

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

SARS 病患臨床超快速檢測

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2751-B-009-001-Y

執行期間：92年07月01日至93年06月30日

執行單位：國立交通大學生物科技學系

計畫主持人：毛仁淡

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 9 月 30 日

## 中文摘要

關鍵詞：SARS，Synthetic peptide，Antibody detection，Virus Detection

在這一波 SARS 疫情爆發的風暴中，以大陸、香港與台灣受創最為嚴重，全球也緊接著陷入危機之中，各國無不傾全力對於 SARS 病毒進行研究，因此包括病毒基因體的解碼，檢測的方法也都陸續完成，然而這一波的風暴卻也顯示出國內確應加速建立相關研究資源及經驗。

由於 SARS 病毒是藉由飛沫傳播，容易造成大規模感染的狀況，因此便需要一個快速而準確的檢測方法，來快速篩檢可疑之病例，對於抑制感染散播的速度有極大之助益。然而目前普遍使用之檢測方法，包括 Real-time PCR、Nested PCR 與 IFA 等方式，雖然準確性相當高，但病人在發病 10 天後或治癒之病人體內是否含有抗體也是一個重要的指標，因此我們計畫發展一項在數分鐘內便可判讀結果的快速檢測方式，讓第一線的醫檢人員可以即時得知檢測結果，做第一時間的處理，若是出現模擬兩可的狀況時，再進行 PCR 的再確認，如此不僅強化了檢測的時效性，對於防疫與臨床診療上也有極大的助益。這個技術平台主要是以偵測病毒顆粒或是人體所產生之相對應抗體為目的，藉由將抗體或抗原粘附於金粒子上，當抗原與抗體產生親和力鍵結後，便可由肉眼辨識紅點的產生與否，以此來判別是否為 SARS 疑似病患。

首先由 CDC 公布 SARS 病毒上之結構蛋白質序列，包含 envelope protein、membrane protein、nucleocapsid protein 及 spike protein，利用計算軟體找出其可能之 epitope 位置，並以人工合成之 peptide 模擬入侵的抗原，篩選疑似病患是否已感染 SARS 而產生相對應之抗體。另一方面，將合成之 peptide 分別打入兔子與老鼠中，藉以製造多株及單株抗體，以得到之抗體來直接偵測病毒抗原的存在與否，如此便可再提早於潛伏期檢測病患是否感染，並及早予以治療隔離。

目前，我們已證明以人工合成之 peptide 可由疾管局提供之病人血清中，測定到罹患 SARS 者之血中抗體，多株抗體及單株抗體也已成功製備完成，並已利用蛋白質晶片建立檢測模式，找出檢測所需之最小 antigen 量。

## 英文摘要

Key Words: SARS, Synthetic peptides, Antibody and virus detection, Immunoassays

During the outbreak of severe acute respiratory disease (SARS), mainland China, Hong Kong, Singapore, Canada, and Taiwan have become the most seriously epidemic areas. International research efforts focusing on the SARS associated coronavirus (SARS-CoV) have been initiated including the viral genomic sequencing, recombinated protein expression, RT-PCR, and immunoassays. Domestic collaborations are also urgently involved under the leadership of NHRI, DOH, NSC, and CDC as well as among the research institutes.

Because of the fast spread of the SARS, some of the data implicated that the etiology of SARS has now been hardly to identify; a rapid and precise diagnosis of patients with SARS becomes of a subject of essence. Real-time PCR and immunofluorescent assay are one of the most commonly used methods to achieve this goal. There is no doubt that the real-time PCR is a significant and crucial approach in identifying the patients. The presence of antibody in SARS patients before and after recovery may also reveal an essential clinical marker. Alternatively, we plan to develop a fast immunoassay that can determine either the presence of antibodies of the viruses in SARS patients. The platform of the technology is based on the antigen or the antibody tagged with red gold nanoparticles, the antigen-antibody interaction will be then visualized within 5 minutes.

Initially our strategy is to synthesize several peptide fragments according to the protein sequences recently published. Thus far, 10 different peptides corresponding to spike, envelope, membrane, and nucleocapsid have been prepared in our laboratory. These peptides will be used for the initial screening of the antibody in SARS patients. In addition, we have already immunized the rabbits to make polyclonal antibody for establishing the immunoassay that can detect the viral particles or to evaluate the ability for neutralizing the SARS-CoV of the polyclonal antibody. Meanwhile, we are currently in progress in preparing mouse monoclonal antibodies against synthetic peptides of interest. Once established, they will be utilized as a diagnostic reagent.

In a collaboration with CDC, we are now able to identify that one of the synthetic peptide (No.9) can be employed in detecting the antibody in patients with SARS. Optimization of the immunoassay is currently underway. On the other hand, we plan to collaborate with Dr. Yi-Ming Chen of Yang Ming Medical School in a large size of patient screening.

## 報告內容

### 前言

非典型肺炎(atypic pneumonia)，亦即所謂的嚴重急性呼吸道症候群 SARS(severe acute respiratory syndrome)，最早是發生在廣東省，並在接下來短短的數個月，擴散到各個國家。2003年3月，各國的研究人員已陸續找出導致這個疾病的病原體[1,2]，其外觀及基因序列[3-5]，和現行已知的病毒 coronavirus 較相似，因此加以命名為 SARS-Associated Coronavirus(SARS-CoV)。

Coronavirus 在分類學上，是屬於帶有外鞘(envelope)的 RNA 病毒，會在宿主細胞的細胞質(cytoplasm)中做複製。在基因的結構上，是以單股正譯核糖核酸(single-stranded positive sense RNA)的形式存在，其基因組長度約為 30KB，在 5'端有 cap，在 3'端有 polyA 的結構。當病毒入侵到宿主細胞時，在病毒基因組 5'端部分的 ORF(open reading frame)會被轉譯成大的聚合蛋白，之後會被病毒本身的蛋白酶切割成許多段非結構蛋白(non-structural protein)，包括了 RNA-dependent RNA polymerase(Rep)及 ATPase heliase(Hel)。這些蛋白質是負責病毒基因組複製及合成病毒蛋白質所必需的。

一般的 coronavirus 基因組，包含了五個 ORF，分別為：replicase (rep)，spike (S)，envelope (E)，membrane (M)，nucleocapsid (N)，其兩端則有 short UTR (untranslation region) [6]。經由和其他三種血清型的 coronavirus 作 phylogenetic analysis，除了和 enzymatic protein (3CLpro, polymerase (POL), and helicase (HEL)) 有較大程度的基因保留性 (gene conserved) 以外，其 structural protein 則有相當程度的差異，說明這株病毒有別於已知的三類，而自成一種新品系 (genus) [3]。

在目前臨床的篩檢上，主要是根據胸腔 X 光照相術 (chest radiograph)、血清分析 (serologic analysis)、病毒分離培養 (virus isolation)、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、EIA (enzyme immunoassay)、反轉錄連鎖聚合酶反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction)、即時連鎖聚合酶反應 (real time-polymerase chain reaction) 等方法，如表一。目前在 SARS 的臨床檢驗上，是根據疑似症狀再加上 X 光照相術做初步判斷，最後再配合 ELISA 及 real time-PCR 來做確認，其過程曠日廢時，且因為過程繁複，亦增加醫護人員的工作及感染的機會。故本實驗室旨在建立快速準確且有效率的檢測方式，當病患有初步症狀時即能自行在家做快速檢驗，減少到醫院造成交互感染的機會，並減輕醫護人員的負擔，以其達到高效率 (high throughput) 的篩檢；只有當病患在該測試有陽性反應時，才需進一步做 real time-PCR 的再確認，可有效地大幅縮短判斷時間，並提早掌握治療的黃金期。

除了最常用的之 Real time-PCR 方法之外，免疫分析方法提供了另一種出色的

選擇。當然各種方法有其優缺點之限制，我們計畫建立一種快速的免疫分析方法，其能偵測疑似病患體內是否存在病毒或相對應的抗體。這個技術平台主要是建立在帶有紅色奈米金顆粒的抗原或抗體上，只有五分鐘的時間，即能利用抗原-抗體之間的相互作用，來判斷該病患是否有遭SARS-CoV的感染。除此之外，我們也將用合成之peptide為抗原來發展ELISA方法，成功後將配合國衛院(NHRI)及其他相關單位提供國內使用。為了安全有效率的收集病患檢體，該研究計畫和其他相關研究團隊共同合作完成。

Table 1. 各種臨床上用來檢驗疾病的技術方法

	Immunochromatography	ELISA(EIA)	Nested-PCR	Real Time-PCR	Viral Culture
<b>Sensitivity</b>	++	+++	++	+++	+
<b>Specificity</b>	++	++	+++	+++	++
<b>Time consuming</b>	+++	+	+	+	+
<b>Cost</b>	+++	++	+	+	+
<b>Simplicity</b>	+++	++	+	+	+

## 研究目的

- 合成 SARS 病毒 peptides(包括 spike、envelope、membrane、nucleocapsid 蛋白質)，並篩選其中能與病人抗體交互作用之 peptide。
- 製作檢測 SARS 病毒抗體之快速檢驗試劑(ELISA 及 immunogold)。
- 製作及提供檢測 SARS 病毒之快速檢驗試劑。
- 提供蛋白質晶片模式大量篩選社區人群中帶有抗體之技術平台(high throughput platform)。

## 研究方法

### 1. 合成與SARS病毒蛋白相同之十種peptides

在美國疾病管制局在四月份所發表之 SARS 冠狀病毒的胺基酸序列的同時，我們及設計出十種不同的 peptide，包含：surface spike glycoprotein 四種 peptides、envelope protein 二種 peptides、small membrane protein 二種 peptides 及 nucleocapsid protein 二種 peptides。此十種 peptides 主要目的在於沒有病毒顆粒下產生抗 SARS 病毒顆粒的抗體。在過去經驗中我們已利用相同方式，在無白斑病毒顆粒下所合成的 peptides，可產生抗白斑病病毒的抗體，並成功的研發出白斑病病毒檢測試片

## 2. 將合成之peptides製成多株抗體

我們已將合成的十種 peptides 打入兔子，使兔子產生可辨識 SARS 病毒的多株抗體。目前已對病毒有些許 titer，再經二週後即可用於偵測病毒用。生產此多株抗體主要目的為：第一、利用抗體與金膠結合製作 SARS 病毒偵測試片。第二、進一步深入研究是否有中和病毒的抗體，可用於治療 SARS 病患。第三、此 peptides 可製作疫苗。

## 3. 將合成之peptides製成單株抗體

我們亦在相同時間免疫小鼠，預計製作出不同種可辨識 SARS 病毒的單株抗體，包含可辨識 surface spike glycoprotein、envelope protein、small membrane protein 及 nucleocapsid protein 之單株抗體，主要目的與生產多株抗體相同，除發展出快速檢測試劑外，並尋找出可中和病毒之單株抗體，但此方式尚需二個月時間才可順利完成。目前已製作成 hybridoma cell。

## 4. 利用ELISA的方式檢測出病人檢體

在五月初由疾病管制局（蘇益仁局長）獲得十二種不同病人檢體 (single blind study)，利用 ELISA 的方式先行試驗，將不同 peptides 分別固定於 ELISA plate 上，再將病人血清以 1:500 方式稀釋，分別於 peptides 反應，反應後用 HRP 標示好之 anti-human IgG 辨識，ABTS 呈色。所測結果有一個為偽陽性，由於本實驗為首次進行，缺點部分現正收集更多病人檢體，並加以修正，以期達到更精準要求。

合成與 SARS 病毒 epitope 相同之 peptide (包含 surface spike glycoprotein、envelope protein、small membrane protein 及 nucleocapsid protein)

自本年度四月中旬(2003)年我們依 SARS-CoV 之蛋白 S,E,M,N 分別合成了 10 組 peptide 列於下表。我們是以 MAP 之形式做成 polymer 所以每一組 peptide 之分子量大小約為 15,000 daltons。

Proteins of SARS-CoV	Coding sequence	Amino acid residues	Synthesized peptide prepared by us
Surface spike glycoprotein	21492-25259	3768	4
Envelope protein	26117-26347	231	2
Small membrane protein	26398-27063	666	2
Nucleocapsid protein	28120-29388	1268	2
Protein X1	25268-26092	825	none
Protein X2	25689-26153	465	none
Protein X3	27074-27265	192	none

Protein X4	27273-27641	369	none
Protein X5	27864-28118	255	none

*Other peptides corresponding to X1-X5 will be constructed in the 2<sup>nd</sup> phase of our study.*

*Sequence data are derived from Marra et al. Science May 1, 2003, and Rota et al. Science May 1, 2003.*

#### 病毒蛋白質之epitope的分析：

每一個能引發免疫反應之蛋白質片段大約 7~8 個胺基酸，而在這些片段中包含有鹼性或酸性胺基酸，使抗體與抗原產生離子性的交互作用(ionic interaction)，在這當中還包含 proline，此胺基酸存在於蛋白質轉彎處，而這些位子常於為蛋白質表面處，另外尚有疏水性胺基酸如：Trp、Phe、Ile、Leu及Tyr，這些胺基酸為穩定抗原與抗體結合後的結構。我們所合成的peptides是依據此方式篩選。篩選後必須再與現有的蛋白質資料庫比對，去除非專一性peptides後，此peptides即為我們所合成之peptides。一般而言，人體受病毒感染後經巨噬細胞 (macrophages) 或其他免疫細胞代謝後，再將病毒片段表現在抗原表現細胞上 (antigen presented cells)，促使T及B細胞的一連串反應及其他免疫反應。因此在設計peptides而言，不僅是針對spike protein及envelope protein兩種表面蛋白，尚需考慮其他病毒的主要蛋白質如membrane protein及nucleocapsid protein。例如：在nucleocapsid protein當中的一小段胺基酸為 Arg 及 Lys 重複； 另外尚有胺基酸重複片段為 SSRSSSSRSRGNSR----SSR、LALLLL及QQQQGQNNNAA，這些片段皆為高引發免疫反應片段。在spike protein內含有 32 個cysteine (C)，其中大部分在COOH-端，此或許可說明為何當SARS病毒與人體接受器結合後會形成穩定的結構。故這些蛋白質片段可考慮用於製作疫苗或治療SARS病患。

(2) 尋找超級免疫抗原 (super antigen)利用抗 SARS 病毒之抗體，以 ELISA 篩選不同之合成 peptides，尋找能與抗 SARS 病毒之抗體起強烈反應的 peptides，此 peptides 即為 SARS 病毒之超級免疫抗原片段，未來可用於生產抗體及檢測病人之抗體。

#### 檢測 SARS 病患抗體之快速 ELISA 及 immunogold 檢測方式

##### 1. ELISA：

由上述 (Table 2) 中，我們欲將 10 組 peptide 分別 coating 在 ELISA plate 上 (每組約 1ug/well)，經過 blocking 及 washing 後再與病人之血清進行反應，30 分鐘後再加上 peroxidase-conjugated 之 anti-human IgG、IgA 及 IgM 二抗混合物反應 30 分鐘，最後加入 chromogenic substrate 即可觀察其結果。目前我們已將此技術應用於 SARS 病患，發現 10 組 peptides 中第 9 號 peptide (against S protein) 最具有潛力檢測病人是否帶有 SARS 抗體。由於陽明大學公衛研究所(陳宜民教授)已收集病人不同發病期之 serum，所以在雙方合作下，我們可測出 1)病人可能

產生抗體之時間（一般約為 10-14 天）；2) 病人抗體之 titer，我們檢測之結果將與 PCR 病毒檢測方法互相比對。關於病人 (SARA) 我們將盡可能收集到 50 位臨床上確認之 sample (包括病症、X-ray 及 PCR 相符者)。另外立刻將本實驗室方法與國內外類似之 immunoassay 方法交互比對，偽陽性者可利用其他 peptide 為抗原加以修正，偽陰性者則應注意血清之用量找出最適當之稀釋濃度。

Immunoassay 最大之缺點：1) 早期感染病人無法驗證；2) 必須要取得病人血清始可進行；3) 病人血中若含有類似 coronavirus 之潛伏抗體可造成 false positive 之現象，但其優點為 1) 病患復原後（已無抗原）可用此法檢測病患抗體之 titer；2) 在 New Eng J Med 報告中 (Ksiazek et al, 200., 3481953-1966) 指出 19 個亞洲病例中，有兩例 PCR 測試為 negative，但 antibody 測試中則為 positive，可見每一種方法各有其優點及缺點。無論如何，若能定出病人抗體之 titer，則病人之血清可以 passive immunity 來治療病患，最近在臨床上也有成功之例。

在先導試驗中，我們利用 9 號 peptide 作了 80 個正常人之測試並無發現有 false positive 之現象。在 protein sequence data bank 中，此段之 sequence 也未發現於已知病毒中有 sequence homology 之現象。所以利用整段 SARS virus 之重組蛋白測試病毒抗體所造成之 background 值太高或 false positive 現象的產生，是可利用本實驗方法來著手改進。我們先導實驗中也曾嘗試以 synthetic peptide cocktail 方法測試，但其 sensitivity 不如單一 peptide 之 ELISA。

## 2. Immunogold

### (1) 直接快速免疫測試

利用抗體及抗原的直接反應，所發展出的方式。首先將病人血清直接點放及固定於 mini-nitrocellulose strip，再與金膠結合完成之 peptides (peptide gold) 反應，peptide gold 會利用毛細現象移動，當病人檢體中如含有抗 SARS 病毒之抗體，則 peptide gold 會與抗體結合形成紅色點，所檢測時間不需超過五分鐘即能測得，此方式原理簡單及容易檢測。此法之考量為如何將病人之血清滴入 strip 上，而不使 nitrocellulose paper 表面受損，目前我們的構想是提供預測實驗室一個稍軟之 tip，以“圖章”之方式置於 strip 中央。血清應使用 inactivated sample 為宜。另外此法困難處是 peptide-gold 之製作，使其達到 100% 之穩定度。本實驗室中之第 9 號 peptide 已初步完成 peptide gold，穩定度尚可，因為 9 號 peptide 分子量較大 (15K)，目前想在合成為 7.5K 及 3.2K 之 peptide 以增加其穩定度。

### (2) 間接免疫快速測試

此方式為利用合成之 peptides 固定於 mini-nitrocellulose strip (2 x 0.4 cm) 上，將病人檢體與 peptide gold (紅色) 混合均勻後與 strip 反應，病人檢體



中含有抗 SARS 病毒之抗體先和 peptide gold(紅色)結合，利用毛細現象移動至固定 peptides 結合成複合體，而形成紅點。原理與懷孕測試片略同，但此方法為逆向操作。此方式有利於醫院在第一線快速檢測病人 (送至醫院的 SARS 病患皆已發病，固體內已有抗體產生)。

#### 製作檢測 SARS 病毒之快速檢測試劑

此檢測技術在於利用一對的抗體及金膠所結合而成的系統，將利用 peptide 所產生的一對單株抗體，一株單株抗體固定於 mini-nitrocellulose strip，另一株單株抗體與金膠結合成免疫金膠 (immunogold)，將此免疫金膠與檢體混合後，利用毛細現象移動至固定於 mini-nitrocellulose strip 上之單株抗體，如檢體中含有病毒顆粒，則病毒顆粒與 immunogold 結合後再與 mini-nitrocellulose strip 上之單株抗體結合形成一複合體而形成紅點。此方式所檢測的檢體範圍廣，如血液、痰、糞便及鼻涕。此試劑與懷孕測試完全相同不只可用於醫院的臨床測試，甚至在居家即能測試。若研發成功，此法之最後組裝可能委託國內生技公司組裝，但希望 prototype 能提供國內相關單位使用。

#### 利用蛋白質晶片模式快速篩選病患

此方式為快速檢測試片的延伸，利用 microarray 系統將所有待測之病人檢體分別點放及固定在 mini-nitrocellulose strip (2 x 0.4 cm) 上，再利用已與金膠結合之 peptides (peptide gold) 或抗體 (immunogold) 反應，peptide gold 會利用毛細現象移動，當病人檢體中如含有抗 SARS 病毒之抗體，則 peptide gold 會與抗體結合形成紅點，所檢測時間只需數分鐘即能測得，結果的判讀無須使用儀器，可直接肉眼判讀。用此方式能在同一時間快速篩檢多個檢體，有利於檢疫單位在疑似檢體上的快速篩檢，且節省人力及時間的耗費。無論是 ELISA 或 immunogold 所發展之技術，將做成 kit 免費提供各單位使用。

#### 醫院及社區之流行病學研究

在兩種檢測試片研發成功後，我們將積極投入醫院及社區的篩檢。由於此檢測方法的便利性，可以針對固定區域的所有人群於不同時間點採集檢體，進行大規模篩檢。在醫院中，可察覺何時何處爆發院內感染，得以快速採取補救措施，有助於醫院對疫情的控制。在社區中，可監控疫情高峰到來的時間，採取不同程度的防疫方式，避免浪費太多社會資源及引起不必要的恐慌。且藉由檢測結果之分析，可進一步了解人體受病毒感染後抗體在人體體內的波動曲線。本實驗的重要性是：找出 antibody titer 與其康復時間是否有其正相關性 (positive correlation)。關於 epidemiology 方面，我們將研究病人在康復期後，其體內抗體 titer 之 attenuation 情形。本實驗將與有關單位共同合作，原因為目前交通大學暫無醫學院，所以中期 (一年計畫) 將與國衛院協同完成。

## 結果與討論

在美國疾病管制局在九十二年四月份所發表之 SARS 冠狀病毒的胺基酸序列的同時，我們及設計出十種不同的 peptide，包含：surface spike glycoprotein 四段 peptides、envelope protein 二段 peptides、small membrane protein 二段 peptides 及 nucleocapsid protein 二段 peptides。期望能在沒有病毒顆粒的情況下，製造辨認 SARS 病毒顆粒的抗體。

首先我們將合成的十段 peptide 與病人血清做結合測試，在 ELISA 的結果中發現在 Spike protein 上之 peptide 9 與病人血清有明顯反應，顯示 peptide 9 與病人產生之抗體有結合能力，peptide 9 在 SARS viron 中的免疫活性是較高的。除此之外，我們也將上述十段 peptide 以 MAP 的形式打入兔子中，發現所產生之抗體同樣只會辨識 peptide 9，此項結果更佐證了 peptide 9 之免疫活性較高的論述。所以我們將 peptide 9 結合 MAP 的形式，分別打入紐西蘭白兔與 Balb-c 小鼠，進行多株抗體與單株抗體的製作，抗體力價經 ELISA 測定，兔子血清多株抗體約為六千，而單株抗體亦順利獲得。

利用 peptide 9 檢測 SARS 病人所產生之抗體方面，在少數已知感染天數之病患血清檢體上，最早可檢測到感染 9 天之病患，而在感染後 9-46 天間之病患皆可順利測得。而針對不同病患間，利用 peptide 9 檢測抗體是否產生，則無個體差異性之問題，並沒有發現已知病患卻無法利用 peptide 9 檢測之困擾，顯示 peptide 9 在不同個體間，所產生之免疫活性是相當一致的，因此利用 peptide 9 檢測 SARS 病患所對應產生之抗體是可行的。

我們亦將 recombinant full-length spike protein 與 recombinant truncated spike protein 進行西方點墨法分析，以兔子血清所取得之多株抗體進行辨識，結果顯示以 peptide 9 所產生之多株抗體亦可特異性辨識重組 spike protein。

這樣的結果證明了利用 synthetic peptide 也可以用於快速檢測抗體產生與否，而 peptide 所產生之抗體亦可以順利辨識重組蛋白，因此未來在面臨類似疾病威脅時，便可先行預測其 antigenic site，利用 synthetic peptide 建立快速檢測系統，乃至於生產單多株抗體，如此便可免除生產重組蛋白所需時間較長之缺點。

最後，我們更針對 spike protein 上之其他可能之 antigenic site，利用 peptide array 之方式進行篩選，亦獲得 8 個可能之 antigenic site。而應用在免疫快速層析方法上，minimum antigen-dotted dosage 亦只需 31 pg。

## 計畫成果自評

### Specific aims:

1. 合成 SARS 病毒 peptides(包括 spike、envelope、membrane、nucleocapsid 蛋白質)，並篩選其中能與病人抗體交互作用之 peptide。
2. 製作檢測 SARS 病毒抗體之快速檢驗試劑。
3. 製作及提供檢測 SARS 病毒之快速檢驗試劑。
4. 提供蛋白質晶片模式大量篩選社區人群中帶有抗體之技術平台。

### 計畫執行情形

#### Aim 1:

我們共合成了十段 SARS peptide，其中包含了 spike protein 四段，membrane protein 二段，nucleocapsid protein 二段，envelope protein 二段，以及一片 24-dot peptide array。十段 synthetic peptide 中，利用 ELISA 的方式順利篩選出一段能與病人抗體交互作用之 peptide。

#### Aim 2:

利用此段篩選出之 peptide 9，我們順利建構了 ELISA 以及 immuno-chromatographic assay 之檢測平台，在檢測之病人血清中，皆可順利檢測出病人抗體。

#### Aim 3:

在製作檢測 SARS 病毒之檢測試劑中，我們順利製作出能夠辨識 peptide 9 與 recombinant spike protein 之多株抗體，在西方點墨法與 ELISA 的結果中，亦可特異性辨識，唯病人血清檢體有限，並無法將此檢測系統進行最適化，獲得完整之檢測結果。

#### Aim 4:

在蛋白質晶片模式中，我們順利找出其所需之最少量 peptide，其量更只需 31 pg，這樣的結果更顯示出 peptide 9 之靈敏性，用來大量篩選社區民眾是否感染並產生 SARS 抗體相當合適，但因檢體有限，並無法進行更進一步的臨床測試。

## 参考文献

1. Peiris J S M *et al.* (2003). "Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome." *The Lancet* **361**: 1319-1325.
2. Thomas G. Ksiazek *et al.* (2003). "A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome." *N Engl J Med* **348**(20): 1953-1966.
3. Marco A. Marra *et al.* *Science* **300**, 1399-1404 (30 May 2003); published online 1 May 2003, 10.1126/science.1085953
4. Paul A. Rota *et al.* *Science* **300**, 1394-1399 (30 May 2003); published online 1 May 2003, 10.1126/science.1085952
5. Kathryn V. Holmes *et al.* (2003). *N Engl J Med* **348**(20): 1948-1951.
6. M. M. C. Lai, K. V. Holmes, *In Fields Virology*, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, New York, ed. 4, 2001), chap. 35
7. Frens G. *Nature Phys. Sci.* **1973**; 241: 20.
8. Chow M. K. and Zukoski C.F. *Journal of colloid and interface science.* 1994, **165**: 97-109.
9. Bhaskar S, Singh S, Sharma M. J. *Immunol. Methods.* 1996; **196**: 193-198.
10. Huang Q, Lan X, Tong T, Wu X, Chen M, Feng X, Liu R, Tang Y, Zhu Z. *J. Chin. Microbiol.* 1996; **34**: 2011-2013.
11. Mao SJT, Kazmar RE, Silverfield JC, Alley MC, Kluge K, Fathman CG. *Biochem. Biophys. Acta* 1982; **713**: 365-374.
12. Mao SJT, Patton JG, Badimon JJ, Kottke BA, Alley MC, Cardin AD. *Clin. Chem.* 1983; **29**: 1890-1897.
13. Patton JG, Badimon JJ, and Mao SJT. *Clin. Chem.* 1983; **29**: 1898-1903.
14. Marcovina S, France D, Phillips RA, Mao SJT. *Clin. Chem.* 1985; **31**: 1654-1658.
15. Marcovina S, Kottke BA, Mao SJT. *Clin. Chem.* 1985; **31**: 1654-1663.
16. Mao SJT, Rechten AE, Jackson RL. *J. Lipid Res.* 1988; **29**: 1023-1029.
17. Mao SJT, Rechten AE, Krstenansky JL, Jackson RL. *Thrombosis and Homeostasis.* 1990; **63**: 445-448.
18. Patton JG, Alley MC, Mao SJT. *J. Immunol. Meth.* 1983; **55**: 193-203.
19. Mao SJT, Miller JP, Gotto AM Jr, Sparrow JT. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 3448-3453.
20. Maciejko JJ, Holmes DR, Kottke BA, Dinh DM, Mao SJT. *N. Eng. J. Med.* 1983; **309**: 385-389
21. Victor C. W. Tsang, Ryan M. Greene, and Joy B. Pilcher *J. Immunoassay* 1995;**16** (4), 395-418

## 附錄

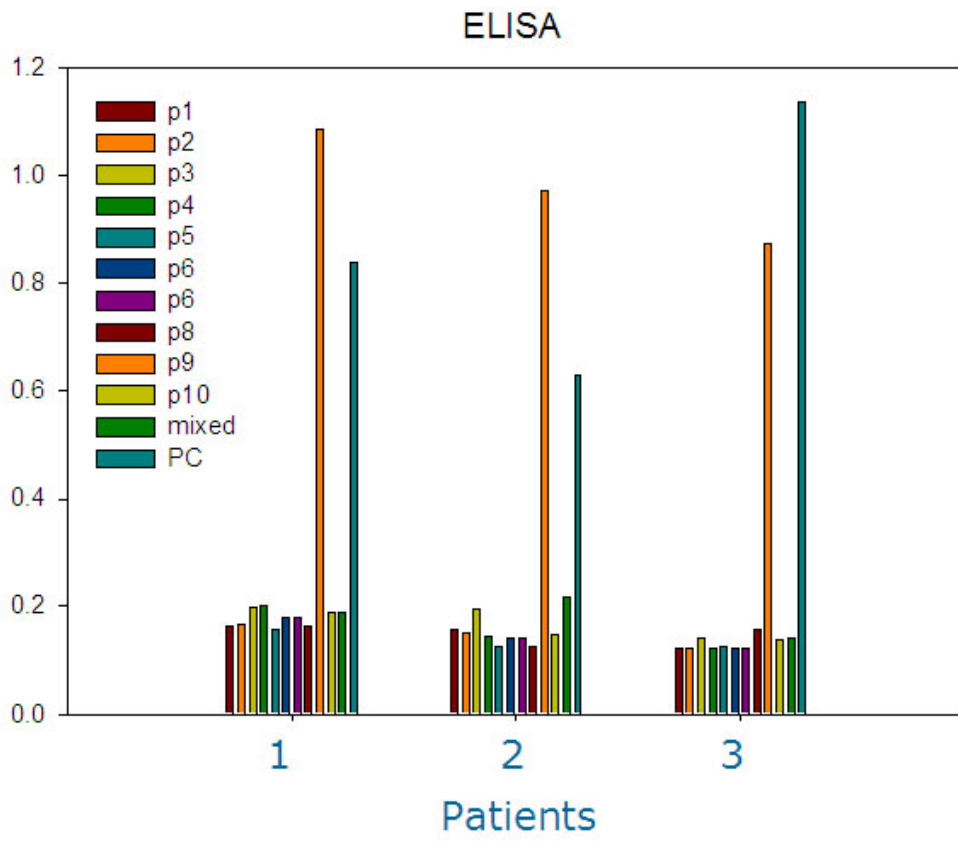


圖 1. 利用 ELISA 分析所合成之 10 段 peptide。將所合成之十段 peptide 分別 coating 1  $\mu\text{g}$ ，再與病人血清作用，結果發現 peptide 9 會與病人血清中之 SARS 抗體反應。

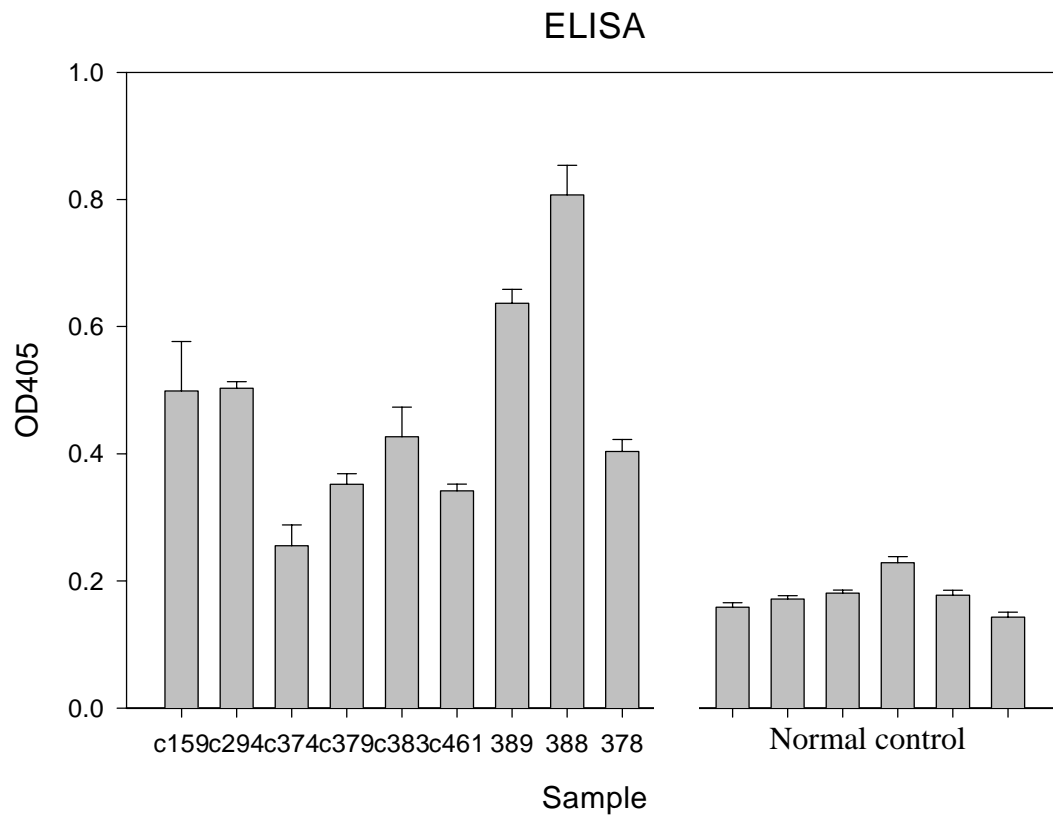


圖 2. 以 ELISA 之方式，利用 peptide 9 檢測 SARS 病患血清。將樣品以 100 倍稀釋後分別與 peptide 9 反應，發現 peptide 可精確地檢測出已受感染之病患（C159，C294，C374，C379，C383，C461，389，388，387）。

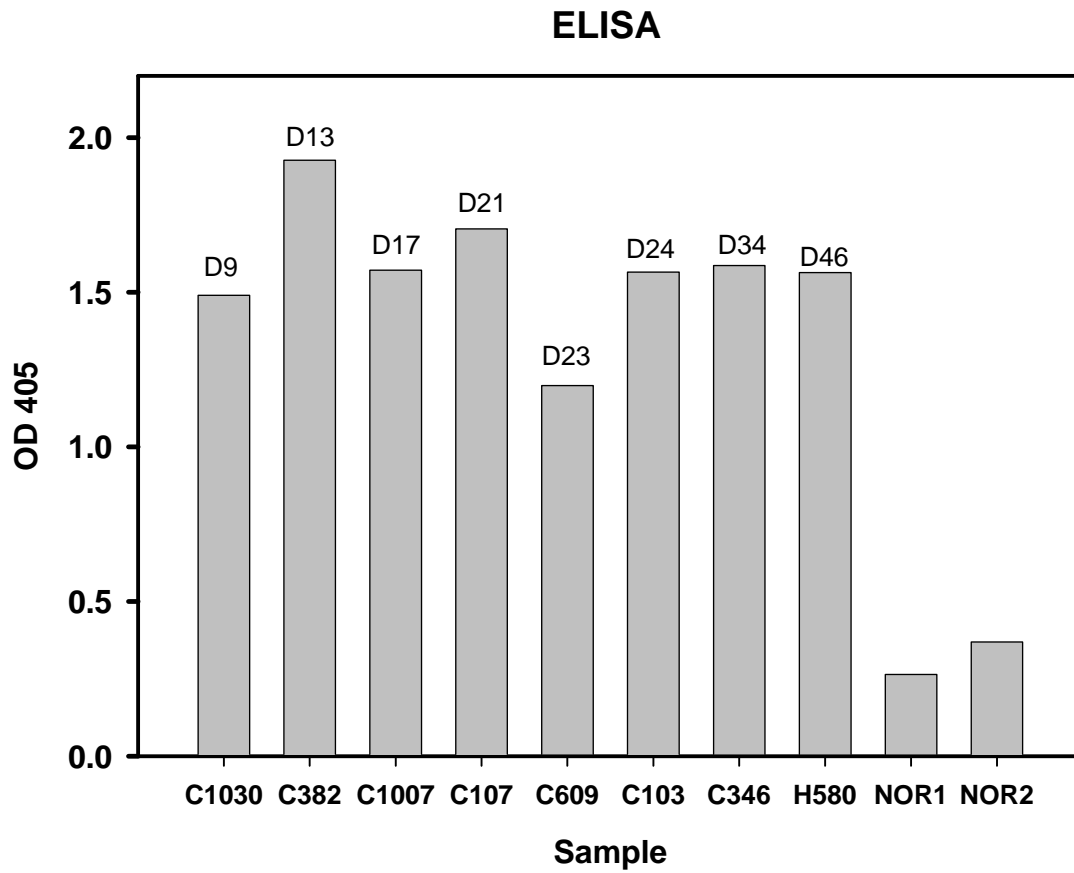


圖 3. 患病天數之檢測靈敏度分析。將感染不同天數之病人血清分別與 peptide 9 反應，利用 ELISA 方式分析，結果發現感染 9 天時即有強烈結合反應。

## Polyclonal Antibody

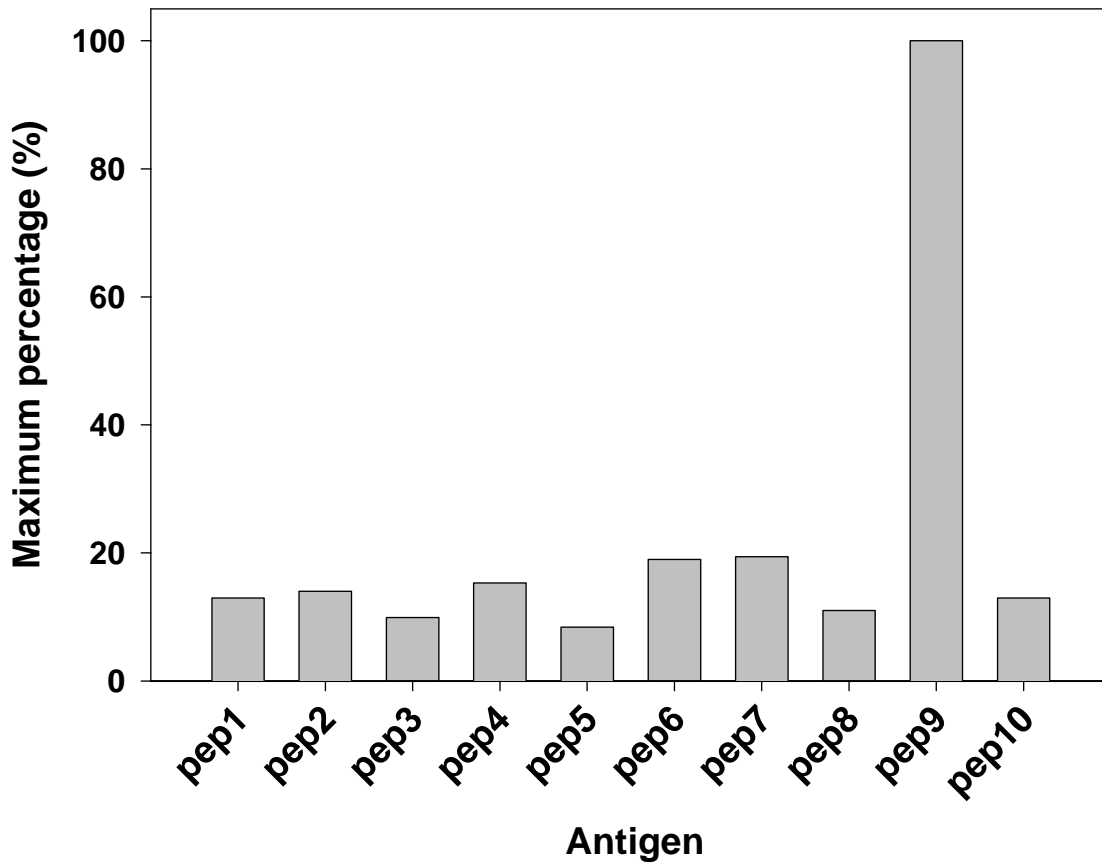


圖 4. 免疫活性強弱分析。將所合成之十段 peptide 混合後 immunize 兔子，再將子血清進行進行免疫活性強弱分析，結果發現只有 peptide 9 會讓兔子產生抗體，顯示出在所設計之十段 peptide 中，peptide 9 具有最強之免疫活性，此結果亦與病人血清抗體之分析結果相符。



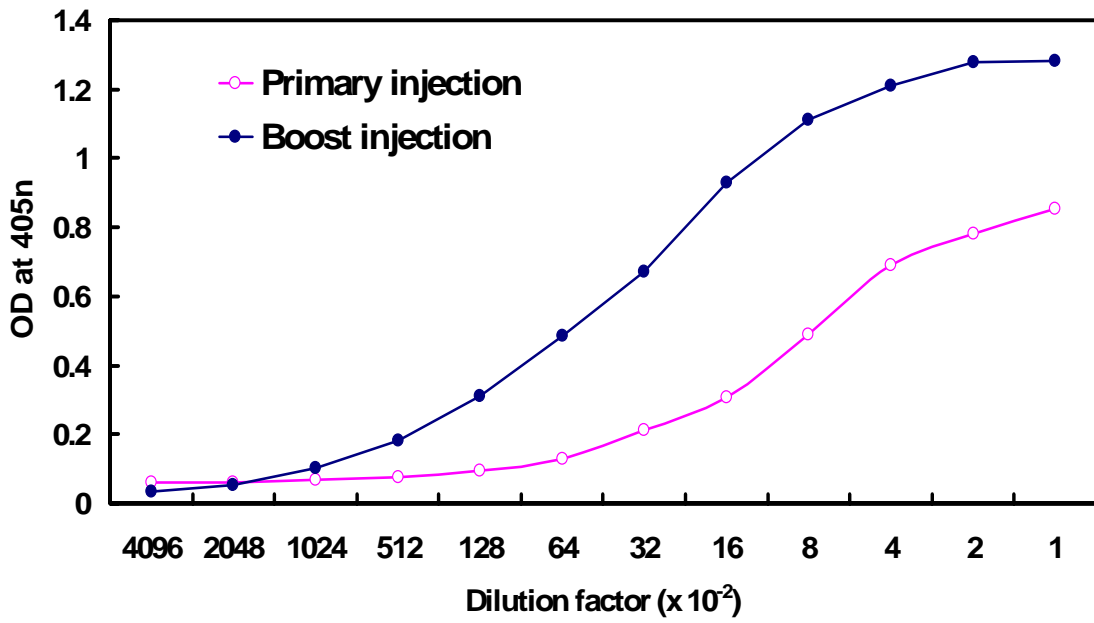


圖 5. 兔子血清力價測試。將 peptide 9 immunize 兔子，經二次 immunize 加強後，抗體力價由 1000 上升至 6400。

Rabbit antiserum

Preimmune

Positive control



Rabbit serum



圖 6. Dot blot 特異性分析。將 peptide 9 點於 NC membrane 上，再分別將免疫前後之兔子血清以及 SARS 病人血清進行結合測試。結果發現免疫後兔子血清病人血清皆與 peptide 9 有強烈結合反應，而免疫前之血清則無反應。



**M : Marker**

**A : No. 9 antiserum**

**B : Normal rabbit plasma**

圖 7. 利用兔子血清分析重組全長 spike protein。SARS spike 全長重組蛋白進行西方點墨法分析，並分別以免疫前後之兔子血清進行辨識，結果發現免疫後之兔子血清亦可辨識重組蛋白。

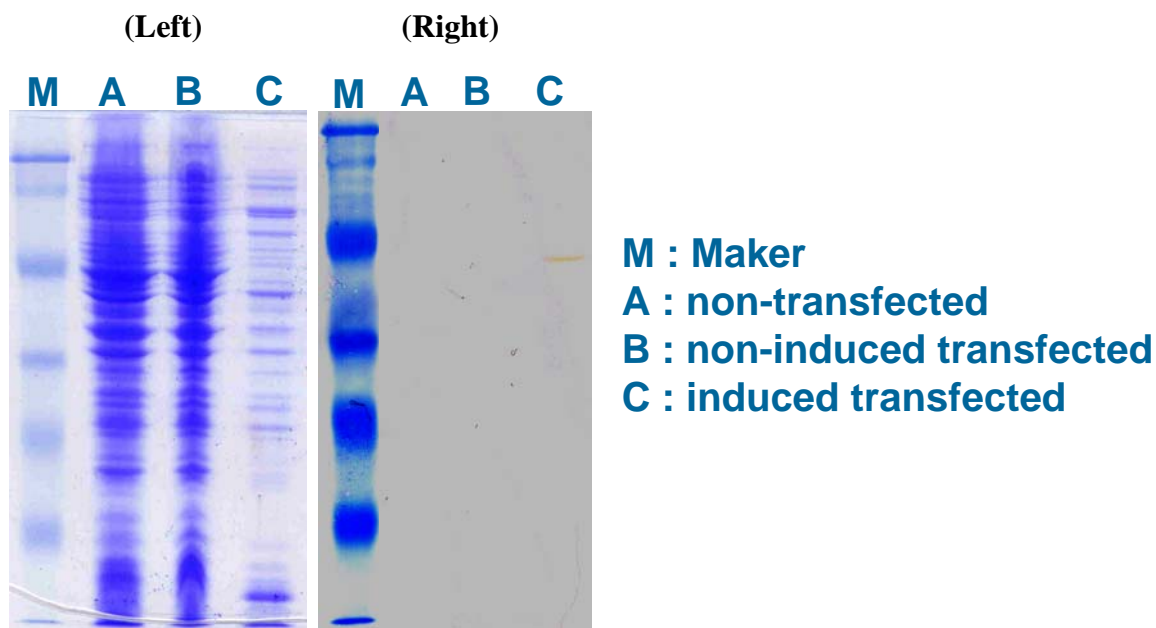


圖 8. 利用兔子血清分析 truncated recombinant spike protein。將本實驗室所表現之 truncated recombinant spike protein 之 *E. coli*，直接進行西方點墨法之分析，並以兔子血清進行測試。左圖為 Coomassie blue 染色之 SDS-PAGE，右圖為利用兔子抗體西方點墨法之結果。結果顯示本實驗室所製備之抗體可成功辨識 truncated recombinant spike protein。



圖 9. 利用 peptide array 的方式分析 spike protein 之 antigenic site。將 S protein 上之其他可能之 antigenic site，分別於 NC membrane 上合成，之後與病人之血清作用，結果發現 9 段 peptide 會與 SARS 病人抗體反應。（各 peptide 之 sequence 請參閱表 2.）



圖 10. peptide 9 單株抗體篩選圖。Peptide 9 免疫後之老鼠，進行細胞融合，結果產生 200 個 hybridoma cell，其中有二株能有效辨識 peptide 9。

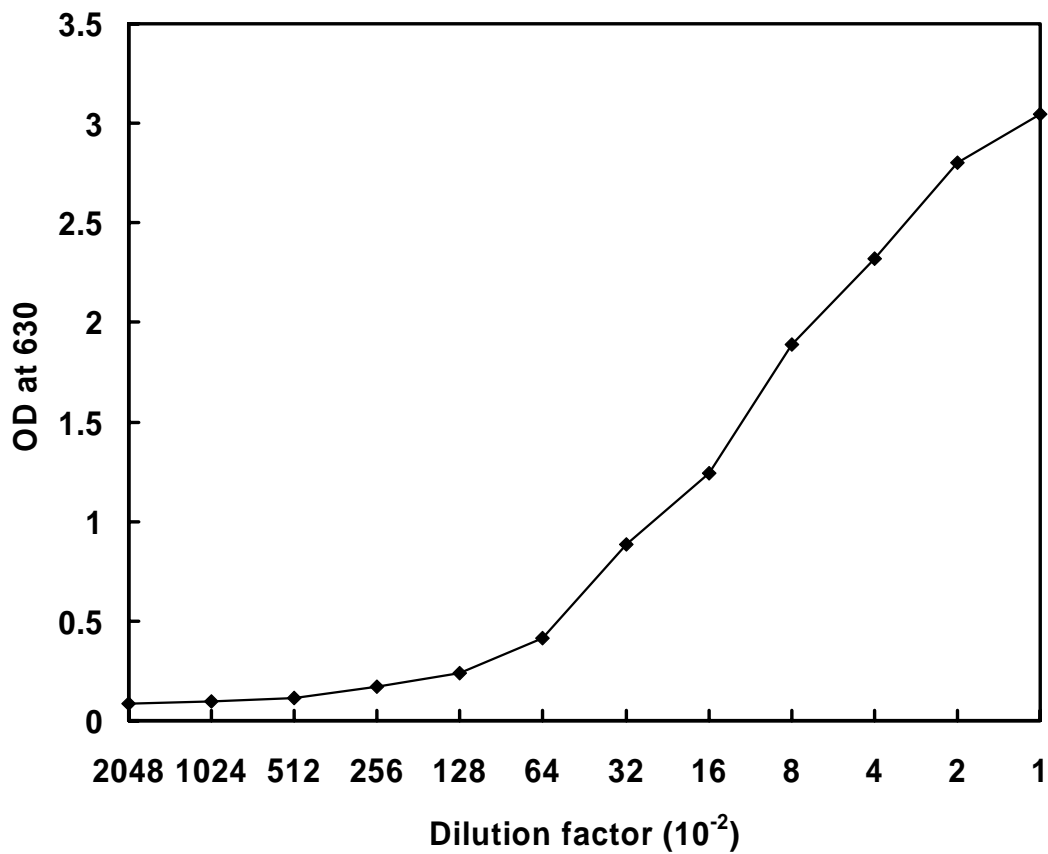


圖 11. 單株抗體細胞培養液之力價檢測圖。將能產生單株抗體之細胞培養液經序列稀釋後，經由 ELISA 檢測，其細胞培養液力價可達為 3200。

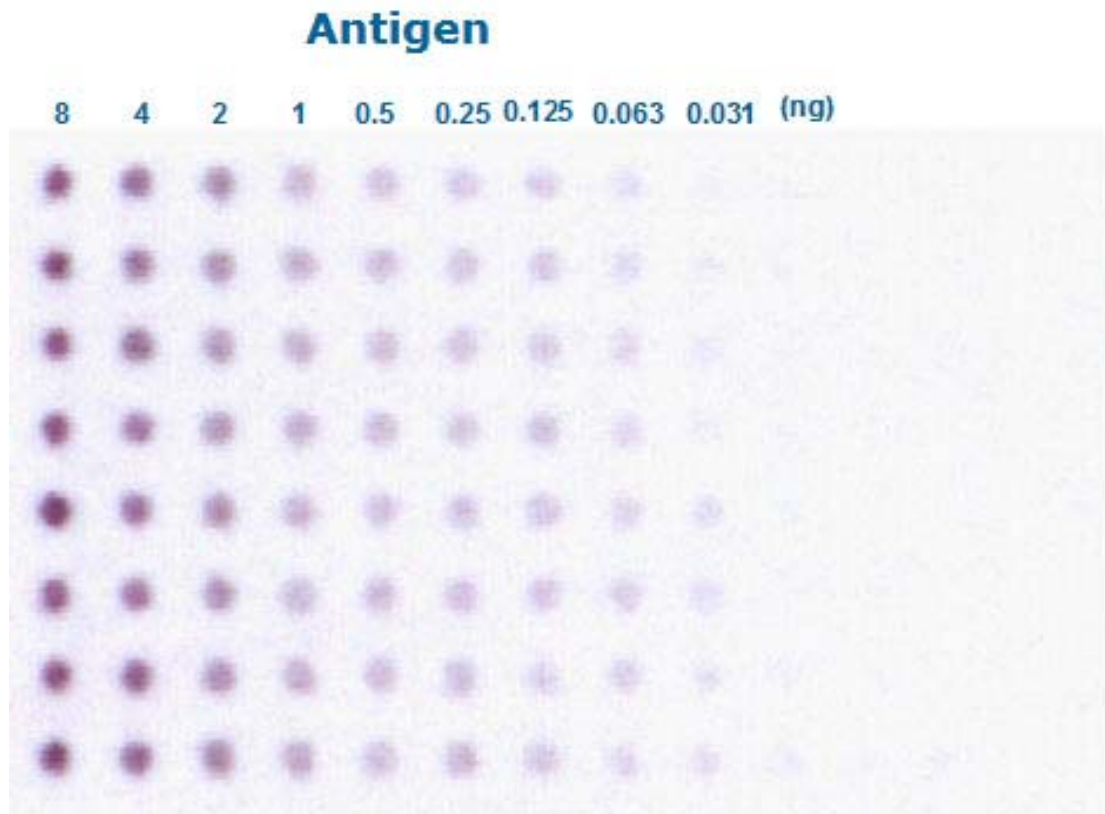


圖 12. 利用 peptide array 之放是分析抗體辨識抗原之敏感度。將 peptide 9 利用機械手臂於 NC membrane 上分別點上不同量之 peptide，再將純化後與金膠結合之多株抗體與之反應，結果發現 dotted peptide 9 在 31 pg 以上即可被順利測得。



表 1. Synthetic peptide sequence

	No.	Amino acid sequence
Envelope	1	AILTALRL
Envelope	2	VKPTVYVYSRVKNL
Membrane	3	MESELVIGAVIIRG
Membrane	4	SRTLSYYKLGASQR
Nucleocapsid	5	KQPTVTLLPAADMD
Nucleocapsid	6	NVILLNKHIDAYKT
Spike	7	YKGYQPIDVVRDLP
Spike	8	DSEPVLKGVKLHYT
Spike	9	NFRVVPSGDVVRFP
Spike	10	TREVFAQVKQMYKT

表 2. peptide array 之對應胺基酸序列

1	NFRVPSGDVVRF
2	SMRGV YYPDEIFRSD
3	PV IPFKDGIYFA ATE
4	GNFK HLREFVFKNKD
5	VYKGY QPIDVVRDLP
6	LKPIF KLPLGININF
7	KFPSVYAW ERKKISN
8	KY RYL RHGKLRP FER
9	KRFQPFQQ FGRDVSD
10	RNT REVFAQVKQM YK
11	QILPD PLKPTKRSFI
12	RLDKVE AEVQIDRLI
13	EGKAY FPREGVFVFN
14	F KEELDKYFKN HTSP
15	IQKEIDRLNE VAKNL
16	GKYEQYIKWPWYVWL
17	DDSEPVKGV KLHYT
18	PCLKEDYQIGGYSED
19	FQSATKIIALNKRWQ
20	EGDGISTPCLKEDYQ
21	GGYSEDRHSGVKDYV
22	NKLVKDPPNVQIHTI
23	VANPAMDPIYDEPTT
24	SNKPHVLEDPCKVQH