

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

以四環素及其衍生物為第二型登革熱病毒之抑制劑



Tetracycline-derivatives as inhibitors of dengue virus

type 2

研究生：杜育穎

指導教授：楊昀良 博士

中華民國九十六年七月

以四環素及其衍生物為第二型登革熱病毒之抑制劑

Tetracycline-derivatives as inhibitors of dengue virus type 2

研究生：杜育穎

Student : Yu-Yin Tu

指導教授：楊昫良 博士

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

國立交通大學

生物科技研究所



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

July 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年七月

摘要

世界衛生組織估計每年發生約 5000 萬的登革熱病例，而目前仍沒有商業化且有效的治療方式及疫苗。先前實驗室與生資所楊進木老師合作進行以登革病毒 2 型的外膜蛋白的結構進行 virtual screening 篩選出可與其 docking 的臨床藥物清單，其中含有 tetracycline 及其衍生物 rolitetracycline。本研究以此為基礎，針對 tetracycline 及其衍生物在培養的細胞上進行測試，以確認其對登革病毒的抑制能力。利用登革熱二型 PL046 病毒株進行溶斑試驗來測試，最後得到三個四環素衍生物在溶斑試驗中對登革熱二型病毒展現出抑制能力。

而在此初步結論下，為進一步推測其機制，於是進行時間點的測試。而其中 doxycycline 與 rolitetracycline 表現出來的是在加入病毒前加入和與病毒同時加入這兩個時間點可以觀察到抑制的現象，而 chlortetracycline 則是持續表現出抑制能力，直至加入病毒顆粒後的 10 小時後。此外，為了建構登革病毒之 expression clone 以進一步探討其機制，便設計將本實驗室所擁有的 cDNA clone 做修飾，在 3'UTR 端後面加上 ribozyme 使得此 cDNA clone 所產生的 RNA 可自行將因 cloning 過程產生的多餘序列移除，以期可以利用修正過的 clone 來進一步探討藥物的作用機制，因此建構 HCV ribozyme 之 construct。

Abstract

The WHO has estimated there are about 50 million dengue cases each year globally. Currently there is no commercial available vaccine and treatment.

In previous study, this laboratory has obtained a list of compound candidates by applying virtual screening based on molecular docking and cluster analysis to select for commercial available medical compounds interacting with dengue E protein and, in theory, blocking the infection in cell cultures. Among them, there are tetracycline derivatives. This has raised the interest in other tetracycline derivatives. In this study, I tested the effectiveness of those tetracycline compounds were tested in cell culture system. In all, seven tetracycline compounds were assayed for their inhibitory effect on DV2 PL046. Three have showed inhibitory activities on DV2 PL046 in cell cultures.

In addition, I have also constructed an HCV-ribozyme plasmid for the purpose of attaching to the 3' end of a DV2 cDNA clone to remove extra sequence when expressed in RNA form.

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
目錄	iii
圖目錄	v
1.緒論	1
1.1 登革病毒簡介	1
1.2 登革病毒的歷史與現況	1
1.3 登革病症的臨床症狀	2
1.4 登革病毒之分子生物學背景	3
1.5 登革病毒外膜蛋白性質	4
1.6 四環素家族的性質	5
1.7 核糖酶的性質	6
2.材料與方法	7
2.1 材料	7
2.1.1 菌株	7
2.1.2 細胞株	7
2.1.3 病毒	7
2.1.4 質體	7
2.1.5 引子	8
2.1.6 藥品試劑	8
2.1.6.1 藥品	8
2.1.6.2 試劑	10
2.1.7 溶劑及緩衝液之配方	10
2.1.8 主要儀器	11

2.2 方法	12
2.2.1 細胞培養	12
2.2.2 登革病毒之增殖	12
2.2.3 溶斑試驗	12
2.2.4 大腸桿菌勝任細胞	13
2.2.5 大腸桿菌轉型作用	13
2.2.6 小量質體 DNA 萃取	14
2.2.7 限制酵素反應	14
2.2.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段	14
3. 結果	16
3.1 以溶斑試驗進行藥物測試	16
3.2 以溶斑試驗進行時間點測試	21
3.3 製造 DV2-specific 之 HCV ribozyme 之 clone	24
4. 討論	25
5. 未來方向	31
6. 參考文獻	32

圖目錄

圖一 近年來登革熱病例	37
圖二 登革病毒其外膜蛋白其 domain 與其結構示意圖	37
圖三 實驗中所使用的四環素家族成員之結構圖	38
圖四 T1 (tetracycline)溶斑試驗之結果整理	39
圖五 T2 (doxycycline)溶斑試驗之結果整理	40
圖六 T3 (rolitetracycline)溶斑試驗之結果整理	41
圖七 T4 (demeclocycline)溶斑試驗之結果整理	42
圖八 T5 (oxytetracycline)溶斑試驗之結果整理	43
圖九 T6 (chlortetracycline)溶斑試驗之結果整理	46
圖十 T7 (minocycline)溶斑試驗之結果整理	47
圖十一 加入不同藥物後，細胞型態的變化	48
圖十二 T1 (tetracycline)的時間點溶斑試驗之結果整理	49
圖十三 T2 (doxycycline)的時間點溶斑試驗之結果整理	50
圖十四 T3 (rolitetracycline)的時間點溶斑試驗之結果整理	51
圖十五 T6 (chlortetracycline)的時間點溶斑試驗之結果整理	52
圖十六 參考 HCV 的 ribozyme 設計示意圖	53
圖十七 PCR 反應示意圖	54
圖十八 第一次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖	55
圖十九 第二次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖	55
圖二十 第三次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖	56
圖二十一 pGEM-T-Ribo 載體示意圖	57
圖二十二 pGEM-T-Ribo 經限制酶 Apa I 作用後之洋菜膠電泳圖	58
圖二十三 pGEM-T-Ribo 經限制酶 Xba I 作用後之洋菜膠電泳圖	59
圖二十四 pGEM-T-Ribo 載體定序結果分析圖	60

1.緒論

1.1 登革病毒簡介

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，登革熱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 dengue fever (DF) 症狀或是更嚴重的 dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (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（如圖一），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，2007）。

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。根據目前的看法，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 antibody-dependent enhancement (ADE)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 的病徵發生，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。而據研究指出 3' 端的 UTR 會形成 stem-loop (3'SL) 對於整個病毒 RNA 的複製扮演著必要的角色 (Harris et al., 2006)。登革病毒具有單一個 open reading frame，一般認為它會在粗內質網 (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) 來構成病毒結構的部份：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 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5, 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 (You et al., 1999)。

對病毒複製的過程, 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)。

1.5 登革病毒外膜蛋白性質

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)，負責媒介病毒及寄主之 lipid bilayer 之融合；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 (如圖二所示) (Thullier et al., 1999; Crill and Roehrig, 2001; Modis et al., 2004; 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 四環素家族的性質

四環黴素 (簡稱四環素) 是一種抗生素，藉由進入細菌體內，與 30S 核糖體上的 A-site 結合，以阻斷 aminoacyl-tRNA 與 30S 核糖體結合，使新的胺基酸單體無法加到肽鏈上，阻斷細菌的蛋白質合成，達到抗菌效果 (Anokhina et al.,

2004)。主要用於治療細菌感染（如黴漿菌、披衣菌……等等）及幫助控制青春痘；口服四環素可能發生之副作用包括噁心、腹瀉、對陽光產生敏感，使成長孩童牙齒變黃及延緩骨骼生長，本實驗所使用之藥物及其結構如圖三，這是因四環黴素會吸收人體內的鈣離子與鐵離子的緣故（Riaz et al., 1984）。

1.7 核糖酶的性質

大多數核酶通過催化轉磷酸酯和磷酸二酯鍵水解反應參與 RNA 自身剪切、加工過程。

有催化能力的核糖核酸（RNA），一般叫核糖酶。是 1981 年切赫（T·R·Cech）最先發現的，之後由他命名，並於 1989 年獲得諾貝爾化學獎。和蛋白質的酶（蛋白質）相比，細胞內的 RNA 酶是極少的。現在已知的幾十種天然 RNA 酶的絕大部分參與 RNA 的加工和成熟。按它們的作用方式可分為剪切型（把 RNA 前體的多餘部分切除），和剪接型（把 RNA 前體的內含子部分切除並把不連續的外顯子部分連接起來）（Johnston et al., 2001）。根據所作用的底物不同，又可分成自體催化和異體催化兩類。絕大多數 RNA 酶以自身為基本進行自體催化，可以是自我剪切，也可以是自我剪接。

2.材料與方法

2.1.材料

2.1.1 菌株

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

2.1.2 細胞株

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

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

2.1.3 病毒

PL046 strain (Dengue virus type 2 Taiwan local strain)



2.1.4 質體

質體名稱	特性	Reference
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 。	賴建李 2006/ 楊昀良 實驗室
pGEM-T-Ribo	pGEM-T cloning HCV ribozyme 在 Apa I~Apa I sites	本研究

2.1.5 引子

引子	序列 5'~3'	位置
Ribor	{ <u>GGGGCCCAAGGTGAGATGA</u> AGCTGTA}	DV-2 (NGC ; M29095) gene : +10542~+10567
Ribo1	GACGGATCTAGATCCGTC{ <u>AGAACCTGTTGA</u> }	DV-2 (NGC ; M29095) gene : +10712~+10723
Ribo2	CCTCACGGACTCATCAGGACGGATCTAG	
Ribo3	<u>AGGGCCCC</u> CAGGTTCTTCGTCCTCACGGACT	

({} 為 gene 敘述之位置；_ 為限制酶切位)

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
Agarose	VEGONIA	9201-05	核酸電泳
Ampicillin	Applichem	A0839	細菌培養
Chlortetracycline	Sigma	C-4881	溶斑試驗
Crystal Violet	Sigma	C-3886	Staining
Demeclocycline	Sigma	D-6140	溶斑試驗
DMSO	Sigma	D-8418	冷凍細胞
Doxycycline	Sigma	D-9891	溶斑試驗
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
Kanamycin	Sigma	K4000	細菌培養
LB agar	Alpha Biosciences	L12-111	細菌培養
LB broth	Scharlau	02-385	細菌培養
MEM	GIBCO	41500-034	細胞培養
Methylcellulose	Sigma	M 0512	Plaque assay
Minocycline	Sigma	M-9511	溶斑試驗
NaCl	AMRESCO	0241	緩衝液
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	細胞培養
NaOH	Riedel-de Haën	30620	緩衝液
Oxytetracycline	Sigma	O-5750	溶斑試驗
Restriction enzyme (Apa I)	Biolab	R0114S	質體構築
Restriction enzyme (Xba I)	Biolab	R0145S	質體構築
Rolitetracycline	Sigma	R-2253	溶斑試驗
T4 DNA ligase	Fermentas	1812	質體構築
TEMED	Sigma	T-9281	Western Blot
Tetracycline	Sigma	T-7660	溶斑試驗
Tris (base)	AMRESCO	0826	緩衝液
Trypsin	GIBCO	12605-010	細胞培養

2.1.6.2 試劑

試劑名稱	製造公司	目錄編號	應用
ExcelPure™ Plasmid Miniprep Purification Kit	Premier	N-PM050	抽取少量質體
PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Premier	N-DCE050	純化 DNA
pGEM®-T vector system I	Promega	A3600	質體建構

2.1.7 溶劑及緩衝液之配方

- 1% crystal violet solution (500 ml)
5 g crystal violet , 50 ml 37% formaldehyde , 450 ml H₂O
- 1X PBS (pH 7.4)
137 mM NaCl , 10 mM Na₂HPO₄ , 2.7 mM KCl , 1.8 mM KH₂PO₄
- 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
- LB (Luria-Bertani)/Ampicillin 培養基
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Ampicillin
- LB (Luria-Bertani)/Kanamycin 培養基
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

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)

血球計數器 (MARIEMFELD)

低溫培養箱 701 (WISOOM)

往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)

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)

無菌操作台 (Laminar flow) VCM-420 (造鑫)

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

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)

2.2.方法

2.2.1 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。

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。

2.2.2 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。

2.2.3 溶斑試驗 (plaque assay) (加入藥物的操作步驟)

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，在須加入藥物做測試的well中加入不同濃度的藥物 450μl，前後左右搖晃一下，將培養盤置入 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中一小時後，將培養皿取出在各well中分別加入已經連續稀釋十倍的病毒懸浮液 450 μl，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 1 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七天。經倒立顯微鏡觀察，確定溶斑已經形成後，盡可能吸去全部培養基，加入 3.7% formaldehyde 固定20分鐘，然後吸去溶液，加入足可覆蓋的 1% 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。

2.2.4 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的製備

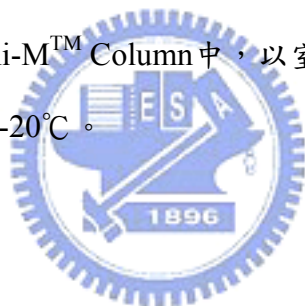
首先取 *Escherichia coli* 之單一菌落培養於 5 ml 的 LB 培養液，於 37°C 下震盪培養 (300 rpm/min) 過夜後，取 2 ml 的菌液轉養於 50 ml 的 LB 培養液中，繼續於 37°C 下震盪培養 (300 rpm/min)，直到 OD_{600nm} 介於 0.4 到 0.6 之間。將培養好的菌液轉移至 50 ml 離心管中，置於冰上 20 分鐘，之後在 4°C 下以 3000 rpm 離心 10 分鐘後倒去上清液，接著以 25 ml 4°C 預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，在 4°C 下以 2000 rpm 離心 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。

2.2.5 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。

2.2.6 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 200 µl 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。



2.2.7 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。

2.2.8 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用Gel Extraction Kit (PREMIER, N-DCE050) 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 µl 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 µl 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。



3.結果

3.1 以溶斑試驗進行藥物測試

利用所得到的藥品清單將其編號為 T1 (tetracycline)、T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)、T4 (demeclocycline)、T5 (oxytetracycline)、T6 (chlortetracycline)、T7 (minocycline) 進行測試 (之後均以 T1、T2、T3...T7 等稱呼)，在 BHK21 細胞株中進行藥物影響登革熱病毒感染過程的實驗，利用溶斑試驗 (plaque assay) 這個方法來測試藥物，於測試後計算其溶斑 (plaque) 數，而在設計實驗中均以兩個控制作為控制組，其中 control-1 為未加入病毒與藥物，而 control-2 為加入病毒但並不加入藥物。

在 T1 的部份，藥物濃度取的是 10 μ M、100 μ M 及 1000 μ M，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μ M 有 198、223、134 個溶斑數，在 100 μ M 有 205、181、124 個溶斑數，在 1000 μ M 有 207、192、126 個溶斑數，而控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 positive 溶斑數 191、185、126 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μ M 時為 110.18%，100 μ M 時為 101.19%，1000 μ M 時為 104.05%，其標準差在 10 μ M 時為 9.07%，100 μ M 時為 5.32%，1000 μ M 時為 4.19%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖四 A、B)。

在 T2 的部份，藥物濃度取的是 10 μ M、100 μ M、300 μ M 及 500 μ M，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μ M 有 180、172、113 個溶斑數，100 μ M 有 38、29、10 個溶斑數，300 μ M 有 26、27、7 個溶斑數，500 μ M 有 2、2、1 個溶斑數，而控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 191、196、143 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計

算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 87.01%，100 μM 時為 13.89%，300 μM 時為 10.76%，500 μM 時為 0.92%，其標準差在 10 μM 時為 7.64%，100 μM 時為 6.50%，300 μM 時為 5.08%，500 μM 時為 0.19%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖五 A、B)。由折線圖求得 IC₅₀ 約為 54.45 μM 。

在 T3 的部份，藥物濃度取的是 10 μM 、100 μM 、300 μM 及 500 μM ，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μM 有 195、192、130 個溶斑數，100 μM 有 30、44、35 個溶斑數，300 μM 有 9、12、6 個溶斑數，500 μM 有 5、3、4 個溶斑數，而控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 186、189、141 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 99.54%，100 μM 時為 21.41%，300 μM 時為 5.15%，500 μM 時為 2.37%，其標準差在 10 μM 時為 6.56%，100 μM 時為 4.64%，300 μM 時為 1.08%，500 μM 時為 0.68%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖六 A、B)。由折線圖求得 IC₅₀ 約為 67.07 μM 。

在 T4 的部份，藥物濃度取的是 10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 、600 μM 、700 μM 及 800 μM ，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μM 有 189、148、159 個溶斑數，50 μM 有 192、152、161 個溶斑數，100 μM 有 197、151、158 個溶斑數，200 μM 有 199、150、153 個溶斑數，300 μM 有 114、82、87 個溶斑數，而在 300 μM 之後的 400 μM ~800 μM 在顯微鏡下觀察發現其細胞為懸浮狀態並不是如同一般溶斑試驗中細胞貼附培養皿的現象，在固定細胞後染色過後也發現到染不上顏色，無法觀察到溶斑的出現，故採計 10 μM ~300 μM 的部份。其控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 196、154、161 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以

百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 97.10%，50 μM 時為 98.89%，100 μM 時為 98.90%，200 μM 時為 97.99%，300 μM 時為 55.15%，其標準差在 10 μM 時為 1.45%，50 μM 時為 1.03%，100 μM 時為 1.40%，200 μM 時為 3.29%，300 μM 時為 2.64%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖七 A、B)。

在 T5 的部份，藥物濃度取的是 10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 、600 μM 、700 μM 及 800 μM ，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μM 有 63、132、135 個溶斑數，50 μM 有 69、145、156 個溶斑數，100 μM 有 69、144、155 個溶斑數，200 μM 有 65、134、143 個溶斑數，300 μM 有 57、125、131 個溶斑數，400 μM 有 54、115、126 個溶斑數，500 μM 有 49、104、114 個溶斑數，600 μM 有 42、92、106 個溶斑數，700 μM 有 37、83、96 個溶斑數，800 μM 有 32、72、80 個溶斑數。其控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 69、145、158 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 89.26%，50 μM 時為 99.58%，100 μM 時為 99.14%，200 μM 時為 92.37%，300 μM 時為 83.91%，400 μM 時為 79.11%，500 μM 時為 71.63%，600 μM 時為 63.80%，700 μM 時為 57.21%，800 μM 時為 48.89%，其標準差在 10 μM 時為 3.31%，50 μM 時為 0.73%，100 μM 時為 0.96%，200 μM 時為 1.85%，300 μM 時為 2.00%，400 μM 時為 0.76%，500 μM 時為 0.57%，600 μM 時為 3.12%，700 μM 時為 3.57%，800 μM 時為 2.23%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖八 A、B)。而由於 800 μM 時溶斑試驗結果為 48.89%，所以進一步測試更高的濃度，因 800 μM 約為 50% 左右，100 μM 時約為 90% 左右，考慮曲線的趨勢及對稱性，故取藥物濃度 800 μM 、900 μM 、1000 μM 、1100 μM 、1200 μM 、1300 μM 、1400 μM 、1500 μM 、2000 μM 、2500 μM 及 3000 μM 。在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 800 μM 有 88、85、90 個溶斑

數，900 μM 有 75、74、72 個溶斑數，1000 μM 有 69、69、67 個溶斑數，1100 μM 有 64、67、63 個溶斑數，1200 μM 有 58、60、57 個溶斑數，1300 μM 有 55、56、55 個溶斑數，1400 μM 有 50、51、53 個溶斑數，1500 μM 有 31、32、29 個溶斑數，而 2000 μM 以上在顯微鏡下觀察發現其細胞為懸浮狀態並不是如同一般溶斑試驗中細胞貼附培養皿的現象，在固定細胞後染色過後也發現到染不上顏色，無法觀察到溶斑的出現，故採計 800 μM ~1500 μM 的部份。其控制組的 control-1 溶斑數為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與控制組的 control-2 溶斑數 182 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 800 μM 時為 48.17%，900 μM 時為 40.48%，1000 μM 時為 37.55%，1100 μM 時為 35.53%，1200 μM 時為 32.05%，1300 μM 時為 30.40%，1400 μM 時為 28.21%，1500 μM 時為 16.85%，其標準差在 800 μM 時為 1.38%，900 μM 時為 0.84%，1000 μM 時為 0.63%，1100 μM 時為 1.14%，1200 μM 時為 0.84%，1300 μM 時為 0.32%，1400 μM 時為 0.84%，1500 μM 時為 0.84%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖八 C、D)，綜合 10 μM ~1500 μM 的數據製成折線圖 (圖八 E)。

在 T6 的部份，藥物濃度取的是 10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 、600 μM 、700 μM 及 800 μM ，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μM 有 151、153、150 個溶斑數，50 μM 有 132、137、135 個溶斑數，100 μM 有 123、122、117 個溶斑數，200 μM 有 101、79、75 個溶斑數，300 μM 有 69、66、60 個溶斑數，400 μM 有 46、32、30 個溶斑數，500 μM 有 27、28、27 個溶斑數，600 μM 有 20、27、26 個溶斑數，700 μM 有 13、9、8 個溶斑數，800 μM 有 9、9、7 個溶斑數。其控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 156、190、175 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實

驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 87.68%，50 μM 時為 77.95%，100 μM 時為 69.97%，200 μM 時為 49.73%，300 μM 時為 37.75%，400 μM 時為 21.16%，500 μM 時為 15.82%，600 μM 時為 13.96%，700 μM 時為 5.88%，800 μM 時為 4.84%，其標準差在 10 μM 時為 8.31%，50 μM 時為 6.29%，100 μM 時為 7.80%，200 μM 時為 13.02%，300 μM 時為 5.62%，400 μM 時為 7.22%，500 μM 時為 1.33%，600 μM 時為 1.04%，700 μM 時為 2.13%，800 μM 時為 0.89%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖九 A、B)。由折線圖求得 IC₅₀ 約為 198.67 μM 。

在 T7 的部份，藥物濃度取的是 10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 、600 μM 、700 μM 及 800 μM ，在每個濃度點的溶斑計數上，分別是 10 μM 有 52、70、68 個溶斑數，50 μM 有 39、58、53 個溶斑數，100 μM 有 75、60、52 個溶斑數，200 μM 有 71、63、51 個溶斑數，300 μM 有 74、64、46 個溶斑數，而在 300 μM 之後的 400 μM ~800 μM 在顯微鏡下觀察發現其細胞為懸浮狀態並不是如同一般溶斑試驗中細胞貼附培養皿的現象，在固定細胞後染色過後也發現到染不上顏色，無法觀察到溶斑的出現，類似 T4 在溶斑試驗中出現的情形，故同樣僅採計 10 μM ~300 μM 的部份。其控制組的 control-1 溶斑數三次重複均為 0 個，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 92、75、69 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 10 μM 時為 82.80%，50 μM 時為 65.51%，100 μM 時為 78.96%，200 μM 時為 78.36%，300 μM 時為 77.48%，其標準差在 10 μM 時為 22.91%，50 μM 時為 20.02%，100 μM 時為 3.21%，200 μM 時為 5.15%，300 μM 時為 9.68%。而利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖十 A、B)。

3.2 以溶斑試驗進行時間點測試

利用time point assay這個方式，來進一步確認前項實驗的結果，過程為在細胞加入病毒顆粒後的不同時間點如-1 (即加入病毒前一小時，亦即依照前面藥物測試實驗重複為本實驗的控制組之一)、0、2、4、6、8、10、12、16、20 小時後，加入藥物，藥物濃度以由前面測試藥物實驗時可測得PFU10%的濃度來作測試，在經每個時間點加藥後，放置在 5% CO₂ 37°C的恆溫培養箱中經一小時後，加入含有 1.1% methyl cellulose的 5% FBS MEM medium，再放置回 5% CO₂ 37°C的恆溫培養箱培養 5~7 天後，固定細胞並計數plaque數。其中控制組的control-1 為未加藥物與病毒，而control-2 為加入病毒但無藥物。

在 T1 的部份，因為在前面的實驗加入藥物未看到 PFU 的百分比下降，因此僅隨意取一個濃度 300 μ M 來進行測試，經過測試在-1 小時時間點溶斑數為 104、88、114，0 小時時間點溶斑數為 105、90、112，2 小時時間點溶斑數為 106、91、120，4 小時時間點溶斑數為 107、92、117，6 小時時間點溶斑數為 109、92、118，8 小時時間點溶斑數為 104、87、120，10 小時時間點溶斑數為 103、88、114，12 小時時間點溶斑數為 108、89、116，16 小時時間點溶斑數為 107、92、117，20 小時時間點溶斑數為 106、90、120。其控制組的 control-1 部份重複三次其溶斑數均為 0，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 105、89、119 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在-1 小時時間點為 97.91%，0 小時時間點為 98.41%，2 小時時間點為 101.35%，4 小時時間點為 101.20%，6 小時時間點為 102.11%，8 小時時間點為 99.21%，10 小時時間點為 97.59%，12 小時時間點為 100.11%，16 小時時間點為 101.20%，20 小時時間點為 100.97%，其標準差在-1 小時時間點為 1.83%，0 小時時間點為 3.76%，2 小時時間點為 0.78%，4 小時時間點為 2.60%，6 小時時間點為 2.57%，8 小時時間點為 1.55%，10 小時時間點為 1.60%，12 小時時間點為 2.69%，16 小時時間點為 2.60%，20 小時時間點為

0.14%。利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖（圖十二 A、B）。

在 T2 的部份，由前面實驗的折線圖取得可得到 PFU 10% 左右的藥物濃度 300 μ M 來進行測試，而又因第一次實驗時，時間點到 4 小時之後 PFU (%) 便持續 100%，因此後面兩次重複實驗均只重複 -1、0、2、4 這幾個時間點。經過測試在 -1 小時時間點溶斑數為 10、6、8，0 小時時間點溶斑數為 2、1、1，2 小時時間點溶斑數為 183、88、89，4 小時時間點溶斑數為 216、100、112，6 小時時間點溶斑數為 216，8 小時時間點溶斑數為 213，10 小時時間點溶斑數為 212，12 小時時間點溶斑數為 212，16 小時時間點溶斑數為 215，20 小時時間點溶斑數為 217。其控制組的 control-1 部份重複三次其溶斑數均為 0，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 215、106、127 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在 -1 小時時間點為 5.54%，0 小時時間點為 0.89%，2 小時時間點為 79.40%，4 小時時間點為 94.33%，6 小時時間點為 100.47%，8 小時時間點為 99.07%，10 小時時間點為 98.60%，12 小時時間點為 98.60%，16 小時時間點為 100.00%，20 小時時間點為 100.93%，其標準差在 -1 小時時間點為 0.83%，0 小時時間點為 0.09%，2 小時時間點為 8.14%，4 小時時間點為 6.14%。利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖（圖十三 A、B）。

在 T3 的部份，由前面實驗的折線圖取得可得到 PFU 10% 左右的藥物濃度 500 μ M 來進行測試，而又因第一次實驗時，時間點到 4 小時之後 PFU (%) 便持續 100%，因此後面兩次重複實驗均只重複 -1、0、2、4 這幾個時間點。經過測試在 -1 小時時間點溶斑數為 7、6、5，0 小時時間點溶斑數為 1、3、2，2 小時時間點溶斑數為 164、126、116，4 小時時間點溶斑數為 190、149、126，6 小時時間點溶斑數為 218，8 小時時間點溶斑數為 221，10 小時時間點溶斑數為 223，12 小時時間點溶斑數為 220，16 小時時間點溶斑數為 219，20 小時時間點溶斑數為 221。其控制組的 control-1 部份重複三次其溶斑數均為 0，分別將每個濃度的溶

斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 220、153、121 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在-1 小時時間點為 3.75%，0 小時時間點為 1.36%，2 小時時間點為 84.26%，4 小時時間點為 95.96%，6 小時時間點為 99.09%，8 小時時間點為 100.45%，10 小時時間點為 101.36%，12 小時時間點為 100.00%，16 小時時間點為 99.35%，20 小時時間點為 100.45%，其標準差在-1 小時時間點為 0.50%，0 小時時間點為 0.80%，2 小時時間點為 10.79%，4 小時時間點為 8.97%。利用上述結果製圖，製成數據列表與折線圖 (圖十四 A、B)。

在 T6 的部份，由前面實驗的折線圖取得可得到 PFU 10% 左右的藥物濃度 700 μ M 來進行測試，經過測試在-1 小時時間點溶斑數為 1、1、2，0 小時時間點溶斑數為 2、1、2，2 小時時間點溶斑數為 97、98、92，4 小時時間點溶斑數為 149、135、128，6 小時時間點溶斑數為 144、140、135，8 小時時間點溶斑數為 168、162、142，10 小時時間點溶斑數為 198、180、173，12 小時時間點溶斑數為 237、227、197，16 小時時間點溶斑數為 246、228、201，20 小時時間點溶斑數為 250、226、203。其控制組的 control-1 部份重複三次其溶斑數均為 0，分別將每個濃度的溶斑數與當次控制組的 control-2 溶斑數 248、225、202 個進行計算，以 control-2 的 PFU 數目為分母，實驗組各濃度的 PFU 數目為分子，相除並乘以百分之百，計算出此藥物在不同濃度下的 PFU (%)，又利用三次重複實驗結果計算出其平均值在-1 小時時間點為 0.61%，0 小時時間點為 0.75%，2 小時時間點為 42.74%，4 小時時間點為 61.15%，6 小時時間點為 62.37%，8 小時時間點為 70.01%，10 小時時間點為 81.83%，12 小時時間點為 97.99%，16 小時時間點為 100.01%，20 小時時間點為 100.58%，其標準差在-1 小時時間點為 0.33%，0 小時時間點為 0.28%，2 小時時間點為 3.29%，4 小時時間點為 1.92%，6 小時時間點為 4.39%，8 小時時間點為 2.14%，10 小時時間點為 3.31%，12 小時時間點為 2.69%，16 小時時間點為 1.16%，20 小時時間點為 0.20%。利用上述結果製圖，製成數據列

表與折線圖 (圖十五 A、B)。

3.3 製造 DV2-specific 之 HCV ribozyme 之 clone

設計出 ribo1、ribo2、ribo3 以及 ribor 等，四條引子，藉以在登革熱病毒的 cDNA clone (pcDNA3-NCS/5'ZNS3'UTR) 上的 3'UTR 後方利用三次 PCR 方式 (圖十六、圖十七)，分別利用 ribor+ribo1 延長原本的 cDNA 片段，經洋菜膠電泳後純化，利用洋菜膠電泳確認其大小 (圖十八)，再以此片段以 ribor+ribo2 延長，經洋菜膠電泳後純化此片段，利用洋菜膠電泳確認其大小 (圖十九)，再利用此片段以 ribor+ribo3 將原本 cDNA 來加上 ribozyme 來得到具有 ribozyme 的 DNA 片段，利用洋菜膠電泳確認其大小 (圖二十)。將此片段利用 T/A cloning 方式接到 pGEM-T 的載體上命名為 pGEM-T-Ribo，如圖二十一所示。經酵素作用後，初步判定得到 10 個具有 ribozyme 與部份登革熱病毒尾端序列的 DNA 片段的載體分別命名為 pGEM-T-Ribo1、pGEM-T-Ribo2、pGEM-T-Ribo3、pGEM-T-Ribo4、pGEM-T-Ribo5、pGEM-T-Ribo6、pGEM-T-Ribo7、pGEM-T-Ribo8、pGEM-T-Ribo9、pGEM-T-Ribo10。經過酵素 *Apal* 作用後，預期得到 0.05、0.2、3.0 kb 大小的 DNA 片段 (圖二十二 A)；經 *XbaI* 作用後，預期得到 3.2 kb 大小的 DNA 片段 (圖二十三 A)，其中 1~8 符合預期 (如圖二十二 A、B、圖二十三 A、B 所示)。而後挑選 1、2、4、5 利用 pGEM-T 上的 T7&SP6 序列為引子，作 sequence 來確定 PCR 後的 DNA 片段是否有突變，如圖二十四所示。得到 pGEM-T-Ribo5 上為完全無突變的片段，命名為 pGEM-T-Ribo。

4. 討論

本實驗室之前與生資所楊進木老師合作以 virtual screening 方式針對登革熱病毒 (DV) 的外膜蛋白 (E protein) 的結構進行篩選藥物，而所篩選的藥物為有可能進入病毒的外膜蛋白中，並阻止其外膜蛋白在感染寄主細胞的過程中所產生的型態變化進而阻止病毒感染寄主細胞的過程。而本實驗室得到的藥物清單為利用程式所預測的前 200 個藥物。在此名單中有兩個四環素家族的成員 T1 (tetracycline)、T3 (rolitetracycline) 存在，又因四環素的四環本身為一固定的平面結構，其四環素家族本身均是修飾其支鏈來形成其他的衍生物，便使用在藥品清單中的那兩個成員 tetracycline、rolitetracycline，以及利用本實驗室尚有另一不同於前兩者的四環素成員 T2 (doxycycline) 進行測試，此時發現原本清單中的 rolitetracycline 及本實驗室未在藥品清單中的四環素成員 doxycycline 均對 PFU 產生抑制的效果，但 tetracycline 未觀察到抑制的現象產生，據此進行初步的推論，乃由於之前是以結構來進行篩選，用此對其在清單中卻未發現抑制能力與位在清單之外卻發現有抑制能力，可給予假設來說明如下：因為四環素家族結構類似，可能發生形狀可進入外膜蛋白結構中，但是並不足以阻止其感染過程中的型態變化，而清單外藥物 doxycycline 同為四環素家族，其 side chain 經過修飾，而可阻止其感染過程中的型態變化。基於上述假設，因此著手尋找可取得的四環素家族成員來進行後續的測試。本實驗中共對七個四環素家族產物來進行測試，其名單如下：T1 (tetracycline)、T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)、T4 (demeclocycline)、T5 (oxytetracycline)、T6 (chlortetracycline)、T7 (minocycline)。其結構如圖三所示。根據實驗結果進行討論，如下：

在 T1 (tetracycline) 的部份上，由圖四 A、B 中，可看出其 PFU 百分比持續保持在 100% 左右的位置並沒有隨著藥物的加入或是提高至 1000 μM 而跟 positive 有所區別。

而在 T2 (doxycycline)的部份，圖五 A、B 中，可以觀察到在 100 μM 的地方的 PFU 百分比只剩下 13%左右，至 500 μM 只剩 0.92%，可觀察到明顯 PFU 被抑制的情形。

T3 (rolitetracycline)的部份上，由圖六 A、B 中，可以觀察到在 100 μM 的地方的 PFU 百分比只剩下 20%左右，到了 300 μM 的位置 PFU 百分比只剩下 5%，可觀察出在加入藥物後 PFU 明顯被抑制的情形。

而在 T4 (demeclocycline)的部份，由圖七 A、B 中，在 200 μM 到 300 μM 部份開始有 PFU 百分比下降的情形發生，但值得注意的是在 400 μM 之後，在固定及染色後，6-well plate 上觀察不到細胞被染色的情形發生，在顯微鏡下可觀察到細胞懸浮的情形 (圖十一 B)，故推論此藥物 T4 在 400 μM 以上可能對細胞有傷害的作用，導致細胞無法在 plate 表面上貼附而懸浮，由於尋找過文獻僅有餵食山羊後的八小時後的血中藥物濃度經換算後約為 164 μM (Jha et al., 1989)而另一篇文獻中最高濃度也僅使用到 150 μM (Jiang et al., 2005)，故以過去文獻上無法確認如此的濃度是否確實會對細胞造成傷害。

在 T5 的部份，由圖八 A、B 中，所觀察到的現象可看到 PFU 的百分比隨著藥物濃度提昇 100 μM 到 200 μM 便開始有下降的趨勢，且持續的提昇濃度 700 μM 到 800 μM 亦可看到 PFU 百分比的下降，但是下降的百分比不多，在藥物加到 800 μM 之後也還有 50%的 PFU 百分比，於是再次進行實驗，由於 800 μM 大約有 50%的 PFU 百分比，以此曲線的趨勢跟對稱度來考量，測試 800 μM ~ 1500 μM ，並另外測試 2000 μM 、2500 μM 及 3000 μM 觀察其在高濃度藥物下是否會有更佳的抑制能力以及細胞在高濃度藥物下的存活情形。在圖八 C、D 中，可觀察到藥物濃度的提昇 800 μM 到 900 μM 均仍有 PFU 百分比下降的情形，這種情形隨著濃度提昇持續到 1400 μM 到 1500 μM 亦可觀察到這種現象，但是下降的


百分比不多，在最後的 1500 μM 會有 17%左右的 PFU 百分比，至於 2000 μM 以上，在顯微鏡觀察下發現細胞有著破裂懸浮的情形 (圖十一 E)，因此無法測得溶斑，故推論其藥物濃度在 2000 μM 以上時，可能對細胞造成傷害。另外在 1500 μM 這個濃度下以顯微鏡觀察細胞，可以發現細胞在這個濃度下會發現到對照無加入任何藥物的細胞形狀 (圖十一 A)有著明顯的延長 (圖十一 D)，推論是此濃度可能已對細胞造成某種影響使得型態產生變化，而在達到 2000 μM 時，此藥物濃度會使細胞破裂而懸浮。以這個藥物與 T2、T3 相比之下，藥物的抑制 PFU 能力相較之下是較弱的。推論其藥物對 PFU 抑制的能力不如 T2、T3 這兩個藥物強的原因，依假設來推論，可能是對外膜蛋白的結合能力較弱，因此抑制能力較弱

在 T6 (chlortetracycline)部份，由圖九 A、B 中，觀察從 10 μM 到 50 μM 便有 PFU 百分比下降的情形，而其抑制能力隨著濃度的提高而提昇，到了 800 μM 時更可達到 10%PFU 的抑制能力，與 T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)相比較，同樣具有較強的抑制能力 (與 T5 相比)。

在 T7 的部份，由圖十 A、B 中，觀察到對 PFU 一直都具有部份的抑制能力，使得 PFU 從 100 μM 到 300 μM 持續保持在 80%左右，但值得注意的為其抑制能力並未隨著濃度增高而提昇，而與 T4 相似的，在 400 μM 以上時，同樣發生細胞不貼附在 plate 上，以致染色後，無法觀察到 plaque 的情形。此處同樣推論此藥物 T7 在 400 μM 以上可能對細胞有傷害的作用，導致細胞無法在 plate 表面上貼附而懸浮。

總結以上 7 個藥物經整理後的結果，觀察得出 T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)、T6 (chlortetracycline)具有較為明顯的抑制 PFU 能力，而在這個部份，基於原本的發現與假設，此藥物抑制的機制應為針對病毒外殼蛋白，但為

求驗證，做出以下推論：由於對 PFU 有抑制的效果，於是考慮病毒感染的過程，將其可能抑制機制歸納為下述類型：1. 進入細胞時被抑制 2. 在細胞內複製被抑制 3. 藥物對細胞本身有抑制作用。因上述結論，對第一項類型來說，也是原本所預期的功能，也就是模擬的藥物結構會卡在病毒的外殼蛋白上，影響立體結構之改變，進而無法進入細胞中造成感染。對第二項類型來說，必須藉由對於病毒感染後，對細胞作病毒 RNA 的測量來確定。而第三項類型來說，因為同是四環素家族，其功能為與原核生物的 30S 核糖體上的 A-site 結合，以阻斷 aminoacyl-tRNA 與 30S 核糖體結合，使新的胺基酸單體無法加到胜肽鏈上，阻斷細菌的蛋白質合成，達到抗菌效果 (Anokhina et al., 2004)。而本實驗所使用的細胞株為真核細胞，再加上同樣而類似的功能卻對細胞本身感染病毒後有不同的作用產生，所以在這個部份，經判斷應為較不可能的。




針對以上第一項與第二項結論，想出了一個可以分辨的方式，由於著重在於進入細胞的前後以及在細胞內的複製。於是設計出 time point assay 這個實驗，此實驗主要目的是著重在每個不同時間點加入藥物，藉由在不同時期的藥物添加，所得到 plaque 結果，可與病毒的生活週期作對照，而由文獻中得知 West Nile (WN) 感染細胞後的 2~10 小時為其 RNA 複製的時間 (Lo et al., 2003)，由於 DV2 與 WN 為同為黃質病毒屬，其生活週期應該類似，因此沿用 WN 的生活週期來做推論，來得出藥物作用的可能機制。

由 time point assay 這個實驗結果 (圖十三 A、B、圖十四 A、B) 可以觀察到，T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline) 作用的時間曲線在 -1 及 0 這兩個時間點觀察到其 PFU 百分比低落至 1~5% 左右的情形，抑制的情形很明顯。可以推論出這兩種藥物的抑制表現應該是作用在病毒進入細胞這段時期。而 T6 (chlortetracycline) 這個藥物的時間曲線 (圖十五 A、B)，可看到在 12 小時這個時間點前的 PFU 百分比都有低落的情形，可推論其作用可能是影響到病毒在細胞內的 RNA 複製，

之所以做此推論，因考慮到文獻中同屬的 WN 也是在感染後的 2~10 小時內進行 RNA 複製的動作，故利用 DV2 與 WN 同屬而可能相近的生活週期來推論 T6 (chlortetracycline)可能為抑制病毒在細胞內的 RNA 複製。

而作為對照組的 T1 (tetracycline)的時間曲線 (圖十二 A、B)，明顯地看出沒有太大的變動，PFU 百分比維持在 100%左右。

由於 T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)於第一次實驗時便觀察到在初期的時間曲線才有明顯變化，在 4 小時這個時間點後，曲線便上升到接近 100%的地方，因此在重複第二次與第三次實驗時，便省略後面的時間點，而只重複前面 -1~4 小時的幾個時間點。



根據上述結論，若要進一步驗證推論是否正確，對於 T2 (doxycycline)、T3 (rolitetracycline)來說必須要針對登革熱病毒的 cDNA clone 在 E protein 上對當初預測的胺基酸位置作點突變來驗證推測；而對於 chlortetracycline 來說，必須要有病毒的 cDNA clone 將其 transfection 到細胞裡面進行表現，然後加入藥物，觀察其複製是不是有被抑制的現象產生。而以上所有的未來目的都必需要有登革熱病毒的 cDNA clone，而在本實驗室中有登革熱二型的 cDNA clone (賴建亭, 2006, 交大碩士論文)，但是仍有不完全的部份，因此為了之後的目的，必須要修正之前的 cDNA clone。之前 cDNA clone 的表現方面出現問題，無法表現出具有感染力的病毒顆粒，其可能的原因有 1. 登革病毒產生的蛋白對大腸桿菌具有毒性，且 CMV 啟動子在大腸桿菌中產生 leaky，造成得到的質體都是經過突變不具感染性的質體。2. ORF 本身之序列有突變。3. 也有可能是質體建構時未除去 5' 及 3' 端的非病毒核苷酸序列，導致病毒 RNA 無法被複製，因而無法得到具有感染力的病毒顆粒。所以針對這部份，想對其作 3' UTR 的修飾，依據文獻 (Alvarez et al., 2005) 指出 West Nile virus, Kunjin virus, dengue virus, and yellow fever virus 對

於3'UTR的完整要求很高，因其3'UTR會形成stem-loop的結構對其複製具有相當的影響，而原本的cDNA clone上在3'UTR的部份確實有多餘的序列，因此必須移除其多餘序列使得cDNA clone可用。

所以在此引入 HCV 的 ribozyme 結構，因其同為黃質病毒科 (Flaviviridae) 的病毒 (Heller et al.,2005)，故其 ribozyme 可使用的可能性很高，設計出 ribo1、ribo2、ribo3 以及 ribor 等四條引子，藉以將 cDNA clone 的尾端加上 ribozyme 讓病毒的 cDNA clone 在細胞內表現出 RNA 後，它的尾端會因為 ribozyme 本身的作用，將原本 3'UTR 後方多餘的序列去除，而讓 RNA 的尾端也就是病毒 3'UTR 的部份保持完整。

由 sequence 結果 (圖二十四) 可得知，與原本預期的序列完全相同，於是未來需要將這片段利用限制酶切割的方式置換到 cDNA clone 上，來進行後續的實驗。



5.未來方向

研究結果顯示，T2、T3、T6 具有明顯對 PFU 的抑制作用，而 T1 對 PFU 並沒有抑制的效果，而 T4 與 T7 都在 400 μ M 之後，細胞有受到傷害而無法完整得到溶斑試驗的結果，而 T5 在濃度提高時，對 PFU 的抑制能力確有提昇的情形，但在顯微鏡觀察下在 1500 μ M 時會引起細胞型態的變化，而其抑制能力終較 T2、T3、T6 為弱。

時間點的測試方面，T1 在任何時間點加入對 PFU 都沒有任何影響。T2 與 T3 在加入病毒顆粒前加入跟同時加入有相當的抑制能力，其機制很可能為抑制病毒進入細胞的機制。未來可針對當初程式上結構設計的胺基酸做突變，進行下一步的機制確認。而 T6 部份，其曲線直到 10~12 小時左右才消失其抑制 PFU 能力，可能為其藥物半生期的影響。未來如果要進一步推測其機制，必須要將病毒的 cDNA clone 送入細胞中，觀察其複製情形是否有被抑制的情形。為了 cDNA clone 能夠表現，根據 HCV ribozyme 所設計的片段，經過定序是跟預期一致的。未來需將 cDNA clone 做進一步修正後，將此片段置換上去，來測試其是否可以作用。

6. 參考文獻

疾病管制局 www.cdc.gov.tw

賴建孝, 2006, 交大碩士論文

Allison, S. L., J. Schlich, 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. Schlich, 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.

Alvarez, Ana Laura De Lella Ezcurra, Silvana Fucito, Andrea V. and Gamarnik (2005). " Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication." *Virology* **339**: 200 – 212.

Anokhina MM, Barta A, Nierhaus KH, Spiridonova VA and Kopylov AM. (2004) "Mapping of the second tetracycline binding site on the ribosomal small subunit of E.coli." *Nucleic Acids Res.* **32** (8):2594-7.

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.

- 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.
- Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C and Clyde K. (2006) " Molecular biology of flaviviruses. " *Novartis Found Symp.* **277**:23-39; discussion 40, 71-3, 251-3.
- Heller T, Saito S, Auerbach J, Williams T, Moreen TR, Jazwinski A, Cruz B, Jeurkar N, Sapp R, Luo G, Liang TJ (2005). " An in vitro model of hepatitis C virion production." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102** (7):2579-83.
- 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.
- Jha V. K. ,Jayachandran C. and Singh MK. (1989) " Disposition kinetics and distribution of demeclocycline in various biological fluids in female goats. " *Vet Res Commun.* **13** (3):225-30.
- Jiang SX, Lertvorachon J, Hou ST, Konishi Y, Webster J, Mealing G, Brunette E, Tauskela J, Preston E. (2005) " Chlortetracycline and demeclocycline inhibit calpains and protect mouse neurons against glutamate toxicity and cerebral ischemia." *J Biol Chem.* **280** (40):33811-8.

- 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.
- 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.
- Lo, MK, Tilgner M, Bernard KA and Shi PY. (2003). " Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication." *J Virol.* **77 (18)**:10004-14.
- 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.
- Riaz, M, Pilpel, N. (1984) "Complexation of tetracyclines with metal ions in relation to photosensitization." *J Pharm Pharmacol.* **36 (3)**:153-6.
- 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.

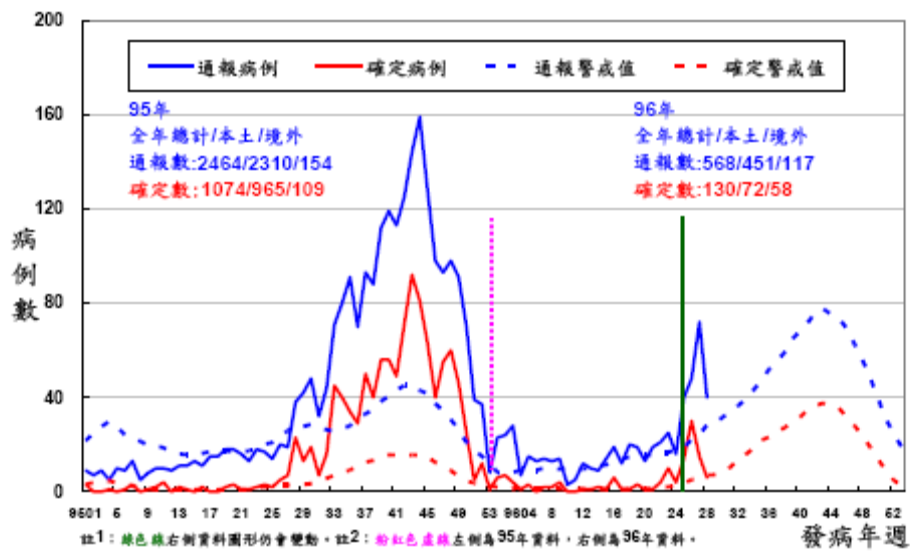
Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. L. Rothman, F. A. Ennis and A. Nisalak (1997). "Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses." *J Infect Dis* **176**: 322-30.

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.

Modis, Y., S. Ogata, D. Clements and S. C. Harrison (2004). " Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." *Nature* **427**, 313-319

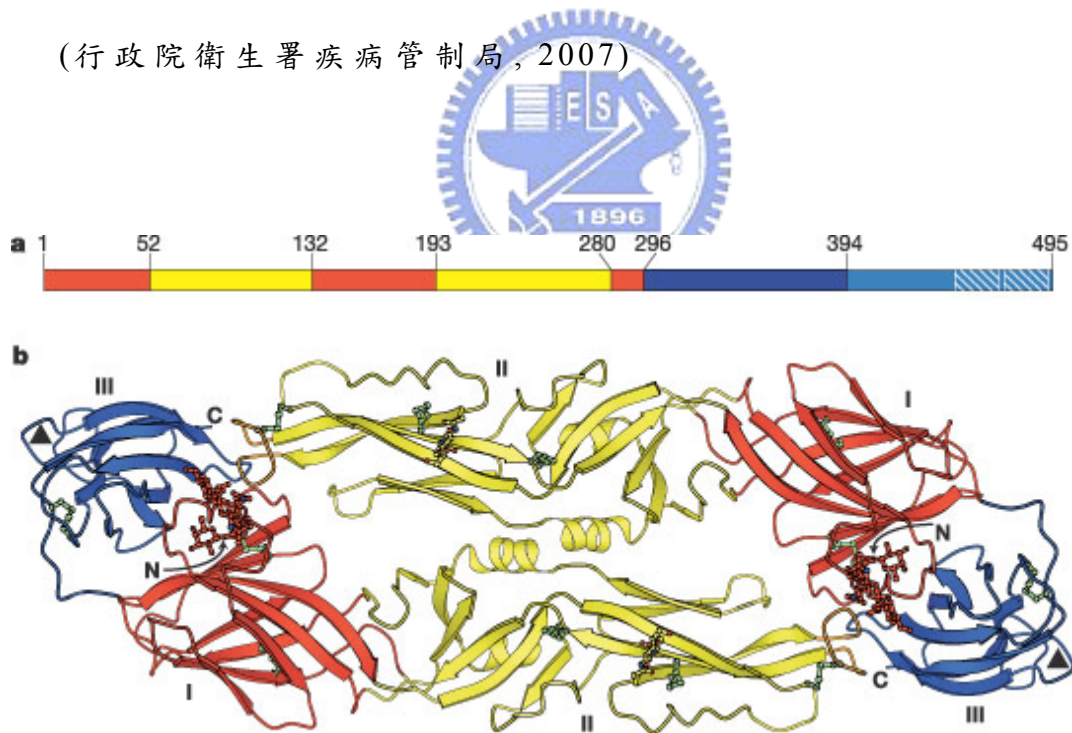
Zhang, Y., W. Zhang, S. Ogata, D. Clements, J. H. Strauss, T. S. Baker, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann (2004). "Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein." *Structure (Camb)* **12**: 1607-18.



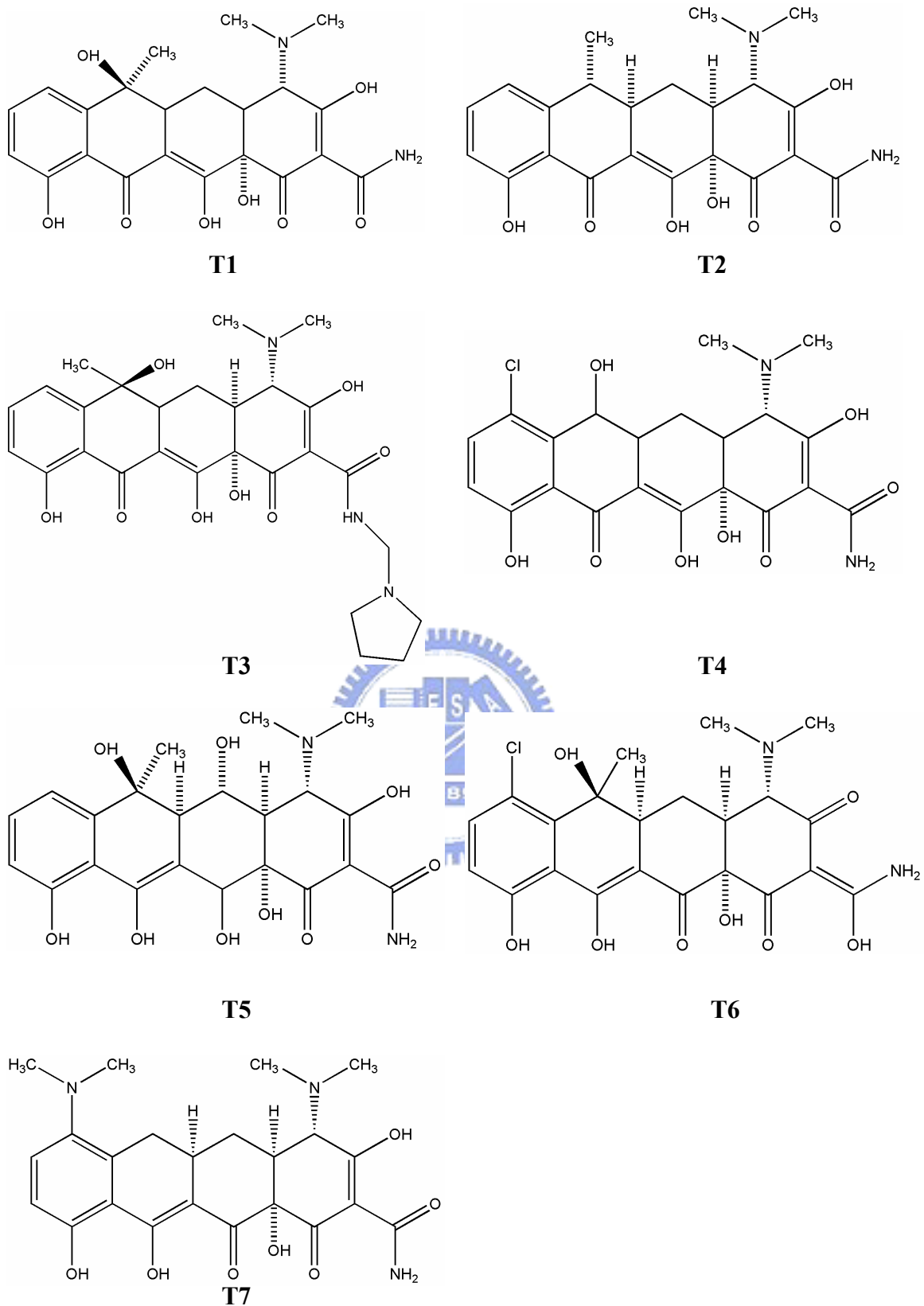


圖一 近年來登革熱病例數。可見近兩年來或多或少都有登革熱的確定病例發生。

(行政院衛生署疾病管制局, 2007)



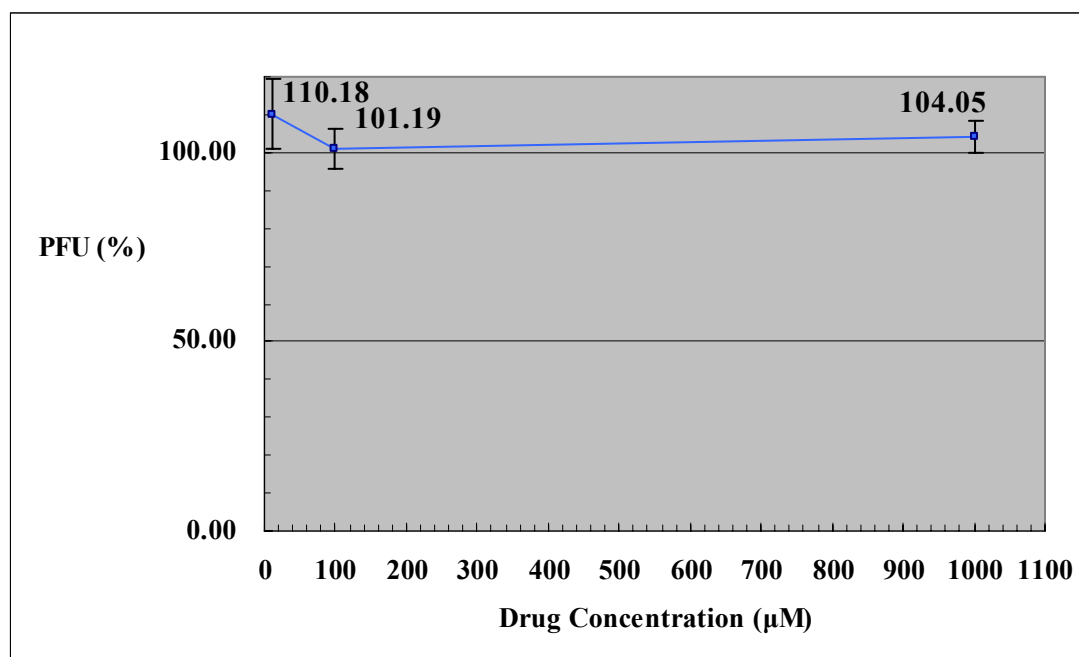
圖二 登革病毒外膜蛋白 domain 與其結構示意圖。圖中 domain I (1~51、132~192 及 280-295) 為紅色部份，domain II (52~131 和 193~279) 為黃色部份，domain III 為藍色部份。(Yorgo et al., 2004)



圖三 實驗中所使用四環素家族成員之結構圖。T1：tetracycline。T2：doxycycline。T3：rolitetracycline。T4：demeclocycline。T5：oxytetracycline。T6：chlortetracycline。T7：minocycline。

Tetracycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	191	100	185	100	126	100			
10 μ M	198	103.66	223	120.54	134	106.35	110.18	9.07	110.18±9.07
100 μ M	205	107.33	181	97.84	124	98.41	101.19	5.32	101.19±5.32
1000 μ M	207	108.38	192	103.78	126	100.00	104.05	4.19	104.05±4.19

A

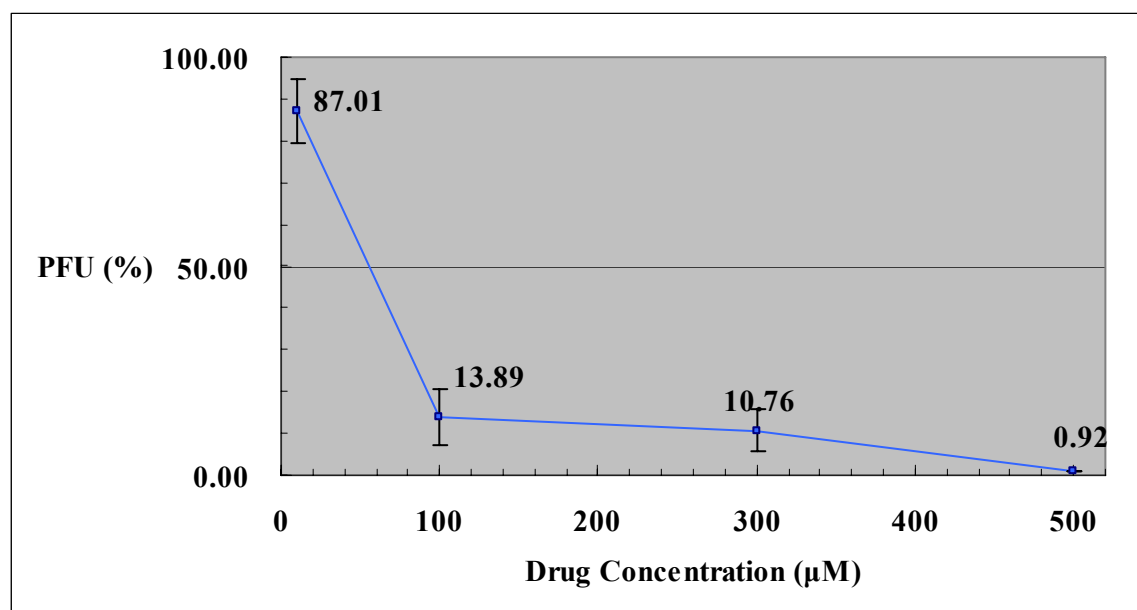


B

圖四為 T1 (tetracycline) 溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Doxycycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	191	100	196	100	143	100			
10 μM	180	94.24	172	87.76	113	79.02	87.01	7.64	87.01±7.64
100 μM	38	19.90	29	14.80	10	6.99	13.89	6.50	13.89±6.50
300 μM	26	13.61	27	13.78	7	4.90	10.76	5.08	13.69±5.08
500 μM	2	1.05	2	1.02	1	0.70	0.92	0.19	1.03±0.19

A

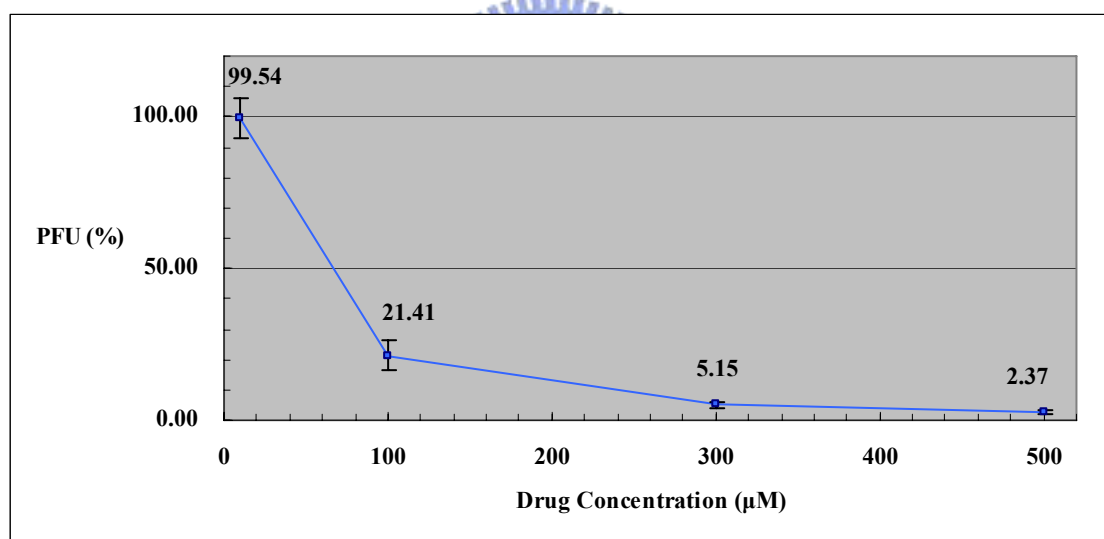


B

圖五為 T2 (doxycycline) 溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，% 為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Rolitetracycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	186	100	189	100	141	100			
10 μM	195	104.84	192	101.59	130	92.20	99.54	6.56	99.54±6.56
100 μM	30	16.13	44	23.28	35	24.82	21.41	4.64	21.41±4.64
300 μM	9	4.84	12	6.35	6	4.26	5.15	1.08	5.15±1.08
500 μM	5	2.69	3	1.59	4	2.84	2.37	0.68	2.37±0.68

A

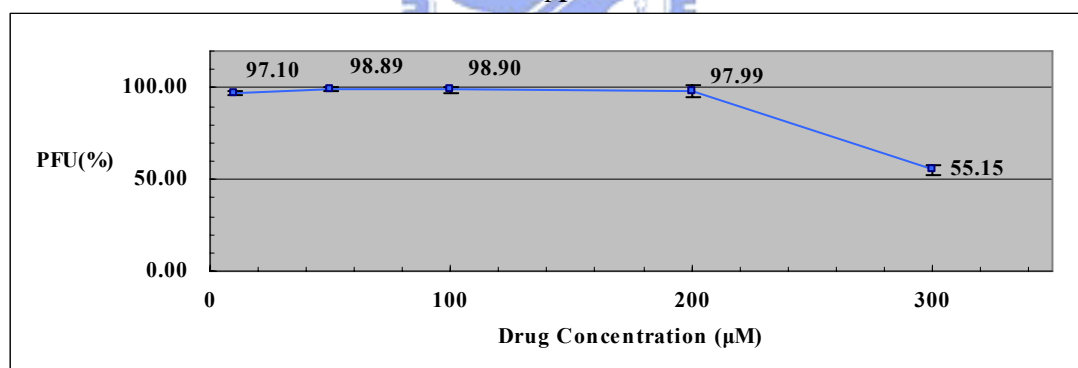


B

圖六為 T3 (rolitetracycline) 溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，% 為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Demeclocycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	196	100	154	100	161	100			
10 μM	189	96.43	148	96.10	159	98.76	97.10	1.45	97.10±1.45
50 μM	192	97.96	152	98.70	161	100.00	98.89	1.03	98.89±1.03
100 μM	197	100.51	151	98.05	158	98.14	98.90	1.40	98.14±1.40
200 μM	199	101.53	150	97.40	153	95.03	97.99	3.29	97.99±3.29
300 μM	114	58.16	82	53.25	87	54.04	55.15	2.64	55.15±2.64
400 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X
500 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X
600 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X
700 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X
800 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X

A

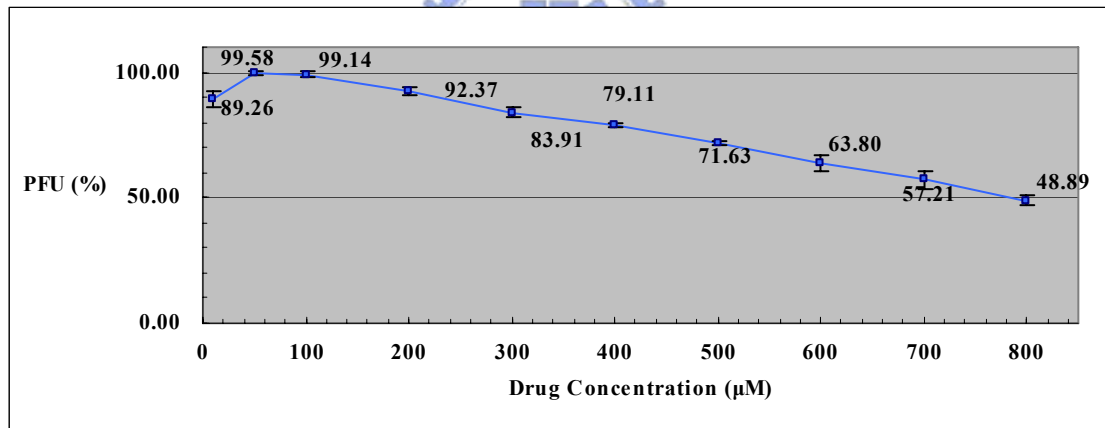


B

圖七為 T4 (demeclocycline) 溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。X 為發生細胞懸浮而溶斑無法計數。

Oxytetracycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	69	100	145	100	158	100			
10 μM	63	91.30	132	91.03	135	85.44	89.26	3.31	89.26±3.31
50 μM	69	100.00	145	100.00	156	98.73	99.58	0.73	99.58±0.73
100 μM	69	100.00	144	99.31	155	98.10	99.14	0.96	99.14±0.96
200 μM	65	94.20	134	92.41	143	90.51	92.37	1.85	92.37±1.85
300 μM	57	82.61	125	86.21	131	82.91	83.91	2.00	83.91±2.00
400 μM	54	78.26	115	79.31	126	79.75	79.11	0.76	79.11±0.76
500 μM	49	71.01	104	71.72	114	72.15	71.63	0.57	71.63±0.57
600 μM	42	60.87	92	63.45	106	67.09	63.80	3.12	63.80±3.12
700 μM	37	53.62	83	57.24	96	60.76	57.21	3.57	57.21±3.57
800 μM	32	46.38	72	49.66	80	50.63	48.89	2.23	48.89±2.23

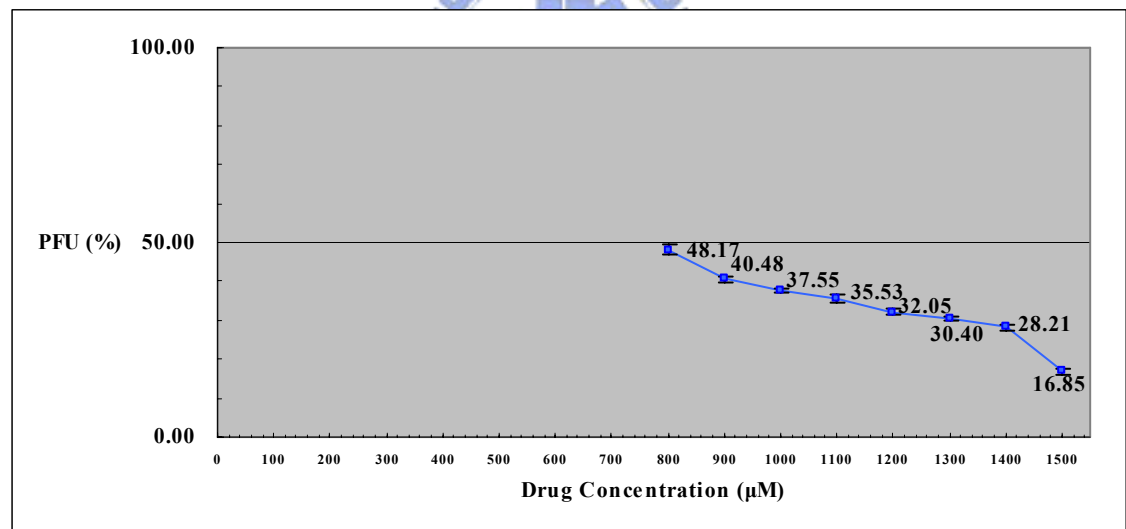
A



B

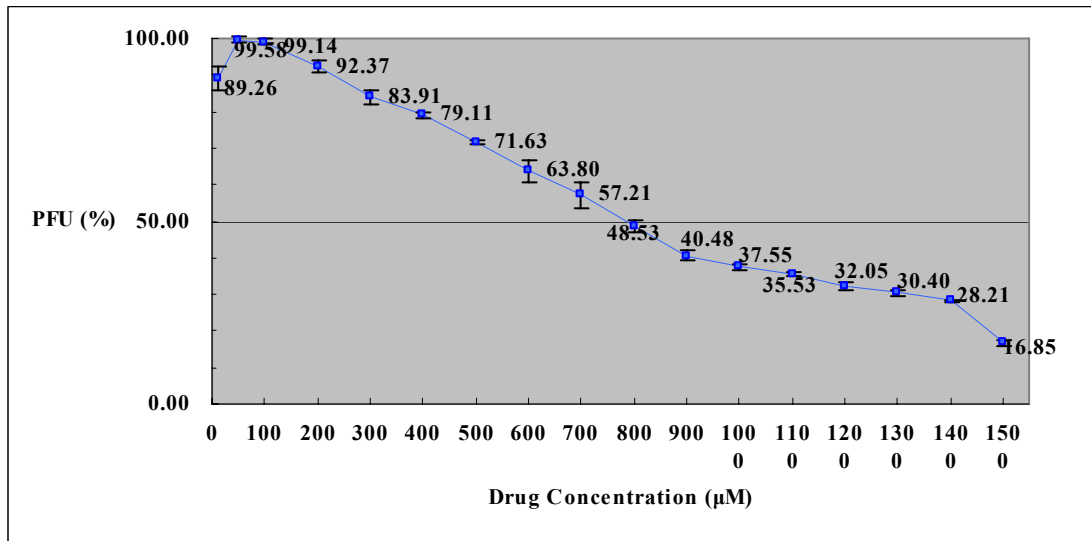
圖八為 T5 (oxytetracycline) 溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Oxytetracycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	182	100							
800 μ M	88	48.35	85	46.70	90	49.45	48.17	1.38	48.17±1.38
900 μ M	75	41.21	74	40.66	72	39.56	40.48	0.84	40.48±0.84
1000 μ M	69	37.91	69	37.91	67	36.81	37.55	0.63	37.55±0.63
1100 μ M	64	35.16	67	36.81	63	34.62	35.53	1.14	35.53±1.14
1200 μ M	58	31.87	60	32.97	57	31.32	32.05	0.84	32.05±0.84
1300 μ M	55	30.22	56	30.77	55	30.22	30.40	0.32	30.40±0.32
1400 μ M	50	27.47	51	28.02	53	29.12	28.21	0.84	28.21±0.84
1500 μ M	31	17.03	32	17.58	29	15.93	16.85	0.84	16.85±0.84
2000 μ M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2500 μ M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3000 μ M	X	X	X	X	X	X	X	X	X



D

圖八 T5 (oxytetracycline)溶斑試驗之結果整理。其中 C 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。D 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。X 為發生細胞懸浮而溶斑無法計數。

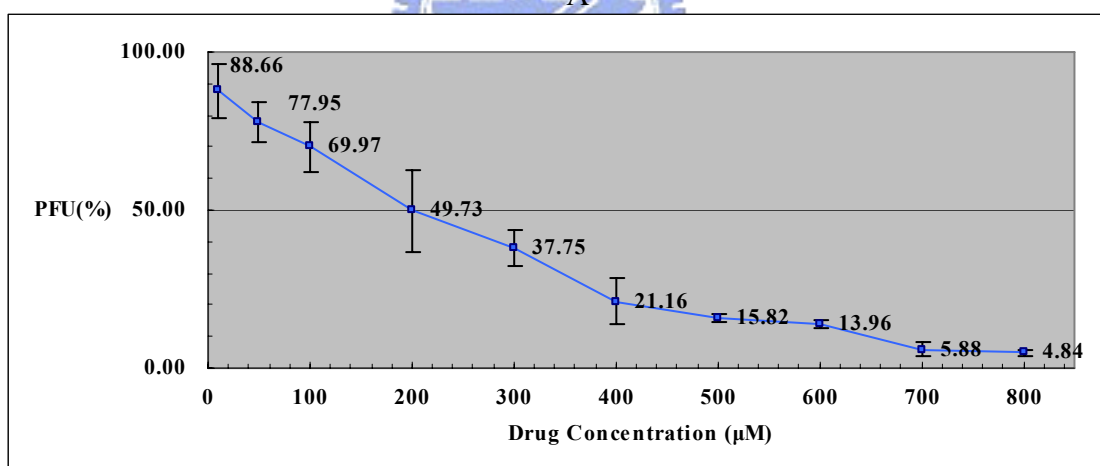


E

圖八 T5 (oxytetracycline)溶斑試驗之結果整理。E 圖中橫座標為藥物濃度，將兩次測試結果 (10 μM ~ 800 μM ; 800 μM ~ 1500 μM) 整理並結合，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 與圖 C 中之 sd，亦即標準差。



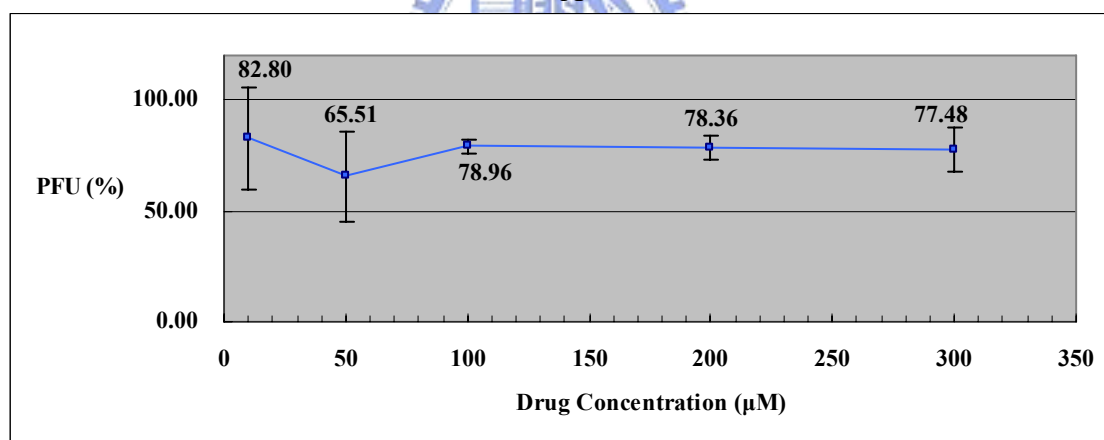
Chlortetracycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	156	100	190	100	175	100			
10 μM	151	96.79	153	80.53	150	85.71	87.68	8.31	87.68±8.31
50 μM	132	84.62	137	72.11	135	77.14	77.95	6.29	77.95±6.29
100 μM	123	78.85	122	64.21	117	66.86	69.97	7.80	69.97±7.80
200 μM	101	64.74	79	41.58	75	42.86	49.73	13.02	49.73±13.02
300 μM	69	44.23	66	34.74	60	34.29	37.75	5.62	37.75±5.62
400 μM	46	29.49	32	16.84	30	17.14	21.16	7.22	21.16±7.22
500 μM	27	17.31	28	14.74	27	15.43	15.82	1.33	15.82±1.33
600 μM	20	12.82	27	14.21	26	14.86	13.96	1.04	13.96±1.04
700 μM	13	8.33	9	4.74	8	4.57	5.88	2.13	5.88±2.13
800 μM	9	5.77	9	4.74	7	4.00	4.84	0.89	4.84±0.89



B

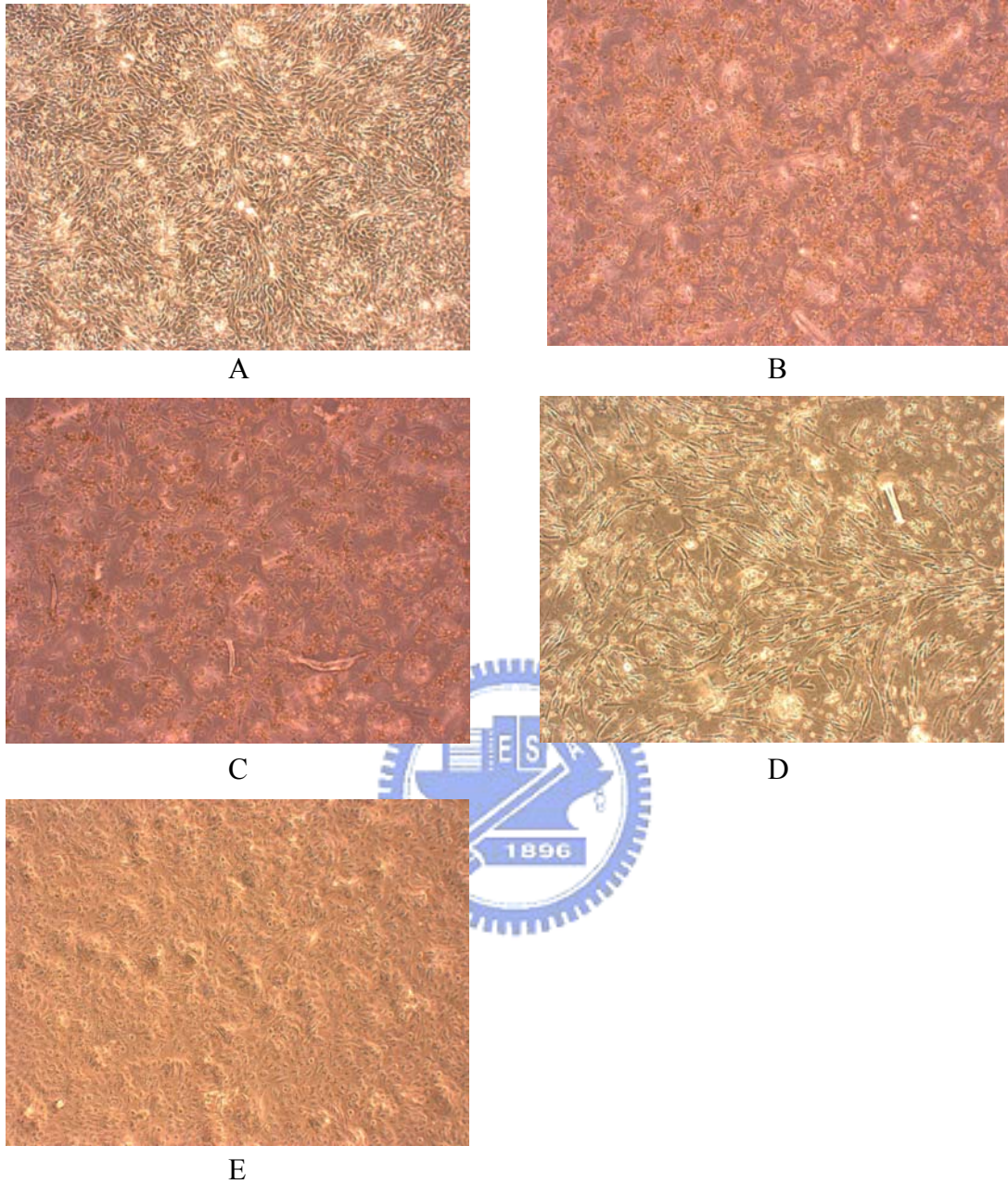
圖九 T6 (chlortetracycline)溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Minocycline	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean±sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	92	100	75	100	69	100			
10 μM	52	56.52	70	93.33	68	98.55	82.80	22.91	82.80±22.91
50 μM	39	42.39	58	77.33	53	76.81	65.51	20.02	65.51±20.02
100 μM	75	81.52	60	80.00	52	75.36	78.96	3.21	78.96±3.21
200 μM	71	77.17	63	84.00	51	73.91	78.36	5.15	78.36±5.15
300 μM	74	80.43	64	85.33	46	66.67	77.48	9.68	77.48±9.68
400 μM	X	X	X	X	X	X	X	X	X



B

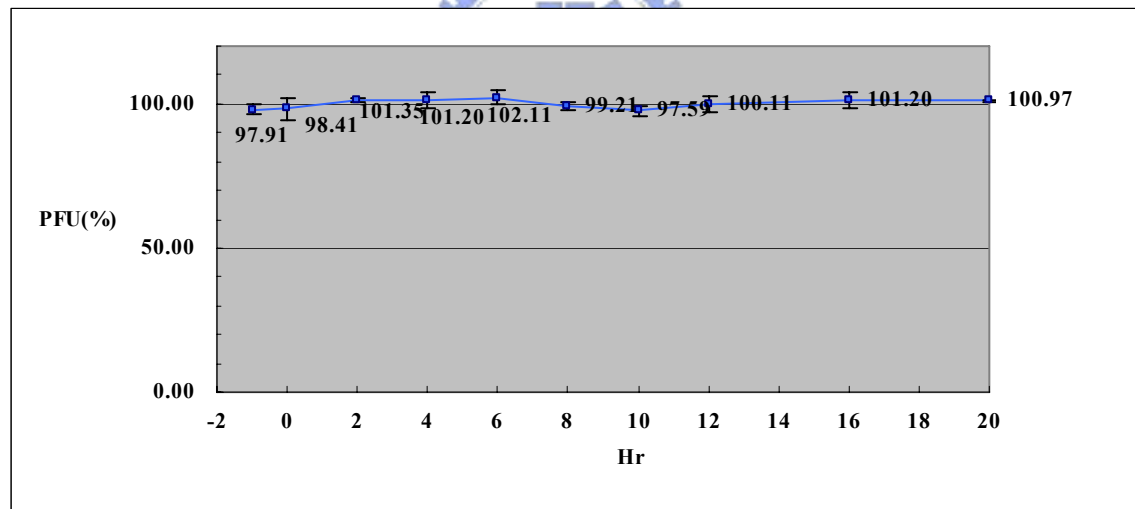
圖十 T7 (minocycline)溶斑試驗之結果整理。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為藥物濃度，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。X 為發生細胞懸浮而溶斑無法計數。



圖十一 在不同藥物加入後，細胞型態的變化。A 圖為正常未加入藥物經過 7 天培養的細胞。B 圖為加入 400 μM T4 (demeclocycline) 經過 7 天培養的細胞。C 圖為加入 400 μM T7 (minocycline) 經過 7 天培養的細胞。D 圖為加入 1500 μM T5 (oxytetracycline) 經過 7 天培養的細胞。E 圖為加入 2000 μM T5 (oxytetracycline) 經過 7 天培養的細胞。

Tetracycline (300 μ M)	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean \pm sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	105	100	89	100	119	100			
-1 hr	104	99.05	88	98.88	114	95.80	97.91	1.83	97.91 \pm 1.83
0 hr	105	100.00	90	101.12	112	94.12	98.41	3.76	98.41 \pm 3.76
2 hr	106	100.95	91	102.25	120	100.84	101.35	0.78	101.35 \pm 0.78
4 hr	107	101.90	92	103.37	117	98.32	101.20	2.60	101.20 \pm 2.60
6 hr	109	103.81	92	103.37	118	99.16	102.11	2.57	102.11 \pm 2.57
8 hr	104	99.05	87	97.75	120	100.84	99.21	1.55	99.21 \pm 1.55
10 hr	103	98.10	88	98.88	114	95.80	97.59	1.60	97.59 \pm 1.60
12 hr	108	102.86	89	100.00	116	97.48	100.11	2.69	100.11 \pm 2.69
16 hr	107	101.90	92	103.37	117	98.32	101.20	2.60	101.20 \pm 2.60
20 hr	106	100.95	90	101.12	120	100.84	100.97	0.14	100.97 \pm 0.14

A



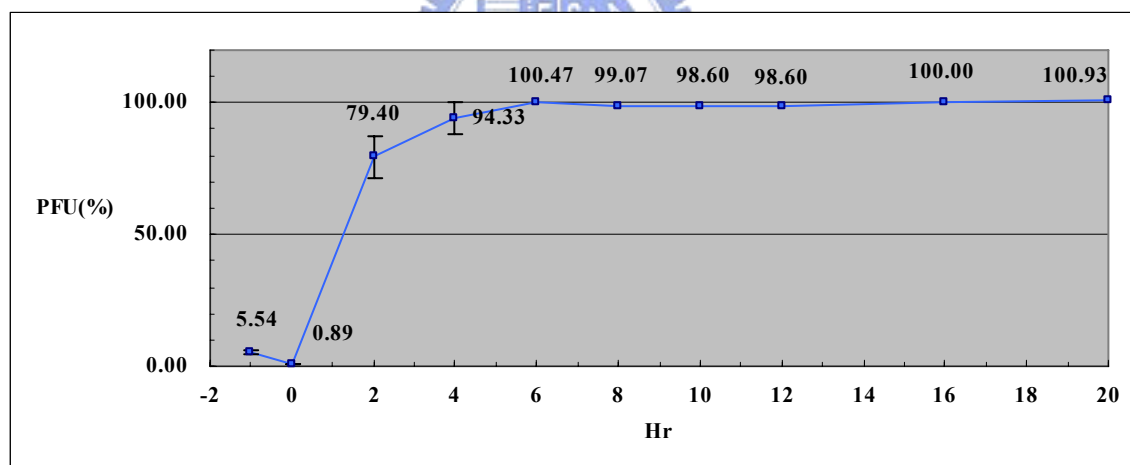
B

圖十二 T1 (tetracycline)的時間點溶斑試驗，所使用藥物濃度為 300 μ M。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為加入藥物之時間點，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Doxycycline (300 μ M)	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean \pm sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	215		106		127				
-1 hr	10	4.65	6	5.66	8	6.30	5.54	0.83	5.54 \pm 0.83
0 hr	2	0.93	1	0.94	1	0.79	0.89	0.09	0.89 \pm 0.09
2 hr	183	85.12	88	83.02	89	70.08	79.40	8.14	79.40 \pm 8.14
4 hr	216	100.47	100	94.34	112	88.19	94.33	6.14	94.33 \pm 6.14
6 hr	216	100.47					100.47		
8 hr	213	99.07					99.07		
10 hr	212	98.60					98.60		
12 hr	212	98.60					98.60		
16 hr	215	100.00					100.00		
20 hr	217	100.93					100.93		



A

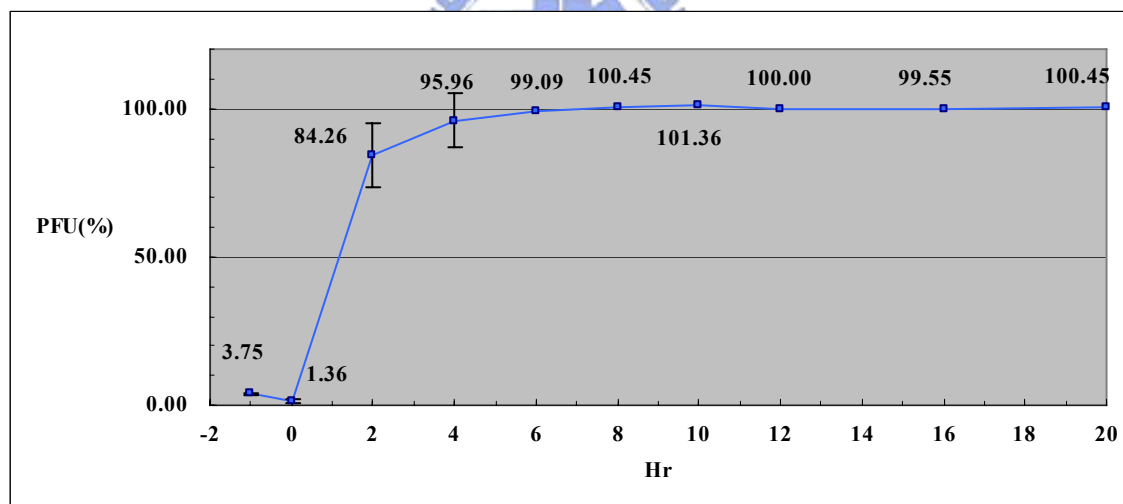


B

圖十三 T2 (doxycycline)的時間點溶斑試驗，所使用藥物濃度為 300 μ M。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為加入藥物之時間點，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

Rolitettracycline (500 μ M)	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean \pm sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	220	100	153	100	121	100			
-1 hr	7	3.18	6	3.92	5	4.13	3.75	0.50	3.75 \pm 0.50
0 hr	1	0.45	3	1.96	2	1.65	1.36	0.80	1.36 \pm 0.80
2 hr	164	74.55	126	82.35	116	95.87	84.26	10.79	84.26 \pm 10.79
4 hr	190	86.36	149	97.39	126	104.13	95.96	8.97	95.96 \pm 8.97
6 hr	218	99.09					99.09		
8 hr	221	100.45					100.45		
10 hr	223	101.36					101.36		
12 hr	220	100.00					100.00		
16 hr	219	99.55					99.55		
20 hr	221	100.45					100.45		

A

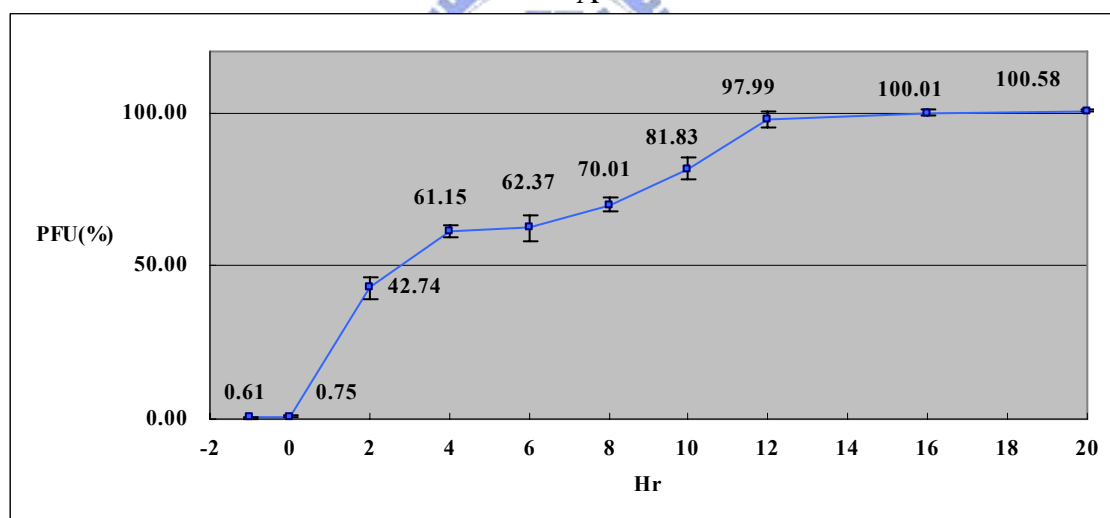


B

圖十四 T3 (rolitettracycline)的時間點溶斑試驗，所使用藥物濃度為 500 μ M。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為加入藥物之時間點，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

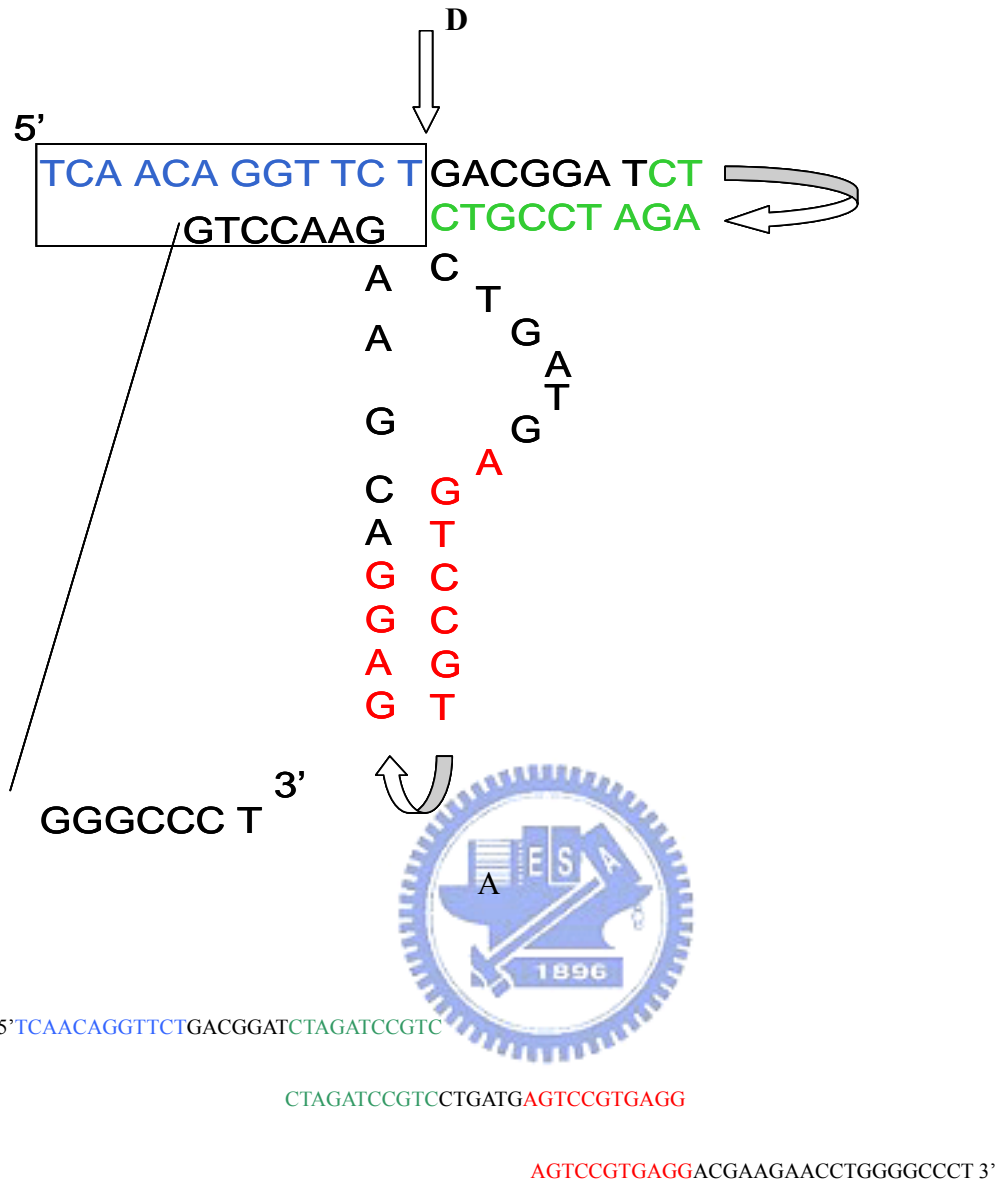
Chlortetracycline (700 μ M)	PFU	%	PFU	%	PFU	%	mean	sd	mean \pm sd
Control-1	0		0		0				
Control-2	248	100	225	100	202	100			
-1 hr	1	0.40	1	0.44	2	0.99	0.61	0.33	0.61 \pm 0.33
0 hr	2	0.81	1	0.44	2	0.99	0.75	0.28	0.75 \pm 0.28
2 hr	97	39.11	98	43.56	92	45.54	42.74	3.29	42.74 \pm 3.29
4 hr	149	60.08	135	60.00	128	63.37	61.15	1.92	61.15 \pm 1.92
6 hr	144	58.06	140	62.22	135	66.83	62.37	4.39	62.37 \pm 4.39
8 hr	168	67.74	162	72.00	142	70.30	70.01	2.14	70.01 \pm 2.14
10 hr	198	79.84	180	80.00	173	85.64	81.83	3.31	81.83 \pm 3.31
12 hr	237	95.56	227	100.89	197	97.52	97.99	2.69	97.99 \pm 2.69
16 hr	246	99.19	228	101.33	201	99.50	100.01	1.16	100.01 \pm 1.16
20 hr	250	100.81	226	100.44	203	100.50	100.58	0.20	100.58 \pm 0.20

A



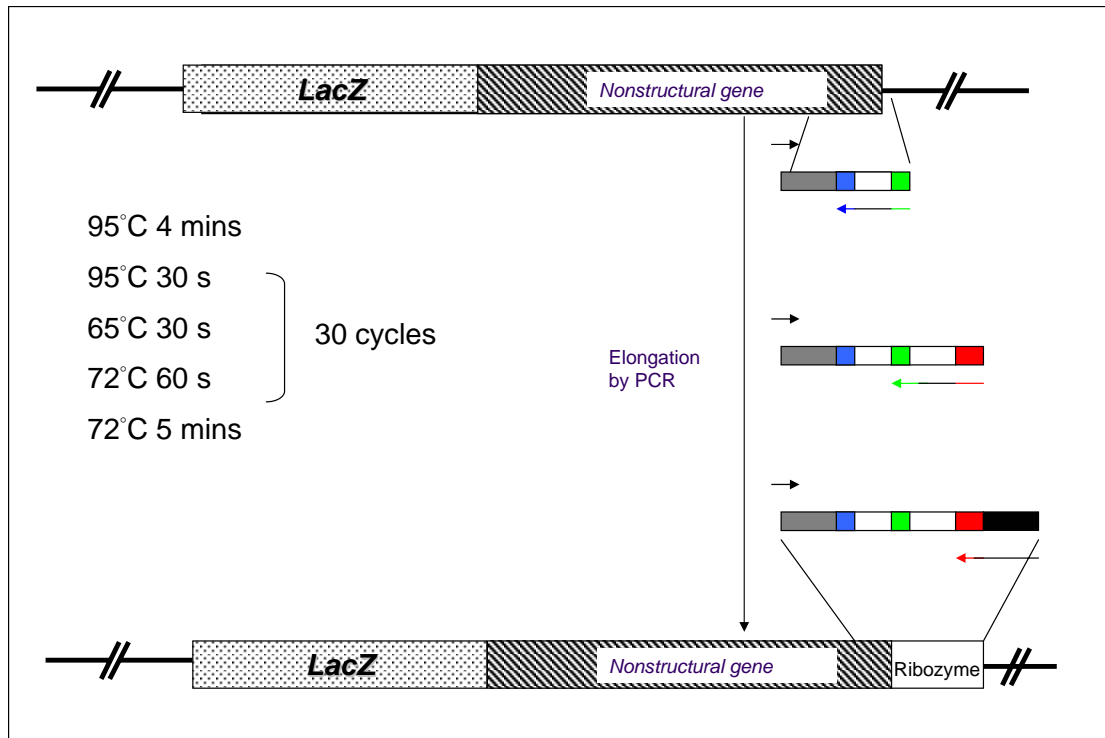
B

圖十五 chlortetracycline 的時間點溶斑試驗，所使用藥物濃度為 700 μ M。其中 A 圖中 control-1 為未加藥物與病毒，而 control-2 為加入病毒但無藥物，左邊各濃度為加入藥物之濃度對應到各直行，PFU 為其實際溶斑數，而%為以 positive 為分母計算後所得 PFU 之百分比。mean 為三次百分比之平均，sd 為三次百分比之標準差。B 圖中橫座標為加入藥物之時間點，縱座標為 PFU 之百分比，其每點之 y 軸誤差線為圖 A 中之 sd，亦即標準差。

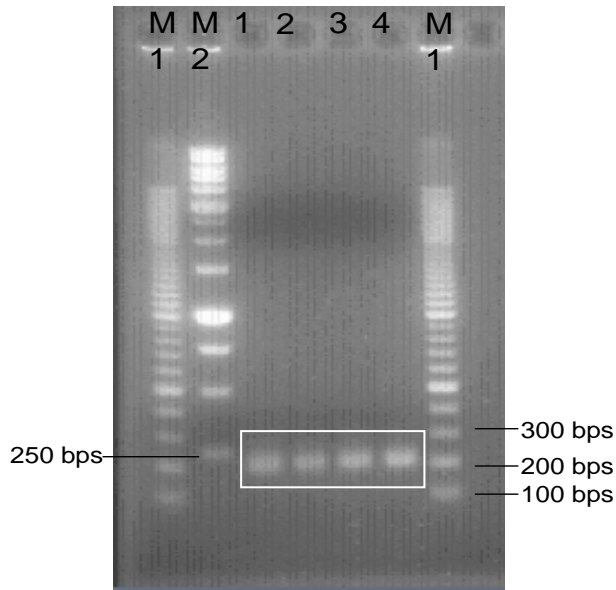


B

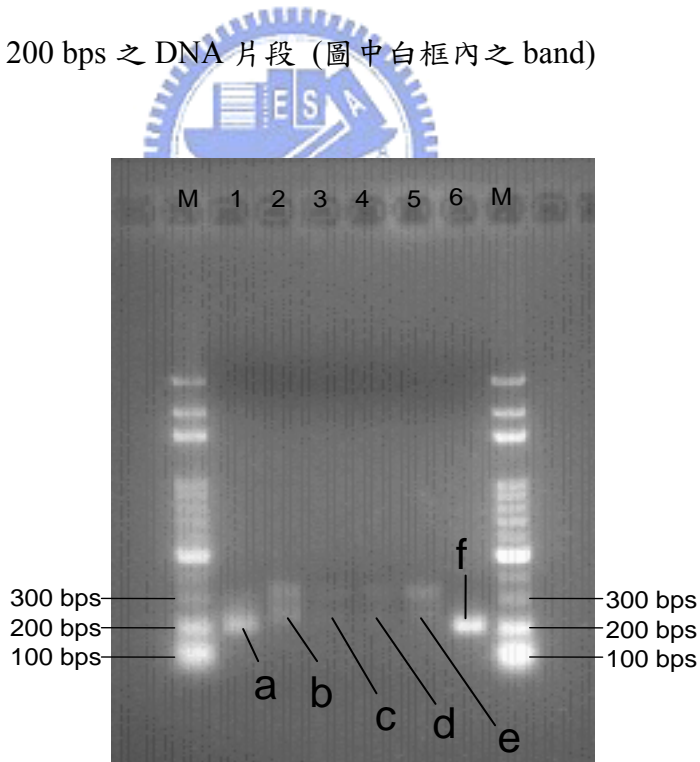
圖十六 A 圖為參考 HCV 的 ribozyme 設計，修改至 DV2 使用。由 5' 到 3' 分別有三條 primer 依序延長而成，其中第一條 ribor1 為互補 TCAACAGGTTCTGACGGATCTAGATCCGTC 的序列，第二條 ribor2 為互補 CTAGATCCGTCCTGATGAGTC CGTGAGG 的序列，第三條 ribor3 為互補 AGTCCGTGAGGACGAAGAACCTGGGGCCCT 的序列。圖中 D 處為經過此 ribozyme 設計後，預計自我剪切的位置。圖 B 為將圖 A 以三段引子的方式分別以互補股之序列列出。



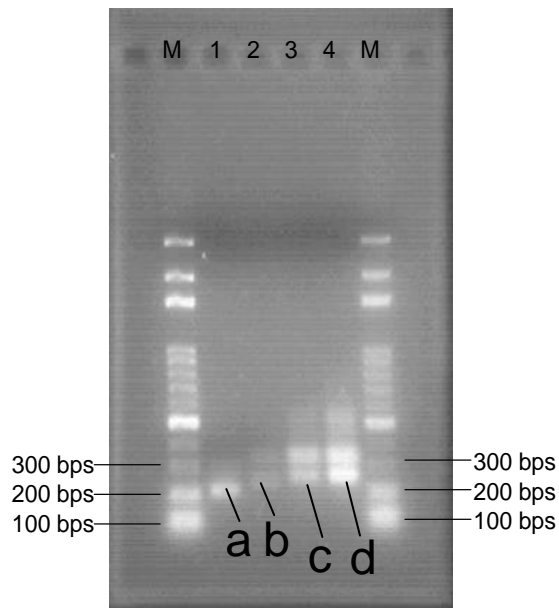
圖十七 為 PCR 反應之示意圖，利用一端固定的 primer，與另一端三條不同的 primer 依次延長所需片段，圖中模板為 pcDNA3-NCS/5'Z (IRES)NS3'UTR 利用上面 DV2 的尾端序列為模板進行 PCR 反應來合成所需片段，右邊三個不同的 primer 各自擁有不同的顏色，其中每一組 primer 都有重疊的部份，在圖中可看到右邊第一組與第二組有重複綠色的部份，而第二組與第三組有紅色的部份重複，利用這種部份片段重複的設計，使得進行 PCR 反應時，利用 primer 黏合上上一次反應產物來逐漸延長所需片段。左邊為 PCR 反應之溫度與時間的步驟。



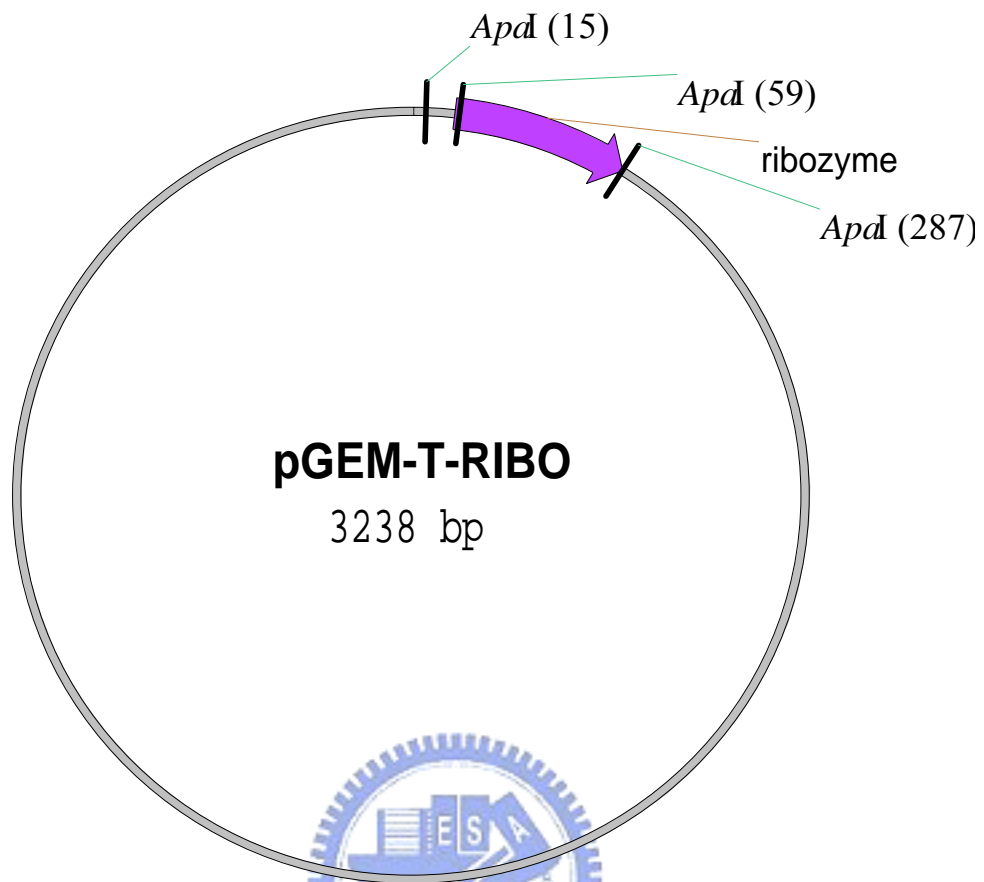
圖十八 第一次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖 (1.5% agarose gel) Lane M1 為 100 bp marker。Lane M2 為 1 kb marker，Lane 1、2、3、4 為 ribof+ribor1 之 PCR 反應產物。預期片段為 200 bps 之 DNA 片段 (圖中白框內之 band)



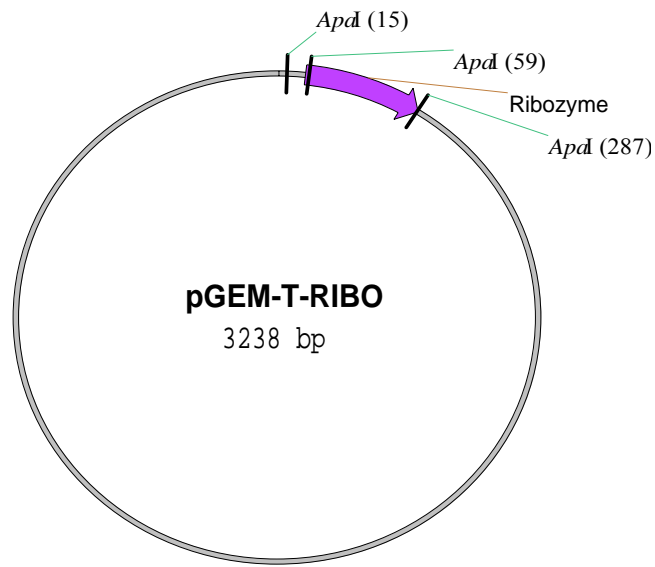
圖十九 第二次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖 (1.5% agarose gel)，以第一次 PCR 反應產物為模板。Lane M 為 100 bp marker；Lane 1-6 為控制組 (ribof + ribor1) (band a & f)；Lane 2、3、4、5 為以第一次 PCR 產物為模板使用 ribof + ribor2 為 primer。預期大小約為 220 bps 之 DNA 片段 (band b、c、d & e)。



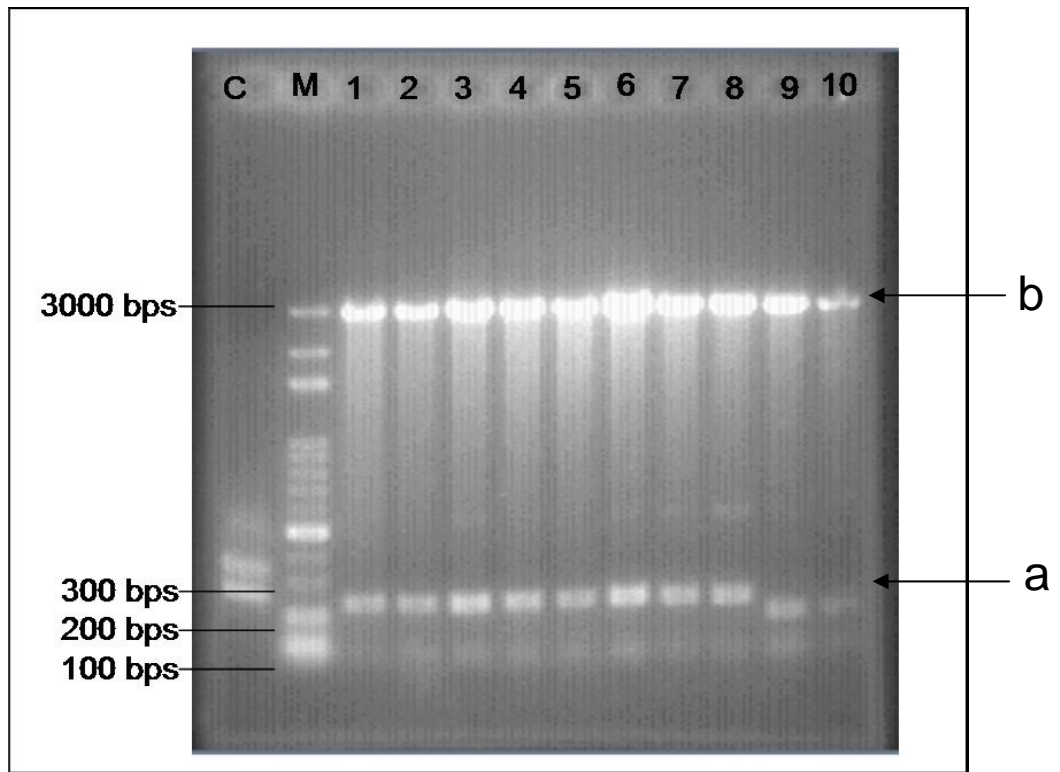
圖二十 第三次 PCR 反應之洋菜膠電泳圖 (1.5% agarose)，以第二次 PCR 反應產物為模板。Lane M 為 100 bp marker；Lane 1 為控制組 (ribof + ribor1) (band a)；Lane 2 為控制組 (ribof + ribor2) (band b)；Lane 3、4 為以第二次 PCR 產物為模板使用 ribof + ribor3 為 primer。預期大小約為 240 bps 之 DNA 片段 (band c、d)。



圖二十一 pGEM-T-Ribo 載體示意圖，其中 ribozyme 片段即為以 T/A cloning 方式置入 pGEM-T 之片段 (有正反接兩種情形，此處以正接方式之箭形表示)。如圖所示，可以 Apa I 原本 primer 上設計的序列來將 ribozyme 片段切下。

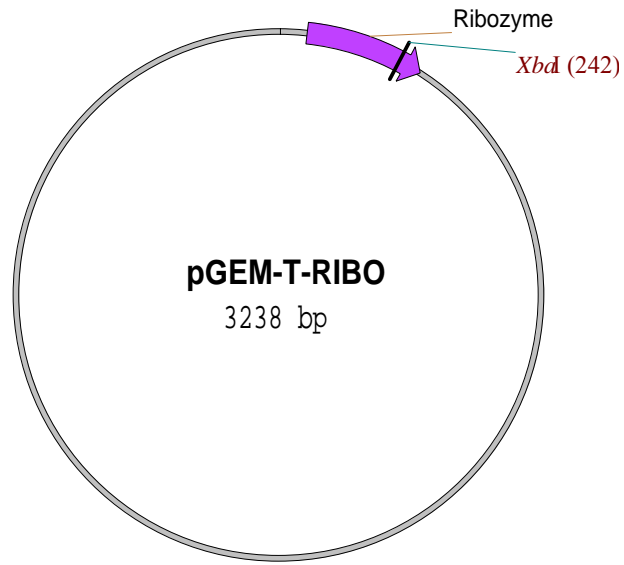


A

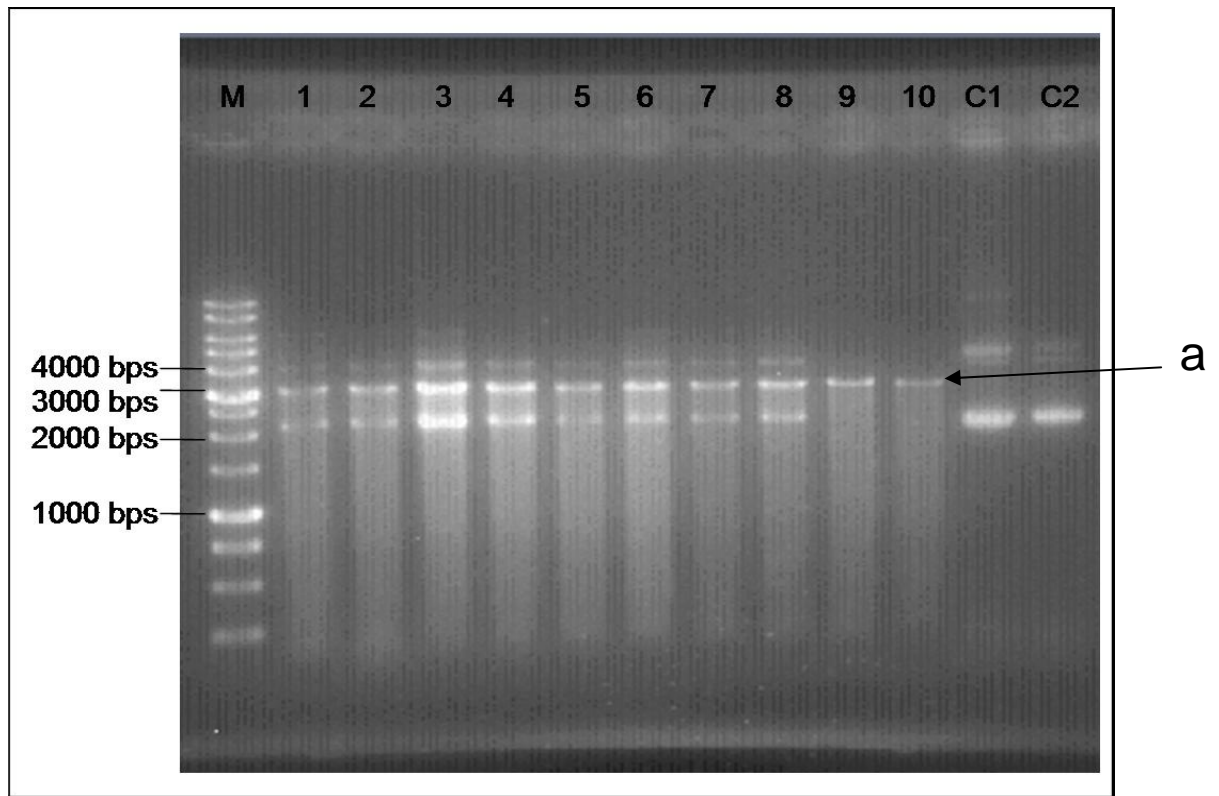


B

圖二十二 洋菜膠電泳 (1.5% Agarose gel) 以 *Apa* I 限制酶對 pGEM-T-Ribo 做切割，由圖 A 所示，預期片段為約 40、230 及 2960 bps 的片段。圖 B 中各符號如下：Lane M：100 bp marker；Lane 1~10：samples (band a & b)；Lane C：control (Ribof + Ribor3)。預期大小為 230 及 2960 bps 之 DNA 片段 (band a：230 bps；band b：2960 bps)。

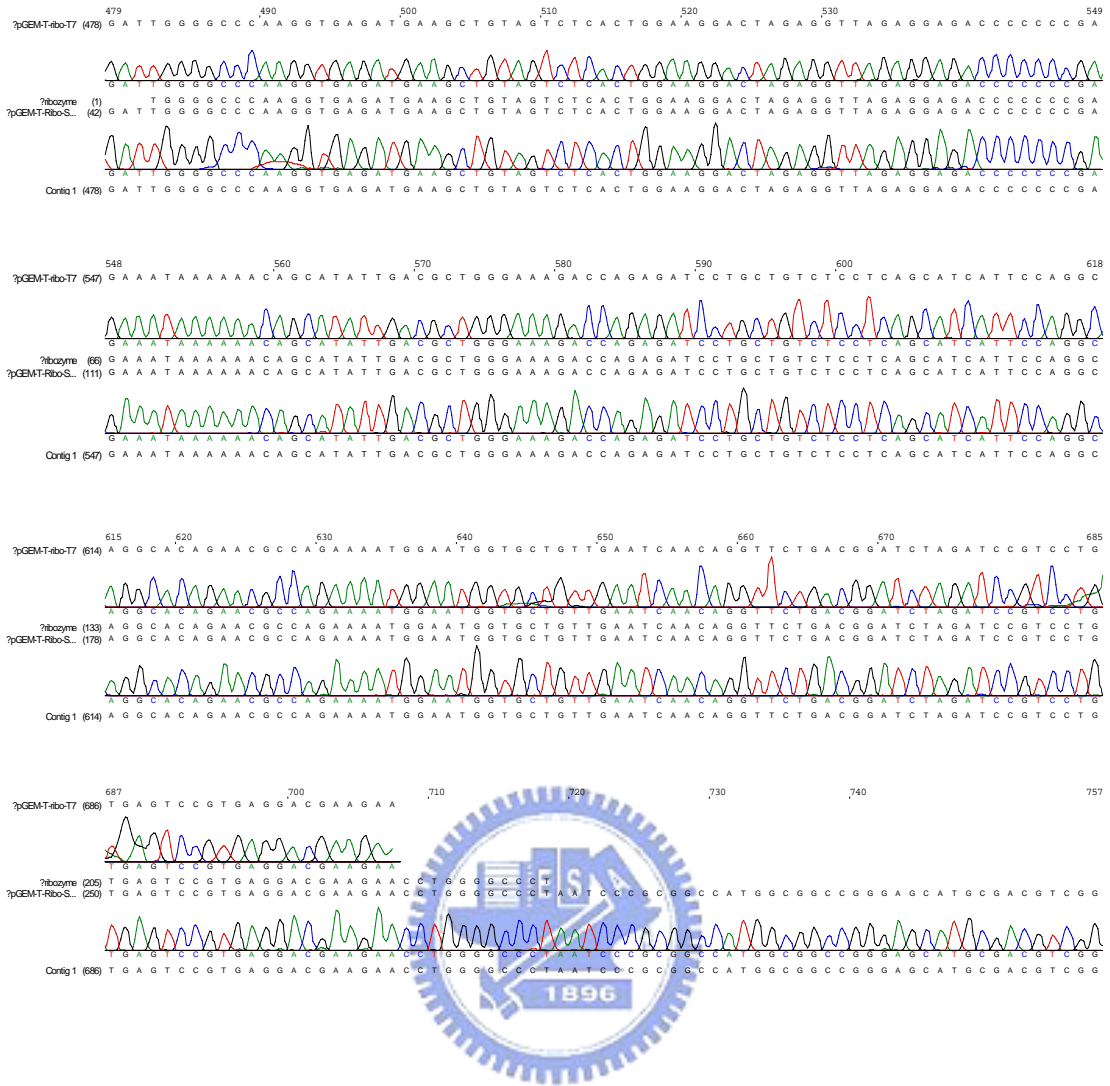


A



B

圖二十三 洋菜膠電泳 (1.0% Agarose gel) 以 Xba I 限制酶對 pGEM-T-Ribo 做切割，由圖 A 所示，預期片段為約 3.2 kb 的片段。圖 B 中各符號如下：Lane M：1 kb marker；Lane 1~10：samples (band a)；Lane C1：sample 1 uncut；Lane C2：sample 9 uncut。預期大小 3.2 kb 之 DNA 片段 (band a：3.2 kb)。



圖二十四 pGEM-T-Ribo 定序 ribozyme 片段所得數據分析圖。圖中三個片段由上而下分別為以 T7 為 primer 所得的 sequence 結果；所預期之 ribozyme 序列；以 SP6 為 primer 所得的 sequence 結果。