

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用重組腺病毒研發 SARS 冠狀病毒疫苗

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2751-B-002-023-Y

執行期間：92年11月01日至93年10月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：楊雅倩

計畫參與人員：胡忠怡、張淑媛、楊文傑、林彥君、林佳蓉

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 1 月 17 日

中文摘要

關鍵詞：嚴重急性呼吸道症候群, 冠狀病毒, 腺病毒, 疫苗

嚴重急性呼吸道症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 為一具有高度傳染性和高致死率的新興疾病，致病原目前已知為一新型變種冠狀病毒，命名為 SARS 冠狀病毒(SARS-CoV)。由於目前對於 SARS 並無有效的治療方法，為免 SARS 再次爆發流行，因此疫苗的研發成為十分重要的工作。在以病毒當做載體設計的試驗性疫苗中，重組腺病毒能夠高量的表達蛋白質，並在許多病毒性疾病模式中，誘發中和性抗體及細胞免疫反應；而其感染人類後不引起嚴重疾病，使用上具有高安全性。另外，重組腺病毒因為能感染黏膜組織，所以能夠引發黏膜性免疫 (mucosal immunity)，對於藉由經黏膜感染的病毒疾病，可提供有效的保護效果。

本計畫利用 SARS-CoV 的棘蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)和外套蛋白(envelope, E)基因 建構重組腺病毒疫苗，目前已建構出三種重組腺病毒，分別為攜帶 S 基因(Adv/S)、帶有 M 及 E 基因(Adv/ME)和帶有 S、M 及 E 基因(Adv/SME)的三種重組腺病毒。此外，帶有 S、M 及 E 基因的 pShuttle 載體亦做為 DNA 疫苗。以質體 DNA 和重組腺病毒當做疫苗施打 BALB/c 小鼠，分別以僅施打重組腺病毒疫苗和先施打 DNA 疫苗再追加重組腺病毒疫苗的方式，在小鼠模式中比較以不同施打策略誘發之免疫反應。亦利用 E coli 表現之病毒抗原建立 ELISA 方法，和利用轉染 S、M、E 基因之細胞建立螢光免疫分析法，以檢測免疫後之小鼠體內有無引發 SARS-CoV 專一性抗體；並以脾臟細胞進行增生試驗，觀察免疫後小鼠體內 T 淋巴球反應的效果。

Abstract

Keywords: SARS, SARS-CoV, adenovirus, vaccine

The severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerged disease with high infectivity and morbidity. The causative agent for SARS has been identified as a novel coronavirus named SARS-CoV. Among the viral vectors used in vaccine design, recombinant adenovirus (ADV) is known for high-level protein expression and efficient induction of neutralizing antibody and/or cellular immunity in many virus diseases, yet only causes mild illness in humans. Besides, recombinant ADV vaccine can induce mucosal immunity, which can effectively protect host from viral diseases disseminated through mucosa.

In this study, we use the recombinant ADV as vector and three of SARS-CoV structure proteins, spike (S), membrane (M) and envelope (E), as targets to develop SARS vaccines. We have constructed three recombinant adenoviral vectors encoding S (Adv/S), M and E (Adv/ME), as well as S, M and E (Adv/SME), respectively. The pShuttle plasmids, which contain S, M or E genes, are used as DNA vaccines. Two immunization strategies, one-shot ADV vaccination and DNA/ADV prime-boost immunization regimen, are performed in BALB/c mice to compare their efficiency in inducing humoral and cellular immune responses. We are establishing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine anti-E, -M, and -S antibodies via *E coli*-expressing proteins and immunofluorescence assay (IFA) via 293A cells transfected with interested gene-carrying. On the other hand, the specific T cell response induced by vaccination will be determined by splenocyte proliferation test.

目 錄

內容	頁 碼
中文摘要	
英文摘要	II
目錄	III
前言	1
研究目的	3
研究方法	4
結果	6
討論	7
參考文獻	9
圖	12
表	28
計畫成果自評	30

前言

嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)為一具有高度傳染性和高致死率的新興疾病，2002年11月首先在大陸廣東省出現，2003年3月12日世界衛生組織(WHO)發出SARS全球警告¹。至2003年7月截止，總計29個國家和地區受到波及，感染人數8098人，死亡人數774人，死亡率9.5%(WHO)。台灣2003年3月14日發現第一個SARS病例，4月臺北市立和平醫院傳出第一宗集體感染SARS事件，之後在全臺灣擴散，直到2004年7月5日世界衛生組織宣佈台灣從SARS感染區除名。2004年9月18日衛生署疾病管制局對664個SARS可能病例重新篩選，扣除抗體皆陰性反應317病例，實際SARS病例為346例，存活人數273人，死亡人數73人(內含醫事人員7人)。

SARS的致病原已知為一新型變種冠狀病毒，命名為SARS冠狀病毒(SARS-CoV)^{2,3}，其在分類上屬於巢氏病毒目(Nidovirales)、冠狀病毒科(Coronaviridae)、冠狀病毒屬(Coronavirus)。冠狀病毒為具有外套(envelope)的正單股RNA病毒，在細胞質中進行複製，基因體長度介於27~32kb，是最大的RNA病毒，直徑在100-120nm之間，病毒顆粒多呈圓形，因為病毒外套上有棘蛋白的凸出，電顯下觀察病毒顆粒類似皇冠形狀，因此命名為冠狀病毒。SARS-CoV全基因體定序完成後，得知其全長29,727bp⁴，有11個開放讀碼區(open reading frame, ORF)，基因體結構具有典型的冠狀病毒特徵，5端有cap結構，3端有poly(A) tail，在5端和3端兩邊有非編碼序列(untranslated region, UTR)，從5端開始的三分之二為rep基因，由Orf1a和Orf1b轉譯出兩個多蛋白(polyprotein)，會由病毒自身的酵素切割為成熟蛋白質，包括RNA dependent RNA polymerase、helicase、3C-like protease、papain-like proteinase。基因體之下游三分之一則主要編碼四種結構蛋白，包括棘蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)、外套蛋白(envelope, E)和核衣殼蛋白(nuclear capsid, NC)。

SARS-CoV的S蛋白由1,255個氨基酸組成，分子量介於150~190kD之間，由S1和S2兩個domain組成，靠近N端的部分為S1，形成一個球狀的domain，靠近C端的部分為S2，形成一個穿膜區域，用來把整個棘蛋白固定在病毒外套上。S蛋白的S1具有跟宿主細胞上的受器進行結合的特性⁵，結合後由S2進行將病毒外套和細胞膜融合的作用，使病毒顆粒進入宿主細胞內，所以S蛋白決定了病毒所感染細胞的種類 (cell tropism)^{6,7}；另外S蛋白能引起中和性抗體的產生⁸。目前已知，angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)為SARS-CoV的主要受器^{9,10}，在S蛋白氨基酸318~510間則為跟ACE2結合之主要的domain¹¹，在有關S蛋白抗原決定基(epitope)和抗原性(antigenicity)的研究中，利用原核或真核細胞所表達的S蛋白皆能辨認SARS恢復期病人的抗體¹²，以S蛋白胜肽所產生的多株抗體也能辨認SARS-CoV¹³。M蛋白由221個氨基酸組成，分子量約26kD，是病毒顆粒含量最豐富的結構蛋白。E蛋白由76個氨基酸組成，分子量介於9~12kD，於病毒顆粒中含量最少。M蛋白和E蛋白都和病毒顆粒的組合(assembly)有關，NC蛋白和病毒核酸結合後便會和位於高爾基氏體和內質網上的M蛋白和E蛋白進行作用¹⁴，形成球形結構後，由M蛋白和E蛋白間的作用促使病毒顆粒的出芽(budding)^{15,16}，最後由M蛋白來決定出芽的位置。

腺病毒屬於腺病毒科(Adenoviridae)，為直線雙股DNA病毒，基因體長30~40kb，病毒顆粒為無外套膜、裸露的二十面體衣殼(capsid)，直徑65~85nm；人類腺病毒可分為6群(A~F)及47種血清型¹⁷，人類在自然狀態中最常接觸的為第二型和第五型腺病毒，並不引起嚴重的感染疾病。腺病毒的許多優點使它適合用來當做基因傳送載體，包括腺病毒被研究透徹，當其感染宿主細胞後，會以游離基因(episome)的形式存在於細胞中，並不嵌入宿主細胞染色體，因此可以短暫性的表現外來基因，而且具有高表現量；重組腺病毒載體感染細胞的範圍很廣，處於複製或非複製狀態的細胞均可被感染，因此其感染力極高；此外由於腺病毒十分穩定，因此在體外繁殖或操作時較能夠獲得高效價病毒。目前藉由分子轉殖技術可

將病毒致病基因去除，除了增加載體使用上的安全性，也可使重組腺病毒能夠攜帶較大容量的外來基因。本計畫所使用的病毒為 E1、E3 基因刪除的血清型第五型腺病毒，其中，E1 基因能夠引發病毒早期基因的啟動，進而促使病毒進行複製，而且具有溶解細胞的性質，所以在設計腺病毒載體時，將 E1 基因加以去除，形成了複製缺陷(replication-defective)的腺病毒；E3 基因主要功能為使腺病毒逃避宿主的免疫攻擊，並不會影響病毒的複製，所以藉由 E3 基因的刪除來增加插入基因的容量，在 E1 及 E3 基因刪除後，重組腺病毒能夠攜帶將近 7.5kb 的外來基因。

構築重組腺病毒時，首先將想要表達的基因轉殖入穿梭載體(shuttle vector)中，再將此穿梭載體和帶有腺病毒基因體的質體 DNA 進行同源互換(homologous recombination)，產生帶有外來基因的腺病毒載體。要產生具有感染力的病毒顆粒，則必須利用包裝細胞(packaging cell) 293 細胞株，其乃源自人類胚胎腎臟上皮細胞(human embryonic kidney epithelial cell)，染色體已嵌入腺病毒複製時所需的 E1 基因，將 E1、E3 基因刪除的重組腺病毒載體轉染至 293 細胞中，即可啟動腺病毒載體的複製，產生重組腺病毒顆粒，由於重組腺病毒缺少 E1 基因，所以感染寄主細胞後，不會大量複製而造成宿主細胞的傷害。目前重組腺病毒已被廣泛試驗作為疫苗的可行性，許多人類病毒性疾病包括 B 型肝炎病毒、單純皰疹病毒第一型¹⁸、EB 病毒¹⁹、呼吸道融合病毒²⁰、狂犬病毒²¹、輪狀病毒²²，和人類免疫不全病毒²³等已在動物模式上，包括小鼠(mice)、兔子(rabbits)及黑猩猩(chimpanzees)等來評估引發的免疫保護效果，研究發現：重組腺病毒幾乎都能夠引發中和抗體產生，對於某些病毒則亦能引發細胞免疫，另外，重組腺病毒因為能感染黏膜組織，所以還能引發黏膜性免疫，對於藉由黏膜感染的病毒疾病，提供了有效的保護效果。

SARS 目前並無有效的治療方法，然而，感染 SARS-CoV 的病患在 2~3 週後會產生 IgG 抗體²⁴，90% 的病人能夠自癒⁶，且施打 SARS 恢復期的病人血清能幫助病患的恢復，顯示人體可以針對此病毒產生抗體，且這些抗體具有中和病毒的效果，因此，發展 SARS-CoV 疫苗具有其前瞻性。冠狀病毒的 S 和 NC 蛋白能夠引起高效價的抗體反應，所以設計疫苗時常以這兩者為主，目前已有研究使用表現 S1、NC 和 M 蛋白之重組腺病毒載體來感染獼猴，結果在獼猴身上產生針對 S1 蛋白的中和抗體，以及針對 NC 蛋白的 T 細胞反應²⁵，表示重組腺病毒疫苗在猴子身上具有效用。Zeng 等人利用帶有各種 S 基因片段的 DNA 疫苗免疫老鼠，結果發現 S1 和 S2 能夠引發中和性抗體²⁶。也有利用 S 蛋白片段來免疫兔子和猴子，結果找到兩段具有強免疫性的蛋白片段(residues 788-820、residues 1002-1030)，提供了以合成之胜肽當作疫苗的可行性²⁷。另外的團隊則利用表現 NC 蛋白的 DNA 疫苗來免疫老鼠，結果能夠引起中和抗體和 T 細胞反應，而且有效的清除掉老鼠體內的 SARS-CoV²⁹。

發展 SARS 疫苗的困難之一就是尋找合適的動物模式來測試疫苗的效用，雖然 SARS-CoV 可在獼猴身上複製引起病變，不過獼猴具有成本太高且不易大量試驗的缺點，所以希望能以小動物如老鼠身上進行疫苗的評估。實驗證實 SARS-CoV 能夠在小鼠肺臟複製，而且老鼠產生的抗體能夠保護老鼠免於受到第二次的感染，注射恢復期老鼠的血清至未感染的老鼠身上可產生保護效果，所以老鼠可以當作 SARS-CoV 的動物模式，用來評估疫苗的效用，不過 SARS-CoV 不會引起老鼠病理上的症狀，所以無法進一步提供病理變化上的評估²⁹。

研究目的

本計畫以 SARS-CoV 的結構蛋白為疫苗設計基礎，首先要建構可表達 S、M、E 蛋白的重組腺病毒疫苗，如此，一次針對多個病毒基因來設計疫苗，用以研究 S、M、E 蛋白引起免疫反應的效果和強弱。重組腺病毒建構完成後，以小鼠為動物模式來評估疫苗效用，有研究指出：先施打 DNA 疫苗再追加重組腺病毒的免疫策略(prime-boost immunization)能夠有效增強 T 細胞的反應³⁰⁻³²；另外的研究指出，施打一次重組腺病毒的免疫方式(one shot immunization)即能在短時間內引起體液和細胞免疫，並且是保護性免疫反應；根據這些研究，疫苗施打設計以不同的策略，包括：prime-boost 和 one shot 免疫方式，經由小鼠肌肉注射途徑，來評估其疫苗效用，希望能夠在小鼠產生對抗病毒結構蛋白的專一性免疫反應。

研究方法

一、重組質體與重組腺病毒之建構

以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 將 S、M、E 基因分別從 pRSET A/S、pGEX-1 λ T/M、pGEX-1 λ T/E(SARS TW1 strain, 由陳培哲教授提供)等原核表現質體中切出,經由電泳確認切出之 DNA 大小後,將 DNA 片段從瓊脂膠中純化出來,連接至 pCA4 上。pCA4 上帶有 CMV promoter 和 SV40 polyA signal,利用特異性引子對(表一)進行 PCR,使擴增之 S、M、E 基因即帶有 CMV promoter 和 SV40 polyA signal,由於引子對上已設計了限制酶切位,所以 PCR 產物可以適當限制酶切割 (*Xba*I for S; *Xho*I for M; *Not*I for E)後,分別連接至 pShuttle 上,獲得重組質體 pShuttle/S、pShuttle/ME 及 pShuttle/SME,分別以限制酶圖譜及 DNA 定序方法確定其結構方向性與正確性。

將 pShuttle/S、pShuttle/ME、pShuttle/SME 以 *Pme*I 限制酶線性化後,分別跟帶有第五型腺病毒 DNA 的 AdEasy-1 質體以電穿孔轉型法共同轉型至 *E.coli* BJ5183 進行同源互換 (homologous recombination),經由 kanamycin 篩選得到 recombinants,挑到的 recombinants 命名為 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME,以 *Pac*I 及 *Bst*XI 之限制酶圖譜確定 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 的正確性,並以 S、M、E 基因之特異性引子對(表二)個別進行 PCR,確認帶有轉殖之基因,將 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 以 *Pac*I 限制酶線性化後,轉染至 293A 細胞,7~10 天後即可獲得第一代重組腺病毒,以顯微鏡觀察 293A 細胞出現腺病毒典型細胞病變,並以螢光染色腺病毒為陽性結果,得到的重組腺病毒命名為 Adv/S、Adv/ME、Adv/SME。再經由第二代及第三代大量培養及純化可得到高效價病毒液,並利用溶菌斑試驗定出其效價。

二、以大腸桿菌表現 S、M、E 蛋白

以原核系統表現 S、M、E 蛋白,做為建立 ELISA 的抗原。利用 pGEX-1 λ T/E 質體在 *E.coli* BL21 表達 E 蛋白,其為 N 端帶有 GST 蛋白之 GST-E 融合蛋白,先以 Coomassie blue 染色和西方墨點法確認 GST-E 蛋白之表達,再以 anti-E 之特異性抗體,確認純化之 E 蛋白的正確性。pGEX-1 λ T/M 質體的 M 蛋白為 N 端帶有 GST 蛋白之 GST-M 融合蛋白,分別以 Coomassie blue 染色和西方墨點法分析。pRSET A/S 質體的 S 蛋白為 N 端帶有 6 個 Histidine 之融合蛋白,以 Coomassie blue 染色和西方墨點法確認 S 蛋白之表達。

三、以哺乳動物細胞表現 S、M、E 蛋白

將轉染 pShuttle/S、pShuttle/ME 或 pShuttle/SME 的 293A 細胞以及感染 Adv/S、Adv/ME、Adv/SME 的 293A 細胞,以西方墨點法分析三種蛋白的表現。除此之外,以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)以及螢光免疫分析法 (immunofluorescence assay, IFA)分別偵測 RNA 和蛋白質的表現。首先將 pShuttle/S、pShuttle/M、pShuttle/E、pShuttle/ME、pShuttle/SME 等質體轉染至 293A 細胞,分別轉染 24 和 48 小時,收取細胞、萃取 RNA 並進行 RT,所得之 cDNA 產物分別針對 S、M、E 基因以適當引子對(表二)進行 PCR,最後以電泳觀察結果。另一方面將 pShuttle、pShuttle/M 轉染至 Vero E6 細胞,培養 24 小時和 48 小時,收取細胞後以丙酮固定在玻片上進行 IFA,以 rabbit anti-M serum 當作一級抗體, FITC-conjugate goat anti-rabbit Ab 當作二級抗體,最後在螢光顯微鏡下觀察 Vero E6 細胞表現 M 蛋白的情形。

四、小鼠免疫實驗

小鼠免疫包括施打 DNA prime-Adv boost 和 Adv one shot 之實驗。所有老鼠在施打疫苗前一日先抽血當作免疫前的檢體。將 16 隻 8 週大的 Balb/c 雌鼠分為二組,1 至 8 號為 Adv one shot 組,9 至 16 號為 prime-boost 組,其中 1 至 4 號、9 至 12 號為實驗組,其餘為對照組。Adv one shot 組的病毒施打時間為第 0 週;prime-boost 組的 DNA 施打時間為第 0、2、

4 週，病毒施打時間為第 8 週。Adv one shot 組的老鼠採血時間為病毒施打前 1 日(day-1)，以及第 2、4、6、8、10、12 週；prime-boost 組的老鼠採血時間為 DNA 以及病毒施打前 1 日(day-1；day55)，以及第 3、5、7、9、12 週。

五、建立檢測 Anti-E 抗體之 ELISA 方法

利用大腸桿菌表現之 GST-E 融合蛋白為抗原建立 ELISA 方法，用以檢測免疫後之老鼠血清裡 anti-E 抗體之效價。ELISA 方法先以 mouse anti-GST 單株抗體、rabbit anti-E 抗血清當作一級抗體，HRP labeled anti-mouse (或 anti-rabbit) IgG 當作二級抗體，測試 ELISA 之實驗條件。

結果

一、重組質體與重組腺病毒之建構

從 pRSET A/S、pGEX-1 λ T/M、pGE-1 λ T/E 等原核表現質體中經酵素切割後獲得 S、M、E 三段 DNA 片段 (圖一)，連接至 pCA4 上獲得 pCA4/S、pCA4/M、pCA4/E (圖二)。再經特異性引子對做 PCR，得出帶有 CMV promoter 和 SV40 polyA signal 之 S、M、E 基因轉錄單位，連接至 pShuttle 上得到 pShuttle/S、pShuttle/ME (基因表達方向由 M→E)、pShuttle/SME (基因表達方向由 S→M→E) 等質體(圖三)，以限制酶圖譜確定 pShuttle/S、pShuttle/ME、pShuttle/SME 的正確性(圖四)，S、M 及 E 基因亦經 DNA 定序分析確認無誤。

pShuttle/S、pShuttle/ME、pShuttle/SME 分別跟 AdEasy-1 質體進行同源互換後，挑到的重組質體分別命名為 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME，以限制酶圖譜確定其正確性(圖五)，個別進行 PCR 確認帶有轉殖之基因 (圖六)。將 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 轉染至 293A 細胞，以顯微鏡觀察，發現 293A 細胞出現腺病毒典型細胞病變(圖七)，以螢光染色顯示腺病毒抗原為陽性結果，於是得到第一代重組腺病毒 Adv/S、Adv/ME 及 Adv/SME。另外以相同方式建構出對照組質體及腺病毒，分別為 pShuttle/CMV 與 Adv/GFP。

Adv/S 及 Adv/ME 經大量製備所得病毒液其效價可達到 10^9 PFU/mL，而 Adv/GFP 之效價可達 10^{10} PFU/mL (圖八)。

二、以大腸桿菌表現 S、M、E 蛋白

以 Coomassie blue 染色和使用 anti-GST 單株抗體之西方墨點法確認 pGEX-1 λ T/E 質體上 GST-E 融合蛋白在 E.coli BL21 之表達，再以免子 anti-E 抗血清進行西方墨點法分析，測得之蛋白質分子量符合預測之大小(圖九、十)。以相同方法確認 pRSET A/S 質體中 S 蛋白在 E.coli BL21 之表達 (圖十一、十二)。而 pGEX-1 λ T/M 質體中 GST-M 融合蛋白之表達情形不佳。

三、以哺乳動物細胞表現 S、M、E 蛋白

轉染 pShuttle/S、pShuttle/ME、pShuttle/SME 的 293A 細胞以西方墨點法分析，目前尚無偵測到 S、M、E 蛋白的表達。感染 Adv/S、Adv/ME、Adv/SME 的 293A 細胞以西方墨點法分析，發現在感染 Adv/ME 的細胞中，M 蛋白可被 SARS 恢復期病人血清辨識，分子量符合預測之大小(圖十三)。以 RT-PCR 偵測 RNA 的表現結果，發現在 pShuttle/M、pShuttle/ME、pShuttle/SME 三種質體中的 M 基因在 293A 細胞內均有 RNA 之表現(圖十四)。將轉染 pShuttle、pShuttle/M 的 Vero E6 細胞進行免疫螢光染色，發現細胞明顯表達出 M 蛋白(圖十五)。

四、小鼠免疫實驗

已完成兩回小鼠之 DNA prime-Adv boost 及 Adv one shot 免疫實驗，第一回 Adv one shot 組施打之重組腺病毒為 Adv/S + Adv/ME，prime-boost 組施打之 DNA 疫苗為 pShuttle/S + pShuttle/ME 重組腺病毒為 Adv/S + Adv/ME。第二回 Adv one shot 組施打之重組腺病毒為 Adv/SME，prime-boost 組施打之 DNA 疫苗為 pShuttle/SME 重組腺病毒為 Adv/SME。所有老鼠在施打疫苗前一日抽血當作免疫前檢體並完成所有實驗期間 (十二週) 所有血液檢體之收集。

五、建立檢測 Anti-E 抗體之 ELISA 方法

利用大腸桿菌表現 GST-E 融合蛋白建立之 ELISA 方法，初步利用 mouse anti-GST 單株抗體及 rabbit anti-E 抗血清當作一級抗體來設定實驗條件，由結果發現所測試的 mouse anti-GST Ab 稀釋倍率，針對所吸附之 GST-E 融合蛋白的 O.D.₄₅₀ 讀值具有線性關係(圖十六)。

討論

本計畫以腺病毒為載體，一次表現一個或多個 SARS-CoV 結構蛋白，希望能在小鼠體內誘發具保護性的免疫反應。選擇重組腺病毒為載體的主要因為，重組腺病毒疫苗除了能夠有效引起體液免疫和細胞免疫外，而且能引起黏膜性免疫反應，因此，對於以呼吸道感染 SARS-CoV 來說，假設能產生黏膜性免疫反應，便能在病毒進入黏膜前將病毒中和，早期阻斷病毒的感染，提供更好的保護效果。之前的研究成果指出，先施打 DNA 疫苗，再追加重組腺病毒(prime-boost)的策略能夠有效增強 T 細胞的反應³⁰⁻³²。而其他的研究則指出，施打一次重組腺病毒(one shot)的方式即能於短時間引起體液和細胞免疫反應，且具有保護的效果³³。根據這些研究，本實驗以施打一劑重組腺病毒疫苗或先施打 DNA 疫苗，再追加一劑重組腺病毒疫苗的方式，來評估不同免疫策略的效用。

目前已建構出攜帶 S 基因、帶有 M 和 E 基因和帶有 S、M 和 E 基因的三種重組腺病毒載體。雖然在細胞轉染實驗中，轉染 pShuttle/S、pShuttle/ME 或 pShuttle/SME 的 293A 細胞以西方墨點法分析時，目前尚無法偵測到 S、M、E 蛋白質的表達，但是在以 Adv/ME 重組腺病毒感染細胞中，卻可以利用 SARS 恢復期的病人血清偵測到病毒蛋白的存在。細胞轉染實驗無法偵測到病毒蛋白的可能原因有二，(1) 選用的 293A 細胞並不適合表達 S、M、E 蛋白，目前已改用其他細胞，例如 Vero E6 來進行轉染實驗，由於 Vero E6 細胞為 SARS-CoV 體外培養的細胞株，希望能改善表達不佳的情形；(2) M 和 E 蛋白都是屬於疏水性極高的膜蛋白，其中 M 蛋白穿膜三次，E 蛋白三分之二的部分嵌在膜裡。假如蛋白萃取液不能破壞膜結構使得 M 和 E 蛋白包覆在膜結構裡，便無法被抗體辨識，可能須藉由膜蛋白分離技術，先將膜蛋白從膜中萃取出來，再行偵測。

由於 Adv/SME 重組腺病毒帶有三個連續轉錄單位以表達 S、M、E 蛋白，在進行表達時，蛋白質的表達能力都有可能因為插入基因的順序或因為同時啟動 mRNA 的轉錄而產生排擠作用，影響到表達出的蛋白量，之後建立的偵測方法必須對於 Adv/SME 重組腺病毒的表達情形進行評估。

目前已經完成免疫小鼠的工作，採集的血清將以 ELISA 和 IFA 分析對抗 SARS-CoV 之 S、M 和 E 蛋白的特異性抗體。由於最近的研究指出，感染 SARS 之恢復期病人的血清，能夠辨認合成之 SARS-CoV 蛋白質之胜肽 (peptide)，包括 Orf1a、Orf1b、NC、S、M 和 E³⁴。因此我們以原核系統表達的 S、M 和 E 蛋白來評估免疫小鼠體內抗體產生的情形。收集到的老鼠血清將以大腸桿菌 (BL21/DE3) 表達出的 S、M、E 蛋白當做抗原，利用 ELISA 來定量老鼠體內的抗體力價。除了體液免疫反應，我們也將分析免疫小鼠體內的細胞免疫反應，如 T 細胞增生反應和細胞內激素測定。這部分我們仍在測試實驗條件，在細胞增生反應和細胞內激素測定中，刺激的抗原為合成之胜肽或大腸桿菌表達的抗原，以胜肽刺激的好處是其為預測的抗原上突(epitope)，能直接測試 T 細胞對於抗原上突產生的反應，不過缺點是合成的胜肽只包含到某部分蛋白區域而無法含括全區的蛋白，無法偵測到沒預測到的蛋白片段。而細菌表達的抗原雖然具有整段完整的蛋白，不過缺點是無法完整的刺激 T 細胞。

了解 SARS 的免疫保護機轉對於成功發展出安全而有效的 SARS 病毒疫苗是非常有幫助的。研究指出，感染 SARS-CoV 的病患在 2~3 週後會產生 IgG 抗體²⁴，而 90% 的病人能夠自癒²，雖然目前還不太清楚感染所誘發的免疫能力是如何保護宿主，不過由於在恢復期病人之血清能測到中和抗體的存在，這代表中和抗體的產生應該在 SARS-CoV 的清除上扮演十分重要的角色。另一方面，毒殺性 T 細胞具有清除掉細胞內病原的能力，對於一般病毒感染疾病而言，能提供較高的保護性。不過在 SARS 病患卻可能是造成嚴重病理性傷害的

原因。例如在 SARS 病患病程發展到後期，強烈的免疫反應使肺部出現瀰散性肺泡傷害 (diffuse alveolar damage)，這傷害與毒殺性 T 細胞的關聯，尚待進一步的實驗來證實。在其他冠狀病毒中，產生的細胞免疫和體液免疫反應有時會加重疾病的惡化，在疫苗的設計上，這也是必須要小心的地方。在其他動物之冠狀病毒的研究中，發現 T 細胞反應對於 murine hepatitis virus (MHV) 的初次感染是具有保護性的，但是再次感染到 MHV 時，會發現特異性的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 細胞會引起病毒性脫髓鞘 (demyelination)，進而損傷大腦和脊髓。而在 feline infectious peritonitis virus (FIPV) 的動物模式，已具有特異性抗體的貓被重複感染後，出現嚴重的病變，甚至造成死亡。至於 SARS-CoV 會不會有此種情況的產生，目前還不清楚。綜上得知，在確立了疫苗所引發的免疫反應後，這些預期應該產生保護性的免疫反應，是否反而造成更嚴重的危害，在之後的疫苗試驗中都是必須謹慎評估的。

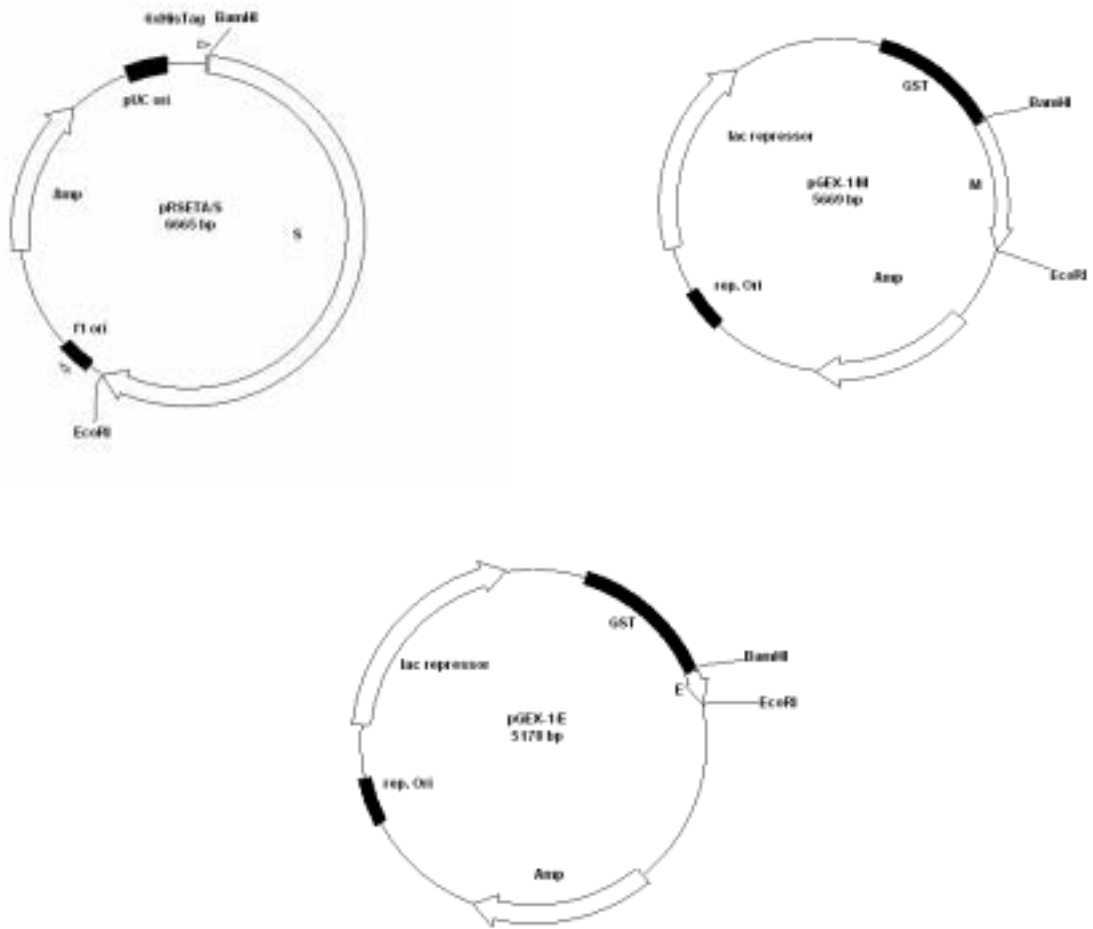
參考文獻

1. Peiris JS. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *J Clin Virol* 2003;**28**(3):245-7.
2. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;**348**(20):1953-66.
3. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;**300**(5624):1394-9.
4. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003;**300**(5624):1399-404.
5. Suzuki H, Taguchi F. Analysis of the receptor-binding site of murine coronavirus spike protein. *J Virol* 1996;**70**(4):2632-6.
6. Hingley ST, Leparc-Goffart I, Weiss SR. The mouse hepatitis virus A59 spike protein is not cleaved in primary hepatocyte and glial cell cultures. *Adv Exp Med Biol* 1998;**440**:529-35.
7. Sanchez CM, Izeta A, Sanchez-Morgado JM, et al. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol* 1999;**73**(9):7607-18.
8. Fleming JO, Stohlman SA, Harmon RC, Lai MM, Frelinger JA, Weiner LP. Antigenic relationships of murine coronaviruses: analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus. *Virology* 1983;**131**(2):296-307.
9. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;**426**(6965):450-4.
10. Hofmann H, Geier M, Marzi A, et al. Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**319**(4):1216-21.
11. Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 2004;**279**(5):3197-201.
12. Ho TY, Wu SL, Cheng SE, Wei YC, Huang SP, Hsiang CY. Antigenicity and receptor-binding ability of recombinant SARS coronavirus spike protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**313**(4):938-47.
13. Chang MS, Lu YT, Ho ST, et al. Antibody detection of SARS-CoV spike and nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**314**(4):931-6.

14. Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* 1980;**33**(1):449-62.
15. Godet M, Grosclaude J, Delmas B, Laude H. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J Virol* 1994;**68**(12):8008-16.
16. Yokomori K, Lai MM. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J Virol* 1992;**66**(10):6194-9.
17. Ginsberg HS. The ups and downs of adenovirus vectors. *Bull N Y Acad Med* 1996;**73**(1):53-8.
18. Witmer LA, Rosenthal KL, Graham FL, Friedman HM, Yee A, Johnson DC. Cytotoxic T lymphocytes specific for herpes simplex virus (HSV) studied using adenovirus vectors expressing HSV glycoproteins. *J Gen Virol* 1990;**71** (Pt 2):387-96.
19. Duraiswamy J, Bharadwaj M, Tellam J, et al. Induction of therapeutic T-cell responses to subdominant tumor-associated viral oncogene after immunization with replication-incompetent polyepitope adenovirus vaccine. *Cancer Res* 2004;**64**(4):1483-9.
20. Hsu KH, Lubeck MD, Davis AR, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5, and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. *J Infect Dis* 1992;**166**(4):769-75.
21. Prevec L, Campbell JB, Christie BS, Belbeck L, Graham FL. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis* 1990;**161**(1):27-30.
22. Both GW, Lockett LJ, Janardhana V, et al. Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. *Virology* 1993;**193**(2):940-50.
23. Natuk RJ, Lubeck MD, Chanda PK, et al. Immunogenicity of recombinant human adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;**9**(5):395-404.
24. Gang Li XCAX. Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *n engl j med* 2003;**349**:5.
25. Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003;**362**(9399):1895-6.

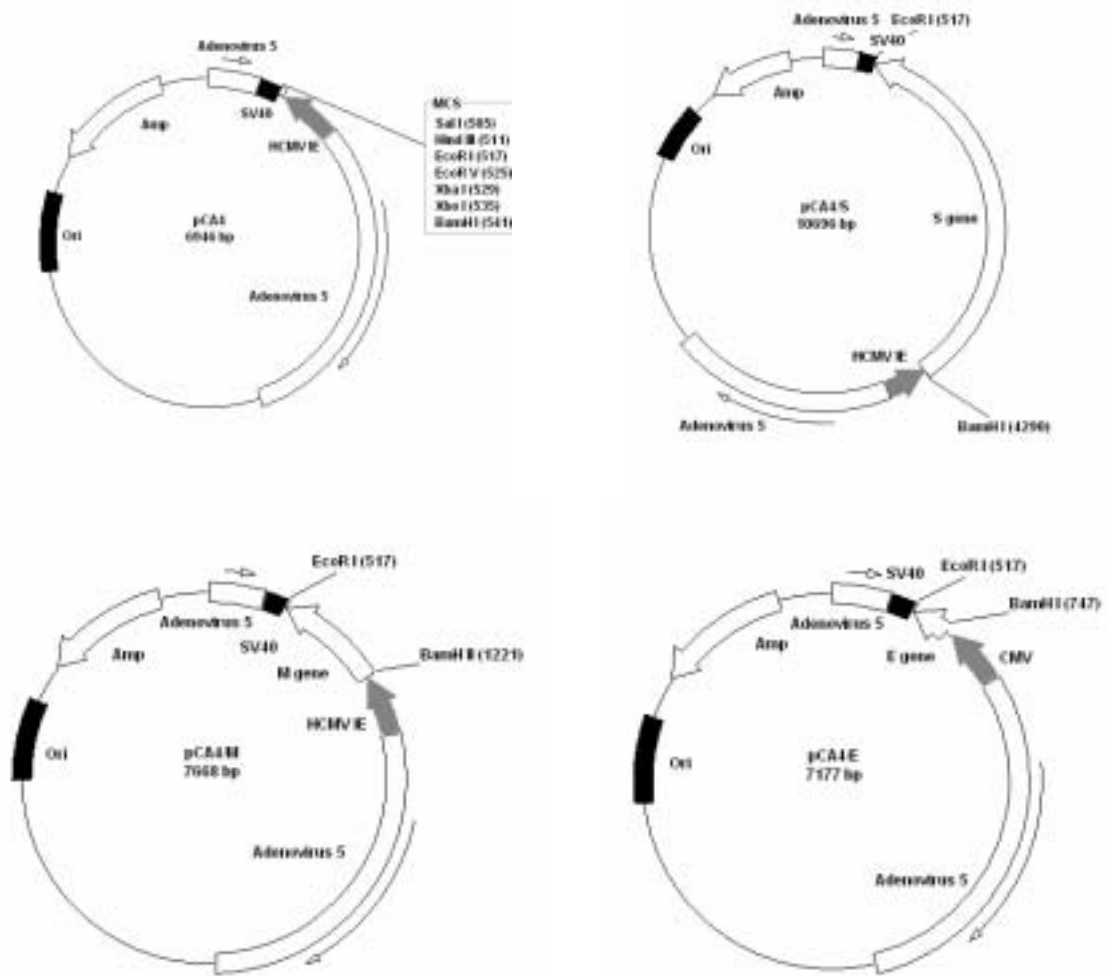
26. Zeng F, Chow KY, Hon CC, et al. Characterization of humoral responses in mice immunized with plasmid DNAs encoding SARS-CoV spike gene fragments. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**315**(4):1134-9.
27. Choy WY, Lin SG, Chan PK, et al. Synthetic Peptide Studies on the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Glycoprotein: Perspective for SARS Vaccine Development. *Clin Chem* 2004;**50**(6):1036-1042.
28. Kim TW, Lee JH, Hung CF, et al. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2004;**78**(9):4638-45.
29. Subbarao K, McAuliffe J, Vogel L, et al. Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. *J Virol* 2004;**78**(7):3572-7.
30. Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, et al. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* 2002;**20**(7-8):1039-45.
31. Matsui M, Moriya O, Akatsuka T. Enhanced induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes and protective efficacy in mice by DNA vaccination followed by adenovirus boosting in combination with the interleukin-12 expression plasmid. *Vaccine* 2003;**21**(15):1629-39.
32. Park SH, Yang SH, Lee CG, Youn JW, Chang J, Sung YC. Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine* 2003;**21**(31):4555-64.
33. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 2003;**424**(6949):681-4.
34. Guo JP, Petric M, Campbell W, McGeer PL. SARS coronavirus peptides recognized by antibodies in the sera of convalescent cases. *Virology* 2004;**324**(2):251-6.
35. 楊文傑 · 建構嚴重急性呼吸道症候群病毒之重組腺病毒疫苗 · 2004 年 · 碩士論文

圖



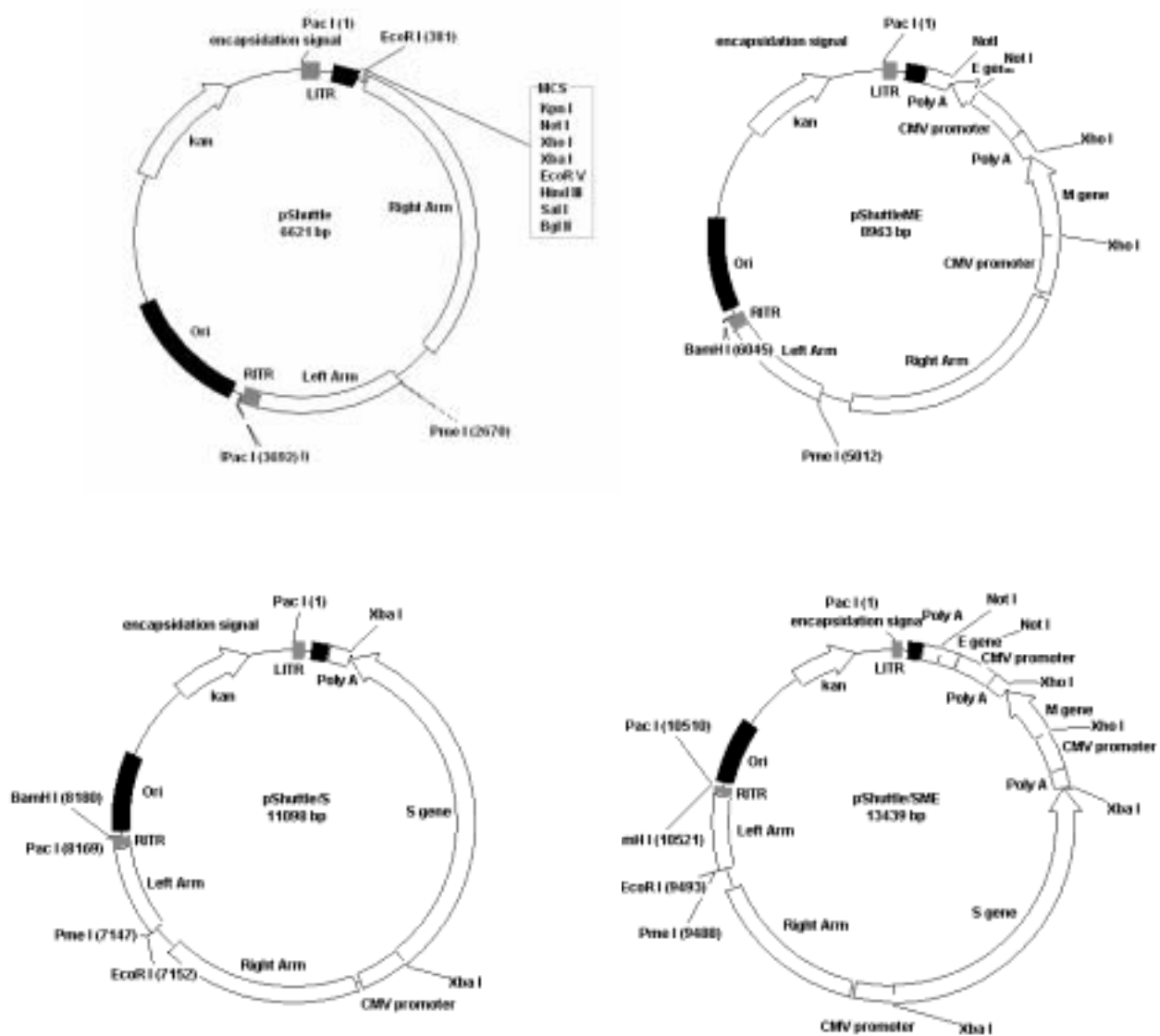
圖一、pRSETA/S、pGEX-1 λ T/M及pGEX-1 λ T/E質體

原核表現質體上分別帶有 SARS TW1 strain spike (pRSETA/S)、membrane (pGEX-1 λ T/M) 或 envelope 基因 (pGEX-1 λ T/E)。〔此三個質體由台大醫學院 陳培哲教授提供〕



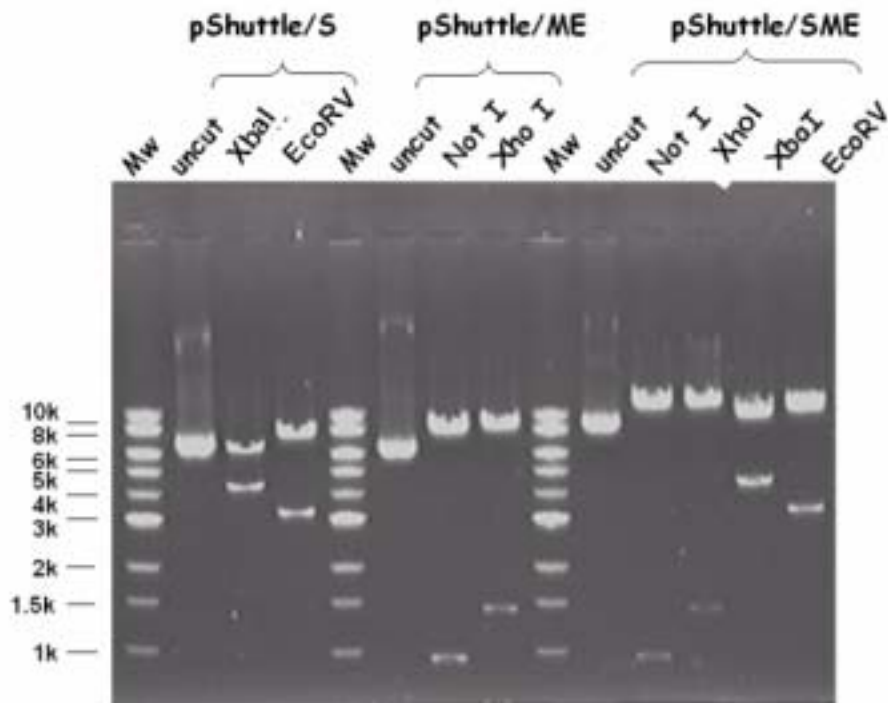
圖二、pCA4、pCA4/S、pCA4/M 及 pCA4/E 質體

pCA4 為帶有 CMV promoter 和 SV40 polyA signal 的真核表現質體，以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 將 S、M、E 基因分別嵌進 pCA4，得到 pCA4/S、pCA4/M 及 pCA4/E 重組質體。



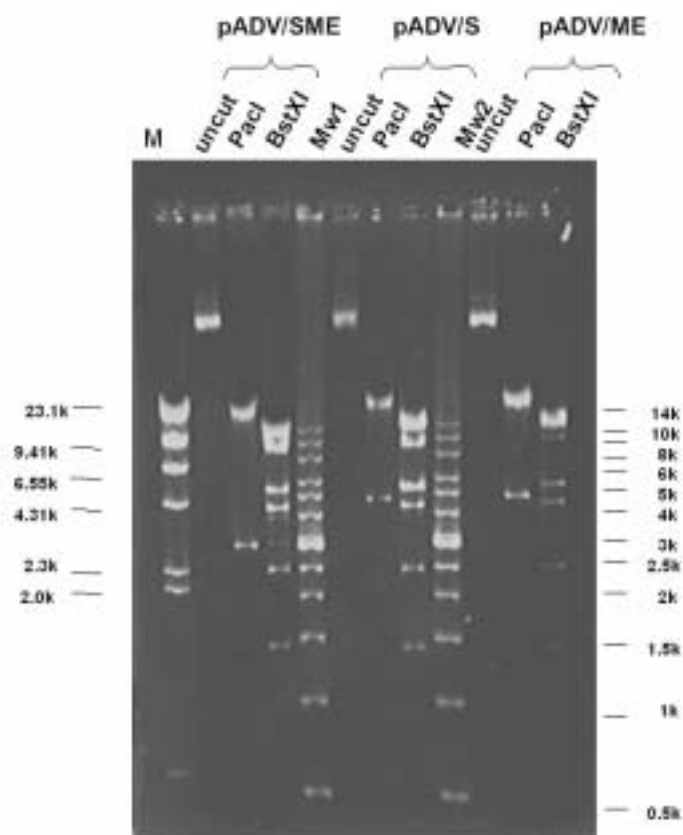
圖三、pShuttle、pShuttle/S、pShuttle/ME、pShuttle/SME 質體

將帶有 CMV promoter 和 SV40 polyA signal 之 S、M、E 基因之 PCR 產物分別以引子對上的限制酶切割(*Xba*I for S；*Xho*I for M；*Not*I for E)後再連接至 pShuttle 質體。



圖四、以限制酶圖譜確定 pShuttle/S、pShuttle/ME 及 pShuttle/SME 的正確性
 pShuttle/S 以 XbaI 和 EcoRV 進行確認，pShuttle/ME 以 XhoI、NotI 進行確認，pShuttle/SME
 以 XbaI、XhoI、NotI 進行確認，切出片段之大小符合預期結果(如下表)。

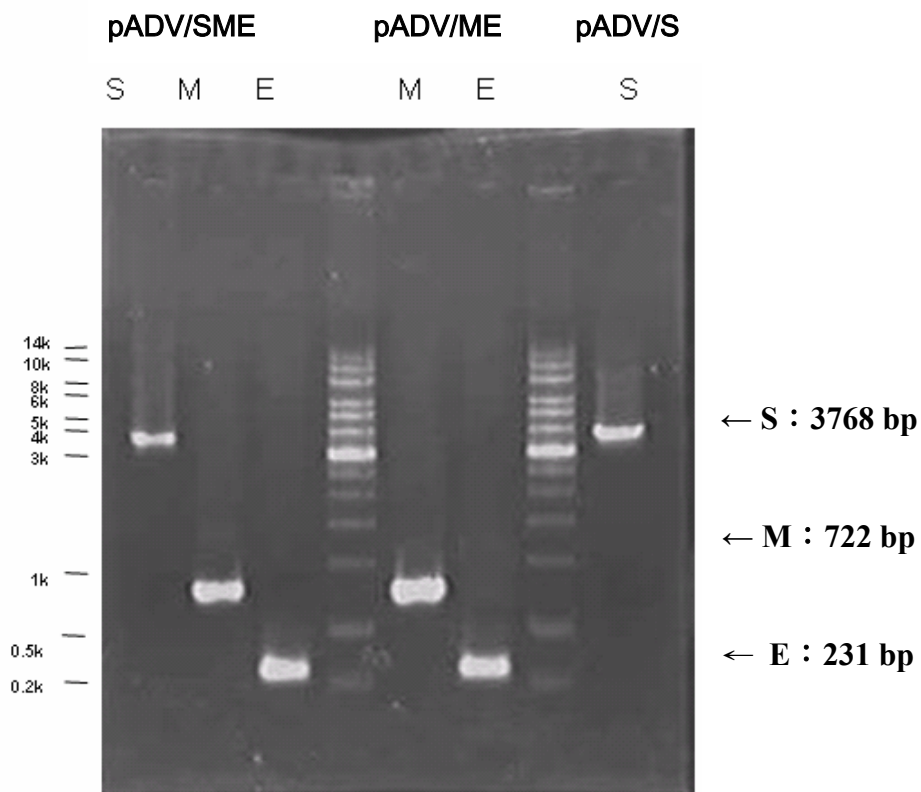
	pShuttle/S	pShuttle/ME	pShuttle/SME
Uncut	11098 bp	8963 bp	13439 bp
XbaI	6693, 4405bp	-	9034, 4405bp
XhoI	-	7604, 1359bp	12080, 1359bp
NotI	-	8095, 868bp	12571, 868bp
EcoRV	7712, 3386bp	-	10053, 3386 bp



圖五、以 PacI、BstXI 圖譜確定 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 的正確性

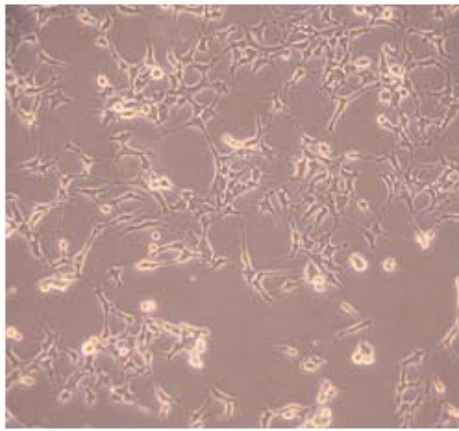
將 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 分別以 PacI、BstXI 限制酶切割，切出之 DNA 大小片段符合預期之大小(如下表)。

Plasmid	限制酶	預期之 DNA 片段大小(bp)
pADV/SME	BstXI	11921, 13201, 5251,4117, 4254, 2379, 1399
pADV/S	BstXI	11921, 10860, 5251, 4254,4117, 2379, 1399
pADV/ME	BstXI	11921, 12842, 5251, 4254, 2379, 1399
pADV/SME	PacI	41000, 3000
pADV/S	PacI	39000, 4500
pADV/ME	PacI	37000, 4500

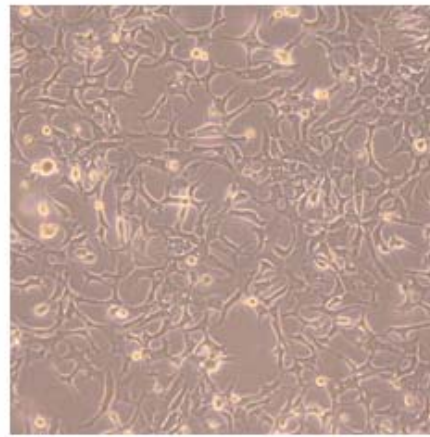


圖六、以 PCR 確定 pADV/S、pADV/ME、pADV/SME 帶有 S、M、E 基因

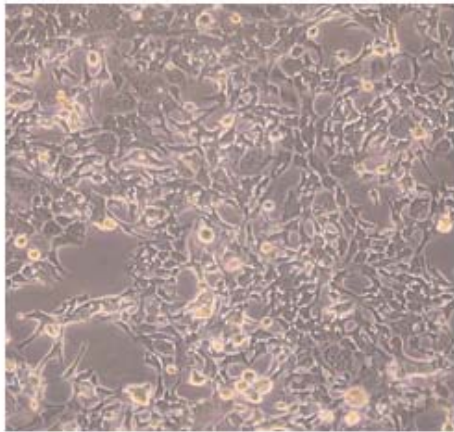
以專一性引子對 (表二) 進行 PCR，從 pADV/S、pADV/ME 和 pADV/SME 可擴增出 S 基因 (3768 bp)、M 基因 (722 bp) 及 E 基因 (231 bp)。



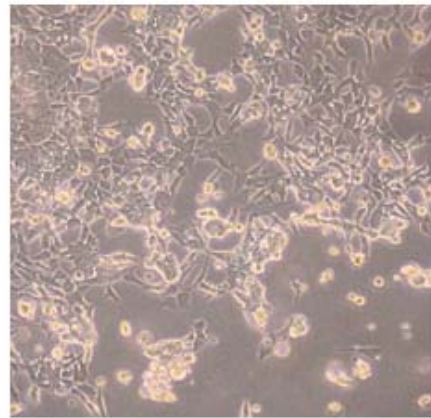
a



b



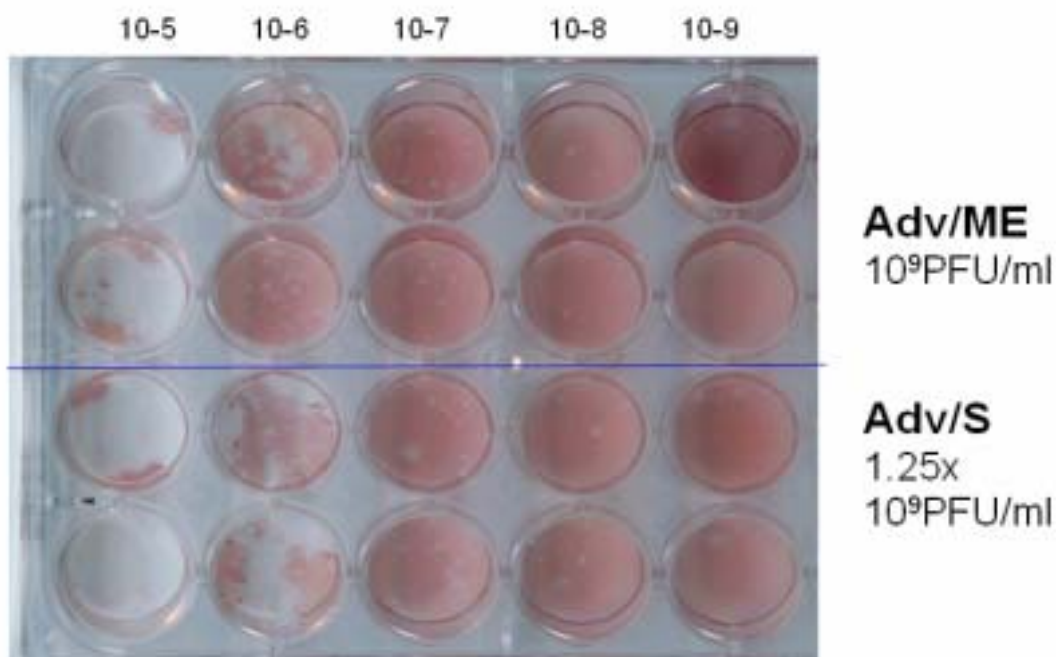
c



d

圖七、轉染重組腺病毒 DNA 後，以倒立顯微鏡觀察 293A 細胞出現腺病毒典型葡萄狀細胞病變(100 X)

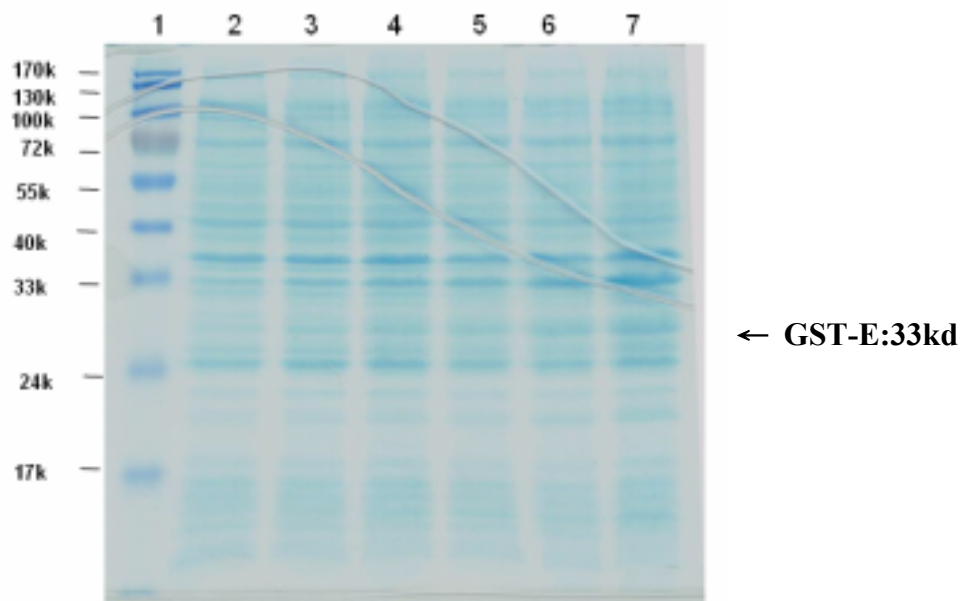
(a) 轉染第 0 天；(b) 轉染後第 4 天；(c) 轉染後第 7 天；(d) 轉染後第 8 天



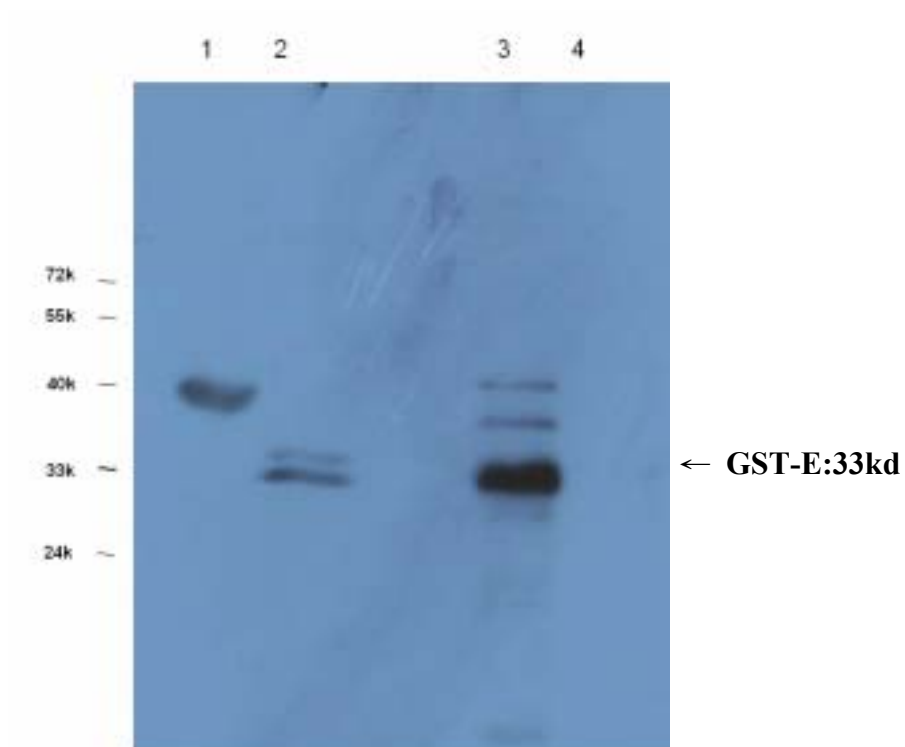
圖八、大量製備的重組腺病毒以溶菌斑試驗定量之結果

病毒稀釋倍數為 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} ，計數溶菌斑(plaques)數目，計算得到 Adv/ME 病毒力價為 10^9 PFU/mL，Adv/S 病毒力價為 1.25×10^9 PFU/mL。下表為所放大之病毒總量。

Virus	Date	Virus titer
Adv/ME	2004/05/20	1.6×10^8 PFU/0.5mL
	2004/06/18	8×10^9 PFU/1.5mL
Adv/S	2004/05/20	5×10^5 PFU/1mL 6×10^9
	2004/06/18	PFU/1.5mL
Adv/GFP	2004/05/20	10^8 PFU/1mL

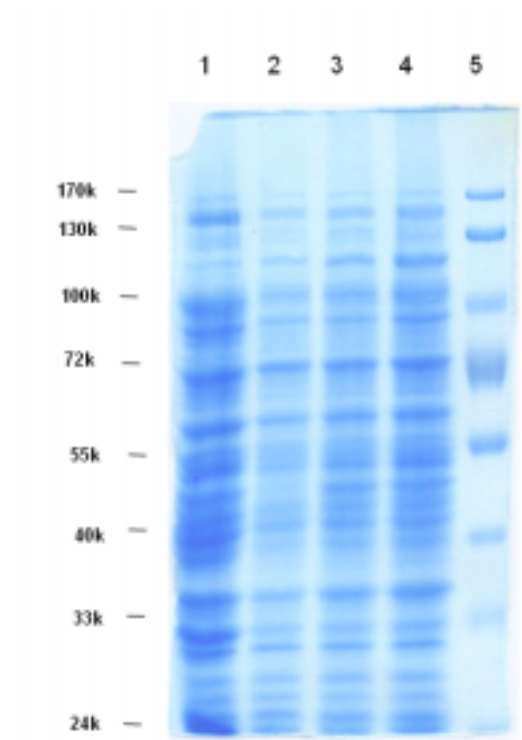


圖九、以 Coomassie blue 染色分析大腸桿菌(BL21/DE3)誘導 GST-E 融合蛋白表現結果
 當細菌生長至 $O.D_{600}=0.6$ 時，於 25°C 加入 IPTG 使最終濃度為 0.5mM ，每隔 1 小時收集菌液分析。 lane 1: protein markers ; lane 2: uninduced bacterial pellet; lane 3: induced 1hr bacterial pellet; lane 4: induced 2hr bacterial pellet; lane 5: induced 3hr bacterial pellet; lane 6: induced 4hr bacterial pellet; lane 7: induced 5hr bacterial pellet。



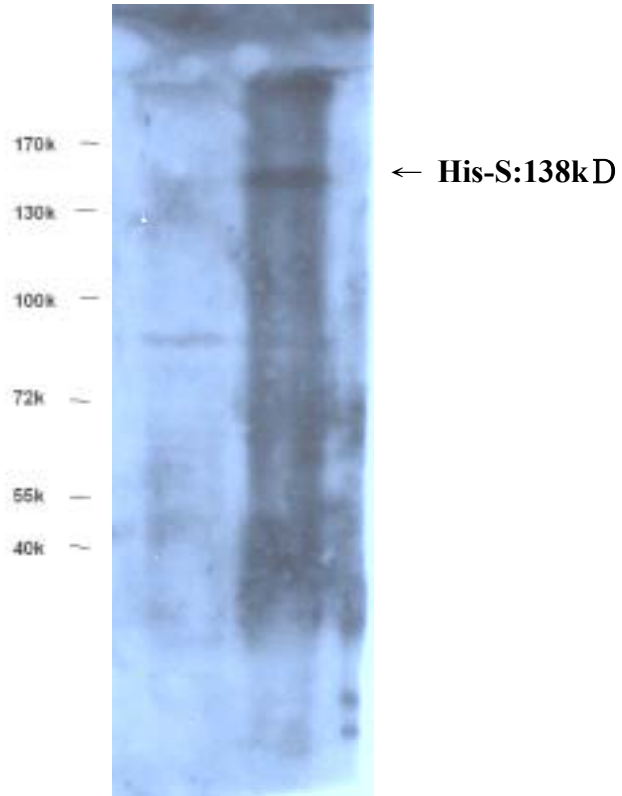
圖十、以 anti-GST 抗體和兔子 anti-E 血清確認純化之 GST-E 融合蛋白

lane 1,4: uninduced bacterial pellet, lane 2,3: eluted GST-E protein。Lane 1,2 之一級抗體為 anti-GST Ab (1:5000 稀釋)，二級抗體為 HRP labeled anti-mouse IgG (1:5000 稀釋)。Lane 3,4 之一級抗體為 rabbit anti-E antiserum (1:1000 稀釋)，二級抗體為 HRP labeled anti-rabbit IgG (1:5000 稀釋)。



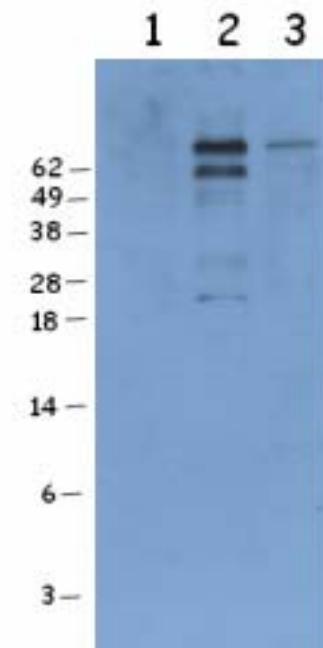
圖十一、以 Coomassie blue 染色分析大腸桿菌(BL21)誘導 S 蛋白表現結果

當細菌生長至 $O.D._{600}=0.6$ 時，於 37°C 加入 IPTG 使最終濃度為 0.5mM ，每隔 1 小時收集菌液分析。 lane 1: uninduced bacterial pellet; lane 2: induced 1hr bacterial pellet; lane 3: induced 2hr bacterial pellet; lane 4: induced 3hr bacterial pellet; lane 5:protein markers。



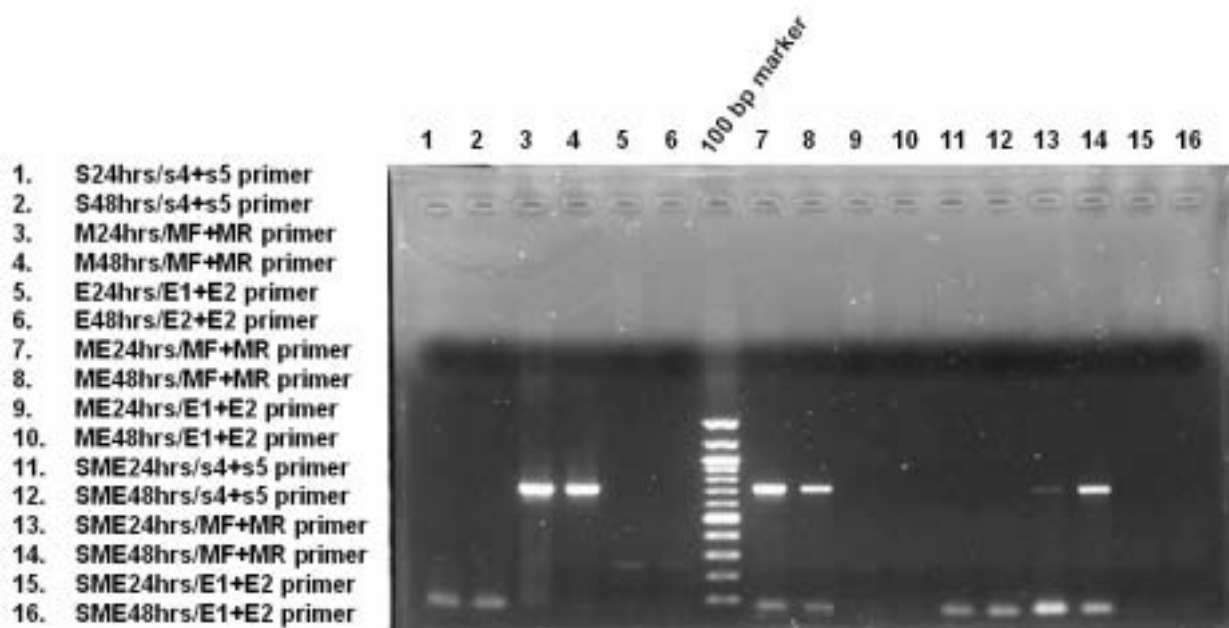
圖十二、以西方點墨法偵測 S 蛋白表現結果

lane 1: uninduced bacterial pellet ; lane 2: induced 3hr bacterial pellet 。 一級抗體為 rabbit anti-S antiserum (1:4000 稀釋) ， 二級抗體為 HRP labeled anti-rabbit IgG (1:5000 稀釋) 。



圖十三、以西方墨點法分析 Adv/ME 於感染細胞之 M 及 E 蛋白表現

lane 1: non infected 293A cell; lane 2:Adv/ME infected 293A, 48hr; lane 3:Adv/GFP infected 293A, 48hr。一級抗體為 SARS 病人恢復期血清 (1:1000 稀釋)，二級抗體為 HRP labeled anti-human IgG (1:5000 稀釋)。

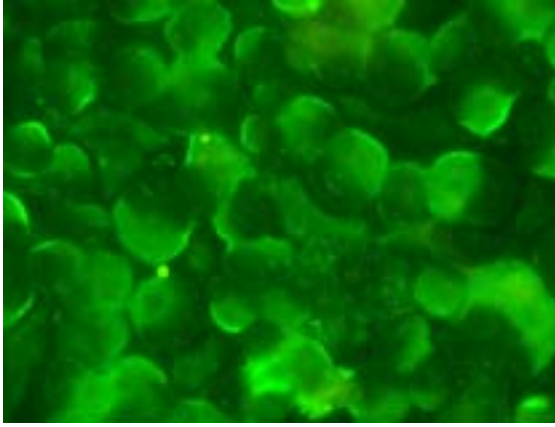


Two step RT-PCR:

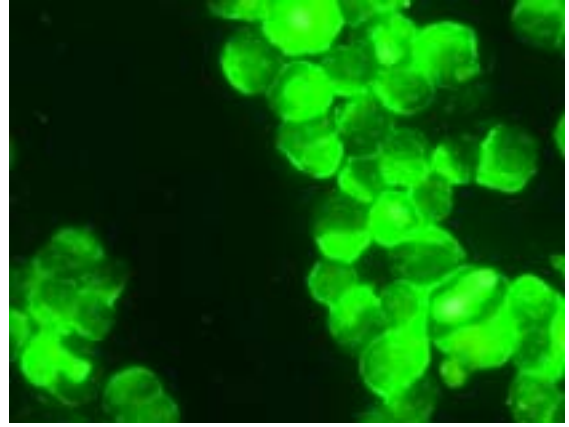
1. Use 3 μ g total RNA in synthesizing first-strand cDNA (with M-MLV RT (H-))
2. Use 2 μ L of the first-strand cDNA reaction in PCR
3. Check PCR product: 1/5 volume of PCR reaction

圖十四、以 RT-PCR 偵測轉染各重組質體之 293A 細胞 S、M 及 E 基因的表現結果

A

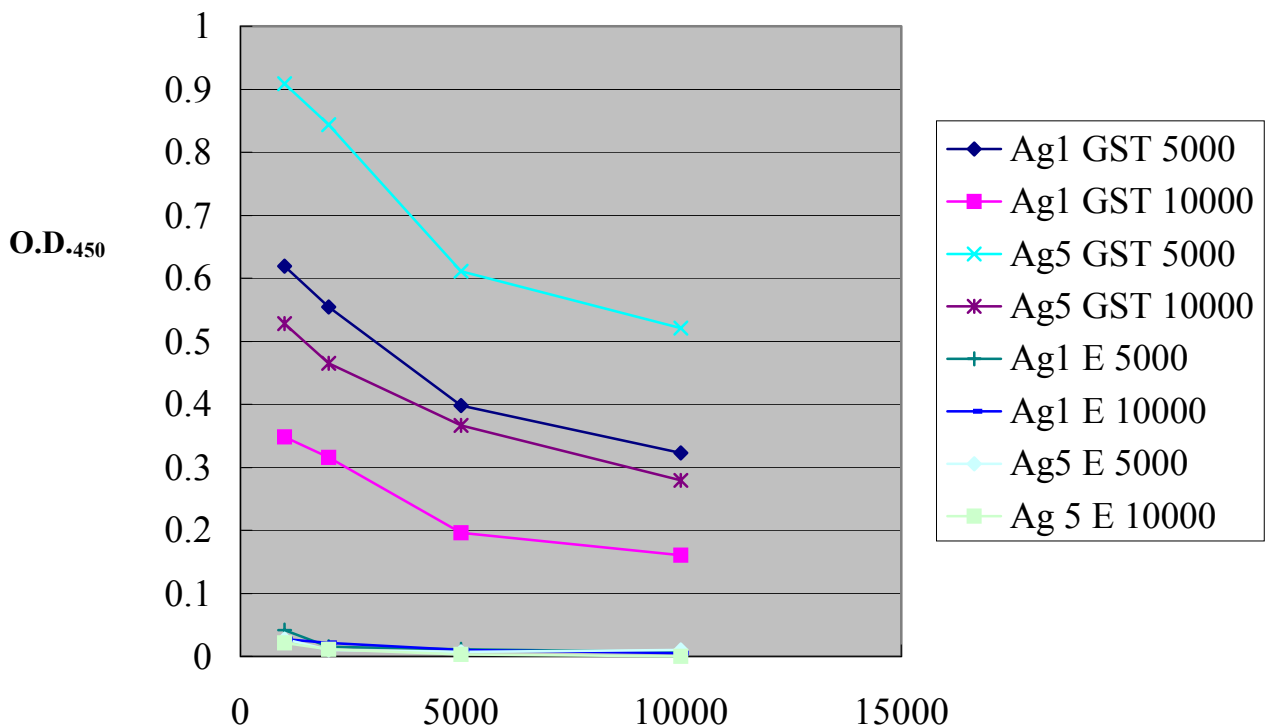


B



圖十五、以 IFA 觀察 Vero E6 細胞轉染 pShuttle、pShuttle/M 後表現 M 蛋白結果

A : Vero E6 cell transfected with pShuttle ; B : Vero E6 cell transfected with pShuttle/M 。一級抗體為 rabbit anti-M antiserum (1:50 稀釋) , 二級抗體為 FITC- conjugate goat anti-rabbit Ab (1:800 稀釋) 。



圖十六、偵測 anti-E 抗體之 ELISA 的條件測試

利用大腸桿菌表現之 GST-E 融合蛋白為抗原建立 ELISA 方法，以 mouse anti-GST 單株抗體、rabbit anti-E 抗血清當作一級抗體，HRP labeled anti-mouse (或 anti-rabbit) IgG 當作二級抗體，測試 ELISA 之實驗條件如下表。

測試項目	測試條件
GST-E 抗原濃度 (μg/well)	1 及 5
Blocking buffer	1% 牛血清白蛋白
Mouse anti-GST Ab 稀釋倍率	1:1000, 1:2000, 1:5000 及 1:10000
Rabbit anti-E antiserum 稀釋倍率	1:1000, 1:2000, 1:5000 及 1:10000
HRP-conjugated goat anti-mouse (or anti-rabbit) IgG 稀釋倍率	1:5000 或 1:10000

表

表一、 pCA4 primers

Primer name	Primer sequence (5' 3')	Gene amplified
AdXbaI-301 (forward)	AAAATCTAGATGAAATCTGAATAATTTTGT	S
AdXbaI-3600 (reverse)	AAAATCTAGACAAAACAGATACAAAACACTAC	S
AdXhoI-301 (forward)	AAAACCTCGAGTGAAATCTGAATAATTTTGT	M
AdXhoI-3600 (reverse)	AAAACCTCGAGCAAAAACAGATACAAAACACTAC	M
AdNotI-301 (forward)	AAAGCGGCCGCTGAAATCTGAATAATTTTGT	E
AdNotI-3600 (reverse)	AAAAGCGGCCGCCAAAACAGATACAAAACACTAC	E

表二、 S、M and E specific primers for PCR check

Primer name	Primer sequence(5' 3')	Gene amplified
SE-1 (forward)	ACGGATCCATGTACTCATTCGTTTCGGA	E
SE-2 (reverse)	ACGAATTCTTAGACCAGAAGATCAGGAA	E
M-F (forward)	ACGGATCCATGGCAGACAACCGGTACTATTA	M
M-R (reverse)	ACGAATTCGTAACCTGGAAGTCAACAAGATG	M
Spike (forwar)	ACGGATCCATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTC	S
Spike (reverse)	ACGAATTCGTTTCGTTTATGTGTAATGTA	S
Spike-4	TAGGCAGCAATCATATCATCA	S
Spike-5	GATTTCACTGATTCCGTTTCG	S

計畫成果自評

本計畫已經分別建構出攜帶S基因、帶有M和E基因和帶有S、M、E基因的三種重組腺病毒載體，並已配合DNA質體完成不同策略的小鼠免疫實驗。目前正建立ELISA和IFA方法，以檢測小鼠體內的免疫反應，觀察其特異性抗體是否有明顯上昇。這些研究結果對於以重組腺病毒發展SARS疫苗可以有很大的參考價值。