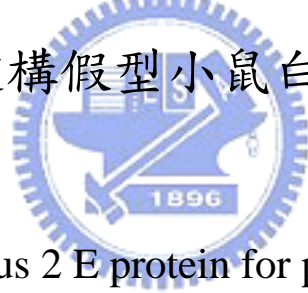


國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文

表現登革病毒 2 型 PL046 外膜蛋白
以用於建構假型小鼠白血病毒



Expressing dengue virus 2 E protein for pseudotype formation of
murine leukemia virus with dengue virus envelope

研究生：林柏吟

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十四年九月

表現登革病毒 2 型 PL046 外膜蛋白以用於建構假型小鼠白血病毒

Expressing dengue virus 2 E protein for pseudotype formation of
murine leukemia virus with dengue virus envelope

研究生：林柏吟

Student：Po-Yin Lin

指導教授：楊昫良 博士

Advisor：Dr. Yun-Liang Yang

國立交通大學

生化工程研究所



Submitted to Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Biochemical Engineering

September 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年九月

摘要

登革病毒 (Dengue virus) 屬於黃質病毒科 (*Flaviviridae*)，為一正向單股 (positive single stranded) 的 RNA 病毒，並具有外膜蛋白 (E: envelope protein)，是引起登革熱與出血性登革熱的病原體，且有日趨嚴重的現象，已漸漸成為世界性的公共衛生問題。研究顯示在登革病毒進入細胞的過程當中，其外膜蛋白扮演了一個重要的角色。它是一個由四百九十五個胺基酸所構成的醣蛋白，位於病毒脂質雙層膜的外側，是一個穿膜蛋白質。外膜蛋白外露在病毒膜外的部分，被認為可以和其受體結合。由於登革病毒感染細胞之後，細胞型態變化不大，因此對於感染成功與否與實驗的有效性多半靠溶斑試驗 (plaque assay) 來確認，且被感染的細胞株並非每一種細胞株都會產生溶斑 (plaque)，加上檢定 plaque 形成的時間需 5~7 天，造成研究登革病毒的困難度。因此本研究的主要目的，其一為表現登革病毒的外膜蛋白，其二為建立一帶有報導基因之假病毒 (pseudotype virus) 模式，以應用於登革病毒感染過程的相關研究。將登革病毒外膜蛋白 (E) 表現質體、外膜蛋白基因缺陷之小鼠白血病毒 (murine leukemia virus) 複製及結構表現質體以及帶有 β -galactosidase 之複製缺失基因組表現質體共同轉染哺乳動物細胞株，使其組裝產生假病毒顆粒。本研究結果顯示：(一) 登革病毒二型的全長外膜蛋白 (DV-2 full-length E protein) 在 *E. coli* Novablue (DE3) 之表現，可使用 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測到 recombinant protein 的表現，惟在哺乳類 BHK21 細胞株中無法偵測。(二) 由穩定細胞株的細胞融合現象推測 E protein 會表現在細胞膜上。(三) 雖然在我目前的實驗條件下，還無法成功的產生假型病毒顆粒，但根據前人研究證明：小鼠白血病毒 (MLV) 與 C 型肝炎病毒 (HCV) 組合成假型病毒顆粒是可行的，而 C 型肝炎病毒屬於黃質病毒科，其與登革病毒有相同的結構及組成，所以未來可繼續改善方法與技術以成功產生假型病毒顆粒。

Abstract

Dengue virus (DV), a member of the family *Flaviviridae*, is an enveloped, single-stranded positive sense RNA virus. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever (DF/DHF) are caused by the dengue viruses that represent a global public health problem. In the process of virus entry, the envelope protein (E protein) plays an important role. It is a glycoprotein of 495 amino acids, with a transmembrane domain at the C-terminal. The extracellular domain of E protein is thought to interact with the host cell receptor. There is no discernable change in the host cell that infected by dengue virus. In general, one can only use plaque assay to determine whether the propagation is successful. However, not every cell line infected can produce plaques and even if it can, the plaque formation needs 5~7 days. Those events make research in dengue virus difficult. The objectives of this study were to generate infectious pseudotyped-particles that were assembled by functional dengue virus E proteins onto retroviral core particles. In this assay, mammalian cells are cotransfected with 3 plasmids, one expressing the retroviral proteins—except the envelope—from murine leukemia virus, another expressing the replication-defective retroviral genome with β -galactosidase gene marker, and the other expressing the E gene from dengue virus. In conclusion: First, the recombinant proteins of DV-2 E protein fused with His-tag can be detected in the *E.coli* expression system by Western blotting analysis but not in BHK21. Second, the DV E proteins can reach the cell surface because the stable cell lines transfected with the plasmid expressing DV E gene displayed syncytium. Third, in this study, no pseudotype viruses were detected. Further studies are required.

誌謝

兩年餘的研究生活，感謝楊昀良老師的耐心指導與訓練，讓我的思緒更富條理性以及邏輯性，亦使我在實驗與生活上受益匪淺，同時並感謝林茗吟老師及岳嶽老師在口試與論文修改方面提供了諸多寶貴的建議，在此致上最誠摯的謝意。

研究生活中，感謝實驗室每位成員的陪伴，使得我能順利完成論文。謝謝美惠學姊在實驗上的經驗分享，雅文學姊與助理貴榮的適時鼓勵與實驗上的幫助，同窗建孝、婷尹、馥嘉、宛真彼此的加油鼓勵互相扶持，研究所學弟妹怡瑾、志豪、歐陽、杏枚、育穎、欣彬、金蓉與大學部學弟妹逸修、政毅、虹綾、欣悟、曜禎、大馨、瀨云、佳叡、萍芳、柏伶、宗翰愉快的相處，因為你們的存在，使我的研究生生活中充滿了歡笑與美好的回憶，謝謝你們。

從大學到現在，一路上需要感謝的人很多。感謝大學時代的曾哲明教授、敬儀學姊、倩君學姊、國宏學長引領我這個新手進入生科的殿堂；感謝研究助理時期的老闆——曾勝弘醫師與陳芸醫師給予我學習的機會，還有讓我挖了不少寶的國峰學長，以及佳康、心怡、曉倫、淑惠、傳雯、書瑋等同事一直以來的加油打氣。當然，還有高中好友心芸的加油祝福以及一千大學好友——郁婷、喬雯、秀鈴、慧君、慶芳、立琇、惠萍、諺雅在生活上彼此的分享激勵及憂喜與共，你們都是我生命中不可或缺的好朋友。

最後，要感謝非常關心我的爺爺奶奶、親愛的父母在生活上與精神上給予我無限的包容與支持、姐姐不時的噓寒問暖及家族成員們一直以來的關懷，讓我得以無後顧之憂的成長學習，有你們真好。

目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目 錄.....	iv
圖目錄.....	vii
附表圖目錄.....	ix
縮寫表.....	x
壹、緒論.....	1
1.1 登革熱之簡介.....	1
1.2 登革病毒的歷史與現況.....	1
1.3 登革病症的臨床病徵.....	2
1.4 登革病毒之分子生物學背景.....	3
1.5 登革病毒外膜蛋白 (E protein) 的已知特性.....	5
1.6 假型病毒顆粒 (pseudotyped viral particles)	6
貳、材料與方法.....	8
2.1 實驗材料.....	8
2.1.1 菌株.....	8
2.1.2 細胞株.....	8
2.1.3 病毒.....	8
2.1.4 質體.....	8
2.1.5 引子.....	10
2.1.6 藥品試劑.....	11
2.1.6.1 藥品.....	11
2.1.6.2 抗體.....	14
2.1.6.3 試劑.....	14
2.1.7 溶劑及緩衝液之配方.....	15
2.1.8 主要儀器.....	17

2.2 實驗方法.....	18
2.2.1 大腸桿菌勝任細胞 (competent cell) 的製備.....	18
2.2.2 大腸桿菌轉形作用 (transformation)	19
2.2.3 小量質體DNA萃取.....	19
2.2.4 大量質體DNA萃取.....	19
2.2.5 限制酵素反應.....	20
2.2.6 萃取洋菜膠內之DNA片段.....	20
2.2.7 重組E蛋白在大腸桿菌之誘導表現2.2.7 重組E蛋白在大腸桿 菌之誘導表現.....	21
2.2.8 大腸桿菌蛋白質之萃取.....	21
2.2.9 哺乳動物細胞蛋白質之萃取.....	22
2.2.10 以SDS-PAGE分析並以Coomassie blue staining及西方轉漬分 析(Western blot analysis)偵測蛋白質表現.....	22
2.2.10.1 SDS-PAGE電泳.....	22
2.2.10.2 Coomassie blue staining.....	22
2.2.10.3 西方轉漬分析(Western blot analysis).....	23
2.2.11 細胞培養 (cell culture)	23
2.2.12 細胞株轉染 (transfection)	24
2.2.13 細胞株RNA萃取 (RNA extraction)	24
2.2.14 北方轉漬分析(Northern blot analysis).....	25
2.2.14.1 製備DNA探針 (DNA probe labeling)	25
2.2.14.2 轉漬RNA (transfer)	25
2.2.14.3 雜交反應 (hybridization)	26
2.2.14.4 免疫偵測 (immunological detection)	26
2.2.15 穩定轉染細胞的篩選(selection of stable transfected cells).....	27
2.2.16 登革病毒的增殖 (amplification of dengue virus)	27
2.2.17 溶斑試驗(plaque assay).....	27
2.2.18 共同轉染(co-transfection)到哺乳動物細胞株.....	28

2.2.19 測試假型病毒顆粒 (pseudotyped viral particles) 的效價.....	28
2.2.20 利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒.....	29
2.2.21 X-gal staining.....	29
參、結果.....	30
3.1 pcDNA3-E14之定序及序列比對.....	30
3.2 pET-30a(+)-E14質體之建構.....	30
3.3 pcDNA3-His-E14質體之建構.....	31
3.4 pET-30a(+) Δ 5T-E14質體之建構.....	31
3.5 pcDNA3-D3E質體之建構.....	31
3.6 利用限制酵素以確認所建構之質體.....	32
3.7 登革病毒外膜蛋白 (E protein) 在 <i>E.coli</i> 中的表現.....	33
3.7.1 截短型外膜蛋白 (truncated E protein) 之表現.....	33
3.7.2 全長外膜蛋白 (full-length E protein) 之表現.....	34
3.8 登革病毒截短型外膜蛋白 (truncated E protein) 在 mammalian cell 中的表現.....	36
3.9 登革病毒外膜基因 (E gene) 之表現.....	37
3.10 穩定細胞株的細胞型態變化與溶斑試驗.....	37
3.11 pMD.gagpol質體之 <i>gag-pol</i> gene 的表現.....	38
3.12 共同轉染以產生假型病毒顆粒.....	38
3.13 利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒.....	38
肆、討論.....	40
4.1 DNA序列比對結果.....	40
4.2 登革病毒截短型外膜蛋白 (truncated E protein) 的表現.....	40
4.3 登革病毒全長外膜蛋白 (full-length E protein) 的表現.....	41
4.4 穩定細胞株的細胞型態變化與溶斑試驗.....	43
4.5 假型病毒顆粒.....	43
伍、結論.....	46
陸、參考文獻.....	47

圖目錄

圖一、定序pcDNA3-E14質體上之insert (DV-2 E gene) 序列與Taiwan local strain PL046及New Guinea-C(M29095)作序列比對.....	53
圖二、pET-30a(+)-E14質體建構之示意圖.....	54
圖三、pcDNA3-His-E14質體建構之示意圖.....	55
圖四、pET-30a(+) Δ 5T-E14質體建構之示意圖.....	56
圖五、pcDNA3-D3E質體建構之示意圖.....	57
圖六、利用限制酵素確認pcDNA3-E14質體.....	58
圖七、利用限制酵素確認pET-30a(+)-E14質體.....	59
圖八、利用限制酵素確認pcDNA3-His-E14質體.....	60
圖九、利用限制酵素確認pET-30a(+) Δ 5T-E14質體.....	61
圖十、利用限制酵素確認pcDNA3-D3E質體.....	62
圖十一、以anti-His-HRP及anti-HA-HRP抗體偵測pKRY1 (pcDNA3- tE-HAHis)在 <i>E.coli</i> BL21(DE3)的蛋白質表現.....	63
圖十二、以anti-DV-2 domain III抗體偵測pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)及pcDNA3-E14在 <i>E.coli</i> BL21(DE3)的蛋白質表現.....	64
圖十三、pET-30a(+)-E14質體轉譯蛋白質之示意圖.....	65
圖十四、以anti-His-HRP抗體偵測pET-30a(+)-E14在 <i>E.coli</i> Novablue(DE3)的蛋白質表現.....	66
圖十五、以anti-His-HRP抗體偵測pcDNA3-His-E14在 <i>E.coli</i> Novablue (DE3)的蛋白質表現.....	67
圖十六、pET-30a(+) Δ 5T-E14質體轉譯蛋白質之示意圖.....	68
圖十七、以anti-His-HRP抗體偵測pET-30a(+) Δ 5T-E14在 <i>E.coli</i> Novablue (DE3)的蛋白質表現.....	69
圖十八、以12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)在BHK-21 cell與293T cell中的蛋白質表現...	70
圖十九、以anti-His-HRP及anti-HA-HRP抗體偵測pKRY1 (pcDNA3- tE-	

HAHis)在BHK-21 cell與293T cell中的蛋白質表現.....	71
圖二十、pcDNA3-E14在BHK-21 cell與293T cell表現mRNA的Northern blot結果.....	72
圖二十一、pcDNA3-D3E在BHK-21 cell與293T cell表現mRNA的Northern blot結果.....	73
圖二十二、穩定細胞株的細胞型態.....	74
圖二十三、各穩定細胞株之fusion index.....	75
圖二十四、穩定細胞株的溶斑試驗結果.....	76
圖二十五、pMD.gagpol在BHK-21 cell與293T cell表現mRNA的Northern blot結果.....	77
圖二十六、產生假型病毒顆粒示意圖.....	78
圖二十七、假型病毒顆粒的產生.....	79
圖二十八、利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒.....	80
圖二十九、確認病毒感染共同轉染後之BHK21細胞.....	81
圖三十、recombinant DV-2 E protein之protease作用切位推測圖.....	82

附表圖目錄

附表一、DV-2之Taiwan local strain PL046與New Guinea-C strain (Accession No. M29095)的E gene (1-495 amino acids)序列比較 之變異處.....	83
附圖一、1987至2004年台灣地區登革熱本土及境外移入確定病例分布....	84
附圖二、Flavivirus life cycle.....	85
附圖三、pBAG.....	86
附圖四、pMD.gagpol.....	87
附圖五、pcDNA3-E14質體之示意圖.....	88
附圖六、pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)質體之示意圖.....	89
附錄一、ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (Premier)	90
附錄二、PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Purification kit (Invitrogen)	91
附錄三、PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Premier)	93
附錄四、pET30a(+)質體之 map.....	95
附錄五、pBluescript II SK(+/-)之 map.....	96

縮寫 (Abbreviation)

APS	Ammonium Persulfate
DF	Dengue fever
DHF	Dengue hemorrhagic fever
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSS	Dengue shock syndrome
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
FBS	Fetal bovine serum
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
MEM	Minimum Essential Medium
MOI	Multiplicity of infection
MOPS	3- (N-Morpholino propanesulfonic acid)
MuLV	Moloney murine leukemia virus
PBS	Phosphate buffer saline
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N', N',-tetramethylenediamine
Tween-20	Polyoxyethene-sorbitan monolaurate
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

壹、緒論

1.1 登革熱之簡介

登革熱(dengue fever, DF)病症是一種感染登革病毒(dengue virus, DV)所引起的傳染病。登革病毒可藉由埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白線斑蚊(*Aedes albopictus*)叮咬宿主的途徑進而傳播給人並引起疾病的發生，是現今世界由節肢動物感染人類所造成最重要的病毒性疾病(Guha-Sapir and Schimmer, 2005)。流行病學的統計顯示登革病症好發於熱帶及亞熱帶地區(Monath, 1994)，氣候環境的關係使得這些區域傳播病毒的病媒蚊易於繁殖因而增高了病毒傳播的機會，台灣隸屬亞熱帶國家，每年夏秋之際登革熱的疫情頻傳。又登革病毒現階段並無有效疫苗可以運用，也無有效的治療藥物，因此民眾的健康仍受到登革病毒傳染的威脅。

1.2 登革病毒的歷史與現況

在近代西元歷史上，早在西元 1779 年到 1780 年，登革病毒就已在印尼雅加達、埃及開羅以及北美的費城爆發流行(Ligon, 2005)。1950 年代，登革病毒只在九個國家現蹤，到了今日，登革病毒已分布超過一百個國家(Guha-Sapir and Schimmer, 2005)。根據世界衛生組織(World Health Organization, WHO)的統計數據顯示，每年感染登革病毒的人口數都在增加，據估計有超過二十五億的人口是生活在遭受登革病毒感染的威脅下，雖然其中大部分的感染者無明顯症狀產生，但仍有為數不少的感染者會出現 DF 症狀或是更嚴重的 DHF/DSS 症狀，其中 DHF/DSS 的致死率達 5 % (Guha-Sapir and Schimmer, 2005)。在台灣，曾在 1915、1931、1942 年發生三次全島性登革熱大流行以及 1981 年屏東縣琉球鄉爆發第二型登革病毒疫情(Wu, 1986)。根據行政院衛生署疾病管制

局的統計顯示，近年來每年或多或少都有登革熱的確定病例(如附圖一所示)，除了陸陸續續出現的境外移入病例，本土型登革病毒感染的病例也有週期性增加的趨勢(行政院衛生署疾病管制局, 2004)。

1.3 登革病症的臨床病徵

臨床上，登革病毒 (dengue virus, DV) 依其血清抗原的不同可分為四個血清型 (serotype)，分別是DV-1、DV-2、DV-3及DV-4，根據台灣地區的登革疫情統計，四型的病毒感染皆發生。當DV隨蚊子唾液進入人體內並於血管內皮細胞中短暫增殖後 (潛伏期 3 到 14 天，平均 4 到 7 天(Kao et al., 2005))，DV再釋放到血流中造成病毒血症 (viremia) 並破壞組織，病患開始有臨床症狀出現。臨床症狀可能為無症狀 (asymptomatic)，或依其嚴重程度可區分為三種：登革熱 (dengue fever, DF)、登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 以及登革休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS)。

感染登革病毒的病患初期只會引起輕微的 DF 病症，類似感冒的症狀，如：發燒、頭痛、眼窩疼痛、肌肉關節痠痛、皮膚紅疹、淋巴結腫大及白血球減少的病徵(Nimmannitya, 1987)，在臨床實驗室的診斷上，亦發現患有DF的病患嗜中性白血球較低 (neutropenia) 與血小板較少 (thrombocytopenia) 的現象。多數病人的初次感染都可自然的痊癒，但有些報導指出，在某些情況下，如遭受 DV 的二次感染 (secondary infection) 且是不同血清型的交叉感染將造成嚴重的 DHF/DSS (Gubler, 1998; Guzman et al., 2000)，此一派理論認為這是因為發生ADE (antibody-dependent enhancement) 現象所造成的。DHF 的病徵初期與 DF 相同，即病患持續二至七天發高燒，但在退燒後，DHF 病患由於血管內皮細胞受到影響，造

成血管通透性 (capillary permeability) 增加，因此有血漿漏出 (plasma leakage) 的現象發生，血漿蛋白流至血管外造成水腫，紅血球濃縮 (hemoconcentration)，胸腔液滲出 (pleural effusion) 及產生腹水等現象，同時伴隨有 thrombocytopenia，所以 DHF 病患會在體表或內臟呈現出血現象。DSS 的病徵與 DHF 相同，並伴隨血壓下降而發生休克的現象 (Kalayanarooj et al., 1997)。

在某些病例中可以觀察到初次感染 DV 的情況下，患者亦會有 DHF/DSS 的病症發生，而前述因二次感染造成 DHF/DSS 的致病機轉之說法無法解釋此現象，於是有另一說法認為病患因其所感染的病毒株毒性不同，導致病症的嚴重程度不一，當感染到毒性較劇的病毒時就易造成嚴重的 DHF/DSS 症狀 (Vaughn et al., 1997; Vaughn et al., 2000; Libraty et al., 2002)。還有第三種說法指出 DV 會感染人類的內皮細胞 (endothelial cells) 且會誘發 IL-6 與 IL-8 的產生而導致出現 DHF/DSS 病徵 (Huang et al., 2000)。上述這三種理論可能說明了造成 DHF/DSS 的致病機轉是多因性的 (multi-factorial)，但其詳細的致病機制至今仍未完全明瞭 (Guha-Sapir and Schimmer, 2005)。

1.4 登革病毒之分子生物學背景

登革病毒 (DV) 是一具有正向單股 RNA 的具膜病毒 (enveloped virus)，在分類學上屬於黃質病毒科 (*Flaviviridae*) 的黃質病毒屬 (*Flavivirus*)。完整的病毒直徑大小為 50 nm (Henchal and Putnak, 1990)。DV 的基因體 (genome) 全長 11 kb，在 5'端有 cap 結構，而 3'端則是缺乏 Poly A 序列。此基因體具有單一個 open reading frame，會在粗內質網 (rough endoplasmic reticulum) 先轉譯 (translation) 出一個聚蛋白質 (polyprotein)，再經由病毒本身的蛋白質酵素 (viral protease) 及宿主細胞的訊息酵素

(signalase) 作用，由聚蛋白質產生 (process) 出三個結構性蛋白 (structural protein)：衣殼蛋白 (capsid protein, C)、前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, prM) 及外膜蛋白 (envelope protein, E)，和七個非結構性蛋白 (non-structural protein) 包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5(Henchal and Putnak, 1990)。

衣殼蛋白 (C) 會包住病毒的核酸形成核衣殼核心 (nucleocapsid core)；前驅膜蛋白 (prM) 會幫助外膜蛋白 (E) 摺疊與組裝，前驅膜蛋白經切割後會形成 pr peptide 和膜蛋白 (M)，膜蛋白和外膜蛋白同為鑲嵌在病毒外套上的蛋白質(Mukhopadhyay et al., 2005)。非結構性蛋白一般認為是參與病毒複製、轉錄及轉譯病毒蛋白過程中的功能蛋白；NS1 是一個糖蛋白，它參與病毒複製的功能未明(Henchal and Putnak, 1990)；NS2A 對於 NS1 processing 扮演重要角色(Falgout et al., 1989)；NS2B 在病毒前驅膜蛋白切割過程中具有輔助的角色，可以幫助 NS3 作用於 NS2A/2B、NS2B/NS3、NS3/NS4A 及 NS4B/NS5 等接合處進行切割(Falgout et al., 1991; Falgout et al., 1993)。NS4A 與 NS4B 功能未明；NS5 為一 RNA dependent RNA polymerase (Liu et al., 2002)。

在病毒複製的過程，目前最普遍的看法是：當病毒顆粒 (virion) 的外膜蛋白與宿主細胞的受體 (receptor) 結合後，經由內胞飲作用 (endocytosis) 進入宿主細胞。病毒顆粒被包在內體小泡 (endosomal vesicle) 的酸性環境中，使得病毒顆粒的構形發生改變，病毒和細胞的細胞膜融合 (fusion) 在一起，將病毒的 nucleocapsid 釋放到細胞質中，之後經由去外套蛋白 (uncoating) 的程序使病毒的基因體 (genome) 釋出於細胞質中，基因體進行轉錄、轉譯的工作，新合成的 RNA 及結構性蛋白進入到內質網的內腔中，接著 RNA 及結構性蛋白在內質網的表面組合成未成熟且不具感染力的病毒顆粒，細胞再將之運送到反式高爾基氏網 (trans-Golgi network)，經由

宿主細胞蛋白酶修飾後，此時病毒顆粒已成熟並具感染力，此成熟的病毒顆粒隨即經由細胞的胞泌作用（exocytosis）釋放到細胞外(Mukhopadhyay et al., 2005)（如附圖二所示）。

1.5 登革病毒外膜蛋白（E protein）的已知特性

E protein 有 495 個胺基酸，分子量約 60 kDa。它是一醣蛋白（glycoprotein），為成熟登革病毒顆粒表面上最主要的結構性蛋白，位於病毒脂質雙層膜的外側，是一個穿膜蛋白質，在與細胞受體結合及與宿主細胞膜融合皆扮演重要角色(Allison et al., 2001)。同時，它也是引起寄主保護免疫的一級抗原且為病毒中和試驗中的主要抗原，故 E protein 直接地影響著登革病毒的感染宿主範圍與細胞感染趨性（cellular tropism）(Heinz, 1986; Chiu and Yang, 2003)。

近年來，已有學者以 X-ray 繞射的方法解出登革病毒二型（DV-2）及同為黃質病毒屬的 TBEV（tick-borne encephalitis virus）的 E protein 之結晶結構，此解出的 E protein 結構只包含位在脂質膜外的蛋白質部分（ectodomain : residues 1-395）(Rey et al., 1995; Modis et al., 2003; Zhang et al., 2004)。根據此結構，E protein 是以頭對尾（head-to-tail）的方式兩兩成對成為雙體（dimer）模式，以一個單體（monomer）的 E protein 而言，其膜外部分可分為三個區域（domain）：domain I、domain II 及 domain III。Domain I 包含了第 1-51、132-192 及 280-295 的胺基酸，是 E protein 的中央區域；domain II 包含了第 52-131 和 193-279 的胺基酸，負責和另外一個 E protein 形成雙體，domain II 的末端含有一個 fusion peptide（第 98-110 的胺基酸）(Allison et al., 2001)，fusion peptide 影響著病毒是否能夠成功感染宿主細胞；而 domain I 的另一端則與 domain III 接合，domain III 包含第 296-394 的胺基酸，是一個 immunoglobulin (Ig) -like domain，被認為是與宿主細胞

之受體結合的位置，單株抗體可辨識 domain III 以中和病毒，阻礙病毒入侵宿主細胞 (Thullier et al., 1999; Crill and Roehrig, 2001 ; Chiu and Yang, 2003; Mukhopadhyay et al., 2005)。

在中性酸鹼值的環境下，E protein 形成雙體結構，而當病毒顆粒進入宿主細胞後，一開始病毒顆粒會被包在內體小泡 (endosomal vesicle) 的酸性環境中，在酸性環境的催化下，E protein 的雙體結構 (dimer) 會分離成單體 (monomer) 後，再聚集成三體結構 (trimer) (Allison et al., 1995; Stiasny et al., 1996; Stiasny et al., 2001)。E protein 的 domain II 因為蛋白質構型的改變，突出於 E protein 雙體原本構成的平面之上，促使病毒的外套膜和細胞內膜進行膜融合。

1.6 假型病毒顆粒 (pseudotyped viral particles)

假型病毒顆粒 (pseudotyped viral particles) 簡言之就是其病毒顆粒成分部分來源於一種病毒而其他部分來源於另一種病毒。因此若有相同的外膜成分，假型病毒的感染過程和真病毒相同，故可模擬病毒感染的早期過程，且假型病毒內可以重組基因方式使之攜帶報告基因 (reporter gene)，可以快速方便的進行各種檢測和分析，所以假型病毒可用來研究病毒和宿主細胞的關係。

過去的研究證明顯示反轉錄病毒 (retroviruses) 能夠混合組裝外來它種病毒的糖蛋白 (Ott, 1997; Sandrin et al., 2002) 以及結合並表現來自無複製能力病毒顆粒中之報告基因的能力 (Negre et al., 2002)，結合以上兩種特性，可以產生能夠表現正常未修飾過之它種病毒的糖蛋白的假型病毒顆粒以利進行生物體外的一些感染試驗分析 (in vitro infection assay) (Bartosch et al., 2003)。

前人研究顯示將三個不同質體：一為帶有 HCV 外膜蛋白基因、二為帶有

MLV (murine leukemia virus) *gag-pol* 基因、三為能表現失去複製能力但帶有 GFP 報告基因的 MLV genome 之質體——共同轉染至 293T 細胞株中可產生出具有感染能力的假型顆粒 (pseudotyped-particles) (Bartosch et al., 2003)。HCV 屬於黃質病毒科，而 MLV 屬於反轉錄病毒科，此研究證明了不同科之病毒組合成假型病毒顆粒之可行性，又登革病毒 (DV) 與 HCV 同為黃質病毒科，因此本論文嘗試產生一帶有登革病毒二型外膜蛋白之小鼠白血病毒 (MLV)。



貳、材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 菌株

Escherichia coli DH5 α (Yang laboratory collection)

Escherichia coli BL-21(DE3) (Yang laboratory collection)

Escherichia coli NovaBlue(DE3) (Novagen)

2.1.2 細胞株

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

293T (人類胚胎腎臟上皮細胞, human embryo kidney epithelial cell)

C6/36 (白線斑紋細胞, *Aedes albopictus* larva cell)



2.1.3 病毒

PL046 strain (Dengue virus type 2 Taiwan local strain)

H87 strain (Dengue virus type 3 strain)

2.1.4 質體

質體名稱	特性	Reference
pcDNA3	篩選標誌為 Ampicillin，並含 T7 promoter 及 CMV promoter	Invitrogen
pBluescript II SK(+)	篩選標誌為 Ampicillin，並含 <i>lac</i> promoter 及 T7 promoter	Stratagene

pET-30a(+)	篩選標誌為 Kanamycin，並含 T7 promoter、His-tag 及 S-tag 序列	Novagen
pET-30a(+) Δ 5T	pET-30a(+) 的 N-terminal His-tag 及 S-tag 序列 被切除	楊昀良 實驗室
pcDNA3-E14	pcDNA3 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene，其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Xho</i> I 及 <i>Xba</i> I	楊昀良 實驗室
pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)	pcDNA3 上含 PL046 strain 的 truncated DV-2 E gene(a.a. 1~402)，3'端並帶有 HAHis-tag， 其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Xho</i> I 及 <i>Apa</i> I	楊昀良 實驗室
pET-30a(+)-E14	pET-30a(+) 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene，其 5'端及 3'端 cloning site 皆為 <i>Not</i> I	本研究
pcDNA3-His-E14	pcDNA3 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene，5'端帶有 His-tag，其 5'端及 3'端 cloning site 皆為 <i>Xba</i> I	本研究
pET-30a(+) Δ 5T-E14	pET-30a(+) Δ 5T 上含 PL046 strain 的 full- length DV-2 E gene，3'端帶有 His-tag，其 5' 端及 3'端 cloning site 為 <i>Sac</i> I 及 <i>Xho</i> I	本研究
pcDNA3-D3E	pcDNA3 上含 H87 strain 的 full-length DV-3 E gene，其 5'端及 3'端 cloning site 為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Xba</i> I	本研究
pBAG	Retroviral vectorg 上含 β -galactosidase gene 以作為 reporter gene 之用（如附圖三所示）	楊昀良 實驗室

pMD.gagpol	含 MuLV <i>gag-pol</i> gene (如附圖四所示)	Ory et al., 1996
pAmpho gp85	含 MLV amphotropic envelope gene	楊昫良 實驗室

2.1.5 引子

引子	序列 5'~3'	位置
E14-A	TTCCTGTGTCATTTCCGACT	DV-2 (NGC; M29095) gene: 1386~1405
E14-B	TTGTGATAACACCTCACTCA	DV-2 (NGC; M29095) gene: 1352~1371
E14-C	TCTCCATGTAAGATCCCTTT	DV-2 (NGC; M29095) gene: 1927~1946
D3E-F	AAGGATCCATGAGATGTGTGGGAGTAGG AAAC	DV-3 (H87; M93139) gene: 935~958
D3E-R	GCTCTAGATTAAGCTTGCACCACGACCC	DV-3 (H87; M93130) gene: 2397~2413
E14His-F	CGAGCTCATGCGTTGCATAGGAATA	DV-2 (NGC; M29095) Gene: 937~954
E14His-R	TTCTCGAGGGCCTGCACCATAACT	DV-2 (NGC; M29095) gene: 2406~2421

2.1.6 藥品試劑

2.1.6.1 藥品

藥品名稱	製造公司	目錄編號	應用
1kb DNA ladder	SibEnzyme	SEM11C001	DNA 電泳
2-propanol	Sigma	I 9516	萃取 RNA
Acetic acid	Fluka	33209	Western Blot
Acryl/Bis 37.5:1 solution	AMRESCO	0254	Western Blot
Agarose	VEGONIA	9201-05	核酸電泳
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養
Anti-DIG-Ab	Roche	1 093 274	Northern Blot
APS	Bio-Rad	161-0700	Western Blot
Blocking reagent	Roche	1 096 176	Northern Blot
CaCl ₂	Riedel-de Haën	31307	Transfection
Chloroform	Riedel-de Haën	32211	萃取 RNA
Coomassie Brilliant Blue R-250	J.T.Baker	F792-01	蛋白質染色
Crystal Violet	Sigma	C-3886	Staining
CSPD	Roche	1 655 884	Northern Blot
DEPC	Sigma	D 5758	Northern Blot
DIG DNA Labeling mix	Roche	1 277 065	Northern Blot
DMEM	GIBCOBRL	12800-017	細胞培養
DMSO	Sigma	D-8418	冷凍細胞

ECL substrate	PIERCE	34079	Western Blot
EDTA	AMRESCO	0105	緩衝液
EtBr	Sigma	E-7637	Staining
Ex Tag polymerase	TaKaRa	RR001B	質體構築
Fetal Bovine Serum	Biological industries	04-001-1A	細胞培養
Formaldehyde	Riedel-de Haën	33220	固定細胞 NorthernBlot
Formamide	Riedel-de Haën	33272	Northern Blot
G418(GENETICIN)	GIBCO	11811-031	細胞培養
Glutaraldehyde	Fluka	49630	固定細胞
HEPES	J.T.Baker	4018-01	Transfection
Hexanucleotide mix	Roche	1 277 081	Northern Blot
IPTG	MDBio,Inc.	105039	細菌培養
K ₃ Fe(CN) ₆	Sigma	P-3667	Staining
K ₄ Fe(CN) ₆ · 3H ₂ O	Sigma	P-3289	Staining
Kanamycin	Sigma	K4000	細菌培養
Klenow enzyme	Roche	1 008 404	Northern Blot
LB agar	Alpha Biosciences	L12-111	細菌培養
LB broth	Scharlau	02-385	細菌培養
Maleic acid	Fluka	63190	Northern Blot
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methanol	Mallinckrodt	3016-08	Western Blot

Methylcellulose	Sigma	M 0512	Plaque assay
MOPS	MERCK	1.06126.0025	Northern Blot
NaCl	AMRESCO	0241	緩衝液
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液
Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher&Schuell	10401396	Western Blot
PMSF	Fluka	78830	Protein 製備
Polybrene	Sigma	H-9258	細胞培養
Protein marker	TBB	0901	SDS-PAGE
Restriction enzyme	TakaRa, Biolab	—	質體構築
SDS	Riedel-de Haën	62862	Northern Blot Western Blot
T4 DNA ligase	Fermentas	1812	質體構築
TEMED	Sigma	T-9281	Western Blot
Tris (base)	AMRESCO	0826	Northern Blot Western Blot
Trypsin	GIBCO	12605-010	細胞培養
Tween-20	Sigma	P-1379	Northern Blot Western Blot
Urea	Fluka	SK-2644U	Protein 製備
X-film	Midwest Scientific	LA7111	Northern Blot Western Blot
X-gal	MDBio,Inc.	613049	Staining

β -mercaptoethanol	MERCK	1.1543.0100	Protein 製備
--------------------------	-------	-------------	------------

2.1.6.2 抗體

抗體名稱	製造公司	目錄編號
HA-probe(F-7)HRP	Santa Cruz	SC-7392
His-probe(H-3)HRP	Santa Cruz	SC-8036 HRP
6xHis Monoclonal Antibody	BD Biosciences	8916-1
Goat anti-mouse HRP	Pierce	31430
Rabbit anti-DV-2 E domain III polyclonal antibody	張雯博士, 中研院分生所	無

2.1.6.3 試劑

試劑名稱	製造公司	目錄編號	應用
TRI reagent	Molecular Reserarch Center, Inc.	TR-118	萃取 RNA
PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Purification kit	Invitrogen	K2100-07	抽取大量質體
ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit	Premier	N-PM050	抽取小量質體
PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Premier	N-DCE050	純化 DNA

2.1.7 溶劑及緩衝液之配方

- 0.25% Coomassive blue stain solution
2.5g Coomassive brilliant blue , 50% methanol , 10% acetic acid added
dd H₂O to 1000 ml
- 0.5% crystal violet solution (500 ml)
2.5 g crystal violet , 25 ml 37% formaldehyde , 250 ml EtOH , 4.25g NaCl
- 0.5% glutaraldehyde
25% glutaraldehyde 以 1X PBS dilute
- 10X MOPS Electrophoresis buffer
0.22 M MOPS (pH 7.0) , 20 mM sodium acetate , 10 mM EDTA (pH 8.0)
- 10X SDS-PAGE running buffer
0.25 M Tris base , 1.92 M Glycine , 1% SDS
- 10X transfer buffer
39 mM Glycine , 48 mM Tris base , 10% SDS , 20% methanol
- 1X PBS (pH 7.4)
137 mM NaCl , 10 mM Na₂HPO₄ , 2.7 mM KCl , 1.8 mM KH₂PO₄
- 20X SSC buffer (pH 7.0)
3 M NaCl , 300 mM sodium citrate
- 2X HEPES-buffer saline (HeBS)solution (pH7.05~7.12)
0.28 M NaCl , 0.05 M HEPES , 1.5 mM Na₂HPO₄
- 2X SDS-PAGE loading buffer
0.5% bromphenol blue , 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) , 10% SDS , 100% glycerol
- 5% Blocking buffer
2.5g nonfat powdered milk dissolved in 50ml 1X TBS buffer

- 50X 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
- Blocking solution
1 % (w/v) blocking reagent dissolved in maleic acid buffer
- Cell lysis buffer (RIPA buffer)
0.1% SDS , 1% Triton X-100 , 1% NP-40 , 10 mM Tris-HCl (pH7.4) , 1 mM
MgCl₂ , 1 mM PMSF
- Detection buffer (pH 9.5)
0.1 M Tris-Cl , 0.1 M NaCl
- LB (Luria-Bertani)/Ampicillin 培养基
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Ampicillin
- LB (Luria-Bertani)/Kanamycin 培养基
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Kanamycin
- LB (Luria-Bertani) 培養液
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl
- Maleic acid buffer (pH 7.5)
0.1 M Maleic acid , 0.15 M NaCl
- Prehybridization/Hybridization solution (pH 7.0)
0.5 M sodium phosphate (pH 7.2) , 7% (w/v) SDS , 1 mM EDTA
- TBS buffer (Tris-buffered saline)
10mM Tris(pH 8.0) , 150 mM NaCl
- TBST buffer
10mM Tris(pH 8.0) , 150 mM NaCl , 0.05% Tween 20

- Washing buffer (pH 7.5) (Northern Blot 之用)
0.1 M Maleic acid , 0.15 M NaCl , 0.3% (v/v) Tween 20
- X-gal staining buffer
5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg/ml X-gal

2.1.8 主要儀器

- 20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
- 4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
- 80°C 超低溫冷凍櫃 925/926 (FORMA SCIENTIFIC)
- 二氧化碳培養箱 5420-0NEW (NAPCO)
- 水平式電泳槽 MJ-105 (MEDCLUB)
- 水平式震盪器 S-101 (FIRSTEK)
- 加熱攪拌器 PC-420 (CORNING)
- 半乾式電泳轉印槽 TRANS-BLOT[®] SD CELL 221BR (BIO-RAD)
- 血球計數器(MARIEMFELD)
- 低溫培養箱 701 (WISOOM)
- 往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 直立式電泳槽(Bio-Rad)
- 恆溫式震盪培養箱 S300R (FIRSTEK SCIENTIFIC)
- 倒立顯微鏡 CK40 (OLYMPUS)
- 核酸計算儀 GeneQuant pro (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
- 桌上型低溫高速離心機 Centrifuge 5804 R (eppendorf)
- 桌上型高速離心機 5100 (KUBOTA CORPORATION)
- 乾燥加熱板 VH-01 (VIOLET BIO SCIENCE)

無菌操作台 (Laminar flow) VCM-420 (造鑫)
程式溫度控制儀 PTC-100TM (MJ RESEARCH INC.)
微量離心機 MICRO 240A (DENVILLE SCIENTIFIC INC.)
落地型高速離心機 Avanti[®] J-E Centrifuge (BECKMAN)
電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)
電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)
電泳影像處理系統 GEL DOC 2000 (BIO-RAD)
酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)
數位相機 C-5050Z (OLYMPUS)
震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)



2.2 實驗方法

2.2.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備

首先取 *Escherichia coli* 之單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，於 37°C 下震盪培養 (160 rpm/min) 過夜後，取 2 ml 的菌液轉養於 50 ml 的 LB 培養液中，繼續於 37°C 下震盪培養 (160 rpm/min)，直到 OD_{600nm} 介於 0.4 到 0.6 之間。將培養好的菌液轉移至 50 ml 離心管中，置於冰上 20 分鐘，之後在 4°C 下以 3000 rpm 離心 10 分鐘後倒去上清液，接著以 25 ml 4°C 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，在 4°C 下以 2000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，以 5 ml 4°C 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，於 4°C 靜置 18 小時，在 4°C 下以 2000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，以 5 ml 預冷的 0.05 M CaCl₂ (含 15% Glycerol) 懸浮菌體。將菌液以每管 100 μl 分裝至預冷好的微量離心管中，迅速儲存於 -80°C 冰箱備用。

2.2.2 大腸桿菌轉形作用 (transformation)

將儲存於-80°C的勝任細胞取出置於冰上解凍後，加入0.1~1 µg的質體DNA充分混合，置於冰上25分鐘，再置於42°C水浴中進行熱休克 (heat shock) 1分鐘，之後加入 500 µl 的LB培養液於37°C震盪培養 (160 rpm/min) 1小時，取 100 µl 的菌液均勻塗布於含Ampicillin (50 µg/ml) 之LB培養基上，置於37°C恆溫箱中培養12~16小時。

2.2.3 小量質體 DNA 萃取

使用ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (PREMIER) 抽取並純化*E. coli*之質體DNA。操作流程如下：先將菌接種於 5 ml 的LB培養液、37°C培養 12~16 小時，於室溫 2500 rpm離心 12 分鐘以去除上清液，加入 200 µl Solution I Buffer懸浮菌體並移置微量離心管中，取 200µl Solution II Buffer緩和地混合均勻後，加入 200 µl Solution III Buffer再次緩和地混合均勻，在室溫下以 13000 rpm離心 5 分鐘離下菌體，取上層液至Mini-M™ Column，在室溫下以 13000 rpm離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，加入 700 µl Washing buffer，在室溫下以 13000 rpm離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，加入 700 µl Washing buffer，在室溫下以 13000 rpm離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，再以室溫 13000 rpm離心 3 分鐘，將Mini-M™ Column移至新微量離心管，於 60°C的烘箱中 5 分鐘把多餘的酒精去除，最後以 30~50 µl二次無菌水加入Mini-M™ Column中，以室溫 13000 rpm離心 1 分鐘後，將製備好的質體DNA儲存於-20°C。【附錄一】。

2.2.4 大量質體 DNA 萃取

使用 PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Purification kit

(Invitrogen) 抽取並純化 *E.coli* 之質體 DNA。操作流程大致如下：先將菌接種於 500 ml 的 LB 培養液、37°C 培養至 OD_{600nm} 介於 1.0 到 1.5 之間，於室溫 4000 rpm 離心 10 分鐘以去除上清液，加入 10 ml Resuspension Buffer 懸浮菌體並移置高速離心管中，加入 10 ml Lysis Buffer 緩等地混合均勻後，於室溫下靜置 5 分鐘後，加入 10 ml Precipitation Buffer 再次緩等地混合均勻，在室溫下以 12000 g 離心 10 分鐘離下菌體，取上層液至 Equilibrated Column，在室溫下利用重力讓溶液全部自然流下後，加入 60 ml Wash Buffer，利用重力讓其慢慢自然流下，將 Equilibrated Column 移至新的離心管，加入 15 ml Elution Buffer，利用重力讓其自然流下後，加入 10.5 ml isopropanol 至所得之 elute DNA 溶液中並混合均勻，在 4°C 下以 15000 g 離心 30 分鐘，移除上清液，加入 5 ml 70% ethanol 懸浮 pellet，在 4°C 下以 14000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，將離心管的蓋子打開，斜放置於室溫下 10 分鐘以去除多餘的酒精，最後加入 500 µl TE Buffer 懸浮 pellet，將製備好的質體 DNA 儲存於 -20°C。【附錄二】。

2.2.5 限制酵素反應

為製備實驗所需的 DNA 片段，取適量 DNA (約 0.5~10 µg；視反應需要) 到適量反應體積 (20 µl) 以限制酵素切割 (Sambrook et al, 1989) (酵素的用量及反應溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行)，反應完後，利用洋菜膠體電泳分析。所需的 DNA 片段在經限制酵素切割後，視需要以 PREMIER 之 Gel Extraction Kit 或 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類。

2.2.6 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用 Gel Extraction Kit (PREMIER) 萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。操作流

程如下：將切下之洋菜膠(約 50-200 mg)，置於微量離心管內，加入 500 μ l Binding Solution，60°C 加熱至完全溶解後，將混合液移至 Gel-M™ Column，以室溫 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，加入 700 μ l Washing Buffer，以室溫 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，再加入 700 μ l Washing Buffer，以室溫 13000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體，再以室溫 13000 rpm 離心 3 分鐘，將 Gel-M™ Column 移至新微量離心管，於 55~60 °C 的烘箱中 5 分鐘把多餘的酒精去除，再加入 30 μ l 二次無菌水於 Gel-M™ Column 中，以室溫 13000 rpm 離心 1 分鐘後，將萃取出之 DNA 儲存於 -20°C。

【附錄三】。

2.2.7 重組 E 蛋白在大腸桿菌之誘導表現

將建構好的 pcDNA3-E14 及 pET-30a(+)-E14 質體轉形於大腸桿菌 BL21(DE3) 或 NovaBlue(DE3)，隔天挑單一菌落於含有 Ampicillin 或 Kanamycin (50 μ g/ml) 之 LB 培養液中於 37°C 培養箱震盪培養，隔夜後，取 1/100 之菌液於 5 ml 的 LB 培養液並於 37°C 培養箱震盪培養，至 OD_{600nm} 介於 0.6 到 0.8 之間時，加入 1 mM IPTG 誘導基因表現四小時。

2.2.8 大腸桿菌蛋白質之萃取

大腸桿菌經 IPTG 誘導表現後，於室溫下以 2500 rpm 離心 12 分鐘後去除上清液，接著取 200 μ l 的 1M Tris-HCl (pH8.0) 懸浮菌體並移置微量離心管中，以 13000 rpm 離心 3 分鐘後去除上清液，將此菌體之微量離心管於液態氮及 42°C 恆溫水槽中來回反覆處理 5~6 次，每次 2 分鐘，以打破細胞。然後再取 200 μ l 1M Tris-HCl (pH8.0) 懸浮，在 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液至另一微量離心管中。最後將 pellet 與上清液加入適量的 2X SDS-PAGE loading dye (含 200 mM β -mercaptoethanol 及 8M

Urea) 混合均勻，於室溫放置 30 分鐘以上後，即可用於 run gel 或儲存於-20 °C 備用。

2.2.9 哺乳動物細胞蛋白質之萃取

將細胞的培養液移除，以 1X PBS 清洗細胞一次後，用細胞刮勺 (cell scraper) 刮下細胞後，用 1X PBS 沖洗細胞並將細胞懸浮液移至離心管，在 4°C 下以 1000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 100 ~ 200 μ l 含有 1 mM PMSF 之 RIPA buffer (成分見 2.1.7) 與細胞混合均勻以溶解細胞，接著於 4°C 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液至另一微量離心管中。最後將細胞殘骸與上清液加入適量的 2X SDS-PAGE loading dye (含 200 mM β -mercaptoethanol 及 8M Urea) 混合均勻，於室溫放置 30 分鐘以上後，即可用於 run gel 或儲存於-20°C 備用。

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

2.2.10.1 SDS-PAGE 電泳

首先配製下層 12% resolving gel，室溫靜置 1 小時，膠凝後再配製上層 4% stacking gel，室溫靜置 30 分鐘，待膠體硬化後移至 Mini-Protein 電泳槽 (Bio-Rad)，加入 SDS-PAGE running buffer，接著將樣品以微量吸管置入膠體之孔洞中，先以 120 伏特 15 分鐘，待樣品均成一直線後，再以 100 伏特電泳 2 小時，直到 protein marker 的 24 kDa 跑到底部位置。

2.2.10.2 Coomassie blue staining

將 SDS-PAGE 膠體直接浸泡於 0.25% Coomassie blue staining solution

(0.25% Coomassive brilliant blue, 50% methanol, 10% acetic acid) 染 1 小時，再以 Destain solution (30% methanol, 10% acetic acid) 褪染膠體直到結果顯現後，以清水清洗膠體數次，取玻璃紙濕貼於玻璃上，放上膠體，蓋上玻璃紙，完全包裹並用夾子固定，待完全乾燥後即可保存。

2.2.10.3 西方轉漬分析(Western blot analysis)

SDS-PAGE 膠體電泳完成後，利用 TRANS-BLOT® SD CELL 221BR (Bio-Rad) 0.09 安培 40 分鐘，使膠體上的 protein 轉漬至醋酸纖維膜 (nitrocellulose membrane, PROTRAN, Schleicher & Schuell)，把膜置入 20~25 ml Blocking buffer (5% skim milk in 1X TBS buffer) 於室溫下平面震盪 1 小時後，再加入稀釋 1/1000 倍的 Anti-His 結合 HRP 之抗體 (SC-8036 HRP, Santa Cruz) 於 Blocking buffer 中於室溫下平面震盪 1 小時以偵測有 His 標誌的蛋白，而 Blocking buffer 中 Anti-His 之抗體最終濃度為 0.2 µg/ml，之後再以 20 ml 之 1X TBST buffer 於室溫下平面震盪 5 分鐘 3 次，最後將 700 µl 之 ECL substrate (PIERCE) 均勻地加到膜上，在暗房內以 X 光底片進行壓片，感光適當時間後，取出底片沖洗顯像。首先，用夾子將底片浸入顯影液 (developer) 中搖晃約 30 秒後，將底片換到清水中漂洗底片約 30 秒，接著將底片浸入定影液 (fixer) 中搖晃約 1 分鐘，最後以大量的流動水清洗底片，將底片晾乾保存。

2.2.11 細胞培養 (cell culture)

BHK-21 cell 培養於添加 5% FBS (Fetal Bovine Serum) 與 0.22% 碳酸氫鈉的 MEM (Minimum Essential Medium; Gibco) 培養液中。

293T cell 培養於添加 10% FBS 與 0.22% 碳酸氫鈉的 MEM 培養液中。

C6/36 cell 培養於添加 10% FBS 與 0.22% 碳酸氫鈉的 MEM 培養液中。

以上這些細胞除了C6/36細胞株置於28°C培養箱外，其餘皆置於37°C、5% CO₂及飽和溼度之恆溫培養箱中進行培養。並視該細胞株之生長速度，以不同稀釋倍數，不同時間間隔做細胞繼代培養。

2.2.12 細胞株轉染 (Transfection)

本研究轉染方式採用碳酸鈣 (Calcium Phosphate) 法作細胞株轉染，將細胞種於培養皿，使其達到約70%的滿度。以 3.5 cm 培養盤為例，將 4 μg 的質體DNA，加入25 μl 的2 M CaCl₂，加滅菌二次水補至總體積250 μl，充分混和。接著將此混和溶液逐滴慢慢加入裝有 250 μl 2X HeBS (HEPES-buffered saline: 0.28 M NaCl, 0.05 M HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄) 溶液的試管中，在加入過程中，並以pasteur pipet在 2X HeBS 中打氣，最後vortex 5秒鐘使其充分混合後，於室溫下靜置20分鐘。將上述DNA/磷酸鈣複合物平均滴入細胞培養盤中，充分混合均勻後，於37°C細胞培養箱中培養16~18小時後，更換新鮮的培養液，繼續於37°C細胞培養箱中培養，每2~3天更換一次新鮮的培養液。

2.2.13 細胞株 RNA 萃取 (RNA extraction)

以 3.5 cm細胞培養盤為列，吸去細胞培養液，以1 X PBS清洗細胞一次後，加入1 ml的TRI reagent，以pipette抽吸細胞數次，使細胞和TRI reagent充分均質化，將溶液轉移至微量離心管內，於室溫下靜置 5 分鐘，然後在室溫下加入 200 μl chloroform，以手搖方式充份混合均勻，於室溫下靜置15分鐘後，在 4°C下以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後，去除下層液，將上清液吸取到另一乾淨微量離心管內，加入 600 μl isopropanol 及 40 μl 3 M sodium acetate (pH 5.2)，於室溫下靜置 8 分鐘，此目的在於沉澱RNA。然後於 4 °C下以 12,000 rpm 離心 8 分鐘，吸去上清液後留下 RNA 沉澱

物，加入 1 ml 已於 4°C 預冷之 75% 冰乙醇充分懸浮 RNA 沉澱物後，於 4 °C 以 7500 rpm 離心 5 分鐘，用微量吸管吸掉上清液後，將微量離心管的蓋子打開，斜放置於室溫下 10 分鐘以去除多餘的酒精，最後加入適量的 DEPC-treated ddH₂O 將 RNA 沉澱物溶解，測定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 吸光值，確定 RNA 的濃度及純度。剩餘之 RNA 樣本儲存於 -80°C 冰箱內保存。

2.2.14 北方轉漬分析(Northern blot analysis)

2.2.14.1 製備 DNA 探針 (DNA probe labeling)

使用 Roche 廠商產品 DIG system (Cat.No.1175033)，以 digoxigenin-11-dUTP (DIG) 標記 DNA，取欲標記的 DNA 15 µl (約 10-30 ng) 置於微量離心管中，於 95°C 加熱 10 分鐘後迅速置於冰上 5 分鐘，然後加入 2 µl 的 hexanucleotide、2 µl 的 10X dNTP labeling mixture 及 1 µl 的 Klenow enzyme (100 unit/ml)，在 37°C 水浴槽中反應 20 小時後，最後加入 2 µl 的 0.2 M EDTA 並於 65°C 加熱 10 分鐘作終止反應，製備完成之 DNA 探針儲存於 -20°C 備用。

2.2.14.2 轉漬 RNA (transfer)

首先進行 1.2 % 洋菜膠配製，秤取 0.6 g 的 agarose 於 36 ml 的 DEPC-treated H₂O 中，微波加熱溶解，待稍微冷卻後加入 5 ml 的 10X MOPS 及 9 ml 的甲醛 (formaldehyde) 混合均勻並製成膠體。而 RNA 樣品進行電泳前之處理：將 12 µg 的 RNA、3.5 µl 的 10X MOPS、5 µl 的 37% formaldehyde、10 µl 的 formamide、3 µl 的 dye 以及 1 µl 的 10 mg/liter ethidium bromide 分別加入微量離心管內並充分混合均勻，於 65°C 加熱 10 分鐘後置於冰上 5 分鐘。將處理好之 RNA 樣品以微量吸管置入洋菜膠之孔洞中，以 50 伏特之電壓進行 RNA 電泳 70 分鐘，電泳結束後，在電泳影像

處理系統照相，之後將膠體浸泡於 50ml 的 10X SSC 中 20 分鐘，接著進行轉漬。主要原理為利用毛細現象之原理，引導 10X SSC 溶液向上流動，進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於耐龍膜 (nylon membrane) 上進行轉漬。其步驟如下：剪裁適當於膠體大小的 Whatman 3MM 濾紙及耐龍膜 (先於 10X SSC 溶液浸泡)，依濾紙、洋菜膠、耐龍膜及 Whatman 3MM 濾紙之順序堆置，並於最上層放置壓瓶。經 14-16 小時後，取出耐龍膜，於核酸快速固定儀中，利用 UV 光 (254 nm; 120 joules) 照射二次作 cross-link 將 RNA 固定於耐龍膜上。

2.2.14.3 雜交反應 (hybridization)

將耐龍膜放置在含 12 ml 的 prehybridization buffer 之培養皿，於 45°C 平面震盪 3 小時，之後將耐龍膜移至含標記探針的 12 ml 的 hybridization buffer 之培養皿中 (探針濃度 50 ng/ml)，於 45°C 平面震盪 18 小時後，將耐龍膜以 50 ml 的 2X Washing solution (2X SSC buffer, 0.1% SDS)，於室溫下平面震盪 20 分鐘，再以 50 ml 的 0.5X Washing solution (0.5X SSC buffer, 0.1% SDS)，於 60°C 平面震盪 20 分鐘。

2.2.14.4 免疫偵測 (Immunological detection)

耐龍膜以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 20 分鐘兩次後，以 25 ml 的 Blocking buffer (Roche Blocking reagent (Cat.No.1096176)) 平面震盪 30 分鐘後，以 15 ml 的 Antibody buffer (Roche Anti-DIG-AP (Cat.No.1093274)) 平面震盪 30 分鐘，之後以 50 ml 的 Washing buffer 於室溫下平面震盪 20 分鐘兩次，再以 30 ml 的 Detection buffer 於室溫下平面震盪 5 分鐘，最後將耐龍膜放置於投影片夾層，取 10 μ l 的 CSPD (Roche Cat.No.1655884) 加入於 1 ml 的 Detection buffer 中，將混合液均勻地加到

耐龍膜上，於 37°C 避光反應 20 分鐘後，在暗房內以 X 光底片進行壓片，經過適當時間曝光後，取出底片沖洗顯像。

2.2.15 穩定轉染細胞的篩選 (selection of stable transfected cells)

將 pcDNA3 與 pcDNA3-E14 質體分別轉染至 BHK-21 細胞株中，置於 37°C 培養箱培養 48 小時後，吸去培養液，以胰蛋白酶(trypsin)打下細胞，留下 1/500 的細胞至 6 cm 細胞培養盤中培養，同時 BHK-21 之細胞培養基置換為含有 600 µg/ml G418 的細胞培養液，如此培養十天後，若有轉染成功的細胞會逐漸生長形成成簇的細胞落，如果沒有則是會逐漸萎縮死亡。接著將單一細胞所形成的細胞落以胰蛋白酶(trypsin)打下，置於 24 well 細胞培養盤中，繼續於含有 600 µg/ml G418 的細胞培養液培養且平均每四天更換一次培養液，直到細胞長滿整個 well 時，將細胞打下，移至 6 cm 細胞培養盤進行擴增培養，G418 的濃度則降至 200 µg/ml 以維持篩選作用，篩選所得之細胞株則可進行其他實驗。

2.2.16 登革病毒的增殖 (Amplification of Dengue virus)

將登革病毒 PL046 strain 以 MOI (multiplicity of infection) = 0.1 感染 C6/36 細胞。將適量的病毒與細胞均勻混合於 1 ml 的培養液中，培養於 37 °C 培養箱，使病毒吸附細胞 2 小時後，充分使細胞懸浮後，將之移到 T75 flask (Falcon) 中，再加入 9 ml 的培養液繼續培養於 28°C 培養箱，於感染後六至八天收集病毒上清液，將之通過 0.22 µm 的 filter 使細胞殘渣過濾掉，最後將病毒上清液分裝到 1.5 ml 的 eppendof 中，冷凍保存於 -80°C 備用。

2.2.17 溶斑試驗 (plaque assay)

待 6 well 細胞培養盤中之BHK-21細胞已長滿至約七~八分滿時，吸掉培養液，以不含血清的培養液（serum-free MEM）清洗細胞一次後，分別加入已經連續稀釋十倍的病毒懸浮液 450 μ l，前後左右搖晃一下培養盤使病毒均勻分布，將培養盤置入 37°C、5% CO₂細胞培養箱使病毒吸附 2 小時之後，每個 well 加入 4 ml 含 1.1% 的methyl cellulose的維持培養基（含 5% FBS之MEM medium）後，再置入37°C、5% CO₂細胞培養箱培養五至六天。經倒立顯微鏡觀察，確定溶斑已經形成後，吸去大部分培養基，加入 3.7% formaldehyde 固定15分鐘，然後吸去溶液，加入足可覆蓋的 0.5% 的結晶紫溶液（crystal violet solution）染色一小時後，以水沖淨，待風乾即可計算溶斑(plaque)的數目，換算病毒效價以 PFU/ml(plaque forming unit/ml) 來表示之。

2.2.18 共同轉染（co-transfection）到哺乳動物細胞株

將含有 *gag-pol* gene的pMD.gagpol質體、含有 β -galactosidase gene的 pBAG質體以及含有病毒外膜蛋白的表現質體（如：pcDNA3-E14、pcDNA3-D3E、pAmpho gp85）以calcium phosphate transfection的方法共同轉染到 293T細胞株中。於轉染前一天，先培養 2.5×10^6 之 293T細胞於 10 cm 的細胞培養盤中，轉染當天，依前述 2.2.12 之方法將上述三種質體分別各取 7 μ g共同轉染至 293T細胞中，轉染 16 小時後，更換新鮮培養液，於開始轉染 40 小時後，以針筒收集一半(4.5 ml)的細胞培養液，接著將所收集的細胞培養液以 0.45 μ m的filter過濾後備用，並同時補加入 4.5 ml的新鮮培養液於原本的 10 cm細胞培養盤中，繼續於 37°C細胞培養箱中培養，於開始轉染 64 小時、88 小時後分別同上述方法收集細胞培養液備用。

2.2.19 測試假型病毒顆粒（pseudotyped viral particles）的效價

將上述 2.2.18 方法中最後過濾好之細胞培養液分別取 1 ml，並同時與 1 ml 的新鮮培養液混合均勻後加到 BHK21 的目標細胞 (target cell) 中，於 37°C 二氧化碳培養箱中培養 48 小時後，進行 X-gal staining 以測試假型病毒顆粒之效價 (titer)。

2.2.20 利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒

將含有 *gag-pol* gene 的 pMD.gagpol 質體及含有 β -galactosidase gene 的 pBAG 質體以 calcium phosphate transfection 的方法共同轉染到 BHK21 或 293T 細胞株中。於轉染前一天，先培養 3×10^5 之 BHK21 細胞或 6×10^5 之 293T 細胞於 3.5cm 的細胞培養盤中，轉染當天，依前述 2.2.12 之方法將上述兩種質體各取 3 μ g 共同轉染至 BHK21 或 293T 細胞中，轉染 16 小時後，更換新鮮培養液並分別感染 MOI=0、1、3 之 DV-2，於開始轉染 48、72、96 小時後，以針筒收集細胞培養液，接著將所收集的細胞培養液以 0.45 μ m 的 filter 過濾後，依上述 2.2.19 方法將過濾好之細胞培養液分別加到 BHK21 的目標細胞中，以測試效價。

2.2.21 X-gal staining

將細胞的培養液移除，以 1X PBS 清洗細胞一次後，加入適量之 0.5% glutaraldehyde 於室溫下靜置 15 分鐘以將細胞固定，再以 1X PBS 清洗細胞三次，每次 3~5 分鐘，最後加入適量新鮮配製的 X-gal staining solution (成分見 2.1.7) 於 37°C 培養箱靜置 2~16 小時，即可觀察細胞染色結果。

參、結果

3.1 pcDNA3-E14 之定序及序列比對

將實驗室已建構好的質體 pcDNA3-E14【附圖五】定序。此質體為以 pcDNA3 為骨架，所含的 insert 為 Dengue virus 2 之 PL046 strain (DV-2 PL046) 全長大小 1485 bp 之 E gene 片段。其 5'端及 3'端有藉由 PCR 引入之 cloning sites: *Xho* I 及 *Xba* I。利用 T7 primer、SP6 primer 及實驗室設計之 primer E14-A、E14-B 與 E14-C，將 insert 予以定序。將定序完之序列組裝及分析，同時與 NCBI 所發表之 DV-2 New Guinea-C strain (M29095) 序列互相比對【圖一】，發現在 PL046 與 NGC 有九個鹼基不同，突變之鹼基位置分別於 1075、1093、1099、1149、1255、1282、2140、2297 及 2356，而鹼基對應的胺基酸位置分別為 E protein 的第 47、53、55、71、107、116、402、454 及 474 個胺基酸，其中第 107 個胺基酸突變為 silent mutation，其餘八個胺基酸突變則會造成胺基酸的改變。此結果與先前 2003 年期刊發表之 Taiwan local strain PL046 的 E gene (Chiu and Yang, 2003) 序列比對結果【附表一】是相符合的。

3.2 pET-30a(+)-E14 質體之建構

建構一在 pET-30a(+) 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene 之質體，使其表達之 E protein 的 N 端帶有 His-tag。使用限制酵素 *Eco*RV、*Xba* I 將上述 DV-2 PL046 所含之 E gene 片段從 pcDNA3-E14 切出，再將此序列選殖於 pBluescript II SK(+) 載體上之 *Eco*RV、*Xba* I 切位，所得到之質體命名為 pBluescript II SK(+)-E14，其 insert 的 5'端之 *Eco*RV 切位後面有一 *Not* I 切位，又 insert 的 3'尾端之 *Xba* I 切位後面為 pBluescript II SK(+) vector 上的 *Not* I 切位，接著使用限制酵素 *Not* I 將 E gene 片段從 pBluescript II

SK(+)-E14 載體切出，再將此序列選殖於 pET-30a(+)上，並以限制酵素 *EcoRI* 確認 insert 為正接方向【圖七-(B)】，最後所得到之質體命名為 pET-30a(+)-E14，此質體建構之示意圖於【圖二】。

3.3 pcDNA3-His-E14 質體之建構

建構一在 pcDNA3 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene 之質體，使其表達之 E protein 的 N 端帶有 His-tag。使用限制酵素 *Xba I* 將 5' 端帶有 His-tag 之 DV-2 PL046 E gene 片段從 pET-30a(+)-E14 切出，再將此序列選殖於 pcDNA3 上，並以限制酵素 *HindIII* 確認 insert 為正接方向【圖八-(B)】，最後所得到之質體命名為 pcDNA3-His-E14，此質體建構之示意圖於【圖三】。

3.4 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體之建構

建構一 pET-30a(+) Δ 5T 上含 PL046 strain 的 full-length DV-2 E gene 之質體，使其表達之 E protein 的 C 端帶有 His-tag。利用 PCR 反應方法以實驗室已有之 cDNA clones 為模板 (template) 得到 dengue virus 2 (DV-2) 之 full-length E gene 片段，並分別在 5' 端引入 *Sac I* 切位及在 3' 端引入 *Xho I* 切位，以協助之後 E gene 能選殖於 pET-30a(+) Δ 5T 載體，最後所得到之質體命名為 pET-30a(+) Δ 5T-E14，此質體建構之示意圖於【圖四】。

3.5 pcDNA3-D3E 質體之建構

建構一 pcDNA3 上含 H87 strain 的 full-length DV-3 E gene 之質體。利用 PCR 反應方法以實驗室已有之 cDNA clones 為模板(template)得到 dengue virus 3 (DV-3) 之 full-length E gene 片段，並分別在 5' 端引入 *BamH I* 切位及在 3' 端引入 *Xba I* 切位及轉譯終止密碼 TAA，以協助之後 E gene 能選殖

於 pcDNA3 載體，最後所得到之質體命名為 pcDNA3-D3E，此質體建構之示意圖於【圖五】。

3.6 利用限制酵素以確認所建構之質體

【圖六】為使用限制酵素切割 pcDNA3-E14 質體所得之結果。Lane 1 為 *Xho* I、*Xba* I 切割 pcDNA3-E14 質體，可得到 5.4 kb(圖中 A 所示) 和 1.5 kb 之 band (圖中 B 所示)；Lane2 為 *Bam* HI 切割 pcDNA3-E14 質體，可得到 5.6kb(圖中 C 所示)、0.8kb(圖中 D 所示)及 0.5kb(圖中 E 所示)之 band；Lane3 為 *Afl*III 切割 pcDNA3-E14 質體，可得到 3.1kb (圖中 F 所示)、2.0kb (圖中 G 所示)及 1.8kb (圖中 H 所示)之 band。

【圖七】為使用限制酵素切割 pET-30a(+)-E14 質體所得之結果。Lane 1 為 *Eco*RI 切割 pET-30a(+)-E14 質體，可得到 5.5kb (圖中 A 所示)和 1.4kb (圖中 B 所示)之 band。Lane 2 為 *Not* I 切割 pET-30a(+)-E14 質體，可得到 5.4 kb(圖中 C 所示) 和 1.5 kb 之 band (圖中 D 所示)；Lane 3 為 *Bam* HI 切割 pET-30a(+)-E14 質體，可得到 5.6kb(圖中 E 所示)、0.8kb(圖中 F 所示)及 0.5kb(圖中 G 所示)之 band；

【圖八】為使用限制酵素切割 pcDNA3-His-E14 質體所得之結果。Lane 1 為 *Hind*III 切割 pcDNA3-His-E14 質體，可得到 6.2 kb(圖中 A 所示)、0.6kb(圖中 B 所示)和 0.3 kb 之 band (圖中 C 所示)；Lane2 為 *Bam* HI 切割 pcDNA3-His-E14 質體，可得到 5.6kb(圖中 D 所示)、0.8kb(圖中 E 所示)、0.5kb(圖中 F 所示)及 0.3kb(圖中 G 所示)之 band；Lane3 為 *Afl*III、*Xba*I 切割 pcDNA3-His-E14 質體，可得到 2.6kb (圖中 H 所示)、2.0kb(圖中 I 所示)、1.3kb(圖中 J 所示)、0.7kb(圖中 K 所示)和 0.4kb (圖中 L 所示)之 band。

【圖九】為使用限制酵素切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體所得之結果。Lane 1 為 *Sac* I、*Xho* I 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體，可得到 5.3 kb(圖中 A

所示) 和 1.5 kb 之 band (圖中 B 所示); Lane2 為 *Bam* HI 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體, 可得到 5.5kb(圖中 C 所示)、0.8kb(圖中 D 所示)及 0.5kb(圖中 E 所示)之 band; ; Lane3 為 *Nco*I、*Ava*I 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體, 可得到 4.3kb(圖中 F 所示)、1.2kb(圖中 G 所示)、0.8kb (圖中 H 所示)及 0.4kb (圖中 I 所示)之 band; Lane4 為 *Afl*III 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體, 可得到 2.7kb(圖中 J 所示)、2.1kb(圖中 K 所示)及 1.9kb(圖中 L 所示)之 band。

【圖十】為使用限制酵素切割 pcDNA3-D3E 質體所得之結果。Lane 1 為 *Bam* HI、*Xba* I 切割 pcDNA3-D3E 質體, 可得到 5.4 kb(圖中 A 所示) 和 1.5 kb 之 band (圖中 B 所示); Lane2 為 *Afl*III、*Stu* I 切割 pcDNA3-D3E 質體, 可得到 2.3kb(圖中 C 所示)、2.0kb(圖中 D 所示)、1.6kb(圖中 E 所示)、0.7kb(圖中 F 所示)及 0.2kb(圖中 G 所示)之 band; Lane3 為 *Nco* I 切割 pcDNA3-D3E 質體, 可得到 3.3kb (圖中 H 所示)、1.8kb (圖中 I 所示)、0.7kb (圖中 J 所示)、0.5kb (圖中 K 所示)及 0.4kb (圖中 L 所示)之 band。

3.7 登革病毒外膜蛋白 (E protein) 在 *E.coli* 中的表現

3.7.1 截短型外膜蛋白 (truncated E protein) 之表現

將實驗室已建構好的 pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)質體【附圖六】轉形於 *E. coli* BL-21 (DE3) 作表現, 所得之轉形菌株(transformants)在 LB broth 中培養, 並加入 IPTG 誘導(induction) 四小時後, 利用 2.2.8 所描述之方法, 把所收取的細胞予以打破, 分為上清液及 pellet, 利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。此重組基因所轉譯之 DV-2 PL046 truncated E protein 含有 402 amino acid residues, 再加上 C 端之 HA-His-tag 為 47 amino acid residues, 預測 tE-HAHis 蛋白質大小約為 49 kDa。首先以 Coomassie blue 染色時, 發現在 pellet 部份可見一條多出來的 band 約為 40 kDa【圖十一-(A) lane 4】, 在 pcDNA3 vector 的 pellet 部分

則無【圖十一-(A) lane 3】。接著使用 anti-HA-HRP 抗體及 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測 E protein 之表現時，可看到 pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)的 pellet 部分在 40 kDa 附近皆有一條明顯的 band【圖十一-(B)(C)】。

3.7.2 全長外膜蛋白 (full-length E protein) 之表現

將實驗室已建構好的 pcDNA3-E14 質體轉形於 *E. coli* BL-21 (DE3) 作表現，所得之轉形菌株(transformants) 在 LB broth 中培養，並加入 IPTG 誘導(induction) 四小時後，利用 2.2.8 所描述之方法，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。此重組基因所轉譯之 DV-2 PL046 full-length E protein 含有 495 amino acid residues，預測 full-length E protein 大小約為 55 kDa。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份與 pcDNA3 vector 比較【圖十二-(A)】，在 55 kDa 附近並無觀察到較粗的 band 或多一條 band。接著使用 anti-DV-2-domain III 抗體藉由 Western blot 同時偵測細胞帶有 pcDNA3-E14 或 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)的 E protein 之表現時，可看到在細胞被轉形了 pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)(帶有 truncated E protein)的 pellet 部分，在 40 kDa 附近有一條明顯的 band，而在 55kDa 附近因為有背景值存在，所以看不出 55 kDa 附近是否有較粗或是多出一條 band【圖十二-(B)】。

將建構好的 pET-30a(+)-E14 質體轉形於 *E. coli* Novablue (DE3) 作表現，所得之轉形菌株(transformants) 在 LB broth 中培養，並加入 IPTG 誘導(induction) 四小時後，利用 2.2.8 所描述之方法，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。預測此重組基因所轉譯之 full-length E

protein 大小約為 55 kDa，再加上其 N 端的 His-tag、thrombin、S-tag 及 enterokinase 之序列約 7 kDa【圖十三】，共約 62 kDa。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份與 pET-30a(+) vector 比較【圖十四-(A)】，在 72 kDa 和 55 kDa 中間並無觀察到較粗的 band 或多一條 band。接著使用 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測在細胞帶有 pET-30a(+)-E14 的 E protein 之表現時，可看到在細胞帶有 pET-30a(+)-E14 的 pellet 部分，在 72 kDa 和 33 kDa 中間共有四條明顯的 bands，分別是大小為介於 72 及 55kDa 間、比 55kDa 大些、約 40 kDa 及比 33 kDa 略大，並有二條較弱的 bands 介於 55kDa 及 40kDa 間【圖十四-(B)】。

將建構好的 pcDNA3-His-E14 質體轉形於 *E. coli* Novablue (DE3) 作表現，所得之轉形菌株(transformants) 在 LB broth 中培養，並加入 IPTG 誘導 (induction) 四小時後，利用 2.2.8 所描述之方法，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。預測此重組基因所轉譯之 full-length E protein 大小約為 55 kDa，再加上其 N 端的 His-tag、thrombin、S-tag 及 enterokinase 之序列約 7 kDa【圖十三】，共約 62 kDa。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份與 pcDNA3 vector 比較【圖十五-(A)】，在 72 kDa 和 55 kDa 中間並無觀察到較粗的 band 或多一條 band。接著使用 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測在細胞帶有 pcDNA3-His-E14 的 E protein 之表現時，可看到在細胞帶有 pcDNA3-His-E14 的 pellet 部分，在 72 kDa 和 33 kDa 中間共有六條明顯的 bands，分別是大小為介於 72 及 55 kDa 間、比 55 kDa 大些、二條介於 55 kDa 與 40 kDa 間的 bands、約 40 kDa 及比 33 kDa 略大的 band【圖十五-(B)】。

將建構好的 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體轉形於 *E. coli* Novablue (DE3) 作表現，所得之轉形菌株(transformants) 在 LB broth 中培養，並加入 IPTG 誘

導(induction) 四小時後，利用 2.2.8 所描述之方法，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。預測此重組基因所轉譯之 full-length E protein 大小約為 55.6 kDa，再加上其 C 端的 His-tag 序列約 0.7 kDa，共約 56.3 kDa 【圖十六】。首先以 Coomassie blue 染色時，發現在 pellet 部份約比 55 kDa 大些的位置處可見一條多出來的 band 【圖十七-(A) lane 4】，在 pET-30a(+) Δ 5T vector 的 pellet 部分則無 【圖十七-(A) lane 2】。接著使用 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測在細胞帶有 pET-30a(+) Δ 5T-E14 的 E protein 之表現時，可看到在細胞帶有 pET-30a(+) Δ 5T-E14 的 pellet 部分，在 72 kDa 和 33 kDa 中間共有三條 bands，分別是大小為比 55kDa 大些、比 55kDa 略小及約 40 kDa 【圖十七-(B)】。

3.8 登革病毒截短型外膜蛋白 (truncated E protein) 在 mammalian cell 中的表現

將實驗室已建構好的 pcDNA3-tE-HAHis 質體分別轉染至 BHK-21 cell 與 293T cell 作表現，於轉染 48 小時後，利用 2.2.9 所描述之方法，把所收取的細胞予以打破，分為上清液及 pellet，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。預測此重組基因所轉譯之 truncated E protein 加上 C 端之 HA-His-tag 的蛋白質大小約為 49 kDa。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份與 pcDNA3 vector 比較 【圖十八】，在 50 kDa 附近並無觀察到較粗的 band 或多一條 band。接著使用 anti-HA-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測 E protein 之表現時，可看到 pcDNA3-tE-HAHis 在 293T cell 的上清液和 pellet 部分以及在 BHK-21 cell 的上清液部分，皆在 55 kDa 附近皆有一條明顯的 band，而 pcDNA3 vector 則無 【圖十九-(A)】；再使用 anti-His-HRP 抗體偵測 E

protein 之表現時，則沒有看到在 55 kDa 附近有 band 的生成【圖十九-(B)】

3.9 登革病毒外膜基因 (E gene) 之表現

由於缺乏合適的抗體，因此以 Northern Blot 測試 pcDNA3-E14 與 pcDNA3-D3E 之表現。將實驗室已建構好的 pcDNA3-E14 與 pcDNA3-D3E 質體分別轉染至 BHK-21 cell 與 293T cell 作表現，於轉染 48 小時後，利用 2.2.13 所描述之方法，抽取細胞的 RNA，接著藉由 Northern blot 偵測 E gene 之表現，此兩個質體的重組基因所轉錄之 full-length E gene 大小皆約為 1.5 kb，位置應該在 18S (大小為 1.9 kb) 下面一點，結果顯示不管在 BHK-21 cell 或 293T cell 中，E gene mRNA 皆有表現【圖二十、二十一】。

3.10 穩定細胞株的細胞型態變化與溶斑試驗

將質體 pcDNA3 與 pcDNA3-E14 轉染至 BHK-21 細胞株中，依 2.2.15 所述之方法，以 G418 篩選出穩定細胞株 (stable cell line)，在倒立顯微鏡下觀察細胞的型態變化，發現到轉染 pcDNA3-E14 質體的穩定細胞株有細胞融合的現象 (syncytium)，而轉染 pcDNA3 vector 的穩定細胞株則無【圖二十二】。細胞融合現象以 fusion index 表示之，Fusion index 定義為 $[1 - (\text{細胞總數} / \text{細胞核總數})]$ ，每個穩定細胞株各選擇五個顯微鏡下之視野，以 300 顆細胞核為一計數單位，共計數五個單位並平均之 (Goncalvez et al., 2004)，fusion index 數值愈大表示細胞融合的現象愈嚴重【圖二十三】，正常 BHK21 細胞株的 fusion index 平均為 0.01 ± 0.01 (mean \pm S.D.)、而 pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之穩定細胞株——BHK21-pcDNA3 的 fusion index 平均為 0.01 ± 0.00 、pcDNA3-E14 質體轉染至 BHK21 之穩定細胞株——BHK21-pcDNA3-E14(1) 及 BHK21-pcDNA3-E14(2) 的 fusion index 分別為平均 0.07 ± 0.02 與 0.38 ± 0.04 。由 fusion index 的數據看來，又以

BHK21-pcDNA3-E14(2) 穩定細胞株比 BHK21-pcDNA3-E14(1)穩定細胞株細胞融合的現象比例更高。

將各穩定細胞株進行溶斑試驗，兩次的溶斑試驗結果皆發現 BHK21-pcDNA3-E14(1)與 BHK21-pcDNA3-E14(2)穩定細胞株的溶斑數比 BHK21-pcDNA3 穩定細胞株的溶斑數減少四成至五成左右【圖二十四】。

3.11 pMD.gagpol 質體之 *gag-pol* gene 的表現

由於缺乏合適的抗體，因此以 Northern Blot 測試 pMD.gagpol 之表現。將 pMD.gagpol 質體分別轉染至 BHK-21 cell 與 293T cell 作表現，於轉染 48 小時後，利用 2.2.13 所描述之方法，抽取細胞的 RNA，接著藉由 Northern blot 偵測 E gene 之表現，此質體所轉錄之 *gag-pol* gene 大小皆約為 5.2 kb，位置應該在 28S (大小為 5.0 kb)上面，結果顯示在 293T cell 中 *gag-pol* gene mRNA 有表現，在 BHK-21 cell 中則無【圖二十五】。

3.12 共同轉染以產生假型病毒顆粒

依上述 2.2.18 之方法以共同轉染質體至 293T 以產生假型病毒顆粒【圖二十六】，結果顯示對照組 pcDNA3 也有 blue cell 的產生，以轉染 40 小時後所收集的上清液而言，對照組 pcDNA3 所產生的 blue cell 為 25 CFU/ml、對照組 pAmpho gp85 所產生的 blue cell 為 64 CFU/ml、實驗組 pcDNA3-E14 所產生的 blue cell 為 41 CFU/ml 以及實驗組 pcDNA3-D3E 所產生的 blue cell 為 75 CFU/ml。而轉染 64、88 小時後所收集的上清液，其產生的 blue cell 皆降為個位數或是零【圖二十七-(B)】。

3.13 利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒

依上述 2.2.20 之方法以產生假型病毒顆粒，結果顯示共同轉染於

BHK21 細胞，皆無假型病毒顆粒的產生【圖二十八-(B)】；而共同轉染於 293T 細胞，以轉染 48 小時後所收集的上清液而言，雖然有 blue cell 的產生，但由於對照組 MOI=0 的組別也同樣有 blue cell 產生，故其 blue cell 應視為背景值，又轉染 72 小時後所收集的上清液，雖然實驗組 MOI=3 的組別有 3 個 blue cell 產生，而對照組 MOI=0 的組別沒有 blue cell 產生，但根據之前的結果顯示這 3 個 blue cell 仍在背景值範圍內【圖二十八-(C)】。同時為了證明 dengue virus type 2 真的有感染被共同轉染後的 BHK21 細胞，所以設計一對照組進行溶斑試驗，結果發現 MOI=0 組別的 BHK21 健康地長滿整個培養盤，而 MOI=1 及 MOI=3 組別的 BHK21 皆已被登革病毒溶解 (lysis) 【圖二十九】。



肆、討論

4.1 DNA 序列比對結果

將定序完之 pcDNA3-E14 質體上的 insert (DV-2 E gene) 序列與 Taiwan local strain PL046 及 NCBI 所公佈之 DV-2 New Guinea-C strain (M29095) 作序列比對後，發現 PL046 與 NGC 有九個鹼基不同，推測這九個不同處可能是 strain 間的歧異度所造成，亦或是在構築 cDNA 質體的過程中所導致的突變。就一個單體 (monomer) 的 E protein 而言，其膜外部分可分為三個區域 (domain)：domain I、domain II 及 domain III；其中第 47 個突變鹼基位於 domain I，第 53、55、71、107 及 116 個突變鹼基位於 domain II，第 402、454 及 474 個突變鹼基則位於 transmembrane domain，domain III 則無變異發生。Domain III 是一個 immunoglobulin (Ig) -like domain，被認為是與宿主細胞之受體結合的位置，在定序的結果中，domain III 並無變異發生，因此 E14(DV-2 E gene) ORF 所轉譯出的 E protein 其與宿主細胞之受體結合的功能應是正常的。

4.2 登革病毒截短型外膜蛋白 (Truncated E protein) 的表現

首先將實驗室已建構好的 pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis) 質體【附圖六】轉形於 *E. coli* BL-21(DE3) 作表現，藉由 12% SDS-PAGE (Coomassie blue staining) 及 Western blot 以 anti-HA-HRP 或 anti-His-HRP 或 anti-DV-2 domain III 之抗體偵測 DV-2 truncated E protein 的表現，結果由 Coomassie blue staining 可於約 40 kDa 處觀察到一條 protein band，因此再以 Western blot 偵測，不論以 anti-HA-HRP 或 anti-His-HRP 或 anti-DV-2 domain III 之抗體皆偵測到一條約 40 kDa 的 band【圖十一、十二】，但此蛋白質大小比預測之 49 kDa 小，因 HA 及 His tag 皆在 C 端，而 Western blot 皆可偵測到 HA 及

His tag，所以推測可能是 N 端被切割掉一小段多肽鏈，導致偵測到的蛋白質大小比預期的小。

在原核表現系統中缺乏蛋白質的修飾加工機制，因此嘗試將 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)質體轉染於真核細胞 293T 或 BHK21 作表現，藉由 12% SDS-PAGE (Coomassie blue staining)及 Western blot 以 anti-HA-HRP 或 anti-His-HRP 之抗體偵測 DV-2 truncated E protein 的表現，結果無法由 Coomassie blue staining 偵測到蛋白質的表現【圖十八】，猜測或許是此重組蛋白質產量很微量，因此再以 Western blot 偵測【圖十九】，以 anti-HA-HRP 抗體可偵測到一條約 55 kDa 的 band，比預期大小為 49 kDa 的蛋白質大，推測是因真核細胞有轉錄後修飾 (post-translational modifications) 的功能，如：醣化 (glycosylation)、雙硫鍵的形成等，所以導致得到的蛋白質大小比預測值大。但是以 anti-His-HRP 抗體則無法偵測到相同大小的蛋白質，推測或許蛋白序列會干擾 C 端 His-tag 的偵測，造成 anti-His-HRP 抗體無法偵測，或者 anti-His-HRP 之敏感性不足。

由於缺乏登革外膜蛋白 C 端疏水性區域 (hydrophobic region) 的 truncated E protein 可以在 *E.coli* 以及 mammalian cell 中被表現出來，因此接著我嘗試將全長外膜蛋白 (full-length E protein) 分別選殖於不同載體上，希望也能偵測到外膜蛋白的表現。

4.3 登革病毒全長外膜蛋白 (full-length E protein) 的表現

首先將實驗室已建構好的 pcDNA3-E14 質體【附圖五】轉形於 *E. coli* BL-21(DE3)作表現，藉由 12% SDS-PAGE (Coomassie blue staining)及 Western blot 以 anti-DV-2 domain III 之抗體偵測 DV-2 E protein 的表現【圖十二】，結果無法由 Coomassie blue staining 偵測到蛋白質的表現，所以再以 Western blot 偵測，發現在 55 kDa 以上皆有背景值存在，而預測 full-length E

protein 大小約為 55 kDa，因此無法以 anti-DV-2 domain III 抗體偵測 DV-2 E protein 是否有表現。由於缺乏合適的抗體偵測蛋白質表現，故改以 Northern Blot 測試 pcDNA3-E14 與 pcDNA3-D3E 載體基因是否能正常表現，將此兩個載體分別轉染至 BHK-21 或 293T 細胞株作表現後，抽取細胞的 RNA 進行 Northern Blot，結果顯示不論在 BHK-21 或 293T 細胞株中，full-length E gene mRNA 皆有表現【圖二十、二十一】，此實驗結果證明了至少此質體在細胞中是可以轉錄出正確大小的 mRNA，但由於缺乏合適抗體，以致我們還是無法確定全長外膜蛋白是否有表現，為了解決上述所遇到的問題，於是我試著將 DV-2 full-length E gene 序列選殖於另一表現載體 pET-30a(+)，希望能利用 pET-30a(+) 上的 His-tag 來偵測 E protein 的表現。待確認 DV-2 full-length E gene 可在細菌表現載體表現後，再將之選殖於真核表現載體，期望其能於真核細胞中表現蛋白質。

因此我建構了 pET-30a(+)-His-E14 與 pcDNA3-His-E14 質體，將此兩個質體分別轉形於 *E.coli* Novablue(DE3) 作表現【圖十四、十五】，結果發現無法由 Coomassie blue staining 偵測到，猜測或許是此重組蛋白質產量很微量所致，因此再以 anti-His-HRP 抗體作 Western blot 偵測時有得到我所預期大小約 62 kDa 的蛋白質，但是同時也偵測到其他五條小於 62 kDa 大小的蛋白質，推測可能因此質體轉譯出之 E protein 的 N 端帶有 His-tag、thrombin、S-tag 及 enterokinase 之序列，而這些序列所轉譯出的蛋白質或許會影響所轉譯之重組外膜蛋白質，使得 *E.coli* 的酵素作用而造成重組外膜蛋白的水解。所以我又建構了一個已切除 His-tag、thrombin、S-tag 及 enterokinase 序列的質體——pET-30a(+) Δ 5T-E14，希望蛋白質水解的情況可以獲得改善。

將 pET-30a(+) Δ 5T-E14 轉形於 *E.coli* Novablue(DE3) 作表現【圖十七】，結果發現在 pellet 部份約比 55 kDa 大些的位置處可見一條多出來的 band，

因此再以 anti-His-HRP 抗體作 Western blot 偵測，結果有得到我所預期大小約 56.3 kDa 的蛋白質，但是同時也偵測到另外兩條小於 56.3 kDa 大小的蛋白質，顯然在我們的實驗條件下，還是有蛋白質水解的現象，且消失的 bands 是由所切除之 His-tag、thrombin、S-tag 及 enterokinase 序列所造成的。未來應可考慮嘗試在不同的實驗條件下，例如：在 *E.coli* 培養過程中的 IPTG 誘導步驟改於 30°C 或甚至更低（如 16°C）進行……等，希望能更有效的解決蛋白質水解的現象。

由於本研究中建構之全長外膜蛋白表現質體所表現的 recombinant E protein 皆有蛋白質水解的現象，又表現截短型外膜蛋白的 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis) 質體所表現出的重組蛋白大小也比預期的小，因此我嘗試根據 Western blot 結果推測在 E protein 的 N 端約 9 kDa 處極可能恰好有一段可被 *E.coli* 中之某一 protease 所辨識的序列【圖三十】，造成 Western blot 中會出現比預期值小的蛋白質片段出現。



4.4 穩定細胞株的細胞型態變化與溶斑試驗

將質體 pcDNA3 與 pcDNA3-E14 轉染至 BHK-21 細胞株中，以 G418 篩選出穩定細胞株 (stable cell line) 後，發現到轉染 pcDNA3-E14 質體的穩定細胞株有細胞融合的現象 (syncytium)【圖二十二】，推測可能是 pcDNA3-E14 質體所轉譯的 E protein 釋放到細胞膜上，這些 E protein 與鄰近細胞之細胞膜上的受體彼此結合在一起，導致產生細胞融合的現象。雖然在登革病毒複製的過程中，目前最普遍的看法是 E protein 是位於內質網的膜上，然由此實驗結果顯示有些 E protein 是會被送到細胞膜上的，這個現象也使得我們之後欲進行的實驗——產生假型病毒顆粒具可行性。

4.5 假型病毒顆粒

欲以共同轉染三個質體——含有 *gag-pol* gene 的 pMD.gagpol 質體、含有 β -galactosidase gene 的 pBAG 質體以及含有病毒外膜蛋白的表現質體（如：pcDNA3-E14、pcDNA3-D3E、pAmpho gp85）到 293T 細胞株中，希望可以產生出一帶有登革病毒外膜蛋白之小鼠白血病毒（MLV）的假型病毒顆粒【圖二十六】。首先先確認這三個質體都可以正常表現：pMD.gagpol 質體由 Northern blot 結果可以確定在 293T 細胞株中有表現 *gag-pol* gene 的 mRNA；pBAG 質體轉染到 293T 細胞後可用 X-gal staining 使細胞呈藍色；pcDNA3-E14 與 pcDNA3-D3E 質體由 Northern blot 結果可以確定在 293T 細胞株中有表現 E gene 的 mRNA，接著進行共同轉染實驗，結果由圖二十五的數據顯示出對照組跟實驗組的 blue cell 數量差距不大，理論上對照組 pAmpho gp85 所產生的 blue cell 應至少有 10^3 CFU/ml 以上 (Lavillette et al., 2002; Blaise et al., 2004)，可是在經過幾次重複實驗後，卻一直無法有效提高假型病毒顆粒的產率，推測可能的原因之一為共同轉染的效率不佳，以 X-gal staining 檢測共同轉染後的細胞，約有四至五成的細胞可以呈現藍色，若以 pBAG 五成左右的表現率當作細胞轉染效率，而推測 pMD.gagpol 及 pAmpho gp85 的轉染效率也大概如此，則三個質體共同轉染到同一個細胞內的機率大概只有一成，而這一成的細胞才可能可以產生出假型病毒顆粒，因而造成對照組 pAmpho gp85 的假型病毒顆粒產率一直無法提高。

為了解決此共同轉染效率不高的問題，我嘗試從三個質體共同轉染到細胞減為只共同轉染兩個質體到 BHK-21 或 293T 細胞，而第三個質體則改由利用登革病毒直接感染共同轉染的細胞以提供外膜蛋白，希望能提高產率，但是由圖二十六的數據顯示無假型病毒顆粒的產生，推測可能原因其一為共同轉染效率依舊不高；其二為由 Northern blot 結果【圖二十五】顯示 pMD.gagpol 在 BHK-21 的表現量極為稀少到偵測不到或是 pMD.gagpol 在 BHK-21 細胞中根本不會表現，若是如此，那當然是不可能會有假型病毒顆

粒的生成。但在 293T 之中也一樣沒有結果，因此尚有其他因素。

在嘗試了以上的實驗後，仍無法成功的產生假型病毒顆粒，究其原因，推測除了質體轉染效率不高之外，共同轉染之質體之間的比例不正確可能也是原因之一，例如病毒的外膜蛋白若表現過多對細胞可能也會造成傷害，因此可試著將表現病毒外膜蛋白的表現質體比例降低。又其他因素如細胞的健康狀況是否良好等也都可能是影響結果不理想的原因，所以未來可繼續改善方法與技術以成功產生假型病毒顆粒。



伍、結 論

綜合上述的實驗結果得知：(一)登革病毒二型的全長外膜蛋白(DV-2 full-length E protein)在 *E.coli* Novablue(DE3)之表現，可使用 anti-His-HRP 抗體藉由 Western blot 偵測到 recombinant protein 的表現，惟在哺乳類 BHK21 細胞株中無法偵測到此蛋白。(二)由穩定細胞株的細胞融合現象推測 E protein 會表現在細胞膜上。(三)雖然在我目前的實驗條件下，還無法成功的產生假型病毒顆粒，但根據前人研究證明：小鼠白血病毒(MLV)與 C 型肝炎病毒(HCV)組合成假型病毒顆粒是可行的(Bartosch et al., 2003)，而 C 型肝炎病毒屬於黃質病毒科，其與登革病毒有相同的結構及組成，所以未來可繼續改善方法與技術以成功產生假型病毒顆粒。



陸、參考文獻

疾病管制局 www.cdc.gov.tw

- Allison, S. L., J. Schalich, K. Stiasny, C. W. Mandl and F. X. Heinz (2001). "Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E." *J Virol* **75**: 4268-75.
- Allison, S. L., J. Schalich, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz and F. X. Heinz (1995). "Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH." *J Virol* **69**: 695-700.
- Bartosch, B., J. Dubuisson and F. L. Cosset (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." *J Exp Med* **197**: 633-42.
- Blaise, S., A. Ruggieri, M. Dewannieux, F. L. Cosset and T. Heidmann (2004). "Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians." *J Virol* **78**: 1050-4.
- Chiu, M. W. and Y. L. Yang (2003). "Blocking the dengue virus 2 infections on BHK-21 cells with purified recombinant dengue virus 2 E protein expressed in Escherichia coli." *Biochem Biophys Res Commun* **309**: 672-8.
- Crill, W. D. and J. T. Roehrig (2001). "Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells." *J Virol* **75**: 7769-73.
- Falgout, B., R. Chanock and C. J. Lai (1989). "Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a." *J Virol* **63**: 1852-60.
- Falgout, B., R. H. Miller and C. J. Lai (1993). "Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity." *J Virol* **67**: 2034-42.
- Falgout, B., M. Pethel, Y. M. Zhang and C. J. Lai (1991). "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." *J Virol* **65**: 2467-75.
- Goncalvez, A. P., R. H. Purcell and C. J. Lai (2004). "Epitope determinants of a chimpanzee

Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein." *J Virol* **78**: 12919-28.

Gubler, D. J. (1998). "Dengue and dengue hemorrhagic fever." *Clin Microbiol Rev* **11**: 480-96.

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

Guzman, M. G., G. Kouri, L. Valdes, J. Bravo, M. Alvarez, S. Vazques, I. Delgado and S. B. Halstead (2000). "Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997." *Am J Epidemiol* **152**: 793-9; discussion 804.

Heinz, F. X. (1986). "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins." *Adv Virus Res* **31**: 103-68.

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

Huang, Y. H., H. Y. Lei, H. S. Liu, Y. S. Lin, C. C. Liu and T. M. Yeh (2000). "Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production." *Am J Trop Med Hyg* **63**: 71-5.

Kalayanarooj, S., D. W. Vaughn, S. Nimmannitya, S. Green, S. Suntayakorn, N. Kunentrasai, W. Viramitrachai, S. Ratanachu-ek, S. Kiatpolpoj, B. L. Innis, A. L. Rothman, A. Nisalak and F. A. Ennis (1997). "Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness." *J Infect Dis* **176**: 313-21.

Kao, C. L., C. C. King, D. Y. Chao, H. L. Wu and G. J. Chang (2005). "Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health." *J Microbiol Immunol Infect* **38**: 5-16.

Lavillette, D., M. Marin, A. Ruggieri, F. Mallet, F. L. Cosset and D. Kabat (2002). "The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors." *J Virol* **76**: 6442-52.

Libraty, D. H., T. P. Endy, H. S. Houg, S. Green, S. Kalayanarooj, S. Suntayakorn, W. Chansiriwongs, D. W. Vaughn, A. Nisalak, F. A. Ennis and A. L. Rothman (2002). "Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections." *J Infect Dis* **185**: 1213-21.

Ligon, B. L. (2005). "Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history,

- transmission, treatment, and prevention." *Semin Pediatr Infect Dis* **16**: 60-5.
- Liu, W. J., P. L. Sedlak, N. Kondratieva and A. A. Khromykh (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**: 10766-75.
- Modis, Y., S. Ogata, D. Clements and S. C. Harrison (2003). "A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6986-91.
- Monath, T. P. (1994). "Dengue: the risk to developed and developing countries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2395-400.
- Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn and M. G. Rossmann (2005). "A structural perspective of the flavivirus life cycle." *Nat Rev Microbiol* **3**: 13-22.
- Negre, D., G. Duisit, P. E. Mangeot, P. Moullier, J. L. Darlix and F. L. Cosset (2002). "Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus." *Curr Top Microbiol Immunol* **261**: 53-74.
- Nimmannitya, S. (1987). "Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **18**: 392-7.
- Ory, D. S., B. A. Neugeboren and R. C. Mulligan (1996). "A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11400-6.
- Ott, D. E. (1997). "Cellular proteins in HIV virions." *Rev Med Virol* **7**: 167-180.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz and S. C. Harrison (1995). "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution." *Nature* **375**: 291-8.
- Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Trono and F. L. Cosset (2002). "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and nonhuman primates." *Blood* **100**: 823-32.
- Stiasny, K., S. L. Allison, C. W. Mandl and F. X. Heinz (2001). "Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus." *J Virol* **75**: 7392-8.
- Stiasny, K., S. L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz and F. X. Heinz (1996). "Structural

requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus." *J Virol* **70**: 8142-7.

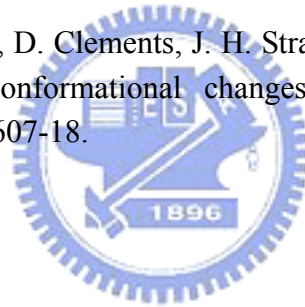
Thullier, P., P. Lafaye, F. Megret, V. Deubel, A. Jouan and J. C. Mazie (1999). "A recombinant Fab neutralizes dengue virus in vitro." *J Biotechnol* **69**: 183-90.

Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, B. Raengsakulrach, A. L. Rothman, F. A. Ennis and A. Nisalak (2000). "Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity." *J Infect Dis* **181**: 2-9.

Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. L. Rothman, F. A. Ennis and A. Nisalak (1997). "Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses." *J Infect Dis* **176**: 322-30.

Wu, Y. C. (1986). "[Epidemic dengue 2 on Liouchyou Shiang, Pingtung County in 1981]." *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* **19**: 203-11.

Zhang, Y., W. Zhang, S. Ogata, D. Clements, J. H. Strauss, T. S. Baker, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann (2004). "Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein." *Structure (Camb)* **12**: 1607-18.



Xho I

E14-sequence	(1)	<u>CTCGAGGACA</u> <u>ATC</u> CGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGACTTTGTAGAAG
PL046-E	(1)	-----ATGCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGACTTTGTAGAAG
M29095-E	(1)	-----ATGCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGACTTTGTAGAAG
E14-sequence	(51)	GGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATGGAAGCTGT
PL046-E	(41)	GGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATGGAAGCTGT
M29095-E	(41)	GGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATGGAAGCTGT
E14-sequence	(101)	GTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATAAA
PL046-E	(91)	GTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATAAA
M29095-E	(91)	GTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATAGA
E14-sequence	(151)	AACAGAAGCCAAACAATCTGCCGCTCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAA
PL046-E	(141)	AACAGAAGCCAAACAATCTGCCGCTCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAA
M29095-E	(141)	AACAGAAGCCAAACAACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAGGCAA
E14-sequence	(201)	AGCTGACCAACACAACAACAGAAATCTCGCTGCCCAACACAAGGAGAACCC
PL046-E	(191)	AGCTGACCAACACAACAACAGAAATCTCGCTGCCCAACACAAGGAGAACCC
M29095-E	(191)	AGCTGACCAACACAACAACAGAAATCTCGCTGCCCAACACAAGGAGAACCC
E14-sequence	(251)	AGCCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCGTCTGCAAACACTCCATGGT
PL046-E	(241)	AGCCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCGTCTGCAAACACTCCATGGT
M29095-E	(241)	AGCCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCGTCTGCAAACACTCCATGGT
E14-sequence	(301)	GGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATATTTTGGAAAAGGAGGCATTG
PL046-E	(291)	GGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATATTTTGGAAAAGGAGGCATTG
M29095-E	(291)	GGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGACTATTTTGGAAAAGGAGGCATTG
E14-sequence	(351)	TGACCCGTGCTATGTTTCACATGCAAAAAGAACATGAAAGGAAAAGTCGTG
PL046-E	(341)	TGACCCGTGCTATGTTTCACATGCAAAAAGAACATGAAAGGAAAAGTCGTG
M29095-E	(341)	TGACCTGTGCTATGTTTCACATGCAAAAAGAACATGAAAGGAAAAGTCGTG
E14-sequence	(401)	CAACCAGAAAACCTTGGAAATACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGA
PL046-E	(391)	CAACCAGAAAACCTTGGAAATACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGA
M29095-E	(391)	CAACCAGAAAACCTTGGAAATACACCATTGTGATAACACCTCACTCAGGGGA
E14-sequence	(451)	AGAGCATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAA
PL046-E	(441)	AGAGCATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAA
M29095-E	(441)	AGAGCATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAA
E14-sequence	(501)	TAAACCCACAGAGTTCCATCACAGAAGCAGAGTTGACAGGCTATGGCACT
PL046-E	(491)	TAAACCCACAGAGTTCCATCACAGAAGCAGAGTTGACAGGCTATGGCACT
M29095-E	(491)	TAAACCCACAGAGTTCCATCACAGAAGCAGAGTTGACAGGCTATGGCACT
E14-sequence	(551)	GTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT
PL046-E	(541)	GTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT
M29095-E	(541)	GTCACGATGGAGTGCTCTCCGAGAACGGGCCTCGACTTCAATGAGATGGT
E14-sequence	(601)	GTTGCTGCAAATGGAAAATAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCC
PL046-E	(591)	GTTGCTGCAAATGGAAAATAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCC
M29095-E	(591)	GTTGCTGCAAATGGAAAATAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCC
E14-sequence	(651)	TAGACCTGCCGTTGCCATGGCTGCCCGAGCGGACACACAAGGATCAAAT
PL046-E	(641)	TAGACCTGCCGTTGCCATGGCTGCCCGAGCGGACACACAAGGATCAAAT
M29095-E	(641)	TAGACCTGCCGTTGCCATGGCTGCCCGAGCGGACACACAAGGATCAAAT
E14-sequence	(701)	TGGATACAGAAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCATGCGAAGAA
PL046-E	(691)	TGGATACAGAAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCATGCGAAGAA
M29095-E	(691)	TGGATACAGAAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCATGCGAAGAA

E14-sequence (751) ACAGGATGTTGTTGTTTTGGGATCCCAAGAAGGGGCCATGCACACAGCAC
 PL046-E (741) ACAGGATGTTGTTGTTTTGGGATCCCAAGAAGGGGCCATGCACACAGCAC
 M29095-E (741) ACAGGATGTTGTTGTTTTGGGATCCCAAGAAGGGGCCATGCACACAGCAC

E14-sequence 801) TCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAACTTACTGTTTACA
 PL046-E (791) TCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAACTTACTGTTTACA
 M29095-E (791) TCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAACTTACTGTTTACA

E14-sequence (851) GGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGGATGGACAACTACAGCTCAAAGGAAT
 PL046-E (841) GGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGGATGGACAACTACAGCTCAAAGGAAT
 M29095-E (841) GGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGGATGGACAACTACAGCTCAAAGGAAT

E14-sequence (901) GTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAG
 PL046-E (891) GTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAG
 M29095-E (891) GTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAG

E14-sequence (951) AAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGT
 PL046-E (941) AAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGT
 M29095-E (941) AAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGT

E14-sequence (1001) TCTCCATGTAAGATCCCTTTTGGAGATAATGGATTTGGAAAAAGACATGT
 PL046-E (991) TCTCCATGTAAGATCCCTTTTGGAGATAATGGATTTGGAAAAAGACATGT
 M29095-E (991) TCTCCATGTAAGATCCCTTTTGGAGATAATGGATTTGGAAAAAGACATGT

E14-sequence (1051) TTTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCC
 PL046-E (1041) TTTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCC
 M29095-E (1041) TTTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCC

E14-sequence (1101) CAGTCAACATAGAAGCAGAACCCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATCATA
 PL046-E (1091) CAGTCAACATAGAAGCAGAACCCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATCATA
 M29095-E (1091) CAGTCAACATAGAAGCAGAACCCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATCATA

E14-sequence (1151) GGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAGCTCAACTGGTTTAAGAAAGGAAGTTC
 PL046-E (1141) GGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAGCTCAACTGGTTTAAGAAAGGAAGTTC
 M29095-E (1141) GGAGTAGAGCCGGGACAATTGAAGCTCAACTGGTTTAAGAAAGGAAGTTC

E14-sequence (1201) TATCGGCCAAATGCTTTGAGACAACAATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCCA
 PL046-E (1191) TATCGGCCAAATGCTTTGAGACAACAATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCCA
 M29095-E (1191) TATCGGCCAAATGCTTTGAGACAACAATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCCA

E14-sequence (1251) TTTTAGGTGACACAGCTTGGGATTTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTTACA
 PL046-E (1241) TTTTAGGTGACACAGCTTGGGATTTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTTACA
 M29095-E (1241) TTTTAGGTGACACAGCTTGGGATTTTGGATCCCTGGGAGGAGTGTTTACA

E14-sequence (1301) TCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTTTTTCGGAGCAATCTATGGGGCTGC
 PL046-E (1291) TCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTTTTTCGGAGCAATCTATGGGGCTGC
 M29095-E (1291) TCTATAGGAAAGGCTCTCCACCAAGTTTTTCGGAGCAATCTATGGGGCTGC

E14-sequence (1351) CTTCAGTGGGGTCTCATGGACATGAAAATCCTCATAGGAGTCATTATCA
 PL046-E (1341) CTTCAGTGGGGTCTCATGGACATGAAAATCCTCATAGGAGTCATTATCA
 M29095-E (1341) CTTCAGTGGGGTCTCATGGATATGAAAATCCTCATAGGAGTCATTATCA

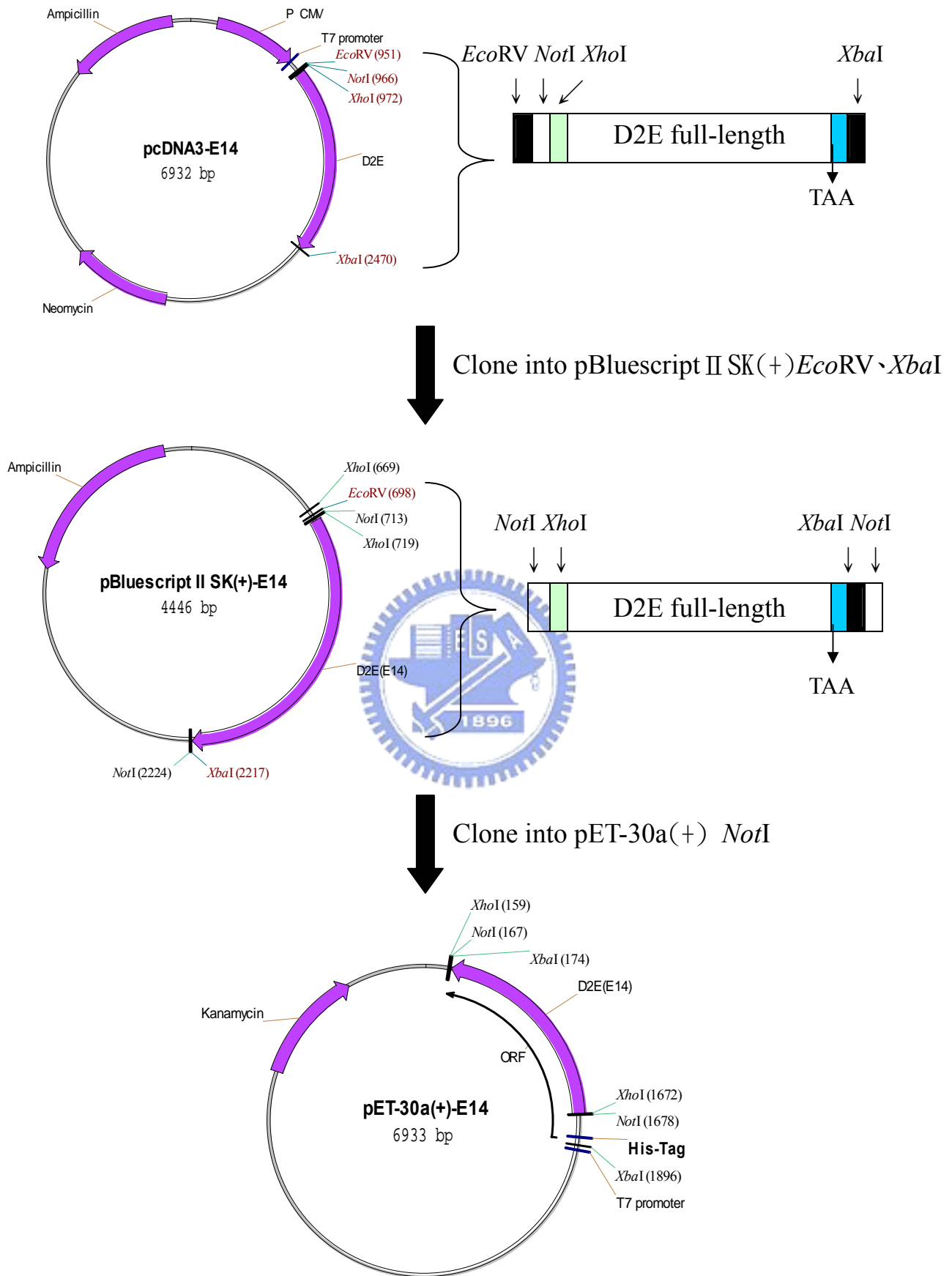
E14-sequence (1401) CATGGATAGGAATGAATTCACGCAGCACCCACTGTCTGTGTCACTAGTA
 PL046-E (1391) CATGGATAGGAATGAATTCACGCAGCACCCACTGTCTGTGTCACTAGTA
 M29095-E (1391) CATGGATAGGAATGAATTCACGCAGCACCTCACTGTCTGTGTCACTAGTA

E14-sequence (1451) TTGGTGGGAGTCGTGACGCTGTATTTGGGAGTTATGGTGCAGGCC TAGTC
 PL046-E (1441) TTGGTGGGAGTCGTGACGCTGTATTTGGGAGTTATGGTGCAGGCC -----
 M29095-E (1441) TTGGTGGGAGTCGTGACGCTGTATTTGGGAGTTATGGTGCAGGCC -----

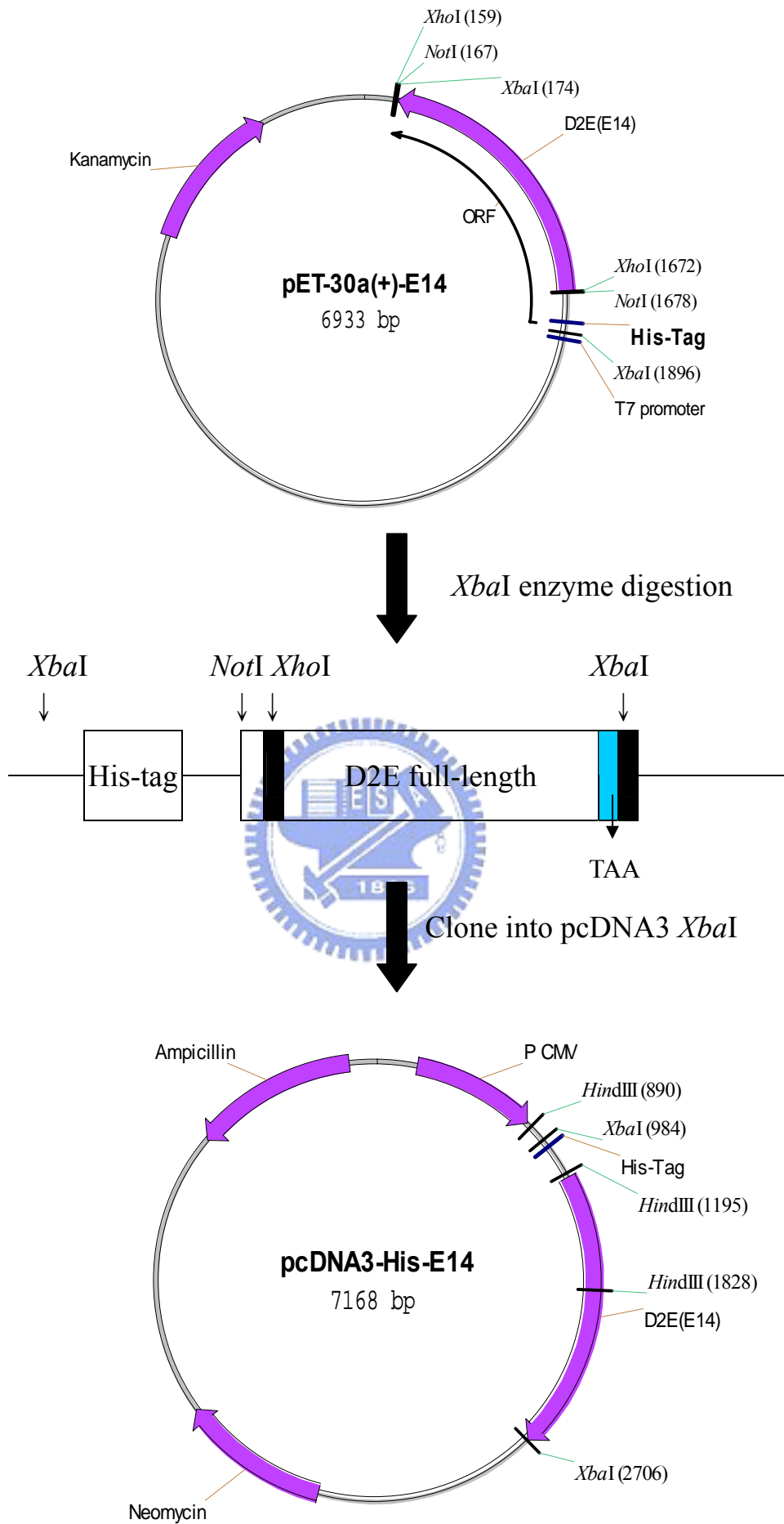
		Xba I
E14-sequence (1501)	<u>TAGAGGGCCC</u>	
PL046-E (1486)	-----	
M29095-E (1486)	-----	

圖一、定序 pcDNA3-E14 質體上之 insert (DV-2 E gene) 序列與 Taiwan local strain PL046 及 New Guinea-C(M29095) 作序列比對。相異處以 標示之。此核酸序列包含轉譯起始密碼與終止密碼 (以方框□標示)。



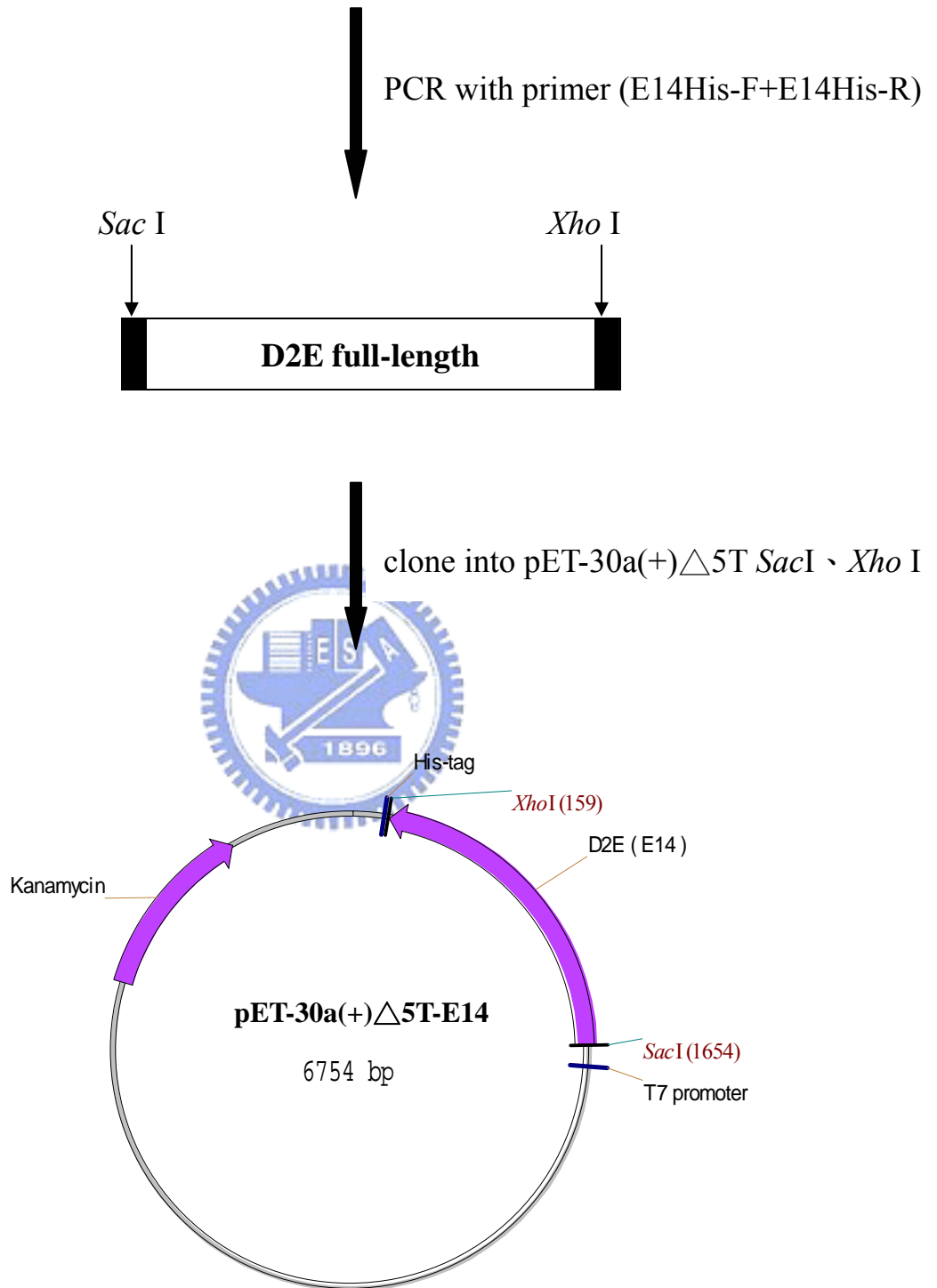


圖二、pET-30a(+)-E14 質體建構之示意圖



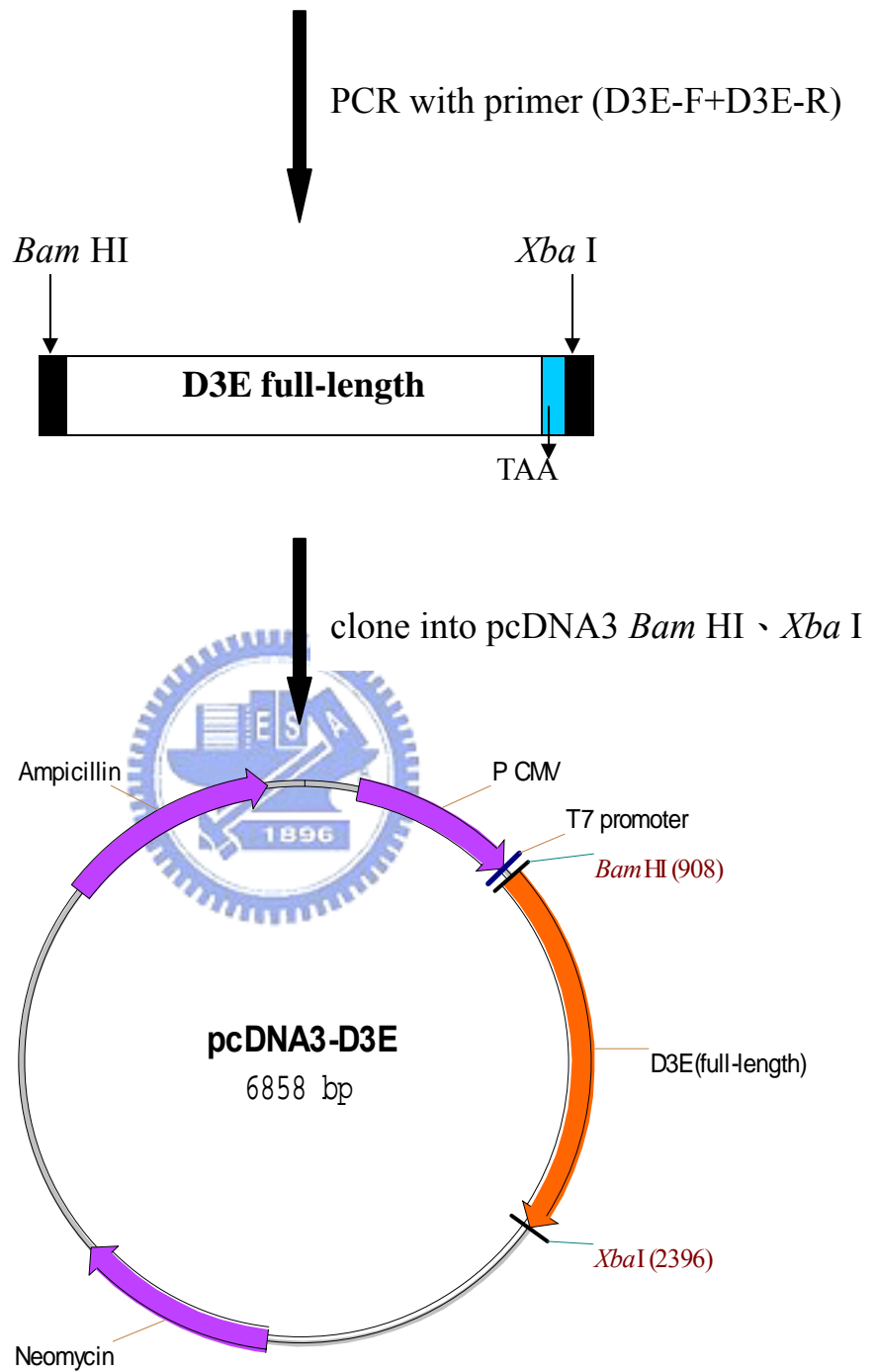
圖三、pcDNA3-His-E14 質體建構之示意圖

以實驗室已有之 cDNA clones 為模板 (template)

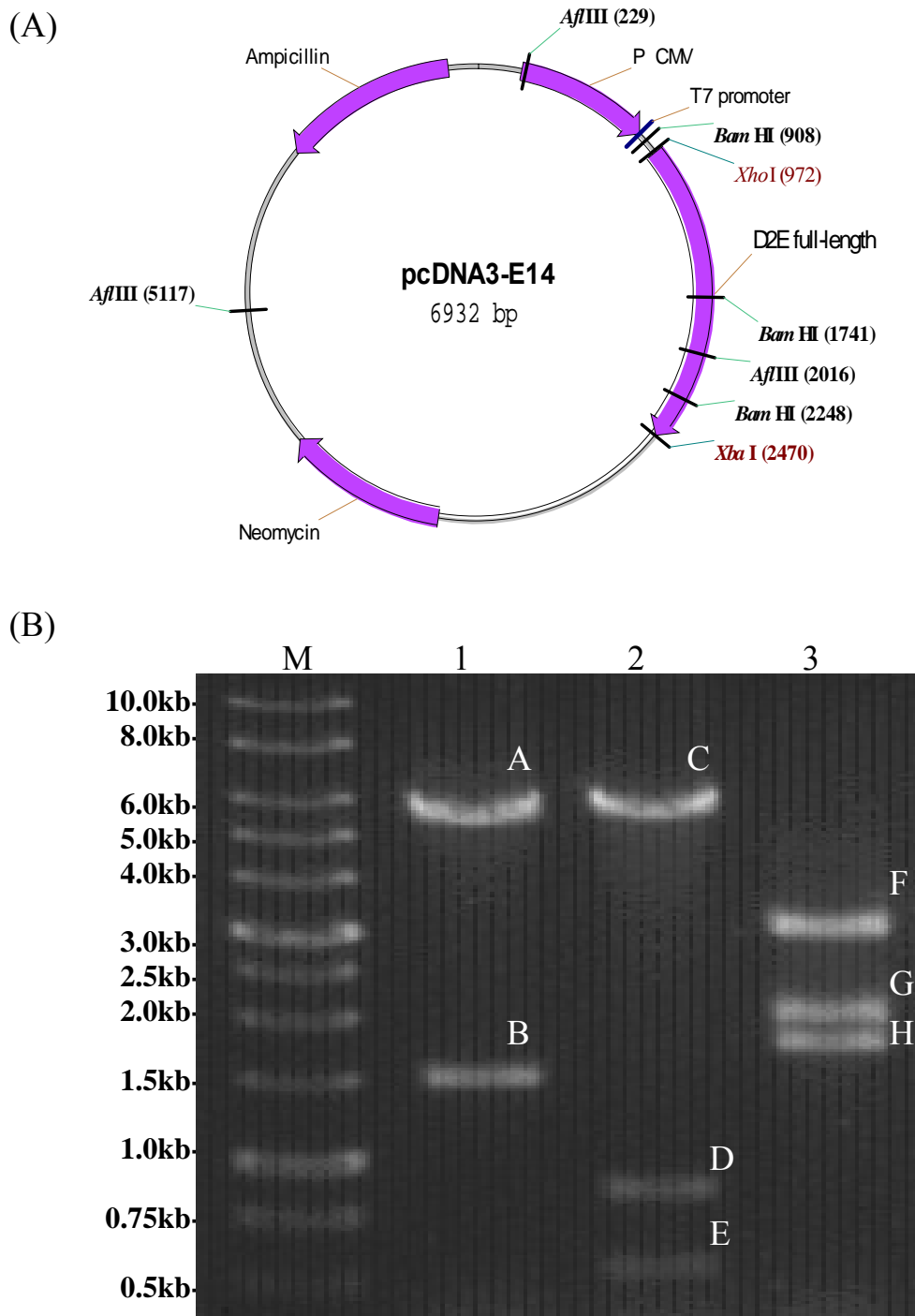


圖四、pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體建構之示意圖

以實驗室已有之 cDNA clones 為模板 (template)



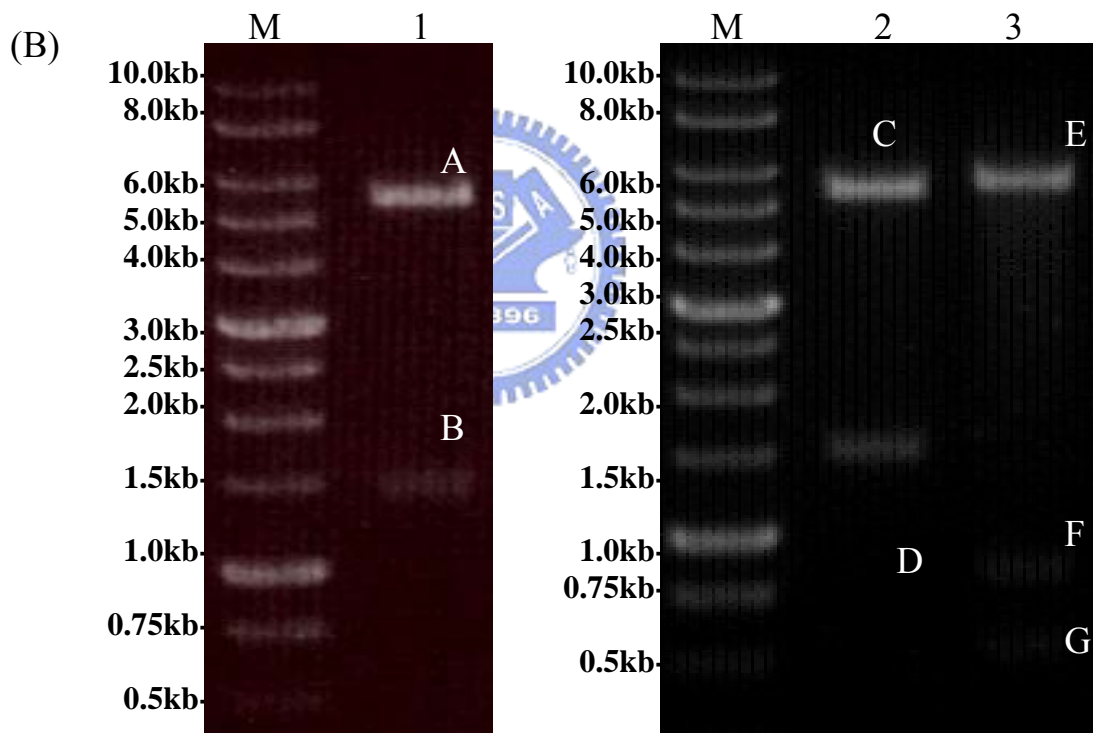
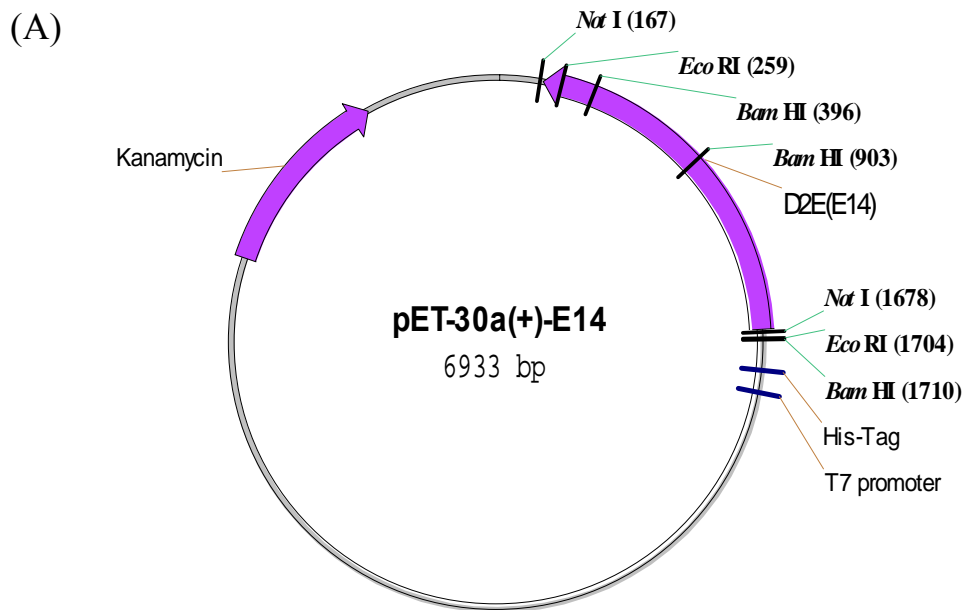
圖五、pcDNA3-D3E 質體建構之示意圖



圖六、利用限制酵素確認 pcDNA3-E14 質體

(A) pcDNA3-E14 之 map。

(B) Lane 1 為 *Xho* I、*Xba* I 切割 pcDNA3-E14 質體；Lane 2 為 *Bam*HI 切割 pcDNA3-E14 質體；Lane 3 為 *Afl*III 切割 pcDNA3-E14 質體。A~H 為酵素切割 pcDNA3-E14 質體後所得之片段：A 約 5.4kb；B 約 1.5kb；C 約 5.6kb；D 約 0.8kb；E 約 0.5kb；F 約 3.1kb；G 約 2.0kb；H 約 1.8kb。M: size marker。

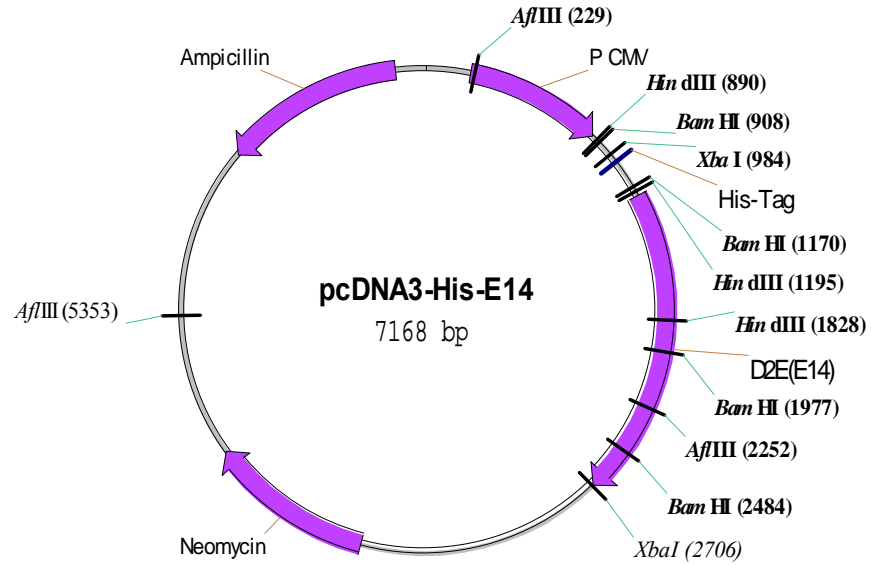


圖七、利用限制酵素確認 pET-30a(+)-E14 質體

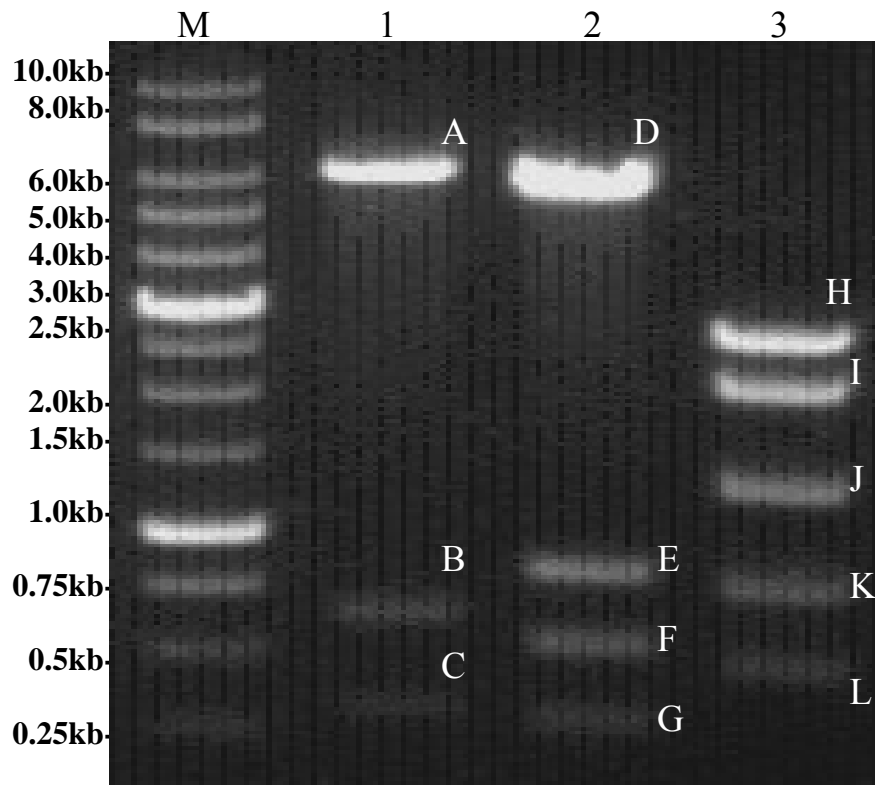
(A) pET-30a(+)-E14 之 map。

(B) Lane 1 為 *Eco*RI 切割 pET-30a(+)-E14 質體；Lane 2 為 *Not* I 切割 pET-30a(+)-E14 質體；Lane 3 為 *Bam*HI 切割 pET-30a(+)-E14 質體。A~G 為酵素切割 pET-30a(+)-E14 質體後所得之片段：A 約 5.5kb；B 約 1.4kb；C 約 5.4kb；D 約 1.5kb；E 約 5.6kb；F 約 0.8kb；G 約 0.5kb。M: size marker。

(A)



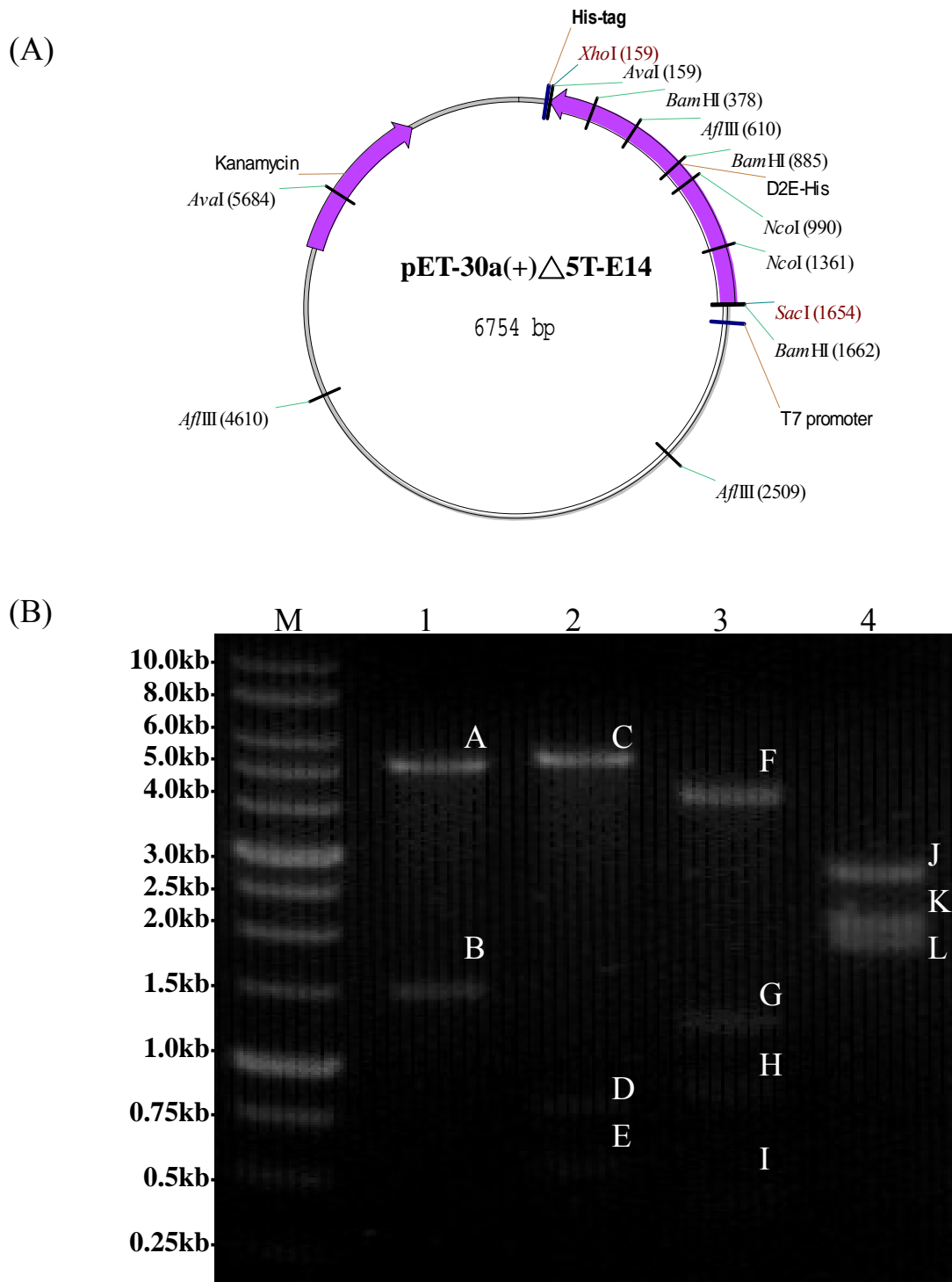
(B)



圖八、利用限制酵素確認 pcDNA3-His-E14 質體

(A) pcDNA3-His-E14 之 map。

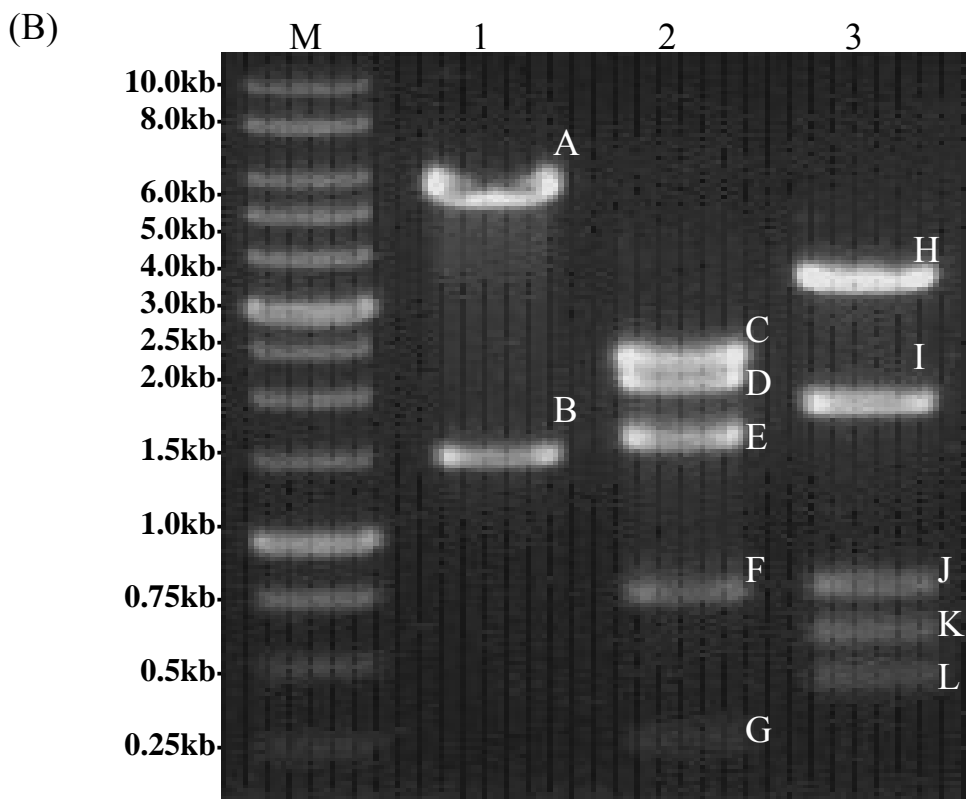
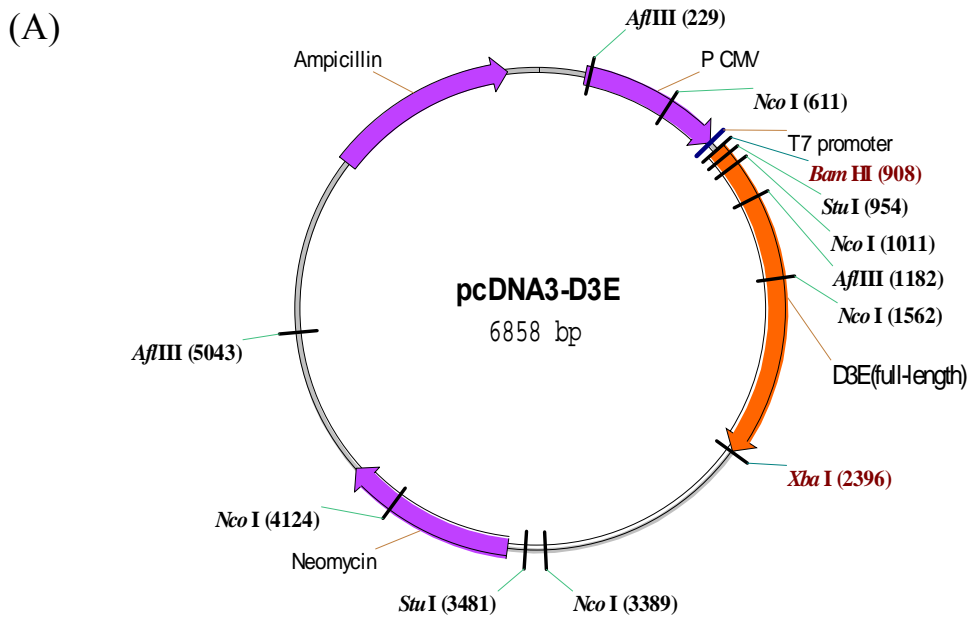
(B) Lane 1 為 *Hind*III 切割 pcDNA3-His-E14 質體；Lane2 為 *Bam*HI 切割 pcDNA3-His-E14 質體；Lane3 為 *Afl*III、*Xba*I 切割 pcDNA3-His-E14 質體。A~L 為酵素切割 pcDNA3-His-E14 質體後所得之片段：A 約 6.2kb；B 約 0.6kb；C 約 0.3kb；D 約 5.6kb；E 約 0.8kb；F 約 0.5kb；G 約 0.3kb；H 約 2.6kb；I 約 2.0kb；J 約 1.3kb；K 約 0.7kb；L 約 0.4kb。M: size marker。



圖九、利用限制酵素確認 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體

(A) pET-30a(+) Δ 5T-E14 之 map。

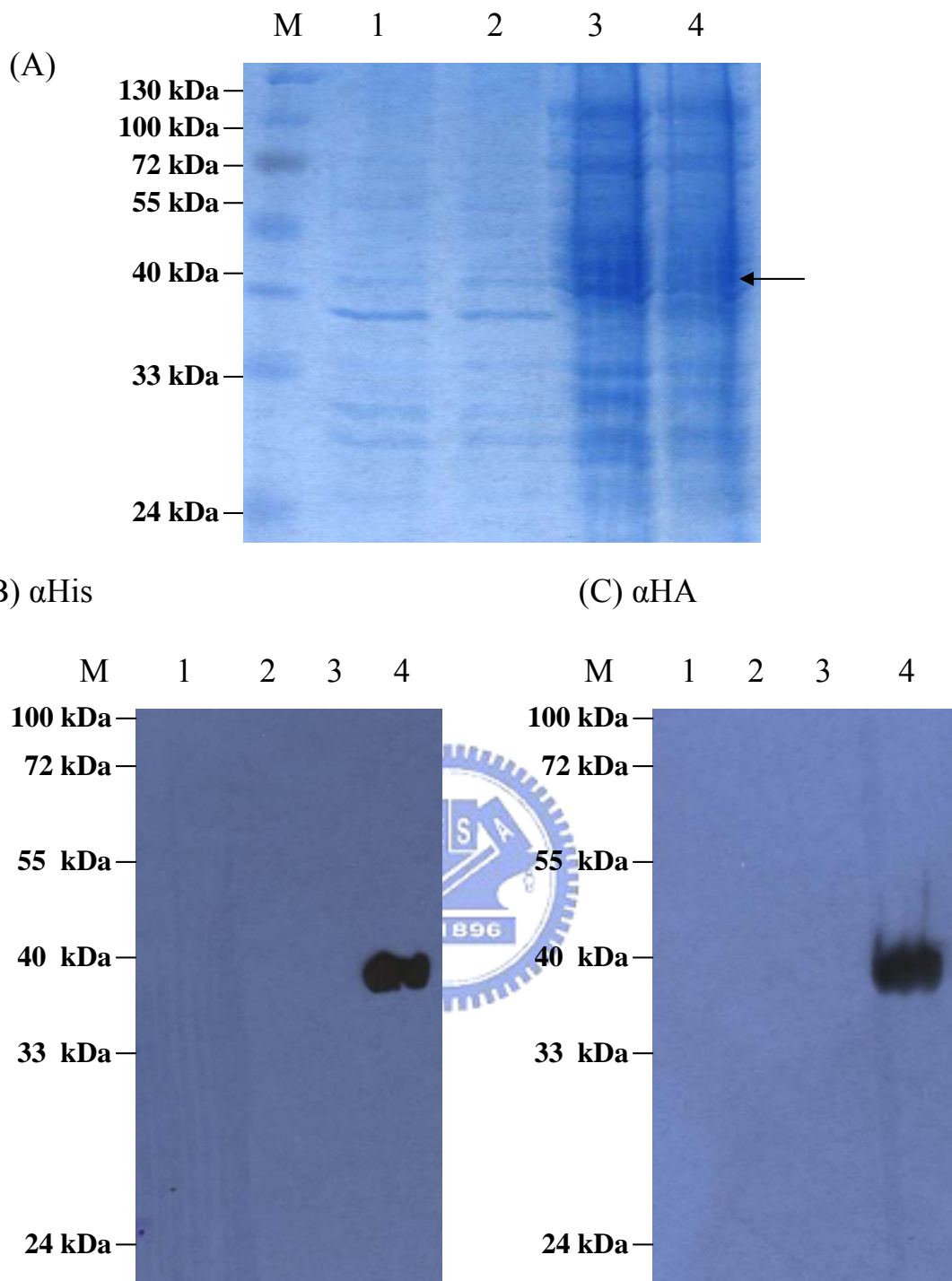
(B) Lane 1 為 *SacI*、*XhoI* 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體；Lane 2 為 *BamHI* 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體；Lane 3 為 *NcoI*、*AvaI* 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體；Lane 4 為 *AflIII* 切割 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體。A~L 為限制酵素切割 pcDNA3-D3E 質體後所得之片段：A 約 5.3kb；B 約 1.5kb；C 約 5.5kb；D 約 0.8kb；E 約 0.5kb；F 約 4.3kb；G 約 1.2kb；H 約 0.8kb；I 約 0.4kb；J 約 2.7kb；K 約 2.1kb；L 約 1.9kb。M: size marker。



圖十、利用限制酵素確認 pcDNA3-D3E 質體

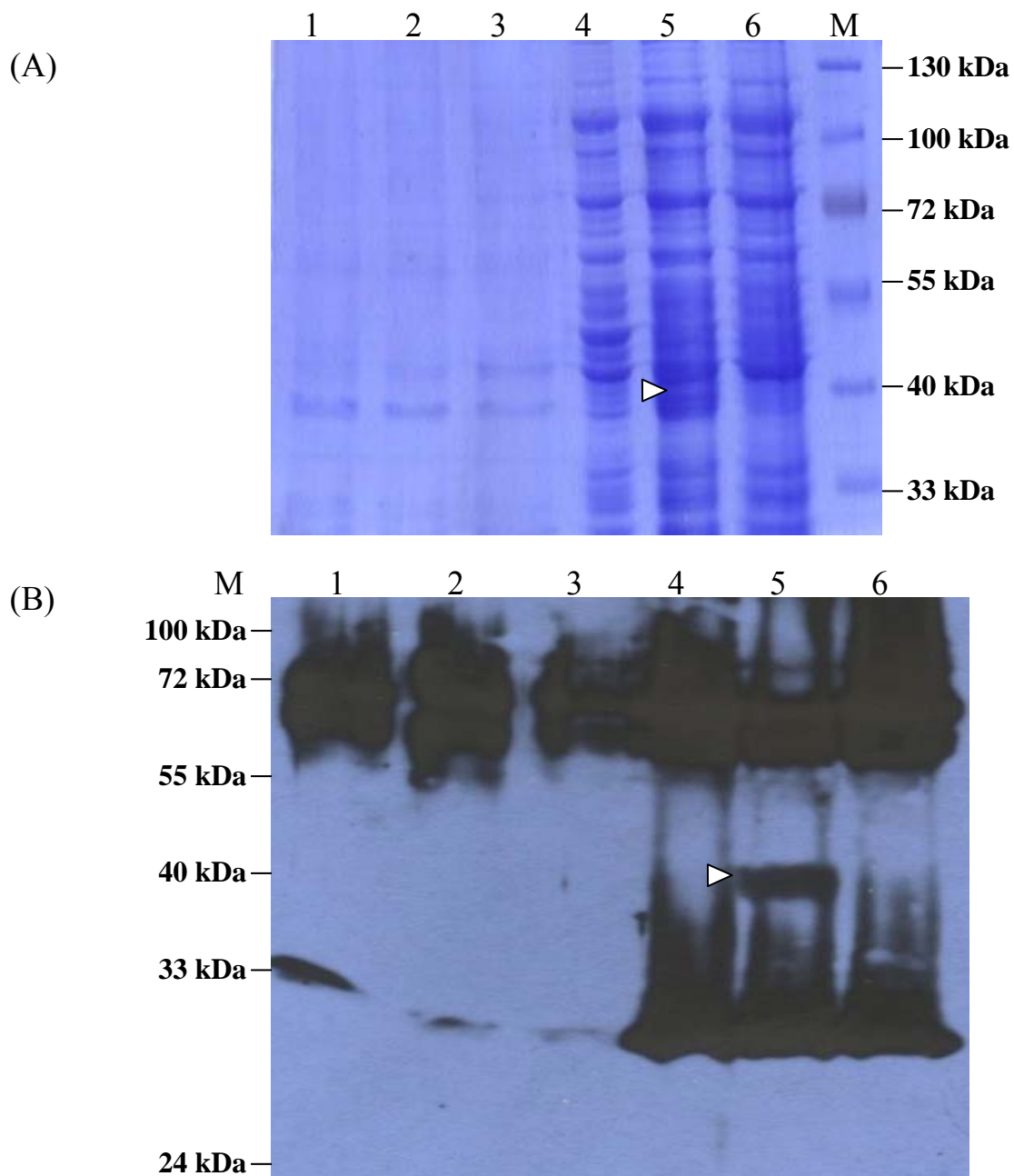
(C) pcDNA3-D3E 之 map。

(D) Lane 1 為 *Bam* HI、*Xba* I 切割 pcDNA3-D3E 質體；Lane2 為 *Afl* III、*Stu* I 切割 pcDNA3-D3E 質體；Lane3 為 *Nco* I 切割 pcDNA3-D3E 質體。A~L 為酵素切割 pcDNA3-D3E 質體後所得之片段：A 約 5.4kb；B 約 1.5kb；C 約 2.3kb；D 約 2.0kb；E 約 1.6kb；F 約 0.7kb；G 約 0.2kb；H 約 3.3kb；I 約 1.8kb；J 約 0.7kb；K 約 0.5kb；L 約 0.4kb。M: size marker。



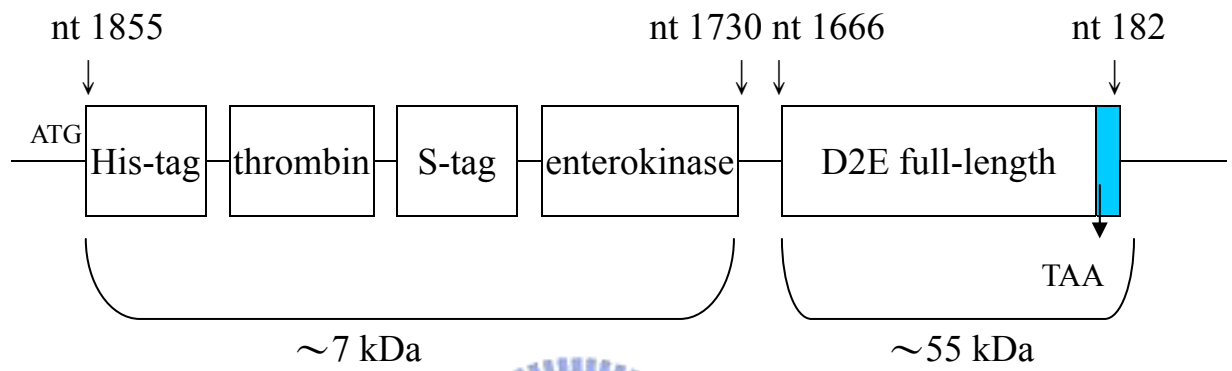
圖十一、以 anti-His-HRP 及 anti-HA-HRP 抗體偵測 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)在 *E.coli* BL21(DE3)的蛋白質表現

(A) 12% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色之結果。(B)以 anti-His-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。(C)以 anti-HA-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。M 為 size marker；lane 1 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3)之 total protein 的上清液；lane 2 為 pKRY1 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的上清液；Lane 3 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的 pellet；lane 4 為 pKRY1 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的 pellet。

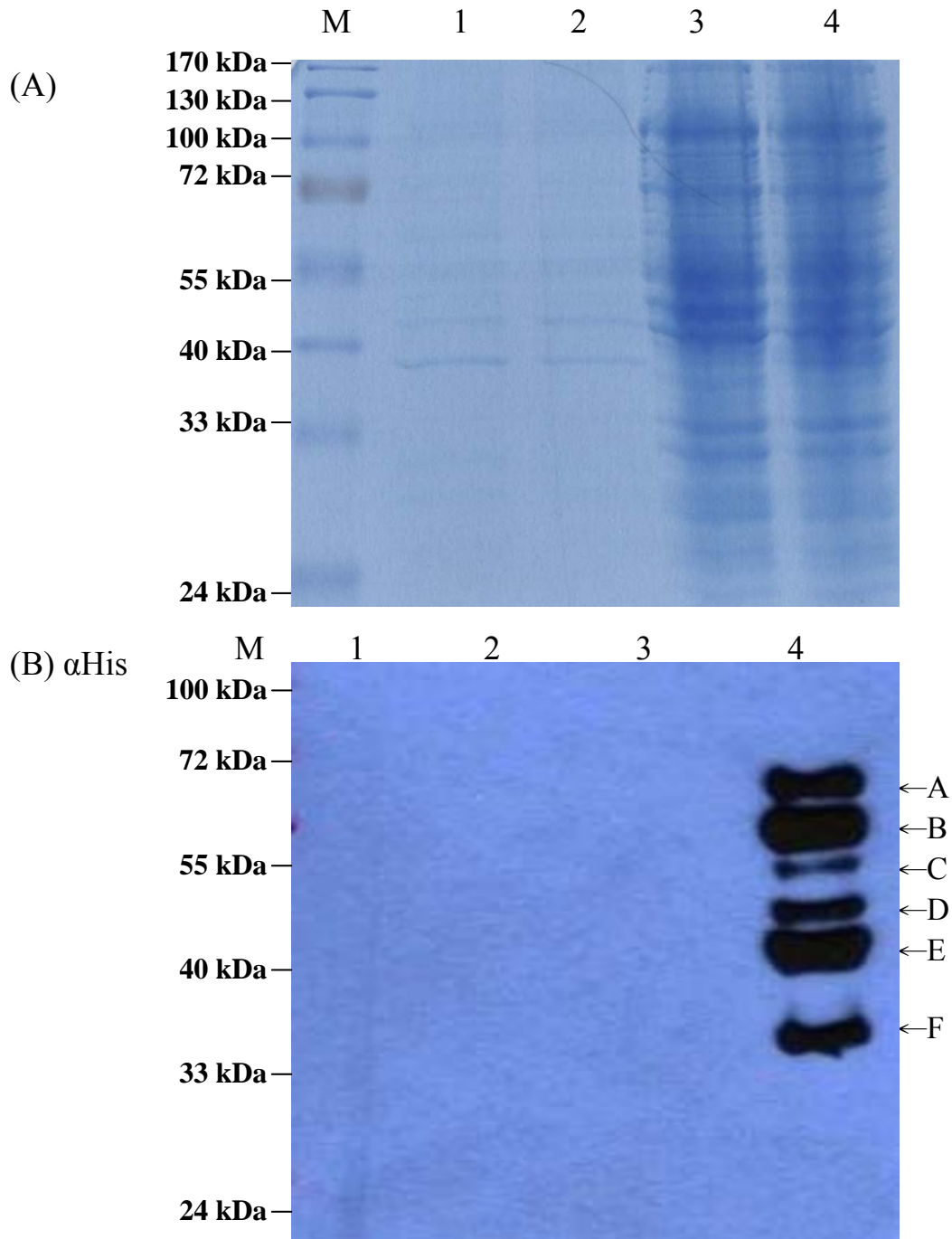


圖十二、以 anti-DV-2 domain III 抗體偵測 pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)及 pcDNA3-E14 在 *E.coli* BL21(DE3) 的蛋白質表現

(A) 12% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色之結果。(B) 以 anti-DV-2 domain III 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。M 為 size marker；lane 1 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的上清液；lane 2 為 pKRY1 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的上清液；lane 3 為 pcDNA3-E14 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的上清液；Lane 4 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的 pellet；lane 5 為 pKRY1 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的 pellet；lane 6 為 pcDNA3-E14 質體轉形至 *E.coli* BL21(DE3) 之 total protein 的 pellet。三角記號標示為 truncated E protein 表現之位置。

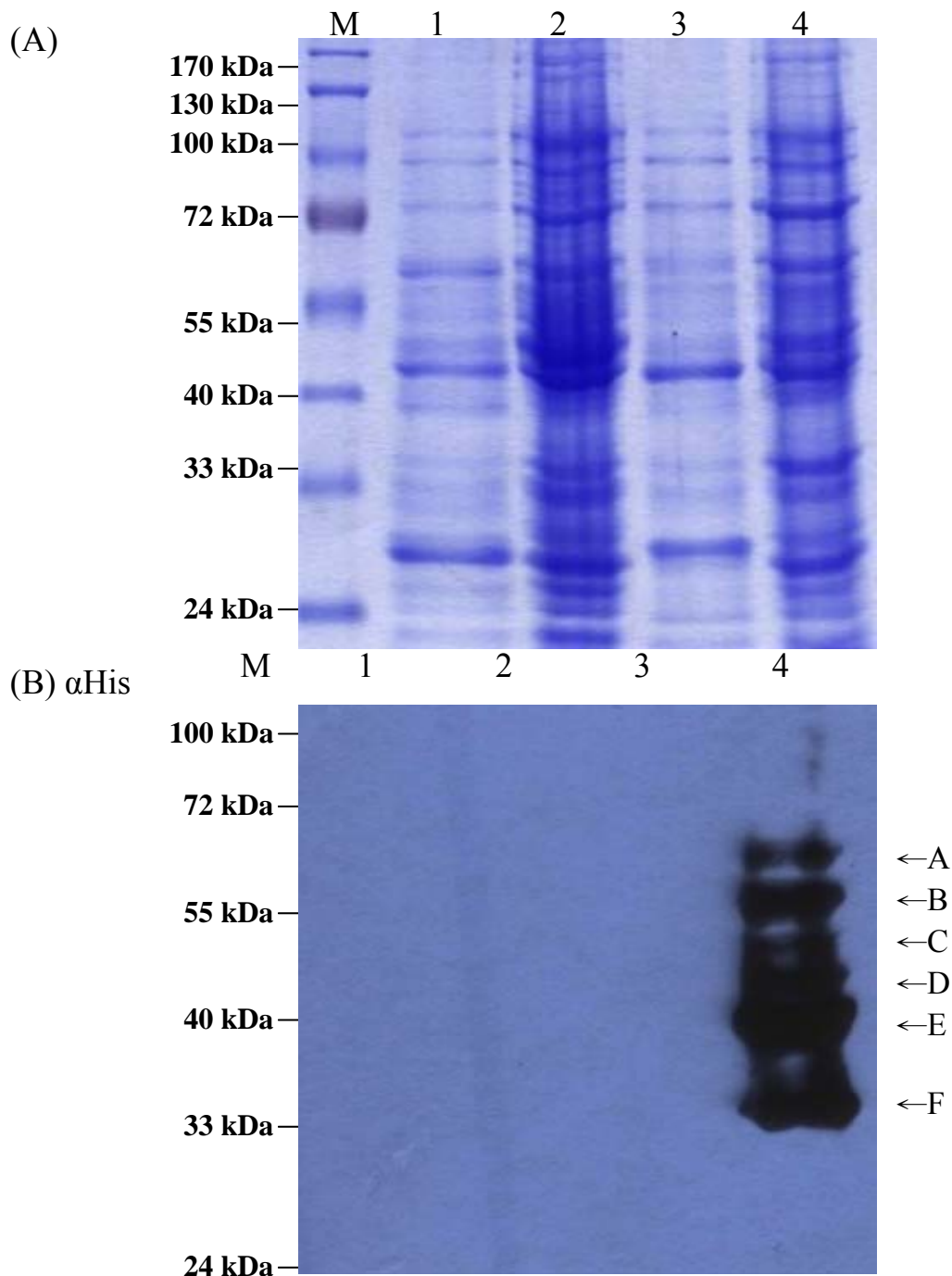


圖十三、pET-30a(+)-E14 質體轉譯蛋白質之示意圖



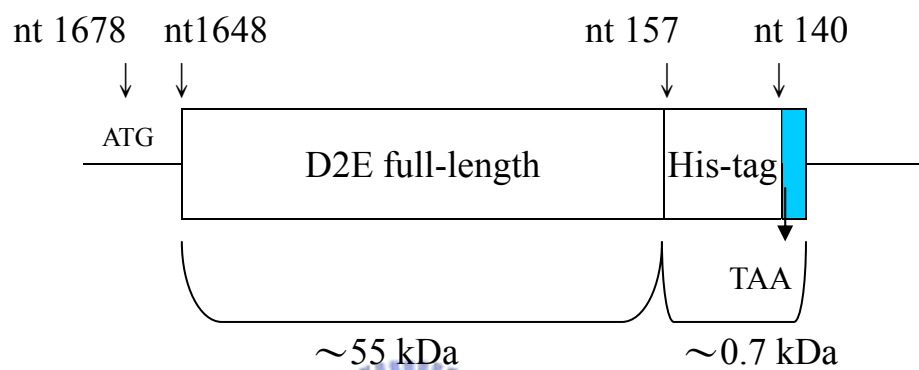
圖十四、以 anti-His-HRP 抗體偵測 pET-30a(+)-E14 在 *E.coli* Novablue(DE3) 的蛋白質表現

(A) 12% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色之結果。(B) 以 anti-His-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。M 為 size marker；lane 1 為 pET-30a(+)質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的上清液；lane 2 為 pET-30a(+)-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的上清液；lane 3 為 pET-30a(+)質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet；Lane 4 為 pET-30a(+)-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet。

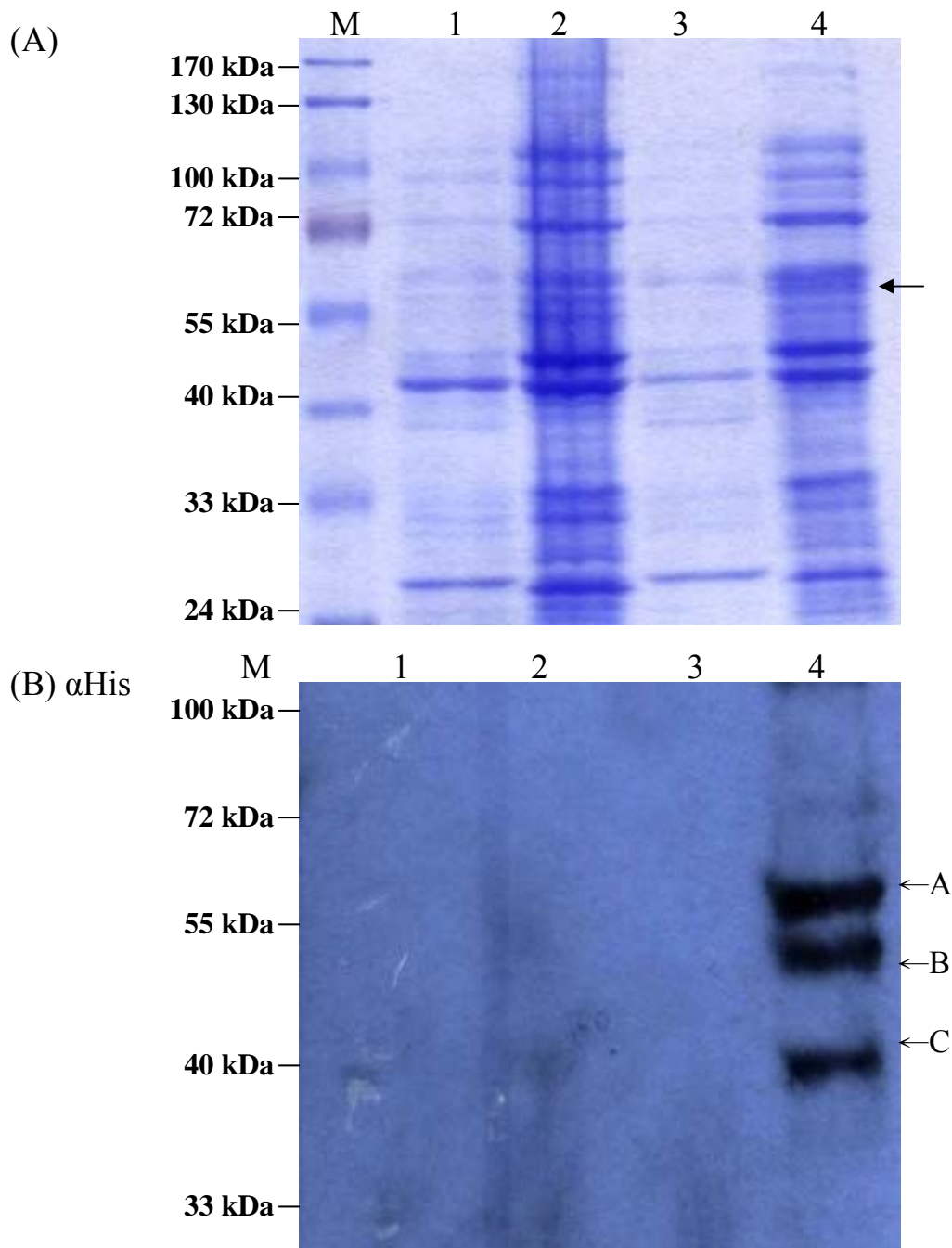


圖十五、以 anti-His-HRP 抗體偵測 pcDNA3-His-E14 在 *E.coli* Novablue (DE3) 的蛋白質表現

(A) 10% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色之結果。(B) 以 anti-His-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。M 為 size marker; lane 1 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的上清液; lane 2 為 pcDNA3 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet; lane 3 為 pcDNA3-His-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的上清液; Lane 4 為 pcDNA3-His-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet。

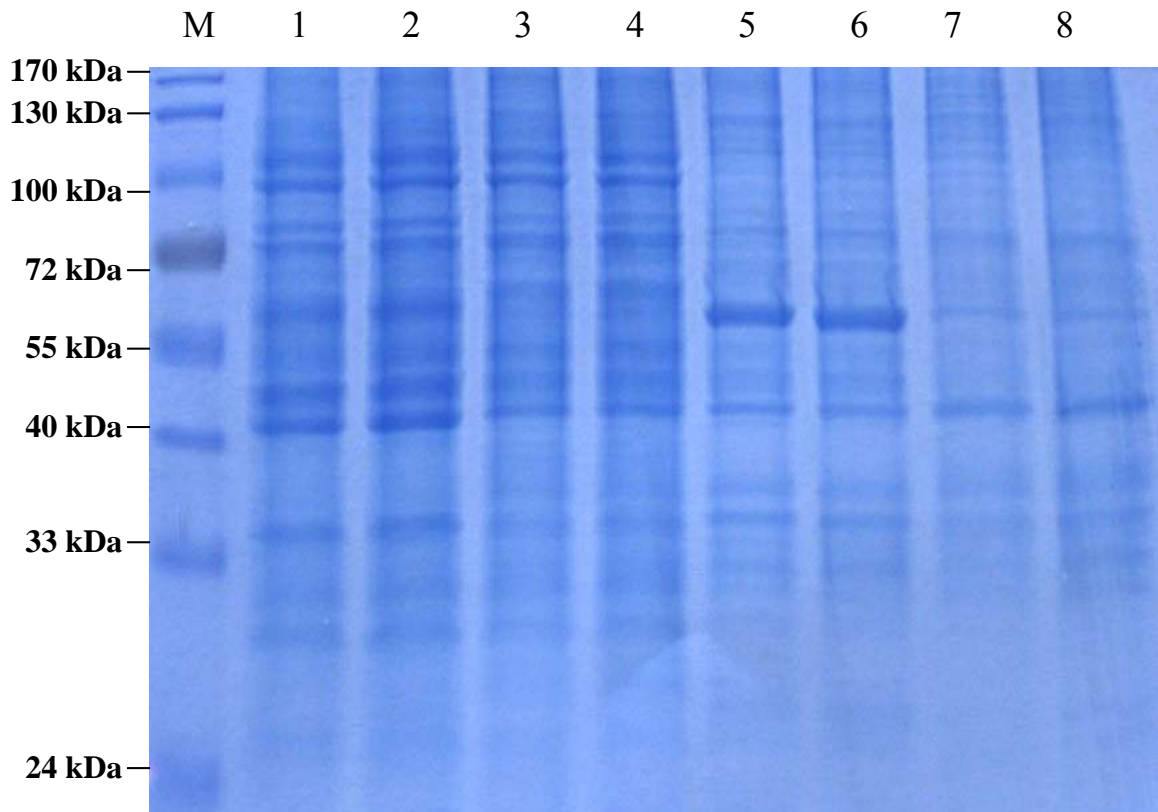


圖十六、pET-30a(+)-5T-E14 質體轉譯蛋白質之示意圖



圖十七、以 anti-His-HRP 抗體偵測 pET-30a(+) Δ 5T-E14 在 *E.coli* Novablue (DE3) 的蛋白質表現

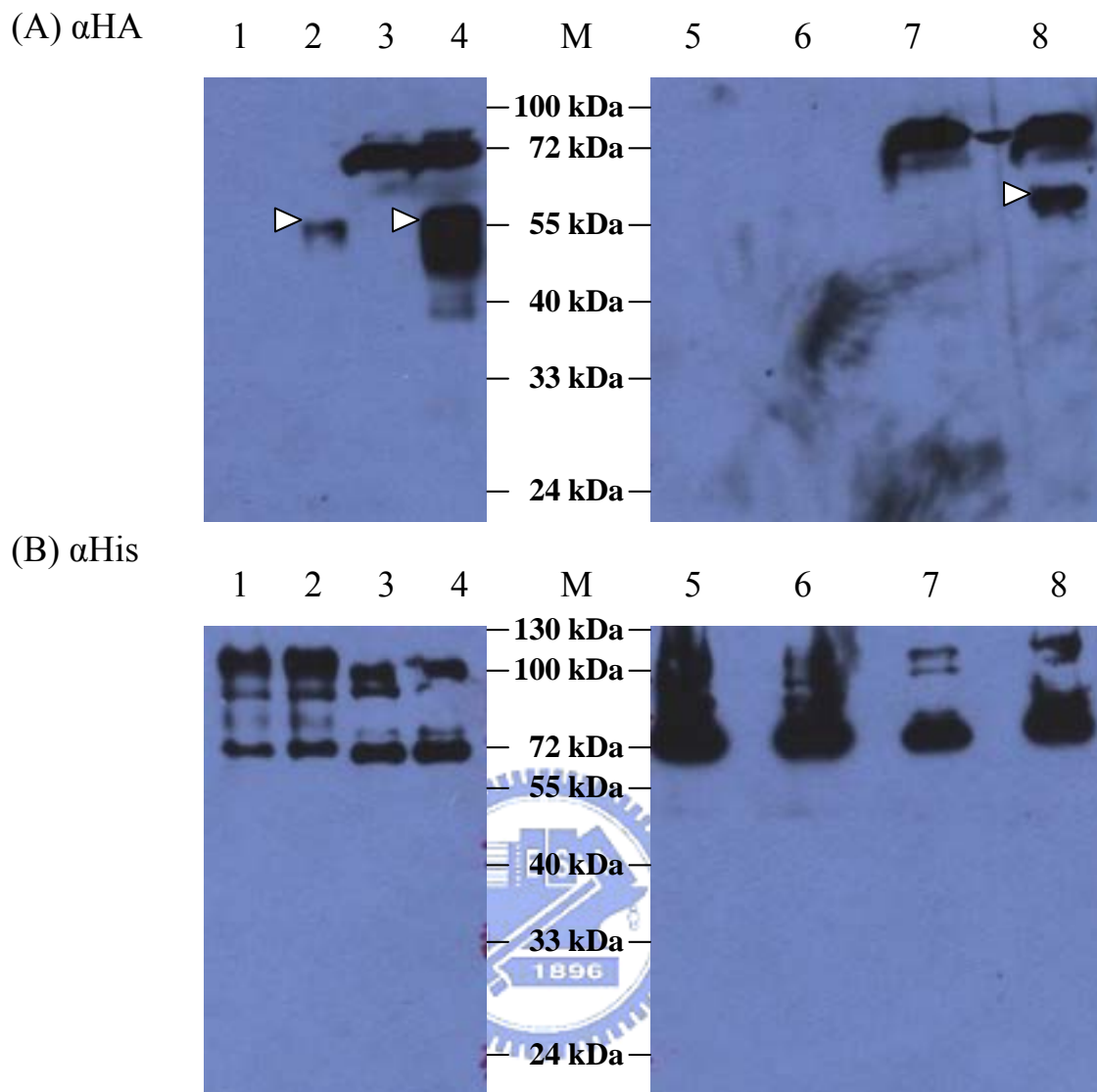
(A) 10% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色之結果。(B) 以 anti-His-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。M 為 size marker；lane 1 為 pET-30a(+) Δ 5T 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的上清液；lane 2 為 pET-30a(+) Δ 5T 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet；lane 3 為 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue (DE3) 之 total protein 的上清液；Lane 4 為 pET-30a(+) Δ 5T-E14 質體轉形至 *E.coli* Novablue(DE3) 之 total protein 的 pellet。



圖十八、以 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis) 在 BHK-21 cell 與 293T cell 中的蛋白質表現

lane 1 為 pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的上清液；
 lane 2 為 pKRY1 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的上清液；
 lane 3 為 pcDNA3 質體轉染至 293T 之 total protein 的上清液；
 lane 4 為 pKRY1 質體轉染至 293T 之 total protein 的上清液；
 lane 5 為 pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的 pellet；
 lane 6 為 pKRY1 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的 pellet；
 lane 7 為 pcDNA3 質體轉染至 293T 之 total protein 的 pellet；
 lane 8 為 pKRY1 質體轉染至 293T 之 total protein 的 pellet。

M 為 size marker。



圖十九、以 anti-His-HRP 及 anti-HA-HRP 抗體偵測 pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)在 BHK-21 cell 與 293T cell 中的蛋白質表現

(A)以 anti-HA-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。

(B)以 anti-His-HRP 抗體偵測蛋白質表現之 Western blot 的結果。

lane 1 為 pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的上清液；

lane 2 為 pKRY1 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的上清液；

lane 3 為 pcDNA3 質體轉染至 293T 之 total protein 的上清液；

lane 4 為 pKRY1 質體轉染至 293T 之 total protein 的上清液；

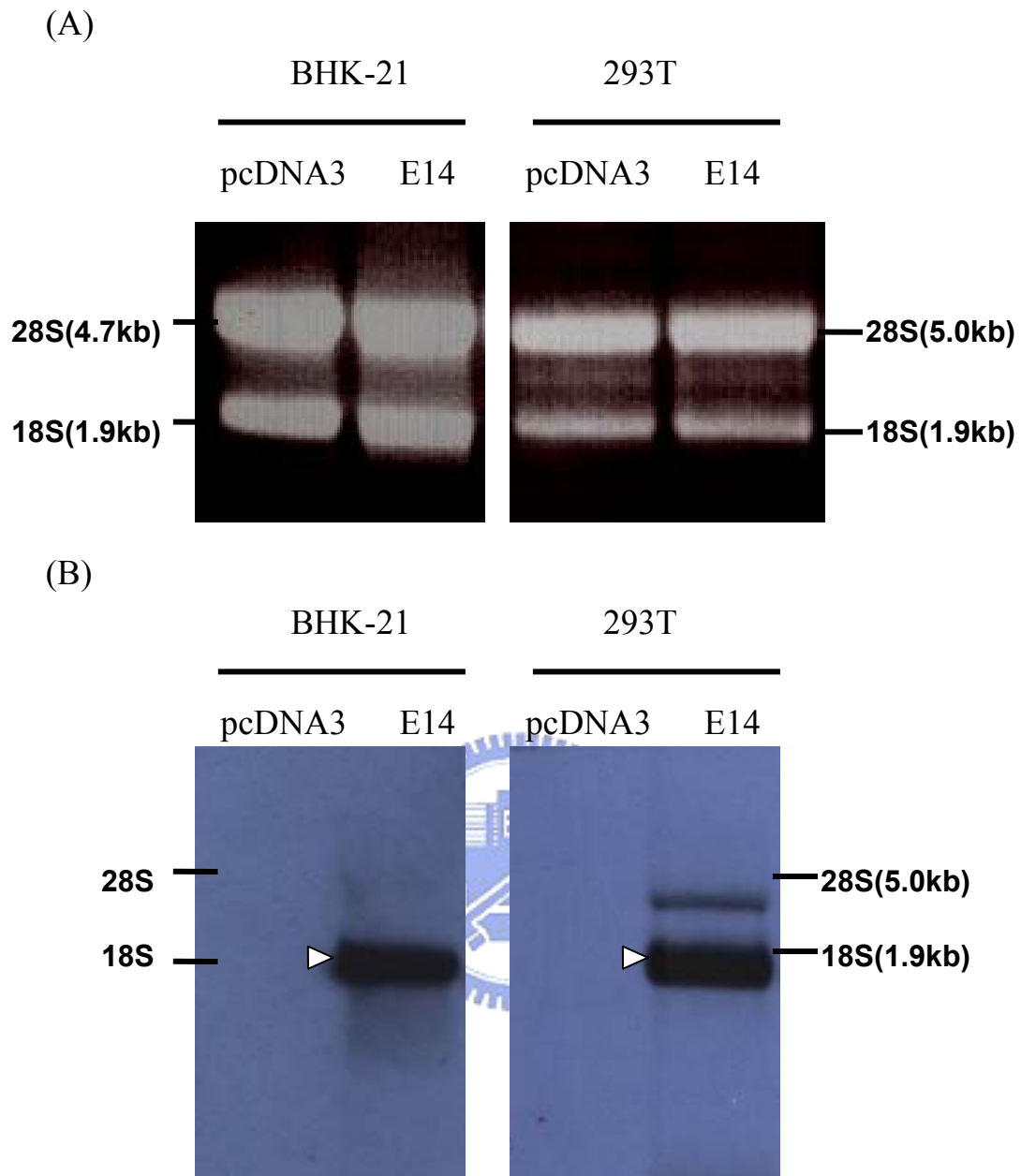
lane 5 為 pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的 pellet；

lane 6 為 pKRY1 質體轉染至 BHK21 之 total protein 的 pellet；

lane 7 為 pcDNA3 質體轉染至 293T 之 total protein 的 pellet；

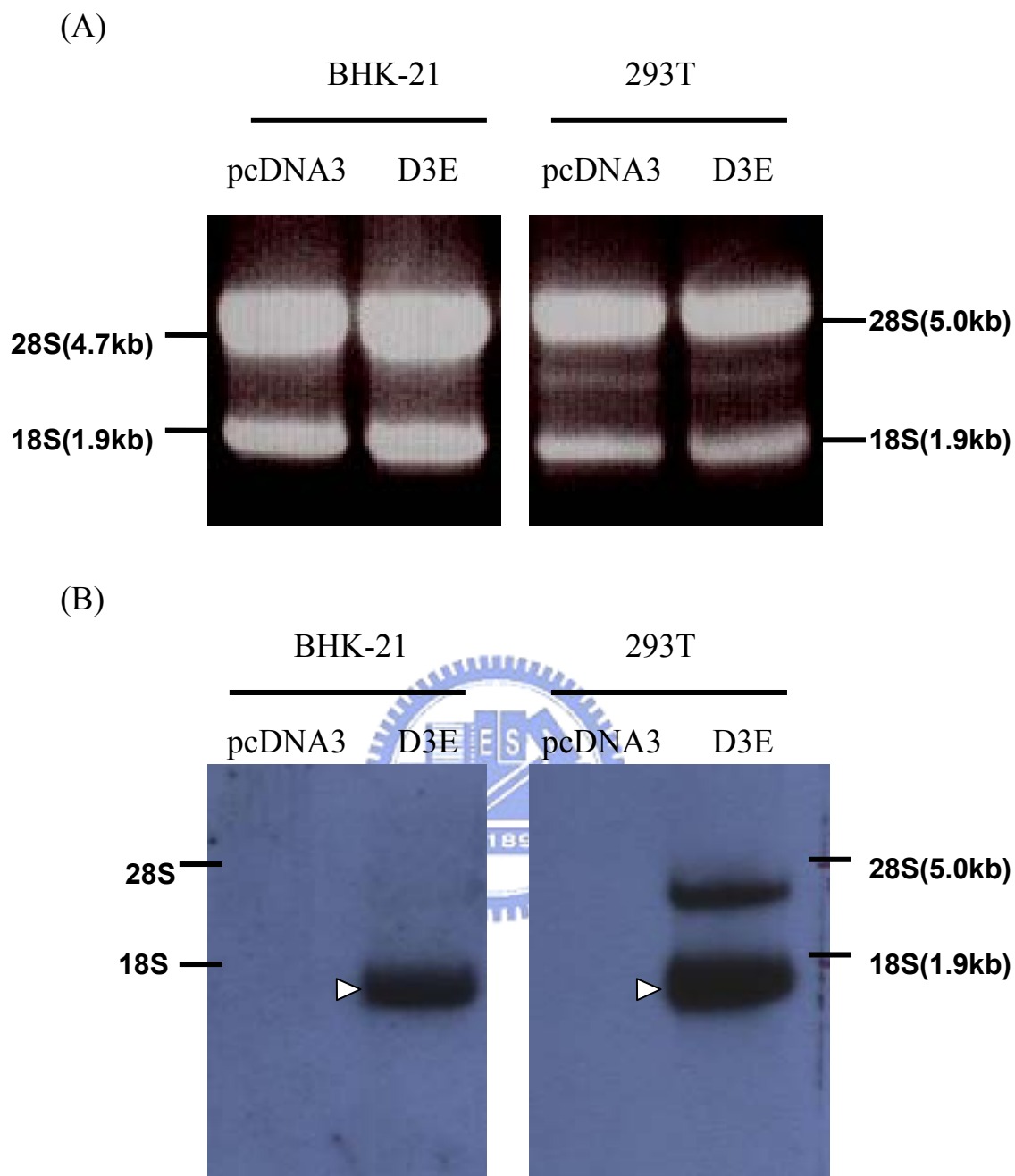
lane 8 為 pKRY1 質體轉染至 293T 之 total protein 的 pellet。

M 為 size marker。三角記號標示為 truncated E protein 表現之位置。



圖二十、pcDNA3-E14 在 BHK-21 cell 與 293T cell 表現 mRNA 的 Northern blot 結果

- (A) pcDNA3 與 pcDNA3-E14 在 1.2% agarose gel 的情形。
- (B) pcDNA3 與 pcDNA3-E14 在 Northern blot 的結果。DV-2 E gene 的 mRNA 之 coding region 應為 1.5 kb；三角記號標示為 DV-2 E gene 表現之位置。

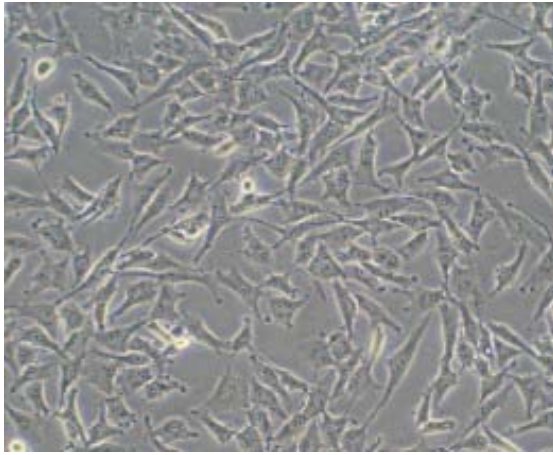


圖二十一、pcDNA3-D3E 在 BHK-21 cell 與 293T cell 表現 mRNA 的 Northern blot 結果

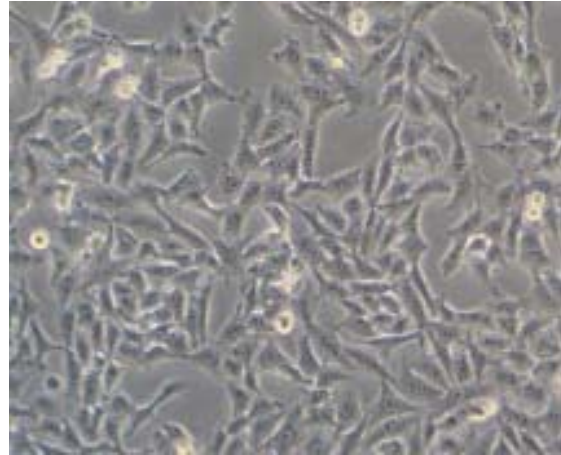
(A)pcDNA3 與 pcDNA3-D3E 在 1.2% agarose gel 的情形。

(B)pcDNA3 與 pcDNA3-D3E 在 Northern blot 的結果。DV-3 E gene 的 mRNA 之 coding region 應為 1.5 kb；三角記號標示為 DV-3 E gene 表現之位置。

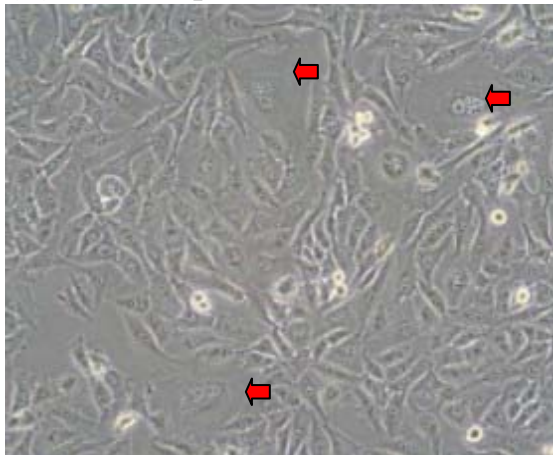
(A) BHK21



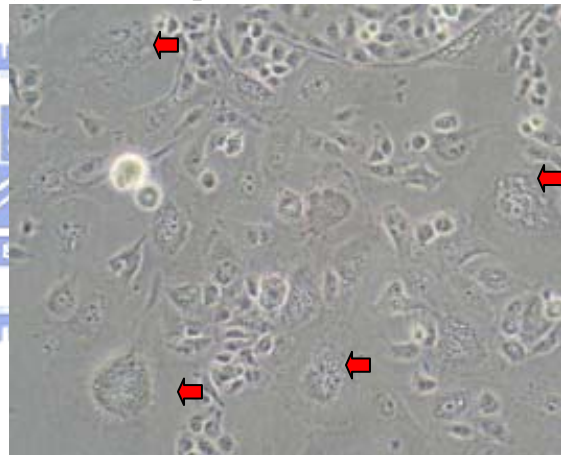
(B) BHK21-pcDNA3



(C) BHK21-pcDNA3-E14(1)



(D) BHK21-pcDNA3-E14(2)

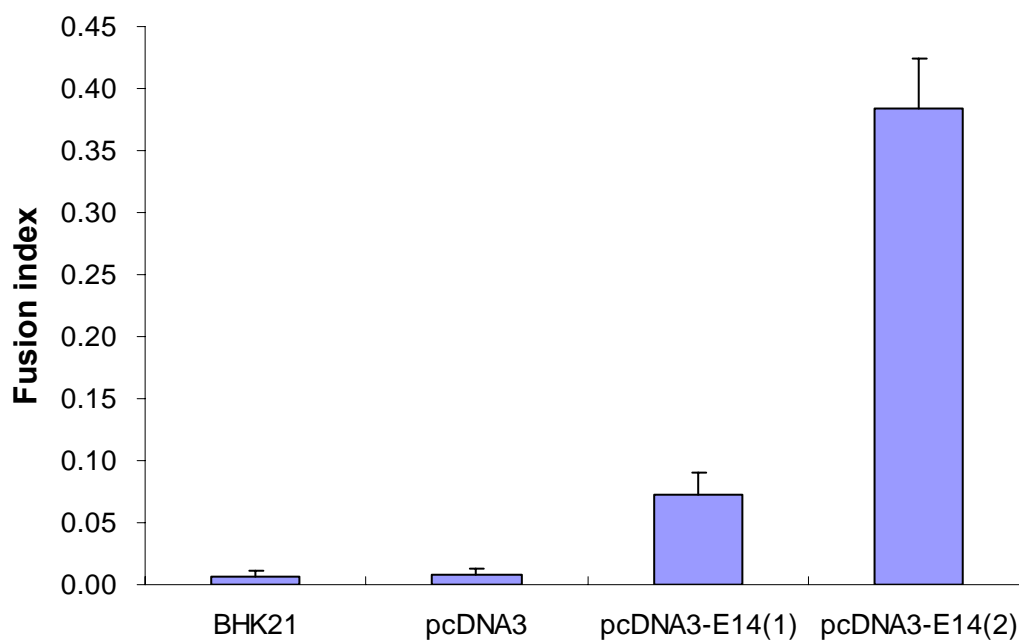


圖二十二、穩定細胞株的細胞型態

- (A) BHK21 的細胞型態。
- (B) pcDNA3 質體轉染至 BHK21 之穩定細胞株的細胞型態，此穩定細胞株命名為 BHK21-pcDNA3。
- (C) pcDNA3-E14 質體轉染至 BHK21 之穩定細胞株的細胞型態，此穩定細胞株命名為 BHK21-pcDNA3-E14(1)。
- (D) pcDNA3-E14 質體轉染至 BHK21 之穩定細胞株的細胞型態，此穩定細胞株命名為 BHK21-pcDNA3-E14(2)。

箭頭記號(◀)標示為 syncytium 之位置。

(A)



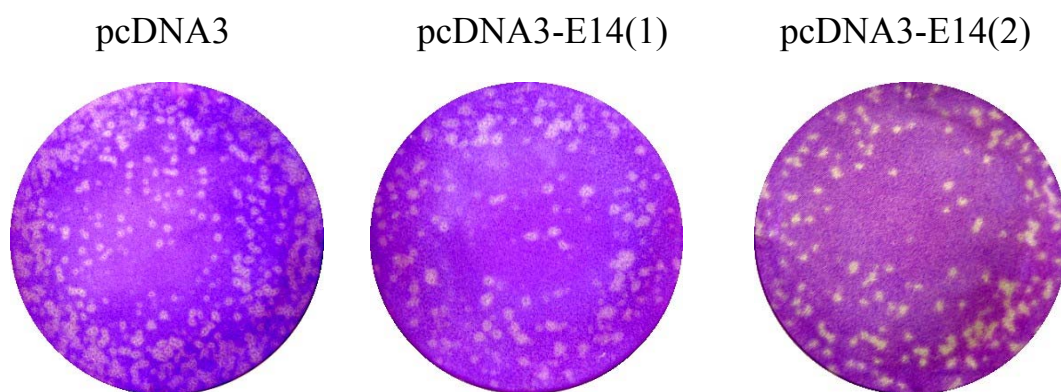
(B)

組別	BHK21	pcDNA3	pcDNA3-E14(1)	pcDNA3-E14(2)
fusion index				
Mean ± S.D.	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.02	0.38 ± 0.04

圖二十三、各穩定細胞株之 fusion index

Fusion index 定義為 $[1 - (\text{細胞總數} / \text{細胞核總數})]$ 。每個穩定細胞株各選擇五個顯微鏡下之視野，以 300 顆細胞核為一計數單位，共計數五個單位並平均之。(A) X 軸由左至右分別為 BHK21 正常細胞株與 BHK21-pcDNA3、BHK21-pcDNA3-E14(1) 及 BHK21-pcDNA3-E14(2) 穩定細胞株；Y 軸為 fusion index。(B) 不同細胞株之 Fusion index。

(A)



(B)

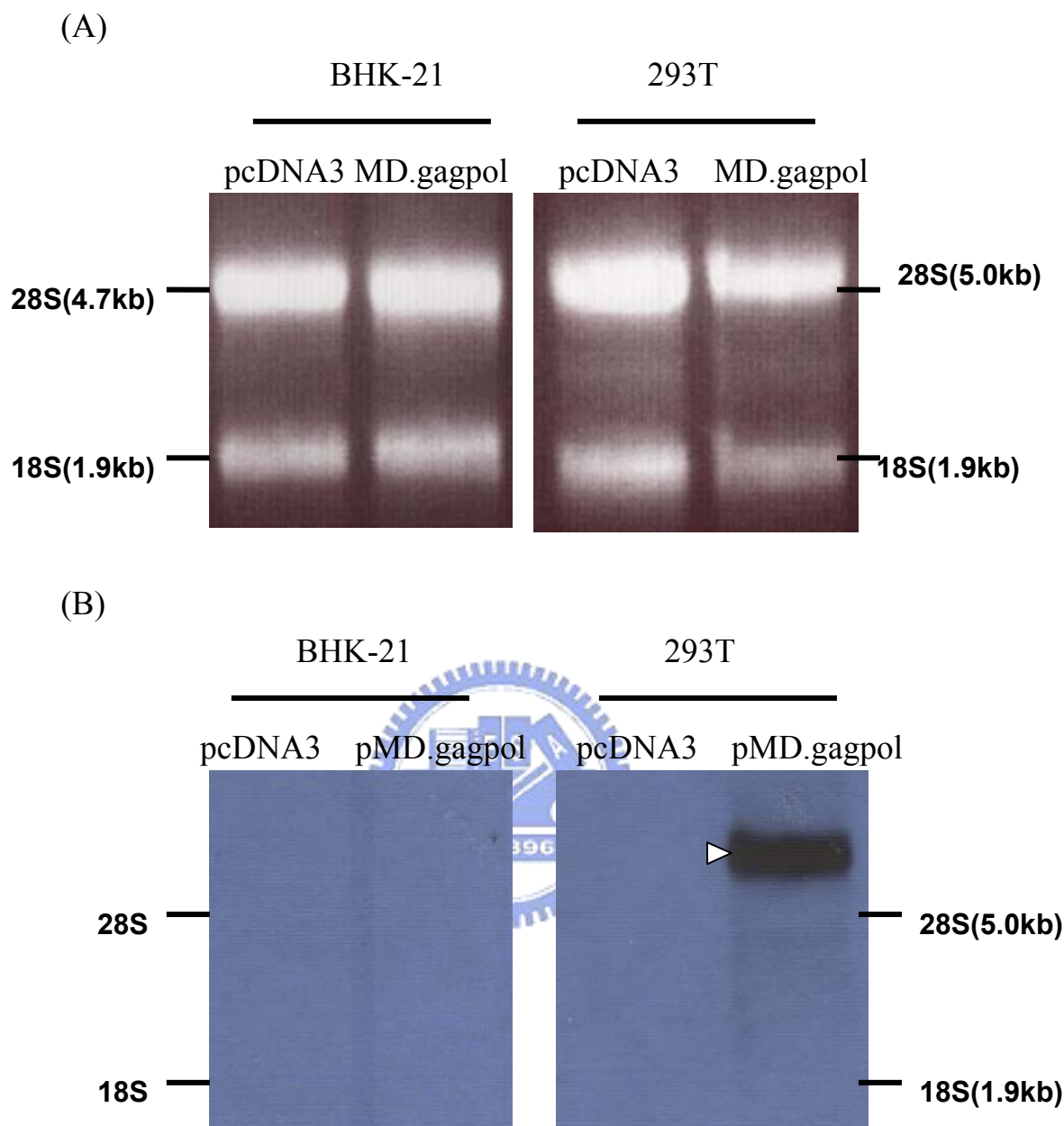
組別	pcDNA3	pcDNA3-E14(1)	pcDNA3-E14(2)
Plaque number 一	332	180	165
二	328	182	160
Mean \pm S.D.	330 ± 2.83	181 ± 1.41	162.5 ± 3.54
%	100	54.85	49.24

組別	pcDNA3	pcDNA3-E14(1)	pcDNA3-E14(2)
Plaque number 一	354	223	190
二	384	202	183
三	348	230	—
Mean \pm S.D.	362 ± 19.29	218.33 ± 14.57	186.5 ± 4.95
%	100	60.31	51.52

圖二十四、穩定細胞株的溶斑試驗結果

(A) 各穩定細胞株 BHK21-pcDNA3、BHK21-pcDNA3-E14(1) 及 BHK21-pcDNA3-E14(2) 的溶斑試驗結果。

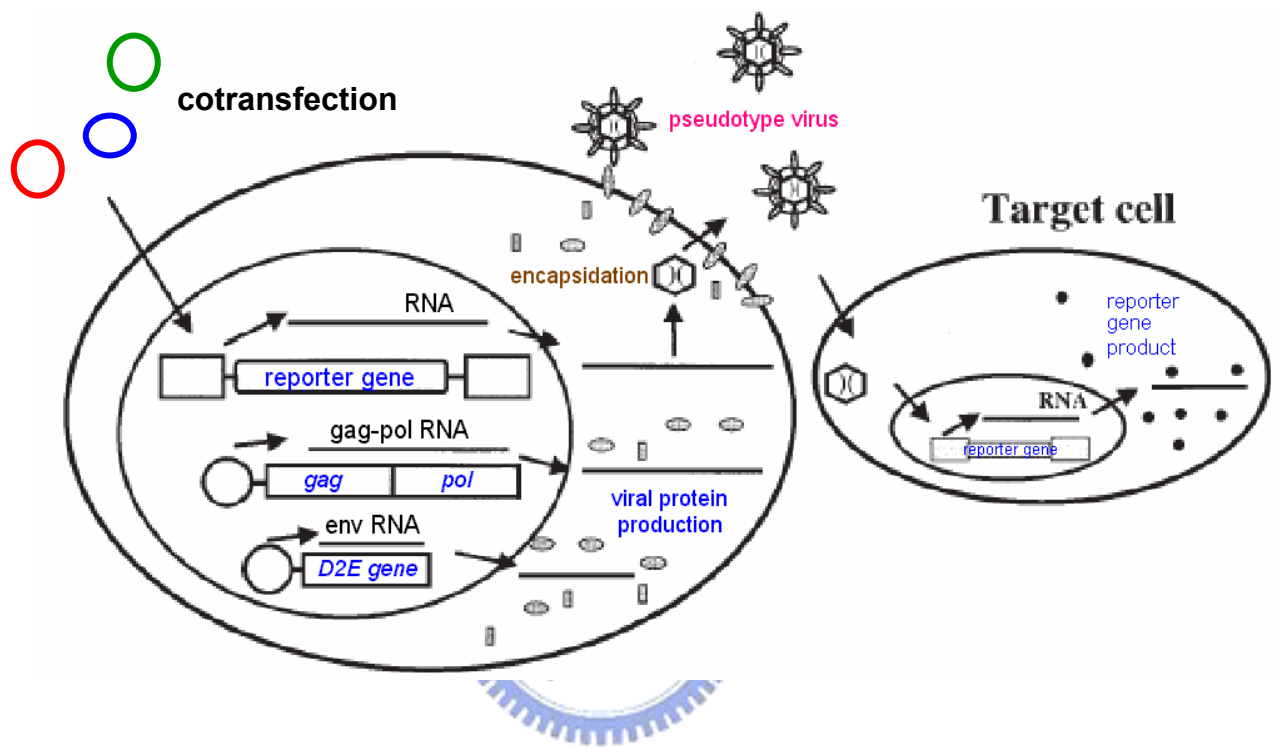
(B) 各穩定細胞株之溶斑試驗的溶斑數 (plaque number) 分析總表。



圖二十五、pMD.gagpol 在 BHK-21 cell 與 293T cell 表現 mRNA 的 Northern blot 結果

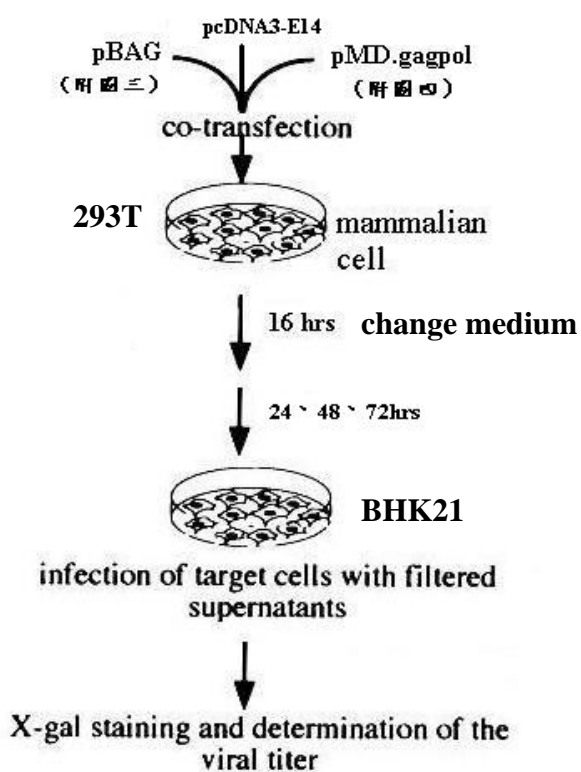
(A)pcDNA3 與 pMD.gagpol 在 1.2% agarose gel 的情形。

(B)pcDNA3 與 pMD.gagpol 在 Northern blot 的結果。gag-pol gene 的 mRNA 之 coding region 應為 5.2 kb；三角記號標示為 gag-pol gene 表現之位置。



圖二十六、產生假型病毒顆粒示意圖
 (此圖 modified 自 Schweizer, 2001)

(A)



(B)

組別	pcDNA3	pcDNA3-E14	pcDNA3-D3E	pAmpho gp85
Blue cell	25	41	75	64
(CFU/ml)	0	0	1	7
(BHK21)	1	1	0	0

圖二十七、假型病毒顆粒的產生

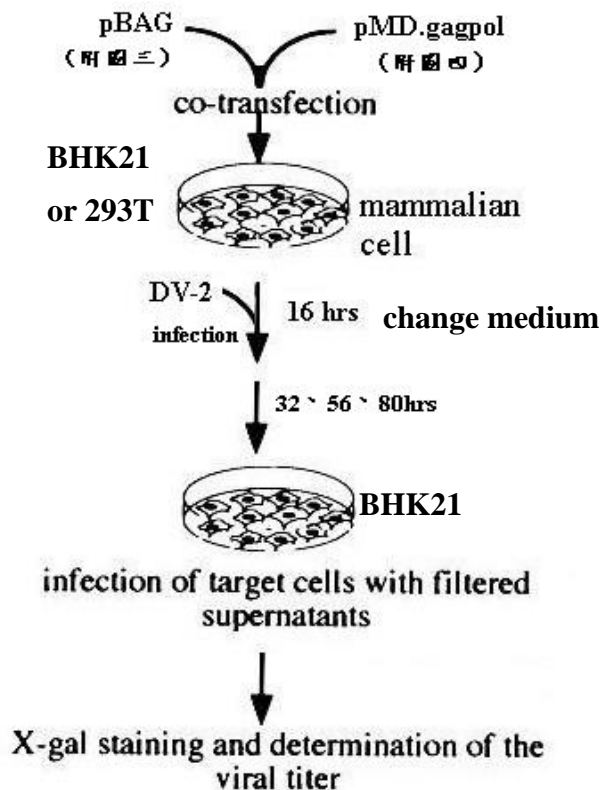
(A)實驗流程。

(B)假型病毒顆粒效價測試結果。

pBAG : retroviral genome with lacZ(附圖三)

pMD.gagpol : retroviral gagpol under control of CMV promoter(附圖四)

(A)



(B) 共同轉染於 BHK21

	組別	MOI=0	MOI=1	MOI=3
Blue cell	48 hrs	10	0	0
(CFU/ml)	72 hrs	0	0	0
(BHK21)	96 hrs	0	0	0

(C) 共同轉染於 293T

	組別	MOI=0	MOI=1	MOI=3
Blue cell	48 hrs	10	8	4
(CFU/ml)	72 hrs	0	0	3
(BHK21)	96 hrs	0	0	0

圖二十八、利用病毒提供外膜蛋白以產生假型病毒顆粒

(A) 實驗流程。

(B) 共同轉染於 BHK21 細胞，所得之假型病毒顆粒效價測試結果。

(C) 共同轉染於 293T 細胞，所得之假型病毒顆粒效價測試結果。

pBAG : retroviral genome with lacZ(附圖三)

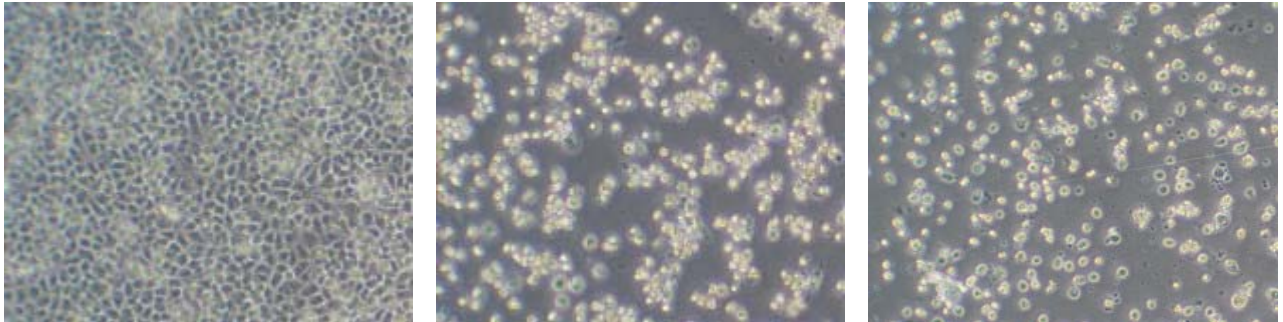
pMD.gagpol : retroviral gagpol under control of CMV promoter(附圖四)

(A)

MOI=0

MOI=1

MOI=3



(B)

MOI=0

MOI=1

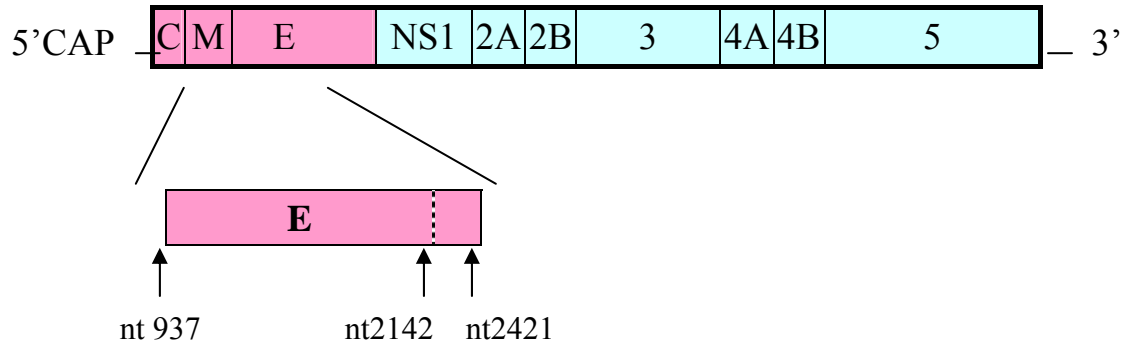
MOI=3



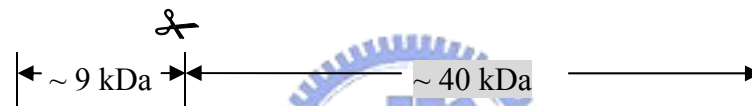
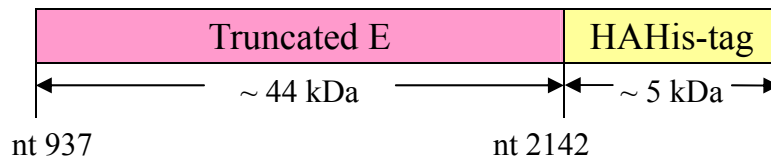
圖二十九、確認病毒感染共同轉染後之 BHK21 細胞

(A) 登革病毒感染細胞第五天後之細胞型態。

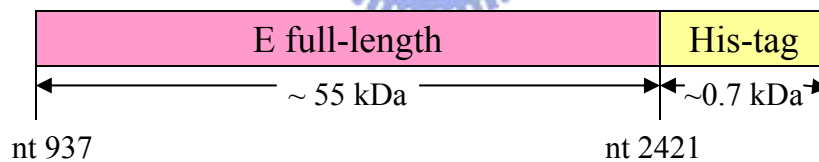
(B) 登革病毒感染細胞第五天後之溶斑試驗結果。



pKRY1 (pcDNA3-tE-HAHis)



pET-30a(+) Δ 5T-E14



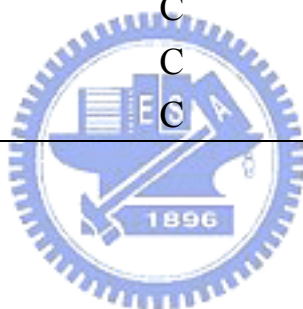
圖三十、recombinant DV-2 E protein 之 protease 作用切位推測圖

✂記號標示為可能之 protease 作用位置。

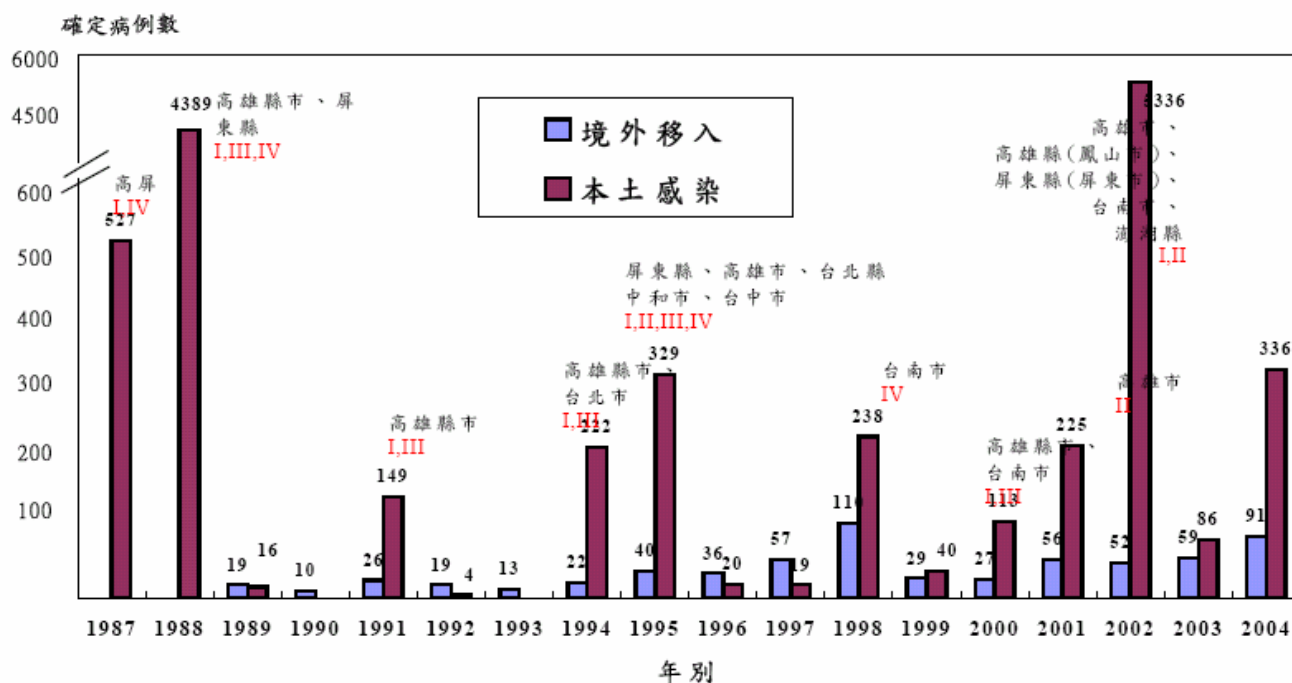
附表一、DV-2 之 Taiwan local strain PL046 與 New Guinea-C strain (Accession No. M29095) 的 E gene (1-495 amino acids) 序列比較之變異處

(Chiu and Yang, 2003)

Nucleotide position	Nucleotide changes		Amino acid changes (M29095→PL046)
	M29095	PL046	
1075	G	A	E 47 K
1093	C	T	P 53 S
1099	A	G	T 55 A
1149	T	A	D 71 E
1255	C	T	L 107 L
1282	T	C	C 116 R
2140	A	C	I 402 L
2297	T	C	I 454 T
2356	T	C	S 474 P

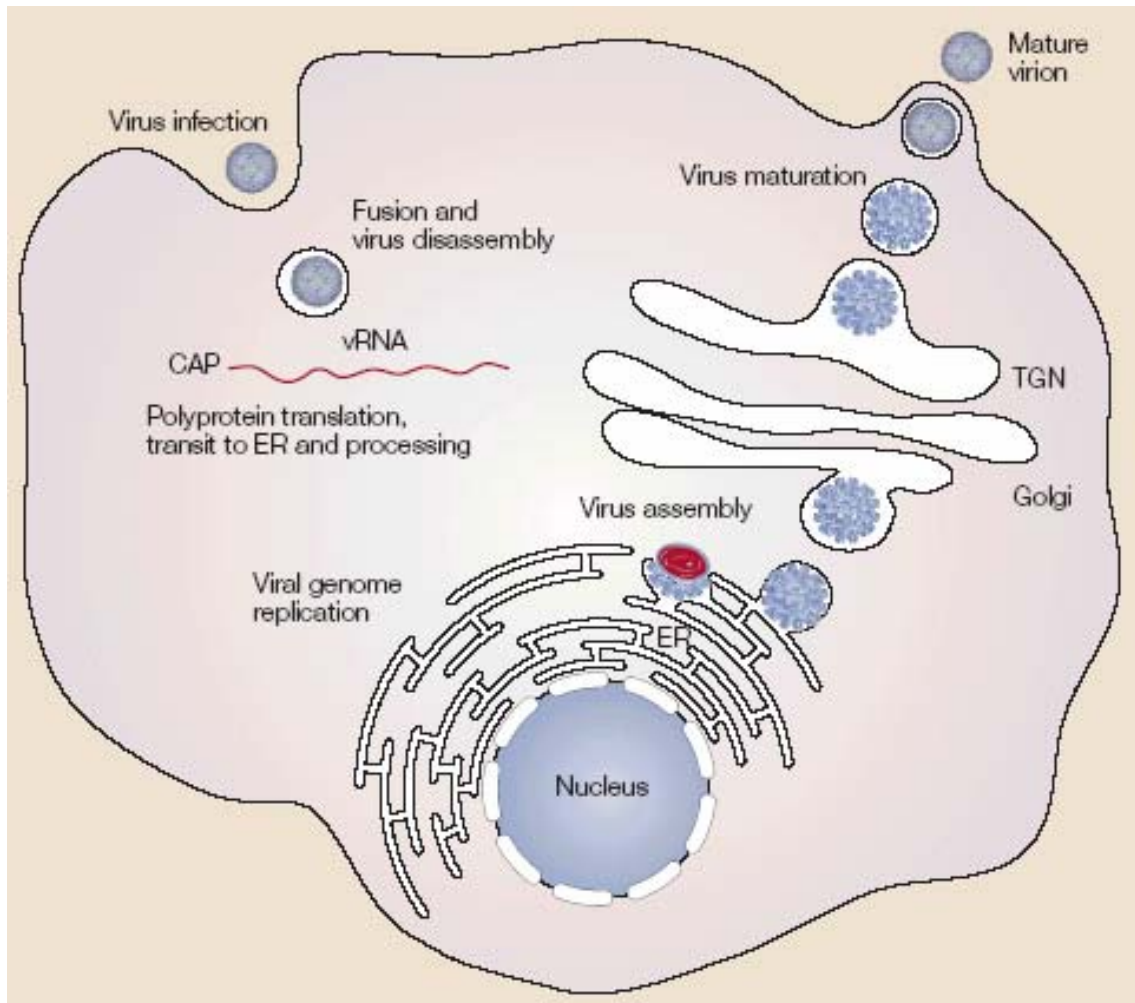


1987 至 2004 年臺灣地區登革熱本土及境外移入確定病例分布



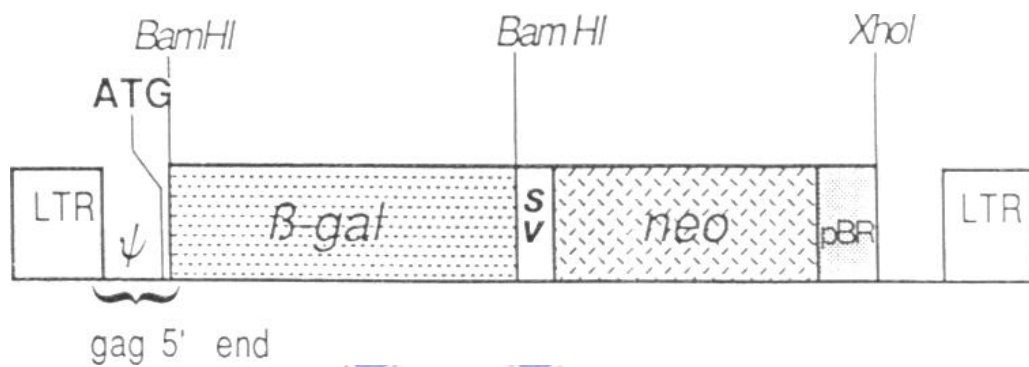
(資料來源：疾病管制局)

附圖一、1987 至 2004 年台灣地區登革熱本土及境外移入確定病例分布



(Mukhopadhyay et al., 2005)

附圖二、Flavivirus life cycle



(Price et al., 1987)



附圖三、pBAG

Structure of the β -gal-transducing Mo-MuLV vector.

LTR : long terminal repeat

β -gal : β -galactosidase

neo : neomycine

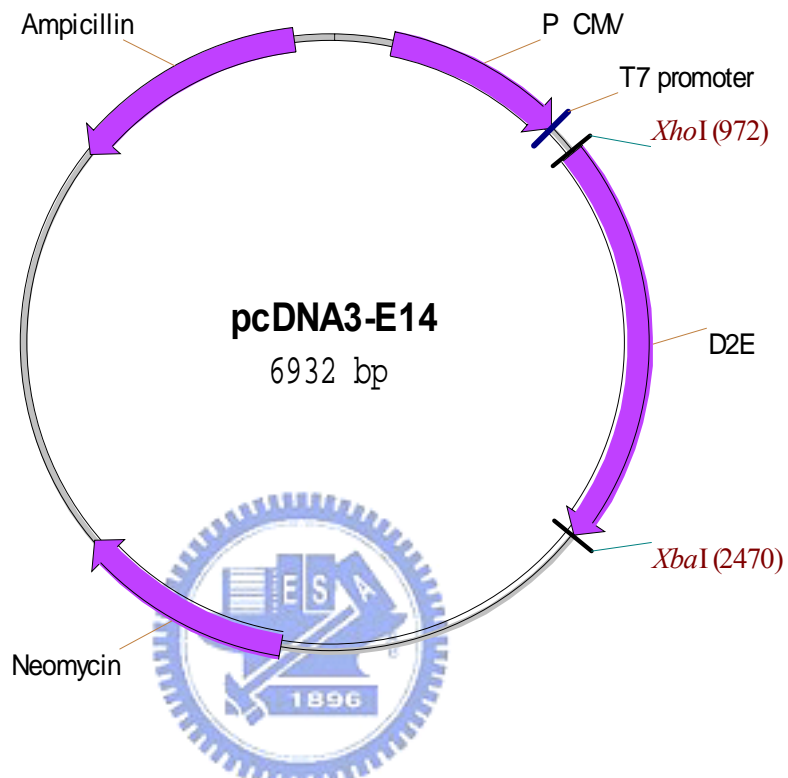
sv : simian virus 40 early promoter



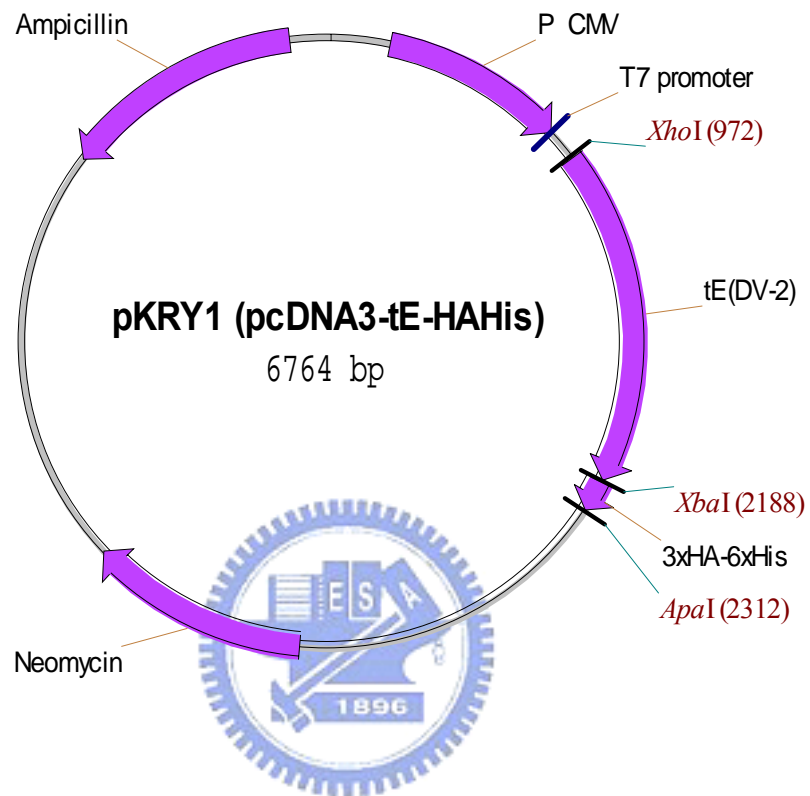
(Ory et al., 1996)

附圖四、pMD.gagpol

The construct encodes the MuLV *gag-pol* gene sequences.



附圖五、pcDNA3-E14 質體之示意圖
 (取自 邱美惠，楊昀良實驗室，交通大學)
 D2E：full-length Dengue 2 E gene sequence



附圖六、pKRY1(pcDNA3-tE-HAHis)質體之示意圖
 (取自 嚴貴榮，楊昀良實驗室，交通大學)

tE(DV-2)：truncated E of Dengue 2；含 DV-2 E gene 1~1205 nt。

ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit (Premier)

1. Pellet 3-5ml of cells by centrifugation for 1 min at top speed (12-14,000 x g) in a microcentrifuge. Pour off the supernatant and remove excess media.
2. Completely resuspend the cell pellet in 200 μ l of solution I, and mix by gently inverting the capped tube 5 times.
3. Add 200 μ l of solution II and mix by inverting the tube 5 times. The cell suspension should be clear immediately.
4. Add 200 μ l of solution III and mix by inverting the tube 5 times.
5. Centrifuge the lysate at top speed in a microcentrifuge for 5 min. A compact white pellet will form along the side or at the bottom of the tube.
6. Insert the spin column into a collection tube, carefully remove all of the cleared lysate at step 5 directly to spin column, spin down for 1 min.
7. Discard the filtrate in the collection tube and add 700 μ l of Washing solution and spin for 1 min. Repeat this step for one more time.
8. Discard the filtrate, the centrifuge for 3 min at top speed to remove residual ethanol.
9. Transfer the spin column into a new microcentrifuge tube and incubate at 45-60°C oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.
10. Add 30-50 μ l of Elution Solution or H₂O (pH 7.0-8.5) into the column and centrifuge at top speed for 1 min to elute the DNA.

附錄二

PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Purification kit (Invitrogen)

1. For high copy number plasmids, harvest 100 ml of an overnight LB culture by centrifugation at 4,000 x g for 10 minutes in a bucket. Remove all medium. Proceed to Step 3.
2. For low copy number plasmids, harvest 250-500 ml of an overnight LB culture by centrifugation at 4,000 x g for 10 minutes in a bucket. Remove all medium. Proceed to Step 3.
3. Add 10 ml Resuspension Buffer (R3) with RNase A to the pellet and resuspend the cells until homogeneous. Transfer cell suspension to a 30-ml centrifuge tube.
4. Add 10 ml Lysis Buffer (L7). Mix gently by inverting the capped tube five times. **Do not vortex.** Incubate at room temperature for 5 minutes.
5. Add 10 ml Precipitation Buffer (N3) and mix immediately by inverting the tube until the mixture is homogeneous. **Do not vortex.**
6. Centrifuge the mixture at $>12,000 \times g$ for 10 minutes at room temperature.
Note: If the pellet does not adhere to the bottom of the tube, incubate the tube at room temperature for 5 minutes to allow the separation of the lysate and gelatinous pellet. Pipette the clear lysate into another tube and centrifuge at $>15,000 \times g$ for 5 minutes at room temperature to remove any remaining cellular debris.
7. Load the supernatant from Step 6 onto the equilibrated column. Allow the solution in the column to drain by gravity flow.
8. Wash the column with 60 ml Wash Buffer (W8). Allow the solution in the column to drain by gravity flow. Discard the flow-through.
9. Place a sterile 30-ml centrifuge tube (elution tube) under the column.
10. Add 15 ml Elution Buffer (E4) on the column to elute DNA. Allow the solution to drain by gravity flow. Do not force out any remaining solution.
The elution tube contains the purified DNA. Discard the column.
11. Add 10.5 ml isopropanol to the elution tube. Mix well.
12. Centrifuge the tube at $>15,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C. Carefully remove and discard the supernatant.
13. Resuspend the DNA pellet in 5 ml 70% ethanol.

14. Centrifuge the tube at $>15,000 \times g$ for 5 minutes at 4°C . Carefully remove and discard the supernatant.
15. Air-dry the pellet for 10 minutes.
16. Resuspend the DNA pellet in $500 \mu\text{l}$ TE Buffer (TE). For low copy number plasmids, use $200 \mu\text{l}$ TE Buffer(TE).
Note: Occasionally, insoluble particles may be present. These particles do not influence the quality of the DNA and can be easily removed. To remove insoluble particles, centrifuge the DNA solution at high speed at room temperature for 1 minute. Transfer the supernatant (DNA sample) into a fresh tube.
17. Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.



PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Premier)

General Procedure for PCR and DNA Clean-up

1. For each completed PCR amplification or other DNA solution (e.g. after enzymatic treatment), remove the solution to a clear microcentrifuge tube.
2. Add 500 μ l Binding Solution to PCR solution (For PCR > 100 μ l, add five volumes of Binding solution) and vortex briefly to mix.
3. Insert the Spin column into a collection tube, transfer the solution into spin column and spin for 1 min at top speed (12-14,000 x g), and discard the filtrate in the collection tube.
4. Add 700 μ l of Washing solution and spin for 1 min at top speed. Repeat this step for one more time.
5. Discard the filtrate then centrifuge for 3 min at top speed to remove residual trace of ethanol.
6. Transfer the spin column into a new microcentrifuge tube and incubate at 45-60°C oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.
7. Add 30-50 μ l of Elution Solution or H₂O (pH 7.0-8.5) to elute the DNA by centrifuge for 1 min and store the elute DNA at -20°C.

General Procedure for gel extraction

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

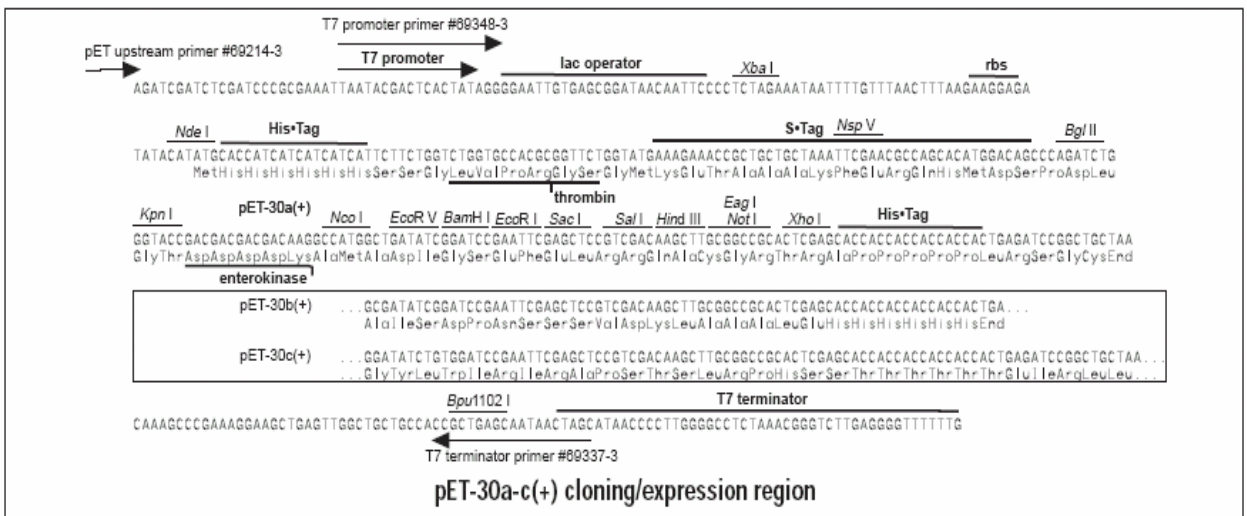
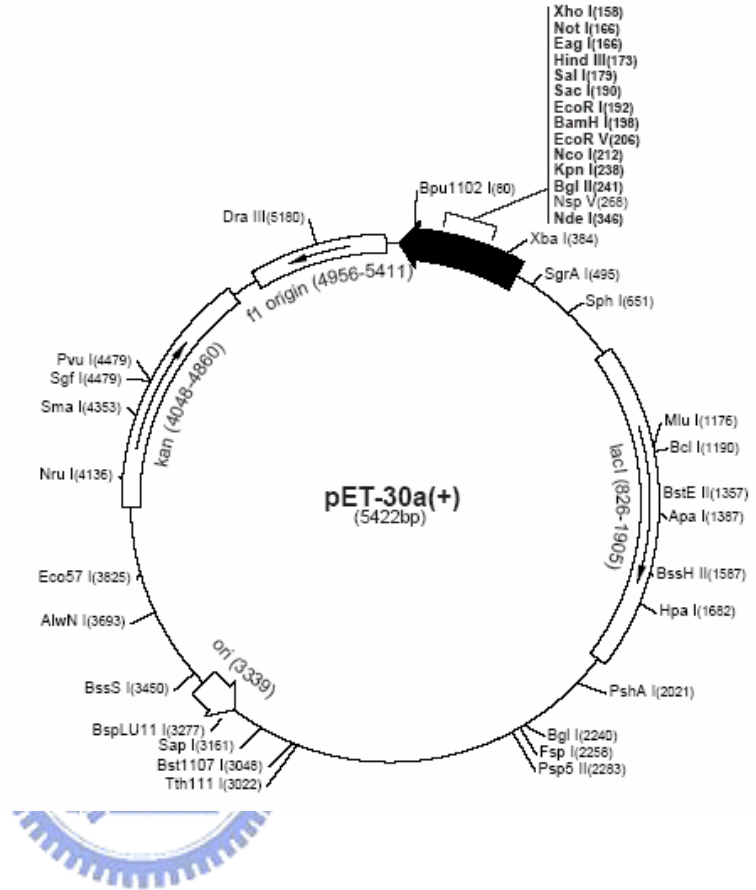
- 45-60°C oven for 5 min to evaporate all of the ethanol.
7. Add 30-50 μ l of Elution Solution or H₂O (pH 7.0-8.5) or TE buffer to elute the DNA by centrifuge for 1 min and store the elute DNA at -20°C (For DNA fragments larger than 5 kb, use preheated 60~70°C H₂O (pH 7.0-8.5) or TE buffer to elute).



附錄四

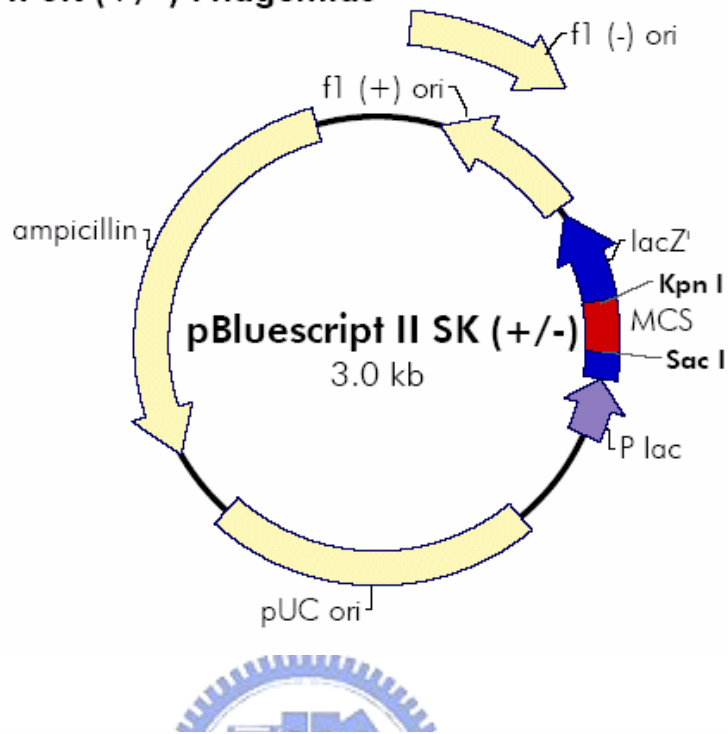
pET-30a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	419-435
T7 transcription start	418
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	826-1905
pBR322 origin	3339
Kan coding sequence	4048-4860
f1 origin	4956-5411

The maps for pET-30b(+) and pET-30c(+) are the same as pET-30a(+) (shown) with the following exceptions: pET-30b(+) is a 5421bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-30c(+) is a 5423bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.

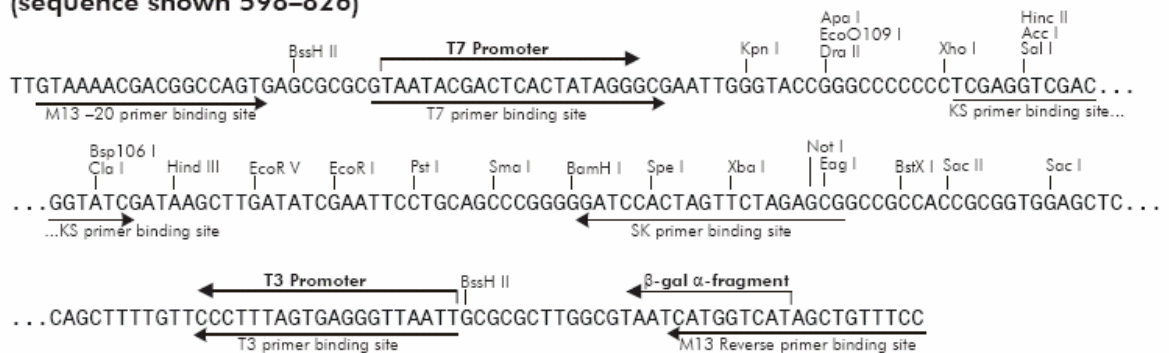


附錄五

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