



中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班
碩士學位論文

發展分子診斷區分流行性感冒病毒基因型的方法與探討
細胞中 Disabled2 蛋白參與流行性感冒病毒進行吞噬作用
的可能機制

Development a new diagnosis method to separate
serological subtype of influenza virus and possible roles of
Dab-2 in the endocytosis pathway of influenza virus.

指導教授：鄭如茜

Ju-Chien Cheng

學生姓名：陳嫻如

Yen-Ju Chen

學號：9473006

中華民國九十六年七月

致謝

兩年的時間，就像一眨眼一樣就這樣過了，在這段過程當中，有辛苦，但也有非常快樂的時候。兩年讓我從一個懵懂的小孩，逐漸的成熟，思考的模式也較為穩重；兩年也讓我交到一群志同道合的夥伴，一起打拼，一起畫未來的理想。兩年，讓我有滿滿的感謝，無法用言語形容。

首先要感謝的是辛苦指導我的鄭如茜老師，鄭老師讓我在實驗的設計與操作上能夠更嚴謹小心，也因平常的訓練讓我的文獻閱讀與整理的的能力能夠更上一層樓，在做人處事的方面，老師也放手讓不愛接觸陌生人的我開始學習與他人溝通、相處；鄭老師對於研究成果嚴謹度的要求，也讓我慢慢知道學術界的辛苦與驕傲；也感謝老師在各方面不斷地鼓勵我，才能有這份論文的產生。感謝非常有耐心的曾慶平老師，曾老師一步一步緊跟著實驗的進度，要求實驗數據的完美，才讓我學著耐心做實驗，而不是半途而廢，覺得自己做不到；曾老師與鄭老師都擁有超級靈活的頭腦，常常問問題讓我無法招架，但也訓練我學著多看多學習。感謝陳春榮老師，在實驗方面給予許多寶貴的意見，讓我的思考方式能更廣闊，並且能小心一些沒注意到的小細節，也讓我試著改良許多實驗的方法。

感謝智暉學長教我很多關於病毒與細胞的處理，在實驗方面給予許多協助；感謝美惠學姊與景堂學長在生活與實驗方面都給予許多意見與支

持，還有更多的關心與鼓勵，陪伴著我成長；感謝實驗室的夥伴，羽伶、家帆、詠薰、勝凱、耀文、原彰學長、德欣、騰彥、晴雅、孟弘、俊龍，在我需要幫忙的時候都不吝伸出援手。感謝維洲，幫助我解決實驗的困難，支持我做任何的決定，並且陪伴我走過實驗的低潮。也感謝瑞慈、千凌學姊、北極、忠慶等曾老師實驗室的夥伴，讓我在長庚能夠很順利完成實驗。

最後，最感謝默默支持我的家人，爸爸媽媽讓我無後顧之憂完成學業，鼓勵我繼續唸書，接受我還像個小孩的依賴；也感謝兩位超優秀的哥哥，忍受任何的疲勞轟炸，在忙碌的工作之餘，還是很關心我這個小妹。

才疏學淺，文筆無法寫盡我的感謝。感謝上蒼能讓我突破許多困難與自我的設限，感謝醫技所的老師對我的鼓勵，感謝 Ju lab 這個大家庭，這個家庭太溫暖，感情太好，也在這裡經歷了太多故事，要離開都很捨不得。感謝在這幾年中我所接觸的每一個人，謝謝大家的幫助，才能有這本論文的誕生。

中文摘要

流行性感冒病毒藉由表面穿膜蛋白 hemagglutinin (HA) 和 neuraminidase (NA) 區分血清亞型，目前發現有 16 種 HA 蛋白及 9 種 NA 蛋白。本研究以 Lightcycler Real time PCR (Roche) 儀器複製病毒基因的特定高度保留區域，結合 High Resolution I (HR-1) 能夠敏銳的偵測聚合酶連鎖反應產物熔點曲線的特性，選取流行性感冒病毒基因中具高度保留性及演化性的 M 基因作為目標基因，發展一套能快速且準確偵測出病毒血清型的分子檢驗方式。實驗結果可區分 H1、H3、H5、H7、H9 五種不同血清亞型，且靈敏度可達到 10^2 個病毒；測試了 21 個經過細胞培養的臨床檢體，並且搭配定序分析序列，可正確區分出有 10 個 H1 檢體與 11 個 H3 檢體，並且可將單一核酸的突變偵測出來。

約有 65 % 的流行性感冒病毒藉由 clathrin 組成的水泡進行吞噬作用進入細胞質當中，disabled-2 也被證實會參與囊泡形成的過程，並且在囊泡與 endosome 融合之前，便脫離囊泡的結構。利用免疫螢光染色法與共軛焦顯微鏡觀察病毒感染 A549 細胞後，病毒在細胞中的位置，推測流行性感冒病毒感染細胞 4~6 小時內進行吞噬作用。此外，於 MDCK 細胞大量表現 Dab2 蛋白時感染病毒，並以病毒斑分析法觀察，病毒斑數量沒有明顯的變化。Dab2 蛋白是否影響流行性感冒病毒的吞噬過程，仍需要進一步研究的釐清。

Abstract

Influenza A virus were subtype by hemagglutinin(HA) and neuraminidase (NA). Until now, sixteen kinds of HA and nine kinds of NA were found. In this study, a rapid and useful method to separate subtypes of influenza A virus by Lightcycler real time PCR combining with HR-1 analysis was developed. The primer set was designed on conserved MP gene, and the PCR products were cloned into plasmids. The results demonstrate that subtype H1, H3, H5, H7, H9 of influenza A viruses can be successfully separated by analyzing heteroduplex product, and the detection limitation of the method was 10^2 copies. Twenty-one samples were applied to the test, and 10 samples were correctly typed to H1, and the others were correctly typed to H3.

About 65 % of influenza A viruses penetrate host cells by clathrin-dependent endocytosis pathway. Dab2 protein was thought to be one of the endocytic accessory proteins. Infection influenza virus to A549 cells and observed the viral protein sublocalization by confocal microscope observation combing immunofluorescence detection, we found that the viruses may process endocytosis before 4~6 hours post viral infection. Besides, there had no significant plaque formation changes in Dab2 over-expressed MDCK cells. The roles of Dab2 in endocytosis of influenza A virus infection is worthy to investigate further.

縮寫表

bp	base pair(s)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Ct	threshold cycle
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
ECL	enhanced chemiluminescence
FA	fluorescence assay
FBS	fetal bovine albumin
FITC	fluorescein isothiocyanate
IPTG	Isopropylthio galactoside
kb	kilo base(s)
kD	kilo dalton(s)
LB	Luria broth
μg	microgram
μl	microliter
μM	micromolar
M	molar (moles per liter)
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid

ng	nanogram
pg	picogram
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcriptase
vRNP	viral ribonuclear protein



目錄

致謝	I
中文摘要	III
英文摘要	IV
縮寫表	V
第一章 導論	- 5 -
1. 流行性感冒病毒	- 5 -
1.1 流行性感冒病毒的歷史	- 5 -
1.2 臨床症狀、診斷及治療	- 6 -
1.3 病毒基因及結構	- 7 -
1.4 流行性感冒病毒的生活史	- 8 -
第二章 發展流行性感冒病毒基因型的分子診斷方法	- 10 -
2.1 緒論	- 10 -
2.2 材料與方法	- 13 -
2.2.1 材料來源	- 13 -
2.2.2 序列比對與引子的設計	- 13 -
2.2.3 萃取病毒 RNA	- 14 -
2.2.4 RT-PCR	- 14 -
2.2.5 LightCycler Real-time PCR	- 15 -
2.2.6 利用 High-Resolution-1 分析	- 15 -

2.2.7 Heteroduplex	- 16 -
2.2.8 構築標準質體	- 16 -
2.3 結果	- 18 -
2.3.1 建立標準病毒株圖形	- 18 -
2.3.2 建立完整分型流程	- 19 -
2.3.3 偵測此檢驗方式的靈敏度	- 19 -
2.3.4 臨床檢體之檢驗	- 20 -
2.4 討論	- 22 -
2.5 結論	- 25 -
第三章 探討細胞中 Disabled2 蛋白參與流行性感冒病毒進行吞嚥作用的 可能機制	- 26 -
3.1 緒論	- 26 -
3.2 材料與方法	- 28 -
3.2.1 材料來源	- 28 -
3.2.2 細胞培養	- 28 -
3.2.3 病毒感染與培養	- 28 -
3.2.4 直接免疫螢光染色法 (Direct Immunofluorescence Assay)	- 29 -
3.2.5 細胞轉染試驗	- 29 -
3.2.6 病毒班分析法 (Plaque Assay)	- 30 -

3.2.7 西方墨點法	- 30 -
3.2.8 萃取細胞 RNA	- 31 -
3.2.9 RT-PCR	- 31 -
3.2.10 實驗室所提供的質體	- 32 -
3.3 結果	- 34 -
3.3.1 探討抑制 DAB2 蛋白於細胞中的表現量是否會影響流行性感冒病毒進入細胞的過程	- 34 -
3.3.2 探討大量表現的 DAB2 蛋白是否會影響流行性感冒病毒進入細胞的過程	- 34 -
3.3.3 用免疫螢光染色法偵測病毒於接觸細胞後存在的位置，並且偵測病毒 RNA 的量	- 35 -
3.4 討論	- 37 -
3.5 結論	- 38 -
圖表	- 39 -
圖一 分型引子的設計	- 39 -
圖二 標準質體的 PCR 產物經由 HR-1 儀器分析	- 40 -
圖三 建立各血清亞型之標準圖形	- 42 -
圖四 建立標準血清亞型區分流程	- 43 -
圖五 偵測此檢驗方法之敏感度	- 45 -

圖六 A 型流行性感冒病毒檢體與疫苗病毒株的檢驗 - 47 -

圖七 改變 Dab2 蛋白表現量，用病毒斑分析法測試所產生的病毒數量有無改變。 - 48 -

圖八 利用免疫螢光染色法標示病毒顆粒，細胞核染 DAPI，再利用共軛膠顯微鏡觀察病毒於感染細胞之後所存在的位置。 - 52 -

圖九 於感染流行性感冒病毒後不同時間點收取細胞的 RNA，偵測病毒 RNA 的量。 - 53 -

參考資料 (Reference) - 54 -



第一章 導論

1. 流行性感冒病毒

1.1 流行性感冒病毒的歷史

約西元前四世紀，醫學之父 Hippocrates 便已經提到了具感染性的呼吸道疾病的流行，在西元 1891 年，科學家 Pfeiffer 將此感染原稱為 *Bacillus influenzae*；直到西元 1933 年，Wilson Smith、Christopher Andrewes 和 Patrick Laidlow 等人才從感冒患者分離出病毒，並且命名為 A/H1N1 (Kuszevski *et al.*, 2000)。流行性感冒病毒從西元前至今，爆發了無數次的大流行，其中西元 1918 年的”西班牙流行性感冒”(A / South Carolina / 1 / 18 (H1N1))造成了約兩千萬至五千萬人的死亡 (Johnson *et al.*, 2002)，1997 年 Taubenberger 等人從當年感染西班牙流行感冒而死亡的患者冷凍肺部組織切片中採集到病毒的 RNA，並且解出其序列 (Taubenberger *et al.*, 1997)，至 2005 年，Tumpey 等人重組病毒的八段基因，利用 Reverse Genetic 的方法重現 1918 年橫掃全球的病毒顆粒，藉此研究西班牙流行性感冒病毒致命的原因 (Tumpey *et al.*, 2005)。除了西元 1918 年造成的大流行外，1957 年的”亞洲流行性感冒”(H2N2)及 1968 年的”香港流行性感冒”(H3N2)也造成了無數人的死亡；從西元 1997 年起，香港爆發了從禽鳥流行性感冒病毒 (H5N1)感染至人類的死亡病歷，震驚了全球；世界衛生組

織 (World Health Organisation)統計 2003 年至 2007 年 7 月，總共發生了 318 件 H5N1 病毒感染致人體的案例，其中高達 192 人死亡 (World Health Organisation, 2007)，流行性感冒病毒再次引起世人的重視。

1.2 臨床症狀、診斷及治療

當人體感染到流行性感冒病毒時，主要引起上呼吸道的病症，依據所感染的病毒數量多寡與宿主的免疫狀態，輕微者可能會沒有症狀，或引起頭痛、打寒顫、乾咳，並伴隨著發燒 ($38^{\circ}\text{C} \sim 41^{\circ}\text{C}$)、肌肉痠痛、食慾不振、鼻塞、流鼻水、打噴嚏等現象 (Wright *et al.*, 2001; Call *et al.*, 2005)；若宿主免疫力低下容易引起併發症，如細菌性肺炎，嚴重者，則有可能會造成死亡。若病毒感染到幼童，大致上的症狀會與成人是相似的，但若孩童有發高燒、發熱性抽搐，則應盡快就醫，避免發生更嚴重的中耳炎、肺炎等。

目前臨床檢驗以咽喉拭子、鼻咽拭子、鼻腔清洗液及鼻腔抽吸液的檢體來檢測流行性感冒病毒。用來診斷病毒的方式，以病毒培養確定細胞病變現象(cytopathic effect)為黃金標準檢驗方法，其他還有血清學檢驗、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction)、免疫螢光染色法 (immunofluorescence assay)都可以診斷出流行性感冒病毒的感染。另外也有許多廠商依據不同的方式研發不同的偵測方式：Directigen Flu A

(Becton-Dickinson) , FLU OIA (Biostar) , QuickVue Influenza A&B (Binax) 等 (World Health Organisation, 2006) 。

目前臨床用來治療流行性感冒病毒的抗病毒藥物有四種: amantadine, rimantadine, zanamavir 和 oseltamivir , 分別針對 MP (matrix protein) 及 NA (neuraminidase) 兩個蛋白的功能; 此四種藥物亦有對於預防流行性感冒病毒的效果, 對於健康的成人來說約有 70 % 至 90 % 的成效 (Advisory Committee on Immunization Practices, 2006) 。

1.3 病毒基因及結構

流行性感冒病毒隸屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*) , 病毒顆粒的直徑約為 80 至 120 nm (Fujiyoshi *et al.*, 1994) , 其基因為八段單股負股 RNA 所組成, 依據其長度大小依序為 PB2 (basic polymerase 2) 、PB1 (basic polymerase 1) 、PA (acidic polymerase) 、HA (hemagglutinin) 、NP (nuclear protein) 、NA 、MP 、NS (non structural protein) , 其中 MP 和 NS 兩個基因會經過選擇性剪接各轉譯出兩個蛋白質, 分別是 M1 、M2 及 NS1 、NS2 。病毒顆粒在複製完成, 出芽宿主細胞時會包裹宿主細胞的脂雙層細胞膜為套膜; 套膜上有三種不同的穿膜蛋白, 分別是組成三元體的 HA 蛋白, 組成四元體的 NA 蛋白, 以及 M2 蛋白; 其中, HA 蛋白與宿主細胞膜上的受體結合, 而 NA 蛋白幫助病毒顆粒離開宿主細胞, 二者皆為產生中

和性抗體的主要抗原，而 M2 蛋白是為離子通道，其功能與病毒基因體脫離套膜有關 (Sugrue *et al.*, 1991; Pinto *et al.*, 1992)；病毒套膜的下層包覆著 M1 蛋白與病毒基因組連結，M1 蛋白是組成病毒體的主要成份。PB2、PB1，及 PA 蛋白組成轉錄酶複合體 (Detjen *et al.*, 1987) 連接在各段病毒基因的 3' 端，執行合成病毒 mRNA (Plotch *et al.*, 1981) 及複製病毒 RNA 的功能 (Ulmanen *et al.*, 1983)，而 NP 蛋白攜帶兩個位核訊息 (nuclear localization signals)，鍵結於病毒基因上，穩定基因的結構，並且於病毒脫離套膜後，帶著病毒基因體前往宿主細胞核 (Neumann *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2000)；此四個蛋白 (PB2、PB1、PA、NP) 與 RNA 組成的複合物稱為 vRNP。另外 NS 基因所轉譯出的 NS1 及 NS2 蛋白是非結構性蛋白，NS1 蛋白抑制宿主細胞的 mRNA 修飾及免疫反應；NS2 蛋白是組成病毒體的次要成分，與 M1 蛋白結合 (Yasuda *et al.*, 1993)，負責攜帶 RNPs 出細胞核 (O'Neill *et al.*, 1998)。在 2001 年，Chen 等人發現在 PB1 的基因有另外一段開放讀碼區 (open reading frame)，可轉錄出一大小約 87 residue 的蛋白質，稱之為 PB1-F2，當病毒感染到細胞後，PB1-F2 蛋白會破壞宿主細胞粒腺體的功能而造成細胞凋亡 (Chen *et al.*, 2001; Gibbs *et al.*, 2003)

1.4 流行性感冒病毒的生活史

病毒顆粒藉由表面穿膜蛋白 HA 的唾液酸 (sialic acid) 與宿主細胞膜

上的醣蛋白或醣脂質上的半乳糖 (galactose) 鍵結，因宿主的不同而有不同的鍵結方式，例如人類的氣管上皮細胞由 $\alpha 2,6$ 鍵結，而禽鳥類以 $\alpha 2,3$ 的方式鍵結 (Connor *et al.*, 1994)。鍵結之後細胞進行吞噬作用 (endocytosis) 形成囊泡而進入細胞質與 endosome 融合 (Lamb *et al.*, 2001)。流行性感冒病毒藉由其表面的穿膜蛋白 M2 使氫離子通透進入 endosome，造成 endosome 內的 pH 值下降成酸性，促使病毒基因組 vRNP 與 M1 基質蛋白分離脫離套膜，並由 NP 上所攜帶的入核訊息(NLS)進入細胞核中進行轉錄作用及複製作用。合成好的 mRNA 進入內質網中轉譯出蛋白質，最後與在細胞核複製好的病毒 RNA 在宿主細胞膜組合，進而出芽釋出病毒顆粒，繼續感染下一顆細胞 (Wright *et al.*, 2001)。

第二章 發展流行性感冒病毒基因型的分子診斷方法

2.1 緒論

A 型流行性感冒病毒依據病毒表面抗原 HA 及 NA 區分其血清型，目前已知有 16 種 HA 及 9 種 NA，較常感染到人類的血清亞型為: H1、H2、H3 及 N1、N2，其他如 H5、H7、H9 為較常出現於禽鳥類的病毒 (Wright *et al.*, 2001; Fouchier *et al.*, 2005)。流行性感冒病毒為了逃避宿主的免疫系統而常發生突變，其中以 antigenic drift 的突變方式較為常見，病毒不斷地進行基因點突變，累積大量的點突變而形成胺基酸的改變，所形成的突變抗原可再感染宿主細胞，這樣的病毒容易引起地區性的流行；而較為嚴重的突變稱為 antigenic shift，原本為禽鳥類的高病原性病毒因為接受器的不同而不會感染至人類細胞，但是如果病毒經過中間宿主重新組合基因 (reassortment) 或病毒不經過中間宿主而自行進行大幅度的突變而形成能感染人類的高病原性病毒，容易因免疫系統不認得此抗原而造成大規模的流行，引起人類的疾病及死亡，西元 1997 年在香港感染的 H5N1 病毒就為此例。因此，當季節進入流行性感冒病毒流行期時，快速診斷出所感染的病毒為何種血清型是重要的。

目前臨床所使用於診斷流行性感冒病毒的方式可分為四大類: 分離病毒，偵測病毒蛋白，偵測病毒核酸與血清學試驗；其中以細胞培養分

離病毒的方式最具敏感性，而其他三種方法的專一性較佳，為避免檢驗的偽陽性與偽陰性，通常以合併兩種以上方式來偵測(Cox *et al.*, 1999)。

而在區分血清亞型的部分，目前各實驗室所發展出來的方式大致上可以分為兩類，第一類為 PCR 的方式，針對各血清亞型的 HA 基因設計具專一性的引子，在藉由 PCR 反應之後的產物大小來區分血清亞型(Chi *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2006)；或在 MP 基因上設計引子與探針，經過 Real time PCR 方式放大分型片段之後，偵測其熔點曲線，再依據不同的血清亞型擁有不同的熔點溫度來區分(Stone *et al.*, 2004)。第二類為 microarray 的方式，在晶片上點上分型的序列片段，將檢體經過 RT-PCR 後與帶有螢光標記的特定片段反應，去除不具專一性結合之後再與晶片反應，最後 R 進行呈色反應，判斷檢體之亞型(Townsend *et al.*, 2006)。

但上述之方式，有些方式較為繁複，不適用於臨床上，有些較為昂貴，或者敏感度不佳等原因，因此，本研究欲發展一套能快速且準確偵測出病毒血清型的分子檢驗方式。

本研究中使用 HR-1 儀器可直接分析 Lightcycler real time PCR 儀器所使用的毛細管中的 PCR 產物，其設備為每次偵測 1 根毛細管，可偵測的體積範圍為 5 μ l ~ 20 μ l，其中以 10 μ l 的體積較為常用；若儀器的升溫速率調整為 0.3 $^{\circ}$ C/sec，只需要 1 個小時就可以偵測 40-45 個檢體，且在分析軟體界面上，一次可以分析 32 個檢體數量 (Idaho technology, Inc.

2003)。PCR 產物所產生的同結構物 (homoduplex)可經過高低溫循環反應形成異結構物(heteroduplex)，而異結構物所產生的熔點曲線會與同結構物不同，利用此原理可區分出不同的基因序列 (Liew *et al.*, 2004)。許多文獻利用 HR-1 可以區分單一核苷酸改變的原理來偵測基因的單核苷酸多型態 (single nucleotide polymorphism, SNP) (Reed *et al.*, 2004)，Zhou 等人區分人類的 HLA 的基因型以利血液幹細胞移植前的基因型配對 (Zhou *et al.*, 2004)；Cheng 等人利用此原理區分 25 種臨床上重要細菌，幫助臨床上的快速診斷、病人的抗生素使用等 (Cheng *et al.*, 2006)。

本研究選取流行性感冒病毒基因中具高度保留性及演化性的 M 基因作為區分血清亞型的目標基因 (Ito *et al.*, 1991; Reid *et al.*, 2002)。實驗材料以 2005 年台灣地區流行病毒株 H1 和 H3，以及 1997 年於香港爆發的 H5N1 病毒作為標準序列，用 Lightcycler Real time PCR 儀器複製病毒基因的特定高度保留區域，並且使用 High Resolution I (HR-1)儀器來檢驗臨床檢體的血清型。

2.2 材料與方法

2.2.1 材料來源

TEMPase Hot Start DNA Polymerase 購自 Ampliqon (Denmark) ;
Lightcycler Capillaries (20µl)購自 Roche Applied Science (Germany) ;
LCGreen I Gene Scanning Reagents 購自 Idaho technology (Utah, USA) ;
M-MLV Reverse Transcriptase 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA) ; RNaseOUT
Recombinant Ribonuclease Inhibitor 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA) ; Gel /
PCR DNA Fragments Extraction Kit 購自 Geneaid (Taiwan R.O.C.) ;
QIAquick PCR purification kit 購自 QIAGEN (Valencia, CA) ; QIAquick Gel
Extraction kit 購自 QIAGEN (Valencia, CA) ; QIAGEN one step RT-PCR kit
購自 QIAGEN (Valencia, CA)

2.2.2 序列比對與引子的設計

從 NCBI 的資料庫當中，收集自 2004 至 2007 年 A 型流行性感冒病毒株 H1、H3、H5 的 M 基因序列，利用 Jemboss 軟體系統將所收集的序列作多重序列比對分析(multiple sequence alignment)，選取比對結果中具高度保留性的區域，並且比較此區域中序列是否可區分出不同的血清亞型。最後選取序列 238-417 作為區分血清亞型的 PCR 區域。設計引子為 IFU-F: 5' GCGAGGACTGCAGCGTAGAC '3 ， 以及 IFU-R: 5'

TGAGACCCATGCAACTGGCAAG' 3，PCR 產物大小應為 179 bp。

2.2.3 萃取病毒 RNA

取 140 μ l 病毒液用 QIAamp® Viral RNA Mini Kit 抽取病毒 RNA，試劑組中試劑 AVL 可分離出病毒 RNA，再利用 carrier RNA 將病毒 RNA 沾附於過濾膜上，經過清洗的動作洗去其餘的雜質，最後溶二次水 50 μ l。

2.2.4 RT-PCR

2.2.4.1 配製反轉錄反應所需之試劑

每個反應包含 5X RT buffer，20 mM dNTP，2.5 μ M IFU-F 引子，20 U RNaseOUT，100 U M-MLV RTase，及 2 μ l 病毒 RNA，補二次水至 20 μ l，於 42 °C 水浴槽反應 1 小時。反應完成後，以 QIAquick PCR purification kit 去除多餘的引子，試劑組中試劑 PB 可抓住反轉錄產物沾附於過濾膜上，經過試劑 PE 洗去殘留雜質之後，溶二次水 20 μ l。

2.2.4.2 配製聚合酶連鎖反應所需之試劑

每個反應包含 10X Reaction buffer，10 mM dNTP，2.5 μ M 引子 IFU-F 及 2.5 μ M IFU-R，2.5 U YEA DNA polymerase 及 5 μ l cDNA，補水至 25 μ l，以 94 °C 反應 5 分鐘，接著 94 °C，30 秒，55 °C，30 秒，72 °C，30 秒進行 35 次循環反應，再以 72 °C 反應 7 分鐘。最後配置 3 % agarose gel，將 PCR 產物跑膠確定 PCR 產物的大小。

2.2.5 LightCycler Real-time PCR

選用 Roche 所研發的 LightCycler Real Time PCR system 進行及時偵測聚合酶連鎖反應，可即時偵測反應產物的螢光量，所使用的染劑為 LCGreen Melting Dye，具有嵌入雙股 DNA 兩個配對核酸之間的特性，相較於嵌入雙股 DNA 小螺旋(minor groove)中的 SYBR Green Dye，LCGreen Melting Dye 具有較高的敏感性。配製即時反應聚合酶連鎖反應所需之試劑，每個反應包含 10X Reaction Buffer (含 20 mM 鎂離子)，2 mM dNTP，2.5 mg / ml BSA，10X LC green® I melting dye，5 μ M IFU-F / R 引子，2.5 U TEMPase Hot Strat DNA Polymerase，及 2 μ l cDNA (或 1 pg 標準質體)，最後補水至體積 10 μ l；Real-time PCR 反應條件為 94 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C，10 秒，55 $^{\circ}$ C，15 秒，72 $^{\circ}$ C，30 秒，進行 40 個循環反應，最後從 50 $^{\circ}$ C 升溫至 95 $^{\circ}$ C 偵測反應產物的熔點曲線。

2.2.6 利用 High-Resolution-1 分析

設定 HR-1 分析的溫度範圍為 70~90 $^{\circ}$ C，升溫的速率為 0.1 $^{\circ}$ C / sec，固定冷卻的溫度為 60 $^{\circ}$ C。分析數據以溫度範圍分別為 77~78 $^{\circ}$ C，87~88 $^{\circ}$ C，並以 H1 標準質體混合 H1 標準質體所分析的曲線為分析依據，取 5% ~ 20% 的螢光量作溫度的標準化。若與 H3 混合的檢體則須設定分析溫度範圍為 76~77 $^{\circ}$ C，87~88 $^{\circ}$ C，並以 H3 標準質體與 H3 標準質體混合所分

析出的曲線為分析依據取 5 % ~ 20 % 的螢光量作溫度的標準化。進行 Difference plot 分析，以 H1 標準質體混合 H1 標準質體所分析的曲線為分析依據，並且截取 77~85 °C 為分析的溫度範圍。

2.2.7 Heteroduplex

紀錄 PCR 結果的 Ct 值以及 Rn 值，以總體積為 12 μ l，Rn 值比例為 1 : 1 在 eppendorf 中混合，取 10 μ l 混合後產物置入毛細管中，以溫度 95 °C，1 秒，40 °C，10 秒，進行 10 個反應循環，再進行 HR-1 分析。

2.2.8 構築標準質體

2.2.8.1 H1、H3、H5 亞型的分型片段

將 H1、H3(A/Taiwan/482/2005)、H5(A/Hong Kong/156/1997)標準病毒株 RNA 各取 1 μ l 進行反轉錄作用及聚合酶連鎖反應做出分型特定片段。反應完成後，將反應產物以 3 % agarose gel 核酸電泳分離，利用 Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit 將 agarose 中的 PCR 產物純化出來，溶二次水 20 μ l；

2.2.8.2 H7、H9 亞型的分型片段

合成 H7 (A/Canada/rv504/2004 (H7N3))、H9 (A/HK/2108/2003 (H9N2))M 基因的分型特定片段正負股。將合成的正負股各取 3 μ g 加入 10X Reaction buffer，20 mM dNTP，2.5 U *Taq* polymerase，補二次水至體

積 25 μ l，反應條件為 94 $^{\circ}$ C，30 秒，65 $^{\circ}$ C，20 分鐘；將反應產物稀釋 100 倍，取 1 μ l 加入 10X Reaction buffer，10 mM dNTP，2.5 μ M 引子 IFU-F 及 2.5 μ M IFU-R，2.5 U *Taq* polymerase，最後補二次水至體積為 25 μ l，以 94 $^{\circ}$ C，30 秒，55 $^{\circ}$ C，30 秒，72 $^{\circ}$ C，30 秒進行 35 次循環反應，再以 72 $^{\circ}$ C 反應 7 分鐘。反應完成後，將反應產物以 3% agarose 核酸電泳分離，利用 Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit 將 agarose 中的 PCR 產物純化出來，溶二次水 20 μ l。

2.2.8.3 合成各血清亞型的標準質體

取 3 μ l 純化產物與載體 pGEM T easy 進行質體選殖，將反應產物塗佈於含有 Ampicillin 50 μ g / ml 的 LB agar plate 上，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養 16 至 18 小時後，挑單一菌落以 3 ml 含 100 μ g / ml Ampicillin 的 LB broth 培養於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中，以 150 rpm 轉速培養 16 至 18 小時後用 High Speed Plasmid Mini Kit 抽取細菌質體 DNA。

2.3 結果

2.3.1 建立標準病毒株圖形

將 H1、H3、H5、H7、H9 各血清亞型的標準質體用 Lightcycler 儀器複製出分型片段，運用 HR-1 儀器分析產物的熔點曲線，經過標準化分析發現各血清亞型的螢光量皆約在 82 °C 下降，無法直接用 PCR 的產物將此 5 種血清亞型區分開(如圖二(A))；在標準化分析後用 Derivative Plot 方式分析，各血清亞型所產生的圖形在 82 °C 至 84 °C 出現一個平滑的山峰狀曲線，亦無法用 Derivative Plot 分析法來區分(如圖二(B))。

因此，以 H1 標準質體的 PCR 產物作參考產物與各血清亞型的 PCR 產物混合，藉由高低溫度變化所產生的異結構物的熔點曲線的改變來區分不同的血清亞型。所產生的產物同樣經由 HR-1 儀器作分析，經過標準化分析與 Derivative Plot 分析所得圖形如圖三(A)，結果在 Derivative Plot 分析中顯示經過混合之後的 H1 標準質體在 82 °C 至 84 °C 呈現平滑的山峰狀曲線；H3 標準質體的曲線會在 78 °C 略為上升，至 78.5 °C 下降，79.5 °C 之後開始平滑上升，至 83 °C 的斜率增加呈現山峰狀曲線；而在 H7 的標準質體曲線在 79 °C 有一小突起，之後呈現山峰狀曲線，且在山峰尖端的部分會呈現右斜切的特色；H5 與 H9 的標準質體呈現相同的圖形，在 82 °C 至 84 °C 之間會有兩波峰出現，不同於其他的血清亞型，但兩者無法用此圖形區分開(如圖三(A))。將此實驗重複操作了數次皆得到相同的結

果，因此，證實所建構的標準質體能夠利用與 H1 產物混合的方式區分出 H1、H3、H7 與 H5、H9 血清亞型(如圖三(B))。

2.3.2 建立完整分型流程

H5 與 H9 兩個血清亞型與 H1 標準質體混合之後呈現相同的雙波峰圖形，無法用 H1 混合的方式區分，所以再用 H5 標準質體去混合，異結構物的曲線會與同結構物所產生的曲線不同；H9 標準質體與 H5 標準質體混合之後產生的異結構物，會呈現兩個波峰，分別在 81.5 °C 與 83 °C，且在 81.5 °C 的波峰比 83 °C 的波峰小，為 H9 的特徵(如圖三(C))。

為避免不同序列的血清亞型產生相同的圖形，當某檢體用 H1 標準質體混合之後推測其所屬之血清亞型之後，應再用該血清亞型的標準質體混合反應作確認，若為同一血清亞型，則為同結構物，所產生圖形為平滑的山峰狀曲線，但若為異結構物，則圖形會有所改變。藉由上述的方式建立了完整的區分血清亞型的流程(如圖四)。

2.3.3 偵測此檢驗方式的靈敏度

將 H3 的標準質體經過 10 倍的序列稀釋，換算成 copy number 為 2.8×10^0 至 2.8×10^8 copies，進行 real time PCR 反應，當 copy number 達到 2.8×10^8 時，僅需要約 11.80 個循環就可以偵測到，而 copy number 降低到 28 個 copy 時的循環數約為 33.30，2.8 個 copies 的病毒數量仍然可以用 real

time PCR 的方式偵測出來(如圖五(A)(B)(C))。將這些 PCR 產物同樣與 H1 標準質體 PCR 產物混合之後用 HR-1 儀器分析 Derivative Plot， 2.8×10^3 至 2.8×10^8 個 copies 所產生的圖形是相合的， 2.8×10^2 個 copies 所產生的圖形略為向右上偏，但 H3 特有的勾狀特徵仍然非常明顯，但 28 個 copies 所產生的圖形在 79°C 所下降的幅度較小，且在 80°C 上升的幅度較平(如圖五(D))。因此，用這個檢驗方式約可以檢測到 2.8×10^2 個 copies。

2.3.4 臨床檢體之檢驗

選取 2004 年至 2007 年台灣地區的 A 型流行性感冒病毒檢體，經過萃取 RNA、反轉錄反應與 real time PCR 反應，同樣與 H1 標準質體混合後用 HR-1 儀器分析，在 21 個檢體當中，檢驗出有 10 個檢體為 H1 亞型，11 個檢體為 H3 亞型。在 10 個 H1 亞型的檢體中，2 個檢體的圖形與標準 H1 圖形略為不同，分別為檢體 2004-4483 與 2004-7974，此 2 個檢體在 81°C 上升， 82°C 略為下降之後又在 83°C 上升，形成一個略為凹陷的山峰狀圖形(如圖六(A))；分析此 2 個檢體的序列發現，在此段分型片段中，2 個檢體皆具有 1 個核苷酸的改變 (如圖六(E))。而 11 個 H3 亞型的檢體中，1 個檢體(2004-R1048)的圖形與標準 H3 圖形不同，此檢體的圖形在 78.5°C 呈現略為下降的趨勢之後上升至 81.5°C ，接著斜率增加形成一個山峰狀曲線(如圖六(A))，將此檢體與 H3 標準質體混合之後，在 81.6°C 與 83°C

形成兩波峰曲線，與標準質體所產生的單一波峰不同如圖六(B)。將歸類於 H3 亞型的檢體與 H3 標準質體混合，發現除了檢體 2004-R1048 的圖形不同之外，還有檢體 2007-T54 的圖形也與 H3 標準質體不同，在 81.8 °C 與 83 °C 形成兩波峰曲線(如圖六(B))；將此 2 檢體分析序列之後發現在分型片段中各有 1 個及 2 個核苷酸的改變(如圖六(F))。

選取過去幾年所用之疫苗病毒株，A/Beijing/262/95，A/New Caledonia/20/99，A/Panama/2007/99，A/Taiwan/1/86，A/Wellington/1/04 等五株，經由 HR-1 儀器分析之後，A/Taiwan/1/86 在 81.2 °C 與 83 °C 形成兩波峰曲線(如圖六(C))，分析其序列發現與 H1 亞型的序列相差 3 個核苷酸(如圖六(E))。而另外 4 株疫苗病毒株所表現之圖形與 H3 標準質體所產生的圖形相似(如圖六(E))，因此再用 H3 標準質體混合，發現 A/Wellington/1/04 與標準質體的圖形相同，而其他三株疫苗病毒株得到的圖形與 H3 標準質體圖形不同，其在 76.5 °C 上升至 77.8 °C 下降，接著在 78.5 °C 開始平滑上升至 81 °C 斜率改變，形成一山峰狀圖形(如圖六(D))；分析此 4 株疫苗病毒株序列，發現 A/Wellington/1/04 的序列與標準質體相同，而其他 3 株疫苗病毒株序列與 H3 亞型相差 9 個核苷酸。

綜合病毒檢體與疫苗病毒株的檢驗結果發現，利用 HR-1 儀器分析的方法可以將各血清亞型區分出來，若有核苷酸的突變也可以利用與相同血清亞型的標準質體混合的方式測出。

2.4 討論

本實驗設計分型的引子於 MP 基因，此基因具有高度的保留性，文獻中將 H1N1、H3N2、H1N2、H2N2、H5N1 與 H9N2 的 MP 基因做序列的比對，具有高於 80 % 的相同性 (Stone *et al.*, 2004)，且分析 2004 至 2005 年感染到人類與禽鳥類 H5N1 亞型病毒株的 HA 基因與 MP 基因，發現以演化樹的方式運算，兩基因是共同演化的 (The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network, 2005)，因此本實驗選取 MP 基因作為分型的目標基因。

在運用 HR-1 軟體分析時，經過標準化分析之後所得之圖形或是經過 Difference Plot 分析之圖形皆可以區分出各血清亞型，但圖形的上升或下降的幅度可能會因不同批次的實驗而有些微的改變，而經過 Derivative Plot 運算出來的圖形較具重複性，且在不同批次實驗之間的差異性為最小，因此選用經過標準化分析後再利用 Derivative Plot 運算出來的圖形作為標準的區分模式。

根據文獻所述，利用晶片的方式，所能偵測到的最低數值約為 0.7 ng (Townsend *et al.*, 2006)，換算成病毒數量約為 10^8 個病毒；而利用 PCR 產物大小區分血清亞型的方式，因不同的實驗方式而其能偵測到的病毒數量約為 10^2 至 10^5 個病毒 (Chi *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2004)；而本實驗能夠準確地檢測到 2.8×10^2 個病毒，敏感性可達到目前已

發展出的檢驗方式的最小值。

臨床檢體的檢驗通常需要在短時間內得到結果，文獻中指出若使用 micorarray 的方式，約需要 12 個小時判斷其亞型 (Townsend *et al.*, 2006)；而使用設計於 M 基因上的 probe 所分析出來的熔點曲線區分亞型的方式約需要 6 個小時完成判讀 (Stone *et al.*, 2004)；設計引子於 H5N1 血清亞型的 HA 與 NA 基因，經過一般 PCR 反應，將 PCR 產物跑膠確定亞型的方式約需要 5 個小時確定亞型 (Wei *et al.*, 2006)；而本實驗所需要的時間僅約需要 4 小時就可以判讀完成結果，相較於其他的方式，HR-1 是較為方便且快速的方式。

分析檢體的序列發現，10 個 H1 亞型檢體中有 2 個檢體具有 1 個核苷酸序列突變，其與 H1 亞型標準質體混合之後，就可以明顯地區分出來，此結果顯示，1 個以上的核苷酸序列改變就可以用 HR-1 分析出來。而 11 個 H3 亞型檢體中有 2 個檢體的序列有改變，分別是檢體 2004-R1048 具有 1 個核苷酸改變，檢體 2007-T54 具有 2 個核苷酸改變，但在與 H1 亞型標準質體混合的圖形當中，檢體 2004-R1048 的圖形與 H3 亞型標準質體相差較大，而檢體 2007-T54 的圖形能與 H3 亞型標準質體相合。觀察 H3 亞型標準質體與此 2 檢體的序列，H3 亞型標準質體的序列為 6 個 G 和 C 所組成的序列，是為緊密的 3 氫鍵結合的區域，而 2004-R1048 所突變的核苷酸為 C 轉變成 T，接著 5 個 G 和 C 所組成的核苷酸序列，推

測緊密的 3 氫鍵鍵結破壞掉一個，進行熔點曲線分析時，檢體 2004-R1048 的 PCR 產物在溫度比較低的地方就被解離開來，而造成圖形的不同。而檢體 2007-T54 的序列雖然具有 2 個核苷酸的突變，但鄰近的核苷酸未有富含 G 或 C 的序列，因此推測此為檢體與 H3 亞型標準質體的差異不大的原因。



2.5 結論

本實驗運用 Lightcycler real time PCR 方式放大分型片段，再利用 HR-1 儀器分析與異結構物熔點曲線不同的原理，經過 Derivative Plot 運算區分出 H1、H3、H5、H7 與 H9 血清亞型。此方法的靈敏度可達到 10^2 個病毒，在臨床檢體與疫苗病毒株的實驗上發現，1 個以上核苷酸改變的序列也能用這個方法偵測出來。此檢驗方法所需的時間較短，適合應用於臨床上檢測病毒檢體，快速偵測病毒的血清亞型。



第三章 探討細胞中 Disabled2 蛋白參與流行性感冒病毒進行吞噬作用的 可能機制

3.1 緒論

一般病毒進入細胞的吞噬作用，可分為五大種，分別是 clathrin 或 caveolin 所引導的吞噬作用，及其他三種不需要 clathrin、caveolin 的吞噬作用 (Pelkmans *et al.*, 2003)。在 clathrin 所進行的吞噬作用中，病毒需要與細胞膜上的受器結合，引發 AP-2 (adaptor protein 2) 與其他吞噬作用相關的蛋白 (endocytic accessory proteins) 幫助 clathrin 組裝成包裹進入細胞的水泡，且在水泡形成進入細胞質之後，clathrin、AP-2 及相關蛋白就會脫離 (Mishra *et al.*, 2001)。

而 C 型肝炎病毒被認為利用 E2 蛋白與細胞上的 LDLR (Agnello *et al.*, 1999)、CD81 (Pilieri *et al.*, 1998) 或醣類 (Koutsoudakis *et al.*, 2006) 等接受器結合，進行細胞膜的融合作用，引起 clathrin 形成的囊泡包裹病毒進細胞質，囊泡會與 early endosome 融合，導致內涵物 pH 值降低，進行後續的運送 (Meertens *et al.*, 2006)。而流行性感冒病毒則藉由套膜表面的 HA 蛋白與細胞上的 sialic acid 結合，進行融合作用，引起吞噬作用進入細胞質與 endosome 結合，病毒的 M2 蛋白為氫離子通道協助氫離子通透，導致內涵物的 pH 質下降，促使病毒的基因脫離套膜 (Lamb *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001)。

Lakadamyali 等人利用即時螢光顯微鏡 (real time fluorescence microscopy) 觀察經過螢光標記的流行性感冒病毒進入宿主細胞的過程，發現約有 65 % 的流行性感冒病毒藉由 clathrin 組成的水泡進行吞噬作用進入細胞質當中，而約少於 5 % 的病毒藉由 caveolae 所組成的 caveosomes 進行，其他則藉由不依賴 clathrin 的方式進入細胞 (Lakadamyali *et al.*, 2003)，因此推測流行性感冒病毒主要依賴 clathrin 幫忙組成進入宿主細胞的水泡，包裹病毒進入細胞質。

研究顯示，被認為是腫瘤抑制基因的 disabled-2 會參與吞噬作用中輔助 clathrin 形成囊泡的過程，並且在囊泡與 endosome 融合之前，便脫離囊泡的結構，此特性與其他吞噬作用相關蛋白的特性相似，因此推測 disabled-2 蛋白與 clathrin 所引導的吞噬作用有關 (Tseng *et al.*, 1998, Morris *et al.*, 2001)。

由於流行性感冒被證實為利用 clathrin 進行吞噬作用，且 disabled-2 蛋白參與輔助 clathrin 包裹成囊泡的過程，因此本實驗欲探討 Dab-2 蛋白在流行性感冒病毒吸附於宿主細胞膜後，是否會參與輔助吞噬作用的進行。因此，利用轉染試驗改變細胞中 Dab2 蛋白的表現量之後感染病毒，並以病毒斑分析法觀察病毒產量是否因 Dab2 的變化而增減；另一方面，在病毒感染細胞之後的各個時間點，利用免疫螢光染色法與共軛焦顯微鏡觀察病毒在細胞中的位置，藉以推測吞噬作用所產生的時間。

3.2 材料與方法

3.2.1 材料來源

FBS 購自 Hyclone (USA) ; DMEM 購自 Hyclone (USA) ; Penicillin Streptomycin 購自 Hyclone (USA) ; TPCK-trypsin 購自 Sigma-Aldrich (USA) ; Triton-X 100 購自 MERCK (USA) ; BSA 購自 SIGMA (USA) ; Influenza A DFA Reagent 購自 DIAGNOSTIC HYBRIDS, INC (Athens, USA) ; OPTI-MEM®I 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA) ; Lipofectamine™2000 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA) ; TaqMan one-step RT-PCR Master mix reagent 購自 Applied Biosystems (USA) ; SYBR Green PCR Master mix 購自 Applied Biosystems (USA) 。

3.2.2 細胞培養

將實驗室所提供的 Madin-Darby 氏狗腎小管細胞株(MDCK)及人類肺腺癌細胞株(A549)培養於含有 10 % Fetal Bovine Serum (FBS)和 1 % Penicillin Streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中，置於 37 °C ，5 % CO₂ 培養箱中培養。

3.2.3 病毒感染與培養

配製病毒培養液：DMEM 添加 1 % Penicillin Streptomycin 及 2 µg / ml TPCK-trypsin 。分 MDCK 細胞 1.3×10^6 / 3.5 cm dish ，置於培養箱中培養

1 小時，吸掉培養液，用磷酸緩衝液(PBS)清洗細胞上殘留的 FBS 後放入培養箱中培養，使病毒吸附於細胞上，每 15 分鐘搖晃培養皿一次，使病毒液能均勻覆蓋細胞。1 小時後以 PBS 清洗細胞後，加入 2 ml 的病毒培養液後繼續培養。

3.2.4 直接免疫螢光染色法 (Direct Immunofluorescence Assay)

分 A549 細胞 5×10^5 (或 MDCK 細胞 8×10^5) 於有放置經過酒精殺菌蓋玻片的 3.5 cm dish，於適當的溫度下種病毒後 1, 2, 4, 6, 8 小時吸掉培養液，用 1 ml PBS 清洗細胞，加入 1 ml 4 % paraformaldehyde 於室溫 20 分鐘固定細胞型態；吸掉 paraformaldehyde，加入 1 ml 0.2 % Triton-X 100 於 4 °C 反應 20 分鐘將細胞打洞；吸掉 Triton-X 100，加入 1 ml 4 % albumin bovine serum (BSA) 37 °C blocking 1 小時；吸掉 BSA，加入用 1 % BSA 10 倍稀釋 Influenza A DFA Reagent (針對 NP 蛋白與一未知蛋白) 於 4 °C 反應 8 小時後，用 PBS 清洗細胞 6 次，挑起蓋玻片，蓋於已滴上 15 μ l Mounting Medium 的載玻片上，再用指甲油封片後，以螢光顯微鏡觀察結果。

3.2.5 細胞轉染試驗

吸掉細胞培養液，用 PBS 清洗細胞，加入 1 ml Opti-MEM 備用。配製 A 溶液：250 μ l OPTI-MEM®I 加 10 μ l Lipofectamine™2000 混合均勻，放

置室溫 5 分鐘；配製 B 溶液：250 μ l Opti-MEM[®]I 加入 2 μ g DNA 混合均勻，放置室溫 5 分鐘。反應時間到時，混合 A 溶液與 B 溶液，放置室溫 20 分鐘後緩緩加入細胞。

3.2.6 病毒斑分析法 (Plaque Assay)

分 MDCK 細胞 1.3×10^6 / 6 孔盤，隔夜，加入病毒液，每 15 分鐘搖晃 6 孔盤 1 次，使病毒液能均勻覆蓋細胞；培養 1 個小時後吸掉病毒液，用 PBS 清洗細胞一次。配製 A 溶液：3 % agarose 微波加熱使其溶解完全，同時回溫病毒培養液至 37 °C；配製溶液 A：病毒培養液 = 1：9，混合均勻後，加 2 ml 於 1 個孔洞當中，待 agarose 稍微凝固後，放置培養箱中培養 48 小時，取出 6 孔盤，於每 1 孔洞當中加入 1 ml 10 % Formalin 固定細胞型態，放置 2 小時後，吸掉 Formalin，去除 agarose，並且吸淨殘餘液體；用 1 % crystal violet 染色後晾乾。

3.2.7 西方墨點法

配製 8 % SDS-PAGE，取等量的蛋白質 (50 μ g) 以 100 伏特進行電泳分離；當電泳完畢後，將膠上的蛋白質轉漬至 PVDF 轉漬膜上。轉漬完成後，用 PBS 配製 5 % 脫脂奶粉做 blocking，室溫反應 1 小時，再用含 0.1 % 脫脂奶粉的 PBS 泡製初級抗體，室溫震盪反應 1 小時；反應完成後，用含有 0.1 % Tween 20 的 PBS 洗滌轉漬膜，每 10 分鐘置換 1 次，洗滌 1

小時；換成二級抗體室溫反應 1 小時後，亦用 PBS 洗滌 1 小時。最後以等比例的 ECL 試劑與轉漬膜進行冷光呈色反應後，用 X 光片顯像判讀結果。

3.2.8 萃取細胞 RNA

用 1 ml 的 Rezol™ C&T 將細胞打散劇烈震盪 15 秒後，靜置室溫 5 分鐘，加入 choroform 200 μ l 劇烈震盪 15 秒，此時液體呈現混濁的粉紅色，靜置室溫 2 分鐘使其分層。4 °C 離心，轉速 13000 rpm，20 分鐘之後，取上清水層約 500 μ l，加入 500 μ l isopropanol，混合均勻後放置 -80 °C 冰箱隔夜。隔天取出以轉速 13000 rpm，離心 20 分鐘之後，去除上清液，加入 99 %酒精清洗 RNA，同樣以轉速 13000 rpm，4 °C 離心 20 分鐘後，去除酒精，將 RNA 烘乾，將其溶解於滅過菌的二次水 50 μ l。

3.2.9 RT-PCR

3.2.9.1 配製一階段式 RT-PCR 所需要試劑

包含 5 μ l RNA，2.5 μ l 2 X Master mix buffer (TaqMan one-step RT-PCR Master mix reagent)，10 μ M MAF primer、MAR primer、MBF primer、MBR primer，5 μ M MA probe、MB probe (由彰化基督教醫院林奇勇學長提供)，及反應酵素 0.67 μ l，補水至 25 μ l。反應條件為反轉錄反應以 48 °C 反應 30 分鐘，接著 95 °C 反應 10 分鐘分離兩股模板，PCR 以 95 °C，15 秒，

60 °C，1 分鐘的條件進行 40 的循環的反應。

3.2.9.2 配製即時反應聚合酶連鎖反應所需之試劑

每個反應包含 2 X Master mix buffer (SYBR Green PCR Master mix)，10 mM dNTP，5 μ M β -actin F/R 引子，2500 U RNase inhibitor，6.25 U Reverse Transcriptase，及 5 μ l RNA；反應條件為反轉錄反應以 48 °C 反應 30 分鐘，接著 95 °C 反應 10 分鐘分離兩股模板，PCR 以 95 °C，15 秒，60 °C，1 分鐘的條件進行 40 的循環的反應。

3.2.10 實驗室所提供的質體

(1) pU6 (由長庚大學曾慶平老師實驗室提供)

由 pCR II-TOPO 載體所修改，加入老鼠的 U6 promoter 序列及 RNA polymerase III 的結束訊息序列，為能表現 RNAi 的載體。

(2) Dab2-2112 (由長庚大學曾慶平老師實驗室提供)

由 pU6 載體所修改，加入針對 Dab2 所設計的 RNAi 序列，能夠抑制 Dab2 蛋白表現

(3) pCI-neo (Promega)

為哺乳動物表現載體，帶有人類巨細胞病毒的 promoter，能穩定表現嵌入物(insert)；並帶有 SV40 病毒的 large T antigen 可以大量表現目標

基因。

(4) pCI-neo hDAB2 (由長庚大學曾慶平老師實驗室提供)

由 pCI-neo 載體修改，加入人類的 DAB2 cDNA 序列，能夠表現人類的 DAB2 蛋白。



3.3 結果

3.3.1 探討抑制 DAB2 蛋白於細胞中的表現量是否會影響流行性感 冒病毒進入細胞的過程

利用轉染試驗將 pU6 與 Dab2-2112 質體分別送入 MDCK 細胞當中，於轉染後的 12、18、24、36 小時收細胞蛋白，用西方墨點法偵測 DAB2 的表現量；實驗結果於 24 小時，送入 Dab2-2112 的細胞 Dab2 蛋白表現量比送入 pU6 與不經過轉染處理的細胞表現量低，因此，採用轉染 24 小時的細胞做病毒斑分析法。MDCK 細胞經過質體轉染後 24 小時，感染流行性感
冒病毒 (H3) ($MOI = 5 \times 10^{-5}$)，使病毒貼附於細胞 1 小時，培養 48 小時後做病毒斑分析法，測試抑制 Dab2 表現後會不會影響病毒斑產生的數量。實驗結果在未經過病毒及轉染質體處理的細胞沒有病毒斑出現，只感染病毒的細胞約有 60~80 個病毒斑，經過轉染試驗與感染病毒的兩組細胞的病毒斑皆為 0~5 個 (如圖七)。

3.3.2 探討大量表現的 DAB2 蛋白是否會影響流行性感 冒病毒進入細胞的過程

利用細胞轉染試驗將 pCI-neo 與 pCI-neo hDAB2 分別送入 MDCK 細胞中，於轉染後 6、12、24、36 小時收取細胞蛋白，用西方墨點法偵測細胞中 DAB2 的表現量；實驗結果於轉染後 12 小時，經 pCR-neo hDAB2

轉染的細胞大量表現 DAB2 蛋白，而轉染 pCI-neo 的細胞 DAB2 表現量與不經過轉染的細胞表現量相同，因此，採用經過轉染 12 小時的細胞做病毒斑分析法。MDCK 細胞分別經過轉染 pCI-neo 與 pCI-neo hDAB2 12 個小時，感染病毒 1 小時做病毒斑分析法。實驗結果於只感染病毒的細胞約有 60~80 個病毒斑，而經過質體轉染的細胞病毒斑與只感染病毒的對照組數目相似 (如圖七)。

3.3.3 用免疫螢光染色法偵測病毒於接觸細胞後存在的位置，並且偵測病毒 RNA 的量

將 A549 細胞分於 3.5 公分 dish 中，分別感染流行性感冒病毒 (MOI = 3)，將一盤細胞放置於 4 °C 當中，控制病毒不進入細胞，於 1 個小時後收取細胞 RNA 及做免疫螢光染色；其餘細胞放置一般的培養箱中培養，分別於培養 1、2、4、6、8、12 小時收取細胞 RNA，並且做免疫螢光染色。

利用免疫螢光染色法及共軛膠顯微鏡觀察的結果發現病毒在 4 °C 培養 1 個小時後，病毒位於細胞膜上，而一般培養箱中培養的細胞，在細胞質中發現病毒顆粒的存在，而培養 2 個小時的細胞，在細胞質中有大量的病毒顆粒；在培養 4 個小時的時間點，病毒進入到細胞核做複製及轉錄的動作；而 6 個小時以後開始出核，擴散到細胞質及細胞膜上，準

備釋放出病毒顆粒 (如圖八)。

在細胞 RNA 的部分，比較各個時間點 (2、4、6、8 小時)流行性感冒病毒的 RNA 量與細胞 β -actin 的比值，發現病毒於進入細胞後，隨著時間的增加，細胞中的病毒的 RNA 量也逐漸地增加 (如圖九)。



3.4 討論

目前病毒斑分析法觀察病毒產量實驗中，所需的病毒培養時間為 48 小時，若抑制或增加了吞噬作用的進行，很有可能會因長時間的培養而看不出病毒數量的差別，所以，未來可收經過轉染試驗改變 Dab2 蛋白表現量後感染病毒的細胞，藉由免疫螢光染色法觀察病毒顆粒在不同時間點所在的位置是否受 Dab2 蛋白表現量改變的影響。

在抑制 Dab2 表現的實驗中發現，當轉染 Dab2 的 RNAi 時會抑制 Dab2 表現，同時抑制病毒的產生，而只轉染 pU6 質體時，也會抑制病毒斑的產生，推測質體 pU6 可能就會影響病毒，若改變表現載體，有可能可以繼續探討 Dab2 在吞噬作用所扮演的角色。

而在大量表現 Dab2 蛋白的實驗中的西方墨點法結果看到，轉染質體後 12 小時會大量表現，但是到了 24 小時 Dab2 的表現量就明顯地降低，但表現量開始降低的時間點未能從這個實驗結果看出，因此不能確定 Dab2 蛋白是否影響細胞吞噬作用；未來可以偵測轉染質體後 12 小時至 24 小時之間的 Dab2 蛋白表現量，以確定在達到表現量最大值時感染病毒是否恰當。

3.5 結論

本實驗利用免疫螢光染色法偵測流行性感冒病毒約於 1~2 小時左右出現於細胞質，4~6 小時進入細胞核，因此推測病毒感染後約在 4~6 小時以前進行吞噬作用。另外感染改變 Dab2 蛋白表現量的細胞，以病毒斑分析法觀察，未發現病毒斑產生量的改變。目前觀察到的結果無法推測 Dab2 蛋白是否影響流行性感冒病毒進行吞噬作用，進一步的研究仍在進行中。

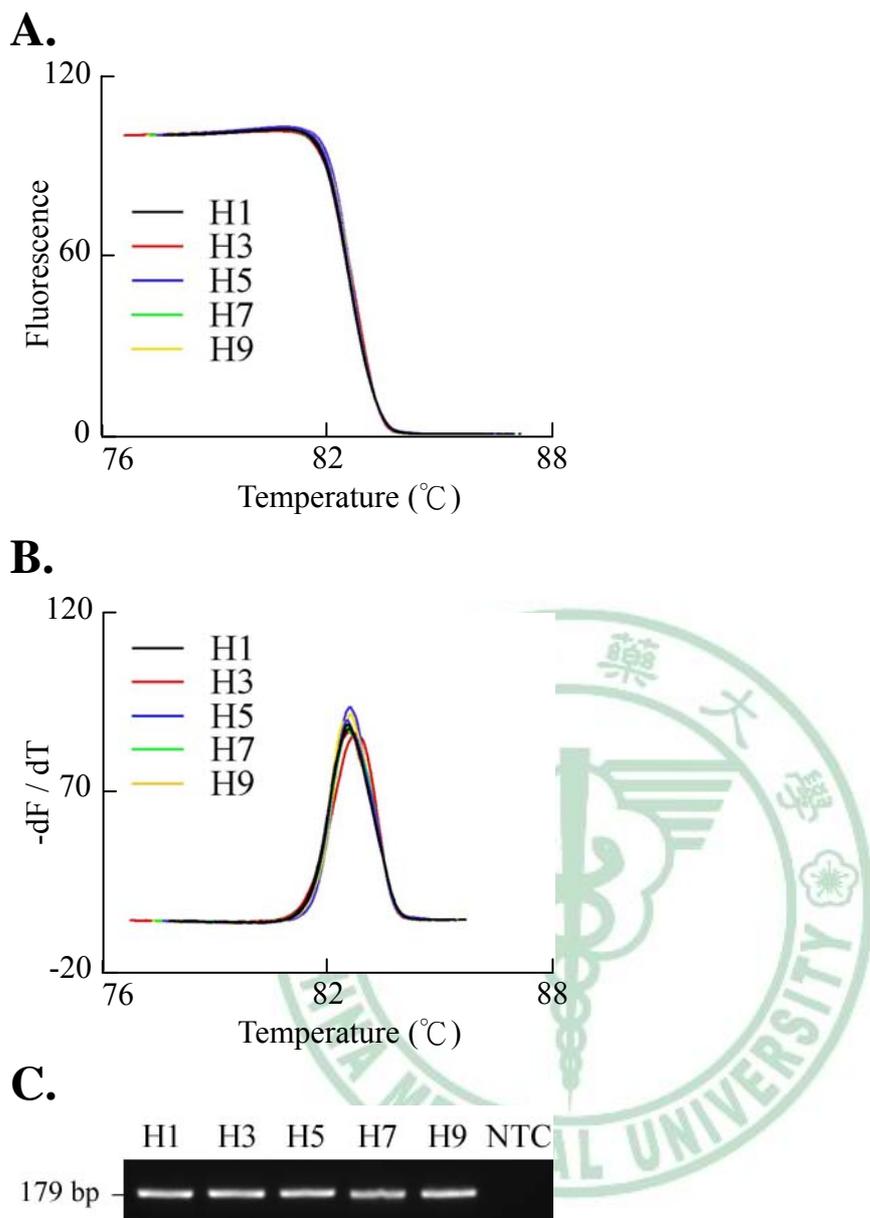


圖表

NewCaledonia/20/99-like (H1)	<u>GCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAATGGGGATCCAA</u>	60
Taiwan/482/05 (H3)C.....	
Hong Kong/156/97 (H5)A.....A.....A..C....	
Canada/rv504/04 (H7)	
Hong Kong/2108/03 (H9)G.....A.....A.....	
NewCaledonia/20/99-like (H1)	ATAATATGGACAGAGCAGTTAAACTGTATCGAAAGCTTAAGAGGGAGATAACATTCCATG	120
Taiwan/482/05 (H3)A.....A.....	
Hong Kong/156/97 (H5)	.C.....A..C.AG....G.....A..G.....	
Canada/rv504/04 (H7)	.C.....G..C.....G....A..A....A.....	
Hong Kong/2108/03 (H9)	.C.....A..C.AG....G.....A..G.....	
NewCaledonia/20/99-like (H1)	GGGCCAAAGAAATAGCACTCAGTTATTCTGCTGGTGC <u>ACTTGCCAGTTGTATGGGACTCA</u>	179
Taiwan/482/05 (H3)C....	
Hong Kong/156/97 (H5)	.A..A..G...G.T.....C..AA.....G.....T....	
Canada/rv504/04 (H7)	...A.....G..G.....AA.....C....	
Hong Kong/2108/03 (H9)	.A..A..G...G.T.....C..AA.....G.....T....	

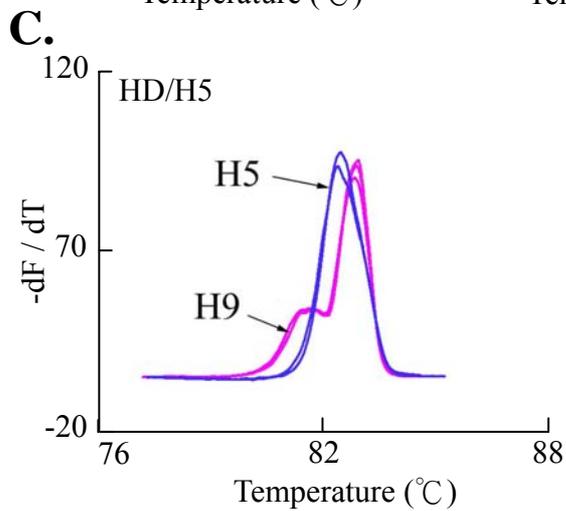
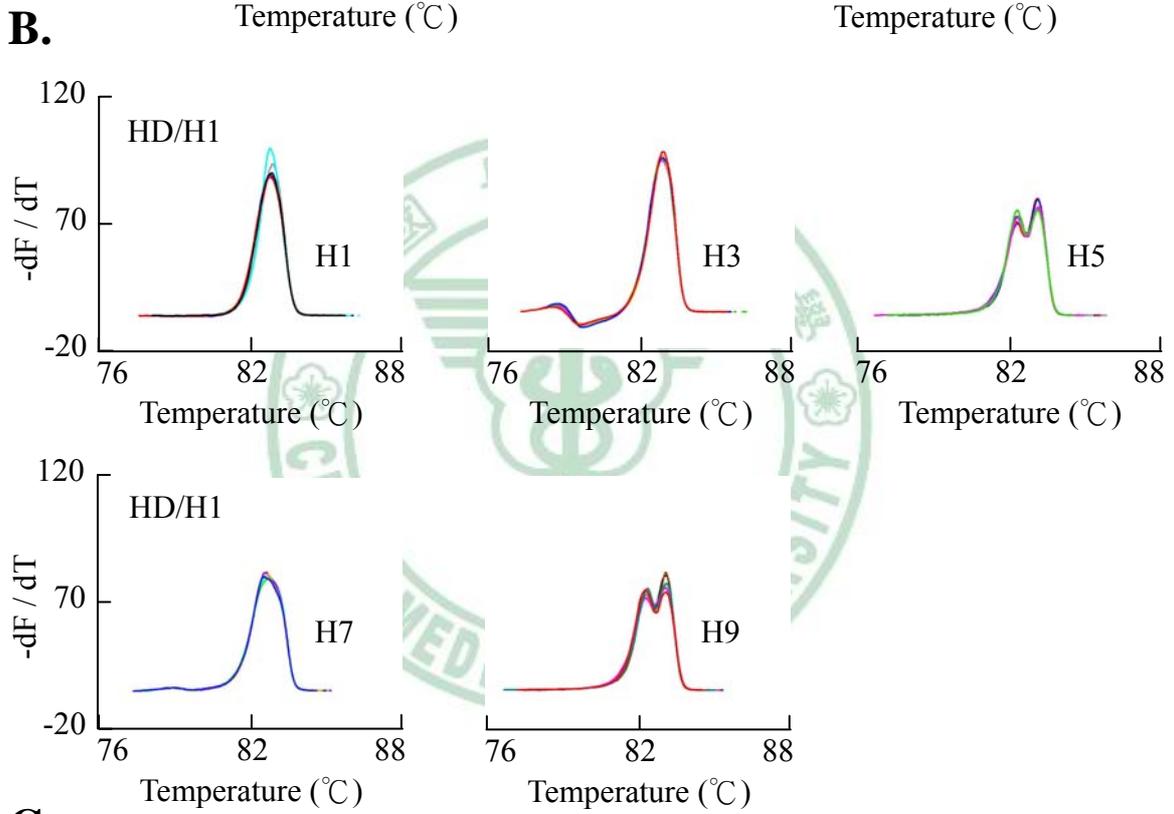
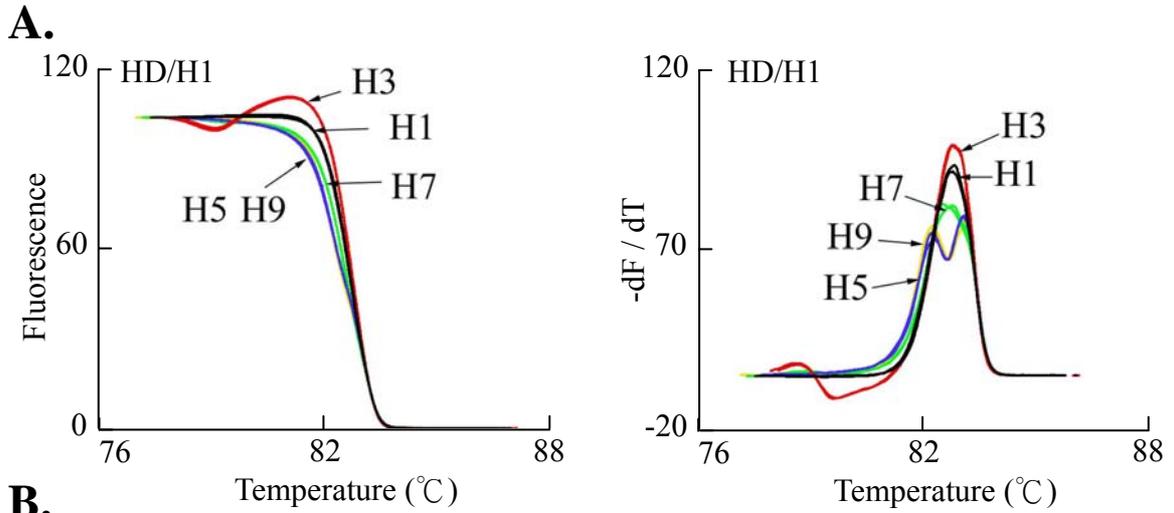
圖一 分型引子的設計

將 H1、H3、H5、H7 與 H9 的 MP 基因序列做多重序列分析，選取較具保留性的區域設計區分血清亞型的引子。最後將引子設計於 279-417 核苷酸上，如圖中劃底線區域。



圖二 標準質體的 PCR 產物經由 HR-1 儀器分析

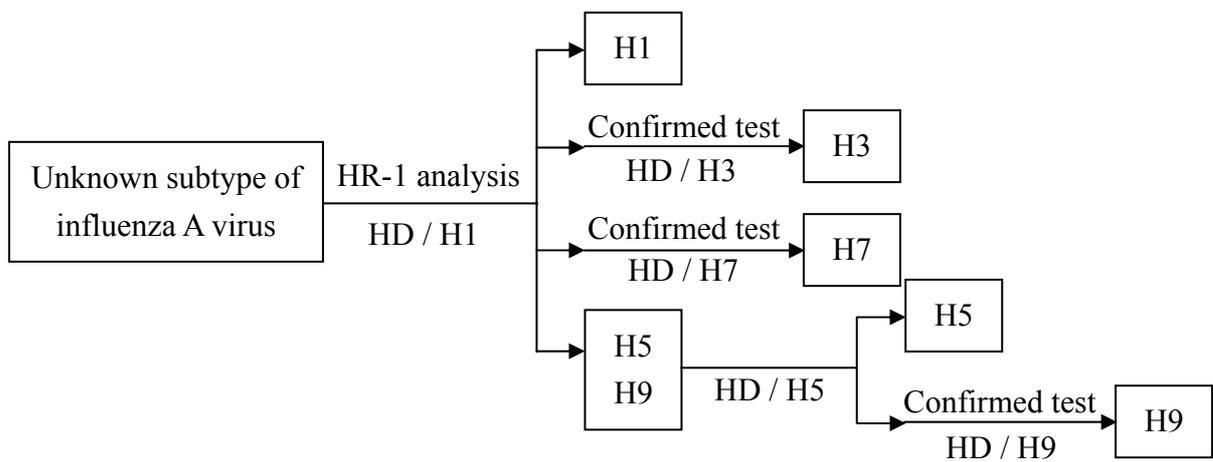
將製備好的 H1、H3、H5、H7、H9 等標準質體取 1 pg 做 real time PCR 反應，再經過 HR-1 分析。(A)經由 HR-1 儀器分析與標準化運算之後，各血清亞型所得的圖形會相合；(B)經由標準化運算與 Derivative Plot 運算之後所得的圖形，各血清亞型皆在 83 °C 產生一山峰狀圖形；(C)取各血清亞型的標準質體 PCR 產物跑 3 % 洋菜膠，其大小皆為 179 bp。若直接利用標準質體的 PCR 產物作 HR-1 儀器分析，將無法區分出各血清亞型。



圖三 建立各血清亞型之標準圖形

直接分析 PCR 產物無法區分各血清亞型，因此將 PCR 產物經過 heteroduplex 的高低溫反應，再經過 HR-1 分析。(A)(左)將各血清亞型的 PCR 產物與 H1 亞型標準質體混合之後所得經過標準化運算結果。(右)經過標準化與 Derivative Plot 運算，可將各血清亞型區分出，但 H5 亞型與 H9 亞型的圖形十分相近，無法藉由這個方法區分。(B)重複 5 次將各血清亞型與 H1 亞型標準質體混合，得到各血清亞型之標準圖形。(C)因 H5 與 H9 亞型無法區分，因此利用與 H5 亞型混合區分。



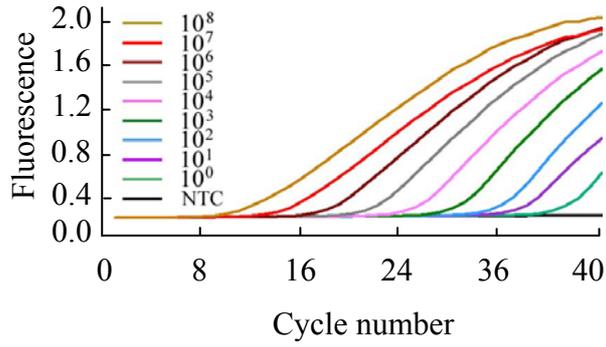


圖四 建立標準血清亞型區分流程

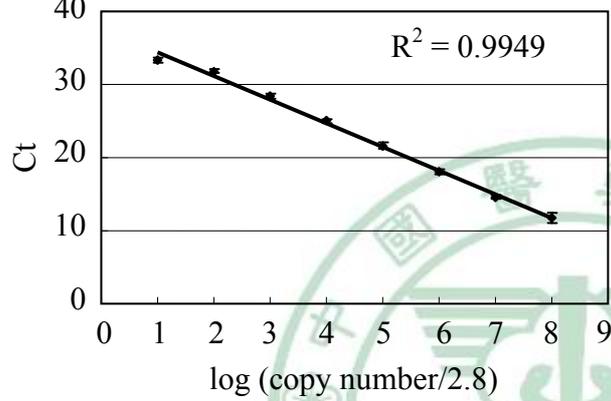
未知的檢體皆經由 H1 亞型的標準質體混合進行初步區分，歸類檢體為何種亞型之後，再利用該亞型之標準質體混合，就可得知該檢體之亞型，並且可以檢驗檢體的序列是否與標準質體相同。



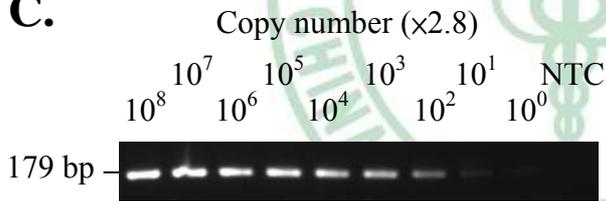
A.



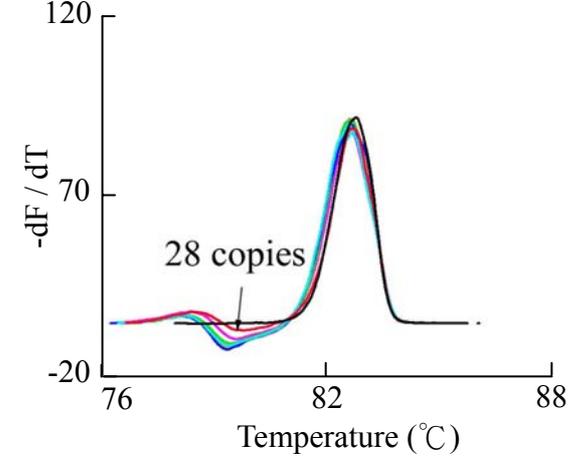
B.



C.



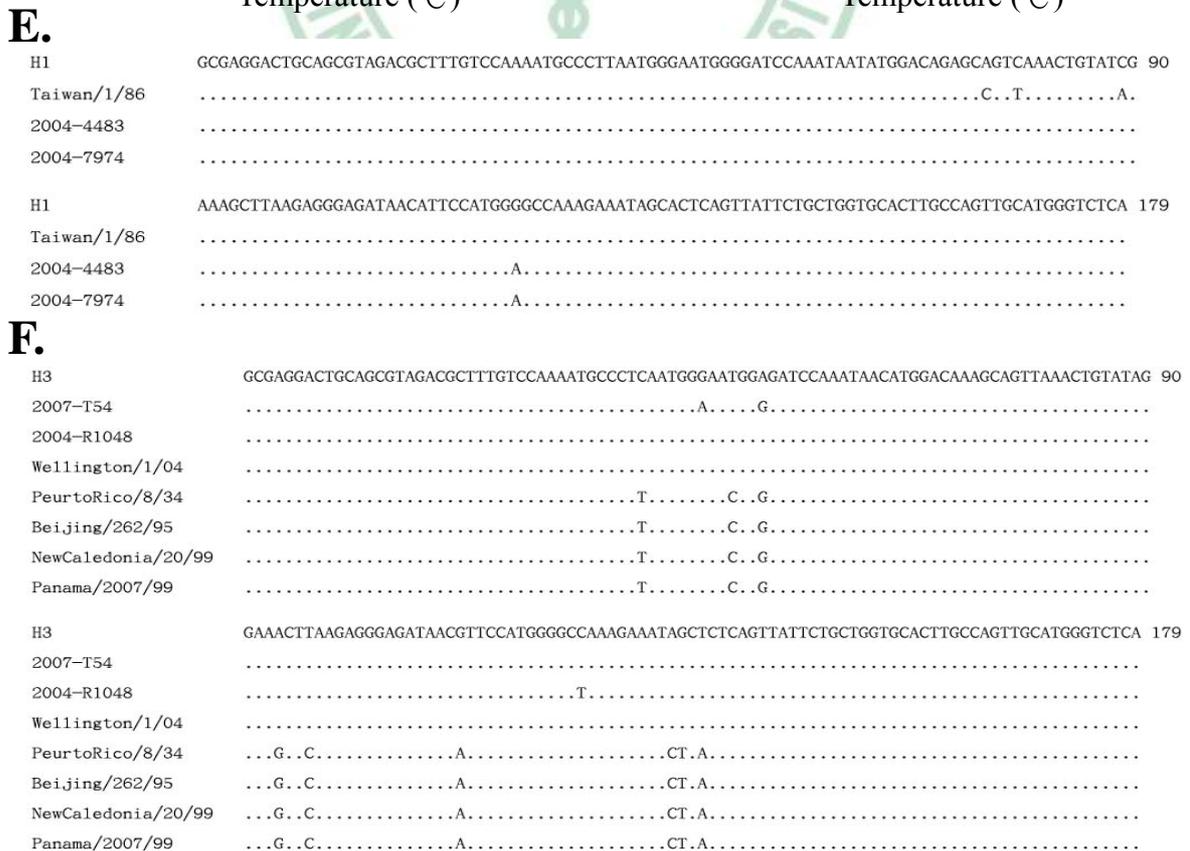
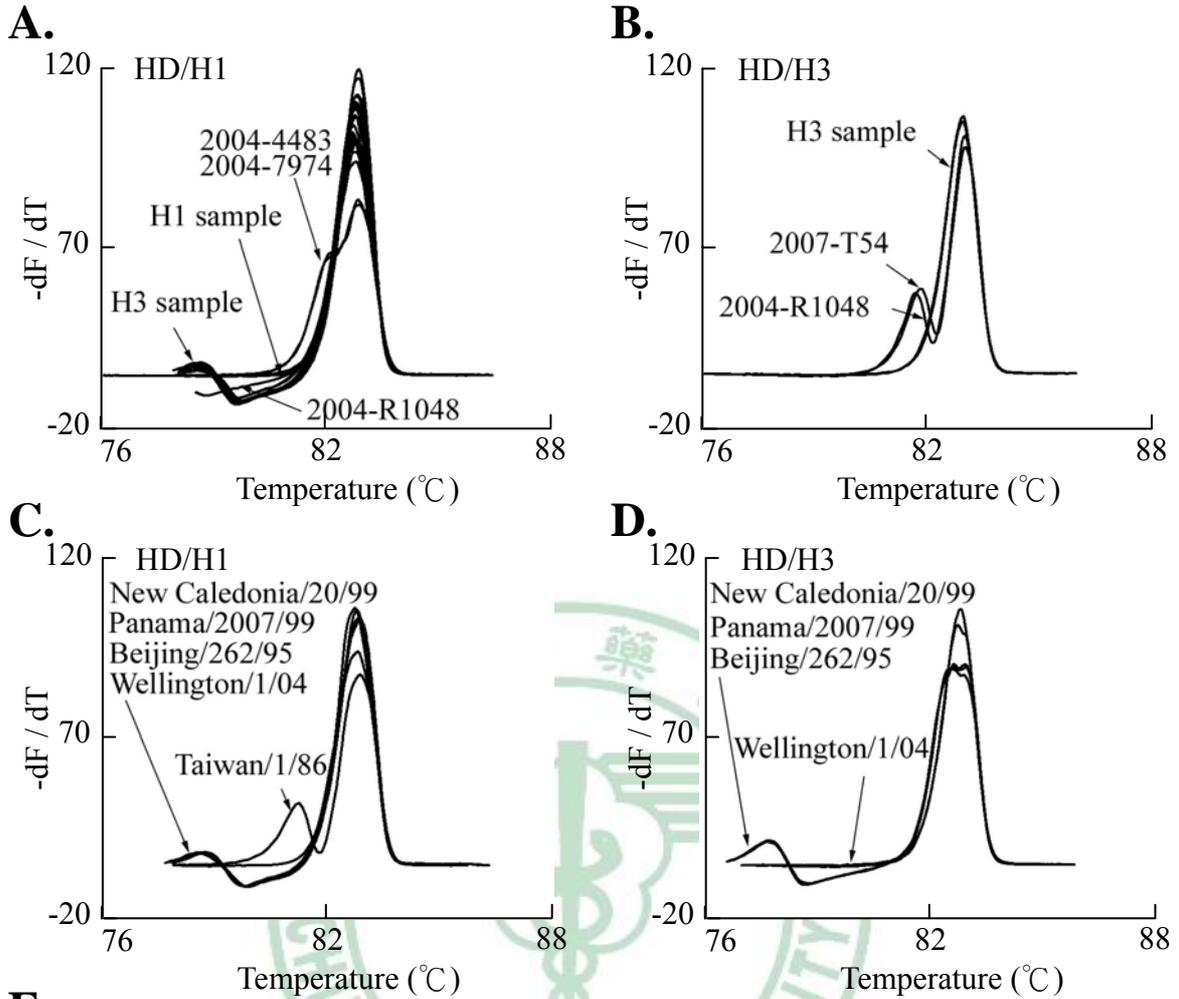
D.



圖五 偵測此檢驗方法之敏感度

將 H3 亞型標準質體 10 倍序列稀釋後經過 real time PCR 反應。(A)將 H3 亞型標準質體經由 10 倍序列稀釋與 Lightcycler real time PCR 反應，所得之反應循環數與螢光量對照表。(B)換算 H3 亞型標準質體濃度為 copy number 與 real time PCR 反應循環數對照表。(C)取部分 PCR 反應產物跑 3 % 洋菜膠，產物大小皆為 179 bp。(D)將 PCR 產物與 H1 亞型標準質體混合之後所得運算結果，28 個 copies 以下所測得的圖形會有些許不同。



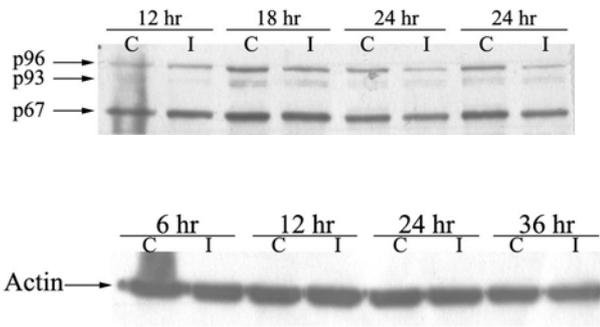


圖六 A 型流行性感冒病毒檢體與疫苗病毒株的檢驗

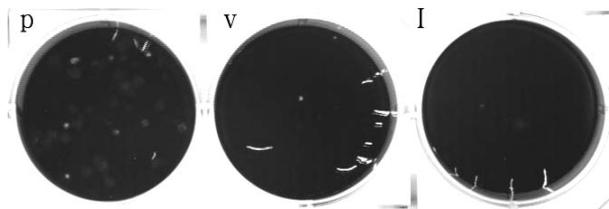
建立各血清亞型的標準曲線後，取臨床檢體做此檢驗方式的測試。(A)取 21 株病毒檢體與 H1 亞型標準質體混合之後分析，測出有 3 個檢體與標準 H1、H3 亞型的圖形有差異。(B)將歸類於 H3 亞型的病毒檢體與 H3 亞型標準質體混合之後分析，可檢驗出與 H3 標準質體序列不同的檢體。(C)取 5 株疫苗病毒株與 H1 亞型標準質體混合之後分析，測出 A/Taiwan/1/86 圖形較為特別，其他 4 株疫苗病毒株與 H3 亞型標準質體圖型相同。(D)將歸類於 H3 亞型之疫苗病毒株與 H3 亞型標準病毒株混合，得到 A/Wellington/1/04 病毒株的圖形與 H3 亞型標準質體的圖形相同，而另 3 株疫苗病毒株的圖形不同。(E)(F)分析檢體與疫苗病毒株的序列，可得知與標準質體圖型不同的病毒株在序列上都有改變。



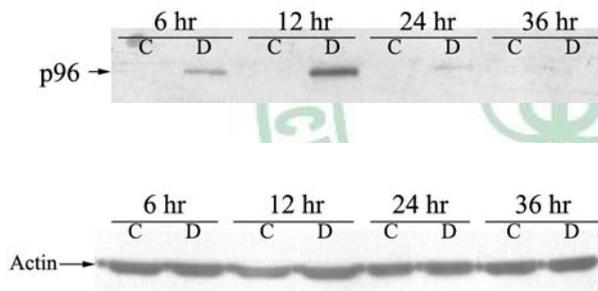
(A)



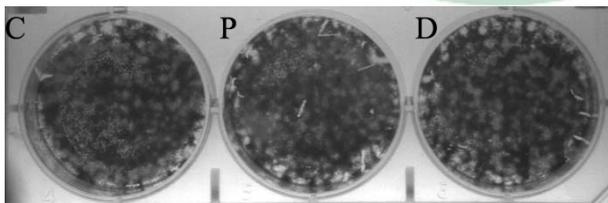
(B)



(C)



(D)



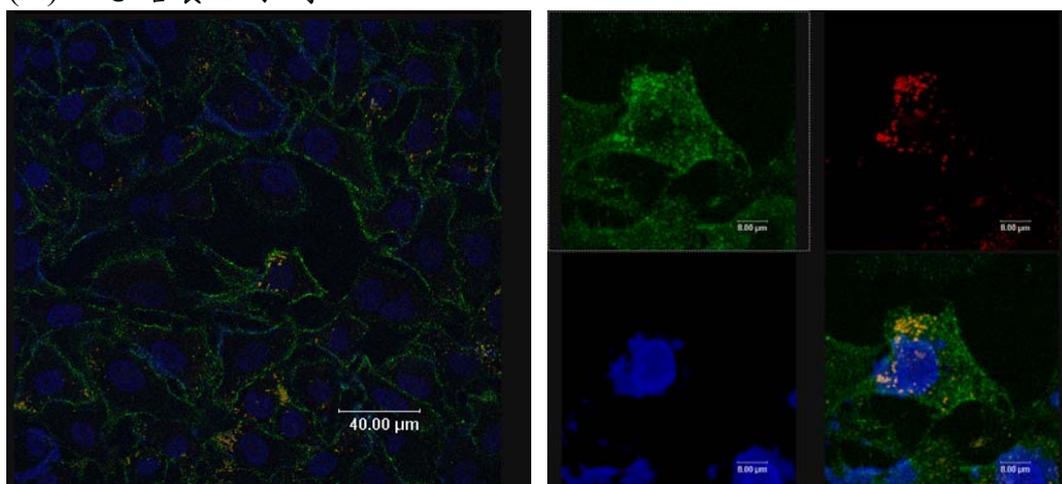
圖七 改變 Dab2 蛋白表現量，用病毒斑分析法測試所產生的病毒數量有無改變。

將 pCI neo vector、pCI neo hDab2 與 pU6、pU6 siDab2 2112 分別送入 MDCK 細胞，改變 Dab2 的表現量後感染病毒，並偵測病毒產生量。(A) 測試 Dab2 蛋白於轉染 RNAi 質體後的蛋白表現量，以 Actin 作為對照，

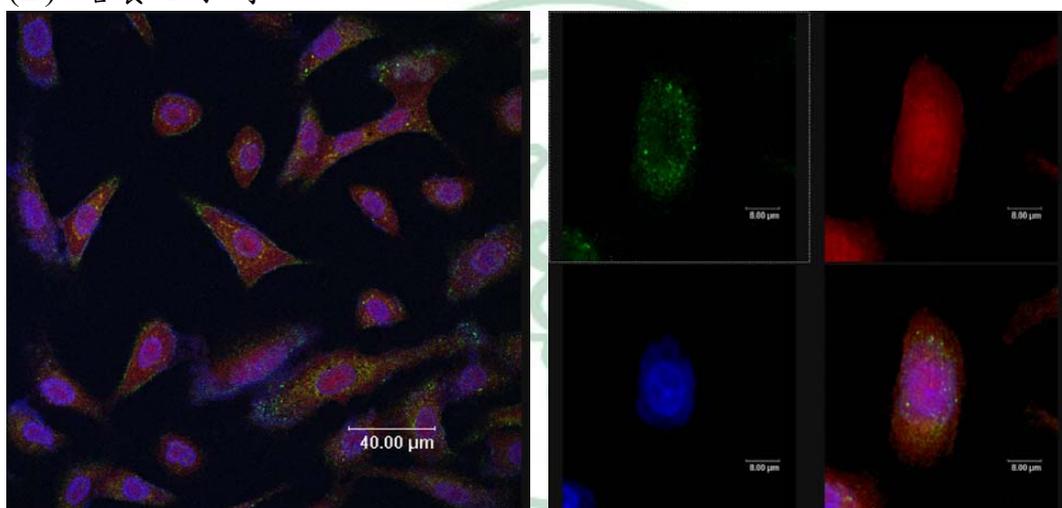
於 24 小時的結果下降較為明顯。(B)轉染質體後用病毒斑分析法所做的結果，只轉染載體的細胞與轉染 Dab2 RNAi 的細胞所產生的病毒斑數量相差不多，約為 0 至 5 顆，比只感染流行性感冒病毒的細胞所產生的病毒斑數量少。(C)測試 Dab2 蛋白於轉染 pCI-neo hDab2 質體後的蛋白表現量，以 Actin 作為對照，於 12 小時的結果表現量上升較為明顯。(D)轉染質體後用病毒斑分析法所做的結果，只轉染載體的細胞與轉染了 pCI-neo hDab2 質體的病毒斑數量與只感染病毒的數量相差不多。(C: control, I: Dab2 si2112, D: pCI-neo hDAB2, P: positive control, V: pU6 / pCI-neo)



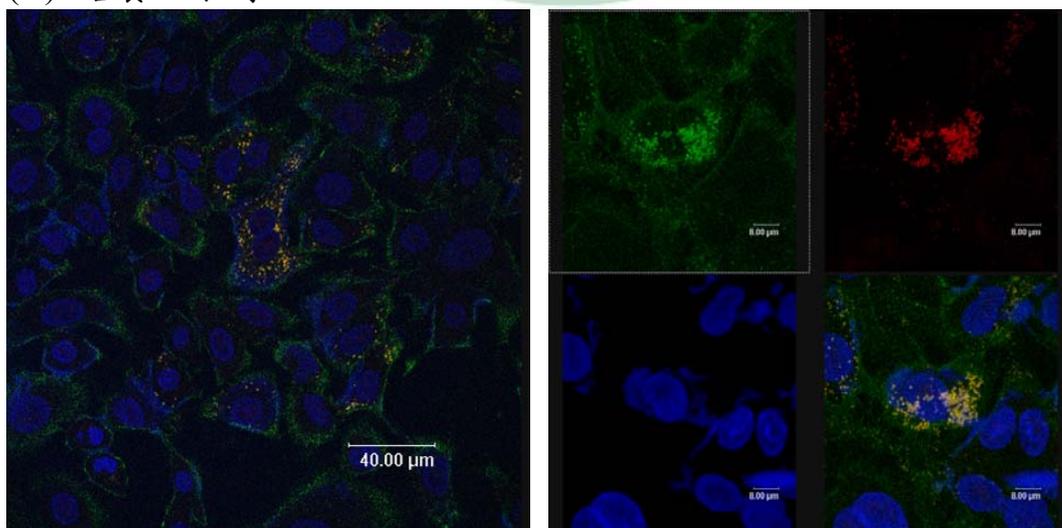
(A) 4 °C 培養 1 小時



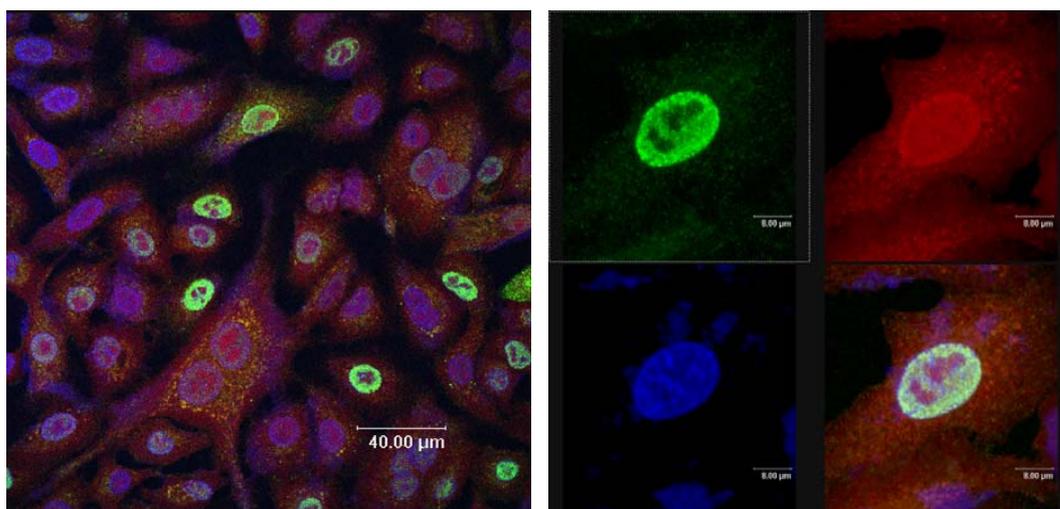
(B) 培養 1 小時



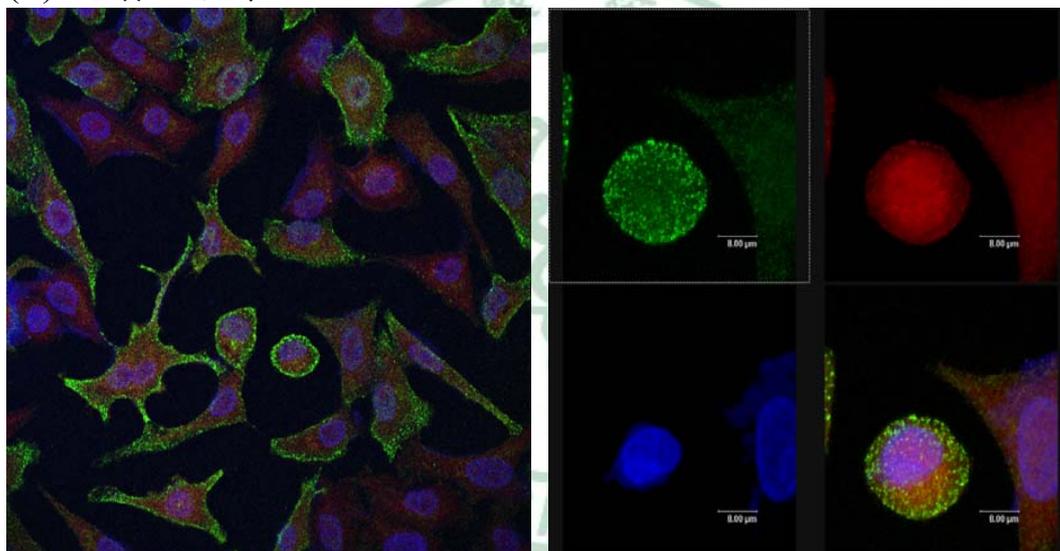
(C) 培養 2 小時



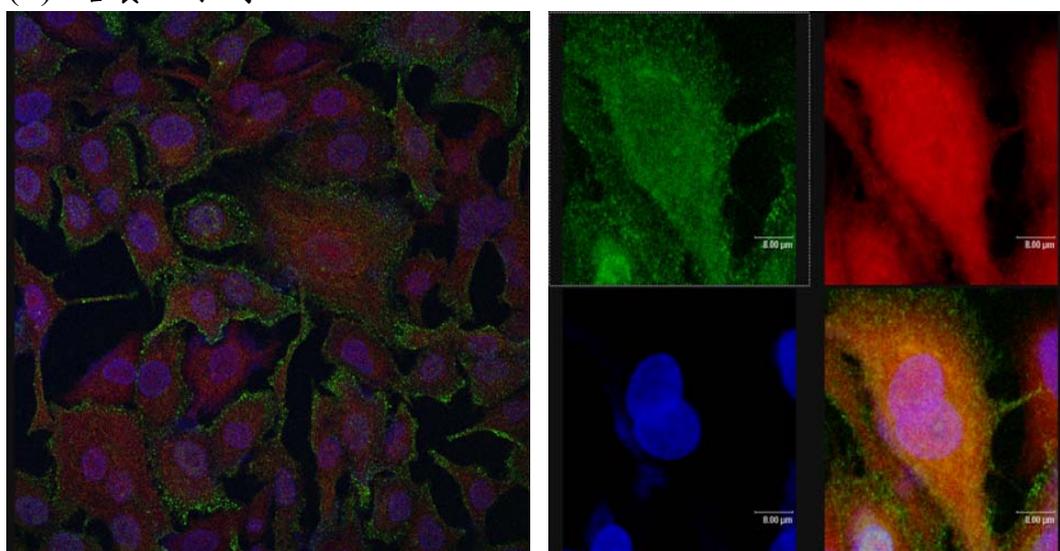
(D) 培養 4 小時



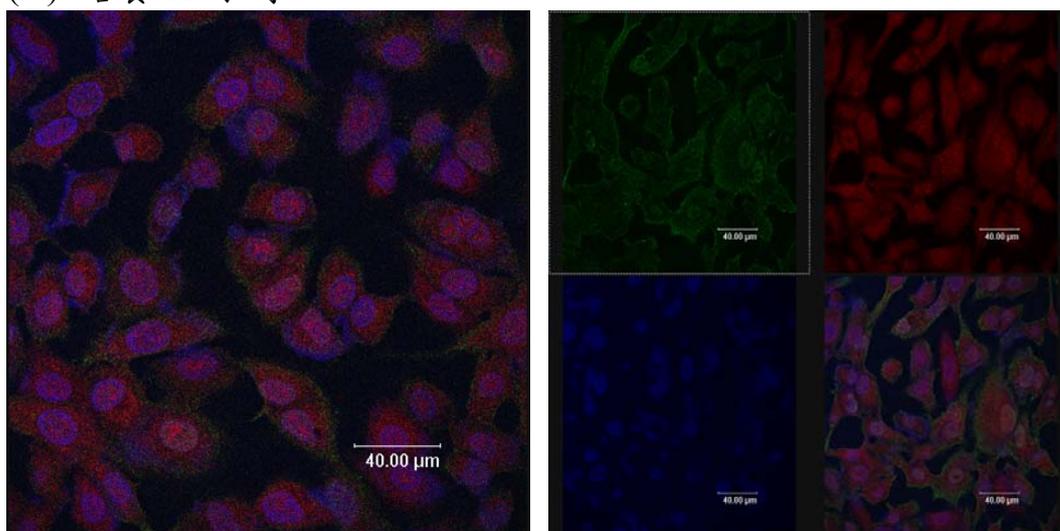
(E) 培養 6 小時



(F) 培養 8 小時

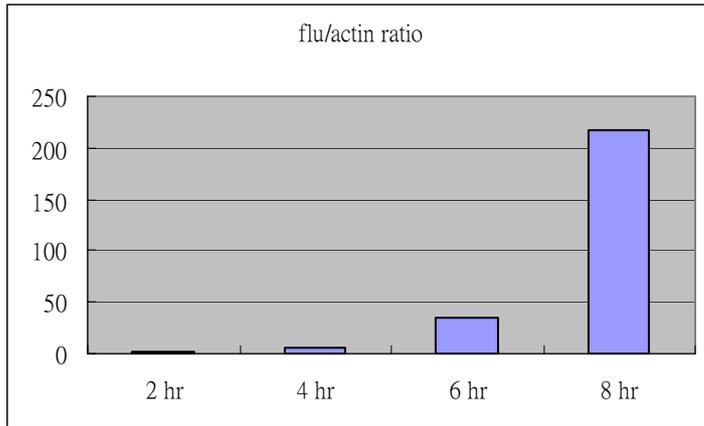


(G) 培養 12 小時



圖八 利用免疫螢光染色法標示病毒顆粒(綠色、黃色),細胞核染 DAPI(藍色),再利用共軛膠顯微鏡觀察病毒於感染細胞之後所存在的位置。

(A)細胞於感染病毒後,放置 4 °C 培養 1 個小時,病毒顆粒大部分位於細胞膜上,未進入細胞當中。(B)細胞於感染病毒後培養 1 個小時,病毒已開始進入細胞。(C)培養 2 個小時,病毒擴散於整個細胞質。(D)培養 4 個小時,病毒大部分進入細胞核當中。(E)、(F)培養 6 至 8 個小時,病毒開始準備離開細胞,聚集於細胞膜附近。(G)培養 12 個小時後,病毒存在的位置較為廣泛,細胞質、細胞膜、細胞核中都可發現病毒顆粒的存在。



圖九 於感染流行性感冒病毒後不同時間點收取細胞的 RNA，偵測病毒 RNA 的量。

將 A549 細胞感染病毒之後的 2、4、6、8 小時收細胞的 RNA，以 real time RT-PCR 方式偵測細胞中病毒含量，發現隨著時間的增加，病毒 RNA 量也隨著增加，此結果與圖八的細胞染色結果相符合。



參考資料 (Reference)

Advisory Committee on Immunization Practices, Smith NM, Bresee JS, Shay DK, Uyeki TM, Cox NJ, Strikas RA. 2006. Prevention and Control of Influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 55(RR-10):1-42.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Heparin C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(22): 12766-12771.

Call SA, Vollenweider MA, Hornung CA, Simel DL, McKinnet WP. 2005. Does this patient have influenza? *JAMA.* 293(8): 987-997.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7(12): 1306-1312.

Cheng JC, Huang CC, Lin CC, Chen CC, Chang YC, Chang SS, Tseng CP. 2006. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44(11): 1997-2004.

Chi XS, Li F, Tam JS, Rappaport R, Chen SM. 2007. Semiquantitative one-step RT-PCR for simultaneous identification of human influenza and respiratory syncytical viruses. *J. Virol. Methods.* 139(1): 90-92.

Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* 205(1): 17-23.

Cox NJ, Subbarao K. 1999. Influenza. *Lancet*: 354(9186): 1277-1282. Review.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79(5): 2814–2822.

Fujiyoshi Y, Kume NP, Sakata K, Sato SB. 1994. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J.* 13(2): 318-326.

Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. 2003. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol.* 77(13): 7214-7224.

Idaho technology, Inc. 2003. High resolution melter technical users manual. Chapter 2 Instrument specifications and installation. 13-21.

Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. 1991. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol.* 65(10): 5491-5498.

Johnson NP, Mueller J. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 76(1): 105-115.

Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol.* 80(11): 5308-5320.

Kuszewski K, Brydak L. 2000. The epidemiology and history of influenza. *Biomed Pharmacother.* 54(4): 188-195. Review.

Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(16):

9280-9285.

Lamb RA, Krug RM. 2001. in *Fields Virology*. (eds Knipe DM, Howley PM) Chapter 46 *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. 1487-1531.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*. 50(7): 1156-1164.

Meertens L, Bertaux C, Dragic R. 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. 80(23): 11571-11578.

Mishra SK, Agostinelli NR, Brett TJ, Mizukami I, Ross TS, Traub LM. 2001. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem*. 276(49): 46230-46236.

Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*. 71(12): 9690-9700.

Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J*. 19(24): 6751-6758.

O'Neill RE, Talon J, Palese P. 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 17(1): 288-296.

Pelkmans L, Helenius Ari. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 15(4): 414-422.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282(5390): 938-941.

Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 69(3): 517-528.

Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM. 1981. A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell.* 23(3): 847-858.

Reed GH, Wittwer CT. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 50(10): 1748-1754.

Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, McCall S, Taubenberger JK. 2002. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J Virol.* 76(21): 10717-10723.

Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, Higgins G, Hampson A, Shaw R, Kok T. 2004. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. *J. Virol. Methods.* 117(2): 103-112.

Sugrue RJ, Hay AJ. 1991. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology.* 180(2): 617-624.

Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 275(5307): 1793-1796.

The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis.* 11(10): 1515-1521.

Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, Smith CB, Cox NJ, Kuchta RD, Rowlen KL. 2006.

Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol* 44(8): 2863-2871.

Tseng CP, Ely BD, Li Y, Pong RC, Hsieh JT. 1998. Regulation of rat DOC-2 gene during castration-induced rat ventral prostate degeneration and its growth inhibitory function in human prostatic carcinoma cells. *Endocrinology*. 139(8): 3542-3553.

Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, Garcia-Sastre A. 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*. 310(5745): 77-80.

Ulmanen I, Broni B, Krug RM. 1983. Influenza virus temperature-sensitive cap (m7GpppNm)-dependent endonuclease. *J Virol*. 45(1): 27-35.

Wei HL, Bai GR, Mweene AS, Zhou YC, Cong YL, Pu J, Wang S, Kida H, Liu JH. 2006. Rapid detection of avian influenza virus A and subtype H5N1 by single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Virus Genes*. 32(3): 261-267.

World Health Organisation. 2007. Situation report of confirmed human cases of H5N1 reported to WHO. At http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_07_11/en/index.html

World Health Organisation. 2006. Influenza symptoms and Laboratory Diagnostic Procedure. At <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labprocedures.htm>

Wright PF, Webster RG. 2001. in *Fields Virology*. (eds Knipe DM, Howley PM) Chapter 47 Orthomyxoviruses. 1533-1579.

Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A. 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*. 196(1): 249-255.

Zhou L, Vandersteen J, Wang L, Fuller T, Taylor M, Palais B, Wittwer CT. 2004. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. *Tissue Antigens*. 64(2): 156-164.

