

計畫編號：DOH92-DC-2011

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

# 建立以基因重組蛋白質為基礎之 黃病毒血清診斷系統

## 研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：黃智雄

研究人員：舒佩芸、簡麗蓉、彭優芸、陳同輝

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、 中文摘要 (2)

貳、 英文摘要 (4)

參、 本文

一、 前言 (5)

二、 材料與方法 (7)

三、 結果 (10)

四、 討論 (12)

五、 參考文獻 (14)

六、 圖、表 (16)

共(18)頁

## 中文摘要

在台灣地區，登革熱及日本腦炎是最重要的黃病毒傳染病。登革熱的疫情近年來在世界各地都有增加趨勢，東南亞各國更是主要疫區。開發快速、準確的檢驗方法早期診斷登革熱感染，是世界衛生組織列為疾病預防與控制的優先工作項目之一。本研究室近年來積極研發登革熱的檢驗試劑，目前已建立一系列快速 ELISA 檢驗方法，能早期鑑別診斷登革熱及日本腦炎感染，並區分第一次或第二次登革熱感染；由非結構蛋白質一(NS1)特異性 IgG 抗體更能鑑別第一次感染者之登革病毒血清型別，或偵測及分辨自然感染與疫苗接種所產生的抗日本腦炎抗體反應。但上述的檢驗方法均是利用細胞培養或鼠腦接種所得之自然抗原（包括 E/M 及 NS1），對於無法分泌於細胞外之病毒抗原之抗體反應，我們所知甚少。本計畫係黃病毒血清學診斷系統的一部分，目的在建立一套基因重組蛋白質的表現方法，藉大量生產、純化無法自然取得之病毒抗原，進一步分析患者對這類病毒抗原之抗體反應，以應用於疾病之臨床診斷、流行病學應用及致病機轉研究。目前已建立第二型登革病毒的 capsid 和 NS3 基因重組蛋白在 *E. coli* 的表現系統。採用 Ni-NTA agarose 純化後的 NS3 基因重組蛋白為抗原，進行登革熱確定病例恢復期及後恢復期血清抗體檢測，初步結果發現 anti-NS3 IgM 與 anti-NS3 IgG 抗體反應比正常人陰性對照組血清有顯

著差異，特異性可達 80~93%，但靈敏度很低，目前仍無法使用於臨床檢驗。未來將繼續進行抗原純化之改進，提高基因重組蛋白質的抗原活性，並進行 ELISA 反應條件最適化研究，以完成利用非結構抗原基因重組蛋白質的血清學檢驗系統。

## 英文摘要

Keyword: flavivirus, dengue fever, ELISA, Nonstructural protein3 (NS3)

Dengue fever and Japanese encephalitis (JE) are the two most important reportable diseases belonging to Flavivirus family in Taiwan. Due to the increased intensity of dengue fever in many part of the world, World Health Organization (WHO) had listed the development of rapid and accurate diagnostic assays for early diagnosis of dengue fever as the first priority in the studies of dengue prevention and control. Our lab has been devoted to develop a system that is able to differentially diagnose all flavivirus (dengue virus, JE virus, yellow fever virus, and West Nile virus) potentially cause outbreaks in Taiwan. A comprehensive system based on virus isolation, RT-PCR, various ELISA and sequence analysis had been developed to detect viral nucleic acid and NS1 antigen in the acute-phase serum samples and virus-specific antibodies in the convalescent-phase serum samples. Although we have setup various forms of ELISA using native antigens (Envelop and NS1 antigens) secreted in the culture supernatants of virus infected cells, little is known about the immune responses elicited to the NS proteins that are not secreted outside the infected cells. We have so far succeeded in the cloning and expression of DEN-2 capsid and NS3 recombinant proteins in *E. Coli* expressing system. Initial studies were performed to analyze the anti-NS3 IgM and IgG antibody response using Ni-NTA agarose purified recombinant proteins. The results showed that the convalescent and post-convalescent phase serum samples from confirmed dengue patients had significant higher titers in ELISA compared to normal control sera. The specificity of NS1-specific IgM and IgG ELISA are 80-93%, respectively. The sensitivity, however, is still very low and is not suitable for clinical diagnosis at its present format. In the future, we will try to improve the sensitivity of this NS3-specific ELISA assay by increasing the purity and native antigenicity of recombinant proteins. The availability of dengue and JE NS3 and NS5 recombinant proteins will eventually used for the serodiagnosis and seroepidemiological studies. This will contribute significantly for the decision-making and development of effective control strategy.

## 前言

登革熱與日本腦炎是台灣地區兩項最重要由黃病毒( Flavivirus )感染所引發的傳染病。其中，登革熱與瘧疾、利什曼原蟲病( Leishmaniasis ) 非洲昏睡病( African trypanosomiasis ) 等共同被世界衛生組織列為熱帶地區重點防治的傳染病項目；而針對登革熱診斷的相關研究則被視為疾病預防與控制的優先工作項目之一〔1〕。根據世界衛生組織建議，登革熱的檢驗方法主要應加強的方向在於：1. 發展快速且特異性高的血清學診斷方法；2. 評估合適的基因重組蛋白作為血清學診斷用抗原；3. 發展快速且敏感的病毒抗原偵測方法；4. 建立方便且安全的登革病毒株抗原與基因型別鑑定方法；以及 5. 反轉錄酶 - 聚合酶鏈鎖反應常規檢驗方法的標準化〔2〕。

本研究計劃首要目的就是希望能找到適合的基因重組蛋白作為血清學診斷用抗原，以提高登革熱和日本腦炎血清學檢驗的敏感性與特異性。根據本研究室以往進行登革病毒與日本腦炎病毒的血清流行病學研究發現〔3,4〕，在登革病毒感染患者體內對抗登革病毒非結構性抗原一( NS1 ) 的抗體陽性率與對抗 E 抗原的抗體陽性率相當，顯示對抗 NS1 抗原的抗體可在被感染者體內長時間維持；而且該試驗可以有效鑑別初次感染者所感染的血清型別。然而在日本腦炎病毒自然感染

者，卻只有二至五成可以測得抗 NS1 抗原抗體，代表值得繼續研究將其他抗原用於血清學診斷與流行病學調查的適用性。

利用西方墨點法的技術，根據 Churdboonchart 等人 1991 年的研究報告指出〔5〕，幾乎所有二次感染的 DHF 病人恢復期血液都可測到抗 NS3 與 NS5 抗原的抗體，但其中只有約 40 % 的人可以測到抗 NS1 抗原的抗體；而且對抗 E、NS3 與 NS5 抗原的抗體可以早在發病後五日內測得。採用相同檢驗方法，Patarapotikul 等人 1993 年的研究報告發現〔6〕，登革熱和日本腦炎患者的血清都有對抗 E、NS1、NS3 與 NS5 抗原的抗體，兩種病患血清抗體的差異僅在於日本腦炎病患抗 NS3 的抗體強度高於登革熱患者。Valdés 等人 2000 年的報告仍指出，相較於其他抗原（C、preM、NS1），偵測抗 E、NS3 與 NS5 抗原的抗體顯然在實驗室診斷的運用上具有較高的敏感性〔7〕。綜合上述研究的發現，本研究以發展 NS3 及 NS5 基因重組蛋白為主要方向。

## 材料與方法

### 1. 人血清檢體收集

病人血清包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)與感染後期(post infection, 症狀出現後超過 30 天)血清。不同期血清, 將用以分析病人對登革病毒各種抗原之抗體反應, 如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化。經實驗室確診為陽性反應血清將加以分裝, 儲存於  $-70^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃長久保存。陰性反應血清為沒有任何抗日本腦炎及登革病毒 IgM 與 IgG 抗體反應者。

### 2. core 及 NS3 蛋白質表現於 *E. coli* 系統

1. 利用 DH5 菌株大量複製帶有 core 及 NS3 基因片段的 pET15b 質體
2. 以 Macherey-Nangel 之 Nucleobond Ax 純化質體(採用 low copy plasmids 的步驟可得較高產量)
3. 將質體轉殖入 BL 菌株
4. 挑菌落培養於含 ampicillin (  $50\ \mu\text{g/ml}$  ) 及 chloramphenicol (  $34\ \mu\text{g/ml}$  ) 的 LB 培養基至菌液濃度約為 OD 0.6
5. IPTG (  $1\ \text{mM}$  ) induction

6. 利用 Novagen 的 BugBuster Protein Extraction Kit 進行蛋白質純化
7. 蛋白質純化產物分 soluble fraction 及 inclusion body 二部分進行分析
8. inclusion body 溶於 refolding buffer 中,在 Tris-HCl pH8.5 (with or without DTT) 溶液內進行透析

### 3. ELISA(酵素免疫分析法)

NS3-specific indirect IgM and IgG ELISA: 先以 Ni-NTA HisSorb 96 孔微量效價盤覆被 (blocking), 清洗後, 將純化之 NS3 基因重組蛋白質加入, 在 37 °C 下反應 1 小時。清洗後, 加入 1:50 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體, 於 37 °C 反應 1 小時。最後, 加入酵素受質體 p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) 室溫作用 30 分鐘, 再用 Dynatech MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

### 4. 西方點墨法(Western blotting)

Proteins were run by Tris-Glycin SDS 4-12% gel and

transfer to PVDF membrane. After blocking, membrane was incubated with anti-His HRP conjugate Ab (1:10,000 dilution). Washing membrane with TBS-Tween / Triton buffer, and then stain with HRP substrate that (PIERCE) SuperSignal West dura luminol extended substrate (HRP buffer + luminol enhancer solution = 1:1). Detect the signal with cooled CCD camera.

## 結果

### 一、 core 與 NS3 基因重組蛋白的表現與純化

第二型登革病毒 capsid 與 NS3 基因重組蛋白在 IPTG induction 4 小時後，以 Novagen 的 Bugbuster 試劑進行蛋白質純化，可發現產物主要生成於包含體(inclusion body)內，產量分別約為包含體蛋白質總量的 12-15 % 及 40 % (圖一)。根據蛋白質濃度測定，粗估本系統每 50ml 菌液可純化得包含體蛋白質 2mg。

將包含體蛋白質利用 QIAGEN 廠牌的 Ni-NTA agarose 進行 His-tagged protein 純化，結果發現 NS3 蛋白質使用 pH 5.0 及 pH 4.5 的 elution buffer 可得到最佳產量(圖二)，而且可由西方墨點法以 anti-His Ab 確認。若以每 2mg 包含體內有 0.8mg 的 NS3 蛋白質來計算，回收率約為 87.5%。然而 core 蛋白質卻不論調整 elution buffer 的 pH 值(pH 7.0~3.5)或是 imidazole 的濃度(20 mM 及 200mM)，皆無法取得單一的純化產物 (data not shown)。

### 二、 ELISA

以 Ni-NTA HisSorb plate 吸附經 Ni-NTA agarose 純化的 NS3 蛋白質作為抗原，進行 ELISA 檢測。首先測試抗原最佳反應濃度，結果發現在濃度為 4 ug/ml 時，若我們以陰性血清組的平均吸光值加上 2 倍標準誤為切點( $\text{mean}+2\text{SE}$ )，陽性預測值(PPV = 80%)

最高 (表一), 且登革熱確定病例與非登革熱病例檢體的吸光值達顯著差異 (圖三、表二)。以此標準比較陰性控制組血清與登革熱確定病例後恢復期血清 anti-NS IgG 陽性率, 結果未達顯著差異, 檢驗特異性為 93.3% (表三)。以此標準進行登革熱確定病例恢復期血清 anti-NS3 IgM、IgG 和 IgA 抗體檢測時, 可發現只有 IgM 抗體吸光值的差異較大 (圖四)。但不論以吸光值進行 t 檢定 (表四), 或以陰性血清組的平均吸光值加上 2 倍標準誤為切點進行卡方檢定 (表五), 結果都未能達顯著性差異。anti-NS3 IgM、IgG 和 IgA 檢驗特異性分別為 80%、80%、66.7%, 陽性預測值分別為 75%、66.4%、25%。

## 討論

本研究的工作目標在於找尋適合的基因重組蛋白作為血清學診斷用抗原，以提高登革熱和日本腦炎血清學檢驗的敏感性與特異性。常用的基因重組蛋白表現系統主要有五種：*E. coli*、mammalian system、*Saccharomyces cerevisiae*、*Bacillus subtilis* 以及昆蟲細胞〔9〕。基於蛋白質產量與方法可近性等方面考量，我們選取 *E. coli* 系統做為優先嘗試的方向，結果成功表現出 core 和 NS3 基因重組蛋白(圖一)。

傳統的黃病毒血清學檢驗方法多是利用病毒的結構性蛋白為抗原，雖然它們具備極佳的抗原性，可以在宿主體內引發很強的免疫反應，但是抗原之間的交叉反應性以及抗體持續性卻也對黃病毒感染的臨床檢驗造成相當大的困擾。根據以往的研究結果顯示，對抗非結構蛋白的抗體在發病後 5-6 天就可以測到〔5,9〕，利用登革病毒結構蛋白目前尚未有任何利用登革病毒 NS3 或 NS5 基因重組蛋白為抗原進行血清學檢測的文獻發表。

我們利用 *E. coli* 的表現系統，目前已成功生產出第二型登革病毒的 capsid 和 NS3 基因重組蛋白。採用 Ni-NTA agarose 純化後的 NS3 基因重組蛋白為抗原，進行登革熱陽性確定病例之恢復期及後恢復期血清抗體檢測，發現 anti-NS3 IgM 與 anti-NS3 IgG 抗體反應比正常人陰性對照組血清有明顯差異，特異性可達 80~93%，但靈敏度很低，

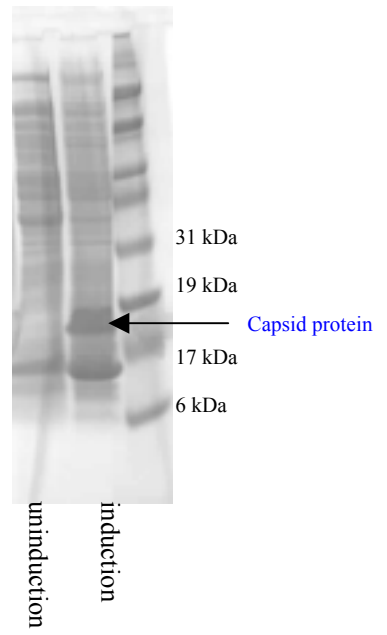
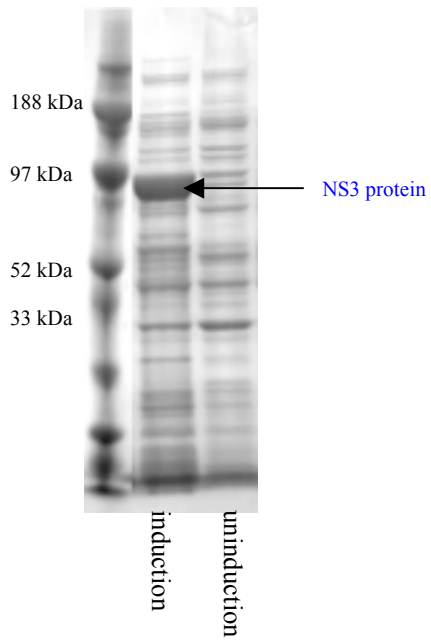
目前仍無法使用於臨床檢驗。主要的問題可能在於：(1) 目前使用的抗原純度不足，(2) 抗原的活性有待改進，需增加 native epitope 之抗原活性，(3) NS3 IgM 與 IgG 抗體反應比 E/M 及 NS1 抗原弱很多，不容易做出很高的抗體反應。未來，我們將繼續改進這些問題，提高基因重組蛋白質的抗原活性，並進行 ELISA 反應條件最適化研究，以完成利用非結構抗原基因重組蛋白質的血清學檢驗系統。

## 參考文獻

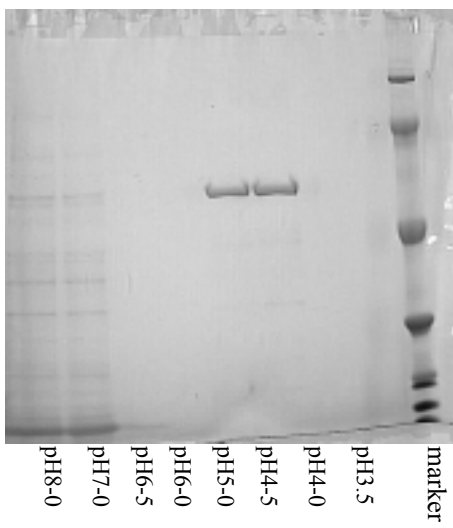
1. Remme J. H.F., Blas E, Chitsulo L, Desjeux P.M.P., Engers H.D., Kanyok T.P., Kayondo J.F.K., Kioy D.W., Kumaraswami V., Lazdins J.K., Nunn P.P., Oduola A., Ridely R.G., Toure Y.T., Zicker F., and Morel C.M.: Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends in Parasitology*; 2002; 18(10): 421-26.
2. WHO: TDR Strategic Direction: Dengue. [www.who.int/td/](http://www.who.int/td/); Feb 2002.
3. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, and Huang JH: Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination. *Vaccine*, 2001; 19:1753-63.
4. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Yang HH, Lin TH, and Huang JH: Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiological study of dengue virus infection: Correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J. Clin. Microbiol*, 2002; 40:1840-44.
5. Churdboochart V., Bhamarapravati N., Peampramprecha S., and Sirinavin S: Antibodies against viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 1991; 44:481-93.
6. Patarapotikul J., Pothipunya S., Wanotayan R., Hongyantarachai A., and Tharavanij S.: Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*; 1993; 24(2):269-76.
7. Valdés K., Alvarez M., Pupo M., Vázquez S., Roderíguez R., and Guzmán M. G.: Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol*; 2000; 7(5):856-57.
8. QIAGENE: QIAamp viral RNA mini kit handbook. 1999
9. Sambrook J. and Russel D.W.: Expression of cloned genes in *Escherichia coli*. 2001; in Sambrook J. and Russel D.W. (ed), *Molecular cloning: A laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY.

10. Leung D., Schroder K., White H., Fang NX, Stoermer M.J., Abbenante G., Martin J. L., Young P. R., and Fairlie D.: Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J. Biol. Chem*; 2001; 276(49): 45762-71.
11. Yusof R., Clum S., Wetzel M., Murthy H.M.K. and Padmanabhan R.: Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids *in vitro*. *J. Biol. Chem*; 2000; 275(14): 9963-69.
12. Offen B., Voit S., Fernholz E., and Hoffmann M.: Rapid Translation System RTS GroE supplement – a folding aid for better solubility of proteins. *Biochemica*; 2002; 1:20-21.
13. Khromykh A.A., Harvey T.J., Abedimia M., and Westaway E.G.: Expression and purification of the seven nonstructural proteins of the flavivirus Kunjin in the *E. coli* and the baculovirus expression system. *J. Virol. Methods*; 1996; 61: 47-58.
14. Preugschat F., Yao CW, and Strauss J.H.: In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B and NS3. *J Virol*; 1990; 64: 4364-74.
15. Bartelma G., and Padmanabhan R.: Expression, Purification, and Characterization of the RNA 5'-Triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology*; 2002; 299: 122-132.
16. Chang GW J., Davis B. S., Hunt A. R., Holmes D. A., and Kuno G.: Flavivirus DNA vaccines: Current status and potential. *Ann. NY Acad. Sci*; 2001; 951: 272-285.
17. Davis B. S., Chang GW J., Cropp B., Roehrig J.T., Martin D. A., Mitchell C.J., Bowen R., and Bunning M.: West Nile Virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expressed *in vitro* noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.*; 2001; 75(9): 4040-47.

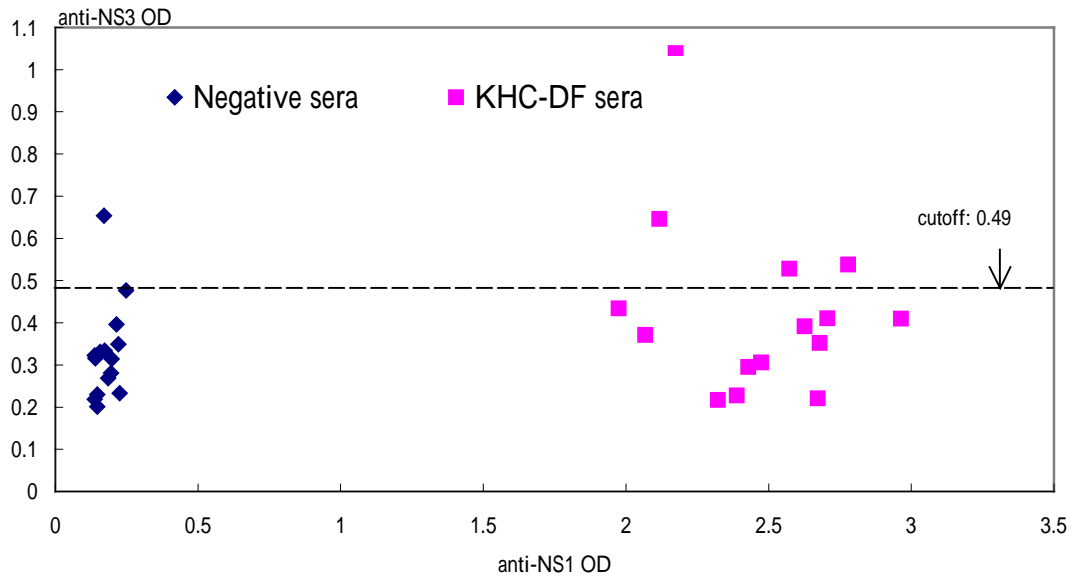
一



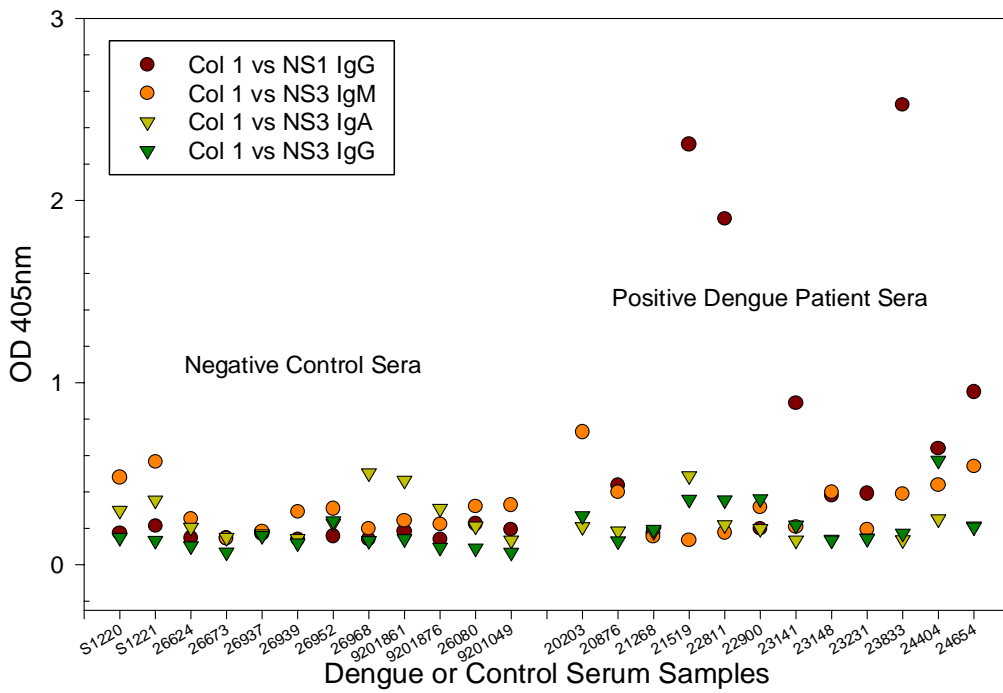
二



圖三



### NS3 ELISA



NS3-1

表一

|         | 2 ug/ml      | 4 ug/ml   | 6 ug/ml   |
|---------|--------------|-----------|-----------|
| p value | 0.028        | 0.05      | 0.058     |
| PPV     | 72.7% (8/11) | 80% (4/5) | 75% (3/4) |

表二

|                       | Negative sera | KHC-DF sera |
|-----------------------|---------------|-------------|
| Anti-NS3 IgG OD mean  | 0.258         | 0.344       |
| t-test p value = 0.05 |               |             |

表三

|                  | Negative sera | KHC-DF sera |
|------------------|---------------|-------------|
| anti-NS3 IgG (+) | 1             | 4           |
| Anti-NS3 IgG (-) | 14            | 11          |

Fisher exact test: 1-tailed p value = 0.165

表四

|                       | Negative sera | Convalescent sera |
|-----------------------|---------------|-------------------|
| Anti-NS3 IgM OD mean  | 0.46          | 0.53              |
| t-test p value = 0.24 |               |                   |
| Anti-NS3 IgG OD mean  | 0.24          | 0.26              |
| t-test p value = 0.38 |               |                   |
| Anti-NS3 IgA OD mean  | 0.29          | 0.23              |
| t-test p value = 0.17 |               |                   |

表五

|   | Negative sera | Convalescent sera |
|---|---------------|-------------------|
| anti-NS3 IgM (+)                            | 2             | 6                 |
| Anti-NS3 IgM (-)                            | 10            | 6                 |
| Fisher exact test: 1-tailed p value = 0.097 |               |                   |
| anti-NS3 IgG (+)                            | 2             | 4                 |
| Anti-NS3 IgG (-)                            | 10            | 8                 |
| Fisher exact test: 1-tailed p value = 0.32  |               |                   |
| anti-NS3 IgA (+)                            | 3             | 1                 |
| Anti-NS3 IgA (-)                            | 9             | 11                |
| Fisher exact test: 1-tailed p value = 0.295 |               |                   |