

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

登革二型病毒 PL046 感染性質體之建構

Construction of the infectious cDNA clone of dengue virus type 2

PL046 strain

研究生：胡旻秀

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十八年六月

登革二型病毒 PL046 感染性質體之建構

Construction of the infectious cDNA clone of dengue virus type 2

PL046 strain

研究生：胡旻秀

Student : Min-Hsiu Hu

指導教授：楊昶良 博士

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang



in

Biological Science and Technology

June 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年六月

摘要

登革病毒為全長 10.7 kb 的正單股形 RNA 病毒，屬黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 黃質病毒屬 (Genus *Flavivirus*)。目前登革病毒感染性質體 (infectious cDNA clones or infectious clone) 的研究，皆是利用原核生物啟動子調控病毒基因表現，需再經過體外轉錄 (*in vitro* transcription) 及接上 5'端 cap 的加工過程，用加工後的病毒 RNA 轉染至宿主細胞後產生病毒顆粒。根據同屬的西尼羅病毒 (West Nile virus) 研究指出，以巨細胞病毒 (cytomegalovirus; CMV) 啟動子替代原核生物啟動子後，可以直接由轉染感染性質體的方式獲得病毒。本研究亦致力以此新穎的模式，建構本土登革二型病毒 PL046 之感染性質體。

先前由實驗室前人賴建孝，將登革二型病毒 PL046 全長基因組建構於 pcDNA3 質體後，成功建構出由巨細胞病毒啟動子所調控之感染性質體 pcDNA3/DV2F。但進一步將其轉染至宿主細胞 (BHK-21) 後，未能獲得病毒顆粒。為了找出可能的原因，將病毒基因序列進行全長定序分析，發現其中產生了數個無義突變 (nonsense mutation) 與轉譯閱讀框架位移突變 (frame shift mutation)。此外，在建構感染性質體的時候，5'端及 3'端非轉譯區 (3'-untranslated region; 3'-UTR) 外側所殘留的多餘序列，亦可能影響病毒複製。因此，本研究嘗試將突變的序列修正，再以聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR) 及核糖酶 (ribozyme) 等方法，修飾出完整的病毒基因 5'端與 3'端非轉譯區。期望修正後的感染性質體能產出病毒顆粒，為本土登革病毒後續研究提供幫助。

結果顯示，修正後的登革二型病毒 PL046 感染性質體轉染至宿主細胞後，可以偵測到病毒 RNA 的表現，但仍然無法檢測出病毒顆粒的產生。

Abstract

Dengue virus (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) is a single-stranded and positive-sense RNA virus with a 10.7 kb genome. Generally, most of the dengue virus infectious clones (or infectious cDNA clones) are under the control of prokaryotic promoter. To generate the virus RNA, the process requires *in vitro* transcription and addition of 5'-cap. According to the study of West Nile virus (*Flavivirus*), the virus could be recovered from the plasmid DNA-transfected cells directly while prokaryotic promoter was replaced by cytomegalovirus (CMV) promoter. Based on this concept, the objective of the present study was to employ this strategy to construct the DNA-launched dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan local isolated) infectious clones.

Previously, the whole genome of dengue virus type 2 PL046 strain was successfully constructed in pcDNA3 plasmid by laboratory predecessors. This infectious clone was named pcDNA3/DV2F and the viral genome was placed under the control of CMV promoter. However, no virus particles were produced in transfected host cells (BHK-21). After full-length sequencing of the clones, several mutations such as nonsense mutation and frame shift mutation were discovered in this study. In addition, there remained certain superfluous nucleotide at the 5'- and 3'- end of viral genome. These non-viral sequence may affect viral replication. Restriction fragment replacement, polymerase chain reaction (PCR), and introduction of ribozyme were applied to correct the mutation and remove excess sequence from the 5'- and 3'- untranslated region (UTR) of viral genome.

The new infectious clone was transfected into host cells for the production of viruses. However, no virus particle was detected, although viral RNA was detected.

誌謝

轉眼間，碩士生涯過去了。能在小楊老師的旗下完成學業，學生備感榮幸與驕傲。老師總是不辭辛勞的細心教導，讓學生在錯縱複雜的十字路口中不至迷失方向，並不時的諄諄教誨，提醒學生正確的邏輯思考觀念，嘗試將事情做得更完整、更美好。老師，謝謝您！

感謝口試委員林苔吟老師、黃兆祺老師及冷治湘老師不吝指導，在與老師討論交談後，學生獲益良多，也讓學生的論文更趨完整。

成長過程中，少不了朋友的陪伴。還記得剛進實驗室時，怡瑾學姐及志豪學長的熱心照顧；聚餐時認識的建季學長，如今依舊記憶猶新；惠菁學姐幫我送超級多定序、祥逢學長比我還愛乾淨、育穎學長帶我入門病毒研究、欣彬學姊健康的生活理念及金蓉學姊性情的直爽坦白，實是承蒙眾多學長姐的關愛。我的好哥們淑萍、羽球好手淑貞和遲到大王敏書，同學的相挺照顧，讓這一路更是溫暖開心。活潑可愛的阿毛、搖滾靈魂的小倩、帥氣滿分的毓駿、講話很直的馨儀、害羞有禮的妍寧、霸氣十足的佳真、認真細心的重延、活潑率真的敬淳、獨立自主的禎憶、勤學努力的幸璇以及在新竹認識的所有好朋友們，有了你們的相伴，讓這周遭的一切點綴了更多的美麗。

特別感謝中華醫事科技大學的楊堉麟老師，在我剛開始接觸分生實驗時給與的提拔和鼓勵，您無微不至的細心教導，學生至今仍是受用無窮。以及黃一修老師、張典顯老師、李道真醫師和所有指導過我的老師們，有你們的用心栽培，學生才能有所成長。

最後，我最感謝永遠呵護我的爺爺、奶奶，只要能和你們在一起，我就能感到安心。爸爸說不完的人生道理、媽媽停不下來的噓寒問暖，雅琳總是適時的給予我支持與鼓勵，姑姑、阿姨、哥哥和姐姐們的溫暖關愛，有你們的陪伴，我很幸福！

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
附錄目錄.....	xi
縮寫表.....	xii
壹、緒論.....	1
1.1 登革熱的歷史與現況.....	1
1.2 登革病症的臨床病徵.....	2
1.3 登革病毒的分子生物學背景.....	3
1.4 登革病毒的感染性質體.....	3
1.5 DNA-launched infectious molecular clone.....	4
1.6 登革病毒的 5'與 3'非轉譯區.....	5
1.7 核糖酶.....	5
1.8 材料來源與實驗設計.....	6
貳、材料.....	8
2.1 菌株.....	8
2.2 細胞株.....	8
2.3 病毒.....	8
2.4 質體.....	8
2.5 引子.....	10
2.5.1 DNA定序使用的引子.....	10
2.5.2 PCR及RT-PCR使用的引子.....	12
2.5.3 架構CP5'片段使用的引子.....	13
2.6 藥品試劑.....	13

2.7 試劑組	15
2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基	16
2.9 儀器設備	16
參、方法	18
3.1 細胞繼代培養	18
3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養	18
3.1.2 C6/36 細胞繼代培養	18
3.2 登革病毒的增殖	18
3.3 空斑試驗	19
3.4 BHK-21 細胞轉染	19
3.5 細胞RNA的萃取	19
3.6 DNase I處理	20
3.7 反轉錄及聚合酶鏈反應	20
3.7.1 反轉錄	20
3.7.2 聚合酶鏈反應	21
3.8 免疫螢光染色	21
3.9 以聚合酶鏈反應製作CP5'片段	21
3.10 大腸桿菌勝任細胞的轉形	22
3.10.1 大腸桿菌勝任細胞的製備	22
3.10.2 勝任細胞的轉形	23
3.11 質體DNA之萃取	23
3.11.1 小量質體萃取	23
3.11.2 大量質體萃取	24
3.12 限制酵素反應	24
3.13 去磷酸反應	25
3.14 萃取洋菜膠內之DNA片段	25
3.15 接合反應	25
3.16 生長曲線試驗	26

肆、結果.....	27
4.1 本土登革二型病毒PL046 感染性質體序列分析.....	27
4.1.1 感染性質體pcDNA3/DV2F-P在NS1 蛋白上的無義突變.....	27
4.1.2 感染性質體全長定序.....	27
4.2 感染性質體缺失突變的修正.....	28
4.2.1 pcDNA3/DV2F-Q/S2 質體建構.....	29
4.2.2 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體建構.....	29
4.3 感染性質體 3'UTR的修飾.....	29
4.3.1 pcDNA3/prS2ApaI質體建構.....	30
4.3.2 pcDNA3/prS2/3'Rz質體建構.....	30
4.3.3 pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz質體建構.....	31
4.3.4 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz質體建構.....	31
4.4 感染性質體 5'UTR的修飾.....	31
4.4.1 pcDNA3/CP5'質體建構.....	32
4.4.2 pCP質體建構.....	32
4.4.3 pCPR質體建構.....	33
4.5 登革二型病毒PL046 感染性質體之表現.....	33
4.5.1 以RT-PCR檢測感染性質體的轉錄.....	34
4.5.2 以空斑試驗檢測感染性質體的感染力.....	34
4.6 感染性質體的生長曲線.....	35
伍、討論.....	36
5.1 質體建構.....	36
5.2 登革二型病毒PL046 感染性質體表現.....	36
5.3 以免疫螢光染色檢測感染性質體的轉譯.....	37
5.4 分析無法得到病毒顆粒的可能原因.....	37
5.5 感染性質體在SURE 2 strain菌株的生長情形.....	40
陸、結論.....	41
柒、參考文獻.....	42

表目錄

表一、登革病毒感染性質體.....	47
表二、感染性質體pcDNA3/DV2F-Q、R、S、T，以引子D2F1873 定序結果.....	48
表三、將「表二」pcDNA3/DV2F-Q、S、T的定序結果轉換成胺基酸序列，轉換部份包含DNA序列nt2083~nt2559.....	50
表四、感染性質體pcDNA3/DV2F-Q、S全長序列與DV2 PL046 strain比對結果.....	51
表五、pcDNA3/DV2F-Q/S2 定序結果.....	55
表六、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 定序結果.....	56
表七、pcDNA3/prS2/3'Rz定序結果.....	58
表八、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz定序結果.....	59
表九、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz定序結果.....	60
表十、pcDNA3/CP5'定序結果.....	62



圖目錄

圖一、登革病毒各基因位置及預測的非轉譯區結構.....	64
圖二、推導出之賴建孝建構的感染性質體pcDNA3/DV2F，在 5'UTR上游 及 3'UTR下游多餘的序列	65
圖三、定序引子在登革病毒基因之相對位置圖.....	66
圖四、以限制酵素反應修正感染性質體pcDNA3/DV2F-Q之缺失突變.....	67
圖五、pcDNA3/DV2F-Q/S2 質體建構.....	68
圖六、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體建構	69
圖七、登革二型病毒NGC strain與PL046 strain的Apa I限制切位對照.....	70
圖八、登革病毒基因 3 端序列接合 3'-ribozyme序列示意圖.....	71
圖九、以限制酵素反應修正感染性質體pcDNA3/DV2F-Q之缺失突變，同 時引入 3'-ribozyme序列.....	72
圖十、pcDNA3/prS2ApaI質體建構.....	73
圖十一、pcDNA3/prS2/3'Rz質體建構.....	74
圖十二、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz質體建構.....	75
圖十三、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz質體建構	76
圖十四、pcDNA3/CP5'質體建構流程示意圖.....	77
圖十五、CP5'片段示意圖.....	78
圖十六、以CP5'片段修正感染性質體登革基因 5 端序列示意圖	79
圖十七、pcDNA3/CP5'質體建構.....	80
圖十八、pCP質體建構.....	81
圖十九、pCPR質體建構.....	82
圖二十、(A)pcDNA3/DV2F經Ava I或Eco RV + Pst I限制酵素作用位置圖(B) 所得電泳分析圖.....	83
圖二十一、(A)pcDNA3/DV2F-Q/S2 經Ava I或Kpn I限制酵素作用位置圖(B) 所得電泳分析圖.....	84
圖二十二、(A)pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 經Ava I或Kpn I限制酵素作用位置 圖(B)所得電泳分析圖	85

圖二十三、(A)pcDNA3/prS2ApaI經 <i>Ava</i> I或 <i>Eco</i> RV + <i>Pst</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	86
圖二十四、(A)pcDNA3/prS2/3'Rz經 <i>Bsp</i> HI或 <i>Apa</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	87
圖二十五、(A)pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz經 <i>Ava</i> I或 <i>Kpn</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	88
圖二十六、(A)pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz經 <i>Ava</i> I或 <i>Kpn</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	89
圖二十七、(A)pcDNA3/CP5'經 <i>Pst</i> I或 <i>Ava</i> I + <i>Cla</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	90
圖二十八、(A)pCP經 <i>Ava</i> I或 <i>Spe</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	91
圖二十九、(A)pCPR經 <i>Ava</i> I或 <i>Spe</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	92
圖三十、(A)pcDNA3 及 pGEM-T/DV2-3'Rz經 <i>Xba</i> I限制酵素作用位置圖(B)所得電泳分析圖	93
圖三十一、以PCR檢測pCP及pCPR的5'端上游多餘序列	94
圖三十二、以RT-PCR檢測感染性質體在BHK-21細胞的RNA表現	95
圖三十三、對RNA extract進行PCR以觀察是否有殘留的質體	96
圖三十四、以空斑試驗觀察經轉染48小時後之空斑數目	97
圖三十五、以空斑試驗觀察經轉染48小時後之上清液病毒數目	98
圖三十六、以空斑試驗觀察經轉染72小時後之空斑數目	99
圖三十七、以空斑試驗觀察經轉染72小時後之上清液病毒數目	100
圖三十八、以空斑試驗觀察經轉染96小時後之空斑數目	101
圖三十九、以空斑試驗觀察經轉染96小時後之上清液病毒數目	102
圖四十、(A)感染性質體pCPR與pcDNA3之生長曲線(B)位於生長曲線相對時間點之菌落數目	103
圖四十一、以倒立顯微鏡觀察細菌外觀	104

圖四十二、以免疫螢光染色檢測感染性質體在BHK-21 細胞之NS1 蛋白表現..... 105

圖四十三、(A)用於HCV的 3'-ribozyme結構，以及參照其結構所設計之登革病毒 3'-ribozyme示意圖(B)由Haseloff和Gerlach所定義的ribozyme保留序列..... 106



附錄目錄

附錄一、pcDNA3 質體示意圖	107
附錄二、pGEM-T質體示意圖	108
附錄三、pEGFP-N2 質體示意圖	109
附錄四、pcDNA3/DV2F-Q質體示意圖	110
附錄五、pcDNA3/DV2F-S質體示意圖	111
附錄六、(A)用於HCV的 3'-ribozyme結構，與參照其結構所設計之登革二 型病毒PL046 之 3'-ribozyme示意圖(B)pGEM-T/DV2-3'Rz質體示意 圖	112
附錄七、QIAGEN Plasmid Midi Kit各種緩衝液的成份	113
附錄八、 <i>E.coli</i> SURE 2 strain 產品介紹	114



縮寫(Abbreviation)

BHK-21	Baby hamster kidney cell
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleotide nucleic acid
CMV	cytomegalovirus
DNA	Deoxyribonucleic acid
DV	Dengue virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
LB broth	Luria-Bertni broth
MEM	Minimun Essential Medium
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris-acetate-EDTA
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane
UTR	Untranslated region

壹、緒論

登革熱(dengue fever, DF)病症是一種感染登革病毒(dengue virus, DV)所引起的傳染病,在台灣藉由埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白線斑蚊(*Aedes albopictus*)叮咬宿主的途徑傳播給人,好發於熱帶及亞熱帶地區,是現今世界由節肢動物感染人類的最重要病毒性疾病(Guha-Sapir and Schimmer, 2005)。世界衛生組織(World Health Organization, WHO)表示,近年來登革熱已經成為國際重要公共衛生議題之一。全球有五分之二的人口(約 25 億人)受到登革病毒的威脅,登革熱的病徵已遍佈 100 多個國家。每年約有 5 千萬人受到病毒感染,其中約有 20~50 萬人會出現登革出血熱(dengue haemorrhagic fever, DHF)的症狀,需要住院治療(Ligon, 2005; Liu *et al.*, 2008)。台灣隸屬亞熱帶國家,氣候溫暖潮濕,非常適合病媒蚊孳生,在 1915、1931、1942 年曾爆發全島性登革熱,到了 1987、2002 年又再度爆發大規模感染,且自 1987 年後,每年都有登革熱的確定病例(行政院衛生署疾病管制局)。目前尚無有效防治疫情的疫苗和藥物,登革病毒對於國民的健康仍是威脅,因此,預防與治療的研究工作是當今重要課題。

1.1 登革熱的歷史與現況

近代西元歷史上,登革病毒在 1779 至 1780 年就曾爆發於印尼雅加達、埃及開羅及北美費城(Ligon, 2005)。二次世界大戰期間,軍隊行軍到世界各地,讓登革病毒在短時間內迅速散播,病例數在短時間遽增,病情也比以往嚴重,在 1953 年菲律賓的病患出現登革出血熱的病徵(Mairuhu *et al.*, 2004),到 1970 年有 9 個國家也有此病徵產生,此後更是向外漫延。而病例數也由年平均 908 人(西元 1950s),增加到 50 餘萬人(西元 1990~1998)(Ligon, 2005)。病情更嚴重的患者會產生登革休克症候群(dengue shock syndrome, DSS),可能導致病人在 12~24 小時內死亡。在台灣,日治時期 1915 年(民國 4 年)、1931 年(民國 20 年)、1942 年(民國 31 年)發生過三次全島性登革熱,其中 1942 年約有六分之五的人口(500 萬人)感染。之後在民國 40 年代瘧疾防治期時,全面撲殺病媒蚊,阻斷了登革病毒的傳

播。直到 1981 年（民國 70 年）小琉球漁民由菲律賓帶入第二型登革病毒，造成島上約 80% 居民感染，而台灣本島亦於 1987、1988 年（民國 76、77 年）在屏東、高雄一帶爆發第一型登革病毒流行，之後幾乎每年都有本土登革熱病例出現（行政院衛生署疾病管制局）。戰爭、城市興建、交通運輸業發達及溫室效應的影響，讓登革熱疫情擴散到熱帶、亞熱帶各個國家，不僅感染規模擴大、患病人數增加，症狀也變的更加嚴重(Mackenzie *et al.*, 2004)，造成疫區國家經濟損失，國民健康受到威脅，是全球必須積極解決的人類重大傳染病。

1.2 登革病症的臨床病徵

臨床上，登革病毒依其血清抗原性不同可分為四個血清型（serotype），分別是 DV1、DV2、DV3 及 DV4。根據目前的看法，登革病毒會隨著蚊子的唾液進入人體內，並於血管內皮細胞中短暫增殖後（潛伏期 3~14 天，平均 4~7 天(Kao *et al.*, 2005)），再釋放到血流中造成病毒血症（viremia）並破壞組織，此時病患開始有臨床症狀出現。臨床症狀可能為無症狀（asymptomatic），或依其嚴重程度可區分為三種：登革熱（dengue fever, DF）、登革出血熱（dengue hemorrhagic fever, DHF）以及登革休克症候群（dengue shock syndrome, DSS）。

DF 一般有發燒、頭痛、眼窩疼痛、肌肉關節痠痛、皮膚紅疹、淋巴結腫大及白血球減少等病徵(Nimmannitya, 1987)。在臨床實驗室的診斷上，亦發現 DF 的病患有嗜中性白血球較低（neutropenia）與血小板較少（thrombocytopenia）的現象。DHF 的病徵初期與 DF 相同，但在發燒將要退時，由於血管內皮細胞受到影響，造成血管通透性（capillary permeability）增加，因此有血漿滲出（plasma leakage）的現象發生，臨床上會併發水腫、紅血球濃縮（hemoconcentration）、胸腔液滲出（pleural effusion）及產生腹水等現象。而當病患血漿滲出量過多時，進一步呈現休克現象，即 DSS(Kalayanarooj *et al.*, 1997)。此時病人皮膚濕冷、四肢冰涼、脈搏壓變窄（脈搏壓 ≤ 20 mmHg），若無及時給予適當的輸液治療，死亡率將可達到 10~

15%(Gubler, 2002)。

1.3 登革病毒的分子生物學背景

登革病毒為正向單股 RNA 病毒，分類上是屬黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 黃質病毒屬 (*Flavivirus*)，常見的同屬病毒有：西尼羅病毒 (West Nile virus)、日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、黃熱病毒 (Yellow fever virus) 等。登革病毒的病毒顆粒直徑約為 50 nm，基因體 (genome) 全長約 10.7 kb，結構依次為：5'端 cap 結構；5'端非轉譯區 (5' untranslated region, 5'UTR)；單一的 open reading frame (ORF)；3'端非轉譯區 (3' untranslated region, 3'UTR)。比較特別的是它缺乏 3'端 poly A (如圖一所示)。進行轉譯時，只會合成出一條多肽鏈 (polypeptide)，再經由病毒本身的蛋白質酵素 (viral protease) 和宿主細胞內的訊息酵素 (signalase) 作用，將多肽鏈裂解成獨立的蛋白，最後產生出三個結構性蛋白 (structural protein)，來構成病毒的外在結構，包括：衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, prM) 及外膜蛋白 (envelope protein, E)；和七個非結構性蛋白 (non-structural protein)，則是與病毒的 RNA 複製及病毒的蛋白裂解有關，包括：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5 (You *et al.*, 1999)。

1.4 登革病毒的感染性質體

將 RNA 病毒基因組，以 cDNA 的方式保存，能有效幫助病毒包裝訊號搜尋、核苷酸變異影響及疫苗研究等。

感染性質體 (infectious cDNA clone; infectious clone)，是把病毒全長基因組以 cDNA 的形式保存於載體中，且其轉錄出的 RNA 可如同病毒 RNA 一般，投入宿主細胞後具有產生感染性病毒顆粒的能力。目前已有許多 *Flavivirus* 製作感染性質體，如：登革病毒、日本腦炎、Kunjin 病毒、小兒麻痺病毒 (Poliovirus)、西尼羅病毒、黃熱病毒等。

在登革病毒的研究中，Lai 等人於 1991 年率先完成第一個 DV4 的感染性質體 (Lai *et al.*, 1991)，且能在 *E. coli* 內大量複製。然而，由於病毒基因在 *E.*

*E. coli*系統的不穩定，使後來的建構陸續發生問題。為了解決不穩定的問題，Kapoor等人利用 *in vitro* ligation 的方式，將分為二段的序列連結為全長序列，以其為模板合成出病毒RNA(Kapoor *et al.*, 1995)；Polo等人則利用 yeast system 複製感染性質體(Polo *et al.*, 1997)。之後在Kinney等人和Gualano等人的研究中，才成功使用 low copy number 載體，在 *E. coli* 內複製感染性質體(Kinney *et al.*, 1997; Gualano *et al.*, 1998)。直到2001年，Sriburi 等人將 *E. coli* 以低溫 (25°C)、抗生素減半 (25 μ g/ml ampicillin) 的方式培養，降低了感染性質體的不穩定性，是第一個成功利用 high copy number 載體複製感染性質體的例子(Sriburi *et al.*, 2001)。但後來的Pierro等人，嘗試以 low copy number 載體製作 Jamaica83 1409 strain 的感染性質體時，卻又失敗，考量降低病毒序列對 *E. coli* 的影響，將序列置換到 pBAC 載體 (single-copy number)，才成功獲得感染性質體(Pierro *et al.*, 2006)。各文獻所使用的材料整理於表一。

1.5 DNA-launched infectious molecular clone

至今的登革病毒感染性質體，主要是利用 SP6 或 T7 啟動子，以 *in vitro* transcription 的方式合成出病毒 RNA，加上 5'端 cap 後，轉染至宿主細胞 (BHK-21) 中，觀察是否有空斑 (plaque) 生成。而此方法的缺點是過程煩雜，且耗費時間。

在西尼羅病毒的研究中，Yamshchikov 等人亦於 SP6 啟動子下游建構出含病毒全長基因序列的感染性質體：pSP6WN/Xba(Yamshchikov *et al.*, 2001)。之後，Pierson 等人企圖排除 *in vitro* transcription 及加上 5'端 cap 等煩雜過程，將 pSP6WN/Xba 的 SP6 啟動子更換為真核表現的 CMV 啟動子，建構出可以直接於哺乳動物細胞表現的感染性質體：pWNII-Not，將其直接轉染至哺乳動物細胞後，即可成功產生病毒顆粒，並將此方法稱為 “DNA-launched infectious molecular clone” (Pierson *et al.*, 2005)。同年，豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 也以相同方法製作出了感染性質體(Lee *et al.*, 2005)。

1.6 登革病毒的 5'與 3'非轉譯區

非轉譯區 (untranslated region, UTR), 是指在 open reading frame (ORF) 以外的序列, 因其位於 ORF 的上游與下游, 而稱之為 5'非轉譯區 (5'UTR) 與 3'非轉譯區 (3'UTR)。病毒基因組的 UTR 雖然不會轉譯出蛋白序列, 但其特殊的序列與結構, 亦可能在病毒生命週期中扮演著重要的角色, 如: *Flaviviridae* 家族中的肝炎病毒屬 (Hepacivirus)、瘟疫病毒屬 (Pestivirus) 及 G 型肝炎病毒 (hepatitis G viruses, HGV/GBV-C) 等, 通常於 5'UTR 會有 internal ribosomal entry site (IRES) 結構, 作為病毒特殊的轉譯方式。而在同屬病毒間, 亦常發現高度保留的序列或結構, 如: *Flavivirus* 的登革病毒、日本腦炎病毒及黃熱病毒等, 其 UTR 皆具有互補序列 (cyclization sequence, CS), 而且都有相似的髮夾 (loop) 結構存在 (Thurner *et al.*, 2004)。

在登革病毒的 UTR 研究中, Edgil 等人發現一個 3'UTR 的點突變, 就足以降低病毒的產量 (low-passage) (Edgil *et al.*, 2003)。之後學者也發現, 3'UTR 能有效提升病毒 RNA 轉譯的效率 (Holden *et al.*, 2004), 亦是在病毒複製過程中所必需 (Yu *et al.*, 2005)。另一方面, 5'UTR 的缺陷也影響著病毒轉譯效率 (Cahour *et al.*, 1995)。不論是 DV1~DV4, 當 block 住 5'UTR 裡的 SL (stem-loop) 區域時, 病毒的複製也隨之受到影響 (Kinney *et al.*, 2005)。進一步的研究更指出, 5'UTR 的 SLA (large stem-loop) 存在, 提升了病毒性 RdRp (viral RNA-dependent RNA polymerase) 的合成效率達 10 倍以上, 因此 SLA 序列很可能是 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 重要的辨識序列 (Filomatori *et al.*, 2006)。而 5'UTR 與 3'UTR 存在的互補序列 (cyclization sequence, CS), 使病毒序列產生 long-range RNA-RNA interactions 的現象, 亦可能與病毒的複製機制有關 (Alvarez *et al.*, 2005)。

1.7 核糖酶

具有催化能力的 RNA, 俗稱“核糖酶”(ribozyme)。是由切赫 (Cech TR) 於 1981 年最先發現 (Cech *et al.*, 1981), 並於 1989 年獲得諾貝爾化學獎。隨後便明白其催化的對象就是與其互補的序列, 若活性中心 (active site) 的

序列改變了，相對也會改變其作用的序列(Zaug *et al.*, 1986)。

自然界的 ribozyme 種類繁多，依其作用方式不同，可將其分為 cleaving ribozymes 和 splicing ribozymes 兩大類(reviewed in Serganov, A. and Patel, DJ., 2007)。在 cleaving ribozymes 中，催化反應作用於自身序列 (*cis*-acting) 的，又可歸類成(1). self-cleaving ribozymes，長度約介於 40 ~ 200 個核苷酸，當中包括 4 個發現於 satellite RNAs 的：hammerhead、hairpin、Varkud satellite (VS) 和 hepatitis delta virus (HDV) ribozymes，此類 ribozymes 主要參與滾環式複製 (rolling-circle replication mechanism) 時的 RNA 修飾過程，將 long multimeric RNAs 切割成 short monomers；另外還包括 3 個參與訊息 RNA (mRNAs) 調控相關的：co-transcriptional cleavage (CoTC)、cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3 (CPEB3) 和 *glmS* ribozymes，是屬於較近期所發現的 ribozymes。(2). 目前為止，RNase P 是唯一發現能在自然界中以 *in trans* 方式作用的 ribozyme，歸類為 *tran*-cleaving ribozymes，長度約介於 140 ~ 500 個核苷酸，主要功能是幫助攜帶 RNA (pre-tRNA) 的成熟。相較於 cleaving ribozymes，splicing ribozymes 包含了兩個連續的反應：RNA 的 cleavage 和 ligation，序列長度也相對較長，由數百到數千個核苷酸所組成，作用是將 intron 除去，並且連接兩端的 exon，主要有 group I introns 和 group II introns 兩類。

質體建構完成後，基因 3'端常伴隨著質體本身的 MCS (multiple cloning sites) 和 poly A 訊號等序列，為了修飾出完整的登革二型病毒 PL046 之 3'UTR，實驗室前人杜育穎參照 Heller 等人的研究(Heller *et al.*, 2005)，將原先使用於 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染性質體的 3'-ribozyme，設計成登革二型病毒 PL046 的 3'-ribozyme，架構於 pGEM-T 載體上，請參照附錄六(杜育穎, 2007, 交大碩士論文)。此一 ribozyme 屬於 self-cleaving 的 hammerhead ribozyme，本研究之後亦是利用此 3'-ribozyme 做感染性質體的登革二型病毒 PL046 基因之 3'UTR 修飾。

1.8 材料來源與實驗設計

先前，為了建構本土登革二型病毒 PL046 的感染性質體，實驗室前人楊明浩嘗試以 RT-PCR 製作出數個 overlapping 的登革病毒基因片段，再以片段剪接的方式，期望接合出全長的病毒基因片段。不過此方法需耗費大量時間去建構數個片段的質體，再加上早期資料有限的情況下，經過努力後仍然無法順利獲得。之後，實驗室前人賴建孝企圖直接由 RT-PCR 製作出全長的登革病毒基因片段，再測試過數種酵素及條件之後，成功利用 Taq DNA polymerase XL (Protech, Cat. P6a) 放大出全長 10.7 kb 的病毒基因片段。利用預先設計在 primer 上的單一切位，以及參考 Sriburi 等人的方法 (Sriburi *et al.*, 2001)，以低溫 (25°C) 及抗生素減半 (25 μ g/ml ampicillin) 的條件下選殖 *E.coli*，成功以 pcDNA3 質體 (high copy number plasmid) 選殖出含有登革二型病毒 PL046 全長基因序列之感染性質體。利用 pcDNA3 質體具有 CMV 啟動子的特性，直接將此質體轉染至 BHK-21 細胞中作表現後，卻仍是無法由轉染後之細胞偵測到病毒的產生(賴建孝, 2006, 交大碩士論文)。

為了明白前人賴建孝所建構的登革二型病毒 PL046 感染性質體為何無法順利產生病毒，本研究將嘗試對其進行詳細的檢查與可能的修正。首先，感染性質體的製作過程中可能會產生突變，不正確的序列將會影響病毒正常表現，因此將以全長基因定序，檢查序列的完整性，並以資料庫的 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 之基因序列為標準進行比對。再來，登革病毒基因的 5'UTR 與 3'UTR 證實為病毒複製所必須，考量自然型態的完整性，計劃移除質體建構時所多出的序列，如：5'UTR 上游多餘的 MCS 序列和 T7 啟動子序列；3'UTR 下游多餘的 MCS 序列和 poly A 訊號 (請參照圖二)。

期望在確認完病毒基因序列的正確性，以及修正完錯誤的地方後，將此感染性質體轉染至 BHK-21 細胞中，能順利觀察到病毒的產生，獲得正確的登革二型病毒 PL046 之感染性質體。

貳、材料

2.1 菌株

Escherichia coli DH5 α (Dr. Yang's laboratory collection)

Escherichia coli SURE 2 (Stratagene, Cat. 200152)

2.2 細胞株

BHK-21 (幼倉鼠腎臟纖維母細胞, baby hamster kidney cell)

C6/36 (白線斑蚊細胞, *Aedes albopictus* cell)

2.3 病毒

Dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan local strain)

2.4 質體

質體	特性	Reference
pcDNA3	篩選標記為 Ampicillin, 含有 T7 及 CMV 啟動子。請參照附錄一。	Invitrogen
pGEM-T	篩選標記為 Ampicillin, 含有 T7 及 SP6 啟動子。請參照附錄二。	Promega
pEGFP-N2	含有 reporter gene, enhanced green fluorescent protein gene。請參照附錄三。	BD Biosciences Clontech
pcDNA3/DV2F-Q	pcDNA3 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列 (尚有缺失。ΔT: nt2820, ΔA: nt10449)。請參照附錄四。	Yang's lab. 賴建孝

pcDNA3/DV2F-S	pcDNA3 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列 (尚有缺失。ΔG : nt737)。請參照附錄五。	Yang's lab. 賴建孝
pGEM-T/DV2-3'Rz	pGEM-T 上帶有 PL046 strain 的 3'端序列, 176 bp, 3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。請參照附錄六。	Yang's lab. 杜育穎
pcDNA3/CP5'	pcDNA3 上, CMV 啟動子轉錄出的第一個核苷酸即為 PL046 strain 的第一個核苷酸, 其後包含 PL046 strain 的 5'端序列, 894 bp。	本研究
pcDNA3/DV2F-Q/S2	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔA : nt10449, 以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正。	本研究
pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔT : nt2820 和 ΔA : nt10449, 以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正。	本研究
pcDNA3/S2	pcDNA3 上帶有 pcDNA3/DV2F-S 的 3'端序列, 1786 bp (約+8762 ~ +10547)。	本研究
pcDNA3/S2/3'Rz	pcDNA3 上帶有 pcDNA3/DV2F-S 的 3'端序列, 1961 bp, 3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。	本研究
pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔA : nt10449, 以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正, 3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。	本研究
pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔT : nt2820 和 ΔA : nt10449, 以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正, 3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。	本研究
pcDNA3/CP	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔT : nt2820 和 ΔA :	本研究

	nt10449，以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正。且 CMV 啟動子轉錄出的第一個核苷酸即為 PL046 strain 的第一個核苷酸。	
pcDNA3/CPR	pcDNA3/DV2F-Q 的 ΔT : nt2820 和 ΔA : nt10449，以 pcDNA3/DV2F-S 序列剪接修正。且 CMV 啟動子轉錄出的第一個核苷酸即為 PL046 strain 的第一個核苷酸。3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。	本研究

2.5 引子

2.5.1 DNA 定序使用的引子

引子	序列 5'~3'	位置
D2R550 ^{註2}	CCATGAGGGTACACATG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +550 ~ +534
D2F265	CTAACAATCCCACCAACAGC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +265 ~ +284
D2F796	GCCCAGAGAATTGAAACTTG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +796~ + 815
D2F1431	ACCACAGAGTTCCATCACAG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +1431 ~ +1450
D2F1873	GCAGAAACACAACATGGAAC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +1873 ~ +1892
D2F2401 ^{註2}	TTGGGAGTTATGGTGCAG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +2401 ~ +2418
D2F2901 ^{註2}	TGGAGTATTCACCACCAAT	DV2 (NGC ; M29095)

		gene: +2901 ~ +2919
D2F3411	GTACGGGATGGAAATCAGAC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +3411 ~ +3430
D2F3930	TATCTTGTGCGTCCCAAATG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +3930 ~ +3949
D2F4401	GGAAGAACAACACTGACC A	DV2 (NGC ; M29095) gene: +4401 ~ +4420
D2F4911	TTCTCCTGGAACCTCAGGAT	DV2 (NGC ; M29095) gene: +4911 ~ +4930
D2F5401	ATAGCGGCTAGAGGATACAT	DV2 (NGC ; M29095) gene: +5401 ~ +5420
D2F5882	CAGCACAAAGAAGAGGGAG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +5882 ~ +5900
D2F6401	AAATGGGTAGGCTTCCAAC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +6401 ~ +6420
D2F6895	GAGAGCAACATCCTGGACAT	DV2 (NGC ; M29095) gene: +6895 ~ +6914
D2F7401	GGCTTTAACCTTAGCGACC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +7401 ~ +7419
D2F7892	CAGGACATGAAGAACCCAT	DV2 (NGC ; M29095) gene: +7892 ~ +7910
D2F8331	AGATGTAGACCTCGGAAGCG	DV2 (NGC ; M29095) gene: +8331 ~ +8350
D2F8841	GGCTGTTGAAGATAGTAGGT	DV2 (NGC ; M29095) gene: +8841 ~ +8860
D2F9401	CTTTCACCAATATGGAAGCC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +9401 ~ +9420

D2F9920	CATCACATTGGGTTCCAAC	DV2 (NGC ; M29095) gene: +9920 ~ +9938
D2F10270 ^{註2}	CGGGATCC{TAGAAGGCAAA ACTAACATGAAACA}	DV2 (NGC ; M29095) gene: +10270 ~ +10294

註1：此處之引子序列為參考 DV2 NGC strain (M29095, NCBI)所設計。

註2：D2R550、D2F2401、D2F2901、D2F10270 來源為實驗室賴建孝先生。

{ } 內的序列為模板所具有的序列；{ } 外的序列為外加的 DNA 序列。

2.5.2 PCR 及 RT-PCR 使用的引子

引子	序列 5'~3'	位置
CMVf534	AATGTCGTAACAACCTCCGCC	pcDNA3 (Invitrogen): +534 ~ +553
5'Rz-r	TGTTCTCCTGTGGTGGTACAC GTCCATA	DV2 (PL046) gene: +695 ~ +667
T7_F	CACTGCTTACTGGCTTATCGA	pcDNA3 (Invitrogen): +839 ~ +859
CM_F	AATAACCAACGGAAAAAGGC	DV2 (PL046) gene: +100 ~ +119
CM_R	CCTATGCAACGCATTGTCA	DV2 (PL046) gene: +950 ~ +932
NS5_F2	CCATATTTGGGGAAAAGAGA AGACCA	DV2 (PL046) gene: +10078 ~ +10103
NS5_R2	AGTCCTTCCAGTGAGACTAC AGCTTCATC	DV2 (PL046) gene: +10584 ~ +10556

註 1：pcDNA3 的序列是參考產品說明書 (Invitrogen)。

註 2：此處 DV2 序列是參考本研究 pcDNA3/DV2F-Q 和 pcDNA3/DV2F-S 的定序結果。

2.5.3 架構 CP5'片段使用的引子

引子	序列 5'~3'	位置
CP-f1 ^{註 2}	CTGGCTAACT{AGTTGTTAGTC TACGTGG}	DV2 (PL046) gene: +1 ~ +18
CP-f2 ^{註 2}	TTTGAGCTCTCTGGCTAACT{A GTTGTTA}	DV2 (PL046) gene: +1 ~ +8
CP-r	CGGCTGTCAGTAAGATGAAGA TCA	DV2 (PL046) gene: +919 ~ +896

註 1：CP5'片段，是指 CMV 啟動子下游即為 DV2 PL046 strain 的 5 端片段，用以去除 CMV 啟動子與登革基因之間的序列(請參照圖二及圖十五)。

註 2：此處 DV2 序列是參考本研究 pcDNA3/DV2F-Q 的定序結果。{ } 內的序列為模板所具有的序列；{ } 外的序列為外加的 DNA 序列；畫單底線部份為外加的酵素切位。

2.6 藥品試劑

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
1kb DNA ladder	SibEnzyme	SEM11C001	DNA 電泳
2-propanol	Sigma	I9516	核酸萃取
Acetic acid	Fluka	33209	緩衝液
Agarose	Vegonia	9201-05	DNA 電泳

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養
Anti-NS1 antibody	Abcam	DN2	細胞染色
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG antibody	Invitrogen	A11031	細胞染色
BSA	Sigma	A3294	細胞培養
CaCl ₂	Riedel-de Haën	31307	細菌培養
Chloroform	Riedel-de Haën	32211	核酸萃取
Crystal violet	Sigma	C-3886	Plaque assay
DNase I	Biolab	M0303S	核酸萃取
DEPC	Sigma	D-5758	Inactivation of RNases
EDTA	Amresco	0105	緩衝液
EtBr	Sigma	E-7637	核酸染色
Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	固定細胞
Glycerol	Amresco	0854-1L	細菌培養
Isoamyl alcohol	MERCK	1.00979.1000	核酸萃取
LB agar	Alpha Biosciences	L12-111	細菌培養
LB broth	Scharlau	02-385	細菌培養
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-019	細胞轉染
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methylcellulose	Sigma	M0512	空斑測試
NaCl	Amresco	0241	細菌培養
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
Paraformaldehyde	Sigma	P-6148	細胞染色
PBS	Biological Industries	11-223-1K	細胞培養
Phenol saturated solution	Amresco	0945	核酸萃取
ProTaq™ DNA polymerase	Protech	PTM525	PCR
Restriction enzyme	Biolab, Fermentas	-	質體建構
SDS	Riedel-de Haën	62862	質體建構
T4 DNA ligase	Fermentas	1812	質體建構
Tris base	Amresco	0826	緩衝液
Triton X-100	J.T.Baker	X198-07	細胞染色
TrypLE™ Express	GIBCO	12605-010	細胞培養

2.7 試劑組

試劑名稱	廠商	目錄編號	應用
Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit	Protech	MP530XL	質體萃取
PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Premier	N-DCE050	DNA 純化
pGEM®-T vector system I	Promega	A3600	質體建構
Phusion™ High-Fidelity PCR Kit	BioLabs	F-553S	質體建構
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN	12123	質體萃取
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN	12143	質體萃取
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN	74104	RNA 萃取
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen	11146-057	RT

2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基

- 0.5% Triton X-100/PBS
100 μ l Triton X-100, 19.9 ml PBS
- 1% crystal violet solution (500ml)
5 g crystal violet, 50 ml 37% formaldehyde, 450 ml H₂O,
- 1% BSA/PBS
0.2 g BSA in 20 ml PBS
- 3.7% Formaldehyde
37% Formaldehyde diluted with ddH₂O
- 4% Paraformaldehyde
0.8 g Paraformaldehyde powder dissolved in 20 ml PBS
- 10% (v/v) Glycerol
12.6 g glycerol (density = 1.26 g/cc)加水至 100 ml
- 10 × TE buffer
100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA
- 50 × TAE buffer
48.4 g Tris base, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml, 11.42 ml acetic acid added
ddH₂O to 200 ml
- Blocking solution (Immunofluorescence Staining)
2 ml FBS, 0.2 g BSA, 18 ml PBS
- LB (Luria-Bertni) broth
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl
- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin agar
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar, 50 μ g/ml or 25 μ g/ml
Ampicillin

2.9 儀器設備

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)
電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)
電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)
往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)
電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)
恆溫式震盪培養箱 B206 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
低溫培養箱 701 (WISOOM)
核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 (博克科技有限公司)
PCR 溫度控制儀 Gene Cycler^{RT} (BIO-RAD)
梯度核酸增殖儀 labcycler (SENSOQUEST)
微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)
微量冷凍高速離心機 centrifuge 5415R (eppendorf)
桌上型低溫高速離心機 centrifuge 5804R (eppendorf)
桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)
落地型高速離心機 Avanti[®] J-E Centrifuge (BECKMAN)
4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
無菌操作台 VCM-420 (造鑫)
血球計數器 (MARIEMFELD)
倒立相位差螢光顯微鏡 TE2000-U (Nikon)
數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)
光子成像系統 G:BOX (SYNGENE)

參、方法

3.1 細胞繼代培養

3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養

培養液為含有 5% FBS(Fetal Bovine Serum)的 MEM(Minimun Essential Medium, Gibco, Cat. 41500-034)，培養環境為含有 5% CO₂ 的 37°C 恆溫培養箱。繼代培養流程如下：吸除培養液，以 PBS 沖洗兩次，加入 1 ml 的 TrypLE™ Express (Gibco, Cat. 12605-010)，37°C 反應 5 分鐘，加入適量的培養液輕沖底盤使細胞脫落，置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘 (KUBOTA 5100)，去除上清液，加入適量培養液混合均勻後，取適量細胞轉移至新的培養皿，置於培養箱培養。

3.1.2 C6/36 細胞繼代培養

培養液為含有 10% FBS 的 MEM，培養於 28°C 恆溫培養箱。繼代培養流程如下：培養液吸到剩約 1 ml，將細胞以細胞刮勺刮落，加入適量的培養液輕沖底盤使細胞脫落，置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘 (KUBOTA 5100)，去除上清液，加入適量培養液混合均勻後，取適量細胞轉移至新的培養皿，置於培養箱培養。

3.2 登革病毒的增殖

利用白線斑蚊細胞增殖登革病毒 PL046 strain。將 1×10^7 的 C6/36 細胞置入 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘 (KUBOTA 5100)，去除上清液，以適量的 10% FBS/MEM 培養液混合均勻後 (使其與病毒混合後體積為 2 ml)，加入 1×10^6 的病毒，即 MOI (multiplicity of infection) = 0.1，置於 37°C 培養箱 2 小時，每 30 分鐘搖一次，將其移到新的 T75 的培養盤中，加入 9 ml 的 10% FBS/MEM 培養液，培養於 28°C 培養箱，於感染經過六天

後，收集病毒上清液，以 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔徑的濾膜進行過濾，最後將含有病毒的過濾液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80°C 。

3.3 空斑試驗

實驗的前一天先在六孔培養盤中放入 3×10^5 的 BHK-21 細胞。隔天，細胞約八成滿，以未含血清的 MEM 培養液沖洗兩次。病毒以未含血清的 MEM 培養液進行序列稀釋，每一個培養孔加入 $400\ \mu\text{l}$ 序列稀釋的病毒溶液，置於含有 5% CO_2 的 37°C 培養箱中 1 ~ 2 小時進行感染，每半小時輕晃培養盤。加入 4 ml 的 1.1% methyl cellulose medium，置入含有 5% CO_2 的 37°C 培養箱中培養五至七天。取出細胞後，吸除培養液，加入適量 2 ml 的 3.7% 甲醛固定細胞，置於室溫 15 分鐘，吸除甲醛，加入 2 ml 的 1% 結晶紫溶液，置於室溫 2 小時，以清水沖洗培養盤。置於室溫風乾後，計數空斑數目。

檢驗登革二型病毒感染性質體的部份，是將轉染經過 48、72 及 96 小時的 BHK-21 細胞，直接加入 4 ml 的 1.1% methyl cellulose medium，置入含有 5% CO_2 的 37°C 培養箱中培養五至七天，以結晶紫染色後，觀察是否有空斑的生成。

3.4 BHK-21 細胞轉染

轉染前一日先於 3.5 公分培養皿置入約 3×10^5 的 BHK-21 細胞。轉染當天，取一微量離心管將 $4\ \mu\text{g}$ 的質體 DNA 稀釋到 $250\ \mu\text{l}$ 的 Opti-MEM (Invitrogen, Cat. 31985-062)，取另一微量離心管將 $10\ \mu\text{l}$ 的 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Cat. 11668-019) 加到 $240\ \mu\text{l}$ 的 Opti-MEM，室溫靜置 5 分鐘，將兩種液體輕輕混和均勻，室溫靜置 20 分鐘，將液體均勻滴入培養盤，放回培養箱中培養。

3.5 細胞 RNA 的萃取

利用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. 74104) 完成。實驗步驟如下：BHK-21 細胞轉染 24 小時後，吸除培養液，加入 $350\ \mu\text{l}$ 的 Buffer RLT/ β -ME，以細

胞刮勻將細胞刮下，再以 pipetting 的方式將細胞與 Buffer RLT/ β -ME 均質化，將溶液移至 QIAshredder spin column，16100 \times g 離心 2 分鐘 (Eppendorf 5415R)；濾出的液體加入 350 μ l 的 70% ethanol，以 pipetting 的方式使其均質化，將溶液轉置至 RNeasy spin column，13400 \times g 離心 30 秒，加入 700 μ l 的 Buffer RW1，13400 \times g 離心 30 秒，加入 500 μ l 的 Buffer RPE，13400 \times g 離心 30 秒，加入 500 μ l 的 Buffer RPE，13400 \times g 離心 2 分鐘，將 RNeasy spin column 移置一乾淨的 2 ml 微量離心管，16100 \times g 離心 1 分鐘，再將 RNeasy spin column 移置一乾淨的 1.5 ml 微量離心管，加入 40 μ l 的 DEPC-H₂O 於濾膜中心，16100 \times g 離心 2 分鐘。RNA 以分光光度計測量濃度及估計純度，儲存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.6 DNase I 處理

將 20 μ g 的 RNA 及 4 units 的 DNase I (Biolabs, Cat. M0303S)，以 DEPC-H₂O 稀釋於 100 μ l 的 1 \times DNase I Reaction Buffer，37 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘，加入 1 μ l 的 0.5 M EDTA，75 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘去除活性。加入 400 μ l 的 phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25: 24: 1)，vortex 1 分鐘，16100 \times g 離心 1 分鐘 (Eppendorf 5415R)，小心將上清液吸取至一乾淨的 1.5 ml 微量離心管。再加入 400 μ l 的 chloroform/ isoamyl alcohol (24: 1)，vortex 30 秒，16100 \times g 離心 1 分鐘，小心將上清液吸取至一乾淨的 1.5 ml 微量離心管。加入 325 μ l 的 100%酒精，冰上靜置 30 分鐘。在 4 $^{\circ}$ C 以 16100 \times g 離心 15 分鐘，小心將上清液吸掉，於室溫烘乾 10 分鐘。加入 22 μ l 的 DEPC-H₂O。

3.7 反轉錄及聚合酶鏈反應

3.7.1 反轉錄

利用 Invitrogen ThermoScript RT-PCR system (Cat. 11146-024) 合成出 cDNA。實驗步驟如下：將 4 μ g 的 RNA 稀釋於 9 μ l 的 DEPC-H₂O，加入 1 μ l 的 Random Hexamers 引子及 2 μ l 的 dNTP，65 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，隨即插入

冰中；於冰上製備 4 μ l 的 5 \times cDNA synthesis buffer、1 μ l 的 0.1 M DTT、1 μ l 的 RNase OUT (40 units/ μ l)、1 μ l 的 DEPC-H₂O、1 μ l 的 ThermoScript™ RT (15 units/ μ l)；於 25°C 反應 10 分鐘、55°C 反應 50 分鐘、85°C 反應 5 分鐘；加入 1 μ l 的 RNase H (2 units/ μ l)，置於 37°C 反應 20 分鐘。所得 cDNA 儲存於 -20°C。

3.7.2 聚合酶鏈反應

總體積為 50 μ l，內含 2 μ l 的 cDNA 模板 (質體為模板時，放入約 10~20 ng)，5 μ l 的 10 倍酵素緩衝液，各 1 μ l (10 μ M) 的引子對，4 μ l (2.5 mM) 的 dNTP，2.5 units 聚合酶 (Protech, Cat. PTM525)。溫度設定：A. 94°C 反應 5 分鐘；B. 94°C 反應 30 秒；C. Annealing temperature，反應 1 分鐘；D. 72°C 反應 1 分鐘；E. 72°C 反應 10 分鐘。其中，B、C、D 重覆 33 次循環。

3.8 免疫螢光染色

此處實驗條件是進行在 3.5 公分的培養皿。BHK-21 細胞轉染經過 48 小時後，以 2 ml PBS 沖洗兩次，加入 2 ml 的 4% paraformaldehyde，室溫靜置 30 分鐘固定細胞，以 2 ml PBS 沖洗兩次，每次 5 分鐘，加入 2 ml 的 0.5% Triton X-100/PBS，室溫靜置 10 分鐘，2 ml PBS 沖洗兩次，每次 5 分鐘，加入 2.5 ml 的 Blocking solution，室溫靜置 1 小時，移除液體，將一級抗體 (anti-NS1 antibody, Abcam, Cat. DN2) 以 1:50 的比例稀釋於 1% BSA/PBS 中，每一個培養孔加入 500 μ l 的一級抗體，室溫靜置 1 小時，2 ml PBS 沖洗三次，每次 5 分鐘，將二級抗體 (Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG antibody, Invitrogen, Cat. A11031) 用 1% BSA/PBS 稀釋成 5 μ g/ml，每一個培養孔加入 500 μ l 的二級抗體，室溫避光靜置 1 小時，2 ml PBS 沖洗三次，每次 5 分鐘，以倒立螢光顯微鏡觀察結果。

3.9 以聚合酶鏈反應製作 CP5' 片段

連續兩次的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR)，藉由引子

與模板間之部分互補及部分延伸序列，延伸出所需的序列片段。CP5'片段的製作是利用 Phusion™ High-Fidelity PCR Kit (BioLabs, Cat. F-553S) 所完成，目的是在片段 5'端延伸出 CMV 啟動子的序列，直至 *Sac* I 切位。每次 PCR 反應約有 18 bp 的互補序列及約 10 bp 的延伸序列，共延長二次。第一次 PCR 反應條件如下：總體積為 50 μ l，內含 30 ng 的 DNA 模板 (pcDNA3-NCS/DV2F-Q)，5 μ l 的 10 \times Phusion™ HF buffer，各 1 μ l (10 μ M) 的引子對，200 μ mole 的 dNTP，1 units 的 Phusion™ DNA Polymerase。溫度設定：A. 98°C 反應 30 秒；B. 98°C 反應 10 秒；C. Annealing temperature，反應 20 秒；D. 72°C 反應 30 秒；E. 72°C 反應 5 分鐘。其中，B、C、D 重覆 20 次循環。第二次 PCR 反應時，取 2 μ l 前一次 PCR 反應的產物當模板，反應條件相同。

註：CP5'片段，是指 CMV 啟動子下游即為 DV2 PL046 strain 的 5 端片段，用以去除 CMV 啟動子與登革基因之間的序列(請參照圖二及圖十五)。

3.10 大腸桿菌勝任細胞的轉形

3.10.1 大腸桿菌勝任細胞的製備

挑選大腸桿菌單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，37°C 震盪培養 (300 rpm/min) 隔夜後，取 2 ml 的菌液轉養至 50 ml 的 LB 培養液，37°C 震盪培養 (300 rpm/min)，直到 OD_{600nm} 介於 0.4 到 0.6 之間。將培養好的菌液轉移至 50 ml 離心管，靜置於冰上 20 分鐘。在 4°C 以 1620 \times g 離心 10 分鐘 (Eppendorf 5804R)，倒掉上清液，加入 25 ml 預冷至 4°C 的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，靜置於冰上 30 分鐘。在 4°C 以 720 \times g 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 5 ml 預冷至 4°C 的 0.1 M CaCl₂ 重新懸浮菌體，於 4°C 靜置 18 小時。隔天，在 4°C 以 720 \times g 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 5 ml 預冷至 4°C 的 0.05 M CaCl₂ (含 15% Glycerol) 懸浮菌體。以每管 100 μ l 體積分裝至預冷的微量離心管，儲存於 -80°C 冰箱。

3.10.2 勝任細胞的轉形

將儲存於 -80°C 的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入約 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}$ 的質體 DNA，混合均勻，冰浴 30 分鐘，轉置於 42°C 水浴槽進行熱休克 (heat shock) 反應 45 秒，加入 1 ml 的 LB 培養液， 37°C (或 25°C) 震盪培養 1 小時 (或 1.5 小時)。取 $100 \mu\text{l}$ 的菌液均勻塗佈至含有抗生素 (Ampicillin: $50 \mu\text{g/ml}$; 或 $25 \mu\text{g/ml}$) 的 LB 固體培養基上， 37°C 培養 12 ~ 18 小時 (或 25°C 培養 2 ~ 3 天)。

註：含登革熱二型病毒基因序列的質體，菌體培養條件需以抗生素濃度減半 (Ampicillin: $25 \mu\text{g/ml}$) 及 25°C 恆溫培養。在所有實驗方法中，均以加入底線為備註。

3.11 質體 DNA 之萃取

3.11.1 小量質體萃取

小量質體是利用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit (Protech, Cat. MP530XL) 萃取。將單一大腸桿菌菌落培養於含抗生素 (Ampicillin: $50 \mu\text{g/ml}$; 或 $25 \mu\text{g/ml}$) 之 5 ml 的 LB 培養液，培養於 37°C (或 25°C)，12 至 16 小時 (或 2 ~ 3 天)。實驗步驟如下：將菌液以轉速 2400 rpm 離心 12 分鐘 (KUBOTA 5100)，去除上清液，加入 $200 \mu\text{l}$ 的 solution I，混合均勻並移至微量離心管，加入 $200 \mu\text{l}$ 的 solution II，緩和的混合均勻，靜置於室溫 5 分鐘，加入 $300 \mu\text{l}$ 的 solution III，緩和的混合均勻， $16100\times g$ 離心 5 分鐘 (Eppendorf 5415R)，將上清液轉移至 spin column， $16100\times g$ 離心 1 分鐘，去除濾液，加入 $700 \mu\text{l}$ 的 washing buffer， $16100\times g$ 離心 1 分鐘，去除濾液， $16100\times g$ 離心 3 分鐘，將 spin column 移至新的微量離心管，開蓋放於 60°C 加熱板上 5 分鐘，加入 $30 \sim 50 \mu\text{l}$ 的二次無菌水於濾膜中心， $16100\times g$ 離心 1 分鐘，所得到的溶液內即含有質體 DNA，以分光光度計測量濃度及純度

後，儲存於-20°C 冰箱。

3.11.2 大量質體萃取

進行細胞轉染時，所使用的質體 DNA 是以 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Cat. 12143) 萃取，實驗步驟如下：將單一大腸桿菌菌落培養於含抗生素 (Ampicillin: 50 μ g/ml；或 25 μ g/ml) 之 5 ml 的 LB 培養液，培養於 37°C (或 25°C) 8 小時 (或 16 ~ 24 小時) 後，轉養至 25 ml (或 50 ml) 的 LB 培養液，培養於 37°C (或 25°C) 12 至 16 小時 (或 1 ~ 2 天)。將菌液轉移至超高速離心管，利用落地型高速離心機 (BECKMAN, Avanti[®] J-E Centrifuge, 轉子: JA 25.50) 以轉速 6000 \times g 在 4°C 離心 15 分鐘，去上清液，加 4 ml (或 8 ml) 的 Buffer P1，以震盪器混合均勻，加入 4 ml (或 8 ml) 的 Buffer P2，緩和的混合均勻，靜置室溫 5 分鐘；加入 4 ml (或 8 ml) 預冷至 4°C 的 Buffer P3，緩和的混合均勻，插入冰中靜置 15 分鐘。以轉速 20000 \times g 在 4°C 離心 30 分鐘，將上清液轉移至新的超高速離心管，再次以轉速 20000 \times g 在 4°C 離心 15 分鐘，在離心的同時，取 Qiagen-tip 並加入 4 ml 的 Buffer QBT，利用重力使加入的液體自行由底端流出。離心完成時，將上清液轉移至經過 Buffer QBT 作用後的 Qiagen-tip，等溶液完全流出後，以 10 ml 的 Buffer QC 清洗 Qiagen-tip 二次，等溶液完全流出後，加入 5 ml 預熱 65°C 的 Buffer QF，收集流出的溶液至一乾淨的超高速離心管，在溶液中加入 3.5 ml 的 2-propanol，混合均勻，以轉速 15000 \times g 在 4°C 離心 30 分鐘，去除上清液，加入 2 ml 室溫的 70%酒精，以轉速 15000 \times g 在 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，置於室溫風乾 5 ~ 10 分鐘，加入 100 μ l 的二次無菌水，溶出質體 DNA，以分光光度計測量濃度及純度後，儲存於-20°C 冰箱。(緩衝液配方參照附錄七)

3.12 限制酵素反應

為製備實驗所需之 DNA 片段，取適量的 DNA (約 0.5 ~ 5 μ g) 及適量的限制酵素 (1 μ g 的 DNA 約使用 2 units 的酵素)，到適量的反應體積 (10

至 50 μ l)，於適當的溫度作用 2 小時至 3 小時。反應完成後，置於適當溫度加熱以終止反應。反應溫度、終止反應溫度及緩衝液的濃度則依照酵素內附之說明書使用。利用洋菜膠體電泳分析。

3.13 去磷酸反應

DNA 的去磷酸反應是利用 SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega, Cat. M8201) 進行。實驗步驟依照內附說明書操作，反應為 1 μ g 的 DNA 是以 1 units 的酵素進行反應，37°C 反應 15 分鐘。反應完成後，於 75°C 加熱 20 分鐘終止反應，反應完後，置於冰上 2 分鐘。直接進行電泳並萃取洋菜膠內之 DNA。

3.14 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

利用 Gel Extraction Kit (PREMIER, Cat. N-DCE050)，萃取出洋菜膠內的 DNA 片段。實驗過程如下：將切下之洋菜膠 (≤ 350 mg) 置於微量離心管內，加入等量的 Binding solution (如：100 mg 的洋菜膠就加入 100 μ l 的 Binding solution；若膠體濃度超過 2%，Binding solution 則須增加一倍)，以 60°C 加熱至洋菜膠完全溶解，將溶液轉移至 spin column，16100 \times g 離心 1 分鐘 (Eppendorf 5415R)，去除濾液；加入 700 μ l 的 Washing solution，16100 \times g 離心 1 分鐘，去除濾液，將此步驟重覆一次；16100 \times g 離心 3 分鐘，將 spin column 移至新的微量離心管，置於 60°C 加熱 5 分鐘，加入 30 μ l 的二次無菌水，16100 \times g 離心 1 分鐘，所得到的溶液即含欲萃取之 DNA，以分光光度計測量濃度及純度後，儲存於 -20°C 冰箱，或直接進行接合反應。

3.15 接合反應

總體積為 10 μ l，內含 1 倍緩衝液、2.5 units 的接合酶 (T4 DNA Ligase, Fermentas, Cat. EL0014)、50 ng 的 vector 及適量的 insert (vector 與 insert 的分子數比約 1:3)，置於 14°C 水浴反應 16 小時，65°C 去活化 10 分鐘，儲存於 -20°C 冰箱，或直接進行大腸桿菌勝任細胞的轉形。

3.16 生長曲線試驗

將隔夜培養的 pcDNA3 質體菌液及培養兩天的 pCPR 質體菌液，由 LB 培養液稀釋至 OD_{600nm} 吸光值為 0.4 (± 0.01)。取 400 μ l 調整好濃度的菌液至 50 ml 的 LB 培養液，置於培養箱培養。在經過 1、2、4、6、8、10、12、20、22 及 24 小時的時間點，測其 OD_{600nm} 吸光值，同時以適當的稀釋倍數，分別塗盤於含有抗生素的 LB 培養盤及不含抗生素的 LB 培養盤，培養後計算生成之菌落數目。所有培養條件均為 25°C、170 rpm 及 25 μ g/ml 的 Ampicillin。菌株均為 SURE 2 strain (Stratagene, Cat. 200152)。



肆、結果

4.1 本土登革二型病毒 PL046 感染性質體序列分析

4.1.1 感染性質體 pcDNA3/DV2F-P 在 NS1 蛋白上的無義突變

根據前人賴建孝的論文描述(賴建孝, 2006, 交大碩士論文), 其將登革二型病毒 PL046 基因全長序列接合到含有 CMV 啟動子之 pcDNA3 質體後, 建構出感染性質體 pcDNA3/DV2F (原命名為 pcDNA3-NCS/DV2F, 本文皆以 pcDNA3/DV2F 表示), 共有五株, 命名為 pcDNA3/DV2F-P、pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-R、pcDNA3/DV2F-S、pcDNA3/DV2F-T。進一步將這五個感染性質體轉染至 BHK-21 細胞, 並以空斑試驗檢驗其感染性時, 皆無法產生空斑。其中 pcDNA3/DV2F-P 的序列經定序後, 發現核苷酸序列第 2512 (nt2512, 第 806 個胺基酸位置, 位於 NS1 蛋白) 的位置有一個點突變 (point mutation), 使原本應為穀胺醯胺 (glutamine) 的 CAA 變成終止密碼 TAA, 造成蛋白質轉譯的停止。

為了解另外四個感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q、R、S、T 在 nt2512 的位置是否也有相同的無義突變, 以引子 D2F1873 進行定序, 定序結果請參照表二。結果顯示, pcDNA3/DV2F-Q、R、S、T 在 nt2512 的位置都沒有轉變為終止密碼, 但 pcDNA3/DV2F-R 位於 nt2146 和 nt2147 的位置, 有兩個相連的缺失突變 (deletion), 會造成轉譯時的閱讀框架易位 (frame shift mutation)。為確認 pcDNA3/DV2F-Q、S、T 在這部分定序結果中, 有沒有其他的無義突變 (nonsense mutation) 產生, 將定序所得的基因序列轉換成胺基酸序列(轉換的部份包含 DNA 序列 nt2083 ~ nt2559), 與資料庫之 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 胺基酸序列進行比對, 請參照表三。結果顯示, pcDNA3/DV2F-Q、S、T 在此區域沒有終止密碼產生。

4.1.2 感染性質體全長定序

由引子 D2F1873 的定序結果可以發現, pcDNA3/DV2F-P 和 pcDNA3/

DV2F-R 的突變位置是不同，這說明或許可以利用剪接的方式，補齊缺失的部位，拼湊出完整的登革病毒基因。將至今尚未發現如缺失突變或無義突變的 pcDNA3/DV2F-Q 和 pcDNA3/DV2F-S，先以不同的限制酶再次確認片段大小都符合預期後，*Ava* I 作用得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段；*EcoR* V 及 *Pst* I 作用得到 5.0、4.2、3.0、2.7、1.0 及 0.2 kb 之 DNA 片段，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十。接續進行全長基因定序檢查，定序使用的引子相對位置圖請參照圖三，定序結果請參照表四。結果顯示，pcDNA3/DV2F-Q 及 pcDNA3/DV2F-S 的全長登革病毒基因序列與資料庫之 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 序列進行比對後，兩個質體與資料庫的核苷酸相似度皆高於 99.7%，胺基酸相似度皆為 99.6%，而 pcDNA3/DV2F-Q 與 pcDNA3/DV2F-S 兩質體間的核苷酸及胺基酸相似度分別為 99.6% 及 99.3%。在所有變異之中，最直接注意到的地方是 pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt2820 (Δ T) 和 nt10449 (Δ A) 有缺失突變 (deletion) 產生，而 pcDNA3/DV2F-S 位於 nt737 (Δ G) 也有一缺失突變產生，這種變異會造成轉譯時的閱讀框架易位 (frame shift mutation)，進而影響表現。此外，沒有發現其他的無義突變 (nonsense mutation) 產生。

4.2 感染性質體缺失突變的修正

由全長的定序結果可以發現，pcDNA3/DV2F-Q 和 pcDNA3/DV2F-S 的缺失突變位於不同位置，因此，設計利用兩個感染性質體完善的序列部份，以剪切、接合的方式補齊缺失的序列。實驗設計是以 pcDNA3/DV2F-Q 作為修改對象，分別將 pcDNA3/DV2F-S 的 3' 端序列片段 (S2 片段, 含登革病毒基因序列 nt9508 ~ nt10723) 和 NS1 附近的序列片段 (S1 片段, 含登革病毒基因序列 nt1131 ~ nt7132) 切出，置換 pcDNA3/DV2F-Q 的序列片段，分別修正原先的 nt10449 (Δ A) 和 nt2820 (Δ T)，如圖四所示。而鑒於感染性質體的不穩定性，實驗在置換 S1 片段至 pcDNA3/DV2F-Q 後，將質體轉殖至 *E. coli* SURE 2 strain (Stratagene, Cat. 200152)，降低可能的序列變化機率，簡介請參照附錄八。

4.2.1 pcDNA3/DV2F-Q/S2 質體建構

將 pcDNA3/DV2F-S 以限制酶 *Nhe* I 和 *Xma* I 處理，切出含登革病毒基因的 3'端序列 nt9508 ~ nt10723 (S2) 和部份載體序列，與相同限制酶處理的 pcDNA3/DV2F-Q 接合後，可得到修正 nt10449 缺失突變的質體：pcDNA3/DV2F-Q/S2，請參照圖五。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Kpn* I 作用後，得到 11、3.9 及 1.0 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十一。定序結果請參照表五。

4.2.2 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體建構

將 pcDNA3/DV2F-S 以限制酶 *Hpa* I (blunt end) 處理，切出登革病毒基因序列 nt1131 ~ nt7132 (S1)，pcDNA3/DV2F-Q/S2 以相同限制酶處理，再經過 SAP 去磷酸反應，片段接合後，可得到修正 nt2820 缺失突變的質體：pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1，如圖六所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Kpn* I 作用後，含 S1 片段的質體在 nt6153 的位置會多一個切位，可與 pcDNA3/DV2F-Q/S2 做區別，得到 11、3.1、1.0 及 0.75 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十二。定序結果請參照表六。

4.3 感染性質體 3'UTR 的修飾

於感染性質體 3'UTR 的下游，接合上 3'-ribozyme 序列，讓感染性質體在細胞內表現出 RNA 後，尾端會因為 ribozyme 本身的作用，將原本 3'UTR 後方多餘的序列移除，使 3'UTR 的尾端保持完整。

實驗室前人杜育穎參照 Heller 等人的研究(Heller *et al.*, 2005)，設計了登革病毒的 3'-ribozyme，架構於 pGEM-T 載體上，請參照附錄六(杜育穎, 2007, 交大碩士論文)。原先設計是利用 3'端的單一限制酵素切位：*Apa* I，將含有部份 3'UTR 且下游帶有 3'-ribozyme 的序列接入感染性質體。不過，在感染性質體全長基因定序完成之後，發現登革病毒 PL046 的基因全長

中，含有兩個 *Apa* I 的切位，請參照圖七。因此，必須先將其接合至更長的登革病毒 3'端序列，使序列上游帶有單一切位：*Nhe* I，再利用 *Nhe* I 切位接合至感染性質體。而原先感染性質體在登革基因序列的下游，有設計一單一切位 *Xba* I(賴建李, 2006, 交大碩士論文)，也因 3'-ribozyme 的序列上帶有一 *Xba* I 切位，使 *Xba* I 切位無法利用。因此，設計將序列移至與感染性質體相同之質體：pcDNA3，再利用載體上的單一切位：*Xma* I，進行剪接，設計流程如圖八所示。之後才能順利將帶有 3'-ribozyme 序列的片斷接合至感染性質體，設計流程如圖九所示。

4.3.1 pcDNA3/prS2ApaI 質體建構

將 pcDNA3/DV2F-S 以限制酶 *Eco* RV 和 *Apa* I 處理，切出含登革病毒基因的 3'端序列 nt8762 ~ nt10547(prS2ApaI)，與相同限制酶處理的 pcDNA3 載體接合後，可得到質體：pcDNA3/prS2ApaI，如圖十所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 5.9 及 1.2 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Eco* RV + *Pst* I 作用後，得到 4.6 及 2.5 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十三。

4.3.2 pcDNA3/prS2/3'Rz 質體建構

將 pGEM-T/DV2-3'Rz 以限制酶 *Apa* I 處理，切出含登革病毒基因的 3'端序列 nt10548 ~ nt10723 及 3'-ribozyme 序列 (prS2s/3'Rz)，與相同限制酶處理的 pcDNA3/prS2ApaI 載體接合後，可得到質體：pcDNA3/prS2/3'Rz，如圖十一所示。以限制酶 *Bsp* HI 作用後，得到 4.4、2.0 及 1.0 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Apa* I 作用，含 3'-ribozyme 片段的質體在 nt2953 的位置會多一個切位，可得到 7.2 及 0.23 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十四。由於會有正接或反接的可能，於 3'-ribozyme 上的 *Xba* I 又可能因為結構的影響，使限制酶 *Xba* I 無法作用，或作用效果極低(請參照圖三十)，因此以定序檢查序列接入的方向是否正確，定序結果請參照表七。

4.3.3 pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 質體建構

將 pcDNA3/prS2/3'Rz 以限制酶 *Nhe* I 及 *Xma* I 處理，切出含登革病毒基因的 3'端序列 nt 9508 ~ nt 10723、3'-ribozyme 序列及部份載體序列 (S2/3'Rz)，與相同限制酶處理的 pcDNA3/DV2F-Q 載體接合後，可得到質體：pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz，如圖十二所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.8、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Kpn* I 作用後，得到 11、3.9 及 1.0 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十五。定序結果請參照表八。

4.3.4 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 質體建構

將 pcDNA3/DV2F-S 以限制酶 *Hpa* I 處理，切出登革病毒基因序列 nt1131 ~ nt7132 (S1)，與相同限制酶處理的 pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 載體接合後，可得到質體：pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz，如圖十三所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.8、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段；以限制酶 *Kpn* I 作用後，含 S1 片段的質體在 nt6153 的位置會多一個切位，可與 pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 做區別，得到 11、3.1、1.0 及 0.75 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十六。定序結果請參照表九。

4.4 感染性質體 5'UTR 的修飾

以連續兩次的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR)，製作出 CP5'片段後，再以片段兩端的 *Sac* I 切位將片段剪接至 pcDNA3，建構出 pcDNA3/CP5'質體，示意圖請參照圖十四。第一次 PCR 反應時，模板為 pcDNA3/DV2F-Q，正向引子為 CP-f1，反向引子為 CP-r；第二次 PCR 反應時，以 2 μ l 的第一次 PCR 反應產物為模板，正向引子為 CP-f2，反向引子為 CP-r。由於 CP-f1 與 CP-f2 會有部分重疊序列及部分延長序列，使放大出的登革病毒基因片段 5 端延長出 CMV 啟動子序列，直到 CMV 啟動子上之 *Sac* I 切位，再利用兩端的 *Sac* I 切位將 CP5'片段剪接至 pcDNA3，形成

pcDNA3/CP5'，依照 pcDNA3 使用手冊指示，其 CMV 啟動子轉錄起始點將為登革基因序列的第一個核苷酸（示意圖請參照圖十五）。

之後，再利用 pcDNA3 上之單一切位 *Mlu* I，及引入片段帶有的單一切位 *Bst* EII 處裡後，把帶有部份 CMV 啟動子序列的 CP5' 片段接合至相同限制酶處理之感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 及 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz，建構出登革基因 5 端序列修正之質體 pCP 及 pCPR（修正指的為除去登革基因上游多餘的 MCS 序列和 T7 啟動子序列），示意圖請參照圖十六。修正後的感染性質體，其 CMV 啟動子之轉錄起始點將為登革基因序列的第一個核苷酸（5'UTR 的第一個核苷酸）。如此，即可在哺乳動物細胞中表現出 5'UTR 完整的登革病毒全長基因。

4.4.1 pcDNA3/CP5' 質體建構

以連續兩次聚合酶鏈反應產生的 CP5' 片段，利用 *Sac* I 切位將片段剪接至 pcDNA3，可得到質體：pcDNA3/CP5'，如圖十七所示。以限制酶 *Pst* I 作用後，得到 4.2、1.8 及 0.2 kb 之 DNA 片段；5'端多餘的序列內，包含著原先建構感染性質體 pcDNA3/DV2F 所引入的 5'端 *Cla* I 切位，因此在移除 5'端多餘序列後，以限制酶 *Ava* I + *Cla* I 作用，預期只會得到 6.1 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十七。定序結果請參照表十。

4.4.2 pCP 質體建構

將 pcDNA3/CP5' 以限制酶 *Mlu* I 及 *Bst* EII 處理，將帶有部份 CMV 啟動子序列的 CP5' 片段切出，與相同限制酶處理的 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 載體接合後，可得到質體：pCP，如圖十八所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.7、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段；去除 5'端多餘序列後，在 CMV 啟動子與 5'UTR 之間會新生成一 *Spe* I 切位，以限制酶 *Spe* I 作用後，得到 11、1.7、1.2、0.72、0.64 及 0.58 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十八。以引子 CMVf534 與 5'Rz-r 進行

PCR 反應，pCP 質體預期可以得到 0.78 kb 的 DNA 片段，pcDNA3/CP5' 質體為 control 1，預期得到同為 0.78 kb 的 DNA 片段，pcDNA3/DV2F-Q 質體為 control 2，預期會得到較大的 0.86 kb DNA 片段；以引子 T7-F 與 CM-R 進行 PCR 反應，pCP 質體和 pcDNA3/CP5' 質體預期皆無法得到 DNA 片段，而 pcDNA3/ DV2F-Q 預期會得到 1 kb 的 DNA 片段，皆符合預期，請參照圖三十一。

4.4.3 pCPR 質體建構

將 pcDNA3/CP5' 以限制酶 *Mlu* I 及 *Bst* EII 處理，將帶有部份 CMV 啟動子序列的 CP5' 片段切出，與相同限制酶處理的 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 載體接合後，可得到質體：pCPR，如圖十九所示。以限制酶 *Ava* I 作用後，得到 7.7、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段；去除 5' 端多餘序列後，在 CMV 啟動子與 5'UTR 之間會新生成一 *Spe* I 切位，以限制酶 *Spe* I 作用後，得到 11、1.7、1.2、0.72、0.64 及 0.58 kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十九。同 pCP 質體，以引子 CMVf534 與 5'Rz-r 進行 PCR 反應時，pCPR 質體與 pcDNA3/CP5' 質體 (control 1) 預期可以得到 0.78 kb 的 DNA 片段，pcDNA3/DV2F-Q 質體 (control 2) 則預期會得到較大的 0.86 kb DNA 片段；以引子 T7-F 與 CM-R 進行 PCR 反應，pCPR 質體和 pcDNA3/CP5' 質體預期皆無法得到 DNA 片段，而 pcDNA3/DV2F-Q 預期會得到 1 kb 的 DNA 片段，皆符合預期，請參照圖三十一。

4.5 登革二型病毒 PL046 感染性質體之表現

實驗組共有五個質體，其一為尚未修正的感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q，尚含二個缺失突變（請參照附錄四）。其二到五為經過修改的四種感染性質體：1. pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1，缺失突變修正之質體；2. pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz，缺失突變修正且 3'UTR 下游含有 3'-ribozyme 序列之質體；3. pCP，缺失突變修正且 5'UTR 上游多餘的序列已移除之質

體；4. pCPR，缺失突變修正，5'UTR 上游多餘的序列已移除且 3'UTR 下游含有 3'-ribozyme 序列之質體。利用 QIAGEN Plasmid Kit 抽取感染性質體。由 Lipofectamine™ 2000 將質體轉染至 BHK-21 細胞後，以 RT-PCR 觀察 RNA 表現情形，再以空斑試驗觀察病毒顆粒形成與否。

4.5.1 以 RT-PCR 檢測感染性質體的轉錄

在轉染經過 24 小時後，以 RNeasy® Mini Kit 抽取細胞 RNA，為了移除可能殘存的 plasmid DNA，RNA 再以 DNaseI 處理一次。利用 ThermoScript™ RT-PCR System 將 RNA 反轉錄成 cDNA。再以聚合酶鏈反應放大基因片段。所使用的引子：CM-F 及 CM-R，用來分析結構基因 C 到 prM 的表現，應得到約 851 bp 的片段；而引子：NS5-F2 及 NS5-R2，用來分析非結構基因 NS5 到部份 3'UTR 的表現，應得到約 506 bp 的片段。以感染 100 PFU (plaque-forming units) 的 DV2 PL046 strain 病毒之細胞 RNA，作為 positive control；另以 pcDNA3 質體轉染後之 RNA，作為 negative control。為確認結果並非因為 RNA 萃取的過程中，萃取出轉染時殘留的質體造成的 false positive，另外取等量的 RNA 直接進行 PCR，與 RT-PCR 的結果做為對照。所獲得的 RT-PCR 或 PCR 產物，取 5 μ l 進行電泳分析。結果顯示，在實驗組方面，不論是檢測結構基因 C 到 prM 的表現，或是檢測非結構基因 NS5 的表現，原感染性質體及四種修正過後的感染性質體皆有檢測出合乎預期的片段，如圖三十二。在控制組方面，直接以等量 RNA 進行的 PCR 反應，沒有任何片段產生，如圖三十三；而 pcDNA3 在所有 RT-PCR 或 PCR 反應中，皆沒有片段產生。

4.5.2 以空斑試驗檢測感染性質體的感染力

在轉染分別經過 48、72 及 96 小時的 BHK-21 細胞，將 1.5 ml 上清液感染新的一批 BHK-21 細胞，而原轉染之 BHK-21 細胞加入 4 ml 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天。新的 BHK-21 細胞，在 37°C 感染一小時後，加入 4 ml 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天。最

後以甲醛固定 15 分鐘，再以結晶紫染色二小時後，以清水沖洗，觀察是否有空斑生成。實驗以感染 100 PFU(plaque-forming units)的 DV2 PL046 strain 病毒之細胞，作為產生空斑的 positive control；另以 pcDNA3 質體，作為 negative control。結果顯示，在實驗組方面，不論是原感染性質體或四種修正過後的感染性質體在 48、72 及 96 小時的實驗中，皆無法產生空斑。在控制組方面，由 DV2 所感染的細胞有空斑產生，並隨著時間的增長，空斑數目變多，而上清液感染新細胞的空斑數目，亦會隨著時間增長而變多；pcDNA3 則無空斑生成。如圖三十四 ~ 三十九。

4.6 感染性質體的生長曲線

感染性質體 pCPR 與空的質體 pcDNA3 轉養於 50 ml LB broth，經過 1、2、4、6、8、10、12、20、22 及 24 小時的時間點，測其 OD_{600nm} 吸光值。並且在每個時間點，以適當的稀釋倍數，分別塗盤於含有抗生素的 LB 培養盤及不含抗生素的 LB 培養盤，兩天後計算生成之菌落數目。結果顯示，感染性質體 pCPR 培養於低溫、抗生素減半的環境，生長速度與空的質體 pcDNA3 沒有明顯差異，如圖四十(A)。但在菌落生長數目的觀察結果，感染性質體 pCPR 轉養經過 8 小時之後，生長在含有抗生素培養盤的菌落數目，只能維持在 $10^4 \sim 10^5$ cells/ml 左右，如圖四十(B)。在顯微鏡下觀察菌體外觀時，發現有長條狀的菌體產生，如圖四十一。但不論是帶有 pcDNA3 或是 pCPR 的菌體皆可觀察到此現象，培養於 25°C 或 37°C 亦是得到相同結果，因此，此一現象應不是由感染性質體之登革基因序列或降低培養溫度造成的。

伍、討論

5.1 質體建構

登革病毒感染性質體的建構，率先由 Sriburi 等人突破性的選殖於 high copy number 載體(Sriburi *et al.*, 2001)。因此，在實驗過程中，參考 Sriburi 等人的建議，*E. coli* 以抗生素濃度減半 (Ampicillin: 25 μ g/ml) 及低溫培養 (25°C) 的條件，篩選登革病毒感染性質體。

由實驗室前人賴建孝所建構的感染性質體：pcDNA3/DV2F-P~T，以上述 Sriburi 等人建議的條件，培養約 24 至 48 小時，可以順利獲得符合預期片段長度的質體(賴建孝, 2006, 交大碩士論文)。但儘管長度符合預期，在全長的定序結果中，還是發現了無義突變 (nonsense mutation) 或轉譯閱讀框架位移突變 (frame shift mutation)，請參照結果 4.1 (表二、表四、附錄四及附錄五)。無法確認突變是在 RT-PCR 過程或是在質體建構過程中所發生。為了確保在之後的修補中不會發生新的突變，利用已定序完成的病毒基因體片段，以限制酵素剪切、接合的方式將缺失突變做修正。並且以 *E. coli* SURE 2 strain (Stratagene, Cat. 200152) 作為質體選殖菌株，降低可能的序列變化機率 (簡介請參照附錄八)。在所有修正的過程中，皆遵守 Sriburi 等人所建議的條件，而修正過後的感染性質體，亦都能順利獲得預期的片段。

5.2 登革二型病毒 PL046 感染性質體表現

根據結果 4.5.1 (圖三十二及三十三) 顯示，尚未修正的的感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q 和四種經過修改的感染性質體：1. pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1；2. pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz；3. pCP；4. pCPR 皆能轉錄出病毒 RNA 序列。說明感染性質體在修改前和修改後，皆能在哺乳動物細胞內表現病毒 RNA 序列，包含將 5'UTR 上游多餘序列移除後的質體：pCP 及 pCPR，亦能在哺乳動物細胞中正常表現 RNA。但結果 4.5.2 (圖三十四 ~ 三十九) 顯示，在缺失突變修正的情況下 (pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1)，及

5'UTR、3'UTR 修飾後的情況下 (pCPR)，皆無法由空斑試驗偵測到病毒的產出。為了釐清病毒顆粒無法由空斑試驗檢測出的可能原因，是在蛋白表現時的問題，還是在蛋白表現完成之後的問題，進而以免疫螢光染色觀察病毒蛋白的表現情形。所選擇的觀察對象為 NS1 蛋白，其 N 端和 C 端，皆是由宿主細胞內的訊息酵素作用 (Falgout *et al.*, 1989; Falgout and Markoff, 1995)，而受到登革病毒感染的哺乳動物細胞，在粗糙型內質網會殘留大量的 NS1 蛋白 (ER-resident form)，部份會坐落於細胞表面 (membrane-anchored form) 且緩慢的釋放出細胞 (secreted form) (reviewed in Lindenbach *et al.*, 2007)。因此，感染性質體若有轉譯出登革病毒的蛋白，就應該能偵測到 NS1 蛋白的表現，檢測結果請參照討論 5.3 (圖四十二)。

5.3 以免疫螢光染色檢測感染性質體的轉譯

將轉染經過 48 小時的 BHK-21 細胞，進行免疫螢光染色，觀察是否能檢測到登革病毒 NS1 蛋白的表現。一級抗體為 anti-NS1 antibody (Abcam, Cat. DN2)，二級抗體為 Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, Cat. A11031)。以等量 pEGFP-N2 質體作為轉染效率表示。約以 MOI (multiplicity of infection) = 0.5 的 DV2 PL046 strain 病毒感染細胞，作為 positive control；另以 pcDNA3 質體，作為 negative control。結果顯示，在實驗組方面，不論是尚未修正感染性質體或是四種修正過後的感染性質體皆無法檢測出紅色螢光。在控制組方面，NS1 抗體能辨認到 DV2 PL046 strain 的 NS1 抗原，發出紅色螢光；而 pcDNA3 無紅螢光生成，如圖四十二。

5.4 分析無法得到病毒顆粒的可能原因

根據免疫螢光染色的結果顯示 (請參照討論 5.3)，修正後的感染性質體無法檢驗到 NS1 蛋白的表現，說明病毒無法產出的原因可能是在蛋白轉譯時就發生了問題。綜合目前得到的結果，將對以下幾點進行討論：

(1). 建構時的可能影響：由於登革病毒全長基因序列的取得，必須經過 RT-PCR 的方式，先將病毒 RNA 序列進行反轉錄後，再以 PCR 反應放大

出全長基因片段，此過程雖然利用了具有校正能力之 DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase XL, Protech, Cat. P6a；賴建孝, 2006, 交大碩士論文)，因登革病毒全長基因有 10.7 kb 之多，難以確保在反應的過程中不會有突變產生。而全長定序的結果中(請參照結果 4.1)，確實發現了數個如無義突變(nonsense mutation)或轉譯閱讀框架位移突變(frame shift mutation)等序列缺陷，雖然目前已將發現到的突變修正，但還是無法排除其他的序列變異影響感染性質體病毒表現的可能性。

(2). 修正時的可能影響:Sriburi 等人所建構的感染性質體為 DV2 16681 strain 病毒株，與 DV2 PL046 strain 同屬於登革二型病毒，由其所建議的 *E. coli* 培養條件(25°C、抗生素減半)來篩選感染性質體，應能獲得正確的登革基因片段。而在序列缺失(deletion)的部份，利用限制酵素進行剪切、接合的方式，將不含缺失突變的序列予以接上補齊(請參照結果 4.2)，策略上只是序列的剪切、接合反應，應當不易出現序列變異的可能性。5'UTR 與 3'UTR 的修飾雖然都經過小片段的 PCR 反應，所得到的序列皆以定序資料確認過(請參照表七 ~ 表十)，都和預期的序列相符合。目前的結果尚未能證明於 3'UTR 下游的 3'-ribozyme 是否具有活性，在與早期學者所定義的 ribozyme 序列相比較後，為了修飾出完整的病毒 3'端序列，使其跟 Haseloff 和 Gerlach 所定義的高度保留序列 A-domain 和 B-domain 有些許差異(Haseloff and Gerlach, 1988)，如圖四十三，而這樣的差異或許會有影響 ribozyme 正確作用的可能(Koizumi *et al.*, 1988)。在當初所引用 Heller 等人的文獻中(Heller *et al.*, 2005)，一樣有修改了部份的 A-domain 和 B-domain 序列，內文提到，以體外進行 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 試驗偵測由 3'-ribozyme 所切開的序列時，很可能因為效率低或不易偵測，使其無法偵測到訊號，不過在轉染後的細胞上清液，就能偵測到訊號。由於改變的序列與文獻上有些許差異，Heller 等人所研究的病毒為 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV)，其與登革病毒雖同為黃質病毒科 (*Flaviviridae*)，但在屬的分類上，登革病毒為黃質病毒屬 (*Flavivirus*)，而 C 型肝炎病毒為肝炎病毒屬 (*Hepacivirus*)，因此在 ribozyme 序列改變不

同及病毒分類不同的情況下，無法確認依其所設計的 3'-ribozyme，是否也可以如其一樣於細胞中具有活性。

(3). 表現時的可能影響：登革病毒進行轉譯時，只會合成出一條多肽鏈 (polypeptide)，再經由病毒本身的蛋白質酵素 (viral protease) 和宿主細胞內的訊息酵素 (signalase) 作用，將多肽鏈裂解成獨立的蛋白。因此，在 RNA 序列有表現的情況下 (請參照結果 4.5.1)，而無法偵測到蛋白的表現 (請參照討論 5.3)，表示序列本身可能還有缺陷，使轉譯不能啟動或不完全、多肽鏈裂解訊號序列 (signal peptide) 突變或蛋白折疊不正確等情形產生。轉譯的部份，登革病毒的轉譯一般如同細胞訊息 RNA (messenger RNA, mRNA)，是屬於 cap-dependent translation。但 Edgil 等人發現，抑制住 cap-dependent translation 途徑的情況下，登革基因還是能夠進行轉譯，證明登革病毒還有其他非傳統的蛋白表現系統，是在沒有 internal ribosome entry site (IRES) 結構，但是需要 5'UTR 與 3'UTR 存在的情形下 (Edgil *et al.*, 2006)，因此，UTR 的序列若有缺陷，亦可能會影響病毒部份的轉譯功能。目前可以確認的是，本研究的 DV2 PL046 strain 感染性質體病毒基因序列，在 5'UTR 的序列與資料庫之 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 序列完全一致，而 5'UTR 與 3'UTR 存在著一些相互補序列，其中的 cyclization sequence (CS) 和 upstream AUG region (UAR) 序列，證實為病毒複製時所必須，而本研究的感染性質體位於 3'UTR 的 CS 及 UAR 序列也與文獻指出的序列一致 (Alvarez *et al.*, 2008)。登革病毒 NS1 蛋白的多肽鏈裂解訊號序列，位於 N 端的 24 個胺基酸為 N 端裂解所必須 (Falgout *et al.*, 1989)，位於 C 端的 8 個胺基酸及大部分的 NS2A 序列為 C 端裂解所必須 (Falgout and Markoff, 1995)，經核對，本研究感染性質體的 NS1 蛋白 N 端 24 個胺基酸及 C 端 8 個胺基酸皆跟資料庫相同，而 NS2A 有 1 個胺基酸與資料庫相異 (修改後的 NS2A 皆為 pcDNA3/DV2F-S 之序列，請參照表四)，但未能確定是否會影響 NS1 蛋白 C 端的裂解。使用的登革病毒 NS1 蛋白抗體 (Abcam, Cat. DN2)，為全長原態蛋白 (native protein) 所誘導之單株抗體，說明書中指出，其可以辨認到 DV2 NGC strain 及 DV2 16681 strain 的 NS1

蛋白，於討論 5.3 中也可以觀察到，此抗體也能辨認由 DV2 PL046 strain 所感染之 BHK-21 細胞，而修改後的 NS1 皆為 pcDNA3/DV2F-S 之序列，與資料庫之 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 序列是完全相同的 (請參照表四)。

綜合這部份的問題，要確認序列的正確性，可以將 5'UTR 經修飾的 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體當模板，利用 T7 啟動子進行體外轉錄，加上 5' 端 cap 後，對 BHK-21 細胞進行轉染及空斑測試，若修正的感染性質體序列有病毒基因功能的，將可檢測出空斑的產生。3'-ribozyme 的部份，可以以 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 試驗進行確認，或嘗試將其更換為 HDV ribozyme，優點是切割點 (cleavage site) 比較不會有序列上之限制 (Perrotta and been *et al.*, 1991)。抗體辨識的部份，可以將 NS1 基因序列建構於載體，轉染至 BHK-21 細胞後，觀察是否能被抗體所偵測到，但前提是要有 DV2 NGC strain 或 DV2 16681 strain 的 NS1 基因序列質體做為實驗的控制組。

5.5 感染性質體在 SURE 2 strain 菌株的生長情形

由 Lewin 等人的研究中証實，除了來自 HSV I 基因上 Thymine kinase 的啟動子以外，包含 CMV 等其他四種病毒的啟動子，皆可以在 *E. coli* 中驅動，並表現螢光蛋白 (Lewin *et al.*, 2005)。本研究中的感染性質體 pCPR，已經去除包含 T7 啟動子的 5' 端多餘序列 (請參照結果 4.4)，使全長登革基因的轉錄，只能由上游的 CMV 啟動子開啟。而在生長曲線的結果中可以觀察到 (請參照結果 4.6)，雖然感染性質體與控制組的菌液濃度攀升情況無明顯差異，但實際能生長在含有抗生素之培養盤的細菌數目，卻與控制組相差 1000 倍以上 (22 hr; 停滯期)。這說明了由 CMV 啟動子驅動轉錄的情況下，感染性質體的病毒序列在 *E. coli* 體內仍然會有不穩定的問題存在。這部份的問題，建議可以使用誘導性啟動子 (inducible promoter)，或是在病毒序列的前端接上一段內含子 (intron) 序列，以確保病毒基因不會在 *E. coli* 中表現。

陸、結論

研究結果顯示，登革二型病毒 PL046 感染性質體上的缺失突變經修正，亦修飾了病毒基因序列的 5'UTR 與 3'UTR，置於 CMV 啟動子下游時，尚無法表現出具有感染性的登革病毒。可能是由於序列還有尚未發現的缺陷，或 ribozyme 的活性不佳所致，導致轉錄出的 RNA 無法具有病毒 RNA 功能，進而無法由空斑試驗偵測到病毒顆粒的產出。未來建議先以 *in vitro* transcription 的方式，合成出修正後的感染性質體登革病毒基因 RNA，將其轉染到宿主細胞中，觀察是否能偵測到病毒的產生，以確認修正後的病毒基因序列是具有功能性的，再做更進一步的探討。



柒、參考文獻

杜育穎, 2007, 交大碩士論文

賴建孝, 2006, 交大碩士論文

Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S. and Gamarnik, A.V., (2005). 'Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication'. *Virology*, 339 (2):200-212.

Alvarez, D.E., Filomatori, C.V. and Gamarnik, A.V., (2008). 'Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs'. *Virology*, 375 (1):223-235.

Cahour, A., Pletnev, A., Vazielle-Falcoz, M., Rosen, L. and Lai, C.J., (1995). 'Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome'. *Virology*, 207 (1):68-76.

Cech, T.R., Zaug, A.J. and Grabowski, P.J., (1981). 'In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence'. *Cell*, 27 (3 Pt 2):487-496.

Clyde, K., Kyle, J. L., and Harris, E., (2006). 'Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis'. *J Virol*, 80(23): 11418-31.

Edgil, D., Diamond, M.S., Holden, K.L., Paranjape, S.M. and Harris, E., (2003). 'Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains'. *Virology*, 317 (2):275-290.

Edgil, D., Polacek, C. and Harris, E., (2006). 'Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited'. *J Virol*, 80 (6):2976-2986.

Falgout, B., Chanock, R. and Lai, C.J., (1989). 'Proper processing of dengue

virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a'. *J Virol*, 63 (5):1852-1860.

Falgout, B. and Markoff, L., (1995). 'Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum'. *J Virol*, 69 (11):7232-7243.

Filomatori, C.V., Lodeiro, M.F., Alvarez, D.E., Samsa, M.M., Pietrasanta, L. and Gamarnik, A.V., (2006). 'A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome'. *Genes Dev*, 20 (16):2238-2249.

Gualano, R.C., Pryor, M.J., Cauchi, M.R., Wright, P.J. and Davidson, A.D., (1998). 'Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA'. *J Gen Virol*, 79 (Pt 3):437-446.

Gubler, D.J., (2002). 'Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century'. *Trends Microbiol*, 10 (2):100-103.

Guha-Sapir, D. and Schimmer, B., (2005). 'Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology'. *Emerg Themes Epidemiol*, 2 (1):1.

Haseloff, J. and Gerlach, W.L., (1988). 'Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities'. *Nature*, 334 (6183):585-591.

Heller, T., Saito, S., Auerbach, J., Williams, T., Moreen, T.R., Jazwinski, A., Cruz, B., Jeurkar, N., Sapp, R., Luo, G. and Liang, T.J., (2005). 'An in vitro model of hepatitis C virion production'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (7):2579-2583.

Holden, K.L. and Harris, E., (2004). 'Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain'. *Virology*, 329 (1):119-133.

Kalayanarooj, S., Vaughn, D.W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Viramitrachai, W., Ratanachu-eke, S., Kiatpolpoj, S., Innis,

B.L., Rothman, A.L., Nisalak, A. and Ennis, F.A., (1997). 'Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness'. *J Infect Dis*, 176 (2):313-321.

Kao, C.L., King, C.C., Chao, D.Y., Wu, H.L. and Chang, G.J., (2005). 'Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health'. *J Microbiol Immunol Infect*, 38 (1):5-16.

Kapoor, M., Zhang, L., Mohan, P.M. and Padmanabhan, R., (1995). 'Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain)'. *Gene*, 162 (2):175-180.

Kinney, R.M., Butrapet, S., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Roehrig, J.T., Bhamarapavati, N. and Gubler, D.J., (1997). 'Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53'. *Virology*, 230 (2):300-308.

Kinney, R.M., Huang, C.Y., Rose, B.C., Kroeker, A.D., Dreher, T.W., Iversen, P.L. and Stein, D.A., (2005). 'Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers'. *J Virol*, 79 (8):5116-5128.

Koizumi, M., Iwai, S. and Ohtsuka, E., (1988). 'Construction of a series of several self-cleaving RNA duplexes using synthetic 21-mers'. *FEBS Lett*, 228 (2):228-230.

Lai, C.J., Zhao, B.T., Hori, H. and Bray, M., (1991). 'Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (12):5139-5143.

Lee, C., Calvert, J.G., Welch, S.K. and Yoo, D., (2005). 'A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity'. *Virology*, 331 (1):47-62.

Lewin, A., Mayer, M., Chusainow, J., Jacob, D. and Appel, B., (2005). 'Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into Escherichia coli'. *BMC Biotechnol*, 5:19.

- Ligon, B.L., (2005). 'Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention'. *Semin Pediatr Infect Dis*, 16 (1):60-65.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.J. and Rice, C.M., (2007). 'Flaviviridae: The Viruses and Their Replication'. *Fields Virology*, (5th ed), Philadelphia.
- Liu, C. C., Lee, S. C., Butler, M. and Wu, S. C., (2008). 'High genetic stability of dengue virus propagated in MRC-5 cells as compared to the virus propagated in vero cells'. *PLoS One*, 3 (3): e1810.
- Mackenzie, J.S., Gubler, D.J. and Petersen, L.R., (2004). 'Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses'. *Nat Med*, 10 (12 Suppl):S98-109.
- Mairuhu, A.T., Wagenaar, J., Brandjes, D.P. and van Gorp, E.C., (2004). 'Dengue: an arthropod-borne disease of global importance'. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23 (6):425-433.
- Nimmannitya, S., (1987). 'Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever'. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 18 (3):392-397.
- Perrotta, A.T. and Been, M.D., (1991). 'A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA'. *Nature*, 350 (6317):434-436.
- Pierro, D.J., Salazar, M.I., Beaty, B.J. and Olson, K.E., (2006). 'Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation'. *J Gen Virol*, 87 (Pt 8):2263-2268.
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., Ahmed, A.A., Valentine, L.E., Davis, C.W., Samuel, M.A., Hanna, S.L., Puffer, B.A. and Doms, R.W., (2005). 'An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene'. *Virology*, 334 (1):28-40.
- Polo, S., Ketner, G., Levis, R. and Falgout, B., (1997). 'Infectious RNA

transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast'. *J Virol*, 71 (7):5366-5374.

Serganov, A. and Patel, D.J., (2007). 'Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins'. *Nat Rev Genet*, 8(10): 776-90.

Sriburi, R., Keelapang, P., Duangchinda, T., Pruksakorn, S., Maneekarn, N., Malasit, P. and Sittisombut, N., (2001). 'Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid'. *J Virol Methods*, 92 (1):71-82.

Turner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L. and Stadler, P.F., (2004). 'Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes'. *J Gen Virol*, 85 (Pt 5):1113-1124.

Yamshchikov, V.F., Wengler, G., Perelygin, A.A., Brinton, M.A. and Compans, R.W., (2001). 'An infectious clone of the West Nile flavivirus'. *Virology*, 281 (2):294-304.

You, S. and Padmanabhan, R., (1999). 'A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA'. *J Biol Chem*, 274 (47):33714-33722.

Yu, L. and Markoff, L., (2005). 'The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence'. *J Virol*, 79 (4):2309-2324.

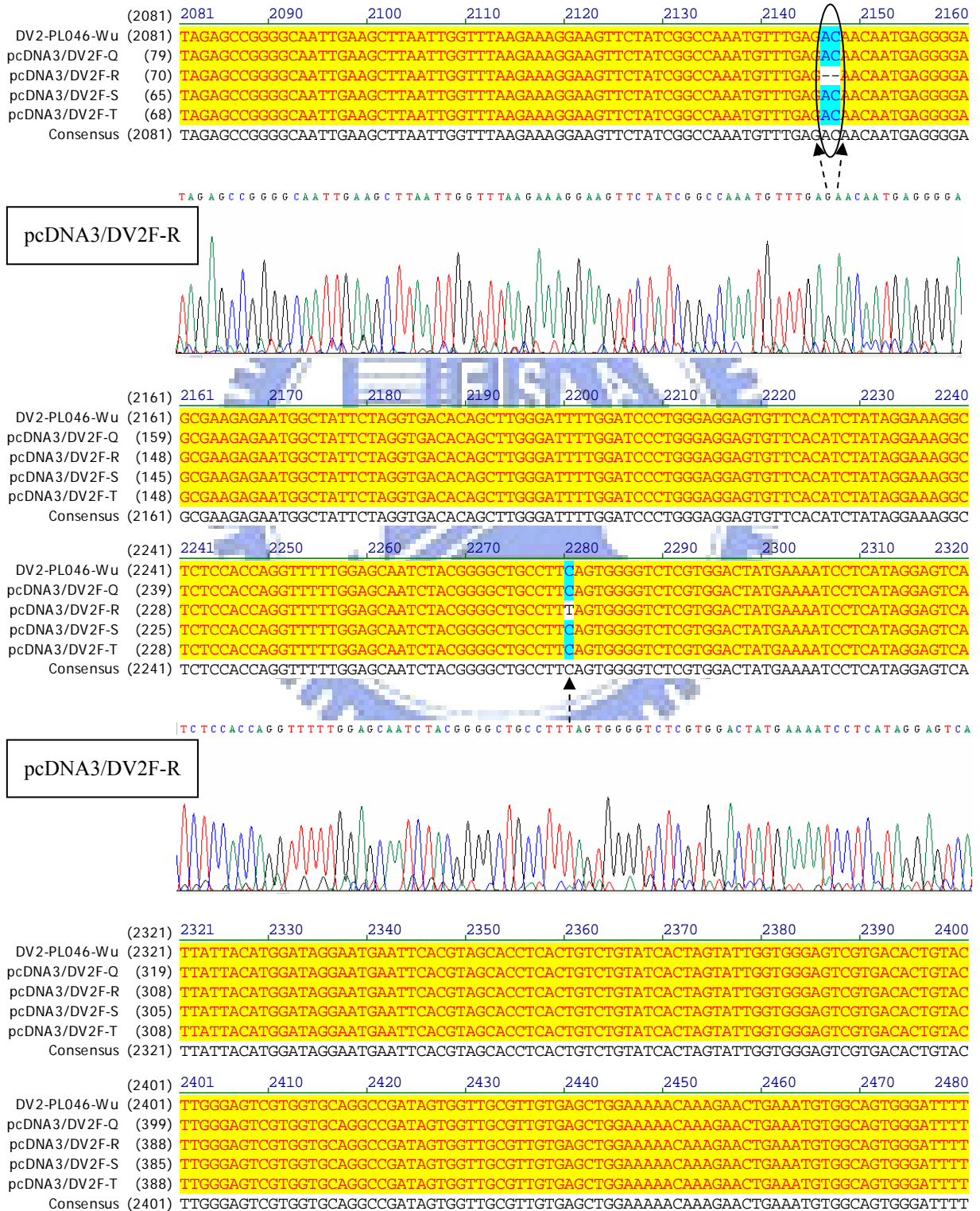
Zaug, A.J. and Cech, T.R., (1986). 'The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme'. *Science*, 231 (4737):470-475.

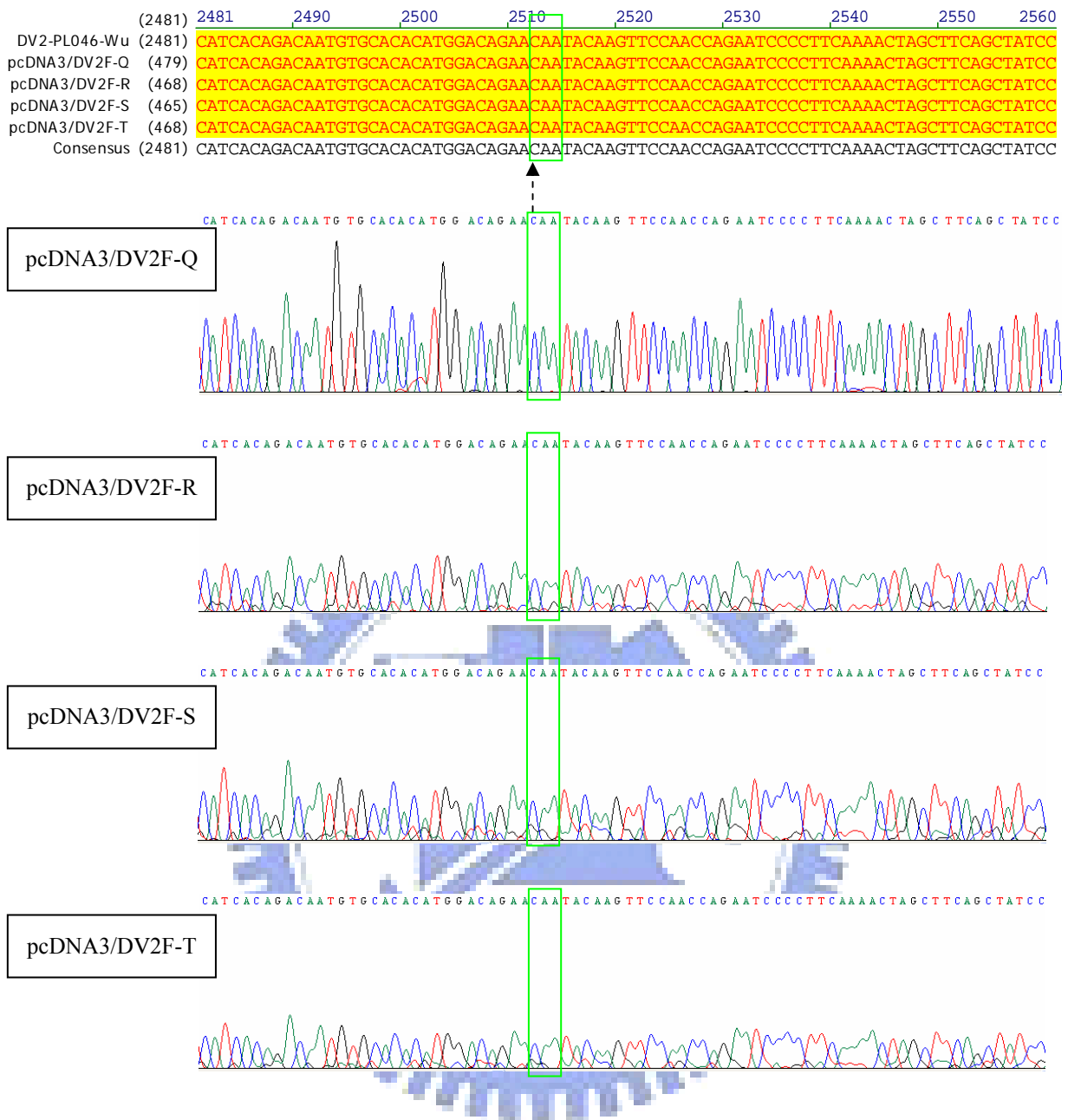
表一、登革病毒感染性質體

reference	virus type	virus strain	vector	promoter	備註
1991, Lai <i>et al</i>	DV4	814669	pBR322 [L]	SP6	
1995, Kapoor <i>et al</i>	DV2	NGC	pLG-SPORT [L]; pBR322 [L]	T7	<i>in vitro</i> ligation & failed in [L]
1997, Kinney <i>et al</i>	DV2	16681	pBR322 [L]	T7	
1997, Polo <i>et al</i>	DV2	NGC	yeast- <i>E. coli</i> shuttle vector	SP6	failed in <i>E. coli</i>
1998, Gualano <i>et al</i>	DV2	NGC	pWSK29 [L]	T7	
2000, Puri <i>et al</i>	DV1	DEN2 WP	yeast- <i>E. coli</i> shuttle vector	SP6	
2001, Sriburi <i>et al</i>	DV2	16681	pBluescript II KS [H]	SP6	15 ~ 55µg plasmid DNA from 100ml LB
2006, Pierro <i>et al</i>	DV2	Jamaica83 1409	pBAC [S]	T7	failed in [L]
2006, Zhu <i>et al</i>	DV2	DEN2-43	pWSK29 [L]	T7	T7

註：[L]代表 low-copy number plasmid；[H]代表 high-copy number plasmid；[S]代表 single-copy number plasmid。

表二、感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q、R、S、T，以引子 D2F1873 定序結果。最上方所列為 DV2 PL046 strain (以 DV2-PL046-Wu 表示；AJ968413, NCBI)，第二到五列依次為 pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-R、pcDNA3/DV2F-S、pcDNA3/DV2F-T。





註：頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。以黑色圓形圈起來的位置為 pcDNA3/DV2F-R 的缺失突變 (deletion)。以綠色方形框起來的位置為 pcDNA3/DV2F-P 在 nt2512 由 CAA 轉變成 TAA (賴建孝, 2006, 交大碩士論文) 的無義突變 (nonsense mutation)。下方波峰圖表示變異部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示全數相同，天藍色背景表示多數相同，白色背景表示相異。

表三、將「表二」pcDNA3/DV2F-Q、S、T的定序結果轉換成胺基酸序列，轉換部份包含DNA序列nt2083~nt2559。最上方所列為DV2 PL046 strain (DV2-PL046-Wu表示；AJ968413, NCBI)序列轉換成胺基酸的結果，第二到四列依次為pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-S、pcDNA3/DV2F-T定序序列轉換成胺基酸結果。

	(663)	663	670	680	690	700	710	720	730	742	
DV2-PL046-Wu	(663)	EPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVI									
pcDNA3/DV2F-Q	(1)	EPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVI									
pcDNA3/DV2F-S	(1)	EPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVI									
pcDNA3/DV2F-T	(1)	EPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVI									
Consensus	(663)	EPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVI									
	(743)	743	750	760	770	780	790	800	810	821	
DV2-PL046-Wu	(743)	ITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLVYLGVVVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSPKLASAI									
pcDNA3/DV2F-Q	(81)	ITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLVYLGVVVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSPKLASAI									
pcDNA3/DV2F-S	(81)	ITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLVYLGVVVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSPKLASAI									
pcDNA3/DV2F-T	(81)	ITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLVYLGVVVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSPKLASAI									
Consensus	(743)	ITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLVYLGVVVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSPKLASAI									

註：部標示的數字為對應之DV2 PL046 strain 胺基酸序列相對位置。若有停止密碼產生的位置會以“-”表示。黃色背景表示全數相同，天藍色背景表示多數相同，綠色背景表示胺基酸的屬性相同，白色表示胺基酸的屬性不同。

表四、感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q、S 全長序列與 DV2 PL046 strain (AJ968413, NCBI) 比對結果。

1. 序列相似度比較

pcDNA3/DV2F-Q 與 DV2 PL046 strain 的核苷酸相似度	99.7 %
pcDNA3/DV2F-Q 與 DV2 PL046 strain 的胺基酸相似度	99.6 %
pcDNA3/DV2F-S 與 DV2 PL046 strain 的核苷酸相似度	99.8 %
pcDNA3/DV2F-S 與 DV2 PL046 strain 的胺基酸相似度	99.6 %
pcDNA3/DV2F-Q 與 pcDNA3/DV2F-S 的核苷酸相似度	99.6 %
pcDNA3/DV2F-Q 與 pcDNA3/DV2F-S 的胺基酸相似度	99.3 %
無義突變 (nonsense mutation)	0
閱讀框架易位突變 (frame shift mutation)	pcDNA3/DV2F-Q × 2 pcDNA3/DV2F-S × 1

2. 基因位置

capsid protein	+100 ~ +438
membrane glycoprotein precursor	+439 ~ +936
membrane glycoprotein	+712 ~ +936
envelope protein	+937 ~ +2421
nonstructural protein 1	+2422 ~ +3477
nonstructural protein 2A	+3478 ~ +4131
nonstructural protein 2B	+4132 ~ +4521
nonstructural protein 3	+4522 ~ +6375
nonstructural protein 4A	+6376 ~ +7233
nonstructural protein 4B	+7234 ~ +7569
nonstructural protein 5	+7570 ~ +10269

3. pcDNA3/DV2F-Q 和 pcDNA3/DV2F-S 全長序列與 DV2 PL046 strain 相異位置

cDNA			amino acid		
PL046	Q	S	PL046	Q	S
G 246	A	G	Leu	Leu	Leu
C 336	C	T	Val	Val	Val
A 495	G	A	Lys	Lys	Lys

A 516	G	A	Lys	Lys	Lys
G 737	G	I	Gly	Gly	I
G 1540	A	A	Glu	Lys	Lys
A 2635	G	A	Thr	Ala	Thr
T 2820	I	T	Phe	I	Phe
T 3162	A	T	Phe	Leu	Phe
A 3227	G	A	His	Arg	His
A 3576	A	G	Thr	Thr	Thr
G 3902	A	A	Arg	Lys	Lys
G 4306	A	G	Val	Ile	Val
A 4471	A	G	Ile	Ile	Val
A 4709	A	C	Lys	Lys	Thr
T 4775	C	T	Leu	Pro	Leu
T 4863	T	C	Gly	Gly	Gly
T 5091	C	C	Ile	Ile	Ile
G 5151	A	A	Glu	Glu	Glu
A 5244	A	G	Arg	Arg	Arg
A 5584	G	A	Lys	Glu	Lys
A 5809	A	G	Lys	Lys	Glu
A 5899	G	A	Arg	Gly	Arg
T 5913	C	T	Asn	Asn	Asn
A 6227	A	G	Asn	Asn	Ser
G 6302	A	G	Arg	Lys	Arg
A 6394	A	G	Ile	Ile	Val
T 6653	C	T	Ile	Thr	Ile
G 6823	A	G	Ala	Thr	Ala
A 6830	I	A	Glu	Val	Glu
A 6854	G	A	Lys	Arg	Lys
G 7008	A	G	Val	Val	Val
C 7418	C	T	Thr	Thr	Ile
A 7805	A	G	Asp	Asp	Gly
A 8015	G	A	Glu	Gly	Glu
T 8686	C	T	Leu	Leu	Leu
C 8953	T	C	Leu	Leu	Leu
G 9179	G	C	Gly	Gly	Ala
A 9513	A	G	Ala	Ala	Ala
T 9715	T	G	Leu	Leu	Val

T 9769	C	T	Leu	Leu	Leu
G 9915	A	G	Ala	Ala	Ala
A 10154	A	G	Asn	Asn	Ser
T 10234	T	C	Phe	Phe	Leu
T 10407	G	T	非轉譯區 (untranslated region, UTR)		
C 10426	C	T			
A 10449		A			
A 10674	G	A			
A 10693	G	A			

註：黃色背景表示與 DV2 PL046 strain 相異；紅色背景表示產生閱讀框架易位突變 (frame shift mutation)。

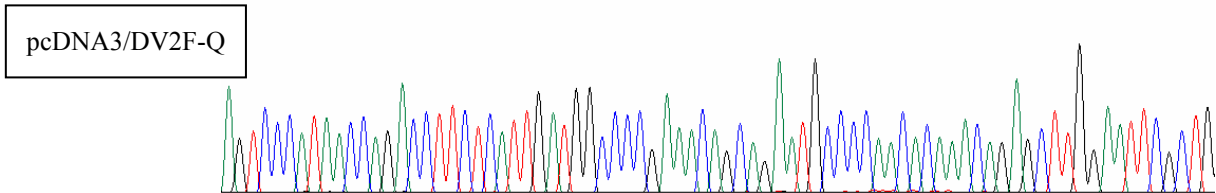
4. pcDNA3/DV2F-Q 及 pcDNA3/DV2F-S 的閱讀框架易位突變

a. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt2820 (ΔT)

```

(2801) 2801 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
DV2-PL046-Wu (2801) AGTCCCATAACCAGACCTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGCCCCAAACACAAACAGAGCTTGGGAATTCGCTG
pcDNA3/DV2F-Q (2801) AGTCCCATAACCAGACCTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGCCCCAAACACAAACAGAGCTTGGGAATTCGCTG
pcDNA3/DV2F-S (2800) AGTCCCATAACCAGACCTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGCCCCAAACACAAACAGAGCTTGGGAATTCGCTG
Consensus (2801) AGTCCCATAACCAGACCTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGCCCCAAACACAAACAGAGCTTGGGAATTCGCTG

```

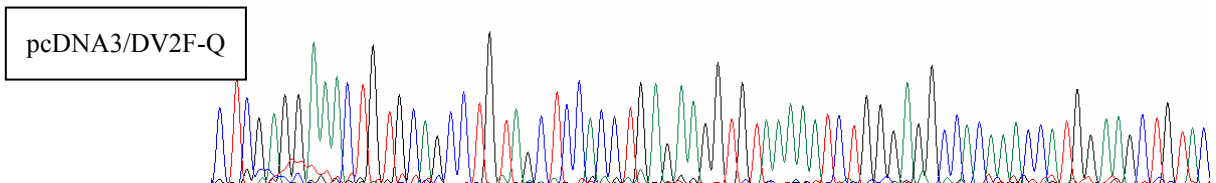


b. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449 (ΔA)

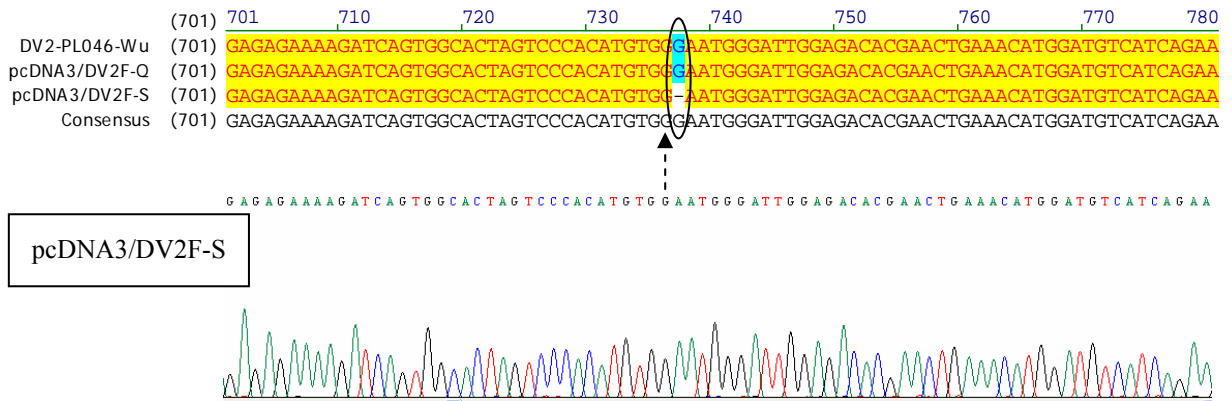
```

(10401) 10401 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480
DV2-PL046-Wu(10401) CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTAC
pcDNA3/DV2F-Q(10400) CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTAC
pcDNA3/DV2F-S(10400) CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTAC
Consensus(10401) CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTAC

```

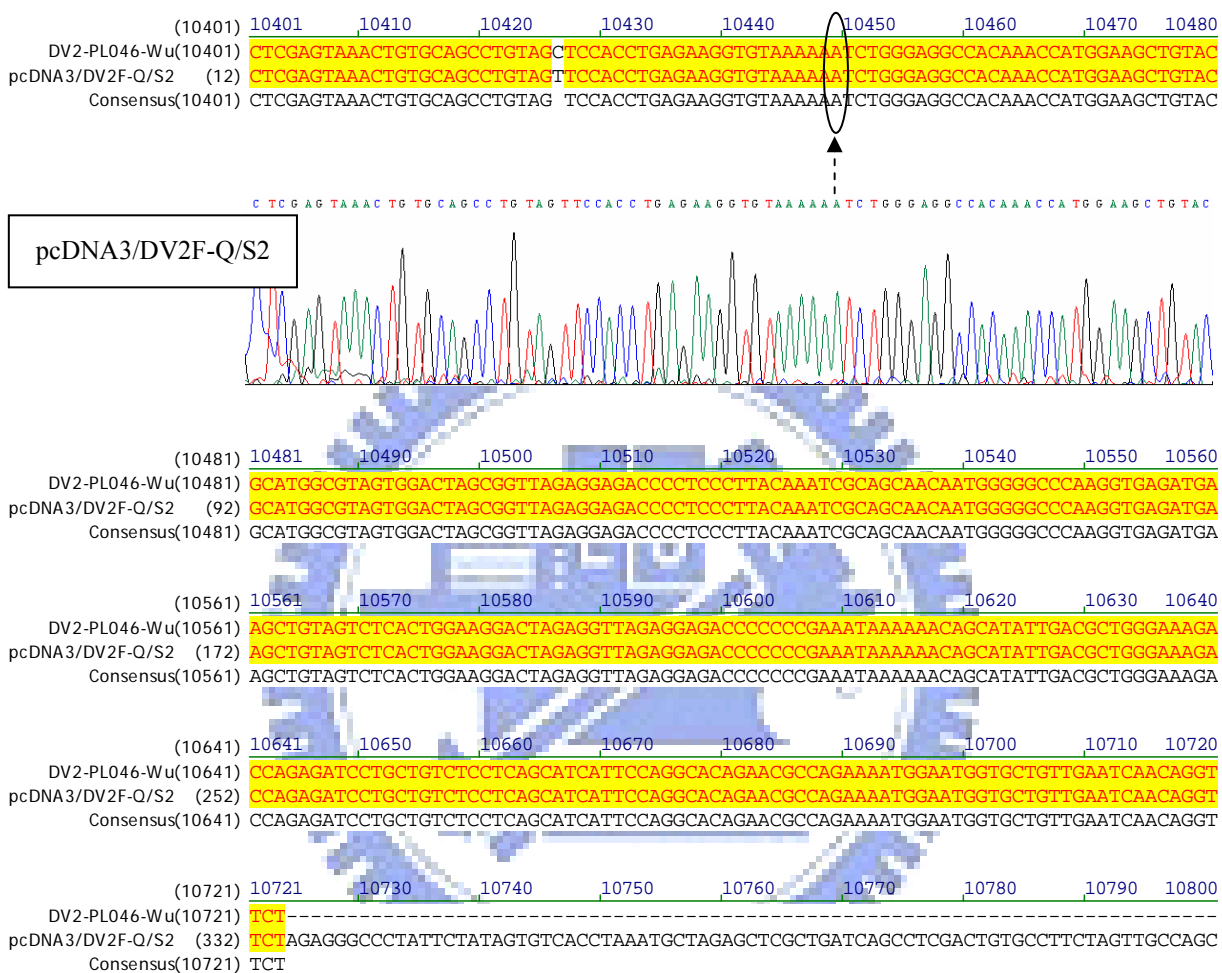


c. pcDNA3/DV2F-S 的 nt737 (ΔG)



註：第一列為 DV2 PL046 strain，第二列為 pcDNA3/DV2F-Q 的定序結果，第三列為 pcDNA3/DV2F-S 的定序結果。頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。黑色圓圈表示產生閱讀框架易位突變 (frame shift mutation) 的位置。下方波峰圖表示變異部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示全數相同，天藍色背景表示多數相同，白色背景表示相異。

表五、pcDNA3/DV2F-Q/S2 定序結果。檢查原來 pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449 (ΔA) 缺失突變，第一列為 DV2 PL046 strain (以 DV2-PL046-Wu 表示；AJ968413, NCBI)，第二列為定序結果。

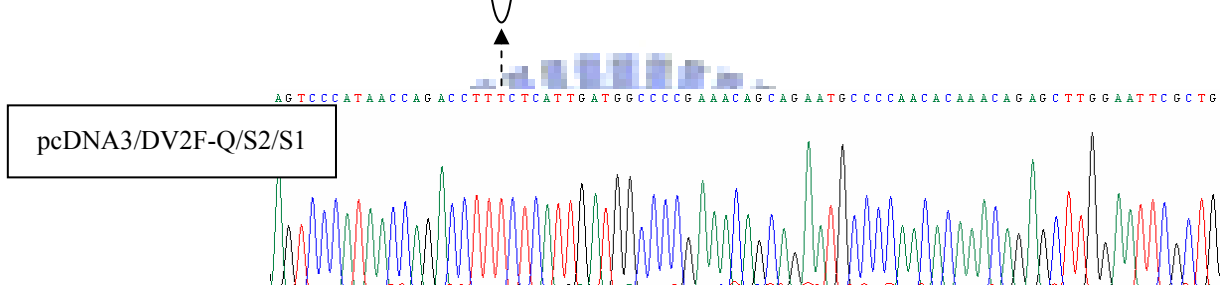


註：頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。黑色圓形圈起來的位置為修正的序列。下方波峰圖表示修正部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示相同，白色背景表示相異。

表六、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 定序結果。1~3. 依次為原來 pcDNA3/DV2F-Q 的 nt2820 (ΔT)、nt10449 (ΔA) 和 pcDNA3/DV2F-S 的 nt737 (ΔG) 缺失突變檢查，第一列為 DV2 PL046 strain (以 DV2-PL046-Wu 表示；AJ968413, NCBI)，第二列為定序結果。

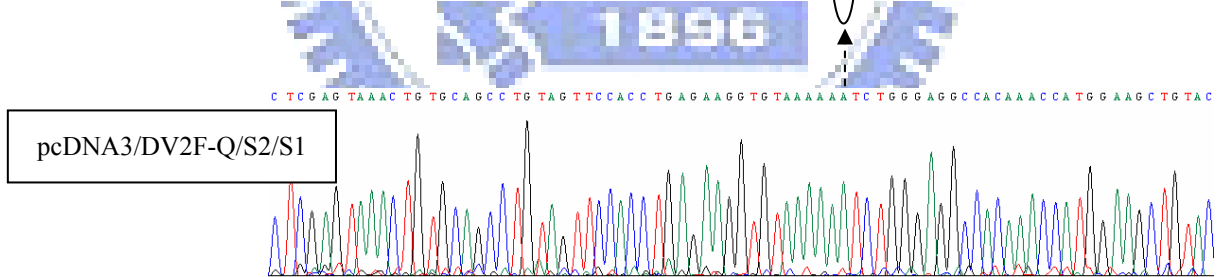
1. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt2820 (ΔT) 檢查

	(2801)	2801	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	
DV2-PL046-Wu	(2801)	AGTCCCATAACCAGACCTTTCATTTGATGGCCCCGAAACAGCAGAATGCCCAACACAAACAGAGCTTGGAAATTCGCTG									
pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1	(290)	AGTCCCATAACCAGACCTTTCATTTGATGGCCCCGAAACAGCAGAATGCCCAACACAAACAGAGCTTGGAAATTCGCTG									
Consensus	(2801)	AGTCCCATAACCAGACCTTTCATTTGATGGCCCCGAAACAGCAGAATGCCCAACACAAACAGAGCTTGGAAATTCGCTG									



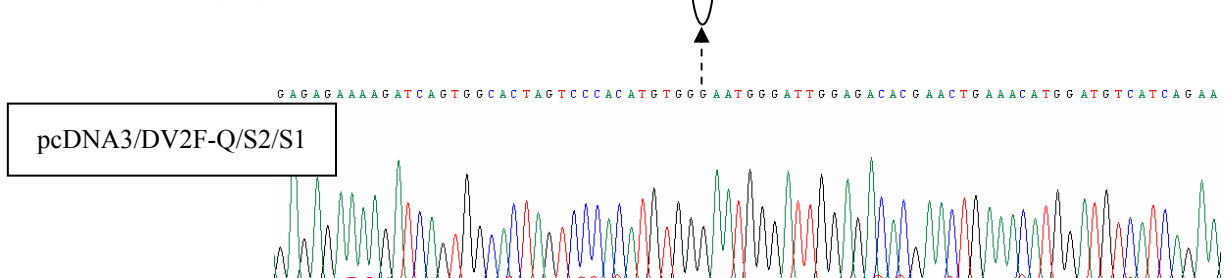
2. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449 (ΔA) 檢查

	(10401)	10401	10410	10420	10430	10440	10450	10460	10470	10480	
DV2-PL046-Wu	(10401)	CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAATAAACTCTGGGAGGCCACAACCATGGAAGCTGTAC									
pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1	(30)	CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAATAAACTCTGGGAGGCCACAACCATGGAAGCTGTAC									
Consensus	(10401)	CTCGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGAAGGTGTAATAAACTCTGGGAGGCCACAACCATGGAAGCTGTAC									



3. pcDNA3/DV2F-S 的 nt737 (ΔG) 檢查

	(701)	701	710	720	730	740	750	760	770	780	
DV2-PL046-Wu	(701)	GAGAGAAAAGATCAGTGGCACTAGTCCCACATGTGGGAATGGGATTTGGAGACCGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAA									
pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1	(349)	GAGAGAAAAGATCAGTGGCACTAGTCCCACATGTGGGAATGGGATTTGGAGACCGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAA									
Consensus	(701)	GAGAGAAAAGATCAGTGGCACTAGTCCCACATGTGGGAATGGGATTTGGAGACCGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAA									



註：頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。黑色圓形圈起來的位置為修正的序列。下方波峰圖表示修正部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示相同，白色背景表示相異。



表七、pcDNA3/prS2/3'Rz 定序結果。第一列為預期的序列，第二列為的定序結果。

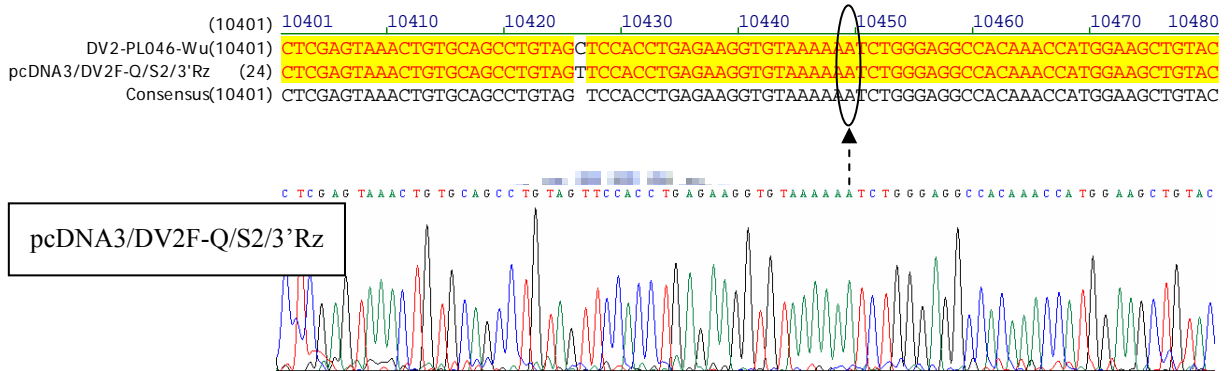
	(2680)	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2759	
pcDNA3/prS2/3'Rz(2680)		TTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAACAATGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGA								
sequence result (443)		TTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAACAATGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGA								
Consensus(2680)		TTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAACAATGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGA								
	(2760)	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2839	
pcDNA3/prS2/3'Rz(2760)		CTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC								
sequence result (523)		CTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC								
Consensus(2760)		CTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTC								
	(2840)	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2919	
pcDNA3/prS2/3'Rz(2840)		AGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCTGACGGATCTAGATCCGTCC								
sequence result (603)		AGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCTGACGGATCTAGATCCGTCC								
Consensus(2840)		AGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCTGACGGATCTAGATCCGTCC								

註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置。藍色方框為質體建構時所使用的 *Apa* I 切位位置；綠色方框為 3'-ribozyme 序列上的 *Xba* I 切位位置；紫色箭頭為 3'-ribozyme 的序列起始。黃色背景表示相同，白色背景表示相異。

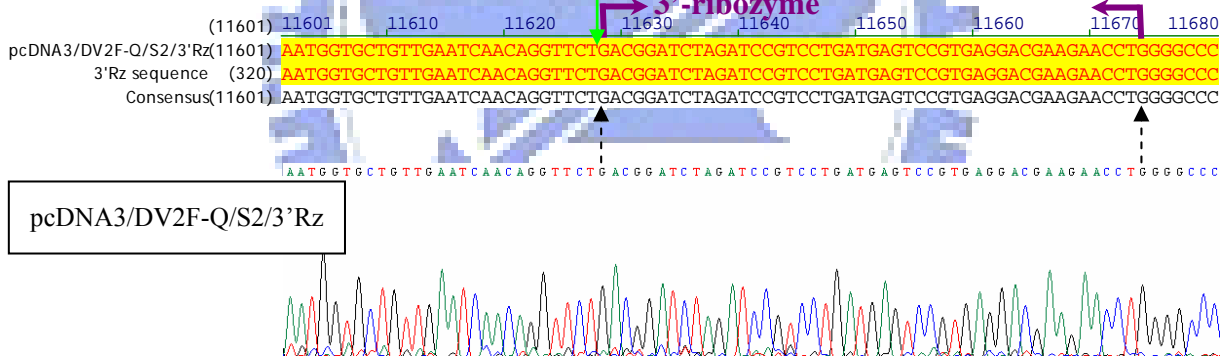


表八、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 定序結果。1. 為原來 pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449(ΔA) 缺失突變檢查，第一列為 DV2 PL046 strain(以 DV2-PL046-Wu 表示；AJ968413, NCBI)，第二列為定序結果。2. 為 3'-ribozyme 序列檢查，第一列為預期的序列，第二列為定序結果。

1. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449 (ΔA) 檢查



2. 3'-Ribozyme 的序列檢查

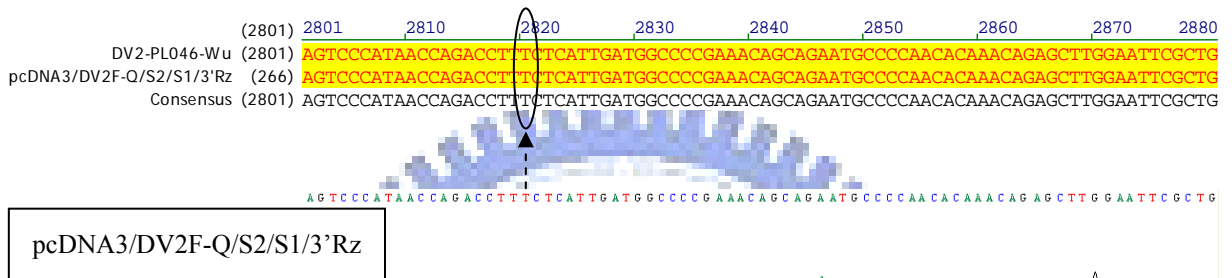


註：1. 頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。黑色圓形圈起來的位置為修正的序列。下方波峰圖表示修正部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。

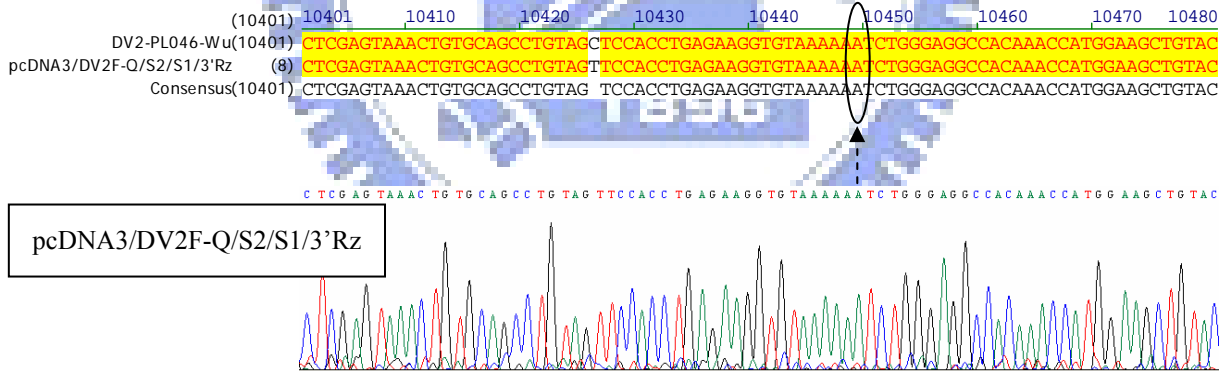
2. 頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置。紫色箭頭內為引入之 3'-ribozyme 序列位置，綠色箭頭為預期 ribozyme 會切開的位置。下方波峰圖表示定序的原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示相同，白色背景表示相異。

表九、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 定序結果。1~3. 依次為原來 pcDNA3/DV2F-Q 的 nt2820 (ΔT)、nt10449 (ΔA) 和 pcDNA3/DV2F-S 的 nt737 (ΔG) 缺失突變檢查，第一列為 DV2 PL046 strain (以 DV2-PL046-Wu 表示；AJ968413, NCBI)，第二列為定序結果。4. 為 3'-ribozyme 序列檢查，第一列為預期的序列，第二列為定序結果。

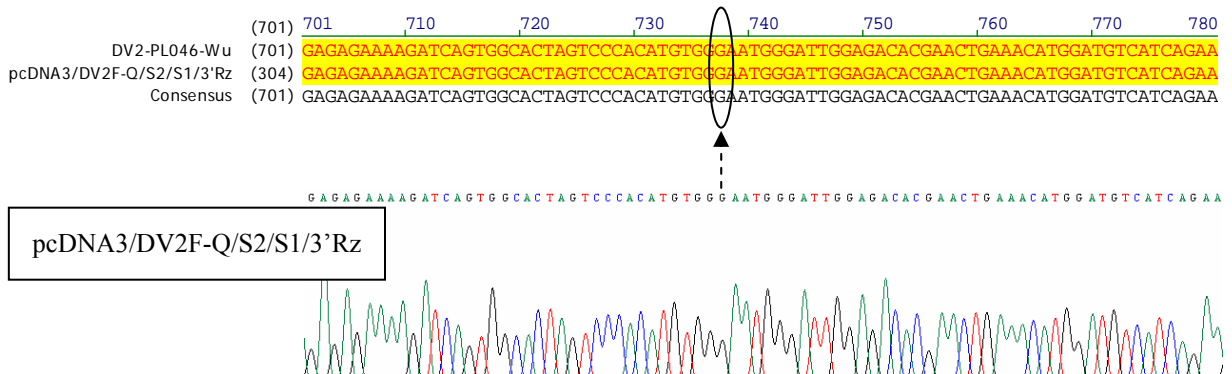
1. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt2820 (ΔT) 檢查



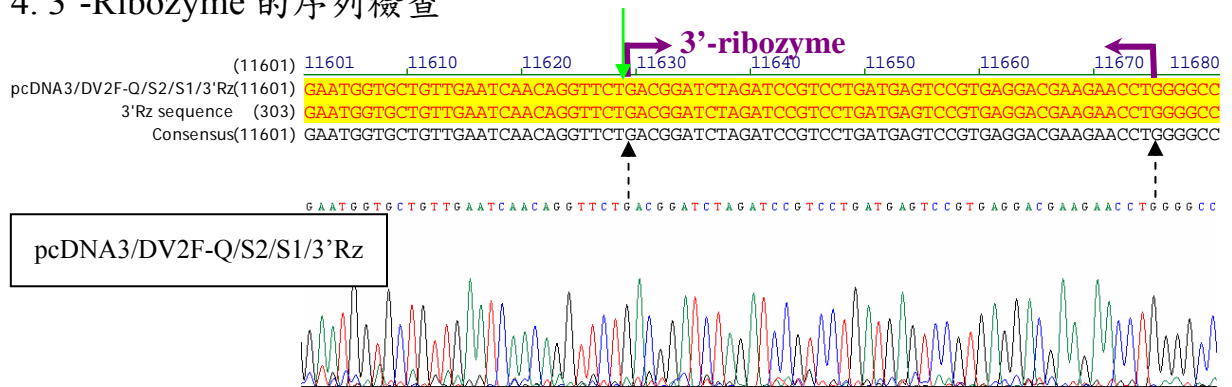
2. pcDNA3/DV2F-Q 的 nt10449 (ΔA) 檢查



3. pcDNA3/DV2F-S 的 nt737 (ΔG) 檢查



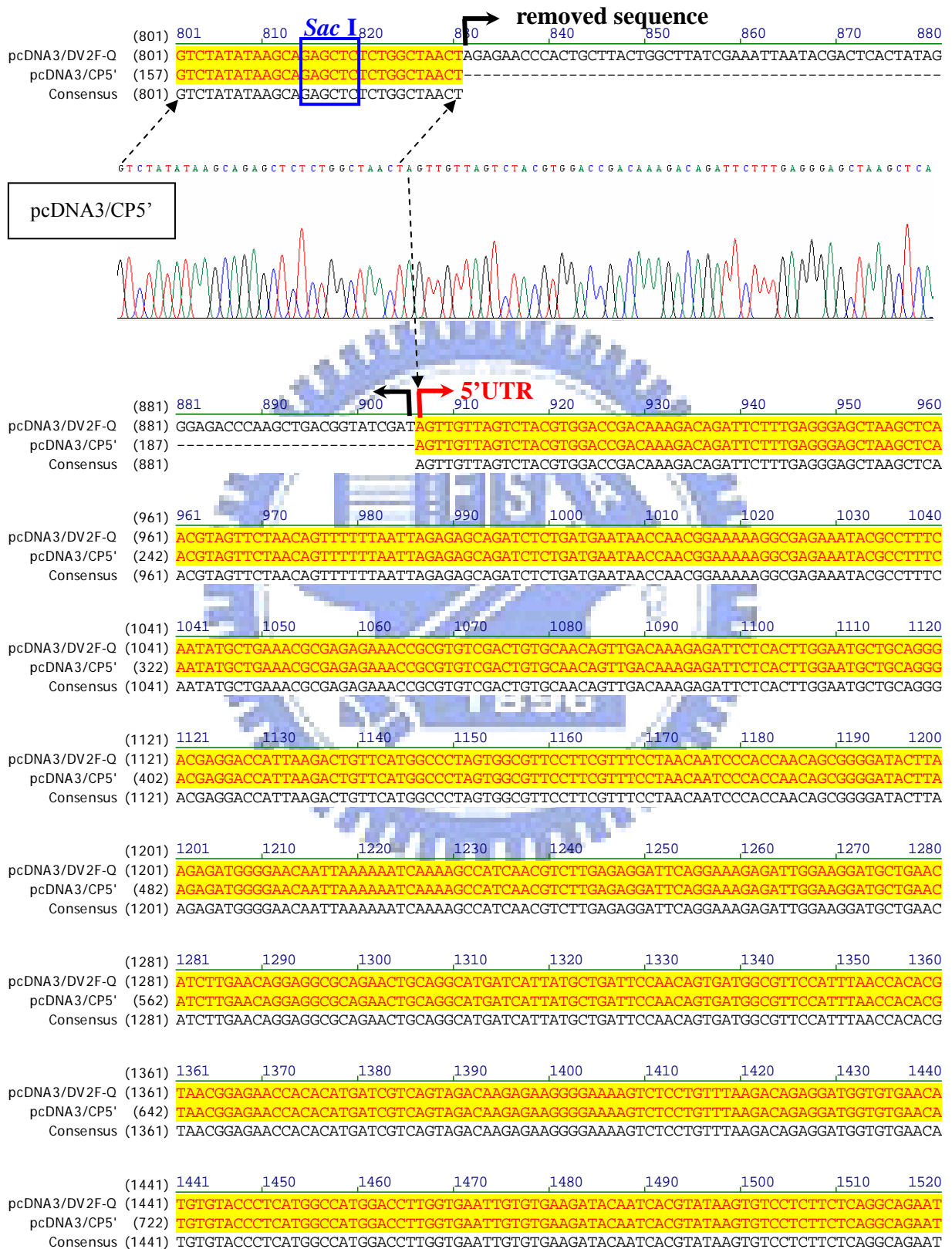
4. 3'-Ribozyme 的序列檢查



- 註：1 ~ 3. 頂部標示的數字為對應之 DV2 PL046 strain 核苷酸序列相對位置。黑色圓形圈起來的位置為修正的序列。下方波峰圖表示修正部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。
4. 頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置。紫色箭頭內為引入之 3'-ribozyme 序列位置，綠色箭頭為預期 ribozyme 會切開的位置。下方波峰圖表示定序的原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示相同，白色背景表示相異。



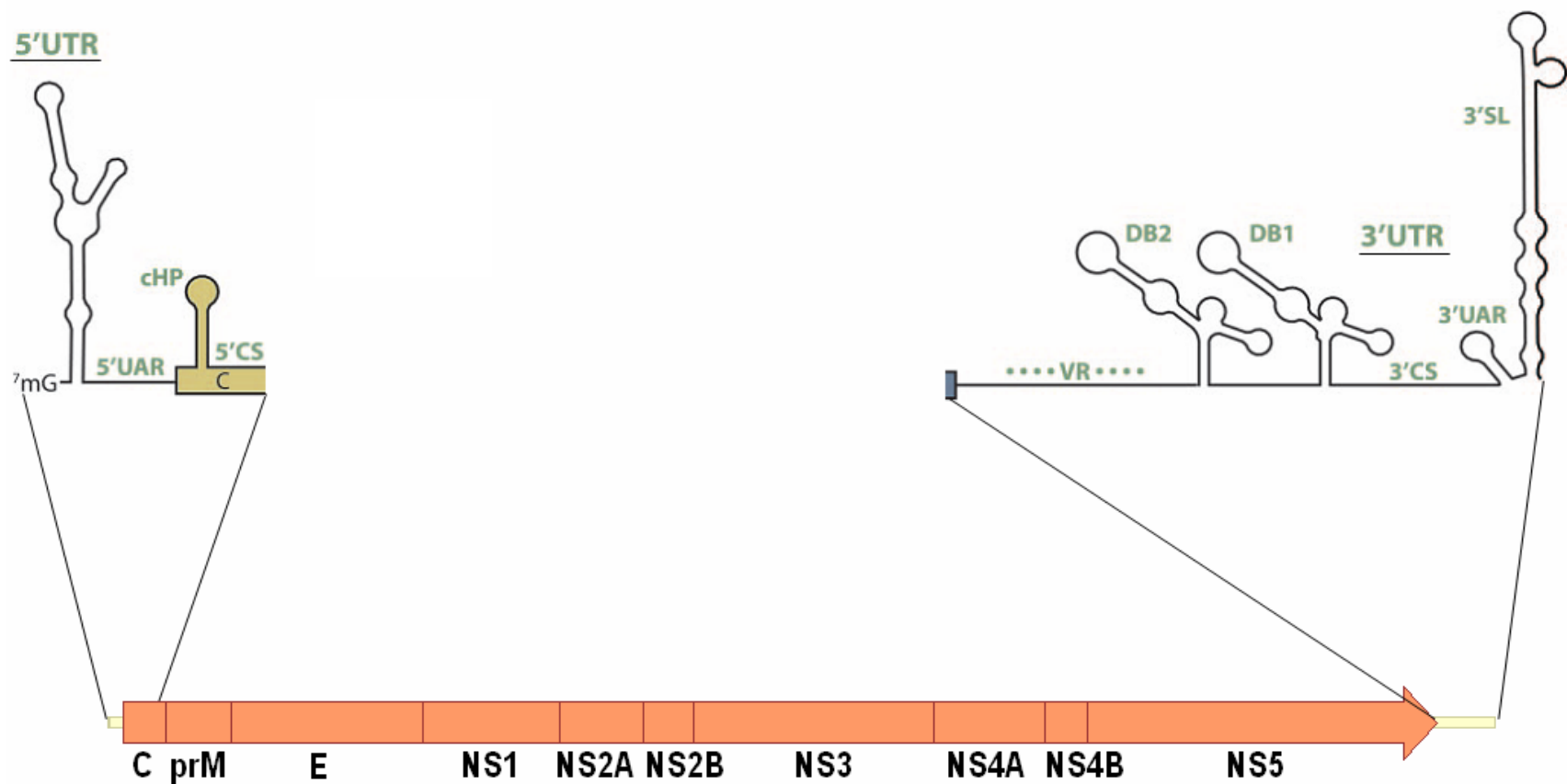
表十、pcDNA3/CP5'定序結果。第一列為 pcDNA3/DV2F-Q 的序列，第二列為定序結果。



	(1521)	1521	1530	1540	1550	1560	<i>Bst</i> EII	1570	1580	1590	1600	
pcDNA3/DV2F-Q	(1521)	GAACCAGAAGACATAGATTGTTGGTGTAACCTCTACGTCCACATGGTAACCTATGGGACGTGTACCACCACAGGAGAACA										
pcDNA3/CP5'	(802)	GAACCAGAAGACATAGATTGTTGGTGTAACCTCTACGTCCACATGGTAACCTATGGGACGTGTACCACCACAGGAGAACA										
Consensus	(1521)	GAACCAGAAGACATAGATTGTTGGTGTAACCTCTACGTCCACATGGTAACCTATGGGACGTGTACCACCACAGGAGAACA										

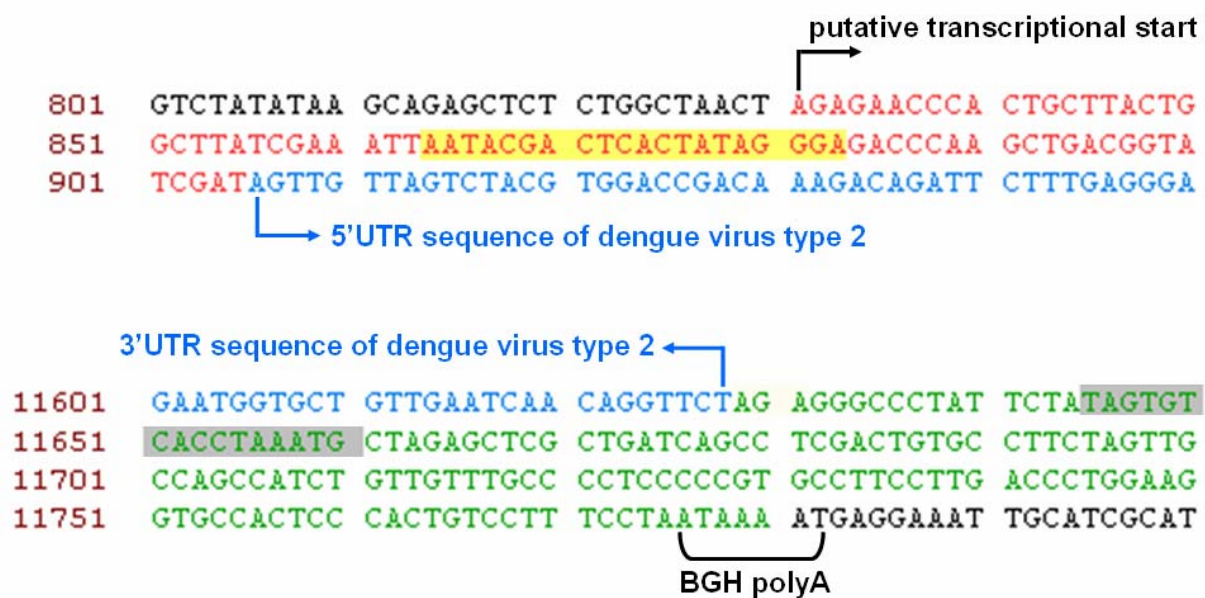
註：頂部標示的數字為 pcDNA3/DV2F-Q 質體對應的序列位置。藍色方框為質體建構時所使用的 *Sac* I 切位位置；綠色方框為之後要建構 pCP 及 pCPR 質體時，所需要的 *Bst* EII 切位位置；黑色箭頭內為所刪除的 5'UTR 上游多餘序列位置，刪除的序列會以“-”表示；紅色箭頭為 5'UTR 序列起始。下方波峰圖表示修正部位的定序原始資料，黑色虛線箭頭所指為相對應之位置。序列比對資料中，黃色背景表示相同，白色背景表示相異。





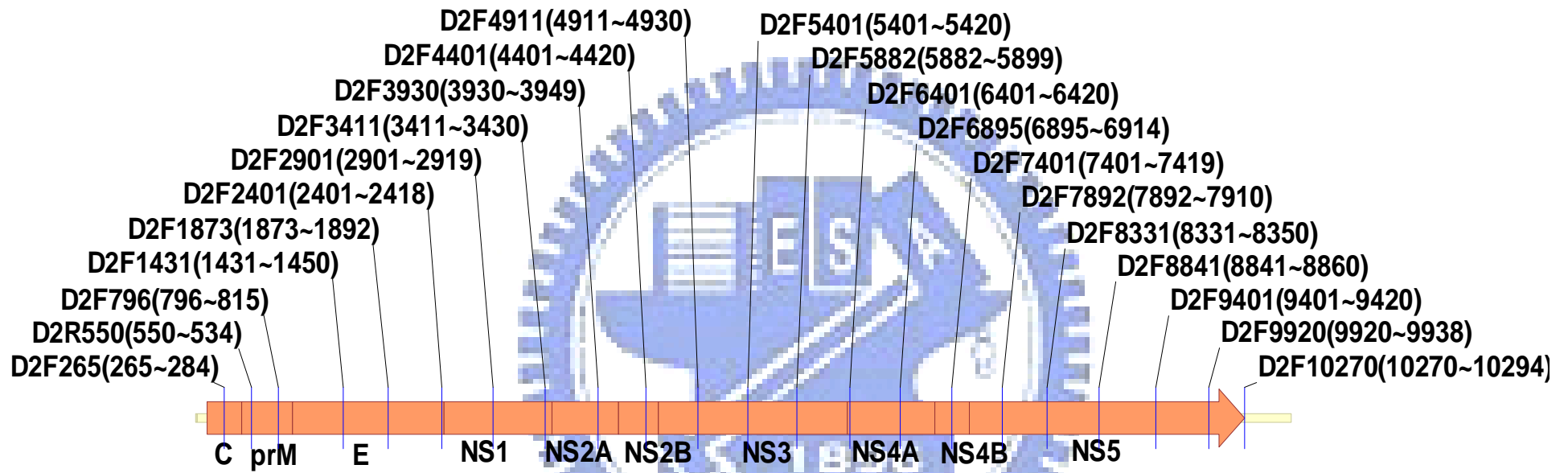
圖一、登革病毒各基因位置及預測的非轉譯區結構

橘色方塊代表病毒各基因所在位置，下方黑色字體為各基因名稱。上方放大所示為文獻推測之登革病毒基因 5 端及 3 端的二級結構，綠色字體表示其各結構名稱(reviewed in Clyde *et al*, 2006)。UTR: untranslated region; UAR: upstream AUG region; cHP: C-coding-region hairpin; CS: cyclization sequence; VR: variable region; DB: dumbbell-shaped structures; 3'SL: 3' stem-loop.



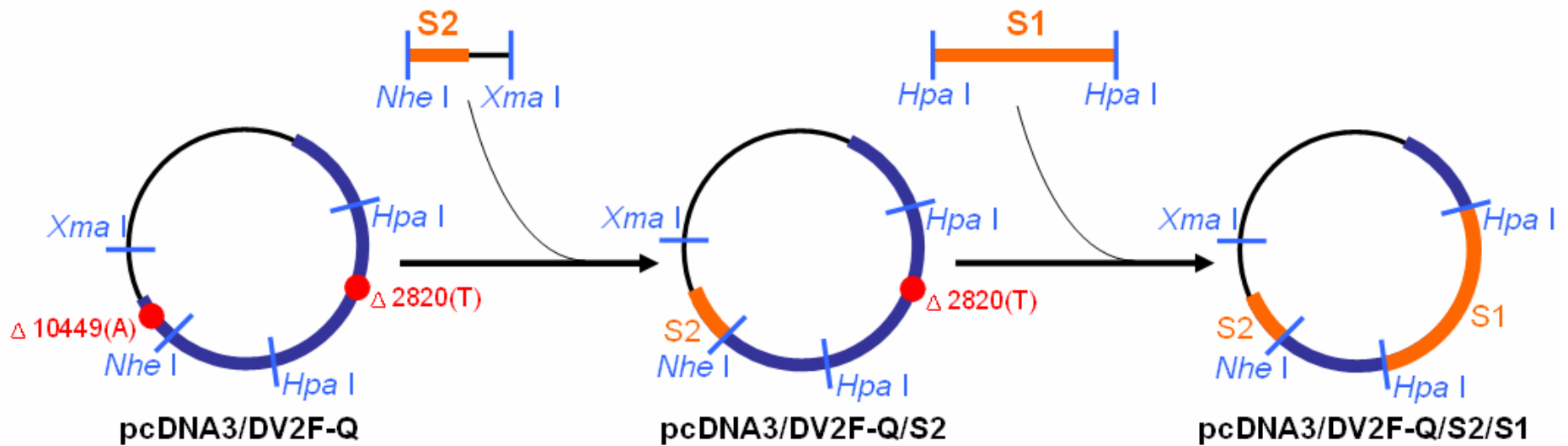
圖二、推導出之賴建孝建構的感染性質體 pcDNA3/DV2F(交大碩士論文, 賴建孝, 2006), 在 5'UTR 上游及 3'UTR 下游多餘的序列

黑色、紅色及綠色字體代表載體的序列；藍色字體代表登革二型病毒 PL046 strain 的序列；紅色字體預測為轉錄出 5'UTR 上游非病毒基因序列；綠色字體預測為轉錄出 3'UTR 下游非病毒基因序列；黃底標示為 T7 啟動子序列，灰底標示為 SP6 啟動子序列；棕色數字為對應於 pcDNA3/DV2F 上的核苷酸位置；putative transcriptional start、BGH polyA、T7 啟動子及 SP6 啟動子為 pcDNA3 使用手冊上所標示之位置。



圖三、定序引子在登革病毒基因之相對位置圖

引子序列是參考登革二型病毒 NGC strain (M29095, NCBI) 所設計。橘色方塊代表病毒各基因所在位置，下方所列為各基因縮寫。上方所列為引子名稱與相對位置，F 表示 forward primer，R 表示 reverse primer，括弧內之數字表示引子序列在登革二型病毒 NGC strain 序列上的相對位置。



圖四、以限制酵素反應修正感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q 之缺失突變

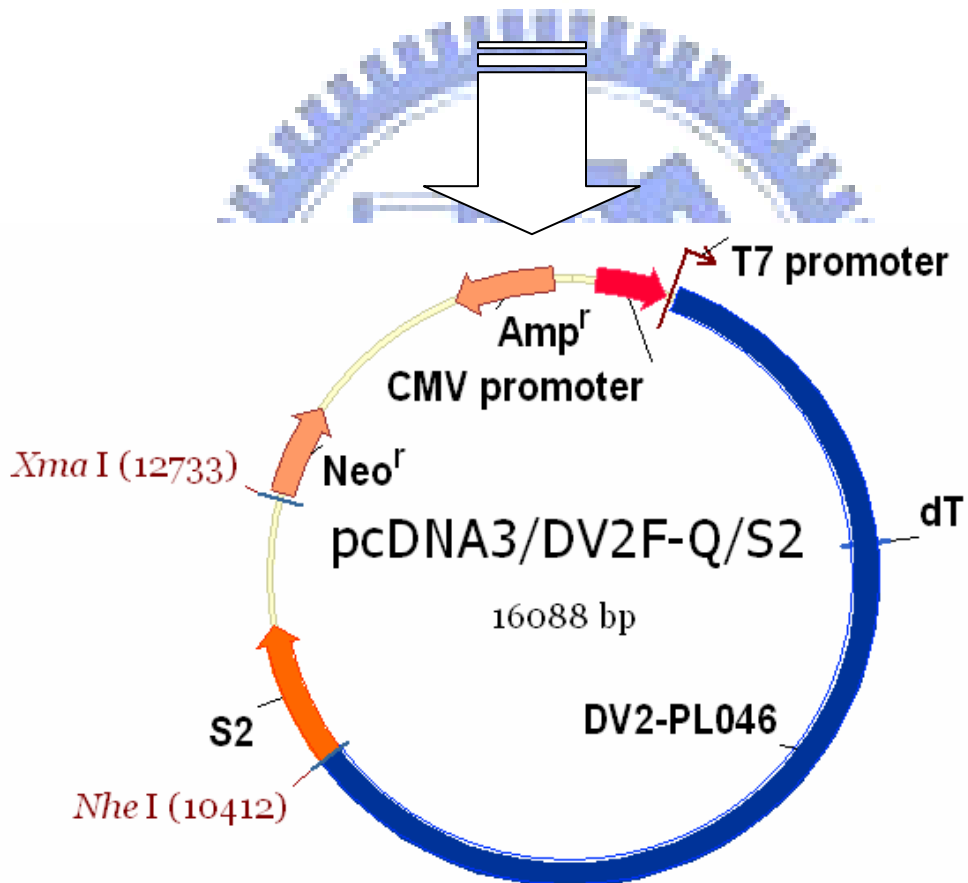
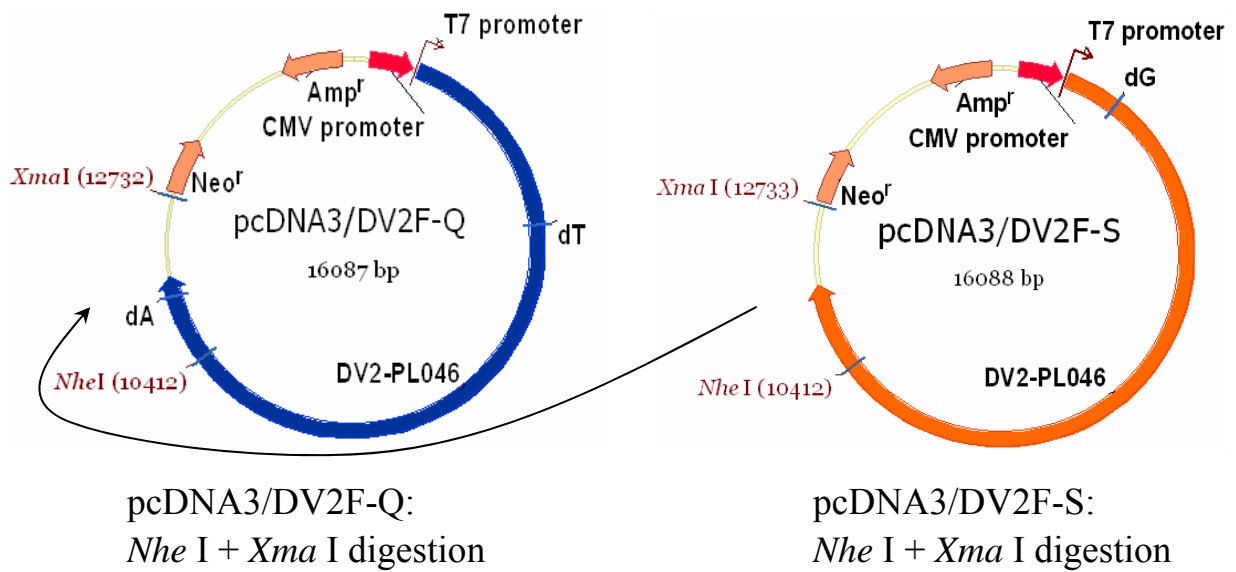
紅點代表 pcDNA3/DV2F-Q 的缺失突變位置；*Nhe* I 及 *Xma* I 為接合 S2 片段所使用；*Hpa* I 為接合 S1 片段所使用；*Xma* I 為 pcDNA3 (nt2091) 上之切位。

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132



圖五、pcDNA3/DV2F-Q/S2 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

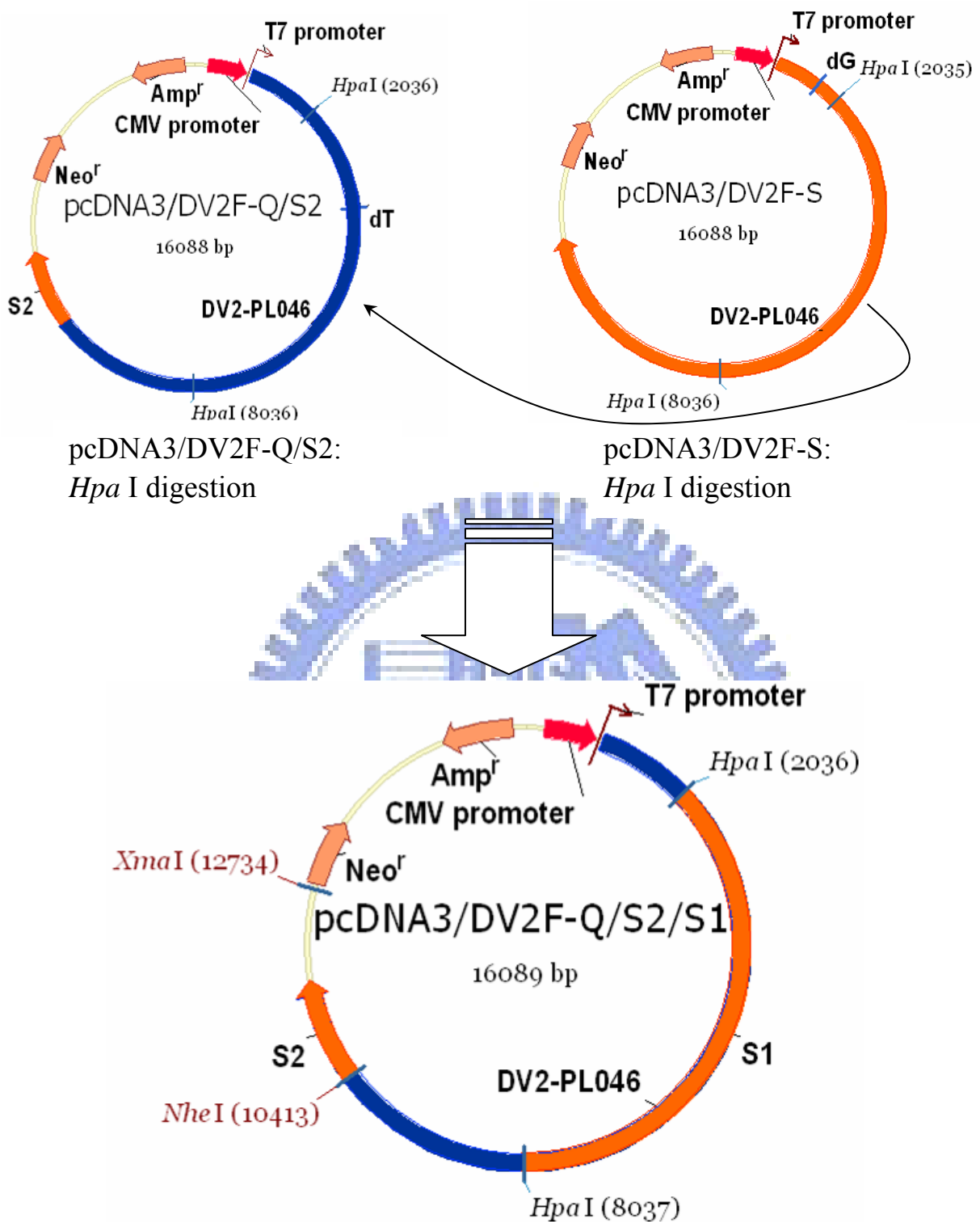
F : Full length cDNA

dT : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt2820 的 T 缺失突變

dA : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt10449 的 A 缺失突變

dG : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt737 的 G 缺失突變

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723



圖六、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

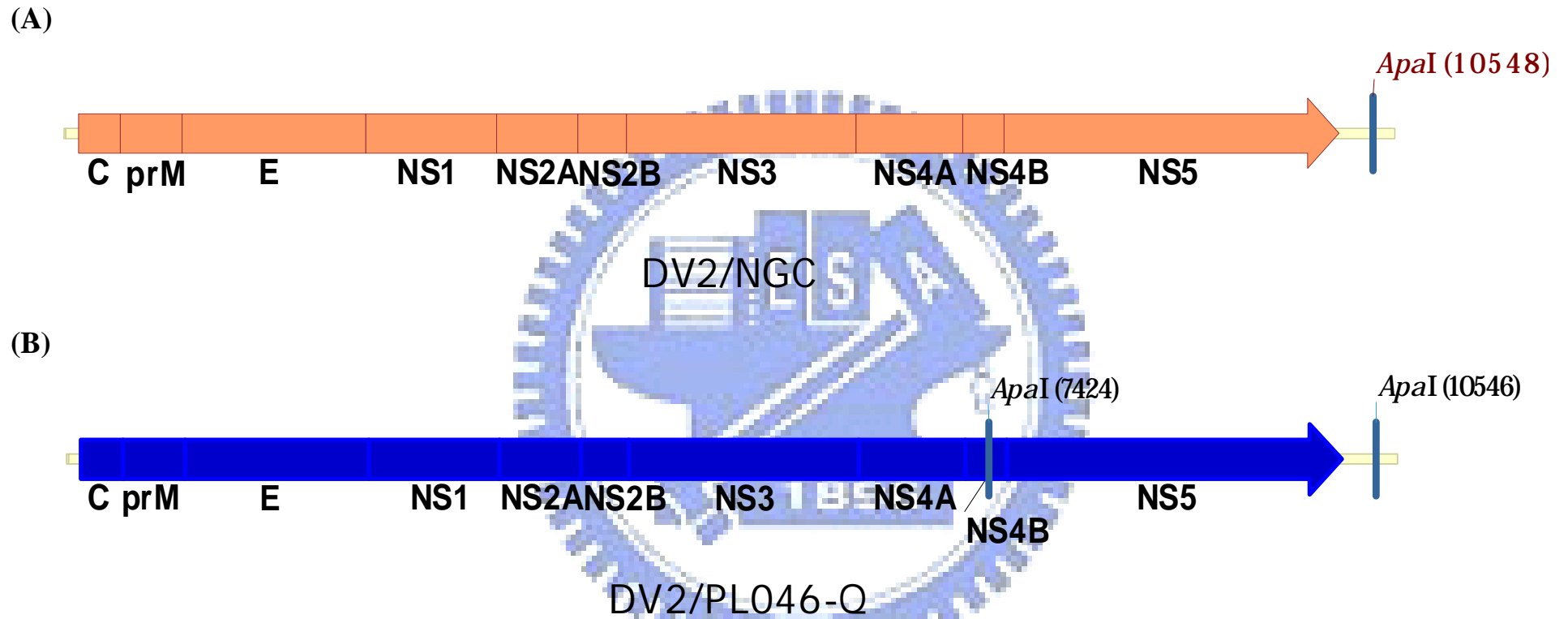
F : Full length cDNA

dT : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt2820 的 T 缺失突變

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

dG : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt737 的 G 缺失突變

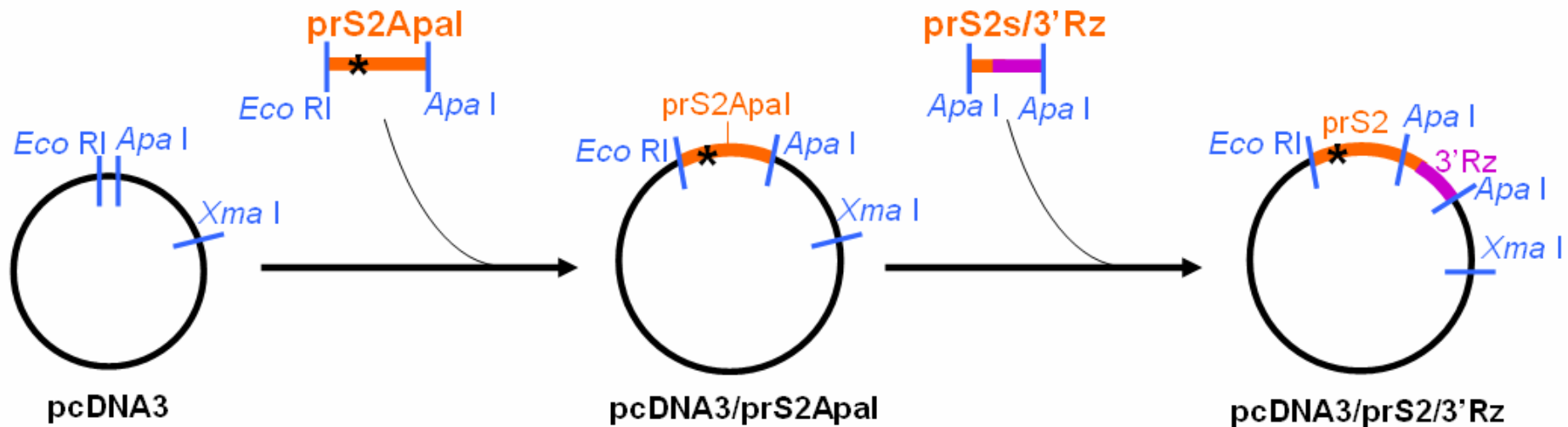
S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132



圖七、登革二型病毒 NGC strain 與 PL046 strain 的 *Apa I* 限制切位對照

DV2/NGC : Dengue virus 2 NGC strain (M29095, NCBI)

DV2/PL046-Q : Dengue virus 2 PL046 strain , 序列來源為 pcDNA3/DV2F-Q 之定序結果



圖八、登革病毒基因 3 端序列接合 3'-ribozyme 序列示意圖

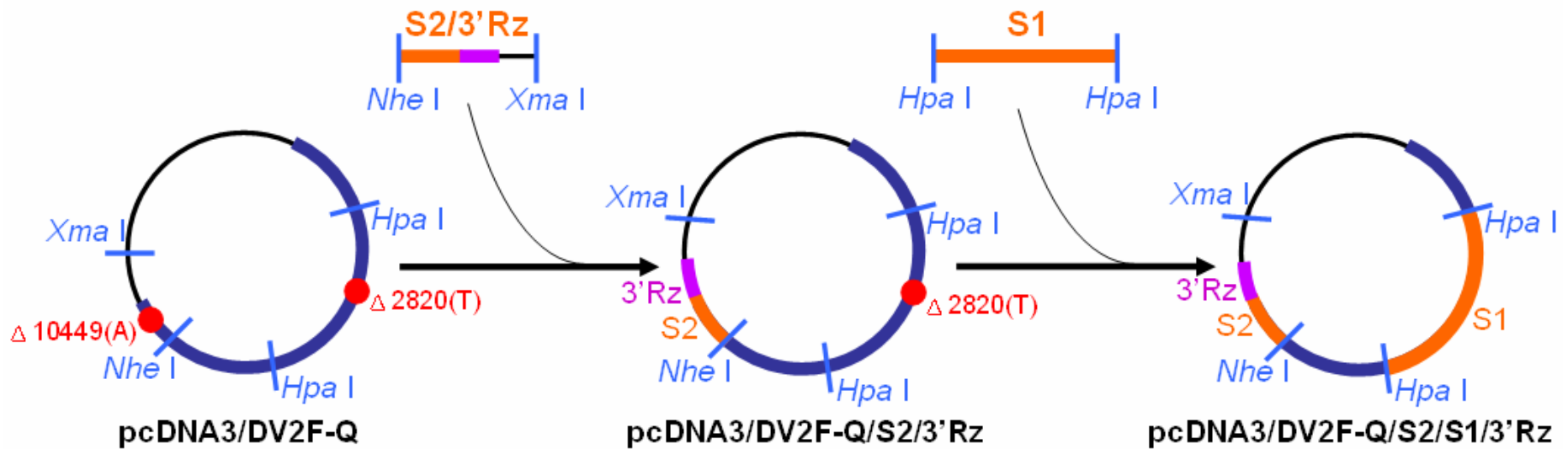
*Eco*RI、*Apa*I 及 *Xma*I 為 pcDNA3 (nt939、nt994 及 nt2091) 上之切位；黑色星號為引入的 *Nhe*I 單一切位；*Eco*RI 及 *Apa*I 為接合 *prS2**Apa*I 片段所使用；*Nhe*I 及 *Xma*I 為之後將片段剪接至感染性質體所使用。

*prS2**Apa*I：pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt 8762 ~ nt 10547，3 端有 *Apa*I 切位

prS2s/3'Rz：pGEM-T/DV2-3'Rz 的登革基因序列 nt10548 ~ nt10723，下游有 3'-ribozyme 序列

prS2：pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 n8762 ~ nt10723

3'Rz：3'-ribozyme 序列



圖九、以限制酵素反應修正感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q 之缺失突變，同時引入 3'-ribozyme 序列

紅點代表 pcDNA3/DV2F-Q 的缺失突變位置；*Nhe* I 及 *Xma* I 為接合 S2/3'Rz 片段所使用；*Hpa* I 為接合 S1 片段所使用；*Xma* I 為 pcDNA3 (nt2091) 上之切位。

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

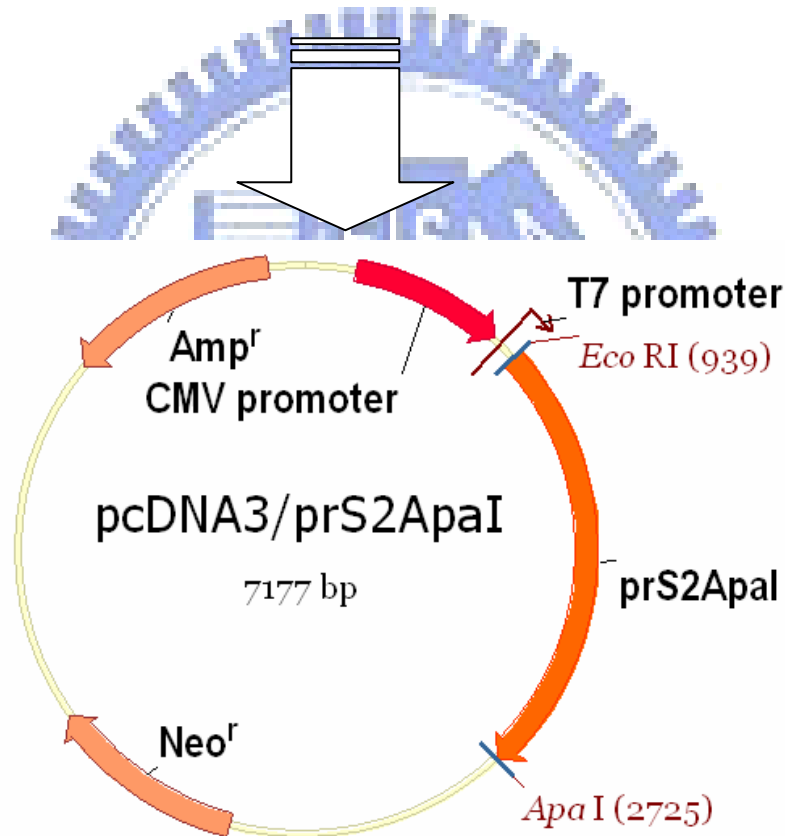
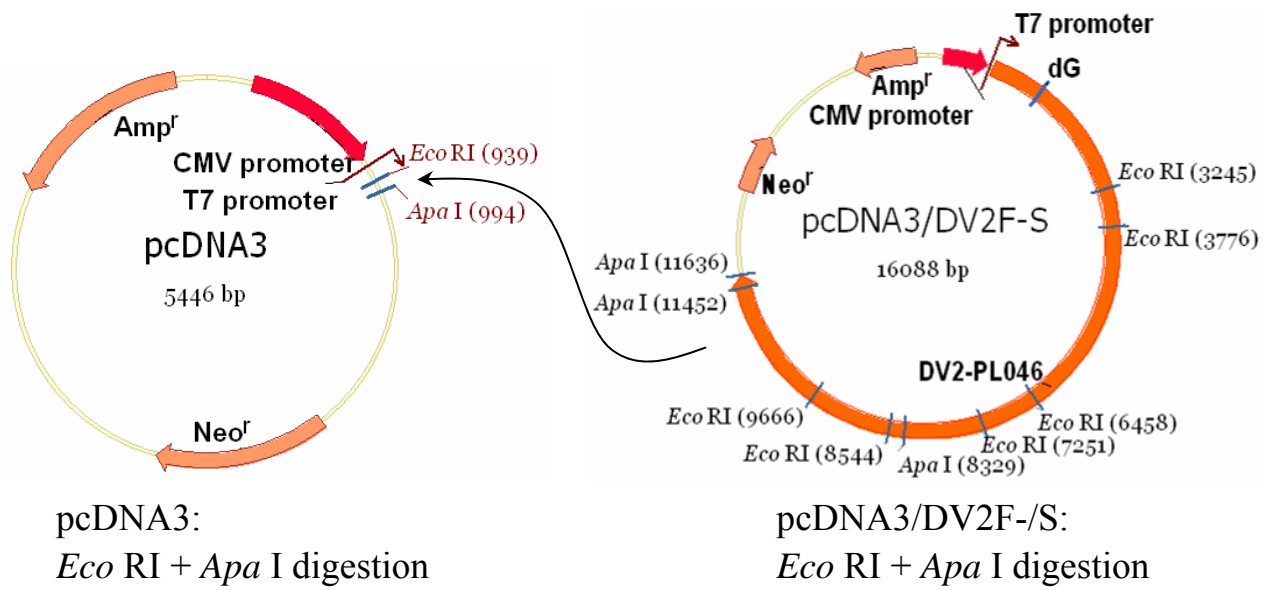
F : Full length cDNA

S2/3'Rz : pcDNA3/prS2/3'Rz 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723，下游有 3'-ribozyme 序列

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

3'Rz : 3'-ribozyme 序列

S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132



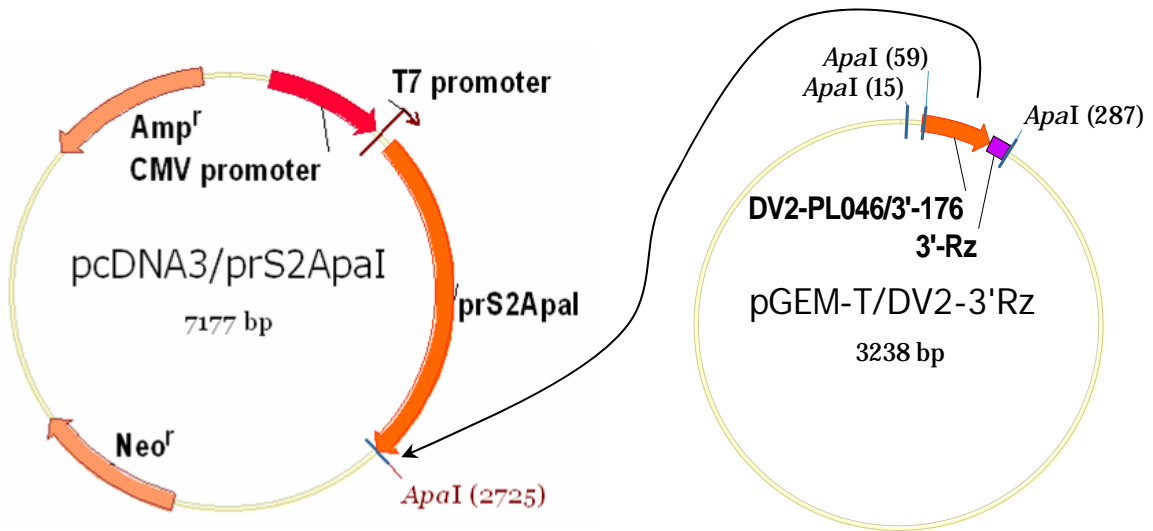
圖十、pcDNA3/prS2ApaI 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

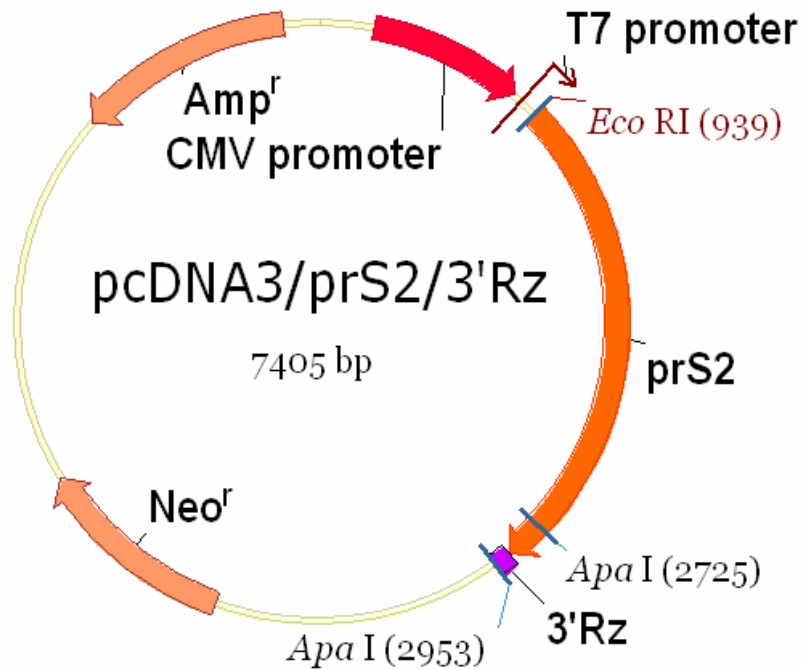
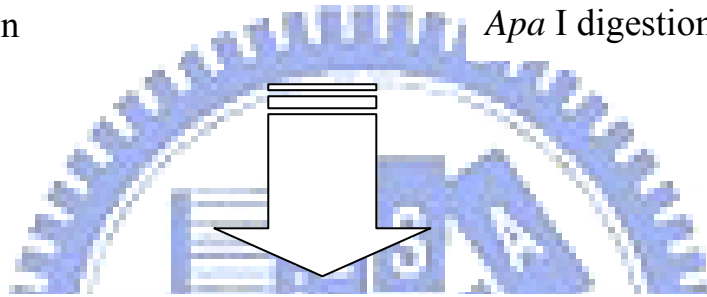
dG : pcDNA3/DV2F-S 位於 nt737 的 G 缺失突變

prS2ApaI : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt 8762 ~ nt 10547 , 3 端有 Apa I 切位



pcDNA3/prS2ApaI:
Apa I digestion

pGEM-T/DV2-3'Rz:
Apa I digestion



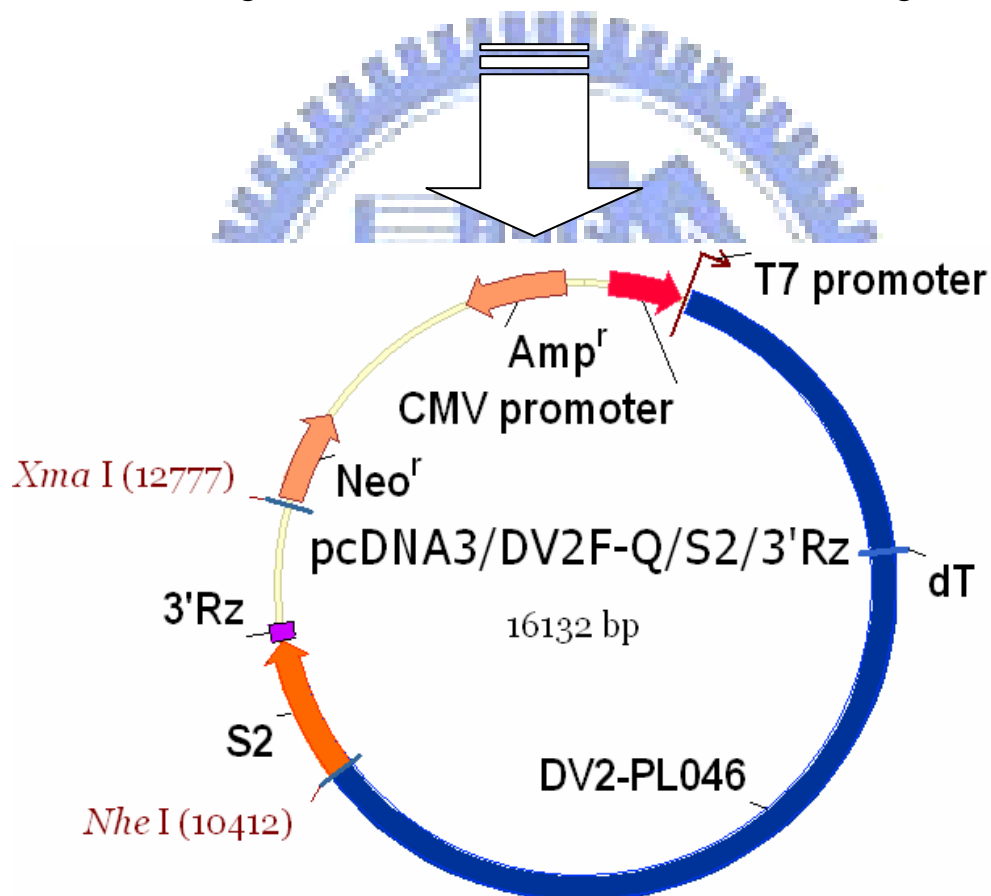
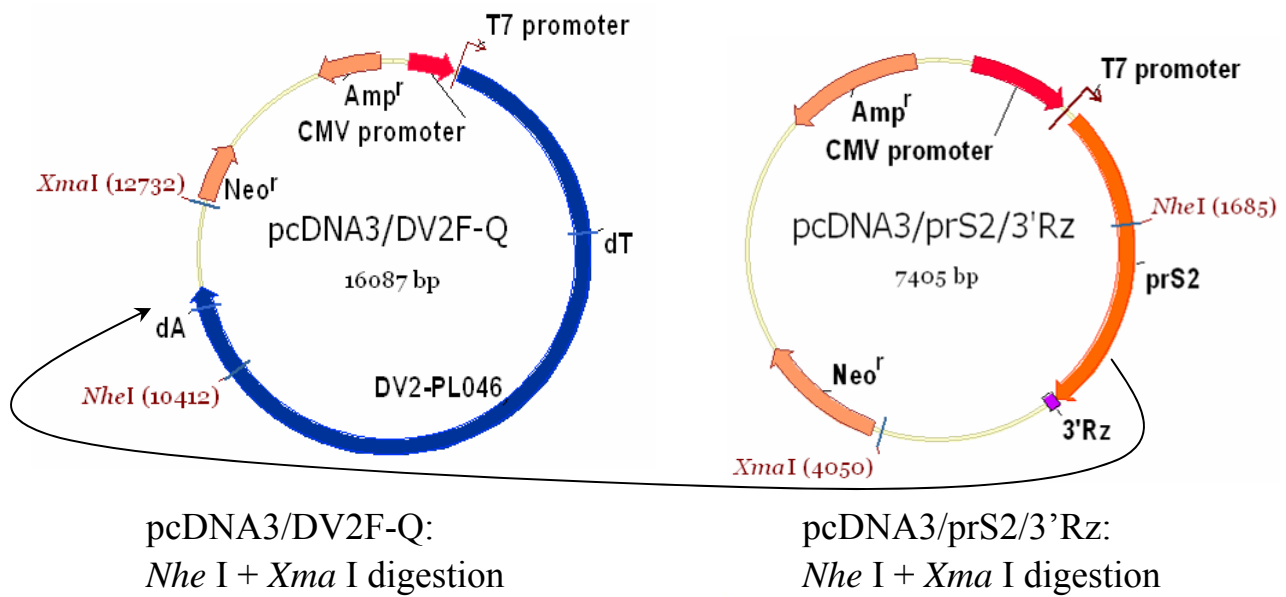
圖十一、pcDNA3/prS2/3'Rz 質體建構

prS2ApaI : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt 8762 ~ nt 10547 ,
3 端有 Apa I 切位

prS2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 n8762 ~ nt10723

DV2-PL046/3'-176 : 登革基因 3'UTR 尾端序列 176 bp

3'Rz : 3'-Ribozyme 序列



圖十二、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

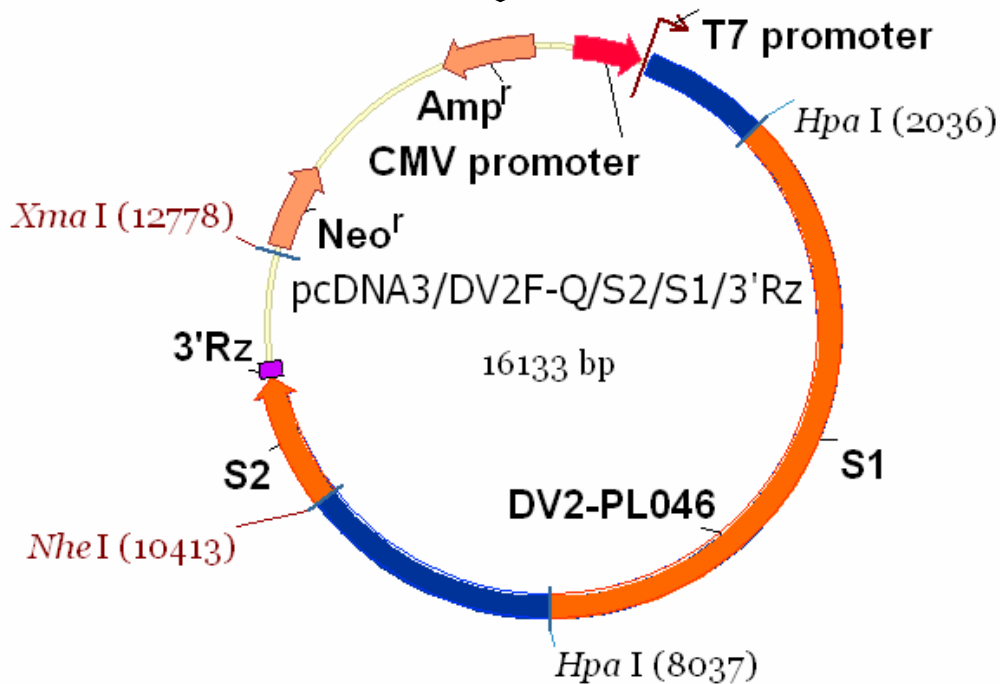
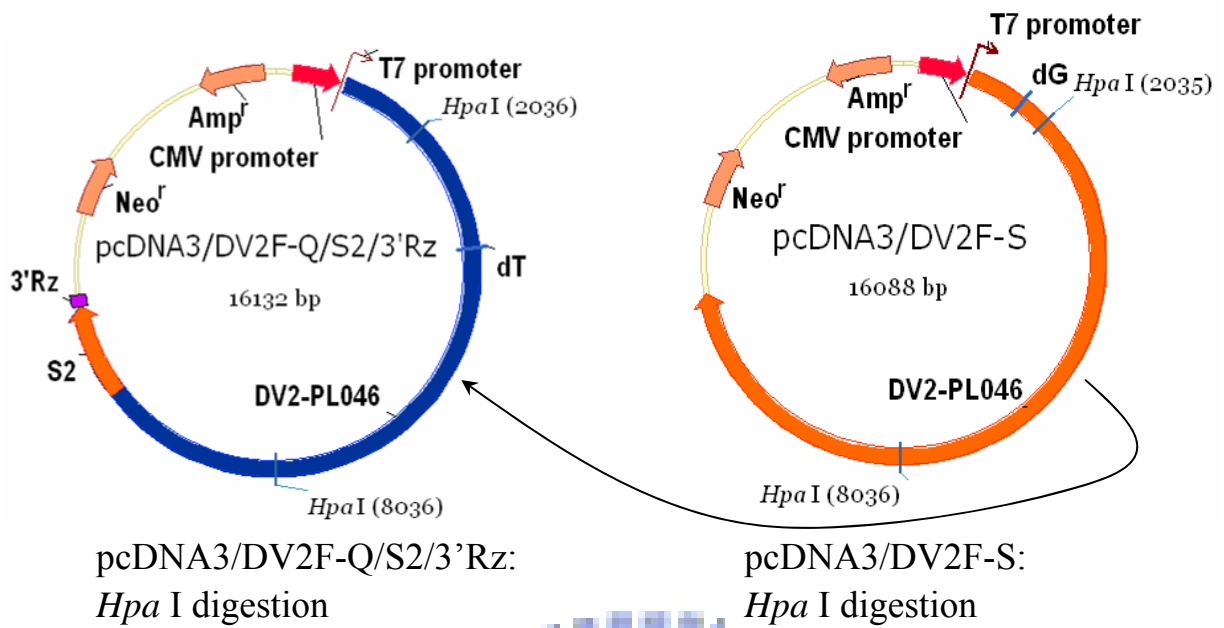
dT : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt2820 的 T 缺失突變

dA : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt10449 的 A 缺失突變

prS2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 n8762 ~ nt10723

3'Rz : 3'-Ribozyme 序列

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723



圖十三、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

dT : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt2820 的 T 缺失突變

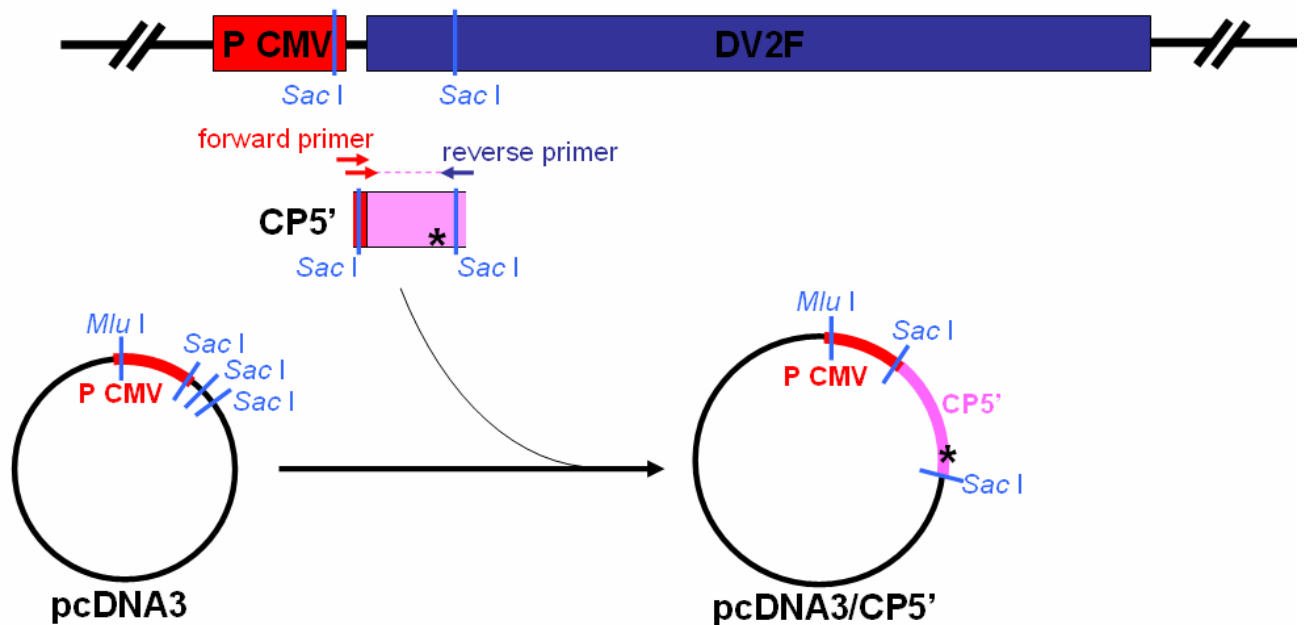
S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

3'Rz : 3'-Ribozyme 序列

dG : pcDNA3/DV2F-Q 位於 nt737 的 G 缺失突變

S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132

pcDNA3/DV2F-Q



圖十四、pcDNA3/CP5'質體建構流程示意圖

pcDNA3/DV2F-Q 為第一次 PCR 反應的模板；兩個紅色箭頭代表正向引子 CP-f1 及 CP-f2；藍色箭頭代表反向引子 CP-r；*Sac* I 為 pcDNA3 接入 CP5' 片段所使用；*Mlu* I 為 pcDNA3 (nt229) 上之切位；黑色星號為引入的 *Bst* EII 切位；*Mlu* I 與 *Bst* EII 為之後將片段剪接至感染性質體所使用。以連續兩次的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR)，藉由引子與模板間之部分互補及部分延伸序列，使放大出的登革病毒基因片段 5 端延長出 CMV 啟動子序列，直到 CMV 啟動子上之 *Sac* I 切位，製作出 CP5' 片段，再以片段兩端之 *Sac* I 切位將片段接入 pcDNA3，建構出 pcDNA3/CP5' 質體。第一次 PCR 反應時，模板為 pcDNA3/DV2F-Q，正向引子為 CP-f1，反向引子為 CP-r；第二次 PCR 反應時，以 2 μ l 的第一次 PCR 反應產物為模板，正向引子為 CP-f2，反向引子為 CP-r。目的是使登革病毒基因的 5 端延長出 CMV 啟動子序列，產生的 CP5' 片段接回 pcDNA3 後，方可去除感染性質體登革基因的 5 端上游序列，讓 CMV 啟動子轉錄起始點成為登革基因的第一個核苷酸。

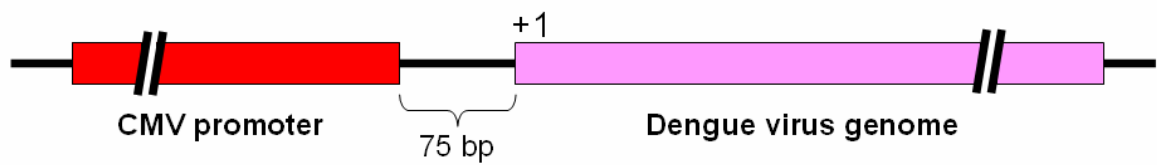
DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

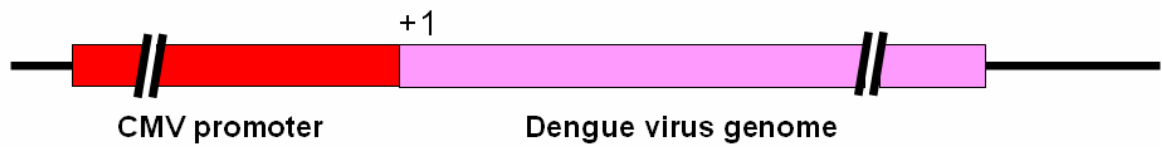
P CMV : CMV 啟動子

CP5' : CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸 (請參照圖十五)

pcDNA3/DV2F-Q



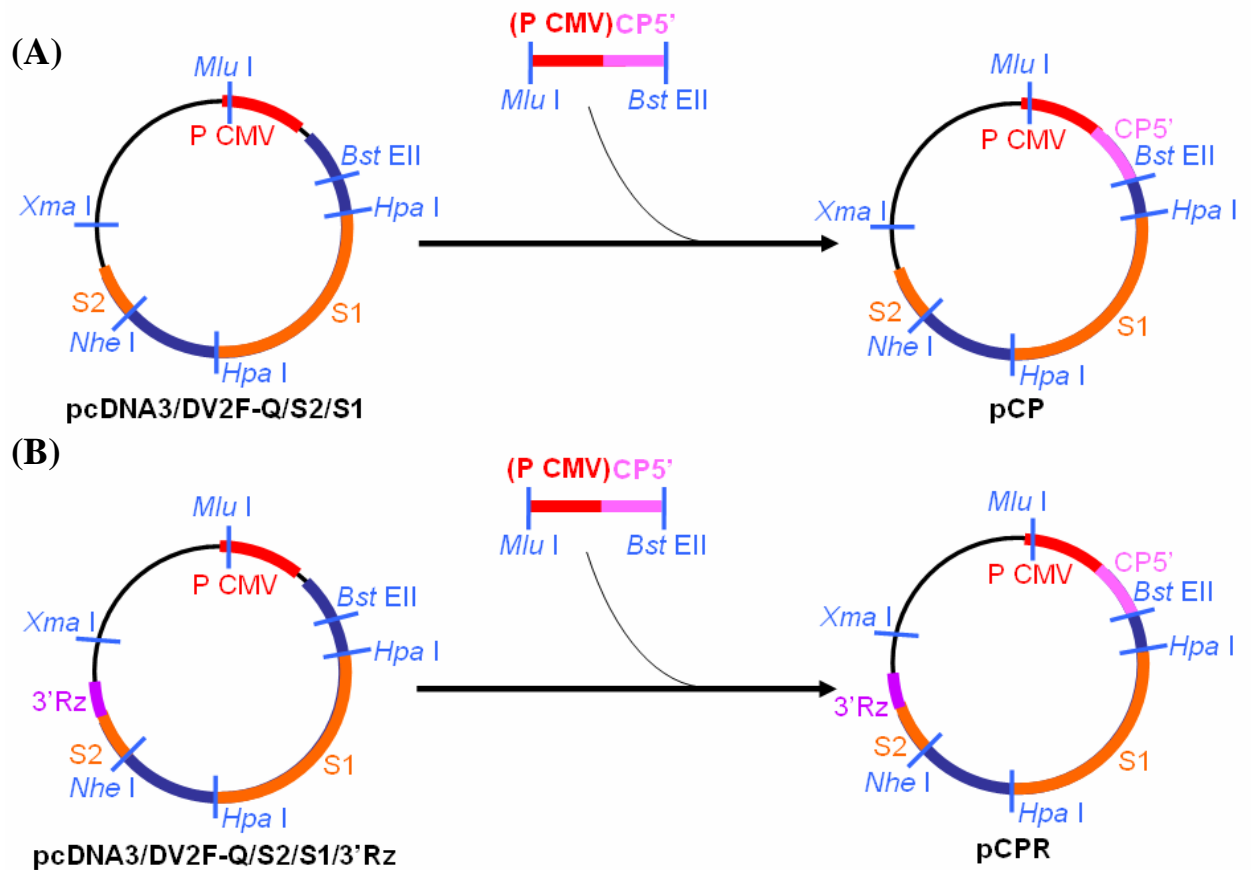
pcDNA3/CP5'



圖十五、CP5'片段示意圖

CP5'片段，是將原感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q 的 5 端多出序列修正後，使得 CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸。

+1: DV genome 的第一個核苷酸



圖十六、以 CP5' 片段修正感染性質體登革基因 5 端序列示意圖

pcDNA3/CP5' 以 *Mlu* I 及 *Bst* EII 處理後，將帶有部份 CMV 啟動子序列的 CP5' 片段切出，接合至以相同限制酵素處理之感染性質體 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 及 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz，建構出登革基因 5 端序列修正之質體 pCP 及 pCPR。

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length cDNA

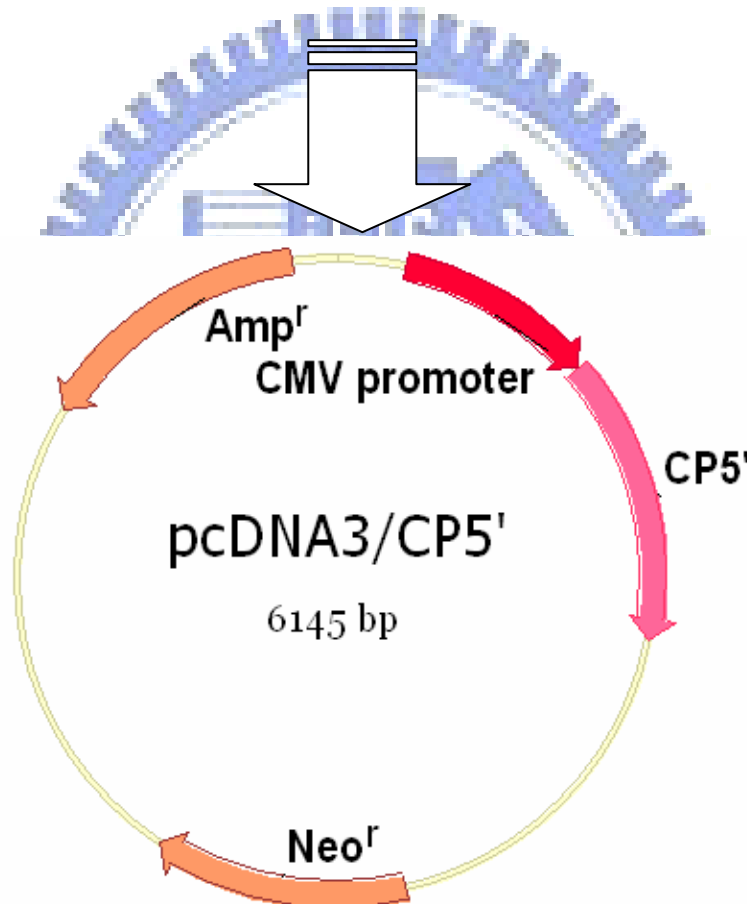
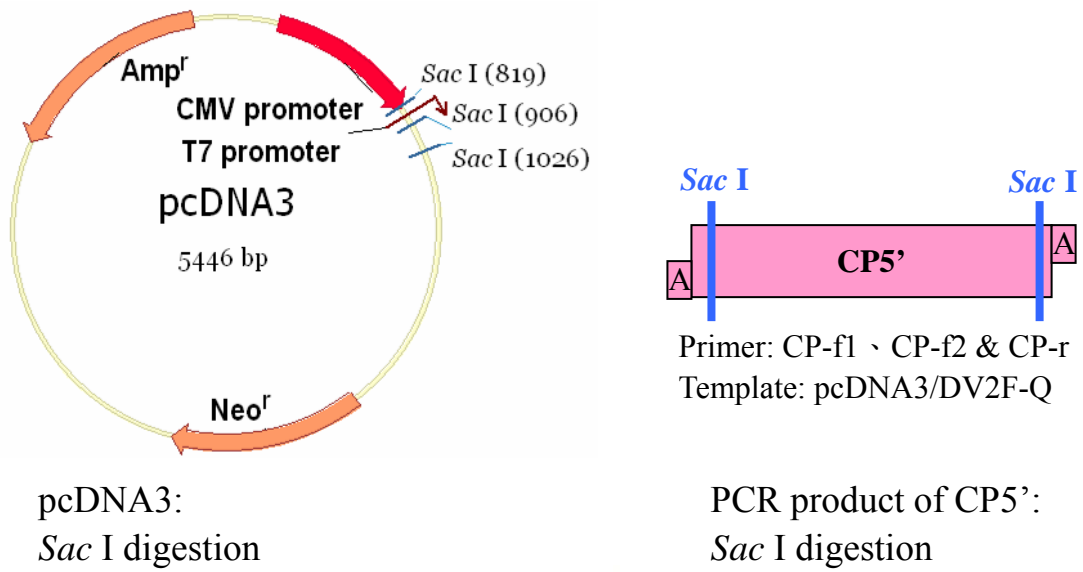
P CMV : CMV 啟動子

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132

3'Rz : 3'-Ribozyme 序列

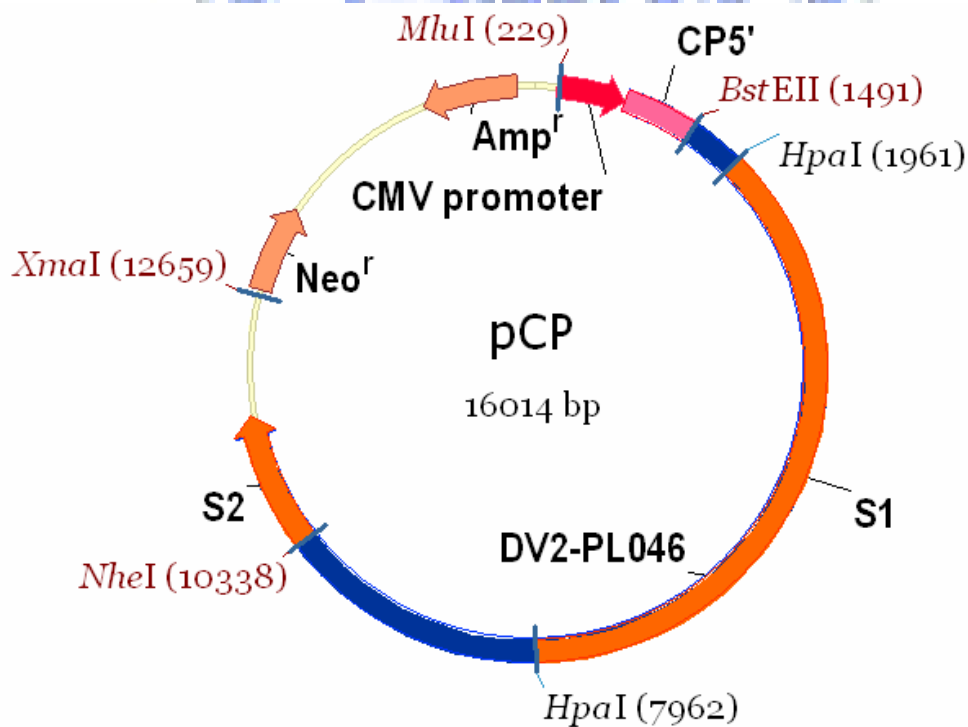
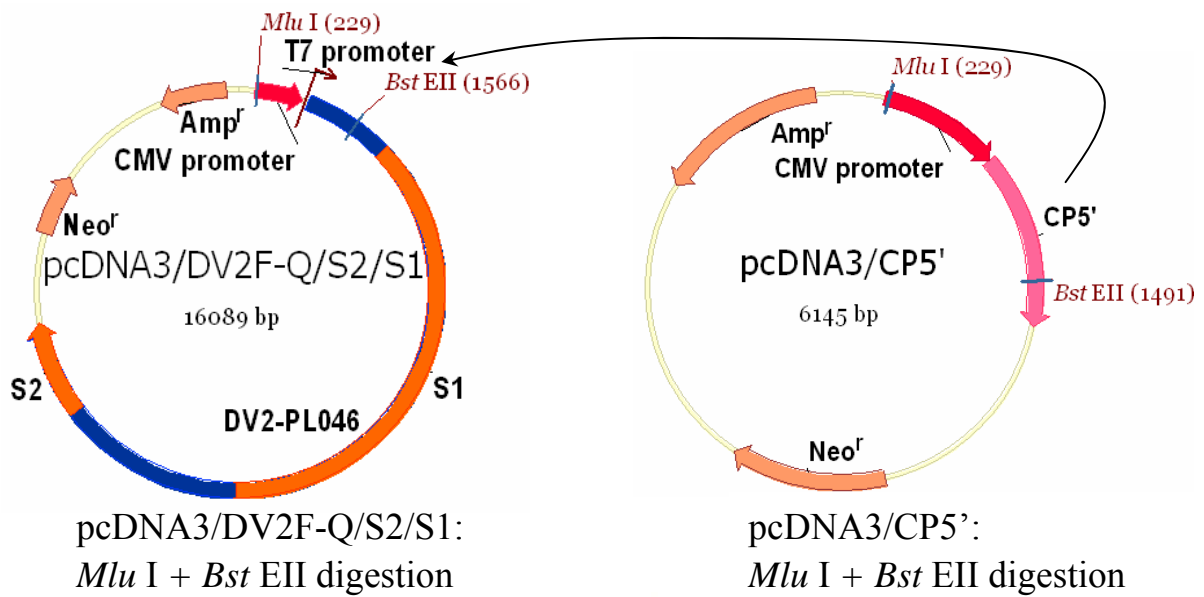
CP5' : CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸 (請參照圖十五)



圖十七、pcDNA3/CP5'質體建構

將連續兩次聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR) 產生的 CP5' 片段, 利用 *Sac* I 切位將片段接入 pcDNA3, 建構出 pcDNA3/CP5' 質體。CP-f1 及 CP-f2 為正向引子; CP-r 為反向引子; 模板為 pcDNA3/DV2F-Q。

CP5': CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸 (請參照圖十五)



圖十八、pCP 質體建構

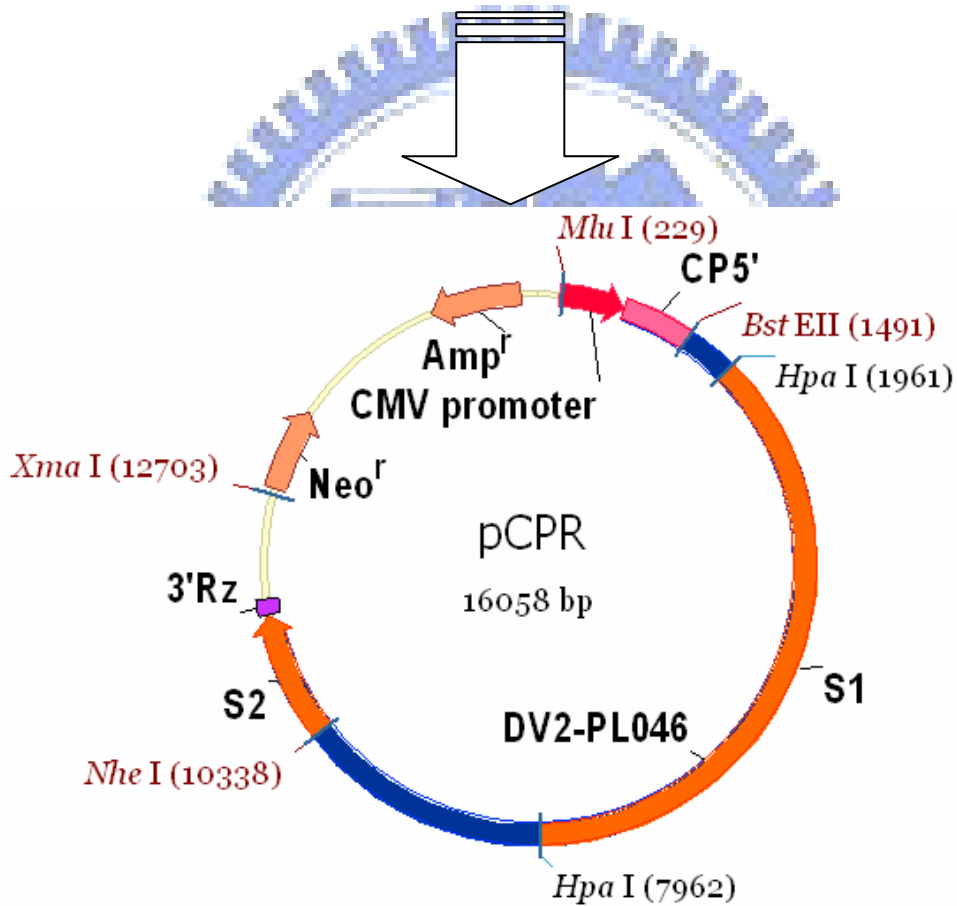
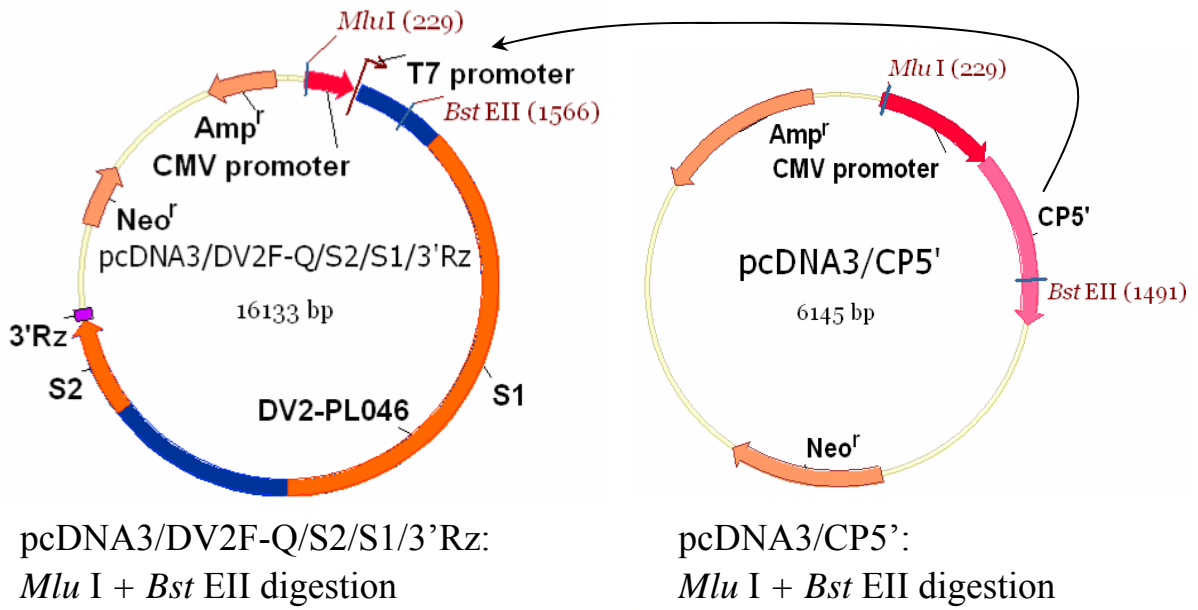
DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

F : Full length Cdna

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132

CP5' : CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸(請參照圖十五)



圖十九、pCPR 質體建構

DV2 : Dengue virus 2 PL046 strain

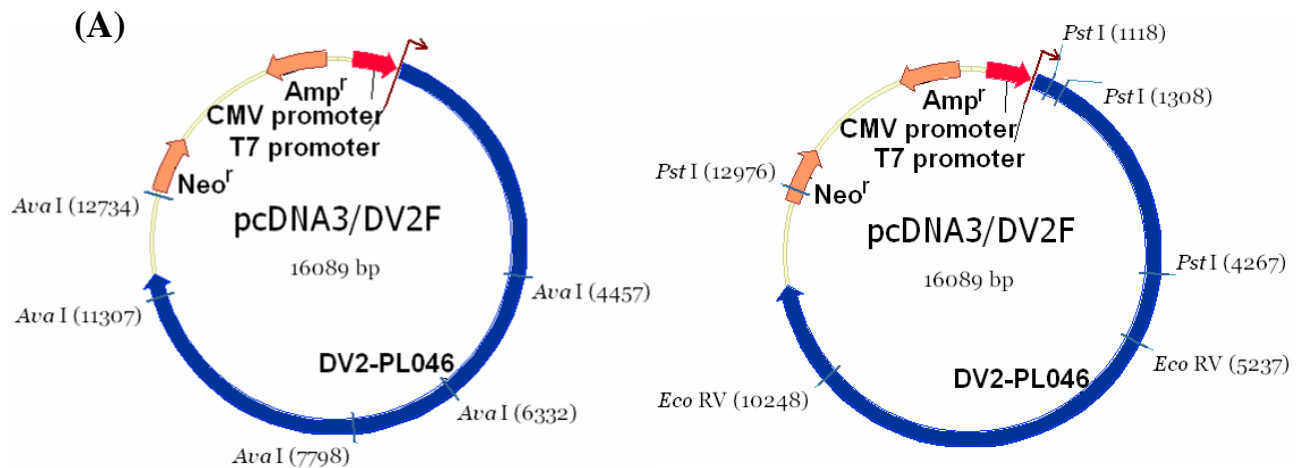
F : Full length Cdna

S2 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因 3 端序列 nt 9508 ~ nt 10723

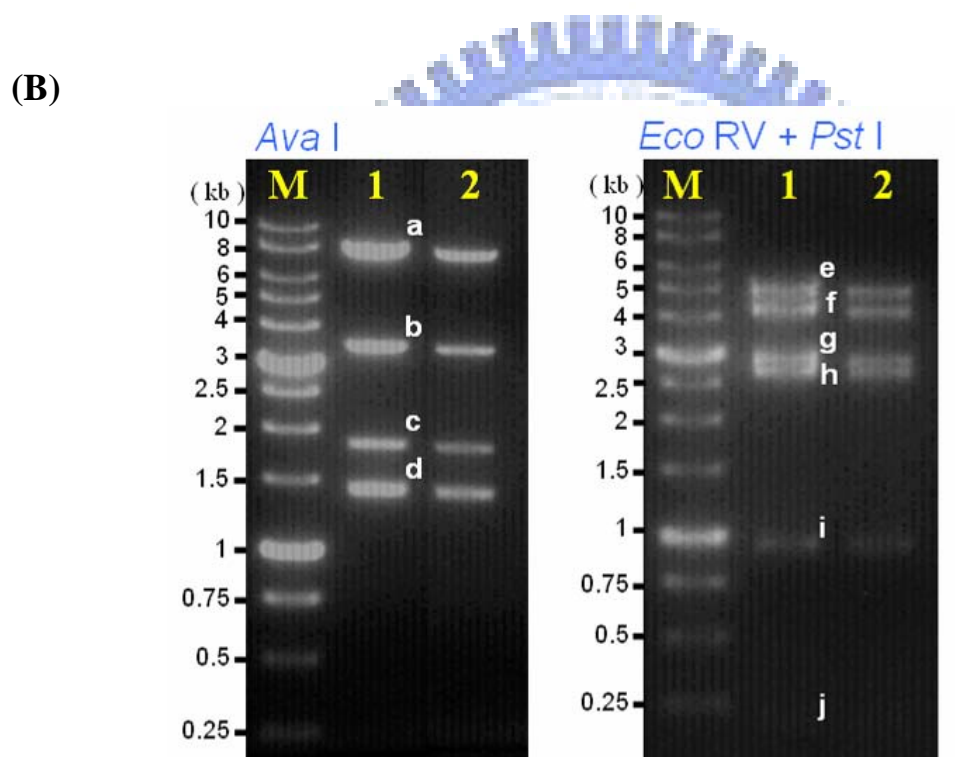
S1 : pcDNA3/DV2F-S 的登革基因序列 nt1131 ~ nt7132

3'Rz : 3'-Ribozyme 序列

CP5' : CMV 啟動子的轉錄起始點為登革基因第一個核苷酸(請參照圖十五)

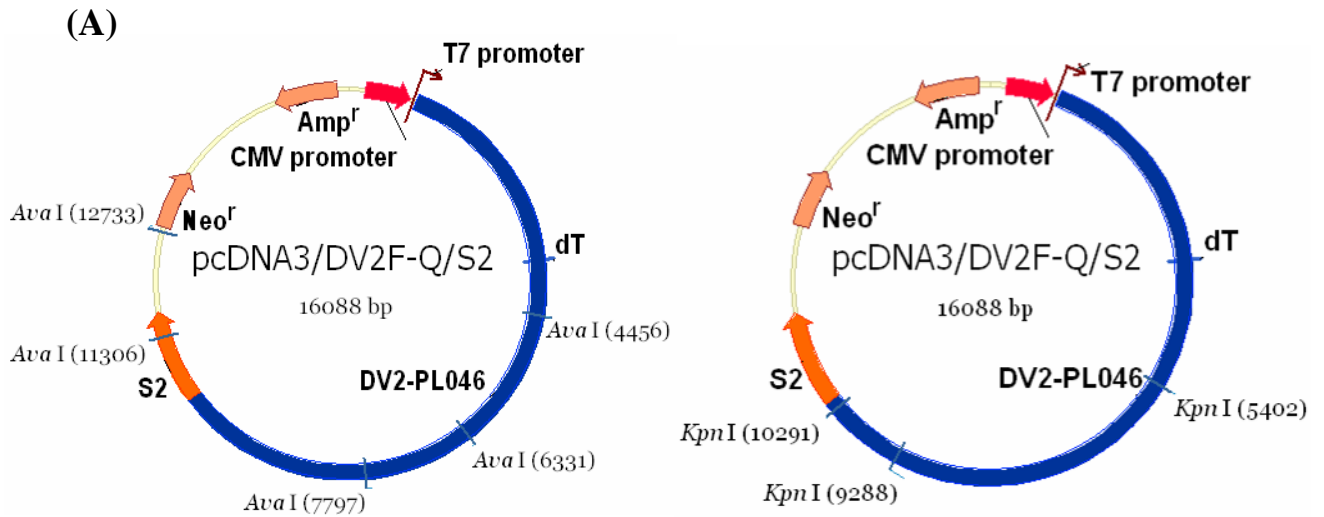


圖二十(A)、pcDNA3/DV2F 經 *Ava I* 或 *Eco RV* + *Pst I* 限制酵素作用位置圖

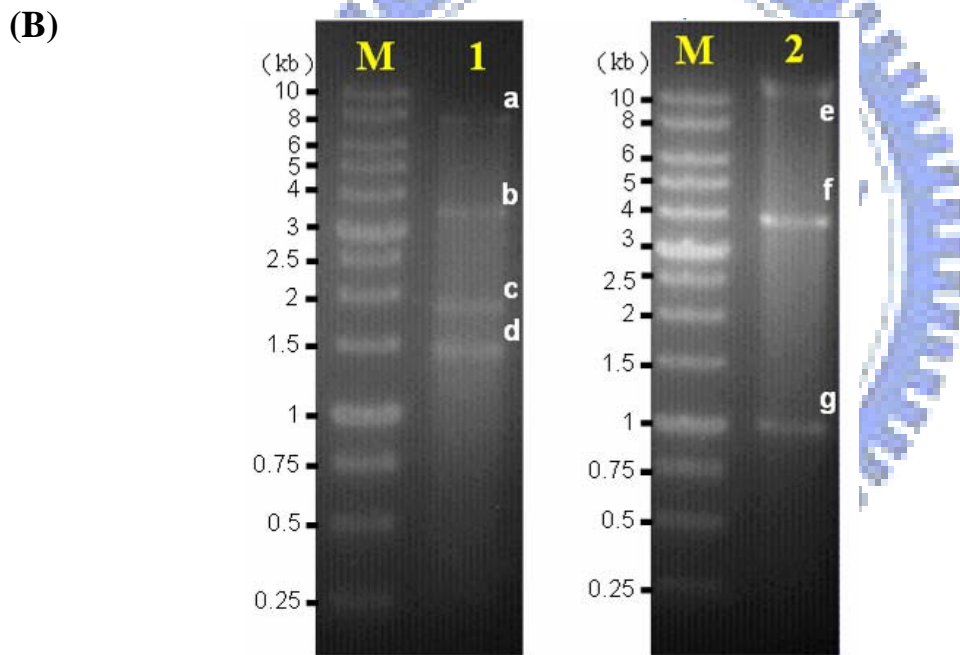


圖二十(B)、pcDNA3/DV2F 經 *Ava I* 或 *EcoRV* + *Pst I* 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/DV2F 經 *Ava I* 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d. d 包含 1.5 及 1.4 kb 片段)，左圖；經 *EcoRV* 及 *Pst I* 作用後，預期可以得到 5.0、4.2、3.0、2.7、1.0 及 0.2 kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, h, i & j)，右圖。Lane 1 是 clone Q；Lane 2 是 clone S；Lane M 表示 marker。

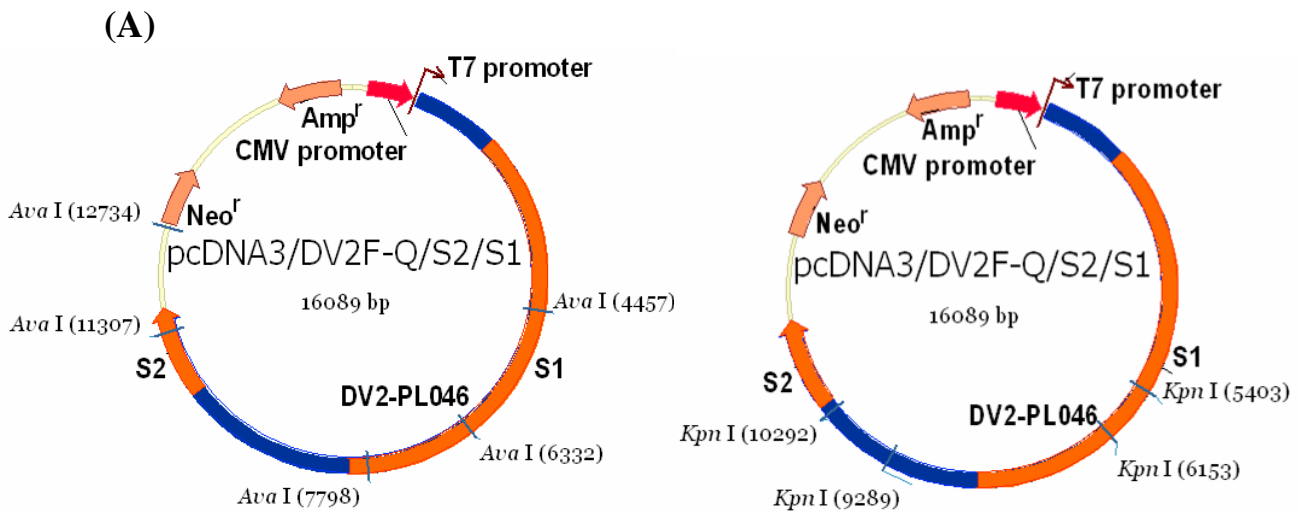


圖二十一(A)、pcDNA3/DV2F-Q/S2 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用位置圖

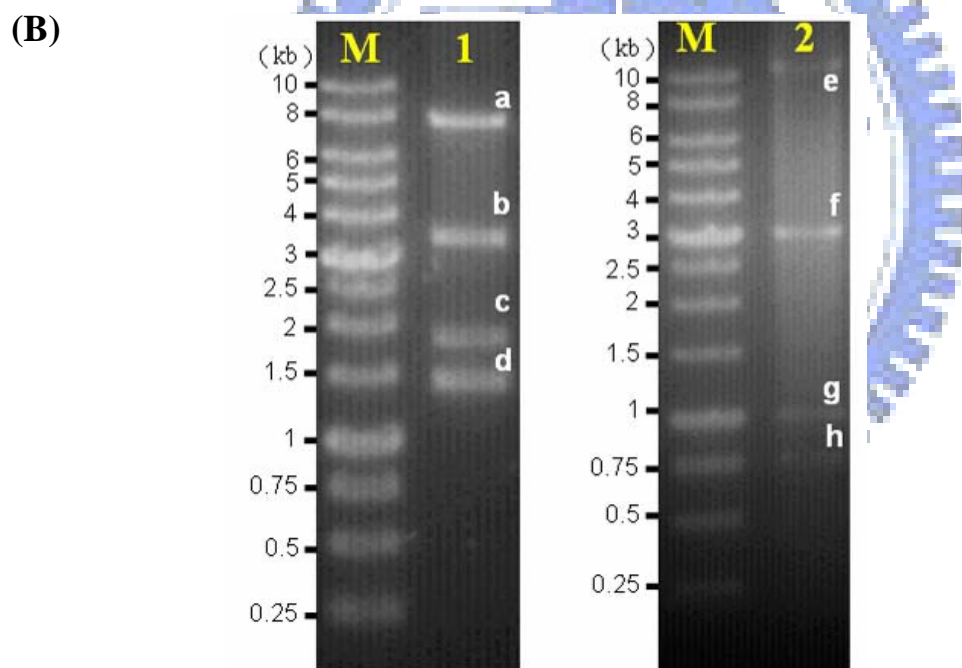


圖二十一(B)、pcDNA3/DV2F-Q/S2 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/DV2F-Q/S2 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d. d 包含 1.5 及 1.4 kb 片段)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 11、3.9 及 1.0 kb 之 DNA 片段 (band e, f & g)。Lane 1 是質體經 *Ava* I 作用；Lane 2 是質體經 *Kpn* I 作用；Lane M 表示 marker。

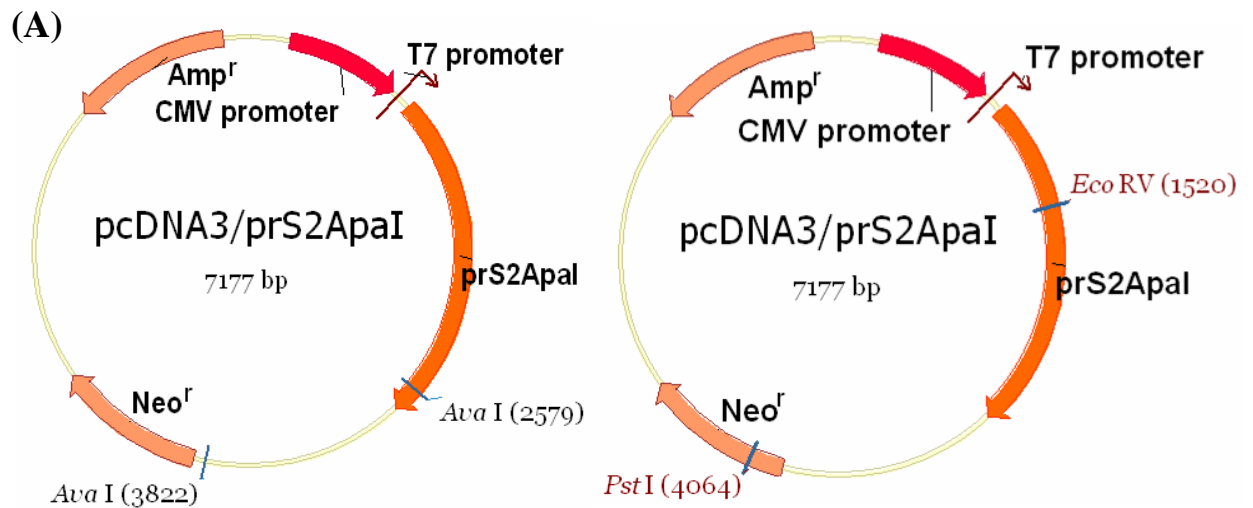


圖二十二(A)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用位置圖

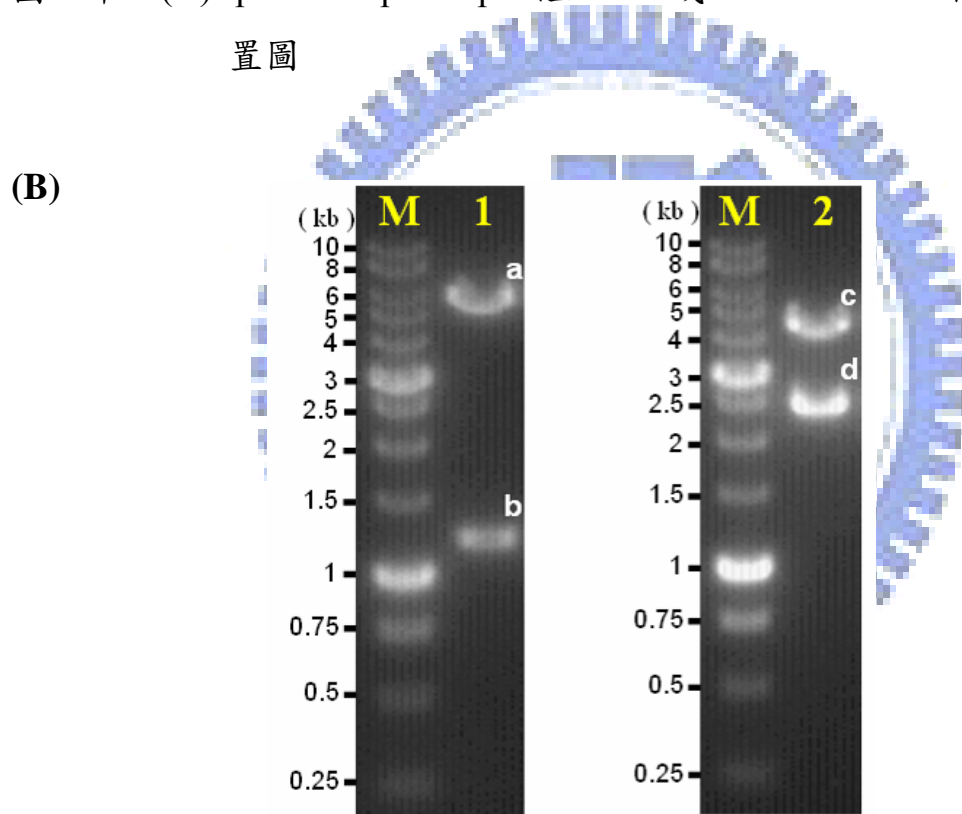


圖二十二(B)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d. d 包含 1.5 及 1.4 kb 片段)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 11、3.1、1.0 及 0.75 kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, & h)。Lane 1 是質體經 *Ava* I 作用；Lane 2 是質體經 *Kpn* I 作用；Lane M 表示 marker。

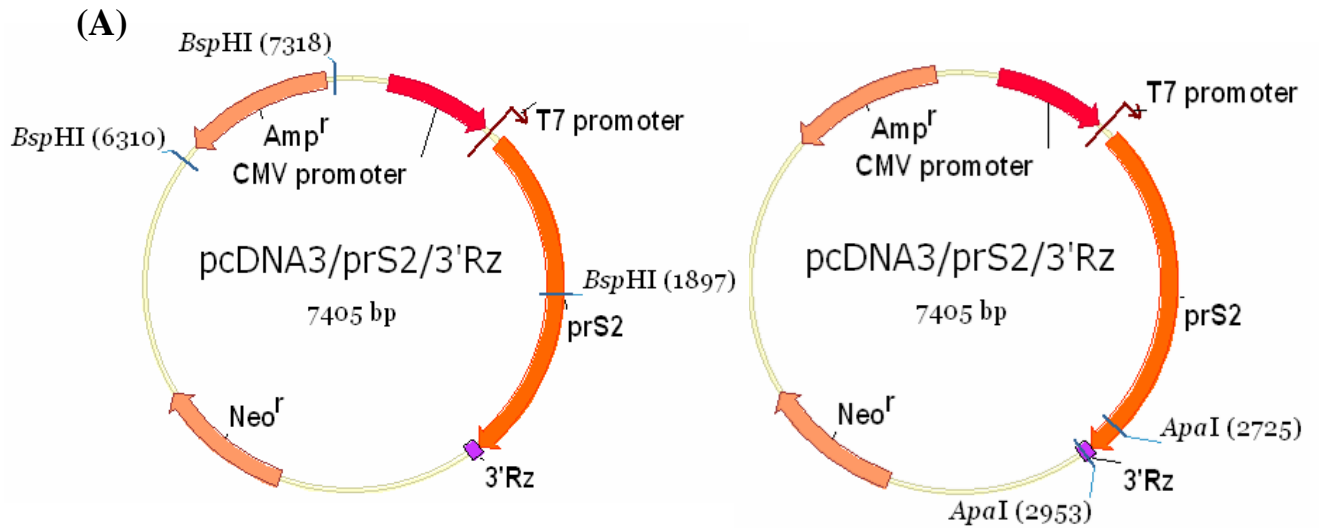


圖二十三(A)、pcDNA3/prS2ApaI 經 *Ava I* 或 *Eco RV* + *Pst I* 限制酵素作用位置圖

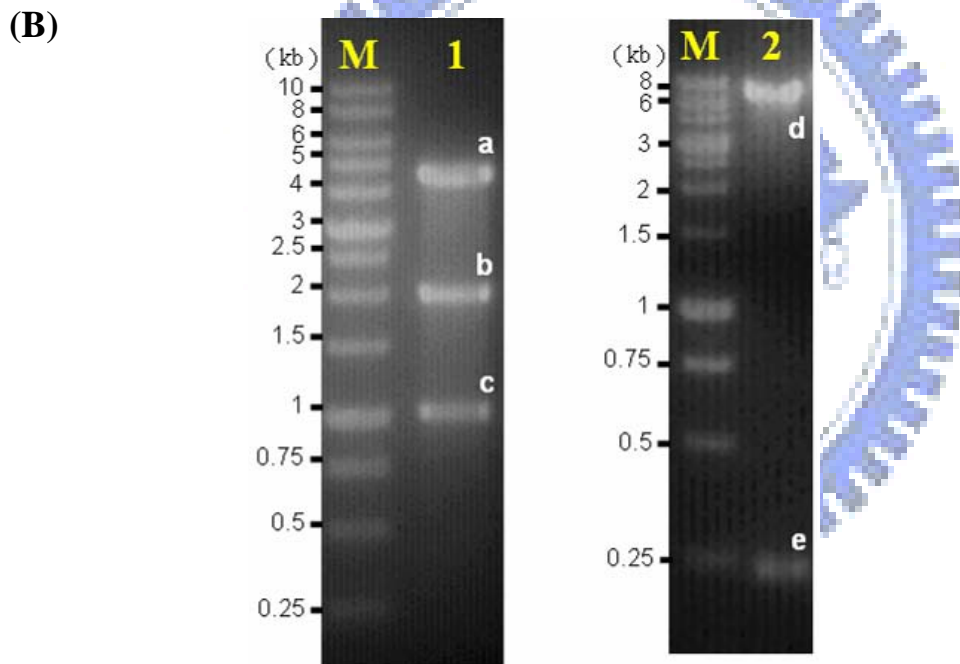


圖二十三(B)、pcDNA3/prS2ApaI 經 *Ava I* 或 *Eco RV* + *Pst I* 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/prS2ApaI 經 *Ava I* 作用後，預期可以得到 5.9 及 1.2 kb 之 DNA 片段 (band a & b)；經 *Eco RV* + *Pst I* 作用後，預期可以得到 4.6 及 2.5 kb 之 DNA 片段 (band c & d)。Lane 1 是質體經 *Ava I* 作用；Lane 2 是質體經 *Eco RV* + *Pst I* 作用；Lane M 表示 marker。

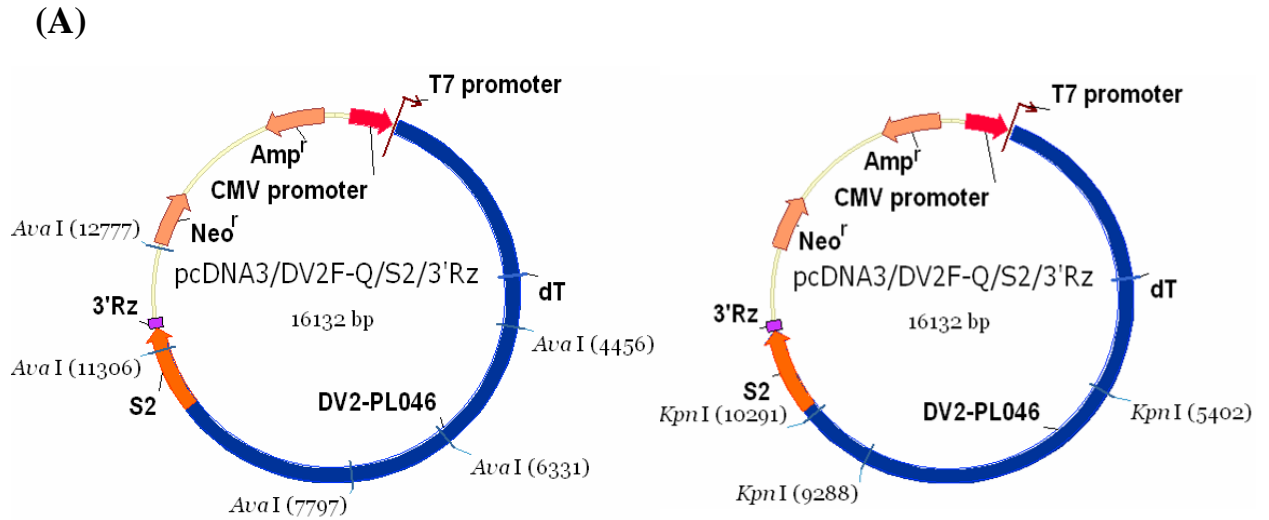


圖二十四(A)、pcDNA3/prS2/3'Rz 經 *Bsp* HI 或 *Apa* I 限制酵素作用位置圖

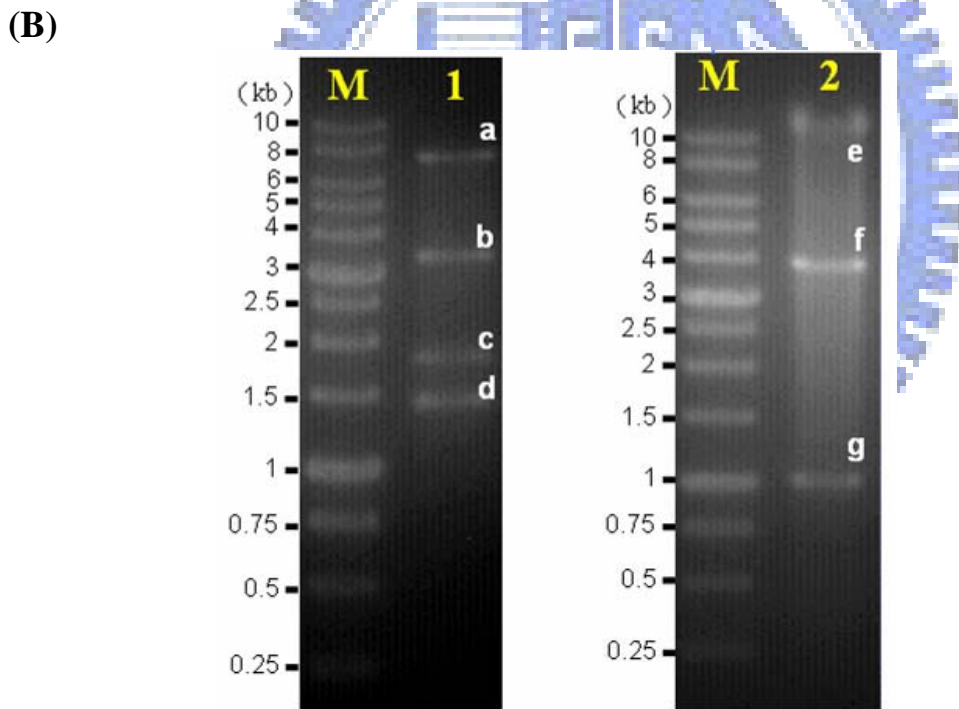


圖二十四(B)、pcDNA3/prS2/3'Rz 經 *Bsp* HI 或 *Apa* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/prS2/3'Rz 經 *Bsp* HI 作用後，預期可以得到 4.4、2.0 及 1.0 kb 之 DNA 片段(band a, b & c)；經 *Apa* I 作用後，預期可以得到 7.2 及 0.23 kb 之 DNA 片段 (band d & e)。Lane 1 是質體經 *Bsp* HI 作用；Lane 2 是質體經 *Apa* I 作用；Lane M 表示 marker。

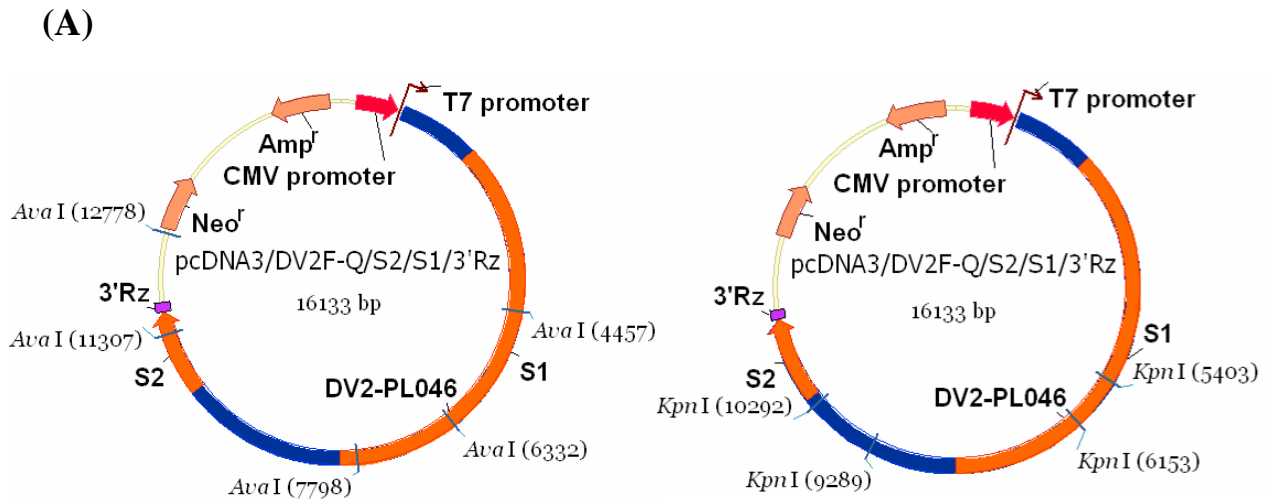


圖二十五(A)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用位置圖

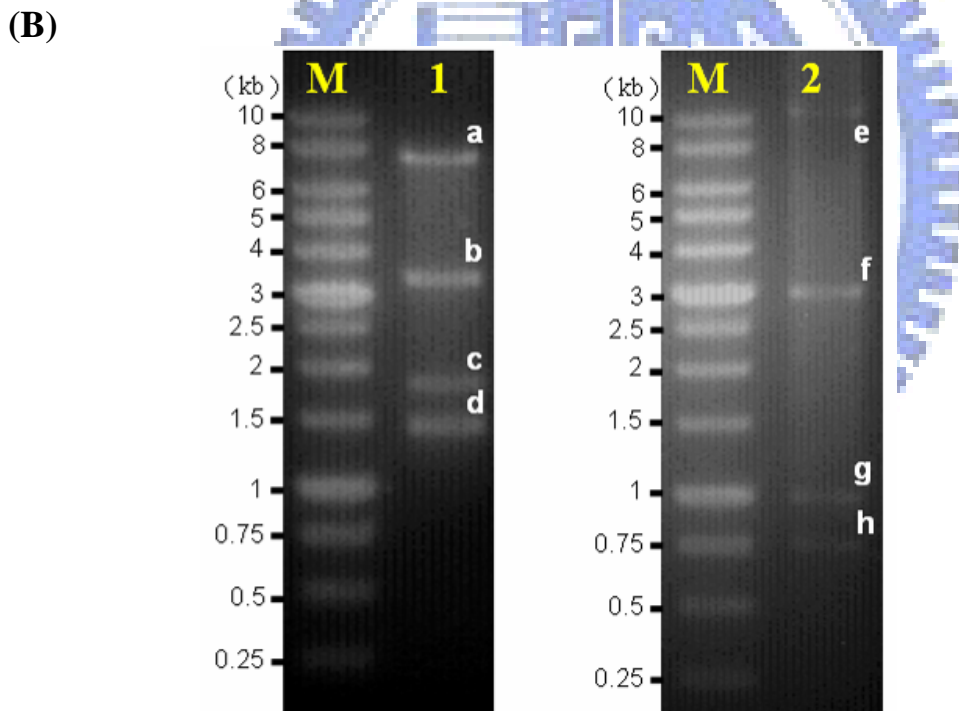


圖二十五(B)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/DV2F-Q/S2/3'Rz 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 11、3.9 及 1.0 kb 之 DNA 片段 (band e, f & g)。Lane 1 是質體經 *Ava* I 作用；Lane 2 是質體經 *Kpn* I 作用；Lane M 表示 marker。

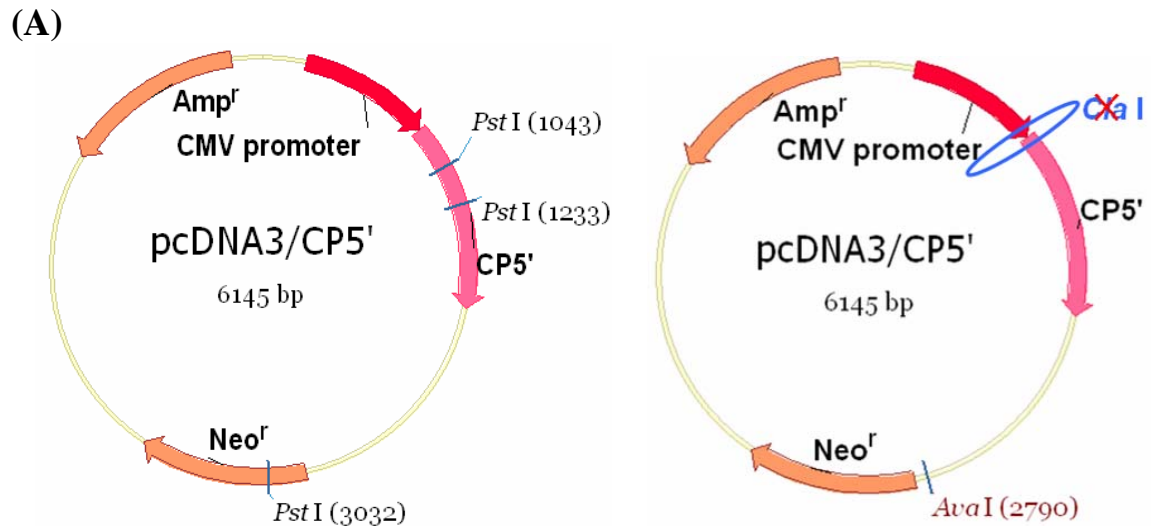


圖二十六(A)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用位置圖

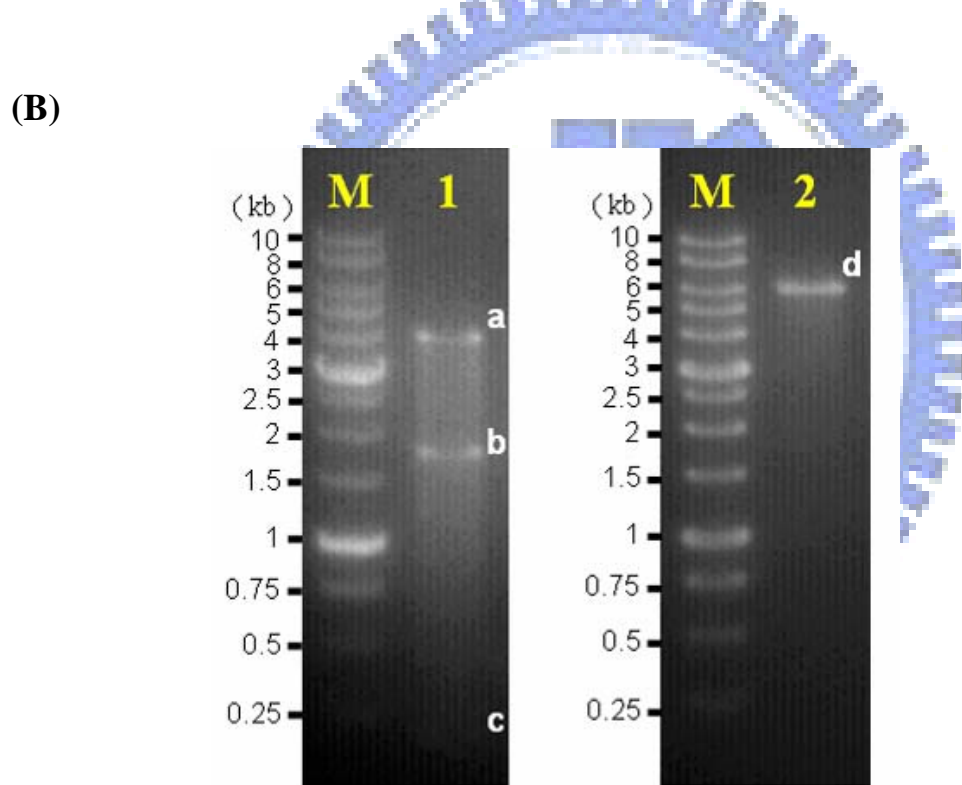


圖二十六(B)、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 經 *Ava* I 或 *Kpn* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 11、3.1、1.0 及 0.75 kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, & h)。Lane 1 是質體經 *Ava* I 作用；Lane 2 是質體經 *Kpn* I 作用；Lane M 表示 marker。

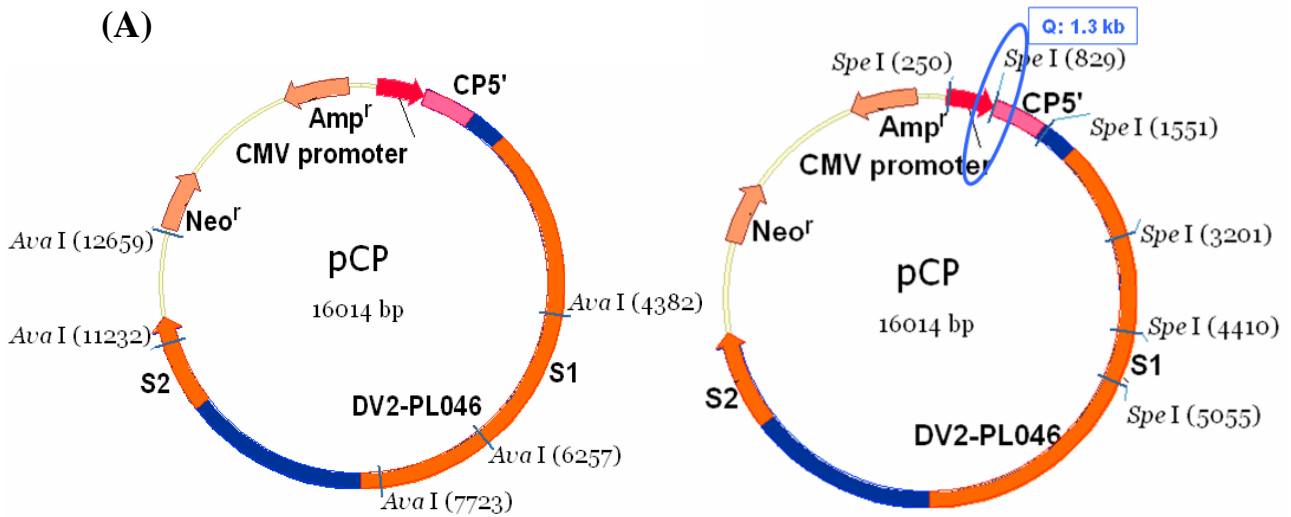


圖二十七(A)、pcDNA3/CP5'經 *Pst*I 或 *Ava*I + *Cla*I 限制酵素作用位置圖

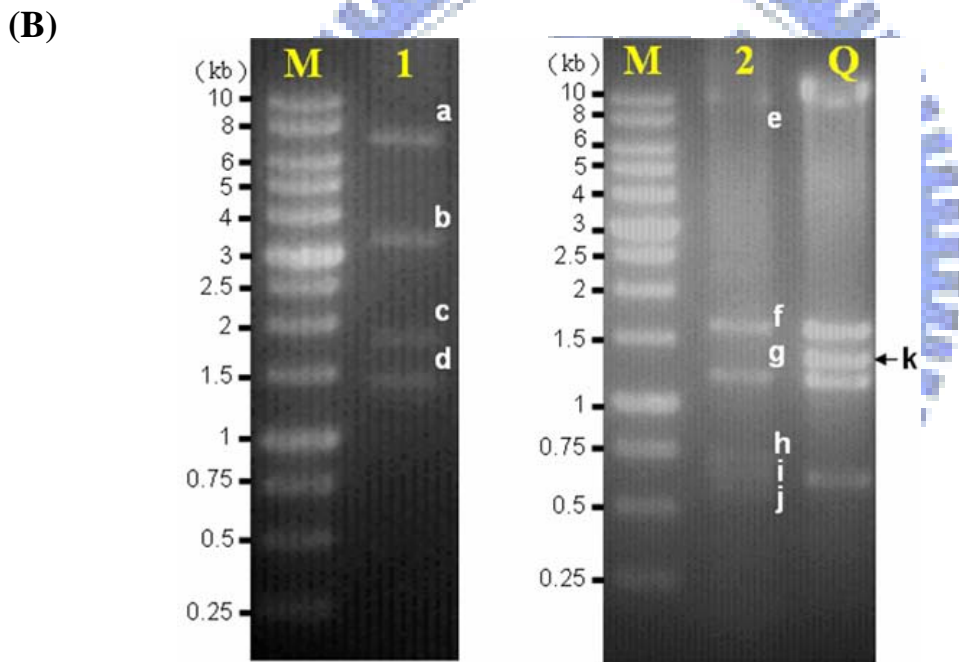


圖二十七(B)、pcDNA3/CP5'經 *Pst*I 或 *Ava*I + *Cla*I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3/CP5'經 *Pst*I 作用後，預期可以得到 4.2、1.8 及 0.2 kb 之 DNA 片段 (band a,b & c)；經 *Ava*I + *Cla*I 作用後，預期可以得到 6.1 kb 之 DNA 片段 (band d)。Lane 1 是質體經 *Pst*I 作用；Lane 2 是質體經 *Ava*I + *Cla*I 作用；Lane M 表示 marker。藍色圓圈圈起來的地方，為原本包含在 5'端多餘序列的 *Cla*I 切位所在位置。

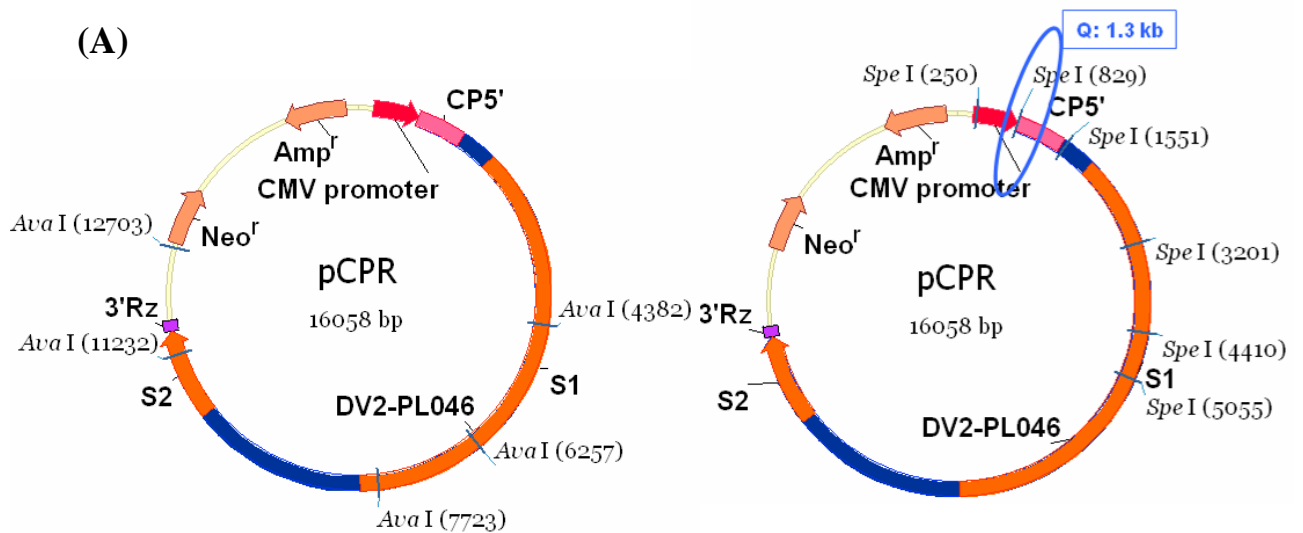


圖二十八(A)、pCP 經 *Ava* I 或 *Spe* I 限制酵素作用位置圖

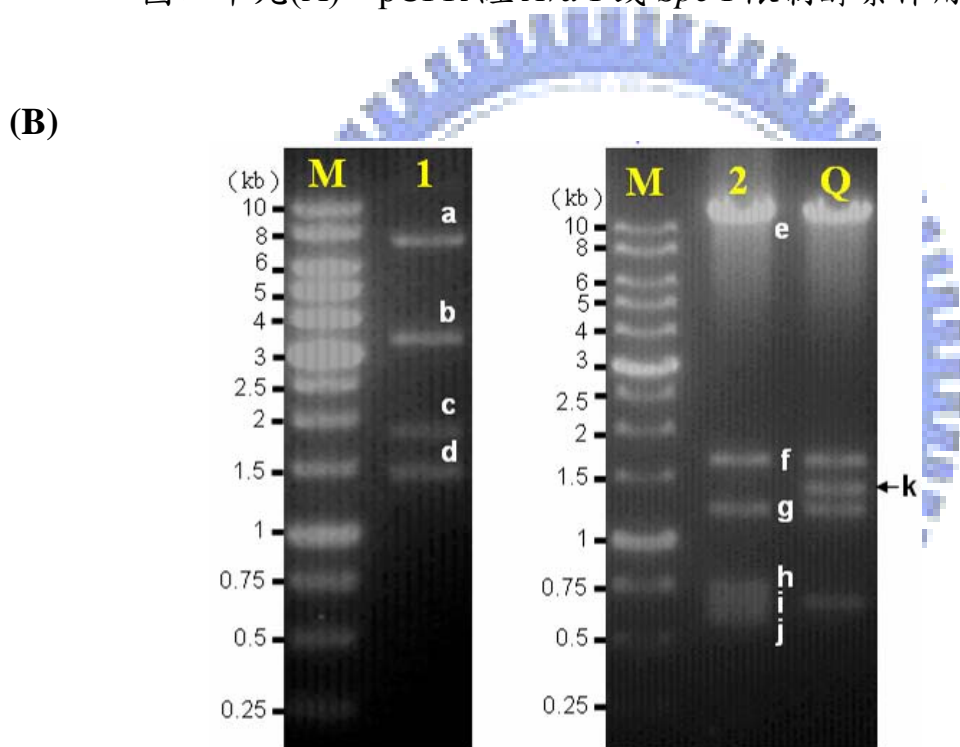


圖二十八(B)、pCP 經 *Ava* I 或 *Spe* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pCP 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.7、3.5、1.9、1.5 及 1.4 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d. d 包含 1.5 及 1.4 kb 片段)；經 *Spe* I 作用後，預期可以得到 11、1.7、1.2、0.72、0.64 及 0.58 kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, h, i & j)。Lane 1 是 pCP 經 *Ava* I 作用；Lane 2 是 pCP 經 *Spe* I 作用；Lane Q 是 pcDNA3/DV2F-Q 經 *Spe* I 作用；Lane M 表示 marker。藍色圓圈圈起來的地方，為去除 5' 端多餘序列後所新生成的 *Spe* I 切位所在位置，而 pcDNA3/DV2F-Q 沒有此一切位，因此 band h & j 會以 band k(1.3 kb) 的形式顯示。

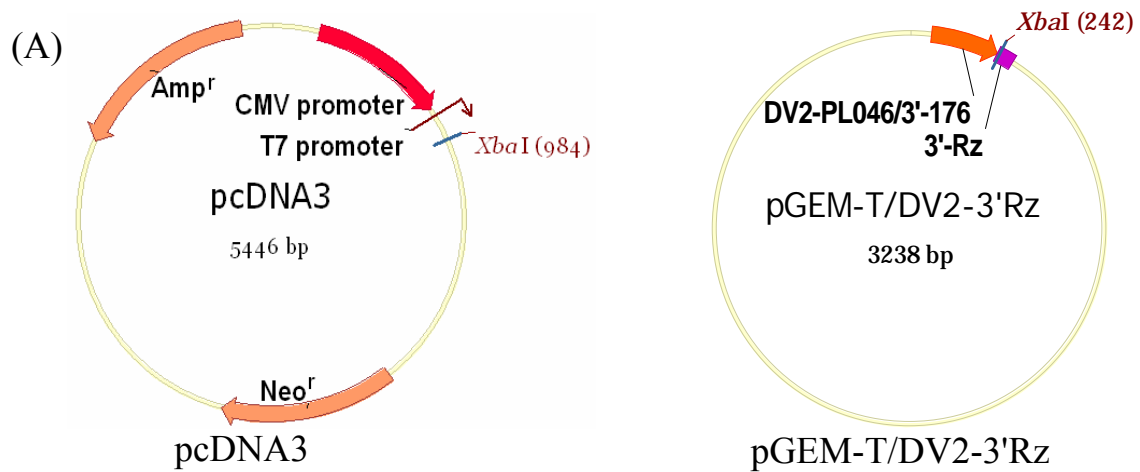


圖二十九(A)、pCPR 經 *Ava* I 或 *Spe* I 限制酵素作用位置圖

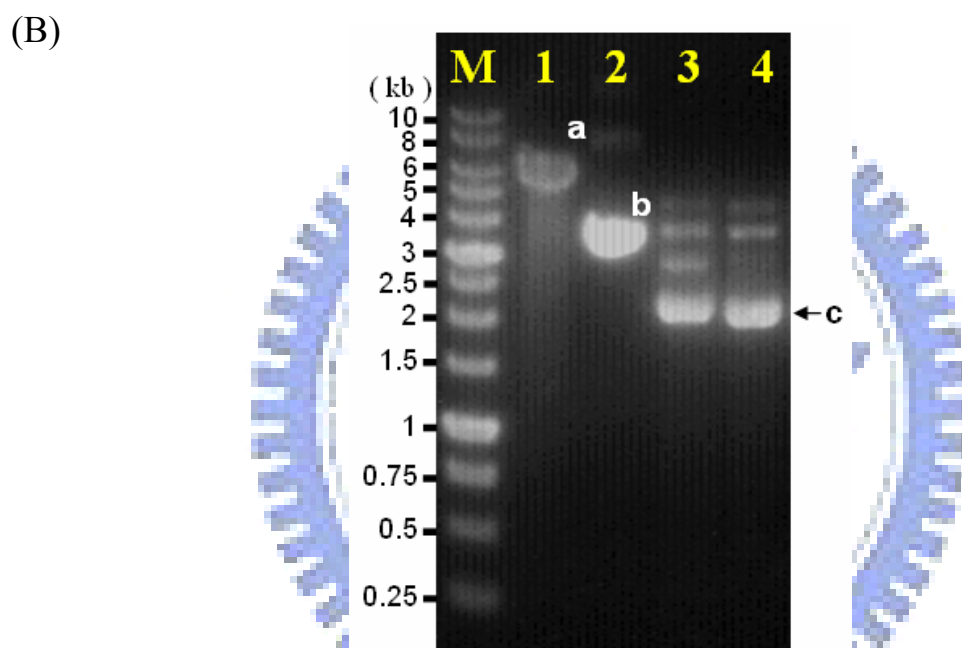


圖二十九(B)、pCPR 經 *Ava* I 或 *Spe* I 限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pCPR 經 *Ava* I 作用後，預期可以得到 7.7、3.5、1.9 及兩個 1.5 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Spe* I 作用後，預期可以得到 11、1.7、1.2、0.72、0.64 及 0.58 kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, h, i & j)。Lane 1 是 pCPR 經 *Ava* I 作用；Lane 2 是 pCPR 經 *Spe* I 作用；Lane Q 是 pcDNA3/DV2F-Q 經 *Spe* I 作用；Lane M 表示 marker。藍色圓圈圈起來的地方，為去除 5' 端多餘序列後所新生成的 *Spe* I 切位所在位置，而 pcDNA3/DV2F-Q 沒有此一切位，因此 band h & j 會以 band k(1.3 kb) 的形式顯示。

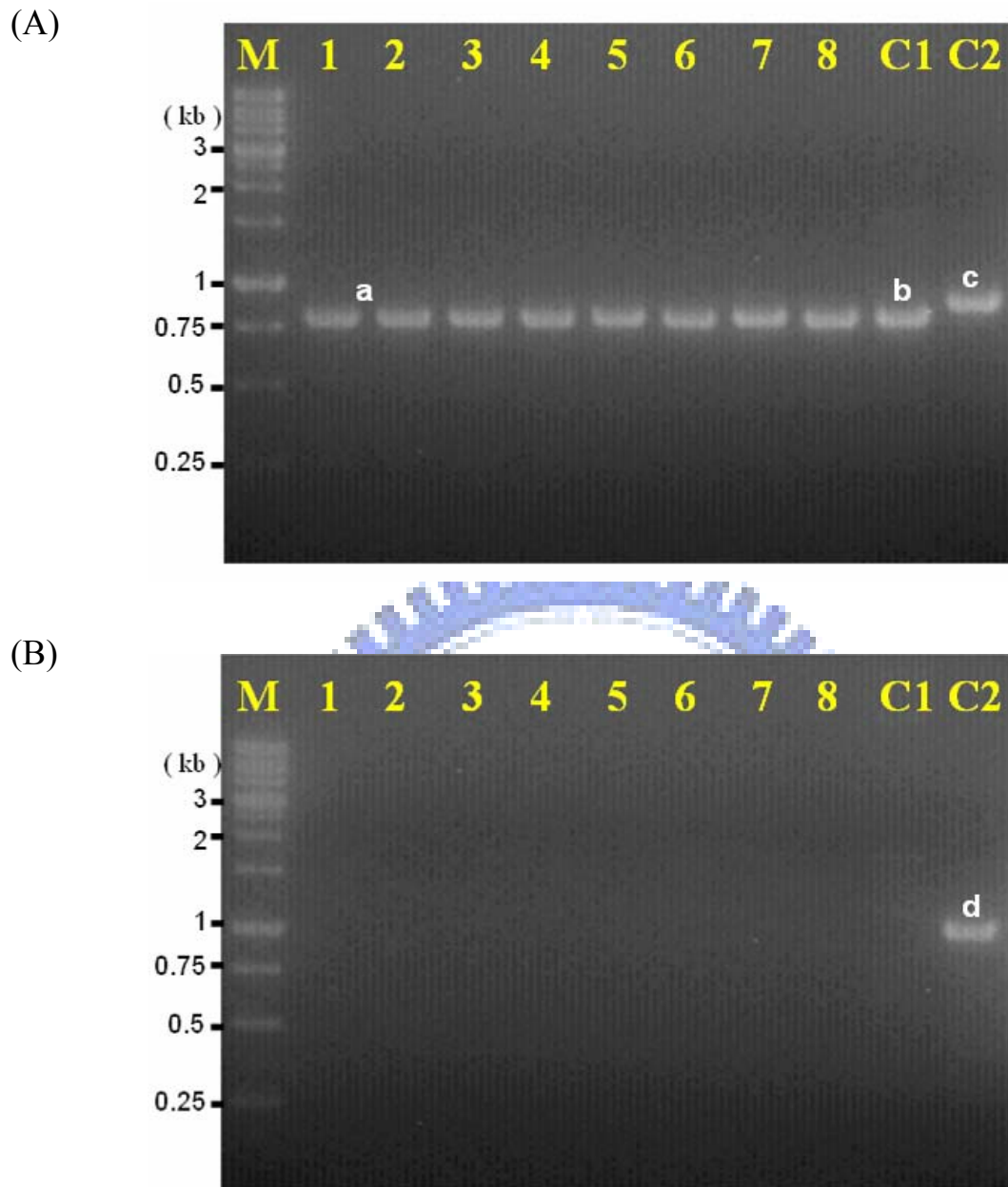


圖三十(A)、pcDNA3 及 pGEM-T/DV2-3'Rz 經 *Xba* I 限制酵素作用位置圖



圖三十(B)、pcDNA3 及 pGEM-T/DV2-3'Rz 的質體 DNA 電泳分析圖，或經 *Xba* I 限制酵素作用後的電泳分析圖

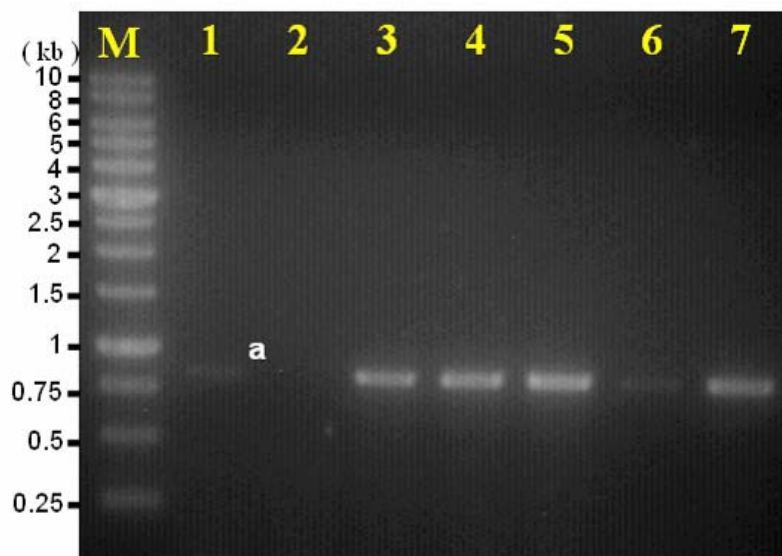
pcDNA3 及 pGEM-T/DV2-3'Rz 的質體上皆有一處 *Xba* I 限制酵素切位，在經過 3 小時的作用後，以電泳分析與質體 DNA 進行比較。Lane 1 是 pcDNA3 經 *Xba* I 作用，預期可以得到 5.4 kb 之 DNA 片段(band a)；Lane 2 是 pcDNA3 質體直接跑電泳，因為超螺旋結構，可以得到比 5.4 kb 還小的 DNA 片段(band b)；Lane 3 是 pGEM-T/DV2-3'Rz 經 *Xba* I 作用，預期應該得到 3.2 kb 之 DNA 片段，並無法獲得；Lane 4 是 pGEM-T/DV2-3'Rz 質體直接跑電泳。由電泳圖 Lane 3 得知，pGEM-T/DV2-3'Rz 經 *Xba* I 作用後，並無法獲得預期中的 3.2 kb 之 DNA 片段，還是如同 Lane 4 的質體 DNA 一樣，只能得到較 3.2 kb 還小的超螺旋結構之 DNA 片段(band c)。



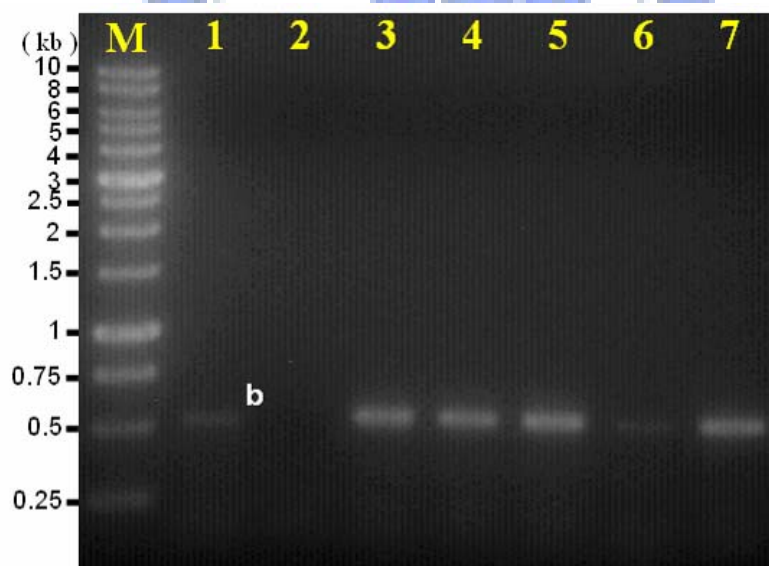
圖三十一、以 PCR 檢測 pCP 及 pCPR 的 5 端上游多餘序列

(A)以引子 CMVf534 與 5'Rz-r 進行 PCR 反應，pCP 及 pCPR 預期可以得到 0.78 kb 的 DNA 片段 (band a; Lane 1 ~ 8)。 (B)以引子 T7-F 與 CM-R 進行 PCR 反應，由於 pCP 及 pCPR 已去除包含 T7 啟動子之 5'UTR 上游序列，預期使用依 T7 啟動子所設計之 T7-F 引子進行 PCR 反應，應無法得到 DNA 片段(Lane 1 ~ 8)。 Lane 1 ~ 4 為選殖之 pCP 質體；Lane 5 ~ 8 為選殖之 pCPR 質體；Lane C1 為以 pcDNA3/CP5'做模板之 control 1，在圖(A)預期可以得到 0.78 kb 的 DNA 片段 (band b)，在圖(B)預期無法得到 DNA 片段；Lane C2 為以 pcDNA3/DV2F-Q 做模板的 control 2，由於其 CMV 啟動子與登革基因序列之間較 pCP 及 pCPR 多出約 75 bp，在圖(A)預期會得到較大的 0.86 kb 的 DNA 片段 (band c)，在圖(B)預期可以得到 1 kb 的 DNA 片段 (band d)。

(A) C 到 prM

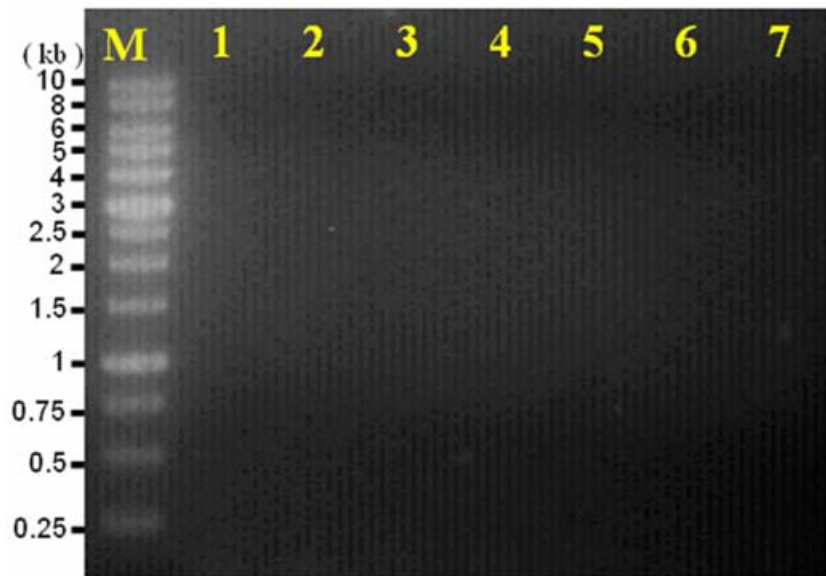


(B) NS5 到部份 3'UTR



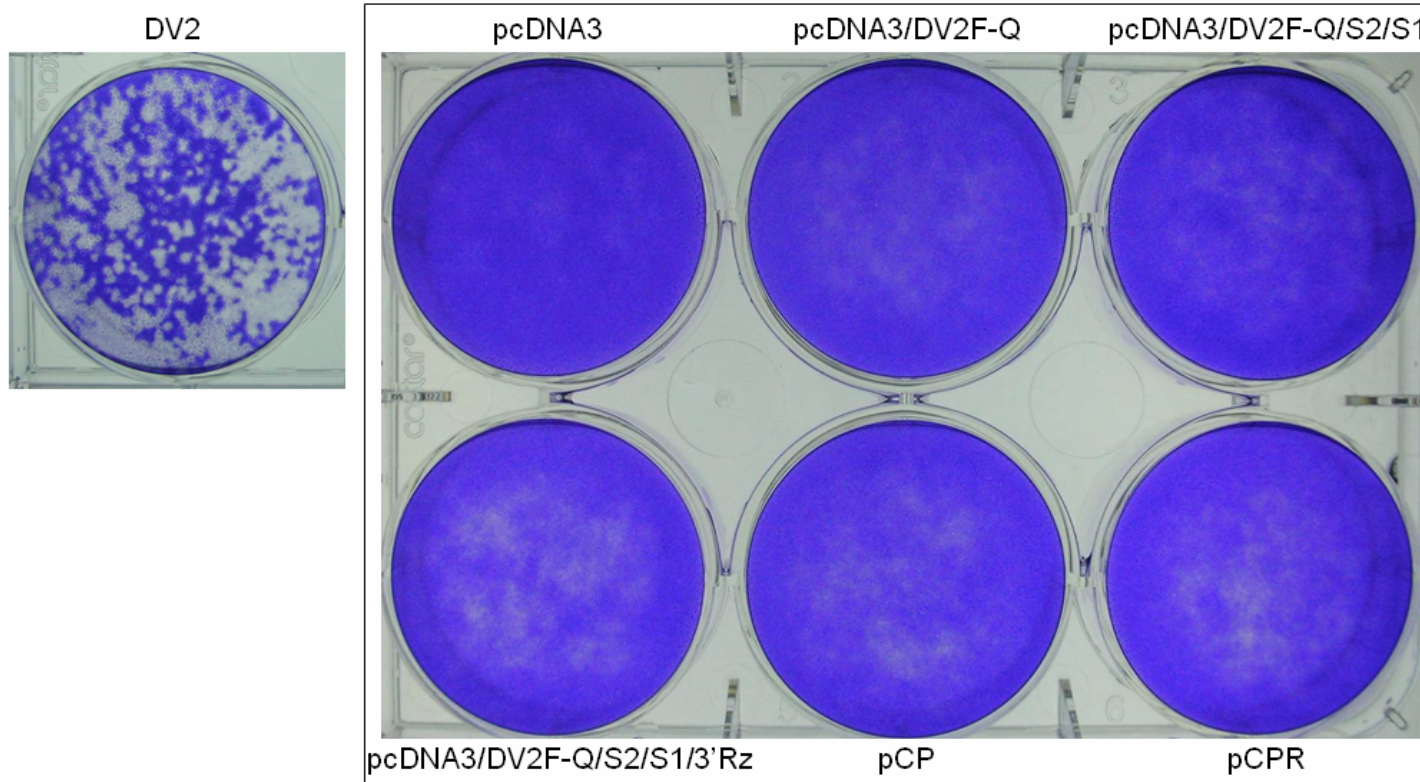
圖三十二、以 RT-PCR 檢測感染性質體在 BHK-21 細胞的 RNA 表現

轉染經過 24 小時後，以引子 CM-F 及 CM-R 分析結構基因 C 到 prM 的 RNA 表現，應得到約 851 bp 的片段 (band a)；以引子 NS5-F2 及 NS5-R2 分析非結構基因 NS5 到部份 3'UTR 的 RNA 表現，應得到約 506 bp 的片段 (band b)。Lane 1 是 DV2 感染的細胞；Lane 2 是 pcDNA3 質體；Lane 3 是 pcDNA3/DV2F-Q 質體；Lane 4 是 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體；Lane 5 是 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 質體；Lane 6 是 pCP 質體；Lane 7 是 pCPR 質體；Lane M 表示 marker。



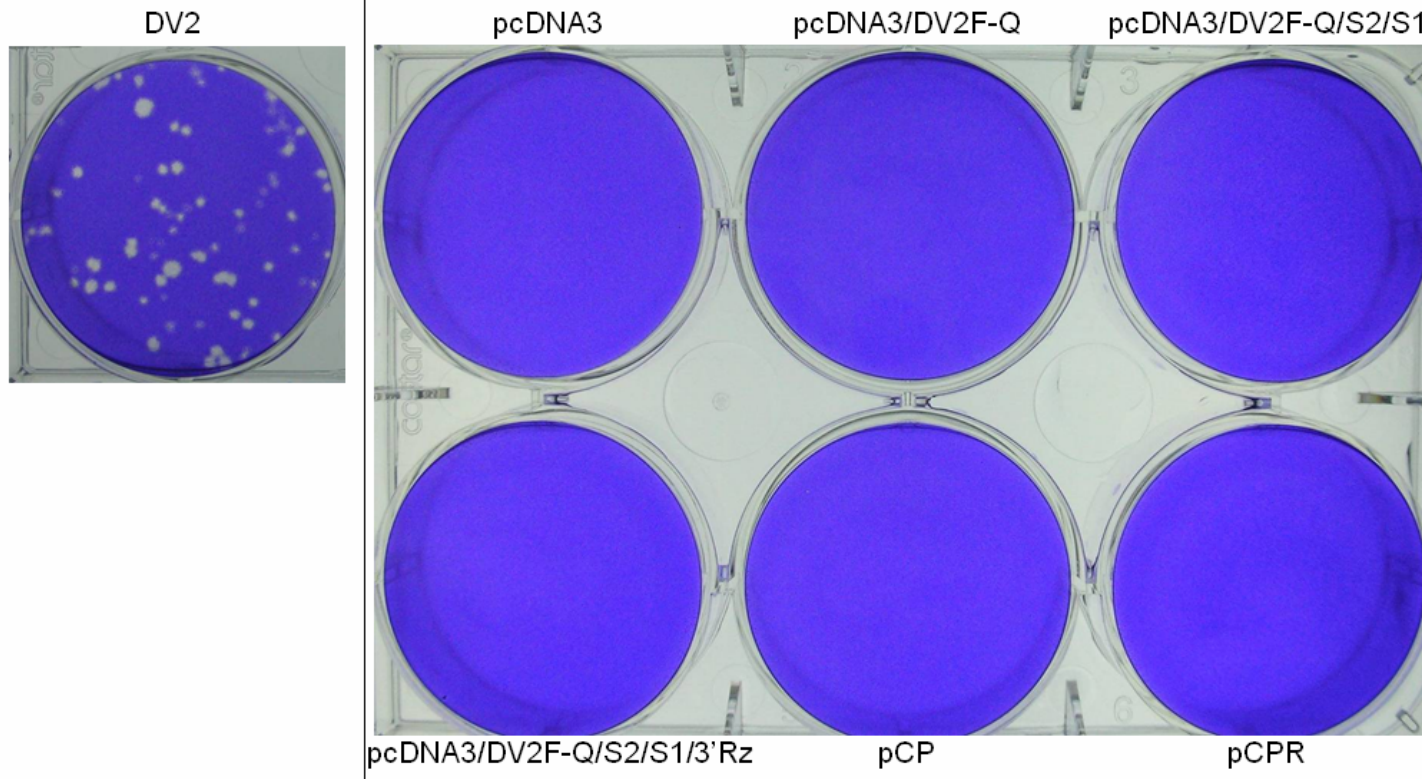
圖三十三、對 RNA extract 進行 PCR 以觀察是否有殘留的質體，造成 false positive (C 到 prM)

以引子 CM-F 及 CM-R，直接將等量的 RNA 進行 PCR 反應，觀察是否能偵測到結構基因 C 到 prM 的存在，造成 false positive，而得到約 851 bp 的片段。Lane 1 是 DV2 感染的細胞；Lane 2 是 pcDNA3 質體；Lane 3 是 pcDNA3/DV2F-Q 質體；Lane 4 是 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1 質體；Lane 5 是 pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz 質體；Lane 6 是 pCP 質體；Lane 7 是 pCPR 質體；Lane M 表示 marker。



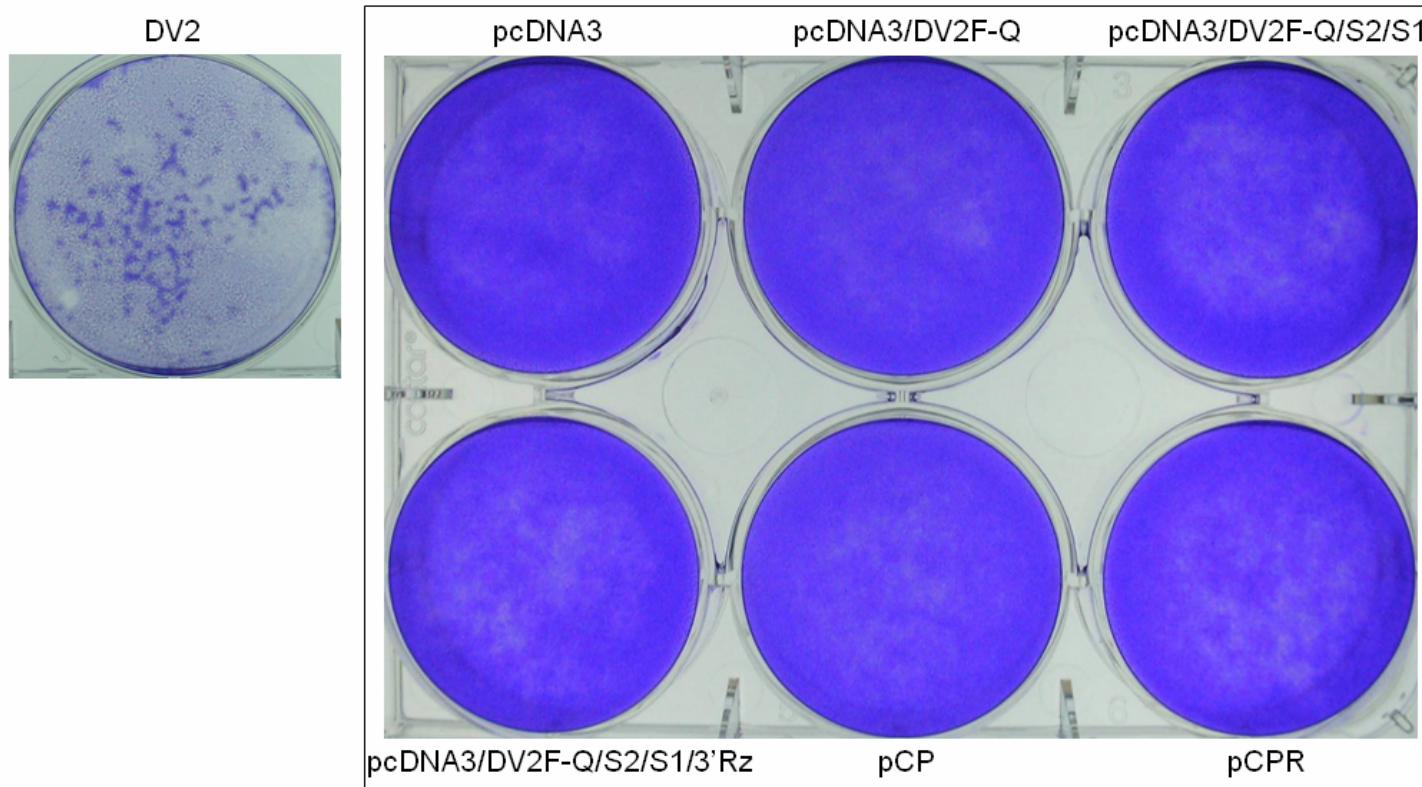
圖三十四、以空斑試驗觀察經轉染 48 小時後之空斑數目

轉染經過 48 小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，檢測感染性質體是否能形成空斑。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒之細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。



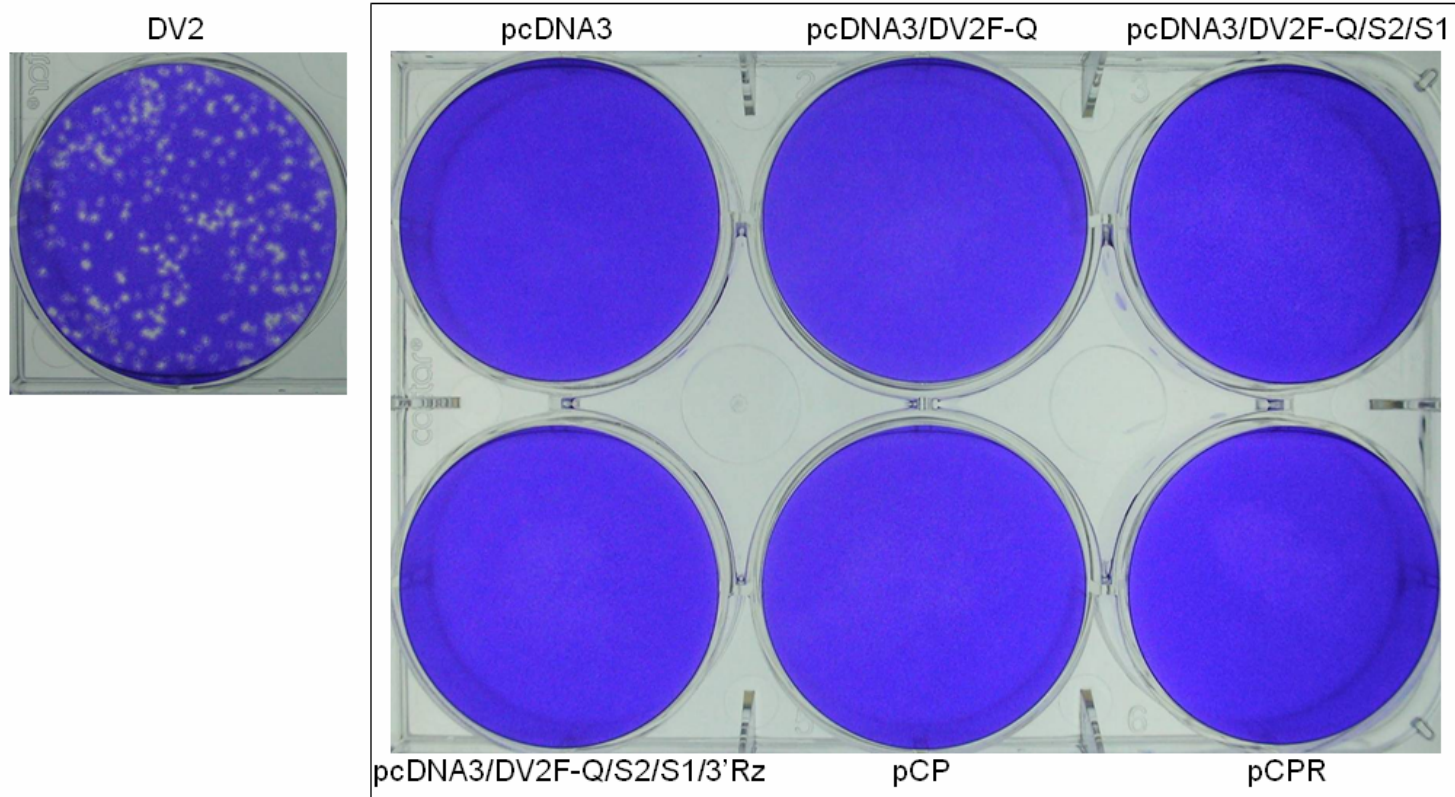
圖三十五、以空斑試驗觀察經轉染 48 小時後之上清液病毒數目

轉染經過 48 小時後，將 1.5 ml 上清液感染新的一批 BHK-21 細胞，在 37°C 感染一小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，觀察上清液病毒數目。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒的細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/ DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。



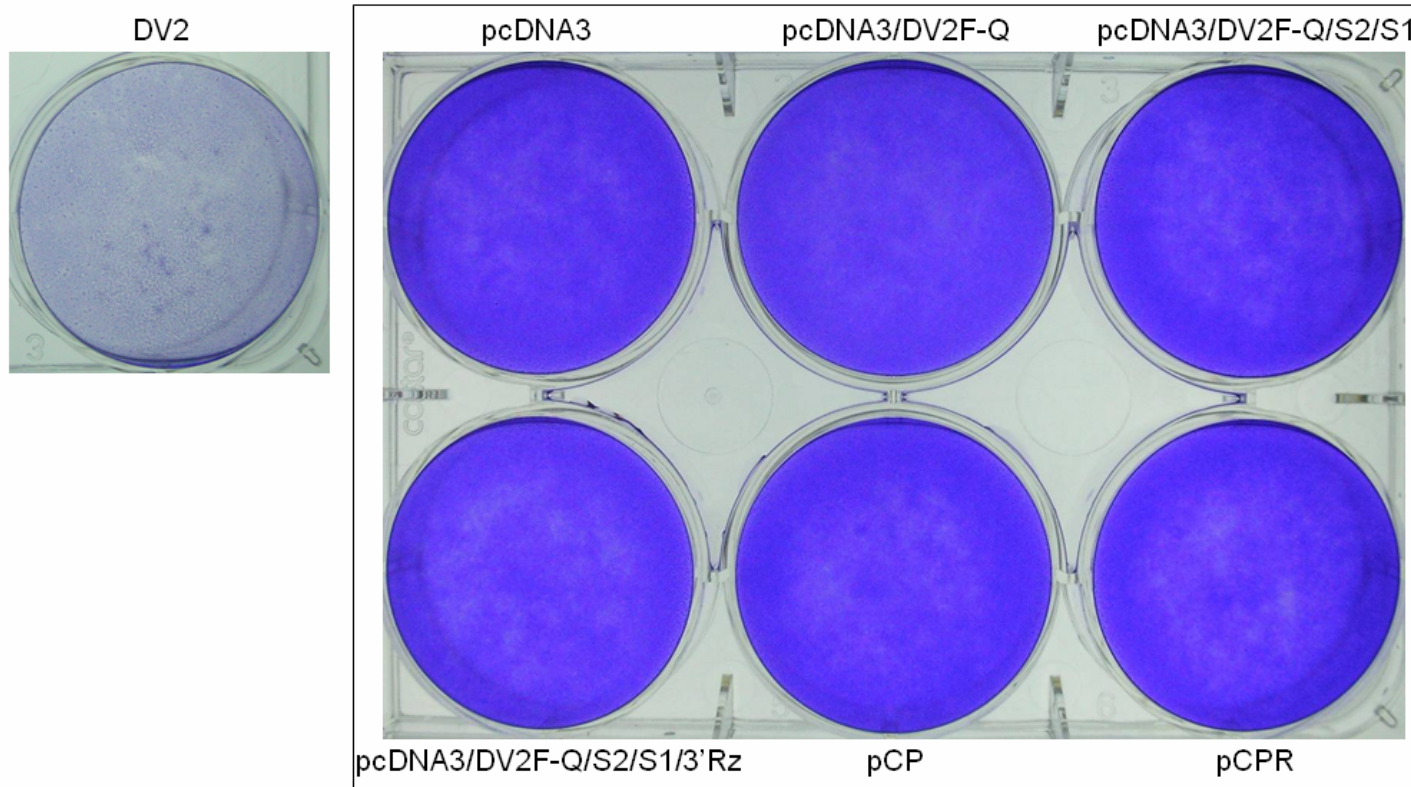
圖三十六、以空斑試驗觀察經轉染 72 小時後之空斑數目

轉染經過 72 小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，檢測感染性質體是否能形成空斑。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒的細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。



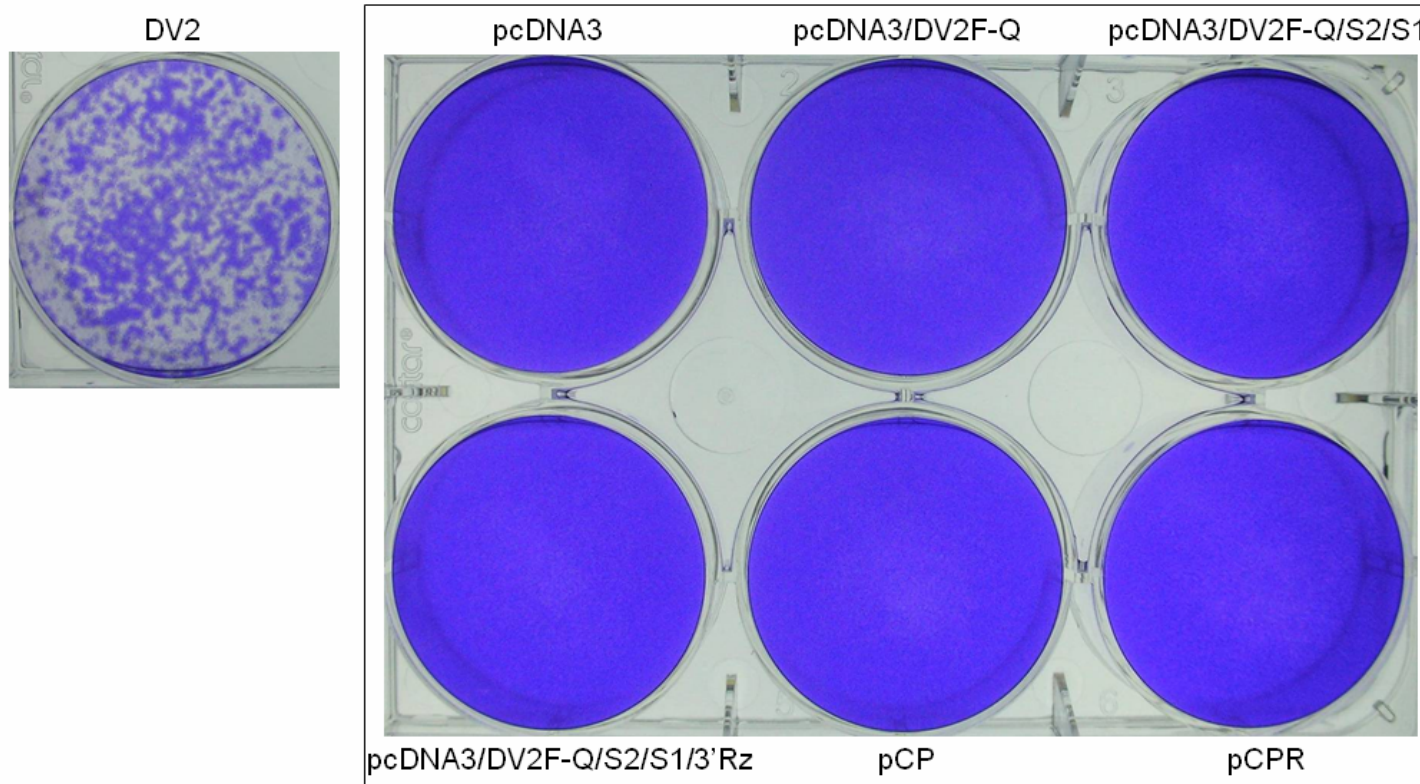
圖三十七、以空斑試驗觀察經轉染 72 小時後之上清液病毒數目

轉染經過 72 小時後，將 1.5 ml 上清液感染新的一批 BHK-21 細胞，在 37°C 感染一小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，觀察上清液病毒數目。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒的細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/ DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。



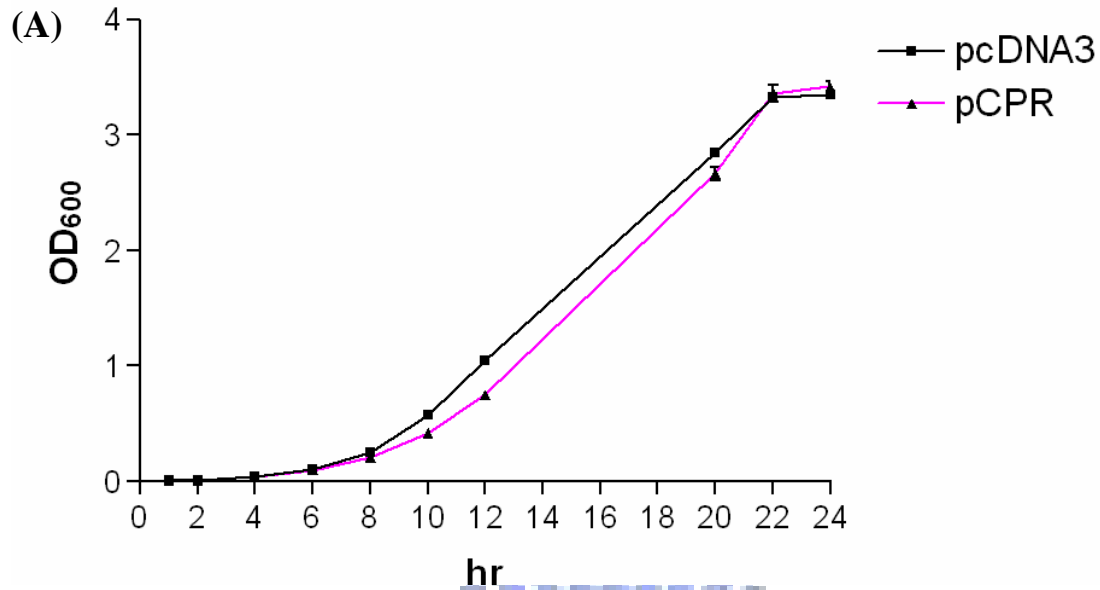
圖三十八、以空斑試驗觀察經轉染 96 小時後之空斑數目

轉染經過 96 小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，檢測感染性質體是否能形成空斑。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒的細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。

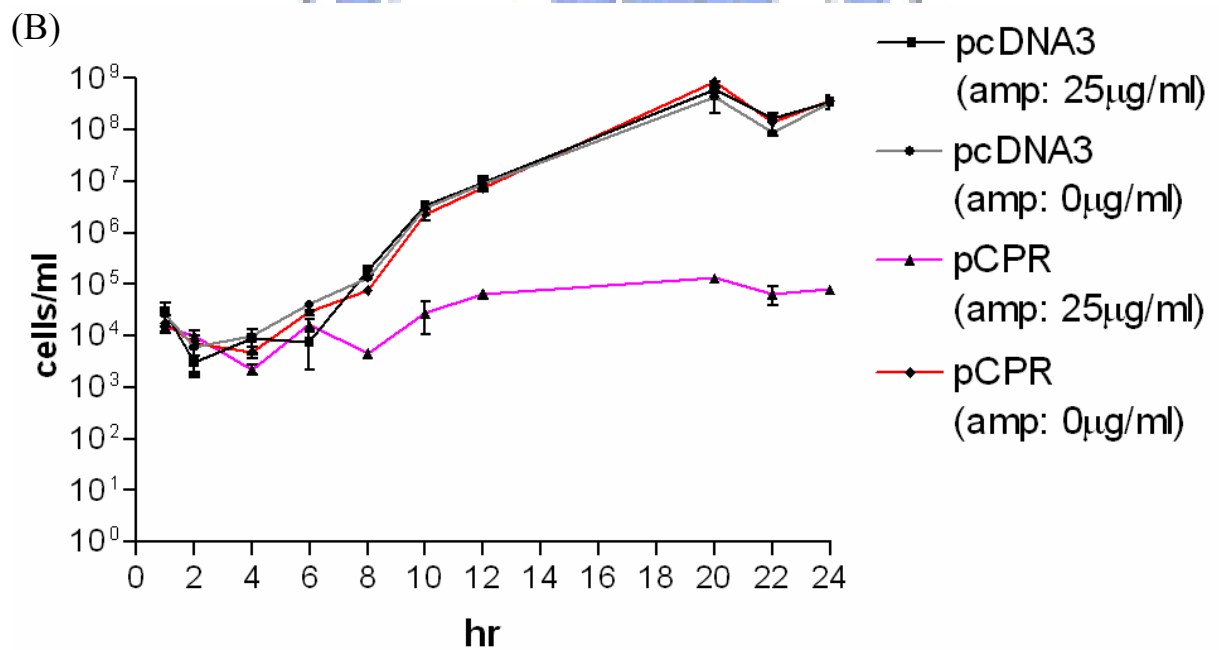


圖三十九、以空斑試驗觀察經轉染 96 小時後之上清液病毒數目

轉染經過 96 小時後，將 1.5 ml 上清液感染新的一批 BHK-21 細胞，在 37°C 感染一小時後，加入 4 毫升 1.1% methyl cellulose medium，置於 37°C 培養七天，觀察上清液病毒數目。左側為感染 100 PFU DV2 PL046 strain 病毒的細胞，作為產生空斑的 positive control；pcDNA3 質體作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/ DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。

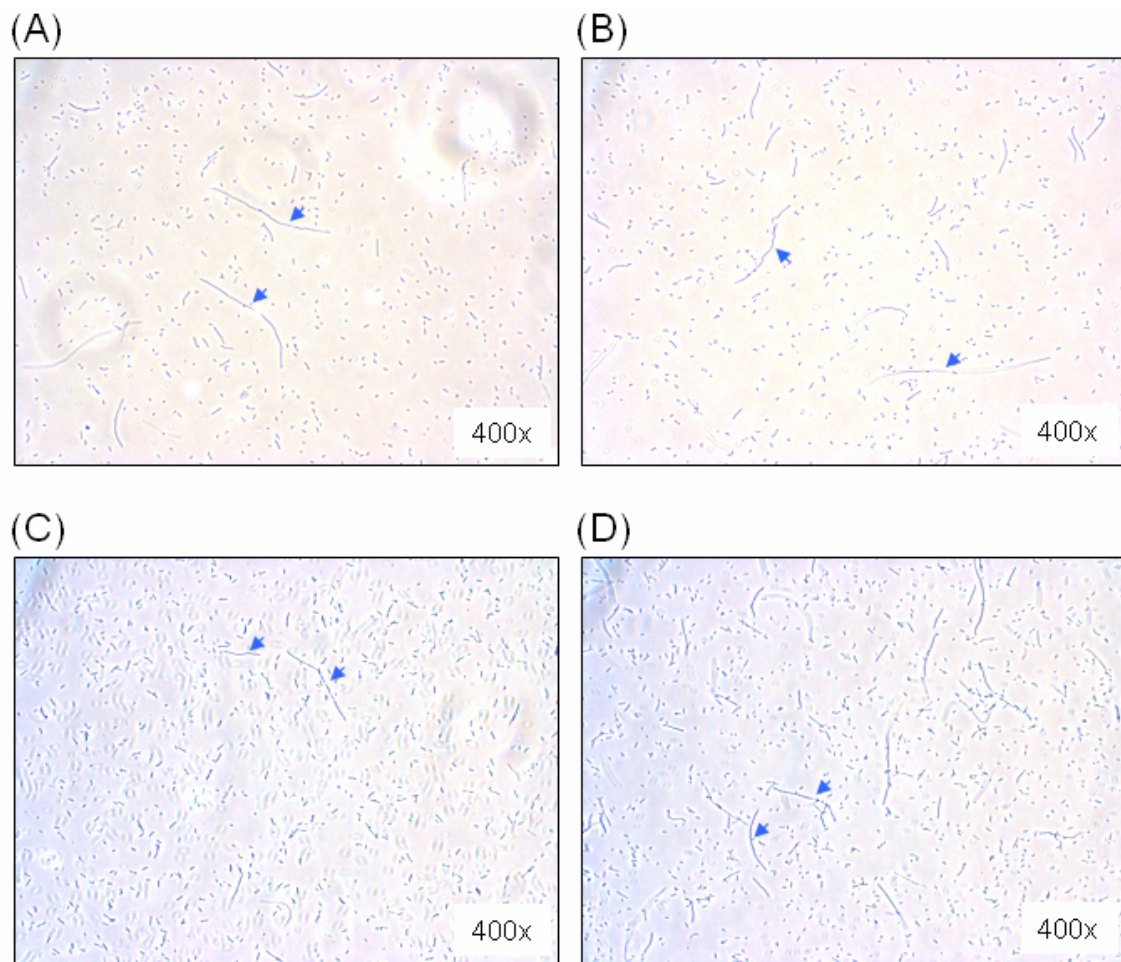


圖四十(A)、感染性質體 pCPR 與 pcDNA3 之生長曲線



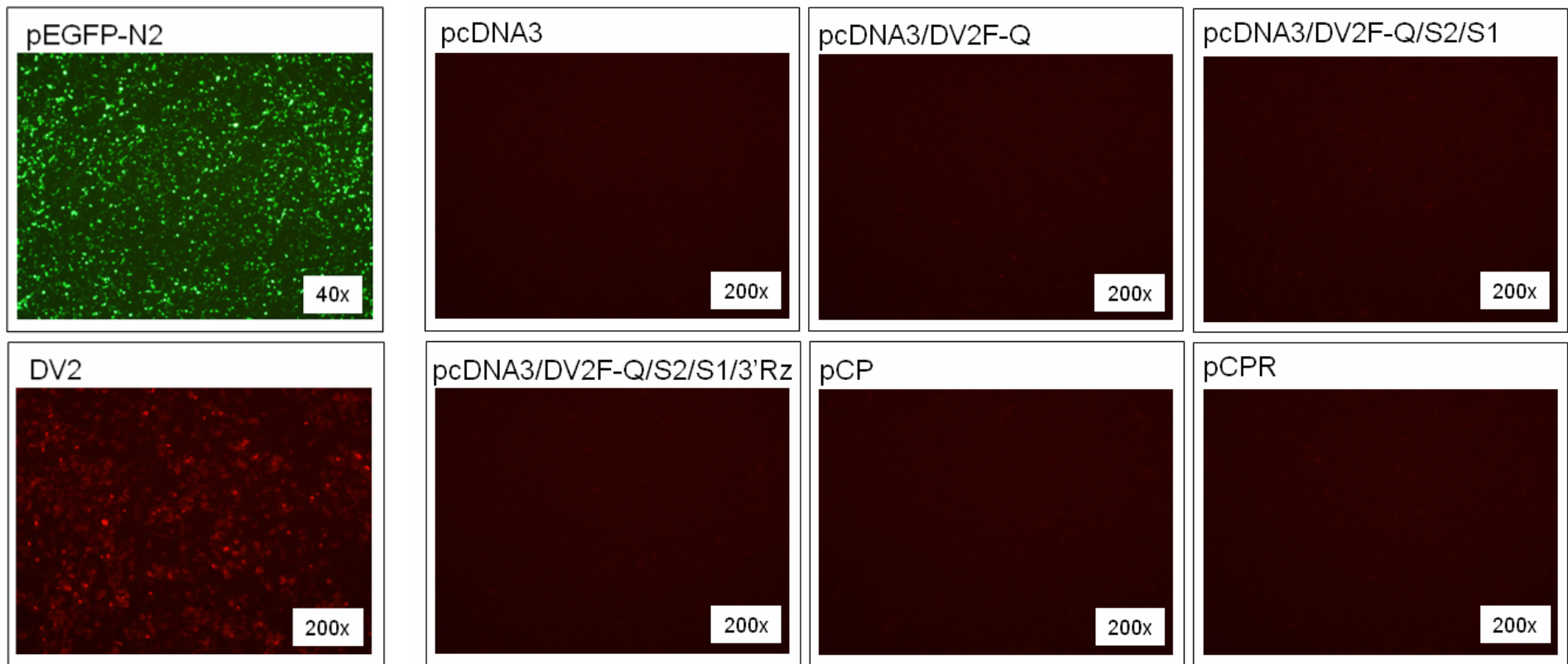
圖四十(B)、位於生長曲線相對時間點之菌落數目

轉養於 50 ml LB broth 之後，經過 1、2、4、6、8、10、12、20、22 及 24 小時的時間點，測其 OD_{600nm} 吸光值。並且在每個時間點，以適當的稀釋倍數，分別塗盤於含有抗生素的 LB 培養盤及不含抗生素的 LB 培養盤，兩天後計算生成之菌落數目。黑線正方形點或灰線圓點為 pcDNA3 質體；粉紅線三角形點或紅線菱形點為 pCPR 質體。amp：培養盤含 25 μg/ml 的 ampicillin 或不含 ampicillin。



圖四十一、以倒立顯微鏡觀察細菌外觀

(A)pcDNA3 質體於 25°C 培養；(B)pCPR 質體於 25°C 培養；(C)pcDNA3 質體於 37°C 培養；(D)pCPR 質體於 37°C 培養。藍色箭頭所指為長條狀之菌體。



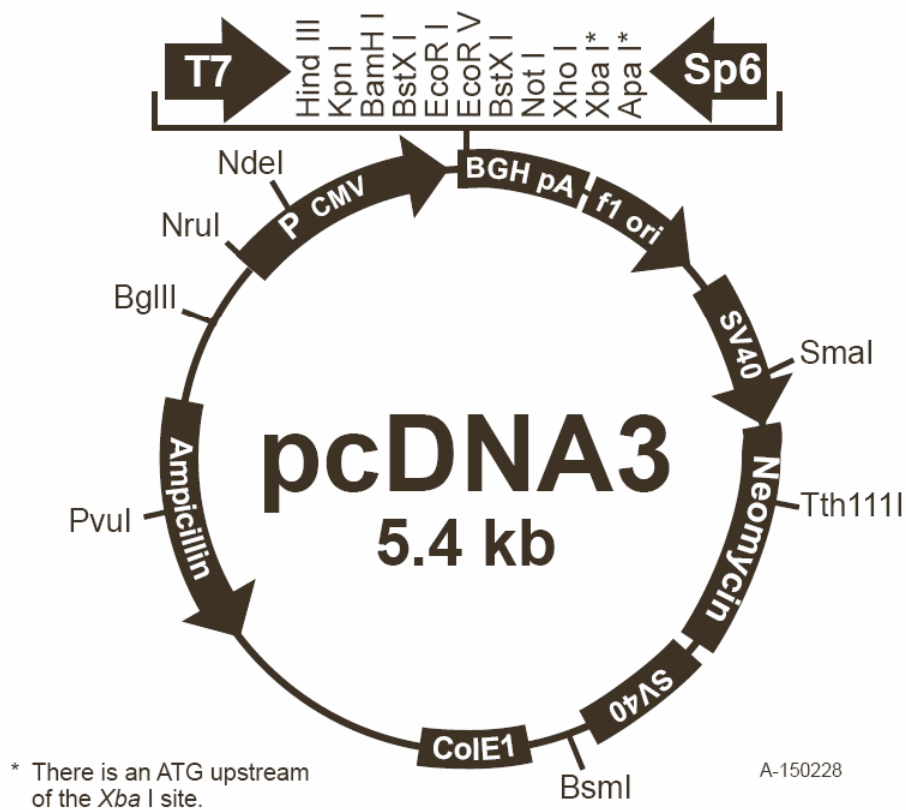
圖四十二、以免疫螢光染色檢測感染性質體在 BHK-21 細胞之 NS1 蛋白表現

轉染經過 48 小時，以 anti-NS1 antibody 進行免疫螢光染色，觀察非結構基因 NS1 的表現。左上角的 pEGFP-N2 質體，作為轉染效率表示，螢光為綠色；左下角為 MOI (multiplicity of infection) = 0.5 的 DV2 PL046 strain 病毒感染細胞，作為抗體的 positive control；另以 pcDNA3 質體，作為 negative control；其餘五個為所建構之感染性質體：pcDNA3/DV2F-Q、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1、pcDNA3/DV2F-Q/S2/S1/3'Rz、pCP 及 pCPR。各圖右下角所示為觀察倍率。

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides



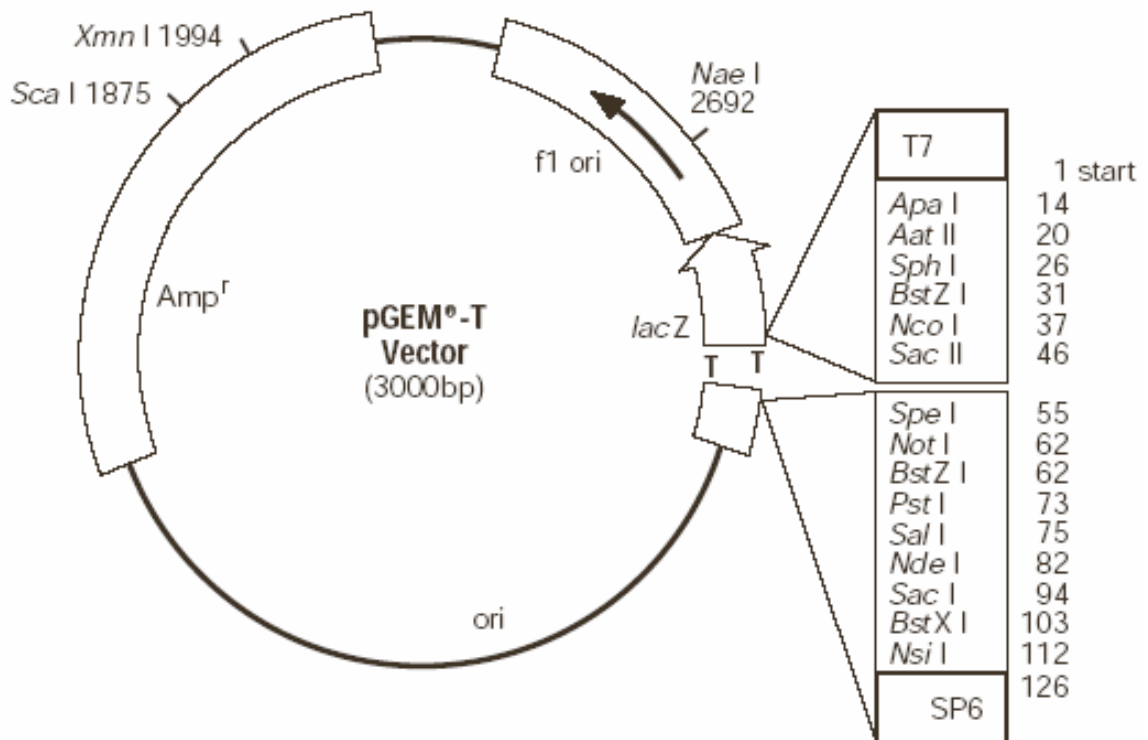
CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequences, and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in the sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department.

附錄一、pcDNA3 質體示意圖 (Invitrogen)

pGEM[®]-T Vector Map and Sequence Reference Points



pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
<i>lac</i> operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3

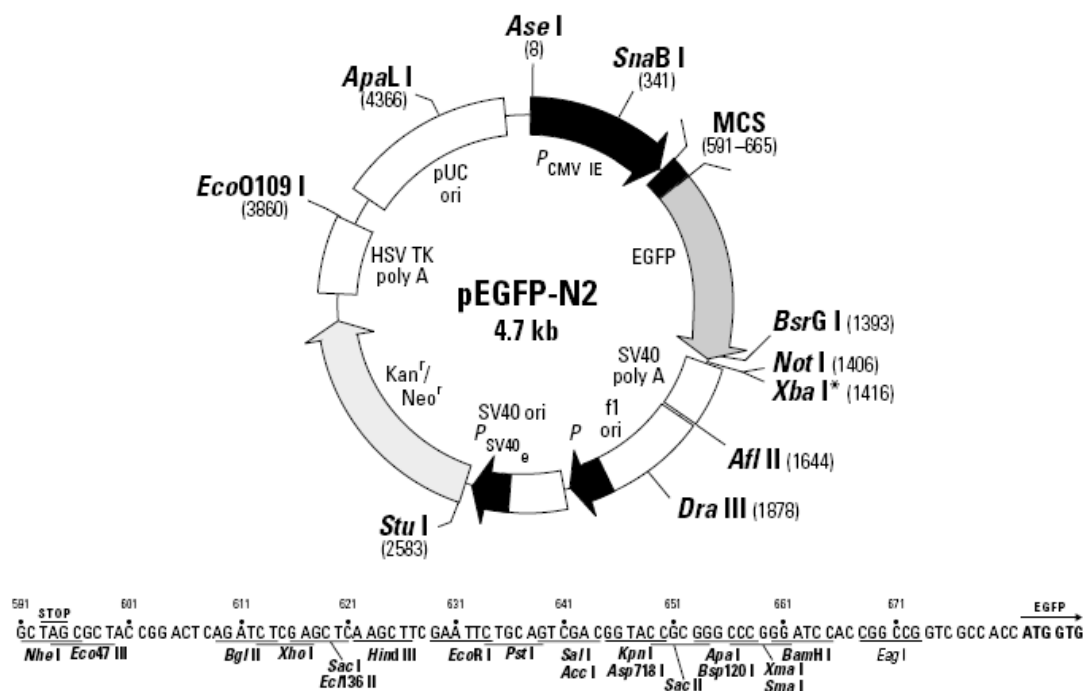
附錄二、pGEM-T 質體示意圖 (Promega)

pEGFP-N2 Vector Information

GenBank Accession #: U57608

PT3053-5

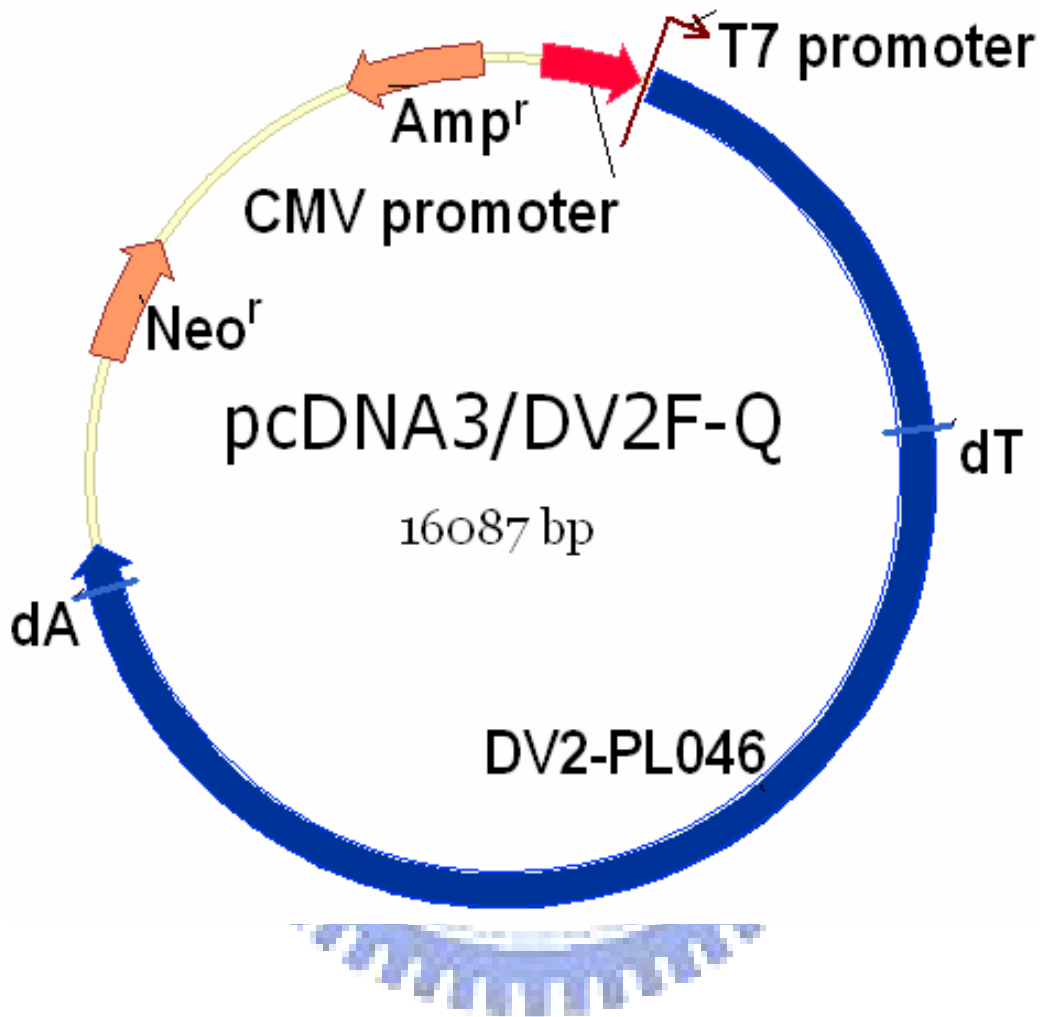
Catalog #6081-1



Location of Features:

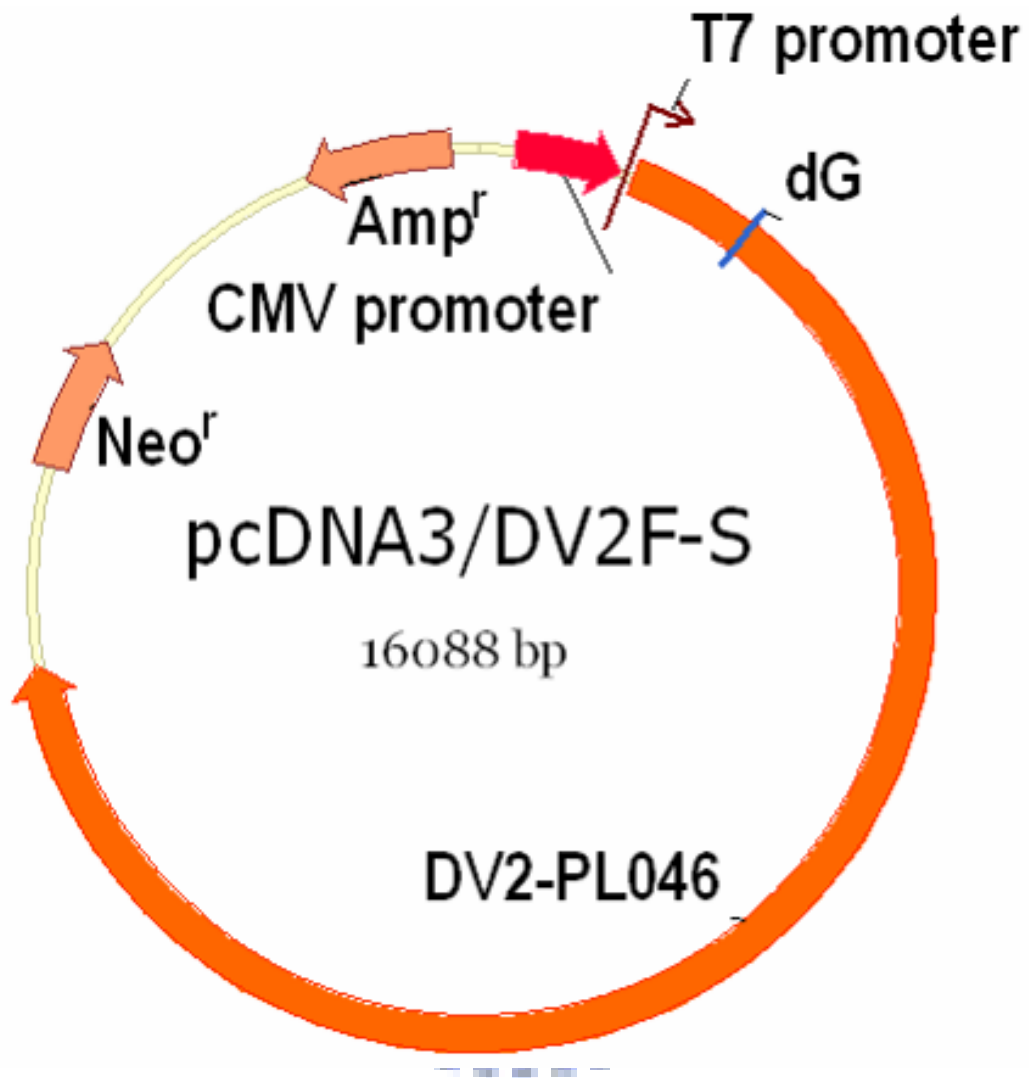
- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
- MCS: 591–665
- Enhanced green fluorescent protein gene
- SV40 early mRNA polyadenylation signal: 1556–1606
- f1 single-strand DNA origin: 1653–2108 (Packages the noncoding strand of EGFP)
- Bacterial promoter for expression of Kan^r gene: 2193–2198
- SV40 origin of replication: 2449–2584
- SV40 early promoter: 2282–2511
- Kanamycin/neomycin resistance gene: 2633–3427
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 3663–3668 & 3676–3681
- pUC plasmid replication origin: 4012–4655

附錄三、pEGFP-N2 質體示意圖 (BD Biosciences Clontech)



附錄四、pcDNA3/DV2F-Q 質體示意圖（依交通大學賴建李論文(2006) 繪）

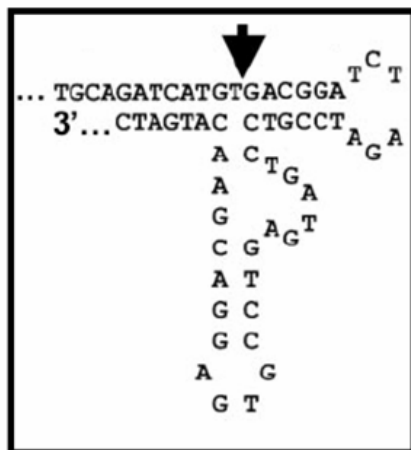
pcDNA3 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列，序列經定序比對後，尚有二缺失突變(deletion): nt2820 的 ΔT ; nt10449 的 ΔA 。原命名為 pcDNA3-NCS/DV2F-Q，本文皆以 pcDNA3/DV2F-Q 表示。



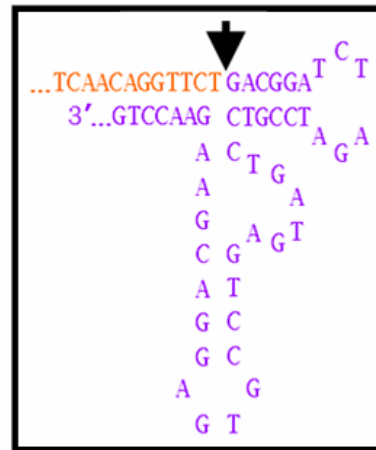
附錄五、pcDNA3/DV2F-S 質體示意圖（依交通大學賴建孝論文(2006) 繪）

pcDNA3 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列，序列經定序比對後，尚有一缺失突變（deletion）：nt737 的 ΔG 。原命名為 pcDNA3-NCS/DV2F-S，本文皆以 pcDNA3/DV2F-S 表示。

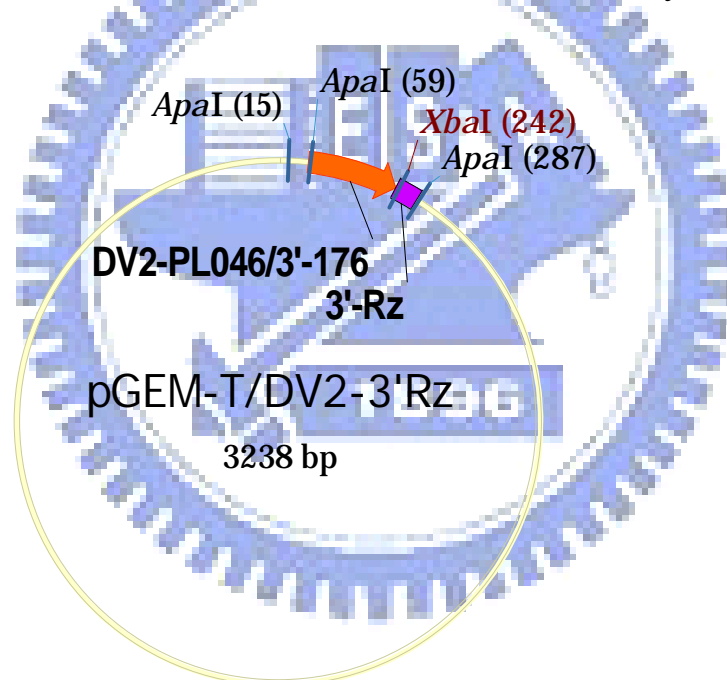
for HCV 3'-UTR ribozyme



for DV2 3'-UTR ribozyme



附錄六(A)、用於 HCV 的 3'-ribozyme 結構(Heller *et al.*, 2005)，與參照其結構所設計之登革二型病毒 PL046 之 3'-ribozyme 示意圖



附錄六(B)、pGEM-T/DV2-3'Rz 質體示意圖 (依交通大學杜育穎論文(2007)繪)

(A)黑色箭頭為切斷處，橘色字體代表 DV2 的 3'UTR 尾端序列，紫色字體代表 DV2 的 3'-ribozyme 序列。(B)pGEM-T 上帶有 DV2 PL046 strain 的 3'UTR 尾端序列，176 bp，3'UTR 下游有 3'-ribozyme 序列。

Appendix B: Composition of Buffers

Buffer	Composition	Storage
Buffer P1 (resuspension buffer)	50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	2–8°C, after addition of RNase A
Buffer P2 (lysis buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)	15–25°C
Buffer P3 (neutralization buffer)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5	15–25°C or 2–8°C
Buffer FWB2 (QIAfilter wash buffer)	1 M potassium acetate pH 5.0	15–25°C
Buffer QBT (equilibration buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)	15–25°C
Buffer QC (wash buffer)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
Buffer QF (elution buffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris·Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
Buffer QN (elution buffer)	1.6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
TE	10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15–25°C
STE	100 mM NaCl; 10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15–25°C

附錄七、QIAGEN Plasmid Midi Kit (Cat. 12143) 各種緩衝液的成份



產品名稱：SURE[®] 2 Supercompetent Cells

產品編號：200152

基因型：*e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*.

簡介：SURE 2 supercompetent cells* are high-efficiency derivatives of Stratagene's SURE (Stop Unwanted Rearrangement Events) competent cells, which have been engineered to allow the cloning of certain DNA segments that are “unclonable” in conventional *E. coli* strains. The SURE strain lacks components of the pathways that catalyze the rearrangement and deletion of nonstandard secondary and tertiary structures, including cruciforms (caused by inverted repeats) and Z-DNA, that occur frequently in eukaryotic DNA and that impede the cloning of the eukaryotic DNA in conventional strains. SURE 2 cells are restriction minus (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR-) endonuclease (*endA*) deficient, and recombination (*recB recJ*) deficient. The *lacI^qZ Δ M15* gene, on the F' episome, allows blue-white screening.

附錄八、*E. coli* SURE 2 strain 產品介紹