

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

利用畢赤氏酵母菌醱酵生產台灣 GII.4 2006b 型諾羅病毒

類病毒顆粒及小型 P 粒子之純化與性質研究

Expression, purification and characterization of

Taiwan-native norovirus GII.4 2006b virus-like particle and

small P particle in *Pichia pastoris*

陳昱伶

Yu-Ling Chen

指導教授：黃慶臻 博士


Advisor: Ching-Tsan Huang, Ph.D.

中華民國 108 年 01 月

January, 2019



謝誌



從一個天馬行空的可能，在經過無數次的討論、校準及堅持後，終於使得這篇論文得以產生，這一切都要感謝黃慶臻老師的悉心指導與啟發，謝謝老師這六年多來的包容與照顧，雖然過程充滿各種曲折及變動，但也讓我歷練與學習到了不管面對生命中的任何變化，都要取絕對值理性面對積極處理，最後，再乘以零的處事哲學。感謝許瑞祥老師在各種跳脫思維框架與菇類方面所給予的啟發與建議，雖然菇類相關的實驗結果，還來不及做完整並搬來口試，但整個學習的過程已讓我受益良多。感謝張世宗老師，在實驗方面所提供的協助，貫徹著以前學長姐教導的-實驗課就是要修到可以靈活應用，並發表文獻的精神，身為第一屆修習更新版醇化實驗課的學生，在老師教學的啟發以及老師實驗室學生在儀器操作所提供的協助下，使得此篇論文中之純化策略得以孕育出來。研究期間，感謝長庚大學臨床醫學研究所 張沛鈞老師在實驗材料上所給予的各種協助，並且在百忙之中撥冗逐字批閱斧正文章，以及給予的諸多寶貴建議。感謝楊啟伸老師在論文上所給予的各種層面的啟發與建議，老師對細節及邏輯架構要求的精神使我印象深刻，未來我將秉持著這份精神繼續努力。

感謝 Lab106 的各個前人、今人和後人，建構及承傳著 106。還記得第一次推開 106 的大門，是在一個炎熱夏季的午後，適逢大家剛好在圓桌上沏茶休憩聊實驗，初來乍到的我，這一坐下來，就跟大家天南地北熱絡地聊了起來。感謝玉儒學姊，在繁忙的同時，撥冗給我實驗上的建議並給予我各種鼓勵。感謝嗣民、王董、昌廷與映慈學長姊，分享人生與實驗上的經驗，使我增長見聞。感謝泡泡，在即將離校的最後二個月，傳授我菇類轉形系統。感謝哩哩桑，給予我的各種協助，也謝謝有妳，與我一起腦力激盪，想實驗、做實驗，並且一起處理掉實驗室許多各種大小問題。與我一起走過摸索博一的承鴻、宛伶、彥鈞，以及帶給我歡笑與各種鼓勵的巧青、佳蕙、芝榕、俞均，開始轉化並接力承傳實驗室各種傳統的景翔、孟羲、凱琳、哲銘、映希、浩安、尚儒、冠陞，

以及後續陸續加入 106 的煒倫、麒倫、穎之、翔輔、宥儒、祐桓、少穎、玟聰、瑞祺等等，有幸能認識你們，與各位一起切磋，一起成長，相信大家在未來的道路上，都能開創出屬於自己的一片天，並完成自己的理想。

致我的好友婷婷與朱朱，感謝二位時常拎我出門放風、到處溜溜，並且忍受我出門永遠隨意，喜歡天外飛來一筆，腦袋容易開啟飛航模式。

感謝我的家人，謝謝親愛的妞妞，最後一年，感謝有妳，願意辭職回去幫忙照顧，家裡幸好有妳幫忙頂著，讓我安心把實驗完成，得以順利畢業。謝謝給我最大包容，給我最大支持，給我最大鼓勵及鞭策的爸爸與沒能看到我完成學業在天上的媽媽，你們在我心中，永遠是我最強大的支柱、後盾與避風港。最後感謝台灣這塊土地養育並栽培了我數十年，感恩在我生命中教導我、指引我、提攜我、幫助我的人，未來我將帶著這份感謝與感恩，繼續回饋這個社會。

昱伶 謹誌

2019 年 2 月

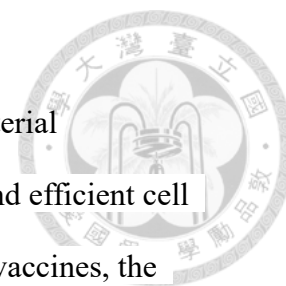
摘要

諾羅病毒為全球流行之非細菌性腸胃道致病菌。由於缺乏細胞株生產減毒或去活的諾羅病毒疫苗，諾羅病毒疫苗主要以類病毒顆粒為基礎發展。諾羅病毒衣殼蛋白質 VP1 之突出區(P (protruding) domain)，會構成由 12 個雙體化 P 蛋白質所組成之 P 粒子(P particle)，其抗原形態與病毒衣殼蛋白質 VP1 相同。因突出區具有三個多出來的環狀結構，能嵌入外來抗原，先前已做為外來抗原呈現平台。本研究欲使用分離自台灣本土株，GII.4 型諾羅病毒之突出區作為 P 蛋白質多抗原呈現平台之基礎。首先在表現部分，利用不具有內毒素疑慮、培養成本低廉且易於放大培養之畢赤氏酵母菌 *Pichia pastoris*，經醱酵槽培養，胞內 P 蛋白質產量可達 220 mg/L。其次，在純化策略方面，利用 P 蛋白質本身的電性及原態具有的組胺酸，本研究發展出二套無標籤純化策略：(1)利用宿主蛋白質與 P 蛋白質對管柱的吸附落差，P 蛋白質可經由離子交換管柱及疏水性管柱純化得到，但最終回收後產量僅有 2.5%。為進一步提升產量，(2)利用親和層析管柱(His-Trap)能與原態暴露在外之組胺酸吸附的特性，P 蛋白質可利用親和層析管柱及離子交換管柱純化，回收率為 28.1%，純度可達 82.1%。此外，藉由 VP1 蛋白質原態所具有的組胺酸，及 VP1 能組成顆粒之特性，原態之 VP1 顆粒亦能藉由親和層析管柱及膠體層析管柱純化，回收率為 20%，純度可超過 90%。純化出之 VP1 蛋白質經粒徑分析儀及穿透式電子顯微鏡檢測，VP1 能成功組成具有生物功能之粒子，能與成人唾液之 HBGA (human histo-blood group antigen)結合。與帶有組胺酸標籤(His-tag)之 P 蛋白質(P-His)相似，純化出之原態 P 蛋白質，經粒徑分析儀測定及穿透式電子顯微鏡觀測，二種 P 粒子皆呈現小型 P 粒子(small P particle)之三角形及四角形形態，顯示以酵母菌表現之台灣流行株 GII.4 型諾羅病毒 P 蛋白質，能構成由 6 個雙體化 P 蛋白質組成之小型 P 粒子。前人文獻指出，小型 P 粒子僅出現在 C 端突變之 P 蛋白質。而本研究之 P 蛋白質未經末端修飾即呈現小型 P 粒子，經與其它 GII.4 菌株序列比對，發現

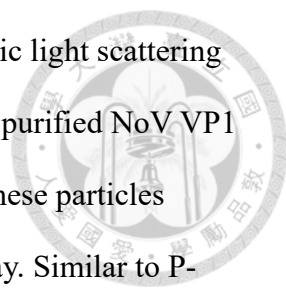
其中四個胺基酸對 P 粒子的形成可能扮演關鍵角色。當以綠色螢光蛋白質模擬外來抗原，呈現於 P 蛋白質的表面頂端，結果發現嵌合型 P 蛋白質不但能成功組成嵌合小型 P 粒子，亦能發出綠色螢光，顯示台灣分離株諾羅病毒 P 蛋白質能做為外來抗原呈現平台。本研究為首篇提供諾羅病毒 P 蛋白質酵母菌大量生產、無標籤簡易純化及確立小型 P 粒子亦能作為外來抗原呈現平台之研究。

關鍵詞：諾羅病毒、類病毒顆粒、小型 P 粒子、嵌合型 P 粒子、畢赤氏酵母菌、醱酵培養、無標籤純化

Abstract



Norovirus (NoV) is one of the leading causes of acute nonbacterial gastroenteritis outbreaks worldwide. Due to the lack of a reliable and efficient cell culture system for producing inactivated or attenuated whole NoV vaccines, the development of NoV vaccines relies largely on virus-like particles (VLPs) formed by the major capsid protein VP1 or subviral particles formed by the exterior protrusion (P) domain of VP1. The P particle is composed of 12 P dimers and revealed the same antigenic types as VLP. Additionally, due to the presence of three outermost surface loops in the P domain, the P particle could serve as a platform for carrying foreign antigens. The goal of this study is to provide the fundamental understanding of different constructs of P particles formed by the P domain of NoV strain GII.4 isolated from Taiwan to establish the multiple antigen presentation platform. The P domain was expressed in *Pichia pastoris*, a well-known expression system with several advantages including high cell density fermentation at low cost and non-risk of endotoxin. The production of NoV P protein reached 220 mg/L as a soluble form in fermentation cultures. The overexpression P protein provided the cornerstone for the development of tag-free P protein purification schemes. For purification of tag-free P protein, based on the charge and the surface histidine in native NoV, two purification schemes were developed: (1) The host cell proteins and the target P protein were separated by the difference of the binding strength to the chromatography column. Using anion-exchange and hydrophobic interaction chromatography purification schemes, NoV P protein with high purity was obtained. However, the P protein recovery was 2.5%. (2) Using the HisTrap affinity column and anion-exchange column, the native NoV P protein was purified, and recovery and purity were 28.1% and 82.1%, respectively. Besides, the NoV major capsid protein VP1 was also purified using the HisTrap affinity column and gel filtration column. The purity of



NoV VP1 protein was over 90% and the recovery was 20%. Dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) analysis of the purified NoV VP1 revealed that VP1 proteins were self-assembled into particles, and these particles remained HBGA binding ability as evidenced by saliva binding assay. Similar to P-His protein, the P protein also formed biologically functional small P particle composed by six of P dimer. The purified P-His and P protein, analyzed by TEM and DLS, were also revealed triangle-, square- and ring-shaped. Previous studies showed that the small P particles were only found with C-terminus modification. Without terminal modification, small P particles were formed in this study. The amino acid sequence analysis showed only four different amino acids between the P domain in this study and other investigated GII.4 strains, suggesting that these amino acids might play an important role in P particle formation. To extend the application of the small P particle, the green fluorescent protein was used to mimic the foreign antigen and inserted into NoV P loop2 distal end. From gel filtration and fluorescent microscopy, the chimera small P proteins were self-assembly into chimera small P particles and showed green fluorescence. It was indicated that these Taiwan native small P particle can be an antigen presentation platform. This study was the first report of NoV P protein covering overexpression in *P. pastoris*, easy handling tag-free purification schemes, and formation of small P particles without terminal modification as foreign antigen displaying platform.

Keyword: Norovirus, Virus-like particle, small P particle, chimera P particle, *Pichia pastoris*, fermentation cultures, tag-free purification

目錄



摘要.....	I
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章 前言.....	1
1. 類病毒顆粒疫苗.....	1
1.1 類病毒顆粒疫苗的發展優勢.....	1
1.2 類病毒顆粒的結構分類.....	1
2. 諾羅病毒介紹.....	2
2.1 諾羅病毒之流行病學.....	2
2.2 諾羅病毒的研究挑戰及替代的研究方案.....	3
2.3 諾羅病毒分子生物學特性及分類.....	5
2.4 諾羅病毒之細胞趨性.....	6
2.4.1 HBGA 之生合成路徑.....	6
2.4.2 人類諾羅病毒與不同 HBGAs 之結合特異性.....	7
3. 諾羅病毒類病毒顆粒 (VP1).....	10
3.1 諾羅病毒 VP1 結構.....	10
3.2 諾羅病毒類病毒顆粒之生產與純化.....	10
3.3 諾羅病毒疫苗.....	11
4. 諾羅病毒 P.....	11
4.1 P 粒子 (P particle).....	12
4.2 小型 P 粒子(Small P particle).....	13
4.3 諾羅病毒 P 粒子做為多抗原呈現平台.....	13
4.3.1 多抗原呈現平台.....	13
4.3.2 P 粒子攜帶外來抗原的策略.....	14
4.3.3 P 粒子成為疫苗的利基及攜帶外來抗原的例子.....	14
4.4 P 蛋白質之生產與純化.....	15
5. 嗜甲醇酵母菌(Methylotrophic yeast).....	18
5.1 甲醇代謝調控路徑(MUT pathway).....	18
5.2 <i>Pichia pastoris</i> 表現系統.....	19
5.2.1 菌株與甲醇表現型.....	20
6. 研究動機及具體目標.....	21
6.1 研究動機.....	21
6.2 研究目標.....	22
第二章 材料與方法.....	24

1. 培養機與藥品.....	24
2. 菌株與培養條件.....	25
2.1 細菌.....	25
2.2 真菌.....	25
2.3 菌種保存.....	26
3. 質體建構.....	26
4. <i>P. pastoris</i> 轉形.....	30
4.1 <i>P. pastoris</i> 勝任細胞製備.....	30
4.2 轉形 DNA 置備.....	30
4.3 電穿孔轉形.....	30
5. <i>P. pastoris</i> 轉形株篩選與培養.....	31
5.1 抗藥性濃度梯度篩選.....	31
5.2 搖瓶培養.....	31
5.3 醱酵槽培養.....	31
6. 轉形株螢光顯微鏡觀察.....	32
7. 異源蛋白質產物純化.....	32
7.1 蛋白質萃取.....	32
7.2 親和層析純化.....	33
7.3 離子交換純化.....	33
7.4 疏水性層析純化.....	34
7.5 膠體過濾法.....	34
8. 異源蛋白質分析.....	37
8.1 西方墨點法.....	37
8.2 LC-MS/MS.....	38
8.3 Indirect ELISA.....	38
8.4 唾液結合測試 (Saliva-binding assay)	39
8.5 穿透式電子顯微鏡.....	40
8.6 粒徑分析.....	40
第三章、結果.....	43
一、序列分析與結構模擬.....	43
1. 胺基酸序列分析.....	43
2. 結構模擬.....	43
3. 不同菌株之序列比對.....	43
二、組胺酸標籤(6xHis)之 P 蛋白質生產、純化及顆粒分析.....	50
1. <i>P. pastoris</i> 生產.....	50
2. 以組胺酸標籤(6xHis)純化.....	50
3. 物性分析.....	50
4. 功能性分析.....	51

三、原態 P 蛋白質之生產、純化及顆粒分析.....	55
1. <i>P. pastoris</i> 生產.....	55
1.1. 高表現量 P 轉形株篩選.....	55
1.2 搖瓶培養.....	55
1.3 醱酵槽培養.....	55
2. 開發無標籤純化策略.....	61
2.1 策略一: 利用雜蛋白質與目標蛋白質對管柱之吸附落差純化.....	61
2.2 策略二: 利用原態之組氨酸純化.....	66
3. 物性分析.....	73
4. 功能性分析.....	73
四、嵌有綠色螢光之原態 P 蛋白質生產及物性功能分析.....	79
1. <i>P. pastoris</i> 生產.....	79
2. 物性與功能性分析.....	79
五、組胺酸標籤(6xHis) VP1 蛋白質之生產與純化.....	83
1. <i>P. pastoris</i> 生產.....	83
2. 以組胺酸標籤(6xHis)純化.....	83
六、原態 VP1 蛋白質之生產、純化及顆粒分析.....	85
1. <i>P. pastoris</i> 生產.....	85
2. 利用原態之組氨酸純化.....	85
3. 物性分析.....	86
4. 功能性分析.....	86
第四章、討論.....	92
1. P 蛋白質產量之比較.....	92
2. 無純化標籤之純化策略探討.....	92
2.1 P 蛋白質之純化策略討論.....	92
2.1.1 策略一: 利用蛋白質之吸附落差純化.....	93
2.1.2 策略二: 利用原態之組氨酸純化.....	93
2.2. VP1 蛋白質之純化策略討論.....	94
3. 類病毒顆粒之顆粒性與生物功能性探討.....	95
3.1. P 蛋白質之顆粒性探討.....	95
3.2. VP1 蛋白質之顆粒性探討.....	95
3.3. VP1、P 與 P-6xHis 與 HBGA 之結合差異討論.....	97
3.4. 組胺酸(6xHis)對 P 蛋白質之影響.....	98
4. P 蛋白質之延伸應用性.....	99
第五章、總結.....	101
第六章、未來工作與展望.....	102
第七章、參考文獻.....	105
附錄.....	117

圖目錄

圖 1-1、人類諾羅病毒基因組成和結構.....	8
圖 1-2、FUT1、FUT2 和 FUT3 酵素生合成 HBGA 之路徑.....	9
圖 1-3、P particle 與 Small P particle cryo-EM 結構圖.....	16
圖 1-4、P 蛋白質外來抗原嵌入模擬圖.....	17
圖 1-5、研究架構.....	23
圖 2-1、載體建構.....	29
圖 3-1、台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 VP1 胺基酸序列.....	45
圖 3-2、台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 VP1 蛋白質結構模擬.....	46
圖 3-3、演化樹分析 17 種不同 GII.4 型菌株之 P 胺基酸序列.....	47
圖 3-4、GII.4 型諾羅病毒之 P domain 序列比較及台灣分離株結構模擬.....	49
圖 3-5、轉形株 P-His (A)以搖瓶誘導表現及(B)以 His-Trap 管柱純化.....	52
圖 3-6、純化之 P-His 蛋白質物理特性分析.....	53
圖 3-7、HBGA 結合測試.....	54
圖 3-8、高表現量 P 轉形株塞選.....	57
圖 3-9、轉形株 P (A) 23 及 30°C (B) 30°C 之誘導培養.....	58
圖 3-10、以醱酵槽大量生產 P 蛋白質.....	60
圖 3-11、分離純化流程圖.....	63
圖 3-12、P 蛋白質與宿主蛋白質之線性沖提圖譜.....	64
圖 3-13、二次階梯式沖提及一次疏水性管柱純化之分析結果.....	65
圖 3-14、台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 P 及 P-6xHis 組胺酸預測結構圖.....	68
圖 3-15、轉形株 P 之搖瓶與醱酵槽之醱酵液以 His-Trap 管柱純化.....	69
圖 3-16、轉形株 P 之搖瓶及醱酵槽醱酵液以陰離子交換管柱二次純化.....	70
圖 3-17、純化之 P 蛋白質物理特性分析.....	75
圖 3-18、HBGA 結合測試.....	77
圖 3-19、粗萃之 P 蛋白質顆粒性分析.....	78
圖 3-20、螢光顯微鏡觀察嵌綠色螢光諾羅類病毒顆粒(P-GFP)酵母菌轉形株...80	
圖 3-21、P-GFP 嵌合蛋白質之顆粒性分析.....	82
圖 3-22、轉形株 VP1-His 醱酵液以 His-Trap 管柱純化.....	84
圖 3-23、台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 VP1 及 VP1-His 組胺酸預測結構圖..87	
圖 3-24、轉形株 VP1 醱酵液以 His-Trap 及膠體層析管柱純化及分析.....	89
圖 3-25、純化之 VP1 蛋白質物理特性分析.....	90
圖 3-26、HBGA 結合測試.....	91
附圖 1、人類諾羅病毒之傳染途徑.....	118
附圖 2、諾羅病毒基因組和基因型.....	119
附圖 3、諾羅病毒組成與生活史.....	120
附圖 4、生合成 HBGA 之路徑.....	122

附圖 5、ABH、Lewis 及相關抗原生合成路徑圖.....	123
附圖 6、諾羅病毒衣殼蛋白質 VP1 組裝成病毒顆粒模擬圖.....	125
附圖 7、VA387 (GII.4) 與 HBGA 之結合界面的晶體結構.....	126
附圖 8、比較 GII.4 與 GI.1 和 GII.3 之 P 蛋白質結構.....	127
附圖 9、嗜甲醇酵母菌甲醇代謝路徑.....	128
附圖 10、以西方墨點法偵測原態或帶有組胺酸之 VP1 或 P 蛋白質.....	129

表目錄

表 2-1、質體建構所使用之引子.....	28
表 2-2、層析所使用之緩衝液.....	36
表 2-3、西方墨點法分析所用試劑之組合成分.....	41
表 2-4、酵素連結免疫反應所用試劑之組合成分.....	42
表 3-1、諾羅病毒 P 蛋白質之回收與純度表.....	72
附表 1、諾羅病毒類病毒顆粒之穩定性研究.....	130
附表 2、諾羅病毒疫苗的發展現況.....	131
附表 3、不同碳源對嗜甲醇酵母菌 AOX 基因的抑制和去抑制作用.....	132



第一章 前言

1. 類病毒顆粒疫苗

類病毒顆粒(VLP; virus-like particle)於 1968 年，首次於感染 B 型肝炎的病人血漿中被純化出來[1, 2]。10 多年後，第一支利用基因重組技術，以大腸桿菌所表現的口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus; FMDV)類病毒顆粒疫苗被研發出來，並用於接種牛和豬上[2, 3]。經過 30 多年的發展，以類病毒顆粒(Virus-like particles; VLPs)為基礎發展的疫苗，已廣為人接受並大量的應用於許多疾病的預防及治療。類病毒顆粒不僅可做為基因治療工具及新的奈米材料，以高通量篩選技術，結合蛋白質工程以及化學耦合(chemical coupling)，還可擴展疫苗學、基因傳遞、免疫治療和生物奈米技術的應用性[4]。

1.1 類病毒顆粒疫苗的發展優勢

傳統疫苗是將分離的病原體經由減毒或去活後呈現給人體的免疫系統以產生抗體，進而達到免疫的效果，但此種方式僅限於可培養且變異度低的病原體。此外，使用活體病原菌，如果去活或減毒不完全將造成安全疑慮[5]。

類病毒顆粒係由多個次單元(subunit)蛋白質組成的複合物，可自我組裝成與病毒相似的 3D 構造。類病毒顆粒具有重複性的表面結構，能誘發較佳的免疫反應，並可經由基因重組的方式將病毒的外鞘蛋白基因送入宿主大量表現，不似傳統疫苗受限於需先分離培養病原菌。類病毒顆粒缺乏病毒的遺傳物質，無法自我複製而不帶有病原性，是個高安全及高免疫原性的疫苗平台。經由不同的策略，幾乎任何類型的分子皆可經由類病毒顆粒呈現給免疫系統[5, 6]。

1.2 類病毒顆粒的結構分類

根據病毒結構，類病毒顆粒可分為二大類：不具外套膜類病毒顆粒(non-enveloped VLPs)及帶有外套膜類病毒顆粒(enveloped VLPs) [4]。

不具外套膜類病毒顆粒通常由一種或多種會自我組裝形成類病毒顆粒的外鞘蛋白質所組成，從宿主表現後，不帶有宿主的任何成份。此外，類病毒顆粒可以進一步發展成一個抗原呈現平台，使外來嵌入的抗原能借由病毒的組裝特性，以高重複性、系統性的方式呈現給免疫系統。類病毒顆粒抗原呈現平台，可做為疫苗對抗任何病原菌，包含慢性非傳染性疾病如癌症和過敏[6]。

帶有外套膜類病毒顆粒的結構相對較複雜，由宿主細胞膜與目標抗原一同組成在外鞘上。帶有外套膜的類病毒顆粒為一個高度靈活的平台，能整合呈現更多來自相同或相異病原菌的抗原[6, 7]。

2. 諾羅病毒介紹

病毒、細菌、真菌、寄生蟲、毒素或普利昂蛋白(prions)皆可經由食物和水傳播，並經由糞口途徑引發食源性疾病，雖然食源性病毒僅能在宿主細胞複製，無法在食物、水以及貯藏期間增加，但是它比細菌更能抵抗高溫、極端 pH 及消毒劑，並且只要少量的病毒顆粒就能致病，因此一般食品加工處理程序無法有效去除病毒病原體[8]。

2.1 諾羅病毒之流行病學

1968 年諾羅病毒首次在美國俄亥俄州諾沃克(Norwalk, Ohio)爆發[9]。疫情通常爆發在人群大量聚集的地方，如醫院 學校、游泳池、軍事基地等。諾羅病毒的主要感染途徑為糞口傳染，一般受汙染的食物和水為首要傳染源，接著再經由人與人的接觸進一步傳播，最後爆發 (如附圖 1)[10]。全球每年有 1.25 億的人口感染諾羅病毒[11]。感染諾羅病毒的症狀包含腹瀉、嘔吐、噁心、腹部絞痛、畏寒、頭痛、脫水和高燒。病毒具有 1~3 天的潛伏期，症狀會持續 2-3 天，並根據個人的免疫能力而有所增減[12]。雖然嚴重到需要入院治療的以幼兒為大宗，但花費最多 死亡率最高的確是以長者為主。由於諾羅病毒有許多不同的菌株，人

體很難長期對此種病毒免疫，因此在一生中可能會反覆感染這項疾病[13]。

諾羅病毒能造成大流行的原因包含，第一、低劑量即可致病(<20 病毒顆粒)，第二、在發病期間，高濃度的病毒顆粒會隨著糞便一起排出(每克的病人糞便有 10^6 到 10^9 之病毒顆粒)，並在發病結束後4-8週內糞便還是可能帶有具感染的病毒顆粒，第三，發病之病人呈霧化之嘔吐物有助於病毒的傳播，第四、病毒一但存在環境中，數週內仍能保有傳染力，由於病毒顆粒極其穩定，以一般的清潔劑或消毒殺菌劑，以常用濃度或一般的處理時間難以完全去除活性[14]。

農產品與海鮮為主要帶有諾羅病毒的高風險食物。在美國自1998-2005年有40%的諾羅病毒大流行來自農產品，帶有諾羅病毒的主要污染途徑，來自於使用被污染的水灌溉、施肥或清洗。因蔬菜和水果中存有非常多的葡萄糖和多聚醣，其中醣類的基團類似諾羅病毒的受體HBGAs (human histo-blood group antigens)，目前認為諾羅病毒也可能經由附著在類似HBGAs的醣類上，進而污染食物[8]。另一個會帶有諾羅病毒的高風險食物為海鮮，特別是像貽貝，牡蠣和蛤等雙殼貝類。由於它們是濾食性攝食動物，在存有病毒的水中，更容易遭到污染，而且根據生長的地點、季節以及檢測方式的靈敏度，會決定諾羅病毒的污染程度。例如從研究指出，諾羅病毒的病毒顆粒會結合在牡蠣中腸內的消化盲囊上，結合在相似於人類HBGAs分子的地方[15]；不同的諾羅病毒基因型，對不同的牡蠣組織會有不同的親和力，因此不同的諾羅病毒基因型會有不同的生物累積量。在許多大爆發的事例中，皆是與食用生的或未煮熟的貝類有關。

2.2 諾羅病毒的研究挑戰及替代的研究方案

諾羅病毒之病毒顆粒於1972年第一次被觀察到，為GI.1大小27 nm之顆粒[9]。往後幾年許多實驗室也致力於發展體外培養平台。而在人類諾羅病毒的研究上，主要遇到二大挑戰，第一，人類諾羅病毒無法從細胞培養中取得，第二，人類諾羅病毒沒有小型的動物培養模式[8]。然而隨著時間的推移，人類諾

羅病毒體外培養有許多重大的突破。於 2007 年，研究人員能以三維之人類腸組織培養諾羅病毒，並且發現人類諾羅病毒傾向感染腺上皮細胞(glandular epithelial cells)並複製[16, 17]，然而這套系統卻無法套用在其他實驗室培養諾羅病毒[18, 19]，因此之後少有研究使用此套系統。

於 2014 年 Jones 等人於諾羅病毒的體外培養有了突破，而契機在於發現，染了人類諾如病毒的黑猩猩其 B 細胞可以產生病毒衣殼蛋白質[20]，以及某些腸道細菌帶有組織血型抗原(histo-blood group antigens；HBGAs) [21]，根據這二點，Jones 團隊成功使人類諾羅病毒基因拷貝數增加了 600 倍，於帶有腸道細菌的 B 細胞(BJAB)中[22]。具體來說，這套培養系統諾羅病毒複製需要游離的 H 型 HBGA 或帶有 H HBGA-like sugars 之腸道細菌(*Enterobacter cloacae*)，做為病毒複製的輔助因子。然而此套培養系統卻有，第一、與腸道細菌(*E. cloacae*)共培養如操作不慎容易引發汙染，然而以帶有人工合成的 HBGAs 溶液做替代並共培養，則有成本高昂以及因合成和純化上的差異而有品質不一的問題，第二、人類諾羅病毒感染 B 細胞，不會產生明顯的細胞病變，因此定量需仰賴 RT-qPCR [14]。

近期，Ettayebi 等人於 2016 年成功地利用幹細胞所衍生的人類腸道細胞培養 GII.4 和 GII.3 人類諾羅病毒株[23]。此套系統之優勢包含，第一、能提供多種人類諾如病毒株複製，第二、感染病毒的細胞能出現細胞病變作為判讀，第三、與流行病學所觀察到之帶有不同 HBGA 宿主其感染模式一致。但缺點為培養時間長及維護成本高，因此無法做為常規食品及水質之病毒檢驗[14]。

雖然野生型小鼠無法使人類諾羅病毒複製，免疫缺陷鼠能使部分人類諾羅病毒複製，並且人類諾羅病毒可以在大型動物如無菌豬、無菌牛和黑猩猩體內複製[14]，然而無論是免疫缺陷鼠或大型動物，皆有高培養成本、需專業動物養護設備以及具有動物倫理問題，近期美國國家衛生研究院 (NIH) 宣布停止支助使用黑猩猩的研究資金[24]，就是其中的一例。

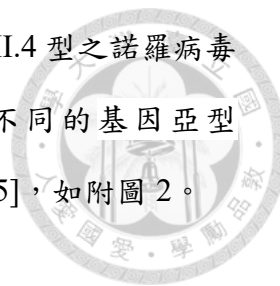
由於先前人類諾羅病毒無法以細胞培養及動物培養模式取得[14]，因此，大量的研究是以諾羅病毒的病毒顆粒(VP1)及老鼠的諾羅病毒，或與諾羅病毒同屬杯狀病毒科(*Caliciviridae*)的貓杯狀病毒(Feline Calicivirus ; FCV)、Porcine sapovirus 和 Tulane virus 做取代，間接研究其特性[8]。

2.3 諾羅病毒分子生物學特性及分類

諾羅病毒(Noroviruses)屬杯狀病毒科(*Caliciviridae*)、諾羅病毒屬(*Norovirus*)，為單鏈、正股 RNA、無包膜病毒，病毒顆粒為高度穩定的二十面對稱體，基因體長度約 7.5-7.7 kb，由三個開放式閱讀框架 (open reading frames; ORF)所組成。ORF1 會轉譯出非結構性病毒蛋白酶；ORF2 會轉譯出諾羅病毒的主要結構蛋白質 VP1；ORF3 會轉譯出次要結構蛋白 VP2 (圖 1-1) [25]。VP1 蛋白質在病毒中扮演重要角色，它會與宿主細胞表面的 HBGA (histo-blood group antigen) 結合，使病毒進入細胞[26] (如附圖 3)，因此不同的諾羅病毒具有不同抗原特異性。VP2 則會加強 VP1 內部的穩定，幫助外鞘蛋白質(VP1)的組裝及協助病毒基因的封裝 [27,28]。諾羅病毒為由 90 個 VP1 二聚體(dimer)所組成，體外表現會自我組裝的 VP1 類病毒顆粒，其大小、形狀及免疫原性皆與諾羅病毒相似，目前已做為疫苗，並進入人體臨床測試 [29]。

諾羅病毒根據基因組序列，目前分成七種基因組(genogroups)，其中 genogroups I、II 和 IV (GI、GII 和 GIV)會感染人類，但 GII 也會感染豬隻，GIV 則會感染貓科及犬科動物，而 GVI 和 GVII 感染犬科動物，GIII 和 GV 分別感染牛及啮齒動物[30]。根據病毒衣殼 (VP1)及 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)之蛋白質序列[31]，七種基因組(genogroups)可個別再細分成不同基因型(genotypes)，其中 9 個 GI (GI.1-GI.9)、19 個 GII (GII.1-GII.10, GII.12-GII.17, GII.20-GII.22)及 1 個 GIV (GIV.1)基因型可感染人類[32]。全球最廣為流行及研究的人類諾羅病毒為 GII.4 型[8]。例如在 2006-2012 文獻指出台灣腹瀉事件中，GII.4 同

樣為主要流行株 [33, 34]。根據諾羅病毒爆發與流行之時間，GII.4 型之諾羅病毒藉由 VP1 之高變異區 P domain (突出區)，可再分類成不同的基因亞型 (subgenotype)，例如 2006a、2006b、2009 及 2012 等[30, 34, 35]，如附圖 2。



2.4 諾羅病毒之細胞趨性

了解病毒與宿主間的交互作用及病毒受器，才能進而了解病毒特定的宿主範圍及病原性。

2.4.1 HBGA 之生合成路徑

HBGAs (human histo-blood group antigens) 為諾羅病毒進入到人體的受器 (receptor) 或輔助受器 (co-receptor) (如附圖 3)。HBGAs 為聚醣複合物，會連結在醣蛋白 (glycoproteins) 或醣脂質 (glycolipids) 呈現在紅血球細胞或黏膜上皮細胞上，或者以游離的方式在血液、唾液、腸道內或乳汁等生物體中流動。HBGAs 抗原的合成，主要受控於 ABO、Lewis 和 secretor 基因家族[36]。如圖 1-2 所示，抗原前驅物 (precursor) 之結構有三個，type 1 (Gal β 1-3 GlcNAc β)、type 2 (Gal β 1-4 GlcNAc β)、type 3 (Gal β 1-3 GalNAc α) [37, 38]；人類 ABO 血型之 ABH 抗原，不同於分泌型 (secretors)，受 FUT1 (fucosyltransferase 1) 控制催化 fucose 轉移至 type 2 前驅物，產生 H 抗原供後續 A 或 B 酵素反應產生 A、B 抗原[13, 36, 37]，孟買血型 (Bombay blood group) 及亞孟買血型 (Para-bombay blood group) 即是 FUT1 缺失或突變無法產生 H 抗原之例子[39]。分泌型 (secretors) 則不同於血型，受控於 FUT2 (fucosyltransferase 2) 催化 fucose 轉移，當缺乏 FUT2 則為非分泌型 (non-secretors)，無法合成 ABH 抗原並分泌至唾液和粘膜等分泌物中[13, 36]，而亞孟買血型 (Para-bombay blood group) 即為雖 FUT1 缺失但 FUT2 還保有功能之例子[39, 40]；特別的是，FUT2 也能催化 type 2 前驅物在粘膜 (mucosa)[36]。FUT3 (fucosyltransferase 3) 又稱為 Lewis 酵素同樣會催化 fucose

轉移，如果為非分泌者，則表型有 Lewis a，如果為分泌者，則表型有 Lewis b；當 type 2 前驅物被 FUT1 或 FUT2 催化者，則表型有 Lewis y，如果沒有催化者，則表型有 Lewis x [13, 36]，如附圖 4。



2.4.2 人類諾羅病毒與不同 HBGAs 之結合特異性

首次從臨床感染發現諾羅病毒會辨識 HBGAs，是經由人體自願受試的研究結果得知，研究結果發現，O 型及 A 型人有極高的機率感染 prototype Norwalk virus (GI-1)，而唾液檢測幾乎不與諾羅病毒結合的 B 型人，在人體測試中發現也幾乎不受諾羅病毒感染，非分泌型(nonsecretors)者則有自然抗性，完全不受感染，相似的結果也發生在諾羅病毒(GI-1)大流行期間 [41, 42]。而以人體測試諾羅 GII.4 Farmington Hills 2002 病毒，從受試結果報告也可觀察到，70%具有 FUT2 功能(即分泌型)之健康成年人會受到諾羅病毒之感染，其中有 57%出現了感染症狀，而沒有 FUT2 功能(即非分泌型)之健康成年受試者，僅有一人(6%)感染，並且症狀輕微[43]，相似的結果也可以在唾液檢測(saliva-binding assay)中觀察到，GII.4 會結合 A、B、O 等分泌型，但卻無法與非分泌型結合[35]。此外，根據合成時不同來源之前驅物(type1-3)(附圖 4)，諾羅病毒有不同的結合強度，研究顯示，前驅物以 type 1 (Gal β 1-3 GlcNAc β)來源之人工合成 O 型或 B 型之聚醣，與諾羅病毒的結合比 type 2 (Gal β 1-4 GlcNAc β)來源之 O 型或 B 型更緊密 [35, 37]。

每 2-3 年 GII.4 會突變形成新的變異株(附圖 2)，導致全球大流行，原因來自於高度變異區 protruding (P) domains 基因序列上的變化，導致宿主受體與病毒親和力的改變、強化病毒逃避人體的免疫力[44]。故通過了解諾羅病毒與不同的 HBGA 受體的結合方式，可得知諾羅病毒流行株的進化方式及病毒特定的宿主範圍。

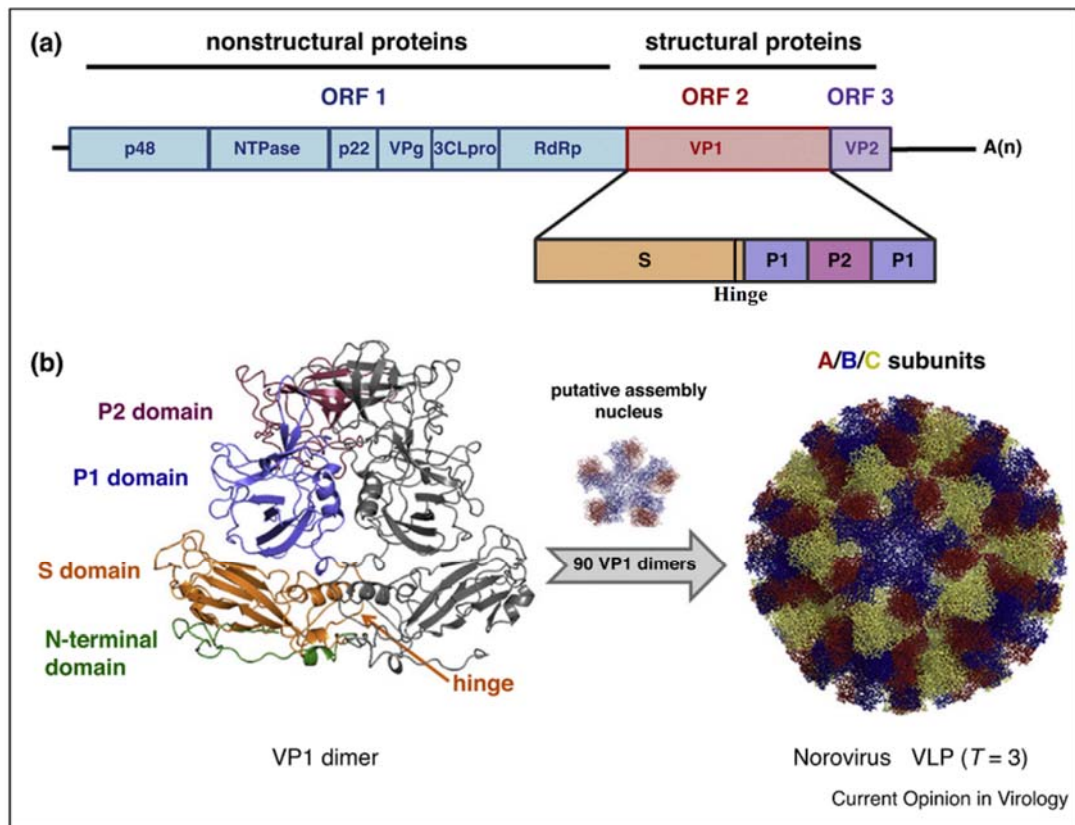


圖 1-1 人類諾羅病毒基因組成和結構 [45]

(a) 諾羅病毒為單鏈正股無包膜 RNA 病毒，病毒具有三個開放式閱讀框架(open reading frames; ORF)，ORF1 會轉譯出非結構性病毒蛋白質；ORF2 和 ORF3 分別會轉譯出諾羅病毒的主要結構蛋白質 VP1 和次要結構蛋白 VP2。VP1 蛋白質由短鉸鏈(hinge)所連接之殼區(S (shell) domain)和突出區(P (protruding) domain)所構成。(b)一個二十面體 $T=3$ 諾羅病毒 VLP 由 90 個 VP1 二聚體所組成。VP1 之 S 結構在最內部會以支架形式包裹病毒的 RNA，P 結構則在最外部，並且可再被細分為 P1 和 P2 區，並藉由鉸鏈(hinge)與 S 結構相連。左圖為二聚體之結構模擬圖，右圖為三個相同之 S 結構 A/B/C 所構成的病毒顆粒(顆粒建構過程詳見附圖 6)。PDB accession number 1IHM。

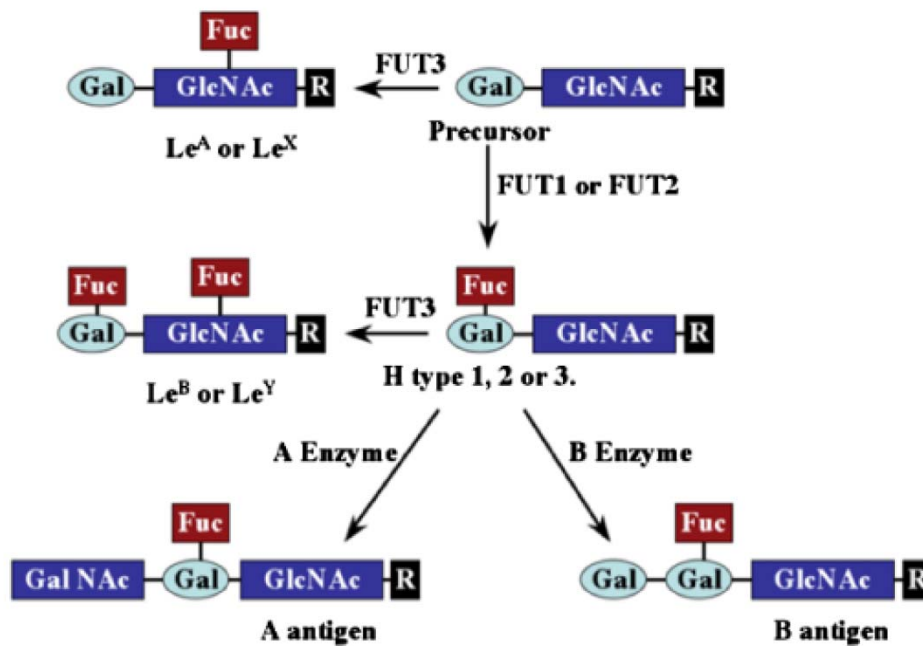


圖 1-2 FUT1、FUT2 和 FUT3 酵素生合成 HBGA 之路徑 [36]

右上之 Type 1、2 或 3 precursor 可經由 fucosyltransferase 1 (FUT1)、FUT2 或 FUT3 以及 A 或 B enzymes 多種酵素修飾產生多種不同抗原。Type 1 及 3 precursor 經由 FUT2 修飾經由 1, 2 linkage 加上 fucose，產生 1 或 3 H type 抗原，產生的 H antigen 可以經由 A 或 B enzymes 修飾，再產生 A 或 B antigens。Type 2 precursor 雖可透過 FUT1 或 FUT2 經由 1, 2 linkage 產生 H type 2，但在紅血球催化酵素是 FUT1；而粘膜則是 FUT2。此外，type 1 或 H type 1 經由 FUT3 (Lewis enzyme)修飾可個別產生 LeA 或 LeB (如附圖 4)；而 type 2 或 H type 2 經由 FUT3 (Lewis enzyme)修飾可個別產生 LeX 或 Le Y (如附圖 4)。Gal: galactose; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Fuc: fucose; GalNAc: N-acetylgalactosamine。



3. 諾羅病毒類病毒顆粒 (VP1)

3.1 諾羅病毒 VP1 結構

諾羅病毒顆粒由 90 個 VP1 二聚體所組成。VP1 係以短鉸鏈(hinge)連接之殼區(S (shell) domain)和突出區(P (protruding) domain)所構成(圖 1-1)。S domain 會主導顆粒之構成，當諾羅病毒顆粒組裝，雙體化之 VP1 蛋白質會呈現二種構形並共同存在，呈彎曲之二聚體會結合構成五聚體，接著五聚體周邊會與呈現平板的 VP1 二聚體再結合，並以這種建構方式逐步構成由 90 個 VP1 二聚體所構成的病毒顆粒[46] (附圖 6)。而位於病毒顆粒頂部之 P domain 則能與宿主之受器或輔助受器接合，進而進入宿主體內感染宿主。P domain 可再被細分為 P1 和 P2 區 (圖 1-1)，其中位於顆粒最頂部之 P2 區為高度變異區，具有二個與 HBGA 接合之主要位點(附圖 7)。相比起 GI 及 GIII 類病毒顆粒，GII 類病毒顆粒在鹼性環境下，顆粒穩定性較高(附表 1)。

3.2 諾羅病毒類病毒顆粒之生產與純化

諾羅病毒類病毒顆粒可以利用多種不同的表現宿主生產，包含：被重組桿狀病毒感染的昆蟲細胞、帶有委內瑞拉馬腦 (Venezuelan equine encephalitis；VEE)複製子或水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus；VSV)載體或質體的哺乳動物細胞、酵母菌(*Pichia pastoris*)、以及許多番茄、土豆、馬鈴薯和煙草等轉基因植物[47]。產出的類病毒顆粒經純化後以口腔、鼻腔或注射或未純化直接口服，不管是人體或動物，皆能產生諾羅病毒全身性或黏膜專一性抗體[47-49]。做為疫苗，桿狀病毒表達系統，是最直接並且高效的生產平台，適合大規模生產及下游純化高純度的類病毒顆粒做為疫苗[47]。文獻指出，以 Sf9 昆蟲細胞生產 GII.4 外鞘蛋白質，醱酵液有超過 100 mg/L 的 VP1 蛋白質產量[50]，經過 PEG (polyethylene glycol)沉澱，再以陰離子交換管柱純化醱酵液，可純化出約 10 mg/L 的 VP1 蛋白質；而醱酵液以 CsCl 以梯度超高速離心純化，則可純

化出約 35 mg/L 的 VP1 蛋白質[51]。另外，使用 *P. pastoris BgII* 酵母菌生產 VP1 蛋白質，經以陰離子交換管柱純化，則可純化出約 0.6 g/L 的 VP1 蛋白質 [52]，顯見以酵母菌生產亦有發展的潛力。



3.3 諾羅病毒疫苗

將表現有諾羅病毒類病毒顆粒的轉基因酵母菌、馬鈴薯塊莖或凍乾的轉基因番茄，未純化直接餵食小鼠，能誘發專一的 IgG 及 IgA 諾羅病毒抗體[53-55]。而人體臨床研究亦顯示，諾羅病毒類病毒顆粒對人體具安全性及免疫原性 [48]，在口服疫苗測試中，24 位自願受試者直接食入二次(第 0 與第 7 天)到三次(第 0 與第 7 和 21 天)150 g 含有 215-751 mg 類病毒顆粒之去皮切塊的轉基因馬鈴薯塊莖，95%受試者誘發出相對微弱但可測得的專一 IgA 諾羅病毒抗體，20%產生專一諾羅病毒血清 IgG 抗體，30%受試者糞便產生專一 IgA 諾羅病毒抗體[56]。

由美國製藥 LigoCyte 公司，臨床 I/II 期諾羅病毒疫苗人體試驗，由 18 到 50 歲的 90 位成年人中，以鼻腔施與桿狀病毒表現系統所生產的諾羅病毒類病毒顆粒疫苗(具殼聚醣及 monophosphoryl lipid A 做佐劑)，結果顯示將近半數的受試者成功降低了諾羅病毒發病病症，有 26%的受試者成功阻止了諾羅病毒的感染，這項研究證明了諾羅病毒疫苗之開發與上市具高度可行性[57]。目前許多諾羅病毒疫苗(附表 2)，主要以諾羅病毒類病毒顆粒為基礎，搭配不同的給藥途徑(例如:注射、口服、鼻腔等)及不同的佐劑發展諾羅病毒疫苗[30]，目前另二種人體臨床試驗的疫苗包括，由 Vaxart 公司所開發，利用口服由複製缺陷之腺病毒所表現 GI.1 VLP 蛋白質，目前已完成臨床一期試驗，試驗結果確立沒有安全問題並且疫苗具有免疫原性[58]；另一個由 Takeda Vaccines (武田藥品)公司所發展，利用肌肉注射雙價(GI.1 和 GII.4) VLP 疫苗，目前已完成在 18-64 歲之健康成年人和 65-85 歲老年人之安全性和免疫原性評估[59, 60]，並且在人體感染測試中，雙價疫苗能提供保護[61]。目前疫苗之安全性和免疫原性正在兒童 (NCT02153112)，以及海軍中評估(NCT02153112)。

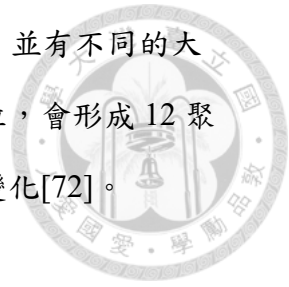
4. 諾羅病毒 P

4.1 P 粒子 (P particle)

諾羅病毒為食源性致病菌，其病毒衣殼蛋白質具有高穩定性和高免疫原性，適合發展疫苗[49]。諾羅病毒的主要結構蛋白 VP1 可分為二種區域：殼區(shell (S) domains)和突出區(protruding (P) domains)，並以一個短鉸鏈(hinge)所連接[62](圖 1-1)。先前文獻顯示，在感染諾羅病毒患者的糞便中，可觀察到約 30 kDa 之大量可溶蛋白質[63]，後經證實為病毒外鞘蛋白質 P domain [64]。此項結果顯示在人體腸腔中，為了對抗蛋白酶的降解，P 蛋白質必需具有好的折疊與構型。存在於病患腸腔中的 P 蛋白質具有潛在的生物功能，其中一個可能的功能即為 P 蛋白質可作為誘餌，使後代的病毒體(virions)逃離宿主的免疫系統[64, 65]。P domain 表現的 P 粒子其抗原形態與病毒衣殼蛋白相同，研究顯示以 P 粒子免疫小鼠，P 蛋白能被樹突細胞呈現並有效的引發細胞免疫，P 粒子所引起的高體液免疫和細胞免疫與完整的類病毒顆粒一樣[66]。以 P 粒子免疫刺激小鼠所誘發的中和抗體(neutralizing antibody)，也能有效抑制諾羅病毒衣殼蛋白與 HBGA (histo-blood group antigen)的結合[67, 68]，因此，P 粒子是個絕佳對抗諾羅病毒的蛋白質疫苗，也是有潛力做為抗原呈現平台，開發雙重疫苗。

全長的 P 蛋白質會形成 P 二聚體(P-dimer)，此二聚體為 P 粒子建構之最小單位，可形成不同大小的 P 粒子。去除掉短鉸鏈(hinge)及末端加上 CCT (cysteine-containing tag)標籤之 P 蛋白質，主要會構成由 12 個 P 二聚體(P-dimer)所組成之 P 顆粒，顆粒大小約在 20 nm (圖 1-3)。P 粒子的形成來自分子間的相互作用力，當 P 粒子帶有連接殼區和突出區的短鉸鏈(hinge)，傾向形成二聚體，並且 P 粒子穩定度較低，去除掉 P 蛋白質 C 端 arginine 片段(RRR-cluster)，同樣也無法形成 P 粒子[49]。P 蛋白質的 N 端或 C 端加上 CCT，能有效加強 P 粒子的形成並強化穩定性，常用之 CCT 有二種，序列為 CNGRC (為 aminopeptidase N (CD13) [69]的配體) [70] 和 CDCRGDCFC (整合素(intergrin)配體 $\alpha_v\beta_3$) [71]。當末端帶有 6xHis 標籤，但是未加有 CCT 標籤之 P 蛋白質，則會

導致 P 粒子的不穩定[49]。P 顆粒在還原條件下會做動態變化，並有不同的大小，當 P 粒子以 *E. coli* 做表現，以 P 二聚體(~6 nm)為組成單位，會形成 12 聚體(~14 nm)、18 聚體、24 聚體(~20 nm)及 36 聚體等動態顆粒變化[72]。



4.2 小型 P 粒子(Small P particle)

Small P particle 來自經突變之 P particle。P 粒子的形成與穩定性受二大要素影響，第一為來自 P 蛋白質之間的相互作用力，第二為加在 P 蛋白質尾端的 CCT (cysteine-containing tag) 標籤[73]。目前，雖然 P domain 各個胺基酸如何影響 P 顆粒之形成尚未清楚，但先前研究指出 P 蛋白質尾端 RRR-cluster 對 P 顆粒形成具關鍵影響力。雖然 P 去除掉短鉸鏈(hinge)及末端加上 CCT 標籤之 P 蛋白質，主要會構成由 12 個 P 二聚體(P-dimer)所組成之 P 顆粒(圖 1-3)，當在同樣條件下，將 P 蛋白質序列之 C 端再加 flag tag (DYKDDDDK)或 P 蛋白質 C 端 arginine 片段(RRR-cluster)突變成 RPRPRP，二種改變皆會使本由 12 個 P 二聚體所構成分子量在 840 kDa 之 P particle (Φ ~20 nm)，轉變成由 6 個 P 二聚體所構成分子量在 420 kDa 之 Small P particle (Φ ~14 nm) (圖 1-3)。然而當去除掉 P 蛋白質 C 端 arginine 片段(RRR-cluster)或 RRR 去掉直接替換成 HHH，則是二種顆粒皆無法形成，僅觀察到~200 kDa 之複合體 (trimer of the P dimer)，並且複合體會失去與 HBGA 結合的能力[73]。

4.3 諾羅病毒 P 粒子做為多抗原呈現平台

4.3.1 多抗原呈現平台

抗原呈現平台，必須以高重覆、系統性的方式呈外來抗原給免疫系統。可自我組裝，具有高重複表現結構，能作為佐劑誘發絕佳免疫反應的類病毒顆粒，可藉由基因融合方式，嵌合外來抗原或化學耦合(chemical conjugation)黏合外來抗原。但是化學耦合在製造上須先分別生成類病毒顆粒與目標抗原，再以共價或非

共價方式黏合目標抗原至類病毒顆粒，相比起基因融合，因不能百分之百交聯外來抗原以及高重複性的生產高再現聚合物，在製造上面臨許多挑戰，須以更複雜的控管方式以確保品質。以基因融合方式嵌入外來抗原於類病毒顆粒上為目前最常用的方式，以基因融合方式嵌合二種蛋白質，能確保在單位面積下，高密度的以相同結構呈現外來抗原，並且在製造上能利用好的模式，快速純化出高純度的嵌合類病毒顆粒[74]。

4.3.2 P 粒子攜帶外來抗原的策略

與 GI.1 和 GI.3 之 P 蛋白質結構相比，GI.4 之 P 蛋白質頂端，具有三個多出來的環狀結構(附圖 8)，經證實皆適合外來抗原的嵌入[75]，並加強抗原的免疫反應(圖 1-4)。根據目前的研究指出，嵌入的胜肽片段抗原，在同一個 P 蛋白質的單一環狀結構[49, 67, 76]或同時嵌入三個環狀結構[77-79]皆可行，並且不影響 P 粒子的形成。藉由 P 顆粒的形成，嵌入的外來抗原，其抗原性和免疫原性可被大幅提升 (one copy per VLP subunit)。雖然目前缺乏抗原呈現在 P 粒子表面的成功通則，但嵌入的外來抗原，大小並非主要的影響關鍵，嵌入親水性的抗原比起疏水性有更高的成功率[49]。

4.3.3 P 粒子成為疫苗的利基及攜帶外來抗原的例子

P 粒子的抗原形態與諾羅病毒病毒顆粒相同，具有能與受體結合與刺激免疫反應的作用區，以 P 粒子免疫刺激小鼠，能得到大量的專一性抗體。P 粒子能以真核或原核系統大量表現[65, 67]，並穩定存在於 pH 1.5-11 並具有 HBGAs 的結合能力[80]。此外，P 粒子從低溫冷凍到一般的室溫環境下都能穩定存在，能以凍乾的方式儲存[49]。

以 P 粒子為基礎所發展出的雙效疫苗，目前已進入臨床動物實驗的包括諾羅病毒/輪狀病毒以及諾羅病毒/流感病毒。諾羅病毒/輪狀病毒疫苗為嵌入輪狀病

毒外鞘 VP8 蛋白(159 個胺基酸), 以免疫過雙效蛋白質疫苗的老鼠感染輪狀病毒, 從糞便檢體測得, 此雙效疫苗具有 90% 的保護力, 比起僅施予 VP8 蛋白更佳[67]。嵌入流感病毒離子通道蛋白質 M2 (23 個胺基酸) 在 P 蛋白質上, 對感染老鼠專一型流感病毒 (PR8 strain; H1N1), 此雙效疫苗能提供 100% 的保護效力, 比起僅施予 M2 蛋白質僅有 12.5% 的保護效力, 諾羅病毒/流感病毒雙效疫苗效果明顯顯著 [76]。這二種雙效疫苗已證實具有強的免疫反應以及保護經免疫刺激過的小鼠抵抗相應病原菌的入侵。針對二種感染性疾病防治, P 粒子嵌合型疫苗提供一個全新的疫苗概念[48]。

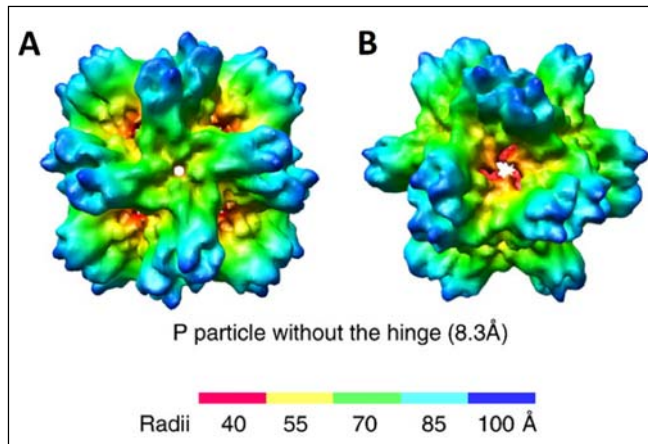
4.4 P 蛋白質之生產與純化

P 蛋白質及嵌合型 P 蛋白質皆能以真核或原核系統大量表現。根據所知的文獻, 目前以真核系統表現 P 蛋白質之相關研究僅有一篇, 是以酵母菌 *P. pastoris* X-33 生產 GII.4 之 P 蛋白質, 產量可達到 7.5 mg/L [68]。而原核系統之大腸桿菌, 為目前 P 蛋白質之主要表現系統, 當以大腸桿菌表現 P 蛋白質, 產量最高達 20 mg/L [49]; 當以大腸桿菌表現嵌合型 P 蛋白質, 產量最高可達 210 mg/L, 然而大量表現出的 P 蛋白質為包涵體(inclusion body) [77], 需要再折疊(Refolding) 才能有正確之構形。

表現之 P 蛋白質或嵌合型 P 蛋白質, 目前的純化方式只有二種並且皆用純化標誌(tag), 一種為在蛋白質末端加 GST (glutathione S-transferase) tag[49], 而另一種為加 6xHis (poly-histidine)tag[77]。上述方法皆具有操做容易、易獲得高純度及高產量之特性, 然而以 GST tag 純化, 需增加勞力與成本以酵素去除~27 kDa 之 GST 純化標誌; 而為了純化加於蛋白質末端 6xHis tag, 則會直接影響蛋白質之原始構形[81-83]、功能[84, 85]並引發非專一的免疫反應[86, 87]。雖 P 蛋白質或嵌合型 P 蛋白質皆有發展成疫苗之潛力, 然而目前尚無無標籤(tag-free)純化之方法。



I. P particle



II. Small P particle

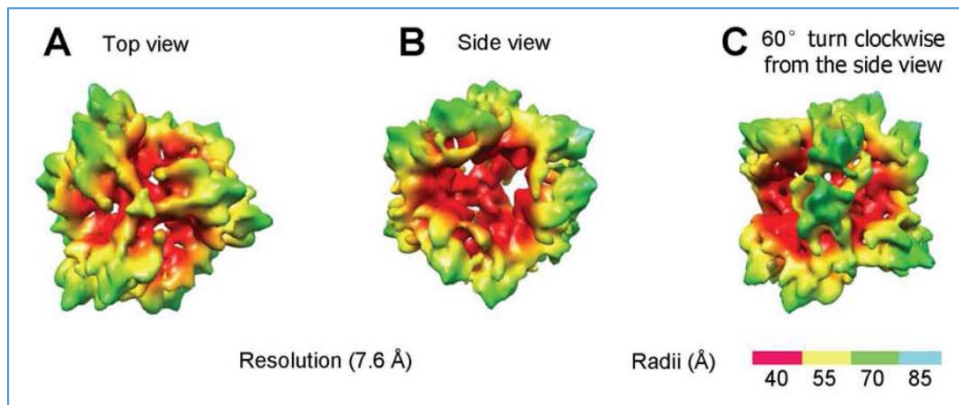


圖 1-3 P particle 與 Small P particle cryo-EM 結構圖

上層之 I. (A)、(B)為 P particle [68]，而下層 II. (A)、(B)、(C)為 Small P particle [73] 之 cryo-EM 結構圖。I. 去除掉短鉸鏈(hinge)及末端加上 CCT (cysteine-containing tag)標籤，由 12 個 P 二聚體所構成之 P particle ($\Phi \sim 20$ nm) (A)四倍數對稱 (B)三倍數對稱。II. 去除短鉸鏈(hinge)及末端加上 CCT 標籤和 C 端加 flag tag(DYKDDDDK)由 6 個 P 二聚體所構成之 small P particle ($\Phi \sim 14$ nm) (A)俯視角度、(B)側視角度、(C)側視角度再順時針轉 60 度，後可觀察到具有中心腔的四面對稱結構。

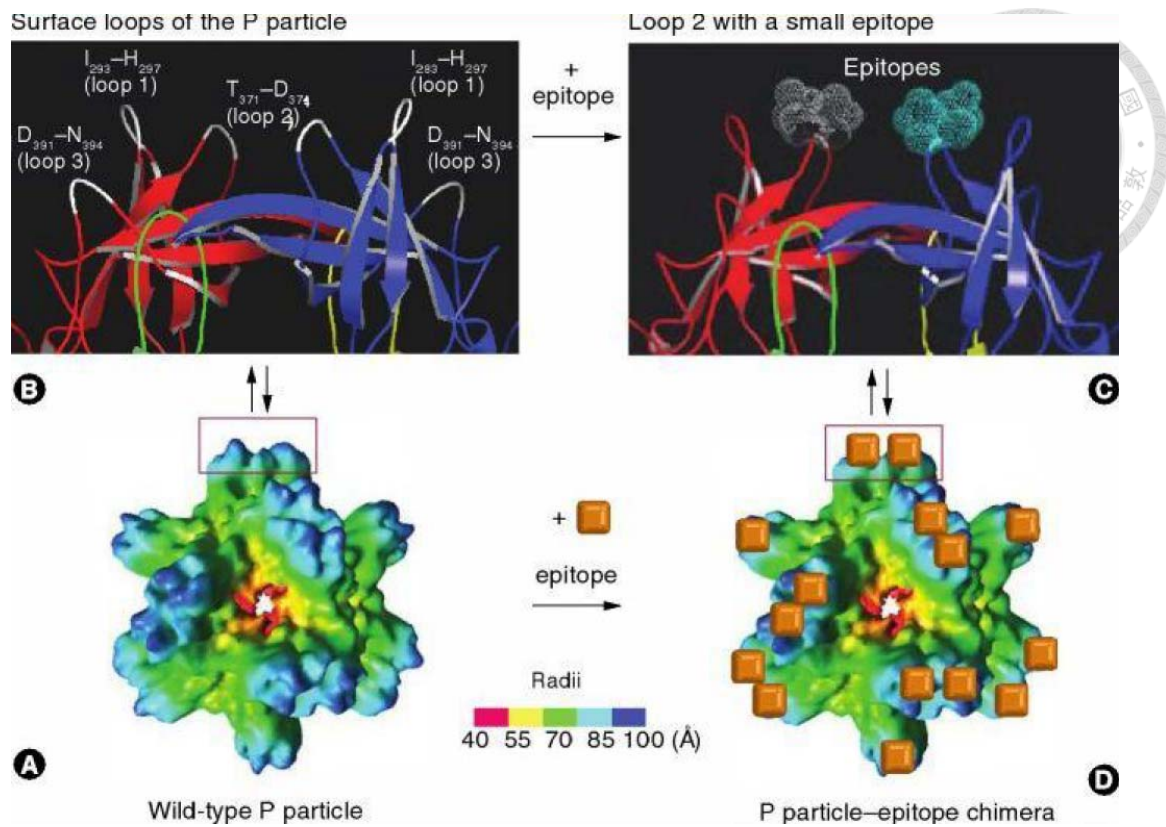


圖 1-4 P 蛋白質外來抗原嵌入模擬圖[49]

(A) 未嵌入外來抗原之 P 蛋白質顆粒電子低溫顯微鏡結構圖。(B) P 二聚體表面頂端可嵌入外來抗原之三個環狀結構示意圖。(C) P 二聚體表面頂端 loop 2 嵌有外來抗原之模擬圖。(D) 嵌入外來抗原之 P 蛋白質顆粒示意圖



5.嗜甲醇酵母菌(Methylotrophic yeast)

在自然界中，能利用甲醇，作為唯一碳源及能量來源之嗜甲醇酵母菌，目前主要有 *Pichia*、*Hansenula*、*Candida* 和 *Torulopsis* 這四種屬(genus) [88]。嗜甲醇酵母菌具有獨特的甲醇代謝調控路徑(methanol utilisation pathway；MUT pathway)，並且代謝路徑上各個基因與蛋白質的表現皆被高度調控與調節，藉由操控甲醇代謝調控路徑內的啟動子(promoter)，能誘導生產重組蛋白質(recombinant protein)。

5.1 甲醇代謝調控路徑(MUT pathway)

由於部分的甲醇代謝(MUT)在過氧化體(Peroxisomes)中進行，這個胞器會在甲醇誘導期間大量增生，經甲醇誘導後，可佔 80% 的細胞質空間[89]。在甲醇利用的第一步中，甲醇會經由酒精氧化酶(alcohol oxidases; AOX, EC 1.1.3.13)被氧化成 formaldehyde (甲醛)和 hydrogen peroxide (過氧化氫)。有毒的過氧化氫(H₂O₂)會經由過氧化氫酶(catalase; CAT, EC 1.11.1.6)被分解為氧氣和水，而甲醇代謝生成的氧化物甲醛(formaldehyde)，則有異化作用(dissimilation)和同化作用(assimilation)二種不同的代謝路徑(如附圖 9)[88]。

在同化作用中，二羥基丙酮合成酶(dihydroxyacetone synthase; DAS, 2.2.1.3)會在過氧化體中將甲醛(formaldehyde)與木酮糖 5-磷酸(xylulose 5-phosphate; Xu5P)縮合轉化為二個 3 碳的二羥基丙酮(dihydroxyacetone; DHA)和 3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate; GAP)，之後這二個 3 碳代謝物會在細胞質中再進一步代謝產生生物質量(biomass)或能量(經 TCA(tricarboxylic acid cycle);呼吸作用(respiration)等)(如附圖 9)。

而在異化作用中，甲醛(formaldehyde)會自發的與穀胱甘肽(glutathione; GSH)反應生成 S-羥甲基穀胱甘肽(S-hydroxymethylglutathione)，接著生成物會與需要 GSH 與 NAD⁺輔酶的甲醛脫氫酶(formaldehyde dehydrogenase; FLD, EC

1.2.1.1)，以及，和需要 NAD⁺輔酶的甲酸脫氫酶(formate dehydrogenase; FDH, EC 1.2.1.2)產生氧化反應，其中反應產生的 NADH 被認為是在甲醇生長時，能量的來源；S-甲酰基谷氨酸水解酶(S-formylglutathione hydrolase; FGH, EC 3.1.2.12)為將 S-甲酰基穀胱甘肽(S-formylglutathione)水解成甲酸(formate)和穀胱甘肽(glutathione)，參與甲醛的去毒和穀胱甘肽的再生之酵素，在異化作用中，經過三個酵素的反應，甲醛會轉化並生成二氧化碳(如附圖 9)。

通常，甲醇代謝調控路徑會被甲醇強烈誘導，但卻會受到葡萄糖和乙醇的抑制(如附表 3)。在以甲醇誘導的過程中，酒精氧化酶(alcohol oxidases; AOX)、二羥基丙酮合成酶(dihydroxyacetone synthase; DAS)和甲酸脫氫酶(formate dehydrogenase; FDH)等關鍵酵素，可占總可溶蛋白質的 30%(AOX)或 20%(DAS, FDH)在誘導的細胞中[88]。

5.2 *Pichia pastoris* 表現系統

Pichia pastoris 在 1920 年首次由 A. Guilliermond 於法國栗樹(chestnut tree)的分泌物中被分離出來，並且一開始被稱為 *Zygosaccharomyces pastori* [90]，此分離株為種(species)模式菌株(type strain) - CBS704 (= NRRL Y-1603)。而後，更多相關的菌種於 1955 年，由 H. Phaff 在美國加利福尼亞被陸續的分離出來，並被 H. Phaff 稱名為 *Pichia pastoris* [91]。幾十年後，僅有少數菌株被保留下來，其中分離自加利福尼亞州黑橡樹的 NRRL Y-11430 (CBS7435)，被飛利浦石油公司開發成單細胞蛋白質(single cell protein)的生產平台，作為富含蛋白質食物的成分或替代物，之後該菌株被用作異源蛋白質生產系統開發的基礎[92]。

根據核糖體基因之序列(ribosomal gene sequence)，*P. pastoris* 在 1995 年被重新分類成新的一屬(genus)- *Komagataella* [93]，後來根據 26S rRNA 序列被分成許多的種(species) [94]。目前 *Komagataella* 有六種種(species) (*K. pastoris*, *K. phaffii*, *K. pseudopastoris*, *K. poluli*, *K. ulmi*, and *K. kurtzmanii*)[95]，目前建立的

Pichia pastoris 異源蛋白質生產平台皆是以 *K. phaffii* 或 *K. pastoris* 菌株為主 [96]。由於不同的 *Komagataella* 屬(genus)非常相似，並且不易從常規的醱酵或測試中區分，因此目前分類主要為根據有限數量的基因序列比較得知。目前 Invitrogen 公司，嗜甲醇酵母菌表現系統尚以 *Pichia pastoris* 作為菌株之名稱。

5.2.1 菌株與甲醇表現型

P. pastoris 具有兩種酒精氧化酶(alcohol oxidases; AOX) -AOX1 和 AOX2，二者皆為甲醇代謝途徑中第一個酵素(如附圖 9)，雖二者調控模式相同，然而驅動產生酒精氧化酶 1 與 2(AOX1 和 AOX2)酵素的啟動子-*pAOX1* 和 *pAOX2* 二者強度不同，由於 *pAOX1* 較強，因此 AOX2 的 mRNA 表現量遠小於 AOX1，AOX1 為主要參與甲醇代謝之酵素，AOX1 基因的表現被嚴格的調控，當細胞生長在具有甲醇的環境下，藉由甲醇的誘導，所轉錄的 RNA 可達胞內 mRNA 總量約 5%，所轉譯的 AOX1 酵素可超過胞內總可溶蛋白質的 30% [88]。而 AOX2 的啟動子較弱，AOX2 基因僅有 AOX1 的 5-10% [97]。

藉由修改 *P. pastoris* 酒精氧化酶(AOX)基因，可得到不同甲醇利用率的菌株，並且可分成三種不同的表現型：第一種為 Mut⁺(methanol utilization plus)，此種菌株二種酒精氧化酶(AOX1 及 AOX2)基因皆保留，如野生型 *Pichia* 菌株 X-33 以及 GS115 (His⁻)等，第二種為 Mut^S(methanol utilization slow)，此種菌株為酒精氧化酶 2 (AOX2)基因保留，但 AOX1 去除，如 KM71H 與 KM71 (His⁻) 菌株等，第三種為 Mut⁻(methanol utilization minus)，此種菌株二種酒精氧化酶 (AOX1 及 AOX2)基因皆去除，此類菌株無法生長在以甲醇為單一碳源的環境 [98]。雖 Mut⁺菌株甲醇利用率較高，異源蛋白質產量較佳 [97]，但相較 Mut^S需氧量較高、產熱快，較不利於大規模醱酵。此外，AOX 會受到其它碳源的抑制，當培養環境存有葡萄糖、甘油或乙醇時，AOX 啟動子會受到抑制，即使在含有甲醇的環境下(附表 3)[88]。但是目前已有研究，藉由轉錄因子的再程序

化，改變 AOX 啟動子上游轉錄因子的調控，目前已開發出改良菌株，AOX 啟動子已不再受抑制性碳源的抑制[99]，目前也已發展出 methanol-free systems[100]。

由於嗜甲醇酵母菌具有微生物的許多優勢，諸如：生長成本低廉、穩定的基因操作平台、操作簡易、易於工業培養及放大，並且具有真核系統的轉譯後修飾等優勢。因本身為 GRAS(Generally Regarded As Safe)物種，不含內毒素、致癌物質和病毒 DNA，因此常做為藥用蛋白質的生產表現宿主[88]。

6. 研究動機及具體目標

6.1 研究動機

諾羅病毒突出區(P domain)所形成之 P 顆粒，其抗原性和免疫原性與類病毒顆粒 VP1 相同，相比起類病毒顆粒 VP1，由於 P 蛋白質分子量只有 VP1 蛋白質的一半，等量的蛋白質，P 蛋白質濃度會是 VP1 蛋白質的二倍[65]，先前文獻指出，P 顆粒在相同劑量下比 VLP 更具免疫原性[101]。相比起同樣廣為流行及研究的 GI.1 諾羅病毒菌株，GII.4 型感染的宿主範圍較廣，並且在突出區頂端，GII.4 型比起其他菌株，具有三個多出來的環狀結構，經證實皆適合外來抗原的嵌入，做為外來抗原呈現平台[75]。

嗜甲醇酵母菌雖具有生長成本低廉、易於工業培養及放大等優勢，然而根據所知的文獻，以真核系統表現 P 蛋白質僅有一篇，並且產量僅有 7.5 mg/L [68]，目前主要表現 P 或嵌合型 P 蛋白質的系統為具有內毒素之原核大腸桿菌，產量最高可達 210 mg/L，但大量表現出的嵌合型 P 蛋白質為包涵體 (inclusion body) [77]，需要再折疊(Refolding)才能有正確之構形。而為了得到大量表現之 P 蛋白質或嵌合型 P 蛋白質，根據文獻，目前之純化方式只有二種，並且皆用純化標誌(tag)-GST 與 6xHis，然而，以 GST tag 純化，需增加勞力與成本，以酵素去除~27 kDa 之 GST 純化標誌；而為了純化，多加於蛋白質末端

之 6xHis tag，在先前文獻也指出會直接影響蛋白質原始之構形[81-83]、功能[84, 85]，並引發非專一的免疫反應[86, 87]。



6.2 研究目標

本研究擬利用不具內毒素之嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris*，表現高抗原和高免疫原性，可做為抗原呈現平台之台灣分離株諾羅病毒 GII.4 之 P 蛋白質。具體策略和目標包括：(1)提升 P 蛋白質產量。本研究擬利用實驗室已發展之醱酵槽生產平台，經由三段式培養策略，大量生產 P 蛋白質。(2)降低純化過程之勞力與成本，並保留原始 P 蛋白質之構形。本研究擬利用 P 蛋白質本身之電性與原態暴露之組胺酸(His)，發展無純化標籤之蛋白質純化系統，並且擬套用此套純化系統，純化外鞘蛋白質 VP1。(3)探討台灣分離株 P 與 VP1 蛋白質之顆粒性與生物功能性。純化出的蛋白質擬利用粒徑分析儀及穿透式電子顯微鏡檢測顆粒之大小與形態，並以唾液結合測試(Saliva-binding assay)檢測純化出的 P 與 VP1 顆粒是否具有生物功能。(4)延伸此台灣分離株 P 蛋白質之應用性。本研究擬以綠色螢光蛋白質模擬另一個抗原，並嵌入 P 蛋白質之頂端，觀察嵌合型 P 蛋白質是否能再次組成顆粒並發出綠色螢光。本研究之架構如圖 1-5。

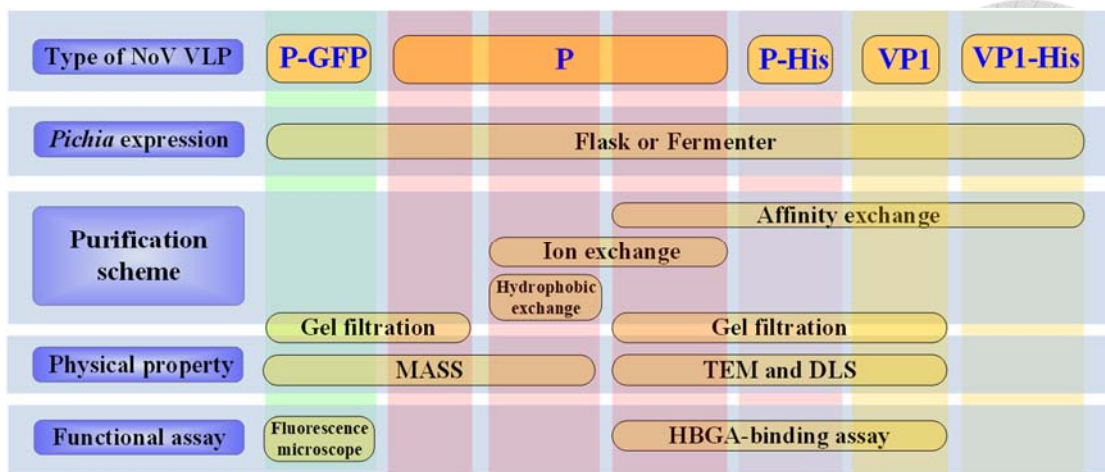


圖 1-5 研究架構

第二章 材料與方法



1. 培養機與藥品

Low salt LB broth (LSLB) : Lennox L Broth (Alpha Bioscience, Baltimore) 2 g 配置成 100 mL 溶液，121°C、20 分鐘高溫滅菌後備用。

Luria-Bertani (LB) 培養基 : 2.5 g LB (Acumedia) 配置成 100 mL 溶液，滅菌後備用。

LA 平板培養基 : 於 LB 培養基中添加 1.5% Bacto agar (Acumedia)，滅菌後降溫至約 60°C 時倒於 9 cm petri dish，待凝固後 4°C 保存。

10x 葡萄糖 stock solution (20%, w/v) : 20 g 葡萄糖 (dextrose, D-Glucose anhydrous, Biotech) 配置成 100 mL 溶液，滅菌後備用。

YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) : 1 g yeast extract (YE, Biotech)，及 2 g peptone-A (from meat, Biotech) 加入 90 mL 蒸餾水，滅菌待冷卻後加入 10 mL 10x 葡萄糖，4°C 保存。

YPD 平板培養基 : 於 YPD 培養基中添加 1.5% agar，滅菌後降溫至約 60°C 時倒於 9 cm petri dish，待凝固後 4°C 保存。

Zeocin stock solution (Invitrogen, R250-01) : 100 mg/mL，-20°C 避光保存。

10x 甘油 (10%, w/v) : 10 g 甘油 (Glycerol Anhydrous, J.T.Baker) 加水至 100 mL，滅菌後備用。

10x 磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, 1M, pH 6.0) (86.8 mM KH₂PO₄, 13.2 mM K₂HPO₄) : 11.81 g KH₂PO₄ (Amresco) 及 2.30 g K₂HPO₄ (Amresco) 配製成 100 mL 溶液，以 KOH 顆粒調整 pH 6.0±0.1，滅菌後備用。

500x biotin stock solution (0.02%, w/v) : 20 mg D-biotin (Sigma) 溶於 100 mL 蒸餾水中，以 0.22 μm 濾膜過濾滅菌備用，4°C 保存。

10x 硫酸銨溶液 [(NH₄)₂SO₄, 10 %, w/v] : 10 g (NH₄)₂SO₄ (Amresco) 配製成 100 mL 溶液，滅菌後備用。

10x YNB (13.4%, w/v) : 3.4 g yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate (YNB, Difco 233520) 及 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，溶於 100 mL 蒸餾水後，以 0.22 μm 濾膜過濾滅菌，4°C 避光保存。

BMGY 培養基 (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1% glycerol (醱酵槽為 4%)) : 1 g YE, 2 g Peptone, 溶於 70 mL 蒸餾水中，滅菌後加入 10 mL 10xYNB、0.2 mL 500x biotin、10 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、10 mL 10x 甘油。

mBMMY 培養基 (0.1% yeast extract, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.0% methanol) : 0.1 g YE 溶於 79 mL 蒸餾水中，滅菌後加入 10 mL 10x 硫酸銨、10 mL 10x 磷酸鉀緩衝液，於使用時添加 100% 甲醇使終甲醇濃度 1%。(The modified buffer was prepared as described in Chen *et al.* [102])

微量元素 (*Pichia* trace metal, PTM4) : 2 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L NaI, 3 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L H_3BO_3 , 0.5 g/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L CoCl_2 , 7 g/L ZnCl_2 , 22 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L biotin and 1 mL H_2SO_4 加水定量至 1 L，以 0.22 μm 濾膜過濾滅菌。

2 菌株與培養條件

2.1 細菌

大腸桿菌 (*Escherichia coli* EPI300; TransforMax™ Epicentre, USA 或 *Escherichia coli* DH5 α (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)) 作為建構與保存質體之宿主細胞。以 Luria-Bertani (LB; Difco, Detroit, MI, USA) 液態培養基於 37°C、轉速 250 rpm 振盪培養，或以添加 1.5% 洋菜膠之固態培養基於 37°C 培養。

2.2 真菌

本實驗選用購買自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* KM71H (Mut^S, *his4*, AOX1::ARG4, *arg4*) 作為重組蛋白質的表現宿主。以液態培養基 YPD，以 30°C、轉速 250 rpm 振盪培養或以添加 1.5 % 洋菜膠之固態培養基於 30°C 培養。篩選培養基則另添加抗生素 Zeocin (Invivogen) 至最終濃度為 100 µg/mL。

2.3 菌種保存

為避免轉形株因多次繼代過程遺失插入的外源基因，將篩選出的大腸桿菌轉形株以含抗生素的 3 mL 的培養液於 37°C 培養 16~18 小時，取 500 mL 菌液與 500 mL 30% 甘油加入凍菌小管振盪混勻，使終濃度為 15% 甘油，並放置 -80°C 保存。嗜甲醇酵母菌轉形株則以含抗生素的 3 mL 培養液於 30°C 培養 24 小時，取 500 mL 菌液與 500 mL 50% 甘油加入凍菌小管振盪混勻，使終濃度為 25% 甘油，並放置 -80°C 保存。

3. 質體建構

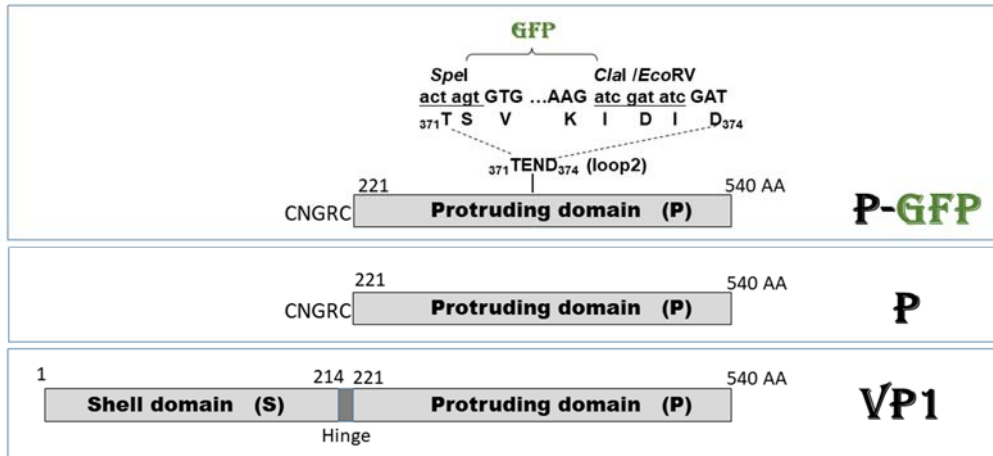
台灣流行株諾羅病毒之結構蛋白 VP1 (cDNA clones of a human norovirus GII.4 strain, HuNV/GII.4/YJB1/2009/Chiayi)，由長庚大學臨床醫學研究所張沛鈞教授研究室提供 (NCBI GenBank 登錄號：MG049692)。本研究使用之蛋白質表現載體 pPICZ B 購自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA)。建構之質體皆使用 PCR 方式進行片段擴增與點突變，並依照質體構築所需建立引子 (表 2-1)。VP1、VP1-6xHis、P、P-6x His、P-GFP 皆以 *EcoRI* 及 *XbaI* 截切，並接於 pPICZ B 表現載體中。其中 P 來自 VP1 但去除 S (shell domain) 及短鉸鏈 (hinge)，並在 N 端帶有 CNGRC 短胜肽。P-GFP 以 P 為骨架，將綠色 (meGFP)(A206K) 螢光蛋白分別在 N 端及 C 端加入 *SpeI* 及 *EcoRV* 切位並接入已在 T371 及 D374 加入 *SpeI* 及 *EcoRV* 之 P loop 2。(圖 2-1)

將建構完成的載體以熱衝擊法 42°C, 90s 轉形至大腸桿菌勝任細胞，將適量菌液塗於含抗生素的培養基，培養 16~18 小時，挑取菌落，以專一性引子進行聚合酶鏈鎖反應，進行洋菜膠體電泳，確認目標片段大小後，將含正確片段之菌落培養於液態培養基中，再依照 Plasmid Miniprep purification Kit 操作手冊抽取質體，定序確認序列正確 (Genomic, Taiwan)。

表 2-1、質體建構所使用之引子

Primer name	Sequence (5'→3')	RE
VP1&P		
F <u>EcoRI</u> NoV ORF2	<u>GAATTCATGAAGATGGCGTCGAAT</u>	<i>EcoRI</i>
F <u>EcoRI</u> ATG <u>CNGRC</u> NoV P	<u>GAATTCATGTGTAATGGTCGTTGTTCAAGAAC</u> TAAAC	<i>EcoRI</i>
R ORF2 NoV stop <u>XbaI</u>	<u>TCTAGATTATAAAGCACGTCTACGCC</u>	<i>XbaI</i>
R ORF2 NoV <u>6x His</u> stop <u>XbaI</u>	<u>TCTAGATTAATGATGATGATGATGATGATAAA</u> GCACGTCTACG	<i>XbaI</i>
P loop2		
R P loop2 <u>SpeI</u> (eGFP)	<u>ACTAGTATCGGTACTGAATTGAACACTG</u>	<i>SpeI</i>
F (eGFP) <u>EcoRV</u> P loop2	<u>ATCGATATCGATTTTGAAACTCACCAA</u>	<i>EcoRV</i>
eGFP		
F <u>SpeI</u> eGFP	<u>ACTAGTGTGAGCAAGGGCGAGGA</u>	<i>SpeI</i>
R eGFP <u>EcoRV</u>	<u>GATATCGATCTTGTACAGCTCGTCCA</u>	<i>EcoRV</i>

(A)



(B)

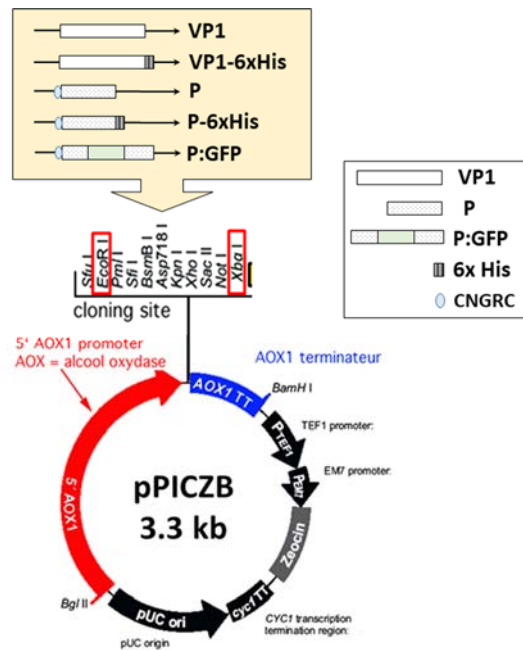


圖 2-1、載體建構

(A)圖解基因片段。VP1 為諾羅病毒的主要結構蛋白質(如圖 1-1)；P 為突出區片段(為 P1 及 P2 所組成(如圖 1-1))；P-GFP 為突出區片段在 loop2(如圖 3-1)之位點以 *SpeI* 及 *EcoRV* 嵌入綠色螢光蛋白質 GFP。(B)圖解本研究酵母菌轉形所使用之五種表現質體。



4. *P. pastoris* 轉形

4.1 *P. pastoris* 勝任細胞製備[103]

將野生型 *P. pastoris* KM71H 之單一菌落接種至 3 mL YPD 液態培養基，於 30°C、轉速 250 rpm 振盪培養活化至 OD₆₀₀ 約 15，取適量菌液至含 100 mL YPD 的 500 mL 三角瓶，使 OD₆₀₀ 約 0.1~0.2，放置於 30°C、轉速 250 rpm 振盪培養至 OD₆₀₀ 約 2.0 (1 OD₆₀₀ = 5 × 10⁷ cells/ml)，回收菌液，將菌體以 3000 g 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，之後冰上操作，加入 50 mL Pre-treat Buffer (100 mM LiOAc, 10 mM DTT, 0.6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)，重新懸浮菌體，放於 30°C 靜置反應 30 分鐘，再以 1500 g、4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，以 2 mL 1 M 山梨糖醇 (sorbitol) 懸浮菌體，再以 1500 g、4°C 離心 10 分鐘，如此重複清洗三次，加入 1 M sorbitol 回溶，使菌體濃度達到 10¹⁰ cells/mL，每管分裝 80 μL 置於冰上以備轉形。

4.2 轉形 DNA 置備

將帶有質體之 *E. coli* 培養於含 25 μg/mL Zeocin 之 LSLB 培養基，在 37°C、250 rpm 振盪培養 16~18 小時，抽取質體，以限制酶 *PmeI* 將 pPICZ B 系統之質體截切成線型 (linear form)，經純化及定量後備用。

4.3 電穿孔轉形

將 1 μg 線型載體與 80 μL 勝任細胞混合，移入已預冷之電擊管 (2 mm Gap cuvette, No.620 BTX, San Diego, USA)，置冰上 5 分鐘，使用 Electro Cell Manipulator ECM630 Electroporation System (BTX, San Diego, CA, USA)，以 1.5 kV、25 μF、200 Ω 之條件給予電脈衝，完成後加入 1 mL 1 M sorbitol 回溶菌體，並於 30°C 下靜置培養 1 小時，最後取 250 μL 菌液塗至含有 YPDSZ 篩選培養基中 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1M sorbitol, 1.5% agar, 100 μg/mL Zeocin)，於 30°C 下培養 2~3 天。



5. *P. pastoris* 轉形株篩選與培養

5.1 抗藥性濃度梯度篩選

待菌落長出後，將 YPDSZ 上之轉形株菌落以無菌牙籤挑起，並將單一菌落點至含不同 Zeocin 濃度 (100、300、500 $\mu\text{g/mL}$) 之 YPDZ 篩選培養基，於 30°C 培養 2~3 天，觀察菌落大小，選取於高濃度 Zeocin 培養基上生長較佳之轉形株進行後續分析。

5.2 搖瓶培養

將確認後的轉形株接種至 3 mL YPDZ 液態培養基中，於 30°C、轉速 250 rpm 活化 24 小時至 OD_{600} 約 15，取適量菌液加至 100 mL BMGY 液態培養基，使 OD_{600} 約 0.1~0.2，於 30°C、轉速 250 rpm 培養 24 小時 (OD_{600} 達 25)，以 10000 g 離心 10 分鐘，去除上清液，進行五倍濃縮，加入 20 mL mBMMY 液態培養基重新懸浮菌體。每 24 小時加入甲醇使其終濃度為 1%，共誘導 3~5 天，以轉速 13,000 g 離心 10 分鐘，收集菌體破菌進行蛋白質分析，並以螢光光譜儀測定菌體螢光強度。

5.3 醱酵槽培養

將確認後的轉形株接種至 3 mL YPDZ 液態培養基中，於 30°C、轉速 250 rpm 活化 24 小時至 OD_{600} 約 15，取適量菌液加至含有 100 mL BMGY 液態培養基之搖瓶，起始 OD_{600} 約 0.1~0.2，於 30°C、轉速 250 rpm 培養 18-24 小時 (OD_{600} 達 20)。將 50 mL 之種菌接至含有 2 L BMGY (4% (v/v) glycerol ; 4.35 mL/L PTM4) 培養基之桌上型 5 L 醱酵槽中 (FS-01-A05, Major Science, Saratoga, CA, USA)，培養溫度為 30°C，培養過程以 10% 氨水或 2 N 硫酸調整至 pH 6，通氣量為 4 vvm，攪拌速率為 800 rpm。培養過程分三階段，分為甘油批次培養 (Batch culture)、甘

油饋料批次培養(Fed-batch culture)與甲醇誘導。三階段的轉換為藉由(DO)數值做判定，當碳源用盡，出現 DO spike (菌體耗氧速率降低而溶氧數值急速上升)時，即從批次培養，轉成饋料批次培養，此階段會定速饋入 250 mL 之 50% 甘油(含 12 mL/L PTM4)；當甘油再次用盡，出現 DO spike，則進入甲醇誘導階段(100% Methanol 含 12 mL/L PTM4)。

6. 轉形株螢光顯微鏡觀察

將 200 μ L 菌液以 200 μ L 蒸餾水稀釋後，以螢光顯微鏡 Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Japan)之 B-2A 濾鏡(EX 450-490, DM 505, BA520)觀察菌體之綠色螢光表現，以 UV-2A 濾鏡(EX 330-380, DM 400, BA420) 觀察菌體之藍色螢光表現。

7. 異源蛋白質產物純化

7.1 蛋白質萃取

取甲醇誘導 1-5 天後 1.5 mL 之醱酵液，離心後將菌塊與 0.5 mL protein extraction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.4; 1 mM EDTA; 5% glycerol)混合；或取甲醇誘導 3-5 天後之醱酵液，離心後濕重每 1g 之菌塊與 1.5 或 3 mL protein extraction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.4; 1 mM EDTA; 5% glycerol)混合；以液態氮研磨成粉破菌，以 13000 g、4°C 離心 15 分鐘，收集上清液分析或以-80°C 保存，蛋白質皆以 Bradford (Bio-Rad)定量法測定。

另外快速破菌法，則是直接把菌跟 4x Protein loading dye (表 2-3)混在一起後以 100 度煮 10-20 min 後直接跑膠分析，此方法具有快速之優點，但是具有分子量破百以上蛋白質易糊掉之缺點；0.1-0.2 mL 之離心後菌塊加 0.05 mL dye 以 Vortex 經充分混勻後，再以 100 度加熱 10-20 min (不當下加熱蛋白質會降解)，僅 loading 0.002-0.01 mL 跑膠分析(需染一塊 SDS-PAGE 對照比對，若蛋白

質濃度過高，膠體呈色後會成瀑布狀無法分析)。



7.2 親和層析純化

帶有 6xHis tag 之蛋白質萃取液，以緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.5)調整至 pH 7.5 以上；而不帶有 His tag 之蛋白質萃取液，以緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.5)調整至 pH 6.75±0.05。經 pH 調整之蛋白質萃取液，直接通入已去除 20%保存酒精及以 ddH₂O 清洗過，並以緩衝液(50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazole)平衡過之帶有藍綠色 Ni 離子 HisTrap HP, Ni-NTA column (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)，通完蛋白質萃取液之管柱，帶有 6xHis tag 之 VP1 蛋白質以 10、20、50、100、200、500 imidazole (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, pH 8 NaOH or HCl adjust pH)沖提，帶有 6xHis tag 之 P 蛋白質以 50、100、300、500 imidazole (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, pH 8)沖提，而不帶有 His tag 之 VP1 與 P 蛋白質皆以 10、100、500 imidazole (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, pH 8)沖提，會沖提出目標蛋白質之 imidazole 濃度(灰底)，僅以總 beads 之 2 倍體積沖提，其餘流洗雜蛋白質之不同梯度 imidazole 濃度，皆以總 beads 之 5-10 倍體積沖提。得到之不同蛋白質皆以 Bradford (Bio-Rad)定量法測定濃度。

7.3 離子交換純化

以陰離子交換管柱(GE Healthcare HiTrap™ DEAE FF column ×5 mL)，利用 AKTA fast-performance liquid chromatography (FPLC) (UPC 900/P-920, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)系統進行分析，所使用之緩衝液如表 2-2，因為親和層析法的緩衝液皆含有 0.3 M NaCl 會影響實驗，因此帶有目標蛋白質之沖提液，皆先以 Buffer A 以 10 倍體積稀釋。如果樣本為 P 蛋白質粗萃液，並以 DEAE 管柱直接以低鹽濃度純化，則管柱通入之蛋白質總量不能太濃，太濃管柱吸附效果不佳，易沖提出高濃度的雜蛋白質，本研究測試之最高

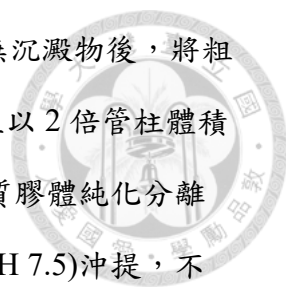
濃度為不超過 5 mg (per 5 mL DEAE column)。蛋白質樣本經 FPLC 之通道吸入 FPLC 內，並流經已去除 20%保存酒精及以 ddH₂O 清洗過，並以 10 mL 加 5 倍管柱體積(5 mL column×5 fold+10 mL=35 mL) Buffer A 平衡後之 DEAE 管柱。通完蛋白質樣本之管柱，再以 Buffer A 流洗至 A₂₈₀ 訊號趨近於零(即未結合蛋白質皆流洗完畢)後，利用 Buffer B 依照不同實驗條件拉梯度。得到之不同蛋白質皆以 Bradford (Bio-Rad)定量法測定濃度。

7.4 疏水性層析純化

以疏水性層析管柱 (GE Healthcare HiTrap™ Phenyl HS column ×1 mL)，利用 AKTA fast-performance liquid chromatography (FPLC) (UPC 900/P-920, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)系統進行分析，所使用之緩衝液如表 2-2，為使目標蛋白質之疏水性區域與膠體結合上，上機前目標樣本皆先與 Buffer C 以 1:1 稀釋，使樣本內(NH₄)₂SO₄ 濃度為 1 M。蛋白質樣本經 FPLC 之通道吸入 FPLC 內，並流經已去除 20%保存酒精及以 ddH₂O 清洗過，並以 10 mL 加 5 倍管柱體積(1 mL column×5 fold+10 mL=15 mL) Buffer A 平衡後之疏水性層析管柱。通完蛋白質樣本之管柱，再以 Buffer A 流洗至 A₂₈₀ 訊號趨近於零(即未結合蛋白質皆流洗完畢)後，利用 Buffer B 拉梯度，當(NH₄)₂SO₄ 濃度降到 0，目標 P 蛋白質即在 0 M (NH₄)₂SO₄ 沖提出。得到之不同蛋白質皆以 Bradford (Bio-Rad)定量法測定濃度。

7.5 膠體過濾法

以 Superose 6 Increase 10/300 GL filtration column (GE Healthcare)管柱，利用 AKTA fast-performance liquid chromatography (FPLC) (UPC 900/P-920, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)系統進行分析。轉形株蛋白質粗萃液上機前須先以 0.22 μm 濾膜過濾；而純化液則以 3 kDa 或 100 kDa 濃縮



管柱做體積濃縮後，上機前再以 13,000 g 離心 10 分鐘，確認無沉澱物後，將粗萃液或純化液打入已去除 20% 保存酒精及以 ddH₂O 清洗過，並以 2 倍管柱體積之流動相(25 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5)平衡後之蛋白質膠體純化分離柱。打入樣品之管柱以流動相(25 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5)沖提，不同分子量蛋白質將於不同餾分(每個餾分為 1 mL，第 1 mL 餾分為 0-1 mL，第 2 mL 餾分為 1.01-2 mL；後面以此類推)沖提出來，後利用標準品做管柱校準 (Catalog # 151-1901, Bio-Red)，以便參照對比樣品的分子量。

表 2-2 層析所使用之緩衝液



Name	Constituent	g/L
Ion-exchange chromatography		
Buffer A (pH 8.5)	20 mM Tris-HCl	2.42
Buffer B (pH 8.5)	20 mM Tris-HCl	2.42
	1 M NaCl	58.44
Hydrophobic interaction chromatography (HIC)		
Buffer A (pH 7)	10 mM Tris-HCl	1.21
	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	132
Buffer B (pH 7)	10 mM Tris-HCl	1.21
Buffer C (pH 7)	10 mM Tris-HCl	1.21
	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	264



8. 異源蛋白質分析

8.1 西方墨點法

配置上層 5% SDS 聚丙醯胺焦集膠體和下層 10%-12.5%聚丙醯胺分離膠體，架設於直立式電泳槽 (Hoefer TM Dual Gel Caster; Amersham Biosciences, USA)，內外槽加入適量 Tris-glycine SDS running buffer。取轉形株蛋白質萃取液與 protein loading dye 混和均勻，於 99°C 作用 10 分鐘，冷卻後注入上層膠體，先以 120 伏特待蛋白質聚集於焦集膠體與分離膠體交界處，降低電壓至 100 伏特，約 1 小時即可取出電泳膠片，浸泡於轉印緩衝液 (Transfer buffer) 10 分鐘，而後轉印。(表 2-3)

0.45 μm PVDF 轉印膜 (PerkinElmer, USA) 浸泡於 100% 甲醇，以濕式電泳轉印槽設定 400 毫安培轉印 1.5 小時 (由負極至正極方向依序放置兩張經轉印緩衝液浸濕之濾紙、電泳膠片、PVDF 膜及兩張濕濾紙)。轉印後之 PVDF 膜以 gelatin-NET 於室溫下、50 rpm 震盪反應 2 小時，而後以 gelatin-NET 稀釋 10000-5000 倍之 anti-NoV 一次抗體(張沛鈞教授研究室提供之自製單株抗體或 ab80024, Abcam)或 anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GTX100118, GeneTex, Irvine, CA, USA)或 anti-6xHis (HIT001R, Bioman, Jhonghe, Taipei, Taiwan)或稀釋 9000 倍之 anti-GFP 一次抗體 (ab6556, Abcam) 於室溫振盪 60 分鐘。去除一次抗體，以 PBST 震盪清洗 3 次，每次 10 分鐘。加入 gelatin-NET 稀釋 2000 倍之 goat anti- mouse IgG AP 或 goat anti- mouse IgG HRP 或稀釋 18000 倍之 goat anti-rabbit IgG AP (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)二次抗體於室溫振盪 60 分鐘，再以 PBST buffer 振盪清洗三次，每次 10 分鐘。最後 AP 之二抗以 AP buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , pH9.5) 浸泡十分鐘，加上 NBT/BCIP 基質溶液避光反應，待呈色清楚後，以蒸餾水清洗 PVDF 膜終止反應，並至 60°C 烘箱乾燥。而 HRP 之二抗以 Western Lighting™ Plus-ECL 基質呈色，並以 UVP AutoChemi Image System (UVP,

Upland, CA, USA)攝影。上述使用試劑之配方 (表 2-3)。



8.2 LC-MS/MS

委託華安醫學股份有限公司(ENERGENESIS BIOMEDICAL CO., LTD., Taipei, Taiwan)進行蛋白質鑑定及比對分析。蛋白質以 LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Basingstoke, UK)分析，MS/MS 訊號以 MASCOT (www.matrixscience.com)分析，搜索參數：Enzyme, trypsin; Fixed modification, Carbamidomethylation, Pyridylethylation; Variable modifications, Deamidation, Oxidation; Peptide MS tolerance, ± 20 ppm; Fragment MS tolerance, ± 1 Da and allowance of one missed cleavage。

8.3 Indirect ELISA

實驗所有緩衝液皆以 ddH₂O 配置。以新鮮配置的 Coating buffer 稀釋待測之蛋白質粗萃液或純化液；以經 His-Trap 管柱純化出之 VP1-6xHis 或 P-6xHis 做檢量線，每種蛋白質每次皆會同時做二條檢量線同時比對檢量，並以 Coating buffer 稀釋成 350 ng/mL 及 300 ng/mL 再各 2 倍稀釋成 175、87.5、43.75、21.875、10.9375 ng/mL 及 150、75、37.5、18.75、9.375、0 ng/mL，每個濃度各取 100 μ L/well 注入 96 孔微量滴定盤 (Nunc, Aarhus, Denmark；Thermo, 442404)，4°C 靜置 16 小時以上，接著以 PBST 清洗三次去除。加入 gelatin-NET buffer 300 μ L/well 室溫靜置 2 小時，以 PBST 清洗三次去除。而後以 gelatin-NET buffer 稀釋 anti-NoV 抗體(張沛鈞教授研究室提供之自製單株抗體) 8000 倍，各取 100 μ L/well 注入 96 孔微量滴定盤，於室溫下靜置 1 小時，接著以 PBST 清洗三次去除。以 gelatin-NET buffer 稀釋 goat anti-mouse IgG HRP (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 8000 倍，各取 100 μ L/well 注入 96 孔微量滴定盤，於室溫下靜置 1 小時，接著以 PBST 清洗三次。加入 100 μ L/well 的

TMB 基質溶液 (OptELISA, BD, USA)，室溫避光呈色，最後加入 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Stop buffer 終止反應，偵測 OD₄₅₀ 吸光值，並製作標準曲線，確定 R² 達 0.99 以上後，以此檢量目標蛋白質濃度。上述使用之試劑 (表 2-4)。



8.4 唾液結合測試 (Saliva-binding assay)

實驗所有緩衝液皆以 ddH₂O 配置，配置後之緩衝液、水(PBS, PBST, ddH₂O)與裝緩衝液之玻璃器皿皆以 autoclave 以 121°C 處理 60 分鐘(如時間不足，負控制組易有高背景值)。本實驗取同一人，單次之 B 型正常成人唾液，以 100°C 作用 10 分鐘後，離心取上清液至 -70°C 保存備用。從 -70°C 取出之同一批 B 型成人唾液，以 100°C 作用 20 分鐘後(唾液中具有結合抑制物，如加熱不足，稀釋 200 倍之唾液，易出現低結合之現象)，離心取上清液，以 PBS 做 200 及 1000 倍稀釋後，取不同濃度之稀釋唾液與 PBS(負控制組)，每 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 注入 96 孔微量滴定盤(Nunc, Aarhus, Denmark; Thermo, 442404)，室溫靜置 16 小時，接著以 PBST 清洗六次，每次震動 20 秒後去除。加入 Blocking buffer 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 37°C 靜置 2 小時，以 PBST 清洗三次，每次震動 20 秒後去除。將 P、P-His 和 VP1 經膠體層析分離(Gel filtration-purified)之第 15 mL 和第 9 mL 之沖提液，以 PBS 稀釋成不同濃度後，以 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加至 96 孔微量滴定盤中，37°C 靜置 1 小時 30 分鐘，再以 PBST 清洗六次，每次震動 20 秒後去除。將諾羅病毒抗體(張沛鈞教授研究室提供之自製單株抗體)以 Blocking buffer 稀釋 4000 倍，取 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 注入 96 孔微量滴定盤，於 37°C 靜置 1 小時，接著以 PBST 清洗三次，每次震動 20 秒後去除。將 Blocking buffer 稀釋 4000 倍的二抗 goat anti- mouse IgG (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)取 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 注入 96 孔微量滴定盤 37°C 靜置 1 小時，同樣以 PBST 清洗三次，每次震動 20 秒後去除。加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 TMB 基質溶液 (OptELISA, BD, USA)，37°C 避光呈色，最後加入 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 Stop buffer 終止反應，偵測 OD₄₅₀ 吸光值。上述使

用之試劑 (表 2-4)。



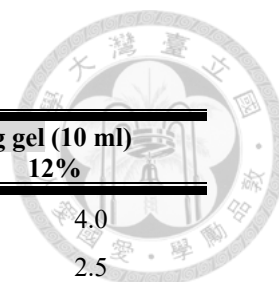
8.5 穿透式電子顯微鏡

委託閣康生物科技股份有限公司(Bio Materials Analysis Technology Inc., Hsinchu, Taiwan)進行樣品負染製備及上機分析。將 P、P-His 和 VP1 經膠體層析分離(Gel filtration-purified)之第 15 mL 和第 9 mL 之沖提液，蛋白質濃度 0.13-0.3 mg/mL，以 4 度低溫冷藏運送至閣康公司進行分析。目標蛋白質以 2% uranyl acetate 負染，並以 TEM (Hitachi HT7700, Tokyo, Japan)在 accelerating voltage of 100 kV 下觀察。

8.6 粒徑分析

將 P、P-His 和 VP1 經膠體層析分離(Gel filtration-purified)之第 15 mL 和第 9 mL 之沖提液，利用 nanoparticle analyzer HORIBA SZ-100 (Horiba, Kyoto, Japan)粒徑分析儀(DLS; dynamic light scattering)，在室溫下以固定散射角 90°下偵測。

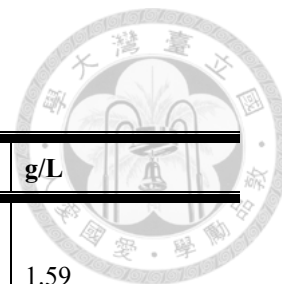
表 2-3、西方墨點法分析所用試劑之組合成分



Constituent	Stacking gel (5 ml)		Separating gel (10 ml)	
	5%		10%	12%
30% Acrylamide (29:1)	0.83		3.3	4.0
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)			2.5	2.5
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63			
10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)	0.05		0.1	0.1
10% APS (Ammonium persulfate)	0.05		0.1	0.1
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	0.005		0.004	0.004
ddH₂O	3.4		4.0	3.3

Name	Constituent
4x Protein loading dye (pH 6.8)	8% SDS 200 mM Tris-HCl (pH 6.8) 0.4% Bromophenol blue 20% Glycerol 400 mM 2-ME (2-Mercaptoethanol)
Tris-glycine SDS running buffer (pH 8.4)	25 mM Tris 250 mM Glycine 0.1% SDS
Wet transfer buffer (pH 8.3)	192 mM Glycine 25 mM Tris-Base 20% methanol
Coomassie Blue Stain (filter with 0.22 μm)	0.1% (w/v) Coomassie Blue R250 10% Acetic acid 50% Methanol 40% H ₂ O
Coomassie Blue Destain	10% acetic acid 20% methanol 70% H ₂ O

表 2-4、酵素連結免疫反應所用試劑之組合成分



Name	Constituent	g/L
Coating buffer (pH 9.5 with NaOH)	Na ₂ CO ₃	1.59
	NaHCO ₃	7.13
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl	8
	2.7 mM KCl	0.2
	8.1 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9
	1.5 mM KH ₂ PO ₄	0.2
PBST (pH 7.4)	PBS with 0.05% Tween-20	
Gelatin-NET buffer (pH 8)	0.25 % Gelatin	2.5
	0.05% Tween 20	0.5
	0.15 M NaCl	8.75
	50 mM Tris-Base	6.05
Blocking buffer	5% skim milk (安佳) in PBS	
Stop Buffer	2 N H ₂ SO ₄	

第三章、結果

一、序列分析與結構模擬

1. 胺基酸序列分析

分離自台灣本土 GII.4 型諾羅病毒(NCBI GenBank 登錄號：MG049692)，其外鞘蛋白質 VP1 由 540 個胺基酸組成，其結構與功能性區塊之定位，經與文獻比對後如圖 3-1 所示，前 213 個胺基酸為殼區(S domain)，其中灰色網底為短鉸鏈(hinge)由八個胺基酸所組成，連接後方由 319 個胺基酸所組成之突出區(P domain)[104]。突出區可嵌入外來抗原之三個環狀結構，分別位於 I293-R297 (Loop 1)、T371-D374 (Loop 2)及 D391-T394 (Loop 3) [67]，此外，突出區具有與人體 HBGA 接合之受器(receptor)[105]，藍色粗體為與 HBGA 之三個主要結合面，分別為位點 I (S343-H347)，位點 II (D374)與位點 III (C441-Y444)，而藍色網底為影響 HBGA 結合特異性之位點[35, 106, 107]。當 P 蛋白質形成雙體，任一側之單體之 HBGA 結合位點 I 及 II 會與另一個單體之位點 III 接合，此接合面能與 HBGA 結合，如附圖 7。圖 3-1 之箭頭為 P1 及 P2 之邊界 [107, 108]。

2. 結構模擬

台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒，其外鞘蛋白質 VP1 序列經交通大學提供之免費線上(PS)²: Protein Structure Prediction Server (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>)做結構預測分析後，經 Rasmol version 2.7.5 模擬台灣本土株諾羅病毒 VP1 蛋白質之結構 (圖 3-2A)。如圖 3-2B，青色短鉸鏈(hinge)連接著下方黃色之殼區(S domain)與上方由 P1 區(紅色)與 P2 區(藍色)所構成之突出區(P domain)，突出區之 P2 區(藍色)具有三個可嵌入外來抗原之三個環狀結構(粉紅色)及二個 HBGA 結合面(綠色)，而 HBGA 結合面之位點 III (綠色)則坐落於 P1 區(紅色)。

3. 不同菌株之序列比對



根據諾羅病毒爆發與流行之時間，GII.4 型之諾羅病毒藉由 VP1 之高變異區 P domain (突出區)，可再分類成不同的基因亞型(subgenotype)，例如 2006a、2006b、2009 及 2012 等[30, 34]。流行於 1987 到 2008 且廣為研究之 16 株 GII.4 型病毒株 [35] (菌株 NCBI GenBank 登錄號：AY038600 (VA387)、AB220922 (Sakai)、DQ078794 (Hunter 284E)、ADF50100.1 (06Y06BC1)、ADF50099.1 (06Y06BC2)、GU937455 (00Y96C)、GU937451 (06Yb96C1)、GU937448 (00Y02C)、GU937449 (03Y02C1)、GU937450 (03Y02C2)、GU937454 (06Y02C)、GU937456 (02Y02C)、GU937463 (08Y02C)、GU937457 (05Y04C)、GU937458 (06Y06aC1)、GU937459 (06Y06aC2))與本研究之台灣分離株之 P domain (突出區)利用 Clustal Omega 做序列比對 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)，以近鄰相接法(neighbour-joining method)做演化樹(phylogenetic tree)分析，如圖 3-3，台灣分離株最近似於 GII.4 型之 2006b。

根據前人研究，圖 3-3 所比較之 16 株 GII.4 型病毒株之 P domain(突出區)，經大腸桿菌做表現皆能形成由 12 個雙體化 P 蛋白質所組成之 P 粒子(P particle) [35]，由 6 個雙體化 P 蛋白質所組成之小型 P 粒子(small P particle)僅發現於 C 端 RRR-cluster 突變之 AY038600 (VA387)菌株 [73]。與台灣分離株序列最相近並同屬 2006b 之 ADF50099.1 (06Y06BC2)，胺基酸序列與本研究之菌株僅有四個差異(residue 84, 119, 136, and 313) (圖 3-4)，並且這四個差異胺基酸也能在 C 端突變後能形成小型 P 粒子之 AY038600 (VA387)菌株發現(圖 3-4A)。當 P 蛋白質形成雙體，P 蛋白質頂端任一側之單體之 HBGA 結合位點 I 及 II 會與另一個單體之位點 III 接合，此接合面能與 HBGA 結合，如附圖 7。P 蛋白質經結構模擬，如圖 3-4C，以俯視觀察諾羅病毒之頂部與 HBGA 接合面，四個突變之胺基酸位置(紅色圓球)環繞在 P 蛋白質之外圍側邊，從模擬結構預測圖顯示，這四個胺基酸突變位對 P 蛋白質之顆粒生成具有重要影響。

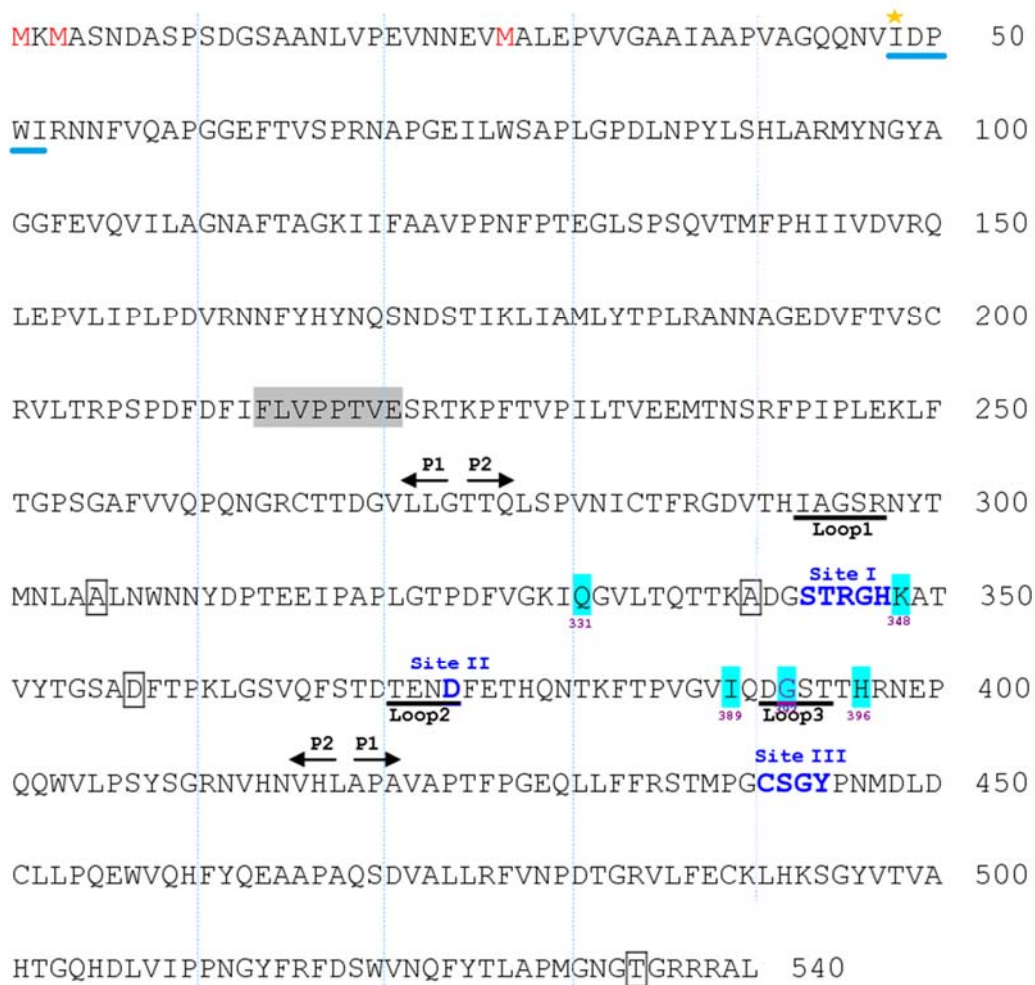


圖 3-1 台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 VP1 胺基酸序列

灰色網底為短鉸鏈(hinge)，連接殼區(S domain) (M1-I213)和突出區(P domain) (S222-L540)；藍色實線為跨菌株高度保守區(I48-I52)，黃色星號(I48)為與 VP2 結合之關鍵位點[27]；黑色實線為外來抗原嵌入之三個環狀結構，分別為 Loop 1 (I293-R297)、Loop 2 (T371-D374)及 Loop 3 (D391-T394)；藍色粗體為 HBGA 之結合面，分別為 Site I (S343-H347)，Site II (D374)與 Site III (C441-Y444)；藍色網底為影響 HBGA 結合特異性之位點；箭頭所指的為 P1 及 P2 之邊界；方框為圖 3-4 比較出之四個相異胺基酸。

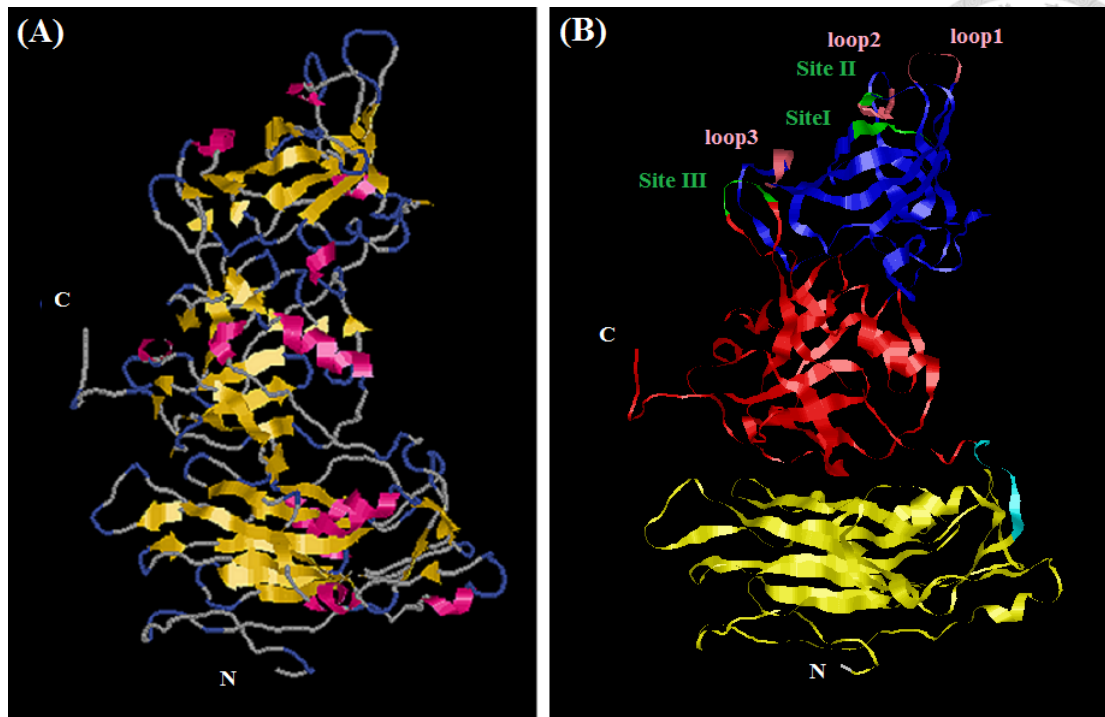


圖 3-2 台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之 VP1 蛋白質結構模擬

(A)結構模擬。 α -helix 之二級結構由紫紅色表示， β -sheet 之二級結構由黃色表示，轉折(turns) 為淡藍色，其餘為灰色。(B)各功能性區塊預測。黃色為殼區(S (shell) domain)(含 small N-terminal domain)，青色為短鉸鏈(hinge)，紅色與藍色各為突出區(P (protruding) domain)之 P1 區(P1 domain)與 P2 區(P2 domain)。P2 區可嵌入外來抗原之三個環狀結構，各以粉紅色呈現，分別為 loop1 (最上方)、loop2 (中間)、 loop3 (最下方)。突出區可與人體 HBGA 接合之位點，各以綠色呈現分別為 Site I (中間)，Site II (最上方)與 Site III (最下方)。

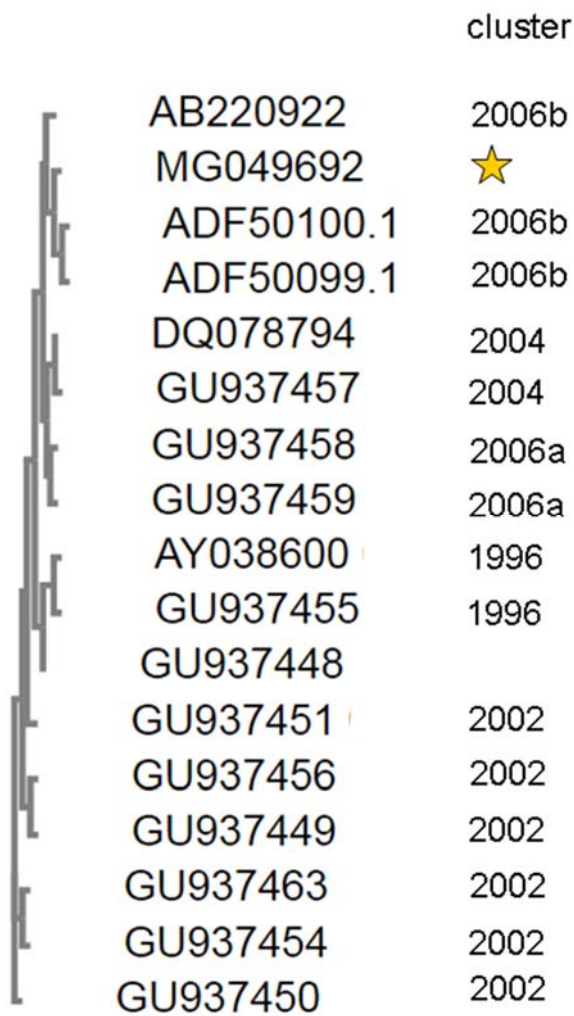
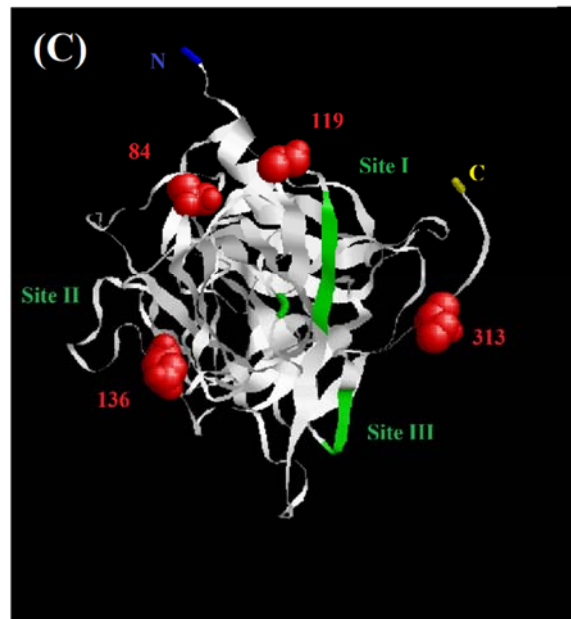
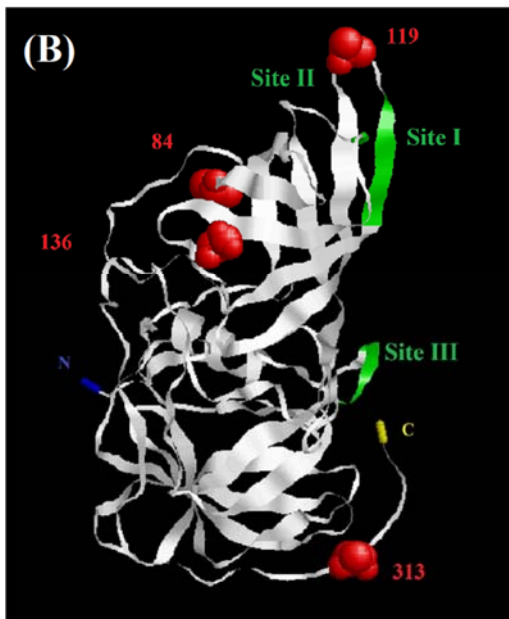
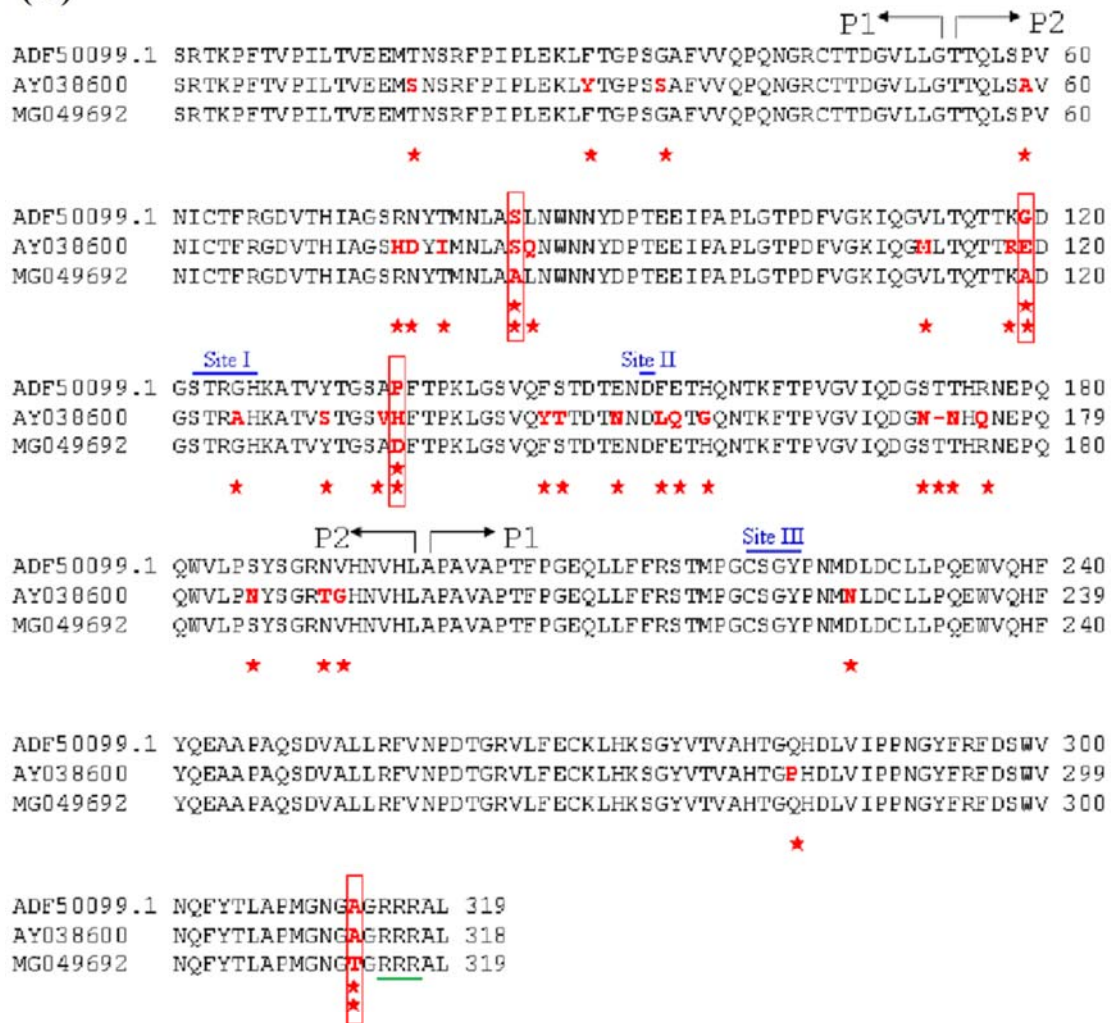


圖 3-3 演化樹分析 17 種不同 GII.4 型菌株之 P 胺基酸序列

(A)



(D)

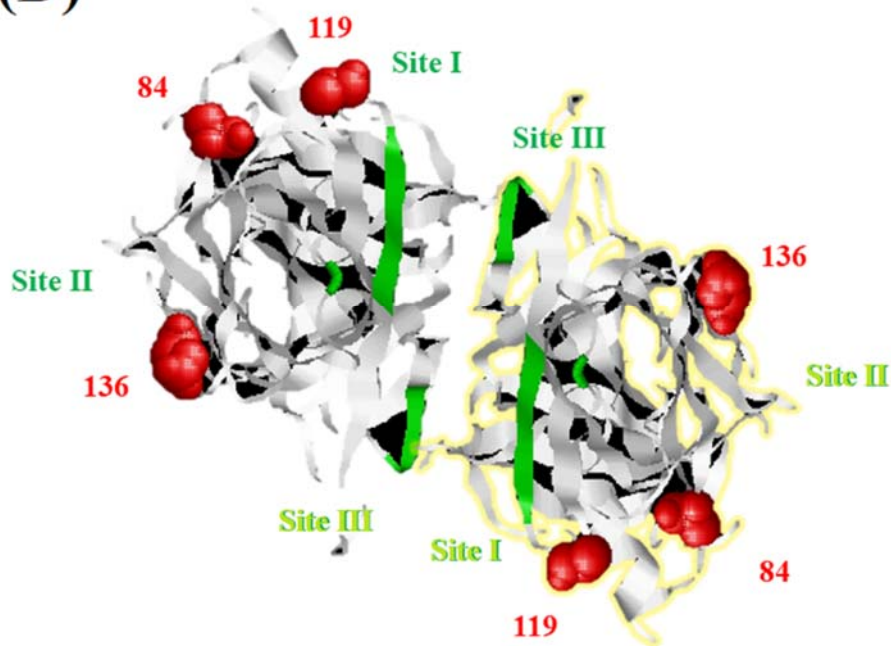


圖 3-4 (A) GII.4 型諾羅病毒之 P domain 胺基酸序列比較。台灣分離株之原態 P 蛋白質之(B)側視(C、D)俯視四個突變位點之結構模擬

(A)菌株編號：本研究之菌株為 MG049692；同屬 GII.4 2006b 並且胺基酸差異最少之菌株為 ADF50099.1 (06Y06bC2) [35]；能形成小型 P 粒子(small P particle)之菌株為 AY038600 (VA387)。紅色★為相異之胺基酸，藍色為 P 蛋白質與 HBGA 之三個結合面，箭頭所指的為 P1 及 P2 之邊界。(B)以側視結構模擬 P 蛋白質四個突變位點之位置。(C)以俯視(諾羅病毒以頂部之 P2 區與 HBGA 接合)結構模擬 P 蛋白質四個突變之胺基酸位置。(D)以俯視模擬雙體之 P 蛋白質(左邊為一單體，黃色外暈為另一單體)。圖 A 比對出之四個相異胺基酸以紅色圓球表示，綠色為與 HBGA 結合之三個位點。白色為蛋白質之主體構形，藍色為 N 端端點，黃色為 C 端端點。台灣分離株 P 胺基酸序列經 (PS)²: Protein Structure Prediction Server (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>)做結構預測分析後，經 Rasmol version 2.7.5 模擬呈現。

二、組胺酸標籤(6xHis)之 P 蛋白質生產、純化及顆粒分析

1. *P. pastoris* 生產

嵌有組胺酸標誌之 P 酵母菌轉形株(P-His)，經 1% 甲醇誘導 120 小時，離心以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液蛋白質進行西方墨點法分析，由蛋白質印跡結果可觀察到，約 36 kDa 之 P-His 蛋白質隨著誘導時間之增加而累加，並在 96 小時達到最高(圖 3-5A)。

2. 以組胺酸標籤(6xHis)純化

將帶有 P-His 之酵母菌轉形株，以搖瓶做培養，經 1% 甲醇誘導四天後，離心取菌塊，以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液利用 His-Trap 管柱純化 P-His 蛋白質，以含有 50、100 及 300 mM imidazol 之沖提液分別做流洗後，P-His 目標蛋白質可在含有 300 mM imidazol 之沖提液沖提出(圖 3-5B)。

3. 物性分析

將 300 mM imidazol 所沖提出之 P-His 蛋白質萃取液，以 3 kDa 濃縮管柱做體積濃縮後，利用蛋白質純化分離柱 Superose 6 increase 依蛋白質大小做分離，不同分子量蛋白質將於不同餾分(每個餾分為 1 mL，第 1 mL 餾分為 0-1 mL，第 2 mL 餾分為 1.01-2 mL；後面以此類推)沖提出來，沖提出之不同餾分之蛋白質分子量大小以標準品做管柱校準。每個餾分皆各取 13 μ L 以 SDS-PAGE 做分析。從圖 3-6A 結果可觀察到，多聚體 P-His 蛋白質主要在 670 kDa 及 158 kDa 間沖提出來。為進一步了解訊號最強之第 15 mL 餾分所沖提出之 P-His 其粒徑大小及外觀形態，以動態光散射粒徑分析儀 (dynamic light scattering, DLS) 的分析結果可觀察到，NoV P-His 之粒徑大小主要在 15 nm (圖 3-6B)，並且與穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 所觀察的大小一致，從穿透式電子顯微鏡結果顯示，15 mL 餾分所沖提出之 P-His 主要以三

角形、四角形及環狀的構形為主(圖 3-6C)。綜合上述之實驗結果，台灣本土分離出之諾羅病毒 P-His 以酵母菌表現並純化後，主要以 12 個 P 蛋白質單體所構成之分子量約 420 kDa 之小 P 粒子(small P particle)形態為主，粒徑大小約再 15 nm 間。

4.功能性分析

本試驗以 B 型之成人唾液做諾羅病毒 HBGA 結合測試，從試驗結果可看到，P-His 蛋白質經 His-Trap 管柱純化後經膠體層析之第 15 mL 餾分所沖提出之小型 P 粒子，能結合 HBGA，並且吸附效果隨著蛋白質濃度增加而增加，吸附能力也與唾液濃度成正比，當唾液稀釋 200 倍下，比稀釋 1000 倍更有較強之吸附能力(圖 3-7)。

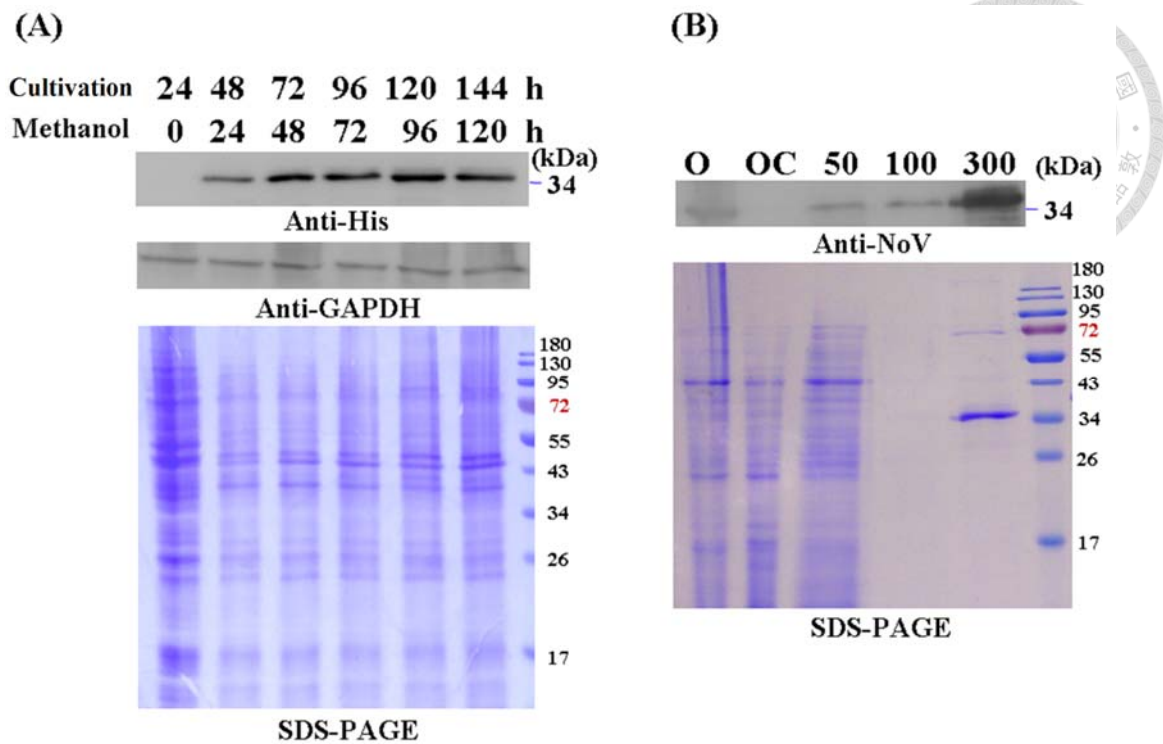


圖 3-5 轉形株 P-His (A)以搖瓶誘導表現及(B)以 His-Trap 管柱純化

(A)每個樣品為 10 μ g 之蛋白質粗萃液以 12.5% SDS-PAGE 做分析。左側

“Cultivation” 為總培養時間，“Methanol” 為甲純誘導時間。上層圖為以 His 抗體偵測隨誘導時間增加之胞內 P 蛋白質，中層圖為 GAPDH (MW ~36 kDa) 抗體偵測之內控制組 (internal control)，以 Coomassie Brilliant Blue 染色之 SDS-PAGE 膠圖結果，為蛋白質跑膠對照。(B) Lane O 及 OC 為粗萃液及蛋白質通過管柱之流洗液，Lane 50 到 300 為含有 50、100 及 300 mM imidazole 之沖提液，約 36 kDa 之 P-His 蛋白質在含有 300 mM imidazole 之沖提液可純化出。上層圖為以 NoV 抗體做西方墨點法分析，下層圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照。

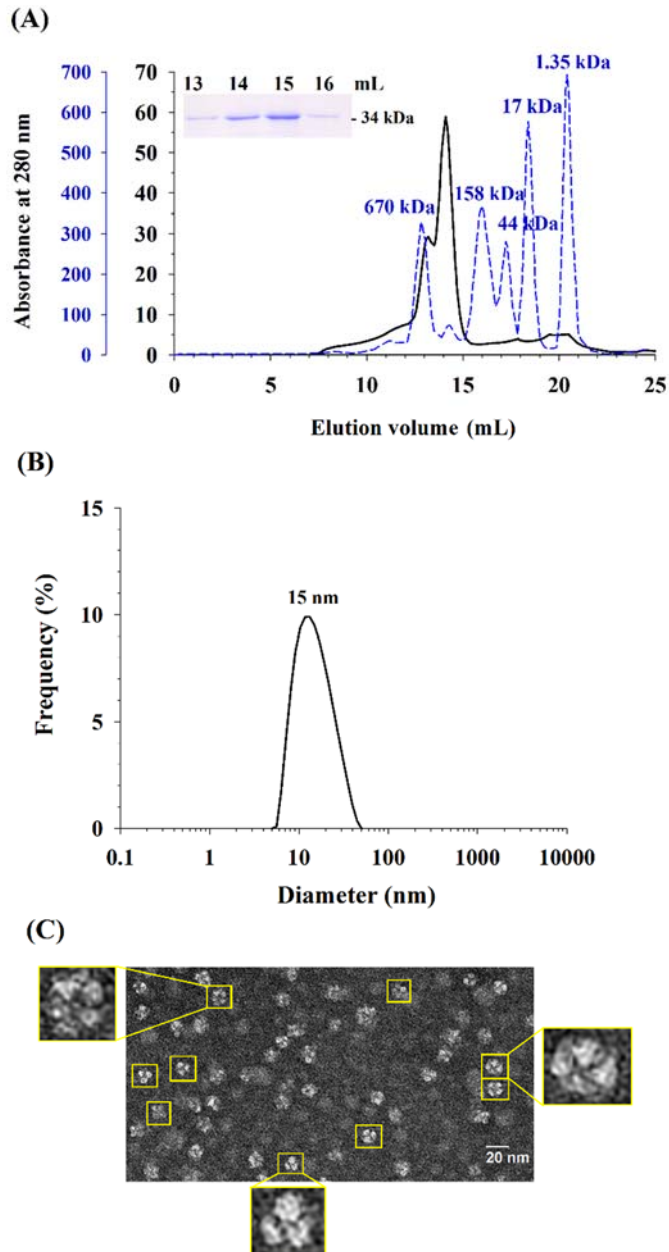


圖 3-6 純化之 P-His 蛋白質物理特性分析

(A) 黑色實線為蛋白質純化分離柱 Superose 6 increase，分析經 His-Trap 管柱純化之 P-His 蛋白質之沖提結果，藍色虛線為以標準品做管柱校準之沖提結果，左上方為 SDS-PAGE 分析不同餾分(每個餾分為 1 mL)之膠圖。(B)動態光散射粒徑分析儀(DLS)分析經純化分離柱於第 15 mL 之餾分。(C)穿透式電子顯微鏡(TEM)分析經純化分離柱於第 15 mL 餾分之 P-His 蛋白質。右下方比例尺為 20 nm。

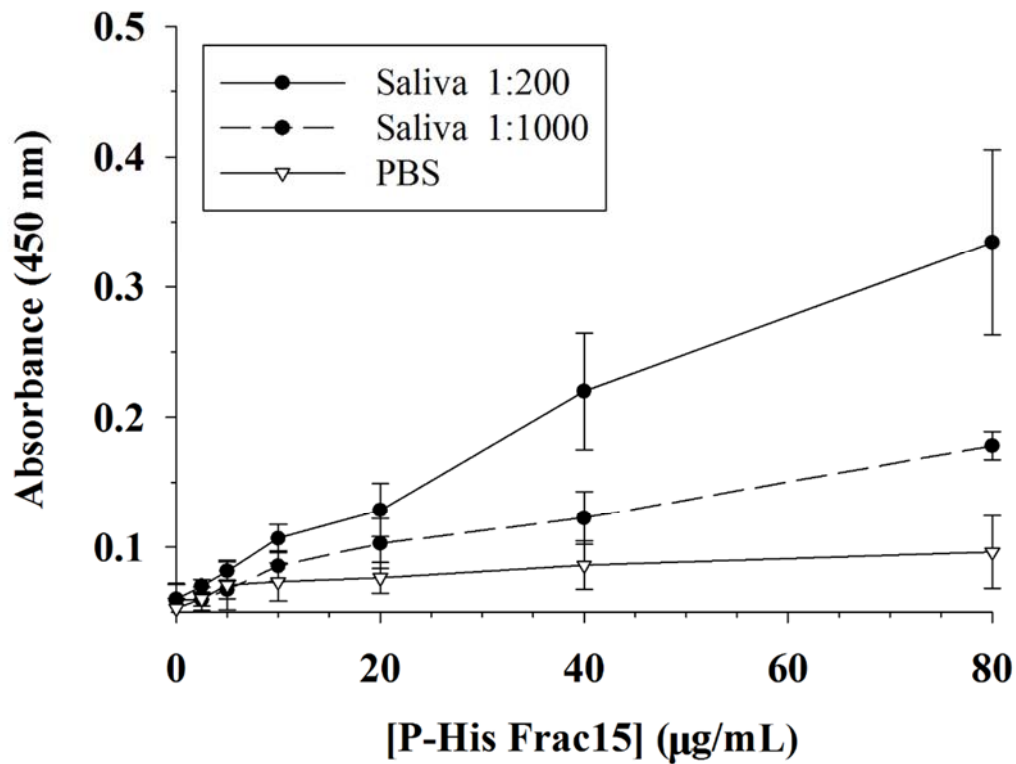


圖 3-7 HBGA 結合測試

B 型之成人唾液與小型 P 粒子(純化分離柱分離之第 15 mL 之餾分)之結合測試結果。實心圓圈為不同濃度之 B 型唾液，實線為 1:200，虛線 1:1000；空心三角形為 PBS (用為稀釋不同濃度之唾液)，在此為不加唾液下，做為負對照組。

三、原態 P 蛋白質之生產、純化及顆粒分析

1. *P. pastoris* 生產

1.1. 高表現量 P 轉形株篩選

本研究之抗 Zeocin 基因與 NoV P 在同一條轉入的質體上，抗 Zeocin 能力愈強之菌株，經電轉後插入的基因拷貝數越多，因此抗 Zeocin 之能力與胞內目標蛋白質之產量成正相關[109]。因此，為挑選出 P 蛋白質高表現量之轉形株，將帶有 P 之不同酵母菌轉形株，先利用梯度 Zeocin 抗性培養基(100、300、500 $\mu\text{g/mL}$)篩選(圖 3-8A)。待 2 至 3 日後，再挑選生長較佳之轉形株，以試管進行小量誘導培養，待誘導 4 天後以快速破菌法進行簡易破菌，並以諾羅病毒抗體做西方墨點法分析，約 35 kDa 之 P 蛋白質利用交叉比對 SDS-PAGE 與西方墨點法之訊號強度篩選出高產量之 P27 號蛋白質轉形株(圖 3-8B)。

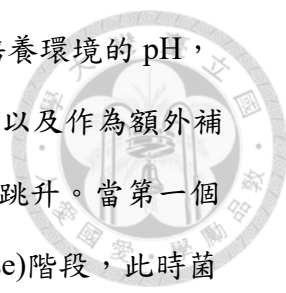
1.2 搖瓶培養

為嘗試提升 P 蛋白質於誘導表現期間之表現量，根據文獻，降溫誘導能提升目標蛋白質之表現量[110, 111]，本研究嘗試比較 23 度(降溫誘導)及 30 度做誘導培養，從圖 3-9A 結果可觀察到，目標 P 蛋白質之生產，30 度顯著高於 23 度，降溫誘導對本研究之目標蛋白質生產，助益不大。為進一步了解以 30 度誘導培養 P 蛋白質之表現變化量，從圖 3-9B 可觀察到，P 蛋白質於誘導 96 小時產量最高，利用三明治酵素免疫法(ELISA)以純化的 P-His 蛋白質做為標準品，做蛋白質定量分析，P 蛋白質搖瓶產量可達到 44.8 mg/L。

1.3 醱酵槽培養

本研究利用三段式的醱酵策略(分別為批次培養(batch phase)、饋料批次培養(fed batch phase)及甲醇誘導培養(methanol-induction phase))，大量生產諾羅病毒 P 蛋白質。如圖 3-10，在甘油批次培養(glycerol batch phase)階段，培養基一





開始配製的 4% 甘油，約在 15-16 小時間會被消耗完，為恆定培養環境的 pH，期間甘油代謝所產生的酸，會以饋入鹼(10% 氨水)做 pH 的恆定以及作為額外補充的氮源來源，當碳源不足菌體代謝趨緩，溶氧值(DO)會急遽跳升。當第一個 Spike 出現後，即進入甘油饋料批式培養(glycerol-fed batch phase)階段，此時菌體正快速分裂及成長，代謝甘油效率極佳，因此溶氧值變化十分劇烈，為避免溶氧(DO)過低對菌體造成傷害，根據溶氧的跳升，250 mL 之 50% 甘油，設定在溶氧值(DO)5-50 間緩慢饋入，並在約 7-8 小時間可完全饋完；為了使菌體提前適應甲醇，使 *AOX1* promoter 能加速去抑制[98, 112]，~0.5 mL/L 的甲醇在甘油饋完前 1~2 小時前加入。當甘油再次消耗完畢，第二個 Spike 出現，生菌數可達到 8×10^9 cfu/mL，並且在甲醇誘導培養期(methanol-induction phase)皆無顯著變化，在菌體尚未完全適應碳源轉換前，大量添加甲醇會對菌體造成生存壓力，為讓菌體逐步適應甲醇，在碳源切換的第一個小時，甲醇饋料的速度設定在 1 mL/h/L，之後每 30 分鐘以各 1.4、1.8、2.2、2.6 及 3 mL/h/L 梯度方式逐步拉升甲醇的饋料速度，並以終 3 mL/h/L 流速持續誘導 120 小時，期間嗜甲醇酵母菌以異化路徑代謝甲醇(dissimilatory pathway)，會產生甲酸(formic acid)及二氧化碳等酸性物質(附圖 9)[113]，本實驗目標 P 蛋白質的生產量與前人結果一致[114]會與鹼及甲醇的添加量成正比。利用三明治酵素免疫法(ELISA)以純化的 P-His 蛋白質做為標準品，做蛋白質定量分析，誘導 120 小時之 P 蛋白質醱酵槽產量可達到 220 mg/L。

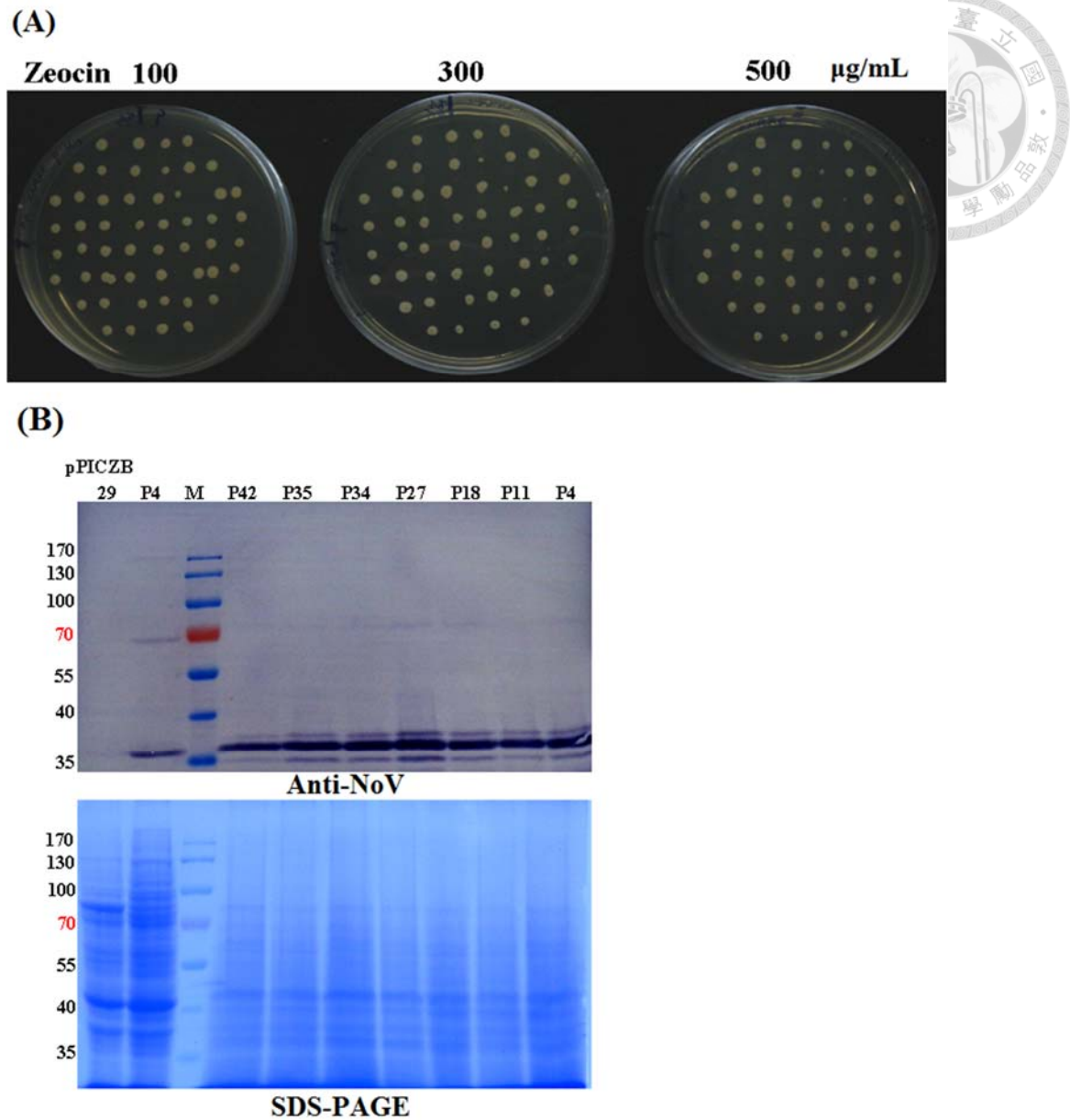


圖 3-8 高表現量 P 轉形株塞選

(A)以梯度 Zeocin 抗性濃度塞選轉形株。(B)以小量培養塞選高表現之 P 轉形株；轉形株經快速破菌後，上層圖為以 NoV 抗體(ab80024)做西方墨點法分析，下層圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照。

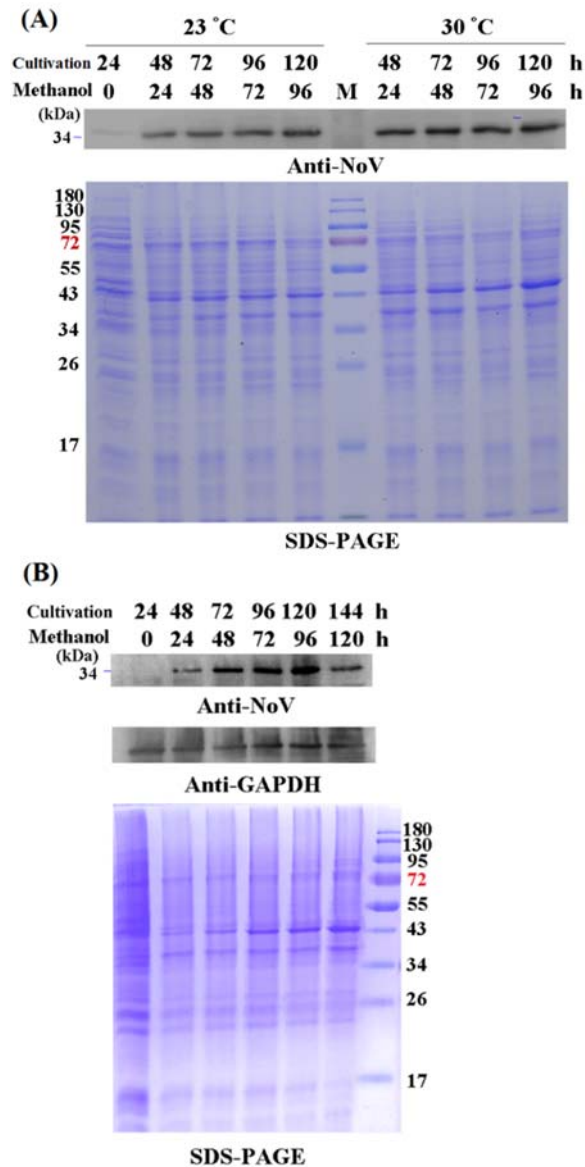
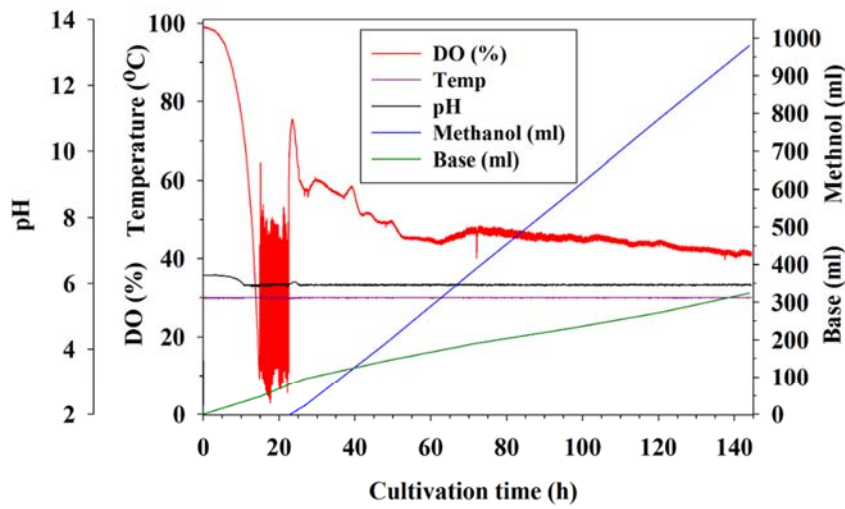


圖 3-9 轉形株 P (A) 23 及 30°C (B) 30°C 之誘導培養

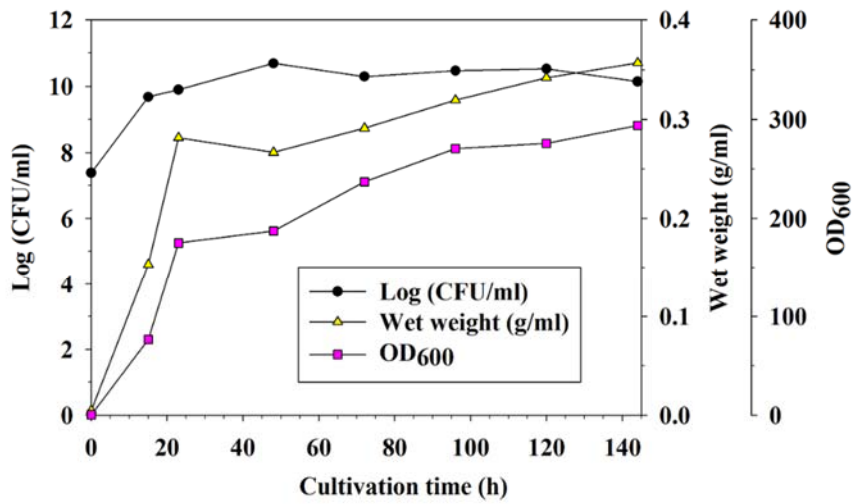
(A) 23 及 30°C 二種不同誘導溫度之比較。1L 之 BMGY 培養液待離心去除菌液後，菌體以 200 mL 之 mBMMY 置換，平分成各 100 mL 以搖瓶做二種不同溫度之誘導培養。(B)較佳(30°C)誘導溫度之培養。左側“Cultivation”為總培養時間，“Methanol”為甲醇誘導時間。“Anti-NoV”為以 NoV 抗體偵測隨誘導時間增加之胞內約 35 kDa 之 P 蛋白質。“GAPDH” (MW ~36 kDa) 為以 GAPDH 抗體偵測之內控制組 (internal control)。下層以 Coomassie Brilliant Blue 染色之 SDS-PAGE 膠圖，為蛋白質跑膠對照。



(A)



(B)



(C)

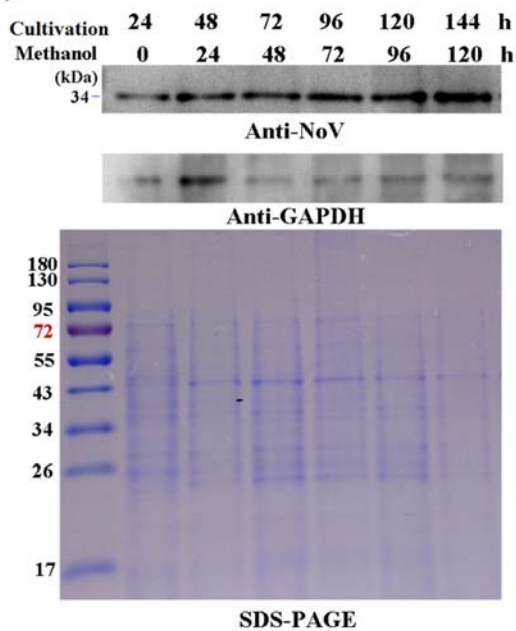



圖 3-10 以醱酵槽大量生產 P 蛋白質



(A) 醱酵參數及饋料。酸鹼值變化(黑線)、溶氧值變化(紅線)、溫度變化(紫線)、甲醇饋料總累加量(藍線)、鹼(10%氨水)饋料總累加量(綠線)。(B) 菌體生長及菌量變化。生菌數(total viable counts; CFU/mL) (黑色圓圈)、溼重(g/mL) (黃色三角形)、菌體濁度(optical density; OD₆₀₀) (紫色方塊)。(C) P 蛋白質在醱酵槽中之誘導累加。各 4 μg 之蛋白質粗萃液以 SDS-PAGE 做分析; 左側 “Cultivation” 為總培養時間, “Methanol” 為甲醇誘導時間。上層圖為以 NoV 抗體偵測隨誘導時間增加之胞內約 35 kDa 之 P 蛋白質, 中層圖為 GAPDH (MW ~36 kDa) 抗體偵測之內控制組 (internal control), 以 Coomassie Brilliant Blue 染色之 SDS-PAGE 膠圖結果, 為蛋白質跑膠對照。

2.開發無標籤純化策略

利用台灣分離株 P 蛋白質之等電點(Isoelectric point)為 6.35，在鹼性環境下蛋白質帶有負電之特性，及原態下具有暴露在表面的組胺酸和能自我組裝成多聚體之特性，本研究發展出二套分離純化策略，並且第二種純化策略能直接套用至純化原態 VP1 蛋白質，整套純化過程如圖 3-11。

2.1 策略一:利用雜蛋白質與目標蛋白質對管柱之吸附落差純化

目標蛋白質與宿主之雜蛋白質(host cell proteins)為二種需分離的群體，文獻指出，藉由雜蛋白質與目標蛋白質之吸附落差，可從線性沖提之數據，找出最佳化之階梯式沖提鹽濃度，並進而直接分離二個獨立之群體[115]。為獲得雜蛋白質與目標 P 蛋白質在不同沖提濃度之洗脫圖譜(pattern)，本研究利用搖瓶培養之醱酵粗萃液以陰離子交換管柱(DEAE)以線性沖提做洗脫圖譜分析。從圖 3-12B 之西方墨點分析可觀察到，P 蛋白質在 0.1-0.33 M NaCl 之範圍可沖提出，從 SDS-PAGE 圖譜可觀察到，隨著沖提鹽濃度的拉升，雜蛋白質之雜度也隨之提升。為了創造出 P 蛋白質與雜蛋白質之沖提滯留差，本實驗收集 0.17-0.3 M NaCl 之沖提液，並將濃度低於 0.16 M NaCl 之沖提液去除，以藉此去除低鹽濃度可沖提出之雜蛋白質，製造出沖提滯留差。

為得到目標 P 蛋白質，本實驗利用陰離子交換管柱(DEAE)以階梯式沖提重覆萃取 P 蛋白質。將線性沖提得到之 0.17-0.3 M NaCl 沖提液，再以 0.12 和 0.3 M NaCl 二段式階梯式沖提做第二次萃取(圖 3-13A 及 C)，接著收集高鹽 0.3 M NaCl 沖提之沖提液，再以階梯式沖提做第三次萃取(圖 3-13B)，從第三次萃取之 SDS-PAGE 膠圖可觀察到，沖提液濃度超過 0.14 M NaCl，雜蛋白質之比例會顯著上升(圖 3-13D)。

為進一步濃縮及精純目標 P 蛋白質，收集前二次階梯式沖提在 0.12 M NaCl 之沖提液，並利用疏水性層析(Phenyl HS)管柱以線性沖提做第四次之純化(圖 3-

13E)，從圖 3-13C 之 SDS-PAGE 膠圖及西方墨點分析可觀察到，P 蛋白質可在 0 M (NH₄)₂SO₄ 沖提出來，將不同管柱之 0 M (NH₄)₂SO₄ 沖提液收集於同一管(圖 3-13F)，並以 LC-MS/MS 做分析，如圖 3-13G 顯示，純化出之 P 蛋白質有 38% 之胺基酸序列符合台灣分離株之 P 胜肽片段。從 LC-MS/MS 及西方墨點法分析之結果顯示，P 蛋白質可藉由離子交換管柱以一次的線性沖提，及二次的階梯式沖提和一次的疏水性管柱分離得到，但經多次純化回收之 P 蛋白質其回收率僅剩 2.5%，為進一步提升 P 蛋白質之回收率，本研究發展第二組純化策略。

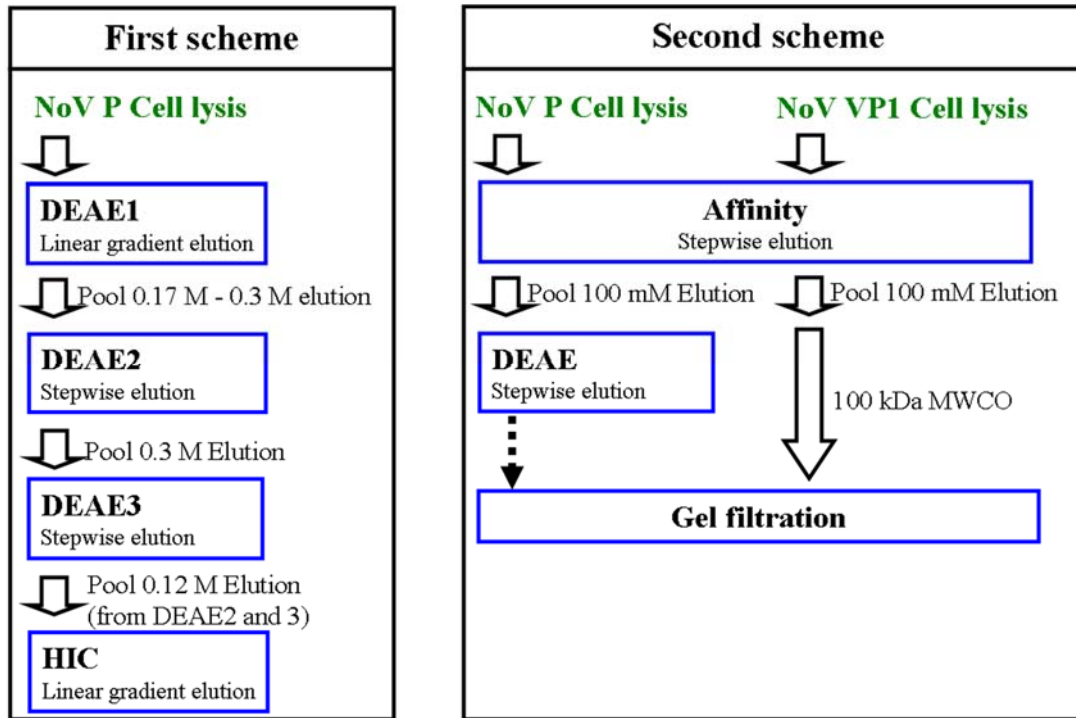
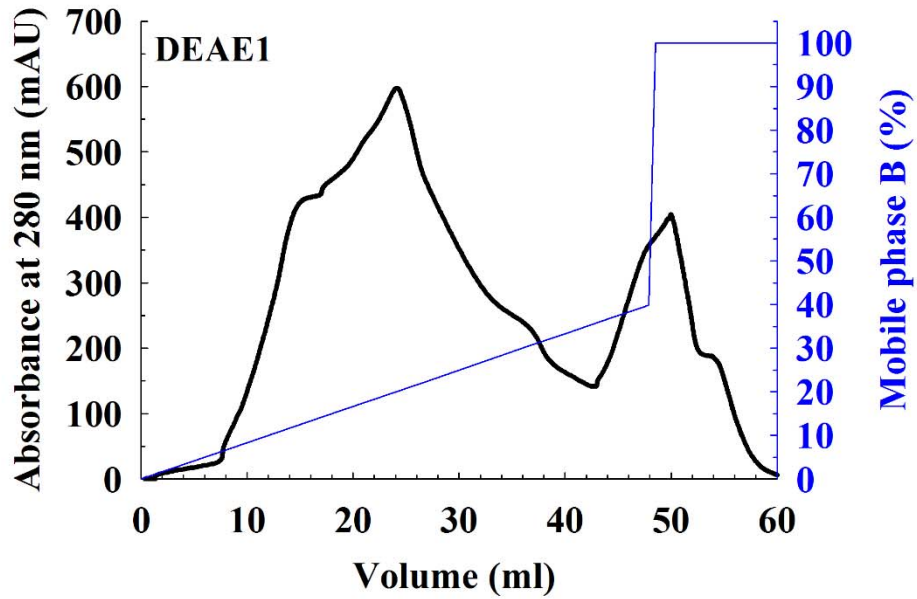


圖 3-11 分離純化流程圖

(A)



(B) DEAE1

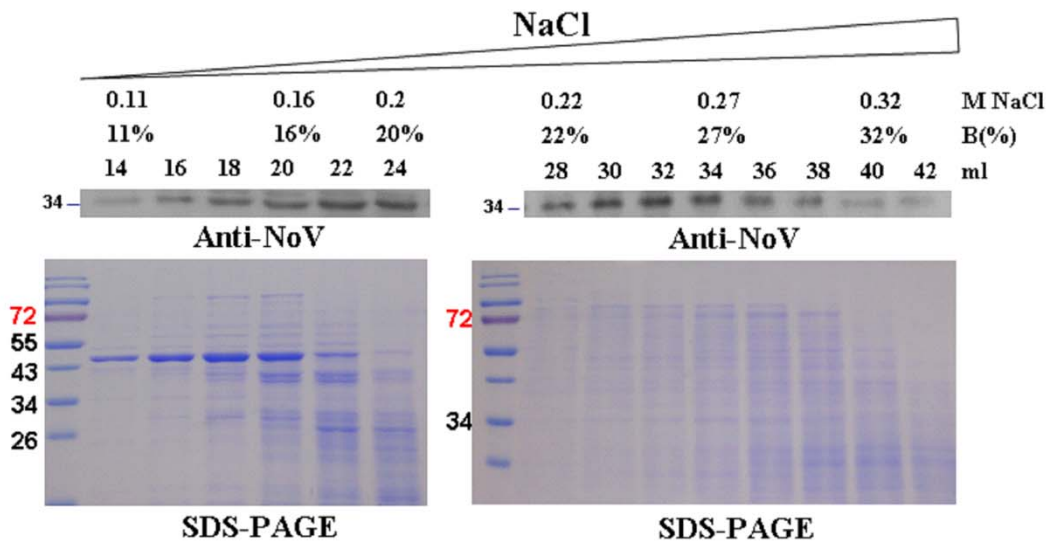


圖 3-12 P 蛋白質與宿主蛋白質之線性沖提圖譜

(A)黑色實線為陰離子管柱(DEAE)之沖提結果，藍色實線為流動相 B (含有 1 M NaCl)之拉提圖譜。(B) “Anti-NoV” 為以 NoV 抗體偵測隨流動相 B 拉提而沖提之 P 蛋白質，SDS-PAGE 為分析不同餾分之蛋白質分佈膠圖。

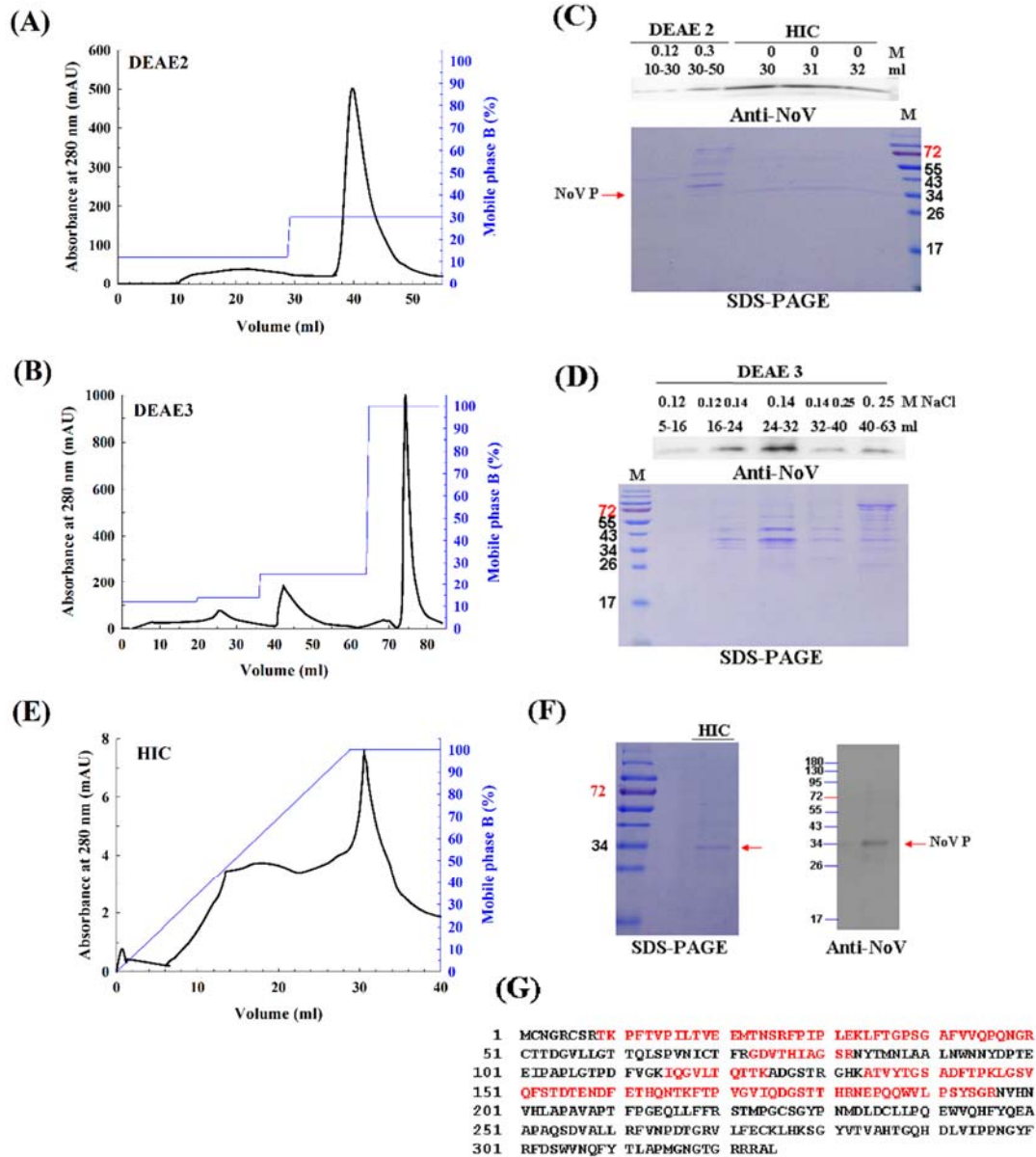


圖 3-13 二次階梯式沖提及一次疏水性管柱純化之分析結果

(A、C)第二次純化以陰離子管柱(DEAE)利用二段式階梯式沖提及分析結果。
 (B、D)第三次純化以陰離子管柱(DEAE)利用階梯式沖提及分析結果。(E、C)第四次純化以疏水性交換管柱(phenyl HS)線性沖提及分析結果。黑色實線為沖提結果，藍色實線為流動相 B 之拉提圖譜；(F、G)純化出之 P 蛋白質以 LC-MS/MS 分析比對，結果顯示有 38%與 P 蛋白質胜肽一致(紅色粗體)。“Anti-NoV”為以 NoV 抗體偵測 P 蛋白質，SDS-PAGE 為分析不同餾分之分析結果。

2.2 策略二:利用原態之組氨酸純化

目標蛋白質可藉由原生暴露在表面之一個以上的組氨酸，利用組氨酸之 histidyl residues 與 His-Trap 管柱之吸附，直接純化[116, 117]。相同的菌株，以不同的培養條件及培養策略，會使宿主之酸蛋白質、鹼蛋白質及原態即具有組氨酸之蛋白質產生不同的分佈[118]。本研究利用原態之 P 蛋白質本身具有之組氨酸(圖 3-14)，以 His-Trap 管柱直接純化。相比起在末端帶有組氨酸之 P 蛋白質(P-6xHis) (圖 3-5)，原態之組氨酸與管柱的吸附能力較弱，以 100 mM Imidazole 之沖提液即能直接沖提出帶有不等比例及分佈之雜蛋白質的目標蛋白質(圖 3-15)。相比起搖瓶醱酵液，醱酵槽之醱酵液其雜蛋白質比例雖然較低，但純度僅為 $40.7\pm 3.1\%$ 。

為進一步提升純度，來自搖瓶之 100 mM imidazole 沖提液以陰離子交換管柱(DEAE)純化；為獲得雜蛋白質與目標 P 蛋白質在不同沖提濃度之洗脫圖譜(pattern)，本研究以線性沖提做洗脫圖譜分析。從圖 3-16B 之西方墨點分析可觀察到，P 蛋白質在 0.15-0.35 M NaCl 之範圍可沖提出，從 SDS-PAGE 圖譜可觀察到，隨著沖提鹽濃度的拉升，雜蛋白質集中在 0.18-0.3 M NaCl 之範圍可沖提出，為創造出 P 蛋白質與雜蛋白質之沖提滯留差，本研究嘗試以低鹽 0.15 M NaCl 直接沖提出 P 蛋白質(圖 3-16 C&D)，然而從 SDS-PAGE 圖譜可觀察到，低鹽濃度雖可拉出目標 P 蛋白質，然而雜蛋白質亦一起沖提出，這個結果代表在 0.15 M NaCl 濃度沖提下，雜蛋白質無法完全停留在管柱中，必須再以更低的鹽濃度做弱蛋白質競爭吸附，使雜蛋白質停留在管柱內，僅目標蛋白質被沖提出。

來自搖瓶及醱酵槽之 100 mM imidazole 沖提液以陰離子交換管柱(DEAE)，再以低鹽 0.12 和高鹽 0.4 M NaCl 之二段階梯式沖提進一步純化及分析(圖 3-16 E-J)。相比起來自搖瓶之醱酵液，來自醱酵槽之醱酵液經二次純化後純度較高，回收率 $28.1\pm 2.1\%$ ，純度可達 $82.1\pm 5.4\%$ (表 3-1)。而不管來自搖瓶或醱酵

槽之醱酵液，以陰離子交換管柱(DEAE)以低鹽 0.12 M NaCl 沖提之沖提液，經濃縮後以 SDS-PAGE 分析可觀察到純度皆可超過 90% (圖 3-16 G&J)。此套純化方法可以明顯觀察到相同之轉形株，經不同之生產策略所誘導生產之醱酵液，宿主之酸鹼、親疏水性蛋白質分布有明顯不同，並進而使純化後之目標蛋白質純度有所差異。雖分布不同，但利用陰離子交換管柱以低鹽濃度(0.12 M)所沖提出之 P 蛋白質，純度卻皆一致的高於 90%，此結果與策略一相似。

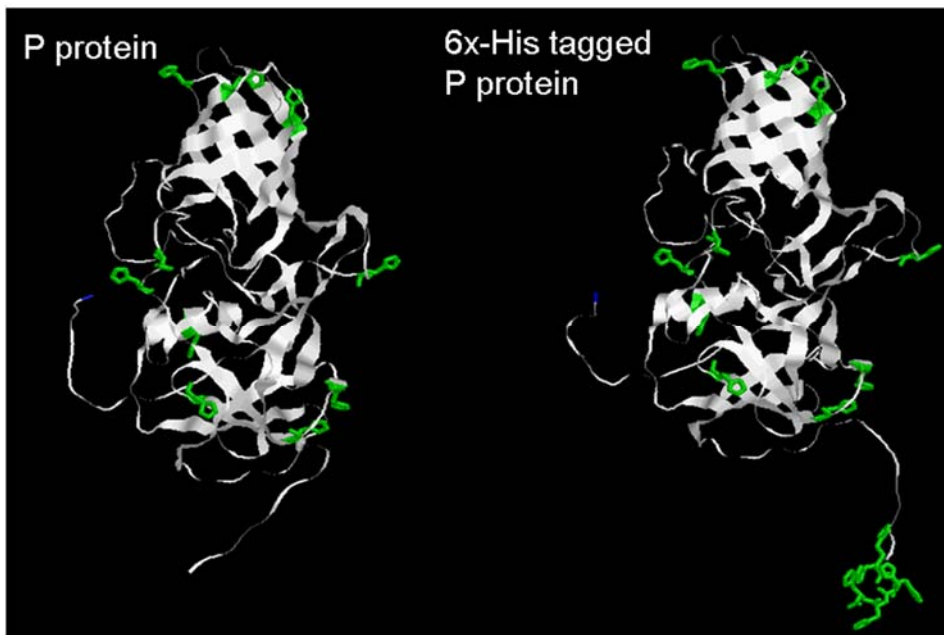


圖 3-14 台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之在 N 端具有 CNGRC 之原態(P)及嵌有組胺酸之 P 蛋白質(P-6xHis)之組胺酸預測結構圖。白色為預測之蛋白質主體構形，綠色為組胺酸，藍色為 N 端端點。P 及 P-His 之胺基酸序列經 (PS)²: Protein Structure Prediction Server (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>)做結構預測分析後，經 Rasmol version 2.7.5 模擬。

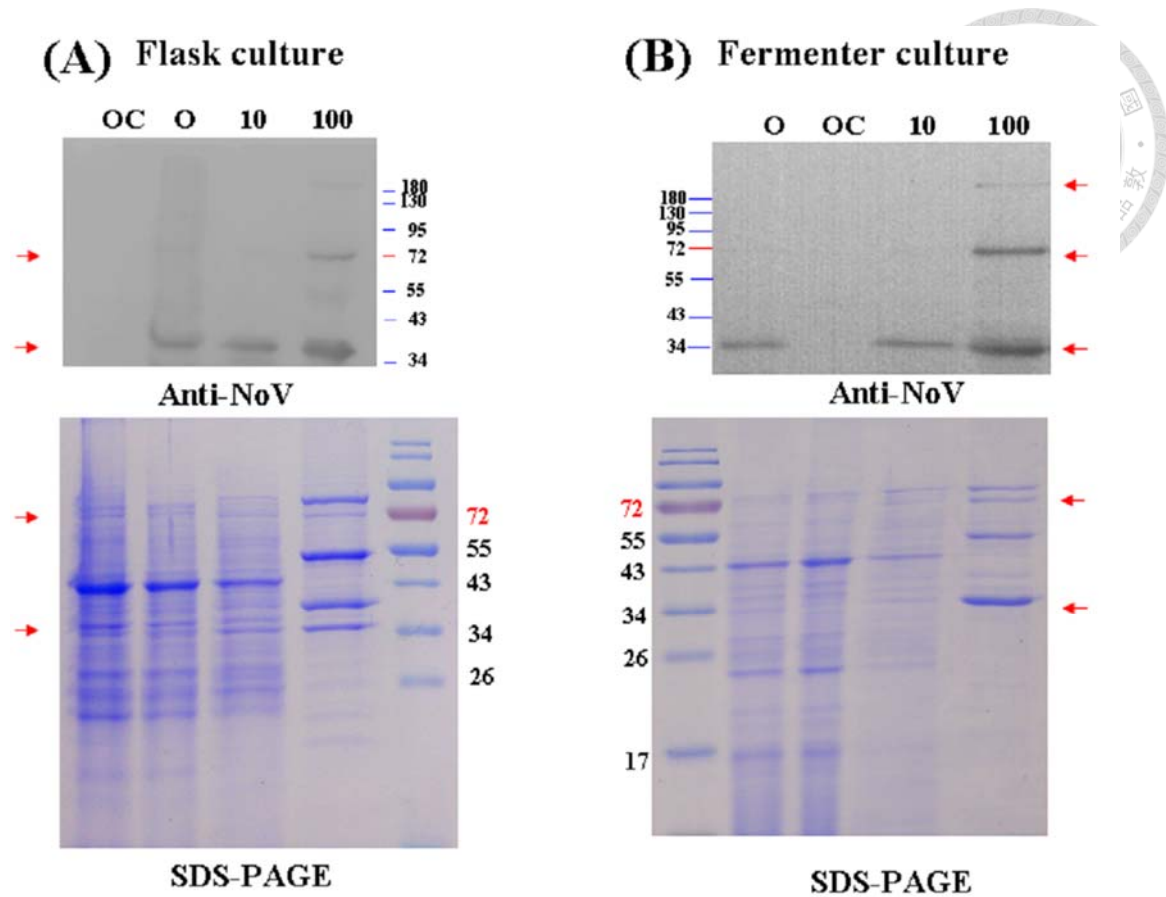
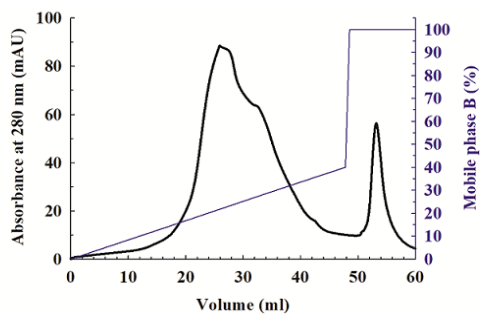


圖 3-15 轉形株 P 之(A)搖瓶(B)醱酵槽之醱酵液以 His-Trap 管柱純化

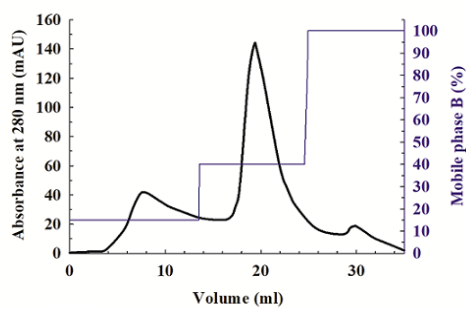
Lane O 及 OC 為粗萃液及蛋白質通過管柱的流洗液，Lane 10 為含有 10 mM imidazole 之沖提液，P 蛋白質在含有 100 mM imidazole 之沖提液可沖提出。上層圖為以 NoV 抗體做西方墨點法分析；下層圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照；紅色箭頭為 P 蛋白質之位置。



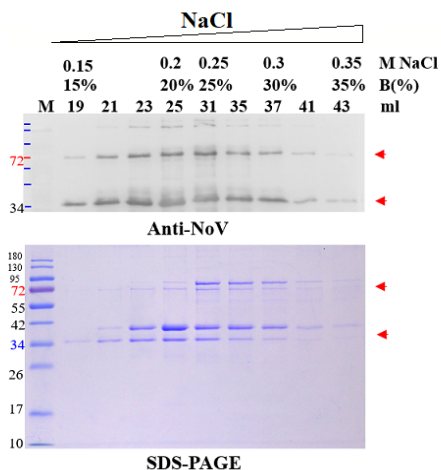
(A) Flask culture



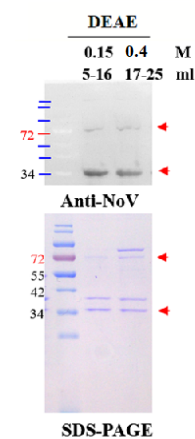
(C) Flask culture



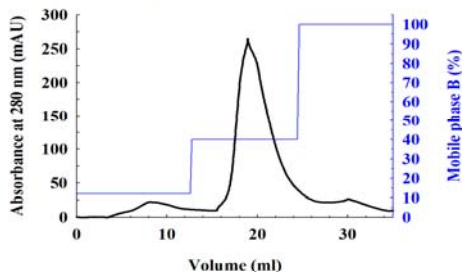
(B) Flask culture



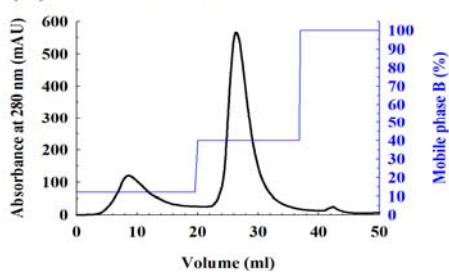
(D) Flask culture



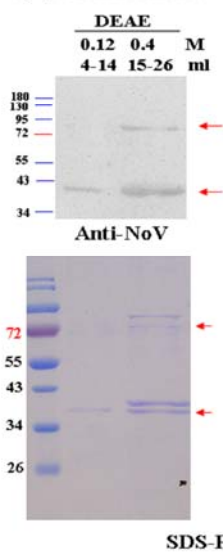
(E) Flask culture



(H) Fermenter culture



(F) Flask culture



(I) Fermenter culture

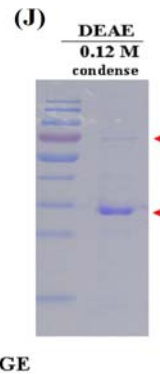
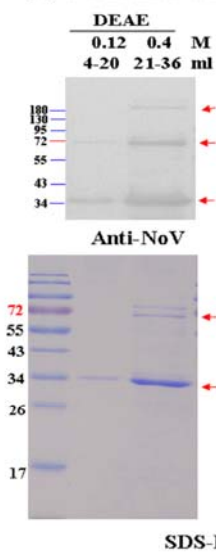


圖 3-16 轉形株 P 之(A-G)搖瓶及(H-J)醱酵槽之沖提液以陰離子交換管柱(DEAE)二次純化

(A、B)經 His-Trap 管柱純化後之搖瓶醱酵液再以陰離子交換管柱純化之線性沖提圖譜。(C、D)經 His-Trap 管柱純化後之搖瓶醱酵液再以陰離子交換管柱純化之 0.15 與 0.4 M 二段式階梯式沖提圖譜。(E、F)經 His-Trap 管柱純化之搖瓶醱酵液再以陰離子交換管柱純化之 0.12 與 0.4 M 二段式階梯式沖提圖譜。(H、I)經 His-Trap 管柱純化後之醱酵槽醱酵液再以陰離子交換管柱之 0.12 與 0.4 M 二段式階梯式沖提純化圖譜。(A、C、E、H)沖提圖譜；黑色實線為沖提結果，藍色實線為流動相 B 之拉提圖譜。(B、D、F、I)沖提液之分析結果；“Anti-NoV”為以 NoV 抗體偵測 P 蛋白質；SDS-PAGE 為以 Coomassie Brilliant Blue 染色分析不同餾分。(G、J)沖提液 0.12 M NaCl 之餾分經濃縮後以 SDS-PAGE 分析；紅色箭頭為 P 蛋白質之位置。

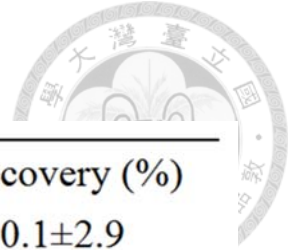


表 3-1 諾羅病毒醱酵槽 P 蛋白質之回收與純度表

Adsorbent	Purity (%)	P Recovery (%)
HisTrap HP	40.7±3.1	60.1±2.9
DEAE Sepharose FF	82.1±5.4	28.1±2.1
Stepwise elution 12%	93.2±0.9	7.6±2.6

3.物性分析

為了解 P 顆粒之大小，本研究以破菌後之 P 蛋白質粗萃液與純化後之 P 蛋白質沖提液，利用膠體層析，分析 P 蛋白質之顆粒大小及含量。將經二次純化後之 0.4 M NaCl 沖提出之 P 蛋白質萃取液，以 3 kDa 濃縮管柱做體積濃縮後，利用蛋白質純化分離柱 Superose 6 increase 依蛋白質大小做分離，不同分子量蛋白質將於不同餾分(每個餾分為 1 mL，第 1 mL 餾分為 0-1 mL，第 2 mL 餾分為 1.01-2 mL；後面以此類推)沖提出來，沖提出之不同餾分之蛋白質分子量大小以標準品做管柱校準。每個餾分皆各取 13 μ L 以 SDS-PAGE 做分析。從圖 3-17A 結果可觀察到，與 P-His 蛋白質相似，P 蛋白質主要在 670 kDa 及 158 kDa 間沖提出來。與純化後之 P 蛋白質相似，直接將破菌後之 P 粗萃液以純化分離柱 Superose 6 increase 分析，從圖 3-19B 可觀察到 P 蛋白質主要在 670 到 158 kDa 間沖提出來，但因雜蛋白質之比例及濃度高，P 蛋白質之沖提從主要集中在 15 mL 餾分延滯(delay)到 16 mL 沖提出。為進一步分析純化後之 P 蛋白質沖提液(圖 3-17A)，訊號最強之第 15 mL 餾分所沖提出之 P 其粒徑大小及外觀形態，以動態光散射粒徑分析儀 (dynamic light scattering, DLS) 的分析結果可觀察到，NoV P 之粒徑大小主要在 14 nm (圖 3-17C)，並且與穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 所觀察的大小一致，從穿透式電子顯微鏡結果顯示，15 mL 餾分所沖提出之 P 主要以三角形、四角形及環狀的構形為主(圖 3-17D)。綜合上述之實驗結果，台灣本土分離出之諾羅病毒 P 以酵母菌表現並純化後，主要以 12 個 P 蛋白質單體所構成之約 420 kDa 之小型 P 粒子 (small P particle) 形態為主，粒徑大小約在 14 nm 間。

4.功能性分析

本試驗以 B 型之成人唾液做諾羅病毒 HBGA 結合測試，從試驗結果可看到，P 蛋白質經二次純化後經膠體層析之第 15 mL 餾分所沖提出之小型 P 粒子，能結合 HBGA，並且吸附效果隨著蛋白質濃度增加而增加，吸附能力也與

唾液濃度成正比，當唾液稀釋 200 倍下，比稀釋 1000 倍更有較強之吸附能力
(圖 3-18)。



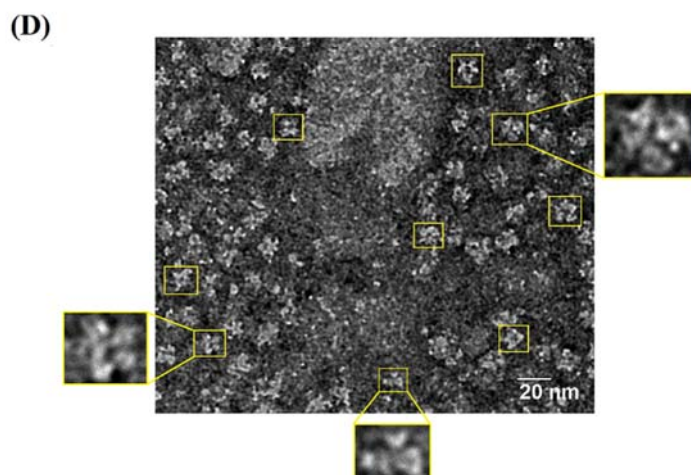
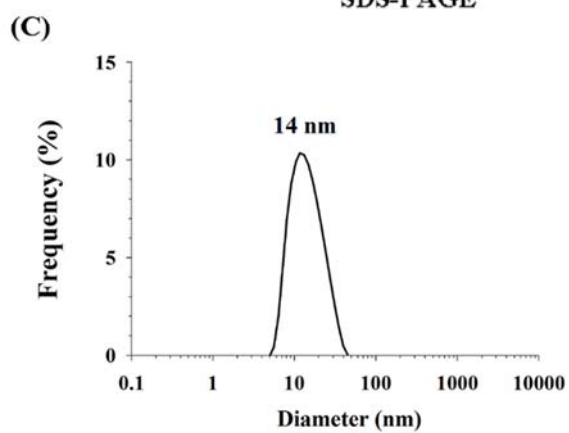
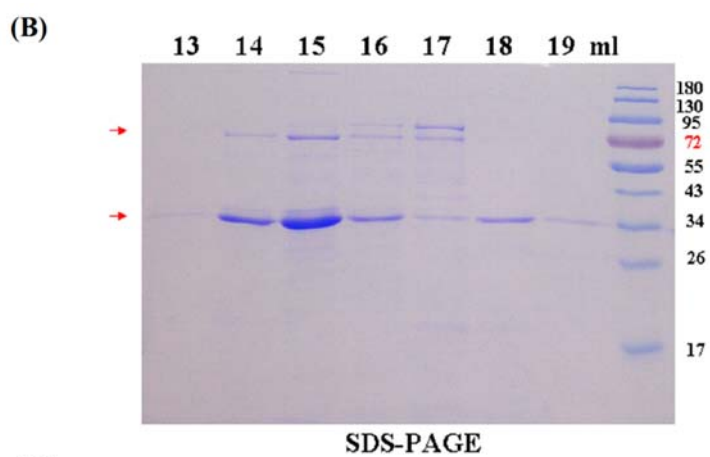
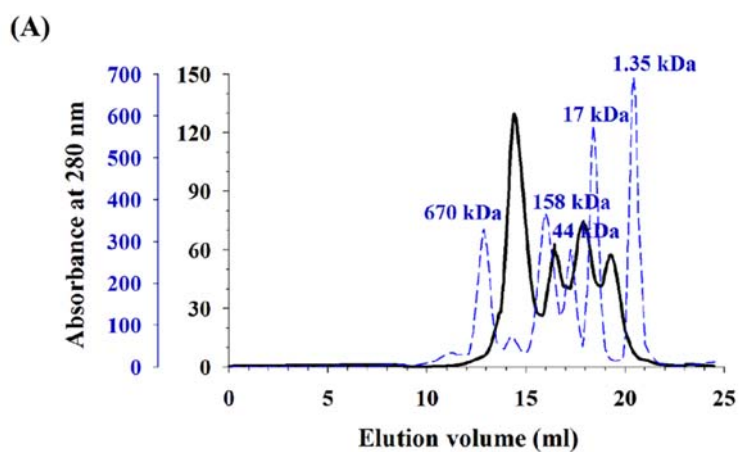


圖 3-17 純化之 P 蛋白質物理特性分析

(A)黑色實線為純化分離柱 Superose 6 increase，分析經 His-Trap 及 DEAE 管柱純化之 P 蛋白質沖提結果，藍色虛線為以標準品做管柱校準之沖提結果。(B) SDS-PAGE 為以 Coomassie Brilliant Blue 染色分析不同餾分。(C)動態光散射粒徑分析儀分析經純化分離柱於第 15 mL 之餾分。(D)穿透式電子顯微鏡分析經純化分離柱於第 15 mL 之餾分，右下方比例尺為 20 nm。

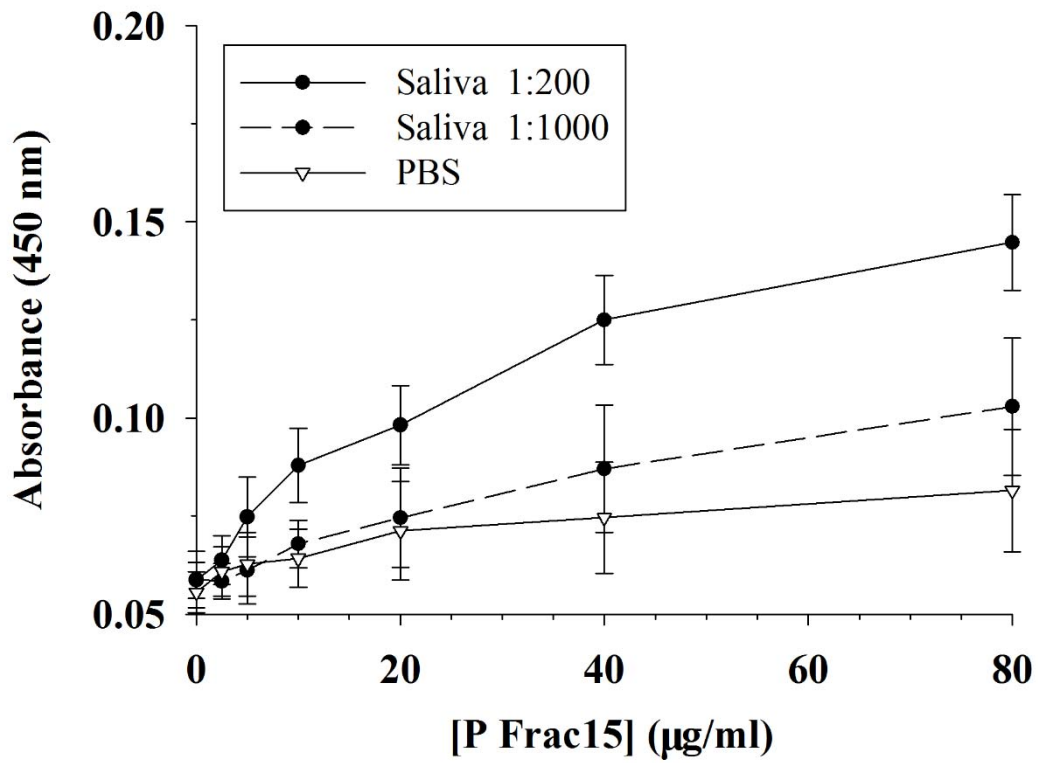


圖 3-18 HBGA 結合測試

B 型之成人唾液與小型 P 粒子(純化分離柱第 15 mL 之餾分)之結合測試結果。

實心圓圈為不同濃度之 B 型唾液，實線為 1:200，虛線 1:1000；空心三角形為

PBS (用為稀釋不同濃度之唾液)，在此為不加唾液下，做為負對照組。

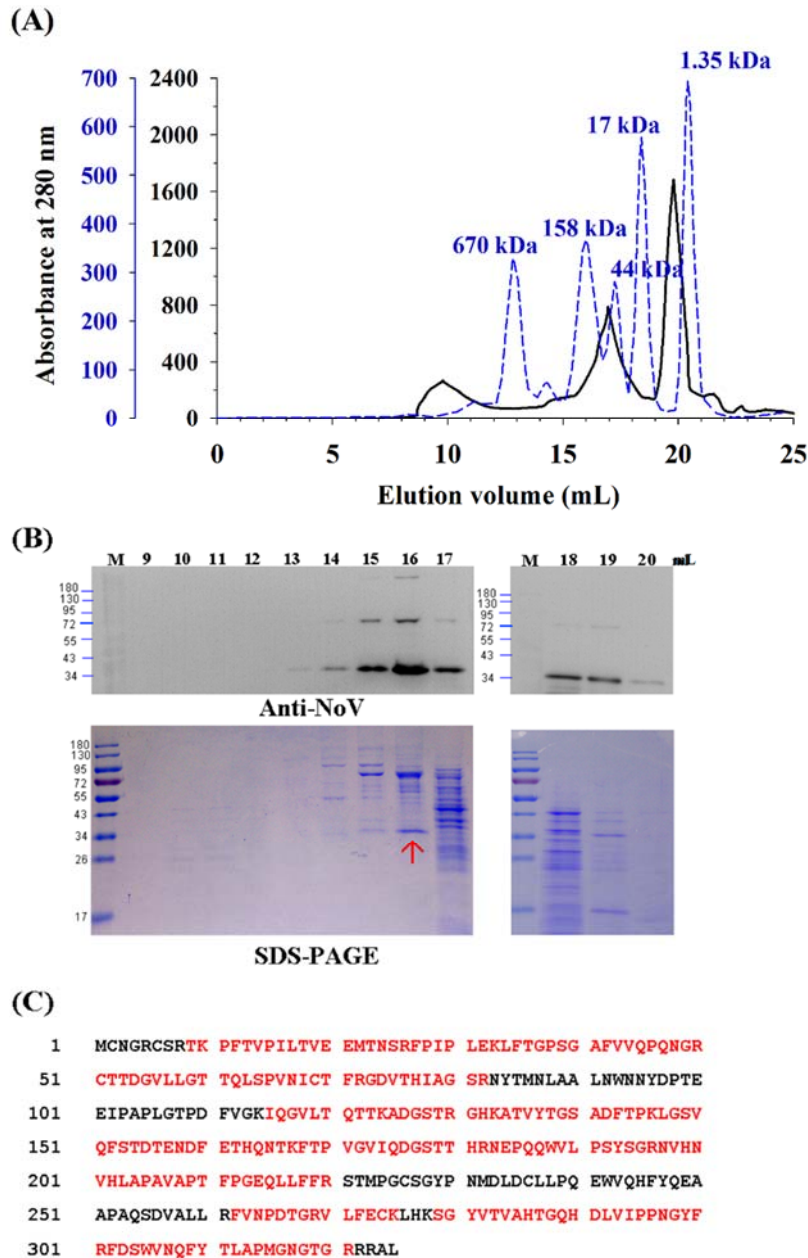


圖 3-19 粗萃之 P 蛋白質顆粒性分析

(A)黑色實線為純化分離柱 Superose 6 increase，分析粗萃之 P 蛋白質沖提結果，藍色虛線為以標準品做管柱校準之結果。(B)“Anti-NoV”為以 NoV 抗體偵測 P 蛋白質，SDS-PAGE 為以 Coomassie Brilliant Blue 染色分析不同餾分。(C)以 LC-MS/MS 分析在(B)圖中，紅色箭頭所指之 35 kDa 條帶。結果顯示有 73% 與 P 蛋白質胜肽一致(紅色粗體)。

四、 嵌有綠色螢光之原態 P 蛋白質之生產及物性功能分析

1. *P. pastoris* 生產

嵌有綠色螢光之 P 酵母菌轉形株(P-GFP)，經 1% 甲醇誘導 96 小時，離心以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液蛋白質進行西方墨點法分析，由蛋白質印跡結果可觀察到，P-GFP 蛋白質可在約 63 kDa 觀察到。

2. 物性與功能性分析

如圖 3-20，嵌有綠色螢光之 P 蛋白質，在藍光視野(450-490 nm)下，可觀察到明顯的綠色螢光，而負對照組皆無觀察到任何螢光表現。直接將破菌後之 P-GFP (分子量 62.8 kDa) 粗萃液以純化分離柱 Superose 6 increase 分析。12 個單體(小型 P 粒子)所構成之 P-GFP 嵌合顆粒，總分子量預測為 753.6 kDa，從圖 3-21 可觀察到大量的 P-GFP 蛋白質可形成 P-GFP 嵌合顆粒，可在超過 670 kDa 之 13 mL 餾分(每個餾分為 1 mL，第 1 mL 餾分為 0-1 mL，第 2 mL 餾分為 1.01-2 mL；後面以此類推)沖提出來(圖 3-21)。綜合上述之實驗結果，嵌有綠色螢光之 P 蛋白質不但能形成嵌合顆粒，還能發出綠色螢光，顯示台灣分離株諾羅病毒 P 蛋白質能做為外來抗原呈現平台。

P-GFP

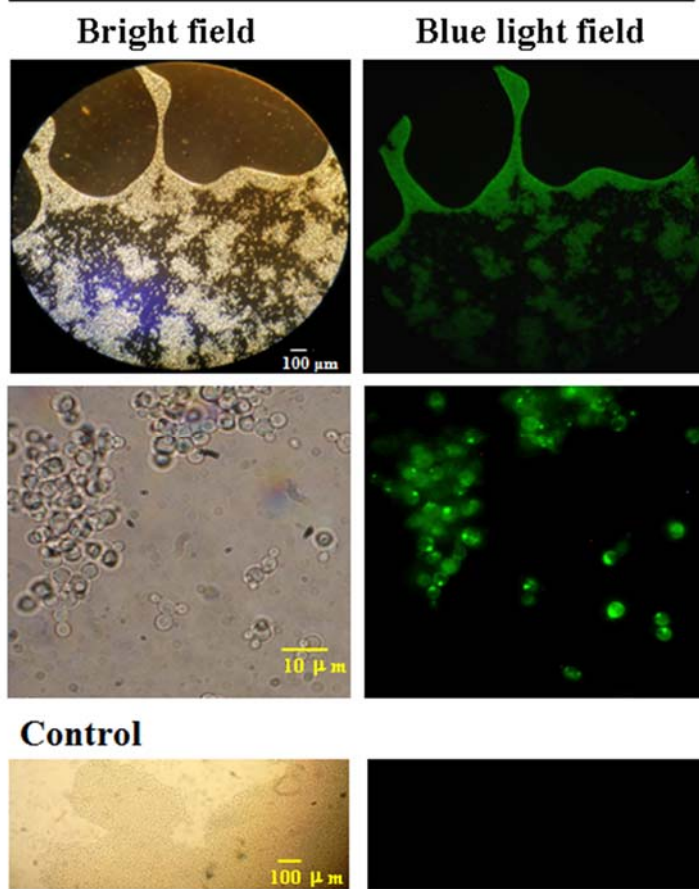
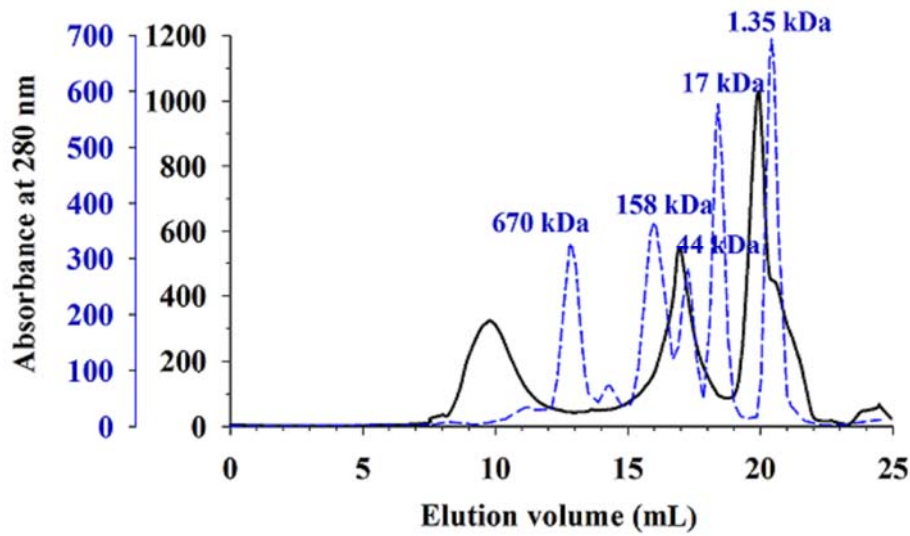


圖 3-20 螢光顯微鏡觀察嵌有綠色螢光諾羅病毒類病毒顆粒(P-GFP)之酵母菌轉形株

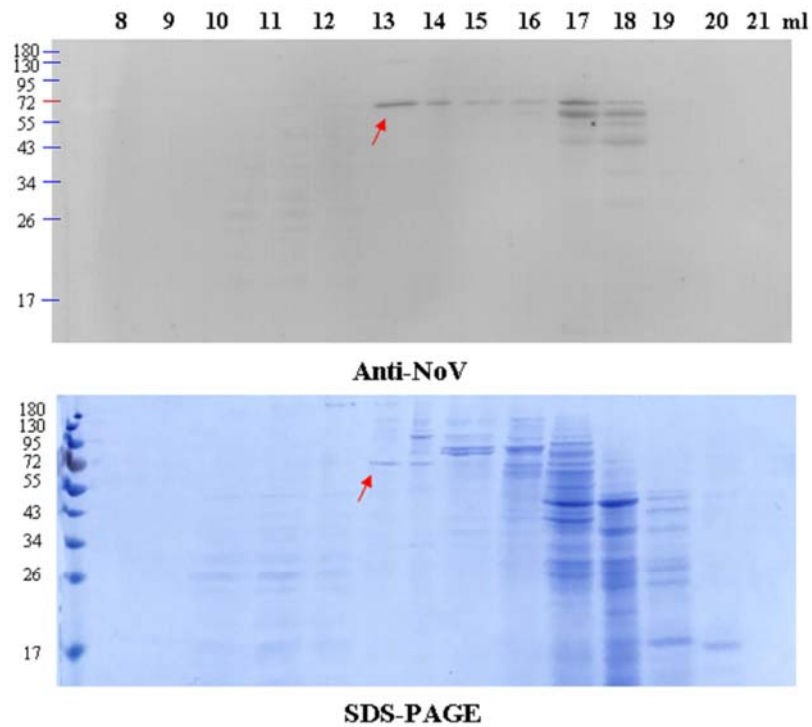
Bright field 為明視野；Blue light field 為波長 450-490 nm 藍光激發，曝光 3 秒下拍攝。上層圖比例尺為 100 μm；中層圖比例尺為 10 μm；下層圖比例尺為 100 μm。Control 為不帶有 P-GFP 之負控制組。



(A)



(B)



(C)

```

1  MCNGRCSR TK PFTVPILTVE EMTNSRFP IP LEKLF TGPSG AFVVQPQNGR
51  CTTDGVLLGT TQLSPVNICT FRGDVTHIAG SRNYTMNLAA LNWNNDPTE
101 EIPAPLGT PD FVGKIQGVLT QTTKADGSTR GHKATVY TGS ADFTPKLGSV
151 QFSTDTSVSK GEELFTGVVP ILVELDGDVN GHKFSVSGEG EGDATY GKLT
201 LKFICTTGKL PVPWPTLVTT LTYGVQCF SR YPDHMKQHDF FKSAMPEGYV
251 QERTIFFKDD GNYKTRAEVK FEGDTLVNRI ELKGDIFKED GNILGHKLEY
301 NYNSHNVYIM ADKQKNGIKV NFKIRHNI ED GSVQLADHYQ QNTPIGDGPV
351 LLPDNH YLST QSKLSKDPNE KRDHMLLEF VTAAGITLGM DELYKIDIDF
401 ETHQNTKFTP VGVIQDGSTT HRNEPQQWVL PSYSGRNVHN VHLAPAVAPT
451 FPGEQLLFFR STMPGCSGY P NMDLDCLLPQ EWVQHFYQEA APAQSDVALL
501 RFVNPDTGRV LFECKLHKS G YVTVAHTGQH DLVIPNGYF RFD SWVNQFY
551 TLAPMGNGTG RRRAL

```

圖 3-21 P-GFP 嵌合蛋白質之顆粒性分析

(A)黑色實線為蛋白質純化分離柱 Superose 6 increase，分析 P-GFP 粗萃液蛋白質之沖提結果，藍色虛線為以標準品做管柱分子量校準之沖提結果。(B)不同餽分之分析膠圖。上層圖為以 NoV 抗體做諾羅病毒蛋白質西方墨點法分析，下層圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照。(C)以 LC-MS/MS 分析在(B)圖 SDS-PAGE 中，紅色箭頭所指之 63 kDa 條帶。結果顯示有 53%與 P-GFP 蛋白質胜肽一致(紅色粗體)。綠色框為綠色螢光蛋白質之胺基酸序列，藍色框為酵素接合位，其餘皆為 P 蛋白質。

五、 組胺酸標籤(6xHis)VP1 蛋白質之生產與純化

1. *P. pastoris* 生產

嵌有組胺酸之 VP1 酵母菌轉形株(VP1-6xHis)，經 1% 甲醇誘導 96 小時，離心以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液蛋白質進行西方墨點法分析，由蛋白質印跡結果可觀察到，VP1 蛋白質可在約 58.9 kDa 觀察到。

2. 以組胺酸標籤(6xHis)純化

將帶有 VP1-His 之酵母菌轉形株，以搖瓶做培養，經 1% 甲醇誘導四天後，離心取菌塊，以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液利用 His-Trap 管柱純化 VP1-His 蛋白質，以含有 50、100 及 300 mM imidazol 之沖提液分別做流洗後，VP1-His 可在含有 200 mM imidazol 之沖提液沖提出(圖 3-22)。並且從圖 3-22 可觀察到，與文獻一致，目標 VP1-His 蛋白質條帶具有二條片段，約在 58 與 55 kDa，而 55 kDa 來自於尚未釋放到培養基之前的末端裂解 VP1 [119]。VP1-His 之 200 mM imidazol 沖提液將用於原態 VP1 定量之標準品。

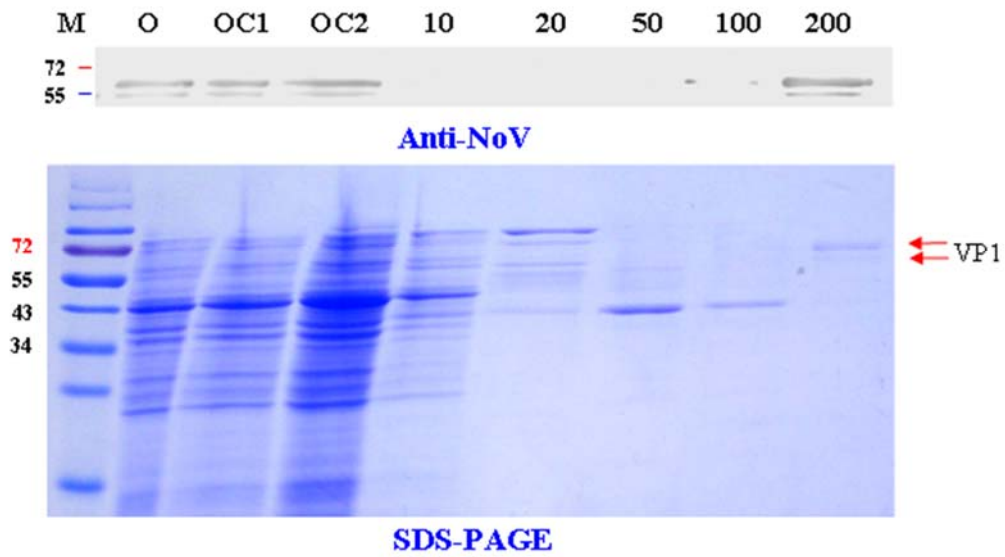


圖 3-22 轉形株 VP1-His 醱酵液以 His-Trap 管柱純化

(A) Lane O 及 OC1、OC2 為粗萃液及蛋白質通過管柱的二次流洗液，Lane 10 到 100 為含有 10、20、50、100 及 200 mM imimidazol 之沖提液，VP1-His 蛋白質在含有 200 mM imimidazol 之沖提液可純化出。上層圖為以 NoV 抗體做西方墨點法分析，下層圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照。

六、原態 VP1 蛋白質之生產、純化及顆粒分析

1. *P. pastoris* 生產

原態之 VP1 酵母菌轉形株，經 1% 甲醇誘導 96 小時，離心以液態氮做菌體破菌後，取粗萃取液蛋白質進行西方墨點法分析，由蛋白質印跡結果可觀察到，VP1 蛋白質(pI 5.54)可在約 58.9 kDa 觀察到。利用三段式的醱酵策略(分別為批次培養(batch phase)、饋料批次培養(fed batch phase)及甲醇誘導培養(methanol-induction phase))，大量生產諾羅病毒 VP1 蛋白質。利用三明治酵素免疫法(ELISA)以純化的 VP1-His 蛋白質做為標準品，做蛋白質定量分析，誘導 120 小時之 VP1 蛋白質醱酵槽產量為 15.5 mg/L。

2. 利用原態之組氨酸純化

目標蛋白質可藉由原生暴露在表面之一個以上的組胺酸，利用組胺酸之 histidyl residues 與 His-Trap 管柱之吸附，直接純化[116, 117]。本研究利用原態之 VP1 蛋白質本身具有之組胺酸(圖 3-23)，以 His-Trap 管柱直接純化。相比起在末端帶有組胺酸之 VP1 蛋白質(VP1-6xHis) (圖 3-22)，原態之組胺酸與管柱的吸附能力較弱，以 100 mM Imidazole 之沖提液即能直接沖提出帶有雜蛋白質的目標 VP1 蛋白質(圖 3-24A)。並且從圖 3-24 可觀察到與文獻一致，目標 VP1 蛋白質條帶具有二條片段，約在 58 與 55 kDa，而 55 kDa 來自於尚未釋放到培養基之前的末端裂解 VP1 [119]。為去除與 100 mM Imidazole 一起沖提出之宿主雜蛋白質，以進一步提升純度，100 mM Imidazole 沖提出之 VP1 蛋白質萃取液，以 100 kDa 濃縮管柱做體積濃縮後，利用蛋白質純化分離柱 Superose 6 increase 依蛋白質大小做分離，不同分子量蛋白質將於不同餾分(每個餾分為 1 mL，第 1 mL 餾分為 0-1 mL，第 2 mL 餾分為 1.01-2 mL；後面以此類推)沖提出來，沖提出之不同餾分之蛋白質分子量大小以標準品做管柱校準。每個餾分以 SDS-PAGE 做分析。成功組成顆粒之 VP1，由 90 個 VP1 二聚體所構成，總分子量約

10,800 kDa，從圖 3-24 B&C 結果可觀察到，VP1 蛋白質主要在超過 670 kDa 之 9 mL 沖提出來。而構成顆粒之基礎，二聚體 VP1，分子量約 120 kDa，亦可在圖譜之 17 mL 與宿主之雜蛋白質一起沖提出來。結果顯示台灣分離株諾羅病毒 VP1 蛋白質經二次純化後，能成功組成顆粒之第 9 mL 餾分，回收率為 20.1±1.9%。後續物性與功能性分析皆選用能成功組成顆粒之第 9 mL 餾分所沖提出之 VP1。

3.物性分析

VP1 蛋白質能成功組成顆粒及濃度最高之第 9 mL 餾分所沖提出之 VP1 其粒徑大小及外觀形態，以動態光散射粒徑分析儀（dynamic light scattering, DLS）的分析結果可觀察到，NoV VP1 之粒徑大小主要在 47 nm (圖 3-25A)，並且與穿透式電子顯微鏡（transmission electron microscopy, TEM）所觀察的大小一致，從穿透式電子顯微鏡結果顯示，9 mL 餾分所沖提出之 VP1 能成功組成顆粒(圖 3-25B)。綜合上述之實驗結果，台灣本土分離出之諾羅病毒 VP1 以酵母菌表現並純化後，能成功組成顆粒，粒徑大小在 47 nm 間。

4.功能性分析

本試驗以 B 型之成人唾液做諾羅病毒 HBGA 結合測試，從試驗結果可看到，VP1 蛋白質經二次純化後，能成功組成顆粒之膠體層析第 9 mL 餾分所沖提出之粒子，能結合 HBGA，並且吸附效果隨著蛋白質濃度增加而增加，吸附能力也與唾液濃度成正比，當唾液稀釋 200 倍下，比稀釋 1000 倍更有較強之吸附能力(圖 3-26)。

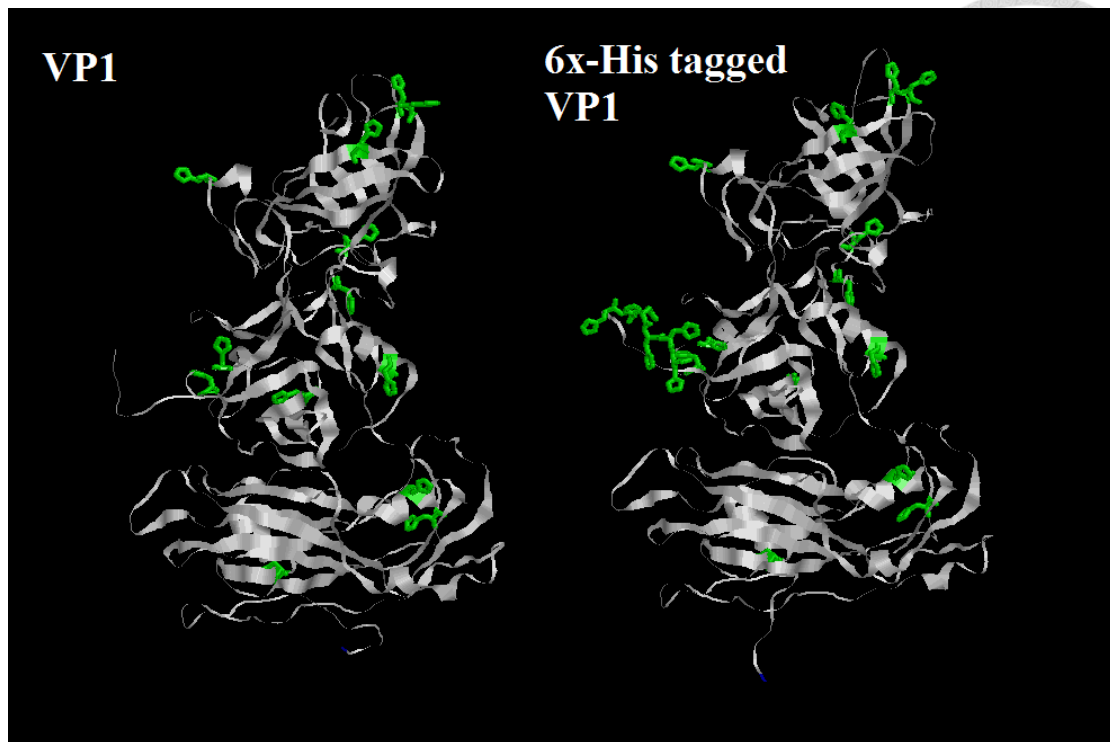
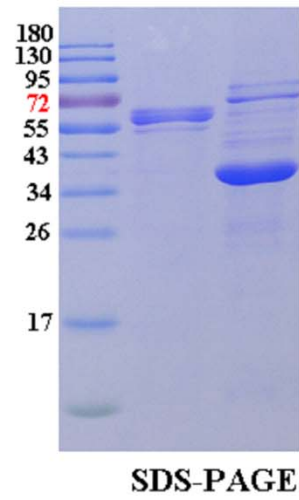
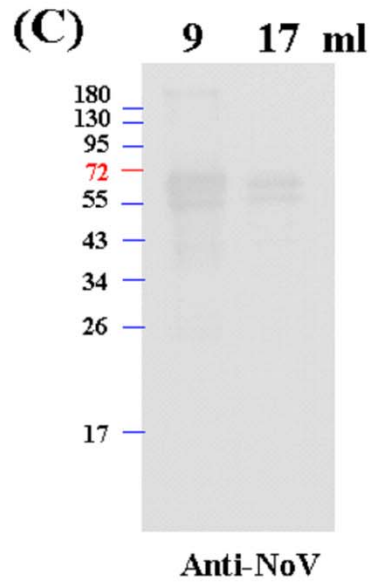
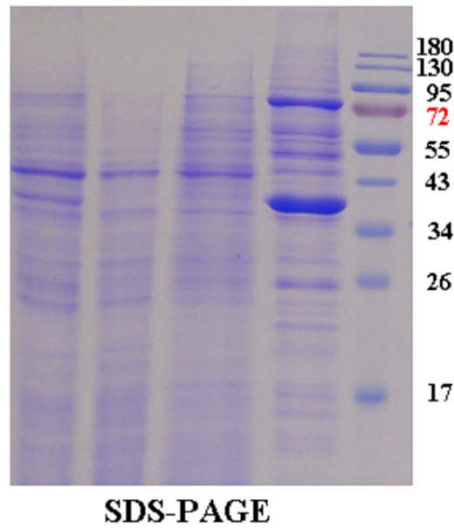
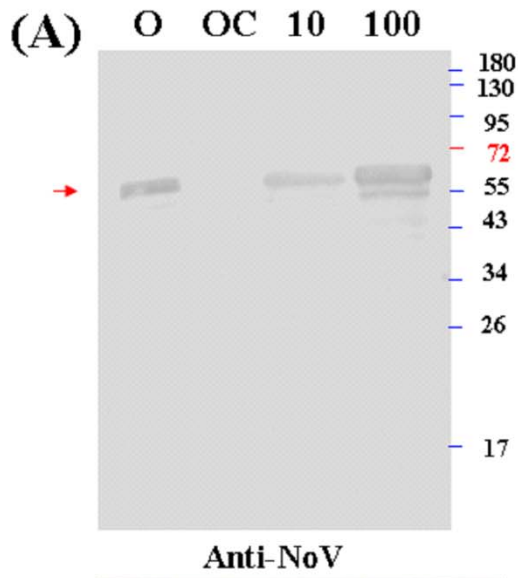


圖 3-23 台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒之原態(VP1)及嵌有組胺酸之 VP1 蛋白質 (VP1-His)之組胺酸預測結構圖。白色為預測之蛋白質主體構形，綠色為組胺酸，藍色為 N 端端點。VP1 及 VP1-His 之胺基酸序列經 (PS)²: Protein Structure Prediction Server (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>)做結構預測分析後，經 Rasmol version 2.7.5 模擬。



(B)

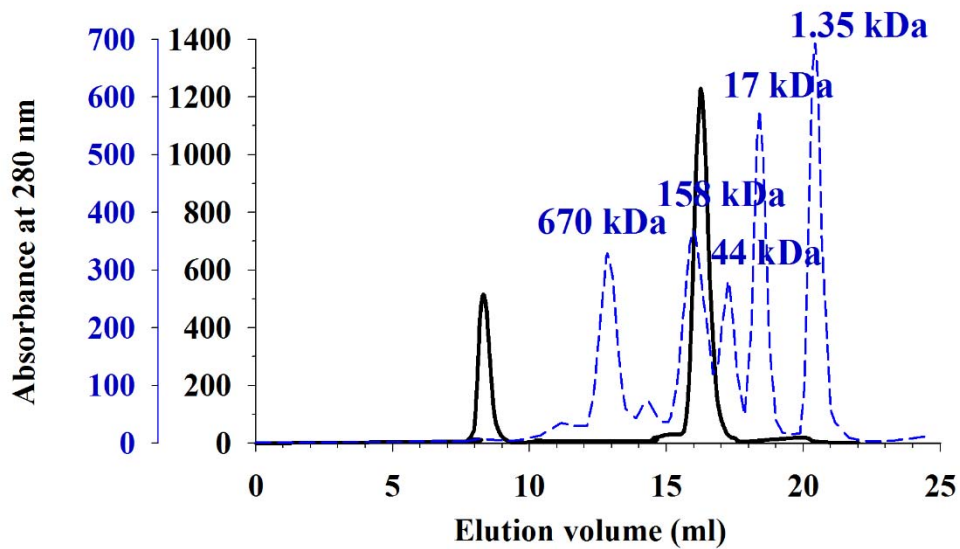


圖 3-24 轉形株 VP1 醱酵液以 His-Trap 及膠體層析管柱純化及分析

(A) Lane O 及 OC 為粗萃液及蛋白質通過管柱的流洗液，Lane 10 為含有 10 mM imidazole 之沖提流洗液，VP1 蛋白質在含有 100 mM imidazole 之沖提液可沖提出。(B) 黑色實線為純化分離柱 Superose 6 increase，分析經 His-Trap 管柱純化之 VP1 蛋白質沖提結果，藍色虛線為以標準品做管柱校準之結果。(C) 分析圖 B 之不同餾分。“Anti-NoV”為以 NoV 抗體偵測 P 蛋白質，SDS-PAGE 為以 Coomassie Brilliant Blue 染色分析不同之餾分。

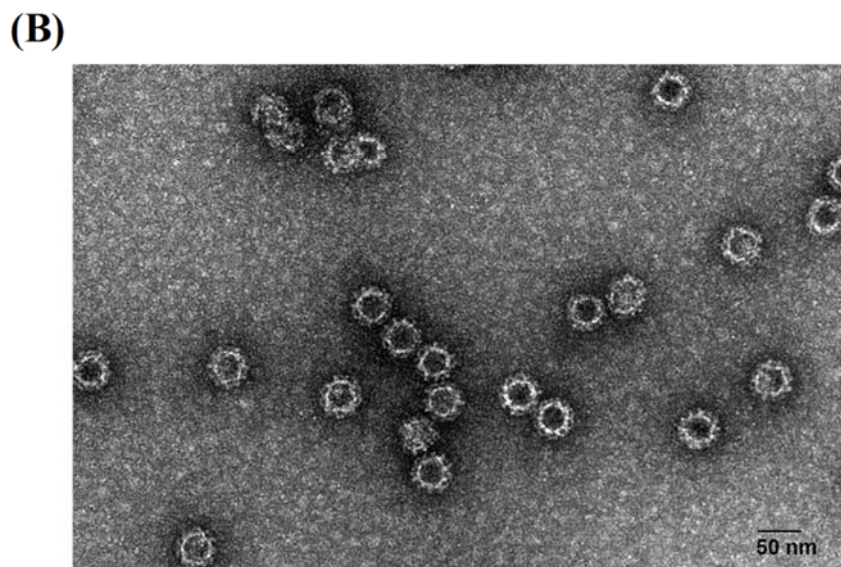
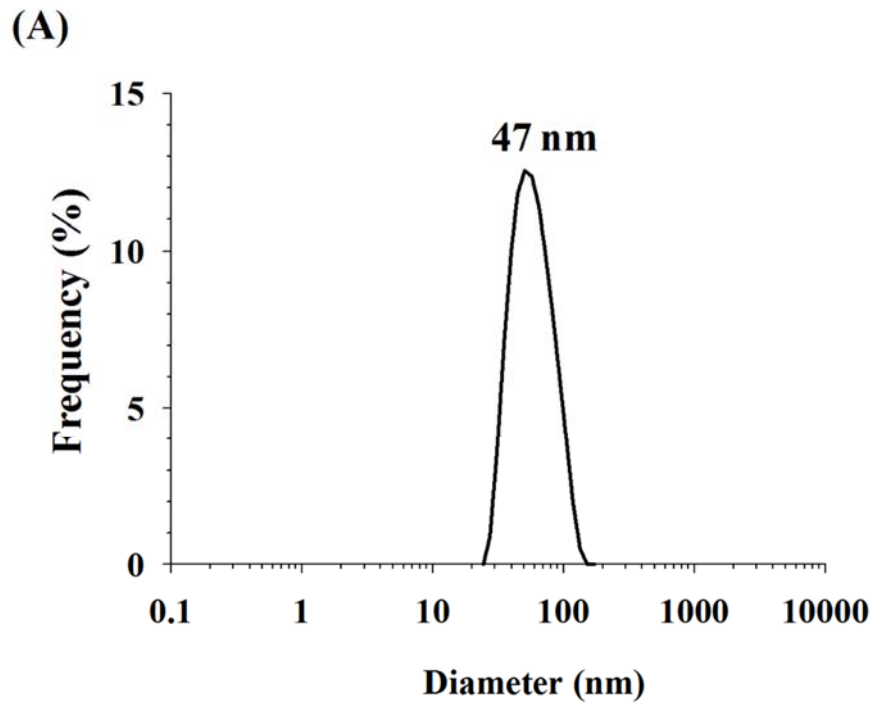


圖 3-25 純化之 VP1 蛋白質物理特性分析

(A)動態光散射粒徑分析儀分析經純化分離柱於第 9 mL 之餾分。(B)穿透式電子顯微鏡分析經純化分離柱於第 9 mL 之餾分，右下方比例尺為 50 nm。

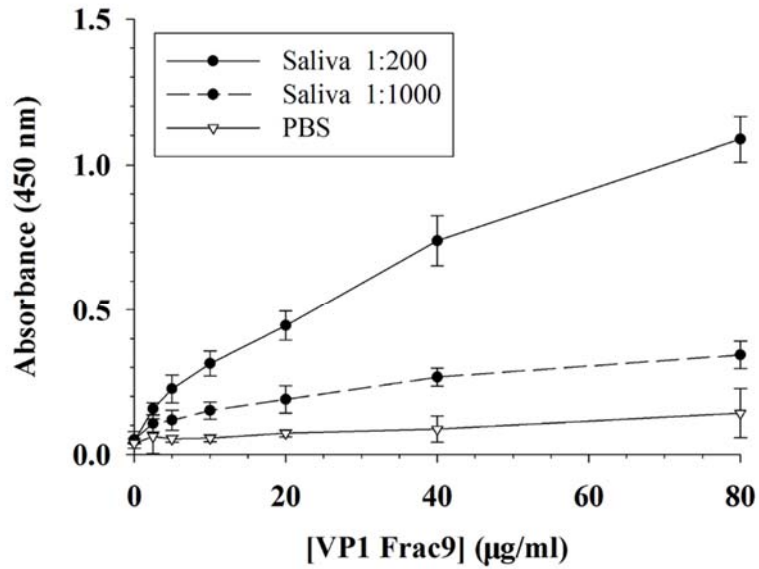


圖 3-26 HBGA 結合測試

B 型之成人唾液與 VP1 粒子(純化分離柱第 9 mL 之餾分)之結合測試結果。實心圓圈為不同濃度之 B 型唾液，實線為 1:200，虛線 1:1000；空心三角形為 PBS (用為稀釋不同濃度之唾液)，在此為不加唾液下，做為負對照組。



第四章、討論

1. P 蛋白質產量之比較

目前 P 或嵌合型 P 蛋白質之主要表現系統，為原核系統之大腸桿菌，以真核系統表現 P 蛋白質之相關研究僅有一篇，是以酵母菌所生產，並且產量僅為 7.5 mg/L [68]。根據文獻，以大腸桿菌生產 P 蛋白質，產量約落在 5~20 mg/L 間 [49, 67, 68, 73, 76]，以大腸桿菌生產嵌合型 P 蛋白質，產量可達到 210 mg/L，然而大量表現出的嵌合型 P 蛋白質為包涵體(inclusion body) [77]。本研究以酵母菌 *P. pastoris* 表現 GII.4 之 P 蛋白質，為挑選到高表現 P 蛋白質菌株，轉形株先經梯度 Zeocin 抗性培養基篩選後，高抗性之菌株，待以試管進行小量誘導培養後，再以 SDS-PAGE 與西方墨點法之訊號強度篩選高表現量之菌株，經層層篩選出之菌株，以搖瓶培養過程中，使用修飾過之甲醇誘導培養基(mBMMY) [120]，誘導培養經五倍濃縮之菌體，P 蛋白質之產量在搖瓶以甲醇誘導 96 小時，即可達到 44.8 mg/L，已遠超過先前之文獻。此篩選出之 P 蛋白質菌株，經醱酵槽以三段式培養策略培養，以甲醇誘導 120 小時之 P 蛋白質醱酵槽產量可達到 220 mg/L，比起搖瓶培養，醱酵槽可提升約 5 倍之 P 蛋白質產量。

2. 無純化標籤之純化策略探討

2.1 P 蛋白質之純化策略討論

根據文獻，目前尚無無標籤(tag-free)純化策略純化 P 蛋白質，目前僅有純化標誌-GST 和 6xHis tag 純化 P 蛋白質，然而 GST tag 純化，需增加勞力與成本以酵素去除~27 kDa 之 GST 純化標誌；而加於蛋白質末端之 6xHis tag 則會直接影響蛋白質之原始構形[81-83]以及功能[84, 85]，並且還會引發非專一的免疫反應[86, 87]。本研究為第一篇利用 P 蛋白質本身之電性與原態暴露之組胺酸(His)，發展出二套無純化標籤之純化策略的研究。

2.1.1 策略一:利用蛋白質之吸附落差純化

離子交換與疏水性層析管柱，為藉由目標蛋白質和宿主之雜蛋白質與管柱間不同的吸附落差，進而純化出目標蛋白質。不同於大腸桿菌，大腸桿菌之宿主雜蛋白質，從二維膠體電泳(2D gel electrophoresis)可觀察到主要皆由酸性蛋白質所組成(蛋白質之 pI 低於 7 以下)[121]，本研究之 P 蛋白質同為酸性蛋白質 (pI 為 6.35)，如果以陰離子交換管柱純化，在鹼性 pH 下會有較強之競爭吸附 [122]，而酵母菌宿主之雜蛋白質，相比起大腸桿菌，從二維膠體電泳可觀察到酸鹼蛋白質分布較平均[118]，在鹼性 pH 下競爭吸附相對較低。為直接分離與純化 P 蛋白質，本研究以高於 P 蛋白質 pI 之鹼性環境 pH 8.5，利用陰離交換管柱進行實驗。

而從實驗線性沖提之圖譜可觀察到，P 蛋白質在 0.1-0.33 M NaCl 之範圍可沖提出，而從 SDS-PAGE 圖譜亦可觀察到，隨著沖提鹽濃度的拉升，雜蛋白質之雜度也隨之提升。為找出最佳化之階梯式沖提鹽濃度，並進而直接分離目標蛋白質與雜蛋白質二個獨立之群體[115]。本研究收集高鹽濃度所沖提出的蛋白質，並以低鹽濃度再次沖提，藉由在低鹽濃度下 P 蛋白質可沖提出，雜蛋白質會滯留在管柱之沖提滯留差，進而拉提出目標 P 蛋白質。雖然此套純化策略可純化出 P 蛋白質，然而 P 蛋白質經多次純化回收後，回收率僅剩 2.5% 為此策略之缺點。從其他文獻亦可觀察出，以無標籤純化策略直接純化出目標蛋白質，同樣有低回收率之缺點[123]。

2.1.2 策略二:利用原態之組氨酸純化

目標蛋白質可藉由原生暴露在表面之一個以上的組胺酸，利用組胺酸之 histidyl residues 與 His-Trap 管柱之吸附，直接純化[116, 117]。當目標蛋白質帶有組胺酸，組胺酸之 histidyl residues 可做為路易士鹼(Lewis bases) [117]提供價電子對給 HisTrap 上之金屬離子，而 pH 環境會左右結合之強弱，當蛋白質純化

之 pH 環境高於蛋白質之 histidine residues 之 pK_{a2} ($pK_{a2} \sim 6$) [124, 125]，蛋白質與管柱之間的鍵結能力會增強；而在酸性環境下， H^+ 離子濃度會增高，增高之 H^+ 會與管柱之金屬離子(ex: Ni^{2+})有競爭吸附[125]，競爭組胺酸 histidyl residues 提供之價電子對，造成蛋白質與管柱之鍵結能力減弱。先前研究指出，在所有 pH 環境下，pH 8 有最佳之吸附效果[124, 125]，然而宿主之雜蛋白質與 His-Trap 管柱之吸附，亦同樣增強[124]。因此，當以無標籤純化策略，從宿主之雜蛋白質中純化出目標蛋白質，純度與回收率之間的拿捏需要權衡。在本研究中，接近中性並高於 P 蛋白質 pI 之 pH 6.7 為操作純化之 pH 環境。

在第二套純化方法中，可以明顯觀察到相同之轉形株，經不同之生產策略所誘導生產之醱酵液，宿主之酸鹼、親疏水性蛋白質分布有明顯不同。經親合管柱純化後再以陰離子交換管柱純化，搖瓶與醱酵槽來源之醱酵液，P 蛋白質純度有明顯落差，雖純度有落差，但利用陰離子交換管柱以低鹽濃度(0.12 M)所沖提出之 P 蛋白質，純度卻皆一致的高於 90%，此結果與策略一一致，皆是利用陰離子交換管柱以低鹽濃度沖提，可得到高純度之目標蛋白質。

2.2. VP1 蛋白質之純化策略討論

本研究以酵母菌生產胞內 VP1 蛋白質，根據文獻，外鞘蛋白質 VP1，主要以密度梯度離心純化為主，如 CsCl 梯度超高速離心[51]或蔗糖梯度離心純化[55, 126]，然而，針對能外泌 VP1 蛋白質至培養基中的表現宿主，經培養之醱酵液亦能直接以陰離子交換管柱直接純化 VP1 蛋白質[50, 52]，本研究藉由 VP1 蛋白質原態所具有的組胺酸，以及 VP1 能組成顆粒之特性，藉由親合層析管柱及膠體過濾管柱之純化方式，提供另一套新的純化策略，未來亦可與文獻所提供之純化策略，根據不同宿主生產外鞘蛋白質 VP1 之不同方式，做不同之純化組合，進而提升目標蛋白質之純度。



3. 類病毒顆粒之顆粒性與生物功能性探討

3.1. P 蛋白質之顆粒性探討

P 粒子的形成與穩定性受二大要素影響，第一為來自 P 蛋白質之間的相互作用力，第二為加在 P 蛋白質尾端的 CCT (cysteine-containing tag) 標籤[73]。一般條件下，去除掉短鉸鏈(hinge)及末端加上 CCT 標籤之 GII.4 1996、2002、2004、2006a、2006b 等不同之基因亞型(subgenotype)，由大腸桿菌或酵母菌所表現出之不同 P 蛋白質，皆會構成由 12 個 P 二聚體(P-dimer)所形成之粒徑大小~20 nm，分子量在 840 kDa 之 P particle (P 顆粒)[35, 68]，以電子顯微鏡觀察會呈現典型之環狀與四角狀(如圖 1-3 之投影)[68]；由 6 個 P 二聚體所構成之 Small P particle (小型 P 顆粒)，僅出現在由大腸桿菌所表現出之 C 端 RRR-cluster 突變成 RPRPRP 或 C 端加 flag tag (DYKDDDDK)之 P 蛋白質觀察到[73]。本研究之 P 蛋白質未經末端修飾即呈現大小~14 nm，分子量在 420 kDa，以電子顯微鏡觀察會呈現典型之三角狀、環形與四角形(如圖 1-3 II 之不同旋轉角度之投影；圖 3-6 與 3-17)之 Small P particle，經與其它 GII.4 菌株序列比對，可觀察到其中四個胺基酸對 P 顆粒的形成可能扮演關鍵角色，從蛋白質結構模擬亦可觀察到(圖 3-4C)，以俯視觀察諾羅病毒之頂部與 HBGA 接合面，四個突變之胺基酸位置(紅色圓球)皆環繞在 P 蛋白質之外圍側邊，再次顯示此四個胺基酸突變對顆粒大小之生成，可能扮演重要角色。

3.2. VP1 蛋白質之顆粒性探討

GII.4 之諾羅類病毒顆粒以重組桿狀病毒感染之昆蟲細胞表現，經密度梯度純化出之病毒顆粒粒大小皆約在 38 nm [127, 128]。而本研究以酵母菌生產胞內 VP1 蛋白質，藉由親合層析管柱及膠體過濾管柱純化後之類病毒顆粒，顆粒大小約在 47 nm。研究指出諾羅病毒類病毒顆粒之穩定性會受 pH、溫度與離子強度所影響[45, 129]，在先前文獻指出，以桿狀病毒表現系統所生產出的 GII.4

類病毒顆粒，顆粒在 pH 3、7 環境下，結構並無明顯變化[129]；當顆粒在 4°C、22°C、65°C、75°C 環境下，4°C 及 22°C 之結構皆無明顯變化，但在 65°C 下 VP1 蛋白質之 α -helix、 β -strands 及 turns 之結構皆會略微移動到無序結構 (unordered structure)，然而，當顆粒在 75°C 環境下， α -helix 會顯著的失去構形 [129]；當顆粒在 0.1 M 和 0.25 M NaCl 環境下，GII.4 之 VLP α -helix 與 turns 之結構雖變動不大，然而隨 NaCl 濃度之增加， β -strands 會顯著轉向非穩定構形 (unstructured forms)(圖 3-2)[129]；NaCl 濃度會對 VP1 結構造成影響，使 β -sheet 之二級結構，轉成較鬆散的線性結構，這個特徵，或許可以解釋許多經陰離子交換管柱，純化出之諾羅病毒類病毒顆粒粒徑偏大之原因。同樣以桿狀病毒感染的昆蟲細胞表現系統所生產出之 GII.4 諾羅病毒類病毒顆粒，經密度梯度(蔗糖或 CsCl)純化出之病毒顆粒粒徑大小皆約在 38 nm [127, 128]。經陰離子管柱以 0.1 和 0.2 M 不同 NaCl 濃度所沖提出之類病毒顆粒，顆粒粒徑為 45 nm [51]；而以酵母菌外泌生產 VP1 蛋白質，同樣以陰離子交換管柱純化，以 0.1 到 0.2 M NaCl 濃度所沖提出之類病毒顆粒，顆粒粒徑約為 70 nm [52]，而此經沖提純化後之蛋白質經與 50 mM ammonium bicarbonate pH 6.0 透析置換緩衝液後，再經冷凍乾燥後重新回溶(部分以 PBS)凍乾產物，顆粒粒徑縮小~40 nm。而本研究最後以膠體過濾管柱沖提之緩衝液亦含有 0.15 M NaCl，沖提出之類病毒顆粒大小約在 47 nm (圖 3-25)。根據上述結果可觀察到，鹽離子濃度對諾羅病毒類病毒顆粒之粒徑大小或許具有一定程度的影響力。

VP2 蛋白質能加強諾羅病毒主結構 VP1 類病毒顆粒之顆粒穩定性。諾羅病毒外鞘 VP1 之 S domain 會與 VP2 結合(圖 3-1) [27]，藉由 VP2 的結合，可提升類病毒顆粒在鹼性環境(pH 8)之穩定性[130]，以及提高抵抗蛋白酶降解的能力 [45]，然而先前研究顯示，以昆蟲細胞表現 VP1 類病毒顆粒，或同時共表現 VP2 與 VP1，經蔗糖梯度離心純化後，二種組別之顆粒大小並無顯著差別皆為 38 nm [130]。然而尚無研究顯示共表現 VP2 與 VP1 之類病毒顆粒，是否可以穩

定病毒顆粒，不受到不同鹽濃度之影響，尚待更進一步之研究釐清。

3.3. VP1、P 與 P-6xHis 與 HBGA 之結合差異討論

根據文獻由於 P 蛋白質分子量只有 VP1 蛋白質的一半，等量的蛋白質，P 蛋白質濃度會是 VP1 蛋白質的二倍[65]，由 P 蛋白質所構成之 P particle 與 Small P particle 僅需 VP1 VLP 一半的蛋白質濃度，及具有與 VP1 VLP 一樣的 A、B 型唾液吸附能力[73]，然而先前結果亦指出與 VLP 相比，P particle 與 Small P particle 對分泌型 O 型吸附明顯減弱，研究結果顯示同屬 GII.4 1996 基因亞型之 P particle 與 Small P particle 相比起 VLP 具有些微的結構改變，雖 A、B 型唾液吸附能力不變，但是 O 型卻明顯削弱[73]；而二種由 C 端突變而生成的 Small P particle，經突變 RRR-cluster 所生成之 Small P particle 相比起加上 flag tag (DYKDDDDK) 生成之 Small P particle，突變 RRR-cluster 所生成之 Small P particle 吸附唾液的能力相較較弱[73]，顯示二種不同來源之 Small P particle 亦具有些微的結構差異。本研究在 B 型成人唾液稀釋 200 倍條件下，由原態 P 組成之 small P particle 相比起原態 VP1 組成之 VLP，吸附 B 型唾液能力明顯較弱(僅 1/7)(圖 3-18 與 3-26)，明顯與先前文獻不同，顯示由台灣分離株原態 P 組成之 small P particle 與文獻突變 RRR-cluster 或加 flag tag (DYKDDDDK) 所生成之 Small P particle，有因不同胺基酸差異所導致與 HBGA 結合位點上之結構變異，所造成與結合 B 型唾液結合能力上的不同。相比起帶有 His 之 small P particle，原態 P 組成之 small P particle，在 B 型成人唾液稀釋 200 倍條件下，吸附 B 型唾液能力明顯也較弱(僅 1/2)(圖 3-7 與 3-18)，顯示帶有 His 之 P 蛋白質 6xHis 亦改變了 P 蛋白質上與 HBGA 結合位點的結構。

另外，分泌型(具有 FUT2 功能)之健康成年人唾液中，至少具有 type1(Gal β 1-3 GlcNAc β)與 type2(Gal β 1-4 GlcNAc β)二種不同前驅物來源之抗原(圖 1-2)[131]，並且文獻指出 type 1 來源之抗原與諾羅病毒之結合比 type 2 更佳[35, 37]，個體間不同 type 來源之抗原其比例必定不同。因此相同血型(A、B、

AB、O 等)但不同個體之成年人，對相同菌株之諾羅病毒 P 顆粒，會有不同的唾液結合強度[35]。



3.4. 組胺酸(6xHis)對 P 蛋白質之影響

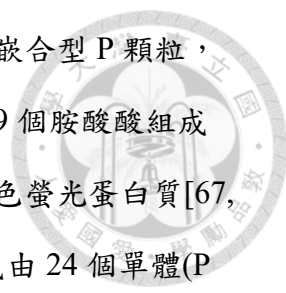
諸多文獻皆指出多加於目標蛋白質末端的 6xHis，會改變目標蛋白質的結構[81-83]，並進而影響功能性蛋白質之活性[84, 132]，以及誘發非專一性的免疫反應[86, 87]。相同的蛋白質在帶有 6xHis 下，側邊之結構會因 6xHis 的影響下產生位移[82]。位移所產生的構形改變，僅有少部分加強[133]或不影響[83]蛋白質之功能，絕大部分的改變皆會造成蛋白質功能及穩定性的降低[84, 85, 132, 133]，以及產生立體遮障，使受體-配體的結合(receptor-ligand binding)效力減弱[134, 135]。此外，相同之功能性蛋白質，加於 N 端的 6xHis，有別於加於 C 端的 6xHis，由於不同位點之 6xHis 會引發不同的立體障礙，相同之功能性蛋白質，加於 N 端的 6xHis 有較多之文獻有較佳的蛋白質功能[132, 135]，以及較佳的免疫原性[136]。然而，人工多加於末端之 6xHis tag，在 Khan et al. 瘧疾疫苗研究中指出[87]，6xHis tag 會改變體液免疫與細胞免疫之免疫反應(humoral and cellular immune responses)，研究發現各帶有 6xHis tag 之二種不同菌株之瘧疾候選抗原，相比起不帶有 6xHis tag 之抗原，不帶有 6xHis tag 之抗原所產生之抗體，免疫原性較為集中，在抗瘧原活性測試中(anti-parasitic activity)，二種不同菌株所產生之抗體，效果皆明顯較佳，而帶有 6xHis tag 之抗原所產生的抗體，會顯著削弱抗瘧原之能力；此外，帶有 6xHis tag 之抗原會影響抗原特異性 T cell 反應之寬度(epitope-specific T-cell responses)，6xHis tag 會明顯改變 T 細胞反應的範圍[87]。由於加於末端之 6xHis tag 會誘發非目標蛋白質之免疫反應，因此 6xHis tag 無法作為醫療級蛋白質製劑中可接受的成份[86]。

本研究亦發現 6xHis tag 改變了 P 蛋白質，帶有 6xHis tag 的 P 蛋白質在與 (1) B 型 HBGA 之吸附能力(圖 3-7；3-18)與(2)抗體之辨識性(附圖 10)，皆產生

改變。有別於原態之 P 蛋白質，雖然 P 與 P-His 皆具有生物功能，然而 P-His 與 P 蛋白質對成人唾液 HBGA 之吸附強度，P-His 比 P 蛋白質高二倍。而因蛋白質構形之改變，以西方墨點法，利用可專一辨識 GII.4 型 P 區之由未知 NoV P 多肽片段所產生之單株抗體(ab80024)，同時偵測原態與帶有 6xHis 之 P 與 VP1 蛋白質(如附圖 10)，此單株抗體(ab80024)的辨識位點，皆因 6xHis 所造成之特定區塊結構改變，而無法偵測到。來自張沛鈞教授研究室所提供之單株抗體，可辨識 VP1 胺基酸序列之 290-340 之間的胺基酸(圖 3-1)，此段序列對應至 P 蛋白質之圖 3-4 A 為 69-119 之間的胺基酸；從圖 3-4 B 可觀察到，位點 69-119 之間的胺基酸鄰近於 HBGA 接合點 Site I 與 Site II，而加於 C 端末端之 6xHis 較為鄰近於 HBGA 接合點 Site III，從結構預測分析圖 3-14，雖無法精確掌握 6 個帶正電荷之 His 較為鄰近哪個方位，並進而影響鄰近方位之 P 蛋白質產生構形的改變，然而綜合 HBGA 之吸附結果與抗體之辨識結果，C 端末端之 6xHis 較為可能影響到 HBGA 接合點 Site III 鄰近之胺基酸構形，並進而促使 HBGA 的結合能力增強。綜合以上之觀察結果，與先前文獻相似[82, 83, 133]，多添加於 P 蛋白質末端之 6xHis 會改變 P 蛋白質之構形[82, 83]，並進而增強蛋白質之功能[133]。然而先前文獻亦指出，加於末端之 6xHis tag 會誘發非目標蛋白質之免疫反應[87]，如未來預做為醫療級蛋白質製劑，人工多添加之 6xHis tag，恐無法作為醫療級蛋白質製劑中可接受的成份[86]。

4. P 蛋白質之延伸應用性

由於 GII.4 之 P 蛋白質頂端，相比起其它諾羅菌株，具有三個多出來的環狀結構(附圖 8)，因此可做為外來抗原呈現平台，雖嵌入不同的外來抗原，但可再次組成嵌合型 P 顆粒，藉由 P 顆粒之形成，嵌入之外來抗原其抗原性與免疫原性可顯著提升[49, 75]。文獻指出，經去除短鉸鏈(Hinge)並在末端加上 CCT (cysteine-containing tag)來自菌株 VA387 之 P 蛋白質，在未呈現抗原下可形成由



24 個單體所構成之 P 顆粒[65]，並且在嵌入抗原下可再次形成嵌合型 P 顆粒，嵌入的抗原，從由七個組胺酸(His)組成的胜肽片段[67]，或 159 個胺酸組成之輪狀病毒外鞘 VP8 蛋白質[67]，到由 238 個胺酸組成之綠色螢光蛋白質[67, 75]，皆可成功嵌入在 P 蛋白質之任一個環狀頂部，並再次形成由 24 個單體(P 粒子)所構成之嵌合型 P 顆粒，並提升嵌入之外來抗原之免疫原性或保有功能；而經去除短鉸鏈(Hinge)，並未在末端加上 CCT 之 P 蛋白質，在未呈現抗原下仍可形成由 24 個單體所構成之 P 顆粒[137]，並且還可在 P 蛋白質之三個環狀結構皆各嵌入由 30 個胺酸組成之重複 A β 1-6 單一短胜肽下，再次成功形成由 24 個單體(P 粒子)所構成之嵌合型 P 顆粒[78]，然而此嵌合型 P 顆粒如經由高表現之大腸桿菌菌株生產，會呈現包涵體(inclusion body)，經帶有尿素(Urea)之緩衝液複溶後再以透析去除，可觀察到總分子量較小之嵌合型小型 P 顆粒 [77]。

本研究為第一個成功證明，小型 P 顆粒(Small P particle)能呈現外來抗原之研究；由於 Small P particle 需末端修飾(C 端)才能形成並觀察到[73]，因此目前尚無任何研究證明，由 12 個單體所構成之小型 P 顆粒，能呈現外來抗原，並成功形成嵌合型顆粒。本研究之台灣分離株 P 蛋白質，未經末端修飾即呈現小型 P 顆粒，當以綠色螢光蛋白質模擬外來抗原，並呈現於 P 蛋白質的表面頂端，研究結果證明，嵌合型 P 蛋白質不但能成功組成嵌合小型 P 顆粒，亦能發出綠色螢光，本研究為第一個成功證明，Small P particle 能做為外來抗原呈現平台之研究。

第五章、總結

本研究成功建立台灣分離株 GII.4 型諾羅病毒 VP1 及 P 蛋白質，嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* 醱酵生產及無標籤純化平台，並深入研究顆粒之形態及檢測其生物功能。具體完成之結果如下：

1. 建立諾羅病毒 VP1、VP1-6xHis、P、P-6xHis 及 P-GFP 表現載體，並成功以畢赤氏酵母菌醱酵生產。
2. 諾羅病毒 P 蛋白質產量為目前已發表文獻中最高者。P 蛋白質利用畢赤氏酵母菌，以搖瓶培養產量可達 44.8 mg/L，經醱酵槽培養產量可提升約五倍達 220 mg/L，二種培養之產量皆為目前已發表文獻 P 蛋白質中產量最高者。
3. 本研究為首篇建立諾羅病毒 P 蛋白質無標籤純化系統。利用 P 蛋白質本身之電性與原態暴露之組胺酸(His)，建立簡易且可快速操作之蛋白質無標籤純化策略，純化出之 P 蛋白質回收率為 28.1%，純度可達 82.1%；並且此套純化策略亦可套用至純化外鞘蛋白質 VP1，回收率為 20%且純度超過 90%。
4. 經酵母菌醱酵生產，和無標籤純化策略所純化出的諾羅病毒 VP1 和 P 蛋白質，能成功組成顆粒粒徑 47 nm 和 14 nm，並具有生物功能之粒子，能與成人唾液之 HBGA 結合。
5. 諾羅 P 蛋白質四個胺基酸對 P 顆粒之形成扮演關鍵角色。本研究之 P 蛋白質未經末端修飾即呈現 Small P particle，經與其它 GII.4 菌株序列比對，具有四個差異胺基酸，從蛋白質結構模擬亦可觀察到此四個胺基酸，環繞在 P 蛋白質之外圍側邊，顯示此四個胺基酸對 P 顆粒之形成可能扮演關鍵角色。
6. 本研究為第一個證明，Small P particle (小型 P 粒子)能呈現外來抗原之研究。模擬外來抗原之綠色螢光，能成功呈現於 P 蛋白質的表面頂端，並組成嵌合型小型 P 顆粒，且亦能發出綠色螢光。
7. 組胺酸(6xHis)純化標識對 P 蛋白質之結構會產生影響。本篇結果指出 6x-His tag 會增強 P 蛋白質對 B 型 HBGA 之吸附能力，及影響抗體之辨識性。

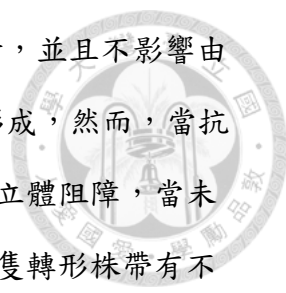
第六章、未來工作與展望

來自食源性腸胃道致病源的諾羅病毒 VP1 與 VP1 之突出區 P 蛋白質，為諾羅病毒之主要結構蛋白質，具高穩定性和高免疫原性，能與受體結合，蛋白質在極端 pH 或極端溫度下不易降解。其中 GII.4 型相比起其他菌株，P 區具有三個多出來的環狀結構，能嵌入外來抗原，做為外來抗原呈現平台。目前諾羅病毒疫苗之開發已進入臨床 II 期階段，距離上市具高度可行性。本身為疫苗候選人之 P 蛋白質，不但比 VLP 更具免疫原性，並且還可做為抗原呈現平台，呈現外來抗原，亦具有高度之發展性。因此本研究所開發建立之平台與發現，皆能作為後續諾羅病毒類病毒顆粒在生產、純化及顆粒形態研究之發展基石。在後續發展上

1. 本研究利用 P 蛋白質本身之電性與原態暴露之組胺酸(His)，所發展出之無標籤純化系統，須藉由與宿主雜蛋白質之差異性，進而從中分離。不同基因型之諾羅病毒雖原態皆具有組胺酸(His)，然組胺酸之數量及位置之分佈皆會影響蛋白質結合管柱之強度；此外，不同的表現宿主、培養微生物之培養基、培養的環境與策略等，皆會影響宿主酸鹼蛋白質之分布。上述之條件皆會影響後續純化之回收率及純度。未來當以不同菌株及宿主套用此套純化策略純化目標蛋白質，亦可先以結構模擬程式，預測蛋白質組胺酸之分佈，在後續純化中可搭配二維膠體電泳以觀察酸鹼蛋白質之分佈，以助於掌握不同陰陽離子交換管柱之搭配，及不同離子濃度拉提之精度，進而提升後續純化之回收率及純度。
2. 為能有效加強 P 粒子的形成並強化顆粒之穩定性，本研究之諾羅 P 與 P-6xHis 皆在 N 端多加有 CCT 標籤(CNGRC 胜肽片段)；而為了簡便蛋白質之純化程序，P-6xHis 在 C 端多加有 6xHis tag (HHHHHH 胜肽片段)，相比起原始病毒株之胺基酸序列，CCT 標籤與 6xHis 標籤皆為人工多增加之胜肽片段。先前文獻已指出，加於末端之 6xHis tag 會誘發非目標蛋白質之免

疫反應，如未來做為醫療級蛋白質製劑，人工多添加之 6xHis tag，恐無法作為醫療級蛋白質製劑中可接受的成份，如未來預做為醫療級蛋白質，勢必須選用諾羅 P 蛋白質，然 P 蛋白質 N 端又多添有人工 CCT 標籤，CCT 標籤之 CNGRC 胜肽片段為生物體本有的 aminopeptidase N(CD13)之配體 (ligand)，未來做為醫療級蛋白質是否一定需去除可再評估，並且去除後對 P 粒子的形成、顆粒穩定性以及 HBGA 之結合能力是否具有影響，也尚待更進一步實驗驗證。

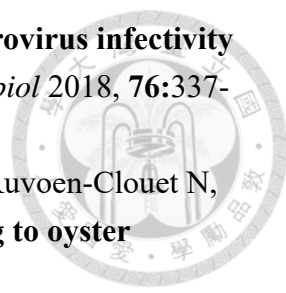
3. P 粒子的形成與穩定性受 P 蛋白質間的相互作用力影響。雖 P 蛋白質上每個胺基酸對 P 顆粒生成之影響尚不清楚，然而本研究發現在 P 蛋白質之中四個胺基酸對顆粒之形成扮演關鍵角色。此四個胺基酸是單一點突變或需其中二或三個突變就能對顆粒之生成造成影響，需後續進一步以實驗釐清。
4. 台灣分離株 P 蛋白質所形成之 Small P particle 與 B 型唾液結合測試結果不如預期，不但明顯比 VP1 吸附能力差，並且也比 P-6xHis 低。然而不同血型，與相同血型但不同個體來源之唾液，皆會影響唾液與諾羅病毒結合之強度。P 蛋白質與 A 或 O 型之唾液結合強度，以及在相同血型不同個體下，是否結合能力仍低於 VP1 與 P-6xHis 蛋白質，仍需後續以更多實驗佐證。
5. 在無更動 P 蛋白質序列下，僅於 P 蛋白質 C 端末端添加 6xHis，及造成 P 蛋白質對 B 型 HBGA 之吸附能力增強，以及諾羅病毒單株抗體無法辨識，以上結果顯示多添加於 C 端末端之 6xHis 改變了 P 蛋白質與 HBGA 受體接合處之結構。P-6xHis 蛋白質相比起 P，實際結構上之位移與差異處，仍需真正解開其蛋白質結構以做實驗佐證。
6. 目前文獻皆指出，嵌入單一外來抗原至 P 蛋白質上之任一個環狀結構，從數個胜肽片段到高達 238 個胺基酸(綠色螢光蛋白質; GFP)皆可[49, 67, 75,




76]；而同時嵌入單一短胜肽至三個環狀結構[77-79]也可行，並且不影響由 24 聚體(12 P dimer)之 P 蛋白質所構成之嵌合型 P 顆粒的形成，然而，當抗原預同時嵌入三個環狀結構時，需考量空間上是否會造成立體阻障，當未來預嵌入分子量較大之抗原，可利用重複轉形方式，使單隻轉形株帶有不同的抗原之嵌合型 P 蛋白質，亦可利用強啟動子(promoter)驅動，以可自我斷裂之 2A 短胜肽[138, 139]，串聯嵌有不同抗原之嵌合型 P 蛋白質。嵌入的抗原，其抗原的大小、親疏水性以及嵌入的 P 蛋白質位點和表現的宿主，皆會影響蛋白質的產量以及是否會出現包涵體(inclusion body)和是否可再次組成嵌合型 P 粒子並具有唾液吸附能力等。本研究證明，Small P particle (小型 P 粒子)亦能呈現外來抗原，未來當以不同表現宿主表現不同嵌合型 P 蛋白質，皆須以實際實驗確認是否可行。

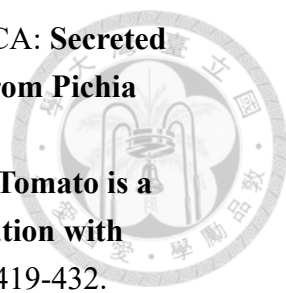
第七章、參考文獻

1. Bayer ME, Blumberg BS, Werner B: **Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis.** *Nature* 1968, **218**:1057-1059.
2. Baschieri S: **Innovation in Vaccinology from design, through to delivery and testing** *SpringerLink* 2012.
3. Kleid DG, Yansura D, Small B, Dowbenko D, Moore DM, Grubman MJ, McKercher PD, Morgan DO, Robertson BH, Bachrach HL: **Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine.** *Science* 1981, **214**:1125-1129.
4. Rodriguez-Limas WA, Sekar K, Tyo KE: **Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development.** *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**:1089-1093.
5. Grimm SK, Ackerman ME: **Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism.** *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**:1078-1088.
6. Rebeaud F, Bachmann M: **Virus-like particles as efficient delivery platform to induce a potent immune response.** In *In Innovation in Vaccinology* (Baschieri S ed. pp. 87-122. Springer2012:87-122.
7. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V: **Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development.** *Vaccine* 2012, **31**:58-83.
8. Li J, Predmore A, Divers E, Lou F: **New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges.** *Annu Rev Food Sci Technol* 2012, **3**:331-352.
9. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: **Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.** *J Virol* 1972, **10**:1075-1081.
10. Hiroshi Ushijima TF, Werner EG Müller, Satoshi Hayakawa **Norovirus and Foodborne Disease: A Review.** *Food Safety Commission* 2014, **2**:37-54.
11. Gibb H, Devleeschauwer B, Bolger PM, Wu F, Ezendam J, Cliff J, Zeilmaker M, Verger P, Pitt J, Baines J, et al: **World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of four foodborne chemical toxins, 2010: a data synthesis.** *F1000Res* 2015, **4**:1393.
12. Koopmans M: **Progress in understanding norovirus epidemiology.** *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**:544-552.
13. de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP: **Human norovirus transmission and evolution in a changing world.** *Nat Rev Microbiol* 2016, **14**:421-433.

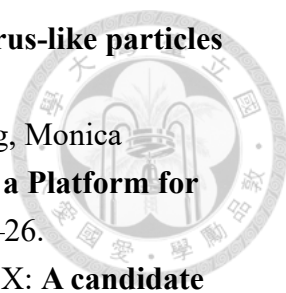
- 
14. Manuel CS, Moore MD, Jaykus LA: **Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges.** *Food Microbiol* 2018, **76**:337-345.
 15. Le Guyader F, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoen-Clouet N, Pommeputy M, Le Pendu J: **Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:931-936.
 16. Leung WK, Chan PK, Lee NL, Sung JJ: **Development of an in vitro cell culture model for human noroviruses and its clinical application.** *Hong Kong Med J* 2010, **16**:18-21.
 17. Straub TM, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, Bruckner-Lea CJ, Call DR: **Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure.** *J Water Health* 2011, **9**:225-240.
 18. Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinje J: **Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models.** *PLoS One* 2014, **8**:e63485.
 19. Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, Wang Q: **Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures.** *Arch Virol* 2014, **159**:257-266.
 20. Bok K, Parra GI, Mitra T, Abente E, Shaver CK, Boon D, Engle R, Yu C, Kapikian AZ, Sosnovtsev SV, et al: **Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:325-330.
 21. Miura T, Sano D, Suenaga A, Yoshimura T, Fuzawa M, Nakagomi T, Nakagomi O, Okabe S: **Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses.** *J Virol* 2013, **87**:9441-9451.
 22. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinje J, et al: **Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells.** *Science* 2014, **346**:755-759.
 23. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, et al: **Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids.** *Science* 2016, **353**:1387-1393.
 24. Kaiser J: **BIOMEDICAL RESEARCH. An end to U.S. chimp research.** *Science* 2015, **350**:1013.

- 
25. Hardy ME: **Norovirus protein structure and function.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **253**:1-8.
26. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK: **Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors.** *Trends Microbiol* 2004, **12**:279-287.
27. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK: **Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain.** *J Virol* 2013, **87**:4818-4825.
28. Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK: **The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein.** *J Virol* 2003, **77**:11603-11615.
29. Tan M, Jiang X: **Vaccine against norovirus.** *Hum Vaccin Immunother* 2014, **10**.
30. Atmar RL, Ramani S, Estes MK: **Human noroviruses: recent advances in a 50-year history.** *Curr Opin Infect Dis* 2018, **31**:422-432.
31. Bull RA, Tanaka MM, White PA: **Norovirus recombination.** *Journal of General Virology* 2007, **88**:3347-3359.
32. Cortes-Penfield NW, Ramani S, Estes MK, Atmar RL: **Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine.** *Clin Ther* 2017, **39**:1537-1549.
33. Tang MB, Chen CH, Chen SC, Chou YC, Yu CP: **Epidemiological and molecular analysis of human norovirus infections in Taiwan during 2011 and 2012.** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:338.
34. Tsai CN, Lin CY, Lin CW, Shih KC, Chiu CH, Chen SY: **Clinical relevance and genotypes of circulating noroviruses in northern Taiwan, 2006-2011.** *J Med Virol* 2014, **86**:335-346.
35. Yang Y, Xia M, Tan M, Huang P, Zhong W, Pang XL, Lee BE, Meller J, Wang T, Jiang X: **Genetic and phenotypic characterization of GII-4 noroviruses that circulated during 1987 to 2008.** *J Virol* 2010, **84**:9595-9607.
36. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS: **Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations.** *Immunol Rev* 2008, **225**:190-211.
37. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N: **Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding.** *J Virol* 2008, **82**:10756-10767.
38. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen

- N, Clement M, Le Pendu J: **ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world.** *Biochimie* 2001, **83**:565-573.
39. Laura D: **Blood Groups and Red Cell Antigens. Chapter 6 The Hh blood group.** *National Center for Biotechnology Information (US)* 2005.
40. Subramaniyan R: **AB para-Bombay phenotype: a rare blood group variant and its clinical significance.** *Hematol Transfus Cell Ther* 2018, **40**:96-97.
41. Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P: **Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type.** *J Infect Dis* 2003, **188**:176-177.
42. Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, Jiang X: **Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns.** *J Virol* 2005, **79**:6714-6722.
43. Frenck R, Bernstein DI, Xia M, Huang P, Zhong W, Parker S, Dickey M, McNeal M, Jiang X: **Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans.** *J Infect Dis* 2012, **206**:1386-1393.
44. Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS: **Norovirus GII.4 strain antigenic variation.** *J Virol* 2011, **85**:231-242.
45. Pogan R, Dulfer J, Uetrecht C: **Norovirus assembly and stability.** *Curr Opin Virol* 2018, **31**:59-65.
46. Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK: **X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid.** *Science* 1999, **286**:287-290.
47. Tan M, Jiang X: **Vaccine against norovirus.** *Hum Vaccin Immunother* 2014, **10**:1449-1456.
48. Herbst-Kralovetz M, Mason HS, Chen Q: **Norwalk virus-like particles as vaccines.** *Expert Rev Vaccines* 2010, **9**:299-307.
49. Tan M, Jiang X: **Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus.** *Nanomedicine (Lond)* 2012, **7**:889-897.
50. Koho T, Huhti L, Blazevic V, Nurminen K, Butcher SJ, Laurinmaki P, Kalkkinen N, Ronnholm G, Vesikari T, Hytonen VP, Kulomaa MS: **Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus.** *J Virol Methods* 2012, **179**:1-7.
51. Koho T, Mantyla T, Laurinmaki P, Huhti L, Butcher SJ, Vesikari T, Kulomaa MS, Hytonen VP: **Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography.** *J Virol Methods* 2012, **181**:6-11.

- 
52. Tome-Amat J, Fleischer L, Parker SA, Bardliving CL, Batt CA: **Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris***. *Microb Cell Fact* 2014, **13**:134.
53. Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS: **Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein**. *Plant Biotechnol J* 2006, **4**:419-432.
54. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ: **Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:5335-5340.
55. Xia M, Farkas T, Jiang X: **Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts**. *J Med Virol* 2007, **79**:74-83.
56. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ: **Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes**. *J Infect Dis* 2000, **182**:302-305.
57. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM: **Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness**. *N Engl J Med* 2011, **365**:2178-2187.
58. Kim L, Liebowitz D, Lin K, Kasperek K, Pasetti MF, Garg SJ, Gottlieb K, Trager G, Tucker SN: **Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial**. *JCI Insight* 2018, **3**.
59. Leroux-Roels G, Cramer JP, Mendelman PM, Sherwood J, Clemens R, Aerssens A, De Coster I, Borkowski A, Baehner F, Van Damme P: **Safety and Immunogenicity of Different Formulations of Norovirus Vaccine Candidate in Healthy Adults: A Randomized, Controlled, Double-Blind Clinical Trial**. *J Infect Dis* 2018, **217**:597-607.
60. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, Gormley R, Chen WH, Ferreira J, Goodwin R, Borkowski A, Clemens R, Mendelman PM: **A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate--reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults**. *J Infect Dis* 2014, **210**:1763-1771.
61. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, Treanor JJ, Chen WH, Jiang X, Vinje J, Gregoricus N, Frenck RW, Jr., Moe CL, et al: **Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults**. *J Infect Dis* 2015, **211**:870-878.

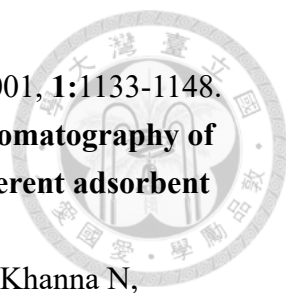
62. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK: **X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid.** *Science* 1999, **286**:287-290.
63. Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, Chanock RM: **Proteins of Norwalk virus.** *J Virol* 1981, **37**:994-999.
64. Hardy ME, White LJ, Ball JM, Estes MK: **Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein.** *J Virol* 1995, **69**:1693-1698.
65. Tan M, Jiang X: **The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors.** *J Virol* 2005, **79**:14017-14030.
66. Fang H, Tan M, Xia M, Wang L, Jiang X: **Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity.** *PLoS One* 2013, **8**:e63269.
67. Tan M, Huang P, Xia M, Fang PA, Zhong W, McNeal M, Wei C, Jiang W, Jiang X: **Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production.** *J Virol* 2011, **85**:753-764.
68. Tan M, Fang P, Chachiyo T, Xia M, Huang P, Fang Z, Jiang W, Jiang X: **Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction.** *Virology* 2008, **382**:115-123.
69. Morgan R, Endres J, Behbahani-Nejad N, Phillips K, Ruth JH, Friday SC, Edhayan G, Lanigan T, Urquhart A, Chung KC, Fox DA: **Expression and function of aminopeptidase N/CD13 produced by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: role of CD13 in chemotaxis of cytokine-activated T cells independent of enzymatic activity.** *Arthritis Rheumatol* 2015, **67**:74-85.
70. Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, Fischetti L, Arap W, Pasqualini R, Corti A: **Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells.** *Cancer Res* 2002, **62**:867-874.
71. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R: **Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties.** *J Biol Chem* 2000, **275**:23745-23750.
72. Bereszczak JZ, Barbu IM, Tan M, Xia M, Jiang X, van Duijn E, Heck AJ: **Structure, stability and dynamics of norovirus P domain derived protein complexes studied by native mass spectrometry.** *J Struct Biol* 2012, **177**:273-282.
73. Tan M, Fang PA, Xia M, Chachiyo T, Jiang W, Jiang X: **Terminal modifications of norovirus P domain resulted in a new type of subviral particles, the small P particles.** *Virology* 2011, **410**:345-352.

- 
74. Barcena J, Blanco E: **Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions.** *Subcell Biochem* 2013, **68**:631-665.
75. Ming Tan MX, Pengwei Huang, Leyi Wang, Weiming Zhong, Monica McNeal, Chao Wei, and Xi Jiang **Norovirus P Particle as a Platform for Antigen Presentation.** *Procedia in Vaccinology* 2011, **4**:19–26.
76. Xia M, Tan M, Wei C, Zhong W, Wang L, McNeal M, Jiang X: **A candidate dual vaccine against influenza and noroviruses.** *Vaccine* 2011, **29**:7670-7677.
77. Fu L, Jin H, Yu YJ, Yu B, Zhang HH, Wu JX, Yin YH, Yu XH, Wu H, Kong W: **Characterization of NoV P particle-based chimeric protein vaccines developed from two different expression systems.** *Protein Expression and Purification* 2017, **130**:28-34.
78. Fu L, Li Y, Hu Y, Zheng Y, Yu B, Zhang H, Wu J, Wu H, Yu X, Kong W: **Norovirus P particle-based active Abeta immunotherapy elicits sufficient immunogenicity and improves cognitive capacity in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Sci Rep* 2017, **7**:41041.
79. Li YN, Fu L, Hu Y, Jin H, Zheng YY, Yin YH, Wu H, Yu XH, Kong W: **Establishment of a novel method without sequence modification for developing NoV P particle-based chimeric vaccines.** *Protein Expression and Purification* 2016, **121**:73-80.
80. Tan M, Hegde RS, Jiang X: **The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors.** *J Virol* 2004, **78**:6233-6242.
81. Gaberc-Porekar V, Menart V: **Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2001, **49**:335-360.
82. Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ: **His-tag impact on structure.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007, **63**:295-301.
83. Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG: **Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site.** *Protein Expr Purif* 2005, **39**:152-159.
84. Thielges MC, Chung JK, Axup JY, Fayer MD: **Influence of histidine tag attachment on picosecond protein dynamics.** *Biochemistry* 2011, **50**:5799-5805.
85. Booth WT, Schlachter CR, Pote S, Ussin N, Mank NJ, Klapper V, Offermann LR, Tang C, Hurlburt BK, Chruszcz M: **Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability.** *ACS Omega* 2018, **3**:760-

- 768.
86. Randolph TW: **The two faces of His-tag: immune response versus ease of protein purification.** *Biotechnol J* 2012, **7**:18-19.
87. Khan F, Legler PM, Mease RM, Duncan EH, Bergmann-Leitner ES, Angov E: **Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stability and immunodominance in mice.** *Biotechnol J* 2012, **7**:133-147.
88. Hartner FS, Glieder A: **Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts.** *Microbial Cell Factories* 2006, **5**.
89. Gleeson MA, Sudbery PE: **The Methylophilic Yeasts.** *Yeast* 1988, **4**:1-15.
90. Guilliermond A: **Zygosaccharomyces pastori, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique.** *Bulletin de la Société Mycologique de France* 1920, **36**:203-211.
91. Phaff HJ, Miller MW, Shifrine M: **The taxonomy of yeasts isolated from Drosophila in the Yosemite region of California.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1956, **22**:145-161.
92. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR: **Pichia-Pastoris as a Host System for Transformations.** *Molecular and Cellular Biology* 1985, **5**:3376-3385.
93. Yamada Y, Matsuda M, Maeda K, Mikata K: **The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of Komagataella gen. nov. (Saccharomycetaceae).** *Biosci Biotechnol Biochem* 1995, **59**:439-444.
94. Kurtzman CP: **Description of Komagataella phaffii sp. nov. and the transfer of Pichia pseudopastoris to the methylophilic yeast genus Komagataella.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:973-976.
95. Naumov GI, Naumova ES, Tyurin OV, Kozlov DG: **Komagataella kurtzmanii sp. nov., a new sibling species of Komagataella (Pichia) pastoris based on multigene sequence analysis.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013, **104**:339-347.
96. Kurtzman CP: **Biotechnological strains of Komagataella (Pichia) pastoris are Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2009, **36**:1435-1438.
97. Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS: **Fermentation Development of Recombinant Pichia-Pastoris Expressing the Heterologous Gene - Bovine Lysozyme.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990, **589**:350-362.
98. Cereghino JL, Cregg JM: **Heterologous protein expression in the**

- methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000, 24:45-66.**
99. Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, Zhou X, Song Z, Cai M: **Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* 2017, 7:41850.**
 100. Vogl T, Sturmberger L, Fauland PC, Hyden P, Fischer JE, Schmid C, Thallinger GG, Geier M, Glieder A: **Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. *Biotechnol Bioeng* 2018, 115:1037-1050.**
 101. Kocher J, Bui T, Giri-Rachman E, Wen K, Li GH, Yang XD, Liu FN, Tan M, Xia M, Zhong WM, et al: **Intranasal P Particle Vaccine Provided Partial Cross-Variant Protection against Human GII.4 Norovirus Diarrhea in Gnotobiotic Pigs. *Journal of Virology* 2014, 88:9728-9743.**
 102. Chen CC, Wu PH, Huang CT, Cheng KJ: **A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme and Microbial Technology* 2004, 35:315-320.**
 103. Wu S, Letchworth GJ: **High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques* 2004, 36:152-154.**
 104. Parra GI, Abente EJ, Sandoval-Jaime C, Sosnovtsev SV, Bok K, Green KY: **Multiple antigenic sites are involved in blocking the interaction of GII.4 norovirus capsid with ABH histo-blood group antigens. *J Virol* 2012, 86:7414-7426.**
 105. Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, Zhang XC, Jiang X, Li X, Rao Z: **Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007, 81:5949-5957.**
 106. Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde RS, Meller J, Li X, Jiang X: **Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One* 2009, 4:e5058.**
 107. Chen Y, Tan M, Xia M, Hao N, Zhang XC, Huang P, Jiang X, Li X, Rao Z: **Crystallography of a Lewis-binding norovirus, elucidation of strain-specificity to the polymorphic human histo-blood group antigens. *PLoS Pathog* 2011, 7:e1002152.**
 108. Bu W, Mamedova A, Tan M, Xia M, Jiang X, Hegde RS: **Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J Virol* 2008, 82:5340-5347.**
 109. Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K: **Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia***

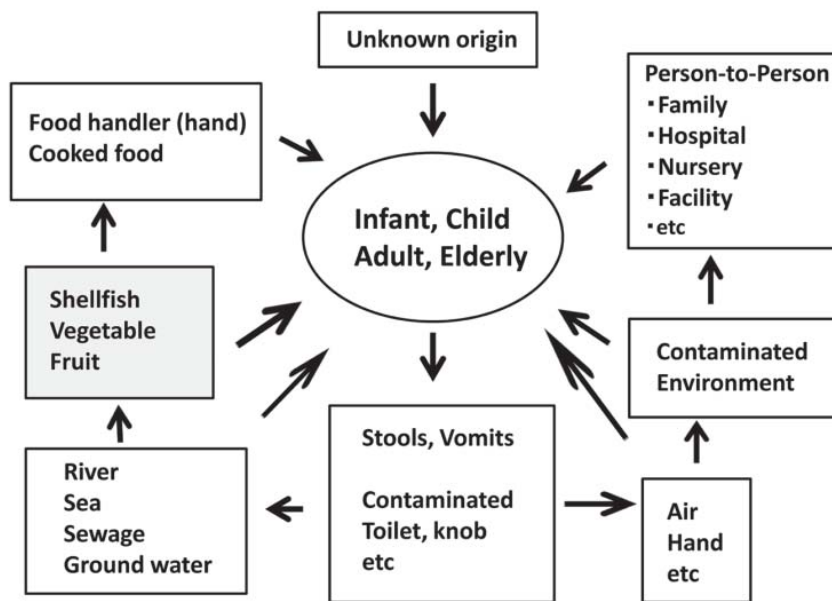
- pastoris for high-level foreign gene expression.** *Biotechnology (N Y)* 1994, **12**:181-184.
110. Wu JM, Wang SY, Fu WC: **Lower temperature cultures enlarge the effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on recombinant *Pichia pastoris*.** *Int J Mol Sci* 2012, **13**:13212-13226.
111. Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO: **Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures.** *Microb Cell Fact* 2003, **2**:6.
112. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Sola C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *J Biotechnol* 2001, **86**:59-70.
113. Hartner FS, Glieder A: **Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts.** *Microb Cell Fact* 2006, **5**:39.
114. Tsai CT, Huang C-T: **Overexpression of the *Neocallimastix frontalis* xylanase gene in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*.** *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **42**:7.
115. Ishihara T, Kadoya T, Endo N, Yamamoto S: **Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data. Reducing residual protein A by cation-exchange chromatography in monoclonal antibody purification.** *J Chromatogr A* 2006, **1114**:97-101.
116. Willoughby NA, Kirschner T, Smith MP, Hjorth R, Titchener-Hooker NJ: **Immobilised metal ion affinity chromatography purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast using an expanded bed adsorption system.** *J Chromatogr A* 1999, **840**:195-204.
117. Gaberc-Porekar V, Menart V: **Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography.** *J Biochem Biophys Methods* 2001, **49**:335-360.
118. Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P, Mattanovich D: **The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*.** *J Proteome Res* 2009, **8**:1380-1392.
119. Huo YQ, Wan X, Wang ZJ, Meng SL, Shen S: **Production of Norovirus VLPs to size homogeneity.** *Virus Research* 2015, **204**:1-5.
120. Chang-Chih Chen P-HW, Ching-Tsan Huang, Kou-Joan Cheng: **A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase.** *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **35**: 315–320.
121. Champion KM, Nishihara JC, Joly JC, Arnott D: **Similarity of the**

- 
- Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes.** *Proteomics* 2001, **1**:1133-1148.
122. Lee MF, Chan ES, Tan WS, Tam KC, Tey BT: **Negative chromatography of hepatitis B virus-like particle: Comparative study of different adsorbent designs.** *J Chromatogr A* 2016, **1445**:1-9.
123. Gurramkonda C, Zahid M, Nemani SK, Adnan A, Gudi SK, Khanna N, Ebensen T, Lunsdorf H, Guzman CA, Rinas U: **Purification of hepatitis B surface antigen virus-like particles from recombinant Pichia pastoris and in vivo analysis of their immunogenic properties.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013, **940**:104-111.
124. Tan YP, Ling TC, Tan WS, Yusoff K, Tey BT: **Purification of recombinant nucleocapsid protein of Newcastle disease virus from unclarified feedstock using expanded bed adsorption chromatography.** *Protein Expr Purif* 2006, **46**:114-121.
125. Yap WB, Tey BT, Alitheen NB, Tan WS: **Purification of His-tagged hepatitis B core antigen from unclarified bacterial homogenate using immobilized metal affinity-expanded bed adsorption chromatography.** *J Chromatogr A* 2010, **1217**:3473-3480.
126. Huhti L, Blazevec V, Nurminen K, Koho T, Hytonen VP, Vesikari T: **A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles.** *Arch Virol* 2010, **155**:1855-1858.
127. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, Lanzavecchia A, Baric RS: **Immunogenetic Mechanisms Driving Norovirus GII.4 Antigenic Variation.** *Plos Pathogens* 2012, **8**.
128. Tamminen K, Lappalainen S, Huhti L, Vesikari T, Blazevec V: **Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice.** *PLoS One* 2013, **8**:e70409.
129. Samandoulgou I, Hammami R, Morales Rayas R, Fliss I, Jean J: **Stability of Secondary and Tertiary Structures of Virus-Like Particles Representing Noroviruses: Effects of pH, Ionic Strength, and Temperature and Implications for Adhesion to Surfaces.** *Appl Environ Microbiol* 2015, **81**:7680-7686.
130. Lin Y, Fengling L, Lianzhu W, Yuxiu Z, Yanhua J: **Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs.** *J Microbiol* 2014, **52**:970-975.
131. Watkins WM: **A half century of blood-group antigen research some personal recollections.** *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 1999,

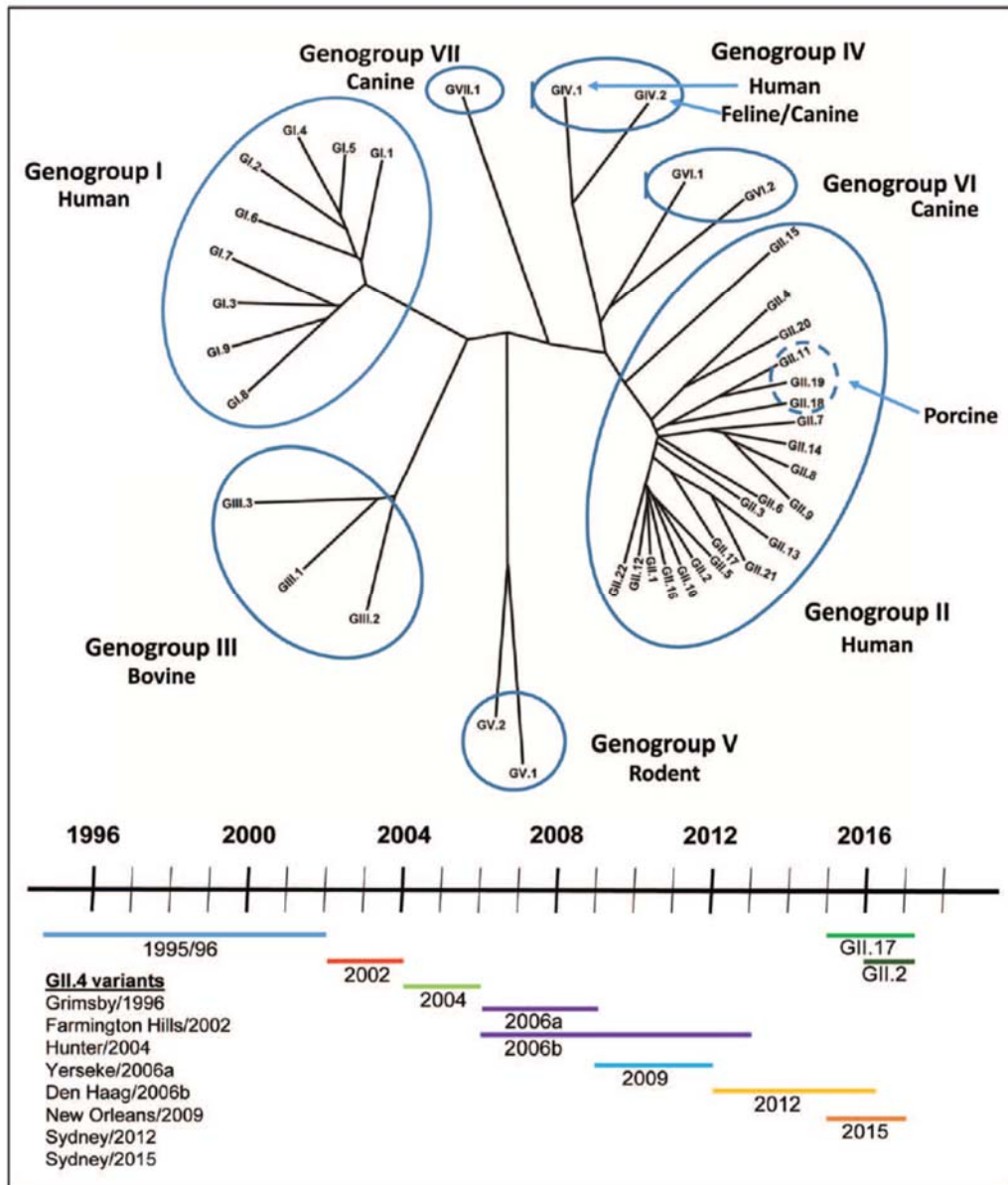
- 11:391-411.
132. Figueroa CM, Iglesias AA: **Aldose-6-phosphate reductase from apple leaves: Importance of the quaternary structure for enzyme activity.** *Biochimie* 2010, **92**:81-88.
133. Zhu ZQC, Gupta KK, Slabbekoorn AR, Paulson BA, Folker ES, Goodson HV: **Interactions between EB1 and Microtubules DRAMATIC EFFECT OF AFFINITY TAGS AND EVIDENCE FOR COOPERATIVE BEHAVIOR.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:32651-32661.
134. Fonda I, Kenig M, Gaberc-Porekar V, Pristovaek P, Menart V: **Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties.** *ScientificWorldJournal* 2002, **2**:1312-1325.
135. Goel A, Colcher D, Koo JS, Booth BJ, Pavlinkova G, Batra SK: **Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1523**:13-20.
136. Krupka M, Masek J, Barkocziava L, Turanek Knotigova P, Kulich P, Plockova J, Lukac R, Bartheldyova E, Koudelka S, Chaloupkova R, et al: **The Position of His-Tag in Recombinant OspC and Application of Various Adjuvants Affects the Intensity and Quality of Specific Antibody Response after Immunization of Experimental Mice.** *PLoS One* 2016, **11**:e0148497.
137. Su W, Gao J, Zang Y, Wu H, Wang L, Hu H, Yu X, Kong W, Jiang C: **Production, characterization and immunogenicity of P particles derived from norovirus GII.4 genotype 2004 variant.** *Acta Virologica* 2015, **59**:33-39.
138. Lin YJ, Liu WT, Stark H, Huang CT: **Expression of enterovirus 71 virus-like particles in transgenic enoki (*Flammulina velutipes*).** *Appl Microbiol Biotechnol* 2015, **99**:6765-6774.
139. Lin YJ, Huang LH, Huang CT: **Enhancement of heterologous gene expression in *Flammulina velutipes* using polycistronic vectors containing a viral 2A cleavage sequence.** *PLoS One* 2013, **8**:e59099.
140. Mahmood N, Xie J: **An endogenous 'non-specific' protein detected by a His-tag antibody is human transcription regulator YY1.** *Data Brief* 2015, **2**:52-55.



附錄



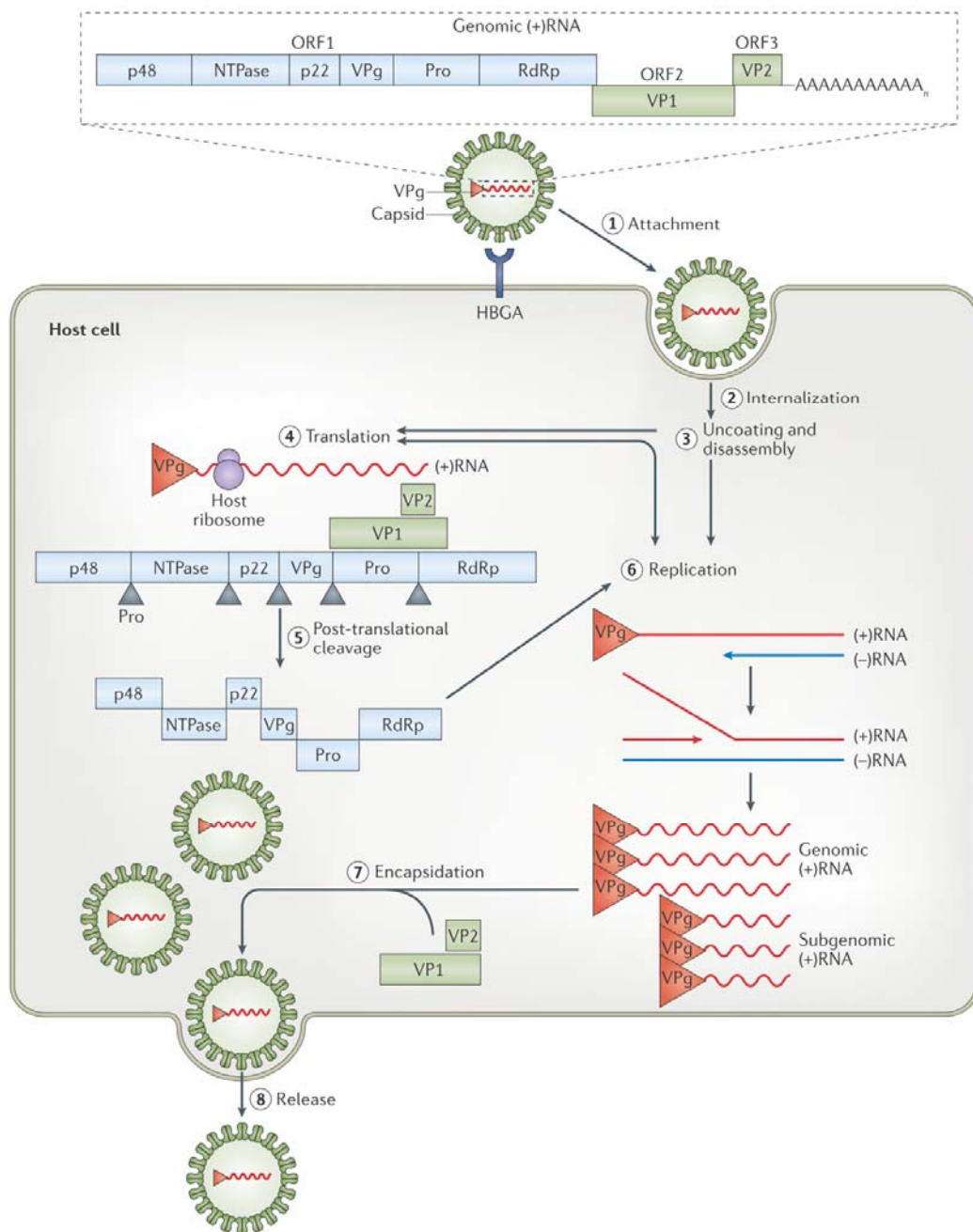
附圖 1 人類諾羅病毒之傳染途徑 [10]



附圖 2 諾羅病毒基因組(genogroups)和基因型(genotypes) [30]


(上層)諾羅病毒分類樹主要根據衣殼蛋白質(VP1)之氨基酸序列分類

(下層)GII.4 突變型之出現時間和近期其他基因型的出現時間。

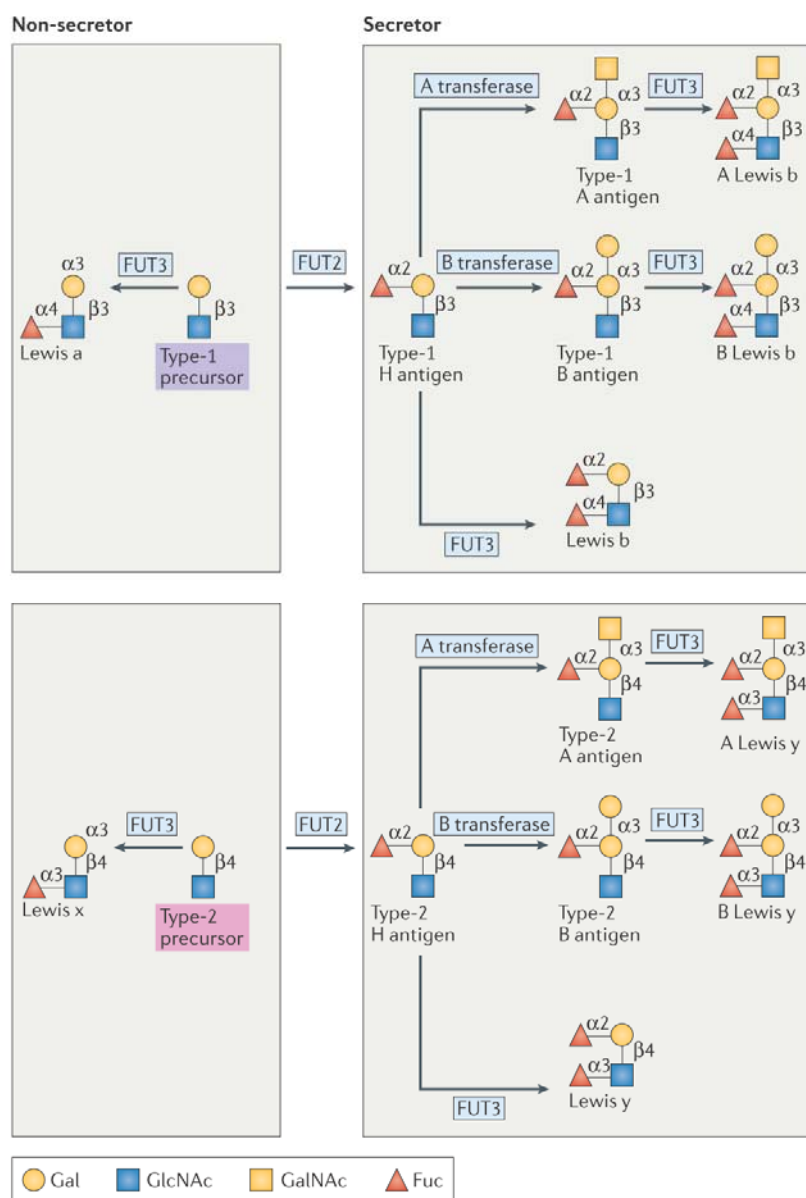


附圖 3 諾羅病毒組成與生活史 [13]

病毒基因組具有三個 ORFs，ORF1 會編碼出六個非結構性病毒蛋白質，ORF2 和 ORF3 會編碼出結構蛋白質 VP1 和 VP2。病毒基因組(正股 RNA)會包裹在由 VP1 和 VP2 所形成的病毒衣殼外鞘蛋白質中，病毒衣殼蛋白質會經由 VP1 與宿主之組織血型抗原(HBGAs)間的相互作用，進而貼附在細胞表面(步驟 1)，隨後進入到宿主細胞內並脫去外鞘蛋白質(步驟 2,3)，(+)RNA 會在宿主細胞之細胞

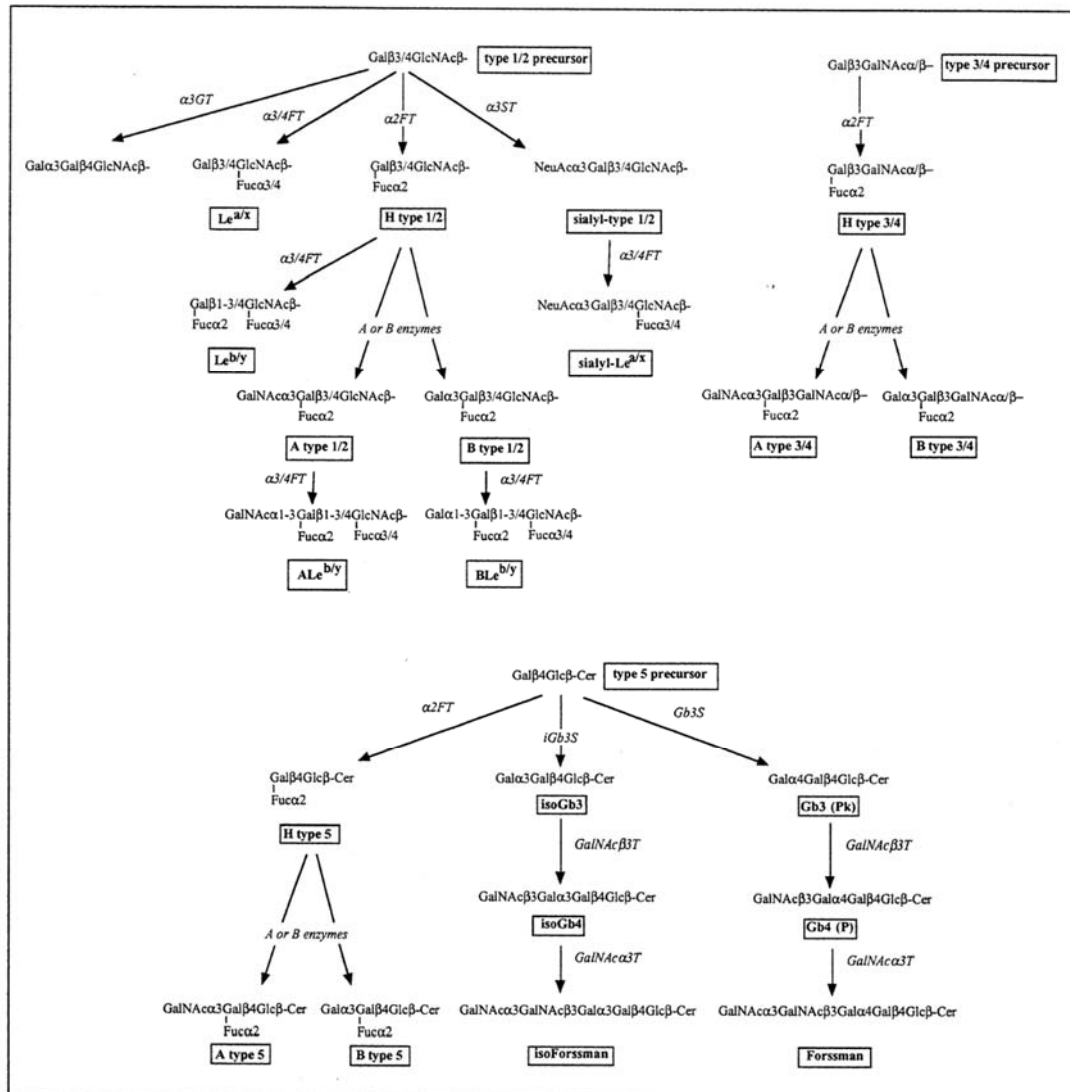


質中轉錄與轉譯，非結構性病毒蛋白質 VPg，會共價鍵結在(+)RNA 之 5'末端，並募集宿主細胞中之轉譯因子(translation factors)調控病毒之轉譯(步驟 4)，ORF1 所轉譯出之非結構性蛋白質，經病毒所編碼出之蛋白酶 Pro (也被稱為 NS6 或 3C-like)切割成獨立的蛋白質：p48 (也被稱為 NS1/2 或 N-term)、NTPase (也被稱為 NS3 或 2C-like)、p22 (也被稱為 NS4 或 3A-like)、VPg、Pro 和 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (步驟 5)，在病毒基因複製期間，(+)RNA 會被轉錄成(-)RNAs，此負股 RNA 會做為合成新的(+)RNAs 基因組(genomic)和(+)RNAs 亞基因組(subgenomic)之模板(步驟 6)，(+)RNAs 亞基因組僅有 ORF2 和 ORF3，並且僅做為外鞘蛋白質 VP1 和 VP2 之生產。在病毒組裝期間，病毒之(+)RNAs 基因組(和可能的(+)RNAs 亞基因組)，會被裝入新的病毒顆粒(步驟 7)，隨後從感染的宿主細胞中釋放(步驟 8)，目前，病毒顆粒釋放的機制仍尚未完全了解。



附圖 4 生合成 HBGA 之路徑 [13]

Type-1 和 type-2 之 HBGA 前驅物，會被 $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase 2 (FUT2) 修飾產生 H 型抗原，此 H 型抗原會進一步被 A 和 B transferases 修飾產生 A 和 B 抗原。而 Lewis 抗原，會經由 $\alpha(3,4)$ -fucosyltransferase (FUT3；也稱為 galactoside 3(4)-l-fucosyltransferase) 修飾產生。當個體缺乏功能性 FUT2 被歸類為非分泌型，因在身體體液中不存有 A、B 或 H 抗原；當個體具有功能性 FUT2 則被歸為分泌型。Fuc: fucose, Gal: galactose, GalNAc: N-acetylgalactosamine, GlcNAc: N-acetylgalucosamine。

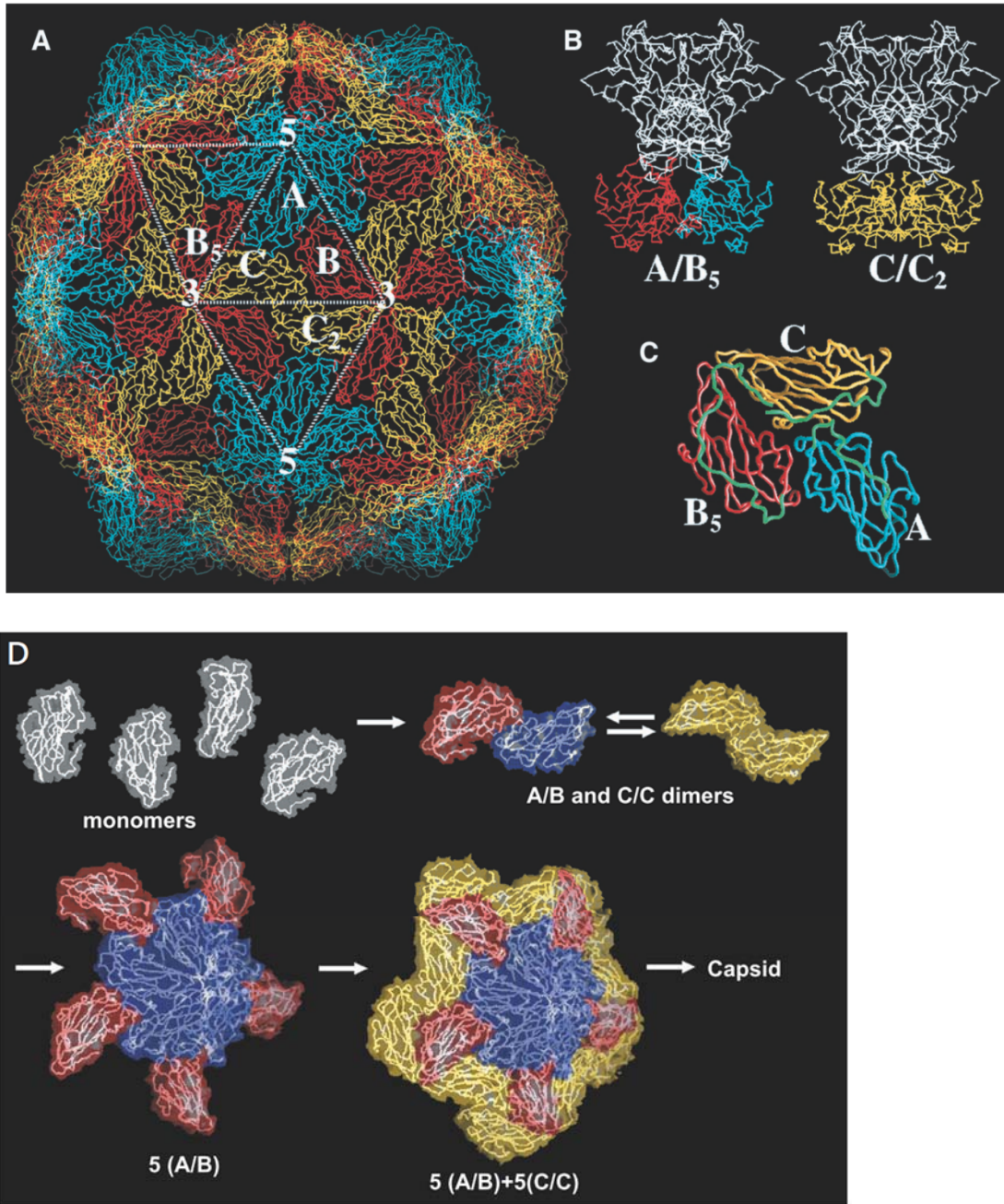


附圖 5 ABH、Lewis 及相關抗原生合成路徑圖 [38]

五種不同類型之雙醣(disaccharides)前驅物(precursor)如圖所示，Type 1 前驅物為 Gal β 1-3 GlcNAc β，type 2 為 Gal β 1-4 GlcNAc β，由於這二種前驅物後續之修飾路徑平行，因此分為一組並以斜線 3/4 區分二者，衍生的抗原以框形標示，Type 1/2, Le^{a/x} 以及 Le^{b/y} 分別表示 types 1 或 2, Le^a 或 Le^x 和 Le^b 或 Le^y，每個步驟所需的催化酵素，酵素名稱皆以縮寫的斜體顯示。α3GT: α 1,3 galactosyl transferase, α 3/4FT: α 1,3 或 α 1,4 fucosyltransferase, α2FT: α 1,2 fucosyltransferase, α3ST: α 2,3 sialyltransferase, A or B enzymes 為 α 1,3N-acetylgalactosaminyl and α 1,3 galactosyltransferases 分別由 ABO 基因座處的 A 和 B 等位基因編碼。Gb3S:

globosynthase, iGb3S: isoglobosynthase, GalNAc β 3T: β 1,3N-acetyl
galactosaminyltransferase, GalNAc α 3T: α 1,3N- acetylgalactosaminyl transferase
或 Forssman synthase。 (Type 4 型前驅物存在於 globo 和 ganglio (神經節)系列的
醣脂上，Type 5 型對應於醣脂乳糖苷神經酰胺(glycolipid lactosylceramide)等)

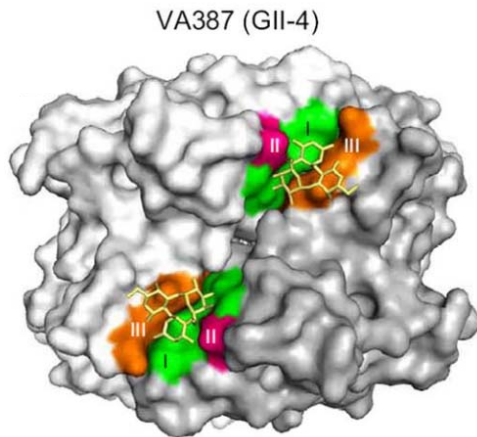




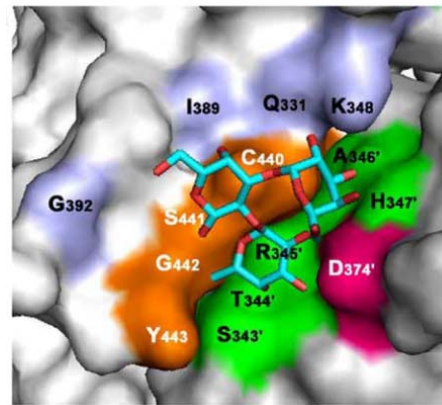
附圖 6 諾羅病毒衣殼蛋白質 VP1 組裝成病毒顆粒模擬圖 [46]

紅色、藍色、黃色皆為相同的 S domain (為避免混淆，由 S 與 P domain 所組成之 VP1 僅顯示 S domain，另外，僅圖 B 之白色為 P domain)，當諾羅病毒在組裝時會以 A/B 或 C/C 之呈彎曲或平板的二聚體為最小單位組裝，整個模擬組裝過程如圖 D，5 個 A/B 會組成五角狀，角狀周邊再加入 5 個 C/C。9 組 [5(A/B)+5(C/C)] 相當於 90 個 VP1 二聚體會形成一個諾羅病毒顆粒。

A.

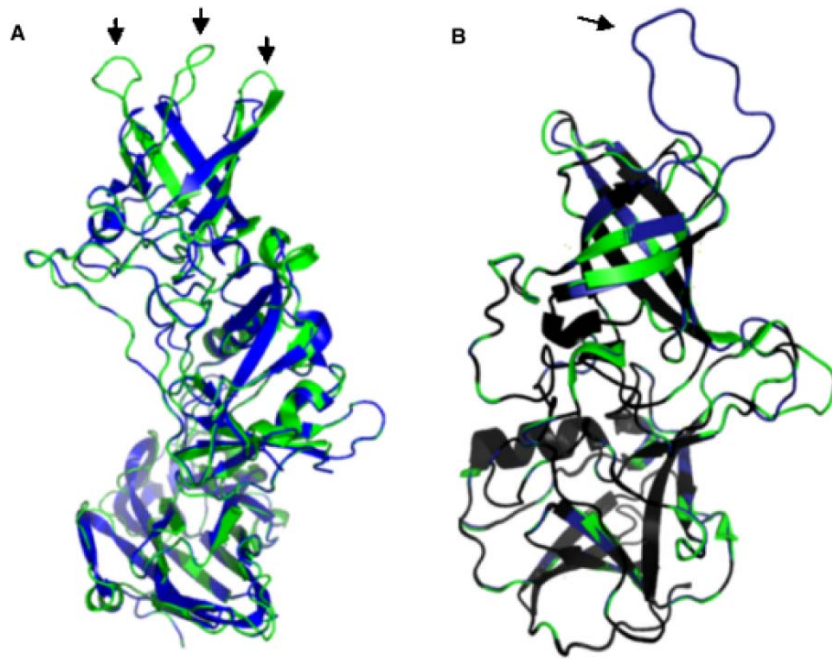


B.



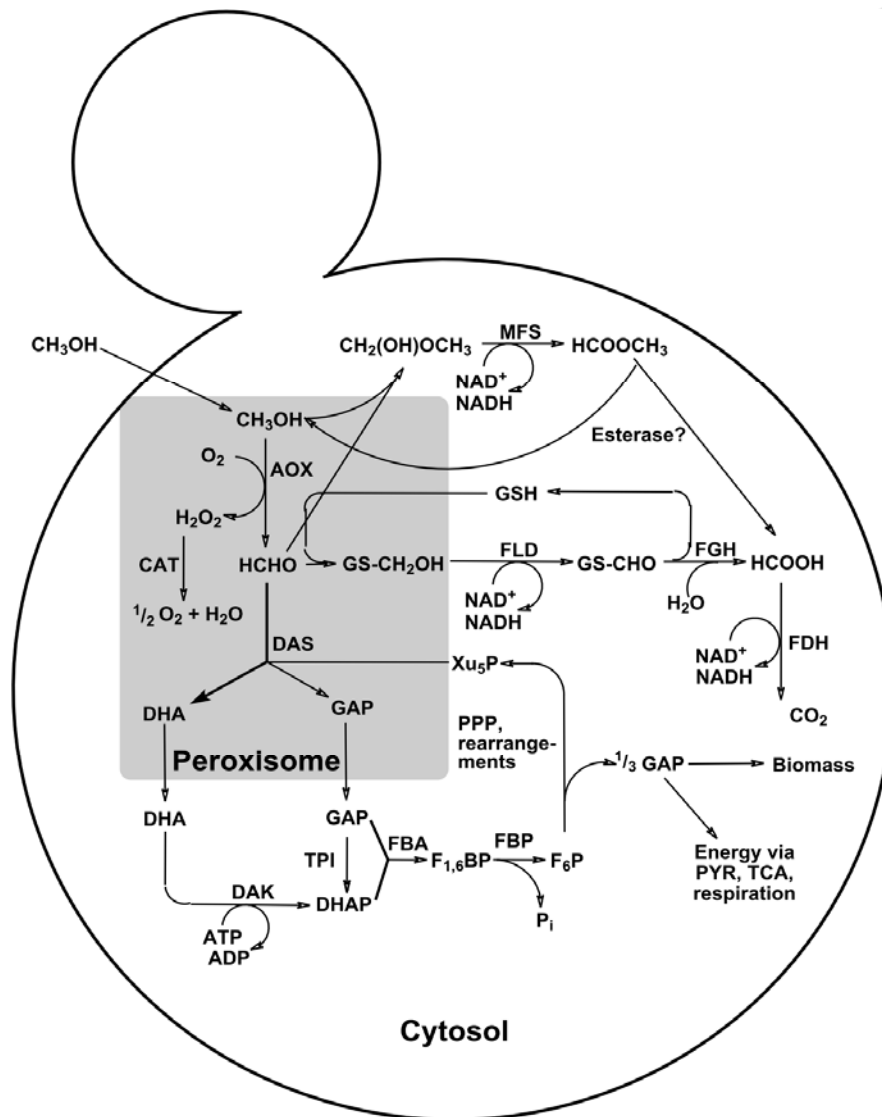
附圖 7 VA387 (GII.4) 與 HBGA 之結合界面的晶體結構 [106]

(A)以俯視的視角觀察雙體化(各單體 P 蛋白質以白色與灰色表示)之 P 蛋白質與 HBGA (以黃色之三醣(trisaccharides)示意) 結合之介面。(B) 圖為放大(A)圖下方之結合介面，三個主要結合界面為綠色(位點 I)，紅色(位點 II)和橙色(位點 III)，而淺藍色為會影響結合特異性之胺基酸，接合界面之三糖以 C-青色、O-紅色和 N-藍色表示。



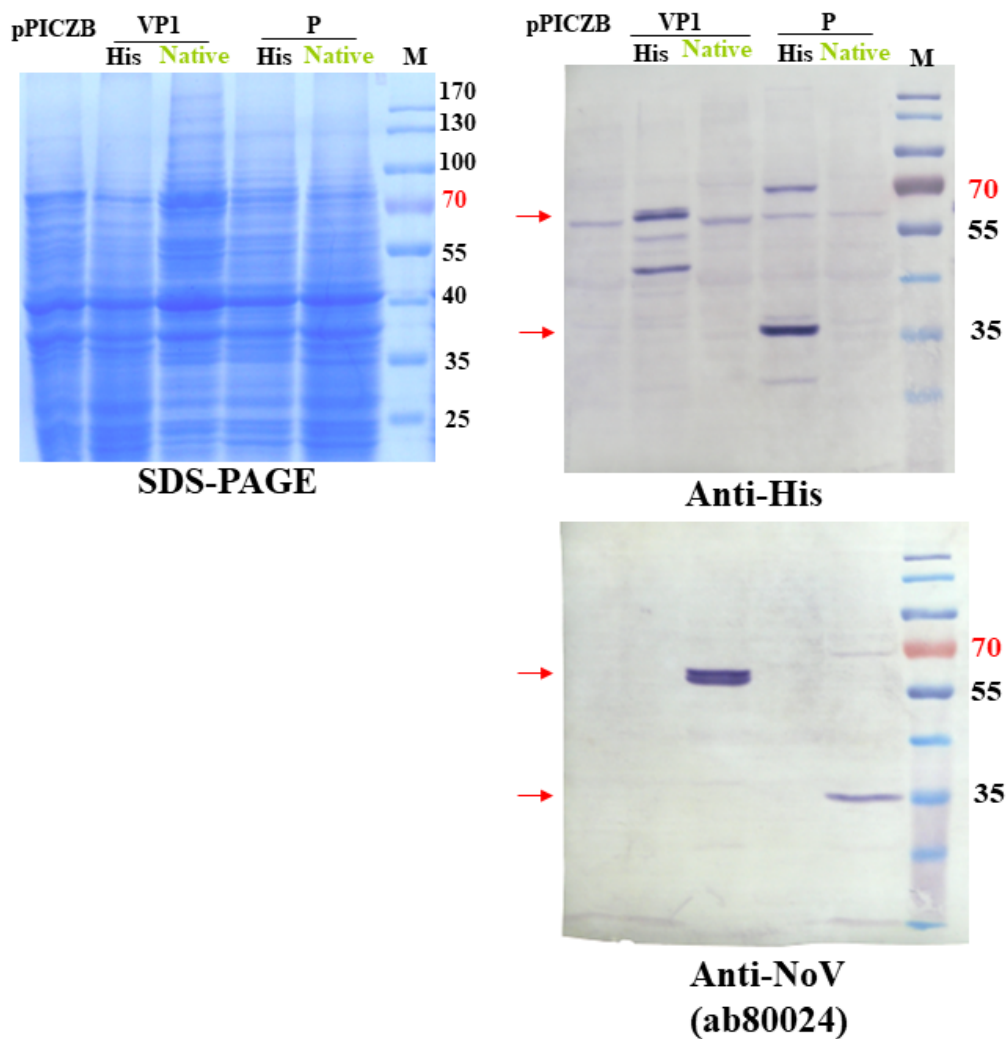
附圖 8 比較 GII.4 與 GI.1 和 GII.3 之 P 蛋白質結構 [36]

(A) GI.1 P 蛋白質(藍色) 疊加在 GII.4 P 蛋白質(綠色)結構，可觀察到 GII.4 (綠色)在箭頭所示的 P2 結構中具有三個額外的環狀結構。(B) GII.3 諾羅病毒的同源模型(深藍色)，疊加在 GII.4 結構上(綠色)，雖然它們非常相似，但 GII.3 結構在 P2 結構中具有一個長環，黑色表示二者相同之位點。



附圖 9 嗜甲醇酵母菌甲醇代謝路徑[88]

嗜甲醇酵母菌之甲醇代謝路徑中各個酵素縮寫如下：AOX: alcohol oxidase (EC 1.1.3.13), CAT: catalase (EC 1.11.1.6), FLD: formaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.1), FGH: S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12), FDH: formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2), DAS: dihydroxyacetone synthase (EC 2.2.1.3), TPI: triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1), DAK: dihydroxy-acetone kinase (EC 2.7.1.29), FBA: fructose 1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.21.13), FBP: fructose 1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11), MFS: methylformate synthase; DHA: dihydroxyacetone, GAP: glyceraldehyde 3-phosphate, DHAP: dihydroxyacetone phosphate, F_{1,6}BP: fructose 1,6-bisphosphate, F₆P: fructose 6-phosphate, P_i: phosphate, Xu₅P: xylulose 5-phosphate, GSH: glutathione, PYR: pyruvate; PPP: pentose phosphate pathway, TCA: tricarboxylic acid cycle.



附圖 10 以西方墨點法偵測原態或帶有組胺酸之 VP1 或 P 蛋白質

左側圖為 SDS-PAGE 以 Coomassie Brilliant Blue 染色做蛋白質跑膠對照，右側圖為以 His 抗體(上方)或 NoV 抗體(下方)做諾羅病毒蛋白質西方墨點法分析。

以 His 抗體，在 pPICZ B (質體負控制組)可辨識到一條約在 60 kDa 之非專一性內源性蛋白質條帶(‘non-specific’ endogenous protein)，此條帶為帶有連續 11 個 His 之內生 transcriptional regulator YY1 [140]。

附表 1 諾羅病毒類病毒顆粒之穩定性研究結果 [45]

諾羅病毒 VLP 在不同 pH 值、溫度、離子強度和其它條件下之穩定性比較結果。



genogroup	isolate	reference	methods*	particle size	pH dependency (stable - disassembled - not tested)										temperature, additives, ionic strength and other factors
					3	4	5	6	7	8	9	10			
GI	GI.1 Norwalk	Ausar (2006)	EM, fluorescence, UV absorption, CD, DLS, DSC	45 nm at pH 7; 28 nm at pH 8	3	4	5	6	7	8	9	10	stable up to 55 °C, citrate-phosphate buffer		
		Baclayon (2011)	IMMS, AFM	39 nm; 29 nm S-particles	3	4	5	6	7	8	9	10	role of P domain in capsid stability, increased stiffness under prestress		
		Bertolotti-Ciarlet (2002)	EM, CryoEM, ELISA, Gradient centrifugation	38 nm; 45 nm (P domain mutant); 30 nm (S-particles)	3	4	5	6	7	8	9	10	effect of mutants and deletions on particle size and stability		
		Boyd (2015)	<i>in silico</i> nanoindentation	-	3	4	5	6	7	8	9	10	the interface building a quasi-sixfold symmetry axis (B/C of S domains) is the most instable one		
		da Silva (2011)	DLS, Electrophoretic mobility, QCM-D Adsorption Studies	35 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	different attachment efficiencies depending on buffer and ionic strength		
		Kissmann (2008)	CD, fluorescence, DSC	-	3	4	5	6	7	8	9	10	influence of vaccine excipients (sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol, lactose, glycerol, dextrose, chitosan); chitosan, glutamate, sucrose, and trehalose enhance stabilization and inhibit aggregation (> 60 °C)		
		Shoemaker (2010)	native MS, IMMS, AFM	various depending on condition	3	4	5	6	7	8	9	10	higher ionic strength reduces alkaline sensitivity		
		Utrecht (2011)	native MS, IMMS	various depending on condition	3	4	5	6	7	8	9	10	shape of small assemblies		
		White (1997)	EM, sucrose gradient centrifugation	23 nm; 38 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	investigation of different capsid sizes		
	GI.1 West Chester	Pogan (2018)	native MS, EM	40 nm at pH 6 and 7; also 20 nm pH 6-8	3	4	5	6	7	8	9	10	higher ionic strength reduces alkaline sensitivity		
GI.4 Chiba	Someya (2011)	EM	23 nm; 38 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	investigation of different capsid sizes			
GI.1	Samandougou (2015)	CD, Near-UV intrinsic fluorescence	-	3	4	5	6	7	8	9	10	slight losses of ordered secondary structure at higher temperature and ionic strength			
GII	GI.4 Guangzhou	Yao (2014)	CD, EM	38 nm (VP1 only and VP1/VP2)	3	4	5	6	7	8	9	10	VP2 might have a stabilizing effect on VLPs		
	GI.4 Houston	da Silva (2011)	DLS, Electrophoretic mobility, QCM-D Adsorption Studies	40 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	different attachment efficiencies depending on buffer and ionic strength		
	GI.4	Huo (2015)	EM	38 nm; 21 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	investigation of different capsid sizes		
	GI.4	Samandougou (2015)	CD, Near-UV intrinsic fluorescence	-	3	4	5	6	7	8	9	10	stable at different ionic strengths; small structure changes at higher temperature		
	GI.7	Cuellar (2010)	AFM	28-47 nm	3	4	5	6	7	8	9	10	tested range pH 2 – 10, size increase at basic pH		
	GI.10 Vietnam	Koromyslova (2015)	EM, ELISA, X-Ray crystallography	43-48 nm depending on citrate concentration	3	4	5	6	7	8	9	10	additional ring-like structure after treatment with citrate buffer		
	GI.17 Kawasaki 308	Pogan (2018)	native MS, EM	-	3	4	5	6	7	8	9	10	high and low ionic strength tested		
GIII	GI.12 Bo/ Newbury2	Tresset (2013)	EM, DLS, SAXS, SANS	-	3	4	5	6	7	8	9	10	low ionic strength promotes disassembly and vice versa		

*Method abbreviations: AFM (atomic force microscopy), CD (circular dichroism), DLS (dynamic light scattering), DSC (differential scanning calorimetry), ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), EM (electron microscopy), IMMS (ion mobility mass spectrometry), MS (mass spectrometry), QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation), SANS (small-angle neutron scattering), SAXS (small-angle X-ray scattering), UV (ultraviolet) absorption.

附表 2 諾羅病毒疫苗的發展現況 [30]



Company or investigators	Vaccine candidate (expression system)	Genotype(s)	Route of Administration	Adjuvant	Stage of development	Published References
UMN Pharma, Inc.	VLP (Baculovirus expression system)	GI.3, GI.4 with rotavirus VP6	Intradermal, intramuscular	None	Preclinical	[103,104]
Ology Bioservices	VLP (Baculovirus expression system)	GI.1, GI.4	Intranasal	GelVac	Preclinical	[105]
Medicago	VLP (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	GI.1, GI.1 or GI.2	Multiple possible routes	Different adjuvants possible	Preclinical	-
Vaxart, Inc.	VLP (replication-defective adenovirus type 5)	GI.1	Oral	Double stranded RNA hairpin (expressed by the vector)	Phase 1	[106*]
Takeda Vaccines, Inc.	VLP (Baculovirus expression system)	GI.1	Intranasal (no longer in development);	Chitosan and monophosphoryl lipid A (MPL)	Phase 2a	[37]
		GI.1, GI.4	Intramuscular	Aluminum hydroxide with or without MPL	Phase 2b	[38,80, 107**,108]

MPL, monophosphoryl lipid A; VLP, virus-like particle.

附表 3：不同碳源對嗜甲醇酵母菌 AOX 基因的抑制和去抑制作用。[88]

		Glucose, EtOH	Glycerol	Methanol	Glycerol+MeOH
<i>P. pastoris</i> [61, 62, 83, 92, 93]	<i>AOX1</i>	Repression	Repression	Induction	Repression
	<i>AOX2</i>	Repression	Repression	Induction	Repression
<i>H. polymorpha</i> [76, 88-91]	<i>MOX</i>	Repression	Derepr. (~60-70%)	Induction	Induction (~100%)
	<i>FMD</i>	Repression	Derepr. (~60%)	Induction	
<i>C. boidinii</i> [57, 68, 70, 71, 86, 87]	<i>AOD1</i>	Repression	Derepr. (~3-30%)	Induction	Induction (~90%)
	<i>FLD</i>	No activity	Derepr. (~20%)	Induction	Induction (~70%)
	<i>FDH</i>	Repression	No activity	Induction	Induction (~30%)
	<i>DAS</i>	Repression	Derepr. (~2%)	Induction	Induction (~70%)
<i>P. methanolica</i> [78, 82, 100, 101]	<i>MOD1</i>	Repression	Derepr. (~60-70%)	Induction	Induction (~100%)
	<i>MOD2</i>	Repression	No activity	Induction	Induction (~100%)
	<i>FLD</i>	No activity	Derepr. (~20%)	Induction	Induction (~70%)

Effect and level of derepression compared to the methanol induced level are shown (Induction by methanol for each gene denotes 100%). The data was extracted from the literature given by the citations and are taken from experiments where ammonia was used as nitrogen source.

在不同嗜甲醇酵母菌物種中，相似的酵素雖蛋白質分子量及基質專一性和調控機制皆相似，但名字卻不同。一樣同為酒精氧化酶但名字卻有 AOX: alcohol oxidase, MOX: methanol oxidase, AOD: alcohol oxidase, AUG(同 MOD): alcohol utilizing gene。

其他酵素縮寫 FMD: formate dehydrogenase, FLD: formaldehyde dehydrogenase, FDH: formate dehydrogenase, DAS: dihydroxyacetone synthase



Publication

Original paper:

Yu-Ling Chen, Pey-Jium Chang, Ching-Tsan Huang: **Small P particles formed by the Taiwan-native norovirus P domain overexpressed in *Komagataella pastoris***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102:9707-9718.

Preparing...

Yu-Ling Chen and Ching-Tsan Huang: **Establishment of two different purification schemes for tag-free recombinant Norovirus P protein and applied to VP1 protein**. 2019

Conference Presentation:

Yu-Ling Chen* and Ching-Tsan Huang: **Small P particles formed by Taiwan native norovirus P domain overexpressed in *Pichia pastoris* and purified by tag-free purification schemes**. The 16th Asia-Pacific Biotechnology Congress & International Conference on Cancer Research and Diagnostics, Singapore, 2018 (*Oral presentation)