

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

建構 RNAi 表現質體用於抑制登革熱病毒 NS2 及
NS4

Construction of RNAi plasmids for targeting dengue
virus NS2 and NS4

研 究 生：林重延

指導教授：楊昀良 博士

中 華 民 國 一 百 年 九 月

建構 RNAi 表現質體用於抑制登革熱病毒 NS2 及
NS4

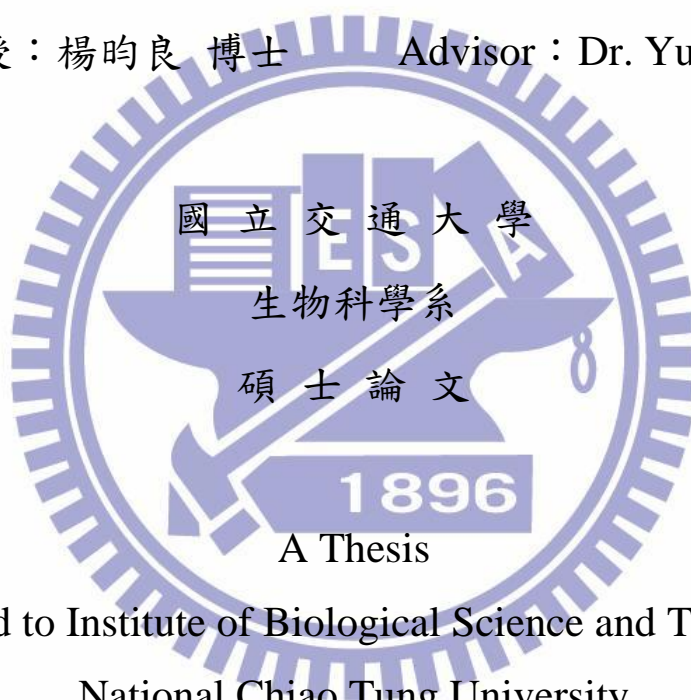
Construction of RNAi plasmids for targeting dengue
virus NS2 and NS4

研 究 生：林重延

Student：Chong-Yan Lin

指導教授：楊昀良 博士

Advisor：Dr. Yun-Liang Yang



Submitted to Institute of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master

in

Biological Science and Technology

September 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中 華 民 國 一 百 年 九 月

建構 RNAi 表現質體用於抑制登革熱病毒 NS2 及 NS4

研究生：林重延

指導老師：楊昀良 博士

國立交通大學生物科技學系

中文摘要

登革熱是由蚊子傳播的疾病，主要分布在熱帶與亞熱帶地區。全球大約有 25 億人口生活在病毒傳播疫區，超過 100 個國家有爆發過登革熱。因此，對於登革熱的治療與預防成為目前的重要議題。登革熱屬於黃質病毒科。其病毒基因是由全長 10.7kb 的單股正形 RNA 組成。病毒 RNA 利用單一開放式讀架(open reading fragment)轉譯出三個結構蛋白(C, prM and E)及七個非結構蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)。除了 NS2B/NS3 (protease)與 NS5 (RNA-dependent RNA polymerases; RdRp)的酵素功能較明確，其他病毒蛋白在病毒複製與致病機制中扮演的角色則不是非常明確。最近一些研究，推測 NS2A、NS2B、NS4A 及 NS4B 可能與參與病毒複製及造成感染後細胞膜重組有關。為了解這四個病毒基因在病毒複製過程中的功能，本研究嘗試用 RNA 干擾(RNA interference, RNAi)的方式降低調控病毒複製。在本研究中利用六個 siRNA 設計平台軟體針對病毒基因預測具有潛力的 siRNAs (small interfering RNAs)，取其交集的結果，建構表現 siRNA 的質體並在 BHK-21 細胞中(baby hamster kidney cell)測試對於病毒複製的影響。在空斑試驗中，短暫性表現 siRNA 的細胞與穩定表現 siRNA 的細胞株皆沒有看到顯著降低複製的結果，表示利用綜合多個設計平台軟體預測出的 siRNA 無法有效地沉默病毒的複製。

Construction of RNAi plasmids for targeting dengue virus NS2 and NS4

Student : Chong-Yan Lin

Advisor : Yun-Liang Yang

Department of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract

Dengue viral infection is a mosquito-borne viral disease in the tropical and subtropical regions. Globally, 2.5 billion people live in over 100 endemic countries and areas where dengue viruses can be transmitted; therefore, the treatments and prevention to the disease become a imperative issue. Dengue virus is a member of the *Flaviviridae* family. The viral genome consists of a single-stranded, positive-sense RNA of 10.7 kb. The viral RNA encodes three structural proteins (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) in a single open-reading-frame. Except for enzymic activities contained within NS2B/NS3 (protease) and NS5 (RNA-dependent RNA polymerases; RdRp), the exact roles of the those proteins in virus replication and pathogenesis are not well defined. In recent studies, NS2A, NS2B, NS4A and NS4B are implicated in assisting viral RNA replication and inducing membrane alteration. In order to understand the functions of those four viral genes in the viral replication, I attempted to down regulate the replication of Dengue virus by the use of RNA interference (RNAi). In this study, I targeted those four viral genes with small interfering RNAs (siRNAs) selected by six siRNA design tools. The plasmids that expressed those siRNAs were constructed and tested in BHK-21 cel (baby hamster kidney cell) to determine the effect on dengue viral replication. According to the results of the plaque assays, there was no significant reduction of viral replication in the cells either transiently or stably expressing the siRNAs. This suggested that the siRNAs designed through combination of those siRNA design tools did not effectively silence the viral replication.

致謝

碩士的日子過去了，感謝所有幫助過的人。首先感謝指導教授楊昀良老師，印象最深是剛進實驗室時遇到設計實驗的難題，整晚出勉強的解決之道，隔天與老師討論後，小楊老師居然瞬間解決而且還改良了方法，當時覺得老師真厲害！。小楊老師總是不辭辛勞悉心教導，要求清晰表達及重視邏輯思考，使我學到如何處理問題，在碩士的日子裡成長許多。老師，謝謝您！另外，感謝黃兆祺老師及冷治湘老師擔任口試委員，不吝指導指論文不足之處，與老師們討論交談後獲益良多。謝謝老師們！

碩士的日子，感謝學長姐、同學、學弟妹們共同砥礪，因為你們讓研究生活變得絢麗多彩。感謝幫我送定序的惠菁學姐、做實驗超嚴謹的秀拔拔、從沒請我吃過提拉米蘇的提拉敏書學長、帥倒掉渣的酷哥學長、嫻靜溫柔的淑禎學姐、燈塔女王兼烏魚子看板娘的淑萍學姐、帶我入門細胞實驗，個性活潑的阿毛學姐、講話精闢卻熱人整理 protocol 給我的馨儀學姐、看起來很酷其實個性很單純的小倩學姐，感謝教我 PCR 基本知識、一整霸氣護體的大姐大的佳禎學姐，感謝學長姐們指出研究中的缺失，在迷惘時為我解惑。另外，也感謝我的同學們，小楊家自稱最多項目”一姐”的優比、超易中韓國洗腦歌的毒，帶起 LAB 流行舞步的阿大，成為碩士生涯中最佳的夥伴。還有在 LAB 留下拖鞋當作足跡的愛喵同士助理蔡金吳。新一代 LAB 管家兼水電工的阿賢、高級美食 guideline 及外務公關的凱薩、LAB 電腦工程技師兼論文寫程式順利的春榮、三不五時實驗做一做會人來瘋「阿~~~」的幸璇、也幫我送定序兼好市多卡長及”很小隻”善人的小善、寵物鼠小啾的媽阿白、常幫我代領早餐兼受我的搞怪荼毒的小氣，有學弟妹們的幫忙及搞笑銘感在心。最後還有細胞室新人的游青、個性乖直的克威、台南鄉民的昇樺、做事要求完美的子喬，學弟妹們為 LAB 注入新血，加油！

還有貓女兒林媚妹總是在背後努力用睡覺支持我，在我累的時候給我來個提神一抓。最後，謹以此文獻給我摯愛的家人、爸爸、媽媽跟妹妹，人力物力的支持，感謝他們的關心與鼓勵。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
附錄目錄.....	x
縮寫表.....	xi
壹、緒論.....	1
1.1 登革熱概論.....	1
1.2 登革熱的臨床病徵.....	2
1.3 登革熱病毒分子生物學背景.....	2
1.4 日本腦炎與日本腦炎病毒概論.....	5
1.5 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 概論.....	6
1.6 RNAi 作用機制.....	7
1.7 RNAi 在哺乳細胞表現系統.....	8
1.8 shRNA Expressing Vector 設計.....	9
1.9 學生 t-檢定 (Student's t-test) 與變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 之統計分析介紹.....	10
1.10 Flavivirus 相關之 RNAi 研究.....	11
1.11 實驗目的與設計.....	12
貳、材料.....	13
2.1 菌株.....	13
2.2 細胞株.....	13

2.3 病毒.....	13
2.4 質體.....	14
2.5 引子(Primer).....	15
2.6 藥品試劑.....	16
2.7 試劑組.....	19
2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基.....	20
2.9 儀器設備.....	21
參、方法.....	23
3.1 質體建構.....	23
3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備.....	23
3.1.2 大腸桿菌勝任細胞的轉形.....	23
3.1.3 小量質體 DNA 萃取.....	23
3.1.4 限制酶反應.....	24
3.1.5 聚丙烯酰胺凝膠電泳.....	24
3.1.6 萃取聚丙烯酰胺凝膠內之小片段 DNA.....	25
3.1.7 聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR).....	26
3.1.8 PCR 產物純化.....	26
3.1.9 去磷酸反應.....	26
3.1.10 接合反應(Ligation).....	27
3.2 細胞實驗.....	27
3.2.1 BHK-21 細胞繼代培養.....	27
3.2.2 C6/36 細胞繼代培養.....	27
3.2.3 登革熱病毒的增殖.....	28
3.2.4 日本腦炎病毒的增殖.....	28
3.2.5 BHK-21 細胞轉染.....	29

3.2.6 BHK-21 穩定細胞株選殖.....	29
3.2.7 空斑試驗(短暫性質體轉染細胞組).....	30
3.2.8 空斑試驗(穩定細胞株組).....	30
3.3 小分子 RNA (small RNA) 檢測.....	31
3.3.1 小分子 RNA(small RNA)的萃取.....	31
3.3.1.1 細胞均質化.....	31
3.3.1.2 有機萃取.....	31
3.3.1.3 小分子 RNA 萃取.....	31
3.3.2 北方墨點法(Northern Blotting)偵測小分子 RNA.....	32
3.3.2.1 變性聚丙烯酰胺凝膠電泳.....	32
3.3.2.2 轉漬 RNA.....	33
3.3.2.3 雜交反應.....	33
3.3.2.4 免疫偵測.....	34
肆、結果.....	35
4.1 pSilencer 系列質體建構與定序分析.....	35
4.2 pDsRed-pS. 系列質體建構與定序分析.....	35
4.3 BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後之空斑試驗測試....	36
4.4 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之挑選.....	38
4.5 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑試驗測試...	38
4.6 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小片 段 RNA 之表現.....	40
伍、討論.....	42
5.1 DV2 基因體、JEV 基因體的分析.....	42
5.2 質體短暫性轉染與穩定株細胞之空斑試驗的分析.....	42
5.3 小分子 RNA 之偵測分析.....	44

陸、結論.....	46
柒、參考文獻.....	47



表目錄

表一、DV2 PL046 與 JEV RP9 的 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 之核苷酸相同率.....	52
表二、shRNA Expression Vector 上 shRNA 片段的設計平台軟體及設計 siRNA 之結果.....	53
表三、登革熱病毒 (DV2) 全長基因體以及在目標基因上設計 siRNA 的位置.....	54
表四、日本腦炎 (JEV) 全長基因體示圖.....	55
表五、日本腦炎 (JEV) 全長基因體與針對登革熱病毒 (DV2) 全長基因體設計之 siRNA 之序列比對圖.....	56
表六、pSilencer-SiNS2A-1 定序結果.....	57
表七、pSilencer-SiNS2B-1 定序結果.....	58
表八、pSilencer-SiNS4A-1 定序結果.....	59
表九、pSilencer-SiNS4B-1 定序結果.....	60
表十、pDsRed-pS.-siNC 定序結果.....	61
表十一、pDsRed-pS.-SiNS2A-1 定序結果.....	62
表十二、pDsRed-pS.-SiNS2B-1 定序結果.....	63
表十三、pDsRed-pS.-SiNS4A-1 定序結果.....	64
表十四、pDsRed-pS.-SiNS4B-1 定序結果.....	65
表十五、pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞株列單.....	66

圖目錄

圖一、pUC57-X13337G 質體圖.....	67
圖二、pSilencer shRNA Expression Vector 質體建構流程圖.....	68
圖三、pSilencer shRNA Expression Vector 質體結構及酵素位置圖.....	69
圖四、pDsRed - shRNA Expression Vector 質體建構流程圖.....	70
圖五、pDsRed - shRNA Expression Vector 質體結構及酵素位置圖.....	71
圖六、pDsRed - shRNA Expression Vector 經 <i>Nde</i> I 與 <i>Hind</i> III 限制酶作用後切電泳分析圖.....	73
圖七、BHK-21 對於 G418(Geneticin)不同濃度之細胞毒性.....	74
圖八、BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後細胞螢光與可見光圖及空斑圖.....	75
圖九、BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後之空斑試驗.....	77
圖十、pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞株培養於含 G418 的 5% FBS / MEM 之細胞觀察圖.....	78
圖十一、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑圖.....	83
圖十二、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑試驗....	84
圖十三、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNC 小分子 RNA.....	86
圖十四、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNS2A 小分子 RNA.....	87
圖十五、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNS4A 小分子 RNA.....	88
圖十六、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNC 小分子 RNA (Size marker: DNA primer-DIG, pS-shNCPB 注入膠孔洞量減半).....	89

附錄目錄

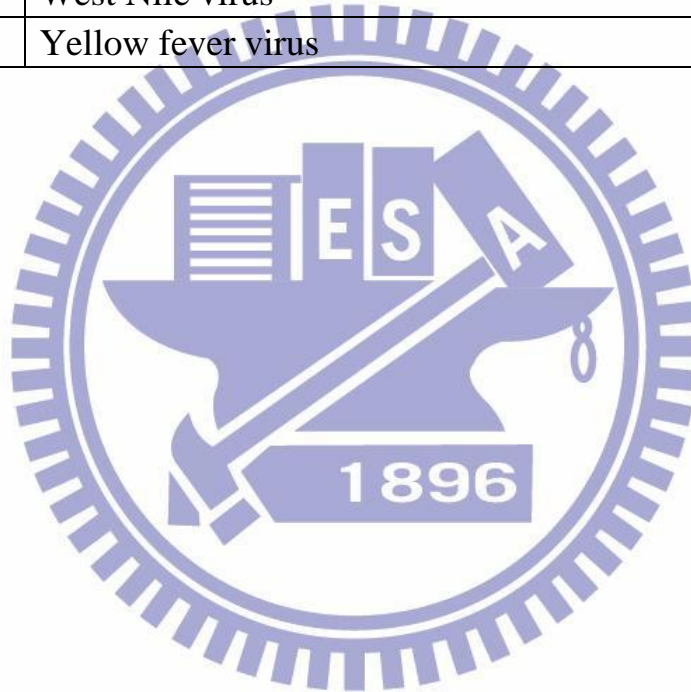
附錄一、登革熱疫情分布圖.....	90
附錄二、台灣早期登革熱流行情形.....	90
附錄三、1987 年至 2007 年台灣登革熱確定病例數.....	91
附錄四、2007 年至 2011 年 7 月台灣登革熱確定病例數.....	91
附錄五、登革熱病毒全長基因體與聚蛋白示意圖.....	92
附錄六、1970 年至 1998年日本腦炎疫情分布圖.....	93
附錄七、1998 年至 2007 年台灣日本腦炎確定病例數.....	93
附錄八、2007 年至 2011 年 8 月台灣日本腦炎確定病例數.....	94
附錄九、小干擾 RNA(Small interfering RNA, siRNA)結構圖.....	95
附錄十、RNA 干擾(RNA interference, RNAi)機制路徑圖.....	95
附錄十一、生物體開啟 siRNA pathway 的方法.....	96
附錄十二、shRNA Expression Vector 上 shRNA 片段之設計.....	97
附錄十三、DIG 北方墨點免疫偵測的原理.....	97
附錄十四、Locked nucleic acid(LNA)的結構圖.....	98
附錄十五、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 的結構圖.....	98

縮寫表

縮寫	全名
2', 5'-AS	2', 5'-oligoadenylate synthetase
AGO2	Argonaute 2
AP	Alkaline phosphatase
APS	Ammonium Persulfate
BHK-21	Baby hamster kidney cell
BSA	Bovine serum albumin
C protein	Capsid protein
CAT	Chloramphenicol acetyl transferase
CDC, Taiwan	Center for Disease Control, Taiwan
CDC, USA	Centers for Disease Control and Prevention, USA
CHS	chalcone synthase
CMV	Cytomegalovirus
CSPD	Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate
CPE	Cytopathic effect
DC-SIG	Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DF	Dengue fever
DHF	Dengue hemorrhagic fever
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	Double strand RNA
DSS	Dengue shock syndrome
DV	Dengue virus
E protein	Envelope protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid
eIF	eukaryotic Initiation Factor
EM	Immunoelectron microscopy
ER	Endoplasmic reticulum
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum

縮寫	全名
IFM	Confocal immunofluorescence microscopy
IFN	Interferon
ISRE	IFN-stimulated response element
JEV	Japanese encephalitis virus
KUNV	Kunjin virus
LB agar	Luria-Bertni agar
LB broth	Luria-Bertni broth
LNA	Locked nucleic acid
MEM	Minimun Essential Medium
miRNA	Micro RNA
MOI	Multiplicity of infection
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MTase	Methyltransferase
HA	Hemagglutinin tag
NS protein	Non-structural protein
NTpase	Nucleoside triphosphatase
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	Plaque-forming unit
PKR	dsRNA-dependent protein kinase
pre-miRNA	Precursor miRNA
pri-miRNA	Primary microRNA transcript
prM protein	Precursor membrane protein
PTGS	Post- transcriptional gene silencing
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RISC	RNA-inducing silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase P	Ribonuclease P
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA

縮寫	全名
SSC	Saline-sodium citrate
ssRNA	Single strand RNA
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEMED	N, N, N', N',-tetramethylenediamine
TGN	Trans Golgi network
Tris	Tris(Hydroxymethyl) aminomethane
UTR	Untranslated region
WHO	World Health Organization
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow fever virus



壹、緒論

1.1 登革熱概論

登革熱是感染登革熱病毒 (dengue virus, DV) 所引起的傳染病。研究顯示，藉由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 與白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 進行傳播，一般認為以人與病媒蚊間的傳播循環做為傳染途徑，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 (見附錄一)，流行季節為每年 8 ~ 12 月。全球大約有 25 億人口生活在病毒傳播疫區，超過 100 個國家有爆發過登革熱 (World Health Organization, WHO)。根據世界衛生組織 (WHO) 全世界每年高達 5000 萬的感染登革熱案例數，其中有 50 萬為登革出血熱 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 病例，2.2 萬為死亡病例。

據我國衛生署疾病管制局 (Center for Disease Control, Taiwan; CDC, Taiwan) 發布，登革熱分列第二類傳染病。於 1870 年起陸續有登革熱病例報告，於 1945 年為止，曾發生三次全島性登革熱大流行 (1915、1931、1942 年)，後於民國 40 年代的瘧疾防治時期大量撲殺病媒蚊，降低了登革熱的傳播。直到 1981 年在屏東縣琉球鄉爆發第二型登革熱疫情，當時全鄉約 80 % 的居民感染登革病毒 (見附錄二，Wu, 1986)。據 CDC, Taiwan 於 1987 至 2007 年登革熱確定病例數及 2007 至 2010 年登革熱確定病例數資料顯示，在 1988 與 2002 年又爆發大規模感染；2007 至 2010 年確定病例數的年平均為 1460.25 例，於 2008 年後有逐年增加的趨勢 (見附錄三、四)。

1.2 登革熱的臨床病徵

在臨床上，登革熱病毒依血清抗原性不同主要分為四個血清型(serotype : DV1, DV2, DV3, DV4)。當登革病毒隨病媒蚊唾液進入人體（潛伏期約 3 ~ 14 天，平均為 4 ~ 7 天，Kao *et al.*, 2005），後會出現病毒血症（viremia）並破壞組織。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）。

登革熱（DF）一般出現症狀有：發燒、頭痛、眼窩痛、肌肉關節痛、皮膚紅疹、白血球減少（leucopenia）等病徵（Nimmannitya, 1987），症狀發生後 3 ~ 7 天可自然痊癒。登革出血熱（DHF）早期出現的發燒症狀與 DF 類似，但由於血管內皮系統受到病毒感染之影響，造成血管通透性（capillary permeability）增加出現血漿滲出（plasma leakage）的現象。臨床上會併發水腫、血小板過低（thrombocytopenia，血小板濃度 $\leq 100,000 / \text{mm}^3$ ）、紅血球濃縮（hemoconcentration）、胸腔液滲出（pleural effusion）及產生腹水等現象（Kalayanarooj *et al.*, 1997），其中血小板過低（thrombocytopenia）是造成出血現象的原因（Huang, 2000）。當血漿滲出過多時，病患會出現皮膚濕冷、四肢冰涼、脈搏壓微弱（脈搏壓 $\leq 20 \text{ mmHg}$ ），進一步出現休克現象，即登革熱休克症候群（DSS, Kalayanarooj *et al.*, 1997）。若無及時給予適當輸液治療，死亡率可達到 10 ~ 15 %（Gubler, 2002）。

1.3 登革熱病毒分子生物學背景

登革熱病毒屬於黃質病毒科（*Flaviviridea*）黃質病毒屬（*Flavivirus*），同屬病毒有：日本腦炎病毒（Japanese encephalitis virus, JEV）、西尼羅病毒（West Nile virus, WNV）、黃熱病毒（Yellow fever virus, YFV）、Kunjin virus（KUNV）...等超過七十種病毒（Lindenbach *et al.*, 2007）。

登革熱病毒基因體（見附錄五，Perera *et al.*, 2008）為單股、正形（single-stranded, positive-sense）的 RNA 病毒，全長約為 10.8 kb，5' 端含有 Cap 結構，3' 端則缺乏 poly(A) 序列（Wengler *et al.*, 1978），僅具一開放式讀架（open-reading-frame, ORF）。複製時，先轉譯出一個聚合蛋白（polyprotein），後由病毒與宿主的蛋白酶切割成三個結構蛋白（structural protein），分別為衣殼蛋白（capsid protein, C）、前驅膜蛋白（precursor membrane protein, prM）與外膜蛋白（envelope protein, E）及七個非結構蛋白（non-structural protein）包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5（Lindenbach *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2008）。

結構蛋白方面，E protein 會與宿主細胞表面的受器結合（如：dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin, DC-SIG; Pokidysheva *et al.*, 2006）；prM protein 在病毒顆粒由內質網經由反面高基網狀系統（trans Golgi network, TGN）釋出宿主細胞外時，prM-E 蛋白會切割成 M-E，幫助 E protein 在病毒顆粒表面結構更為穩定（Perera *et al.*, 2008）。

在非結構蛋白方面，NS1 為分泌型蛋白（secreted protein），在病毒早期複製時被認為扮演重要角色（Lindenbach *et al.*, 1999），而且可抑制補體的活化（Chung *et al.*, 2006）；NS2B 為 NS3 protease 的 co-factor，幫助 DV polyprotein 在 NS1/NS2A、NS2A/2B、NS2A/NS3、NS3/NS4A、NS4B/NS5 等處切割（Falgout *et al.*, 1991）；NS3 為多功能性蛋白，具有 serine protease、RNA helicase、nucleoside triphosphatase（NTPase）（Gorbalenya *et al.*, 1989; Wengler *et al.*, 1991）之特性；NS5 為雙功能蛋白，具有 methyltransferase, MTase、RNA-dependent RNA polymerase（RdRp）（Egloff *et al.*, 2002; Yap *et al.*, 2007）之特性，另外，RdRp 的演化相關性也是黃質病科（*Flaviviridea*）分類的依據（Lindenbach *et al.*, 2007）。

至於 DV 在 NS2A、NS4A、NS4B 有一些研究推測可能的功能。於 2003 年 Muñoz-Jordan 團隊建構表現 DV 蛋白的質體 (C-HA、prM-HA、E-HA、NS1-HA、NS2A-HA、NS2B-HA、NS3-HA、NS4A-HA、NS4B-HA、NS5-HA；HA 為 Hemagglutinin tag)，利用綠猿腎臟癌細胞 (Vero cell) 將表現 DV 蛋白的質體及 ISRE-CAT 的質體 (ISRE, IFN-stimulated response element；CAT, chloramphenicol acetyl transferase) 共轉染 (co-transfection)，外加 IFN- β (interferon- β) 觀察，經由 IFN- β 誘發 ISRE 下游 CAT 表現量，由結果顯示，當轉染細胞表現 NS2A、NS4A 或 NS4B 病毒蛋白時，會使 CAT 表現量下降 (分別抑制 51.5 %、38.5 %、74.5 %)；另外，若細胞同時表現 NS2A、NS4A、NS4B 三種病毒蛋白時，會抑制 CAT 達 92.5 %。推測 NS2A、NS4A、NS4B 可能影響 IFN 與 ISRE 的作用，抑制細胞的 IFN 訊號傳遞 (IFN signal transduction) (Muñoz-Jordan *et al.*, 2003)。在 NS4A 方面，於 2007 年 Miller 團隊利用共軛焦免疫螢光顯微鏡 (confocal immunofluorescence microscopy, IFM) 觀察受 DV 感染的人類肝癌細胞 (Huh7 cell)，發現內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 會變成 dot-like structure；另外，發現 NS4A protein、dsRNA (viral RNA) 及 E protein 與 ER 的 dot-like structure 有 co-localization，推測 NS4A 可能是病毒複製複合物 (replication complex) 的一部分，而且 dot-like structure 可能是因為感染後發生膜重排 (membrane alteration)；此外，Miller 團隊還建構 NS4A-eGFP 質體及剔除 NS4A 的 2K 片段的 NS4A(-2K)-eGFP 質體去轉染 Huh7 cell，利用 IFM 及免疫電子顯微鏡 (immunoelectron microscopy, EM) 觀察。在 IFM 的結果顯示，表現 NS4A(-2K)-eGFP 的細胞在 ER 會出現與受 DV 感染的細胞一樣的 dot-like structure，而且細胞內的 NS4A(-2K)-eGFP 蛋白也與 ER 的 dot-like structure 有 co-localization；在 EM 部分，表現 NS4A(-2K)-eGFP 的細胞會出現細胞內膜積聚 (intracellular

membrane accumulation)，表示當 NS4A 在細胞內經過蛋白酶修飾切割掉 2K 片段會造成 ER 形成 dot-like structure，綜合 Miller 團隊的結果，推測 DV 的 NS4A 蛋白的 C 端的 2K 片段與調節 membrane alteration 有關 (Miller *et al.*, 2007)。在 NS4B 方面，於 2006 年 Umareddy 團隊利用酵母菌雙雜交分析 (yeast two-hybrid assay)、pull-down assay、免疫沉澱分析 (immunoprecipitation assay) 發現 NS4B 與 NS3 會互相作用，在免疫螢光偵測 (immunofluorescence) 也發現受 DV 感染的細胞內 NS4B 與 NS3 有 co-localization，推測 NS4B 可能會透過與 NS3 作用而協助病毒複製；另外，以不同的 NS4B：NS3 比例進行 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 發現當 NS4B：NS3 比值 ≥ 2 可以看到病毒 RNA 條帶 (band)，推測 NS4B 可能是形成 2 個以上的 oligomer 去協助病毒 RNA 從 NS3 脫離 (Umareddy *et al.*, 2006)。

1.4 日本腦炎與日本腦炎病毒概論

日本腦炎是感染日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 所引起的傳染病。在台灣傳播之病媒蚊為三斑家蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*)、環紋家蚊 (*Culex annulus*)。一般認為豬隻與鳥類為日本腦炎病毒的增幅宿主，帶有病毒的病媒蚊再經叮咬傳染給人。傳播範圍主要為北起西伯利亞、日本、台灣、菲律賓、馬來西亞、印尼、斯里蘭卡和澳洲北部...等 (見附錄六)，流行季節為每年 5 ~ 10 月。根據我國疾病管制局 (CDC, Taiwan) 發布，分列第三類傳染病。自 1968 年台灣開始全面接種疫苗，臺灣日本腦炎疫情控制良好。據 CDC, Taiwan 於 1998 至 2007 年日本腦炎病毒確定病例數及 2007 至 2010 年日本腦炎病毒確定病例數資料顯示，從 1998 至 2010 年，臺灣確定病例數的年平均為 25.1 例 (見附錄七、八)。

JEV 的感染大部分為無症狀感染，部分病患的血液病毒含量很高，會

發展為發燒、頭痛、無菌性腦膜炎，嚴重者會出現頭痛、高燒、腦膜刺激、昏迷、痙攣等症狀，最後導致精神、神經性後遺症或死亡 (CDC, Taiwan)。

JEV 與 DV 同屬於黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 黃質病毒屬 (*Flavivirus*)，為單股、正形 (single-stranded, positive-sense) 的 RNA 病毒，僅具一開放式讀架 (open-reading-frame, ORF)。此 ORF 會轉譯出一個聚合蛋白 (polyprotein)，經蛋白酶切割成三個結構蛋白 (structural protein)，分別為 C、prM、E，及七個非結構蛋白 (non-structural protein) 包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 (見表四)。JEV 感染模式與 DV 相似，皆藉由 E protein 構形變化促使病毒與細胞的融合 (Lindenbach *et al.*, 2007)。在分子生物背景層面，JEV 與 DV 有許多相似處，但在核苷酸序列上 JEV 與 DV 的 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 並不相似 (見表一)，因此在本研究中作為對照組。

1.5 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 概論

RNA 干擾現象 (RNA interference, RNAi) 最早源於 1990 年植物學家所發現，當時為增加牽牛花鮮豔度而送入 chalcone synthase (CHS) 基因使其過度表達 (overexpression)，卻出現預期之外的白色牽牛花，這種造成牽牛花本身基因 (endogenous gene) 與轉殖基因 (transgene) 皆失去功能的現象，稱為共同抑制作用 (co-suppression)，認為是某種轉錄後的抑制作用 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 造成基因抑制的結果 (Napoli *et al.*, 1990)。到了 1998 年在線蟲 (*C. elegans*) 中發現雙股 RNA 分子會影響基因表達，將純化的長鏈雙股 RNA 注射線蟲內能夠高效率及專一性阻斷相應基因的表達，此時此現象被正式稱為 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) (Fire *et al.*, 1998)。隨後，在植物、錐蟲 (*Trypanosomes*)、果蠅 (*Drosophila*)、真菌 (fungi) 等真核生物中陸續發現此現象 (Hammond

et al., 2001)。而哺乳動物則與較為低等生物中的 RNAi 機制有所不同，其原因是當長鏈雙股 RNA (dsRNA > 30 bp) 進入大多數的哺乳動物後，會啟動序列非專一性的干擾素反應 (sequence-nonspecific interferon response) (Stark *et al.*, 1998)。在干擾素反應中會活化雙股 RNA 依賴型蛋白質激酶 (dsRNA-dependent protein kinase, PKR) 及 2', 5'-寡腺苷酸合成酶 (2', 5'-oligoadenylate synthetase, 2', 5'-AS) (Stark *et al.*, 1998)。活化的 PKR 會將真核起始因子 2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化而抑制 mRNA 轉譯反應 (Manche *et al.*, 1992); 活化的 2', 5'-AS 會活化 RNase L 而造成細胞內的 mRNA 降解 (Minks *et al.*, 1979)。之前研究指出，在線蟲與果蠅中送入長鏈的 dsRNA 會被切割成小分子干擾 RNA (small interfering RNA, siRNA) 而導致 RNAi 發生，因此，於 2001 年 Elbashir 團隊首次成功利用 siRNA 方式送入哺乳動物細胞，以專一序列有效誘發哺乳動物細胞內的 RNAi 作用 (Elbashir *et al.*, 2001 a)。

1.6 RNAi 作用機制

RNAi 機制主要分為兩個路徑: siRNA pathway (small interfering RNA) 與 miRNA pathway (micro RNA)。差別在於起源的 RNA 不太相同 (見附錄十, de Fougères *et al.*, 2007)。

對於外源 RNA 或是病毒感染會以 siRNA pathway 誘發 RNAi。在 siRNA pathway，首先由屬於 RNase II 家族的 Dicer 將長片段雙股 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 切割成約 21 ~ 25 個核苷酸大小的小分子干擾 RNA (small interfering RNA, siRNA)，此小片段雙股 siRNA 的 5' 端帶有一個磷酸團基，而 3' 端會突出兩個核苷酸 (見附錄九, Dykxhoorn *et al.*, 2003)。接著 siRNA 會與 Argonaute 2 (AGO2, 由 EIF2C2 基因所轉譯) 及 RNA 誘導沉默複合物 (RNA-inducing silencing complex, RISC) 結合，

此時 AGO2-RISC 會將雙股 siRNA 的正股端 (sense strand) 切除，然後有反股 (anti-sense strand) siRNA 的 AGO2-RISC 會與目標 mRNA 上互補區的鹼基序列配對黏合，由 AGO2 催化在 anti-sense strand siRNA 的 5' 端數來第十與十一個核苷酸位置上切割 mRNA，造成直接性 mRNA 切割 (direct mRNA cleavage)。

另外一個是內源性路徑，稱為 miRNA pathway，此路徑 RNA 先在細胞核中經由 RNA pol II 轉錄出具有髮夾結構 (hairpin structure 或 stem-loop structure) 的 RNA 產物，稱為起始微 RNA 轉錄物 (primary microRNA transcript, pri-miRNA)，而 pri-miRNA 在細胞核中經由 Drosha 修飾成 miRNA 前驅物 (precursor miRNA, pre-miRNA)，pre-miRNA 再經由 Exportin 5 運輸至細胞質中，隨後 pre-miRNA 與 Dicer 結合修飾並引導與 AGO2-RISC 結合，pre-miRNA 會經由活化的 RISC 將雙股 miRNA 解旋 (unwinding) (需要 ATP, Dykxhoorn *et al.*, 2003)，有反股 (anti-sense strand) miRNA 的 AGO2-RISC 會與目標 mRNA 上鹼基序列互補區位 (通常位在 3' UTR, 3' untranslated region) 配對黏合，造成轉譯抑制 (Translational repression) 或是 mRNA 降解 (mRNA degradation)。

1.7 RNAi 在哺乳細胞表現系統

一般開啟生物的外源性 RNAi 路徑 (siRNA pathway) 方式有三種：(1) 利用長鏈雙股 RNA；(2) 直接外送 siRNA；(3) 送入會表現 siRNA 的載體 (siRNA expression vector) (見附錄十一)。若研究對象不是哺乳動物細胞，可以利用方法 (1) 直接用長鏈雙股 RNA 送入誘導 RNAi 機制；因為當長鏈雙股 RNA (dsRNA > 30 bp) 進入哺乳動物細胞後，會啟動干擾素反應 (interferon response) (Stark *et al.*, 1998)。

因此，哺乳細胞系統可利用直接將 siRNA 送入細胞內的方式，以化學合成出 siRNA，優點為方便性可得直接得到高純度的 siRNA，但合成花費昂貴；或者利用體外轉錄 (*In vitro* transcription)，成本低於化學合成法，但需要經管柱純化。外送 siRNA 的缺點為基因沉默時效較短，大約 3~7 天 (Wu *et al.*, 2010)，無法在細胞中做長效 RNAi 抑制。

第 3 種方式是利用表現 siRNA 的載體 (siRNA expression vector，如：DNA 質體、病毒載體 ...) 來表現 siRNA，其優點為：質體可大量製備、RNAi 抑制時效較長、可用於建立表現 siRNA 的穩定細胞株、可經由質體上的報導基因 (reporter gene) 得知轉染效率、遇到轉染效率偏低的細胞株可改用病毒載體增加轉染效率。相較之下，利用 siRNA expression vector 的系統在細胞中以內生性的方式可較穩定與持續轉譯出 siRNA 以誘發 RNAi 的發生。

1.8 shRNA Expressing Vector 設計

本研究是利用 pSilencer shRNA Expressing Vector (Ambion, Inc) 於細胞中表現出 shRNA (small hairpin RNA)，經由細胞內的 siRNA pathway 切割修飾成 siRNA (見附錄十一)。以 shRNA 質體方式表現 siRNA 時，正股與反股之間會需要 loop (UUCAAGAGA) (見附錄十二)。

siRNA 序列設計目前沒有一定的準則，經由 Ambion 指引介紹與文獻歸納出幾點設計方法：於目標 mRNA 的開放式讀架 (Open-reading-frame, ORF) 中找尋連續 “AA” 序列及往後 19 個鹼基序列 (AA(N)₁₉) 總長為 21 nt 作為 siRNA 的目標序列 (見附錄十二)。找尋 “AA” 序列的原因為當互補的反股 (antisense strand) 的 3' 端為 “UU” 的突出兩個核苷酸時，有助於基因沉默的效果 (Elbashir *et al.*, 2001 b)。另外，siRNA 的 GC 比例可能會對效率造成影響，一般 GC 含量介於 40~50 % 較佳。AA(N)₁₉ 中找

尋連續“AA”往後 19 個鹼基序列的 5' 端以 GC-rich 為佳，3' 端以 AT-rich 為佳 (Mittal, 2004)。最後在目標 mRNA 上挑選的 AA(N)₁₉ 序列需與 NCBI 的 genome sequence database 進行比對，避免標的到實驗細胞株、實驗動物（人、小鼠、大鼠或蚊子...）的基因。

1.9 學生 t-檢定 (Student's t-test) 與變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 之統計分析介紹

學生 t-分佈 (Student's t-distribution) 簡稱為 t-分布，於 1908 年 William Sealy Gosset 發表，當時在愛爾蘭 Dublin 的 Arthur Guinness Son & Co. 釀酒廠工作，因為商業機密不能以個人名義發表，以筆名 Student 發表。t-分佈用於常態分布的母體平均值的估計，是對兩組獨立樣本平均值差異進行顯著性測試的學生 t-檢定 (Student's t-test) 的基礎。t-檢定改進 Z-檢定 (Z-test) 的缺點，沒有樣本數目的限制。Z-檢定在小樣本數會產生很大的誤差，因此小樣本數情況下得改用 t-檢定。

變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 是因統計資料會受到各種因素影響，使個別樣本的數值產生差異，這種影響因素所造成之差異與檢定的統計方法稱為變異數分析。ANOVA 用於多組（兩組以上）的獨立樣本進行的平均值差異統計分析。

當分析母體樣本超過兩組，若用 t-檢定進行兩兩比較，會無法得到整體性的差異，而且出現第 I 型錯誤 (Type I error) 的機率也會提高。所謂的第 I 型錯誤 (Type I error)，是指統計結果有假陽性的有顯著水準，假設兩組數據的真實狀況是沒有差異，可是統計計算出的結果卻是有差異。因此，可利用單因子 ANOVA 來分析兩組以上的平均值是否相同，並且降低 t-檢定容易犯第 I 型錯誤的機率。但 ANOVA 只能說明整體多組的平均值有沒有統計上顯著差異，無法明確指出哪幾組有差異。當 ANOVA 檢定為

有顯著差異時，可再事後多重比較（如：t-檢定）來確定個別組與組之間的平均值誰存在顯著差異。

1.10 Flavivirus 相關之 RNAi 研究

在 Flavivirus 上有其他病毒有以 RNAi 的方式做病毒研究，如：YFV、JEV、DV1...等。在 YFV 方面，於 2009 年 Pacca 團隊建構針對 YFV 的 E、NS1、NS5 的 shRNA 表現質體，在體外（*in vitro*）與體內（*in vivo*）進行實驗，在空斑試驗（plaque assay）中，標的 E、NS1 的 shRNA 表現質體轉染綠猿腎臟癌細胞（Vero cell）可抑制病毒的複製；在免疫螢光偵測（Immunofluorescence）上，此兩個 shRNA 表現質體也可降低病毒蛋白的表現；在活體老鼠實驗上，可增加感染後存活率（cell survival rate）及減少中樞神經損傷（Pacca *et al.*, 2009）。在 JEV 部分，於 2008 年 Qi 團隊建構針對 JEV 的 NS5 的 shRNA 表現質體，在 293T 部分，shRNA 表現質體與 pNS5-EGFP 共轉染（co-transfection）以流式細胞技術（flow cytometry）、定量反轉錄 PCR（Q-RT CPR）、西方墨點（Western blotting）觀察 NS5-EGFP 的基因表現量，以及在 BHK-21 部分，shRNA 表現質體轉染後以免疫螢光（Immunofluorescence）、定量反轉錄 PCR（Q-RT CPR）、西方墨點（Western blotting）觀察病毒的複製，由結果顯示，shRNAs 可以專一性標的 NS5 基因及可有效抑制 JEV 病毒複製（Qi *et al.*, 2008）。在 DV1，於 2010 年 Wu 團隊針對 prM 設計，以直接外送 siRNA 的形式轉染至蚊子細胞（C6/36 cell），其結果顯示轉染 siRNA 的蚊子細胞可降低病毒感染後造成的細胞病理效應（cytopathic effect, CPE）、增高細胞存活率（cell survival rate）及降低病毒 RNA 的複製量（Viral RNA copies）（Wu *et al.*, 2010）。

1.11 實驗目的與設計

由登革熱病毒基因體(見附錄五, Perera *et al.*, 2008)得知, 對於 DV 的結構蛋白 C、prM、E 的功能及非結構蛋白 NS3、NS5 的酵素功能是比较明瞭, 而且蛋白結構也已被解讀(見附錄五, PDB identifiers: 1R6R, 3C5X, 1OKE, 2VBC, 2P1D, 2J7U; Perera *et al.*, 2008); 另外 NS1 也已有商品化的抗體可供實驗測試(如: Abcam, ab41623); 相較上述的蛋白, 非結構蛋白 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 的功能較不明確。目前以知 Flavivirus 的 NS2B 為 NS3 protease 的 co-factor; 有研究顯示, DV2 的 NS2A、NS4A、NS4B 會抑制宿主細胞的 IFN signal transduction (Munoz-Jordan *et al.*, 2003); 在 Kunjin virus (KUNV) 中, NS2A 推測為組成 replicase complex (NS3、NS5) 中的一部分, 參與 RNA 複製 (Mackenzie *et al.*, 1998); 在 DV 中, NS4A 蛋白 C 端的 2K 片段與調節膜重排 (membrane alteration) 有關 (Miller *et al.*, 2007); 在 DV 中, NS4B 會與 NS3 作用協助病毒複製 (Umareddy *et al.*, 2006)。因此, 本研究想了解 NS2A/2B、NS2A/2B 基因表現量對於病毒複製的影響, 一般消除表現量常用方式是利用 knock-out 或將基因局部 deletion 產生不具功能的 truncated protein 以達到目的; 本研究則嘗試以 knock-down 的方式, 利用 RNAi 的機制找尋 siRNA 降低這些基因表現量觀察對病毒複製的影響。

一般自行設計 siRNA 或 shRNA 是利用 siRNA 設計平台軟體對於一個目標基因內找尋多個預測的 siRNA 進行實驗, 通常是依據設計平台預測出來的分數 (score), 預測分數越高越符合設計規則, 但預測分數越高的 siRNA 序列不代表一定有效。因此, 本研究利用多個 siRNA 設計平台 (見表二) 針對於一個目標基因內去預測 siRNA, 並挑選 siRNA 設計平台交集共同預測有潛力的 siRNA 的序列做為研究的 siRNA (見表二下表為針對 DV2 PL 046 strain 設計的 siNS2A、siNS2B、siNS4A、siNS4B 序列)。

貳、材料

2.1 菌株

Escherichia coli DH5 α strain (lab collection)

2.2 細胞株

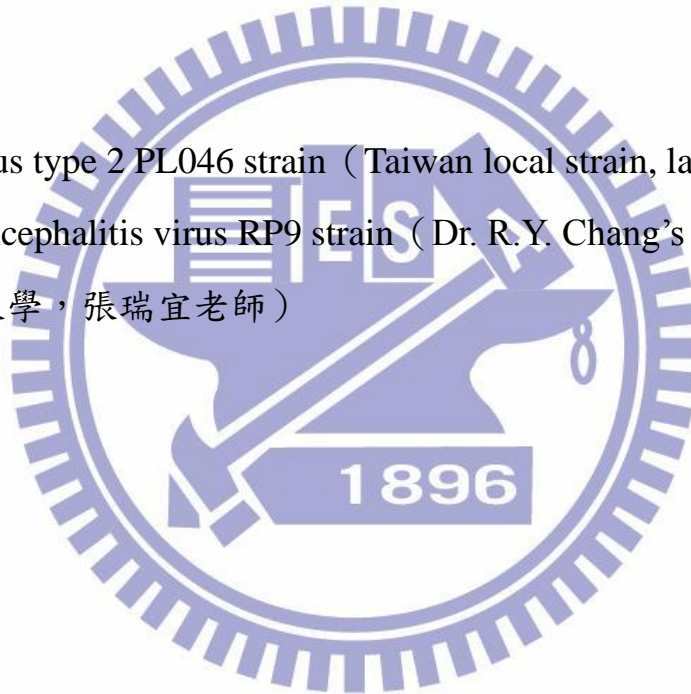
BHK-21 (幼倉鼠腎臟纖維母細胞, baby hamster kidney cell)

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

2.3 病毒

Dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan local strain, lab collection)

Japanese encephalitis virus RP9 strain (Dr. R.Y. Chang's lab collection,
NDHU; 東華大學, 張瑞宜老師)



2.4 質體

質體	特性	Reference
pUC57-X1337G	請廠商合成並將設計的 DNA 序列片段接入 pUC57 質體，其合成 DNA 序列為本研究建構一系列針對不同 DV2 的 NS 基因設計的 shRNA 片段序列，每個 shRNA 片段外以不同限制酶分隔，以做為切割某單一 shRNA 序列進行後續系列質體建構，請參照圖一。	生工 (MDbio) 廠商合成
pSilencer 3.1-H1 neo-siNC	篩選標記為 Ampicillin（在大桿菌轉型時使用）及 Neomycin（於細胞轉染時使用），另有 H1 RNA pol III promoter，其下游片段會表現對於人類、小鼠、大鼠基因體沒有 RNA 干擾的 shRNA，做為 negative control。請參照圖三.a。	Ambion
pSilencer-SiNS2A-1 pSilencer-SiNS2B-1 pSilencer-SiNS4A-1 pSilencer-SiNS4B-1	pSilencer 質體的 H1 RNA pol III promoter 其下游表現 shRNA 片段為針對個別 NS 基因設計的序列。請參照圖三.b - e。	本研究

pDsRed-Express2-N1	篩選標記為 Kanamycin (在大桿菌轉型時使用) / Neomycin (於細胞轉染時使用)，另含有 reporter gene， <i>Discosoma sp.</i> red fluorescent protein, DsRed。請參照圖五.a。	Clontech
pDsRed-pS.-SiNC pDsRed-pS.-SiNS2A-1 pDsRed-pS.-SiNS2B-1 pDsRed-pS.-SiNS4A-1 pDsRed-pS.-SiNS4B-1	pDsRed-E2-N1 質體於 <i>E.coO109</i> I 切位處接入由 pSilencer 系列各質體的 H1 RNA pol III promoter 及其下游表現 shRNA 片段的得到的 PCR 產物。請參照圖五.b - f。	本研究

2.5 引子 (Primer)

引子	5' → 3' 序列	位置	應用
M13F(-40)	5'-GTTTCCAGTCAC GAC-3'	pSilencer (Ambion) : + 359 ~ + 375	DNA 定序
3.0rev	5'-GAGTTAGCTCACTC ATTAGGC-3'	pSilencer (Ambion) : + 662 ~ + 682	DNA 定序
pDRNC-S-F1(3683)	5'-GCTGGCACTCTGTC GATACC-3'	pDsRed (Clontech) : + 3683 ~ + 3702	DNA 定序
pDRNC-S-R1(4292)	5'-CTCACGTTAAGGG ATTTGG-3'	pDsRed (Clontech) : + 4272 ~ + 4291	DNA 定序
pS-F-1(288)	5'-TATAGGCCCTGCCT CTTCGCTATTACGC-3'	pSilencer (Ambion) : + 288 ~ + 305	PCR 使用

pS-R-1(635)	5'-TATAGGGCCTCGGC TCGTATGTTGTGTG-3'	pSilencer (Ambion) : + 618 ~ + 635	PCR 使用
pS-shNCPB	5'-ACTACCGTTGTAA GGTG-3' Digoxigenin	pDsRed-pS.-siNC : + 4030 ~ + 4047	北方墨點 探針使用
pS-sh2APB	5'-GGTCTCAATCCAAC AGCTA-3' Digoxigenin	Dengue PL046 genome : + 4075 ~ + 4093	北方墨點 探針使用
pS-sh4APB	5'-GATGACCTTAGGAA TGTGC-3' Digoxigenin	Dengue PL046 genome : + 6613 ~ + 6633	北方墨點 探針使用

2.6 藥品試劑

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
1kb DNA ladder	SibEnzyme	SEM11C001	DNA 電泳
100 bp DNA ladder	Fermentas	SM0243	DNA 電泳
40 % Acryl / Bis 19 : 1 solution	Amresco	0496-500 mL	RNA 電泳
30 % Acryl / Bis 29 : 1 solution	Sigma	A-3754	DNA 電泳
Acetic acid	Fluka	33209	緩衝液
Agarose	Vegonia	May-01	DNA 電泳
Anti-DIG-AP	Roche	1093274	北方墨點
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養

APS	Bio-Rad	161-0700	DNA / RNA 電泳
Blocking reagent	Roche	1096176	北方墨點
Bronic acid	Merck	1.00165.1000	DNA / RNA 電泳
CaCl ₂	Riedel-de Haën	31307	細菌培養
CH ₃ COONH ₄ (ammonium acetate)	Panreac	131114	緩衝液
Crystal violet	Sigma	C-3886	空斑測試
CSPD	Roche	1655884	北方墨點
DIG Easy Hyb	Roche	11603558001	北方墨點
DEPC	Sigma	D-5758	RNases 去活化
DMSO	Sigma	D-8418	細胞儲存
EDTA	Amresco	105	緩衝液
EtBr	Sigma	E-7637	核酸染色
Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	細胞固定
G418 (GENETICIN)	GIBCO	11811-031	細胞培養
Glycerol	Amresco	0854-1L	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

Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-019	細胞轉染
Maleic acid	Fluka	63190	緩衝液
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methylcellulose	Sigma	M0512	空斑測試
microRNA marker	Biolabs	N2102S	RNA 電泳
NaCl	Amresco	241	細菌培養
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液
Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (magnesium acetate)	Sigma	M5661	緩衝液
Nylon membrane	Pall	60207	北方墨點
Opti-MEM	GIBCO	31985-062	細胞轉染
PBS	Biological Industries	11-223-1K	細胞培養
Taq DNA polymerase	Fermentas	EP0402	質體建構
Restriction enzyme	Biolabs, Fermentas	-	質體建構
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	Promega	M8201	質體建構
SDS	Riedel-de Haën	62862	質體建構
Sodium citrate	Riedel-de Haën	25116	緩衝液
SYBR-Gold	Invitrogen	S11494	核酸染色

T4 DNA ligase	Promega	M1801	質體建構
TEMED	Sigma	T-9281	DNA / RNA 電泳
Tris-base	Amresco	826	緩衝液
Tris-HCl	Amresco	234	緩衝液
TrypLE™ Express	GIBCO	12605-010	細胞培養
Tween-20	Sigma	P1379	緩衝液
Urea	Fluka	SK-2644U	RNA 電泳
X-ray film	Midwest Scientific	LA7111	北方墨點

2.7 試劑組

試劑名稱	廠商	目錄編號	應用
pSilencer™ neo Kit	Ambion	AM5770	質體 DNA 建構
Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit	Protech	MP530XL	質體 DNA 萃取
QIAEX II® Gel Extraction Kit	QIAGEN	20021	DNA 純化
PCR Clean-up Kit	Premier	N-DCE050	PCR 純化
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Ambion	AM1560	Small RNA 萃取

2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基

➤ 1 X PBS (Phosphate buffer saline)

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

➤ 1 % Crystal violet solution (1 L)

10 g crystal violet; 100 ml 37 % formaldehyde; 900 ml ddH₂O

➤ 3.7 % Formaldehyde (1 L)

100 ml 37 % formaldehyde; 900 ml ddH₂O

➤ Diffusion buffer

0.5 M ammonium acetate; 10 mM magnesium acetate; 1 mM EDTA, pH 8.0;
0.1 % SDS.

➤ 50 X TAE (Tris-acetate-EDTA) (200 ml)

48.4 g Tris base; 20 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0; 11.42 ml acetic acid 加
ddH₂O 至 200 ml

➤ 10 X TBE (Tris-Borate-EDTA) (for DNA) (800 ml)

86.4 g Tris base; 44 g boric acid; 32 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0; 加 ddH₂O
至 800 ml

➤ 10 X TBE (Tris-Borate-EDTA) (for RNA) (800 ml)

86.4 g Tris base; 44 g boric acid; 32 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0; 加
DEPC-treated H₂O 至 800 ml

➤ 0.1 % DEPC (Diethyl pyrocarbonate) -treated H₂O (1000 ml)

取 DEPC 原液 1 ml 加 999 ml ddH₂O, 37 °C 震盪 3 ~ 16 小時, 滅菌

➤ 20 X SSC (Saline-sodium citrate), pH 7

3 M NaCl; 0.3 M Sodium citrate

➤ Maleic acid buffer, pH 7.5

0.1 M Maleic acid; 0.15 M NaCl

➤ **Washing buffer, pH 7.5**

0.1 M Maleic acid; 0.15 M NaCl; 0.3 % Tween 20

➤ **10 X blocking buffer (100 ml)**

10 g blocking reagent 加 Maleic acid buffer 至 100 ml

➤ **Detection buffer, pH 9.5**

0.1 M Tris-base; 0.1 M 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
Ampicillin

➤ **LB (Luria-Bertni) / Kanamycin agar**

1 % tryptone; 0.5 % yeast extract; 1 % NaCl; 1.5 % agar; 50 µg/ml
Kanamycin

2.9 儀器設備

一次水製造機 UR-181JW-1 (UNION)

超純水製造機 Simplicity (MILLIPORE)

微量管震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)

試管震盪器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

乾燥加熱板 HV-01 (Violet BioSciences)

加熱攪拌器 PC-420 (CORNING)

酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)

電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)

電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)

垂直式電泳槽 VE-180 (瑞伯生物科技有限公司)

電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)

迴轉式震盪培養箱 S300R (WISDOM APPARATUS MFG COMPANY)

低溫培養箱 701 (WISDOM)

二氧化碳培養箱 (NAPCO)

電磁式奈米級偵測儀 ND-1000 (博克科技有限公司)

分光光度計 20GENES YSRT (SPECTRONIC INSTRUMENTS)

梯度核酸增殖儀 labcycler (SENSOQUEST)

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

微量冷凍高速離心機 centrifuge 5415R (eppendorf)

桌上型低溫高速離心機 centrifuge 5804R (eppendorf)

烘箱 DS-45 (DENG YNG)

4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)

4°C 雙門冰藏櫃 CH-502 (CHIN HSIN)

-20°C 開蓋式冷凍櫃 311-407-00 (至鴻股份有限公司)

-20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)

-80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

液態氮桶 LS 750 (TAYLOR-WHARTON)

無菌操作台 VCM-420 (造鑫)

血球計數器 (MARIEMFELD)

倒立相位差螢光顯微鏡 TE2000-U (Nikon)

數位相機 C-5050ZOOM (OLYMPUS)

雜交連結器 (UVITEC)

參、方法

3.1 質體建構

3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備

取單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，於 37 °C 震盪 (180 rpm) 培養。培養 14 ~ 16 小時後，取 2 ml 的菌液轉養於 100 ml 的 LB 培養液 (含 5 % 葡萄糖; 2 mM MgCl₂)，於 37 °C 下震盪 (180 rpm) 培養直到 O.D.₆₀₀ 介於 0.4 ~ 0.6 之間。將菌液移至 50 ml 離心管於冰上 20 分鐘。在 4 °C 以 3000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 50 ml 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，靜置冰中 30 分鐘。在 4 °C 以 2000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，再加入 5 ml 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，於 4 °C 靜置 18 ~ 20 小時。在 4 °C 以 2000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入 5 ml 預冷的 freezer solution (50 mM CaCl₂; 15 % Glycerol) 懸浮菌體。每管以 100 μ l 的體積分裝於預冷的微量離心管，儲存於 -80 °C。

3.1.2 大腸桿菌勝任細胞的轉形

將勝任細胞於冰上解凍，加入 <100 ng 質體 DNA 混合均勻，冰浴 20 分鐘。於 42 °C 水浴熱休克 (Heat shock) 30 秒，加入 500 μ l LB 培養液，於 37 °C 震盪培養 (180 rpm) 1 小時。取 100 μ l 菌液均勻塗至含有抗生素 (Ampicillin: 50 μ g / ml 或 Kanamycin: 50 μ g / ml) 的 LB 固體培養基上，37 °C 培養 14 ~ 16 小時。

3.1.3 小量質體 DNA 萃取

小量質體是利用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit (Protech, MP530XL) 萃取。實驗步驟如下：將單一大腸桿菌菌落轉養在 5 ml 含有

抗生素 (Ampicillin: 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 或 Kanamycin: 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 的 LB 培養液，37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪培養 (180 rpm) 14 ~ 16 小時。取 1.5 ml 菌液移至微量離心管，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。加入 200 μl 預冷的 Solution I 混合均勻，再加入 200 μl 的 Solution II 緩和混合均勻，靜置室溫 5 分鐘，最後加入 300 μl 的 Solution III 緩和混合均勻，以 13000 rpm 離心 5 分鐘。取上清液至 column，以 13000 rpm 離心 30 秒，去除濾液。加 700 μl 的 Washing Solution 至 column，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，此步驟重複一次 (清洗 2 次)。以 13000 rpm 離心 5 分鐘，去除殘留的 Washing Solution，將 column 裝置新的微量離心管。開蓋放於 60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱板 3 ~ 5 分鐘去除多餘酒精，加 40 ~ 50 μl 的 ddH₂O 或 Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 於 column 濾膜中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，測量 DNA 的濃度與純度，儲存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.1.4 限制酶反應

為製備實驗所需之 DNA 片段，取適量 DNA (0.5 ~ 5 μg) 及適量限制酶 (1 μg 的 DNA 約使用 1 unit 的酵素)，到適量的反應體積 (20 ~ 50 μl)，於酵素作用的溫度作用 2 ~ 3 小時。反應完成後，於適當溫度加熱以終止反應。酶切溫度、終止反應溫度及緩衝液的濃度則依照所附之說明書使用。利用洋菜膠電泳分析，若為小片段 DNA (約 100 bp) 則用聚丙烯酰胺凝膠電泳分析。

3.1.5 聚丙烯酰胺凝膠電泳

此為分析實驗小片段 DNA (約 100 bp)。以 12 % 的 nondenaturing polyacrylamide gel (native PAGE) 進行電泳分離，凝膠配法如下：6ml 的 30 % acryl / bis (29 : 1) solution、1.5 ml 的 10 X TBE、120 μl 的 10 % APS、

6 μ l 的 TEMED，補 ddH₂O 至總體積為 15 ml，靜置膠凝固 1~2 小時。將 DNA 與 6 X loading buffer (0.01 % bromophenol blue; 0.25 M EDTA; 50 % sucrose) 混合均勻，注入膠孔中，以 100 V 進行電泳直到 bromophenol blue 電泳至凝膠底部，取出膠體以 EtBr 染色，觀察小片段 DNA。

3.1.6 萃取聚丙烯酰胺凝膠內之小片段 DNA

小片段 DNA 是利用 QIAEX II® Gel Extraction Kit (QIAGEN, 20021) 萃取。將含有所要的小片段 DNA 的聚丙烯酰胺凝膠切下放入新的微量離心管(凝膠 \leq 250 mg)。秤量切下的凝膠重量，加入 2 倍體積的 diffusion buffer 至 1 倍體積凝膠中，於 50 °C 作用 30 分鐘，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。小心吸取上清液以 Whatman GF/C 濾膜的 column 過濾。計算過濾液的體積，加入 6 倍體積的 Buffer QX1 至 1 倍體積的過濾液中。預先將 QIAEX II 震盪 30 秒，加入 30 μ l 的 QIAEX II 至濾液/QX1 混合物中，於 50 °C 作用 10 分鐘，每 2 分鐘震盪一次確保 QIAEX II 懸浮於溶液中(QX1 在 pH \leq 7.5 為黃色，此時 QIAEX II 與 DNA 作用效果最佳，在高 pH 下 QX1 會呈橘色或紫色，則會降低 DNA 回收效率，若液體呈橘色或紫色可加入 10 μ l 的 3 M sodium acetate, pH 5.0 使 QX1 恢復黃色)，以 13000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。以 500 μ l 的 QX1 清洗管中沉澱物，以 13000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。以 500 μ l 的 Buffer PE 清洗沉澱物，以 13000 rpm 離心 30 秒，移除上清液，此步驟重複一次(清洗 2 次)。自然烘乾 15~30 分鐘使沉澱物變成微白，加入 20 μ l 的 ddH₂O 或 Elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 懸浮沉澱物，以 13000 rpm 離心 30 秒，將上清液移至新的微量離心管，測量 DNA 的濃度與純度，儲存於 -20 °C。

3.1.7 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

此步驟為取得 pSilencer 系列各質體的 H1 RNA pol III promoter 及其下游表現 shRNA 片段的 PCR 產物，以供接入 pDsRed-E2-N1 質體於 *E.coO109* I 切位處。取 100 ~ 150 μg 的質體 DNA、5 μl 的 10 倍酵素緩衝液（不含 MgCl_2 ）、4 μl (25 mM) 的 MgCl_2 、4 μl (2.5 mM) 的 dNTP、各 1 μl (50 mM) 的引子對、1 ~ 1.5 units 的聚合酶，反應總體積為 50 μl 。溫度設定：A. 95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘；B. 95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 分鐘；C. 55 $^{\circ}\text{C}$ (Annealing temperature) 反應 1 分鐘；D. 72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 分鐘；E. 72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘。其中，B、C、D 重覆 29 次循環。

3.1.8 PCR 產物純化

PCR 產物是利用 PCR Clean-up Kit (Premier, N-DCE050) 純化。將 PCR 產物加入 500 μl binding solution 混合均勻放入 column 中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。加入 700 μl washing solution，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液，此步驟重複一次（清洗 2 次）。以 13000 rpm 離心 2 分鐘，去除 column 上殘餘的液體。將 column 換至新的微量離心管，開蓋放於 60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱板 3 ~ 5 分鐘去除多餘酒精，加 30 ~ 50 μl ddH₂O 或 Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 於 column 濾膜中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，測量 PCR 產物的濃度與純度，儲存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.1.9 去磷酸反應

DNA 去磷酸反應是利用 SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 進行。取 1 μg 的 DNA、5 μl 的 10 倍酵素緩衝液、1 unit 的 SAP 酵素，反應總體積為 50 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 15 分鐘。於 65 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 15 分鐘終止反應。

3.1.10 接合反應 (Ligation)

取 50 ng 的 vector DNA、適量 insert DNA (vector 與 insert 的分子數比約 1 : 3)、2 μ l 的 10 倍酵素緩衝液、1 μ l (3 units / μ l) 的接合酶，反應總體積為 20 μ l，於 14 °C 水浴反應 16 小時，65 °C 去活化 10 分鐘，儲存於 -20 °C 冰箱或直接進行大腸桿菌勝任細胞的轉形。

3.2 細胞實驗

3.2.1 BHK-21 細胞繼代培養

培養液為含有 5 % FBS (Fetal Bovine Serum) 的 MEM (Minimum Essential Medium)，培養環境為含有 5 % CO₂ 的 37 °C 恆溫培養箱。繼代培養流程如下：吸除 75 cm² 培養皿中舊培養液，以 5 ml 的 PBS 沖洗一次，加入 1 ml 的 TrypLETM Express，37 °C 反應 5 分鐘。加入 2~3 ml 的 5 % FBS / MEM 輕輕沖散細胞，置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。以 3 ml 新鮮 5 % FBS / MEM 懸浮細胞，取適量細胞液加入 10~12 ml 新鮮 5 % FBS / MEM 混合均勻於培養箱培養。

3.2.2 C6/36 細胞繼代培養

培養液為含有 10 % FBS 的 MEM，培養於 28 °C 恆溫培養箱。繼代培養流程如下：舊培養液留約 1 ml，將細胞以細胞刮勺刮落，加入 2 ml 的 10 % FBS / MEM 輕輕沖散細胞，置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。以 3 ml 新鮮 10 % FBS / MEM 懸浮細胞，取 1/3 的細胞液加入 12 ml 新鮮 10 % FBS / MEM 混合均勻於培養箱培養。

3.2.3 登革熱病毒的增殖

利用 C6/36 細胞以 MOI (multiplicity of infection) = 0.1 增殖 DV2 PL046 strain。將 1×10^7 的 C6/36 細胞置入 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。以適量 10 % FBS / MEM 混合均勻，加入 1×10^6 的病毒(含細胞的培養液其與病毒混合後體積為 2 ml)。於 37 °C 培養箱 2 小時，每 30 分鐘搖一次，將其移到新的 T75 培養皿中，加入 7 ml 的 10 % FBS / MEM，培養於 28 °C 培養箱。於感染經過第四、六、八、十天，每兩天收集一次培養皿中含有病毒的培養液，後補 8 ml 新鮮 10 % FBS / MEM 至培養皿中，培養於 28 °C 培養箱。含有病毒的培養液以 0.22 μ m 孔徑的濾膜過濾，將含有病毒的過濾液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C。

3.2.4 日本腦炎病毒的增殖

利用 BHK-21 細胞以 MOI (multiplicity of infection) = 0.1 增殖 JEV RP9 strain。將 1×10^7 的 BHK-21 細胞前一日置於 T75 培養皿，加入 5 % FBS / MEM，在 37 °C、5 % CO₂ 培養箱中培養 12 小時。感染前先去除培養液，以 PBS 沖洗兩次，再加入 1×10^6 病毒(最後在 T75 培養皿中病毒液體積為 3 ml)，於 37 °C，5 % CO₂ 培養箱中培養 1 小時，每 15 分鐘搖晃一次。一小時後去除上清液，加入 10 ml 的 5 % FBS / MEM，培養於 37 °C，5 % CO₂ 培養箱。於感染經過三天，收集培養皿中含有病毒的培養液，含有病毒的培養液以 0.22 μ m 孔徑的濾膜過濾，將含有病毒的過濾液分裝到 1.5 ml 的微量離心管中，保存於 -80 °C。

3.2.5 BHK-21 細胞轉染

轉染前一日先於 6-well 培養盤置入 2×10^5 的 BHK-21 細胞。轉染當天，取一微量離心管將 4 μg 的質體 DNA 稀釋於 250 μl 的 Opti-MEM 中，取另一微量離心管將 10 μl 的 Lipofectamine™ 2000 加入 240 μl 的 Opti-MEM，室溫靜置 5 分鐘。將兩種液體輕輕混和均勻，室溫靜置 20 分鐘，將液體均勻滴入培養皿，於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 培養箱中 4~6 小時。置換新的 5 % FBS / MEM。於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 培養箱中培養 24 小時，以供後續的實驗進行。

3.2.6 BHK-21 穩定細胞株選殖

將 6-well 培養盤經過轉染 24 小時的 BHK-21 細胞吸起培養液，以 2 ml 的 PBS 沖洗，加入 300 μl TrypLE™ Express，37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘。加入 1 ml 的 5 % FBS / MEM 輕輕沖散細胞，置於 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上清液，以 5 % FBS / MEM 懸浮細胞，以 1/500 稀釋倍率將細胞液均勻置入 10 cm 培養皿中，以有含抗生素 (G418: 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 的 5 % FBS / MEM，於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 培養箱培養，每 2 天更換一次含 G418: 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的 5 % FBS / MEM。直到單一細胞長成群落，以適量 TrypLE™ Express 將細胞單體化，將細胞依序放大轉移至 24-well 培養盤、12-well 培養盤、6-well 培養盤、10 cm 培養皿。最後將 10 cm 培養皿內穩定細胞株以含 5 % DMSO 的 5 % FBS / MEM 製成凍管，以漸凍盒於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷凍一天後，存放於液態桶中。

3.2.7 空斑試驗（短暫性質體轉染細胞組）

實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有轉染質體的 BHK-21 細胞（短暫性質體轉染細胞）。以不含血清的 MEM 沖洗兩次。病毒（分成 DV2 實驗組及 JEV 對照組）以不含血清的 MEM 進行序列稀釋，每一個培養孔加入 450 μ l 序列稀釋的病毒溶液（100 ~ 200 PFU / well）（PFU, plaque-forming unit），於含有 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中 1 ~ 2 小時進行感染，每 30 分鐘搖晃一次。加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入含有 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中培養。DV2 實驗組培養 7 天後，吸除培養液，加入適量 2 ml 的 3.7 % 甲醛固定細胞，於室溫 15 ~ 20 分鐘，吸除甲醛，加入 2 ml 的 1 % 結晶紫溶液染色，於室溫 2 ~ 16 小時，以清水沖洗培養盤。於室溫風乾後，計數空斑數目。JEV 對照組則培養 3 天後，進行固定及染色細胞，計數空斑數目。

3.2.8 空斑試驗（穩定細胞株組）

實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株。以不含血清的 MEM 沖洗兩次。病毒（分成 DV2 實驗組及 JEV 對照組）以不含血清的 MEM 進行序列稀釋，每一個培養孔加入 450 μ l 序列稀釋的病毒溶液（100 ~ 200 PFU / well），於含有 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中 1 ~ 2 小時進行感染，每 30 分鐘搖晃一次。加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入含有 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中培養。DV2 實驗組培養 7 天後，吸除培養液，加入適量 2 ml 的 3.7 % 甲醛固定細胞，於室溫 15 ~ 20 分鐘，吸除甲醛，加入 2 ml 的 1 % 結晶紫溶液染色，於室溫 2 ~ 16 小時，以清水沖洗培養盤。於室溫風乾後，計數空斑數目。JEV 對照組則培養 3 天後，進行固定及染色細胞，計數空斑數目。

3.3 小分子 RNA (small RNA) 檢測

3.3.1 小分子 RNA (small RNA) 的萃取

小分子 RNA (small RNA) 是利用 mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, AM1560) 萃取，分成以下三個部分。

3.3.1.1 細胞均質化

將細胞以 5 ml 的 PBS 沖洗，加入 1 ml TrypLE™ Express，37 °C 反應 5 分鐘。加入 3 ml 的 5 % FBS / MEM 輕輕沖散細胞置於 15 ml 離心管，於 4 °C 以 1500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上清液，加入 1 ml PBS 洗勻細胞，於 4 °C 以 1500 rpm 離心 5 分鐘，放至冰中。倒掉 PBS 上清液，加入 600 µl 的 Lysis/Binding Solution，均勻懸浮使細胞均質化，將細胞均質液換至新的微量離心管。

3.3.1.2 有機萃取

加入 1/10 倍體積 miRNA Homogenate Additive 與細胞均質液混合均勻，靜置冰上 10 分鐘。加入 1 倍體積常溫 Acid-Phenol : Chloroform，震盪 30 ~ 60 秒。以 10,000 g 離心 5 分鐘，會出現上層水相液 (aqueous phase) 及下層有機相液 (organic phase)，小心取上層液 (aqueous phase)，不要碰到下層液，將上層液換至新微量離心管中。

3.3.1.3 小分子 RNA 萃取

加入 1/3 倍上層液 (aqueous phase) 體積的 100 % 酒精至微量離心管混合均勻 (例如：100 µl 的 100 % 酒精加至 300 µl 的吸取的上層液)。將上層液/酒精混合物加入 column 中，以 10,000 g 離心 15 秒，收集過濾液移至新微量離心管中。重複以 10,000 g 離心 15 秒一次，使上層液/酒精混

合物都通過 column 上的濾膜。加入 2/3 體積 100 % 酒精至過濾液混合均勻（例如：266 μ l 的 100 % 酒精加至 400 μ l 的過濾液中）。將過濾液/酒精混合物加入新 column 中，以 10,000 g 離心 15 秒，倒掉過濾液，重複離心一次，使過濾液/酒精混合物都通過 column 上的濾膜。加入 700 μ l 的 miRNA Wash Solution 1 至 column 中，以 10,000 g 離心 5~10 秒，倒掉過濾液，重複離心一次，去除多餘殘留液。加入 500 μ l 的 Wash Solution 2/3 至 column 中，以 10,000 g 離心 5~10 秒，此步驟重複一次（清洗 2 次）。倒掉過濾液，以 10,000 g 離心 1 分鐘，將 column 移至新 collection tube 中，加入 100 μ l 的 95 $^{\circ}$ C 的 Elution Solution 於 column 濾膜中，以 10,000 g 離心 20~30 秒。測量 RNA 濃度與純度，儲存於 -80 $^{\circ}$ C。

3.3.2 北方墨點法（Northern Blotting）偵測小分子 RNA

一般偵測 mRNA 是利用含有 formaldehyde 的 1.5 % agarose gel，將 RNA 樣本經過 formaldehyde、formamide 及加熱 denaturing 處理後，以 MOPS（3-(N-morpholino)propanesulfonic acid）電泳緩衝液進行電泳。接著以 10 X SSC 利用毛細現象轉漬法（capillary transfer）將 RNA 轉漬到 Nylon membrane 上。而 1.5 % 的 agarose gel 可適用 0.5~8.0 kb 的 RNA。本實驗為偵測 20~30 nt 的小分子 RNA，因此改用聚丙烯酰胺凝膠（polyacrylamide gel），15 % 的 polyacrylamide gel 可適合的範圍為 25~150 bp。另外，本實驗改以電壓的方式轉漬，提高小分子 RNA 轉移到 Nylon membrane 上的效率。

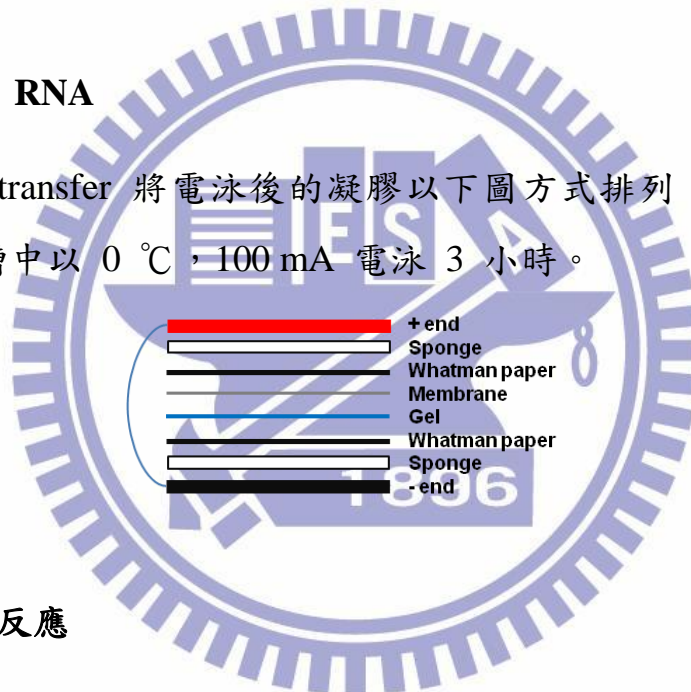
3.3.2.1 變性聚丙烯酰胺凝膠電泳

以 15 % 的 denaturing polyacrylamide gel（8 M Urea）進行電泳分離，凝膠配法如下：5.625 ml 的 40 % acrylamide（19:1）solution、1.5 ml 的 10

X TBE、7.2072 g 的 Urea、75 μ l 的 10 % APS (ammonium persulfate)、15 μ l 的 TEMED，補 DEPC-treated H₂O 至總體積為 15 ml，靜置膠凝固 1 小時，以 4 $^{\circ}$ C 及 150 V 進行預跑 15 分鐘。將 DNA 與 1X Gel Loading Buffer II 混合均勻，於 95 $^{\circ}$ C 作用 4 分鐘，後放置於冰上。將樣品注入膠孔中，用 0.5 X TBE buffer 在電泳槽中以 4 $^{\circ}$ C 及 150 V 進行電泳直到 bromophenol blue 電泳至凝膠最底部，取出膠體以 SYBR-Gold 染色 30 分鐘，以 UV 光觀察膠上 RNA 片段。以 SYBR-Gold 染色的原因為敏感度較 EtBr 高，可觀察到更小片段的 RNA。

3.3.2.2 轉漬 RNA

利用 wet transfer 將電泳後的凝膠以下圖方式排列，用 0.5 X TBE buffer 在轉漬槽中以 0 $^{\circ}$ C，100 mA 電泳 3 小時。



3.3.2.3 雜交反應

將轉漬完的 Nylon membrane 下面墊一片 3M 濾紙，以 UV 254 nm 照射 membrane（有 RNA 那面朝上）2 次，每次 2 分鐘。將 membrane 泡入 DIG Eazy Hy (pre-hybridization) 於 42 $^{\circ}$ C 震盪 (50 rpm) 2 小時。將 100 μ M 的 Probe 於 95 $^{\circ}$ C 預熱 10 分鐘，後置於冰上 10 分鐘，以 0.5 μ l 的 100 μ M 的 Probe : 1 ml 的 DIG Eazy Hy 比例混合均勻（最後濃度約為 300 ng / ml 或 60 pmole / ml）。將 membrane 泡入含有 probe 的 DIG Eazy Hy，於 37 ~ 41 $^{\circ}$ C (Oligonucleotide 的 T_m 值 - 15 $^{\circ}$ C) 震盪 (50 rpm) 16 小時。配製 25 ml 的 2 X washing buffer (2.5 ml 20 X SSC; 500 μ l

10 % SDS; 22 ml DEPC-treated H₂O), 將 membrane 泡入 2 X washing buffer, 於室溫震盪 (50 rpm) 5 分鐘, 重複此步驟一次 (清洗 2 次)。配製 25 ml 的 0.5 X washing buffer (625 μ l 20 X SSC; 500 μ l 10 % SDS; 23.875 ml DEPC-treated H₂O), 將 membrane 泡入 0.5 X washing buffer, 於 37 ~ 41 °C (Oligonucleotide 的 T_m 值 - 15°C) 震盪 (50 rpm) 15 分鐘, 重複此步驟一次 (清洗 2 次)。

3.3.2.4 免疫偵測

將 membrane 泡入 washing buffer, 於室溫震盪 (50 rpm) 15 分鐘, 重複此步驟一次 (清洗 2 次)。配製 20 ml 的 1 X Blocking buffer (18 ml Maleic acid buffer; 2 ml 10 X Blocking buffer), 將 membrane 放入 1 X Blocking buffer 中, 於室溫震盪 (50 rpm) 30 分鐘。配製 20 ml Antibody buffer (18 ml Maleic acid buffer; 2 ml 10 X Blocking buffer; 2 μ l Antibody, Roche Anti-DIG-AP), 將 membrane 放入 Antibody buffer 中, 於室溫震盪 (50 rpm) 30 分鐘。將 membrane 泡入 washing buffer 中, 於室溫震盪 (50 rpm) 15 分鐘, 重複此步驟一次 (清洗 2 次)。將 membrane 泡入 Detection buffer 中, 於室溫震盪 (50 rpm) 10 分鐘。將 membrane 放置在投影片上 (有 RNA 那面朝上), 混合 10 μ l 的 CSPD 和 990 μ l 的 Detection buffer, 加到 membrane 上, 蓋上另一片投影片, 推掉多餘緩衝液和氣泡, 以鋁鉑紙包好, 於 37 °C 反應 20 分鐘。在暗房進行壓片, 將底片隔著投影片放置於 membrane 上, 待感光適當時間後, 將底片置於 Develop buffer 中使影像顯現, 再以 Fix buffer 固定影像, 以清水沖洗掉緩衝液後, 將底片陰乾永久保存。

肆、結果

4.1 pSilencer 系列質體建構與定序分析

pSilencer 系列質體建構流程參照圖二。首先，pUC57-X1337G 是請廠商 (MDbio) 合成並將設計的 DNA 片段接入 pUC57 質體。其接入 DNA 序列為針對不同 DV2 的 NS 基因設計的 shRNA 序列，每個 shRNA 片段外以不同限制酶分隔以做為切割某單一 shRNA 序列進行後續質體建構。在 pUC57-X1337G 上含有的 shRNA 序列為：5'- *Sac* I - (*Bam*HI)siNS2A-1(*Hind*III) - *Kpn* I - *Ava* I - (*Bam*HI)siNS2B-1(*Hind*III) - *Nae* I - (*Bam*HI)sieGFP(*Hind*III) - *Spe* I - (*Bam*HI)siNS4A-1(*Hind*III) - *Xho* I - *Not* I - (*Bam*HI)siNS4B-1(*Hind*III) - *Pst* I -3' (見圖一)。將 pUC57-X1337G 上以每段 shRNA 序列兩端外圍不同限制酶酵素切割 (例如：利用 *Sac* I 與 *Kpn* I 處理可以得到 (*Bam*HI)siNS2A-1(*Hind*III) 片段；利用 *Ava* I 與 *Nae* I 處理可以得到 (*Bam*HI) siNS2B-1(*Hind*III) 片段...等)，利用 PAGE 及膠上純化獲得此大約 80 ~ 86 bp 之 DNA 片段。將各自 80 ~ 86 bp 之 DNA 片段再利用 *Bam* HI 與 *Hind* III 進行第二次酶切獲得各自不同 shRNA 片段的 insert (大約 65 ~ 68 bp)，與經 *Bam* HI 與 *Hind* III 處理過的線性 pSilencer 3.1-H1 neo siRNA Expression Vector 接合，建構出一系列表現 shRNA 片段的 pSilencer shRNA Expression Vector (pSilencer-SiNS2A-1、pSilencer- SiNS2B-1、pSilencer-SiNS4A-1、pSilencer-SiNS4B-1)，質體結構圖請參照圖三。由於接入 insert 片段很短 (大約 65 ~ 68 bp) 且無適當酵素切位於 insert 區域，直接以定序結果判定質體建構，可得知各建構質體的 insert 部分皆符合預期，定序結果請參照表六~九。

4.2 pDsRed-pS. 系列質體建構與定序分析

pSilencer 系列質體 (請參照圖三) 上面帶有細胞轉染用藥物篩選標記 Neomycin，但是當轉染入細胞後並沒有觀察的報導基因可明確知道轉染效

率，因此建構 pDsRed-pS. 系列質體含有 reporter gene, *Discosoma sp.* red fluorescent protein, DsRed，質體轉染後可利用螢光觀察轉染效率。

pDsRed-pS. 系列質體建構流程參照圖四，利用 pSilencer shRNA Expression Vector (pSilencer-SiNS2A-1、pSilencer-SiNS2B-1、pSilencer-SiNS4A-1、pSilencer-SiNS4B-1) 以 pS-F-1(288) 與 pS-R-1(635) 引子對進行 PCR 製作出含有各質體的 H1 RNA pol III promoter 以及其下游表現 shRNA 片段的 PCR 產物 (約 362 bp)。將 PCR 產物以其兩端的 *E.coO109* I 切位接合至 pDsRed-Express2-N1 質體的 *E.coO109* I 切位處，建構出一系列帶有 H1 RNA pol III promoter 以及其下游表現 shRNA 片段的 pDsRed - shRNA Expression Vector (pDsRed-pS.-siNC、pDsRed-pS.-SiNS2A-1、pDsRed-pS.-SiNS2B-1、pDsRed-pS.-SiNS4A-1、pDsRed-pS.-SiNS4B-1)。經由 *Nde* I 與 *Hind* III 作用，含有 H1 RNA pol III promoter - shRNA 片段會多一個 *Hind* III 切位，可得到約為 0.39、1.19、3.46 kb 之 DNA 片段，可與 pDsRed-Express2-N1 做區分 (只有 0.39、4.3 kb 片段)，質體結構及限制酶作用位置圖請參照圖五、電泳結果圖請參照圖六。定序結果請參照表十~十四，皆符合預期。

4.3 BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後之空斑試驗測試

首先先用 BHK-21 細胞以不同 G418 濃度測試對細胞的毒性，挑選 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度培養 2 天可以毒殺大部分 BHK-21 細胞 (毒殺約 70%) 做為篩選掉未轉染細胞的條件，請參照圖七。

將經過 pDsRed-pS. 系列質體轉染 24 小時的 BHK-21 細胞，置換成含抗生素 (G418: 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 5% FBS/MEM 培養 2 天，篩選掉未轉染細胞。經 2 天 G418 篩選後，細胞族群大部分為帶有轉染質體的細胞 (稱為短暫性質體轉染細胞，分別稱為 BHK-DsRed、BHK-siNC、BHK-siNS2A、

BHK-siNS2B、BHK-siNS4A、BHK-siNS4B)。實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有轉染質體的 BHK-21 細胞（短暫性質體轉染細胞）。分別以 100 PFU (plaque-forming unit) 的登革熱病毒 (DV 2 PL046 strain) 與日本腦炎病毒 (JEV RP9 strain) 37°C 感染 1 小時後，加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入含有 5 % CO_2 的 37°C 培養箱中培養。由於 DV2 與 JEV 形成空斑速度不同，DV2 組培養 7 天後，進行甲醛固定及結晶紫染色細胞，計數空斑數目；JEV 組則是培養 3 天後，進行甲醛固定及結晶紫染色細胞，計數空斑數目。此實驗以 JEV 組作為整體實驗之對照組，DV2 組作為整體實驗之實驗組進行 3~4 次重複性實驗。兩組實驗中以 BHK 細胞作為短暫性質體轉染細胞的對照組，短暫性轉染 BHK-DsRed 的細胞做為其他短暫性轉染 BHK-siRNA 細胞的對照組，短暫性轉染 BHK-siNC 的細胞表現出的 siRNA，其 21 nt 的序列對於人類、小鼠、大鼠基因體的序列只有部分相似，不會在宿主內引起 RNAi。本次實驗有感染前觀察短暫性轉染細胞螢光與可見光圖、短暫性轉染後之結晶紫空斑圖的具代表性圖，請參照圖八。

由圖九.a 結果顯示，DV2 組部分，以 BHK 細胞的空斑數據當作 100 % 基準去分析其他短暫性質體轉染細胞空斑相對值，短暫性質體轉染細胞的空斑相對值大部分則是介於 70 ~ 80 %。但其中有 BHK-siNS2A 的相對值為 52.69 %，較 BHK-DsRed 的細胞 (71.4 %) 與 BHK-siNC 的細胞 (77.52 %) 的值低；另外，BHK-siNS4A 的相對值為 91.11 %，較 BHK-DsRed 的細胞 (71.4 %) 與 BHK-siNC 的細胞 (77.52 %) 的值高。經過統計 (利用 ANOVA 與 Student's T test) 後，僅 BHK-siNS2A 與 BHK-siNC 的值有統計上的差異 ($P < 0.05$)。

由圖九.b 結果顯示，JEV 組部分，以 BHK 細胞的空斑數據當作 100 % 基準，短暫性質體轉染細胞的空斑相對值則是介於 70 ~ 80 %。其他短

暫性轉染 BHK-siRNA 細胞 (BHK-siNS2A、BHK-siNS2B、BHK-siNS4A、BHK-siNS4B) 相較於短暫性轉染 BHK-DsRed 的細胞與 BHK-siNC 的細胞則無差異。

4.4 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之挑選

選用 pDsRedE2-N1、pDsRed-pS.-siNC、pDsRed-pS.-SiNS2A-1、pDsRed-pS.-SiNS4A-1 四種質體分別轉染至 BHK-21 細胞中，以 1/500 稀釋倍率 (約 400 ~ 800 顆細胞) 將含細胞液均勻置入 10 cm 培養皿中，以有含抗生素 (G418: 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 的 5 % FBS / MEM，於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 培養箱培養 10 ~ 12 天 (每 2 天更換一次新鮮 MEM)。直到單一細胞長成群落，將單一細胞群落依序放大轉移至 24-well 培養盤、12-well 培養盤、6-well 培養盤、10 cm 培養皿，最後獲得穩定細胞株。

由表十五之結果，每種質體的穩定細胞株各挑選 4 株以做後續實驗，4 株帶有 DsRed 質體的穩定株：RD010301、RD030401、RD040201、RD050201；4 株帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101、NC040303、NC050403、NC050501；4 株帶有 siNS2A 質體穩定株：2A060203、2A060402、2A060404、2A070206；4 株帶有 siNS4A 質體穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503。另外，由圖十之結果，利用可存活於含抗生素 (G418) 及表現紅色 *Discosoma sp.* red fluorescent protein 作為穩定表現質體的依據。

4.5 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑試驗測試

實驗流程大致與短暫性轉染空斑試驗相同，準備 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (1 株帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；1 株帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101；4 株帶有 siNS2A 質體的穩定株：2A060203、2A060402、2A060404、2A070206；4 株帶有 siNS4A 質

體的穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503)。實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株。分別以 100 PFU 的 DV2 與 JEV 以 37°C 感染 1 小時後，加入 4 ml 的 1.1 % methyl cellulose medium，置入含有 5 % CO_2 的 37°C 培養箱中培養。DV2 組培養 7 天後，進行甲醛固定及結晶紫染色細胞，計數空斑數目；JEV 組則是培養 3 天後，進行甲醛固定及結晶紫染色細胞，計數空斑數目。此實驗以 JEV 組作為整體實驗之對照組，DV2 組作為整體實驗之實驗組，進行 5 次重複性實驗。兩組實驗中以 BHK 細胞作為穩定細胞株的對照組，DsRed 質體的穩定細胞株(RD050201)做為其他帶有 siRNA 質體的穩定株的對照組。本次實驗有穩定株細胞之結晶紫空斑圖的具代表性圖，請參照圖十一。

由圖十二.a 結果顯示，DV2 組部分，以 BHK 細胞的空斑數據當作 100 % 基準去分析其他穩定細胞株空斑相對值，穩定細胞株的相對值大部分則是介於 105 ~ 140 %。但其中有 DsRed 質體的穩定細胞株 (RD050201) 的相對值為 69.25 %；另外，1 株帶有 siNS4A 質體的穩定株 (4A070503) 的相對值為 81.85 %。經過統計 (利用 ANOVA 與 Student's T test) 後，帶有 DsRed 質體的穩定細胞株 (RD050201)、帶有 siNS4A 質體的穩定株 (4A070503) 與帶有 siNC 質體的穩定株 (NC010101) 的值有統計上的差異 ($P < 0.05$)。

由圖十二.c 結果顯示，JEV 組部分，以 BHK 細胞的空斑數據當作 100 % 基準，大部份穩定細胞株空斑相對值則是介於 79 ~ 97 %。經過統計 (利用 ANOVA 與 Student's T test) 後，大部分帶有 siRNA 質體穩定細胞株 (帶有 siNS2A 質體的穩定株：2A060203、2A060402、2A060404、2A070206；帶有 siNS4A 質體的穩定株：4A070201、4A070402、4A070503) 相較於帶有 DsRed 質體的穩定細胞株 (RD050201) 與帶有 siNC 質體的

穩定株(NC010101)無差異。僅 1 株帶有 siNS4A 質體的穩定株(4A070403)的相對值 (107.19 %), 較於與帶有 siNC 質體的穩定株 (NC010101) 的值有統計上的差異 ($P < 0.05$)。

由於圖十二.a 與圖十二.c 分析為技術性實驗重複(Technical Repeats), 因此考慮以整體細胞株族群角度觀看, 將 4 株帶有 siNS2A 質體的穩定株 (2A060203、2A060402、2A060404、2A070206) 視為一個 siNS2A 質體的穩定株族群 (siNS2A 01 ~ 04); 4 株帶有 siNS4A 質體的穩定株: 4A070201、4A070402、4A070403、4A070503) 視為一個 siNS4A 質體的穩定株族群 (siNS4A 01 ~ 04), 將各自 4 株的空斑相對值彙整得到圖十二.b 與圖十二.d 的生物學的實驗重複 (Biological Repeats) 結果。

由圖十二.b 結果顯示, DV2 組部分, 經過統計 (利用 ANOVA 與 Student's T test) 後, siNS2A 質體的穩定株族群 (siNS2A 01 ~ 04, 123.47 %) 和 siNS4A 質體的穩定株族群 (siNS4A 01 ~ 04, 104.65 %) 均與帶有 siNC 質體的穩定株 (NC010101, 128.52 %) 的值無統計差異。

同樣, 由圖十二.d 結果顯示, JEV 組部分, 經過統計 (利用 ANOVA 與 Student's T test) 後, siNS2A 質體的穩定株族群 (siNS2A 01 ~ 04, 88.13 %) 和 siNS4A 質體的穩定株族群 (siNS4A 01 ~ 04, 91.60 %) 均與帶有 siNC 質體的穩定株 (NC010101, 82.00 %) 的值無統計差異。

4.6 表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA (small RNA) 之表現

本實驗以 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株(1 株帶有 DsRed 質體的穩定株: RD050201; 4 株帶有 siNC 質體的穩定株: NC010101、NC040303、NC050403、NC050501; 4 株帶有 siNS2A 質體穩定株: 2A060203、2A060402、2A060404、2A070206; 4 株帶有 siNS4A 質

體穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503) 進行實驗，抽取 BHK-21 細胞及上述的 13 株細胞株的小分子 RNA (≤ 200 nt)。本實驗分成三組各別偵測 siNC、siNS2A、siNS4A 的小分子 RNA，以從 BHK-21 與有 DsRed 質體的穩定株：(RD050201) 抽取的小分子 RNA 當作負對照組 (negative control) 並用各自的 3 端修飾 Digoxigenin (DIG) 的探針 (pS-shNCPB、pS-sh2APB、pS-sh4APB) 當作 DIG 免疫偵測時的 size marker。

由圖十三、十四、十五的北方墨點結果顯示，經過 16 小時壓片後，除了免疫偵測時的 size marker (pS-shNCPB、pS-sh2APB、pS-sh4APB) 經過電泳、轉漬、免疫偵測、壓片後，在 17 ~ 25 nt 處可看到條帶 (band)。三組的 negative control (BHK-21 與 RD050201) 抽取的小分子 RNA 在 17 ~ 25 nt 處沒有看到對應的 band。另外，每組北方墨點都對應另外兩個 siRNA 細胞株抽取的小分子 RNA (例如：siNC 組的北方墨點會選 1 株 siN2A 及 1 株 siNS4A 抽取的小分子 RNA 當做探針專一性對照，以此類推...) 沒有在 17 ~ 25 nt 處看到 band。最後，每組北方墨點的實驗組部分的小分子 RNA (例如：siNC 組的北方墨點的 4 株 NC010101、NC040303、NC050403、NC050501 抽取的小分子 RNA...)，於 17 ~ 25 nt 處也沒有看到 band。

最後，選用 siNC 組將免疫偵測時的 size marker 的量減半 (560 pg 降至 280 pg) 再進行一次北方墨點。由圖十六的北方墨點結果顯示，經過 16 小時壓片後，還是只有免疫偵測時的 size marker (pS-shNCPB) 可以在 17 ~ 25 nt 處看到 band，可知北方墨點的電泳、轉漬、偵測的部分沒有問題。

伍、討論

5.1 DV2 基因體、JEV 基因體的分析

實驗室所記載的 DV2 PL046 序列與 NCBI 的 genome sequence database 所公佈之 DV2 strain AJ968413.1 (見表三) 一致；JEV RP9 所記載的序列與 NCBI 所公佈之 JEV strain NC_001437.1 (見表四) 一致。在分子生物背景層面 JEV 與 DV 有許多相似處，但將兩病毒基因體的核苷酸序列比對後，兩者的 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 並不相似，各基因的核苷酸相同率只有 44.4 ~ 56.3 % (見表一)，另外，將針對 DV2 的設計的 siNS2A、siNS2B、siNS4A、siNS4B 序列與 JEV 全長基因體比對(見表五)，每個 siRNA 的序列也只有局部與 JEV 一致。siRNA 對於目標 mRNA 的序列正確性要求很高，所以採用 JEV 做為實驗的對照組。

5.2 質體短暫性轉染與穩定株細胞之空斑試驗的分析

根據在 DV2 部分的結果顯示，在質體短暫性轉染後之空斑試驗測試中(見圖九)，僅 siNS2A 的空斑相對值(52.69 %)與 siNC 之值(77.52 %)相比有統計上差異，但僅有 32.04 % 的抑制，而其他三個 siRNA 則無抑制的效果；另外，在質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑試驗中(見圖十二)，細胞穩定株 siNS2A 質體的穩定株族群 (siNS2A 01 ~ 04) 和 siNS4A 質體的穩定株族群 (siNS4A 01 ~ 04) 與帶有 siNC 質體的穩定株 (NC010101) 均無差異，表示這四個 siRNA 對於 DV2 沒有明顯的抑制的效果，不會影響 DV2 的複製。

而從圖十二.b、DV2 Biological Repeats 可以看到有 DsRed 質體的穩定細胞株 (RD050201) 的空斑相對值為 69.25 % (與 siNC 之值有統計上差異，且有 46.12 % 的抑制)，此可能原因為在 negative control 部分，帶有

DsRed 質體的穩定株與帶有 siNC 質體的穩定株只各挑選 1 株 ($n = 1$) 進行實驗，而實驗組部分，帶有 siNS2A 質體的穩定株與帶有 siNS4A 質體的穩定株是以 4 株的數據整合變成以族群 ($n = 4$) 的角度分析，所以在 DsRed 質體的穩定細胞株部分，應該是單一細胞株本身的狀況而導致的結果，因為不管是有 DsRed 質體的穩定細胞株或是有 siRNA 質體的穩定株，其細胞都會表現 report gene (DsRed 紅色螢光蛋白)，應該不是因為 DsRed 紅色螢光蛋白造成 DV2 感染後抑制的差異。

另外，造成 siNS2A 在短暫性轉染 (與 siNC 相比有 32.04 % 的抑制) 與穩定株族群 (與 siNC 相比無差異) 的結果不一致，其可能性由圖八與圖十的短暫性轉染與穩定株族群的螢光程度來推測，短暫性轉染細胞的螢光比穩定株族群相對高出許多。穩定株族群需要更長的曝光時間才可觀察到亮度，表示短暫性轉染細胞內質體上的基因表現量 (report gene 以及 shRNA 的表現量) 比細胞穩定株高，細胞穩定株經過長時間的抗藥篩選以及細胞分裂，原本在短暫性轉染細胞內的大部分質體已被稀釋至可基本維持對抗抗生素 (G418) 藥篩壓力的表現量。

shRNA 的表達量與啟動子強弱有關，本研究使用 siRNA 的啟動子為 H1 RNA pol III promoter。H1 RNA 為 human RNase P 的一部分，RNase P 為一種 Ribozyme，主要是剪切 tRNA 分子多餘的序列，為 housekeeping gene，所以其啟動子可以用來穩定產生小分子 RNA。但因細胞穩定株會大幅降低質體上的基因表現量，siRNA 的表現量會比短暫性轉染細胞低。可嘗試改用 Cytomegalomavirus (CMV) pol II promoter，CMV promoter 表達水平較高，且不是人類或鼠類細胞的內源啟動子，不會影響細胞本身的轉錄，應該可改善細胞穩定株降低質體上基因表現量的問題。使用 H1 promoter 時，其 shRNA 序列設計為：H1 pol III promoter - Bam HI - Sense Strand - Loop - Antiense Strand - RNA pol III Terminator - Hind III -。若改用 CMV

promoter，其 shRNA 序列設計則需改為：CMV promoter - Bam HI - Sense Strand - Loop - Antisense Strand - Hind III - SV40 poly(A) signal，質體建構時，底線 shRNA 部分則不需要加入五個 T 當作 RNA pol III Terminator，因為 RNA pol II 可以耐受 4 個 U 或是更長的一串 U，所以 shRNA 下游需添加 SV40 poly(A) signal 當作轉錄終止信號。

5.3 小分子 RNA 之偵測分析

此部分的結果，除了免疫偵測時的 size marker 可以看到 band，其他則無法於 marker 附近（17~25 nt 處）觀察到 band，其可能的原因如同空斑試驗中提到相同，細胞穩定株經過長時間的抗藥篩選以及細胞分裂，原本在短暫性轉染細胞內的大部分的質體已被稀釋至可以基本維持對抗生素（G418）藥篩壓力的表現量，report gene 以及 shRNA 的表現量也就跟著降低，以致於北方墨點偵測不到。在本實驗的北方墨點是以傳統偵測 mRNA 修改成偵測小分子 RNA 的方法：用 denaturing PAGE 進行電泳、利用帶正電 Nylon membrane 以高電壓轉漬 RNA、以適用 Oligonucleotide 的 probe 的雜交條件（如：probe 的濃度提高、Hybridization 的溫度下降...等），最後利用 DIG 免疫偵測（見附錄十三），但還是無法偵測到細胞穩定株中的 siRNA。

最近文獻指出，Kim 團隊發展出一個 LED 北方墨點法來偵測小分子 RNA (Kim *et al.*, 2010)，應該可以改善偵測不到細胞穩定株中的 siRNA 的問題。其 LED 是指 LNA、EDC、DIG：相較於傳統 DNA oligonucleotide probe，而有一種 LNA (Locked nucleic acid) oligonucleotide probe，其核糖環 (ribose ring) 上的 2'-O 與 4'-C 形成 methylene bridge 連結（見附錄十四），這樣的結構可讓 LNA oligonucleotide 較快速與膜上的 RNA 互補，黏合後形成的 duplex (RNA : LNA oligonucleotide) 其穩定性也較高，而且

其偵測小分子 RNA 的 sensitivity 也較傳統 DNA oligonucleotide probe 高 (Várallyay E *et al.*, 2007 & 2008); 另外, 傳統上是利用 UV-cross-linking 的方式使 RNA 連結於轉漬膜上, 但這種方式對於偵測 < 40 bp 的小分子 RNA 會降低偵測的結果。最近發展出利用一種水溶性的 carbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (簡稱 EDC, 見附錄十五) 來將 RNA 連結於膜上 (是將 RNA 的 5' 端的磷酸基與轉漬膜連結), 雖然 EDC cross-linking 的作用時間(15 分 ~ 2 小時)較 UV cross-linking 作用時間(2 ~ 4 分)長許多, 但研究結果顯示, 可增加 20 ~ 50 倍的 sensitivity (Pall *et al.*, 2007 & 2008); 最後利用 Digoxigenin (DIG) 免疫偵測相較於利用同位素 ^{32}P (isotope ^{32}P) 偵測的 sensitivity 差不多, 而且 DIG 在偵測上更具安全性 (Ramkissoon *et al.*, 2006)。



陸、結論

在 Ambion, Inc 和 Qiagen, Inc 認為能降低目標基因表達 70 % 以上的 siRNA 方稱為有效；Sigma, Inc 的標準則是 75 %。由研究結果顯示，這四個設計的 siRNA 不會影響 DV2 複製而減少空斑數，表示為無基因沉默效果的 siRNA。因此除了利用多個 siRNA 設計平台對一個目標基因內找尋共同預測有潛力的 siRNA 外，一個目標基因內還必須找尋多個共同預測的 siRNA 以增加找尋到有效 siRNA 的機率。另外，在偵測 siRNA 部分，其偵測的步驟未來可以朝以 LED 的方式以及雜交的條件兩方面做修改，以達到可成功偵測到 siRNA。



柒、參考文獻

- Centers for Disease Control and Prevention, USA (CDC, USA).
<http://www.cdc.gov/>
- Center for Disease Control, Taiwan (CDC, Taiwan).
<http://www.cdc.gov.tw/mp.asp?mp=1>
- Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, Diamond MS. (2006). Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Virol*, 80:1340-1351.
- de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6:443-453.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:457-67.
- 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*, 21:2757-2768.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001 a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-498.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. (2001 b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20:6877-6888.
- 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.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811.
- 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
- Gubler DJ. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 10:100-103.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2:110-119.
- Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. (2000). Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol*, 81:2177-2182.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*, 176:313-21.
- Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. (2005). Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect*, 38:5-16.
- Kim SW, Li Z, Moore PS, Monaghan AP, Chang Y, Nichols M, John B. (2010). A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res*, 38:e98.
- 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.

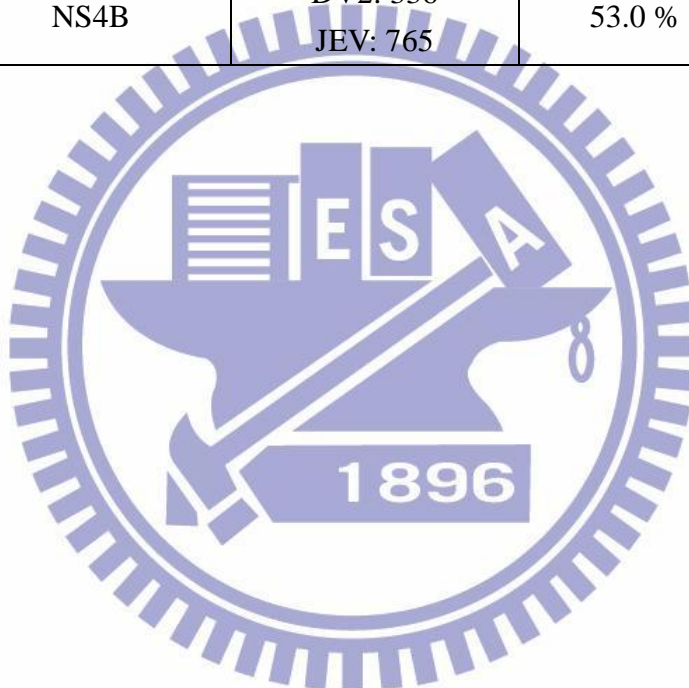
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, 5th edition:1101-1152
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology, 245:203-215.
- Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. Mol Cell Biol, 12:5238-5248.
- 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, 282:8873-8882.
- Minks MA, West DK, Benveniste S, Baglioni C. (1979). Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. J Biol Chem, 254:10180-10183.
- Mittal V. (2004). Improving the efficiency of RNA interference in mammals. Nat Rev Genet, 5:355-365.
- 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, 100:14333-14338.
- Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. (2004). siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. Nucleic Acids Res, 32: 124-129.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell, 2:279-289.

- Nimmannitya S. (1987). Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 18:392-397.
- Pacca CC, Severino AA, Mondini A, Rahal P, D'avila SG, Cordeiro JA, Nogueira MC, Bronzoni RV, Nogueira ML. (2009). RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus Genes*, 38:224-231.
- Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. (2007). Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res*, 35:e60.
- Pall GS, Hamilton AJ. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*, 3:1077-1084.
- Perera R, Kuhn RJ. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11:369-377.
- Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*, 124:485-493.
- Qi WB, Hua RH, Yan LP, Tong GZ, Zhang GH, Ren T, Wu DL, Liao M. (2008). Effective inhibition of Japanese encephalitis virus replication by small interfering RNAs targeting the NS5 gene. *Virus Res*, 132:145-151.
- Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Sloand EM, Young NS, Kajigaya S. (2006). Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes. *Mol Cell Probes*, 20:1-4.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67:227-264.

- 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*, 87:2605-2614.
- Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc*, 3:190-196.
- Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. (2007). Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 43:140-145.
- 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.
- Wengler G, Wengler G. (1991). The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*, 184:707-715.
- World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/en/>
- Wu YC. (1986). Epidemic dengue 2 on Liouchyou Shiang, Pingtung County in 1981. *Chinese J Microbiol Immunol* 1986;19:203-211.
- Wu X, Hong H, Yue J, Wu Y, Li X, Jiang L, Li L, Li Q, Gao G, Yang X. (2010). Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. *Virol J*, 7:270.
- Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol*, 8:4753-4765.

表一、 DV2 PL046 與 JEV RP9 的 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 之核苷酸相同率

基因名	大小 (bp)	相同率
NS2A	DV2: 654 JEV: 681	44.4 %
NS2B	DV2: 390 JEV: 393	48.1 %
NS4A	DV2: 858 JEV: 447	56.3 %
NS4B	DV2: 336 JEV: 765	53.0 %



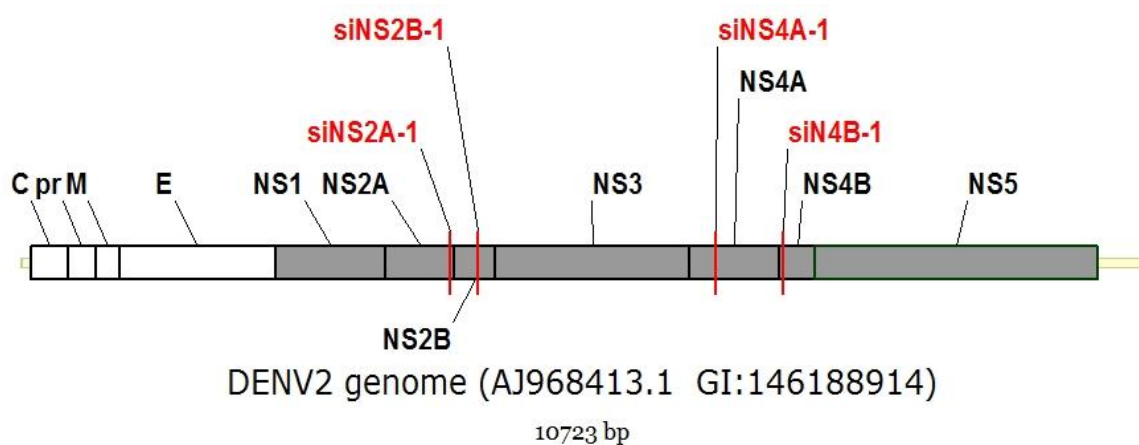
表二、shRNA Expression Vector 上 shRNA 片段的設計平台軟體及設計 siRNA 之結果

- siRNA Target Finder (Ambion, Inc)
http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html
- Invitrogen, Inc
<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=3360549240898877144>
- Gene Link, Inc
<http://www.genelink.com/sirna/shRNAi.asp>
- siRNA Design (Integrated DNA Technologies, Inc)
<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/ddRNAi/>
- SVM RNAi Design (Chang Bioscience, Inc)
<http://www.changbioscience.com/stat/sirna.html>
- siDirect (Naito *et al.*, 2004)
<http://design.rnai.jp/>

siNS2A	AAGGTCTCAATCCAACAGCTA (DV2 PL046: + 4075 ~ + 4093)
5'-G GATCCGGTCTCAATCCAACAGCTATTCAAGAGATAGCTGTTGGATTGAGACCTTTTTTGGAAA AGCTT-3' 3'-CCTAG GCCAGAGTTAGGTTGTCGATAAGTTCTCTATCGACAACCTAACTCTGGAAAAACCTTTTCGA A-5'	
siNS2B	AAGCAGTCCAATTCTGTCAAT (DV2 PL046: + 4340 ~ + 4358)
5'-G GATCCGCAGTCCAATTCTGTCAATTCAAGAGAATTGACAGAATTGGACTGCTTTTTTGGAAA AGCTT-3' 3'-CCTAG GCGTCAGGTTAAGACAGTTAAAGTTCTCTTAAGTGTCTTAACCTGACGAAAAACCTTTTCGA A-5'	
siNS4A	AAGATGACCTTAGGAATGTGC (DV2 PL046: + 6615 ~ + 6633)
5'-G GATCCGATGACCTTAGGAATGTGCTTCAAGAGAGCACATTCCTAAGGTCATCTTTTTTGGAAA AGCTT-3' 3'-CCTAG GCTACTGGAATCCTTACACGAAGTTCTCTCGTGTAAAGGATTCCAGTAGAAAAACCTTTTCGA A-5'	
siNS4B	AAGCCCAACTGTCGATGGAAT (DV2 PL046: + 7257 ~ + 7274)
5'-G GATCCGCCCAACTGTCGATGGAATTTCAAGAGAATTCCATCGACAGTTGGGCTTTTTTGGAAA AGCTT-3' 3'-CCTAG GCGGGTTGACAGCTACCTTAAAGTTCTCTTAAGGTAGCTGTCAACCCGAAAAACCTTTTCGA A-5'	

註、此表為利用上列的 siRNA 設計平台共同預測後，每個病毒基因具潛力的 siRNA 的序列位置之結果。

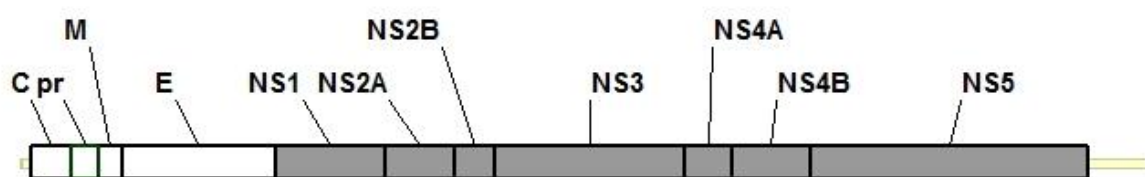
表三、登革熱病毒 (DV2) 全長基因體以及在目標基因上設計 siRNA 的位置



基因	位置
C	+ 97 ~ + 438
pr	+ 439 ~ + 711
M	+ 712 ~ + 936
E	+ 937 ~ + 2421
NS1	+ 2422 ~ + 3477
NS2A	+ 3478 ~ + 4131
NS2B	+ 4132 ~ + 4521
NS3	+ 4522 ~ + 6375
NS4A	+ 6376 ~ + 7233
NS4B	+ 7234 ~ + 7569
NS5	+ 7570 ~ + 10269
全長	10723 bp

	於 DV2 PL046 之位置
siNS2A-1	AAGGTCTCAATCCAACAGCTA (DV2 PL046: + 4075 ~ + 4093)
siNS2B-1	AAGCAGTCCAATTCTGTCAAT (DV2 PL046: + 4340 ~ + 4358)
siNS4A-1	AAGATGACCTTAGGAATGTGC (DV2 PL046: + 6615 ~ + 6633)
siNS4B-1	AAGCCCAACTGTCGATGGAAT (DV2 PL046: + 7257 ~ + 7274)

表四、日本腦炎（JEV）全長基因體示圖



JEV genome (NC 001437.1 GI:9626460)

10976 bp

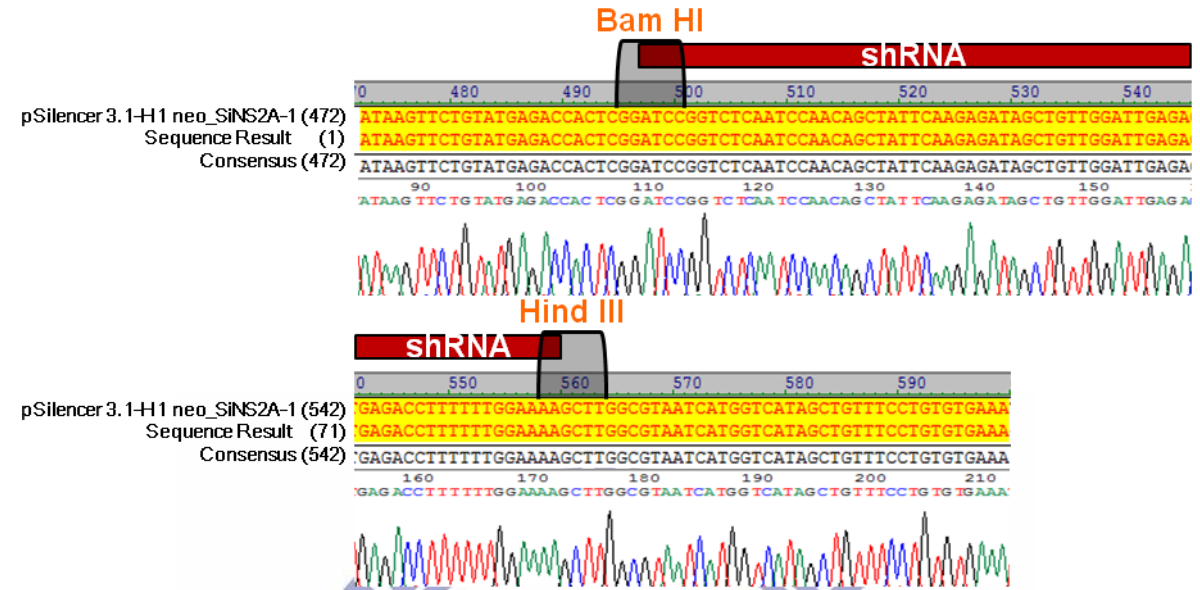
基因	位置
C	+ 96 ~ + 476
pr	+ 477 ~ + 752
M	+ 753 ~ + 977
E	+ 978 ~ + 2477
NS1	+ 2478 ~ + 3533
NS2A	+ 3534 ~ + 4214
NS2B	+ 4215 ~ + 4607
NS3	+ 4608 ~ + 6464
NS4A	+ 6465 ~ + 6911
NS4B	+ 6912 ~ + 7676
NS5A	+ 7677 ~ + 10391
全長	10976 bp

設計之 siRNA 之序列比對圖

	NS5												
	8768	8770	8780	8790	8800	8810	8820	8830	8840	8850	8860	8870	
JEV (strain JaOArS982)	8768	G	G	C	T	C	T	G	A	C	C	A	G
silNS4B seq	1	G	G	C	T	C	T	G	A	C	C	A	G

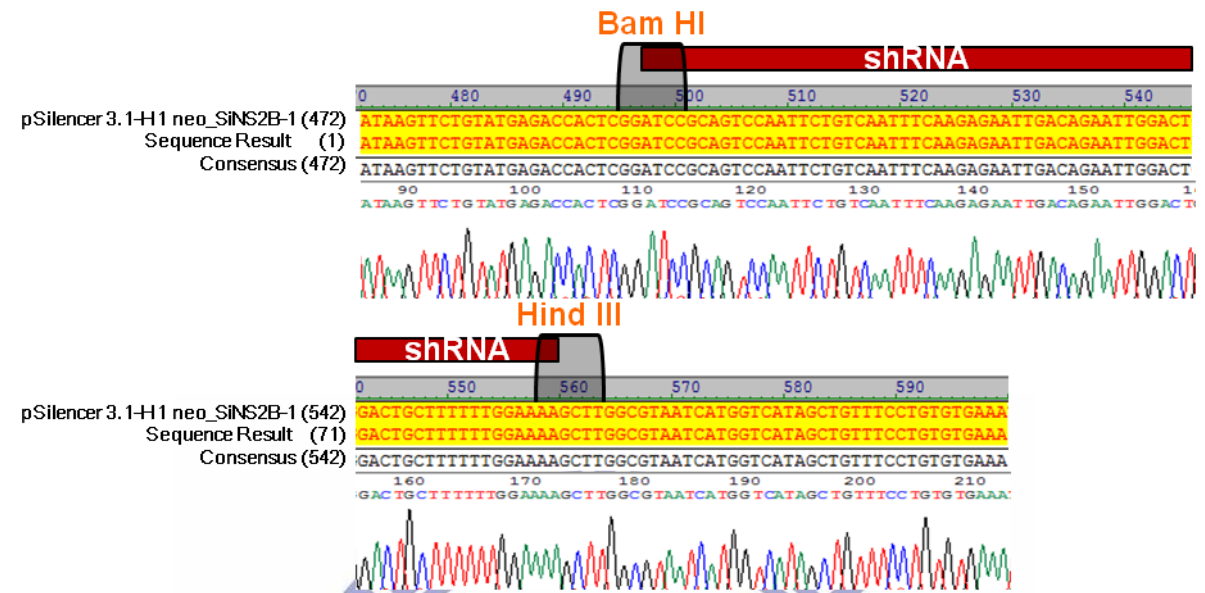
註：每行的第一列為日本腦炎腦炎（JEV RP9）全長基因體序列，每行的第二列各為 siNS2A、siNS2B、siNS4A、siNS4B 的序列，黃色區域代表兩個序列一致的核苷酸；每行的上面細長（灰色）方框表示第一列 JEV 該段序列的基因名。

表六、pSilencer-SiNS2A-1 定序結果



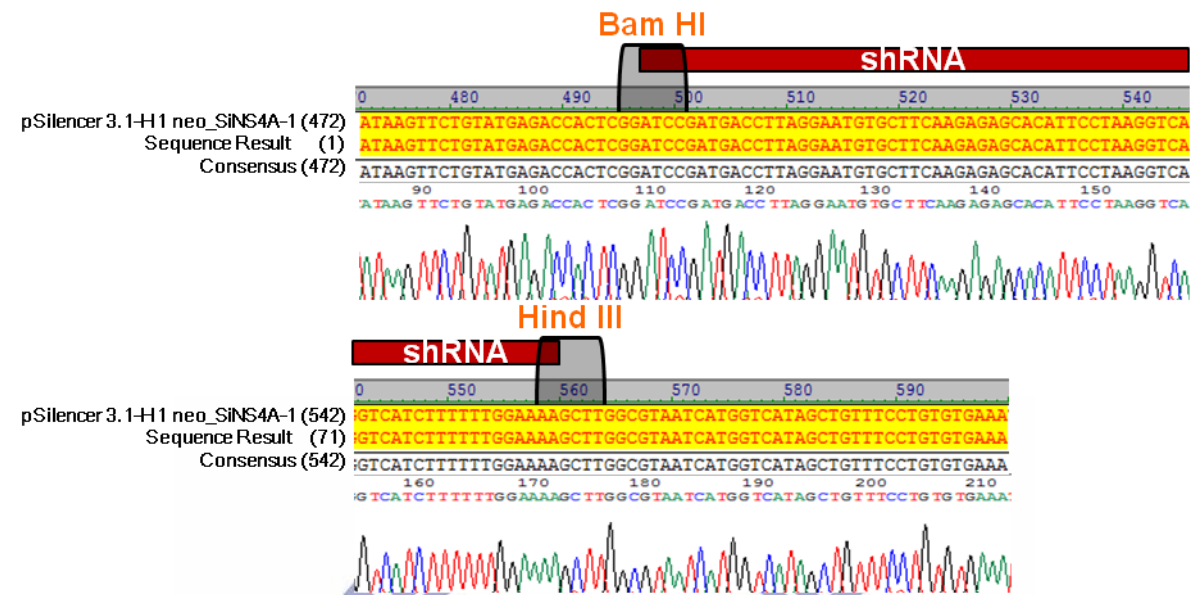
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *Bam* HI 與 *Hind* III 接合的酵素位置，另外細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表七、pSilencer-SiNS2B-1 定序結果



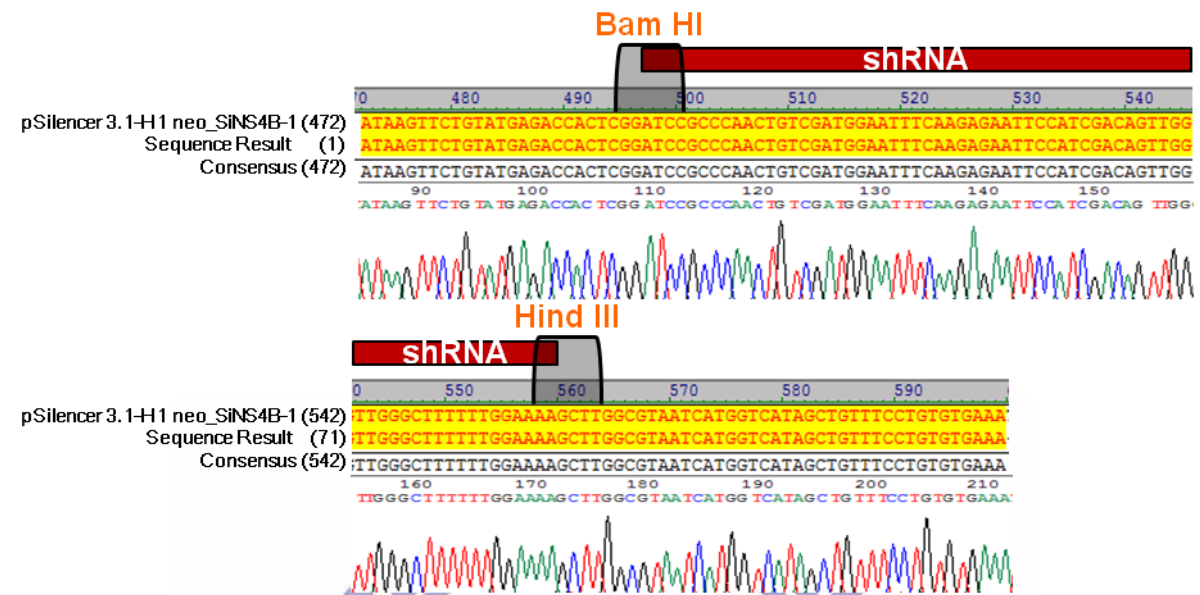
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *Bam* HI 與 *Hind* III 接合的酵素位置，另外細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表八、pSilencer-SiNS4A-1 定序結果



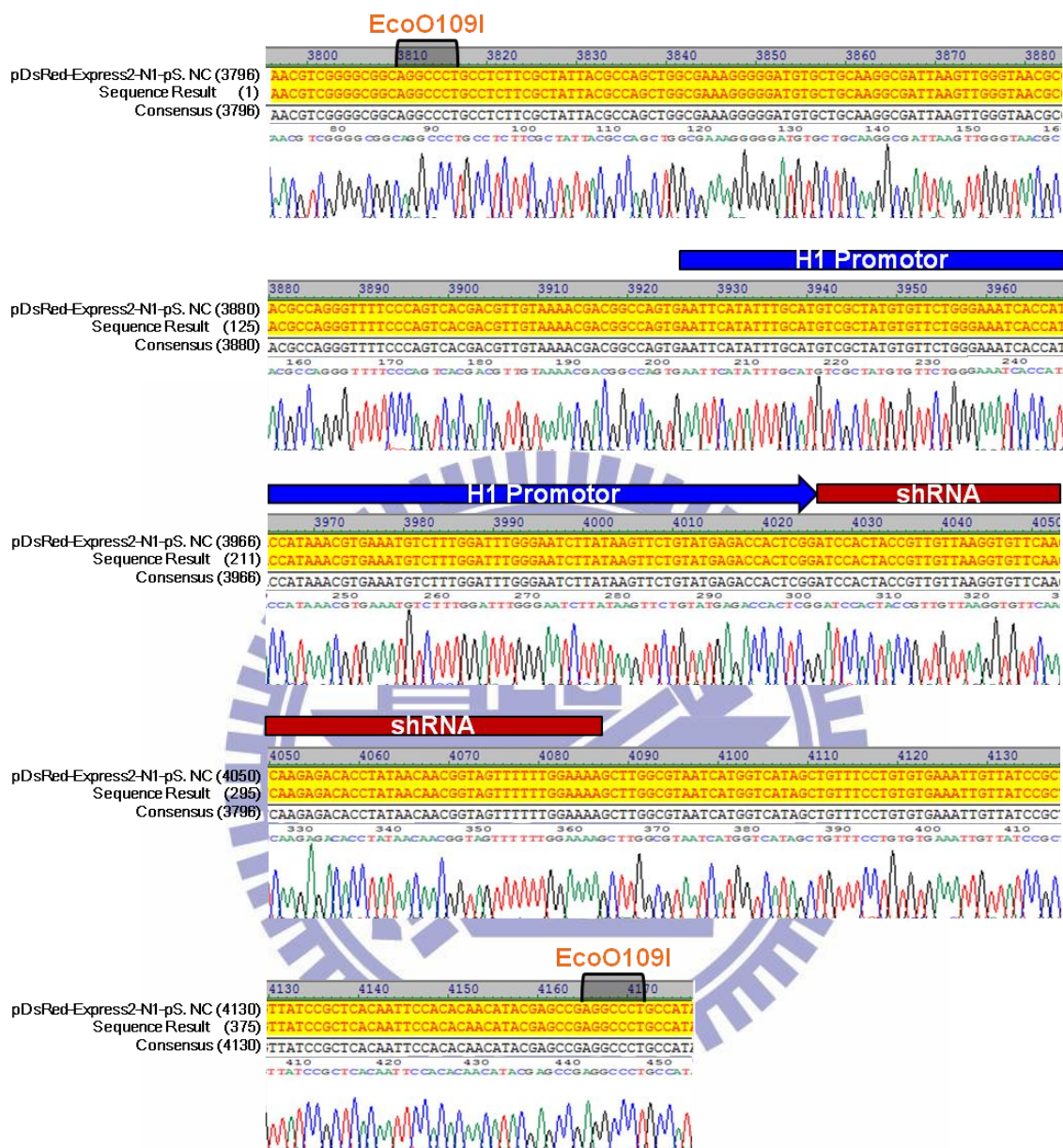
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *Bam* HI 與 *Hind* III 接合的酵素位置，另外細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表九、pSilencer-SiNS4B-1 定序結果



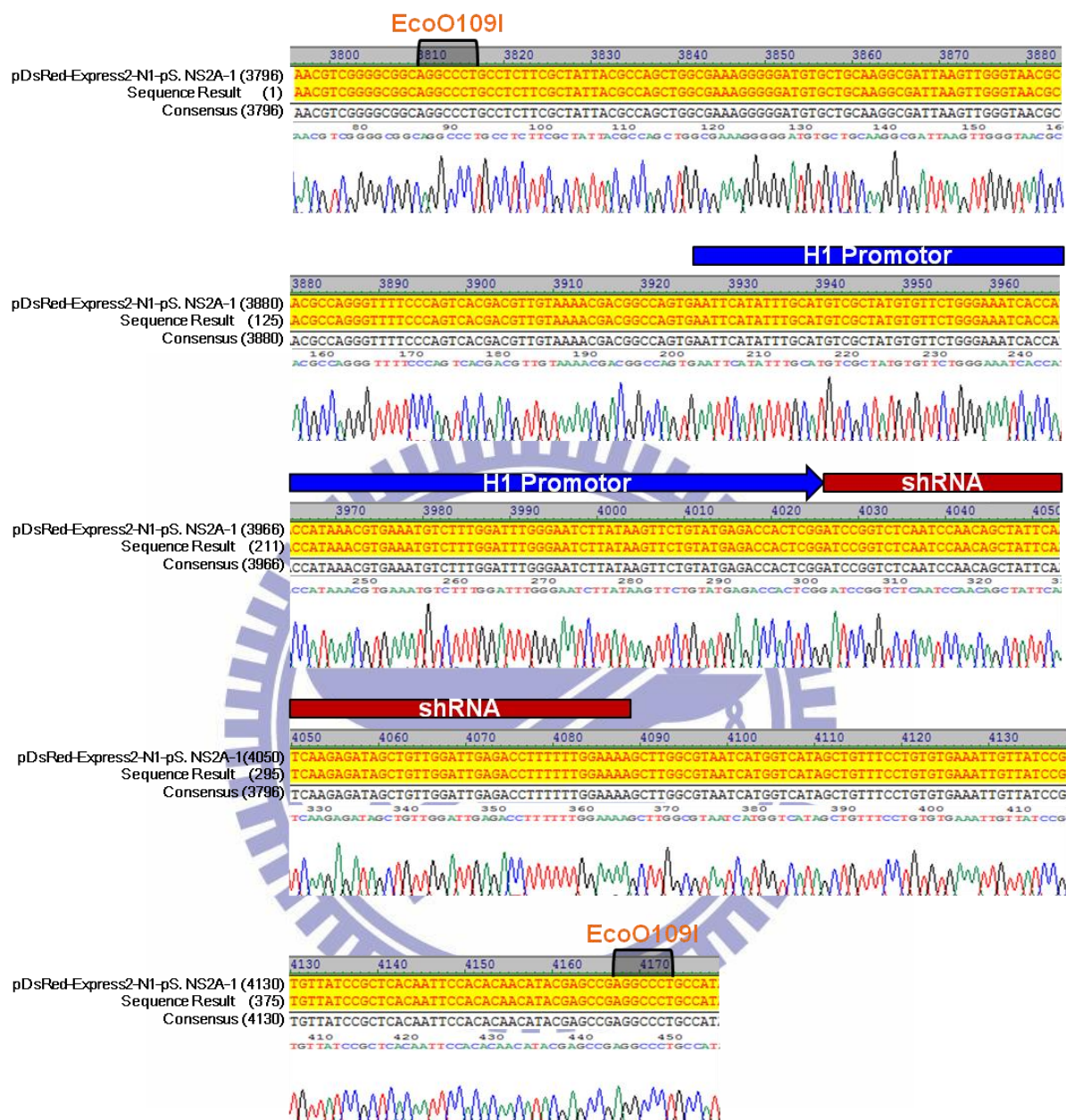
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *Bam* HI 與 *Hind* III 接合的酵素位置，另外細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十、pDsRed-pS.-siNC 定序結果



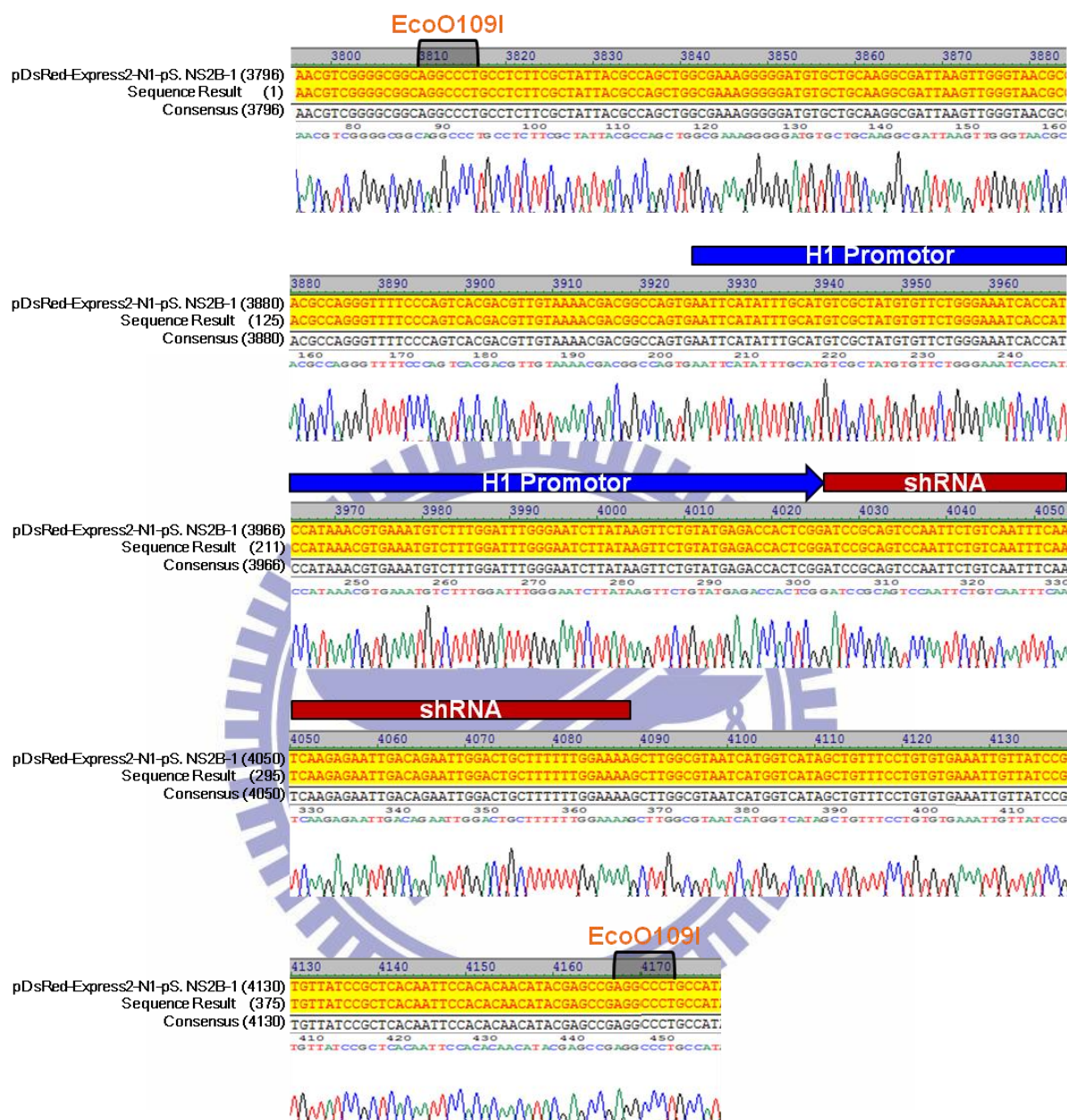
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *EcoO109I* 接合的酵素位置，另外細長（藍色）箭頭區塊為 H1 RNA pol III promoter 序列區域；細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十一、pDsRed-pS.-SiNS2A-1 定序結果



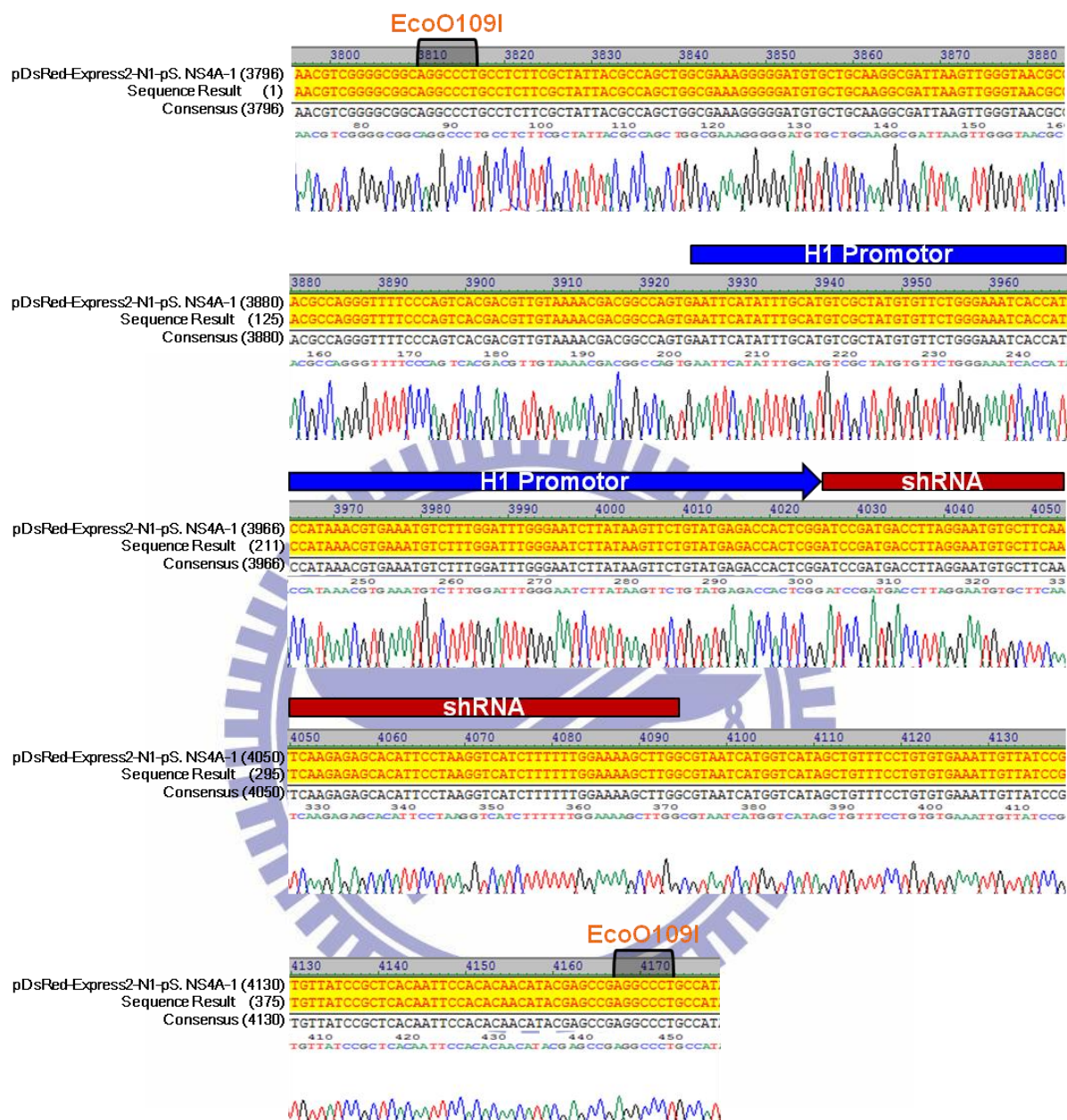
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *EcoO109I* 接合的酵素位置，另外細長（藍色）箭頭區塊為 H1 RNA pol III promoter 序列區域；細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十二、pDsRed-pS.-SiNS2B-1 定序結果



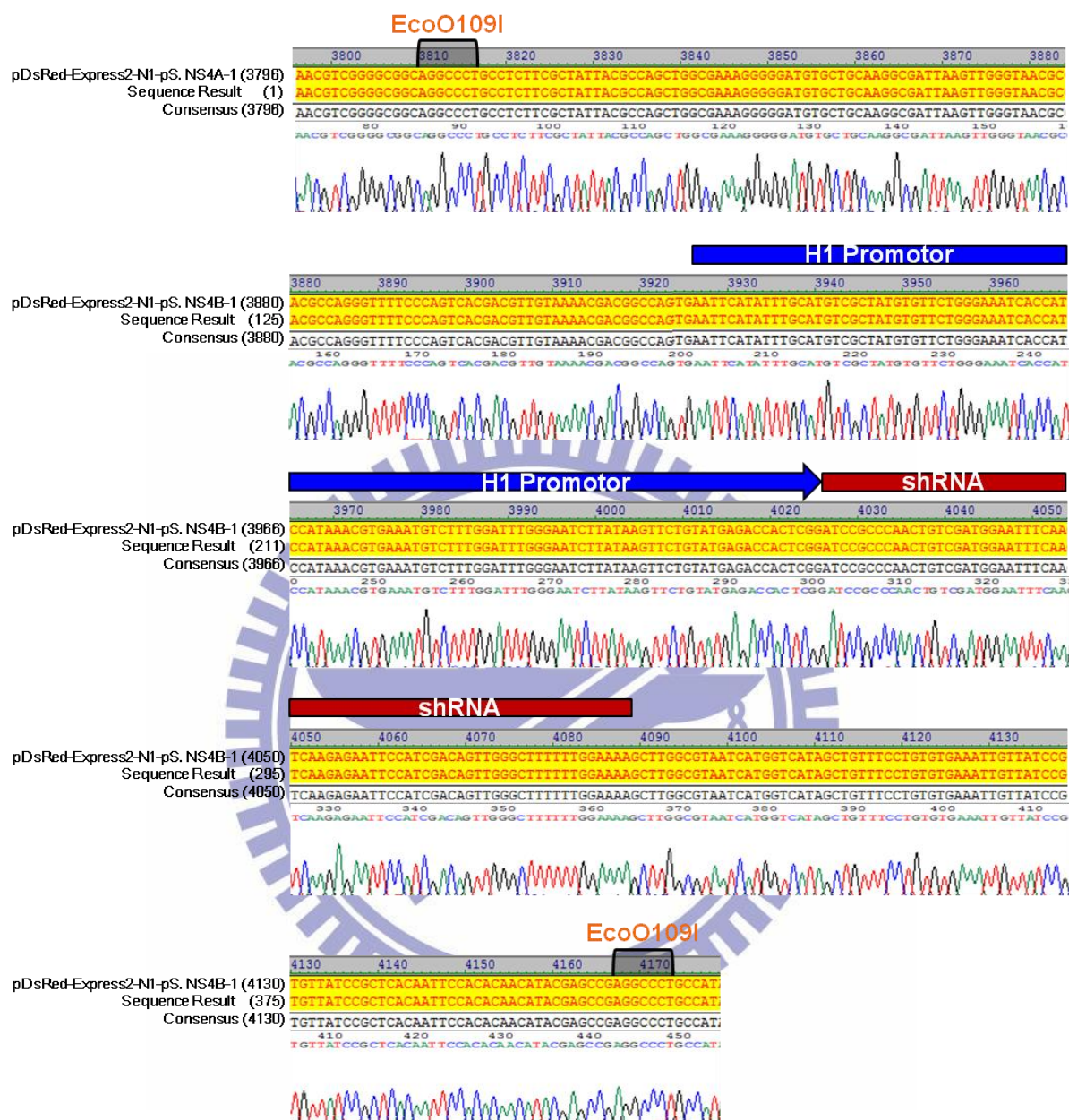
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *EcoO109I* 接合的酵素位置，另外細長（藍色）箭頭區塊為 H1 RNA pol III promoter 序列區域；細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十三、pDsRed-pS.-SiNS4A-1 定序結果



註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *EcoO109I* 接合的酵素位置，另外細長（藍色）箭頭區塊為 H1 RNA pol III promoter 序列區域；細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十四、pDsRed-pS.-SiNS4B-1 定序結果



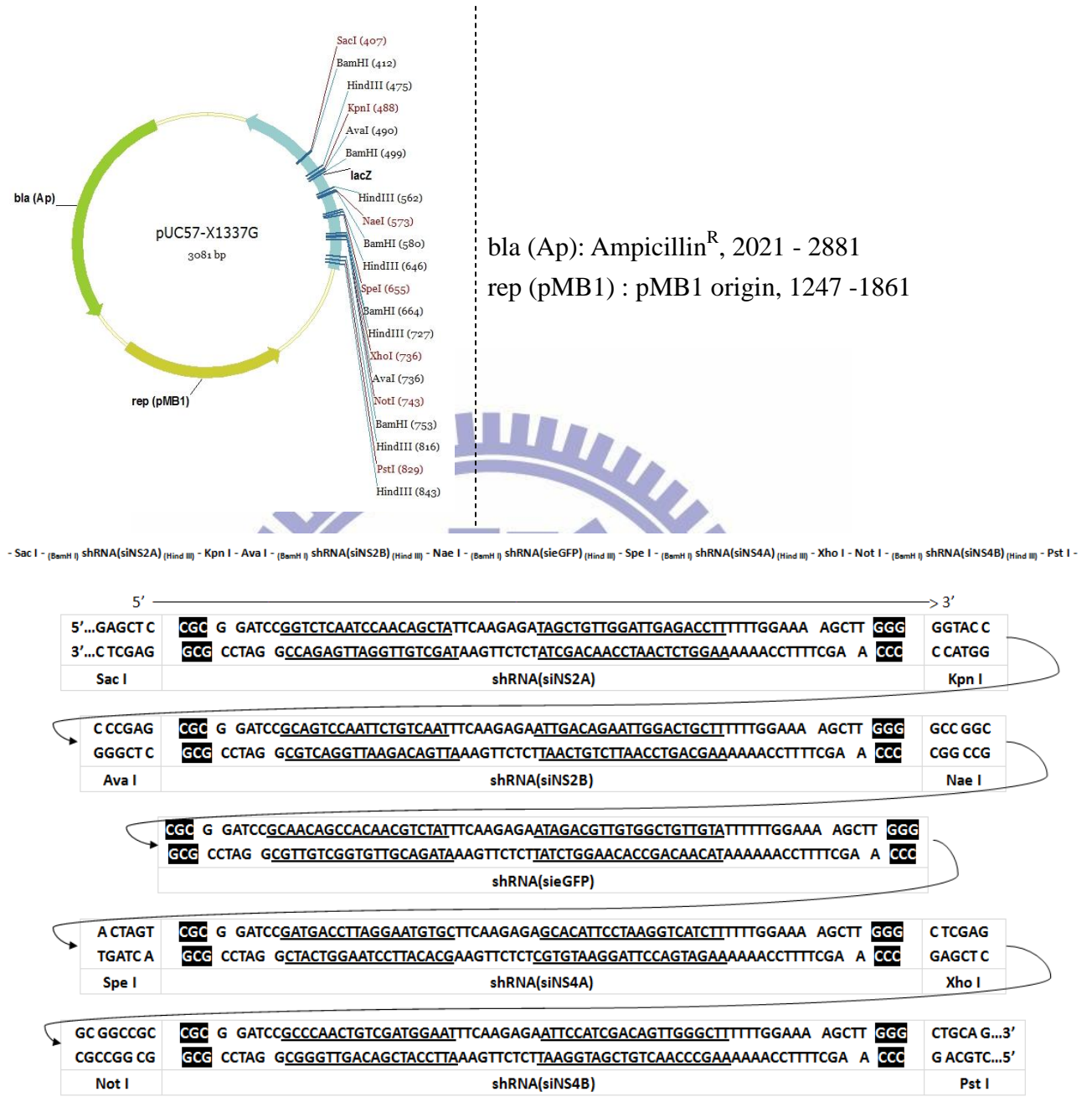
註：頂部標示的數字為建構的質體所對應之序列位置，黃色序列第一列為預期質體序列，黃色序列第二列為定序結果。每一行最下面為第二列定序結果得到之波峰圖。黑色灰影含括區域為建構質體所使用的 *EcoO109I* 接合的酵素位置，另外細長（藍色）箭頭區塊為 H1 RNA pol III promoter 序列區域；細長（褐色）方框為表現 shRNA 序列區域。

表十五、pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞株列單

Plasmid	G418 Resistance	DsRed protein	shRNA	Stable cell line
BHK-DsRed	✓	✓	X	NC010101 NC040303 NC050403 NC050501
BHK-shRNA(siNC)	✓	✓	shRNA (Negative control)	RD010301 RD030401 RD040201 RD050201
BHK-shRNA(siNS2A)	✓	✓	shRNA (targeting NS2A)	2A060203 2A060402 2A060404 2A070206
BHK-shRNA(siNS4A)	✓	✓	shRNA (targeting NS4A)	4A070201 4A070402 4A070403 4A070503

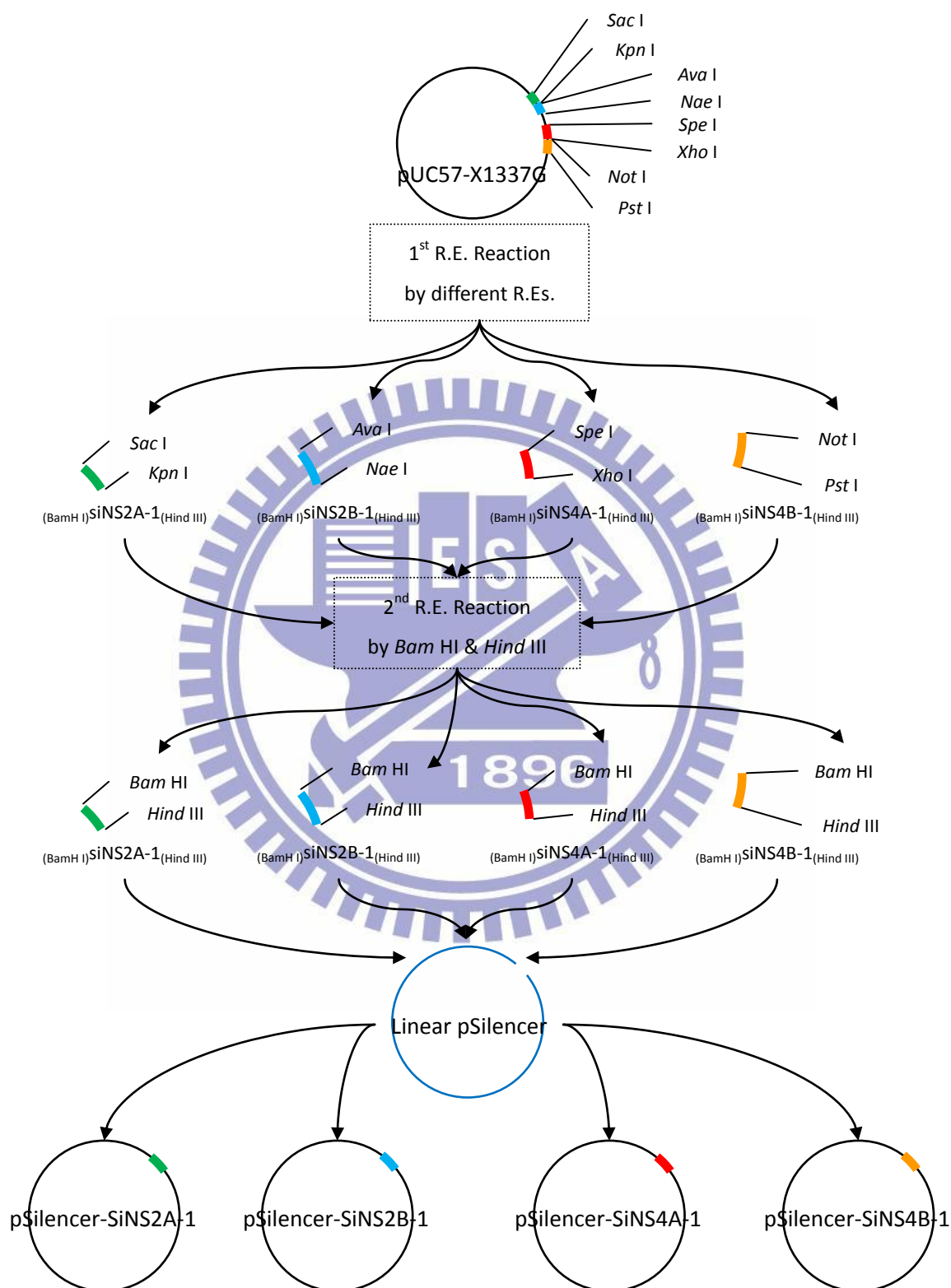
註：表中 ”✓” 表示建構的質體內具有抗 G418 基因及報導基因 *Discosoma sp.* red fluorescent protein (DsRed)。”X” 表示建構的質體內不含 H1 RNA pol III promoter-shRNA 片段，pDsRed-pS.-siNC 在 H1 RNA pol III promoter-shRNA 片段會表現一個當作 negative control 的 shRNA；pDsRed-pS.-siNS2A-1 在 H1 RNA pol III promoter-shRNA 片段為針對 DV2 的 NS2A 設計之序列；pDsRed-pS.-siNS4A-1 在 H1 RNA pol III promoter-shRNA 片段為針對 DV2 的 NS4A 設計之序列。表中最右處為每個穩定細胞株的編號，RD 開頭代表轉染質體為 pDsRed-Express2-N1、NC 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNC；2A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS2A；4A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS4A。英文後面則以數字編號做區分不同的細胞株，每一個質體挑選到 4 株穩定細胞株以做後續實驗。

圖一、pUC57-X1337G 質體圖



註、下圖序列 (含 shRNA 序列: siNS2A、siNS2B、siNS4A、siNS2B) 為上圖 pUC57-X1337G 的 407 處 (Sca I) 至 829 處 (Pst I) 的詳細核苷酸序列圖

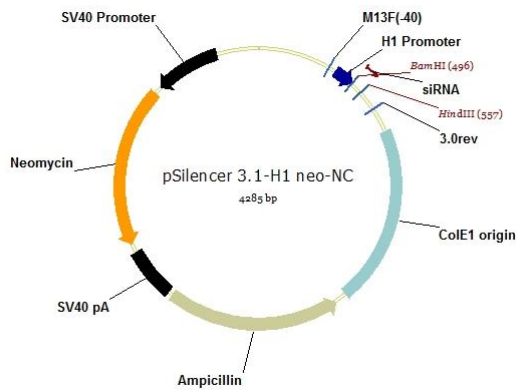
圖二、pSilencer shRNA Expression Vector 質體建構流程圖



註、R.E. 表示 Restriction Endonuclease。1st R.E. Reaction 以不同限制酶切出不同 shRNA 片段；2nd R.E. Reaction 以 *Bam* HI & *Hind* III 將 shRNA 片段切出切位。

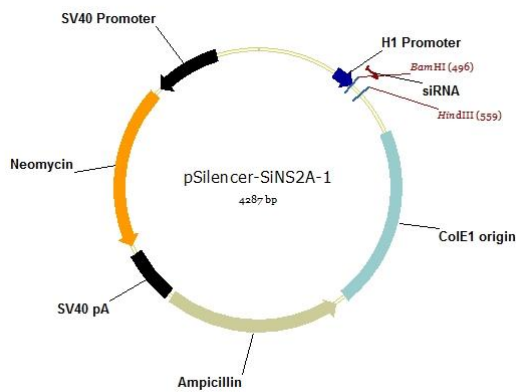
圖三、pSilencer shRNA Expression Vector 質體結構及酵素位置圖

圖三.a、pSilencer 3.1-H1 neo-siNC

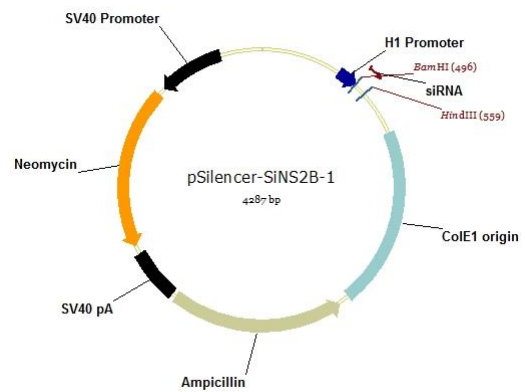


H1 Promoter: 397 - 496
SV40 early Promoter: 3754 - 4077
Neomycin^R: 2922 - 3716
SV40 early pA signal: 2621 - 2870
Ampicillin^R: 1735 - 2595
ColE1 origin: 790 - 1675

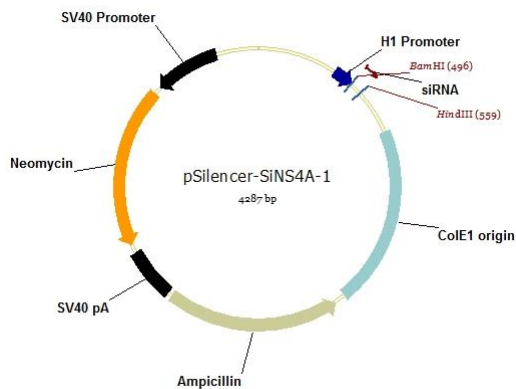
圖三.b、pSilencer-SiNS2A-1



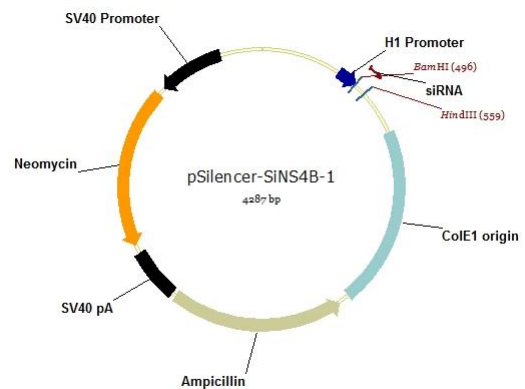
圖三.c、pSilencer-SiNS2B-1



圖三.d、pSilencer-SiNS4A-1

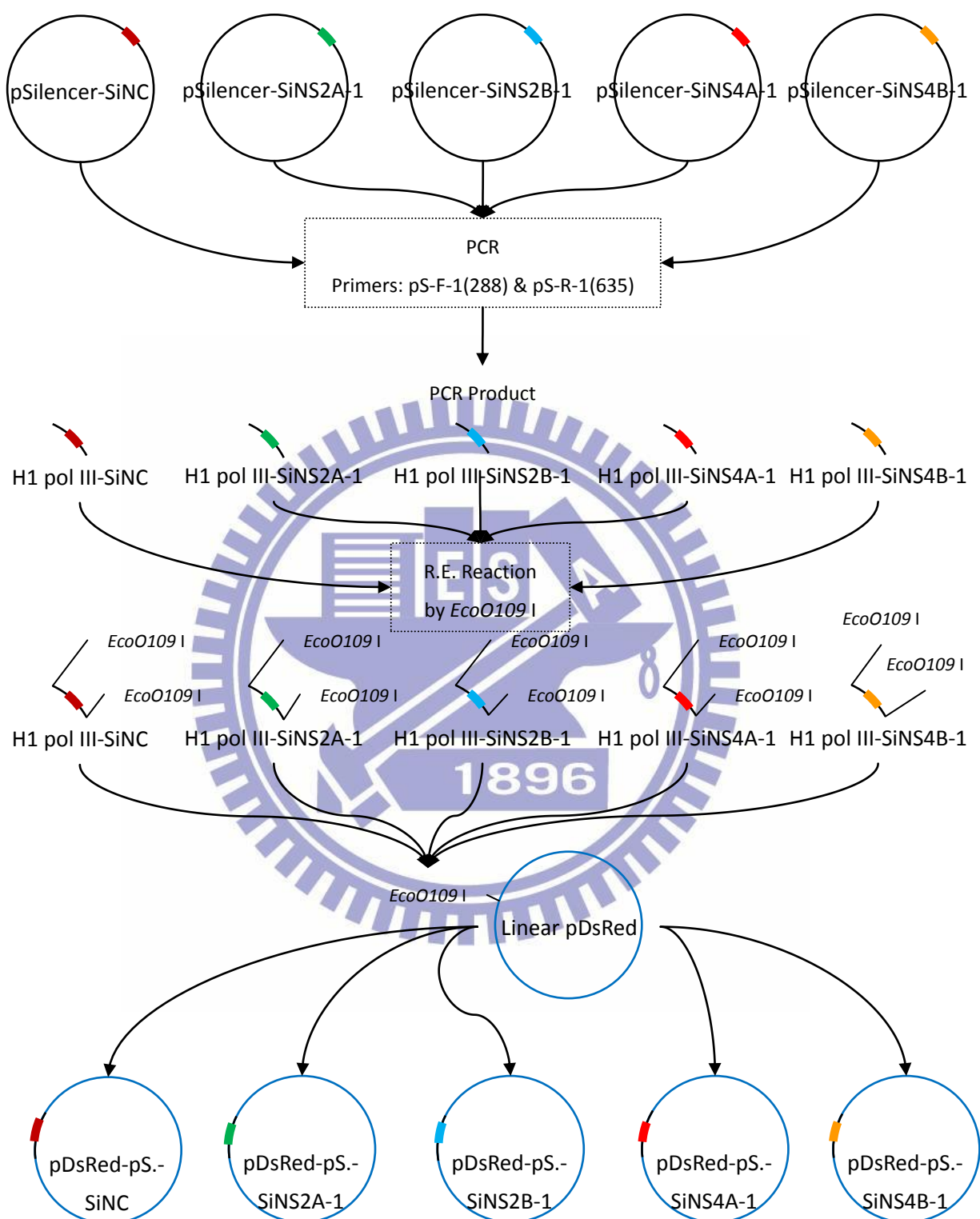


圖三.e、pSilencer-SiNS4B-1



註：由圖上至下依序為：pSilencer 3.1-H1 neo-siNC、pSilencer-SiNS2A-1、pSilencer-SiNS2B-1、pSilencer-SiNS4A-1、pSilencer-SiNS4B-1。其中在 pSilencer 3.1-H1 neo-siNC 的右處有質體結構的資訊，此質體的 H1 promoter 下游會表現對於人類、小鼠、大鼠基因體沒有 RNAi 的 shRNA，做為實驗的 negative control。後四個質體則是在 pSilencer 3.1-H1 的 *Bam* HI 與 *Hind* III 切位處 (496 與 557 處)，接入針對登革熱 NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 各別基因所設計之 shRNA 序列片段。

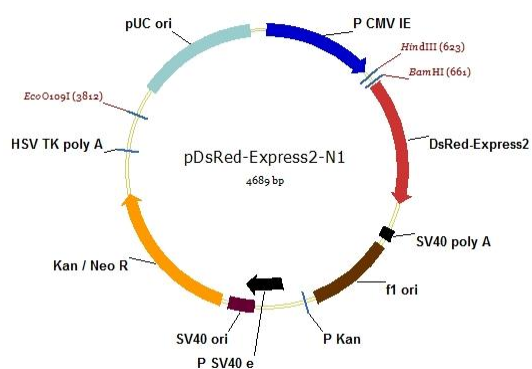
圖四、pDsRed - shRNA Expression Vector 質體建構流程圖



註、PCR 表示 Polymerase Chain Reaction；R.E. 表示 Restriction Endonuclease。利用 pS-F-1(288) 與 pS-R-1(635) 引子對產生有各質體的 H1 promoter-shRNA 片段的 PCR 產物。R.E. Reaction by *E.coO109 I* 表示為將 PCR 產物其兩端以 *E.coO109 I* 酶切出切位。

圖五、pDsRed - shRNA Expression Vector 質體結構及酵素位置圖

圖五.a、pDsRed-Express2-N1



PCMV IE (human cytomegalovirus immediate early promoter): 1 - 589

MCS (multiple cloning site): 591 - 671

DsRed-Express2: 679 - 1356

SV40 early polyA signals: 1508 - 1558

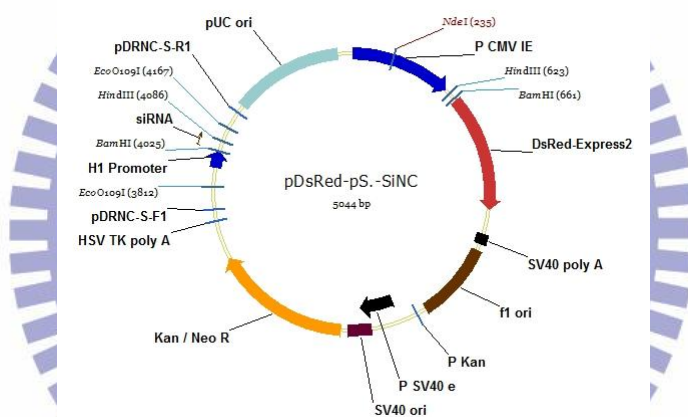
f1 origin: 1605 - 2060

SV40 origin: 2401 - 2539

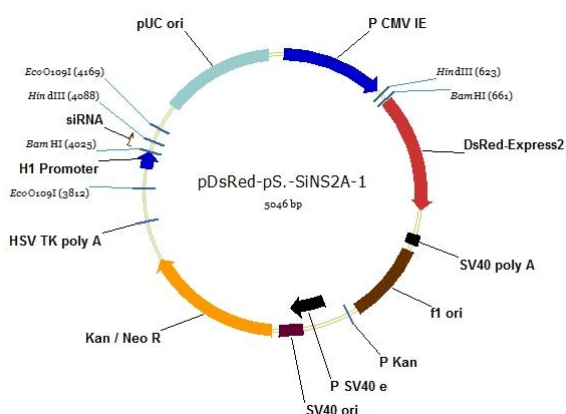
Kan^R/Neo^R: 2585 - 3379

pUC origin: 3964 - 4607

圖五.b、pDsRed-pS.-siNC



圖五.c、pDsRed-pS.-SiNS2A-1



圖五.d、pDsRed-pS.-SiNS2B-1

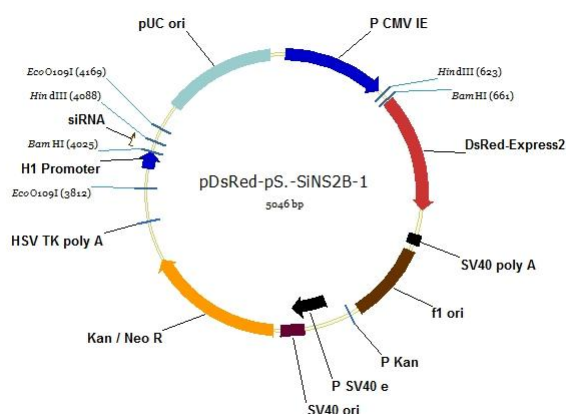


圖 五.e、pDsRed-pS.-SiNS4A-1

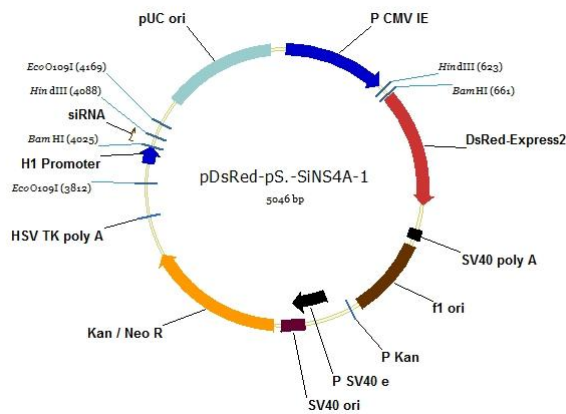
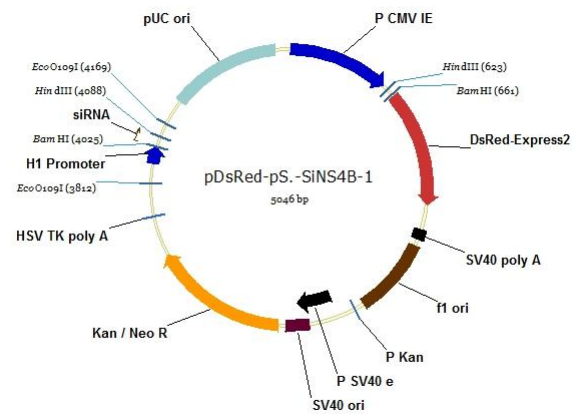
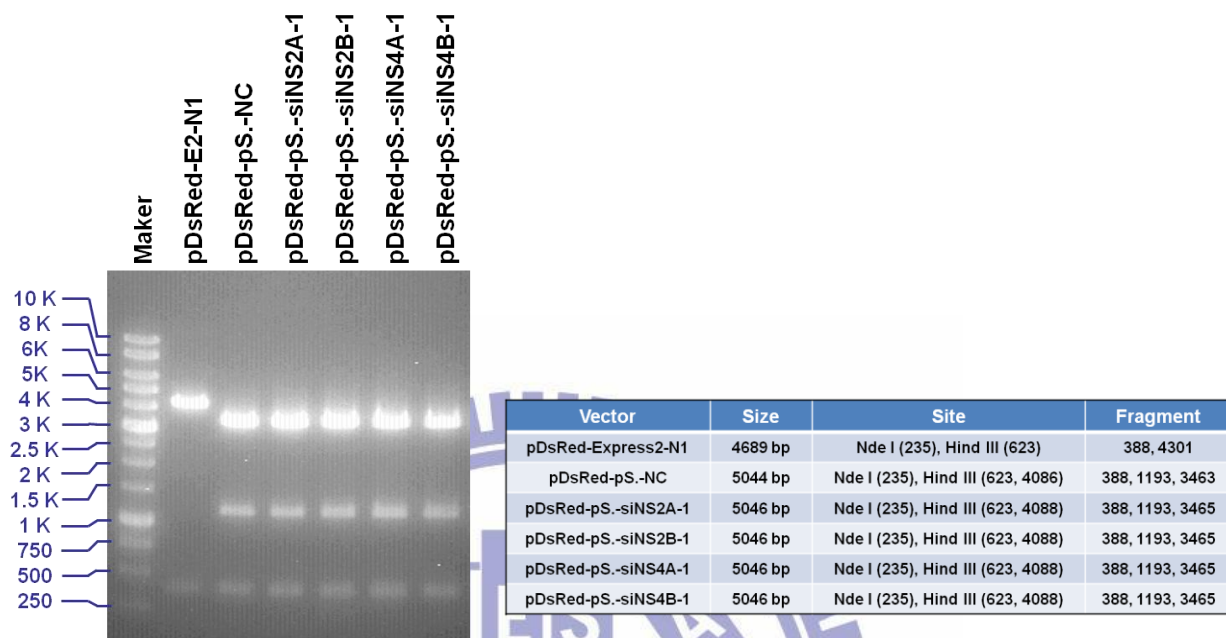


圖 五.f、pDsRed-pS.-SiNS4B-1



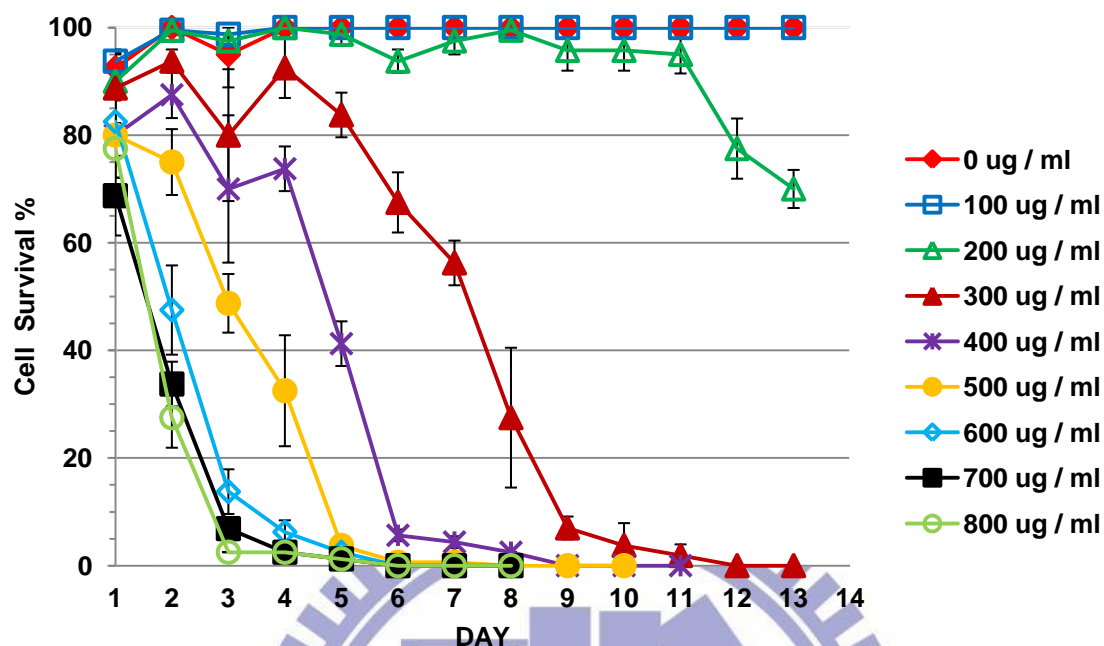
註：由圖上至下依序為：pDsRed-Express2-N1、pDsRed-pS.-siNC、pDsRed-pS.-SiNS2A-1、pDsRed-pS.-SiNS2B-1、pDsRed-pS.-SiNS4A-1、pDsRed-pS.-SiNS4B-1。其中在 pDsRed-Express2-N1 的右處有質體結構的資訊。後五個質體則是在 pDsRed-Express2-N1 的 *E.coO109 I* 切位處(3812 處)接入的帶有 H1 RNA pol III promoter 以及下游可表現 shRNA 片段；pDsRed-pS.-siNC 的 H1 promoter 下游會表現對於人類、小鼠、大鼠基因體沒有 RNAi 的 shRNA，做為實驗的 negative control。

圖六、pDsRed - shRNA Expression Vector 經 *Nde* I 與 *Hind* III 限制酶作用後切電泳分析圖



註：左圖最左邊 Lane 是 1 kb DNA ladder，左數 2nd ~ 7th Lane 依序為不同的 pDsRed - shRNA Expression Vector。右表則為不同質體的質體的總大小、限制酶 *Nde* I 與 *Hind* III 切位位置、及預期經 *Nde* I 與 *Hind* III 酶切後會得到的 DNA 片段大小。pDsRed - shRNA Expression Vector 含有接入的 H1 RNA pol III promoter-shRNA 片段，會多一個 *Hind* III 切位，經由 *Nde* I 與 *Hind* III 作用後，可得約為 0.39、1.19、3.46 kb 之 DNA 片段，與對照組 pDsRed-Express2-N1 質體（得到約為 0.39、4.3 kb 之 DNA 片段）做區分。

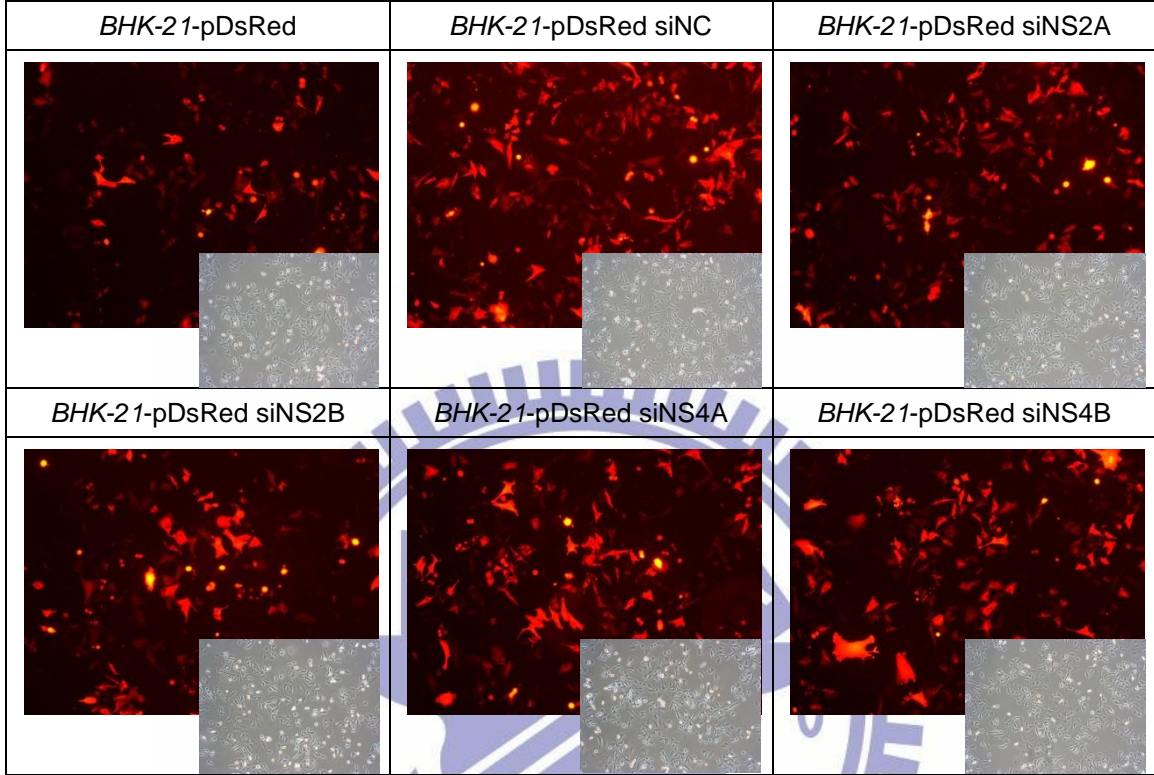
圖七、BHK-21 對於 G418 (Geneticin) 不同濃度之細胞毒性



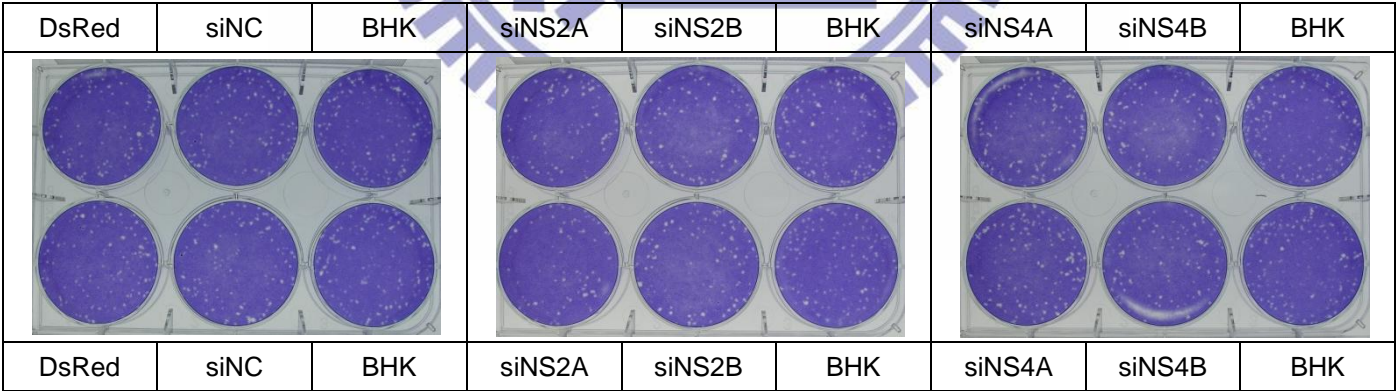
在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞，隔天以含有不同濃度 G418 的 5 % FBS / MEM 培養 13 天（第 3、6、9、12 天更換新的不同濃度 G418 的 5 % FBS / MEM），觀察細胞存活率，此為三次重複之平均數值。做為質體短暫性轉染入 BHK-21 後，經 G418 篩選掉未轉染成功的細胞在不同濃度所需的天數之依據。

圖八、BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後細胞螢光與可見光圖
及空斑圖

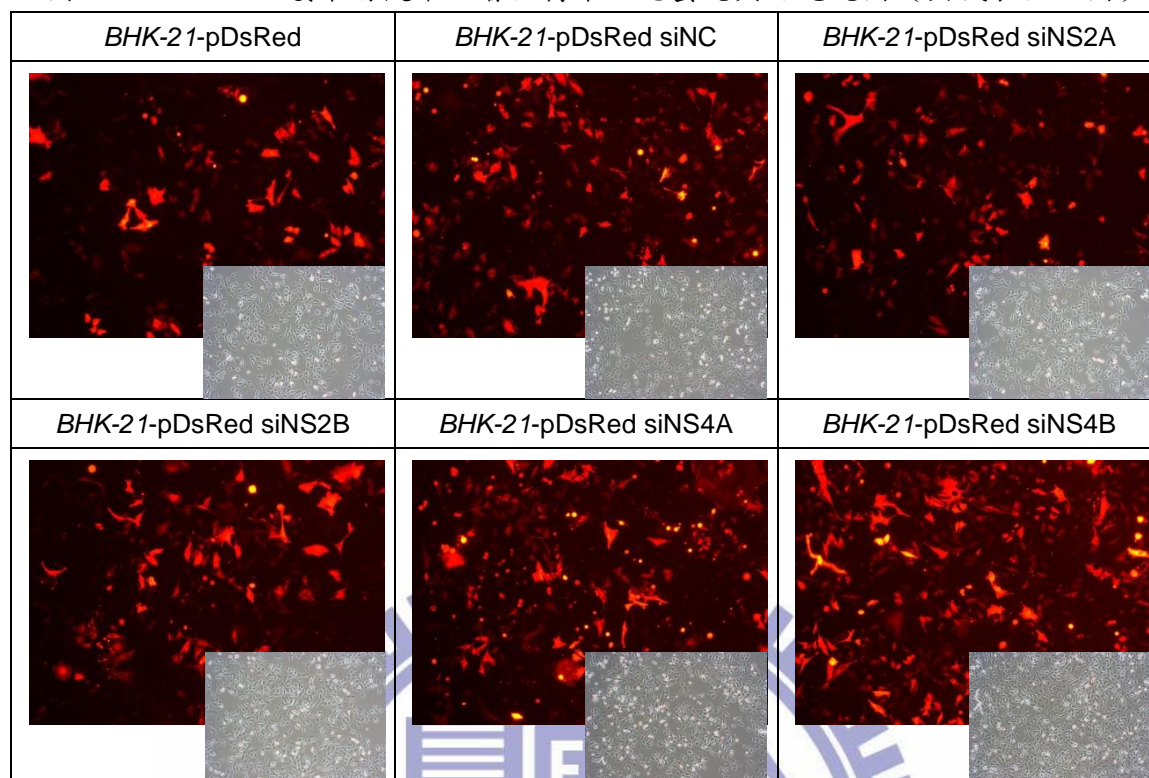
圖八.a DV2 組 - 感染前觀察短暫性轉染細胞螢光與可見光圖（具代表性之圖）



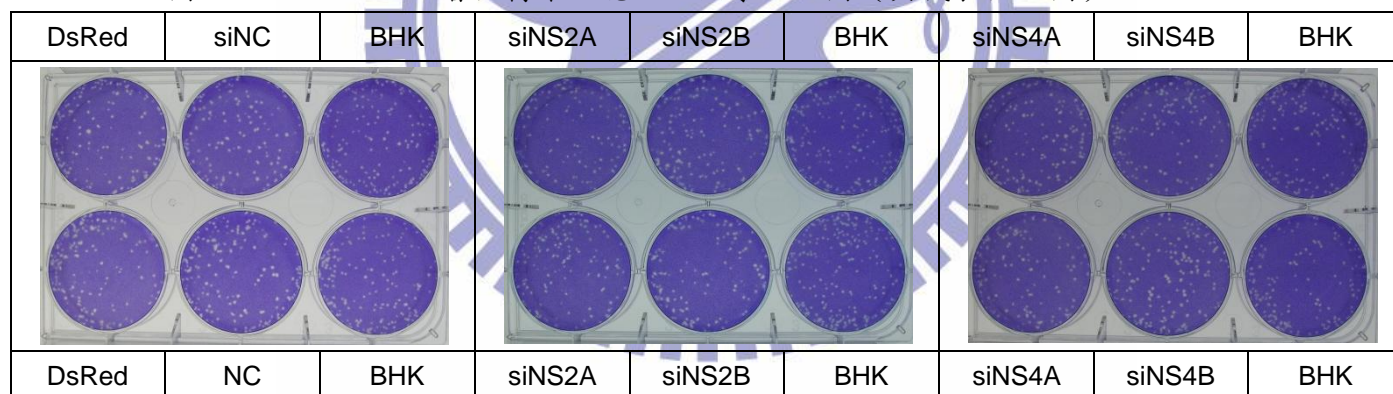
圖八.b DV2 組 - 短暫性轉染細胞之結晶紫空斑圖（具代表性之圖）



圖八.c JEV 組 - 感染前觀察短暫性轉染細胞螢光與可見光圖（具代表性之圖）



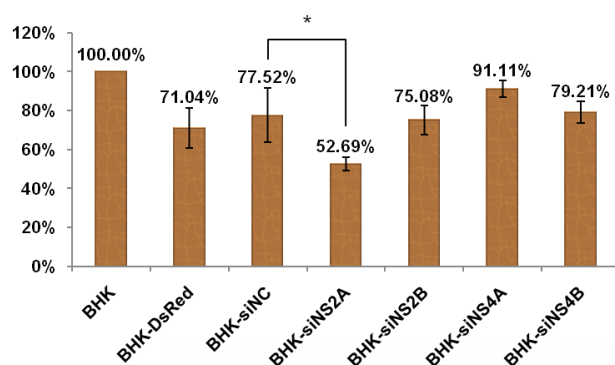
圖八.d JEV 組 - 短暫性轉染細胞之結晶紫空斑圖（具代表性之圖）



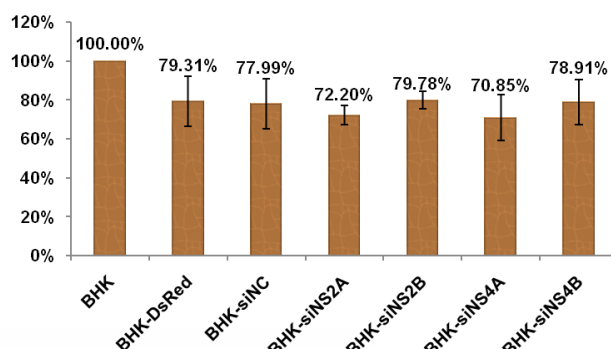
註：圖八.a 與圖八.c 其螢光曝光時間為 0.8 秒。

圖九、BHK-21 經 pDsRed-pS. 系列質體短暫性轉染後之空斑試驗

圖九.a、DV2 的空斑相對值




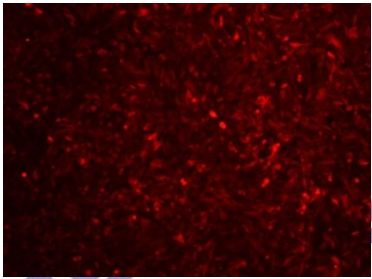
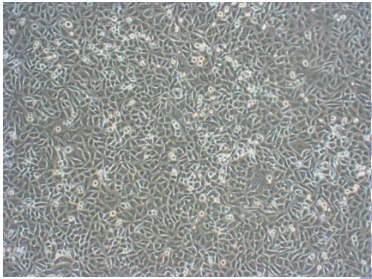
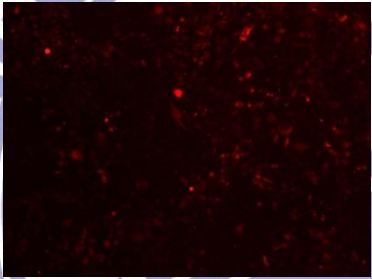
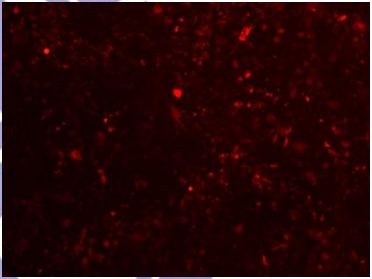

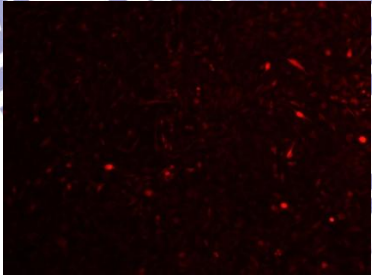
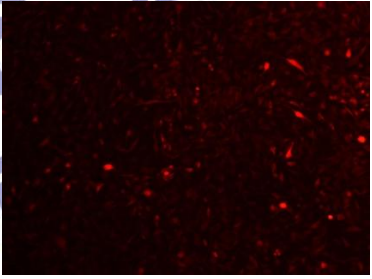
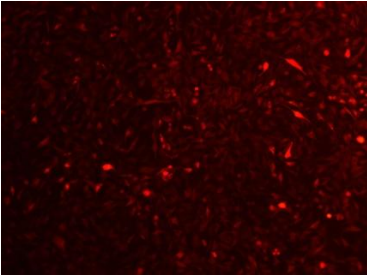

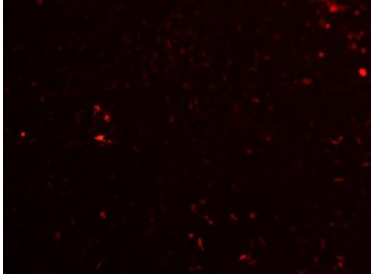
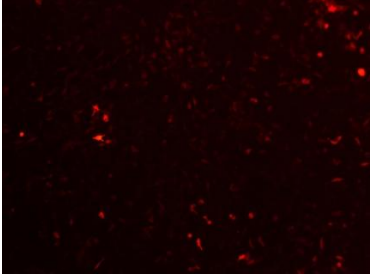
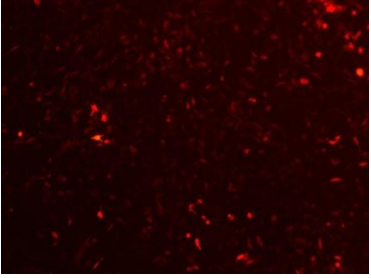
圖九.b、JEV 的空斑相對值

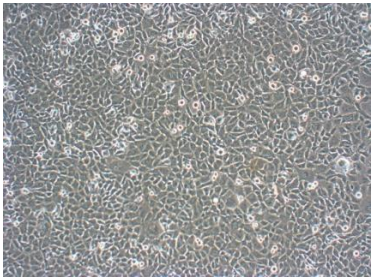
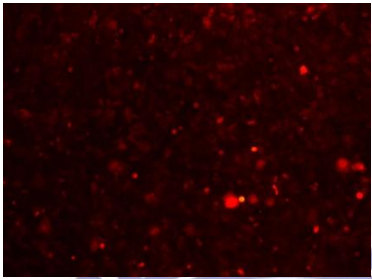
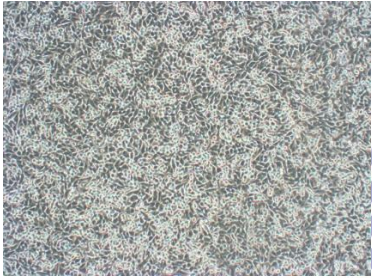
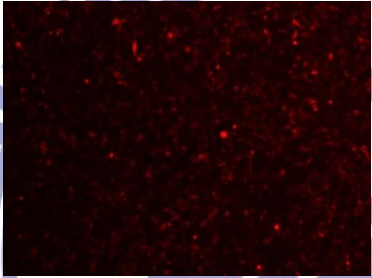
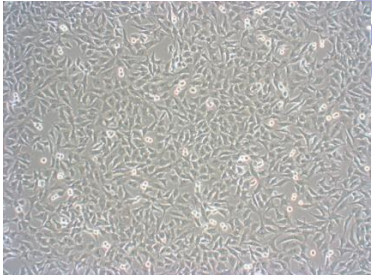
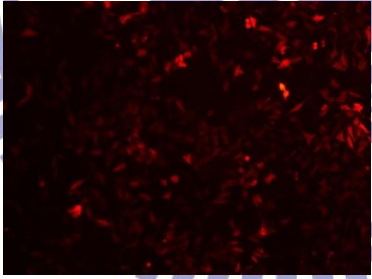
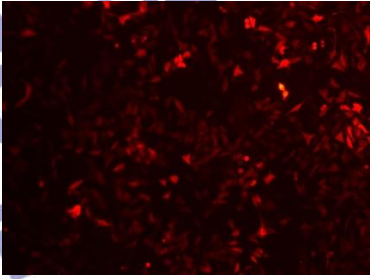

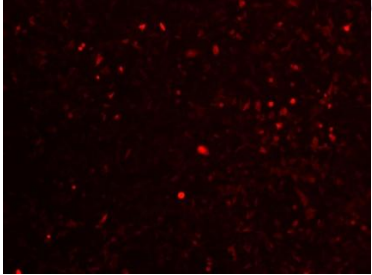
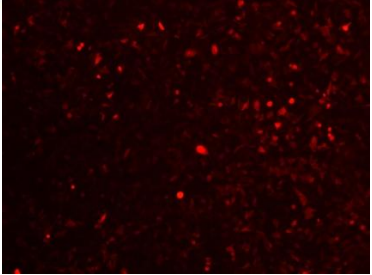
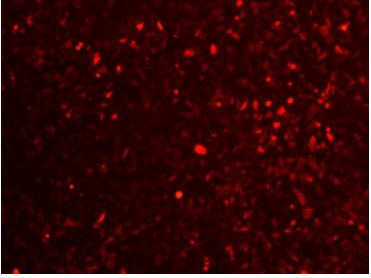


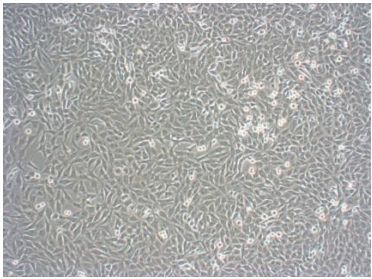
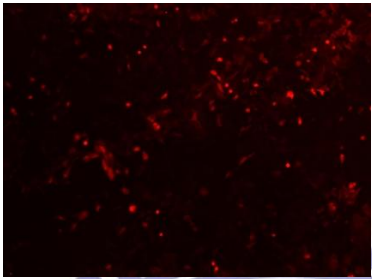
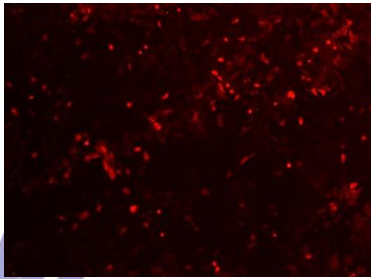
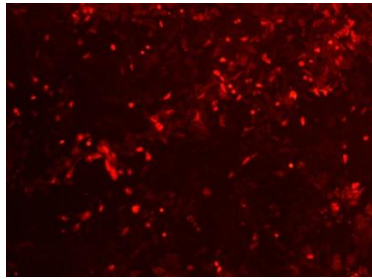
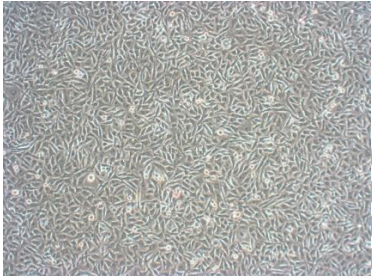
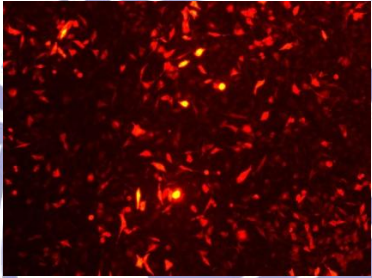
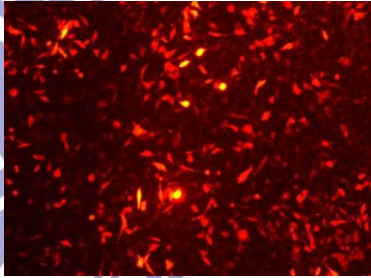
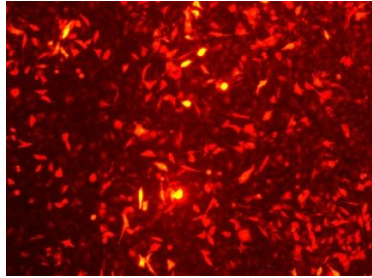
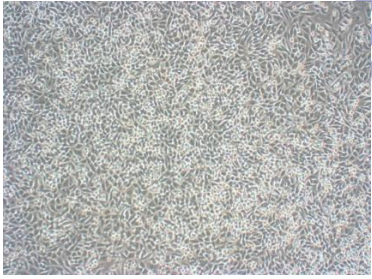
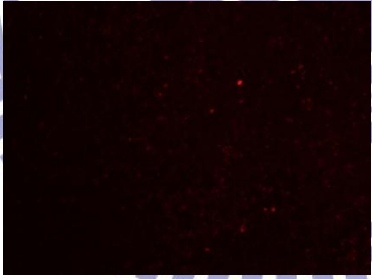
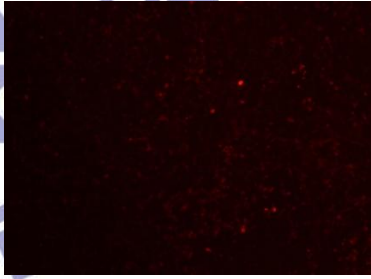
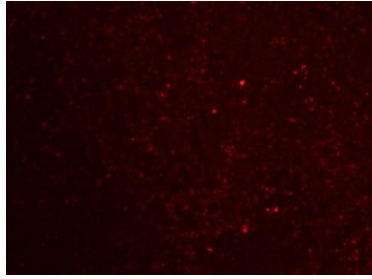

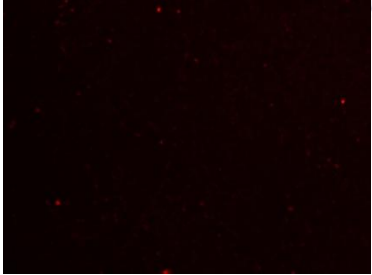
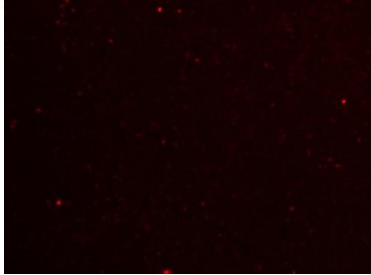
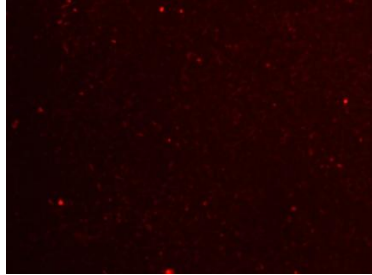
註、siNC 質體其 H1 RNA pol III promoter，下游片段表現出的 shRNA，其 shRNA (21 nt) 的序列對於人類、小鼠、大鼠基因體的序列只有部分相似，不會在宿主內引起 RNA 干擾的 shRNA。”*”表示 $P < 0.05$ (先經 ANOVA 檢定整體多組的平均值有顯著差異，再用 t-檢定統計出 P 值)。


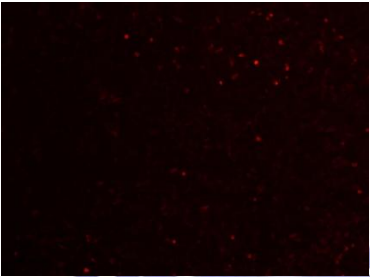
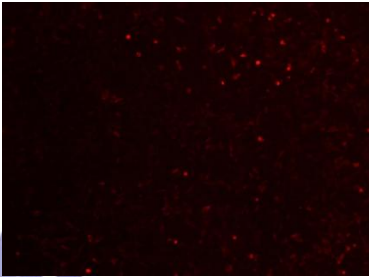
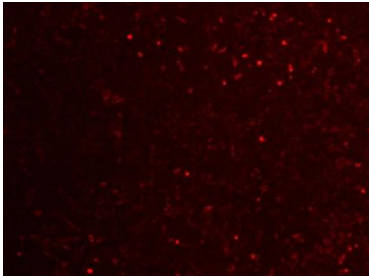

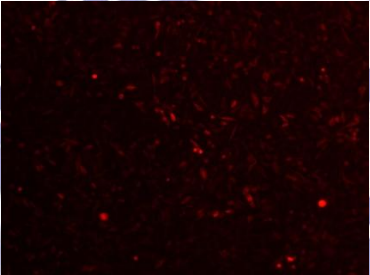
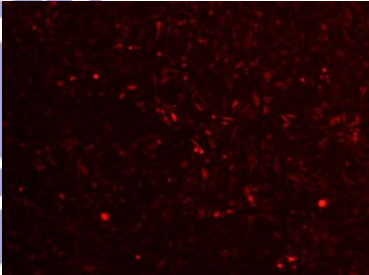
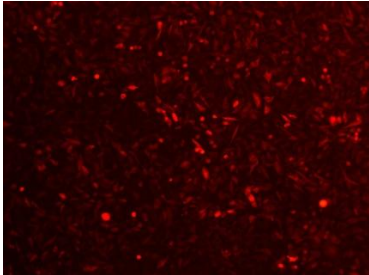

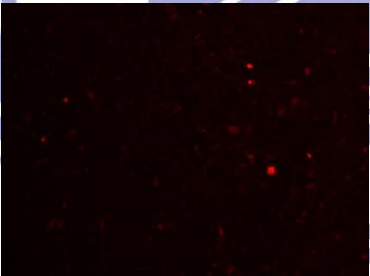
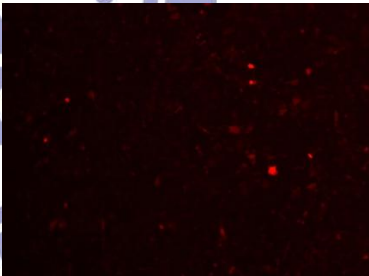
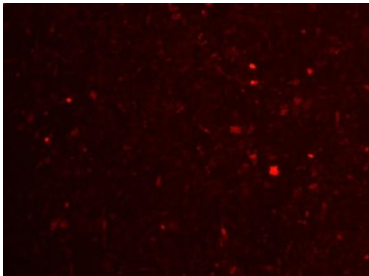
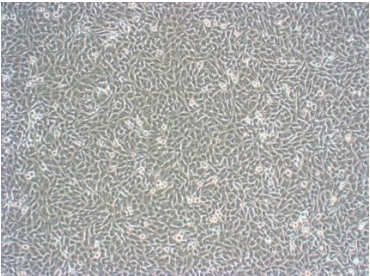
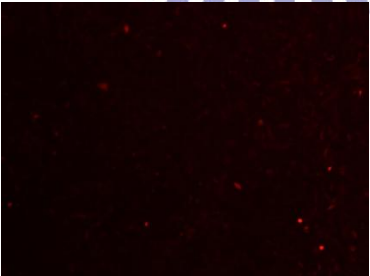
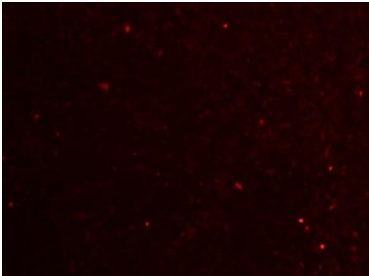
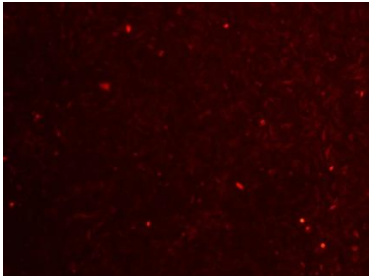
實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有轉染質體的 BHK-21 細胞(短暫性質體轉染細胞:BHK-DsRed、BHK-siNC、BHK-siNS2A、BHK-siNS2B、BHK-siNS4A、BHK-siNS4B)。分別以 100 PFU 的 DV2 與 JEV 於 37°C 感染 1 小時。由於 DV2 與 JEV 形成空斑速度不同，DV2 組培養 7 天後，計數空斑數目；JEV 組則培養 3 天後，計數空斑數目。此實驗以 JEV 組作為整體實驗之對照組，進行 3 次重複性實驗；DV2 組作為整體實驗之實驗組進行 4 次重複性實驗。

圖十、pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞株培養於含 G418 的 5 % FBS / MEM 之細胞觀察圖

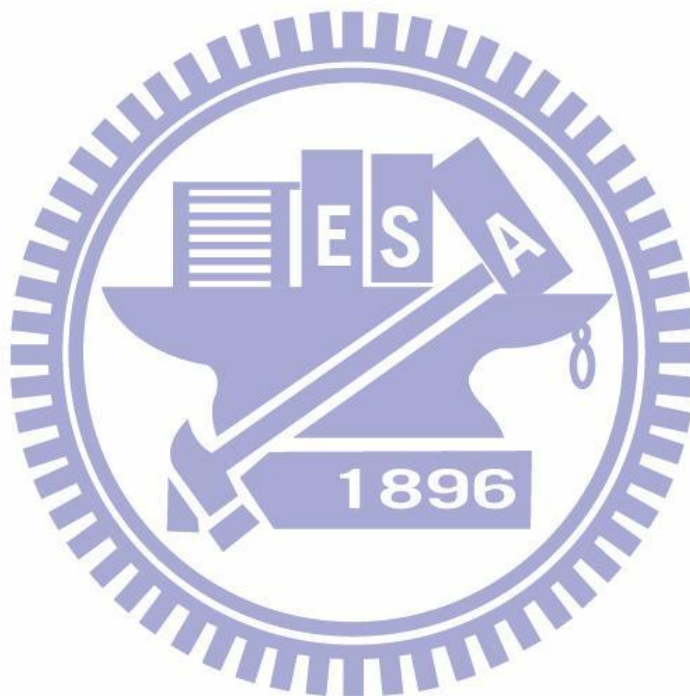
NO.	Image	Fluorescence (Ex. 1.5 sec)	Fluorescence (Ex. 2.0 sec)	Fluorescence (Ex. 3.0 sec)
NC010101			-	-
NC040303				-
NC050403				
NC050501				

NO.	Image	Fluorescence (Ex. 1.5 sec)	Fluorescence (Ex. 2.0 sec)	Fluorescence (Ex. 3.0 sec)
RD010301.1			-	-
RD030401			-	-
DR040201				-
RD050201				

NO.	Image	Fluorescence (Ex. 1.5 sec)	Fluorescence (Ex. 2.0 sec)	Fluorescence (Ex. 3.0 sec)
2A060203				
2A060402				
2A060404				
2A070206				

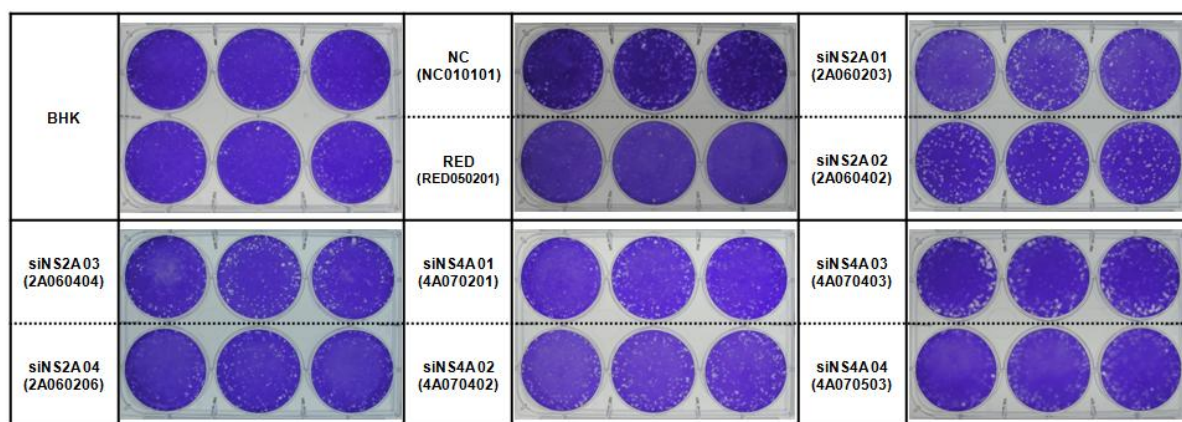
NO.	Image	Fluorescence (Ex. 1.5 sec)	Fluorescence (Ex. 2.0 sec)	Fluorescence (Ex. 3.0 sec)
4A070201				
4A070301				
4A070402				
4A070503				

註：表格中 “-” 表示沒有記錄該曝光時間的細胞株螢光圖。表格中每行表示為一個細胞株，左數 1st 格為每個穩定細胞株的編號，RD 開頭代表轉染質體為 pDsRed-Express2-N1、NC 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNC；2A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS2A；4A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS4A。英文後面則以數字編號做區分不同的細胞株。左數 2nd 格為每株細胞株的可見光圖。左數 3nd ~ 5th 格依序為細胞株在螢光下不同的曝光時間（依序為曝光 1.5、2、3 秒）。

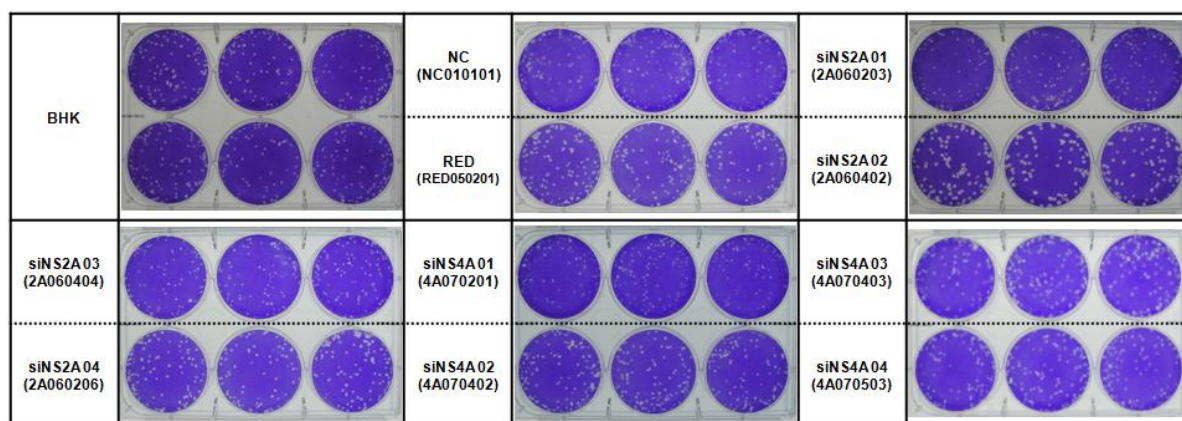


圖十一、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑圖

圖十一.a DV2 組 - 質體 BHK-21 穩定株細胞之結晶紫空斑圖（具代表性之圖）



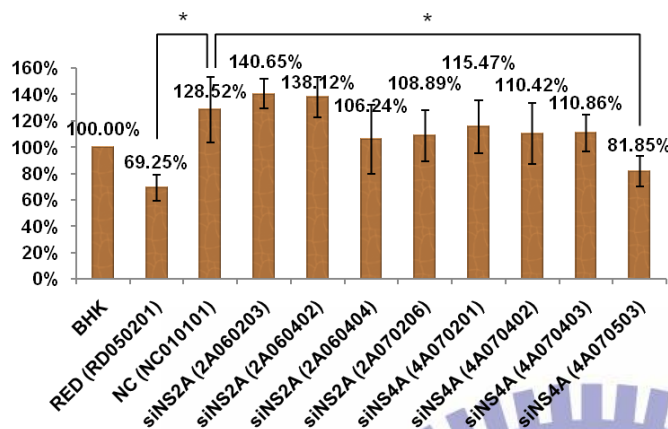
圖十一.b JEV 組 - 質體 BHK-21 穩定株細胞之結晶紫空斑圖（具代表性之圖）



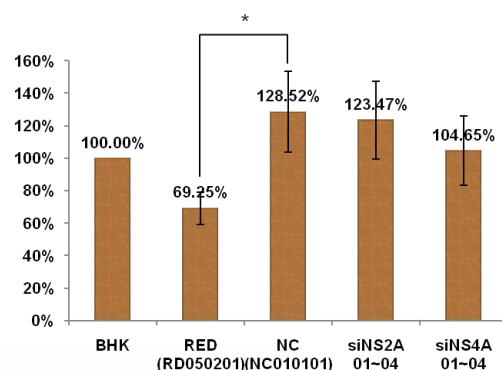
註：表中穩定細胞株的編號，RED 開頭代表轉染質體為 pDsRed-Express2-N1、NC 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNC；2A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS2A；4A 開頭代表轉染質體為 pDsRed-pS.-siNS4A。英文後面則以數字編號做區分不同的細胞株。

圖十二、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之空斑試驗

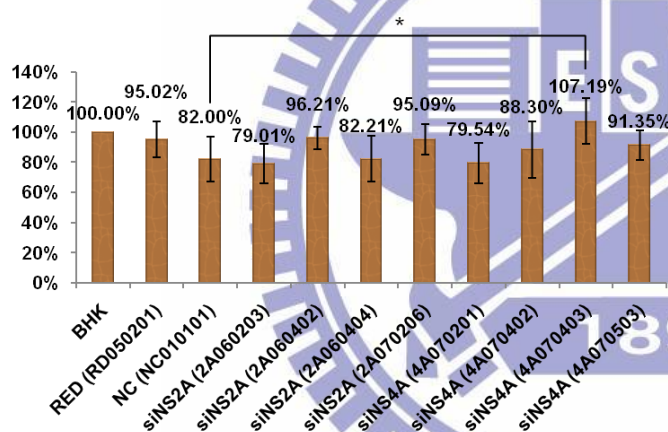
圖十二. a、DV2 Technical Repeats



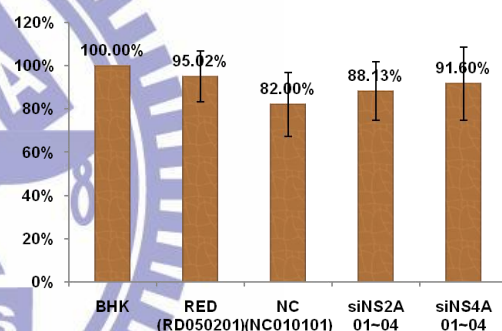
圖十二.b、DV2 Biological Repeats



圖十二.c、JEV Technical Repeats



圖十二.d、JEV Biological Repeats



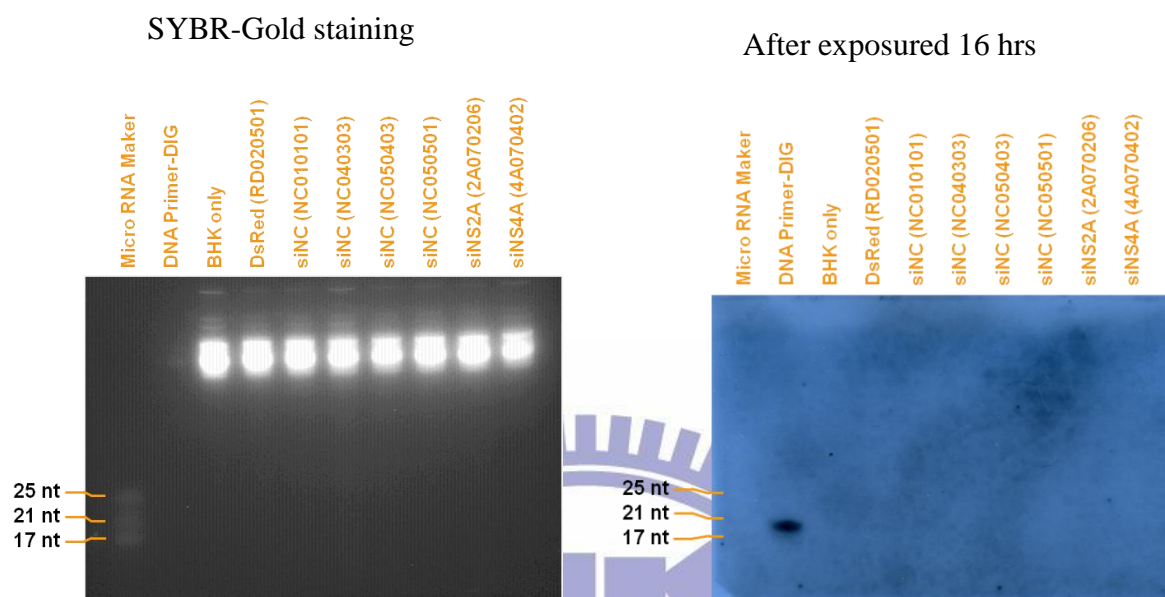
註、siNC 質體其 H1 RNA pol III promoter，下游片段表現出的 shRNA，其 shRNA (21 nt) 的序列對於人類、小鼠、大鼠基因體的序列只有部分相似，不會在宿主內引起 RNA 干擾的 shRNA。圖十二.b 與 d 中 siNS2A 01 - 04 表示將圖十二.a 與 c 中 siNS2A 質體的穩定株 (2A060203、2A060402、2A060404、2A070206) 4 株的相對值加總平均；圖十二.b 與 d 中 siNS4A 01 - 04 表示圖十二.a 與 c 中 siNS4A 質體的穩定株 (4A070201、4A070402、4A070403、4A070503) 4 株的相對值加總平均。”*”表示 $P < 0.05$ (先經 ANOVA 檢定整體多組的平均值有顯著差異，再用 t-檢定統計出 P 值)。

實驗前一天在 6-well 培養盤中個別放入 2×10^5 的 BHK-21 細胞、 2×10^5 的帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101；帶有 siNS2A 質體的

穩定株：2A060203、2A060402、2A060404、2A070206；帶有 siNS4A 質體的穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503)。分別以 100 PFU 的 DV2 與 JEV 以 37 °C 感染 1 小時。DV2 組培養 7 天後，計數空斑數目；JEV 組則培養 3 天後，計數空斑數目。此實驗以 JEV 組作為整體實驗之對照組，DV2 組作為整體實驗之實驗組，兩組皆進行 5 次重複性實驗。

圖十二.a 與圖十二.c 分析為針對個別單一穩定細胞株進行實驗，視為技術性實驗重複 (Technical Repeats)，另外也以整體細胞株族群角度觀看，將 4 株帶有 siNS2A 質體的穩定株 (2A060203、2A060402、2A060404、2A070206) 視為一個 siNS2A 質體的穩定株族群 (siNS2A 01 ~ 04)；4 株帶有 siNS4A 質體的穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503) 視為一個 siNS4A 質體的穩定株族群 (siNS4A 01 ~ 04)，將各自 4 株的空斑相對值彙整得到圖十二.b 與圖十二.d 的生物學上的實驗重複 (Biological Repeats) 結果。

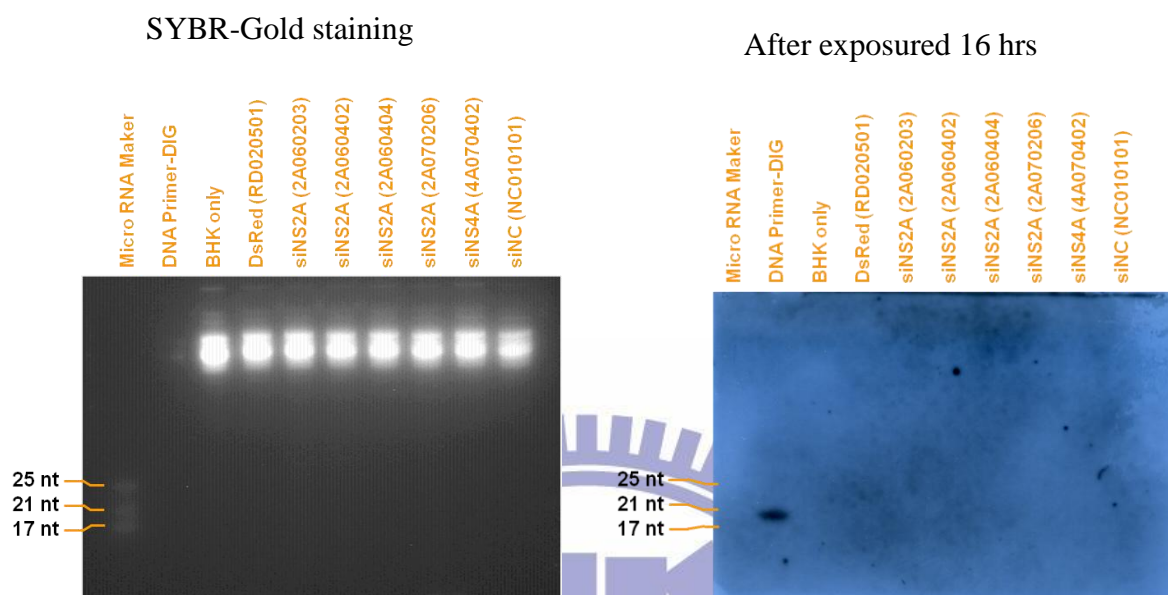
圖十三、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測
小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNC 小分子 RNA



註、左 1st 的 Lane 上的 Micro RNA Marker 為 (17nt, 21nt, 25nt 的單股 RNA) 判斷 siRNA (約 21 nt) 在膠上的位置，注入孔洞量為 120 ng / well；左 2nd 的 Lane 的 DNA primer-DIG (pS-shNCPB, 約 21-25 nt) 作為 DIG 免疫偵測的 size marker，注入孔洞量為 550 pg / well；其他 Lane 的 small RNA 注入孔洞量為 1200 ng / well。探針 (Probe) 為 pS-shNCPB (5'-ACTACCGTTGTTAAGGTG-3' DIG)，此序列與偵測 siNC 的 siRNA 序列互補。在雜交 (Hybridization) 步驟，其雜交的探針 (Hybridization Probe) 濃度為 300 ng(60 pmole) / ml；雜交的溫度 (Hybridization Temp.) 為 37°C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。在雜交的 Washing 步驟：高嚴峻清洗步驟的溫度 (High Stringency Washing Temp.) 為 37 °C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。

本組實驗以 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101、NC040303、NC050403、NC050501；帶有 siNS2A 質體穩定株：2A070206；帶有 siNS4A 質體穩定株：4A070402) 抽取小分子 RNA (≤ 200 nt) 偵測 siNC 的 RNA。左圖為 15 % 的 denaturing polyacrylamide gel(8 M Urea) 電泳圖，右圖為北方墨點曝光 16 小時的壓片圖。

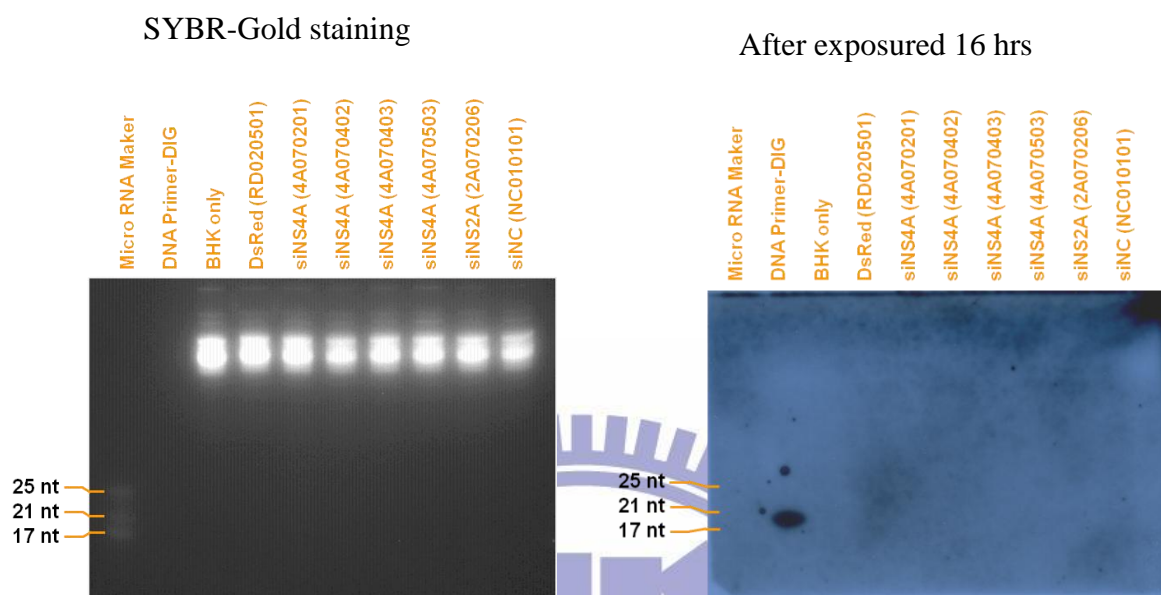
圖十四、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNS2A 小分子 RNA



註、左 1st 的 Lane 上的 Micro RNA Marker 為 (17nt, 21nt, 25nt 的單股 RNA) 判斷 siRNA (約 21 nt) 在膠上的位置，注入孔洞量為 120 ng / well；左 2nd 的 Lane 的 DNA primer-DIG (pS-sh2APB, 約 21-25 nt) 作為 DIG 免疫偵測的 size marker，注入孔洞量為 570 pg / well；其他的 Lane 的 small RNA 注入孔洞量為 1200 ng / well；探針 (Probe) 為 pS-sh2APB (5'-GGTCTCAATCCAACAGCTA-3' DIG)，此序列與偵測 siNS2A 的 siRNA 序列互補。在雜交 (Hybridization) 步驟，其雜交的探針 (Hybridization Probe) 濃度為 300 ng(60 pmole) / ml；雜交的溫度 (Hybridization Temp.) 為 41°C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。在雜交的 Washing 步驟：高嚴峻清洗步驟的溫度 (High Stringency Washing Temp.) 為 41°C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。

本組實驗以 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；帶有 siNS2A 質體穩定株：2A060203、2A060402、2A060404、2A070206；帶有 siNS4A 質體穩定株：4A070402；帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101) 抽取小分子 RNA (≤ 200 nt) 偵測 siNS2A 的 RNA。左圖為 15 % 的 denaturing polyacrylamide gel (8 M Urea) 電泳圖，右圖為北方墨點曝光 16 小時的壓片圖。

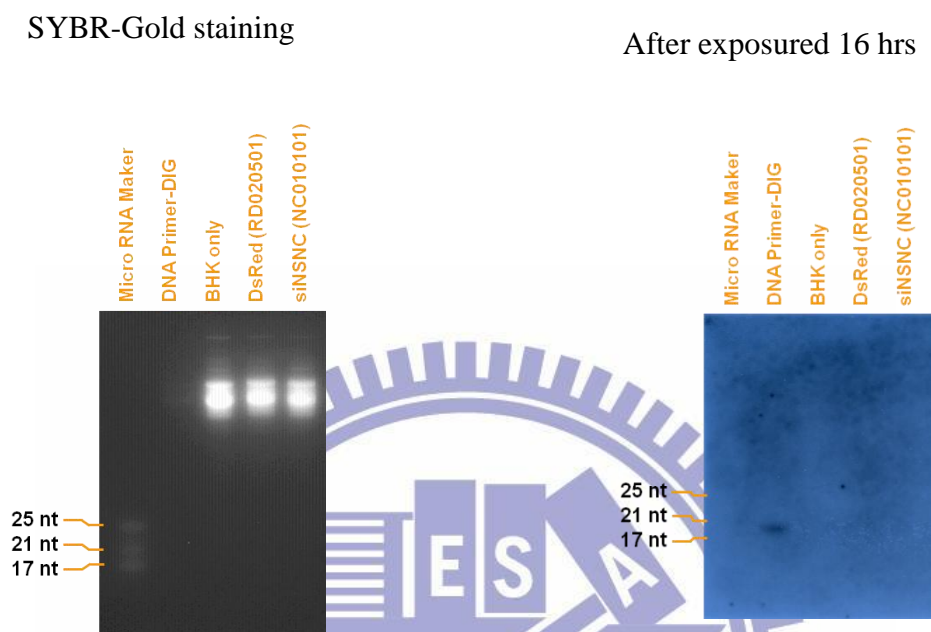
圖十五、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測
小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNS4A 小分子 RNA



註、左 1st 的 Lane 上的 Micro RNA Marker 為 (17nt, 21nt, 25nt 的單股 RNA) 判斷 siRNA (約 21 nt) 在膠上的位置，注入孔洞量為 120 ng / well；左 2nd 的 Lane 的 DNA primer-DIG (pS-sh4APB, 約 21-25 nt) 作為 DIG 免疫偵測的 size marker，注入孔洞量為 580 pg / well；其他的 Lane 的 small RNA 注入孔洞量為 1200 ng / well；探針 (Probe) 為 pS-sh4APB (5'- GATGACCTTAGGAATGTGC -3' DIG)，此序列與偵測 siNS4A 的 siRNA 序列互補。在雜交 (Hybridization) 步驟，其雜交的探針 (Hybridization Probe) 濃度為 300 ng(60 pmole) / ml；雜交的溫度 (Hybridization Temp.) 為 41°C (探針的 T_m 值 - 15°C，T_m of probe - 15°C)。在雜交的 Washing 步驟：高嚴峻清洗步驟的溫度 (High Stringency Washing Temp.) 為 41°C (探針的 T_m 值 - 15°C，T_m of probe - 15°C)。

本組實驗以 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；帶有 siNS4A 質體穩定株：4A070201、4A070402、4A070403、4A070503；帶有 siNS2A 質體穩定株：2A070206；帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101) 抽取小分子 RNA (≤ 200 nt) 偵測 siNS4A 的 RNA。左圖為 15 % 的 denaturing polyacrylamide gel (8 M Urea) 電泳圖，右圖為北方墨點曝光 16 小時的壓片圖。

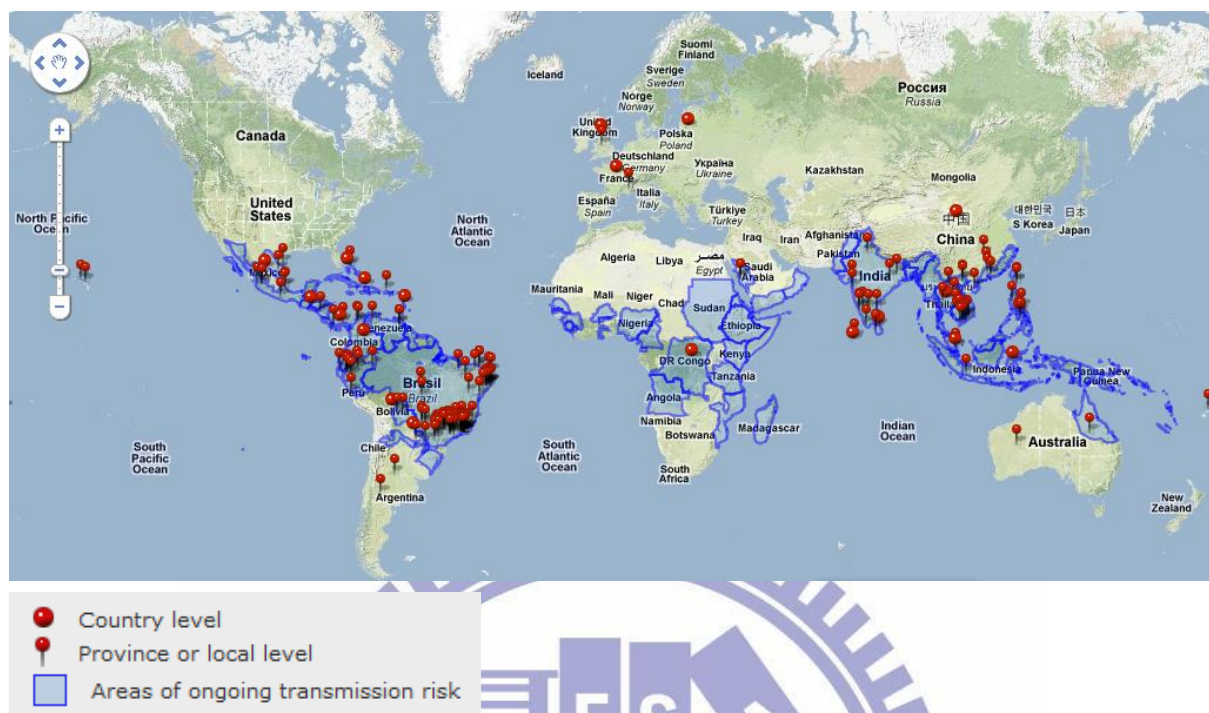
圖十六、表現 pDsRed-pS. 系列質體 BHK-21 穩定株細胞之北方墨點檢測小分子 RNA 之表現 - 偵測 siNC 小分子 RNA (Size marker: DNA primer-DIG, pS-shNCPB 注入膠孔洞量減半)



註、左 1st 的 Lane 上的 Micro RNA Marker 為 (17nt, 21nt, 25nt 的單股 RNA) 判斷 siRNA (約 21 nt) 在膠上的位置，注入孔洞量為 120 ng / well；左 2nd 的 Lane 的 DNA primer-DIG (pS-shNCPB, 約 21-25 nt) 作為 DIG 免疫偵測的 size marker，注入孔洞量為 550 pg / well；其他的 Lane 的 small RNA 注入孔洞量為 1200 ng / well；探針 (Probe) 為 pS-shNCPB (5'-ACTACCGTTGTTAAGGTG-3' DIG)，此序列與偵測 siNC 的 siRNA 序列互補。在雜交 (Hybridization) 步驟，其雜交的探針 (Hybridization Probe) 濃度為 300 ng(60 pmole) / ml；雜交的溫度 (Hybridization Temp.) 為 37°C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。在雜交的 Washing 步驟：高嚴峻清洗步驟的溫度 (High Stringency Washing Temp.) 為 37°C (探針的 T_m 值 - 15°C, T_m of probe - 15°C)。

本組實驗以 BHK-21 細胞及帶有質體的 BHK-21 穩定細胞株 (帶有 DsRed 質體的穩定株：RD050201；帶有 siNC 質體的穩定株：NC010101) 抽取小分子 RNA (≤ 200 nt) 偵測 siNC 的 RNA。左圖為 15 % 的 denaturing polyacrylamide gel (8 M Urea) 電泳圖，右圖為北方墨點曝光 16 小時的壓片圖。

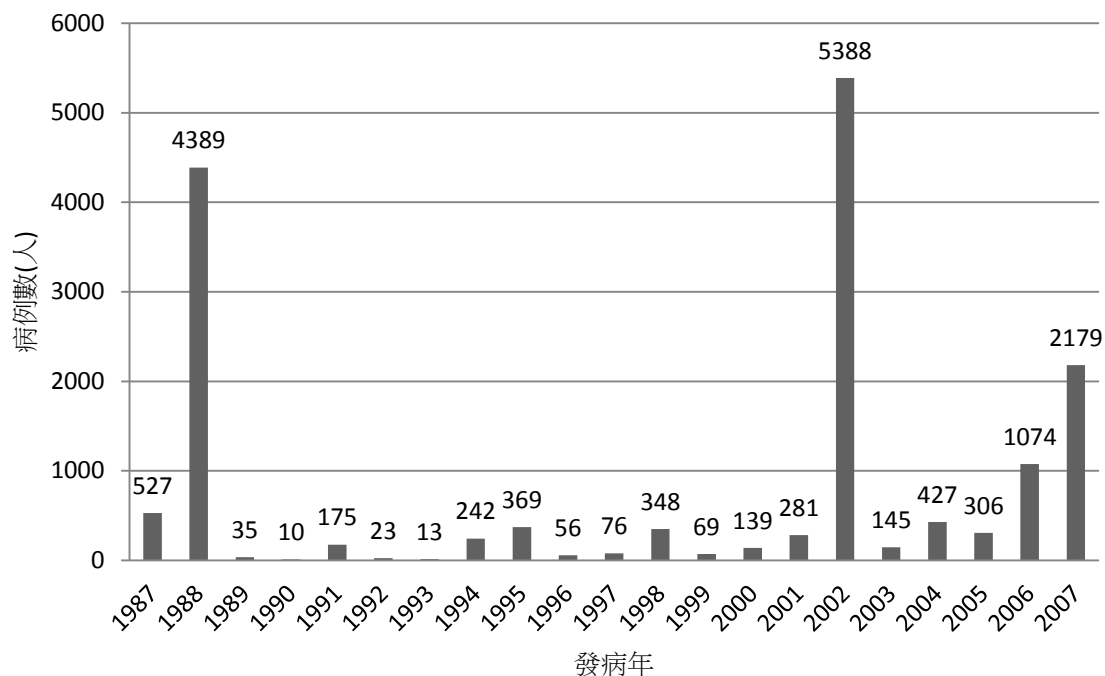
附錄一、登革熱疫情分布圖（美國疾病管制局，CDC, USA）



附錄二、台灣早期登革熱流行情形（台灣疾病管制局，CDC, Taiwan）

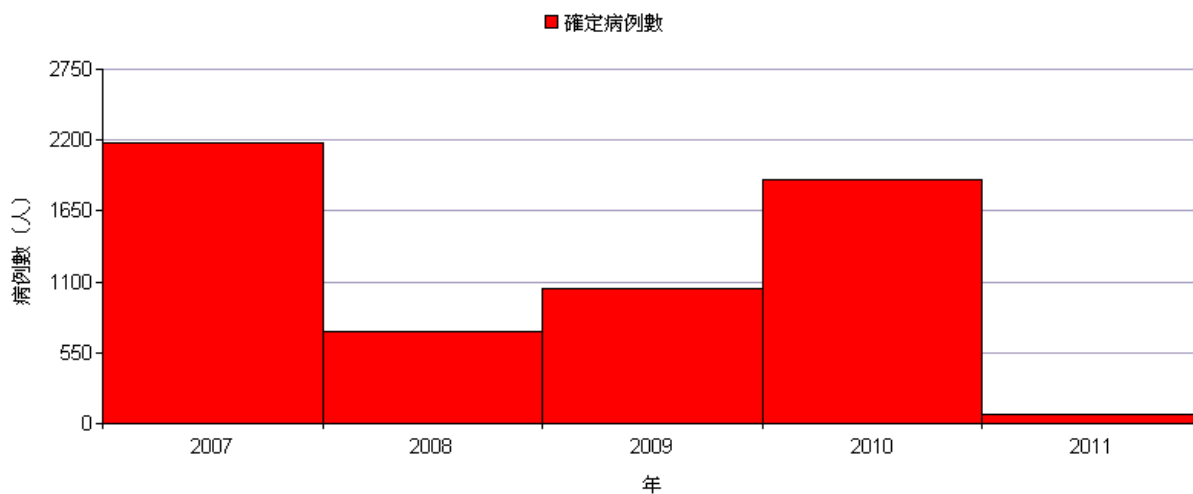
年代	流行地區	侵襲率
1870	-	大流行
1887	-	大流行
1901-02	台灣南部	大流行
1915-16	全島性	25-50 %
1922	澎湖	25-30 %
1927	台灣南部	小流行
1931	全島性	25-50 %
1942-43	全島性	80 %
1981	屏東琉球鄉	80 %

附錄三、1987 年至 2007 年台灣登革熱確定病例數(台灣疾病管制局，CDC, Taiwan)



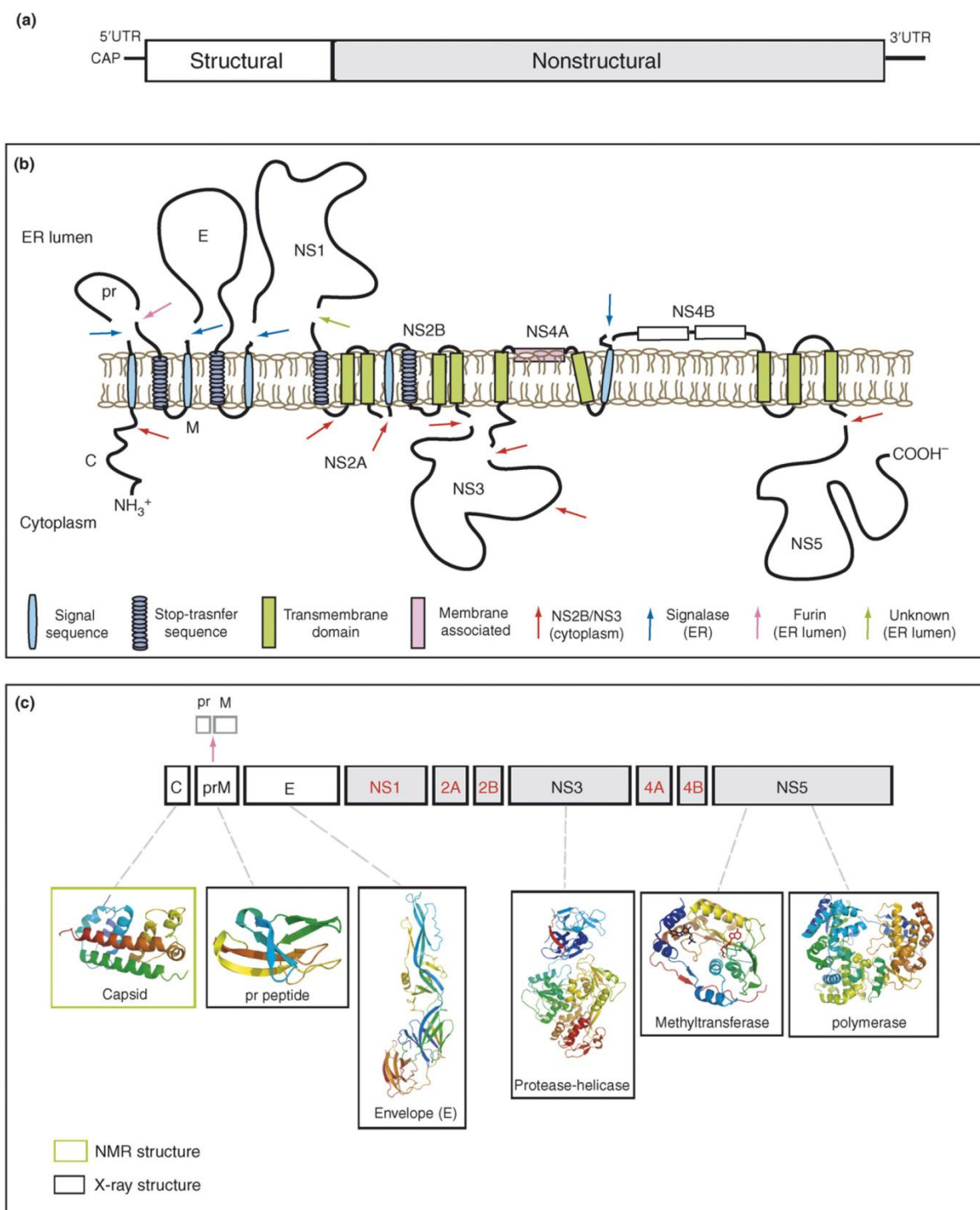
附錄四、2007 年至 2011 年 7 月台灣登革熱確定病例數(台灣疾病管制局，CDC, Taiwan)

全國登革熱含本土及境外移入病例趨勢圖(2007/01/01~2011/7/26)



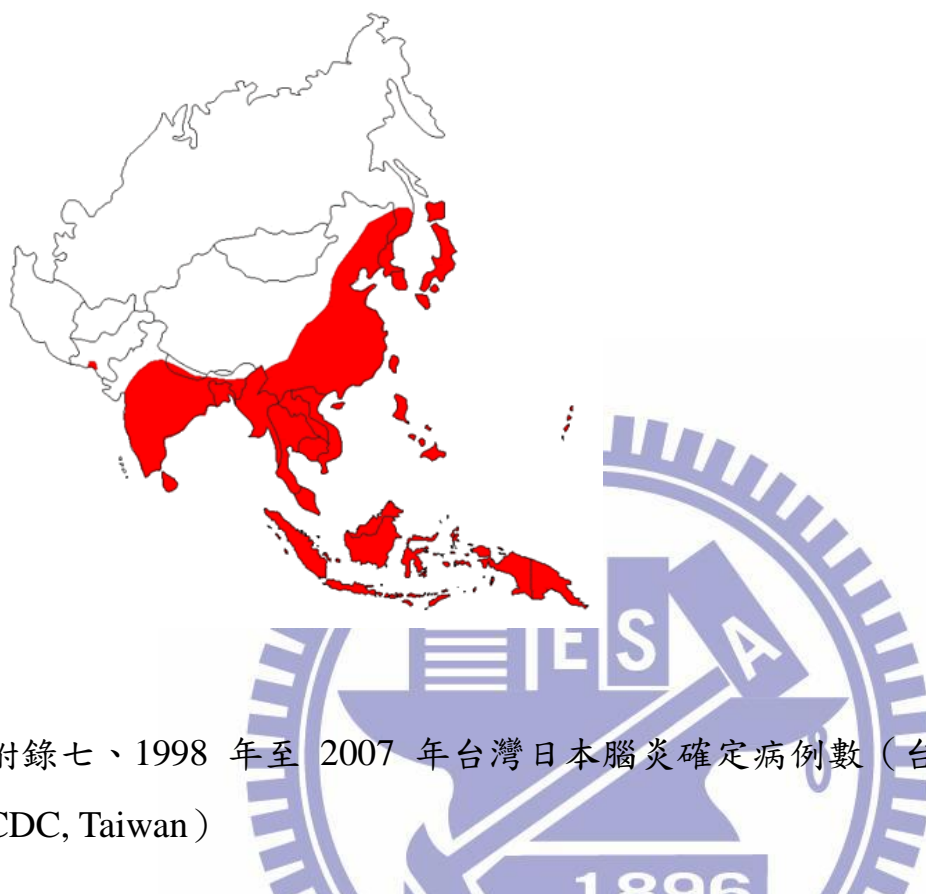
資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC 2011/7/27

附錄五、登革熱病毒全長基因體 (genome) 與聚蛋白 (polyprotein) 示意圖

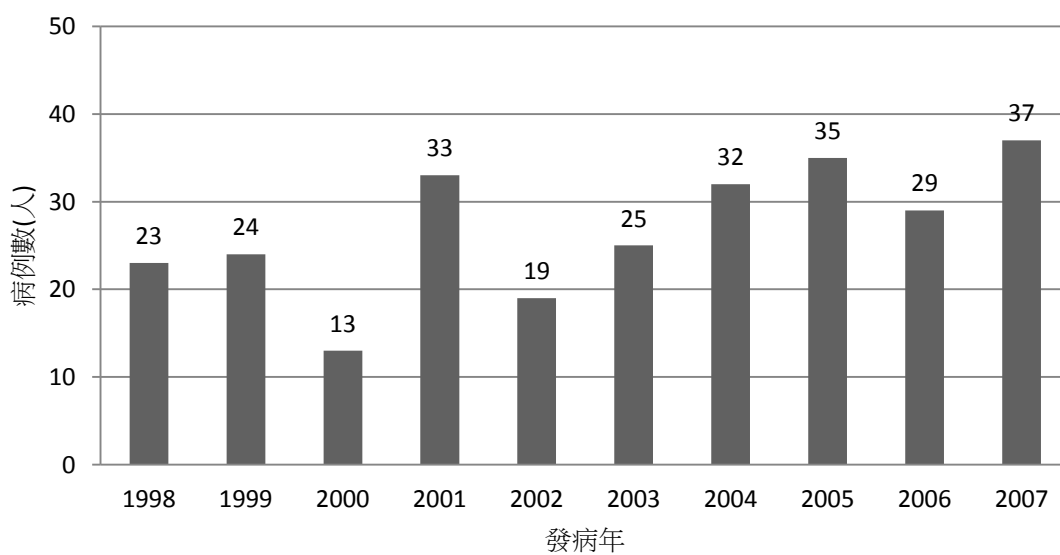


Perera *et al.*, 2008

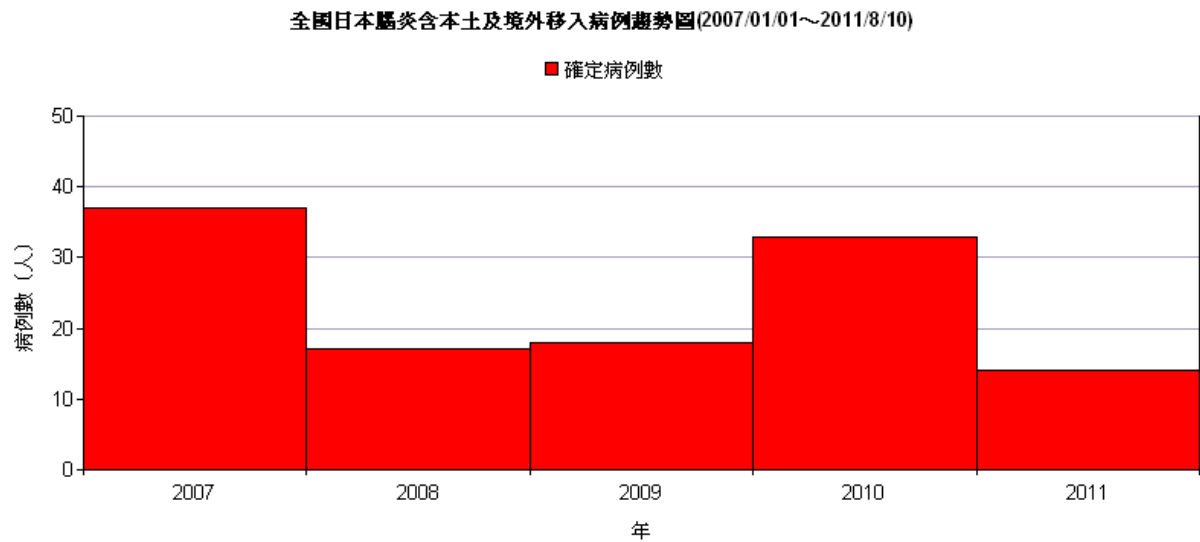
附錄六、1970 年至 1998 年日本腦炎疫情分布圖（台灣疾病管制局，CDC, Taiwan）



附錄七、1998 年至 2007 年台灣日本腦炎確定病例數（台灣疾病管制局，CDC, Taiwan）



附錄八、2007 年至 2011 年 8 月台灣日本腦炎確定病例數（台灣疾病管制局，CDC, Taiwan）



資料來源：疾病管制局 Taiwan CDC 2011/8/11

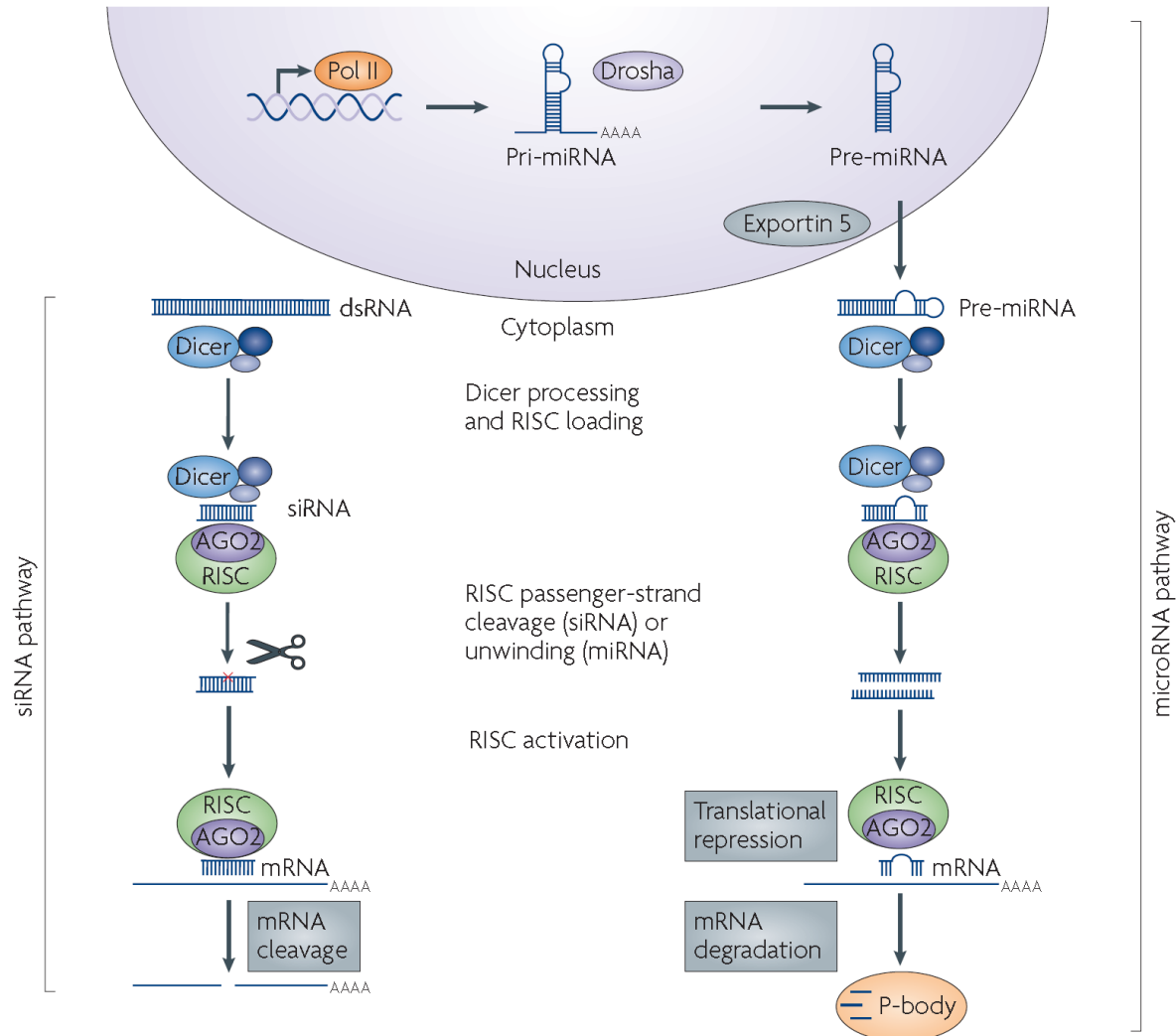


附錄九、小干擾 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 結構圖



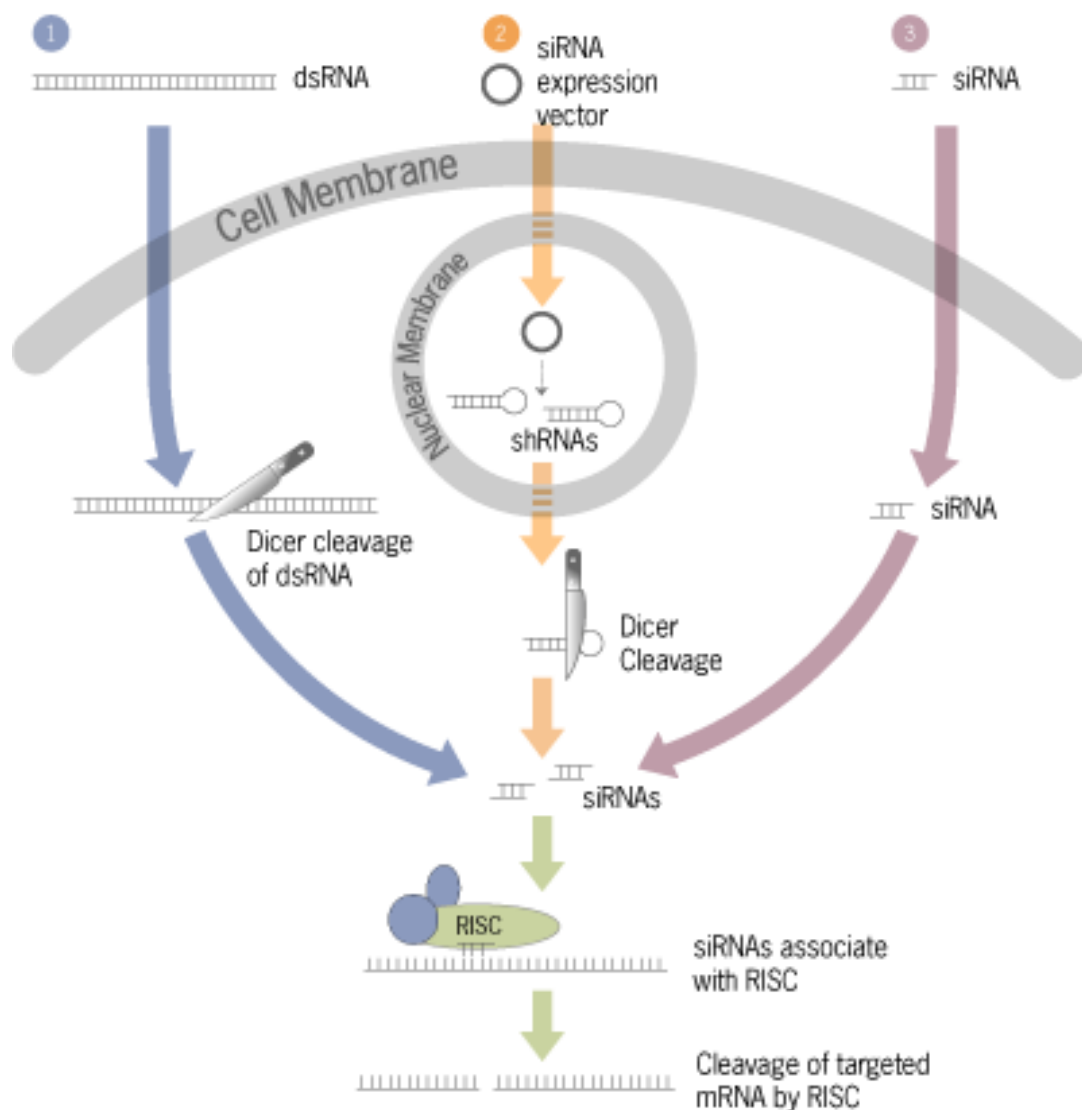
Dykxhoorn *et al.*, 2003

附錄十、RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 機制路徑圖



de Fougereolles *et al.*, 2003

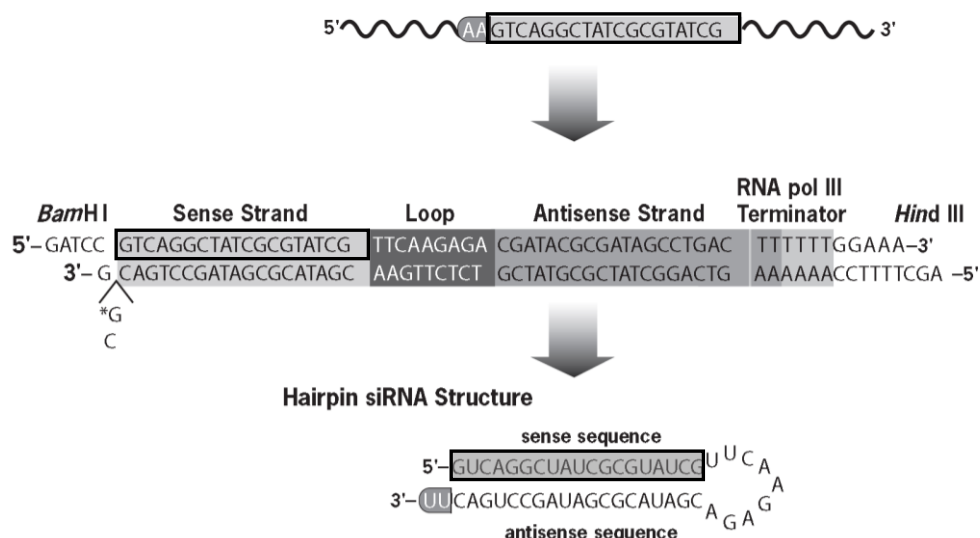
附錄十一、生物體開啟 siRNA pathway 的方法



<http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/overview/4.html>

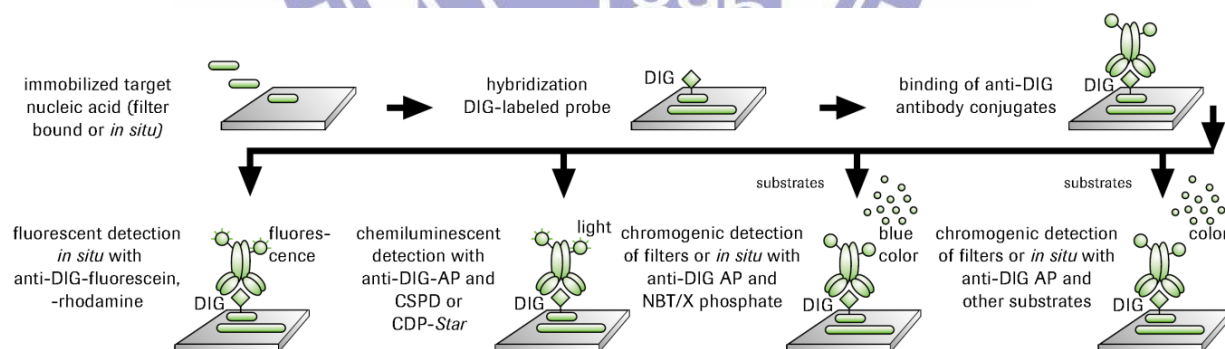
附錄十二、shRNA Expression Vector 上 shRNA 片段之設計

Example Target Sequence (AA plus 19 nt)



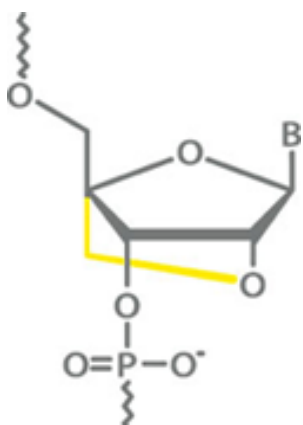
註、於目標序列的開放式讀架（Open reading frame, ORF）中找尋連續“AA”的序列及往後的 19 鹼基序列（AA(N)₁₉）總長為 21 nt 作為 siRNA 的目標序列，轉換成 shRNA 形式（Sense Strand - Loop - Antisense Strand - RNA pol III Terminator）以便接入 shRNA Expressing Vector 中。

附錄十三、DIG 北方墨點免疫偵測的原理



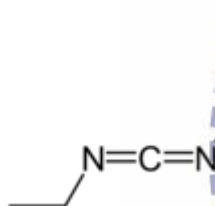
註、本研究中的北方墨點是利用 Digoxigenin (DIG) 系統 (Roche, Inc) 作為免疫偵測。於探針 (probe) 上修飾 DIG，利用探針與轉漬膜上的核苷酸雜合，再利用可以偵測的抗體 (anti-DIG antibody AP) 與 DIG 結合，最後利用 CSPD (Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate) 與 anti-DIG AP 上的 AP (alkaline phosphatase) 發生催化產生冷光 (luminescent light) 最後經由底片壓片以獲得條帶 (band)。

附錄十四、locked nucleic acid (LNA) 的結構圖



<http://www.exiqon.com/lna-technology>

附錄十五、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 的結構圖



[http://en.wikipedia.org/wiki/1-Ethyl-3-\(3-dimethylaminopropyl\)carbodiimide](http://en.wikipedia.org/wiki/1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)