

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

探討登革熱二型病毒 PL046 之質體建構及
報導基因的選擇

Construction of dengue virus PL046 strain genomic cDNA and
reporter chimera

研究生：賴建孝

指導教授：楊昶良 博士

中華民國九十五年元月

探討登革熱二型病毒 PL046 之質體建構及
報導基因的選擇

Construction of dengue virus PL046 strain genomic cDNA and
reporter chimera

研究生：賴建孝

Student : Chien-Hsueh Lai

指導教授：楊昶良 博士

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

A Thesis

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

January 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年元月

摘要

登革熱病毒是全長 11kb 的正單股形 RNA 病毒，屬黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 黃質病毒屬 (Genus *Flavivirus*)。目前對於登革熱病毒在組裝過程中，如何正確選擇病毒 RNA 包覆至結構性蛋白的機制並不清楚。

為瞭解登革熱病毒組裝訊號所在的位置，實驗計畫先獲得登革熱病毒全長的 cDNA clone，再將登革熱病毒的結構性及非結構性基因，分別與報導基因 (*lacZ*) 作重組 DNA，置於 CMV 啟動子的控制。以含有病毒基因序列 (結構性或非結構性基因) 及報導基因的報導質體對細胞進行轉染，藉細胞轉錄出含報導基因及病毒基因序列的 RNA，再以登革熱病毒感染被轉染的細胞，產生病毒複製及組裝所需之蛋白；任一段帶有組裝訊號的 RNA 在細胞中應可被組裝至病毒顆粒。將過程中產生的病毒收集後，再次感染細胞，進行報導基因活性測試；若測得酵素活性則表示該重組基因上所帶有的病毒基因序列具有組裝時所需要的組裝訊號。

根據前人之研究，在抗生素濃度減半及低溫的培養狀況下，篩選具有登革熱二型病毒全長基因序列質體的 *E. coli*，進行一連串質體建構、報導基因的選擇及表現，建構出含有報導基因及病毒基因序列 (結構性或非結構性基因) 的質體，期望能為整個實驗建立可行的基本架構。

結果顯示，所獲得的登革熱病毒全長 cDNA clone 置於 CMV 啟動子下游時，並無法表現出具有感染性的登革熱病毒。在以 X-gal staining 分析含有部份病毒基因的報導質體表現時發現，當 *lacZ* 與病毒基因分別在不同 ORF (bicistronic) 的狀況下，*lacZ* 位於上游時，產生的藍色細胞數最多；當 *lacZ* 位於下游的 ORF 並在前方加入 IRES 時，產生的藍色細胞數只有在位於上游時的二十分之一。未來在進行組裝訊號分析時，建議採用 bicistronic 的方式，並嘗試利用其它的報導基因，改變偵測的狀況，期望能提昇報導基因所表現之活性被偵測的情形。

Abstract

Dengue virus (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) is a single- stranded, positive-sense RNA virus with an 11-kb genome. It is not clear how dengue viruses select viral RNA packaging into structural protein during encapsidation.

The goal of these studies was to develop a dengue virus packaging system for possible future use in defining the dengue virus RNA packaging signal. First, we have to obtain full length cDNA clone of dengue virus type 2. Then, the viral structural or nonstructural cDNA were ligated with *lacZ* reporter gene separately, and were driven by CMV promoter. BHK-21 cells were transfected by plasmids that contain partial sequence of dengue genome (structural or nonstructural genes) and *lacZ* reporter gene. The plasmids would produce RNAs containing either the structural or nonstructural sequence of dengue genome alone with the reporter gene. Then, the cells were infected with dengue virus type 2, which would provide viral proteins necessary for viral packaging and replication. Any RNAs contains viral packaging signal would assemble with the viral structural proteins. The media were collected, and used for infecting new BHK-21 cells. If the activity of the reporter gene expresses in BHK-21 cells, this would suggest that the partial sequence of dengue viral genome may contain the signals for viral packaging.

For the propagation of plasmids, the method of Sriburi et al. was followed. They propagated *E. coli* at room temperature (20-25°C) under low level of antibiotic selection to construct entire cDNA of a dengue serotype 2 virus genome. I have proceeded through a series of plasmid constructions, and selection and expression of the reporter genes in an attempt to build the foundation of the dengue viral packaging signal research.

The results showed that the full length cDNA clones of dengue virus type 2 driven by CMV promoter did not produce infectious virions. Analyses of expression of the reporter gene with partial sequence of dengue genome revealed that when *lacZ* located upstream and in a bicistronic unit with the viral sequence, the expression was the best. When *lacZ* was driven by an IRES and was located downstream, the amounts of the expression was only one-twentieth of that in upstream. In the future, reporter gene expression shall observe the bicistronic manner, and use of other reporter genes may vary the detection method and increase the usefulness of the construct.

謝誌

轉眼間兩年多已經過去了，新的一年已經來到，碩士班的生涯也即將終了。僥倖的，經過入學考試進入交通大學生物科技所，加入了小楊老師實驗室，在老師的細心指導之下，完成了這本論文。感謝老師，在我整個跌跌撞撞的實驗過程中，耐心與寬容的指導一個不擅溝通又缺少耐性與自信的學生，使我在整個研究生的生涯中瞭解到，遇到問題時，如何一個一個的排除變因，找出問題的癥結，並解決它。老師，謝謝您！

感謝口試委員林苔吟老師、陳浩仁老師及冷治湘老師不吝指導，讓這本論文內容更加豐富與完整。也感謝中原大學的吳宗遠老師提供實驗過程所需的材料，謝謝你們！

回憶兩年實驗生活的點點滴滴：與雅文學姊拌嘴，是在實驗室時最大的樂趣；阿貴的鼓勵與關心，柏吟的友情贊助與情義相挺，讓我心中感到絲絲暖意；還有住在隔壁且心地善良的婷尹、好歌喉的嘉嘉、做事認真負責的宛真，大家都給我很多的建議與鼓勵；還有活潑熱情的怡瑾、善解人意的志豪、風趣幽默的杏枚、電腦高手育穎、好脾氣的欣彬以及害怕與我相認的金蓉；此外還有大學部的逸修、政毅、虹綾、欣悟、曜禎、大馨、佳叡、萍芳、瀟云、柏伶、宗翰，有大家的陪伴，使我的研究所生涯更增色彩。

感謝台北醫學大學細胞分子生物研究所的張淑芬老師，在我剛退伍時，願意聘用一個毫無實驗室經驗的助理，並給予耐心的指導，培養我基本的邏輯概念與實驗精神。想告訴您，那段時間對我來說，真的很重要，感謝您的指導；此外，對當時我的不成熟，對您致上最高的歉意！！也感謝當時的研究生恬慈與小肉，以及助理佳伶，大家都陪我走過一段很重要的日子。

最後，還是要謝謝這一路陪我走來的家人、小鳳、景盛、詩欣、兆傑與小祝；若沒有你們不斷的鼓勵與支持，還真不知要如何調適過程中所遇到的挫折，想告訴你們，有你們，真好！！也謝謝所有在一路上陪伴我的人，感謝大家，讓我的生活更加的多采多姿，謝謝你們！！

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	iv
圖目錄	viii
表目錄	xi
附錄目錄.....	xii
縮寫表	xiii
壹、緒論	1
1.1 近代登革熱的發展史	1
1.2 登革熱病毒簡介	1
1.3 Kunjin virus 組裝訊號的研究	2
1.4 登革熱病毒 cDNA clone	2
1.5 cDNA clone 感染力測試	3
1.6 Kozak sequence	3
1.7 EMCV IRES	4
1.8 實驗設計	4
1.8.1 登革熱病毒的 cDNA clone.....	4
1.8.2 登革熱病毒組裝訊號的搜尋.....	5
貳、材料	7
2.1 菌株.....	7
2.2 細胞株.....	7
2.3 病毒.....	7
2.4 質體.....	7
2.5 引子.....	9
2.5.1 針對質體建構及 RT-PCR 所使用的引子.....	9
2.5.2 針對 DNA 定序所設計的引子.....	11

2.6 藥品試劑	13
2.7 試劑組	15
2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基	15
2.9 儀器設備	16
參、方法	18
3.1 RNA 的萃取	18
3.1.1 病毒 RNA 的萃取	18
3.1.2 細胞 RNA 的萃取	18
3.2 反轉錄及聚合酶鏈反應	19
3.2.1 反轉錄	19
3.2.2 聚合酶鏈反應	19
3.3 大腸桿菌勝任細胞的轉形	20
3.3.1 大腸桿菌勝任細胞的製備 (電穿孔法)	20
3.3.2 勝任細胞的轉形 (電穿孔法)	20
3.4 質體 DNA 之萃取 (Plasmid extraction)	21
3.4.1 小量質體之萃取	21
3.4.2 大量質體萃取	21
3.5 限制酵素反應	22
3.6 Klenow fill in	22
3.7 去磷酸反應	23
3.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段	23
3.9 接合反應	23
3.10 細胞繼代培養及轉染	23
3.10.1 BHK-21 細胞繼代培養	23
3.10.2 轉染	24
3.11 X-gal staining	24
3.12 空斑試驗	24
肆、結果	25

4.1 登革熱二型病毒感染性質體建構及表現	25
4.1.1 pcDNA3-NCS 質體建構	25
4.1.2 RT-PCR	25
4.1.3 TA cloning	25
4.1.4 登革熱二型病毒感染性質體建構	26
4.1.5 登革熱二型病毒感染性質體的表現	26
4.1.6 確認感染性質體是否能在 BHK-21 細胞中進行轉錄	27
4.1.7 DNA 定序	27
4.2 單一 ORF 非結構性基因報導質體建構	28
4.2.1 pcDNA3-NCS/5'3'UTR 質體建構	28
4.2.2 殖入報導基因	29
4.2.3 非結構性基因的殖入	29
4.2.4 非結構性基因報導質體的表現	29
4.3 報導基因的來源及選擇	30
4.3.1 報導基因質體의 建構	30
4.3.2 報導基因的表現	30
4.3.3 引入酵素切位	31
4.4 結構基因報導質體建構	31
4.4.1 結構基因質體建構	31
4.4.2 報導基因的殖入	32
4.4.3 Spacer DNA 的殖入	32
4.4.4 EMCV IRES 的殖入	33
4.5 非結構基因報導質體建構	33
4.5.1 報導基因的殖入	33
4.5.2 非結構性基因的殖入	34
4.5.3 EMCV IRES 的殖入	34
4.6 結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體的表現	34
伍、討論	36

5.1 質體建構.....36

5.2 登革熱二型病毒感染性質體建構及表現.....37

5.3 報導基因的表現.....39

5.4 結構性基因及非結構性基因報導質體的建構.....41

5.5 結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體的表現.....41

陸、結論.....43

柒、參考文獻.....44



圖目錄

圖一、Construction of pcDNA3-NCS.....	48
圖二、TA cloning – pCR-XL-TOPO/DV2F.....	49
圖三、Construction of pcDNA3-NCS/DV2F.....	50
圖四、單一 ORF 非結構性基因報導質體建構示意圖.....	51
圖五、Construction of pcDNA3-NCS/3'UTR.....	52
圖六、Construction of pcDNA3-NCS/5'3'UTR.....	53
圖七、Construction of pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR.....	54
圖八、construction of pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR.....	55
圖九、報導基因的選擇 – 來源及轉譯起始點之比較.....	56
圖十、Construction of pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR.....	57
圖十一、Construction of pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR.....	58
圖十二、TA cloning – pGEM-T/lacZ.....	59
圖十三、結構性基因報導質體建構示意圖.....	60
圖十四、Construction of pcDNA3-NCS/5'S3'UTR.....	61
圖十五、Construction of pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR.....	62
圖十六、Construction of pGEM-T/spacer.....	63
圖十七、Construction of pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR.....	64
圖十八、Construction of pcDNA3.0-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR.....	65
圖十九、非結構性基因報導質體建構示意圖.....	66
圖二十、Construction of pcDNA3.0-NCS/5'Z3'UTR.....	67
圖二十一、Construction of pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR.....	68
圖二十二、Construction of pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR.....	69
圖二十三(A)、pcDNA3-NCS 限制酵素作用位置圖.....	70
圖二十三(B)、pcDNA3-NCS 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖.....	70
圖二十四、登革熱二型病毒 (PL046 strain) RT-PCR 產物之電泳分析圖.....	71
圖二十五(A)、pCR-XL-TOPO/DV2F 限制酵素作用位置圖.....	72
圖二十五(B)、pCR-XL-TOPO/DV2F clone P 經限制酵素作用後，	

所得之電泳分析圖·····	72
圖二十六(A)、pcDNA3-NCS/DV2F 限制酵素作用位置圖·····	73
圖二十六(B)、pcDNA3-NCS/DV2F clone P1 經限制酵素作用後， 所得之電泳分析圖·····	73
圖二十七(A)、pcDNA3-NCS/3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	74
圖二十七(B)、pcDNA3-NCS/3'UTR 經限制酵素作用後， 所得之電泳分析圖·····	74
圖二十八(A)、pcDNA3-NCS/5'3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	75
圖二十八(B)、pcDNA3-NCS/5'3'UTR 經限制酵素作用後， 所得之電泳分析圖·····	75
圖二十九(A)、pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	76
圖二十九(B)、pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 經限制酵素作用後， 所得之電泳分析圖·····	76
圖三十(A)、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	77
圖三十(B)、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 經限制酵素作用後， 所得之電泳分析圖·····	77
圖三十一(A)、pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 及 pcDNA3-NCS/ 5'KZ(BAG)3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	78
圖三十一(B)、pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG) 3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖·····	78
圖三十二(A)、pGEM-T/lacZ 限制酵素作用位置圖·····	79
圖三十二(B)、pGEM-T/lacZ 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖·····	79
圖三十三(A)、pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	80
圖三十三(B)、pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 經限制酵素作用後， 所得電泳分析圖·····	80
圖三十四(A)、pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR 限制酵素作用位置圖·····	81
圖三十四(B)、pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR 經限制酵素作用後， 所得電泳分析圖·····	81

圖三十五(A)、pGEM-T/Spacer 限制酵素作用位置圖	82
圖三十五(B)、pGEM-T/Spacer 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖	82
圖三十六(A)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 限制酵素作用位置圖	83
圖三十六(B)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 經限制酵素作用後， 所得電泳分析圖	83
圖三十七(A)、pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR 限制酵素作用位置圖	84
圖三十七(B)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 經限制酵素作用後， 所得電泳分析圖	84
圖三十八(A)、pcDNA3-NCS/5' Z3'UTR 限制酵素作用位置圖	85
圖三十八(B)、pcDNA3-NCS/5'Z3'UTR 經限制酵素作用， 所得之電泳分析圖	85
圖三十九(A)、pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR 限制酵素作用位置圖	86
圖三十九(B)、pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR 經限制酵素作用， 所得電泳分析圖	86
圖四十(A)、pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 限制酵素作用位置圖	87
圖四十(B)、pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 經限制酵素作用後， 所得電泳分析圖	87
圖四十一、登革熱二型病毒感染性質體 pcDNA3-NCS/DV2F clone P1 的表現	88
圖四十二、將不同的質體，轉染至 BHK-21 細胞內 48 小時後， 抽取細胞 RNA，進行 PCR 或 RT-PCR 結果	89
圖四十三、報導基因的表現	90
圖四十四、結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體的表現	91
圖四十五、定序引子在質體上之相對位置圖	93

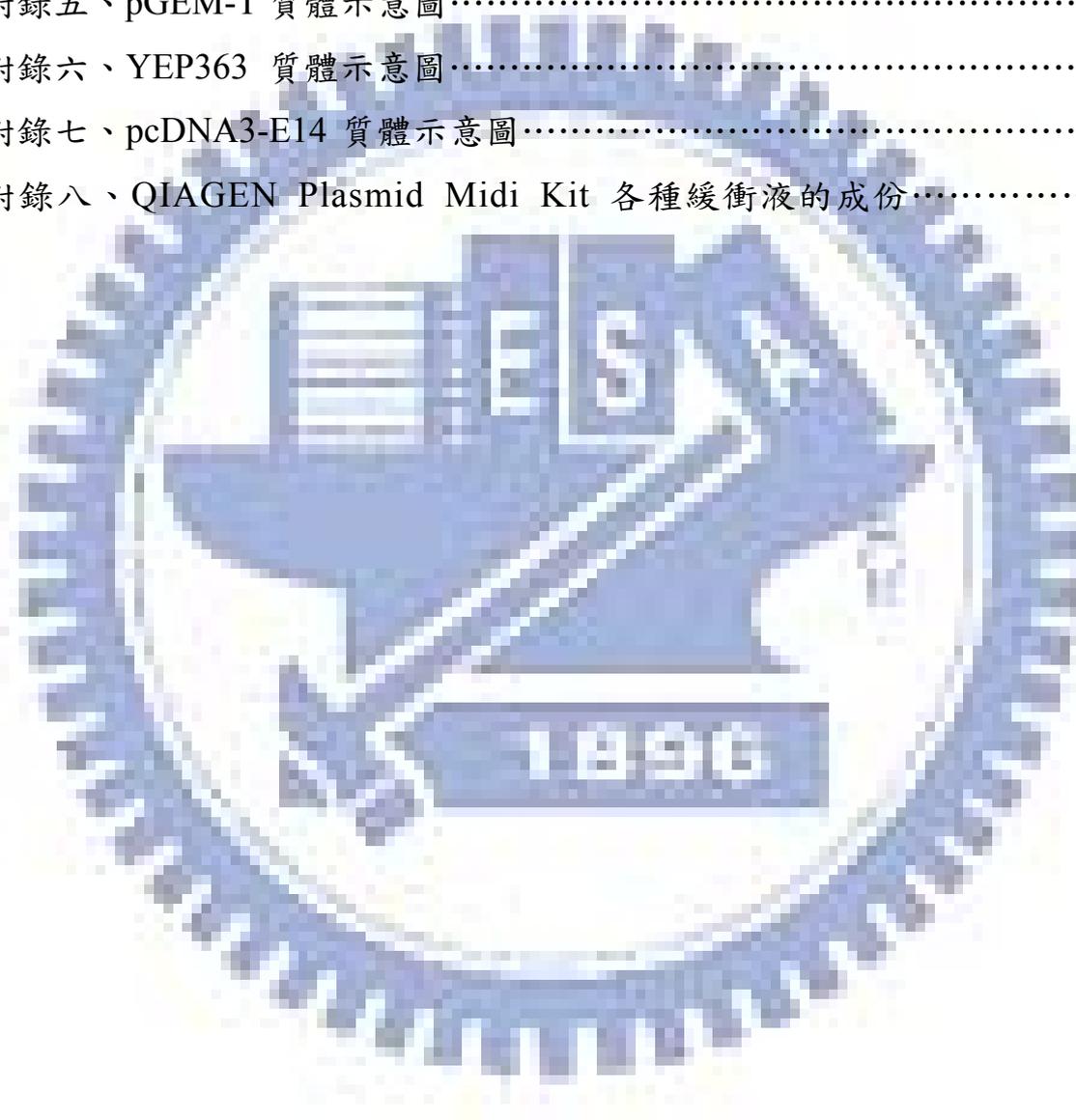
表目錄

表一、登革熱病毒 PL046 病毒株， pcDNA3-NCS/5'S3'UTR (結構性基因) 定序結果.....	94
表二、將「表一」定序結果轉換成胺基酸序列， 轉換部份包含 DNA 序列 97-3306 (非 UTR 部份)	98
表三、預測 pcDNA3-NCS/DV2F 在細胞內被轉錄後， 生成之 RNA 兩側的非病毒基因序列.....	100



附錄目錄

附錄一、pBAG.....	101
附錄二、pBluescript II SK(+)質體示意圖.....	102
附錄三、pcDNA3 質體示意圖.....	103
附錄四、pCR-XL-TOPO 質體示意圖.....	104
附錄五、pGEM-T 質體示意圖.....	105
附錄六、YEP363 質體示意圖.....	106
附錄七、pcDNA3-E14 質體示意圖.....	107
附錄八、QIAGEN Plasmid Midi Kit 各種緩衝液的成份.....	108



縮寫(Abbreviation)

BHK-cell	Baby hamster kindey cell
cDNA	complenmentary deoxyribonucleotide nucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid
EMCV	Encephalomyocarditis virus
EtBr	Ethidium bromide
IRES	Internal ribosome entry site
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
X-gal	5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
FBS	Fetal bovine serum

壹、緒論

世界衛生組織表示，近年來登革熱已經成為國際重視的公共衛生議題。全球有五分之二人口，就是約二十五億人正受到登革熱病毒的威脅，每年世界上約有五千萬人受到登革熱病毒的感染。台灣在民國 76 年，爆發了一波登革熱大規模感染，自此之後年年皆有登革熱確定病例。民國 91 年又再度爆發大規模感染，當年度感染登革熱的確定病例有 5388 人之多（資料來源：行政院衛生署網站）。登革熱病毒在台灣是藉由埃及斑蚊（*Aedes aegypti*）及白線斑蚊（*Aedes albopictus*）傳播的疾病。溫暖潮溼的台灣，非常適合病媒蚊的孳生，稍有不慎，疫情便無法控制。我們必需正視登革熱病毒相關的問題，才能防患於未然。

1.1 近代登革熱的發展史

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

1.2 登革熱病毒簡介

登革熱病毒在分類上是屬黃質病毒科(*Flaviviridae*)黃質病毒屬(Genus

Flavivirus)，傳播途徑是藉由節肢動物叮咬患病宿主將病毒傳遞至下一位被感染者。登革熱病毒為正股的單股 RNA 病毒，其 genome 在 5'端具有 cap，3'端不具 poly A，整個基因序列只有一個 open reading frame (ORF)，進行轉譯時，只會合成出一條多肽鏈 (polypeptide)，最後再藉由細胞內的酵素 (signalase) 及病毒本身的非結構性蛋白將多肽鏈裂解成獨立的蛋白 (Henchal et al.,1990)。其基因組成可大略分為兩部份，結構性基因 (structural gene) 及非結構性基因 (nonstructural gene)。結構性基因所對應 (encode) 的蛋白質構成病毒實際結構部份，包含構成病毒的衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, PrM) 及外膜蛋白 (envelope protein, E)；非結構性基因所對應的部份，則是與病毒的 RNA 複製及病毒的蛋白裂解有關，主要有 NS1、NS2A、NS2B、NS3A、NS3B、NS4 及 NS5(You et al.,1999)。

1.3 Kunjin virus 組裝訊號 (packaging signal) 的研究

經過查詢，登革熱病毒組裝訊號似乎沒有任何文獻探討，但是對於同屬於 *flavivirus* 的 Kunjin virus 則有些許的文獻資料。過去研究 Kunjin virus 發現，在 in trans 的狀況下，病毒進行組裝時，不會將結構性基因包覆至病毒顆粒中(Khromykh et al.,1998)；病毒 RNA 被組裝的前提是 RNA 要先被複製(Khromykh et al., 2001)；病毒在組裝時，需要完整的 NS3 基因(Liu et al., 2002)；NS3 基因發生突變會影響病毒 RNA 的複製，而 NS2A 蛋白則有報導指出可能與病毒的組裝有關(Liu et al.,2003)。因此 *flavivirus* 的組裝訊號至少有一部份可能在非結構性基因的區段中。

1.4 登革熱病毒 cDNA clone

西元 1991 年，第一個登革熱病毒四型的 cDNA infectious clone 被完成，且能在 *E. coli* 內大量複製(Lai et al., 1991)。然而，後續在登革熱二型病毒 cDNA infectious clone 的製作，卻發生了問題。西元 1995 年，Kapoor 等人將登革熱二型病毒分為二段進行質體建構，最後再利用 in vitro ligation 的方

式，成功製作出具感染性的 cDNA clone(Kapoor et al., 1995)。西元 1997 年，Polo 等人發表了文章，利用 yeast 複製得到登革熱二型病毒全長的 cDNA infectious clone 後，將此質體放入 *E. coli* 內，也可成功複製，只是質體具有的感染力較差(Polo et al., 1997)。Kinney 等人則綜合以上兩種方式，利用 low copy number 的載體，以 *E. coli* 複製登革熱二型病毒 cDNA infectious clone，成功的得到具有感染性的質體(Kinney et al., 1997)。西元 2001 年，Sriburi 等人才成功的利用 high copy number 載體，在 *E. coli* 複製出具有感染性的登革熱二型病毒(Sriburi et al., 2001)。

1.5 cDNA clone 感染力測試 (plaque assay)

過去，分析得到的登革熱病毒的 cDNA clone 是否具有感染力，主要採用的方式是利用 SP6 或 T7 啟動子，以 in vitro transcription 的方式，合成登革熱病毒的 RNA，加上 5'端 cap 後，轉染至 BHK-21 細胞中，觀察是否有空斑 (plaque) 生成，然而此種方法過程煩雜且耗費時間。在 poliovirus 的研究中，Semler 等人將含有 poliovirus 全長的 cDNA 質體轉染至哺乳類動物細胞中，進行空斑測試，發現到可以得到具感染性的病毒，但生成的空斑數目不多；隨後他們在 cDNA 前方加入 SV40 啟動子及 Ori (origin) 後，將質體轉染至不同種類的細胞中，進行空斑測試，所得到的空斑數較先前未加啟動子及 Ori 的質體可以增加 10 至 250 倍(Semler et al., 1984)。

1.6 Kozak sequence

根據 Kozak 等人的研究表示，真核細胞的 mRNA 在啟始密碼兩側的序列並非是隨機產生的。他分析了 699 種脊椎動物 mRNA 的 5'端序列，歸納出在啟始密碼兩側序列多為 (A/G)XXAUGG，其中，AUG 為啟始密碼，X 表示任意的核苷酸(Kozak, 1981)。隨後又發表文章指出，對啟始密碼周圍的 DNA 序列做點突變，會降低轉譯的效率(Kozak, 1986)。

1.7 EMCV IRES (Encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site)

真核細胞的轉譯方式有兩種，cap-dependent translation 及 cap-independent translation。在真核細胞中約有95%至97%的mRNA是藉由cap-dependent translation的方式進行轉譯(Merrick, 2004)。cap-dependent translation是藉著帶有Met-tRNA^{Met}與initiation factor的40S subunit，與mRNA的5'端cap結合後，順著mRNA移動至第一個AUG的位置，形成initiation complex，啟始蛋白質的轉譯(Kozak, 1989)。

在少部份的細胞mRNA及病毒則發現到cap-independent translation。在HCV、retrovirus及屬於Picornaviridae家族成員之一的Encephalomyocarditis virus (EMCV)，都被發現到具有internal ribosomal entry site (IRES)。IRES是富含二級結構的序列，核糖體可以在缺少cap的狀況下，直接與含有IRES序列的RNA結合，啟始蛋白質的轉譯。在含有IRES的病毒中，以poliovirus及EMCV的IRES最常被應用在bicistronic的質體建構中(Hennecke et al., 2001)。

1.8 實驗設計

1.8.1 登革熱病毒的 cDNA clone

要了解登革熱二型病毒組裝訊號的位置，首先，需要得到整個病毒全長的cDNA clone。我們使用Sriburi等人的方法(Sriburi et al., 2001)，以high copy number 載體，在抗生素濃度減半(25 μg/ml)及低溫(25°C)的生長狀況下，篩選具有登革熱二型病毒全長基因序列質體的*E. coli*。為了分析得到具有登革熱二型病毒全長基因序列的質體是否具有感染性，參考Semler的方法(Semler et al., 1984)，利用能夠被真核細胞啟始的病毒啟動子序列，使細胞的RNA聚合酶合成病毒的RNA以產生病毒所需的蛋白。我們選擇含有CMV啟動子的載體pcDNA3，將登革熱病毒的基因序列轉殖至此質體上，期望能得到在哺乳動物細胞內可以進行轉錄並轉譯出病毒蛋白的質

體；將此質體轉染至 BHK-21 細胞中，測試得到的登革熱病毒基因序列是否具有感染性。

1.8.2 登革熱病毒組裝訊號的搜尋

關於登革熱二型病毒組裝訊號的搜尋，計畫先將登革熱二型病毒的基因序列分成兩段，結構性基因及非結構性基因部份。將含有報導基因及結構性基因或含有報導基因及非結構性基因的質體轉染至細胞，讓細胞合成出帶有報導基因及登革熱病毒基因（結構性或非結構性基因）序列的 RNA，同時，對細胞進行登革熱病毒的感染，產生登革熱病毒所需的蛋白。登革熱病毒進行組裝時，會將具有組裝訊號的 RNA 進行包覆，產生病毒顆粒，釋放至細胞外。將產生出的病毒收集後，感染新的 BHK-21 細胞，如果能在被感染的細胞內偵測到報導基因的表現，即可得知報導基因上帶有的登革熱病毒序列具有病毒組裝訊號。

考慮到病毒組裝訊號可能有相對位置關係的狀況，我們決定將報導基因設計在結構性基因下游，非結構性基因的上游，以符合結構性基因及非結構性基因在病毒 genome 上的相對位置。報導基因選擇 *lacZ*，則是考慮到偵測過程簡單，只需要進行 X-gal 染色，方便觀察。此外，為了避免 RNA 的長度干擾了病毒組裝 RNA 的能力，在質體建構過程中，將含有結構性基因及報導基因的質體，在後方插入一段序列，稱之為 Spacer DNA，以符合病毒 genome 的長度。根據 Proutski 等人推測，登革熱病毒的 5' 及 3' UTR 序列可能具有病毒的組裝訊號(Proutski et al., 1997)，因此在含有報導基因及結構性或非結構性基因的兩端皆分別加入 5' 及 3' UTR 的序列。

初步實驗後發現，報導基因在 BHK-21 細胞中的表現狀況並不理想，因此參考 Kozak 等人的文章(Kozak, 1981)及 pcDNA3.1 手冊上的建議，在報導基因前方加入 Kozak sequence，期望能使基因表現量增加。

此外整個實驗設計原本是採用 monocistronic 的方式，期望利用細胞內的酵素 (signalase)，將合成出來含有報導基因及結構性或非結構性基因的多肽鏈順利分割成報導基因所含的蛋白及結構性或非結構性蛋白，然而所

得到的結果並不理想。於是改而採用 bicistronic 的方式，也就是經細胞轉譯出來的 RNA 含有報導基因及結構性基因或非結構性基因兩個轉譯讀框（open reading frame, ORF），並在後方 ORF 的上游接上 EMCV IRES，以增加後方 ORF 基因的表現量。

近代西方發現類似登革熱疫情至今，大約已有二百年左右。整個病毒的生活史，從病毒感染細胞後，RNA 的複製、病毒多肽鏈的合成及裂解、各蛋白的功能及病毒組裝過程，都有程度不一的了解。然而登革熱病毒組裝時所需要的組裝訊號（packaging signal），至今仍然沒有任何文獻的探討。究竟在病毒組裝過程中，如何區別病毒產生的 RNA 與細胞產生的 RNA，以便將病毒的 RNA 進行組裝，合成出具有感染性的病毒顆粒？這些訊號位於病毒 RNA 的何處？為了瞭解登革熱二型病毒組裝訊號的位置，進行一連串的質體建構、報導基因的選擇及表現，期望能為整個實驗建立可行的基本架構。



貳、材料

2.1 菌株

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

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen)

2.2 細胞株

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

2.3 病毒

Dengue virus type 2 PL046 strain (Taiwan local strain)

2.4 質體

質體	特性	Reference
pBAG	Retroviral vector 上含有 reporter gene , β -galactosidase gene。請參照附錄一。	Yang's lab.
pBluescript II SK(+)	篩選標記為 Ampicillin, 含有 <i>lac</i> 及 T7 啟 動子。請參照附錄二。	Stratagene
pcDNA3	篩選標記為 Ampicillin, 含有 T7 及 CMV 啟動子。請參照附錄三。	Invitrogen
pcDNA3-NCS	pcDNA3 上的 MCS 以 pBluescript II SK(+) 的 MCS 置換。	本研究
pcDNA3-NCS/ 5'Z(YEP)3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 YEP363 且不 含 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶 有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR。	本研究

pcDNA3-NCS/ 5'KZ(YEP)3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 YEP363 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR 。	本研究
pcDNA3-NCS/ 5'KZ(BAG)3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 PL046 strain 的 3'UTR 。	本研究
pcDNA3-NCS/5'Z NS(MONO)3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 YEP363 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 PL046 strain 的非結構性基因及 3'UTR 。 <i>lac Z</i> 與非結構性基因共用一個 ORF 。	本研究
pcDNA3-NCS/5'Z (IRES)NS3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR , 下游帶有 IRES 、 PL046 strain 的非結構性基因及 3'UTR 。 <i>lac Z</i> 與非結構性基因分別使用各自的 ORF 。	本研究
pcDNA3-NCS/5'S ZSp3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR 及結構性基因, 下游帶有 Spacer DNA 及 PL046 strain 的 3'UTR 。 結構性基因與 <i>lac Z</i> 分別使用各自的 ORF 。	本研究
pcDNA3-NCS/5'S (IRES)ZSp3'UTR	pcDNA3-NCS 上帶有來源為 pBAG 且含有 Kozak sequence 的 <i>lac Z</i> ; <i>lac Z</i> 的上游帶有 PL046 strain 的 5'UTR 、 結構性基因及	本研究

	EMCV IRES，下游帶有 Spacer DNA 及 PL046 strain 的 3'UTR。結構性基因與 <i>lac Z</i> 分別使用各自的 ORF。	
pcDNA3-NCS/ DV2F	pcDNA3-NCS 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列。	本研究
pCR-XL-TOPO	篩選標記為 Kanamycin 及 Zeocin，並含 <i>lac</i> 啟動子。請參照附錄四。	Invitrogen
pCR-XL-TOPO/ DV2F	pCR-XL-TOPO 上帶有 PL046 strain 全長的基因序列。	Invitrogen
pGEM-T	篩選標記為 Ampicillin，含有 T7 及 SP6 啟動子。請參照附錄五。	Promega
pGS-EMCV	篩選標記為 Ampicillin，含有 CMV 啟動子及 EMCV IRES。(Lee et al., 2005)	中原大學 吳宗遠老 師實驗室
YEP363	篩選標記為 Ampicillin，含有 β -galactosidase gene。請參照附錄六。	Yang's lab.

2.5 引子

2.5.1 針對質體建構及 RT-PCR 所使用的引子

引子	序列 5'~3'	位置
YlacF	CCCAAGCTTATG{CCCGCCGTCG TTTTACAAC}	<i>lacZ</i> (V00296 ; NCBI) gene: +19 ~ +37

引子	序列 5'~3'	位置
YlacF(K)	TTTT <u>CCCGGGATG</u> {GCCGTCGTTT TACAACGTC}	<i>lacZ</i> (V00296; NCBI) gene: +22 ~ +40
YlacR(S)	TCACTAGGATCC {TTTTTGACAC CAGACCAACTGG}	<i>lacZ</i> (V00296; NCBI) gene: +3048 ~ +3069
LacF	<u>GTTTAAACGGCGCGCCATG</u> {GCC GTCGTTTTACAACGT}	<i>lacZ</i> (V00296; NCBI) gene: +22 ~ +37
LacR	<u>TTAATTAAGCGGCCGCTCA</u> {TTTT TGACACCAGACCAACTG}	<i>lacZ</i> (V00296 ; NCBI) gene: +3049 ~ +3069
SpacerF	TTTT <u>GCGGCCGC</u> {GAGGCGTTAA CCGTCACG}	<i>lacZ</i> (V00296 ; NCBI) gene: +1055 ~ +1072
SpacerR	TCCCCCCCCTTAATTA <u>A</u> {CCACTG GTGTGGGCCAT}	<i>lacZ</i> (V00296 ; NCBI) gene: +2837 ~ +2853
D2F0001A'	TTT <u>ATCGAT</u> {AGTTGTTAGTCTAC GTGGACCGACA}	DV-2(NGC; M29095) gene: +1 ~ +25
D2R10723A	GCTCT{AGAACCTGTTGATTCAA CAGCACC}	DV-2(NGC; M29095) gene:+10700~+10723
D2R0099	CCCAAGCTT{CATCAGAGATCTG CTCTCTAATTA AAA}	DV-2(NGC; M29095) gene: +73 ~ +99
D2F10270	<u>CGGGATCC</u> {TAGAAGGCAAACT AACATGAAACA}	DV-2(NGC; M29095) gene:+10270~+10294
E14 F	TTT <u>CTCGAG</u> {GACAATGCGTTGC ATAGG}	DV-2(NGC; M29095) gene: +933 ~ +950
E14 R	CGTCTAGATTA{GGCCTGCACCAT AACTCC}	DV-2(NGC; M29095) gene: +2404 ~ +2421
SIRESF*	TCCCGTTTAAAC{AATTCCGCCCC TCTCCCT}	pIRES (Clontech): +1130~+1147

引子	序列 5'~3'	位置
SIRESR*	TTTTGGCGCGCC{TTATCATCGTG TTTTTCAAAGGA}	pIRES (Clontech): +1688~+1710
NSIRESF*	TTTTGCGGCCGC{AATTCCGCCCC TCTCCCT}	pIRES (Clontech): +1130~+1147
NSIRESR*	TCCCCGGATCCCAT{TTATCATCG TGTTTTTCAAAGGA}	pIRES (Clontech): +1688~+1710

註：{ } 內的序列為模板所具有的序列；{ } 外的序列為外加的 DNA 序列；
畫單底線及雙底線部份為外加的酵素切位；粗體字部份為啟始密碼或
終止密碼。

*IRES 的引子序列設計參考 pGS-IRES (Lee et al., 2005) 質體建構時所
使用的 EMCV IRES，其來源為 pIRES (Clontech, Cat. 631605)。

2.5.2 針對 DNA 定序所設計的引子

引子	序列 5'~3'	位置
D2F283	GCAGGGATACTGAAGAG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +283 ~ +299
D2F796	GCCCAGAGAATTGAAACTTG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +796~ + 815
D2F1352	TTGTGATAACACCTCACTCA	DV-2(NGC ; M29095) gene: +1352 ~ +1371
D2F2401	TTGGGAGTTATGGTGCAG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +2401 ~ +2418
D2F2901	TGGAGTATTCACCACCAAT	DV-2(NGC ; M29095) gene: +2901 ~ +2919

引子	序列 5'~3'	位置
D2R70	CTGTTAGAACTACGTTGAG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +52 ~ +70
D2R550	CCATGAGGGTACACATG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +534 ~ +550
D2R1100	GTGGCAGGTTGTTTGG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +1085 ~ +1100
D2R1610	TCCGCTCCGGGCAGCC	DV-2(NGC ; M29095) gene: +1595 ~ +1610
D2R2290	AGACCCCACTGAAGGC	DV-2(NGC ; M29095) gene: +2275 ~ +2290
D2R2700	GATGTCTCCTGTCATAATAG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +2681 ~ +2700
D2R3200	TAGCCTGGTCTGTAGTTG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +3183 ~ +3200
D2R10360	GGACGGGGCTCACAG	DV-2(NGC ; M29095) gene: +10346 ~ +10360
PCF101	GGAGGTCGCTGAGTAG	pcDNA3 (Invitrogen): +101 ~ +116
PCF601	TCGCTATTACCATGGTGA	pcDNA3 (Invitrogen): +601 ~ +618
PCR520	CCGTCATTGACGTCAATAG	pcDNA3 (Invitrogen): +502 ~ +520
PCR1113	ACAGTGGGAGTGGCAC	pcDNA3 (Invitrogen): +1098 ~ +1113

2.6 藥品試劑

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
1kb DNA ladder	SibEnzyme	SEM11C001	DNA 電泳
2-propanol	Sigma	I9516	核酸萃取
Acetic acid	Fluka	33209	緩衝液
Agarose	Vegonia	9201-05	DNA 電泳
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養
Bacto™ Tryptone	Difco	211705	細菌培養
Bacto™ yeast extract	Difco	212750	細菌培養
CaCl ₂	Riedel-de Haën	31307	細胞轉染
Chloroform	Riedel-de Haën	32211	核酸萃取
Crystal violet	Sigma	C-3886	Plaque assay
DEPC	Sigma	D-5758	Inactivation of RNases
Dextrose	J.T.Baker	1916-01	細菌培養
DMEM	GIBCOBRL	12800-017	細胞培養
EDTA	Amresco	0105	緩衝液
EtBr	Sigma	E-7637	核酸 Staining
Ex Tag polymerase	TaKaRa	RR001B	PCR
Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	固定細胞
Glutaraldehyde	Fluka	49630	固定細胞
Glycerol	Amresco	0854-1L	細菌培養
HEPES	J.T. Baker	4018-01	細胞轉染

藥品名稱	廠商	目錄編號	應用
$K_3Fe(CN)_6$	Sigma	P-3667	X-gal Staining
$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	Sigma	P-3289	X-gal Staining
Kanamycin	Sigma	K40000	細菌培養
KCl	Pancreac	131494	細菌培養
LB agar	Alpha Biosciences	L12-111	細菌培養
LB broth	Scharlau	02-385	細菌培養
Methylcellulose	Sigma	M0512	空斑測試
$MgCl_2$	Merk	1.05833	細菌培養
$MgSO_4$	Merk	A258586	細菌培養
NaCl	Amresco	0241	細菌培養
$NaHCO_3$	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液
Phenol saturated solution	Amresco	0945	核酸萃取
Restriction enzyme	TakaRa, Biolab	-	質體建構
SDS	Riedel-de Haën	62862	質體建構
T4 DNA ligase	Fermentas	1812	質體建構
Taq DNA polymerase XL	Protech	P6a	PCR
Tris base	Amresco	0826	緩衝液
TrypLE™ Express	GIBCO	12605-010	細胞培養
X-gal	MDBio, Inc	613049	X-gal Staining

2.7 試劑組

試劑名稱	廠商	目錄編號	應用
ExcelPure™ Plasmid DNA Mini Purification Kit	Premier	N-PM050	質體萃取
PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Premier	N-DCE050	DNA 純化
pGEM®-T vector system I	Promega	A3600	質體建構
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	QIAGEN	52904	RNA 萃取
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN	12143	質體萃取
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen	11146-057	RT
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen	K4700-10	質體建構
TRI reagent	Molecular Research Center, Inc.	TR-118	RNA 萃取

2.8 溶劑、緩衝溶液及培養基

- 0.5% crystal violet solution (500ml)
2.5g crystal violet, 25ml 37% formaldehyde, 250ml EtOH, 4.25g NaCl
- 0.5% glutaraldehyde
25% glutaraldehyde diluted with PBS
- 1 × PBS (pH 7.4)
137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄
- 10% (v/v) Glycerol
12.6 g glycerol (density = 1.26 g/cc)加水至 100 ml
- 10 × TE buffer
100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA

- 2 × HEPES buffer saline (HeBS) solution (pH 7.05 ~7.12)
0.28 M NaCl, 0.05M HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄
- 3.7% Formaldehyde
37% Formaldehyde diluted with ddH₂O
- 50 × TAE buffer
48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added
dd H₂O to 200 ml
- L-Broth (1 L)
10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl
- LB (Luria-Bertni) broth
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl
- LB (Luria-Bertni)/Ampicillin agar
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 μg/ml or 25 μg/ml
Ampicillin
- LB (Luria-Bertni)/Kanamycin agar
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 μg/ml or 25 μg/ml
Kanamycin
- SOC media
2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄, 20 mM glucose
- X-gal staining buffer
5 mM K₄Fe(CN)₆ · 3 H₂O, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 1 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 1
mg/ml X-gal

2.9 儀器設備

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

核酸計算儀 GeneQuant pro(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

PCR溫度控制儀 Gene Cycler^{RT} (BIO-RAD)

震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)
試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR
加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
酸鹼值檢測計 Φ 360 (BECKMAN)
電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)
低溫培養箱 701 (WISOOM)
往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
水平式電泳槽 MJ-105(MEDCLUB)
微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)
電穿孔裝置 MicroPulser™ Electroporation Apparatus (BIO-RAD)
電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)
恆溫式震盪培養箱 B206(FIRSTEK SCIENTIFIC)
電泳影像處理系統 GEL DOC 2000(BIO-RAD)
桌上型高速離心機 5100(KUBOTA CORPORATION)
落地型高速離心機 Avanti® J-E Centrifuge (BECKMAN)
4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
- 20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
- 80°C 超低溫冷凍櫃 925/926(FIRSTEK SCIENTIFIC)
無菌操作台 (Laminar flow) VCM-420 (造鑫)
倒立顯微鏡 OLYMPUS CK40
數位相機 OLYMPUS C-5050ZOOM

參、方法

3.1 RNA 的萃取

3.1.1 病毒 RNA 的萃取

將冰凍在 -80°C 含病毒的培養液，置於 37°C 水浴槽退冰至 0°C 時開始操作。利用 Qiagen Viral RNA Mini Kit (Cat. 52904) 萃取病毒 RNA。實驗步驟依照產品內附說明書操作。操作過程如下：將 $560\ \mu\text{l}$ 的 AVL 溶液與 $140\ \mu\text{l}$ 含有病毒的培養液以震盪器混合 15 秒，置於室溫 10 分鐘；加入 $560\ \mu\text{l}$ 的 100% 酒精，以震盪器混合 15 秒；將溶液移至 spin column，利用微量離心機以轉速 6000 rpm 離心 1 分鐘並去除濾液；加入 $500\ \mu\text{l}$ 的 AW1 溶液至 spin column，利用微量離心機以轉速 6000 rpm 離心 1 分鐘並去除濾液；加入 AW2 溶液至 spin column，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 離心 3 分鐘並去除濾液；將 spin column 再以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘並去除濾液；加入 $60\ \mu\text{l}$ 的 AVE 溶液至 spin column 中，靜置室溫 1 分鐘，利用微量離心機以轉速 6000 rpm 離心 1 分鐘，所得溶液內含病毒 RNA，將溶液儲存於 -80°C 。

3.1.2 細胞 RNA 的萃取

經轉染兩天後的 BHK-21 細胞，吸除培養液，以 2 ml 的 TRI reagent 進行細胞 RNA 的萃取。實驗步驟依照產品內附說明書操作。操作過程如下：以 pipetting 方式將細胞與 TRI reagent 均質化，將溶液轉置至微量離心管，室溫靜置 5 分鐘；加入 $400\ \mu\text{l}$ 的 chloroform，以震盪器混合 15 秒，靜置室溫 10 分鐘，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在 4°C 低溫離心 15 分鐘；吸取上層液至乾淨的微量離心管內，加入 2 ml 的 2-propanol，靜置室溫 10 分鐘，沉澱 RNA；利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在 4°C 低溫離心 10 分鐘，去除上清液；加入 1 ml 的 75% 酒精，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。靜置室溫 5 分鐘，加入適量 DEPC-treated ddH₂O，

溶解 RNA，並以分光光度計測量 RNA 濃度及純度。所得的 RNA 儲存於 -20°C 。

3.2 反轉錄及聚合酶鏈反應

3.2.1 反轉錄 (RT)

登革熱病毒的 cDNA，是利用 Invitrogen ThermoScript RT-PCR system (Cat. 11146-024) 合成。反轉錄酶合成溫度依引子所計算出之 T_m 值約低 2 至 5°C 。實驗過程依照產品內附說明書操作。操作過程如下：將 $9\ \mu\text{l}$ 的 RNA、 $1\ \mu\text{l}$ 的引子 (20 pmole) 及 $2\ \mu\text{l}$ 的 dNTP，置於 65°C 、5 分鐘，隨即插入冰中；加入 $4\ \mu\text{l}$ 的 $5\times$ cDNA synthesis buffer、 $1\ \mu\text{l}$ 的 0.1 M DTT、 $1\ \mu\text{l}$ 的 RNase OUT ($40\ \text{U}/\mu\text{l}$)、 $1\ \mu\text{l}$ 的 DEPC-treated H_2O 、 $1\ \mu\text{l}$ 的 ThermoScriptTM RT ($15\ \text{U}/\mu\text{l}$)；置於合成溫度 60 分鐘， 85°C 、5 分鐘；加入 $1\ \mu\text{l}$ 的 RNase H ($2\ \text{U}/\mu\text{l}$)，置於 37°C 、20 分鐘。所得產物內含 cDNA，儲存於 -20°C 。

3.2.2 聚合酶鏈反應 (PCR)

合成登革熱全長 cDNA 片段的 PCR 過程是使用 Taq DNA Polymerase XL (Protech, Cat.P6a)，其餘的則是使用 TaKaRa Ex TaqTM (Cat. RR001A)。合成溫度 (Extension time) 則依照使用說明書設定，Taq XL 為 68°C ，Ex Taq 為 72°C 。PCR 反應的總體積為 $50\ \mu\text{l}$ ，內含 $2\ \mu\text{l}$ 的 cDNA 或 100 至 500 ng 的模板， $5\ \mu\text{l}$ 的 10 倍酵素緩衝液，各 10 至 50 pmole 的引子對， $10\ \mu\text{mole}$ 的 dNTP，2.5 U 聚合酶。溫度設定：A. 94°C ，時間 3 分鐘；B. 94°C ，時間 30 秒；C. Annealing temperature，時間 1 分鐘；D. 68°C (或 72°C)，時間依合成出的 DNA 片段長度而定，原則上合成 1 kb 的 DNA 需要 1 分鐘的時間；E. 68°C (或 72°C)，時間依合成出的 DNA 片段長度而定。其中，B、C、D 重覆 30 次循環。其中 Annealing temperature 的設定依照計算出來的 T_m 值下降 2 至 5°C 。

3.3 以電穿孔法進行大腸桿菌勝任細胞（competent cell）的轉形（transformation）

3.3.1 大腸桿菌勝任細胞的製備（電穿孔法）

挑選大腸桿菌單一菌落於 5 ml 的 L-broth、37°C 震盪培養隔夜後，將其轉養至 500 ml 的 L-broth，37°C 震盪培養，當菌液在波長 600 nm 的吸光值約 0.5-0.7 時，靜置於冰上 20 分鐘。利用落地型高速離心機（BECKMAN）以 4000 g 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 500 ml 預冷至 4°C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000 g 轉速在 4°C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 250 ml 預冷至 4°C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000g 轉速在 4 °C 離心 15 分鐘後去除上清液。加入 20 ml 預冷至 4°C 的 10% 甘油重新懸浮菌體，以 4000g 轉速在 4°C 離心 15 分鐘後去除上清液。最後，加入等體積 10% 甘油重新懸浮菌體，以每管 50 μ l 體積分裝，儲存於 -80°C。

3.3.2 勝任細胞的轉形（電穿孔法）

含登革熱二型病毒基因序列的質體在轉形的過程是以 25°C、抗生素濃度為 25 μ g/ml 培養 24~48 小時；不含登革熱二型病毒基因序列則是以 37 °C、抗生素濃度為 50 μ g/ml 培養 12~18 小時。

將儲存於 -80°C 的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入質體 DNA 約 0.01~0.05 ng，混合均勻，冰浴 1 分鐘。轉置至預冷至 0°C 的 0.2 cm 電極管（Electroporation cuvette）中，置入電穿孔器中（Bio-Rad，Cat. 165-2100），以 2.5 KV、5 毫秒對勝任細胞進行電擊。電擊結束後，立即加入 SOC 培養液 1 ml，混合均勻。將混合物轉移至離心管內，置於 37°C（或是 25°C）震盪培養 1 小時（或是 1.5 小時）。取 50 μ l 塗抹至抗生素濃度為 50 μ g/ml（或是 25 μ g/ml）的 LB 固體培養基上。置於 37°C 培養箱中 12~18 小時（或是 24~48 小時）。

3.4 質體 DNA 之萃取

3.4.1 小量質體之萃取

在質體建構時所使用的質體DNA是以ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (Cat. N-PM050) 萃取。將單一大腸桿菌菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，抗生素濃度為 50 μ g/ml (含登革熱二型病毒基因序列的質體使用的抗生素濃度為 25 μ g/ml)，培養於 37°C (或 25°C)，12 至 16 小時 (或 24~48 小時) 後，以 Miniprep Purification Kit 進行質體萃取。萃取過程依照產品內附說明書操作。操作過程如下：首先，將菌液以轉速 2500 rpm 離心 12 分鐘，去除上清液；加入 200 μ l 的 solution I，以震盪器混合均勻；加入 200 μ l 的 solution II，小心混合均勻；加入 200 μ l 的 solution III，小心混合均勻；利用微量離心機在室溫以轉速 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液轉置至 spin column；利用微量離心機在室溫以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液；加入 700 μ l 的 washing buffer，利用微量離心機在室溫以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液，將此步驟重覆一次；利用微量離心機在室溫以轉速 13000 rpm 離心 3 分鐘，將 spin column 移至新的微量離心管，置於 60°C 加熱 5 分鐘；加入適量的 TE 溶液，利用微量離心機在室溫以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘，所得到的溶液內含質體 DNA，將溶液儲存於 -20°C。

3.4.2 大量質體萃取

在進行轉染時所使用的質體 DNA 是以 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Cat. 12143) 萃取，萃取過程依照產品內附說明書操作，各緩衝液的成份請參照附錄八。操作過程如下：將單一大腸桿菌菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，抗生素濃度為 50 μ g/ml (含登革熱二型病毒基因序列的質體使用的抗生素濃度為 25 μ g/ml)，培養於 37°C (或 25°C) 8 小時 (或 16~24 小時) 後，轉養至 25 ml 的 LB 培養液，培養於 37°C (或 25°C) 12 至 16 小時 (或 24~48 小時)。將菌液轉移至離心管，利用落地型高速離心機 (BECKMAN) 以轉速 6000 g 在 4°C 離心 15 分鐘，去上清液；加 4 ml 的 Buffer P1，以震盪器

混合均勻；加入 4 ml 的 Buffer P2，小心混合均勻，靜置室溫 5 分鐘；加入 Buffer P3，並混合均勻，插入冰中靜置 15 分鐘；利用落地型高速離心機以轉速 20000 g 在 4°C 離心 30 分鐘，將上清液轉移至新的離心管，再以轉速 20000 g 在 4°C 離心 15 分鐘，在離心的同時，取 Qiagen-tip 並加入 4 ml 的 Buffer QBT，利重力使加入的溶液自底端流出；離心完成時，將上清液轉移至經過 Buffer QBT 作用後的 Qiagen-tip；等溶液完全流出後，以二次 10 ml 的 Buffer QC 清洗 Qiagen-tip；等溶液完全流出後，加入 5 ml 的 Buffer QF，收集流出的溶液至離心管，在溶液中加入 3.5 ml 的 2-propanol，混合均勻，利用落地型高速離心機以轉速 15000 g 的轉速離心 30 分鐘，去除上清液；加入 2 ml 的 70% 酒精，並將溶液轉移至微量離心管；利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，置於室溫風乾 5 分鐘，加入適量體積的 $0.1 \times TE$ ，溶解質體 DNA，並以分光光度計測量濃度及純度。所得的質體儲存於 -20°C。

3.5 限制酵素反應

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

3.6 Klenow fill-in

取適量的 DNA（約 5 μg ），以 Klenow enzyme 將 DNA 被限制酶作用的切位補成平端，反應體積為 50 μl 。原則上 1 μg 的 DNA 以 1 U 的 Klenow enzyme 在 25°C 作用 15 分鐘。反應完成，加入 1 μl 的 0.5M EDTA 至反應溶液中，置於 75°C 加熱 20 分鐘終止反應。實驗步驟依照內附說明書操作。反應完成後依實驗所需，直接進行脫鹽去蛋白或從洋菜膠體回收 DNA 片段。

3.7 去磷酸反應

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

3.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用 Gel Extraction Kit (PREMIER) 萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。萃取過程依照產品內附說明書操作。操作過程如下：將切下之洋菜膠 (約 50 至 150 mg)，置於微量離心管內，加入 $500\ \mu\text{l}$ 的 Binding solution，以 60°C 加熱至洋菜膠完全溶解後，將溶液轉移至 spin column，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在室溫離心 1 分鐘，去除濾液；加入 $700\ \mu\text{l}$ 的 Washing solution，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在室溫離心 1 分鐘，去除濾液，將此步驟重覆一次；利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在室溫離心 3 分鐘；將 spin column 移至新的微量離心管，置於 60°C 加熱 5 分鐘；加入適量的 TE 溶液，利用微量離心機以轉速 13000 rpm 在室溫離心 1 分鐘，所得到的溶液內含欲萃取之 DNA，將溶液儲存於 -20°C 。

3.9 接合反應

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

3.10 細胞繼代培養及轉染

3.10.1 BHK-21 細胞繼代培養

吸除培養液，以 PBS 沖洗兩次，加入 1 ml 的 TrypLE™ Express (Gibco，

Cat. 12605-010), 置於室溫下約 2 分鐘, 加入適量的培養液輕沖底盤使細胞脫落, 置於 15 ml 離心管中, 以 2000 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液, 加入適量血清培養液混合均勻後, 取適量細胞轉移至新的培養皿中。

3.10.2 轉染

轉染前一日先於 3.5 公分培養皿置入約 3×10^5 的 BHK-21 細胞。轉染前 1 至 4 小時置換 2 毫升新鮮培養液。取一微量離心管加入 25 μ l 的 2.5M 氯化鈣溶液及 4 μ g 的質體 DNA, 以二次水將體積補至 250 μ l; 另在 7 毫升離心管內置入 250 μ l 的 $2 \times$ HeBS, 取內含 HeBS 的離心管以約 2000 rpm 轉速持續震盪, 同時緩慢加入含 DNA 的氯化鈣溶液。靜置室溫 20 分鐘, 加入 BHK-21 細胞中, 將細胞置於 37°C、5% 二氧化碳的狀態。16 個小時後, 以 PBS 沖洗細胞兩次, 加入 2 毫升新鮮的培養液, 置入培養箱中培養。在轉染 48 小時後, 取出細胞, 依實驗需要進行 X-gal staining 或空斑試驗。

3.11 X-gal staining

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

3.12 空斑試驗 (Plaque assay)

進行空斑試驗的前一天先在六孔培養盤中置入 5×10^5 的細胞, 置於培養箱中培養。隔日, 細胞約九成滿時, 將病毒進行序列稀釋, 稀釋液為未含血清的培養液。序列稀釋完成後, 取出前一日培養的細胞, 加入 500 μ l 序列稀釋的病毒溶液, 置於培養箱中 2 小時進行感染, 每半個小時輕晃培養盤。最後加入 4 毫升的 1.1% methyl cellulose, 置入培養箱中培養五至七天後, 取出細胞, 吸除培養液, 加入適量 3.7% 甲醛以固定細胞, 置於室溫 15 分鐘, 吸除甲醛, 加入適量結晶紫溶液染色, 置於室溫 2 小時, 以清水沖洗培養盤。置於室溫風乾後, 計數空斑的數目並觀察形狀。

肆、結果

4.1 登革熱二型病毒感染性質體建構及表現

4.1.1 pcDNA3-NCS 質體建構

由於 pcDNA3 上的 MCS (Multiple cloning site) 並不能滿足質體建構的需求，故將 pBluescript II SK(+) 上的 MCS 轉置至 pcDNA3 上。將質體 pBluescript II SK(+) 以限制酶 *Hinc* II (blunt end) 及 *Xba* I 進行作用，所得到 53bp 之 DNA (pBluescript II 之 MCS) 當作殖入片段 (insert)；利用限制酶 *Hin* dIII 對質體 pcDNA3 進行切割，再以 Klenow enzyme 對切位進行修飾，形成平端 (blunt end)，之後以 *Xba* I 進行切割。將殖入片段與經限制酵素作用的 pcDNA3 進行接合，經選殖得到的質體命名為 pcDNA3-NCS，如圖一所示。此質體以 *Bam*H I 及 *Stu* I 作用後得到 4.3 及 1.1kb 之 DNA 片段；以 *Cla* I 及 *Fsp* I 作用後，得到 2.4、1.6 及 1.4kb 之 DNA 片段；以 *Hin*dIII 及 *Nde* I 作用後，得到 5.0 及 0.4kb 之 DNA 片段；以 *Nco* I 及 *Xba* I 作用後，得到 3.3、1.0、0.7 及 0.3kb 之 DNA 片段；此外尚有額外的 band 標示為 z。限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十三。

4.1.2 RT-PCR

萃取病毒 RNA，以 D2F0001A' 及 D2R10723A 當引子，引入限制酵素 *Cla* I、*Xba* I 之切位分別於 PCR 產物之 5' 端及 3' 端，利用 RT-PCR 方式得到含病毒全部基因序列的 DNA (nt 1 ~ nt 10723)，預期得到全長約為 10.7kb 的 DNA 片段。取 5 μ l 的 RT-PCR 產物進行電泳分析。共得到三條主要的 DNA 片段，分別位於 10、3.5 及 1.5kb 的位置，另有不明顯者位於 4kb 的位置，結果請參照圖二十四。

4.1.3 TA cloning

直接利用 TA cloning 方式將 DNA 片段接入 pCR-XL-TOPO 的載體上，

命名為 pCR-XL-TOPO/DV2F，如圖二所示。經過酵素作用後，初步判定總共得到五個含有登革熱病毒全長 cDNA 的質體，分別命名為 P、Q、R、S、T。pCR-XL-TOPO/DV2F 經 *Bam*HI 及 *Eco*RV 作用後，得到 5.0、3.5、2.1、1.7、1.4 及 0.5kb 之 DNA 片段；經 *Hind*III 作用後，得到 7.5、5.0、1.1 及 0.5kb 之 DNA 片段，皆符合預期。限制酵素作用位置圖及 P 的電泳圖請參照圖二十五。

4.1.4 登革熱二型病毒感染性質體建構

將 pCR-XL-TOPO/DV2F 以限制酶 *Cla*I 及 *Xba*I 將含登革熱病毒基因序列的 DNA 切出，與經過 *Cla*I 及 *Xba*I 限制酶作用的質體 pcDNA3-NCS 進行接合。經過轉形選殖後，得到可能具有感染性的質體為 pcDNA3-NCS/DV2F，如圖三所示。將自 P 質體所得不同菌落的命名為 P1、P2、P3，自 Q 質體所得不同的菌落命名為 Q1、Q2、Q3，自 R 質體所得不同菌落命名為 R1、R2、R3，自 S 質體所得不同菌落命名為 S1、S2、S3，自 T 質體所得不同菌落命名為 T1、T2、T3。pcDNA3-NCS/DV2F 經 *Ava*I 及 *Xba*I 作用後，得到 7.8、3.5、1.9、1.5、1.1 及 0.3kb 之 DNA 片段；經 *Bam*HI 及 *Eco*RV 作用後，得到 8.4、5.0、2.1 及 0.5kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及 P1 的電泳圖請參照圖二十六。

4.1.5 登革熱二型病毒感染性質體的表現

利用 QIAGEN Plasmid Midi 抽取感染性質體 P1、Q2、R3、S3、T1。將質體利用 Calcium phosphate 的方法轉染至 BHK-21 細胞中，經過 48 小時，收集上清液，以 0.22 μ m 過濾器過濾。將被轉染的 BHK-21 細胞直接加入 4 毫升 1.1% 的 methyl cellulose，置於 37°C 培養 7 天。而經過濾的上清液則對新的 BHK-21 細胞進行感染，在 37°C 感染兩個小時後，加入 4 毫升 1.1% 的 methyl cellulose，置於 37°C 培養 7 天。最後以甲醛固定 15 分鐘，再以結晶紫染色 2 小時後，以清水沖洗，觀察是否有空斑形成。結果顯示，在實驗組方面 (P1、Q2、R3、S3、T1)，不論是被轉染的細胞，或是以上清液感

染的細胞皆無任何的空斑生成。在控制組方面，以病毒感染的控制組有明顯空斑生成；以 pcDNA3 進行轉染的細胞，不論是被轉染的細胞，或是以上清液感染的細胞皆無任何的空斑生成，P1 的結果如圖四十一所示。

4.1.6 確認感染性質體是否能在 BHK-21 細胞中進行轉錄

結果 4.1.5 顯示，得到的五個感染性質體在進行空斑試驗時，皆無任何的空斑生成。為確定感染性質體的轉錄過程是否有問題，選擇了二個感染性質體，將其轉染至 BHK-21 細胞 48 小時後，抽取細胞的 RNA，利用 RT-PCR 方式，確認感染性質體是否能在細胞中成功轉錄出 RNA，同時也進行一組含有 E 基因質體的 pcDNA3-E14（本實驗室邱美惠提供，請參照附圖七），已被確認可以在 BHK-21 細胞中進行轉錄，當作是 positive control，另以 pcDNA3 質體當作為 negative control。過程中以 E 基因的引子(E14F 及 E14R) 做為 RT-PCR 所需要的引子。為確認結果並非因為 RNA 萃取的過程中，萃取出轉染時殘留的質體造成的 false positive，另外取 RNA 直接進行 PCR，與 RT-PCR 的結果做為對照。又為了確認結果並非因為 PCR 材料被質體污染所造成，進行一管未加任何模板的 PCR 混合物，直接一起進行 PCR 反應，所獲得的 RT-PCR 或 PCR 產物，取 5 μ l 進行電泳分析。結果顯示，經過 P1、Q3 轉染的細胞所抽取的 RNA 皆可在 RT-PCR 中得到約 1.5kb 的 band，而經 pcDNA3 轉染的細胞所抽取的 RNA 在 RT-PCR 的結果並沒有 1.5kb 的 band 生成。而以 RNA 當模板的電泳分析，則未有任何 band 的生成，如圖四十二所示。

4.1.7 DNA 定序

感染性質體可以在細胞中進行轉錄，卻不能表現出感染性的病毒，故先將含 clone P1 結構性基因進行 DNA 定序（若 DNA 序列過長，可能會干擾定序結果，故先以含結構性基因的質體 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 進行定序，建構過程請參照 4.4.1），定序引子在質體上的相對位置圖請參照圖四十五，定序結果請參照表一。將定序所得的基因序列轉換成胺基酸序列的結

果請參照表二。結果顯示，對應於登革熱二型病毒新幾內亞株 (NGC strain, M29095, NCBI) 核苷酸序列上第 2512 的位置 (第 806 個胺基酸位置，位於 NS1 蛋白) 發生了一個點突變，使得原本應為穀胺醯胺 (glutamine) 的 CAA 變成 TAA，造成蛋白質轉譯的停止。

為確認核苷酸序列上第 2512 位置的突變是在 RT-PCR 時產生的或是在將登革熱全長 cDNA clone 由 pCR-XL-TOPO/DV2F 轉殖至 pcDNA3-NCS 時產生的，將 pCR-XL-TOPO/DV2F (P clone) 進行定序，結果顯示，在 pCR-XL-TOPO/DV2F (P clone) 上本身就已發生突變。

4.2 單一 ORF 非結構性基因報導質體建構「圖四」

登革熱病毒產生的多肽鏈合成出來後，能直接被細胞內的酵素 (signalase) 將結構性蛋白及非結構蛋白分開。開始設計整個報導質體時，便打算利用這種特性，以單一 ORF 為藍圖，將 *lacZ* 與非結構性基因共用一個 ORF，在保留部份 E 基因的狀況下 (signalase 的作用位置在 E 蛋白的 C 端)，合成出含有 β -半乳糖苷酶及登革熱病毒非結構性蛋白的單一多肽鏈，再經由細胞內的酵素將 β -半乳糖苷酶及非結構性蛋白分開，使得報導基因能夠順利表現。

4.2.1 pcDNA3-NCS/5'3'UTR 質體建構

以 D2F10270 及 D2R10723A 當引子，引入 *Bam*H I、*Xba* I 之切位分別於 PCR 產物之 5'端及 3'端，以 P1 當模板，利用 PCR 方式得到含病毒的 3' UTR DNA 序列 (nt 10270 ~ nt 10723)。將此段 DNA 選殖於 pcDNA3-NCS，所得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/3'UTR，如圖五所示。此質體經 *Afl* III 及 *Xho* I 作用後，得到 3.0、2.0 及 0.8kb 之 DNA 片段；經 *Fsp* I 及 *Cla* I 作用後，得到 2.3、1.9 及 1.6kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十七。

以 D2F0001A' 及 D2R0099 當引子，引入限制酵素 *Cla* I、*Hind* III 之切位分別於 PCR 產物之 5'端及 3'端，以 P1 當模板，利用 PCR 方式得到含病

毒的 5' UTR DNA 片段 (nt 1~nt 99)，並選殖於 pcDNA3-NCS/3'UTR，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'3'UTR，如圖六所示。此質體經 *Bgl* II 作用後，得到 5.0 及 1.0kb 之 DNA 片段；經 *Afl* III 及 *Xho* I 作用後，得到 3.0、2.0 及 0.9kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十八。

4.2.2 殖入報導基因

以質體 YEP363 上 (請參照附圖六) 的 β -半乳糖苷酶基因序列當模板，利用 PCR 方式引入限制酵素 *Hind* III、*Bam*HI 之切位分別於 5'端及 3'端，將此段 DNA 選殖於 pcDNA3-NCS/5'3'UTR，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR，如圖七所示。此質體經 *Mlu* I 作用後，得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段；經 *Nco* I 作用後，得到 3.7、3.3、1.2 及 0.7kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖二十九。

4.2.3 非結構性基因的殖入

將 P1 質體以 *Bam*HI 及 *Xba* I 作用後，切出含有部分 E 基因、完整非結構性基因及 3'UTR 的登革熱 DNA 片段，選殖於含有報導基因的載體 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR，得到的單一 ORF 非結構性基因報導質體；其中啟始密碼是利用 5'UTR 上的 ATG，而終止密碼是利用 3'UTR 上的 TAG，且 *lacZ* 與非結構性基因為 in frame 的狀況。所得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR，如圖八所示。質體經 *Hind* III 及 *Kpn* I 作用後，得到 6.8、4.1、3.8、1.3 及 0.9 kb 之 DNA 片段；經 *Bam*HI 及 *Eco*RV 作用後，得到 8.0、5.0、2.1 及 1.9kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十。

4.2.4 非結構性基因報導質體表現

此質體轉染至 BHK21 細胞後，報導基因表現狀況不佳 (請參照結果

4.6)。最後，決定捨棄單一 ORF 的方式，改而採用 bicistronic 的方式，在第二個 ORF 上游加入 EMCV IRES，以增加第二個 ORF 轉譯的效率，另外，亦重新尋找 *lacZ* 的來源，期望能改善報導基因表現不佳的狀況。

4.3 報導基因的來源及選擇「圖九」

4.3.1 報導基因質體的建構

由於 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 以及接續建構的質體 pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 的表現狀況不佳(請參照 4.3.3 及 4.6)，根據 pcDNA3.1 使用手冊建議，更改 5'端限制酵素切位為 *Sma* I 以加入 Kozak sequence，重新選殖於 pcDNA3-NCS/5'3'UTR 的 *EcoR* V 及 *Bam*H I 切位，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR，如圖十所示。

在 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 建構過程中發現 YEP363 上 *lacZ* 的 *EcoR* I 切位發生變異，改採 BAG 上的 β -半乳糖苷酶基因序列當模板，利用 PCR 方式引入限制酵素 *Sma* I、*Bam*H I 之切位分別於 5'端及 3'端，將含有 Kozak sequence 的 *lacZ*，選殖於 pcDNA3-NCS/5'3'UTR，此質體命名 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR，如圖十一所示。

pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 經 *Mlu* I 作用後，得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段，皆符合預期；經 *Fsp* I, *Xba* I, 及 *EcoR* I 作用後，pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 得到 2.8、2.3、1.8、1.3 及 0.5kb 之 DNA 片段，符合預期。然而 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 的 *EcoR* I 切位突變，產生了 3.3、2.3、1.8 及 1.3kb 之 DNA 片段，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十一。

4.3.2 報導基因的表現

將未含 Kozak sequence 的質體 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR，及帶有 Kozak sequence 的質體 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR、pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 分別轉染於 BHK-21 細胞 48 小時後，進行 X-gal staining，

並計數藍色細胞數。以 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 進行轉染的 BHK-21 細胞產生的藍色細胞數約 111 ± 35 cells/mm²；pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 約為 168 ± 50 cells/mm²；pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 約為 326 ± 78 cells/mm²。在顯微鏡下觀察亦可發現以 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 進行轉染的 BHK-21 細胞得到的藍色細胞不僅細胞數較多 (326 ± 78 cells/mm²)，顏色也較深，如圖四十三所示。將未含 Kozak sequence 的 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 及含有 Kozak sequence 的 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 所得的結果做比較，產生的藍色細胞數分別為 111 ± 35 cells/mm² 及 168 ± 50 cells/mm²。雖然加入 Kozak sequence 後產生的藍色的細胞數有增加，但是與未加入 Kozak sequence 的差異並不大，仍在誤差範圍內。由此得知，Kozak sequence 在此對 *lacZ* 的表現並沒有太大的助益。

最後，決定以質體 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 上的 β -半乳糖苷酶基因序列當作接續質體建構報導基因的來源。

4.3.3 引入酵素切位

由於 pcDNA3-NCS 上 MCS 仍不敷接續質體建構的使用。利用 PCR 的方式在 β -半乳糖苷酶基因序列 5'端引入 *Pme* I、*Asc* I，3'端引入 *Not* I、*Pac* I。將所得到的 PCR 產物利用 TA cloning 方式直接選殖於 pGEM-T vector，得到的質體命名為 pGEM-T/*lacZ*，如圖十二所示。此質體經 *Cla* I、*Sac* I 及 *Eco*R I 作用後，預期可以得到 3.0、1.1、1.1 及 0.8kb 之 DNA 片段；經 *Mlu* I 作用後，預期可以得到 3.5、1.3、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十二。

4.4 結構基因報導質體建構「圖十三」

4.4.1 結構基因質體建構

殖入片段是將 P1 質體經 *Ppu*M I 作用後，以 Klenow enzyme 將切位補

成平端，再以 *Cla* I 將含登革熱病毒結構性基因及部份 NS1 基因的 DNA 片段切出。載體 pcDNA3-NCS/5'3'UTR 以 *Hind* III 作用後，利用 Klenow enzyme 補成平端，再以 *Cla* I 作用。將殖入片段與載體接合後，得到含有 5'UTR、結構性基因及部份 NS1 基因及 3'UTR 的質體，將其命名為 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR，如圖十四所示。此質體經 *Fsp* I 及 *Bam*H I 作用後，得到 3.3、2.3、1.8、1.1 及 0.5kb 之 DNA 片段；經 *Hind* III 作用後，得到 7.4、1.1 及 0.6kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十三。

4.4.2 報導基因的殖入

利用 pGEM-T/*lacZ* 上的 *Sac* II、*Spe* I 切位將 β -半乳糖苷酶基因序列切下，經過 Klenow 酵素將切位補成平端後，選殖於 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 的 *Eco* RV 切位。所得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR，如圖十五所示。此質體經 *Mlu* I 及 *Xba* I 作用後，得到 5.3、4.7、1.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段；經 *Eco*R V 及 *Not* I 作用後，得到 10 及 2kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十四。

4.4.3 Spacer DNA 的殖入

登革熱病毒的 RNA 全長約 10.7kb，但結構基因加上報導質體經過轉錄出來的 RNA 僅約 6.9kb。為了讓轉錄出來的 RNA 能符合登革熱病毒 RNA 的全長，所以需要在報導基因 ORF 後面加上一段可以被轉錄但無法被轉譯的 DNA 序列，稱之為 Spacer DNA。Spacer DNA 的製備過程是先利用 pGEM-T/*lacZ* 上的 *Hinc* II 的切位，切下 β -半乳糖苷酶基因序列部份序列，此段 DNA 不含任何的轉錄終止訊號且不含有轉譯啟始密碼。將此段 DNA 選殖於 pGEM-T/*lacZ* 上的 *Eco*R V 切點，所得到的質體命名為 pGEM-T/Spacer，如圖十六所示。此質體經 *Sac* I 及 *Eco*R V 作用後，得到 4.1、1.8、1.2 及 0.8kb 之 DNA 片段；經 *Fsp* I 作用後，得到 6.3、1.2 及 0.3kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十五。

利用 PCR 的方式，以 Spacer F 及 Spacer R 為引子，分別在 5'端及 3'端引入 *Not* I、*Pac* I 切位，合成出一段長約 3.6kb 的 spacer DNA 片段，再選殖於 pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR，如圖十七所示。此質體經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用後，得到 5.2、2.4、2.1、1.9、1.7、1.4 及 0.9kb 之 DNA 片段；經 *Bam*H I 及 *Eco*R V 作用後，得到 7.5、3.5、2.2、2.0 及 0.5kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十六。

4.4.4 EMCV IRES 的殖入

真核細胞的轉譯，大部份是藉由 5' cap-dependent ribosome scanning mechanism 啟動。在 bicistronic 狀況下，位於後方的 ORF (Open Reading Frame) 的蛋白表現量大幅減少。為了能增加位於後方 ORF 蛋白表現量，所以在 *lacZ* 前方接上一個 EMCV IRES，以增加 *lacZ* 的表現量。

利用 PCR 方式，以 SIRESF 及 SIRESR 為引子，分別在 5'端及 3'端引入 *Pme* I、*Asc* I 切位，以 pGS-EMCV (中原大學吳宗遠老師提供) 當模板，合成出 EMCV IRES 的 DNA 片段，將其選殖於 pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR，如圖十八所示。質體經 *Bam*H I 及 *Kpn* I 作用後，得到 7.5、6.9、1.6 及 0.5kb 之 DNA 片段；經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用後，得到 5.2、3.0、2.1、1.9、1.8、1.4 及 1.0kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十七。

4.5 非結構基因報導質體建構「圖十九」

4.5.1 報導基因的殖入

取 pGEM-T/*lacZ* 質體，以 *Sac* II、*Spe* I 將 β -半乳糖苷酶基因序列切下，經過 Klenow enzyme 將切位補成平端後，選殖於 pcDNA3-NCS/5'3'UTR 的 *Eco*R V 切位。所得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'Z3'UTR，如圖二十所示。此質體經 *Mlu* I 作用後，得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段；經

Fsp I 作用後，得到 4.8、2.4 及 1.9kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十八。

4.5.2 非結構性基因的殖入

將 S 質體以 *Bam*HI、*Xba* I 作用，將含有登革熱二型病毒非結構性基因及部分 E 基因片段切出，選殖於 pcDNA3-NCS/5'Z3'UTR 的 *Bam*HI 及 *Xba* I 酵素切位。所得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR，如圖二十一所示。此質體經 *Eco*R V 作用後，得到 8.0、5.0 及 4.1kb 之 DNA 片段；經 *Hind* III 作用後，得到 13.0 及 4.1kb 之 DNA 片段；經 *Kpn* I 作用後，得到 12.2、3.9 及 0.9kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖三十九。

4.5.3 EMCV IRES 的殖入

利用 PCR 方式，以 NSIRESF 及 NSIRESR 為引子，分別在 5'端及 3'端引入 *Not* I、*Bam*H I 切位，以 pGS-EMCV（中原大學吳宗遠老師提供）當模板，合成出 EMCV IRES 的 DNA 片段，將其選殖於 pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR，得到的質體命名為 pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR，如圖二十二所示。此質體經 *Eco*R V 及 *Hind* III 作用後，得到 6.8、5.0、2.2、1.4、1.1 及 1.1kb 之 DNA 片段；經 *Kpn* I 作用後，得到 10.3、3.9、2.4 及 0.9kb 之 DNA 片段，皆符合預期，限制酵素作用位置圖及電泳圖請參照圖四十」

4.6 結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體表現

最後建構出含有登革熱結構性或非結構性基因的報導質體，主要有四種形式，第一種，monocistronic，*lacZ* 位於 5'端的 ORF，pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 屬於此種狀況；第二種，bicistronic，*lacZ* 位於 5'端的 ORF，pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 屬於此種狀況；第三種，bicistronic，*lacZ* 位於 3'端的 ORF，兩個 ORF 間不含有 IRES，pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 屬於此種狀況；第四種 bicistronic，*lacZ* 位於 3'端的 ORF，兩個 ORF 間加

入 IRES，pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR 屬於此種狀況。將這四種質體分別轉染至 BHK21 細胞內，以比較 *lacZ* 位於第二個 ORF、*lacZ* 位於第二個 ORF 前方加入 IRES、*lacZ* 位於第一個 ORF (bicistronic) 及 *lacZ* 位於第一個 ORF (monocistronic) 的四種情況下，基因表現的狀況。

轉染 48 小時後，進行 X-gal 染色，計算藍色細胞生成的數目。經過計算，以 pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 進行轉染的細胞，在 3.5 公分的培養盤內有 95 個 BHK21 轉變成藍色細胞；以 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR 進行轉染的細胞，則有 1.0×10^4 個細胞轉變成藍色，以 pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 進行轉染的細胞，有 1.6×10^5 個細胞轉變成藍色，以 pcDNA3-NCS/5'ZNS (MONO)3'UTR 則有 425 個細胞變成藍色，結果請參照圖四十四。

由此結果可知，在 bicistronic 的狀況下，*lacZ* 位於第一個 ORF 時，表現的狀況最佳；位於第二個 ORF，表現結果最差，生成的藍色細胞數約僅有位於第一個 ORF 的二千分之一；若在第二個 ORF 前方加入 IRES，產生的藍色細胞數約可增加 100 倍，但生成的藍色細胞數亦約僅有位於第一個 ORF 的二十分之一；至於 *lacZ* 位於第一個 ORF 且為 monocistronic 的狀況，生成的藍色細胞數亦僅有 bicistronic 的五百分之一。

伍、討論

5.1 質體建構

pcDNA3 原本具有的 MCS (multiple cloning site) 不敷後續質體建構上使用，因為上面的酵素切位大多可以作用在報導基因 *lacZ* 或是登革熱病毒的 genome 上。為了日後質體建構的方便，觀察過 pBluescript II SK(+) 上的 MCS 後，決定以 pBluescript II SK(+) 上的 MCS 取代 pcDNA 的 MCS，建構出含有新的 MCS 的 pcDNA3-NCS (請參照結果 4.1.1)。經限制酵素作用後，在 *BamH I* 及 *Stu I* 進行作用的組別有一條不符合預期的 DNA 片段 (band z)，請參照「圖二十三」，由於此 DNA 片段大小界於 5kb 至 6kb 之間，而 pcDNA3-NCS 的大小為 5.4kb，故推測 band z 應該是酵素作用不完全所造成。

實驗計畫先行建構出含有登革熱病毒全長的 cDNA clone，以尋找出登革熱病毒的組裝訊號，並建立可行的實驗架構。在實驗的過程中，參考 Siburi 等人的建議 (Siburi et al., 2001)，以抗生素濃度減半 ($25 \mu\text{g/ml}$) 及低溫 (25°C) 的條件篩選登革熱病毒 full length cDNA clone。在進行結構性基因或非結構性基因報導質體建構時，也採用相同的條件，對含有登革熱病毒基因序列的報導質體進行篩選。

在 pCR-XL-TOPO/DV2F 質體建構過程中，曾試圖提高篩選溫度至 37°C ，然而在此條件下，得到的質體長度並不符合預期。而在以上述 Siburi 等人建議的條件下，培養約 24 至 48 小時，獲得的質體長度，大多符合預期。在限制酵素作用時，由於並沒有 PL046 strain 的基因序列，只能根據 NGC strain 的序列做為參考，再根據不同菌落所得到的質體經限制酵素作用後所得到的 DNA 片段互相比較，並對所產生的 DNA 片段長度進行加總，觀察質體的總長是否符合預期。

在後續的質體建構過程中，所得到的質體在以限制酶作用後，皆會與 pCR-XL-TOPO/DV2F 做比較，觀察是否有突變的狀況發生。儘管如此，假設在質體內有發生點突變 (point mutation) 或小片段的刪除 (deletion)，以限制酵素作用的方式確認，可能還是無法偵測到。在登革熱基因序列發生

了點突變或小片段刪除的狀況下，如果沒有使整個 RNA 的二級或三級結構發生改變，對於整個組裝訊號的搜尋，應該不至於造成太大的影響。但亦無法排除登革熱基因序列僅發生了小片段刪除或點突變卻造成 RNA 的二級或三級結構發生巨大改變的可能性。

5.2 登革熱二型病毒感染性質體建構及表現

根據結果 4.1.5 顯示，質體建構得到的五個登革熱二型病毒感染性質體皆無法表現出具感染性的病毒；在結果 4.1.6 顯示，雖然無法表現出具感染性的病毒，但可以轉錄出 RNA；在結果 4.1.7 顯示，以 pcDNA3-NCS/DV2F (clone P1) 質體進行建構的 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 經過基因定序後，發現在第 2512 的位置 (第 806 個胺基酸位置) 發生了一個點突變，使得原本應為穀胺醯胺 (glutamine) 的 CAA 變成 TAA，造成蛋白質轉譯的停止；為得知突變發生的時間點，再將 pCR-XL-TOPO/DV2F (clone P) 進行定序，結果顯示，在 pCR-XL-TOPO/DV2F (clone P) 本身就已發生突變，即此一突變應該是在 RT-PCR 過程就已發生。

由於只針對其中一個感染性質體進行結構性基因的序列分析，無法得知其它四個質體的 DNA 序列是否也有發生突變。綜合上述結果，針對下列二點進行討論：一、pcDNA3-NCS/DV2F 突變發生的可能成因。二、假設在未發生突變的狀況下，造成 pcDNA3-NCS/DV2F 在細胞內無法製造出感染性質體的原因。

一、pcDNA3-NCS/DV2F 突變發生的可能成因：第一，突變是在 RT-PCR 或是質體建構過程中發生，造成質體無法正常表現，所得到的 pCR-XL-TOPO/DV2F 與後續建構的 pcDNA3-NCS/DV2F，質體內所含的登革熱病毒基因序列都是不具功能性的。第二，突變是在實驗過程中產生的，pCR-XL-TOPO/DV2F 內所含的登革熱病毒基因序列是具有功能性的，而接續建構的質體 pcDNA3-NCS/DV2F 所含的登革熱病毒基因序列是不具功能性的。整個實驗設計的目的在於簡化過去在建構感染性質體時，常採用的方法：利用 SP6 或 T7 啟動子在 in vitro 狀況下合成出病毒 RNA 再對細胞進

行轉染。相對的，本實驗利用 pcDNA3 上的 CMV 啟動子，直接以質體進行細胞轉染，讓細胞自行合成出病毒 RNA，轉譯出病毒所需的蛋白。然而，過去在進行 *flavivirus* 感染性質體的建構研究指出，*flavivirus* 完整的 DNA 序列所產生出來的蛋白可能對 *E. coli* 具有毒性(Varnavski et al., 2000)。另外，Lewin 等人針對五種病毒啟動子在 *E. coli* 菌體內進行分析，除了來自 HSV I 基因上 Thymine kinase 的啟動子以外，包含 CMV 等四種病毒的啟動子可以被 *E. coli* 驅動並表現螢光蛋白(Lewin et al., 2005)。Mishin 等人證明 CMV 啟動子在 *E. coli* 內確實會被轉錄，並轉譯出螢光蛋白，若去除 CMV 啟動子的 enhancer，可使螢光蛋白表現量下降 5 至 6 倍。隨後，他們便以缺少 enhancer 的 CMV 啟動子，成功的建構出日本腦炎病毒的感染性質體(Mishin et al., 2001)。另外，在 CMV 啟動子含有 enhancer 的狀況下，他們則藉由在日本腦炎病毒基因序列中插入 intron 的方式，使得整段病毒序列在 *E. coli* 中無法表現日本腦炎病毒的蛋白，但可在真核細胞內藉由 splicing 的過程，去除 intron 產生病毒蛋白，也成功的建構出感染性質體(Yamshchikov et al., 2001)。我們在質體建構過程中亦發現，含有 *lacZ* 的 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR (含有 CMV 啟動子 enhancer、CMV 及 T7 啟動子) 轉形至 *E. coli* DH5 α ，如果在培養基上加入 X-gal，可以得到藍色的菌落，即 CMV 與 T7 啟動子在 *E. coli* DH5 α strain 中至少有一個有 leaky 的現象。在登革熱二型病毒感染性質體的設計是利用含有 enhancer 的 CMV 啟動子，可是沒有對登革熱病毒的 ORF 中做任何的修飾。可能因登革病毒產生的蛋白對 *E. coli* 具有毒性，導致質體建構得到的 pcDNA3-NCS/DV2F 是經過突變不具感染性的質體。

二、假設在未發生突變的狀況下，造成 pcDNA3-NCS/DV2F 在細胞內無法製造出感染性質體的可能改善如下：最近的研究指出，正確的 *flavivirus* 之 3'UTR 是在病毒複製時所必需的(Yu et al., 2005)；亦可提升細胞對病毒 RNA 進行轉譯的效率(Holden et al., 2004)。在整個實驗過程中，可能在 RT-PCR 及質體建構過程皆未發生突變，整個 ORF 的序列是可以合成出完整的多胜肽鏈 (polypeptide)，然而由於在實驗設計時，未將載體上 5'UTR

上游及 3'UTR 下游多餘的 DNA 序列進行刪除 (deletion)，留下多餘的基因序列 (請參照表三)。在蛋白質合成出來後，即便合成出完整的登革熱病毒，感染到下一個細胞，但由於 5' 及 3'UTR 兩側多出來的 RNA 序列，可能影響 RdRp 與 RNA 的結合，干擾 RNA 的複製，使得病毒不具感染性。根據稍早文獻指出，RNA 病毒的 5' 及 3' 端若存在有非病毒本身的核苷酸會大幅減少病毒的感染力 (infectivity)，並推測這些多出的核苷酸可能會妨礙 RNA 的合成。至於影響的程度，則與非病毒本身核苷酸的序列、長度及病毒的種類有關 (Boyer et al., 1994)。在 Kunjun virus (同屬 *flavivirus*) 的研究中指出，在 3'UTR 後面加上一個 HDVr (hepatitis delta virus ribozyme)，將多餘的 RNA 切除，可以使整個感染率上升大約 2.6 倍 (Liu et al., 2003)。關於 *flavivirus* 在 5' 端的非病毒序列與病毒感染力的分析，並沒有查詢到相關的文獻記載；但過去在設計病毒感染性質體時，皆採取直接在啟動子後方加上 5' 端的病毒序列，減少 5' 端的非病毒序列的生成。雖然多餘的 3' 端的非病毒序列並不至於造成病毒感染力完全喪失，但亦無法排除 5' 端的非病毒序列或者 5' 與 3' 端的非病毒序列同時存在時，使得病毒感染力喪失的可能性。

綜合上述的二個問題，接下來需要確認所得到的登革熱病毒基因序列是否能表現。建議可以利用 PCR 方法，以 pCR-XL-TOPO/DV2F 當模板，合成出不含非病毒本身核苷酸序列並帶有 SP6 或 T7 啟動子的登革熱病毒全長 DNA，利用 *in vitro* 方式轉錄出病毒 RNA，加上 5' 端 cap 後，對 BHK-21 細胞進行轉染及空斑測試，以確認所獲得的 5 個 cDNA clone (pCR-XL-TOPO/ DV2F) 內含的登革熱病毒序列是否具有功能性。在確認合成出來的蛋白是具有功能性之後，再針對登革熱病毒 PL046 株去做更進一步的研究與探討。

5.3 報導基因的表現

登革熱病毒的基因序列只有一個 ORF，在細胞進行轉譯後，生成一條多肽鏈，再藉由細胞內的酵素 (signalase) 將結構性蛋白與非結構性蛋白分

開(von Heijne, 1985)。一開始實驗在設計報導質體的建構時，原本想利用上述方式，合成出一條含有 β -半乳糖苷酶與登革熱病毒的結構性或非結構性蛋白的多肽鏈，再藉由細胞內的酵素，將 β -半乳糖苷酶與登革熱病毒的結構性或非結構性蛋白分開。然而，在建構出 pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO) 3'UTR 並轉染至 BHK-21 細胞後，結果顯示報導基因的表現狀況不佳（請參照結果 4.6）。

為了增加報導基因表現的量，針對了三個方向做修正。第一，根據黃熱病毒 replicon 的研究指出，要讓 replicon 所含的報導質體順利表現，主要有兩種方法：第一種是 monocistronic 的方法，報導基因與黃熱病毒基因共用一個 ORF，並在中間插入一個 2A (autoproteolytic peptide from foot and mouth disease virus) 的基因序列，當多肽鏈合成出來後，2A 蛋白可將報導基因蛋白與黃熱病毒蛋白切開，讓報導基因蛋白順利表現。第二種是 bicistronic 的方法，也就是將報導基因與黃熱病毒基因各為一個 ORF，在二個 ORF 中間插入一段 IRES，以使第二段 ORF 轉譯效率增加(Jones et al., 2005)。由於使用單一 ORF 的方法，在質體建構完成後，若要更動其中的某段基因片段，需要考慮 in frame 的因素，會使整個過程變得複雜，因此我們選擇 bicistronic 的方式。在 β -半乳糖苷酶與登革熱結構性或非結構性基因中間加入 IRES，做為實驗設計的藍圖。第二，我們發現到報導基因的來源 YEP363 內所含的 β -半乳糖苷酶基因序列有變異，造成限制酶 *Eco* RI 切位消失。於是更改報導基因來源，改採用 pBAG 上的 β -半乳糖苷酶基因作為報導基因來源。最後，根據 Kozak 發表的文章，在 β -半乳糖苷酶基因上游加入 Kozak sequence，希望能增加 β -半乳糖苷酶的表現量(Kozak, 1981)。

結果 4.3.3 顯示以 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 進行轉染的 BHK21 細胞產生的藍色細胞數約 111 ± 35 cells/mm²；pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP) 3'UTR 約為 168 ± 50 cells/mm²；pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG) 3'UTR 約為 326 ± 78 cells/mm²。

比較加入與未加入 Kozak sequence 的質體，pcDNA3-NCS/5'Z(YEP) 3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP) 3'UTR，雖然加入 Kozak sequence 產生

的藍色細胞較未加入時來得多，但差異仍在誤差範圍內，因此 Kozak sequence 在此影響不大。比較不同的報導基因來源，pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP) 3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG) 3'UTR 兩個質體，可以看出，以 pBAG 為 *lacZ* 來源的報導質體產生的藍色細胞數確實較以 YEP363 為來源的報導質體多。至於究竟是什麼原因造成 β -半乳糖苷酶活性的差異，使得產生出藍色細胞數較少，由於未針對基因進行定序，並無法做出結論。不過，以 *EcoR* I 酵素對質體進行作用後，可以發現，YEP363 的 β -半乳糖苷酶基因原本有的酵素切位發生突變，使得酵素在這個切位無法進行切割（請參照圖三十一）。根據這個現象，推測 YEP363 上的 β -半乳糖苷酶的基因序列可能發生突變，造成酵素活性降低，才造成結果 4.3.3 的狀況發生。

5.4 結構性基因及非結構性基因報導質體的建構

在結構性基因報導質體建構過程中，針對 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 進行基因定序。發現對應於登革熱病毒 NGC strain 基因序列的 2512 位置（第 806 個胺基酸位置，位於 NS1 蛋白）發生了一個點突變，使得原本應為穀胺醯胺（glutamine）的 CAA 變成 TAA，造成蛋白質轉譯的停止（請參照結果 4.1.7）。由於此胺基酸位於非結構性基因 NS1 內，不影響結構性基因的轉譯，所以接續的結構性報導質體的建構仍以此段序列為結構性基因來源。

由於 pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 的結構性基因來源是 pcDNA3-NCS/DV2F (P1)，在定序後發現在非結構性基因上有一無義突變（nonsense mutation），故接續的非結構性質體建構的基因來源改以 TA cloning 所得到含有登革熱病毒基因序列的 pCR-XL-TOPO/DV2F (S) 當作非結構性基因的來源。

5.5 結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體表現

過去有文獻指出，在 bicistronic 的狀況下，冷光基因（luciferase）位於第一個 ORF 的表現量較位於第二個 ORF 且前方加入 EMCV IRES 的表現量約多 5 倍(Hennecke et al., 2001)。結果 4.6 顯示，在 bicistronic 的狀況下，當

報導基因位於第一個（非結構性基因報導質體）或第二個 ORF（結構性基因報導質體）時，產生出來的藍色細胞數可以說差異十分懸殊，即使在第二個 ORF 前方加入了 EMCV IRES，雖然產生的藍色細胞數有增加，但是與位於第一個 ORF 的報導基因比起來，產生的藍色細胞數仍然只有二十分之一，而且顏色的深淺，也有明顯的差異。雖然上述 Hennecke 等人的研究結果顯示，利用 EMCV IRES 進行轉譯的效果約為利用 cap dependent transaltion 的 5 分之 1，但由於報導基因並不相同，所以產生的結果可能有所差異。

建構結構性基因及非結構性基因報導的目的是要進行登革熱病毒組裝訊號的分析。整個策略是將結構性基因報導質體或非結構性基因報導質體轉染至細胞後，讓細胞合成出帶有報導基因及登革熱病毒基因（結構性或非結構性基因）序列的 RNA，同時，也對細胞進行登革熱病毒的感染，以產生登革熱病毒所需的蛋白。在登革熱病毒進行組裝時，會將具有組裝訊號的 RNA 進行包覆，並釋放至細胞外。將產生出的病毒收集後，再感染新的 BHK-21 細胞，如果能在被感染的細胞內偵測到報導基因的表現（藍色細胞的生成），即可得知報導基因上帶有的登革熱病毒序列具有病毒組裝訊號。

在這種實驗架構下，報導基因的表現量及活性一定要足夠。因為帶有報導基因及登革熱病毒基因（結構性或非結構性基因）序列的 RNA 最後進入細胞內的數量應該不多，而且可能無法複製；在這種狀況下，轉譯出的 β -半乳糖苷酶是否足夠讓細胞轉成藍色，是值得關注的。尤其當報導基因位於第二個 ORF 時，表現的狀況原本就不佳，如果 RNA 經過病毒組裝，再經由感染進入細胞，產生的 β -半乳糖苷酶必定更少。未來在進行組裝訊號分析時，可能要針對這個問題，尋找其他的報導基因，例如螢光或冷光基因，嘗試改善偵測狀況；或者，改用 RT-PCR 的方式，藉由偵測報導基因 RNA 序列的存在與否，觀察 RNA 是否被病毒進行組裝。

陸、結論

研究結果顯示，所獲得的登革熱病毒全長 cDNA clone 置於含有 enhancer 的 CMV 啟動子下游時，並無法表現出具有感染性的登革熱病毒，可能是由於登革熱病毒所產生的蛋白對 *E. coli* 有毒性，且 CMV 啟動子在 *E. coli* 產生 leaky，造成得到的質體都是經過突變不具感染性的質體。另外，亦有可能是由於質體建構時，未去除 5' 及 3' 端的非病毒核苷酸序列，導致病毒 RNA 無法被複製，因此無法偵測到任何具有感染性的病毒顆粒生成。

在 X-gal staining 分析含有病毒基因的報導質體表現時發現，當報導基因與病毒基因分別使用各自的 ORF (bicistronic) 的狀況下，報導基因位於在上游的 ORF 時，產生的藍色細胞數最多，在 3.5 公分的培養皿上約可生成 1.6×10^5 個藍色細胞；當報導基因位於下游的 ORF 時，在前方加入 IRES 的報導基因所產生的藍色細胞數較未加入 IRES 的多，但藍色細胞數分別只有在位於上游 ORF 的二十分之一及二千分之一。若報導基因與病毒基因共用同一個 ORF 時 (monocistronic)，產生的藍色細胞約只有位於上游 ORF (bicistronic) 的五百分之一。未來在進行組裝訊號分析時，建議採用 bicistronic 的方式，並使用其它的報導基因，例如螢光或冷光基因，以嘗試改善當報導基因位於下游 ORF 不易被偵測的狀況。或者，改用 RT-PCR 的方式，藉由偵測報導基因 RNA 序列的存在與否，觀察 RNA 是否被病毒進行組裝。

柒、参考文献

- Boyer, J. C., and Haenni, A. L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**(2), 415-26.
- Henchal, E. A., and Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* **3**(4), 376-96.
- Hennecke, M., Kwissa, M., Metzger, K., Oumard, A., Kroger, A., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Hauser, H. (2001). Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **29**(16), 3327-34.
- Holden, K. L., and Harris, E. (2004). Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology* **329**(1), 119-33.
- Jones, C. T., Patkar, C. G., and Kuhn, R. J. (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* **331**(2), 247-59.
- Kapoor, M., Zhang, L., Mohan, P. M., and Padmanabhan, R. (1995). Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* **162**(2), 175-80.
- Kautner, I., Robinson, M. J., and Kuhnle, U. (1997). Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* **131**(4), 516-24.
- Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., Sedlak, P. L., and Westaway, E. G. (2001). Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol* **75**(10), 4633-40.
- Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., and Westaway, E. G. (1998). Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *J Virol* **72**(7), 5967-77.

- Kinney, R. M., Butrapet, S., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Roehrig, J. T., Bhamarapavati, N., and Gubler, D. J. (1997). Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* **230**(2), 300-8.
- Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* **9**(20), 5233-52.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**(2), 283-92.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**(2), 229-41.
- Lai, C. J., Zhao, B. T., Hori, H., and Bray, M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12), 5139-43.
- Lee, J. C., Wu, T. Y., Huang, C. F., Yang, F. M., Shih, S. R., and Hsu, J. T. (2005). High-efficiency protein expression mediated by enterovirus 71 internal ribosome entry site. *Biotechnol Bioeng* **90**(5), 656-62.
- Lewin, A., Mayer, M., Chusainow, J., Jacob, D., and Appel, B. (2005). Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into Escherichia coli. *BMC Biotechnol* **5**(1), 19.
- Liu, W. J., Chen, H. B., and Khromykh, A. A. (2003). Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol* **77**(14), 7804-13.
- Liu, W. J., Sedlak, P. L., Kondratieva, N., and Khromykh, A. A. (2002). Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 in cis for virus assembly. *J Virol* **76**(21), 10766-75.

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

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

Merrick, W. C. (2004). Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* **332**, 1-11.

Mishin, V. P., Cominelli, F., and Yamshchikov, V. F. (2001). A 'minimal' approach in design of flavivirus infectious DNA. *Virus Res* **81**(1-2), 113-23.

Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**(3), 299-310.

Polo, S., Ketner, G., Levis, R., and Falgout, B. (1997). Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol* **71**(7), 5366-74.

Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(1), 156-60.

Proutski, V., Gaunt, M. W., Gould, E. A., and Holmes, E. C. (1997). Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol* **78** (Pt 7), 1543-9.

Semler, B. L., Dorner, A. J., and Wimmer, E. (1984). Production of infectious poliovirus from cloned cDNA is dramatically increased by SV40 transcription and replication signals. *Nucleic Acids Res* **12**(12), 5123-41.

Sriburi, R., Keelapang, P., Duangchinda, T., Pruksakorn, S., Maneekarn, N., Malasit, P., and Sittisombut, N. (2001). Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid. *J Virol Methods* **92**(1), 71-82.

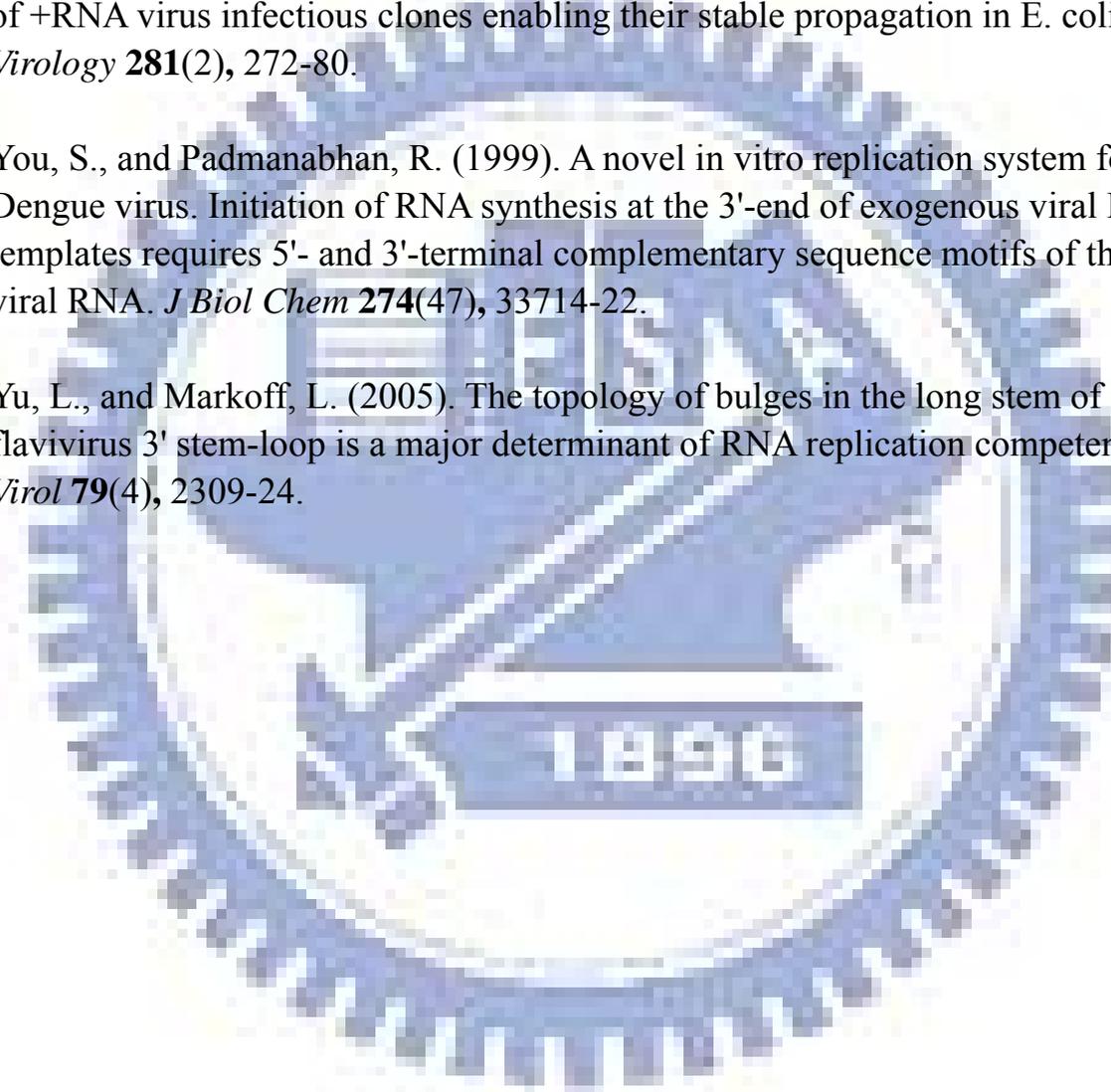
Varnavski, A. N., Young, P. R., and Khromykh, A. A. (2000). Stable high-level expression of heterologous genes in vitro and in vivo by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors. *J Virol* **74**(9), 4394-403.

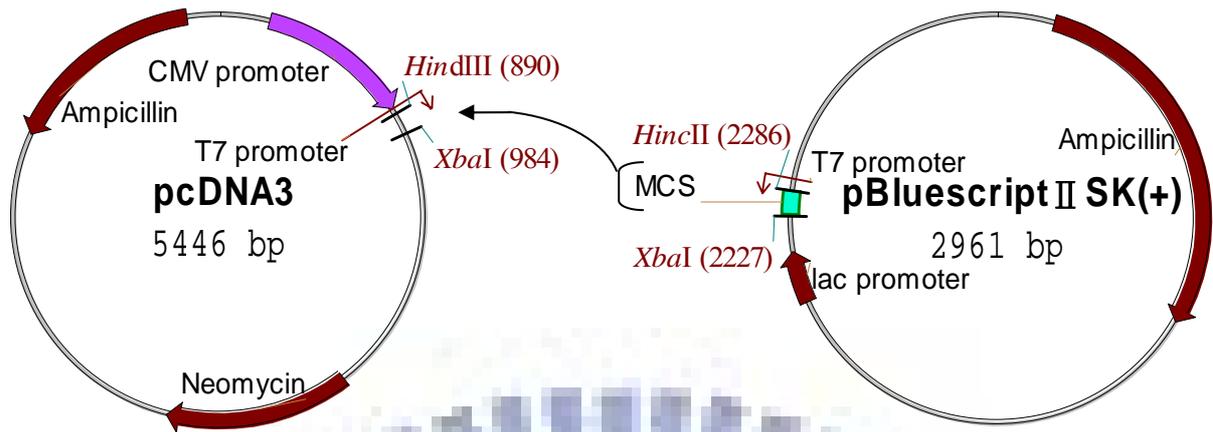
von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**(1), 99-105.

Yamshchikov, V., Mishin, V., and Cominelli, F. (2001). A new strategy in design of +RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in E. coli. *Virology* **281**(2), 272-80.

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

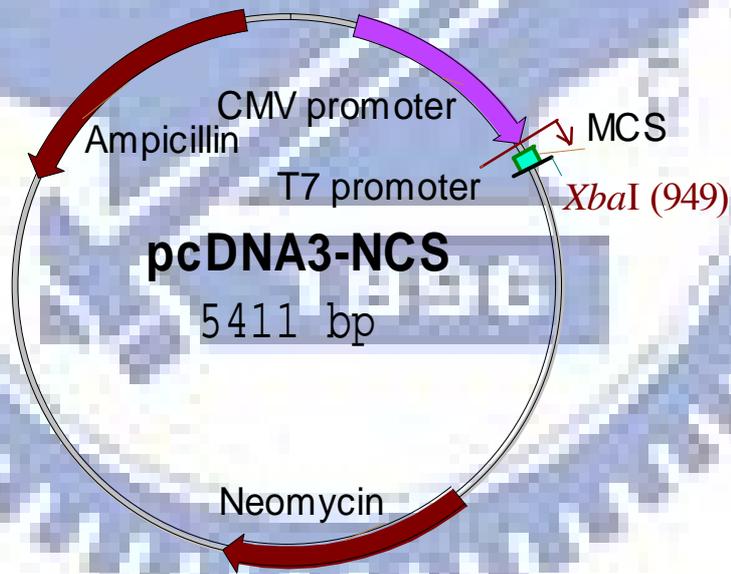
Yu, L., and Markoff, L. (2005). The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J Virol* **79**(4), 2309-24.





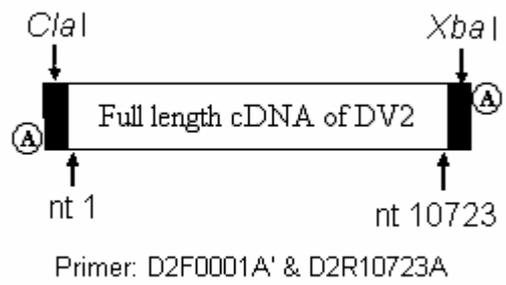
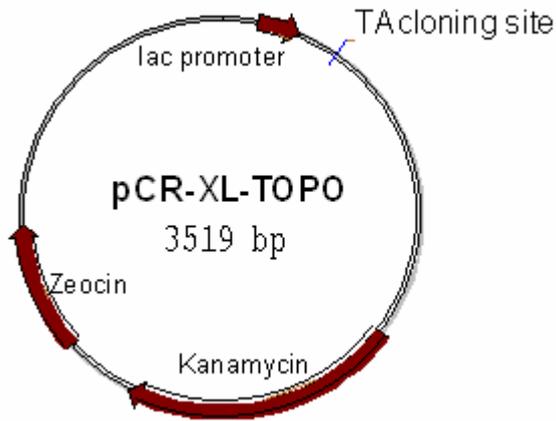
pcDNA3 :
Hind III (Klenow) + *Xba* I digestion

pBluescript II SK(+):
Hinc II + *Xba* I digestion



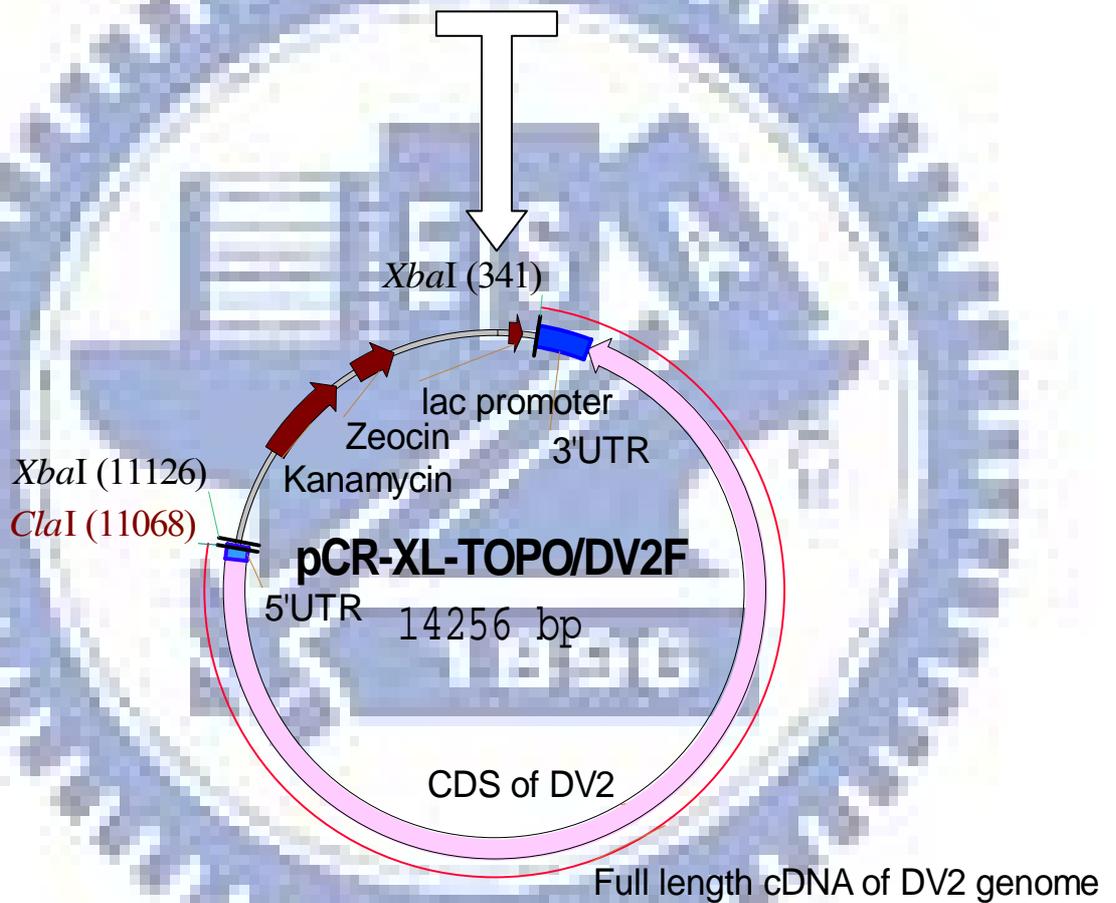
圖一、Construction of pcDNA3-NCS

NCS: New cloning site from pBluescript II SK(+)



pCR-XL-TOPO: TA cloning vector

RT-PCR product

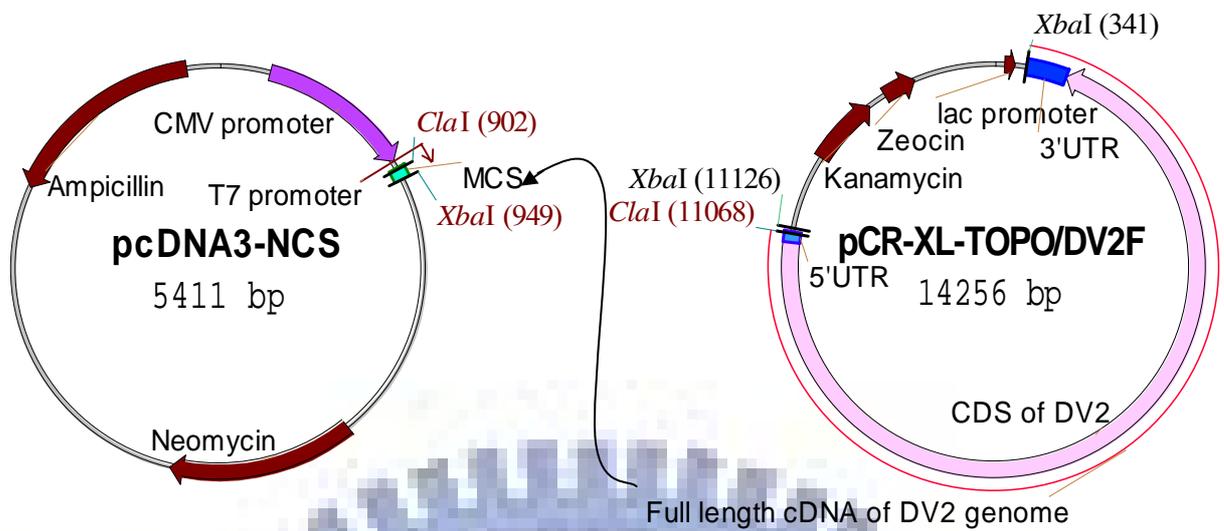


圖二、TA cloning – pCR-XL-TOPO/DV2F

CDS: Coding sequence

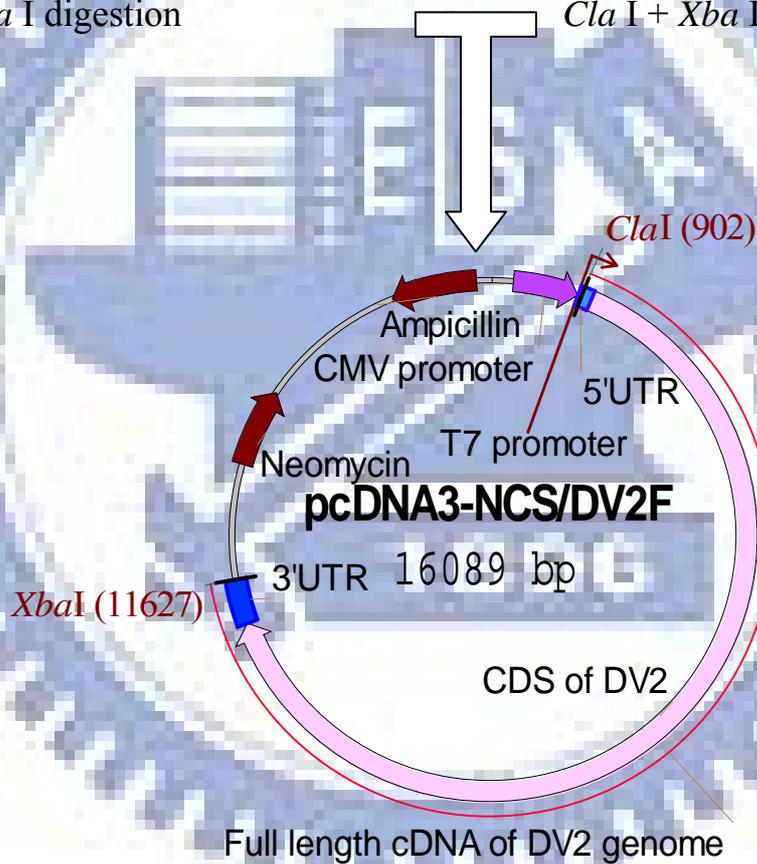
DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

F: Full length cDNA



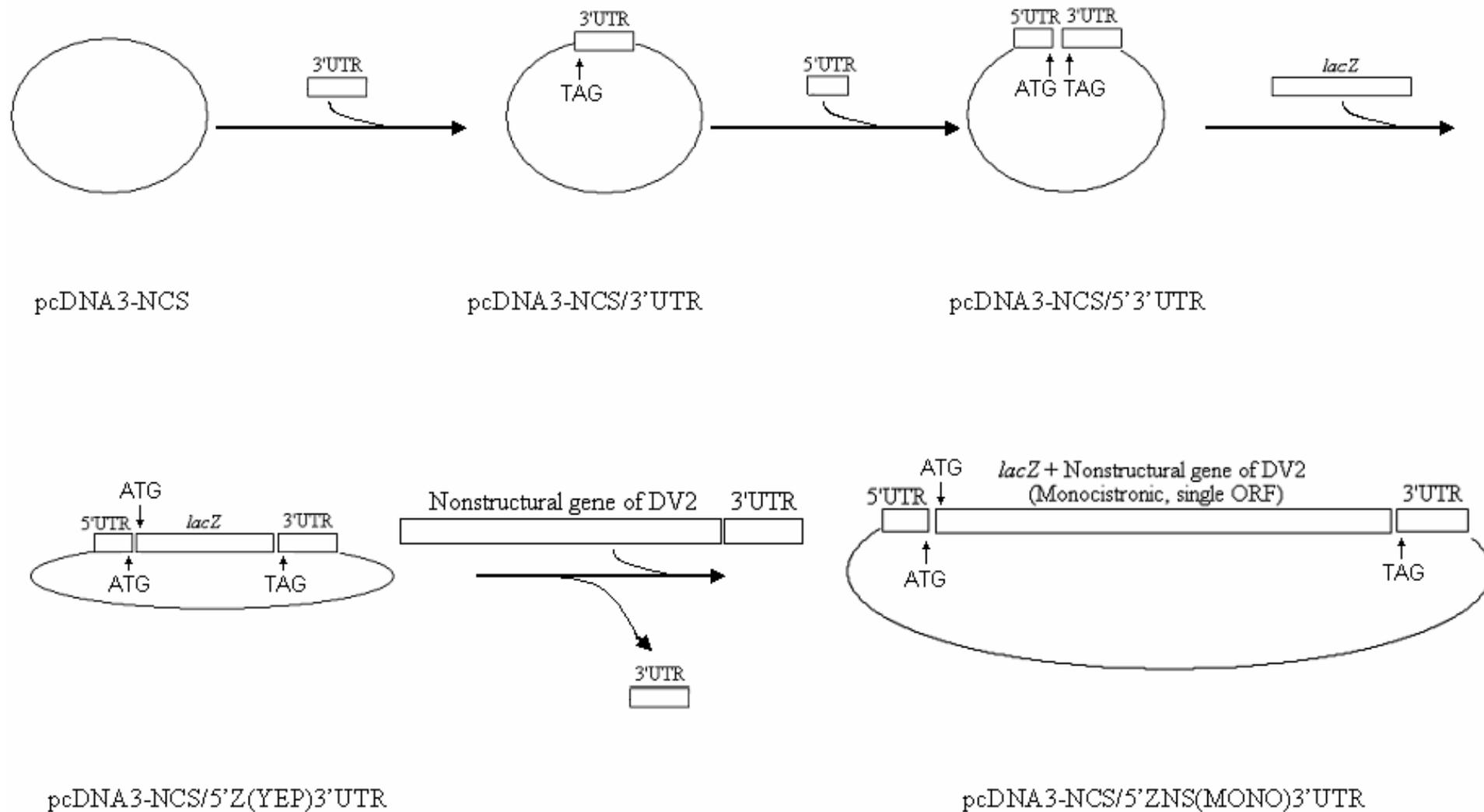
pcDNA3 -NCS:
Cla I + *Xba* I digestion

pCR-XL-TOPO/DV2F:
Cla I + *Xba* I digestion



圖三、Construction of pcDNA3-NCS/DV2F

CDS: Coding sequence
 DV2: Dengue virus 2 PL046 strain
 F: Full length cDNA
 NCS: New cloning site



圖四、單一 ORF 非結構性基因報導質體建構示意圖

5': 5'UTR

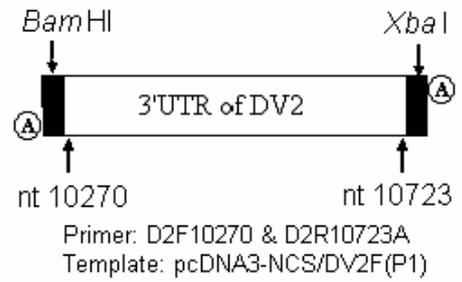
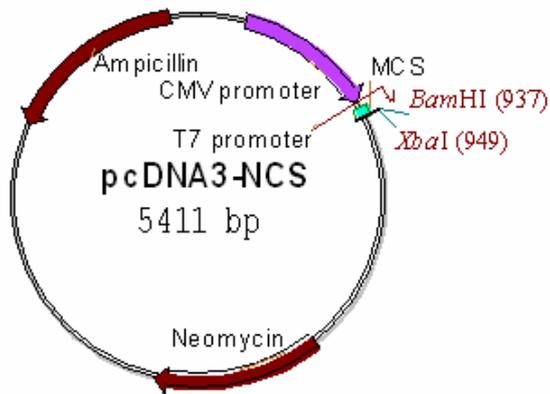
NCS: New cloning site

Z: *lacZ* (YEP) w/o Kozak sequence

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

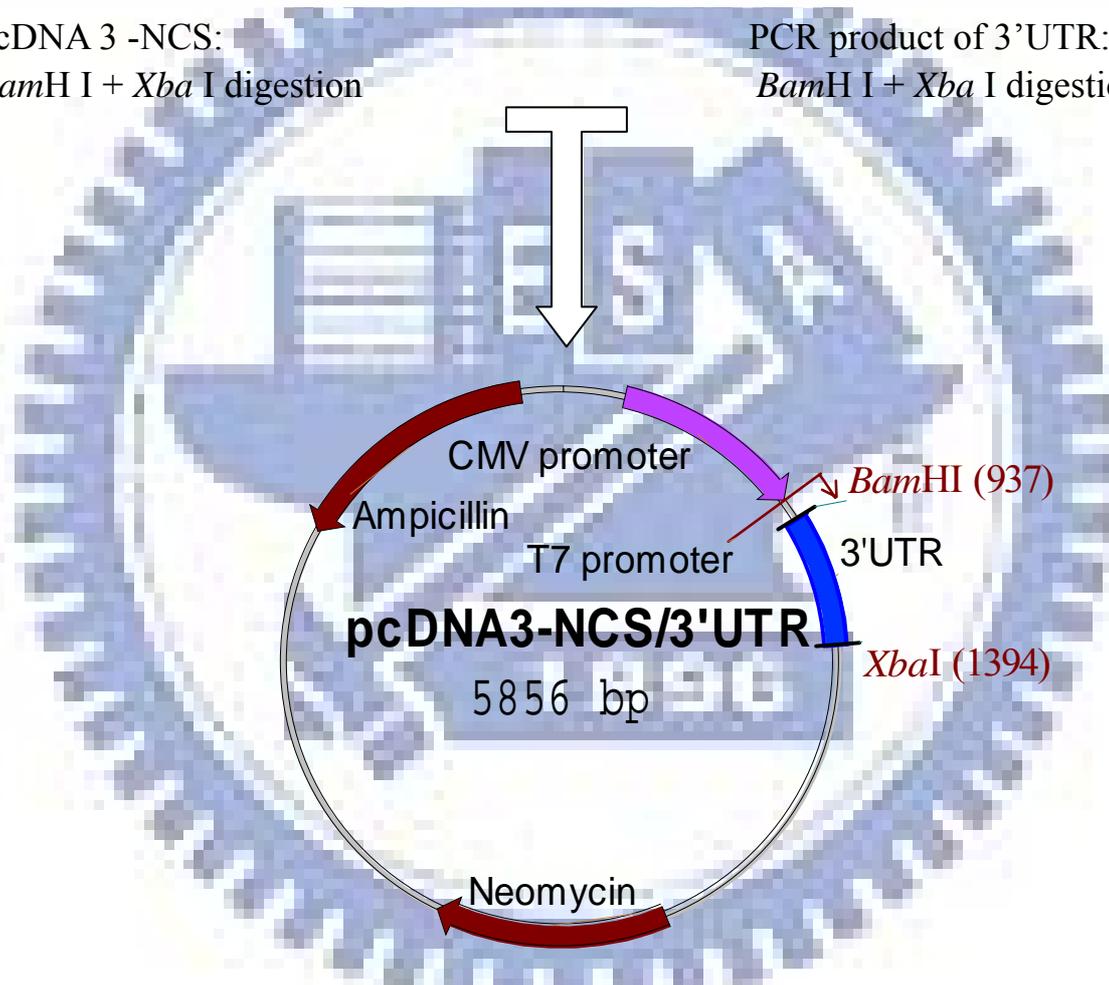
NS: Nonstructural genes of DV2 from P1

MONO: monocistronic



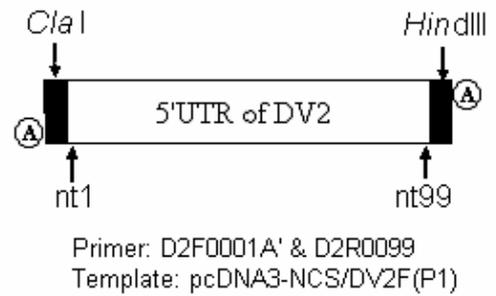
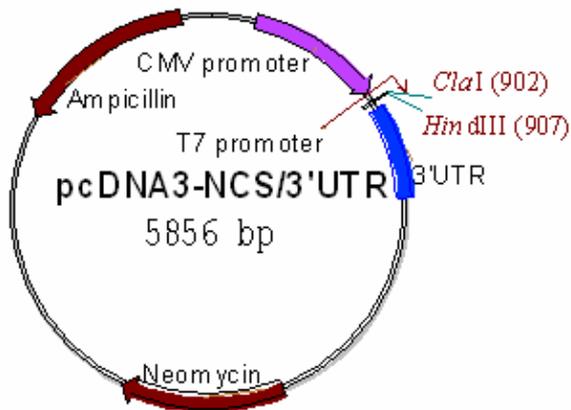
pcDNA 3 -NCS:
BamH I + Xba I digestion

PCR product of 3'UTR:
BamH I + Xba I digestion



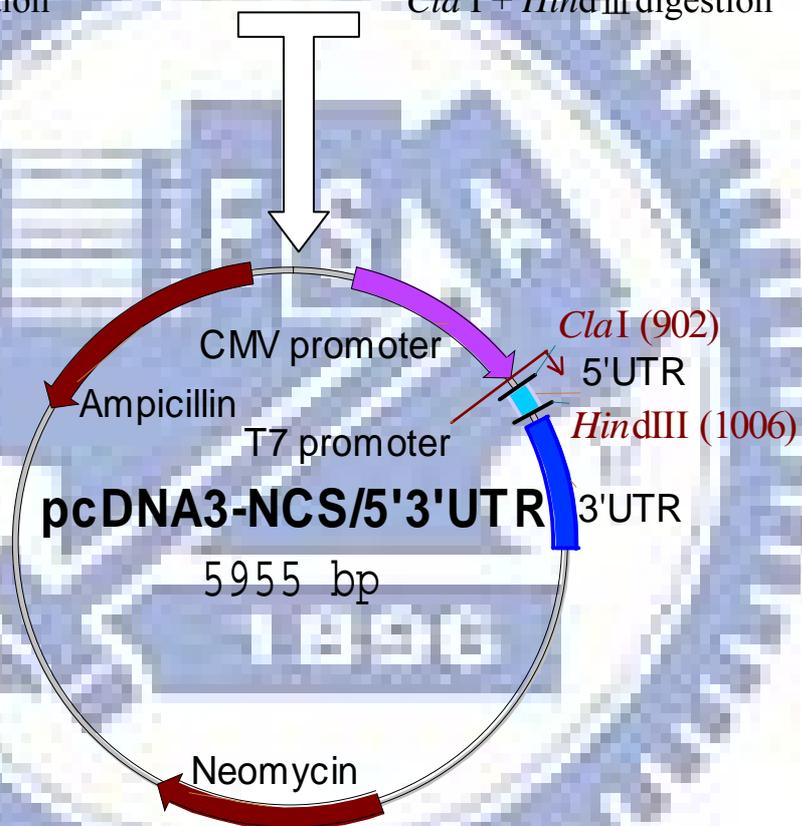
圖五、Construction of pcDNA3-NCS/3'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain
NCS: New cloning site



pcDNA3 -NCS/3'UTR:
Cla I + *Hind* III digestion

PCR product of 5'UTR:
Cla I + *Hind* III digestion

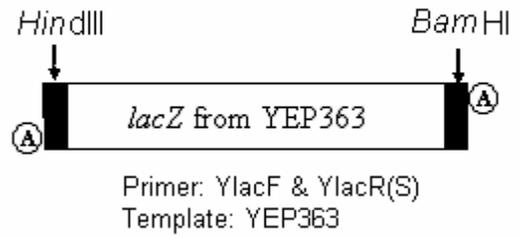
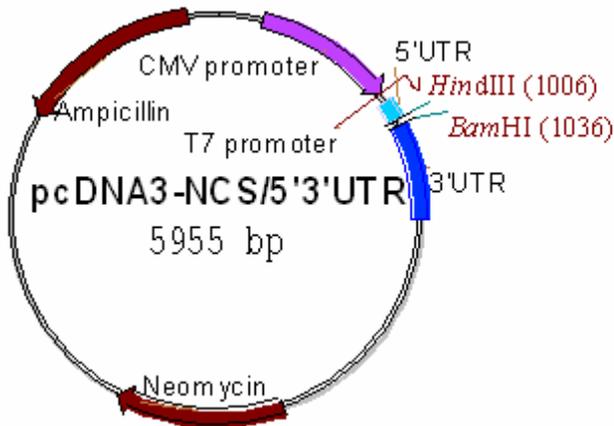


圖六、Construction of pcDNA3-NCS/5'3'UTR

5': 5'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

NCS: New cloning site

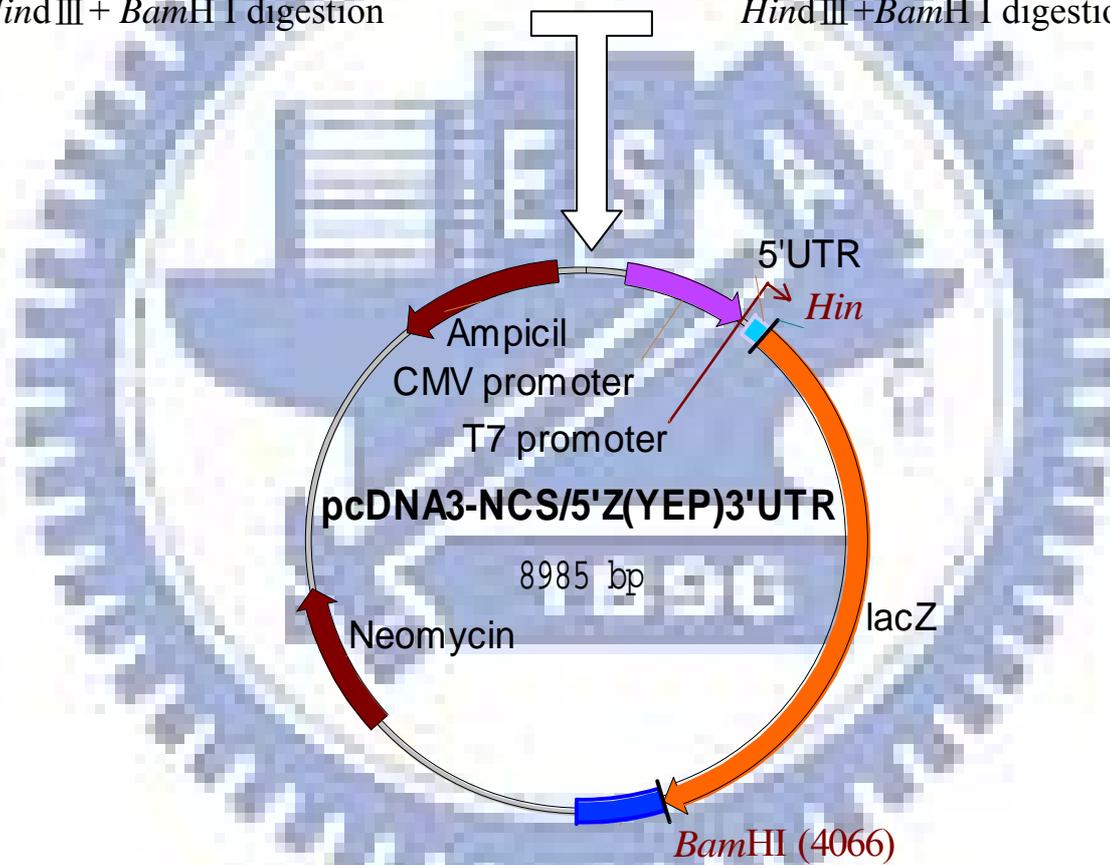


5'3'UTR/pcDNA3-NCS:

*Hind*III + *Bam*HI I digestion

PCR product of *lacZ*:

*Hind*III + *Bam*HI I digestion

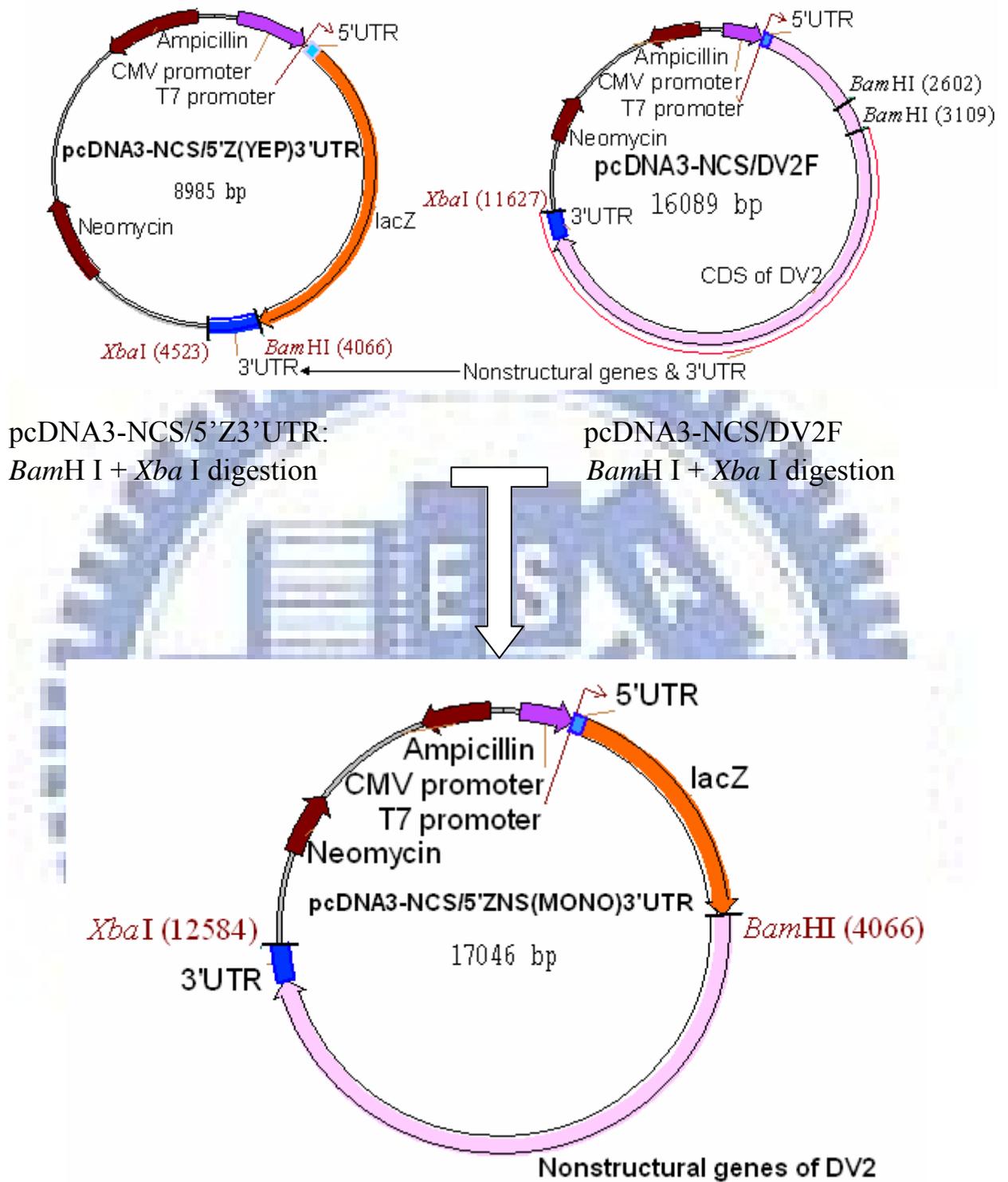


圖七、Construction of pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR

5': 5'UTR

NCS: New cloning site

Z(YEP): *lacZ* from YEP363 w/o Kozak sequence



圖八、construction of pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR

5': 5'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

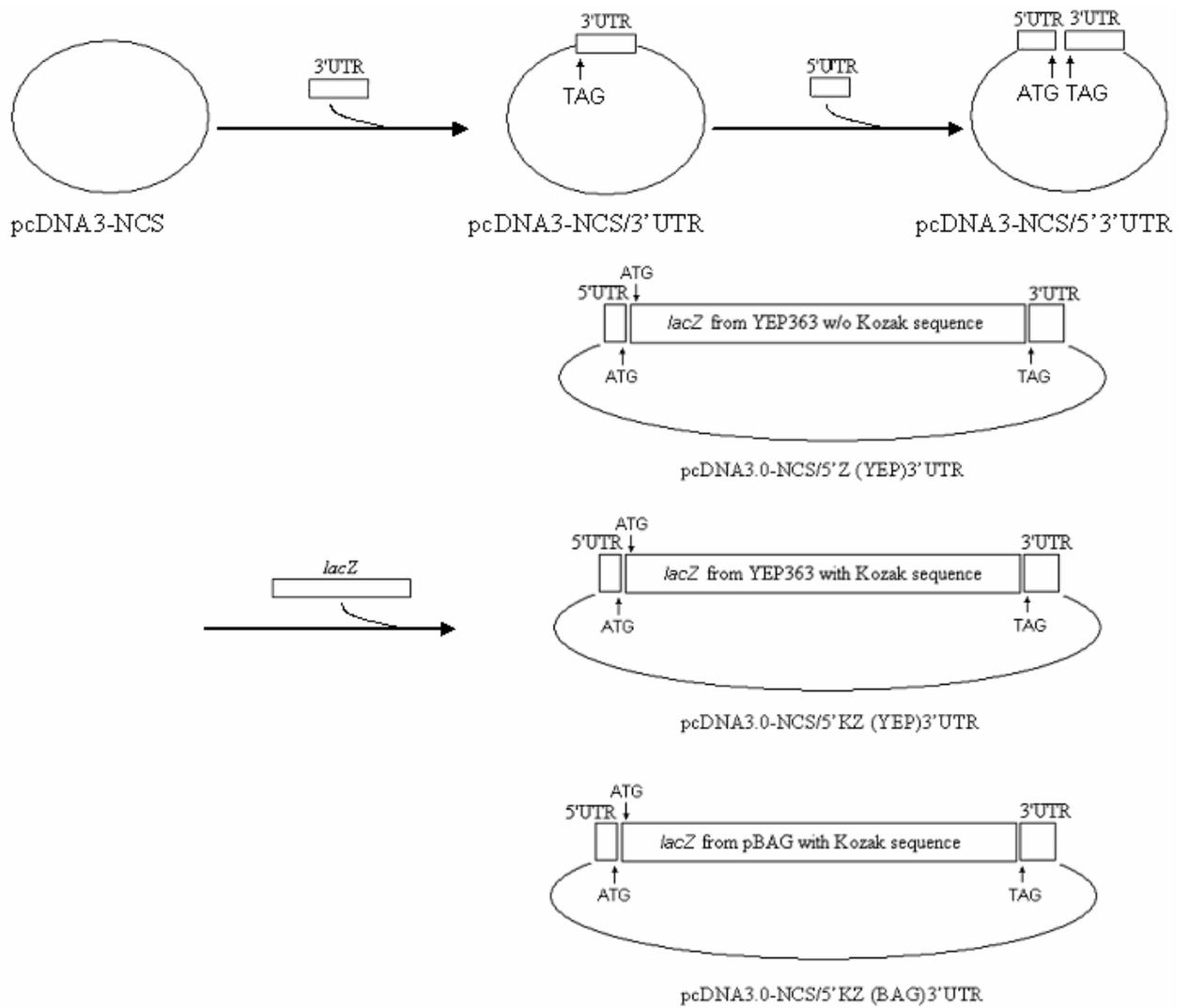
NCS: New cloning site

NS: Nonstructural genes of DV2 from P1

CDS: Coding sequence

F: Full length cDNA

Z: lacZ(YEP) w/o Kozak sequence



圖九、報導基因的選擇 - 來源及轉譯起始點之比較

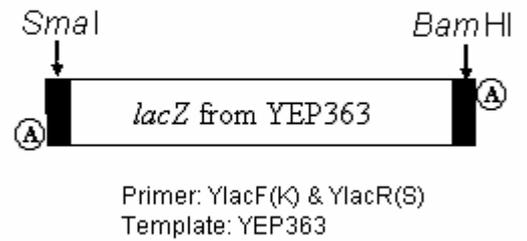
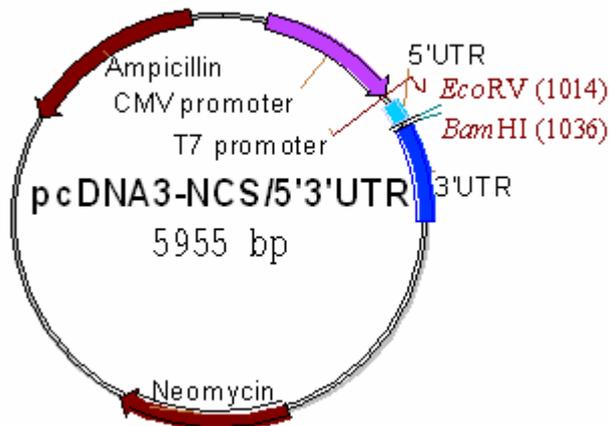
5': 5'UTR

NCS: New cloning site

K: Kozak sequence

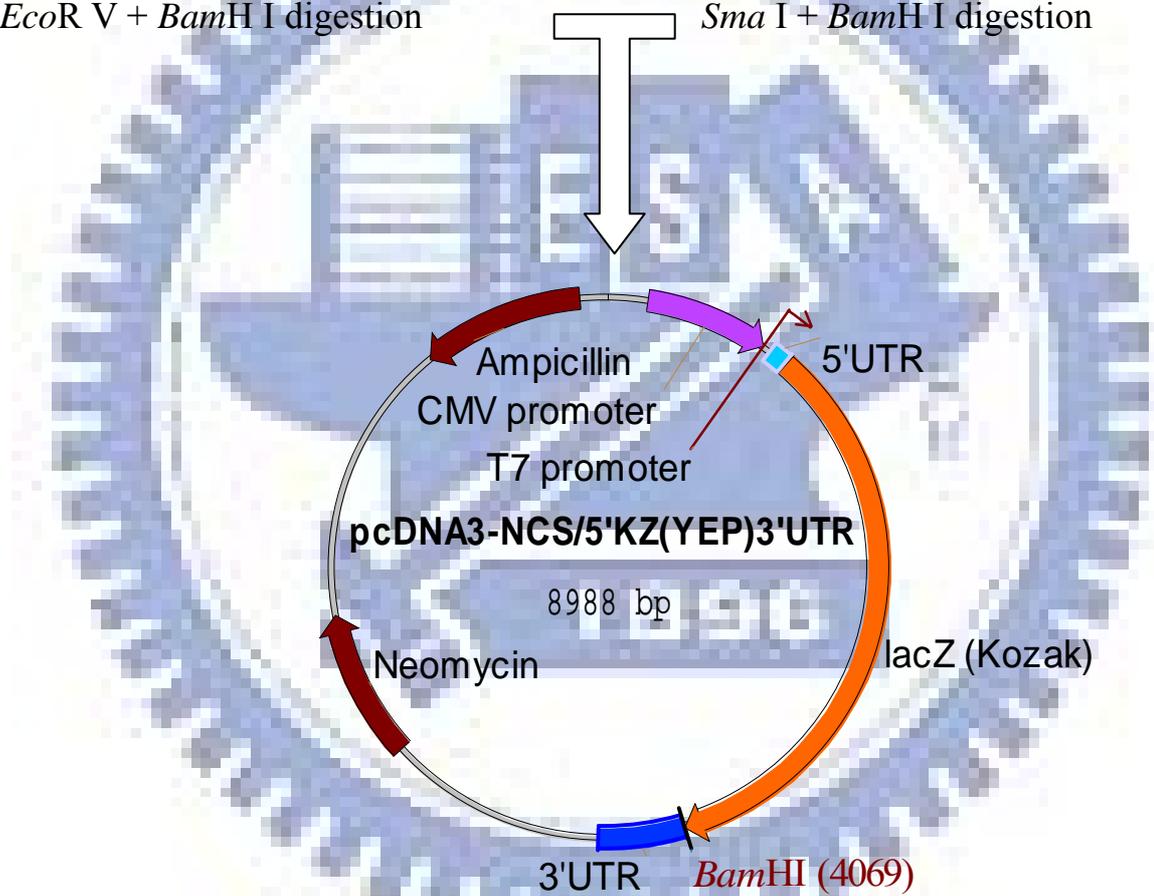
Z(BAG): *lacZ* from BAG

Z(YEP): *lacZ* from YEP363



5'3'UTR/pcDNA3-NCS:
EcoRV + BamHI digestion

PCR product of lacZ:
SmaI + BamHI digestion



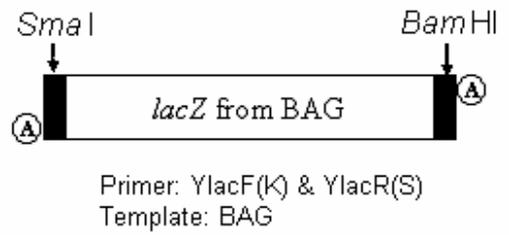
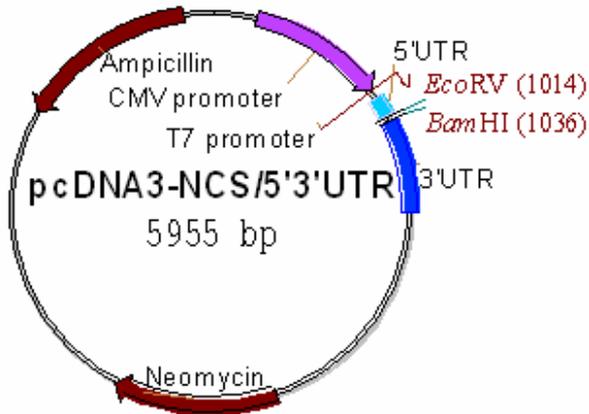
圖十、Construction of pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR

5': 5'UTR

K: Kozak sequence

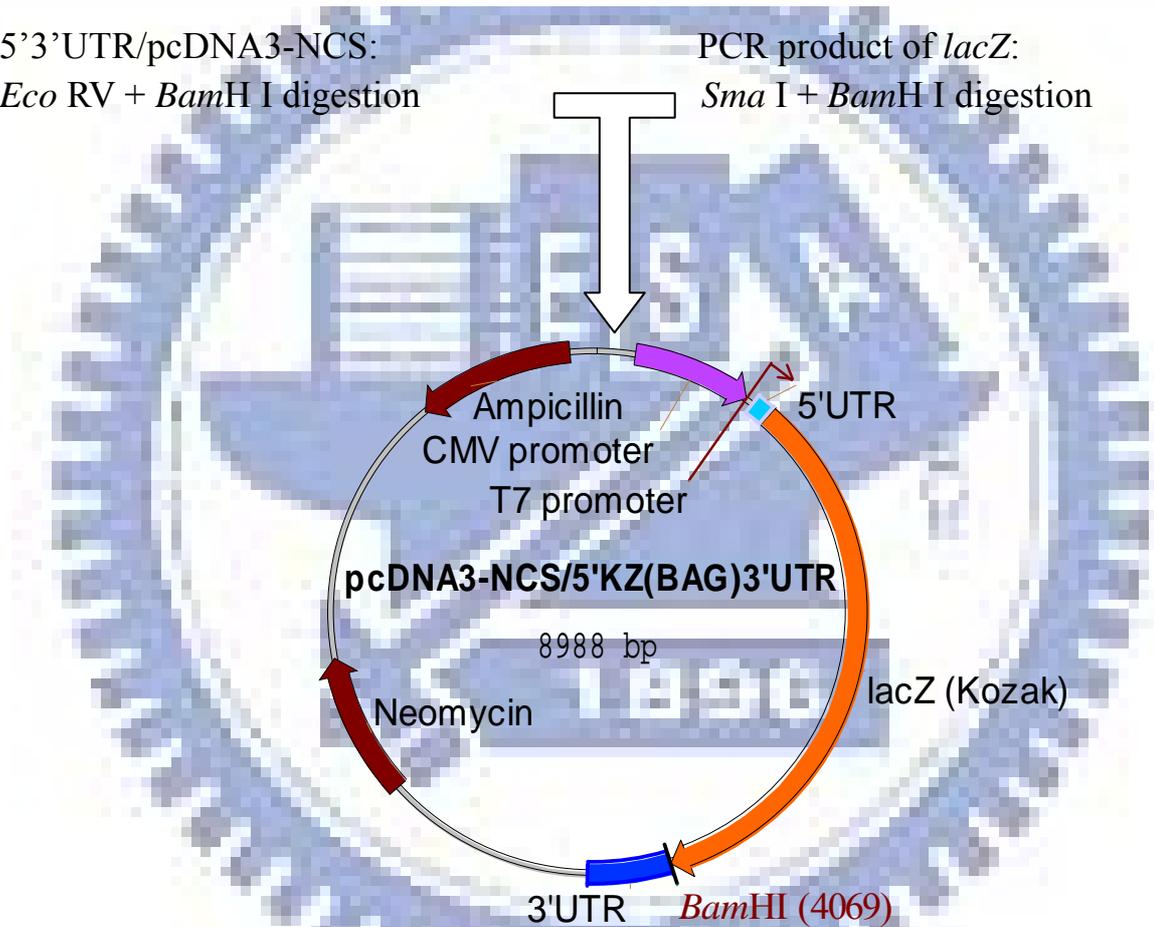
NCS: New cloning site

Z(YEP): lacZ from YEP363 with Kozak sequence



5'3'UTR/pcDNA3-NCS:
EcoRV + *BamHI* digestion

PCR product of *lacZ*:
SmaI + *BamHI* digestion



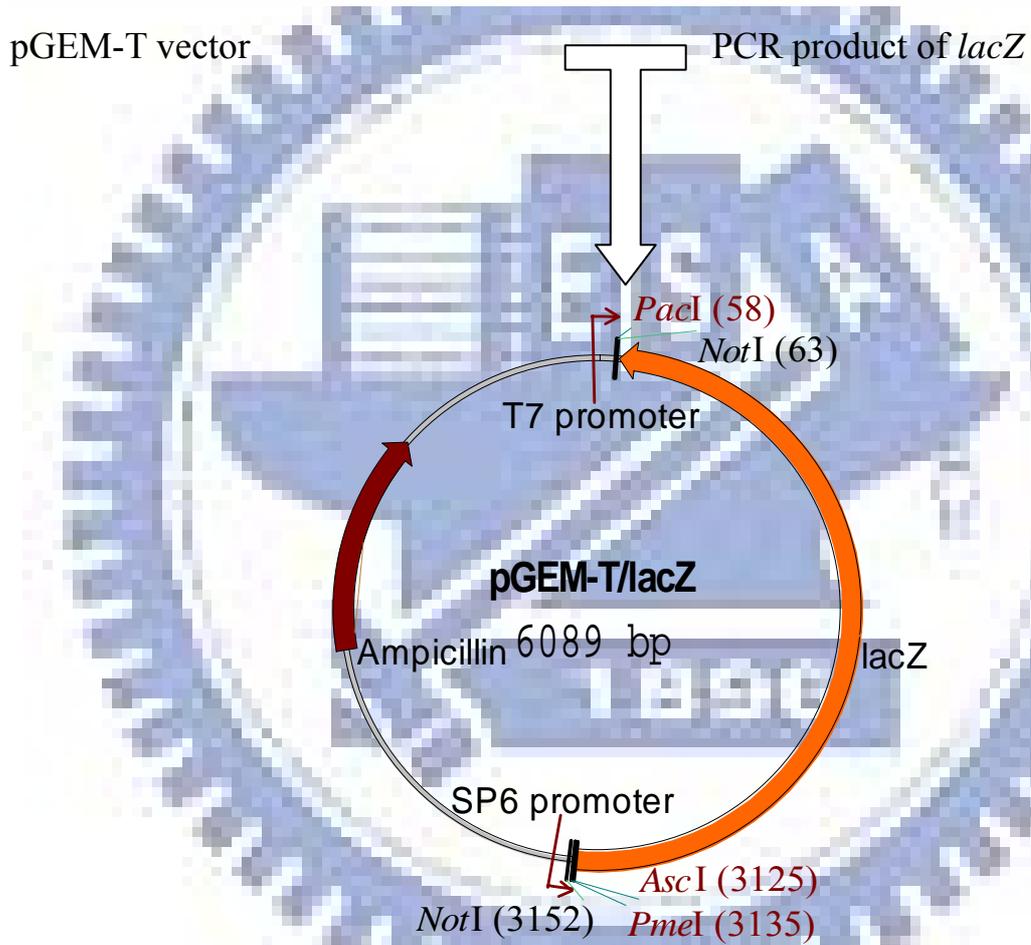
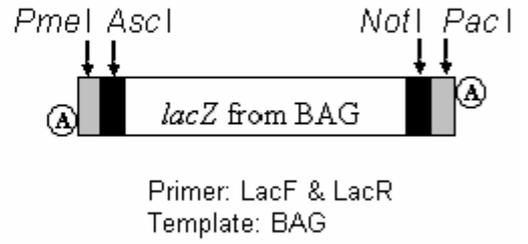
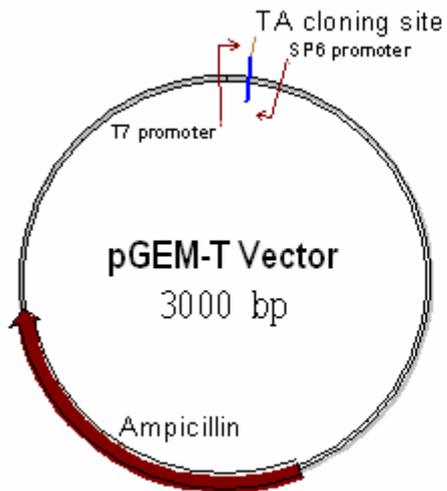
圖十一、Construction of pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR

5': 5'UTR

K: Kozak sequence

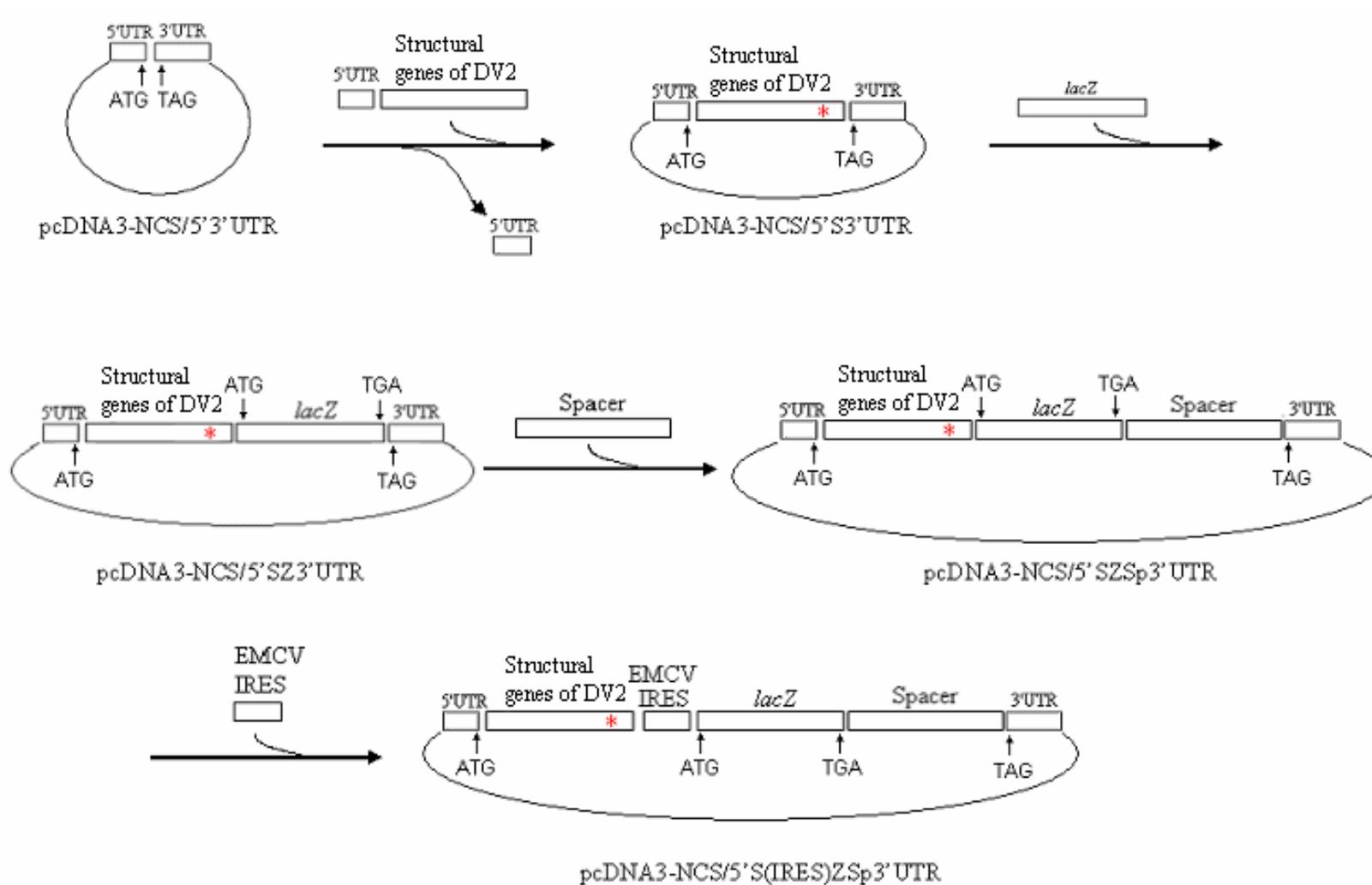
NCS: New cloning site

Z(BAG): *lacZ* from BAG with Kozak sequence



圖十二、TA cloning – pGEM-T/*lacZ*

lacZ: *lacZ* from BAG



圖十三、結構性基因報導質體建構示意圖

5': 5'UTR

EMCV: Encephalomyocarditis virus

NCS: New cloning site

Sp: Spacer DNA

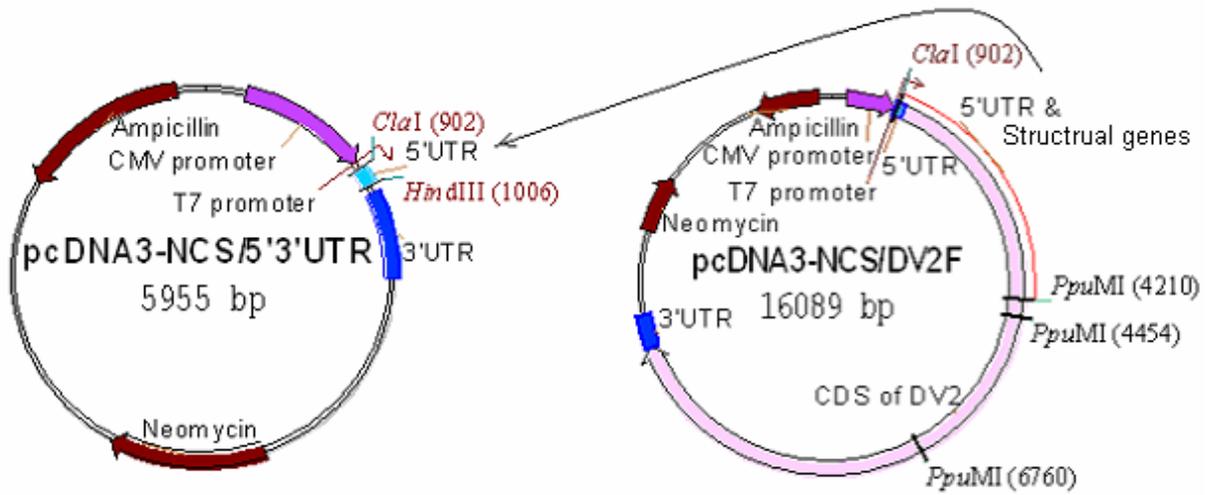
*: nonsense mutation in NS1 gene

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

IRES: Internal ribosomal entry site

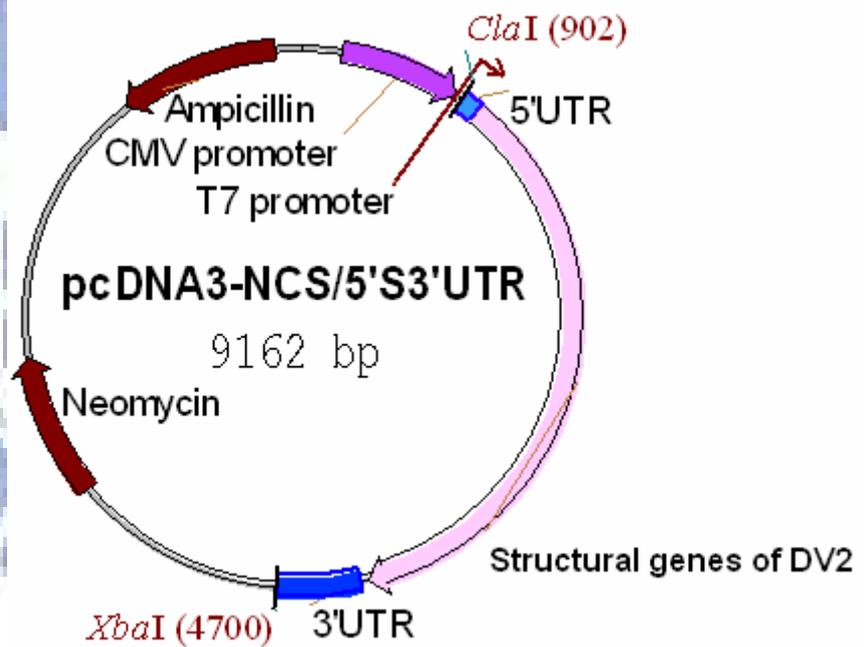
S: Structural genes of DV2 from P1

Z: *lacZ*(BAG) with Kozak sequence



pcDNA3-NCS/5'3'UTR:
Hind III (Klenow) + Cla I

pcDNA3-NCS/DV2F:
PpuM I (Klenow) + Cla I



圖十四、Construction of pcDNA3-NCS/5'S3'UTR

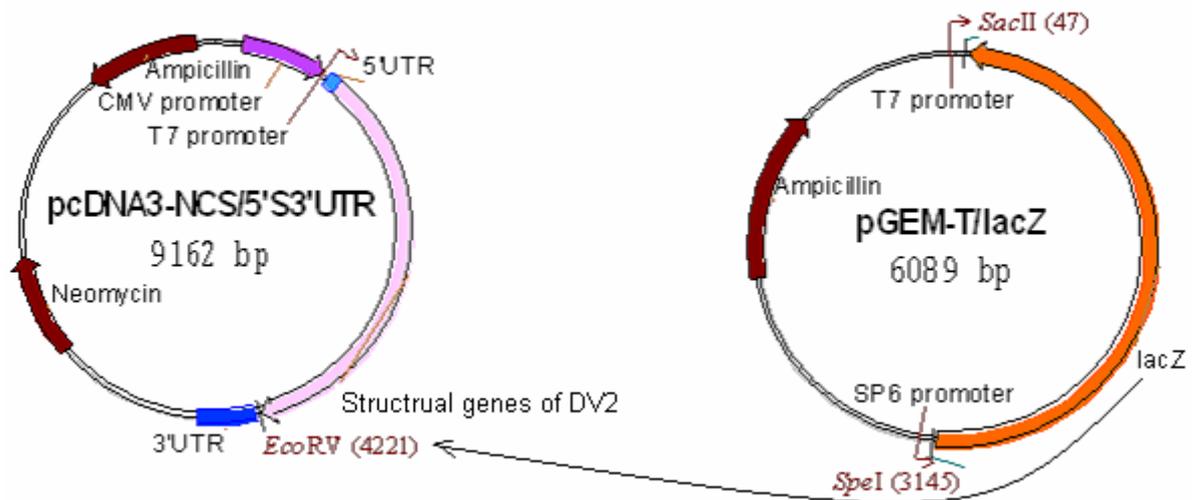
5': 5'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

F: Full length cDNA

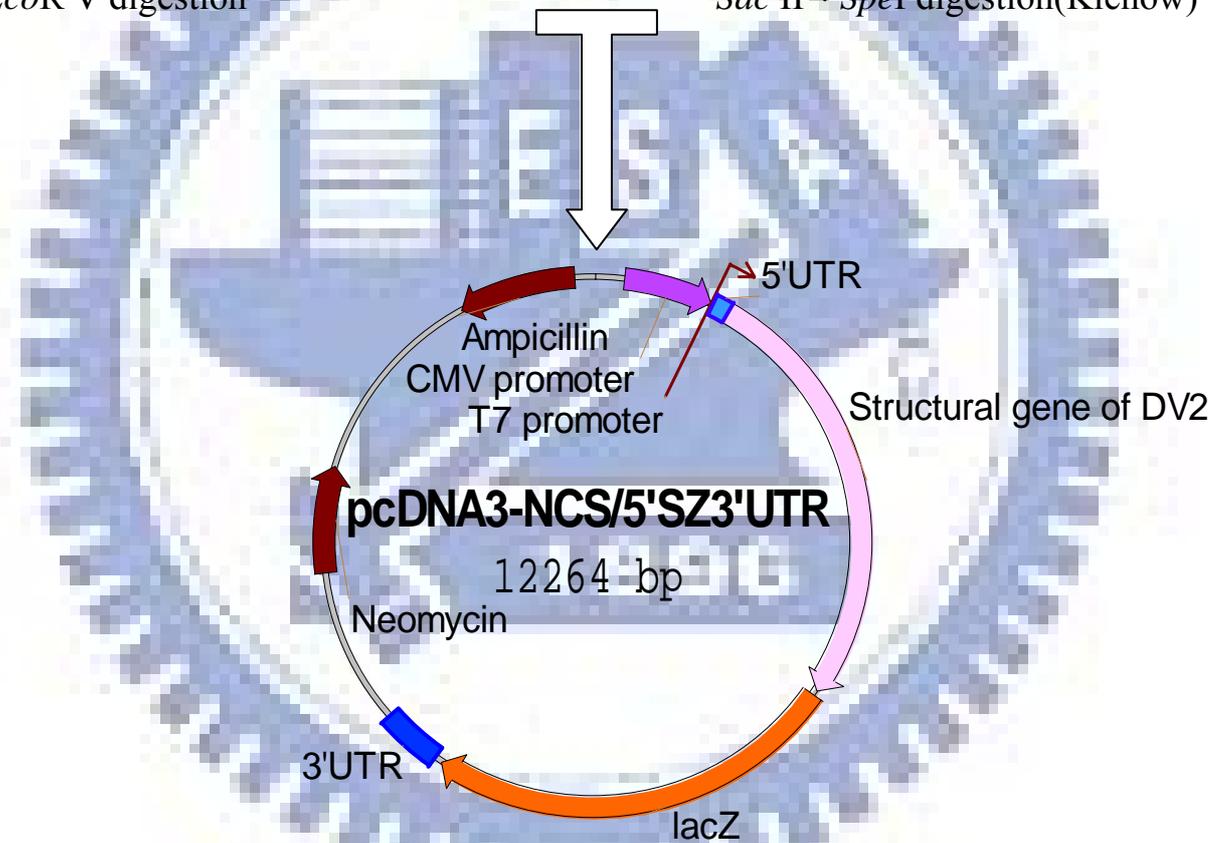
NCS: New cloning site

Structural genes of DV2 from P1



pcDNA3-NCS/5'S3'UTR:
EcoR V digestion

pGEM-T/lacZ:
Sac II、SpeI digestion(Klenow)



圖十五、Construction of pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR

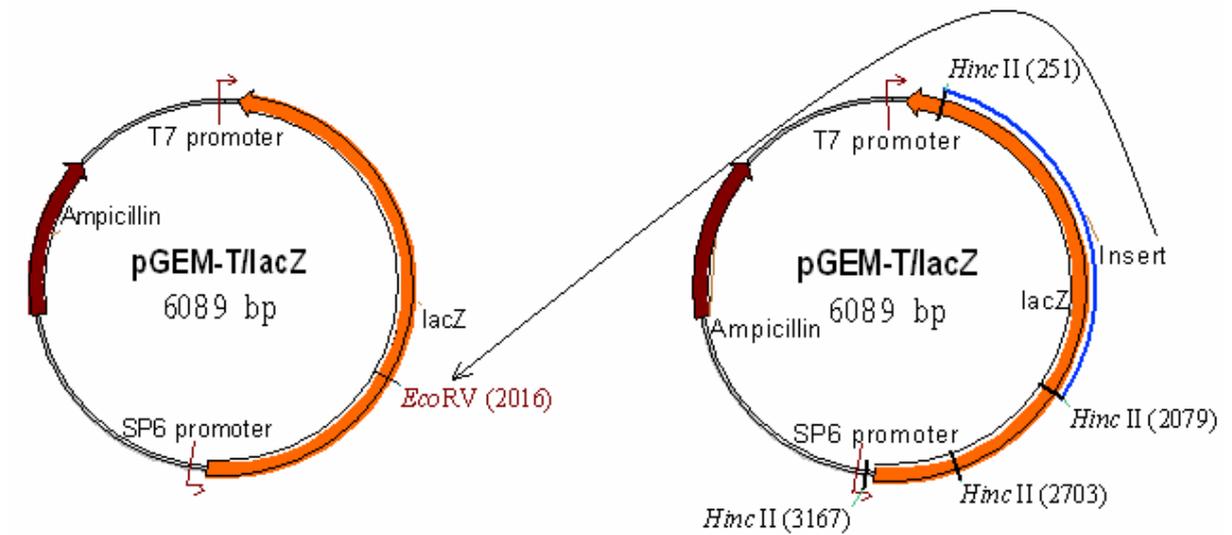
5': 5'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

NCS: New cloning site

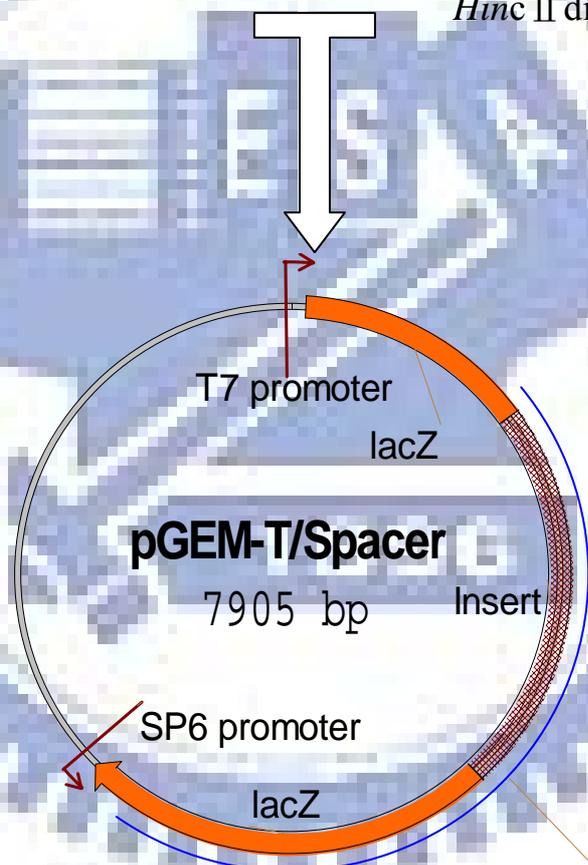
S: Structural genes of DV2 from P1

Z: lacZ(BAG) with Kozak sequence



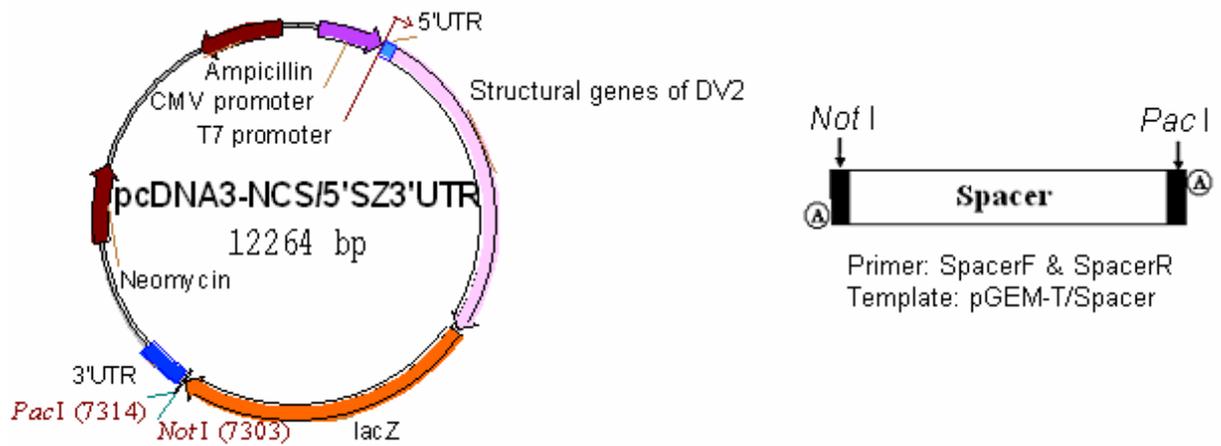
pGEM-T/lacZ:
EcoR V digestion

pGEM-T/lacZ:
Hinc II digestion



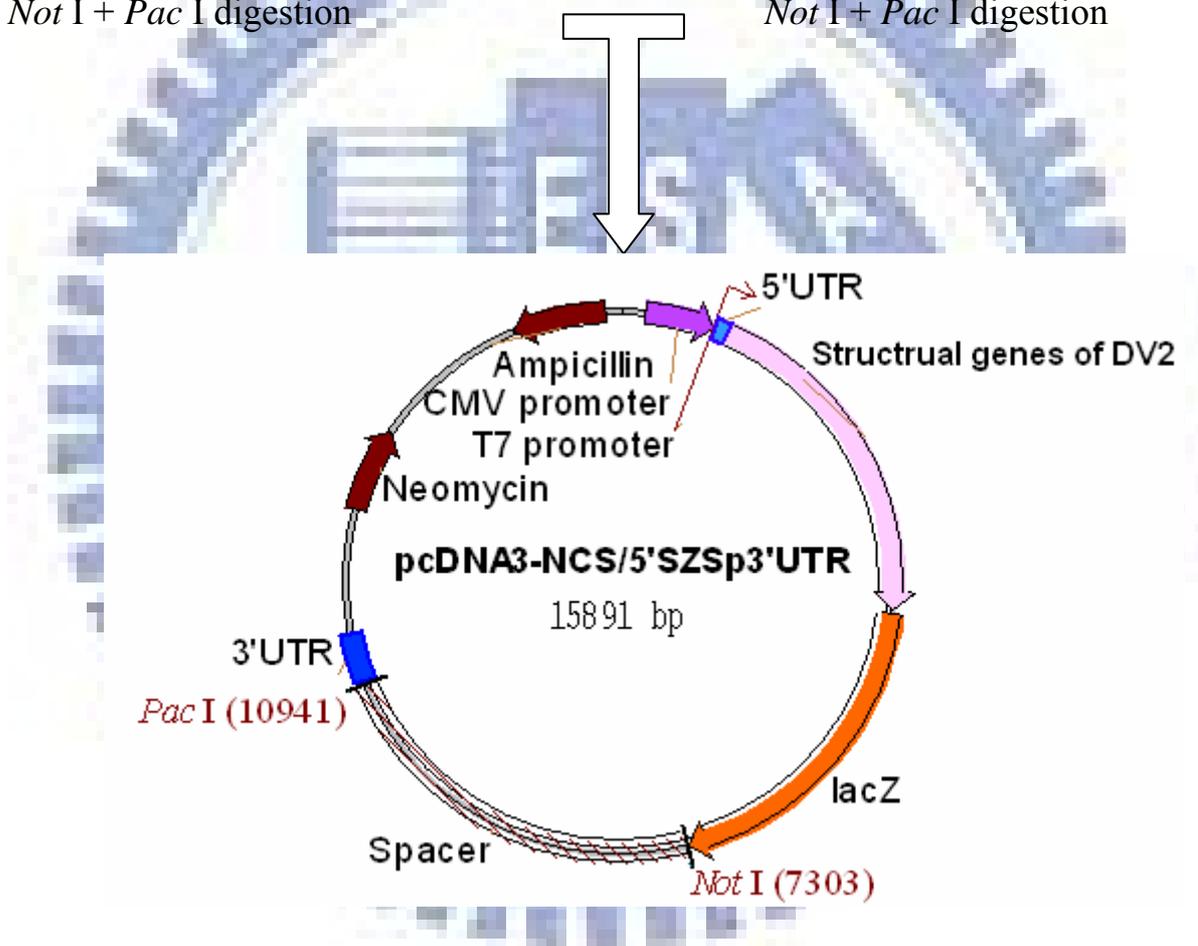
Using for spacer DNA (nt1101-4727)

圖十六、Construction of pGEM-T/spacer



pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR:
Not I + Pac I digestion

PCR product of Spacer:
Not I + Pac I digestion

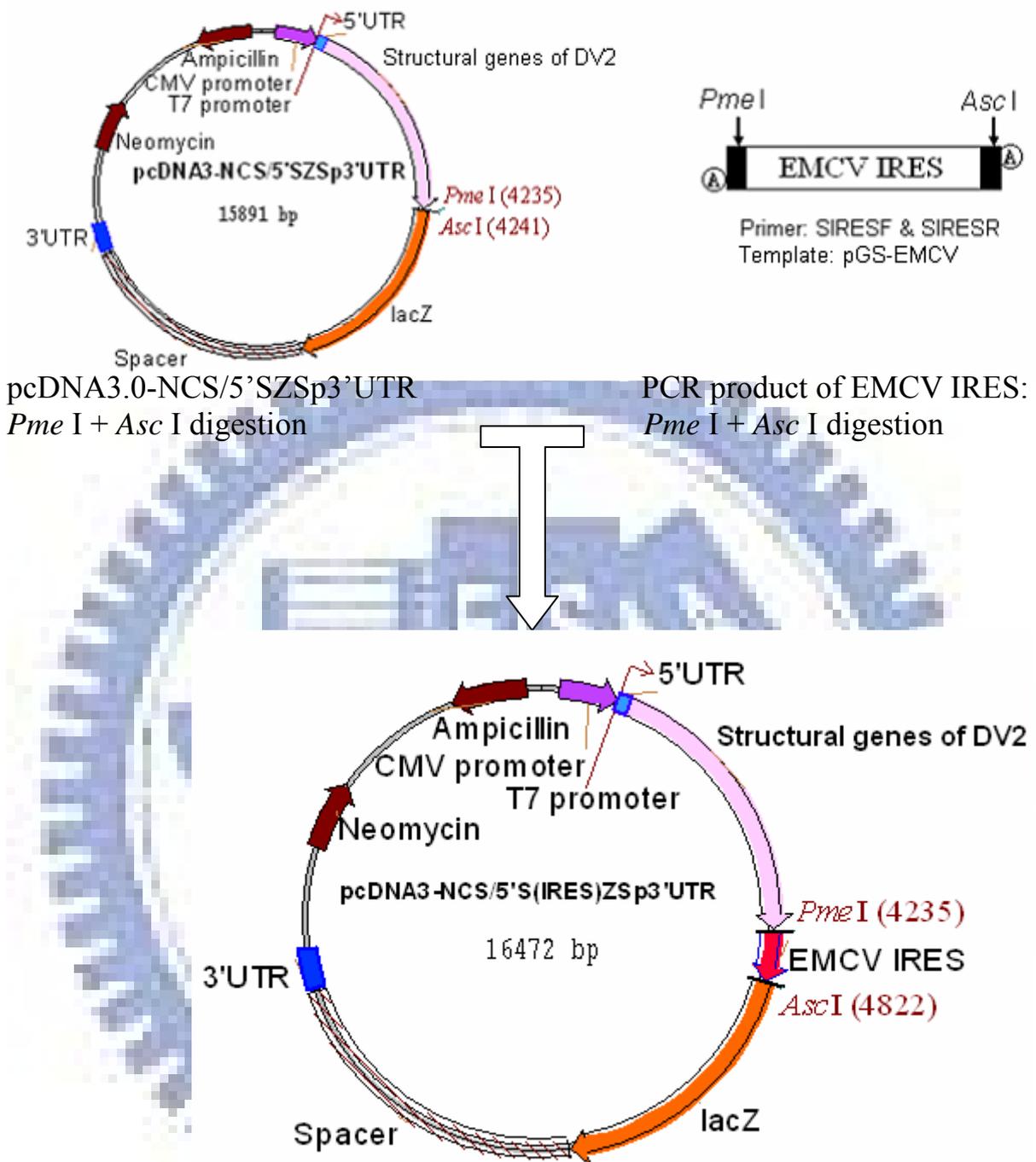


圖十七、Construction of pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR

Spacer DNA: nt 1101 ~ nt 4727 of pGEM-T/ Spacer

5': 5'UTR
NCS: New cloning site
Sp: Spacer DNA

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain
S: Structural genes of DV2 from P1
Z: *lacZ* (BAG) with Kozak sequence



圖十八、Construction of pcDNA3.0-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR

5': 5'UTR

EMCV: Encephalomyocarditis virus

NCS: New cloning site

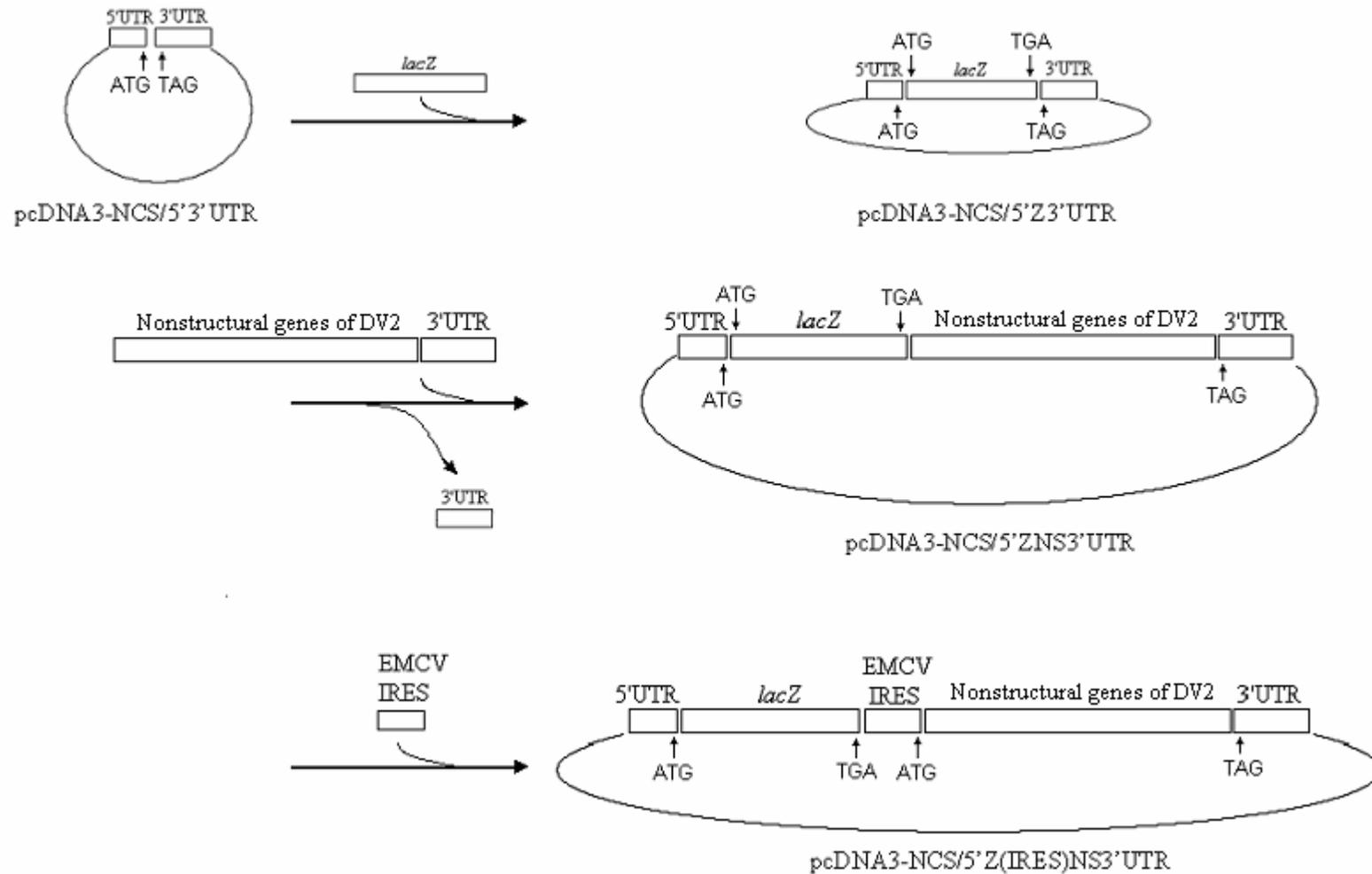
Sp: Spacer DNA

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

IRES: Internal ribosomal entry site

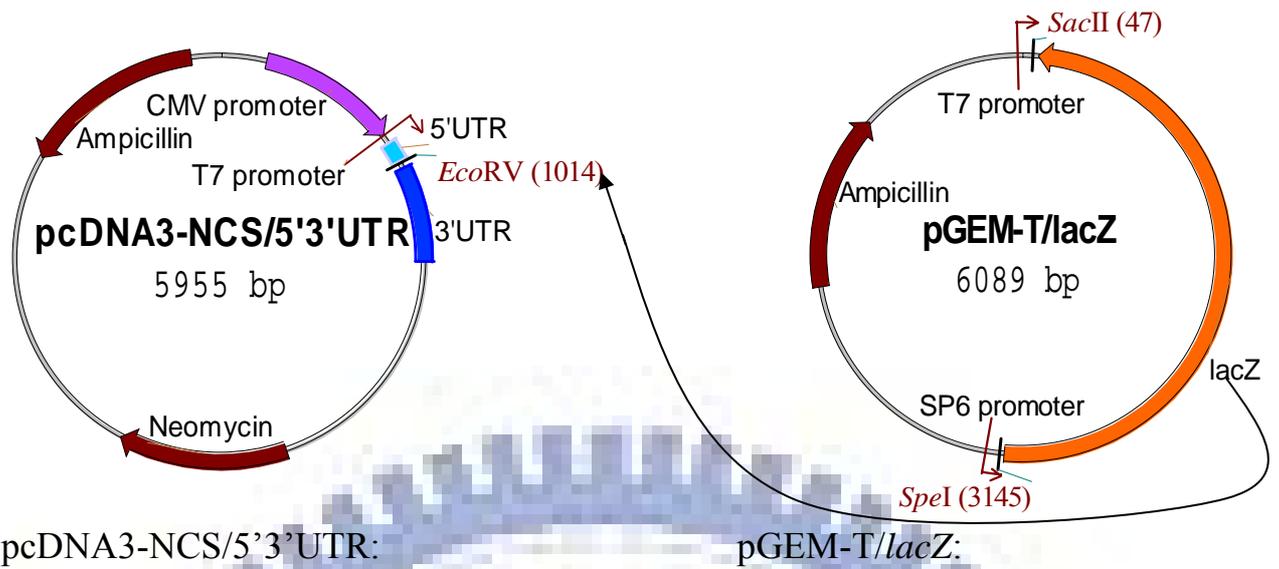
S: Structural genes of DV2 from P1

Z: lacZ(BAG) with Kozak sequence



圖十九、非結構性基因報導質體建構示意圖

5': 5'UTR
 EMCV: Encephalomyocarditis virus
 NCS: New cloning site
 Z: *lacZ* (BAG) with Kozak sequence
 DV2: Dengue virus 2 PL046 strain
 IRES: Internal ribosomal entry site
 NS: Nonstructural genes of DV2 from S

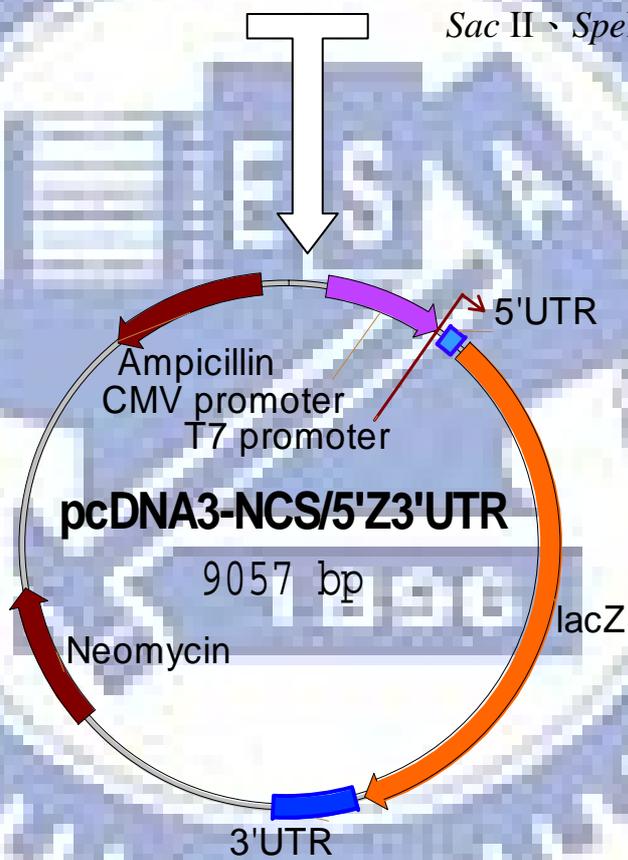


pcDNA3-NCS/5'3'UTR:

pGEM-T/*lacZ*:

EcoR V digestion

Sac II - *Spe* I digestion(Klenow)

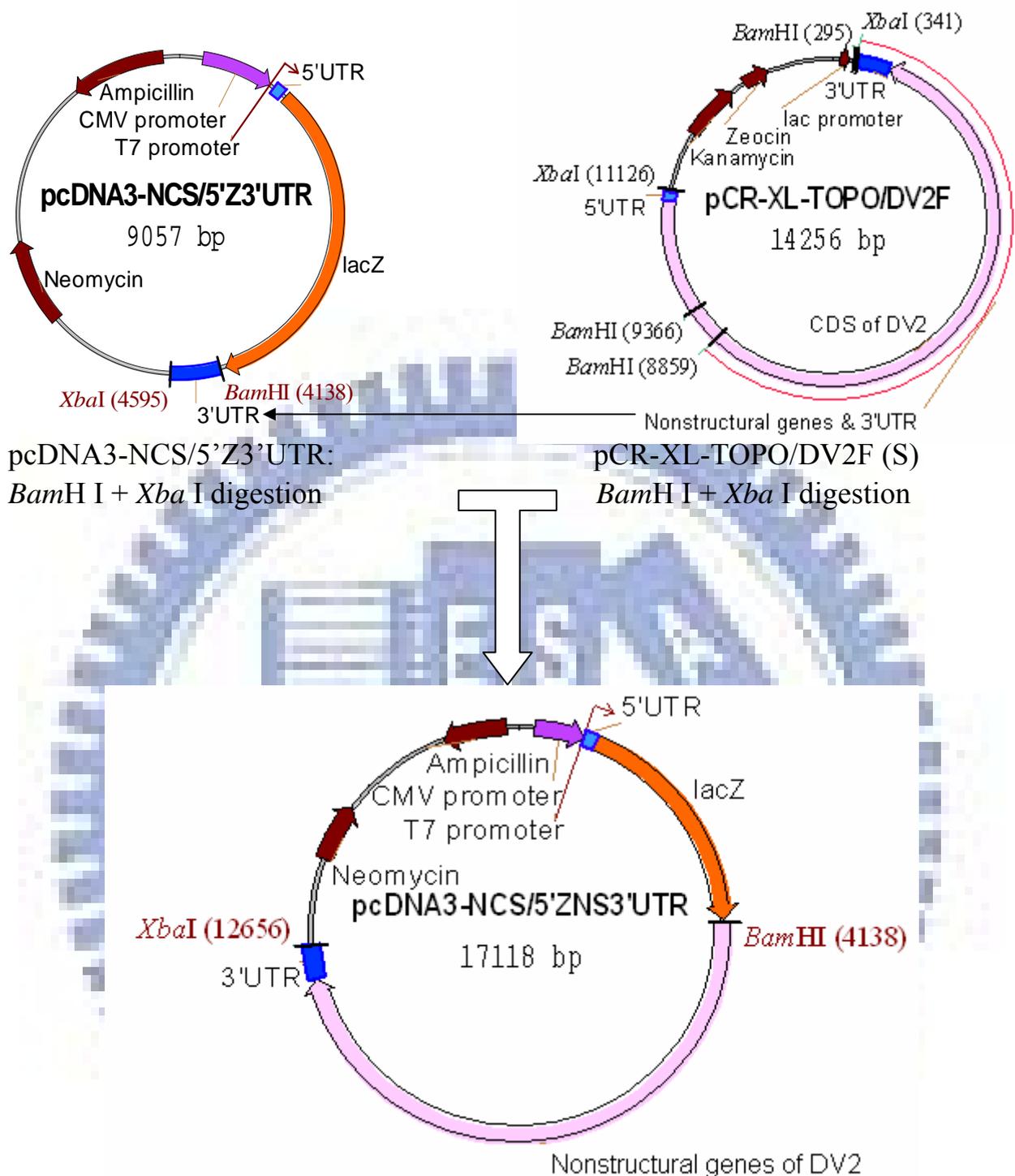


圖二十、Construction of pcDNA3.0-NCS/5'Z3'UTR

5': 5'UTR

NCS: New cloning site

Z: *lacZ* (BAG) with Kozak sequence



圖二十一、Construction of pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR

5': 5'UTR

DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

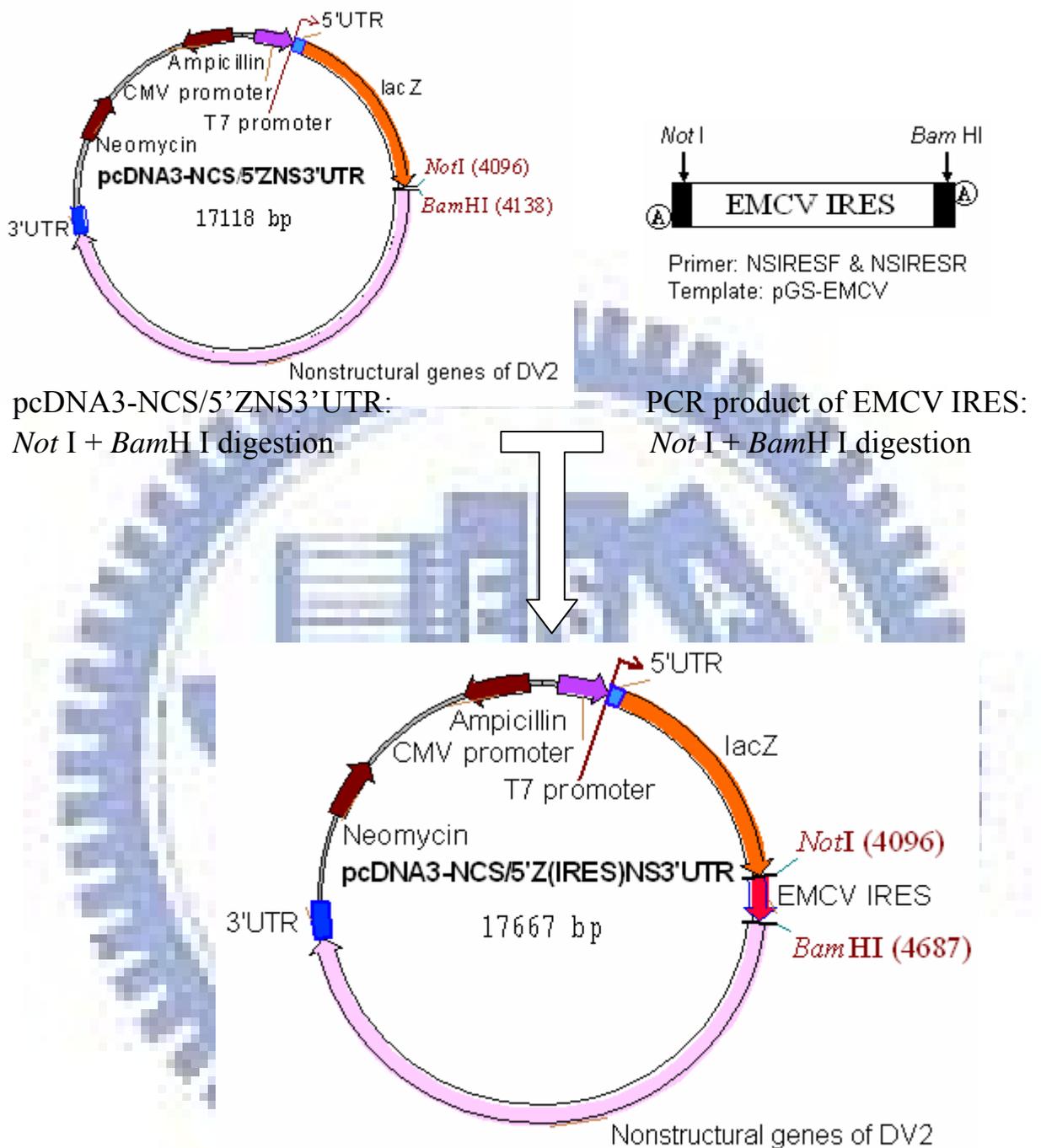
NCS: New cloning site

NS: Nonstructural genes of DV2 from S

CDS: Coding sequence

F: Full length cDNA

Z: *lacZ* (BAG) with Kozak sequence



圖二十二、Construction of pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR

5': 5'UTR

EMCV: Encephalomyocarditis virus

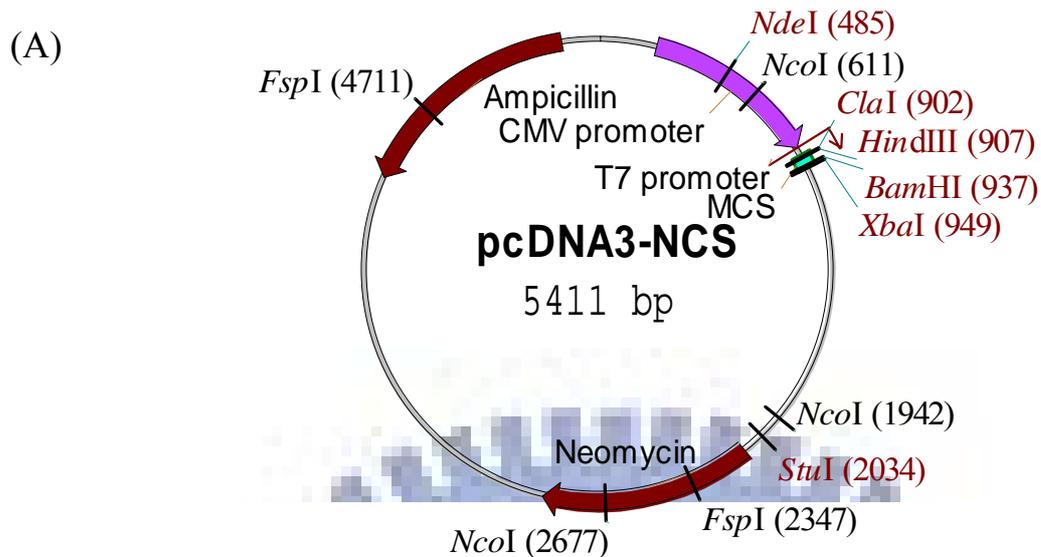
NCS: New cloning site

NS: Nonstructural genes of DV2 from S

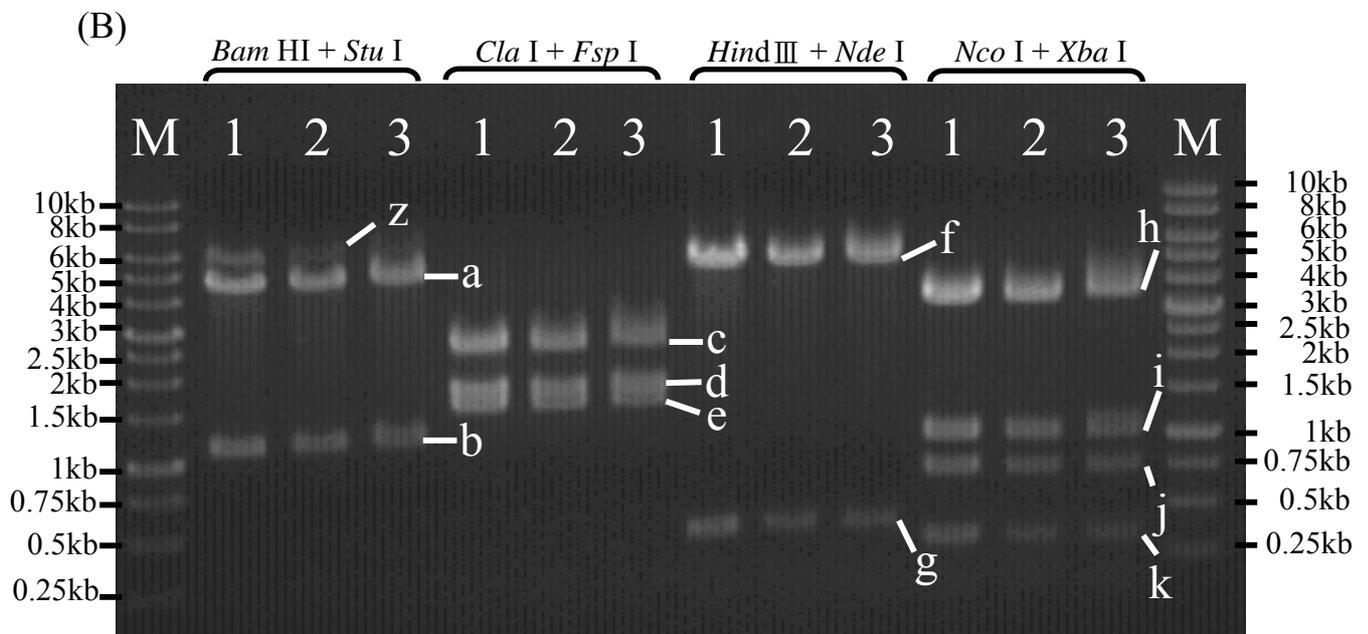
DV2: Dengue virus 2 PL046 strain

IRES: Internal ribosomal entry site

Z: *lacZ* (BAG) with Kozak sequence

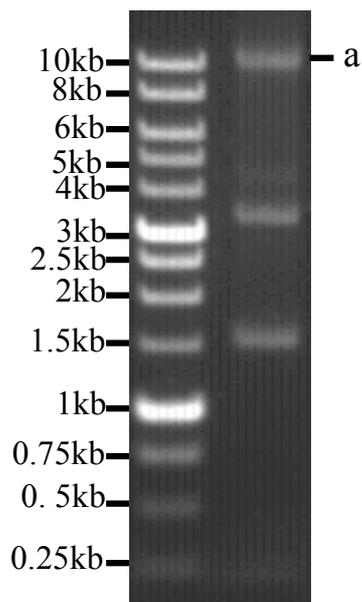


圖二十三(A)、pcDNA3-NCS 限制酵素作用位置圖



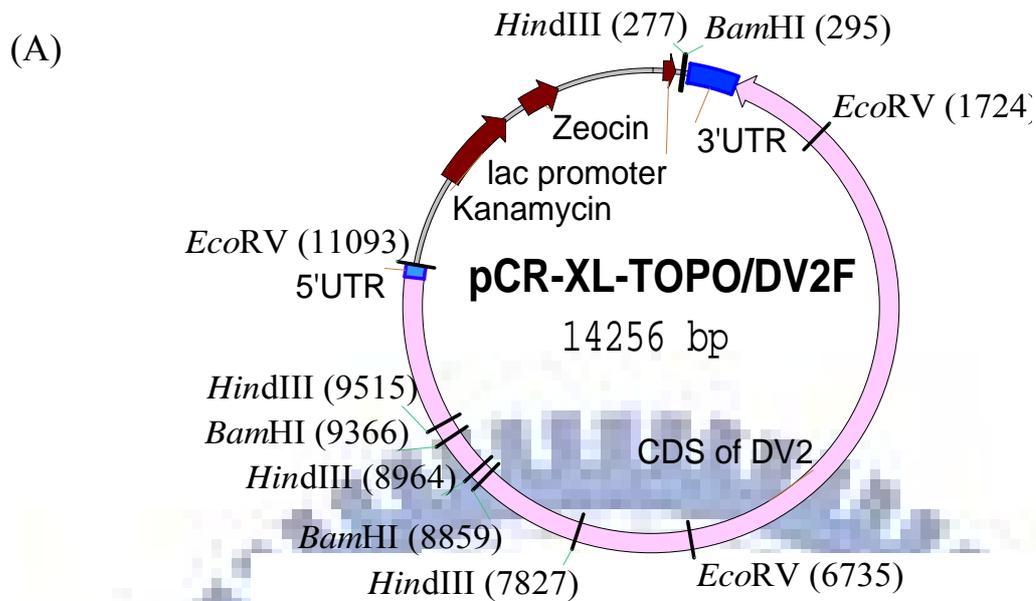
圖二十三(B)、pcDNA3-NCS 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS 經 *Bam*HI 及 *Stu*I 作用後，預期可以得到 4.3 及 1.1kb 之 DNA 片段 (band a & b)；經 *Cla*I 及 *Fsp*I 作用後，預期可得 2.4、1.6 及 1.4kb 之 DNA 片段 (band c, d & e)；經 *Hind*III 及 *Nde*I 作用後，預期可得 5.0 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band f & g)；經 *Nco*I 及 *Xba*I 作用後，預期可得 3.3、1.0、0.7 及 0.3kb 之 DNA 片段 (band h, i, j & k)。圖中所標示之 lane M 為 marker，lane 1, 2, 3 為質體建構所得到三個不同的 clone，band z 推測可能是酵素未作用完全所造成，其位置在 5 至 6kb 之間，與 pcDNA3-NCS 的長度相符。所用的限制酵素在圖上方，Marker band 的大小在兩側。

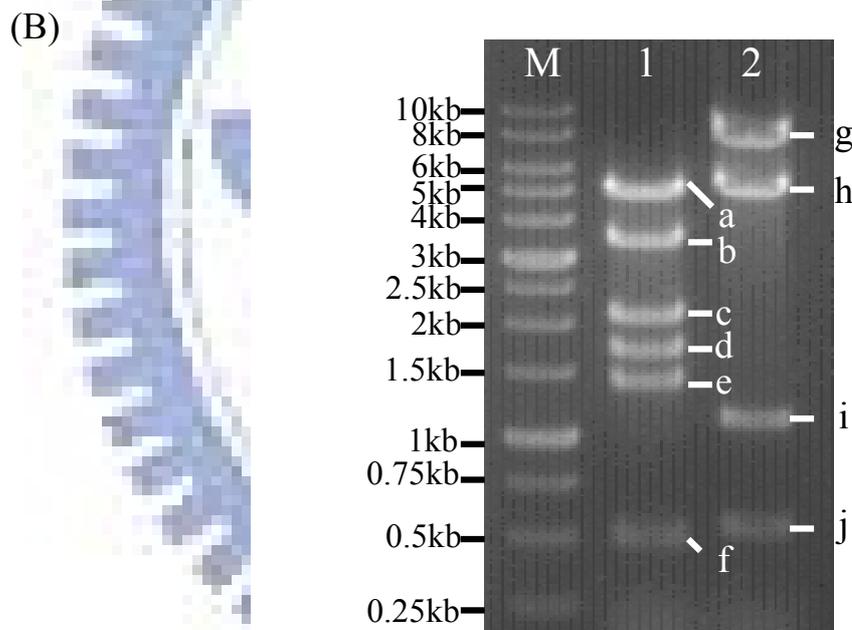


圖二十四、登革熱二型病毒 (PL046 strain) RT-PCR 產物之電泳分析圖

登革熱二型病毒 (NGC strain) RNA 全長為 10723bp。將登革熱二型病毒 PL046 strain 之 RNA 進行 RT-PCR 反應，所得到的產物進行電泳分析，預期所得到的產物應該在 10.7kb 位置。結果顯示，band a 可能是含有 PL046 strain 全長基因序列的 DNA 片段。

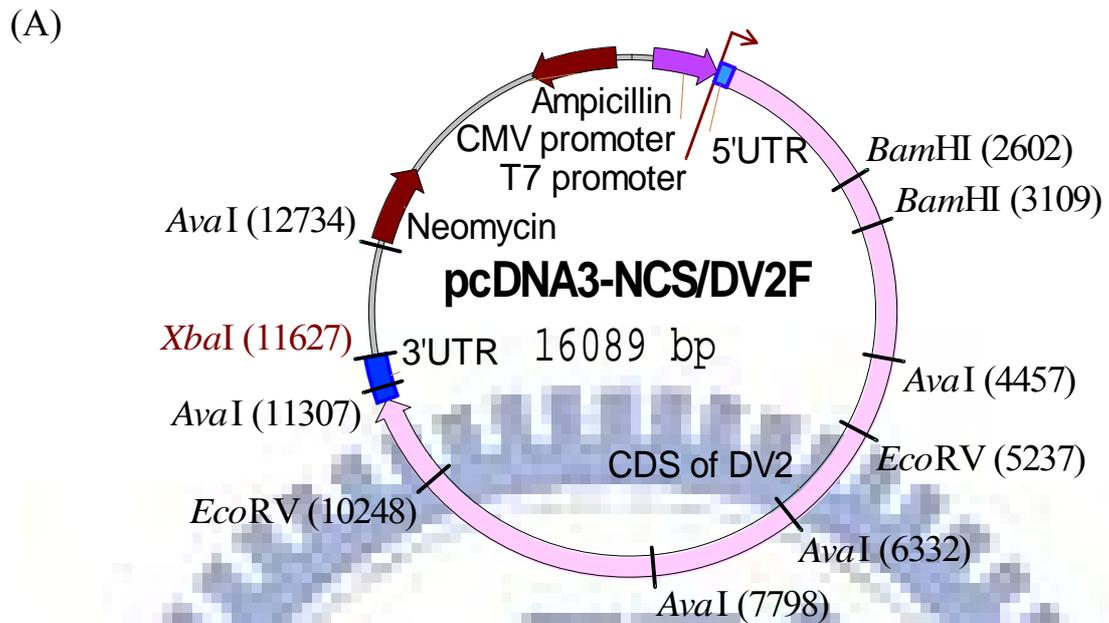


圖二十五(A)、pCR-XL-TOPO/DV2F 限制酵素作用位置圖

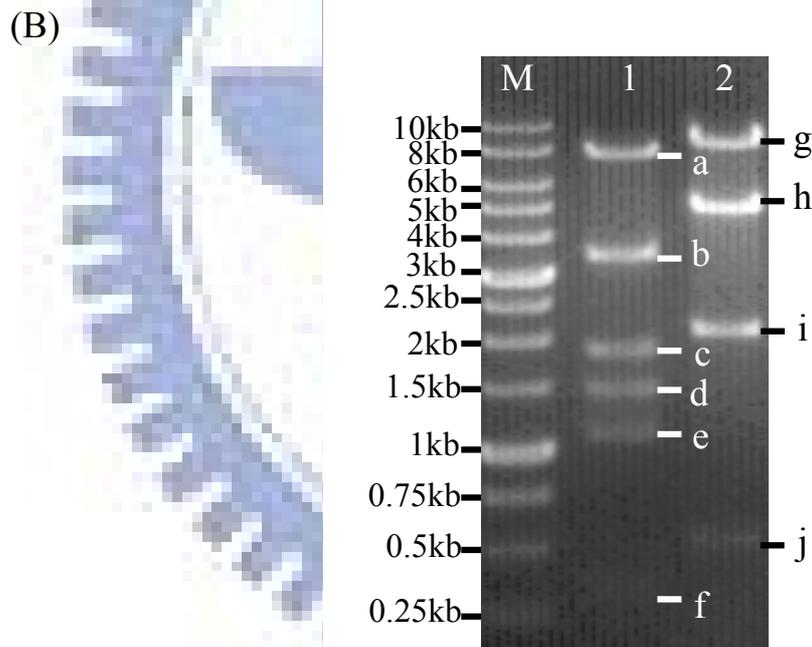


圖二十五(B)、pCR-XL-TOPO/DV2F clone P 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pCR-XL-TOPO/DV2F 經 *BamHI* 及 *EcoRV* 作用後，預期可以得到 5.0、3.5、2.1、1.7、1.4 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d, e & f)；經 *HindIII* 作用後，預期可得 7.5、5.0、1.1 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band g, h, i & j)。Lane 1 是質體經 *BamHI* 及 *EcoRV* 作用，lane 2 是質體經 *HindIII* 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

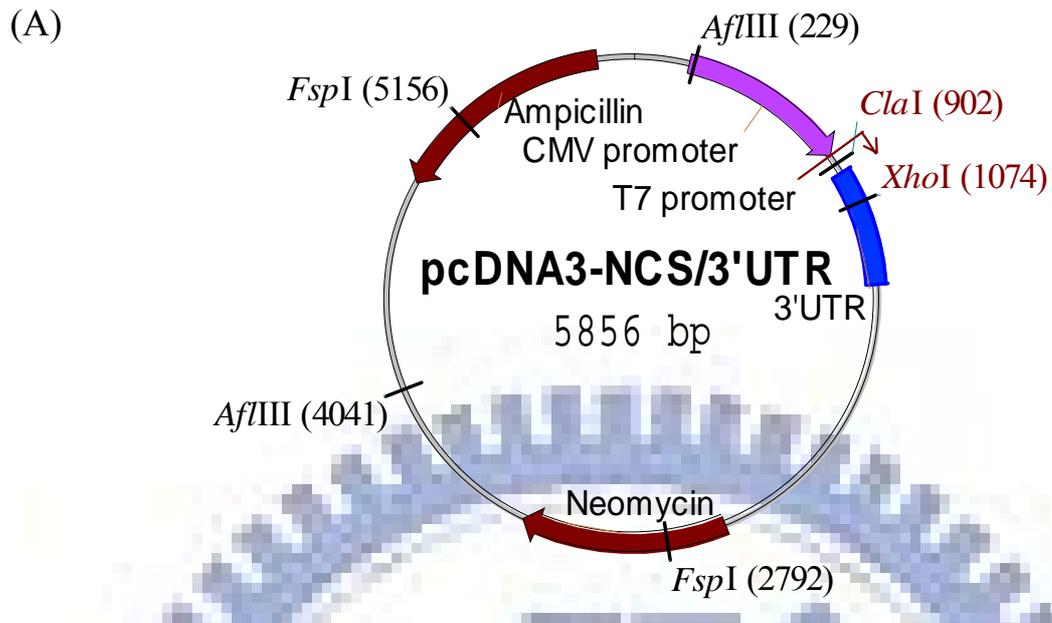


圖二十六(A)、pcDNA3-NCS/DV2F 限制酵素作用位置圖

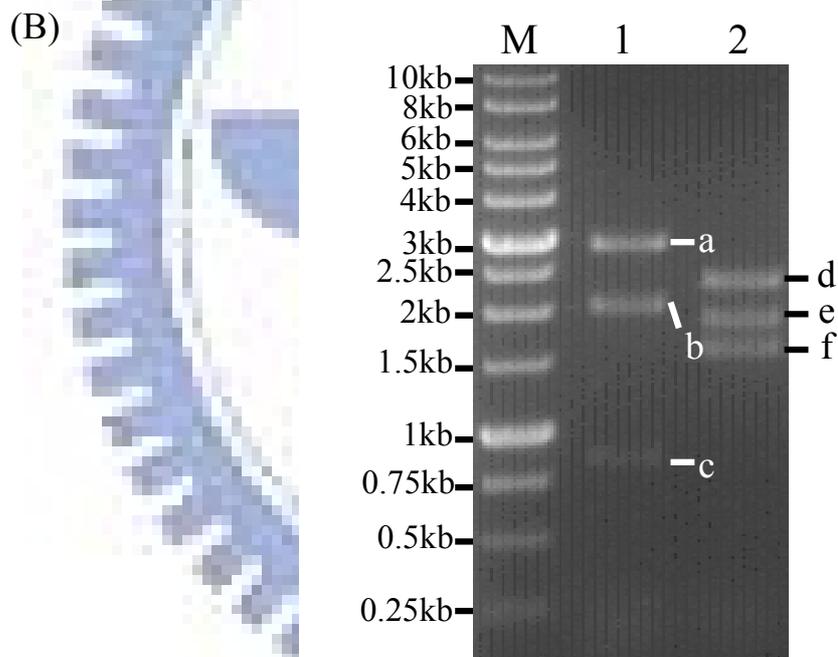


圖二十六(B)、pcDNA3-NCS/DV2F clone P1 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/DV2F 經 *Ava* I 及 *Xba* I 作用後，預期可以得到 7.8、3.5、1.9、1.5、1.1 及 0.3kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d, e & f)；經 *Bam*HI 及 *Eco*R V 作用後，預期可得 8.4、5.0、2.1 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band g, h, i & j)。Lane 1 是質體經 *Ava* I 及 *Xba* I 作用，lane 2 是經 *Bam*HI 及 *Eco*R V 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

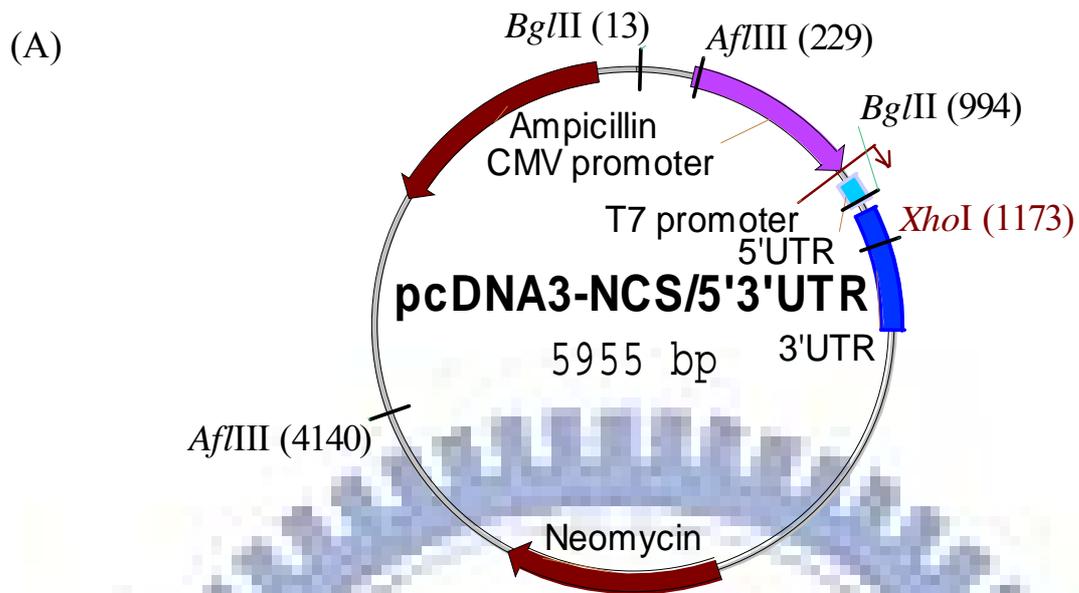


圖二十七(A)、pcDNA3-NCS/3'UTR 限制酵素作用位置圖

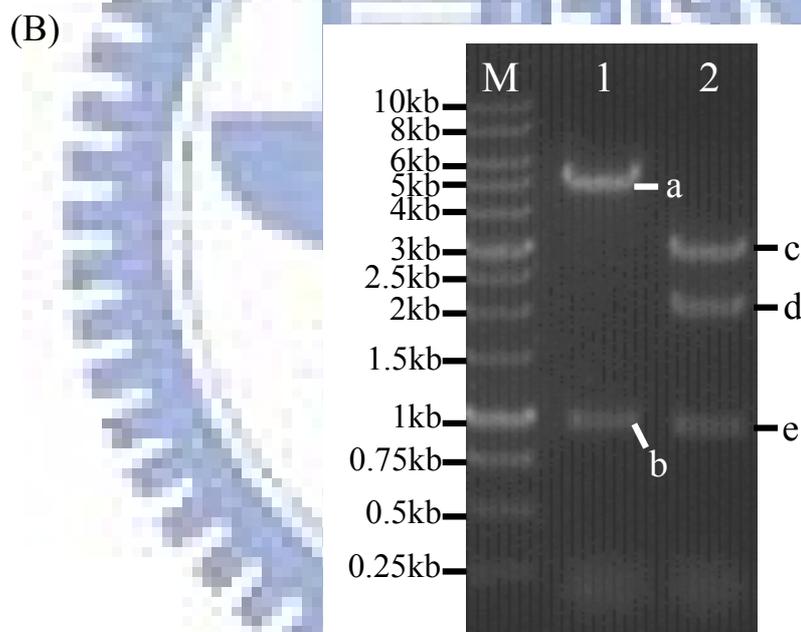


圖二十七(B)、pcDNA3-NCS/3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/3'UTR 經 *Afl*III 及 *Xho* I 作用後，預期可以得到 3.0、2.0 及 0.8kb 之 DNA 片段 (band a, b & c)；經 *Fsp* I 及 *Cla* I 作用後，預期可得 2.3、1.9 及 1.6kb 之 DNA 片段 (band d, e & f)。Lane 1 是質體經 *Afl*III 及 *Xho* I 作用，lane 2 是質體經 *Fsp* I 及 *Cla* I 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

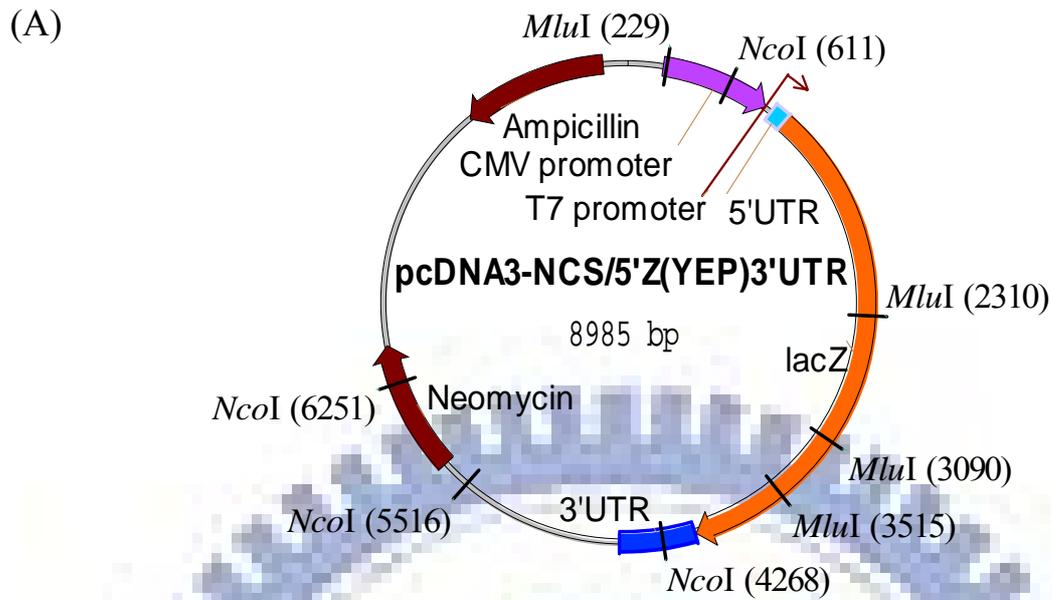


圖二十八(A)、pcDNA3-NCS/5'3'UTR 限制酵素作用位置圖

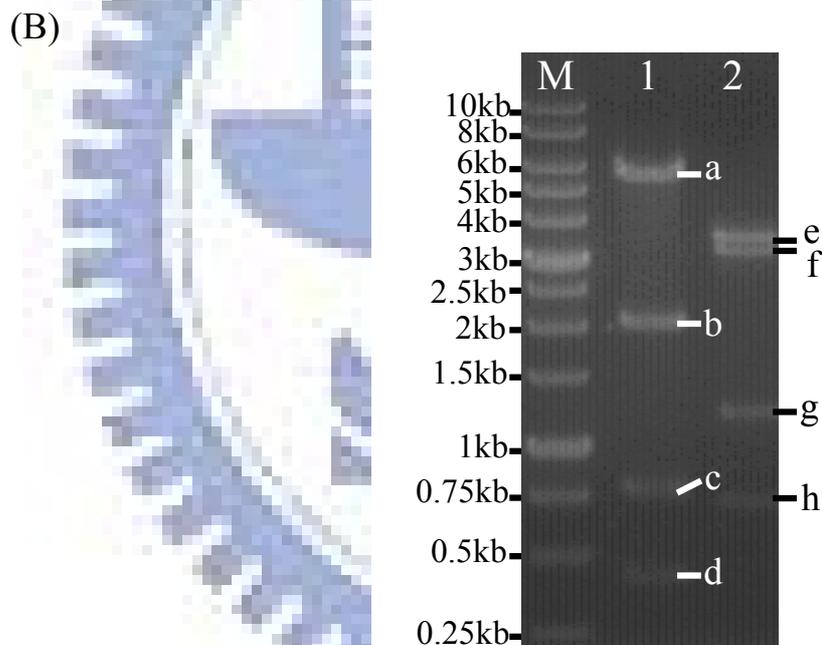


圖二十八(B)、pcDNA3-NCS/5'3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'3'UTR 經 *Bgl*II 作用後，預期可以得到 5.0 及 1.0kb 之 DNA 片段 (band a & b)；經 *Afl*III 及 *Xho*I 作用後，預期可得 3.0、2.0 及 0.9kb 之 DNA 片段 (band c, d & e)。Lane 1 是質體經 *Bgl*II 作用，lane 2 是質體經 *Afl*III 及 *Xho*I 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

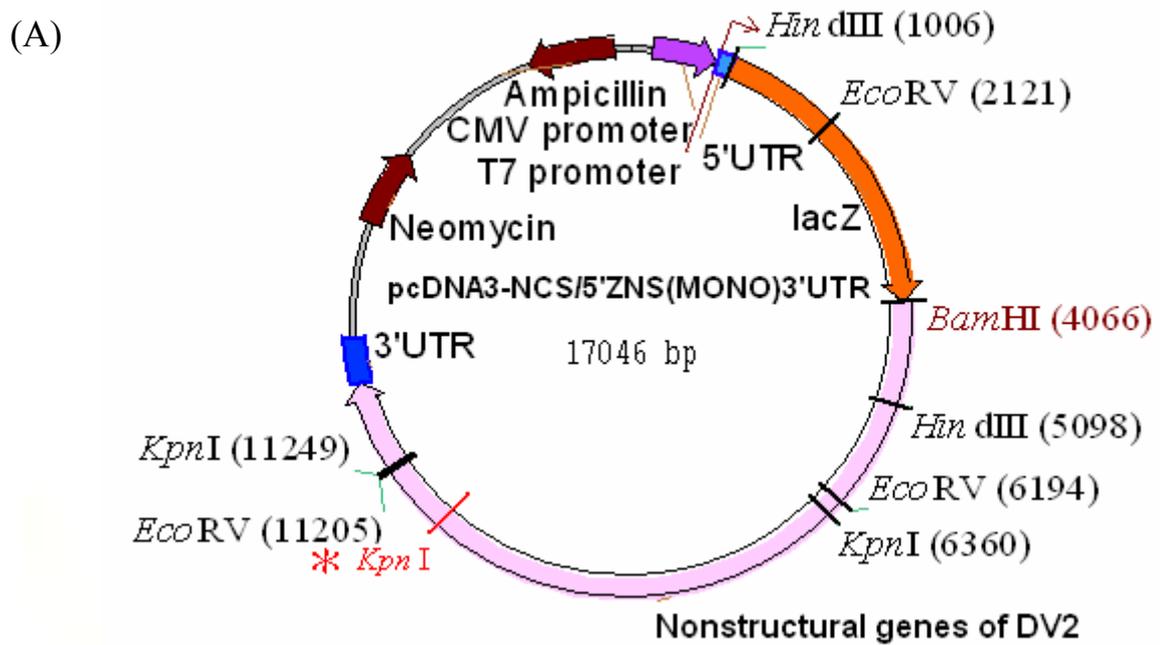


圖二十九(A)、pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 限制酵素作用位置圖

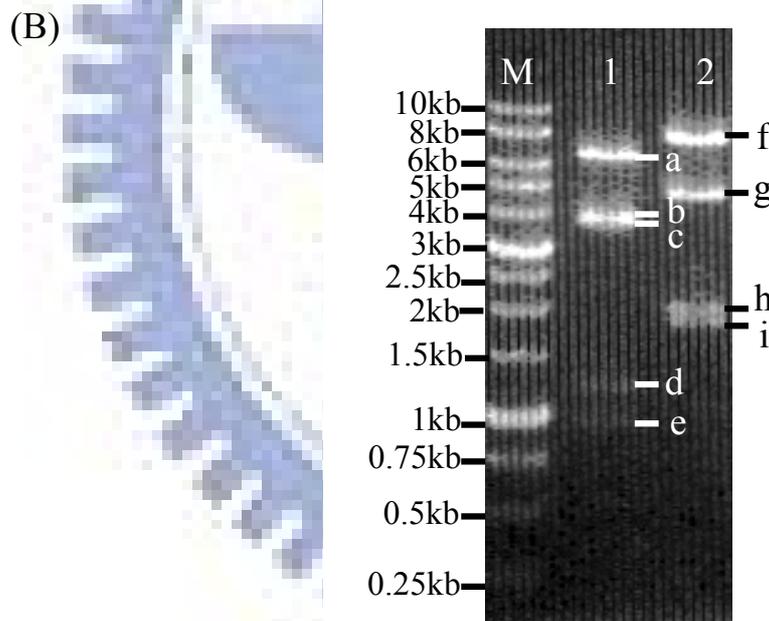


圖二十九(B)、pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 經 *Mlu* I 作用後，預期可以得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Nco* I 作用後，預期可得 3.7、3.3、1.2 及 0.7kb 之 DNA 片段 (band e, f, g & h)。Lane 1 是質體經 *Mlu* I 作用，lane 2 是質體經 *Nco* I 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

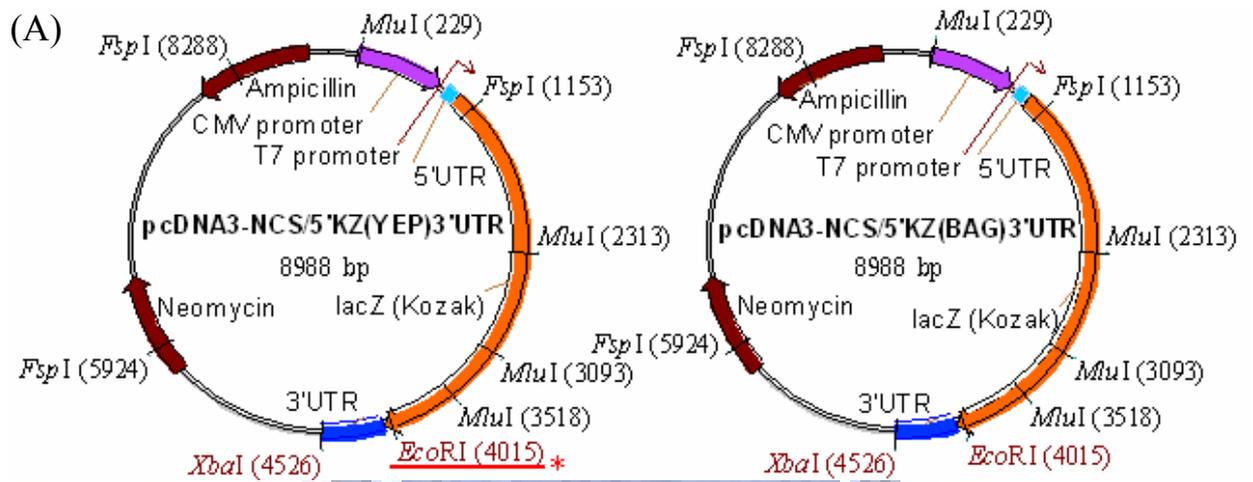


圖三十(A)、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 限制酵素作用位置圖
 *：登革熱病毒二型 PL046 strain 在距離 *Kpn* I (11249) 上游約 0.9kb 有一切位，限制酵素作用位置圖之序列來源則為 NGC strain。

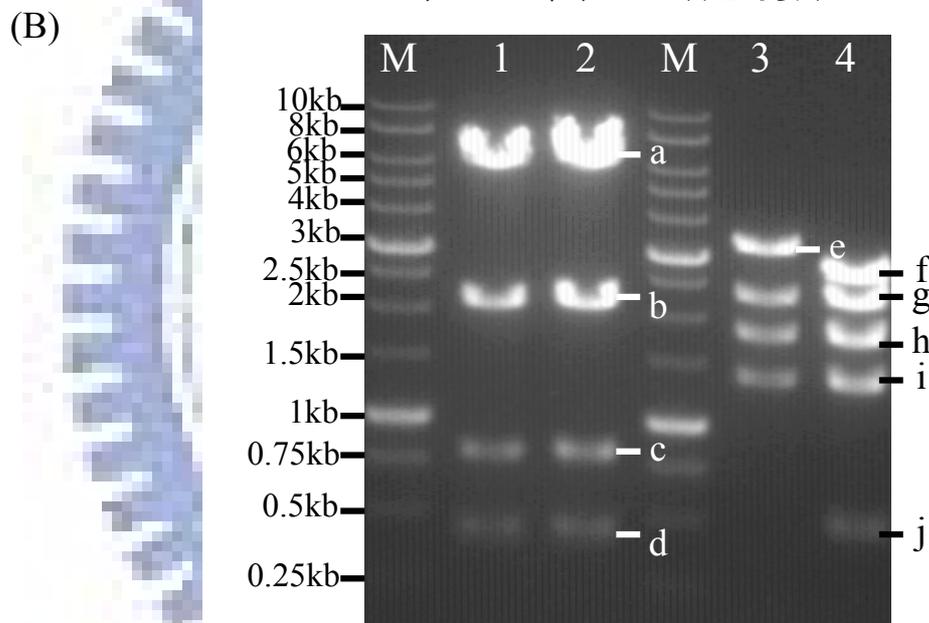


圖三十(B)、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 經 *Hind* III 及 *Kpn* I 作用後，預期可得 6.8、4.1、3.8、1.3 及 0.9 kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d & e)；經 *Bam* H I 及 *Eco* R V 作用後，預期可以得到 8.0、5.0、2.1 及 1.9kb 之 DNA 片段 (band f, g, h & i)。Lane 1 是質體經 *Hind* III 及 *Kpn* I 作用，lane 2 是質體經 *Bam* H I 及 *Eco* R V 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

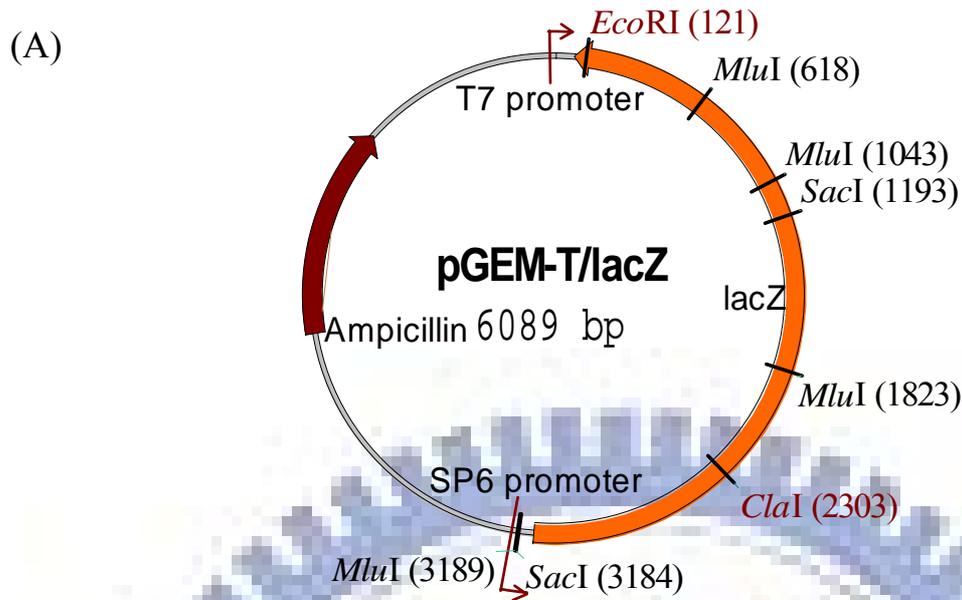


圖三十一(A)、pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 限制酵素作用位置圖
*：表示該酵素切位發生變異

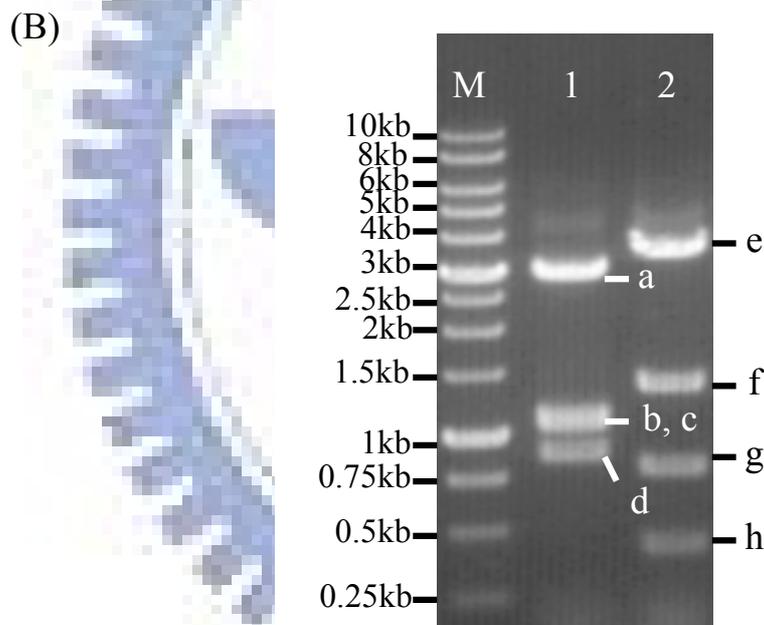


圖三十一(B)、pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 及 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

Lane 1 及 3 為 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 經酵素作用後的電泳分析圖，lane2 及 4 為 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 經酵素作用後的電泳分析圖。Lane 1 及 2 為質體經 *Mlu* I 作用後的結果，預期可以得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；lane 3 及 4 為質體經 *Fsp* I, *Xba* I, 及 *Eco*R I 作用後的電泳分析圖，質體經酵素作用後，預期可得 2.8、2.3、1.8、1.3 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band f, g, h, i & j)。Lane M 表示 maker。pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR 的 *Eco*R I 切位突變，在 lane 3 產生了 3.3、2.3、1.8 及 1.3kb 的 DNA 片段 (band e, g, h, & i)。

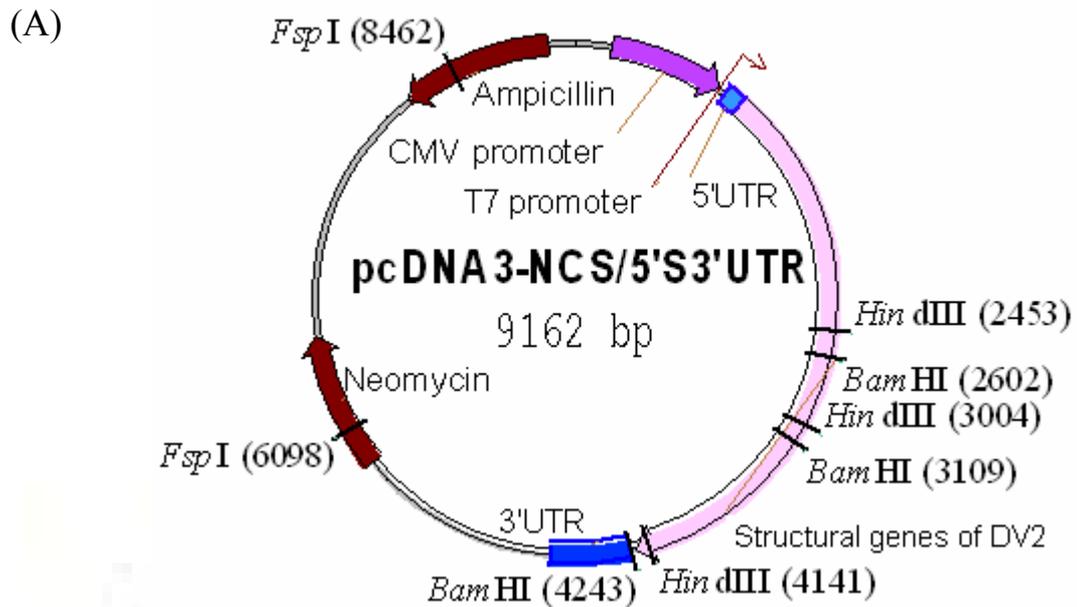


圖三十二(A)、pGEM-T/lacZ 限制酵素作用位置圖

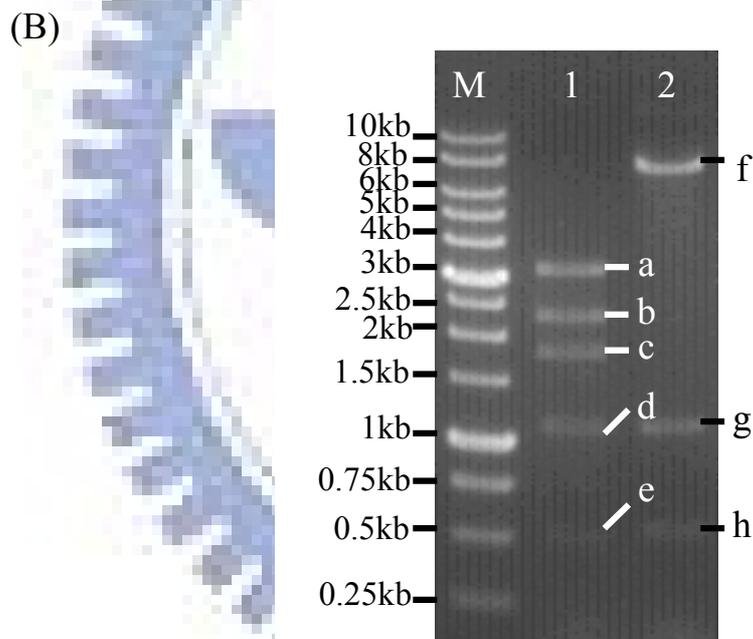


圖三十二(B)、pGEM-T/lacZ 經限制酵素作用後，所得之電泳分析圖

pGEM-T/lacZ 經 *Cla* I、*Sac* I 及 *Eco*R I 作用後，預期可以得到 3.0、1.1、1.1 及 0.8kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Mlu* I 作用後，預期可以得到 3.5、1.3、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band e, f, g & h)。Lane 1 是質體經 *Cla* I、*Sac* I 及 *Eco*R I 作用，lane 2 是質體經 *Mlu* I 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

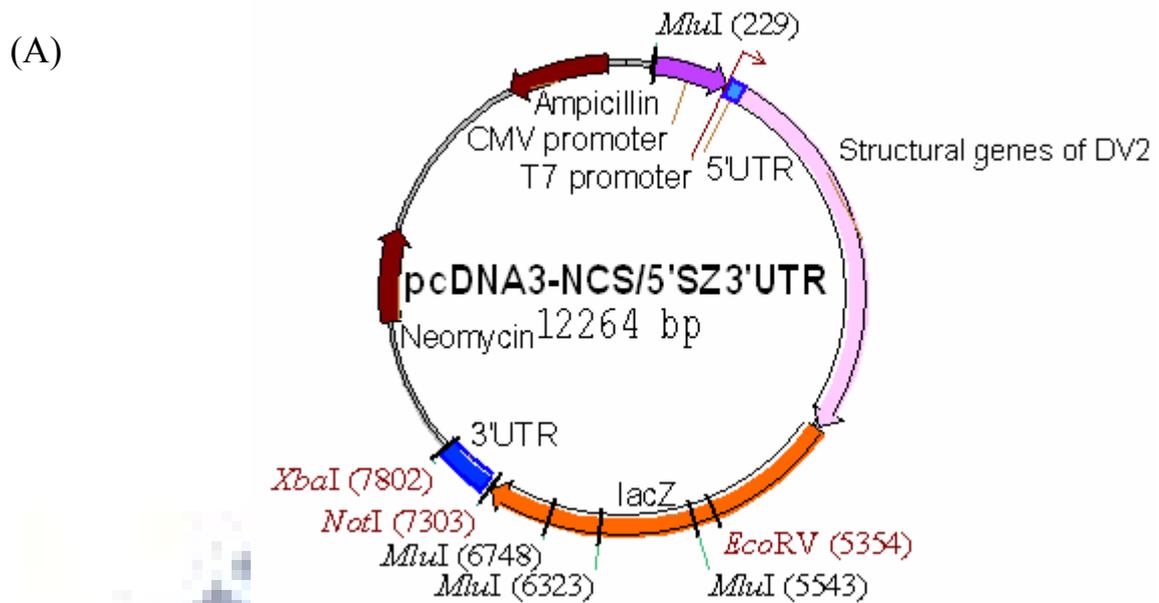


圖三十三(A)、pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 限制酵素作用位置圖

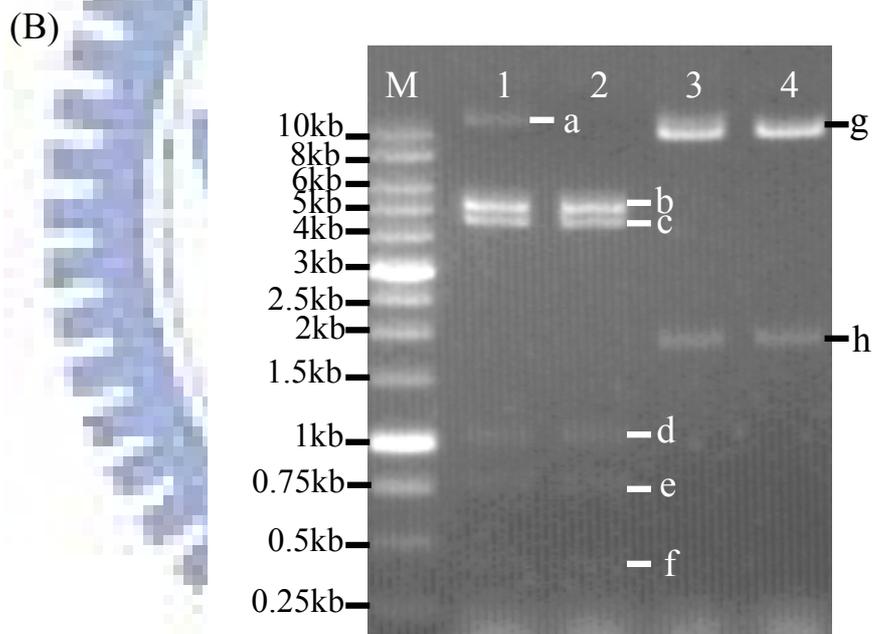


圖三十三(B)、pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'S3'UTR 經 *Fsp* I 及 *Bam* HI 作用後，預期可以得到 3.3、2.3、1.8、1.1 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d & e)；經 *Hind* III 作用後，預期可以得到 7.4、1.1 及 0.6kb 之 DNA 片段 (band f, g & h)。Lane 1 是質體經 *Fsp* I 及 *Bam* HI 作用，lane 2 是質體經 *Hind* III 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

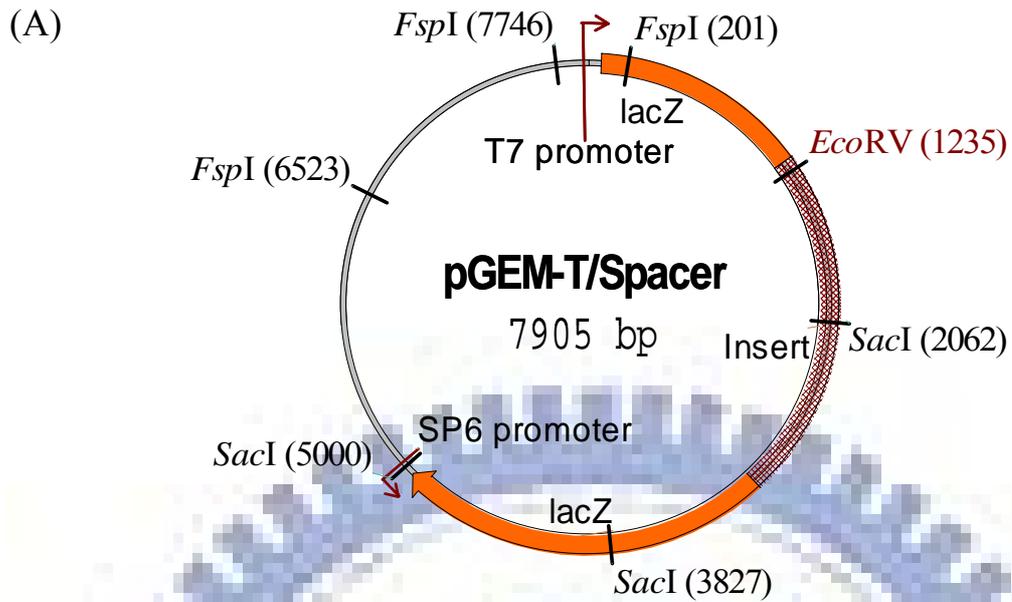


圖三十四(A)、pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR 限制酵素作用位置圖

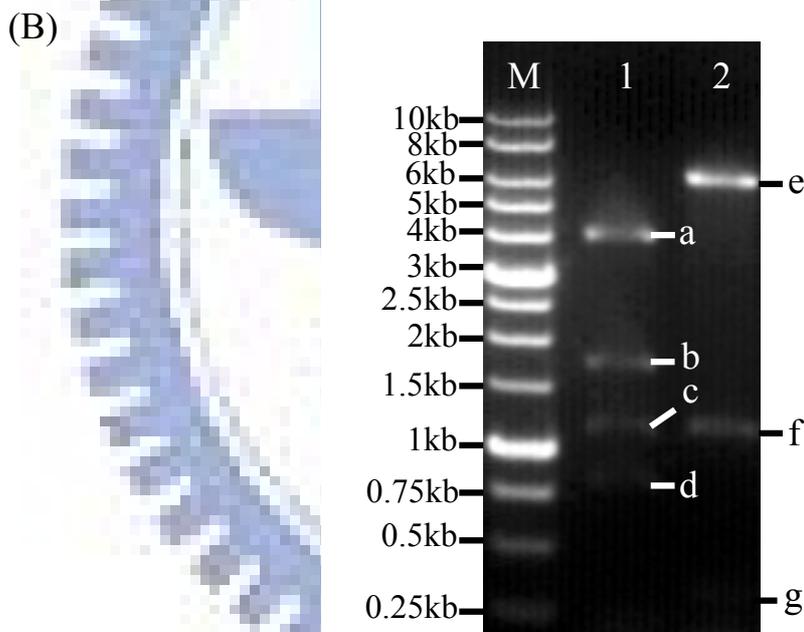


圖三十四(B)、pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'SZ3'UTR 經 *Mlu* I 及 *Xba* I 作用後，預期可以得到 5.3、4.7、1.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band b, c, d, e & f)；經 *Eco* RV 及 *Not* I 作用後，預期可以得到 10 及 2kb 之 DNA 片段 (band g & h)。Lane 1 & 2 是質體經 *Mlu* I 及 *Xba* I 作用，lane 3 & 4 是質體經 *Eco* RV 及 *Not* I 作用後所得之電泳分析圖；lane M 表示 maker。Band a 可能是質體萃取過程殘留的 genomic DNA。

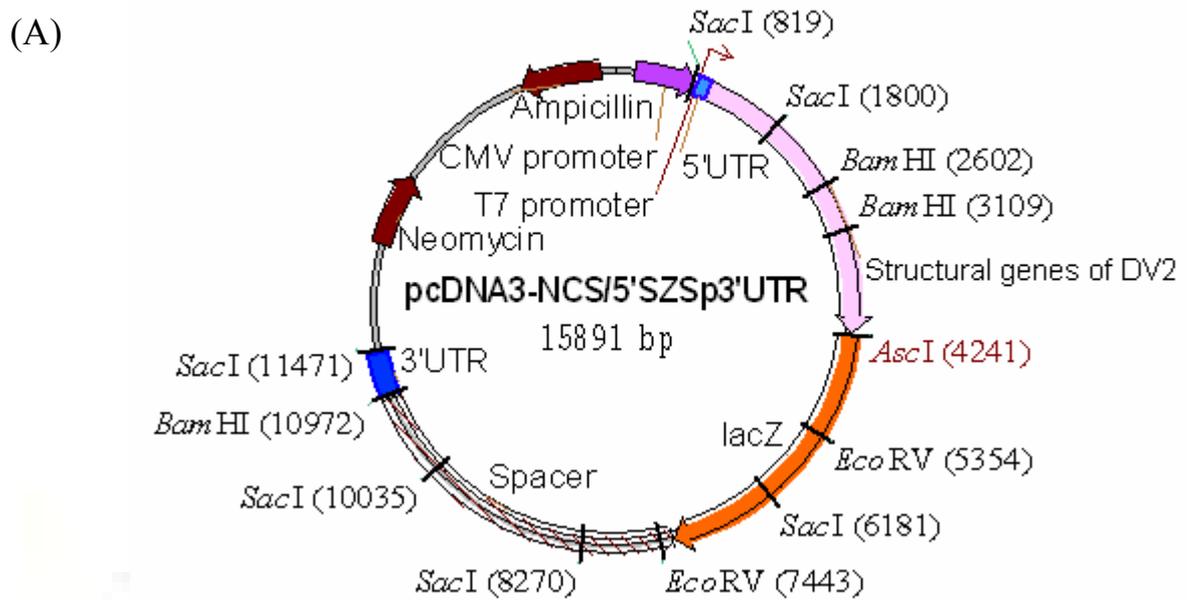


圖三十五(A)、pGEM-T/Spacer 限制酵素作用位置圖

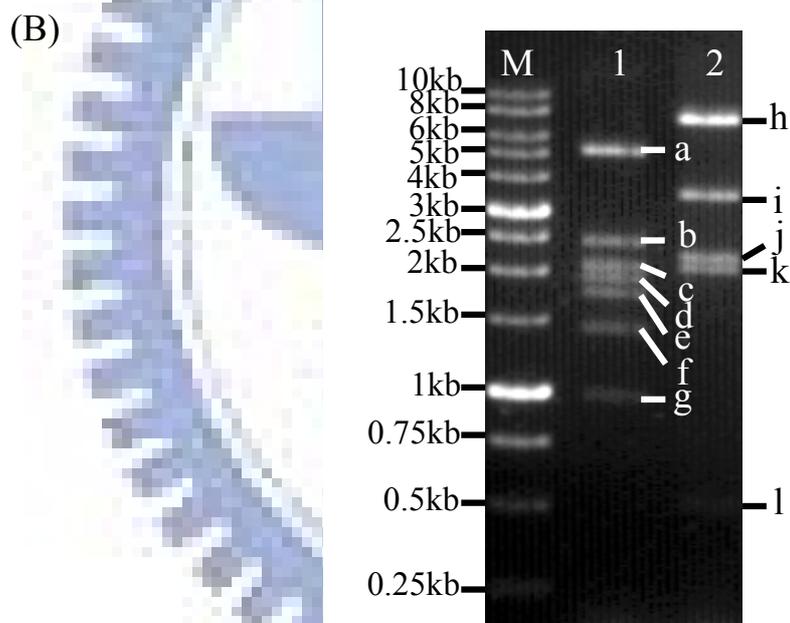


圖三十五(B)、pGEM-T/Spacer 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pGEM-T/Spacer 經 *Sac* I 及 *Eco*RV 作用後，預期可以得到 4.1、1.8、1.2 及 0.8kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Fsp* I 作用後，預期可以得到 6.3、1.2 及 0.3kb 之 DNA 片段 (band e, f & g)。Lane 1 是質體經 *Sac* I 及 *Eco*RV 作用，lane 2 是質體經 *Fsp* I 作用後所得之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

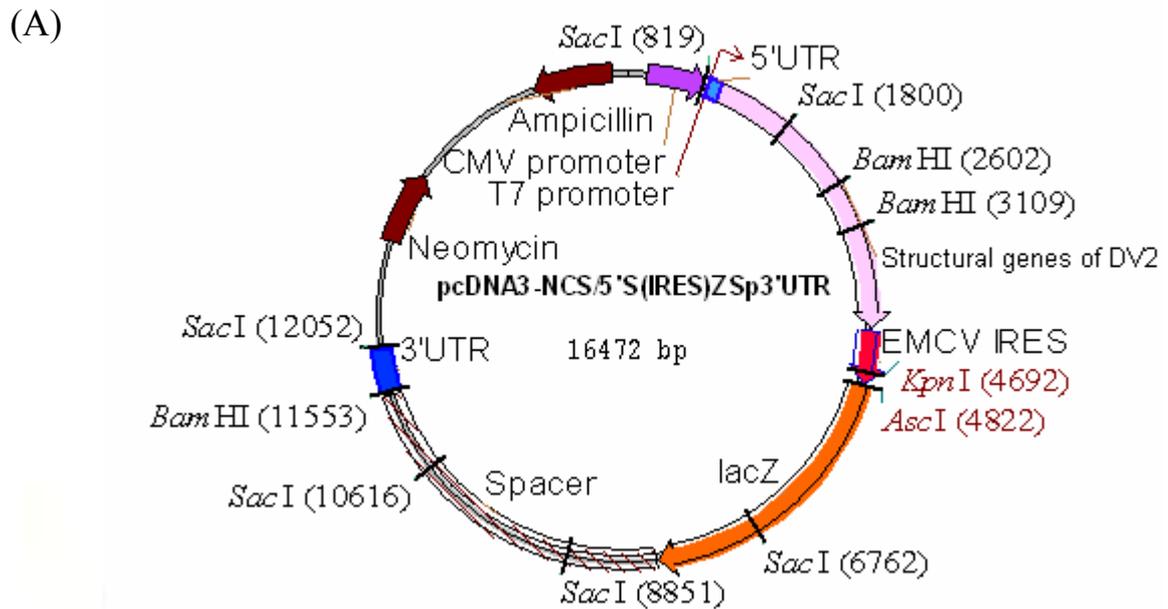


圖三十六(A)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 限制酵素作用位置圖

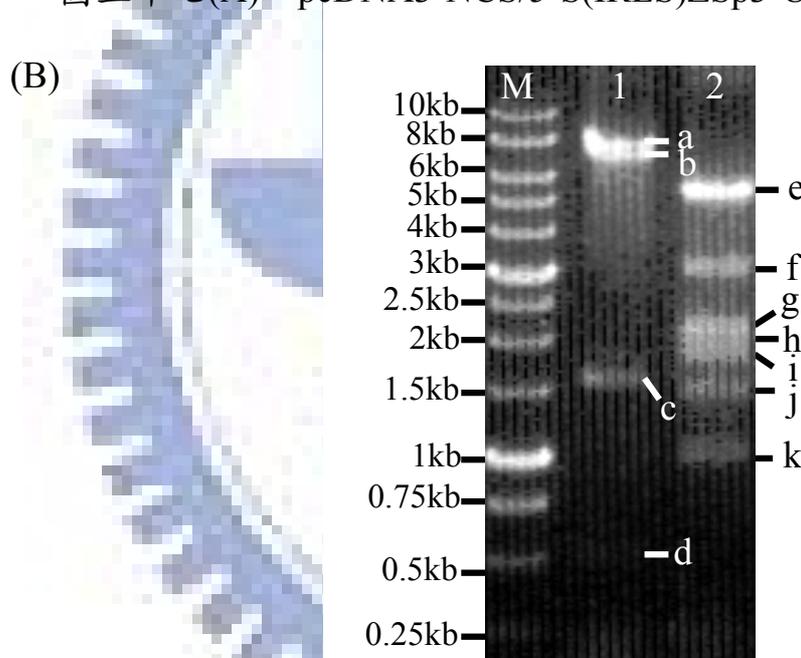


圖三十六(B)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用後，預期可以得到 5.2、2.4、2.1、1.9、1.7、1.4 及 1.0kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d, e, f & g)；經 *Bam* H I 及 *Eco* R V 作用後，預期可以得到 7.5、3.5、2.2、2.0 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band h, i, j, k & l)。Lane 1 是質體經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用，lane 2 是質體經 *Bam* H I 及 *Eco* R V 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。

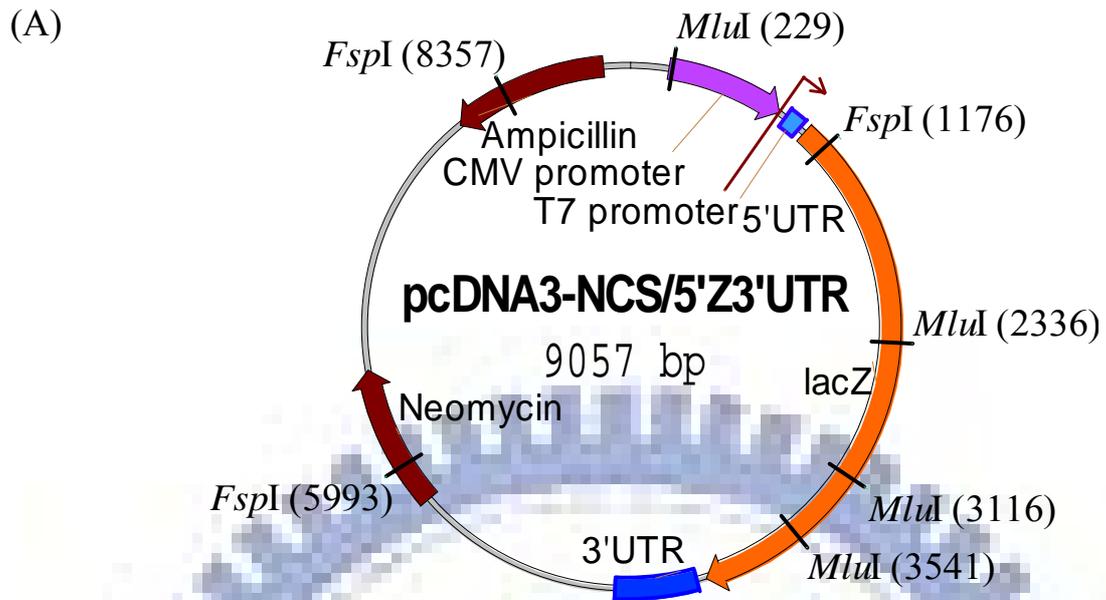


圖三十七(A)、pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR 限制酵素作用位置圖

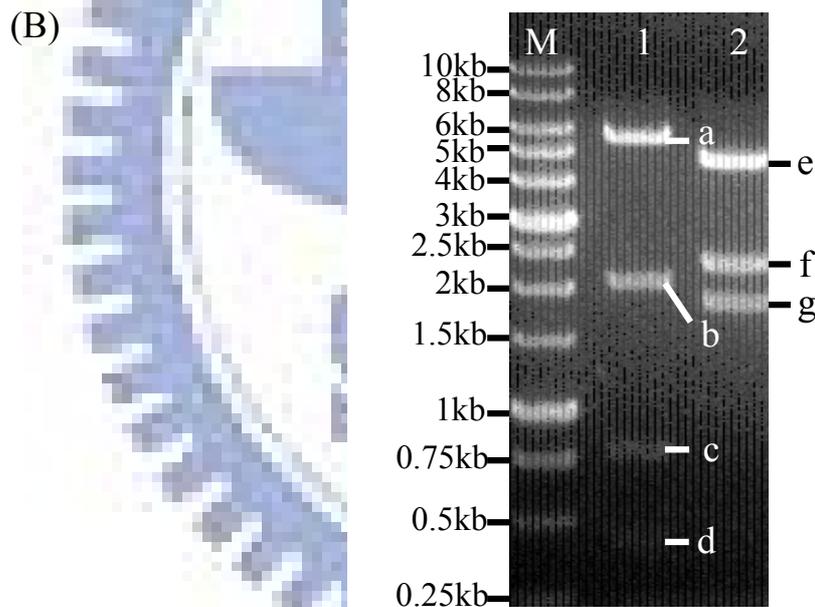


圖三十七(B)、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR 經 *Bam*H I 及 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 7.5、6.9、1.6 及 0.5kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, & d)；經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用後，預期可以得到 5.2、3.0、2.1、1.9、1.8、1.4 及 1.0kb 之 DNA 片段 (band e, f, g, h, i, j & k)。Lane 1 是質體經 *Bam*H I 及 *Kpn* I 作用，lane 2 是質體經 *Asc* I 及 *Sac* I 作用後所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。



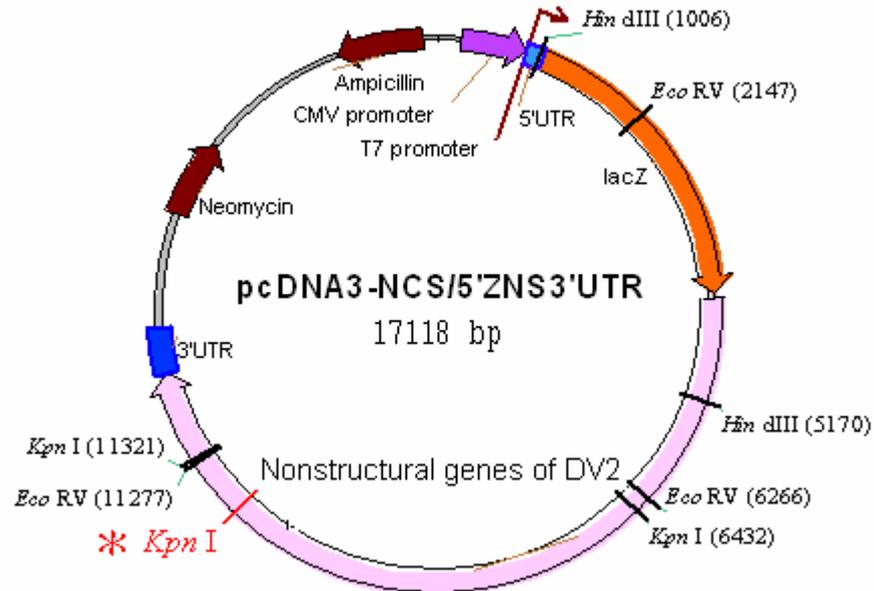
圖三十八(A)、pcDNA3-NCS/5'Z3'UTR 限制酵素作用位置圖



圖三十八(A)、pcDNA3-NCS/5'Z3'UTR 經限制酵素作用，所得之電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR 經 *Mlu* I 作用後，預期可以得到 5.7、2.1、0.8 及 0.4kb 之 DNA 片段 (band a, b, c & d)；經 *Fsp* I 作用後，預期可得 4.8、2.4 及 1.9kb 之 DNA 片段 (band e, f & g)。Lane 1 是質體經 *Mlu* I 作用，lane 2 是質體經 *Fsp* I 作用後所得到之電泳分析圖；Lane M 表示 maker。

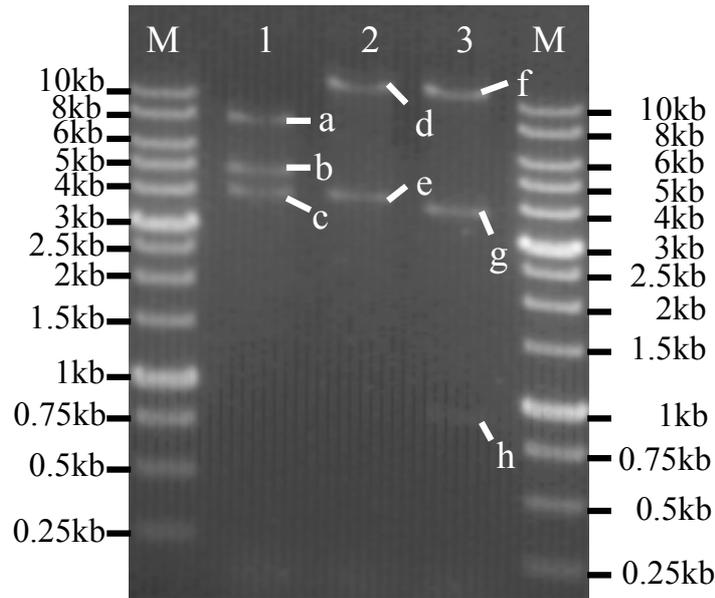
(A)



圖三十九(A)、pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR 限制酵素作用位置圖

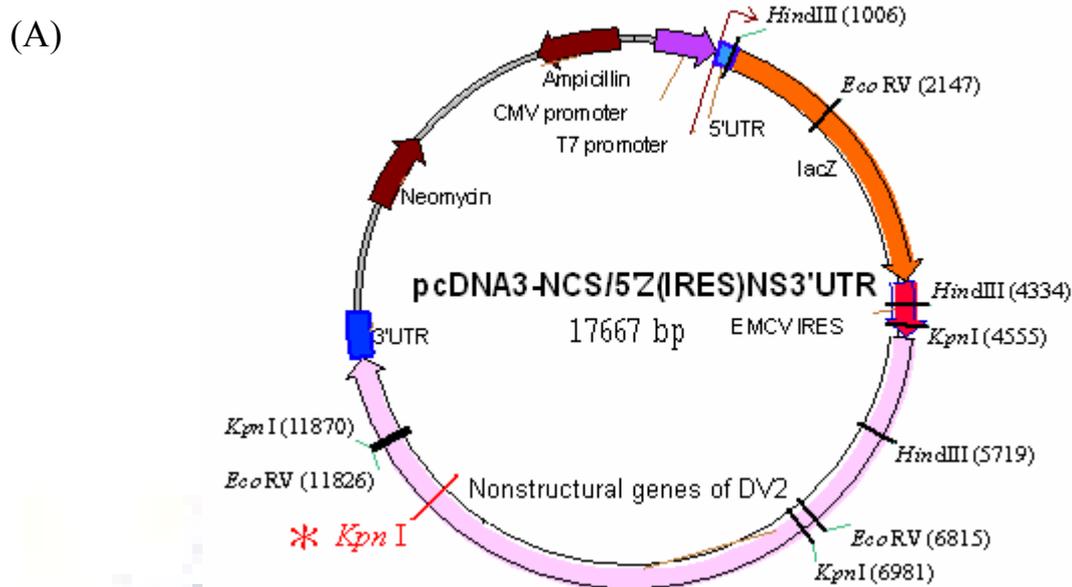
*：登革熱病毒二型 PL046 strain 在距離 *Kpn* I (11321) 上游約 0.9kb 有一切位，限制酵素作用位置圖之序列來源則為 NGC strain。

(B)



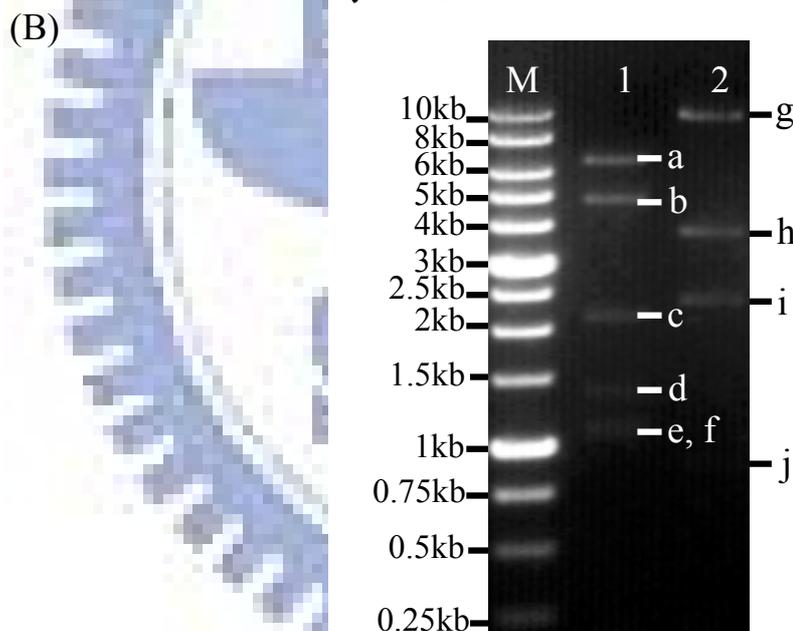
圖三十九(B)、pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR 經限制酵素作用，所得電泳分析圖

pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR 經 *EcoRV* 作用後，預期可以得到 8.0、5.0 及 4.1kb 之 DNA 片段 (band a, b & c)；經 *Hind* III 作用後，預期可以得到 13.0 及 4.1kb 之 DNA 片段 (band d & e)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 12.2、3.9 及 0.9kb 之 DNA 片段 (band f, g & h)。Lane 1 是質體經 *EcoRV* 作用，lane 2 是質體經 *Hind* III 作用，lane 3 是質體經 *Kpn* I 作用所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。



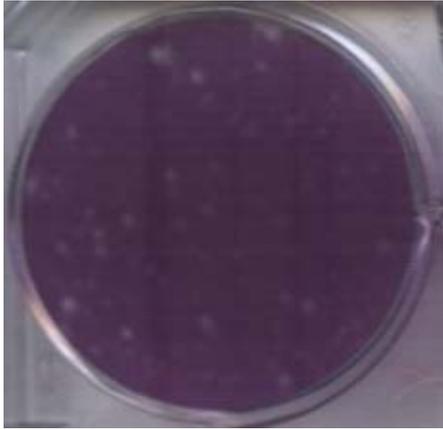
圖四十(A)、pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 限制酵素作用位置圖

*：登革熱病毒二型 PL046 strain 在距離 *Kpn* I (11870) 上游約 0.9kb 有一切位，限制酵素作用位置圖之序列來源則為 NGC strain。

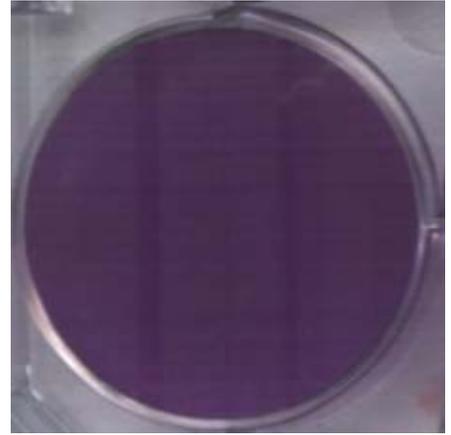


圖四十(B)、pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 經限制酵素作用後，所得電泳分析圖

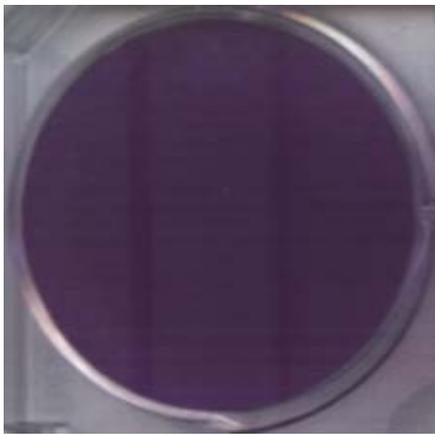
pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR 經 *Eco*RV 及 *Hind*III 作用後，預期可以得到 6.8、5.0、2.2、1.4、1.1 及 1.1kb 之 DNA 片段 (band a, b, c, d, e & f)；經 *Kpn* I 作用後，預期可以得到 10.3、3.9、2.4 及 0.9kb 之 DNA 片段 (band g, h, i & j)。Lane 1 是質體經 *Eco*RV 及 *Hind*III 作用，lane 2 是質體經 *Kpn* I 作用所得到之電泳分析圖；lane M 表示 maker。



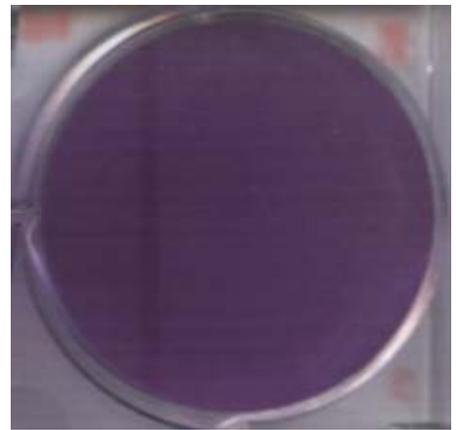
Dengue virus infection



P1-被轉染的細胞



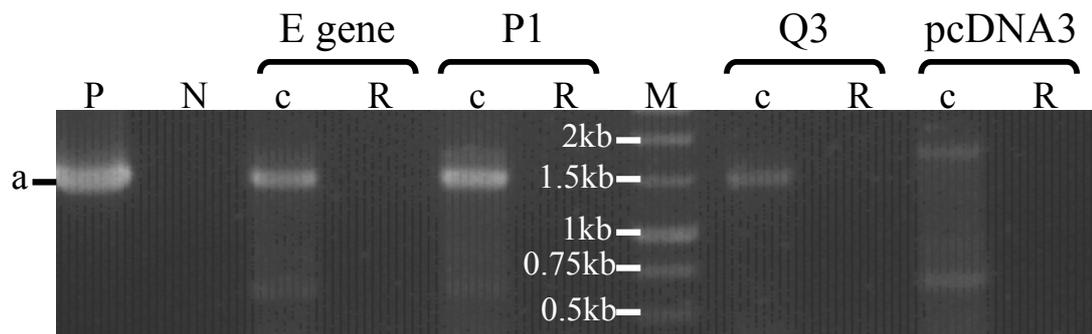
pcDNA3



被P1轉染細胞的上清液再感染的細胞

圖四十一、登革熱二型病毒感染性質體 pcDNA3-NCS/DV2F clone P1 的表現

將 pcDNA3-NCS/DV2F 轉染至 BHK-21 細胞中 48 小時後，將上清液經 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾器過濾後，再行感染新的 BHK-21 細胞，進行空斑測試。另外，被轉染的細胞也直接進行空斑測試，以了解是否有具感染性的病毒生成。控制組 Dengue virus infection，是直接以病毒感染後，進行空斑測試的結果。控制組 pcDNA3，則是將 pcDNA3 轉染至 BHK-21 細胞 48 小時後，進行空斑測試所得結果。結果顯示，以病毒直接感染 BHK-21 細胞後可以看到明顯的空斑生成，而在實驗組則不見任何的空斑生成。



圖四十二、將不同的質體，轉染至 BHK-21 細胞內 48 小時後，抽取細胞 RNA，進行 PCR 或 RT-PCR 結果。

E gene 的長度約 1.5kb，可以在 E gene、P1、Q3 組中，以 cDNA 當模板的 PCR 反應見到 1.5kb 的 band (band a)。即可證明，細胞有對轉染進細胞中的質體進行基因轉錄，產生 RNA。

電泳圖上方標示為進行 PCR 反應時所用的模板：

c：cDNA，表示以 RT 所得到 cDNA 當模板，進行 PCR 反應。

R：RNA，表示以 RNA 當模板，進行 PCR 反應。

P：plasmid，PCR 反應的 positive control；以含有 E gene 的質體當模板，進行 PCR 反應。

N：無模板，PCR 反應的 negative control；未加任何模板，進行 PCR 反應。

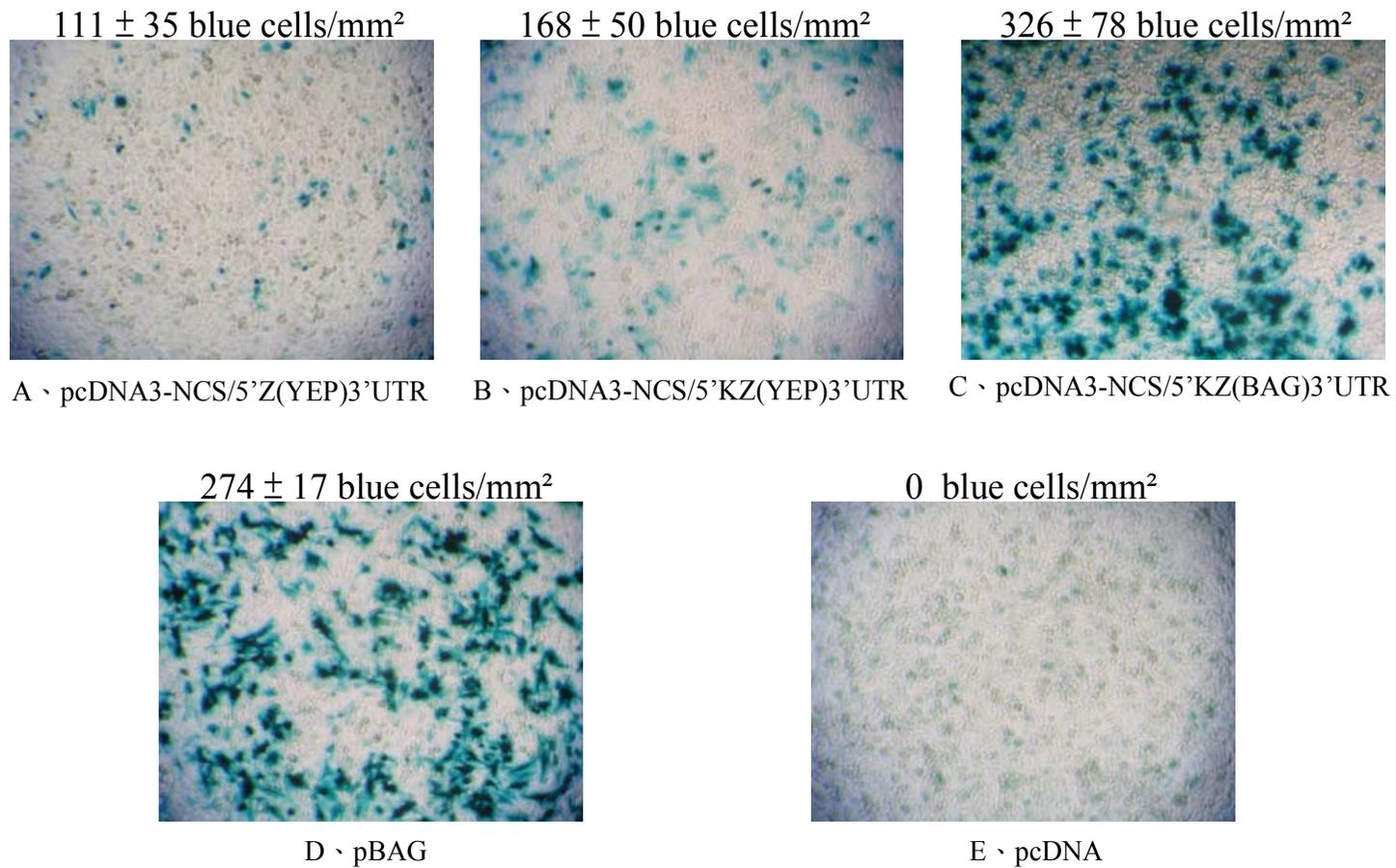
M：marker

E gene：將含有 E gene 之質體轉染至細胞，再抽取細胞所得之 RNA，進行 RT-PCR 或 PCR 反應。

P1：將 pcDNA3-NCS/DV2F (P1) 質體轉染至細胞，抽取細胞 RNA，進行 RT-PCR 或 PCR 反應。

Q3：將 pcDNA3-NCS/DV2F (Q3) 質體轉染至細胞，抽取細胞 RNA，進行 RT-PCR 或 PCR 反應。

pcDNA3：將 pcDNA3 轉染至細胞，抽取細胞之 RNA，進行 RT-PCR 或 PCR 反應。



圖四十三、報導基因的表現

將 *lacZ* 來源為 YEP363 且不含 Kozak sequence 的質體 pcDNA3-NCS/5'Z(YEP)3'UTR(圖 A)、*lacZ* 來源為 YEP363 且含有 Kozak sequence 的質體 pcDNA3-NCS/5'KZ(YEP)3'UTR(圖 B)、*lacZ* 來源為 pBAG 並含有 Kozak sequence 的質體 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR(圖 C)分別轉染至 BHK-21 細胞中 48 小時後，進行 X-gal 染色。結果顯示以 pcDNA3-NCS/5'KZ(BAG)3'UTR 進行轉染的 BHK-21 細胞產生的藍色細胞不僅細胞數較多，顏色也較深。圖 D 及 E 分別代表 positive 及 negative control。

95 blue cells/3.5 cm dish



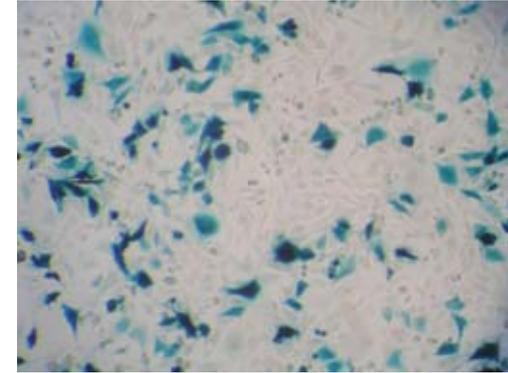
A、pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR

1.0×10^4 blue cells/3.5 cm dish



B、pcDNA3-NCS/5'S(IRES)Sp3'UTR

1.6×10^5 blue cells/3.5 cm dish



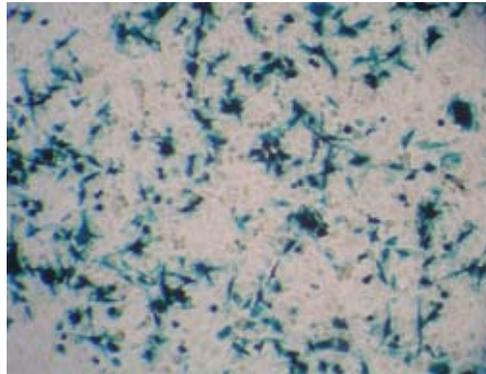
C、pcDNA3-NCS/5'Z(IRES)NS3'UTR

412 blue cells/3.5 cm dish



D、pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR

2.4×10^5 blue cells/3.5 cm dish



E、pBAG

0 blue cells/3.5 cm dish



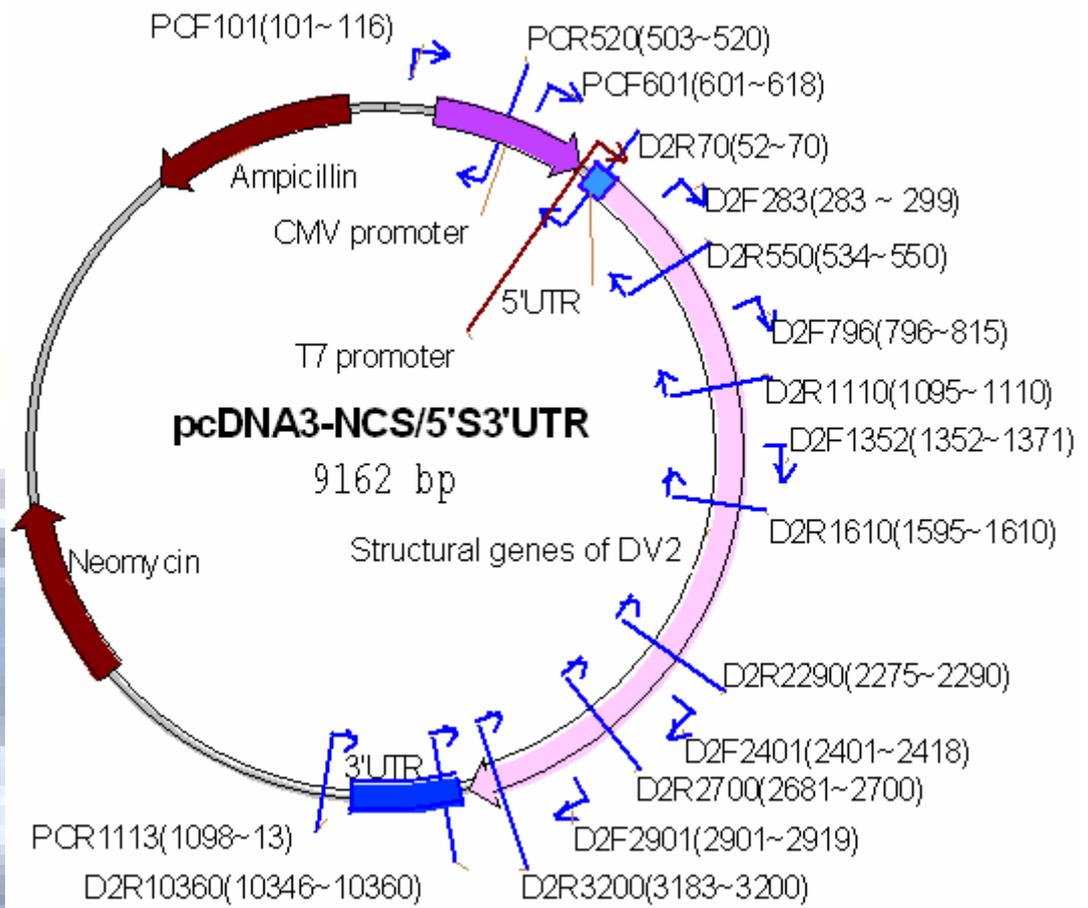
F、pcDNA3

圖四十四、結構性基因報導質體及非結構性基因報導質體的表现

將含有結構性基因的報導質體 pcDNA3-NCS/5'SZSp3'UTR 及含有結構性基因，並在報導基因前加入 IRES 的質體 pcDNA3-NCS/5'S(IRES)ZSp3'UTR，含有非結構基因(bicistronic)的報導質體 pcDNA3-NCS/5'Z (IRES)NS3'UTR 及含有非結構基因(monocistronic)的報導質體 pcDNA3-NCS/5'ZNS(MONO)3'UTR 同時轉染至 BHK-21 細胞內，經過 48 小時後進行 X-gal

染色，以比較 *lacZ* 位於第二個 ORF(圖 A)、*lacZ* 位於第二個 ORF 前方加入 IRES(圖 B)、*lacZ* 位於第一個 ORF 且為 bicistronic(圖 C)、*lacZ* 位於第一個 ORF 且為 monocistronic(圖 D)的這四種情況下，報導基因表現的狀況。結果顯示，*lacZ* 位於第一個 ORF 時(bicistronic)，表現的狀況最佳；位於第二個 ORF，表現狀況最差，生成的藍色細胞數約僅有位於第一個 ORF 的二千分之一。若在第二個 ORF 前方加入 IRES，產生的藍色細胞數約可增加 100 倍，但生成的藍色細胞數亦約僅有位於第一個 ORF(bicistronic) 的二十分之一。至於 *lacZ* 位於第一個 ORF 且為 monocistronic 的狀況，生成的藍色細胞數亦僅有 bicistronic 的五百分之一。圖 E 及 F 分別代表 positive 及 negative control。





圖四十五、定序引子在質體上之相對位置圖

註：PCF，表示引子序列與 pcDNA3 的正股序列相同；PCR 表示引子序列與 pcDNA3 的反股序列相同。括弧內標示之數字，表示引子序列在 pcDNA3 的相對位置。

D2F，表示引子序列與登革熱病毒 NGC strain(M29095, NCBI)的正股序列相同；D2R 表示引子序列與登革熱病毒 NGC strain 的反股序列相同。括弧內標示之數字，表示引子序列在登革熱二型病毒 NGC strain 序列上的相對位置。

表一、登革熱病毒 PL046 病毒株，pcDNA3-NCS/5'S3'UTR (結構性基因) 定序結果。上方所列为 NGC strain，下方為定序結果。

NGC-S & 3'UTR	(1)	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTGAGGGAGCTAA
PL046-S & 3'UTR	(1)	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTGAGGGAGCTAA
NGC-S & 3'UTR	(51)	GCTCAACGTAGTTCTAACAGTTTTTTAATTAGAGAGCAGATCTCTGATGA
PL046-S & 3'UTR	(51)	GCTCAACGTAGTTCTAACAGTTTTTTAATTAGAGAGCAGATCTCTGATGA
NGC-S & 3'UTR	(101)	ATAACCAACGAAAAAGGCGAGAAATACGCCTTTCAATATGCTGAAACGC
PL046-S & 3'UTR	(101)	ATAACCAACGAAAAAGGCGAGAAATACGCCTTTCAATATGCTGAAACGC
NGC-S & 3'UTR	(151)	GAGAGAAACCGCGTGTGACTGTACAACAGCTTGACAAAAGAGATTCTCACT
PL046-S & 3'UTR	(151)	GAGAGAAACCGCGTGTGACTGTGCAACAGTTTGACAAAAGAGATTCTCACT
NGC-S & 3'UTR	(201)	TGGAATGCTGCAGGGACGAGGACCATTAAACTGTTTCATGGCCCTGGTGG
PL046-S & 3'UTR	(201)	TGGAATGCTGCAGGGACGAGGACCATTAAACTGTTTCATGGCCCTGGTGG
NGC-S & 3'UTR	(251)	CGTTCCTTCGTTTCCTAACAAATCCACCAACAGCAGGGATACTGAAGAGA
PL046-S & 3'UTR	(251)	CGTTCCTTCGTTTCCTAACAAATCCACCAACAGCAGGGATACTTAAGAGA
NGC-S & 3'UTR	(301)	TGGGGAACAATTAATAAATCAAAAGCCATTAAATGTTTTGAGAGGTTTCAG
PL046-S & 3'UTR	(301)	TGGGGAACAATTAATAAATCAAAAGCCATCAACGCTCTTGAGAGGATTTCAG
NGC-S & 3'UTR	(351)	GAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCTTGAACAGGAGACGCAGAACTG
PL046-S & 3'UTR	(351)	GAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAACATCTTGAACAGGAGGCGCAGAACTG
NGC-S & 3'UTR	(401)	CAGGCATGATCATTATGCTGATTCCAACAGTGATGGCGTTCCATTTAACC
PL046-S & 3'UTR	(401)	CAGGCATGATCATTATGCTGATTCCAACAGTGATGGCGTTCCATTTAACC
NGC-S & 3'UTR	(451)	ACACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGTAGACAAGAGAAAAGGGAA
PL046-S & 3'UTR	(451)	ACACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGTAGACAAGAGAAAAGGGAA
NGC-S & 3'UTR	(501)	AAGTCTCTGTTTTAAAACAGAGGATGGTGTGAACATGTGTACCCTCATGG
PL046-S & 3'UTR	(501)	AAGTCTCTGTTTTAAAACAGAGGATGGTGTGAACATGTGTACCCTCATGG
NGC-S & 3'UTR	(551)	CCATGGACCTTGGTGAATTGTGTGAAGATACAATCACGTACAAGTGTCCCT
PL046-S & 3'UTR	(551)	CCATGGACCTTGGTGAATTGTGTGAAGATACAATCACGTATAAGTGTCCCT
NGC-S & 3'UTR	(601)	TTTCTCAAGCAGAATGAACCAGAAGACATAGATTGTTGGTGCACACTCTAC
PL046-S & 3'UTR	(601)	TTTCTCAGGCAGAATGAACCAGAAGACATAGCTTGTGGTGTAACTCTAC
NGC-S & 3'UTR	(651)	GTCCACATGGGTAACCTTATGGGACGTGTACCACCACAGGAGAACACAGAA
PL046-S & 3'UTR	(651)	GTCCACATGGGTAACCTTATGGGACGTGTACCACCACAGGAGAACACAGAA
NGC-S & 3'UTR	(701)	GAGAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCACATGTGGGAATGGGACTGGAG
PL046-S & 3'UTR	(701)	GAGAGAAAAAGATCAGTGGCACTAGTTCACATGTGGGAATGGGATGGAG
NGC-S & 3'UTR	(751)	ACACGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTGGAAACATGCCCA
PL046-S & 3'UTR	(751)	ACACGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTGGAAACATGCCCA
NGC-S & 3'UTR	(801)	GAGAATTGAAACTTGGATCTTGGAGACATCCAGGCTTTACCATTAATGGCAG
PL046-S & 3'UTR	(801)	GAGAATTGAAACTTGGATTTTGGAGACATCCAGGCTTTACCTTAATGGCAG
NGC-S & 3'UTR	(851)	CAATCCTGGCATAACCCATAGGAACGACACATTTCCAAAGAGCCCTGATTT
PL046-S & 3'UTR	(851)	CAATCCTGGCATAACCCATAGGAACGACACATTTCCAAAGAGCTCTGATTC
NGC-S & 3'UTR	(901)	TTCATCTTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGG
PL046-S & 3'UTR	(901)	TTCATCTTACTGACAGCCGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGG

NGC-S & 3' UTR (951) AATATCAAAATAGAGACTTTGTAGAAGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTG
 PL046-S & 3' UTR (951) AATATCAAAACAGAGATTTTGTAGAAGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTG

NGC-S & 3' UTR (1001) ACATAGTCTTAGAACATGGAAGCTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAA
 PL046-S & 3' UTR (1001) ACATAGTCTTAGAACATGGAAGCTGTGTGACGACAATGGCAAAAAACAAA

NGC-S & 3' UTR (1051) CCAACATTGGATTTTGAAGTACTGATAGAAACAGAAGCCAAACAACCTGCCAC
 PL046-S & 3' UTR (1051) CCAACATTGGATTTTGAAGTACTGATAAAGACAGAAGCCAAACAACCTGCCAC

NGC-S & 3' UTR (1101) TCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAAAGCTGACCAACACAACAACAGATT
 PL046-S & 3' UTR (1101) TCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAAAGTTAACCAACACAACAACAGAAAT

NGC-S & 3' UTR (1151) CTCGCTGCCAACACAAGGAGAACCAGCCTAAATGAAGAGCAGGACAAA
 PL046-S & 3' UTR (1151) CTCGCTGTTCCAACACAAGGGGAACCAGCCTAAATGAAGAGCAGGACAAA

NGC-S & 3' UTR (1201) AGGTTTCGTCTGCAAACTCCATGGTGACAGAGGATGGGGAAATGGATG
 PL046-S & 3' UTR (1201) AGGTTTCGTCTGCAAACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATG

NGC-S & 3' UTR (1251) TGGACTATTTGGAAAAGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTACATGCA
 PL046-S & 3' UTR (1251) TGGACTATTTGGAAAAGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTACATGCA

NGC-S & 3' UTR (1301) AAAAGAACATGAAGGAAAAAGTCTGTGCAACCAGAAAACTTGGAAATCACC
 PL046-S & 3' UTR (1301) AAAAGAACATGAAGGAAAAATTTGTGCAACCAGAAAACTTGGAAATATACC

NGC-S & 3' UTR (1351) ATTTGTGATAACACCTCACTCAGGGGAAGAGCATGCAGTCGGAAATGACAC
 PL046-S & 3' UTR (1351) ATCTGTGATAACACCCCACTCAGGGGAAGAGCACGCAGTTGGAAATGACAC

NGC-S & 3' UTR (1401) AGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAATAACACCACAGAGTTCCATCACAG
 PL046-S & 3' UTR (1401) AGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAATAACACCACAGAGTTCCATCACAG

NGC-S & 3' UTR (1451) AAGCAGAGTTGACAGGCTATGGCACTGTACGATGGAGTGCTCTCCGAGA
 PL046-S & 3' UTR (1451) AAGCAGAGTTGACAGGCTATGGCACTGTACGATGGAGTGCTCTCCGAGA

NGC-S & 3' UTR (1501) ACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGTGTTCCTGCAAATGAAAAATAAAGC
 PL046-S & 3' UTR (1501) ACGGGCCTCGACTTCAACGAGATGGTGTTCCTGCAAATGAAAAATAAAGC

NGC-S & 3' UTR (1551) TTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCGTTGCCATGGCTGC
 PL046-S & 3' UTR (1551) TTGGCTGGTGCACCGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCGTTGCCATGGTGC

NGC-S & 3' UTR (1601) CCGGAGCGGACACACAAGGATCAAATTGGATACAGAAAGAGACATTGGTC
 PL046-S & 3' UTR (1601) CCGGAGCGGACACACAAGGATCAAATTGGATACAGAAAGGAGACATTGGTC

NGC-S & 3' UTR (1651) ACTTTCAAAAATCCCCATGCGAAGAAAACAGGATGTTGTGTTTGGGATC
 PL046-S & 3' UTR (1651) ACTTTCAAAAATCCCCATGCGAAGAAAACAGATGTTGTGTTTAAAGGATC

NGC-S & 3' UTR (1701) CCAAGAAGGGGCATGTCACACAGCACTCACAGGGCCACAGAAATCCAGA
 PL046-S & 3' UTR (1701) CCAAGAAGGGGCTATGTCACACAGCACTCACAGGGCCACAGAAATCCAGA

NGC-S & 3' UTR (1751) TGTTCATCAGGAAGAACTTACTGTTACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGG
 PL046-S & 3' UTR (1751) TGTTCATCAGGGAAGAACTTACTGTTACAGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGG

NGC-S & 3' UTR (1801) ATGGACAAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGCACAGGAAA
 PL046-S & 3' UTR (1801) ATGGACAAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCATGTGCACAGGAAA

NGC-S & 3' UTR (1851) GTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAAACACAACATGGAACAATAGTTA
 PL046-S & 3' UTR (1851) GTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAAACACAACATGGAACAATAGTTG

NGC-S & 3' UTR (1901) TCAGAGTACAATATGAAGGGACGGTTCTCCATGTAAGATCCCTTTTGAG
 PL046-S & 3' UTR (1901) TCAGAGTACAATATGAAGGGACGGTTCTCCATGTAAGATTCCTTTTGAG

NGC-S & 3' UTR (1951) ATAATGGATTTGGAAAAAAGACATGTTTAAAGTTCGCTGATTACAGTCAA
 PL046-S & 3' UTR (1951) ATAATGGATTTGGAAAAAAGACATGTTTAAAGTTCGCTGATTACAGTCAA

NGC-S & 3'UTR (2001) **CCCAATCGTAAACAGAAAAAGATAGCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTC**
 PL046-S & 3'UTR (2001) **CCCAATGTGACAGAAAAAGATAGCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTC**

NGC-S & 3'UTR (2051) **CATTTCGGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAG**
 PL046-S & 3'UTR (2051) **CATTTCGGAGACAGCTACGTCATCATAGGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAG**

NGC-S & 3'UTR (2101) **CTCAACTGGGTTTAAGAAAGGAAGTTCTATCGGCCAAATGATTGAGACAAC**
 PL046-S & 3'UTR (2101) **CTTAAATGGGTTTAAGAAAGGAGGTTCTATCGGCCAAATGATTGAGACAAC**

NGC-S & 3'UTR (2151) **AATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCTATTCTAGGTGACACAGCTTGGGATT**
 PL046-S & 3'UTR (2151) **AATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCTATTCTAGGTGACACAGCTTGGGATT**

NGC-S & 3'UTR (2201) **TTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTCACATCTATAGGAAAGGCTCTCCACCA**
 PL046-S & 3'UTR (2201) **TTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTCACATCTATAGGAAAGGCTCTCCACCA**G

NGC-S & 3'UTR (2251) **GTTTTTCGGAGCAATCTATGGGGCTGCCTTCAGTGGGGTCTCATGGATTAT**
 PL046-S & 3'UTR (2251) **GTTTTTCGGAGCAATCTACGGGGCTGCCTTCAGTGGGGTCTCGTGGACTAT**

NGC-S & 3'UTR (2301) **GAAAATCCTCATAGGAGTCATTATCACATGGATAGGAATGAATTCACGCA**
 PL046-S & 3'UTR (2301) **GAAAATCCTCATAGGAGTCATTATCACATGGATAGGAATGAATTCACCTA**

NGC-S & 3'UTR (2351) **GCACCTCACTGTCTGTGTCACTAGTATTGGTGGGAGTCGTGACGCTGTAT**
 PL046-S & 3'UTR (2351) **GCACCTCACTGTCTGTATTCACTAGTATTGGTGGGAGTCGTGACACTGTAC**

NGC-S & 3'UTR (2401) **TTGGGAGTTAATGGTGCAGGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAA**
 PL046-S & 3'UTR (2401) **TTGGGAGTCGTTGGTGCAGGCCGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAA**

NGC-S & 3'UTR (2451) **CAAAGAACTGAAAGTGTGGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACTGTCACA**
 PL046-S & 3'UTR (2451) **CAAAGAACTGAAATGTGTGGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACTGTCACA**

NGC-S & 3'UTR (2501) **CATGGACAGAAACATACAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAACTAGCT**
 PL046-S & 3'UTR (2501) **CATGGACAGAAATATACAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAACTAGCT**

NGC-S & 3'UTR (2551) **TCAGCTATCCAGAAAGCTCATGAAGAGGGCATTGTGGAATCCGCTCAGT**
 PL046-S & 3'UTR (2551) **TCAGCTATCCAGAAAGCTCATCAAGAGGGCATTGTGGAATCCGCTCAGT**

NGC-S & 3'UTR (2601) **AACAAGACTGGAAAATCTGATGTGGAAACAAATAACACCGAATTGAATC**
 PL046-S & 3'UTR (2601) **AACAAGACTGGAAAATTTGATGTGGAAACAAATAACACCGGAATTGAATC**

NGC-S & 3'UTR (2651) **ACATTCTATCAGAAAATGAGGTGAAGTGTGACTATTATGACAGGAGACATC**
 PL046-S & 3'UTR (2651) **ACATTCTATCAGAAAATGAGGTGAAGCTGTGACTATTATGACAGGAGACATC**

NGC-S & 3'UTR (2701) **AAAGGAATCATGCAGGCGAGGAAAACGATCTCTGCAGCCAGCCACTGA**
 PL046-S & 3'UTR (2701) **AAAGGAATCATGCATGTCAGGAAAACGATCTCTGCAGCCAGCCACTGA**

NGC-S & 3'UTR (2751) **GCTGAAGTATTCATGGAAAACATGGGGCAAAGCGAAAATGCTCTCTACAG**
 PL046-S & 3'UTR (2751) **GCTGAAGTATTCATGGAAACATGGGGCAAAGCGAAAATCTCTCTCTACAG**

NGC-S & 3'UTR (2801) **AGTCCATAACCAGACCTTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGC**
 PL046-S & 3'UTR (2801) **AGTCCATAACCAGACCTTTCTCATTGATGGCCCCGAAACAGCAGAAATGC**

NGC-S & 3'UTR (2851) **CCCAACACAAACAGAGCTTGAATTCGCTGGAAGTTGAAGACTATGGCTT**
 PL046-S & 3'UTR (2851) **CCCAACACAAACAGAGCTTGAATTCGCTGGAAGTTGAAGACTATGGTGT**

NGC-S & 3'UTR (2901) **TGGAGTATTCACCACCAATATATGGCTAAAGTTGAGAGAAAAGCAGGATG**
 PL046-S & 3'UTR (2901) **TGGAGTATTCACCACCAATATATGGCTAAAGCTGAGAGAAAAGCAAGATG**

NGC-S & 3'UTR (2951) **TATTCGTGGACTCAAACTCATGTGAGCGGCCATAAAAAGACAACAGAGCC**
 PL046-S & 3'UTR (2951) **TATTTGTGGACTCAAACTCATGTGAGCGGCCATAAAAAGACAACAGAGCC**

NGC-S & 3'UTR (3001) **GTCCATGCCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGTGCACCTCAATGACACATG**
 PL046-S & 3'UTR (3001) **GTCCATGCCGACATGGGTTATTGGATAGGAAGTGCACCTCAATGACACATG**

NGC-S & 3'UTR (3051) GAAGATAGAGAAAGCCTCTTTTCATCGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAA
 PL046-S & 3'UTR (3051) GAAGATAGAGAAAGCCTCTTTTCATCGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAA

 NGC-S & 3'UTR (3101) AGTCACACACCCTCTGGAGTAAATGGAGTGTAGAAAAGTGAGATGATAATT
 PL046-S & 3'UTR (3101) AGTCACACACCCTCTGGAGCAAGGGAGTGTAGAAAAGTGAGATGATAATT

 NGC-S & 3'UTR (3151) CCAAAGAATTTTCTGCTGGACCAGTGTCAACAACAACTACAGACCAGGCTA
 PL046-S & 3'UTR (3151) CCAAAGAATTTTCTGCTGGACCAGTGTCAACAACAACTACAGACCAGGCTA

 NGC-S & 3'UTR (3201) CCATACACAAACAGCAGGACCATGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACT
 PL046-S & 3'UTR (3201) CCATACACAAACAGCAGGACCATGGCATCTAGGTAAGCTTGAGATGGACT

 NGC-S & 3'UTR (3251) TTGATTTCTGCGAAGGAACACAGTGGTGGTGACTGAGGACTGTGGAAAT
 PL046-S & 3'UTR (3251) TTGATTTCTGCGAAGGAACACAGTGGTGGTGACTGAGGACTGTGGAAAT

 NGC-S (3301-07 10270-77) AGAGGACAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCTAGAAAGGC
 PL046-S (3301-07 10270-77) AGAGGACAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCTAGAAAGGC

 NGC-S & 3'UTR (10278) AAAACTAACATGAAACAAGGCTAGAAGTCAGGTCGGATTAAGCCATAGTA
 PL046-S & 3'UTR (10278) AAAACTAACATGAAACAAGGCTAGAAGTCAGGTCGGATTAAGCCATAGTA

 NGC-S & 3'UTR (10328) CGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTTAAAAAGAAG
 PL046-S & 3'UTR (10328) CGGAAAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTTAAAAAGAAG

 NGC-S & 3'UTR (10378) TCAGGCCATTACAAATGCCATAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCT
 PL046-S & 3'UTR (10378) TCAGGCCATTACAAATGCCACAGCTCGAGGAAACTGTGCAGCCTGTAGCT

 NGC-S & 3'UTR (10428) CCACCTGAGAAGGTGTAAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTG
 PL046-S & 3'UTR (10428) CCACCTGAGAAGGTGTAAAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTG

 NGC-S & 3'UTR (10478) TACGCATGGCGTAGTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAA
 PL046-S & 3'UTR (10478) TACGCATGGCGTAGTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAA

 NGC-S & 3'UTR (10528) TCGCAGCAA CAATGGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGG
 PL046-S & 3'UTR (10528) TCGCAGCAGCAATGGGGGCCCAAGGTGAGCTGAAGCTGTAGTCTCACTGG

 NGC-S & 3'UTR (10578) AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAAAACAAAAACAGCATATTG
 PL046-S & 3'UTR (10578) AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCGAAATAAAAACAGCATATTG

 NGC-S & 3'UTR (10628) ACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCAGGC
 PL046-S & 3'UTR (10628) ACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCAGGC

 NGC-S & 3'UTR (10678) ACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT
 PL046-S & 3'UTR (10678) ACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

註：標示的數字為對應登革熱二型病毒新幾內亞株（NGC strain, M29095, NCBI）序列上的位置。黑色曲形底線部份為 5'UTR，紅色直形底線為 3'UTR 的部份。灰色字部份則為質體建構時所留下的部份 vector 的 DNA 片段。第 2512 個核苷酸，以黑色圓形圈起來的位置為造成無義突變（Nonsense mutation）的位置。

表二、將「表一」定序結果轉換成胺基酸序列，轉換部份包含 DNA 序列
 97-3306 (非 UTR 部份)。上方所列為 NGC strain 序列轉換成胺基酸
 的結果，下方為定序序列轉換成胺基酸結果。

NGC-S & 3'UTR	(1)	MNNQRKKARNTPFNMLKREERNRVSTVQQLTKRFSLQGLQGRGPIKLFMAL
PL046-S & 3'UTR	(1)	MNNQRKKARNTPFNMLKREERNRVSTVQQLTKRFSLQGLQGRGPIKLFMAL
NGC-S & 3'UTR	(51)	VAFRLRFLTIPPTAGILKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR
PL046-S & 3'UTR	(51)	VAFRLRFLTIPPTAGILKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR
NGC-S & 3'UTR	(101)	TAGMIIMLIPTVMAFHLTTRNGEPHMIIVSRQEKGKSLLFKTEDGVNMCTL
PL046-S & 3'UTR	(101)	TAGMIIMLIPTVMAFHLTTRNGEPHMIIVSRQEKGKSLLFKTEDGVNMCTL
NGC-S & 3'UTR	(151)	MAMDLGELCEDTITYKCPFLKQNEPEDIDCWCNSTSTWVTYGTCTTTTGEH
PL046-S & 3'UTR	(151)	MAMDLGELCEDTITYKCPFLKQNEPEDIACWCNSTSTWVTYGTCTTTTGEH
NGC-S & 3'UTR	(201)	RREKRSVALVPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHAQRLETWILRHPGFTIM
PL046-S & 3'UTR	(201)	RREKRSVALVPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHAQRLETWILRHPGFTIM
NGC-S & 3'UTR	(251)	AAILAYTIGTTHFQRALIFILLTAVAPSMTMRCIGISNRDFVEGVSGGSW
PL046-S & 3'UTR	(251)	AAILAYTIGTTHFQRALIFILLTAVAPSMTMRCIGISNRDFVEGVSGGSW
NGC-S & 3'UTR	(301)	VDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIETEAKQPATLRKYCIEAKLTNTTT
PL046-S & 3'UTR	(301)	VDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFGLIKTEAKQLATLRKYCIEAKLTNTTT
NGC-S & 3'UTR	(351)	DSRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWNGCGLFGKGGIVTCAMFT
PL046-S & 3'UTR	(351)	ESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWNGCGLFGKGGIVTCAMFT
NGC-S & 3'UTR	(401)	CKKNMKGKVQVPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSI
PL046-S & 3'UTR	(401)	CKKNMEGKIIVQVPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSI
NGC-S & 3'UTR	(451)	TEAELTGYGTVTMECSPTGLDFNEMVLLQMKNAWLVRQWFLDPLPW
PL046-S & 3'UTR	(451)	TEAELTGYGTVTMECSPTGLDFNEMVLLQMKNAWLVRQWFLDPLPW
NGC-S & 3'UTR	(501)	LPGADTQGSNWIQKETLVTFKNPHAKKQDVVVLGSQLGAMHTALTGATEI
PL046-S & 3'UTR	(501)	LPGADTQGSNWIQKETLVTFKNPHAKKQDVVVLGSQLGAMHTALTGATEI
NGC-S & 3'UTR	(551)	QMSSGNLLFTGHLKCLRMRDQKLQKGMSSMCTGKFKVVKEIAETQHGTI
PL046-S & 3'UTR	(551)	QMSSGNLLFTGHLKCLRMRDQKLQKGMSSMCTGKFKVVKEIAETQHGTI
NGC-S & 3'UTR	(601)	VIRVQYEGDQSPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSVPNIEAE
PL046-S & 3'UTR	(601)	VIRVQYEGDQSPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSVPNIEAE
NGC-S & 3'UTR	(651)	PPFGDSYIIIGVEPGQLKNWFKKGSSIGQMIETTMRGAKRMAILGDTAW
PL046-S & 3'UTR	(651)	PPFGDSYVIIIGVEPGQLKNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAW
NGC-S & 3'UTR	(701)	DFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWIMKILIGVIITWIGMNS
PL046-S & 3'UTR	(701)	DFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWIMKILIGVIITWIGMNS
NGC-S & 3'UTR	(751)	RSTLSVSLVVLGVVTLVYLGVMVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNV
PL046-S & 3'UTR	(751)	RSTLSVSLVVLGVVTLVYLGVMVQADSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNV
NGC-S & 3'UTR	(801)	HTWTEQYKFOPEPSKLASAIQKAHEEGICGIRSVTRLENLMWKOITPEL
PL046-S & 3'UTR	(801)	HTWTEQYKFOPEPSKLASAIQKAHEEGICGIRSVTRLENLMWKOITPEL
NGC-S & 3'UTR	(851)	NHILSENEVKLTIMTGDIKGIMQAGKRSIQPQPTELKYSWKTWGWKAKMLS
PL046-S & 3'UTR	(851)	NHILSENEVKLTIMTGDIKGIMHAGKRSIRPQPTELKYSWKTWGWKAKMLS
NGC-S & 3'UTR	(901)	TESHNQTFLLIDGPETAACPNTNRAWNSLEVEDYGFVGF'TNIWLKLEKQ
PL046-S & 3'UTR	(901)	TESHNQTFLLIDGPETAACPNTNRAWNSLEVEDYGFVGF'TNIWLKLEKQ
NGC-S & 3'UTR	(951)	DVFCDSKLSAAIKDNRAVHADMGYWIEGASALNDTWKIEKASFIEVKSCHW
PL046-S & 3'UTR	(951)	DVFCDSKLSAAIKDNRAVHADMGYWIEGASALNDTWKIEKASFIEVKSCHW

NGC-S & 3'UTR (1001) **PKSHTLWS****NGVLESEMI****I****PKNFAGPVS****Q****HN****YRPGYHT****Q****TAGP****WHLGKLEM**
 PL046-S & 3'UTR (1001) **PKSHTLWS****K****GVLESEMI****I****PKNFAGPVS****Q****HN****YRPGYHT****Q****TAGP****WHLGKLEM**

 NGC-S & 3'UTR (1051) **DFDFCEGTTVVVTE****DCGNRG**
 PL046-S & 3'UTR (1051) **DFDFCEGTTVVVTE****DCGNRG**

註：標示的數字為對應登革熱二型病毒新幾內亞株（NGC strain, M29095, NCBI）胺基酸序列上的位置。第 806 個胺基酸（對應於核酸序列第 2512-2514 個核苷酸），以黑色圓形圈起來的位置為突變後生成停止密碼的位置。以綠色及白色背景標示為該位置的胺基酸與新幾內亞株有異；綠色表示胺基酸的屬性相同，白色表示胺基酸的屬性不同。



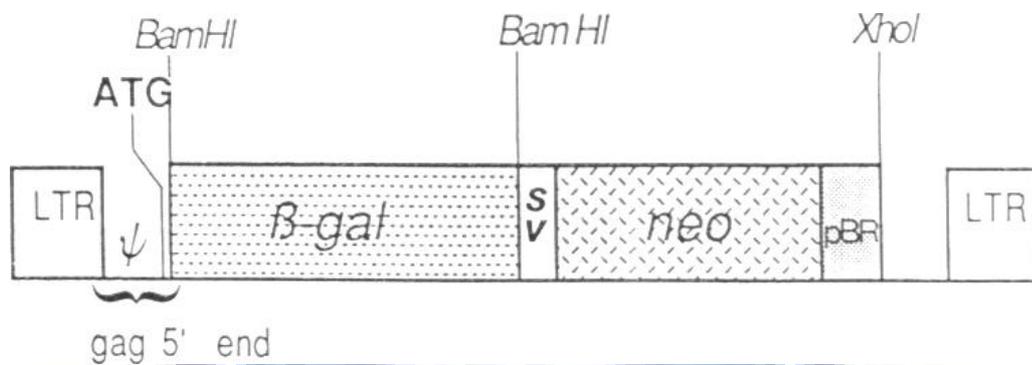
表三、預測 pcDNA3-NCS/DV2F 在細胞內被轉錄後，生成之 RNA 兩側的非病毒基因序列。

```

801   GTC TATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
851   GCTTATCGAA ATT AATACGA CTCACTATAG GGA GACCCAA GCTGACGGTA
901   TCGATAGTTG TTAGTCTACG TGGACCGACA AAGACAGATT CTTTGAGGGA
      5'UTR sequence of dengue virus type 2

      3'UTR sequence of dengue virus type 2
11601 GAATGGTGCT GTTGAATCAA CAGGTTCTAG AGGGCCCTAT TCTA TAGTGT
11651 CACCTAAATG CTAGAGCTCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG
11701 CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG
11751 GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT
      BGH polyA
  
```

註：黑色、紅色及綠色字體代表 pcDNA3-NCS 的序列；粉紅色字體代表登革熱二型病毒 PL046 strain 的序列；紅色及綠色字體為預測被轉錄出 RNA 兩側的非病毒基因序列；黑色框內為 T7 啟動子序列，藍色框內為 SP6 啟動子序列；棕色數字為對應於 pcDNA3-NCS/DV2F 上的核苷酸位置；putative transcriptional start、BGH polyA、T7 啟動子及 SP6 啟動子為 pcDNA3 使用手冊上所標示之位置。



附錄一、pBAG

β -gal-transducing Mo-MuLV vector 的示意圖。pBAG 是將 β -gal gene 置入 pDOL vector (來源為 Moloney murine leukemia virus) 中所得到的質體。(Price et al., 1987)

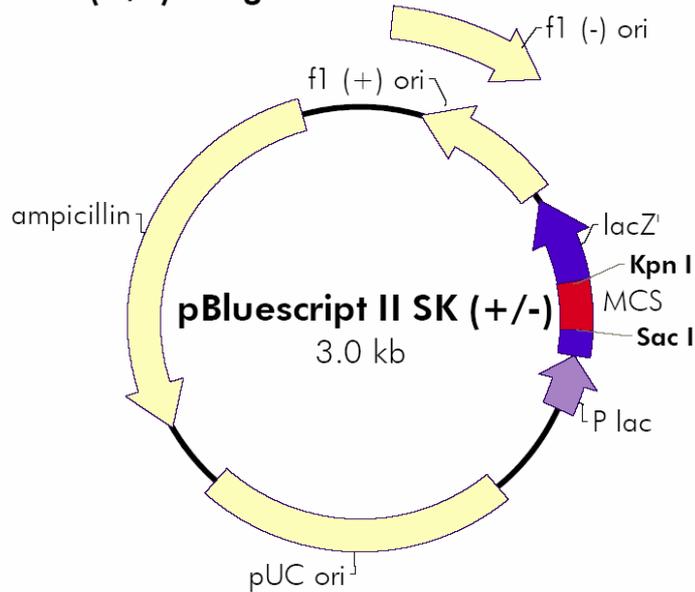
LTR : long terminal repeat

β -gal : β -galactosidase

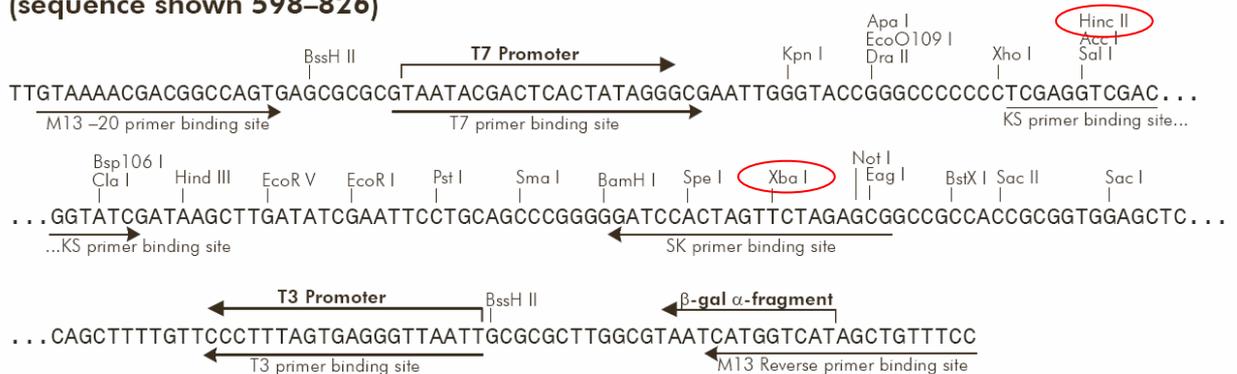
neo : neomycin

sv : simian virus 40 early promoter

pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



Feature	Nucleotide Position
f1 (+) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (+) only]	135–441
f1 (-) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (-) only]	21–327
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	460–816
multiple cloning site	653–760
T7 promoter transcription initiation site	643
T3 promoter transcription initiation site	774
<i>lac</i> promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	1976–2833

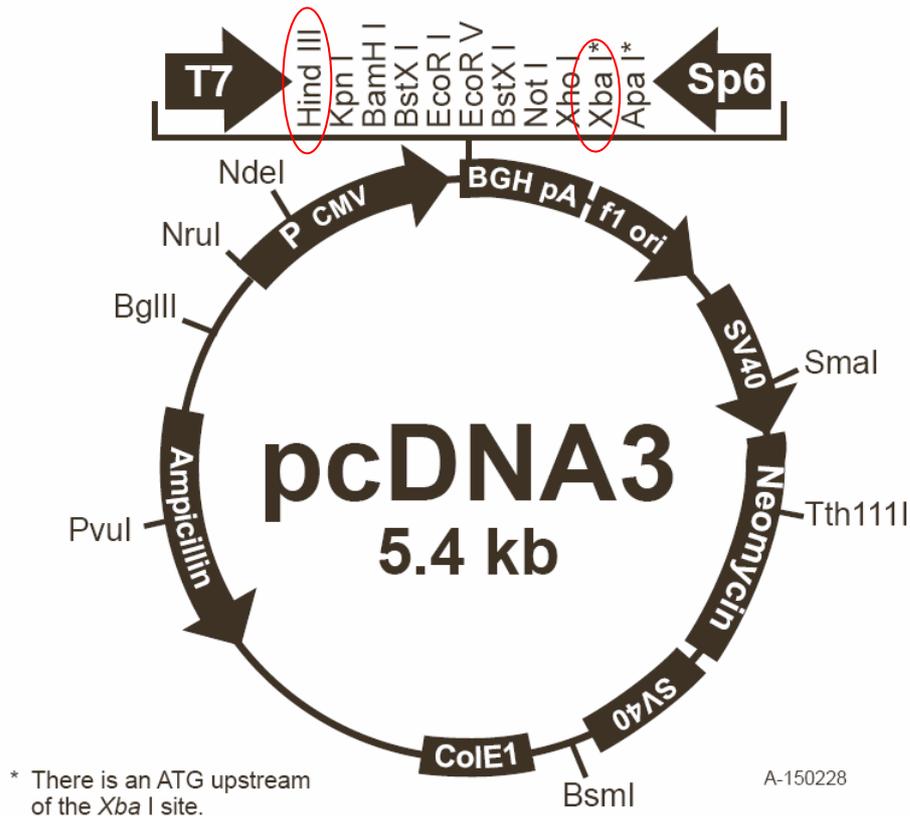
附錄二、pBluescript II SK(+)質體示意圖 (Stratagene)

以 *Hinc* II 至 *Xba* I 間的序列 (紅色橢圓形標示) 的序列，使用作為置換 pcDNA3 的 Multiple cloning site，用以建構質體 pcDNA3-NCS。

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides



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



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

附錄三、pcDNA3 質體示意圖 (Invitrogen)

pcDNA3-NCS 是將 *Hind* III 至 *Xba* I 間 (紅色橢圓形標示) 的序列置換為 pBluescript II SK(+) 的 Multiple cloning site。

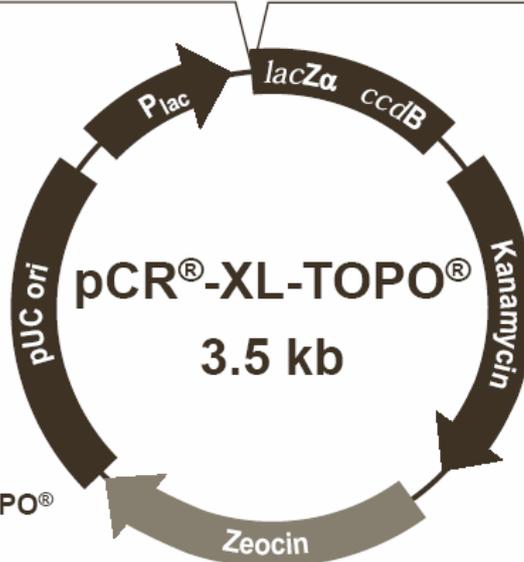
M13 Reverse priming site Mlu I
 201 CACA CAGGAA ACAGCTATGA CATGATTAC GCCAAGCTAT TTAGGTGACG CGTTAGAATA
 GTGT GTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTTCGATA AATCCACTGC GCAATCTTAT

Nsi I Hind III Kpn I Ecl36 II Sac I BamHI Spe I
 261 CTCAAGCTAT GCATCAAGCT TGGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT
 GAGTTCGATA CGTAGTTCGA ACCATGGCTC GAGCCTAGGT GATCATTGCC GGC GGTCACA

EcoRI EcoRI Pst I EcoRV
 321 GCTGGAATTC GCC CTT **XL PCR Product** AAG GGC GAATTCT GCAGATA
 CGACCTTAAG CGG GAA **XL PCR Product** TTC CCG CTTAAGA CGTCTAT

Not I Xho I Nsi I Xba I Dra II Apa I T7 promoter/priming site
 357 TCCATCACAC TGGCGGCCGC TCGAGCATGC ATCTAGAGGG CCCAATTTCG CCTATAGTGA
 AGGTAGTGTG ACCGCCGGCG AGCTCGTACG TAGATCTCCC GGGTTAAGC GGATATCACT

M13 Forward (-20) priming site
 417 GTCGTATTAC AATTCATCTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT 470
 CAGCATAATG TTAAGTGACC GGCAGCAAAA TGTTGCAGCA CTGACCCTTT TGGGACCGCA

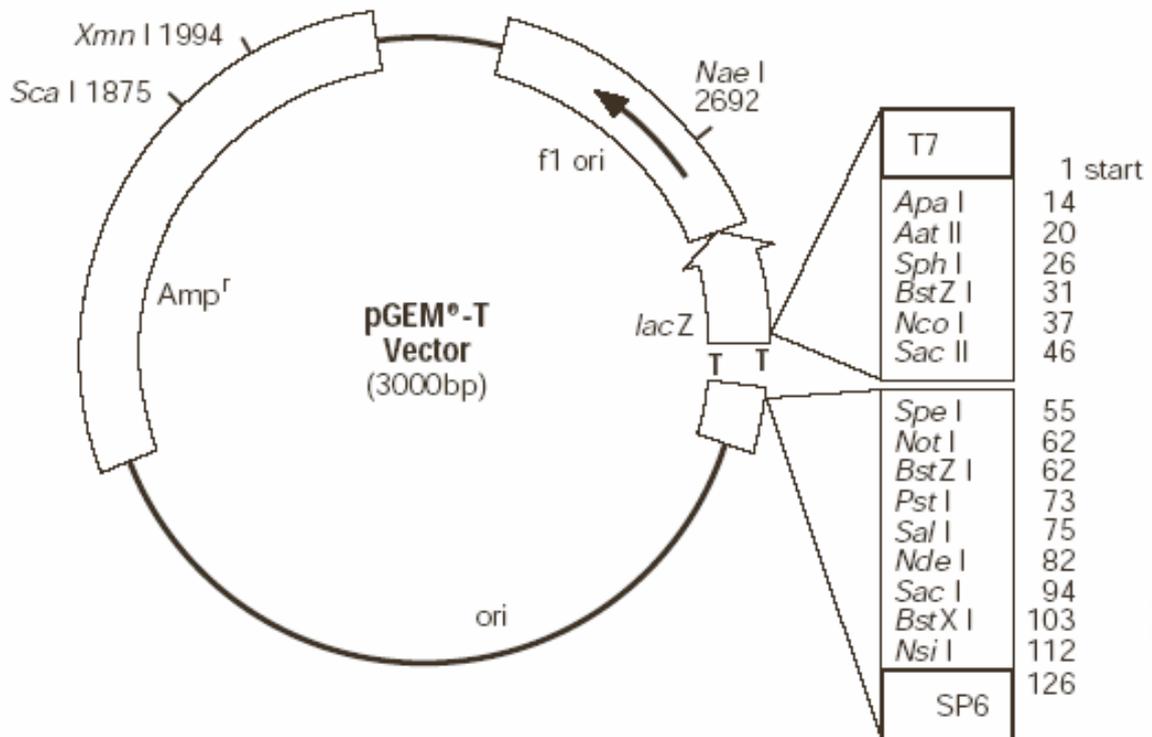


Comments for pCR[®]-XL-TOPO[®]
 3519 nucleotides

- Lac promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Lac Za ORF: bases 217-576
- Multiple Cloning Site: bases 248-399
- TOPO[®] Cloning site: bases 336-337
- T7 promoter priming site: bases 406-425
- M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448
- Fusion joint: bases 577-585
- ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
- Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031
- Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
- pUC origin: bases 2680-3393

附錄四、pCR-XL-TOPO 質體示意圖 (Invitrogen)

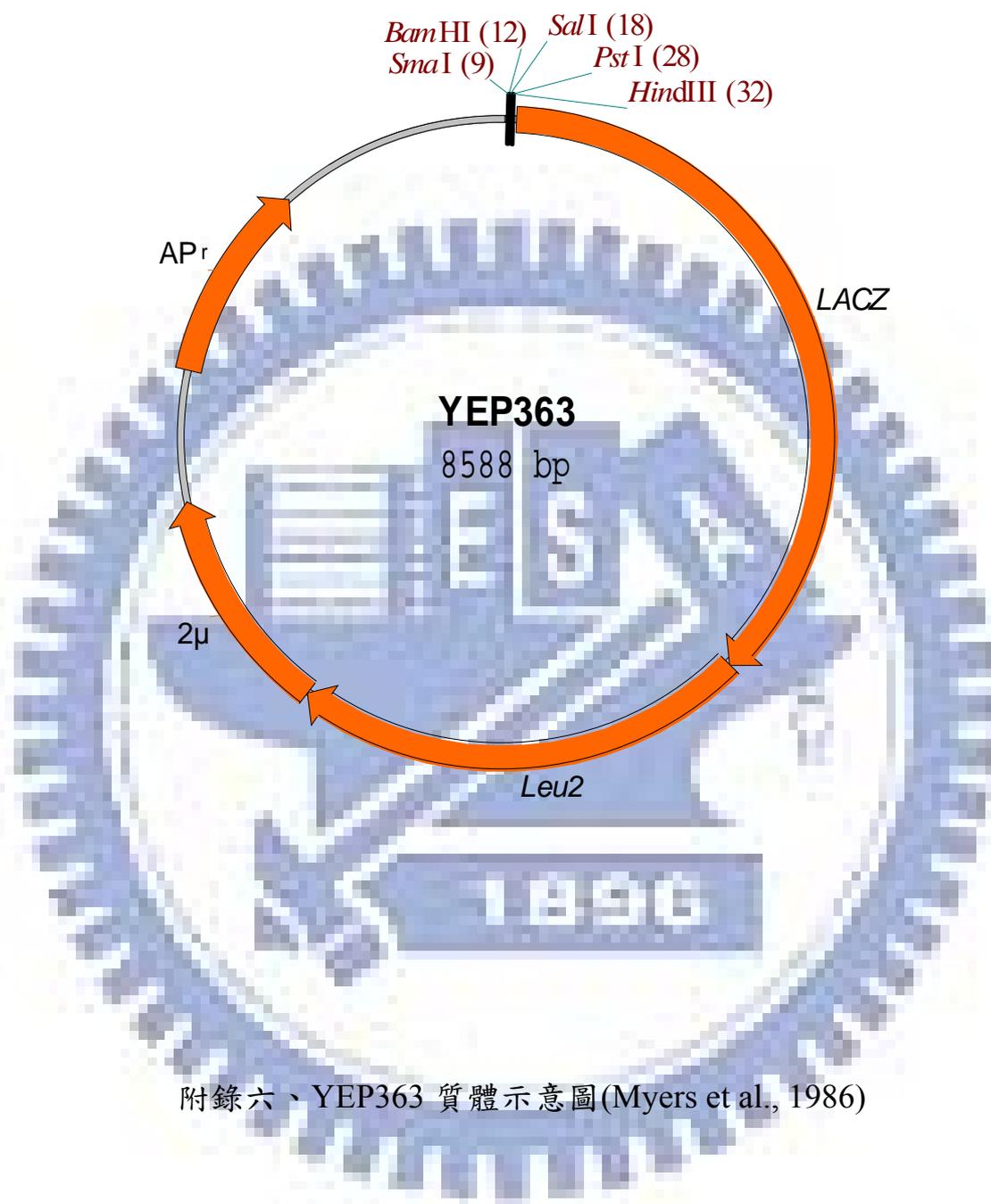
pGEM®-T Vector Map and Sequence Reference Points



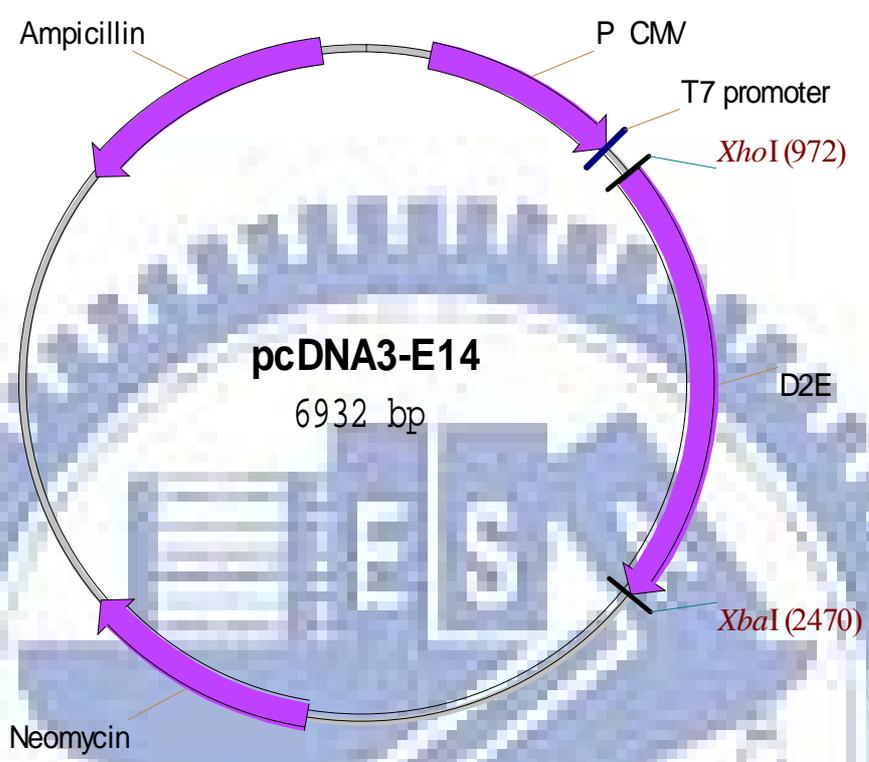
pGEM®-T Vector sequence reference points:

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

附錄五、pGEM-T 質體示意圖 (Promega)



附錄六、YEP363 質體示意圖(Myers et al., 1986)



附錄七、pcDNA3-E14 質體示意圖
(取自邱美惠，楊昶良老師實驗室，交通大學)
D2E：Full length E gene of denge virus type 2

Appendix B: Composition of Buffers

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

附錄八、QIAGEN Plasmid Midi Kit (Cat. 12143) 各種緩衝液的成份