

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



新型 H7N9 流感病毒重組基質蛋白與非結構性蛋白  
之表現與純化

Expression and Purification of the Novel H7N9 Influenza A Virus  
Recombinant Matrix Proteins and Nonstructural Proteins

盧德釗

De-Chao Lu

指導教授：張世宗 博士

Advisor: Shih-Chung Chang, Ph.D.

中華民國 105 年 1 月

January 2016

# 目錄



摘要..... i

Abstract..... ii

縮寫表..... iii

第一章 緒論..... 1

    1.1 禽流感病毒簡介..... 1

        1.1.1 禽流感病毒的歷史..... 1

        1.1.2 流感病毒的分類..... 1

        1.1.3 流感病毒的構造與型態..... 2

        1.1.4 流感病毒的基因體..... 3

        1.1.5 流感病毒的蛋白質體..... 3

        1.1.6 流感病毒的生活史..... 4

    1.2 新型H7N9流感病毒簡介..... 5

        1.2.1 新型H7N9流感的爆發與流行病學..... 5

        1.2.2 新型H7N9病毒的親緣分析與序列特異性..... 6

    1.3 桿狀病毒表現系統..... 6

    1.4 研究動機與目的..... 7

第二章 材料與方法..... 8

    2.1 實驗材料..... 8

        2.1.1 大腸桿菌..... 8

        2.1.2 昆蟲細胞..... 8

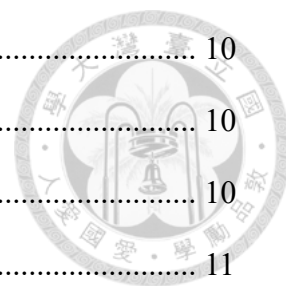
    2.2 表現載體之建構..... 8

        2.2.1 真核表現系統載體..... 8

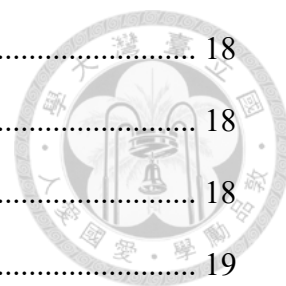
        2.2.2 核酸引子設計..... 9

        2.2.3 聚合酶鏈鎖反應..... 9


2.2.4 限制酶切反應.....	10
2.2.5 接合反應.....	10
2.2.6 轉型作用.....	10
2.2.7 重組載體之篩選.....	11
2.3 核酸實驗方法.....	11
2.3.1 質體DNA製備.....	11
2.3.2 洋菜膠體電泳.....	11
2.3.3 核酸純化.....	12
2.3.4 核酸定量.....	12
2.4 蛋白質實驗方法.....	12
2.4.1 蛋白質定量.....	12
2.4.2 蛋白質電泳法.....	12
2.4.3 蛋白質電泳膠片染色法.....	13
2.4.4 蛋白質電泳轉印法.....	13
2.4.5 免疫染色.....	14
2.5 細胞培養.....	14
2.5.1 昆蟲細胞培養.....	14
2.5.2 細胞解凍.....	14
2.5.3 細胞冷凍.....	14
2.6 桿狀病毒表現系統.....	15
2.6.1 質體轉型作用.....	15
2.6.2 重組 Bacmid 之純化.....	16
2.6.3 聚合酶鏈鎖反應檢驗.....	16
2.6.4 昆蟲細胞之轉染作用.....	17
2.6.5 病毒效價檢測.....	18



2.6.6 病毒最佳感染條件測試.....	18
2.6.7 重組蛋白之表現.....	18
2.7 重組蛋白之純化.....	18
2.8 多株抗體之製備.....	19
第三章 結果.....	20
3.1 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒表現載體之建構.....	20
3.2 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞之表現.....	20
3.3 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒液之病毒效價試驗.....	21
3.4 H7N9 M1、NS1 與 M2 重組蛋白質之表現條件測試.....	21
3.5 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之純化.....	22
3.6 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之多株抗體效價測試.....	23
第四章 討論.....	24
4.1 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質之表現探討.....	24
4.2 H7N9 M1、NS1 與 M2 重組蛋白質之表現條件探討.....	24
4.3 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之純化條件探討.....	24
4.4 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之多株抗體效價探討.....	25
參考文獻.....	26
表與圖.....	30
附錄.....	45



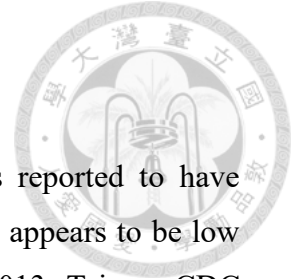
## 摘要



在 2013 年 3 月中國大陸爆發人感染 H7N9 禽流感病毒之疫情，此為全球首次低致病性 H7N9 禽流感病毒經基因重組引發高致病性人類感染。臺灣在同年 4 月出現首例境外移入病例，在其體內驗出具有克流感抗藥性的 H7N9 病毒。目前全球超過 600 位的確定病例，死亡率高達 40%。根據基因序列分析，發現此禽流感病毒對哺乳類宿主具有適應性。因此研發快速檢驗與治療所需之抗體非常重要。本論文研究目標為利用桿狀病毒表現系統，進行新型 H7N9 流感病毒的基質蛋白 M1、M2 與非結構性蛋白 NS1、NS2 重組蛋白質的生產，以提供基礎科學研究、抗體與疫苗研發之需求，有助於未來運用在流感病毒之監測與實驗診斷。本研究已將 M1、M2、NS1 與 NS2 基因分別選殖至 pFastBac HT A 載體，再轉型至 *E. coli* DH10Bac 中，以建立重組 Bacmid 載體。經轉染至 Sf21 昆蟲細胞後，已成功表現出 H7N9 流感病毒之 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質。進一步將取得之重組桿狀病毒液進行效價測定，並測試 M1、NS1 與 M2 之最佳表現條件，得出以 5 MOI 的病毒液，感染 Sf21 之懸浮細胞 5 天的表現條件為最佳。將 M1 與 NS1 藉由親和層析法進行純化，並以質譜儀確認純化後的 M1 與 NS1 重組蛋白質的序列與預測之序列相符。綜合上述結果，本研究已成功利用桿狀病毒與昆蟲細胞表現與量產新型 H7N9 流感病毒 M1 與 NS1 的重組蛋白質，並將其分別免疫 BALB/c 小鼠產生多株抗體。

關鍵字：新型 H7N9 流感病毒、基質蛋白、非結構性蛋白、桿狀病毒表現系統

## Abstract



In March 2013, a new avian influenza A(H7N9) virus was reported to have infected humans for the first time in China. The novel H7N9 virus appears to be low pathogenic in birds but highly pathogenic in humans. In April 2013, Taiwan CDC reported the first imported case of H7N9 infection from China, and the H7N9 virus variants isolated from this patient performs Tamiflu resistance. A total of 693 laboratory-confirmed H7N9 influenza infections with a mortality of 40% was reported by WHO in December 2015. Based on genetic analysis, this avian influenza A virus H7N9 shows some extent adaptation to mammalian hosts. Therefore, it is very important to develop rapid laboratory diagnostics, antibodies and vaccines for better pandemic preparedness. This study focused on production of recombinant matrix proteins M1, M2 and nonstructural proteins NS1, NS2 of the novel H7N9 influenza virus by using baculovirus expression system for generation of antibodies, laboratory diagnosis and virological surveillance in the future. The gene encoding M1, M2, NS1, or NS2 has been cloned into pFastBac HT A respectively, and then transformed to *E. coli* DH10Bac competent cells for construction of recombinant bacmids, which were subsequently tranfected to Sf21 insect cells for expressing H7N9 M1, M2, NS1 and NS2 recombinant proteins. A viral plaque assay was applied for measuring the titer of the baculoviral stock. The optimal expression conditions of M1, NS1 and M2 were determined as using 5 MOI to infect cells for 5 days. Recombinant M1 and NS1 proteins with a 6xHis tag were purified by affinity chromatography, and the identity was confirmed by mass spectrometry. The high-level production of the recombinant H7N9 M1 and NS1 proteins by baculovirus expression system was successful in the present study. The purified H7N9 M1 or NS1 proteins were used to immunize the BALB/c mice to produce polyclonal antibodies.

Keyword: Novel H7N9 influenza virus, Matrix protein, Nonstructural protein,  
Baculovirus expression system

## 縮寫表



縮寫	全名
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BSA	Bovine serum albumin
$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoethanol
CAPS	<i>N</i> -cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CBG	Coomassie brilliant blue G-250
CBR	Coomassie brilliant blue R-250
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidium bromide
EV	Extracellular virus
FBS	Fetal bovine serum
FPLC	Fast performance liquid chromatography
HA	Hemagglutinin
HPAI	Highly pathogenic avian influenza
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Lysogeny broth
M	Matrix protein
MOI	Multiplicity of infection
NA	Neuraminidase
NLS	Nuclear localization signal
NP	Nucleoprotein
NS	Nonstructural protein
OV	Occluded virus
PA	Polymerase acid protein
PB	Polymerase basic protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	Phosphate-buffered saline with Tween-20
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RNA	Ribonucleic acid



RNP	Ribonucleoprotein
SA	Sialic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAE buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
TEV protease	Tobacco Etch Virus protease
VLP	Virus like particle
WHO	World Health Organization
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

---

# 第一章 緒論



## 1.1 禽流感病毒簡介

### 1.1.1 禽流感病毒的歷史

家禽流行性感冒(avian influenza)的文獻，最早要追溯回西元 1878 年的義大利北部，由 Perroncito 記載雞群爆發嚴重的傳染性疾病，造成雞隻大量死亡，當時稱為雞瘟(fowl plague)。最初雞瘟與急性敗血的家禽霍亂(fowl cholera)產生混淆，而隨後於 1880 年由 Rivolta 與 Delprato 指出雞瘟的臨床與病理性質和家禽霍亂有很大的差異，並將其命名為 *Typhus exudatious gallinarum*。在 1901 年，Centanni 與 Savunzzi 確認雞瘟是由一種濾過性病毒所引起，但直到 1955 年才由 Schäfer 證實此病毒是 A 型流行性感冒病毒(type A influenza virus)。於 1981 年在第一屆禽流感國際研討會(International Symposium on Avian Influenza)中將雞瘟名稱正式更名為高致病性家禽流行性感冒(highly pathogenic avian influenza, HPAI) (Lupiani and Reddy, 2009)。

最早的人類流行性感冒全球性大流行是 1918 年爆發的西班牙流感(Spanish flu)，造成全世界高達五千萬至一億人死亡，平均死亡率大於 2.5%。隨後是 1957 年的亞洲流感(Asian flu)和 1968 年的香港流感(Hong Kong flu)，同樣造成嚴重的傷亡(Thomas and Noppenberger, 2007)。根據研究分析，1918 年西班牙流感的人類流感病毒 H1N1，其基因可能來自於禽流感病毒。1957 年的亞洲流感 H2N2，其 HA、NA 和 PB1 基因也來自於禽流感病毒，與人類流感病毒發生重組所致。而 1968 年的香港流感 H3N2，亦發現是禽流感病毒的 HA 和 PB1，與人類流感病毒 H2N2 產生重組所造成(Belshe, 2005)。因此，人類流行性感冒的全球大流行，經由人流感病毒或禽流感病毒的抗原漂變(antigenic drift)與其之間基因重組的抗原移變(antigenic shift)有十分密切的關係。1997 年在香港爆發高致病性禽流感 H5N1 感染人，才發現禽流感病毒可以直接跨越宿主屏障傳染給人，致死率超過 50% (Chan, 2002)。而 2013 年 3 月在中國大陸爆發人感染 H7N9 禽流感病毒之疫情，此為全球首次低致病性 H7N9 禽流感病毒經基因重組引發高致病性人類感染(Gao et al., 2013b)。由於流感病毒持續快速的演化與變異，對其基礎科學、公共衛生、病毒監測、疫苗開發與治療方法的研究迫切重要。

### 1.1.2 流感病毒的分類

流行性感冒病毒在分類學上是屬於正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)。正黏液病毒對紅血球表面的黏蛋白具有親和力，而使紅血球凝集(hemagglutination)的特性，具有分段的單股負向 RNA (single-stranded antisense RNA)，作為其基因體。流感病毒依核蛋白(nucleoprotein)或基質蛋白(matrix protein)的不同，可區分為 A、

B、C 三型，A 型流感病毒可感染人、哺乳類動物(如豬、馬)與鳥類；B 型流感病毒僅對人類致病；C 型流感冒病毒僅感染人和豬。A 型流感病毒依其病毒外套膜上的血球凝集素(hemagglutinin, HA)與神經胺酸酶(neuraminidase, NA)兩種醣蛋白(glycoprotein)可分為多種不同亞型，目前已發現 18 種 HA 亞型(H1-H18)與 11 種 NA 亞型(N1-N11) (Tong et al., 2013)。根據 1981 年世界衛生組織(World Health Organization, WHO)訂定的流感病毒命名規定，依照下列原則：

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

抗原型(A、B、C 型)/宿主來源/分離地區/病毒編號/分離年代 (亞型)，  
宿主若為人則省略訊息。

以本論文所使用的病毒株為例：

A/Taiwan/1/2013 (H7N9) 指的是

A 型流感病毒，宿主為人，分離自台灣，病毒株編號 1，分離於 2013 年，亞型 H7N9。

### 1.1.3 流感病毒的構造與型態

流感病毒在電子顯微鏡下呈現球狀或絲狀，呈現球狀的流感病毒，直徑大小約在 80~120 nm；若呈現絲狀的病毒，長度可達 400 nm (Couch, 1996)。流感病毒的結構由外而內可分為外套膜、基質蛋白與核心三部分(Nelson and Holmes, 2007)。

#### 外套膜(envelope)

外套膜為包裹於病毒顆粒表面的雙層磷脂質(phospholipid bilayer)，這層膜來自於宿主細胞的細胞膜。病毒外套膜上鑲嵌有兩種醣蛋白，分別是血球凝集素與神經胺酸酶，由於突出病毒體外，被稱為棘突蛋白質(spike protein) (Nelson and Holmes, 2007)。

#### 基質蛋白(matrix protein)

基質蛋白包含兩種，第一型基質蛋白(matrix protein 1, M1)構成病毒外殼骨架，與病毒外套膜內側緊密結合，具有保護病毒內部核心與維持病毒空間結構的功能；第二型基質蛋白(matrix protein 2, M2)，是位在病毒外套膜上穿膜的氫離子通道蛋白(proton channel)，將氫離子運送至病毒內部，幫助病毒脫去外殼(Nelson and Holmes, 2007)。

#### 核心(core)

病毒的內部核心包含了攜帶病毒遺傳訊息的 8 段單股負向 RNA，分別緊密纏繞於核蛋白(nucleoprotein, NP)上，與轉錄遺傳訊息的 RNA 聚合酶(RNA polymerase)結合，形成病毒核醣核蛋白複合體(ribonucleoprotein complex, RNP) (Nelson and Holmes, 2007)。

#### 1.1.4 流感病毒的基因體

A 型流感病毒的基因體是由 8 段單股負向 RNA 所組成，每段基因編譯出不同的蛋白質：第一段基因編碼 RNA 次單元聚合酶 PB2 (polymerase basic protein 2)；第二段基因編碼 RNA 次單元聚合酶 PB1 (polymerase basic protein 1)；第三段基因編碼 RNA 次單元聚合酶 PA (polymerase acid protein)；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(nonstructural protein, NS1 and NS2) (Nelson and Holmes, 2007)。

流感病毒 8 段基因可轉譯成 11 種蛋白質，其中第七段與第八段基因，因為具有兩個不同的開放閱讀框架(open reading frame)，各可以轉譯出兩種蛋白質。近年來所發現的病毒蛋白質 PB1-F2，是由 PB1 基因的選擇性閱讀框架讀架(alternative reading frame)所產生的(Nelson and Holmes, 2007)。

#### 1.1.5 流感病毒的蛋白質體

##### RNA 聚合酶(RNA polymerase)

RNA 聚合酶異構三聚體是由 PA、PB1 與 PB2 三個聚合酶次單元體構成的 RNA-dependent RNA polymerase，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，負責在宿主細胞內進行病毒 RNA 的轉錄(vRNA→vmRNA)與複製(vRNA→cRNA→vRNA)。PB2 辨識並利用宿主 mRNA 的 5' cap，作為引子；PB1 負責延長由 PB2 啟始轉錄的 RNA，且具有內切酶的功能；PA 具有蛋白酶(protease)的活性(Obayashi et al., 2008)。

##### 核蛋白(nucleoprotein, NP)

核蛋白是 RNA 結合蛋白質(RNA binding protein)，與病毒 RNA 和 RNA 聚合酶形成核糖核蛋白複合體(RNP)，具有細胞核定位訊號(nuclear localization signals, NLS)，可協助病毒 RNP 進入宿主細胞核中(Eisfeld et al., 2015)。

##### 血球凝集素(hemagglutinin, HA)

血球凝集素是在病毒外套膜上的三聚體糖蛋白，能與動物的紅血球表面的受體結合，引起凝血反應，故命名之。原態的血球凝集素(HA0)經宿主細胞的蛋白酶切後，分成 HA1 和 HA2，兩者以雙硫鍵連結，前者可以與宿主細胞膜上的唾液酸受體結合，後者則協助病毒外套膜與宿主細胞膜相互融合，所以血球凝集素在病毒進入宿主細胞的過程中扮演重要角色(Webster and Rott, 1987)。

##### 神經胺酸酶(neuraminidase, NA)

神經胺酸酶是在病毒外套膜上的四聚體糖蛋白，當成熟的病毒以出芽

(budding)釋出時，藉由神經胺酸酶水解唾液酸(sialic acid)，破壞血球凝集素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)。

#### 基質蛋白(matrix protein, M)

病毒第七段基因編碼的基質蛋白 M 具有兩個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)與第二型基質蛋白(matrix protein 2, M2)。M1 是病毒中含量最多的蛋白質，構成病毒外殼骨架，連接病毒外套膜與 RNP，保護病毒內部核心與維持病毒空間結構(Noton et al., 2007)。M2 會組成四聚體，在病毒外套膜上形成離子通道，當病毒進入宿主細胞時，M2 會使氫離子送入內涵體內部，導致 pH 降低，使得病毒脫去外套膜，將核心內的 RNP 釋放到細胞質中，並轉運至細胞核內進行病毒 RNA 的轉譯與複製(Stouffer et al., 2008)。

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

病毒第八段基因編碼的非結構性蛋白 NS 具有兩個不同的開放閱讀框架，可分別轉譯出第一型非結構性蛋白(nonstructural protein 1, NS1)與第二型非結構性蛋白(nonstructural protein 2, NS2)。NS1 會抑制細胞 mRNA 聚腺苷酸化與離開細胞核，促使病毒 RNA 進入細胞質中進行轉譯，也會抑制宿主細胞的干擾素反應(Hale et al., 2008)。NS2 又稱為 NEP (nuclear export protein)，一般認為會促進病毒新合成的 RNP 離開細胞核(Shimizu et al., 2011)。

### 1.1.6 流感病毒的生活史

流感病毒的生活史(life cycle) (Medina and Garcia-Sastre, 2011)。

#### 吸附(virus attachment)

流感病毒藉由血球凝集素表面分子，辨識宿主細胞膜上表面醣蛋白或醣脂的唾液酸，與其結合並吸附宿主細胞。一般而言，禽流感病毒以  $\alpha$ -2,3 的方式與禽類宿主細胞表面受體形成 N-acetylneuraminyl-galactose (SA- $\alpha$ -2,3-Gal)，而人流感病毒以  $\alpha$ -2,6 的方式與人類宿主細胞表面受體形成 N-acetylneuraminyl-galactose (SA- $\alpha$ -2,6-Gal) (Shinya et al., 2006)。

#### 進入(virus entry)

病毒吸附後，經由 Calathrin 的受體媒介內吞作用(clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis)進入宿主細胞，形成內涵體(endosome) (Lakadamyali et al., 2004)。

#### 脫殼(uncoating)

當病毒進入宿主細胞內的內涵體時，病毒外套膜上的離子通道 M2 會活化，將氫離子送入內涵體內部，導致 pH 降低，干擾 M1 與 RNP 間的交互作用，並使 HA 結構改變，促使內涵體與病毒外套膜進行融合，讓病毒脫去外套膜，將核心

內的 RNP 釋放到細胞質中，藉由 NLS 運送至細胞核內進行病毒 RNA 的轉譯與複製(Medina and Garcia-Sastre, 2011)。

#### 複製(replication)

RNP 送入細胞核後，藉由病毒的 RNA 聚合酶複合體進行轉錄合成病毒 mRNA，為轉譯病毒結構蛋白所需，並複製病毒的基因組 vRNA。首先 PB2 利用宿主 mRNA 的 5' cap 作為引子，接著 PB1 開始進行 RNA 的轉錄與延長(Medina and Garcia-Sastre, 2011)。

#### 組裝(assembly)

各種病毒蛋白質轉譯完成後，HA、NA 與 M2 會送至內質網進行醣基化作用(glycosylation)修飾，再嵌入宿主細胞膜上。PA、PB1、PB2 和 NP 會送回細胞核內，與複製完成的病毒 RNA 結合成新生的 RNP，經由 M1 協助移動到細胞膜，組裝成病毒顆粒(Medina and Garcia-Sastre, 2011)。

#### 釋放(release)

組裝完成的病毒顆粒，經由出芽(budding)的方式釋放到細胞外，並將嵌有 HA、NA 與 M2 的細胞膜作為病毒的外套膜，過程中 NA 會水解唾液酸，破壞 HA 與宿主細胞唾液酸受體的結合，使宿主細胞可以釋放病毒顆粒(Medina and Garcia-Sastre, 2011)。

## 1.2 新型 H7N9 流感病毒簡介

### 1.2.1 新型 H7N9 流感的爆發與流行病學

流行性感冒(influenza)是由流感病毒(influenza virus)所引起高度傳染力的急性呼吸道疾病，主要藉由飛沫傳播感染宿主呼吸道。患者病發初期常會有發燒、頭痛、咳嗽、喉嚨痛、鼻炎、肌肉痠痛和疲倦等。重症者快速發展成嚴重肺炎，可能併發急性呼吸窘迫、敗血性休克及多重器官衰竭而死亡。2013 年 3 月中國大陸東部沿海爆發人感染 A 型 H7N9 禽流感病毒之疫情，此為全球首次低致病性 H7N9 禽流感病毒引發人類流行與高致死率。臺灣行政院衛生福利部於同年 4 月宣布首例確診為 H7N9 境外移入之病例，並驗出其體內具有抗藥性之 H7N9 病毒(Chang et al., 2013)，截至目前為止臺灣共有 4 名病例。至 2015 年 12 月止，全球共 693 位的確定病例，其中有 277 例的死亡，致死率高達 40% (Tanner et al., 2015)。根據流行病學統計，追查其主要感染源發現有超過 80% 確診病例與活禽或家禽市場接觸過，並出現 4 起家庭群聚案例(Li et al., 2014)。在世界衛生組織的監測報告中顯示，從 2013 年起每年到了冬季開始進入 H7N9 流感流行高峰，一直持續到次年春季結束(Wang et al., 2015)。當 H7N9 流感病毒感染時，會誘導免疫細胞大量產生細胞激素(cytokines)，促使嚴重的發炎反應(inflammatory response)，導致病人發展成嚴重肺炎(severe pneumonia)與急性呼吸窘迫症候群

(acute respiratory distress syndrome, ARDS) (Gao et al., 2013a)。

### 1.2.2 新型 H7N9 病毒的親緣分析與序列特異性

新型 H7N9 禽流感病毒藉由基因親源分析發現，是之前從未出現過經由基因重組的新病毒，其 8 段基因來源不同，H7 片段源於浙江鴨流感病毒 H7N3，N9 片段近似韓國野鳥的禽流感病毒 H7N9，其餘 6 個基因片段來自於 H9N2 禽流感病毒(Gao et al., 2013b)。由於病毒特性與其基因突變有所關連，已有報導指出新型 H7N9 禽流感病毒，HA 與受體結合位的第 226 胺基酸由 Q 突變為 L，與人的感染有關；NA 的第 294 胺基酸由 R 突變為 K，則會對克流感(oseltamivir)有抗藥性；M1 胺基酸序列若產生 N30D 與 T215A 的突變，會增強病毒的致病性；M2 胺基酸序列若產生 S31N 的突變，會對 Amantadine 具有抗藥性；NS1 胺基酸序列 P42S 的突變，會使病毒對小鼠的病原性增強，而 I106M 的突變會增強與 CPSF30 (cleavage and polyadenylation specificity factor 30)結合力，抑制宿主基因的表現(Ayllon et al., 2014)；PB2 胺基酸序列若有 E627K 與 D701N 的突變，病毒對小鼠有較高的適應能力(Li et al., 2013)。H7N9 病毒對於禽類呼吸道表面受器  $\alpha$ -2,3-linked sialic acid ( $\alpha$ -2,3-SA)與哺乳類呼吸道表面受器  $\alpha$ -2,6-linked sialic acid ( $\alpha$ -2,6-SA)皆具有親和性，研究發現 H7N9 病毒 HA 的 Q226L 與 G186V 突變，可以增加與  $\alpha$ -2,6-SA 受器的結合能力，進而感染人類(Belser et al., 2013)。也有研究指出 Q226L 可能使病毒具有透過空氣傳播的能力(Zhang et al., 2013)。傳染性的研究發現，H7N9 病毒已經可以在雪貂與小鼠之間傳染(Belser et al., 2013)，顯示病毒已開始適應哺乳類的宿主。自 H7N9 暴發以來，目前世界各國積極對其研究與開發抗體及疫苗，已有報導利用 H7N9 HA、NA 與 M1 所形成的類病毒顆粒(virus like particle, VLP)做成疫苗，成功誘導小鼠產生抗病毒抗體(Smith et al., 2013)。也有研究將 NP-M1-HSP60 重組蛋白作為疫苗免疫小鼠，可以保護 H7N9 感染的小鼠免於死亡(Yang et al., 2014)。

## 1.3 桿狀病毒表現系統

桿狀病毒表現系統(baculovirus expression system)是一種快速且有效率的方法表現與生產各種來源的重組蛋白質，在 1984 年由 Smith 與 Summers 所建立。桿狀病毒的宿主是昆蟲，主要感染鱗翅目(Lepidoptera)，對宿主感染具有高度的專一性，尚未發現非無脊椎動物的宿主。桿狀病毒的基因體是雙股環狀超螺旋 DNA 所組成，大小約為 80~200 kb，被包覆在鞘蛋白(capsid protein)所構成的桿狀核殼(nucleocapsid)中，其外再覆以磷酸蛋白的外套膜，形成外型呈桿狀的病毒顆粒，長度約為 250~300 nm，寬度約為 30~60 nm。桿狀病毒的感染生活史可分為二個不同的階段，在早期階段，利用出芽的方式釋放病毒，稱為 Extracellular virus (EV)，包含細胞膜外套膜與 gp64 幫助病毒胞吞進入細胞；在晚期階段，病

毒會大量表現多角體蛋白(polyhedrin)，在細胞核內組裝病毒顆粒，稱為 Occluded virus (OV)，形成明顯的包涵體(occlusion body)或稱多角體(polyhedral inclusion body)。目前桿狀病毒表現系統最常用的桿狀病毒 DNA 是由 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)與 *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV)發展而來，將目標重組基因取代其基因體中多角體蛋白基因，利用 polyhedrin 與 p10 啟動子在昆蟲細胞中大量表現外源基因與生產重組桿狀病毒，產量可以達到細胞蛋白質總量的 25~50%。桿狀病毒表現系統的優點：對人體無害具有安全性，技術簡單且容易操作可插入大片段的外源基因，可以同時表現多種蛋白質，重組蛋白質具有高表現量，容易放大生產蛋白質，蛋白質可以被轉譯後修飾且具有生物活性(King, 2012)。

流感病毒的宿主是哺乳類或鳥類的真核細胞，其蛋白質具有轉譯後修飾而有活性，而常見的原核大腸桿菌表現系統無轉譯後修飾，酵母菌表現系統的轉譯後修飾正確性低。已有利用桿狀病毒表現系統成功表現出流感病毒重組蛋白的報導(Margine et al., 2013)，故選用桿狀病毒表現系統作為本實驗生產重組蛋白質的方式。

## 1.4 研究動機與目的

流行性感官是最具全球大流行潛力的病毒傳染病之一，其中 A 型流感病毒感染宿主範圍廣泛(哺乳類與鳥類)，其 HA 與 NA 具有多種亞型，且經由基因重組的抗原移變與基因突變的抗原漂變，可以產生多元的新型流感病毒而造成全球大流行。在 2013 年 3 月全球首次出現低致病性 H7N9 禽流感病毒經基因重組而感染人的病例，導致重症的病程急速惡化與高致死率，而病例無禽類接觸史的比率增加。臺灣在同年 4 月首例境外移入病例的 H7N9 病毒具有克流感的抗藥性，發現其病毒蛋白也有增加傳染力與適應性的胺基酸突變。為維護國人健康與防止疫情發生，因此對其基礎科學、公共衛生、病毒監測、疫苗開發與治療方法的研究十分重要。

本論文研究目標為利用桿狀病毒與昆蟲細胞表現系統，製備新型 H7N9 流感病毒的基質蛋白 M1、M2 與非結構性蛋白 NS1、NS2。本實驗成功利用桿狀病毒表現系統進行 H7N9 重組蛋白質的生產，並進一步以管柱層析法來純化，以提供基礎科學研究、抗體與疫苗研發之需求，有助於未來運用在流感病毒之監測與實驗診斷。

## 第二章 材料與方法



### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 大腸桿菌(*Escherichia coli*)

##### *E. coli* DH5 $\alpha$

普遍使用於基因選殖與保存之大腸桿菌菌種，其基因型經過多種重組與轉化，具有高轉型效率，可以大量複製質體 DNA 並穩定的保存於細胞中。endA1 突變會減少核酸內切酶(endonuclease)對質體 DNA 的降解，增加轉型效率與質體 DNA 的產量與品質。recA1 會降低 DNA 的同源重組，穩定插入之外源基因。*lacZ* $\Delta$ M15 是 *lacZ* 的缺失突變，當轉殖入含有 *lacZ* $\alpha$  基因的載體時，利用 IPTG 誘導表現  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)，在含有 X-gal 的培養盤上進行藍白篩選(blue-white screen)。

##### *E. coli* DH10Bac<sup>TM</sup>

在桿狀病毒表現系統中使用於生產重組桿狀病毒質體(bacmid)，含有桿狀病毒穿梭載體(baculovirus shuttle vector)與輔助質體(helper plasmid)。藉由輔助質體表現的轉位酶(transposase)提供 Tn7 轉位作用(transposition)的功能，將 pFastBac 質體(pFastBac<sup>TM</sup> donor plasmid)的目標基因轉位至桿狀病毒質體中，將其轉染到昆蟲細胞中，可表現生產重組桿狀病毒與蛋白質。

#### 2.1.2 昆蟲細胞

Sf21 源自於鱗翅目(Lepidoptera)秋行軍蟲(*Spodoptera frugiperda*, Fall Army worm)的卵巢細胞株。通常利用重組桿狀病毒感染 Sf21 昆蟲細胞進而生產重組蛋白質。Sf21 昆蟲細胞以含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum)的 Grace's Insect Medium 或無血清培養基 Sf-900<sup>TM</sup> II SFM 培養，並置於 27°C 恆溫培養箱內生長，可以單層貼附培養亦或懸浮培養，細胞的倍增時間為 24~30 小時。

### 2.2 表現載體之建構

#### 2.2.1 真核表現系統載體

本論文中所選殖的基因為新型 H7N9 流感病毒的 M1、M2、NS1 和 NS2，其基因片段是由國立臺灣大學醫學院張淑媛老師提供，來源是從臺灣第一例境外移入且痊癒之臺商體內分離得到的 H7N9 病毒株。將此四個基因重新選殖至 pFastBac<sup>TM</sup> HT A 內，以利於在桿狀病毒表現系統中使用。pFastBac<sup>TM</sup> HT A 在選殖基因的 N 端會有 6×His-tag 與 TEV 蛋白酶切位(TEV protease cleavage site)，有

助於後續純化與去除 His-tag。其上游具有完整的多角體啟動子(polyhedrin promoter)，可增加重組蛋白質的表現量。



### 2.2.2 核酸引子設計

從 NCBI 資料庫取得 H7N9 流感病毒的 M1、M2、NS1 和 NS2 核酸序列資料(附錄圖一)，分別對其設計一對專一性引子(primer)，並在 Forward 端與 Reverse 端加上特定的限制酶(restriction enzymes)切位(附錄表一)。

### 2.2.3 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶鏈鎖反應是一種快速大量增殖特定 DNA 片段的分子生物學技術。本論文使用 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)放大目標基因序列，依據下表添加實驗材料於微量離心管中，混合均勻後短暫離心。

Component	Volume (μL)	Final conc. (μM)
Template DNA (100 ng)	1	
10 μM Forward primer	2.5	0.5
10 μM Reverse primer	2.5	0.5
10 mM dNTPs	1	200
5X Phusion HF Buffer	10	
Phusion DNA Polymerase	0.5	
ddH <sub>2</sub> O	32.5	
Total	50	

將反應原料混合之微量離心管置於核酸增殖器(PCR machine) (Biometra, Germany)中進行反應。PCR 反應程序如下表所示。反應完成後純化目標 DNA 片段。

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	10 s	35
Annealing	55°C	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Final Extension	72°C	10 min	1
Storage	4°C	Hold	

### 2.2.4 限制酶切反應(Restriction Enzyme Digestion)

限制酶是一種對核酸序列具有專一性的核酸內切酶，能辨識核酸序列中特定的迴文序列(palindrome sequence)，將雙股 DNA 切斷在核糖與磷酸之間形成缺口，可產生單股 DNA 突出的黏狀末端(sticky end)與平整的平滑末端(blunt end)。將表現載體與基因片段利用限制酶反應，再經由 DNA 連接酶(DNA ligase)將二者黏合，常用於 DNA 重組技術。本論文使用 New England Biolabs®限制酶(New England Biolabs, USA)進行反應(附錄表二)，依據下表添加實驗材料於微量離心管中，混合均勻後短暫離心，置於 37°C 反應 12 小時。反應完成後利用洋菜膠電泳分析 DNA，再進行切膠萃取目標 DNA 片段。

Reagent	Volume ( $\mu\text{L}$ )
DNA (5 $\mu\text{g}$ )	X
10X NEBuffer	5
NEB® Restriction Enzyme	1
ddH <sub>2</sub> O	44-X
Total	50

### 2.2.5 接合反應(Ligation)

DNA 連接酶會催化兩條 DNA 片段之間 5'端磷酸根(5' phosphate)與 3'端羥基(3' hydroxyl)生成磷酸雙脂鍵(phosphodiester bond)而相互黏合，需要 ATP 作為輔因子。本論文使用 T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, USA)進行反應，以 Vector: Insert = 1 : 5 之莫耳數比例混合，DNA 總量為 200 ng，依據下表添加實驗材料於微量離心管中，混合均勻後短暫離心，置於 22°C 反應 1 小時。

Reagent	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Linear vector DNA	X
Insert DNA	Y
10X T4 DNA Ligase Buffer	2
T4 DNA Ligase	1
ddH <sub>2</sub> O	17-(X+Y)
Total	20

### 2.2.6 轉型作用(Transformation)

將目標基因建構完成之 pFastBac™ HTA 載體經由轉型作用轉入大腸桿菌中，藉由宿主細胞的系統複製質體 DNA，並利用質體上的 Ampicillin 抗性基因進行

單一菌落的篩選。自 $-80^{\circ}\text{C}$ 取出  $50\ \mu\text{L}$  *E. coli* DH5 $\alpha$  勝任細胞(competent cell)置於冰上解凍，加入  $10\ \mu\text{L}$  Ligation product 冰浴 20 分鐘後，於  $42^{\circ}\text{C}$  的乾浴槽內進行熱休克反應(hot shock)90 秒，再置於冰上 2 分鐘。加入  $200\ \mu\text{L}$  LB 培養液(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)於  $37^{\circ}\text{C}$ 、轉速 150 rpm 震盪培養 1 小時後，取出  $100\ \mu\text{L}$  菌液均勻塗佈在 LB 培養盤( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin)上，於  $37^{\circ}\text{C}$  培養 16 小時。

### 2.2.7 重組載體之篩選

挑選培養盤上的單一菌落置於 LB 培養液( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin)進行隔夜培養，分離細胞內的質體 DNA，進行 DNA 膠體電泳分析。藉由聚合酶鏈鎖反應利用載體上設計的引子複製質體 DNA；或限制酶切反應利用對應的限制酶作用質體 DNA 後，進行 DNA 膠體電泳與核酸定序比對確認目標基因有接入 pFastBac<sup>TM</sup> HTA 載體上。

## 2.3 核酸實驗方法

### 2.3.1 質體 DNA 製備(plasmid miniprep)

本論文使用 Mini Plus<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System (Viogene, Taiwan)製備質體 DNA。其原理是根據 Brinboim 和 Doly 所研發的鹼裂解法(alkaline lysis method)，利用 SDS 與 NaOH 分解大腸桿菌，並使蛋白質與 DNA 變性，再以酸中和使小分子 DNA 得以復性，而大部分的大腸桿菌染色體 DNA 無法恢復原態與 SDS- $\text{K}^+$ 形成複合物沉澱，經由離心所得之上清液含有質體 DNA，以 Silica-based membrane spin column 吸附 DNA，再以 70%酒精清洗後，用無菌水回溶收集。

### 2.3.2 洋菜膠體電泳(Agarose Gel Electrophoresis)

核酸分子帶負電荷，在電場中會由負極往正極移動，利用洋菜膠作為 DNA 分子的電泳膠體，可依據分子大小分離 DNA，分子越大則泳動率越慢。Agarose 的濃度影響膠體的孔隙大小，特定大小的 DNA 片段在不同濃度的膠體中移動速率均不相同，故須與標準分子量的 DNA marker 進行比對。核酸在膠體中可經由 Ethidium bromide (EtBr)對其染色，三環平面結構的 EtBr 會嵌入核酸分子的鹼基對之間，當核酸吸收紫外光後，再經由 EtBr 放出橙色螢光，藉此觀察核酸的位置。將 Agarose (Invitrogen, USA)粉末加入 TAE 電泳緩衝溶液(Thermo Scientific, USA)中加熱溶解，稍待冷卻後加入 EtBr ( $0.05\ \mu\text{L}/\text{mL}$ ) (Sigma, USA)，混合均勻後倒入鑄膠膜插上齒梳，靜置室溫凝膠製成 0.8~1% (w/v)的洋菜膠體。將膠體置於

含有 TAE 電泳緩衝溶液的電泳槽(Mupid, Japan)中，DNA 樣本與 DNA loading dye (Thermo Scientific, USA)混合均勻後加到樣本槽中，以 150 V 進行電泳，藉由 BioDoc-It<sup>®</sup> Imaging System (UVP, USA)觀察 DNA 位置與大小。



### 2.3.3 核酸純化(DNA Extraction)

本論文使用 Viogene<sup>®</sup> Gel/PCR DNA Isolation System (Viogene, Taiwan)純化膠體中的 DNA 片段或 PCR product。將含有目標 DNA 片段的膠體用刀片切下放入微量離心管中，加入 500  $\mu$ L 的 DF buffer，置於 50°C 的乾浴槽中完全溶解，待冷卻至室溫，利用 Silica-based membrane spin column 吸附 DNA，藉由離心過濾清洗再用無菌水回溶收集純化的 DNA 片段。

### 2.3.4 核酸定量

核酸分子會吸收波長 260 nm 的紫外光，使用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)進行 DNA 定量分析，以無菌水作為 Blank，測定樣本 DNA 的濃度與純度，記錄  $A_{260}/A_{280}$  數值介於 1.8~2.0 表示純度正常。

## 2.4 蛋白質實驗方法

### 2.4.1 蛋白質定量

本論文使用 Bradford protein assay (Bradford, 1976)測定蛋白質濃度，此方法是利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG)染劑，藉疏水性與離子作用力與蛋白質結合，由酸性下的棕色變成藍色。將 5  $\mu$ L 樣本蛋白質或 BSA 蛋白質標準品 (bovine serum albumin protein standard)加至酵素免疫分析盤 (enzyme-linked immunoassay plate, ELISA plate)上，加入 200  $\mu$ L Protein assay dye reagent (Bio-Rad, USA)，混合均勻後室溫靜置 5 分鐘，以酵素免疫分析儀 (Thermo Scientific<sup>™</sup> Multiskan<sup>™</sup> FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, USA)測定波長 595 nm 的吸光值，用已知濃度的 BSA 蛋白質標準品對  $A_{595}$  吸光值製作標準曲線作為蛋白質濃度的測定依據。

### 2.4.2 蛋白質電泳法

蛋白質分子依其帶電性、分子量與分子形狀差異在膠體電泳中產生不同的泳動率而彼此分離，本論文使用 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)膠體電泳分離與分析蛋白質，在此系統中會加入界面活性劑 (detergent) SDS 使蛋白質變性且在其表面均勻附上負電荷，因此可以忽略蛋白質

的帶電性與分子形狀對泳動率的影響，在電場中會由負極往正極移動，用以分析蛋白質的分子量大小。蛋白質樣本會加入 Sample buffer (125 mM Tris-HCl, 0.1 M DTT, 2% SDS, 12.5% Glycerol, 0.01% Bromophenol blue)於乾浴槽中加熱至 95°C 反應 10 分鐘，使蛋白質變性與 SDS 結合，還原劑  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)或 Dithiothreitol (DTT)會打斷蛋白質分子內或分子間的雙硫鍵(disulfide bond)，使用 16% 聚丙烯醯胺膠體(依據下表製作)與 SDS 電泳緩衝溶液(90 mM Tris-HCl, 80mM Boric acid, 2.5 mM EDTA, pH8.4)於電泳槽(Amersham Biosciences, USA)以 170 V 進行電泳。

Buffer (mL)	Resolving gel	Stacking gel
	16%	4%
<b>A</b>	4	0.5
<b>B</b>	2.5	—
<b>C</b>	—	1.24
<b>10% SDS</b>	0.1	0.05
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3.3	3.11
<b>APS</b>	0.1	0.1
<b>Total</b>	10	5

A buffer: 40% Acrylamide

B buffer: 1.5 M Tris-HCl, 0.36% TEMED, pH 8.8

C buffer: 0.5 M Tris-HCl, 0.4% TEMED, pH 6.8

APS: 10% Ammonium persulfate

### 2.4.3 蛋白質電泳膠片染色法

本論文使用 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR)進行蛋白質染色。CBR 的芳香族苯環會與蛋白質的疏水性區結合，其分子中的亞硫酸根( $\text{SO}_3^{2-}$ )亦會與蛋白質中帶正電荷的胺基酸相互吸引，使蛋白質呈現藍色的色帶。將完成電泳的蛋白質膠片以 CBR 染色液(0.15% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% Acetic acid, 50% Methanol)搖晃浸泡 15 分鐘後，用脫色液(10% acetic acid, 20% methanol)脫色背景至澄清。

### 2.4.4 蛋白質電泳轉印法

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 是一種疏水性材質，蛋白質可藉由其疏水性區域與之結合，將電泳膠片上的蛋白質用 CAPS 轉印緩衝溶液(10 mM CAPS, 15% Methanol, pH11)於轉印槽(Amersham Biosciences, USA)以 400 mA 轉印至 PVDF membrane (EMD Millipore, USA)上，用於後續的酵素免疫染色。

### 2.4.5 免疫染色法(Western Blotting)

將電泳後轉印至 PVDF membrane 上的蛋白質以專一性抗體對特定蛋白質進行辨識，再利用抗體上連接的酵素如 Horseradish peroxidase (HRP)與基質  $H_2O_2$  進行反應而呈色。將完成轉印的 PVDF membrane 以 PBST (0.13 M NaCl, 0.01 M  $NaH_2PO_4$ , 0.05% Tween 20, pH7.0)稀釋成 0.5% 脫脂牛奶(0.5% skim milk in PBST) Blocking 30 分鐘，用 PBST 洗 3 次 10 分鐘後，以 Gelatin-NET (0.25% Gelatin, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.05% Tween 20, pH8.0) 1:2000 稀釋 anti-Histidine tag antibody (Product code: MCA1396, Bio-Rad, USA)或 anti- $\alpha$ -Tubulin antibody (Product number: T6074, Sigma, USA)搖晃反應 1 小時，用 PBST 洗 3 次 10 分鐘後，以 Gelatin-NET 1:5000 稀釋 Peroxidase-labeled anti-Mouse IgG (Catalog number: 474-1806, KPL, USA)搖晃反應 1 小時，用 PBST 洗 3 次 10 分鐘後，加入 ECL(enhanced chemiluminescence)化學冷光呈色劑(Visual Protein, Taiwan)，藉由 BioSpectrum<sup>®</sup> Imaging System (UVP, USA)觀察特定蛋白質位置與大小。

## 2.5 細胞培養

### 2.5.1 昆蟲細胞培養

Sf21 昆蟲細胞在含有 10%胎牛血清(GeneDireX, USA)的 Grace's Insect Medium (Gibco, USA)或無血清培養基 Sf-900<sup>™</sup> II SFM (Gibco, USA)中置於 27°C 恆溫培養箱內生長，可以單層貼附培養亦或懸浮培養，懸浮培養時需加入 Pluronic<sup>®</sup> F-68 (Gibco, USA)保護細胞不受剪切力傷害，細胞的倍增時間為 24~30 小時，以 1:5 的比例進行繼代培養(subculture)。

### 2.5.2 細胞解凍

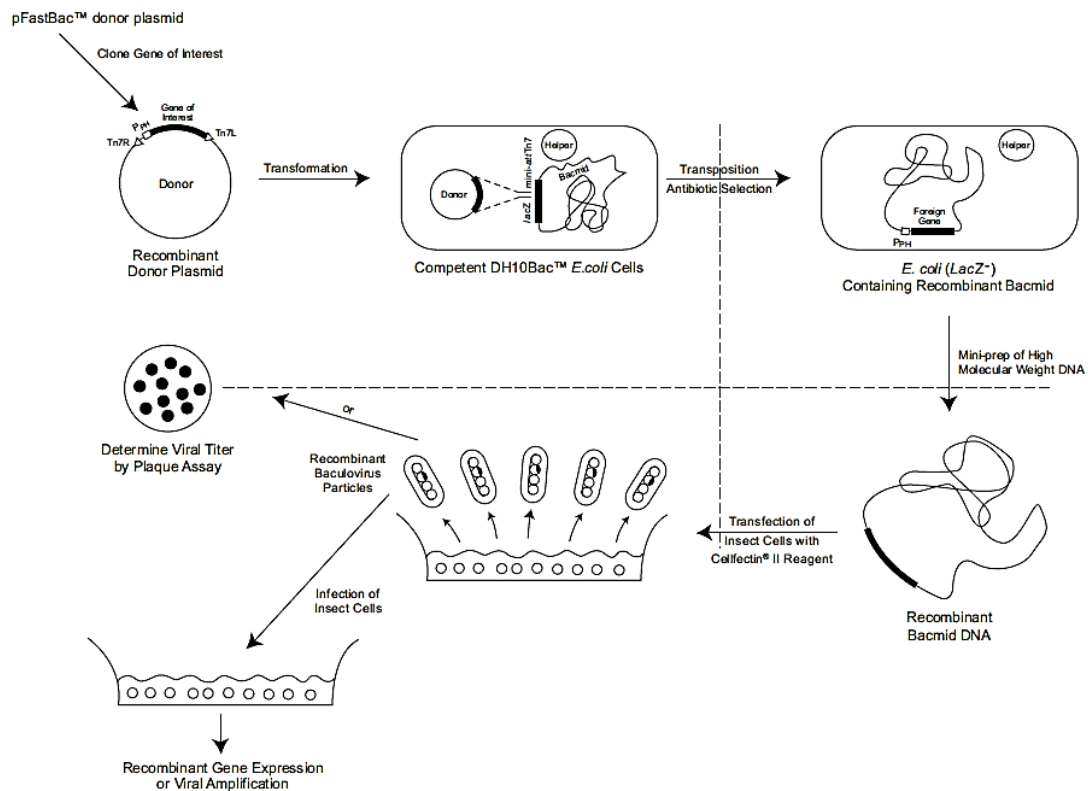
自-80°C 取出細胞冷凍管置於冰上，快速放入 37°C 水浴中解凍 1 分鐘，將細胞液取出加入至 10 mL 培養基，以 300g 離心 10 分鐘，倒掉上清液去除 DMSO (dimethyl sulfoxide)。加入 15 mL 培養基回溶細胞團塊，取出加到 T-75 flask (GeneDireX, USA)貼附培養，隔日吸除細胞培養液，加入 15 mL 新鮮的培養基進行培養。

### 2.5.3 細胞冷凍(Cryopreservation)

配置 5% DMSO 的培養基細胞凍存液，將健康且生長旺盛的細胞以 300g 離心 10 分鐘，去除上清液，加入細胞凍存液回溶細胞團塊，取出 1 mL 加到細胞冷凍管中置於冰上，最後放入-80°C 或液態氮中長期保存。

## 2.6 桿狀病毒表現系統

本論文使用 Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System (Invitrogen, USA)，可快速且有效地生產重組桿狀病毒，其原理是利用 Tn7 轉位子(transposon)專一性位置轉位作用(site-specific transposition)的特性產生重組 Bacmid DNA。將目標基因選殖至 pFastBac<sup>™</sup> 載體內，基因表現會受到 *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) polyhedrin (PH) promoter 的調控，在昆蟲細胞中大量表現。將 pFastBac<sup>™</sup> 表現質體轉型入 DH10Bac<sup>™</sup>，藉由輔助質體表現的轉位酶將目標基因片段轉位至 Bacmid 中。將重組 Bacmid DNA 轉染到昆蟲細胞中，可生產重組桿狀病毒。放大並獲得高效價的桿狀病毒液，用於感染昆蟲細胞，進而大量表現目標重組蛋白質。



(Figure from Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System, Invitrogen)

### 2.6.1 質體轉型作用

將目標基因建構完成之 pFastBac<sup>™</sup> HT A 載體經由轉型作用轉入 *E. coli* DH10Bac<sup>™</sup> 中，藉由轉位作用至 Bacmid。自 -80°C 取出 50 μL *E. coli* DH10Bac 勝任細胞置於冰上解凍，加入 5 μL pFastBac construct 冰浴 30 分鐘後，於 42°C 的乾浴槽內進行熱休克反應 45 秒，再置於冰上 2 分鐘。加入 900 μL LB 培養液於 37°C、轉速 150 rpm 震盪培養 4 小時後，用 LB 培養液 10 稀釋後，取出 100 μL 菌液均勻塗佈在 LB 培養盤(50 μg/mL kanamycin, 7 μg/mL gentamicin, 10 μg/mL

tetracycline, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-gal, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPTG)上，於 37°C 培養 48 小時。使用藍白篩選(blue/white selection)，挑選白色的單一菌落，再一次畫在新的 LB 培養盤 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamycin, 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetracycline, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-gal, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPTG)上，於 37°C 隔夜培養。

### 2.6.2 重組 Bacmid 之純化

挑選培養盤上的單一菌落置於 4 mL LB 培養液(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamycin, 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetracycline)進行隔夜培養，將菌液以 14000g 離心 1 分鐘，去除上清液，加入 0.3 mL Solution I (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A; filter-sterilize and store at 4°C)回溶菌塊，加入 0.3 mL Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS; filter-sterilize)，混合均勻置於室溫 5 分鐘，加入 0.3 mL 3 M Potassium acetate, pH 5.5 (autoclave and store at 4°C)，混合均勻置於冰上 10 分鐘，以 14000g 離心 10 分鐘，將上清液加入含有 0.8 mL Isopropanol 的微量離心管中，混合均勻置於-20°C 隔夜，在室溫以 14000g 離心 15 分鐘，小心移除上清液，加入 0.5 mL 70% 酒精，翻轉清洗沉澱物，在室溫以 14000g 離心 5 分鐘，盡可能移除上清液，在室溫風乾沉澱物 10 分鐘，加入 40  $\mu\text{L}$  無菌水回溶 DNA，保存於 4°C。

### 2.6.3 聚合酶鏈鎖反應檢驗

由於重組 Bacmid DNA 大於 135 kb，因此利用限制酶分析非常困難，所以使用聚合酶鏈鎖反應的方式來確認目標基因是否有接入 Bacmid，Bacmid 上含有 M13 Forward (-40)與 M13 Reverse 引子結合位，利用 M13 引子進行聚合酶鏈鎖反應放大特定 DNA 片段，藉由膠體電泳分析其大小，依據下表添加實驗材料於微量離心管中，混合均勻後短暫離心。

Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Final conc. ( $\mu\text{M}$ )
Template DNA (50 ng)	1	
10 $\mu\text{M}$ M13 Forward (-40) primer	1	0.5
10 $\mu\text{M}$ M13 Reverse primer	1	0.5
10 mM dNTPs	0.4	200
5X Phusion HF Buffer	4	
Phusion DNA Polymerase	0.2	
ddH <sub>2</sub> O	12.4	
Total	20	

將反應原料混合之微量離心管置於核酸增殖器中進行反應。PCR 反應程序如下表所示。反應完成後純化目標 DNA 片段。

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	10 s	30
Annealing	55°C	30 s	
Extension	72°C	120 s	
Final Extension	72°C	10 min	1
Storage	4°C	Hold	

重組 Bacmid 確認表

Sample	Size of PCR Product
Bacmid alone	~300 bp
Bacmid transposed with pFastBac™ HT	~2430 bp + size of your insert

#### 2.6.4 昆蟲細胞之轉染作用

在 24-well 細胞培養盤中加入 2 mL Grace's Insect Medium (10% FBS) 與  $2 \times 10^5$  個 Sf21 細胞，在 27°C 貼附至少 1 小時。取 1  $\mu$ L Bacmid DNA 與 3  $\mu$ L Cellfectin® Reagent (Invitrogen, USA) 混合，再加入 300  $\mu$ L 無血清的 Grace's Insect Medium，均勻混合後靜置 30 分鐘。吸除細胞培養液，用無血清的 Grace's Insect Medium 清洗細胞後並吸除，加入 300  $\mu$ L Bacmid:Cellfectin 複合液，以轉速 50 rpm 搖晃 1 小時，再移入 27°C 培養箱避光培養 4 小時，吸除 Bacmid:Cellfectin 複合液，加入 500  $\mu$ L Grace's Insect Medium (10% FBS)，27°C 避光培養 96 小時，收取細胞上清培養液即為 P1 病毒液(viral stock)，保存於 4°C。用培養基懸浮細胞，以 500g 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 1 mL PBS (130 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) 回溶細胞團塊，以 500g 離心 5 分鐘，去除上清液，將細胞保存於 -80°C，用於後續實驗，以酵素免疫染色法分析蛋白質表現。P1 病毒液通常少量且效價低，所以要放大桿狀病毒液，利用病毒液重複感染細胞生產高效價的病毒液，將 P1 病毒液以 100 倍稀釋感染 24-well 細胞培養盤，含有 0.5 mL 培養基的  $2 \times 10^5$  個 Sf21 細胞，27°C 避光培養 96 小時，收取細胞上清培養液即為 P2 病毒液。將 P2 病毒液以 100 倍稀釋感染 T-25 Flask 細胞培養盤含有 5 mL 培養基的  $2 \times 10^6$  個 Sf21 細胞，27°C 避光培養 96 小時，獲得 P3 病毒液。將 P3 病毒液以 100 倍稀釋感染 T-75 Flask 細胞培養盤含有 15 mL 培養基的  $6 \times 10^6$  個 Sf21 細胞，27°C 避光培養 96 小時，獲得 P4 病毒液。

### 2.6.5 病毒效價檢測

本論文是參考 Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System 實驗操作手冊利用 Viral plaque assay 測定桿狀病毒液的效價。在 6-well 細胞培養盤中加入 2 mL Grace's Insect Medium (10% FBS) 的  $1 \times 10^6$  個 Sf21 細胞，在 27°C 貼附至少 1 小時。用 Grace's Insect Medium 序列稀釋桿狀病毒液 ( $10^{-1}$  至  $10^{-9}$ )。吸除細胞培養液，各孔分別加入 1 mL 病毒稀釋液 ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) 與培養基，室溫避光培養 2 小時。將 2% Agarose Gel (Gibco, USA) 於 70°C 水浴中融化後移置 40°C 水浴備用；20% FBS Grace's Insect Medium (2X) (Gibco, USA) 置於 40°C 水浴回溫，以 2% Agarose Gel : 20% FBS Grace's Insect Medium (2X) = 1 : 1 的方式配製成病毒效價檢測培養基，置於 40°C 水浴保溫。2 小時培養後，吸除含有病毒的細胞培養液，加入 2 mL 病毒效價檢測培養基，室溫靜置 20 分鐘待凝膠，於 27°C 避光培養 10 天後，每孔加入 0.5 mL Neutral Red (1mg/mL) 溶液，室溫靜置 2 小時，去除多餘的染劑，計算 Plaques 數目，根據下列公式計算效價。

$$\text{Titer (pfu/mL)} = \text{number of plaques} \times \text{dilution factor} \times \frac{1}{\text{mL of inoculum/well}}$$

### 2.6.6 病毒最佳感染條件測試

利用不同 MOI (multiplicity of infection) 的病毒量來感染 Sf21 細胞 0~6 天，以進行最佳感染條件的測試。MOI 表示每一個細胞感染病毒顆粒的平均個數，依據下列公式計算不同 MOI 條件所要添加病毒液的體積。

$$\text{Inoculum required (mL)} = \frac{\text{MOI (pfu/cell)} \times \text{number of cells}}{\text{titer of viral stock (pfu/mL)}}$$

### 2.6.7 重組蛋白之表現

培養 150 mL Sf21 細胞 ( $1 \times 10^6$  cell/mL) 於 500 mL 錐形瓶，以 5 MOI 的病毒液感染細胞，在 27°C 以轉速 125 rpm 震盪避光培養 5 天。以 500g 離心 10 分鐘，倒除上清液，獲得有表現目標重組蛋白質之細胞，保存於 -20°C 用於後續純化與分析實驗。

## 2.7 重組蛋白之純化

本論文中所表現的重組蛋白質帶有 His-tag，其 Histidine 會與鎳離子間的整合以親和層析法 (affinity chromatography) 進行純化，使用 HisTrap™ FF 管柱 (GE

Healthcare Life Sciences, USA) 與 ÄKTAprime plus FPLC (GE Healthcare Life Sciences, USA) 純化系統。用 20 mL Lysis buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, pH 9.0) 震散細胞，置於冰上反應 10 分鐘，使用超音波細胞破碎儀(Misonix, USA)均質化細胞，在 4°C 以 20000 rpm 離心 20 分鐘，將上清液用 0.45 µm Millex<sup>®</sup> Syringe Filter (EMD Millipore, USA) 過濾，得到粗萃取液。將 HisTrap<sup>™</sup> FF 管柱以 Binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, pH 9.0) 流洗平衡，依據下表設定 FPLC 程式。將 30 mL 樣本經由 FPLC 之 A8 管線注入管柱中後，再以 Binding buffer 流洗管柱 26 mL，每管收集 8 mL。利用 Elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole, 10% glycerol, pH 9.0) 拉梯度從 20 到 250 mM imidazole 流洗管柱 30 mL，每管收集 1 mL。最後用 Elution buffer 流洗管柱 10 mL，每管收集 1 mL。將每個劃分以 Bradford protein assay 定量蛋白質，以 SDS-PAGE 用 CBR 染色分析蛋白質純度，以免疫染色法確認目標蛋白質表現。

FPLC 程式編輯：

Brkp	volume	Conc B	Flow	Frac	Buff	Inj	Peak	Autozero	Eventmark
1	0	0	1.0	8.0	8	Load	0	Y	N
2	56	0	1.0	1.0	1	Load	0	N	N
3	86	100	1.0	1.0	1	Load	0	N	N
4	96	100	1.0	1.0	1	Load	0	N	N

## 2.8 多株抗體之製備

免疫 6 週大的 BALB/c 公小鼠以製備 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質的多株抗體。以腹腔注射 100 µg 的 H7N9 M1 或 NS1 重組蛋白質與 Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA)，之後每隔二週免疫 50 µg 的 H7N9 M1 或 NS1 重組蛋白質與 Incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) 共 3 次。在免疫前、第二次與第三次免疫後，分別採集 30 µL 小鼠血液與 270 µL PBS 混合，在 4°C 以 4000 rpm 離心 20 分鐘，吸取 200 µL 上取液的小鼠血清與 200 µL Glycerol 混合，保存於 -20°C，之後進行抗血清的效價測試。

## 第三章 結果

### 3.1 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒表現載體之建構

新型 H7N9 流感病毒的基因片段是由國立臺灣大學醫學院張淑媛老師所提供，其來源是從臺灣第一例境外移入並痊癒之臺商體內分離得到的 H7N9 病毒株。從 NCBI 資料庫取得 H7N9 流感病毒的 M 與 NS 核酸序列資料(M accession: KF018048；NS accession: KF018049)，M 基因可以編碼出 M1 是 759 bp 與 M2 是 294 bp；NS 基因可以編碼出 NS1 是 654 bp 與 NS2 是 366 bp。分別對 M1、M2、NS1 與 NS2 設計一對專一性引子，並在 Forward 端與 Reverse 端加上特定的限制酶切位。利用聚合酶鏈鎖反應放大目標基因序列，獲得 M1 大小是 772 bp，M2 是 307 bp，NS1 是 668 bp，NS2 是 380 bp(圖一 A)，各別經由其對應的一組限制酶反應後，利用 T4 DNA Ligase 與 pFastBac™ HT A 進行接合作用，將其轉型至 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，並利用載體上的 Ampicillin 抗性基因進行單一菌落的篩選。將菌落以 LB 培養液培養後，抽取其菌內的 pFastBac 重組質體(圖一 B)，以聚合酶鏈鎖反應或限制酶切反應(圖一 C)，藉由 DNA 膠體電泳確認分子量大小，以 pFB-HT-F 引子進行核酸定序比對確認目標基因有接入 pFastBac™ HTA 載體，核酸序列比對結果發現 M 基因第 10 個核苷酸由 T 變成 C，但不會改變胺基酸序列(附錄圖一 A)。

將建構完成之重組質體 pFastBac HT A-M1、pFastBac HT A-M2、pFastBac HT A-NS1 與 pFastBac HT A-NS2 分別轉型至 *E. coli* DH10Bac™ 中，藉由輔助質體表現的轉位酶將目標基因片段轉位至 Bacmid 上。經由藍白篩選挑選白色的單一菌落，將菌落以 LB 培養液培養後，抽取其菌內的重組 Bacmid。由於重組 Bacmid 大於 135 kb，利用限制酶分析非常困難，因此以 M13 引子進行聚合酶鏈鎖反應，藉由 DNA 膠體電泳確認分子量大小，確認目標片段有插入 Bacmid，其大小分別約為 3190 bp (M1)、2720 bp (M2)、3080 bp (NS1)與 2800 bp (NS2) (圖二)。

### 3.2 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞之表現

將重組 Bacmid M1、M2、NS1 與 NS2 分別利用 Cellfectin® Reagent 轉染至 Sf21 昆蟲細胞中，生產重組桿狀病毒，可獲得 P1 病毒液與細胞。將 P1 病毒液以 100 倍稀釋感染 Sf21 昆蟲細胞，可獲得 P2 病毒液與細胞，以此類推，用此方式放大病毒液並提高其效價。利用胺基酸序列來預測蛋白質的理論分子量，H7N9 重組蛋白質 M1 約 31.2 kDa，M2 約 14.6 kDa，NS1 約 28.1 kDa，NS2 約 17.7 kDa，此四種重組蛋白質皆帶有 His-tag，以便於抗體專一性確認，並利用親和層析法來純化。藉由免疫染色法確認 P1 至 P4 細胞內重組蛋白質之表現，由圖三可知，以 anti-His 抗體辨識，M1 在 P1 至 P4 細胞內皆有表現並符合預測大小；M2 在 P1 至 P4 細胞內皆有表現，但分子量約為 20 kDa，與預測不符；NS1 在 P1 至 P4 細

胞內皆有表現並符合預期大小；NS2 在 P1 至 P4 細胞內皆有表現，但分子量大於 17kDa，與預測略大。由此結果可知，H7N9 流感病毒的 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白可以藉由桿狀病毒表現系統在 Sf21 昆蟲細胞中成功被表現出來。而在未受重組桿狀病毒感染的 Sf21 昆蟲細胞則不會表現 H7N9 重組蛋白，作為轉染的控制組。

### 3.3 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒液之病毒效價試驗

因為使用不同 MOI 的病毒液感染量會對於重組蛋白的表現量造成影響，所以需要使用 Viral plaque assay 對重組桿狀病毒液的效價進行測定，作為計算病毒液稀釋倍率的依據。在開始此實驗前，先大量製備高效價的病毒液，以利於未來大量生產目標重組蛋白。將  $1 \times 10^6$  Sf21 細胞分別以  $10^{-5}$  至  $10^{-9}$  序列稀釋的重組桿狀病毒液感染 10 天，利用 Neutral Red 進行染色，透過紅色的背景，可以看到透明的溶細胞斑點。從不同的病毒液稀釋倍數感染細胞，可以觀察到病毒液稀釋倍數越大，溶細胞斑的數目會等比例減少。計算效價最適當的溶細胞斑數目是 3 至 20 個，故計算  $10^{-9}$  稀釋倍數的溶細胞斑數目，根據公式估算病毒液效價，M1 是  $5.2 \times 10^{10}$ ，M2 是  $2.5 \times 10^{10}$ ，NS1 是  $3.8 \times 10^{10}$ ，NS2 是  $2.3 \times 10^{10}$ ；而未受重組桿狀病毒感染的 Sf21 昆蟲細胞則無溶細胞斑，作為感染的控制組(圖四)。

### 3.4 H7N9 M1、NS1 與 M2 重組蛋白質之表現條件測試

在大量量產由昆蟲細胞所表現的 H7N9 重組蛋白質之前，必須先測試最佳表現的培養條件，得知最佳病毒液感染量與最佳感染天數，以獲得大量的目標蛋白質。培養 150 mL Sf21 細胞於 500 mL 錐形瓶中，以不同 MOI 的病毒液感染量 (1, 5, 10 MOI) 感染一定量的昆蟲細胞後，在不同天數(第 0 至 6 天)收集其細胞進行蛋白質表現量的分析。從結果顯示(圖五 A)，M1 在 1 MOI 感染下，第 0 天至第 2 天都不表現，從第 3 天才開始表現，到第 5 天達表現的最大量；在 5 MOI 或 10 MOI 感染下，第 0 天至第 1 天都不表現，從第 2 天才開始表現，比 1 MOI 提早一天，到第 5 天達表現的最大量，而第 6 天表現量則略微降低，表示較高的 MOI 會使蛋白質在細胞中提早被表現與累積。比較不同 MOI 在相同天數的蛋白質表現量(圖五 B)，在感染第 3 天或第 5 天後，5 MOI 會比 10 MOI 或 1 MOI 的表現量多。

相似的結果也可以在 NS1 的實驗中發現(圖六 A)，在 1 MOI 感染下，第 0 天至第 2 天都無 NS1 的表現，從第 3 天才開始表現；在 5 MOI 或 10 MOI 感染下，從第 2 天開始表現，三者皆到第 5 天達表現的最大量，而第 6 天表現量則約略下降。比較不同 MOI 在相同天數的蛋白質表現量(圖六 B)，不論是感染第 3 天或感染第 5 天後，5 MOI 都會比 10 MOI 或 1 MOI 的表現量多。

然而 M2 的實驗結果顯示(圖七 A)，在 1 MOI 感染下，第 0 天至第 4 天都不表現，從第 5 天才開始表現達最大量；在 5 MOI 感染下，從第 3 天開始表現；在 10 MOI 感染下，從第 2 天開始表現，二者到第 5 天皆達表現的最大量。比較不同 MOI 在相同天數的蛋白質表現量(圖七 B)，在感染第 3 天後，1 MOI 不會表現 M2；在感染第 5 天後，5 MOI 會比 10 MOI 或 1 MOI 的表現量多。綜合以上結果，最佳病毒液感染量是 5 MOI，最佳感染天數是 5 天，本研究以此培養條件來大量量產 H7N9 M1、NS1 與 M2 重組蛋白質。

### 3.5 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之純化

因為表現的重組蛋白質帶有 His-tag，故以親和層析法使用 HisTrap™ FF 管柱與 ÄKTAprime plus FPLC 純化系統進行純化。將細胞粗萃取液通過 HisTrap™ FF 管柱後，以 20~250 mM Imidazole 連續性梯度流洗結合在管柱內的 His-tag 重組蛋白質。將每個劃分以 Bradford protein assay 測定蛋白質，以 SDS-PAGE 用 CBR 染色分析蛋白質的純度，以免疫染色法確認目標蛋白質的表現與分子量大小。

M1 純化結果，由 A<sub>595</sub> 吸光值曲線(圖八 A)可知，蛋白質約在 70 mM Imidazole 開始被流洗下來，並分布在第 14~40 管中。由 CBR 染色的結果(圖八 B)所示，在第 25 與 36 管可以觀察到 M1 分子量大小的色帶，而在蛋白質濃度最高的第 20 管，無明顯的 M1 色帶，而在第 18 與 20 管有許多高分子量的雜蛋白。免疫染色的結果(圖八 C)顯示，M1 分布在第 18~36 管，且越接近後面管數，M1 的含量越多。將上述純化流程進行微調後，改以利用低濃度 Imidazole 去除非專一性結合的雜蛋白，再用高濃度 Imidazole 將 M1 流洗下來。因此在粗萃取液通過親和性管柱後，改用 50 mM Imidazole 清洗管柱，先將雜蛋白流洗下來，再以 50~250 mM Imidazole 連續性梯度流洗結合在管柱內的 His-M1。由 A<sub>595</sub> 吸光值曲線(圖九 A)可知，在第 18 管左右與第 29 管各有一個蛋白質峰值。由 CBR 染色的結果(圖九 B)所示，在後面峰值的第 29 與 34 管含有 M1，而在前面峰值的第 18 與 24 管有許多高分子量的雜蛋白。從免疫染色的結果(圖九 C)顯示，M1 分佈在第 29~34 管。由此證明此方法可以使 M1 與部分雜蛋白分離開來。

NS1 的純化結果(圖十 A)顯示，蛋白質約在 70 mM Imidazole 開始被流洗下來，並分布在第 14~40 管中。如 CBR 染色的結果(圖十 B)所示，在第 21~35 管可以觀察到 NS1 分子量大小的色帶，而在第 21 與 24 管有許多高分子量的雜蛋白。免疫染色的結果(圖十 C)顯示，NS1 分布在第 21~35 管，且越接近後面管數，NS1 的含量越多。進一步嘗試以低濃度 Imidazole 的緩衝液去除雜蛋白，再用高濃度 Imidazole 將 NS1 流洗下來，希望可以提高樣本的純度。因此在粗萃取液通過管柱後，改用 50 mM Imidazole 清洗管柱，再以 50~250 mM Imidazole 連續性梯度流洗結合在管柱內的 NS1。代表蛋白質濃度的 A<sub>595</sub> 吸光值曲線(圖十一 A)顯示，在第 18 管與第 36 管各有一個蛋白質峰值。由 CBR 染色的結果(圖十一 B)

得知，在第 18~36 管都有 NS1，而在第 10~30 管都有許多高分子量的雜蛋白。免疫染色的結果(圖十一 C)也顯示，NS1 在第 18~36 管都存在。所以此方法無法達到去除雜蛋白及增加 NS1 之純化效果。

將含有 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質的 CBR 染色條帶切出，經由質譜儀與 Mascot 軟體比對進行身分鑑定分析確認無誤(圖十二)，M1 重組蛋白質序列 coverage 是 56.7%；NS1 蛋白質序列 coverage 是 81.1%。從培養 500 mL 的昆蟲細胞中，經純化與脫鹽濃縮後，可獲得 M1 約為 1.4 mg 與 NS1 約為 1.5 mg。

### 3.6 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之多株抗體效價測試

為了建立新型 H7N9 流感病毒研究與檢驗用的抗體，將純化後的 H7N9 M1 或 NS1 重組蛋白質分別免疫 BALB/c 小鼠以製備多株抗體，採集免疫前、第二次與第三次免疫後的小鼠血清，使用 Sf21 昆蟲細胞表現的 H7N9 M1 或 NS1 重組蛋白質及大腸桿菌表現的 H7N9 M1 或 NS1 重組蛋白質作為正向抗原，Sf21 昆蟲細胞的全蛋白與 V5-GFP-His 蛋白質作為負向抗原，藉由免疫染色法進行效價的測試。

利用 CBR 染色確認抗原蛋白質時，發現不論是 Sf21 昆蟲細胞表現的 M1 重組蛋白質或是大腸桿菌表現的 M1 重組蛋白質都有降解的現象發生，尤其 Sf21 昆蟲細胞表現的 M1 重組蛋白質降解的最嚴重，而大腸桿菌表現的 M1 重組蛋白質亦大部分降解成約 17 kDa 的片段(圖十三 A)。以 anti-His 抗體進行免疫染色的結果顯示，M1 已降解成多個片段，並且大腸桿菌表現的 M1 重組蛋白質所降解的 17 kDa 片段卻不含 His tag (圖十三 B)。Sf21 昆蟲細胞的全蛋白中沒有 His tag 的蛋白質。測試 H7N9 M1 重組蛋白質抗血清的效價(圖十三 C)，於抗原免疫前，小鼠無抗 H7N9 M1 蛋白質的抗體反應。免疫二次與三次後，小鼠產生抗 H7N9 M1 蛋白質的抗體，但因 M1 重組蛋白質已經降解，顯示出抗血清的效價不佳，不過對大腸桿菌表現的 M1 重組蛋白質降解的片段有很高的效價，且免疫三次後的效價略高於免疫二次後的效價。此抗血清對 Sf21 昆蟲細胞的全蛋白僅有少部分的結合，也不會辨認 V5-GFP-His 蛋白質，所以此抗 H7N9 M1 蛋白質多株抗體的專一性相當好。

由 CBR 染色結果可知(圖十四 A)，NS1 重組蛋白質的穩定性相對於 M1 重組蛋白質好。從 anti-His 的免疫染色發現，Sf21 昆蟲細胞表現的 NS1 重組蛋白質是 28.1 kDa，略大於大腸桿菌表現的 27.1 kDa (圖十四 B)。測試 H7N9 NS1 重組蛋白質抗血清的效價(圖十四 C)，於抗原免疫前，小鼠無抗 H7N9 NS1 蛋白質的抗體反應。免疫二次與三次後，小鼠血清對 H7N9 NS1 蛋白質有極高的效價，免疫三次又比二次好，也不會結合 Sf21 昆蟲細胞的全蛋白與 V5-GFP-His 蛋白質，此抗 H7N9 NS1 蛋白質多株抗體的專一性非常好。

## 第四章 討論

### 4.1 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質之表現探討

常用於桿狀病毒表現系統的昆蟲細胞有 Sf9 或 Sf21。本研究最初是使用 Sf9 作為轉染的昆蟲細胞，但是實驗結果顯示 Sf9 細胞不會表現流感病毒的重組蛋白 (data not shown)。而改用 Sf21 細胞之後，發現其可以成功產生重組蛋白質，所以之後皆改以 Sf21 細胞做實驗。從圖三結果可知，H7N9 流感病毒的 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白皆可由桿狀病毒表現系統在 Sf21 昆蟲細胞中成功被表現出來。M1 在 P2~P4 的細胞中可以看見降解的片段，且隨著代數的增加，出現的量越多，可能是因為 M1 重組蛋白質本身不太穩定，隨著感染代數增加，不僅放大了病毒液，且隨著效價的提高，重組蛋白質也大量表現，增加了降解的片段。而 NS1 也在 P4 細胞中看到些微降解的片段，M2 與 NS2 則沒有觀察到。M2 與 NS2 皆比預期的分子量大，推測可能具有轉譯後修飾，已有報導指出 M2 具有磷酸化、醣基化、乙醯化(acetylation)與棕櫚酸化(palmitoylation)修飾(Holsinger et al., 1994; Sugrue et al., 1990; Thaa et al., 2014; Thomas et al., 1998)，NS2 具有磷酸化修飾(Richardson and Akkina, 1991)。

### 4.2 H7N9 M1、NS1 與 M2 重組蛋白質之表現條件探討

在以桿狀病毒表現系統大量生產重組蛋白質前，必須先行探討其表現條件，以獲得最大量的目標蛋白質。以不同病毒液稀釋量 1 MOI、5MOI 和 10 MOI 感染 Sf21 昆蟲細胞後，皆可以發現隨著感染天數的增加，M1、NS1 或 M2 的表現量也增加，在第 5 天達到表現的最大量，而第六天略微降低(圖五 A、圖六 A、圖七 A)，推論是昆蟲細胞被桿狀病毒大量感染導致細胞溶解(cell lysis)使蛋白質表現量下降(Licari and Bailey, 1991)。比較不同 MOI 在相同天數的蛋白質表現量(圖五 B、圖六 B、圖七 B)，發現 1 MOI 的表現量比 5 MOI 少，推測原因為加入的病毒太少，雖然可以產生重組蛋白，但表現量仍不如 5 MOI 來得高。而 10 MOI 的表現量亦不如 5 MOI，推測原因可能為加入的病毒液太多，使得昆蟲細胞被大量感染，來不及產生重組蛋白而走向 Lytic cycle (Licari and Bailey, 1991)。在 5 MOI 下，隨著感染的時間增加，在第 5 天達到最大的表現量，故選定 M1、NS1 與 M2 的最佳表現條件是 5 MOI 感染 5 天。

### 4.3 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之純化條件探討

表現的重組蛋白質皆帶有 His-tag，所以本實驗以親和層析法進行純化，獲得 H7N9 流感病毒的 M1 與 NS1 重組蛋白。最初以實驗操作手冊所提供 pH7.4 的 Binding buffer 回溶細胞，純化後發現 M1 不可溶。之後改用 pH 9.0 的 Binding

buffer 增加蛋白質溶解度，與加入 10% Glycerol 以防止蛋白質降解，並加入 0.5% Triton X-100 以幫助打破細胞，發現的確增加了 M1 的溶解度與純化效率。M1 與 NS1 分別經由 HisTrap™ FF 管柱純化，CBR 染色結果可知(圖八、圖十)，皆有高分子量的雜蛋白存在。藉以調整 FPLC 的純化流程，用低濃度 Imidazole 去除非專一性結合的雜蛋白，再用高濃度 Imidazole 將目標蛋白質流洗下來，從 M1 的結果看來可以去除大量雜蛋白(圖九)，但 NS1 無法達到相同的純化效果(圖十一)，可能是有部分的 NS1 與管柱結合的能力較弱所導致。

#### 4.4 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質之多株抗體效價探討

純化後的 H7N9 M1 重組蛋白質在經過 $-20^{\circ}\text{C}$  一個月保存之後，不管是 Sf21 昆蟲細胞表現的 M1 重組蛋白質或大腸桿菌表現的 M1 重組蛋白質皆不穩定(圖十三 A 與 B)，先前報導指出 M1 在酸性的環境下容易降解(Sha and Luo, 1997)。而 H7N9 NS1 重組蛋白質相較於 M1 穩定(圖十四 A 與 B)，符合圖三看到 M1 重組蛋白質會有降解的現象，NS1 重組蛋白質則較輕微。也因為 M1 的降解，使得抗血清的效價看起來不好(圖十三 C)，無法判斷是免疫的抗原降解導致抗原性下降，還是降解的抗原無法被多株抗體有效的辨識，需要以新鮮純化的完整 H7N9 M1 重組蛋白進行驗證。然而 H7N9 NS1 重組蛋白質的抗血清效價非常高，專一性也很好(圖十四 C)，但在 Sf21 昆蟲細胞表現的 NS1 重組蛋白質在 28.1 kDa 附近有二條色帶，推測下方的色帶是 NS1 降解的片段且無 His tag(圖十四 B 與 C)，因其免疫染色不會被 anti-His 染到，而仍可被 anti-NS1 所染到。

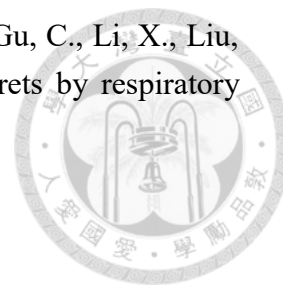
## 參考文獻

- Ayllon, J., Domingues, P., Rajsbaum, R., Miorin, L., Schmolke, M., Hale, B.G., and Garcia-Sastre, A. (2014). A single amino acid substitution in the novel H7N9 influenza A virus NS1 protein increases CPSF30 binding and virulence. *J Virol* 88, 12146-12151.
- Belser, J.A., Gustin, K.M., Pearce, M.B., Maines, T.R., Zeng, H., Pappas, C., Sun, X., Carney, P.J., Villanueva, J.M., Stevens, J., *et al.* (2013). Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 501, 556-559.
- Belshe, R.B. (2005). The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 353, 2209-2211.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Chan, P.K. (2002). Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 34 *Suppl* 2, S58-64.
- Chang, S.Y., Lin, P.H., Tsai, J.C., Hung, C.C., and Chang, S.C. (2013). The first case of H7N9 influenza in Taiwan. *Lancet* 381, 1621.
- Couch, R.B. (1996). Orthomyxoviruses. In *Medical Microbiology*, S. Baron, ed. (Galveston (TX)).
- Eisfeld, A.J., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2015). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* 13, 28-41.
- Gao, H.N., Lu, H.Z., Cao, B., Du, B., Shang, H., Gan, J.H., Lu, S.H., Yang, Y.D., Fang, Q., Shen, Y.Z., *et al.* (2013a). Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med* 368, 2277-2285.
- Gao, R., Cao, B., Hu, Y., Feng, Z., Wang, D., Hu, W., Chen, J., Jie, Z., Qiu, H., Xu, K., *et al.* (2013b). Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med* 368, 1888-1897.
- Gong, J., Xu, W., and Zhang, J. (2007). Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* 14, 113-122.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89, 2359-2376.

- Holsinger, L.J., Nichani, D., Pinto, L.H., and Lamb, R.A. (1994). Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J Virol* 68, 1551-1563.
- Lakadamyali, M., Rust, M.J., and Zhuang, X. (2004). Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6, 929-936.
- Li, J., Yu, X., Pu, X., Xie, L., Sun, Y., Xiao, H., Wang, F., Din, H., Wu, Y., Liu, D., *et al.* (2013). Environmental connections of novel avian-origin H7N9 influenza virus infection and virus adaptation to the human. *Sci China Life Sci* 56, 485-492.
- Li, Q., Zhou, L., Zhou, M., Chen, Z., Li, F., Wu, H., Xiang, N., Chen, E., Tang, F., Wang, D., *et al.* (2014). Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. *N Engl J Med* 370, 520-532.
- Lupiani, B., and Reddy, S.M. (2009). The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32, 311-323.
- Medina, R.A., and Garcia-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 9, 590-603.
- Nelson, M.I., and Holmes, E.C. (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8, 196-205.
- Noton, S.L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A.E., Elton, D., and Digard, P. (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* 88, 2280-2290.
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J.R., and Park, S.Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454, 1127-1131.
- Richardson, J.C., and Akkina, R.K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 116, 69-80.
- Sha, B., and Luo, M. (1997). Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* 4, 239-244.
- Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K., and Kobayashi, N. (2011). Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Lett* 585, 41-46.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., and Kawaoka, Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435-436.

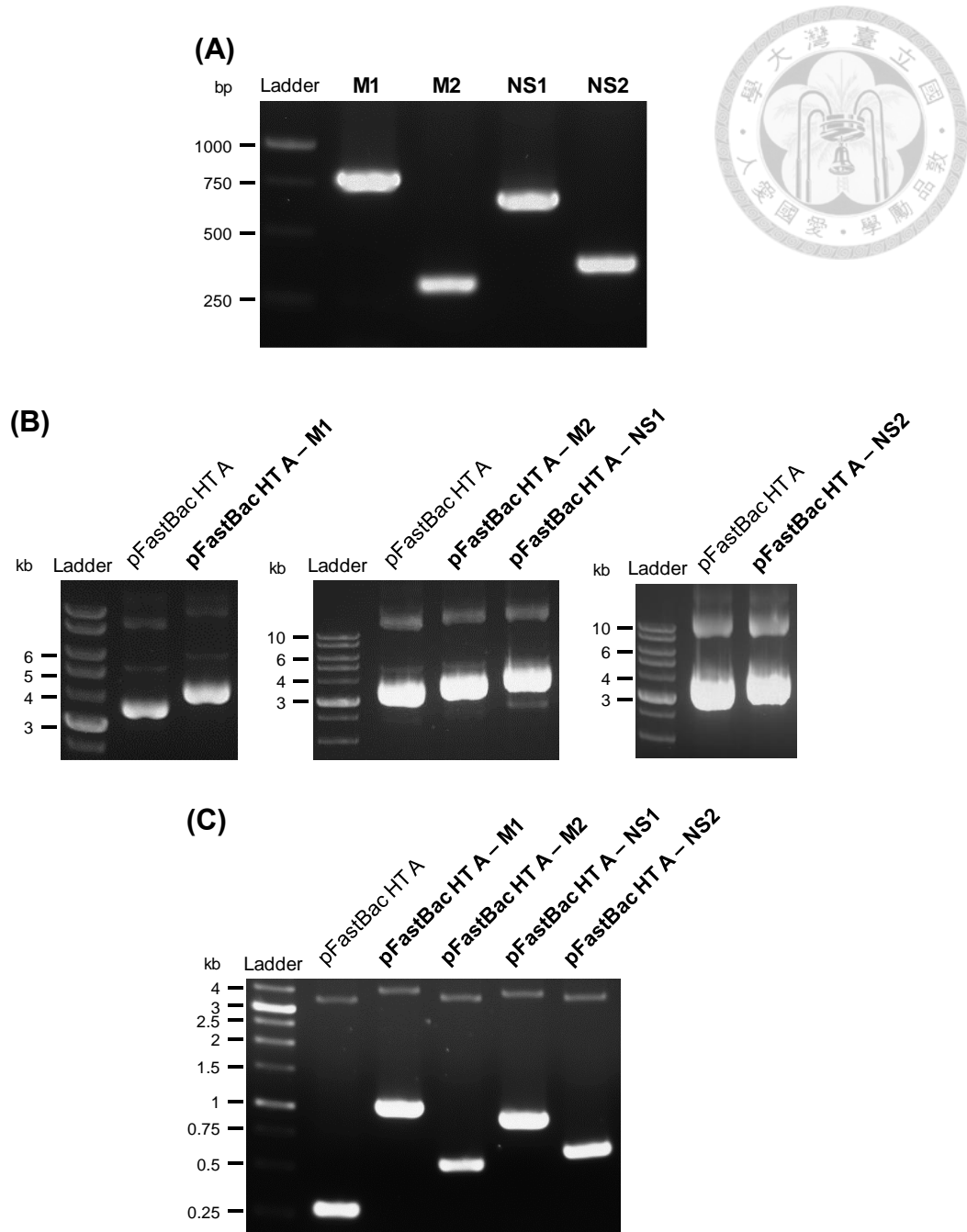
- Smith, G.E., Flyer, D.C., Raghunandan, R., Liu, Y., Wei, Z., Wu, Y., Kpamegan, E., Courbron, D., Fries, L.F., 3rd, and Glenn, G.M. (2013). Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine* 31, 4305-4313.
- Stouffer, A.L., Acharya, R., Salom, D., Levine, A.S., Di Costanzo, L., Soto, C.S., Tereshko, V., Nanda, V., Stayrook, S., and DeGrado, W.F. (2008). Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* 451, 596-599.
- Sugrue, R.J., Belshe, R.B., and Hay, A.J. (1990). Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein. *Virology* 179, 51-56.
- Tanner, W.D., Toth, D.J., and Gundlapalli, A.V. (2015). The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. *Epidemiol Infect* 143, 3359-3374.
- Thaa, B., Siche, S., Herrmann, A., and Veit, M. (2014). Acylation and cholesterol binding are not required for targeting of influenza A virus M2 protein to the hemagglutinin-defined budzone. *FEBS Lett* 588, 1031-1036.
- Thomas, J.K., and Noppenberger, J. (2007). Avian influenza: a review. *Am J Health Syst Pharm* 64, 149-165.
- Thomas, J.M., Stevens, M.P., Percy, N., and Barclay, W.S. (1998). Phosphorylation of the M2 protein of influenza A virus is not essential for virus viability. *Virology* 252, 54-64.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., *et al.* (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9, e1003657.
- Wang, X., Liu, S., Mao, H., Yu, Z., Chen, E., and Chai, C. (2015). Surveillance of Avian H7N9 Virus in Various Environments of Zhejiang Province, China before and after Live Poultry Markets Were Closed in 2013-2014. *PLoS One* 10, e0135718.
- Webster, R.G., and Rott, R. (1987). Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell* 50, 665-666.
- Yang, P., Wang, W., Gu, H., Li, Z., Zhang, K., Wang, Z., Li, R., Duan, Y., Zhang, S., and Wang, X. (2014). Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NP-M1-HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice. *Antiviral Res* 111, 1-7.

Zhang, Q., Shi, J., Deng, G., Guo, J., Zeng, X., He, X., Kong, H., Gu, C., Li, X., Liu, J., *et al.* (2013). H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science* 341, 410-414.



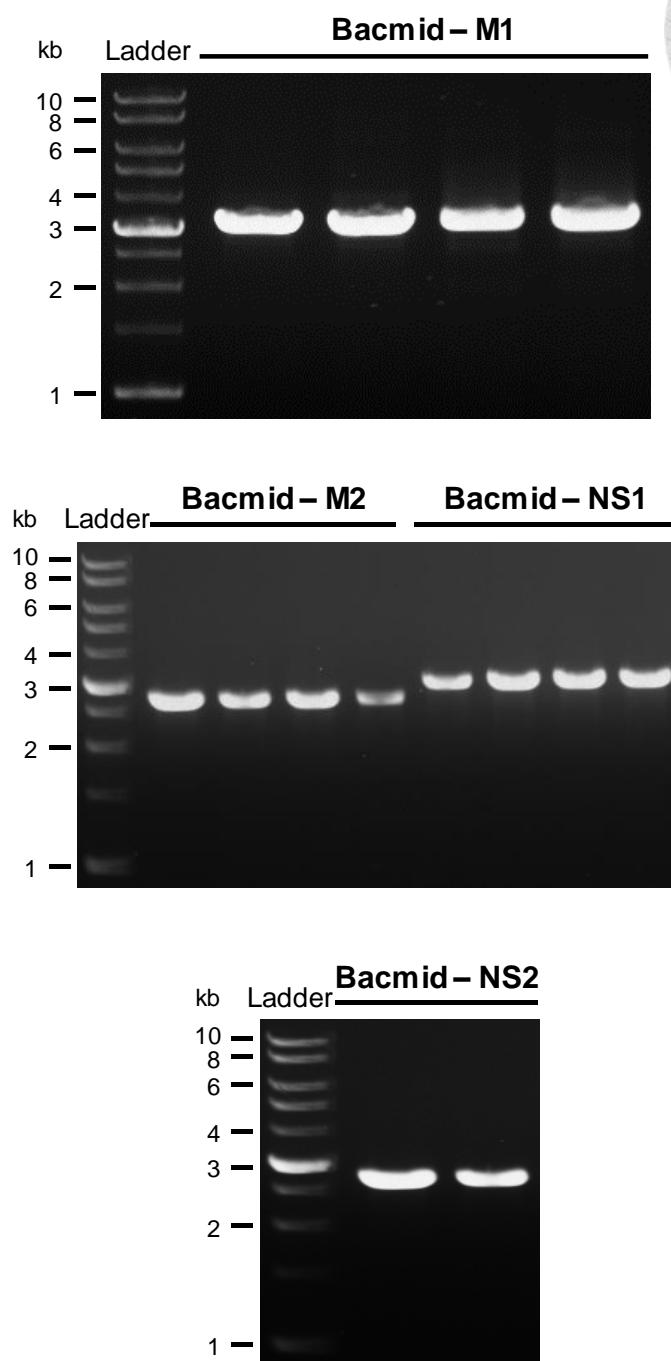


## 表與圖



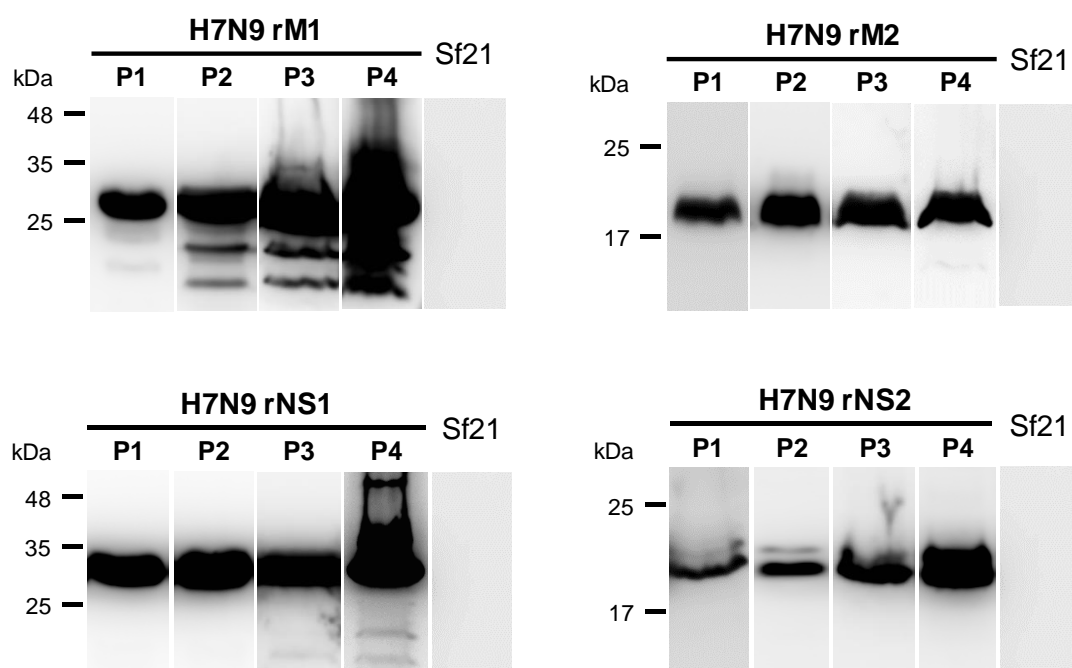
**圖一 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒表現載體之建構**

- (A) 利用聚合酶鏈鎖反應放大 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 基因片段，M1 大小為 772 bp、M2 為 307 bp、NS1 為 668 bp、NS2 為 380 bp。
- (B) 建構 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 之 pFastBac HT A 重組質體，其分子量皆比控制組 pFastBac HT A 之分子量大。
- (C) 利用聚合酶鏈鎖反應確認目標基因有接入 pFastBac HT A 載體，以 pFB-HT-F 與 pFB-HT-R 引子分別放大控制組 pFastBac HT A (272 bp)、pFastBac HT A-M1 (981 bp)、pFastBac HT A-M2 (516 bp)、pFastBac HT A-NS1 (858 bp)、pFastBac HT A-NS2 (570 bp)。



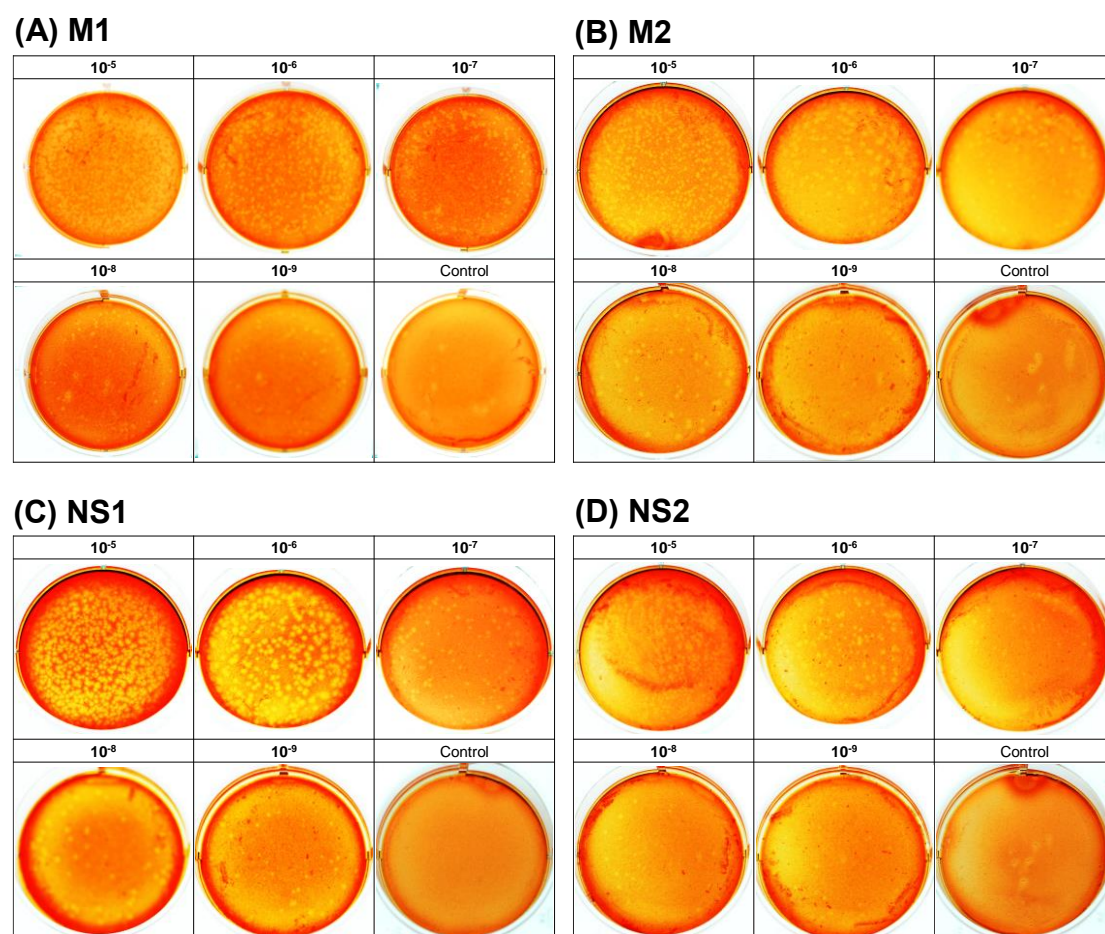
圖二 利用聚合酶鏈鎖反應確認桿狀病毒重組 **Bicmid**

以 M13 引子進行聚合酶鏈鎖反應確認目標片段有插入 Bacmid，Bacmid-M1 為 3190 bp、Bacmid-M2 為 2720 bp、Bacmid-NS1 為 3080 bp、Bacmid-NS2 為 2800 bp。



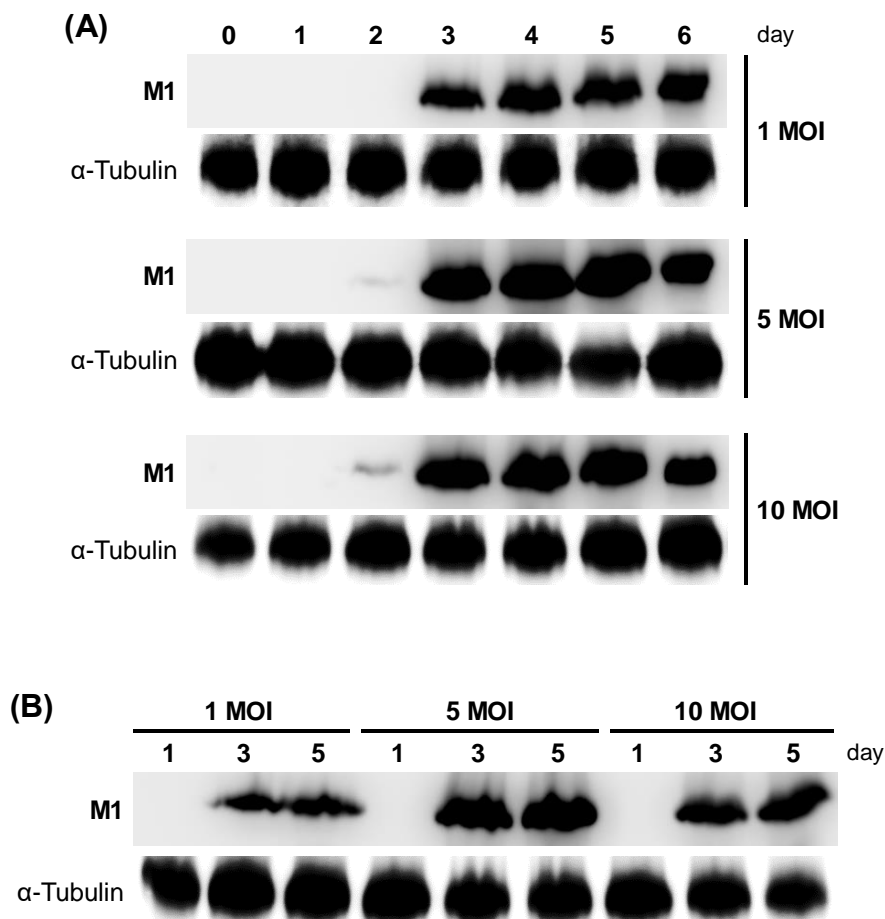
**圖三 表現 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞**

將重組 Bacmid M1、M2、NS1 與 NS2 轉染至 Sf21 昆蟲細胞中，表現 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組蛋白質於 P1 至 P4 細胞，以 anti-His 抗體進行免疫染色法。控制組為未受重組桿狀病毒感染的 Sf21 昆蟲細胞，則不會表現 H7N9 重組蛋白。



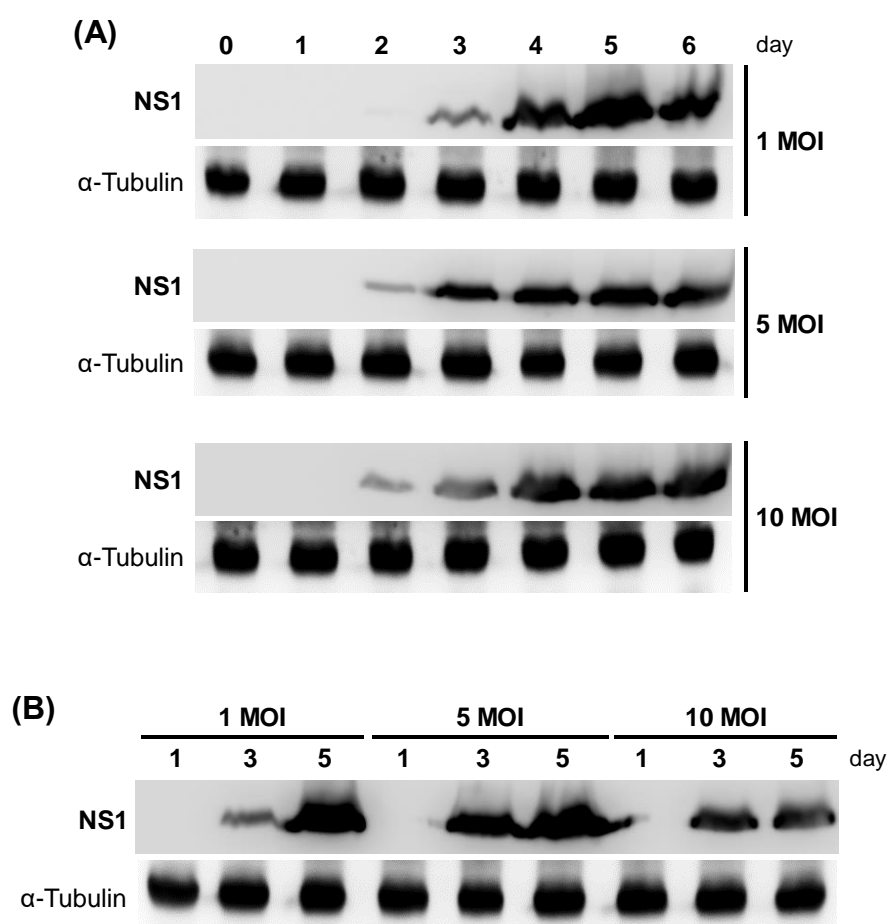
**圖四 H7N9 M1、M2、NS1 與 NS2 重組桿狀病毒液之病毒效價試驗**

使用 Viral plaque assay 對重組桿狀病毒液的效價進行測定，計算  $10^{-9}$  稀釋倍數的溶細胞斑數目，利用公式估算病毒液效價。(A) M1 為  $5.2 \times 10^{10}$ ; (B) M2 為  $2.5 \times 10^{10}$ ; (C) NS1 為  $3.8 \times 10^{10}$ ; (D) NS2 為  $2.3 \times 10^{10}$ 。



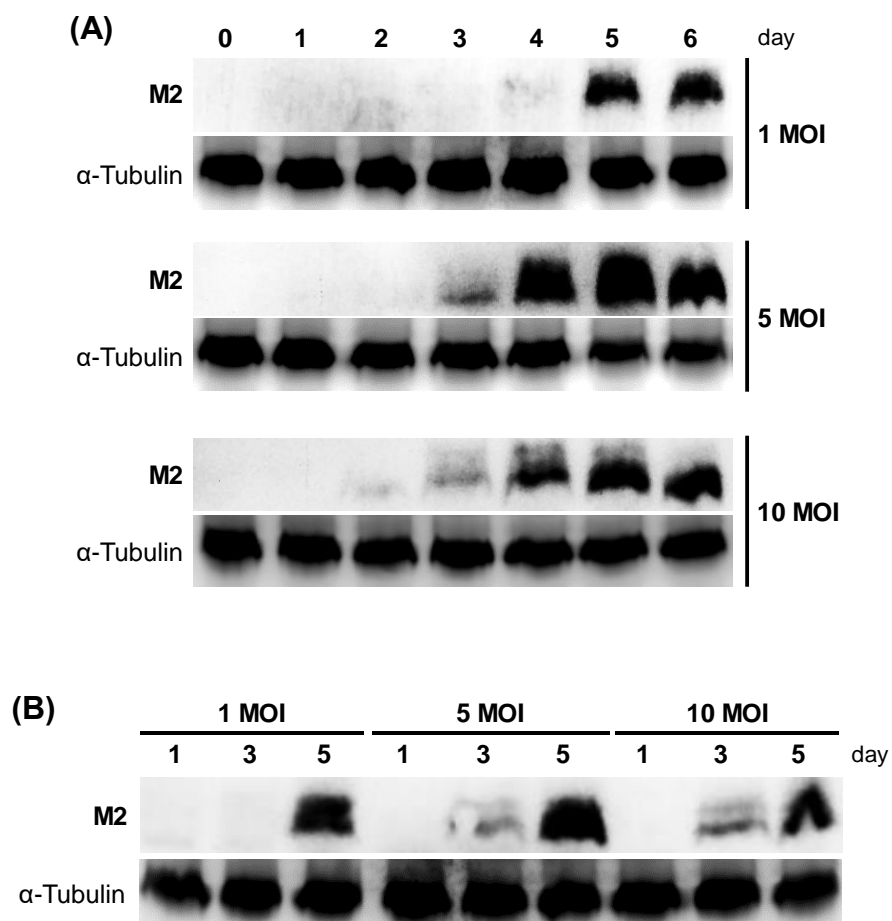
**圖五 H7N9 M1 重組蛋白質之表現條件測試**

以 1, 5, 10 MOI 的病毒液感染量分別感染一定量的昆蟲細胞後，在第 0 至 6 天收集其細胞以免疫染色法進行蛋白質表現量的分析，以  $\alpha$ -Tubulin 作為表現的控制組。(A) M1 在相同 MOI 不同感染天數的表現量比較；(B) M1 在不同 MOI 相同感染天數的表現量比較。



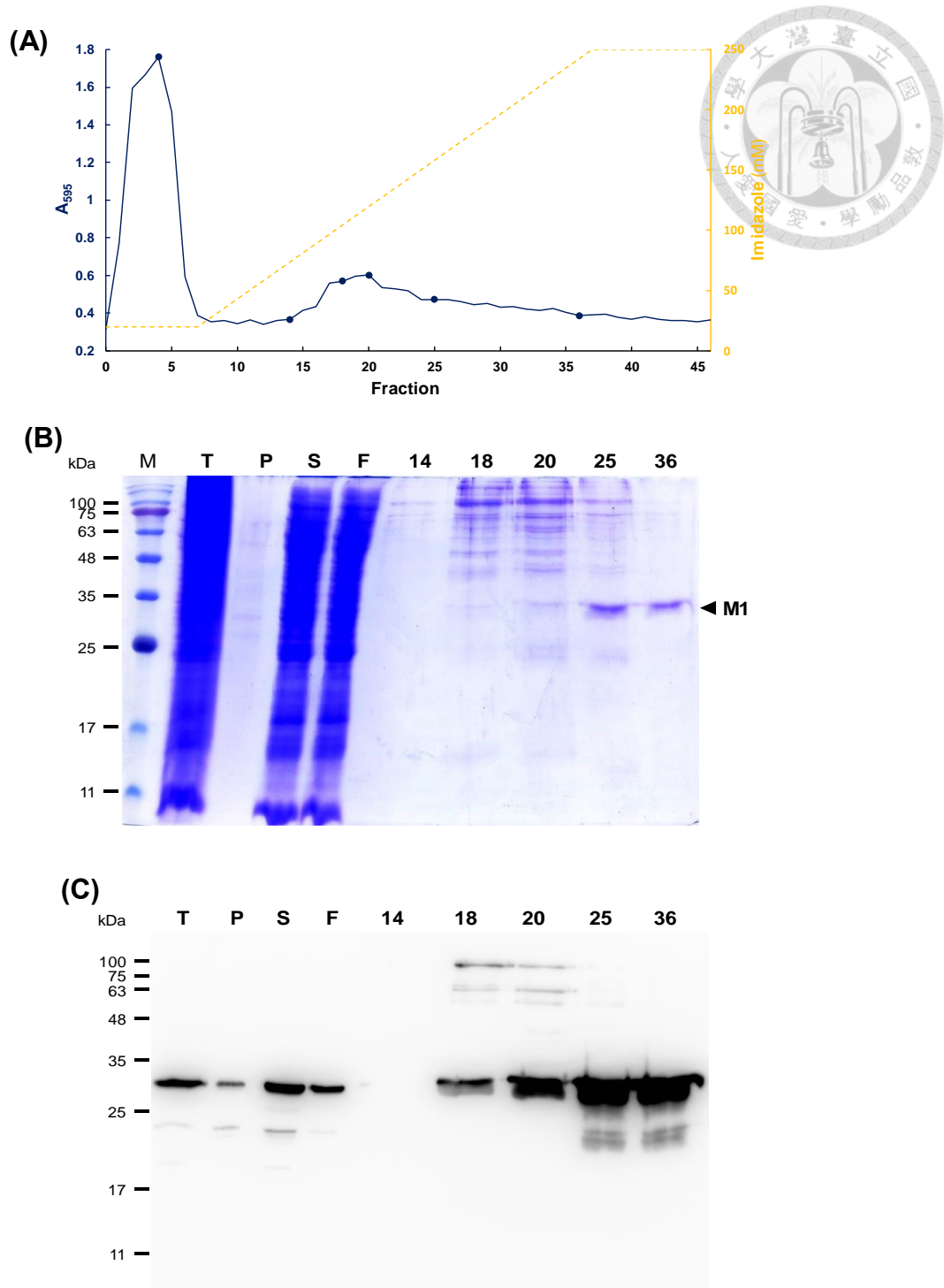
**圖六 H7N9 NS1 重組蛋白質之表現條件測試**

以 1, 5, 10 MOI 的病毒液感染量分別感染一定量的昆蟲細胞後，在第 0 至 6 天收集其細胞以免疫染色法進行蛋白質表現量的分析，以  $\alpha$ -Tubulin 作為表現的控制組。(A) NS1 在相同 MOI 不同感染天數的表現量比較；(B) NS1 在不同 MOI 相同感染天數的表現量比較。



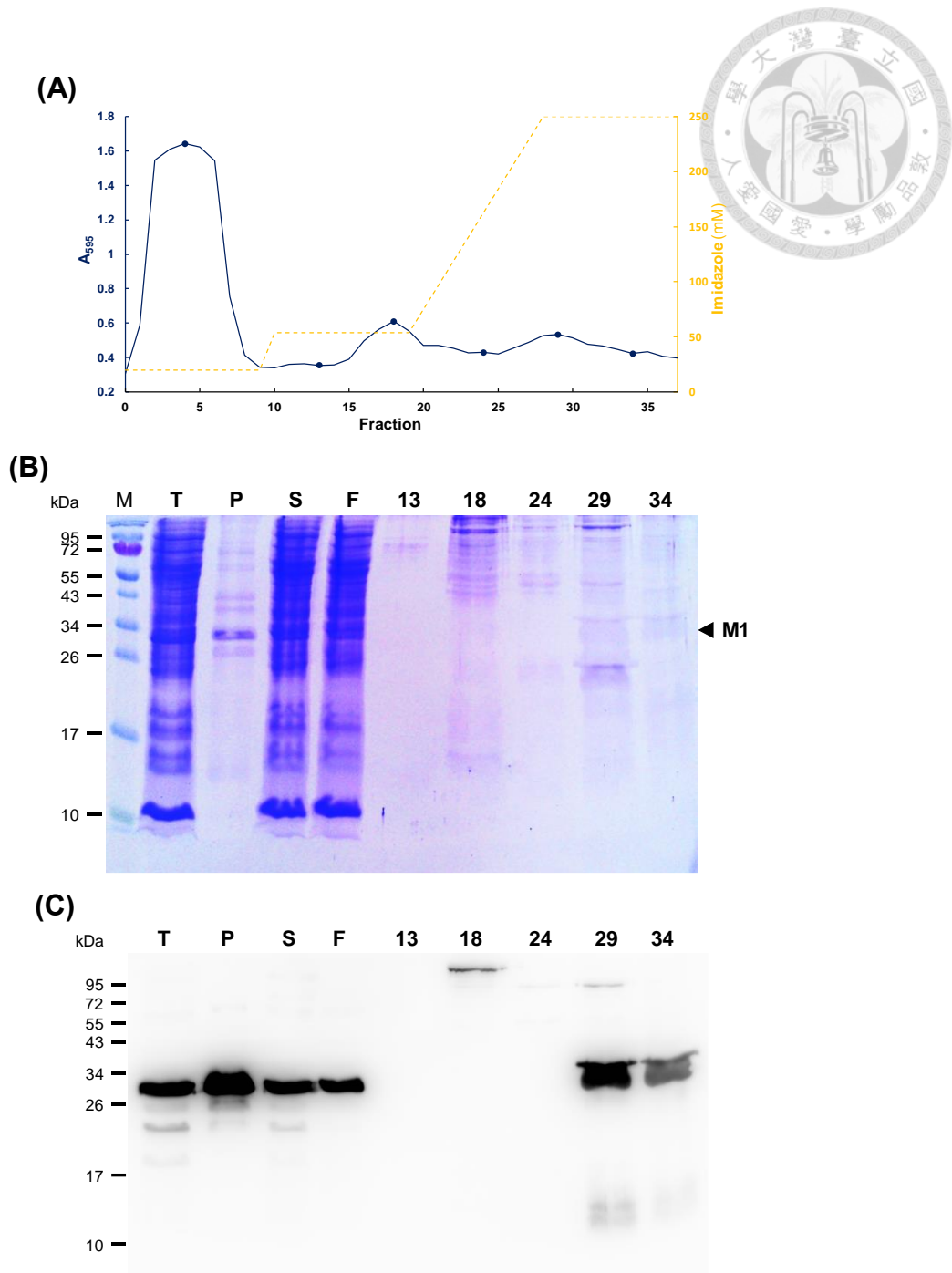
**圖七 H7N9 M2 重組蛋白質之表現條件測試**

以 1, 5, 10 MOI 的病毒液感染量分別感染一定量的昆蟲細胞後，在第 0 至 6 天收集其細胞以免疫染色法進行蛋白質表現量的分析，以  $\alpha$ -Tubulin 作為表現的控制組。(A) M2 在相同 MOI 不同感染天數的表現量比較；(B) M2 在不同 MOI 相同感染天數的表現量比較。



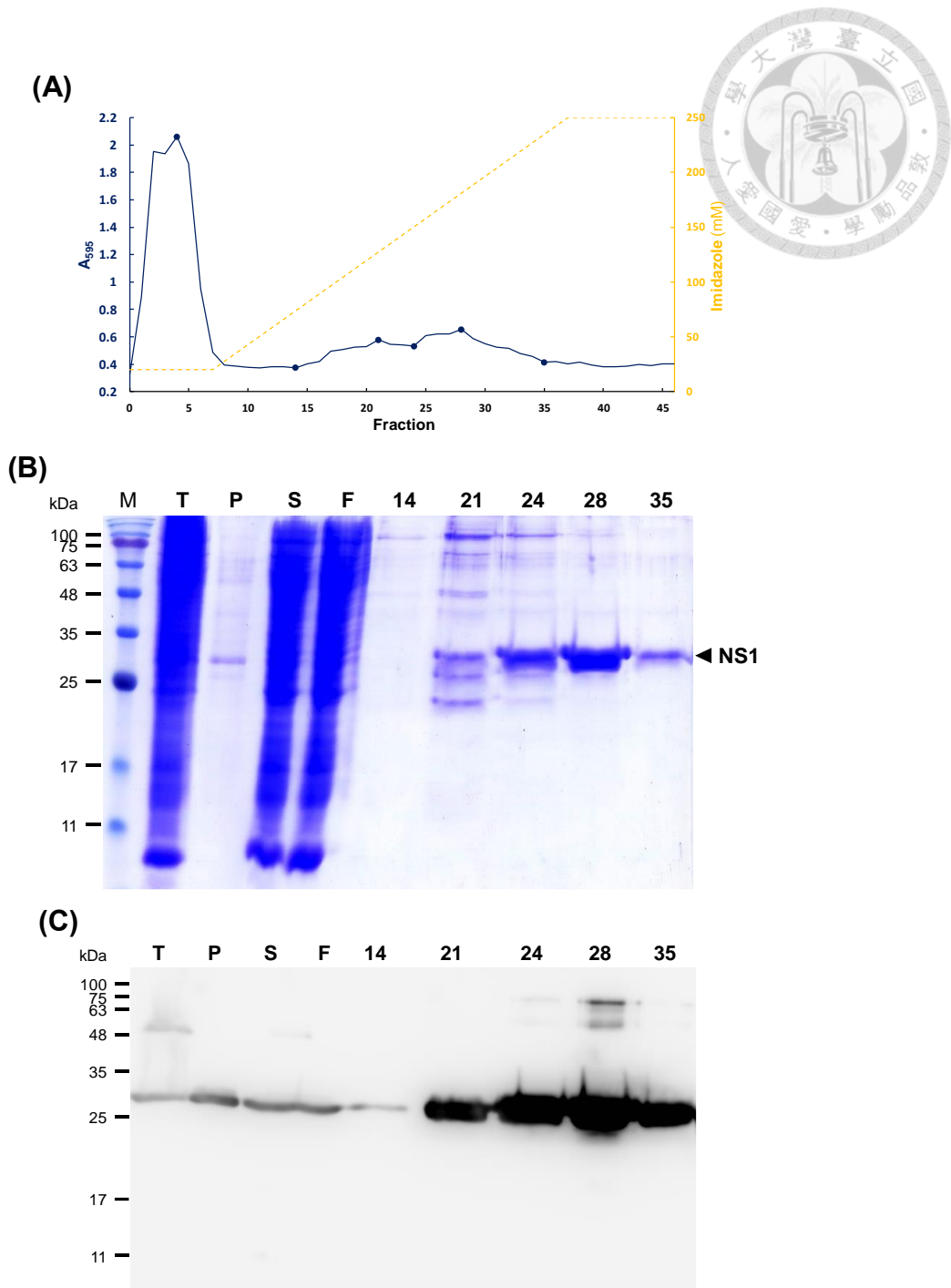
圖八 利用連續梯度純化 H7N9 M1 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞

以親和層析法使用 HisTrap™ FF 管柱與 ÄKTAprime plus FPLC 純化系統純化 H7N9 M1 重組蛋白質，以 20~250 mM Imidazole 連續性梯度流洗結合在管柱內的重組蛋白質。(A)利用 Bradford protein assay 測定蛋白質，作  $A_{595}$  吸光值對分劃的曲線，觀察蛋白質所在的管數。(B)利用 CBR 染色分析蛋白質的純度。(C)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認目標蛋白質的表現與分子量大小。T: Total cell lysate ; P: Pellet ; S: Supernatant ; F: Flow through。



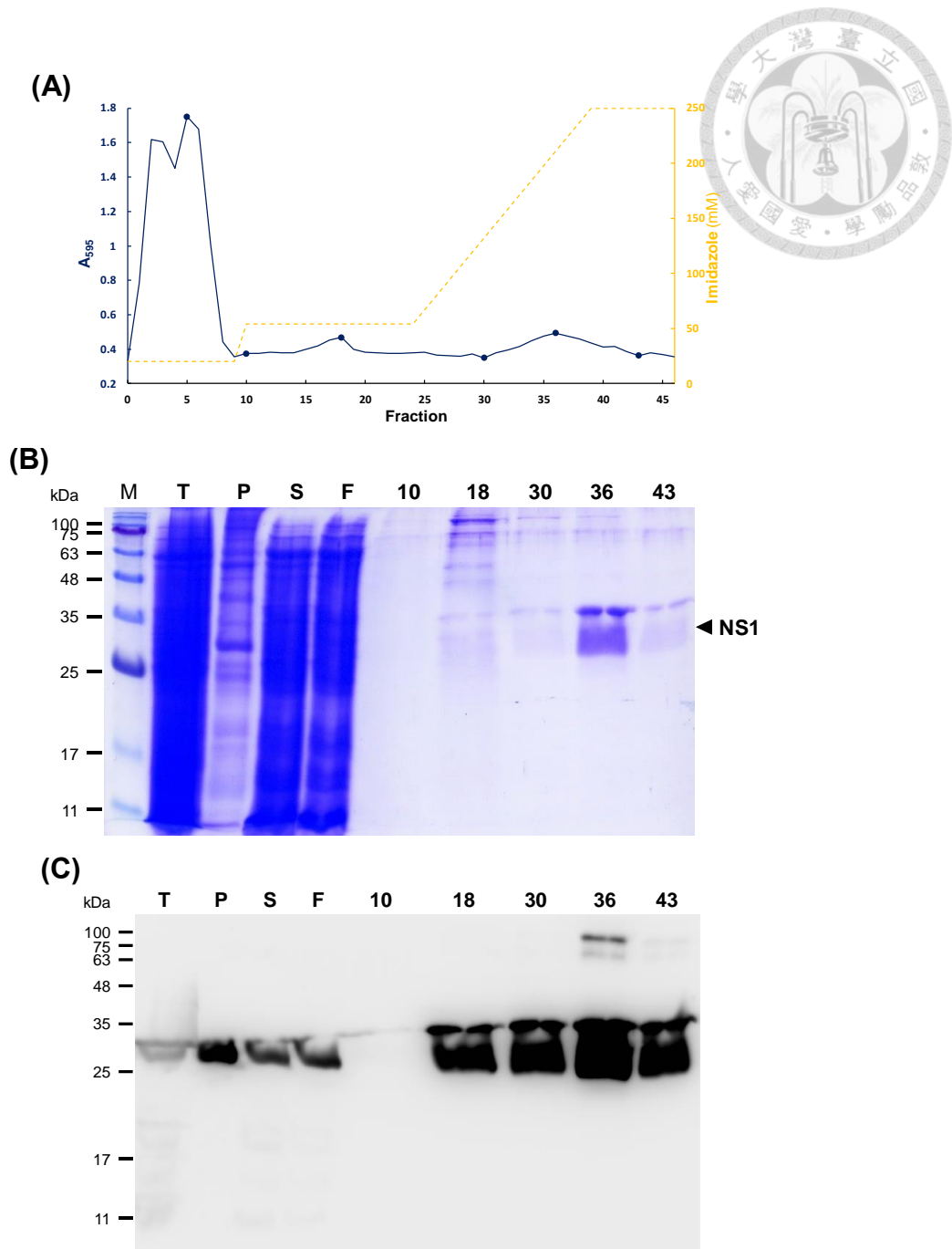
圖九 利用非連續梯度純化 H7N9 M1 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞

以親和層析法使用 HisTrap™ FF 管柱與 ÄKTAprime plus FPLC 純化系統純化 H7N9 M1 重組蛋白質，先用 50 mM Imidazole 清洗管柱，再以 50~250 mM Imidazole 梯度流洗結合在管柱內的重組蛋白質。(A)利用 Bradford protein assay 測定蛋白質，作 A<sub>595</sub> 吸光值對分割的曲線，觀察蛋白質所在的管數。(B)利用 CBR 染色分析蛋白質的純度。(C)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認目標蛋白質的表現與分子量大小。T: Total cell lysate; P: Pellet; S: Supernatant; F: Flow through。



圖十 利用連續梯度純化 H7N9 NS1 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞

以親和層析法使用 HisTrap™ FF 管柱與 ÄKTAprime plus FPLC 純化系統純化 H7N9 NS1 重組蛋白質，以 20~250 mM Imidazole 連續性梯度流洗結合在管柱內的重組蛋白質。(A)利用 Bradford protein assay 測定蛋白質，作 A<sub>595</sub> 吸光值對分割的曲線，觀察蛋白質所在的管數。(B)利用 CBR 染色分析蛋白質的純度。(C)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認目標蛋白質的表現與分子量大小。T：Total cell lysate；P：Pellet；S：Supernatant；F：Flow through。



**圖十一 利用非連續梯度純化 H7N9 NS1 重組蛋白質於 Sf21 昆蟲細胞**

以親和層析法使用 HisTrap™ FF 管柱與 ÄKTAprime plus FPLC 純化系統純化 H7N9 NS1 重組蛋白質，先用 50 mM Imidazole 清洗管柱，再以 50~250 mM Imidazole 梯度流洗結合在管柱內的重組蛋白質。(A)利用 Bradford protein assay 測定蛋白質，作 A<sub>595</sub> 吸光值對分割的曲線，觀察蛋白質所在的管數。(B)利用 CBR 染色分析蛋白質的純度。(C)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認目標蛋白質的表現與分子量大小。T: Total cell lysate; P: Pellet; S: Supernatant; F: Flow through。

**(A) M1**

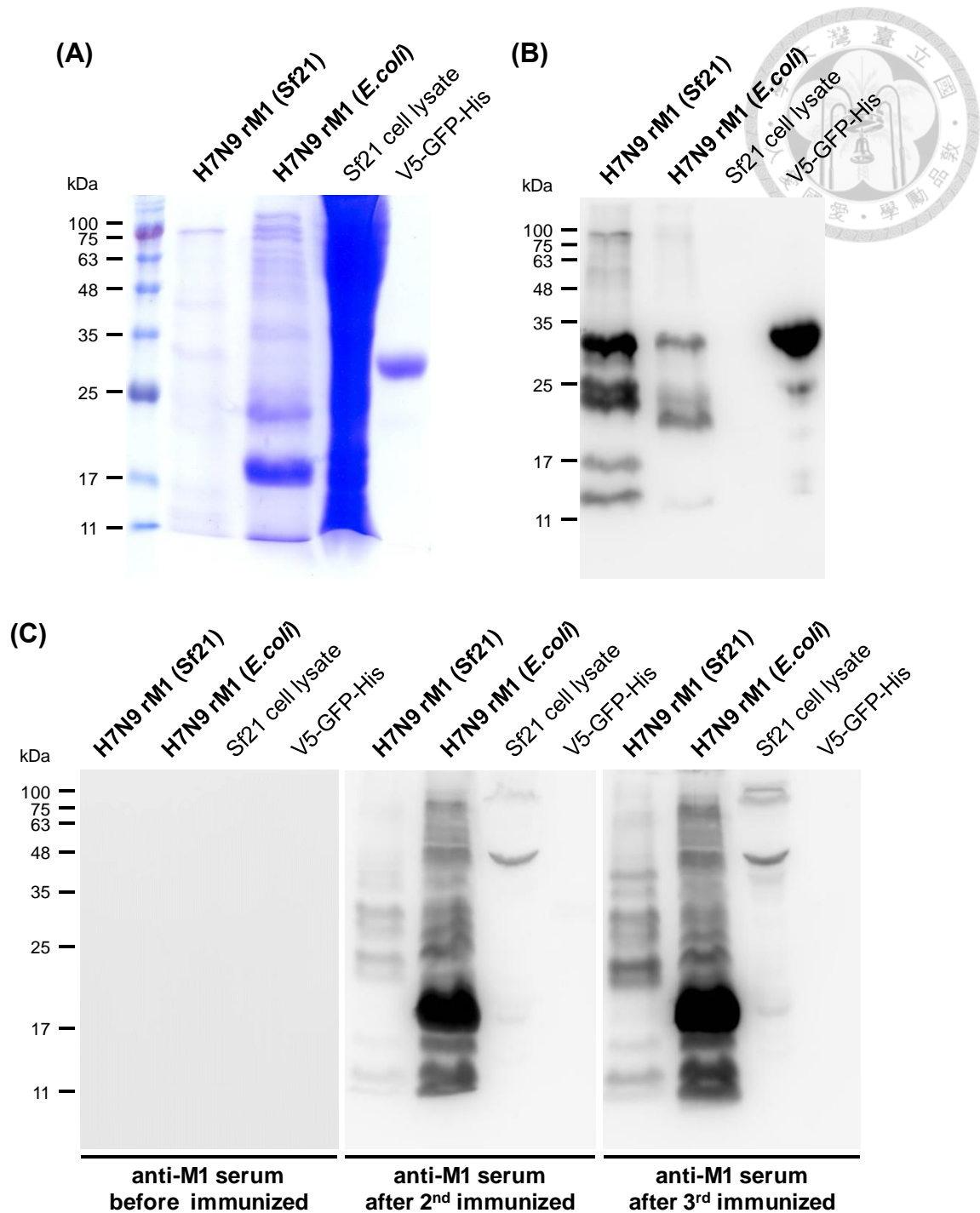
1 MSLLTEVETY VLSIIPSGPL **KAEIAQRLED VFAGKNADLE ALMEWIKTRP**  
 51 **ILSPLTKGIL** GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV **QNALNGNGDP NNMDKAVKLY**  
 101 KKLK**REMTFH** **GAKEVALSYS** TGALASCMGL IYNRMGTVTA EGALGLVCAT  
 151 CEQIADAQHR **SHRQMATTN** **PLIRHENRMV** **LASTTAKAME** **QMAGSSEQAA**  
 201 **EAMEVASQAR** **QMVQAMRTVG** THPNSSTGLK **DDLLENLQAY** **QNRMGVQLQR**  
 251 FK

**(B) NS1**

1 MDSNTVSSFQ VDCFLWHVRK **RFADQEMGDA PFLDRLRRDQ** KSLRGRSSTL  
 51 **GLDIRTATRE** GKHIVERILE **EESDEAFKMS** **IASVPAPRYL** **TDMTLEEMSR**  
 101 **DWLMLIPKQK** **ITGSLCIRMD** **QAIVDKNITL** **KANFSVIFNR** **LEALILLRAF**  
 151 **TEEGAIVGEI** **SPLPSLPGHT** **DKDVKNAIEI** **LIGGFENWLN** **TVRVSETLQR**  
 201 FAWRSSDEEDG **RSPLSTK**

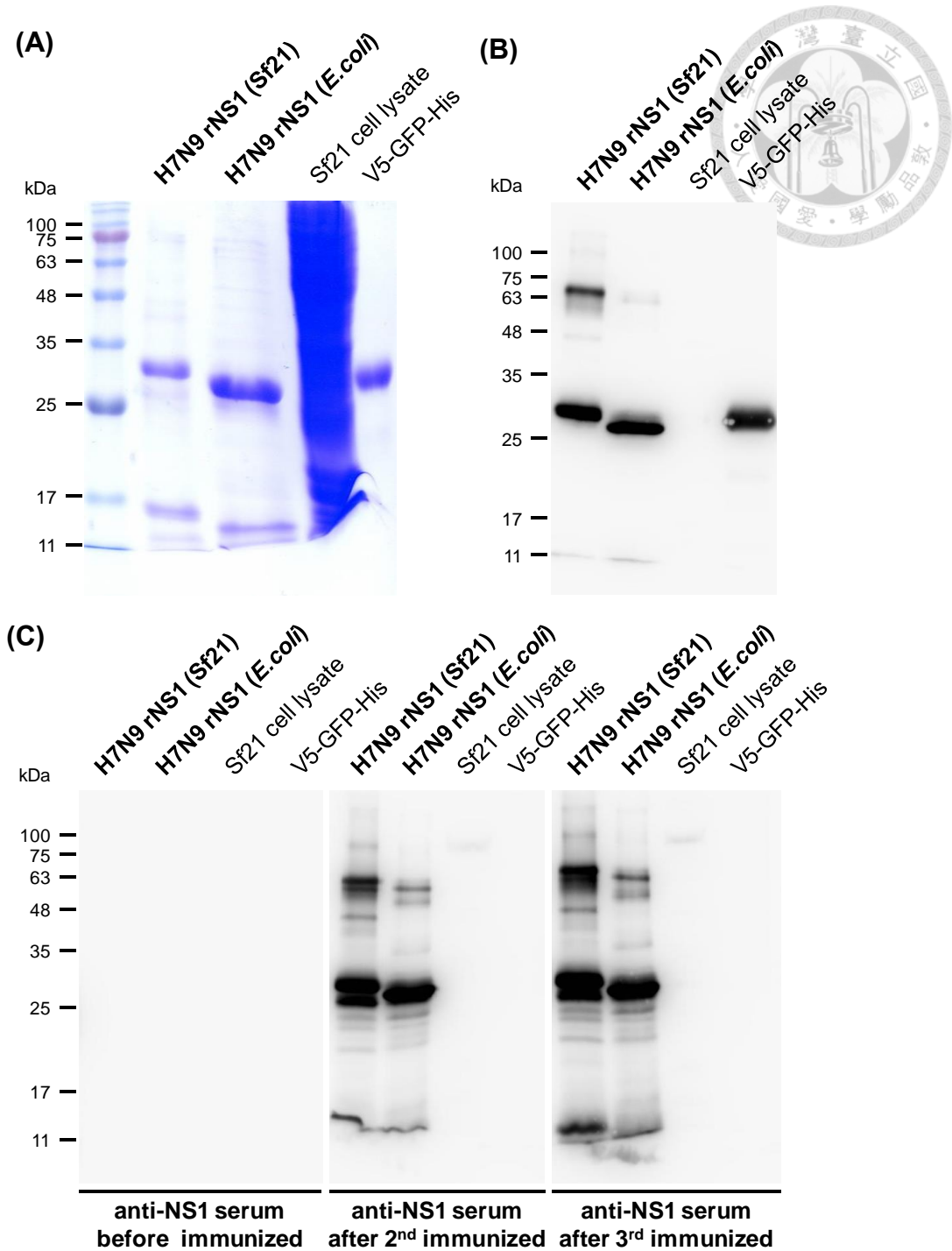
**圖十二 利用質譜儀分析確認 H7N9 M1 與 NS1 重組蛋白質。**

利用質譜儀分析與 Mascot 軟體比對重組蛋白質之胺基酸序列，紅色粗體字為胺基酸片段比對正確的序列。(A) M1 蛋白質序列 coverage 是 56.7% (143/252)。(B) NS1 蛋白質序列 coverage 是 81.1% (176/217)。



**圖十三 H7N9 M1 重組蛋白質之抗血清的效價測試**

將純化的 H7N9 M1 重組蛋白質免疫 BALB/c 小鼠以製備多株抗體，分別採集免疫前、第二次與第三次免疫後的小鼠血清，使用 Sf21 昆蟲細胞表現的 H7N9 M1 重組蛋白質、大腸桿菌表現的 H7N9 M1 重組蛋白質、Sf21 昆蟲細胞的全蛋白與 V5-GFP-His 蛋白質作為抗原，藉由免疫染色法進行效價的測試。(A) CBR 染色確認蛋白質。(B)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認蛋白質。(C)以免疫前、第二次與第三次免疫後的小鼠血清進行免疫染色法測試多株抗體的效價。



**圖十四 H7N9 NS1 重組蛋白質之抗血清的效價測試**

將純化的 H7N9 NS1 重組蛋白質免疫 BALB/c 小鼠以製備多株抗體，分別採集免疫前、第二次與第三次免疫後的小鼠血清，使用 Sf21 昆蟲細胞表現的 H7N9 NS1 重組蛋白質、大腸桿菌表現的 H7N9 NS1 重組蛋白質、Sf21 昆蟲細胞的全蛋白與 V5-GFP-His 蛋白質作為抗原，藉由免疫染色法進行效價的測試。(A) CBR 染色確認蛋白質。(B)以 anti-His 抗體進行免疫染色法確認蛋白質。(C)以免疫前、第二次與第三次免疫後的小鼠血清進行免疫染色法測試多株抗體的效價。



# 附錄



附錄表一 本論文使用之引子設計

Name	Sequence (5'→3')
M-F	CAAGGATCCAATGAGTCTTCTAACCGAGGTC
M1-R	CTTCTAGATCACTTGAACCGCTGCAGTTG
M2-F	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCTTACCAGAACCGGATGGGAG
M2-R	CTTCTAGATTACTTCAGCTCTATGTTGAC
NS-F	CAACCATGGATATGGATTCCAATACTGTGTC
NS1-R	GACTCGAGCTACTTTGTAGAGAGTGGAG
NS2-F	ATGGATTCCAATACTGTGTCAAGCTTCCAGGACATACTGACAAGGATGTC
NS2-R	CTCTCGAGTTAAATAAGCTGAAACGAGAAAG
pFB-HT-F	CCGGATTATTCATACCGTCC
pFB-HT-R	CTCTACAAATGTGGTATGGC
M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC

附錄表二 本論文使用之限制酶

Target	Restriction enzyme (forward/reverse)
M1	BamHI / XbaI
M2	BamHI / XbaI
NS1	NcoI / XhoI
NS2	NcoI / XhoI

**(A) H7N9 rM1**

## DNA sequence

1 **ATG**TCGTACT ACCATCACCA TCACCATCAC GATTACGATA TCCCAACGAC  
 51 CGAAAACCTG TATTTTCAGG GCGCCATGGA TCCA**ATGAGT** CTT**C**TAACCG  
 101 AGGTCGAAAC GTACGTTCTA TCTATCATTC CATCAGGCCC CCTCAAAGCC  
 151 GAGATCGCGC AGAGACTTGA GGATGTTTTT GCAGGGAAGA ACGCAGATCT  
 201 CGAGGCTCTC ATGGAGTGGA TAAAGACAAG ACCAATCCTG TCACCTCTGA  
 251 CTAAGGGGAT TTTAGGGTTT GTGTTACGCG TCACCGTGCC CAGTGAGCGA  
 301 GGACTGCAGC GTAGACGGTT TGTCCAAAAC GCCCTAAATG GGAATGGAGA  
 351 CCCAAACAAC ATGGACAAGG CAGTTAAATT ATACAAGAAA CTGAAGAGGG  
 401 AAATGACATT CCATGGAGCA AAGGAAGTTG CACTCAGTTA CTCAACTGGT  
 451 GCGCTTGCCA GCTGCATGGG TCTCATATAC AACAGGATGG GGACAGTAAC  
 501 TGCAGAAGGG GCTCTTGGAT TGGTATGTGC CACTTGTGAG CAGATTGCTG  
 551 ACGCACAACA TCGGTCCCAC AGGCAGATGG CAACTACTAC CAACCCACTA  
 601 ATTAGGCATG AGAATAGAAT GGTACTAGCC AGTACTACGG CTAAGGCTAT  
 651 GGAGCAGATG GCTGGATCAA GTGAACAGGC AGCGGAAGCC ATGGAAGTTG  
 701 CAAGCCAGGC TAGGCAAATG GTGCAGGCTA TGAGAACAGT CGGGACTCAC  
 751 CCTAACTCCA GTACAGGTCT AAAGGATGAT CTTATTGAAA ATTTGCAGGC  
 801 TTACCAGAAC CGGATGGGAG TGCAACTGCA GCGGTTCAAG **TGA**

## Protein sequence

1 MSYYHHHHHH DYDIPTTENL YFQGAMPMS LLTEVETYVL SIIPSGPLKA  
 51 EIAQRLEDVF AGKNADLEAL MEWIKTRPIL SPLTKGILGF VF~~TL~~VP~~SE~~R  
 101 GLQRRRFVQ~~N~~ ALNGNGDPNN MDKAVKLYKK LKREMTFHGA KEVALSYSTG  
 151 ALASCMGLIY NRMGTVTAEG ALGLVCATCE QIADAQHRSH RQ~~MA~~TTNPL  
 201 IRHENRMVLA S~~TT~~AKAMEQ~~M~~ AGSSEQAAEA MEVASQARQ~~M~~ VQAMRTVGTH  
 251 PNSSTGLKDD LIENLQAYQ~~N~~ RMGVQLQ~~R~~FK

附錄圖一 (A) H7N9 rM1 DNA 序列與蛋白質序列



## (B) H7N9 rM2

### DNA sequence

1 **ATG**TCGTACT ACCATCACCA TCACCATCAC GATTACGATA TCCCAACGAC  
 51 CGAAAACCTG TATTTTCAGG GCGCCATGGA TCCA**ATGAGT** CTT**C**TAACCG  
 101 AGGTCGAAAC GCTTACCAGA ACCGGATGGG AGTGCAACTG CAGCGGTTCA  
 151 AGTGATCCTC TCGTTGTTGC AGCTAACATT ATTGGGATAT TGCACTTGAT  
 201 ATTGTGGATT CTTGATCGTC TTTTCTTCAA ATGCATTTAT CGTCGCTTTA  
 251 AATACGGTTT GAAAAGAGGG CCTTCTACGG AAGGAATGCC TGAGTCTATG  
 301 AGGGAAGAAT ATCGGCAGGA ACAGCAGAAT GCTGTGGATG TTGACGATGG  
 351 TCATTTTGTC AACATAGAGC TGAAG**TAA**

### Protein sequence

1 MSYYHHHHHH DYDIPTTENL YFQGAMP**MS** LLTEVETLTR TGWECNCSGS  
 51 SDPLVVAANI IGILHLILWI LDRLEFFKCIY RRFKYGLKRG PSTEGMPESM  
 101 REEYRQEQQN AVDVDDGHFV NIELK

附錄圖一 (B) H7N9 rM2 DNA 序列與蛋白質序列

**(C) H7N9 rNS1**

## DNA sequence

1 **ATG**TCGTACT ACCATCACCA TCACCATCAC GATTACGATA TCCCAACGAC  
 51 CGAAAACCTG TATTTTCAGG GCGCCATGGA **TATGGATTCC** **AATACTGTGT**  
 101 **CAAGCTTCCA** **GGTAGACTGC** **TTTCTTTGGC** **ATGTCCGCAA** **ACGATTTGCA**  
 151 **GACCAAGAAA** **TGGGTGATGC** **CCCATTTCTA** **GACCGGCTTC** **GCCGAGATCA**  
 201 **GAAGTCCCTG** **AGAGGAAGAA** **GCAGCACTCT** **TGGTCTGGAC** **ATCAGAAGCTG**  
 251 **CCACGCGTGA** **AGGAAAGCAT** **ATAGTGGAGC** **GGATTTTAGA** **GGAAGAGTCA**  
 301 **GATGAAGCAT** **TTAAAATGAG** **TATTGCTTCA** **GTGCCAGCTC** **CACGCTATCT**  
 351 **AACTGACATG** **ACTCTTGAAG** **AAATGTCAAG** **AGATTGGTTA** **ATGCTCATTG**  
 401 **CCAAACAGAA** **AATAACAGGG** **TCCCTATGCA** **TTAGAATGGA** **CCAAGCAATA**  
 451 **GTGGACAAAA** **ACATCACATT** **GAAAGCAAAT** **TTCAGTGTGA** **TTTTCAATCG**  
 501 **GCTTGAAGCC** **CTGATACTAC** **TTAGAGCTTT** **TACGGAAGAA** **GGAGCAATTG**  
 551 **TAGGCGAAAT** **CTCACCATTA** **CCTTCTCTTC** **CAGGACATAC** **TGACAAGGAT**  
 601 **GTCAAAAATG** **CAATTGAGAT** **CCTCATCGGA** **GGATTTGAAT** **GGAATGATAA**  
 651 **CACAGTTCGA** **GTCTCTGAAA** **CTCTACAGAG** **ATTCGCTTGG** **AGAAGCAGCG**  
 701 **ATGAGGATGG** **GAGATCTCCA** **CTCTCTACAA** **AGTAG**

## Protein sequence

1 MSYYHHHHHH DYDIPTTENL YFQGAMD**MDS** **NTVSSFQVDC** **FLWHVRKRFA**  
 51 **DQEMGDAPFL** **DRLRRDQKSL** **RGRSSTLGLD** **IRTATREGKH** **IVERILEEES**  
 101 **DEAFKMSIAS** **VPAPRYLTDM** **TLEEMSRDWL** **MLIPKQKITG** **SLCIRMDQAI**  
 151 **VDKNITLKAN** **FSVIFNRLEA** **LILLRAFTEE** **GAIVGEISPL** **PSLPGHTDKD**  
 201 **VKNAIEILIG** **GFEWNDNTRV** **VSETLQRFWA** **RSSDEDGRSP** **LSTK**

附錄圖一 (C) H7N9 rNS1 DNA 序列與蛋白質序列



### (D) H7N9 rNS2

#### DNA sequence

1 **ATG**TCGTACT ACCATCACCA TCACCATCAC GATTACGATA TCCCAACGAC  
 51 CGAAAACCTG TATTTTCAGG GCGCCATGGA **TATGGATTCC** **AATACTGTGT**  
 101 **CAAGCTTCCA** **GGACATACTG** **ACAAGGATGT** **CAAAAATGCA** **ATTGAGATCC**  
 151 **TCATCGGAGG** **ATTTGAATGG** **AATGATAACA** **CAGTTCGAGT** **CTCTGAAACT**  
 201 **CTACAGAGAT** **TCGCTTGGAG** **AAGCAGCGAT** **GAGGATGGGA** **GATCTCCACT**  
 251 **CTCTACAAAG** **TAGAAACGGG** **AAATGGAGAG** **AACAGTTAAG** **CCAGAAGTTC**  
 301 **GAAGAAATAA** **GATGGTTGAT** **TGAAGAAGTA** **CGACATAGAT** **TAAAAATTAC**  
 351 **GGAGAATAGC** **TTTGAGCAAA** **TAACTTTTAT** **GCAAGCCTTA** **CAACTATTGC**  
 401 **TTGAAGTGGA** **GCAAGAGATA** **AGAACTTTCT** **CGTTTCAGCT** **TATT**TAA****

#### Protein sequence

1 MSYYHHHHHH DYDIPTTENL YFQGAMD**MDS** **NTVSSFQDIL** **TRMSKMQLRS**  
 51 **SSEDLNGMIT** **QFESLKLYRD** **SLGEAAMRMG** **DLHSLQSRNG** **KWREQLSQKF**  
 101 **EEIRWLIEEV** **RHRLKITENS** **FEQITFMQAL** **QLLLEVEQEI** **RTFSFQLI**

附錄圖一 (D) H7N9 rNS2 DNA 序列與蛋白質序列