

中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1608

探討中台灣人類疱疹病毒第八型盛行率：

於愛滋病毒帶原者、

糖尿病患者與一般族群之比較

Prevalence of Human Herpesvirus 8

in Taiwan: a comparison among

HIV-infected patients, diabetic patients

and general population

所別：環境醫學研究所

指導教授：吳芳鵞 Wu, Fang-Yang

林振文 Lin, Cheng-Wen

學生：張鈞萍 Chang, Chun-Pin

學號：9365008

中華民國 九十五年 七月

致謝

碩士論文終於在一連串不分晝夜的奮戰中完成了，其中除了包括這兩年來在實驗上的努力，還有最後階段對於論文的撰寫。首先要感謝我的父母從小到大在學業上與經濟上源源不絕的支持與鼓勵，讓我可以無後顧之憂的走完這兩年。另外也感謝醫技所的指導教授林振文老師在這兩年間不停的鞭策與教導，並在論文定稿前反覆的校閱與修改；環醫所的指導教授吳芳鵞老師平時的關心與課業上的協助；口試委員張照勤老師在口試前對於本論文認真的修改與口試時提供許多寶貴的意見；口試委員黃素華老師於口試時的批評與指教。

原本一開始我還是個連 PCR 都沒做過的新手，但是在林振文老師實驗室 (Lab. Lin) 經過兩年的學習，奠定了許多分生實驗技術的基礎，最要感謝的是林冠勳學長一開始時替我翻譯老師說的話以及實驗上的教導，同袍戰友炳峰、傑文、善恩平時的切磋與資源的交流，實驗室所有學弟妹詩雯、素蓮、佳芳、明宏、政怡、欣怡、靜宜、光庭、育存、佳文、弘達、韋華、世娟、美少女、家龍平日的幫忙。而吳芳鵞老師實驗室的佳蓉、懷芝、乾華、姿明在平時課業上的討論與鼓勵也讓我受益良多。還有好朋友們佩雯、旻珊、思杰、婉萍、鳳嬌、凱婷、美樂蒂、春慧在失敗時幫我打氣，在順利時陪我開心。

這兩年求學的階段，在 14 樓實驗室看過許多日出與日落，很高興這一切終於有一個具體的結果，希望這段日子的努力，除了對自身有許多幫助與成長外，也能對浩瀚的學術界有一些微薄的貢獻。



鈞萍敬撰 2006 年 7 月 24 日

於中國醫藥大學環境醫學研究所

摘要

人類疱疹病毒第八型 (human herpesvirus 8, HHV-8) 被認為造成卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma) 及淋巴球增生疾病如初期積水型淋巴瘤 (primary effusion lymphomas) 與灶性卡斯特萊曼病 (multicentric Castleman disease)。在世界各地，人類疱疹病毒第八型在愛滋病毒帶原者族群的血清盛行率從 13~65% 不等。然而，在台灣尚未有研究針對人類疱疹病毒第八型與愛滋病毒帶原者之血清學盛行率與其他危險因子之相關性進行探討。本研究使用巢式聚合酵素連鎖反應針對愛滋病毒帶原者進行病毒 DNA 的檢測；使用酵素免疫分析法、西方轉漬分析以新建立的 rORF66 與 rORFK12 蛋白作為抗原進行血清學的檢測，探討人類疱疹病毒第八型與愛滋病毒帶原者之盛行率，並與糖尿病患者、一般族群進行比較。結果發現中台灣愛滋病毒帶原者人類疱疹病毒第八型 DNA 盛行率為 7.39%，血清盛行率為 61.93%；糖尿病患者的血清盛行率為 36.21%；一般族群為 10%。若是結合西方轉漬法作為系列檢定，則愛滋病帶原者之盛行率為 41.95%；糖尿病患者之盛行率為 26.76%；一般族群之盛行率為 9%。因此中台灣之愛滋病帶原者血清盛行率高於糖尿病患者，也高於一般族群。在愛滋病毒帶原者中，性行為傳遞被檢測出抗體陽性的勝算比針頭共用者還高 ($p < 0.0001$)，此外，高 CD4 數目與 HIV 病毒量的病人有較高的人類疱疹病毒第八型抗體陽率 ($p = 0.54$, $p =$

0.53)。本研究新建立了以 ORF66 和 ORFK12 為抗原的酵素免疫分析法、西方轉漬分析作為人類疱疹病毒第八型的診斷，有利於將來進行更大型的流行病學研究以探討其他的風險因子。



關鍵字：人類疱疹病毒第八型；血清盛行率；愛滋病毒帶原者

Abstract

Human herpesvirus 8(HHV-8) may be the cause agent of Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphomas and multicentric Castleman disease. Seroprevalence of HHV-8 varied from 13% to 65% of HIV-infected patients in worldwide countries. However, seroprevalence and risk factor of HHV-8 in HIV-infected patients remain undefined in Taiwan. The purpose of this study was to detect HHV-8 DNA in HIV-infected patients using ORF26 specific nested polymerase chain reaction (PCR), and to compare seroprevalence of HHV-8 among HIV-infected patients, diabetic patients, and general individuals in Taiwan using recombinant ORF66 and ORFK12 antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and western blotting. The results showed that prevalence of HHV-8 DNA was 7.39% (13/176) in HIV-infected patients. Moreover, ELISA screening indicated seroprevalence was 61.93% in HIV-infected patients, 36.21% in diabetic patients, and 10% in general population. In addition, western blotting conformed that seroprevalence of HIV-infected patients(41.95%) were higher than those of diabetic patients(26.76%) and general population(9%). A significant decrease of HHV-8 seroprevalence was observed in intravenous drug users compared to sexual contact persons using adjusted logistic regression model(aOR=0.11, 95% CI 0.05–0.28, $p<0.0001$). Patients with ≥ 200 CD4+(cells/mm³) or ≥ 1000 HIV viral load(copies/mm³) showed higher seroprevalence($p=0.54$, $p=0.53$). This study has established rORF66 and rORFK12 antigen-based ELISA and western blotting for serological detection of HHV-8 infection, which may be a novel tool for determining more risk factors in association

with HHV-8 infection.



Keyword: Human herpesvirus 8; HHV-8; KSHV; HIV; seroprevalence

目錄

致謝	I
中文摘要	III
英文摘要	V
目錄	VII
圖目錄	IX
表格目錄	X
第一章、前言	1
第二章、文獻探討	3
2.1 人類疱疹病毒第八型	3
2.1.1 病毒的發現與特性	3
2.1.2 基因特性	4
2.1.3 檢測方法	5
2.1.4 傳播途徑與風險因子	6
2.1.4 盛行率	9
2.2 人類疱疹病毒第八型與愛滋病毒之相關性	11
2.3 人類疱疹病毒第八型與糖尿病之相關性	12
第三章、材料與方法	14
3.1 研究架構	14
3.2 研究對象	14
3.3 實驗材料	16
3.4 研究方法	18
3.5 統計方法	29
3.6 使用藥劑	30
3.7 使用儀器	30

第四章、結果	31
4.1 檢驗方法的建立	31
4.2 研究對象基本人口學特性	33
4.3 巢式聚合酵素連鎖反應	34
4.4 酵素免疫分析法	35
4.5 西方轉漬分析	36
第五章、討論	37
第六章、結論與建議	42
6.1 結論	42
6.2 研究限制	42
6.3 建議	43
第七章、參考文獻	44
圖	55
表	65
附圖	70
附錄	72

圖目錄

圖一、以 nested PCR 檢驗 positive control 結果.....	55
圖二、以 nested PCR 檢驗愛滋病毒帶原者之第一次反應結果.....	56
圖三、以 nested PCR 檢驗愛滋病毒帶原者之第二次反應結果.....	57
圖四、ORF66 與 ORFK12 PCR 反應後的電泳結果.....	58
圖五、由 16 管菌液中純化質體 rORF66 與 rORFK12 進行 PCR 反應後的電 泳圖.....	59
圖六、以西方墨點法進行蛋白質純化後產物之測定.....	60
圖七、以酵素免疫分析法進行血清篩檢之陽性個案其OD值分佈結果...	61
圖八、以酵素免疫分析法進行血清篩檢之陰性個案其OD值分佈結果...	62
圖九、以各 OD 值之比值為切點之比較與 ROC 曲線.....	63
圖十、以 Western blotting 進行 HHV-8 陽性的二次確認結果.....	64

表目錄

表一、不同族群之 HHV-8 ELISA 檢測結果分佈比較.....	65
表二、愛滋病毒帶原者 HHV-8 DNA 陽性與基本人口學變項相關性分析.....	66
表三、愛滋病毒帶原者 HHV-8 ELISA 檢測結果與基本人口學變項分佈.....	67
表四、愛滋病毒帶原者 HHV-8 ELISA 檢測結果與危險因子之多變項邏輯斯回歸分析.....	68
表五、糖尿病患者 HHV-8 ELISA 檢驗結果與基本人口學變項分佈和危險因子之多變項邏輯斯回歸模型.....	69



第一章、前言

人類疱疹病毒 (herpesviridae) 家族中的許多病毒都有非常久遠的歷史，引起的疾病也是大家所熟悉的。如免疫力不好時有許多人會在嘴唇長出單純性皰疹，這是由人類疱疹病毒第一型所引起的；水痘與帶狀性皰疹是由人類疱疹病毒第三型所引起的；近年來也發現人類疱疹病毒第四型與鼻咽癌有相關性的存在。

人類疱疹病毒第八型 (human herpesvirus 8, HHV-8)，也可以稱之為卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus, KSHV)，於1994年在卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS) 的組織中被發現 (Chang et al., 1994)，經過許多學者的研究，漸漸確認此病毒為卡波西氏肉瘤之致病原 (Ablashi et al., 2002)。卡波西氏肉瘤為一種皮膚癌，常見於愛滋病 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 病患，因此有許多人類疱疹病毒第八型的研究都是針對愛滋病毒帶原者。

在全世界的健康族群中，人類疱疹病毒第八型血清盛行率最高的地區在非洲地區 (20~60%)，其次是南義大利與地中海地區 (14~30%)，北美與亞洲等其他地區 (2~6%) 屬於盛行率較低之地區 (Schulz, Sheldon, and Greensill, 2002)。台灣盛行率隨著年齡層的不同從3%至24.1%不等 (Huang et al., 2000; Wang et al., 2002)，但是台灣的人類疱疹病

毒第八型流行病學資料有限，未有針對愛滋病毒帶原者所做的盛行率調查，本研究為台灣第一篇針對愛滋病毒帶原者族群的血清流行病學研究。當愛滋病毒帶原者免疫力下降時，出現卡波西氏肉瘤的機率相對提高(Serraino et al., 2005)，本研究也針對免疫力較差的糖尿病患者族群感染人類疱疹病毒第八型之機率。另外再以一般族群作為健康對照組。

由於人類疱疹病毒第八型屬於較新的病毒，對於其傳播方式與病毒特性還有許多需要深入探討的地方，而診斷方法目前還未有一個黃金標準（gold standard），造成各個研究結果的可比較性降低，因此目前亟欲建立一個高敏感度與特異度的診斷方法。本研究為第一篇以人類疱疹病毒第八型的ORF66與ORFK12兩高抗原性蛋白同時以酵素免疫分析法進行血清學的篩檢。

本研究目的：

1. 藉由不同診斷方法調查中台灣愛滋病毒帶原者的人類疱疹病毒第八型之盛行率，並探討與其他因子之間的相關性。
2. 比較在糖尿病病患與一般族群的人類疱疹病毒第八型之盛行率。

第二章、文獻探討

2.1 人類疱疹病毒第八型

2.1.1 病毒的發現與特性

人類疱疹病毒第八型 (human herpesvirus 8) 於 1994 年在愛滋病患者的卡波西氏肉瘤組織中分離出疱疹病毒的片斷，而後經過數個實驗室再次證明，所以又命名為卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma associated-herpes virus) (Chang et al., 1994; Moore et al., 1996)。自從發現以後，就一直是國際上重要的公共衛生議題。病毒基因體為線性雙股 DNA 結構，屬於人類疱疹病毒 γ 科，由 130~170 千個核苷酸 (Kbp) 所組成，總共分為 89 個開放閱讀框 (open reading frame, ORF) (Uetz et al., 2006)，而人類疱疹病毒第八型之特有蛋白之開放讀序框架則從 K1 到 K15 來命名區分 (Russo et al., 1996)。

人類疱疹病毒第八型被認為是引起卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS) 之必要因子，卡波西氏肉瘤是因纖維母細胞及內皮細胞不正常增生的多發性惡性腫瘤。除了愛滋病相關之卡波西氏肉瘤 (AIDS KS) 中可以發現人類疱疹病毒第八型外，在各種形式的卡波西氏肉瘤中也皆被證實可偵測到病毒的存在，包括典型卡波西氏肉瘤 (classic KS)、地方性卡波西氏肉瘤 (endemic African KS)、免疫受抑制之卡波西氏肉瘤 (iatrogenic KS) (Regamey et al., 1998)。除此之外，人類疱疹病毒

第八型也被認為與灶性卡斯特萊曼病 (multicentric Castleman's disease)、初期積水型淋巴瘤 (primary effusion lymphoma) 有相關性存在。在初次感染 (primary infection) 的孩童身上，有可能會引起紅疹等非特異性症狀 (Andreoni et al., 2002)。

2.1.2 基因特性

人類疱疹病毒第八型的開放閱讀框 (open reading frame, ORF) 中，若是屬於此病毒所特有的序列則以K開頭作為命名，共有ORFK1至ORFK15，而其他的ORF中，某些與人類疱疹病毒科的病毒基因序列具有部分相似性，如本研究所使用的ORF66蛋白與EBV的BFRF2具有28%的相似性 (Russo et al., 1996)。雖然經過許多年的努力，但並非每一個ORF的功能都已得到解答，其所轉譯出來的功能性蛋白依感染病程出現的時期可分為潛伏期 (latent) 蛋白、早期活化 (early lytic) 蛋白、晚期活化 (late lytic) 蛋白。潛伏期蛋白較主要的有ORFK12、ORF71、ORF72、ORF73；早期活化蛋白主要有ORFK2、ORFK4、ORFK5、ORFK6、ORFK7、ORF16、ORF50、ORFK8、ORFK9、ORF14、ORF74；晚期活化蛋白主要有ORFK8.1 (Ablashi et al., 2002)。而其詳細的功能主要針對幾個重要的蛋白介紹：在ORFK4為結合蛋白 (complement binding protein)；ORF6為ssDNA結合蛋白 (ssDNA binding protein)；ORFK7為運輸蛋白

(transport protein); ORFK19、ORF43、ORF44、ORF67、ORFK15為外衣蛋白 (tegument protein); ORF26、ORF43、ORF65為外殼蛋白 (capsid protein); ORF29b為包裝蛋白 (packaging protein); ORFK12為 kaposin(Russo et al., 1996)。

2.1.3 檢測方法

Chang等人(1994)利用代表性差異分析 (representational difference analysis, RDA) 在愛滋病患者的卡波西氏肉瘤組織中分離出疱疹病毒的片斷，開啟了人類疱疹病毒第八型檢驗方法嶄新的一頁。人類疱疹病毒第八型的檢測技術主要有聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫螢光分析法 (immunofluorescence assay, IFA) 三種，目前還未發展出檢測人類疱疹病毒第八型的黃金標準 (gold standard) (Ablashi et al., 2002)。PCR可偵測血液中是否存在人類疱疹病毒第八型的DNA，但是當病毒在潛伏期時可能會偵測不到，因此當PCR陰性時不能完全排除感染的可能性(Albrecht et al., 2004)，此種方法在臨床上是用來檢測卡波西式肉瘤組織中是否有人類疱疹病毒第八型之DNA(Pak et al., 2005)。IFA與ELISA則是偵測血清或血漿中是否存在人類疱疹病毒第八型之抗體，依照不同屬性之抗原可偵測不同之抗體。早

期有許多研究是以IFA作為診斷工具，此方法以含有病毒之細胞株經過處理後當作抗原進行篩檢，但是此方法較為耗時，判讀時需要螢光顯微鏡且會因判讀人員的不同產生誤差，這些原因都會造成大量樣本的篩檢的困難，特別是在高盛行率的地區(Topino et al., 2001)。而ELISA則是較有效率的方法，適合進行大量的篩檢，但是被當作抗原的人類疱疹病毒第八型蛋白質有許多種，最常被使用的有open reading frame 65 (ORF65)和ORF73，但其敏感度和特異度並未建立(Rainbow et al., 1997; Simpson et al., 1996)。

2.1.4 傳播途徑與風險因子

人類疱疹病毒第八型所引起的卡波西氏肉瘤，常見於愛滋病毒帶原者，是一種伺機性感染 (opportunistic infection)，但是隨著雞尾酒療法 (introduction of highly active antiretroviral therapy) 有效的治療與控制免疫系統，卡波西氏肉瘤的發生漸漸的減少。雖然如此，但研究發現人類疱疹病毒第八型之盛行率並未因此而下降(Osmond et al., 2002)。

病毒的傳播途徑被認為主要有下列幾種：

1. 血液傳染：病毒藉著血液或血液製品來進行傳染為血液傳染

(blood transmission) (Operskalski et al., 1997)。在人類

疱疹病毒第八型中高盛行率地區所做的研究，發現針頭共用者之病毒盛行率高於一般族群(Cannon et al., 2001; Sosa et al., 2001)，但是在阿姆斯特丹的毒癮世代研究族群所獲得的結果顯示毒癮與人類疱疹病毒第八型的發生率無統計上顯著的相關(Renwick et al., 2002)。此種傳染方式在人類疱疹病毒第八型有高度地方性流行之區域扮演重要的腳色，而在低盛行率的區域較為罕見(Dukers and Rezza, 2003)。

2. 非性行為之人對人傳染：非性行為之人對人傳染 (non-sexual person-to-person transmission) 可以透過唾液進行傳染(Corey et al., 2002)。在非洲孩童身上可檢測到人類疱疹病毒第八型的感染，因此發現病毒的傳染方式不只有性行為傳染。同樣的，埃及的孩童也被偵測到高的病毒血清盛行率(Andreoni et al., 1999)。流行病學研究顯示童年時期的擁擠程度 (childhood crowding) 與病毒DNA被偵測與否具有顯著的相關性存在(Brown et al., 2005)。另外，Pauk等人 (2000) 利用定量聚合酵素連鎖反應 (quantitative polymerase-chain-reaction) 針對美國人類疱疹病毒第八型血清學陽性且曾有男性同性性行為 (men who had sex with men) 之世代研究族群所取得的咽喉分泌物、鼻腔分泌物、肛門分泌物、精液、血液進行病毒量檢測分析，發現唾

液中的病毒量是其他部位檢體的2.5倍，因此認為可藉由唾液傳染病毒給他人。

3. 性行為傳染：在性行為傳染 (sexual transmission) 中，多重性伴侶與性病是人類疱疹病毒第八型血清學陽性的一個重要風險因子，特別是男同性戀性行為 (men who had sex with men) (Pierrotti et al., 2005)。生殖器疣 (genital warts)、梅毒等性病與人類疱疹病毒第八型病毒血清學陽性有統計上顯著的相關，因此研究者推測性行為傳染是風險因子之一 (Baeten et al., 2002; Klaskala et al., 2005; Mbulaiteye et al., 2006)。此傳染方式在美國為主要的傳染途徑 (Martin et al., 1998)，特別是在男同志愛滋病毒帶原者族群中。但同樣也有少數研究質疑此傳遞途徑的可能性 (Andreoni et al., 1999)。

某些研究指出在男性之血清盛行率大於女性，並且有統計上顯著的意義，但是此結果在其他研究中並不具有一致性 (Albrecht et al., 2004; Plancoulaine et al., 2000)。人類疱疹病毒第八型之病毒血清盛行率與勝算比 (odds ratio) 會隨著年齡而增加，除此之外，家族聚集 (familial aggregation) 的現象也出現在某些研究中 (Baeten et al., 2002; Plancoulaine et al., 2000)。在非洲地區所做的研究發現母親傳染給小孩的機率超過30%，研究者推測病毒也有可能於母親懷孕期藉著垂直

感染 (vertical transmission) 使出生嬰兒具有病毒抗體，但是這一方面的研究結果證據較為缺乏(Bourboullia et al., 1998; Brayfield et al., 2003; Sarmati et al., 2004)。有趣的是有些較新的研究數據顯示抽菸者其人類疱疹病毒第八型的盛行率較低，表示抽菸有可能為一保護因子，但此結論還具有許多爭議性，需要進一步的探討(Ford et al., 2005; Mbulaiteye et al., 2006; Nawar et al., 2005)。

2.1.5 盛行率

大多數的人類疱疹病毒在一般族群中是很普遍的，但是人類疱疹病毒第八型並非很廣泛的散佈於族群當中。在全世界的健康族群中，人類疱疹病毒第八型血清盛行率依地理區域有很不一樣的分布，最高的地區在非洲地區 (20~60%)，其次是南義大利與地中海地區 (14~30%)，北美與亞洲等其他地區 (2~6%) 屬於盛行率較低之地區(Schulz, Sheldon, and Greensill, 2002)。另外，在愛滋病毒感染的族群與接受器官移植的族群中，人類疱疹病毒第 8 型之血清盛行率是較高的(Albrecht et al., 2004; Alzahrani et al., 2005)。

非洲中部尚比亞在1998年2000年針對3160名孕婦所作的血清流行病學調查發現盛行率高達40.2%(Klaskala et al., 2005)，此研究使用BC-3進行免疫螢光分析法檢驗，過程參考Lennette 等人 (1996) 所建立的步

驟。東非的肯亞愛滋病毒陰性的婦女之人類疱疹病毒第八型血清盛行率為41%，愛滋病陰性的男性血清盛行率為43%(Baeten et al., 2002; Chohan et al., 2004)。南美洲北部的法屬圭亞那 (French Guiana) 之血清盛行率以病毒之蛋白質溶液為抗原進行酵素免疫分析法檢測，結果為13.2%(Chatlynne et al., 1998; Plancoulaine et al., 2000)。於義大利南部卡波西氏肉瘤盛行率較高的地區，人類疱疹病毒第八型之盛行率為25~30%，高於義大利北部的1~8%(Serraino et al., 2005)。在北德未罹患卡波西氏肉瘤的愛滋病帶原者族群之血清盛行率為52%，罹患卡波西氏肉瘤的族群則高達91%(Albrecht et al., 2004)。以免疫螢光分析法測量瑞典北部的血清盛行率為16.2%(Tedeschi et al., 2006)。巴西屬於卡波西氏肉瘤發生率較低的國家，其愛滋病帶原者人類疱疹病毒第八型血清盛行率為13.9%(Pierrotti et al., 2005)。以免疫螢光分析法(Lennette, Blackbourn, and Levy, 1996)篩檢埃及之小孩 (平均年齡5歲) 與年輕人 (平均年齡15歲) 所獲得之血清盛行率為6.4%(Serraino et al., 2001)。美國一般族群盛行率為3.0~3.5%，但在愛滋病毒帶原者族群中，與同性曾有性行為之男性盛行率為29%，高於異性戀的13%與女性的6%(Mbulaiteye et al., 2006; Pellett et al., 2003)。中國之初步流行病學調查是針對人類疱疹病毒第八型之ORF26以巢式聚合酵素連鎖反應，結果顯示盛行率為8%(Wang et al., 2005)。

在韓國以酵素免疫分析法進行檢測發現在孩童的盛行率為3.5%(Han, Chung, and Kim, 2005)。

在台灣所做的人類疱疹病毒第八型血清流行病學研究主要有兩篇，一篇是Huang等人(2000)在1994~1998年針對台灣1201人所作的調查，以BCBL-1進行免疫螢光分析法(Lennette, Blackbourn, and Levy, 1996)，發現10歲以下小孩的盛行率為3-4%，11歲至40歲的盛行率漸升高高峰(19.2%)，而懷孕的婦女血清盛行率為24.1%，女性盛行率較男性高。Wang等人(2002)以20~60歲的血液捐贈者共174位為研究族群，以ORF57為抗原進行西方轉漬分析，檢測出血清盛行率為23%。

2.2 人類疱疹病毒第八型與愛滋病毒之相關性

橫斷式流行病學研究(cross-sectional study)發現人類疱疹病毒第八型之血清盛行率與卡波西氏肉瘤有強烈的相關性，而當同時感染人類疱疹病毒第八型與愛滋病毒時，10年內有49.6%的機率罹患卡波西氏肉瘤，而卡波西氏肉瘤的危險比(hazard ratio)高達5.04(Albrecht et al., 2004; Martin et al., 1998; Renwick et al., 1998)。其原因有可能是愛滋病毒與人類疱疹病毒第八型為共同因子(co-factor)，有研究認為愛滋病毒的某些蛋白可以刺激人類疱疹病毒第八型的複製，因此在愛滋病患者身上才會有卡波西氏肉瘤的高盛行率(Hengge et al.,

2002)。

同時，有研究指出雖然愛滋病毒帶原者之人類疱疹病毒第八型之血清盛行率較高，但與一般族群並無統計上的差異(Baeten et al., 2002)。

2.3 人類疱疹病毒第八型與糖尿病之相關性

人類疱疹病毒第八型所引起的卡波西氏肉瘤發於免疫力不全之病患，如器官移植者、愛滋病患者。糖尿病為一種慢性疾病，其成因是因為胰臟分泌之胰島素不足，或分泌正常但功能不佳，使血糖無法備正常利用所引發的疾病。當病情控制不佳時，常因免疫力的低下而造成各種病菌的感染(Geerlings and Hoepelman, 1999)。過去研究無針對人類疱疹病毒第八型與糖尿病之間之相關性進行探討，但有幾個簡單的病例報告指出卡波西氏肉瘤患者同時罹患糖尿病的個案(Guttman-Yassky et al., 2006; Herr et al., 2001)。

在糖尿病與其他病毒之間的相關性，針對美國黑人的研究中發現在肝硬化患者中，因感染 C 型肝炎病毒而罹患肝硬化的病人其糖尿病盛行率比因其他原因造成肝硬化的病患高，這有可能是因為在感染糖尿病的黑人族群中，C 型肝炎病毒盛行率較高的關係(Thuluvath and John, 2003)；在同時感染糖尿病與 B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒或酒精性肝硬化的老兵中，會增加他們產生初發性肝癌 (primary liver cancer) 的

風險(El-Serag, Richardson, and Everhart, 2001)。在芬蘭的回顧性文章中，認為糖尿病與腸病毒之間具有相關性，但此結果還有待良好的世代研究與機制的探討去證明之(Hyoty, Hiltunen, and Lonrot, 1998)，另外也有其他研究認為腸病毒在糖尿病的病理機轉上扮演重要的角色(Haverkos et al., 2003)¹。



第三章、材料與方法

3.1 研究架構

3.1.1 研究設計

本研究包含三種不同特性的研究族群，有愛滋病毒帶原者、糖尿病病患、一般族群，血漿檢體在收案後放置於-20°C 冰箱保存。愛滋病毒帶原者之 DNA 檢體以巢式聚合酵素連鎖反應 (nested PCR) 進行 HHV-8 DNA 片段的放大，並針對 HHV-8 DNA 陽性的片段進行定序。愛滋病毒帶原者、糖尿病病患、一般族群之血漿檢體以酵素免疫分析法 (ELISA) 進行 HHV-8 抗體的檢測，被診斷為陽性之個案再以西方轉漬分析 (Western blot) 進行確認。(詳情可參考附圖一)

3.1.2 實驗流程

於附圖二

3.2 研究對象

3.2.1 愛滋病毒帶原者

愛滋病毒帶原者 (HIV-infected patients) 其DNA與血漿檢體由中國醫藥大學附設醫院病毒檢驗室所提供，於2005年7、8月由醫師通報經疾病管制局特約病毒檢驗室檢驗確認血液中含有HIV者則納入本研究。取

得DNA檢體之病例共226人，其中取得血漿檢體的共176人。病歷資料包括性別、年齡、HIV病毒量、CD4、CD8、臨床症狀與診斷，本研究將以巢式聚合酵素連鎖反應（nested polymerase chain reaction, nested PCR）、酵素免疫分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）、西方轉漬分析（western blotting）偵測是否感染HHV-8，並進行相關性的比較與分析。（感謝病毒室劉喬俐學姊協助）

3.2.2 糖尿病病患

糖尿病病患血漿樣本於2004年由「評估台中縣衛生局糖尿病檢驗HbA1c之精確度照護計畫」中的糖尿病病患，經年齡的不等比例頻率抽樣後選取301人作為血清盛行率之研究，並分析HHV-8與年齡、性別、糖化血色素（A1c）之相關性。（感謝施木青主任提供）

3.2.3 一般族群

一般族群之血漿樣本由中國醫藥大學附設醫院所提供，由參加健康檢查之民眾隨機挑選100名，獲得年齡與性別之基本資料。

3.3 實驗材料

3.3.1 細胞株

本實驗的研究細胞株 BC-3 購買自 ATCC (American type culture collection)，其為 1995 年由 Leandros Arvanitakis 和 Ethel Cesarman 所建立的初期積水型淋巴瘤 (primary effusion lymphoma, PEL) 細胞株，來自罹患初期積水型淋巴瘤的非愛滋病毒帶原者。BC-3 細胞株內有 HHV-8 的完整病毒基因，並排除愛滋病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、人類疱疹病毒第四型 (Epstein-Barr virus, EBV)、人類疱疹病毒第一型 (herpes simplex virus 1, HSV-1)、人類疱疹病毒第二型 (herpes simplex virus 2, HSV-2)、巨細胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 的存在 (Arvanitakis et al., 1996)。培養於 90% 的 RPMI 1640 (HyClone, USA) 培養液，包含有 10 % 的 FBS (fetal bovine serum) (Biological industries)。若要將細胞進行保存，則將 10ml 含 BC-3 之培養液離心後，去除上清液，加入 700 μ l 之培養液、200 μ l FBS、100 μ l DMSO 於沉澱底部的細胞中混合均勻，至於冷凍小管後保存於 -20°C 冰箱一晚後再放置於液態氮中即可長期保存。

3.3.2 大腸桿菌菌株

在重組基因的保存與基因蛋白的表現皆會使用到大腸桿菌菌株

(*Escherichia coli*)，菌株的基本特性如下：

(1) Top10：基因型為 F^- ，*mcrA*， $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ， $\phi 80 lacZ$ ， $\Delta M1$ ， $\Delta lacX74$ ，*recA1*，*araD139*，*galU*，*galK*， $\Delta(ara-leu)7697$ ，*rpsL* (Str^R)，*endA1*，*nupG*，用於質體轉形 (transformation)、質體製備。

(2) BL21 (DE3)：基因型為 F^- ，*ompT*，*hsdS_B* (*rB⁻* *mB⁻*)，*gal*，*dcm* (*DE3*) (*cam^R*)，用於蛋白質表現 (protein induction)。

3.3.3 質體

將我們所需的基因與質體(Vector)進行接合後，轉型至適應性細胞中則可進行大量的複製與保存，本研究所使用的質體為 pET32a (Novagen)，含有 5.9kb 個鹼基配對，可在大腸桿菌 BL21 品係，經 IPTG 誘導表現蛋白質，N' 端帶有 Trx-tag、S-tag、His-tag，C' 端帶有 His-tag。

3.3.4 抗體

在酵素免疫分析法與西方轉漬分析中皆會使用到抗體 (anti-body)。在酵素免疫分析法的第二次抗體為 Anti-human IgG horseradish peroxidase conjugation (Chemicon)；西方轉漬分析的控

制組中，第一次抗體與第二次抗體分別為 Mouse Anti-his tag antibody (Novagen™)與 Anti-mouse IgG (goat) AP labeled antibody(PerKlin-Elmer™)，而實驗組的第二次抗體為 Anti-Human IgG (goat) Phosphatase Labeled (KPL)。

3.4 研究方法

3.4.1 病毒 DNA 萃取

病毒 DNA 萃取 (purification of viral DNA) 首先將 BC-3 細胞株經培養後之培養液 (含 HHV-8 病毒) 每 1ml 分裝入 1.5ml 離心管，加入 200 μ l PEG2000/ 2.5M NaCl 混合後，放入 37°C 培養箱搖晃一小時。離心，10K rpm 10 分鐘，小心的完全去掉上清液，將沈澱物溶於 200 μ l 二次水中，再加入 200 μ l phenol/ chloroform (USP, USA)，搖晃均勻。離心 12000 rpm 15 分鐘。取上清液 150 μ l 加入 300 μ l ethanol (Sigma, USA)。置於 -80°C 冰箱 1 小時。離心，10,000 rpm 10 分鐘，小心的完全去掉上清液，用 70% ethanol 清洗沈澱物後置於室溫中晾乾，再加入 30 μ l 二次水。之後將 HHV-8 DNA 進行 PCR 與 OD 值的測量。

3.4.2 巢式聚合酵素連鎖反應

巢式聚合酵素連鎖反應 (nested polymerase chain reaction,

nested PCR) 同時兼具敏感性與特異性，其詳細步驟與條件如下列描述。

(1) Primer 序列

1st : KS1、KS2(Dupon et al., 1997)

KS1 : 5' -AGCCGAAAGGATTCCACCAT - 3'

KS2 : 5' -TCCGTGTTGTCTACGTCCAG - 3'

2nd : NS1、NS2(Monini et al., 1996)

NS1 : 5 - ACGGATTTGACCCCGTGTTTC - 3'

NS2 : 5 - AATGACACATTGGTGGTATA - 3'

(2) Nested PCR 反應溶液之配置

- a. 模板 (Template) 2.5 μ l
- b. Primer (100uM) 各 1 μ l
- c. 去氧核苷三磷酸 (10mM) (Promega, USA) 0.5 μ l
- d. Taq Buffer (GeneTeKs) 5 μ l
- e. OptiPol™ DNA Polymerase (5u/ μ l) (GeneTeKs) 0.5 μ l
- f. 最終體積以滅菌蒸餾水調製成 50 μ l

(3) Nested PCR 反應步驟

Nested PCR 共有兩次 PCR 反應，第一次 PCR 以病人 DNA 為

Template，反應步驟為 94°C、5 分鐘作為預變性 (pre-denature)，其次以 94°C、1 分鐘；58°C、1 分鐘；72°C、1 分鐘的條件循環反應 40 次，最終設定 72°C、15 分鐘，使產物反應更完全。第一次 PCR 反應產物為 233 個核苷酸 (base pair, bp)，從反應溶液取 2.5 μ l 作為第二次 PCR 的 Template。第二次 PCR 反應步驟為 94°C、5 分鐘作為預變性 (pre-denature)，其次以 94°C、30 秒；58°C、30 秒；72°C、30 秒的條件循環反應 40 次，最終設定 72°C、15 分鐘，使產物反應更完全。第二次 PCR 產物為 160bp。陽性控制組 (positive control) 的 Template 為 HHV-8 病毒 DNA，陰性控制組 (negative control) 的 Template 為滅菌二次水，以了解 PCR 效能與污染的控制。PCR 結果以 2% 瓊脂凝膠 (2% agarose gel) 進行電泳分析，並將陽性個案之序列進行定序分析。

3.4.3 HHV-8 蛋白純化

本研究純化了 HHV-8 ORF66 與 ORFK12 之蛋白。ORF66 分子量為 47022.16 Daltons，功能為類似 EBV BFRF2 homolog；ORFK12 分子量為 6440.28 Daltons，功能為 kaposin。由於本研究以 pET32a 為載體，因此最後純化出來的蛋白質分子量需加上 pET32a 本身的蛋白，如 thioredoxin。

(1) 聚合酵素連鎖反應

先針對 ORF66 與 ORFK12 基因片段進行聚合酵素連鎖反應

(PCR)，詳細步驟與條件如下列描述。

1. Primer 序列

ORF 66 : 5' - TATCGGATCCATGGCCCTGGATCAGC - 3'

5' - GGTGCTCGAGGGAGGAACACTTCCCG - 3'

ORF K12 : 5' - TCGCGGATCCATGGATAGAGGCTTAA - 3'

5' - CGCACTCGAGGTGCGCGCCCGTTGCA - 3'

2. PCR 反應溶液之配置

a. 模板 (Template) $5\mu\text{l}$

b. Primer (100 μM) 各 $2\mu\text{l}$

c. 去氧核苷三磷酸 (10mM) (Promega, USA) $1\mu\text{l}$

d. Taq Buffer (GeneTeKs) $10\mu\text{l}$

e. OptiPol™ DNA Polymerase (5u/ μl) (GeneTeKs) $1\mu\text{l}$

最終體積以滅菌蒸餾水調製成 $100\mu\text{l}$

3. PCR 反應步驟

ORF66 為 1290bp，PCR 反應為為 94°C 、5 分鐘作為預變性

(pre-denature)，其次以 94°C 、1 分鐘； 52°C 、1 分鐘 30 秒；

72°C、1 分鐘 45 秒的條件循環反應 40 次，最終設定 72°C、15 分鐘，使產物反應更完全。

ORFK12 為 182bp，PCR 反應為為 94°C、5 分鐘作為預變性 (pre-denature)，其次以 94°C、30 秒；52°C、30 秒；72°C、30 秒的條件循環反應 40 次，最終設定 72°C、15 分鐘，使產物反應更完全。

(2) 限制酵素的水解

PCR 得到的產物，以 Spin PCR Clean-Up system 試劑套組 (Viogene) 將 DNA 純化後，以 80 μ l 的 ddH₂O 將 DNA 溶出，加入 10X reaction buffer (Fermentas) 10 μ l 及切位的限制酵素 (10u/ μ l) (Fermentas) 5 μ l，使總體積為 100 μ l，以 37°C 作用隔夜。相對應的質體載體亦以同樣的方式進行限制酵素的水解，來構築實驗的表現載體。ORF66 與 ORFK12 所使用的之切位酵素為 BamH I、Xho I。

(3) 質體的構築：DNA 接合

質體載體 pET32a 1 μ l，加上欲接合 (ligation) 的 DNA (ORF 66 與 ORFK12) 7 μ l，10X ligation buffer (Fermentas) 1 μ l，濃度為 5 Weiss unit/ μ l 的 T4 ligase (Fermentas) 1 μ l，以 16°C 作用隔夜。

(4) 適應性細胞的製備

適應性細胞(competent cell)為培養隔夜的 *E. coli* cell (Top10、BL21) 2ml，倒入 200ml LB 中，以 37°C 培養箱培養二至三小時達到 log phase，取出置於冰上靜置十分鐘後，再以 3000rpm、4°C、離心 15 分鐘，取出倒掉上清液，以 0.1M CaCl₂ resuspend pellet。於冰上靜置培養三十分鐘後，同樣再以 3000rpm，4°C，離心十五分鐘，取出後小心地倒掉上清液，再加入 0.1M CaCl₂ 1.6ml，glycerol 0.4ml(20%)將 pellet resuspend，然後靜置於冰上二小時後分裝至 1.5ml 離心管中，每管約含 200 μ l 左右。

(5) 大腸桿菌之轉型

將構築好的質體加入適應性細胞中以進行轉型 (transformation)。兩者混合均勻後至於冰上三十分鐘。在經 42°C 反應 90 秒後，迅速至於冰上三分鐘，之後加入 800 μ l 不含抗生素的 LB 培養液。在 37°C 培養箱培養一小時後，離心去掉上清液，均勻塗在含抗生素 (ampicillin) 的 LB 培養基上，抗生素濃度為 50mg/ml。

(6) 質體純化

質體純化 (plasmid purification) 的步驟首先將含有質體的單一菌落，以 2ml LB 在 37°C 培養箱搖隔夜後取出，以最大速離心

12,000rpm 五分鐘後，倒掉上清液，用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit 試劑組 (Protech technology) 來純化質體。

以 solution I 溶液 200 μ l resuspend pellet，加入 solution II 溶液 200 μ l 上下倒置數次後，再加入 solution III 溶液 200 μ l 上下倒置數次，最大速離心五分鐘。將 spin column 插入一收集管 (collection tube) 中，離心後的上清液移至 spin column 中，離心 30 秒，移除濾液後，加入 700 μ l Washing solution，離心一分鐘。再將收集管以 1.5ml 微量離心管置換，加入 20 μ l ddH₂O 回收質體。

(7) 誘導大腸桿菌上乳糖啟動子 (*lac* promoter) 表現蛋白

經過定序確認所需之 DNA 片段已構築於載體上後，將含有融合蛋白的實驗菌株培養在 10ml LB 培養液，隔天加到 500ml 的 LB broth，培養箱中 37°C 培養二到三小時，吸光值 OD_{600nm} 約為 0.4 到 1 之間，加入 IPTG (0.8M) 500 μ l，最終濃度為 0.8mM，再經 16°C 培養隔夜，將菌液收集並且離心，之後加入 20ml 的 10mM imidazole。再置於超音波擊碎機 (sonicator) 將細胞打碎。本實驗之載體為 pET32a，實驗菌株為 BL21。

(8) 純化重組病毒蛋白質

利用 FPLC 純化蛋白，在 column 中裝填 10ml 的 Chelating

Sepharose™(Amersham Biocsciences)，將以打碎的細菌溶液離心，上清液流過鎳離子親和性層析凝膠，先用沖洗緩衝液（100mM imidazole）沖洗，再用析出緩衝液（400mM imidazole）將蛋白質析出。流程如下：dH₂O 總量 250ml，流速 5min/ml→EDTA 總量 20ml，流速 1min/ml→dH₂O 總量 250ml，流速 5min/ml→Ni 總量 15ml，流速 1min/ml→dH₂O 總量 250ml，流速 5min/ml→10M Imidazole 總量 60ml，流速 3min/ml→Sample 總量 20ml，流速 1min/ml→10M Imidazole 總量 60ml，流速 3min/ml→100M Imidazole 總量 60ml，流速 5min/ml，收取 5ml/tube→400M Imidazole 總量 60ml，流速 3min/ml，收取 3ml/tube。

(9) 蛋白質濃度測定

純化後的蛋白質濃度用 Bio-Rad protein assay 染劑(取 10ml，以二次水稀釋到 50ml)進行測試。用牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 1mg/1ml 為樣品，分配成濃度為 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/1ml 各 20 μ l，各別加入 1ml 染劑中，算出線型回歸公式，做出標準曲線。再取蛋白質樣本 20 μ l 加入 1ml 染劑，測 OD_{595nm} 的吸光值，並分析蛋白質濃度。

(10) 蛋白質之電泳分析

實驗所使用的電泳裝置為 Bio-Rad 蛋白質電泳槽，待鑄膠裝置

組合後，先加入分離膠體溶液 (separating gel)，再加入二次水將上層膠壓平，待凝固後倒掉二次水並擦拭乾後加入集膠溶液

(stacking gel)，插上齒膜，膠體凝固後置於電泳槽中，注入電泳緩衝液 (running buffer)。取蛋白質樣本溶液 $80\ \mu\text{l}$ 加入 2X sample loading buffer $20\ \mu\text{l}$ ，混勻後在 $100\ ^\circ\text{C}$ 加熱五分鐘後，迅速置於冰上再注入樣本槽 $10\ \mu\text{l}$ ，並注入蛋白質標準溶液以為對照，先以 80V 進行電泳，待藍色染劑跑到分離膠體時，將電壓調整為 110V 繼續電泳，直到藍色染劑跑到膠體底部。關閉電源將膠體取出，用 Commassie brilliant blue 染色再用脫色液 (Destain solution) 脫色到蛋白質色帶清楚。

(11) 西方轉漬分析

實驗所使用的電泳裝置為 Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽，SDS-PAGE 後，切除集膠體部份，膠片浸在轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 中。取轉印紙 (硝化纖維紙 nitrocellulose paper) 切成膠片大小浸在轉漬緩衝液，先鋪上三張濕潤的 3M 濾紙，後鋪上濕潤的轉印紙，疊上已濕潤的膠片，再鋪上三張濕潤的 3M 濾紙，過程需趕走氣泡。轉印紙那面位向正極，膠片那面位向負極，以 200 mA 轉印一小時三十分鐘。之後，將轉印紙放入 1X TBST 含 0.5% 脫脂牛奶，

室溫搖盪一小時，以填塞沒有蛋白質轉印上去的空間。倒掉進行 Blocking 的牛奶，以 1X TBST 清洗十分鐘三次。倒掉 1X TBST，加入第一次抗體（1：1000 稀釋），放置 4°C 隔夜，隔天於室溫搖擺一小時。倒去第一次抗體，以 1X TBST 清洗十分鐘三次。再加入第二次抗體（1：1000 稀釋），置於室溫搖擺二小時。倒去二次抗體，轉印紙以 1X TBST 清洗七分鐘三次。加入 NBT/TCIP 顯色劑，反應至呈色（約二十分鐘以內）。加入二次水以終止反應，晾乾後保存。

3.4.4 酵素免疫分析法

在製作完酵素免疫分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）的抗原後，將純化的蛋白，thioredoxin、HHV-8 rORFK12 蛋白、HHV-8 rORF66 蛋白，分別被覆（coating）在 96well plate 上，濃度為 5 μ g/ml，4°C 靜置隔夜。隔天，倒掉上清液，加 5% 脫脂牛奶，每一個 well 200 μ l，室溫中搖晃一個小時。將脫脂牛奶倒掉後以 1X TBST 每 well 100 μ l，清洗七分鐘重複三次。清洗完後加入以 1X TBST 稀釋 100 倍的血漿每 well 100 μ l，每個檢體重複 3 個 well，控制組則不加入血漿，室溫搖晃一個小時。將血漿完全除去，以 1X TBST 每 well 100 μ l，室溫中清洗七分鐘三次。加入以 1X TBST 稀釋五萬倍的二抗 anti-human

IgG peroxidase，每 well 100 μ l 室溫中搖晃一個小時。倒去二抗後以 1X TBST 每 well 100 μ l，室溫中清洗七分鐘三次。接著以 1 比 1 加入 ABTs Peroxidase Substrate (KPL) 與 Peroxidase Solution B (KPL)，每 well 共 50 μ l 呈色二十分鐘，加入 stop solution (50 μ l / well) 立刻測 OD_{405nm} 吸光值。

每個檢體皆進行三重複，測得 OD 值後，以較相近的兩個值取其平均作為檢驗結果。另外，以被覆 thioredoxin 的 plate 之 OD 值為基準，HHV-8 rORFK12 蛋白、HHV-8 rORF66 蛋白所測出來的 OD 值與之相除。若 OD 值 HHV-8 rORFK12/thioredoxin 超過 1.2 則判別為血漿中 HHV-8 rORFK12 抗體陽性；同理，若 OD 值 HHV-8 rORF66/thioredoxin 超過 1.2 則判別為血漿中 HHV-8 rORF66 抗體陽性。若 HHV-8 rORFK12 抗體、HHV-8 rORF66 抗體皆呈陽性，則定義為曾遭受 HHV-8 感染，即 HHV-8 ELISA 陽性個案。

3.4.5 以西方轉漬分析技術進行陽性確認

此方法主要用來進行二次確認。一開始的步驟與 3.3.4 中所陳述的西方轉漬分析一樣，較不同的地方在於鑄膠時將齒模以膠帶封住，只留下一個 well 可以注入 maker，其他齒槽合併為一，注入 thioredoxin、HHV-8 rORFK12 蛋白、HHV-8 rORF66 蛋白。

以 Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽進行轉漬完成後，將轉印紙以 1x

TBST 含 0.5% 脫脂牛奶，室溫搖盪一小時，以填塞沒有蛋白質轉印上去的空間。將轉印紙剪成條狀，每一條分別加入稀釋 100 倍的血漿當作第一次抗體，控制組則是加入稀釋 1000 倍的 mouse anti-his tag antibody 為一抗，室溫中搖盪一小時。倒去第一次抗體，以 1X TBST 清洗七分鐘三次。加入稀釋 1000 倍的第二次抗體 anti-human IgG AP labeled antibody，控組組則是加入 anti-mouse IgG AP labeled antibody，室溫搖盪一小時。倒去第二次抗體，以 1X TBST 清洗七分鐘三次。加入 NBT/TCIP 顯色劑，反應至呈色（約二十分鐘以內）。加入二次水以終止反應，晾乾後保存。

呈色結果在控制組會有 3 條蛋白質片段，分別為 thioredoxin (20KDa)、HHV-8 rORFK12 蛋白 (26KDa)、HHV-8 rORF66 蛋白 (67Kda)。而實驗組若同時對 rORFK12、rORF66 蛋白具有抗體反應，則判定為陽性。

3.5 統計方法

使用 Microsoft Excel 2003 進行資料建檔與處理，SAS 8.0 統計軟體進行分析。在愛滋病帶原者，利用 t-test 檢定 HHV-8 陽性與 HHV-8 陰性兩組之連續變項如年齡、CD4、HIV 病毒量之差異性；並以卡方檢定 (χ^2 -test) 與費雪氏檢定 (Fisher's exact test) 來探討與其他類別變項如性別、HAART 的使用、傳染途徑之相關。最後用邏輯斯迴歸

(logistic regression model) 作多重危險因子多變項迴歸分析。在糖尿病患者中，以上述方法探討 HHV-8 陽性與年齡、性別、糖化血色素(A1c)之相關性，並計算相對危險性及 95%信賴區間。

3.6 使用藥劑

詳情於附錄中

3.7 使用儀器

詳情於附錄中



第四章、結果

4.1 檢驗方法的建立

4.1.1 巢式聚合酵素連鎖反應

巢式聚合酵素連鎖反應 (nested PCR) 需進行兩次 PCR 反應，如圖一所示，第一次反應產物為 233bp，第二次反應產物為 160bp。圖二為檢體進行巢式聚合酵素連鎖反應之電泳圖，第一次 PCR 反應時訊號較微弱，因此只有 positive control 具有 HHV-8 DNA 陽性反應；第二次 PCR 反應時，圖三的 lane 10 與 positive control 皆具有特異性片段 160bp，因此 lane 10 便被判別為 HHV-8 DNA 陽性。以巢式聚合酵素連鎖反應為一黃金標準進行酵素免疫分析法之 OD 值切點之決定。

4.1.2 建立ORF66與ORFK12之重組蛋白

4.1.2.1 藉聚合酵素連鎖反應進行基因選殖

以 HHV-8 DNA 為 Template，進行 ORF66 與 ORFK12 的 DNA 片段放大，圖四為 PCR 反應後的電泳結果。ORF66 的 PCR 反應片段為 1290bp，ORFK12 的 PCR 反應片段為 183bp。

4.1.2.2 載體送入適應性細胞後的篩選

將 ORF66 與 ORFK12 與 pET32a 接合之後，將重組後的 DNA 送入適應

性細胞 TOP10，再由菌液中純化質體 (plasmid purification) 進行 PCR 反應，以確認 rORF66、rORFK12 建立完成。圖五為 PCR 反應後的電泳圖，隨機挑選 16 個不同 TOP10 菌落，放大為 16 管菌液進行純化質體後，以之為 Template 進行 PCR 反應，若 PCR 反應為陽性表示 ORF66 與 ORFK12 已經成功的重組於 pET32a。確認 PCR 反應產物之片段大小無誤之後，將 PCR 反應溶液進行 DNA 定序，再次確定重組 DNA 無誤。

4.1.2.3 蛋白質純化

本研究所純化的蛋白，於質體純化後經過定序確認 DNA 片段無誤，圖六為蛋白質純化後，使用蛋白質之電泳分析與西方轉漬分析確認蛋白質分子量無誤。另外，蛋白質分子量必須加上原本 pET32a 本身的表現蛋白，因此 HHV-8 ORF66 分子量約為 67kDa (Daltons)，HHV-8 ORFK12 分子量約為 26kDa，thioredoxin 約為 20kDa。

4.1.3 以酵素免疫分析法 (ELISA) 進行大量篩檢

圖七為 HHV-8 ELISA 陽性控制組，其 ELISA 與 nested PCR 皆為陽性反應。圖八為 HHV-8 ELISA 陰性控制組，其 ELISA 與 nested PCR 皆為陽性反應。

診斷標準切點的決策中，判定的準則首先以 nested PCR 結果做為參

考，計算出以 0.9 至 1.7 作為切點時的敏感度 (sensitivity) 與特異度 (specificity)，製作出 ROC 曲線 (receiver operator characteristic curve) 後決定以 1.2 為較適當的切點 (圖九)。

4.1.4 以西方轉漬分析技術進行 HHV-8 ELISA 陽性再確認

利用西方轉漬分析，將病毒蛋白當做抗原，愛滋病毒帶原者之血漿為第一次抗體進行特異性抗體的篩檢，一張轉印紙可檢驗約 10 個血漿檢體。圖十為呈色後的結果，以 thioredoxin 作為控制組，因此若一抗為愛滋病毒帶原者之血漿，則在 20kDa 處不應有 band 的產生，若不符合此結論之檢體有陽性反應，將被判別為偽陽性。

4.2 研究對象基本人口學特性

於表一同時比較在愛滋病毒帶原者、糖尿病患者、一般族群中，HHV-8 ELISA 陽性個案於年齡與性別所佔的比例。在小於 30 歲的糖尿病患者中，沒有 HHV-8 ELISA 陽性個案，是因為在此族群平均年齡偏高所導致的。

4.2.1 愛滋病毒帶原者

本研究共有 176 人，平均年齡 32.73 ± 8.75 歲，CD4 數目平均為 477.5 ± 229.28 ，CD8 數目平均為 1247.22 ± 622.35 。本研究族群男性居多 (89.2

%)，以病歷資料進行判斷發現 8.52% 曾罹患後天免疫缺乏症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS)，全部的病人皆被檢驗出帶有愛滋病病毒。

4.2.2 糖尿病患者

糖尿病患者共有 301 人，平均年齡 62.6 ± 11.74 歲，男性佔 44.19%，女性佔 55.81%，用來監測血糖的 HbA1c 平均為 0.07 ± 0.01 。

4.2.3 一般族群

一般族群共 100 人，平均年齡為 25.88 ± 11.38 歲，60 位男性 (60%) 與 40 位女性 (40%)。

4.3 巢式聚合酵素連鎖反應

對 176 位愛滋病毒帶原者之 DNA 以巢式聚合酵素連鎖反應篩檢後，HHV-8 DNA 陽性有 13 人 (7.39%)，陽性個案部分經由定序確認片段無誤。由表二可得知，愛滋病毒帶原者其血液是否有 HHV-8 DNA 與其年齡、性別、被 HIV 帶原者傳染之方式、HIV 病毒量、CD4 數目、後天免疫不全症候群無統計上顯著的相關 ($p\text{-value} > 0.05$)。以邏輯斯回歸模式進行變項的調整年齡、性別、HIV 病毒量、CD4 數目後，沒有發現其他顯著相關

因子存在。

4.4 酵素免疫分析法

愛滋病毒帶原者、糖尿病患者、一般族群之血漿以酵素免疫分析法進行大量篩檢，發現血清盛行率分別為 61.93%、36.21%、10%。

表三為探討在愛滋病毒帶原者中，HHV-8 ELISA 陽性與其他因子之間的相關性，發現傳染方式與 ELISA 陽性之間有顯著的相關 ($p\text{-value} < 0.0001$)，表四為利用邏輯斯回歸分析經過其他變項的調整後，Model 1 調整了年齡、性別、傳染方式、血漿中 HIV 病毒量、CD4 數目、HHV-8 DNA 檢測結果、後天免疫不全症候群情況，Model 2 則針對傳染方式、CD4 數目、HIV 病毒量進行調整。在 Model 2 中，HIV 病毒量越高者，HHV-8 ELISA 陽性的勝算就越高；CD4 數目超過 200 cells/mm³ 其 HHV-8 ELISA 陽性勝算比小於 200 cells/mm³ 高；靜脈注射傳遞者的 aOR 值 (adjusted odds ratio) 為 0.11 (95% C.I : 0.05~0.28)，可推測性行為傳遞者比靜脈注射傳遞者還容易感染 HHV-8。表五為糖尿病患者 HHV-8 ELISA 陽性與基本變項之多變項邏輯斯回歸模型，在經過變項調整分析後，於年齡、性別、HbA1c 沒有發現相關性存在。

4.5 西方轉漬分析

使用西方轉漬分析 (western blot) 對 HHV-8 ELISA 陽性個案進行檢驗。在愛滋病毒帶原者族群的 HHV-8 ELISA 陽性個案中有 67.74% 對 rORF66 與 rORFK12 抗原為陽性反應；糖尿病患者的 HHV-8 ELISA 陽性個案中有 73.91% 於西方轉漬分析為陽性反應。一般族群中則有 90%。

而針對愛滋病毒帶原者以 nested PCR 所檢驗出來的 HHV-8 DNA 陽性個案的 13 人中，共有 10 人 (76.92%) 可在西方轉漬分析中具有陽性反應。



第五章、討論

本研究以橫斷式研究法針對三種不同的族群調查人類疱疹病毒第八型之盛行率，並討論愛滋病毒帶原者族群感染人類疱疹病毒第八型之相關危險因子。本研究使用酵素免疫分析法以 rORF66 與 rORFK12 蛋白作為抗原進行檢測；中台灣愛滋病毒帶原者人類疱疹病毒第八型的血清盛行率，結果為 61.93%；糖尿病患者的血清盛行率為 36.21%；一般族群為 2.86%。而若是結合西方轉漬法作為系列檢定，則愛滋病帶原者之盛行率為 41.95%；糖尿病患者之盛行率為 26.76%；一般族群為 9%。可發現中台灣之愛滋病帶原者血清盛行率高於糖尿病患者，也高於一般族群。

於檢驗方法的建立，倘若以巢式聚合酵素連鎖反應陽性者為主要診斷標準，則本研究使用酵素免疫分析法以新建立的 rORF66 與 rORFK12 蛋白作為抗原進行檢測之敏感度為 46.51%，特異度為 36.8%，雖然敏感度與特異度似乎太低，但有可能是因為巢式聚合酵素連鎖反應不適宜作為主要診斷標準。Tedeschi 等人 (2006) 對一般族群以免疫螢光分析法進行血清學檢驗，並同時以聚合酵素連鎖反應篩檢，發現雖然血清學盛行率為 16.2%，但是皆未能檢測出人類疱疹病毒第八型之 DNA。而本研究之 nested PCR 陽性個案以西方轉漬分析檢驗後，其敏感度為 76.92%，但未進行其特異度之比較。Brown 等人 (2005) 在義大利南部針對 18 歲以

上未罹患卡波西氏肉瘤且血清中無愛滋病毒的健康成人進行人類疱疹病毒第八型的檢測，其結果發現在血清中檢測出人類疱疹病毒第八型之抗體的 158 位成人中，只有 16.5% 檢測出人類疱疹病毒第八型 DNA，而童年時期的擁擠程度、低紅血球、血小板數目、心血管疾病、腎臟病與病毒 DNA 偵測結果有顯著相關性存在。而本研究在血清學陽性的檢體中有 5.5% 偵測到病毒 DNA，比之前的研究低，這有可能與台灣卡波西式肉瘤的低發生率有關係，也有可能因為病毒大量增殖的期限較短，因此遭受感染後病毒已潛伏的個案或者病毒開始感染但尚未大量複製的個案將無法以 PCR 偵測到 HHV-8 DNA。在台灣，卡波西氏肉瘤之發生率與盛行率無完整的流行病學資料，僅有研究表示東台灣地區發生率較高(Hsu, Kuo, and Su, 2001)，而本研究之愛滋病毒帶原者族群中只有一位患有卡波西氏肉瘤，但也有可能因病歷資料記載不詳盡而導致資料錯誤。巢式聚合酶連鎖反應陽性意味著病毒為初期感染人體或者是經過潛伏後因宿主免疫力下降等原因再次激發活性，若是屬於前者則有可能宿主未有對抗病毒之抗體，若屬於後者則可於血清或血漿中偵測到對抗病毒之抗體 (Dukers and Rezza, 2003)。Albrecht (2004) 等人認為 PCR 的診斷作為愛滋病毒帶原者的卡波西氏肉瘤風險預測方法，因為單一次的 PCR 陰性無法排除過去曾經感染或者病毒正在潛伏的狀態，因此本研究以 PCR 所觀察之 HHV-8 DNA 盛行率有可能低估。Pellett (2003) 針對 33 名至

少經過兩個實驗室使用血清學方法檢驗確認為陽性的樣本，以 PCR 偵測是否含有人類疱疹病毒第八型之 DNA 片段，全無偵測到病毒 DNA。由於 PCR 檢驗有病毒感染病程的限制，有可能會低估病毒的危險性，且於檢體的取得也較費時，需要由全血中萃取出 DNA 才能夠進行篩檢，因此若是針對人類疱疹病毒第八型進行大量篩檢時，應以血清學檢驗會較為適當。

在血清學的檢驗方面，本研究使用新建立的 rORF66 與 rORFK12 蛋白作為抗原進行檢測，在同時為陽性時裁判定為陽性。因為人類疱疹病毒第八型之 ORF66 蛋白屬於 EBV 的 BFRF2 的相似性蛋白，具有 28% 相同性 (Russo et al., 1996)，類似的蛋白結構也出現於其他疱疹病毒上，因此本研究以此高抗原的蛋白作為診斷方法的輔助因子之一。另一作為抗原的 ORFK12 蛋白為 Kaposin，其為人類疱疹病毒第八型之特有蛋白，具有致癌性 (Muralidhar et al., 2000)。

在愛滋病毒帶原者與糖尿病患者這兩個族群的人類疱疹第八型血清盛行率較之前研究針對台灣健康族群所得的盛行率 (Huang et al., 2000; Wang et al., 2002) 還要高，這有可能因為愛滋病帶原者與糖尿病患者被人類疱疹病毒第八型感染的風險較高，也有可能只是因為診斷方法所造成的誤差。愛滋病毒帶原者 HHV-8 DNA 盛行率為 7.39%，與其他國家之愛滋病毒帶原者相比，台灣之 HHV-8 DNA 盛行率偏低 (Szalai et al., 2005)。而本研究一般族群之血清盛行率較之前台灣的其他研究低，

有可能是因為年齡層的差異或是診斷方法所造成的誤差，對於此部份需要再進行更深入的探討以釐清疑點。

利用多變項邏輯斯迴歸模型控制其他因子後，發現血漿中的 HIV 病毒量中等對於 HHV-8 抗體的檢測是一種保護作用 ($aOR=0.92$)，但在經過傳染方式、HIV 病毒量、CD4 數目的調整後轉為危險因子 ($aOR=1.11$)，不過皆無統計上顯著的意義，而 CD4 數目超過 200 比小於 200 之 HHV-8 抗體陽性的勝算高。一般認為卡波西氏肉瘤好發於免疫力較低的人，與本研究結果不符合；有些研究之結果此假設相反，認為 CD4 數目增加時，發炎性細胞激素 (inflammatory cytokines) 也會跟著增加，而發炎性細胞激素被證明可以刺激 HHV-8 的複製 (Chang et al., 2000)，另外，HHV-8 陽性與 CD4 數目具有正相關的結果也在其他研究中被發現 (Casper et al., 2004)；亦有研究結果為 CD4 數目、CD4/CD8 與 DNA 偵測病毒 DNA 陽性無相關 (Brown et al., 2005)。愛滋病毒帶原者的傳染方式，因性行為傳遞而感染 HHV-8 的勝算大於共用針頭的人 ($aOR=0.11$)，在許多其他的研究也觀察到此現象 (Serraino et al., 2005)，有可能因為進行性行為時除了面對精液中病毒的暴露外，唾液中也有 HHV-8 的存在，如此的雙重病毒暴露比起共用針頭時血液中存在病毒的暴露，將增加感染的機率。患有後天免疫不全症候群的愛滋病毒帶原者 HHV-8 盛行率反而較低，這有可能是因為目前台灣雞尾酒療法 (highly active anti-retroviral

therapy, HAART) 為健保已付，因此當出現此症狀時立即接受治療，而使用雞尾酒療法對於 HHV-8 的感染具有保護作用(Casper et al., 2004; Pierrotti et al., 2005; Serraino et al., 2005)，因此降低了感染的風險。

本研究針對糖尿病患者以酵素免疫分析法進行人類疱疹病毒第八型的檢驗盛行率為 36.21%。糖尿病患者這個族群的平均年齡偏高，若以 60 歲作為分層可發現超過 60 歲者被檢驗出 HHV-8 ELISA 陽性的勝算小於 60 歲的患者低，不過此結果沒有統計上顯著的意義。糖化血色素 (glycated hemoglobin, HbA1c) 是用來監督糖尿病患者血糖控制的情形，醫師建議糖尿病患者應控制在 0.7 以下，本研究則以 0.7 作為分層，發現 HbA1c 與 HHV-8 ELISA 陽型無統計上顯著的相關性存在。

第六章、結論與建議

6.1 結論

本研究為中台灣首次針對愛滋病毒帶原者與糖尿病患者進行人類疱疹病毒第八型盛行率的探討，並同時使用巢式聚合酵素連鎖反應、酵素免疫分析法、西方轉漬分析三種診斷技術。主要結論有下列三點：

- (1) 在愛滋病毒帶原者中，HHV-8 DNA 盛行率為 7.39%，HHV-8 ELISA 盛行率為 61.93%，而經過系列檢定後所得到的血清學盛行率為 41.95%。另外也發現性接觸傳染對於 HHV-8 感染的勝算會增加。
- (2) 糖尿病患者族群中，HHV-8 ELISA 盛行率為 36.21%，而經過系列檢定後所得到的血清學盛行率為 26.76%。一般族群中，HHV-8 ELISA 盛行率為 10%，而經過系列檢定後所得到的血清學盛行率為 9%。
- (3) 本研究為第一篇以新的檢驗方法，rORF66 與 rORFK12 蛋白同時做為 HHV-8 血清學檢驗的研究，其效果仍有評估的空間。

6.2 研究限制

由於研究設計屬於橫斷式研究法，因此限制於因果時序性方面的推論。另外，因為收案方式的限制，所獲的危險因子變項有限，無法進行更多的流行病學探討，這是較為可惜的地方。本研究自變項大部分來自

病歷資料，因此資料的正確性有一部份取決於輸入資料的醫師與生化值檢驗人員。檢體由其他單位所提供，因此於收案前，檢體的品質較難掌控。本研究使用的檢驗方法無人使用過，因此可比性受到限制，將來也可進一步對於此檢驗方法之敏感性與特異性進行深入的評估。

6.3 建議

人類疱疹病毒第八型為引起卡波西氏肉瘤的致病因子，而卡波西氏肉瘤常發生於後天免疫不全症候群的病人身上。台灣的愛滋病毒帶原者有逐年上升的趨勢，但是對於人類疱疹病毒第八型與卡波西氏肉瘤之流行病學資料卻非常的欠缺，這會造成無法評估台灣的人類疱疹病毒第八型之危險因子，而無法進一步擬定預防措施與衛生教育政策。雖然卡波西氏肉瘤可以因為雞尾酒療法而得到良好的控制，但是如果傳染病的防制只著重於治療，不但浪費醫療成本，也非長久之計。因此建議除了將卡波西氏肉瘤納入愛滋病毒帶原者的監控中外，將來應再針對更大族群進行更完善的風險評估與探討。

第七章、參考文獻

- Ablashi, D. V., Chatlynne, L. G., Whitman, J. E., Jr., and Cesarman, E. (2002). Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* **15**(3), 439-64.
- Albrecht, D., Meyer, T., Lorenzen, T., Stoehr, A., Arndt, R., and Plettenberg, A. (2004). Epidemiology of HHV-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi sarcoma: diagnostic relevance of serology and PCR. *J Clin Virol* **30**(2), 145-9.
- Alzahrani, A. J., El-Harith el, H. A., Milzer, J., Obeid, O. E., Stuhmann, M., Al-Dayel, A., Mohamed, E. A., Al-Egail, S., Daoud, M., Chowdhury, A., Guella, A., Aloraifi, I., and Schulz, T. F. (2005). Increased seroprevalence of human herpes virus-8 in renal transplant recipients in Saudi Arabia. *Nephrol Dial Transplant* **20**(11), 2532-6.
- Andreoni, M., Sarmati, L., Nicastrì, E., Andreoni, M., El-Sawaf, G., Rezza, G., Ensoli, B., Nicastrì, E., Ventura, L., Ercoli, L., Sarmati, L., and Rocchi, G. (1999). High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* **91**(5), 465-9.
- Andreoni, M., El-Sawaf, G., Rezza, G., Andreoni, M., El-Sawaf, G., Rezza, G., Ensoli, B., Nicastrì, E., Ventura, L., Ercoli, L., Sarmati, L., and Rocchi, G. (1999). High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* **91**(5), 465-9.
- Arvanitakis, L., Mesri, E. A., Nador, R. G., Said, J. W., Asch, A. S., Knowles,

- D. M., and Cesarman, E. (1996). Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* **88**(7), 2648-54.
- Baeten, J. M., Chohan, B. H., Lavreys, L., Rakwar, J. P., Ashley, R., Richardson, B. A., Mandaliya, K., Bwayo, J. J., and Kreiss, J. K. (2002). Correlates of human herpesvirus 8 seropositivity among heterosexual men in Kenya. *Aids* **16**(15), 2073-8.
- Bourboulia, D., Whitby, D., Boshoff, C., Newton, R., Beral, V., Carrara, H., Lane, A., and Sitas, F. (1998). Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *Jama* **280**(1), 31-2.
- Brayfield, B. P., Phiri, S., Kankasa, C., Muyanga, J., Mantina, H., Kwenda, G., West, J. T., Bhat, G., Marx, D. B., Klaskala, W., Mitchell, C. D., and Wood, C. (2003). Postnatal human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 infection in mothers and infants from Zambia. *J Infect Dis* **187**(4), 559-68.
- Brown, E. E., Whitby, D., Vitale, F., Fei, P. C., Del Carpio, C., Marshall, V., Alberg, A. J., Serraino, D., Messina, A., Gafa, L., and Goedert, J. J. (2005). Correlates of Human Herpesvirus-8 DNA detection among adults in Italy without Kaposi sarcoma. *Int J Epidemiol* **34**(5), 1110-7.
- Cannon, M. J., Dollard, S. C., Smith, D. K., Klein, R. S., Schuman, P., Rich, J. D., Vlahov, D., and Pellett, P. E. (2001). Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **344**(9), 637-43.

- Casper, C., Redman, M., Huang, M. L., Pauk, J., Lampinen, T. M., Hawes, S. E., Critchlow, C. W., Morrow, R. A., Corey, L., Kiviat, N., and Wald, A. (2004). HIV infection and human herpesvirus-8 oral shedding among men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr* **35**(3), 233-8.
- Chang, J., Renne, R., Dittmer, D., and Ganem, D. (2000). Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology* **266**(1), 17-25.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., and Moore, P. S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**(5192), 1865-9.
- Chatlynne, L. G., Lapps, W., Handy, M., Huang, Y. Q., Masood, R., Hamilton, A. S., Said, J. W., Koeffler, H. P., Kaplan, M. H., Friedman-Kien, A., Gill, P. S., Whitman, J. E., and Ablashi, D. V. (1998). Detection and titration of human herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**(1), 53-8.
- Chohan, B. H., Taylor, H., Obrigewitch, R., Lavreys, L., Richardson, B. A., Mandaliya, K. N., Bwayo, J. J., Kreiss, J. K., and Morrow, R. A. (2004). Human herpesvirus 8 seroconversion in Kenyan women by enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay. *J Clin Virol* **30**(2), 137-44.
- Corey, L., Brodie, S., Huang, M. L., Koelle, D. M., and Wald, A. (2002). HHV-8 infection: a model for reactivation and transmission. *Rev Med*

Virol **12**(1), 47-63.

Dukers, N. H., and Rezza, G. (2003). Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know. *Aids* **17**(12), 1717-30.

Dupon, M., Masquelier, B., Cazorla, C., Chene, G., Dumon, B., Ragnaud, J. M., de Barbeyrac, B., Bebear, C., Lacut, J. Y., and Fleury, H. J. (1997). Acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 DNA detection in serial peripheral blood mononuclear cell samples. *Res Virol* **148**(6), 417-25.

El-Serag, H. B., Richardson, P. A., and Everhart, J. E. (2001). The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* **96**(8), 2462-7.

Ensoli, B., Nicastrì, E., Ventura, L., Ercoli, L., Sarmati, L., and Rocchi, G. (1999). High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* **91**(5), 465-9.

El Sawaf, G., El Zalabani, M., Uccella, I., Bugarini, R., Parisi, S. G., and Rezza, G. (2002). Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. *Jama* **287**(10), 1295-300.

Ford, P. W., Hamden, K. E., Whitman, A. G., Bryan, B. A., Chintalgattu, V., McCubrey, J. A., Dyson, O. F., and Akula, S. M. (2005). Cigarette smoke concentrate inhibits Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *Virus Res* **114**(1-2), 172-6.

Geerlings, S. E., and Hoepelman, A. I. (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**(3-4), 259-65.

Guttman-Yassky, E., Dubnov, J., Kra-Oz, Z., Friedman-Birnbaum, R.,

- Silbermann, M., Barchana, M., Bergman, R., and Sarid, R. (2006). Classic Kaposi sarcoma. Which KSHV-seropositive individuals are at risk? *Cancer* **106**(2), 413-9.
- Han, T. H., Chung, J. Y., and Kim, S. W. (2005). Seroprevalence of human herpesvirus 8 in children in Seoul, Korea. *Pediatr Infect Dis J* **24**(5), 476.
- Haverkos, H. W., Battula, N., Drotman, D. P., and Rennert, O. M. (2003). Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* **57**(9), 379-85.
- Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tyring, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A., and Seeber, S. (2002). Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis* **2**(5), 281-92.
- Herr, H., Kim, J. U., Kang, G. H., Moon, K. C., and Koh, J. K. (2001). Kaposi's sarcoma occurring during short-term dialysis: report of two cases. *J Korean Med Sci* **16**(1), 130-4.
- Hsu, Y. H., Kuo, W. L., and Su, I. J. (2001). Clinicopathologic study of Kaposi's sarcoma and strain analysis of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in the Hua-Lien area of eastern Taiwan. *J Formos Med Assoc* **100**(7), 449-54.
- Huang, L. M., Huang, S. Y., Chen, M. Y., Chao, M. F., Lu, C. Y., Tien, H. F., Lee, C. Y., and Jeang, K. T. (2000). Geographical differences in human herpesvirus 8 seroepidemiology: a survey of 1,201 individuals in Asia. *J Med Virol* **60**(3), 290-3.
- Hyoty, H., Hiltunen, M., and Lonrot, M. (1998). Enterovirus infections and

- insulin dependent diabetes mellitus--evidence for causality. *Clin Diagn Virol* **9**(2-3), 77-84.
- Klaskala, W., Brayfield, B. P., Kankasa, C., Bhat, G., West, J. T., Mitchell, C. D., and Wood, C. (2005). Epidemiological characteristics of human herpesvirus-8 infection in a large population of antenatal women in Zambia. *J Med Virol* **75**(1), 93-100.
- Lennette, E. T., Blackbourn, D. J., and Levy, J. A. (1996). Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**(9031), 858-61.
- Martin, J. N., Ganem, D. E., Osmond, D. H., Page-Shafer, K. A., Macrae, D., and Kedes, D. H. (1998). Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* **338**(14), 948-54.
- Mbulaiteye, S. M., Atkinson, J. O., Whitby, D., Wohl, D. A., Gallant, J. E., Royal, S., Goedert, J. J., and Rabkin, C. S. (2006). Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity in the AIDS Cancer Cohort Study. *J Clin Virol* **35**(4), 442-9.
- Monini, P., de Lellis, L., Fabris, M., Rigolin, F., and Cassai, E. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med* **334**(18), 1168-72.
- Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J., and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* **70**(1), 549-58.
- Muralidhar, S., Veytsmann, G., Chandran, B., Ablashi, D., Doniger, J., and Rosenthal, L. J. (2000). Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF

- K12). *J Clin Virol* **16**(3), 203-13.
- Nawar, E., Mbulaiteye, S. M., Gallant, J. E., Wohl, D. A., Ardini, M., Hendershot, T., Goedert, J. J., and Rabkin, C. S. (2005). Risk factors for Kaposi's sarcoma among HHV-8 seropositive homosexual men with AIDS. *Int J Cancer* **115**(2), 296-300.
- Operskalski, E. A., Busch, M. P., Mosley, J. W., and Kedes, D. H. (1997). Blood donations and viruses. *Lancet* **349**(9061), 1327.
- Osmond, D. H., Buchbinder, S., Cheng, A., Graves, A., Vittinghoff, E., Cossen, C. K., Forghani, B., and Martin, J. N. (2002). Prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection in homosexual men at beginning of and during the HIV epidemic. *Jama* **287**(2), 221-5.
- Pak, F., Pyakural, P., Kokhaei, P., Kaaya, E., Pourfathollah, A. A., Selivanova, G., and Biberfeld, P. (2005). HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Cutan Pathol* **32**(1), 21-7.
- Pauk, J., Huang, M. L., Brodie, S. J., Wald, A., Koelle, D. M., Schacker, T., Celum, C., Selke, S., and Corey, L. (2000). Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* **343**(19), 1369-77.
- Pellett, P. E., Wright, D. J., Engels, E. A., Ablashi, D. V., Dollard, S. C., Forghani, B., Glynn, S. A., Goedert, J. J., Jenkins, F. J., Lee, T. H., Neipel, F., Todd, D. S., Whitby, D., Nemo, G. J., and Busch, M. P. (2003). Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion* **43**(9), 1260-8.
- Pierrotti, L. C., Etzel, A., Sumita, L. M., Braga, P. E., Eluf-Neto, J., de Souza, V. A., and Segurado, A. A. (2005). Human herpesvirus 8 (HHV-8)

- infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. *Sex Transm Dis* **32**(1), 57-63.
- Plancoulaine, S., Abel, L., van Beveren, M., Tregouet, D. A., Joubert, M., Tortevoeye, P., de The, G., and Gessain, A. (2000). Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet* **356**(9235), 1062-5.
- Rainbow, L., Platt, G. M., Simpson, G. R., Sarid, R., Gao, S. J., Stoiber, H., Herrington, C. S., Moore, P. S., and Schulz, T. F. (1997). The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* **71**(8), 5915-21.
- Regamey, N., Tamm, M., Wernli, M., Witschi, A., Thiel, G., Cathomas, G., and Erb, P. (1998). Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med* **339**(19), 1358-63.
- Renwick, N., Dukers, N. H., Weverling, G. J., Sheldon, J. A., Schulz, T. F., Prins, M., Coutinho, R. A., and Goudsmit, J. (2002). Risk factors for human herpesvirus 8 infection in a cohort of drug users in the Netherlands, 1985-1996. *J Infect Dis* **185**(12), 1808-12.
- Renwick, N., Halaby, T., Weverling, G. J., Dukers, N. H., Simpson, G. R., Coutinho, R. A., Lange, J. M., Schulz, T. F., and Goudsmit, J. (1998). Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *Aids* **12**(18), 2481-8.
- Russo, J. J., Bohenzky, R. A., Chien, M. C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J. P., Peruzzi, D., Edelman, I. S., Chang, Y., and Moore, P. S. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated

- herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25), 14862-7.
- Sarmati, L., Carlo, T., Rossella, S., Montano, M., Adalgisa, P., Rezza, G., and Andreoni, M. (2004). Human herpesvirus-8 infection in pregnancy and labor: lack of evidence of vertical transmission. *J Med Virol* **72**(3), 462-6.
- Schulz, T. F., Sheldon, J., and Greensill, J. (2002). Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8 (HHV8). *Virus Res* **82**(1-2), 115-26.
- Serraino, D., Angeletti, C., Carrieri, M. P., Longo, B., Piche, M., Piselli, P., Arbustini, E., Burra, P., Citterio, F., Colombo, V., Fuzibet, J. G., Dal Bello, B., Targhetta, S., Grasso, M., Pozzetto, U., Bellelli, S., Dorrucchi, M., Dal Maso, L., Busnach, G., Pradier, C., and Rezza, G. (2005). Kaposi's sarcoma in transplant and HIV-infected patients: an epidemiologic study in Italy and France. *Transplantation* **80**(12), 1699-704.
- Serraino, D., Toma, L., Andreoni, M., Butto, S., Tchangmena, O., Sarmati, L., Monini, P., Franceschi, S., Ensoli, B., and Rezza, G. (2001). A seroprevalence study of human herpesvirus type 8 (HHV8) in eastern and Central Africa and in the Mediterranean area. *Eur J Epidemiol* **17**(9), 871-6.
- Simpson, G. R., Schulz, T. F., Whitby, D., Cook, P. M., Boshoff, C., Rainbow, L., Howard, M. R., Gao, S. J., Bohenzky, R. A., Simmonds, P., Lee, C., de Ruiter, A., Hatzakis, A., Tedder, R. S., Weller, I. V., Weiss, R. A., and Moore, P. S. (1996). Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**(9035),

1133-8.

- Sosa, C., Benetucci, J., Hanna, C., Sieczkowski, L., Deluchi, G., Canizal, A. M., Mantina, H., Klaskala, W., Baum, M., and Wood, C. (2001). Human herpesvirus 8 can be transmitted through blood in drug addicts. *Medicina (B Aires)* **61**(3), 291-4.
- Szalai, E., Gerlei, Z., Szlavik, J., Szladek, G., Patel, R., Hunyadi, J., Gergely, L., and Juhasz, A. (2005). Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**(2), 265-8.
- Tedeschi, R., Bidoli, E., Agren, A., Hallmans, G., Wadell, G., De Paoli, P., and Dillner, J. (2006). Epidemiology of Kaposi's Sarcoma herpesvirus (HHV8) in Vasterbotten County, Sweden. *J Med Virol* **78**(3), 372-8.
- Thuluvath, P. J., and John, P. R. (2003). Association between hepatitis C, diabetes mellitus, and race. a case-control study. *Am J Gastroenterol* **98**(2), 438-41.
- Topino, S., Vincenzi, L., Mezzaroma, I., Nicastrì, E., Andreoni, M., and Sirianni, M. C. (2001). Correlation between enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay with lytic antigens for detection of antibodies to human herpesvirus 8. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(1), 203-5.
- Uetz, P., Dong, Y. A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S. V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E., and Haas, J. (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**(5758), 239-42.
- Wang, G. Q., Xu, H., Wang, Y. K., Gao, X. H., Zhao, Y., He, C., Inoue, N., and Chen, H. D. (2005). Higher prevalence of human herpesvirus 8

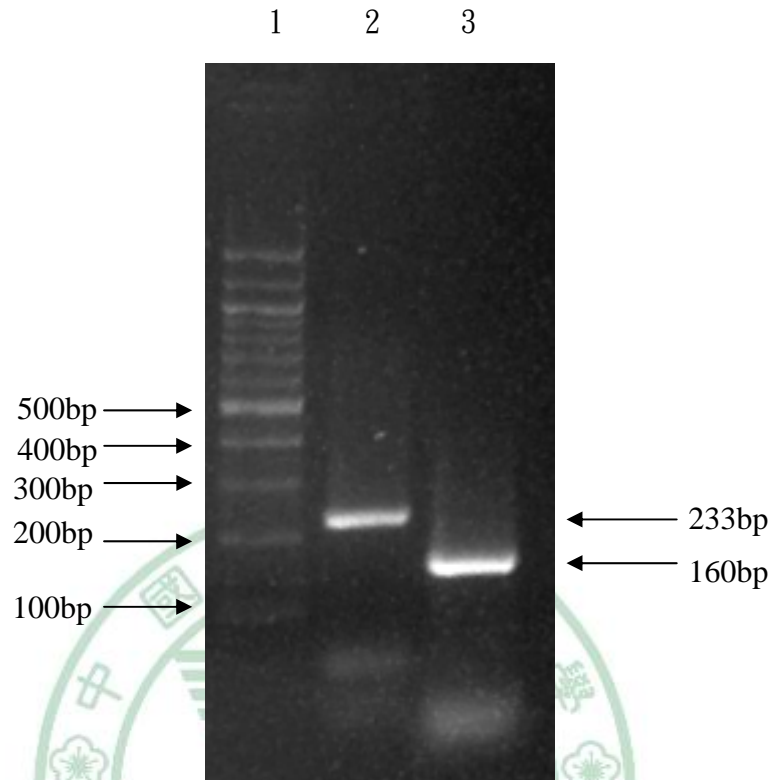
DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol* **52**(3 Pt 1), 460-7.

Wang, Y. F., Lee, S. B., Cheng, L. C., Tai, M. H., and Su, I. J. (2002).

Detection of serum antibodies to three different recombinant antigens of human herpesvirus 8 by immunoblotting: seroprevalence studies in Taiwan. *Clin Chim Acta* **320**(1-2), 37-42.

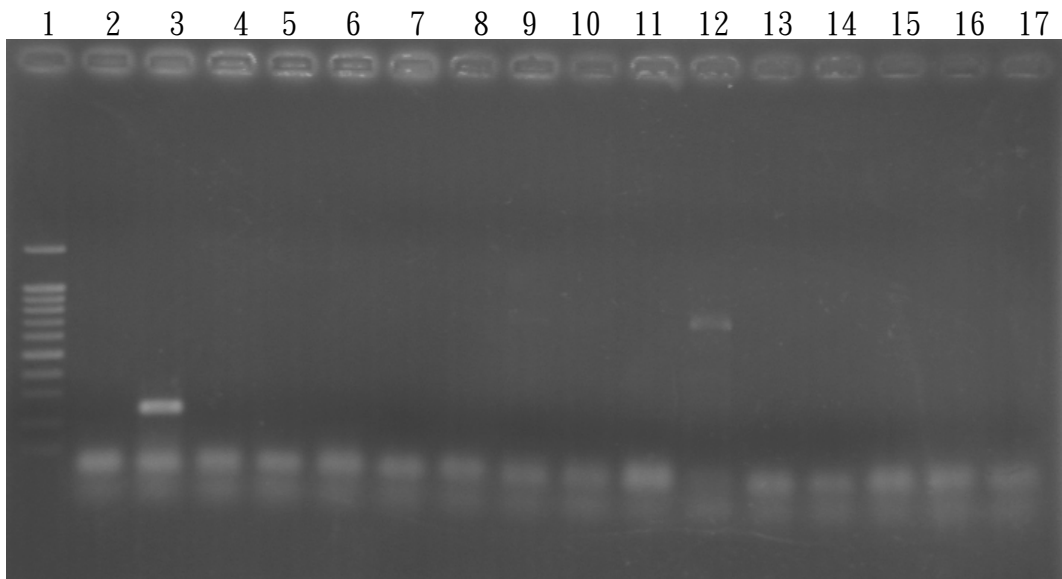


圖



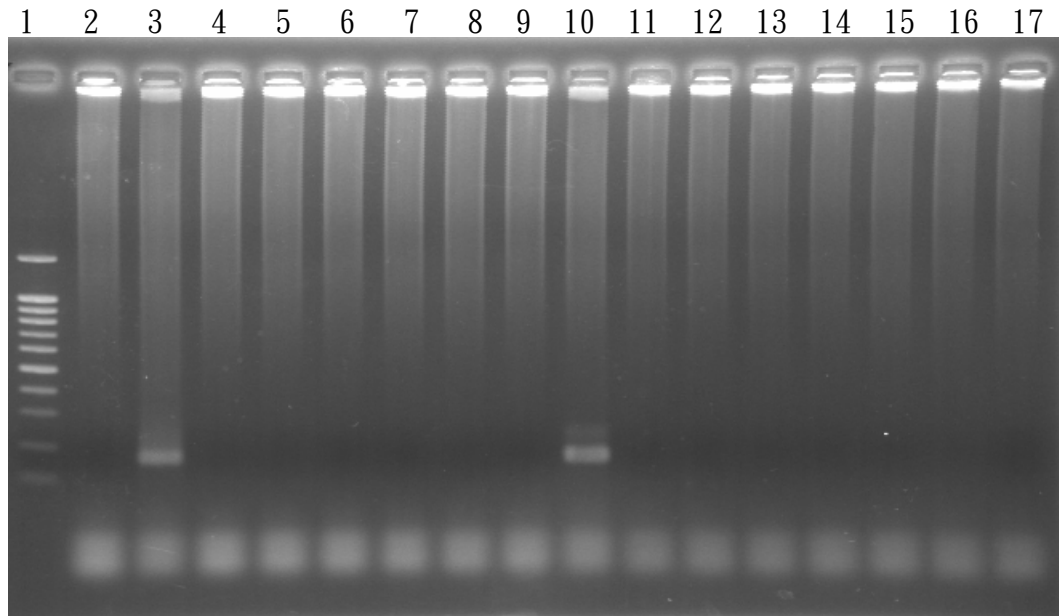
圖一 以 nested PCR 檢驗 positive control 結果

以病毒 DNA 為 Template 進行 nested PCR。Lane 1 為 maker；Lane 2 為 nested PCR 的第一次反應，產物 233bp；Lane 3 為 nested PCR 的第二次反應，產物 160bp。



圖二 以 nested PCR 檢驗愛滋病毒帶原者之第一次反應結果

Lane 1 為 maker ; Lane 2 為 negative control ; Lane 3 為 positive control , 產物片段 233bp ; Lane 4~17 是以愛滋病毒帶原者之 DNA 為 Template 進行 nested PCR 第一次反應之電泳結果。

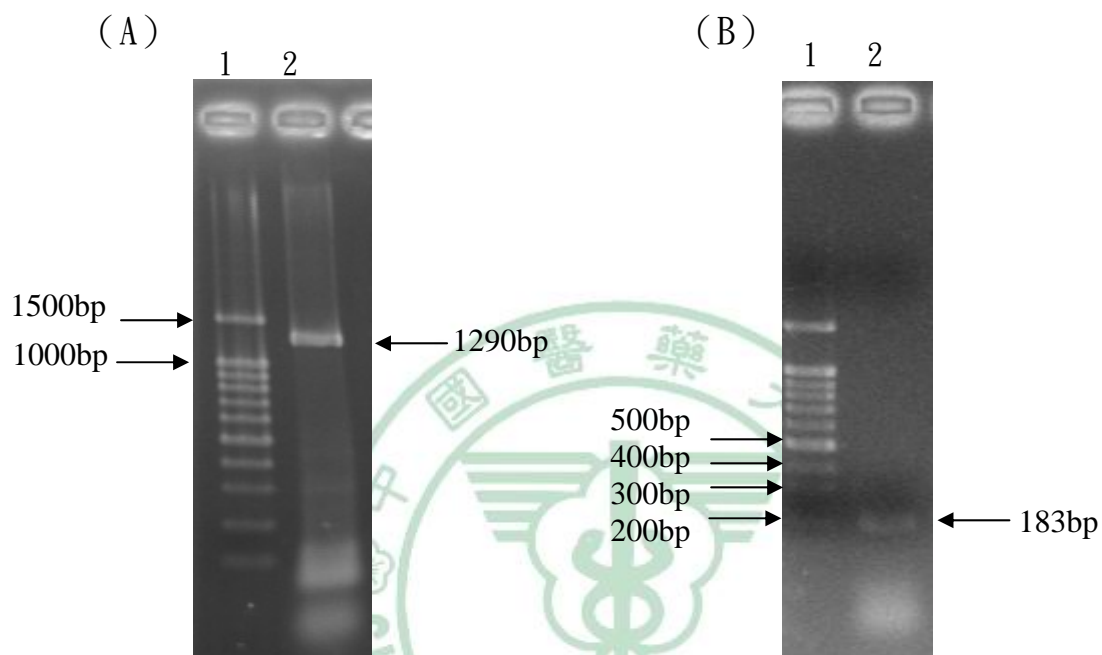


圖三 以 nested PCR 檢驗愛滋病毒帶原者之第二次反應結果

Lane 1 為 maker ; Lane 2 為 negative control ; Lane 3 為 positive control , 產物片段 160bp ; Lane 4~17 是以愛滋病毒帶原者之 DNA 為

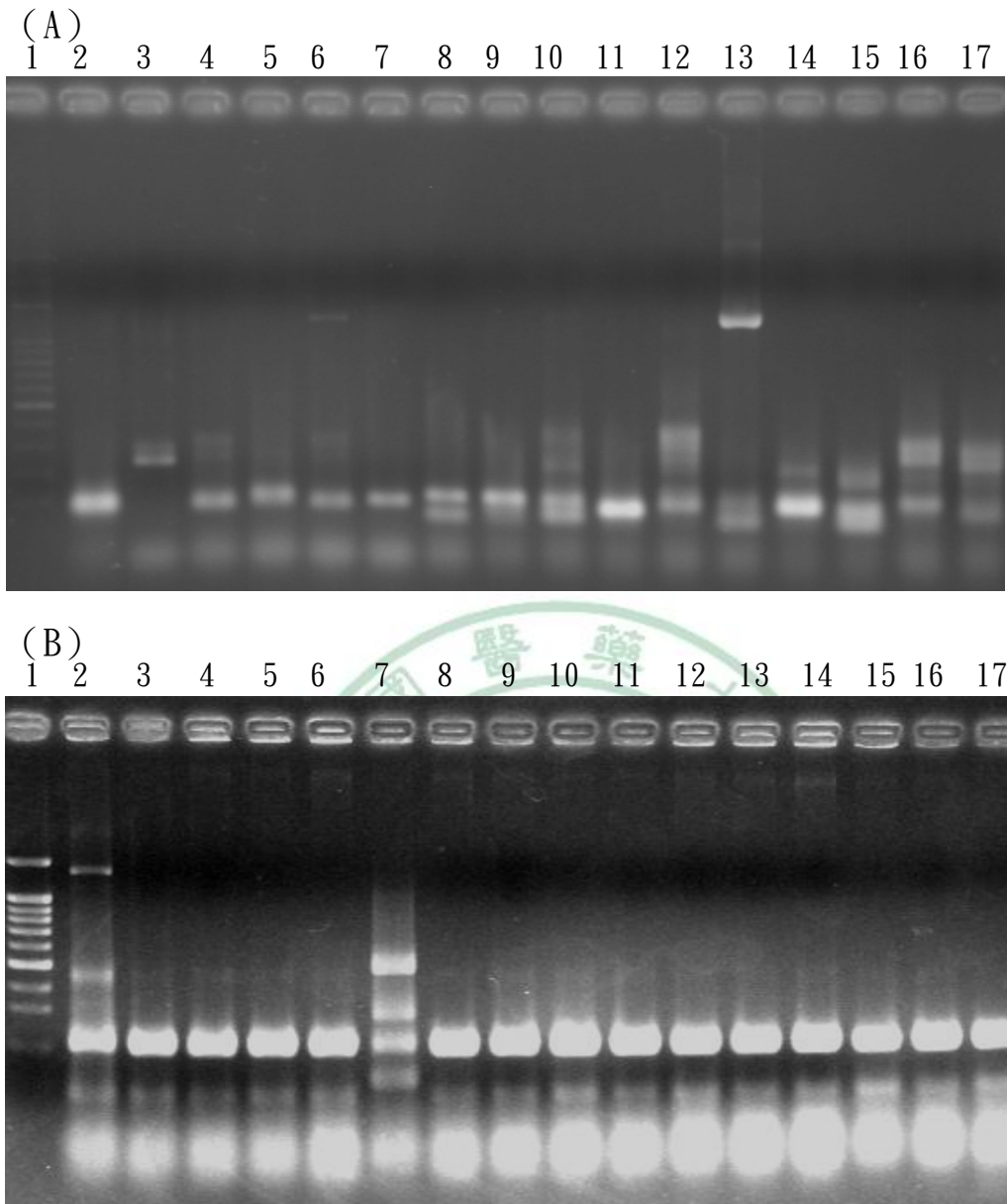
Template 進行 nested PCR 第二次反應之電泳結果 , lane10 被判別為 HHV-8

DNA 陽性。



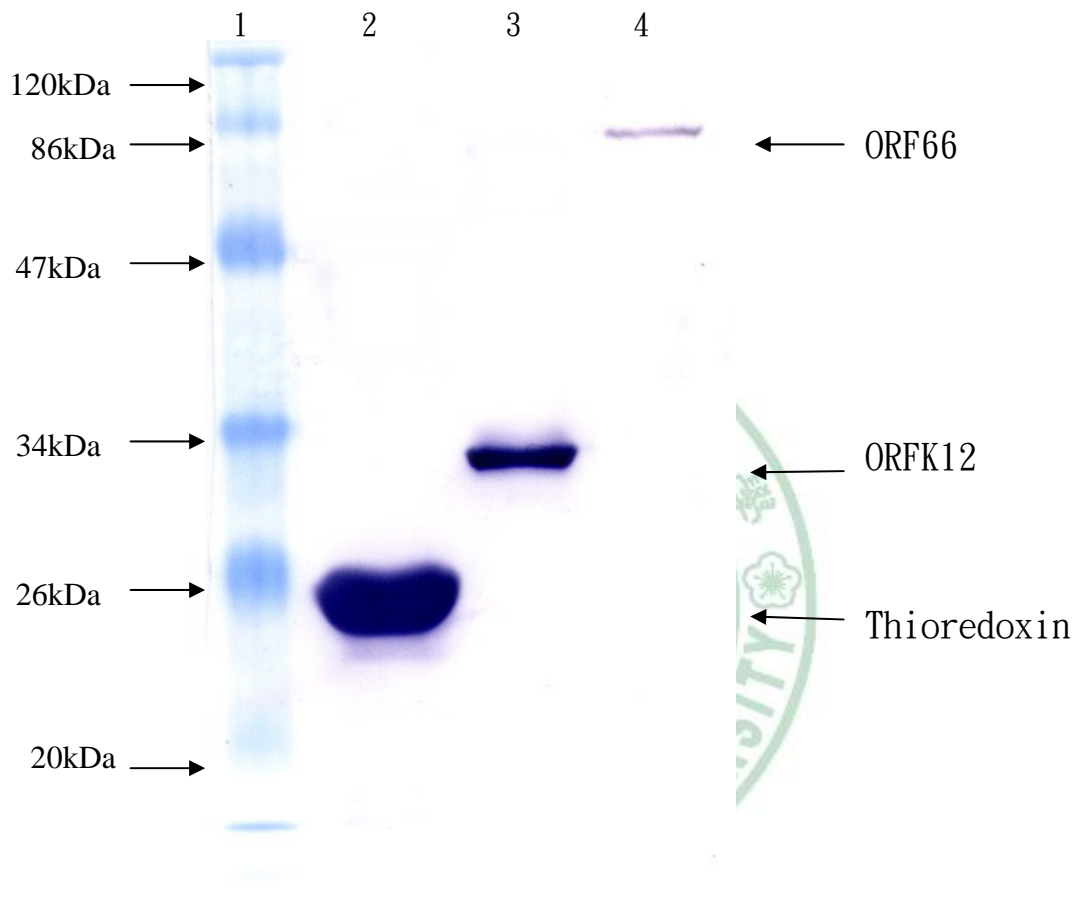
圖四 ORF66 與 ORFK12 PCR 反應後的電泳結果

(A) 為 ORF66 之電泳結果。Lane 1 為 maker；Lane 2 為 ORF66 之 PCR 反應片段，產物片段為 1290bp。(B) 為 ORFK12 之電泳結果。Lane 1 為 maker；Lane 2 為 ORFK12 之 PCR 反應片段，產物片段為 183bp。



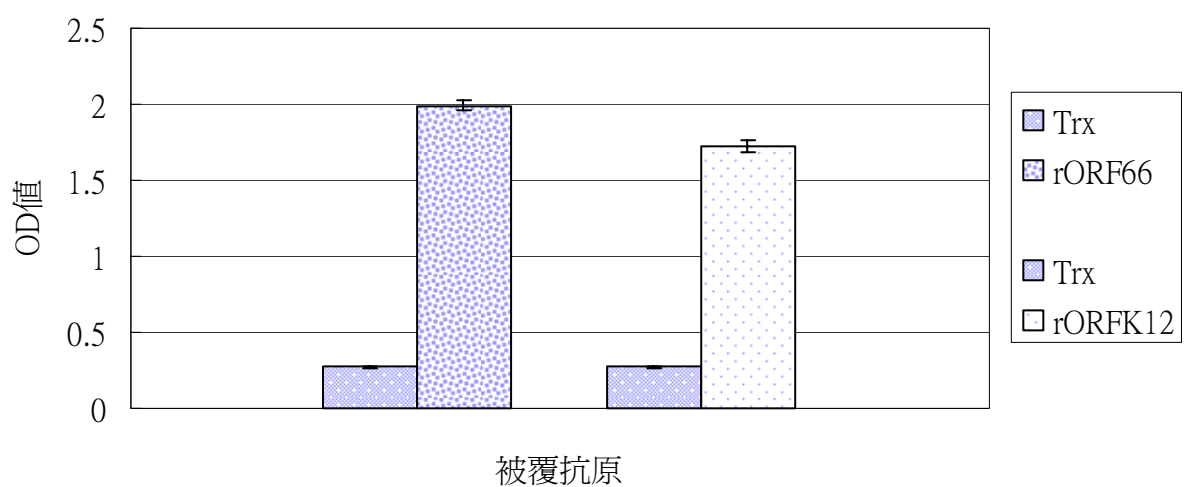
圖五 由 16 管菌液中純化質體 rORF66 與 rORFK12 進行 PCR 反應後的電泳圖

(A) 為篩選 Top10 的 vector 中是否含有 rORF66；Lane 1 為 maker；Lane 2~17 為 rORF66 之 PCR 結果，產物為 1290bp，將 lane 13 送定序。(B) 為篩選 Top10 的 vector 中是否含有 rORFK12；Lane 1 為 maker；Lane 2~17 為 rORFK12 之 PCR 結果，產物為 183bp，將 lane 8~17 送定序。



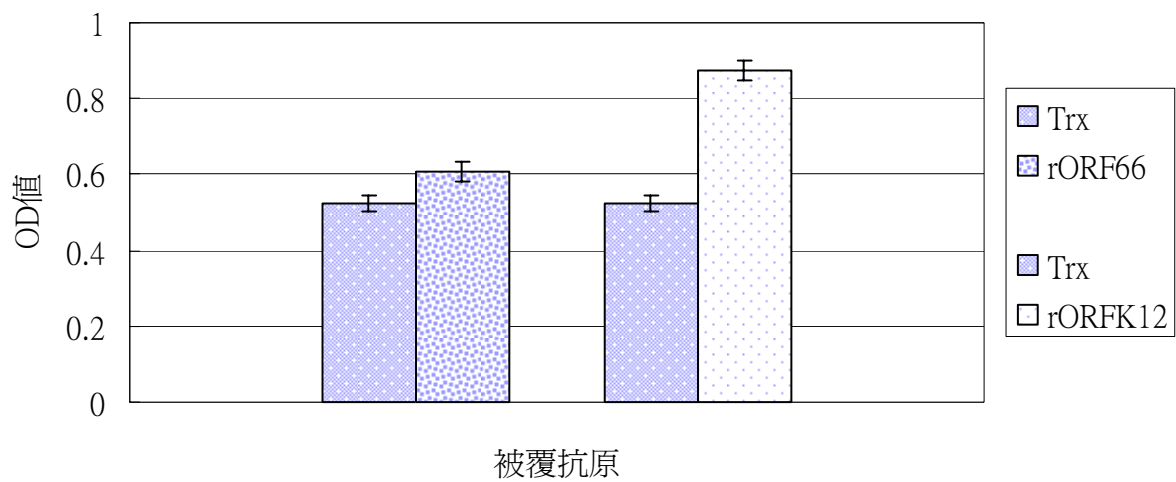
圖六 以西方墨點法進行蛋白質純化後產物之測定

本研究純化了HHV-8 ORF66蛋白、HHV-8 ORFK12蛋白、pET32a上的 Thioredoxin等蛋白。Lane 1 為maker；Lane 2為由pET32a上所純化的 Thioredoxin等；Lane 3為ORFK12蛋白；Lane 4為ORF66蛋白。



圖七 以酵素免疫分析法進行血清篩檢之陽性個案其OD值分佈結果

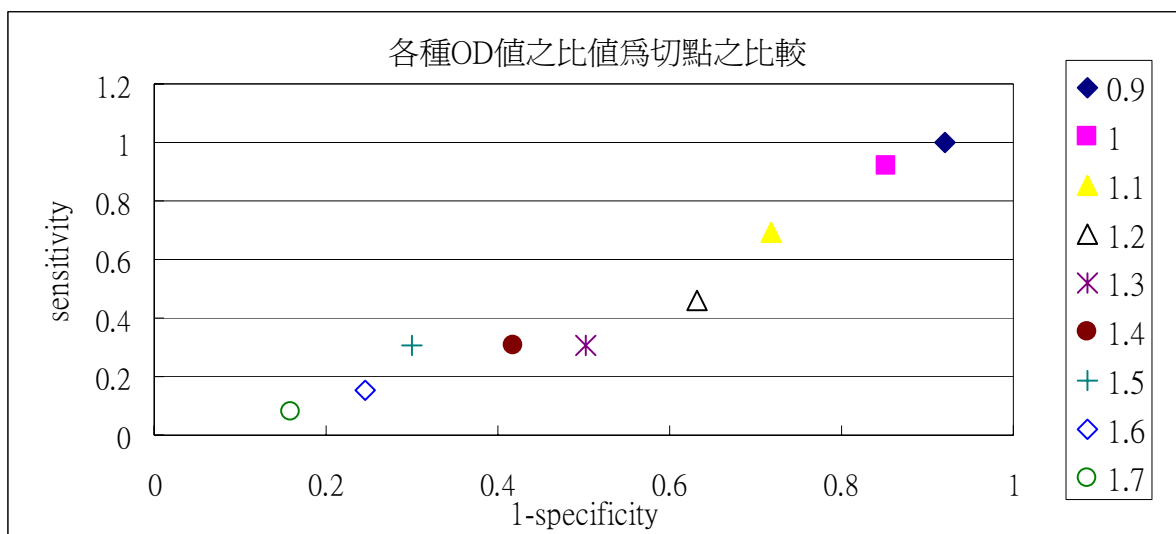
在完成酵素免疫分析法（ELISA）後，HHV-8 rORF66/thioredoxin之OD值超過1.2且HHV-8 rORFK12/thioredoxin之OD值超過1.2則定義為陽性。本個案為陽性控制組，其nested PCR與ELISA結果皆為陽性。



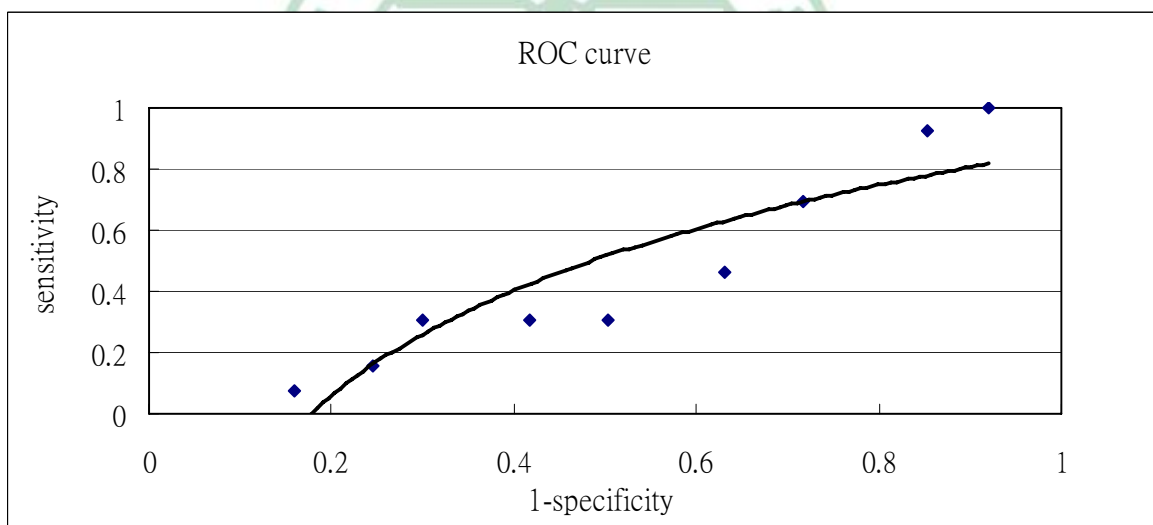
圖八 以酵素免疫分析法進行血清篩檢之陰性個案其OD值分佈結果

在完成酵素免疫分析法（ELISA）後，HHV-8 rORF66/thioredoxin之OD值小於1.2且HHV-8 rORFK12/thioredoxin之OD值小於1.2則定義為陰性。此個案於nested PCR、ELISA皆為陰性反應。

(A)

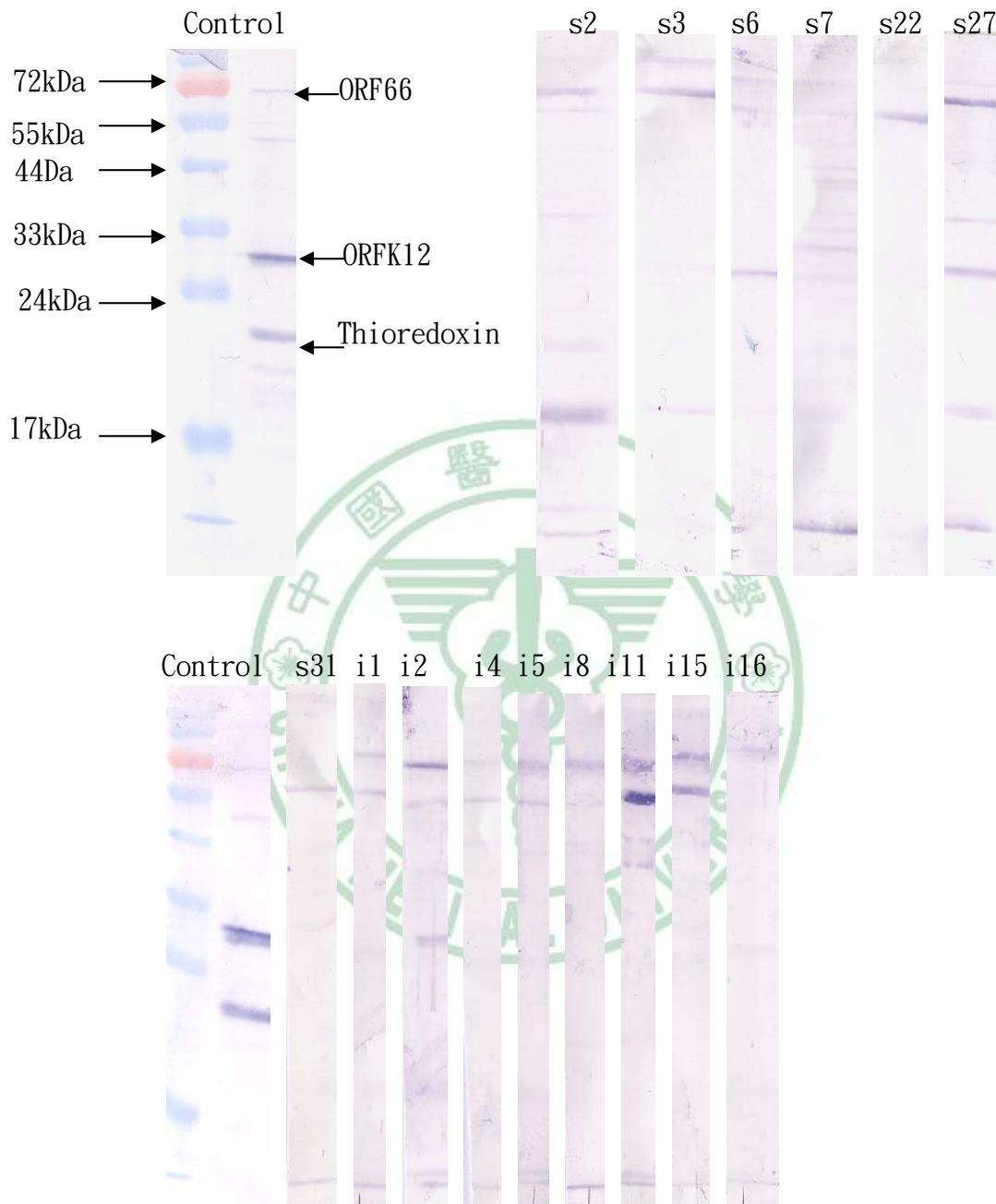


(B)



圖九 以各 OD 值之比值為切點之比較與 ROC 曲線

(A)圖的各點為ELISA分析後，rORF66與rORFK12之OD值與thioredoxin之OD值相除，以0.9至1.7作為陽性判別的切點，並以nested PCR之結果為準則，計算出各點的sensitivity與specificity。(B)圖為ROC曲線，最後以OD值的比值為1.2作為切點。



圖十 以 Western blotting 進行 HHV-8 陽性的二次確認結果

每張轉印紙皆有一個 Control 組，其他以愛滋病毒帶原者血漿為一抗的轉印紙在停止呈色反應後，再與 Control 對照呈色位置來決定是否具有特異性抗體。

表

表一 不同族群之 HHV-8 ELISA 檢測結果分佈比較

	愛滋病毒帶原者(%) (HHV-8 陽性人數/總人數)	糖尿病患者(%) (HHV-8 陽性人數/總人數)	一般族群(%) (HHV-8 陽性人數/總人數)
年齡 (歲)			
≤30	63%(53/83)	0%(0/2)	7.5%(6/80)
>30	60.22%(56/93)	36.45%(109/299)	20%(4/20)
<i>p-value</i> *	0.62	0.54	0.11
性別			
男	73.68%(14/19)	33.08%(44/133)	13.33%(8/60)
女	60.51%(95/157)	38.69%(65/168)	5%(2/40)
<i>p-value</i> *	0.26	0.32	0.31

*使用卡方檢定或費雪氏檢定



表二 愛滋病毒帶原者 HHV-8 DNA 陽性與基本人口學變項相關性分析

	HHV-8DNA 陰性 (n=163)(%)	HHV-8 DNA 陽性 (n=13)(%)	<i>P- value*</i>
年齡 (歲)	32.6±8.9	34.2±7.2	0.54
性別			
女	19(100)	0(0)	0.37
男	144(91.72)	13(8.28)	
傳染方式			
性行為傳遞	58(92.06)	5(7.94)	1.00
靜脈注射傳遞	105(92.92)	8 (7.08)	
血漿中 HIV 病毒量 (copies/ml)			
低 (<1000)	52(91.23)	5(8.77)	0.35
中 (1000~9999)	31(88.57)	4(11.43)	
高 (≥10000)	80(95.24)	4(4.76)	
CD4 數目** (cells/mm ³)	476.18±232.29	500±176.11	0.78
<200	11(100)	0(0)	0.85
200~499	73(94.81)	4(5.19)	
≥500	52(92.86)	4(7.14)	
後天免疫不全症候群			
無	150(93.17)	11(6.83)	0.31
有	13(86.67)	2(13.33)	

*使用費雪氏檢定

**CD4 數目有 32 個遺漏值

表三 愛滋病毒帶原者 HHV-8 ELISA 檢測結果與基本人口學變項分佈

	HHV-8 ELISA 陰性 (n=67)(%)	HHV-8 ELISA 陽性 (n=109)(%)	<i>P</i> -value
年齡 (歲)	33.02±9.48	32.55±8.32	0.73
性別			
女	5(26.32)	14(73.68)	0.26
男	62(39.49)	95(60.51)	
傳染方式			
性行為傳遞	43(68.25)	20(31.75)	<0.0001
靜脈注射傳遞	24(21.24)	89(78.76)	
血漿中 HIV 病毒量(copies/ml)			
低 (<1000)	25(43.86)	32(56.14)	0.53
中 (1000~9999)	13(37.14)	22(62.86)	
高 (≥10000)	29(34.52)	55(65.48)	
CD4 數目* (cells/mm) ³	442.06±234.91	495.79±225.24	0.18
<200	4(36.36)	7(63.64)	0.54
200~499	29(37.66)	48(62.34)	
≥500	16(28.57)	40(71.43)	
後天免疫不全症候群			
無	62(38.51)	99(61.49)	0.69
有	5(33.33)	10(66.67)	
HHV-8 DNA			0.22
陰性	60(36.81)	103(63.19)	
陽性	7(58.85)	6(46.15)	

* CD4 數目有遺漏值 32 位

表四 愛滋病毒帶原者 HHV-8 ELISA 檢測結果與危險因子之多變項邏輯斯回歸分析

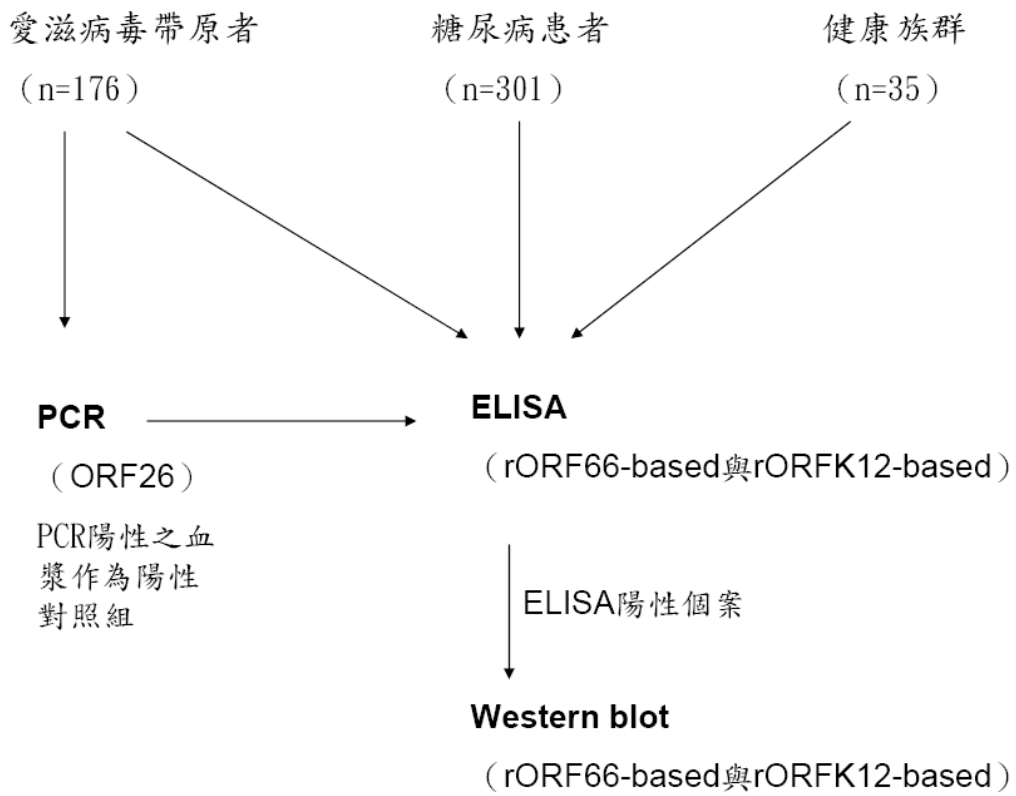
	Model 1		Model 2	
	aOR 值*	95% C.I	aOR 值*	95% C.I
年齡 (歲)				
≤30	1		-	-
>30	2.66	(0.26~1.48)	-	-
性別				
女	1		-	-
男	2.4	(0.58~9.89)	-	-
傳染方式				
性行為傳遞	1		1	
靜脈注射傳遞	0.09	(0.03~0.23)	0.11	(0.05~0.28)
血漿中 HIV 病毒量(copies/ml)				
低 (<1000)	1		1	
中 (1000~9999)	0.92	(0.28~2.97)	1.11	(0.36~3.4)
高 (≥10000)	1.15	(0.43~3.06)	1.22	(0.48~3.13)
CD4 數目** (cells/mm ³)				
<200	1		1	
200~499	2.66	(0.53~13.32)	3.21	(0.7~14.83)
≥500	1.95	(0.35~11.01)	2.81	(0.55~14.38)
HHV-8 DNA				
陰性	1		-	-
陽性	3.04	(0.63~14.65)	-	-
後天免疫不全症候群				
無	1		-	-
有	0.16	(0.02~1.77)	-	-

*aOR: adjusted odds ratio

表五 糖尿病患者 HHV-8 ELISA 檢驗結果與基本人口學變項分佈和危險因子之多變項邏輯斯回歸模型

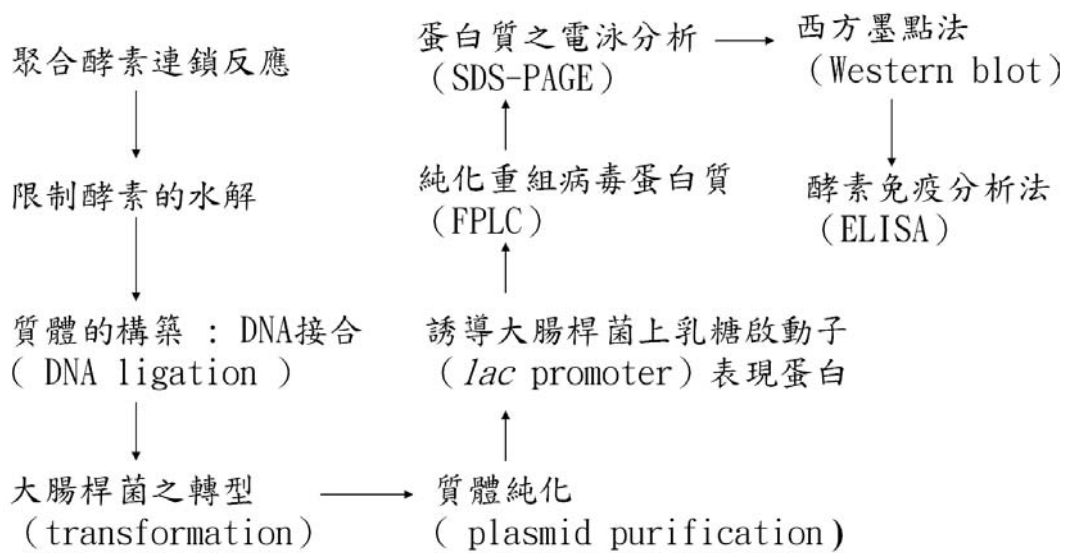
	HHV-8 ELISA 陰性 (n=192)(%)	HHV-8 ELISA 陽性 (n=109)(%)	<i>P</i> -value	aOR 值	95%CI
年齡 (歲)	62.41±11.85	62.91±11.59	0.72		
<60	83(64.34)	46(35.66)	0.86	1	
≥60	109(63.37)	63(36.63)		0.97	(0.6~1.56)
性別					
女	103(61.31)	65(38.69)	0.31	1	
男	89(66.92)	44(33.08)		1.32	(0.82~2.14)
HbA1c	0.08±0.02	0.08±0.02	0.3		
<0.7	55(57.89)	26(27.37)	0.15	1	
≥0.7	137(66.5)	69(33.5)		1.48	(0.89~2.45)

附圖



附圖一 研究設計

ORF66, ORFK12



附圖二 實驗流程

附錄

使用藥劑

1. DNA 電泳 (DNA electrophoresis)

- (1) TAE buffer : 40 mM Tris.Acetate, 2 mM EDTA, pH=8.5
- (2) EtBr : 0.5 /ml 溴化乙苯啡啶 ethidium bromide
- (3) DNA 染劑 : 0.25%(w/v) bromophenol blue, 0.25%(w/v)xylene
cyaol FF, 30%(v/v)glycerol in ddH₂O

2. 蛋白質濃度測定 (Protein concentrate detection)

- (1) Protein Standard : bovine serum albumin (1mg/1ml)
- (2) Protein assay dye : Bio-RAD Protein assay dye reagent
concentrat, 450 ml

3. 蛋白質之電泳分析與西方轉漬分析

- (1) 1.5M Tris-base (pH8.8) : 5.4g tris-base add ddH₂O 250ml pH=8.8
- (2) 0.5M Tris-HCl (pH6.8) : 7.88gtris-HCl, dd ddH₂O 100ml, pH=6.8
- (3) 10% SDS : 10g SDS sodium dodecyl sulfate , add ddH₂O 100ml
- (4) 10% APS : ammonium persulfate 1g/10ml ddH₂O
- (5) 4% Stacking gel : ddH₂O 1.35ml, 30%Acy/Bis 0.27ml, 0.5M

- Tris-HCl (pH6.8) 0.55ml, APS 10% 22.5 μ l, 10% SDS
22.5 μ l, TEMED 3.5 μ l
- (6) 12% separating gel : ddH₂O 4ml , 30 % Acy/Bis 4.8ml, 1.5M
Tris-base (pH8.8) 3.0ml, APS 10% 120 μ l, 10% SDS 120 μ l, TEMED
6.5 μ l
- (7) 2X sample loading buffer : glyceol 2.5 ml , 2-mercaptoethanol
100 μ l, 10% SDS 2 ml, 0.5 M Tris-HCl 1.25 ml, pH6.8, 0.5%
(W/V) bromophenyl blue 0.2ml, ddH₂O 3.55 ml , glycerol 2.5ml
- (8) 10X running buffer : 30g tris-base, 144g glycine, 10% SDS 100ml
add distilled water to 1L
- (9) Comassie brilliant blue 染色液 : 40% methanol , 10% acetic
acid, 0.1% Comassie brilliant blue-250
- (10) Destain solution : 40% methanol , 10% acetic acid
- (11) Transfer buffer : 8.72g tris-base, 4.4g glycine, add ddH₂O
to 1.5L, pH 8.4, add methanol 300ml, 10% SDS 5.6ml store at 4
°C.
- (12) 10x TBS (Tris buffer saline) : 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5
M NaCl
- (13) 1x TBST : 1x TBS contain 0.1% Tween-20

(14) 5% skim milk : 2.5g skim milk/50ml TBST

4. 純化蛋白質 (FPLC)

(1) 8x Phosphate buffer : 1.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (177.99 g/mol),
1.11 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (137.99 g/mol) , 23.38 g NaCl (58.44
g/mol), add distilled water to 90 ml, pH 7.4. Add distilled
water to 100 ml and filter through a 0.45 μm filter. This
gives a final concentration of 160 mM phosphate and 4 M NaCl.

(2) 0.1 M NiSO_4 : 2.63g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (262.86/mol) add distilled
water to 100ml filter through a 0.45 μm filter

(3) 10mM Imidazole : 62.5ml Phosphate buffer 8x stock solution
(pH 7.4) , 2.5ml 2 M Imidazole (pH 7.4) , add distilled
water to 500ml

(4) 40mM Imidazole : 62.5ml Phosphate buffer 8x stock solution
(pH 7.4) , 25ml 2 M Imidazole (pH 7.4) , add distilled water
to 500ml

(5) 100mM Imidazole : 62.5ml Phosphate buffer 8x stock solution
(pH 7.4) , 100ml 2 M Imidazole (pH 7.4) , add distilled
water to 500ml

使用儀器

- (1) 4°C 冰箱 (DEL-625)
- (2) -20°C 冰箱 (Caravel1)
- (3) -80°C 低溫冷凍機 (Revco)
- (4) 恆溫水浴槽 (TKS)
- (5) PCR Express (Thermo Hybaid)
- (6) PCR System 480 (PERKIN ELMER)
- (7) Mini gel migration trough (Cosmobio)
- (8) BioDoc-It System (UVP)
- (9) 無菌操作箱 VCM-620
- (10) 二氧化碳培養箱 (Forma Scientific)
- (11) 迴轉式震盪培養箱 (Forma Scientific)
- (12) 高速冷凍離心機 (Hitachi CR21FC)
- (13) 離心機 (Beckman Avanti J-25)
- (14) 乾式低溫恆溫槽 (Scinic EC-301)
- (15) 乾浴槽 (Firstek Scientific B101)
- (16) Orbital Skaker (TKS OS701)
- (17) Vortex-2 genie (Secientific Industries)

- (18) 紫外光可見光光譜儀 (Beckman DU-650)
- (19) 液相層析儀 (Pharmacia Biotech)
- (20) Bio-Rad 蛋白質電泳槽
- (21) Bio-Rad 半乾式的電泳轉漬槽
- (22) 自動酵素免疫測讀機 (MRX)
- (23) 秤重器 (MonoBloc)
- (24) Stirrer/Hatplate (Corning)
- (25) Microprocessor PH meter (SUNTEX)

