

壹、緒論

1.1 登革熱概論

登革熱是由登革熱病毒感染所引起的疾病，在台灣是藉由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 來傳播。症狀有頭痛、關節痛、發熱等等。臨床症狀可分為無症狀 (asymptomatic)，或依嚴重程度區分為：登革熱 (dengue fever, DF)、登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 及登革熱休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS)。目前登革熱並沒有任何商業性疫苗，病患是以支持性療法做為治療的主軸。其傳播範圍主要為熱帶與亞熱帶地區，包括亞洲、非洲、中南美洲與大洋洲。

近年來登革熱已經成為國際重視的公共衛生議題。全球有五分之一人口，約二十五億人正受到登革熱病毒的威脅，每年世界上約有五千萬人受到登革熱病毒的感染 (World Health Organization, WHO) (見附錄一)，估計其中有 50 萬為登革出血熱 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 病例，而 2.5% 為死亡病例。

臺灣在日治時期曾爆發過三次全島大流行，分別在 1912 年 (民國 4 年)、1931 年 (民國 20 年) 和 1942 年 (民國 31 年)。近年隨著戰爭、交通運輸發達與溫室效應等影響，登革熱病毒感染的地區正逐漸擴大。2007 年到 2010 年在臺灣的確定病例數平均為 1500 例，從 2008 年後每年都有增加的趨勢 (見附錄二)。在溫暖潮溼的台灣，非常適合病媒蚊的孳生，稍有不慎，疫情便無法控制，近年來感染登革熱而死亡的病例亦時有所聞，我們必需正視登革熱病毒相關的問題，才能防患於未然。

1.2 近代登革熱病毒發展史

在西元 1779 至 1880 年，印尼雅加達、埃及開羅及菲律賓曾經爆發過類似登革熱的疫情，當時登革熱病情僅止於發燒及肌肉關節疼痛，並沒有致命的情形發生。在二次世界大戰期間，登革熱疫情藉由日漸發達的交通航運散播，熱帶地區每 10 至 30 年就爆發區域性大規模的感染 (Henchal et al., 1990; Kautner et al., 1997)。在西元 1945 年後，南亞地區的登革熱患者開始出現了出血 (dengue haemorrhagic fever, DHF) 及休克性 (dengue shock syndrome, DSS) 的症狀，嚴重者會導致死亡。隨後，菲律賓在西元 1953 至 1954 年也出現了伴隨有出血性症狀的登革熱疫情 (Mairuhu et al., 2004)。隨著人口增加、城市的快速發展、交通網路日漸發達及溫室效應的影響下，登革熱疫情有從熱帶地區擴散到亞熱帶地區的跡象。過去二十五年來的登革熱疫情，不僅感染的規模增大、頻率增加，症狀也變得更加嚴重 (Mackenzie et al., 2004)，造成的經濟損失更是疫區的一大問題，登革熱已經是當前不得不重視的課題。

1.3 登革熱病毒簡介

登革熱病毒在分類上是屬黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 黃質病毒屬 (Genus *Flavivirus*)，其他同屬的病毒還有：日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、西尼羅河病毒 (West Nile virus, WNV)、黃熱病毒 (Yellow fever virus, YFV)、Kunjin virus (KUNV) ... 等 (Lindenbach et al., 2007)。依其血清型分類，可分為登革熱一至四型，傳播途徑是藉由節肢動物叮咬患病宿主將病毒傳遞至下一位被感染者。

1.4 登革熱病毒分子生物學

登革熱病毒的基因體為一條正股的單股 RNA，其 genome 在 5' 端具有 cap，3' 端不具 poly A (Wengler *et al.*, 1978)，整個基因序列只有一個 open reading frame (ORF)，進行轉譯時，只會合成出一條多肽鏈 (polypeptide)，最後再藉由細胞內的酵素 (signalase) 及病毒本身的非結構性蛋白將多肽鏈裂解成獨立的蛋白 (Henchal *et al.*, 1990)。其基因組成可大略分為兩部份，結構性基因 (structural gene) 及非結構性基因 (nonstructural gene)。結構性基因所對應 (encode) 的蛋白質構成病毒實際結構部份，包含構成病毒的衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, PrM) 及外膜蛋白 (envelope protein, E)；非結構性基因所對應的部份，則是與病毒的 RNA 複製及病毒的蛋白裂解有關，主要有 NS1、NS2A、NS2B、NS3A、NS3B、NS4 及 NS5 (You *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2008)。

在結構蛋白方面，Capsid protein 是一個約 11 kD 大小的蛋白，帶電的 residues 聚集在其 N 與 C 端，中間則是疏水性蛋白的部分，負責與細胞膜調節 (Ma L., *et al.*, 2004)。C protein 能摺疊成一個緊密的 dimer，每一個 monomer 皆由四個 α -helix 組合而成 (Jones CT., *et al.*, 2003)。

prM 是 M protein 的前驅蛋白，大小約 26 kD。prM 的 N 端含有 1 至 3 個 N-linked glycosylation sites (Chambers TJ., *et al.*, 1990) 以及六個 conserved 並以 disulfide bond 鍵結的 cysteine (Nowak T., *et al.*, 1989)。prM 能幫助 E protein 正確的折疊 (Konishi E., *et al.*, 1993)。

E protein 大小約為 53 kD，是 flavivirus virions 表面的主要蛋白成分，E protein 能與寄主細胞表面的 receptor 結合，啟動病毒粒子

與細胞膜的融合。近年來，已有研究解出 E protein 的結晶結構，此解出的 E protein 結構只包含位在脂質膜外的蛋白質部分 (Modis *et al.*, 2003)，是根據此結構 E protein 是以頭對尾 (head-to-tail) 的方式兩兩成為雙體 (dimer)，以一個單體 (monomer) 而言，E protein 分為 domain I、domain II、domain III，domain I 包含第 1~51、132~192、280~296 的胺基酸，是 E protein 的中央區域；domain II 包含 52~131、193~279 的胺基酸，負責與另一個 E protein 形成雙體；domain III 包含第 296~394 的胺基酸，是一個 immunoglobulin-like domain，被認為是與宿主細胞之受體結合的位置。

在非結構蛋白方面，NS2B 是一個大小約 14 kD 的膜相關蛋白 (Clum S., *et al.*, 1997)，NS2B 與 NS3 形成穩定的複合體並且是 NS2B-NS3 serine protease 的 cofactor (Falgout B *et al.*, 1991)。NS3 是一個多功能蛋白，大小約為 70 kD，具有 serine protease、RNA helicase、nucleoside triphosphatase (NTPase) (Gorbalenya *et al.*, 1989; Wengler *et al.*, 1991) 之特性。NS5 亦是個大約 103 kD 且具多功能性的蛋白，包括 methyltransferase (MTase) 與 RdRP 的活性 (Egloff *et al.*, 2002; Koonin EV *et al.*, 1993)。

1.5 組裝訊號 (Packaging signal)

本實驗的實驗目的是因搜尋組裝訊號為前提而產生的。而組裝訊號是病毒要組裝、成熟的一個必要條件。病毒進入宿主細胞後會釋放出病毒的 genome 並進行基因體的複製以及轉譯和轉錄 (附錄四，步驟 a)，當病毒要離開細胞前必須將各成分組合成完整顆粒，genome 必須與蛋白質外殼做專一性的組合，形成 nucleocapsid (附錄四，步驟 b)，而這個 packaging signal 就是位於 genome 上，可以用來與 Capsid protein 做專一性結合的序列。若能找到這個序列，不但可以

用做 anti-virus 的目標，更可助於重組病毒的操作。

1.6 實驗設計

1.6.1 含螢光蛋白的結構/非結構質體

以實驗室前人（賴建孝, 2006）建構好的兩種質體，分別含結構及非結構基因，兩者皆帶有 LacZ 做為其報導基因（見附錄三）。以圖一的流程測試後，發現沒有辦法偵測到 LacZ 的訊號，因此我將其原本的 LacZ 更換為 EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein，EGFP），以增加偵測的靈敏度。GFP 是由 238 個胺基酸組合而成，一個大小約 27 kD 的蛋白，來源是 jellyfish *Aequorea victoria*，優點是可以利用顯微鏡直接觀測，而不需要外加其他物質來偵測。

1.6.2 PLP/D2VE 質體建構

VSV-G 為 Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein，其在 ViralPower Lentiviral Expression System™ 中作為 pseudotyping 的 envelope（見附錄四），VSV-G 可使 lentivirus vector 有較多的產量，且感染宿主範圍廣。因此在本實驗將登革熱病毒上的 E protein 與 PLP/VSVG 上的 VSV-G 部分置換。希望能夠使此系統有更廣泛的應用。

貳、材料

2.1 菌株

Escherichia coli DH5α（Yang laboratory collection）

Escherichia coli BL21(DE3）（Yang laboratory collection）

2.2 細胞株

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

2.3 病毒

Dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan local strain)

2.4 質體

| 質體名稱 | 特性 | Reference |
|-----------------------------|--|------------|
| pcDNA3 | 篩選標記為 Ampicillin，含有 T7 及 CMV 啟動子。請參照附錄五。 | Invitrogen |
| pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR | pcDNA3-NCS 上帶有來源為 YEP363 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ； <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR，下游帶有 PL046 strain 的非結構性基因及 3'UTR。 <i>lac Z</i> 與非結構性基因共用一個 ORF。請參照附錄十二。 | Yang lab |

| | | |
|--|--|-----------------|
| <p>pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR</p> | <p>pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 IRES 、 PL046 strain 的非結構性基因 及 3'UTR 。 <i>lac Z</i> 與非結構性基因分別使用各自的 ORF 。</p> | <p>Yang lab</p> |
| <p>pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR-fix</p> | <p>pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 IRES 、 PL046 strain 的非結構性基因 及 3'UTR 。 <i>lac Z</i> 與非結構性基因分別使用各自的 ORF , 並且具有完整的非結構性基因 。</p> | <p>本研究</p> |
| <p>pcDNA3-NCS5'S3'UTR</p> | <p>pcDNA3-NCS 上帶有 PL046 strain 的結構性基因 , 上游帶有 PL046 strain 的</p> | <p>Yang lab</p> |

| | | |
|-------------------------------|---|----------|
| | 5'UTR，下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR。請參照附錄十一。 | |
| pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR | pcDNA3'上帶有 PL046 strain 的非結構性基因，下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR。 | 本研究 |
| pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR-fix | pcDNA3'上帶有 PL046 strain 的非結構性基因，下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR，並且具有完整的非結構性基因。 | 本研究 |
| pcDNA3-NCS/5`S (IRES)ZSp3`UTR | pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ； <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR、結構性基因及 EMCV IRES，下游帶有 Spacer DNA 及 PL046 strain 的 3'UTR。結構性基因與 <i>lac Z</i> 分別使用各自的 ORF。 | Yang lab |
| pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR | pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pEGFP 的螢光基因 EGFP， | 本研究 |

| | | |
|---------------------------------|---|----------|
| | EGFP 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR、結構性基因及 EMCV IRES，下游帶有 Spacer DNA 及 PL046 strain 的 3'UTR。結構性基因與 EGFP 分別使用各自的 ORF。 | |
| pcDNA3-NCS/5'EGFP(IRES)NSS3'UTR | pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pEGFP 的螢光基因 EGFP，EGFP 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR，下游帶有 IRES、PL046 strain 的非結構性基因及 3'UTR。EGFP 與非結構性基因分別使用各自的 ORF。 | 本研究 |
| pGEM-T Vector | 篩選標記為 Ampicillin，含有 T7 及 SP6 啟動子。請參照附錄六。 | Promega |
| pEGFP-N2 | 篩選標記為 Neomycin/Kanamycin。含有 CMV 啟動子。請參照附錄七 | Clontech |
| pGEMT/SPACER | pGEMT 上含一段不含任何的 | Yang lab |

| | | |
|---------------|---|-----|
| | 轉錄終止訊號，且不含有轉譯啟始密碼的序列。做為補足登革熱病毒基因長度的質體。請參照附錄十三。 | |
| pGEMT-EGFP | 以 pEGFP-N2 為模板，經 PCR 後此片段以限制酶酵素 <i>AscI</i> 、 <i>PacI</i> 接上載體 pGEMT。 | 本研究 |
| pGEMT-SPACER1 | 以 pGEMT/SPACE R 為模板，經 PCR 後，將此片段以限制酶酵素 <i>PacI</i> 接到載體 pGEM-T。 | 本研究 |
| pGEMT-SPACER2 | 以 pGEMT/SPACE R 為模板，經 PCR 後，將此片段以限制酶酵素 <i>EcoRV</i> 接到載體 pGEM-T。 | 本研究 |
| pGEMT-SPACER | 以限制酶酵素 <i>EcoRV</i> 將 pGEMT-SPACE R2 切下接至 pGEMT-SPACE R1 上 | 本研究 |
| pGEMT-NEGFP | 以 pEGFP-N2 為模板，經 PCR 後，將此片段以限制酶酵素 | 本研究 |

| | | |
|------------------------|--|------------|
| | AscI、NotI 接到載體 pGEM-T。 | |
| pGEMT-NSPACER | 以 pGEMT/SPACE R 為模板，經 PCR 後，將此片段以限制酶素 NotI 接到載體 pGEM-T。 | 本研究 |
| pKRY1(pcDNA3-te-HAHis) | pcDNA3 上含 PL046 strain 的截短型 E 基因(a.a 1~402)，3'端有 HAHis-tag，其 5'端 3'端的 cloning site 皆為 NotI。請參照附錄八。 | Yang lab |
| pStag9 | pcDNA3 上含 PL046 strain 的截短型 E 基因(a.a 1~402)，其 3'端連接 s-tag，來自 PET32-C。請參考附錄九。 | Yang lab |
| pcDNA3-E14 | pcDNA3 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene，其 5'端及 3'端 cloning site 為 XhoI 及 XbaI。請參照附錄十。 | Yang lab |
| PLP/VSVG | 篩選標記為 Ampicillin。含有 CMV 啟動 | Invitrogen |

| | | |
|----------|--|-----|
| | 子。請參照附錄四 | |
| PLP/D2VE | 將質體 PLP/VSVG 原先的 VSVG，經限制酶酵素作用後，替換成 pcDNA3-E14 上的 full-length DV-2 E gene。 | 本研究 |

2.5 引子

2.5.1 DNA 定序使用的引子

| 引子 | 位置 | 序列 |
|----------|-----------------|------------------------------|
| D2R550 | +550 ~ +534 | CCATGAGGGTACACATG |
| D2F265 | +265 ~ +284 | CTAACAATCCCACCAACAGC |
| D2F796 | +796 ~ +815 | GCCCAGAGAATTGAAACTTG |
| D2F1431 | +1431 ~ +1450 | ACCACAGAGTTCCATCACAG |
| D2F1873 | +1873 ~ +1892 | GCAGAAACACAACATGGAAC |
| D2F2276 | +2276 ~ +2295 | CCTTCAGTGGGGTCTCGTGG |
| D2F2401 | +2401 ~ +2418 | TTGGGAGTTATGGTGCAG |
| D2F2796 | +2796 ~ +2815 | TACAGAGTCCCATAACCAGA |
| D2F2901 | +2901 ~ +2919 | TGGAGTATTCACCACCAAT |
| D2F3617 | +3617 ~ +3636 | ACATGTCCTTTAGAGACCTG |
| D2F3930 | +3930 ~ +3949 | TATCTTGTGCGTCCCAAATG |
| D2F4517 | +4517 ~ +4536 | AACGGGCTGGAGTATTGTGG |
| D2F4837 | +4837 ~ +4856 | CCAAGAGCCGTCCAAACAAA |
| D2F5401 | +5401 ~ +5420 | ATAGCGGCTAGAGGATACAT |
| D2F5957 | +5957 ~ +5976 | TGGAAAATGACGAAGACTGT |
| D2F6277 | +6277 ~ +6296 | GGGGAAAGGAAGAAATTA |
| D2F6870 | +6870 ~ +6889 | AGGAAGCATTACAACCCAGC |
| D2F7401 | +7401 ~ +7419 | GGCTTTAACCTTAGCGACC |
| D2R7401 | +7383 ~ +7401 | GGTCGCTAAGGTAAAGCC |
| D2F7892 | +7892 ~ +7910 | CAGGACATGAAGAACCCAT |
| D2F8331 | +8331 ~ +8350 | AGATGTAGACCTCGGAAGCG |
| D2F8841 | +8841 ~ +8860 | GGCTGTTGAAGATAGTAGGT |
| D2F9347 | +9347 ~ +9366 | TATCGAGAAGAGACCAAAGA |
| D2F9920 | +9920 ~ +9938 | CATCACATTGGGTCCAAC |
| D2F10270 | +10270 ~ +10294 | TAGGAGGCAAACTAATATGAAA CA |

註：數字是根據 DV-2 PL046 strain

2.5.2 PCR 使用的引子

| 名字 | 位置 | 序列 |
|-----------|------|--|
| SPACERF1 | 352 | GG <u>T</u> TAA <u>T</u> TAA <u>C</u> GTAACCTATCCCATTA CG |
| SPACERR1 | 2684 | CCTTAATTAACAATCCGGTAGGTTT |
| SPACERF2 | 1238 | CGGATATCCTGCTGATGAAGCA |
| SPACERR2 | 4864 | GCGATATCTCGTCGCCACCAAT |
| NEGFPF | 683 | TTGGCGCGCCATGGTGAGCAAGGG |
| NEGFPR | 1402 | GTCGCGGCCGCTTTACTTGTACAG |
| NSPACERF` | 352 | AGCGGCCGCGTAACCTATCCATTAC G |
| NSPACERR` | 2683 | AGCGGCCGCCAATCCGGTAGGTTT |
| EGFPF | 683 | TTGGCGCGCCATGGTGAGCAAGGG |
| EGFPR | 1402 | CCTTAATTAATTACTTGTACAGCTCGT CCATGC |

註：底下畫線的序列是外加的酵素切位

2.6 藥品試劑

| 藥品名稱 | 製造公司 | 目錄編號 | 應用 |
|--------------------------------|---------------|----------------|--------------|
| 1kb DNA ladder | SibEnzyme | SEM11C00 1 | 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 | DNA 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 | Western blot |
| Crystal Violet | Sigma | C-3886 | DNA 染色 |
| DTT (1,4-Dithiothreitol) | Uni-region | UR-DTT-1 5g | 蛋白質製備 |
| HRP substrate | MILLIPOR E | WBKLS05 00 | Western blot |
| EDTA | Amresco | 0105 | 緩衝液 |
| EtBr | Sigma | E-7637 | DNA 染色 |
| Fetal Bovine Serum | Biological | 04-001-1A | 細胞培養 |

| | | | |
|--|---------------------|-------------|---------------------|
| | industries | | |
| Glycerol | Amresco | 0854-1L | 細菌培養 |
| Glutaraldehyde | Fluka | 49630 | 固定細胞 |
| IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) | MDBio,Inc | 105039 | 細菌培養 |
| Kanamycin | Sigma | K4000 | 細菌培養 |
| K ₃ Fe(CN) ₆ | Sigma | P-3667 | X-gal Staining |
| K ₄ Fe(CN) ₆ · 3H ₂ O | Sigma | P-3289 | X-gal Staining |
| 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 |
| NaHCO ₃ | Sigma | S-5761 | 細胞培養 |
| Nitrocellulose Transfer Membrane | Schleicher& Schuell | 10401396 | Western blot |
| PMSF | Fluka | 78830 | 蛋白質製備 |
| Prestain Protein marker | TBB | 0901 | SDS-PAGE |
| Restriction enzyme | Biolab | — | 建構質體 |
| SDS | Riedel-de Haën | 62862 | Western blot |
| T4 DNA ligase | Promega | M1801 | 建構質體 |
| Tag polymerase | TaKaRa | RR001A | PCR |
| Tris (base) | AMRESCO | 0826 | Western blot |
| TEMED | Sigma | T-9281 | Western blot |
| TrypLE TM Express | GIBCO | 12605-010 | 細胞培養 |
| 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、X-gal staining |
| β-mercaptoethanol | MERCK | 1.1543.0100 | 蛋白質製備 |

2.7 試劑組

| 試劑名稱 | 廠商 | 目錄編號 | 應用 |
|--|----------|----------|------------|
| pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors | Promega | A3600 | TA cloning |
| PROTECH Gene-Spin™ Genomic DNA Isolation Kit | 波士特 | PT-GD112 | 少量質體萃取 |
| PCR Clean-up kit | Premier | N-DCE050 | DNA 純化 |
| Gel purification kit | favorgen | FAGCK001 | 膠相純化 |
| QIAGEN Plasmid Midi Kit | QIAGEN | 12143 | 中量質體萃取 |

2.8 抗體

| 抗體名稱 | 製造公司 | 目錄編號 |
|---|----------------|-------------|
| Dengue virus type II E protein domain III | Peng's lab | - |
| 6xHis Monoclonal Antibody | BD Biosciences | 8916-1 |
| Goat – r – rabbit | jackson | 111-035-003 |
| Goat – r- mouse | jackson | 115-035-003 |
| S-tag (E15)+HRP | Novus | NB600-512 |
| EGFP-HRP | Novus | NB600-313 |
| HA-probe (F-7) HRP | Santa cruz | SC-7392 |

2.9 溶劑、緩衝溶液及培養基

- 0.5% crystal violet solution (500ml)
2.5g crystal violet, 25ml 37% formaldehyde, 250ml EtOH, 4.25g NaCl
- 0.5 % crystal violet solution (500 ml)
2.5 g crystal violet , 25 ml 37% formaldehyde , 250 ml EtOH , 4.25 g NaCl
- 0.5% glutaraldehyde
25% glutaraldehyde diluted with PBS
- 1 × PBS (pH 7.4)

137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄

- 10% (v/v) Glycerol

12.6 g glycerol (density = 1.26 g/cc) added dd H₂O to 100 ml

- 10 × TE buffer

100 mM Tris-Cl (pH 8.0) , 10 mM EDTA

- 50 × TAE buffer

48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid
added dd H₂O to 200 ml

- L-Broth (1 L)

10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl

- LB (Luria-Bertni) broth

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl

- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin agar

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml or
25 µg/ml Ampicillin

- LB (Luria-Bertni)/Kanamycin agar

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml or
25 µg/ml Kanamycin

- Cell lysis buffer(RIPA buffer)

0.1% SDS , 1% Triton X-100 , 1% NP-40 , 10mM Tris- HCl(pH7.4) ,
1 mM MgCl₂ , 1mM PMSF

- SOC media

2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM
MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose

- 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

- 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

- X-gal staining buffer

5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$,
1 mg/ml X-gal

2.10 儀器設備

分光光度計 20GENESYS^{RT}(SPECTRONIC INSTRUMENTS)

核酸計算儀 GeneQuant pro(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

PCR 溫度控制儀 Gene Cyclor^{RT}(BIO-RAD)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR

加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)
低溫培養箱 701 (WISOOM)
往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
水平式電泳槽 MJ-105(MEDCLUB)
微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)
電穿孔裝置 MicroPulser™ Electroporation Apparatus (BIO-RAD)
電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)
恆溫式震盪培養箱 B206(FIRSTEK SCIENTIFIC)
電泳影像處理系統 GEL DOC 2000(BIO-RAD)
桌上型高速離心機 5100(KUBOTA CORPORATION)
落地型高速離心機 Avanti® J-E Centrifuge (BECKMAN)
4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926(FIRSTEK SCIENTIFIC)
無菌操作台 (Laminar flow) VCM-420 (造鑫)
倒立顯微鏡 OLYMPUS CK40
數位相機 OLYMPUS C-5050ZOOM

參、方法

3.1 細胞繼代培養

3.1.1 BHK-21 細胞繼代培養

吸除培養液，以 PBS 沖洗兩次，加入 1 ml 的 TrypLE™Express (Gibco, Cat. 12605-010)，置於室溫下約 5 分鐘，加入適量的培養液輕沖底盤使細胞脫落，置於 15 ml 離心管中，以 2000 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液，加入適量血清培養液混合均勻後，取適量細胞轉移至新的培養皿中。

3.1.2 BHK-21 細胞轉染

轉染前一日先於 3.5 公分培養皿置入約 3×10^5 的 BHK-21 細胞。將細胞原先的 medium 置換成 serum free 的 medium。把 serum free 的 medium 240 μ l 加入 10 μ l 的 lipofectamin，靜置 5 分鐘。再將欲轉染的質體 DNA 加入混合好的 serum free 的 medium (已加入 lipofectamin) 放置在常溫下 20 分鐘，結束後將混合好的溶液滴進培養皿中，並稍微左右搖勻後，置回培養箱內。5 個小時後，將 serum free medium 吸掉再換成含 FBS 的 medium。轉染 48 小時後，取出細胞，依實驗需要進行 X-gal staining 或 stable cell line 的挑選。

3.1.3 X-gal staining

吸除培養液，加入 1 毫升 0.5% glutaraldehyde，靜置室溫 15 分鐘，吸除 glutaraldehyde，以 PBS 沖洗三次後，加入 X-gal 染液，置於 37°C 中 2~16 小時，置於顯微鏡下觀察並計數藍色細胞的數目。

3.2 聚合酶鏈反應

PCR 反應的總體積為 50 μ l，內含 2 μ l 的 cDNA 或 100 至 500 ng 的模板，5 μ l 的 10 倍酵素緩衝液，各 10 至 50 p mole 的引子對，10 μ mole 的 dNTP，2.5 U 聚合酶。溫度設定：A. 94 $^{\circ}$ C，時間 3 分鐘；B. 94 $^{\circ}$ C，時間 30 秒；C. Annealing temperature，時間 1 分鐘；D. 68 $^{\circ}$ C（或 72 $^{\circ}$ C），時間依合成出的 DNA 片段長度而定，原則上合成 1 kb 的 DNA 需要 1 分鐘的時間；E. 68 $^{\circ}$ C（或 72 $^{\circ}$ C），時間依合成出的 DNA 片段長度而定。其中，B、C、D 重覆 30 次循環。其中 Annealing temperature 的設定依照計算出來的 T_m 值減少 2 至 5 $^{\circ}$ C。

3.3 大腸桿菌勝任細胞的轉形

3.3.1-1 大腸桿菌(CaCl_2)勝任細胞的製備

首先取 *Escherichia coli* (DH5 α) 之單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 下震盪培養（160 rpm/min），直到 OD 600 nm 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 $^{\circ}$ C 下以 1620 \times g 離心 10 分鐘後倒去上清液，接著以 25 ml 4 $^{\circ}$ C 預冷的 0.1 M CaCl_2 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 下以 720 \times g 離心 10 分鐘後去除上清液，以 5 ml 4 $^{\circ}$ C 預冷的 0.1 M CaCl_2 懸浮菌體，於 4 $^{\circ}$ C 靜置 18 小時，在 4 $^{\circ}$ C 下以 720 \times g 離心 5 分鐘後去除上清液，以 5 ml 預冷的 0.05 M CaCl_2 （含 15 % Glycerol）懸浮菌體。將菌液以每管 100 μ l 分裝至預冷好的微量離心管中，迅速儲存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存備用。

3.3.1-2 大腸桿菌（電穿孔）勝任細胞的製備

挑選大腸桿菌單一菌落於 5 ml 的 L-broth 以 37 $^{\circ}$ C 震盪培養隔

夜後，將其轉養至 500 ml 的 L-broth，37 °C 震盪培養，當菌液在波長 600 nm 的吸光值約 0.5-0.7 時，靜置於冰上 20 分鐘。利用落地型高速離心機 (BECKMAN) 以 4000 xg 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 500 ml 預冷至 4 °C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000 xg 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 250 ml 預冷至 4 °C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000 xg 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 20 ml 預冷至 4 °C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000 xg 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。最後，加入等體積 10% 甘油重新懸浮菌體，以每管 50 µl 體積分裝，儲存於 -80 °C。

3.3.2-1 勝任細胞的轉形 (CaCl₂)

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 20 分鐘，再置於 42 °C 水浴中進行熱休克 (heat shock) 42 秒，之後加入 500 µl 的 LB 培養液於 37 °C (or 25 °C) 震盪培養 (160 rpm/min) 1 小時 (或 90 分鐘)，取 100 µl 的菌液均勻塗布於含 Ampicillin (50 µg/ml 或 25 µg/ml) 之 LB 培養基上，置於 37 °C 或 25 °C 恆溫箱中培養 12~16 小時。

3.3.2-2 勝任細胞的轉形 (電穿孔)

含有登革熱二型病毒 PL046 基因序列質體的 *E coli* 在轉形的過程是以 25 °C、48 小時培養；不含者則是以 37 °C 培養 12~18 小時。

將儲存於 -80 °C 的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入質體 DNA 約 0.01~0.05 ng，混合均勻，冰浴 1 分鐘。轉置至預冷至 0 °C 的 0.2 cm 電極管 (Electroporation cuvette) 中，置入電穿孔器中 (Bio-Rad，

Cat. 165-2100), 以 2.5 KV、5 毫秒對勝任細胞進行電擊。電擊結束後，立即加入 SOC 培養液 1 ml，混合均勻。將混合物轉移至離心管內，置於 37 °C (或是 25 °C) 震盪培養 1 小時 (或是 1.5 小時)。取 50µl 塗抹至抗生素濃度為 50 µg/ml 的 LB 固體培養基上。置於 37 °C 培養箱中 12~18 小時 (或是 24~48 小時)。

3.4 質體 DNA 之萃取

3.4.1 小量質體萃取

在質體建構時所使用的質體 DNA 是以 PROTECH Gene-Spin™ Genomic DNA Isolation Kit(PT-GD112) 萃取。將單一大腸桿菌菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，抗生素濃度為 50 µg/ml，培養於 37 °C (或 25 °C)，12 至 16 小時 (或 24~48 小時) 後，以 Miniprep Purification Kit 進行質體萃取。萃取過程依照產品內附說明書操作。操作過程如下：首先，將菌液以轉速 1037 xg 離心 12 分鐘，去除上清液；加入 200 µl 的 solution I，以震盪器混合均勻；加入 200µl 的 solution II，小心混合均勻；加入 200 µl 的 solution III，小心混合均勻；利用微量離心機在室溫以轉速 16100 xg 離心 5 分鐘，將上清液轉置至 spin column；利用微量離心機在室溫以轉速 16100 xg 離心 1 分鐘，去除濾液；加入 700 µl 的 washing buffer，利用微量離心機在室溫以轉速 16100 xg 離心 1 分鐘，去除濾液，將此步驟重覆一次；利用微量離心機在室溫以轉速 16100 xg 離心 3 分鐘，將 spin column 移至新的微量離心管，置於 60 °C 加熱 5 分鐘；加入適量的 TE 溶液，利用微量離心機在室溫以轉速 16100 xg 離心 2 分鐘，所得到的溶液內含質體 DNA，將溶液儲存於 -20 °C。

3.4.2 中量質體萃取

在進行轉染時所使用的質體 DNA 是以 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Cat. 12143) 萃取，萃取過程依照產品內附說明書操作，各緩衝液的成份請參照附錄十五。操作過程如下：將單一大腸桿菌菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，抗生素濃度為 50 $\mu\text{g/ml}$ ，培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ (或 25 $^{\circ}\text{C}$) 8 小時 (或 16~24 小時) 後，轉養至 25 ml 的 LB 培養液，培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ (或 25 $^{\circ}\text{C}$) 12 至 16 小時 (或 24~48 小時)。將菌液轉移至離心管，利用落地型高速離心機 (BECKMAN) 以轉速 6000 xg 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 15 分鐘，去上清液；加 4 ml 的 Buffer P1，以震盪器混合均勻；加入 4 ml 的 Buffer P2，小心混合均勻，靜置室溫 5 分鐘；加入 Buffer P3，並混合均勻，插入冰中靜置 15 分鐘；利用落地型高速離心機以轉速 20000 xg 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 30 分鐘，將上清液轉移至新的離心管，再以轉速 20000 xg 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 15 分鐘，在離心的同時，取 Qiagen-tip 並加入 4 ml 的 Buffer QBT，利重力使加入的溶液自底端流出；離心完成時，將上清液轉移至經過 Buffer QBT 作用後的 Qiagen-tip；等溶液完全流出後，以二次 10 ml 的 Buffer QC 清洗 Qiagen-tip；等溶液完全流出後，加入 5 ml 的 Buffer QF，收集流出的溶液至離心管，在溶液中加入 3.5 ml 的 2-propanol，混合均勻，利用落地型高速離心機以轉速 15000 xg 的轉速離心 30 分鐘，去除上清液；加入 2 ml 的 70% 酒精，並將溶液轉移至微量離心管；利用微量離心機以轉速 16100 xg 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10 分鐘，去除上清液，置於室溫風乾 5 分鐘，加入適量體積的 0.1 \times TE，溶解質體 DNA，並以分光光度計測量濃度及純度。所得的質體儲存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.5 限制酵素反應

取適量的 DNA (約 0.5~10 μ g) 至適量反應體積 (20 至 50 μ l), 以限制酵素進行作用, 原則上 1 μ g 的 DNA 是以 2 U 的酵素在適當的溫度作用 2 小時至 3 小時; 反應完成後, 置於適當溫度加熱以終止反應。反應的溫度、終止反應溫度及緩衝液的濃度則依照酵素內附之說明書設定。利用洋菜膠體電泳分析, 從洋菜膠體回收 DNA 片段。

3.6 Klenow fill-in

取適量的 DNA (約 5 μ g), 以 Klenow enzyme 將 DNA 被限制酶作用的切位補成平端, 反應體積為 50 μ l, 需加入 dNTP, 其最後濃度為 33 μ M。原則上 1 μ g 的 DNA 以 1 U 的 Klenow enzyme 在 25 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。反應完成, 加入 1 μ l 的 0.5M EDTA 至反應溶液中, 置於 75 $^{\circ}$ C 加熱 20 分鐘終止反應。實驗步驟依照內附說明書操作。反應完成後直接從洋菜膠體回收 DNA 片段。

3.7 去磷酸反應

DNA 的去磷酸反應是利用 SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega, Cat. M8201) 進行。實驗步驟依照內附說明書操作, 原則上 1 μ g 的 DNA 是以 1 U 的酵素進行反應; 反應溫度 37 $^{\circ}$ C, 時間 15 分鐘。反應完成後, 75 $^{\circ}$ C 加熱 20 分鐘終止反應。直接進行電泳並萃取洋菜膠內之 DNA。

3.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

用 Gel Extraction Kit (Favorgen) 萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。萃取過程依照產品內附說明書操作。操作過程如下: 將切下之洋菜膠 (約 50 至 150 mg), 置於微量離心管內, 加入 500 μ l 的 Binding

solution，以 60 °C 加熱至洋菜膠完全溶解後，將溶液轉移至 spin column，利用微量離心機以轉速 16100 xg 在室溫離心 1 分鐘，去除濾液；加入 750 µl 的 Washing solution，利用微量離心機以轉速 16100 xg 在室溫離心 1 分鐘，去除濾液，再利用微量離心機以轉速 16100 xg 在室溫離心 3 分鐘；將 spin column 移至新的微量離心管，加入適量的 TE 溶液，利用微量離心機以轉速 16100 xg 在室溫離心 2 分鐘，所得到的溶液內含欲萃取之 DNA，將溶液儲存於-20 °C。

3.9 接合反應

總體積為 10 µl，內含 1 倍緩衝液、5 U 的接合酶(T4 DNA Ligase，Fermentas，Cat. EL0014)、50 ng 的 vector 及適量的 insert (vector 與 insert 的分子數比約 1:3)，靜置 14 °C 約 16 小時，於 65 °C 去活化 10 分鐘，儲存於-20 °C 或直接進行大腸桿菌勝任細胞的轉形。

3.10 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)，隔天挑單一菌落於含有 Ampicillin (50 µg/ml) 或 Kanamycin (50 µg/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，至波長 600 nm 介於 0.6 到 0.8 之間時，以 1620 ×g 離心 12 分鐘收下細胞。

3.11 大腸桿菌蛋白質之萃取

大腸桿菌於室溫下以 1620 ×g 離心 12 分鐘後去除上清液，接著取 200 µl 的 RIPA buffer (含 PMSF) 懸浮菌體，並移置微量離心管中，在冰上靜置 30 分鐘再以 16100 xg 離心 30 分鐘後，分別收取其上清液以

及 pellet。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 β -mercaptoethanol, 200mM DTT 及8M Urea) 混合均勻，於95 °C放置5分鐘後儲存於-20 °C備用。

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

3.12-1 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130 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。

3.12-2 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。

3.12-3 西方轉漬分析 (Western blot analysis)

SDS-PAGE 膠體電泳完成後，利用濕式(wet)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 14 伏特 over night，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

釋之 6xHis 單株抗體 (BD Bioscience) 、HA-probe (F-7) HRP 抗體 (Santa Cruz Biotechnology) 、Dengue virus type II E protein domain III 抗體 (Peng's lab) 、S-tag (E15) HRP 抗體 (Novus) 、EGFP-HRP 抗體 (Novus) 於 Blocking buffer 中於室溫下平面震盪 1 小時，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，清洗後加入不同稀釋倍率之二級抗體:Goat anti-mouse HRP (jackson) 、Goat anti- rabbit (jackson) ，再以 20 ml 之 1X TBST buffer 於室溫下平面震盪清洗 5 分鐘共 3 次，最後將 500 μ 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 (Develope 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。

肆、結果

4.1 X-gal staining

將前人已建構完成的結構性與非結構性以 LacZ 為報導基因的兩組質體，transfect 至 BHK21 細胞中，於 24 小時後加入登革熱二型病毒 (M.O.I=0.1、1、10)，分別於一天後、三天後、五天後收集的上清液，再加入 BHK21 細胞，用 X-gal staining 的實驗方式進行偵測，實驗流程請參照圖一，結果請參照圖二。在圖二中 A、B、C 圖分別表示第一、三、五天的結果。觀察到不同天數以及不同 M.O.I 值，兩組質體皆無 LacZ 的表現。

4.2 結構性螢光蛋白質體建構

4.2.1 結構性基因的螢光蛋白質體建構

4.2.1.1 pGEMT-EGFP 質體建構

以 pEGFP-N2 為模板，利用一組引子 EGFPF 與 EGFPR 將螢光蛋白這段增殖放大出來，並在兩端加上兩種切位。一為 *AscI* 另一為 *PacI*，將此段 EGFP 基因接入載體 pGEMT 上。如圖三所示，經酵素 *AscI*、*PacI* 切割後會得 3000 bp、720 bp；經 *BcgI* 切割則為 2400 bp、1200 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 3 kb 及 0.75 kb 的 size marker 附近 (a, b)；在 Lane 2 中可見 c band 比 2.5 kb marker 略低，d band 則在 1 kb 及 1.5 kb marker 間，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十四。

4.2.1.2 結構性基因接上螢光蛋白的質體建構

利用前人建構好的質體 pcDNA3-NCS5'S(IRES)ZSp3'UTR 如附錄三所示，將原先的 LacZ 換成 EGFP，以 *AscI* 與 *PacI* 兩個限制酶切位，將 LacZ 置換成在 pGEMT-EGFP 上的 EGFP 螢光蛋白，其兩端亦含有 *AscI* 與 *PacI*。以此方式得到的質體稱為 pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFP3'UTR 如圖四所示。經酵素 *BsrGI* 與 *XcmI* 切割後會得到 8122 bp 和 2381 bp 的片段，在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 8 kb 及 2.5 kb 的 size marker 附近 (f, g)；vector only 經酵素 *BsrGI* 與 *XcmI* 切割後會得到 8736 bp、3882 bp、1765 bp、1344 bp、745 bp，五個片段。Lane 1 中可見 DNA bands 位於 8kb、4kb、2kb、1.5kb、0.75kb 附近 (a,b,c,d,e)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十五。亦將此質體螢光蛋白的部分送定序做確認。

4.2.2 結構性基因接上螢光蛋白的質體其 SPACER 片段殖入

4.2.2.1 pGEMT-SPACER 質體建構

由於 EGFP 的基因片段較原先質體上的 LacZ 少了 2332 bp，

為維持登革熱二型病毒的基因總體長度，因此需要插入缺少片段補足之。方法是以接兩個小片段的方式增長為 SPACER 的全長，方法如下所述。先以前人建構的質體 pGEMT/SPACER 為模板，利用一組引子 SPACERF1 與 SPACERR1 將欲接入的基因增殖出來，並在兩端加上限制酶酵素切位 *PacI*，接入載體 pGEMT 上，將此質體命名為 pGEMT-SPACER1。再以相同方式將質體 pGEMT/SPACER 為模板以引子 SPACERF2 與 SPACERR2 增殖出第二個片段，並在兩端接上 *EcoRV* 這個限制酶酵素，以此方式得到的質體稱為 pGEMT-SPACER2，如圖五所示。pGEMT-SPACER1 經酵素 *HincII* 切割後會得到 3115 bp、1210 bp、624 bp 的片段；經 *SacI* 與 *ClaI* 切割後會得到 3496 bp、1179 bp、674 bp 的片段。在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 3 kb、2 kb 與 1.5 kb 間以及 0.75 kb 的 size marker 附近(a, b, c)；在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 3 kb、1.5 kb 與 1 kb 間以及 0.75 kb 的 size marker 附近 (d, e, f)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十六。pGEMT-SPACER2 經酵素 *XcmI* 與 *AfeI* 切割後會得到 4129 bp、1765 bp、745 bp 與 4847 bp、1765 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 4 kb、2 kb 與 0.75 kb 的 size marker 附近 (a, b, c)；在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 5 kb 與 2 kb 的 size marker 附近 (d, e)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十七。得到正確的 pGEMT-SPACER1 與 pGEMT-SPACER2 後，利用限制酶酵素 *EcoRV* 將 SPACER2 片段接上 pGEMT-SPACER1 上，得到的質體命名為 pGEMT-SPACER，如圖六所示。pGEMT-SPACER 經酵素 *XcmI* 切割後會得到 5349 bp、1765 bp、1123 bp、746 bp 的片段；經酵素 *HincII* 切割後會得到 3658 bp、3115 bp、1587 bp、624 bp 的片段。在 Lane1 中可見 DNA bands 位

於 5 kb、1.5 kb 與 2 kb 間、1 kb 以及 0.75 kb 的 size marker 附近 (a, b, c, d)；在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 4 kb、3 kb、1.5 kb、0.75 kb 與 0.5 kb 間的 size marker 附近 (e, f, g, h)，皆符合預期。經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十八。

4.2.2.2 結構性基因含螢光蛋白質體接入 SPACER 質體建構

pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 與 pGEMT-SPACER

這兩種質體以限制酶酵素 *PacI* 切割後，將 SPACER 片段殖入載體 pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 上得到的質體稱為 pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR。如圖七所示。

pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經酵素 *PshAI*、*XbaI* 切割後會得到 7938 bp、6284 bp、1526 bp、729 bp 的片段；經酵素 *XcmI* 切割後會得到 8458 bp、4386 bp、1765 bp、1123 bp、745 bp 的片段。在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 8 kb、6 kb、1.5 kb、0.75 kb 的 size marker 附近 (a, b, c, d)；在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 8 kb、4 kb 與 5 kb 之間、1.5 kb、1 kb、0.75 kb 的 size marker 附近 (e, f, g, h, i)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖十九。

4.3 非結構性螢光蛋白質體建構

4.3.1 非結構性基因的螢光蛋白質體建構

4.3.1.1 pGEMT-NEGFP 質體建構

以 pEGFP-N2 為模板，利用一組引子 NEGFPF 與 NEGFR 將螢光蛋白這段增殖放大出來，並在兩端加上兩種切位一為 *AscI* 另一為 *NotI*，將此段 EGFP 基因接入載體 pGEMT 上。如圖八所示，經酵素 *AscI*、*NotI* 切割後會得到 3008 bp 和 736 bp。*BcgI* 切割後會得到 2486 bp、1250 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 3 kb、0.75 kb 的 size marker 附近 (a, b)；在 Lane 2 中可見 c band 位

於 2.5 kb 附近，d band 則在 1 kb marker 與 1.5 kb marker 間 (c, d)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖二十所示。

4.3.1.2 非結構性基因接上螢光蛋白的質體建構

利用前人建構好的質體 pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 如附錄三所示，將原先的 LacZ 換成 EGFP，以 *AscI* 與 *NotI* 兩個限制酶切位，將 LacZ 置換成在 pGEMT-NEGFP 上的 EGFP 螢光蛋白，其兩端亦含有 *AscI* 與 *PacI*。以此方式得到的質體稱為 pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 如圖九所示。經酵素 *KpnI* 切割後會得到 8020 bp、4889 bp、2398 bp 的片段，在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 8 kb、4 kb、2.5 kb 的 size marker 附近 (d, e, f)；vector only 經酵素 *KpnI* 切割後會得到 10352 bp、4889 bp、2426 bp。Lane 1 中可見 DNA bands 位於 10 kb、4 kb、2.5 kb 的 size marker 附近 (a, b, c)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖二十一。亦將此質體螢光蛋白的部分送定序做確認。

4.3.2 非結構性基因接上螢光蛋白的質體其 NSPACER 片段殖入

4.3.2.1 pGEMT-NSPACER 質體建構

由於 EGFP 的基因片段較原先質體上的 LacZ 少了 2332 bp，為維持登革熱二型病毒的基因體總長度，因此需要殖入缺少片段補足之。以前人建構的質體 pGEMT/SPACER 為模板，利用一組引子 NSPACERF 與 NSPACERR 將欲接入的基因增殖出來，並在兩端加上切位為 *NotI*，將此段 NSPACER 基因接入載體 pGEMT 上。以此方式得到的質體稱為 pGEMT-NSPACER 如圖八所示。經酵素 *EcoRV*、*NotI* 切割後會得到 3008 bp、1452 bp、889 bp。經酵素 *NdeI*、*ApaI* 切割後會得到 2932 bp、2417 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 3 kb、1.5 kb、1 kb 的 size marker 附近 (a, b, c)；在 Lane

2 中可見 DNA bands 位於 3 kb、2.5 kb 的 size marker 附近 (d, e)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖二十二。

4.3.2.2 非結構性基因含螢光蛋白質體接入 NSPACER 質體建構

將 pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 與 pGEMT-NSPACER 這兩種質體以限制酶酵素 *NotI* 切割後，將 NSPACER 片段殖入載體 pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 上得到的質體稱為 pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR，如圖十所示。經酵素 *EcoRV* 切割後會得到 8492 bp、5011 bp、4171 bp；經酵素 *ClaI*、*XbaI* 切割後會得到 13913 bp、5364 bp、1097 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 8 kb、5 kb、4 kb 的 size marker 附近 (a, b, c)；在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 10 kb、5 kb、1 kb 的 size marker 附近 (d, e, f)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖二十三。

4.4 非結構性基因質體建構

由於只含有結構性基因的質體已經由前人建構完成(見附錄十一)，為了挑出能穩定表現非結構性蛋白的細胞株，因此需要建構一個只含有非結構性基因的質體，方法則是利用前人(賴建孝, 2006)建構的質體 pcDNA3-NCS5`Z(IRES)NS3'UTR (見附錄三)以 *XbaI*, *BamHI*, *AscI* 取 8 kb 之非結構性基因的部分接上載體 pcDNA3 上，接上的質體稱為 pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR，如圖十一所示。經限制酶酵素 *EcoRV*、切割後會得到 8877 bp、5011 bp；經限制酶酵素 *KpnI* 切割後會得到 6697 bp、4800 bp、2300 bp 的片段，在 Lane 1 中可見 DNA bands 位於 8 kb、5 kb 的 size marker 附近 (a, b) Lane 2 中可見 DNA bands 位於 8 kb 與 6 kb 間、4 kb、2.5 kb 的 size marker 附近 (c, d, e)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖參照圖二十四。亦將此質

體非結構基因的部分送定序確認。

4.5 DNA 定序

將前人建構好的 pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 以及上述我所建構的 pcDNA3.0-NCS5'NS3'UTR 二者送定序，結果發現兩者在 3738 bp 處皆有個 T 的缺失，由於缺失會導致整段序列有 frame shift 的現象，無法產生正確的蛋白因此必須進行修補，由定序結果發現，原先缺失的 T 已經補回去。定序結果如表一所示。

4.6 缺失質體的修復

4.6.1 非結構性基因且帶有 IRES 及 LacZ 的質體修補

利用限制酶酵素 *PshAI* 和 *XbaI* 切下錯誤的片段，且用同一組酵素切下前人（賴建亭, 2006）已建構好且經定序確認過並無缺失的質體 pcDNA3-NCS5'ZNS(MONO)3'UTR（見附錄十二）中正確的片段，定序結果見表，得到的質體即為修正好的質體，修正後的質體命名為 pcDNA3.0-NCS5'NS3'UTR_fix，如圖十二所示。因為修補完的質體與原先缺失的質體只差一個 base，因此以定序確認是否有補回正確的序列。由定序結果發現，原先缺失的 T 已經補回去。定序結果如表一所示。

4.6.2 非結構性基因質體修補

利用限制酶酵素 *PshAI* 和 *XbaI* 切下錯誤的片段，且用同一組酵素切下前人已建構好且經定序確認過並無缺失的質體 pcDNA3-NCS5'ZNS(MONO)3'UTR 中正確的片段，定序結果見表，得到的質體即為修正好的質體，修正後的質體命名為 pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR_fix，如圖十二所示。因為修補完的質體與原先缺失的質體只差一個 base，因此以定序確認是否有補回正確的序列。由定序結果發現，原先缺失的 T 已經補回去。定序結果

如表一所示。

4.7 結構性蛋白穩定細胞株的蛋白質電泳

4.7.1 適當 positive control

將前人的幾組含有 E 蛋白的載體 pstag9 (邱美惠, 2007)、pKRY1 (林柏吟, 2005) 以 BL21 大腸桿菌株表現蛋白並以 western blot 實驗方法偵測。pStag9 以抗體 anti-Stag 與抗體 anti-E protein domain III 偵測, 結果如圖二十五所示。在 Lane 1、Lane 2、Lane 3、Lane 5 皆無偵測到訊號, 而 Lane 4 則可見一個在 43 kD 與 55 kD 之間的 band。在 Lane 6 則見一個靠近 55 kD 的 band。轉錄出來的蛋白質預測大小應該是 53 kD。pKRY1 以抗體 anti-His 與抗體 anti-HA 偵測, 結果如圖二十六所示。在 Lane 1、Lane 2、Lane 3、Lane 5、Lane 6、Lane 7 皆無偵測到訊號, 而 Lane 4 則可見一個 43 kD 附近的 band。在 Lane 8 則見一個 43 kD 附近的 band。以抗體 anti-E protein domain III 偵測, 結果如圖二十七所示。在 Lane 1、Lane 2、Lane 3 皆無偵測到訊號, 而 Lane 4 則可見一個 34 kD 與 43 kD 之間以及 43 kD 與 55 kD 之間的 band。轉錄出來的蛋白質預測大小應該是 49 kD。pStag9 以抗體 anti-Stag 與抗體 anti-E protein domain III 偵測的結果以及 pKRY1 以抗體 anti-His、anti-HA 偵測的結果皆接近預測的片段。而 pKRY1 以抗體 anti-E protein domain III 偵測的結果則是得到兩個可能的片段。

4.7.2 含結構性基因質體 pcDNA3-NCS5'S3'UTR 定序

以前人(賴建孝, 2006)已建構質體 pcDNA3-NCS5'S3'UTR (見附錄十一), 為挑選結構性蛋白穩定細胞株的質體, 因此對此質體做定序。從定序結果可發現與 PL046 strain 比較後, 有些鹼基的差異, 但皆是 silent mutation 與 missense mutation。

4.8 PLP/D2VE 質體建構

利用限制酶酵素 *EcoRI* 將 PLP/VSVG 上的 VSV-G 基因切下，且將 pcDNA3-E14 上的 E 基因以限制酶酵素 *XhoI*、*XbaI* 切下。因為 vector 與 insert 切位不同，因此利用 klenow fill-in 的方式將兩邊限制酶酵素切位的 3'端切除，同時將 5'端補齊，因此能得到兩個 blunt end 的產物，即能將兩者進行接合反應。得到的質體命名為 PLP/D2VE。經酵素 *AflIII* 切割後會得到 2655 bp、1622 bp、1383 bp 的片段，在 Lane 2 中可見 DNA bands 位於 2.5 kb、1.5 kb、1 kb 的 size marker 附近 (c, d, e)；vector only 經酵素 *AflIII* 切割後會得到 3166 bp、2155 bp 的片段。Lane 1 中可見 DNA bands 位於 3 kb、2.5 kb 的 size marker 附近 (a, b)，皆符合預期，經酵素切割的位置圖及電泳圖請參照圖二十八。亦對此質體的 E gene 做定序確認，定序結果如表二所示。由定序結果發現與 PL046 strain 比較後，有些鹼基的差異，但皆是 silent mutation 與 missense mutation，無 frameshift 或是 stop codon 的形成。轉譯成蛋白與 PL046 比較後（見表二），共有 13 個 missense mutation，其中第 44、53 的突變在 E protein 的 domain I，第 55、116、126、129、202 的突變在 E protein 的 domain II，第 322、378 的突變則是在 E protein 的 domain III，第 396、402、474、492 的突變在 E protein 的 C-terminal。此質體的 E gene 與其原先 E gene 的提供者（pcDNA3-E14）比較後序列皆相同。

伍、討論

5.1 X-gal staining

將質體 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSP3'UTR 與 pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 轉染至 BHK21 中，並以登革熱二型 PL046 病毒株感染之，再收取其上清液重複感染 BHK21 細胞。

根據圖二結果顯示，無論是以 M.O.I 為 0.1、1、10 在第一、三、五天收取的含病毒上清液，加入新的 BHK21 以 X-gal staining 染色後，細胞顏色皆無明顯變化。由於此偵測方式經過轉染且病毒感染的步驟，因此推測其中一個可能原因是轉染效率以及病毒感染效率不佳。因為以登革熱病毒感染時，根據實驗設計，包覆到質體產生的 RNA 以及病毒包覆自己的基因機率是各半，也有可能因此而觀測不到細胞顏色變化。

5.2 質體建構

所有登革熱二型結構/非結構基因質體：pcDNA3-NCS5'S3'UTR、pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR、pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR、PLP/D2VE，皆以定序做過確認。在定序結果可以發現與 PL046 strain 比較後，有些鹼基的差異，但皆是 silent mutation 與 missense mutation。而原先發現有鹼基缺失的質體，經修補過後者：pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR_fix、pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR_fix，定序後也確認已經修復完成。

5.3 結構性蛋白穩定細胞株

5.3.1 適當的 positive control

在這兩種 positive control：pStag9 以及 pKRY1 皆能被 anti-Stag 與 anti-His、anti-HA 辨認，如圖二十五與圖二十六。亦能以 anti-E protein domain III 的抗體偵測，如圖二十五與二十七。但在圖二十七可觀察到 pKRY1 以 anti-E protein domain III 偵測的結果有兩個可能的片段，分別是靠近 34 kD 與 43 kD 之間以及 43 kD 與 55 kD 之間。觀察 pKRY1 以抗體 anti-His、anti-HA 偵測的結果產生的 band 位置較靠近 43 kD 處，因此以 anti-E protein domain III 偵測的結果也應較靠近 43 kD 處。除此之外，我所使用 anti-E protein domain III 是

屬於 polyclonal antibody，且未經過純化，另一較接近 55 kD 的片段較不明顯，因此推測可能是背景值。

5.4 PLP/D2VE

從定序與酵素確認的圖發現此質體應該是沒有問題，並無 frameshift 或是 stop codon 的形成。將來即可做細胞表現的部分。

陸、結論

在本實驗中，我陸續建構了與登革熱二型病毒結構/非結構基因相關的質體，質體建構的部分經定序與酵素確認，皆無問題。而結構性蛋白穩定細胞株與 PLP/D2VE 表現，則待由更進一步的實驗探討。

柒、Future work

7.1 含螢光蛋白的結構/非結構質體

由於已含有 EGFP 為 reporter 基因的質體已建構完成，下一步可參照圖一的流程，以偵測登革熱二型病毒其組裝訊號的位置。而已修復好的質體 pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR_fix 由於其包含非結構基因，因此可與含結構性基因質體 pcDNA3-NCS5'S3'UTR 做酵素切割及接合反應，形成一個含登革熱二型 PL046 病毒全長之 infectious clone。此外亦可將 pcDNA3.0-NCS5`NS3`UTR_fix 做非結構性蛋白穩定細胞株的挑選。

7.2 結構性蛋白穩定細胞株

由於 pStag9 在 *E.coli* BL21 以抗體(anti-Stag、anti-His、anti-HA、anti-E protein domain III) 偵測皆能表現 (pKRY1 在 anti-E protein domain III 偵測到不止一個片段)，因此可以選擇將其轉染至 BHK21 細胞中並與挑選的 stable cell line 以 Western blot 分析。另外，關於登革熱二型其穩定細胞株，其文獻搜尋找不到與登革熱表現三種結

構蛋白穩定細胞株的文章，只有與登革熱病毒同屬的其他病毒的文獻，不過大部分都是以部分結構性蛋白為主，如 JEV 的 E 蛋白穩定細胞株 (Zhang, F., *et al*, 2007)、JEV 的 prM、E 蛋白的穩定細胞株 (konishi E, *et al*, 2001) 以及 DV 的 prM、E 蛋白的穩定細胞株 (konishi E, *et al*, 2002)。而三種結構性蛋白皆表現的穩定細胞株，則有澳洲 Kunji virus 的研究，在這篇文章，作者以 Clontech 的 tet-off 系統，建立一個能表現三種結構性蛋白的穩定細胞株 (Harvey T.J., *et al*, 2004)。也許可做為挑選結構性蛋白細胞株的參考。除了可參考其他文獻之外，將來亦可將 EGFP 這螢光蛋白接上其 (pcDNA3-NCS5'S3'UTR) 後並以 IRES 獨立表現，藉由螢光能幫助挑選過程中的 colonies 篩選。

7.3 PLP/D2VE 質體建構

由於此質體由定序及酵素確認結果發現是沒有缺失、framesift 或 stop codon 的產生，接下來可以用 Western blot 或免疫螢光蛋白等實驗方法，測試是否有表現登革熱二型的 E protein。

八、參考文獻

林柏吟, 2005, 交大碩士論文

賴建孝, 2006, 交大碩士論文

邱美惠, 2007, 交大博士論文

Center for Disease Control, Taiwan (CDC, Taiwan).

<http://www.cdc.gov.tw/mp.asp?mp=1>

Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.-K. Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Pseudotyped Retroviral Vectors: Concentration to a Very High Titer and Efficient Gene Transfer into Mammalian and Nonmammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 8033-8037

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649–688.

Clum S, Ebner KE, Padmanabhan R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem* 1997;272(49):30715–30723.

Eiji Konishi, Atsuko Fujii, Peter W. Mason, et al. Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese Encephalitis virus subviral particles. *J Virol* 2001,

75(5):2204-2212

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

Falgout B, Pethel M, Zhang Y-M, et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 1991;65:2467–2475.

Fuquan Zhang, Wenyu Ma, Li Zhang, Marlen Aasa-Chapman and Hongyi Zhang, Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line. *Virology*, 2007,4:17.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*, 17:4713-4730

Henchal, E. A., and Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3(4), 376-96.

Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative

methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 4):733–740.

Jones CT, Ma L, Burgner JW, et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 2003;77(12):7143–7149.

Kautner, I., Robinson, M. J., and Kuhle, U. (1997). Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* **131**(4), 516-24.

Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 1993;67(3):1672–1675.

Konishi E, Atsuko Fujii. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine* 2002(20):1058-1067

Lindenbach BD, Rice CM. (1991). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*, 73:4611-4621.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3414–3419.

Mairuhu, A. T., Wagenaar, J., Brandjes, D. P., and van Gorp, E. C. (2004). Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**(6), 425-33.

Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., and Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* **10**(12 Suppl), S98-109.

Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S.C. Harrison, A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 6986–6991.

Nowak T, Farber PM, Wengler G, et al. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* **1989**;169(2):365–376.

Perera R, Kuhn RJ. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, **11**:369-377.

Tracey J. Harvey, Wen Jun Liu, Xiang, Ju Wang, Richard Linedale, Michael Jacobs, Andrew Davidson, Thuy T. T. Le, Itaru Anraku, Andreas Suhrbier, Pei-Yong Shi, and Alexander A. Khromykh, *J Virol* **2004**, **78**(1):531-538.

You, S., and Padmanabhan, R. (1999). A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem* **274**(47), 33714-22.

Yee, J. K., Miyanochara, A., LaPorte, P., Bouic, K., Burns, J. C., and Friedmann, T. (1994) A General Method for the Generation of High-Titer, Pantropic Retroviral Vectors: Highly Efficient Infection of Primary Hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 9564-9568

Wengler G, Wengler G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* 1991;184:707-715.

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.

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/en/>

PL046

ACATGTCCTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGATGGTTATGGTGGGCGCTACTATGACGGATGA
CATAGGTATGGGCGTGACTTATCTTGGCCCTAC



表一、非結構基因質體定序與修補後質體定序圖

登革熱二型病毒 PL046 病毒株，其非結構基因質體：

pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR (上圖縮寫為 2)、pcDNA3.0-NCS5'NS3'UTR (上圖縮寫為 4)定序圖。以及修補過後的質體：pcDNA3.0-NCS5'NS3'UTR_fix (上圖縮寫為 4')、pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR_fix (上圖縮寫為 2')其缺失片段定序結果。MONO 指的是 pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR。

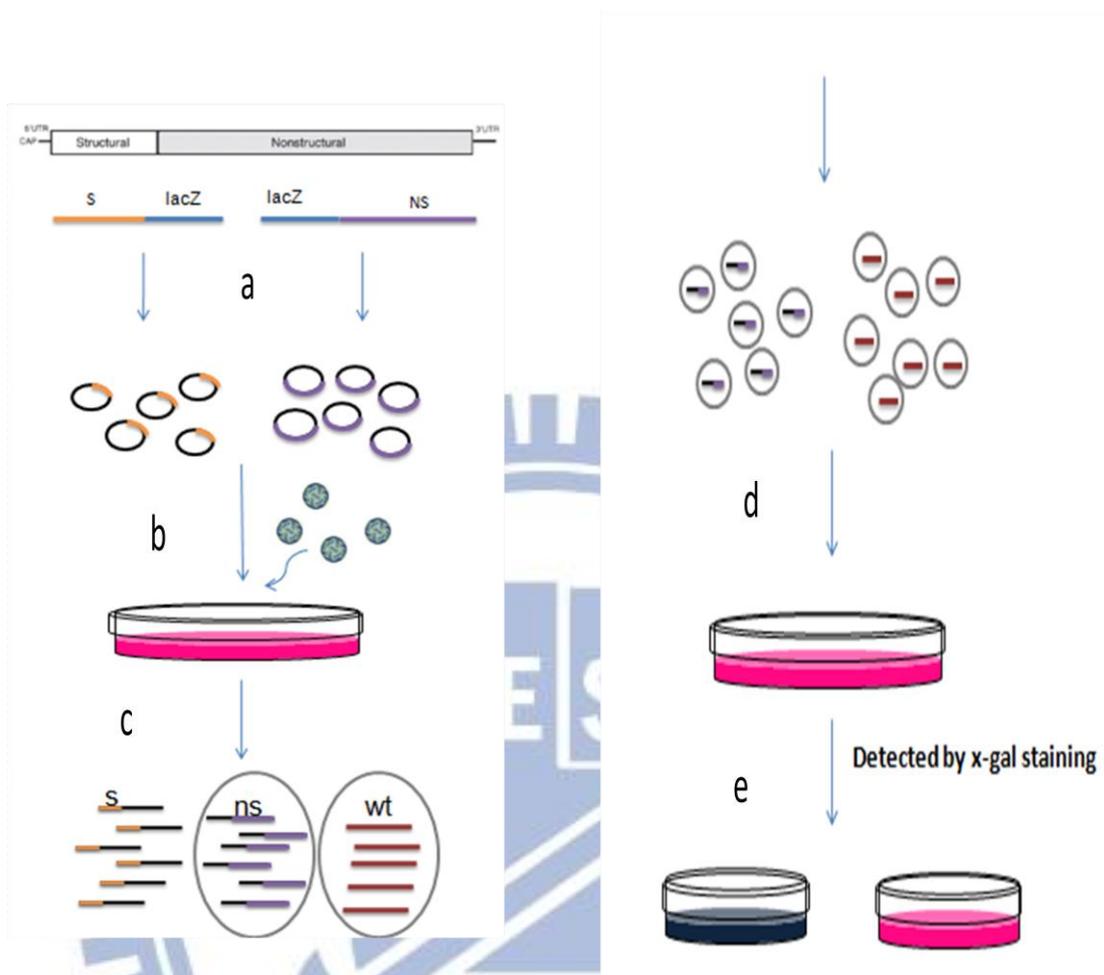
底線部分為定序用的引子 binding site。方框圈起的位置即為原先缺失已補回的部分。

5'-TCCTTTGGCAAGCACGTGAGATCTGAATTTCGAGGACAATGCGTTGCAT
A-----GTGCAGGCCCTAGTCTAGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGCCT - 3'

| | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| pl046-e-aa | 1 | MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFGLIKTEAKQSLALRKYCIEARLNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDR | | | | | | | | |
| plpd2v-e-aa-seq | 1 | MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFGLIKTEAKQSSALRKYCIEARLNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDR | | | | | | | | |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 |
| pl046-e-aa | 100 | SWGNGCGLFGKGGIVTCAAMFTCKRMESEIYVQFENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGRHGKEIKITPQSSITEAELTYGVTMECSFRGLDFNEMVLL | | | | | | | | |
| plpd2v-e-aa-seq | 100 | SWGNGCGLFGKGGIVTCAAMFTCKRMESEIYVQFENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGRHGKEIKITPQSSITEAELTYGVTMECSFRGLDFNEMVLL | | | | | | | | |
| | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 |
| pl046-e-aa | 200 | QMKNKANLVHRQWFLDPLPWLPGADTQGSNWIQKETLVTFKNPHAKQDVVVLGSGQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCLRMDKQLKQKMSY | | | | | | | | |
| d2f1431-aa-seq | 10 | QMKNKANLVHRQWFLDPLPWLPGADTQGSNWIQKETLVTFKNPHAKQDVVVLGSGQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCLRMDKQLKQKMSY | | | | | | | | |
| | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 |
| pl046-e-aa | 300 | SMCTGKFKVYKEIAETQHGTVIVRVQYEGDGSFKIPFEIMDLKRRHLGRLITVNPVTEKDSFVNIEAEPFPGDSVLIIGVEPGQLKLNWFKKGGSSIG | | | | | | | | |
| d2f1431-aa-seq | 110 | SMCTGKFKVYKEIAETQHGTVIVRVQYEGDGSFKIPFEIMDLKRRHLGRLITVNPVTEKDSFVNIEAEPFPGDSVLIIGVEPGQLKLNWFKKGGSSIG | | | | | | | | |
| | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 |
| pl046-e-aa | 400 | QMLFTTMRGAKRMAILGDTANDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTPSVSLVLVGVVTLVYLVGMVQA | | | | | | | | |
| d2f1873-aa-seq | 3 | QMLFTTMRGAKRMAILGDTANDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTPSVSLVLVGVVTLVYLVGMVQA | | | | | | | | |

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 gene 胺基酸比較

上圖畫底線部分為酵素切割且經由 klenow fill-in 反應過後的結果，而灰色框是起始密碼與終止密碼處。將 PLPD2VE 的 E gene 定序結果轉換為胺基酸序列，如下圖所示，上方序列為 PL046 DV2 病毒株，下方序列為 E gene 轉換為胺基酸後的序列。plpd2ve、D2F1431、D2F1873 為定序引子名稱。DV2 PL046 strain sequence data 來自 AJ968413, NCBI。



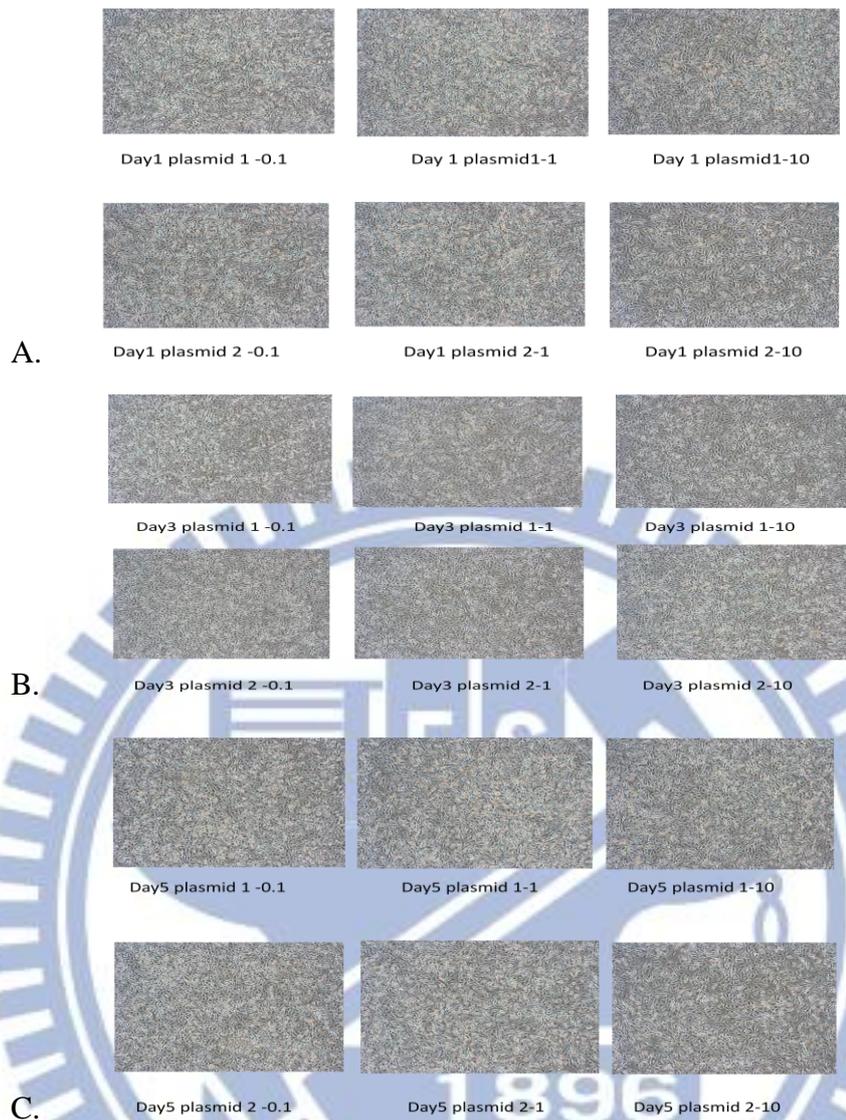
圖一、偵測登革熱二型病毒組裝訊號所設計的實驗流程

- 已建構的登革熱二型病毒基因，分別為結構/非結構基因，以 LacZ 做為其報導基因。
- 將兩種質體轉染至 BHK21 後，以登革熱病毒感染細胞，登革熱病毒會依循圖一的路徑，產生正確的結構/非結構蛋白。
- 登革熱病毒經感染細胞後會產生新的病毒顆粒，根據圖一，假設我的質體有帶其組裝訊號，應該也能被病毒包裝起來(此圖假設在非結構基因上)。
- 感染病毒後的上清液分天數收集後，再感染到新的 BHK21 。
- 以 x-gal staining 偵測其報導基因。

S 表示: structural gene from Dengue virus PL046 strain

NS 表示: non-structural gene from Dengue virus PL046 strain

WT 表示: full-length genome from Dengue virus PL046 strain



圖二、 X-gal staining 結果

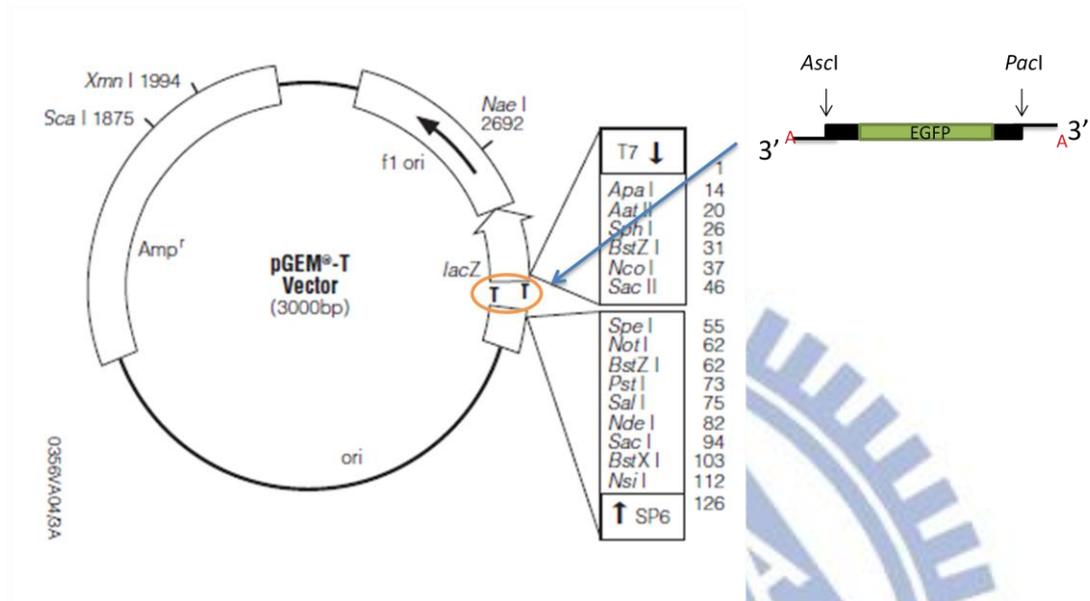
A 圖為將病毒感染後第一天所收取的上清液加在新的 BHK21 培養 24 小時後，並以 X-gal 染色的結果。

B 圖為將病毒感染後第三天所收取的上清液加在新的 BHK21 培養 24 小時，並以 X-gal 染色的結果。

C 圖為將病毒感染後第五天所收取的上清液加在新的 BHK21 培養 24 小時，並以 X-gal 染色的結果。

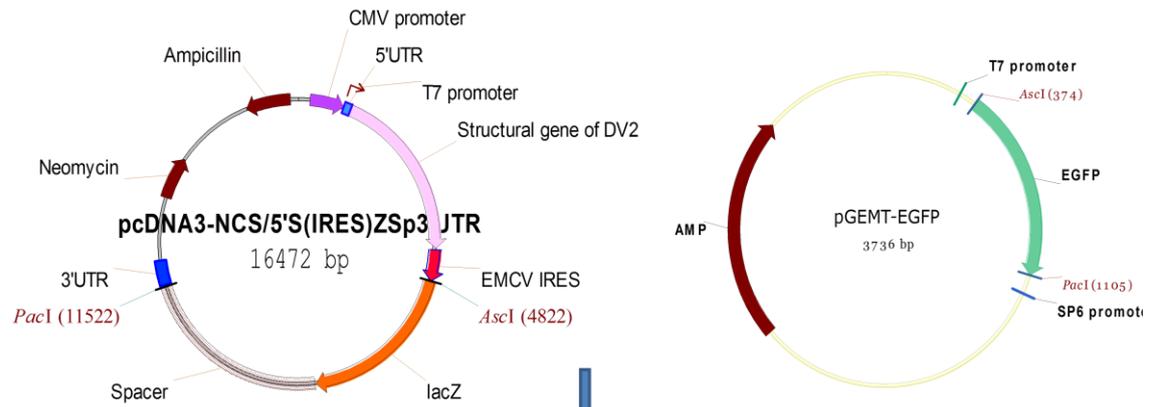
0.1、1、10 是 M.O.I 值； M.O.I 值指的是 multiplicity of infection，意義是感染時細胞與病毒的比值。

Plasmid1 是 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSP3'UTR 的縮寫； Plasmid2 是 pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 的縮寫，詳圖見附錄四。



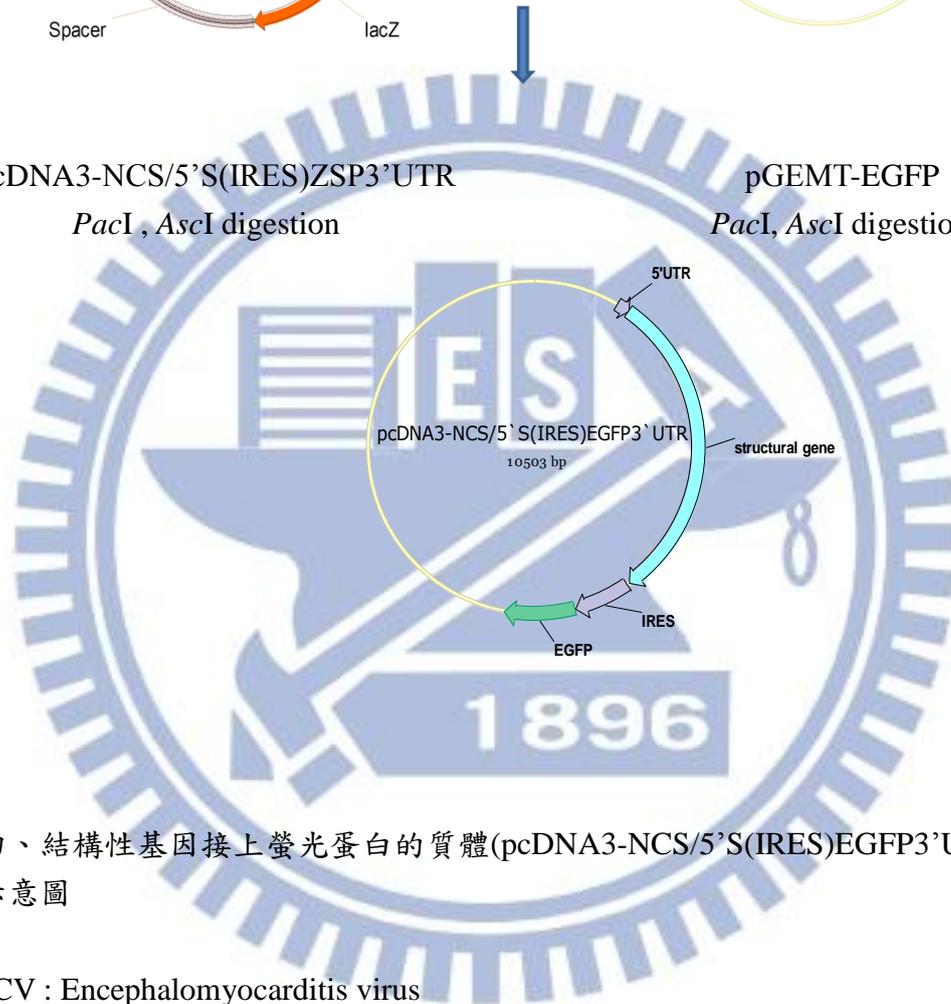
圖三、 pGEMT-EGFP 的質體建構示意圖

含 EGFP 的片段先以 PCR 方式增幅產生。
EGFP 的模板來自 pEGFP-N2 (詳細資料請見附錄七)



pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR
PacI, Ascl digestion

pGEMT-EGFP
PacI, Ascl digestion

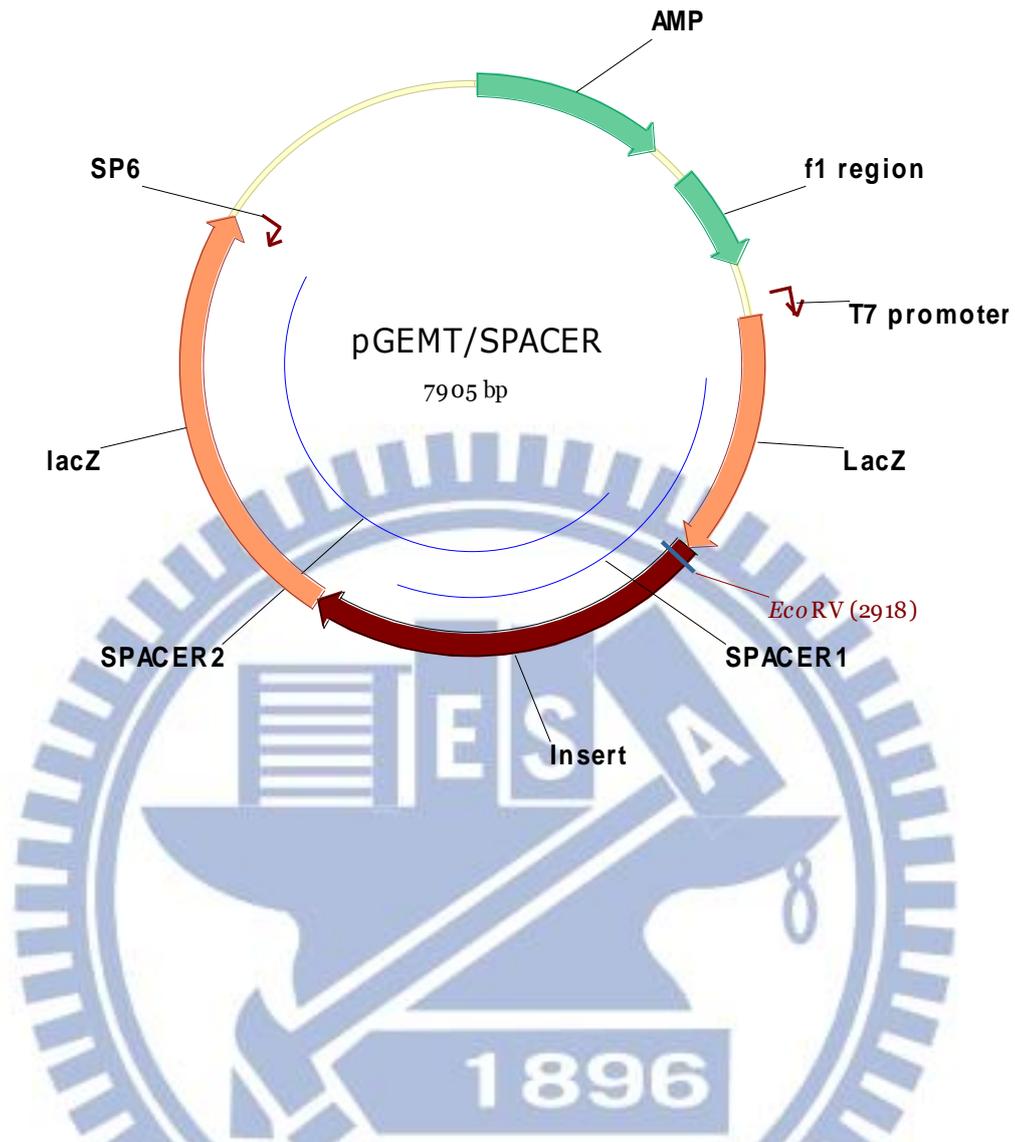


圖四、結構性基因接上螢光蛋白的質體(pcDNA3-NCS/5'S(IRES)EGFP3'UTR)建構示意圖

EMCV : Encephalomyocarditis virus

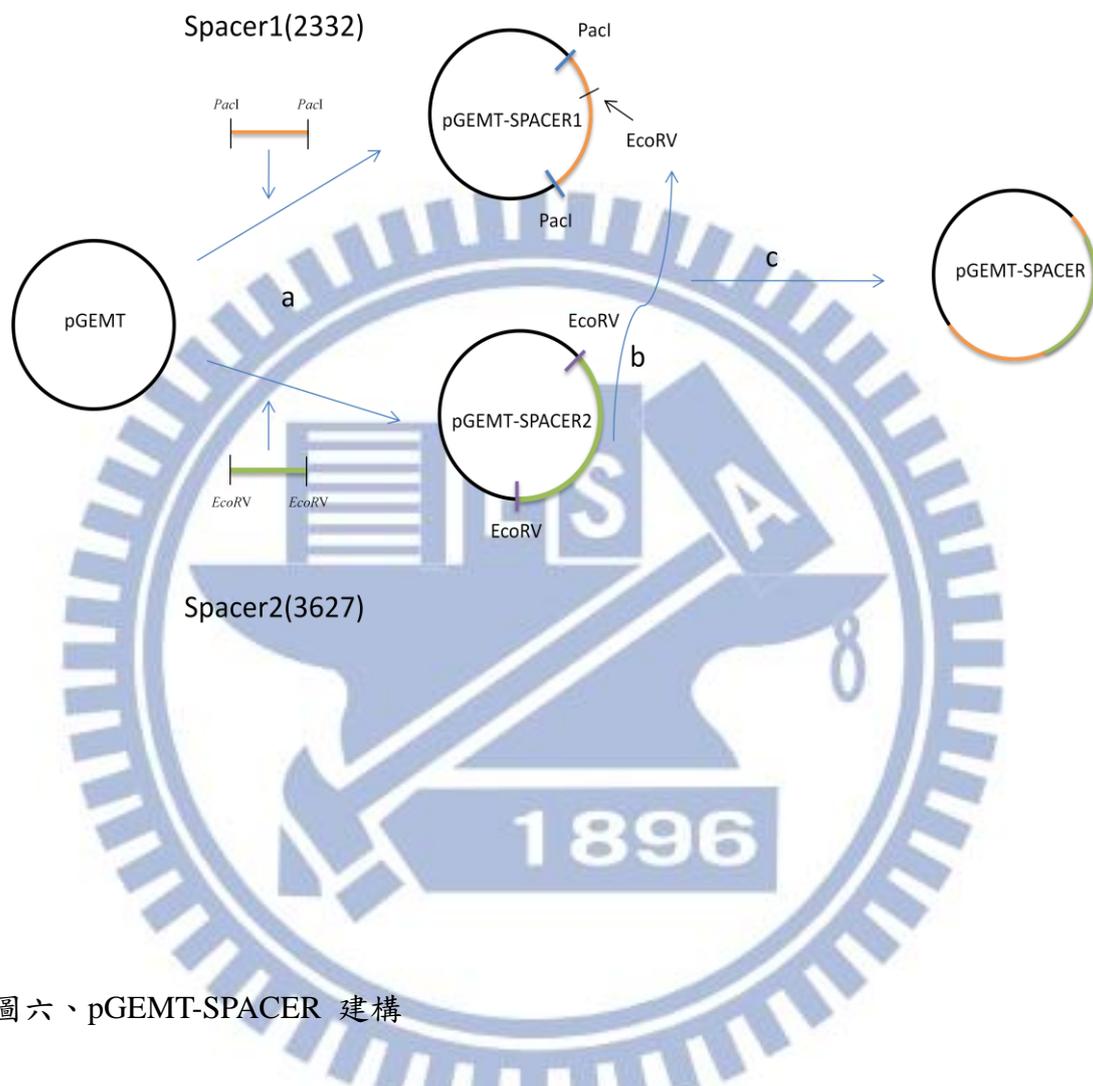
Structural gene : Dengue virus 2 PL046 strain structural gene

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein



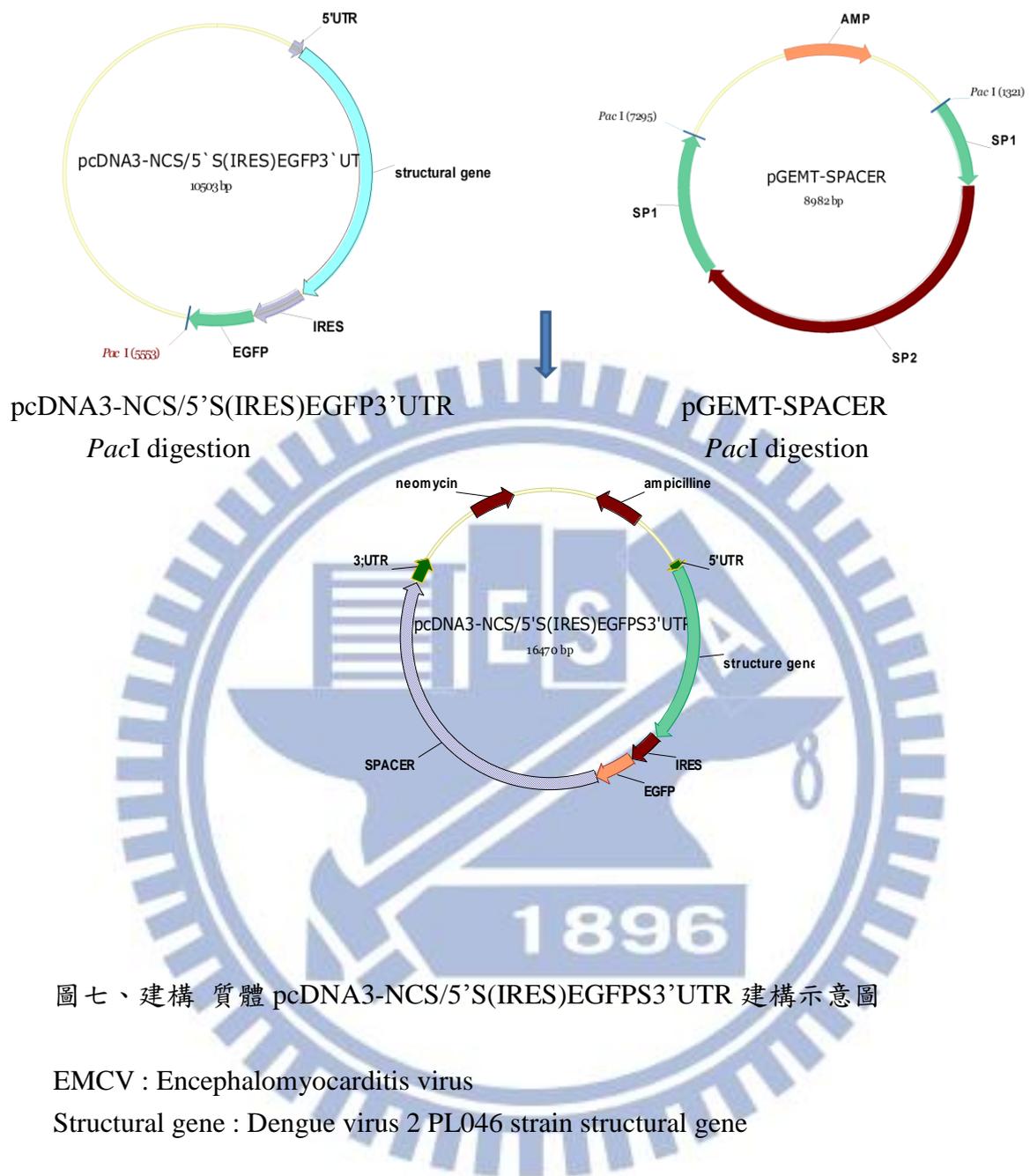
圖五、pGEMT-SPACER1 and pGEMT-SPACER2 的 PCR 示意圖

PCR 模板來自 pGEMT/SPACER，見附錄十四
 pGEMT-SPACER1 兩端外加 *PacI* 的切位
 pGEMT-SPACER2 兩端外加 *EcoRV* 的切位



圖六、pGEMT-SPACER 建構

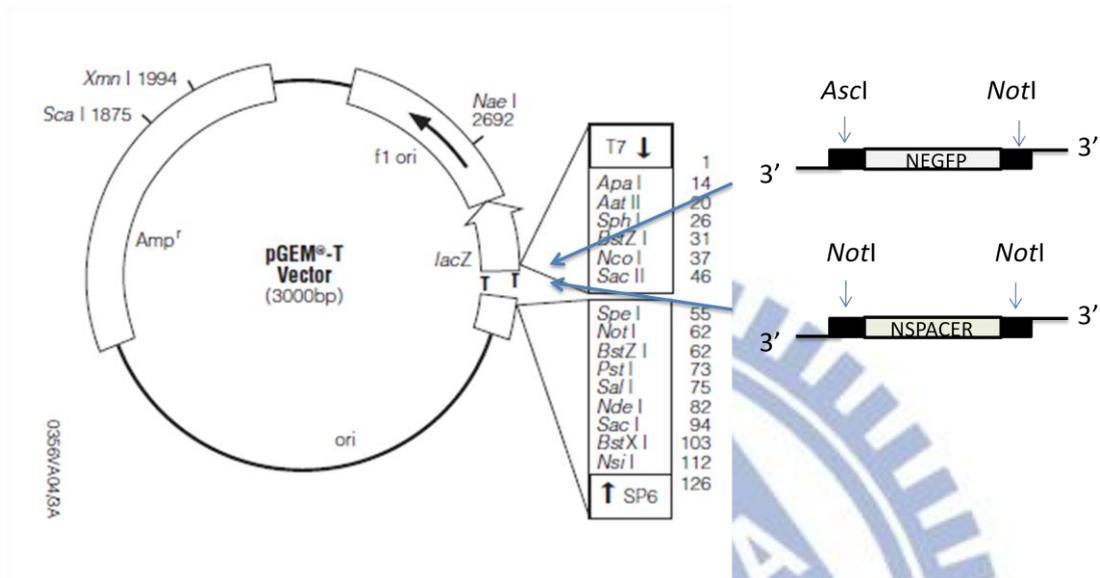
- 將兩種片段(2332bp、3627bp)分別接上 pGEMT 載體上。
- 將 pGEMT-SPACER2 片段以限制酶酵素 *EcoRV* 切下接上 pGEMT-SPACER1 上。
- 得到的質體 pGEMT-SPACER 即得 5959bp 的片段。



圖七、建構 質體 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)EGFP3'UTR 建構示意圖

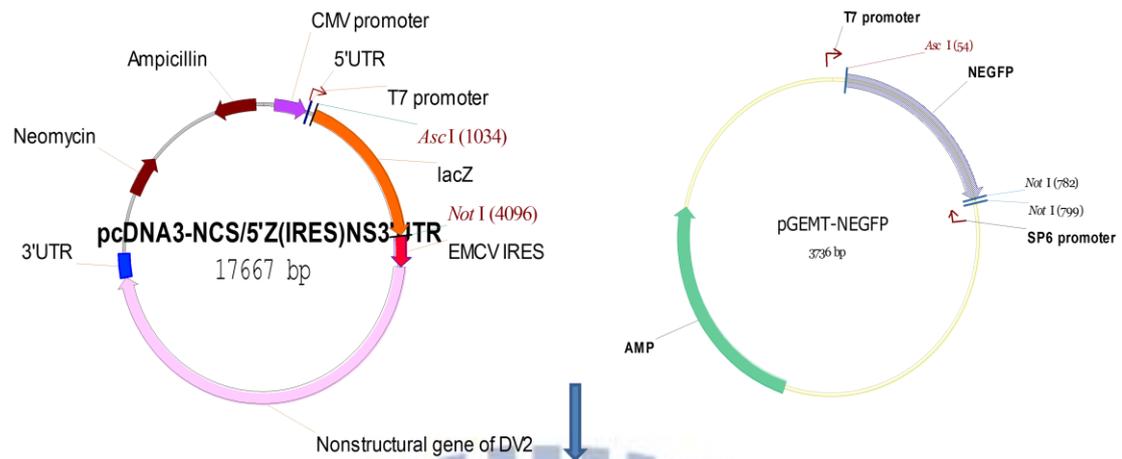
EMCV : Encephalomyocarditis virus

Structural gene : Dengue virus 2 PL046 strain structural gene



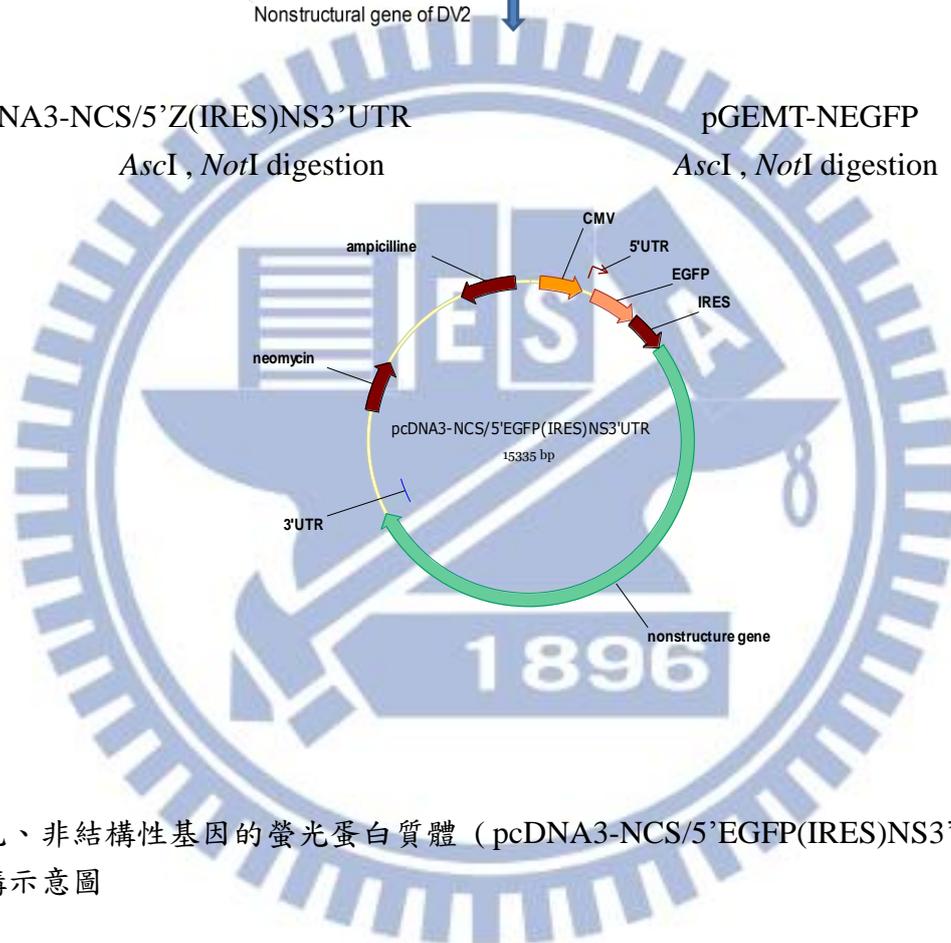
圖八、pGEMT-NEGFP 與 pGEMT-NSPACER 的質體建構示意圖

NEGFP 與 NSPACER 兩個片段皆先以 PCR 方式增幅。NEGFP 的模板來自 pEGFP-N2 (詳細資料請見附錄八)。NSPACER 的模板來自前人建構的質體 pGEMT/SPACER (詳細資料請見附錄十四)。



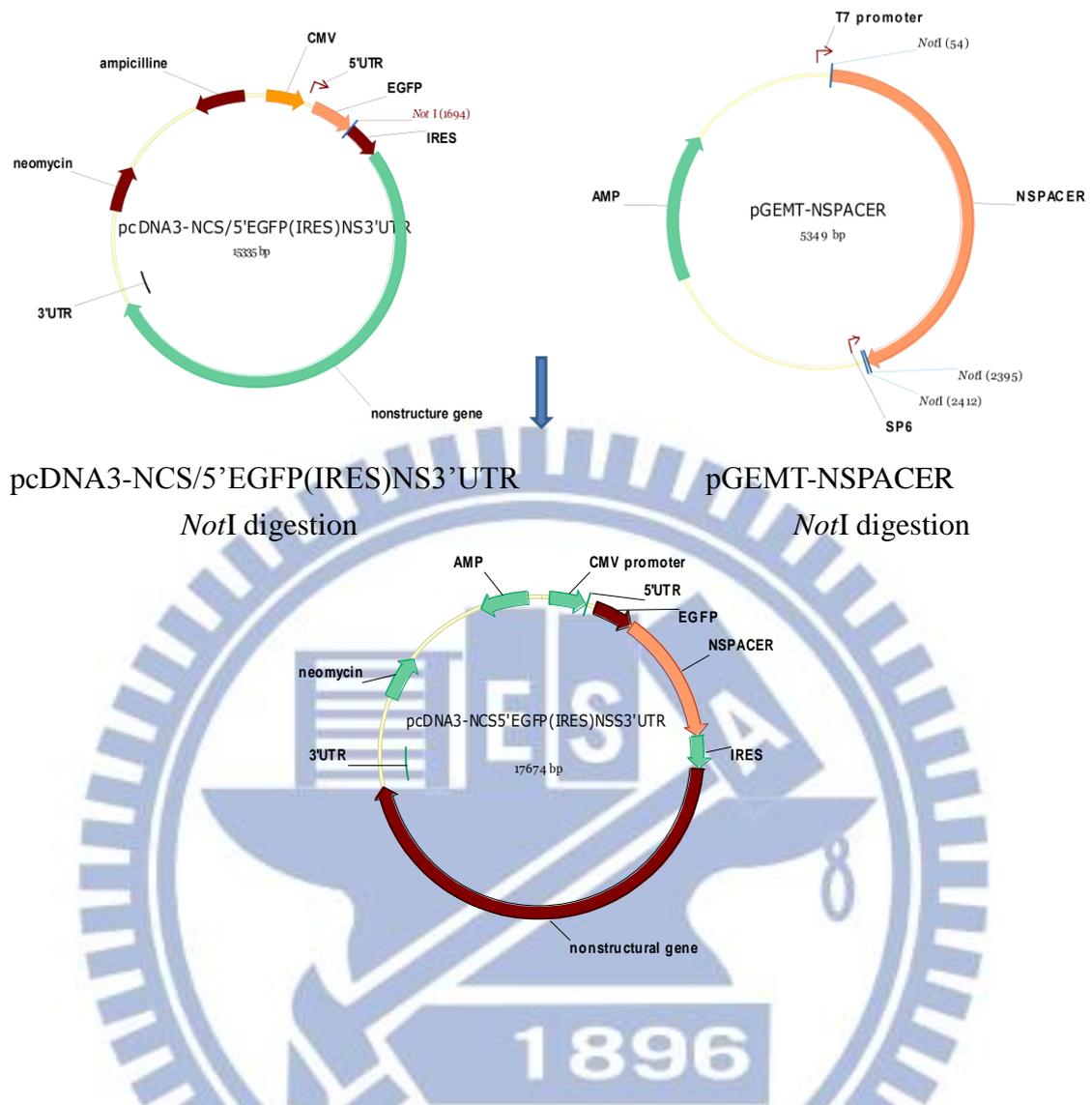
pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR
AscI, *NotI* digestion

pGEMT-NEGFP
AscI, *NotI* digestion



圖九、非結構性基因的螢光蛋白質體 (pcDNA3-NCS/5'EGFP(IRES)NS3'UTR) 建構示意圖

EMCV : Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site
 Nonstructural gene : Dengue virus 2 PL046 strain nonstructural gene
 EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

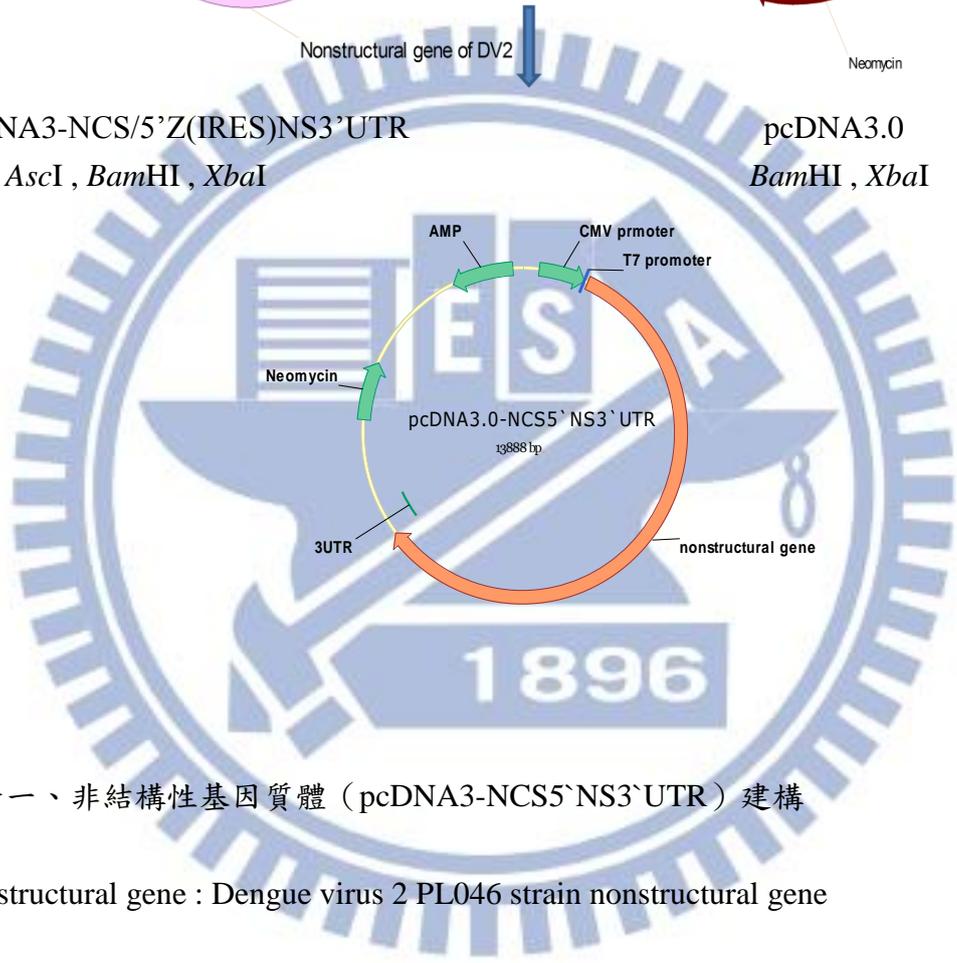
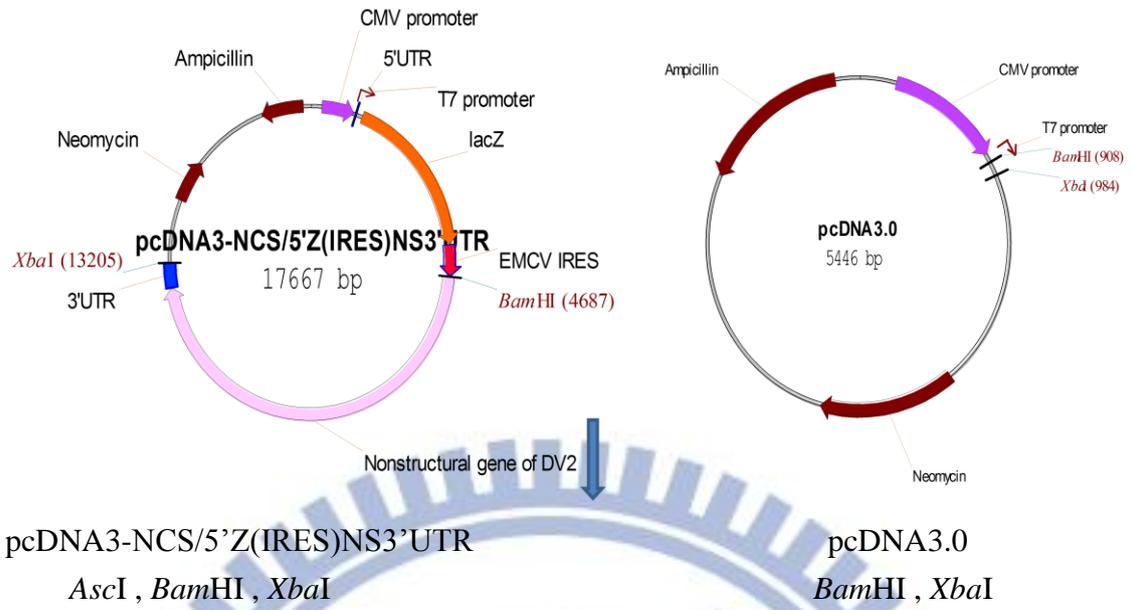


圖十、非結構性基因接上螢光蛋白的質體
(pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR) 其 NSPACER 片段殖入

EMCV : Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site

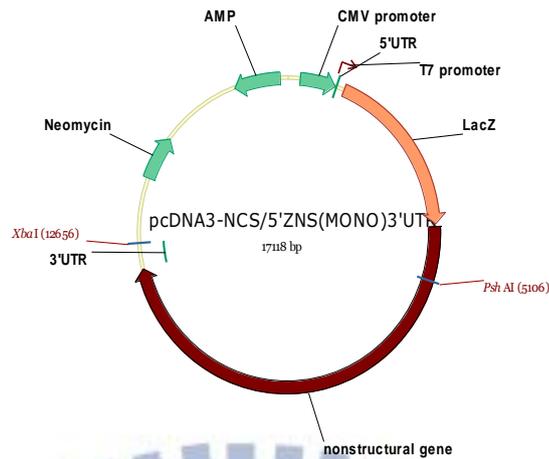
Nonstructural gene : Dengue virus 2 PL046 strain nonstructural gene

EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

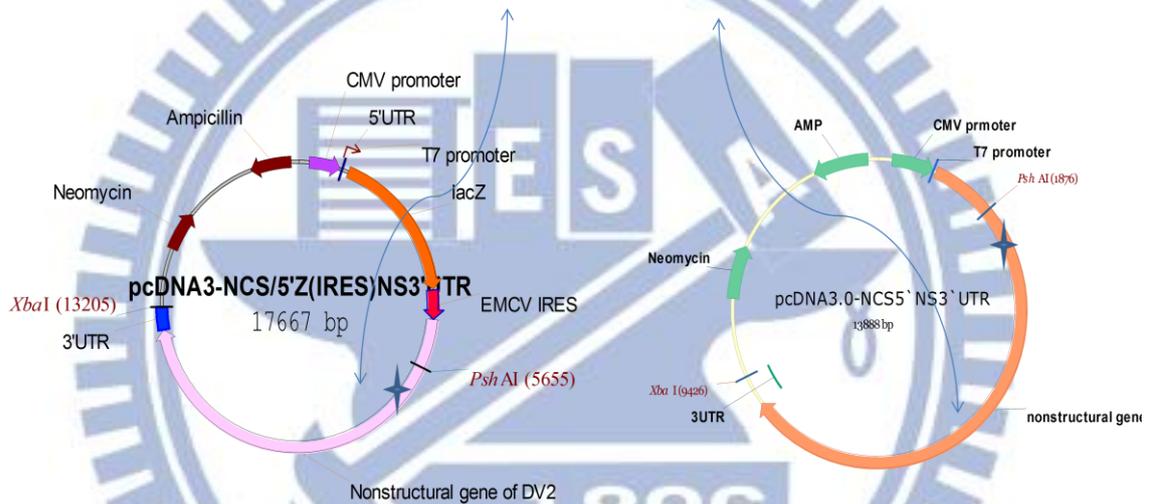


圖十一、非結構性基因質體 (pcDNA3-NCS5'NS3'UTR) 建構

Nonstructural gene : Dengue virus 2 PL046 strain nonstructural gene



pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR
PshAI, XbaI digest



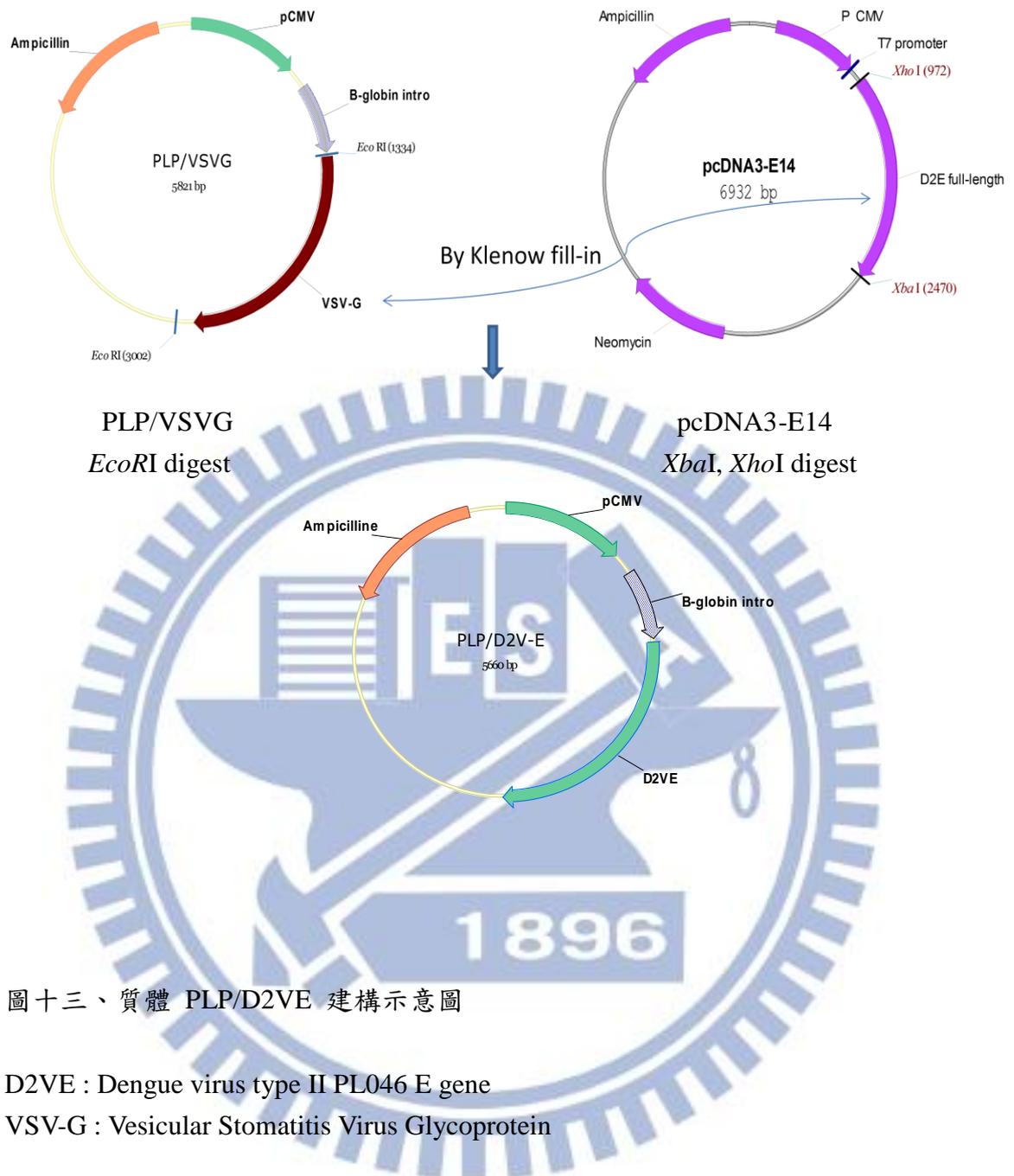
pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR
PshAI, XbaI digest

pcDNA3.0-NCS5'NS3'UTR
PshAI, XbaI digest

圖十二、非結構性基因且帶有 IRES 及 LacZ 的質體
pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 修補與非結構性基因質體
pcDNA3-NCS5'NS3'UTR 修補

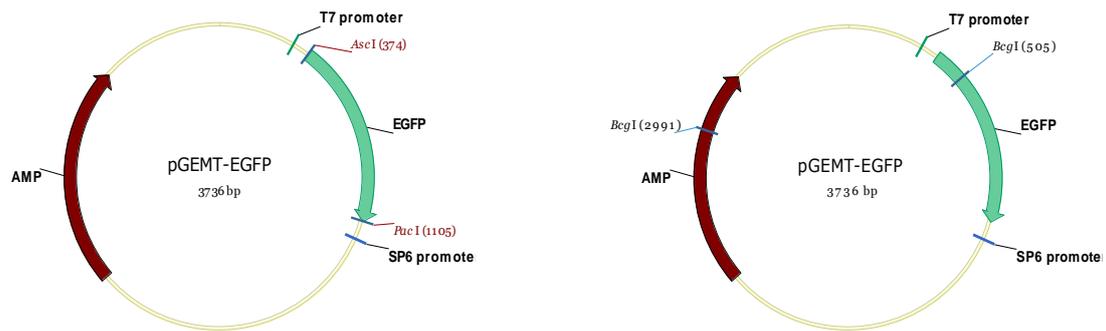
EMCV : Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site
Nonstructural gene : Dengue virus 2 PL046 strain nonstructural gene

✧ : 表示突變處

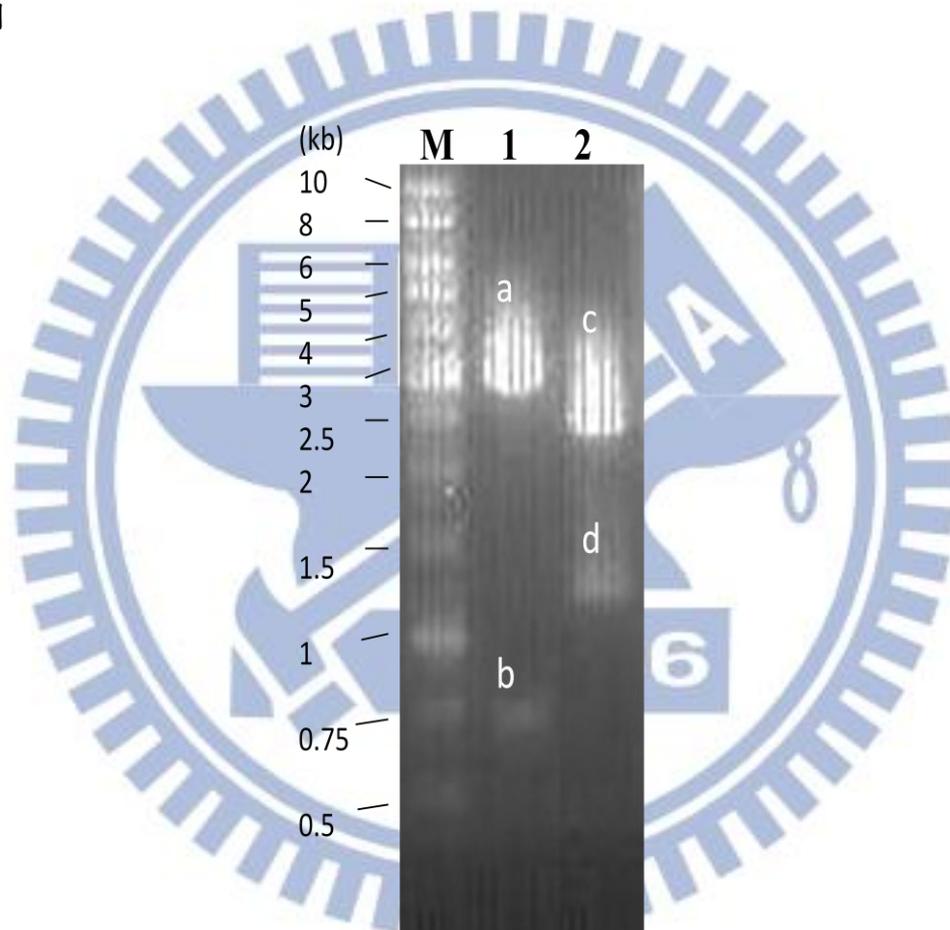


圖十三、質體 PLP/D2VE 建構示意圖

D2VE : Dengue virus type II PL046 E gene
 VSV-G : Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein



圖十四(A)、pGEMT-EGFP 經酵素 *AscI*、*PacI* 與 *BcgI* 作用後，酵素作用位置圖



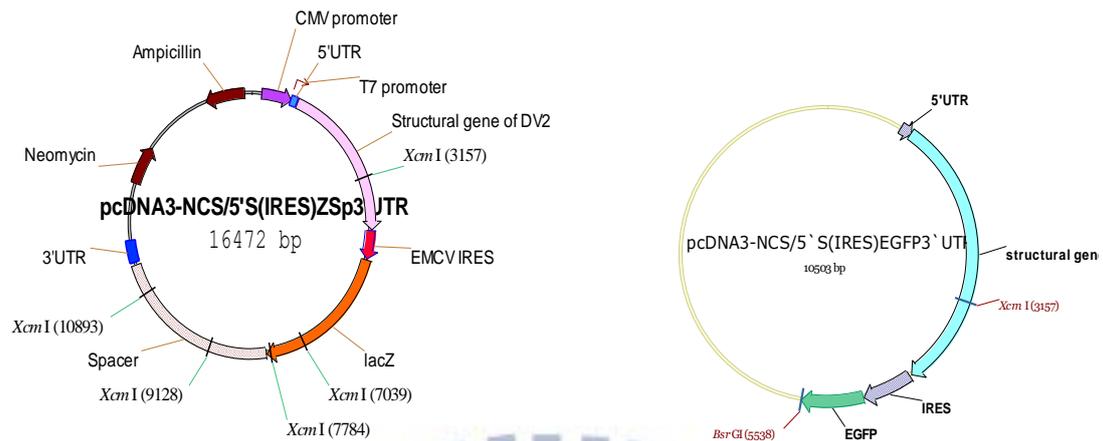
圖十四(B)、pGEMT-EGFP 經酵素 *AscI*、*PacI* 與 *BcgI* 作用後，所得電泳分析圖

pGEMT-EGFP 經 *AscI*、*PacI* 與 *BcgI* 作用後，會得到 3008 bp、736 bp 的片段 (band a, b) 與 2400 bp、1200 bp 的片段 (band c, d)。

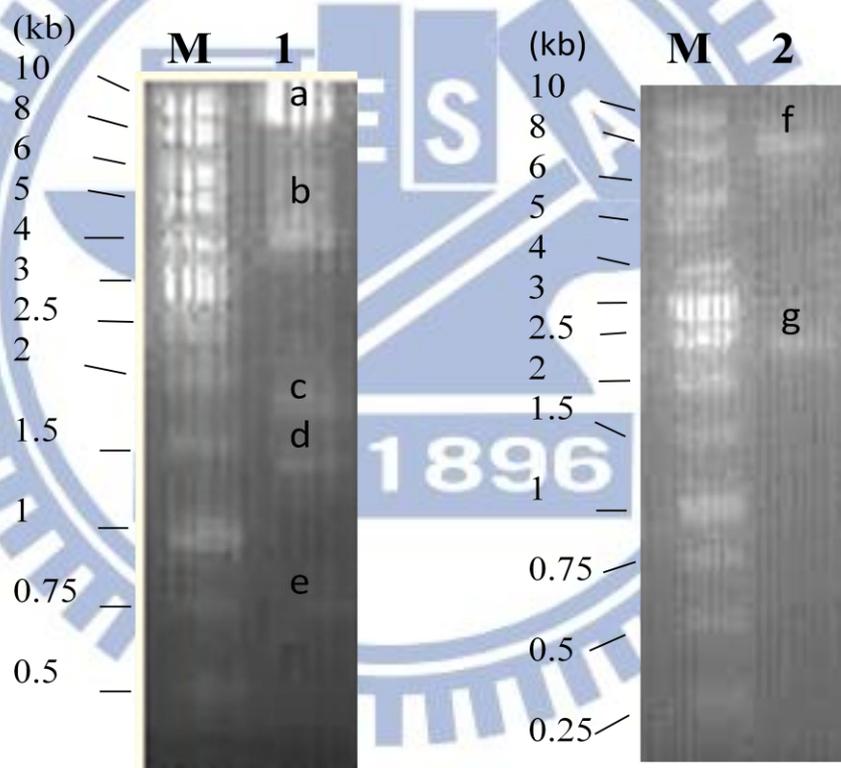
Lane 1 : pGEMT-EGFP 經酵素 *AscI*、*PacI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pGEMT-EGFP 經酵素 *BcgI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker。



圖十五(A)、pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 與
其原先 vector : pcDNA3-NCS5`S(IRES)ZSp3`UTR 經 *BsrGI* 與 *XcmI* 作用
後，酵素作用位置圖

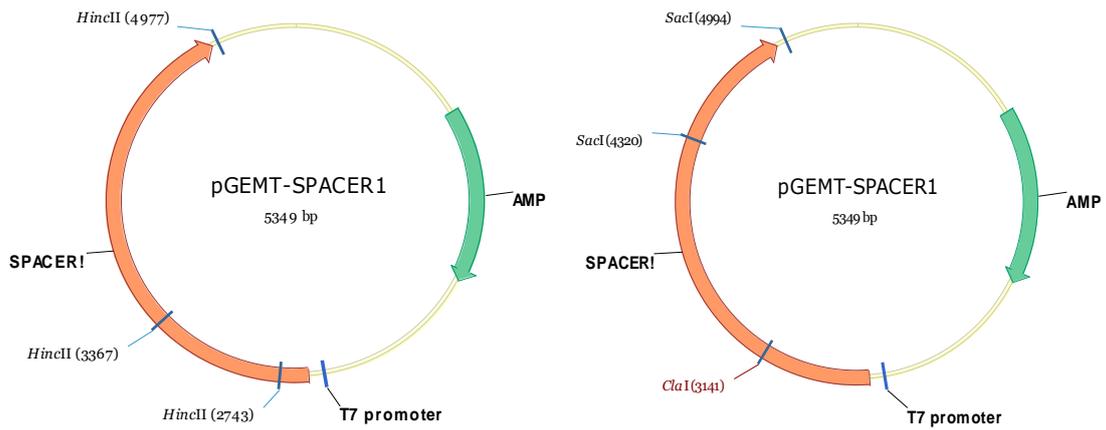


圖十五(B)、pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 與
其原先 vector : pcDNA3-NCS5`S(IRES)ZSp3`UTR 經 *BsrGI* 與 *XcmI* 作用後，
所得電泳分析圖

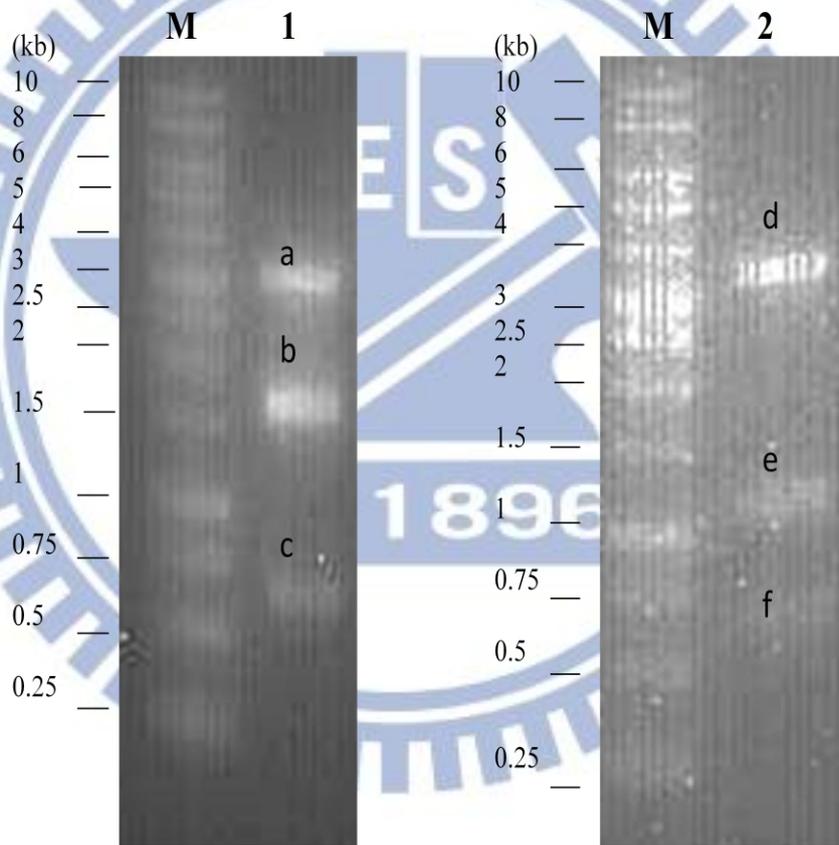
Lane 1 : pcDNA3-NCS5`S(IRES)ZSp3`UTR 經 *BsrGI* 與 *XcmI* 切割後，會得到
8736 bp、3882 bp、1765 bp、1344 bp、745 bp (band a, b, c, d, e)的片段。

Lane 2 : pcDNA3-NCS5`S(IRES)EGFP3`UTR 經 *BsrGI* 與 *XcmI* 切割後，會得到
8122 bp、2381 bp (band f, g)。

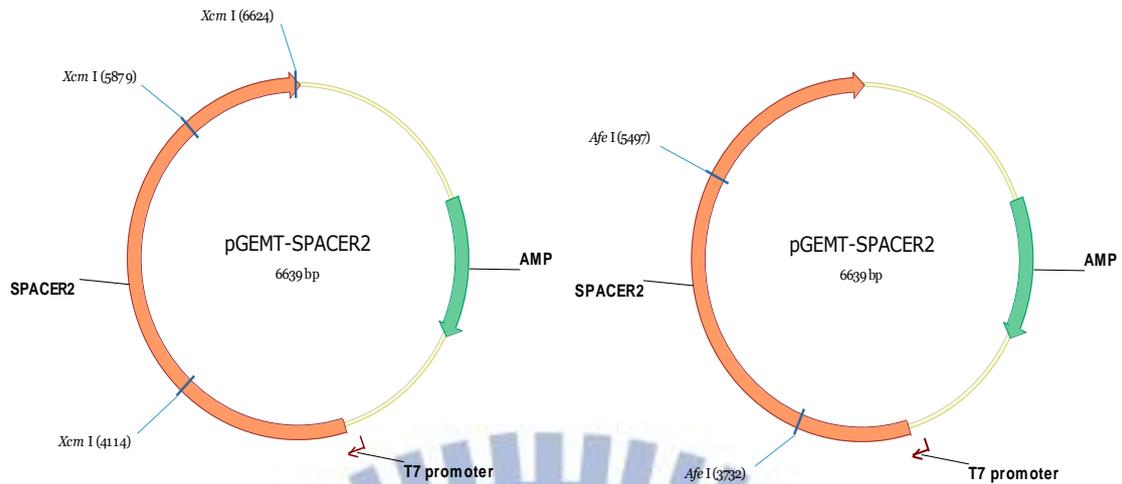
Lane M 表示 DNA size marker 。



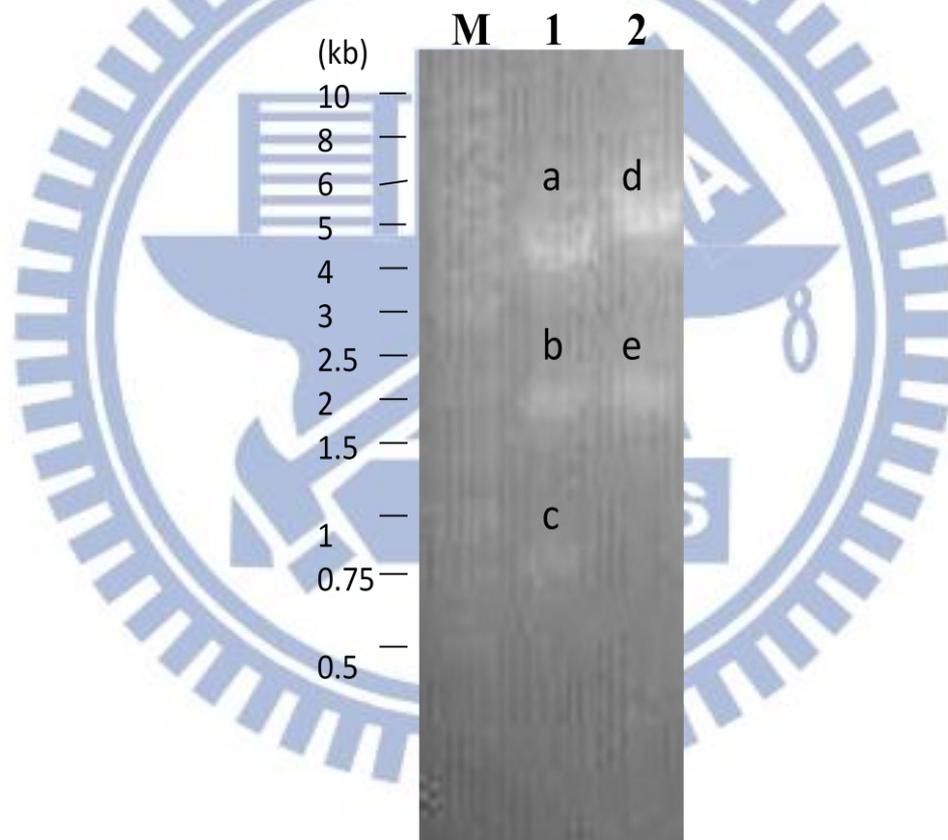
圖十六(A)、pGEMT-SPACER1 經 *HincII* 與 *SacI*、*ClaI* 作用後，酵素作用位置圖



圖十六(B)、pGEMT-SPACER1 經 *HincII* 與 *SacI*、*ClaI* 作用後，所得電泳分析圖
 pGEMT-SPACER1 經 *HincII* 與 *SacI*、*ClaI* 作用後，會得到 3115bp、1210 bp、624 bp 的片段 (band a, b, c) 與 3496 bp、1179 bp、674 bp 的片段 (band d, e, f)。
 Lane 1 : pGEMT- SPACER1 經酵素 *HincII* 作用後，所得電泳分析圖。
 Lane 2 : pGEMT- SPACER1 經酵素 *SacI*、*ClaI* 作用後，所得電泳分析圖。
 Lane M 表示 DNA size marker 。



圖十七(A)、pGEMT-SPACER2 經 *XcmI* 與 *AfeI* 酵素作用後，酵素作用位置圖



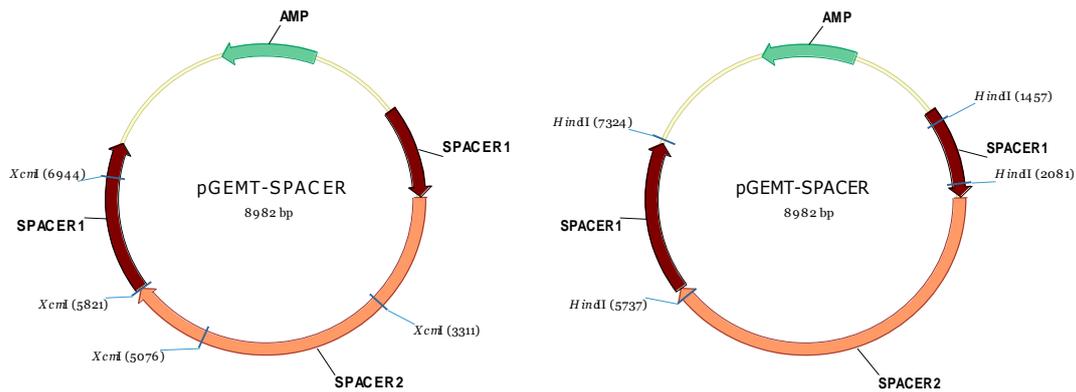
圖十七(B)、pGEMT-SPACER2 經 *XcmI* 與 *AfeI* 酵素作用後，所得電泳分析圖

pGEMT- SPACER2 經 *XcmI* 與 *AfeI* 作用後，會得到 4129bp、1765bp、745bp 的片段(band a, b, c) 與 4847bp、1765bp 的片段 (band d, e)。

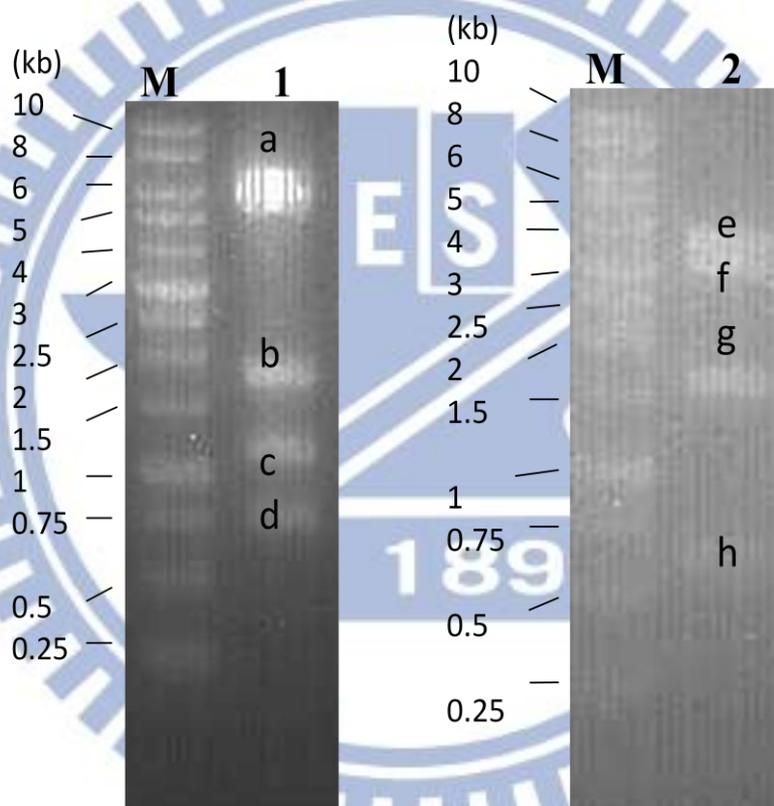
Lane 1 : pGEMT-SPACER2 經 *XcmI* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pGEMT-SPACER2 經 *AfeI* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker 。



圖十八(A)、pGEMT-SPACER 經 *XcmI* 與 *HincII* 作用後，酵素作用位置圖

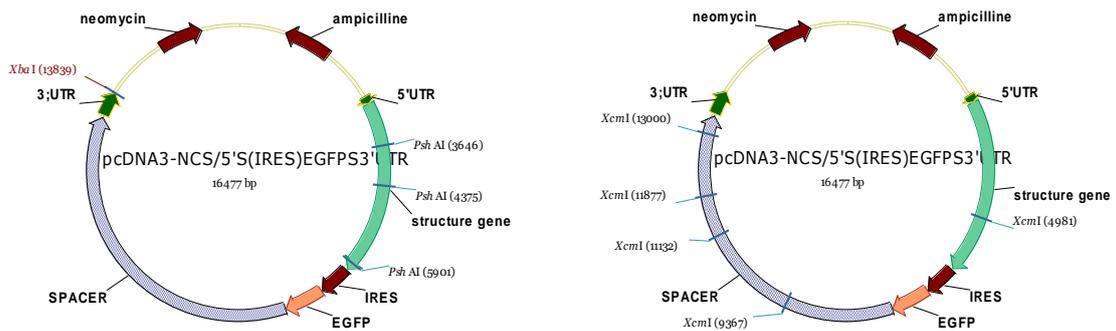


圖十八(B)、pGEMT-SPACER 經 *XcmI* 與 *HincII* 作用後，所得電泳分析圖
 pGEMT- SPACER 經 *XcmI* 與 *HincII* 作用後，會得到 5349 bp、1765 bp、1123 bp、746 bp 的片段 (band a, b, c, d) 與 3656 bp、3115 bp、1587 bp、624 bp 的片段 (band e, f, g, h)。

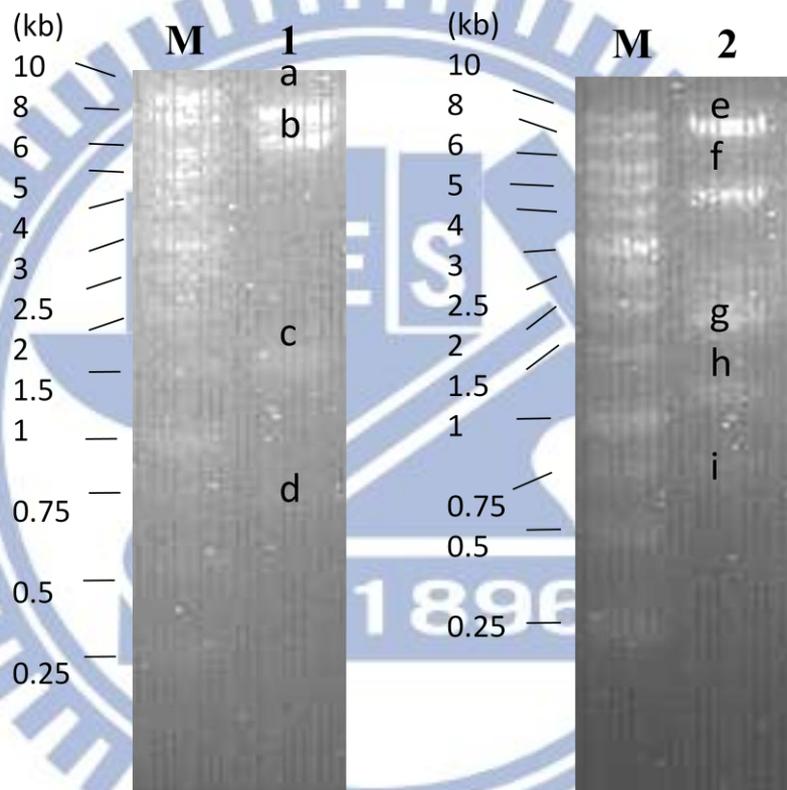
Lane 1 : pGEMT-SPACER2 經 *XcmI* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pGEMT-SPACER2 經 *HincII* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker。



圖十九(A)、pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 *PshAI*、*XbaI* 與 *XcmI* 酵素作用後，酵素作用位置圖



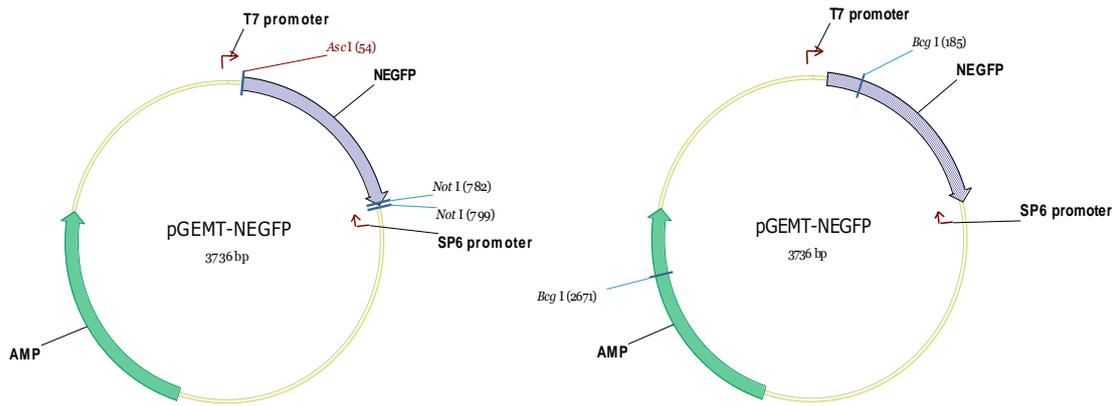
圖十九 (B)、pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 *PshAI*、*XbaI* 與 *XcmI* 酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 *PshAI*、*XbaI* 與 *XcmI* 作用後會得到 7938 bp、6284 bp、1526 bp、729 bp 的片段(band a, b, c, d)與 8458 bp、4386 bp、1765 bp、1123 bp、745 bp 的片段(band e, f, g, h, i)。

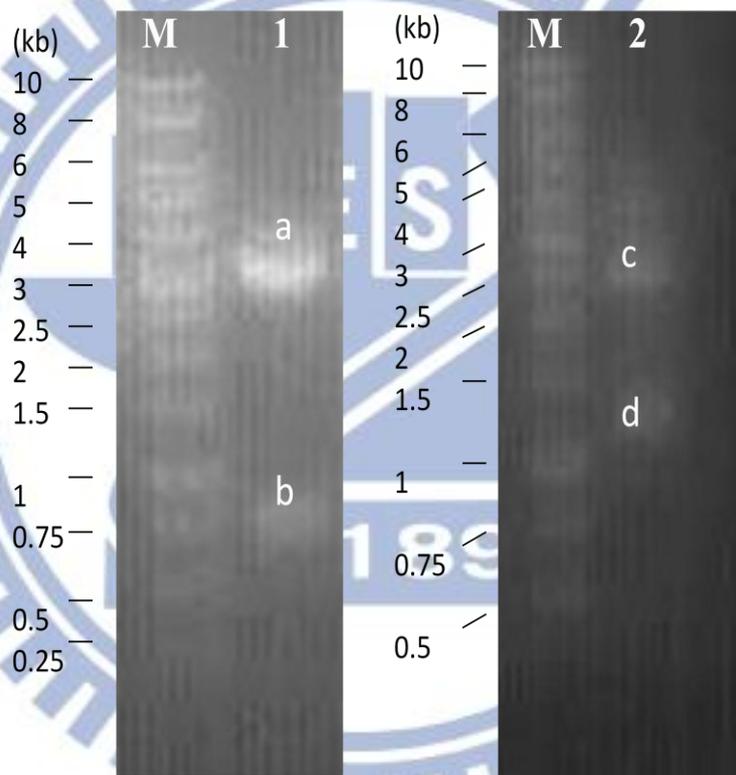
Lane 1 : pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 *PshAI*、*XbaI* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pcDNA3-NCS5'S(IRES)EGFPS3'UTR 經 *XcmI* 酵素作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker 。



圖二十 (A)、pGEMT-NEGFP 經 *AscI*、*NotI* 與 *BcgI* 作用後，酵素作用位置圖



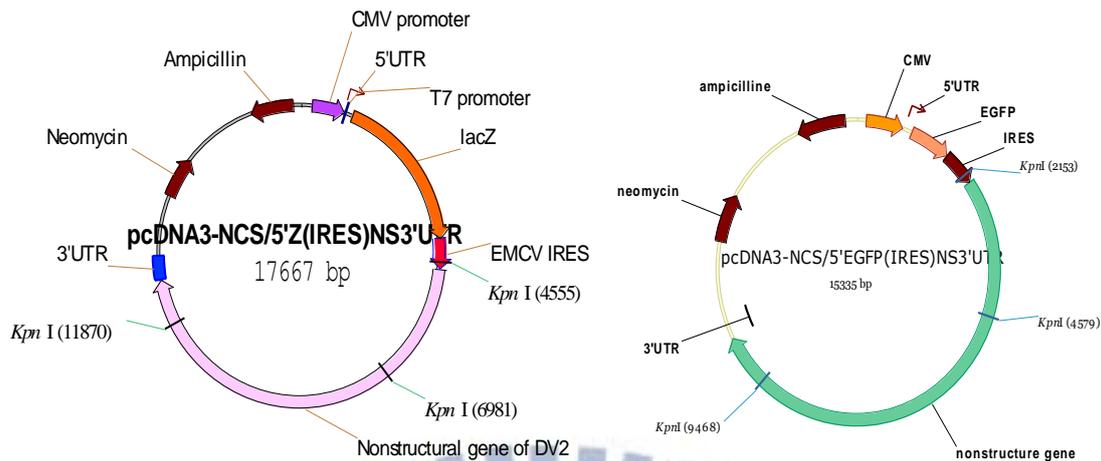
圖二十(B)、pGEMT-NEGFP 經 *AscI*、*NotI* 與 *BcgI* 作用後，所得電泳分析圖

pGEMT-NEGFP 經 *AscI*、*NotI* 與 *BcgI* 作用後，會得到 3008 bp、736 bp 的片段(band a, b) 與 2486 bp、1250 bp (band c, d)。

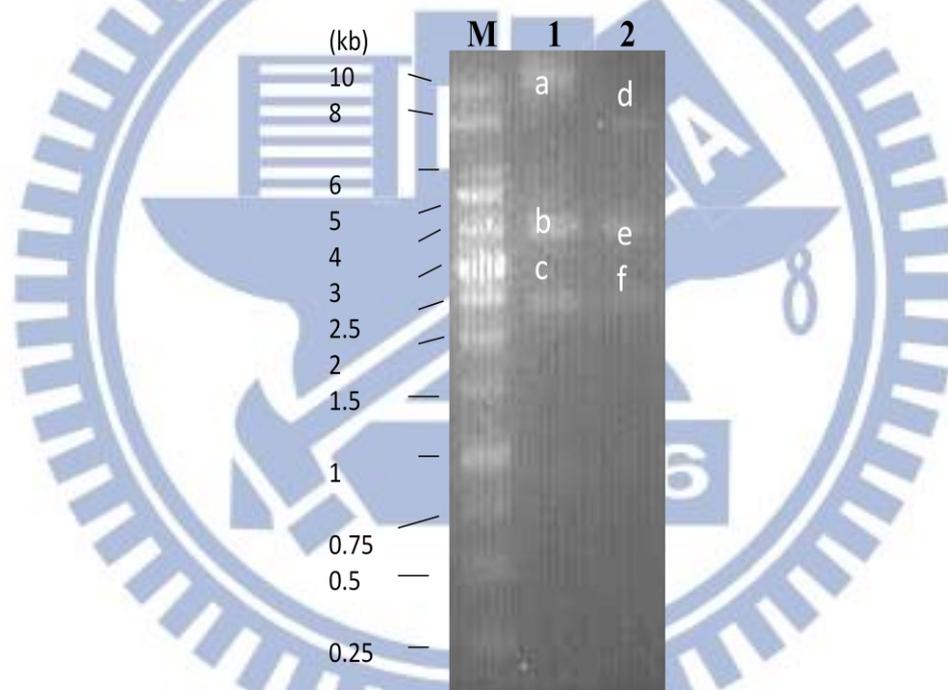
Lane 1 : pGEMT-NEGFP 經 *AscI*、*NotI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pGEMT-NEGFP 經 *BcgI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker 。



圖二十一 (A)、pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 與其原先 vector : pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 作用後，酵素作用位置圖



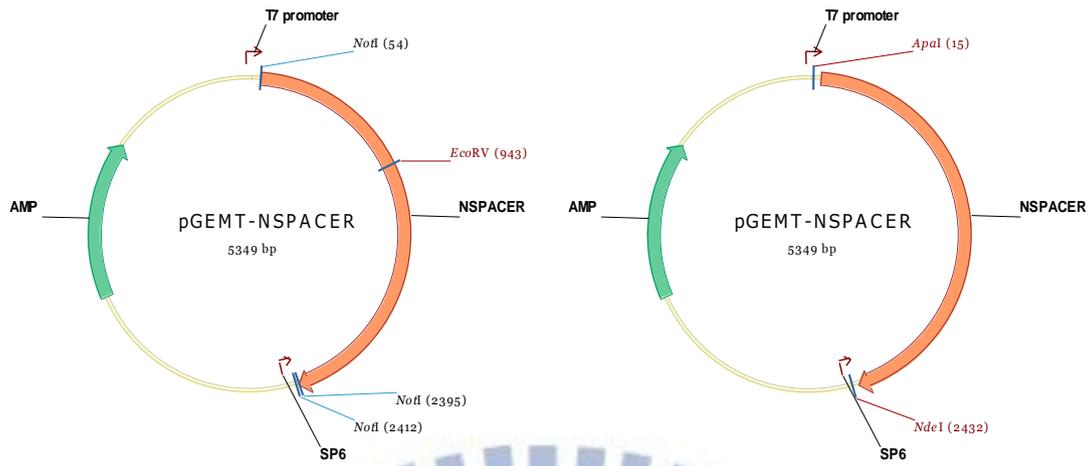
圖二十一(B)、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 與其原先 vector : pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 切割後會得到 10352 bp、4889 bp、2426 bp (band a, b, c) 的片段。pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 切割後會得到 8020bp、4889bp、2398bp 的片段 (band d, e, f)。

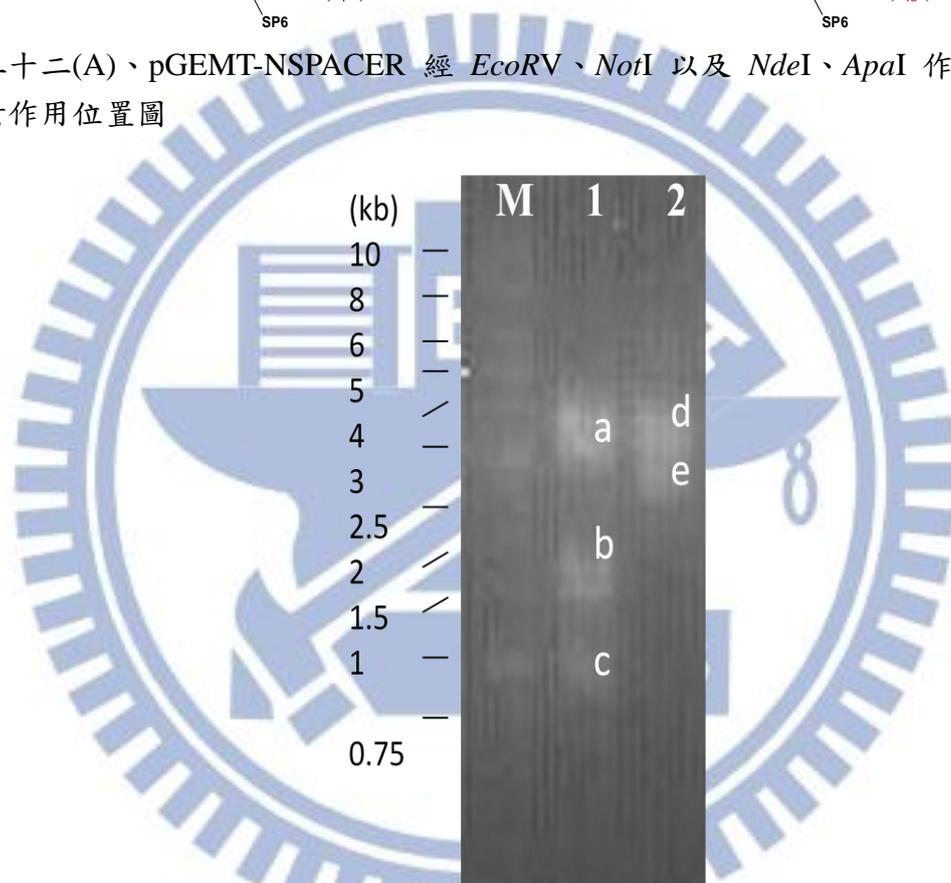
Lane 1 : pcDNA3-NCS5'Z(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 作用後，所得電泳分析圖

Lane 2 : pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NS3'UTR 經 *KpnI* 作用後，所得電泳分析圖

Lane M 表示 DNA size marker。



圖二十二(A)、pGEMT-NSPACER 經 *EcoRV*、*NotI* 以及 *NdeI*、*ApaI* 作用後，
 酵素作用位置圖



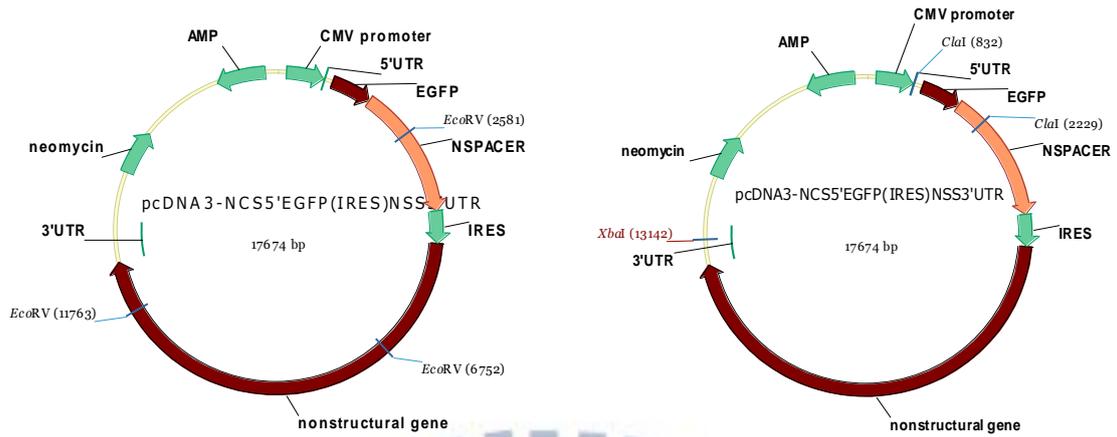
圖二十二(B)、pGEMT-NSPACER 經 *EcoRV*、*NotI* 以及 *NdeI*、*ApaI* 作用後，
 所得電泳分析圖

pGEMT-NSPACER 經 *EcoRI*、*NotI* 以及 *NdeI*、*ApaI* 切割後會得到 3008 bp、
 1452 bp、889 bp (band a, b, c) 以及 2932 bp、2417 bp (band d, e) 的片段。

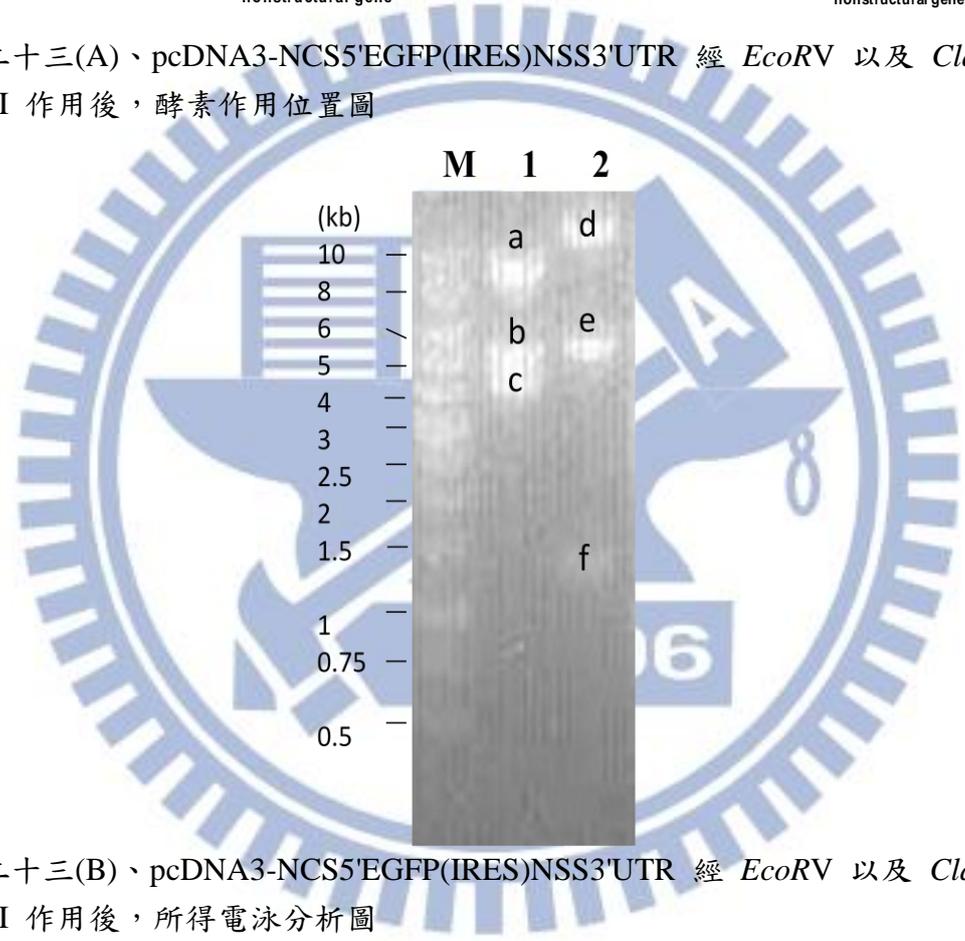
Lane 1 : pGEMT-NSPACER 經 *EcoRI*、*NotI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pGEMT-NSPACER 經 *NdeI*、*ApaI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker 。



圖二十三(A)、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經 *EcoRV* 以及 *ClaI* 、*XbaI* 作用後，酵素作用位置圖



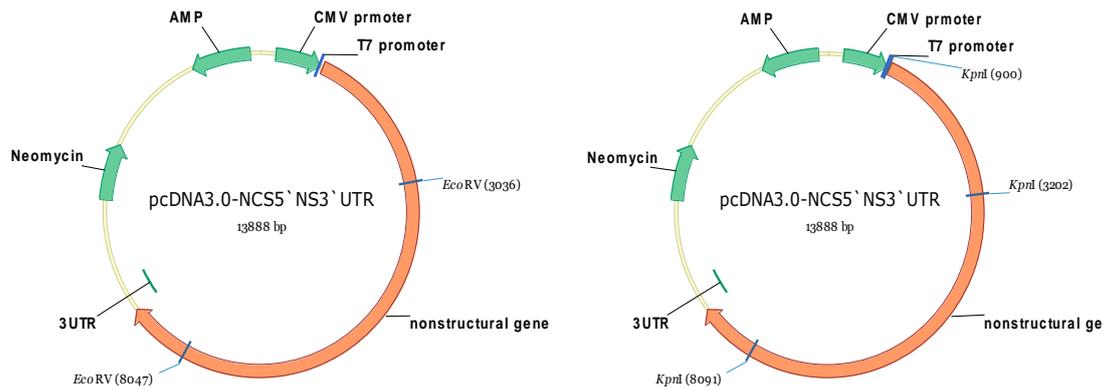
圖二十三(B)、pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經 *EcoRV* 以及 *ClaI* 、*XbaI* 作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經酵素 *EcoRV* 以及 *ClaI* 、*XbaI* 切割後會得到 8492 bp、5011 bp、4171 bp (a, b, c) 以及 13913 bp、5364 bp、1097 bp (d, e, f) 的片段。

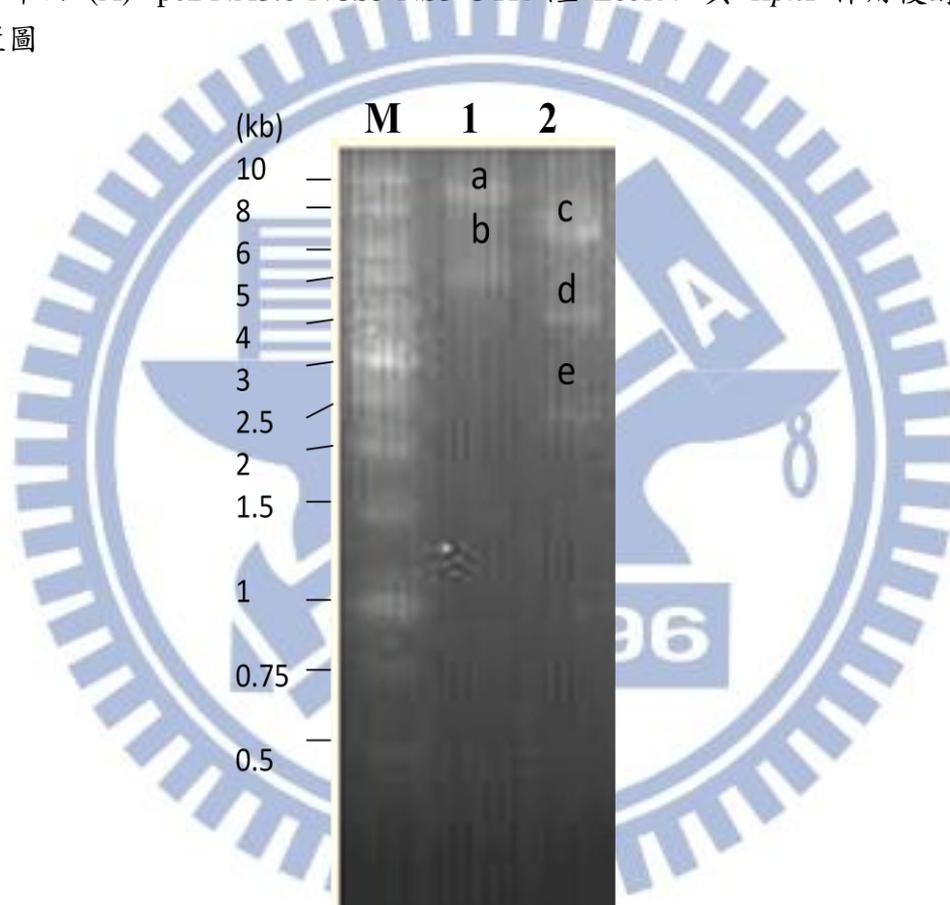
Lane 1 : pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經 *EcoRV* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pcDNA3-NCS5'EGFP(IRES)NSS3'UTR 經 *ClaI* 、*XbaI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marker 。



圖二十四 (A)、pcDNA3.0-NCS5' NS3' UTR 經 *EcoRV* 與 *KpnI* 作用後酵素作用位置圖



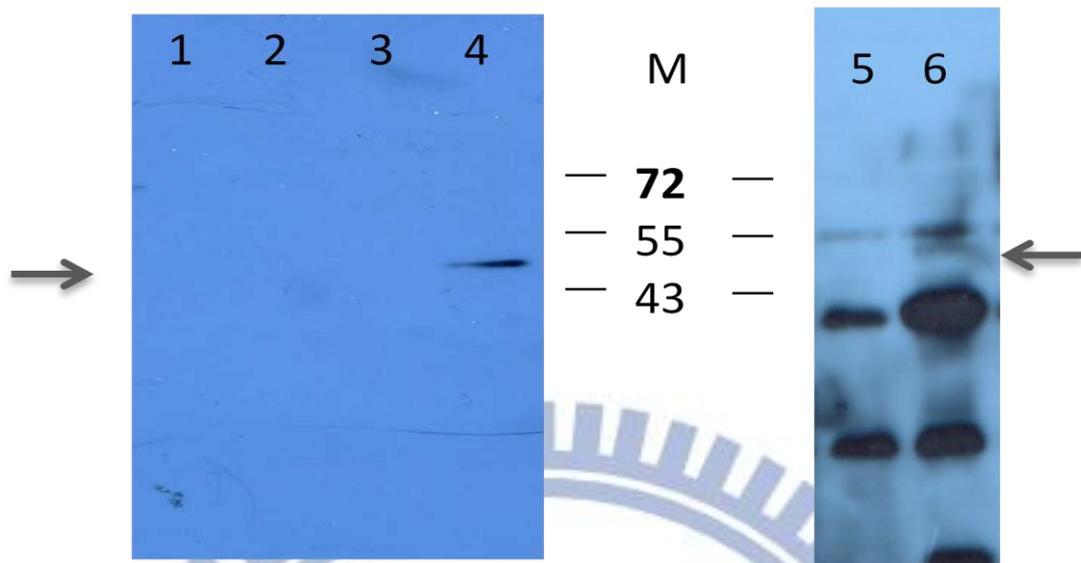
圖二十四 (B)、pcDNA3.0-NCS5' NS3' UTR 經 *EcoRV* 與 *KpnI* 作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3.0-NCS5' NS3' UTR 經 *EcoRV* 與 *KpnI* 切割後，會得到 8877 bp、5011 bp (band a, b) 與 6697 bp、4800 bp、2300 bp (band c, d, e) 的片段。

Lane 1 : pcDNA3.0-NCS5' NS3' UTR 經 *EcoRV* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : pcDNA3.0-NCS5' NS3' UTR 經 *KpnI* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane M 表示 DNA size marke 。



圖二十五、以 Western analysis 偵測 pStag9 在 *E.coli* BL21 中之表現。偵測用的抗體為 anti-Stag 與抗體 anti-E protein domain III blot 偵測

M : protein marker

Lane 1 : Western blot with anti-Stag 抗體 ; pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 2 : Western blot with anti-Stag 抗體 ; pStag9 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

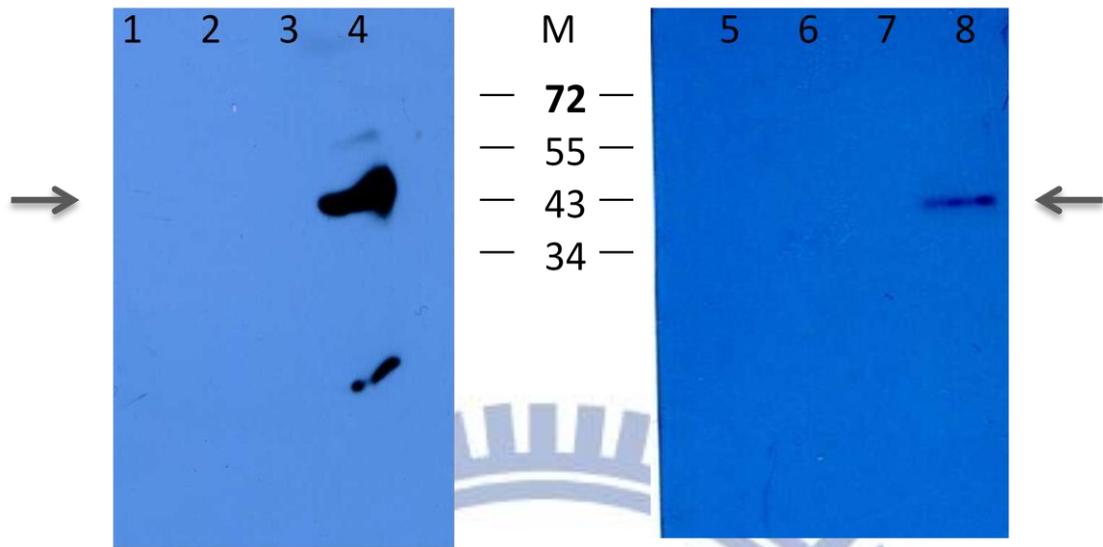
Lane 3 : Western blot with anti-Stag 抗體 ; pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

Lane 4 : Western blot with anti-Stag 抗體 ; pStag9 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

Lane 5: Western blot with anti-E protein domain III 抗體 ; pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

Lane 6 : Western blot with anti-E protein domain III 抗體 ; pStag9 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

pStag 預測大小是 53 kD



圖二十六、以 Western analysis 偵測 pKRY1 在 *E.coli* BL21 中之表現。偵測用的抗體為 anti-His 與抗體 anti-HA

M : protein marker

Lane 1 : Western blot with anti-HA 抗體； pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 2 : Western blot with anti-HA 抗體； pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 3 : Western blot with anti-HA 抗體； pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

Lane 4 : Western blot with anti-HA 抗體； pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

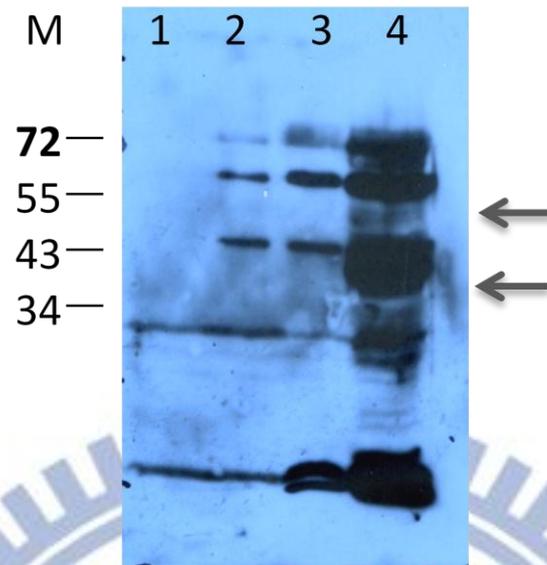
Lane 5: Western blot with anti-His 抗體； pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 6 : Western blot with anti-His 抗體； pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 7 : Western blot with anti-His 抗體； pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

Lane 8 : Western blot with anti-His 抗體； pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets 。

pKRY1 預測大小是 49 kD



圖二十七、以 Western analysis 偵測 pKRY1 在 *E.coli* BL21 中之表現。偵測用的抗體為 anti-E protein domain III

M : protein marker

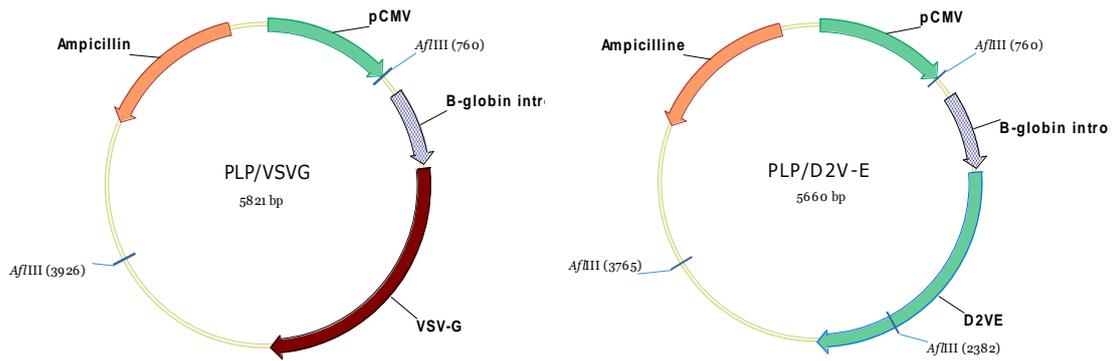
Lane 1 : Western blot with anti-E protein domain III 抗體；pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

Lane 2 : Western blot with anti-E protein domain III 抗體；pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其上清液。

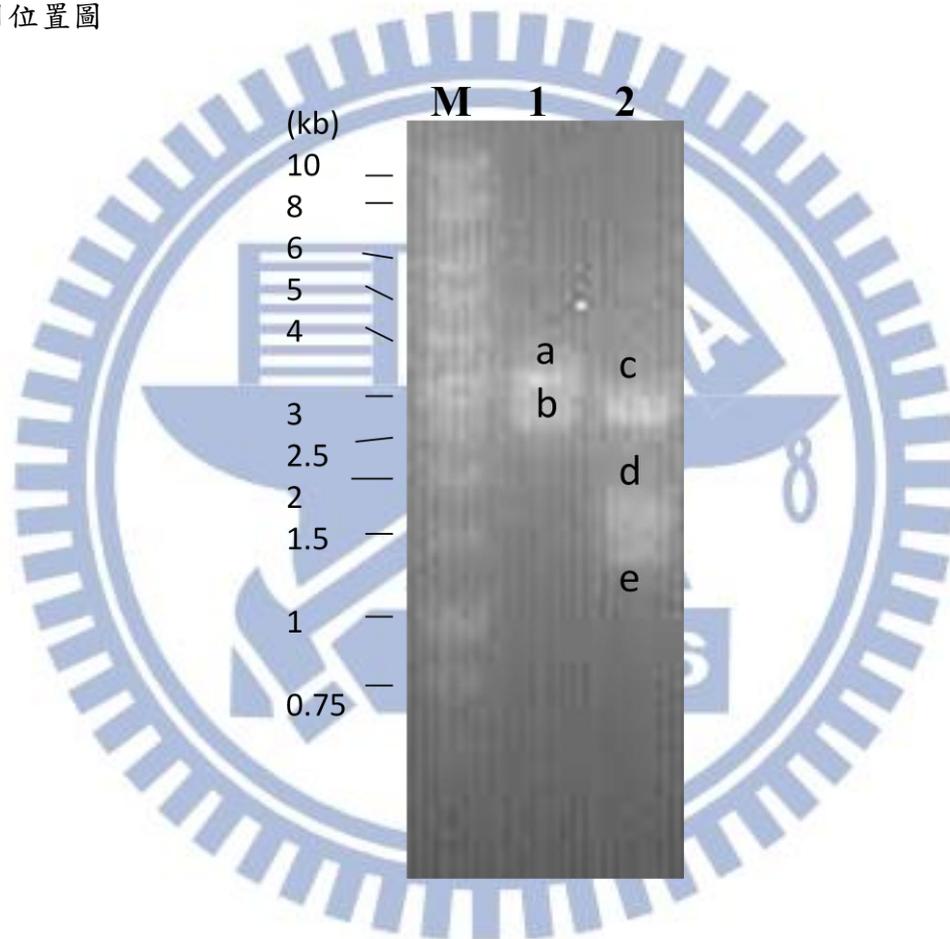
Lane 3 : Western blot with anti-E protein domain III 抗體；pcDNA3 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets。

Lane 4 : Western blot with anti-E protein domain III 抗體；pKRY1 transform 至 BL21 培養 24 小時後將 *E.coli* 打碎取其 pellets。

pKRY1 預測大小是 49 k



圖二十八(A)、PLP/D2VE 與其原先 vector : PLP/VSVG 經 *AflIII* 作用後，酵素作用位置圖



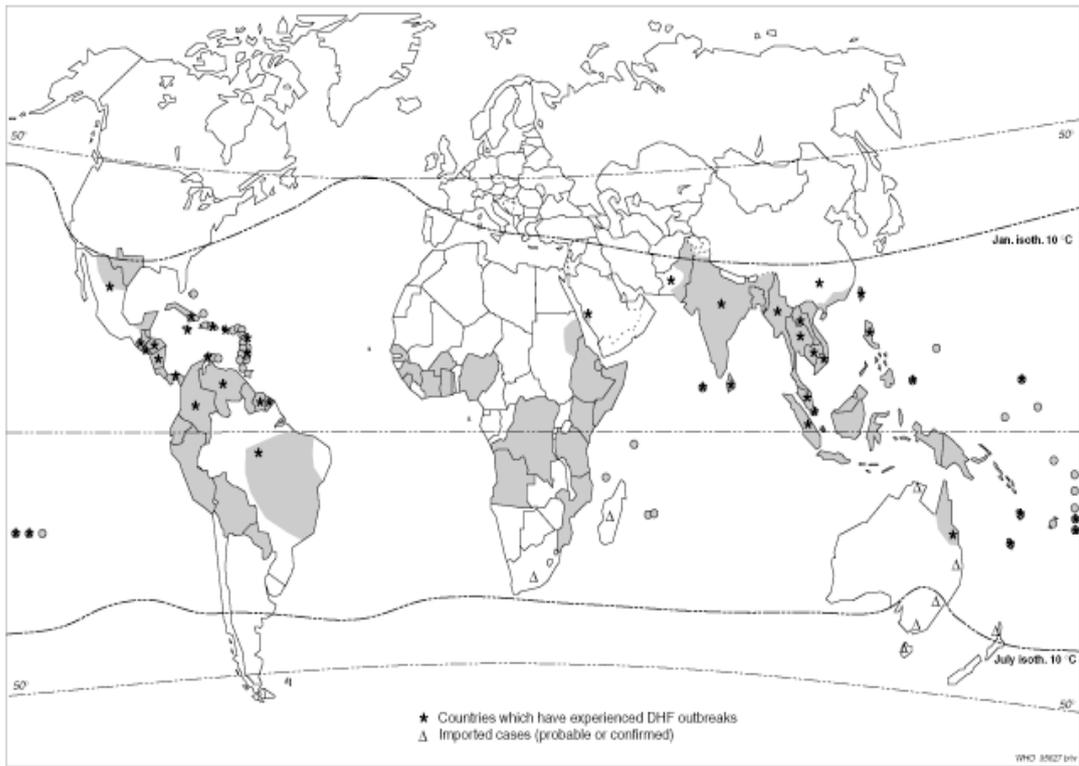
圖二十八(B)、PLP/D2VE 與其原先 vector : PLP/VSVG 經 *AflIII* 作用後，所得電泳分析圖

PLP/VSVG 經 *AflIII* 會得到 3166 bp、2155 bp 的片段 (band a, b) 。 PLP/D2VE 經 *AflIII* 會得到 2655 bp、1622 bp、1383 bp 的片段 (band c, d, e) 。

Lane 1 : PLP/VSVG 經 *AflIII* 作用後，所得電泳分析圖。

Lane 2 : PLP/D2VE 經 *AflIII* 作用後，所得電泳分析圖。

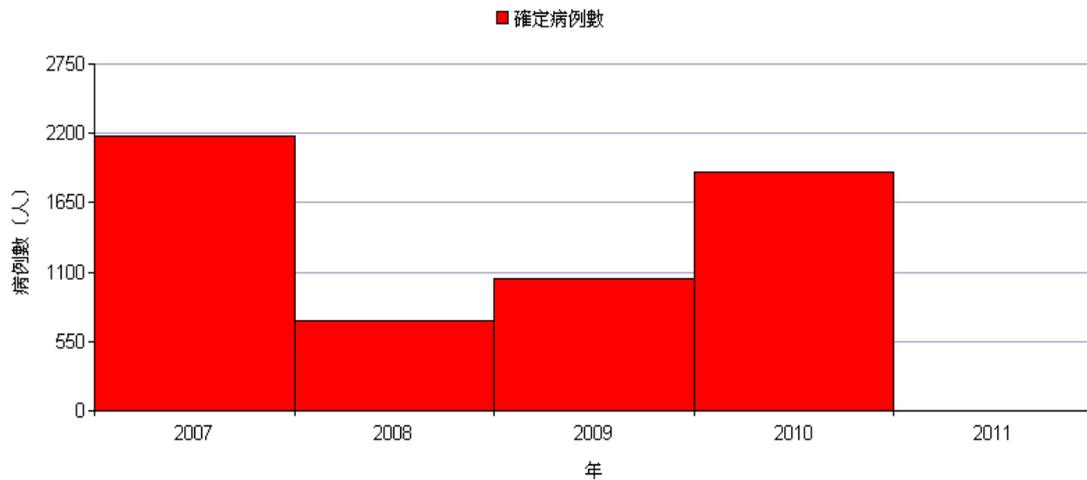
Lane M 表示 DNA size marker 。



Map 6.1 The general distribution of dengue fever and/or dengue haemorrhagic fever, 1975-1996

附錄一、登革熱傳播及其盛行地區,2008,WHO

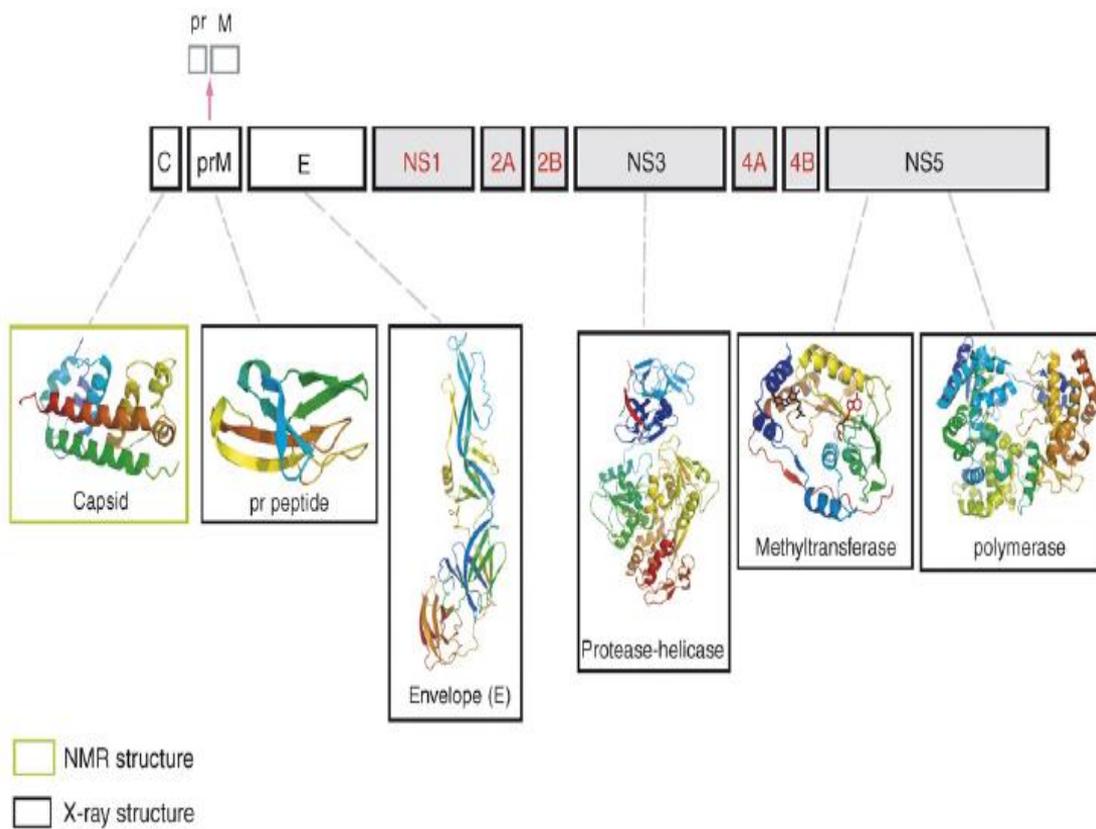
全國登革熱含本土及境外移入病例趨勢圖(2007/01/01~2011/1/10)



資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC 2011/1/11

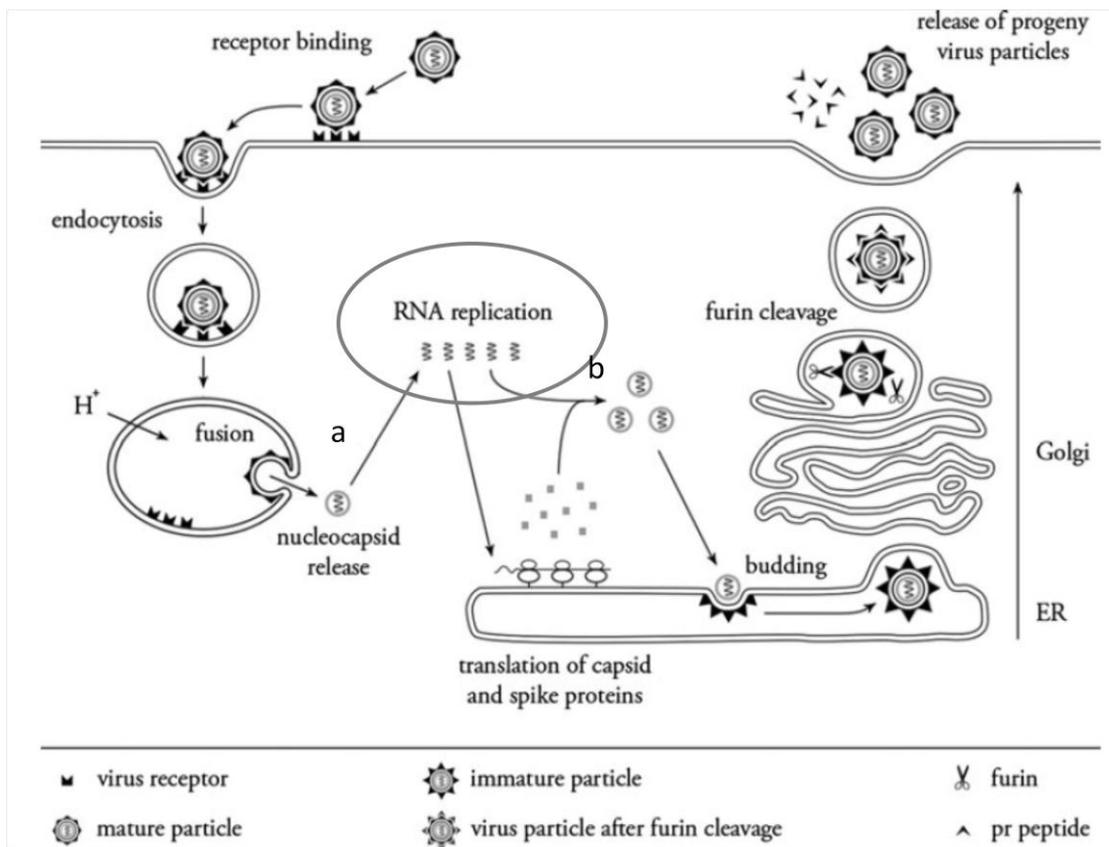
附錄二、行政院衛生署疾管局統計 2007-2010 年登革熱通報確定病

例



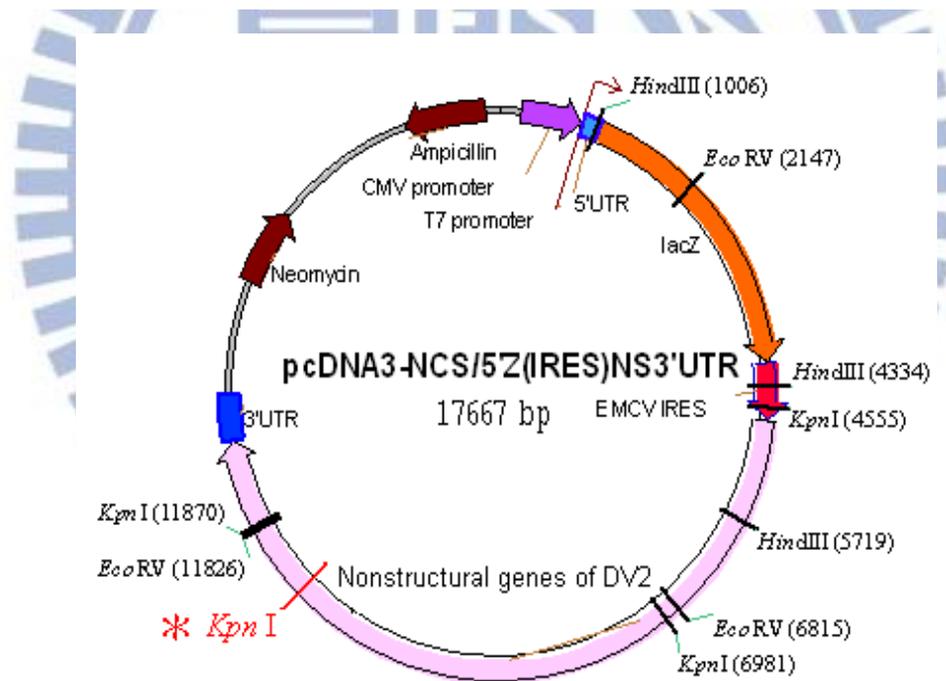
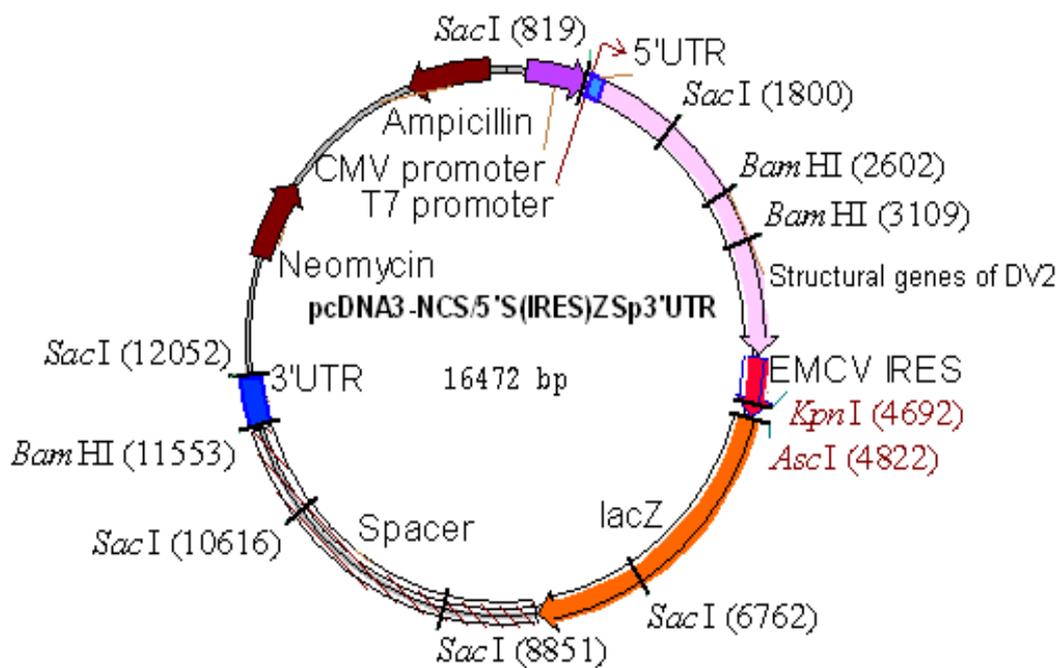
附錄三、登革熱病毒基因及其相對應蛋白質

(Rushika Perera and Richard J Kuhn, Structural proteomics of dengue virus, Current Opinion in Microbiology 2008, 11:369–377)



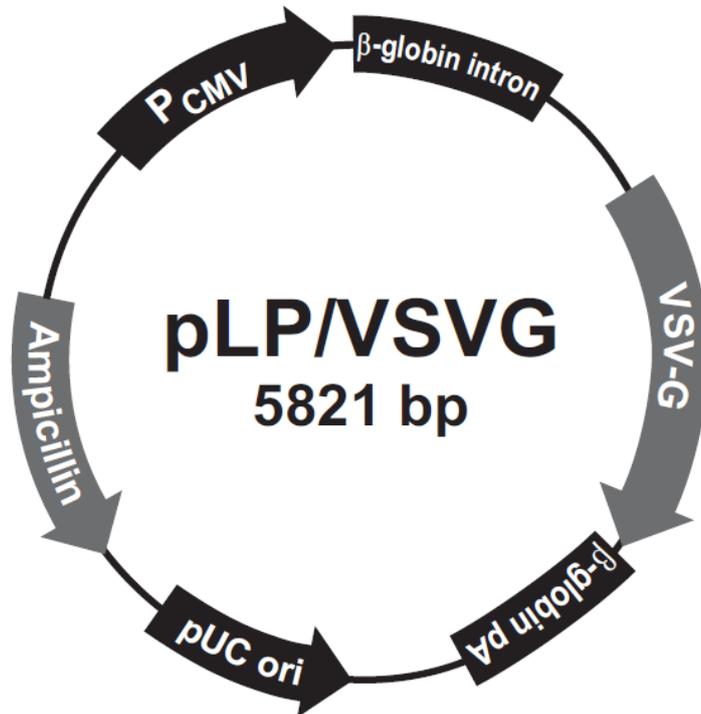
附錄四、登革熱病毒的生活史，packaging signal 的說明

(Izabela A. Rodenhuis-Zybert, Jan Wilschut, Jolanda M. Smit, Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity, Cell. Mol. Life Sci. , 2010 67:2773–2786)



附錄五、前人(賴建孝,2006)建構的結構/非結構基因質體，兩者皆以

LacZ 為其報導基因。



**Comments for pLP/VSVG
5821 nucleotides**

CMV promoter: bases 1-747

TATA box: bases 648-651

Human β -globin intron: bases 880-1320

VSV G glycoprotein (VSV-G): bases 1346-2881

Human β -globin polyadenylation signal: bases 3004-3769

pUC origin: bases 3927-4600 (C)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4745-5605 (C)

bla promoter: bases 5606-5704 (C)

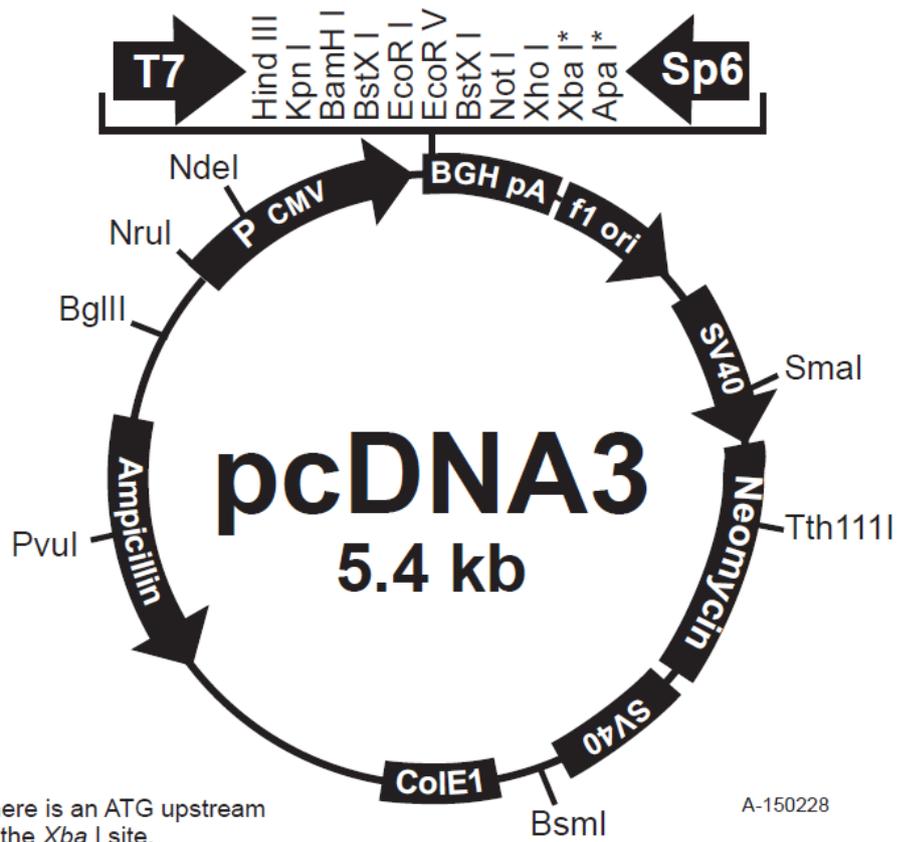
C=complementary strand

附錄六、PLP/VSVG 質體圖

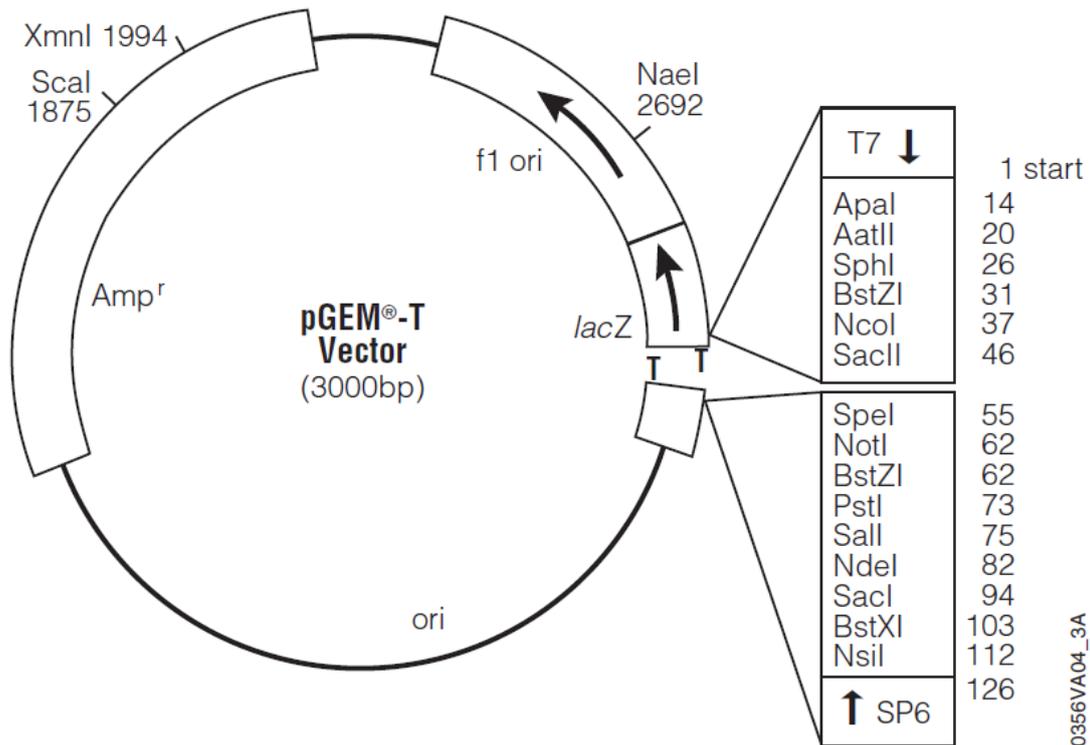
Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides



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



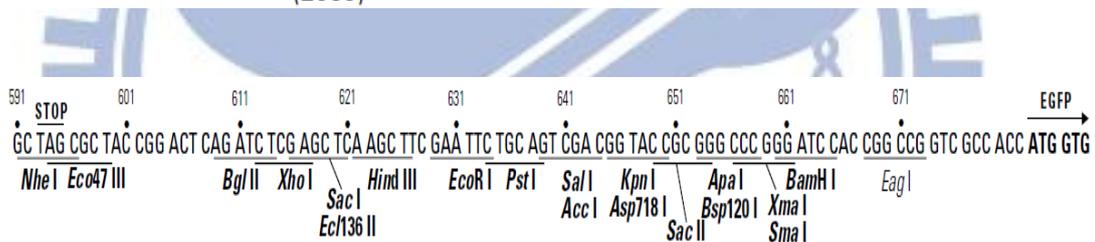
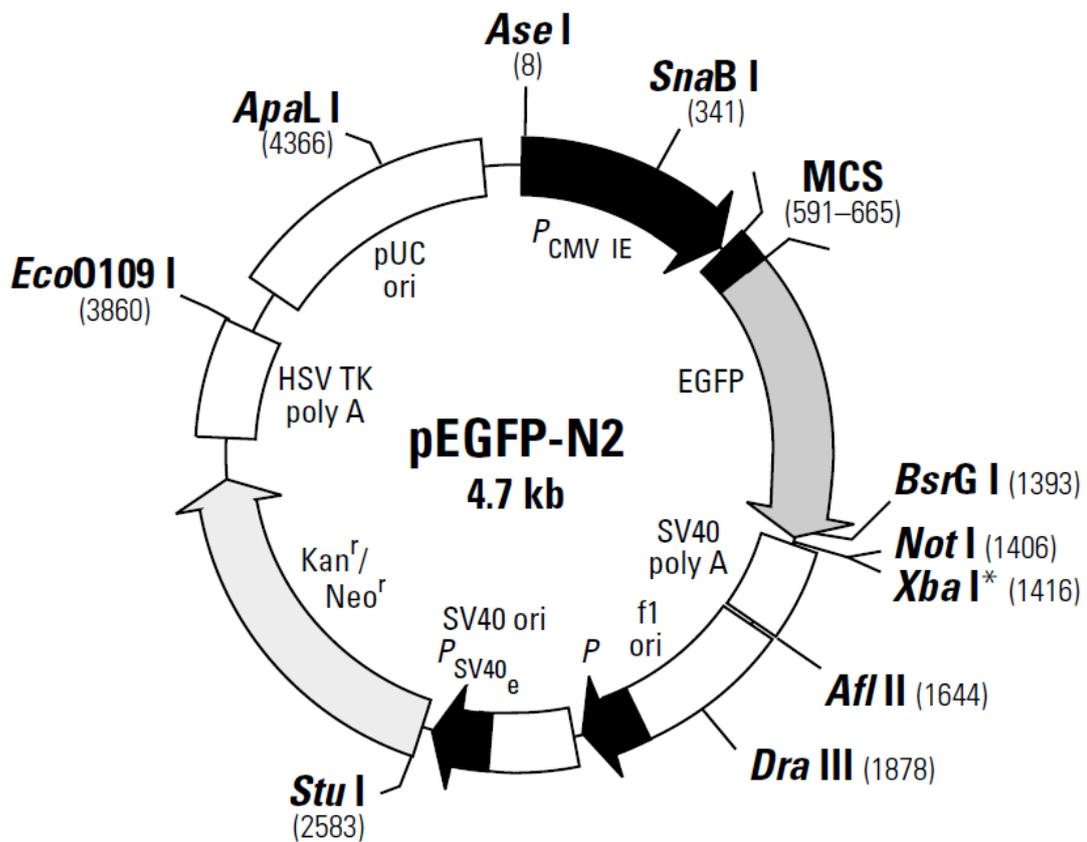
附錄七、pcDNA3 質體圖



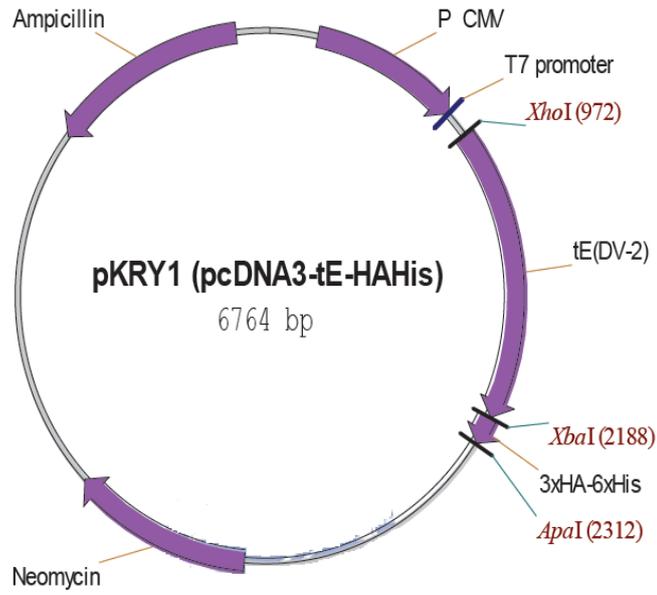
pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

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

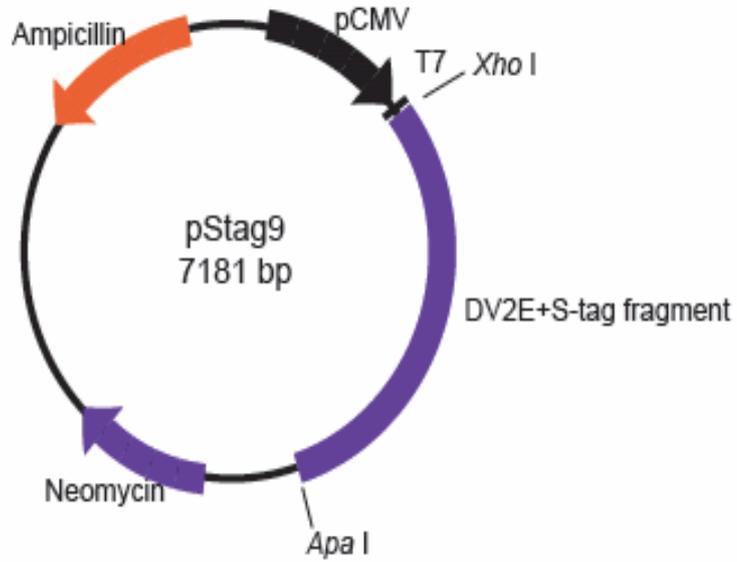
附錄八、pGEM-T 質體圖



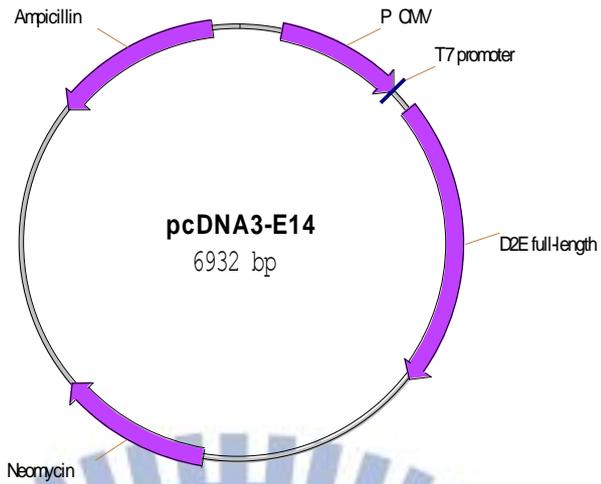
附錄九、pEGFP-N2 質體圖



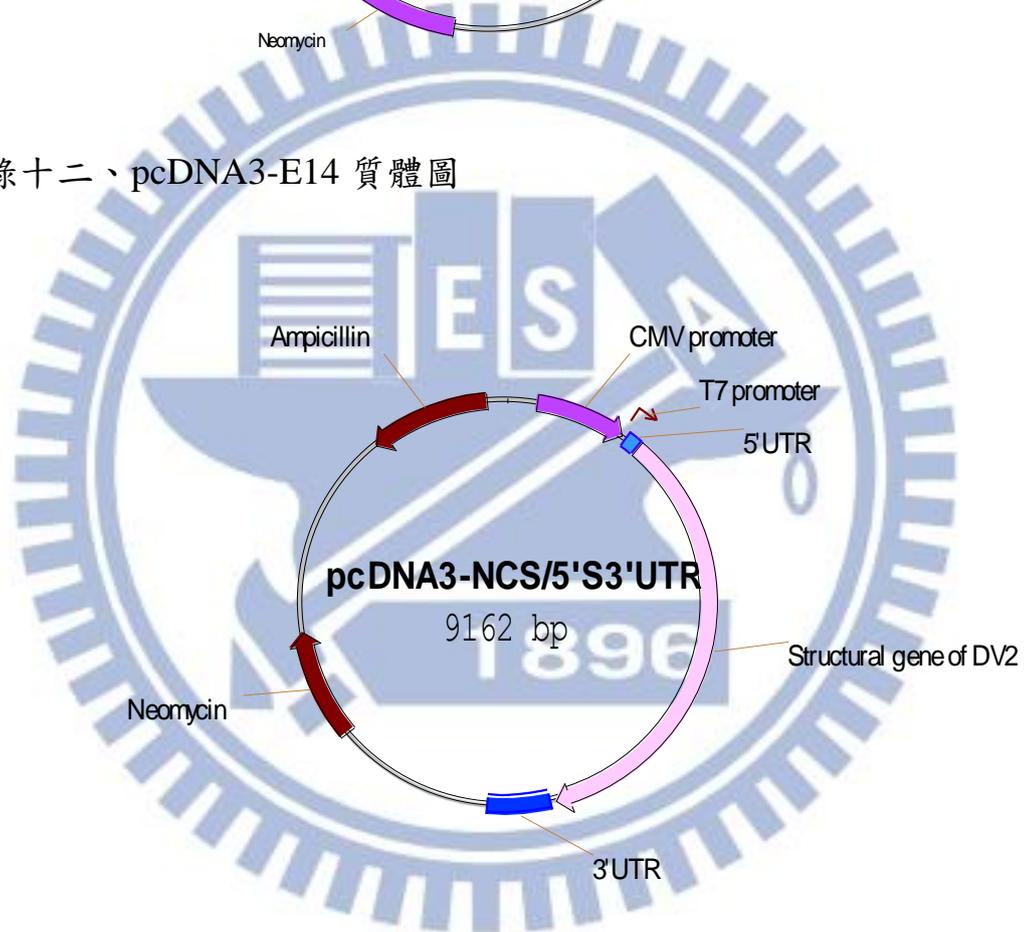
附錄十、pKRY1 質體圖



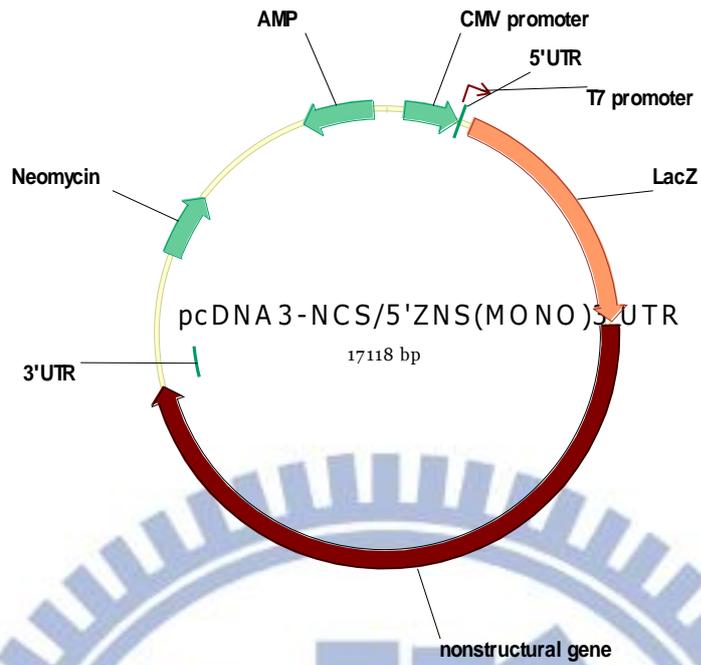
附錄十一、pStag9 質體圖



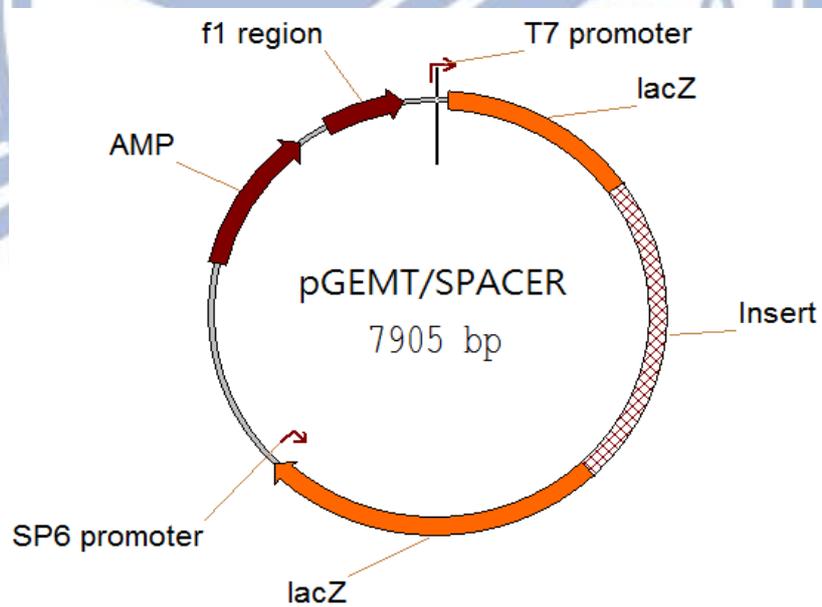
附錄十二、pcDNA3-E14 質體圖



附錄十三、pcDNA3-NCS5'S3'UTR 質體圖(賴建孝, 2006)



附錄十四、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 質體圖(賴建孝,2006)



附錄十五、pGEMT/SPACER 質體圖(賴建孝,2006)

Appendix B: Composition of Buffers

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

附錄十六、Qiagen midi kit 內的 buffer 成分