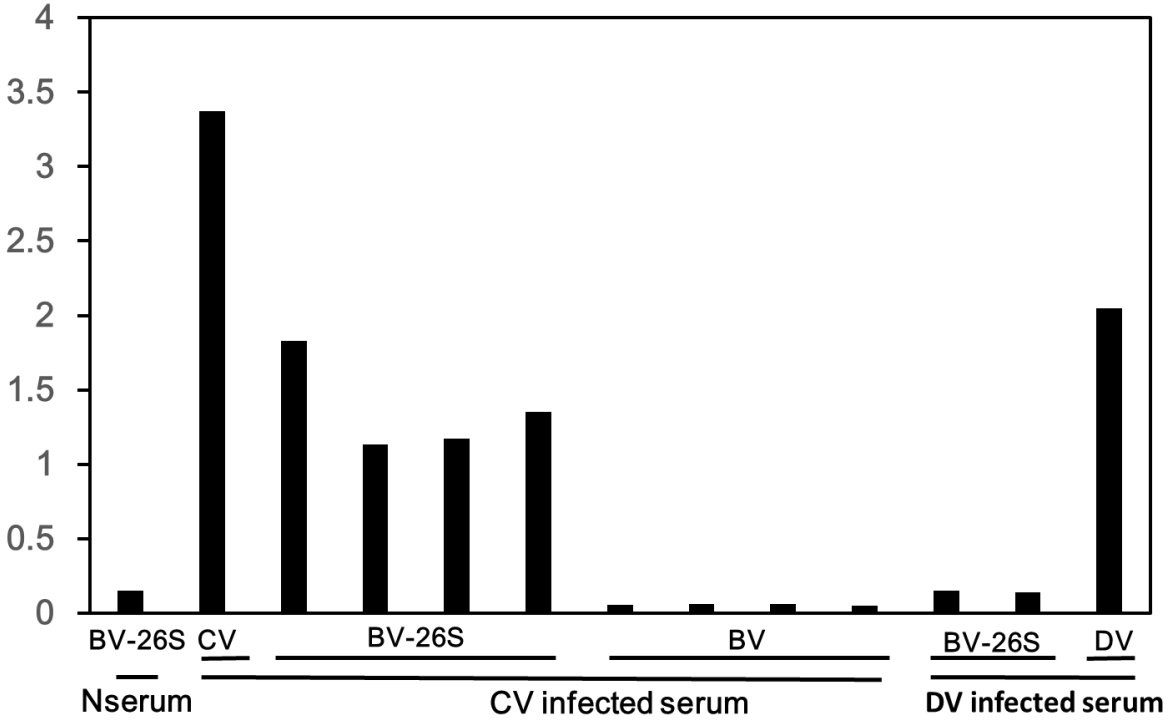


圖 3. 以重組桿狀病毒 vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗。

CV：屈公病毒病毒。DV：登革病毒。Nserum：正常、未受屈公病毒感染之人的血清樣品。CV infected serum：受屈公病毒病毒感染之人的血清樣品。DV infected serum：受登革病毒感染之人的血清樣品。BV：不含屈公病毒結構蛋白之重組桿狀病毒，為控制組。

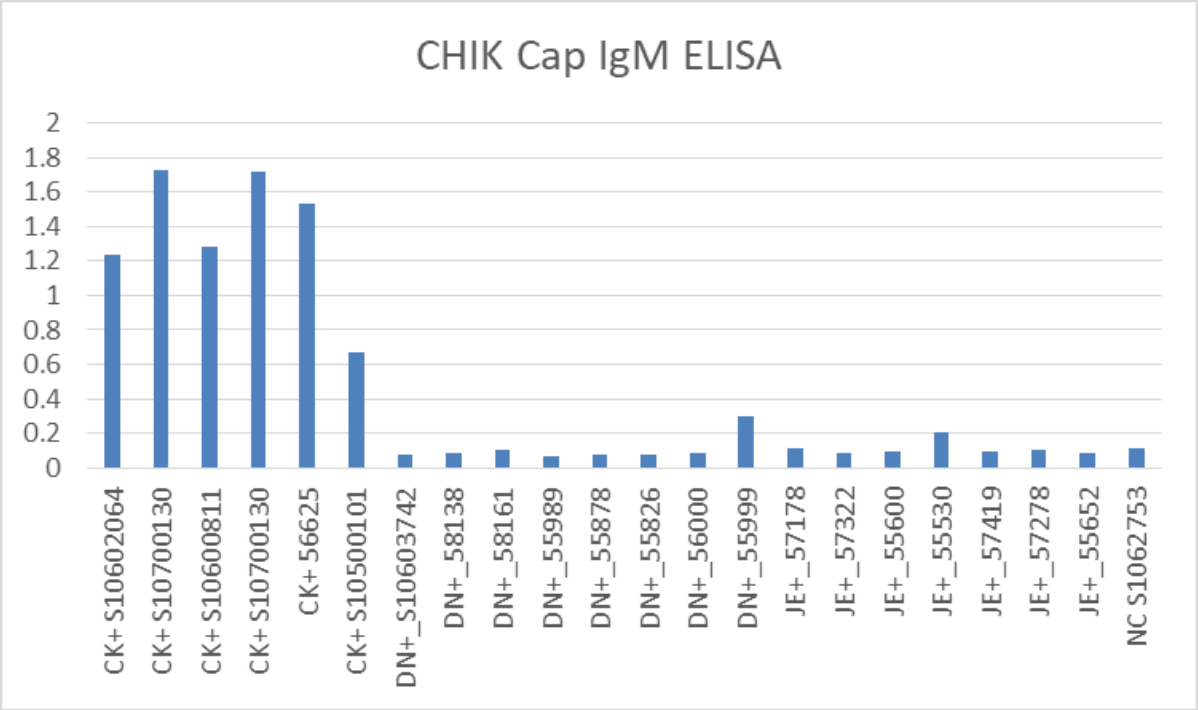


圖 4. vAc-CMV-Ph-CHIKV 26S-Lir-EGFP 取代屈公病毒專一性檢測。

CK+：受屈公病毒感染之人的血清樣品。DN+：受登革病毒感染之人的血清樣品。JE+：受日本腦炎病毒感染之人的血清樣品。

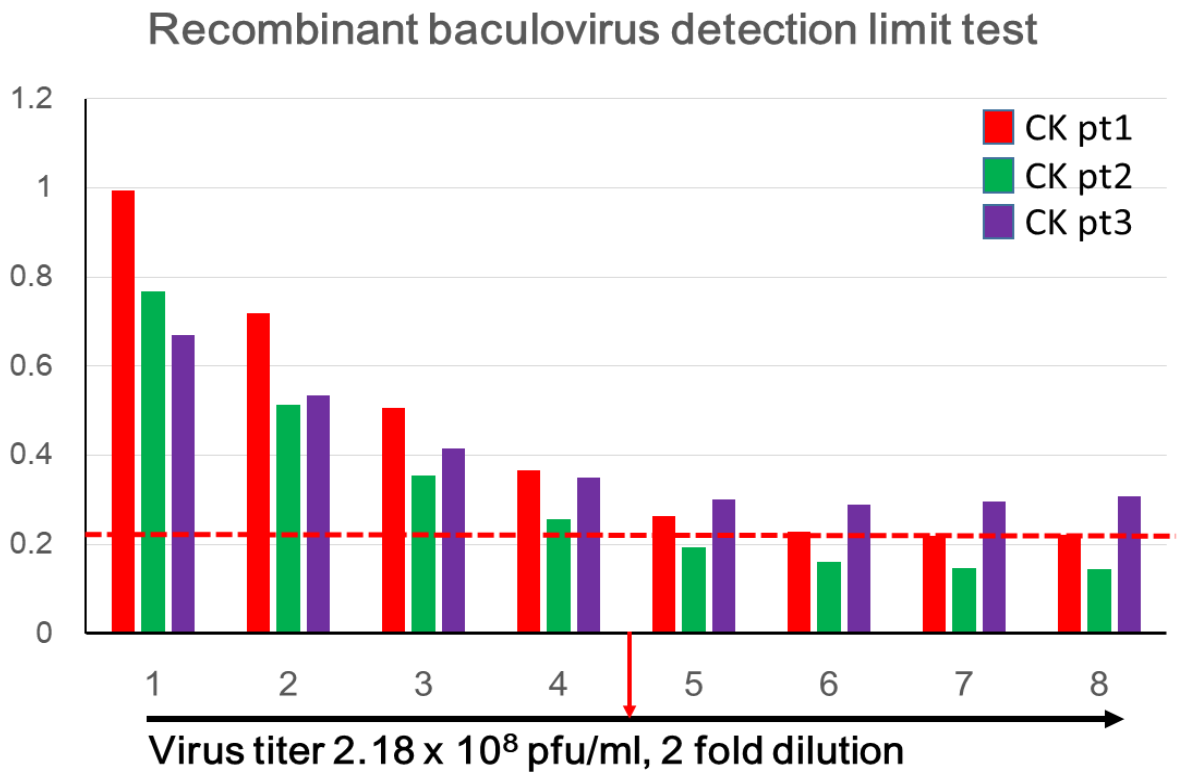


圖 5. 測試可用於檢測血清中抗屈公病毒 IgM 之 vAc-CMV-Ph-CHIKV-26S 之力價範圍

CK pt：受屈公病毒感染之人的血清樣品。

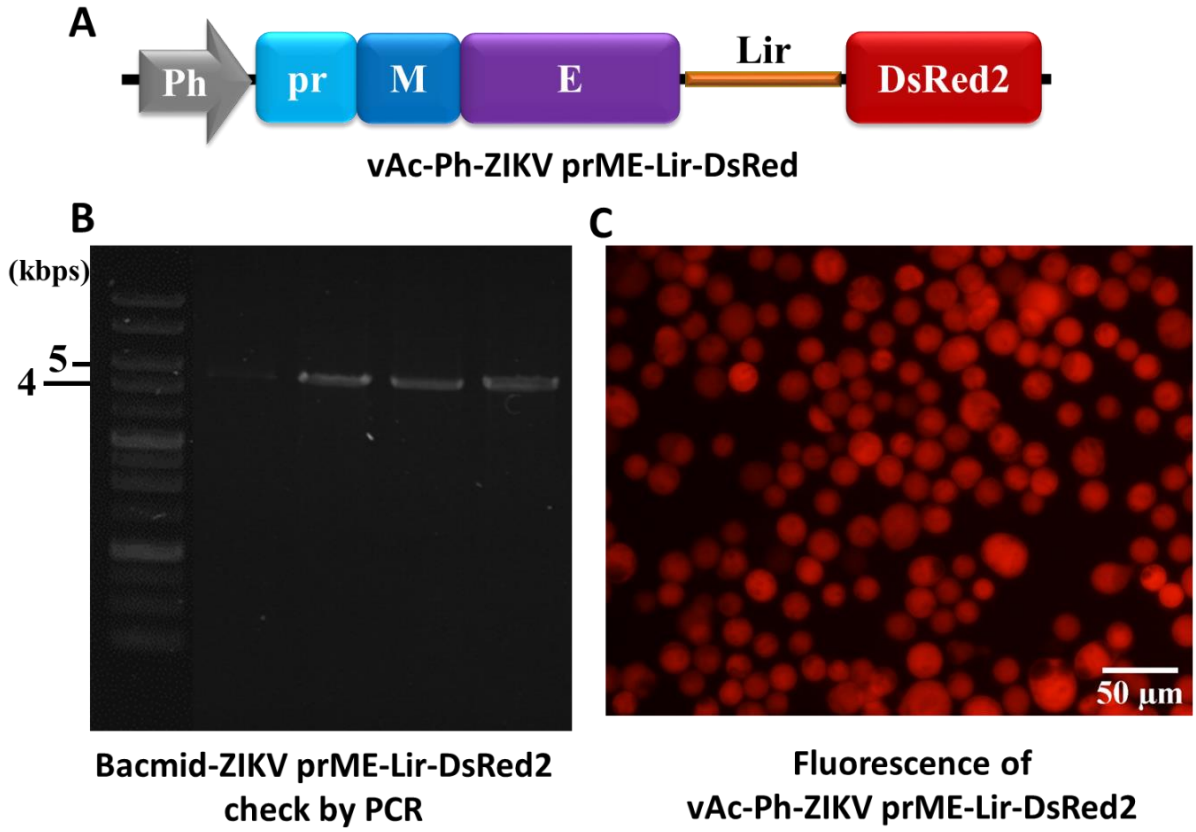


圖 6、製備呈現茲卡病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2

圖 A. 呈現茲卡病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 的示意圖。Ph：*Polyhedron* 啟動子，為昆蟲桿狀病毒的極晚期啟動子。ZIKV prME：茲卡病毒的膜蛋白的前驅物 (pre-membrane protein；prM) 以及封套蛋白 (envelope protein；E) 基因。Lir：Lir IRES (Internal ribosome entry site)。DsRed2：紅螢光基因。圖 B. 利用聚合酶連鎖反應確認病毒質粒，使用的引子如下：

pUC/M13 Forward：5’-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3’ 及 pUC/M13 Reverse：5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3’。

圖 C. 感染了 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 的 *Sf21* 昆蟲細胞， M.O.I = 1，d.p.i = 3 天，scale bar：50 μm。

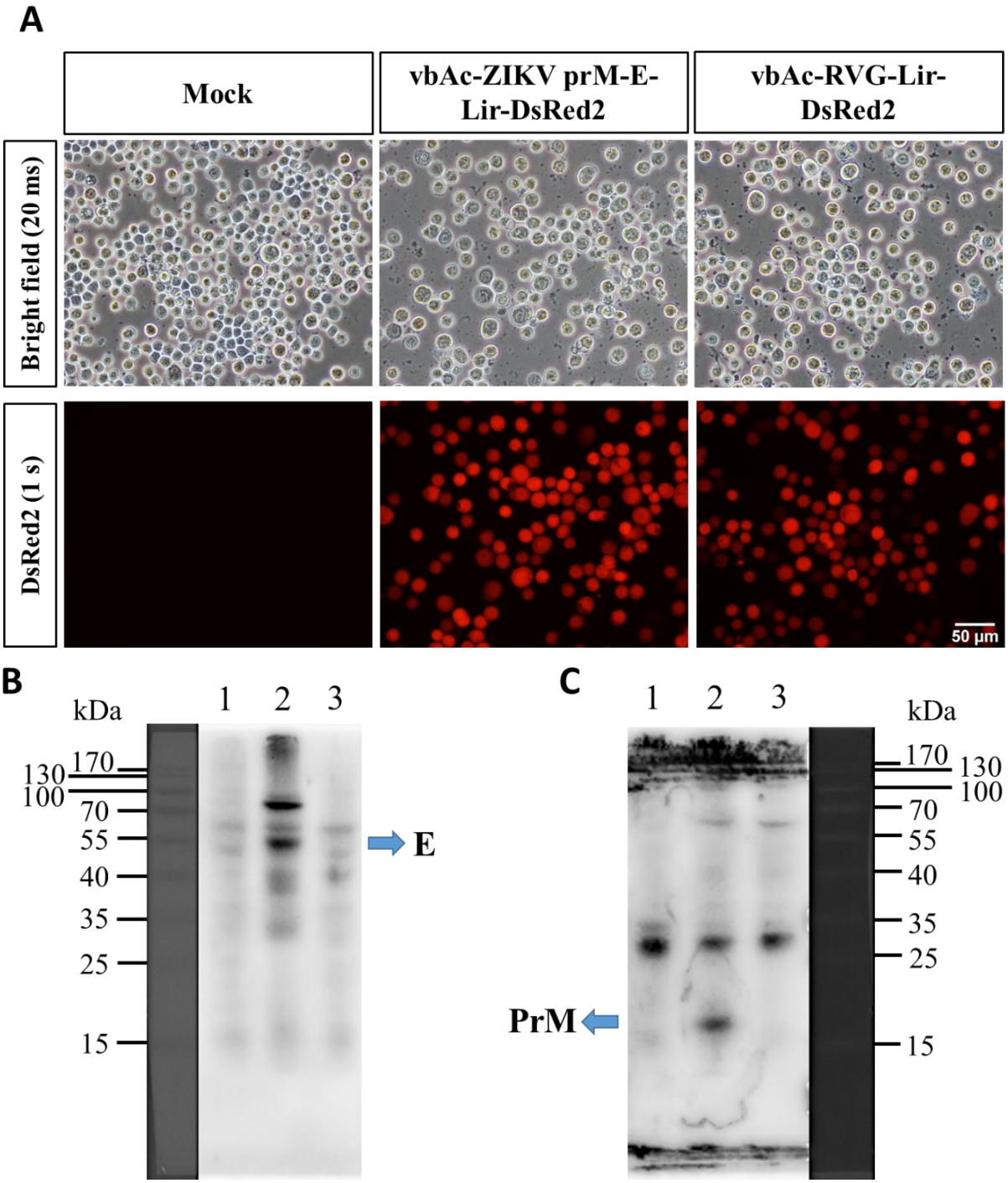
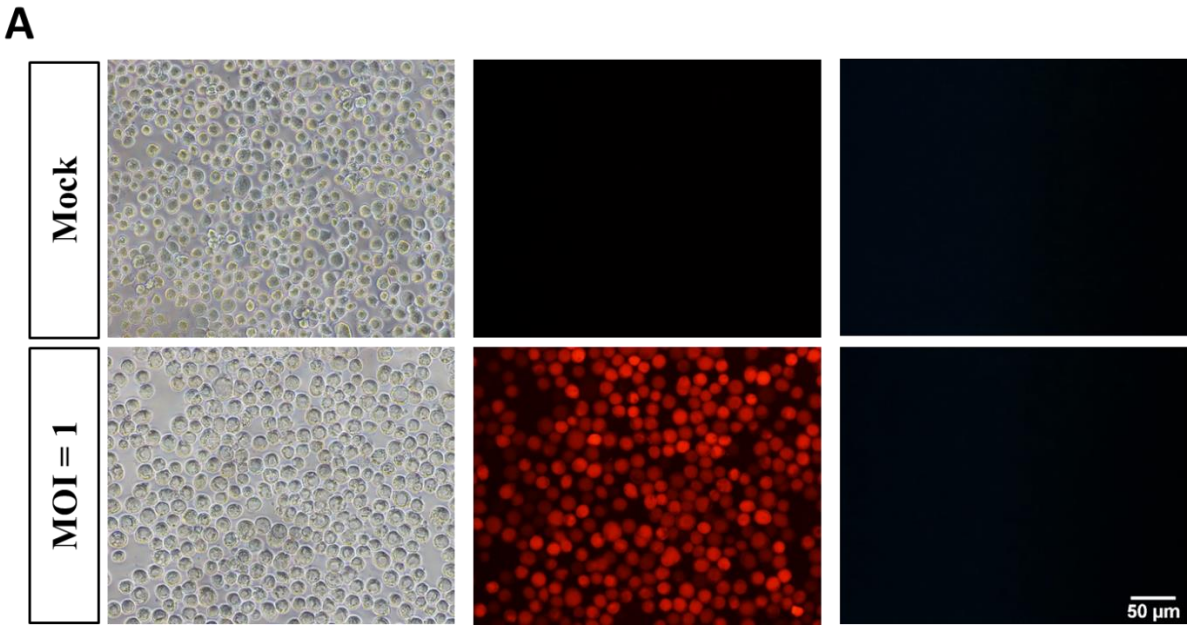


圖 7、以西方墨點法分析茲卡病毒重組結構蛋白的表現

圖 A. 感染了 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 的 *Sf21* 昆蟲細胞，M.O.I =

0.1， d.p.i = 3 天，scale bar：50 μm，白光曝光時間 (Bright field)：20 msec，紅螢光蛋白曝光時間 (DsRed2)：1 sec。圖 B. 使用西方墨點法確認是否表現茲卡病毒的結構蛋白 E，抗體：anti-ZIKV Envelope (GTX133314, GeneTex)，稀釋比 1：4000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。圖 C. 使用西方墨點法確認是否表現茲卡病毒的膜蛋白 PrM，抗體：anti-ZIKV PrM (GTX133584, GeneTex)，稀釋比 1：1000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。Lane 1：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組 Lane2：感染了重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 的組別，Lane3：感染了重組桿狀病毒 vAc-RVG-Lir-DsRed2 的組別，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。



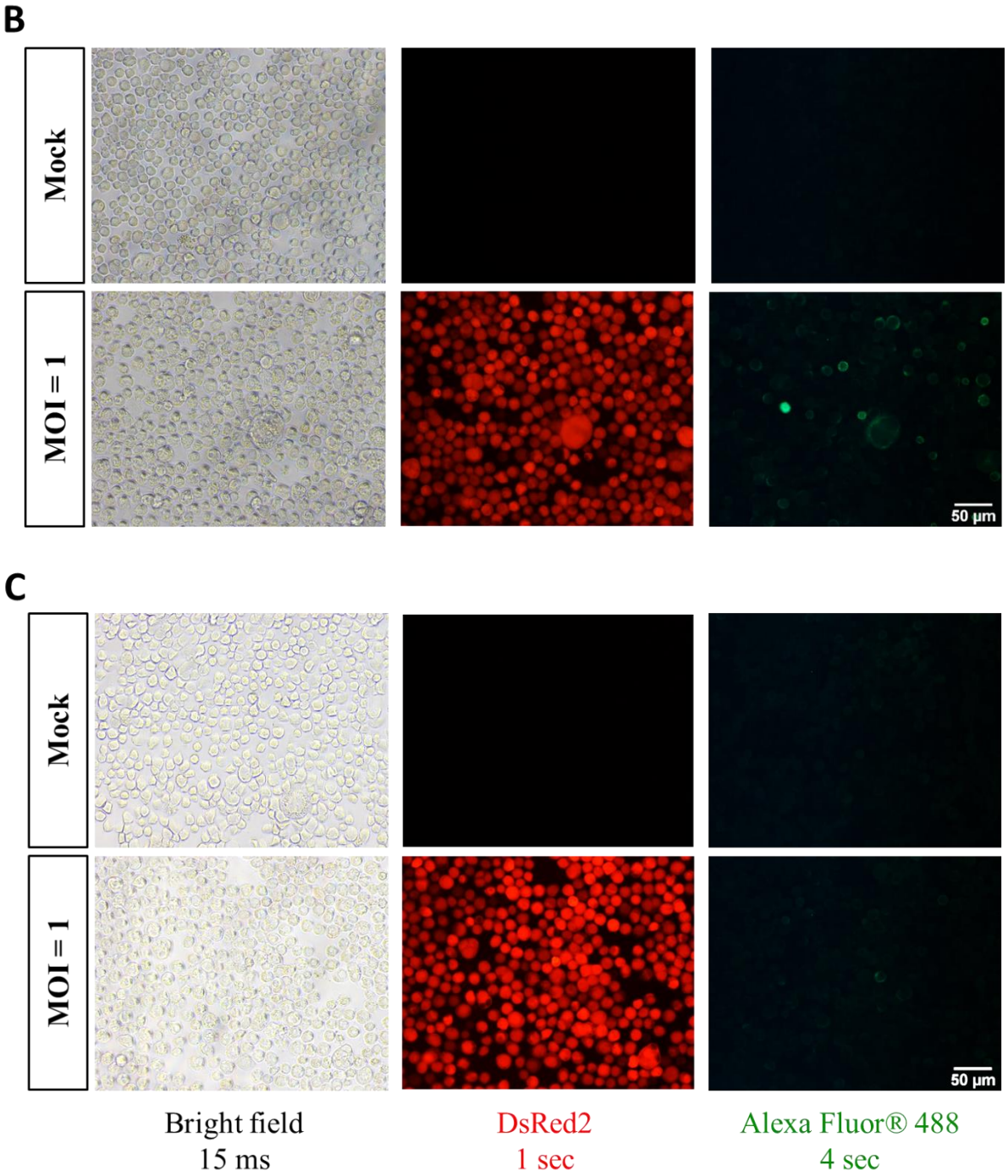


圖 8、以免疫螢光分析茲卡病毒重組結構蛋白的表現

重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV prME-Lir-DsRed2 以 M.O.I = 1 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第 3 天進行實驗。圖 A. 使用 PBS 取代一

級抗體進行測試的控制組。圖 B. 使用抗茲卡 E 結構蛋白抗體 (GTX133314, GeneTex) 確認茲卡病毒的結構蛋白 E 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1：500。圖 C. 使用抗茲卡 PrM 膜蛋白抗體 (GTX133305, GeneTex) 確認茲卡病毒的膜蛋白 PrM 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1：250。二抗皆為 anti-rabbit Alexa Fluor ® 488-conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1：300，scale bar：50 μm，白光 (Bright field) 曝光時間：15 msec，紅螢光蛋白 (DsRed2) 曝光時間：1 sec，綠螢光染料 (Alexa Fluor ® 488) 曝光時間：4 sec。

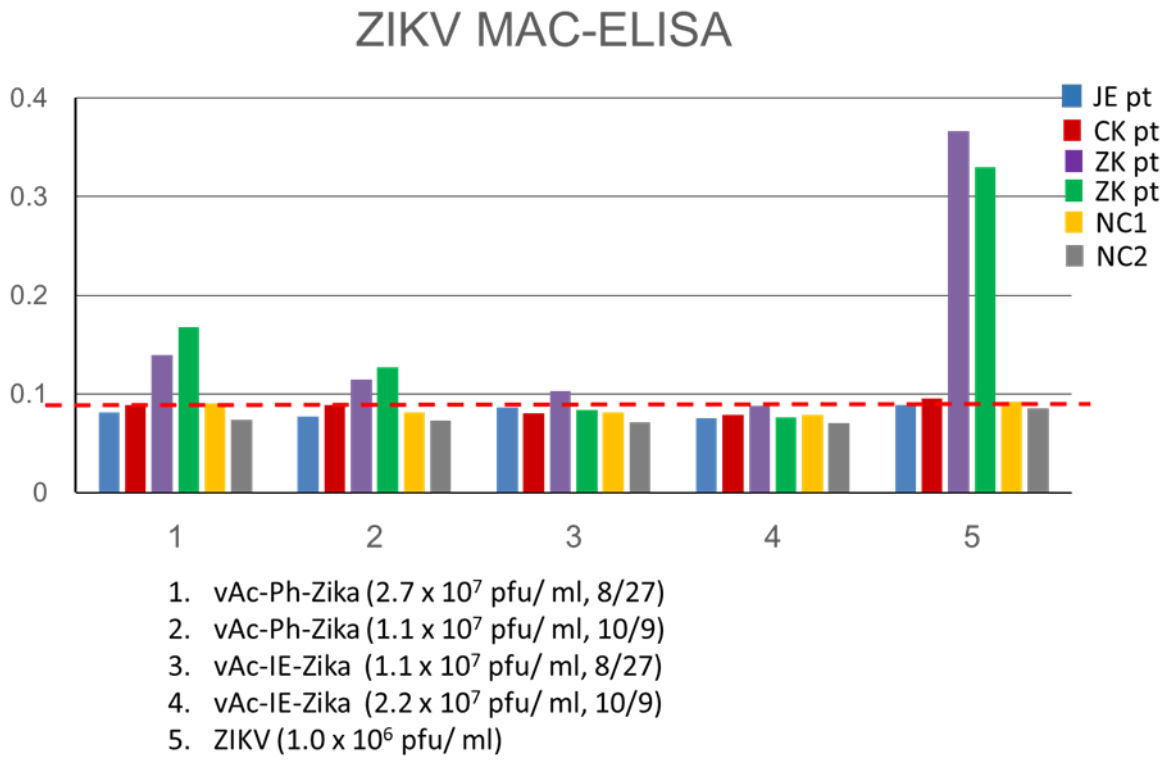


圖 9、以重組桿狀病毒 vAc-Ph-ZIKV 和 vAc-IE-ZIKV 取代茲卡病毒所進行的 Mac-ELISA 檢驗。

JE pt：受日本腦炎病毒感染之人的血清樣品。CK pt：受屈公病毒感染之人的血清樣品。ZK pt：受茲卡病毒感染之人的血清樣品。NC：正常、未受蟲媒病毒感染之人的血清樣品。vAc-Ph-Zika：為呈現茲卡病毒結構蛋白之重組桿狀病毒，使用桿狀病毒的極晚期啟動子。vAc-IE-Zika：為呈現茲卡病毒結構蛋白之重組桿狀病毒，使用桿狀病毒的早期啟動子。

玖、　期末經費使用狀況		
項　目	本年度核定金額	支　用　狀　況
計畫主持人	120,000	6~11 月人事費共支出 70,000，餘額 0。
助理薪資	606,000	6~11 月人事費共支出 340,589，餘額 87,487。
臨時工資	84,000	6~11 月臨時工資支出 36,050，餘額 14,420。
一般事務費	40,000	6~11 月一般事務費支出 7,704，餘額 32,031。
材料費	450,000	6~11 月材料費支出 201,559，餘額 132,275。
國內旅費	10,000	6~11 月國內旅費支出 4,704，餘額 4,260。
其他	10,000	6~11 月其他支出 6,099，餘額 3,901。
管理費	180,000	6~11 月其他支出 0，餘額 180,000。

拾、　　衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

107 年計畫重要研究成果及具體建議

（本資料須另附 1 份於成果報告中）

計畫名稱：__以重組桿狀病毒表現系統開發蟲媒病毒傳染病診斷試劑之研究__

主 持 人：__吳宗遠_ 計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-113502

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫之目標為發展具有生物安全性與成本競爭力之蟲媒病毒傳染病抗體 ELISA 快速檢測試劑。我們以具有生物安全性之重組桿狀病毒表現屈公病毒和茲卡病毒表面抗原，並證明其具有高靈敏度與專一性的優點。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

推薦參與本計畫之研究人員參加中原大學創新育成中心的創新創業課程，在 9 月初的競賽中獲得第三名，預計於 107 年底會參加下一階段的報告。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

在氣候變遷與交通便捷下，病媒病毒傳染病如登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病等的在台灣很可能會發生共同流行。我們建議應加強進行機場與區域醫院之監測並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行病媒病毒傳染病的監測、檢驗與流行病學研究才能有效的因應可能的公衛風險。

拾壹、　　衛生福利部疾病管制署 107 年科技研究計畫

期末審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-113502

計畫名稱：以重組桿狀病毒表現系統開發蟲媒病毒傳染病診斷試劑之研究

計畫主持人: 吳宗遠

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	計畫執行內容與進度相符。	謝謝委員肯定	14、30
2	由於使用具有生物安全性之重組桿狀病毒表現蟲媒病毒表面抗原，因而具有生物安全性及高靈度的優點，開發成功可有效提升相關能量與應用，目前已有初步成果。	謝謝委員意見，我們會嘗試在這 3 年內測試合適的抗體與重組桿狀病毒目前的結果顯示可以重組桿狀病毒取代屈公病毒但茲卡病毒則尚待改進。	
3	與 MOHW107-CDC-C315-113512 計畫具高度整合性建議可整體一起報告不需分成兩個報告。	謝謝委員意見，我們會在下年度整合 MOHW107-CDC-C315-113512 計畫與 MOHW107-CDC-C-114-113502 計畫進行整體報告。	
4	兩株單株抗體 Kd:0.5~1x10^{8}M 顯示 affinity 仍偏低，可以再好一點;1B1 也具有 PRNT 活性;敏感度為 6x10^{6}?	我們以 ELISA 方式進行單株抗體與重組桿狀病毒的結合活性測得 Kd:0.5~1x10^{-8}M。我們推測可能是因重組桿狀病毒並非純化之抗原因此含有許多的 non-specific binding sites，而這些 non-specific binding sites 通常皆是 low affinity 且具有高 Bmax，因此以 Scatchard plot 進行分析時會降低	

		真正的結合活性。而以目前的分析顯示 1B1 單株抗體可以進行 CHIKV 之 MAC ELISA 的檢測同時在稀釋 1:1000 倍時仍具 PRNT 活性。因此 1B1 單株抗體可以用在以重組桿狀病毒的檢測上。	
5	相關定量方式後續建議可提前規劃。	已進行最低力價之測定約 6.8 x 10^6 pfu/ml 與 4℃下最少可保存 3 個月。	
6	測登革熱時是用 structure protein，為何 Zika 要 preM 及 envelope protein?	在本計畫的研究顯示若僅表現屈公病毒的單一結構蛋白如 E1 或 E2 蛋白病無法以重組桿狀病毒進行檢測，因此我們推測如以重組桿狀病毒作為”pseudotype virus“ 進行檢測時需以表現完整的結構蛋白，因此再進行 Zika virus 的檢測時我們同時表現 preM 及 envelope protein。	
7	要符合 LDT 標準。	謝謝委員意見，「實驗室發展出來的檢驗」（lab-developed test, LDT）相關之法規是未來要推廣此檢驗技術必須符合的標準。依當代法規醫療月刊(呂雅情, RegMed 2018, VOL 88, p. 13-25)所進行的分析所示，因本計畫所欲發展之蚊媒病毒檢驗試劑屬於新興傳染病之 LDT，在台灣預期可能是屬於免除上事前審查之項目，推測因本技術除不會對對病患造成傷害外，於操作上為廣泛使用且操作容易並自動化的 ELISA 檢驗，而且檢驗之結果易於判讀，因此應可符合 LDT 標準，我們會在未來的計劃中注意 LDT 相關法規之公告並注意是否符合衛福部有關之規定。	