

國立台灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文初稿

**Institute of Microbiology and Biochemistry  
College of Life Science  
National Taiwan University  
Master Thesis First Draft**

臺灣本土禽流感病毒株血液凝集素重鏈異構物分析及其

醣質表現圖譜

**Analysis on multiple isoforms and glycan profile of hemagglutinin 1  
from avian influenza viruses isolated in Taiwan.**



**Ting-Fang Lo**

指導教授：莊榮輝 博士

王金和 博士

**Advisor: Rong-Huay Juang, Ph.D.  
Ching-Ho Wang, Ph.D**

中華民國九十八年六月

**June, 2009**



# 謝誌

感謝我的父親羅銀煌、母親蔡雪玉的養育及栽培，從小給予我良好的教育環境，讓我有機會繼續進修學習，走我想走的路。感謝我的姐姐庭萱和弟弟庭甫，陪我分享生活的點點滴滴，一起成長。

感謝我的指導教授莊榮輝老師，提供我良好的學習環境、自由的研究空間，讓我在短短的兩年內，學到了很多很多。也很感謝莊老師在科學精神方面的教導，對科學要有熱忱，要為了“全世界我第一個知道”的實驗結果而興奮並努力；「實驗技術再怎麼發達，科學研究最重要的還是人腦！」，老師的這句話，我會謹記在心，時時刻刻思考並修正自己的研究方向。

感謝我的共同指導教授王金和老師，教導我禽流感研究所需的知識，一起討論研究方向及如何撰寫研究論文，並提供我充足的病毒樣本，讓研究得以順利進行。

感謝中研院生化所陳水田老師，從碩二開始，幫助我進行醣質研究。陳老師每周一次的書報討論及進度報告，讓我學習到很多專業知識，也見識到了老師嚴謹及腳踏實地的研究態度，而短短一年所受到的訓練，也讓我受益良多。

感謝中國醫藥研究所盧美光老師，幫助我進行全醣分析，熱心教導我如何水解醣類並操作 HPAEC-PAD。也感謝中研院基因體中心楊文彬老師，提供 HPAEC-PAD 相關之儀器設備。感謝楊健志老師教導我使用 Discovery Studio。

感謝莊老師實驗室的夥伴們：信傑學長、杰龍學長、皮蛋學姊、玉米學姊、和成學長、福氣蓋學長、雨亭學姊、之儀、毓庭、惠敏、瑩貞、怡君、迺茵、阿金，給予我研究及生活上之幫助。感謝王老師實驗室的怡彤，辛苦的進行病毒繁殖，提供我充足的樣本。感謝陳老師實驗室的夥伴們，尤其是帶著我進行醣質圖譜分析的顯裕學長，總是忙裡抽空，耐心教導我相關的知識和技能。感謝楊文彬老師實驗室的瑋婷學姊，幫助我操作使用 HPAEC-PAD。

短短兩年的碩士生涯，感受到了臺大這所學校自由開放的學風，也因此接觸到廣泛的人群，受到了無數人們的幫助，如今完成碩士論文，我會滿懷感激，謹記各位師長的教誨，邁向人生的下一個歷程。



# 目錄

中文摘要.....	iv
英文摘要.....	v
<b>第一章 緒論.....</b>	<b>1</b>
1.1 簡介禽流感病毒.....	1
1.1.1 歷史背景.....	1
1.1.2 流感病毒之構造與型態.....	2
1.1.3 流感病毒之基因體.....	4
1.1.4 流感病毒蛋白質功能簡介.....	5
1.1.5 流感病毒生活史.....	6
1.2 血液凝集素 (hemagglutinin, HA).....	9
1.2.1 HA 之結構與功能.....	9
1.2.2 HA 之受體結合區 (receptor binding sites).....	9
1.2.3 HA 與致病力之關係.....	9
1.2.4 HA 之醣質與致病力之關係.....	10
1.3 研究動機與目的.....	13
<b>第二章 材料與方法.....</b>	<b>14</b>
2.1 禽流感病毒樣本處理方法.....	14
2.1.1 病毒增殖.....	14
2.1.2 濃縮與純化.....	15
2.1.3 病毒蛋白質定量.....	16
2.2 一般電泳檢定法.....	16
2.2.1 SDS 膠體電泳.....	16
2.2.2 膠體染色法 - CBR 染色.....	18
2.2.3 膠體染色法 - 銀染.....	19
2.2.4 蛋白質電泳轉印法.....	20
2.2.5 轉印膜 Ponceau S 染色法.....	20
2.3 免疫染色法.....	21
2.4 凝集素染色法 (lectin blot).....	22
2.5 醣晶片.....	23
2.6 二次元膠體電泳.....	24
2.6.1 脫鹽及溶解.....	24
2.6.2 第一維等電點聚焦.....	24

2.6.3	第二維 15% SDS-PAGE 膠體電泳.....	25
2.7	酶切實驗.....	26
2.7.1	鹼性磷酸酶之去磷酸化.....	26
2.7.2	神經胺酸水解酶水解唾液酸.....	26
2.8	使用高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 配合脈衝式安培法偵測器 (PAD) 分析唾液酸.....	27
2.8.1	弱酸水解釋放唾液酸.....	27
2.8.2	使用 HPAEC-PAD 分析唾液酸亞型.....	27
2.9	蛋白質身份鑑定.....	28
2.9.1	膠體內蛋白質水解.....	28
2.9.2	以質譜儀鑑定蛋白質點身分.....	30
2.10	高效能層析儀 (HPLC) 配合螢光偵測器分析 N-醣質.....	30
2.10.1	醣質之膠內蛋白質水解釋放及螢光標定.....	30
2.10.2	使用 HPLC 分析 N-glycans.....	31
2.11	質譜儀醣質定序.....	31
2.11.1	從蛋白質上釋放並純化 N-glycans.....	31
2.11.2	N-glycans 之泛甲基化.....	32
2.11.3	以質譜儀分析 N-glycans.....	33
<b>第三章</b>	<b>結果.....</b>	<b>34</b>
3.1	比較非毒性與毒性禽流感病毒株之間蛋白質體的差異.....	36
3.1.1	兩株 2838 禽流感病毒二次元圖譜之比較.....	36
3.1.2	血液凝集素重鏈 (HA1) 為兩禽流感病毒株蛋白質圖譜上差異最大之蛋白質.....	36
3.1.3	非毒性與毒性 AIV 之 HA1 皆有 6 種不同異構物.....	37
3.2	探究紅血球凝集素 1 (HA1) 有 6 種不同等電點異構物之原因.....	41
3.2.1	預測血液凝集素 1 (HA1) 之蛋白質轉譯後修飾.....	41
3.2.2	實驗設計.....	41
3.3	不同等電點異構物之紅血球凝集素 1 (HA1) 並非蛋白質磷酸化所造成.....	44
3.3.1	以鹼性磷酸酶處理禽流感病毒株並進行二次元電泳.....	44
3.3.2	以抗磷酸抗體進行二次元電泳之免疫染色.....	44
3.4	不同等電點異構物之紅血球凝集素 1 (HA1) 可能是由其醣質之唾液酸修飾所造成.....	47
3.4.1	以神經胺酸水解酶處理禽流感病毒株並進行二次元電泳.....	47
3.4.2	以凝集素染色法 (lectin blot) 發現 HA1 之醣質可能有 $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸.....	47
3.4.3	以高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 配合脈衝式安培法偵測器 (PAD) 分析 HA1 醣基之唾液酸.....	48

3.4.4	以凝集素染色法分析經唾液酸酶水解後之 HA1.....	48
3.5	紅血球凝集素 (HA1) 之醣質表現圖譜.....	54
3.5.1	使用醣晶片分析 HA1 之醣質.....	54
3.5.2	使用 HPLC 配合螢光偵測器分析 HA1 之醣質.....	54
3.5.3	以 MALDI-TOF/TOF MS 及 MS/MS 研究 HA1 之醣質表現圖譜.....	54
<b>第四章</b>	<b>討論.....</b>	<b>66</b>
4.1	探討非毒性及毒性病毒株之間 HA1 等電點之差異，及其各自形成 6 種等電點異構物之生理意義.....	66
4.2	HA1 之醣基化位置與其功能探討.....	66
4.3	除了醣基化外，蛋白質骨架本身及其它蛋白質轉譯後修飾亦可能造成 HA1 異構物.....	67
4.4	m/z 1867 之 X-glycan 尙未被報導過.....	67
4.5	X-glycan 與 HA1 等電點異構物可能之兩種關係.....	67
<b>第五章</b>	<b>結論.....</b>	<b>70</b>
<b>第六章</b>	<b>參考文獻.....</b>	<b>71</b>



## 中文摘要

許多低病原性禽類流感病毒 (avian influenza viruses, AIV) 已於臺灣本土農場分離出來，然而這些病毒蛋白質體之改變與毒性之關係尚未被研究清楚。在本研究中，使用二次元電泳 (2-DE) 並配合專一性之凝集素 (specific lectins) 分析比較，來自同一 H6N1 族群，但卻表現不同毒性程度之兩株 AIV：非毒性病毒株 (2838N) 及毒性病毒株 (2838V)。比較兩病毒株之二次元蛋白質圖譜發現，血液凝集素 1 (hemagglutinin, HA) 為差異最大之蛋白質，且兩株 AIV 之 HA1 皆有分子量相近，但等電點迥異之 6 種異構物。本研究發現，HA1 這些異構物形成之原因，並非因於蛋白質磷酸化，亦非 HA1 醣質之唾液酸修飾 (sialylation)。另外，我們使用介質輔助雷射脫附離子化質譜儀 (MALDI MS and MS/MS) 建構 HA1 各異構物之醣質圖譜。比較 HA1 各異構物之醣質表現圖譜發現，等電點越低之 HA1 異構物其 m/z 1867 之 X-醣質比例越高。而血液凝集素主要功能為辨識並和宿主之唾液酸受體結合，因此 HA1 本身特別之醣基化可能會影響 AIV 之宿主辨識，亦可能和病毒之組織趨性及免疫逃脫有關。



## 英文摘要

Several low pathogenic avian influenza viruses (AIV) had been isolated in local farms. However, the relationship between the protein change and the virulence of these AIV was not clear. In this study, two variants from a single H6N1 population with different virulence levels, the non-virulent strain (2838N) and the virulent strain (2838V), were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and then identified with specific lectins. Comparisons of the 2-DE patterns of these two strains showed major difference in hemagglutinin 1 (HA1) which contained six isoforms with similar molecular mass but showing variant isoelectric points (pI). We found that the difference in pI values was not due to either of phosphorylation and sialylation on HA1. In addition, we performed MALDI mass spectrometry (MS and MS/MS)-based glycomic profile analyses for the N-glycans of the HA1 isoforms. The results showed that the isoform with lower pI contained more m/z 1867 X-glycan. One of the major functions for hemagglutinin is the recognition and binding of sialic acid-containing receptors on the target cell. It is possible that the special glycosylation of HA1 might have effects on host recognition, as well as tissue tropism or immune escape.



# 第一章 緒論

## 1.1 簡介禽流感病毒

### 1.1.1 歷史背景

家禽流行性感冒 (avian influenza) 之歷史，要追溯回 1878 年之北義大利，由 Perroncito 首次報導雞群爆發之嚴重疾病，當時稱為雞瘟 (fowl plague)。最初雞瘟和家禽霍亂 (fowl cholera) 產生混淆，但很快的於 1880 年 Rivolta 和 Delprato 發現雞瘟之臨床和病理，都和家禽霍亂有很大之差異，因此重新命名為 *Typhus exudatious gallinarum*。雖然於 1901 年 Centanni 和 Savonuzzi 已認為此雞瘟是由濾過性病毒所致，但直到 1955 年才由 Schäfer 研究得知，是由 A 型流行性感冒病毒 (influenza A viruses) 所致。而 1878 年雞瘟 (fowl plague) 此名稱，也於第一屆禽流感國際研討會中 (International Symposium on Avian Influenza)，正式更名為高病原性家禽流行性感冒 (highly pathogenic avian influenza, HPAI)<sup>1</sup>。

家禽流行性感冒，是由禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 所引起的動物傳染病，通常只感染鳥禽類，少見情況會感染豬。禽流感病毒高度針對特定之物種，但在罕有之情況下會跨越種間障礙感染人類。禽流感病毒屬正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 之 A 型流行性感冒病毒，依據血液凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經氨酸酶 (neuraminidase, NA) 二個表面蛋白可區分 16 種 HA 亞型及 9 種 NA 亞型。而 A 型流行性感冒病毒，對於野生鳥類寄主，一般不會出現任何反應，並能與其寄主達至平衡共生<sup>2,3</sup>。而低病原性禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza, LPAIV) 從野生雀鳥傳至到家禽雀鳥，可能會出現一些輕微受感染徵兆，而此現象也輔助了病毒之變異。而病毒遺傳因子變異，除了適應新種寄主外，也會加速變異為高病原性禽流感病毒。

全球流行之人類流行性感冒，最初為 1918 年爆發之西班牙流行性感冒 (Spanish flu)，接著是 1957 年亞洲流行性感冒 (Asian flu) 及 1968 年香港流行性感冒 (Hong Kong flu)<sup>4</sup>。研究顯示 1918 年人類流行性感冒之基因，可能來自於禽類流感病毒<sup>5</sup>，1957 年之流感，懷疑為野鴨病毒之 PB1、HA 和 NA 三段基因與人類 H2N2 病毒產生基因重組所致；1968 年之香港流感亦發現為野鴨病毒之 PB1 和 HA 與人類 H2N2 病毒產生基因重組所致<sup>6</sup>。人類之全球性流感與禽流感之間緊緊相扣，而禽流感成為全球關注之焦點，是因為 1997 年於香港，出現可感染人類之高病原性禽流感病毒 H5N1，其後更傳至東南亞一帶，其死亡率高達 6 成。

而此 H5N1 病毒跨越剛間傳染屏障，可直接由禽鳥類傳至哺乳類（如貓、豬及人類）<sup>7,8</sup>，因此在病毒持續快速的演化變異之當下，禽流感病毒之基礎科學、公共衛生、疫苗開發及治療方法成爲十分迫切之研究。

### 1.1.2 流感病毒之構造與型態

禽流感病毒在電子顯微鏡下呈現球狀或絲狀，球狀之直徑在 80 至 120 nm 之間，絲狀流感病毒的長度可達 400 nm。流感病毒結構自外而內可分爲套膜、基質蛋白以及核心三部分，圖 1.1<sup>9</sup>。

#### 套膜 (envelope)

套膜爲包裹在病毒顆粒之基質蛋白外之一層磷脂雙分子層膜 (phospholipid bilayer)，這層膜來自於宿主的細胞膜，成熟之流感病毒由宿主細胞出芽，將宿主之細胞膜包裹於病毒本身脫離細胞，接著即可去感染下一個目標。另外，套膜有兩種嵌入之醣蛋白：血液凝集素和神經胺酸酶，這兩類蛋白質突出病毒體外，長度約爲 10 nm 至 40 nm，被稱作棘突蛋白質 (spike protein)。通常一個流感病毒顆粒會有 500 個血液凝集素和 100 個神經胺酸酶棘突，而穿膜之離子通道蛋白質 M2 約有 16 ~ 67 個<sup>10,11</sup>。

#### 基質蛋白 (matrix protein)

基質蛋白分爲兩種，第一種爲構成病毒外殼骨架之基質蛋白 1 (matrix protein 1, M1)，M1 蛋白質與細胞之套膜內壁緊密結合，有保護病毒核心及維繫病毒空間結構之功能；第二種基質蛋白爲前段提到之基質蛋白 2 (matrix protein 2, M2)，M2 爲穿膜之質子通道蛋白質 (proton channel)。

#### 核心 (core)

病毒之核心包含了存貯病毒遺傳訊息之 8 段單股負鏈 RNA，此 8 段 RNA 會和核殼蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 密集纏繞形成 8 個病毒核醣核蛋白 (vRNP)。另外，病毒核心亦包括轉錄這些遺傳訊息所必須之 RNA 聚合酶 (RNA polymerase)。

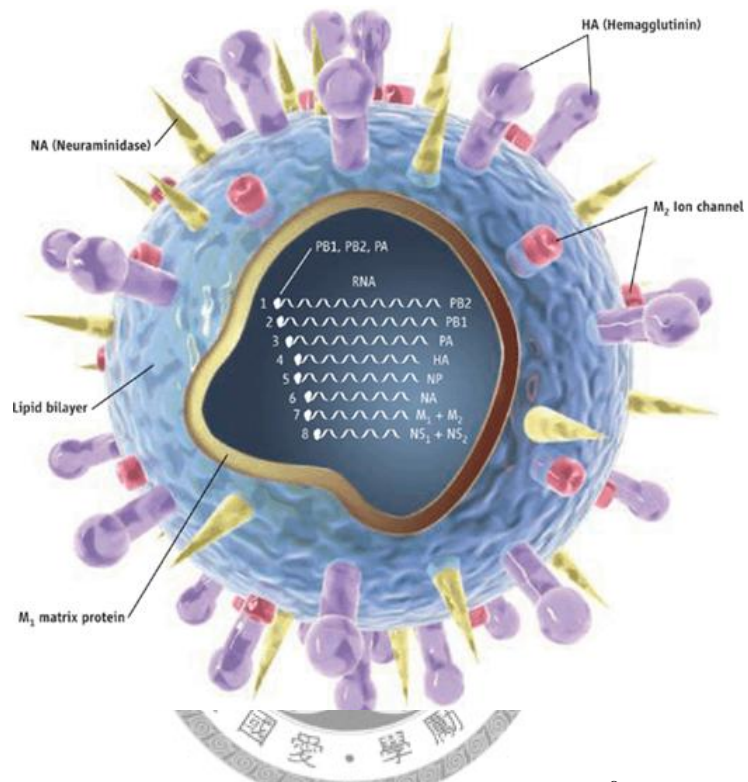


圖 1.1 A 型流行性感冒病毒圖解<sup>9</sup>

Figure 1.1 Structural diagram of the influenza A virus<sup>9</sup>

### 1.1.3 流感病毒之基因體

A 型流感病毒的基因體由 8 段單股負鏈 RNA 所組成，第 1、2、3 個節段編碼三種 RNA 聚合酶：PB2、PB1 和 PA；第 4 個節段編碼血液凝集素；第 5 節段編碼核殼蛋白；第 6 個節段編碼神經胺酸酶；第 7 節段編碼基質蛋白 (M1, M2)；第 8 個節段編碼非結構性蛋白質 (NS1, NS2)<sup>12</sup>。此 8 段 RNA 會和核殼蛋白密集纏繞，並和 PB2、PB1 和 PA 組成之聚合酶異構三聚體 (heterotrimeric polymerase complex) 結合形成 8 個病毒核糖核蛋白，如圖 1.2<sup>13</sup>。

病毒之 8 段基因共轉錄出 10 種蛋白質，其中有 9 種蛋白質包含於病毒顆粒中，而和 mRNA 剪切 (splicing) 相關之 NS1 蛋白質則不存在於病毒顆粒內。此外，8 段基因中，有 6 段分別轉譯出一種蛋白質；而第 7、8 兩段基因，因為分別有兩個開放讀架 (open reading frames)，因此各轉錄出兩種蛋白質 M1、M2 和 NS1、NS2<sup>14</sup>。近年來新發現第 11 種蛋白質 PB1-F2，此為 PB1 基因之開放讀架有選擇性讀架 (alternative reading frame) 所致<sup>15</sup>。

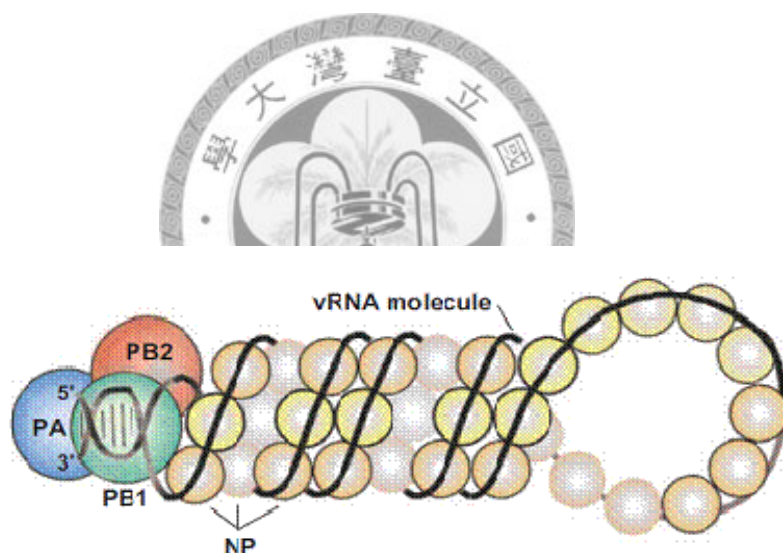


圖 1.2 流行性感冒病毒核糖核蛋白 (RNP) 組織之圖示模型<sup>13</sup>

Figure 1.2 Schematic model of RNP organization<sup>13</sup>

## 1.1.4 流感病毒蛋白質功能簡介

### (1) RNA 聚合酶 (RNA polymerase)

於 8 段遺傳序列中，最長之三段 RNA 負責編碼三種不同之 RNA 聚合酶，PB2、PB1 和 PA，而此三種聚合酶會組成異構三聚體，如圖 1.2<sup>13</sup>，其功能為在宿主細胞內轉錄並複製病毒 RNA。此三種聚合酶皆為依賴於 RNA 之 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase)，其中 PB2 辨識並竊取宿主 mRNA 之 5' 端帽 (cap)，作為引子 (primer)；PB1 負責延長由 PB2 啓始轉錄之 RNA，且 PB1 有內切酶之功能。而目前已已知 PA 擁有蛋白酶 (protease) 之活性<sup>16-18</sup>。另外，近年來發現之 PB1-F2 則和誘發細胞凋亡 (pro-apoptotic) 相關<sup>15</sup>。

### (2) 核殼蛋白 (nucleocapsid protein, NP)

核殼蛋白是一種與 RNA 結合之蛋白質 (RNA binding protein)，其與 RNA 密集纏繞形成 8 個病毒核糖核蛋白，並調節 nuclear import<sup>18-20</sup>。

### (3) 血液凝集素 (hemagglutinin, HA)

血液凝集素為三聚體糖蛋白，能與人、鳥、豬，及豚鼠等動物之紅血球表面的受體結合，引起凝血，因此被稱為血液凝集素。原態之血液凝集素 (HA0) 經蛋白質水解切割後，會分為重鏈 (HA1) 和輕鏈 (HA2) 兩部分，HA1 可以與宿主細胞膜上之唾液酸受體結合，後者則可以協助病毒套膜與宿主細胞膜相互融合。血液凝集素在病毒進入宿主細胞的過程中扮演了重要角色<sup>21</sup>。另外，血液凝集素具有免疫原性，為流感病毒最主要之抗原。

### (4) 神經胺酸酶 (neuraminidase, NA)

神經氨酸酶為四聚體糖蛋白，具有水解唾液酸 (sialic acid) 之活性，當成熟之流感病毒，以出芽的方式脫離宿主細胞後，病毒表面的血液凝集素 (HA) 依舊會經由唾液酸與宿主之細胞膜聯繫，因此需要由神經氨酸酶，將唾液酸水解，切斷病毒與宿主細胞之最後聯繫<sup>22</sup>。

### (5) 基質蛋白 (matrix protein)

基質蛋白分為兩種，第一種為構成病毒外殼骨架之 M1，其與細胞之套膜內壁緊密結合，有保護病毒核心及維繫病毒空間結構之功能。此外，M1 亦會和 vRNP 產生交互作用，調控 RNA nuclear export，並會參與病毒之出芽<sup>20</sup>。第二種基質蛋白為 M2，其為穿膜之質子通道蛋白質，和病毒脫去外殼 (uncoating) 及組裝 (assembly) 有關<sup>23</sup>。

### (6) 非結構性蛋白質 (nonstructural protein, NS)

非結構性蛋白質分為兩種，第一種為 NS1，其大量存在於宿主細胞內，但不在

病毒顆粒中，其主要之功能有調控宿主基因表現，及抑制宿主之干擾素對抗病毒<sup>24</sup>。第二種非結構性蛋白質為 NS2 亦稱為 NEP (nuclear export protein)，顧名思義，其主要功能與 RNA 之 nuclear export 相關<sup>20,25</sup>。

### 1.1.5 流感病毒生活史

流感病毒之生活史如圖 1.3 所示<sup>14</sup>。

#### (1) 病毒吸附宿主細胞 (virus attachment)

流感病毒之血液凝集素，會辨識宿主細胞上之唾液酸並與之結合吸附宿主細胞，一般來說，禽流感病毒之 HA 會與唾液酸  $\alpha$ -2,3-半乳糖鍵結之唾液酸結合；人類流感病毒之 HA 會與唾液酸  $\alpha$ -2,6-半乳糖鍵結之唾液酸結合<sup>26,27</sup>。

#### (2) 病毒進入宿主細胞 (virus entry)

病毒吸附後，主要以依賴 clathrin 型受體媒介內吞作用 (clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis) 進入宿主細胞。然而有少許流感病毒利用別種方式進入細胞<sup>28,29</sup>。

#### (3) 合成病毒 RNA (synthesis of viral RNA)

##### (3a) vRNPs 脫殼並進入宿主細胞核中

當病毒顆粒被吞嚥進入吞嚥體 (endosome) 時，病毒顆粒上少數之 M2 質子通道蛋白質，可以使吞嚥體內之酸性物質進入病毒顆粒，擾亂 M1 及 vRNP 之交互作用，並以酸催化的方式使 HA 進行構形重組，幫助 vRNPs 脫殼 (uncoating)。接著，吞嚥體和病毒之膜融合，使 8 組 vRNPs 進入細胞質中。而纏繞住 vRNA 之 NP 帶有細胞核定位訊號 nuclear localization signal (NLS)，因此可將 vRNPs 運送至宿主細胞核內<sup>30</sup>。

##### (3b) 製造病毒之 mRNA (vmRNA Production)

宿主細胞內，主要有三型病毒 RNA，第一為正向之病毒 mRNA (vmRNA)；第二為負向之 genomic RNA (vRNA)，第三種為正向之互補 RNA (complementary RNA, cRNA)。vmRNA 有由宿主竊取來之 5' 端帽及 3' 端多腺嘌呤尾<sup>31-34</sup>。而聚合酶異構三聚體製造完成之 vmRNA 會經由核孔運送出細胞核，進入細胞質中<sup>30</sup>。

##### (3c) 複製病毒基因體 (viral genome replication)

病毒基因體由聚合酶異構三聚體複製，其包含合成全長之 vRNA 及 cRNA。以 cRNA 作為轉譯 vRNA 之模板，新合成之 vRNA 則可再轉譯出更多之 vmRNA 以及 cRNA。



#### **(4) 合成病毒蛋白質 (synthesis of viral proteins)**

##### **(4a) 核殼蛋白 (NP)、非結構性蛋白 (NS)、基質蛋白 (M)，與 RNA 聚合酶之合成**

當病毒感染宿主後，宿主細胞之蛋白質合成速度會下降<sup>35</sup>，而由細胞核中運送出之 vmRNA 得以藉由宿主之核糖體 (ribosome) 以最快之速率進行病毒蛋白之合成。新合成之 NP、M，及 NS 蛋白質被運送回細胞核中後，會參與 M 及 NS 之 mRNA 剪切 (splicing)、轉錄及基因體之複製。

##### **(4b) 合成套膜蛋白質 (envelope protein production)**

經核糖體轉譯出之 M2、HA 及 NA 三種套膜蛋白質，會進入內質網 (ER) 進行醣基化修飾，並進入高基氏體 (Golgi apparatus)，接著會移動至宿主細胞膜之病毒出芽頂端 (apical)。

##### **(5) 包裹 RNA (packaging of RNA) 並運送出宿主細胞核**

首先，PB2、PB1、NP 及 NS2 蛋白質結合上 vRNA 並形成 vRNP，接著 M1 結合上 vRNP，形成 M1-vRNP 複合體，並催化 vRNP 出細胞核，進入細胞質內，而此出核之反應是由 M1、NS2 及 NP 共同完成<sup>36</sup>，而和 M1 聯繫在一起之 vRNP，無法再次進入細胞核中。

##### **(6) 病毒出芽與釋出 (virus budding and release)**

M2、HA 及 NA 三種套膜蛋白質，移動至宿主細胞膜後，其細胞體漿尾 (cytoplasmic tail) 會和 M1-vRNP 複合體產生交互作用，並於組裝位置 (assembly site) 出芽 (budding)。當病毒出芽完成後，HA 依舊會和宿主細胞膜上之唾液酸受體結合，而 NA 則會酶切此唾液酸，由宿主細胞釋出病毒顆粒<sup>22</sup>。

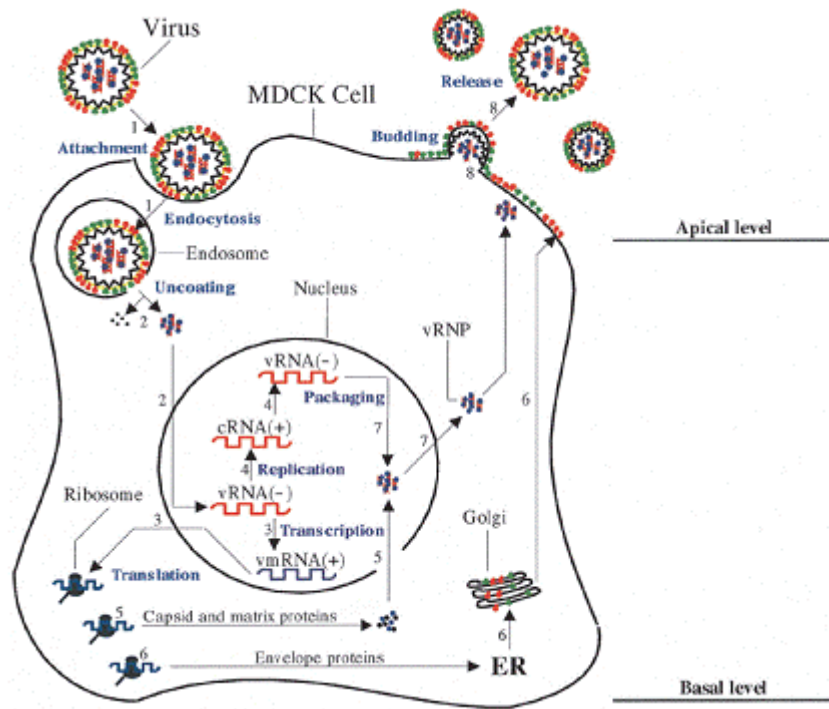


圖 1.3 A 型流感病毒之複製生活史<sup>14</sup>

Figure 1.3 Replication cycle of influenza A virus<sup>14</sup>

## 1.2 血液凝集素 (hemagglutinin, HA)

### 1.2.1 HA 之結構與功能

血液凝集素之結構為同質三聚體 (homotrimer)，各單體主要分為兩個功能區塊：球狀功能區塊 (globular domain) 與莖狀功能區塊 (stem domain)，如圖 1.4 a 所示。原態之血液凝集素 (HA0) 之剪切位 (cleavage site) 經蛋白質水解切割後，會分為重鏈 (HA1) 和輕鏈 (HA2) 兩部分，其中 HA1 包含頂端球狀頭部及部分莖狀主幹；HA2 則形成莖狀主幹，如圖 1.4 b 所示，而 HA1 之功能主要為可以與宿主細胞膜上之唾液酸受體結合<sup>37</sup>，吸附宿主細胞；HA2 則可以協助病毒套膜與宿主細胞膜相互融合。

### 1.2.2 HA 之受體結合區 (receptor binding sites)

HA 之受體結合區域，位於頂端之球狀功能區塊，而其球狀頭部有輕微凹陷 (圖 1.4 c)，使宿主表面醣蛋白 (glycoprotein) 及醣脂質 (glycolipid) 之唾液酸受體，可進入 HA 之頭部凹陷，形成鎖與鑰匙 (lock and key) 之結合<sup>37,38</sup>。而此頭部凹陷是由構成三角形之 loop-helix-loop 之蛋白質二級結構，與唾液酸受體結合 (圖 1.4 d)<sup>38</sup>。各種流行性感冒病毒其 HA 之受體結合區域之不同，會導致病毒感染之特異性，一般來說，禽流感病毒之 HA1 會與唾液酸  $\alpha$ -2,3-半乳糖鍵結之唾液酸結合；人類流感病毒之 HA1 則與唾液酸  $\alpha$ -2,6-半乳糖鍵結之唾液酸結合<sup>37</sup>。

### 1.2.3 HA 與致病力之關係

#### (1) HA 造成宿主專一性

血液凝集素與宿主之唾液酸結合，為流感病毒感染宿主的第一步，而 1.2.2 節提及之 HA 受體結合區之不同，直接造成了 HA 感染宿主之專一性，也造就了種間感染屏障 (species barrier)。研究發現，感染禽類之 HA1 會與唾液酸  $\alpha$ -2,3-半乳糖鍵結之唾液酸結合；感染人類之 HA1 會與唾液酸  $\alpha$ -2,6-半乳糖鍵結之唾液酸結合<sup>39-41</sup>。

流感病毒是經由呼吸道感染人類及豬，但卻以腸道感染禽類。經研究發現位於人類之深層呼吸道，如肺部，擁有豐富 HA 禽類型受體 ( $\alpha$ -2,3-半乳糖鍵結之唾液酸)，而禽類腸道亦擁有 HA 人類型受體 ( $\alpha$ -2,6-半乳糖鍵結之唾液酸)，而豬之呼吸道則同時擁有 HA 人類型受體其禽類型受體<sup>42</sup>，這些發現意味著新興之流感病毒很有可能可以跨越感染之種間屏障。然而，人類上呼吸道分泌之黏蛋白擁有大量 HA 禽類型受體<sup>26</sup>，可和大部分禽流感病毒結合，預防禽類型流感病毒進入擁有禽類型受體之肺部，進而感染給人類。

#### (2) HA 快速突變演化

##### (2a) 抗原飄變 (antigenic drift)

宿主之免疫系統，為了避免病毒於體內擴大感染，會產生抗 HA 之抗體

(anti-HA antibodies) 中和病毒，但流感病毒之 RNA 聚合酶缺乏校正功能，容易造成點突變 (point mutation)，產生抗原飄變之現象，抗原飄變後之 HA 無法被原先之抗體中和，病毒逃脫宿主免疫系統後，即可感染宿主其他細胞或其他宿主，並有潛力成爲新興病毒造成疫情。研究發現，1968 年香港流感病毒之基因截至 1999 年，每年平均藉由抗原飄變產生 3.5 個胺基酸突變，且其中超過半數爲 HA 之抗原飄變<sup>43</sup>。

### (2b) 抗原移變 (antigenic shift)

來自不同病毒株之 8 段 RNA，於宿主內基因重組 (gene reassortment) 後，會形成新的病毒亞型，此種現象稱爲抗原移變。人類史上之流行性感冒疫情，多來自於禽類與人類病毒之抗原移變，如 1957 年之亞洲流感，可能是野鴨病毒之 PB1、HA 和 NA 三段基因與人類 H2N2 病毒，於中間宿主 (如豬) 產生基因重組所致；1968 年之香港流感亦發現爲野鴨病毒之 PB1 和 HA 與人類 H2N2，於中間宿主 (如豬) 產生基因重組所致，而 HA 產生抗原移變後極有可能跨越種間屏障<sup>6,44,45</sup>。

### (3) HA 蛋白質水解切位

HA 之剪切活化 (cleavage and activation) 爲感染宿主之第一步。HA 藉由宿主專一性之蛋白酶切割爲重鏈 (HA1) 和輕鏈 (HA2) 兩部分，始具有感染能力，而此切割也造就了病毒感染之組織趨性 (tissue tropism) 及致病力。研究發現高病原性禽流感病毒 HA 之蛋白質水解切位，具有多個鹼性胺基酸，而低病原性禽流感病毒較少。亦發現，低病原性禽流感病毒 HA 之蛋白質水解切位突變爲鹼性胺基酸後，病毒之致病力會增加<sup>46</sup>。如 1993 年低病原性墨西哥 H5N2 禽流感病毒，其 HA 蛋白質切位爲 R-E-T-R，而將其切位插入鹼性胺基酸形成 R-K-R-K-T-R 後，即轉變爲高病原性禽流感病毒<sup>47</sup>。而雖然 HA 之切割爲流感病毒感染力之主因，但致病力高低則不完全受此限制<sup>48,49</sup>。

## 1.2.4 HA 之醣質與致病力之關係

### (1) HA 醣基化與功能

流感病毒所有之 HA 皆有不同程度之 N-醣基化，而高度保留之醣基於不同病毒株及不同病毒亞型之間並不常見<sup>50</sup>。研究各種病毒株發現，HA 之醣基化位置有 5 至 11 個，且大部分之醣基化位於 HA 之頭部球狀功能區塊<sup>51</sup>。而 HA 依賴於平衡之醣基化 (balance of glycosylation) 進行合適之蛋白質折疊 (folding)、病毒受體交互作用，和有效之病毒釋放<sup>52</sup>。

### (2) HA 醣基化影響病毒與宿主結合之能力

研究發現 HA 球狀頭部之醣基化，會減少病毒與宿主之結合力，例如：HA 之 158 號胺基酸若有醣基化修飾，則其與受體之親和力下降<sup>53,54</sup>；而於試管實驗增加 H3N2 病毒株 HA 球狀頭部之醣類，亦會減少病毒與受體之結合力，但不會影響到 HA 之融合能力<sup>55</sup>。

相反的，研究發現 HA 位於受體結合位附近之醣基，在病毒之複製與釋放上扮演了決定性的角色<sup>56</sup>，因為這些醣基調控了 HA 與受體結合之親和力 (binding affinity)，並控制 HA1 結合受體之專一性<sup>57</sup>。

### (3) HA 醣基化與宿主之免疫反應

HA 球狀功能區之醣質可遮蔽宿主免疫系統辨識之抗原位置，進而從宿主免疫系統逃脫。而 HA 亦可藉由抗原移變 (antigenic shift) 產生新的醣基化位置，遮蔽抗原決定位置，從宿主免疫系統逃脫<sup>55</sup>。

### (4) HA 醣基化與蛋白質水解切位

HA 藉由宿主專一性之蛋白酶切割為重鏈 (HA1) 和輕鏈 (HA2) 兩部分，始具有感染能力。研究發現 HA 之醣基化會遮蔽蛋白質水解位置，因此蛋白酶只能在蛋白質水解切位沒有被醣質遮蔽的狀態下作用<sup>58,59</sup>。



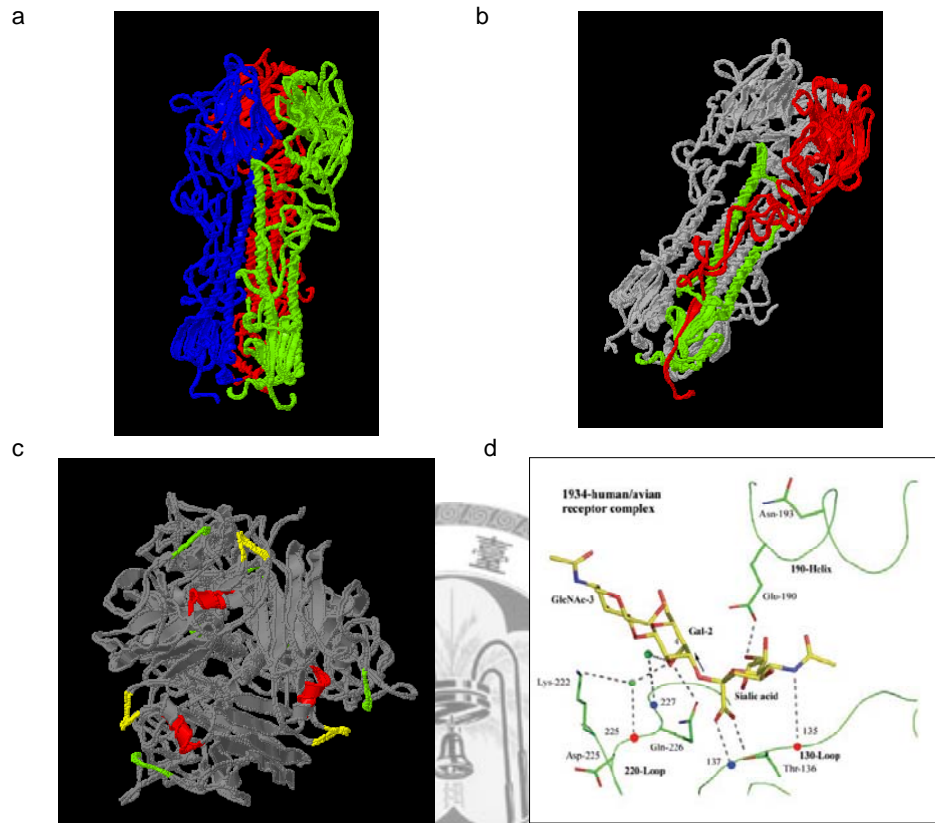


圖 1.4 血液凝集素之結構及受體結合區

本圖 a-c 使用 PDB ID 為 1HGD 之 HA<sup>60</sup>。

- a. HA 由同三聚體組成。
- b. HA 單體可分為 HA1 (紅色) 及 HA2 (綠色)。
- c. 俯視 HA 可發現球狀頭部受體結合區有輕微凹陷。
- d. 唾液酸受體與 HA 頭部功能區塊之結合<sup>38</sup>。

**Figure 1.4 Structure and receptor binding site of hemagglutinin**

(a-c) Hemagglutinin from PDB ID 1HGD<sup>60</sup>

- a. HA is a homotrimer.
- b. HA monomer contains HA1 (red) and HA2 (green) domains.
- c. The binding sites (colors) on HA.
- d. Sialic acid and receptor binding site<sup>38</sup>

### 1.3 研究動機與目的

1986 年至 2003 年間臺灣陸續分離到 H6N1 及 H7N1 等多株弱毒性型家禽流行性感冒病毒，而在 2004 年間統計有 22 間養禽場之 38 萬隻雞因發現弱毒性 H5N2 禽流感病毒潛藏而遭致撲殺。此表示目前臺灣已有 H5 和 H6 亞型禽流感感染之情況，為瞭解目前於臺灣廣泛流行之 H6N1 禽流感病毒其蛋白質與毒力之間之關係，本論文研究 2000 年臺大獸醫系王金和老師實驗室分離出之台灣本土 H6N1 禽流感病毒株 (A/Chicken/Taiwan/2838/00)，而 2838 病毒株經由病毒的毒性強弱，又可分為兩種亞型，非毒性 (2838N) 及毒性 (2838V) 病毒株<sup>61</sup>。

使用二次元電泳，配合本實驗室製備之 HA 單株抗體<sup>62</sup> 進行免疫染色，分析比對兩病毒株之蛋白質體間之差異後，發現兩病毒株之 HA1 皆有 6 種不同等電點的異構物 (isoforms)。然而 HA1 有多種等電點異構物於 30 年前就已被發現，但至今尚未研究出 HA1 形成多種等電點異構物之原因<sup>63</sup>。

本論文主要目的是了解 HA1 等電點異構物 (isoforms) 形成之原因，研究 HA1 是否有被磷酸化，及 HA1 醣質是否有唾液酸化等轉譯後修飾。並利用酶切、凝集素染色法 (lectin blot) 配合醣晶片、高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC)、高效能層析儀配合螢光偵測器 (HPLC-fluorescence)、MALDI-Q-TOF MS 以及 MS/MS 建構 HA1 之醣質表現圖譜。



## 第二章 材料與方法

本論文使用臺大獸醫系王金和老師，於 2000 年分離出之台灣本土 H6N1 禽流感病毒株 (A/Chicken/Taiwan/2838/00)，此 2838 病毒株經由病毒的毒性強弱又可分為兩種亞型，非毒性 (2838N) 及毒性 (2838V) 病毒株。非毒性病毒株感染雞隻後，並不會有任何缺失；但在毒性病毒株感染後，會有腎臟缺失並死亡<sup>61,64</sup>。而在實驗室內以雞胚蛋進行增殖之 2838N 及 2838V 為本實驗主要之研究材料。

### 2.1 禽流感病毒樣本處理方法

本實驗使用之禽流感病毒，皆由臺大獸醫系王金和老師實驗室之研究生陳怡彤增殖、純化。使用無特定病源 (specific pathogen free, SPF) 雞胚蛋增殖之病毒，經 BEI (binary ethyleneimine) 將病毒不活化處理後，交由本實驗室進行樣本定量、分裝並儲存於 -80°C 冰箱。

#### 2.1.1 病毒增殖

##### 儀器設備：

照蛋器  
注射器 (Terumo, 1 mL, 25-G 5/8-in.)  
37°C 孵蛋箱  
50 mL 離心管  
鑿子  
水性填封膠

##### 藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：

NaCl (0.13 M)	(J.T.Baker)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.01 M)	(Wako)

pH 7.0，滅菌後冷卻備用。

##### 方法步驟：

- 1) 選用 9-11 日齡無特定病源 (specific-pathogen-free, SPF) 雞胚蛋，以照蛋器觀察蛋鈍端，於氣室邊緣選擇避開血管處標記。
- 2) 以碘液擦拭標記處，使用鑿子鑽一個小洞，以利接種。
- 3) 將病毒液以滅菌 PBS buffer 稀釋成 10<sup>6</sup> 倍，每個蛋以注射器接種 100 μL 至尿囊腔，並以水性填封膠將小洞封住。



- 4) 將雞胚蛋置於 37°C 孵蛋器中培養，每日照蛋觀察，接種 24 小時內死亡之雞胚視為細菌污染予以丟棄。
- 5) 接種後 3 天，將雞胚蛋置於 4°C 冷藏 4 hr 後，收集尿囊液進行濃縮與純化。

### 2.1.2 濃縮與純化

#### 儀器設備：

高速離心機  
超高速離心機

#### 藥品試劑：

NET (NaCl-EDTA-Tween) buffer：

NaCl (0.15 M)	(J.T.Baker)
EDTA.2Na (5 mM)	(Merck)
Tween 20 (0.05%)	(Merck)
Tris (50 mM)	(Merck)

---

pH 8.0

TEN (Tris-EDTA saline) buffer：

NaCl (0.1 M)	(J.T.Baker)
EDTA.2Na (0.5 mM)	(Merck)
Tris (2.5 mM)	(Merck)

---

pH 8.4

Sucrose gradient solution

Sucrose (66%)	(Sigma)
TEN buffer	

---

pH 8.4，配製成 66% (w/w) stock，再依所需配製各蔗糖梯度。

BEI (binary ethyleneimine)

#### 方法步驟：

- 1) 將 2.1.1 中收集之尿囊液，於 4°C 以 3,000 rpm 離心 15 min。
- 2) 取上清液，加入 1% BEI，置於 37°C 隔夜，使病毒不活化。
- 3) 於 4°C 以 70,000 g 超高速離心 3 hr。
- 4) 去除上清液後，以原體積 1/100 之 NET buffer 回溶。
- 5) 配製 10%、20%、30%、40%、50% 之蔗糖梯度。
- 6) 將回溶液緩緩加入蔗糖梯度中，於 4°C 以 50,000 g 超高速離心 3 hr。
- 7) 以針吸取可目視之病毒層，加入 4 mL NET buffer 清洗。
- 8) 於 4°C 以 50,000 g 超高速離心 3 hr 後，視沉澱物多寡以 200 ~ 500  $\mu$ L NET buffer 回溶，置於 -80°C 保存。

### 2.1.3 病毒蛋白質定量

本實驗使用均勻懸浮之禽流感病毒，以 Bradford 法進行初步蛋白質定量。

#### 儀器設備：

- 37°C 恆溫箱 (Mettler)
- ELISA 光度計 (Dynatech Laboratories, MRX)
- 96 孔微量滴定盤 (Nunc, 269620)

#### 藥品試劑：

- Bio-Rad Protein assay dye reagent concentrate 5× (Bio-Rad, 500-0006)
- 牛血清白蛋白標準溶液 (Bio-Rad, 500-0007)

#### 方法步驟：

- 1) 配製不同濃度蛋白質標準品，濃度範圍在 0~100  $\mu\text{g/mL}$ 。
- 2) 取 50  $\mu\text{L}$  各濃度標準品及經稀釋之未知濃度樣本，依序加入 96 孔盤。
- 3) 每孔再加入 200  $\mu\text{L}$  五倍稀釋之 Protein assay dye，輕拍 96 孔盤一側，使其混合均勻。
- 4) 於 37°C 反應 10 min 後，以 ELISA 光度計讀取 570 nm 之吸光值。
- 5) 將不同濃度蛋白質標準品之 570 nm 吸光值繪成標準曲線，以內插法求得樣本蛋白質濃度。

## 2.2 一般電泳檢定法

本論文皆使用 15% SDS 膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate-PAGE)，以迷你平板直立式電泳套件進行。

### 2.2.1 SDS 膠體電泳

#### 儀器設備：

- 電泳玻璃片及鋁片 (10×8 cm 及 10×10 cm)
- 間隔條 (spacer, 0.75 mm 及 1 mm)
- 齒梳 (comb, 10 well 及 15 well)
- 鑄膠套件 (Hofer)
- 平板式垂直迷你電泳槽 (Hofer, SE-250)
- 電源供應器 (Pharmacia, EPS 301)

## 藥品試劑：

### A 液：丙烯醯胺溶液：

Acrylamide	(Sigma)	29.0	g
<i>N,N'</i> -Methylene-bis-acrylamide	(Bio-Rad)	0.8	g

加二次水至 100 mL 溶解，置於 4°C 避光儲存。

### B 液：分離膠體緩衝液 (Running buffer)：

Tris (1.5 M)	(Bioman)	45.4	g
TEMED	(Sigma)	0.9	mL

以 200 mL 的二次水溶解後，使用 HCl (J.T.Baker) 將 pH 調至 8.8，再定量至 250 mL。置於 4°C 避光儲存。

◆ TEMED：N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine

### C 液：焦集膠體緩衝液 (Stacking buffer)：

Tris (0.5 M)	(Bioman)	6	g
TEMED	(Sigma)	0.4	mL

以 80 mL 的二次水溶解後，使用 HCl 將 pH 調至 6.8，再定量至 100 mL。置於 4°C 避光儲存。

### 過硫酸銨溶液 (APS)：

Ammonium persulfate (10 %)	(Bio-Red)	100	mg
----------------------------	-----------	-----	----

取 100 mg ammonium persulfate 溶於 1 mL 二次水中，使用前新鮮配置。

### 異丙醇 (Isopropanol) (Mallinckrodt chemicals)

### SDS 電泳緩衝液 (5×)：

Tris (90 mM×5)	(Bioman)	54.5	g
EDTA-2Na (2.5 mM×5)	(J.T.Baker)	4.7	g
Boric acid (80 mM×5)	(RDH)	24.8	g

加二次水 800 mL 溶解，以 HCl 將 pH 調至 8.4，定量至 1,000 mL。使用時稀釋 5 倍，加入 10% SDS，使得最終濃度為 0.1% SDS，室溫保存。

### SDS 膠體電泳樣品溶液 (SDS-PAGE sample buffer, 2×)：

Tris (125 mM×2)	(Bioman)		
EDTA.2Na (2 mM×2)	(J.T.Baker)		
sodium dodecyl sulfate (2%×2)	(J.T.Baker)		
β-Mercaptoethanol (5%×2)	(Sigma)		
Bromophenol blue (0.01%×2)	(Sigma)		
Glycerol (20%)	(J.T.Baker)		

pH 6.8

10% SDS 溶液

預先染色之蛋白質分子量標準品 (prestained protein ladder) (Bioman)

## 方法步驟：

1) 利用表 2.1 鑄 15% SDS 電泳膠片

表 2.1 常用的 SDS 膠體電泳溶液之參考濃度配方

鑄膠溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4%
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
10% SDS	0.1						0.05
H <sub>2</sub> O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1

(單位：mL)

- 2) 取適量的樣品 (10  $\mu$ L/well)，加入同體積之 SDS 膠體電泳樣品溶液，混合均勻後於 100°C 中煮沸 10 min，迅速置於冰上。
- 3) 取 3  $\mu$ L 蛋白質分子量標準品注入最左側樣本槽中，並取 10  $\mu$ L 步驟 2 處理之樣品，注入各樣品槽。
- 4) 蓋上電泳槽蓋子，確認正負極裝置正確，連接電源供應器，定電壓 160 V 進行電泳。
- 5) 待追蹤染料跑出膠片外，即可停止電泳。輕輕撬起玻片切去焦集膠體部份，在分離膠體右上截角作為正反面之記號，準備進行染色或轉印。

## 2.2.2 膠體染色法 - CBR 染色 (Coomassie Brilliant Blue R-250)

儀器設備：

平台震盪器 (TKB, OS701)

染缸

藥品試劑：

CBR 染色液：

CBR	(Sigma)	1.5	g
Methanol	(Mallinckrodt chemicals)	250	mL
CH <sub>3</sub> COOH	(J.T.Baker)	50	mL

以 Methanol 溶解 CBR 後二次水定量至 250 mL，混勻過濾後使用。

CBR 脫色液：

Methanol	(Mallinckrodt chemicals)	200	mL
CH <sub>3</sub> COOH	(J.T.Baker)	100	mL

加二次水定量至 1 L。

甲醇溶液 (50%)：

Methanol	(Mallinckrodt chemicals)	500	mL
----------	--------------------------	-----	----

加二次水定量至 1 L。

方法步驟：

- 1) 取下電泳後的膠體置於染缸，CBR 染色液須完全蓋過膠體，置於平台震盪器上搖盪約 30 min。
- 2) 倒出染色液回收，並倒入脫色液完全蓋過膠體，於平台震盪器上搖盪 1 hr。
- 3) 置換新的脫色液 1 至 2 次，直至背景完全透明則脫色完成。

### 2.2.3 膠體染色法-銀染 (Silver staining)

#### 儀器設備：

平台震盪器 (TKB, OS701)

玻璃染缸

#### 藥品試劑：

##### 還原液甲：

Glutaraldehyde	(25% GR, Merck)	4	mL
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	(Nakalai)	0.8	g

以二次水定量至 100 mL。

##### 還原液乙：

0.5% Citric acid	(USB)	1	mL
Formaldehyde	(37% GR, Merck)	0.1	mL
Methanol	(Mallinckrodt chemicals)	15	mL

以二次水定量至 100 mL。

##### 硝酸銀液：

Silver nitrate	(J.T. Baker)	0.8	g
0.36% NaOH	(Merck)	21	mL
Ammonia solution	(28~30% GR, J.T.Baker)	1.4	mL

先將硝酸銀溶於 4 mL 二次水，再緩慢滴入上述二者的混合液中，邊滴邊搖晃，當全部硝酸銀液滴完時，溶液應呈現澄清。若有混濁現象須以氨水反滴定至澄清。

##### 反應終止液：

0.5% Citric acid	(USB)	10.0	mL
Ethylenediamine	(Wako)	0.1	mL

以二次水定量至 100 mL。

#### 方法步驟：

- 1) 取下電泳後的膠體置於玻璃染缸，以 50% 甲醇洗三次，每次至少 10 min，或浸泡隔夜。
- 2) 倒去甲醇，以二次水洗三次，每次 10 min。
- 3) 加入還原液甲，反應 1 h。
- 4) 倒去還原液甲，以二次水洗 3 次，每次 10 min。

- 5) 加入硝酸銀溶液，反應 15 min。
- 6) 回收硝酸銀液至廢液桶，用二次水洗 3 次，每次 10 min。
- 7) 加入還原液乙呈色。在背景顏色未加深前倒去還原液乙。
- 8) 以二次水清洗膠片，加入反應終止液終止呈色，浸泡 1 h 後乾片。

#### 2.2.4 蛋白質電泳轉印法

##### 儀器設備：

電泳轉印槽 (Hofer, TE 52) 及轉印卡夾、海綿等套件  
 電源供應器 (Pharmacia, EPS 301)  
 電磁攪拌器 (Corning PC-420D)  
 攪拌子  
 PVDF 轉印膜 (Millipore, Immobilon P)  
 濾紙 (Whatman 3 mm)

##### 藥品試劑：

轉印緩衝液 (Blotting buffer)：

CAPS (10 mM)	(J.T.Baker)	2.22 g
--------------	-------------	--------

加水 600 mL 溶解，以 NaOH 調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再定量至 1,000 mL；最後含 10% 甲醇。

預先染色之蛋白質分子量標準品 (prestained protein ladder) (Bioman)

##### 方法步驟：

- 1) 將電泳後之膠片浸於轉印緩衝液平衡 30 min。
- 2) 將疏水性 PVDF 轉印膜先以 100% 甲醇充分潤溼後，浸入轉印緩衝液中平衡至少 5 min 後使用。
- 3) 裝置膠片、轉印膜與卡夾並置入轉印槽中，並開啓攪拌器。
- 4) 固定電流以 400 mA 轉印 100 min 後終止。

#### 2.2.5 轉印膜 Ponceau S 染色法

##### 儀器設備：

染缸

##### 藥品試劑：

Ponceau S 染色液：

Ponceau S	(Sigma)	0.2 g
CH <sub>3</sub> COOH	(J.T.Baker)	10 mL

二次水定量至 250 mL，混合均勻後使用。

##### 方法步驟：

- 1) 將轉印完成的轉印膜置於染缸，倒入蓋過轉印膜的 Ponceau S 染色液。
- 2) 輕輕搖晃，使轉印膜被 Ponceau S 染色液均勻浸潤後倒去。
- 3) 以水漂洗數次，此時可見轉印膜上的蛋白質染成紅色。
- 4) 再以水清洗至所有紅色染劑消失。

## 2.3 免疫染色法

### 儀器設備：

平台震盪器 (TKB OS701)

冷光螢光影像分析系統 (UVP, AutoChemi image system)

### 藥品試劑：

#### Urea-PBST：

Urea (6 M)	(RDH)	180	g
------------	-------	-----	---

加入 200 mL PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 500 mL。

#### Gelatin-NET (NaCl-EDTA-Tween)：

Gelatin (0.25%)	(Merck)	5	g
-----------------	---------	---	---

NaCl (0.15 M)	(Bioshop)	17.5	g
---------------	-----------	------	---

EDTA.2Na (5 mM)	(J.T.Baker)	3.6	g
-----------------	-------------	-----	---

Tween 20 (0.05%)	(Plus one)	1	mL
------------------	------------	---	----

Tris (50 mM)	(Bioman)	12.1	g
--------------	----------	------	---

先以 500 mL 二次水將 gelatin 加熱溶解，然後加其他藥劑補二次水至 1,700 mL，調 Ph 至 8.0，再定量至 2,000 mL。

#### PBS (Phosphate buffer saline)：

詳見 2.1.1 節。

#### PBST (Phosphate buffer saline & Tween-20)：

將 PBS 加入 0.05% (v/v) 的 Tween-20。

#### 二次抗體 (Horse radish peroxidase-goat-anti-mouse, HRP-GAM)：

Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)	(Cappel 5556)
--	---------------

使用前以 Gelatin -NET 稀釋 4000 倍。

#### ECL 冷光基質：

ECL Western Blotting Substrate (Pierice, 32106)
---

等量 A 液與 B 液使用前新鮮配製，覆蓋過轉印膜即可。

### 方法步驟：

- 1) 轉印膜以 Uera-PBST 浸泡 30 min 並倒掉後，以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- 2) 加入 Gelatin-NET 完全蓋過轉印膜，反應 1 hr 後倒掉。
- 3) 加入以 Gelatin-NET 稀釋 3,000 倍之一次抗體，覆蓋轉印膜，室溫下反應 1 h 後倒掉。並以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- 4) 加入以 Gelatin-NET 稀釋 4,000 倍之二次抗體，室溫下反應 1 h，倒掉後以 PBST 洗 3 次，每次 10 min，最後保存在 PBS 中。
- 5) 加入 ECL 冷光基質完全蓋過轉印膜，以冷光螢光影像分析系統呈相。

## 2.4 凝集素染色法 (lectin blot)

使用 DIG Glycan Differentiation kit (Roche) 進行實驗。

### 儀器設備：

平台震盪器 (TKB OS701)

### 藥品試劑：

TBS buffer (Tris buffered saline)

Tris (0.05 M)	(Bioman)
NaCl (0.15 M)	(Bioshop)
<hr/>	
pH 7.5	

緩衝液 1 (Buffer 1)

TBS buffer	
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	(Nacalai)
MnCl <sub>2</sub> (2 mM)	(Merck)
CaCl <sub>2</sub> (2 mM)	(sigma)
<hr/>	
pH 7.5	

緩衝液 2 (Buffer 2)

Tris (0.1 M)	(Bioman)
MgCl <sub>2</sub> (0.05 M)	(Merck)
NaCl (0.1 M)	(Bioshop)
<hr/>	
pH 9.5	

DIG Glycan Differentiation kit (Roche)

1. Blocking Reagent
2. *Maackia amurensis* agglutinin (MAA)
3. *Sambucus nigra* agglutinin (SNA)
4. Anti-Digoxigenin-AP
5. NBT/BCIP solution



### 方法步驟：

- 1) 轉印膜以 Blocking Reagent 於 4°C 浸泡隔夜，倒掉後以 TBS 洗二次，每次 10 min，接著以 Buffer 1 洗 10 min。
- 2) 分別吸取 10  $\mu$ L 之 MAA 及 50  $\mu$ L 之 SNA，加入 Buffer 1，使兩種凝集素溶液體積為 10 mL。
- 3) 將凝集素溶液覆蓋轉印膜，反應 1 hr。
- 4) 倒掉凝集素溶液後，以 TBS 洗三次，每次 10 min。
- 5) 吸取 10  $\mu$ L 之 Anti-Digoxigenin-AP，加入 Buffer 1，使液體積為 10 mL。加入並覆蓋轉印膜，反應 1 hr。
- 6) 倒掉 Anti-Digoxigenin-AP 溶液後，以 TBS 洗三次，每次 10 min。
- 7) 吸取 200  $\mu$ L 之 NBT/BCIP 溶液，加入 Buffer 2，使液體積為 10 mL。
- 8) 加入 NBT/BCIP 成色液並覆蓋轉印膜，避光反應呈色，並於背景黑掉前，倒掉成色液，並以二次水清洗。

## 2.5 醣晶片

使用 Qproteome GlycoArray kit (QIAGEN) 進行實驗。

### 儀器設備：

平台震盪器 (TKB, OS701)

Qproteome GlycoArray kit

晶片掃描器 (Axon GenePix 4100A)

Qproteome GlycoArray software

### 藥品試劑：

Qproteome GlycoArray kit (QIAGEN):

blocking solution

wash solution

螢光標定之抗小鼠單株抗體 (二次抗體)

血液凝集素單株抗體 (一次抗體)

### 方法步驟：

- 1) 取將框架黏貼至醣晶片之載玻片上，並將載玻片放入培養品中。
- 2) 加入 blocking solution 搖盪反應 1 hr，到掉後，以 wash solution 洗三次，每次 5 min。
- 3) 以拭鏡紙將框架擦乾後，加入 450  $\mu$ L 之 0.2 mM 蛋白質樣本溶液，搖盪反應 1 hr，倒掉後，以 wash solution 洗三次，每次 5 min。
- 4) 以拭鏡紙將框架擦乾後，加入 450  $\mu$ L 螢光標定之二次抗體，避光搖盪反應 40 min，倒掉後，以 wash solution 洗三次，每次 5 min。

- 5) 使用 二次水清洗 1 min 後，將醣晶片風乾後。
- 6) 使用掃描器掃描晶片，並以軟體分析。

## 2.6 二次元膠體電泳

### 2.6.1 脫鹽及溶解

#### 儀器設備：

- 微量高速離心機 (Beckman, Microfuge)
- 小型真空離心機 (Thermo, SpeedVac)
- 超音波震盪器 (Branson, Sonicater)

#### 藥品試劑：

10% TCA/acetone

TCA (10%)	(RDH)	50	mL
Acetone	(J.T. Baker)	450	mL

保存於 -20°C

100% acetone (J.T. Baker)

IPG sample buffer：

Urea (6 M)	(RDH)	9	g
Thiourea (2 M)	(Amersham)	3.8	g
Triton X-100 (0.5%)	(Sigma)	0.125	mL

加水至 25 mL，每 mL 分裝一管，置 -20°C 保存，使用前解凍充份回溶，每管添加 10 mg DTT 及 5  $\mu$ L IPG buffer (pH 3~10)。

#### 方法步驟：

- 7) 取 30 ~ 120  $\mu$ g 病毒樣本，加入 1.5 mL 之 10% TCA/acetone，置於 -20°C 隔夜，沉澱蛋白質。
- 8) 於 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 min，去除上清液。
- 9) 加入 1.5 mL 之 100% acetone 震盪，並於 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 min，去除上清液。重複此步驟三次。
- 10) 使用 SpeedVac 將 acetone 抽乾。
- 11) 加入 125  $\mu$ L sample buffer 震盪回溶。

### 2.6.2 第一維等電點聚焦

#### 儀器設備：

- Ettan™ IPGphor™ isoelectric focusing system (Amersham)
- Strip (Amersham, 7 cm, pH 3~10) 連續性 strip
- Holder (Amersham, 7 cm)

鑷子

**藥品試劑：**

Dry strip cover oil (Plus one)

**方法步驟：**

- 1) 取 125  $\mu\text{L}$  Sample buffer 回溶完全之樣品加入 7 cm holder 中。
- 2) 放入 pH 3~10 之 IPG strip。
- 3) 正負二極各加入 0.2 mL cover oil，蓋上蓋子，使蓋子吸住密封 holder。
- 4) 將 holder 置於 IPGphor system 電極板上，兩端接點確實與電極板接觸，以 30 V 電壓將 strip rehydration 12 hr，使 strip 上膠體膨潤，再進行表 2.2 設定之 program。

表 2.2 等電點聚焦 program

電壓 (V)	Volt-hours (Vhr)
500	250
1,000	500
2,000	1,000
5,000	10,000
8,000	16,000

◆ 系統溫度保持 25°C，每條 strip 電流限制在 50  $\mu\text{A}$ 。

### 2.6.3 第二維 15% SDS-PAGE 膠體電泳

**儀器設備：**

同 2.2.1 節。

◆ 使用 10×10 cm 電泳玻璃片及鋁片，1 mm 間隔條，不使用齒梳，電泳槽換 SE-260 底部。

**藥品試劑：**

SDS-PAGE 電泳試劑同 2.2.1 節

**SDS 平衡 buffer：**

1.5 M Tris-HCl buffer (50 mM)		10	mL
SDS (2%)	(J.T.Baker)	4	g
Glycerol (30%)	(J.T.Baker)	60	mL
Urea (6 M)	(RDH)	72	g
Bromophenol blue (0.01%)	(sigma)	200	$\mu\text{L}$

加水至 200 mL。

**Agarose：**

Agarose (Biomax) 0.5 g

將兩者混合後，在微波爐加熱溶解。

DTT (dithiothreitol) (USB)

IAA (iodoacetamide) (Amersham)

方法步驟：

- 1) 將進行完 IEF 之 strip，以二次水清洗後，放入 5 mL 含 50 mg DTT 的 SDS 平衡緩衝液，平衡 20 min 後，再放入 5 mL 含 125 mg IAA 的 SDS 平衡緩衝液，平衡 20 min。
- 2) 以二次水清洗 strip，並將 strip 靠右放入 SDS-PAGE 膠片中。
- 3) 將滴有蛋白質分子量標準品之 4 mm<sup>2</sup> 濾紙，以 agarose 封住後，靠左放入 SDS-PAGE 膠片中。
- 4) 以 agarose 進行封膠。
- 5) 將上述膠體放入電泳槽，依 2.2.1 節的方法固定電壓 160 V 進行電泳。
- 6) 電泳完成後，取下膠片去除 strip 及 agarose，於右上角截角標記。

## 2.7 酶切實驗

### 2.7.1 鹼性磷酸酶之去磷酸化

儀器用具：

37°C 恆溫箱 (Mettler)

藥品試劑：

Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) (Promega)

方法步驟：

- 1) 取 30 µg 病毒蛋白質，加入 3 µl (3 U) 鹼性磷酸酶，於 37°C 下反應 48 hr。
- 2) 加入 1.5 ml 10% TCA/Acetone 於 -20°C 終止反應並沉澱蛋白質。
- 3) 參照 2.6 節，以二次元電泳進行分析。

### 2.7.2 神經胺酸酶水解唾液酸

儀器用具：

37°C 恆溫箱 (Mettler)

藥品試劑：

神經胺酸酶反應液：



Neuraminidase	(Roach , Cat. No. 11 080 725 001)
SDS (0.1%)	(J.T.Baker)
Triton X-100 (0.5%)	(Sigma)
$\beta$ - Mercaptoethanal (0.5%)	(Sigma)

此品號 Neuraminidase 為 pH 5 之液態溶液，加入以上三種蛋白質變性劑後，即可使用。

#### 方法步驟：

- 1) 取 30  $\mu$ g 病毒蛋白質，加入 40  $\mu$ l (40 mU) 神經胺酸酶反應液，於 37°C 下反應 1 ~ 48 hr。加入 1.5 ml 10% TCA/Acetone 於 -20°C 終止反應並沉澱蛋白質。
- 2) 參照 2.6 節，以二次元電泳進行分析。

## 2.8 使用高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 配合脈衝式安培法偵測器 (PAD) 分析唾液酸

### 2.8.1 弱酸水解釋放唾液酸

#### 儀器用具：

- 小型真空離心機 (Thermo, SpeedVac)
- 37°C 恆溫箱 (Mettler)

#### 藥品試劑：

- Neuraminidase (Roach , Cat. No. 11 080 725 001)

#### 方法步驟：

- 1) 使用 60  $\mu$ g 病毒蛋白進行電泳後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜上，並剪切下目標蛋白質。
- 2) 加入 80  $\mu$ l 之神經胺酸水解酶，於 37°C 反應 48 hr。
- 3) 將 PVDF 膜取出後，以 SpeedVac 於 40°C 抽乾。
- 4) 抽乾後之唾液酸於 -20°C 保存備用。

### 2.8.2 使用 HPAEC-PAD 分析唾液酸亞型

#### 儀器用具：

- ICS 3000 (Dionex)
- Chromatography system
- Gradient Pump
- Electrochemical Detector
- Autosampler
- Chromeleon chromatography software (Dionex)
- CarboPac PA10 Analytical Column (2 x 250 mm) (Dionex)
- CarboPac PA10 guard Column (2 x 50 mm) (Dionex)

Filter (Millex-GV PVDF membrane , 0.22  $\mu\text{m}$  、 4 mm )

**藥品試劑：**

N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac) (Sigma)

N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) (Sigma)

3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (KDN) (Toronto Chemicals)

Sodium hydroxide, 50% (w/w) (Fisher Scientific)

Sodium Acetate (Merck)

100 mM Sodium Hydroxide

100 mM Sodium Hydroxide/1 M Sodium Acetate

**方法步驟：**

- 1) 裝置並以 100 mM NaOH 流洗 CarboPac PA10 及其 guard column。
- 2) 使用 100  $\mu\text{l}$  二次水回溶樣本，過濾，裝入樣本瓶後，裝入 autosampler。
- 3) 使用軟體設定以下程式，並設定流速為 0.25 mL/min

Inj. Vol.:	25 $\mu\text{L}$		
Waveform f			
<u>Time (sec)</u>	<u>Potential (V)</u>	<u>Integration</u>	
0.00	+ 0.05		
0.20	+ 0.05	Begin	
0.40	+ 0.05	End	
0.41	+ 0.75		
0.60	+ 0.75		
0.61	- 0.15		
1.00	- 0.15		
Eluent:	A: 100 mM Sodium hydroxide B: 100 mM Sodium hydroxide/ 1 M Sodium acetate		
Method:	<u>Time (min)</u>	<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>
	Initial	93	7
	0.0	93	7
	10.0	70	30
	11.0	70	30
	12.0	93	7

(Dionex Technical note 41)

- 4) 啟動程式，待程式終止後，以軟體分析。

## 2.9 蛋白質身分鑑定

### 2.9.1 膠體內蛋白酶水解

**儀器用具：**

平台震盪器 (TKB, OS701)

微量高速離心機 (Beckman, Microfuge)

小型真空離心機 (Thermo, SpeedVac)

超音波震盪器 (Branson, Sonicater)

37°C 恆溫箱 (Mettler)

### 試劑藥品：

Ammonium bicarbonate 緩衝溶液

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (0.25 M)	(Sigma)	2.43 g
---	---------	--------

調 pH 至 8.5，補二次水至 100 mL，使用前加入 DTT 1.54 mg/mL 或 IAA 17.5 mg/mL

蛋白質脫色液：

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (25 mM)	(Sigma)
ACN (50%)	(Labscan)

pH 8.5

酵素緩衝液：

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (0.2 N)	(Sigma)	1.94 g
CaCl <sub>2</sub> (0.5 mM)	(Sigma)	5.5 mg

加二次水至 100 mL。

萃取溶液：

TFA (0.1%)	(Merck)	0.1 mL
ACN (60%)	(Labscan)	60 g

加二次水至 100 mL。

DTT (dithiothreitol) (USB)

IAA (iodoacetamide) (Amersham)

### 方法步驟：

- 1) 膠體經 CBR 染色後，以二次水清洗二次，每次 2 h。
- 2) 將目標蛋白質點從膠片上割下，放入經甲醇清洗過之微量離心管中。
- 3) 加入 100 μL 10 mM DDT/25 mM ammonium bicarbonate，pH 8.5 緩衝溶液中，在 37°C 下反應 1 h。
- 4) 以 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。
- 5) 加入 100 μL 100 mM iodoacetamide (IAA)/25 mM ammonium bicarbonate，pH 8.5 緩衝溶液，於室溫避光反應 1 h。
- 6) 以 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 IAA。
- 7) 加入蛋白質脫色液，於 30°C 反應 15 min，重複兩次。
- 8) 以二次水清洗兩次，每次 10 min，以去除 CBR，最後以 SpeedVac 抽乾。
- 9) 加入含有 0.1 μg trypsin 之酵素緩衝液 10 μL，水解反應 10 min。
- 10) 再加入 100 μL 酵素緩衝液，於 37°C 下反應隔夜。
- 11) 加入 200 μL 萃取溶液。
- 12) 在 35~40°C 下超音波震盪 30 min，收集萃取液於微量離心管中，重複一次。
- 13) 用 SpeedVac 抽乾。

## 2.9.2 以質譜儀鑑定蛋白質點身分

### 儀器用具：

ESI-Q-TOF (Micromass)

### 方法步驟：

- 1) 將經 2.5.1 處理之樣本，送交錯德科技股份有限公司以 ESI-Q-TOF 質譜儀分析。
- 2) 將送回之原始資料傳送至 Mascot 資料庫平台比對蛋白質身分，主要比對資料庫為 MSDB 或 NCBIInr。

## 2.10 高效能層析儀 (HPLC) 配合螢光偵測器分析 N-醣質

### 2.10.1 醣質之膠內水解釋放及螢光標定

#### 儀器用具：

65°C 水浴槽 (Kansin instruments)

#### 試劑藥品：

N-Glycosidase F (PNGase F) (BioLabs)

N-Glycosidase F 之酵素緩衝液:

25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 (Sigma)

TFA (Merck)

ACN (Labscan)

2-aminobenzamide (Merck)

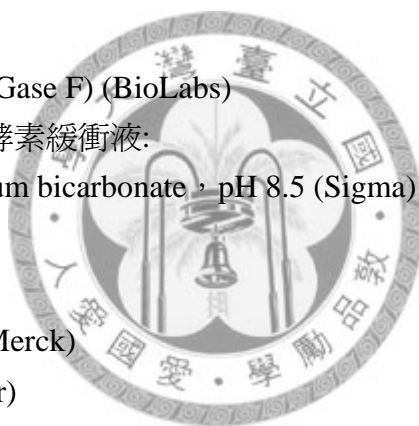
Acetic acid (J.T.Baker)

DMSO (Sigma)

Sodium cyanoborohydride (Merck)

冷凍乾燥機

微量高速離心機 (Beckman, Microfuge)



#### 方法步驟：

- 1) 膠體經 CBR 染色後，參考方法 2.9.1 將 CBR 去除。
- 2) 加入含有 3 unit N-Glycosidase F 之酵素緩衝液，於 37°C 反應 72 hr。
- 3) 加入 500  $\mu$ l 100% ACN/2% TFA，超音波震盪 15 分鐘，離心蒐集上清液。
- 4) 加入 500  $\mu$ l 50% ACN/1% TFA，超音波震盪 15 分鐘，離心蒐集上清液。
- 5) 加入 500  $\mu$ l 0.1% TFA/ddH<sub>2</sub>O，超音波震盪 15 分鐘，離心蒐集上清液。
- 6) 重複步驟 5。
- 7) 加入 500  $\mu$ l 100% ACN 震盪，離心取上清液。
- 8) 將前步驟上清液集中，以 10,000 rpm 離心 1 min，取上清液進行冷凍乾燥。
- 9) 將 1.5 mg 2AB 加入 100  $\mu$ l 之 30% acetic acid/DMSO 中，混合均勻。



10) 再加入 5.15 mg sodium cyanoborohydride，混合均勻。

11) 吸取 15  $\mu$ l 步驟 10 配製之試劑，回溶乾燥之醮質，於 65°C 避光反應 3hr。

## 2.10.2 使用 HPLC 分析 N-glycans

### 儀器用具：

TSKgel amide-80 column (TOSOH)

HITACH L-7100 pump

螢光偵測器 (Waters 2475)

軟體 (SISC 32)

### 試劑藥品：

20% 50 mM NaOAc/ACN

50 mM NaOAc

### 方法步驟：

- 1) 裝置並以 NaOH 20% 50 mM NaOAc 流洗管柱。
- 2) 注入 10  $\mu$ l 樣本。
- 3) 使用軟體設定以下程式，並定流速為 1 mL/min，excitation 330 nm, emission 420 nm

**Column: TSKgel amide-80**  
**Detection: fluorescence detector**  
**Flow rate: 1 mL/min**  
**Eluent: A. 20% 50 mM NaOAc/ACN**  
**B. 50 mM NaOAc**

	A	B
<b>0 min</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>
<b>20 min</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>
<b>100 min</b>	<b>50%</b>	<b>50%</b>
<b>110 min</b>	<b>50%</b>	<b>50%</b>
<b>120 min</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>

- 4) 啟動程式，待程式終止後，以軟體分析。

## 2.11 質譜儀醮質定序

### 2.11.1 從醮蛋白質上釋放並純化 N-glycans

#### 儀器用具：

37°C 保溫箱 (Mettler)

Sep-Pac C18 column (Waters)

冷凍乾燥機

### 藥品試劑：

N-Glycosidase F 之酵素緩衝液:

25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 (Sigma)

N-Glycosidase F (PNGase F) (BioLabs)

Acetonitrile (ACN) (J.T.Baker)

Formic acid (Sigma)

### 方法步驟：

- 1) 將方法 2.9.1 萃取乾燥後之 peptide，加入含有 3 unit N-Glycosidase F 之酵素緩衝液，於 37°C 反應 72 hr。
- 2) 進行 Sep-Pac C18 column 之再生:  
以針筒吸取 5 ml 100% ACN 流洗管柱，於兩分鐘完成。  
以針筒吸取 5 ml 50% ACN/0.1% Formic acid 流洗管柱，於兩分鐘完成。  
以針筒吸取 5 ml 0.1% Formic acid 流洗管柱，於兩分鐘內完成。
- 3) 接著注入樣品等待 1 min 後，使用 5 ml 0.1% Formic acid 流洗管柱，並以玻璃管收集流洗出之 N-glycans。
- 4) 使用 2 ml 50% ACN/0.1% Formic acid 流洗管柱後，以 3 ml 75% ACN/1% Formic acid 流洗管柱，並以 15 ml 離心管收集流洗出之 peptides。
- 5) 將收集之 N-glycans 與 peptides 冷凍乾燥。

### 2.11.2 N-glycans 之泛甲基化

#### 儀器用具：

玻璃管及玻璃滴管

研鉢

冷凍乾燥機

超音波震盪器

#### 藥品試劑：

NaOH (J.T.Baker)

DMSO (Sigma)

CH<sub>3</sub>I (KANIO chemical)

CHCl<sub>3</sub> (J.T.Baker)

#### 方法步驟：

- 1) 將 1 g NaOH 加入 DMSO 內，並以研鉢研磨至雲狀。
- 2) 以玻璃滴管吸取 200 μl DMSO/NaOH 加入裝有醣質之玻璃管，於超音波震盪 30 min。
- 3) 以玻璃滴管吸取 100 μl CH<sub>3</sub>I 加入玻璃管，並於超音波震盪 60 min。
- 4) 重複步驟 2、3。
- 5) 加入 3 ml 之 CHCl<sub>3</sub> 後，加入 8 ml H<sub>2</sub>O 萃取 NaOH，移除水層，重複加入 8 ml H<sub>2</sub>O 萃取 NaOH 多次，至水層不再呈鹼性為止。
- 6) 移除水層，並將含有醣質之有機層冷凍乾燥。

### 2.11.3 以質譜儀分析 N-glycans

#### 儀器用具：

小型真空離心機 (Thermo, SpeedVac)  
MICROMASS MALDI MicroMX (Waters)

#### 藥品試劑：

70% methanol  
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)

#### 方法步驟：

- 1) 以 200  $\mu$ L 70% methanol 回溶醣質，吸取至 1.5 mL 微量離心管，並以 SpeedVac 抽乾。
- 2) 將醣鏈以 70% methanol 回溶，並以基質溶液 (DHB, 20 mM sodium acetate) 稀釋至 3  $\mu$ L，將樣本點至 MALDI plate 上，真空乾燥後，進行 MALDI TOF/TOF 質譜分析



## 第三章 結果

本論文研究源起於 2000 年，王金和老師實驗室分離出台灣本土 H6N1 禽流感病毒株 (A/Chicken/Taiwan/2838/00)，而 2838 病毒株經由病毒的毒性強弱又可分為兩種亞型，非毒性 (2838N) 及毒性 (2838V) 病毒株<sup>61</sup>。毒性及非毒性禽流感病毒株之八段基因已於 2002 年完成定序工作，而兩病毒株之間胺基酸序列之差異如表 3.1 所示<sup>64</sup>。

為了解兩病毒株之蛋白質體間之差異，本論文使用二次元電泳配合本實驗室製備之 HA 單株抗體<sup>62</sup> 進行免疫染色分析比對。發現兩病毒株之血液凝集素 1 (HA1) 皆有 6 種不同等電點的異構物，為了解異構物形成之原因，實驗轉向蛋白質之轉譯後修飾。



表 3.1 非毒性與毒性 2838 禽流感病毒株各基因之間胺基酸序列的差異<sup>64</sup>

**Table 3.1 Comparison of amino acid sequences from the genes of non-virulent and virulent 3838 avian influenza viruses strains <sup>64</sup>**

經由胺基酸序列比對發現，非毒性及毒性之禽流感病毒株之八段基因中，血液凝集素 (HA) 之差異度最大 (1.41%)，而間質蛋白 1 (Matrix protein 1) 之序列並無差異。

Gene (%, no. of differences/total)	Position	2838N	2838V
Gene 1: PB2 (0.65, 5/759)	106	PT-S-ST	PT-T-ST
	432	PM-H-QL	PM-Y-QL
	460	MG-M-IG	MG-I-IG
	494	ER-V-WV	ER-I-WV
	586	VP-K-AA	VP-R-AA
Gene 2: PB1 (0.79, 6/757)	171	DV-M-ES	DV-I-ES
	240	RR-A-IA	RR-E-IA
	414	FN-M-LS	FN-T-LS
	464	GV-D-RF	GV-N-RF
	475	VG-V-NM	VG-I-NM
Gene 3: PA (0.28, 2/716)	706	SY-R-RY	SY-G-RY
	350	IE-N-EE	IE-D-EE
Gene 4: HA (1.41, 8/567)	686	GG-Q-YE	GG-L-YE
	-5	LA-A-AG	LA-T-AG
Gene 5: NP (0.80, 4/498)	106	LI-E-SG	LI-G-SG
	304	IG-E-CP	IG-K-CP
	332	GI-L-RA	GI-F-GA
	381	NK-V-NS	NK-A-NS
	419	FL-E-WV	FL-D-WV
	541	MC-Q-NG	MC-S-NG
	253	AE-I-ED	AE-V-ED
Gene 6: NA (0.20, 1/457)	348	FI-G-GT	FI-R-GT
	391	RT-K-SG	RT-R-SG
	420	LP-F-ER	LP-L-ER
Gene 8: NS1 (0.43, 1/230)	201	II-P-DT	II-T-DT
NS2 (0.83, 1/121)	65	QI-V-ER	QI-A-ER
	100	TF-M-QA	TF-V-QA

Abbreviations: HA = hemagglutinin; NA = neuraminidase; NP = nucleoprotein; NS = non-structural protein

### 3.1 比較非毒性與毒性禽流感病毒株之間蛋白質體的差異

使用由雞胚胎之尿囊液純化出之禽流感病毒，以 10% TCA/Acetone 沉澱其蛋白質，並進行二維電泳，使用 Coomassie blue 及硝酸銀染色法比對非毒性與毒性 AIV 蛋白質體之差異。結果發現 HA1 為二維圖譜上差異最大之蛋白質點。接著使用血液凝集素 (HA) 單株抗體進行免疫染色，發現非毒性及毒性 AIV 之 HA1 皆有 6 種不同等電點之異構物。

#### 3.1.1 兩株 2838 禽流感病毒二次元電泳圖譜之比較

本實驗使用病毒全蛋白進行二次元電泳分析，比較非毒性 (2838N) 與毒性 (2838V) 禽流感病毒株之蛋白質體。圖 3.1 a, b 使用 Coomassie blue 染色，並以質譜儀進行蛋白質份鑑定，可在蛋白質圖譜中發現最為豐富的三種蛋白質。第一種為佔蛋白質總量最大之間質蛋白 1 (M1)，M1 分子量約 24 kD 為結合流感病毒 RNA 之蛋白質，因此 M1 富含鹼性胺基酸，其位於圖譜中 pH 10 的位置，但事實上 M1 等電點可能大於 10。第二種為核殼蛋白 (NP)，NP 約 60 kD 其本身為包覆 RNA 的蛋白質，因此其本身等電點亦可能超過 10。第三種為血液凝集素 (HA)，圖譜中可發現分子量約 130 kD 之 HA0，50 kD 之 HA1 及 25 kD 之 HA2。圖 3.1 c, d 為圖 3.1 a, b 之膠片進行硝酸銀染色的結果，可發現更多蛋白質點，這些蛋白質有些來自病毒本身，有些來自於病毒增殖用之雞胚胎。比較非毒性與毒性禽流感病毒株之蛋白質體可發現差異最大的為 HA1 之蛋白質群點。

#### 3.1.2 血液凝集素重鏈 (HA1) 為兩禽流感病毒株蛋白質圖譜上差異最大之蛋白質

血液凝集素 (HA) 為非毒性 (2838N) 與毒性 (2838V) 禽流感病毒株之胺基酸序列差異度 (1.41%) 最大的蛋白質，而在二次元蛋白質圖譜中，血液凝集素重鏈 (HA1) 亦為差異最大的蛋白質，非毒性株 HA1 等電點較毒性株低。圖 3.2 為兩株病毒 HA 以 BLAST 進行分析之結果，可發現 16 個胺基酸之訊號肽中有 1 個胺基酸不同；而 HA2 的 222 個胺基酸中有 5 個胺基酸不同，但這 5 個胺基酸之不同，並未使兩株病毒之 HA2 在二次元蛋白質圖譜中產生明顯差異；反觀 HA1，HA1 在 329 個胺基酸中只有 2 個不同，但此 2 個胺基酸差異卻使非毒性與毒性株之 HA1 相差 3 個電荷。2838N 中 HA 之第 106 個胺基酸為酸性的麩胺酸 (Glu)，但 2838V 為中性的甘胺酸 (Gly)；另外，2838N 之第 304 個胺基酸為酸性的麩胺酸 (Glu)，但 2838V 卻為鹼性的離胺酸 (Lys)，而 HA 之第 106 及 304 個胺基酸，就是 HA1 在 329 個胺基酸中僅有的兩個不同，此差異造成兩株病毒之 HA1 相差三個電荷。以 EMBOSS IEP 軟體預測 HA1 之等電點得知，2838N 之 HA1 等電點為 6.8764；2838V 之 HA1 等電點為 7.9163，此預測結果可和蛋白質二維圖譜 HA1 之蛋白質群點互相呼應，也就是非毒性株 HA1 之等電點較毒性株低，可能源自於蛋白質一級結構。

### 3.1.3 非毒性與毒性 AIV 之 HA1 皆有 6 種不同等電點之異構物

雖然兩株病毒之 HA1 等電點差異甚大，但皆有 6 種不同等電點之異構物。圖 3.3 使用 HA 單株抗體進行免疫染色，再次證實。延續 3.1.2 中 HA1 等電點之預測，2838N 之 HA1 等電點為 6.8764；2838V 之 HA1 等電點為 7.9163，此二預測之 pI 值，恰好是 HA1 在蛋白質圖譜的 6 個點中，pI 值最大的點，也就是最鹼性的蛋白質點。因此推測其餘 5 個 pI 值較小，較偏酸性之 HA1 異構物，可能是由不同程度之蛋白質轉譯後修飾使 HA1 酸化所造成。



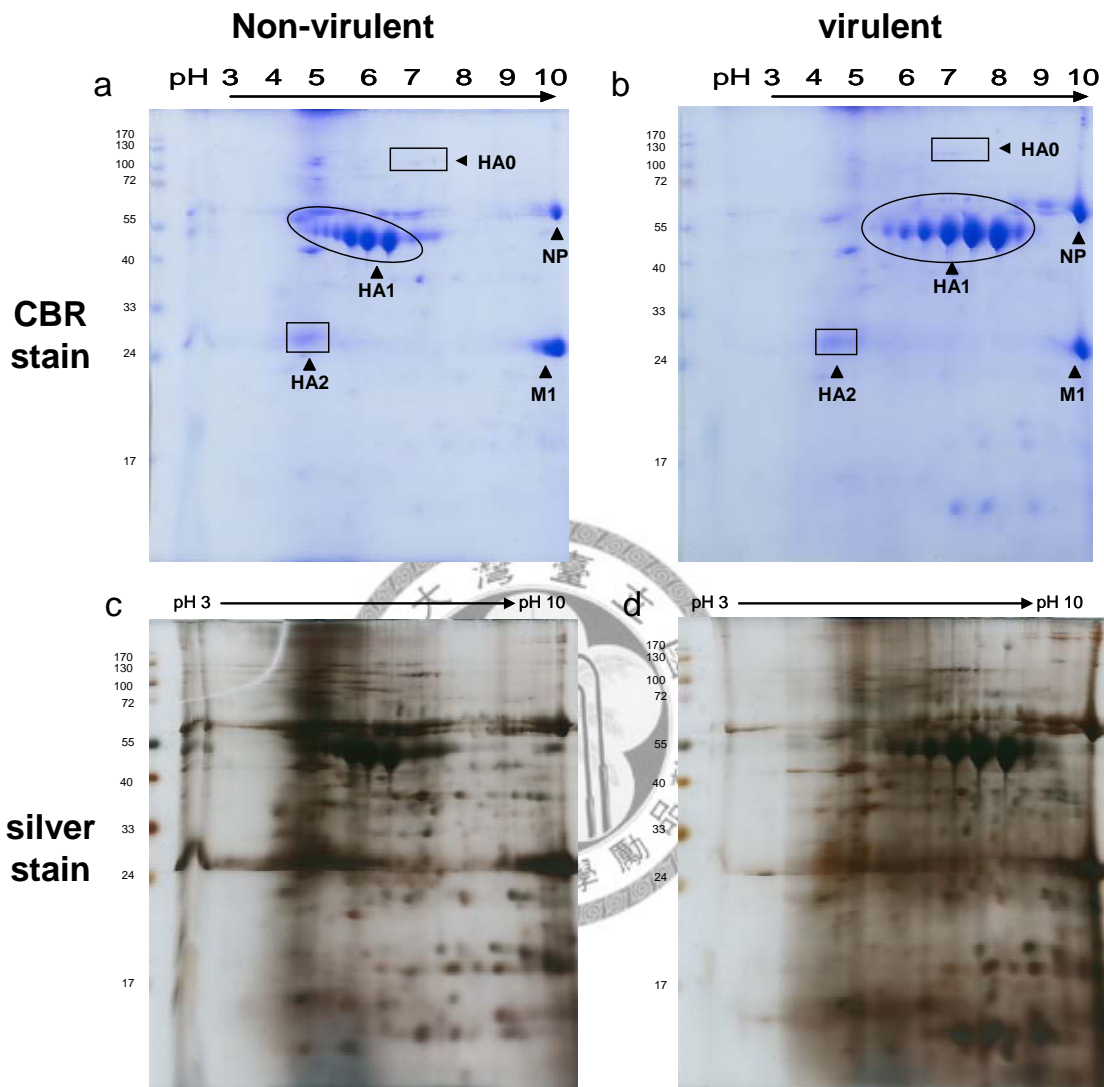


圖 3.1 二次元電泳比較非毒性與毒性禽流感病毒株之間蛋白質體的差異

Figure 3.1 Comparison of the total proteins from the non-virulent and virulent avian influenza viruses by 2-DE



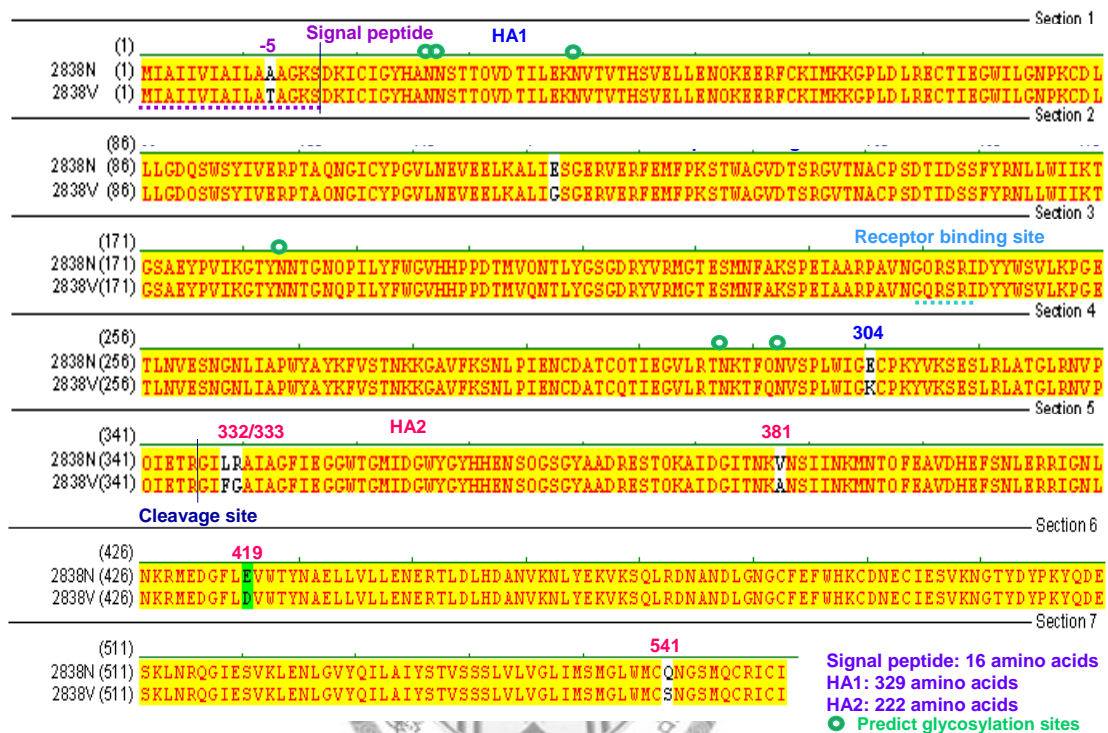


圖 3.2 BLAST 比對非毒性與毒性 2838 禽流感病毒株血液凝集素之胺基酸序列之差異

Figure 3.2 Alignment of the sequences of hemagglutinin between non-virulent and virulent 2838 avian influenza viruses

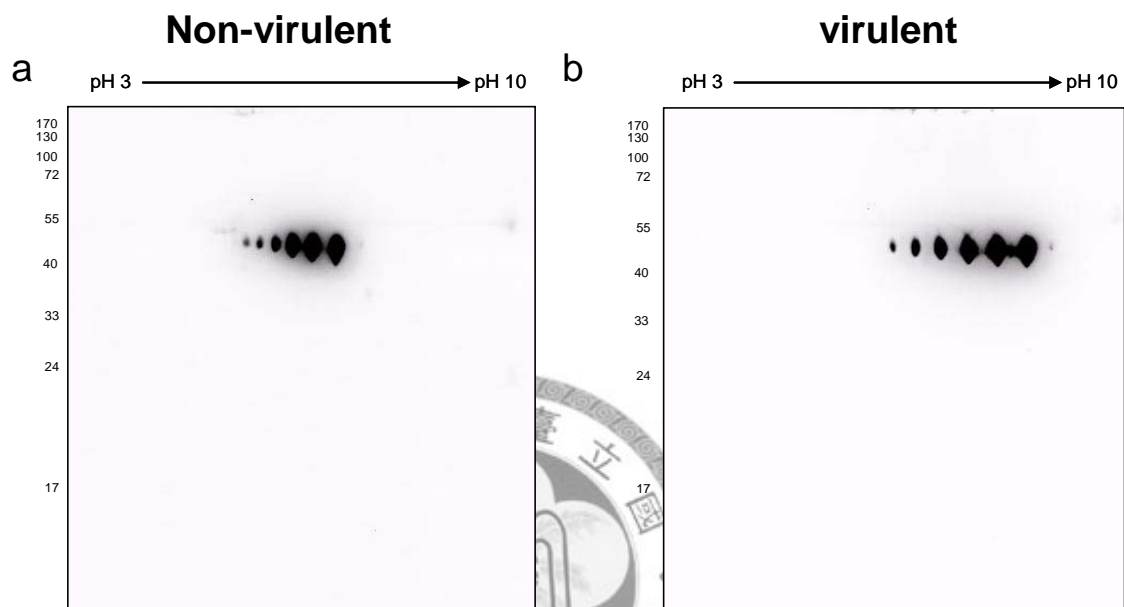


圖 3.3 以免疫染色檢定血液凝集素 1 (HA1) 在非毒性與毒性禽流感病毒株之二次元圖譜得知，HA1 有 6 種不同等電點之異構物

Figure 3.3 Immunoblot analysis of hemagglutinin 1 on the 2-DE PAGE revealed six pI isoforms of HA1

### 3.2 探究血液凝集素 1 (HA1) 有 6 種不同等電點異構物之原因

爲了解 HA1 形成 6 種異構物之原因，實驗轉向研究可能影響蛋白質等電點之轉譯後修飾。

#### 3.2.1 預測血液凝集素 1 (HA1) 之蛋白質轉譯後修飾

蛋白質之磷酸化 (phosphorylation)，醣基化 (glycosylation) 以及硫酸鹽化 (sulfation)，都有可能使蛋白質之等電點變小、變酸。圖 3.4 a 使用 NetPhos 2.0 軟體預測 HA1 可能之磷酸化修飾，發現兩株病毒之 HA1 皆可能有 21 個可能被磷酸化修飾之胺基酸位置，其中 8 個爲 Ser、8 個爲 Thr，5 個爲 Tyr。圖 3.4 b 使用 NetGlyc 1.0 軟體預測 HA1 可能之 N-醣基化位置，發現共有 6 處爲 Asn-X-Ser/Thr 可能之 N-醣基化位置，而其中有 4 處爲可能性更高之醣基化預測位置 (圖中紅色之 N)。圖 3.4 c 使用 Sulfinator 軟體預測可能之 Tyr 硫酸鹽化之位置，發現 HA1 並無可能之硫酸鹽化位置。

#### 3.2.2 實驗設計

由於 3.2.1 預測之結果，發現 HA1 可能有 phosphorylation 及 glycosylation，而醣基化若接上酸性醣，如廣泛存在之唾液酸，則有可能影響蛋白質之等電點，因此實驗設計配合酶切、二次元電泳、免疫染色及凝血素染色及質譜儀分析，探究 HA1 形成 6 種異構物，是否爲蛋白質磷酸化，或是醣基化所造成，圖 3.5。





圖 3.4 以軟體預測可能使 HA1 等電點變小之轉譯後修飾  
**Figure 3.4 Post-translational modification prediction of HA1**

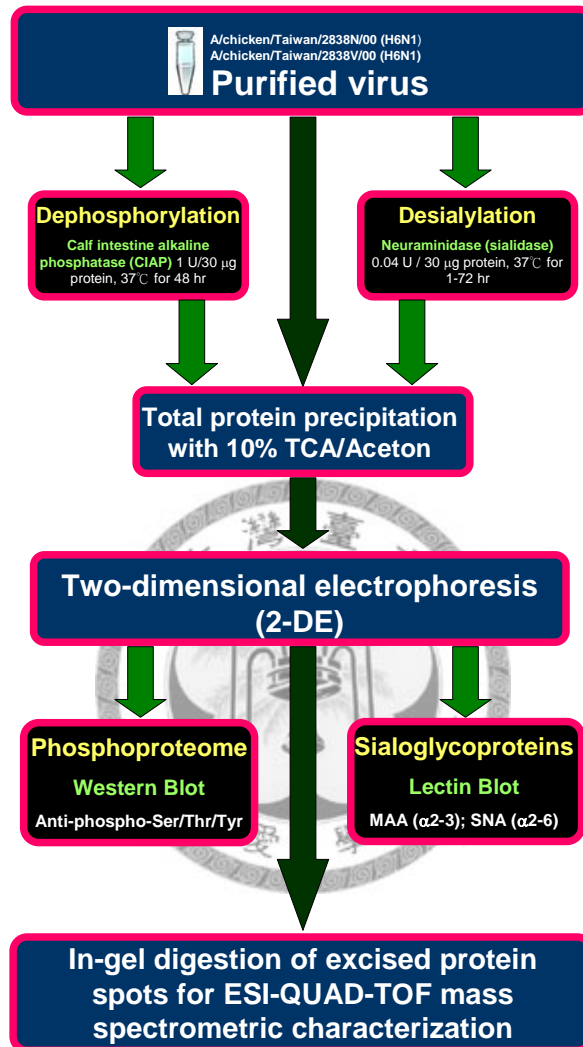


圖 3.5 以可能影響血液凝集素 1 (HA1)等電點之轉譯後修飾作用進行實驗設計  
 Figure 3.5 Experimental design based on the hemagglutinin 1 post-translational modifications that influence pI values

### 3.3 不同等電點異構物之血液凝集素 1 (HA1) 並非蛋白質磷酸化所造成

本段實驗接續 3.2 之實驗設計，研究 HA1 異構物形成的原因是否為蛋白質磷酸化所致。實驗分別以鹼性磷酸酶處理禽流感病毒，以及使用抗磷酸化抗體進行免疫染色。

#### 3.3.1 以鹼性磷酸酶處理禽流感病毒株並進行二次元電泳

本實驗使用鹼性磷酸酶處理病毒蛋白質，結果如圖 3.6 所示。在鹼性磷酸酶酶切 48 小時後，HA1 蛋白質群點並無明顯變化，而 M1 分子量有明顯下降，比較控制組及酶切組，可清楚分別磷酸化及去磷酸化之 M1。

#### 3.3.2 以抗磷酸抗體進行二次元電泳之免疫染色

本實驗首先進行禽流感病毒之二次元電泳，接著轉印至 PVDF 膜並使用抗磷酸抗體進行免疫染色，偵測磷酸化蛋白質。實驗結果如圖 3.7 所示，可發現 HA1 蛋白質群點之絲胺酸 (Ser) 及酰胺酸 (Thr) 並無磷酸化，另使用 anti-phosph-Tyr 單株抗體偵測，發現在 ECL 呈色後，並無任何訊號，因此 HA1 之酪胺酸 (Tyr) 可能無磷酸化，亦或是此株抗體失效。另外，實驗發現和 3.3.1 鹼性磷酸酶酶切結果相符，間質蛋白 1 (M1) 之絲胺酸 (Ser) 及酰胺酸 (Thr) 有磷酸化現象。而 NP 之絲胺酸 (Ser) 及酰胺酸 (Thr) 亦有明顯磷酸化。此外，二次元圖譜上約 100 kD 之 RNA 聚合酶 A (RNA polymerase A，簡稱 PA) 之酰胺酸 (Thr) 有磷酸化，而藉由此實驗，本實驗室第一次確定 PA 在二次元圖譜上的位置。配合 3.3.1 及本段結果得知，不同等電點異構物之 HA1 並非由蛋白質磷酸化所造成。

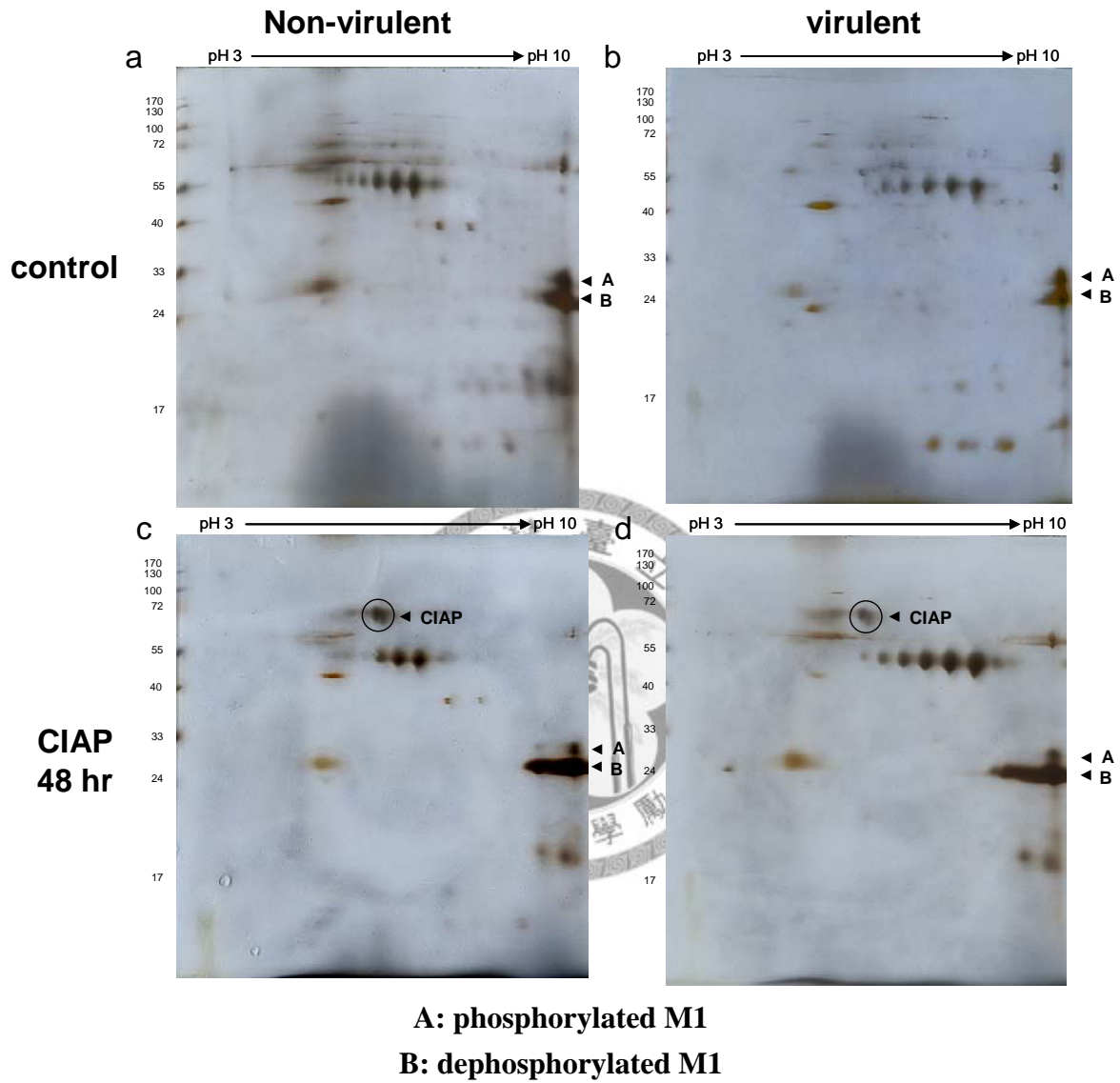


圖 3.6 以鹼性磷酸酶處理非毒性與毒性禽流感病毒株並進行二次元電泳  
**Figure 3.6 Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) treatment of total proteins of the virulent and non-virulent avian influenza viruses**

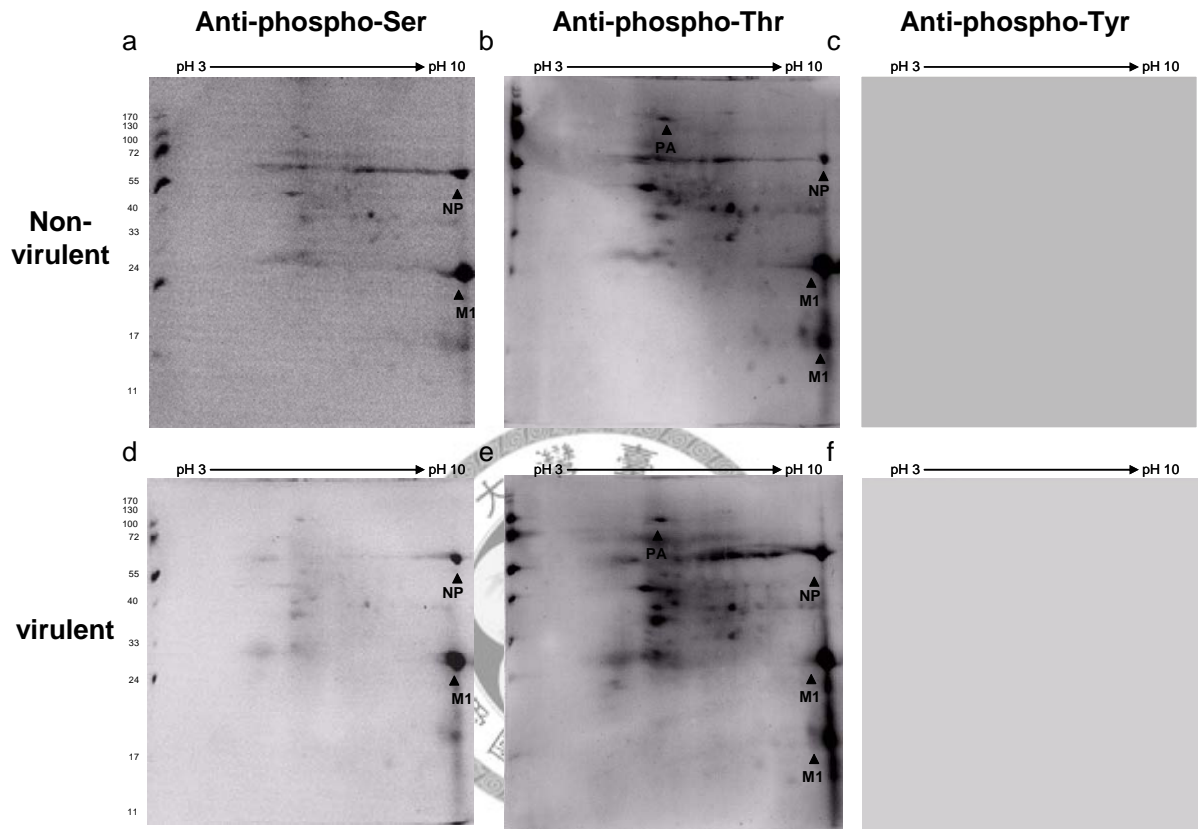


圖 3.7 以抗磷酸抗體進行二次元電泳之免疫染色

Figure 3.7 Immunoblot analysis of virus protein with anti-phospho-Ser, anti-phospho-Thr, and anti-phospho-Tyr antibodies



### 3.4 不同等電點異構物之血液凝集素 1 (HA1) 可能是由其醣質之唾液酸修飾所造成

本段實驗接續 3.2 之實驗設計，研究 HA1 異構物形成的原因是否為醣蛋白質表面醣基化之唾液酸修飾。實驗首先以神經胺酸水解酶 (neuraminidase, NA) 處理病毒全蛋白質，發現 HA1 蛋白質點受酶切影響，接著使用凝集素染色法 (lectin blot)，發現 HA1 之醣質可能有  $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸，最後企圖使用高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 分析唾液酸之亞型。

#### 3.4.1 以神經胺酸水解酶處理禽流感病毒株並進行二次元電泳

以神經胺酸水解酶處理病毒全蛋白質 1 至 48 小時後，進行二次元電泳，銀染後可發現，隨著處理時間的增長，HA1 蛋白質群點由等電點高至低，依序消失，如圖 3.8 a-e 所示。酶切 1 小時後，HA1 蛋白質群點並無變化；4 小時後最鹼性之蛋白質點消失；24 小時後，等電點最高的兩個點消失；48 小時後，等電點較高之 5 個異構物消失。在酶切 48 小時後，使用質譜儀進行蛋白質身份鑑定，發現新產生之 24 kD 蛋白質為間質蛋白 1 (M1)，圖 3.8 f。而經酶切 48 小時後，進行二維電泳並轉印至 PVDF 膜上，以 HA 單株抗體進行免疫染色，可發現等電點較高之 HA1 無法被偵測，而酶切後之 HA1 亦無法由免疫染色偵測。雖然本實驗和預期結果不符，但由 HA1 蛋白質群點由等電點高至低，依序消失的現象可得知，神經胺酸水解酶會影響 HA1 之 6 個異構物。

#### 3.4.2 以凝集素染色法 (lectin blot) 發現 HA1 之醣質可能有 $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸

得知神經胺酸水解酶會影響 HA1 蛋白質群點後，繼續使用凝集素染色法 (lectin blot)，欲直接證明唾液酸的存在。使用的凝集素有兩種，第一種為 *Maackia amurensis* agglutinin (MAA)，可偵測唾液酸  $\alpha$ -2,3-半乳糖鍵結；第二種凝集素為 *Sambucus nigra* agglutinin (SNA)，可偵測唾液酸  $\alpha$ -2,6-半乳糖鍵結。實驗首先進行 SDS-PAGE 並轉染至 PVDF 膜上，接著使用 MAA 及 SNA 進行凝集素染色，結果如圖 3.9 所示。可發現 HA1 表面醣化有與半乳糖以  $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸，而無  $\alpha$ -2,6 鍵結之唾液酸。另外，間質蛋白 (M1) 同時有  $\alpha$ -2,3 及  $\alpha$ -2,6 鍵結之唾液酸。圖 3.10 為二次元電泳配合凝集素染色法，以 MAA 凝集素染色發現非毒性與毒性株中，HA1 最鹼性的異構物，都只有被 MAA 輕微染到，而 pI 較低的 5 個異構物則有很深的染色。另外，在二次元電泳圖譜中在原先的 6 個異構物左側，也偵測到  $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸，這些蛋白質點的蛋白質量很小，但卻被清楚染到唾液酸的存在。而在 SNA 凝集素染色的實驗中，HA1 並未被染色，此結果和一維電泳結果相符。總和以上實驗結果得知，HA1 多種等電點異構物可能是由 HA1 醣質含有  $\alpha$ -2,3 鍵結之唾液酸所造成。

### 3.4.3 以高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 配合脈衝式安培法偵測器 (PAD) 分析 HA1 醣基之唾液酸

為了解 HA1 表面醣化之唾液酸為何種亞型，使用 CarboPac PA-10 陰離子交換管柱，配合 HPAEC-PAD 進行實驗。首先以禽流感病毒進行 SDS-PAGE 並轉印至 PVDF 膜上，剪切出 HA1 蛋白質條帶，接著進行唾液酸水解酶酶切，釋出唾液酸，進行 HPAEC-PAD 分析。圖 3.11 a 為三種亞型之唾液酸標準品的分離，可發現此方法可以清楚分離三種亞型之唾液酸。圖 3.11 b, c 為 HA1 經唾液酸解酶酶切並進行 HPAEC，結果無偵測到唾液酸。本實驗無法偵測到唾液酸，可能是因為唾液酸的量過小，或是神經胺酸酶並無水解唾液酸，抑或是唾液酸並不存在於 HA1 之醣質。

### 3.4.4 以凝集素染色法分析經唾液酸酶水解後之 HA1

由於結果 3.4.1 中，發現神經胺酸水解酶會影響 HA1 之 6 個異構物，且結果 3.4.2 中，以凝集素染色法發現 HA1 可能有唾液酸化，但於結果 3.4.3 中，唾液酸酶處理 HA1 後以 HPAEC 無法偵測到唾液酸，因此開始懷疑 HA1 上是否真的存在唾液酸。本實驗將唾液酸酶處理過之病毒，以凝集素染色法分析，發現隨著唾液酸酶處理時間愈長，HA1 之蛋白質量漸少，並從酶切 24 hr 後開始，在 36 kD 形成新的蛋白質條帶，經由質譜定序分析後發現此蛋白質亦為 HA1，且此條帶也可結合 MAA，圖 3.12。因此推論，HA1 可能在酶切過程中降解，因此 HA1 蛋白質量會減少；而經由唾液酸酶酶切過後，無論是 50 kD 或 35 kD 之 HA1 皆可結合 MAA，則表示唾液酸酶並無作用，亦或是 HA1 本身並無唾液酸修飾，也就是說 MAA 與 HA1 醣質為非專一性結合。為了解 HA1 確切之醣質結構，實驗接著進行建構 HA1 之醣質表現圖譜。

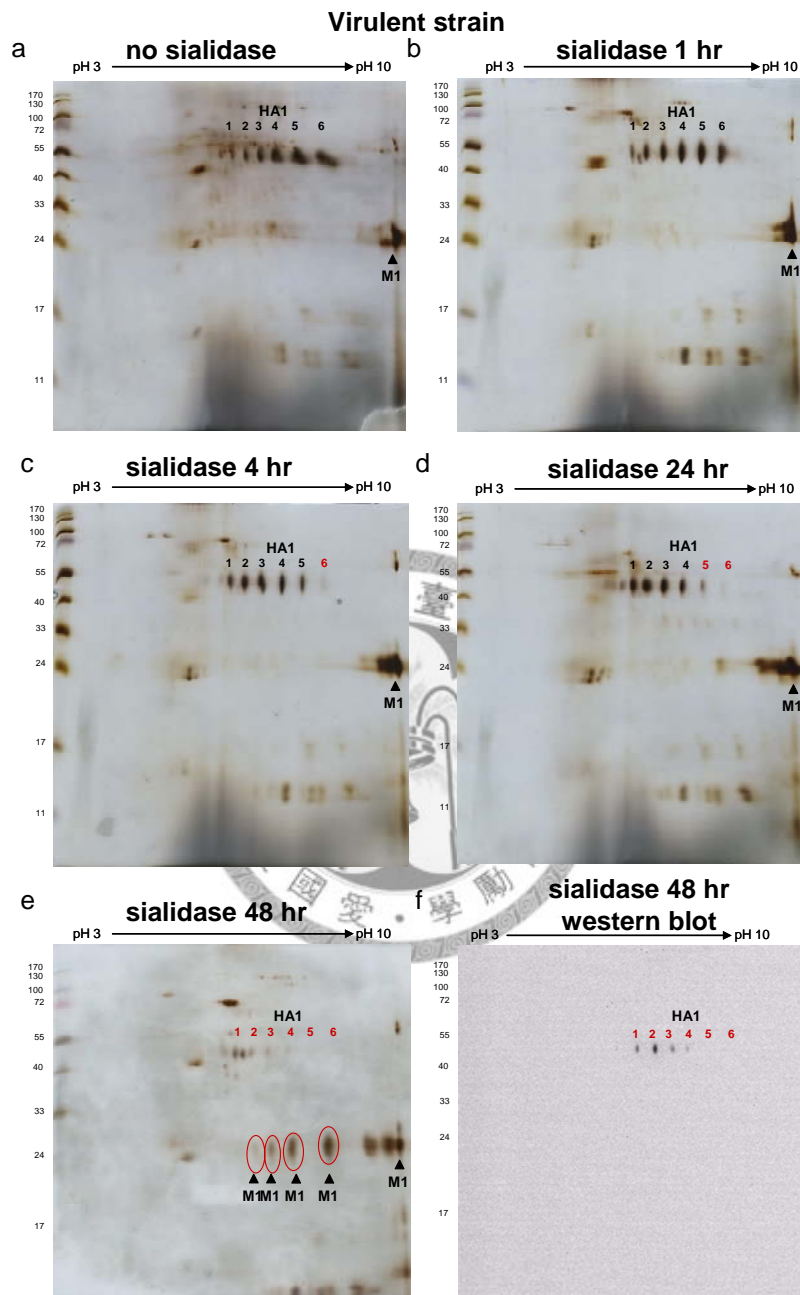


圖 3.8 以神經胺酸水解酶處理毒性禽流感病毒株並進行二次元電泳  
 Figure 3.8 Neuraminidase treatment of the virulent (2838V) avian influenza viruses

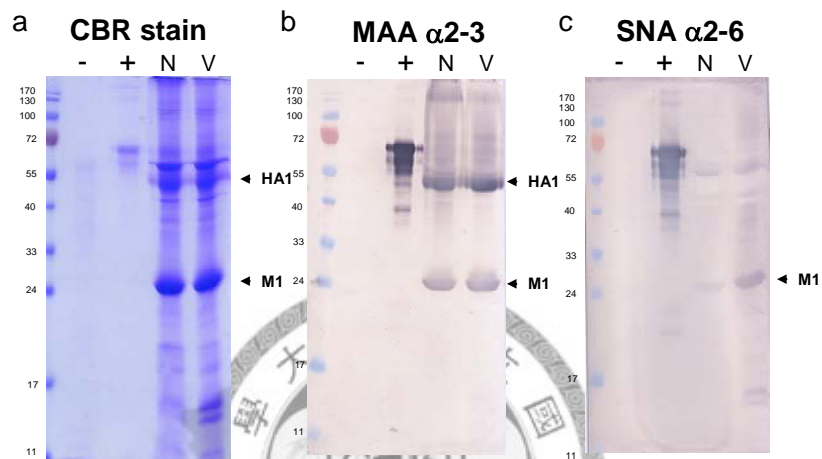


圖 3.9 以凝集素染色法 (lectin blot) 發現血液凝集素 1 (HA1) 之醣質有  $\alpha$ -2,3 鍵結的唾液酸

Figure 3.9 Sialyoglicoproteins were detected by MAA and SNA. Asialofetuin and fetuin were used as negative (-) and positive (+) controls, respectively

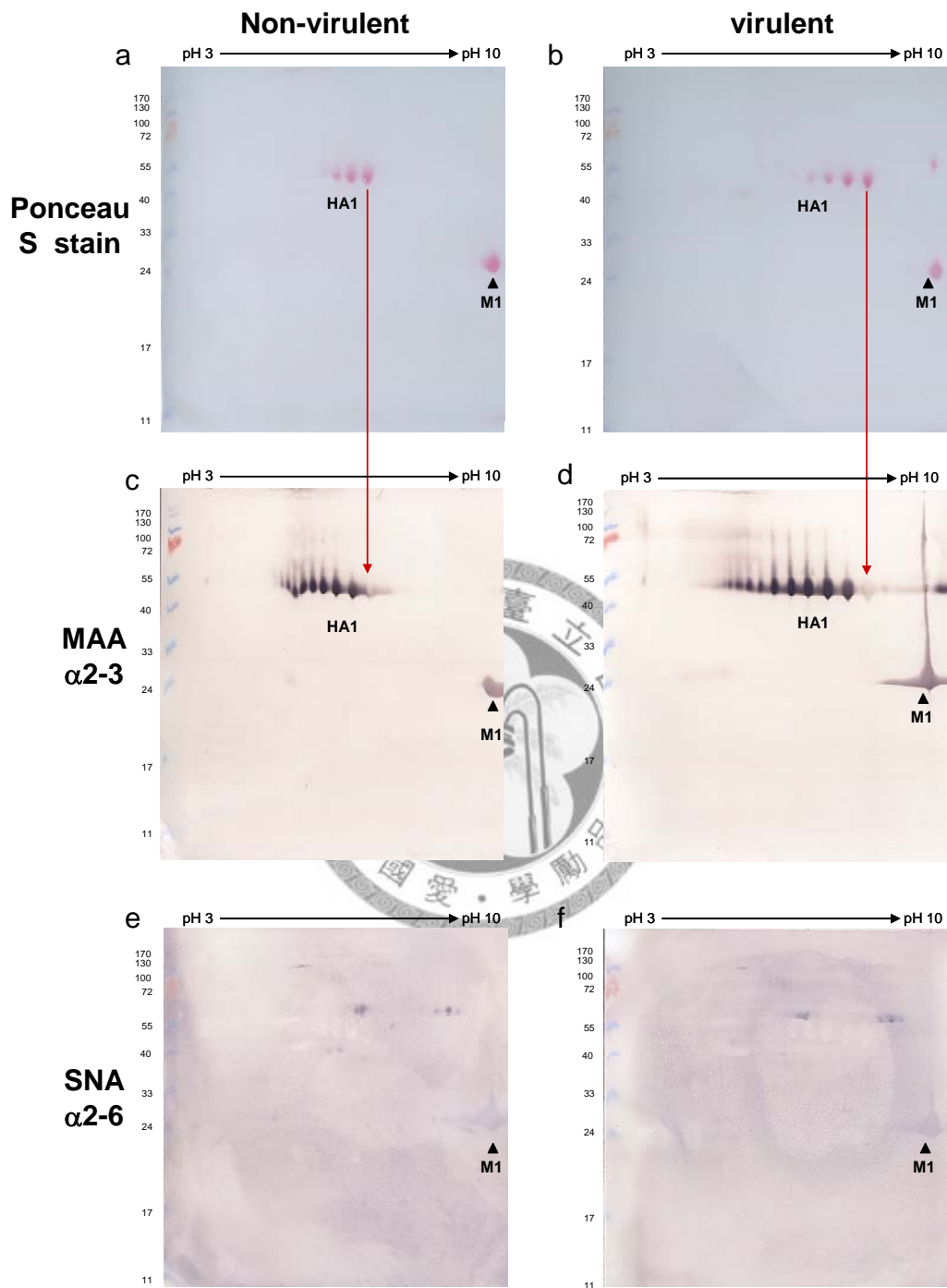


圖 3.10 以凝集素染色法 (lectin blot) 配合二次元電泳分析病毒蛋白質  
 Figure 3.10 Sialoglycoproteins were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE)  
 and MAA/SNA lectins

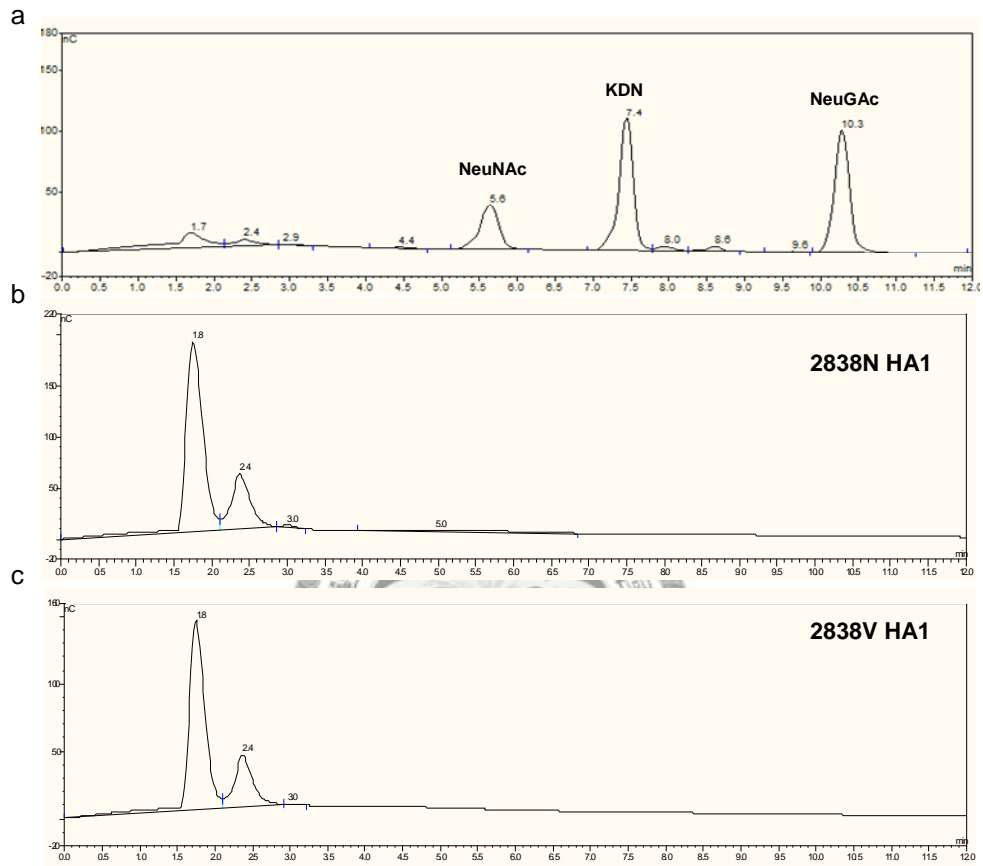


圖 3.11 以高效能陰離子交換層析儀 (HPAEC) 配合脈衝式安培法偵測器 (PAD) 分析血液凝集素 1 (HA1) 表面醣化中之唾液酸亞型

Figure 3.11 Sialic acid composition in HA 1 was analyzed by high performance anion-exchange chromatography (HPAEC), coupled with pulsed amperometric detection (PAD)

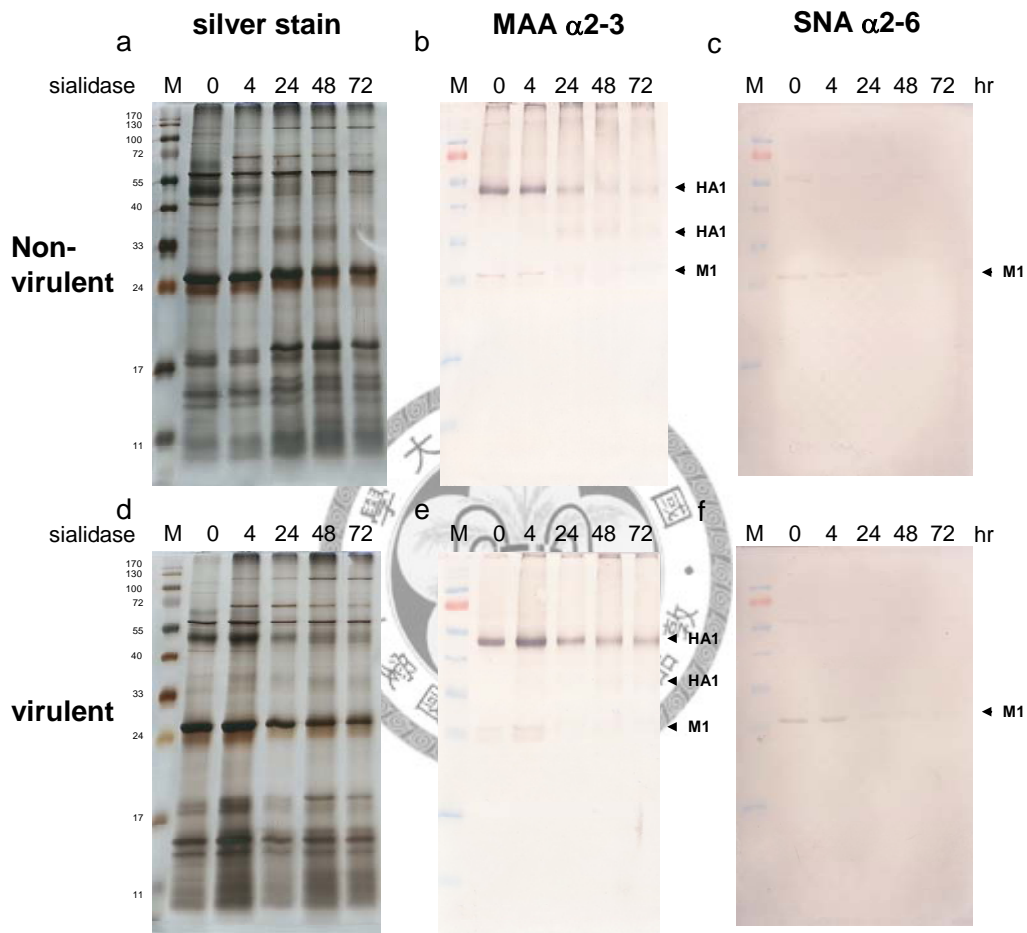


圖 3.12 血液凝集素 1 (HA1) 經唾液酸酶水解後，以凝集素染色法分析  
 Figure 3.12 Lectin blotting analysis of HA1 after sialidase treatment

### 3.5 血液凝集素 1 (HA1) 之醣質表現圖譜

HA1 有 4 至 6 個可能之 N-醣基化位置 (N-glycosylation sites) (圖 3.4 b)，本實驗以凝集素染色為基礎之 QIAGEN 醣晶片分析 HA1 之醣質，接著使用 MALDI-TOF/TOF 質譜儀，研究 HA1 之醣質表現圖譜。

#### 3.5.1 使用醣晶片分析 HA1 之醣質

本實驗利用 Qproteome GlycoArray Kit 分析 HA1 之醣質，此醣晶片各點固定了特定之凝集素，若 HA1 之醣質可和固定之凝集素結合，配合 HA 之單株抗體以及帶有螢光之二次抗體，即可得知 HA1 醣質之概況。結果如圖 3.13 所示，首先 HA1 之醣質可能有 N-複雜型 (N-complex type) 之結構，如二分支 (biantennary) 和三、四分支 (tri-/tetraantennary) 等複雜結構。次之 HA1 可能有 N-醣基之核心甘露糖 (mannose) 或是 high-mannose 型之醣結構。接著 HA1 醣鏈之尾端可能是半乳糖 (galactose) 或 N-乙醯半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine)。另外，HA1 有  $\beta$  半乳糖 ( $\beta$ -galactose) 訊號顯示，表示 HA1 有部分之醣鏈之末端為半乳糖，且無接上唾液酸。而醣晶片也發現 HA1 之醣質有岩藻醣基化 (fucosylation) 之現象。最後，HA1 有被偵測到大量的唾液酸訊號 (sialic acid)，表示 HA1 除了有部分半乳糖或 N-乙醯半乳糖胺作為醣鏈末端的醣質之外，亦有許多以唾液酸為末端之醣質。而此醣晶片若是唾液酸之訊號過強，則會導致  $\beta$  半乳糖、N-乙醯半乳糖胺及 N-乙醯葡萄糖胺之訊號較為低落 (Qproteome glycoarray handbook)，此現象亦可在圖 3.13 發現。偵測到大量之唾液酸訊號，表示 HA1 有一種以上之醣基末端為唾液酸，而此以凝集素染色為基礎之醣晶片，快速的提供了 HA1 醣質之概況，可輔助 3.5.3 質譜儀之醣質體分析。

#### 3.5.2 使用 HPLC 配合螢光偵測器分析 HA1 之醣質

HA1 只有 N-glycans 而無 O-glycans，本實驗將 HA1 之 N-glycans 以 PNGase F 於電泳膠體內酶切釋放，接著以 2-aminobenzamide 進行螢光標定，並使用 HPLC 分析 HA1 之醣質，流程如圖 3.14 a 所示。結果顯示 HA1 有 10 種左右不同大小之 N-glycans，圖 3.14 b。

#### 3.5.3 以 MALDI-TOF/TOF MS 及 MS/MS 研究 HA1 之醣質表現圖譜

本實驗利用質譜儀進行 HA1 醣質定序與醣質體之質譜分析，實驗流程如圖 3.15 所示。首先以二次元電泳分離 6 種 HA1 之異構物，接著切下 HA1 各蛋白質點進行膠內水解後，使用 PNGase F 釋放 N-glycans，並以 Sep-Pak C18 小柱分離肽鏈及醣質，接著將分離的醣質泛甲基化後，以 MALDI TOF/TOF MS 及 MS/MS 進行醣質定序。圖 3.13 為 MALDI TOF/TOF MS 比較病毒株最鹼性之 HA1 異構物之醣質差異。結果顯示，兩株病毒株並無明顯差異圖 3.16。毒性病毒株最鹼性之 HA1 異構物經由 MALDI MS 分析後 (圖 3.17 a)，選出三組 m/z 值分別為 1579.8、1867.0



和 2489.2 作為前驅者 (precursor)，進行 MS/MS 之醣質定序，可得到圖 3.17 呈現之醣質結構。

首先， $m/z$  1579.8 之醣質為 5 個 mannose 之 high mannose type 醣鏈 (圖 3.17 a)；而  $m/z$  1867 之醣質為  $m/z$  1579.8 之醣質再加上一個  $m/z$  287.2 之物質，將此未知物質稱為 X，此醣質稱為 X-glycan (圖 3.17 b)；而  $m/z$  2489.2 之醣質為 N-複雜型 (N-complex type) 之三分支 (tri-antennary) 結構 (圖 3.17 c)。

而使用上述三個醣質之確切結構，則可由 MALDI MS 之結果 (圖 3.16) 推測出其餘醣質之結構。表 3.2 為 HA1 十個主要醣質之組成及結構分析，可發現  $m/z$  2070.3 及  $m/z$  2244.4 為 N-複雜型之二分支 (bi-antennary) 醣質，其中  $m/z$  2244.4 較  $m/z$  2070.3 多一個 fucose； $m/z$  2489.2、 $m/z$  2693.6 及  $m/z$  2867.8 為 N-複雜型之三分支 (tri-antennary) 醣質，其中  $m/z$  2489.2 為確切解出之結構， $m/z$  2693.6 較  $m/z$  2489.2 多一個 fucose， $m/z$  2693.6 較  $m/z$  2867.8 多出兩個 fucose； $m/z$  2968.8、 $m/z$  3143.0 及  $m/z$  3317.2 為 N-複雜型之四分支 (tetra-antennary) 醣質， $m/z$  3143.0 較  $m/z$  2968.8 多一個 fucose， $m/z$  3317.2 較  $m/z$  2968.8 多兩個 fucose。

另外，使用 MALDI TOF/TOF MS 比較各 HA1 異構物之醣質差異，可發現等電點越低，也就是越酸之 HA1 異構物，其  $m/z$  1867 之 X-glycan 含量比例越高，如圖 3.18 所示。表 3.3 為 HA1 異構物各醣質之含量比較。





# Glycoarray analysis

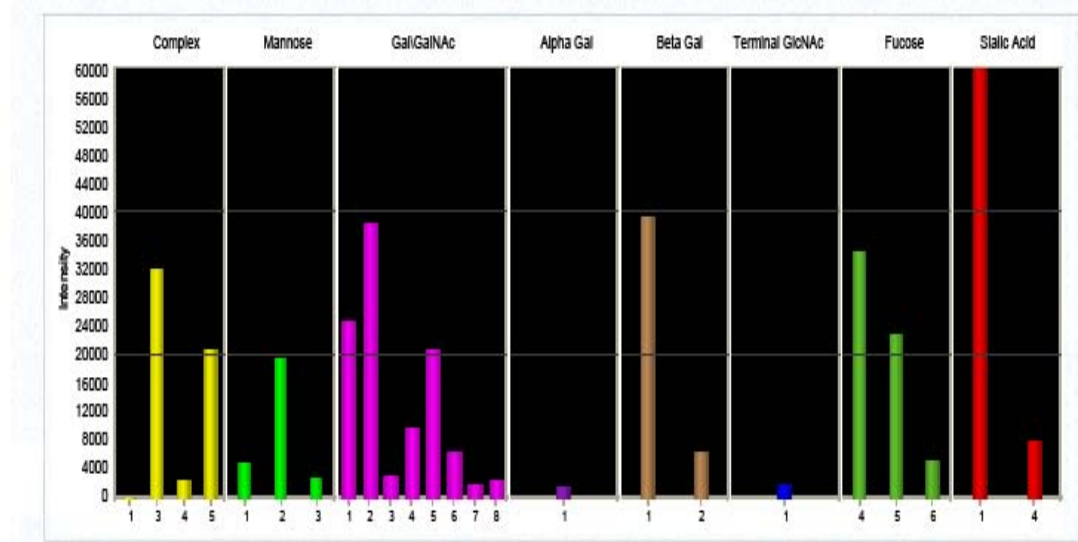
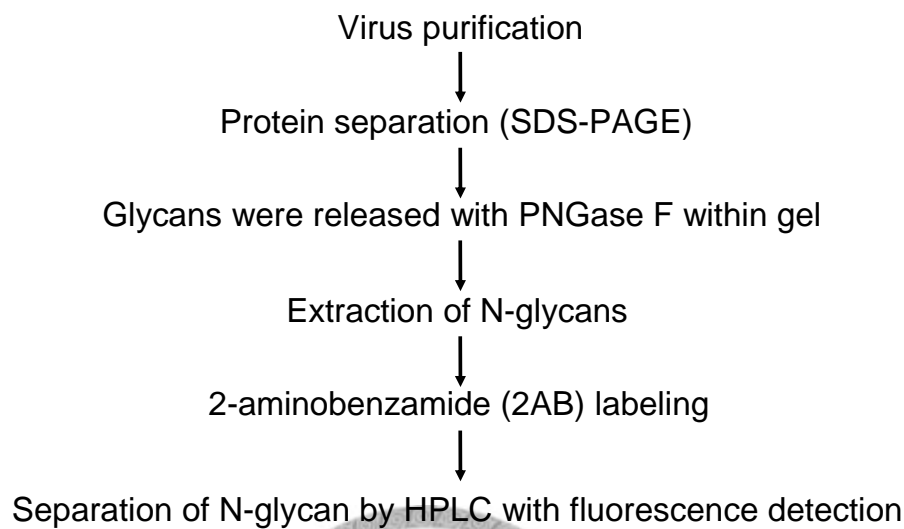


圖 3.13 利用 Qproteome 醣晶片分析血液凝集素 1 (HA1) 之醣質  
 Figure 3.13 Qproteome GlycoArray Kit analysis for the glycan of hemagglutinin 1 (HA1)

a



b

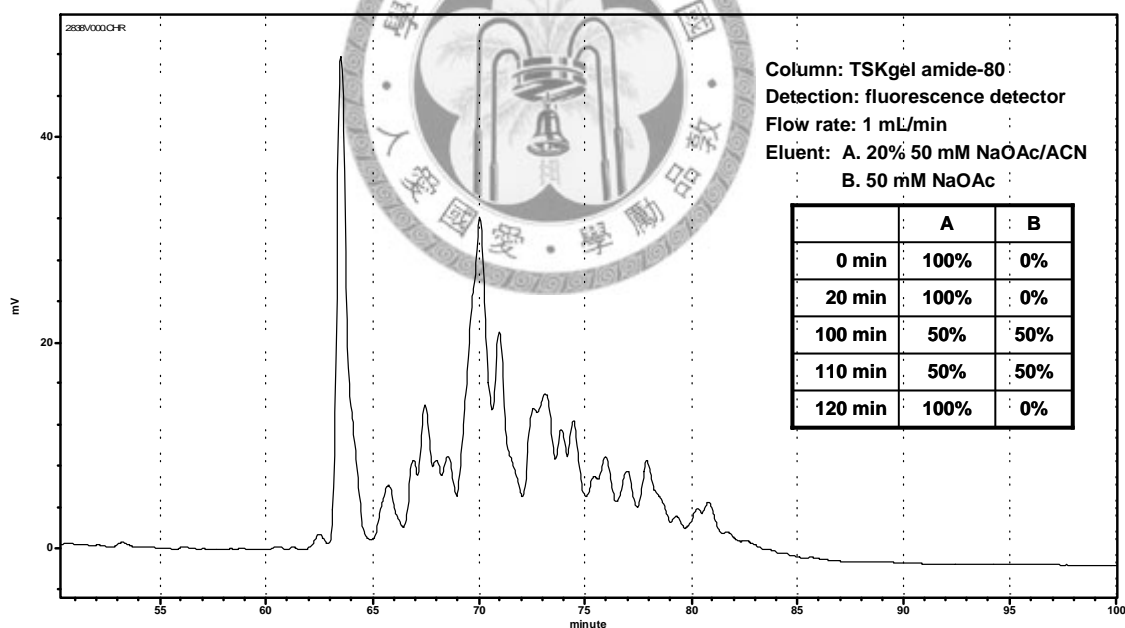


圖 3.14 使用 HPLC 分析毒性株 HA1 螢光標定之 N-醣質

Figure 3.14 HPLC analysis of fluorescence-labeled HA1 N-glycans of virulent strain

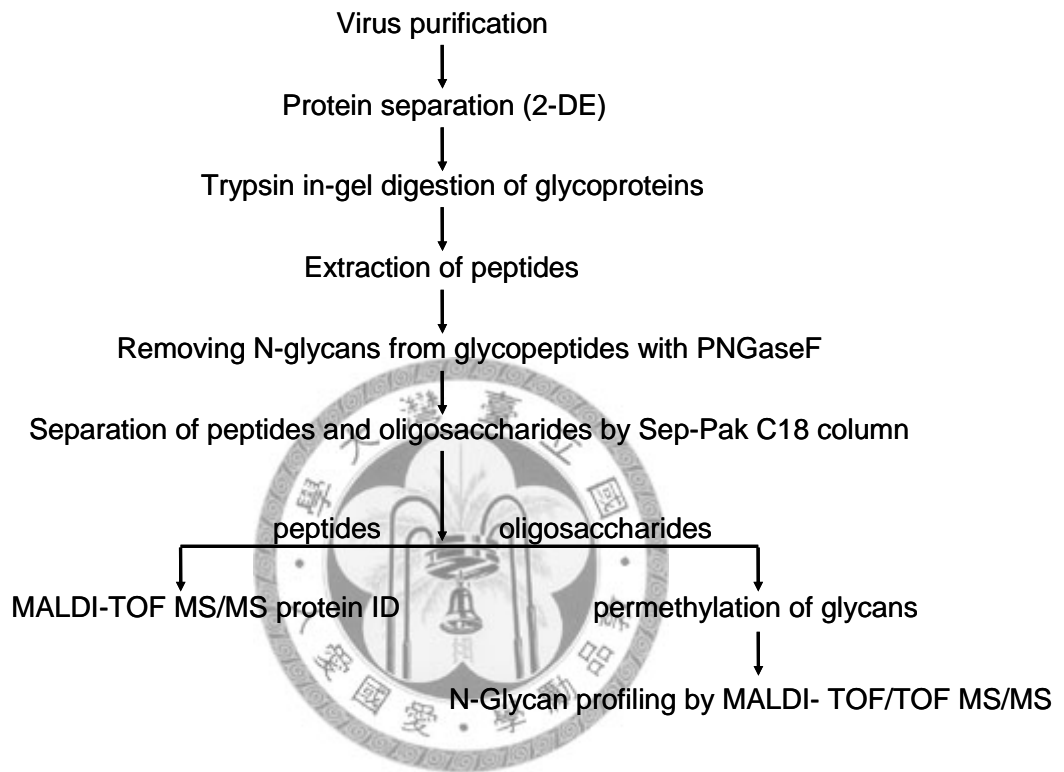


圖 3.15 醣質定序與醣質體之質譜分析流程

Figure 3.15 Workflow of N-glycans profiling

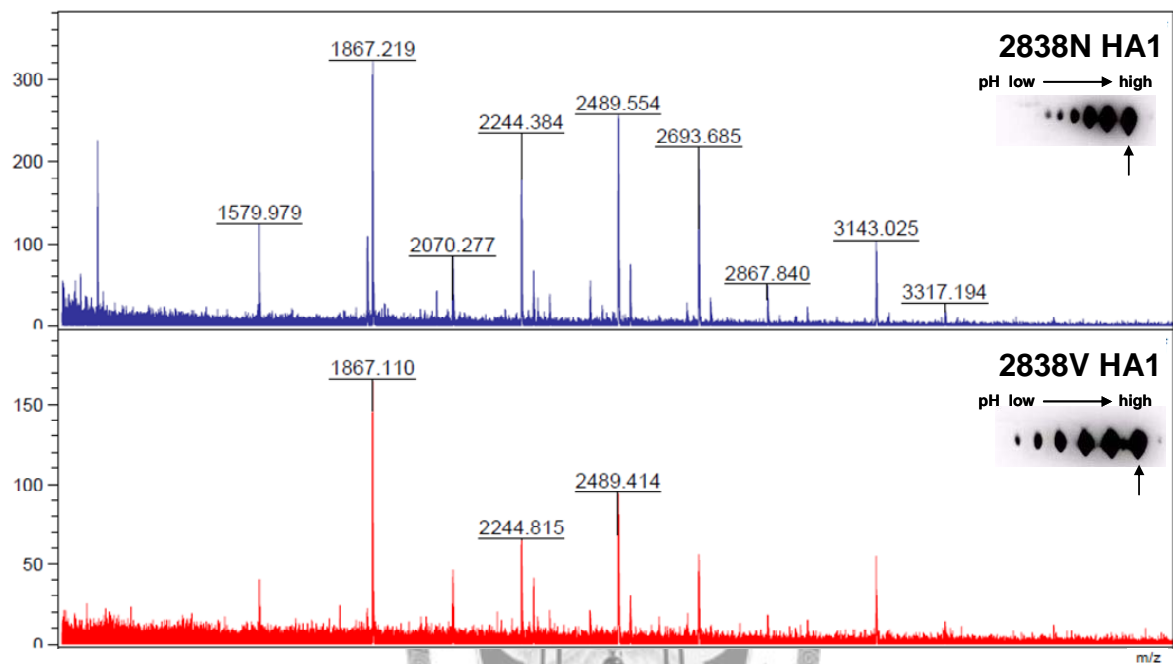
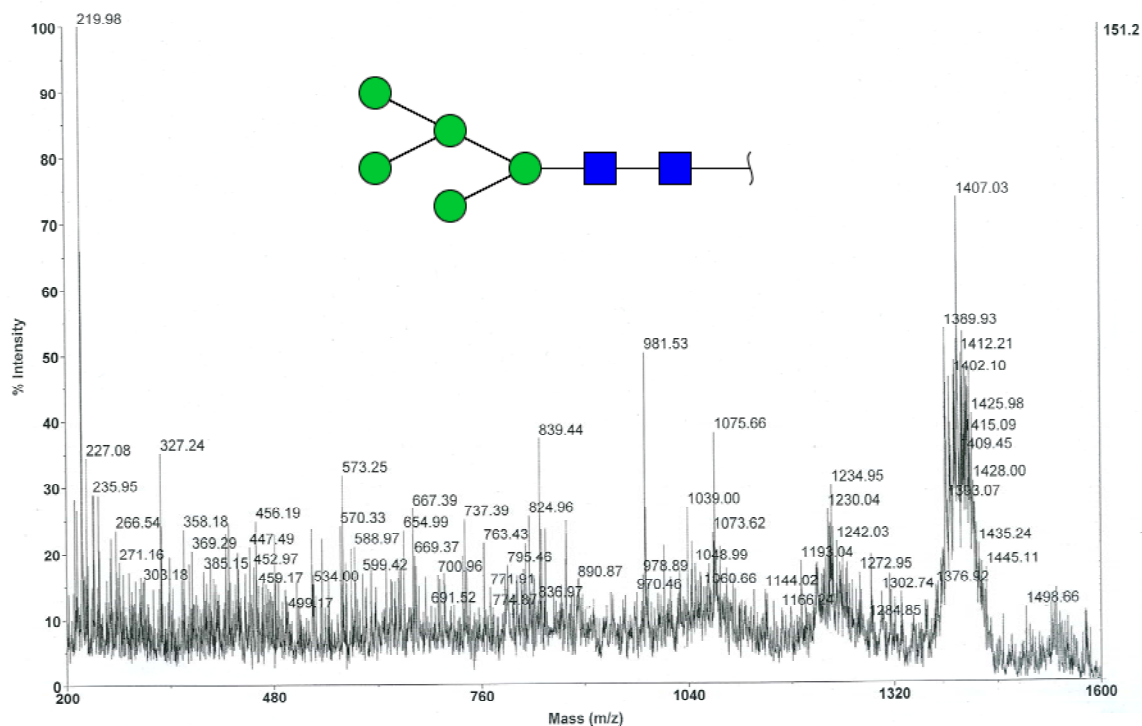


圖 3.16 MALDI MS 比較毒性與非毒性禽流感病毒株 HA1 之醣質表現圖譜。

Figure 3.16 Comparison by the MALDI TOF/TOF MS glycan profiles for hemagglutinin 1 between 2838N and 2838V

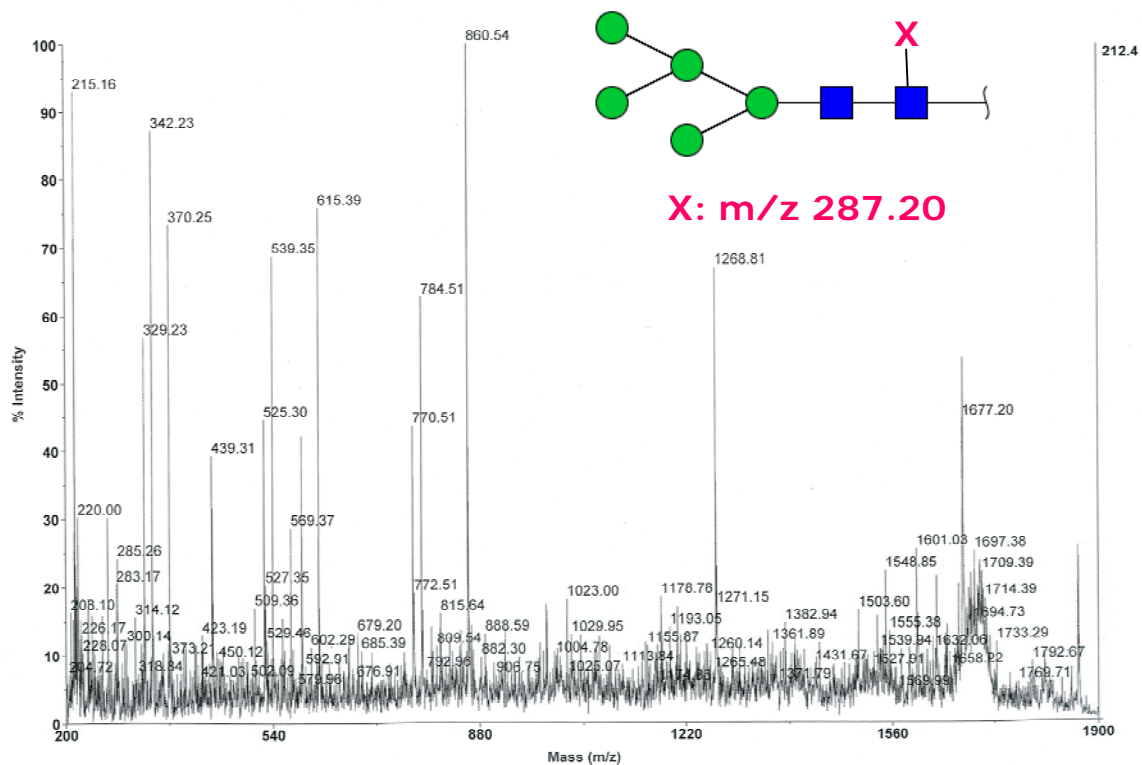
a **m/z 1579.79**



m/z	structure	type
327.24		B <sup>1,4</sup> X <sub>Man</sub> <sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>
459.17		B <sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>
573.25		<sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>
667.39		C
737.39		B <sup>3,5</sup> X <sub>Man</sub> Y
839.44		BY
981.53		<sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>
1039.00		Y <sup>1,4</sup> X <sub>Man</sub> <sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>
1075.66		C
1230.04		Y <sup>1,4</sup> X <sub>Man</sub>
1389.93		<sup>1,5</sup> X <sub>Man</sub>

- ▼ Fucose
- Mannose
- Galactose
- N-acetylglucosamine

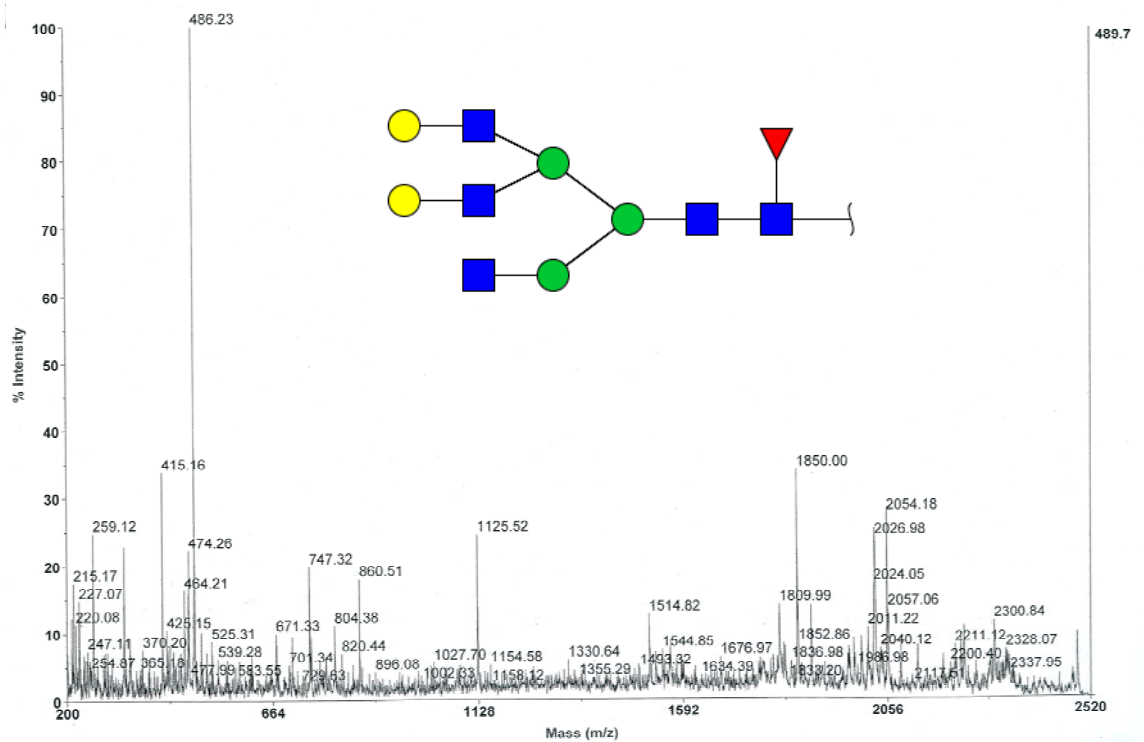
b m/z 1866.99



m/z	structure	type
615.39		1,5X <sub>GalNAc</sub>
860.54		1,5X <sub>Man</sub>
1268.81		1,5X <sub>Man</sub>
1677.20		1,5X <sub>Man</sub>
1792.67		0,4X <sub>Man</sub>

- ▼ Fucose
- Mannose
- Galactose
- N-acetylglucosamine

C m/z 2489.20



m/z	structure	type
259.12		C
474.26		Y
486.23		B
747.32		1,5X <sub>Man</sub>
1809.99		C
2026.98		C
2300.84		Y

▼ Fucose  
 ● Mannose  
 ● Galactose  
 ■ N-acetylglucosamine

圖 3.17 以 MALDI MS/MS 確認毒性株 HA1 之醣質序列

Figure 3.17 MALDI MS/MS analysis of HA1 N-glycans of virulent strain

- 以 m/z 1579 之醣鏈做為前驅者，進行 MS/MS
- 以 m/z 1867 之醣鏈做為前驅者，進行 MS/MS
- 以 m/z 2489 之醣鏈做為前驅者，進行 MS/MS



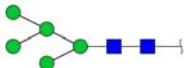
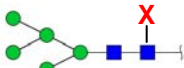
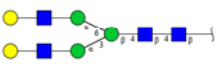
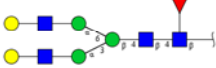


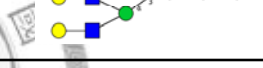



m/z	N-glycan composition	structure
1579.979	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	
1867.219	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub> X <sub>1</sub>	
2070.277	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub>	
2244.384	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub>	
2489.433	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	
2693.685	Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub>	
2867.840	Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>5</sub> Fuc <sub>2</sub>	
2968.785	Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub>	
3143.025	Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>1</sub>	
3317.194	Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>6</sub> Fuc <sub>2</sub>	

表 3.2 HA1 之 N-醣質  
Table 3.2 The N-glycans of HA1

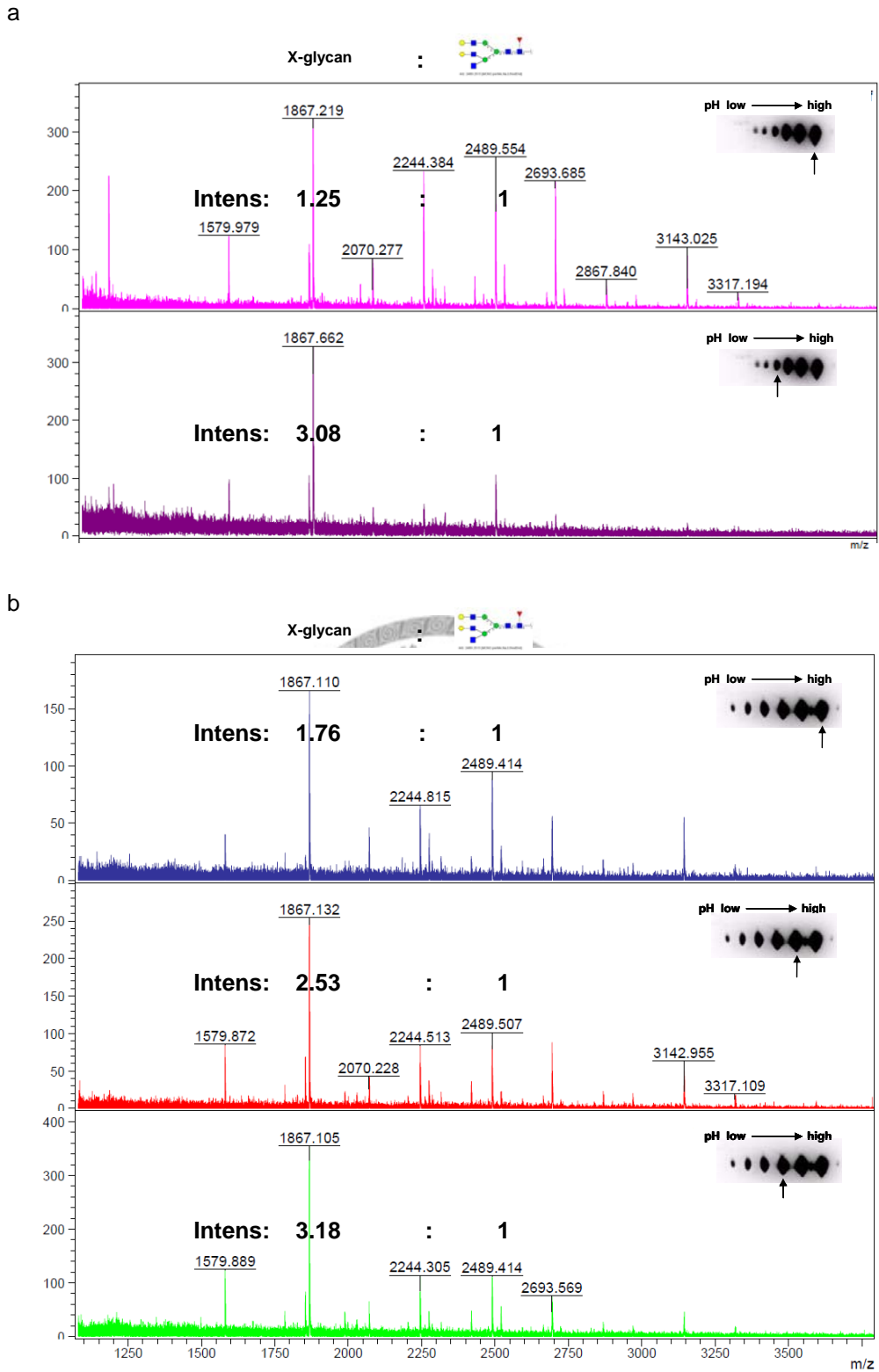


圖 3.18 比較 HA1 異構物之間 X-醣鏈之差異  
 Figure 3.18 Comparison for the X-glycans between HA1 isoforms

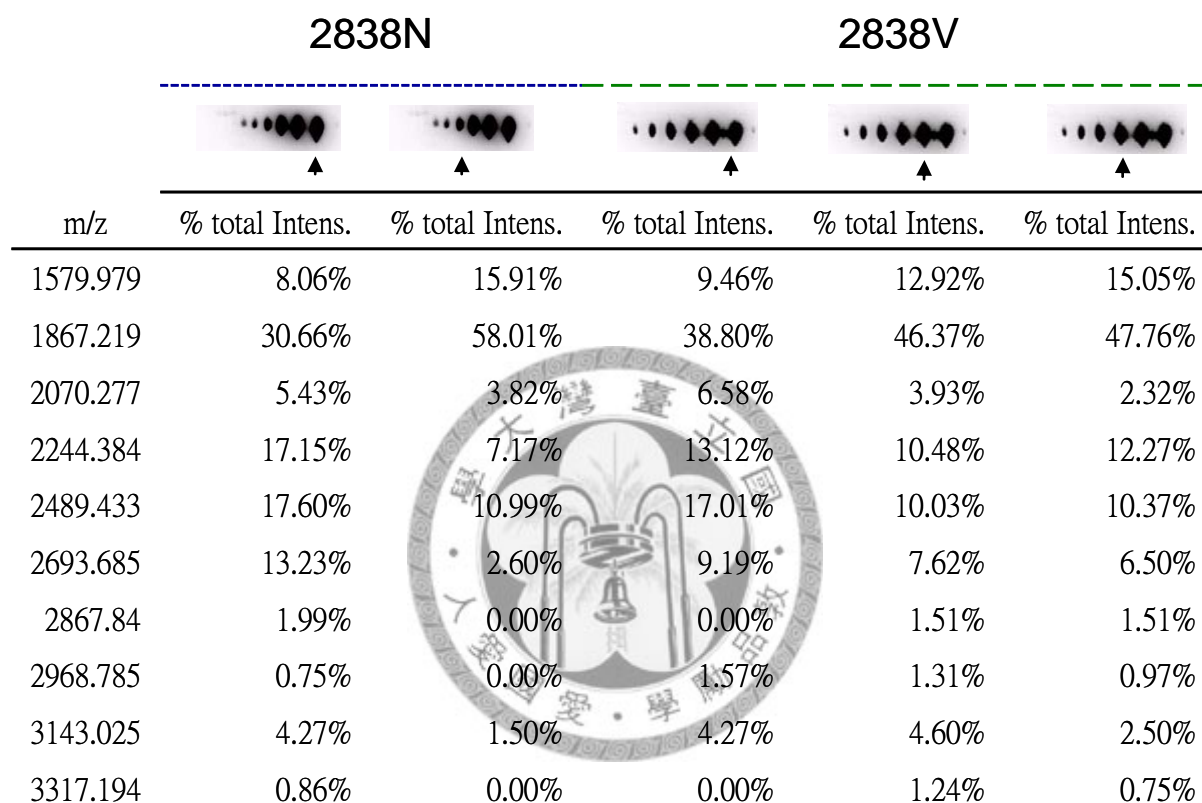


表 3.3 比較非毒性與毒性禽流感病毒株之 HA1 異構物之間醣質比例之差異  
 Table 3.3 Comparison for the N-glycans ratio of HA1 between 2838N and 2838V

## 第四章 討論

### 4.1 探討非毒性及毒性病毒株之間 HA1 等電點之差異，及其各自形成 6 種等電點異構物之生理意義

HA 被專一性的蛋白水解酶切割成 HA1 及 HA2 後，始具有感染能力，而這些專一性的蛋白水解酶也進一步造成了病毒感染的組織趨性 (tissue tropism)；另外，研究也發現 HA1 蛋白質本身酸鹼性的改變，會影響流感病毒與受體結合的特性，進而造成組織趨性<sup>65</sup>。本實驗使用之兩株病毒株中，非毒性病毒株並無特定的組織趨性，且感染後並無明顯症狀；但毒性病毒株則會特定攻擊腎臟，造成宿主腎臟缺失並死亡，這樣特定的組織趨性，可能和毒性株的 HA1 較呈鹼性相關。比較兩株病毒株 HA1 在 329 個胺基酸中只有 2 個不同，但此 2 個胺基酸差異卻使非毒性與毒性株之 HA1 相差 3 個電荷 (由 2 個酸性胺基酸變成 1 個中性及 1 個鹼性胺基酸)，這樣的差異使毒性株之 HA1 較鹼性，可能會影響病毒與受體結合的特性，進而造成組織趨性，使毒性病毒株趨向於感染腎臟組織。

本實驗使用的兩株病毒株，都各有 6 個等電點異構物，而在先前的研究亦發現大部分流感病毒之 HA1 皆會形成多個異構物<sup>63,66</sup>，而此現象亦被稱為 HA1 之 charge heterogeneity。然而，對於這些多型性 HA1 之研究並不完整，無論是如何形成這些異構物以及這些異構物的功能都尚未被研究清楚。雖然尚未有研究提到為何 HA1 會有多種等電點異構物，但可以從既有的知識及演化的概念推知，HA1 之多型性可能和病毒的生存有關，因 HA 之酸鹼性會影響其感染之組織趨性<sup>65</sup>，因此若 HA1 本身就擁有多種等電點差異甚大的多種異構物，則有幫助病毒在宿主體內感染及擴散。此外，流感病毒之 HA 蛋白質為宿主辨識最主要的抗原，而宿主產生之抗體也會和 HA 結合並進行中和反應，而 HA1 多種異構物可能也有助於病毒逃脫宿主之免疫系統，只要有一種以上之異構物沒有被免疫系統攻擊，病毒存活的機率就會增加，因此認為 HA1 形成多種等電點異構物，可能和流感病毒之生存及感染能力有關係。

### 4.2 HA1 之醣基化位置與其功能探討

流感病毒之 HA 皆有不同程度之 N-醣基化，經由預測發現，本實驗所使用的兩株病毒株醣基化位置並無差異，且分別有 4 至 6 個可能的醣基化位置。在 1.2.4 提到目前已知 HA 之醣基化與其功能的關係，著重在醣基化位置是否影響蛋白質三級結構功能區塊。因此，我們以 Discovery Studio 2.0 軟體，利用目前已知結構之 1HA0 (PDB ID) 為模板，進行蛋白質三級結構之模擬，並標示出可能醣基化之 ASN-X-Ser/Thr 位於蛋白質三級結構之位置，如圖 4.1 所示。結果顯示，Asn-167 位於球狀頭部頂端，且在受

體結合區的對面，此醮基化位置可能不會減少宿主之結合力，但可能遮蔽 HA 頂端之抗原結合位置，幫助 HA 逃脫宿主免疫系統。而位於 HA1 中段亦有兩個可能之醮基化位置，Asn-291 和 Asn-296，這兩個醮基化位置距離受體結合區與蛋白質水解切位較遠，但亦可能會影響蛋白質之折疊 (folding)。此外，Asn-23、Asn-10 及 Asn-11 和蛋白質水解切位較接近，因此本實驗之兩株病毒株切位可能會被醮質所遮蔽。然而，蛋白質水解切位是決定病毒致病力強弱的重要依據，此兩株病毒株都編列於低病原性禽流感病毒，可能是因為醮基化位置遮蔽蛋白質水解切位所造成<sup>67</sup>。

#### 4.3 除了醮基化外，蛋白質骨架本身及其它蛋白質轉譯後修飾亦可能造成 HA1 異構物

異構物形成之原因亦可能是由蛋白質骨架本身及其他轉譯後修飾所共同造成。有研究指出抑制 HA1 之醮基化後，HA1 依舊可生成多個異構物<sup>66</sup>。而蛋白質轉譯後修飾，除了醮基化 (glycosylation) 以外，可能使蛋白質骨架酸化的還包括：磷酸化 (phosphorylation)、硫酸鹽化 (sulfation)。目前研究發現，HA 預測出許多磷酸化位置<sup>68</sup>，使用軟體預測本實驗所使用的兩株病毒之 HA1 序列，亦有許多磷酸化位置，然而經由本實驗發現 HA1 並無磷酸化現象。另外，有文獻指出 HA 之醮基有被硫酸鹽化<sup>69</sup>；亦有文獻預測 HA 之 Tyr 可能會被硫酸鹽化<sup>70</sup>。由以上種種研究可發現，形成 HA1 多種異構物之原因可能不只單單因為醮基化所造成，可能還和蛋白質骨架本身及其餘轉譯後修飾有關。

#### 4.4 m/z 1867 之 X-glycan 尚未被報導過

HA1 有多種等電點異構物，於 30 年前進行二次元電泳就已被發現<sup>63</sup>，但當時作者引用前人 HA 全醮分析之研究，認為 HA1 上並無唾液酸<sup>71</sup>，故這些異構物形成之原因並非由唾液酸所造成。本研究利用 lectin blot 發現，於雞胚蛋內繁殖之病毒的 HA1 可能有  $\alpha$ -2,3 之唾液酸化修飾，且等電點越低之 HA1 異構物被 MAA 結合的能力越強，但無論是以唾液酸水解酶或是 HPAEC-PAD 分析都無法獲得預期之結果，因此進行 MS/MS 分析，欲解出 HA1 之全醮結構。

以 MALDI MS/MS 的結果發現，HA1 之 10 種左右之醮質皆無唾液酸修飾。此經過和前人之實驗相符<sup>72</sup>，因此在凝集素染色中 MAA 與 HA1 醮質之結合可能是因為一些非專一性結合所致。而有趣的是，實驗發現 HA1 最多之醮質為 m/z 1867 此未知之醮質，稱之為 X-glycan，X-glycan 是由 m/z 1579 之 high mannose type 之醮質再接上一個 m/z 287 之未知物質 X。

#### 4.5 X-glycan 與 HA1 等電點異構物可能之兩種關係

比較各 HA1 異構物之間醮質之差異，可發現等電點越低，也就是越酸之 HA1 異構物，其 X-glycan 含量比例越高。因此推論有兩種可能性，其一：若 X 為酸性物質，則 X 可能為造成 HA1 形成多種異構物的原因之一，但 HA1 最有可能之醮基化位置

只有四個，若單單只是由 X-glycan 所造成，可能不會形成 6 種以上的等電點異構物，因此亦有可能有其餘未知之轉譯後修飾參與。其二：若 X 是中性物質，則代表不同等電點異構物並非由醣基化所造成，而越酸性的 HA1 異構物接上 m/z 1579 及 m/z 1867 之 high mannose type 醣質之比例越高之成因，則是因為不同等電點之 HA1 會有不同比例之醣基化。



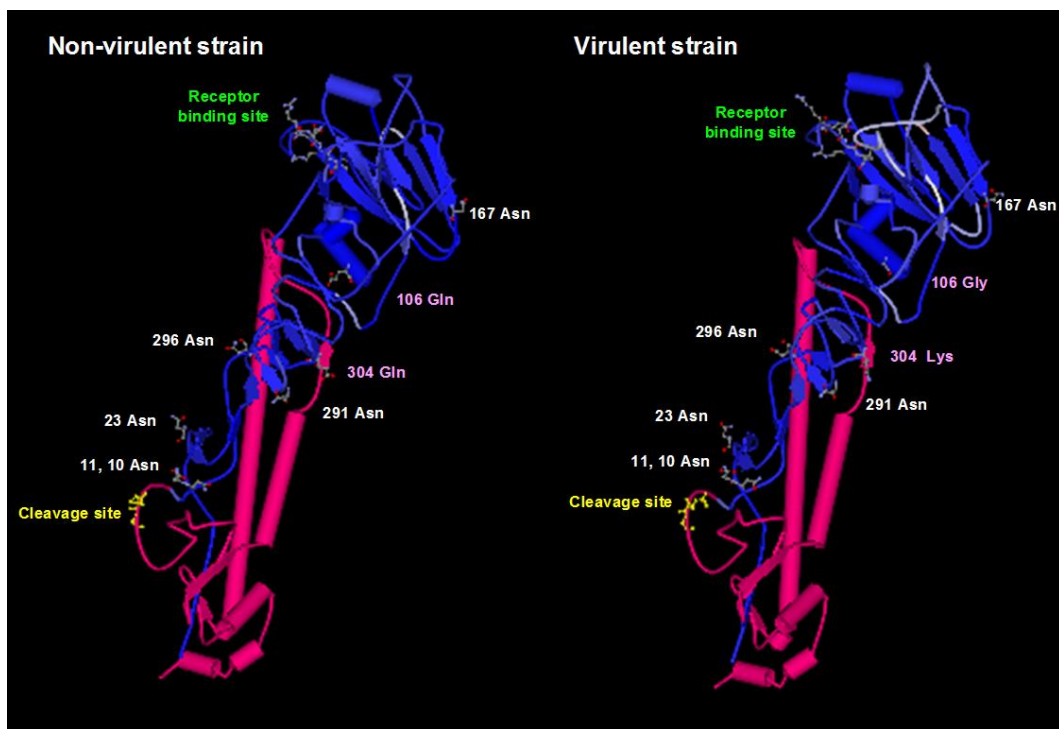


圖 4.1 使用 Discovery Studio 2.0 軟體，進行兩病毒株 HA 之蛋白質三級結構模擬  
Figure 4.1 Homology modeling of HA for two AIV strains by Discovery Studio 2.0

## 第五章 結論

以二次元電泳分析比對非毒性與毒性 H6N1 禽流感病毒株，發現毒性株 HA1 蛋白質群點之等點電較非毒性株大，此差異源自於 HA1 之胺基酸序列差異，而毒性株之 HA1 較呈鹼性，可能和病毒之組織趨性有關。

利用免疫染色法，清楚發現兩株病毒之 HA1 各有六種等電點異構物。研究證實這些異構物並非由蛋白質磷酸化所造成，而是與 HA1 之醣質相關。使用 lectin blot 發現，唾液酸 (sialic acid) 可能會以  $\alpha$  2-3 之方式與 HA1 醣質之半乳糖 (galactose) 鍵結後，實驗進一步以醣晶片、HPLC，配合 MALDI MS/MS 建立 HA1 之醣質表現圖譜。結果發現，HA1 之醣質皆無唾液酸修飾。特殊的是，HA1 大部分之醣質為 m/z 1867 之未知 X-glycan。X-glycan 為 m/z 1579 之 high mannose type 之醣質再加上一個 m/z 287 未知之物質 X。比較各 HA1 異構物之醣質圖譜發現，等電點越低之 HA1 異構物其 X-glycan 比例越高。因此推論若 X 為酸性物質，則 HA1 之 X-glycan 可能為形成 HA1 多種等電點異構物的原因之一；若 X 為中性物質，則表示越酸性之 HA1 異構物，其 high mannose type 之醣質比例越高。而 HA1 形成多種異構物，則可能和流感病毒之宿主辨識、組織趨性及逃脫宿主免疫系統有關。



## 第六章 參考文獻

1. Lupiani, B. & Reddy, S.M. The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (2008).
2. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**, 152-79 (1992).
3. Alexander, D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* **19**, 443-62 (2000).
4. Gendon Iu, Z. [Influenza pandemic: hypotheses and facts]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 109-18 (2008).
5. Basler, C.F. & Aguilar, P.V. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* **79**, 166-78 (2008).
6. Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**, 4603-8 (1989).
7. Perkins, L.E. & Swayne, D.E. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet Pathol* **40**, 14-24 (2003).
8. Perkins, L.E. & Swayne, D.E. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis* **47**, 956-67 (2003).
9. Kaiser, J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* **312**, 380-2 (2006).
10. Zebedee, S.L. & Lamb, R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**, 2762-72 (1988).
11. Cornelia Schroeder<sup>1</sup>, H.H., Elisabeth Möncke-Buchner and Tse-I Lin. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein *European Biophysics Journal* **34**, 52-66 (2005).
12. Brown, E.G. Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, 196-209 (2000).
13. Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M.A. & van der Werf, S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* **62**, 403-24 (2008).
14. Sidorenko, Y. & Reichl, U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng* **88**, 1-14 (2004).

15. Chen, W. et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306-12 (2001).
16. Portela, A., Zurcher, T., Nieto, A. & Ortin, J. Replication of orthomyxoviruses. *Adv Virus Res* **54**, 319-48 (1999).
17. Mikulasova, A., Vareckova, E. & Fodor, E. Transcription and replication of the influenza A virus genome. *Acta Virol* **44**, 273-82 (2000).
18. Bouvier, N.M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53 (2008).
19. Neumann, G., Hughes, M.T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**, 6751-8 (2000).
20. Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**, 147-65 (2004).
21. Webster, R.G. & Rott, R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell* **50**, 665-6 (1987).
22. Gong, J., Xu, W. & Zhang, J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* **14**, 113-22 (2007).
23. Pinto, L.H. & Lamb, R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* **281**, 8997-9000 (2006).
24. Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**, 2359-76 (2008).
25. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W. & Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* **124**, 12-21 (2007).
26. Couceiro, J.N., Paulson, J.C. & Baum, L.G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* **29**, 155-65 (1993).
27. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A. & Klenk, H.D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4620-4 (2004).
28. Siczekarski, S.B. & Whittaker, G.R. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**, 1535-45 (2002).
29. Siczekarski, S.B. & Whittaker, G.R. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**, 10455-64 (2002).
30. Cros, J.F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**, 3-12 (2003).
31. Li, X. & Palese, P. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* **68**, 1245-9 (1994).
32. Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. The polyadenylation signal of

- influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**, 2861-7 (1991).
33. Robertson, J.S., Schubert, M. & Lazzarini, R.A. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol* **38**, 157-63 (1981).
  34. Krug, R.M. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**, 125-49 (1981).
  35. Park, Y.W. & Katze, M.G. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**, 28433-9 (1995).
  36. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**, 723-34 (2002).
  37. Subbarao, K. & Katz, J. Avian influenza viruses infecting humans. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1770-84 (2000).
  38. Gamblin, S.J. et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* **303**, 1838-42 (2004).
  39. Rogers, G.N. & D'Souza, B.L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* **173**, 317-22 (1989).
  40. Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G. & Paulson, J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**, 17-23 (1994).
  41. Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. & Webster, R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* **73**, 1146-55 (1999).
  42. Ito, T. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**, 7367-73 (1998).
  43. Bean, W.J. et al. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol* **66**, 1129-38 (1992).
  44. Parrish, C.R. & Kawaoka, Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol* **59**, 553-86 (2005).
  45. Recker, M., Pybus, O.G., Nee, S. & Gupta, S. The generation of influenza outbreaks by a network of host immune responses against a limited set of antigenic types. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7711-6 (2007).
  46. Rott, R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol* **33**, 303-10 (1992).
  47. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J Clin Microbiol* **33**, 748-51 (1995).
  48. Rohm, C., Zhou, N., Suss, J., Mackenzie, J. & Webster, R.G. Characterization of a

- novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* **217**, 508-16 (1996).
49. Hebart, H. et al. CMV infection after allogeneic bone marrow transplantation is associated with the occurrence of various autoantibodies and monoclonal gammopathies. *Br J Haematol* **95**, 138-44 (1996).
  50. Keil, W., Niemann, H., Schwarz, R.T. & Klenk, H.D. Carbohydrates of influenza virus. V. Oligosaccharides attached to individual glycosylation sites of the hemagglutinin of fowl plague virus. *Virology* **133**, 77-91 (1984).
  51. Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-69 (2000).
  52. David J. Vigerust, a.V.L.S. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions *Trends in Microbiology* **15**, 211-218 (2007).
  53. Perdue, M.L. & Suarez, D.L. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol* **74**, 77-86 (2000).
  54. Baigent, S.J. & McCauley, J.W. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* **79**, 177-85 (2001).
  55. Abe, Y. et al. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol* **78**, 9605-11 (2004).
  56. Klenk, H.D., Wagner, R., Heuer, D. & Wolff, T. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res* **82**, 73-5 (2002).
  57. Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S. & Klenk, H.D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* **74**, 6316-23 (2000).
  58. Deshpande, K.L., Fried, V.A., Ando, M. & Webster, R.G. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 36-40 (1987).
  59. Zambon, M.C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* **44 Suppl B**, 3-9 (1999).
  60. Sauter, N.K. et al. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry* **31**, 9609-21 (1992).
  61. Wang, C.W. & Wang, C.H. Experimental selection of virus derivatives with variations in virulence from a single low-pathogenicity H6N1 avian influenza virus field isolate. *Avian Dis* **47**, 1416-22 (2003).
  62. 何杰龍. 建立單株抗體庫以應用於臺灣家禽流行性感冒病毒之蛋白質體學研究. 國立台灣大學微生物與生物化學研究所博士班資格考論文 (2006).

63. Privalsky, M.L. & Penhoet, E.E. Influenza virus proteins: identity, synthesis, and modification analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3625-9 (1978).
64. Hsu, C.N. & Wang, C.H. Sequence comparison between two quasi strains of H6N1 with different pathogenicity from a single parental isolate. *J Microbiol Immunol Infect* **39**, 292-6 (2006).
65. Philpott, M., Hioe, C., Sheerar, M. & Hinshaw, V.S. Hemagglutinin mutations related to attenuation and altered cell tropism of a virulent avian influenza A virus. *J Virol* **64**, 2941-7 (1990).
66. Bosch, F.X. Studies on the development of the charge heterogeneity of the influenza virus glycoproteins. *Arch Virol* **83**, 311-7 (1985).
67. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Molecular changes in virulent mutants arising from avirulent avian influenza viruses during replication in 14-day-old embryonated eggs. *Virology* **206**, 755-9 (1995).
68. Gendoo, D.M., El-Hefnawi, M.M., Werner, M. & Siam, R. Correlating novel variable and conserved motifs in the Hemagglutinin protein with significant biological functions. *Virol J* **5**, 91 (2008).
69. Spiro, M.J. & Spiro, R.G. Sulfation of the N-linked oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin: temporal relationships and localization of sulfotransferases. *Glycobiology* **10**, 1235-42 (2000).
70. Lin, H.C. et al. Prediction of tyrosine sulfation sites in animal viruses. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1154-8 (2003).
71. Klenk, H.D., Caliguri, L.A. & Chopin, P.W. The proteins of the parainfluenza virus SV5. II. The carbohydrate content and glycoproteins of the virion. *Virology* **42**, 473-81 (1970).
72. Wei, C.J. et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J Virol* **82**, 6200-8 (2008).



# 問答錄

## 論文口試問答摘要

口試委員：

陳水田 博士、張世宗 博士、楊健志 博士、王金和 博士、莊榮輝 博士。

陳水田 老師：

1. 研究 2838N 和 2838V 致命性的差異時，為何將研究重點放在只有兩個胺基酸不同之 HA1 而非多個胺基酸差異之 HA2 上面？

答：

因 HA1 擁有辨識宿主的受體結合位置，為病毒感染宿主的第一個步驟。且比較 HA1 及 HA2 之胺基酸差異可以發現，HA1 僅僅兩個胺基酸的差異會造成三個 charge 的改變，也可以在 2-DE 上看到差異，因此以 HA1 為研究重點。

2. HA1 只有 329 個胺基酸，為何在 2-DE 上分子量高達 50 kD 以上？

答：

HA1 為一個高度醣基化的蛋白質，多出來的 1 kD 以上的分子量為 HA1 醣質的分子量。

3. HA1 六個 pI isoforms 在 2-DE 中左邊異構物的分子量較大之原因？

答：

在實驗最後發現隨著異構物等電點的不同，其醣基化的型態也不同，因此這些分子量微小的差異可能來自於醣基化的差異。

4. 未知物 X？

答：

未知物 X 在實驗過程中發現，它可能不是醣類，而是不尋常的 modification。

5. 位於病毒表面的 HA trimer，其什麼位置位於外側？酸性變成鹼性的胺基酸改變是否也位於外側，因此影響了功能？

答：

含有宿主結合位置之 HA1 的球狀頭部，位於病毒外側。在三級結構的預測中也可發現，2838N 及 2838V 之 HA1 的兩個差異的胺基酸亦位於外側。

### 張世宗 老師：

1. 在 HA1 的六個等電點異構物中，哪一個是最原始的型態？

答：

由 EMBOSS IEP 預測可得知，最鹼性也就是等電點最大的異構物為最原始的型態，而其餘五個等電點較小的異構物則是可能是後修飾酸化所造成。

2. 為何在唾液酸酶酶切後，M1 會向 pI 較低的位置移動？

答：

在唾液酸酶酶切後，預測蛋白質會回歸到較鹼性的 pI 質點，但在本實驗中卻無發獲得預期的實驗結果，這有可能是唾液酸酶內含有不純的物質導致此現象，亦或是 M1 蛋白質點之 pI 值超過 strip 可分析之範圍。

### 楊健志 老師：

1. 就胺基酸序列來看，是否就可以預測出 charge 改變之兩個胺基酸位置位於蛋白質之內測或外側？

答：

可以。

楊老師補充：這種 charge 改變通常會位於蛋白質外側，因為電性的不同會嚴重影響到蛋白質三級結構。

2. 為什麼這六個異構物的點不是連續的，而是點點分明？

答：

一般來說，若是醮基化造成異構物的產生可能會出現脫尾的現象，但實驗卻發現 2838 strain 的 HA1 異構物清楚的分開成六點，這也有可能是因為 X 為中性物質，也就是 2838 strain 的 HA1 醮質並不帶電，也就是這些 HA1 異構物的成因可能並非醮基化所造成。

3. 六個異構物和致病力之間是否相關？

答：

研究發現 HA 之等電點會和病毒的毒性及組織趨性相關，另外，HA1 本身的多型性可能也會有助於 HA1 與宿主的結合以及逃脫免疫系統。

### 王金和 老師：

1. 為什麼在唾液酸酶酶切以後，HA1 蛋白質點消失？

答：

在 SDS-PAGE 實驗中可發現，HA1 在四小時之後就有被降解的現象，這可能是因為酵素反應液中混有不純物所致。



2. 爲什麼在唾液酸酶酶切以後，在 SDS-PAGE 上可看到斷掉的 HA1，在 2-DE 卻無法看到？

答：

因爲 HA1 在斷裂後，pI 值就會改變，因此不會在全長的 HA1 下再看到一排相對應之蛋白質點，另外，這些斷裂的 HA1 也有可能是在 2-DE 的前處理中被 lose 掉。

**莊榮輝 老師：**

1. 2838 strain 之 HA1 是有 4 個還是 6 個預測之醣基化位置？

答：

在 2838 strain 之 HA1 胺基酸序列中可發現，符合 Asn-X-S/T 之序列有 6 處，但其中有兩組 Asn 太過相近，因此推測最有可能的醣基化位置是 4 個，另外兩處符合之序列，醣基化的可能性較低。

2. 這種 HA1 的等電點異構物是否只單獨存在於雞蛋培養的病毒？

答：

參考相關研究資料可發現，於細胞內培養之病毒，其 HA1 也會出現等電點異構物，因此認爲此現象不單單只存在於雞蛋繁殖之病毒中。

3. HA1 之 106 & 304 兩處不同之胺基酸位置是否遠離三聚體的連接處？

答：

在 2838N & 2838V 之 HA1 中，兩處胺基酸的改變，造成了三個電性的差異，而這些胺基酸在形成三聚體之後，位於 HA 之外側，若再三聚體的連接處則可能會嚴重影響三聚體之構形。