

計畫編號：MOHW109-CDC-C-114-133403

衛生福利部疾病管制署 109 年委託科技研究計畫

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

執行單位：中原大學生物科技學系

計畫主持人：吳宗遠

研究人員：陳俊中

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 壹佰肆拾壹 萬 伍 仟元整

## 目錄

頁碼

封面

中文摘要 (3)

英文摘要 (4)

本文

(1) 前言 (5-6)

(2) 材料與方法 (7-9)

(3) 結果 (10-13)

(4) 討論 (14-15)

(5) 結論與建議 (16)

(6) 計畫重要研究成果及具體建議 (17)

(7) 參考文獻 (18-22)

圖次

表次

共 (22)頁

## 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)、日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus)、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。本計畫將製備與生產可以呈現日本腦炎病毒之結構蛋白的重組桿狀病毒，並以感染者之血清進行 MAC-ELISA 測試，證實表現日本腦炎病毒的重組桿狀病毒可以具專一性的進行日本腦炎病毒感染者 IgM 抗體的檢測。取代具生物危險性之日本腦炎病毒，開發安全簡易的血清抗體檢測試劑套組。

**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), Japanese Encephalitis Virus (JEV), 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 world and emerged as new challenge. Due to population growth 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 Japanese encephalitis virus (JEV). The MAC-ELISA test was performed with the serum of infected person to confirm that the baculoviruses expressing JEV structure protein can specifically to detected the IgM antibody from JEV infection person. To replace the biologically dangerous JEV, develop safe and simple serum antibody detection reagents kit.

**Keyword :** arboviruses; recombinant baculoviruses; serum antibody detection reagents

## 前言

日本腦炎病毒的媒介主要為節肢動物，如埃及斑蚊與白線斑蚊等，在自然界會感染人類、豬、牛與狗等哺乳動物，另外禽類如雞、鳥類等亦會受感染，而當蚊子叮咬已感染日本腦炎病毒的動物後，再叮咬人類便會將病毒注入人體引起感染，而在感染後易產生腦膜炎症狀，其發病率約為 0.1%，但死亡率則高達 10-25%，且存活者約有 25%將產生智力障礙等後遺症，因此其在台灣被列為第三類傳染病，為蟲媒病毒所造成之傳染病之一，流行於每年 5-10 月，高峰則落於 6-7 月，同屈公病及茲卡為新興並具威脅的蟲媒病毒傳染病。在屈公病及登革熱方面則被歸類為第二類法定傳染病，另外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。

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)、日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus)、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。

在這些病毒均有可能對台灣造成嚴重的威脅及爆發流行且多數蚊媒病毒皆沒有疫苗也暫無臨床上可以進行治療的抗病毒藥物的情況下，本計畫主要目標以重組桿狀病毒分別表現日本腦炎、登革、茲卡及屈公病毒的結構蛋白，因登革、茲卡、屈公病毒及日本腦炎等的結構蛋白皆為膜蛋白因此應可呈現於重組蛋白之表面而成為在外膜結構上相似於日本腦炎、登革、茲卡及屈公病毒的”假病毒”，而可以取代具危險性的日本腦炎、登革、茲卡及屈公病毒的”真病毒”作為開發以 ELISA 及免疫色層分析法為基礎的日本腦炎、登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病抗體快速檢測試劑。由於重組桿狀病毒具有生物安全性及易於製作與保存的優點，將易於開發成為商業化檢驗試劑。本計畫的最終目標是將此建立於重組桿狀病毒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，並開發出可用於日本腦炎檢驗之試劑與屈公、茲卡何登革病毒檢驗之套組。

## 材料與方法

### (一) Sf21 昆蟲細胞 (Spodoptera frugiperda 21 cell line)

秋行軍蟲卵巢細胞所分化出來的細胞株，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 小時進行增生，培養基為 TNMFH (Gibco)加 10 %胎牛血清 (fetal calf serum; FCS)，培養環境為 27 °C 恆溫，不需額外注入 CO<sub>2</sub>，此細胞和同為秋行軍蟲卵巢細胞分化出來的 Sf9 cell line 皆常被用於桿狀病毒表現系統中。

### (二) 免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay ; IFA)

將 Sf21 昆蟲細胞分至 24 well plate 中 ( $2 \times 10^5$  cells/well)，以 M.O.I=1 的 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 桿狀病毒量來感染 Sf21 昆蟲細胞，在病毒感染後第 3 天時以螢光顯微鏡觀察感染情形，確認完每顆細胞都被病毒感染後將病毒液移除，並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗一次，潤洗完後加入 350  $\mu$ l 的 4% formaldehyde 進行固定 (固定條件為室溫下 15 分鐘)，待 15 分鐘後，移除 4% formaldehyde，並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350  $\mu$ l，濃度為 5 % 的 BSA 進行 blocking (blocking 的條件為在室溫中一小時)，一小時後將 blocking Buffer 移除並加入 350  $\mu$ l 以 1:500 稀釋比例所調配的一抗 (1°Ab)，接著置於 4 °C 冰箱過夜 (overnight)，隔日移除一抗並以 500  $\mu$ l 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 350  $\mu$ l 以 1:250

稀釋比例所調配的二抗 (2°Ab)，接著置於室溫並避光作用一小時，一小時後移除二抗並以 500 µl 的 PBS 潤洗 3 次，潤洗完後移除 PBS 並加入 mounting Buffer 以利於後續在螢光顯微鏡下觀察與保存。

### (三) 西方墨點法 (western blotting)

取 25 µg 的蛋白質樣品與 sample buffer 在 100 °C 乾浴槽中煮 6 分鐘，將樣品置入 SDS-PAGE 的 well 中，於蛋白質電泳裝置 (Bio-Rad) 先以 70 V 進行電泳約半小時後再以 120 V 進行電泳 1.5 小時，在電泳結束後於 transfer buffer 中將 SDS-PAGE 所分離的蛋白質以 0.34 安培約 2 小時轉漬到 PVDF 轉漬膜上。轉漬完成後的 PVDF 膜以含有 7 % 脫脂奶粉的 Tris-buffered saline buffer (TBS : 100 mM Tris, pH = 7.4、100 mM NaCl 與 0.1 % Tween-20) 在室溫中進行 blocking 作用一小時。一小時後將 blocking buffer 移除並加入以 TTBS 稀釋，稀釋比例為 1:5000 的一抗 (1°Ab) 在 4 °C 冰箱過夜 (overnight)。隔天以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。然後移除 TTBS 並加入稀釋比例為 1:5000 的二抗 (2°Ab ; anti-rabbit HRP antibody) 於室溫下輕輕搖晃作用一小時。接著再以 TTBS buffer 輕輕搖晃潤洗 PVDF 膜 3 次 (每次 10 分鐘)。最後進行 PVDF 膜化學冷光呈色後再上機 (Fusion-SOLO 冷光系統暗箱設備)。



#### **(四) IgM-antibodies capture ELISA (Mac-ELISA)**

將血清以 1:100 比例稀釋後加入 coating 含 anti human IgM 的 96 well ELISA 盤並於 37 度 C 作用 30 分鐘。作用三十分鐘後再分別加入帶有各病媒蚊結構蛋白基因的重組桿狀病毒作為抗原 (另外以日本腦炎病毒、茲卡病毒與屈公病毒等真病毒作為控制組比較)於 37 度 C 作用 30 分鐘，作用三十分鐘後加入帶有 AP 的抗體 (D56.3 或 1B1 等) 於 37 度 C 作用 30 分鐘，反應 30 分鐘後最後加入 PNPP 並於 37 度 C 作用 10-90 分鐘。作用完畢後進行吸光直之偵測並統計。

## 結果

### (一) 分離與純化呈現日本腦炎病毒結構蛋白之重組桿狀病毒

我們利用核糖體內轉譯子(internal ribosome entry site, IRES) 共表現標的蛋白(targeting protein) 與螢光蛋白(fluorescent protein) 於重組桿狀病毒分離與純化。圖 1-A 為可表現日本腦炎病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 的示意圖。我們以核糖體內轉譯子 Rhir 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(Sf21) 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 中我們也觀察到當日本腦炎病毒結構蛋白表現時所造成的 Sf21 細胞融合現象。

### (二) 呈現重組桿狀病毒感染昆蟲細胞表現日本腦炎病毒結構蛋白基因之分析-IFA 與 Western blot

藉由西方墨點法來分析日本腦炎病毒結構蛋白的表現，昆蟲細胞在感染重組桿狀病毒 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 後的第三天，以 CytoBuster 細胞裂解液收取胞內蛋白，分別使用抗日本腦炎 E 結構蛋白抗體 (GTX125867, GeneTex)、疾管局所提供之 D56-3 抗 Flavivirus 抗體與抗日本腦炎 PrM 結構蛋白抗體 (GTX131833, GeneTex)來進行驗證，結果發

現抗日本腦炎 E 結構蛋白抗體 (GTX125867, GeneTex)與疾管局所提供之抗 Flavivirus 抗體 (D56-3, CDC)分別皆可辨認到符合預期大小約 55 kDa 的日本腦炎 E 結構蛋白 (如圖 2 與圖 3 所示)。而在使用抗日本腦炎 PrM 結構蛋白抗體 (GTX131833, GeneTex)上亦可發現可辨認到符合預期大小約 19 kDa 的日本腦炎 PrM 結構蛋白 (如圖 4 所示),由此我們可以確認有成功完整的表現日本腦炎病毒結構蛋白。另外利用 IFA 分析日本腦炎病毒結構蛋白的表現, 昆蟲細胞在感染重組桿狀病毒 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 後的第三天分別使用抗日本腦炎 E 結構蛋白抗體 (GTX125867, GeneTex)、疾管局所提供之 D56-3 抗 Flavivirus 抗體與抗日本腦炎 PrM 結構蛋白抗體 (GTX131833, GeneTex)來進行 IFA 試驗, 結果在使用抗日本腦炎 E 結構蛋白抗體 (GTX125867, GeneTex)與疾管局所提供之抗 Flavivirus 抗體 (D56-3, CDC) 最後再分別加入帶有紅螢光染料的二級抗體 (Alexa Fluor 594-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG) 或 (Alexa Fluor 594-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG)後結果顯示在感染 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 桿狀病毒後的昆蟲細胞上皆能辨識到其所呈現的日本腦炎病毒結構蛋白 (如圖 5 與圖 6 所示)。而當使用抗日本腦炎 PrM 結構蛋白抗體 (GTX131833, GeneTex) 來進行 IFA 分析時,發現此抗體是辨認不到我們所呈現的日本腦炎病毒結構蛋白 PrM (如圖 7 所示), 因此

在這邊我們推論兩點可能：1. GTX131833 這支抗體所能辨認的是蛋白質 denature from 的位點，因而在 western blot 的結果上可辨認到 PrM 蛋白然而在 IFA 結果上則辨認不到 PrM 或 2. 日本腦炎病毒結構蛋白 E 在細胞上的表現量遠多於日本腦炎病毒結構蛋白 PrM 的表現量，因此使用 GTX131833 這支抗體做 IFA 時所呈現的紅螢光極弱。綜合以上結果，我們證實 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 能夠成功的呈現日本腦炎結構蛋白。

### (三) 測試表現日本腦炎病毒結構蛋白基因之桿狀病毒是否可用於檢測病人血清中抗日本腦炎病毒之 IgM 抗體

我們將重組桿狀病毒 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 製備放大完成後提供給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 (如圖 8 所示)，結果顯示其可用於檢測病人血清中抗日本腦炎病毒之 IgM 抗體，且其中一株標示(2017/12)的 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 桿狀病毒其對血清偵測反應效果甚至高於 Japanese encephalitis virus 真病毒，因此我們利用上述血清偵測反應效果較佳的 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 桿狀病毒病毒株再來做更大規模的樣品測試，並再次驗證 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 桿狀病毒可用於檢測受日本腦炎病毒感染的病人血清中的抗體 (如圖 9 所示)。綜合以上的結果，我們確立重組桿狀病毒 **vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP** 可成功提供作為取代

Japanese encephalitis virus 來做為血清診斷之使用。

#### (四) 重組桿狀病毒 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 應用於血清抗體診斷試劑套組之可行性分析

我們預計市售之診斷用血清抗體ELISA Kit所需品項：Anti-human IgM 或Anti-human IgG Coated Microwells、Japanese encephalitis virus antigens (Recombinant)、Wash Buffer (20x)、Sample Diluent、Antigen Diluent、HRP or AP Conjugated Monoclonal Antibody Tracer、TMB Chromogen (TMB)、Positive Control、Calibrator、Negative Control與Stop solution等試劑 (如圖10所示)，我們可事先將anti-Human IgM或anti-Human IgG抗體coating至Microwells上製作成Anti-human IgM Coated Microwells或Anti-human IgG Coated Microwells供隨時使用。另外以我們所製作的重組桿狀病毒vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP (Recombinant)作為Antigens使用。HRP或AP Conjugated Monoclonal Antibody Tracer則可以使用疾管局所提供之單株抗體 (如D56.3-AP)。Calibrator、Positive control與Negative control為人類的血清，Wash Buffer (20x)、Sample Diluent、Antigen Diluent、TMB Chromogen (TMB)與Stop solution等我們可依照配方自行配製，如將以上試劑備妥，利用重組桿狀病毒來呈現病媒蚊結構蛋白並製作成血清抗體檢測試劑套組的可行性甚高。

## 討論

傳統用於檢疫病人血清中抗體的偵測方法主要為病毒蛋白：其可為重組蛋白或自病毒純化或重組之類病毒粒子等，此方法雖無安全之疑慮，但蛋白之純化與生產皆是非常費工與費時的製程，因此成本高昂。另一方面，若用完整之病毒粒子則會有安全上的疑慮，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  $\gamma$  射線進行消毒則會有未達 100% 滅毒的風險，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 之病毒，因此其可做為檢測用之抗原蛋白皆為膜蛋白，本計畫將表現日本腦炎病毒 PrM 和 E 蛋白等，當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，此法可避免桿狀病毒或大腸桿菌或酵母菌表現系統要大量表現具有 epitope 之抗原時的難度並降低生產所需之成本。

本計畫利用桿狀病毒表現日本腦炎病毒 PrM 與 E 重組結構蛋白，在對單一蛋白偵測上能皆能以專一性之抗體證實其存在，並且在病人血清陽性反應之測試上亦有不錯之效果，因此其顯示將日本腦炎病毒結構蛋白呈現於重組桿狀病毒上表現能夠成功的取代日本腦炎病毒來做為檢測試劑用，進而可使操作檢驗人員免於一些不必要之感染風險。

## 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呈現日本腦炎病毒表面抗原，可應用於抗體之檢測上，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。



## **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。我們證實以具有生物安全性之重組桿狀病毒表現日本腦炎病毒結構蛋白於桿狀病毒表面將可直接取代日本腦炎病毒用於血清抗體之檢測上，未來將以呈現日本腦炎結構蛋白之桿狀病毒進行開發血清抗體檢測之套組。

### **2. 計畫對民眾具教育宣導之成果**

本計畫之研究人員於中原大學生物科技系所開之蛋白質表現系統課程中介紹桿狀病毒表現系統之創新應用。

### **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。

## 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.
- Chang YH, Chiao DJ, Hsu YL, Lin CC, Wu HL, Shu PY, Chang SF, Chang JH, Kuo SC (2020) Mosquito Cell-Derived Japanese Encephalitis Virus-Like Particles Induce Specific Humoral and Cellular Immune Responses in Mice. *Viruses* 12 (3).
- 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.

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 (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.

Iswardy E, Tsai TC, Cheng IF, Ho TC, Perng GC, Chang HC (2017) A bead-based immunofluorescence-assay on a microfluidic dielectrophoresis platform for rapid dengue virus detection. *Biosens Bioelectron* 95 : 174-80.

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

- Liu MK, Lin JZ, Jinn TR, Chan HL, Wu TY (2015) Identification of Rhopalosiphum Padi Virus 5' Untranslated Region Sequences Required for Cryptic Promoter Activity and Internal Ribosome Entry. *Int J Mol Sci* 16 : 16053-66.
- Lu CY, Hour MJ, Wang CY, Huang SH, Mu WX, Chang YC, Lin CW (2017) Single-Round Infectious Particle Antiviral Screening Assays for the Japanese Encephalitis Virus. *Viruses* 9 (4).
- 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.
- Lum FM, Ng LF (2015) Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res* 120 : 165-74.
- Maeda S (1989) Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 34 : 351-72.
- Nath B, Vandna, Saini HM, Prasad M, Kumar S (2020) Evaluation of Japanese encephalitis virus E and NS1 proteins immunogenicity using a recombinant Newcastle disease virus in mice. *Vaccine* 38 (7) : 1860-68.
- 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 arbovirolosis. *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. *Virology* 393 (2) : 183-97.
- Su CL, Yang CF, Teng HJ, Lu LC, Lin C, Tsai KH, Chen YY, Chen LY, Chang SF, Shu PY (2012) Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes in Taiwan during 2005–2012. *PLoS Negl Trop Dis* 8 (10).
- 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.

Tham HW, Balasubramaniam VR, Chew MF, Ahmad H, Hassan SS (2015) Protein-protein interactions between *A. aegypti* midgut and dengue virus 2: two-hybrid screens using the midgut cDNA library. *J Infect Dev Ctries* 9 (12) : 1338-49.

Utomo DIS, Hirono I, Kato T, Park EY (2019) Formation of Virus-Like Particles of the Dengue Virus Serotype 2 Expressed in Silkworm Larvae. *Mol Biotechnol* 61 (11) : 852-9.

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.

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.

## 圖次

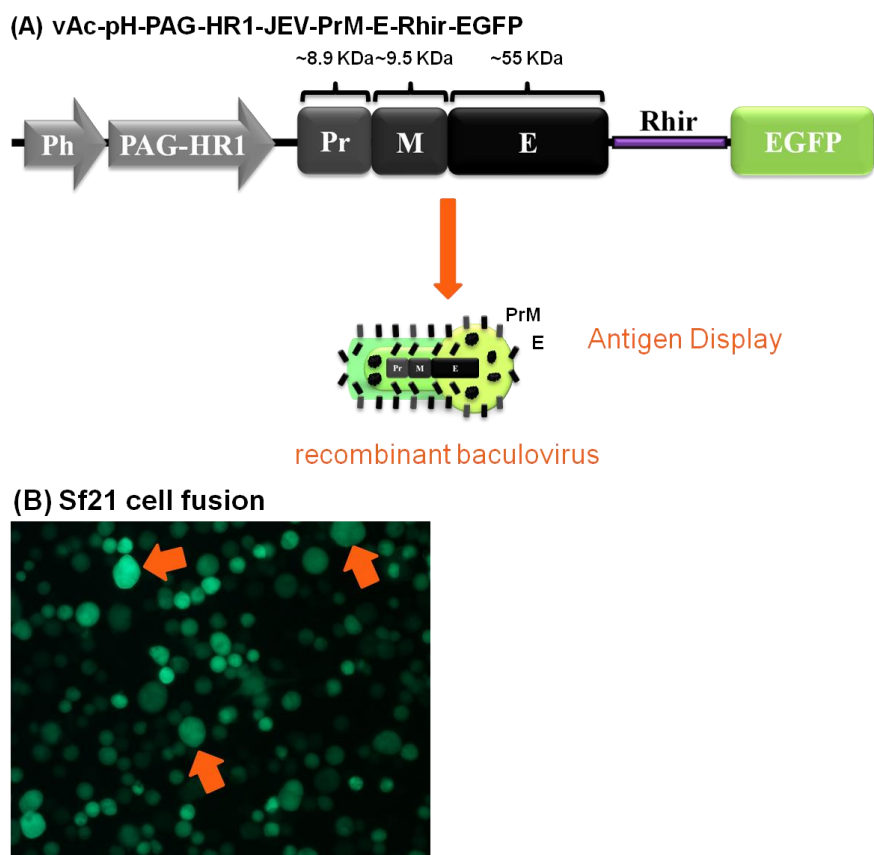


圖 1. 呈現日本腦炎病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP。圖 A. 呈現日本腦炎病毒結構蛋白之重組桿狀病毒 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 的示意圖。Ph：Polyhedron 啟動子，為昆蟲桿狀病毒的極晚期啟動子。PrM：日本腦炎病毒的結構蛋白 PrM 基因。E：日本腦炎病毒的結構蛋白 E 基因。Rhir：RhPV IRES (Internal ribosome entry site)。EGFP：綠螢光基因。圖 B. 感染 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 的 Sf21 昆蟲細胞，M.O.I = 2，d.p.i = 3 天，放大倍率：200 X。

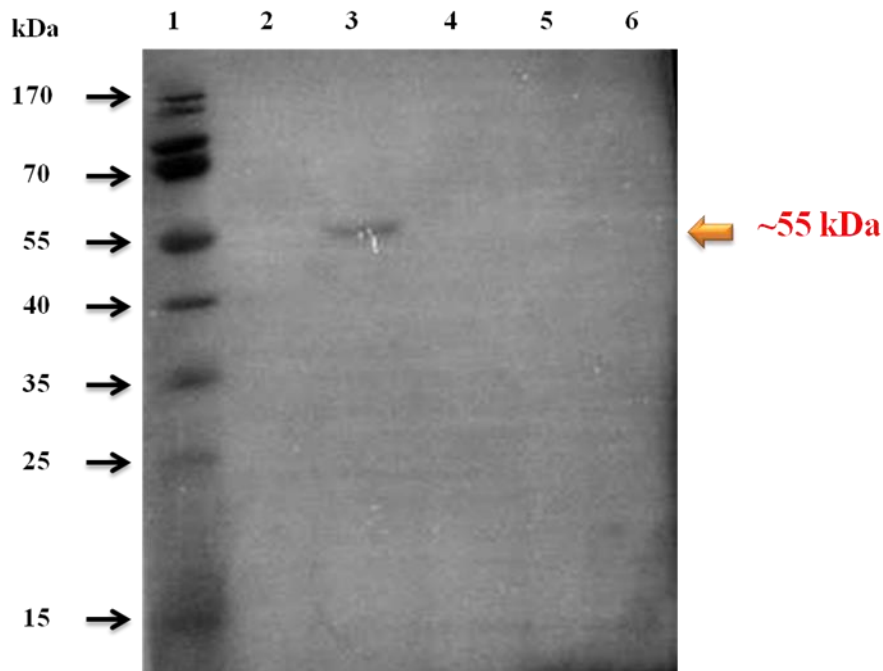


圖 2. 以西方墨點法分析日本腦炎病毒重組結構蛋白 E 的表現

利用西方墨點法來確認是否表現日本腦炎病毒的 E 結構蛋白，抗體：anti-JEV Envelope (GTX125867, GeneTex)，稀釋比 1：5000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。Lane 1：Protein Marker，Lane 2：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組，Lane 3：**vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP**，Lane 4：**vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP**、Lane 5：**vbAc-pH-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2** 與 Lane 6：**vbAc-pH-Zika virus -PrM-E-Lir-DsRed2**，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。



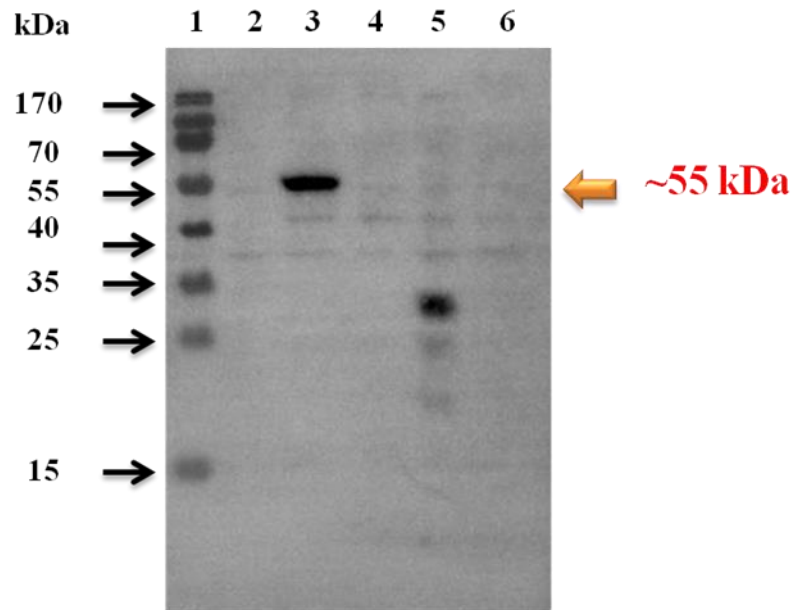


圖 3. 以西方墨點法分析日本腦炎病毒重組結構蛋白的表現

利用西方墨點法來確認是否表現日本腦炎病毒的結構蛋白，抗體：anti-Flavivirus (D56-3, CDC)，稀釋比 1：1000，二抗為 anti-mouse IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。 Lane 1：Protein Marker，Lane 2：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組，Lane 3：**vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP**，Lane 4：vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP、Lane 5：vbAc-pH-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2 與 Lane 6：vbAc-pH-Zika virus -PrM-E-Lir-DsRed2，作為重組桿狀病毒表現蛋白的控制組。

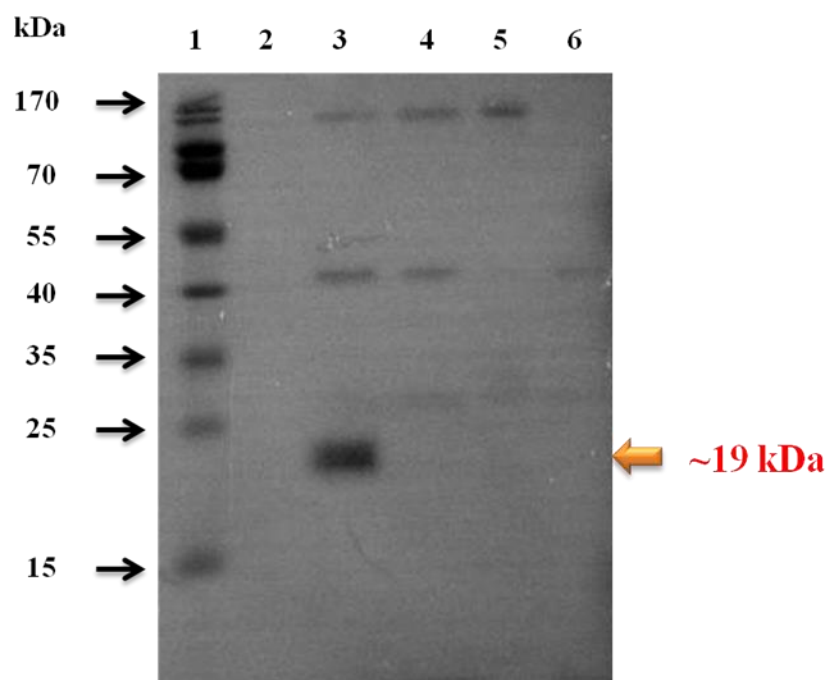


圖 4. 以西方墨點法分析日本腦炎病毒重組結構蛋白 PrM 的表現

利用西方墨點法來確認是否表現日本腦炎病毒的 PrM 結構蛋白，抗體：anti-JEV PrM (GTX131833, GeneTex)，稀釋比 1：5000，二抗為 anti-rabbit IgG HRP 抗體 (Sigma-Aldrich)，稀釋比 1：5000。 Lane 1：Protein Marker，Lane 2：Mock 組，作為昆蟲細胞蛋白的控制組，Lane 3：**vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP**，Lane 4：**vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP**、Lane 5：**vbAc-pH-Dengue virus 2-PrM-E-Lir-DsRed2** 與 Lane 6：**vbAc-pH-Zika virus -PrM-E-Lir-DsRed2**，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。

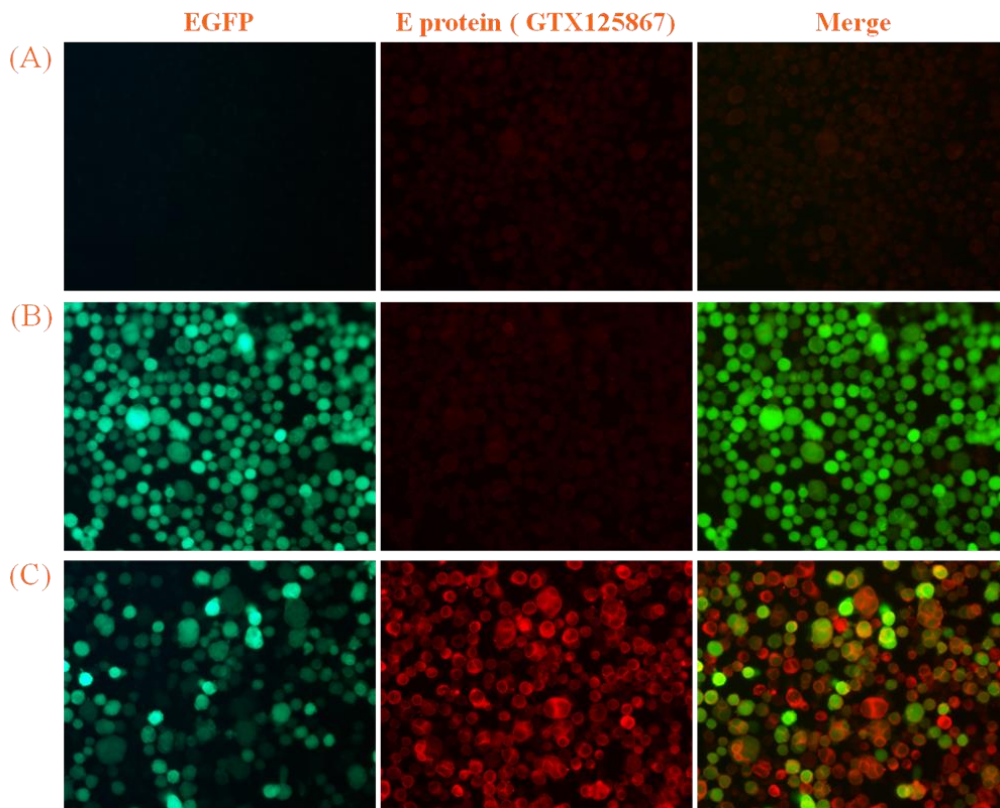


圖 5. 以免疫螢光分析日本腦炎病毒重組結構蛋白 E 的表現 (GTX125867) 重組桿狀病毒以 M.O.I = 1 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第 3 天進行實驗。圖 A. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 B. 為感染 vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP 之昆蟲細胞，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。圖 C. 為感染 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 之昆蟲細胞。使用抗日本腦炎病毒 E 結構蛋白抗體 (GTX125867, GeneTex) 來確認日本腦炎病毒的結構蛋白 E 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1 : 250。二抗為 anti-rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup> 594- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1 : 250，放大倍率：200X，綠螢光蛋白 (EGFP) 曝光時間：3 s，紅螢光染料 (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594) 曝光時間：1s。

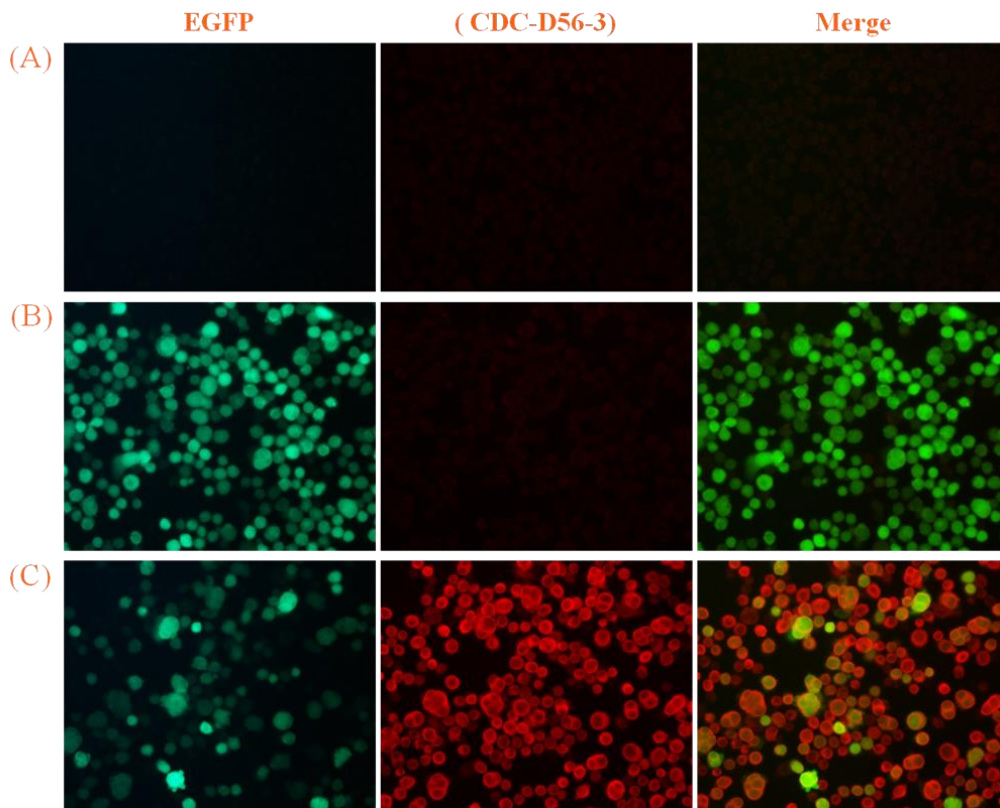


圖 6. 以免疫螢光分析日本腦炎病毒重組結構蛋白的表現 (D56-3, CDC) 重組桿狀病毒以 M.O.I = 1 的病毒量感染 *Sf21* 昆蟲細胞，感染後第 3 天進行實驗。圖 A. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 B. 為感染 vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP 之昆蟲細胞，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。圖 C. 為感染 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 之昆蟲細胞。使用抗 Flavivirus 結構蛋白抗體 (D56-3, CDC) 來確認日本腦炎病毒的結構蛋白 E 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1 : 100。二抗為 anti-mouse Alexa Fluor® 594- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1 : 250，放大倍率：200X，綠螢光蛋白 (EGFP) 曝光時間：3 s，紅螢光染料 (Alexa Fluor® 594) 曝光時間：1s。

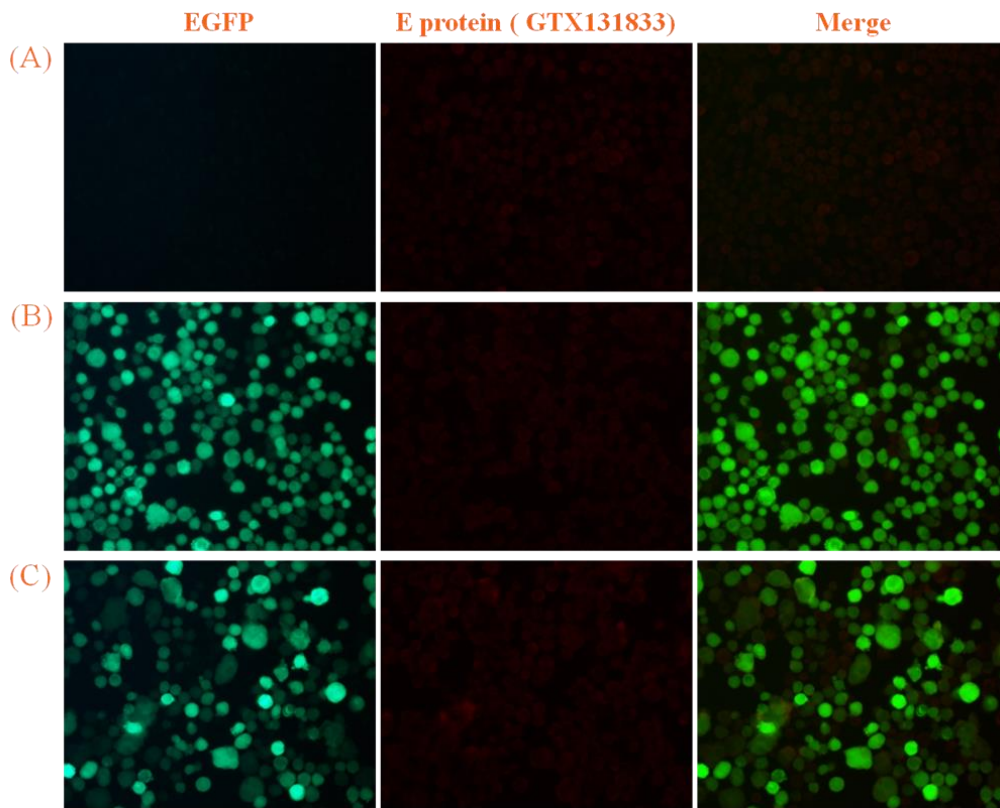


圖 7. 以免疫螢光分析日本腦炎病毒重組結構蛋白 E 的表現 (GTX131833)

重組桿狀病毒以 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. 為未感染之昆蟲細胞，作為細胞蛋白的控制組。圖 B. 為感染 vAc-CMV-pH-CHIKV26S-Lir-EGFP 之昆蟲細胞，作為重組桿狀病毒蛋白的控制組。圖 C. 為感染 vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 之昆蟲細胞。使用抗日本腦炎病毒 PrM 結構蛋白抗體 (GTX131833, GeneTex) 來確認日本腦炎病毒的結構蛋白 PrM 是否表現於受感染的昆蟲細胞表面，稀釋比 1 : 250。二抗為 anti-rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup> 594- conjugated (Jackson ImmunoResearch Inc.)，稀釋比 1 : 250，放大倍率：200X，綠螢光蛋白 (EGFP) 曝光時間：3 s，紅螢光染料 (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594) 曝光時間：1s。

### JEV Capture IgM ELISA

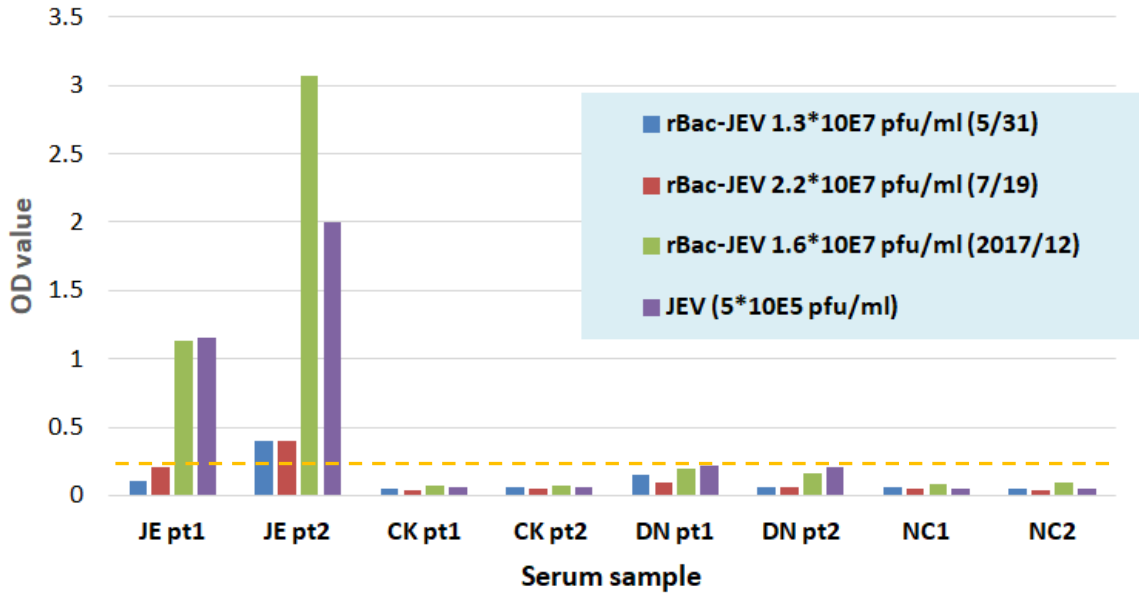
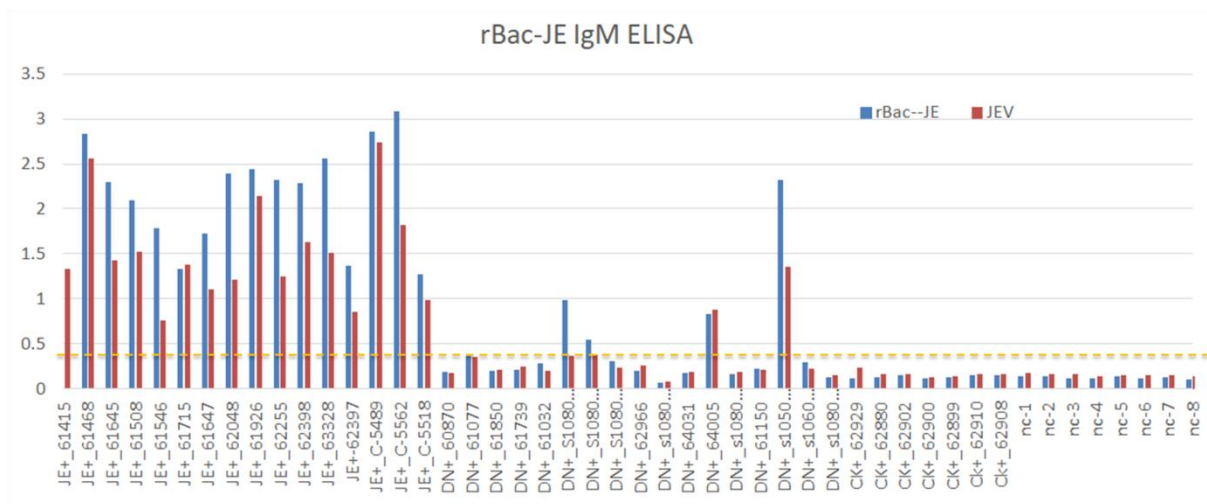


圖 8. 以 vAc-pH-PAG-HR1-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 取代日本腦炎病毒所進行的 Mac-ELISA 專一性檢測。JE pt：受日本腦炎病毒感染之人的血清樣品。CK pt：受屈公病毒感染之人的血清樣品。DN pt：受登革病毒感染之人的血清樣品。NC：正常、未受蟲媒病毒感染之人的血清樣品。



**圖 9. 以 vAc-pH-PAG-HR1-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP 取代日本腦炎病毒所進行的 Mac-ELISA 專一性檢測。JE+：受日本腦炎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。CK+：受屈公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。**

<b>Contents of the test kit:</b>		
<b>Component</b>	<b>Colour</b>	<b>Format</b>
<b>1. Anti-human IgM or IgG Coated Microwells</b> Microwells are coated with anti-human IgM or IgG antibodies. Ready for use.		12 x 8 wells
<b>2. Recombinant Baculovirus (vAc-pH-JEV-PrM-E-Rhir-EGFP) antigen</b> Concentrated baculovirus display JEV structure protein antigens. Unused diluted antigen must be discarded. Concentrated antigen is stable at 2-8°C until expiry.	One <b>Clear-capped vial</b>	5-10 mL
<b>3. Calibrator</b> Human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.	One <b>Orange-capped vial</b>	600 µL
<b>4. Positive control</b> Human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.	One <b>Black-capped vial</b>	200 µL
<b>5. Negative control</b> Human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.	One <b>White-capped vial</b>	200 µL
<b>6. D56.3-AP Conjugated Monoclonal Antibody Tracer</b> Ready for use. alkaline phosphatase conjugated monoclonal antibody tracer with preservative (0.1% Proclin™) and protein stabilisers. Stable at 2-8°C until expiry.	One bottle ( <b>Yellow</b> )	7 mL
<b>7. Sample Diluent</b> Ready for use. Tris buffered saline (pH 7.2-7.6) with preservatives (0.1% Proclin™) and additives. Stable at 2-8°C until expiry.	Two bottles ( <b>Pink</b> )	50 mL
<b>8. Antigen Diluent</b> Ready for use. Phosphate Buffer containing preservatives (0.1% Proclin™ and 0.005% gentamycin). Stable at 2-8°C until expiry.	One bottle ( <b>Clear</b> )	50 mL
<b>9. Wash Buffer (20x)</b> 20x concentrate of phosphate buffered saline (pH 7.2-7.6) with Tween 20 and preservative (0.1% Proclin™). Crystallisation may occur at low temperatures. To correct, incubate at 37°C until clear. Mix well. Dilute one part Wash Buffer with 19 parts of distilled water. Diluted buffer may be stored for one week at 2-25°C.	One bottle	60 mL
<b>10. p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP)</b> Ready for use. A non-proteinaceous, non-specific substrate. Stable at -20°C until expiry.	One bottle	15 mL
<b>11. Stop solution</b> Ready for use. 1M Phosphoric acid. Stable at 2-25°C until expiry.	One <b>Red-capped bottle</b>	15 mL

**圖 10. 參考 Panbio 廠牌所設計之 Japanese encephalitis virus IgM or IgG CAPTURE ELISA Kit**



**衛生福利部疾病管制署 109 年科技研究計畫  
期末審查意見回復**

計畫編號：MOHW109-CDC-C-114-133403

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	以重組桿狀病毒平台表現病原體抗原，可以分泌方式表現，容易純化；而且用於快速診斷，已有 capture-ELISA 的原型試用於屈公及日本腦炎。	以重組桿狀病毒平台表現病原體抗原，將抗原呈現於重組桿狀病毒並藉由病毒釋放分泌,甚至不須純化即可應用於快速診斷上。	
2	研究目的與報告內容清晰，與進度相符。	謝謝委員肯定。	

備註:請將此表單附在期末報告後方,如有修正期末報告內容請註明頁碼,並務必至 GRB 系統完成資料抽換。