

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

以大腸桿菌 C41 與 C43 菌株表現登革熱病毒蛋白

NS1、NS2、NS4 與 E

Expression of Dengue Virus Proteins NS1, NS2, NS4 and E in *E.coli*

C41 and C43 Expression Strains

研究生：藍敏書

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十八年六月

以大腸桿菌 C41 與 C43 菌株表現登革熱病毒蛋白 NS1、NS2、NS4  
與 E

Expression of Dengue Virus Proteins NS1, NS2, NS4 and E in *E.coli*  
C41 and C43 Expression Strains

研究生：藍敏書

Student : Min-Shu Lan

指導教授：楊昶良 博士

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Biomedical Science  
College of Biological Science and Technology  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for Degree of Master of Science  
in  
Biomedical Science

June 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年六月

## 以大腸桿菌 C41 與 C43 菌株表現登革熱病毒蛋白 NS1、NS2、NS4 與 E

### 中文摘要

登革熱病毒屬黃熱病毒科(*Flaviviridae*)黃熱病毒屬(*Flavivirus*)。它會造成登革熱(dengue fever)、登革出血熱(dengue hemorrhagic fever)及登革休克症候群(dengue shock syndrome)等症狀。登革熱病毒產生蛋白質的過程中，會先產生單一個蛋白質轉譯區，再切割成 10 個獨立的蛋白質。包含 3 個結構性蛋白(structural proteins)以及 7 個非結構性蛋白(non-structural proteins)，其中外膜蛋白(envelope protein)便屬於結構性蛋白，位於病毒雙層膜的外側，是一種穿膜的蛋白質，被認為可和受體結合，與感染宿主細胞有關。NS1 與 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 是較小的非結構性蛋白，具有疏水的特性，皆是與膜有關的蛋白質。已知 NS2B 會參與蛋白切割酶切割反應，而 NS1、NS2A、NS4A、NS4B 則與病毒的複製有關。為研究蛋白質的功能，首先必須建構質體並於大腸桿菌系統中表現蛋白質，本研究將針對 NS1、NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 與 E 蛋白等蛋白質做探討，由於這些蛋白質皆具有疏水的特性，因此選用大腸桿菌 C41(*DE3*)及 C43(*DE3*)菌株以利其表現。將基因構築於修飾過 pET-30(+)表現載體：pETΔ5T-HAHis 上，分別於基因末端接上融合蛋白 HA-His(influenza Hemagglutinin-Hexahistidine protein)以利抗體偵測。將此建構質體送入大腸桿菌 C41(*DE3*)或 C43 (*DE3*) 菌株後，皆可採用西方點墨法(Western blot)偵測其表現，但以 Comassie blue 染色則無法偵測到。

# Expression of Dengue Virus Proteins NS1, NS2, NS4 and E in *E.coli* C41 and C43 Expression Strains

## Abstract

Dengue virus is a member of family *Flaviviridae*, genus of *Flavivirus*. Dengue viruses cause dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. Dengue virus encodes 10 proteins in a single open reading frame, including 3 structural proteins and 7 non-structural proteins. Envelope protein is one of the structural proteins located outside of the virus particle, which can bind to receptors on host cells and causes infection. NS2A, 2B, 4A and 4B are small non-structural proteins which are membrane-associated proteins exhibiting hydrophobic profiles. NS2B has been suggested to involve in protease activity. NS1, NS2A, NS4A and NS4B have been suggested to involve in virus replication. Individual expression plasmids were constructed and expressed in *E.coli* C41 (*DE3*) and C43 (*DE3*) strains due to their hydrophobic profiles. These genes were cloned individually into a modified pET-30(+) vector, pET $\Delta$ 5T-HAHis. Their proteins were expressed as HA-His (influenza Hemagglutinin- Hexahistidine protein) fusion proteins for antibodies detection. Recombinant proteins fused with HA-His tag could be detected by Western blotting analysis, but not by Comassie blue staining.

## 致謝

在新竹兩年多的研究生活，除了學習到許多專業知識、也明白許多待人處世的道理，很慶幸能遇到楊昀良老師的指導，開啟我充實的碩士生涯，在此學生由衷的感謝您。

十分感謝口試委員林苔吟老師、黃兆棋老師、冷治湘老師給予論文上的指導與建議，讓論文更加完整與充實，學生獲益良多。

在這裡，不僅擁有舒適的實驗環境，在實驗方面老師給予我們細心指導與缺失的改進，做人做事方面老師也教導我們謙卑的態度，讓我們獲益良多。研究生忙碌的日子中，朋友間的伴隨與幫助讓這段日子增添美麗豐富的色彩，壞小孩旻秀生活玩樂有默契，淑貞做事認真努力，淑萍直來直往有個性，同儕間的我們一同渡過許多時光；昶文生活好榜樣，小毛志豪幽默很逗趣，秉博、晨圃、毓緯、欣彬照顧後輩很夠力，有學長姐們的提拔讓我活力十足；大學姐惠菁總是幫大家送定序，正妹小倩聰穎伶俐，麻麻阿毛笑嘻嘻很陶氣，阿彭毓駿率直有自信，為人師表佳真虧人有霸氣，小 Sunny 馨儀細心謹慎，妍寧禮貌周到，媚妹&重延簡報製作有創意，乖孩子 Ubi 總愛玩遊戲，阿大人緣超好有魅力，武田幸璇小巨人有毅力，阿錕照顧愛貓有一套，志達催促進度有效率，新夥伴世宏與睿賢未來研究很順利，有了大家的加入，實驗室彷彿像個大家庭般的快樂又美麗。

此外朝彥、小高、采婷、怡仁、茵嵐與孟鈴等好友的陪伴讓生活充滿樂趣，感謝葉大哥全心全力呵護小楊實驗室不遺餘力，所辦工作團隊給我許多工讀機會很感動，還有小胖吃喝玩樂揪團去，家煒活潑互動很有趣，咏馨歌唱天后有實力，世勳提供居家生活好環境，若芬默默給予支持與鼓勵，讓我在研究生涯中總是能夠樂觀進取的前進。

父母的栽培與弟弟的陪伴可以讓我在求學過程中平安順利，一路走來受惠於許多人的幫忙與協助，感謝上天給了我許多學習成長的機會，研究生涯的回憶點滴在心頭，未來的道路願你我都能平安順遂，期望我們都能保持愉快的心去幫助更多的人，套句大家常說的話：「要感謝的人太多了，不如就謝天吧。」，所有一切的祝福與感謝，盡在不言中。

## 目錄

中文摘要.....	I
Abstract .....	II
致謝.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
附錄目錄.....	X
縮寫 (Abbreviation) .....	XI
壹、緒論.....	1
1.1 登革熱病毒.....	1
1.2 登革熱病毒的基因結構.....	2
1.3 登革熱病毒基因轉譯.....	2
1.4 外膜蛋白 E 之特性.....	3
1.5 非結構蛋白 NS1 之特性.....	4
1.6 非結構蛋白 NS2A 的特性.....	5
1.7 非結構蛋白 NS2B 的特性.....	6
1.8 非結構蛋白 NS4A 的特性.....	6
1.9 非結構蛋白 NS4B 的特性.....	7
1.10 表現登革熱蛋白質的系統-大腸桿菌 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株.....	7
貳、材料與方法.....	9
2.1 實驗材料.....	9
2.1.1 菌株 (Bacteria Strains) .....	9
2.1.2 病毒 (Viruses) .....	9
2.1.3 質體 (Plasmids) .....	9
2.1.4 引子 (Primers) .....	11
2.1.4.1 針對建構質體所設計的引子.....	11
2.1.4.2 針對 Site-Directed Mutagenesis 所設計的引子.....	13

2.1.5 藥品試劑.....	14
2.1.5.1 藥品.....	14
2.1.5.2 抗體.....	15
2.1.5.3 Kit.....	16
2.1.6 溶劑及緩衝液之配方.....	16
2.1.7 主要儀器.....	17
2.2 實驗方法.....	18
2.2.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備.....	18
2.2.2 大腸桿菌轉形作用 (transformation).....	18
2.2.3 建構質體 DNA.....	19
2.2.4 小量質體 DNA 萃取.....	19
2.2.5 限制酵素反應.....	20
2.2.6 萃取洋菜膠內之 DNA 片段.....	20
2.2.7 重組蛋白在大腸桿菌之誘導表現.....	20
2.2.8 大腸桿菌蛋白質之萃取.....	21
2.2.9 以 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 及西方轉漬分析(Western blot analysis)偵測蛋白質表現.....	21
2.2.9.1 SDS-PAGE 電泳.....	21
2.2.9.2 Coomassie blue staining.....	21
2.2.9.3 西方轉漬分析(Western blot analysis).....	22
參、結果.....	23
3.1 pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體之建構.....	23
3.2 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis pET-30a-D2NS1-HAHis 質體之建構.....	23
3.3 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體之建構.....	24
3.4 利用限制酵素以確認所建構之質體.....	24
3.5 序列結果比對.....	26

3.6 登革熱病毒非結構蛋白以及外膜蛋白(E protein)在 <i>E.coli</i> C41( <i>DE3</i> ) 和 C43 ( <i>DE3</i> ) 中的表現.....	27
3.6.1 登革熱病毒非結構蛋白 NS2 與 NS4 的表現.....	27
3.6.1.1 pET $\Delta$ 5T-D2NS2A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS2A-HAHis 蛋白質表現結果.....	27
3.6.1.2 pET $\Delta$ 5T-D2NS2B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS2B-HAHis 蛋 白質表現結果.....	28
3.6.1.3 pET $\Delta$ 5T-D2NS4A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4A-HAHis 蛋白質表現結果.....	29
3.6.1.4 pET $\Delta$ 5T-D2NS4B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4B-HAHis 蛋 白質表現結果.....	30
3.6.2 登革熱病毒外膜蛋白的表現.....	31
3.6.2.1 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 蛋白質表 現結果.....	31
3.6.3 登革熱病毒非結構蛋白 NS1 的表現.....	32
3.6.3.1 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 蛋白質表現結果.....	32
3.6.3.2 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 蛋白質表現結果.....	33
3.6.3.3 pET30a-D2NS1-HAHis 蛋白質表現結果.....	33
肆、討論.....	35
4.1 質體建構與序列分析.....	35
4.2 表現登革熱病毒非結構蛋白 NS2 與 NS4 與外膜蛋白在 <i>E.coli</i> C41 ( <i>DE3</i> ) 和 C43 ( <i>DE3</i> ) 表現系統.....	35
4.3 表現登革熱病毒外膜蛋白在 <i>E.coli</i> C41 ( <i>DE3</i> ) 和 C43 ( <i>DE3</i> ) 表現 系統.....	37
4.4 表現登革熱病毒非結構蛋白 NS1 在 <i>E.coli</i> C41 ( <i>DE3</i> ) 和 C43 ( <i>DE3</i> ) 表現系統.....	37
伍、結 論.....	40
陸、參考文獻.....	41



## 表目錄

表 1	Comparison of amino acid sequence of dengue virus type 2 and PL046 strain ( Accession No. AJ968413 ) .....	53
表 2	Comparison of amino acid sequence of dengue virus type 3 and H87 strain ( Accession No. M93130 ) .....	53
表 3	Result of Western blot .....	54



## 圖目錄

### 壹、緒論圖

圖 1.1	<i>Flavivirus</i> 之 RNA 基因結構.....	55
圖 1.2	<i>Flavivirus</i> Polyprotein 之結構與在 ER 膜上的分佈.....	55
圖 1.3	登革熱病毒外膜蛋白結構圖.....	56
圖 1.4	登革熱病毒 NS1 疏水性分布圖.....	56
圖 1.5	登革熱病毒 NS2B 疏水性分布圖與 NS2B-NS3 protease 於膜上之示意圖.....	57
圖 1.6	登革熱病毒 NS2B-NS3 protease 立體結構圖.....	58
圖 1.7	登革熱病毒 NS4A 於膜上之 Topology 示意圖.....	59



圖 3.1	pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體建構示意圖與 HA3His6 定序分析..	60
圖 3.2	pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)- HAHis 質體.....	61
圖 3.3	pET $\Delta$ 5T-D3NS2A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS2B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體.....	62
圖 3.4	限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-HAHis.....	63
圖 3.5	限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體.....	64
圖 3.6	限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體.....	65

圖 3.7	限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體.....	66
圖 3.8	限制酶酵素切割 pET-30a(+), pET-30a(+)-D2NS1-HAHis 質 體.....	67
圖 3.9	DV2-NS2A 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	68
圖 3.10	DV3-NS2A 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	69
圖 3.11	DV2-NS2B 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	70
圖 3.12	DV3-NS2B 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	71
圖 3.13	DV2-NS4A 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	72
圖 3.14	DV3-NS4A 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	73
圖 3.15	DV2-NS4B 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	74
圖 3.16	DV3-NS4B 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	75
圖 3.17	DV2-E 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 ...	76
圖 3.18	DV3-E 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 ...	77
圖 3.19	DV2-NS1 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	78
圖 3.20	DV2-NS1 在 <i>E.coli</i> B21(DE3)的蛋白質表現 .....	79
圖 3.21	DV2-NS1(d)在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現 .....	80

圖 3.22 DV2-NS1 在 <i>E.coli</i> C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現	81
---	----

### 附錄目錄

附錄 1 Site-Directed Mutagenesis Kit	82
附錄 2 TA cloning Kit	83
附錄 3 pGEM-T 質體之 map	84
附錄 4 ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit	85
附錄 5 PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	86
附錄 6 pET-30a(+) 質體之 map	88
附錄 7 pETΔ5T 質體之示意圖	89
附錄 8 pETΔ5T-D22A-HAHis, pETΔ5T-D2B-HAHis, pETΔ5T-D24A-HAHis 與 pETΔ5T-D22A-HAHis 質體示意 圖	90
附錄 9 pcDNA3-NCS/DV2FL-PL046-S 與 pcDNA3/DV3/1029-10696/fix5 示意圖	91

## 縮寫 ( Abbreviation )

<b>APS</b>	Ammonium Persulfate
<b>C protein</b>	Capsid protein
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>DENV</b>	Dengue virus
<b>DF</b>	Dengue fever
<b>DHF</b>	Dengue hemorrhagic fever
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DSS</b>	Dengue shock syndrome
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<i><b>E.coli</b></i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>E protein</b>	Envelope protein
<b>EtBr</b>	Ethidium bromide
<b>HA-His</b>	Hemagglutinin-polyhistidine protein
<b>HPR</b>	horseradish peroxidase
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
<b>KUNV</b>	Kunjin virus
<b>LB broth</b>	Luria-Bertani broth
<b>NS protein</b>	Non-structure protein
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PMSF</b>	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
<b>prM protein</b>	Precursor membrane protein
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>TAE</b>	Tris-acetate-EDTA
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>TEMED</b>	N, N, N', N',-tetramethylenediamine
<b>Tween-20</b>	Polyoxyethene-sorbitan monolaurate
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>WNV</b>	West Nile virus
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
<b>YFV</b>	Yellow Fever Virus

## 壹、緒論

### 1.1 登革熱病毒

登革熱病毒 (Dengue virus, DENV) 在分類學上屬於黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 的黃質病毒屬 (*Flavivirus*)。病毒直徑大小約為 50 nm (Henchal and Putnak, 1990)。黃質病毒屬的病毒的傳播影響人類的健康，主要經由蚊蟲或壁蝨 (tick) 等節肢動物傳染，除了登革熱病毒 (DENV)，黃熱病毒 (yellow fever virus, YFV)、West Nile virus (WNV)、Kunjin virus (KUNV)、日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 與 Tick-borne encephalitis virus 等也屬於 *Flavivirus*。

登革熱病毒可分為四種血清型 (serotype) DENV-1~DENV-4，藉由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 叮咬宿主的途徑進而傳播給人類並引發疾病，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 (Dengue shock syndrome, DSS) 等 (Clyde et al., 2006)。登革熱 (DF) 主要病徵類似流行性感冒，主要為發燒、頭痛、眼窩疼痛、肌肉關節痠痛。登革出血熱 (DHF) 的病徵與登革熱相同，並且會增加血管的通透性，導致血漿漏出 (plasma leakage)、血小板減少 (thrombocytopenia) 與紅血球濃縮 (hemoconcentration) 的症狀發生，嚴重者將有休克性的現象 (DSS)，無妥善處理將導致死亡。

登革熱病毒於西元 1779~1780 年在主要擴及熱帶及亞熱帶地區爆發流行，在 1950 年代，由原本 9 個遭受登革熱病毒感染的國家，如今已經分布超過 100 多個國家，根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 的統計數據顯示，全球約超過 25 億的人口曾經遭受登革熱病毒的感染，DF/DHF 的感染率在西元 1950~1959 年之中，由每年平均增加 908 個病患；到了西元 1990~1999 年，每年約有 50 萬 DHF/DSS 病患住院治療，約有 5 % 患者因而死亡 (Guha-Sapir and Schimmer, 2005)，面對登革熱病毒所帶來的危害，是一個急需解決的重要課題。

## 1.2 登革熱病毒的基因結構

登革熱病毒為正向單股的 RNA 病毒(positive single stranded RNA virus) 且具外膜的病毒。基因體全長約 11 kb，在 5'端有 type I cap 結構- $m^7GpppAmpN_2$ ，不同於一般的 mRNA，其 3'端則是缺乏 Poly A 序列 (polyadenylated tail) (Cleaves and Dubin, 1979; Wengler et al., 1978)。基因體具有單一個 open reading frame (ORF)，在 5'端以及 3'端各有一個 noncoding region (NCR)，兩端之 NCR 含有 stem-loop (SL) 可以協助 RNA 轉譯以及複製，3'端 SL 和許多蛋白質之間有交互作用，如病毒 replicase 相關的蛋白質 NS3 與 NS5，在 DENV-4 與 WNV 中的研究中，發現 elongation factor 1A (EF1A) 能與 3'端 SL 結合 (Blackwell et al., 2004; De Nova-Ocampo et al., 2002)。【圖 1.1】

## 1.3 登革熱病毒基因轉譯

Flavivirus 運用許多機制去協助蛋白質轉譯的進行，如上述所提及的 5'端與 3'端 NCR 等特殊結構。轉譯的起始為 cap dependent，並能幫助 ribosomal scanning，不過有研究發現 DENV 會運用未知的機制，在抑制 cap dependent 的情況下亦能進行蛋白質轉譯 (Edgil et al., 2003)。以蚊子當媒介的 Flavivirus 因缺乏 Kozak motif 序列，對於起始密碼 AUG 的辨識缺乏專一性，由於 DENV 之 capsid coding region (cHP) 上具有 RNA hairpin 的結構，協助核糖體(ribosome)能從 first AUG 進行起始轉譯 (Clyde and Harris, 2005)。

病毒的基因體擁有單一個 ORF，因此會轉譯出一個單一的 polyprotein，經由轉譯後切割，成為 10 個蛋白質。Polyprotein 的 N 端區域編碼三個結構蛋白 (structural protein) C- prM- E，分別為衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, prM) 以及外膜蛋白 (envelope protein, E)，其餘區域編碼非結構蛋白 (nonstructural protein) NS1- NS2A- NS2B- NS3- NS4A- 2K- NS4B- NS5 (Lindenbach et al., 2003; Miller et al., 2007)，其中 Transmembrane domain 2K 序列位於 NS4A 的 C 端。Polyprotein 會被宿主細胞內的 peptidase 與病毒本身的 serine peptidase 切割，宿主細胞

內的 peptidase 負責切割 C/prM、prM/E、E/NS1 與 2K/NS4B；病毒的 serine peptidase 負責切割 NS2A/NS2B、NS2B/NS3、NS3/NS4A、NS4A/2K 與 NS4B/NS5 的蛋白質連結。NS1/NS2A 的蛋白質切割所使用的酵素目前還未知 (Lindenbach et al., 2007)。【圖 1.2】

衣殼蛋白 (C) 會包住病毒的 RNA，形成雙體 (dimer)，其結構中包含四個  $\alpha$ -helixes (Dokland et al., 2004; Jones et al., 2003; Ma et al., 2004)，衣殼蛋白的雙體結構是如何組成 nucleocapsids 的機制目前還不明確，RNA 與衣殼蛋白間的交互作用有助於形成類似 nucleocapsids 的結構 (Kiermayr et al., 2004)。前驅膜蛋白 (prM) 與外膜蛋白 (E) 同屬於糖蛋白 (glycoprotein)，前驅膜蛋白會幫助外膜蛋白摺疊與組裝 (Brock et al., 1992)，前驅膜蛋白經切割後會形成膜蛋白 (M)，膜蛋白和外膜蛋白同為鑲嵌在病毒外套上的蛋白質 (Mukhopadhyay et al., 2005)。

非結構性蛋白最主要的功能在於複製病毒 RNA，NS3 是一個具有多功能性的蛋白質，含有 protease 以及 RNA 複製活性，其蛋白質 N 端約 1/3 的大小含有 catalytic domain 將形成 NS2B-NS3 serine protease 以便進行 polyprotein 的修飾 (Bazan et al., 1989; Chambers et al., 1990; Gorbalenya et al., 1989)。

NS5 擁有 7 個 motifs，C 端 2/3 的位置擁有 RNA-dependent RNA polymerase 活性，而 N 端的 2 個 motifs 則具有 methyltransferase (MTase) 活性 (Koonin EV, 1993)，為 S-adenosyl-methionine dependent MTase，研究指出 DENV-2 之 NS5 的 N 端能轉移 S-adenosyl-methionine 上的甲基 (methyl group) 至受質 RNA 上，修飾 5' cap 的功能 (Egloff et al., 2002)。

#### 1.4 外膜蛋白 E 之特性

E protein (約 53 kDa)，是 flavivirus 病毒顆粒表面主要的蛋白質，E 是以膜蛋白 type I 的形式所合成，並且具有 12 個 cysteine 以利形成雙硫鍵 (Nowak and Wengler, 1987)，E protein 是以頭對尾 (head-to-tail) 的形式兩兩成對成為雙體 (dimer)。完整的 E protein 可為三個區域 (domain)。Domain



I 是 E protein 的中央區域並形成  $\beta$ -barrel; domain II 含有和另外一個 E protein 形成雙體的區域，並且含有一個 fusion peptide (fusion peptide 與病毒感染宿主細胞有關)；而 domain I 的另一端則與 domain III 接合，domain III 含有 receptor-binding 的活性是一個 immunoglobulin (Ig)-like domain，可和宿主細胞受體結合，能被抗體所辨識並且能抑制病毒的侵入 (Lindenbach et al., 2007, Nybakken et al., 2005)。【圖 1.3】

E protein 於自然狀態下會形成雙體結構，在低 pH 值的環境下，E protein 的雙體結構 (dimer) 會分離成單體 (monomer)，之後形成三體結構 (trimer)。其機轉還不明確，但此三體的 ectodomains 有助於與細胞膜融合 (Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2004)。

### 1.5 非結構蛋白 NS1 之特性

醣蛋白 NS1 (約 45 kDa) 主要位於 ER 的內部，共有三種表現形式：位於 replication complex、membrane-anchored 以及分泌於胞外等形式 (Lindenbach et al., 2003)。利用宿主體內的 signal peptidase 使 NS1 與 E protein 分離，位於 ER 內部的酵素則可分離 NS1/2A 的鍵結 (Falgout et al., 1989; Falgout and Markoff, 1995)。NS1 會大量的存在於被感染的細胞中，並且發現位於細胞表面的 NS1 將會被哺乳細胞緩慢的分泌出去 (Lindenbach and Rice, 2003)。

Flaviviruses 在 NS1 結構當中含有 2~3 個 N-linked glycosylation sites 與 12 個 conserved cysteine (Lee et al., 1989; Mason PW, 1989; Smith et al., 1970)。已知在 dengue virus 的 glycosylation sites 位於 N130 以及 N207，為病毒複製所必須 (Crabtree et al., 2005)，而 NS1 參與 RNA 複製過程中的角色並不明確，但有研究指出，若將 NS1 之 N-linked glycosylation sites 做突變，將抑制 RNA 的複製以及病毒顆粒的產生 (Crabtree et al., 2005; Muylaert et al., 1996)。NS1 與 NS4A 之間的作用也是 replicase 運作所必須 (Lindenbach and Rice, 1999)。

蛋白質轉譯後約 30 分鐘，NS1 將形成穩定的 homodimers 的結構，並

傾向於附著於膜上 (Winkler et al., 1988; Winkler et al., 1989)【圖 1.4】。NS1 具有高度的疏水性特質以及缺乏 transmembrane domains，但為何是和膜有關的蛋白質，其機制目前還不明確。推測可能是 dimerization 在蛋白質表面創造出一個疏水性的區域以利於和膜產生疏水性鍵結的作用 (Lindenbach et al., 2007)。儘管前人的研究指出 NS1 為分泌到細胞外必須經由 dimerization (Pryor and Wright, 1993)，但也有研究指出，將 Kunjin virus (KUNV) 之 NS1 做蛋白質突變，使其產生結構不穩定之 dimer 結構但仍然可以被細胞所分泌到胞外 (Hall et al., 1999)。被分泌到胞外的 NS1 將形成可溶性的 hexameric particles (約 11 nm)，由三個具有 dimer 形式的 NS1 蛋白經由疏水性鍵結 (hydrophobic interaction) 而成 (Crooks et al., 2005; Flamand et al., 1999)。此種形式的 NS1 會被運送到 hepatocytes 以及 late endosome 中堆積，並且會提高 flavivirus 的感染性 (Alcon-LePoder et al., 2005)。

## 1.6 非結構蛋白 NS2A 的特性

NS2A 是一個較小的疏水性蛋白質 (約 22 kDa)，其 N 端與 NS1 相接，透過宿主 ER 內部未知的酵素分離 NS1-2A (Falgout and Markoff, 1995)。NS2A/2B 暴露於細胞質中，會與 NS2B-NS3 serine protease 作用而分割，NS2A 之 C 端與 serine protease 作用後將形成 NS2A $\alpha$  (Chambers et al, 1990; Nestorowicz et al., 1994)。在 Yellow Fever Virus (YFV) 中，若將 NS2A $\alpha$  之 cleavage site 做突變，將會影響之後病毒顆粒之組裝，但若在 NS3 helicase domain 也進行突變，便會抵消突變 NS2A 所造成的效果 (Kummerer and Rice, 2002)。KUNV 的 NS2A 亦會參與 RNA 的複製，並與 replicase 中的 NS3 與 NS5 有交互作用 (Mackenzie et al., 1998)。

在免疫學上的研究指出 Interferon (IFN) 可以抑制病毒的感染。在 Dengue virus type 2 中，發現 NS2A 會抑制 IFN 在細胞內的訊號 (Munoz-Jordan et al., 2003)，進一步研究指出，若將 KUNV 以及 West Nile Virus (WNV) 的 NS2A 蛋白質突變，會加強其抑制 IFN 的活性，並減弱 WNV 對於老鼠所造成的毒害 (Liu et al., 2004; Liu et al., 2006)。有趣的是，

將 KUNV 之 NS2A 做突變，在 IFN 勝任細胞 (IFN competent cell lines) 的實驗中，會提升 KUNV 中複製子 (replicon) 的活性並且持續性地進行病毒 RNA 的複製 (Liu et al., 2004)。

### 1.7 非結構蛋白 NS2B 的特性

NS2B 是一個小分子量的膜蛋白 (約 14 kDa)，會與 NS3 serine protease 形成一個穩定的結構：NS2B-NS3 serine protease。NS2B 同時也是 NS3 serine protease 的 cofactor，其角色與 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus) 中的 NS4A 作用相似 (Falgout et al., 1991)。Cofactor 的活性位置約位於整條 peptide 的中心，由 40 個胺基酸所組成，一般稱為 serine protease domain (或 cofactor domain)，而其中具有疏水性的 12 個胺基酸 (<sup>70</sup> GSSPILSITISE <sup>80</sup>) 可能與 NS3 的結合有關，(Brinkworth et al., 1999; Erbel et al., 2006)。進一步研究發現，若將 NS2B 之 conserve residue 突變，將會造成蛋白質反切 (transcleavage) 的活性，使 NS2B/NS3 分離 (Chambers et al., 2005; Niyomrattanakit et al., 2004)。【圖 1.5, 圖 1.6】



### 1.8 非結構蛋白 NS4A 的特性

NS4A 是一個疏水性蛋白質 (約 16 kDa)，與 NS1 交互作用並且與病毒的 RNA 複製有關 (Lindenbach and Rice, 1999; Mackenzie et al., 1998)。NS4A 的結構由四個疏水性的區域組成 (pTMS1~4) 【圖 1.7】，由於 Flavivirus 感染細胞時會產生膜重排 (cytoplasmic membrane rearrangement) 的現象，以提高病毒感染，而 NS4A 其 C 端的 transmembrane domain 2K (圖 1.7 中之 pTMS4)，被發現與膜重排有關。研究發現在 KUNV 中，NS4A/2K/NS4B 的連結經由 NS2B-NS3 serine protease 作用切割，可以切斷 2K/NS4B 的連結，這將影響膜重排的起始，若是將 NS4A 蛋白質 C 端的 2K 序列切除，將會降低細胞膜重排的現象，而被切除 2K 序列之 NS4A 則會被運送到高基氏體 (Golgi) 中 (Miller et al., 2007; Roosendaal et al., 2006)。

## 1.9 非結構蛋白 NS4B 的特性

NS4B亦是一個疏水性蛋白質(約27 kDa)，其胺基酸序列在登革熱病毒各個血清型間約有78~85%的相似度，研究發現NS4B、NS3與雙股RNA會一同位於ER的膜上，推測NS4B與病毒的RNA複製有關 (Miller et al., 2006; Westaway et al., 2002)。進一步研究指出，利用酵母菌雙雜交法 (yeast two-hybrid assay) 發現NS4B會與NS3的C端 (aa 303~618) 的helicase motif 結合，而NS3的C端的helicase motif也和RNA的結合有密切的關係，單一的NS4B分子無法順利的與NS3和ssRNA結合，因此推測至少有兩個NS4B分子構成oligomer後才能順利的與NS3和ssRNA結合。(Umareddy et al., 2006)。

如前面所述，NS2A 與 interferon (IFN) 與細胞內的訊號抑制有關 (Munoz-Jordan et al., 2003)。在 DENV 中 NS4B 同樣也能抑制 interferon (IFN) 在細胞內的訊號，尤其對於 IFN- $\beta$  與 IFN- $\gamma$  具有強力的抑制作用 (Munoz-Jordan et al., 2005)。

## 1.10 表現登革熱蛋白質的系統-大腸桿菌 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株

為了研究登革熱蛋白質的功能，首先必須將蛋白質大量表現 (over-express)，將 DENV-2 PL046 strain 與 DENV-3 H87 strain 欲表現的結構與非結構蛋白質基因建構成於適合的質體 (plasmid)，利用大腸桿菌 (*E.coli*) 表現系統表現蛋白質，本實驗所運用的大腸桿菌為 C41(DE3)與 C43(DE3) 菌株，可用來大量產生膜蛋白，從突變之大腸桿菌 *E.coli* BL21 (DE3) 而來，在蛋白質表現方面，可以有效改善在 BL21 (DE3) 中表現不佳的情形 (Miroux and Walker, 1996)，此兩種菌株和一般 BL21 (DE3) 的不同點在於在大量表現蛋白質 (over-expression) 的同時，於菌株體內會伴隨著增生內膜 (proliferation of intracellular membrane)，所產生的蛋白質會附著於此內膜上，並且降低 inclusion body 的產生 (Arechaga et al., 2000)，此外，此兩種菌株通常用於大量表現對宿主細胞有毒害的蛋白質並能避免宿主細胞死亡，且有穩定質體的作用 (Dumon- Seignovert et al., 2004)，由於登革熱病毒中大多數的蛋白質目前並無有效的偵測方式，因此本實驗想利用

C41 (*DE3*) 與 C43 (*DE3*) 菌株表現登革熱病毒中具有疏水特性的蛋白質，將蛋白質大量表現純化並製造專一性抗體，用於於病毒顆粒或感染細胞株的偵測等功能性研究，以利於進一步探討蛋白質的生化功能。



## 貳、材料與方法

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 菌株 (Bacteria Strains)

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Yang laboratory collection)

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Yang laboratory collection)

*Escherichia coli* C41(DE3)

(Yang laboratory collection; gift from Dr. Chin-Hsiang Leng)

*Escherichia coli* C43(DE3)

(Yang laboratory collection; gift from Dr. Chin-Hsiang Leng)

#### 2.1.2 病毒 (Viruses)

PL046 strain (Dengue virus type 2 Taiwan local strain)

H87 strain (Dengue virus type 3 strain)

#### 2.1.3 質體 (Plasmids)

質體名稱	特性	Reference
pcDNA3	篩選標誌為 Ampicillin，並含 T7 promoter 及 CMV promoter	Invitrogen
pET-30a(+)	篩選標誌為 Kanamycin，並含 T7 promoter、His-tag 及 S-tag 序列	Novagen
pGEM-T Vector	本研究用於 TA cloning	Promega
pcDNA3-NCS/DV2FL-PL046-S	pcDNA3 含有 PL046 strain 全長的 cDNA	Yang laboratory collection

pcDNA3/DV3/1029-10696/ fix5	pcDNA3 含有 H87 strain 全長的 cDNA	Yang laboratory collection
pET△5T	pET-30a(+)的 N-terminal His-tag 及 S-tag 序列被切除	楊馥嘉, 2006 交大碩 士論文; Yang laboratory collection
pET△5T-HAHis	pET-30a(+)的 N-terminal His-tag 及 S-tag 序列被切除, 並含有 HA-tag 及 His-tag 序列	本研究
pET△5T-D22A-HAHis pET△5T-D22B-HAHis pET△5T-D24A-HAHis pET△5T-D24B-HAHis	pET△5T 上含 PL046 strain 的 NS2A、2B、4A 以及 4B 基因, 3'端帶有 HAHis-tag, 其 5'端及 3' 端 cloning site 為 <i>Bam</i> HI 及 <i>Xba</i> I	楊馥嘉, 2006 交大碩士論 文; Yang laboratory collection
pET△5T-D2E-HAHis	pET△5T-HAHis 上含 PL046 strain 的 E 基因, 3'端帶有 HAHis -tag, 其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Eco</i> RV 及 <i>Not</i> I	本研究
pET△5T-D32A-HAHis pET△5T-D32B-HAHis pET△5T-D34A-HAHis pET△5T-D34B-HAHis pET△5T-D3E-HAHis	pET△5T-HAHis 上含 H87 strain 的 NS2A、2B、4A、4B 以及 E 基因, 3'端帶有 HAHis-tag, 其 5' 端及 3'端 cloning site 為 <i>Bam</i> HI 及 <i>Not</i> I	本研究

pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis	pET $\Delta$ 5T-HAHis 上含 PL046 strain 的 NS1 基因，3'端帶有 HAHis-tag，其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Bam</i> HI 及 <i>Not</i> I	本研究
pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis	pET $\Delta$ 5T-HAHis 上含 PL046 strain 的截短型 NS1 基因 (a.a. 1~723)，3'端帶有 HAHis-tag，其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Bam</i> HI 及 <i>Not</i> I	本研究
pET-30a(+)-D2NS1-HAHis	pET-30a(+)上含 PL046 strain 的 NS1 基因，3'端帶有 HAHis-tag，其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Bam</i> HI 及 <i>Xho</i> I	本研究

## 2.1.4 引子 (Primers)

### 2.1.4.1 針對建構質體所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
HAHis-F'	TTTGCGGCCGCA{TACCCATACG A}	HAHis gene (from pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis) nucleotide:+5864~+5874
HAHis-R	TTTCTCGAGTCACTA{GCCATG GTGA}	HAHis gene (from pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis) nucleotide:+5968~+5977
DV2-E-F	TTTGCGGCCGC{GGCCTGCACC ACGACTCC}	DV-2 (PL046; AJ968413) nucleotide:+2404~+2421
DV2-E-R	TTTGATATC{ATGCGTTGCATAG GAATATC}	DV-2 (PL046; AJ968413) Nucleotide:+937~+956



DV3-2A-F	TTTGGATCCATG{GGGAGTGG AAAGG}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +3470~+3482
DV3-2A-R	TTTGCGGCCGC{TCTCCTTTTG AGT}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +4111~+4123
DV3-2B-F	TTTGGATCCATG{AGCTGGCC ACTGAAT}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +4124~+4138
DV3-2B-R	TTTGCGGCCGC{TCTTTGGGTT TG}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +4502~+4513
DV3-4A-F	TTTGGATCCATG{TCAATCGCC CTTGA}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +6371~+6384
DV3-4A-R	TTTGCGGCCGC{GGCCGCTACT ATT}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +6808~+6820
DV3-4B-F	TTTGGATCCATG{AATGAAATG GGACTG}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +6821~+6835
DV3-4B-R	TTTGCGGCCGC{TCTCTTTCCT GTTC}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +7551~+7564
DV3-E-F	TTTGGATCC{ATGAGATGTGTG GGAGTAG}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +935~+953
DV3-E-R	TTTGCGGCCGC{AGCTTGCAC CACGA}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +2400~+2413
DV2-NS1-F	TTTGGATCCATG{GATAGTGGT TGCGTTG}	DV-2 (PL046; AJ968413) nucleotide: +2422~+2437
DV2-NS1-R	TTTGCGGCCGC{GGCTGTGAC CAAG}	DV-2 (PL046; AJ968413) nucleotide: +3465~+3477
DV2-NS1-R705	TTTGCGGCCGC{CTCACTTTCT AGCACTCC}	DV-2 (PL046; AJ968413) nucleotide: +3112~+3240

註：DV-2 基因的引子是根據前人賴建孝定序結果所設計（賴建孝, 2006, 交大碩士論文）。DV-3 基因的引子根據 NCBI 網站核酸序列編號（H87; M93139）所設計。{ } 內的序列為模板所具有的序列；{ } 外的序列為外加的 DNA 序列；畫單底線為外加的酵素切位；粗體字部份為起始密碼或終止密碼。

#### 2.1.4.2 針對 Site-Directed Mutagenesis 所設計的引子

DV3-2B-a	{GGACTTGTGAGCATTC}TA{GCTA GTTCTCT}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +4157~+4185
DV3-2B-b	{AGAGAACTAGC}TA{GAATGCTCA CAAGTCC}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +4185~+4157
DV3-4A-a	{TGATGATCTTGTTA}A{CAGGTGG AGCAATG}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +6549~+6577
DV3-4A-b	{CATTGCTCCACCTG}T{TAACAAG ATCATCA}	DV-3 (H87; M93139) nucleotide: +6577~+6549

註： DV-3 基因的引子根據 NCBI 網站核酸序列編號（H87; M93139）所設計。{ } 內的序列為模板所具有的序列；{ } 外的序列為外加的 DNA 序列。

## 2.1.5 藥品試劑

### 2.1.5.1 藥品

藥品名稱	製造公司	目錄編號	應用
1kb DNA ladder	SibEnzyme	SEM11C001	DNA 電泳
2-propanol	Sigma	I 9516	SDS-PAGE
Acetic acid	Fluka	33209	Western blot
Acryl/Bis 37.5:1 solution	AMRESCO	0254	Western blot
Agarose	VEGONIA	9201-05	核酸電泳
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養
APS	Bio-Rad	161-0700	SDS-PAGE
Coomassie Brilliant Blue R-250	J.T.Baker	F792-01	蛋白質染色
Crystal Violet	Sigma	C-3886	DNA 染色
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Uni-region	UR-DTT-15g	蛋白質製備
HRP substrate	MILLIPORE	WBKLS0500	Western blot
EtBr	Sigma	E-7637	DNA 染色
Ex Tag polymerase	TaKaRa	RR001B	PCR
IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside)	MDBio,Inc.	105039	細菌培養
Kanamycin	Sigma	K4000	細菌培養
LB agar	Alpha Biosciences	L12-111	細菌培養
LB broth	Scharlau	02-385	細菌培養
Methanol	Mallinckrodt	3016-08	Western blot
NaCl	AMRESCO	0241	緩衝液
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液
Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher&Schue II	10401396	Western blot
PMSF	Fluka	78830	Protein 製備

Prestain Protein marker	TBB	0901	SDS-PAGE
Restriction enzyme	Biolab	—	建構質體
SDS	Riedel-de Haën	62862	Western blot
T4 DNA ligase	Fermentas	1812	建構質體
Tris ( base )	AMRESCO	0826	Western blot
TEMED	Sigma	T-9281	Western blot
Tween-20	Sigma	P-1379	Western blot
Urea	Fluka	SK-2644U	蛋白質製備
X-film	Midwest Scientific	LA7111	Western blot
X-gal	MDBio,Inc.	613049	細菌培養
$\beta$ -mercaptoethanol	MERCK	1.1543.0100	蛋白質製備

#### 2.1.5.2 抗體

抗體名稱	製造公司	目錄編號
HA-probe(F-7)HRP	Santa Cruz	SC-7392
6xHis Monoclonal Antibody	BD Biosciences	8916-1
Goat anti-mouse HRP	PIERCE	31430

### 2.1.5.3 Kit

產品名稱	製造公司	目錄編號	應用
pGEM <sup>®</sup> -T and pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vectors	Promega	A3600	TA cloning
QuikChange <sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE	200519	修補 DNA
ExcelPure <sup>™</sup> Plasmid Miniprep Purification Kit	Premier	N-PM050	抽取少量質體
PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Premier	N-DCE050	純化 DNA

### 2.1.6 溶劑及緩衝液之配方

- 0.25 % Coomassie blue stain solution  
2.5 g Coomassie brilliant blue , 50 % methanol , 10 % acetic acid  
added ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml
- 0.5 % crystal violet solution (500 ml)  
2.5 g crystal violet , 25 ml 37% formaldehyde , 250 ml EtOH , 4.25 g  
NaCl
- 10X SDS-PAGE running buffer  
0.25 M Tris base , 1.92 M Glycine , 1 % SDS
- 10X Transfer buffer  
39 mM Glycine , 48 mM Tris base , 10 % SDS , 20 % methanol
- 2X SDS-PAGE loading buffer  
0.5 % bromphenol blue , 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) , 10 % SDS ,  
100 % glycerol

- 50X TAE buffer  
48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid  
added dd H<sub>2</sub>O to 200 ml
- LB (Luria-Bertani)/Ampicillin 培養基  
1 % tryptone , 0.5 % yeast extract , 1 % NaCl , 1.5 % agar , 50 µg/ml  
Ampicillin
- TBS buffer (Tris-buffered saline)  
10 mM Tris(pH 8.0) , 150 mM NaCl
- TBST buffer  
10 mM Tris(pH 8.0) , 150 mM NaCl , 0.05% Tween 20

### 2.1.7 主要儀器

- 20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
- 4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
- 80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FORMA SCIENTIFIC)
- 水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)
- 水平式震盪器 S-101 (FIRSTEK)
- 加熱攪拌器 PC-420 (CORNING)
- 半乾式電泳轉印槽 TRANS-BLOT<sup>®</sup> SD CELL 221BR (BIO-RAD)
- 低溫培養箱 701 (WISOOM)
- 往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 直立式電泳槽(Bio-Rad)
- 恆溫式震盪培養箱 S300R (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH )
- 桌上型低溫高速離心機 Centrifuge 5415 R (eppendorf)
- 桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)
- 乾燥加熱板 VH-01 (VIOLET BIO SCIENCE)
- 無菌操作台 (Laminar flow) VCM-420 (造鑫)

程式溫度控制儀 PTC-100™ (MJ RESEARCH INC.)

微量離心機 MICRO 240A (DENVILLE SCIENTIFIC INC.)

落地型高速離心機 Avanti® J-E Centrifuge (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備

首先取 *Escherichia coli* C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 之單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，於 37°C 下震盪培養 (160 rpm/min) 過夜後，取 2 ml 的菌液轉養於 50 ml 的 LB 培養液中，繼續於 37°C 下震盪培養 (160 rpm/min)，直到 OD<sub>600nm</sub> 介於 0.4 到 0.6 之間。將培養好的菌液轉移至 50 ml 離心管中，置於冰上 20 分鐘，之後在 4°C 下以 1620 ×g 離心 10 分鐘後倒去上清液，接著以 25 ml 4°C 預冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，在 4°C 下以 720 ×g 離心 10 分鐘後去除上清液，以 5 ml 4°C 預冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 懸浮菌體，於 4°C 靜置 18 小時，在 4°C 下以 720 ×g 離心 5 分鐘後去除上清液，以 5 ml 預冷的 0.05 M CaCl<sub>2</sub> (含 15 % Glycerol) 懸浮菌體。將菌液以每管 100 μl 分裝至預冷好的微量離心管中，迅速儲存於 -80°C 冰箱保存備用。

### 2.2.2 大腸桿菌轉形作用 (transformation)

將儲存於 -80°C 的勝任細胞取出置於冰上解凍後，加入 0.1~1 μg 的質體 DNA 充分混合，置於冰上 25 分鐘，再置於 42°C 水浴中進行熱休克 (heat shock) 1 分鐘，之後加入 500 μl 的 LB 培養液於 37°C 震盪培養 (160 rpm/min) 1 小時，取 100 μl 的菌液均勻塗布於含 Ampicillin (50 μg/ml)

之LB培養基上，置於37 °C恆溫箱中培養12~16小時。

### 2.2.3 建構質體 DNA

將所設計的引子 (Primers) 經由聚合酶連鎖反應 (PCR, Polymerase Chain Reaction), 透過每個引子  $T_m$  值的不同條件設計反應溫度, 將欲得到的 DNA 片段合成出來, 而 DV3-NS2B 與 DV3-NS4A 的模板基因 (pcDNA3/DV3/1029-10696/fix5) 因含有 deletion 的現象, 因此利用 Site-Directed Mutagenesis Kit 修補 deletion 的部分【附錄 1】, 反應完成後利用洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確, 之後利用 PCR Clean-up Kit (PREMIER) 純化 DNA 以去除酵素及鹽類。

經 Clean-up 且確認 DNA 大小無誤之 PCR 產物, 使用 pGEM-T Vector Systems (Promega) 進行 TA cloning【附錄 2, 附錄 3】, 使 PCR 產物與 pGEM-T Vector 接合 (Ligation), 以利於限制酵素作用, 可用來進一步確認 PCR 產物並加以保存。



### 2.2.4 小量質體 DNA 萃取

使用 ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (PREMIER) 抽取並純化 *E. coli* 之質體 DNA。操作流程如下：將大腸桿菌接種於 5 ml 的 LB 培養液、於 37°C 震盪培養箱中培養 12~16 小時之後, 於室溫 1125  $\times g$  離心 12 分鐘去除上清液, 加入 200  $\mu l$  Solution I Buffer 懸浮菌體並移置微量離心管中, 取 200  $\mu l$  Solution II Buffer 緩和地混合均勻後, 加入 200  $\mu l$  Solution III Buffer 再次緩和地混合均勻, 在室溫下以 16100  $\times g$  離心 5 分鐘, 取上清液至 Mini-M™ Column, 在室溫下以 16100  $\times g$  離心 1 分鐘, 倒掉收集管內液體, 加入 700  $\mu l$  Washing buffer, 在室溫下以 16100  $\times g$  離心 1 分鐘, 倒掉收集管內液體, 重複此步驟一次, 再以室溫 16100  $\times g$  離心 2 分鐘, 將 Mini-M™ Column 移至新微量離心管, 置於 60 °C 的乾浴槽中 5 分鐘將多餘的酒精去除, 最後加入適量 Elution solution 加入 Mini-M™ Column 中, 以室溫 16100  $\times g$  離心 2 分鐘後, 將製備好的質體 DNA 儲存



於-20 °C。【附錄 4】

### 2.2.5 限制酵素反應

為製備實驗所需的 DNA 片段，取適量 DNA (約 0.5~10  $\mu\text{g}$ ) 到適量反應體積 (約 20  $\mu\text{l}$ )，以限制酵素切割 (酵素的用量及反應溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行)，原則上 1  $\mu\text{g}$  的 DNA 是以 2U 的酵素在適當的溫度作用 2 小時至 3 小時，反應完成後，置於適當的溫度終止反應 (依廠商所提供的條件)，利用洋菜膠體電泳分析。DNA 片段在經限制酵素切割後，視需要以 Gel Extraction Kit (PREMIER) 或 PCR Clean-up Kit (PREMIER) 回收 DNA 並去除限制酵素及鹽類。【附錄 5】

### 2.2.6 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用 Gel Extraction Kit (PREMIER) 萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。操作流程如下：將切下之洋菜膠 (約 50-200 mg)，置於微量離心管內，加入 500  $\mu\text{l}$  Binding Solution，60 °C 加熱至完全溶解後，將混合液移至 Gel-M<sup>TM</sup> Column，以室溫 16100  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，加入 700  $\mu\text{l}$  Washing Buffer，以室溫 16100  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，再加入 700  $\mu\text{l}$  Washing Buffer，以室溫 16100  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，再以室溫 16100  $\times\text{g}$  離心 3 分鐘，將 Gel-M<sup>TM</sup> Column 移至新微量離心管，置於 60 °C 的乾浴槽中 5 分鐘把多餘的酒精去除，再加入 30  $\mu\text{l}$  Elution solution 於 Gel-M<sup>TM</sup> Column 中，以室溫 16100  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘後，將萃取出之 DNA 儲存於-20 °C。【附錄 5】

### 2.2.7 重組蛋白在大腸桿菌之誘導表現

將質體轉形於大腸桿菌 BL21(DE3) 或 NovaBlue(DE3)，隔天挑單一菌落於含有 Ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或 Kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 之 LB 培養液中於 37 °C 培養箱震盪培養，隔夜後，取 1/100 之菌液轉養於 5 ml 的 LB 培養液中並於 37 °C 培養箱震盪培養，至 OD<sub>600nm</sub> 介於 0.6 到 0.8 之間時，

加入 0.5 mM isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactoside (IPTG) 誘導基因表現四小時。

### 2.2.8 大腸桿菌蛋白質之萃取

大腸桿菌經 0.5 mM IPTG 誘導表現後，於室溫下以 1125  $\times$ g 離心 12 分鐘後去除上清液，接著取 200  $\mu$ l 的 1M Tris-HCl (pH8.0) 懸浮菌體並移置微量離心管中，以 16100  $\times$ g 離心 3 分鐘後去除上清液，將此菌體之微量離心管於液態氮及 42  $^{\circ}$ C 恆溫水槽中來回反覆處理各 1 分鐘 (共 6 次)，以打破細胞。然後再取 150  $\mu$ l 1M Tris-HCl (pH8.0, 含 1mM PMSF) 懸浮，在 4  $^{\circ}$ C 下以 16100  $\times$ g 離心 5 分鐘後，取上清液至另一微量離心管中。Pellet 則加入 150  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH8.0, 含 1mM PMSF 與 8M Urea) 再次懸浮，冰浴 1 小時，在 4  $^{\circ}$ C 下以 16100  $\times$ g 離心 30 分鐘，取其 pellet 上清液的部分至另一微量離心管中，最後再將所收集的 pellet 與上清液各加入等體積之 2X SDS-PAGE loading dye (含 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 200mM DTT 及 8M Urea) 混合均勻，於室溫放置 30 分鐘以上後儲存於 -20  $^{\circ}$ C 備用。



### 2.2.9 以 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 及西方轉漬分析 (Western blot analysis) 偵測蛋白質表現

#### 2.2.9.1 SDS-PAGE 電泳

首先配製下層 14 % resolving gel，室溫靜置約 1 小時，膠凝後再配製上層 4% stacking gel，室溫靜置約 30 分鐘，待膠凝後移至 Mini-Protein 電泳槽 (Bio- Rad)，加入 1X SDS-PAGE running buffer，接著將樣品以微量吸管置入膠體之孔洞中，先以 120 伏特跑膠直到樣品通過 stacking gel 成一直線後，且以 100 伏特電泳 2 小時直到適當位置。

#### 2.2.9.2 Coomassie blue staining

將 SDS-PAGE 膠體直接浸泡於 0.25 % Coomassie blue staining solution (0.25 % Coomassie brilliant blue, 50 % methanol, 10 % acetic acid) 染

30 分鐘，再以 Destain solution (30 % methanol, 10 % acetic acid) 褪染膠體直到結果顯現後，以清水潤洗膠體，並取玻璃紙封膠並封乾保存。

### 2.2.9.3 西方轉漬分析(Western blot analysis)

SDS-PAGE 膠體電泳完成後，利用半乾式 (semi-dry) 轉漬槽 TRANS-BLOT® SD CELL 221BR (Bio-Rad) 轉漬膠體上的蛋白質至硝基纖維膜上 (nitrocellulose membrane, PROTRAN, Schleicher & Schuell)，以 0.09 安培進行 37 分鐘，之後把膜置入 20 ml Blocking buffer (5 % milk in 1X TBS buffer) 於室溫下平面震盪 1 小時後，加入稀釋 1/1000 倍的 6xHis 單株抗體 (BD Bioscience)、HA-probe (F-7) HRP 抗體 (Santa Cruz Biotechnology) 或 NS1-monoclonal antibodies (NS1-Mabs, abcan) 於 Blocking buffer 中於室溫下平面震盪 1 小時以偵測有 HA-His 標誌的複合蛋白，之後再以 20 ml 之 1X TBST buffer 於室溫下平面震盪清洗 5 分鐘 3 次，(使用 6xHis 單株抗體於 1X TBST buffer 清洗後加入稀釋 1/9000 倍之 Goat anti-mouse HRP (PIERCE)，再以 20 ml 之 1X TBST buffer 於室溫下平面震盪清洗 5 分鐘 3 次)，最後將 500  $\mu$ l 之 HRP substrate (MILLIPORE) 均勻地加到硝基纖維膜上約 5 分鐘，在暗房內以 X 光底片進行壓片，取出底片沖洗顯像。用夾子將底片浸入顯影液 (Developer solution) 中搖晃約 30 秒後，將底片換到清水中漂洗底片至底片中影像顯現完成，接著將底片浸入定影液 (Fixer solution) 中約 1 分鐘直到底片定影完成，以水清洗底片後晾乾保存。

## 參、結果

### 3.1 pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體之建構

pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體是由 pET-30a(+)質體而來，利用 *NdeI* 與 *NcoI* 將 pET-30a(+)的 N-terminal His-tag 及 S-tag 序列切除，接著進行 Klenow enzyme fill-in 的方式將序列補齊接合，形成 pET $\Delta$ 5T 質體（楊馥嘉, 2006, 交大碩士論文）【附錄 7】。利用 PCR 反應方法以實驗室已有之 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 為模板得到 HA3His6 之基因片段（楊馥嘉, 2006, 國立交通大學碩士論文），並分別在 HA3 His6 基因之 5'端引入 *Not I* 切位、3'端引入 *Xho I* 切位與轉譯終止密碼 TAGTGA，clone 入 pET $\Delta$ 5T 質體中，所得到之質體命名為 pET $\Delta$ 5T-HAHis，此質體建構之示意圖於【圖 3.1】。利用 pET $\Delta$ 5T-HAHis 中的 Multiple cloning site 協助之後 DV-2 與 DV-3 的基因能建構於 pET $\Delta$ 5T-HAHis 載體上，以利於蛋白質表現後的抗體的偵測。

### 3.2 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis pET-30a-D2NS1-HAHis 質體之建構

建構一 pET $\Delta$ 5T-HAHis 上分別含 PL046 strain 的 DV-2 E gene 以及 DV-2 NS1 gene 之質體，使其表達之 E protein 或 NS1 protein 的 C 端帶有 HAHis-tag。利用 PCR 方法以 pcDNA3 載體上含有 PL046 strain 全長的 cDNA 基因之質體為模板（pcDNA3-NCS/DV2FL-PL046-S）【附錄 9】，得到 dengue virus 2 (DV-2) 之 E gene (nt.937 ~ 2421) 以及 NS1 (nt.2422~3477) 片段，在 E gene 之 5'端引入 *EcoR V* 切位及在 3'端引入 *Not I* 切位，而 NS1 gene 與截短型 NS1(d) gene (nt.2422~3141, 由 NS1 全長基因 1056bp  $\rightarrow$  720bp) 之 5'端引入 *BamHI* 切位及在 3'端引入 *Not I* 切位，以協助之後能選殖於 pET $\Delta$ 5T-HAHis 載體，最後所得到之質體分別命名為 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 以及 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis，此質體建構之示意圖於【圖 3.2】。pET-30a-D2NS1-HAHis 則是將建構好的 D2NS1- HAHis 基因，以 5'端 *BamHI* 與 3'端 *XhoI* 等切位建構於 pET-30a(+)載體中。

### 3.3 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34A

#### -HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體之建構

建構一 pET $\Delta$ 5T-HAHis 上含 H87 strain 的 DV-3 部分基因之質體，其 DV-3 部分基因包括 NS2A (nt.3470~4123)，NS2B (nt.4124~4513)，NS4A (nt.6371~6820)，NS4B (nt.6821~7564)，E gene (nt.935~2413) 等。同樣使其表達之基蛋白質的 C 端帶有 HAHis-tag。利用 PCR 反應方法以實驗室已有之 H87 strain cDNA clones 為模板 (pcDNA3/DV3/1029-10696/fix5)【附錄 9】，得到 dengue virus 3 (DV-3) 之 NS 2、NS4 gene 以及 E gene 片段，分別在 NS gene 之 5'端引入 *Bam*H I 切位，E gene 在 5'端的切位則為 *Eco*RV，在 3'端引入 *Not* I 切位，以協助之後能選殖於 pET $\Delta$ 5T-HAHis 載體，最後所得到之質體分別命名為 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis，此質體建構之示意圖於【圖 3.3】。

### 3.4 利用限制酵素以確認所建構之質體

【圖 3.4.】為使用限制酵素切割 pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體所得之結果。Lane 1 為 *Mlu*I、*Nco*I 切割 pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體，可得到 4417 bp (圖中 A 所示) 和 994 bp 之 band (圖中 B 所示)。

將實驗室已建構之質體加以確認 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis (楊馥嘉, 2006, 交大碩士論文)【圖 3.5.】。

Lane 1 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 質體，可得到 5260 bp (圖中 A 所示)、960 bp (圖中 B 所示)；Lane 2 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 質體，可得到 3123 bp (圖中 C 所示)、2101 bp (圖中 D 所示)及 996 bp (圖中 E 所示)之 band；Lane 3 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 質體，可得到 5261 bp (圖中 F 所示)、696 bp (圖中 G 所示)；Lane 4 為 *Mlu*I、*Spe*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 質體，可得到 5008 bp (圖中 H 所示)、949 bp (圖中 I 所示) 之 band；Lane 5 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis

質體，可得到 5260 bp (圖中 J 所示)、756 bp (圖中 K 所示)； Lane 6 為 *Bsp*HI 切割 pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 質體，可得到 3423 bp (圖中 L 所示)、1417 bp (圖中 M 所示)、875 bp (圖中 N 所示) 及 301 bp (圖中 O 所示) 之 band； Lane 7 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體，可得到 5260 bp (圖中 P 所示)、1050 bp (圖中 Q 所示)； Lane 8 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體，可得到 3168 bp (圖中 R 所示)、2101 bp (圖中 S 所示) 及 1041 bp (圖中 T 所示) 之 band 【附錄 8】。

【圖 3.6】 Lane 1 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 A 所示)、664 bp (圖中 B 所示)； Lane 2 為 *Xba*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 質體，可得到 5688 bp (圖中 C 所示)、355 bp (圖中 D 所示) 之 band； Lane 3 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 E 所示)、400 bp (圖中 F 所示)； Lane 4 為 *Nco*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 質體，可得到 5352 bp (圖中 G 所示)、427 bp (圖中 H 所示) 之 band； Lane 5 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 I 所示)、460 bp (圖中 J 所示)； Lane 6 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 質體，可得到 2788 bp (圖中 K 所示)、2101 bp (圖中 L 所示)、950 bp (圖中 M 所示) 之 band； Lane 7 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 N 所示)、754 bp (圖中 O 所示)； Lane 8 為 *Afl*III、*Eco*RI 切割 pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體，可得到 3006 bp (圖中 P 所示)、2101 bp (圖中 Q 所示)、1026 bp (圖中 R 所示) 之 band。

【圖 3.7】 Lane 1 為 *Eco*RV、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 質體，可得到 5371 bp (圖中 A 所示)、1494 bp (圖中 B 所示)； Lane 2 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 質體，可得到 2883 bp (圖中 C 所示)、2101 bp (圖中 D 所示)、1881bp (圖中 E 所示)； Lane 3 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 F 所示)、1486 bp (圖中 G 所示)； Lane 4 為 *Xho*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體，可得到 5329 bp (圖中 H 所示)、1536 bp (圖中 I 所示)； Lane 5 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 質體，可得到 5379 bp (圖中 J 所示)、1066 bp (圖中 K 所示)； Lane 6 為 *Nco*I

切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 質體，可得到 5268 bp (圖中 L 所示)、803 bp (圖中 M 所示)、347 bp (圖中 N 所示) 之 band； Lane 7 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體，可得到 5377 bp (圖中 O 所示)、730 bp (圖中 P 所示)； Lane 8 為 *Nco*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體，可得到 5268 bp (圖中 Q 所示)、841 bp (圖中 R 所示) 之 band。

【圖 3.8】 Lane 1 為 *Mlu*I、*Xho*I 切割 pET-30a(+)-HAHis 質體，可得到 4404 bp (圖中 A 所示)、1018 bp (圖中 B 所示)； Lane 2 為 *Bam*HI、*Xho*I 切割 pET-30(a)-D2NS1-HAHis 質體，可得到 5382 bp (圖中 C 所示)、1194 bp (圖中 D 所示)； Lane 3 為 *Afl*III、*Mlu*I 切割 pET-30a(+)-D2NS1-HAHis 質體，可得到 4699 bp (圖中 E 所示)、1877 bp (圖中 F 所示)。

### 3.5 序列結果比對

將實驗室建構於質體中的 insert 基因定序。此質體為以 pET $\Delta$ 5T-HAHis 為骨架，所含的 insert 為 Dengue virus 2 之 PL046 strain (DV-2 PL046) 的非結構蛋白 (NS2A、NS2B、NS4A、NS4B、NS1) 以及外膜蛋白 (E) 的全長基因片段與 Dengue virus 3 之 H87 strain (DV-3 H87) 的非結構蛋白 (NS2A、NS2B、NS4A、NS4B) 以及外膜蛋白 (E) 的全長基因片段。其 5' 端及 3' 端有藉由 PCR 引入之 cloning sites: *Xho* I 及 *Xba* I。將定序完成之序列與 NCBI 所發表之 DV-2 PL046 strain (AJ968413) 與 DV-3 H87 strain (M93130) 序列互相比對，在 PL046 strain 的比對中，除了 NS2B 基因序列與 DV-2 PL046 strain (AJ968413) 上所公佈的 NS2B 基因序列完全相同之外，NS2A 則有 4 個鹼基不同、NS4A 有 2 個鹼基不同、NS4B 有 3 個鹼基不同、NS1 與 E gene 各只有 1 個鹼基不同；而 H87 strain 與 DV-3 H87 strain (M93130) 比對結果中，發現 NS2A 有 2 個鹼基不同，NS2B 有 4 個鹼基不同、NS4A 有 3 個鹼基不同、NS4B 有 3 個鹼基不同、E gene 有 8 個鹼基不同。其中在 NS2B 突變鹼基於 4173-4174 位置發現有兩個鹼基發生 deletion (dTA)，NS4A 突變鹼基也在 6563 位置發現 deletion (dA)，由於 DV-3 H87 strain 之 NS2B 與 NS4A 將產生 frameshift mutation 現象，因此進行

Site-directed Mutagenesis 的方法將 deletion 的部分修補。

由定序結果發現，大部分突變之鹼基突變為 silent mutation，少部分則突變為 missense mutation，關於非結構蛋白以及外膜蛋白基因之改變鹼基與胺基酸將列於【表 1~2】。

### 3.6 登革熱病毒非結構蛋白以及外膜蛋白 (E protein) 在 *E.coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 中的表現

將已建構好的質體轉形於 *E. coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 作表現，所得之轉形菌株(transformants) 在 LB broth 中培養，並加入 0.5 mM IPTG 誘導(induction) 四小時後，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析 (所分析的蛋白質含量中，上清液蛋白質約 10  $\mu$ g、pellet 約 100  $\mu$ g) 並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現，*E. coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 菌株之蛋白質偵測結果將列於【表 3】。

欲表現 DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 所得到轉譯完成之蛋白質分別為 D2NS2A-HAHis、D2NS2B-HAHis、D2NS4A-HAHis、D2NS4B-HAHis、D2E-HAHis、D2NS1-HAHis 與 D2NS1(d)-HAHis，分子量大小分別預測為 28.9、19.4、21.7、32.1、59、44.7 與 32.1 kDa。

DV-3 H87 strain 由 *E. coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 兩種菌株所得到轉譯完成之蛋白質分別為 D3NS2A-HAHis、D3NS2B-HAHis、D3NS4A-HAHis、D3NS4B-HAHis、D3E-HAHis，分子量大小分別預測為 28.6、18.8、21、31.2、58.3 kDa。

#### 3.6.1 登革熱病毒非結構蛋白 NS2 與 NS4 的表現

##### 3.6.1.1 pET $\Delta$ 5T-D2NS2A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS2A-HAHis 蛋白質表現結果

欲表現 DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 之 NS2A，所得到轉譯完成之蛋白質分別為 D2NS2A-HAHis 與 D3NS2A-HAHis，分子量大小分別為預測為 28.92 kDa 與 28.62 kDa。由 Coomassie blue staining 分析



PL046 與 H87 strains，無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

以 Western blot 偵測，在 DV-2 PL046 strain 以 anti-HA 抗體做偵測，可在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株於 pellet 中偵測到一條符合預期的蛋白質片段 (DV2- NS2A-HAHis, 約 29 kDa)，並於 60 kDa 與 17 kDa 大小附近也可以被偵測到蛋白質【圖 3.9】。

在 DV-3 H87 strain 中，以 anti-HA 抗體做偵測，除了 C41 (DE3) 偵測不到符合預期大小的片段之外 (DV3-NS2A-HAHis, 約 29 kDa)，其餘結果皆與 DV-2 PL046 strain 部分相似，於 60 kDa 與 17 kDa 大小附近也可以被偵測到蛋白質【圖 3.10】。

		Anti-HA		Anti-His	
		C41	C43	C41	C43
<b>DV2-NS2A</b> (PL046)	Supernatant				
	Pellet	○	○		
<b>DV3-NS2A</b> (H87)	Supernatant				
	Pellet		○		

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

### 3.6.1.2 pET△5T-D2NS2B-HAHis, pET△5T-D3NS2B-HAHis 蛋白質表現結果

欲表現 DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 之 NS2B，所得轉譯完成之蛋白質分別為 D2NS2B-HAHis 與 D3NS2B-HAHis，分子量大小分別為預測為 19.4 kDa 與 18.8 kDa。由 Coomassie blue staining 分析 PL046 與 H87 strains，無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

以 Western blot 偵測，在 DV-2 PL046 strain 中，除了 C41 (DE3) 菌株

的上清液之外，皆可以 anti-HA 抗體偵測到一條約符合預期大小的片段 (DV2-NS2B-HAHis, 約 19 kDa)，但在 19 kDa 大小附近也偵測到另外兩條分子量大小相似蛋白質【圖 3.11】。

不同於 PL046 strain，H87 strain 在兩種菌株 pellet 的表現下，可在 43、19 與 17 kDa 大小附近以 anti-HA 與 anti-His 抗體偵測到蛋白質，其中 19 kDa 符合預期的大小 (DV3-NS2B-HAHis, 約 19 kDa)【圖 3.12】。

		Anti-HA		Anti-His	
		C41	C43	C41	C43
<b>DV2-NS2B</b> (PL046)	Supernatant				
	Pellet	○	○		
<b>DV3-NS2B</b> (H87)	Supernatant				
	Pellet	○	○	○	○

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

### 3.6.1.3 pET△5T-D2NS4A-HAHis, pET△5T-D3NS4A-HAHis 蛋白質表現

#### 結果

DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 之 NS4A，所得到轉譯完成之蛋白質分別為 D2NSBA-HAHis 與 D3NS4A-HAHis，分子量大小分別為預測為 21.7 kDa 與 21 kDa。由 Coomassie blue staining 分析 PL046 與 H87 strains，無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

以 Western blot 偵測，DV-2 PL046 strain 中 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株可在上清液與 pellet 中偵測到符合預期大小的片段(DV2-NS4A-HAHis, 約 22 kDa)，不過在 pellet 中，C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株亦有 17 kDa 的片段與 inclusion body 的現象發生，將 pellet 的蛋白質含量降低分析 (約 10 mg)，則可觀察到 44 與 60 kDa 等片段【圖 3.13】。

H87 strain 可於兩菌株之 pellet 以 anti-HA 抗體測到兩條分子量約 40 kDa 與符合預期大小的片段 (DV3-NS4A-HAHis, 約 21 kDa), 以 anti-His 抗體偵測, 僅能從 pellet 偵測到分子量約 40 kDa 的片段 (約預期片段兩倍大小) 【圖 3.14】。

		Anti-HA		Anti-His	
		C41	C43	C41	C43
<b>DV2-NS4A</b> (PL046)	Supernatant	○	○		
	Pellet	○	○		
<b>DV3-NS4A</b> (H87)	Supernatant				
	Pellet	○	○		

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

#### 3.6.1.4 pET△5T-D2NS4B-HAHis, pET△5T-D3NS4B-HAHis 蛋白質表現結果

欲表現 DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 之 NS4B, 所得轉譯完成之蛋白質分別為 D2NS4B-HAHis 與 D3NS4B-HAHis, 分子量大小分別為預測為 32.1 kDa 與 31.2 kDa。由 Coomassie blue staining 分析 PL046 與 H87 strains, 無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現(over-expression) 的現象。

以 Western blot 偵測, 在 PL046 strain 中, 可在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株之上清液與 pellet 以 anti-HA 與 anti-His 抗體皆可以偵測到符合預期大小的片段 (DV2-NS4B-HAHis, 約 32 kDa)。不過在 pellet 的部分, 以 anti-HA 在兩種菌株的表現下, 另有兩條 20 kDa 與 17 kDa 大小的蛋白質可以被偵測 【圖 3.15】。

H87 strain 在 DV3-NS4B-HAHis 的表現結果與 PL046 strain 結果相似, 在兩種抗體的偵測下皆可以於 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株之上清液與

pellet 以偵測到符合預期大小的片段 (DV3-NS4B-HAHis, 約 32 kDa), 在 17 kDa 大小附近也被偵測到分子量較小的蛋白質【圖 3.16】。

		Anti-HA		Anti-His	
		C41	C43	C41	C43
<b>DV2-NS4B</b> (PL046)	Supernatant	○	○	○	○
	Pellet	○	○	○	○
<b>DV3-NS4B</b> (H87)	Supernatant	○	○	○	○
	Pellet	○	○	○	○

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

### 3.6.2 登革熱病毒外膜蛋白的表現

#### 3.6.2.1 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 蛋白質表現結果

DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 兩種 strain 之外膜蛋白, 所得到轉譯完成之蛋白質分別為 D2E-HAHis 與 D3E-HAHis, 分子量大小分別為預測為 59 kDa 與 58.3 kDa。由 Coomassie blue staining 分析 PL046 與 H87 strains, 無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

以 Western blot 偵測, 在 DV-2 PL046 strain 中以 anti-HA 抗體於 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株之 pellet 偵測到 70 kDa 大小的蛋白質, 並於 C41 (DE3) 菌株中另可測得表現符合 DV2-E 大小的蛋白質 (DV2-E-HAHis, 約 59 kDa)【圖 3.17】。

H87 strain 在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株的表現方面一致, 在上清液與 pellet 中以 anti-HA 抗體可以偵測到符合預期的片段 (DV3-E-HAHis, 約 58 kDa), pellet 的部分亦有 70 kDa 與 50 kDa 大小蛋白質被偵測, 利用 anti-His 抗體則可在 pellet 偵測到符合預期大小的蛋白質【圖 3.18】。

		Anti-HA		Anti-His	
		C41	C43	C41	C43
<b>DV2-E</b> (PL046)	Supernatant				
	Pellet	○			
<b>DV3-E</b> (H87)	Supernatant	○	○		
	Pellet	○	○	○	○

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

### 3.6.3 登革熱病毒非結構蛋白 NS1 的表現

#### 3.6.3.1 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 蛋白質表現結果

由於非結構蛋白與外膜蛋白在 *E.coli* C41 (DE3) 以及 C43 (DE3) 表現系統表現量不佳，因此想藉由相同的蛋白質表現系統，用來表現 DV-2 PL046 strain 之非結構蛋白 NS1，觀察蛋白質在 *E.coli* C41 (DE3) 以及 C43 (DE3) 系統表現狀況。

轉譯完成之蛋白質 D2NS1-HAHis 的分子量大小約為 44.7 kDa。結果由 Coomassie blue staining 分析，無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

利用 anti-HA 抗體偵測時，僅 C41 (DE3) 菌株可於上清液偵測 50 kDa、45 kDa、40 kDa 到蛋白質。在 pellet 的部分，在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株皆可在 50 kDa、45kDa、40kDa 的大小偵測到蛋白質，45 kDa 大小的片段符合預期結果 (DV2-NS1-HAHis, 約 45 kDa)，利用 anti-His 抗體的偵測結果與 anti-HA 的結果相似，但並無法偵測到符合預期大小的片段。根據結果觀察，45kDa 大小的 band 相較於另外兩條 50 kDa 與 40 kDa 的 band 訊號較弱【圖 3.19】。

為了探討此三條蛋白質的表現結果是否為 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株所造成，因此將 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 質體轉形於 *E.coli* BL21(DE3) 菌株中作表現，結果由 Coomassie blue staining 分析，在上清液中同樣無法

清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象，但在 pellet 中卻可以觀察到蛋白質大量表現產生。

進一步利用 Western blot 進行確認，利用 anti-HA 抗體偵測時於上清液與 pellet 同樣可以在 50 kDa、45 kDa、40 kDa 的位置偵測到蛋白質，45 kDa 大小的片段符合預期結果 (DV2-NS1-HAHis, 約 45 kDa)，利用 anti-His 抗體的偵測結果與 anti-HA 的結果相似【圖 3.20】。

### 3.6.3.2 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 蛋白質表現結果

為了確認此三條蛋白質，因此表現另外建構的質體，pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis，此質體與 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 不同點在於其 insert 之 NS1 基因大小不同，將 NS1 基因 (全長 1059 bp) 的末端截短，得到 NS1(d) 基因 (全長 723 bp)，藉此觀察蛋白質表現狀況有何差異。

D2NS1(d)-HAHis 的分子量大小約為 32.1 kDa，藉由 Coomassie blue staining，在上清液無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象，但在 pellet 的部分，C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株可在 40 kDa、26 kDa 的大小以 Coomassie blue staining 偵測到，卻無法於 32 kDa 大小附近觀察到符合預期大小之 NS1(d)-HAHis 的表現。

利用 Western blot 偵測，利用 anti-HA，C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株可於上清液與 pellet 偵測到大小約 40 kDa、32 kDa、26 kDa 的蛋白質，32 kDa 符合預期大小。(DV2- NS1(d)-HAHis, 約 32 kDa)；利用 anti-His 抗體偵測結果，除了上清液無法偵測到符合預期大小的片段，與 anti-HA 結果相仿【圖 3.21】。根據結果觀察，33 kDa 大小的 band 相較於另外兩條 40 kDa 與 26 kDa 的 band 訊號較弱，結果呈現與 D2NS1-HAHis 相似。

### 3.6.3.3 pET30a-D2NS1-HAHis 蛋白質表現結果

將 NS1-HAHis 基因建構於 pET-30a(+) 載體上，形成 pET30a-D2NS1-HAHis 後轉型於 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株做蛋白質表現，轉譯完成之蛋白質 NS1-HAHis 連接來自載體 pET-30a(+) 之 5' 端的 His-S Tag，其分

子量大小約為 49.9 kDa。結果由 Coomassie blue staining 分析，無論是上清液與 pellet 皆無法清楚看到蛋白質大量表現 (over-expression) 的現象。

利用 anti-HA 抗體偵測時，不論是上清液及 pellet，C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株皆可在 55 kDa、50 kDa、45 kDa 的大小偵測到蛋白質，50 kDa 大小的片段符合預期結果，利用 anti-His 抗體的偵測結果與 anti-HA 的結果相似。根據結果觀察，更換載體 (由 pET $\Delta$ 5T-HAHis 換到 pET30a(+)) 並不能有效改善雜片段的形成【圖 3.22】。

		Anti-HA			Anti-His		
		C41	C43	BL21	C41	C43	BL21
<b>DV2-NS1</b> (PL046)	Supernatant	○	○	○			
	Pellet	○	○	○	○	○	○
<b>DV2-NS1(d)</b> (PL046)	Supernatant	○	○	/			/
	Pellet	○	○		○	○	
<b>DV2-NS1</b> (pET30a(+))	Supernatant	○	○		○		
	Pellet	○	○		○	○	

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

## 肆、討論

### 4.1 質體建構與序列分析

將本實驗所使用的 Dengue virus type 2, Taiwan local strain PL046 之基因 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B、E、NS1 與 NCBI 網站基因資料庫所公佈之 DV-2 PL046 strain (AJ968413) 作基因序列比對，於核苷酸的部分其相似度介於 99.39 ~ 100%，而胺基酸的相似度則介於 99.08 % ~ 100%，幾乎沒有序列比對上的差異；而將 H87 strain 與 NCBI 網站基因資料庫所公佈之 DV-3 H87 strain (M93130) 比對，核苷酸相似度界於 99.46 % ~ 99.69%，其胺基酸相似度介於 98.46% ~ 99.54%，序列的比對結果差異亦不大。造成鹼基不同與胺基酸序列的些微差異，可能是 RNA 病毒複製所造成，或是利用 PCR 建構質體的過程中所導致的突變【表 1~2】。

### 4.2 表現登革熱病毒非結構蛋白 NS2 與 NS4 與外膜蛋白在 *E. coli* C41(DE3) 和 C43 (DE3) 表現系統

首先將實驗室已建構好 DV-2 PL046 strain 與 DV-3 H87 strain 基因之 pET $\Delta$ 5T-HAHis 質體【圖 3.1】轉形於 *E. coli* C41 (DE3) 與 *E. coli* C43 (DE3) 作表現，再將轉形質體後的大腸桿菌 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株經 0.5 mM IPTG 誘導表現 4 小時之後，萃取上清液以及 pellet 中的蛋白質，經由 SDS-PAGE 蛋白質電泳、以及西方點墨法分析。由於 C 端同樣含有 HA-His-tag，因此可以利用 anti-HA-HRP 或 anti-His-HRP 抗體來做蛋白質偵測與表現分析。由於蛋白質的表現普遍不佳，無法藉由 Coomassie blue staining 來觀察蛋白質表現狀況，因此本實驗主要利用西方點墨法的方式來觀察蛋白質表現狀況。

NS2A-HAHis 可以經由西方點墨法的方式在預期的位置 (29 kDa) 所偵測到，並且在 PL046 strain 與 H87 strain 中所表現的結果彼此相似。除了 NS2A-HAHis 之外，在 17 kDa 大小附近也可以被偵測到分子量較小的蛋白質。推測這些小分子量的蛋白質的形成原因可能是由 NS2A-HAHis 水解而



來，此現象與 Kunjin virus 之 GST-NS2A 在 baculovirus system 表現結果相似 (Khromykh, et al., 1996)。

NS2B-HAHis 皆可在 PL046 strain 與 H87 strain 中所偵測到，且符合預期 (約 18 kDa)。但在 PL046 strain 的部分於所預期的 19 kDa 大小附近也偵測到另外兩條分子量略小的蛋白質，且 band 的強度稍弱。推測為 NS2B-HAHis 的水解產物，H87 strain 在 43 kDa 與 21 kDa 大小附近也可以被偵測到蛋白質，推測可能是 NS2B-HAHis 形成時，因為疏水的特性而與細胞內的物質相結合所導致。

NS4A-HAHis 可在 21 kDa 的位置被偵測到，於 PL046 strain 上清液也可偵測到其表現。但在 pellet 的部分，無論是 PL046 strain 或 H87 strain，皆可觀察到數條分子量較大的蛋白質，推測可能 NS4A 在電泳過程中所造成不溶的現象。也有文獻指出，在 baculovirus 的系統中表現 Kunjin virus 之 GST-NS4A 在進行 SDS-PAGE 電泳的過程中，可能會造成 double 或 triple 等大小的複合物。(Khromykh, et al., 1996)。

NS4B-HAHis 的分子量大小約 32 kDa 左右，皆可於 PL046 strain 與 H87 strain 的上清液及 pellet 中偵測到。相較於上清液，在 pellet 的部分一些小於預期大小的片段，PL046 strain 在 20 kDa 與 17 kDa 大小可以偵測到蛋白質，不同於 PL046 strain，H87 strain 也能在 17 kDa 大小附近偵測到蛋白質。推測由 NS4B-HAHis 水解而來。

由上述的結果可以觀察到，在表現 PL046 strain 與 H87 strain 之 NS2 與 NS4 之非結構蛋白時，都可觀察到預期大小片段以外的蛋白質。經由質體序列比對後並無發現其他 ORF 存在，因此推測 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株對於這些疏水性的蛋白質可能有修飾的作用，對於分子量較小的蛋白質片段，可能經由疏水性蛋白質水解而來；而分子量較大的蛋白質，根據研究指出，利用帶有 Kunjin virus 重組基因之 baculovirus system，在轉染 Sf9 細胞株後表現其重組基因蛋白質後發現，GST-NS2B 與 GST-NS4B 等 fusion protein 時，也有觀察到有類似的現象，推測疏水性蛋白質在表現時可能會與宿主細胞內的物質結合所致 (Khromykh, et al., 1996)。

#### 4.3 表現登革熱病毒外膜蛋白在 *E.coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 表現系統

欲表現全長的登革熱病毒外膜蛋白，E-HAHis 的分子量大小約 59 kDa 左右，可於 PL046 strain 之 pellet 與 H87 strain 的上清液及 pellet 中偵測到符合預期的片段。在兩個 strains 的 70 kDa 的位置皆可被偵測到蛋白質，在外膜蛋白的表現下與非結構蛋白皆有類似的結果，蛋白質疏水的性質可能與細胞內的物質相結合導致此現象，在高溫環境下表現外膜蛋白，可能會形成 inclusion bodies (Mason et al., 1990)。因此未來可以嘗試不同的實驗條件，例如 *E.coli* 培養過程中運用較低的溫度（如 30 °C），希望能解決較大分子量的蛋白質片段。

將兩 strain 比較後發現，H87 strain 比 PL046 strain 在 50 kDa 左右的位置多了一條可被偵測到蛋白質。由於 flavivirus 之外膜蛋白有容易被蛋白質水解酶水解的特性 (Wengler et al., 1987; Guirakhoo et al., 1989)，因此推論 H87 strain 所表現的 E-HAHis 有被水解的現象。為了改善外膜蛋白容易被水解的特性，切除 C 端 transmembrane domain (約 94 amino acids)，將有助於外膜蛋白不被水解，並且利於 *P. pastoris* 將外膜蛋白分泌到胞外 (Sugrue, et al., 1997)。

#### 4.4 表現登革熱病毒非結構蛋白 NS1 在 *E.coli* C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 表現系統

非結構蛋白 NS1 已可利用 *E.coli* 系統大量表現 (Das et al., 2009)，因此欲表現 DV2 之 NS1 蛋白以探討蛋白質表現的結果。

NS1-HAHis 的分子量大小預期大小約為 44.7。皆可於上清液與 pellet 偵測到大小分別為 50 kDa、45 kDa、40 kDa 的蛋白質，45kDa 的大小較符合預期。此三條蛋白質於 C41 (DE3) 菌株 pellet 中也能以 Coomassie blue staining 偵測到，蛋白質表現量似乎較 NS2、NS4 與 E 來的多。

為了確認在表現 NS1-HAHis 蛋白質所出現的不專一性片段是否與 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株修飾有關，由於已有文獻指出 Dengue virus Type-1

之 NS1 可經由 *E.coli* BL21(DE3) 進行蛋白質大量表現及純化，Western blot 結果顯示並無雜片段的形成 (Das et al., 2009)，因此將 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 轉型到 BL21 菌株作蛋白質表現，就 Coomassie blue staining 的結果觀察，pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株無法觀察出明顯蛋白質表現，但在 BL21 (DE3) 菌株則可觀察出源於 NS1-HAHis 所產生的雜片段，Western blot 的結果則與 C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 菌株表現一樣，在 50 kDa、45 kDa、40 kDa 的大小可以偵測到蛋白質，其中 45 kDa 大小的片段符合預期，但是相較於 50 kDa、40 kDa 等雜片段，並無法以 Coomassie blue staining 測得，換言之，其雜片段的表現量較佳，雜片段的問題還是無法加以解決。

由於有三條蛋白質片段，為了加以確認 NS1-HAHis 蛋白質表現的結果，將 NS1 基因於 3' 端的部分截短 336 bp，並建構 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體，想觀察蛋白質大小位移的狀況。其表現出的蛋白質為 NS1(d)-HAHis，預期的分子量約 32.1 kDa。利用 Western blot 偵測，可於上清液及 pellet 偵測到分子量大小約 40 kDa、33 kDa、26 kDa 的蛋白質，以 33 kDa 大小的片段較符合預期結果。其結果呈現與 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 表現結果相似，而 40kDa 與 26kDa 的蛋白質同樣也可於 Coomassie blue staining 偵測到，相較於 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 在 C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 菌株中的表現，其 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 表現量較佳，推測截短其 C 端疏水性片段將有助於在 *E.coli* 系統蛋白質大量表現。

將 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 與 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 做蛋白質表現比較後發現，前者所表現出的蛋白質片段分別為 50 kDa、45 kDa、40 kDa，後者則為 40 kDa、33 kDa、26 kDa，截短後皆縮小了約 10 kDa 左右。推測此三條截短蛋白質與 NS1 基因 3' 端截短有密切關係。

為了探討片段的形成是否與載體 pET $\Delta$ 5T-HAHis 有關？由於 pET $\Delta$ 5T-HAHis 載體是由 pET-30a(+) 載體修飾而成【圖 3.1】，因此我將 PL046 strain 中之 NS1 基因重新建構於未經修飾之 pET-30a(+) 載體，並於 NS1 基因 3' 端建構 HAHis tag 以利於 Western blot 抗體偵測，建構完成之質體為 pET-30a

-D2NS1-HAHis，並同樣轉型於 C41 (DE3) 和 C43 (DE3) 菌株中表現，由於所轉錄之 NS1-HAHis 包含 pET-30a(+)載體之 5'端 His tag 與 S tag，因此 NS1-HAHis 的分子量大小約 50 kDa，以 Western blot 抗體偵測的結果與 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 在 C41 (DE3) 與 C43 (DE3) 菌株中表現結果類似，分別在 55 kDa、50 kDa 與 45 kDa 的位置可以偵測到蛋白質，50 kDa 符合預期大小，但雜片段的現象並沒有因更換 pET-30a(+)載體而有所改善，因此雜片段和蛋白質表現量似乎與 pET-30a(+)載體 5'端修飾沒有直接相關。

此三條蛋白質中，以 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 來看，分子量 50 kDa 的蛋白質較預期的 44.7 kDa 來的大，由於 NS1 之 N 端具有 heterologous signal peptide 與 hemagglutinin epitope，推測可能其 N 端與胞內之物質鍵結，導致分子量變大 (Noisakran et al., 2007)。較預期分子量略小的蛋白質片段 (約 40 kDa)，推測與 NS1-HAHis 之 N 端修飾有關，由於其 N 端有 linear epitopes，可能較容易被細菌胞內之 protease 水解，導致分子量略為變小 (Falconar et al., 1994)。



## 伍、結論

本研究運用大腸桿菌之蛋白質表現系統 C41 (*DE3*) 與 C43 (*DE3*)，表現登革熱病毒 DV-2 PL046 strain 及 DV-3 H87 strain 之 HA-His 複合蛋白 (influenza hemagglutinin-polyhistidine protein)，包括非結構蛋白 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 及外膜蛋白 (E)，以及 PL046 strain 之 NS1 非結構蛋白，其基因接於 pET $\Delta$ 5T-HAHis 載體中皆可成功的被表現出來，不過僅可於 Western blot 中可偵測到蛋白質表現。

大腸桿菌 C41 (*DE3*) 與 C43 (*DE3*) 菌株通常用於大量表現膜蛋白或對宿主細胞有毒害的蛋白質並能避免宿主細胞死亡 (Dumon-Seignovert et al., 2004)，尤其可以改善 PL046 strain 之 NS2A-HAHis 蛋白質在 BL21 (*DE3*) 中無法以 Western blot 中可偵測到蛋白質表現的情形 (楊馥嘉, 2006, 交大碩士論文)，但 C41 (*DE3*) 與 C43 (*DE3*) 在蛋白質的表現中卻仍然無法以 Coomassie blue 的染色方式觀察到蛋白質表現的情形，顯示蛋白質的表現量仍然相當微量 ( $<10^{-6}$  mg)，並有蛋白質結合或水解等現象。此外，文獻指出 Dengue virus Type-1 之 NS1 可經由 *E.coli* BL21(*DE3*) 進行蛋白質大量表現 (Das et al., 2009)，因此本研究不能大量表現 NS1 的原因就值得進一步探討。根據前人研究，如能將大腸桿菌大量培養加以純化濃縮，才能得到適量的蛋白質以利於進行 Coomassie blue 染色觀察 (Khromykh et al., 1996)。

## 陸、参考文献

Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, Frenkiel MP, Arborio M, Durand-Schneider AM, Maurice M, Le Blanc I, Gruenberg J, Flamand M. 2005. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *J Virol*, 79(17):11403-11411.

Arechaga I, Miroux B, Karrasch S, Huijbregts R, de Kruijff B, Runswick MJ, Walker JE. 2000. Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase. *FEBS Lett*, 482(3):215-9.

Bazan JF, Fletterick RJ. 1989. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*, 171:637-639.

Blackwell JL, Brinton MA. 1997. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol*, 71(9):6433-6444.

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA. 2004. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*, 23(4):728-738.

Brinkworth RI, Fairlie DP, Leung D, Young PR. 1999. Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *J Gen Virol*, 80 (Pt 5):1167-77.

Brock KV, Deng R, Riblet SM. 1992. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods*, 38(1):39-46.

Chambers TJ, Droll DA, Tang Y, Liang Y, Ganesh VK, Murthy KH, Nickells M. 2005. Yellow fever virus NS2BNS3 protease: characterization of charged-to-alanine mutant and revertant viruses and analysis of polyprotein-cleavage activities. *J Gen Virol*, 86(Pt 5):1403-1413.

Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. 1990. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*, 177:159-174.

Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, Rice CM. 1990. Evidence that the Nterminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:8898-8902.

Chang YS, Liao CL, Tsao CH, Chen MC, Liu CI, Chen LK, Lin YL. 1999. Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol*, 73(8):6257-64.

Cleaves GR, DubinDT. 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology*, 96:159-165.

Clyde K, Harris E. 2006. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol*, 80(5):2170-82.

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

Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. 2005. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol*, 150(4):771-786.



Crooks AJ, Lee JM, Easterbrook LM, Timofeev AV, Stephenson JR. 1994. The NS1 protein of tickborne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J Gen Virol*, 75(Pt 12):3453-3460.

Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. 2009. Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. *Protein Expr Purif*, 66(1):66-72.

De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepulveda N, del Angel RM. 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology*, 295(2):337-347.



Dokland T, Walsh M, Mackenzie JM, Khromykh AA, Ee KH, Wang S. 2004. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure*, 12(7):1157-1163.

Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. 2004. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif*, 37(1), 203-6.

Edgil D, Diamond MS, Holden KL, Paranjape SM, Harris E. 2003. Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. *Virology*, 317(2):275-290.

Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. 2002. An RNA cap (nucleoside- 2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J*, 21(11):2757-2768.

Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. 2006. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol*, 13(4):372-373

Evans JD, Seeger C, 2007. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. *J Virol*, 81(21):11809-16.

Falgout B, Chanock R, 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, 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.

Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*, 65:2467-2475.

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*, 73(7):6104-6110.

Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. 1989. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res*, 17(10):3889-3897.

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

Hall RA, Khromykh AA, Mackenzie JM, Scherret JH, Khromykh TI, Mackenzie JS. 1999. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology*, 264(1):66-75.

Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*, 14(11):1603-10.

Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. 2003. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol*, 77(12):7143-7149.

Khromykh AA, Harvey TJ, Abedinia M, Westaway EG. 1996. Expression and purification of the seven nonstructural proteins of the flavivirus Kunjin in the E. coli and the baculovirus expression systems. *J Virol Methods*, 61(1-2), 47-58.

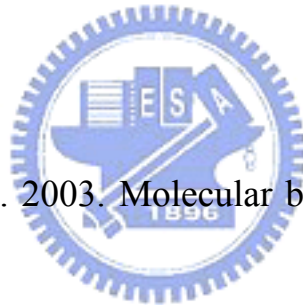
Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. 2004. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol*, 78(15):8078-8084.

Kümmerer BM, Rice CM. 2002. Mutations in the yellowfever virus nonstructural Protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol*, 76(10):4773-4784.

Lee JM, Crooks AJ, Stephenson JR. 1989. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. *J Gen Virol*, 70:335-343.

Lemes EM, Miagostovicsh MP, Alves AM, Costa SM, Fillipis AM, Armoa GR, Araujo MA. 2005. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic tests. *J Clin Virol*, 32(4):305-12.

Lindenbach BD, Rice CM. 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*, 73(6):4611-4621.



Lindenbach BD, Rice CM. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 59:23-61.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. 5th Edition. DM Knipe, PM Howley, Eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. 2004. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol*, 78(22):12225-12235.

Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. 2006. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol*, 80(5):2396-2404.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10):3414-3419.

Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*, 245(2):203-215.

Mason PW. 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*, 169(2):354-364.

Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 nonstructural protein 4B. *J Biol Chem*, 281(13):8854-8863.

Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*, 282(12):8873-82.

Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol Biol*, 260(3), 289-298

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972):313–319.

Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):14333–14338.

Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. 2005. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*, 79(13):8004–8013.

Muylaert IR, Galler RG, Rice CM. 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology*, 222:159–168.

Nestorowicz A, Chambers TJ, Rice CM. 1994. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication and evidence for alternative processing of the NS2A protein. *Virology*, 199:114–123

Niyomrattanakit P, Winoyanuwattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. 2004. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J Virol*, 78(24):13708–13716.

Noisakran S, Dechtawewat T, Rinkaewkan P, Puttikhunt C, Kanjanahaluethai A, Kasinrerk W, Sittisombut N, Malasit P. 2007. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *J Virol Methods*, 142(1-2):67-80.

Nowak T, Wengler G. 1987. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology*, 156(1): 127–137.

Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH. 2005. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*, 437(7059):764–769.

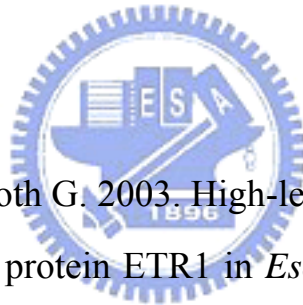
Perera R, Kuhn RJ. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11(4):369-77.

Pryor MJ, Wright PJ. 1993. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology*, 194(2):769–780.

Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol*, 80(9), 4623-32.

Smith TJ, Brandt WE, Swanson JL, McCown JM, Buescher EL. 1970. Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens. *J Virol*, 5:524–532.

Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*, 87(Pt 9):2605-14.



Voet-van-Vormizeele J, Groth G. 2003. High-level expression of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor protein ETR1 in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. *Protein Expr Purif*, 32(1):89-94.

Wengler G, Wengler G, Gross HJ. 1978. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*, 89:423–437.

Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. 2002. Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 267:323–351.



Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. 1989. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*, 171(1):302–305.

Winkler G, Randolph VB, Cleaves GR, Ryan TE, Stollar V. 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, 162(1):187–196.

林柏吟. 2005. 表現登革病毒 2 型 PL046 外膜蛋白以用於建構假型小鼠白血病病毒. 國立交通大學碩士論文.

徐婕琳. 2003. 表現登革熱病毒 2 型 PL046 非結構性蛋白：NS2A、NS2B、NS4A 及 NS4B 在大腸桿菌、哺乳類細胞及真菌 *Pichia pastoris* 表現系統. 國立交通大學碩士論文.

楊馥嘉. 2006. 登革熱病毒 2 型 PL046 非結構性蛋白 NS2A、NS2B、NS4A 及 NS4B 之功能性研究. 國立交通大學碩士論文.

賴建孝. 2006. 探討登革熱二型病毒 PL046 質體建構及報導基因的選擇. 國立交通大學碩士論文.

表 1

Comparison of amino acid sequence of dengue virus type 2 and PL046 strain ( Accession No. AJ968413 )

	NS2A	NS2B	NS4A	NS4B	E	NS1
Change of amino acids (DV2->PL046)	R142K R213R T214T S215N	NA	L2L P49L	T198I N245N T246T	E201K	T132A
Identity of nucleotide sequences	99.39%	100%	99.56%	99.60%	99.93%	99.91%
Identity of amino acids	99.08%	100%	99.33%	99.60%	99.8%	99.72%



表 2

Comparison of amino acid sequence of dengue virus type 3 and H87 strain ( Accession No. M93130 )

	NS2A	NS2B	NS4A	NS4B	E
Change of amino acids (DV3->H87)	G52D K102K	I109S M119L	M97T W104R	R185R T186I L237P	K47N T48T G52G Y176Y L234L K245R G256E E291G
Identity of nucleotide sequences	99.69%	99.49%	99.56%	99.60%	99.46%
Identity of amino acids	99.54%	98.46%	98.67%	99.19%	99.19%

表 3

## Result of Western blot

		Anti-HA			Anti-His			
		C41	C43	BL21	C41	C43	BL21	
<b>DV2-NS2A</b> (PL046)	Supernatant							
	Pellet	○	○					
<b>DV3-NS2A</b> (H87)	Supernatant							
	Pellet		○					
<b>DV2-NS2B</b> (PL046)	Supernatant							
	Pellet	○	○					
<b>DV3-NS2B</b> (H87)	Supernatant							
	Pellet	○	○		○		○	
<b>DV2-NS4A</b> (PL046)	Supernatant	○	○					
	Pellet	○	○					
<b>DV3-NS4A</b> (H87)	Supernatant							
	Pellet	○	○		○			
<b>DV2-NS4B</b> (PL046)	Supernatant	○	○		○		○	
	Pellet	○	○		○		○	
<b>DV3-NS4B</b> (H87)	Supernatant	○	○		○		○	
	Pellet	○	○		○		○	
<b>DV2-E</b> (PL046)	Supernatant							
	Pellet	○						
<b>DV3-E</b> (H87)	Supernatant	○	○					
	Pellet	○	○		○		○	
		C41	C43	BL21	C41	C43	BL21	
<b>DV2-NS1</b> (PL046)	Supernatant	○	○	○				
	Pellet	○	○	○	○	○	○	
<b>DV2-NS1(d)</b> (PL046)	Supernatant	○	○	/			/	
	Pellet	○	○		○	○		
<b>DV2-NS1</b> (pET30a(+))	Supernatant	○	○		○			
	Pellet	○	○		○	○		

(“○”代表能利用抗體找到符合預期大小的片段)

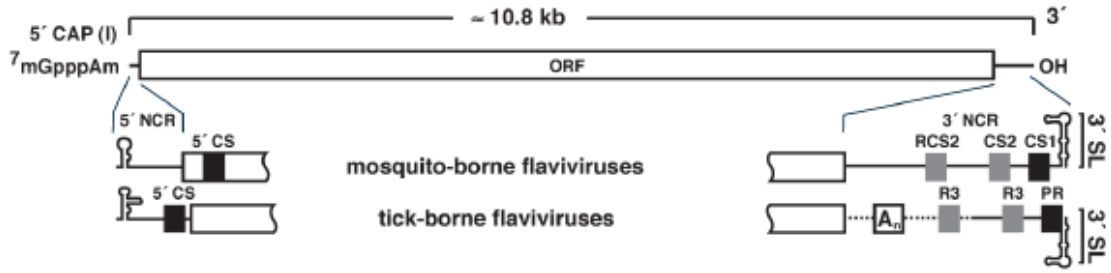


圖 1.1 *Flavivirus* 之 RNA 基因結構

包含 5'cap 以及 5'與 3'端 noncoding regions (NCR)，其 NCR 中含有二級及三級結構與病毒 RNA 的複製與轉譯有關。

(Lindenbach et al., 2007)

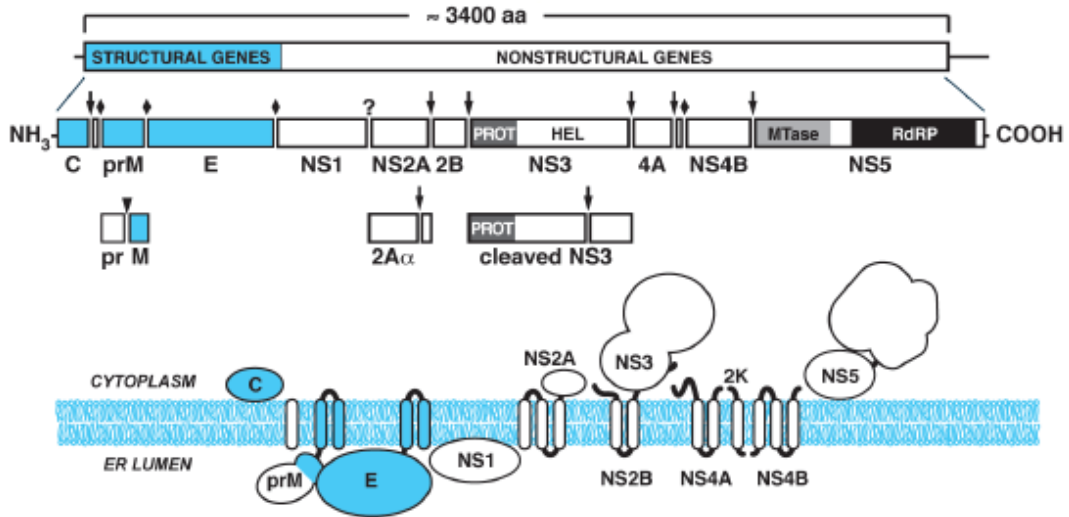


圖 1.2 *Flavivirus* Polyprotein 之結構與在 ER 膜上的分佈

分為結構蛋白 (structure proteins) 與非結構蛋白 (nonstructure proteins) 兩部分，透過病毒serine protease(↓)、宿主體內signalase(♦)與未知的protease (?) 切割而成具有功能的蛋白質。

(Lindenbach et al., 2007)

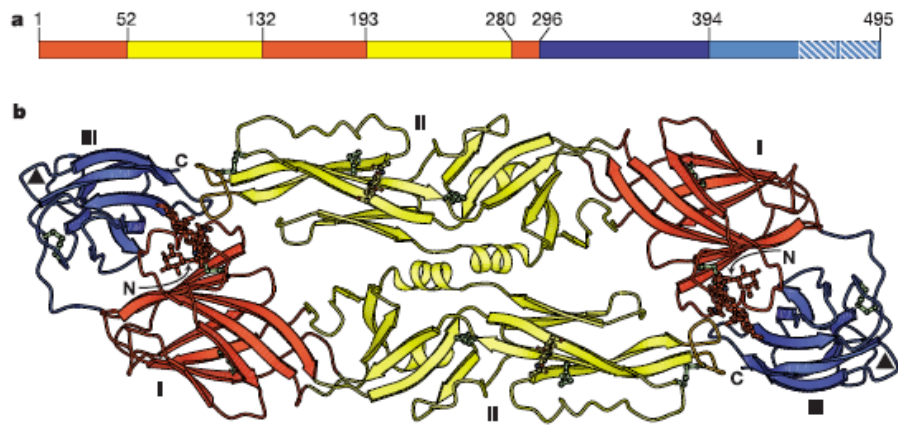


圖 1.3 登革熱病毒外膜蛋白結構圖

a.三個外膜蛋白 domain，domain I 為紅色部分，domain II 為黃色部分，domain III 為藍色部分。b.外膜蛋白 dimer 立體結構圖。

(Modis et al., 2004)

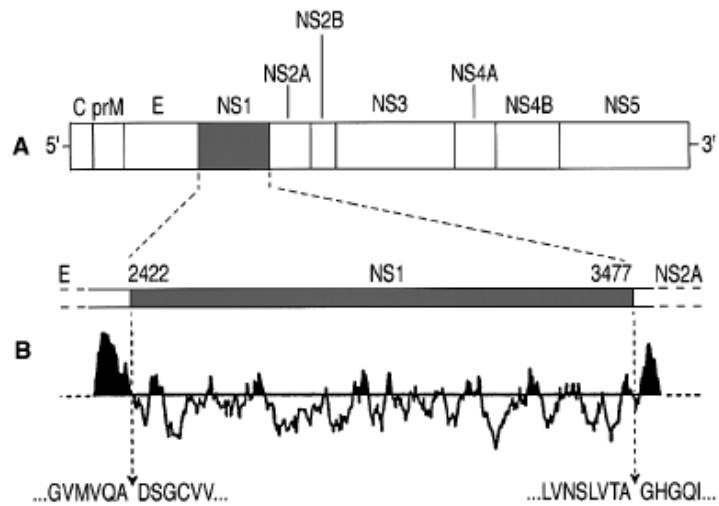
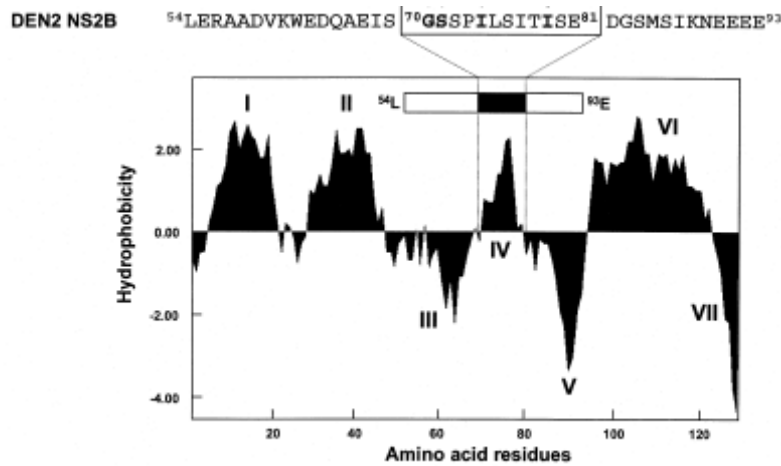


圖 1.4 登革熱病毒 NS1 疏水性分布圖

(Jacobs et al., 2000)

(A)



(B)

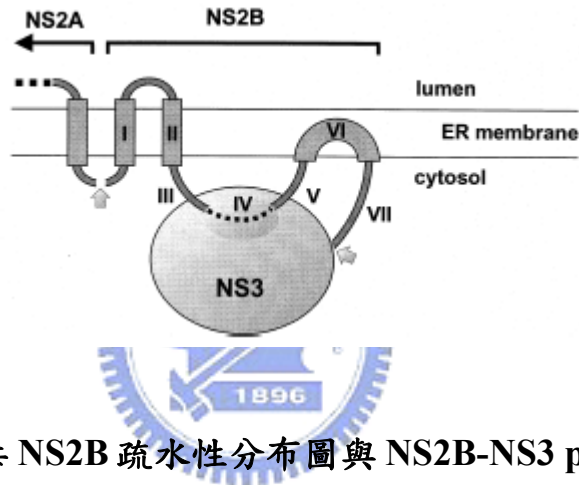
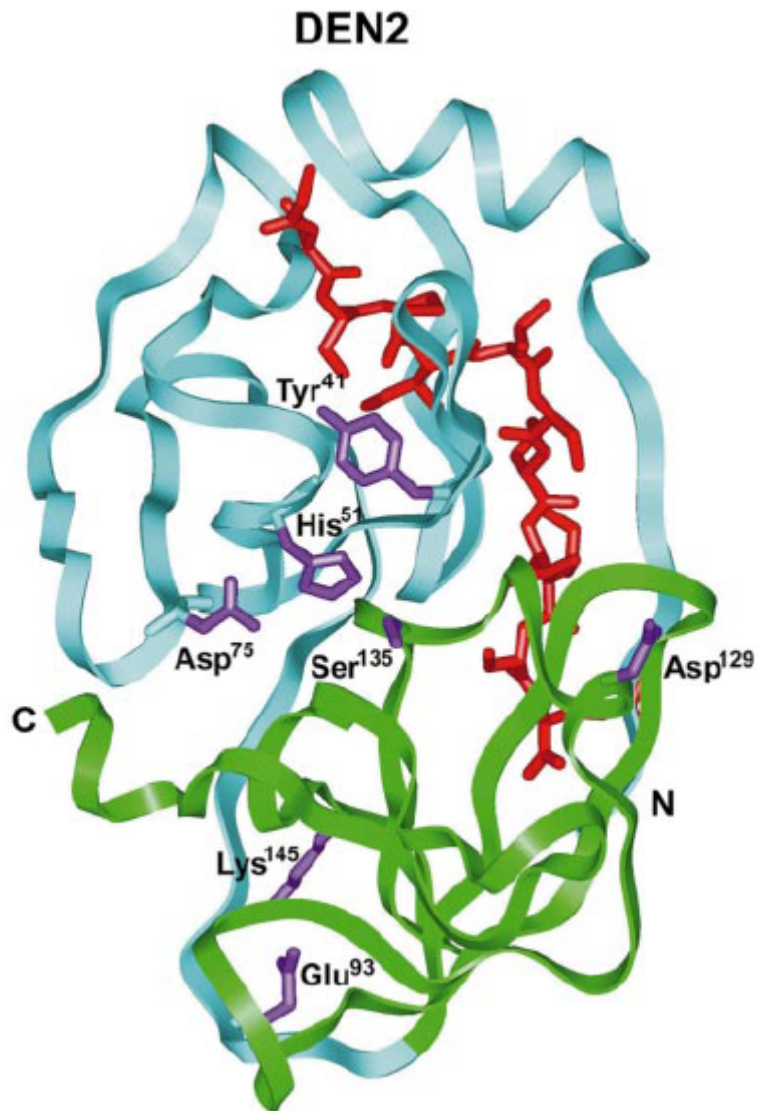


圖 1.5 登革熱病毒 NS2B 疏水性分布圖與 NS2B-NS3 protease 於膜上之示意圖

(A) Kyte&Doolittle hydrophobicity profile of DENV2 NS2B, NS2B 可分為 7 個區域 (I~VII)，包含三個親水性區域 (III, V 與 VII) 及四個疏水性區域 (I, II, IV 與 VI)，NS2B cofactor domain 位於  $^{54}\text{L} \sim \text{E}^{93}$  等 40 個胺基酸之中的疏水性區域 (IV)，由 12 個疏水性的胺基酸 ( $^{70}\text{GSSPILSITISE}^{80}$ ) 組成。(B) 根據疏水性分布圖所推測 NS2B 各個 domain 與 NS2B-NS3 protease 在膜上的分布圖，途中箭頭所指的為 NS2B/NS3 cleavage site。

(Brinkworth et al., 1999)



**圖 1.6 登革熱病毒 NS2B-NS3 protease 立體結構圖**

其結構共可分為：Domain 1（藍色區域）、Domain 2（綠色區域）、cofactor NS2B（紅色區域）與鹽橋（salt bridge）鍵結處（紫色區域）。

（Brinkworth et al., 1999）

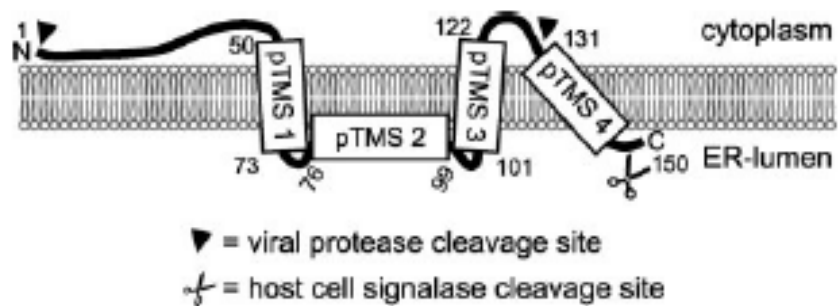
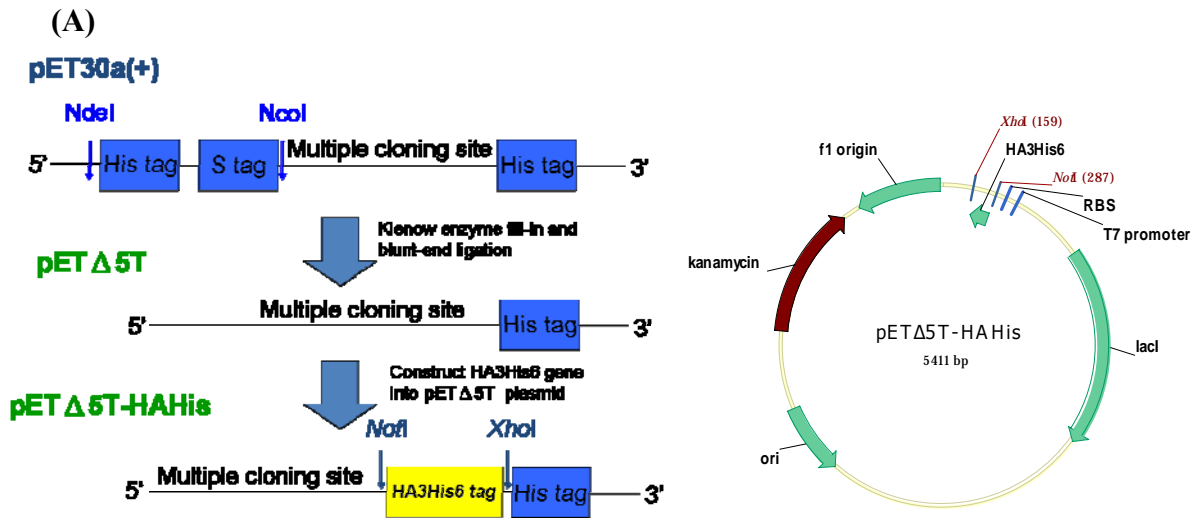


圖 1.7 登革熱病毒 NS4A 於膜上之 Topology 示意圖

NS4A 的結構由四個疏水性的區域組成 (pTMS1~4)，NS4A 之 N 端前 1/3 位於細胞質中，pTMS 1 與 pTMS 4 由細胞質穿膜至 ER lumen，pTMS 3 則由 ER lumen 穿膜至細胞質，pTMS 2 (aa. 76~99) 區域推測可能貼附於 ER 內膜上。

( Miller et al., 2007 )





(C)

**HA3His6 :**

**YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGAHHHHHHG**

圖 3.1 pETΔ5T-HAHis 質體建構示意圖與 HA3His6 定序分析  
 (A) pETΔ5T- HAHis 是由 pET30a(+)  
 修飾而來。 (B) HA3His6 tag 之定序分析，於 5' 端引入 *Not I* 切位、3' 端引入 *Xho I* 切位與轉譯終止密碼 TAGTGA，clone 入 pETΔ5T 中。 (C) HA3His6 tag 之胺基酸序列分析，其分子量約 5kDa。

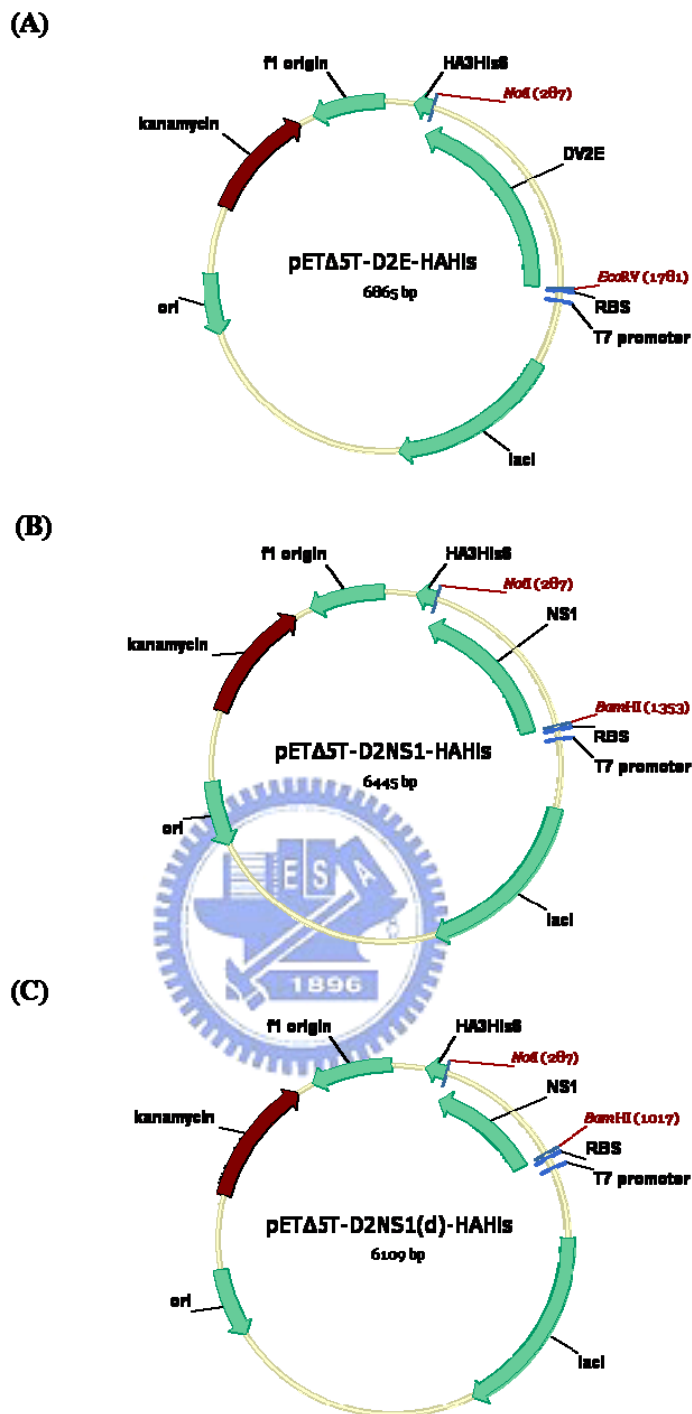


圖 3.2 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體

(A) pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis : DV-2 的 E 基因 (nt.937~2421) clone 入 pET $\Delta$ 5T-HAHis 的 *EcoRV* 及 *NotI* 切位。(B) pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis : DV-2 的 NS1 基因 (nt.2422~3477) clone 入 pET $\Delta$ 5T-HAHis 的 *BamHI* 及 *NotI* 切位。

(C) pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis : DV-2 的截短型 NS1 基因 (nt.2422~3141) clone 入 pET $\Delta$ 5T-HAHis 的 *BamHI* 及 *NotI* 切位。

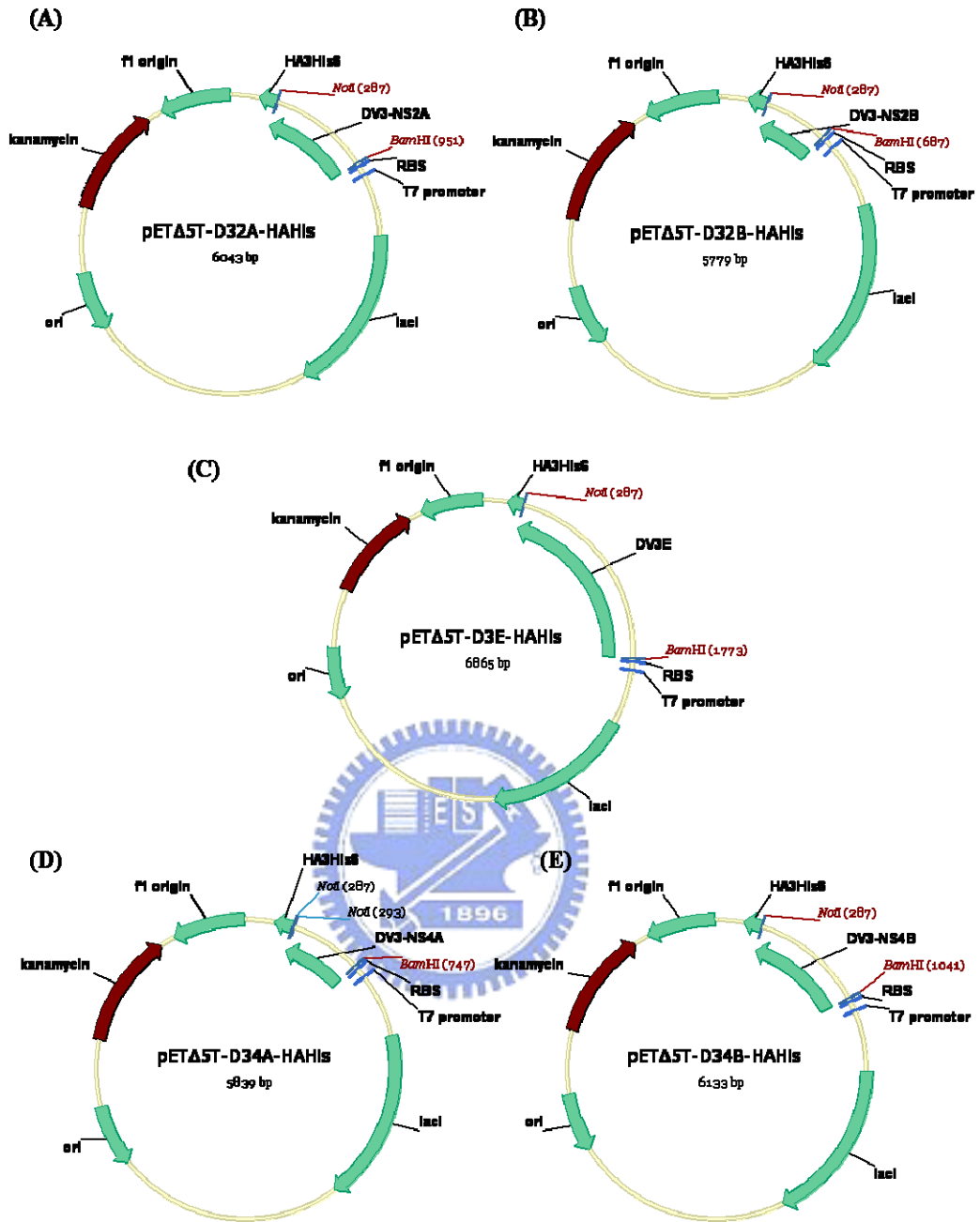


圖 3.3 pET $\Delta$ 5T-D3NS2A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS2B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3NS4B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體

(A) pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis : DV-3 的 NS2A 基因 (nt.3470~4123) ;  
 (B) pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis : DV-3 的 NS2B 基因 (nt.4124~4513) ;  
 (C) pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis : DV-3 的 NS4A 基因 (nt.6371~6820) ;  
 (D) pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis : DV-3 的 NS4B 基因 (nt.6821~7564) ;  
 (E) pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis : DV-3 的 E 基因 (nt.935~2413) 等五個 DV-3 的基因皆 clone 入 pET $\Delta$ 5T-HAHis 的 *Bam*HI 及 *Not*I 切位。

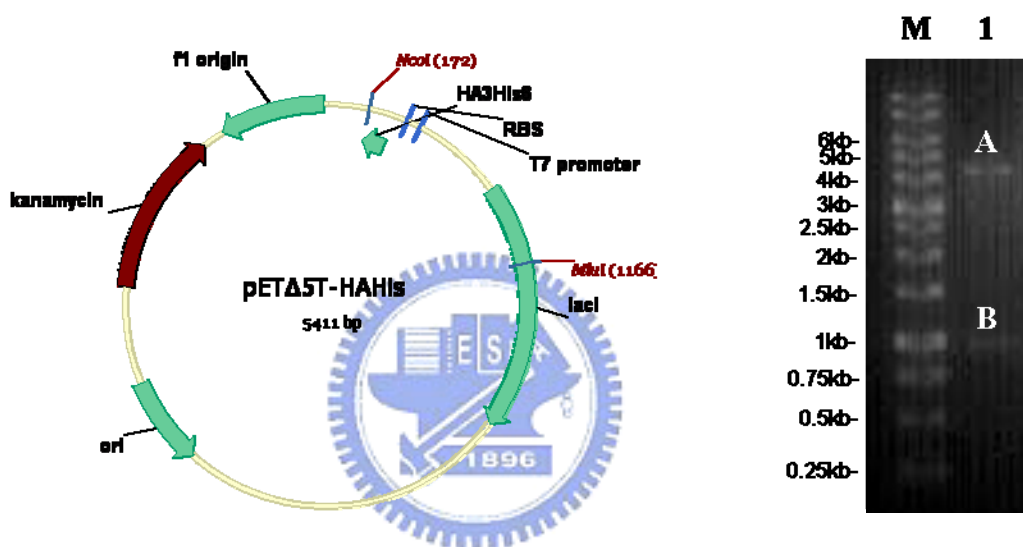


圖 3.4 限制酶酵素切割 pETΔ5T-HAHis

Lane 1 為 MluI、NcoI 切割 pETΔ5T-D22A-HAHis 質體

A, 4417bp; B, 994bp

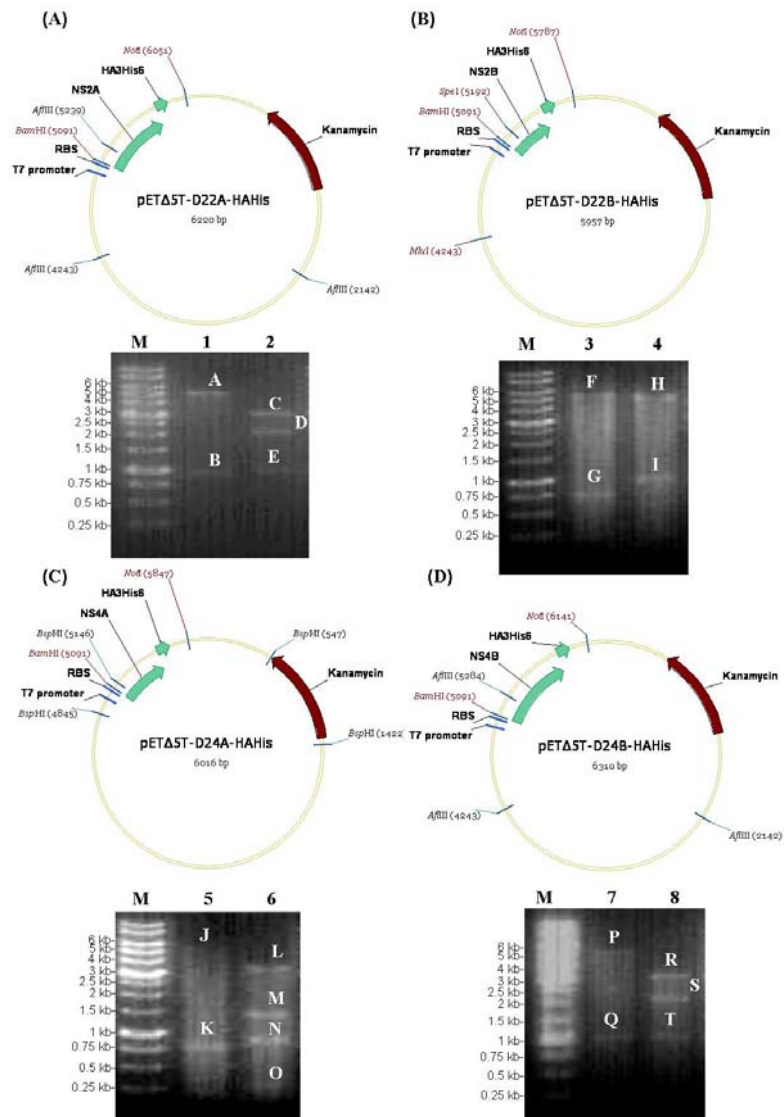


圖 3.5 限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體

(A) Lane 1 為 *Bam*HI·*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 質體; Lane 2 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 質體; (B) Lane 3 為 *Bam*HI·*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 質體; Lane 4 為 *Mlu*I·*Kpn*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 質體; (C) Lane 5 為 *Bam*HI·*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 質體; Lane 6 為 *Bsp*HI 切割 pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 質體; (D) Lane 7 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體; Lane 8 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 質體

A, 5260bp; B, 960bp; C, 3123bp; D, 2101bp; E, 996bp; F, 5261bp; G, 696bp; H, 5008bp; I, 949bp; J, 5260bp; K, 756bp; L, 3423bp; M, 1417bp; N, 875bp; O, 301bp; P, 5260bp; Q, 1050bp; R, 3168bp; S, 2101bp; T, 1041bp

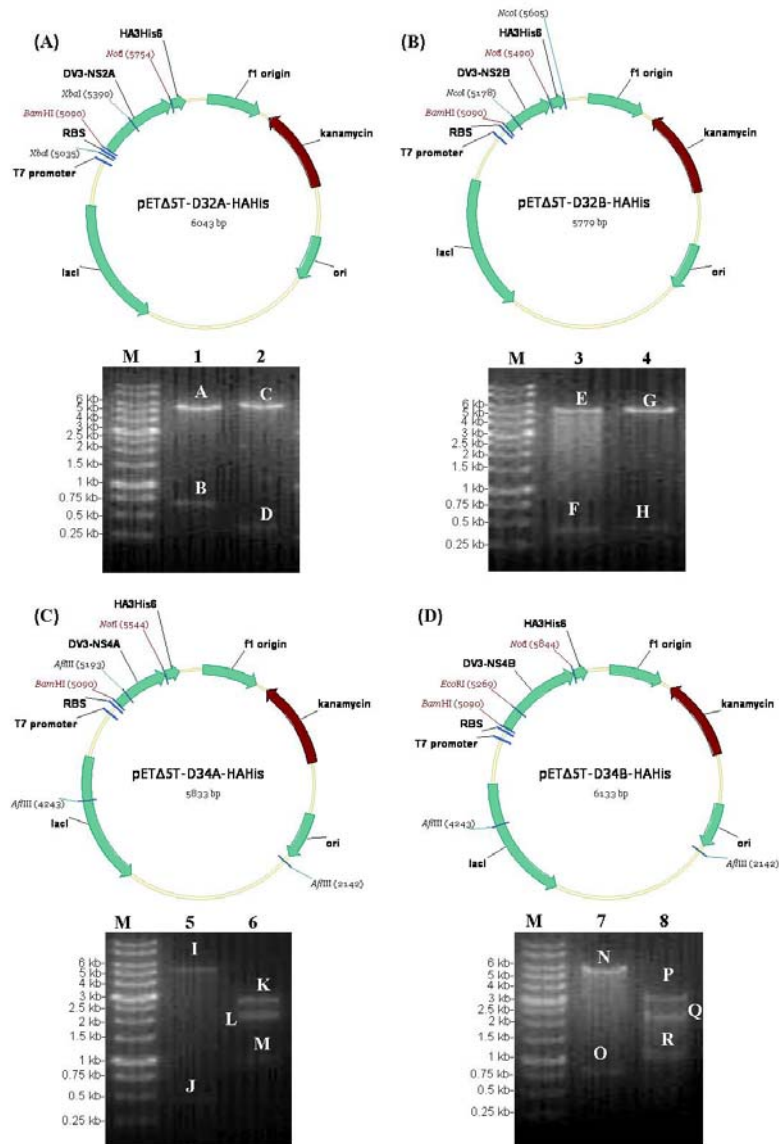


圖 3.6 限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體

(A) Lane 1 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 質體；Lane 2 為 *Xba*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 質體；(B) Lane 3 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 質體；Lane 4 為 *Nco*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 質體；(C) Lane 5 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 質體；Lane 6 為 *Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 質體；(D) Lane 7 為 *Bam*HI、*Not*I 切割 pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體；Lane 8 為 *Eco*RI、*Afl*III 切割 pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 質體

A, 5379bp; B, 664bp; C, 5688bp; D, 355bp; E, 5379bp; F, 400bp; G, 5352bp; H, 427bp; I, 5379bp; J, 460bp; K, 2788bp; L, 2101bp; M, 950bp; N, 5379bp; O, 754bp; P, 3006bp; Q, 2101bp; R, 1026bp

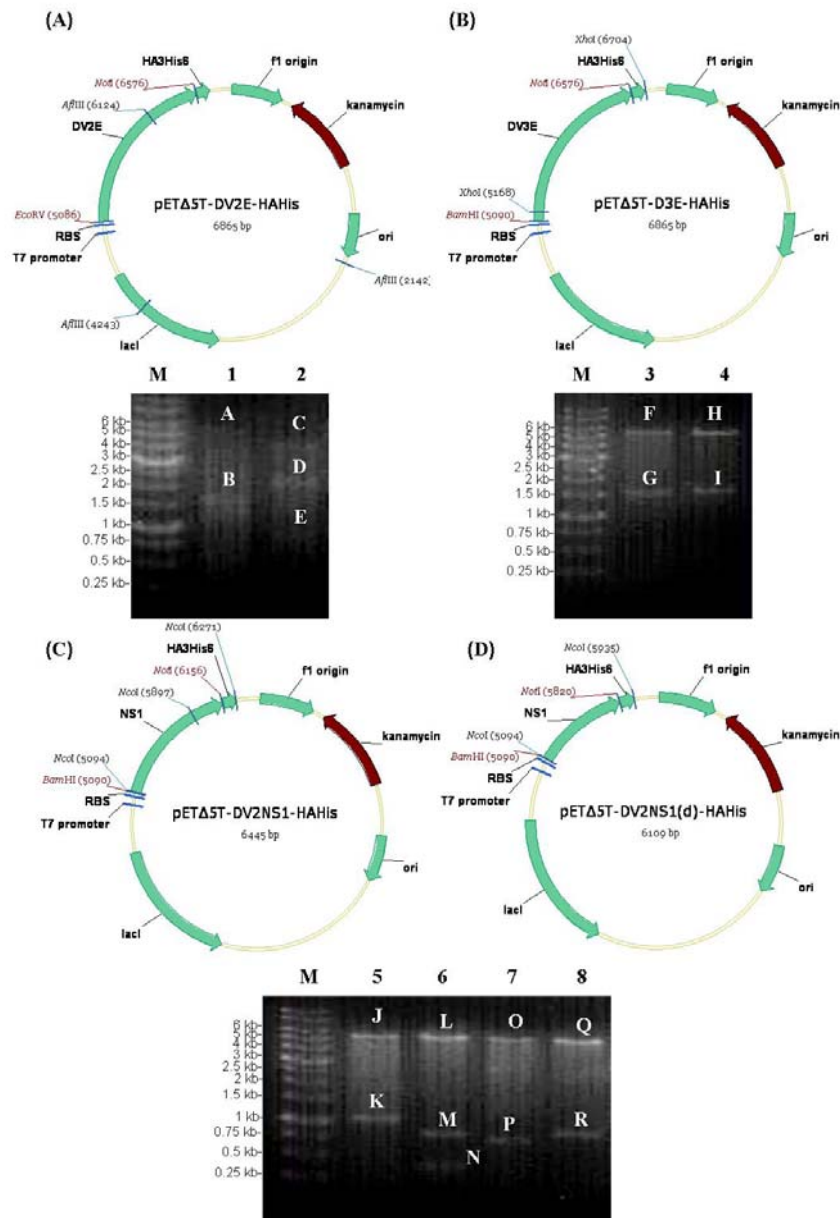


圖 3.7 限制酶酵素切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體

(A) Lane 1 為 *EcoRV*、*NotI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 質體；Lane 2 為 *AflIII* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 質體；(B) Lane 3 為 *BamHI*、*NotI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體；Lane 4 為 *XhoI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 質體；(C) Lane 5 為 *BamHI*、*NotI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 質體；Lane 6 為 *NcoI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 質體；Lane 7 為 *BamHI*、*NotI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體；Lane 8 為 *NcoI* 切割 pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 質體  
 A, 5371bp; B, 1494bp; C, 2883bp; D, 2101bp; E, 1881bp; F, 5379bp; G, 1486bp; H, 5329bp; I, 1536bp; J, 5379bp; K, 1066bp; L, 5268bp; M, 803bp; N, 347bp; O, 5377bp; P, 730bp; Q, 5268bp; R, 841

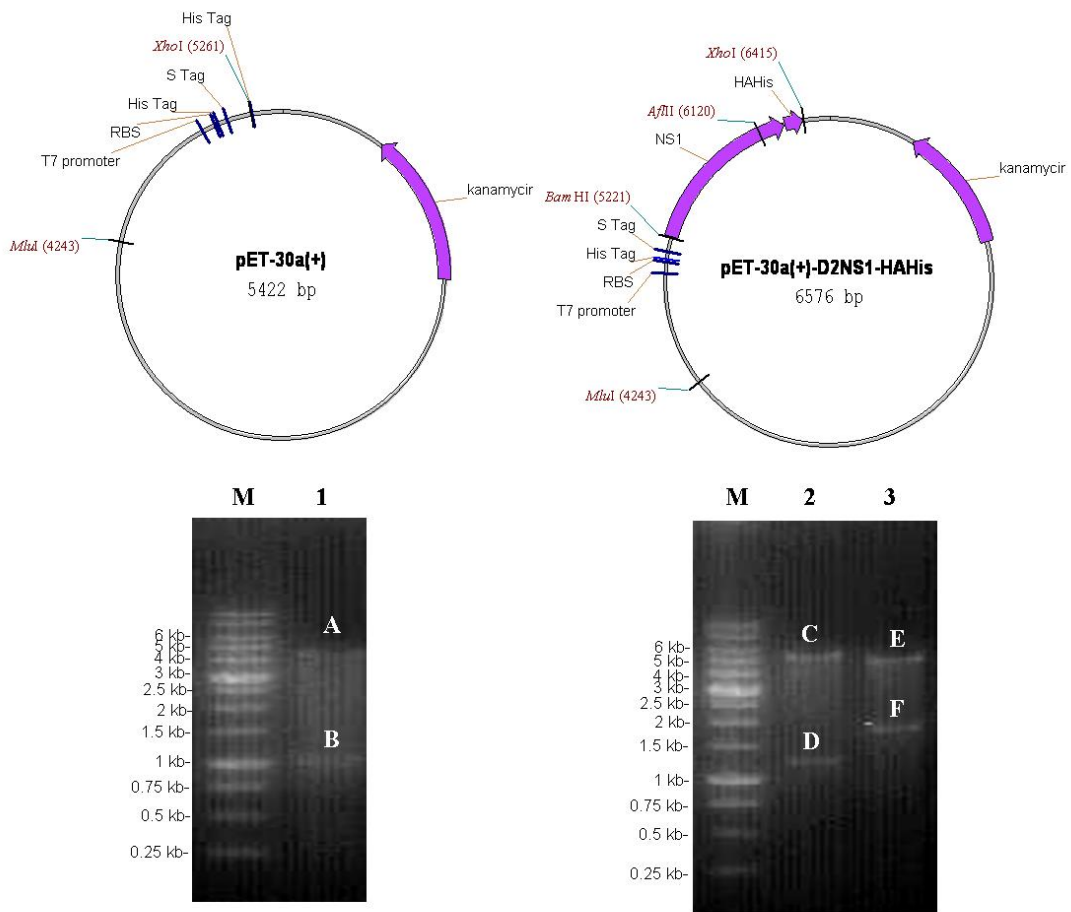


圖 3.8 限制酶酵素切割 pET-30a(+), pET-30a(+)-D2NS1-HAHis 質體

(A) Lane 1 為 *MluI*、*XhoI* 切割 pET-30a(+) 質體；(B) Lane 2 為 *BamHI*、*XhoI* 切割 pET-30(a)-D2NS1-HAHis 質體；Lane 3 為 *AflIII*、*MluI* 切割 pET-30(a)-D2NS1-HAHis 質體

A, 4404bp; B, 1018bp; C, 5382bp; D, 1194bp; E, 4699bp; F, 1877bp



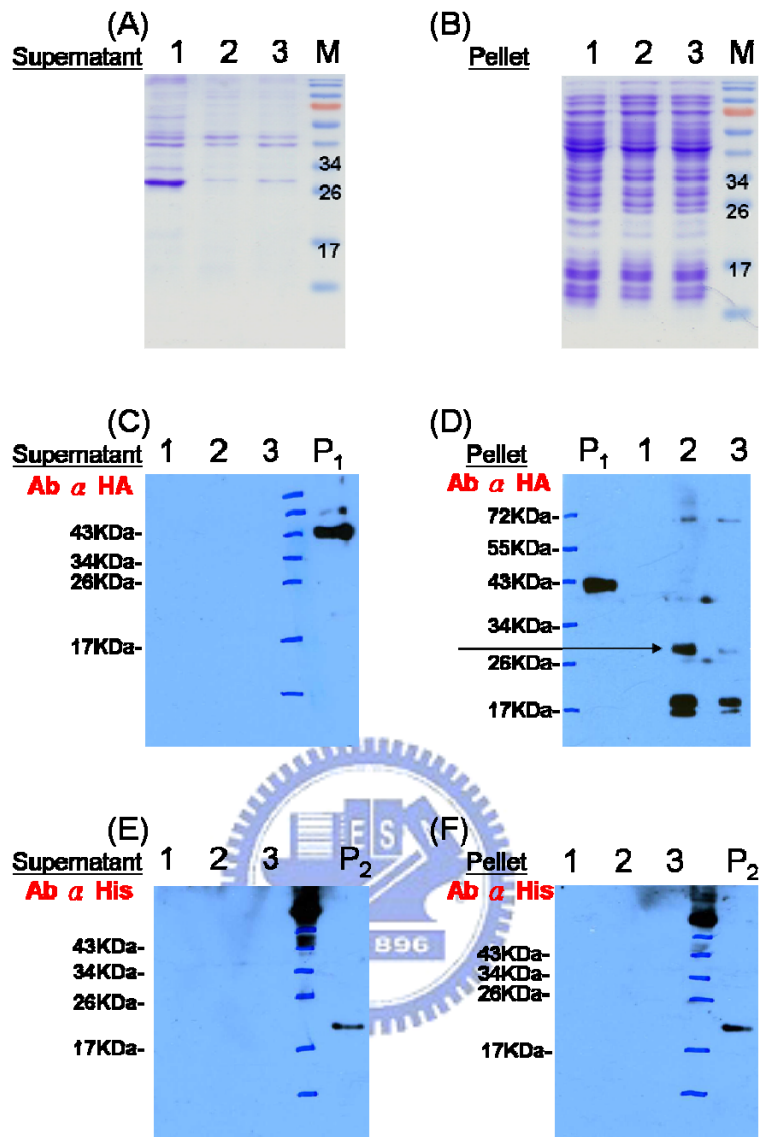


圖 3.9 DV2-NS2A 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

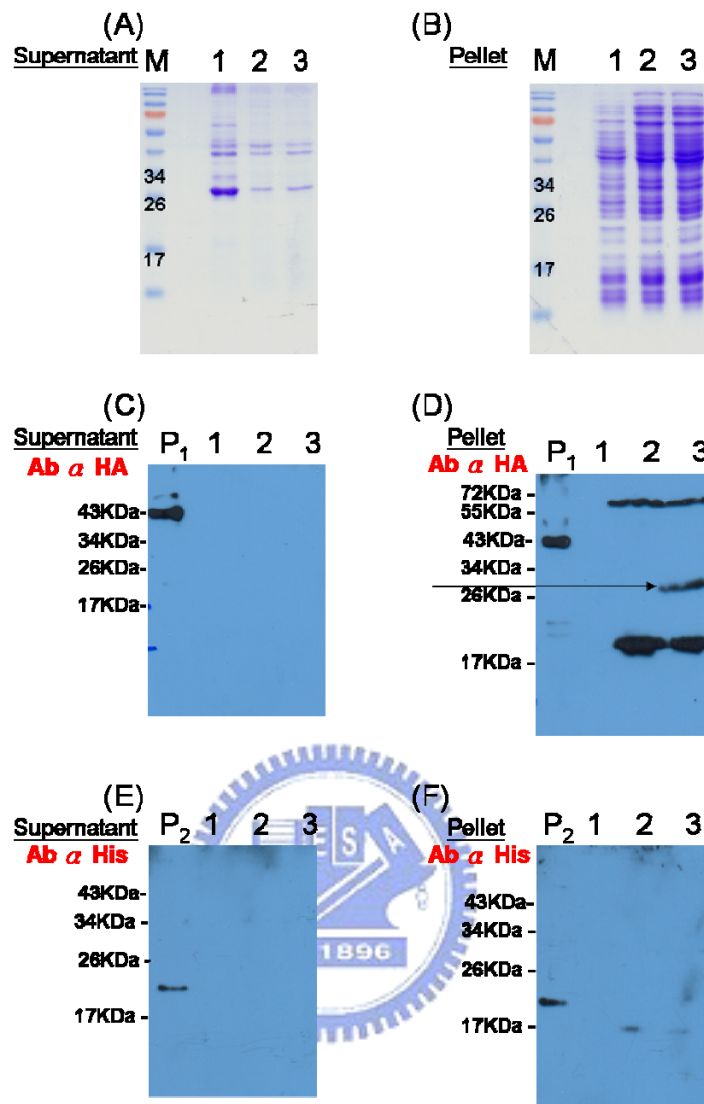


圖 3.10 DV3-NS2A 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D32A-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

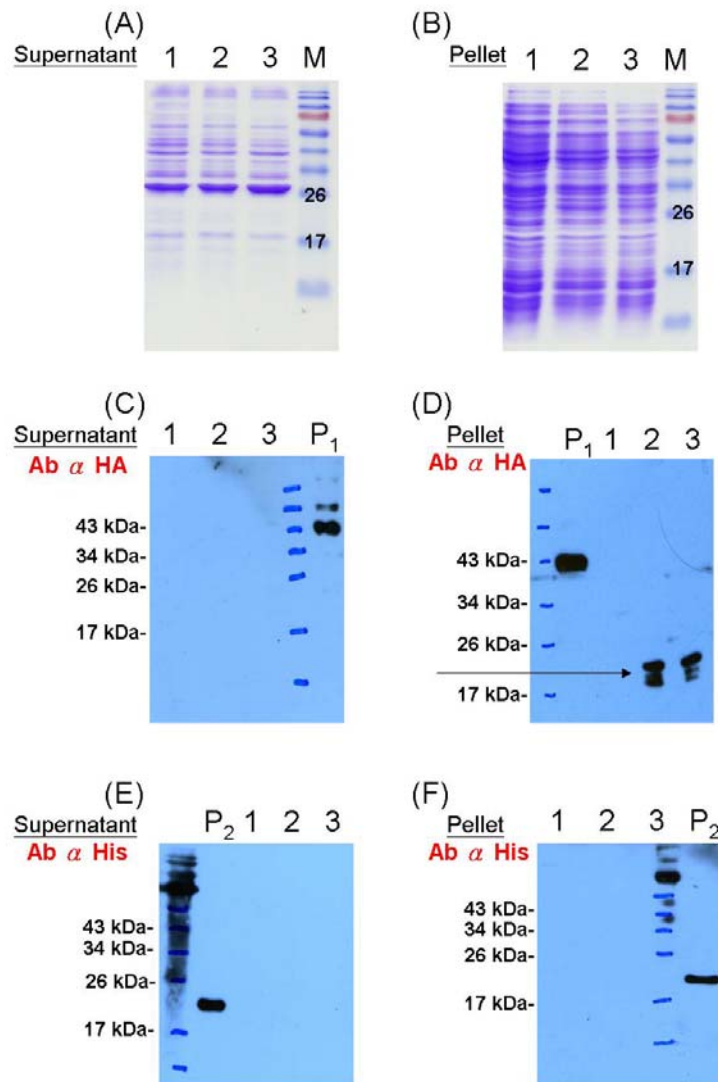


圖 3.11 DV2-NS2B 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D22B-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

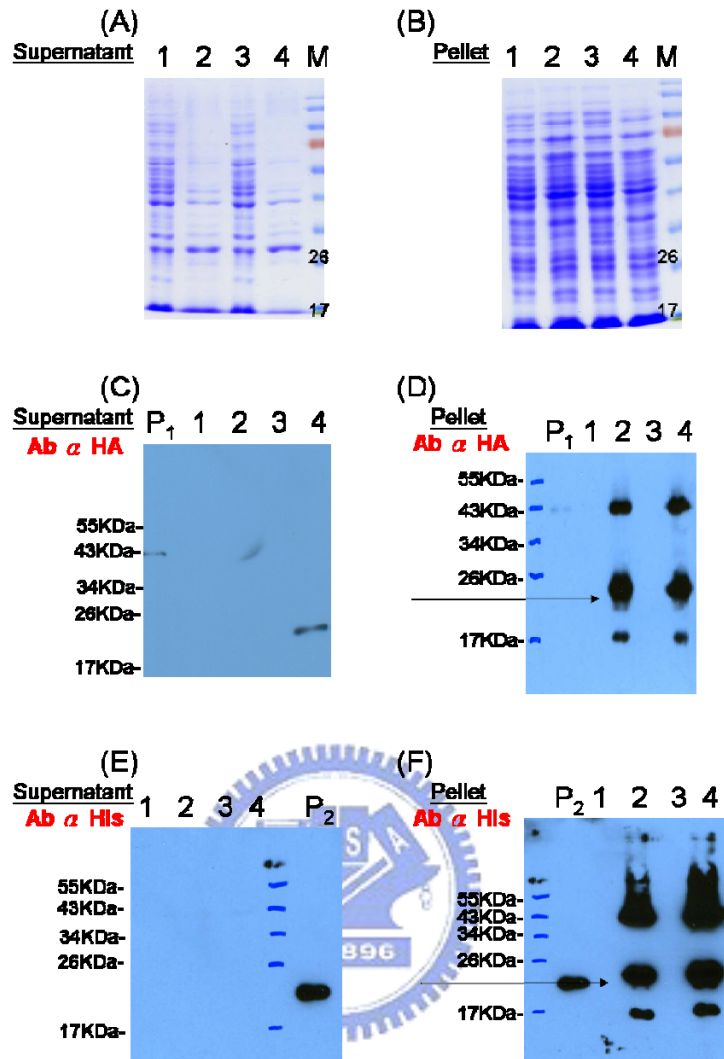


圖 3.12 DV3-NS2B 在 *E. coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E. coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 於 *E. coli* C41(DE3)表現結果

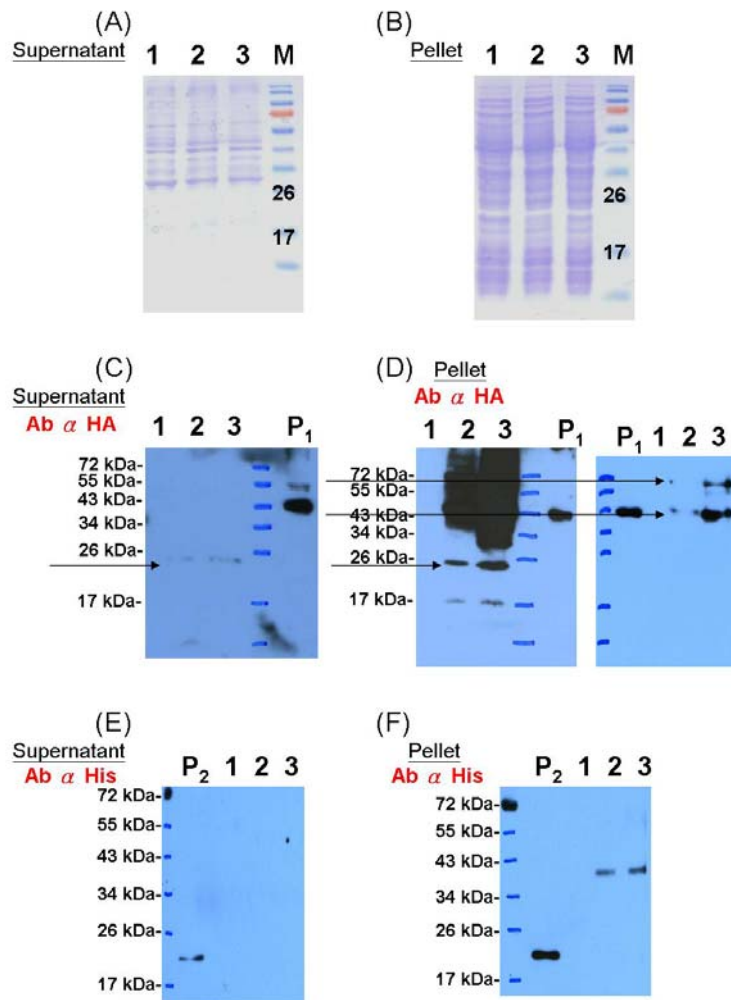
Land 3, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E. coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET $\Delta$ 5T-D32B-HAHis 於 *E. coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB



**圖 3.13 DV2-NS4A 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現**

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果，右側的圖為蛋白質含量降成 10 mg 的結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

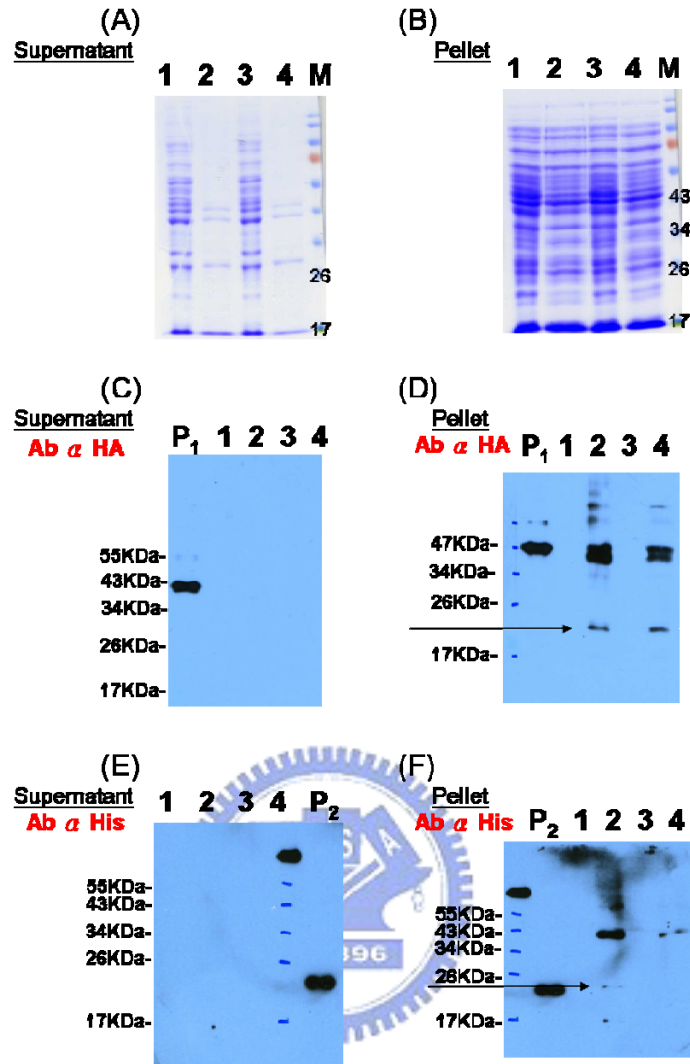


圖 3.14 DV3-NS4A 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET $\Delta$ 5T-D34A-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

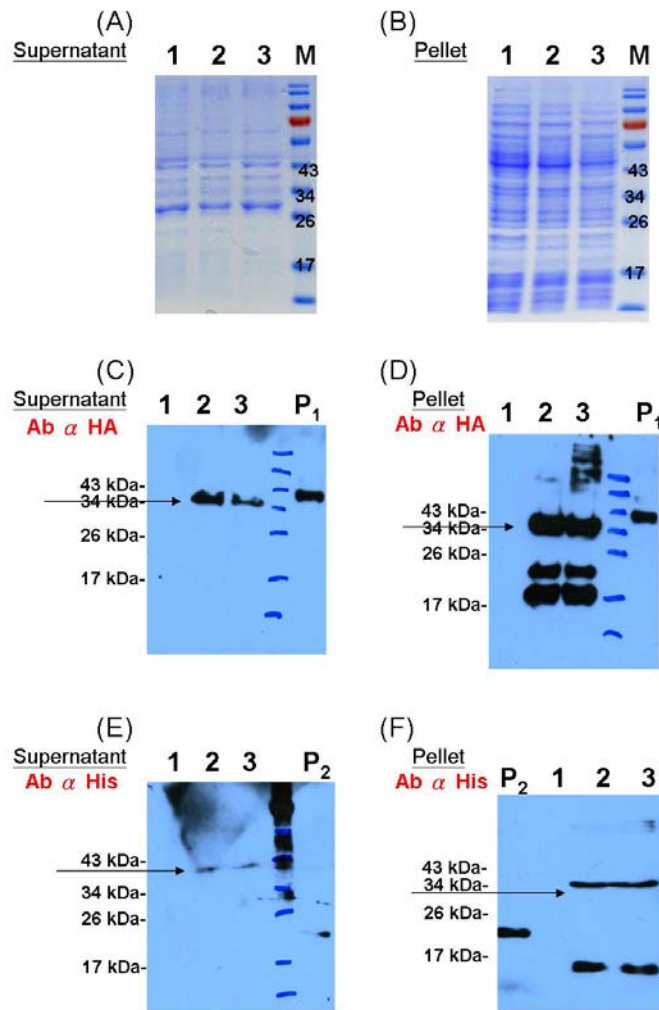


圖 3.15 DV2-NS4B 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D24B-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

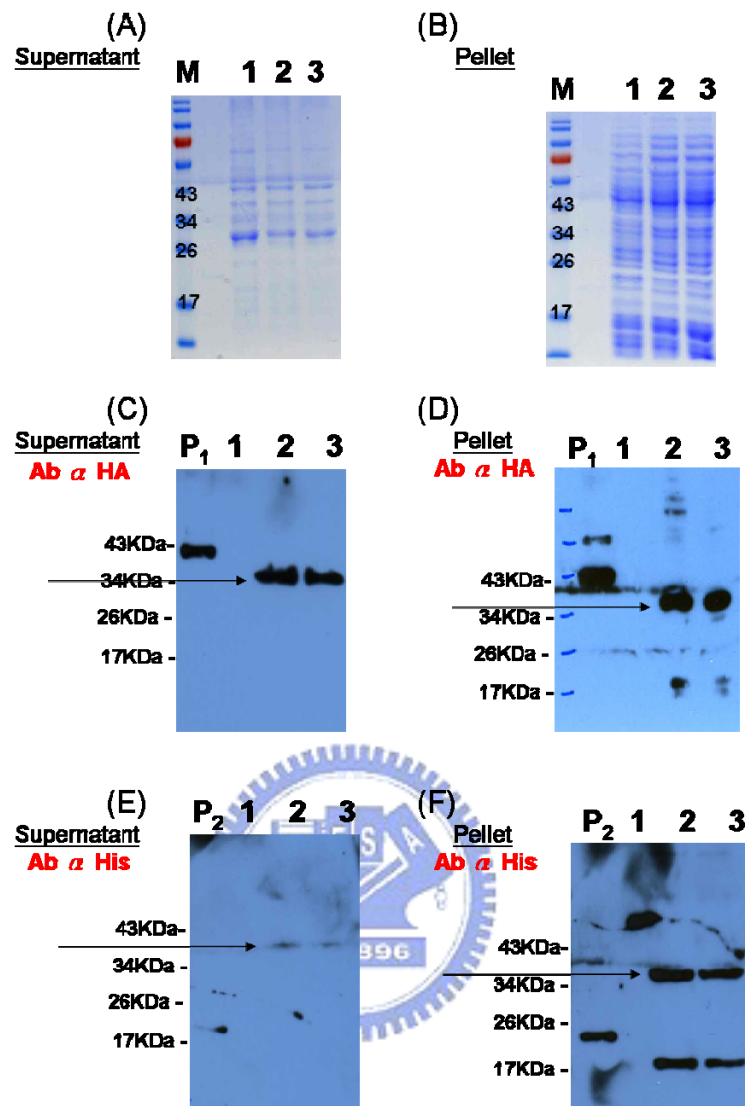


圖 3.16 DV3-NS4B 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D34B-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB



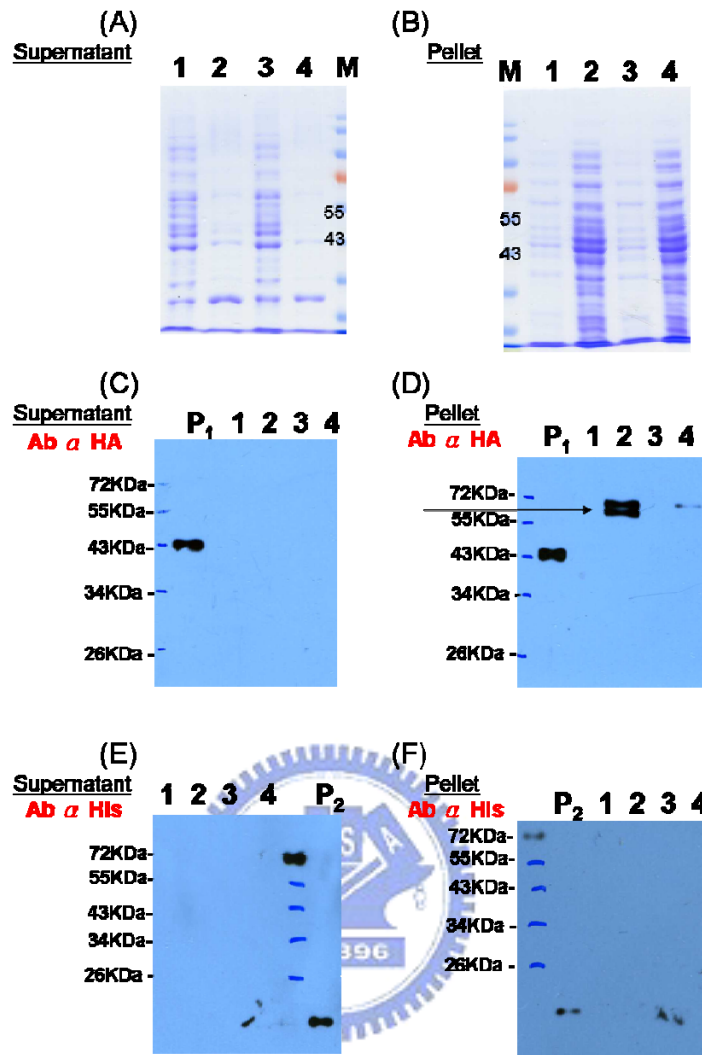


圖 3.17 DV2-E 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET $\Delta$ 5T-D2E-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

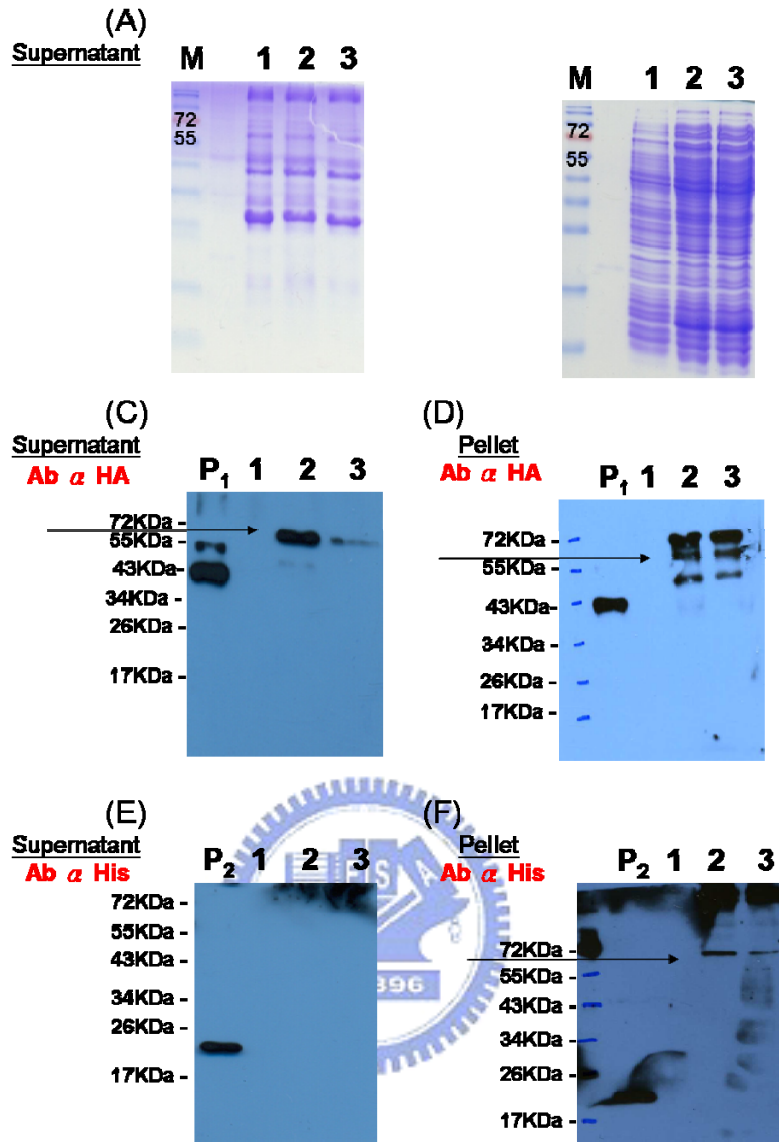


圖 3.18 DV3-E 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-D3E-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

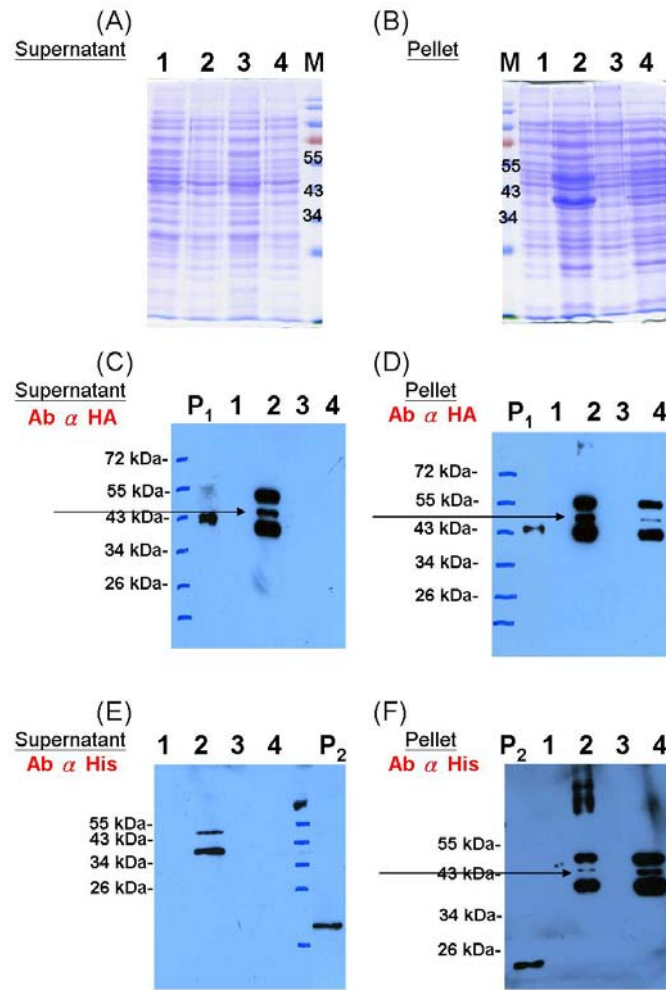


圖 3.19 DV2-NS1 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

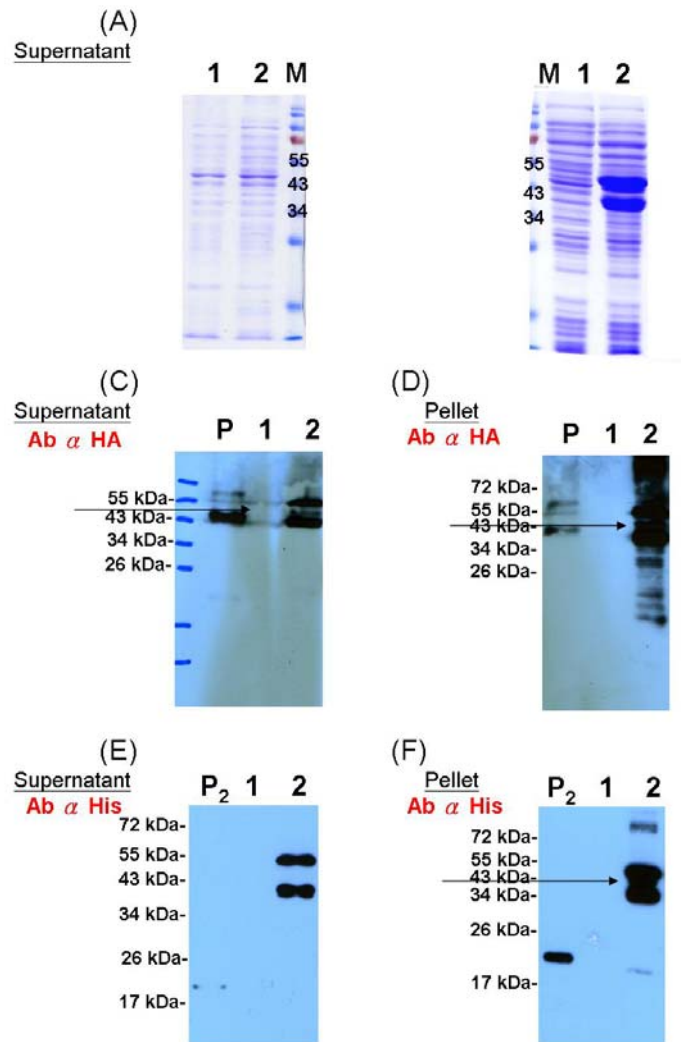


圖 3.20 DV2-NS1 在 *E.coli* B21(DE3) 的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control) 於 *E.coli* BL21(DE3) 表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D2NS1-HAHis 於 *E.coli* BL21(DE3) 表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

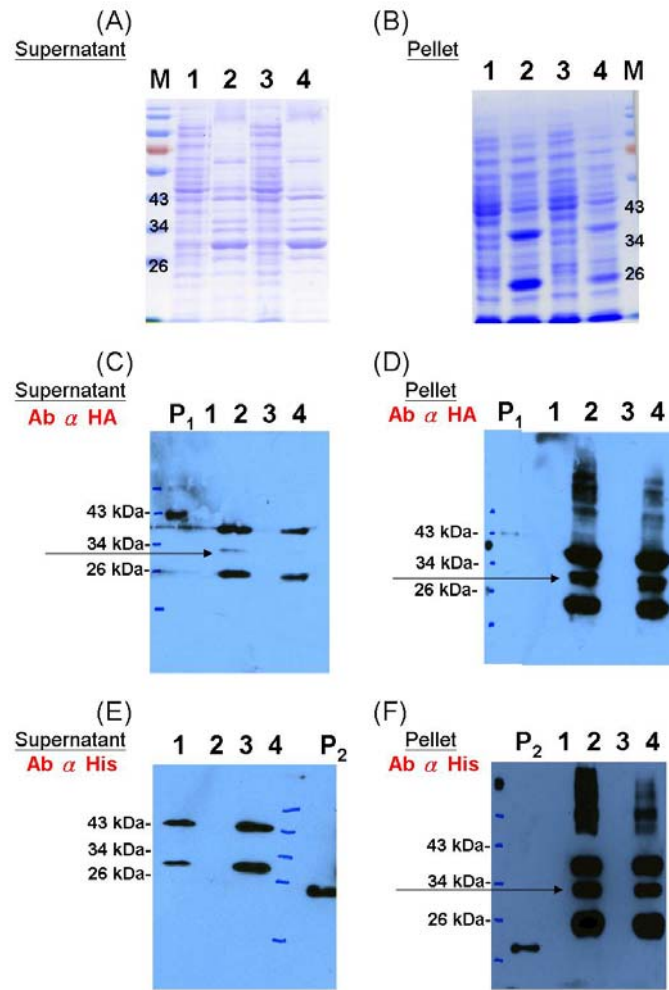


圖 3.21 DV2-NS1(d)在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET $\Delta$ 5T-HAHis (negative control)於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET $\Delta$ 5T-D2NS1(d)-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

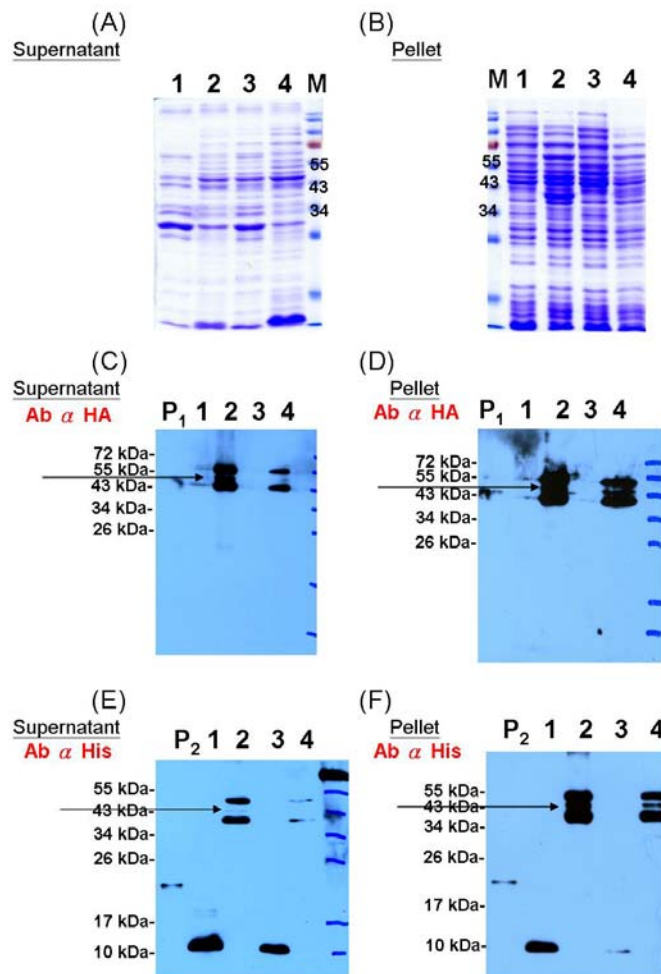


圖 3.22 DV2-NS1 在 *E.coli* C41(DE3)與 C43(DE3)的蛋白質表現

(A) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析上清液蛋白質表現之結果。  
 (B) 14% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色分析 pellet 蛋白質表現之結果。  
 (C) 以 anti-HA 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(D) 以 anti-HA 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。(E) 以 anti-His 抗體偵測上清液蛋白質表現之 Western blot 結果。(F) 以 anti-His 抗體偵測 pellet 蛋白質表現之 Western blot 結果。

Land 1, pET-30a(+) (negative control)於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 2, pET-30a-D2NS1-HAHis 於 *E.coli* C41(DE3)表現結果

Land 3, pET-30a(+) (negative control)於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land 4, pET-30a-D2NS1-HAHis 於 *E.coli* C43(DE3)表現結果

Land M, Marker

Land P<sub>1</sub>, anti-HA 抗體(positive control), E-tag

Land P<sub>2</sub>, anti-His 抗體之(positive control), HtpB

## 附錄 1

### Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)



#### QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Catalog #200516 and #200517

#### QUICK-REFERENCE PROTOCOL

- Prepare the control and sample reaction(s) as indicated below:

**Note** *Stratagene recommends setting up an initial sample reaction using 10 ng of dsDNA template. If this initial sample reaction is unsuccessful, set up a series of reactions using various concentrations of dsDNA template ranging from 5 to 50 ng (e.g., 5, 10, 20, and 50 ng of dsDNA template) while keeping the primer concentration constant.*

##### Control Reaction

5  $\mu$ l of 10 $\times$  reaction buffer  
 2  $\mu$ l (10 ng) of pWhitescript™ 4.5-kb control template (5 ng/ $\mu$ l)  
 1.25  $\mu$ l (125 ng) of oligonucleotide control primer #1 [34-mer (100 ng/ $\mu$ l)]  
 1.25  $\mu$ l (125 ng) of oligonucleotide control primer #2 [34-mer (100 ng/ $\mu$ l)]  
 1  $\mu$ l of dNTP mix  
 3  $\mu$ l of QuikSolution  
 36.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O to a final volume of 50  $\mu$ l

##### Sample Reaction

5  $\mu$ l of 10 $\times$  reaction buffer  
 X  $\mu$ l (10 ng) of dsDNA template  
 X  $\mu$ l (125 ng) of oligonucleotide primer #1  
 X  $\mu$ l (125 ng) of oligonucleotide primer #2  
 1  $\mu$ l of dNTP mix  
 3  $\mu$ l of QuikSolution  
 ddH<sub>2</sub>O to a final volume of 50  $\mu$ l

- Then add 1  $\mu$ l of *PfuTurbo* DNA polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) to each control and sample reaction.
- If the thermal cycler to be used does not have a hot top assembly, overlay each reaction with ~30  $\mu$ l of mineral oil.
- Cycle each reaction using the cycling parameters outlined in the following table:

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	1 minute
2	18	95°C	50 seconds
		60°C	50 seconds
		68°C	1 minute/kb of plasmid length
3	1	68°C	7 minutes

- Add 1  $\mu$ l of *Dpn* I restriction enzyme (10 U/ $\mu$ l) below the mineral oil overlay.
- Gently and thoroughly mix each reaction, spin down in a microcentrifuge for 1 minute, and immediately incubate at 37°C for 1 hour to digest the parental supercoiled dsDNA.
- Transform 2  $\mu$ l of the *Dpn* I-treated DNA from each control and sample reaction into separate 45- $\mu$ l aliquots of XL10-Gold ultracompetent cells (see *Transformation of XL10-Gold® Ultracompetent Cells* in the instruction manual).

## TA cloning Kit (Promega)

### pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1360, A1380, A3600 AND A3610.

**Quick  
PROTOCOL**

#### Cloning PCR Products with pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors

##### Ligation Using 2X Rapid Ligation Buffer

- Briefly centrifuge the pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector and Control Insert DNA tubes to collect contents at the bottom of the tube.
- Set up ligation reactions as described below. Vortex the 2X Rapid Ligation Buffer vigorously before each use. Use 0.5ml tubes known to have low DNA-binding capacity.

Reagents	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl	—	—
Control Insert DNA	—	2µl	—
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
Deionized water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

- Mix the reactions by pipetting. Incubate the reactions 1 hour at room temperature. Alternatively, incubate the reactions overnight at 4°C for the maximum number of transformants.

##### Transformation of JM109 High Efficiency Competent Cells

- Prepare LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates.
- Centrifuge the ligation reactions briefly. Add 2µl of each ligation reaction to a sterile 1.5ml tube on ice. Prepare a control tube with 0.1ng of uncut plasmid.
- Place the JM109 High Efficiency Competent Cells in an ice bath until just thawed (5 minutes). Mix cells by **gently** flicking the tube.
- Carefully transfer 50µl of cells to the ligation reaction tubes from Step 2. Use 100µl of cells for the uncut DNA control tube. **Gently** flick the tubes and incubate on ice for 20 minutes.
- Heat-shock the cells for 45–50 seconds in a water bath at exactly 42°C. DO NOT SHAKE. Immediately return the tubes to ice for 2 minutes.
- Add 950µl room temperature SOC medium to the ligation reaction transformations and 900µl to the uncut DNA control tube. Incubate for 1.5 hours at 37°C with shaking (~150rpm).
- Plate 100µl of each transformation culture onto duplicate LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates. For the uncut DNA control, a 1:10 dilution with SOC is recommended.
- Incubate plates overnight at 37°C. Select white colonies.



Set up ligation. Incubate at room temperature for 1 hour or at 4°C overnight.

Thaw competent cells on ice. Add 50µl cells to 2µl of the ligation reaction. Incubate on ice for 20 minutes.

Heat Shock for 45–50 seconds at exactly 42°C.

Incubate on ice for 2 minutes.

Add SOC medium. Incubate for 1.5 hours at 37°C with shaking.

Plate. Select white colonies.

Additional protocol information in Technical Manual #TM042, available upon request from Promega or online at [www.promega.com](http://www.promega.com)

##### ORDERING / TECHNICAL INFORMATION:

[www.promega.com](http://www.promega.com) • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©2000, 2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.  
Prices and specifications subject to change without prior notice.



**Promega**

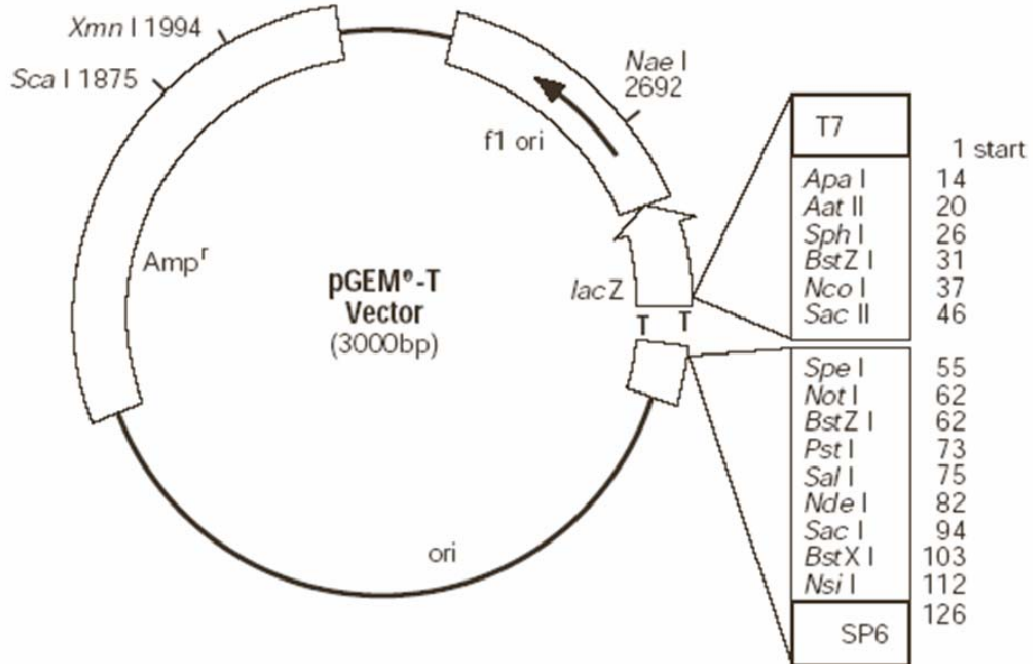
Printed in USA. Revised 12/05.  
Part# 9FB033



### 附錄 3

## pGEM-T 質體之 map (Promega)

### pGEM<sup>®</sup>-T Vector Map and Sequence Reference Points



#### pGEM<sup>®</sup>-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
$\beta$ -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 4

### **ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (Premier)**

1. Pellet 3-5ml of cells by centrifugation for 1 min at top speed (12-14,000 x g) in a microcentrifuge. Pour off the supernatant and remove excess media.
2. Completely resuspend the cell pellet in 200 µl of solution I, and mix by gently inverting the capped tube 5 times.
3. Add 200 µl of solution II and mix by inverting the tube 5 times. The cell suspension should be clear immediately.
4. Add 200 µl of solution III and mix by inverting the tube 5 times.
5. Centrifuge the lysate at top speed in a microcentrifuge for 5 min. A compact white pellet will form along the side or at the bottom of the tube.
6. Insert the spin column into a collection tube, carefully remove all of the cleared lysate at step 5 directly to spin column, spin down for 1 min.
7. Discard the filtrate in the collection tube and add 700 µl of Washing solution and spin for 1 min. Repeat this step for one more time.
8. Discard the filtrate, the centrifuge for 3 min at top speed to remove residual ethanol.
9. Transfer the spin column into a new microcentrifuge tube and incubate at 45-60°C oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.
10. Add 30-50 µl of Elution Solution or H<sub>2</sub>O (pH 7.0-8.5) into the column and centrifuge at top speed for 1 min to elute the DNA.

## 附錄 5

### PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Premier)

#### General Procedure for PCR and DNA Clean-up

1. For each completed PCR amplification or other DNA solution(e.g. after enzymatic treatment), remove the solution to a clear microcentrifuge tube.
2. Add 500  $\mu$ l Binding Solution to PCR solution (For PCR>100  $\mu$ l, add five volumes of Binding solution) and vortex briefly to mix.
3. Insert the Spin column into a collection tube, transfer the solution into spin column and spin for 1 min at top speed (12-14,000 x g),and discard the filtrate in the collection tube.
4. Add 700  $\mu$ l of Washing solution and spin for 1 min at top speed. Repeat this step for one more time.
5. Discard the filtrate then centrifuge for 3 min at top speed to remove residual trace of ethanol.
6. Transfer the spin column into a new microcentrifuge tube and incubate at 45-60°C oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.
7. Add 30-50  $\mu$ l of Elution Solution or H<sub>2</sub>O (pH 7.0-8.5) to elute the DNA by centrifuge for 1 min and store the elute DNA at -20°C.



## General Procedure for gel extraction

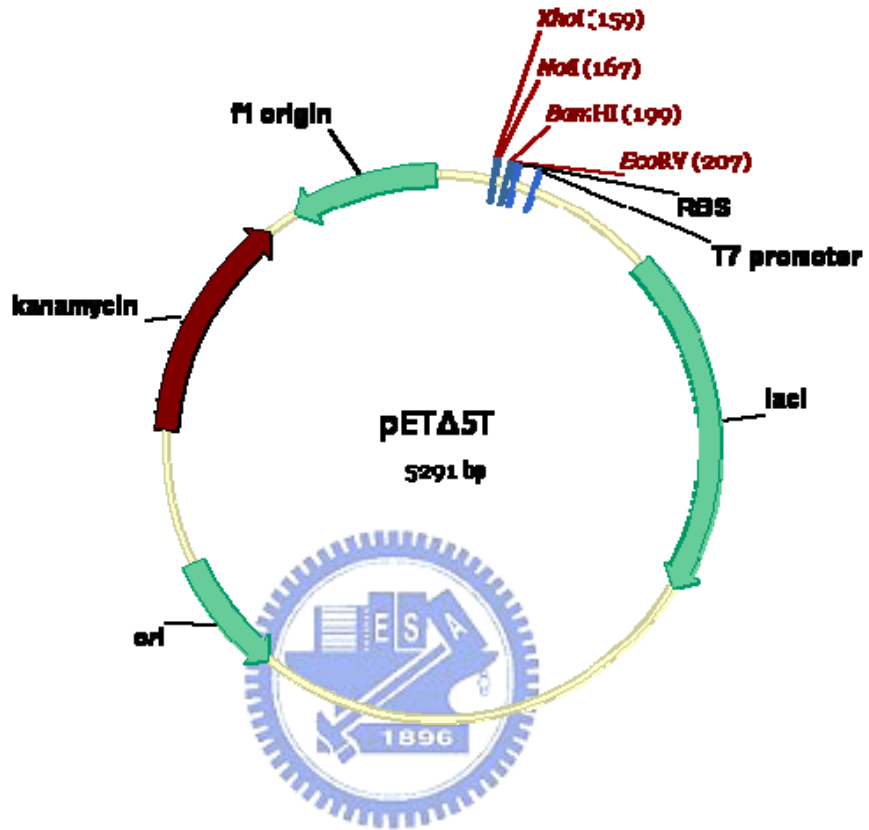
1. Cut out the desired DNA band ( $\leq 350$  mg) with a scalpel after electrophoresis in TAE buffer.
2. Transfer the gel slice into a 1.5 ml clean sterile microcentrifuge tube and equal volumes of Binding Solution to the gel slice, and incubate 5~15 mins at  $60^{\circ}\text{C}$  to dissolve agarose.
3. Insert the Spin column into a collection tube, After the gel slice is completely melted, transfer the DNA/agarose solution to spin column and spin for 1 min at top speed ( $12\text{-}14,000 \times g$ ), and discard the filtrate in the collection tube.
4. Add  $700 \mu\text{l}$  of Washing solution and spin for 1 min at top speed. Repeat this step for one more time.
5. Discard the filtrate then centrifuge for 3 min at top speed to remove residual trace of ethanol.
6. Transfer the spin column into a new microcentrifuge tube and incubate at  $45\text{-}60^{\circ}\text{C}$  oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.

Add  $30\text{-}50 \mu\text{l}$  of Elution Solution or  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.0-8.5) or TE buffer to elute the DNA by centrifuge for 1 min and store the elute DNA at  $-20$  (For DNA fragments larger than 5 kb, use preheated  $60\text{-}70^{\circ}\text{C}$   $\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.0-8.5) or TE buffer to elute).



附錄 7

pETA5T 質體之示意圖

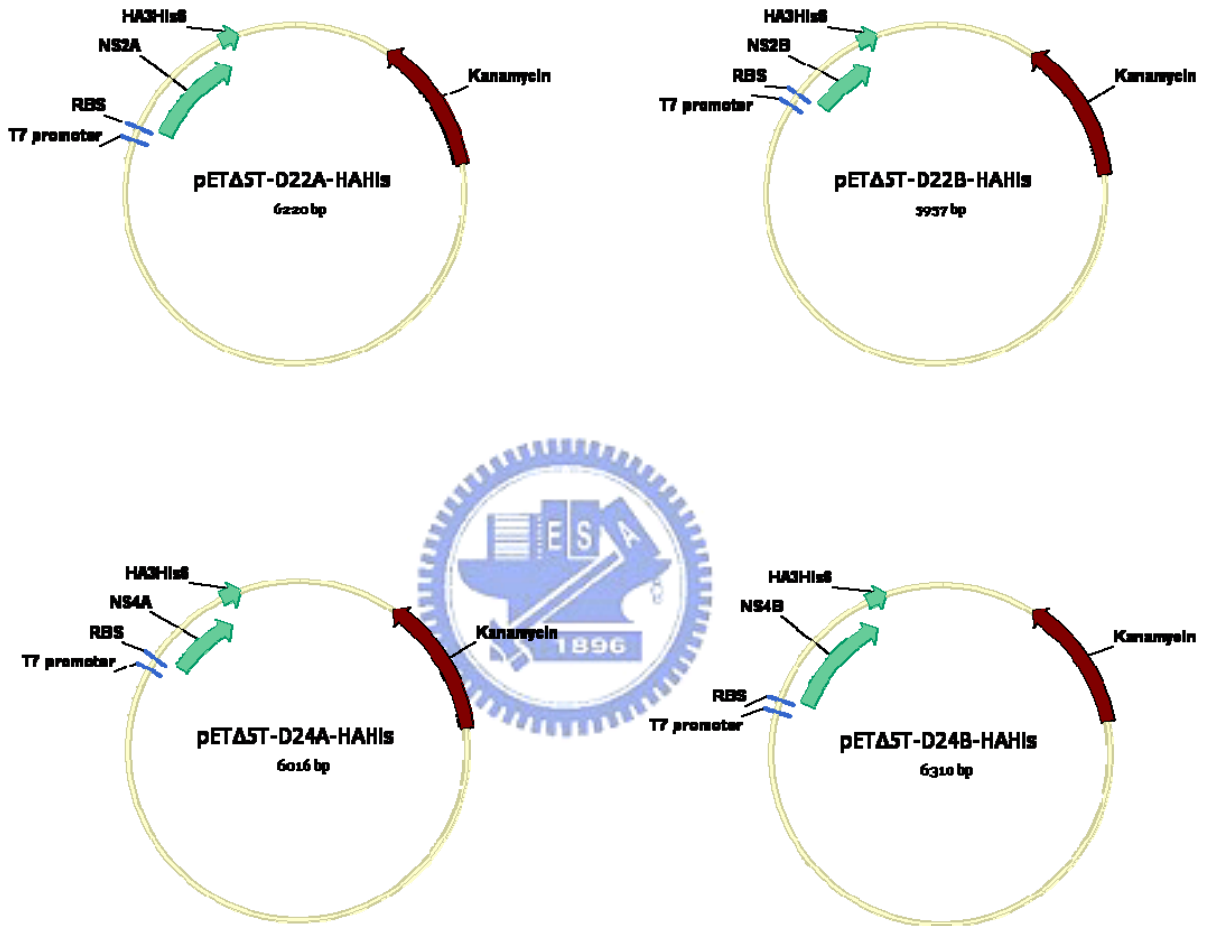


(楊馥嘉, 2006, 交大碩士論文)

附錄 8

pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D2B-HAHis, pET $\Delta$ 5T-D24A-HAHis 與

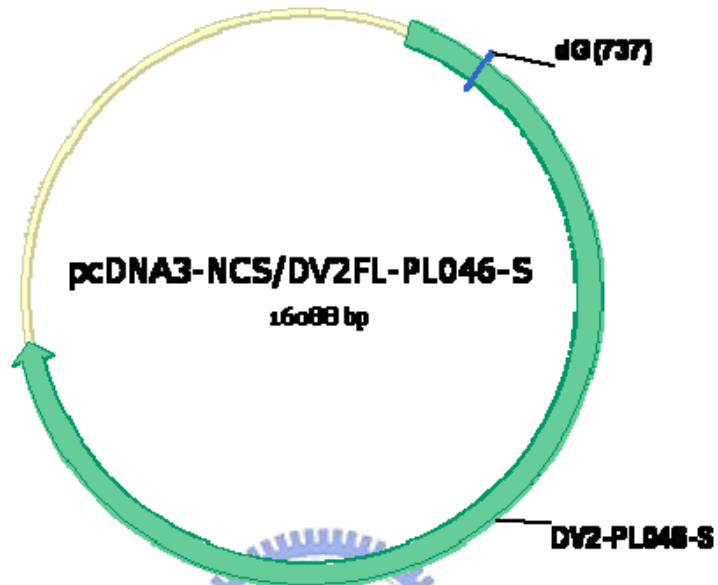
pET $\Delta$ 5T-D22A-HAHis 質體示意圖



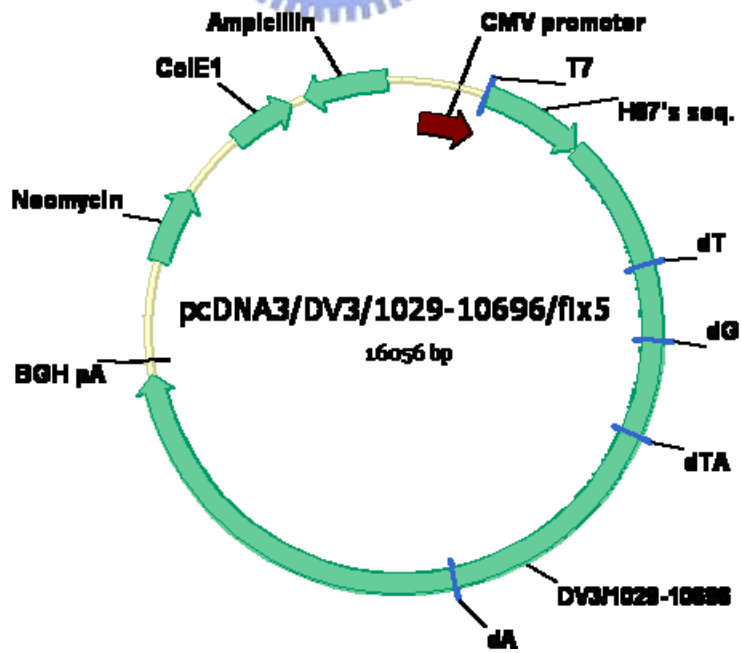
(楊馥嘉, 2006, 交大碩士論文)

附錄 9

pcDNA3-NCS/DV2FL-PL046-S 與 pcDNA3/DV3/1029-10696/fix5 示意圖



(賴建孝, 2006, 交大碩士論文)



(From 楊明浩, Yang laboratory)