計畫編號: DOH95-DC-1414

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

計畫名稱:

流感病毒群體研究— 病毒學、免疫病理學、免疫分析技術平台

研究報告

執行機構:國立成功大學

計畫主持人:王貞仁

研究人員:黎煥耀、劉清泉、王憲威、龔彥樺、林雅嵐、邱芳琳

執行期間: 95年 1月 1日至 95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

封面	•••••	1
目錄	•••••	2
表目錄	•••••	2
圖目錄	•••••	3
中文摘要	•••••	4
英文摘要	•••••	6
前言	•••••	8
材料與方法	•••••	20
结果與討論	•••••	26
結論與建議	•••••	34
計畫重要研究成果及具體建議	•••••	40
参考資料	••••••	42
表目錄 表一、RT-PCR 增幅流成 A 刑疾责入佣疾责 RNA 其因所债		
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使		46
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組	••••••	46 47
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組		47
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子组表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析		_
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀		47
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析		47 48 49
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析表五、放大流感病毒 HA 基因所用之引子		47 48
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析表五、放大流感病毒 HA 基因所用之引子表六、Library size determinant		47 48 49 50
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析表五、放大流感病毒 HA 基因所用之引子表六、Library size determinant表七、流感病毒與腺病毒感染病人血球標記之比較		47 48 49 50 51
表一、RT-PCR 增幅流感 A型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析表五、放大流感病毒 HA 基因所用之引子表六、Library size determinant表七、流感病毒與腺病毒感染病人血球標記之比較		47 48 49 50 51 52
表一、RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析表五、放大流感病毒 HA 基因所用之引子表六、Library size determinant表七、流感病毒與腺病毒感染病人血球標記之比較表八、流感病毒與腺病毒感染病人自血球數目之比較表入、流感病毒與腺病毒感染病人自血球數目之比較		47 48 49 50 51 52 53

圖目錄

圖一、Influenza A NS1 蛋白構造	•••••	57
圖二、1998 年至 2006 年南台灣 Influenza A 流行趨勢	•••••	58
圖三、臨床 Influenza A 病毒 NS1 基因演化分析		59
圖四、臨床 Influenza A 病毒 NS2 基因演化分析	•••••	60
圖五、感染流感病毒之細胞經抗體染色後以流式細胞		
儀分析所得結果	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	61
圖六、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式		
細胞儀之分析	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	62
圖七、不同稀釋濃度之血清與流感病毒中和後,接種		
於 MDCK 細胞,再以流式細胞儀分析結果	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	63
圖八、以 ELISA 方式偵測血清中之流感病毒抗體	•••••	65
圖九、代表健康個案施打流感疫苗前後免疫細胞表現		
型的變化	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	66
圖十、以噬菌體表現系統表現流感病毒 HA 胜肽流程	•••••	67
圖十一、Nucleases modification of HA gene and library		
size determination	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	68
圖十二、Phage library is to be established by directional		
cloning of the HA ₅₀₋₁₀₀ fragments in pORFES		60
IV into JC-M13-88	•••••	69
圖十三、將 HA 基因克隆至 pGEM-T EASY 載體上	•••••	70
圖十四、Characterization of pORFES-IV by restriction		71
enzyme digestion	••••	71
圖十五、pORFES IV construction and plasmid map	•••••	72
圖十六、Enzyme modification and purification of		73
50~100 bp HA fragments	•••••	
圖十七、HA 片段之製備	•••••	74
圖十八、The panning procedure to identify		75
serum-interacting phage clone	•••••	13

中文摘要

本計畫擬建立標準化免疫及感染分析技術平台來了解流行性感冒病毒 基因變異對宿主免疫反應之影響,我們將分析所純化分離出之病毒株的基 因序列,建立一些技術平台來評估台灣臨床分離流感病毒株的抗原變化、 免疫抗體反應、細胞及體液性免疫反應,利用這些技術可讓我們進一步評 估這些病毒株是否可以作為日後流感疫苗的疫苗候選株。

在動物實驗中已證實流感病毒之非結構蛋白 NS1 是干擾素之拮抗物,可影響宿主之抗病毒機制以及病毒對宿主之致病力。因此我們首先針對 2000 年至 2006 年 A 型流感病毒進行基因定序與分析,發現 2000年 H1N1 病毒株之 NS1 分別在 poly(A)-binding protein II 的 binding domain 226 胺基酸由 isoleucine 變為 valine; 2006年的 RNA binding domain 25 胺基酸位置則由 glutamine 變為 lysine,因此推測也許這些位置的改變是造成此兩年 H1N1 較大流行原因之一。

流行性感冒病毒的二個外套蛋白質 Hemagglutinin (HA)及 Neuraminidase (NA)是主要引起宿主免疫反應的抗原,因此也愈針對此兩病毒抗原蛋白發展一免疫分析平台能快速檢測不同病毒株的感染情形。 目前所建立之流式細胞儀分析方法可以 anti-M 及 anti-NP 抗體偵測細胞是否被流感病毒所感染及可利用此法來定量流感病毒所產生之中和抗

體;而 ELISA 也能高敏感的偵測血清中之流感病毒抗體,此兩平台將有助於評估基因變異對免疫反應之影響、疫苗株之篩選及可用來進行自然感染或免疫前後抗體效價之分析。

此外,在控制流行性感冒病毒傳播時,細胞性免疫反應扮演了重要的角色,特別是 CD8 T 細胞的免疫力在殺死受病毒感染的細胞時;而血清抗體效價,亦是用來評估免疫保護作用的方法之一。因此在此計劃中亦探討:在先天性自然感染或接受疫苗株後之細胞及體液性之免疫保護作用,包括免疫受體與病毒交互作用及抗體反應等。初步結果顯示,流感病人之 CD3,CD4,CD8 或 CD16CD56 之絕對細胞數平均值比腺病毒感染患者為低;此外,施打流感疫苗後之 TLR-3,TLR-4 及 CD4CD25之表現均比施打前有顯著增加,此意義將進一步探討。此平台之建立將有助於分析自然感染及接受疫苗個體之免疫反應分析。

另外,針對 HA 基因之抗原決定位發生突變之流感病毒株,我們將初步建立噬菌體快速展示系統表達流感病毒株的 HA 表面的寡肽抗原庫 (phage display library)。目前正進行 library 之構築,希望未來能利用此平台偵測及分析病患與疫苗接受者體內抗體相對應的免疫多肽抗原。

關鍵字:流感病毒、基因序列分析、免疫反應、流感病毒疫苗、噬菌體表現系統

英文摘要

In this project we would like to establish standard immunological and infection platform in order to investigate the effects of influenza viral genome variations on host immune response. These technologies would be helpful in selection of potential influenza vaccine candidate in the future. In previous study, influenza viral NS1 protein has been reported to be associated with the resistance to the antiviral effects of host immune response and play an important role in viral virulence. Thus, we first focus on the analysis of NS gene. The results showed influenza A H1N1 clinical isolates from 2000 had a isoleucine to valine mutation at position 226 in poly(A)-binding protein II binding domin, and isolates from 2006 had a glutamine to lysine substitution at position 25 in RNA binding domain of NS1. These changes might result in epidemics of influenza A H1N1 in 2000 and 2006. Hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) of influenza envelope proteins are the major antigens which trigger host immune response. Secondly, we would like to set up an immunological analysis platform for rapid detection of antibody for influenza viral infection. The method we recently built up could detect viral infected cells by anti-M and anti-NP antibody and neutralizing antibody could also be evaluated by flow cytometry. In addition, serum antibody could be measured by virus-captured ELISA with high sensitivity. Thirdly, cellular and humoral immunity are important in controlling influenza viral infection. In this part we would like to study the immune response of both influenza nature infection and vaccinated individuals. The preliminary data showed the absolute cell numbers of CD3, CD4, CD8 and CD16CD56 from influenza virus infected patients were lower when compared

with adenovirus infected ones. In addition, the expression level of TLR-3, TLR-4 and CD4CD25 were increased after influenza vaccination. The significance of those findings will be further investigated. Fourthly, we aim to establish a phage display system of hemagglutinin surface molecule to identify immunodominant determinants located within the circulating influenza A viruses in Taiwan. These platforms will be contributed to evaluate the immune response resulting from viral genome variations, nature infection, vaccination, and aid in the selection of vaccine strain candidate.

Key words: Influenza virus, sequence analysis, vaccine, immunological platform, phage display

前言

流行性感冒病毒的感染一直是全球的重要健康問題,對大部份人的感 染大多是輕微的,健康人的免疫系統最終可以清除病毒而痊癒,只有嬰幼 兒或年紀大的人因為免疫系統尚未發育完整或已老化,使得對抗流行性感 冒病毒的感染無法有效的作用,因此容易引起較嚴重的臨床徵狀,加上老 年人可能有潛在的其他疾病如高血壓、糖尿病、或腎臟疾病,更容易因感 染流行性感冒病毒而伴隨引起更惡化的臨床徵狀。流行性感冒病毒有 A, B, 及С三種型態,感染人類的主要是А及В型。流行性感冒病毒的感染在 所有的傳染性疾病中有其特殊性,主要是流行性感冒病毒的遺傳構造特殊 引起的,流行性感冒病毒是由八條 RNA 基因片段所組成,因為是 RNA 病毒先天上容易突變,這些小突變產生抗原漂移(antigenic drift)。加上流 行性感冒病毒的八條 RNA 基因片段在病毒複製時容易發生重配 (reassortment) 現象,尤其如果和來自動物如豬或家禽類的流行性感冒 病毒發生跨物種的基因重配,所產生的新型流行性感冒病毒,容易發生大 流行,如最近 WHO 預測可能會發生大流行的 H5N1 禽流感。萬一發生重 配產生新型的流行性感冒病毒,可能因為有大的抗原轉移(antigenic shift),使得免疫系統的記憶細胞所能辨認的抗原構造失去免疫記憶作 用,加上人體的免疫系統如果因為新型的流行性感冒病毒的病毒性增加,

複製快速產生大量的病毒,如果免疫系統也因為第一次碰到新抗原,引起強烈的免疫反應,可能使宿主無法承受大量的組織破壞,而有高死亡率,由最近東南亞地區因為親密接觸家禽的流行性感冒病毒 H5N1,禽的流行性感冒病毒大量複製,引起年輕宿主強烈的免疫反應,產生細胞激素風暴,造成高達 50%以上的死亡率。

針對流行性感冒病毒 A 型以及 B 型之 NP、M 以及 NS 基因進行演化特性的研究發現這些基因來自多個病毒族系 (Jambrina, et al,1997, Yamashita, et al,1988),而且在同時流行的病毒株之間常可見到基因重配導致病毒蛋白質顯著變異的現象(Lindstrom, et al,1999)。目前已經知道 HA 以及 NA 基因的改變是由單一病毒族系而來,其胺基酸的變化慢慢地隨著時間而累積。在許多的研究報告中指出流感病毒的其他六個基因也有發生突變或重配的現象,而且這六個基因的改變也會影響病毒的毒性及生物特性等等。有文獻指出,基質蛋白質(matrix, M1 protein)會嚴重影響流感病毒的毒性、生長情形以及宿主專一性。

然而非結構蛋白質的胺基酸改變並沒有一定規則可循,也不會隨著時間而累積。針對六個非結構性蛋白的分子演化分析結果顯示他們的演化過程與表面的 HA 和 NA 醣蛋白無關。此外,日本在 1995 年和 1997 年發生 A 型流行性感冒病毒的流行中也觀察到非結構性蛋白質變異增加

(Lindstrom, et al.,1999),因此基因重配以及抗原漂移對病毒演化以及致病力都非常的重要。

為了瞭解台灣所流行的 A、B 型流行性感冒病毒發生突變及其免疫反應的情形,我們預計完成流感病毒非結構蛋白的定序與分析工作,以掌握這些病毒基因及抗原之最新且完整的流行趨勢。流感病毒粒子表面醣蛋白 HA 和 NA 為流感病毒主要引起宿主免疫反應的抗原,過去的研究多以此二基因及蛋白之研究為主;但近年來的研究顯示非結構蛋白對於流感造成的致病程度也扮演一定的角色,對疫苗株之選擇可能亦有重要之影響,本計劃中我們預計要完成流感病毒之非結構蛋白(包括 PB2, PB1, PA, NS1, NS2)基因之定序與分析工作,目前首先針對 NS 基因進行分析:

a. NS 基因之重要性

本計劃將先針對 A 型流感病毒的 nonstructural protein (NS)基因及其蛋白做分析。A 型流感 NS 基因可轉錄出一段完整的 NS1 及經疊合的 NS2, NS1 跟 NS2 於 5′端共享了 31 個核酸即 10 個胺基酸。而已有研究指出 A 型流感 NS1 蛋白質可經由和宿主細胞中的 cleavage and polyadenylation specificity factor 的 30k-Da 次單位 (30k-Da CPSF)及 poly(A)- binding protein II (PABII) 結合而抑制其功能以達到抗病毒 mRNA 合成的拮抗,並透過和

protein kinase (PKR)結合抑制干擾素合成(Krug, et al, 2003); 更有研究指出不 同株的流感病毒 NS1 蛋白質可造成不同可活化干擾素基因的抑制程度 (Geiss, et al, 2002); 今年 Science 也發表相關文章,指出高致病性 A 型流感 NS1 胺基酸序列的 C 端有 PDZ domain 的配位體(ligand), 細胞中有許多蛋 白質都含有 PDZ domain, 而 PDZ domain 也參與了許多細胞生理功能,如 調節某些膜蛋白的活性,維持細胞膜的極性及形態,調節神經細胞突觸後 的離子密度等。典型的 PDZ domain ligand 包括 EPEV(Glutamate-Proline-Glutamate-Valine) , ESEV (Glutamate -Serine-Glutamate-Valine) , KSEV (Lysine-Serine-Glutamate -Valine), 禽鳥類流感病毒的 NS1 胺基酸序列 C 端 大部分為 ESEV, 人類 A 型流感以 RSKV(Arginine-serine-Lysine-Valine)和 RSEV(Arginine-Serine- Glutamate-Valine) 這兩種非 PDZ domain ligand 為 主。而 1997 年香港爆發的 H5N1 為 EPEV, 2003 年香港 H5N1 為 ESEV, 1918 年西班牙流感為 KSEV,這幾次造成人類高致病性的流感病毒的 NS1 蛋白 C 端皆為 PDZ domain ligand,因此 NS1 的 C 端序列極有可能是造成 高致病性的重要影響因子。

b. NS1 基因之功能

人類 A 型流感 NS1 蛋白質序列有兩種長度: H3N2 和 H1N1 為 231 個 胺基酸, H2N2 為 237 個胺基酸。而 NS1 可分成兩大區(domain):

RNA-binding domain 和 effector domain (圖一)。RNA-binding domain 主 要可以和三種形式的 RNA 結合, dsRNA, snRNA U6 和 poly-A RNA, 而 和 poly-A RNA 主要結合位置為 19-38,透過和宿主細胞 mRNA 的 poly-A 結合,使得一些抗病毒 RNA 無法順利運至細胞質中轉譯成有功能的蛋白 質,以達到拮抗抗病毒機制,並且藉由將宿主 mRNA 滯留於細胞核內, 使得流感病毒的 polymerase 蛋白有較大的機會去拿到宿主 mRNA 5'端的 cap 以幫助流感病毒基因的轉錄;而透過和 snRNA U6 結合也可以直接抑 制宿主細胞中的抗病毒 RNA 轉譯成蛋白質而達到抗病毒機制的拮抗。 Effector domain 上,在第 186(E)個胺基酸為 30k-Da CPSF 結合位置, 223-237 為 PABII 結合處, CPSF 和 PABII 主要是在幫助宿主 mRNA 末端 poly-A 的合成,流感病毒 NS1 則具有抑制此兩者的功能以達到抗病毒機 制的拮抗,而 NS1 這些位置序列長久以來極少有變化,足見其重要性, 有研究發現將這些位置改變會使得流感病毒致病性大大降低(Krug, et al.,2003)。當宿主細胞感染流感病毒時,NS1 會先大量被表現,以達到細 胞抗病毒的拮抗以及病毒基因的轉錄,因此流感病毒 NS1 對於病毒的致 病力有一定程度的影響,在疫苗株的選擇上應值得注意。

c. NS2 基因之功能

NS2 的對於流感病毒所扮演得角色至今仍不甚清楚,但知道其和病

毒之 ribonucleoprotein complexes (vRNPs)由宿主細胞核內運至細胞質的過程中扮演相當重要角色,因此 NS2 亦稱為 nuclear export protein (NEP),這主要是因為 NS2 帶有 nuclear export signal sequence,而這樣的序列通常以懼水性(hydrophobic)胺基酸為主,透過和 transport receptor 作用而達到運至細胞質,有研究顯示在流感病毒 NS2 的 nuclear export sequence 中的懼水性胺基酸加以突變會導致流感病毒毒性及複製能力下降。

由上述資訊可知 NS 蛋白在病毒複製及拮抗宿主免疫反應扮演重要 角色,進而影響病毒毒性;因此我們將針對 A 型流感病毒的非結構蛋白 NSI 進行基因定序與分析工作,以追蹤觀察流感病毒之演化及變異狀況, 結合各病毒株的基因序列結果,並利用本計劃所建立之免疫及感染分析 方法加以釐清基因片段與免疫反應之間的關係。因此本計劃目標之一即 將各流感病毒株建立起完整的基因序列及其在細胞中所對應的生物特性 及免疫反應。

流行性感冒病毒引起的免疫反應在免疫學上有其特殊性,流行性感冒病毒的二個外套蛋白質 Hemagglutinin (HA)及 Neuraminidase (NA)是主要的抗原,如上所述有小改變的抗原漂移及大改變的抗原轉移,這種每年不斷的高變化率使得流行性感冒病毒疫苗必須每年施打,以求得好的疫苗保護效果。疫苗廠必須根據 WHO 收集分析過去一年流行性感冒病毒感染的

趨勢,預測決定未來一年可能擴散感染的流行性感冒病毒株,再由疫苗廠 組合這些流行性感冒病毒株做為疫苗株使用。如果預測正確,則當年施打 流感疫苗會有高的保護率;如果預測不正確,則當年施打流感疫苗的保護 率不高。這種狀況對台灣的流行感冒病毒的感染有不適當性,因為新的流 行性感冒病毒通常源自亞洲,亞洲地區生活方式及習慣容易產生新的變異 種。根據流行病學的分析,流行台灣的流行性感冒病毒株通常比流行歐美 地區的早,所以施打疫苗廠的疫苗株對台灣當年流行的保護率可能不高。 流行性感冒病毒感染引起的免疫反應還有一特色,就是所謂的抗原原罪 (Original antigenic sin)的現象,這是描述人體的免疫系統在連續性免疫反 應中對構造類似的抗原如不同品系的流行性感冒病毒有偏袒的反應,當人 被流行性感冒第二次感染時,抗体的反應只侷限於對和第一次感染品系有 相同的抗原決定位反應,第二次或之後病毒的其他有免疫性的抗原決定位 都被忽略。所以對抗現在的流行性感冒病毒感染的抗体反應,其產生的抗 体愈來愈狹窄,保護效果愈來愈差。發生這抗原原罪現象的原因是免疫 (memory)淋巴細胞和純真(naïve)淋巴細胞在同時對抗流行感冒病毒的抗 原時,免疫記憶淋巴細胞會比純真淋巴細胞優先被啟動活化,所以產生對 之前原有記憶的抗原決定位有較強或親和力較高的抗体。

此子計畫第一年的目標是用以建立一些免疫方法來評估

anti-influenza Ab 的方法,尤其是是有保護效果的 anti-HA 及 NA 抗體。流行性感冒病毒 HA 及 NA 的抗原漂移及的抗原轉移,和所謂的抗原原罪這些特性讓每年不斷的高變化率使得流行性感冒病毒疫苗必須每年施打,以求得好的疫苗保護效果。我們期望建立一免疫分析平台能快速檢測不同病毒株的感染情形。

近來發展細胞培養技術,利用細胞來支援病毒的繁殖也可作為病毒疫苗的製備(Kemble, et al,2003)。利用細胞培養技術製備疫苗除了適合大量製造外,其所培養出之繼代病毒不但具有同源性(Katz, et al,1990, Robertson, et al,1990)而且所製成的疫苗也同樣具有抗原性(Nerome, et al,1990)。目前最常用也最有利於流感病毒複製的細胞株是狗腎細胞(MDCK)及綠猴腎細胞(Vero)細胞。因此在此研究中我們分別將 A型流感病毒與 B型流感病毒培養於 MDCK 細胞中,並藉由流感病毒凝集試驗(HA titer)觀察各病毒株在細胞中繁殖的情形。另一方面也獲得單株抗體抗 HA 、NA 及 M 的細胞株進行培養,取得大量的老鼠腹水及細胞培養液,進行進一步的純化及定量。將取得的病毒液和單株抗體進行免疫螢光色分析法(IFA),確定單株抗體對於不同病毒株的表現情形;初步結果:培養的病毒細胞可以被單株抗體 HA、 NA 和 M 所辨認。

人體免疫系統可分為先天與後天兩大部份,先天免疫系統主要由吞噬

細胞、干擾素Ⅰ型及其他細胞激素所組成。此先天免疫系統可在短時間內 被外來物所誘導。因此當流感病毒感染宿主細胞後,大部份的流感病毒 會被先天免疫系統所辨識並在數小時內將病毒摧毀(Ada, et al,1986, Murphy, et al,1996)。一旦病毒成功地逃脫人體第一道防線,人體即會啟 動後天免疫系統加以防禦。後天免疫系統主要是由 T 淋巴球及 B 淋巴球 組成,並對抗原具有專一性,可有效阻止病毒之入侵。在活化之 T 淋巴 球中,以毒殺性 T 細胞反應對於病毒的清除扮演相當重要的角色。此激 活之毒殺性 T 細胞能夠將被病毒感染的細胞予以毒殺,防止病毒之增殖 與擴散。另外,被活化之 B 淋巴球則會隨即產生該病毒之抗體,消滅細 胞外之病毒,防止病毒入侵宿主細胞。被流感病毒感染之淋巴球及吞噬 細胞均會產生細胞增生之反應,這種增生的現象也許對人類對抗病毒而 言是重要的(Roberts, et al, 1989)。在流感病毒感染宿主後,其免疫反應過 程, CD4 輔助 T 細胞受抗原刺激後, 會分化為第一型(Th1)或第二型(Th2) 輔助 T 細胞,產生不同的細胞激素,第一型輔助 T 細胞以產生 IL-2 和 IFN-γ,以活化吞噬細胞和自然殺手細胞。第二型輔助 T 細胞則會分泌 IL-4、IL-6、和 IL-10, 主要幫忙產生特異性抗體(Ada, et al., 1986)。第一 型干擾素 (IFN-α/β),在流感病毒感染之初期即會被誘發出來,使未感染 之細胞具有抗病毒之能力(Lindenmann, et al, 1957)並有效地控制病毒之擴

散。同時第一型干擾素亦會活化殺手細胞及吞噬細胞(Biron, et al,1999, Bogdan,2000),促使抗原表達細胞(dendritic cells)活化和成熟(Luft, et al,1998)。在體內,第一型干擾素會協助T淋巴球及B淋巴球之活化(Le Bon, et al,2001)。趨化細胞激素 (chemokines) 是一個結構相關的趨化因子 (chemoattractant cytokines)大家族,可選擇性地讓單核球細胞聚集。根據 其作用目標不同,可被分成三組:(1)CXC chemokine:主要作用於嗜中性 白細胞(Neutrophils)、T和B淋巴細胞(Lymphocytes)以及癌細胞。;(2)CC chemokine:主要作用於多種白細胞亞群,包括嗜鹼性球(Basophils)、嗜 酸性球(Eosinophils)及樹突狀細胞(dendritic cells)。其中 RANTES、 MIP1 和 MCP1 比較受囑目;(3)CX3C 及 C:主要作用於淋巴亞群,包 括 T 和 NK 細胞。在流感病毒感染過程中,對趨化細胞激素之研究,大 部份集中在CXC及CC兩組。屬於CXC chemkine 的 IL-8 主要吸引嗜中 性球(Schroder, et al, 1988)。IP-10 (interferon-g-inducible protein-10)則主要 作用於單核球(Taub, et al,1993) 。另外屬於 CC chemkine 的 MIP-1α2 (macrophage inflammatory protein-1a) ≠ MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)主要作用於單核球及淋巴球(Schall,1991)。在老鼠之動物模式 中,觀察到輔助刺激因子,例如 CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)和 CD40L (CD154),會加強免疫反應。同時,活的流感病毒感染人類肺泡吞噬細胞

及抗原表達細胞亦會增加輔助刺激因子的表現量。除此之外,被病毒感染之上皮細胞會利用 MHC class I 將病毒蛋白呈現給毒殺性 T 細胞,此毒殺性 T 細胞隨即是放出穿孔蛋白 (perforin) 和顆粒溶解酶 (granzyme),在標的細胞的膜上穿孔,使其因渗透壓的改變而死亡。

本計劃之目的即針對台灣流行之流感病毒株感染細胞後,觀察各病毒株所誘發之免疫反應,例如淋巴細胞之增生、細胞激素之刺激、趨化激素之表達、免疫輔助因子之表現量及毒殺性 T 細胞之活化等,比較之間的差異,期望藉由此分析能夠選出最具免疫性之疫苗候選株。臨床上,將採集感染流感病毒之病患的血清,加以分析所感染之病毒株、自然感染所引起的免疫反應、病毒株與接受器的免疫反應及不同之抗原變化產生的免疫生成性 (immunogenicity)和保護作用,進而建立先天性自然感染之血清庫。亦將採集施打流感疫苗的志願者之血清,觀察疫苗所誘發之細胞及體液性保護作用,進而建立施打疫苗後之血清庫。並將兩個血清庫結合,即可比較先天性自然感染和後天性疫苗注射其免疫保護之間的差異。

再者,在致死性禽流感西班牙株(H1N1)感染而存活的病人,其人體之中和性抗體可被同株病毒的表面抗原激發產生,但卻有其種別專一性,無法有效中和它種 H1N1 病毒。如此的專一性似乎也存在於不同的

H1N1 感染的病人的免疫中和反應中。因此,如何系統性的了解抗體與病 毒間的種別專一性,將更有助於篩選有效的弱致病性病毒株供做疫苗載 體(Enshell-Seijffers, et al,2001), 甚而利用基因操作來改良弱致病性病毒 株以發展具有多效價用途的疫苗。對於台灣病人第二型白血球組織相容 抗原(MHC-II)上所承載的免疫顯性多肽抗原(immunodominant peptide)的 釐清,將有助於研發國人適用的有效價疫苗。然而傳統性免疫顯性多肽 抗原的分離與選殖非常耗時與耗財,利用 DNAseI 切割的 H3 病毒 HA cDNA 轉殖入噬菌體來表達 15-20 mer 的 H3 多胜肽抗原,已能快速的利 用單株或多株抗體來成功篩選坐落於 H3 上免疫顯性多肽抗原的基因序 列(Stratmann, et al, 2005)。此類噬菌體快速展示系統(phage cDNA display) 免疫平台的建立將有助於釐清特定流感病毒株上的免疫顯性多肽抗原與 病人細胞免疫(cellular immunity)防禦機制的相對關係(Patel, et al,1997, Stratmann, et al., 2005, Tamura, et al, 2005) •

本計畫的目標之一是建立噬菌體表現系統用來分析在台灣流行的 A型流感病毒表面的結構蛋白,hemagglutinin 和 neuroaminidase,上面的免疫決定位分布的狀況。我們將使用曾經感染過 A 型流感病毒之病人血清,用來選擇對病人血清具有親合力的噬菌體顆粒,而這些噬菌體顆粒上都帶有不同片段的 A 型流感病毒的 hemagglutinin 蛋白;期望找出在不

同基因型的病人中,他們所辨識出的免疫決定位是否有一定的模式或相關聯性,並預期此分析結果可以用來回答:(1)是否此相關的模式可用來預測在某一特定區域中,下一個流感流行的季節可能會流行的病毒株。 (2)是否有共通的免疫原決定位可以引起強效的 MHC-I 或 MHC-II 相關的T細胞或B細胞反應,以作為疫苗發展的參考。

總而言之,本計畫擬建立標準化免疫及感染分析技術平台來了解病毒 基因變異對宿主免疫反應之影響,我們將分析所純化分離出之流感病毒株 的基因序列,建立一些技術平台來評估台灣臨床分離流感病毒株的抗原變 化、免疫抗體反應、細胞及體液性免疫反應,利用這些技術可讓我們進一 步評估這些病毒株是否可以作為日後流感疫苗的疫苗候選株。

材料與方法

病毒分離及鑑別

在成大醫院病毒實驗室,我們使用四種不同的細胞,包括 RD、A549、green monkey kidney (GMK)和 MDCK 常規性的用來分離流感病毒。細胞都培養在 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco, BRL, Grand Island, NY) (其中含有 10%的胎牛血清,penicillin (100 U/ml)和 streptomycin (100 μ g/ml) 培育於 35°C,空氣中含有 5% CO₂ 的環境中),細胞長滿後,每一個培養管換成流感病毒培養基後,接種 0.2 ml 的臨床檢體

(從喉嚨拭子、腦脊髓液、糞便檢體等),而在接種的 14 天內觀察細胞型態變化。之後利用抗 influenza virus 的單株抗體進行間接免疫螢光染色。

RNA 萃取與核酸定序

我們自 2001 年到 2008 年的期間隨機取樣 Influenza virus 的檢體來作序列分析的研究。我們將取臨床檢體分離株,取病毒液 200µl,以 QIAmp Viral RNA 試劑組(QIAgen)萃取 RNA,純化出來的 RNA 溶解於 50µl 的蒸餾水中。之後利用 OneStep RT-PCR kit (QIAgen)試劑,內含(Omniscript、Sensiscript reverse transcriptases 與 HotStartTaq DNA 聚合酶),與 400 µM 正股、負股引子(詳列於表一)以下述的條件進行增幅反應:

IA (HA, NA, NP, NS, M)

,		,					
			30 cycles				
42°C	95°C	95℃	50°C	72℃	72℃		
60 min	5 min	30 sec	30 sec	2 min	15 min		
IA (polymerase gene : PA, PB1, PB2)							
			30 cycles				
42°C	95°C	95℃	58°C	72°C	72℃		
60 min	5 min	30 sec	30 sec	3 min	15 min		

最後,增幅的產物以洋菜膠電泳分析,並以 ethidium bromide 染色,產

物的大小將與標準分子標記比較。在完成循環定序反應後,產物會以自動 化 DNA 定序機 (model 373A; DNA Sequencer, Applied Biosystems) 以電泳 的方式分析。每一個 PCR 產物都會以兩個方向來定序,以解決可能有的序 列錯誤問題。

序列資料分析

Pairwise nucleotide 和 amino acid 序列判讀是利用 Gap 程式(Wisconsin Sequence Analysis Package, version 10.2; Genetic Computer Group, Inc., Madison, Wis.),以所有的流感病毒基因序列成對排序計算。為了做phylogenetic reconstructions,各個流感基因定序得到的 nucleotide sequence 會依不同的病毒基因,以pileup(Genetics Computer Group)排列比較,並比對抗原決定位置的差異。DAMBE program 則是用來計算 nucleotide 和 amino acid 的差異。之後使用 PHYLIP package(version 3.6)的 neighbor-joining program 來建立 phylogenetic tree。SEQBOOT 用來計算 bootstrap 資料,資料值設定設定為 1000 來進行分析,而 CONSENSE 則是用來計算一個 consensus tree,作為分析資料可信度的依據。

血球凝集抑制試驗

取 50 μl 兩倍序列稀釋之去活化病毒液,與 50 μl 0.5% 雞紅血球進行混

和,之後放置於 4° C 反應一小時,倒數最後一個最高完全與天竺鼠紅血球產生凝集的稀釋濃度,即定義為 1 HA。取 25 μl 兩倍序列稀釋之專一性抗血清,與 $25\mu l$ 的 4 個 HA 濃度病毒稀釋液加以混和,放置於室溫一小時進行反應,之後再加入 50 μl 0.5% 雜紅血球進行混和,於 4° C 反應一小時,倒數最後一個最高可以抑制病毒凝集紅血球的血清稀釋濃度即為其血清效價。

溶菌斑試驗

將 MDCK 培養於 6 well 培養盤中,以 PBS 清洗細胞,同時將病毒以 10 倍序列稀釋後,加入細胞中,於 37 ℃下作用一小時。上清液吸除後,加入 0.75%之洋菜膠,於 33 ℃下培養 24-96 小時。用冰甲醇固定細胞及 1% 結晶紫染色,計算溶菌斑數。

流感病毒中和試驗

在 96 well 培養盤中,將血清檢體用 DMEM(5%FBS)做 10 倍稀釋,之後以 2 倍之序列稀釋至最高稀釋倍數 640 倍,在各 well 中加入 50 μ l 病毒液 (1 TCID₅₀/ μ l),於 37 °C下作用一小時。吸除上清液,在各 well 中加入 100 μ l DMEM(5%FBS)其中含有 2.5×10^5 MDCK/ml,於 37 °C下培養隔夜。去除培養液,再加入 200 μ l 新鮮培養液,於 37 °C下培養4 天。再各 well 加入 50 μ l 0.5%CRB/PBS 溶液,於 4 °C下作用一小時,觀察各 well 血球凝集之情況。

病毒生長特性試驗

將病毒感染 MDCK 細胞,培養於 37 ℃下,在不同的時間點收集培養液,利用溶菌斑試驗以測定病毒量(Fujii, et al,2005)。

免疫螢光染色法

將流感病毒感染周邊血液單核球之後,感染後的細胞用抗體: anti-CD3、anti-CD4、anti-CD8、anti-CD16、anti-CD20、anti-CD25、anti-CD56、 anti-TLR-3、anti-TLR-4或 isotype control antibodies (Pharmingen, San Diego, CA, USA)染色。用流式細胞儀加以分析。

噬菌體快速展示系統

a. 噬菌體快速展示系統

所需噬菌體系統及選殖質體可購自 Kang AS (美國專利號 658623,(26)) 或以 Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolab)及 FliTrxTM Random Peptide Display Library(Invitrogen)雨家公司為主再作選殖質體修飾。後者是大腸桿菌鞭毛表達系統可以較易篩選。H1, H3 流感病毒株的 HA 基因將以 cDNA 型式質體或隨基多肽展示系統做此研究,大規模重新探索病人及疫苗接受者體內抗體相對應的免疫顯性多肽抗原(或是以文

獻所提供之已知 HA 之免疫顯性多肽抗原資訊(Ludwig, et al,1999)做小規模之測試)。我們使用 Stratmann and Kang(Stratmann, et al.,2005)所建立方法在噬菌體上表現 15~30 個胺基酸長度的胜肽鍊。這些胜肽鍊是從疾管局所提供的台灣流行 H3 型強致病性流感病毒的 hemagglutinin 上所製備而來。DNA修飾酵素將 HA 基因片段經連串處理過後,選擇 50~100bp 大小的片段並將其接到 pORFES IV 載體上面,利用 pORFES IV 載體上面的兩個抗藥基因,監視 HA 基因片段接進載體的效率。簡單來說,這兩個抗藥性基因分別在HA 基因片段插入點前後,在插入點之後的抗藥性基因一開始並沒有活性,只有在 HA 基因片段插入後,有 1/3 的機率使後面的抗藥性基因活化。藉由檢視在含有單一或兩種抗生素的存在下長的菌落的數目,若比例接近 3:1表示其中的空載體的數量在可以接受的範圍內。

b. 流感病患及疫苗接受者之抗體血清

抗體血清以各病毒型 50 樣本為限,各病毒型之基因定序資料未清者 則定序。

c. 偵測及分析病患與疫苗接受者體內抗體相對應的免疫顯性多肽抗原

流感病患病毒基因型由定序而得知;疫苗接受者由疫苗種株 HA 之基因型而定。噬菌體快速展示系統或大腸桿菌鞭毛表達系統將以洋菜膠培養基做選殖,並利用 PVDF 或 Nitrocellulose 纖維膜片以 replica lifting 的方式印

嵌,再用血清抗體來逐次篩選。

d. 陽性多肽抗原的進一步定序並比對相對應的病毒株 HA 基因序列

正陽性株可取樣定序並找出相對應基因序列,各個正陽性株其基因序 列重疊者,可比較分析並指出差異。

e. 建立所有差異性正陽性噬菌株庫

選出代表性正陽性株具序列差異者做菌體培養,建立差異性正陽性噬菌株庫。

結果與討論

在臨床流感病毒基因分析部份,首先針對 NS 基因進行分析。在 NS1部分,由圖二可以看出南台灣 A 型流感的流行主要以 H3N2 造成持續性的流行,而 H1N1 每年則造成零星病例,然於 2000年及 2006都有一波 H1N1較大的流行,分析 HA 及 NA 序列,發現從 1999年至今所流行的 H1N1都屬於 New Caledonia-like strain,因此這兩波 H1N1造成較大的流行初步排除與病毒表面醣蛋白變異較無關。

而目前我們已針對南台灣從 2000 年至今所收集到的病毒共 29 株(12 株 H3N2 及 19 株 H1N1)進行 NS1 序列分析,由圖三發現各型間並沒有基因 重配現象(reassortmant),而針對目前 NS1 已知的功能區域分析,表二列出

為各型間在這些區域胺基酸序列不同的點,發現各型間在這些位置都有屬於各自特異性的胺基酸序列,然而在 2000 年造成較大流行的 H1N1 於Poly-A binding protein II (PABII)的作用位置第 226 個安基酸序列 valine,是與其他年 H1N1 的 iso-leucine 不同的;而在 2006 造成較大流行的 H1N1 則於 RNA- binding domain 上第 25 個胺基酸序列 lysine 與其他年的 glutamine 不同。因此,不排除 2000 年及 2006 年造成 H1N1 較大的流行是由於其 NS1 在功能區域氨基酸發生改變所引起。

過去研究發現,對 NS1 的 RNA-binding domain 上帶有正電荷的胺基酸進行置換,發現在第 19,35 和 46 這三個位置的正電荷胺基酸對於 NS1 的 RNA-binding domain 形成 dimer 有絕對的影響,而 dimer 的形成對於 NS1 和 RNA 的結合有很大的關係;另外在第 38 和 41 帶正電荷的胺基酸則對 RNA 結合有直接的影響(Wang, et al,1999)。

因此,對於今年初H1N1所造成的較大流行中,亦於NS1的RNA-binding domain上,第25個位置由本來為不帶電的 glutamine 轉成帶正電的 lysine,是否也影響到 NS1 對 RNA 結合的能力,進而影響到 NS1 的功能以致造成這一波較大的流行。由表二可知在今年4月底 H1N1 的流行株,其 NS1 在第25個位置又跟之前病毒株一樣為 glutamine,而此時 H1N1 流行亦漸緩,因此,對於 NS1 第25 個胺基酸的序列是否影響 NS1 功能 ,這是值得進一

步探討的。

而 NS2 的分析中,目前我們主要針對 N 端的 nuclear export sequence 加以分析,由圖四可以看到我們所分離的病毒株中 NS2 並無基因重配的現象,H3N2 及 H1N1 仍位於各自的分化枝;而分析 NS2 的 nuclear export signal sequence 可以發現我們所分析的病毒株中並無太大變化(表三),H1N1 為 mathionine-rich 胜肽序列(12-ILMRMSKMQL-21),H3N2 為 leucine-rich 胜肽序列(12-ILLRMSKMQL-21),這兩種都是典型的 nuclear export signal sequence,顯示我們所分析的流感病毒 NS2 基因並無太大改變也不會造成流感病毒致病性降低。

在免疫分析平台的建立上,目前利用流感病毒複製狗腎細胞(MDCK)及綠猴腎細胞(Vero)細胞,除了取得流感病毒外,我們也分別利用此方式檢測 A 型流感病毒與 B 型流感病毒感染的細胞,利用流式細胞儀以抗體染色的方式測定感染的程度,做為定量中和抗體的方法。另外也嘗試發展不同於傳統測抗體的方式,以 influenza virus-captured ELISA 來定量 anti-influenza virus antibody。

a. 發展一個流式細胞儀可以定量流感病毒感染細胞的方法

利用 anti-NP 或 anti-M Ab 可以用流式細胞儀染色的方式測定 Influenza

A 不同病毒株感染的細胞(圖五)。

b. 決定測量流感病毒感染細胞的最佳條件

流感病毒在 HA titer 1:32 下感染 MDCK DMEM with 2% FBS 48 或 72 小時可以得到感染細胞仍存活且有一半以上的細胞是被流感病毒感染的 (圖六及表四)。

c. 以上述的方法定量流感病毒的中和抗體。

將不同稀釋濃度的血清和適當的流感病毒株和混合均勻,置於冰上反應 2 小時, 再感染 MDCK 細胞, 72 小時後定量病毒感染的細胞, 以不同比例的血清稀釋看是否仍可中和流感病毒的感染來定其中和抗體的力價, 這七個血清對此流感病毒株中和抗體的力價分別是 30、90、90、270、<30、30、及 270(圖七)。

d. 設立 influenza virs-captured ELISA 來定量 anti-influenza virus antibody

將 Anti-HA1 mAb coated 在 96 well plate 上,用以抓住 influenza virus,再加上不同稀釋的 human antiserum,可以較高敏感的測定 anti-influenza virus antibody (圖八)。

另外,本計劃也將分析感染流感病毒病人之免疫反應。首先收集 9 位

流感病毒感染病人的血液檢體,為了得知流感病毒感染病人血液中特定血球標記的表現狀況,利用流式細胞儀(Flow Cytometry)做血球細胞標記的分析,並與腺病毒感染之病人進行比較。結果發現,利用平均細胞標記的比例來看流感病毒感染病人和腺病毒感染的病人的差異,發現兩組病人間其不同的細胞標記並無明顯差異。但利用絕對細胞數平均值來比較,發現流感病人這一組的細胞數目平均值較低(表五)。因為流感病人細胞中平均CD3、CD4、CD8或CD16CD56的比例和腺病毒病人的平均值無明顯差異,但平均絕對細胞數都比腺病毒病人低。我們後來發現腺病毒病人的白血球數目都比流感病人的數目高,因此在細胞比例平均差不多的情況下絕對細胞數目就相對的較高(表六)。

而當我們分析流感疫苗施打前後之病人血液檢體,則發現比較健康個案施打流感疫苗前後的血球標記表現的比例和絕對細胞數的變化,發現施打疫苗後 TLR-3、TLR-4 以及 CD4CD25 的表現均有顯著的增加(表七、八、九、圖九)。

而在寡胜肽嗜菌體展示系統,本研究計畫乃嘗試建立 HA(H1,H3,及 H5) 寡胜肽嗜菌體展示系統,並利用感染病人的血清的結合篩選,以分析 HA 上的高顯性抗原決定位的分佈(圖十)。目前先以 H3 來初步構築寡胜肽嗜 菌體展示系統(圖十一、十二)。

a. H3 基因的選殖

表現 H3 的 A 型流感病毒株(2006IFN517; CDC)取自疾管局。此病毒取自重症病人血液。由於檢體量不多,我們將其感染 MDCK 細胞,繼代後純化病毒並抽取 RNA。此病毒的 H3 基因以 one step RT-PCR(promega)及能放大 H3 基因片段的的廣泛性引子對 (表十)來放大並選殖至 pGEM-T EASY 載體 (Invitrogen) (圖十三)。我們也已將 H1 基因片段 (PR8,表十) (Hoffmann, et al,2000)選殖至 pGEM-T EASY 載體。H3 基因片段也因此選殖而可以利用 H3 基因片段的特一性引子(表十)對及有護錄效果的 DNA 聚合酶無限放大,以供酵素切割修飾成 50-100 bp 的基因片斷作進一步的選殖(圖十一)。

b. H3 基因片段的修飾與選殖入 pORFES-IV 質體

H3 基因經 PCR 放大後,必須經酵素切割修飾成 50-100 bp 的基因片斷以供進一步的選殖至另一質体 pORFES-IV(圖十四、十五)。我們將 PCR 放大的 H3 DNA 以 0.4 U/ml 的 DNAseI 在 27 °C 進行分解切割,在不同時間間隔取出反應物置入 0.05M EDTA 並於 75°C 進行 10 分鐘的抑制。所有反應混合物接著以凝膠電泳分離(80V, 36mA, 2hr)。在 2%膠上,可清楚的看見 1.7 kb的 HA 基因片段隨 DNAseI 作用時間而分解成小片段。HA 基因片段在 50-100bp 左右的區段被分離並純化(圖十六 A)。純化的 HA $_{50$ - $100}$ 片段接著

以 mungbean nuclease 進行修飾,切除 5'及 3'的單股突出端,並接著以 T4 DNA 聚合酶修整及加磷。此時這些 HA_{50-100} 片段為平頭式片段,膠泳純化後即可 粘接至質体 pORFES-IV 的 NdeI 位址(圖十六 B)。pORFES-IV 的構築乃經 由置換一段 linker (含有 NheI-NdeI-HindIII 限制酶切點) 到含有 NheI 及 HIII 切點的 pORFES-DB3 (圖十五)。此 pORFES-DB3 質體得自 Stratmann and Kang 等人(Stratmann, et al.,2005)。由於 NdeI 切點不易切割及粘聯,含有 SmaI 切點的 linker 也被置換入 pORFES-DB3 以提供高效率的切割及粘聯平頭式的 HA_{50-100} 片段(圖表數據未附)。

c. HA₅₀₋₁₀₀基因片段的選殖及片段基因庫的代表性

平頭式的 HA_{50-100} 片段粘聯至 pORFES-IV NdeI 切點經由電導 (electroporation)送入 $DH5\alpha$ 或 XLOLR E. coli 菌株 (10^9) transformation efficiency for supercoil pORFES-IV)。電導後之 E. coli 菌株以 $37^{\circ}C$ 養 1 小時後,塗上含有一種抗生素 Chloramphinical 或具兩種抗生素(Chloramphinical 及 Carbenicilin) 的培養基來分析此 E. coli 菌株上表達的 HA_{50-100} 基因片段是否具有代表性 (表十一) 。我們預估 1.7 kb 的 HA 可產生大約 1686000 個 (1.7×10^6) 無方向性的 50-100bp 片段。因此經由 T4 ligase 粘聯 HA_{50-100} 基因片段至 pORFES-IV NdeI 切點再轉染 E. coli 後,我們期望能在轉染液中含有至少 1.7×10^6 的可生成轉染菌落。pORFES-IV 上的 Chloramphinical 及

Carbenicilin 的抗性基因提供篩選轉染菌落的可行性。僅使用Chloramphinical篩選的培養基,則任何插入型式的片段,經轉染篩選後扣除未插入而自我粘聯的pORFES-IV,可產生至少1.7 x 10⁶的轉染菌落,方具有代表性。其中有三分之一的轉染菌落(5.8 x 10⁵)具有 Carbenicilin 抗性,因僅有三分之一可回復 Carbenicilin 的讀碼而表達抗性。然而尚有二分之一為含有反向插入 HA₅₀₋₁₀₀基因片段的轉染菌落無法被 Cm 及 Carb篩選而排除,理論上 2.8 x 10⁵的轉染菌落代表真正的 HA₅₀₋₁₀₀基因片段基因庫。由圖表一,兩種抗生素的篩選狀況得知,我們僅獲得平均小於 10³的菌落,而且兩種抗生素篩選與單一 Cm 篩選的菌落數比例也不穩定並不接近 1/3。這個實驗說明我們需要提升 HA₅₀₋₁₀₀基因片段與 pORFES-IV 的粘聯與轉染的效率。由於 HA₅₀₋₁₀₀基因片段的處理牽涉許多精細的酵素操作與純化,我們目前正採用較高效率的酵素系統與純化步驟來解決此一瓶頸。

嗜菌體寡肽展示系統的建立的瓶頸在於寡肽基因庫的建立。寡肽基因庫的大小如果不具代表性,則無法構築具代表性的嗜菌體寡肽展示系統以有效的用來定義與遴選與其有親合力的寡肽或抗體。我們的寡肽基因庫的建立遵循發表文獻的基本原則,然而產生的基因庫與發表文獻的大小約差距 100 倍。可能原因如下: (1) HA₅₀₋₁₀₀基因片段的處理可能不完全,可能尚存有非平頭式片段,造成與 pORFES-IV 的粘聯的效率降低,影響粘合分子

的數量。我們目前採用高效率 BAL-31 單鏈外核酸酶(NewEngland, BioLab) 取代 mungbean 核酸酶以減低 mungbean 核酸酶非特異性分解 HA50-100 基因 片段的可能性;(2)因 HA50-100 基因片段片段太小導致純化回收後的數量及品 質無法與 pORFES-IV 產生高效率的粘聯。我們目前將採用電泳析出式 (electro-elution)的方法, 盡量回收 HA50-100 基因片段, 並利用 tRNA 及 spermin (11)來純化回收這些片段,以提高與 pORFES-IV 粘聯的效率; (3) 我們目 前使用之轉染用 E. coli 為自己實驗室製備之菌種,其轉染效率以 supercoil form 的 ORFES-IV 評估約有 10^9 ,然而某些商業公司有提供 10^{10} - 10^{12} 的轉染 用 E. coli (Invitrogen),但費用極高,如果近期內無法產生代表性基因庫, 我們極可能採用此高轉染性菌株以趕上進度;(4)再者 DNAse I 在室溫以上 裂解的 HA50-100 基因片段大小可能有非機率效應,而使片段種類不均,也可 能影響到基因庫的代表性。我們也將利用高頻聲波(soniction)作為前處理 HA 裂解的手續,並輔以 4℃ DNAse I 的酵素裂解來解決此一可能發生的問 題。

結論與建議

針對 2000-2006 年臨床病毒株 NS1 的基因序列分析結果顯示,2000年及 2006 造成較大的 H1N1 流行中,其 NS1 在 functional domain 上都仍維持 H1N1 亞型所具有的胺基酸序列,但 2000年所流行的 H1N1 則於

poly(A)-binding domainII (PABII)的 binding domain 上第 226 的位置胺基酸序列 Valine 變成和其他年的 H1N1 的 Isoleucine 不同;而在 2006 年所流行的 H1N1 則於 RNA-binding domain 上第 25 個胺基酸序列 lysine 與其他年的流感病毒株的 Glutamine 所不同。因此推測也許是這些位置的改變也是造成 H1N1 較大流行原因之一,而目前我們所定序範圍僅至 2000 年,2000 年以前的序列則以 reference strain 為參考,因此必需擴大分離株定序年數,以比較台灣所流行的病毒株 NS1 在 functional domain 上序列變化情形。

在免疫分析平台的建立部分,已可利用 anti-NP 或 anti-M Ab 的抗體,透過流式細胞儀的分析來進一步的偵測被病毒感染的細胞。未來將會嘗試更多不同的流感臨床分離株來評估此方法是否適用於多數的病毒。另外也將嘗試更多不同種類的流感抗體來達到更高的敏感性及特異性;而virus-captured ELISA 目前也能敏感的偵測血清中之流感病毒抗體,將再對此方法進行多面的改善,以求最佳之反應條件。

於宿主免疫反應的分析中,我們發現流行性感冒病毒感染病人和腺病毒感染的病人的周邊血液單核球的免疫細胞表現型,兩組病人間其不同的細胞標記的比例並無明顯差異。但流行性感冒病毒感染病人的平均絕對細胞數則較低。腺病毒感染病人的白血球數目都比流行性感冒病毒感染病人

的數目高,因此在細胞比例平均差不多的情況下絕對細胞數目就相對的較高。在比較健康個案施打流行性感冒病毒疫苗前後的血液單核細胞其免疫細胞表現型的比例和絕對細胞數的變化,則發現相較於施打疫苗前,個案施打疫苗後其血液單核細胞的 TLR-3、TLR-4 以及 CD4⁺CD25⁺的表現均有顯著的增加。我們將進一步探討這些變化的意義,並比較自然感染和施打疫苗後其體內抗體的變化情形以及和這些單核細胞其免疫細胞表現型變化的相關性。

發展噬菌體快速展示系統表達致死性 H1, H3,或 H5 流感病毒株的 HA 表面的寡肽抗原庫(phage display library),以偵測及分析病患與疫苗接受者體內抗體相對應的免疫多肽抗原具有極大的潛力價值(Beghetto, et al,2001, Beghetto, et al,2003, Enshell-Seijffers, et al.,2001, Gupta, et al,2001, Li, et al,2005, March, et al,2006),它可提供直接的臨床證據來探討與病人體內抗體相對應的流感病毒 HA 抗原決定位的免疫敏感性。病人體內抗體能認知的 HA 抗原決定位,因其顯性的依持特性,我們稱此 HA 抗原決定位為 antigenic dominant epitope (ADE)。它們雖與 MHCI 及 MHCII 上抓取的寡肽無一定對等的關係,其中當然還涉及病人本身 MHCI 及 MHCII 的基因歧異多向性的影響,但此 ADE 被 MHCI 及 MHCII 所展示時,他們是否具廣泛性及免疫敏感性以刺激有效的 T 及 B 細胞的免疫反應,則是個很重要的課題:這些流感病毒 HA 上的 ADE 是否有一些可以被用來作

為綜合性免疫原,又是否某些是較容易成為免疫原罪 (Aantigenic sin) 抗原僅具偏狭的免疫敏感性,是兩個值得深入探討的研究題材。

人類致死性禽流感病毒複製期間所引發的高度發炎反應及急速細胞 病變或死亡的原因可能是病毒致病機制的重要線索。除了病毒與病毒蛋白 本身在複製期間可能引發的連串細胞病變外,第二型白血球組織相容抗原 (MHC-II)上所承載的流感病毒免疫顯性多肽抗原(immunodominant epidope)的變異性也可能導致失效甚或不洽當的細胞免疫力而造成病變。 因此, 釐清致死性流感病毒免疫顯性多肽抗原的變異性與流感病患間的免 疫力,可提供有力的線索了解致死性流感病毒致病的部份機轉,並對疫苗 發展提供有效的資訊(Li, et al., 2005, March, et al., 2006)。再者,利用反轉 基因系統,目前在老鼠動物的研究模式成功的指出,人類致死性禽流感西 班牙株(H1N1) 的表面抗原中的 HA 可活化巨噬細(macrophage),釋放前 發炎細胞激素(proinflammatory cytokines)及趨化細胞激素(chemokines)以 引發嗜中性細胞(neutrophil)的組織滲入,並造成急性肺部組織的損傷 (Kobasa, et al, 2004)。更有趣的是,在致死性禽流感西班牙株(H1N1)感染 而存活的病人,其人體之中和性抗體可被同株病毒的表面抗原激發產生, 但卻有其種別專一性,無法有效中和它種 H1N1 病毒。如此的專一性(也 就是所謂的免疫原罪)似乎也存在於不同的 H1N1 感染的病人的免疫中和

反應中。因此,如何系統性的了解抗體與病毒間的種別專一性,將更有助 於篩選有效的弱致病性病毒株供做疫苗載體。

利用 DNAseI 切割的 H3 病毒 HA cDNA 轉殖入噬菌體來表達 15-20 mer 的 H3 多胜肽抗原,確實已能快速的利用單株或多株抗體來成功篩選坐落於 H3 上抗體相對應的 ADE 基因序列(Stratmann, et al., 2005)。此類噬菌體快速 展示系統(phage cDNA display)免疫平台的建立勢必有助於釐清特定流感病 毒株上的免疫顯性多肽抗原與病人細胞免疫(cellular immunity)防禦機制的 相對關係(Patel, et al.,1997, Tamura, et al.,2005)。我們急欲建立噬菌體快速展 示系統表達致死性H1, H3,或H5流感病毒株的HA表面的寡肽抗原庫(phage display library),這個平台的設立可用來快速界定不同的臨床病人與疫苗接 受者 HA 抗體對 H1, H3, 及 H5 的差異性,以分析病患與疫苗接受者體內抗 體相對應的免疫多肽抗原。利用成大醫院庫存的流感病毒患者、新病人、 及疫苗接受者的血液及分離病毒株,我們已配合醫院資深教授與醫師對現 有病毒株定序分型,一旦菌體展示系統建構完成,將利用血庫病患抗體來 快速界定不同的臨床病人與疫苗接受者 HA 抗體對 H1, H3, 及 H5 的差異 性,並找出顯性多肽的序列及進一步定序,以建造參考資料庫。再者,系 統性的H1, H3, 及H5致死株的HA多胜肽抗原噬菌體展示排序組(array chip) 或甚至是人工純合成多胜肽的排序晶片(Andresen, et al, 2006, Li, et al., 2005,

Patel, et al.,1997, Zeng, et al,2001)的建立應可用來快速界定不同的臨床病人 與疫苗接受者 HA 抗體對 H1, H3, 及 H5 的差異性。陽性反應即代表有相對 應的抗體與顯性多肽抗原;反之陰性即代表沒有相對應的抗體與顯性多肽 抗原。依據流感病毒種別致病之此差異性,應可快速的在排序晶片上顯現 差異,進而界定最有效率的 HA 免疫顯性多肽抗原序列,以供日後中和性 抗體的研發或疫苗發展。更甚者,利用差異性顯性多肽抗原,加上文獻上 已知的 HA 顯性多肽抗原,可再排定特定的圖譜晶片以供量產,將非常有 利於檢測疫苗株的有效性與否,與審查族群間顯性多肽抗原的差異性而做 未來疫苗製備的相應措施。

然而目前的起始階段遭遇到許多實驗瓶頸,將 HA gene 片段殖入 pORFES-IV vector 的過程中發生許多問題,目前換過許多不同的酵素系統 與嚐試過不同的條件,整理於圖十七。

這是本實驗室第一次嘗試製作 library,對於老師和學生都是一種挑戰,然而這項挑戰比我們預期中還要困難。目前最大的問題應為 HA 基因片段片段化(fragmentation)與的平頭化(blunt end)。由於電泳膠解析度的關係,我們懷疑在電泳膠上面看到的 45~90bps 的片段,有可能只有少部分的 DNA片段是這種大小,再加上小片段純化不易,造成純化時巨大的損失。另一個部份是 HA 基因片段的平頭化,由於沒有有效的方法可以偵測 HA 基因的

平頭化是否完全,只能單單由 ligation 的結果來判斷。因此我們可能會改變 純化小片段 DNA 的方式,以電泳析出(electro-dialysis)加上 tRNA/spermin 沉 澱純化,或 HPLC/column chromatography 的方式分離 45~90 bps 的片段,並 利用高效率的核酸酶作處理,希望藉此能夠獲得足量且大小適當的 HA 基 因片段。

計畫重要研究成果及具體建議

我們知道流感病毒除了其表面佔有較大比例的醣蛋白HA及NA易受到環境壓力而突變造成流行,其他 6 段基因則不易受到外在環境壓力或是病毒內在因素而造成突變。而我們於此計畫中分析南台灣 2000 年至 2006 年臨床病毒株,分析其 NS 序列,發現在 NS1 的 function domain 上序列的改變似乎跟臨床流感病毒株的流行有著一定的相關性。

建立免疫分析平台的部分中,藉由流式細胞儀的分析,已經可以利用 anti-NP 與 anti-M 的抗體偵測受流感病毒感染 MDCK 細胞中,核蛋白 (NP) 與膜蛋白 (M) 的表現量;同時也發現,不同的流感病毒感染 MDCK 細胞後,NP 與 M 蛋白的表現量也有所差異;另外,這些病毒蛋白表現量也會隨著病毒感染細胞的時間,以及受到來自病患的抗體中和的能力不同而受到影響;此外,在偵測人體血清中抗體部分,利用 virus-captured ELISA 的方法也可以快速、高產量且高靈敏地偵測血清中之流感病毒抗體。未來,

我們將嘗試各種不同的流感臨床病毒株感染 MDCK 細胞,觀察病毒蛋白的表現量,並且繼續針對流式細胞儀分析及 ELISA 分析更進一步地改善系統的敏感度及特異性,由所得到的結果,進一步評估這些流感病毒株作為流感疫苗候選株的可能性。

目前雖發現腺病毒感染病人的 CD3、CD4、CD8 或 CD16CD56 的絕對細胞數以及白血球數目都比流行性感冒病毒感染病人的數目高;另外健康個案施打流行性感冒病毒疫苗後其血液單核細胞的 TLR-3、TLR-4 以及CD4⁺CD25⁺的表現則有增加的情形。然而這些細胞標記之減少,或是增加,是否再宿主免疫反應中扮演一定角色?我們將進一步探討探討這些血液單核細胞免疫細胞表現型變化的意義,及其參與免疫致病機轉的角色。另外也將比較自然感染和施打疫苗後人體內抗體的變化情形,並研究抗體的變化情形和這些單核細胞其免疫細胞表現型變化的相關性。

在噬菌體表現系統上,H3型流感病毒已由疾管局提供的重症病毒株替代。病毒已成功養殖,其HA基因之純化、定序與培植已完成。H3病毒株的 HA gene 酵素切割並殖入 pORFES 質體,並評估其效率。目前尚無具體重要研究成果,但此計劃將可導出新穎的流感病毒表面抗原之顯性多肽抗原展示系統及研發與病人直接相關的顯性多肽抗原圖普及晶片的建立,可以方便特定免疫顯性多肽抗原的定序,有利於檢測疫苗株的有效性與否,

審查族群間顯性多肽抗原的差異性而做未來疫苗製備的相應措施,提供台灣病人體內流感病毒顯性多肽抗原的相對分布狀況並反映出國內病患特定的顯性多肽抗原與致病性的關係。

参考資料

- 1. Ada GL, and Jones PD: The immune response to influenza infection. Curr Top Microbiol Immunol 1986;128:1-54.
- 2. Andresen H, Grotzinger C, Zarse K, Kreuzer OJ, Ehrentreich-Forster E, and Bier FF: Functional peptide microarrays for specific and sensitive antibody diagnostics. Proteomics 2006;6:1376-84.
- 3. Beghetto E, Pucci A, Minenkova O, Spadoni A, Bruno L, Buffolano W, et al: Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of Toxoplasma gondii by phage display of cDNA libraries. Int J Parasitol 2001;31:1659-68.
- 4. Beghetto E, Spadoni A, Buffolano W, Del Pezzo M, Minenkova O, Pavoni E, et al: Molecular dissection of the human B-cell response against Toxoplasma gondii infection by lambda display of cDNA libraries. Int J Parasitol 2003;33:163-73.
- 5. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, and Salazar-Mather TP: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol 1999;17:189-220.
- 6. Bogdan C: The function of type I interferons in antimicrobial immunity. Curr Opin Immunol 2000;12:419-24.
- 7. Enshell-Seijffers D, Smelyanski L, Vardinon N, Yust I, and Gershoni JM: Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals. Faseb J 2001;15:2112-20.
- 8. Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, et al: Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. J Virol 2005;79:3766-74.
- 9. Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, et al: Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:10736-41.

- 10. Gupta S, Arora K, Sampath A, Singh SS, Gupta A, and Chaudhary VK: Mapping of hiv-1 Gag epitopes recognized by polyclonal antibodies using gene-fragment phage display system. Prep Biochem Biotechnol 2001;31:185-200.
- 11. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, and Webster RG: A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:6108-13.
- 12. Jambrina E, Barcena J, Uez O, and Portela A: The three subunits of the polymerase and the nucleoprotein of influenza B virus are the minimum set of viral proteins required for expression of a model RNA template. Virology 1997;235:209-17.
- 13. Katz JM, Wang M, and Webster RG: Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. J Virol 1990;64:1808-11.
- 14. Kemble G, and Greenberg H: Novel generations of influenza vaccines. Vaccine 2003;21:1789-95.
- 15. Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, et al: Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. Nature 2004;431:703-7.
- 16. Krug RM, Yuan W, Noah DL, and Latham AG: Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. Virology 2003;309:181-9.
- 17. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, and Tough DF: Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. Immunity 2001;14:461-70.
- 18. Li B, Jiang L, Song Q, Yang J, Chen Z, Guo Z, et al: Protein microarray for profiling antibody responses to Yersinia pestis live vaccine. Infect Immun 2005;73:3734-9.
- 19. Lindenmann J, and Isaacs A: [Research on viral interference.]. Schweiz Z Pathol Bakteriol 1957;20:640-6.
- 20. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, Saito T, Nerome R, and Nerome K: Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. J Virol 1999;73:4413-26.
- 21. Ludwig S, Pleschka S, and Wolff T: A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell. Viral Immunol 1999;12:175-96.
- 22. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, et al: Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. J Immunol 1998;161:1947-53.
- 23. March JB, Jepson CD, Clark JR, Totsika M, and Calcutt MJ: Phage library screening for the rapid identification and in vivo testing of candidate genes for a DNA vaccine

- against Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony biotype. Infect Immun 2006;74:167-74.
- 24. Murphy P, Roberts ZM, and Waner JL: Differential diagnoses of influenza A virus, influenza B virus, and respiratory syncytial virus infections by direct immunofluorescence using mixtures of monoclonal antibodies of different isotypes. J Clin Microbiol 1996;34:1798-800.
- 25. Nerome K, Yoshioka Y, Ishida M, Okuma K, Oka T, Kataoka T, et al: Development of a new type of influenza subunit vaccine made by muramyldipeptide-liposome: enhancement of humoral and cellular immune responses. Vaccine 1990;8:503-9.
- 26. Patel SD, Cope AP, Congia M, Chen TT, Kim E, Fugger L, et al: Identification of immunodominant T cell epitopes of human glutamic acid decarboxylase 65 by using HLA-DR(alpha1*0101,beta1*0401) transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:8082-7.
- 27. Roberts NJ, Jr., and Nichols JE: Regulation of lymphocyte proliferation after influenza virus infection of human mononuclear leukocytes. J Med Virol 1989;27:179-87.
- 28. Robertson JS, Bootman JS, Nicolson C, Major D, Robertson EW, and Wood JM: The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus. Virology 1990;179:35-40.
- 29. Schall TJ: Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine 1991;3:165-83.
- 30. Schroder JM, Mrowietz U, and Christophers E: Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. J Immunol 1988;140:3534-40.
- 31. Stratmann T, and Kang AS: Cognate peptide-receptor ligand mapping by directed phage display. Proteome Sci 2005;3:7.
- 32. Tamura S, Tanimoto T, and Kurata T: Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. Jpn J Infect Dis 2005;58:195-207.
- 33. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, et al: Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. J Exp Med 1993;177:1809-14.
- 34. Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, and Krug RM: RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. Rna 1999;5:195-205.
- 35. Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, and Palese P: Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. Virology 1988;163:112-22.

36. Zeng W, Ghosh S, Macris M, Pagnon J, and Jackson DC: Assembly of synthetic peptide vaccines by chemoselective ligation of epitopes: influence of different chemical linkages and epitope orientations on biological activity. Vaccine 2001;19:3843-52.

表一、 RT-PCR 增幅流感 A 型病毒八個病毒 RNA 基因所使用的引子組。

Primer name	Sequence(5'-3')	Product size(bp)
HA-F	Agcaaaagcagggg	
HA-R	Agtagaaacaagggtgtttt	1778
NA-F	Agcaaaagcaggagt	
NA-R	Agtagaaacaaggagtttttt	1413
NP-F	Agcaaaagcagggta	
NP-R	Agtagaaacaagggtattttt	1565
M-F	Agcaaaagcaggatg	
M-R	Atagaaacaaggtagttttt	1027
NS-F	Agcaaaagcagggtg	
NS-R	Agtagaaacaagggtgtttt	890
PA-1F	Agegaaageaggtae	
PA-4R	agtagaaacaaggtacttttttgg	2233
PB1-1F	Agcgaaagcaggca	
PB1-4R	Agtagaaacaaggcatttttca	2341
PB2-1F	Agegaaageaggte	
PB2-4R	agtagaaacaaggtcgtttttaa	2341

表二、流感 A 型病毒臨床分離株 NS1 胺基酸序列分析。

-	RNA-binding domain Isolate N. (19-38)				clear e	•	CPSF bind- ing site	locali	clear zation jnal	1)			PABII ding do 223-23	main		_
		21 22 23 25 26 28	41 44 (5 7 139	143 1	144 145	186			21	223	224 2	26 227	228	229	230
H5N1	Thailand/676/05 Memphis/24/95 Shiga/25/97	R F A Q E G R F A Q E G R F A Q E G Q V V Q E S Q V V Q E S	K R K R K R R R R R	R N R N R D K D K D	A A T T	L I L I L I L V L V	E E E E	P P P P	K N N K K	K K K K K	E A A A	R R R R	E E E E R R R	PPSSSS	EEEKK	V V V V
H3N2	Tainan/N264/04 Tainan/N1620/04 Tainan/M687/04 Tainan/N519/06 Tainan/N1817/06	Q V V Q K S Q V V Q E S	R R R R R R R R R R R R R R R R R R R	K K K K K K K K K K K K K K K K K K K	T T T T T T T	V		P P P P P P P P P	K K K K K K K	E K K K K K K K K K	A A A A A A A A A A	R	R R R R R R R R R R R R R R R R R R R	999999999999	KKKKKKKKKK	V V V V V V V V V V V V V V V V V V V
H2N2	England/10/67 Tokyo/3/67 Korea/426/68 Brevig Mission/1/18 WSN/33 Puerto Rico/8/34	Q V V Q E S Q V V Q E S Q V A Q E G Q V A Q E G R F A Q E G R V A Q E G	R R R R R R R R R R R R R R R R R R R	K D C R D D C R C D C R C D C R C D C R C C C C	T T T T T T T T	V		P P P P P P P	K K K K K K	K K K K K K K K E	A A A A A A A A A		R R R R R R R R R R R R R R R R R R R	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	K K K K K K E E E	V V V V V V V V V V V V V V V V V V V
H1N1	New Caledonia/20/99 Tainan/N202/00 Tainan/N202/00 Tainan/N277/00 Tainan/N364/00 Tainan/S63/01 Tainan/S63/01 Tainan/N277/02 Tainan/N1025/05 Tainan/N277/02 Tainan/N1025/05 Tainan/S243/05 Tainan/S01/06 Tainan/N39/06 Tainan/N1156/06 Tainan/M1156/06 Tainan/M115/06 Tainan/M195/06 Tainan/M195/06 Tainan/M195/06 Tainan/M221/06	Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q G G Q V A Q G G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A Q D G Q V A C C C C C C C C C C C C C C C C C C	**************************************	R	z zzzzzzzzzzzzzzzz			P P P T T T T T T T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	K	A AAAAAAAAAAAAAA	000000000000000000000000000000000000000	R R R R R R R R R R R R R R R R R R R			V V V V V V V V V V V V V V V V V V V

表三、流感 A 型病毒 Nuclear export signal 胺基酸序列分析。

PALICIALITY OF	opat	4	الدحر		que		of N	5 2			
Inclate N.	12	1	i 3 1	14	15	16	17	18	15	71	2 1
Hony Kong/156/97		L	K		R	ш	S	K		Q	L
Hong. Kong/37/98	ı	L	K		R		S	K		Q	L
Hong Kong/212/03	ı	L	¥		R		S	K		Q	L
Theiland/676/05	I	L	v		R	W	S	K		Q	L
Mamphis/24/95	•	L	L		R		S	K		Q	L
Ship.e/25/37	ı	L	L		R	W	S	K		Q	L
Tainan/N/727/00	ı	L	L		R	-	S	K		Q	L
Telman/N/1811/02		L	L		R		S	K	w	0	L
Teinen/14069/07		L	L		R		S	K		0	L
	_					_	_				ī
	_					_	_				L
	_									_	ī
	_										L
	_		· ·				_				L
	_										
	_									_	L
	_										L
	_						_			_	L
	_									_	L
		L	L		R		5	K	-	Q	L
Pananna/1/61	I	L	L		R		S	K		Q	L
California i 166	I	L	L		R	H	S	K		Q	L
England*i 0/67	I	L	L		R		S	K		Q	L
Tokyo/3/57	I	L	L		R	H	5	K		R	L
Koran#25/58	I	L	L		R		S	K		Q	L
Bravig Mission*i/18	ı	L	-		R		S	K		Q	L
WSN/33		L	*		R		S	K		Q	L
Puerto Rico/8/34	I	L	L		R	M	5	K		Q	L
New Caledonis/20/99	I	L	*		R		S	K		Q	L
Talran/N202/00	ı	L	-		R		S	K		Q	L
Talnan/N277/00	ı	L	-		R		S	K		Q	L
Talnan/N354/00	I	L	+		R	ш	S	K		Q	L
Talnan/S63/01		L	*		R		S	K		Q	L
Talnan/N4542/01	ı	L	+		R	ш	S	K		Q	L
TalnaniN/277/N2	ı	L				ш	S	K		Q	L
Talnan/N/1025/05	ı	L			R		S	ĸ		Q	L
Tainan/S320/05	Ī	ī					S	K		9	L
	Ī										L
	_									_	ī
Tainan N. 221/05	i	-			R		3 5	ĸ		0	L
	Hong Kong/15687 Hong Kong/21283 Thomas Kong/2128	Ho np. Kong/15637	Hong Kong/156/97								

表四、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析。

		enza me IM + 2數			DMEM	-	2% FBS in DMEM			
		trypsin								
	CPE	HA	Cell	CPE	HA	Cell	CPE	HA	Cell	
	(%)	titer	viabili	(%)	titer	viabili	(%)	titer	viabili	
		ty				ty			ty	
24 h	No	0	100%	No	0	100%	No	0	100%	
	CPE			CPE			CPE			
48 h	80%	1:8	60%	60%	1:16	80%	20%	1:16	100%	
72 h	100%	1:32	0%	100%	1:32	0%	100%	1:32	80%	

表五、流感病毒與腺病毒感染病人血球標記之比較。(a)依比例;(b)依絕對細胞數。

(a)

	Influenz	za virus i	infection	l	Adenovirus infection						
Patient	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD16 CD56 (%)	Patient	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD16 CD56 (%)		
1	46.9	17.61	22.96	21.72	1	17.8	9.8	5.2	34.7		
2	16.94	8.5	6.81	26.38	2	25.00	12.30	11.50	5.10		
3	14.95	7.55	6.3	25.96	3	69.60	33.40	35.10	36.00		
4	28.69	18.1	11.3	12.69	4	50.00	20.80	25.60	4.50		
5	45.43	17.72	20.81	5.55	5	15.90	5.00	2.20	0.40		
6	37.34	31.33	7	1.1	6	59.80	13.30	22.70	19.00		
7	58.31	30.66	24.67	6.84	7	44.80	23.40	19.10	22.40		
8	66.73	29.37	25.7	9.45	8	41.30	21.90	21.60	17.10		
9	64.48	24.43	35.37	10.01	Mean	40.53	17.49	17.88	17.40		
Mean	46.9	17.61	22.96	13.30							

(b)

	Influenz	za virus i	nfection			Adend	virus inf	ection	
Patient	CD3+	CD4+	CD8+	CD16	Patient	CD3+	CD4+	CD8+	CD16
	cells/µl	cells/µl	cells/µl	CD56		cells/µl	cells/µl	cells/µl	CD56
				cells/µl					cells/µl
1	476	179	233	220	1	192	94	88	39
2	172	86	69	267	2	181	100	53	353
3	152	77	64	263	3	501	240	253	259
4	291	184	115	129	4	949	395	486	85
5	461	180	211	56	5	234	74	32	6
6	379	318	71	11	6	710	158	270	226
7	591	311	250	69	7	1538	803	656	769
8	677	298	261	96	8	632	335	330	262
9	654	248	359	102	Mean	617	274	270	250
Mean	428	209	181	135					

表六、流感病毒與腺病毒感染病人白血球數目之比較。

Influenza	virus infe	ection		Adenovir	us infectio	n	
Patient	WBC	ANC	ALC	Patient	WBC	ANC	ALC
1	7800	6474	1014	1	11300	9492	1017
2	7200	5760	792	2	9600	7488	768
3	6800	4216	1904	3	7200	5616	720
4	2200	44	1958	4	14600	11826	1898
5	6700	5454	972	5	6700	4623	1474
6	6100	366	5490	6	9900	7821	1188
7	7600	6764	304	7	14300	8866	3432
8	5300	3763	848	8	15300	14535	1530
9	4600	2346	1932	Mean	11113	8783	1503
Mean	6033	3910	1754				

表七、健康個案細胞標記表現,施打流感疫苗前。(a)依比例;(b)依絕對細胞數。

(a)

	WBC	ALC	CD3 (%)	CD4	CD8 (%)	CD20	CD4	CD16	TLR-3	TLR-4
Patient				(%)		(%)	CD25	CD56	(%)	(%)
							(%)	(%)		
1	6100	1769	75.62	39.72	32.31	12.81	0.23	9.74	2.07	13.48
2	6100	1159	66.66	36.82	27.84	12.46	0.36	11.64	5.23	2.18
3	7400	1110	46.75	26.39	21.52	14.63	0.34	10.92	0.94	0.68
4	5500	2640	71.91	19.55	29.73	6.04	0.04	12.34	1.91	1.19
5	6000	1320	67.01	39.21	27.01	8.77	0.29	19.33	4.01	4.91
6	6000	2580	79.58	41.79	32.17	3.55	0.08	8.41	4.75	4.12
7	9100	3185	63.11	40.64	30.78	9.78	0.02	23.85	2.43	1.75
8	6800	2312	57.89	24.6	26.92	9.12	0.18	26.46	3.43	1.42
9	7200	2160	65.31	33.46	27.64	20.82	0.29	7.44	2.1	1.67
10	7300	1898	47.96	27.1	19.2	13.64	0.08	34.36	3.56	4.56
11	8400	2352	37.92	21.48	16.05	11.42	0.08	4.78	2.97	2.37
12	6600	2640	48.3	29.23	17.97	9.17	0.24	31.72	21.72	3.59
mean	6875	2094	60.67	31.67	25.76	11.02	0.19	16.75	4.59	3.49

(b)

		ALC	CD3	CD4	CD8	CD20	CD4CD25	CD16	TLR-3	TLR-4
Patient	WBC		cells/µl	cells/µl	cells/µl	cells/µl	cells/µl	CD56	•	cells/µl
								cells/µl		
1	6100	1769	1338	703	572	227	4	172	37	238
2	6100	1159	773	427	323	144	4	135	61	25
3	7400	1110	519	293	239	162	4	121	10	8
4	5500	2640	1898	516	785	159	1	326	50	31
5	6000	1320	885	518	357	116	4	255	53	65
6	6000	2580	2053	1078	830	92	2	217	123	106
7	9100	3185	2010	1294	980	311	1	760	77	56
8	6800	2312	1338	569	622	211	4	612	79	33
9	7200	2160	1411	723	597	450	6	161	45	36
10	7300	1898	910	514	364	259	2	652	68	87
11	8400	2352	892	505	377	269	2	112	70	56
12	6600	2640	1275	772	474	242	6	837	573	95
mean	6875	2094	1275	659	543	220	3	363	104	70

表八、健康個案細胞標記表現,施打流感疫苗後。(a)依比例;(b)依絕對細胞數。

(a)

	WBC	ALC	CD3	CD4	CD8	CD20	CD4CD25	CD16	TLR-3	TLR-4
Patient			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	CD56	(%)	(%)
								(%)		
1	8800	2464	74.87	38.65	31.76	15.3	1.21	7.53	9.04	7.77
2	6900	1932	69.54	37.05	29	14.36	1.66	14.09	6.57	4.93
3	7500	1500	59.52	29.2	29.73	22.2	1.34	15.71	12.52	7.79
4	8100	2430	53.58	28.81	21.53	7.62	0.54	28.12	9.02	4.7
5	8300	1826	70.74	38.15	31.35	11.36	1.69	10.56	16.56	10.21
6	6900	2208	57.77	29.28	28.02	9.75	1.18	25.72	21.72	0.47
7	6100	2379	68.85	31.02	31.23	11.34	1.5	18.22	19.16	14.34
8	6600	1980	68.89	35.59	29.2	21.63	1.25	4.25	18.56	9.68
9	7400	2590	50.56	24.98	19.26	6.59	3.04	35.01	4.21	4.06
10	7200	2448	61.33	32.48	24.19	10.69	0.12	4.05	4.34	4.5
11	8300	2241	76.03	40.1	30.17	16.01	1.77	5.32	17.97	7.47
12	6600	2178	55.15	26.14	23.69	3.92	0.61	15.54	6.57	7.2
mean	7392	2181	69.71	35.59	29.92	13.71	1.45	16.74	12.19	6.93

(b)

D	HID C	ALC	CD3	CD4	CD8	CD20	CD4CD25		TLR-3	TLR-4
Patient	WBC		cells/µl	cells/µl	cells/µl	cells/µl	cells/µl	CD56 cells/µl	cells/µl	cells/µl
1	8800	2464	1845	952	783	377	30	186	223	191
2	6900	1932	1344	716	560	277	32	272	127	95
3	7500	1500	893	438	446	333	20	236	188	117
4	8100	2430	1302	700	523	185	13	683	219	114
5	8300	1826	1292	697	572	207	31	193	165	86
6	6900	2208	1276	647	619	215	26	568	366	225
7	6100	2379	1638	738	743	270	36	433	517	11
8	6600	1980	1364	705	578	428	25	84	367	192
9	7400	2590	1310	647	499	171	79	907	109	105
10	7200	2448	1501	795	592	262	3	99	106	110
11	8300	2241	1704	899	676	359	40	119	403	167
12	6600	2178	1201	569	516	85	13	338	143	157
mean	7392	2181	1389	709	592	264	29	343	244	131

表九、健康個案施打疫苗前後血清中之抗體定量。

		施打流原	感疫苗前			施打流	感疫苗後	
Patient	H1 HI titer	H3 HI titer	VIC HI titer	YAMA HI titer	H1	Н3	VIC	YAMA
1	40	40	640	160	80	40	1280	160
2	10	10	320	160	40	20	320	160
3	20	40	160	160	40	40	320	320
4	160	40	160	160				
5	40	40	80	160	80	80	320	80
6	80	20	640	160	160	40	320	80
7	80	40	320	80	160	40	320	80
8	40	20	80	40	160	80	1280	320
9	320	80	160	320	40	80	80	40
10	80	40	320	160	320	20	160	320
11	20	20	40	80	80	80	1280	40
12					80	40	2560	160

表十、放大流感病毒 HA 基因所用之引子

H3 Universal primers:

Forward: AGCAAAAGCAGGGG

Reverse: AGTAGAAACAAGGGTGTTTT

2006IFN507 H3 specific primers

Forward: AGCAAAAGCAGGGGATAATT

Reverse: AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAATT

PR8 (H1 specific primers)

Forward: ATGAAGGCAAACCTACTG Reverse: TCAGATGCATATTCTGCAC

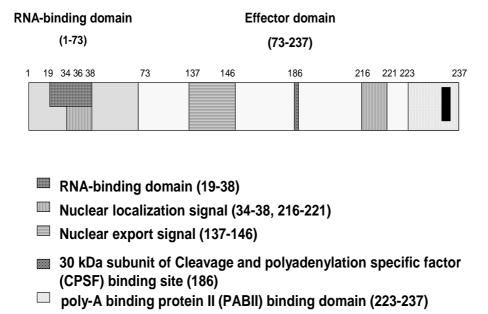
表十一、Library size determinant.

Ligation condition		16°C 24 hr		37°C 2 hr	
Plating ^b	Plate	Vector + insert	Vector only	Vector + insert	Vector only
1 ul	Cm + Carb	1	N/A	4	N/A
10 ul	Cm+ Carb	0	N/A	1	N/A
	Cm	1	0	4	0
100 ul	Cm+ Carb	1	N/A	4	N/A
	Cm	32	8	25	8

Vector: pORFES IV which treated with Smal and CIP; Insert: Blunt ended HA fragment

a: This is one representative result after several trails. The library size is estimated to be no more than 2 x 10⁴, which is 100 fold less than the estimation. The ratio of colonies on Cm plate with or without Carb is not 1:3, indicating an inefficient ligation reaction.

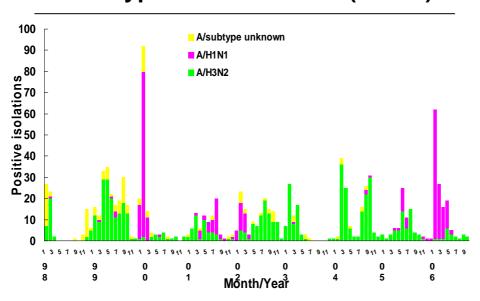
b: Transformed E.coli by the ligation mixtures was incubated at 37°C for an hour in 1000 ul SOC medium. Plating was preformed by using 1, 10, 100 ul without further dilution in plates containing Cm with or without Carb.



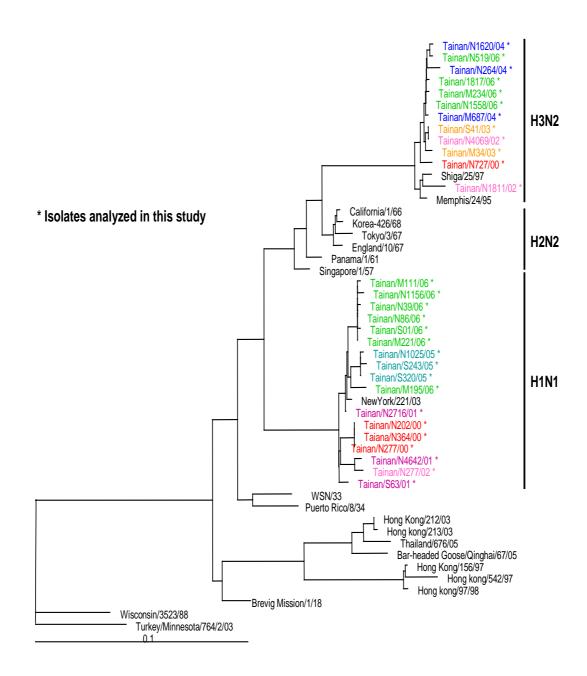
圖一、Influenza A NS1 蛋白構造。

■ PDZ domain ligand (228-231)

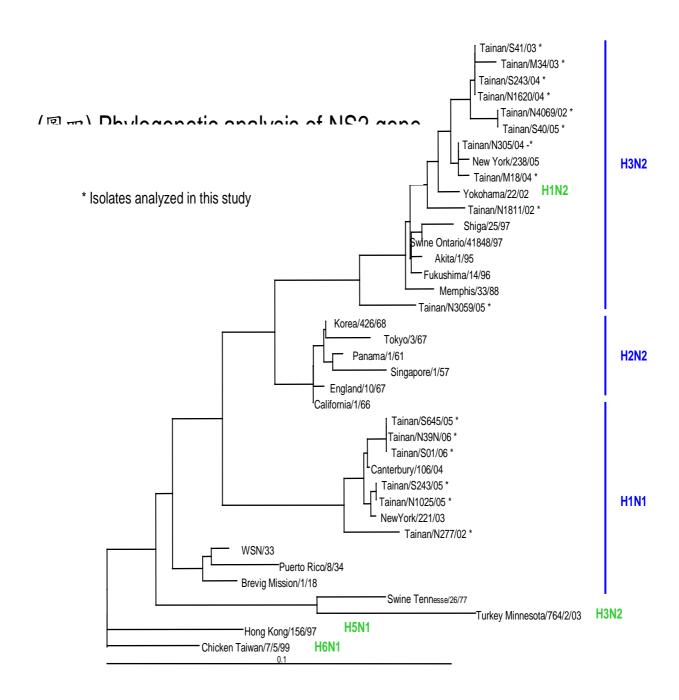
Subtypes of influenza A (NCKU)



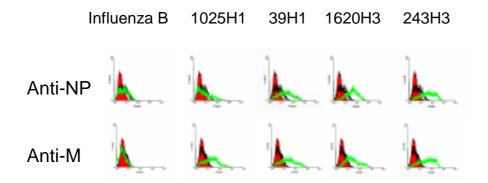
圖二、1998 年至 2006 年南台灣 Influenza A 流行趨勢。



圖三、臨床 Influenza A 病毒 NS1 基因演化分析。



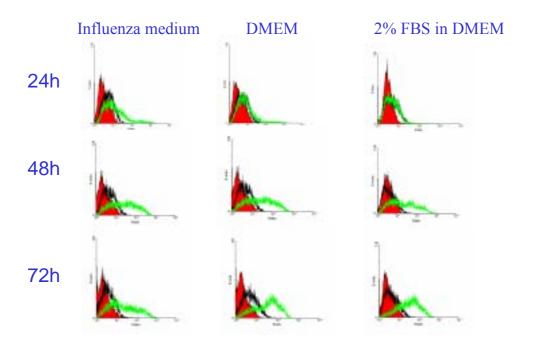
圖四、臨床 Influenza A 病毒 NS2 基因演化分析。



圖五、感染流感病毒之細胞經抗體染色後以流式細胞儀分析所得結果。

Red: Mock control stained only FITC conjugate anti-mouse antibody Black: Mock control stained with anti-NP or anti-M antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody.

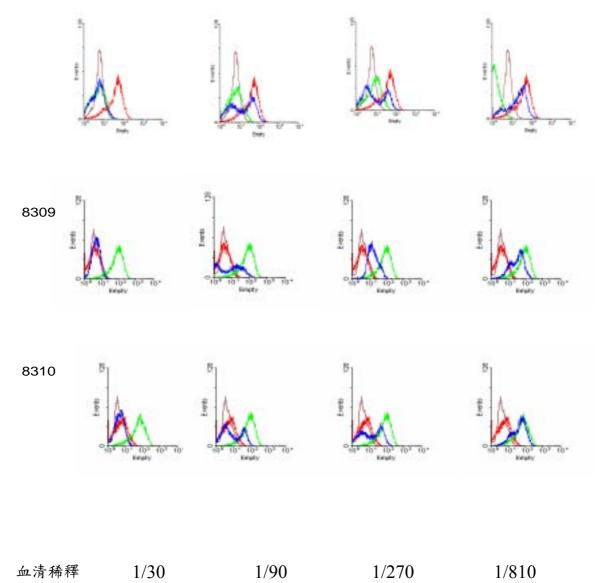
Green: Influenza virus-infected cells stained with anti-NP or anti-M antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody.



圖六、流感病毒感染 MDCK 後於不同時間進行流式細胞儀之分析。

Red: Mock control stained only FITC conjugate anti-mouse antibody Black: Mock control stained with anti-NP or anti-M antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody.

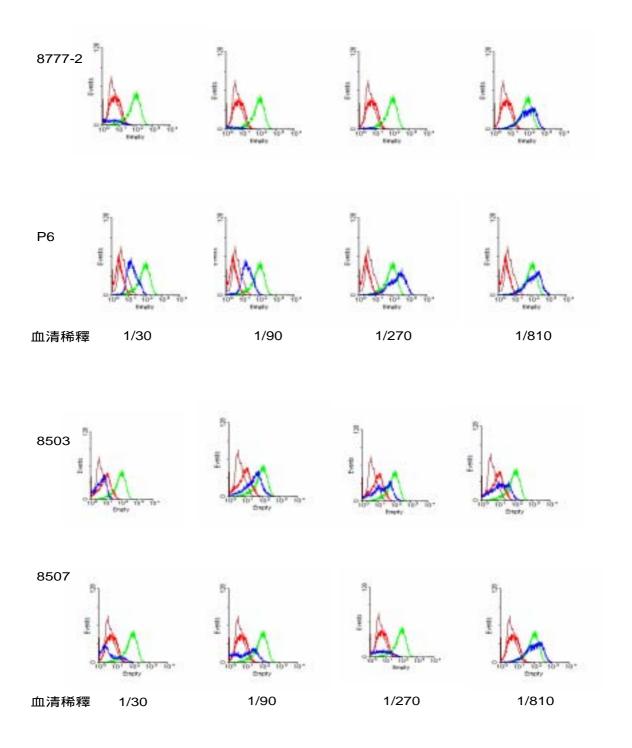
Green: Influenza virus-infected cells stained with anti-NP or anti-M antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody.



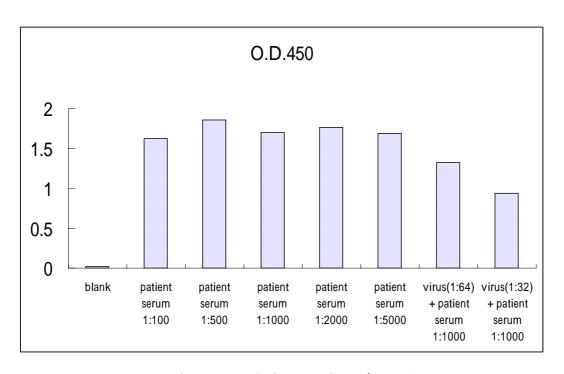
圖七、不同稀釋濃度之血清與流感病毒中和後,接種於 MDCK 細胞,再以流式細胞儀分析結果。

Green: Influenza virus-infected cells stained with anti-NP antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody.

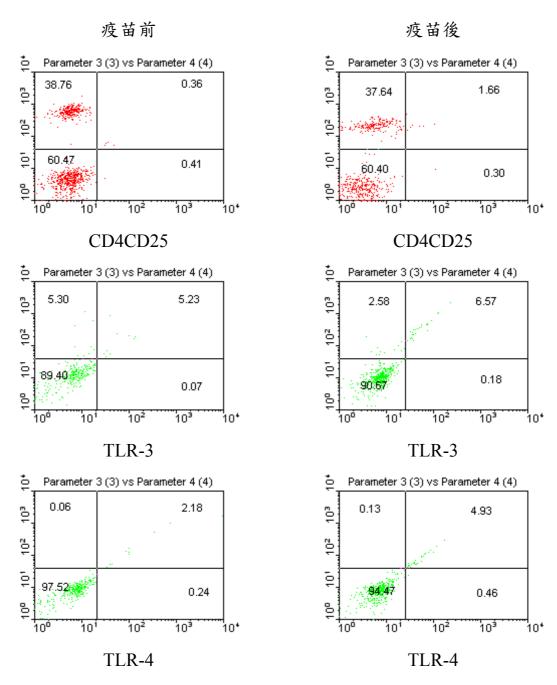
Blue: Patient serum diluted mixed with influenza A virus, then stained with anti-NP or anti-M antibody, and FITC conjugate anti-mouse antibody. Red and purple: Other negative contro.



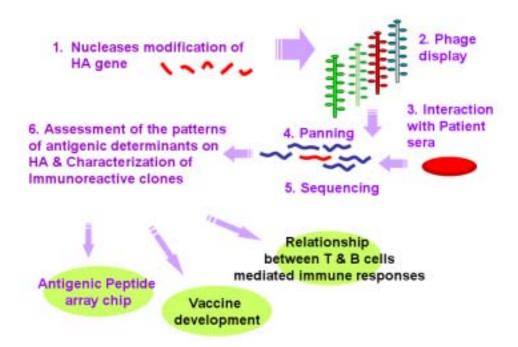
圖七、不同稀釋濃度之血清與流感病毒中和後,接種於 MDCK 細胞,再以流式細胞儀分析結果。續前頁。



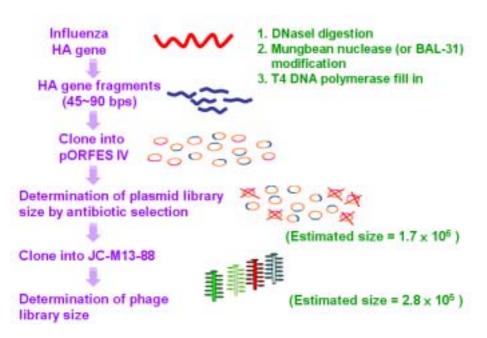
圖八、以 ELISA 方式偵測血清中之流感病毒抗體。



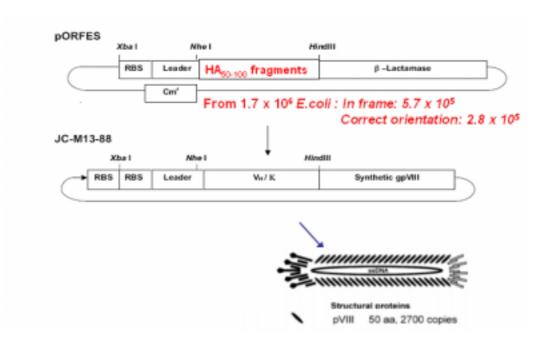
圖九、代表健康個案施打流感疫苗前後免疫細胞表現型的變化。



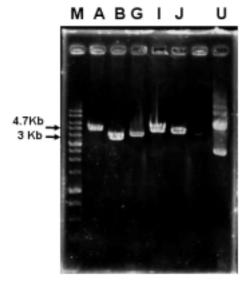
圖十、以噬菌體表現系統表現流感病毒 HA 胜肽流程。



圖+-、Nucleases modification of HA gene and library size determination.

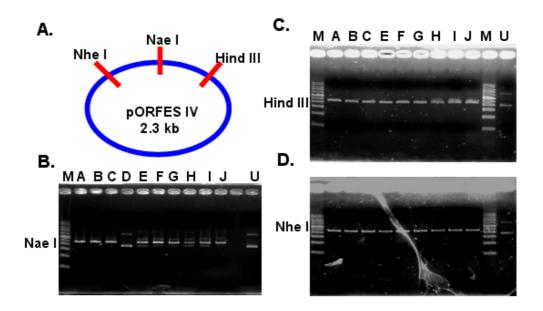


圖十二、Phage library is to be established by directional cloning of the HA_{50-100} fragments in pORFES IV into JC-M13-88.



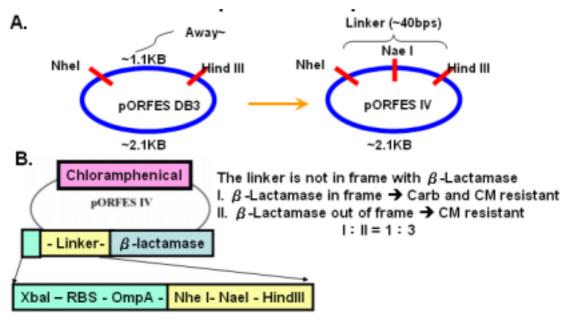
Virus was isolated from an critical illness patient (CDC, Taiwan) and H3 sequence universal primers were used to amplify the HA cDNA in an RT-PCR reaction. The H3 cDNA was further amplified by a high fidelity enzyme KOD+ system using H3 sequence specific primers in PCR and ligated into pGEM-T vector for E.coli transformation. Plasmids isolated from several E.coli transformants (# A~J) were characterized by Pst I digestion and the sequence was confirmed by automatic sequencer. Linearized pGEM-T plasmid was 3 kb without insert and 4.7 kb with HA insert. U: undigested pGEM-T without insert.

圖十三、將 HA 基因克隆至 pGEM-T EASY 載體上。



The pORFES-IV was constructed by insertion of a linker (Nhe1-Nael-HindIII) into pORFES-DB3 obtained from the provider. (A) graphic map showing linker position and the size of pORFES IV. The pORFES-IV harboring the ligated linker was transformed into E.coli. Plasmids purified from E.coli transformants (A~J) was then digested with Nae I (B), HindIII (C), and Nhe I (D).

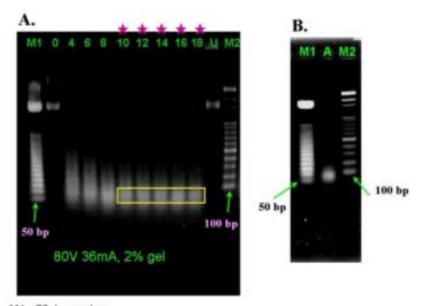
圖十四、Characterization of pORFES-IV by restriction enzyme digestion.



RBS: ribosomal binding sites

OmpA Leader: E.coli OmpA leader peptide

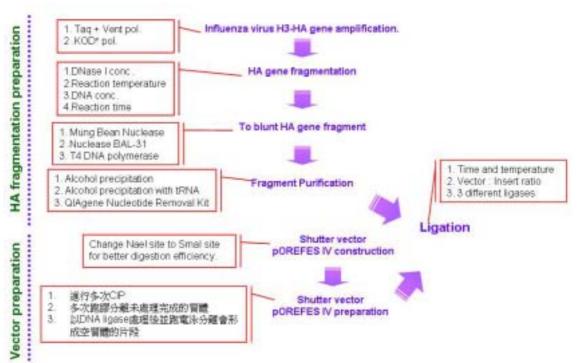
圖十五、pORFES IV construction and plasmid map.



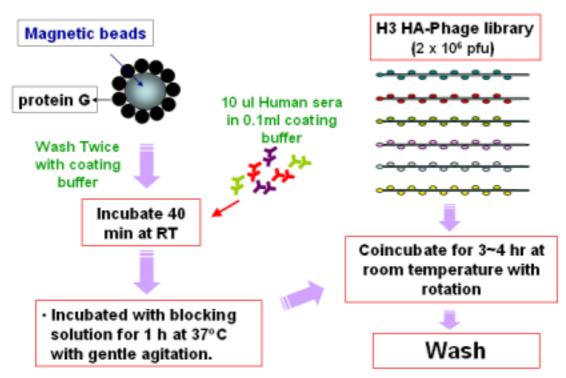
M1= 50 bp marker
M2 = 100 bp marker
0 ~ 18 = The time of DNasel treat (minutes)
A = mung bean nuclease treated HA fragment.
U = uncut

A) A time course digestive response of PCR-amplified full length HA gene with DNasel. Each reaction contains 1ug of HA gene and 0.04U of DNasel. After different time periods, the reaction was stopped and separated by electrophoresis. The yellow frame indicated the fragments selected. (B) Selected fragments in 50-100 bp were gel-extracted and treat with Mung Bean Nuclease. After the treatment of Mung Bean Nuclease, fragments were gel-purified and the sizes were checked by electrophoresis.

圖十六、Enzyme modification and purification of 50~100 bp HA fragments.



圖十七、HA 片段之製備。



圖+八、The panning procedure to identify serum-interacting phage clone.

CDC 期末報告審查意見: DOH95-DC-1414

1. 以流式細胞儀檢測感染細胞之病毒及中和抗體是很好的構想,但是必 須考慮到流式細胞儀對於一般實驗室而言仍不是常備儀器,很多實驗 室是沒有該項設備,且此項技術需具備相當的專業性,因此以此種儀 器為基礎開發之檢驗方法將不具普遍性、方便性,無法成為一般實驗 室通用之檢驗方法,建議應予已停止。

答覆:

- 一、利用流式細胞儀做為檢測細胞變化的技術是一個非常有用(powerful) 平台。審查者為此種儀器為基礎開發的檢驗方法不具普遍性、方便性, 無法成為一般實驗室通用之檢驗方法,所以建議此計劃應停止。但事實 上台灣現有約 250 - 300 部的流式細胞儀,幾乎各大學、醫學中心、或 研究單位都有。因此就目前台灣的現況,流式細胞儀應是兼具普遍性及 方便性的。對於未來發展為參考實驗室或醫學中心,有這種技術是必備 的。
- 二、流式細胞儀檢測感染細胞以測定流感中和抗體的力價,在初步結果上,三天內可以測定中和抗體的力價,和 HI 比較,力價更高,也更有參考意義(可看出部份抑制效果),指出可能有未來運用性,不應輕言終止。

- 三、計劃的審查是申請時是看其是否有科學或符合目標的價值,以及主持人是否具有能執行的能力。因此流式細胞儀的實驗,能通過計劃之審核,表示此設計是相當好的構想。而計劃執行中的進度報告審查是督促研究執行、提供建議改善、或因應新情況修正計劃目標,若非完全未達原設定目標,不應輕言終止。
- 噬菌體快速展示系統實驗結果不理想,找出的胺基酸片段還一一驗證,而且發展此系統時間成本與材料成本太高,太不符合經濟效效益, 此實驗適合於國科會基礎研究,不適合以任務為導向之流感計畫。

答覆:

此噬菌體快速展示系統的研發乃採用國外之專利,其技術瓶頸在於 library size 是否具代表性。雖然目前的結果顯示 peptide library size 與原 報告有大於 100-1000 倍以上差距,而不具代表性,此瓶頸只能在步驟 上漸漸修正進步而可預期。這一部份因屬基礎科學研發,無法很密切的 順應報告的進度。然而如果能研發成功,它有許多臨床與商業任務為導 向發展(Figure 1, and 6)。病人抗體上對同型或不同型病毒的歧異性可以 用此噬菌體晶片區分出來(Figure 2, 3, & 4),此歧異性可以再進一步在細 胞株感染模式下求證是否有中和的能力(Figure 5),或與流式細胞儀免疫 發展平台結合而成為分析免疫中和抗體的利器。同時這些免疫抗原決定 位(immunodominant antigenic epitopes)是否同時也是 cross-protective 的 免疫顯性抗原(immunodominant epitopes),也可經由基礎研究,提供強 而有利的證據 (Figure 5),作為國人自製研發安全有效的 immunodominant-peptide vaccine。當然這些 peptide library 可以選擇性的 篩自 phage-library 或以其他形式表達,以作為疫苗候選之用,其方便與 實用性並不亞於,甚至可能優於目前用 reverse genetics 做出的病毒疫 苗。 尤其利用已知可被中和的 peptides 更可發展"預測疫苗是否有效" 的晶片或提供治療性的中和性抗體的研發,此噬菌體快速展示系統的研 發,在在顯示其重要性與任務性(Figure 6)。雖然研究者或計畫目前在短 期上無法配合流感計畫的急迫性,以長程的發展而言,此計劃的 idea 可提供一個臨床與基礎結合的絕佳研究方向與願景,以大約再兩年200 萬之子計劃而言,是否值得鼓勵研發甚於經濟性的考量。預計此噬菌體 快速展示系統之瓶頸突破後,血清學的分析將很快速的提供臨床數據。 已下以六張 figures 摘要其重要性與應用性。

3. 高敏感度 ELISA 的建立是值得期待,但必須有完整的分析方法確效, 包括精密度、準確度、再現性、LOD及 LOQ 等數據。

答覆:

目前正積極進行中。

4. 免疫學部分應整合陽明謝世良教授計畫,以避免資源浪費。

答覆:

內容及方向不同時,進行整合將有一定困難性。請審查者明確指出整合方法。

5. 偵測及分析病患與疫苗接受者體內抗體及相對的免疫性的多肽抗原的發展與病毒基因 NS1 的功能之了解,值得進一步研究與說明。

答覆:

謝謝審查委員的建議。NS1 蛋白上之變異將會進一步研究。

6. 本報告書寫嚴謹,研究人員具專業之病毒及免疫背景,所得第一年之研究成果,除噬菌體抗原表現系統遭遇困難外大致符合預期,應可進行下階段之研究。

答覆:

謝謝審查委員的建議。之後幾年會積極的解決目前所遭遇之瓶頸以及進行下一階段之研究。

7. 相較其他已建立之技術,流式細胞分析法檢測血中病毒中和抗體是否

靈敏度與專一度比較高應先行評估後,再繼續研發。

答覆:

初步和簡單的 hemagglutination inhibition (HI)比較,所得的力價更高, 也更有參考意義(如顯示部份抑制效果)。最重要的是此方法三天內可以 測定中和抗體的力價,傳統的 plaque reduction assay 不容易在流感病毒 上做,所需時間要一星期,手續繁複。這種新穎的方法有其未來發展性。

8. 以 phage display 法找到的應屬 linear epitopes,且與 MHC-II 承載之 oligopeptides 無一定關聯,未來以此篩選出的抗原可能會造成相當程度 抗體效價之偽陰性結果;其他適當表現 conformational epitopes 的系統 應同時發展,以互補有無。

答覆:

未來也將同時發展這些技術來補足 linear epitopes 的缺失,謝謝委員們的提醒。

應盡速建立當年台灣地區完整之流感病毒分子流病的資料庫,以利預測及選出來年疫苗生產之病毒株。

答覆:

目前正積極進行中。

Figure 1: Schematic representation of the experimentations for the proposed study

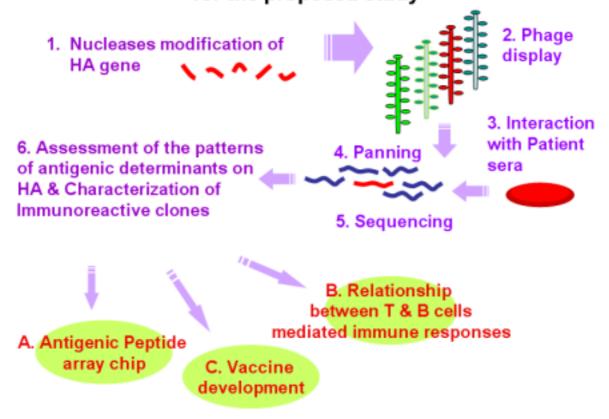


Figure 2: Capable of elucidating the Ab diversities for an functional important antigenic peptide

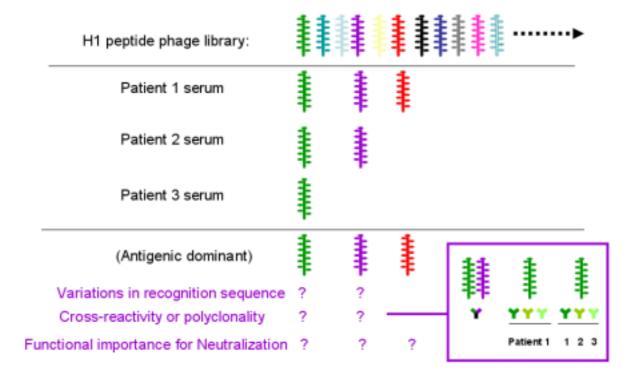


Figure 3: The dominant HA antigenic epitopes identified from symptomatic patients are clinical and immunogenic relevant to human

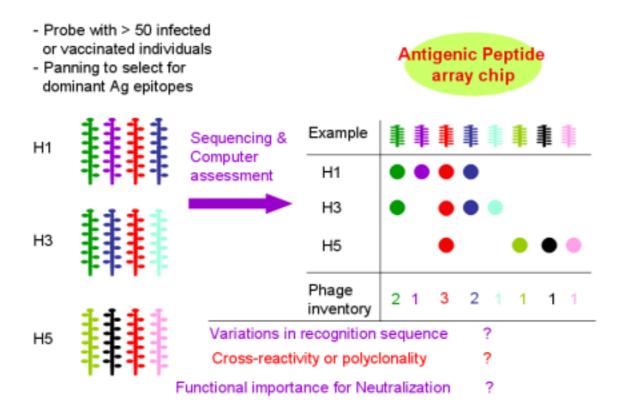


Figure 4: The HA antigenic epitopes can be assessed demographically based on sex, age, racial, and HLA

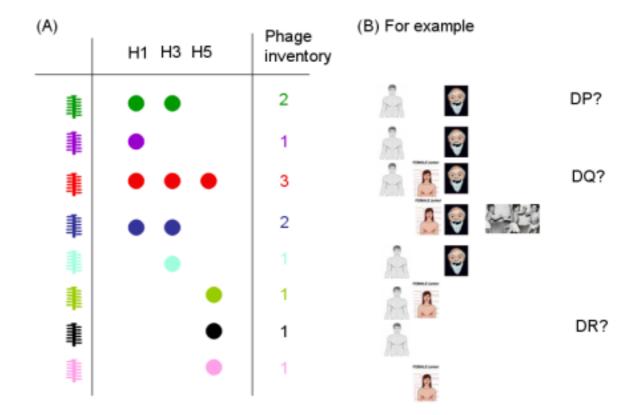
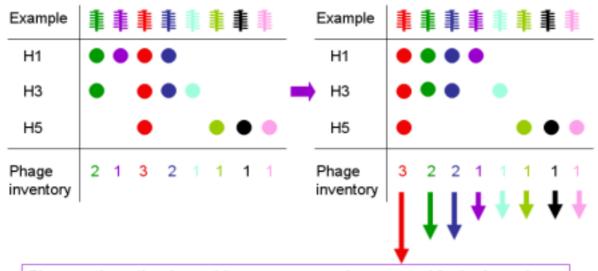


Figure 5: Are these antigenic dominant epitopes responsible for protective immune response or for immunological sin?



Phage or the antigenic peptides sequence can be assessed for *in vivo* or *in vitro* immune stimulations to determine their function in eliciting neutralization Ab, protective T cell immune response, or immunogenic sin.

Figure 6: Great potential for clinical and pharmaceutical applications

