

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

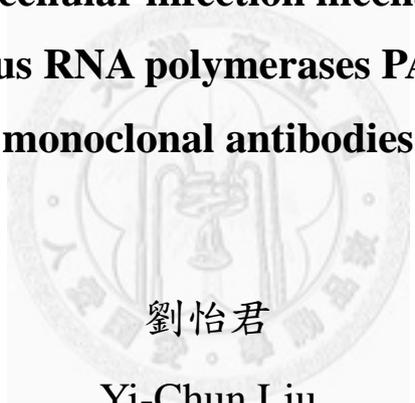
National Taiwan University

Master Thesis

利用禽流感病毒 RNA 聚合酶 PA 和 PB2 之單株抗體探討

其細胞感染機制

**Exploring the cellular infection mechanism of avian
influenza virus RNA polymerases PA and PB2 by
monoclonal antibodies**



劉怡君

Yi-Chun Liu

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 99 年 7 月

July, 2010

謝誌

首先感謝我的父親 劉世銘 先生，我的母親 賴美雪 女士；尤其是我的母親，獨自扶養並栽培我們，無怨無悔的付出關心與照顧，更給予我念書的機會，讓我得以追求更美好的人生。感謝我的哥哥建均和妹妹盈君對我的支持，在成長的路上，我們一起分享了許多生活中的樂趣。

感謝我的指導老師莊榮輝老師，不僅僅是因為老師提供了良好的學習空間，更因為開放而自由的研究環境，讓我得以盡情的探索，學到了好多；在這兩年間，老師除了在研究上讓我找到方向，順利完成論文，更教我們將科學研究精神延伸到做人做事上，要有規畫並有計畫找到根本，解決問題，因為吃不好吃的牛肉麵換筷子是沒有用的；凡事要積極、要盡力，要將別人的事情看成自己的事情一樣努力，這些話都令我銘記在心，時時刻刻提醒自己要努力成為「一個能打仗的人」。而老師像朋友一樣，關心我們的生活，和我們分享有趣的事情，總是幽默的回應我們說的瑣碎小事，讓我覺得能成為老師的學生真是幸運呢！

感謝我的共同指導老師王金和老師，提供我實驗的場所、充足的病毒樣本，並教導我許多禽流感的相關知識，讓研究得以順利進行；感謝常怡雍老師、陳翰民老師及張世宗老師，擔任我的口試委員，給予指正與建議，讓論文能更完善。也謝謝生化組的所有老師，不論是 master day 或是生化探索課程，您們的指導與建議都讓我獲益良多。並感謝生命科學院科技共同空間 TC3、TC4 和 TC5 平台提供協助，使實驗能順利完成。

還有要感謝 520 的各位夥伴們：杰龍學長、皮蛋學姐、玉米學姐、庭芳學姐、之儀學姐、惠敏學姐、瑩貞、迺茵、大蝦、小蝦、驊珊、福氣蓋學長、俐惟，給予我生活上及實驗上的幫助，陪伴著我開心的度過兩年，因為有了你們，實驗室的生活變得更加有趣而多采多姿。感謝王老師實驗室中的夥伴們：謝謝惠雯學姐教我感染病毒及許多相關的知識，協助我完成研究；謝謝怡彤學姐，辛苦的進行病毒繁殖。感謝楊健志老師實驗室的老爹學長，教我使用 Discovery Studio。

時光飛逝，短短兩年的碩士生涯很快就過去了，在這段時間裡面，要感謝的人實在太多了，對於你們的照顧與幫助，在此獻上我最由衷的感激。在未來的日子裡，這些美好的回憶將伴隨著我勇往直前，大步的朝著目標邁進。

劉怡君 謹誌

中華民國 九十九年七月

目錄

中文摘要	3
ABSTRACT	4
第一章 緒論.....	5
1.1 簡介禽流感病毒.....	5
1.1.1 禽流感病毒的歷史背景.....	5
1.1.2 流感病毒之分類.....	7
1.1.3 流感病毒的構造與形態.....	8
1.1.4 流感病毒的基因體.....	10
1.1.5 流感病毒的蛋白質簡介.....	11
1.1.6 流感病毒的複製週期.....	13
1.1.7 流感病毒的變異.....	17
1.2 RNA 聚合酶三聚體的重要性.....	19
1.2.1 RNA 聚合酶複合體之功能.....	19
1.2.2 RNA 聚合酶複合體之生成與運輸.....	19
1.2.3 RNA 聚合酶複合體與宿主因子作用.....	20
1.3 研究動機與目的.....	23
第二章 材料與方法.....	24
2.1 病毒樣本處理方法.....	24
2.1.1 雞胚培養病毒增殖.....	24
2.1.2 病毒樣本濃縮與純化.....	25
2.1.3 蛋白質定量.....	25
2.2 二維膠體電泳.....	26
2.2.1 樣本處理（脫鹽及溶解）.....	26
2.2.2 第一維等電點聚焦.....	26
2.2.3 第二維 SDS-PAGE 膠體電泳.....	28
2.3 抗體製備相關實驗.....	29
2.3.1 動物免疫法.....	29
2.3.2 單株抗體製備.....	29
2.3.3 單株抗體大量製備.....	32
2.3.4 免疫球蛋白純化.....	33
2.4 免疫學方法.....	34
2.4.1 酵素免疫分析法.....	34
2.4.1.1 一般酵素免疫分析法.....	34
2.4.1.2 競爭型酵素免疫分析法.....	35

2.4.2 免疫共沉澱法	35
2.4.3 單株抗體型別分析法	36
2.5 以禽流感病毒感染 MDCK 細胞	38
2.6 蛋白質生物素標定	39
2.7 共軛焦顯微鏡分析	40
第三章 結果	41
3.1 禽流感病毒 RNA 次單元聚合酶蛋白 PA、PB1 及 PB2 之抗體製備	42
3.1.1 以複合的結構與免疫性指標預測並設計抗原決定位	42
3.1.2 傳統免疫抗血清製備	50
3.1.3 單株抗體製備	51
3.1.4 單株抗體大量製備	52
3.2 禽流感病毒 RNA 次單元聚合酶蛋白 PA 及 PB2 單株抗體特性分析	60
3.2.1 以酵素連結免疫吸附法檢定抗原決定基位置	60
3.2.2 以競爭型酵素連結免疫吸附法進一步檢定可能的抗原決定基位置	60
3.2.3 PA 單株抗體型別檢定	61
3.3 利用抗體觀察 RNA 聚合酶各次單元體於受病毒感染的 MDCK 細胞內位移的情形	67
3.3.1 以免疫螢光染色法觀察 MDCK 細胞中 PB1 及 PB2 位移	67
3.3.2 以免疫螢光染色法觀察 MDCK 細胞中 PB2 及 PA 位移	68
3.3.3 本研究利用抗體標定觀察 MDCK 細胞中 RNA 聚合酶各次單元體，但尚無法得知其新生各次單元體組裝並位移至細胞核的過程	68
3.3.4 病毒感染 MDCK 細胞 24 小時後各次單元體訊號明顯減弱	69
3.4 以 PA、PB1 及 PB2 抗體與雞胚尿囊濃縮液進行免疫共沉澱	75
3.4.1 PA 及 PB1 抗體與雞胚尿囊濃縮液中約 53 kDa 分子作用並沉澱	75
3.4.2 免疫共沉澱所得結果可能為蛋白質降解所致	76
3.5 PA、PB1 單株抗體可於二維電泳圖譜標定出單一明顯的蛋白質點	80
第四章 討論	82
4.1 以合成胜肽作為抗原製備的單株抗體可辨識原態分子	82
4.2 本文所產 PA 及 PB2 單株抗體的抗原決定基與目前已知功能區域的關係	83
第五章 結論	86
第六章 參考資料	87
問答錄	92
附錄	96

中文摘要

RNA 聚合酶複合體在禽流感病毒複製過程扮演重要角色，由 PA, PB1 與 PB2 三個次單元所構成，負責轉錄與複製病毒 RNA，關係到禽流感病毒是否能順利複製病毒子代，感染更多宿主細胞，並決定其遺傳訊息是否能完整傳遞。相較於病毒表面封套上較易突變的醣蛋白 HA 與 NA，RNA 聚合酶複合體在各種病毒亞型間較保守，且其功能乃啓動於病毒感染早期，使其成爲良好的抗流感藥物標的。

本論文根據本土禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 (H6N1) 序列，經結構及免疫性預測，設計可能的抗原決定基，合成短鏈胜肽作爲抗原，嘗試製備 RNA 聚合酶各次單元體 (PA, PB1 及 PB2) 之單株抗體。經酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 及免疫染色法分析，確認得到具良好專一性的 PA 及 PB2 單株抗體，此外亦得到 PB1 之傳統抗血清。分析這些抗體特性，以競爭型 ELISA 初步確認 PA 及 PB2 單株抗體之抗原決定位，並以免疫染色法測定 PA 及 PB2 之抗體型別。

爲了觀察 RNA 聚合酶各次單元體，於受感染細胞中位移過程，我們使用抗體標定受 H6N1 亞型禽流感病毒株 (A/Wild duck/Ilan/2904/1999) 感染的 MDCK 細胞，確認 PA 及 PB2 單株抗體及 PB1 抗體，均可辨識被感染細胞上的原態抗原。此外，利用免疫共沉澱分析，發現 PA 及 PB1 皆可辨認一個約 53 kDa 大小的蛋白質。另一方面，使用免疫染色法定位 RNA 聚合酶各次單元體於二維電泳圖譜位置，結果 PA 單株抗體可於對應分子量及等電點辨認專一蛋白質點。

本論文所產抗體除了能作爲專一性的檢測與觀察工具，更可能進一步應用於基礎研究，協助了解流感病毒 RNA 聚合酶的活化機制。

Abstract

RNA polymerase is a protein complex composed of three subunits including PA, PB1 and PB2, which play essential roles for the replication of avian influenza virus genome. Compared with the glycoproteins on the viral envelope (haemagglutinin and neuraminidase), RNA polymerase complex shows more conservative in the protein sequences among various virus subtypes. Moreover, the function of this enzyme complex is initiated in the early-stage of viral replication. This makes RNA polymerase an ideal target for the anti-influenza virus therapeutics.

In this study, we used synthetic peptides as antigen for the subunits of the avian influenza RNA polymerase complex (PA, PB1 and PB2) monoclonal antibodies preparation. The peptides were determined based on the structural analysis and the immunogenicity prediction from a local avian influenza virus A/Chicken/Taiwan/2838V/00 (H6N1) sequences.

The result of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis confirmed that the specificity of the monoclonal antibodies against PA and PB2, as well as the conventional antisera against PB1. The epitopes of these two monoclonal antibodies (anti-PA and anti-PB2) were estimated by using competitive ELISA. The isotypes of the antibodies were determined by Western blots. To follow the cellular movement of the RNA polymerase complexes in a living cell, MDCK cells were infected with the H6N1 virus (A/wild duck/Ilan/2904/1999). Then the target proteins were detected by indirect immunofluorescence assays. The results of indirect immunofluorescence assay shows these antibodies can recognize antigen in native form in infected cells. By using immunoprecipitation, a 53 kDa protein was identified as interacted with PA and PB1. On the other hand, the position of PA on the two-dimensional map was allocated by Western blot.

The antibodies produced in this work might be used as a specific probe for viral analysis in order to explore the activation mechanism in RNA replication.

第一章 緒論

1.1 簡介禽流感病毒

1.1.1 禽流感病毒的歷史背景

家禽流行性感冒 (avian influenza, AI) 是一種禽類惡性傳染病，早在西元 1878 年由 Perronctio 記載於義大利北部，雞群爆發嚴重的非細菌性疾病，造成雞隻大量死亡，歷史上稱為雞瘟 (fowl plague)。最初人們將雞瘟與家禽霍亂 (fowl cholera) 混淆，但隨後於 1880 年由 Rivolta 與 Delprato 指出雞瘟之臨床與病理症狀和家禽霍亂有很大的差異，並將其稱之為 *Typhus exudatious gallinarum*。後來於 1901 年才由 Centanni 及 Savunozzi 指出此禽病是由一種濾過性病毒所引起的，於 1902 年該病原被分離出來。然而直到 1955 年才由 Schäfer 證實此病毒屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 之 A 型流行性感冒病毒。隨著對此病毒的認識，於 1981 年第一屆國際家禽流行性感冒研討會 (International Symposium on Avian Influenza) 中，正式放棄使用雞瘟的名稱，更名為高病原性家禽流行性感冒 (highly pathogenic avian influenza, HPAI)，目的為突顯其致病性的差異，即除了高病原性的病毒株，亦存在許多低病原性 (mildly pathogenic) 病毒株，造成雞隻不同程度的病害與死亡率 (Lupiani and Reddy, 2009)。

目前已知最早的人類流行性感冒全球性大流行於 1918 年爆發，史稱西班牙流感 (Spanish flu)，平均致死率約為 2.5~5%，於 1918 至 1919 年間，造成高達二至四千萬人死亡。接著為 1957 年爆發的亞洲流感 (Asian flu) 及 1968 年的香港流感 (Hong kong flu)，同樣的也造成了嚴重的死傷 (Gendon Iu, 2008)。根據病毒親源分析，1918 年爆發的西班牙流感，其基因可能來自禽類流感病毒 (Basler and Aguilar, 2008)；並有研究懷疑 1957 年的亞洲流感，為來自野鴨的禽流感病毒株之 PB1、HA 和 NA 三段基因，與人類流感病毒 H2N2 亞型產生重組所致；而 1968 年的香港流感，同樣被發現其為野鴨的禽流感病毒株之 PB1、HA，與人類流感病

毒 H2N2 亞型產生重組所致 (Kawaoka et al., 1989)。人類流行性感冒的大流行，似乎和禽流感病毒與人類病毒株的基因重組有十分密切的關係。然而，造成禽流感成爲全球關注焦點，最重要的事件爲 1997 於香港，首次發現能夠不透過基因重組，直接從由受感染的禽隻傳染給人的 H5N1 高病原性禽流感病毒，受感染者死亡率高達六成 (Subbarao and Katz, 2000)。爾後，於香港、荷蘭、東南亞地區陸續傳出人類感染禽流感的病例。自此得知，部分禽流感病毒株可跨越種間屏障，由鳥類傳染至哺乳類 (包括馬、豬、鯨魚、人) (Perkins and Swayne, 2002, 2003)。由於禽流感病毒快速的演化與變異，加強對其基礎科學、流行病學、公共衛生、疫苗開發研究爲刻不容緩的工作。



1.1.2 流感病毒之分類

禽流感病毒在分類學上屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 之 A 型流行性感冒病毒 (influenza virus)。正黏液病毒科病毒對紅血球表面的黏蛋白具有親和力，並具有使紅血球凝集 (hemagglutination) 的特性 (Büchen-Osmond, 2006)，此外其特徵還包括具分段的核酸，導致此類病毒較易因基因重組而發生變異。

流感病毒可依核蛋白 (nucleoprotein) 或基質蛋白質 (matrix protein) 抗原性不同，區分出 A、B、C 三型。A 型流感病毒可感染人類及多種哺乳動物 (包括豬、馬) 及禽類；B 型流感病毒僅能對人類致病；而 C 型流感病毒則僅可感染人跟豬 (Murphy et al., 1996)。而由遺傳物質分段特徵來看，A、B 兩型流感病毒的核酸皆分為 8 段；C 型核酸則只分為 7 段 (Kilbourne et al., 1987)。

此外，A 流感型病毒又可依其表面的血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 兩種醣蛋白的抗原性作為分型標準，區分出 15 種 HA 亞型 (H1~H16) 及 9 種 NA 亞型 (N1~N9) (Fouchier et al., 2005)，由同一株病毒的兩種不同醣蛋白的組合，最多可組合出 144 種亞型，使 A 型流感病毒更具多樣性。而 B、C 型流感病毒，因抗原間變異性不明顯，不再區分亞型。

根據 1981 年世界衛生組織 (WHO) 流感病毒命名規定，命名方式需包括：

Type/Origin/Location/Number/Year (Subtype)

抗原血清型/宿主/分離地區/病毒株序號/分離年份 (血清亞型, HnNn)

* 其中若為人類流感病毒，則省略宿主信息。

以本實驗所使用的病毒株為例：

A/Chicken/Taiwan/2838V/00 (H6N1)

A 型流感病毒，宿主為雞，分離自台灣，病毒株序號 2838V，分離於 2000 年，血清亞型為 H6N1。

A/Wild duck/Ilan/2904/1999 (H6N1)

A 型流感病毒，宿主為野鴨，分離自宜蘭，病毒株序號 2904，分離於 1999 年，血清亞型為 H6N1。

1.1.3 流感病毒的構造與形態

禽流感病毒在電子顯微鏡下大多呈現圓形顆粒或絲狀，呈現圓形顆粒狀的病毒，直徑大小約介於 80 至 120 nm；若呈現絲狀，長度則可達 400 nm (Kilbourne et al., 1987)。流感病毒的結構由外而內可分為封套、基質蛋白及核心，如圖 1.1 (Subbarao and Joseph, 2007) 所示。

封套 (envelope)

封套為一包裹於病毒顆粒表層的磷脂雙層膜 (phospholipid bilayer)，這層膜乃來自於宿主細胞，當成熟病毒由宿主細胞出芽 (budding) 脫出時，將宿主細胞的細胞膜一併帶離，形成包裹於病毒顆粒表層的封套膜。此外，於病毒封套上鑲嵌有兩種醣蛋白 (glycoprotein)，由於突出病毒體外，被稱為棘突蛋白 (spike protein) (Lamb, 1996)，分別為血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase, NA)，呈現桿狀與蕈狀結構，長度約為 10~14 nm。一個病毒顆粒大約有 400~500 個血球凝集素和約 100 個神經胺酸酶棘突 (Zebedee and Lamb, 1988; Schroeder et al., 2005)。

基質蛋白 (matrix protein)

基質蛋白包括兩種：第一型基質蛋白 (matrix protein 1, M1) 構成病毒外殼骨架，以之區分病毒內外的基質蛋白鞘，是一層脂質被膜，透過與細胞封套內膜緊緊相接，具有保護病毒內部核心並維持空間結構的功能；第二型基質蛋白 (matrix protein 2, M2)，為一穿膜離子通道蛋白，其開口位於封套上，平均每個病毒顆粒約有 16~67 個穿膜離子通道蛋白 (Ye et al., 1989)。

核心 (core)

病毒的內部核心包含了攜帶遺傳訊息的 8 段負向單股的 RNA、核蛋白 (nuclearprotein, NP)，及轉錄遺傳訊息所需之 RNA 聚合酶複合體 (heterotrimeric RNA polymerase complex)。各段病毒 RNA 緊密纏繞於核蛋白上，結合 RNA 聚合酶複合體，形成螺旋彎狀、近似髮夾形 (hairpin) 的三級結構，為病毒核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, vRNP) (Ye et al., 1989)。

以病毒顆粒整體組成分而言，蛋白質佔 70~75%，脂質佔 20~24%，碳水化合物佔 5~8%，而核酸僅佔 1% (Ye et al., 1989)。

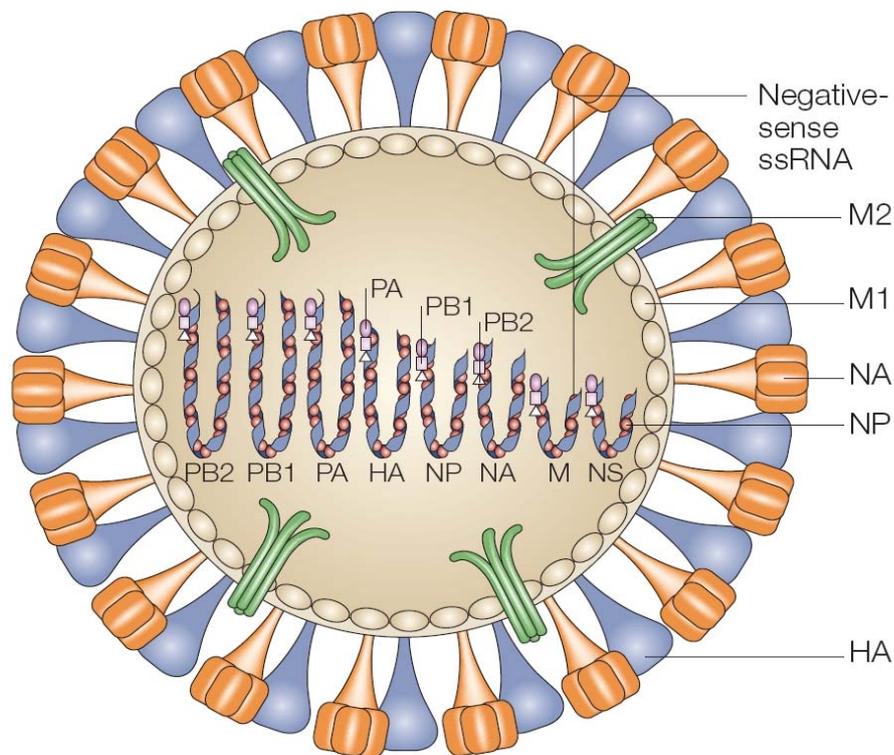


圖 1.1 A型流感病毒圖解 (Subbarao and Joseph, 2007)

Figure 1.1 Structural diagram of the influenza A virus

1.1.4 流感病毒的基因體

A 型流感病毒的基因體以核糖核蛋白 (vRNP) 為單位存在病毒顆粒核心。其 8 段負向單股的 RNA，全長約 13,600 個核苷酸，於 5' 端後 13 個核苷酸序列及 3' 端前 12 個核苷酸序列具高度保留，可配對形成二級結構，與轉錄作用開始的啓動子 (promoter) 有關 (Rao et al., 2003)。

8 段負向單股的 RNA，每段基因編碼出不同功能的蛋白：第一段基因編碼 RNA 次單元聚合酶蛋白 PB2 (polymerase basic protein 2)；第二段基因編碼 RNA 次單元聚合酶蛋白 PA (polymerase acid protein)；第三段基因編碼 RNA 次單元聚合酶蛋白 PB1 (polymerase basic protein 1)；第四段基因編碼血球凝集素 (hemagglutinin, HA)；第五段基因編碼核蛋白 (nucleoprotein, NP)；第六段基因編碼神經胺酸酶 (neuraminidase, NA)；第七段基因編碼基質蛋白 (Matrix protein, M1 and M2)；第八段基因編碼非結構性蛋白 (nonstructure protein, NS1 and NS2) (Inglis and Brown, 1981) (Brown, 2000)。而流感病毒的基因體中，第七段及第八段 RNA 可各轉譯出兩種蛋白質乃因其具有兩個不同的開放閱讀框架 (open reading frame, ORF) 所致 (Sidorenko and Reichl, 2004)。

總計流感病毒 8 段負向單股的 RNA 共可編碼出 10 種病毒蛋白質，其中八種為病毒顆粒的組成分，而另外兩種非結構性蛋白：NS1 與 NS2 幾乎不存在病毒顆粒中，但可在感染初期大量發現於宿主細胞核內。近年來發現第 11 種蛋白質 PB1-F2，此乃由於 PB1 基因的開放閱讀框架有選擇性閱讀框架 (alternative reading frame) 所致 (Chen et al., 2001)。

1.1.5 流感病毒的蛋白質簡介

(1) RNA 聚合酶三聚體 (heterotrimeric RNA polymerase)

RNA 聚合酶三聚體 (heterotrimeric RNA polymerase) 是由 PA (polymerase acid protein)、PB1 (polymerase basic protein 1) 及 PB2 (polymerase basic protein 2) 三個聚合酶次單元體構成的 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)，負責病毒 RNA 轉錄 (vRNA→vmRNA) 及複製 (vRNA→cRNA→vRNA)。各次單元體彼此以 N 端與 C 端相互結合，組成具有完整功能的聚合酶複合體。而此三個聚合酶次單元體上皆有細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，幫助其送入宿主細胞核中作用，而新生成的各次單元體則在細胞核中與核蛋白 (NP) 及攜帶病毒遺傳訊息之 RNA 組合為病毒核糖核蛋白 (ribonuclearprotein, vRNP) (Lamb, 1996)。並有文獻指出 RdRp 與宿主特異性有關 (Naffakh et al., 2008)。

(2) 核蛋白 (nucleoprotein, NP)

核蛋白 (NP) 結合病毒 RNA 及 RNA 聚合酶三聚體形成病毒核糖核蛋白 (vRNPs)，並存在細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，可協助病毒 vRNP 順利進入宿主細胞核中 (Neumann et al., 2000; Nayak et al., 2004; Bouvier and Palese, 2008)。依其與基質蛋白質 (M) 的抗原性，可將流感病毒區分 A、B、C 三型 (Murphy et al., 1996)。此外核蛋白與病毒轉錄、複製及宿主特異性有關 (Naffakh et al., 2008)。

(3) 血液凝集素 (hemagglutinin, HA)

血球凝集素 (HA) 為病毒表面封套上的錐狀突起，結構上為三聚體，由於其能與動物血球表面受體結合，凝集紅血球，固命名之 (Lamb, 1996)。初生成時為原態之血球凝集素 (HA0)，經宿主細胞的蛋白酶水解切割 (proteolytic cleavag)，分成 HA1 (約為 47 kDa) 及 HA2 (約為 29 kDa)，兩者以雙硫鍵連結，前者負責與宿主細胞膜上之唾液酸接受器結合，後者則協助病毒囊膜與宿主細胞膜融合，促使病毒入侵細胞 (Webster and Rott, 1987)。HA 被切開才具有病原性，而切割位的

多寡與病毒的致病力及散布力有關 (Rott, 1992; Horimoto and Kawaoka, 1995)。此外 HA 是禽流感病毒主要的抗原之一，誘導宿主產生抗體。在宿主免疫反應的選擇壓力下，具有高度變異的能力。

(4) 神經胺酸酶 (neuraminidase, NA)

神經胺酸酶 (NA) 為病毒表面套膜上的蕈狀突起，結構上為四聚體 (homotetramer)，主要功能為當病毒成熟，出芽 (budding) 釋出時，藉由水解唾液酸，破壞 HA 與宿主細胞唾液酸受體的結合，使病毒順利脫離，避免病毒顆粒聚集於宿主細胞膜上 (Gong et al., 2007)。與 HA 同為引起宿主免疫反應之主要抗原，但強度不若 HA。在宿主免疫反應的選擇壓力下，具有高度變異的能力。

(5) 基質蛋白 (Matrix protein)

由於病毒第七段基因編碼基質蛋白 M 具有不同的開放閱讀框架，可分別轉譯出第一型基質蛋白 (matrix protein 1, M1) 和第二型基質蛋白 (matrix protein 2, M2)。M1 是病毒顆粒中含量最多的蛋白質，主要功能為構成病毒外殼骨架，連接封套膜與核糖核蛋白 (vRNP)，保護病毒核心並維持病毒空間結構，此外 M1 蛋白與協助新生成之 vRNP 的出核反應 (nuclear export) 及病毒出芽 (budding) 有關 (Neumann et al., 2000; Nayak et al., 2004)。M2 蛋白為穿膜離子通道，於病毒進行脫殼 (uncoating) 時活化，調節 pH 值，幫助病毒與宿主細胞膜融合 (Pinto et al., 1992)。

(6) 非結構性蛋白 (nonstructure protein)

病毒第八段基因具有不同的開放閱讀框架，分別轉譯出兩種非結構性蛋白，第一型非結構性蛋白 (nonstructure protein 1, NS1) 和第二型非結構性蛋白 (nonstructure protein 2, NS2)。NS1 不存在病毒顆粒中，但可於受感染宿主細胞核內發現，功能為調節 mRNA 剪切、協助病毒 RNA 的轉譯，並具有抑制宿主干擾素對抗病毒的功能 (Hale et al., 2008; Hale et al., 2008)。NS2 的功能為與 M1 蛋

白質共同作用，協助 vRNP 由細胞核運送至細胞質，因此又稱為出核蛋白 (nuclear export protein, NEP) (Neumann et al., 2000)。

1.1.6 流感病毒的複製週期

流程如圖 1.2 (Neumann et al., 2009) 所示。

(1) 病毒吸附宿主細胞 (virus attachment)

流感病毒藉由血液凝集素表面分子，辨識宿主細胞膜上表面醣蛋白質或醣脂之唾液酸 (sialic acid)，與之結合並吸附宿主細胞。一般而言，禽流感病毒以 α -2, 3 的方式與禽類宿主細胞表面受體形成 N-acetylneuraminyl-galactose (SA 2,3 Gal)，而人流感病毒則是以 α -2, 6 的方式與人類宿主細胞表面受體形成 N-acetylneuraminyl-galactose (SA 2, 6 Gal) (Couceiro et al., 1993; Matrosovich et al., 2004)。

(2) 進入宿主細胞 (virus entry)

病毒吸附後，經受體媒介胞飲作用 (receptor-mediated endocytosis) 進入宿主細胞。由內涵蛋白 clathrin 媒介形成 clathrin-coated membrane-bound vesicles。一旦病毒進入宿主細胞膜，clathrin coat 便脫去，囊泡融合形成吞噬小體 (endosome) (Sieczkarski and Whittaker, 2002)。

(3) 脫殼 (uncoating)

當病毒顆粒進入吞噬小體 (endosome)，病毒封套膜上之穿膜離子通道 M2 活化，調節質子進入吞噬小體中，造成 pH 值逐漸下降，擾亂基質蛋白 M1 與病毒核醣核蛋白 vRNP 間的交互作用，而使 HA 會產生不可逆的結構變化，促使吞噬小體與病毒之膜進行融合，病毒脫去封套，位於病毒核心的病毒核醣核蛋白 vRNP 被送入宿主細胞質中。由於構成 vRNP 的蛋白質 (PB1、PB2、PA 和 NP) 皆具有細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，藉此將 vRNP 送入宿主細胞核中 (Lamb, 1996; Cros et al., 2005)。

(4) 合成病毒 RNA (mRNA synthesis and replication of virion RNA)

vRNP 送入宿主細胞核後，進行轉錄轉譯主要的功用有兩種：第一種為合成病毒 mRNA，為轉譯病毒結構蛋白所需，另一為複製病毒自身遺傳訊息 vRNA。

(4a) 合成病毒 mRNA (viral mRNA generation)

由於 A 型流感病毒為負向單股 RNA 病毒，因此於宿主細胞核中，需先將轉錄成正向之病毒 mRNA (vmRNA)。vmRNA 由 RNA 聚合酶異構三聚體合成，合成過程中從宿主處截取來的 5' 帽 (約 13 個核苷酸) 及 3' 腺嘌呤尾 (約 12 個核苷酸)。而合成完成的 vmRNA 經由核孔送入宿主細胞質中，接著轉譯出病毒蛋白 (Krug, 1981; Li and Palese, 1994; Lamb, 1996)。

(4b) 複製病毒基因體 (virion RNA replication)

由於 A 型流感病毒為負向單股 RNA 病毒，因此病毒基因體複製，由分為兩階段進行，RNA 聚合酶異構三聚體負責，第一階段先進行複製互補 RNA (complementary RNA, cRNA)，第二階段才是利用 cRNA 做模板轉成 genomic RNA (vRNA) (Nagata et al., 2008)。

(5) 合成病毒蛋白

病毒感染宿主細胞後，促使宿主細胞的蛋白質合成速度降低，目的為使病毒之蛋白質得以利用宿主的核糖體 (ribosome) 快速合成 (Park and Katze, 1995)。

(5a) NP、PA、PB1、PB2、M1、NS1 與 NS2 的合成

此類蛋白於新生成初期即運送進入核內。構成病毒 vRNP 所需的 NP 及各 RNA 聚合酶次單元體，需運送回宿主細胞核內，與病毒的遺傳訊息包裹形成新生的 vRNP (Neumann et al., 2009)。新生的 vRNP 與運送進入核內的基質蛋白 (M1) 結合形成 M1-vRNP 複合體，經由 M1、NS2、NP 共同作用，將 vRNP 由細胞核移向細胞質，而與 M1 連結之 vRNP 則無法再進入宿主細胞核內。非結構性蛋白 NS1 作用在宿主細胞核內，參與病毒 mRNA 剪切 (splicing)、轉錄、基因體複製，甚至調節上述出核反應 (Lamb, 1996; Portela and Digard, 2002)。

(5b) 嵌入性膜蛋白 (integral membrane proteins) : HA、NA、M2

包括 HA、NA 及 M2，於結構上為突出病毒顆粒外，嵌入病毒封套膜之蛋白質。此類蛋白新生成後藉訊息辨識顆粒 (signal recognition particle, SRP) 媒介送入粗內質網 (rough endoplasmic reticulum) 進行醣基化作用修飾 (glycosylation)，並送往高基氏體 (Golgi)，最後移動至宿主細胞膜，嵌入病毒出芽頂端 (apical surface) (Lamb, 1996)。

(6) 病毒出芽釋出 (virus budding and release)

HA、NA 及 M2 嵌入宿主細胞膜上的病毒出芽頂端後，藉由其細胞體漿尾 (cytoplasmic tails) 與 M1-vRNP 進行交互作用，重新組合成病毒顆粒，經出芽 (budding) 釋放到細胞外，並將嵌有 HA、NA 及 M2 之細胞膜帶走作為封套。在出芽的過程中 HA 仍會與宿主唾液酸受體結合，此時 NA 會將該連結酶切，使病毒顆粒釋放 (Lamb, 1996; Gong et al., 2007)。



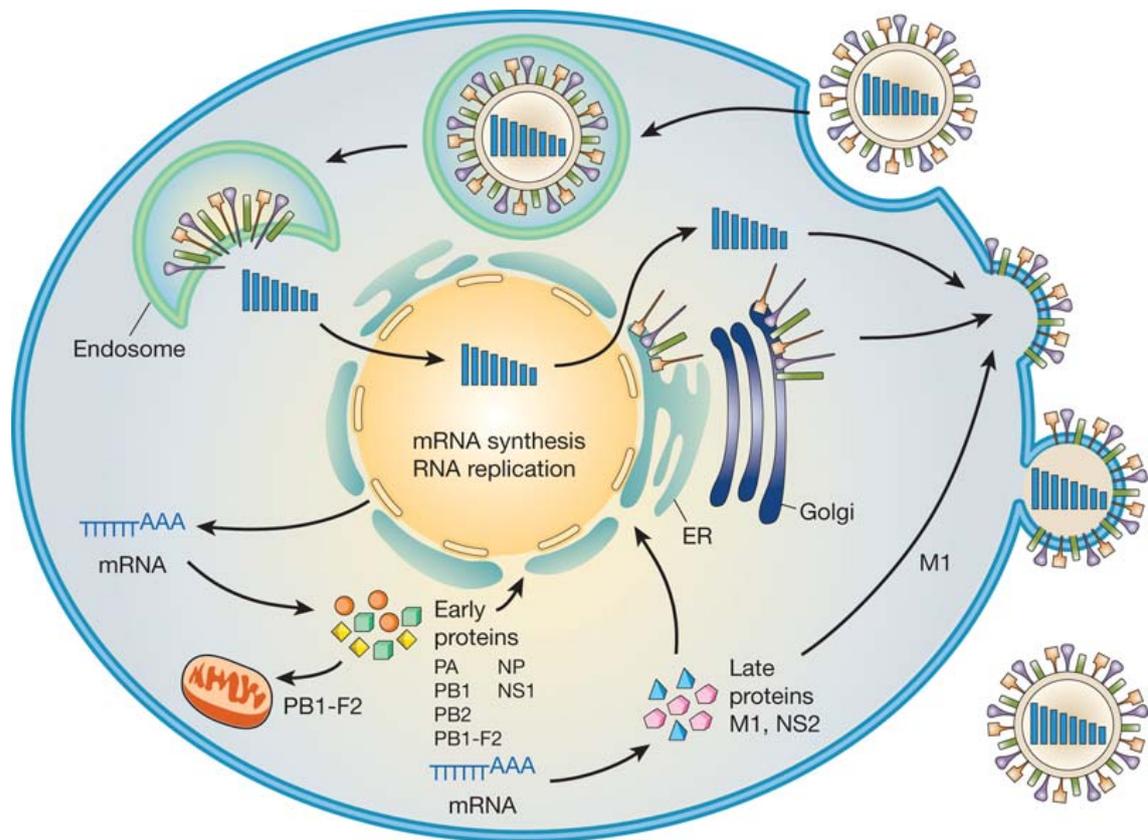


圖 1.2 A 型流感病毒生活之複製生活史 (Neumann et al., 2009)

Figure 1.2 Replication cycle of influenza virus

1.1.7 流感病毒的變異

(1) 流感病毒 HA 受體具宿主專一性

流感病毒以表面的血液凝集素 (HA) 與宿主細胞受體上的唾液酸多醣體結合進而入侵細胞，而就如同 1.2.5 小節提及的，禽類與人類流感辨識的受體結合區不同，使得其具有宿主專一性，形成了禽流感病毒無法跨越的種間屏障 (species barrier)。即禽類流感可辨認禽類宿主細胞表面受體的唾液酸寡糖 (Sialyloligosaccharides) 末端之唾液酸以 α -2-3 的方式鍵結於半乳糖上；而人流感所辨識受體為唾液酸以 α -2-6 方式鍵結於半乳糖上 (Rogers and D'Souza, 1989; Matrosovich et al., 2004)。

流感病毒辨識的受體不同，造成了種間屏障。但研究指出，豬的呼吸道同時具禽流感 HA 與人流感 HA 可辨識受體，即同時擁有唾液酸 (N-acetyl sialic acid) 以 α -2-3 和 α -2-6 兩種方式鍵結於半乳糖上的兩種受體。這意味著豬有機會同時感染禽流感與人流感，使兩種病毒相遇並進行基因重組機率增加，扮演著基因體混合者 (mixing vessel) 的角色 (Ito et al., 1998)。目前已知除了外部因子 HA 及 NA 外，內部因子包括 NP、M 及 RNA 聚合酶次單元體 (PA、PB1 及 PB2) 也會影響宿主專一性 (Nagata et al., 2008)。

(2) 流感病毒快速突變演化

為了適應環境，流感病毒以相當快的速度進行突變演化，以逃避宿主免疫系統，而其抗原改變方式如下：

i. 抗原漂變 (antigenic drift)

由於病毒 RNA 聚合酶缺乏校正功能，易造成點突變 (point mutation)，而產抗原漂變的現象。此原因造成的突變，通常只改變數個胺基酸，且大多數的突變株會因功能缺失而遭淘汰，只有極少數在環境壓力或其他因素選殖下脫穎而出。然而，若突變的位置於 HA 或 NA 上，病毒便有機會能夠逃脫宿主的免疫系統的監控，順利入侵細胞，造成流行 (epidemic)。因為直接承受天擇的環境壓力，通常 HA 及 NA 比較容易產生抗漂移 (McDonald et al., 2007)。

ii. 抗原移變 (antigenetic shift)

此為不同病毒株之遺傳序列，即 8 段 RNA 片段，於宿主體內進行基因重組 (gene reassortment)。一般而言，產生的改變較大，且蛋白質較不易產生功能缺失，因此能夠很快的形成一株新的病毒，造成全球大流行 (pandemic flu)。有研究指出，造成 1957 及 1968 全球性流感大流行的病毒株即是以此機制產生 (Aoki and Sitar, 1988)。此外，2009 年造成流行的 A 型流感 (H1N1) 為經類禽類 A 型豬流感病毒 (avian-like swine A virus) 與經三次基因重組的豬流感病毒進行基因重組的結果，其 PB2 和 PA 的基因來自禽流感病毒；PB1 基因來自人流感病毒；HA、NP、NS 基因的來源則是豬流感病毒 (Gatherer, 2009)。



1.2 RNA 聚合酶三聚體的重要性

流感病毒的 RNA 聚合酶由 3 個次單元體構成，包含 2 個鹼性的聚合酶單元次體 PB1 (polymerase basic protein 1) 及 PB2 (polymerase basic protein 2)，和 1 個酸性的聚合酶次單元體 PA (polymerase acid protein)。PB1 具有 757 個胺基酸，分子量約為 86 kDa；PB2 有 759 個胺基酸，分子量約為 86 kDa；PA 有 716 個胺基酸，分子量約為 84 kDa (Lamb, 1996)。

1.2.1 RNA 聚合酶複合體之功能

流感病毒 RNA 聚合酶為 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)，由 3 個次單元體構成，與核蛋白 (NP) 及病毒 RNA 遺傳序列結合，形成核殼合蛋白 (vRNP) 存在於病毒核心，主要負責 vRNA 轉錄 (vRNA→vmRNA) 及 vRNA 的複製 (vRNA→cRNA→vRNA)，而構成 RNA 聚合酶的 3 個聚合酶單元次體則於其中具有不同的功用，彼此以 N 端及 C 端互相結合，形成具完整功能的 RNA 聚合酶複合體 (Naffakh et al., 2008)。

PB2 能辨認並結合宿主 pre-mRNA 5' 端帽上 10~13 個核苷酸 (cap binding region)，配合 PB1 之內切酶 (endonuclease) 功能，將該段序列切下，成為 vRNA 轉錄為正向 vmRNA 的引子 (primer)，這個行為稱為 cap snatching。此外 PB1 具有聚合酶 (polymerase) 的功能，能於轉錄時延長 vmRNA，並於複製時延長病毒 RNA 及 cRNA。PA 為具磷酸化修飾的蛋白質，目前已知具蛋白酶 (protease) 活性，並參與病毒 RNA 複製 (Rameix-Welti et al., 2009)。而目前為止，這些 RNA 聚合酶詳細的功能、相互的關係及作用機制則尚未完全明瞭。

1.2.2 RNA 聚合酶複合體之生成與運輸

流感病毒 RNA 聚合酶的 3 個單元次體於宿主細胞質合成後，需運送回宿主細胞核內，與病毒的遺傳訊息包裹形成新生的 vRNP，雖然此 3 個單元次體各自具有細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，能藉此運送入核 (Lamb,

1996)，但有文獻指出單元次體可能於細胞質便已開始聚合，並認為這 3 個 RNA 聚合酶單元次體以單體 (monomer)、雙聚體 (dimer) 甚至是三聚體 (trimer) 的形式進入細胞核，為調控病毒不同感染時期的指標 (Deng et al., 2005)。

目前對於病毒 RNA 聚合酶單元次體是以何種形式進入細胞核，存在有兩種假說：第一種假說認為藉由宿主因子 Hsp90 (Heat Shock Protein 90, Hsp90)，又稱 RAF-1 (RNA polymerase activating factor 1)，與 PB2 結合並協助進入核內，PA 與 PB1 兩者以雙聚體的形式進入核內，三者於細胞核中形成三聚體 (Momose et al., 2002)，並有研究指出 RanBP5 (Ran binding protein 5) 又稱 importin β 能與 PB1-PA 雙聚體結合 (Deng et al., 2006)。第二種假說則認為 Hsp90 會分別與 PB1 與 PB2 結合，幫助兩者於細胞質形成 PB1-PB2-Hsp90 複合體，藉此穩定結構並運輸進入核內，再與單獨運輸進入核內的 PA 形成 RNA 聚合酶三聚體 (Naito et al., 2007)。然而，近期亦有研究經由雙分子螢光互補系統 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFc) 發現 PA 及 PB2 彼此結合，並隨著感染時間的增加，PA-PB2 複合體由細胞質移往細胞核 (Hemerka et al., 2009)。

1.2.3 RNA 聚合酶複合體與宿主因子作用

病毒利用其 8 段 RNA 生成 11 種病毒蛋白質，然而病毒的複製週期中，除了需依靠病毒蛋白質，仍然需要有許多宿主因子 (host factors) 的參與。除了前 1.2.2 小節提及的 Hsp90 (Heat Shock Protein 90, Hsp90) 及 BanBP5 (Ran binding protein 5) 外，病毒 RNA 的複製與轉錄同樣需要許多宿主因子共同參與完成。

目前已知 RNA 聚合酶複合體與宿主細胞 RNA 聚合酶 II (DNA dependent RNA polymerase, Pol II) 之 C 端區域 (C terminal domain, CTD) 結合，協助轉錄病毒 vmRNA (Chan et al., 2006; Vreede and Brownlee, 2007)；並有文獻指出，PA 會與推測作用在宿主蛋白之轉錄活化因子 hCLE (human homologue chicken CLE) 進行結合 (Huarte et al., 2001; Perez-Gonzalez et al., 2006)。亦有研究發現 PA 與宿主因子 MCM (minichromosome maintenance) 或稱 IREF (influenza virus replication factor

1) 作用，幫助病毒 cRNA 複製 (Nagata et al., 2008) (Yankulov et al., 1999)。事實上，近期有研究利用全基因組短片段 RNA 干擾 (genome wide short interfering RNA)，發現約有高達 295 個宿主因子可能參與病毒複製 (Konig et al., 2010)。

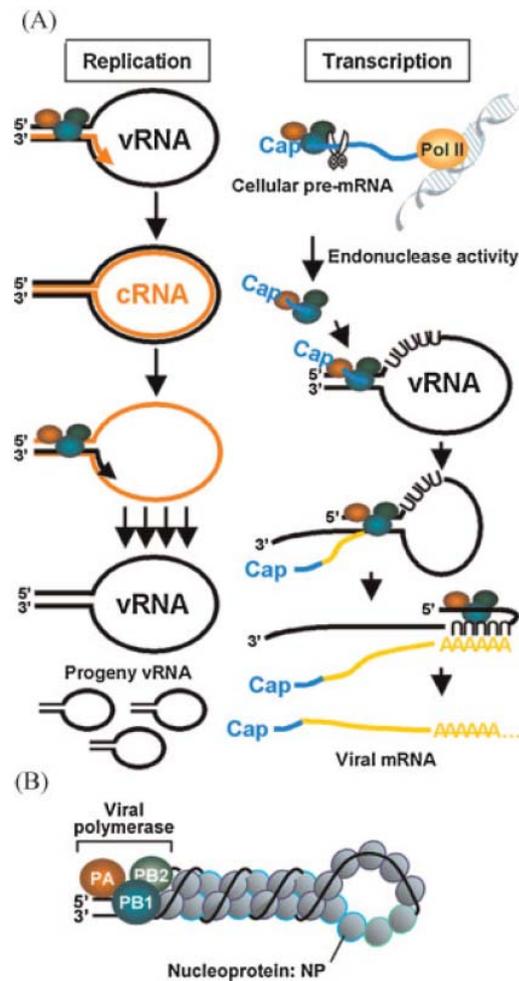


圖 1.3 流感病毒複製與轉錄過程示意圖 (Nagata et al., 2008)

Figure 1.3 Replication and transcription of the influenza virus genome

A. 流感病毒複製與轉錄過程

B. 流感病毒核糖核蛋白 (vRNP) 模型

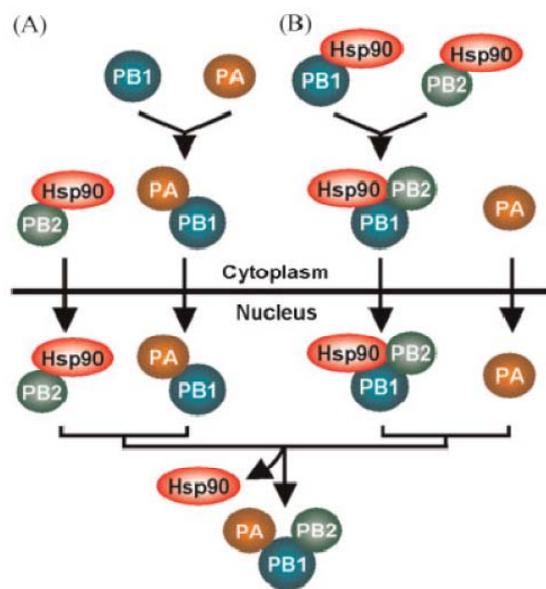


圖 1.4 流感病毒 RNA 聚合酶組裝及運送入核的兩種假說

Figure 1.4 Nuclear import and assembly of viral RNA polymerase subunits
(Nagata et al., 2008)

1.3 研究動機與目的

於 1986 年至 2003 年間臺灣陸續分離到 H6N1 及 H7N1 等弱毒性家禽流行性感冒病毒，而在 2004 年間檢驗出 H5N2 禽流感疫情，統計有 22 間養禽場約 38 萬隻禽隻遭到撲殺 (Chang TY, 2004)，顯示臺灣已有 H5 及 H6 亞型禽流感病毒入侵之情形，加強禽流感病毒基礎研究為刻不容緩的。

以病毒複製週期看來，當病毒感染宿主細胞後，會經由脫殼 (uncoating) 脫去封套，促使含有其核蛋白、遺傳序列及 RNA 聚合酶複體的 vRNP 進入宿主細胞核，由 RNA 聚合酶複體進行轉錄病毒 mRNA，並複製病毒 RNA，而過程亦有許多宿主因子參與。RNA 聚合酶複體的重要之處，除了為決定病毒是否能順利複製病毒子代感染更多宿主細胞，更決定其遺傳訊息是否能完整傳遞。

為了了解更多病毒 RNA 聚合酶與細胞感染的機制，本論文藉由比對 H6 亞型禽流感病毒 2838V 病毒株已知的序列，進行結構預測，並配合單株抗體製備技術，製備出禽流感病毒 RNA 聚合酶的各次單元體之抗體工具，利用此工具，以免疫螢光染色法追蹤這些次單元體在感染宿主細胞時的變化，期望能拼湊出各目標蛋白質於受感染的宿主細胞中位移的過程；並以免疫共沉澱法鑑定與這些目標蛋白質產生交互作用的因子，期望能搜尋各次單元體是否會與其他宿主因子結合；最後試圖利用抗體為標定工具，定位各次單元體於二維電泳圖譜的位置。

本論文的目的是期望可以在 *in vivo* 下觀察其 RNA 聚合酶次單元體相互之間的關係以及運輸的先後順序，希望能更進一步釐清禽流感病毒感染宿主細胞的致病機制，並將利用專一性的單株抗體與蛋白質體學工具，進行進一步研究及身分鑑定，期望可以初步分析先前文獻中所提及的宿主因子，或許會有新的發現。

第二章 材料與方法

本論文使用之禽流感病毒株，為臺大獸醫系王金和老師實驗室於 2000 年分離出之台灣本土低病原性病毒株 A/Chicken/Taiwan/00 (H6N1)，依照感染雞隻後是否出現因腎臟病變而死亡的症狀，將其再可分為弱毒性 (2838N) 及 毒性 (2838V) 兩種亞型。此外本論文還使用另一株同樣來源的低病原性毒株 A/Wild duck/Ilan/2904/1999 (H6N1)。

2.1 病毒樣本處理方法

禽流感病毒由臺大獸醫系王金和老師實驗室之研究助理陳怡彤增殖、純化及不活化處理。以無特定病原 (specific pathogen free, SPF) 雞胚蛋增殖病毒，經超高速離心初步純化後，以二乙炔亞胺 (binary ethyleneimine, BEI) 不活化處理，二乙炔亞胺能使核酸鏈交互聯結 (cross-link)，在不會傷及蛋白質的情況下，達到病毒去活化作用。失去感染能力的病毒樣本交由本實驗室進行蛋白質定量，分裝儲存於 -20°C 。

2.1.1 雞胚培養病毒增殖

儀器設備：

照蛋器

注射器 (Terumo, 1mL, 25-G 5/8-in)

37°C 孵化箱

50 mL 離心管

鑿子

水性填封膠

藥品試劑：

PBS (phosphate buffer saline) 10x

NaCl (0.13M×10)	(J.T.Baker)	79.5	g
-----------------	-------------	------	---

NaH ₂ PO ₄ (0.01M×10)	(Wako)	15.6	g
---	--------	------	---

加二次水 1.5 L 溶解後，以 NaOH 調整 pH 值為 7.0，再加水定量至 2 L，為 10 倍 PBS。使用前稀釋 10 倍，滅菌冷卻後備用。

方法步驟：

- 1) 選用 9-11 日齡無特定病原雞胚蛋，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，小心的用鑿子鑽一個小洞，以利接種。
- 3) 病毒液以滅菌 PBS buffer 稀釋成 10^4 倍。每個蛋以注射器接種 100 uL 稀釋後之病毒液至尿囊腔，以水性填封膠將小洞封住。

- 4) 置於 37°C 孵化箱中培養，每天照蛋觀察。接種 24 小時內死亡之雞胚視為細菌污染予以丟棄。
- 5) 接種 3 天後，將雞胚蛋置於 4°C 冷藏 4 h，待其血管收縮，收集尿囊液進行濃縮與純化。

2.1.2 病毒樣本濃縮與純化

儀器設備：

高速離心機、超高速離心機

藥品試劑：

TEN (Tris-EDTA saline) buffer

NaCl (0.1M)	(J.T.Baker)	5.84 g
EDTA·2Na (0.5 mM)	(Merk)	0.38 g
Tris (2.5 mM)	(Merk)	1.21 g

以二次水定量至 1 L。

BEI (binary ethyleneimine)

方法步驟：

- 1) 將收集之病毒尿囊液於 4°C 下，以 3,500 rpm 離心 15 min。
- 2) 取病毒上清液，加入 1% BEI，置於 37°C 震盪過夜。
- 3) 於 4°C 下以 70,000 g 超高速離心 2 h。
- 4) 去除上清液後以原體積 1/100 的 TEN buffer 回溶
- 5) 將病毒濃縮液緩慢加入事先製作之蔗糖梯度溶液 20% ~ 50%。
- 6) 於 4°C 下以 50,000 g 超高速離心 2 h。
- 7) 以針筒吸取可目視之病毒層，加入 4 mL TEN buffer 清洗。
- 8) 於 4°C 下以 50,000 g 超高速離心 3 h，收集沉澱以適量 TEN buffer 回溶，置於 -80°C 保存。

2.1.3 蛋白質定量

本論文使用 Pierce, 660 nm Protein assay dye 作為蛋白質定量的染劑，其在酸性的環境下，會與蛋白質中帶正電的胺基酸包括：histidine, arginine 和 lysine 作用，染劑會由紅褐色轉為綠色，可藉由偵測波長 660 nm 吸光值，進行蛋白質定量。

儀器設備：

ELISA 光度計 (Dynatech Laboratories, MRX)

96 孔微量滴定盤 (Nunc, 269620)

藥品試劑：

牛血清白蛋白標準溶液 (Bio-Rad, 500-0007)

Pierce, 660 nm Protein assay dye (Thermo, 226606)

方法步驟：

- 1) 配製不同濃度蛋白質標準品，濃度範圍在 0~2 µg/mL。
- 2) 將樣本溶液適當稀釋後，分別取稀釋後樣本溶液及不同濃度蛋白質標準品，

- 各 10 μ L 加入 96 孔盤各槽中。
- 3) 將每槽加入 660 nm Protein assay dye 150 μ L。
 - ◆ 輕拍 96 孔盤側，使兩者均勻混合。若液面有氣泡時，需加以去除，以免干擾吸光值之測定。
 - 4) 室溫下反應 5 min 後，以 ELISA 光度計讀取 660 nm 吸光值。
 - 5) 將不同濃度的蛋白質標準品於 660 nm 測得的吸光值繪製成標準曲線，以內插法求得樣本蛋白質濃度。

2.2 二維膠體電泳

2D-PAGE 二維電泳是研究蛋白質體的重要工具之一，具有極佳的解析度，蛋白質複合體能在原態的狀況下展開，第一維先以等電點聚焦法 (Isoelectric focusing, IEF) 分離不同等電點 (isoelectric points, pI) 的蛋白質，接著再利用第二維的 SDS-PAGE 依蛋白質分子量不同分離，形成二次元的蛋白質圖譜。二維電泳依等電點聚焦膠條 (IPG strips) 長度可分為 7、11、13、18 cm，一般而言，尺寸越大分離效果越好，但相對的所需樣本量也越高。由於禽流感病毒蛋白質體組成單純且樣本來源不易，因此本文中皆以 7 cm, pH 3~10 的 IPG strips 進行二維電泳。

2.2.1 樣本處理 (脫鹽及溶解)

病毒樣本經蔗糖梯度濃縮純化後仍含有高鹽，為避免影響第一維 IEF 結果，造成膠片上出現橫紋干擾，需經過脫鹽步驟。

儀器設備：

- 微量高速離心機 (Beckman, Microfuge)
- 小型真空離心機 (Thermo, SpeedVac)

藥品試劑：

10% TCA/acetone

TCA (10%)	(100% GR, J.T. Baker)	50	mL
Acetone	(J.T. Baker)	450	mL

保存於 -20°C 備用。

Acetone：置於 -20°C 冰凍。

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，溶解後分裝成 1 mL/管，置 -20°C 保存。

使用前待充分解凍後，每管添加 10 mg DTT 及 5 μ L IPG buffer (pH 3~10)。

方法步驟：

- 1) 取適量病毒樣本 (依蛋白質濃度不同，體積約 20~30 μ g)，加 1.5 mL 10% TCA/acetone，置於 -20°C 隔夜，沉澱蛋白質。
- 2) 在 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 min，去除上清液。

- 3) 加入 1.5 mL 冰凍 acetone，於 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 min，去除上清液。重複此步驟三次，將殘留的鹽類盡量洗去。
 - 4) 用小型真空離心機將 acetone 抽乾，若不馬上進行電泳置於 -20°C 保存。
 - 5) 加入 125 μ L sample buffer 震盪回溶。
- ◆ 依 IPG strips 尺寸，選擇適量體積回溶樣本：7 cm-125 μ L; 11 cm-200 μ L; 13 cm-250 μ L。

2.2.2 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)

藥品試劑：

Dry strip cover oil (Plus one)

方法步驟：

- 1) 將樣本完全回溶於 sample buffer 後，取出加入 holder 中。
- 2) 選擇適當的 IPG strip，小心撕去上面的保護膜，膠面朝下以鑷子夾入 holder 中，注意 strip 正負極放置的方向需與 holder 相同。
 ◆ strip 與 holder 間不可以有任何氣泡，若有氣泡以 tips 輕壓趕出。
- 3) 加入 0.4 mL cover oil，防止 strip 乾掉或 urea 結晶。
 ◆可於正負極各加入 0.2 mL，再蓋上蓋子，蓋子就會吸住 holder 而密封。
- 4) 將 holder 置於 IPGphor system 電極板上，兩端接點確實與電極板接觸，檢查正負極是否正確，以 30 V 電壓將 strip rehydration 12 h，使 strip 上膠體膨潤，再進行設定的 program。
- 5) 待 IEF 進行結束後，紀錄最終電壓及 Volt-hours，將 strip 以二次水清洗，去除 cover oil，若無法立即進行 SDS 電泳分析，將其置 -80°C 保存。

表 2.1 等電點聚焦條件

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 20°C，每 strip 電流限制在 50 μ A 以內。

2.2.3 第二維 SDS-PAGE 膠體電泳

儀器設備：

同 SDS 膠體電泳。詳見附錄 1.1.1 節。

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

藥品試劑：

同 SDS 膠體電泳。並增加以下溶液：

SDS 平衡緩衝液：

1.5 M Tris-HCl (50 mM)	(BDH 103157P)	10	mL
SDS (2%)	(J.T.Baker)	4	g
Glycerol (30%)	(J.T.Baker 2136-03)	69	mL
Urea (6M)	(J.T.Baker 4204-05)	72	g
Bromophenol blue (0.01%)	(Sigma B-6896)	200	mL

加入二次水定量至 200 mL。

Agarose：

Agarose	(Biomax)	0.5	g
SDS running buffer		100	mL

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) 進行第二維電泳前，先預鑄所需之 SDS-PAGE 膠體，配方如附錄表 2.1 所示，但是不需鑄焦集膠體。本文使用 10% SDS-PAGE。
- 2) 將進行完 IEF 之 strip 以二次水輕輕沖洗，去除上方的 cover oil，接著放入 5 mL 含 50 mg DTT 的 SDS 平衡緩衝液，平衡 15 min。
- 3) 取出 strip 放入含 125 mg IAA 的 SDS 平衡緩衝液，平衡 15 min。
- 4) 將鑄好的 SDS-PAGE 膠片架上電泳槽，上層加入 SDS running buffer，取出平衡好的 strip 以二次水沖去 SDS 平衡緩衝液後，將 strip 朝右輕輕滑入，趕走 strip 和 SDS 膠片中間的氣泡。
- 5) 取適量蛋白質分子標準品滴在 4 mm² 大小的濾紙上，將膠片上方的 SDS running buffer 倒乾後，把濾紙靠左放入膠片後，立刻以 agarose 封膠。
- 6) 將上述處理好的膠體放入電泳槽中，依 2.2.1 節的方法固定電壓 120 V 進行電泳。
- 7) 電泳完成後，取下膠片去除 strip 及 agarose，並於右上角截角標記。

2.3 抗體製備相關實驗

本論文使用 BALB/c 小鼠生產抗體。將抗原與佐劑 (adjuvant) 混合製成乳劑之後，注射入小鼠腹腔中，使其誘發免疫反應而產生所需之抗體。免疫程序及細胞培養技術主要參考莊榮輝博士論文 (莊榮輝, 1985)。

2.3.1 動物免疫法

儀器設備：

BALB/c 小白鼠 (購自台大醫學院實驗動物中心)
三向閥 (Nipro)
Prasfilm (American National Can)
注射針筒 (Terumo, 1 mL, 27-G 1/2-in.)

藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。
Adjuvant：Freund's Adjuvant, Complete (Sigma F5881)
Freund's Adjuvant, Incomplete (Sigma F5506)

方法步驟：

- 1) 購買四週大 BALB/c 小鼠，待飼養至六週大時，開始進行抗體誘導。
 - ◆第一劑免疫每隻小鼠注射 100 μg 抗原，之後改為每隻小鼠 50 μg 。
- 2) 以 PBS 稀釋抗原至體積為 250~300 μL ，吸入注射針筒內，另一支針筒則裝入與均質化抗原相等體積的 adjuvant。
 - ◆第一劑免疫使用 Complete Adjuvant，之後的免疫則使用 Incomplete Adjuvant。
- 3) 將針筒接上三向閥，連接處以 parafilm 確實封住，防止抗原因反覆吸放壓力過大而噴出損失。
- 4) 旋開三向閥開關，使其兩接針筒端通透，左右來回推送注射器約 30 min，使其充份乳化。
 - ◆可將乳化後的樣品滴於水面測試，若樣品不溶於水，表示乳化完全。
- 5) 取乳化完全之抗原對小鼠進行腹腔注射。
- 6) 之後每隔兩周免疫一次，依抗體誘發情形免疫 4~9 次。

2.3.2 單株抗體製備

儀器設備：

二氧化碳培養箱 (Forma, Model 3158) 及 CO₂ 鋼瓶 (37°C, 7% CO₂)
37°C 水浴槽
倒立式位相差顯微鏡 (Nikon Diaphot)
血球計數器 (AO, USA)
水平氣流無菌操作箱 (台灣海天牌, 14HT-24 型)
離心機 (International Centrifuge, Universal Model UV)

無菌離心管 (15 mL, 50 mL)
96 孔、24 孔細胞培養盤及 T-25, T-80 培養瓶 (Nunc)
解剖用手術剪刀、尖頭攝子、鈍頭攝子、止血鉗及大頭針十數支
酒精燈
無菌玻璃吸管
小型培養皿四個
鋁箔紙及保麗龍板
計時器

藥品試劑：

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養基 (Hyclone SH3004502)

◆內含成分：含 3.7 g/L NaHCO₃, 4.5 g/L D-Glucose, 1.028 g/L stable glutamine 。
避光貯存於 4°C 備用，可保存半年以上。

Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone SH 30070.03)

Pen-Strep (penicillin-streptomycin, Flow 16-700-49)

◆10,000 IU/mL-10,000 mg /mL，使用時稀釋 200 倍。於 4°C 儲存。

Sodium pyruvate (Flow 16-820-49, 100mM, 100X)

◆使用時稀釋 100 倍。於 4°C 儲存。

DMEMX 培養液：

DMEM	(Hyclone SH3004502)	170	mL
FBS	(Hyclone SH30070.03)	30	mL
Sodium pyruvate	(Flow 16-820-49)	2	mL
Pen-Strep	(Flow 16-700-49)	2	mL

上述溶液混合後使用。置於 4°C 保存。

Polyethylene Glycol 1500 (PEG) (Roche, 50%, w/w)

HAT (Sigma H-0262, 50X)

◆內含成分：hypoxanthine 100 mM, thymidine 16 mM, aminopterin 0.4 mM，
aminopterin需避光，儲藏於 -20°C。

HAT-DMEMX 培養液：取 HAT 0.6 mL 與 DMEMX 30 mL 均勻混合。

方法步驟：

前置作業：

- 1) 進行細胞融合前一週，需先確定小鼠的免疫抗血清已有穩定效價。
- 2) 融合進行是否順利與骨髓癌細胞 Sp2/0-Ag14 的生長狀況有關。細胞融合前需準備約一個 T-75 flask 內含約八分滿的骨髓癌細胞 Sp2/0-Ag14，於顯微鏡底下觀察，細胞應呈現圓形且飽滿透亮。
- 3) 所有刀剪器械均需經高壓滅菌，並以 80°C 烘乾後備用。

脾臟 B 細胞收集：

- 1) 將保麗龍板以鋁箔紙包好作為解剖台，並準備一個裝滿 95% 酒精的燒杯，用以浸泡使用過的解剖工具。
- 2) 犧牲小鼠，以酒精將毛噴濕後，移至無菌操作臺內。將小鼠置於解剖檯上，

四肢以大頭針固定呈大字型，使其左腹凸出向上。

- 3) 以鑷子夾起表皮後工字型剪開，以大頭針固定。
- 4) 判斷脾臟位置後，以鑷子挑起附近真皮，小心的剪開一個小洞，再分別往背側及腹側剪開並以大頭針固定。
- 5) 打開腹腔後，將鑷子換成鈍頭鑷子，小心的把脾臟由根部剪開取出，置入裝有 DMAM 的培養皿中。
◆打開腹腔後，也可以剪開心臟採取全血。
- 6) 在培養皿中小心的剪去白色的結締組織。當結締組織去除乾淨時，脾臟將呈現光滑的深褐色狀，將其充分漂洗乾淨，移往另一個裝有 DMEM 的乾淨培養皿。
- 7) 以針頭於脾臟前端與後端刺穿幾個小洞，再吸取培養皿中的 DMEM 注入脾臟內，此時細胞便由小洞流出，為深紅色的液體。反覆沖洗數次，直到脾臟顏色由深紅轉為淺粉紅。
- 8) 將內含脾細胞的 DMEM 倒入 15 mL 離心管中，待組織碎片沉降至管底後，小心上清換至另一個離心管中，以 900 rpm 離心 10 min。
- 9) 倒去上清液，將沉澱輕敲打散後，把 DMEM 補至 33 mL，接著以 900 rpm 離心 10 min。此步驟重複兩次，最後一次將 DMEM 補至 15 mL。

細胞融合：

- 1) 沖下 Sp2/0-Ag 14 細胞，裝入 15 mL 離心管中，以 850 rpm 離心 10 min。
- 2) 去除上清後，將沉澱敲打散，再補 DMEM 至 33 mL，混合均勻後以 850 rpm 離心 10 min。此步驟重複兩次，最後一次將 DMEM 補至 15 mL。
- 3) 以血球計數器計算脾細胞及 Sp2/0-Ag 14 細胞數量。
- 4) 將含有兩種細胞的上清液混合，再將 DMEM 補至 33 mL，以 900 rpm 離心 10 min。
- 5) 去除上清液，將沉澱輕敲打散。
- 6) 開始進行融合。將裝有細胞之離心管放在裝有 37°C 二次水的燒杯內，一邊搖動一邊加入 37°C 0.7 mL PEG，於 1 min 內加完並混合均勻。
- 7) 均勻搖晃 1 min 後，加入 2 mL 37°C DMEM，邊加邊搖晃均勻以稀釋 PEG。此動作需於 2 min 內完成。
- 8) 再於 2 min 內加入 8 mL 37°C DMEM。以 850 rpm 離心 8 min 後，去除上清液，將沉澱輕敲打散。

◆PEG 對細胞有害，需將含有 PEG 之上清液倒乾淨，盡量去除。

- 9) 加入 30 mL HAT-DMEMX 輕輕混合使細胞懸浮。
- 10) 輕輕均勻混合，以無菌塑膠滴管將細胞均分至三盤 96 孔細胞培養盤中。

HAT 篩選：

- 1) 融合完成後，於第一天 (D₁)，每孔加入 2 滴 37°C HT-DMEMX，以進一步稀釋 PEG。
- 2) 融合後的第三天 (D₃) 開始，可看見有二元體及三元體的細胞出現。加入兩滴 HT-DMEMX 於各槽中。此後每隔兩天加一次培養液。

- 3) 待至第六天 (D₆)，未融合成功的 Sp2/0-Ag 14 細胞逐漸死去，而順利生長並聚成的群落者，即為融合成功的細胞。小心吸出 0.1 mL 培養液，加入 2 滴 37°C HAT-DMEMX，並標記。
- 4) 大約第七天 (D₇) 至十一天 (D₁₁) 細胞持續生長，可以肉眼見到白色點狀群落，小心吸出 0.1 mL 培養液，加入 2 滴 37°C HAT-DMEMX，並標記。
- 5) 於第十天 (D₁₀) 取樣成功聚合成群落的細胞之培養上清液，進行 ELISA 初步篩選；正反應的細胞株，將取其培養上清液，進一步與對應的抗原以 Western blot 確定。
- 6) 約在融合後二到三週後，細胞生長可趨於穩定，再次檢視上次標記融合成功的培養槽，並吸去其餘未成功槽的培養液。

限數稀釋法 (limiting dilution) 單株化細胞：

- 1) 將欲單株化的細胞小心懸濁，以血球計數器估算細胞密度，於 50 mL 離心管中加入適量 DMEMX，將細胞密度稀釋至 10⁴ cells/mL。
- 2) 以 DMEMX 進行系列稀釋，使最後溶液體積 10 mL，濃度為 10 cells/mL。
- 3) 小心搖晃稀釋過的細胞溶液，使其均勻分布，接著 96 孔培養盤中每孔加入 100 μL (約兩滴)，即每個培養槽理論上含有 1 個細胞。
- 4) 將培養盤置入 37°C 二氧化碳培養箱中培養，3~5 天後於顯微鏡底下觀察細胞群落生長情形，挑出由單一細胞群聚而成的小群落。
- 5) 待群落長大，取樣細胞培養上清液，進行 ELISA 初步篩選；正反應的細胞株，將取其培養上清液，進一步與對應的抗原以 Western blot 確定。
- 6) 有正反應的單一群落細胞株應立刻擴大培養，並盡快進行細胞冷凍，保存於液態氮桶中。

2.3.3 單株抗體大量製備

融合瘤細胞株建立後，可擴大培養細胞，收集其培養上清液，即可得所需抗體；亦可將融合瘤細胞株以腹腔注射的方式，注射進入小鼠體內，以誘導小鼠產生腹水的方式大量生產，後者生產方式所得的抗體濃度高且量多。

儀器設備：

BALB/c 小白鼠 (購自台大醫學院實驗動物中心)
注射針頭 (Terumo, 19-G 1 1/2-in.)
注射器 (Terumo, 1 mL, 27-G 1/2-in.)
噴火槍

藥品試劑：

Pristane (Sigma P-2870)
DMEM (Biochrom AG, FG 0435)：詳見 2.3.3 節。

方法步驟：

培養基生產法：

視需要擴大培養細胞，至細胞培養於不同大小的培養瓶中，培養時讓細胞一直長過飽和期，待培養液呈現橘黃色，將培養液倒出，離心去除細胞，收集上清液進行免疫球蛋白純化。

誘發小鼠腹水生產法：

- 1) 選用八週以上 BALB/c 小鼠，每隻小鼠於腹腔注射 0.5 mL pristane。
- 2) 5~7 天後，吸去融合瘤細胞培養液，加入 DMEM 小心懸濁，置於 50 mL 離心管，以 850 rpm 離心 5 min。
- 3) 去除上清液，將沉澱輕敲打散，再加入新的 DMEM 懸濁後，以 850 rpm 離心 5 min。此步驟重複兩次。
- 4) 最後一次離心，將細胞懸濁於 0.5 mL DMEM，注射於上述小鼠腹腔。
◆每隻小鼠約使用 $10^6\sim 10^7$ 個細胞，可由顯微鏡觀察，約為一個 T25 培養瓶八成滿的數量，細胞生長狀況需良好，呈現飽滿透亮。
- 5) 約 7~14 天後，小鼠腹部脹大，取 19 號塑膠針頭，以噴火槍將塑膠接頭燒融去除，接著將針頭燒紅消毒，待冷卻後插入小鼠腹腔，以離心管收集滴出之腹水，收到不再滴出為止。
- 6) 收集之腹水應盡快離心，取上清液進行免疫球蛋白純化。
◆良好的狀況下，一隻小鼠約可收集 10 mL 腹水。

2.3.4 免疫球蛋白純化

本論文使用 0~40% 硫酸銨飽和濃度沉澱免疫球蛋白 (Ig)，此為初步純化。後續可使用離子交換法進行更進一步純化。

儀器設備：

高速冷凍離心機 (Beckman, Microfuge)

透析膜 (Seamless cellulose tubing 36/32, 分割分子量12,000~14,000 Da)

藥品試劑：

硫酸銨 (ammonium sulfate, Merck 101211)：使用前需研磨並烘乾。

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

方法步驟：

- 1) 將收集之小鼠腹水，於 4°C 下靜置 30~60 min。
- 2) 以 12,000 rpm 離心 30 min，去除細胞及血球碎裂物 (lysate)，取上清液並計算體積。
- 3) 加入 2 倍體積 PBS 混合均勻，冰浴下進行 0~40% 飽和度的硫酸銨沈澱。
- 4) 於冰浴下平衡 30 min，接著以 12,000 rpm 離心 30 min。
- 5) 去除上清，IgG 沉澱以與腹水同體積之 PBS 回溶。
- 6) 將回溶之樣品對 5,000 mL PBS 透析隔夜。
- 7) 透析後樣品以 12,000 rpm 離心 30 min，收集上清液，加入等倍甘油保存。

2.4 免疫學方法

2.4.1 酵素免疫分析法

或稱為酵素連結免液吸附試驗 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。將抗原吸附於 96 槽微量滴定盤 (96 well microtitration plate, ELISA plate) 中，加入一次抗體與之反應，接著以二次抗體專一性的辨識一次抗體，由於二次抗體上連結有特定酵素 (horse radish peroxidase, HRP)，加入 o-phenylenediamine (OPD) 基質液後，經氧化還原反應，呈現黃色訊號，亦可由偵測 405 nm 波長吸光值比較結果。

2.4.1.1 一般酵素免疫分析法

儀器設備：

- 37°C 恆溫箱 (Mettler)
- ELISA 光度計 (Beckman counter, DTX880)
- ELISA 96 槽微量滴定盤 (Nunc 442404)
- 十二爪微量吸管 (Gilson)

藥品試劑：

- PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。
- PBST (Phosphate buffer saline & Tween-20)：詳見附錄 1.3.1 節。
- 明膠-NET (NaCl-EDTA-Tween)：詳見附錄 1.3.1 節。
- 二次抗體：詳見2.5.1 節。

OPD 基質液：

o-Phenylenediamine	(Sigma P-1526)	40	mg
H ₂ O ₂ (30%)	(Merck 7210)	10	μL

以 PBS (1×) 溶解後，定量至 100 mL。

- ◆ 以深色瓶避光保存，使用前新鮮配置。
- ◆ OPD 可能為致癌物質，注意勿吸入塵埃或直接接觸。

方法步驟：

- 1) 抗原吸附 (Coating)：於 ELISA 96 槽微量滴定盤中，每槽以 PBS 稀釋之抗原加入 100 μL，於 4°C 反應過夜。
 - ◆ 以透明膠布封住滴定盤，防止溶液蒸發。
- 2) 填塞 (Blocking)：小心吸去抗原，以 PBST 洗三次。每槽注滿明膠-NET，以保鮮膜封住後，置室溫反應 1~2 h 後倒去，再以 PBST 洗三次。
- 3) 抗原抗體反應：以明膠-NET 稀釋一次抗體，每槽加入 100 μL，於 37°C 反應 30 min，接著於室溫反應 1 h。
- 4) 小心吸去一次抗體，以 PBST 洗三次。
- 5) 二次抗體反應：以明膠-NET 稀釋二次抗體，每槽加入 100 μL，於 37°C 反應 30 min，接著於室溫反應 1 h。

- 6) 小心吸去二次抗體，以 PBST 洗三次。
- 7) 酵素呈色反應：每槽加入 150 μL OPD 基質液，避光於 37°C 反應呈色。約在半小時後反應趨於穩定。使用 ELISA 光度計偵測 405 nm 波長吸光值。

2.4.1.2 競爭型酵素免疫分析法

儀器設備：同 2.4.1.1 節。

藥品試劑：同 2.4.1.1 節。

方法步驟：

- 1) 抗原吸附 (Coating)：於 ELISA 96 槽微量滴定盤中，每槽以 PBS 稀釋之抗原加入 100 μL ，於 4°C 反應過夜。
 - ◆ 以透明膠布封住滴定盤，防止溶液蒸發。
- 2) 填塞 (Blocking)：小心吸去抗原，以 PBST 洗三次。每槽注滿明膠-NET，以保鮮膜封住後，置室溫反應 1~2 h 後倒去，再以 PBST 洗三次。
- 3) 競爭反應：以明膠-NET 稀釋一次抗體後，加入抗原於 37°C 反應 1h。
- 4) 抗原抗體反應：將反應過後的一次抗體，加入 96 槽微量滴定盤中，每槽加入 100 μL ，於 37°C 反應 30 min，接著於室溫反應 1 h。
- 5) 小心吸去一次抗體，以 PBST 洗三次。
- 6) 二次抗體反應：以明膠-NET 稀釋二次抗體，每槽加入 100 μL ，於 37°C 反應 30 min，接著於室溫反應 1 h。
- 7) 小心吸去二次抗體，以 PBST 洗三次。
- 8) 酵素呈色反應：每槽加入 150 μL OPD 基質液，避光於 37°C 反應呈色。約在半小時後反應趨於穩定。使用 ELISA 光度計偵測 405 nm 波長吸光值。

2.4.2 免疫共沉澱法

Protein A 是存在於金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 細胞壁上的蛋白質，其可與抗體 heavy chain 的 Fc 區域，以疏水性交互作用力結合。

實驗中使用預先接上 Sepharose CL-4B 之 Protein A，目的為增加重量，便於後續分離。當 Protein A 與抗體結合後，加入抗原與之反應，接著可用高速離心將複合體沉澱分離，達到純化抗原的目的。

儀器設備：

Rota-Mixer、高速冷凍離心機 (Beckman, Microfuge)

藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

PBST (Phosphate buffer saline & Tween-20)：詳見附錄 1.3.1 節。

SDS 膠體電泳樣品溶液：詳見 2.2.1 節。配製時不加 bromophenol blue。

追蹤染劑：取 bromophenol blue 1 mg 溶於 5 mL SDS 通用電泳緩衝液 (詳見 2.2.1 節)，加 5 mL 甘油混合均勻。

Quench buffer (Q-buffer)：ethanolamine (50mM, Sigma E9508)，調整 pH=8.2。

glycine (1M, amresco 2938B) : 調整 pH= 3。

Wash buffer (W-buffer) 2x :

Triethanolamine	(0.4 M, Fluka 90290)	3.7 g
Sodium borate	(0.2 M, Sigma S9640)	3.8 g

溶於 40 mL 二次水，以 NaOH 調 pH 至 8.2，再定量至 50 mL。使用前以二次水稀釋 1 倍。

Cross linking solution :

Dimethyl pimelimidate (DMP)	(Thermo 21667)	0.26 g
Dimethyl Sulfide (DMS)	(Thermo 20700)	0.27 g

以 20 mL 2x W-buffer 溶解，調 pH 至 8.2，再以二次水定量至 40 mL。使用前新鮮配製。

DTT (1M)

方法步驟：

- 1) 取 10 μ L Protein A Sepharose。
- 2) 加入 1 mL PBST 於 4°C 震盪 5 min。以 2000 g 離心 5 min，吸去上清液。此步驟重複兩次。
- 3) 加入抗體 10 μ L，於 4°C 反應過夜。
- 4) 以 2000 g 離心 5 min，吸去上清液。加入 PBST 清洗三次，每次 5 min。
- 5) 加入 Cross linking solution，於室溫反應 30 min。
- 6) 2000 g 離心 5 min，吸去上清液後，加入 W-buffer 震盪 5 min，以 2000 g 離心 5 min，吸去上清液。
- 7) 重複步驟 5~6，兩次。
- 8) 加入 Q-buffer 於室溫反應 5 min，離心後吸去上清液。此步驟重複兩次。
- 9) 加 glycine (pH=3) 於室溫反應 5 min，離心後吸去上清。此步驟重複兩次。
- 10) 以 PBST 清洗三次，每次 5 min。
- 11) 加入抗原 100 μ L，於 4°C 反應過夜。
- 12) 以 2000 g 離心 5 min，吸去上清液。加入 PBST 清洗七次，每次 5 min，去除非專一性吸附蛋白質。
- 13) 加入 SDS 膠體電泳樣品溶液，於 37°C 反應 10 min。
- 14) 加入 DTT 和追蹤染劑後，於 100°C 加熱 10 min，離心取上清液，進行 SDS 電泳檢定。

2.4.3 單株抗體型別分析法

本論文以 Western blot 代替傳統 Isotyping Kit 建議之 ELISA。優點是可降低干擾，增加結果可信度。實驗流程如下：將抗原轉印至 PVDF 膜上，然後將預測之抗體與抗原進行反應，接著以各型別 (isotype) 之抗體與預測抗體進行反應，最後先後加入兩種連結特定的呈色酵素 (horse radish peroxidase, HRP) 的二次抗體偵測結果。首先加入為能專一辨認型別抗體之二次抗體，得知型別。接著加入能辨識預測抗體之二次抗體作為控制組，證明預測抗體確實與能辨識抗原，並與之反應。

儀器設備：

37°C 恆溫箱 (Mettler)

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：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

PBST (Phosphate buffer saline & Tween-20)：詳見附錄 1.3.1 節。

明膠-NET (NaCl-EDTA-Tween)：詳見附錄 1.3.1 節。

二次抗體：詳見附錄 1.3.1 節。

ECL 冷光基質、DAB 呈色液：詳見附錄 1.3.1 節。

Pierce ImmunoPureR Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (Prod 37501)

方法步驟：

HRP呈色系統：

- 1) 轉印膜以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- 2) 填塞 (blocking)：加入適量的明膠-NET，反應 1 h。
- 3) 抗體抗原反應：以明膠-NET 稀釋一次抗體，室溫下反應 1 h，或於 4°C 反應過夜。去除一次抗體，以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- 4) 各型別專一性抗體反應：由分型套組中取出兔子抗小鼠抗體之各型別專一性抗體，稀釋方法為每 1 mL 明膠-NET 加入一滴 (50 μ L)。於 37°C 恆溫箱反應 30 min，再於室溫下反應 1 h。去除後，以 PBST 洗四次，每次 10 min。
- 5) Goat anti-rabbit IgG-HRP 反應：加入以明膠-NET 適當稀釋之 Goat anti-rabbit IgG-HRP working solution，於室溫下反應 1 h。去除後，以 PBST 洗五次，每次 5 min。最後保存在 PBS 中。
- 6) 加入 ECL 冷光基質完全蓋過轉印膜，置於冷光螢光攝像及顯像系統 (UVP AutoChemi System) 呈相。
- 7) Goat anti-mouse IgG-HRP 反應：加入以明膠-NET 適當稀釋之二次抗體，於室溫下反應 1 h。去除後，以 PBST 洗五次，每次 5 min。
- 8) 加入 ECL 冷光基質完全蓋過轉印膜，置於冷光螢光攝像及顯像系統 (UVP AutoChemi System) 呈相。

2.5 以禽流感病毒感染MDCK細胞

本論文觀察對象為經 H6N1 禽流感病毒株感染的 MDCK 細胞 (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells)。MDCK 細胞最早是由 S. H. Madin 和 N. B. Darby，於 1958 年自西班牙長耳獵犬 (cocker spanie) 的腎細胞繼代培養而來，由於其對流感病毒具有高度的感染性 (susceptibility)，且利於流感病毒複製，具有較高產率，因此為目前常用於研究流感病毒的細胞株之一 (Lee et al., 2008)。本實驗中使用之病毒株為 A/Wild duck/Ilan/2904/1999，由臺大獸醫系王金和老師提供。

儀器設備：

二氧化碳培養箱 (37°C, 5% CO₂) 及 CO₂ 鋼瓶
37°C 水浴槽
倒立式位相差顯微鏡
血球計數器
水平氣流無菌操作箱

藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養基 (GIBCO 11971-025)
◆內含成分：含 3.7 g/L NaHCO₃, 4.5 g/L D-Glucose, 1.028 g/L stable glutamine。
避光貯存於 4°C 備用，可保存半年以上。
Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone SH 30070.03)
Pen-Strep-Ampho sol (penicillin-streptomycin-amphotericin, Biological 914469)
◆10,000 IU/mL-10,000 mg /mL，使用時稀釋 200 倍。於 4°C 儲存。
Trypsin – EDTA (Gibco 75P7535)
TPCK- trypsin (Sigma T1426)

方法步驟：

- 1) 於 MDCK 培養瓶中加入 trypsin-EDTA 溶液，使細胞懸浮。
- 2) 以血球計數器約略計算細胞濃度。將細胞培養於 6 孔細胞培養盤中，每槽約 4.2×10^5 個細胞。
- 3) 隔天於顯微鏡底下觀察細胞生長情況，細胞應貼壁呈紡錘狀，且細胞核與細胞膜應完整無空洞。接著倒去上清液，以 PBS 清洗一次。
- 4) 於 50 mL 離心管中，將病毒液、TPCK-trypsin 及適量培養液混合均勻，每槽約加入 500 μ L。置於 37°C 二氧化碳培養箱中培養。
- 5) 感染 1 h 後，於每槽添加 TPCK-trypsin 之培養液至 2 mL。

2.6 蛋白質生物素標定 (protein biotinylation)

Biotin 與 avidin、streptavidin、neutr avidin 可形成專一性的非共價性鍵結，是目前認為最強的蛋白質配體鍵結之一 ($K_a \approx 10^{15}$ mol/L)。Neutr Avidin 是去醣以後的 avidin，可降低與 biotin-binding protein 之間的非專一性結合。本論文中，將抗體進行生物素標定 (biotinylation)，當抗體抗原反應後，可藉由 Neutr Avidin, DyLight™ 488 偵測。

生物素標定則是利用 biotinamido hexanoic acid (biotinAC, BAC)，其長鍊己酸 (hexanoic acid) 可克服接上蛋白質後的空間障礙，增加 biotin 與 avidin 的反應機會。將 BAC 先與 *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 活化成 -NHS esters (biotinamido hexanoic acid 3-sulfo-*N*-hydroxysuccinimide ester, BAC-SulfoNHS) 後，再與 IgG 的 N 端進行共價鍵結，完成標定。

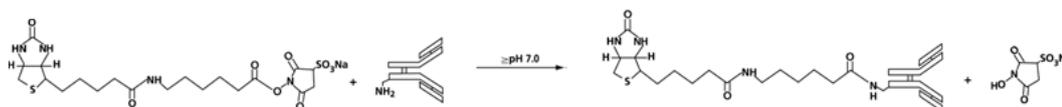


圖 2.1 BAC-SulfoNHS 與 IgG -N 端進行共價鍵結

Figure 2.1 Conjugation of BAC-SulfoNHS to the Amino Group of IgG

圖片取自 ImmunoProbe[®] Biotinylation Kit (Sigma-Aldrich)

儀器設備：

Rota mixer

藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

Biotinylation Reagent：

BAC-SulfoNHS	(BDH 103157P)	10	mg
DMSO (dimethyl sulfoxide)	(Merck 9678)	60	μL

以 DMSO 將 BAC-SulfoNHS 溶解，以 PBS 定量至 1 mL。新鮮配製。

方法步驟：

- 1) 準備欲標定之蛋白質，其濃度需至少 10 mg/mL，溶於 PBS 或無菌水中。
 - ◆ 溶液中不可含有 amines (如：Tris, glycine) 或 sodium azide，否則將抑制反應進行。
- 2) 每 1 mL 蛋白質，加入 38 μL biotinylation Reagent，於室溫反應 30 min 或於 4°C 反應 2-8 h。
 - ◆ 此為 biotinylation reagent : IgG = 10 : 1。亦可使用 biotinylation Reagent 減半，則比例改為 5 : 1。
- 3) 將樣品對 5,000 mL PBS 透析隔夜。
- 4) 透析後之樣品以 12,000 rpm 離心 30 min，收集上清液，加入等倍甘油保存於 -20°C。

2.7 共軛焦顯微鏡分析 (confocal microscope analysis)

儀器設備：

Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System

蓋玻片 (22×22 mm)

載玻片 (76×26×1 mm)

藥品試劑：

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

Fixation buffer：formaldehyde (3.7%, Merck K27911103)

Permeabilization buffer：triton X100 (1%, Sigma X100) 以 fixation buffer 配製。

◆ triton X100：t-octylphenoxypoly ethoxyethanol。

Blocking solution：BSA (1%, Sigma A3059), preimmune serum (1%) 溶於 PBS。

明膠-NET (NaCl-EDTA-Tween)：詳見附錄 1.3.1 節。

KPL Cy3-labeled goat anti-mouse antibody

Neutr Avidin, DyLight™ 488 Conjugated (Pierce 22832)

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)

方法步驟：

- 1) 將細胞培養於蓋玻片上。待欲觀察時，以 PBS 小心清洗兩次，以去除細胞碎片與未附著細胞。
- 2) 加入 1 mL Fixation buffer，於 37°C 反應 5~10 min。
- 3) 去除上清液，加入 1 mL Permeabilization buffer，於 37°C 反應 5~10 min。
- 4) 倒去上清液，以 PBS 洗三次。加入 Blocking solution，於室溫反應 2 h。
- 5) 去除 Blocking solution，以 PBS 洗三次。加入以明膠-NET稀釋之一次抗體，於 4°C 反應隔夜。
- 6) 去除一次抗體，以 PBS 洗三次。加入以明膠-NET 稀釋之二次抗體，避光於 4°C 反應至隔夜。
- 7) 去除二次抗體，以 PBS 洗三次。再度加入 Blocking solution，室溫反應 2 h。
- 8) 去除 Blocking solution，以 PBS 洗三次。加入經 biotinylation 之一次抗體，於 4°C 反應隔夜。
- 9) 去除一次抗體，以 PBS 洗三次。加入稀釋之 Neutr Avidin, DyLight™ 488，避光，於 4°C 反應至隔夜。
- 10) 倒去上清液，以 PBS 洗三次。
- 11) 小心夾出蓋玻片，在覆蓋細胞的那一面均勻滴上 DAPI。接著玻片朝下，小心蓋在載玻片上，注意玻片間的接觸面不可有氣泡。
- 12) 吸去多於 DAPI，以指甲油封。置於顯微鏡底下觀察。

第三章 結果

本論文使用 2000 年臺大獸醫系王金和老師實驗室分離出之臺灣本土禽流感病毒株禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 為抗體製備材料，其為 H6N1 亞型，該病毒株已於 2002 年完成基因定序工作。

由於禽流感病毒顆粒表面具有抗原性高的血液凝集素 (HA) 及神經胺酸酶 (NA)，且病毒 RNA 聚合酶的各次單位聚合酶蛋白於病毒顆粒中含量稀少，造成這些蛋白質的專一性單株抗難以製備，因此針對這些瓶頸，我們抗體製備的策略為運用已完成定序的病毒基因資訊，藉由比對序列進行結構預測，設計合成短鏈胜肽 (peptide) 作為抗原免疫小鼠，並分為兩階段篩選，首先混合三段短鏈胜肽作為抗原，以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 測試，接著將病毒全蛋白轉印至 PVDF 膜作為抗原，進一步以免疫染色法檢驗，以含少量目標蛋白質的病毒顆粒進行進階篩選，挑選兩種篩選結果均呈正反應者，確保所篩出的單株抗體可辨識真正的病毒蛋白質。

3.1 禽流感病毒 RNA 次單元聚合酶蛋白 PA、PB1 及 PB2 之抗體製備

誘導抗體生成的策略為於每種目標蛋白質 (PA、PB1 及 PB2) 上，各選擇三段序列，作為可能的抗原決定基 (epitope)，合成短鏈胜肽 (peptide)。將三段短鏈胜肽混合作為抗原，每種目標蛋白免疫兩隻 6~8 週大的 Balb/c 小鼠，以期能製備出所需要的抗體。

3.1.1 以複合的結構與免疫性指標預測並設計抗原決定位

抗原決定位序列的選擇，參考文獻中已知功能區域為主 (圖 3.2) (Masunaga et al., 1999)，以軟體根據序列預測之結果 (由何杰龍先生協助完成) 為輔。

使用 DNastar 軟體依序列預測 PA、PB1 及 PB2 可能的結構，並利用 CBS Prediction Servers 網站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 預測各蛋白質可能之轉錄後修飾位置。根據結構性與免疫性預測，尋找各蛋白質上較易引起免疫反應的區域，包含：二級結構預測為 β -sheet、 β -turns 及 coil，抗原性 (antigenic index) 較高，並偏好該區域親水性與疏水性平均、較具彈性 (flexible) 及位於蛋白質表面 (surface probability) 或兩端 (N- and C- terminal regions)；除此之外，將避免選擇二級結構預測為 α -helix 的區域，並避開具訊息類胜肽 (signal peptides) 功能、及可能具轉錄後修飾位置，包含 Phosphorylation sites, N-Glycosylation sites, O-Glycosylation sites。

綜合以上結果，每種目標蛋白質各選擇三段約 20 個胺基酸長度的抗原決定基序列，委託生技公司合成短鏈胜肽 (peptide) 抗原。

由於合成的胜肽多為 linear 型式且分子較小，為了提高抗原性，在合成的過程中，將這些短鏈胜肽以 multiple antigen peptides (MAP) 型式相接。MAP 是以 polylysine 為核心，將各胜肽抗原以樹枝狀結構連結 (圖 3.1) (Soares and Rodrigues, 1998)，可藉由將多段相同或不同的接合在一起，增加空間構形，使其形成較大分子，增強免疫效果。

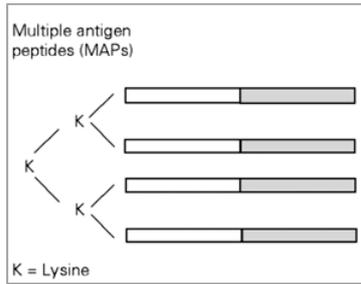


圖 3.1 multiple antigen peptide polymers (MAP) 示意圖

Figure 3.1 Schematic representation of multiple antigen peptide polymers (Soares and Rodrigues, 1998)

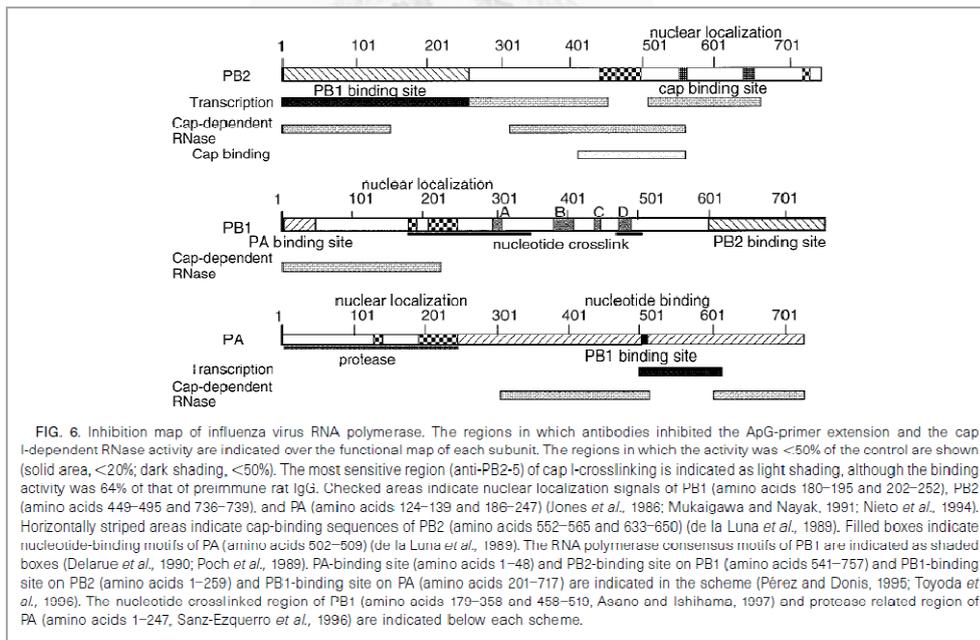
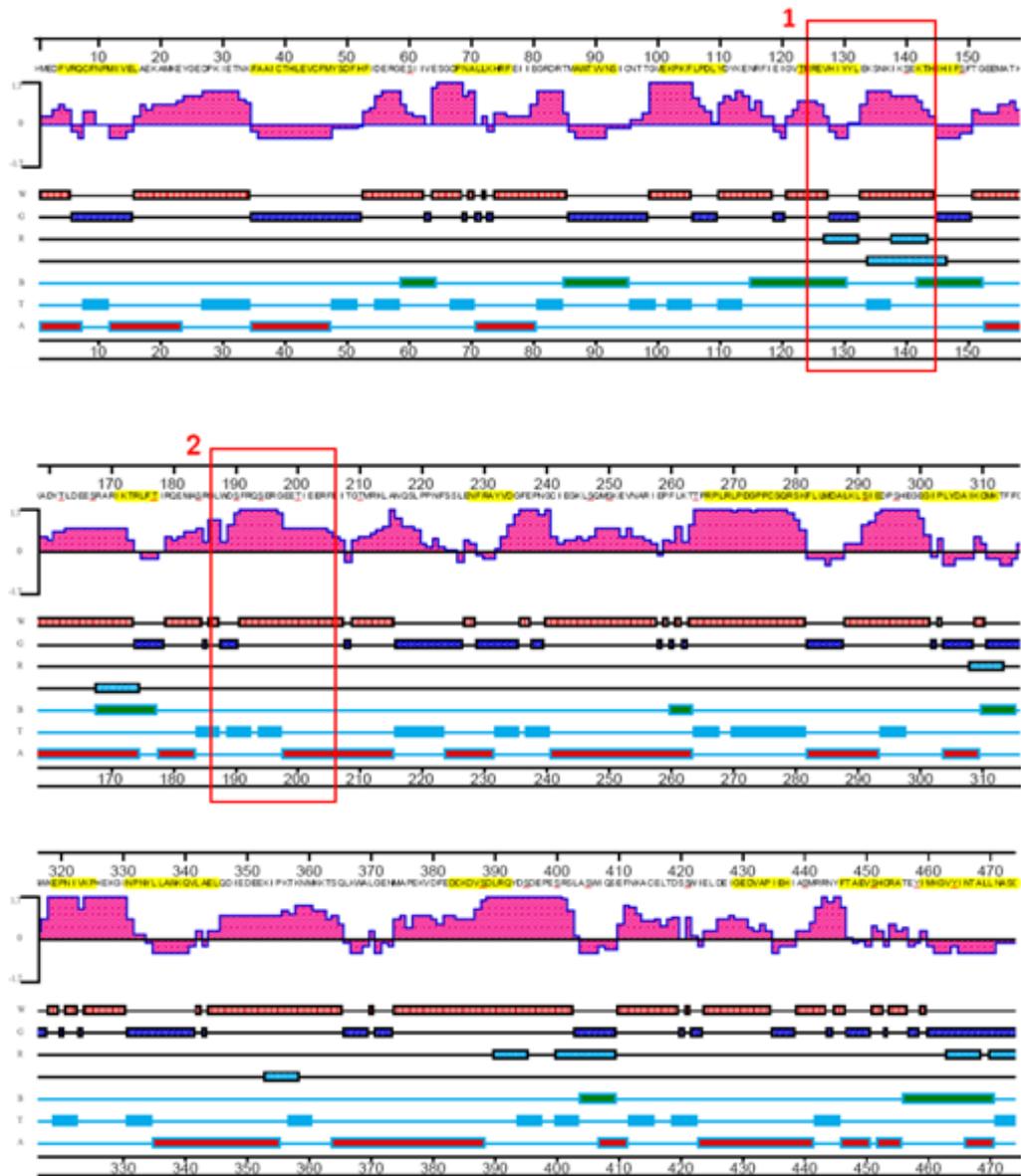


圖 3.2 參考文獻得知各 RNA 次單元聚合酶蛋白的功能區域

Figure 3.2 The respective functional areas of RNA polymerase subunit PA, PB1 and PB2 (Masunaga *et al.*, 1999)

3.1.1.1 選擇三段 20 個胺基酸的 PA 序列為候選抗原決定位

綜合 DNastar 軟體及 CBS Prediction Servers 網站，對禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 之 RNA 聚合酶次單位體 PA 的序列進行結構性與免疫性預測結果。結果如圖 3.3 所示。



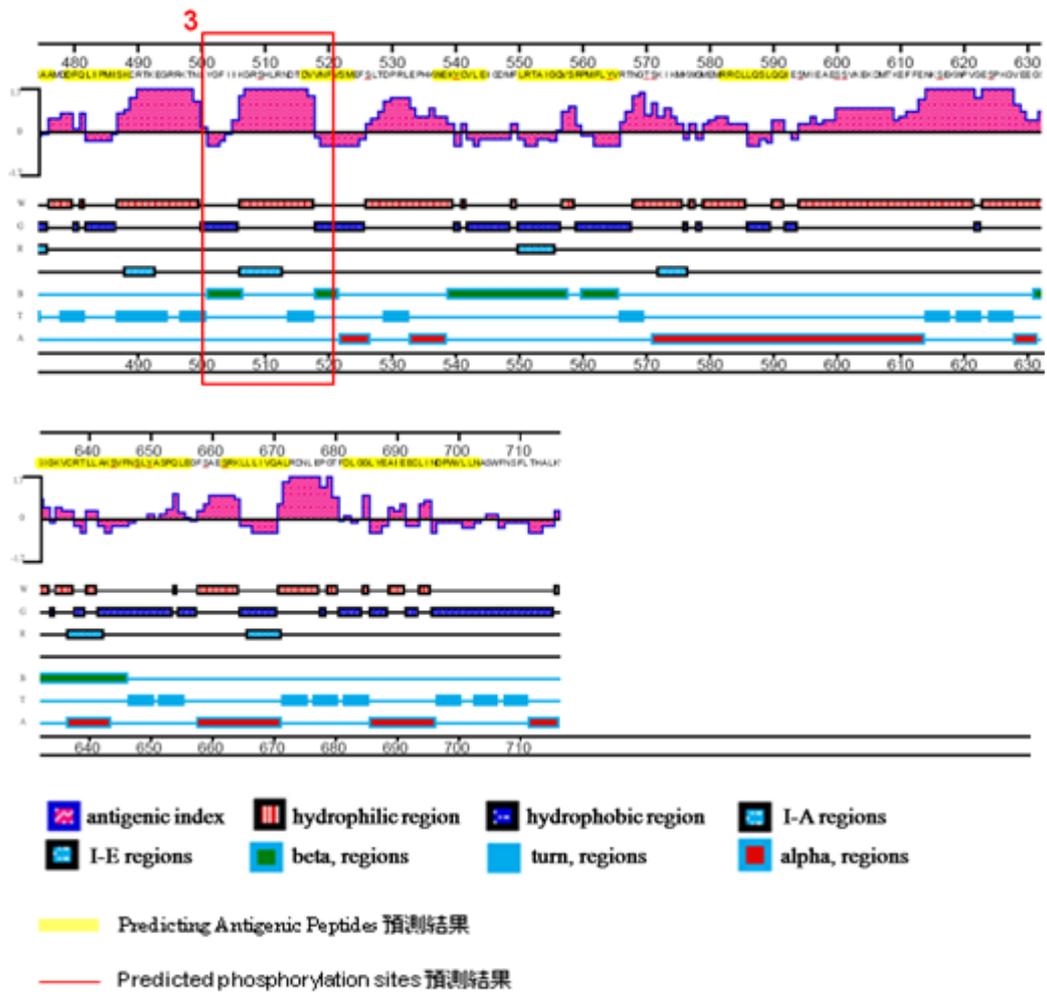


圖 3.3 以軟體對 PA 序列進行結構性與免疫性預測結果
Figure 3.3 structure analysis and immunogenicity prediction of PA
 紅色框線框起來的區域，為所選擇合成胜肽抗原的區域。

3.1.1.2 選擇三段 20 個胺基酸的 PB1 序列為候選抗原決定位

綜合 DNastar 軟體及 CBS Prediction Servers 網站，對禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 之 RNA 聚合酶次單位體 PB1 的序列進行結構性與免疫性預測結果。結果如圖 3.4 所示。

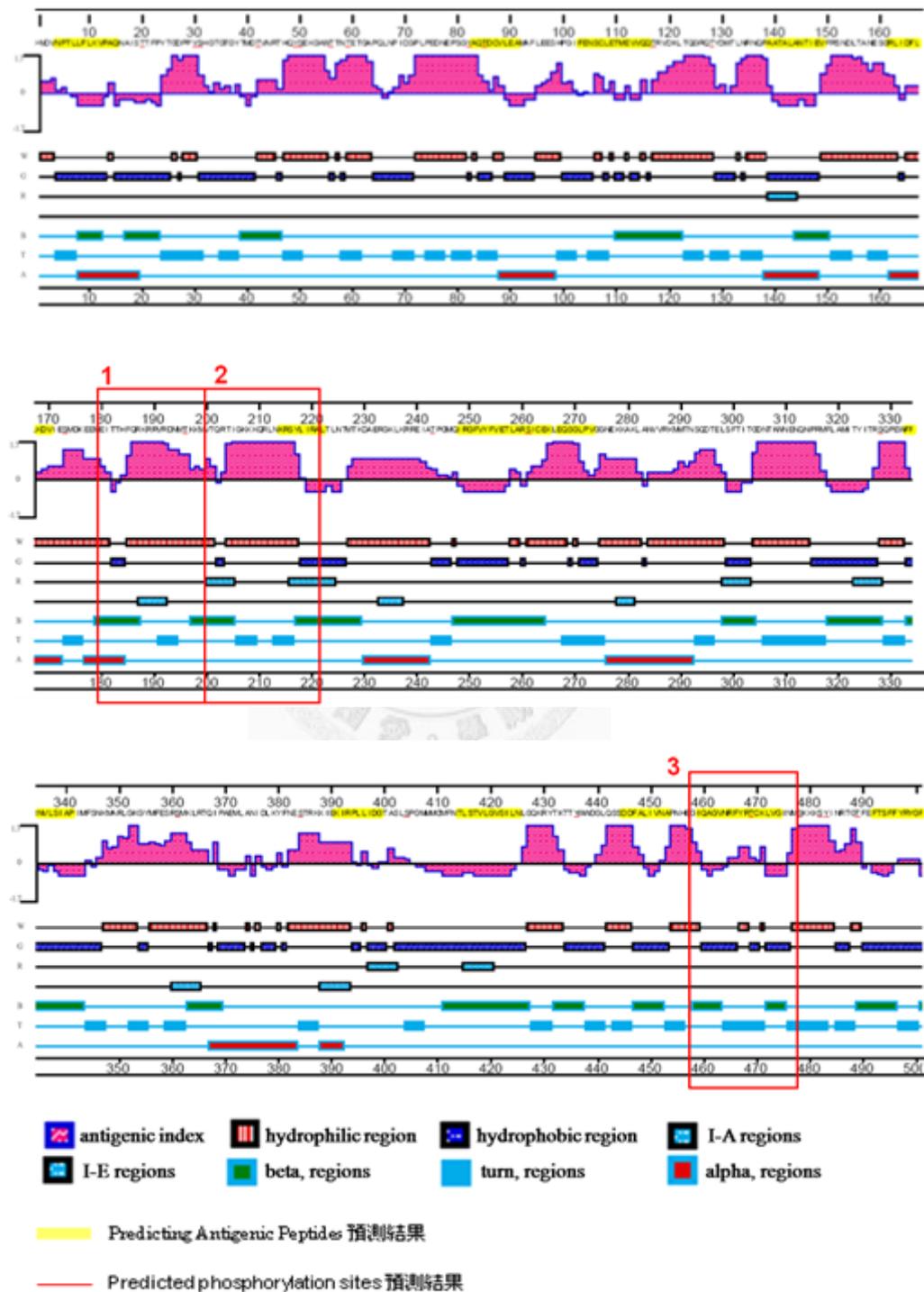
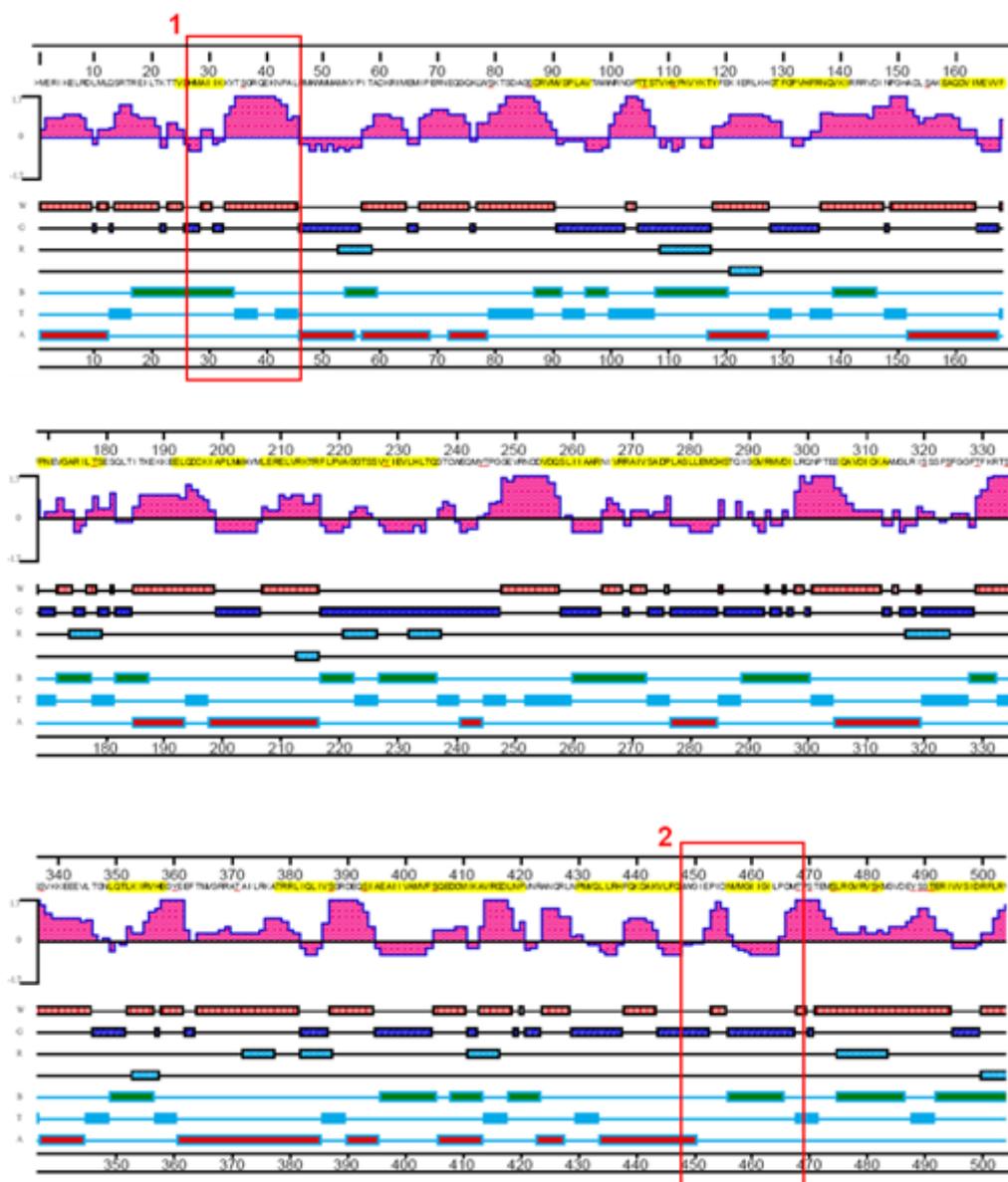


圖 3.4 以軟體對 PB1 序列進行結構性與免疫性預測結果

Figure 3.4 structure analysis and immunogenicity prediction of PB1
紅色框線框起來的區域，為所選擇合成胜肽抗原的區域

3.1.1.3 選擇三段 20 個胺基酸的 PB2 序列為候選抗原決定位

綜合 DNastar 軟體及 CBS Prediction Servers 網站，對禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 之 RNA 聚合酶次單位體 PB2 的序列進行結構性與免疫性預測結果。結果如圖 3.5 所示。



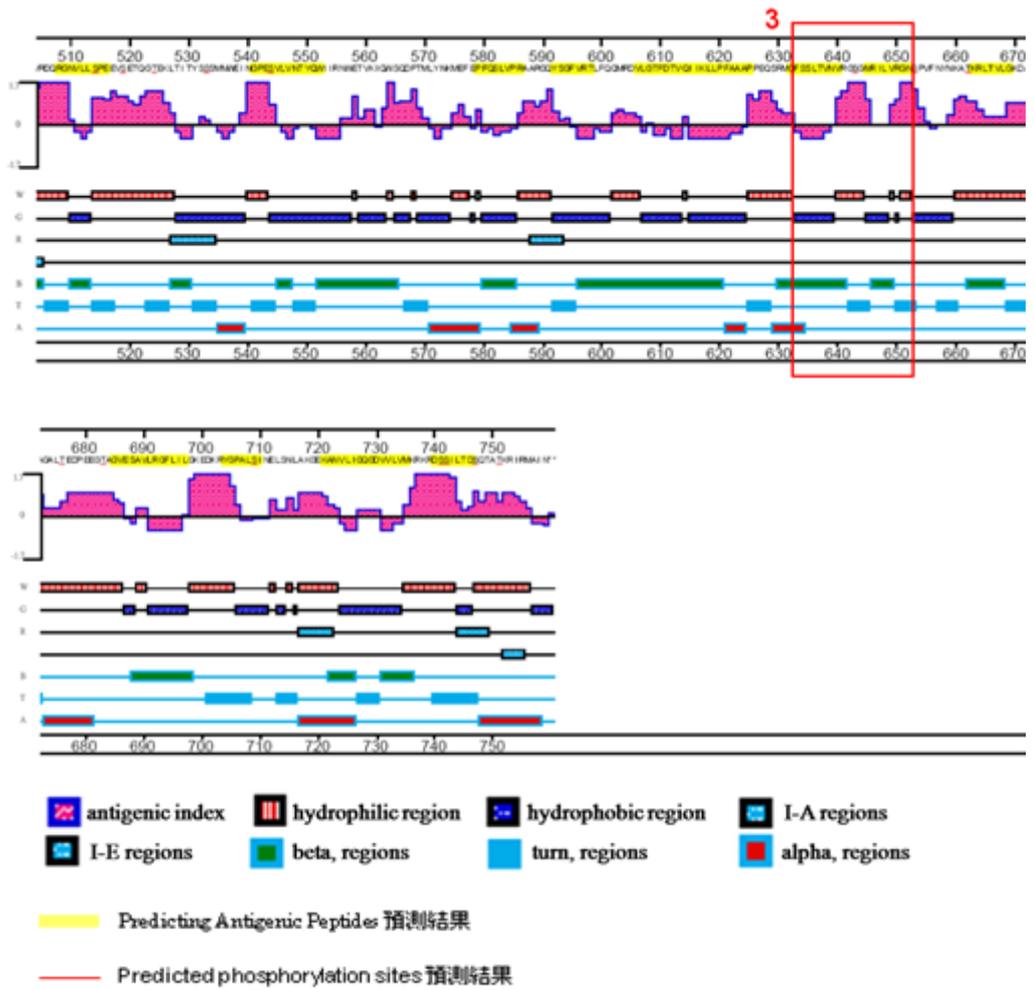


圖 3.5 以軟體對 PB2 序列進行結構性與免疫性預測結果
 Figure 3.5 structure analysis and immunogenicity prediction of PB2
 紅色框線框起來的區域，為所選擇合成胜肽抗原的區域

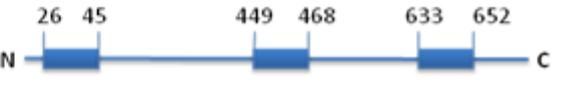
目標蛋白質	編號/序列	位置示意圖
PA	79 -RREVHIYYLEKSNKIKSEKT- 80 -GLWDSFRQSERGEETIEERF- 81 -YGFIIKGRSHLRNDTDVNF-	 N — [124 143] [186 250] [501 520] — C
PB₁	82 -EITTHFQRKRRVRDNMTKKM- 83 -QRTIGKKKQRLNKRSYLIRA- 84 -GIQAGVNRFYRTCKLVGINM-	 N — [180 199] [202 221] [458 477] — C
PB₂	85 -DHMAIIKKYTSGRQEKNPAL- 86 -WGIEPIDNVMGIIGILPDMT- 87 -FSSLTVNVRGSGMRILVRGN-	 N — [26 45] [449 468] [633 652] — C

表 3.1 目標蛋白與所選抗原決定基序列一覽表

Table 3.1 Selected epitopes of the target protein

3.1.2 傳統免疫抗血清製備

候選序列委託生技公司合成胜肽抗原。將每種目標蛋白設計三段不同的胜肽抗原混合，免疫 Balb/c 小鼠，隔週免疫一次，並進行剪尾採血，配合免疫染色法檢測抗體誘發情形。若測得抗體效價反應，則即為傳統免疫抗血清。流程如圖 3.6 所示。

3.1.2.1 PA 經多次免疫注射後採血測得穩定抗體效價

由於爲了得到後續的單株抗體，PA 進行兩次抗體製備流程，每次免疫兩隻小鼠，共免疫四隻小鼠，其中兩隻產生傳統免疫抗血清。結果如圖 3.7 所示，兩次的結果一致，PA 經免疫三次後，於相對分子量可見清楚的條帶，即已產生少量抗體，隨著免疫次數增加，免疫抗血清的效價逐漸增強，免疫至第七次，效價穩定達最高峰。

3.1.2.2 PB1 經多次免疫注射後採血測得穩定抗體效價

PB1 進行三次抗體製備流程，共免疫五隻小鼠，其中三隻在免疫過程中死亡，只有一隻產生傳統免疫抗血清。可由圖 3.9 得知，於相對分子量可見清楚的條帶，即血清中已含有抗 PB1 的抗體，效價雖穩定但並不高。圖 3.9 爲提高抗原濃度至 1.5 μg ，並降低稀釋倍數至 2000 倍所得結果。

3.1.2.3 PB2 經多次免疫注射後採血測得穩定抗體效價

PB2 亦進行兩次抗體製備流程，共免疫四隻小鼠，其中兩隻產生傳統免疫抗血清。結果如圖 3.10 所示，兩次的結果一致，PB2 經免疫三次後，於相對分子量可見條帶，即已產生少量抗體，隨著免疫次數增加，免疫抗血清的效價亦逐漸增強。但整體而言，第一次製備時，效價雖穩定並不高，而第二次製備時，效價明顯較高，且於免疫第五次即達穩定。

3.1.3 單株抗體製備

取得小鼠傳統免疫抗血清後，於兩週內取小鼠脾臟細胞，與骨髓瘤細胞 Sp2/0-Ag14 進行細胞融合 (cell fusion)，融合後的細胞以含 HAT 的培養液進行篩選，存活下來的細胞，經酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 及免疫染色法進行篩選。可分泌抗體的細胞即進行擴大培養，並以限數稀釋法 (limiting dilution) 單株化細胞，於顯微鏡下檢測，挑出單一群落的細胞，收集其培養液，以免疫染色法進行確認。流程如圖 3.6 所示。

3.1.3.1 篩得 7 株可辨識 PA 的單株抗體

經單株抗體製備流程，最後篩得能分泌抗體的單株細胞。詳細流程如下：將融合後的細胞平均分到 288 個細胞培養槽 (約三盤 96 孔細胞培養盤) 中，七天後於顯微鏡底下觀察，約有 221 個培養槽有細胞存活，細胞融合率 (fusion ratio) 約為 77%。收集其培養液，進行酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 及免疫染色法分析，於圖 3.8 A 中可知，有 11 個培養槽呈現正反應。取其中 3 個培養槽 (3H、6A、8A) 內的細胞進行限數稀釋，待其生長成群落，經酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 分析，結果如圖 3.8 B (1) 所示，只有來自 3H 培養槽內的細胞經限數稀釋後，仍呈現正反應，收集其培養液稀釋後，利用免疫染色分析，由圖 3.8 B (2) 可發現有七株單株細胞能分泌抗體，專一性辨識病毒顆粒內的目標蛋白質。

3.1.3.2 未篩得可辨識 PB1 的單株抗體

取能分泌 PB1 抗體的小鼠脾臟細胞，與 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤細胞進行細胞融合，平均分到 288 個細胞培養槽中，七天後於顯微鏡底下觀察，只有 5 個培養槽中有細胞存活，細胞融合率 (fusion ratio) 約為 2%，由於細胞融合率太低，經免疫染色法分析篩選，沒有篩到能分泌辨識 PB1 抗體的細胞。重新免疫小鼠，欲進行下一輪單株抗體製備，結果未有任何小鼠血清中出現效價。

3.1.3.3 篩得 11 株可辨識 PB2 的單株抗體

經單株抗體製備流程，最後篩得能分泌抗體的單株細胞。詳細流程如下：將融合後的細胞平均分到 288 個細胞培養槽 (約三盤 96 孔細胞培養盤) 中，七天後於顯微鏡底下觀察，約有 130 個培養槽有細胞存活，細胞融合率 (fusion ratio) 約為 30%。以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 及免疫染色法篩選，結果如圖 3.11 A，只有 4 個培養槽於兩種篩選法之結果皆呈現正反應。取其中二個培養槽 (1-5F、2-8F) 中的細胞進行限數稀釋，待其生長成群落，收集其培養液，經酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 及免疫染色分析，免疫染色分析結果為圖 3.11 B，可知有四株單株細胞能分泌抗體，專一性辨識病毒顆粒內的目標蛋白。

3.1.4 單株抗體大量製備

將可分泌抗體辨識目標蛋白的融合瘤細胞株，以腹腔注射的方式，注射進入小鼠體內，誘導小鼠產生腹水，收集腹水進行使用 0~40% 硫酸銨飽和濃度沉澱法純化免疫球蛋白。分泌 PA 抗體的七株融合瘤單株細胞中，取效價最高的三株：3H1E3E、3H1E4D、3H11G10G 進行大量製備；分泌 PB2 抗體的四株融合瘤單株細胞中，取效價最高的三株：1-5F7C、2-8F4C、2-8F12C 進行大量製備。約兩週後可發現，每隻小鼠均可誘導出 5~6 mL 的腹水，並可於小鼠腹水中，純化出辨識目標蛋白的單株抗體。免疫染色結果結果如圖 3.12 所示。

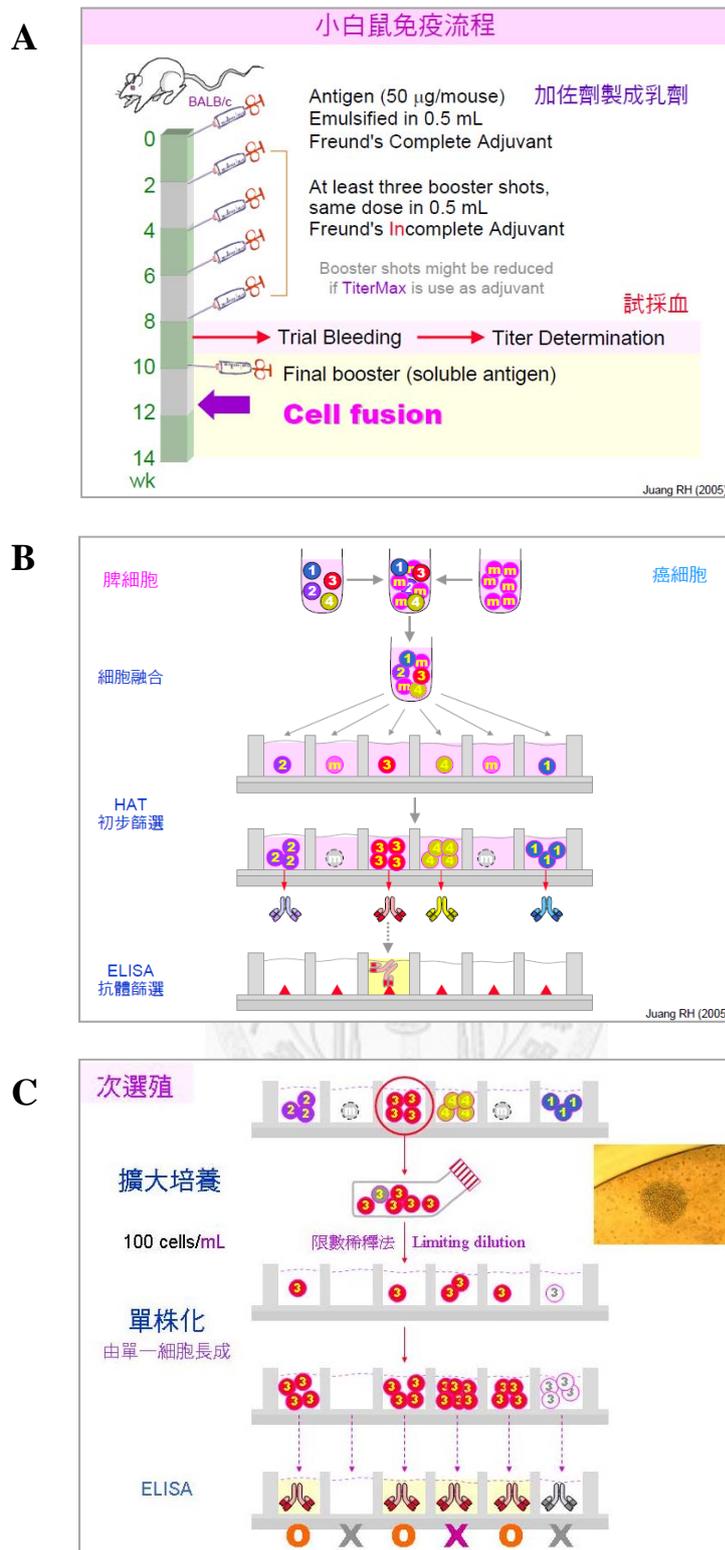


圖 3.6 單株抗體製備流程

Figure 3.6 The process of monoclonal antibody production

- A. 小鼠免疫流程
- B. 細胞融合流程示意圖
- C. 限數稀釋法單株化 (次選殖) 細胞流程示意圖

圖片取自莊榮輝 (2000) 生物技術簡介 單株抗體 <http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/monoclonal.htm#目錄>

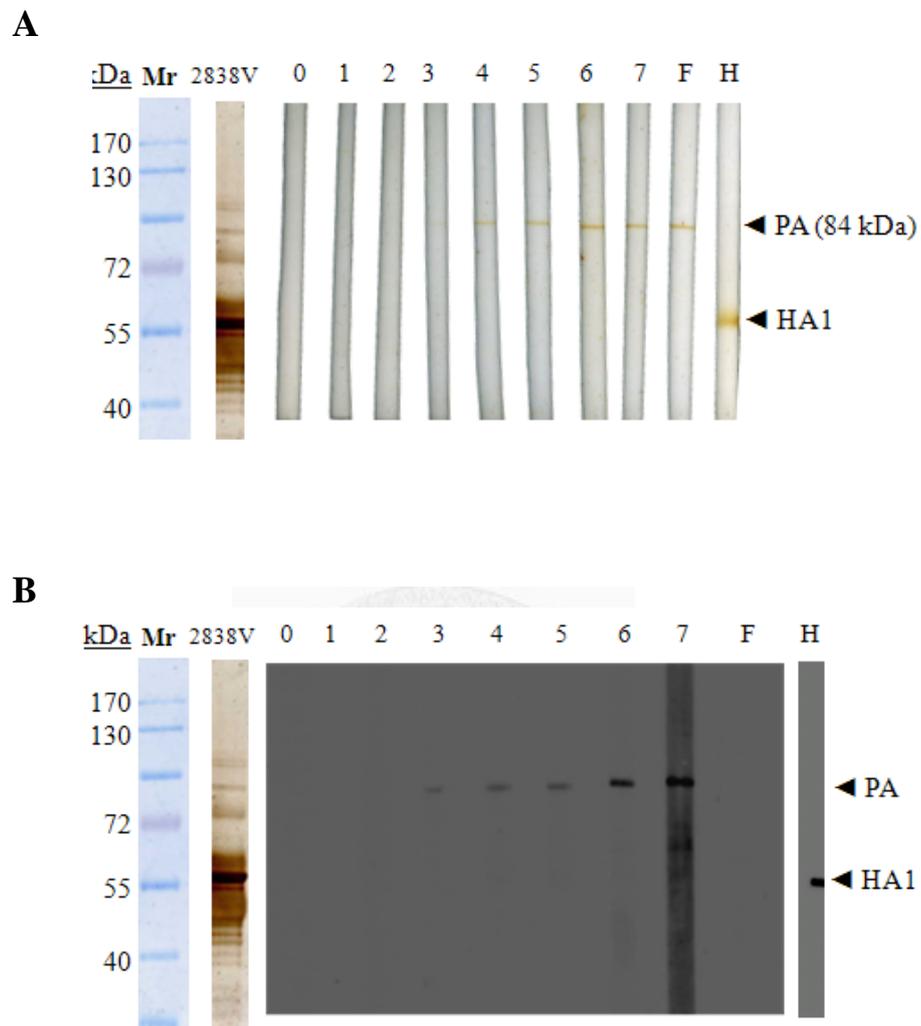


圖 3.7 PA 傳統免疫抗血清 (多株抗體) 效價測試結果

Figure 3.7 Titer determination of PA post-immune serum

第一次製備 (A) 及第二次製備 (B) 小鼠血清皆出現效價

* 2838V: virus particle total protein; **H**: positive control, anti-HA mAb; **F**: 心臟採血所採得的血清

* 數字表示免疫次數。

* HA (hemagglutinin) 為存在於病毒上另一蛋白質，其分子量約 50 KDa (HA1)。在此為 positive control，測試 strip 是否可用，並可用來定位目標蛋白位置。(後續實驗亦以此為 control)

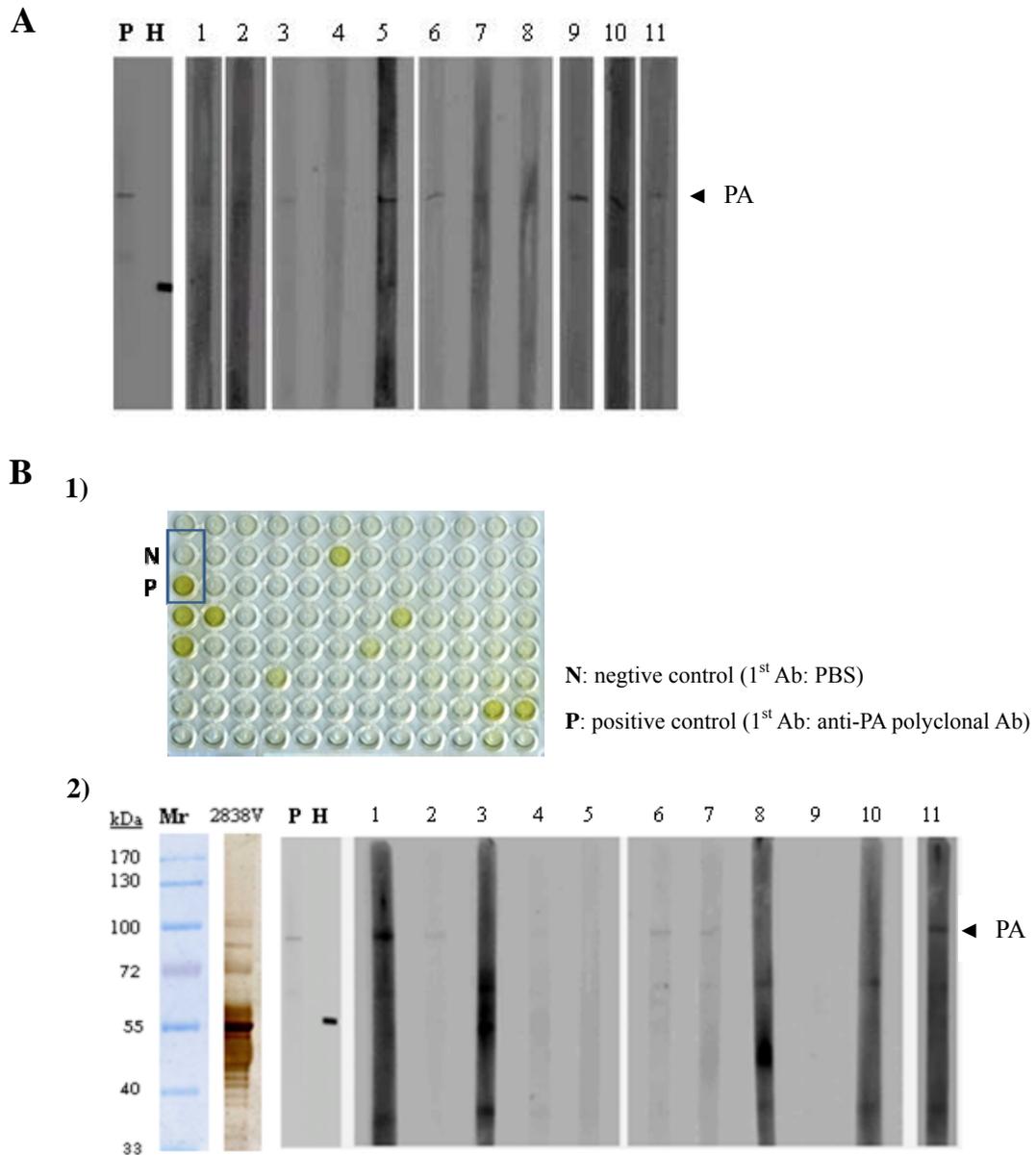


圖 3.8 PA 單株抗體製備結果

Figure 3.8 Preparation of anti-PA monoclonal antibodies

- A. 經細胞融合後，HAT 篩選結果，有 11 個培養槽呈現正反應。
- B. 1) 限數稀釋後，以 ELISA 分析可知，只有來自 3H 培養槽內的細胞呈現正反應。
- 2) 將 ELISA 結果呈正反應細胞株，經免疫染色分析有 7 株單株細胞能分泌抗體。
- (lane: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11)

* 2838V: virus particle total protein; P: positive control (1st Ab: anti-PA polyclonal Ab); H: positive control (1 Ab: anti-HA mAb)

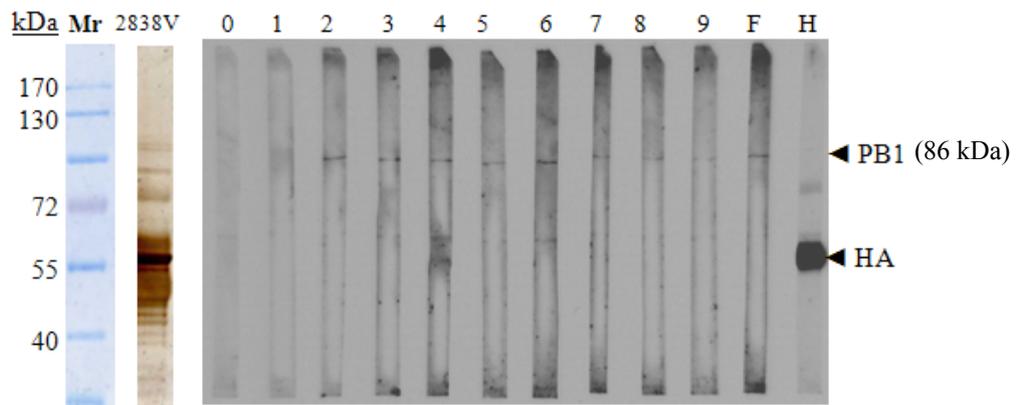


圖 3.9 PB1 傳統免疫抗血清 (多株抗體) 效價測試

Figure 3.9 Titer determination of PB1 post-immune serum

* 2838V: virus particle total protein; **H**: positive control, anti-HA mAb; **F**: 心臟採血所採得的血清

* 數字表示免疫次數。

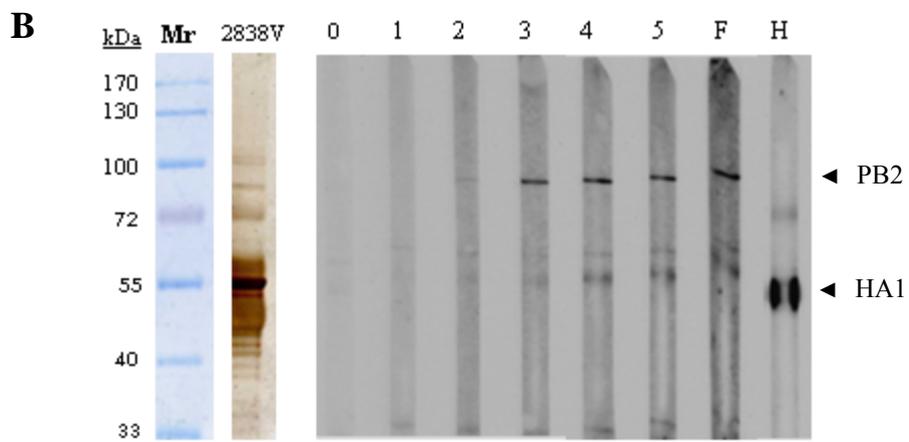
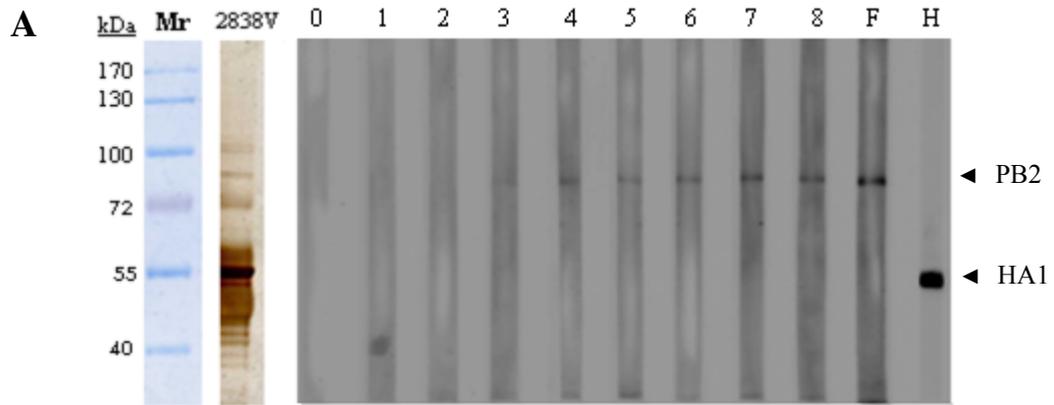


圖 3.10 PB2 傳統免疫抗血清 (多株抗體) 效價測試

Figure 3.10 Titer determination of PB2 post-immune serum

第一次製備 (A) 及第二次製備 (B) 小鼠血清皆出現效價

* 2838V: virus particle total protein; H: positive control, anti-HA mAb; F: 心臟採血所採得的血清

* 數字表示免疫次數。

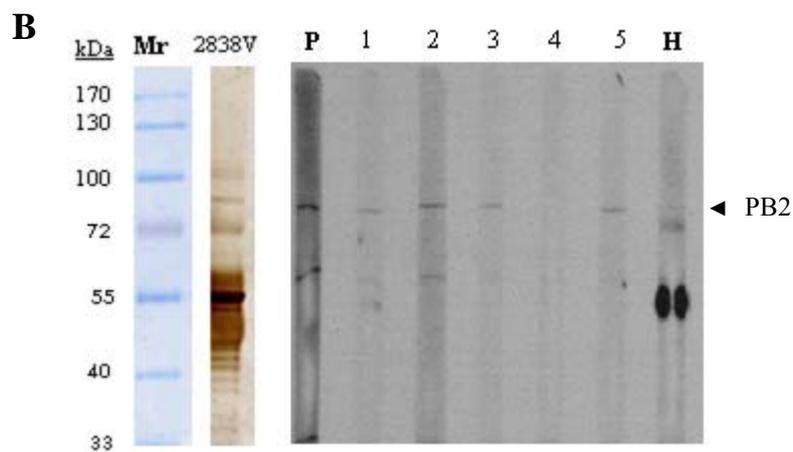
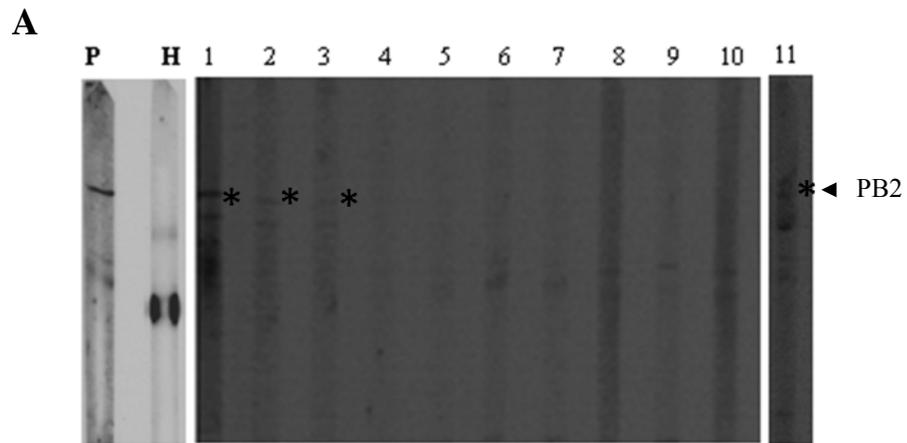


圖 3.11 PB2 單株抗體製備結果

Figure 3.11 Preparation of anti-PB2 monoclonal antibodies

- A. 經細胞融合後，經 HAT 篩選結果，有 4 個培養槽呈現正反應。(lane: 1, 2, 3, 11)
- B. 經限數稀釋後，以免疫染色分析，有 4 株融合瘤單株細胞能分泌抗體。(lane: 1, 2, 3, 5)

* 2838V: virus particle total protein; **P**: positive control (1st Ab: anti-PA polyclonal Ab); **H**: positive control (1st Ab: anti-HA mAb)

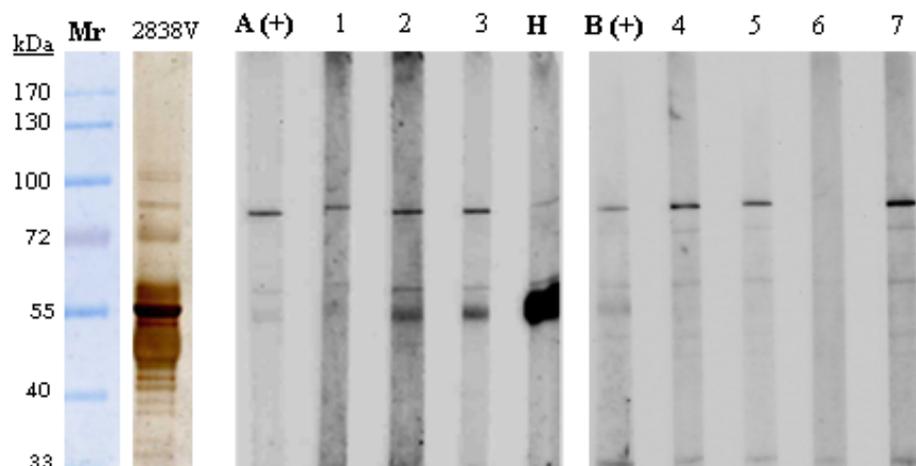


圖 3.12 PA 及 PB2 單株抗體大量製備結果

Figure 3.12 Large scale production of anti-PA and anti-PB2 monoclonal antibodies

- * 2838V: virus particle total protein
- * **A (+)** : anti-PA polyclonal Ab, **1~3**: anti-PA mAb (1: 3H1E3E, 2: 3H1E4D, 3H11G10G₁)
- * **B(+)** : anti-PB2 polyclonal Ab, **4~7**: anti-PB2 mAb (4: 1-5F7C, 5: 2-8F-4C, 6: 2-8F11C, 7: 2-8F12C)
- * **H**: positive control (1 Ab: anti-HA mAb)

3.2 禽流感病毒 RNA 次單元聚合酶蛋白 PA 及 PB2 單株抗體特性分析

取得 PA 及 PB2 單株抗體後，即進行特性分析，包括檢測抗原決定基 (epitope) 位置及抗體型別檢測 (isotyping)。

3.2.1 以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 檢定抗原決定基 (epitope) 位置

抗原決定基 (epitope) 是抗體最重要的特性之一，相較於以其他方式製備抗原，免疫動物而得到的抗體，本論文中製備的抗體是以三段合成胜肽混合作為抗原，抗原來源單純。因此可藉由酵素連結免疫吸附法 (ELISA)，使抗體分別與各段胜肽抗原作用，配合連接 HRP 的二次抗體與基質液的作用，可初步檢定抗原決定基位置，且將可能的序列位置縮小至約 20 個胺基酸，流程如圖 3.13 所示。結果如圖 3.14 所示，挑選分泌 PA 及 PB2 抗體的融合瘤細胞中，抗體效價較強者，收集其培養液經由間接型酵素連結免疫吸附法分析，發現所有單株細胞分泌之 PA 抗體，皆辨認編號 81 號抗原序列，而 PB2 單株抗體，則皆辨認編號 86 號抗原序列。

3.2.2 以競爭型酵素連結免疫吸附法 (Competitive ELISA) 進一步檢定可能的抗原決定基 (epitope) 位置

為了更進一步確認 3.2.1 小節檢定結果，使用競爭型酵素連結免疫吸附法重複檢定。將抗體先與各段胜肽抗原於 37°C 作用 1 h，再與滴定盤中的抗原進行反應，配合連接 HRP 的二次抗體與基質液的作用，得知檢定結果。若抗體可先與各段合成胜肽進行反應，則能與滴定盤中的抗原作用之抗體數量將會減少，當加入二次抗體與基質液後，呈色結果將減弱。實驗結果如圖 3.14 所示，各抗體依然能與先前辨識的抗原序列反應，且呈色結果較先未加入抗原反應的對照組弱。因此得知，PA 單株抗體抗原決定基位於編號 81 號抗原序列，對應目標蛋白胺基酸序列為位於第 501~520 個胺基酸位置；而 PB2 單株抗體抗原決定基位於編號 86 號抗原序列，對應目標蛋白胺基酸序列位於第 449~468 個胺基酸位置。

3.2.3 PA 單株抗體型別為免疫球蛋白 IgG₁、PB2 單株抗體型別為免疫球蛋白 IgG_{2a} 兩者輕鏈皆為 κ

本論文使用之檢定方法以免疫染色法代替 Isotyping Kit 建議之酵素連結免疫分析法。優點是可降低干擾，增加結果可信度。詳細流程如圖 3.15 所示。結果如圖 3.16 所示，PA 單株抗體型別皆為免疫球蛋白 IgG₁，輕鏈 (light chain) 為 κ。由圖 3.17 可知，PB2 單株抗體型別皆為免疫球蛋白 IgG_{2a}，而輕鏈 (light chain) 結果則是皆為 κ。



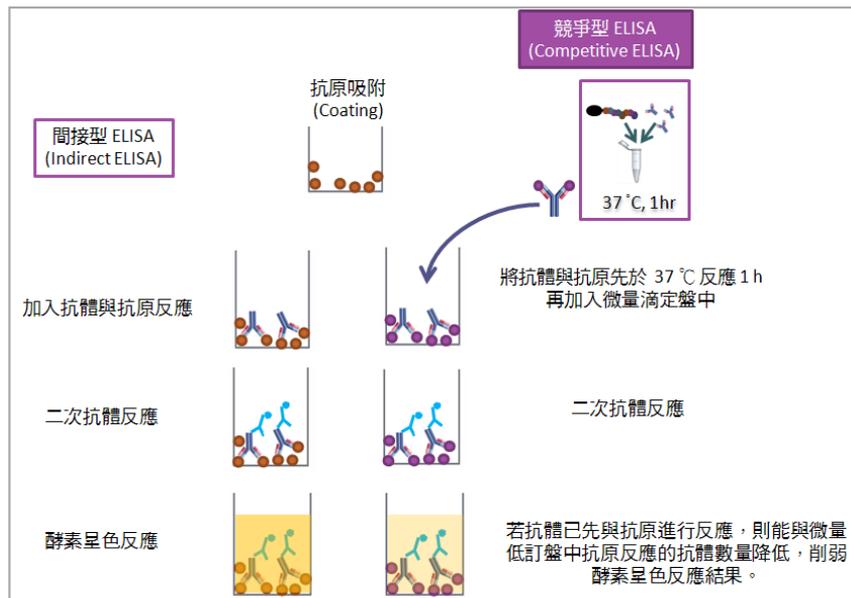


圖 3.13 以酵素連結免疫吸附法檢定抗原決定基位置

Figure 3.13 Epitope mapping by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the epitope-based peptide antigen

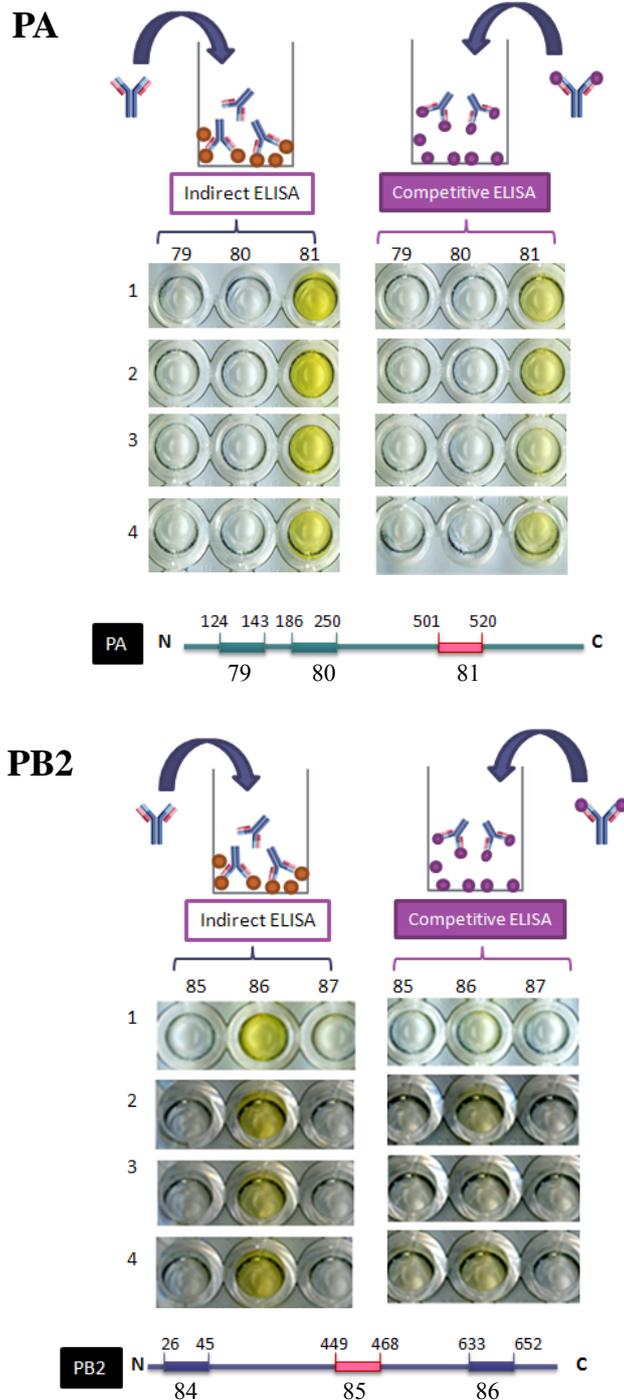


圖 3.14 以酵素連結免疫吸附法檢定抗原決定基位置結果

Figure 3.14 Epitope mapping by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the epitope-based peptide antigen

- 1) Anti-PA mAb (medium, 1:120), 1~4 表不同細胞株所分泌的 PA mAb
- 2) Anti- PB2 mAb (medium, 1:20), 1~4 表不同細胞株所分泌的 PB2 mAb

* antigen: peptide (5 μ g/well), 上方數字代表 peptide 編號。(PA: 79~81; PB2: 85~87)

* Competitive ELISA檢定：每 1.2 mL Ab 預先加入 antigen peptide (5 μ g) 於 37°C 反應 1 h。

INSTRUCTIONS
Monoclonal Antibody Isotyping Kit
 (HRP/ABTS)

Thermo
 SCIENTIFIC

37501

Rabbit Anti-Mouse Ig-specific Antibodies, 5 ml each, polyclonal rabbit antibodies specific for the indicated mouse class and subclass, supplied in phosphate-buffered saline, pH 7.4, with 1% bovine serum albumin and 0.05% sodium azide.

Anti-Mouse IgG₁ gamma 1 chain specific

Anti-Mouse IgG_{2a} gamma 2a chain specific

Anti-Mouse IgG_{2b} gamma 2b chain specific

Anti-Mouse IgG₃ gamma 3 chain specific

Anti-Mouse IgA, alpha chain specific

Anti-Mouse IgM, mu chain specific

Anti-Mouse Kappa 1 light chain

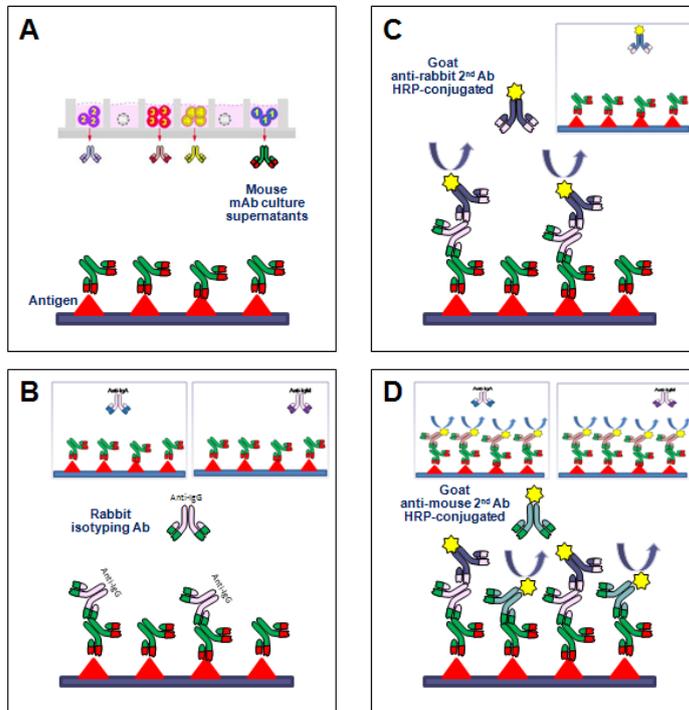
Anti-Mouse Lambda Light Chain

**“Complex antigen”
 maybe interfere
 ELISA result...**

ELISA



**Western
 blotting**



(2010, 何杰龍)

圖 3.15 以免疫染色法測定抗體型別流程

Figure 3.15 The process of immunoglobulin isotyping

- A: 將預測之抗體 (mouse Ab) 與抗原進行反應。
- B: 加入各型別抗體 (rabbit anti-mouse isotyping Ab) 與預測抗體反應。
- C: 加入辨認型別抗體之二次抗體 (goat anti-rabbit IgG-HRP)，得知預測抗體型別。
- D: 加入辨認預測抗體之二次抗體 (goat anti-mouse IgG-HRP) 作為對照組，證明預測抗體皆與膜上抗原進行反應存在膜上，所得訊號確認為型別抗體辨識預測抗體後的結果。

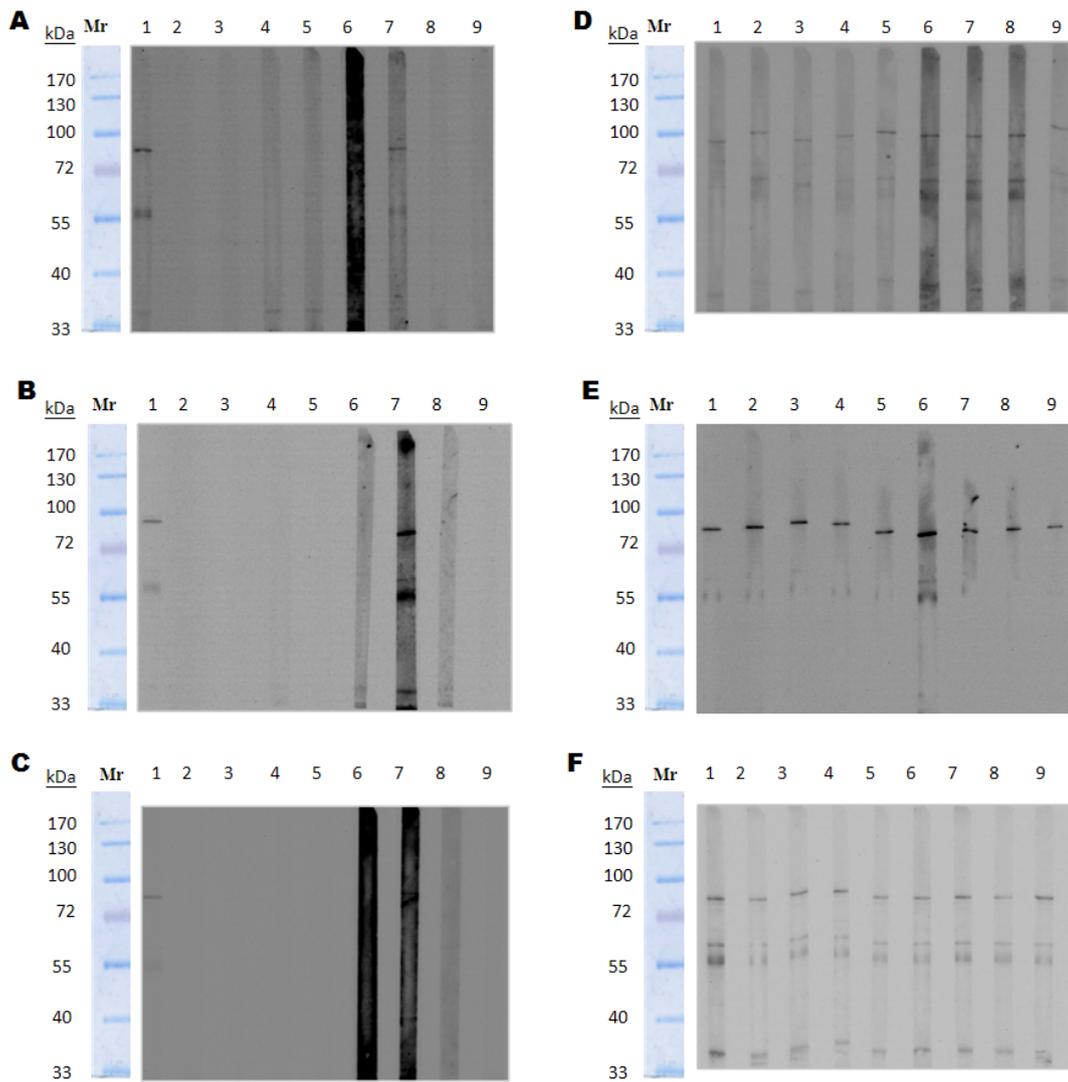


圖 3.16 PA 單株抗體型別檢定結果

Figure 3.16 Determination of anti-PA monoclonal antibody isotype

PA 單株抗體型別皆為 IgG₁，輕鏈為 κ。

共檢定三株 PA 單株抗體 (由上而下分別為 3H1E3E, 3H1E4D, 3H1G10G)

* A ~ C: 1st Ab 為 anti-PA mAb

2nd Ab: rabbit anti-mouse isotyping Ab

(1: IgG1, 2: IgG2a, 3: IgG2b, 4: IgG3, 5: IgA, 6: IgM, 7: κ, 8: λ, 9: normal rabbit serum)

* normal rabbit serum 為 negative control。

3rd Ab: goat anti-rabbit IgG Ab

* D~F: 4th Ab: goat anti-mouse IgG-HRP

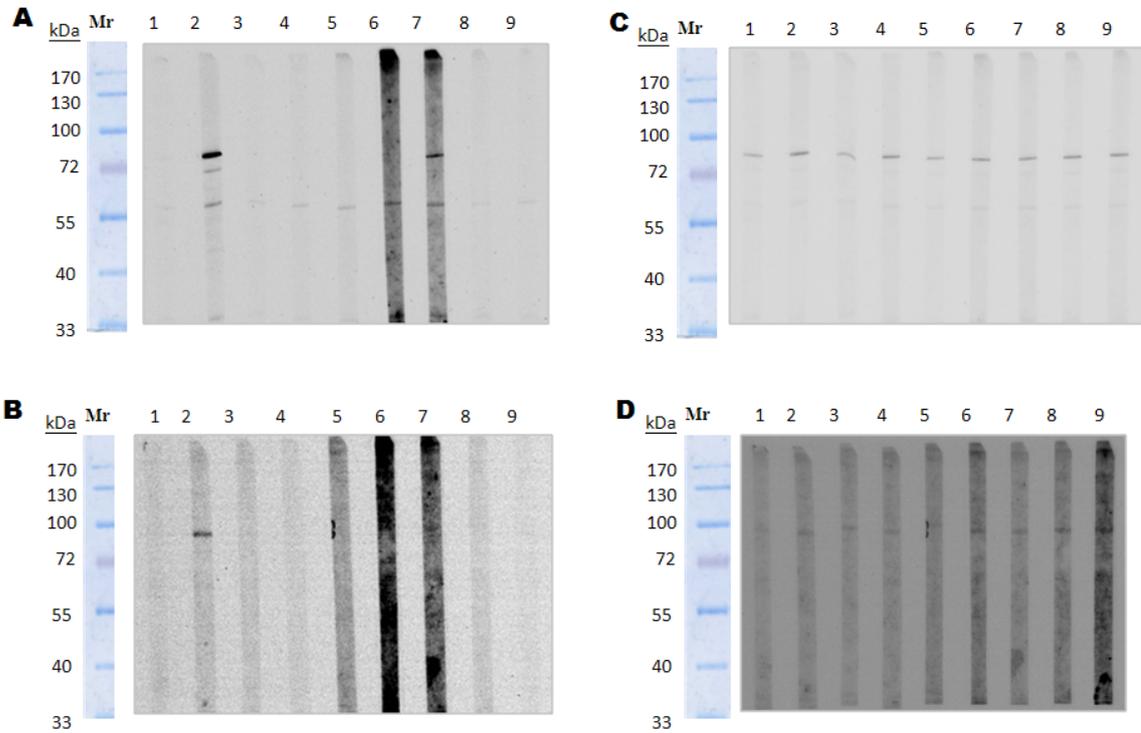


圖 3.17 PB2 單株抗體型別檢定結果

Figure 3.17 Determination of anti-PB2 monoclonal antibody isotype

PB2 單株抗體型別皆為 IgG_{2a}，輕鏈為 κ。

共檢定兩株 PB2 單株抗體 (由上而下分別為 2-8F12C, 2-8F4C)

* A ~ C: 1st Ab 為 anti-PA mAb

2nd Ab: rabbit anti-mouse isotyping Ab

(1: IgG1, 2: IgG2a, 3: IgG2b, 4: IgG3, 5: IgA, 6: IgM, 7: κ, 8: λ, 9: normal rabbit serum)

* normal rabbit serum 為 negative control。

3rd Ab: goat anti-rabbit IgG Ab

* D~F: 4th Ab: goat anti-mouse IgG-HRP

3.3 利用抗體觀察 RNA 聚合酶各次單元體於受病毒感染的 MDCK 細胞內位移的情形

抗體工具製備完成後，利用其標定目標蛋白質，配合螢光免疫染色法，期望能直接觀察受病毒感染的 MDCK 細胞中目標蛋白質位移的過程。由於各次單元體抗體的來源皆為小鼠，因此分別利用經生物素標定與未經生物素標定 (Biotinylation) 的抗體，重複免疫染色後，於共軛焦顯微鏡底下觀察結果，流程如圖 3.18。生物素標定抗體的結果如圖 3.19，PA 及 PB2 單株抗體皆標定成功。

觀察對象為以 A/Wild duck/Ilan/2904/1999 禽流感病毒株感染之 MDCK 細胞。2904 病毒株與用來篩選抗體的 2838V 病毒株同為 H6N1 亞型，但於細胞培養增殖的效率較佳。2904 病毒株及 MDCK 細胞皆由臺大獸醫系王金和老師提供。

3.3.1 以免疫螢光染色法觀察 MDCK 細胞中 PB1 及 PB2 位移

以 PB1 多株抗體及經生物素標定的抗 PB2 單株抗體，於共軛焦顯微鏡下觀察受病毒感染 0~33 小時內 MDCK 細胞中，病毒之 RNA polymerase 次單元體 PB1 及 PB2 位移的經過。結果如圖 3.20 所示，未感染 (mock) 及感染 0 小時 MDCK 細胞內都未偵測到 PB1 及 PB2；感染 0 小時操作方式為一加入病毒液即立刻吸出，並固定細胞，作為病毒尚未吸附宿主細胞的控制組。於感染 4 小時後，可發現 PB1 出現於 MDCK 細胞核中，於感染 10 小時後，可發現 PB1 位於細胞質及位於細胞核外圍近似核膜的位置，但於感染 24 小時及 33 小時後皆未再發現 PB1 的訊號；PB2 的訊號出現於感染 10 小時，同樣是位於細胞核外圍，少部分訊號出現在細胞核內，而於感染 4、24 及 33 小時皆未發現 PB2 的訊號。

3.3.2 以免疫螢光染色法觀察 MDCK 細胞中 PB2 及 PA 位移

以 PB2 多株抗體及經生物素標定的抗 PA 單株抗體，於共軛焦顯微鏡下觀察受病毒感染 0~33 小時內 MDCK 細胞中，病毒之 RNA polymerase 次單元體 PB2 及 PA 位移的經過。結果如圖 3.21 所示，未感染 (mock) 及感染 0 小時，MDCK 細胞內都未偵測到 PA 及 PB2，於感染 10 小時後，可發現 PB2 的訊號，位置包括於 MDCK 細胞核、細胞質及細胞核外圍，於感染 24 小時後，PB2 出現的位置與感染 10 小時後觀察到的結果相近，但訊號似乎較強，於感染 33 小時後，出現 PB2 的細胞較先前少，且訊號較先前的減弱；觀察 PA 的結果，於感染 4 小時、10 小時及 24 小時皆可觀察到 PA 出現於 MDCK 細胞中，分布的位置包括細胞核、細胞質及細胞核外圍，於感染 33 小時後，則未發現 PA 訊號。

3.3.3 本研究利用抗體標定觀察 MDCK 細胞中 RNA 聚合酶各次單元體，但尚無法得知其新生各次單元體組裝並位移至細胞核的過程

利用免疫螢光染色所觀察到的結果，並未觀察到明顯的共定位 (co-localization) 趨勢，因此尚無法得知新生之 RNA 聚合酶各次單元體組裝並位移至細胞核的過程。然而，雖然結果不如預期，但所得結果與病毒複製週期中各次單元體位移的趨勢仍是相符的。在感染後 4 小時，第一波病毒已進入宿主細胞核，雖然數量較少，但可由結果觀察於細胞中偵測到 PB1 及 PA 訊號；於感染後 10 小時；第二波病毒開始大量生成並感染細胞，因此可由結果觀察到有較多細胞出現 PA、PB1 及 PB2 的訊號，位置包含細胞質、細胞核膜周圍及細胞核；於感染 24 小時後，第二波受病毒感染的宿主細胞開始生成病毒蛋白質，而新生成的各次單元體必須由細胞質運送回細胞核內，因此可觀察到 PA 及 PB2 的訊號出現在細胞核及其周圍，並有部分 PA 與 PB2 已於核中結合 (圖 3.21)；於感染 33 小時後訊號則明顯減弱。

3.3.4 病毒感染 MDCK 細胞 24 小時後各次單元體訊號明顯減弱

由結果可發現，於感染 24 小時以後，RNA polymerase 各次單元體於 MDCK 細胞中，訊號明顯減弱或偵測不到。收集各時間點的細胞培養液，經 RNA 電泳與 Real-time PCR 分析 (由臺大獸醫所王金和老師實驗室洪惠雯助理協助完成)，結果如圖 3.22 所示，病毒 RNA 於感染後 4 小時即增加，於感染後 10 及 24 小時皆有持續增加，而於感染 33 小時後達到最大值。此一趨勢與螢光免疫染色結果相符，並與先前推論一致，即第一波病毒雖於感染後 4 小時進入宿主細胞；但第二波病毒於感染後 10 小時開始大量感染細胞，造成感染後 10 至 24 小時病毒 RNA 大幅增加，推測此時受病毒感染的細胞達最多；而感染後 33 小時開始，病毒 RNA 量雖達最高峰，但增加的幅度不如感染後 10 小時至 24 小時，推測為此時處於感染後期，大部分病毒已完整合成，而先前受感染的宿主細胞開始出現細胞病變 (cytopathic effects, CPE)，如圖 3.23 所示，出現細胞凋零 (apoptosis)、多核巨細胞形成 (multinucleated giant cells formation)，宿主細胞開始死亡、脫落並形成碎片，造成免疫螢光染色結果 RNA polymerase 各次單元體的訊號減弱或偵測不到。

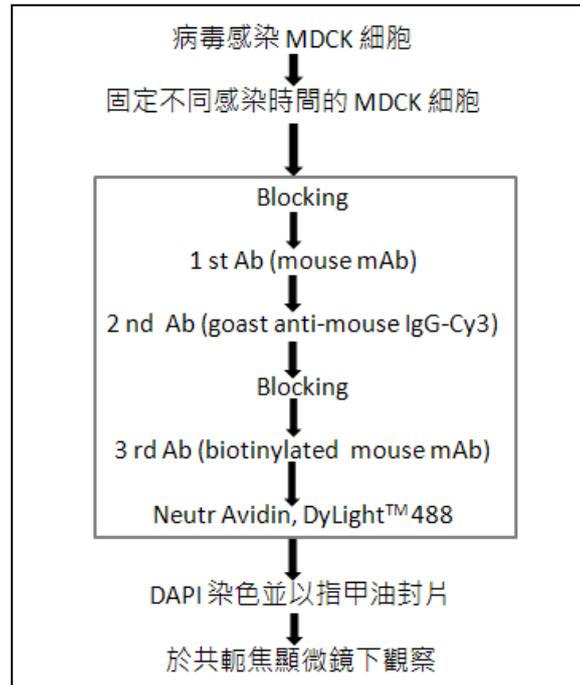


圖 3.18 免疫螢光染色法操作流程

Figure 3.18 The process of immunofluorescence

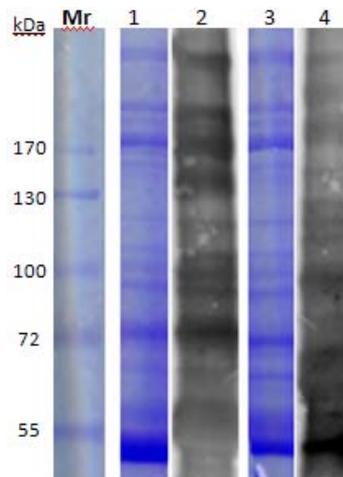


圖 3.19 PA 及 PB2 單株抗體生物素標定結果

Figure 3.19 Biotinylation of anti-PA and anti-PB2 monoclonal antibody

1~2: biotinylated anti-PA mAb, 3~4: biotinylated anti-PB2 mAb

Western blot: 1st Ab avidin-HRP (1:2000)

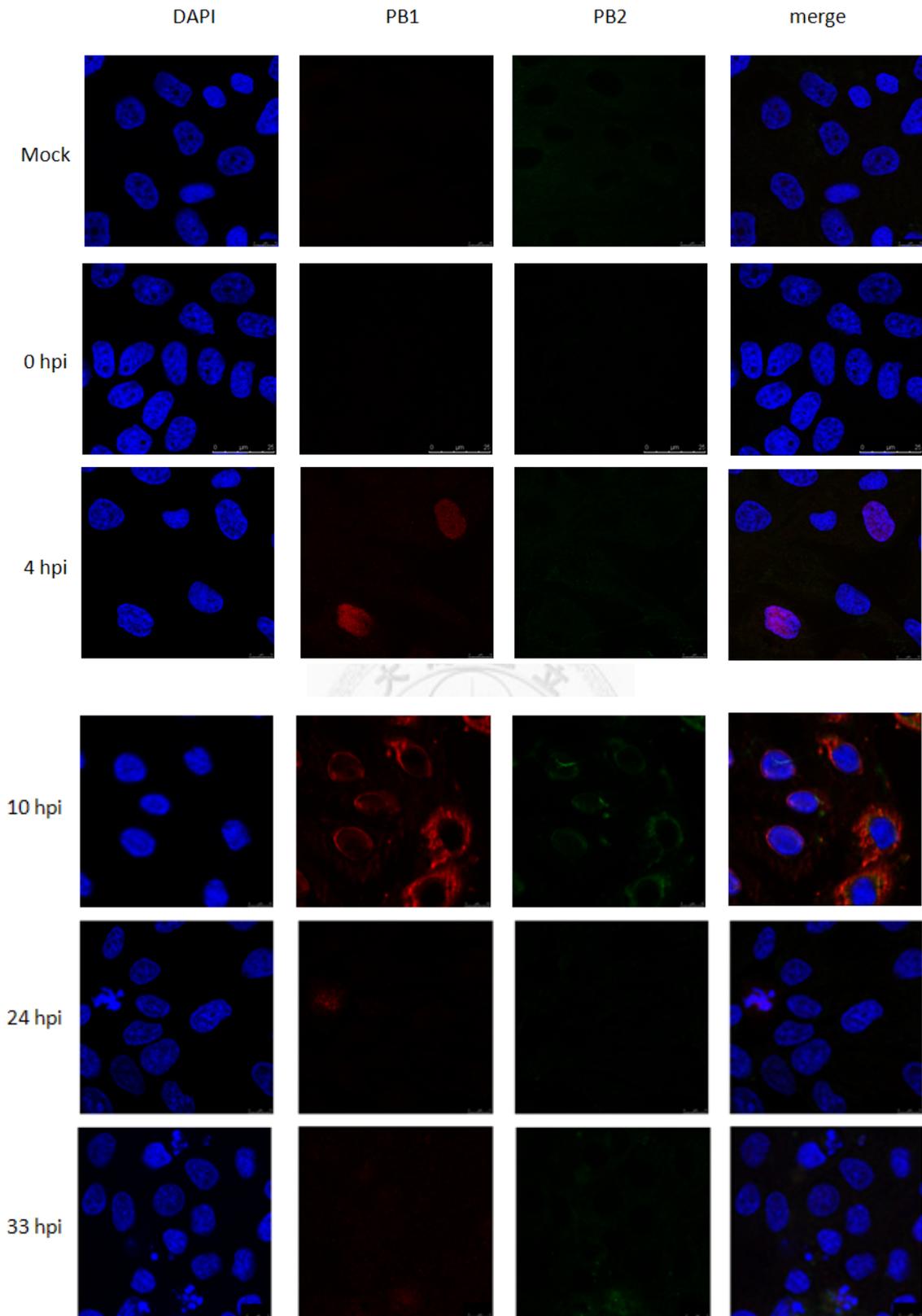


圖 3.20 PB1 及 PB2 於宿主細胞中位移的過程

Figure 3.20 Intracellular localization of PB1 and PB2 during influenza virus infection

* Mock : 未感染之 MDCK 細胞

* multiplicity of infection (m.o.i) = 1

* hpi (hours of postinfection)

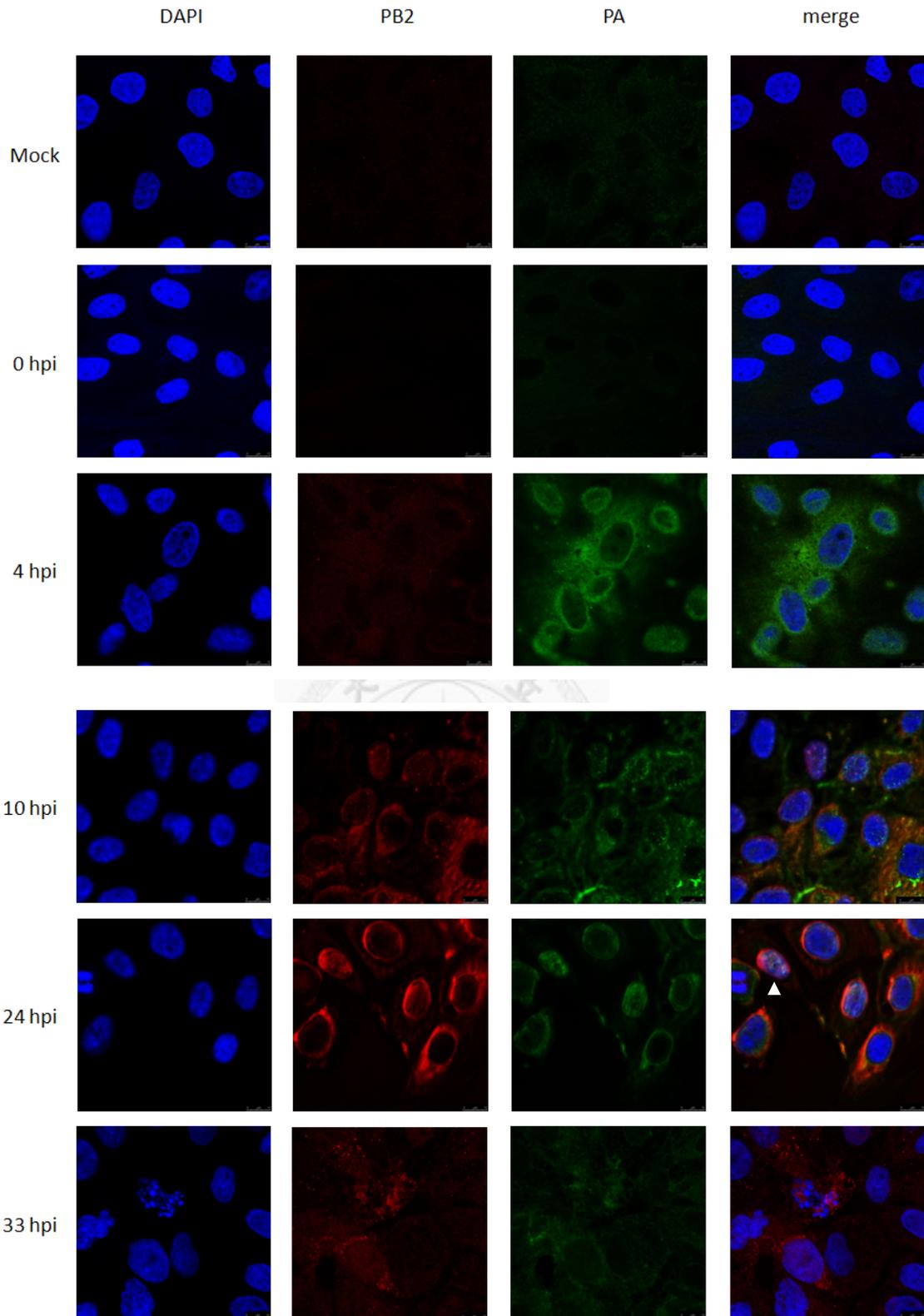


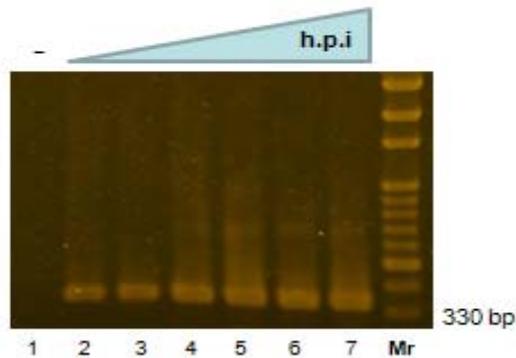
圖 3.21 PB2 及 PA 於宿主細胞中位移的過程

Figure 3.21 Intracellular localization of PB2 and PA during influenza virus infection

* Mock : 未感染之 MDCK 細胞

* multiplicity of infection (m.o.i) = 1

* hpi (hours of postinfection)



感染時間 (hpi)	病毒 RNA 表現量 (ng)
- 未感染	9.22×10^{-7}
0	7.59×10^{-4}
4	1.33×10^{-3}
10	3.07×10^{-2}
24	1.85×10^{-1}
33	4.68×10^{-1}

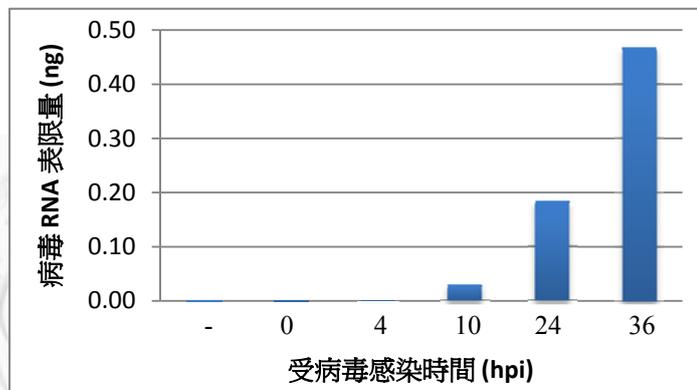


圖 3.22 以 Real-time PCR 檢測各感染時間點之病毒 RNA 量

Figure 3.22 Quantification of virus RNA by Real-time PCR assay

* hpi (hours of postinfection)

* Lane 1: 未感染病毒

* Lane 2~7: 分別是 0, 4, 10, 24, 33, 48 hpi 的結果

(由臺大獸醫所王金和老師實驗室 洪惠雯助理協助完成)

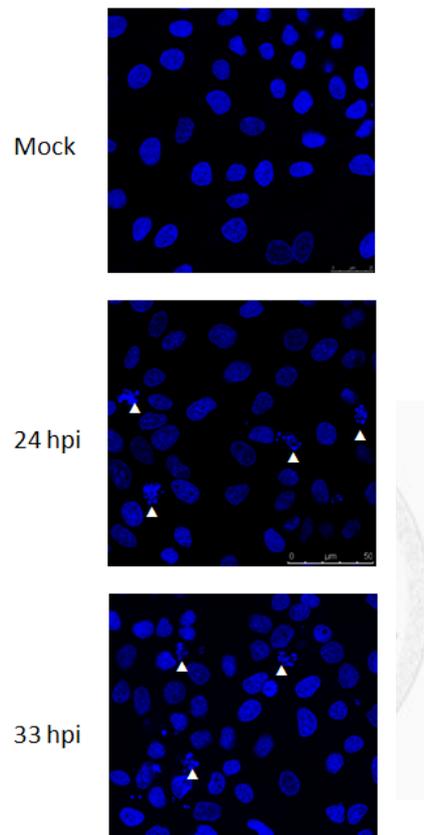


圖 3.23 MDCK 細胞出現細胞病變症狀 (C.P.E)

Figure 3.23 Cytopathic effects (C.P.E) of MDCK cell after virus infection

* Mock : 未感染之 MDCK 細胞

* multiplicity of infection (m.o.i) = 1

* hpi (hours of postinfection)

3.4 以 PA、PB1 及 PB2 抗體與雞胚尿囊濃縮液進行免疫共沉澱

3.4.1 PA 及 PB1 抗體與雞胚尿囊濃縮液中約 53 kDa 分子作用並沉澱

目前已知 PA、PB1 及 PB2 三者需彼此結合形成 RNA 聚合酶複合體，於 3.3.3 小節利用抗體進行免疫螢光染色，於圖 3.21 觀察到 PA 及 PB2 於宿主細胞核中會進行結合；本實驗設計以各抗體為工具，進行免疫共沉澱，後以 10% SDS-PAGE 及免疫染色法分析，期望能於蛋白質層次，觀察到三者結合，並試圖尋找是否有其他的宿主因子 (host factor) 與各次單元體結合。由於使用細胞培養的病毒量過於稀少，故使用純化自雞胚尿囊液之濃縮液進行實驗。

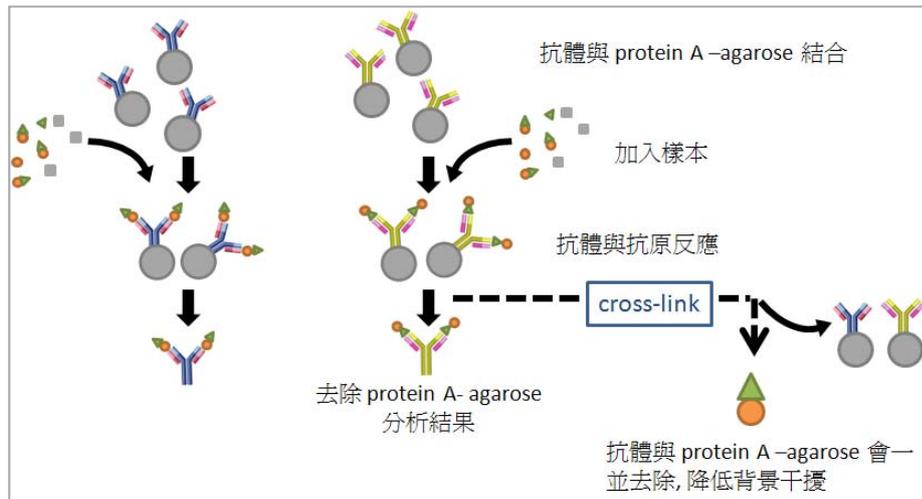
首先以 PA 多株抗體及 PB2 多株抗體與濃縮液進行免疫共沉澱，結果如圖 3.25 所示。圖 A 為硝酸銀染色結果，比較病毒全蛋白與經 PA 及 PB2 抗體所沉澱純化之蛋白質條帶，發現差異不大；而圖 B 為以 PA 多株抗體進行免疫染色的結果，由圖可知，PA 多株抗體可與濃縮液中的 PA 反應，並於免疫染色法中相對分子量出現條帶訊號，此外，PB2 多株抗體與濃縮液反應後，亦可偵測到 PA，顯示 PB2 多株抗體可能與濃縮液中的 PB2 反應，而於病毒液中 PB2 與 PA 結合而得到訊號。然而，觀察圖 C 結果，PB2 多株抗體則於實驗組中雖偵測到訊號，但由於控制組亦於相同處出現訊號，故無法確定 PB2 多株抗體是否能與濃縮液中的 PB2 反應。

由於已得到初步結果，因此重覆進行 PA 及 PB2 抗體並同時加入 PB1 多株抗體，與純化自雞胚尿囊液之濃縮液進行免疫共沉澱。結果如圖 3.26 所示，由圖 A 結果可發現，經抗體所沉澱純化之蛋白質較病毒全蛋白多出數條條帶，但比較未加入病毒只加入抗體與 protein A 的蛋白質圖譜，發現兩者相似，因此推測所多出的條帶為 protein A，非我們希望看到的宿主因子。由 PA、PB2 單株抗體及 PB1 多株抗體進行免疫染色的結果 (B~D 圖)，PB2 抗體似乎仍舊無法與濃縮液中的 PB2 反應；而 PA 抗體可與病毒濃縮液中約 53 kDa 的分子作用並沉澱，並可由免疫染色結果得知，包括 PA、

PB1、PB2 皆可與此分子結合，進而一起沉澱下來；而 PB1 多株抗體所得結果類似，可與病毒濃縮液中約 53 kDa 的分子作用並沉澱，並可由免疫染色結果得知，包括 PA、PB1、PB2 皆可與此分子結合。然而，將此分子以質譜儀定序鑑定可能身分，並未定出病毒蛋白質。

3.4.2 免疫共沉澱所得結果可能為蛋白質降解所致

本論文中製備的抗體是以三段合成的胜肽混合作為抗原，抗原來源單純，且抗體篩選過程中，分別以混合三段胜肽及病毒顆粒進行篩選，挑選於兩種篩選中皆呈現正反應者，因此理論上，所得之抗體能夠專一性辨識病毒顆粒內目標蛋白的相對序列。於免疫沉澱結果中可發現 PA 及 PB1 抗體皆可辨認並結合一個約 53 kDa 大小的 X 蛋白質，且由圖 3.26 C 可知該複合體上可能包括 PB2，即形成 PA-PB1-PB2-X 複合體。由於重複免疫共沉澱多次皆得到相同結果，推測原因可能為目標蛋白質於病毒全蛋白中所佔總量太少，大部分於純化的過程中流失，加上操作過程時間過久，造成目標蛋白質降解，使各抗體無法於相對分子量辨識目標條帶；禽流感病毒全蛋白中尚存在另一含量較多的核蛋白 (NP)，由於分子量接近，且同具有可結合 PA、PB1 及 PB2 次單元體蛋白質的特性，因此推測 PA 及 PB1 抗體所辨識條帶 (X 蛋白質) 有可能為核蛋白。



以免疫染色 (western blot, WB)法分析

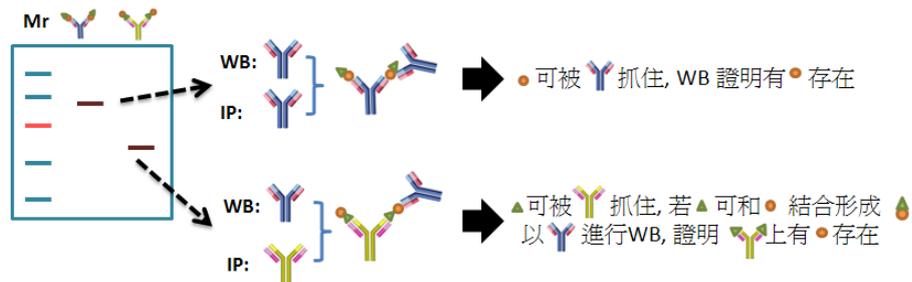


圖 3.24 免疫共沉澱操作流程

Figure 3.24 The process of Co-Immunoprecipitation assay

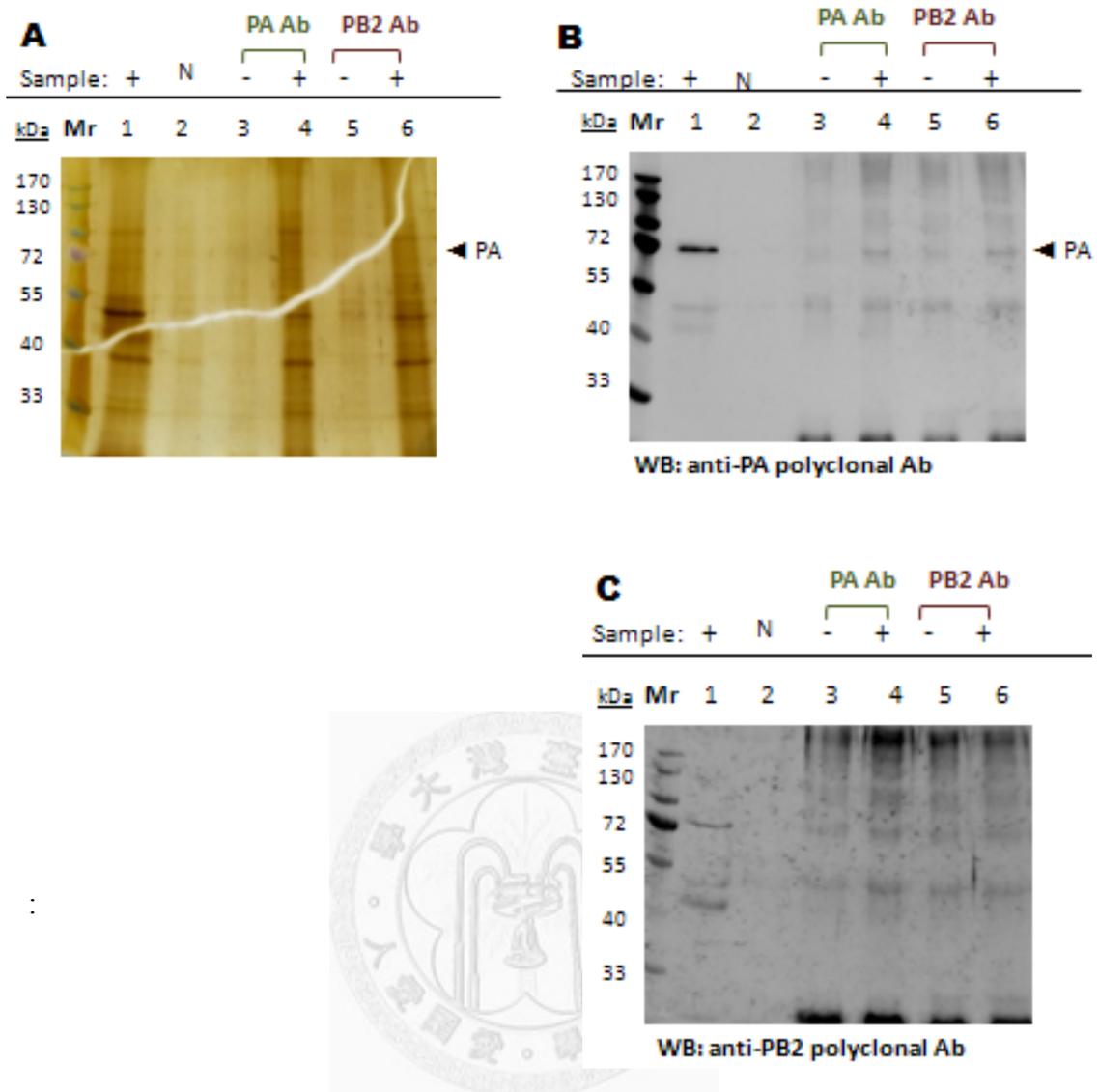


圖 3.25 以 PA 及 PB2 抗體與病毒濃縮液進行免疫共沉澱結果

Figure 3.25 virus particle immunoprecipitation with anti-PA and anti-PB2 antibodies

- * Lane 1: 10% input virus particle
- * Lane 2: protein A-agarose + sample (negative control)
- * Lane 3: Protein A-agarose + anti-PA polyclonal Ab
- * Lane 4: Protein A-agarose + anti-PA polyclonal Ab + sample
- * Lane 5: Protein A-agarose + anti-PB2 polyclonal Ab
- * Lane 6: Protein A-agarose + anti-PB2 polyclonal Ab + sample

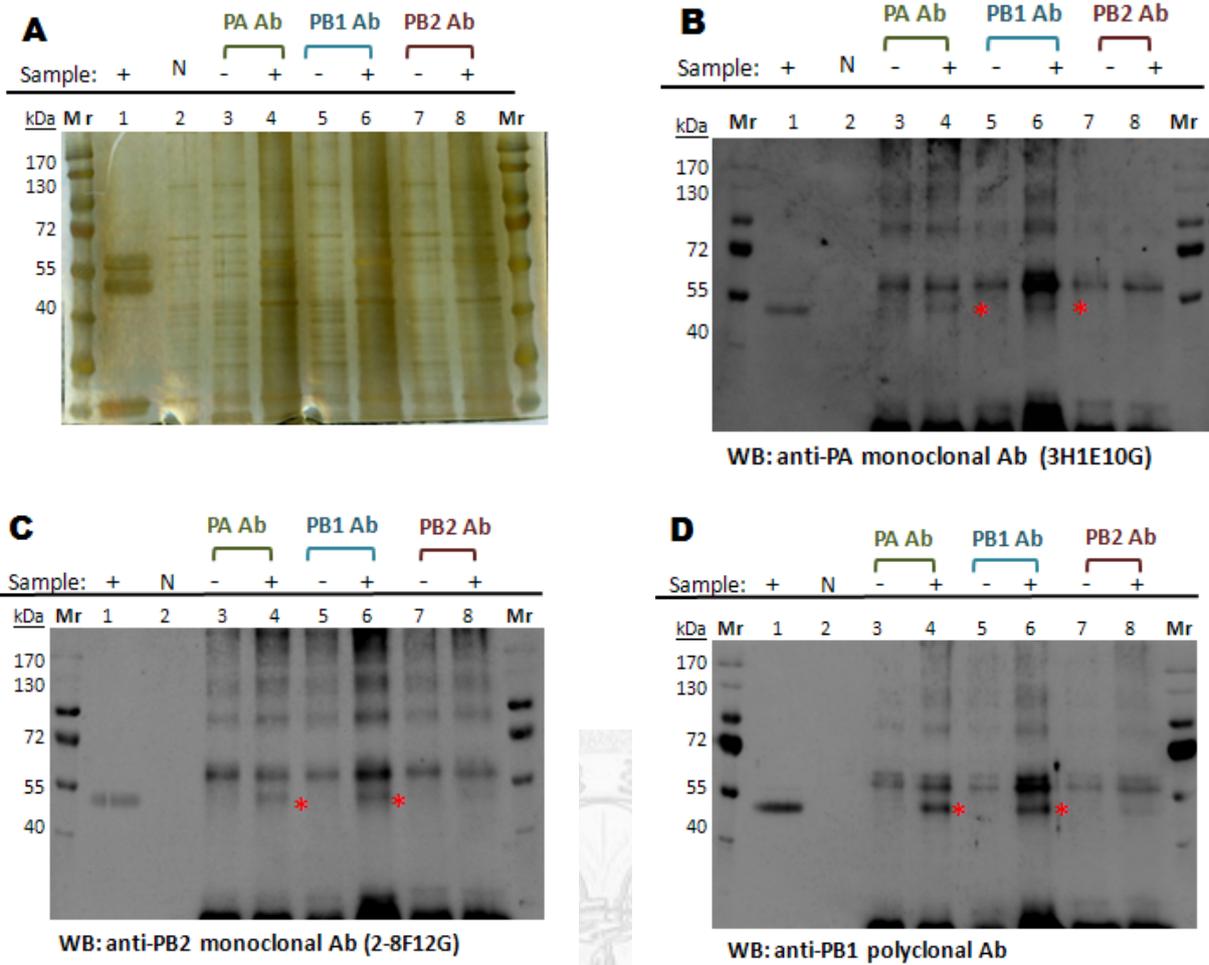


圖 3.26 以各 RNA 次單元聚合酶蛋白之抗體與病毒濃縮液進行免疫共沉澱結果

Figure 3.26 virus particle immunoprecipitation with anti-PA, anti-PB1 and anti-PB2 antibodies

- * Lane 1: 10% input virus particle
- * Lane 2: protein A-agarose + sample (negative control)
- * Lane 3: Protein A-agarose + anti-PA polyclonal Ab
- * Lane 4: Protein A-agarose + anti-PA polyclonal Ab + sample
- * Lane 5: Protein A-agarose + anti-PB1 polyclonal Ab
- * Lane 6: Protein A-agarose + anti-PB1 polyclonal Ab + sample
- * Lane 5: Protein A-agarose + anti-PB2 polyclonal Ab
- * Lane 6: Protein A-agarose + anti-PB2 polyclonal Ab + sample

3.5 PA、PB1 單株抗體可於二維電泳圖譜標定出單一明顯的蛋白質點

於病毒微粒 (virion) 中，RNA polymerase 各次單元體的含量相當稀少，平均一個病毒微粒約含 500 個血液凝集素 (hemagglutinin, HA) 分子，約含 1000 個核蛋白 (nuclear protein, NP) 分子，而 RNA 聚合酶次單元體 PA (polymerase acid protein)、PB2 (polymerase basic protein 2) 及 PB1 (polymerase basic protein 1) 則各只有約 30~60 個分子。由於含量稀少，其蛋白質點於二維電泳圖譜中難以辨認。因此本實驗希望以抗體工具，定位 RNA polymerase 各次單元體於二維電泳圖譜分布位置。

使用純化自雞胚尿囊液之禽流感病毒，以 10% TCA/Acetone 沉澱其蛋白質，接著進行二維電泳，以禽流感病毒 RNA 聚合酶次單元體 PA (polymerase acid protein)、PB2 (polymerase basic protein 2) 單株抗體及 PB1 (polymerase basic protein 1) 多株抗體進行免疫染色，比對經硝酸銀染色的蛋白質群點，定位 RNA 聚合酶各次單元體於二維電泳圖譜分布位置。

使用 ExPASy Compute pI/Mw tool 經序列分析，預測各 RNA 聚合酶次單元體分子量與等電點，結果如下：PA 分子量約 83 kDa，等電點為 5.43；PB1 分子量約 86.5 kDa，等電點為 9.23；PB2 分子量約 86 kDa，等電點為 9.47。比對實驗結果圖 3.27，PA 單株抗體可標定出單一明顯的蛋白質點，比對其分子量與等電點，與分析結果相近；PB1 多株抗體亦可辨認單一蛋白質點，其分子量約為 70 kDa，等電點約為 5，其與 ExPASy Compute pI/ Mw tool 分析結果相差甚遠，將該蛋白質色點進行 LC/MS/MS 身份鑑定，並未定到任何病毒蛋白質，推測為非專一性吸附；而 PB2 單株抗體並未於相對分子量或等電點辨認出蛋白質點，推測原因為蛋白質於沉澱過程中流失或降解。

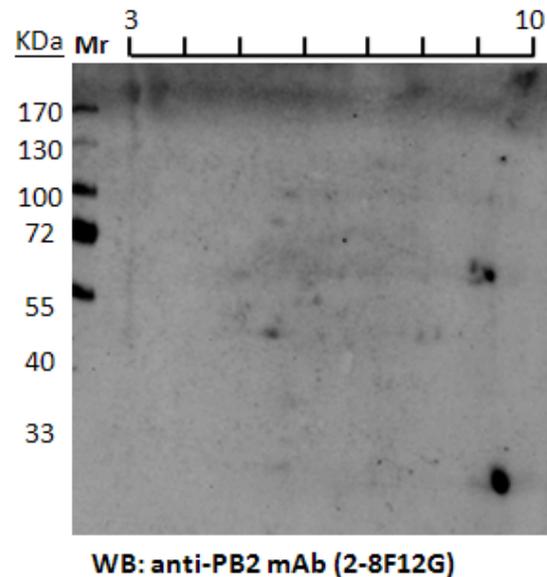
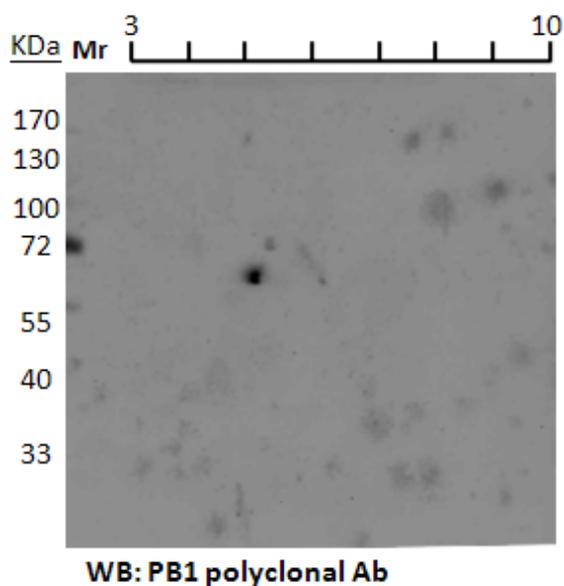
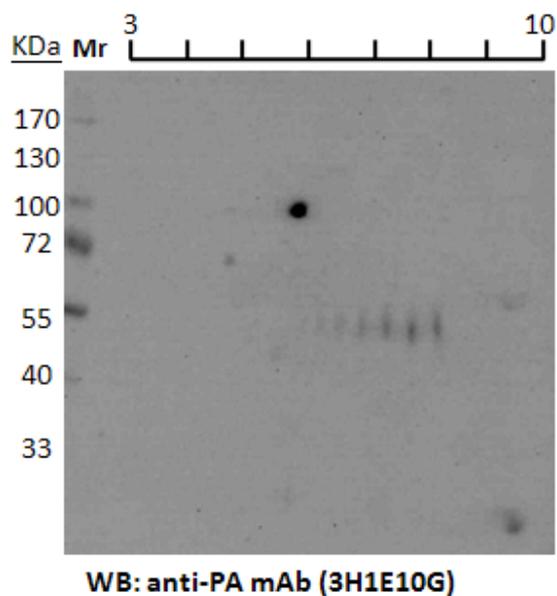
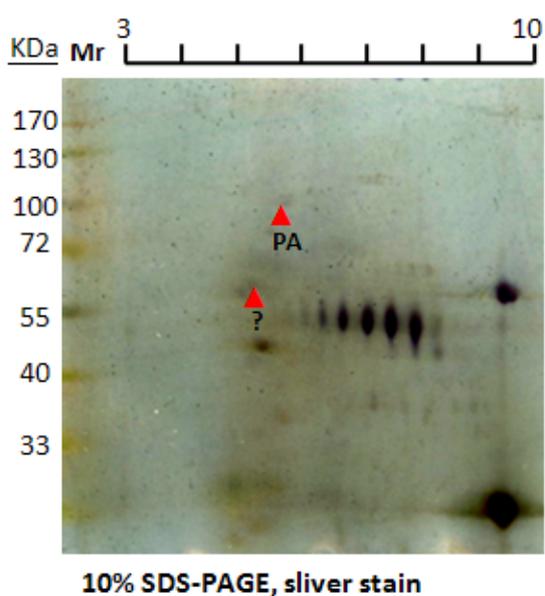


圖 3.27 利用抗體定位 RNA polymerase 各次單元體於二維電泳圖譜分布位置

Figure 3.27 Identified location of target protein in 2-DE PAGE by antibodies

第四章 討論

4.1 以合成胜肽作為抗原製備的單株抗體可辨識原態分子

由於當初是以三段合成胜肽混合作為抗原免疫小鼠，加上抗體篩選過程中，分別以合成胜肽與病毒全蛋白作為抗原，利用酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 法及免疫染色法進行篩選，於兩種篩選法皆呈正反應的細胞株才予以保留，因此理論上，所得之抗體能夠專一性辨識病毒顆粒內目標蛋白的相對序列。由結果顯示，利用免疫染色法分析，確實能於一維 SDS-PAGE 中相對分子量辨識主要條帶；進一步使用同為 H6N1 亞型的禽流感病毒株感染 MDCK 細胞，以間接螢光染色法偵測，由結果顯示確實能得到訊號，分別位於細胞核、細胞質及近似細胞核膜的位置。

參考病毒的複製生活史，於病毒感染宿主細胞的初期，病毒會經由脫殼 (uncoating) 將由 RNA 聚合酶各次單元體、病毒 RNA 及病毒核蛋白 (NP) 組成之核糖核蛋白 (vRNP) 送入宿主細胞質中，接著藉由位於各蛋白質上的細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) 送入細胞核；同樣的，當病毒蛋白質利用宿主細胞的核糖體合成後，各 RNA 聚合酶各次單元體需再次由細胞質送入細胞核中重新與病毒 RNA 及病毒核蛋白 (NP) 合成核糖核蛋白 (vRNP)；此外組裝完成的核糖核蛋白 (vRNP) 會再次由宿主細胞核送出，準備與其他病毒蛋白 (HA、NA、M2) 組合成新的病毒顆粒。此過程中 RNA 聚合酶各次單元體多次來回於宿主細胞質與細胞核，遍布於病毒各個感染時期；而參考感染時間與實驗結果，我們將所得結果比對病毒複製週期中各次單元體位移的趨勢是相符的，而由結果得知，於本論文中製備而得的 PA、PB2 單株抗體及 PB1 多株抗體可辨認位於宿主細胞中的原態目標蛋白，並可經由間接螢光染色法偵測，分別位於細胞核、細胞質及近似細胞核膜的位置。

4.2 本文所產 PA 及 PB2 單株抗體的抗原決定基與目前已知功能區域的關係

本論文中製備的抗體抗原來源單純，使用間接型及競爭型酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 檢定抗原決定基 (epitope) 位置，初步檢定發現 PA 單株抗體抗原決定基位於靠近 C 端第 501~520 胺基酸處，PB2 單株抗體抗原決定基則位於第 449~468 胺基酸處。

比對目前已知功能區域，PA 與宿主因子 hCLE (human homologue chicken CLE) 位於流感病毒作用區域第 493~512 胺基酸處 (Naffakh et al., 2008)。由於 hCLE 與 *S. cerevisiae* Cdc68 轉錄活化因子家族為同源蛋白，故推測其亦具轉錄活化因子的功能。此外，有研究指出 hCLE 與活化病毒核糖核蛋白 (vRNP) 有關 (Huarte et al., 2001; Perez-Gonzalez et al., 2006)。經序列比對，本文使用之禽流感病毒株 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 與該篇文章使用之人流感 A/Victoria/3/75 序列相似度高達 94%，並於 hCLE 推測與該流感病毒作用區域 (即第 493~512 胺基酸處) 的序列完全相同，而該段區域與本論文自產 PA 抗體推測之抗原決定基 (第 501~520 胺基酸處) 重疊。然而禽流感病毒與禽類宿主間是否具有類似作用宿主因子參與其中，抑或本文所產 PA 抗體是否可結合 hCLE 作用區，甚至影響人流感病毒感染宿主細胞的機制則尚待確認。

參考文獻可發現 PB2 抗體之抗原決定基位與目標蛋白之細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) 位置 (即第 449~495 胺基酸處) (Naffakh et al., 2008) 具部分重疊。有研究顯示，當 PB2 突變造成 449~495 序列缺失，將造成 PB2 無法進入宿主細胞核，於細胞質與細胞核周圍累積 (Mukaigawa and Nayak, 1991)；此外有研究指出，此段序列上第 475 胺基酸可能影響流感感染宿主特異性，即禽類流感此位置為 Leucine，若突變成 Methionine 將可感染哺乳類 (Naffakh et al., 2008)，並有學者認為胺基酸缺失的改變、蛋白質無法完整組裝折疊，與宿主特異性，三者間可能具關聯性 (Resa-Infante et al., 2008)。然而本論文自產抗體能否經由結合其中一段細胞核定位訊號，是否造成 PB2 進入宿主細胞核的效率降低，甚至進一步影響病毒的 RNA 聚合酶完整組裝則尚待確認。

相較於病毒表面封套上的醣蛋白 (HA 與 NA), 易於突變且擁有許多亞型, 流感病毒 RNA 聚合酶的重要功能及較保留的序列, 使其成為相當好的抗流感藥物標的, 目前科學家們正致力於研究其分子結構, 並期望更了解各單元體間結合機制, 試圖找出抵抗流感病毒的方法。我們使用 Discovery studio 2.0 軟體, 以目前已知結構的 PA 及 PB2 區域 (PDB ID: 1V1D 及 2VQ2) 為模板, 得知各單株抗體之抗原決定位於三級結構的位置, 結果如圖 4.1 所示。



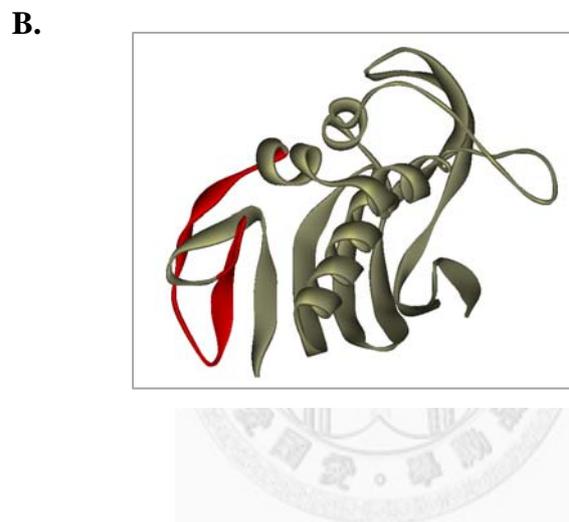


圖 4.1 使用 Discovery studio 2.0 軟體，模擬單株抗體之抗原決定位於三級結構位置

Figure 4.1 Homology modeling of the eptiopes for PA and PB2 monoclonal antibodies

by Discovery studio 2.0

以已知結構的 PA 及 PB2 區域 (PDB ID: 1V1D 及 2VQ2) 為模板，模擬 PA (圖

A) 及 PB2 (圖 B) 單株抗體之抗原決定位於三級結構的位置。

第五章 結論

爲了解更多病毒 RNA 聚合酶與細胞感染的機製，本論文藉由比對序列進行結構預測，並配合單株抗體製備技術，期望製備出禽流感病毒 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRP) 的各次單位聚合酶蛋白 (PA、PB1 及 PB2) 之抗體工具，標定目標蛋白。經酵素連結免疫吸附法及免疫染色法分析後，確認得到 PA 及 PB2 單株抗體，並得到 PB1 多株抗體。

此外，進行抗體特性分析，利用間接型及競爭型酵素連結免疫吸附法初步確認 PA 及 PB2 單株抗體抗原決定位，推測 PA 之抗原決定位爲靠近 C 端之第 501~520 胺基酸處，與轉錄活化因子 hCLE 與流感病毒推測作用區域具部分重合；PB2 之抗原決定位爲 449~468 胺基酸處，與目標蛋白之細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS) 位置具部分重疊。以免疫染色法測定抗體型別得知 PA 單株抗體爲免疫球蛋白 IgG₁；PB2 單株抗體爲免疫球蛋白 IgG_{2a}，兩種單株抗體的輕鏈 (light chain) 則皆爲 κ 。

使用同爲 H6N1 亞型的禽流感病毒株 A/Wild duck/Ilan/2904/1999 感染 MDCK 細胞，利用間接免疫螢光染色法分析，雖未能觀察到各 RNA 聚合酶各次單元體於受感染的細胞中位移的經過，但可確認 PA 及 PB2 單株抗體及 PB1 多株抗體可辨識原態抗原。利用免疫共沉澱，可發現 PA 及 PB1 皆可辨認一個約 53 kDa 大小的蛋白質，推測期可能爲核蛋白 (NP)。另一方面，試圖使用免疫染色法定位 RNA 聚合酶各次單元體於二維電泳圖譜位置，比對結果只有 PA 可於相對分子量及等電點辨認專一蛋白質點。

由於 RNA 聚合酶的重要功能及較保留的序列，使其成爲相當好的抗流感藥物標的，此外目前流感病毒 RNA 聚合酶完整的結構及活化機制仍尚不清楚，本論文自產抗體除了能作爲良好的觀察工具，更能進一步應用於基礎研究，協助了解流感病毒 RNA 聚合酶的活化機制。

第六章 參考資料

- Aoki FY, Sitar DS** (1988) Clinical pharmacokinetics of amantadine hydrochloride. *Clin Pharmacokinet* **14**: 35-51
- Büchen-Osmond CE, Columbia University, New York, USA** (2006) International Committee on Taxonomy of Viruses Index of Viruses - Orthomyxoviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4.
- Basler CF, Aguilar PV** (2008) Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* **79**: 166-178
- Bouvier NM, Palese P** (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**: D49-53
- Brown EG** (2000) Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**: 196-209
- Chan AY, Vreede FT, Smith M, Engelhardt OG, Fodor E** (2006) Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**: 210-217
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW** (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**: 1306-1312
- Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG** (1993) 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**: 155-165
- Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P** (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**: 205-213
- Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchev AV, Brownlee GG, Fodor E** (2006) Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**: 11911-11919
- Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG** (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**: 8669-8674
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD** (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* **79**: 2814-2822
- Gatherer D** (2009) The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* **45**: 174-178
- Gendon Iu Z** (2008) [Influenza pandemic: hypotheses and facts]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 109-118
- Gong J, Xu W, Zhang J** (2007) Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* **14**: 113-122
- Hale BG, Barclay WS, Randall RE, Russell RJ** (2008) Structure of an avian influenza A

- virus NS1 protein effector domain. *Virology* **378**: 1-5
- Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D** (2008) The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**: 2359-2376
- Hemerka JN, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik RS, Jin J, Harmon AF, Li F** (2009) Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* **83**: 3944-3955
- Horimoto T, Kawaoka Y** (1995) Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J Clin Microbiol* **33**: 748-751
- Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J, Nieto A** (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**: 8597-8604
- Inglis SC, Brown CM** (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **9**: 2727-2740
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y** (1998) Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**: 7367-7373
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG** (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**: 4603-4608
- Kilbourne ED, Cerini CP, Khan MW, Mitchell JW, Jr., Ogra PL** (1987) Immunologic response to the influenza virus neuraminidase is influenced by prior experience with the associated viral hemagglutinin. I. Studies in human vaccinees. *J Immunol* **138**: 3010-3013
- Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tscherne DM, Ortigoza MB, Liang Y, Gao Q, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, Garcia-Sastre A, Young JA, Palese P, Shaw ML, Chanda SK** (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**: 813-817
- Krug RM** (1981) Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**: 125-149
- Lamb RA** (1996) Orthomyxoviridae: The virus and their replicaton. *Virology*, 3rd ed: 1353~1395
- Lee CW, Jung K, Jadhao SJ, Suarez DL** (2008) Evaluation of chicken-origin (DF-1) and quail-origin (QT-6) fibroblast cell lines for replication of avian influenza viruses. *J Virol Methods* **153**: 22-28
- Li X, Palese P** (1994) Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* **68**: 1245-1249
- Lupiani B, Reddy SM** (2009) The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **32**: 311-323
- Masunaga K, Mizumoto K, Kato H, Ishihama A, Toyoda T** (1999) Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies. *Virology* **256**: 130-141

- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD** (2004) Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4620-4624
- McDonald NJ, Smith CB, Cox NJ** (2007) Antigenic drift in the evolution of H1N1 influenza A viruses resulting from deletion of a single amino acid in the haemagglutinin gene. *J Gen Virol* **88**: 3209-3213
- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K** (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**: 45306-45314
- Mukaigawa J, Nayak DP** (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* **65**: 245-253
- Murphy P, Roberts ZM, Waner JL** (1996) Differential diagnoses of influenza A virus, influenza B virus, and respiratory syncytial virus infections by direct immunofluorescence using mixtures of monoclonal antibodies of different isotypes. *J Clin Microbiol* **34**: 1798-1800
- Naffakh N, Tomoiu A, Rameix-Welti MA, van der Werf S** (2008) Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* **62**: 403-424
- Nagata K, Kawaguchi A, Naito T** (2008) Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol* **18**: 247-260
- Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K** (2007) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**: 1339-1349
- Nayak DP, Hui EK, Barman S** (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**: 147-165
- Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y** (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* **19**: 6751-6758
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y** (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**: 931-939
- Park YW, Katze MG** (1995) 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**: 28433-28439
- Perez-Gonzalez A, Rodriguez A, Huarte M, Salanueva IJ, Nieto A** (2006) hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J Mol Biol* **362**: 887-900
- Perkins LE, Swayne DE** (2002) Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis* **46**: 53-63
- Perkins LE, Swayne DE** (2003) Comparative susceptibility of selected avian and

- mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis* **47**: 956-967
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA** (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528
- Portela A, Digard P** (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**: 723-734
- Rameix-Welti MA, Tomoiu A, Dos Santos Afonso E, van der Werf S, Naffakh N** (2009) Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection. *J Virol* **83**: 1320-1331
- Rao P, Yuan W, Krug RM** (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J* **22**: 1188-1198
- Resa-Infante P, Jorba N, Zamarrero N, Fernandez Y, Juarez S, Ortin J** (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One* **3**: e3904
- Rogers GN, D'Souza BL** (1989) Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* **173**: 317-322
- Rott R** (1992) The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol* **33**: 303-310
- Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, Lin TI** (2005) The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**: 52-66
- Sidorenko Y, Reichl U** (2004) Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng* **88**: 1-14
- Sieczkarski SB, Whittaker GR** (2002) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**: 10455-10464
- Soares IS, Rodrigues MM** (1998) Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. *Braz J Med Biol Res* **31**: 317-332
- Subbarao K, Joseph T** (2007) Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* **7**: 267-278
- Subbarao K, Katz J** (2000) Avian influenza viruses infecting humans. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1770-1784
- Vreede FT, Brownlee GG** (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**: 2196-2204
- Webster RG, Rott R** (1987) Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell* **50**: 665-666
- Yankulov K, Todorov I, Romanowski P, Licatalosi D, Cilli K, McCracken S, Laskey R, Bentley DL** (1999) MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* **19**: 6154-6163
- Ye ZP, Baylor NW, Wagner RR** (1989) Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and

synthetic peptides. J Virol **63**: 3586-3594

Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol **62**: 2762-2772

莊榮輝 (1985) 水稻合成酶之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。

何杰龍 (2006) 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化學研究所博士班資格考論文。



問答錄

論文口試問答摘要

口試委員：常怡雍 博士、陳翰民 博士、張世宗 博士、王金和 博士、莊榮輝 博士。

常怡雍 老師：

1. 過去是否有類似的方法，利用抗體觀察禽流感病毒蛋白質位移，此研究提供的新的單株抗體強項為何？

答：先前亦有研究使用抗體觀察禽流感病毒 RNA 聚合酶位移的過程。本研究與之不同的地方在於，本研究使用的是以選定序列合成胜肽抗原製備出的單株抗體作為觀察工具，因此已知抗體的抗原決定位，且本研究製備出三種單體蛋白質的抗體工具以之進行觀察。

2. 此研究與先前研究所觀察到的現象是否有類似或不同之處？

答：本結果共選擇四個時間點，其中感染後 10 小時是先前研究未選定的時間點，可觀察到 PA、PB1 及 PB2 出現於細胞質及靠近核膜的位置，少數的 PA 甚至已進入細胞核中；感染後 24 小時為參考文獻所選定的時間點，所觀察到的現象與前人相符，PA、PB1 及 PB2 進入細胞核中，但亦可發現各單元體出現在核膜周圍及細胞質，推測為各病毒株的感染力及毒力的不同，加上細胞個體的差異，造成的結果。

3. 是否曾檢測製備出單株抗體對宿主蛋白質的專一性？

答：所選的抗原序列已使用軟體比對過，皆為對應於禽流感目標蛋白質序列。於篩選的過程中使用短鏈胜肽作為抗原，以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 測試；並將病毒全蛋白轉印至 PVDF 膜作為抗原，進一步以免疫染色法檢驗，挑選兩種篩選結果均呈正反應者，確保所篩出的單株抗體可辨識真正的病毒蛋白質。

4. 是否曾檢測單株抗體辨識不同時間點下未感染宿主細胞的結果？

答：是。由於未感染宿主細胞所得的結果，各時間點與培養 0 小時結果相同，皆未得到訊號，因此文中 mock 為未感染宿主細胞培養 0 小時的結果。

5. 能否進一步收集不同感染時間點的宿主細胞，利用抗體進行免疫染色觀察宿主細胞中，目標蛋白質是否隨培養時間增加而增加？

答：利用細胞培養增殖的病毒量本來就比較少，加上禽流感 RNA 聚合酶於病毒顆粒中含量稀少，若利用免疫染色可能會測不到訊號。但是由 RNA 電泳及 Real-time PCR 結果，病毒 RNA 量確實隨感染時間增加而上升，確認病毒成功感染宿主細胞，並於細胞內增殖。

6. 由 PA、PB1 及 PB2 三個單體蛋白質構成 RNA 聚合酶，理論上三者會一起作用，為何在出現的時間點上會有差異？

答：各個單體蛋白質於宿主細胞質中分別生成，並未行使功能，因此是有可能單獨存

在的。由免疫螢光染色的結果得知，於感染 10 小時後，各單體皆大量出現。然而於感染後 4 小時，可於細胞核及細胞質中偵測到部分 PA 及 PB1，推測所測到的為第一波受感染的宿主細胞，因此理論上應可偵測到三種單體蛋白質。由結果中得知未偵測到 PB2 的訊號，推測原因為第一波受感染的宿主細胞數量較少，且與 PB2 抗體對目標蛋白親和力的差異及染色操作過程的人為誤差有關。因此由本研究無法推論三者生成的時間點是否不同。

7. 請解釋文中心臟採血的意思？

答：在免疫的過程中，可由剪尾採血所得的血清來測試效價，每次所得約 30 μL ，所採得的量較小，當免疫數次效價穩定且達最高峰，進行細胞融合前，將小鼠犧牲後可進行心臟採血，約可得 500~1000 μL ，此時所得到的傳統免疫抗血清量最大且效價最強。

8. 是否嘗試使用文中製備的抗體對其他的禽流感病毒進行檢測？

答：除了本文中曾使用的：自雞分離出的 A/Chicken/Taiwan/2838V/00 及自野鴨分離出的 A/Wild duck/Ilan/2904/1999 以外，未對其他禽流感病毒進行檢測。

9. 不同抗體型別 (IgG₁ 及 IgG_{2a}) 差異為何？

答：每一種免疫球蛋白的功能、構型及性質皆不同，以功能而言，IgG 的中和作用較佳；IgM 具有活化補體系統功能；而 IgE 則與發炎反應有關。不同型別抗體的擴散能力與血清中含量亦有差別。本文中所製備出的抗體皆為 IgG 系列，能產生較佳的中和作用，IgG₁ 尚具有調理作用；以性質而言 IgG₁ 及 IgG_{2a} 皆可擴散至血管以外的位置，IgG₁ 甚至可通過胎盤。此外，IgG₁ 血清中含量濃度較高。

10. 文中以競爭型 ELISA 測試抗原決定位，是否曾比較加入各段合成胜肽競爭反應後，以可能的抗原決定基對應序列之合成胜肽作為抗原，進行競爭型 ELISA 之結果？

答：未比較過。但由結果可知，PA 單株抗體專一性辨識編號 81 號抗原序列；PB2 單株抗體專一性辨識編號 86 號抗原序列，若事先加入少量胜肽抗原與抗體反應，再以 ELISA 檢定，訊號明顯減弱。

王：不同的抗體於 ELISA 結果訊號有強弱之別，原因為何？

答：雖然辨識相同目標的抗體，但是由不同細胞株分泌，抗體的效價強弱及對抗原的親和力皆會有所區別。

陳翰民 老師：

1. 已知 RNA 聚合酶為三種次單元體蛋白質構成的三聚體 (heterotrimeric polymerase)，為何會想要單獨看各單體蛋白質的運輸？

答：RNA 聚合酶複合體在禽流感病毒複製過程扮演重要角色，且其功能乃啟動於病毒感染早期，使其成為良好的抗流感藥物標的。此外 RNA 聚合酶由三種次單元體蛋白質組成才具有完整功能，因此三者的組裝顯得重要，配合本實驗室製備單株抗體的專長，期望以單株抗體這個專一性且靈敏性具佳的工具，觀察三者運輸及組裝的過程。

2. 於禽流感病毒複製週期中，RNA 聚合酶各次單元體蛋白質多次來回於宿主細胞質及細胞核，如何區分免疫螢光染色所見訊號為禽流感病毒複製週期的哪一時期？

答: 無法區分。只能由感染後的時間比對，約略推估。

3. 為何免疫螢光染色只呈現 (PB2 及 PA 抗體)、(PB2 及 PB1 抗體) 結果，是否嘗試以 (PB1 及 PA 抗體) 進行染色？

答: 沒有。由於未得到 PB1 的單株抗體，而傳統免疫抗血清的量有限，因此未使用抗體觀察 PB1 及 PA 於受感染的宿主細胞中位移的情形。

4. 使用免疫共沉澱的目的為何？為何選用病毒濃縮液與各聚合酶次單元體的抗體進行檢定？

答: 事實上病毒濃縮液是從雞胚尿囊液純化而得的，純化的過程為使用不同的蔗糖梯度將其分離，並使用 BEI 進行減毒，因此若存在可與各聚合酶次單元體結合的宿主蛋白，可經免疫共沉澱與各聚合酶次單元體蛋白質一起純化沉澱下來。

5. 於文中 p 102 頁 (圖 3.26) 免疫共沉澱的結果，使用各抗體進行免疫染色為何辨識的條帶分子量大小與目標蛋白質不符？

答: 本論文以合成的抗原序列作為抗原，抗原來源單純，且抗體篩選過程中分別以胜肽抗原及病毒顆粒進行篩選，理論上所得抗體可專一性辨識病毒顆粒內目標蛋白質的相對序列。由於重複免疫共沉澱多次皆得到相同結果，推測原因可能為目標蛋白質於病毒全蛋白中所佔總量太少，加上操作過程時間過久，造成目標蛋白質降解。由於流感病毒全蛋白中尚存在另一含量較多、且可與此三種次單元體蛋白質結合的核蛋白 (NP)，故推測所辨識條帶亦有可能為核蛋白。

6. 若只是為了搜尋可能與 RNA 聚合酶次單元體進行結合的宿主蛋白質，是否只需比較 p 102 頁 (圖 3.26) A 圖結果中各 line 的差異即可？

答: 是。但由於本論文中製備出三種聚合酶次單元體的抗體，因此想要同時看看三個次單元體是否確實彼此結合。

王金和 老師：

1. 文中 p 102 頁 (圖 3.26) 免疫共沉澱的結果，使用各抗體進行免疫染色所辨識的條帶分子是否有可能是核蛋白 (NP)？

答: 是的。我曾經也有懷疑過，但經液相層析儀 LC/MS/MS 身分鑑定並未定到流感病毒內的蛋白質，因此無法確定。

2. 就免疫的觀點而言，是否有考慮 multiple antigen peptides (MAP) 各分支分別接上不同的胜肽抗原，免疫性會更好？

答: 是的，謝謝老師。當初委託生技公司合成抗原胜肽時並未考慮到，MAP 各分支所接胜肽是相同的，後來搜尋文獻也有發現這點，未來若進行類似實驗將改進。

張世宗 老師：

1. 應注意論文標題英文題目文法及論文格式是否有錯誤。

答: 是的，謝謝老師，我會再進行檢查修改。

2. 免疫螢光染色實驗的條件是否有標示清楚，加入多少病毒感染宿主細胞？

答: 是的，在本文中使用 m.o.i 值表示。

莊榮輝 老師：

1. 免疫共沉澱的結果，所有免疫染色的圖都太髒了。

答: 是，老師我會再改進的。

2. 是否可比對先前免疫螢光染色的結果，分別收集各次單元體蛋白質於細胞核或細胞質大量累積的時間點中，受感染之 MDCK 細胞以之進行免疫共沉澱？

答: 以細胞培養的病毒量可能還是太少，進行免疫共沉澱可能無法得到結果。

3. 能否由實驗結果得知三種次單元體於不同感染時間位移並組裝的情形？

答: 利用免疫螢光染色所觀察到的的結果，並未觀察到明顯的共定位 (co-localization) 趨勢，因此尚無法得知新生之各次單元體組裝並位移至細胞核的過程。但各次單元體位移的結果與病毒複製週期中位移趨勢相符，並可觀察到 PA 與 PB2 於核中結合。



附錄

1.1 一般電泳檢定法

本論文使用之電泳方法為 10% SDS 膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate-PAGE)，以迷你平板直立式電泳套件進行。

1.1.1 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
平板式垂直迷你電泳槽 (Hoefer, SE-250)
電源供應器 (Pharmacia, EPS 301)

藥品試劑：

A 液：丙烯醯胺溶液 (T 30%, C 2.6%)：

Acrylamide	(RDH 62021)	29.2 g
Bis	(Bio-Rad 161-0201)	0.8 g

加水至 100 mL，30°C 加熱助溶，溶解後以濾紙過濾。置於 4°C 儲存。

◆ Bis：N,N'-Methylene-bis-acrylamide

B 液：分離膠體緩衝液 (Running buffer)：

Tris	(BDH 103157P)	45.4 g
TEMED	(Sigma T-8133)	0.9 mL

以 200 mL 的水溶解後，使用 HCl 將 pH 調至 8.8，再定量至 250 mL。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	(BDH 103157P)	6 g
TEMED	(Sigma T-8133)	0.4 mL

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

過硫酸銨溶液 (APS)：

Ammonium persulfate	(10%, Bio-Red 115953A)	100 mg
---------------------	------------------------	--------

溶於 1 mL 水中，使用前新鮮配置。

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

Tris (125 mM×2)	(BDH 103157P)	0.3 g
EDTA·2Na (2 mM×2)	(Sigma E-4884)	14.9 mg
SDS (2%×2)	(Nacalai 316-07)	0.4 g
β-ME (5%×2)	(Sigma M-6250)	1 mL
Bromophenol blue (0.01%×2)	(Sigma B-6896)	2 mg
Glycerol (20%)	(J.T.Baker 2136-03)	2 mL

加二次水 8 mL 溶解，pH 調至 6.8 之後，再定量至 10 mL。

◆ SDS : sodium dodecyl sulfate

◆ β-ME : β -Mercaptoethanol

SDS 電泳緩衝液 (5×) :

Tris	(90 mM×5, BDH 103157P)	54.5 g
EDTA·2Na	(2.5 mM×5, Sigma E-4884)	4.7 g
Boric acid	(80 mM×5, RDH 31146)	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 將 pH 調至 8.4，再定量至 1,000 mL。使用時稀釋 5 倍，加入 10% SDS，使得最終濃度為 0.1% SDS，置於室溫保存。

異丙醇 (Isopropanol)

SDS 溶液 (10%) : 取 SDS 10 g 溶於 100 mL 二次水中。

◆ SDS 粉末很輕，極易揚起，配製時需注意勿吸入，最好戴上口罩。

Gnenaid Pre-Stained 標準蛋白質組合

方法步驟 :

A. 鑄膠方法 :

- 1) 將鑄膠套件包含間隔條 (spacer)、電泳玻璃片、氧化鋁片皆以酒精擦拭乾淨，選擇 0.75 mm 間隔條將套件組合起來，氧化鋁片後面需墊一張塑膠片。將套件放入鑄膠器 (caster) 中。
- 2) 配製適當濃度的分離膠體，各溶液比例依下表配製。其中 APS 溶液最後加入，小心混合均勻，避免產生氣泡。

表 1.1 常用的原態膠體電泳溶液之參考濃度配方 (單位 : mL)

鑄膠溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	6%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	
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 ₂ O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1
Total	10						5

- 3) 迅速將配製好的分離膠體溶液注入，膠體高度約玻片的 2/3 至 3/4 高，避免氣泡存在膠體中，接著在膠片上層加入 100 μL 異丙醇 (isopropanol)，以壓平膠體液面。
- 4) 待膠體凝結後，倒去上層的異丙醇。

- 5) 配製焦集膠體溶液，溶液比例依表 1.1 所示。將焦急膠體溶液注入分離膠體上層，盡快插上齒梳 (comb)，注意避免有氣泡陷入膠體中。
- 6) 待膠體凝結後，拆卸鑄膠套件，以水沖去多餘凝膠。將鑄好的膠片放入封口袋，加少許蒸餾水防止膠片乾裂，置於 4°C 保存。使用期限約為一週。

B. 電泳：

- 1) 取出膠片於室溫回溫，將 1× SDS 電泳緩衝液倒入電泳槽底部，將膠片以 45 度斜放入緩衝液中，避免氣泡進入電泳片底部。以電泳夾夾妥後，在電泳片上方，亦加入 1× 通用電泳緩衝液。
- 2) 取適量的樣品 (5~15 μL/ well)，加入同體積之 2×SDS 膠體電泳樣品溶液，混合均勻後於 100°C 煮沸 10 min，置於冰上待其冷卻。
- 3) 以微量針管清洗樣本槽，以去除殘於樣本槽內的膠體。依導引片指示，在最左邊的樣本槽中，注入 3 μL 低分子量標準蛋白質組合，作為蛋白質分子量參考的依據，接著依序將冷卻後的樣品混合液小心的注入樣本槽。
- 4) 蓋上電泳槽上層蓋子，確認正負極裝置，連接電源供應器，定電壓 120 V 進行電泳。
- 5) 藉由追蹤染劑觀察樣品泳動情形，當追蹤染劑跑出膠片外，即可停止電泳。
- 6) 取出膠片組合，以間隔條輕輕撬起玻片，切去焦集膠體部份，在分離膠體右上截角區別左右，準備進行染色或轉印。

1.1.2 膠體染色法

1.1.2.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 蛋白質染色法

利用 CBR 染劑上芳香族苯環與蛋白質上的疏水性區作用，及 CBR 上帶負電的亞硫酸根 (SO_3^{2-}) 與蛋白質上的正電荷結合，而使蛋白質呈現藍色，是常用的染色法之一，快速而方便，但靈敏度中等。

儀器設備：

平台震盪器 (TKB OS701)

染缸

藥品試劑：

甲醇溶液 (50%)：

Methanol	(Wako 136-09475)	500	mL
----------	------------------	-----	----

取甲醇溶液 500 mL 加二次水定量至 1,000 mL。

CBR 染色液：

CBR	(Sigma B-0149)	1.5	g
Methanol	(Wako 136-09475)	250	mL
CH ₃ COOH	(J.T. Baker 9508-03)	50	mL

以 Methanol 溶解 CBR 後，再加入醋酸混和均勻，以二次水定量至 250 mL，經濾紙過濾後使用。

◆ CBR：Coomassie Brilliant Blue R-250

CBR 脫色液：

Methanol	(20%, Wako 136-09475)	200	mL
CH ₃ COOH	(10%, J.T.Baker 9508-03)	100	mL

加二次水混合均勻定量至 1 L。

方法步驟：

- 1) 將電泳完畢的膠體取下後，浸入 CBR 染色液中，置於平台震盪器上搖盪。約 10~20 min 後倒出染色液。
◆若蛋白質濃度較低，可以加長染色時間，增加色帶深度。
- 2) 倒出染色液回收，以少量的 50% 甲醇稍微潤洗膠片後倒去。
- 3) 倒入脫色液蓋過膠體，於平台震盪器上搖盪 1 h。過程中可放一小片擦手紙吸附 CBR，加速脫色。
- 4) 置換新的脫色液一至兩次，直至背景完全透明則脫色完成。

1.1.2.2 硝酸銀蛋白質染色法 (Silver staining)

硝酸銀染色的靈敏度極高。其原理是利用蛋白質上的酸基 (COO-) 與銀銨錯離子結合，在酸性環境中，銀離子藉由甲醛還原為金屬銀，可使蛋白質色帶呈現棕黑色。本論文中使用的硝酸銀染色法略作修改，藉由戊二醛 (glutaraldehyde) 與蛋白質分子上的銨根 (Lys 或 Arg) 耦合，增加銀離子的結合基團，使得靈敏度更高。

儀器設備：

平台震盪器 (TKB OS701)

玻璃染缸

藥品試劑：

NaOH 溶液 (0.36%)：蓋緊保存瓶，於室溫儲存。

Citric acid 溶液 (0.5%)：4°C 儲存。須注意是否發霉或沉澱，以免影響呈色結果。

還原液甲：

Glutaraldehyde	(25% GR, Merck 1042339)	4	mL
Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	(Nakarai 320-06)	0.8	g

以二次水定量至 100 mL。

還原液乙：

0.5% Citric acid		1	mL
Formaldehyde	(37% GR, Merck 104003)	0.1	mL
Methanol	(Wako 136-09475)	15	mL

以二次水定量至 100 mL。

硝酸銀液：

Silver nitrate	(J.T. Baker 3426-04)	0.8	g
0.36% NaOH	(Merck 106498)	21	mL
Ammonia solution	(Merck 106498)	1.4	mL

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，過程中邊滴邊搖晃，硝酸銀液滴完時，溶液呈現澄清。若有混濁現象以氨水反滴定至澄清。

反應中止液：

0.5% Citric acid	10 mL
Ethylenediamine (Wako 053-00936)	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，亦可浸泡過夜。
 - ◆ CBR 染色過的電泳膠片，脫色後由步驟二開始進行硝酸銀染色。
- 2) 倒去 50% 甲醇，以二次水洗三次，每次 10 min。
- 3) 加入還原液甲，蓋過膠片，於平台震盪器上搖盪反應 1 h。
- 4) 倒去還原液甲，以二次水洗三到五次，每次 10 min。
 - ◆ 將膠片盡量清洗乾淨，否則會導致嚴重的背景干擾。
- 5) 加入硝酸銀溶液，反應 10~15 min。
- 6) 回收硝酸銀溶液至廢液桶，用二次水洗三到五次，每次 10 min。
 - ◆ 此處一開始清洗時，可先沖洗數次，使玻璃缸中的硝酸銀濃度盡量降低，否則由於此時氨水的量已減少，會使錯銀離子開始析出，背景加深。
- 7) 加入還原液乙，開始呈色。在背景呈色前倒去還原液乙。
- 8) 用二次水清洗後，加入反應中止液浸泡 1 h，終止呈色。

1.1.3 膠片乾燥與保存

膠片乾燥法的操作步驟主要是參考莊榮輝博士論文 (1985)。利用玻璃紙 (cellophane, 賽路芬) 的半透膜特性，電泳膠片中的水分及甲醇在三明治法的組合中會滲透而蒸發，使得膠片被壓乾且壓平於兩張玻璃紙中，可以長久保存 (Juang et al., 1984)。電泳膠片乾燥後仍極易破損，以護貝膠膜護貝可使膠片變得平整，並且易於保存。

儀器設備：

- 玻璃紙 (Cellophane 裁成大約 25×25 cm 大小)
- 玻璃板 (21×16 cm 大小)
- 文書夾
- 護貝膠膜 (明光牌 85×100 mm 250)
- 護貝機 (MS-Pouch L-100 Mini)

方法步驟：

- 1) 將第一張玻璃紙以水潤溼，鋪平在玻璃板上，趕走兩者接觸面的氣泡。
- 2) 將染色後之膠片置於上述步驟的玻璃紙上，同樣需避免膠片與玻璃紙之接觸面產生氣泡。
- 3) 取出第二張玻璃紙潤濕，小心覆蓋鋪平於膠片上，趕走兩者接觸面的氣泡。

- 4) 將四周多出的玻璃紙反折至玻璃片背面，四周以黑色文書夾夾住，將其平放於陰涼處風乾。
 - ◆ 檢查膠片是否完全乾燥，可以利用指甲輕輕在膠片上敲敲看，完全乾燥的膠片不會留下任何指甲痕跡。
- 5) 乾片完成後可將膠片剪下，護貝保存。

1.1.4 蛋白質電泳轉印法

PVDF 全名為 polyvinylidene difluoride，為一種疏水性的材質，蛋白質可以藉由其本身的疏水性與之結合，PVDF 對甲醇的耐受性非常好，不易碎裂或扭曲，且對蛋白質的吸附力 (capacity) 極佳，十分適合作為轉印膜的材質。蛋白質電泳膠片經過轉印至 PVDF 膜上後，可以用於免疫染色法、蛋白質 N- 端序列定序以及酵素活性染色等。

儀器設備：

電泳轉印槽 (Hofer TE 52) 及轉印卡夾、海綿
 電源供應器 (ISCO-453 及 Pharmacia Biotech EPS 301)
 電磁攪拌器 (Corning PC-420D)
 PVDF轉印膜 (9×6 cm 大小, Millipore P-15552)
 濾紙 (10×8 cm 大小)
 攪拌子

藥品試劑：

轉印緩衝液 (Blotting buffer)：

CAPS	(Sigma C-2632)	4.43	g
Methanol	(Wako 136-09475)	200	mL

加水 1,500 mL 溶解，調整 pH 至 11 後，再定量至 2,000 mL。

- ◆ CAPS: 3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid

方法步驟：

- 1) 將電泳後之膠片浸於轉印緩衝液平衡 20~30 min。
 - ◆ 通常 SDS-PAGE 膠片在轉印過程中會加入 10% 的甲醇，避免小分子的蛋白質擴散。
- 2) 由於 PVDF 為疏水性材質，先以 100% 甲醇充分溼潤後，浸入轉印緩衝液中平衡備用。
- 3) 取轉印卡夾，墊一張多孔性海綿，接著鋪上一張濾紙，小心鋪上膠片及轉印膜，再蓋上一層濾紙和多孔性海綿。
 - ◆ 注意濾紙、膠片以及 PVDF 轉印膜之間均不得存有氣泡，否則會影響蛋白質轉印。
 - ◆ 轉印膜最好一次就鋪在膠片上，因疏水性甚強，避免蛋白質複印其上。
- 4) 將卡夾置於轉印槽中，加入轉印緩衝液。注意 PVDF 轉印膜朝向正極，膠

片面朝負極。轉印開始前需除去卡夾外面的氣泡。

- 5) 定電流 400 mA 轉印 60~90 min。取出轉印膜，以 Ponceau S 暫時性染色，或比對電泳時使用 prestained 標準蛋白估計轉印效率。

若未立刻進行免疫染色，可將轉印膜乾燥後保存於 -20°C，使用前以甲醇潤溼即可。

1.1.5 轉印膜 Ponceau S 染色法

Ponceau S 可藉由本身的負電與帶正電的蛋白質基團結合，也可以與蛋白質非極性區域結合，而出現紅色的條帶。由於紅色條帶的訊號可藉由蒸餾水漂洗清除，使之成爲是一種很方便的暫時性染色法，常用於對 PVDF 膜上之蛋白質進行染色，來評估蛋白質轉印效率。

藥品試劑：

Ponceau S 染色液：

Ponceau S	(Sigma P-3504)	0.2	g
CH ₃ COOH	(RDH 33209)	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中，倒入適量 Ponceau S 染色液。
- 2) 輕輕搖晃染缸，使 Ponceau S 染色液均勻覆蓋轉印膜上，將膜浸潤後倒去。
- 3) 以二次水漂洗數次，可見轉印膜上的蛋白質被染成紅色。

1.2 抗體製備相關實驗

1.2.2 小鼠剪尾採血

於每次免疫前，對小鼠進行剪尾採血，採得的血液經離心後，取得的血清可用於檢測抗體誘發情形，若測得抗體效價反應，則即爲傳統免疫抗血清。

儀器設備：

剪刀
焊槍
微量離心管
高速離心機

藥品試劑：

碘液
甘油

PBS (Phosphate buffer saline)：詳見 2.1.1 節。

方法步驟：

- 1) 以 75 % 酒精噴濕紙巾擦拭小鼠尾巴消毒，並手指輕彈尾巴數次使其血管充血，待血管浮上來後，剪掉尾巴末端預備採血。
- 2) 搓揉小鼠尾巴擠出血珠，每隻小鼠可採 30 μ L 血液，以 pipetman 吸取裝入預先加入 PBS 的微量離心管中。
- 3) 採完血後，以棉花棒沾碘酒擦拭傷口，用焊槍將傷口的血管封住，使其不再流血。
- 4) 將採得的血液於 12,000 rpm 離心 20~30 min。
- 5) 吸取血清裝入新的微量離心管中，加入等體積甘油充分混合後，置於 -20°C 保存。

1.2.2 細胞保存

1.2.2.1 細胞冷凍

取得可分泌抗體的融合瘤細胞株，應盡速冷凍保存。本論文使用 dimethyl sulfoxide (DMSO) 將細胞保存於液態氮桶中。

儀器設備：

- 80°C 冰箱
- 液態氮及鋼瓶
- 冷凍小瓶 (cryotube)

藥品試劑：

DMSO 保存液：

DMSO (dimethyl sulfoxide)	(Merck 9678)	1	mL
DMEMX		3	mL
FBS	(PAA 0360)	4	mL

於冰浴下依序將 DMSO 及 FBS 緩緩滴入 DMEMX，應新鮮配製。

方法步驟：

- 1) 前一天於顯微鏡底下觀察欲冷凍的細胞，細胞生長狀況需良好，且覆蓋面積約為所培養面積的八成滿。此時換掉 1/2~1/3 培養液。
- 2) 隔天小心懸濁細胞，以血球計數器計算數目，細胞總數需在 10^5 細胞以上。
- 3) 以 850 rpm 離心 5 min，去除上清液，將沉澱輕敲打散。
- 4) 於冰浴下，一邊搖晃一邊緩緩滴入 DMSO 保存液，使細胞均勻懸浮其中。
◆約每 5×10^6 個細胞加入 1 mL DMSO 保存液。
- 5) 將含有細胞的 DMSO 細胞保存液，分裝於冷凍小瓶，每瓶裝入 1 mL。
◆加入 DMSO 保存液後，若未立刻放入 -80°C 冰箱，應將細胞置碎冰上。
- 6) 收集冷凍小瓶置於保麗龍架內，外層以報紙包裹後，置於 -80°C 過夜。
- 7) 取出冷凍小瓶，移入液態氮桶中保存。

1.2.2.2 細胞解凍

儀器設備：

37°C 水浴槽
計時器

藥品試劑：

DMEM (Biochrom AG,FG 0435)：詳見 2.3.3 節。

DMEMX 培養液：詳見 2.3.3 節。

方法步驟：

- 1) 於液態氮桶中，取出冷凍小瓶，立即將其置於 37°C 水浴鍋搖晃解凍，此步驟需於 1 min 內完成。
- 2) 以 75% 酒精擦拭後，小心打開冷凍小瓶。
- 3) 緩慢加入 1 mL DMEM，邊加邊搖晃，此動作在 1 min 內完成。
- 4) 將細胞移入 50 mL 離心管內，補 DMEM 至 33 mL。
- 8) 以 850 rpm 離心 5 min，去除上清液後，以掌心輕握，將沉澱輕拍打散。
- 5) 加入 7 mL DMEMX，混合均勻後，倒入 T25 細胞培養瓶中培養。
 - ◆細胞解凍過程中，應立即將細胞回溫至 37°C，因此 DMEM 及 DMEMX 均需事先於水浴鍋中加熱至 37°C。
- 6) 隔日倒去懸浮細胞碎片及培養液，加入新鮮的 DMEMX 培養。
 - ◆細胞冷凍保存液中內含 DMSO，對細胞有害，應盡量稀釋去除。

1.3 免疫學方法

1.3.1 酵素免疫染色法

本論文中使用間接標定法 (indirect labeling)。蛋白質經電泳後，轉印至 PVDF 轉印膜上，利用專一性抗體 (一次抗體)，對抗原蛋白質進行辨識，接著利用可辨識一次抗體的抗體 (二次抗體) 再進行一次專一性的辨識結合。將二次抗體連結特定的呈色酵素 (horse radish peroxidase, HRP)，可藉由酵素催化基質反應呈色或發出冷光。此步驟可提高抗體的專一性，並提高染色的靈敏度。

儀器設備：

平台震盪器 (TKB OS701)

塑膠染缸

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

藥品試劑：

明膠-NET (NaCl-EDTA-Tween)：

Gelatin	(0.25%, Merck 4078)	5 g
NaCl	(0.15 M, Merck 6404)	17.5 g
EDTA·2Na	(5 mM, Merck 8418)	3.6 g
Tween 20	(0.05%, Merck 822184)	1 mL
Tris	(50 mM, BDH 103157P)	12.1 g

以少量二次水將 gelatin 加熱溶解，接著加二次水及其他試劑至 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 0.05% (v/v) Tween-20。

HRP 呈色系統：

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)

使用前以明膠-NET稀釋，稀釋濃度依廠商建議 (3000~5000倍)。

◆原液加 50% 甘油於 -20°C 儲存，使用前新鮮配製。

DAB 呈色液：

Diaminobenzidine	(Sigma D-5637)	5 mg
H ₂ O ₂ (30%)	(Merck 7210)	10 μL

以 PBS (1×) 溶解後，定量至 100 mL。

◆以深色瓶避光保存，使用前新鮮配置。

◆DAB 可能為致癌物質，注意勿吸入塵埃或直接接觸。

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。

二次抗體 Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) (Cappel 5556)：使用前以明膠-NET 稀釋 4000 倍。

方法步驟：

HRP 呈色系統：

1) 轉印膜以 PBST 洗三次，每次 10 min。

◆ 若用於篩選抗體效價 (titer)，則使用寬 0.3 cm 的長條轉印膜。

製備方法如下：

a. 製備 10% SDS-PAGE 之分離膠體，並於上方不使用齒梳，加鑄焦集膠體 (約 0.4 mL)。

b. 取 20 mg 病毒樣本以附錄 1.1.1 節方法進行電泳。

c. 接著以依附錄 1.1.4 方法進行轉印。並以附錄 1.1.5 方法確定病毒蛋白質確實轉印成功。

d. 將轉印膜小心切成寬 0.3 cm 長條。若不直接使用，待轉印膜完全乾燥置於 -20°C 儲存。

2) 加入適量的明膠-NET，反應 1 h。

3) 以明膠-NET 稀釋一次抗體，室溫下反應 1 h，或於 4°C 反應過夜。

◆ 若用於篩選融合瘤細胞株，則收集培養液上清液當作一次抗體，於 4°C 反應過夜。

4) 去除一次抗體，以 PBST 洗三次，每次 10 min。

5) 加入以明膠-NET稀釋至適當倍數的二次抗體 (HRP-GAM 2nd-Ab)，室溫下反應 1 h。

6) 去除二次抗體，以 PBST 洗五次，每次 5 min。最後保存在 PBS 中。

7) 加入 ECL 冷光基質完全蓋過轉印膜，置於冷光螢光攝像及顯像系統 (UVP AutoChemi System) 呈相。

若以 DAB 呈色，則在步驟 6) 後接下列步驟呈色：

➤ 加入 DAB，可在 5~30 min 呈色。若天冷可置於 37°C 烘箱增快反應；在背景顏色尚未變深前，倒去呈色劑，以蒸餾水清洗數次。