

計畫編號：DOH87-TD-1038

行政院衛生署八十七年度委託研究計畫

發展愛滋病 DNA 疫苗

研究報告

執行機構：國立台灣大學醫學院

計畫主持人：李君男

研究人員：陳茂源、李明城

執行期限：八十六年七月至八十七年六月

本研究報告僅供參考用，不代表本署意見

目 錄

目錄	i
圖表目次:	ii
摘要	iii
英文摘要(ABSTRACT)	iv
前言	1
實驗材料及方法	4
I. 血液及單核白血球檢體來源	4
II. 單核白血球之分離	4
III. 單核白血球 DNA 之萃取	4
IV. 聚合酵素連鎖反應	4
V. 核酸定序	5
VI. 質體之構築	6
VII. 蛋白質表現	8
VIII. SDS-PAGE	9
IX. 蛋白質純化	9
X. 西方墨點法	10
結果	12
(一) 抗原決定位之分析	12
(二) 重組蛋白質表現載體之構築	12
(三) 重組蛋白質之表現	13
(四) 重組蛋白質之免疫分析	14
討論	15
結論與建議	18
參考文獻	19
圖表	23

圖表目次

表一、台灣地區第一型人類免疫缺乏病毒 p24 蛋白抗原決定位氨基酸序列之比較.....	23
圖一、pRSET A,B,C 蛋白質表現質體結構圖.....	24
圖二、HIV-1 重組蛋白質基因 p24 PCR 產物之洋菜膠電泳圖.....	25
圖三、Colony PCR selection 洋菜膠電泳圖.....	26
圖四、pRSET. P24-E 質體可表現重組蛋白質之核酸序列.....	27
圖五、pRSET. P24-B.T 質體可表現重組蛋白質之核酸序列.....	28
圖六、P24-E 重組蛋白質表現產量之分析.....	29
圖七、P24-B.T 重組蛋白質表現與純化後之 SDS-PAGE 電泳圖.....	30
圖八、P24-E 重組蛋白質表現與純化後之 SDS-PAGE 電泳圖.....	31
圖九、P24 重組蛋白質與單株抗體 (mouse anti-p24) 之西方墨點試驗.....	32
圖十、重組蛋白質 P24-B.T 及 P24-E 與 HIV-1 感染血漿之西方墨點試驗.....	33
圖十一、重組蛋白質 P24-B.T 及 P24-E 與未受 HIV-1 感染血漿之西方墨點試驗.....	34
圖十二、p24 重組蛋白質與 HIV-1 B 亞型病毒感染者血漿之西方墨點試驗.....	35

摘 要

愛滋病是由人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)引起的。HIV 已造成世界各地的流行，亞洲地區之感染人數直線上升，世界衛生組織預估在西元 2000 年亞洲地區之感染人數將會佔了全世界感染人數的四分之一。台灣地區的 HIV-1 感染人數亦是持續在增加，我們應加強對於 HIV 之防治工作，疫苗之研究發展是不可或缺的。

一般認為在發展疫苗時，以當地最盛行之病毒作為候選之疫苗，成功之機會較大。本地盛行之 HIV-1，以 B 與 E 兩種亞型最多，故本研究選擇此兩種亞型之病毒株來做疫苗之研究。

本研究分析了台灣地區 12 個 B 亞型和 12 個 E 亞型(env)病毒株之 p24 蛋白質抗原決定位之氨基酸序列，經聚合酵素連鎖反應所增幅出之基因片段擇殖入質體中，再以之定出核酸序列，轉譯成氨基酸序列後比較，發現兩種亞型之病毒株分別與國外之參考病毒株有些許差異。將 p24 基因片段再擇殖入表現載體中，構築出兩個 p24 之蛋白質表現質體，分別含有 B 與 E 兩種亞型 HIV-1 p24 之基因，兩者均可以在大腸桿菌內經由 IPTG 誘導下產生大量之 p24 重組蛋白質，其中 E 亞型 p24 以單株抗體及 HIV-1 感染者之血漿均有血清反應發生。故此 p24 基因可用以接入另一蛋白表現質體，送入真核細胞內表現，將可做為核酸疫苗之用。另本研究表現之 p24 重組蛋白質更可應用在許多學術與臨床研究上，如應用於偵測 HIV-1 感染者體內抗體之變化，探討體內抗體量之變化與愛滋病發展的關係；亦可將表現之蛋白質去免疫動物，得到抗血清或單株抗體，做為偵測感染者體內病毒抗原之用；或利用在 ELISPOT 試驗上，偵測 HIV-1 感染者體內是否會有分泌抗體之 B 細胞。

關鍵詞：愛滋病、核酸疫苗、蛋白質表現

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus (HIV) is now virtually worldwide distributed. The transmission in Asia is dramatically increasing in recent years. The infection in Taiwan is also increasing. Vaccine development is essential for the control and prevention of HIV-1 infection.

In general, it is more efficient to incorporate the most prevalent virus strains as the candidate vaccine. The most prevalent HIV-1 in Taiwan belonged to subtypes B and E. Therefore, the virus strains of these two subtypes were selected for vaccine development.

This report included the work we have done for p24 gene. At first, we had analyzed the amino acid sequences of an antigenic determinant of the p24 gene which were amplified by PCR from 12 samples each of subtype B and E. The amplified p24 genes were cloned into T vector and then were sequenced by autosequencer. The deduced amino acid sequences were compared. The amino acid sequences of Taiwanese strains were varied a little from the reference strains. The p24 genes were then subcloned into a series of expression vectors, pRSET-A, B, or C. Two recombinant p24 gene constructs, either with subtype B or E, were successfully cloned and expressed. After IPTG induction, recombinant p24 was produced. Of these two recombinant proteins, p24 of subtype E could be reactive with specific monoclonal antibodies and plasma from HIV-1 infected individuals by Western blot testing. This construct could be further cloned into a mammalian expression vector and could be tested as a potential candidate of DNA vaccine. The p24 recombinant protein could be further purified and applied in various related studies.

Key words : AIDS, DNA vaccine, Protein expression

前 言

愛滋病 (AIDS) 是由人類免疫缺乏病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 引起的。HIV 已造成世界各地的流行，亞洲地區之感染人數直線上升，世界衛生組織預估在西元 2000 年亞洲地區之感染人數將會佔了全世界感染人數的四分之一。台灣地區的 HIV-1 感染人數亦是持續在增加，我們應加強對於 HIV 之防治工作，疫苗之研究發展是不可或缺的。

HIV 是一種反錄病毒 (Retrovirus)，它和一般的反錄病毒相似，其遺傳物質主要包含 gag、pol、env 三個部分，但 HIV 還多了一些輔助性的基因。由 gag 所生成之蛋白質，與病毒之核心結構有關，核心之主要成分為 p24，其他如 p17、p7 等之含量較少。pol 主要與病毒複製、嵌入及蛋白之切割所需之酵素之生成有關。env 基因生成一個前趨蛋白 gp160，經細胞之蛋白酶切割後成為 gp120 與 gp41 兩個糖蛋白 (23,29,34)，gp120 位於病毒粒子之表面，gp41 穿透外套膜，與 gp120 之間有非共價鍵之結合。HIV 感染細胞的第一步是經由 gp120 和細胞表面的病毒接受器 CD4 產生高度親和性的結合 (3,9,17)，進而病毒和細胞膜融合在一起，於是病毒進到細胞內，此步驟與 gp120 和 gp41 均有關連 (10,13,26)。gp120 的抗體可以阻斷 HIV-1 和 CD4 的結合，進而中和 HIV-1 的感染能力，此與 gp120 上之 CD4 binding region 有關 (7,14)；或是抑制融合的步驟而中和 HIV-1 的感染能力，此與高度變異性的 V3 部位有關 (16,21)，故外套膜蛋白一直被認為是疫苗發展的主要目標之一。HIV 之輔助性基因包括 tat、rev、vpu、vpr、vif、nef 等，這些基因多具有高度之保守性 (19)，在病毒之複製或感染細胞之過程具有重要之角色，tat 和 rev 是在 HIV 複製中佔有基本調控之地位 (12)。nef 基因之產物為一 27KD 之 myristylated protein，此蛋白之功能仍不確定，由猴子之實驗發現 Nef 蛋白對於感染後維持體內之高病毒量是必須的 (8)。最近由長期活存之 HIV-1 感染者分析其 nef 基因發現有缺損之現象，推測 Nef 蛋白與 HIV-1 之致病力有關 (4)。至於 vpu、vpr 及 vif 之角色仍不甚清楚。

發現 HIV-1 至今，十餘年來各先進國家傾全力支持 HIV-1 的研究，期望能發展有效的疫苗以抑制 HIV-1 感染的擴散。然而至今仍未發展出一種理想的疫苗，

其原因除了與致病機轉尚未明確瞭解外，HIV-1 病毒本身的變異性更增其困難度，不易評估疫苗之保護能力及缺乏一個合適的動物模式均成為疫苗發展的障礙 (11)。

HIV 疫苗主要採用兩種方式，一為利用完整的病毒，一為利用組成蛋白質 (subunits)。前者之優點為包含了病毒所有之成分，並呈現各個蛋白質的自然結構，缺點為病毒去活性處理時可能會有不完全的情況發生。如果採用減毒的 HIV 或與猴子的 SIV 組合之病毒 (如 SHIV) 當做疫苗，病毒之核酸會嵌入受免疫者之細胞 DNA 內，日後將會如何變化亦是可慮之處。第二種方式為利用病毒之組成蛋白質，雖無前者之缺點，但在體外由細胞表現之蛋白質必須經過純化等製造過程，經常會改變蛋白質之自然結構，繼而影響其抗原性而導致抗體品質的變化。以組成蛋白質當做疫苗之缺點為不易刺激產生細胞免疫力，即細胞毒殺淋巴球 (CTL) 之反應。對預防 HIV 之感染，能產生持續存在之抗體及 CTL 反應，在疫苗之發展上是同等重要的。

目前發展的 HIV-1 組成蛋白疫苗，除了利用各種方法改變蛋白質以改善其抗原性以利激發免疫反應，或嚐試採用各種不同之佐劑 (adjuvants)，以改善細胞免疫力 CTL 反應之產生。近年來一種新的技術核酸免疫法 (Nucleic acid vaccination) 被認為極具潛力而受到重視 (1,5)。

核酸免疫法是以表現蛋白質之媒介質體 DNA，直接利用注射或基因槍 (Gene gun) 的方式注入動物的皮膚、肌肉或其他組織中，可以刺激產生免疫反應 (2,6,15,22,28)。質體 DNA 在動物體內會產生蛋白質，並可維持蛋白質之自然結構，可以產生較好的抗體。另在細胞上可以展現處理過之抗原，免疫系統可以辨識，進而產生細胞免疫力。亦有實驗證明一些對傳統疫苗不起反應之小老鼠 (Nonresponder mice)，核酸疫苗可以刺激產生免疫反應 (36)。此外，核酸本身之穩定性及製造成本低廉亦為其優點。

核酸免疫法除了可以激發產生抗體及細胞免疫力外，在動物實驗證明核酸疫苗亦具有保護能力。例如一個會表現流行性感冒病毒血球凝集素之質體 DNA，注射過之動物具有免疫力，可以抵抗流行性感冒病毒之感染 (24,33)。如選擇流行性感冒病毒較保守之核蛋白 (Nucleoprotein) 基因，甚至可以保護不同型之流行性

感冒病毒之感染(18,27)。此外,在單純皰疹病毒(HSV)、狂犬病毒(Rabies Virus)等病毒亦有報導証明核酸疫苗會產生具保護作用之免疫力(37,39)。在小老鼠的實驗中發現質體 DNA 在注射之肌肉中可以長期持續存在並表現蛋白質(35),核酸疫苗對於持久性感染(persistent infection)是否有保護作用,在 Lymphocytic choriomeningitis virus 之核蛋白基因實驗中証明是有可能的(38)。

至於核酸疫苗在 HIV 之研究,已知利用含有 gp120 或 gp160 基因之質體 DNA 可以激發小老鼠或猴子產生體液的(Humoral)及細胞的免疫力(20,25,31,32)。在猴子的實驗中利用 SHIV challenge model 可以達到一些保護的效果(30)。至於何種 HIV 蛋白質基因最適合做為核酸疫苗,目前仍不清楚(40)。

一般認為在發展疫苗時,以當地最盛行之病毒作為候選之疫苗,成功之機會較大(11)。譬如本地盛行之 HIV-1,以 B 與 E 兩種亞型最多,則應選擇此兩種亞型之病毒株來做疫苗之研究。

而本研究已構築出兩個分別含有 B 與 E 兩種亞型 HIV-1 p24 之蛋白表現質體,以大腸桿菌表現 p24 之重組蛋白,並測試其與單株抗體及 HIV-1 感染者之血漿之血清免疫反應。

材料及方法

I. 血液及單核白血球檢體來源：

本研究使用之 HIV-1 感染者之血液檢體是1996年6月至1998年2月收集自台大醫院慢性病房。而單核白血球 (PBMC) 及血漿檢體是1991年8月至1997年5月收集自台北市性病防治所。

II. 單核白血球之分離

將當日以 EDTA 採血管收集之 HIV-1 感染者之血液檢體 (約8至10 C.C.)，以 2500 rpm (Sorvall RT 6000D) 離心十分鐘。將上層血漿以滴管吸出，裝入小試管中，保存在 -80°C 中。剩餘之血球則加入1 X PBS緩衝液至採血管中，補足原來血液體積，以 Ficoll-Hypaque 將單核白血球 (PBMC) 分離出來，並冰凍在 -80°C 保存。

III. 單核白血球 DNA之萃取

將200 μl RBC lysis buffer (0.32 M Sucrose, 10 mM Tris, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 % Triton X-100) 加入裝有50 μl PBMC的1.5 ml 離心管中混合均勻，置於 55°C 作用至紅血球完全溶解。再將單核白血球以10,000 rpm 離心一分鐘，倒掉上清液，再加入100 μl cell lysis buffer (10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.45 % NP-40, 0.45% Tween-20) 和1 μl Proteinase K (20 mg/ml) 混合均勻，置於 55°C 水浴槽中。翌日，再用沸水煮5分鐘，除去內含酵素之活性。最後儲存在 -20°C 中。

IV. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

本研究主要針對 HIV-1 的結構蛋白質基因 *gag* 進行兩次的 PCR 反應。PCR 反應的總體積為50 μl ，所使用的機型是 Perkin-Elmer DNA Thermal cycler 480。第一次 PCR 反應所使用的 DNA 模版是取10 μl 的單核白血球 DNA 萃取液，第二次 PCR 反應 DNA 模版是取1 μl 第一次的 PCR 反應產物。PCR 反應結束後，取5 μl 的反

應產物進行1% agarose電泳，以 ethidium bromide染色，在 UV照射下觀察是否有增幅出預期長度的 DNA 片段。再以 QIAGEN PCR反應產物純化試劑組 (QIAGEN, Germany)純化。

p24 基因PCR反應所使用引子對之核酸序列及反應條件如下所述：第一次 PCR所使用引子為 START (5'- ggg CAA ATg gTA CAT CAg gCC ATA TCA C -3') 及STOP(A) (5'- CYT AAA ATT gCC TCT CTg CAT CAT -3')。第二次 PCR所使用引子為START 及STOP(B)(5'- gCY TCC TAC AAA ACT CTT gCT TTA Tg -3')。P24所有PCR反應溫度條件皆為：94°C 30秒，60°C 1分鐘20秒，72°C 1分鐘，共進行 30 次，接著72°C 10分鐘，再靜置於4°C。

V. 核酸定序 (DNA Sequencing)

(1) 核酸定序反應 (cycle sequencing reaction)

欲利用螢光自動分析儀 (ABI-373-18 DNA Sequencer)分析核酸的序列，首先以 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit (Perkin-Elmer) 做核酸定序反應。取事先混合好的前混合液8μl (premix)，並加入20~200 ng 純化後PCR產物或 0.2~2.0 μg DNA質體當雙股形式的 DNA 模板，及定序用的引子 3.2 ~ 5.0 pmole，再加入適量的無菌二次蒸餾水，使反應的總體積為20 μl，最後並覆以一層礦物油。將反應物置於聚合酵素連鎖反應器中，反應的溫度設定為94°C 30秒，55°C 15秒，60°C 4分鐘，共計重覆25次，之後保存在4°C。

(2) 核酸定序反應產物之純化

為移除核酸定序反應完成後產物內所多餘的 dye terminators 和 primer，將核酸定序反應產物的礦物油在蠟紙 PARAFILM (American National Can TM) 上移除後，加入2 μl 3M sodium acetate (pH 4.6) 和 50 μl 95% ethanol混合均勻，並置於冰上10分鐘之後，以14000 rpm 離心 25~30分鐘，小心吸除上清液，並以250 μl 70% ethanol清洗沉澱物。真空乾燥後的 DNA沉澱物可保存在-20°C，待上機前才將之溶於3 μl loading buffer中 [deionized formamide : 25 mM EDTA (pH 8.0) = 5 : 1]。

(3) 核酸定序凝膠之準備

使用不含螢光劑之清潔劑洗淨玻璃，晾乾後置於自動核酸定序儀內掃描，確定玻璃無螢光物質之污染後，將間隔條 (Spacer) 置於兩玻璃之間，玻璃的左右兩側及底部以 3 M 膠帶封好，並以夾子固定，灌入 4.75% 凝膠 (polyacrylamide gel) 溶液 (7.125 ml 40% acrylamide [acrylamide : bis = 19 : 1] , 45 ml 11 M urea , 6ml 10 x TBE , 1.875 ml ddH₂O, 150 μ l 20% ammonium persulfate, 50 μ l TEMED)，並在玻璃上端插好間隔板 (Spacer)。約二小時後，凝膠凝結完全，拆除 3 M 膠帶，重新將玻璃洗淨晾乾後即可使用。

(4) 上機

將玻璃裝置在自動核酸定序儀內，並確認玻璃乾淨沒有螢光物質的污染後，拔出上方的間隔板，改插入齒狀板 (comb)。加入電泳緩衝液 (TBE buffer, Amresco, 89mM Tris, 2 mM Borate, 2 mM EDTA) 預跑三分鐘，以確認電壓是否介於 1000 到 1300 伏特之間。已溶於 loading buffer 之核酸定序反應物，先經由 94 °C 加熱兩分鐘，然後馬上放置在冰上。依序將反應物注入齒槽後，設定最大電壓 2500 Volt、電流 40 Amp、功率 40 Watt，跑 8~10 小時，電腦將自動收集結果並分析出核酸序列。

(5) 基因之分析

經螢光自動核酸定序儀分析出的基因序列，可利用電腦軟體 Gene Works (IntelliGenetics) 做序列的連結與比較，並依據參考的病毒株基因序列來做病毒之分型。亦可將基因序列轉換成氨基酸序列，以觀察蛋白質表現質體其氨基酸序列是否有誤。

VI. 質體之構築

(1) TA Cloning

由於 Taq polymerase 在做聚合酵素連鎖反應 (PCR) 時具有 nontemplate-dependent activity 的特性，會在 PCR 產物的 3' 端多加一個

deoxyadenosine (A)。故可選用 PCR II或是 PCR II.1(T vector, Invitrogen, USA)當作載體。此種載體在其5'端多出一個 deoxythymidine (T) residue , 故可與 PCR產物做連結 (Ligation)。反應時取純化過的 PCR DNA產物和1 μ l T vector (數量約3:1), 並加入1 μ l的10 X緩衝液和1 μ l的 T4 DNA Ligase (Invitrogen, USA), 補水至總體積10 μ l。在14°C下做連結反應, 反應時間至少四小時以上或放置到隔日。

(2) 限制酵素切割反應 (Restriction enzyme digestion)

針對基因重組所須選擇適當之限制酵素以3 U/ μ g DNA的比例相互混合。並依廠商建議使用適當的 10 X緩衝液, 加入適量的二次蒸餾水, 在37°C下作用2小時後將反應終止, 並可繼續進行純化反應。本實驗中所用到的限制酵素只有 EcoR I (New England BioLabs Inc.) 一種, 所使用的緩衝液為第二號緩衝液。如果切割的 DNA是載體DNA, 可再經由 CIP (Calf intestine alkaline phosphatase , New England BioLabs Inc.)處理, 除去5'端的磷酸根, 避免載體自行環化。

經限制酵素切割反應後之 DNA片段可經洋菜膠電泳後再行純化出所要之片段, 本實驗所使用的純化試劑組是 Ultra Clean™ DNA純化試劑組(Mo Bio Laboratories, Inc., USA)。純化後之 DNA將保存在-20°C。

(3) 核酸連結反應 (DNA Ligation)

將已用限制酵素切割過且純化後的 DNA片段, 和蛋白質表現載體以約3 :1的比例混合, 在加入1.5 μ l的10 X緩衝液和 1 μ l的T4 DNA Ligase (New England BioLabs Inc.), 補水至總體積15 μ l。在16°C下做連結反應到隔日。

(4) 轉型反應 (Transformation)

將連結反應的混合液加入50 μ l的勝任細菌 (JM 109 或 BLR), 輕輕地用 Tip攪拌均勻後置於冰上30分鐘, 然後移至42°C水浴槽作用40秒, 再快速移回冰上2分鐘, 之後將菌液均勻塗在含50 μ l/ml X-gal 和100 μ g/ml Ampicillin的1.5 % 的洋菜膠盤表面, 培養於37°C恆溫箱16-18小時。

(5) 聚合酵素連鎖反應之菌落篩選 (Colony PCR Selection)

在 TA Cloning 中，因為 T vector 可讓外來基因嵌入區域位在載體的 LacZ α 基因部份，會使得細菌無法表現 β -galactosidase，所以在含有 X-gal 的洋菜膠盤上，若為藍色的菌落則表示其所含載體不帶有外來基因；而白色菌落則可能就是含有外來基因擇殖成功的菌株。而 PCR 實驗可更進一步提高篩選的效率。

首先製備 PCR 反應混合物，其中包括 2.5 μ l 10 X buffer、2 μ l 2.5 mM dNTP、1.5 μ l primer (5 pmole/ μ l) 兩個和適量的無菌二次蒸餾水，使反應的總體積為 25 μ l。再用無菌 Tip 挖取一個已標示好之白色的菌落，置入 PCR 混合液中，吹吸均勻，在加入一層礦物油，置於聚合酵素連鎖反應器中 94°C 加熱，10 分鐘後立刻置於冰上，再加入 1 Unit 的 Taq DNA 聚合酵素。再選取適合此引子對之反應溫度條件進行聚合反應。PCR 反應結束後，取 8 μ l 的反應產物進行 1% agarose 電泳，以 ethidium bromide 染色，在 UV 照射下觀察是否有增幅出預期長度的 DNA 片段。

(6) 質體之製備

將由聚合酵素連鎖反應篩選法所確認的單一菌落，培養在 4ml 含有 Ampicillin (100 μ g/ml) 的 TB DRY 培養基裡，37°C 14-16 小時。並以 GenePrepPure™ Spin Plasmid Mini Kit (Watson Biotechnology Co., Ltd. Taiwan) 抽取質體。最後所得之質體溶液再以波長 260nm 測量吸光值 (OD₂₆₀) 以計算所抽取出質體的量，並做自動核酸定序，確定質體上的 DNA 序列。

VII. 蛋白質表現 (Protein expression)

挑選經核酸定序確定可表現重組蛋白質之單一菌落，培養在含 Ampicillin (100 μ g/ml) 4 ml TB DRY 的培養液中，37°C 14-16 小時。取 2ml 菌液加入含 Ampicillin (100 μ g/ml) 23 ml TB DRY 培養液，37°C 培養至 OD₆₀₀ 值約為 0.5~0.6。取 4 ml 菌液置於冰上，作為未加 IPTG 誘發重組蛋白質表現的對照組。剩餘之菌液加入 0.5~1.0 mM IPTG 於 37°C 培養。數小時後，將菌液在 4°C 下以 5000 X g 離心 5 分鐘，並以 0.25 倍體積之 1 X PBS 清洗一次。再將菌塊均勻溶在 0.1 倍體積

含1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)及 100 ug/ml Lysozyme的1 X PBS中。將此溶好的菌液置在冰上，用超音波振盪打破細胞，每振盪15秒休息30秒，重覆四次。再以12000 X g，4℃ 離心30分鐘，將上清液收集在一新的離心管中，且將沉澱物溶在1 X lysis緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 8M Urea)中，以供分析或純化用。

VIII. SDS-PAGE

將蛋白質萃取物與5 X sample buffer混合均勻。以沸水煮沸三分鐘後，立即放在冰中，準備跑 SDS-PAGE。Stacking gel與 Running gel 的濃度分別為 5 %及 15 %的 polyacrylamide gel。在200 Volt 下跑 1.0小時。以 Coomassie blue 染色15分鐘，再經脫色數小時或隔夜。最後以玻璃紙封片保存。

IX. 蛋白質純化

pRSET (A,B,C)載體所表現出來的蛋白質為 N端有六個連續的Histidine之融合蛋白質 (fusion protein)，此6個 His可與二價的 Co^{+2} 離子產生鍵結。本實驗中所使用的 TALON Superflow™ Metal Affinity Resin (Clontech Lab Inc., USA)就是利用此原理將細菌所表現出之重組蛋白質純化出來。

首先將 TALON Resin混合均勻，吸取2 ml樹脂 (resin)至15 ml離心管，離心2分鐘，吸掉含20%酒精的上層液。加入10 ml的 lysis緩衝液清洗樹脂，再離心2分鐘，吸掉 lysis緩衝液。將欲純化之蛋白質加入樹脂內完全混合，並置於室溫下輕輕搖晃20分鐘。離心5分鐘，將上層液體小心吸出，收集在另一試管中。加入12 ml的 lysis緩衝液清洗樹脂，在室溫下搖晃10分鐘。離心5分鐘，將上層液體吸出。重覆清洗的步驟一次。加入 2 ml的 lysis緩衝液與樹脂混合均勻，並將其加入 Poly-Prep Chromatography Column中，垂直靜置一段時間，待其樹脂完全沉澱下來。將底部之封口剪開，讓內部液體流乾。加入12 ml含有10 mM Imidazole的清洗緩衝液清洗樹脂。再加入8 ml含有50 mM Imidazole的萃取緩衝液，每滴出500 μl 收集一管，並依收集之先後順序編號。最後用含100 mM Imidazole 萃取液將所有的蛋白質都分離出來。接下來可將每一管收集之萃取液跑SDS-

PAGE，以確定是否有重組蛋白質被萃取出來。一般被萃取出之重組蛋白質會在第二管或第三管達最大量。

X. 西方墨點法

(1) 蛋白質轉印

將跑完 SDS-Polyacrylamide Gel 的 HIV-1 重組蛋白質轉印到 nitrocellulose paper 上，本研究中使用兩種方法：

第一種是利用重物壓片法。即首先以兩張 3MM filter paper (Whatman Inc., England)、一張 nitrocellulose paper (Schleicher & Schuell Inc., Germany)、一張電泳凝膠片、一張 nitrocellulose paper、兩張 3MM filter paper 之順序將其層層相疊以保鮮膜包裹後，以兩片玻璃將其夾住，最後用錫箔紙包裹住，平放在桌面上，再以重物加壓，靜置16小時以上。裡面所包裹的電泳凝膠片、nitrocellulose paper和 filter paper均要先浸泡過轉印緩衝液，且要避免有氣泡存在。

第二種是電泳法。在 Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA)的正極板上，由下而上，依序疊兩張 3MM filter paper、一張 nitrocellulose paper、一張電泳凝膠片、兩張3MM filter paper，所有重疊的電泳凝膠片、nitrocellulose paper和 filter paper均要先浸泡轉印緩衝液，且避免氣泡存在。重疊好後再蓋上負極板，以 15 伏特電壓跑30分鐘。

(2) 單株抗體與重組蛋白質之西方墨點試驗

將蛋白質已轉印好之 nitrocellulose paper浸泡在含3% bovine serum albumin (BSA)的1 X PBS緩衝液中，在37°C下輕輕搖晃1小時。再以 washing buffer清洗三次，每次5分鐘。接下來以稀釋100倍對抗 p24蛋白質的單株抗體(購自Chemicon International Inc., USA)在37°C下輕輕搖晃1小時。再以 washing buffer清洗三次，每次5分鐘。接下來以稀釋2000倍連結有酵素之山羊對抗老鼠免疫球蛋白 G之抗體，在37°C下輕輕搖晃1小時。再以 washing buffer清洗三次，1 X PBS清洗一次，每次5分鐘。最後加入10 ml呈色劑 (5 mg Diaminobenzidine

tetrahydrochoride, 10 μ l 30% H_2O_2 , 150 μ l 1% $NiCl_2$, 溶在10 ml 1 X PBS 中), 立即馬上觀察有無顏色變化。

(3) HIV-1感染者血清與重組蛋白質之西方墨點試驗

將蛋白質已轉印好之 nitrocellulose paper 浸泡在含3% bovine serum albumin (BSA) 的1 X PBS緩衝液中, 在37°C下輕輕搖晃1小時。再以washing buffer (含0.2 % Tween-20 的1 X PBS緩衝液) 清洗三次, 每次5分鐘。接下來以稀釋100倍 HIV-1感染者之血清在37°C下輕輕搖晃1小時。再以washing buffer清洗三次, 每次5分鐘。接下來以稀釋2000倍連結有酵素之山羊對抗人類免疫球蛋白G之抗體, 在37°C下輕輕搖晃1小時。再以 washing buffer清洗三次, 1 X PBS清洗一次, 每次5分鐘。最後加入10 ml呈色劑, 立即馬上觀察有無顏色變化。

結 果

(一) 抗原決定位之分析

爲了解台灣地區 HIV-1 感染者彼此間體內病毒 p24 蛋白質上有效的抗原決定位 (epitope) 之氨基酸序列的差異性，及與外國參考病毒株之關係。本研究中利用自動核酸定序儀，定出台灣地區 HIV-1 感染者體內病毒 p24 蛋白質之核酸序列，再利用電腦軟體將原本之核酸序列轉譯成爲氨基酸序列，進而探討此蛋白質上之有效抗原決定位其氨基酸序列之差異性。

分析了臺灣地區 12 個 B 亞型和 12 個 A 亞型病毒株 (其 *env* 基因爲 E 亞型) 之 p24 蛋白質抗原決定位 GPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQA (290-311 a.a, HIV-1 SF2) 之氨基酸序列分析上結果發現在 B 亞型病毒株中僅發現 1 個氨基酸位置有變異產生，而在 A 亞型之病毒株中有 2 個氨基酸位置發生變異 (表一)。而在所有分析的病毒檢體中，每一臺灣病毒株與國外參考株序列僅相差了 1 個氨基酸。

由氨基酸序列比對之結果發現，在台灣地區不同 HIV-1 病毒株之間 p24 蛋白質上抗原決定位之氨基酸序列相似性很高。

(二) 重組蛋白質表現載體之構築

(A) 重組蛋白質基因之增幅

本研究中可經由兩次的聚合酵素連鎖反應增幅出 HIV-1 蛋白質 p24 之基因。第二次 PCR 所使用的 3' 端引子有設計一個停止譯碼 (stop codon)，5' 端引子則含有起始譯碼 (start codon)。由圖二中的 Agarose 電泳圖中可看到所增幅出來 p24 基因長度爲約 680 bp。所增幅出來之基因長度可能會因爲病毒的本身突變而造成核酸的增加或減少，導致有些微之差距。

(B) 聚合酵素連鎖反應之菌落篩選

利用聚合酵素連鎖反應篩選菌落可以快速並準確的篩選出含有以正向嵌入之

外來基因，且可以做蛋白質表現之載體。在聚合酵素連鎖反應中，所加之引子對其中之一相對核酸序列為 T7 啟動子 (Promoter) 序列，另一引子則選擇位在所表現蛋白質 C 端之相對核酸序列上。如此在經聚合酵素反應三十個週期後，跑 Agarose 電泳則可觀察有無增幅出預估長度之 DNA 片段。從圖三之 Agarose 電泳圖中，可發現許多 Lanes 在 850 bp 位置附近都有 DNA 增幅，但根據經驗發現只有很亮的片段才是真正反應載體含有正向嵌入之外來基因，且可能表現蛋白質。

(C) 重組蛋白質表現載體之核酸定序

本研究中所選用可在大腸桿菌中表現重組蛋白質的載體是 pRSET™A,B,C (圖一)，利用限制酵素 EcoR I 的位置將重組基因嵌入載體。其所表現出之蛋白質 N 端會含有約 44-47 個氨基酸是屬於載體本身序列表現出來的蛋白質片段。本研究共構築了二種表現重組蛋白質的質體，分別是可表現核殼蛋白質 p24 的 pRSET.P24-B.T 和 pRSET.P24-E 等。

pRSET.P24-E 其可表現重組蛋白質之核酸序列全長 822 bp，可經轉譯成為 273 個氨基酸序列，其中包含有載體本身的 49 個氨基酸及 HIV-1 E 亞型病毒之核殼蛋白質 p24 的 224 個氨基酸 (圖四)；pRSET.P24-B.T 表現蛋白質之質體其因 p24 的基因序列 3' 端有一點突變，產生一終止譯碼 (Stop Codon)，所以表現出之蛋白質之核酸序列全長只有 678 bp，可經轉譯成為 225 個氨基酸序列，其中包含有載體本身的 49 個氨基酸及 HIV-1 B 亞型病毒核殼蛋白質少掉 C 端蛋白質片段的 176 個氨基酸 (圖五)。

(三) 重組蛋白質之表現

本研究中將上述二種 HIV-1 蛋白質 p24 之表現質體轉送進入大腸桿菌 BLR 菌種中，以 IPTG 誘發重組蛋白質之表現。在圖六中可發現重組蛋白質表現質體 pRSET.P24-E 之細菌，在以 0.5~1.0 mM IPTG 誘發蛋白質表現約五小時後，重組蛋白質之表現可達到最大量。所表現出來之重組蛋白質多以不可溶性蛋白質的型式存在菌體內。故須將菌體打破後離心，並將所得之沉澱物溶在含有 8 M Urea 的溶液中，再跑 SDS-PAGE 電泳，並以 Coomassie blue 染色，以觀察有無重組蛋白質

表現。圖七和圖八，分別為此二種重組蛋白質表現質體在 IPTG誘發蛋白質表現前、誘發後、蛋白質純化前和純化後之 SDS-PAGE圖。本研究中所使用之純化重組蛋白質試劑組為 TALON Superflow™ Metal Affinity Resin。由 SDS-PAGE圖中可發現，所純化之蛋白質主要是存在於第二和第三收集管中。且純化的效果並不理想，在純化後之液體裡面仍含有大腸桿菌的蛋白質。

(四) 重組蛋白質之免疫分析

(A) 重組蛋白質與單株抗體之西方墨點反應

此研究中將使用老鼠對抗 HIV-1 p24蛋白質的單株抗體去確定所表現出來的重組蛋白質是否為 HIV-1之病毒蛋白質。由圖九之西方墨點結果可發現，具有 p24全長之重組蛋白質 P24-E無論純化前或純化後皆可和單株抗體反應。而僅含有載體的細菌蛋白質萃取物和重組蛋白質 P24-B.T純化前與純化後之蛋白質萃取物，則皆不與單株抗體反應。P24-B.T是 p24蛋白質之 C端有短缺之重組蛋白質，有可能此部份正好是單株抗體作用的位置，因此而失去了與單株抗體反應的能力。

由以上結果顯示大腸桿菌所表現出來的融合蛋白質 P24-E應是 HIV-1蛋白質 p24之重組蛋白質。而重組蛋白質 P24-B.T則有待更進一步之證明。

(B) 重組蛋白質與HIV-1感染血漿之西方墨點反應

將受 HIV-1感染和未受 HIV-1感染者之血漿經稀釋100倍後與純化過的重組蛋白質進行西方墨點反應，以測試本研究中所表現之重組蛋白質的血清反應性。結果發現未受 HIV-1感染之血漿皆不與重組蛋白質反應(圖十一)。而在重組蛋白質與受 HIV-1 E亞型感染者之血漿西方墨點反應中，P24-E與 E亞型病毒株感染者之血漿皆有明顯的反應發生(圖十)，P24-B.T則無反應。再將此兩重組蛋白質 P24-B.T和 P24-E純化前和純化後之蛋白質萃取物與受 B亞型感染者之血清反應，結果重組蛋白質 P24-E與 B亞型感染者之血漿仍然有很好的血清反應，而 P24-B.T重組蛋白質與 B亞型感染者之血清反應則較弱(圖十二)。

討 論

根據本實驗室這幾年分析台灣地區 HIV-1 gp120 核酸序列的結果，台灣地區主要流行的 HIV-1 亞型是以 B 亞型居多，其次是 E 亞型。還有發現少數的 A、C、及 G 亞型。1988 年美國 Bionetics Research 公司 Devico 等人，曾以 HTLV-III_B 病毒株的病毒分解物做為抗原，與 700 位來自歐美已有愛滋病症狀或可能發展成為愛滋病的高危險族群之血清做免疫反應。由其結果發現 64.7 % 以上的血清皆可和 gp41、p31 及 p24 蛋白質反應。由此可見較多數的感染者體內會產生對抗病毒蛋白質 gp41、p31 及 p24 的抗體。所以本實驗室除了分析 gp120 外，亦想繼續探討在 p24 蛋白質上其核酸序列與氨基酸序列之差異性。

本研究中分析了台灣地區 16 個 B 亞型和 16 個 E 亞型之病毒檢體，結果發現在 p24 蛋白質第 306 個氨基酸位置可能是 Leucine (L)、Isoleucine (I) 和 Phenylalanine (F)，皆具有厭水性的側鏈。扣除掉這一類型的氨基酸變異，p24 蛋白質在不同病毒株之間的相似性亦將更高。

一個完整的蛋白質上其抗原決定位當然不會只有一個或兩個，而本研究中僅就國外曾經發表過最常討論的抗原決定位進行分析，其目的僅是想探討在這些抗原決定位上的氨基酸序列，在台灣地區第一型人類免疫缺乏病毒中相對的氨基酸序列是否彼此間具有差異，而由以上結果發現在 p24 蛋白氨基酸序列上變異十分小。

在進行重組蛋白質表現質體之篩選過程中，最初都是挑選單一檢體進行基因重組與轉殖到細菌內表現蛋白質，但所得可表現蛋白質之菌株機會很小。最後改由以多個檢體(5到6個)同時進行單一種重組蛋白質的表現，結果發現並非每一個核酸序列正確的質體都能表現出蛋白質來。平均約有一半的病毒檢體所構築之表現質體無法表現出重組蛋白質。而此種含有正確序列但無法表現蛋白質的質體在加入 IPTG 後，其細菌的生長曲線和不含 HIV-1 基因的表現質體生長曲線相似，而為何細菌內所含之質體不會受到 IPTG 之誘發調控，原因不明。

本研究中利用大腸桿菌為宿主細胞，在 IPTG 的誘發下成功的表現出 HIV-1 p24 之重組蛋白質。在蛋白質的表現過程中，將含有可表現重組蛋白質 p24 質體

之菌種培養至菌量在 OD_{600} 約等於0.5-0.6時，加入 IPTG誘發五小時後，可得到大量之 p24重組蛋白質。

本研究的過程中曾嘗試以較大量菌液培養表現蛋白質，目前在蛋白質大量表現上，除了重組蛋白質 P24-E可以在1公升培養液中大量表現外，重組蛋白質 P24-B.T的表現量並不理想。故可能需要將蛋白質表現質體重新轉送細菌一次，同時取多個菌落表現蛋白質，以篩選出少量培養時蛋白質表現量較大之菌落。進而測試此菌株改為大量培養表現蛋白質之最適當的培養條件，例如：IPTG之濃度、培養之溫度、氧氣濃度和酸鹼度等。

在重組蛋白質的純化方面，本實驗中使用 TALON Superflow™ Metal Affinity Resin 上所含的二價的 Co^{+2} 離子與 pRSET載體所表現出來的融合蛋白質 N端上六個連續的 Histidine產生鍵結，而將表現出之重組蛋白質純化出來。由 SDS-PAGE的結果可看出純化之蛋白質並不夠純，仍多少含有細菌本身之蛋白質在裡面。所以在製備西方墨點反應之抗原時，不能直接將純化後之蛋白質固定在 nitrocellulose paper上，而需經由跑電泳先將裡面所含之蛋白質分開，再轉印到 nitrocellulose paper，才能進行西方墨點試驗。否則，必須進一步利用其他的方法，如毛細電泳、Gel filtration、Affinity chromatography等方法以得到更純的蛋白質。

將以大腸桿菌所表現出來二種 HIV-1 p24之重組蛋白質與購買來的單株抗體做免疫反應，發現 P24-E可與單株抗體反應，推測此蛋白質應是 HIV-1之蛋白質 p24。但 P24-B.T則皆不與單株抗體反應，其原因可能是此蛋白質的 C端含有單株抗體所認的抗原位置，而此重組蛋白質皆發生 C端蛋白質部份短缺，所以喪失與單株抗體結合的能力。

在此兩種 HIV-1 p24之重組蛋白質的血清免疫反應方面，發現只有 HIV-1感染者之血漿可和重組蛋白反應，正常人血漿則無反應，推論受 HIV-1感染者體內血液含有與 p24重組蛋白質反應之抗體。就血漿來源所感染之病毒亞型來看，重組蛋白質 P24-E可和 B亞型與 E亞型病毒株感染者的血漿有強的血清免疫反應發生，而 p24蛋白質 C端短缺的重組蛋白質 P24-B.T無論和 B亞型或 E亞型病毒株感染者的血漿反應，其結果均很弱。所以推測 p24蛋白質的 C端可能含有一個很

重要的抗原決定位，或是 C 端的氨基酸序列與整個蛋白質的結構有關，缺少了這個部份可能影響了 p24 之抗原性。

本研究初步結果已成功利用大腸桿菌表現出 HIV-1 p24 之重組蛋白質，除了 C 端有短缺的 P24-B.T 外，重組蛋白質 P24-E 可和 HIV-1 感染者之血漿有很強的血清免疫反應。日後之研究方向可繼續將 B 亞型之 p24 全長之重組蛋白質表現出來，並將此 HIV-1 之基因嵌接入一可在真核細胞表現蛋白之載體，更進而將此質體送入小老鼠體內觀察其引發免疫反應之效果。而以在大腸桿菌系統中表現出之重組蛋白更可應用在許多學術與臨床研究上，例如：用於偵測 HIV-1 感染者體內抗體之變化，探討體內抗體量之變化與愛滋病發展的關係；亦可將表現之蛋白質去免疫動物，得到抗血清或單株抗體，做為偵測感染者體內病毒抗原之用；或利用在 ELISPOT 試驗上，偵測 HIV-1 感染者體內是否有分泌抗體之 B 細胞。

結論與建議

本研究中利用大腸桿菌為宿主細胞，在 IPTG 的誘發下成功的表現出 HIV-1 p24 之重組蛋白質。由 SDS-PAGE 的結果可看出純化之蛋白質並不夠純，仍多少含有細菌本身之蛋白質。要得到更純之蛋白質，必須利用其他的方法，如毛細電泳、Gel filtration、Affinity chromatography 等方法將之進一步純化。

表現出之重組蛋白質 P24-E 可與單株抗體及 HIV-1 感染者之血漿有很強的血清免疫反應，C 端有短缺的 P24-B.T 則無。日後之研究可繼續將 B 亞型之 p24 全長之重組蛋白質表現出來，並將此 HIV-1 之基因轉接入一可在真核細胞表現蛋白之載體，即有可能做為核酸疫苗。而以在大腸桿菌系統中表現出之重組蛋白更可應用在許多學術與臨床研究上，如應用於偵測 HIV-1 感染者體內抗體之變化，探討體內抗體量之變化與愛滋病發展的關係；亦可將表現之蛋白質去免疫動物，得到抗血清或單株抗體，做為偵測感染者體內病毒抗原之用；或利用在 ELISPOT 試驗上，偵測 HIV-1 感染者體內是否會有分泌抗體之 B 細胞。

參考文獻

1. Cohen, J. 1993 Naked DNA points way to vaccine. *Science* 259:1691.
2. Cox, G. J. M., T. J. Zamb, and L. A. Babiuk. 1993. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 67:5664.
3. Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R. et al. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.
4. Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Dowton, and J. Mills. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270:988-991.
5. Donnelly, J. J., J. B. Ulmer, and M. A. Liu. 1994 . Immunization with polynucleotides: a novel approach to vaccination. *Immunologist* 2 (1):20.
6. Fynan, E. F., R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, and H. L. Robinson. 1993. DNA vaccines : Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11478-11482.
7. Ho, D. D., McKeating, J. A., Li, X, L. et al. 1991. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* 65:489-493.
8. Kestler, H. M., III, D. J. Ringler, K. Mori, D.L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651-662.
9. Klazmann, D., Champagne, E., Chamaret, S. et al. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-771.
10. Kowalski, M., Polz, J., Baasiripour, L. et al. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237:1351-1355.
11. Lee, T. H. 1996. Acquired immunodeficiency disease vaccines : design and development. *AIDS : Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4th ed. Chapter 32. ed.V. T. DeVita, Jr. , S. A. Rosenberg.

Lippincott-Raven Publishers.

12. Levy, J. A. 1995. The Retroviridae Volume 4 p.5-7. Plenum Press.
13. Lifson, J. D., Feinberg, M.B., Reyes, G. R. et al. 1986. induction of CD4- dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. Nature 323:725-728.
14. Linsley, P., Ledbetter, J., Thomas, E., and Hu, S. -L. 1988. Effects of anti-gp120 monoclonal antibodies on CD4 receptor binding by the env protein of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 62:3695-3702.
15. Liu, M. A., and F. R. Vogel. 1994. Use of novel DNA vectors and immunologic adjuvants in HIV vaccine development. AIDS 8 (Suppl.):S195-S201.
16. Matthews, T., Langlois, A., Robey, W. et al. 1986. restricted neutralization of divergent human T-lymphotropic virus type III isolated by antibodies to the major envelope glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9709-9713.
17. McDougal, J. S., Kennedy, M. S., Sligh, J. M. et al. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and T4 molecule. Science 231:382-385.
18. Montgomery, D. L., J. W. Shiver, K. R. Leander, H. C. Perry, A. Friedman, D. Martinez, J. B. Ulmer, J. J. Donnelly, and M. A. Liu. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. DNA Cell Biol. 12:777-783.
19. Myers, G., Rabson, A. B., Berzofsky, J. A. Smith, T. F., and Wong-Staal, F. 1994. Human retrovirus and AIDS. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.
20. Peet N., P. Delves, B. de Souza, G. Cambridge, L. Wilkinson, T. Klonisch, P. Matear, A. Vyakarnam, and T. Lund. 1995. The immune response to HIV gp120 induced by nucleic acid immunization (NAI). Annals of the New York Academy of Sciences. 772:257-260.
21. Putney, S., Matthews, T., Robey, W. G. et al. 1986. HTLV-III/LAV-neutralizing antibodies to an E. coli-produced fragment of the virus envelope. Science 234:1392-1395.
22. Raz, E., D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M. A. Yankauckas, S. M. Baird, and G. H. Rhodes. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519.
23. Robey, W. G., Safai, B., Oroszan, S. et al. 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from

- AIDS patients. *Science* 228:593-595.
24. Robinson, H. L., L. A. Hunt, and R. G. Webster. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11:957-960.
 25. Shiver J., H. Perry, M. Davies, D. Freed, and M. Liu. 1995. Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 772:198-208
 26. Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D. et al. 1987. pH-dependent HIV entry into CD4-positive T cells via virrus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* 49:659-668.
 27. Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Laender, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, and M. A. Liu. 1993 Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-1749.
 28. Vahlsing, H. L., M. A. Yankauckas, M. Sawdey, S. H. Gromkowski, and M. Manthorpe. 1994. Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *J. Immunol. Methods* 175:11.
 29. Veronese, F. D., DeVico, A. L., Copeland, T. D. et al. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229:1402-1405.
 30. Wang, B., J. Boyer, V. Skikantan, K. Ugen, M. Agadjanan, M. Merva, L. Gilbert, K. Dang, D. McCallus, and K. Moelling. 1995. DNA inoculation induces cross clade anti-HIV-1 responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 772:186-197.
 31. Wang, B., J. Boyer, V. Skikantan, L. Coney, R. Carrano, C. Phan, M. Merva, K. Dang, M. Agadjanan, L. Gilbert, K. E. Ugen, W. V. Williams, and D. B. Weiner. 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* 12:799-805.
 32. Wang, B., K. E. Ugen, V. Srikantan, M. G. Agadjanyan, K. Dang, Y. Refaeli, A. I. Sato, J. Boyer. W. V. Williams, and D. B. Weiner. 1993. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4156-4160.
 33. Webster, R. G., E. F. Fynan, J. C. Santoro, and H. Robinson. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 12:1495-1498.

34. Wiley, R.L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J. et al. 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9580-9584.
35. Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, and A. Jani. 1992. Longterm persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1:363-369.
36. Schirmbeck R., W. Bohm, K. Ando, F. V. Chisari, and J. Reimann. 1995. Nucleic acid vaccination promotes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol.* 69 : 5929.
37. Manickan, E., R. J. D. Rouse, Z. Yu, W. S. Wire, and B. T. Rouse. 1995. Genetic immunization against herpes simplex virus, protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 155 : 259-265.
38. Martins, L. P., L. L. Lau, M. S. Asano, and R. Ahmed. 1995. DNA vaccination against persistent viral infection. *J. Virol.* 69 : 2574-82.
39. Xiang, Z. Q., S. Spitalnik, M. Tran., W. H. Wunner, J. Cheng, and H. C. J. Ertl. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199 : 132-140.
40. Round table discussion on AIDS vaccines. 1996. Xth International congress of Virology. Israel.

表一：臺灣地區第一型人類免疫缺乏病毒 p24 蛋白抗原決定位(Epitope)氨基酸序列之比較

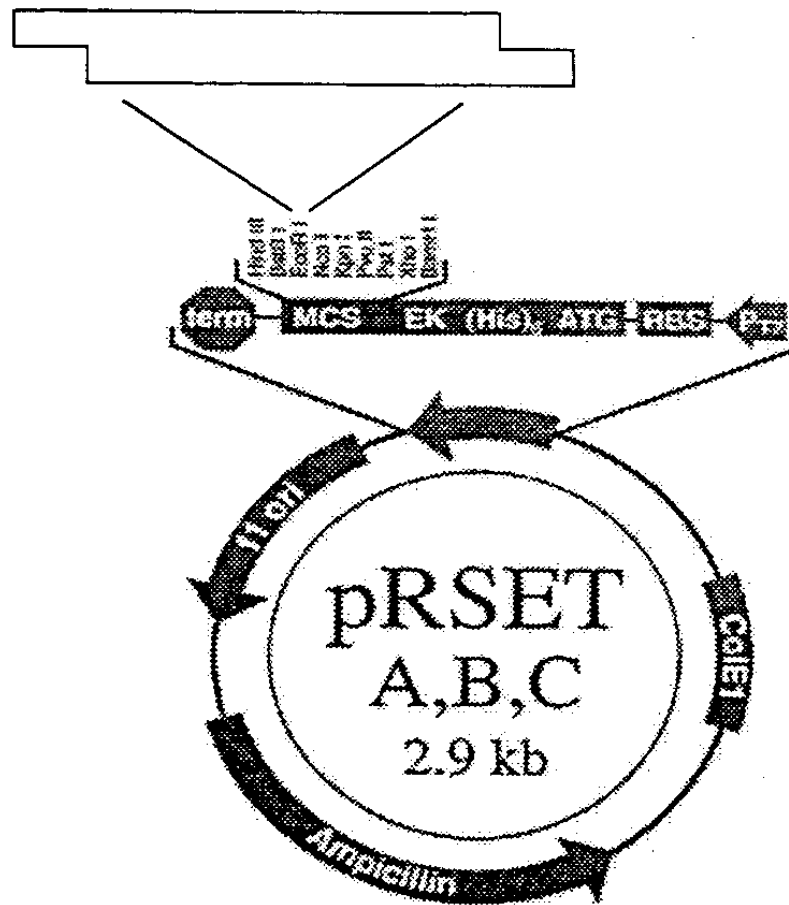
Subtype.	Sample number.	Consensus Amino Acid Sequences	
		290 a.a.~ 311 a.a. ^a	
		GPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQA ^b	
B	12	-----I-----	1
			F
			1
		GPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQA ^c	
A	13	-----F-----P-	1 1

a. 此氨基酸號碼是比照 HIV-1 SF2 病毒株之 *gag* 基因轉譯後之氨基酸序列號碼。

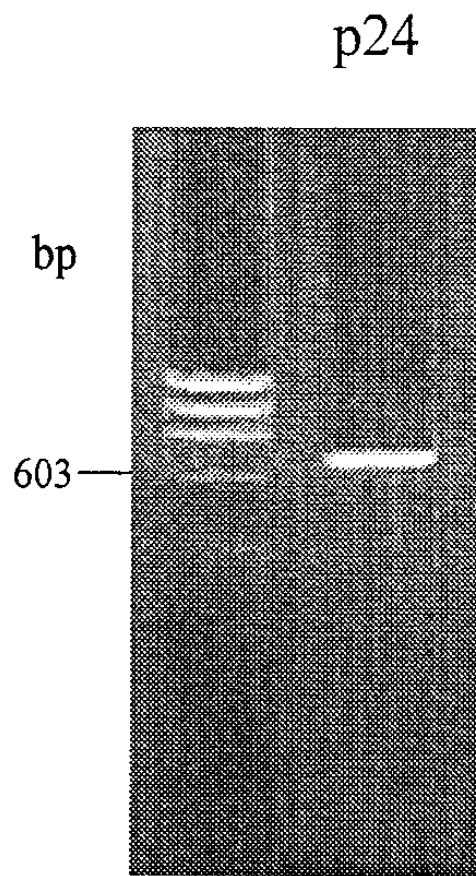
b. B 亞型 HIV-1 之 Consensus amino acid sequences 是來自 Los Alamos National Laboratory 比較不同的病毒株之結果；
小寫之英文字母代表此氨基酸位置變異較大。

c. 此 Consensus amino acid sequences 是比對泰國之 HIV-1 TN238, TN240, TN243 和 TN245 病毒株(其 *env* 基因皆為 E 亞型)之氨基酸序列所得。

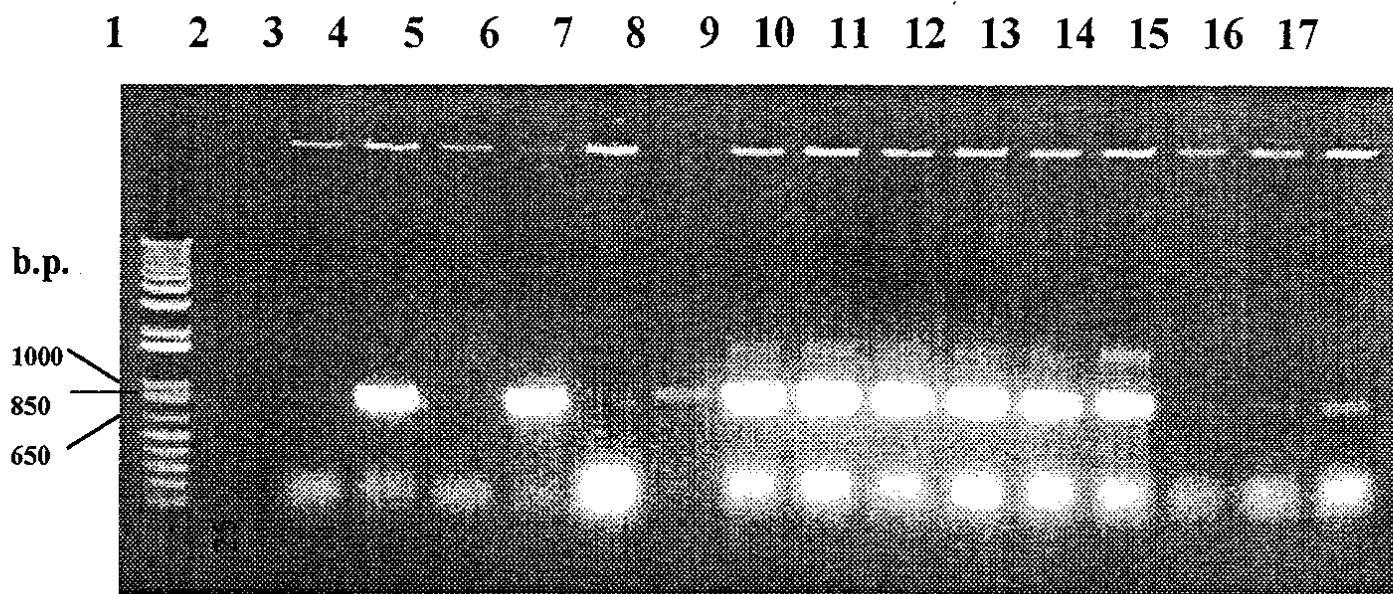
Inserted genes of HIV-1(p24):



圖一：pRSET A,B,C 蛋白表現載體結構圖。
(本圖來自 Invitrogen 1997 product catalog.)



圖二：HIV-1蛋白基因 p24 PCR產物之洋菜膠電泳圖。



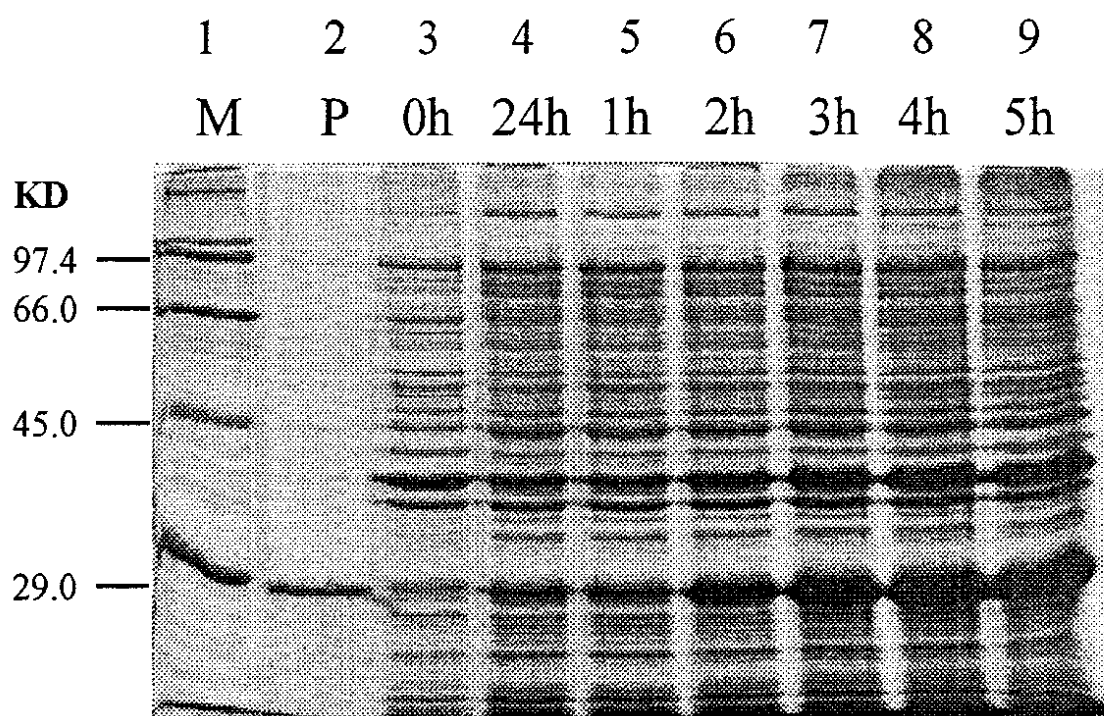
圖三：Colony PCR selection 洋菜膠電泳圖。Lane 1：是marker。Lane 2：是PCR的 negative control。Lane 3~17：為不同菌落之 PCR反應。而只有在850 bp有很強的 DNA增幅的菌落才是含有正向嵌入外來基因質體的菌落。(例如: Lane 4,6, 9,10,11,12,13,14等)

ATG OGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT OGG GAT CTG	75
TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT <u>GGA ATT CGG</u> CTT GGG	150
p24 EcoR I	
CAA ATG GTA CAT CAG GCC ATA TCA CCT AGA ACT TTG AAT GCA TGG GTG AAA GTA GTA GAA GAA AAG GGT TTT AAC	225
CCA GAA GTA ATA CCC ATG TTC TCA GCA TTA TCA GAG GGA GCC ACC CCA CAA GAT TTA AAT ATG ATG CTC AAT ATA	300
GTG GGG GGA CAC CAG GCA GCA ATG CAA ATG TTA AAA GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA CAA TGG GAT AGG GTA	375
CAC CCA GTA CAT GCA GGG CCT ATT CCA CCA GGC CAG ATT AGG GAA CCA AGG GGA AGT GAC ATA GCA GGA ACT ACT	450
AGT ACC CTT CAA GAA CAA ATT GGA TGG ATG ACA AAC AAT CCA CCT CTC CCA GTG GGA GAG ATC TAT AAA AGG TGG	525
ATA ATC CTG GGA TTA AAT AAA ATA GTA AGA ATG TAT AGC CCT GTT AGC ATT TTG GAC ATA AGA CAA GGG CCA AAA	600
GAA CCC TTC AGA GAC TAT GTA GAT AGG TTC TAT AAA ACT CTC AGA GCG GAA CAA GCT ACA CAG GAG GTA AAA AAC	675
TGG ATG ACA GAA ACC TTG CTA GTC CAA AAT GCG AAT CCA GAC TGT AAG TCC ATT TTA AAA GCA TTA GGA ACA GGA	750
GCT ACA TTA GAA GAA ATG ATG ACA GCA TGC CAG GGA GTG GGA GGA CCT AGC CAT AAA GCA AGA GTT TTG TAG	822

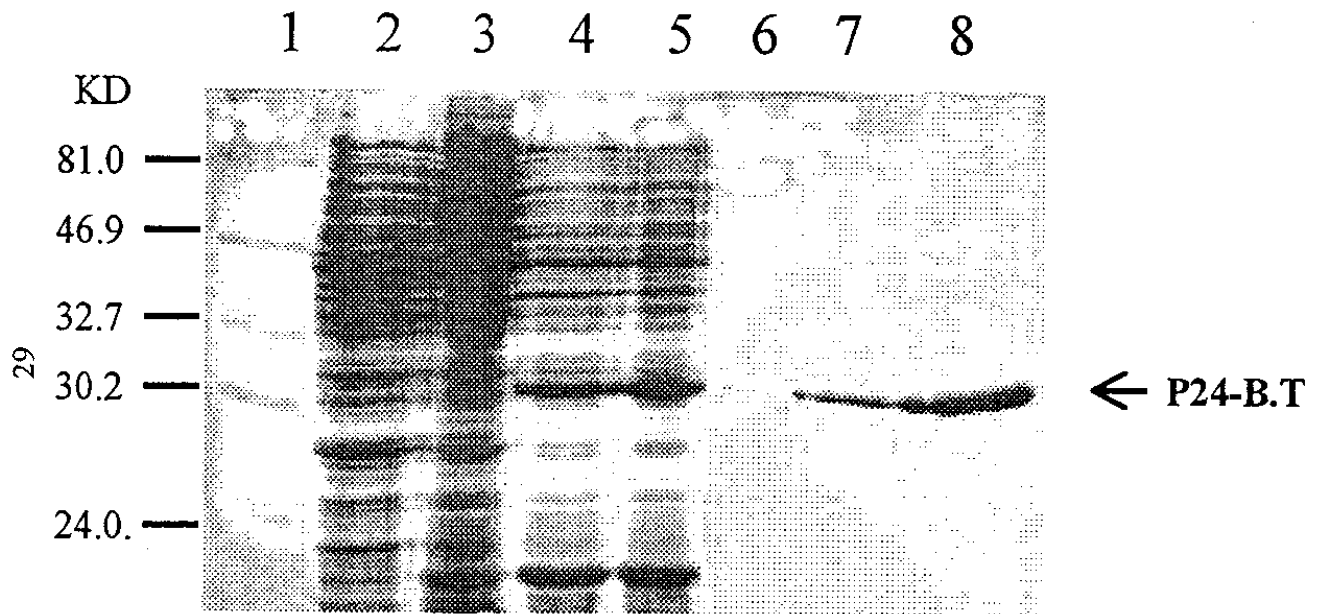
圖四：pRSET.P24-E 質體可表現出重組蛋白質之核酸序列。

ATG CGG GGT TCT CAT <u>CAT CAT CAT CAT</u> GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG	75
TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT <u>GGA ATT</u> CGG CTT GGG	150
EcoR I	
CAA ATG GTA CAT CAG GCC ATA TCA CCT AAA ACT TTA AAT GCA TGG GTA AAA GTA GTA GAA GAG AAG GCT TTC AGC	225
CCA GAA GTA ATA CCC ATG TTT TCA GCA TTA TCA GAA GGA GCC ACC CCA CAA GAT TTA AAC ACC ATG CTA AAC ACA	300
GTT GGG GGA CAT CAA GCA GCC ATG CAA ATG TTA AAA GAA ACC ATC AAT GAG GAA GCA GCA GAA TGG GAT AAA TTG	375
CAT CCA GTG CAT GCA GGG CCT ATT GCA CCA GGC CAG ATC AGA GAA CCA AGG GGA AGT GAC ATA GCA GGA ACT ACT	450
AGT ACC CTT CAG GAA CAA ATA GCA TGG ATG ACA AAT AAT CCA CCT ATC CCA GTA GGA GAA ATC TAT AAA AGA TGG	525
ATA ATC CTG GGA TTA AAT AAA ATA GTA AGG ATG TAT AGT CCT ACC AGC ATT TTG GAC ATA AGA CAG GGC CCA AAA	600
GAA CCC TTT AGA GAT TAT GTA GAC CGG TTC TAT AAA ACT CTA AGA GCC GAG CAA GCT TCA CAG GAG GTA AAA AAC	675
TGA	678

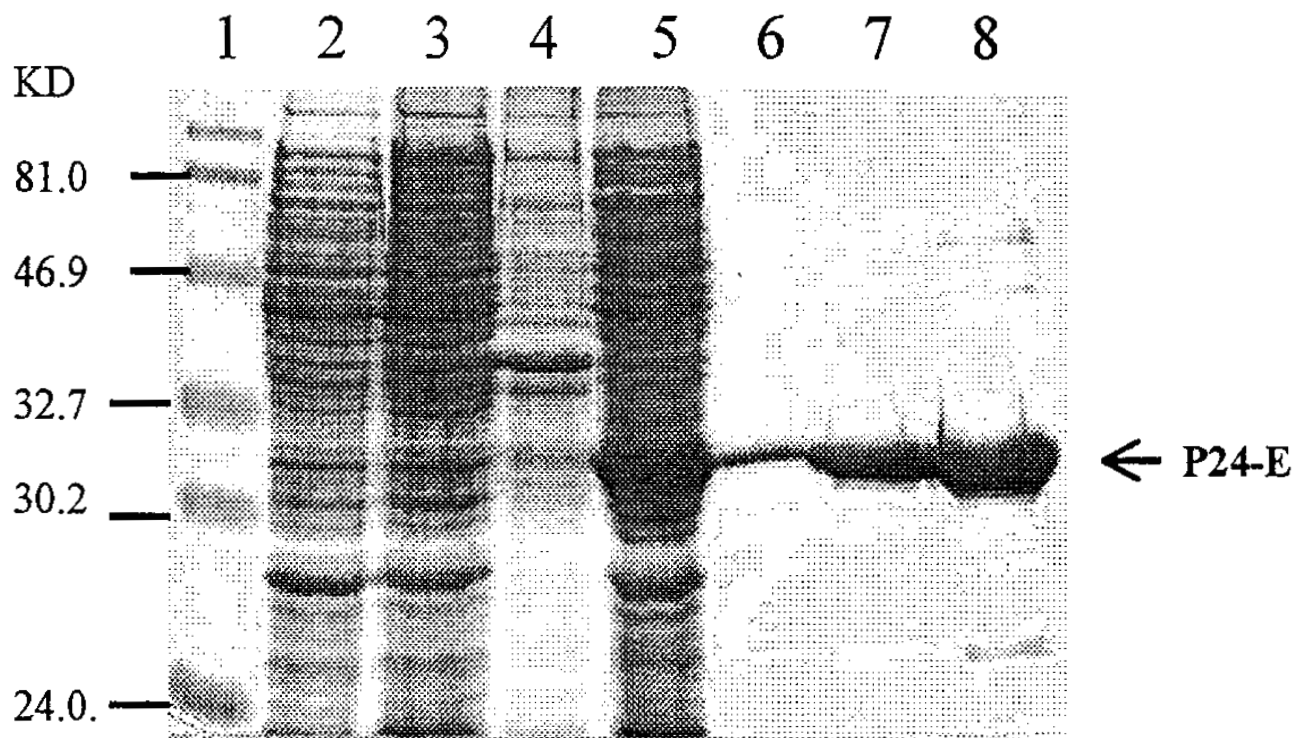
圖五：pRSET.P24-B.T 質體可表現重組蛋白質之核酸序列。



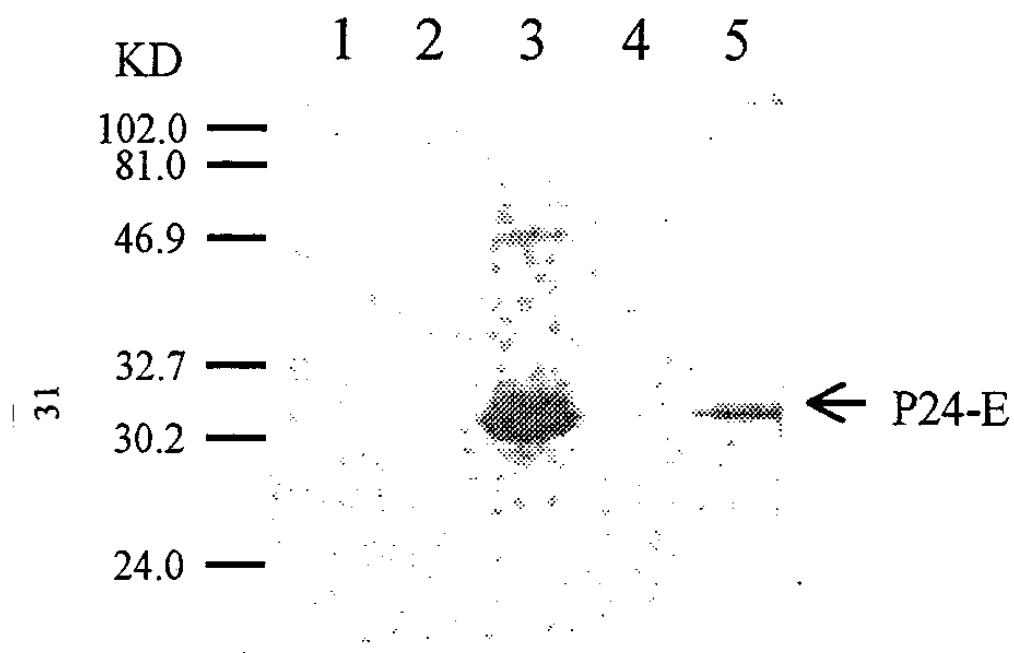
圖六：P24-E重組蛋白質表現產量之分析。Lane 1：Protein marker。Lane 2：純化過後之 P24-E重組蛋白質。Lane 3：不含重組蛋白質基因之大腸桿菌於 IPTG誘發後0小時。Lane 4：不含重組蛋白質基因之大腸桿菌於 IPTG誘發後24小時。Lane 5~9：含有重組蛋白質基因之大腸桿菌於 IPTG誘發後1,2,3,4,5小時之蛋白質萃取物。



圖七：P24-B.T重組蛋白質表現與純化後之 SDS-PAGE電泳圖，以 Coomassie blue 染色。Lane 1：Protein Marker。Lane 2：大腸桿菌之 BLR 菌種。Lane 3：含有 pRSET 載體之 BLR。Lane 4：含有 pRSET.P24-B.T 質體之 BLR，未加 IPTG。Lane 5：含有 pRSET.P24-B.T 質體之 BLR，加 IPTG 後五小時。Lane 6~8：P24-B.T 重組蛋白質純化後，收集之前三管萃取液(每管 500 μ l)。



圖八：P24-E重組蛋白質表現與純化後之 SDS-PAGE電泳圖，以 Coomassie blue 染色。Lane 1：Protein marker。Lane 2：大腸桿菌之 BLR 菌種。Lane 3：含有 pRSET載體之 BLR。Lane 4：含有 pRSET.P24-E質體之 BLR，未加 IPTG。Lane 5：含有 pRSET.P24-E質體之 BLR，加 IPTG後五小時。Lane 6~8：P24-E重組蛋白質純化後，收集之前三管萃取液(每管500 μ l)。

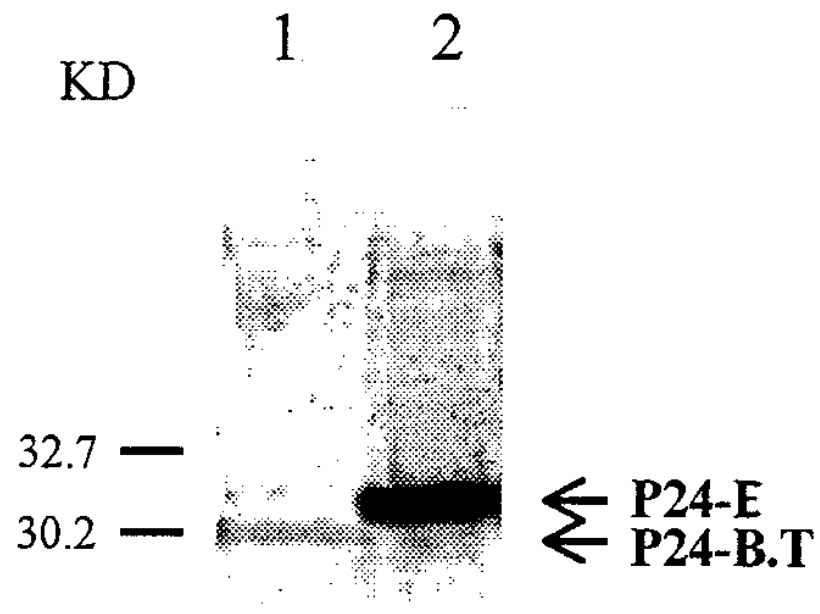


圖九：p24之重組蛋白質與單株抗體(mouse anti-p24)之西方墨點試驗。

Lane 1：含有 pRSET載體之 BLR。Lane 2：純化前之重組蛋白質 P24-B.T。

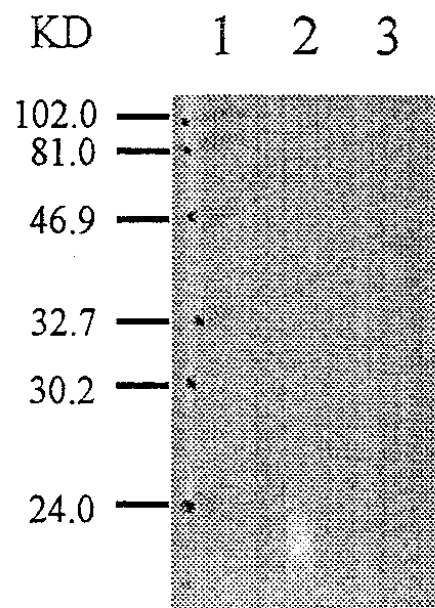
Lane 3：純化前之重組蛋白質 P24-E。Lane 4：純化後之重組蛋白質 P24-B.T。

Lane 5：純化後之重組蛋白質 P24-E。單株抗體只與全長的 p24之重組蛋白質 P24-E反應。



圖十：重組蛋白質 P24-E 及 P24-B.T 與 HIV-1 感染血漿之西方墨點試驗。

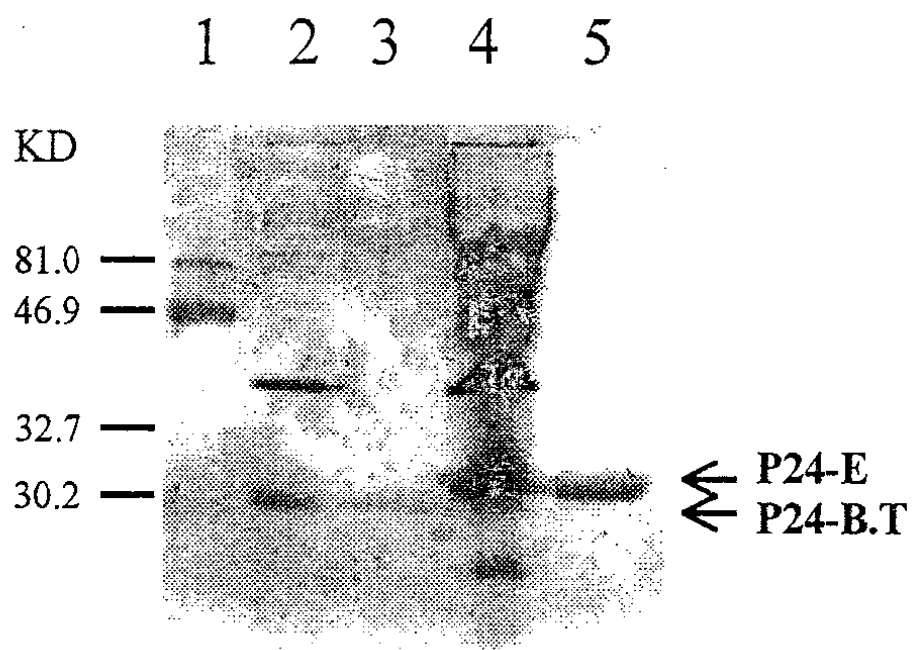
Lane 1：純化後之重組蛋白質 P24-B.T。Lane 5：純化後之重組蛋白質 P24-E。此血漿為 E 亞型病毒感染之血漿。



圖十一：重組蛋白質 P24-B.T及 P24-E與未受 HIV-1感染血漿之西方墨點試驗。

Lane 1：Protein marker。Lane 2：純化後之重組蛋白質 P24-B.T。

Lane 3：純化後之重組蛋白質 P24-E。



圖十二：p24重組蛋白質與 HIV-1 B亞型病毒株感染者血漿之西方墨點試驗。Lane 1：Protein marker。

Lane 2：純化前之重組蛋白質 P24-B.T。Lane 3：純化後之重組蛋白質 P24-B.T。Lane 4：純化前之重組蛋白質 P24-E。Lane 5：純化後之重組蛋白質 P24-E。(反應結果兩種亞型之重組蛋白質皆可與 B亞型感染血漿反應，但 P24-B.T反應效果不好。)