

以 EGFP 為報導基因建構登革熱二型 PL046 病毒結構/非結構基因表現

載體

研究生:洪禎憶

指導老師:楊昶良 博士

國立交通大學生物科技學系

中文摘要

登革熱病毒是屬於黃質病毒科黃質病毒屬，基因全長 10.7 kb，是一條正股的單股 RNA，可以產生一個巨蛋白，並經由酵素切割成三個結構與七個非結構蛋白。

在本論文所呈現的研究中，我嘗試建構能表現登革熱病毒二型 PL046 株不同基因體區段的質體。希望能取得單一區段所產生的基因產物。為了能偵測到登革熱病毒的組裝訊號，首先建構了能表現 EGFP 的兩個質體，其上分別帶有登革熱病毒的結構及非結構基因，目的在藉 EGFP 的表現提升觀察表現的靈敏度。第二、為了能大量表現 E protein，將登革熱病毒二型 PL046 株之 E gene 建構於 pLP 質體上，目的在單獨產生 E protein，做功能性研究。以實驗室前人的結果為基礎，我建構完成了上列質體。以定序及限制酶反應進行分析，確認這些 constructs 都沒有 non-sense mutations。

Using EGFP as reporter for the construction of expression vectors carrying structural/non-structural genes from dengue virus type II strain PL046

Student: Jhen-Yi Hong

advisor: Yun-Liang Yang

Department of biological Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract

Dengue virus is a single-stranded, positive-sense RNA virus with 10.7 kb genome, which can simultaneously serve as an mRNA for translation of the viral proteins which will be digested by enzymes into three structural (C, prM, E) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

In this study, I constructed plasmids which contained the structural and nonstructural genes separately along with an EGFP as the reporter, for detecting the packaging signal. Next, I sub-cloned a full-length E gene from Dengue virus type II PL046 strain into pLP vector to express the E proteins for functional study. These constructs were assessed by restriction digestion and sequencing. No non-sense mutation was detected in the coding regions.

致謝

一轉眼又來到秋風瑟瑟的季節，時間真是過的飛快，遙想當初還是個懵懵懂懂的碩一新生，一直不斷在做實驗的道路上跌跌撞撞，到現在總算有個小成果了！在這段時間，很感謝小楊老師的細心指導，讓我明瞭邏輯的重要性，希望未來在職場的闖蕩，可以因為這些學習能夠順利的走下去。謝謝兩位口試委員撥空參加我的口試，冷治湘老師與黃兆棋老師老師告訴我，要清楚明白自己的實驗目的為何，也給了我論文不少建議，謝謝兩位老師。

這幾年在小楊家遇到很多有趣又開朗的朋友，剛進實驗室很感激秀拔拔與藍敏書學長教導我做一些基礎的實驗，冷冷的酷哥其實很搞笑，淑萍學姐做實驗很厲害！還有超可愛的阿毛麻麻、時常陷入自己世界的小倩、想要趕快賺錢的馨儀、很有老師威嚴的佳貞，都讓我的實驗生活更有樂趣！還有和我一起共同奮鬥的阿大大、重神以及新鮮魚，阿大我很想念你唷，下次開車載我出去玩吧！重哥哥一直是我詢問與討論實驗的好幫手，以後對妹妹溫柔點吧！新鮮魚我好懷念和你一起八卦個不停的日子，再找時間聚聚吧！還有老實的阿賢、小啾媽阿白、很好聊天的凱薩、少根筋的小善姐姐、電腦神

春榮哥、前凸後翹的小氣(真的是康熙的死忠粉絲啊!)，最後碩一的小朋友們，子喬、克威、游清希望妳們實驗順利喔！

最後，我要謝謝我的朋友與家人，我的好朋友 Elsa、Johnny 總是聽我抱怨個不停，Elsa 現在妳在澳洲，要好好照顧自己，Johnny 好好工作賺大錢唷！而我的爸爸媽媽一直在我求學的路上給我意見與幫助，雖然我總是跌跌撞撞，但你們始終不離不棄，真的很感動，謝謝我的小狗波局在我不在的時候陪著我的家人，最後謝謝每一個在我身邊的人！



目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	v
表目錄.....	x
圖目錄.....	xi
附錄目錄.....	xvi
縮寫表.....	xvii
壹、緒論.....	1
1.1 登革熱概論.....	1
1.2 近代登革熱病毒發展史.....	2
1.3 登革熱病毒簡介.....	2
1.4 登革熱病毒分子生物學.....	2
1.5 組裝訊號 (Packaging signal).....	4
1.6 實驗設計.....	5
1.6.1 含螢光蛋白的結構/非結構質體.....	5
1.6.2 PLP/D2VE 質體建構.....	5
貳、材料.....	5

2.1 菌株.....	5
2.2 細胞株.....	5
2.3 病毒.....	5
2.4 質體.....	6
2.5 引子.....	12
2.5.1 DNA 定序使用的引子.....	12
2.5.2 PCR 使用的引子.....	13
2.6 藥品試劑.....	13
2.7 試劑組.....	15
2.8 抗體.....	15
2.9 溶劑、緩衝溶液及培養基.....	15
2.10 儀器設備.....	17
參、方法.....	19
3.1 細胞繼代培養.....	19
3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養.....	19
3.1.2 BHK-21 細胞轉染.....	19
3.1.3 X-gal staining.....	19
3.2 聚合酶鏈反應.....	19
3.3 大腸桿菌勝任細胞的轉形.....	20

3.3.1-1 大腸桿菌(CaCl_2)勝任細胞的製備.....	20
3.3.1-2 大腸桿菌(電穿孔)勝任細胞的製備.....	20
3.3.2-1 勝任細胞的轉形(CaCl_2).....	21
3.3.2-2 勝任細胞的轉形(電穿孔)	21
3.4 質體 DNA 之萃取.....	22
3.4.1 小量質體萃取.....	22
3.4.2 中量質體萃取.....	23
3.5 限制酵素反應.....	23
3.6 Klenow fill-in.....	24
3.7 去磷酸反應.....	24
3.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段.....	24
3.9 接合反應.....	25
3.10 重組蛋白在大腸桿菌之誘導表現.....	25
3.11 大腸桿菌蛋白質之萃取.....	25
3.12 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	26
3.12-1 SDS-PAGE 電泳.....	26
3.12-2 Coomassie blue staining.....	26
3.12-3 西方轉漬分析(Western blot analysis).....	26
肆、結果.....	27

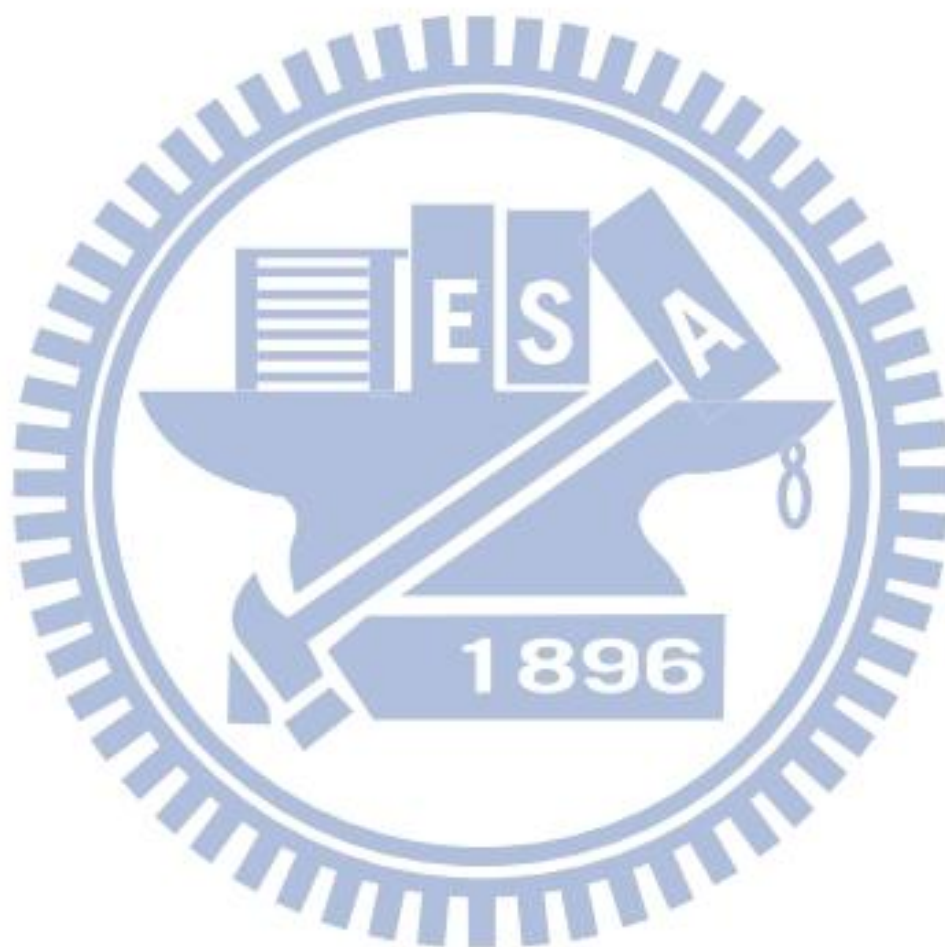
4.1	X-gal staining.....	27
4.2	結構性螢光蛋白質體建構.....	27
4.2.1	結構性基因的螢光蛋白質體建構.....	27
4.2.1.1	pGEMT-EGFP 質體建構.....	28
4.2.1.2	結構性基因接上螢光蛋白質體建構.....	28
4.2.2	結構性基因接上螢光蛋白質體其 SPACER 片段殖 入.....	28
4.2.2.1	pGEMT-SPACER 質體建構.....	28
4.2.2.2	結構性基因含螢光蛋白質體接入 SPACER 質體建 構.....	30
4.3	非結構性螢光蛋白質體建構.....	30
4.3.1	非結構性基因的螢光蛋白質體建構.....	30
4.3.1.1	pGEMT-NEGFP 質體建構.....	30
4.3.1.2	非結構性基因接上螢光蛋白質體建構.....	31
4.3.2	非結構性基因接上螢光蛋白質體其 NSPACER 片段殖 入.....	31
4.3.2.1	pGEMT-NSPACER 質體建構.....	31
4.3.2.2	非結構性基因含螢光蛋白質體接入 NSPACER 質體建 構.....	32

4.4 非結構性基因質體建構.....	32
4.5 DNA 定序.....	33
4.6 缺失質體的修復.....	33
4.6.1 非結構性基因且帶有 IRES 及 LacZ 的質體修補.....	33
4.6.2 非結構性基因質體修補.....	33
4.7 結構性蛋白穩定細胞株的蛋白質電泳.....	34
4.7.1 適當 positive control.....	34
4.7.2 含結構性基因質體 pcDNA3-NCS5'S3'UTR 定序.....	34
4.8 PLP/D2VE 質體建構.....	35
伍、討論.....	35
5.1 X-gal staining.....	35
5.2 質體建構.....	36
5.3 結構性蛋白穩定細胞株.....	36
5.3.1 適當的 positive control.....	36
5.4 PLP/D2VE.....	37
陸、結論.....	37
柒、Future work.....	37
7.1 含螢光蛋白的結構/非結構質體.....	37
7.2 結構性蛋白穩定細胞株.....	37
7.3 PLP/D2VE 質體建構.....	38



表目錄

表一、非結構基因質體定序與修補後質體定序圖.....	44
表二、PLP/D2VE 其 insert 前後之核苷酸序列以及 PLP/D2VE 與登革熱二型病毒 PL046 strain 之 E gnen 胺基酸比較.....	45

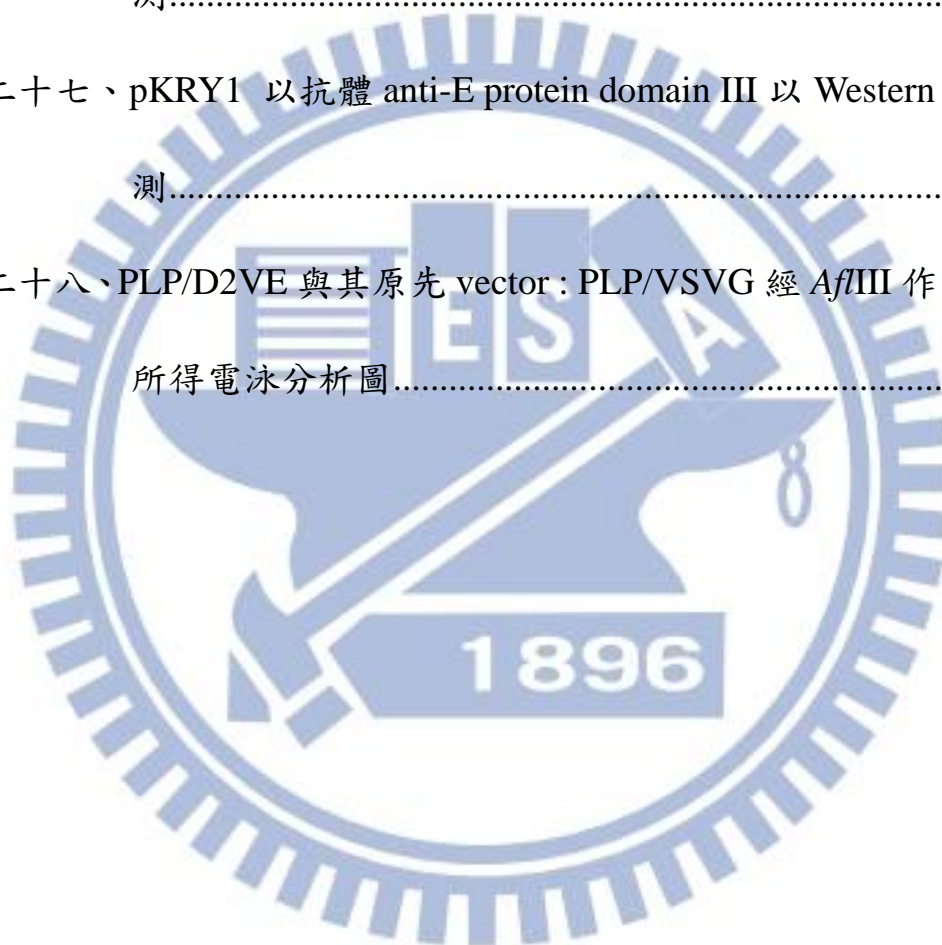


圖目錄

圖一、偵測登革熱二型病毒組裝訊號所設計的實驗流程.....	46
圖二、X-gal staining 結果.....	47
圖三、pGEMT-EGFP 的質體建構.....	48
圖四、結構性基因接上螢光蛋白的質體建構.....	49
圖五、pGEMT-SPACER1 and pGEMT-SPACER2 的 PCR 示意圖.....	50
圖六、pGEMT-SPACER 建構.....	51
圖七、結構性基因接上螢光蛋白的質體其 SPACER 片段殖入.....	52
圖八、pGEMT-NEGFP 與 pGEMT-NSPACER 的質體建構.....	53
圖九、非結構性基因的螢光蛋白質體建構.....	54
圖十、非結構性基因接上螢光蛋白的質體其 NSPACER 片段殖入.....	55
圖十一、非結構性基因質體建構.....	56
圖十二、非結構性基因且帶有 IRES 及 LacZ 的質體修補與非結構性 基因質體修補.....	57
圖十三、PLP/D2VE 示意圖.....	58
圖十四、pGEMT-EGFP 經酵素 <i>AscI</i> 、 <i>PacI</i> 與 <i>BcgI</i> 作用後，所得電 泳分析圖.....	59
圖十五、pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 與 其原先 vector : pcDNA3-NCS5`S(IRES)ZSp3`UTR 經 <i>BsrGI</i>	

與 <i>XcmI</i> 作用後，所得電泳分析圖.....	60
圖十六、pGEMT-SPACER1 經 <i>HincII</i> 與 <i>SacI</i> 、 <i>ClaI</i> 作用後，所得電 泳分析圖.....	61
圖十七、pGEMT-SPACER2 經 <i>XcmI</i> 與 <i>AfeI</i> 酵素作用後，所得電泳分 析圖.....	62
圖十八、pGEMT-SPACER 經 <i>XcmI</i> 與 <i>HincII</i> 作用後，所得電泳分析 圖.....	63
圖十九、pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 <i>PshAI</i> 、 <i>XbaI</i> 與 <i>XcmI</i> 酵素作用後，所得電泳分析圖.....	64
圖二十、pGEMT-NEGFP 經 <i>AscI</i> 、 <i>NotI</i> 與 <i>BcgI</i> 作用後，所得電泳分 析圖.....	65
圖二十一、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 與其原先 vector : pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 經 <i>KpnI</i> 作用後，所得電泳分析圖.....	66
圖二十二、pGEMT-NSPACER 經 <i>EcoRI</i> 、 <i>NotI</i> 以及 <i>NdeI</i> 、 <i>ApaI</i> 作用 後，所得電泳分析圖.....	67
圖二十三、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經 <i>EcoRV</i> 以及 <i>ClaI</i> 、 <i>XbaI</i> 作用後，所得電泳分析圖.....	68
圖二十四、pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR 經 <i>EcoRV</i> 、 <i>KpnI</i> 作用後，所	

得電泳分析圖.....	69
圖二十五、pStag9 以抗體 anti-Stag 與抗體 anti-E protein domain III 以 Western blot 偵測.....	70
圖二十六、pKRY1 以抗體 anti-His 與抗體 anti-HA 以 Western blot 偵測.....	71
圖二十七、pKRY1 以抗體 anti-E protein domain III 以 Western blot 偵測.....	72
圖二十八、PLP/D2VE 與其原先 vector : PLP/VSVG 經 <i>Af</i> III 作用後，所得電泳分析圖.....	73



附錄目錄

附錄一、登革熱傳播及其盛行地區, 2008, WHO.....	74
附錄二、行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年登革熱通報確定病 例.....	74
附錄三、登革熱病毒基因及其相對應蛋白質.....	75
附錄四、登革熱病毒的生活史, packaging signal 的說明.....	76
附錄五、前人(賴建李,2006)建構的結構/非結構基因質體, 兩者皆以 LacZ 為其報導基因.....	77
附錄六、PLP/VSVG 質體圖.....	78
附錄七、pcDNA3 質體圖.....	79
附錄八、pGEM-T 質體圖.....	80
附錄九、pEGFP-N2 質體圖.....	81
附錄十、pKRY1 質體圖.....	82
附錄十一、pStag9 質體 圖.....	82
附錄十二、pcDNA3-E14 質體圖.....	83
附錄十三、pcDNA3-NCS5'S3'UTR 質體圖(賴建李,2006).....	83
附錄十四、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 質體圖(賴建 李,2006)	84

附錄十五、pGEMT/SPACER 質體圖(賴建孝,2006).....84

附錄十六、Qiagen midi kit 內的 buffer 成分.....85



縮寫(Abbreviation)

APS	Ammonium Persulfate
BHK21	Baby hamster kidney cell
BSA	Bovine Serum Albumin
C PROTEIN	Capsid protein
DENV	Dengue virus
DF	Dengue fever
DHF	Dengue hemorrhagic fever
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSS	Dengue shock syndrome
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
E PROTEIN	Envelope protein
EMCV	Encephalomyocarditis virus
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
HA-His	Hemagglutinin-polyhistidine protein
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
IRES	Internal ribosome entry site
JEV	Japanese encephalitis
KUNV	Kunji virus
LB broth	Luria-Bertani broth
MEM	Minimum Essential Medium
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
prM PROTEIN	Precursor membrane protein
RNA	Ribonucleic acid
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAE	Tris-acetate-EDTA

TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N', N', -tetramethylenediamine
Tween-20	Polyoxyethene-sorbitan monolaurate
UTR	Untranslated region
WNV	West Nile Virus
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YFV	Yellow Fever Virus

