

「行政院衛生署八十七年度科技研究發展計畫」

成果報告書

計畫編號： DOH87-TD-1002

計畫名稱： 以免疫聚合酵素連鎖反應研發一種快速靈敏之日本  
腦炎診斷法

執行機構： 國防醫學院預防醫學研究所

計畫主持人： 林宜玲

研究人員： 林宜玲、陳政潔、陳立光

執行期限： 八十六年七月一日至八十七年六月三十日止

## 目 錄：

目 錄	p. 2
插圖目錄	p. 3
中文摘要	p. 4
英文摘要	p. 5
本文	
前言	p. 6-10
材料與方法	p. 11-14
結果	p. 15-16
參考文獻	p. 17-19
插圖	p. 20-27

## 插圖目錄：

圖一	p. 20
圖二	p. 21
圖三	p. 22
圖四	p. 23
圖五	p. 24
圖六	p. 25
圖七	p. 26
圖八	p. 27

## 中文摘要：

日本腦炎在台灣地區之流行雖經疫苗注射而大量減少，但每年仍有數十個確定的病歷。目前對日本腦炎診斷的方法是靠病毒分離及血清學陽轉來鑑定。日本腦炎病毒之分離是出名的困難，原因是在中樞神經系統之外血清中的病毒很少，而且只在發病的初期中可分離到。另外，病毒對溫度敏感，標本必須保存於-70°C，病毒才不會被破壞，所以造成過去三十年來台灣沒有從病人標本中分離出日本腦炎病毒的記錄。血清中抗體的陽轉則通常要等發病後幾個星期，比較發病前後的血清抗體濃度，才會有確定的結果。因此，如何能快速準確的診斷日本腦炎病例，應為衛生醫療科技發展之當務之急。本計畫以免疫聚合酵素連鎖反應(Immuno-PCR)，結合抗體抗原反應之專一性與聚合酵素連鎖反應之靈敏性原理，發展出一種對日本腦炎快速準確而且靈敏的診斷方法。第一年的初步結果已顯示 Immuno-PCR 確實可以用來偵測黃質病毒抗原的存在，而其靈敏度也大於 RT-PCR 和 ELISA 等其它的方法。但是我們也發現了目前所採用的方法，其步驟過於繁瑣容易產生偽陽性並不適用於一般實驗室診斷用。所以我們進一步改良現階段的方法，主要的策略是先將抗體與 DNA 以化學的方法直接結合在一起，而不採用藉由 biotin/avidin 結合的方式，那將可省去相當多的步驟而達到實用的價值。目前的結果顯示抗體可以與 DNA 直接結合在一起，而用在 Immuno-PCR 來偵測日本腦炎病毒，然而目前的方法仍然有偽陽性的問題，為提高專一性的考量下也犧牲了部份的敏感性，因此目前只可偵測到 100 PFU 的病毒量，仍有待改善以達到快速診斷、早期治療以及防範疫情擴大之成效。

## 英文摘要：

Case numbers of Japanese encephalitis (JE) in Taiwan area have been greatly reduced since the universal administration of vaccine; however there have still been several confirm cases every year. Diagnosis of JE is mainly dependent on the sero-conversion or/and virus isolation. Isolation of JE virus (JEV) has been extremely difficult since the amounts of the virus found in patient sera were very low and the virus was only detectable during the acute phase of the disease. Furthermore, JEV is sensitive to temperature and the specimens have to be stored under  $-70^{\circ}\text{C}$  to maintain the viral infectivity. All of these reasons mentioned above have resulted in that no JEV has been isolated from the patients during the past 40 years in Taiwan. Therefore, development of a quick and sensitive method for JEV detection will greatly facilitate the JE diagnosis. In this project, we combined the specificity of antigen-antibody reaction and the sensitivity of polymerase chain reaction to develop an Immuno-PCR method for detection of JEV infection. During the first year of this project, we have established an Immuno-PCR system and found that Immuno-PCR is much more sensitive than ELISA and RT-PCR. However, the current protocol involved many steps of washing and easily resulted in false positive. In the second year of the project, we have established new approach of Immuno-PCR to cut-down the tedious washing procedure. Instead of biotin/avidin binding method, antibody was conjugated with reporter DNA directly. By this simplified Immuno-PCR method, as low as 100 PFU of JEV could be detected. Further experiments will be required to improve the sensitivity and specificity of Immuno-PCR for JEV infection.

## 前言：

黃質病毒 (Flavivirus) 為一種小而具有外套膜 (envelope) 的動物病毒，約38~50 nm，經由節肢動物 (arthropod-borne) 作為媒介 (vector)。此病毒對於人類以及多種其他動物均為一重要的致病原 (Shope *et al.*, 1980; Monath *et al.*, 1986)。黃質病毒依其抗原複合體 (antigenic complex) 的不同至少包括68個成員 (Calisher *et al.*, 1989)。帶有一單股線狀核糖核酸 (linear single-strand positive-sense RNA)、3'端無poly A結構，其基因全長約11 kb。在病毒的RNA中只有一長的閱讀框架 (open reading frame)，經轉譯成一多蛋白質 (polyprotein)；其中包含有三個結構性蛋白質 (structural proteins) 及七個非結構性蛋白質 (nonstructural proteins, NS)，其組成次序為5' C-PrM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 3'。其結構性蛋白質主要的組成有：核小 (capsid, core; C) 蛋白質，前膜 (prematured M; prM) 蛋白質及外套膜 (envelope; E) 蛋白質；其非結構性蛋白質主要的組成有：糖化NS1 (glycosylated NS1)；兩個親水性 (hydrophilic) 蛋白質，NS3以及NS5；四個厭水性 (hydrophobic) 的小蛋白質，NS2a，NS2b，NS4a及NS4b。於病毒感染的動物細胞中可見其病毒基因表現後的病毒蛋白質皆聯繫於細胞膜上。而日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 及登革病毒 (Dengue virus) 為黃質病毒中之二種主要病毒。

日本腦炎是由日本腦炎病毒所引起的急性腦炎症狀傳染病。在亞洲地區，它是造成人類腦炎最主要的病因，也是所有的病毒性腦炎中分佈最廣也是最嚴重的一種 (Umenai *et al.*, 1985)。過去在台灣地區，日本腦炎是一種流行幅度很廣的傳染病，於每年五至九月流行，其致死率及預後均相當嚴重。因此於民國44年起被列為報告傳染病。民國56年發生率及死亡率均最高，報告病歷達1024名，其中206人死亡，十萬人

口發生率為7.66，十萬人口死亡率為1.54。民國58年起，全面對二歲幼兒施行日本腦炎不活化疫苗之預防接種，使得發生率從此急遽下降，至民國64年以後日本腦炎病例即維持穩定狀態，民國八十三年報告病歷為214名，其中13人死亡（致死率6.1%），十萬人口發生率為1.01，十萬人口死亡率0.06。在214名報告病例中有176人（82.2%）血清檢查可判讀，確定病歷為13人，十萬人口發生率為0.06（衛生白皮書，1993；中華民國公共衛生概況，1995）。目前使用的日本腦炎不活化疫苗是由感染鼠腦之萃取物所製成（Joshi, 1987），成功地將病例數由1967年的十萬人中8人降成1991年的0.17人（Okuno et al., 1975；National Quarantine Service, 1992）。然而在1986-1991之間的162名日本腦炎確定病例中仍有21位（13%）是施打過疫苗者（Ku et al., 1994；預防醫學研究所，1992，未發表之資料）。而每年平均仍有幾十個經血清學陽轉確定的病歷，所以日本腦炎仍為台灣夏日對公共衛生造成威脅之主要傳染疾病。

登革病毒依病毒的抑制溶菌斑中和性測驗（plaque reduction neutralization test）可將登革病毒區分為四種血清型（Russell and Nisalak, 1967）。不同的血清型的登革病毒各具不同的抗原性，且有時同一血清型間的不同病毒株，也略有差異。登革病毒主要藉由埃及斑蚊（*Aedes aegypti*）傳播，只知於人和病媒蚊之間循環，無其他中間宿主被報導。登革病毒主要流行於熱帶亞洲、非洲、澳洲、及中南美洲，可造成人類的登革熱、登革出血性熱（dengue hemorrhage fever [DHF]）及登革休克性症狀群（dengue shock syndrome [DSS]）。全球每年均有超過一億人感染登革熱，2萬5千人出現 DHF，為世界公共衛生上的重要疾病，並為現今人類經節肢動物感染的病毒性疾病中最嚴重者（Monath, 1994）。

登革熱的臨床症狀包括高燒、肌肉及骨頭酸痛、結膜充血及臉部潮紅，血液檢查會有顆粒性球減少症及血小板減少症。高燒可維持6-7天，且可能有二次性波狀熱的

產生。典型的登革熱在人類均會自癒，且感染同一型的登革病毒可有終身免疫。而感染12週，對不同類型的登革病毒間的保護作用則逐降低。值得注意的是，感染不同類型的登革病毒出現DHF/DSS的機會較初次感染者高出甚多。DHF/DSS的主要症狀包括散發性的微血管出血而有出血斑、血量降低及血容比升高，造成組織缺氧，嚴重時可出現酸血症及休克。一般致死率可達1%~10%，依給予治療的情況優劣而有所不同。現在已知四種登革病毒均可引起DHF/DSS，而因病毒流行區域及時間的不同，各有不同的重要性 (reviewed by Monath and Heinz 1996)。例如在1980年以前，泰國造成DHF/DSS的登革病毒主要以DEN-2為主，但1980年之後，則以DEN-3及DEN-4為主要致病原。而在印尼1976到1978年，由DHF病人分離出的登革病毒則以DEN-3最常見。對決定DHF的臨床症狀及流行型態而言，感染不同登革病毒的順序、感染的間隔及不同毒力的病毒株，均為重要的決定因素 (Halstead, 1989; Sangkawhibha, 1984)。

黃質病毒的核心部份是由C蛋白 (Capsid protein) 包裹著正向股的單股核糖核酸 (single positive-stranded RNA) 所組成，直徑約30nm左右，外面則是由兩個表面蛋白-M蛋白、E蛋白 (membrane protein、envelope protein)，以及磷酯層的外套膜包圍而成，病毒顆粒直徑大小約 50 nm (Henchal et. al.,1990)。病毒的單股正向核糖核酸全長約11 kilobases，而此單股核糖核酸僅帶有一個約10 kilobases 蛋白編譯框 (open reading frame)，在感染寄主細胞後，病毒的單股核糖核酸會先作出一條前驅蛋白 (polyprotein) (Henchal et. al., 1990; Preugschat et. al., 1990; Chambers et. al., 1990)，此前驅蛋白再被寄主細胞之訊息酵素 (signalases) 及病毒本身之蛋白酵素 (proteases) 處理，分別切出三個結構性蛋白如C、E、M蛋白以及至少七個的非結構性蛋白如NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B及NS5蛋白。病毒非結構性蛋白方面，目前已知NS3蛋白的N端可能為蛋白酵素 (protease)，C端可能為核糖核酸解螺旋酵素 (RNA

helicase) (Bazan et. al., 1989)，而NS5蛋白則可能為以核糖核酸為模板的核糖核酸合成酵素 (RNA-dependent RNA polymerase) (Chambers et. al., 1990)，NS2A及NS2B是屬於厭水性的蛋白質，在病毒上的角色仍不清楚(Chambers et. al., 1990; Speight et. al., 1988)，NS4A蛋白及NS4B蛋白功能也不清楚，有可能是核糖核酸複製複合體的輔因子 (RNA replication complex cofactors) (Speight et. al., 1989)。有關病毒NS1蛋白的研究，目前所知仍不多，其所扮演的角色及功能也不清楚。

檢討臨床上目前對日本腦炎診斷的方法，是靠病毒分離及血清學陽轉來鑑定。日本腦炎病毒之分離是出名的困難，原因是由於在 CNS 之外血清中病毒很少，而且只在發病的初期中可分離到。另外，病毒對溫度敏感，標本必須保存於-70°C，病毒才不會被破壞，所以造成過去三十年來台灣沒有從病人標本中分離出日本腦炎病毒的記錄。血清中抗體的陽轉則通常要等發病後幾個星期，比較發病前後的血清抗體濃度，才會有確定的結果。因此，如何能快速準確的診斷日本腦炎病例，應為衛生醫療科技發展之當務之急。

近十年來科技精進，聚合酵素連鎖反應 (PCR, polymerase chain reaction) 為現代分子生物學中應用很廣的一個技術 (Innis et al., 1990; Sano et al., 1992)，其主要的長處在於可將很微量的DNA複製，增加其數目到可以測知的程度。1992年Sano等人將此技術結合免疫學方法 (Ruzicka et al., 1993)，利用PCR來擴大抗原抗體結合的訊號，發展出一種可以測定極微量抗原的方法；稱之為免疫聚合酵素連鎖反應 (Immuno-PCR)。可以檢測580個抗原分子，比ELISA法靈敏了十萬倍。本計畫將利用此免疫聚合酵素連鎖反應，結合抗體抗原反應之專一性與聚合酵素連鎖反應之靈敏性原理，發展出一種對日本腦炎快速準確而且靈敏的診斷方法。

免疫聚合酵素連鎖反應剛開始時實驗方法複雜而不易應用，經Ruzicka (1993) 及 Zhou (1993) 等人進一步改進成為方便而可應用的方法；其簡易原理見圖一 (The principle of immuno-PCR)。基本上是將欲偵測之血清檢體吸附在96孔培養盤內，與日本腦炎單一性抗體反應後，洗掉所有的雜質，再與Streptavidin以及Biotin標誌的DNA片段反應，之後再以PCR反應來擴大DNA訊號，經過洋菜膠電泳以及Ethidium bromide染色後 (Sambrook et al., 1989)，有PCR產物即代表有抗原存在，由此可以簡單地判定欲偵測之血清檢體是否含有日本腦炎病毒抗原。本計劃發展的方法應用於臨床診斷上，從標本中極微量之病毒抗原存在，即可於48小時內準確地診斷日本腦炎或登革熱，要比目前使用之病毒培養鑑定法需時一星期，或血清抗體陽轉法需時一個月迅速甚多，提供病患及早對症治療的機會。也可更有效地做到早期偵測疾病流行而防範疫情擴大之效。

第一年的初步結果已顯示Immuno-PCR確實可以用來偵測黃質病毒抗原的存在，而其靈敏度也大於RT-PCR或ELISA等其它的方法。但是我們也發現了目前我們所採用的Immuno-PCR的方法，其步驟過於繁瑣易產生偽陽性並不適用於一般實驗室診斷用。所以在第二年內我們進一步改良現階段的方法，主要的策略 (見圖二) 是先將抗體與DNA以化學的方法直接結合在一起，而不採用如圖一中所示之biotin/avidin結合的方式，那將可省去相當多的步驟而達到實用的價值。另外我們也發展PCR-ELISA (如圖三所示) 作為Immuno-PCR的替代方案 (請參考圖四對這三種方法的比較)，然而目前利用PCR-ELISA Kit (Boehringer Mannheim) 我們無法偵測到陽性訊號，可能是引子的設計仍有待改善。

# 材料與方法：

## I. 抗原之製備。

### A. 日本腦炎病毒感染小白鼠之血清，腦組織等檢體。

$1 \times 10^5$  pfu 鼠腦生產的日本腦炎病毒將以腹腔注射 (i.p.) 之方式 (Harlow and Lane, 1988)，打入3-4週大的ICR小白鼠內，於感染後的1-21天內每隔一天抽血，經離心收集血清後分裝儲存於 $-70^{\circ}\text{C}$ 備用。感染之腦組織取下後以組織研磨器磨碎後，經離心取上清液，分裝儲存於 $-70^{\circ}\text{C}$ 備用。

### B. 細胞組織培養繁殖之病毒。

BHK-21或C6/36細胞以 $\text{moi}=0.1$ 日本腦炎病毒感染兩天後，細胞培養液離心分裝儲存於 $-70^{\circ}\text{C}$ 備用。病毒的量將以溶斑數來測定 (plaque assay)，基本上將十倍連續稀釋的病毒液加在BHK-21上， $37^{\circ}\text{C}$ 培養一個小時後洗掉，再加入含有洋菜膠 (agar) 之培養基培養四天後，以crystal violet染色計算病毒之溶斑數 (plaque number)。

## II. 吸附抗原於微量培養盤。

不同量的血清，組織標本或是病毒 ( $1-10^5$  pfu) 十倍稀釋於50ml的0.1M bicarbonate coating buffer (pH9.6)，放入微量培養盤 (microtiter plate, Maxisorp, Nunc, Denmark) (Ruzicka et al., 1993)， $4^{\circ}\text{C}$ 培養16小時，那將使抗原吸附於培養盤之表面。不含任和抗原之溶液緩衝液和正常小白鼠之血清將作為控制組。吸附後將以TBS (Tris-buffered saline, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH7.5, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 洗三次後以200 $\mu\text{l}$  MESTBS (TBS, 4.5% nonfat dried milk, 0.1M EDTA, 1mg/ml natured salmon sperm DNA, 0.2%  $\text{NaN}_3$ ) 在 $37^{\circ}\text{C}$ 做blocking兩個小時 (Sano et al., 1992)。

## III. 抗原抗體反應。

純化的日本腦炎特異性單株抗體，Biotin標誌的綿羊抗鼠血清 (biotinylated sheep anti-mouse secondary antibody) (western immunodetection kit, Amersham, USA)，將以Reagent dilution buffer (RDB) 稀釋，RDB的成份含有十分之一的MESTBS和十分之九的TETBS (TBS, 0.04% Tween 20, 0.1mM EDTA)，逐一加入含有抗原的培養盤內於室溫中培養一個小時，每次作用後都將以TETBS洗三次，以去除非特

異性的結合 (nonspecific binding) 。

IV. 製備Biotin標誌的DNA片段 (biotinylated DNA tag) 。

一段354-bp包含於Luciferase基因內的DNA片段 (nucleotide 607-960) )，將首先嘗試作為DNA tag。將此354-bp DNA片段以PCR方法增殖後選殖於TA-vector (Invitrogen) 以利之後的工作。包含此354-bp DNA片段的質體 (plasmid) 將以10單位的Eco RI(New England Biolabs)作用後，再以2.5 unit Klenow fragment (New England Biolabs)以及20uM Biotin-14-dATP (BRL)來做biotinylation (Zhou et al., 1993)，之後在以洋菜膠電泳和Gene Clean kit (Bio 101)來純化。

V. Immuno-PCR (Zhou et al., 1993) 。

與抗體反應後，50  $\mu$ l 1mg/ml的Streptavidin (Pierce, USA)將加入每一個孔內，作用室溫一個小時洗掉後，再加入50  $\mu$ l以RDB稀釋成 $3 \times 10^{-19}$  molecules / $\mu$ l的biotinylated DNA tag，作用室溫一個小時洗掉後，附著於孔內的DNA將以GeneAmp (Perkin Elmer)經30 cycle的PCR amplification來擴大其訊號。選用的primer set為5'-GGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGC-3'以及5'-CGAAAGAGGTGCGCC CCCAGAAGC-3'，每一個cycle將包括以下三個步驟:95 $^{\circ}$ C一分鐘，55 $^{\circ}$ C兩分鐘以及72 $^{\circ}$ C三分鐘。一個U型底耐熱可吸附蛋白質的96孔盤將被選用。5  $\mu$ l的PCR產物將置於1%的洋菜膠中電泳，經ethidium bromide染色，在UV燈下觀察，若有一260-bp DNA片段可被看到測定為陽性結果。

VI. ELISA (Sano et al., 1992).

Streptavidin-alkaline phosphate conjugate (Western immunodetection kit, Amersham, USA)以RDB稀釋後，與抗原抗體作用室溫一個小時洗掉後，以50  $\mu$ l 1mg/ml p-nitrophenyl phosphate disodium substrate (prepared by Sigma's pNPP capsule) in 0.1M Tris-Cl pH9.0, 50mM MgCl<sub>2</sub>呈色10分鐘後，以50  $\mu$ l 0.1M EDTA終止反應，結果將以ELISA plate reader在450nm閱讀。

VII. 建立第二代Immuno-PCR.

合成DNA -Antibody conjugates需經以下三個步驟：

1. Reduction of antibody by 2-MEA
2. Activation of DNA tag by Sulfo-SMCC
3. Antibody-DNA conjugation reaction

Activation of antibody :

- ↓ antibody (1 mg) dialyze in Centricon-30 against Buffer I (100 mM Sodium phosphate, 5 mM EDTA pH 6.0)
- ↓ add 2MEA-HCl to 50 mM
- ↓ incubate at 37 °C for 90 min
- ↓ cool to room temp
- ↓ apply to an Excellulose GF-5 (KwikSep™) in Buffer I
- ↓ collect fractions ( 500 µl/fr)
- ↓ pool Ab-containing fraction
- ↓ dialyze against Buffer I, concentrate to 40 µl

Activation of dsDNA :

amino-modified DNA (~200µg)

- ↓ dialyze in Centricon 30 against Buffer II (100 mM Sodium phosphate pH8.0)
- ↓ add 1 mg (solid ) Sulfo-SMCC
- ↓ incubate at 37 °C for 20 min
- ↓ cool to RT
- ↓ apply to an Excellulose GF-5 in Buffer III (100 mM Sodium phosphate pH6.0)
- ↓ collect and pool fractions
- ↓ dialyze in Centricon 30 against Buffer III
- ↓ concentrate to 40 µl

Ab-DNA Conjugation Reaction :

- ↓ pool 40 µl activated DNA and 40 µl reduced Ab
- ↓ add Buffer IV (100 mM Sodium phosphate, 5 mM EDTA pH 7.0) to total of 200 µl
- ↓ reaction at room temp for 2 hr (in the dark, with gentle shaking)
- ↓ Store at 4 °C

Purification of Ab-DNA Conjugates :

- ↓ Protein G (or A) Affinity Column (to remove free DNA)
- ↓ Qiagen tip 20 (to remove free Ab)
- ↓ elute with Buffer V (50 mM MOPS, 1.25 M NaCl pH 8.0) and collect the elute

↓ dialyze in Centricon 100 against Buffer VI (100 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA pH 7.0)

↓ add acetylated BSA (0.1 mg/ml) and store at 4 °C

Immuno-PCR assay :

↓ In a 96-well microtiter plate

↓ add 50 µl/well serial dilutions of antigen

↓ incubate 4°C overnight

↓ wash three times with TBS/Tween buffer (25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.4, 0.05% Tween-20)

↓ add 200 µl/well of PBS-BLA buffer (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH7.4, 2% BSA, 10% β-lactose, 0.02% sodium azide)

↓ incubate RT 1 hr

↓ wash 3 times with TBS/Tween buffer

↓ add 50 µl/well of appropriately diluted Ab-DNA conjugate

↓ incubate RT 1hr

↓ wash 6 times with TBS/Tween buffer

↓ wash 3 times with ddH<sub>2</sub>O

↓ PCR reaction as described above

## 結果：

在此研究計畫的第一年內，我們已對於Immuno-PCR技術的建立做了以下的嘗試：

- (1) 製備Biotin標誌的DNA片段 (biotinylated DNA tag)
- (2) 建立Immuno-PCR的實驗步驟
- (3) 比較Immuno-PCR與RT-PCR以及ELISA的靈敏度
- (4) 建立第二代Immuno-PCR的實驗步驟

第一年的初步結果已顯示Immuno-PCR確實可以用來偵測黃質病毒抗原的存在，而其靈敏度也大於RT-PCR和ELISA等其它的方法。但是我們也發現了目前所採用的方法，其步驟過於繁瑣容易產生偽陽性並不適用於一般實驗室診斷用。所以我們進一步改良現階段的方法，主要的策略是先將抗體與DNA以化學的方法直接結合在一起，而不採用藉由biotin/avidin結合的方式，那將可省去相當多的步驟而達到實用的價值。在此研究計畫的第二年內，我們已對於Immuno-PCR技術的建立做了以下的嘗試：

1. Preparation and purification of Anti-JEV monoclonal antibodies: 含有對抗日本腦炎病毒Envelope以及NS1的單株抗體的腹水已被大量製造，並以E-Z-SEP kit大量純化，另外部份單株抗體也以Protein-A/G sepharose方式純化，其純度如圖五所示。
2. Preparation of JEV and JEV-infected mouse sera: 已利用組織培養細胞C6/36和BHK-21來大量繁殖日本腦炎病毒，其效價可達 $10^8$  PFU/ml。感染日本腦炎病毒的老鼠血清也已收集儲存於 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用。
3. conjugation of DNA Tag with antibody: 已利用PCR方法大量合成DNA Tag，並且嘗試將DNA Tag和抗體接合，但是發現二者結合的效率很低。討論原因可能是因為大量未被使用的primer也會和DNA Tag競爭和抗體接合，因此決定重新設計primer

以期提高PCR的效率，並且利用高解析度的MetaPhor agarose或是NuSieve GTG agarose來分開DNA Tag與primer（圖六），再將此純化過的DNA Tag和抗體接合並以電泳分析以分子量變大來確定二者接合成功（圖七）。

4. 建立第二代Immuno-PCR的實驗步驟。

我們已利用上述接合好的DNA Tag/抗體，以第二代的Immuno-PCR方式，來重覆偵測positive與negative的樣本，在沒有false positive的情形下，結果顯示Immuno-PCR的靈敏度可達 $10^2$  PFU，並不算相當的靈敏（圖八），尚待改善。

5. PCR-ELISA: 其基本原理為利用capture probe上的biotin，與coated在well內的streptavidin結合，而再利用DNA上的DIG與anti-DIG反應，而以ELISA方式呈色。所以PCR結果不須經電泳跑膠方式即可得知，非常適用於大量樣本數時使用。我們首先利用FluoroAmp T4 kinase oligonucleotide labeling system (Promega)將biotin接到capture primer上，並且利用anti-biotin抗體來確認 capture primer上有接上biotin。接下來於PCR合成時加入DIG-dUTP (Boehringer Mannheim)，經電泳分析PCR產物的分子量略高於未加DIG-dUTP的對照組，顯示DIG-dUTP確實有被合成到DNA內。但是利用PCR-ELISA Kit (Boehringer Mannheim)我們無法偵測到訊號（data not shown），可能是引子的設計或是雜交的溫度仍有待改善。

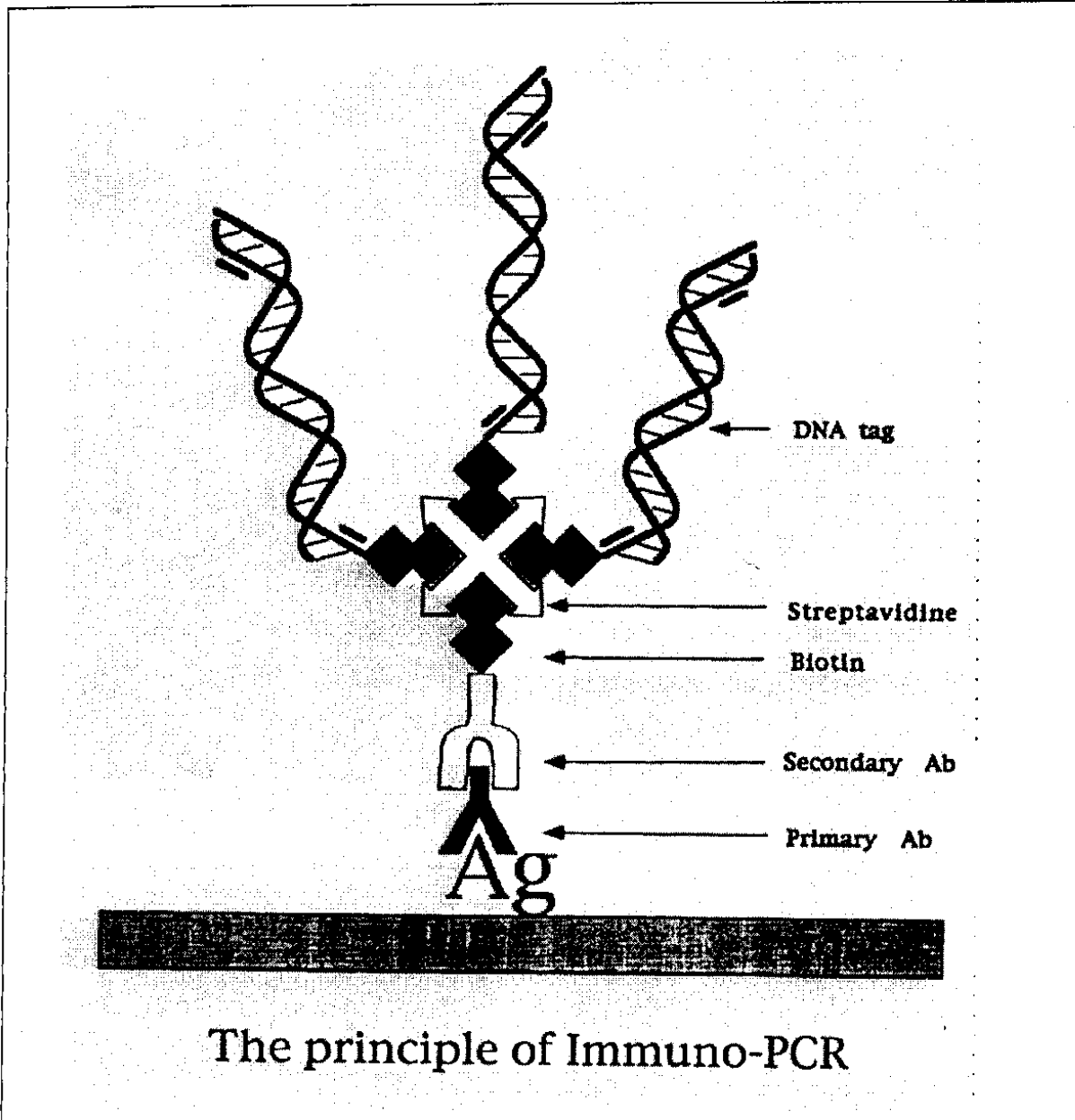
## 参 考 文 献：

1. Bazan, J. F. and Fletterick, J. (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171:637-639.
2. Calisher, C. H. et al., (1989). Antigenic relationships among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* 70:37-43.
3. Chambers, T. J. et. al., (1990). Flavivirus genome, organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:649-688.
4. Halstead, S. B. (1989). Antidody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev. Infect. Dis.* 11: S930-S939.
5. Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press.
6. Henchal, E. A. and Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:376-396.
7. Hendrickson, E. R. et al., (1995). High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 23:522-529.
8. Innis, M. A. et al., (1990). *PCR Protocols: A guide to Methods & Applications.* Academic Press.
9. Joerger, R. D. et al., (1995). Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 41:1371-1377.
10. Joshi, D. D. (1987). Japanese encephalitis outbreak during the year 1985 and 1986. *JE & HERS Bulletin.* 2:1-10.
11. Ku, C.-C. et al., (1994). Homologous and heterologous neutralization antibody

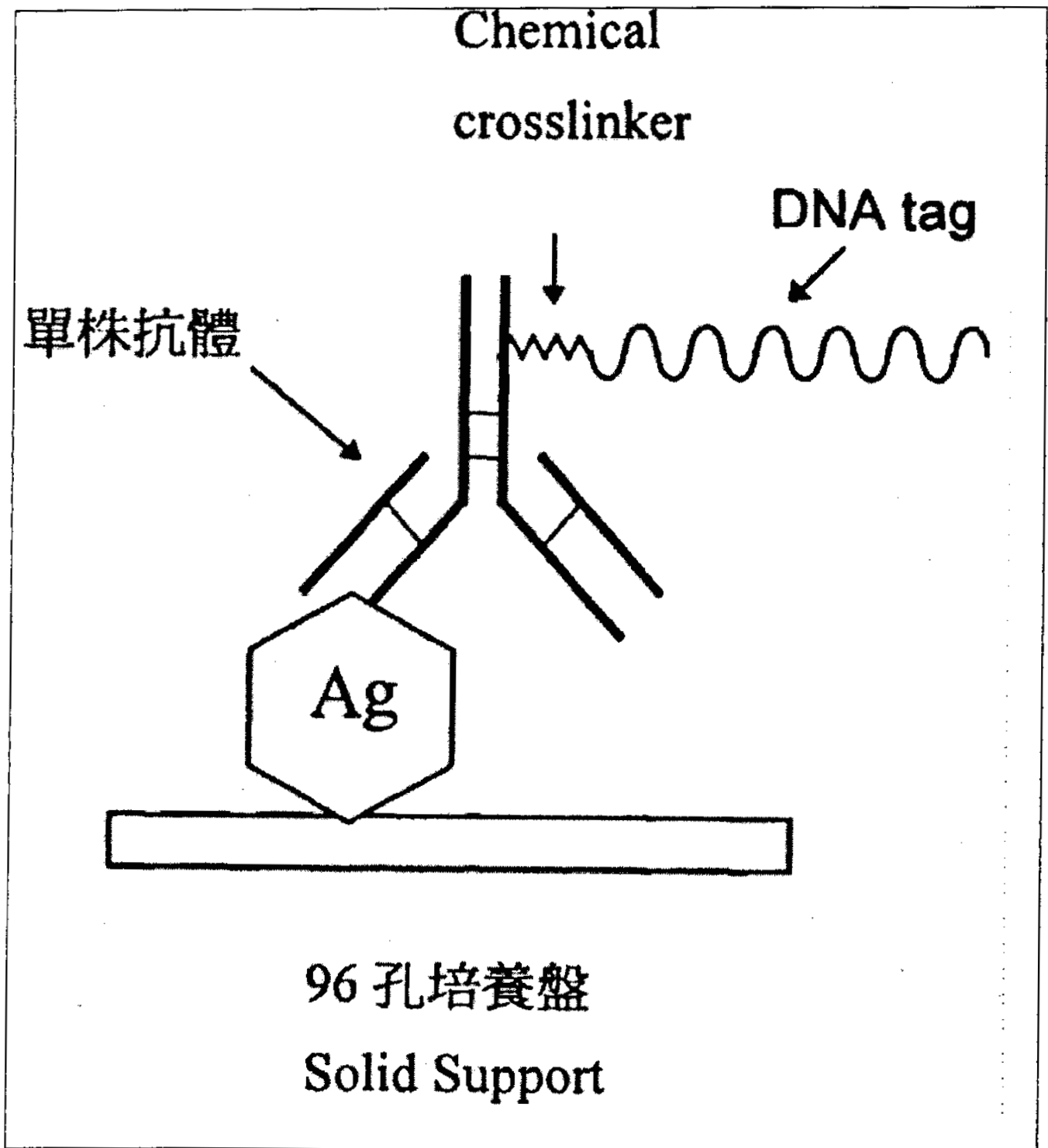
- responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan Children. *J. of Med. Virol.* 44, 122-131.
12. Monath, T. P. (1986). Pathobiology of the Flaviviruses. In "The Togaviridae and Flaviviridae" (S. Schlesinger and M. J. Schlesinger, Eds.), Plenum Press, New York/London. p.375-440.
  13. Monath, T. P. (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2395-2400.
  14. Monath, T. P. and F. X. Heinz. (1996). Flaviviruses, p. 961-1034. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
  15. National Quarantine Service (1992): Statistics on Japanese encephalitis control in Taiwan area pp4.
  16. Okuno, T. et al., (1975). Japanese encephalitis surveillance in China (province of Taiwan) during 1968-1971. I. Geographical and seasonal features of case outbreaks. *Japan Journal of Medical Science and Biology.* 28:235-153.
  17. Preugscht, F. et al., (1990). In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *J. Virology* 64:4364-4374.
  18. Russel, P. K. and A. Nisalak. (1967). Dengue virus identification by the plaque reduction neutralisation test. *J. Immunol.* 99:291-296.
  19. Ruzicka, V. et al., (1993). Immuno-PCR with a commercially available avidin system. *Science* 260:698-699.
  20. Sambrook, J. et al., (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press.
  21. Sangkawhibha, N. et al. (1984). Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective

- study in Rayong, thailand. in the 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.* 120: 653-669.
22. Sano, T. et al., (1992). Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258:120-122.
  23. Speight, G. G. et al., (1988). Gene mapping and positive identification of the nonstructural protein NS2a, NS2b, NS3, NS4b and NS5 of flavivirus Kunjin and their cleavage sites. *J. Gen. Virology* 69:23-34.
  24. Speight, G. G. et al., (1989). Positive identification of NS4a, the last of the hypothetical nonstructural proteins of flaviviruses. *Virology* 170:299-301.
  25. Shope R. E., (1980), Medical Significance of Togaviruses: An Overview of Diseases Caused by Togaviruses in Man and Domestic and Wild Vertebrate animals. In "The Togaviruses" (R. W. Schlesinger, Ed.), Academic Press, NY. p.47-82.
  26. Umenai, T. et al., (1985). Japanese encephalitis: Current world-wide status. *Bull. World Hlth. Org.* 63:625-631.
  27. Zhou, H. et al., (1993). Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection. *Nucleic Acids Res.* 21(5): 6038-6039.
  28. 衛生白皮書.89-92頁.行政院衛生署.中華民國八十二年八月出版.
  29. 中華民國公共衛生概況.70-73,119-120頁.行政院衛生署.中華民國八十四年三月出版.

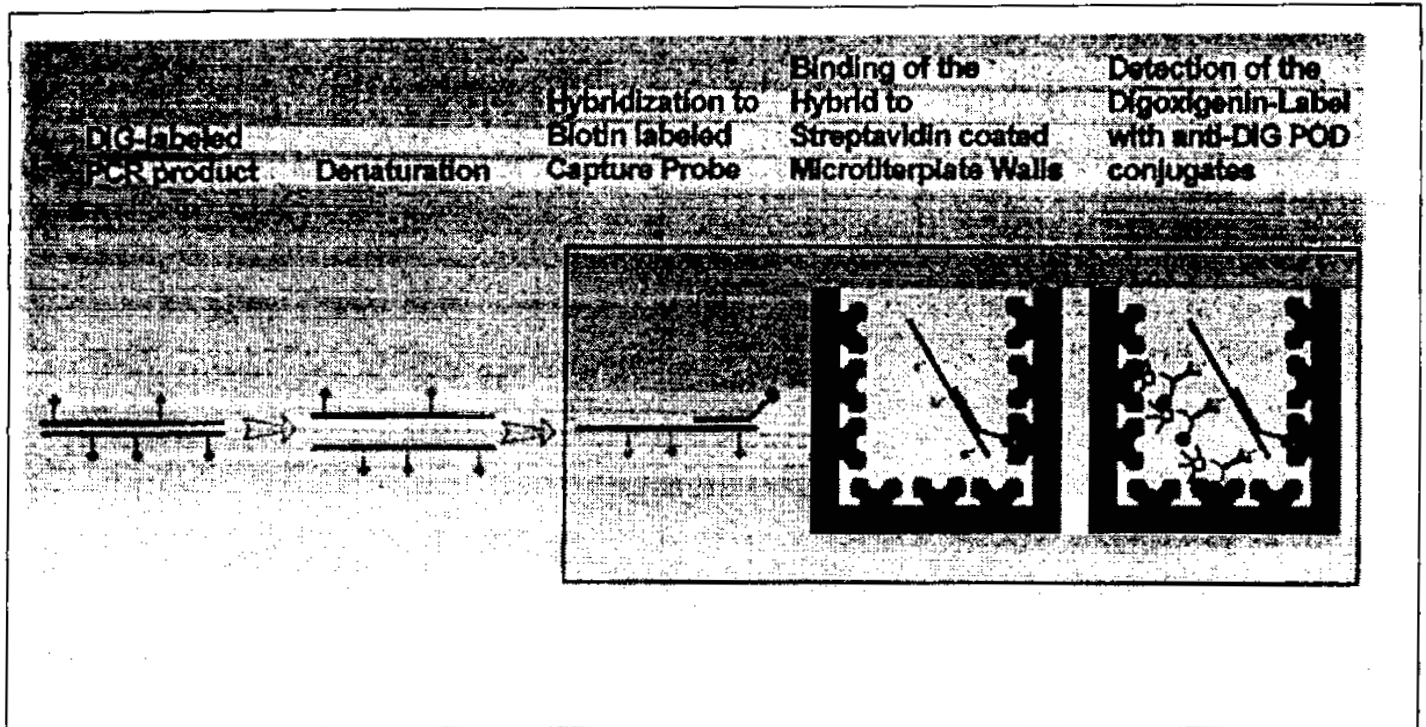
圖一：The principle of Immuno-PCR (第一代方法)



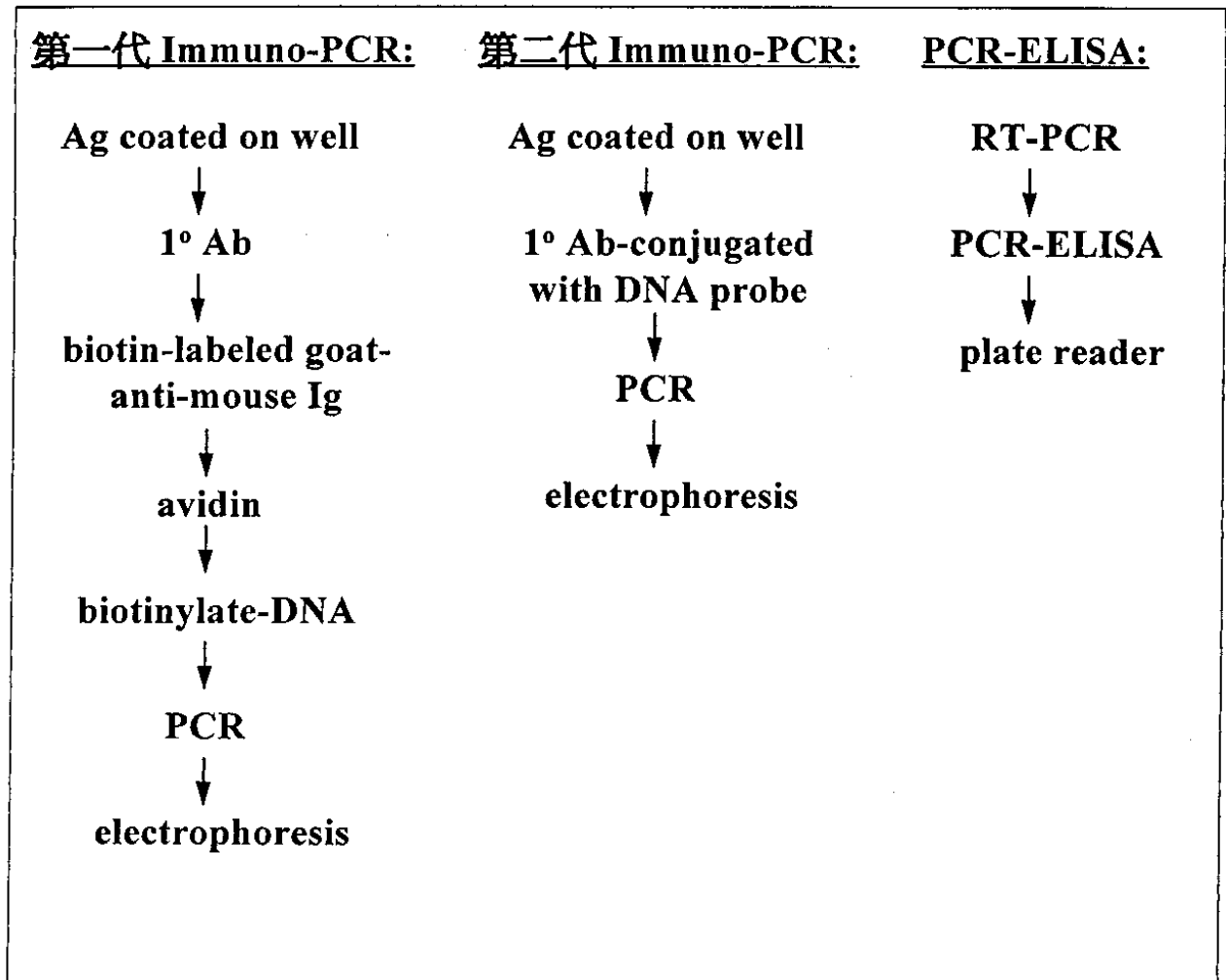
圖二：改良之Immuno-PCR (第二代方法)



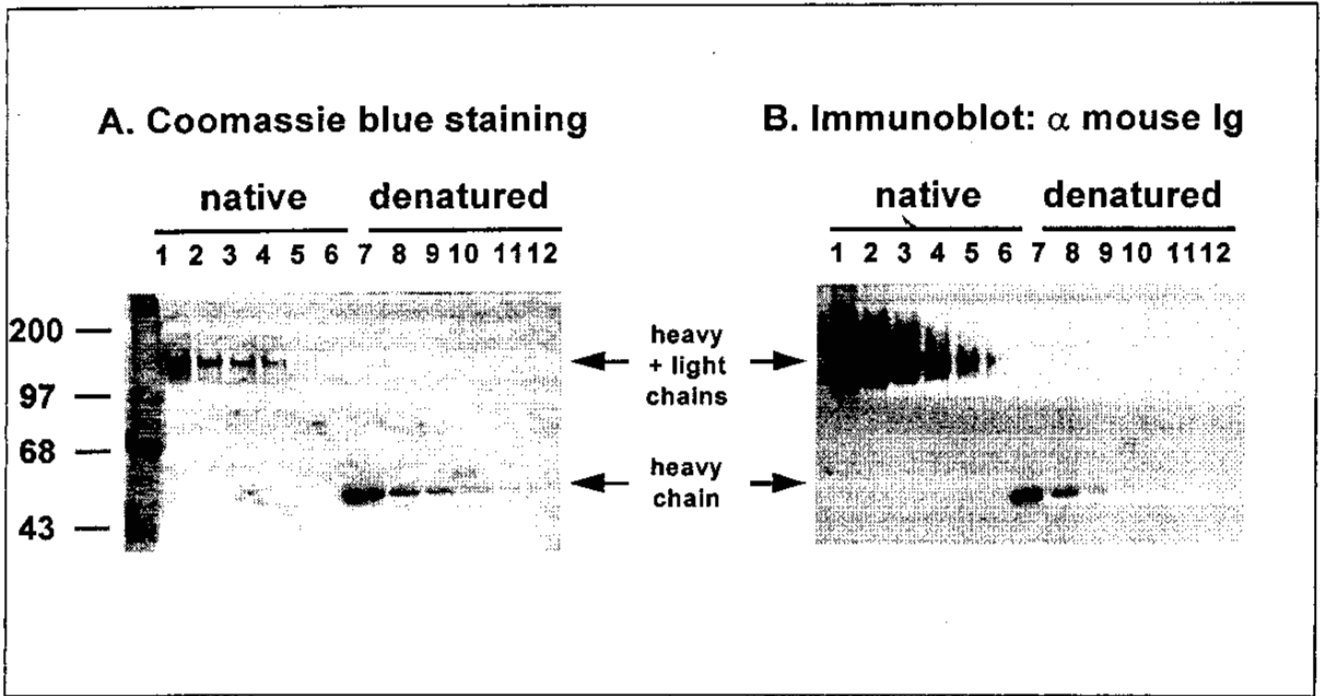
### 圖三：The principle of PCR-ELISA



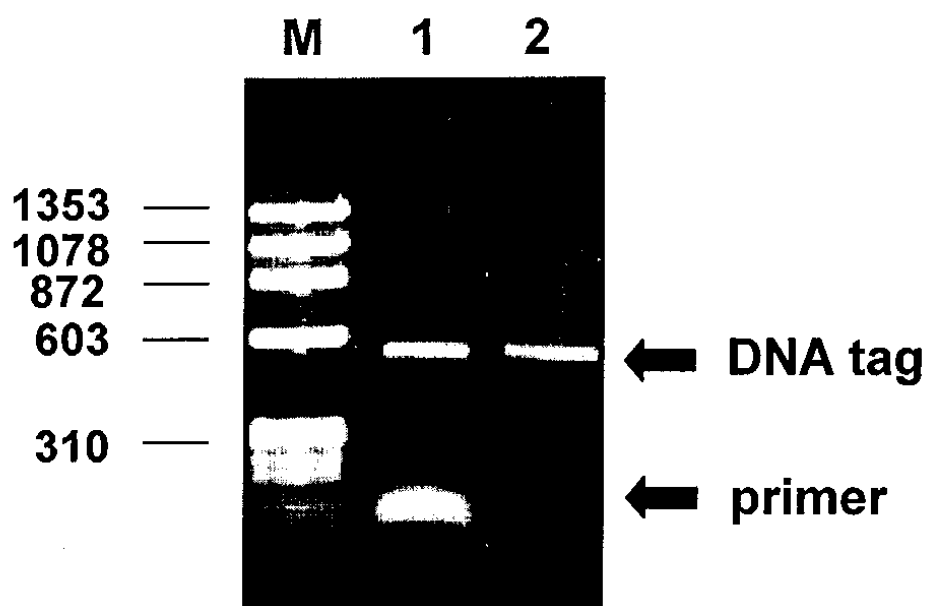
圖四：第一、二代Immuno-PCR以及PCR-ELISA的比較



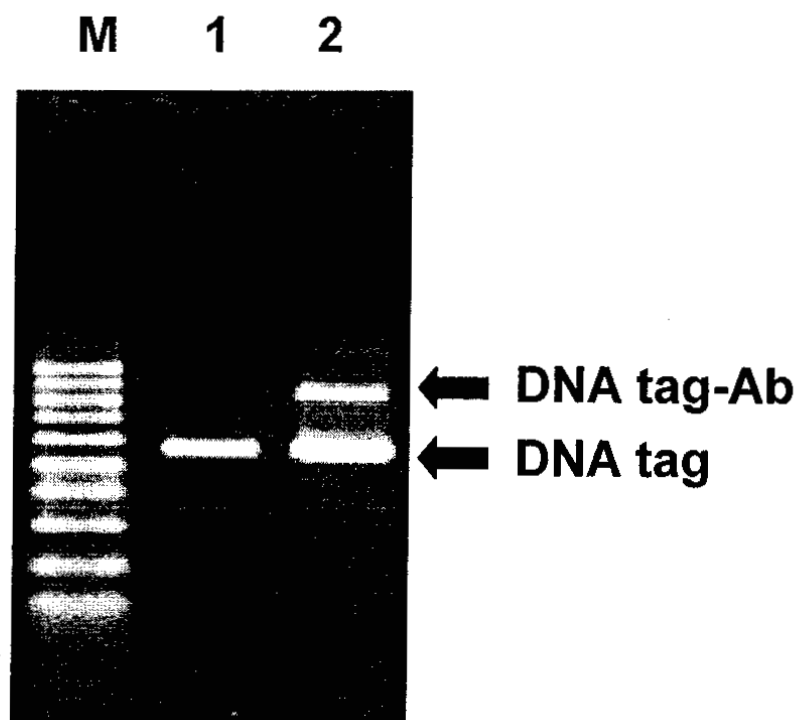
**圖五: IgG column purified anti-JEV E protein moAb, 58-2.1**



圖六：純化DNA Tag

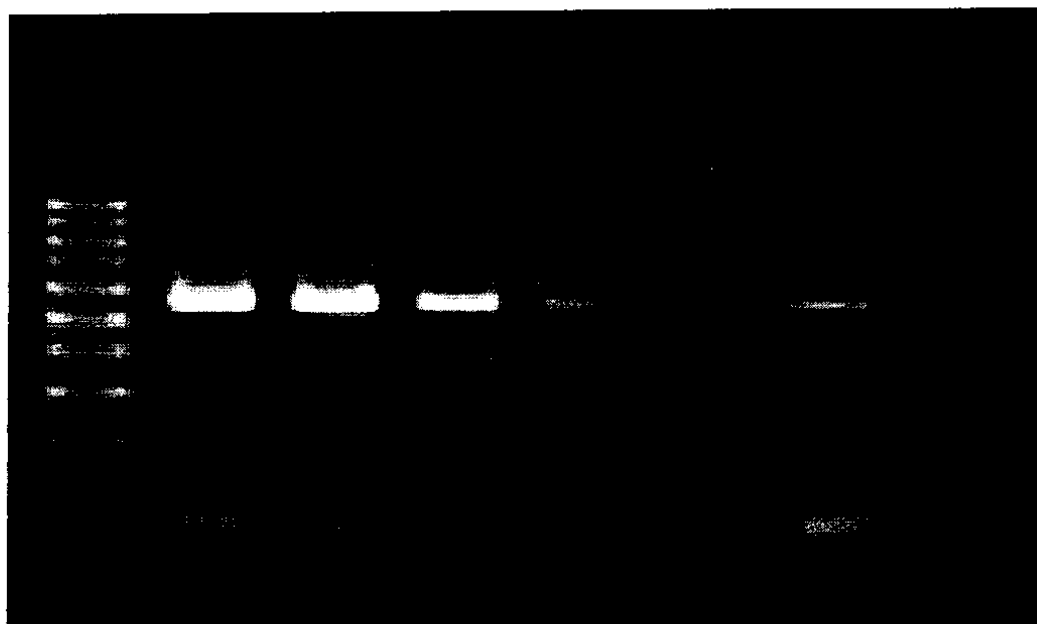


圖七：抗體和DNA-tag結合之結果



圖八: Immuno-PCR之結果

PFU:  $10^5$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^1$  + -



M 1 2 3 4 5 6 7