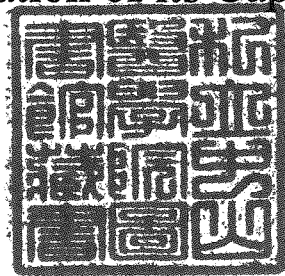


R
007.8
0011

中山醫學院生物化學研究所
碩士論文

人類多瘤性病毒 JC 病毒主要殼體蛋白 VP1
在昆蟲細胞表達之分子特性化
及其殼體穩定性之研究

Molecular Characterization of the Human Polyomavirus
JC Virus Major Capsid Protein Expressed in Insect Cells
and Investigation of its Capsid Stability



指導教授：張德卿 博士

研究生：方瓊瑤

中華民國八十五年七月

中山醫學院圖書館



C036300

簽署人須知

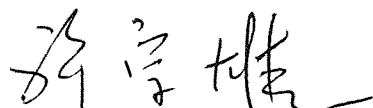
1. 依著作權法之規定，任何人以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人之授權，請分別在三種利用方式的同意欄內填妥各項資料。屬專授權是複授權給他人使用；反之即為專授權，如果您已簽署專授權，請勿簽署本授權書。
2. 依著作權法之規定，任何人以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人之授權，請分別在三種利用方式的同意欄內填妥各項資料。屬專授權是複授權給他人使用；反之即為專授權，如果您已簽署專授權，請勿簽署本授權書。
3. 依著作權法之規定，任何人以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人之授權，請分別在三種利用方式的同意欄內填妥各項資料。屬專授權是複授權給他人使用；反之即為專授權，如果您已簽署專授權，請勿簽署本授權書。
4. 依著作權法之規定，任何人以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人之授權，請分別在三種利用方式的同意欄內填妥各項資料。屬專授權是複授權給他人使用；反之即為專授權，如果您已簽署專授權，請勿簽署本授權書。
5. 依著作權法之規定，任何人以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人之授權，請分別在三種利用方式的同意欄內填妥各項資料。屬專授權是複授權給他人使用；反之即為專授權，如果您已簽署專授權，請勿簽署本授權書。

研究生姓名：方瓊瑤 聯絡電話：(05)224-7007
 地址：嘉義市興業新村74號

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院生化研究所
碩士論文考試委員會審查合格及口試通過

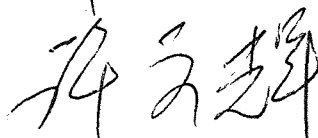
口試委員

清華大學生命科學院



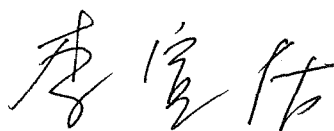
許宗雄 教授兼院長

中興大學分子生物研究所



許文輝 教授兼所長

中山醫學院細胞遺傳室



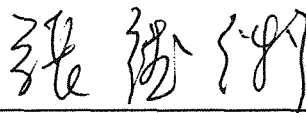
李宣佑 教授兼主任

中山醫學院生物化學研究所



王朝鐘 教授兼所長

中山醫學院醫學系微生物科
(論文指導教授)



張德卿 副教授兼主任

中華民國八十五年七月

學生方瓊瑤論文題目為人類多瘤性病毒 JC 病毒主要殼體結構蛋白 VP1 在昆蟲細胞表達之分子特性化及其殼體穩定性之研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：張德卿

簽名：張德卿

中華民國 85 年 7 月 17 日

誌 謝

首先要感謝指導教授張德卿博士在研究及課業上的教導，使論文得以順利完成。除了專業知識提昇之外，在跟隨張德卿博士期間，我學習到老師對科學堅持不懈、嚴謹的精神，以及宏觀的人生哲學，使我在未來的處世更成熟、更圓滿。

同時，特別感謝許宗雄教授，許文輝教授，李宣佑教授及王朝鐘教授撥冗審查和口試論文，並提供寶貴意見，使論文更完善。謹此致上誠摯的謝意。

此外，感謝謝玲玲教授對於實驗的幫忙，廖克剛教授、趙佩琪小姐對於電子顯微鏡技術的協助，嚴正傑老師對於樣本鋅、鎘的測定，黃耀騰同學對於血的提供，微生物科各位老師、黃玉珍小姐以及實驗室歐威志、王梅林、曾才郁、黃亦樂等學弟妹的幫忙，使得研究得以順利進行。

最後要感謝我的父母及家人對我的關懷。尤其是我的先生，宏欣，這兩年來給予我不斷的支持與鼓勵，才能讓我完成學業。我謹將這份結果與他們分享，並向所有幫助我的人表示由衷的謝意。

八十五年七月

目 錄

	頁次
中文摘要 -----	1
英文摘要 -----	2
前言	
人類多瘤性病毒背景介紹 -----	3
本研究相關資料及結果簡介 -----	8
材料與方法 -----	11
結果 -----	21
討論 -----	26
參考文獻 -----	62

中文摘要

人類多瘤性病毒JC病毒主要結構蛋白VP1基因已被選殖到昆蟲細胞桿狀病毒系統表達。此VP1蛋白質在昆蟲細胞內可以形成殼體(capsid)。利用殼體密度為1.28~1.30 g/ml的特性,藉CsCl密度梯度離心可以純化出VP1蛋白質。其密度約為1.29 g/ml,不含DNA,在電子顯微鏡下為empty capsid的構造。此VP1蛋白質具有結合DNA的能力。VP1在細胞質表達後可被送入核內。以2D-PAGE分析,共有6 species。

以EDTA及DTT一起處理純化的VP1 capsid,會使capsid解離為次殼體(capsomere)。加入二價離子 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 會使capsomere部份重組回capsid。若加入EDTA於再重組的capsid,不需DTT即可使capsid再解離成capsomere。由此推測二價金屬離子在capsid組合扮演決定性角色,而且雙硫鍵則在殼體穩定上具有保護金屬離子的功能。在pH值方面,capsid在中性、鹼性下較穩定(pH 6.5~10.5)。相對的在酸性下(pH 5.3以下),capsid較不穩定而易解離成capsomere。此外,以不同溫度測其穩定性得知capsid在37及42°C較穩定,65及72°C則使capsid迅速解離。

Abstract

The gene of the major capsid protein VP1 of human polyomavirus JC virus has been cloned into baculovirus and expressed in insect cells. The VP1 protein was able to self-assemble into a capsid structure in insect cells. The VP1 protein was purified by CsCl density gradient centrifugation to near homogeneity. The density of this purified capsid was 1.29 g/ml. Electron microscopy demonstrated that the VP1 protein was expressed in the cytoplasm and then transported into the nucleus. Two-dimensional gel analysis revealed that the VP1 protein was composed of six distinct species.

EDTA and DTT together were able to disrupt the capsid into capsomeres. Zn^{2+} and Cd^{2+} could reassemble capsomeres into capsid. In addition, the reassembled capsid could be disrupted into capsomeres by EDTA alone. These findings indicated that the divalent cations played a major role in assembling the capsid structure and the disulphide bond protected the cations from chelation. Capsids appeared to be more stable in neutral or alkaline conditions (pH 6.5 ~ 10.5). Furthermore, capsids were found to be more stable at 37 °C and 42 °C, but not at above 65 °C.

前言

人類多瘤性病毒 (Human polyomavirus) 簡介

人類多瘤性病毒屬於乳多瘤病毒科 (Papovaviridae) 的一屬，大小約 45 nm，不含套膜 (envelope)，為二十面體的病毒。病毒外殼 (capsid) 是由 polypeptide 構成的 72 次殼體 (capsomere) 所組成，內含有圓形，超螺旋 (circular supercoiled) 的雙股 DNA，分子量約有 3×10^6 道爾吞 (dalton)，人類多瘤性病毒有 JC virus (JCV) 及 BK virus (BKV)。JCV 首先於 1971 年從進行性多病灶腦白質病 (Progressive multifocal leukoencephalopathy，PML) 的病人腦部組織被分離出來 (57)，而 BKV 則從腎臟移植病人的尿液中被分離出來 (24)。

PML 跟 JCV 的相關性

PML 這個名詞最早使用於 1958 年，用於描述一個患有慢性淋巴球白血病 (Chronic lymphocytic leukemia，CLL) 及 Hodgkin's 疾病的病人的神經細胞有嚴重的脫髓鞘現象 (3)，然而病因並不清楚。直至 1959 年，在有損傷的寡樹突膠質細胞 (oligodendrocyte) 核發現 inclusion body 才推測 PML 的病因跟病毒有關 (9)。接下來的幾年，Richardson 曾報告在老年人及其它疾病如淋巴瘤 (lymphoma)，白血病 (leukemias)，類肉瘤病 (sarcoidosis) 及癌症病人中，其中十個有 PML 者，均有 plaque lesion 的現象 (61)。隨著 PML 越來越被了解，電子顯微鏡的證據也顯示在有 inclusion body 的寡樹突膠質細胞的變大的核內有類似於多瘤性病毒的顆粒的存在 (74)。然而直到 1971 年才由 Padgett (57) 等人利用 PML 病人的腦組織接種到人類胎兒腦細胞株分離出來，而此病毒構造、大小跟另一個由 Gardner 等人從腎臟病人尿液分離出來的病毒類似 (24)。二者皆依病人的姓名分別命名為 JC virus (JCV) 及 BK virus (BKV)。這兩種病毒均可以凝集 (hemagglutinate) 人類 O 型血球 (24, 56)。此特性使得可以利用血液凝集抑制 (hemagglutination inhibition) 方法來做流行病學調查，探討這二病毒的盛行率 (56)。在 1970 年中期所做的血液凝集抑制調查，證實 JCV 及 BKV 是不同的病毒 (23, 53, 56)，而且是廣泛分佈於人類族群中 (8)。大部份的人均感染過 JCV (62)，而 PML 病人血清及腦脊液 (Cerebral spinal fluid，CSF) 缺乏 JCV IgM 抗體，且不會隨著 PML 病情發展而有抗體濃度增高的情形，顯示 JCV 本來為潛伏性感染，而再活化 (reactivation) (54)。因 JCV 不同於其它的多瘤性病毒，就有許多科學家開始探討其生化、分子及基因特性。

JCV 的生物特性

人類腦細胞及病毒培養

1971 年，Padgett 等人分離 JCV，培養在人類胎兒腦細胞的技術，使得可以再從 PML 病人分離新 JCV (57)。1976 年，Padgett 等人 (55) 再分離出新 JCV，由於是在美國 Madison 威斯康辛大學被分離出來，所以命名為 Mad-1 (prototype)，Mad-2 等。從血清學上調查得知 JCV 在人類分佈很廣，然而 JCV 的分離必須從人類腦部組織才能成功，只能感染特定的神經細胞如產生髓鞘的寡樹突膠質細胞 (oligodendrocyte)，而且只能在免疫抑制病人腦細胞引起去髓鞘症狀。為何 JCV 分佈如此廣，卻只會感染產生髓鞘的寡樹突神經細胞呢？爲了了解此問題，所以許多科學家開始測試不同細胞對 JCV 的感受性。

JCV 可在寡樹突膠質細胞的前驅細胞 (precursor) 神經膠母細胞 (spongioblast) (64)，及星狀細胞 (astrocyte) 生長，這兩類均爲膠質細胞 (glial cell) 構成白質 (white matter)。JCV 在這些細胞的生長緩慢，需數星期才能收集病毒，且只有輕微細胞病理特性可觀察到。

JCV 在非腦組織衍生的細胞宿主範圍探討

利用血液凝集特性，來探討其它源自於人類非腦組織及其它種 (species) 的細胞來測試對 JCV 的感受性。人類胚胎的腎、肺、羊膜、肝、腸及猴子腎細胞株，如 BSC-1，CV-1，Vero cells，則均不能讓 JCV 生長 (53)。爲了決定 JCV 的這種宿主細胞限制是否在於病毒的吸附及進入。以 JCV DNA 做轉感染 (transfection)，以四種 JCV 分離株及其 DNA 測試人類胚胎及肺細胞，同時以人胚胎腦細胞作爲正控制組 (20)，結果只有源自於 Mad-4 的 DNA 有病毒 T 蛋白質產生，其它的則無。而其它的 JCV 對人胚胎腦細胞具感染性，對其它細胞則不具感染性。所以 JCV 的宿主限制似乎跟細胞內因子有關，而跟受體無關。若將 Mad-1 接種到人類胚胎腎細胞，經由連續分裝 (passage) 細胞，會產生一新 JCV-HEK 病毒株 (50)，此新病毒株在調節區有刪除 (deletion) 及重排 (rearrangement) 之情形 (49, 73)。因此，調節區的基因順序可能跟宿主範圍有關。

星狀細胞株的建立

雖然人胚胎膠細胞是 JCV 的最好宿主，然而此細胞的不易獲得及生長時間長均限制了實驗的進行。爲了解決此問題，利用複製缺陷而能產生 T 蛋白質的 SV 40 病毒株使星狀細胞不死亡 (immortalized) 而產生 SVG 細胞株 (42)，及利用複製缺陷也能產生 T 蛋白質的 JCV 病毒株給人類胚胎膠細胞而得到 POJ 細胞株 (45)。這些細胞株均能讓 JCV 複製。

癌生物特性

JCV 在結構及基因上均類似於 SV 40 及鼠類多瘤性病毒，而 PML 病人常有

系統腫瘤 (systemic tumor) (淋巴性而非中樞神經性) ，所以 JCV 被分離出來之後，即測其致癌性。由於倉鼠 (hamster) 對於 SV40 具感受性 (43) ，所以選擇倉鼠做為實驗動物。若將 JCV 注射到倉鼠大腦內或皮下，80 % 倉鼠均產生神經膠母細胞瘤 (glioblastomas) ，神經管胚細胞瘤 (medulloblastomas) (71, 75) 。在這些腫瘤細胞可發現 T 蛋白質，若將其跟人類膠細胞一起培養，則倉鼠的腫瘤細胞會釋出具感染性病毒，可見具生物活性完整 JCV 基因體存在 (71) 。若接種到倉鼠眼內，則誘發腹部神經母細胞瘤，且轉移到肝、骨髓、及淋巴結 (70) 。在細胞培養情況下，倉鼠腦細胞株可因 JCV 感染或因 JCV 的 DNA 轉感染而轉形 (transformed) (21) ，而在這些被轉形的細胞，發現 JCV 基因體嵌入倉鼠基因，表現的 T 蛋白質會跟 p53 及 Rb 蛋白質結合 (44) 。JCV 是唯一被證實在非人類靈長類可誘發腫瘤的多瘤性病毒，若將 JCV 接種到猴子的大腦、皮下、或腹腔內，打入 prednisone 使成免疫缺陷狀態，則產生大腦腫瘤或神經膠母細胞瘤。在腦細胞組織發現 T 蛋白質而沒有 V 蛋白質或病毒殼體蛋白 (39) 。雖然 JCV 可在非人類靈長類誘發腫瘤，在 PML 病人曾發現神經膠瘤 (glioma) ，但尚未有直接證據證實 JCV 跟人類腫瘤有關 (17) 。

分子調節 (Molecular regulation)

病毒基因體分析

JCV 基因體 (genome) 可分為三主要功能區：(i) 在複製起始點近端的早期區 (early region) ，(ii) 在複製起始點遠端的晚期區 (late region) ，(iii) 在早期及晚期之間的調節區 (regulatory region) ，其含複製起始點，起動子 (promoter) ，及增強子 (enhancer) ，如圖 1 。早期區有二種基因產物，大腫瘤 (LT) 抗原 (large T antigen) 及小腫瘤 (st) 抗原 (small t antigen) ，大 T 蛋白質是種非結構性的多功能磷酸蛋白質，可調控早期基因的轉錄，所以可自我調控 (autoregulation) 。除此之外，T 蛋白質為 DNA 複製起始所需，也控制基因表現從早期轉換到晚期，同時，也能引起細胞的惡性轉形。小 t 蛋白質的功能則尚未清楚。大 T，小 t 蛋白質的 open reading frame 均從 5013 開始，但由於不同的切割 (differentiation splicing) 產生兩種 mRNA (19) ，例如小 t 蛋白質的終止訊號發生於核苷酸 4495，而大 T 蛋白質發生於核苷酸 2603 。因此，二者有相同的 5' 端，但 3' 端卻是獨特的，所產生的蛋白質，大 T 含有 688 氨基酸，小 t 則含有 172 氨基酸。

晚期基因順序則跟早期基因的方向相反，共決定 4 種蛋白質 (19) ，晚期基因的 5' 端是最小的 open reading frame，可做出 71 個氨基酸，相對應在 SV40 所 encode 的蛋白質為 7.9 Kda 的 agnoprotein (6) 。在 SV40，此 agnoprotein 可結合 DNA (31) ，且可能參與病毒成熟步驟 (30) 。最大的 open reading

frame 位於 3'端， encode — 354 氨基酸的 VP1 殼體蛋白質，是最主要結構蛋白，跟細胞吸附有關。在 VP1 蛋白質及 agnoprotein 之間尚有兩個 open reading frame， encode VP2 及 VP3 殼體蛋白，分別為 344 及 225 個氨基酸。VP3 是 VP2 的 C 端的 2/3。

調控區介於早期及晚期基因之間的未轉錄區，含有 DNA 複製起始點及早期、晚期轉錄的同向調節訊息 (cis-acting signal)。比較 JCV、BKV 及 SV40 的複製起始點，發現三者有非常相似的區域，(如圖 2)，包括有二對稱區 (dyad symmetry)，及一個 17 bp 的迴文區，顯示三者結構上的類似。其中一個 dyad symmetry 在三種病毒有 22 或 23 核苷酸完全相同。在 SV40 其中一個區域為 T 蛋白質的結合區 (Site I)，而第二個區域為 T 蛋白質的結合區 (Site II)，跟 17 bp 的迴文區重疊 (51)。第三個 T 結合位置在 JCV 則不存在 (圖 3)。除了 DNA 複製起始點之外，尚有二 98-bp 的 tandem repeat，位於 non-coding region 的左端 (圖 4)。雖然 JCV 在這區域的核苷酸排列類似於 SV40 及 BKV，順序上卻鮮少相同。此乃因 Mad-1 JCV 其 TATA box 及 Goldberg-Hogness box 是重覆序列中之一段。

病毒基因的改變 (Alteration in the Viral Genome)

JCV 的基因會有異質性 (heterogenous) 的現象，造成這種異質性的原因可能是：(i) 在生物體外 (in vitro) 培養的條件，(ii) JCV 基因體的來源及分子選殖的演變 (25, 26, 60)，及 (iii) 分離出來的病毒的自然改變 (46)。JCV 基因體的改變也曾見於未經細胞培養而直接從組織分離出來的病毒株 (strain) (37)，所以，JCV 基因的改變無論是生物體內 (in vivo) 及生物體外 (in vitro) 均有可能發生。

在非 PML 的老年人的尿液中所分離出來的 JCV 基因體有 23-bp 插入 (圖 4)，也曾在 PML 感染的腦組織中發現 (56)。另外還有 66-bp 插入在 80 及 98-bp tandem repeat 之間曾發現 (72)，同時有 23 及 66-bp 插入者稱為 archetype。大部份基因的改變均位於調節區，這些改變的真正意義則尚未完全清楚。

病毒基因的表現 (Expression of the Viral Genome)

爲了瞭解調節區的功能，就有研究探討調節區跟宿主控制的關係。Kenney 等人 (32) 發現 Mad-1 的第一個 TATA box 具有促進基因表現的功能，同時此種促進功能具有細胞專一性，在人類胎兒神經細胞的表現高於其它種類的細胞。相同的，Feigenbaum (18) 及 Tada (67) 也曾證實調控區具有組織專一性。調節區控制宿主細胞範圍及對膠原細胞的偏好 (tropism) (69)，而 T 蛋白質在決定足夠基因表現及細胞專一性扮演重要角色 (5, 16, 27)。細胞核內 DNA

結合蛋白會結合到 JCV 的調節區的 5' 及 3' 端 (35)，調節基因轉錄。在其它的實驗則發現，有四個結合區，其中兩個位於 98- bp 的 TATA box 區，另一則位於第二個 TATA box 之外，似乎作為在非神經膠原細胞的負調節因子 (67)，來自神經膠細胞的 45Kd 因子 (1) 及 nuclear factor-1 相似的因子 (35)，均是轉錄的正調節因子，調控轉錄效率。

病毒基因體的複製

JCV 基因體的複製起始點跟 SV 40 類似，由 T 蛋白質結合到 GAGGC 的順序 (19)，然而 JCV DNA 的複製不像 SV 40 如此高效率，通常要感染 3-5 天之後才能偵測到且持續數星期 (18, 34)。JCV T 蛋白質的存在是必須的，若將 T 蛋白質的 coding sequence 做了突變，則 JCV 的複製無法進行 (44)，而且 SV40 及 BKV 的 T 蛋白質可跟 JCV 的 ori 順序結合而促使溶解性感染 (lytic infection) (16)。然而 JCV 的 DNA 複製不僅需 T 蛋白質，還需要一些靈長類的因子存在 (18)，JCV 可在含 SV40 T 蛋白質的細胞株複製，如 SVG (人類神經膠細胞)，SV1 (人類胚胎腎細胞) 及 COS 1 (猴子腎細胞)，卻不能在 HJC (表現 JCV T 蛋白質的鼠類腦細胞)，CV-1 (猴子腎細胞) 或 Hela 等細胞株複製。因此，JCV 基因體的轉錄受限於細胞專一性因子，而在神經膠細胞最好，而複製則受限於種專一性 (species-specific) 因子，而靈長類的效果最好 (18)。此外，Lynch 及 Frisque (40, 41) 發現在第二個 T 蛋白質結合位置的重覆序列 (AGGGA) 對 JCV 的複製能力有很大的影響力，若在這區域發生突變，則 JCV T 蛋白質促進複製的功能則大為降低。

PML 為 JCV 感染所致的腦細胞病變

JCV 感染寡樹突膠質細胞 (oligodendrocyte) 之後，進行細胞溶解性破壞而導致去髓鞘，有 80 % 去髓鞘會伴隨著星狀細胞的肥大 (43)，藉由 in situ hybridization 的方法可以偵測到病毒 DNA (2)。失去髓鞘會引起軸突的損傷，進而使在灰質 (gray matter) 的細胞衰亡，最後導致神經的死亡。臨床上的特徵，初期通常有半盲 (homonymous hemianopia)，hemiparesis，心智上的改變等。臨床上的診斷則以電腦斷層掃描 (computerized tomography, CT) 及核磁共振 (MRI) 偵測去髓鞘病灶。實驗室的診斷則以 in situ hybridization，免疫細胞化學方法 (immunocytochemistry) 或 PCR 測腦部的活組織 (biopsy)。

本研究相關資料及結果簡介

到目前為止，鼠類及猿猴類的多瘤性病毒，了解得較為透徹，鼠類及猿猴的多瘤性病毒殼體三度空間 X-射線繞射圖分別於 1982 (59) 及 1991 (36) 被決定出來，這些病毒外殼蛋白是對稱的 20 面體構造，由 12 個 five-coordinated 及 60 個 six-coordinated capsomere 所組成。而這些 capsomere 均由 5 個 VP1 所形成的 pentamer 構成，所以 VP1 分子在 20 面體殼體是非對等鍵結 (nonequivalently bonded) (63)。由於 VP1 位於病毒顆粒表面，所以可能跟細胞接受體 (cell receptor)，血液凝集反應及抗原反應有關。

VP1 蛋白質在參與病毒顆粒組成前會廣泛的修飾，包括了 acetylation，phosphorylation (4)，然而，在 *E. coli* 表達未經修飾的 VP1 卻可以因改變緩衝液狀況，組成一個類似殼體的構造 (63)。若將此殼體以還原劑 (如 DTT) 及螯合劑 (如 EDTA) 處理，則殼體解離成 capsomere。單獨作用，則殼體仍保持完整構造。在二價離子，則以 Ca^{2+} 保護殼體的完整性最好 (7)。VP1 蛋白質在鹼性環境下，carbonate 或 glycine 存在時，會解離成 capsomere，高鹽濃度則會幫助殼體穩定 (58)。鼠類多瘤性病毒 VP1 蛋白質形成之後，會送到細胞核組裝成殼體 (48)。此乃因在細胞質時，hsc 70 蛋白質跟 VP1 結合而防止 VP1 在細胞質組裝成殼體 (15)。

在之前我們實驗室研究中，Taiwan - 3 JCV 是在一位自體免疫病人的尿液中發現 (11)，其 VP1 基因以 PCR 的方法放大之後，再選殖到大腸桿菌的表達質體 pGEX-4T-1 (10)，表達出來的 JCV VP1 蛋白質跟 SV40 VP1 蛋白質比較，二者有 77.3 % 的相似性，然而在 BC (氨基酸 57-90)，DE (127-148) 及 HI (268-278) loops 這些位於病毒顆粒表面的區域，相似性則降至 54.5，65 及 66.6 %。為了更進一步了解 VP1 蛋白質的生物特性，包括轉譯後修飾作用 (posttranslational modification)，殼體穩定性，及抗原性 (antigenicity) 等，我們將 JCV VP1 的基因送到昆蟲細胞表達。而對此在昆蟲細胞表達的 JCV VP1 蛋白質做一些探討。

桿狀病毒表達系統 (baculovirus expression system) 可以在昆蟲 (真核) 細胞表達大量蛋白質，其含許多特點：在昆蟲細胞所表達的蛋白質的修飾作用 (modification) 類似於在哺乳類細胞的修飾作用，而昆蟲細胞所表達的蛋白質產量較高，所耗費的成本也較低。最常用來表達外來基因的桿狀病毒為 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)。當 AcMNPV 感染昆蟲細胞後，病毒顆粒進入細胞，且在細胞核進行病毒 DNA uncoating 作用 (如圖 5)。DNA 複製則開始於病毒感染後約 6 小時，病毒感染後的晚期 (約 6-24 小時)，病毒顆粒開始製造，且以出芽方式從細胞釋出。感染後的最晚期 (very late phase) 約從 20 小時之後持續到 2 天，直至細胞死亡。在此時期，

幾乎所有細胞的轉錄作用均已停止，只表達病毒的兩種基因：polyhedrin 及 p10 基因。Polyhedrin 蛋白質是 polyhedra 的結構成份，polyhedra 蛋白質的作用在於保護病毒免於受外界傷害而能繼續感染宿主。所以在細胞培養情況下，polyhedrin 的基因產物非病毒存活所必需，因此 polyhedrin 基因可被有興趣的基因取代，而此非常強的 polyhedrin promoter 則促使此基因轉錄，因而使得此基因在最晚期累積。

AcMNPV 基因體是 128 Kb 的雙股 DNA，由於病毒 DNA 太大，使得基因操作有困難，因此先將 JCV VP1 基因選殖到含有病毒 polyhedrin 基因的傳送載體 (transfer vector) pBacPAK8 (圖 6)，pBacPAK8 含複製起始點，及對安比西林有抗性的 (ampicillin resistant) 基因，可在大腸桿菌，卻不能在昆蟲細胞內複製。最初選殖到傳送載體的病毒基因段含有整個 polyhedrin 基因及兩旁的重組序列 (recombinant sequence)，之後 polyhedrin 的 coding sequence 被刪掉，以一些內限制酶切割位置取代。JCV VP1 的基因插入 polyhedrin 的起動子 (promoter) 及多腺吟 (polyadenylation) 中間的內限制酶切割位置；第二步驟為將此含有 VP1 基因的傳送載體 pBacPAK8 及病毒 DNA 一起轉感染 (cotransfect) 到昆蟲細胞，在細胞內 pBacPAK8，VP1 旁的病毒重組序列及桿狀病毒 DNA 上的重組序列，發生同源性重組現象 (homologous recombination) 而將此 VP1 基因接到桿狀病毒 (圖 7)。

而在此實驗所用的桿狀病毒表達系統 (Clontech BacPAK™ Baculovirus Expression system) 對桿狀病毒做一些處理。也就是利用在 polyhedrin 基因下游有一病毒存活所需的基因，將內限制酶 *Bsu36I* 切割位置利用基因工程技術放到 polyhedrin 起動子之後，及病毒存活必須基因兩個位置。以 *Bsu36I* 來切割病毒 DNA (pBacPAK6)，則會切下部份病毒存活的必須基因 (ORF1629，為複製所必須)，如果此大 DNA 片段自己接起來，因必須基因部份被刪除，所以病毒不能複製，無法存活。若大基因片段跟攜帶此必須基因的傳送載體發生重組，才能產生一含有完整必須基因的重組病毒。利用此原理，而使存活下來的幾乎 100% 均為重組病毒 (33)。實驗的大綱描述於圖 8。

在這實驗中，我們成功得到此含有 JCV VP1 的重組桿狀病毒，利用此含 VP1 基因的重組病毒感染昆蟲細胞使 VP1 基因在 polyhedrin 起動子的驅動下，在昆蟲細胞表達 JCV VP1 蛋白質。此 VP1 蛋白質在昆蟲細胞 72 小時表達量最高，且在細胞質就可能已組裝成殼體。經由電子顯微鏡分析，發現其為空殼體，不含 DNA。此 VP1 蛋白質具 DNA 結合能力。利用 densitometry 得知 VP1 在昆蟲細胞的表達量為 54 ug/ml，經由 sucrose cushion 及 CsCl 密度梯度離心純化，可得 96% 純度的 VP1 蛋白質，回收率 (yield) 約為 22%。經由 2D gel 分析，VP1 蛋白質在昆蟲細胞有 6 species。利用此純化殼體，探討其穩定性，發現還原劑 DTT 及螯合劑 EDTA 同時存在時，會使殼體解離成 capsomere。病毒在鹼性環境下 (pH 6.5-10.5) 較穩定，酸性環境下 (pH 5.3 以下) 則會破壞病毒殼體完整性。加入二價離子 Zn^{2+} ，及 Cd^{2+} 可使 capsomere 再組裝成 capsid，

以原子吸收光譜 (atomic absorption) 測定殼體內含金屬種類，可測得 Zn^{2+} ，及 Cd^{2+} 。利用此在昆蟲細胞表達的 JCV 殼體，可用於流行病學上的探討，同時提供將來疫苗發展一良好的工具。

材料與方法

細胞培養

昆蟲細胞 *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) (Clontech # 1601-1) 培養方法參照 Hink 的方法 (29)。簡單的說，Sf21 細胞培養於含 10 % 胎牛血清 (Gibco) 的 TNM-FH (Sigma #T1032) 培養液中。TNM-FH 的泡法是將 51.2g 的粉狀培養液溶於 0.9 公升的去離子水中，加入 0.35g 的 sodium bicarbonate，室溫下攪拌使其完全溶解後，再用 1N NaOH 調 pH 至 6.0，加水到一公升，再於無菌操作檯內以 0.22um 的濾膜過濾。此時 pH 約為 6.2，保存於 4 °C。胎牛血清初次使用前需先 56 °C，30 分鐘處理，將補體去活化。

DNA 載體

本實驗所用的 DNA 載體為 pBacPAK8 (Clontech # 6145-1)，含有質體複製起始點 (replication origin) 及抗安比西林 (ampicillin resistant) 基因，可在 *E. coli* 複製。此質體含有 BamHI 切割位置，用於構築重組質體，將 JCV VP1 基因放在 polyhedrin 起動子之後。

病毒結構蛋白基因 (JCV VP1) 的純化與處理

JCV VP1 的基因已從類風濕性關節炎病人尿液中，以 PCR 方法放大出來，選殖到 DNA 載體 pGEX-4T-1 的 BamHI 選殖位置 (10)。此含有 JCV VP1 基因的 pGEX-4T-1 質體已轉殖 (transformation) 到 *E. coli* JM109 上，將此 *E. coli* 接種到含有 ampicillin (100 ug/ml) 的 5 ml 已滅菌 L broth 中，37 °C，200 rpm 的轉速隔夜培養。取出 1.5 ml 隔夜培養的菌液，離心 12,000 rpm，5 分鐘。以 Wizard™ Minipreps DNA purification system (Promega) 純化出 50 ul，約 10ug JCV VP1/pGEX-4T-1 質體。取出 40 ul plasmid DNA 再用 5 ul (10 units /ul) 的 BamHI (Promega) 切割，加入 5 ul 10x buffer，在 37 °C 水浴下切割 3 小時。經 1% agarose gel 電泳分析後，可見質體被切割成 4469 bp 的質體及 1065 bp 的 JCV VP1 基因片段。切下 JCV VP1 的 DNA 片段，以 GeneClean II Kit (Bio 101) 純化出 1065 bp 的 JCV VP1 DNA，即可用於基因選殖。

DNA 載體的處理

含有 pBacPAK8 質體的 *E. coli* 菌株，培養在含 ampicillin (100 ug/ml) 的 5 ml 已滅菌 L broth 中，37 °C，200 rpm 的轉速，隔夜培養。取出 1.5 ml 的菌液，以 Wizard™ Minipreps DNA purification system (Promega) 純化出 50 ul，約 10 ug 的 pBacPAK8 質體，取出 40ul plasmid DNA 加入 5 ul (10 unit /ul) BamHI，再加入 5 ul 10x buffer，在 37 °C 水浴下切割 3 小時。再加入 1 unit Calf intestinal phosphatase (CIP) 及 5.5 ul 10x buffer 於 37 °C 水浴反應 1 小時，以切除 5' 端的磷酸根。再於 72 °C 下水浴以破壞 CIP 的活性。以 1% agarose 電泳分析，切下 5538 bp 的 pBacPAK 質體片段。以 GeneClean II Kit (Bio 101) 純化 pBacPAK8 質體 DNA 的片段，即可用於基因選殖。

基因選殖

取 *Bam*HI 及 CIP 處理過 pBacPAK8 質體 1 ul 約 20 ng，加 *Bam*HI 處理過的 JCV VP1 insert 3 ul 約 30 ng，再加入 1 ul T4 DNA ligase (3 units)，1 ul 10x buffer 及 5 ul H₂O 共 10 ul 於 15 °C 隔夜 ligation 反應。將此質體命名為 pBJCV1。

E. coli 轉殖

Competent cell 的製備：將 *E. coli* JM109 strain 接種於 5 ml 已滅菌的 L broth 37 °C 隔夜培養之後，再取 0.5 ml 接種到 50 ml 已滅菌的 L broth (1 : 100) 於 37 °C，200 rpm 轉速，培養 2-3 小時直到 OD₆₀₀ 值達到 0.4~0.6，此數值表示 *E. coli* 生長速率正好達 mid-log phase。之後離心，2500 rpm，4 °C，5 分鐘，丟掉上層液，再用冰溫的已滅菌 25 ml 0.1M CaCl₂ 輕輕攪拌沉澱下來的細菌，冰浴靜置 30 分鐘。再離心 2500rpm，4 °C，5 分鐘，丟掉上清液，加入已滅菌的冰溫 1 ml 0.1M CaCl₂，輕輕攪拌沉澱下來的細菌，冰浴靜置 30 分鐘。

轉殖 (Transformation)：取 0.1 ml 的 competent cell 加到 10 ul ligate，冰浴靜置 30 分鐘，接著 42 °C 水浴 heat shock 3 分鐘。冰浴靜置 5 分鐘。再直接塗到含 ampicillin (100 ug/ml) 的 LB agar plate 上，37 °C 培養箱中培養隔夜。

篩選含有 JCV VP1 的菌落

挑出長在含 ampicillin 的 LB agar plate 上的菌落，接種在含有 100 ug/ml ampicillin 5 ml L broth，37 °C，200 rpm 轉速，隔夜培養。以鹼溶解方法 (alkaline lysis) 方法純化質體。

鹼溶解方法純化質體：取出 1.5 ml 菌液到 eppendorf 離心管，離心 12,000 rpm，5 分鐘，倒掉上清液。加入 100 ul resuspending solution (10 mM Tris，pH 8.0，4 mg/ml lysozyme)，使沉澱的菌液混合均勻，再加入 200 ul 新鮮配製的 lysis solution (1 % SDS，0.2 N NaOH)，上下混合離心管 (invert the tube)，此時可見菌液呈清澈透明狀，再加入 150 ul 5 M potassium acetate，同樣上下混合離心管，則可見到白色沉澱物出現。接著，離心 12,000 rpm，5 分鐘，將上層液換到乾淨的 eppendorf 離心管，加入 5 ul RNase (1 mg/ml)，37 °C 水浴，1 小時，以移去 RNA。再加入 500 ul saturated phenol，混合均勻後，離心 12,000rpm，3 分鐘，將水層移到乾淨 eppendorf 離心管，加入 250 ul saturated phenol 及 250 ul chloroform/isopropanol (24/1) 混合均勻後，離心 12,000 rpm，3 分鐘，將水層移到乾淨 eppendorf 離心管，加入 500 ul chloroform/isopropanol 混合均勻，離心 12,000 rpm，3 分鐘。將水層移到乾淨 eppendorf 離心管，加入 1/10 體積的 3 M sodium acetate，再加入 2 倍體積冰溫的絕對酒精，置於 -70 °C，30 分鐘，使質體沉澱。接著離心 16,000 rpm，4 °C，20 分鐘。倒掉上清液後，以 80 % 冰溫酒精潤濕，於 Speed-Vac 5 分鐘乾燥，再溶於 50 ul 已滅菌的 ddH₂O。

Restriction mapping

先在乾淨的 eppendorf 離心管加入 4 ul 已滅菌的 ddH₂O，再加入 4 ul 純化出的質體 DNA，再加入 1 ul 10x buffer，1 ul (10 units) 的限制酶，混合均勻後，於 37 °C 水浴作用 1 小時。之後加入 2 ul 的 6x loading dye，取出 6 ul 於 1 % agarose 電泳分析。若 JCV VP1 成功的接進質體，EcoR1 作用後，則可切成 5741 bp 及 861 bp 的片段。

構築 JCV VP1/Baculovirus recombinant

將 PBJCV1 及 BacPAK6 DNA 一起轉感染 (cotransfection) 到 Sf21 昆蟲細胞

首先在 35 mm² 的培養皿種入昆蟲細胞 7×10^5 cells/ml，共 1.5 ml，27 °C 隔夜培養之後。移去培養液，再加入 2 ml 沒有抗生素也沒有血清的 TNM-FH，輕輕轉動培養皿，再移去培養液，再加入 2 ml 沒有抗生素也沒有血清的 TNM-FH 培養液。室溫下靜置 10 到 30 分鐘 (由於血清會抑制由 lipofectin 所媒介的轉感染，所以此步驟必須清洗乾淨以移去正常的培養液)。

在此期間，準備 lipofectin-DNA 複合物。首先將質體 DNA pBJCV1 稀釋成 100 ng/ul 的濃度。接著在離心管內加入無菌水 40 ul，質體 pBJCV1 DNA 5 ul，BacPAK6 Viral DNA (Bsu36I digest) 5 ul，使總體積成 50 ul。因 BacPAK6 的病毒 DNA 易斷裂，所以處理時要特別小心，不能太用力。且離心管需使用 polystyrene 材質，以免將 DNA 黏在管壁上。接著加入 50 ul lipofectin 溶液 (0.1 mg/ml) 到含 DNA 的離心管中，輕輕混合均勻，室溫靜置 15 分鐘。在 15 分鐘快結束時，吸走培養皿上的培養液，再從外圍慢慢加入 1.5 ml TNM-FH (無抗生素，血清)。之後，再加 lipofectin-DNA 複合物到培養液，一邊加，一邊輕輕轉動培養皿，以混合均勻。置於 27 °C，培養 5 小時。第一個小時，每 15 分鐘以“side/side”的方式混合，之後每隔一小時，再混合一次。5 小時之後，再加入 1.5 ml TNM-FH (含 10 % FBS 及抗生素) 到培養皿中。繼續培養在 27 °C，60-72 小時之後，將培養液移到乾淨無菌容器，再加入 1.5 ml TNM-FH/FBS，27 °C 在培養。在第五、十、十三天分別將上層培養液移到乾淨無菌管。由於在第十一天時昆蟲細胞開始出現溶解 (lysis) 現象，所以在第十六天將上層液及細胞分別收起來。

以西方墨點法 (Western Blot) 來確認 JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞表達情形

由於 cotransfection 後所收集的培養液會含有部份細胞碎片懸浮。經 3,000 rpm，5 分鐘離心後，上清液含有病毒，保存於 -70 °C，沉澱下的細胞再溶於 200 ul 1 : 4 稀釋的 SDS sample buffer (20 % SDS 250 ul，glycerol/0.2 % bromophenol blue 250 ul，β-mercaptoethanol 125 ul)，在 100 °C 沸水中煮沸 5 分鐘，再以超音波震盪打斷 DNA，取出 12 ul 以 12.5 % SDS-PAGE 分析。再將膠上的蛋白以 HORIBLOT (ATTO) 以 anode buffer # 1 : 0.3 M Tris，pH 10.4，20 % methanol；anode buffer # 2 : 25 mM Tris，pH 10.4，20 % methanol；cathode buffer # 3 : 25 mM Tris，pH 9.4，40 mM 6-

aminohexanoic acid (Sigma A-2504), 20% methanol, 在 2.5 mA/cm^2 , 40 分鐘條件下轉印到 nitrocellulose paper 上, 再用 10 ml 5% 脫脂奶粉搖動, 使均勻混合 30 分鐘。再加入來自 *E. coli* 產生的全長 JCV VP1 所製成的抗體 anti-JCV VP1/Flag 抗體 (3000 倍稀釋), 室溫下搖 30 分鐘。再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次, 一次五分鐘。之後再加入 biotinylated anti-rabbit IgG (H + L) made in goat (Vectastain ABC kit # PK-4001), 於室溫反應 30 分鐘, 再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次, 一次五分鐘, 然後加入 ABC reagent (avidin DH, biotinylated horseradish peroxidase H) 30 分鐘, 再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次, 一次五分鐘。最後加 diaminobenzidine solution (DAB, 0.01% final concentration), 及 H_2O_2 (0.012% final concentration) 呈色分析。

以免疫螢光染色 (Immunofluorescence) 及西方墨點法 (Western blot) 探討 JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞不同時間表達情形

於 3 mm 之培養皿先置入 1.5 cm 見方以酒精消毒過後的蓋玻片, 再種入 7×10^5 cells/ml, 1.5 ml 的 Sf21 昆蟲細胞(約 80% 滿), 分別在病毒感染後 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 小時收集細胞。蓋玻片上的細胞固定後, 準備螢光染色用。長在培養皿上的細胞則沖下, 準備做西方墨點法。

重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染 Sf21 昆蟲細胞

先將培養皿內的 TNM-FH/FBS 吸掉, 再加入 0.1 ml 的 JCV VP1/Baculovirus 室溫培養一小時, 每間隔 15 分鐘再左右或上下混合, 使病毒的吸附增加, 以提高感染率。再加入 2 ml TNM-FH/FBS 於 27°C 培養。

免疫螢光染色 (Immunofluorescence assay)

A. 細胞固定

首先將培養液吸掉, 以 2 ml PBS 潤濕兩次。再用吹風機吹乾。再加入 2 ml 冰溫固定液 (丙酮: 甲醇 = 2:1) 置於 -20°C , 15 分鐘。吸掉固定液, 再用吹風機吹乾, 利用鑽石刀將蓋玻片切割成四片, 取其中的一片準備染色, 另外的三片則放回培養皿, 以 paraffin 封好, 再放回 -20°C 保存。

B. 螢光染色

將固定好的蓋玻片置於乾淨的培養皿內, 加入 2 ml PBS, 靜置 10 分鐘。再用 water pump 盡量將殘餘水份吸乾。加 30 μl 正常血清 (馬的血清) (1:200 以 PBS 稀釋), 並使均勻的覆蓋玻片上, 蓋上蓋子, 室溫反應 30 分鐘。再加 2 ml PBS 清洗 5 次, 每次 5 分鐘。再將 PBS 以 water pump 盡量吸乾。再加入專一性的抗體 (rabbit anti-JCV VP1, 1:200 以 PBS 稀釋), 蓋上蓋子, 室溫培育 30 分鐘。吸掉血清, 同樣以 2 ml PBS 清洗 5 次, 每次 5 分鐘。以 water pump 吸乾, 再加入 30 μl 的 secondary antibody (goat anti-rabbit-IgG-FITC, Sigma F-0511, 1:160 稀釋), 室溫反應 30 分鐘, 吸乾, 再用 2 ml PBS 清洗 5 次, 一次 5 分鐘。接著滴 10 μl glycerol/PBS (1:1) 於載玻片上, 再

讓蓋玻片的細胞面向下接觸載玻片上的 glycerol，即可於螢光顯微鏡下觀察。

西方墨點法 (Western blot)

培養皿上的細胞收集起來之後，3,000 rpm，5分鐘離心，沉澱下來的細胞再溶於50 ul的溶解緩衝液 (lysis buffer)，每個不同的時間的細胞取50 ug的量以12.5%的 SDS-PAGE 分析，再將膠上的蛋白質以 HORIBLOT (ATTO) 以 anode buffer #1 : 0.3 M Tris，pH 10.4，20% methanol；anode buffer #2 : 25 mM Tris，pH10.4，20% methanol；cathode buffer #3 : 25 mM Tris pH9.4，40 mM 6-aminohexanoic acid (Sigma A-2504)，20% methanol；轉印到 nitrocellulose paper 上。

血液凝集試驗 (Hemagglutination assay，HA)

分別收集被 JCV VP1/Baculovirus 感染 72 小時及未做任何處理的 Sf21 昆蟲細胞，離心 3,000 rpm，4℃，5分鐘，將沉澱下來的細胞溶於 200 ul Tris buffer (10 mM Tris pH7.4，150 mM NaCl，0.5 mM CaCl₂，5% glycerol) 再置於液態氮使其冷凍，再於 45℃ 回溫，如此來回數次，使細胞膜破掉。之後再用超音波震盪，接著離心 10,000 rpm，10分鐘，將上清液換到乾淨離心管。即可用於血液凝集試驗。先將人的 O 型血球以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗三次，製成 0.5% 紅血球懸浮液。以 96 well 的 microtiter plate 以 PBS 2 倍連續稀釋感染及未感染的昆蟲細胞上清液，再加入 50 ul 的 0.5% 紅血球懸浮液，混合均勻，室溫靜置 1 小時，再觀察血液凝集的情形。以呈現血液凝集的最後稀釋倍數，定為血液凝集活性。

JCV VP1 蛋白質的純化

昆蟲細胞 Sf21 被重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染 72 小時之後，收集 10 個 flask，約 4×10^7 的細胞，離心 3,000 rpm，4℃，5分鐘。上清液為病毒，保存於 -70℃，沉澱下來的細胞則溶於 8 ml 溶解緩衝液 (lysis buffer) (50 mM NaCl，10 mM Tris pH7.4，0.5 mM CaCl₂，0.01% Triton X-100，1 mM PMSF)，在冰浴下以超音波震盪，再離心 10,000 rpm，4℃，15分鐘。上清液保存於乾淨離心管。沉澱物則再溶於 7ml 的 lysis buffer，冰溫下，以超音波震盪，再離心 10,000 rpm，4℃，15分鐘，上清液跟前次離心的上清液混合在同一離心管，沉澱物則丟棄。接著進行蔗糖 cushion 純化：先在超高速離心管 (Beckman # 344059，14 × 89 mm) 加入 5 ml 的上清液，再從離心管底部加入 3 ml 20% 蔗糖溶液 (in PBS)，再用上清液填滿剩餘空間，總體積約 10 ml，所以會有 2 根離心管。接著以超高速離心機 (Beckman L8-70M)，SW41Ti 的旋轉子離心 23,000 rpm，3 小時。之後，倒掉上層液，兩離心管沉澱下的蛋白質再溶於 0.5 ml Tris pH7.4，再加入 0.167 ml 的 1.8 g/ml 的 CsCl 溶液，使密度相當於 1.2 g/ml；再加 5-step CsCl 溶液 (1.2, 1.25, 1.29, 1.32, 1.35 g/ml 各 2 ml) 到離心管中，上層再加上含 CsCl，密度為 1.2 g/ml 的 sucrose cushion 純化出的蛋白質，同樣以 Beckman L8-70M 超高速離心機，SW41Ti 的旋轉子離心 33,000 rpm，40 小時。之後，在離心管底部戳一個洞，約 200 ul/fraction 收集在 eppendorf 離心管，測定血液凝集 (Hemagglutination)，密

度，DNA 濃度，及 SDS-PAGE 分析蛋白質純度。

血液凝集試驗 (Hemagglutination assay , HA)

先在 96 well 的 microtiter plate ，加入 100 ul 以 PBS 20 倍稀釋的收集到的各管的檢體到第一個 well ，第二到第十二個 well 則加 50 ul PBS ，之後從第一個 well 取出 50 ul 到第二個 well ，以此類推連續稀釋到第十二個 well ，丟掉最後的 50 ul ，最後加 50 ul 0.5 % 紅血球懸浮液到每一個 well 中，混合均勻，室溫靜置 1 小時。

密度測定

從收集到的各管中，分別取 5 ul 到曲光儀 (Abbe Refractometer No.501) 上，調整刻度，使平面剛好位於交叉線上，此時所讀到的值，即為檢體的曲光度，再由換算表而得出檢體的密度。

DNA 濃度測定

從各管取出 20 ul 到 Hoefer TKO 100 Fluorometer 測定 DNA 濃度。所用的緩衝液為 10 ml 1x TNE (10 mM Tris ， 1 mM EDTA ， 200 mM NaCl ， pH7.4) 加入 1 ul 的染料 (Hoechst 33258 ， 1 mg/ ml in H₂O) ，所讀出的值即為 DNA 濃度。

SDS-PAGE 分析 JCV VP1 的量及純度

從各管取 15 ul 加 5 ul 4x sample buffer (250 ul 20% SDS, 250ul glycerol/0.2%BPB ， 125 ul β -mercaptoethanol) ，沸水煮沸 5 分鐘，再用超音波震盪，即可用 12.5% SDS-PAGE 分析，再用 Coomassie blue solution (50% methanol ， 10% acetic acid ， 0.1% Coomassie blue R-250 [Sigma #B-0149]) 染色之後，再以 25% 甲醇/ 7% 冰醋酸脫色。

JCV VP1 的純化過程 (Purification profile of JCV VP1)

在 JCV VP1 的純化過程的各步驟：如將細胞溶於 lysis buffer ， sucrose cushion 及 CsCl 超高速離心後病毒蛋白質濃度最高的部份，分別取出以 SDS-PAGE 的 Coomassie blue 染色及西方墨點法來了解蛋白質純化情形。

JCV VP1 蛋白質的保存

經由 CsCl 超高速離心純化之後的 JCV VP1 ，在 10 mM Tris pH7.4 ， 0.5 mM CaCl₂ ， 150 mM NaCl ， 5% glycerol 的緩衝液，於 4 °C 下透析，隔夜之後，保存於 -70 °C 。

電子顯微鏡觀察 JCV VP1 capsid

JCV VP1 capsid 陰染的方法根據 Garcea (48) 的方法再稍做修飾。在 parafin paper 點一滴 (約 10 ul) 純化的 JCV VP1 capsid ，再用碳蒸著的篩片

(carbon formvar-coated grid) 浮在上面 5 分鐘，使蛋白質吸附其上。再用濾紙沿篩片邊緣將多餘水份吸走。再用 uranyl acetate 染色 10~15 秒，即可在電子顯微鏡 (JOEL , JEM , 2000-CX , 80KV) 下觀察。

超薄切片的電子顯微鏡觀察 (Electron microscopy of thin sections)

Sf21 昆蟲細胞 (有病毒感染或無病毒感染) 收集起來之後，離心 2,500 rpm , 4 °C , 5 分鐘，移去上清液，再用 5 ml PBS 清洗兩次 (一次 15 分鐘) ，再加上 3 ml 2.5 % 戊二醛固定液 (2.5 % glutaraldehyde in PBS) 於 4 °C 下固定一小時。再離心 2,500 rpm , 5 分鐘。再加入 3 ml 戊二醛固定液在 4 °C 下作用 3 小時。再用 3 ml PBS 清洗三次 (一次 15 分鐘) ，加入約 50 ul 的 2 % agarose (in H₂O) ，待其凝固後，倒在乾淨的載玻片上切成約 1-2 mm 的細塊，裝入乾淨的 4 ml 小瓶子，準備脫水。脫水的程序是從 50 % , 70 % , 80 % , 90 % , 95 % 酒精依序替換，一次 15 分鐘，絕對酒精則換兩次，一次 15 分鐘。之後，加入 0.5 ml 絕對酒精及 0.5 ml 的 L. R. White 包埋劑，室溫靜置隔夜，吸掉溶液，再加入約 0.5 ml 的 L. R. White 包埋劑，室溫靜置隔夜。再用膠囊包埋 (capsule embedding) 也就是先將膠囊放在膠囊架上，先加一點 L. R. White 到膠囊底部，再將以洋菜膠預包埋的細胞放到膠囊內，再調整位置，使細胞位於中央，再將 L. R. White 填滿膠囊之後，將膠囊放到 56 °C 烘箱中 26 小時使之聚合，再用鑽石刀切成 90 nm 的切片，使其附著於篩片上。

免疫金 (Immunogold) 的染色

在 parafilm paper 上滴 10 ul 含有 1 % bovine serum albumin 的 20 mM PBS (pH7.0) ，篩片正面跟溶液接觸，室溫下反應 10 分鐘，以濾紙吸乾。立刻滴上 10 ul 以 PBS 稀釋 200 倍的抗血清 anti-JCV VP1/Flag ，室溫下作用 90 分鐘。再用 PBS 水洗 80 滴 (約 2 ml) ，再用去離子水水洗 40 滴 (約 1 ml) ，以濾紙吸乾。再用 10 ul 以 PBS 稀釋 20 倍的 5 nm gold (anti-rabbit IgG gold conjugated 5 nm , Sigma #G-7277) 作用 30 分鐘。再用 80 滴 PBS 及 40 滴去離子水水洗。再用 2 % UA 染色 60 分鐘 (在黑暗中) ，以去離子水水洗 40 滴，再用 0.5 % 檸檬酸鉛染色 (在密閉容器內加上 NaOH 顆粒，以吸走 CO₂ ，避免檸檬酸鉛沉澱而污染篩片) 20 分鐘，以去離子水水洗 40 滴，以濾紙吸乾，即可於電子顯微鏡 (JOEL , JEM , 2000-CX , 80 KV) 下觀察。

免疫電子顯微鏡 (Immunoelectron microscopy)

將 JCV VP1 capsomere 跟 1: 200 稀釋的兔子 anti-JCV VP1 抗體作用，37 °C , 1 小時，或 4 °C , 隔夜。離心 12,000 rpm , 30 分鐘。倒掉上清液，溶於少量去離子水，即可用於陰染方法染色，在電子顯微鏡下觀察。

2D gel 分析

2D- PAGE 分析蛋白質的方法主要參照 O'Farrel (52) 及 Forstova 等人 (22) 的方法，再稍做修飾。Sf21 被 JCV VP1/Baculovirus 感染 72 小時之後收集。以 PBS 清洗，溶於 SB 1 (0.3 % SDS , 0.6 M β -mercaptoethanol ,

50 mM Tris)。之後以 100 °C 煮沸 5 分鐘，置於冰上 5 分鐘。再加入 1/10 體積的 SB 2 (500 mM Tris , 50 mM MgCl₂ , 1 mg/ml DNase , 0.25 mg/ml RNase A) , 置於冰上 9 分鐘直到黏稠度消失。蛋白質再用 4 倍冰溫的丙酮沉澱，置於 -20 °C 30 分鐘。沉澱物再離心 12,000 rpm , 20 分鐘，去掉上清液。再用 1 ml 冰溫丙酮潤濕，去掉上清液，以 Speed-Vac 乾燥。再溶於 1/4 比率的 SB 1/ SB 3 (9.9 M urea , 4 % NP-40 , 2.2 % pH 3-10 Ampholyte [Bio-Rad] , 10 mM DTT) 。不可溶部份再離心去掉，取上清液做分析。

2D gel 的配製

1D : Isoelectrofocusing (IEF)

A. 玻璃管 (2 × 4 × 160 mm, Bio-Rad #1653155) 的清洗

先將玻璃管浸泡於 1 M KOH/ 95 % EtOH，隔夜之後，以水清洗，再用二次水潤濕。再用 95 % 酒精潤濕，置於烘箱烘乾。

B. Tube gel 的配製

10 支 tube gel 則取 0.93 g urea , 1.19 ml 30 % acrylamide, 0.8 % bisacrylamide , 1.43 ml 10 % Triton X-100 , 1.19 ml H₂O , 在 37 °C 水浴下混合均勻後，以 0.45 um 的濾膜過濾，再加入 357.1 ul pH 3-10 Ampholyte , 7.14 ul ammonium persulfate 及 5 ul Temed 。將 gel 加到玻璃管內，置於室溫 2- 3 小時，待其凝固。

C. Running buffer

上層： 20 mM NaOH , 0.8 g NaOH 溶於 1 公升去離子水，下層： 10 mM phosphoric acid , 1.38 ml phosphoric acid 溶於 2 公升去離子水。使用前先 degas 。

D. Isoelectrofocusing (IEF) 電泳

裝好 IEF 電泳裝置後，將溶於 SB 1/ SB 3 的檢體 (約 250 ug) ，加到玻璃管的 gel 上，其上再置 10 ul overlay buffer (0.48 g urea , 20 ul pH 3- 10 Ampholyte , 0.975 ml H₂O , urea 溶解之後過濾，才加入 Ampholyte) ，最後以上層鹼性緩衝液填滿剩餘空間，不能破壞分層。

2D : SDS-PAGE

1D 的 IEF 分離好之後，再將 gel 從玻璃管擠出來，放在 equilibration buffer (For 100 ml , 2.3 g SDS , 5 ml 2-ME , 10 ml glycerol , 0.75 g Tris , 85 ml H₂O , pH 6.8) ，待其平衡 (約 20 分鐘) ，再轉移到 SDS-PAGE 。 VP1 subspecies 的鑑定採用西方墨點法。西方墨點法參照前面敘述，也就是將蛋白質轉印到 nitrocellulose paper ，再用抗體確認，以 DAB 呈色。

JCV VP1 蛋白質跟 DNA 結合能力

A. DNA 探針的製備

DNA 探針 (probe) 的製備是依 nick translation 的方法 (Promega , U1001) 。未標幟的 DNA 藉 DNase I 的作用產生自由 3' -OH 端 (nicks) , DNA polymerase I 則催化將核甘酸加到 3' -OH 端的反應。同時,此酵素的 5'→3' 外切酶活性移去 nick 的 5' 磷酸端。因此,移去原核甘酸的位置即為加入新核甘酸的位置,所以將具放射性的核甘酸加到 DNA 。步驟如下:

先混合如下成份

Nucleotide mix	10 ul
nick translation 10x buffer	5 ul
TW-3 DNA genome in H ₂ O	2 ug
[α - ³² P] dATP	7 ul
DNA polymerase/ DNaseI mix	5ul
Sterile H ₂ O to final volume	50 ul

在 15 °C 下作用 60 分鐘,再加入 5 ul stop solution 。經由 Sephadex G-50 固定離心條件 (1,000 rpm , 3 分鐘) 移去未結合的 dATP 。取 1 ul 以閃爍計數儀測其放射強度。

B. Southwestern blotting

Sf21 細胞 total lysate (感染或未感染) 以 12.5 % SDS-PAGE 分離,轉印到 nitrocellulose paper 後,置於 buffer B (10 mM Tris.Cl, pH 6.7 , 50 mM NaCl , 1 mM EDTA , 0.02 % BSA , 0.02 % Ficoll , 0.02 % polyvinylpyrrolidone) , 30 分鐘。加入 DNA 探針,使其放射強度達 10⁵ cpm /ml , 室溫下作用 1 小時。再用 buffer B 清洗,之後乾燥,放射顯影。

JCV VP1 capsid 的穩定度探討

JCV VP1 capsid 的純化方法同前，也就是將被 JCV VP1/Baculovirus 感染的昆蟲細胞，經由 sucrose cushion，CsCl 超高速純化後收集，在 10 mM Tris pH 7.4 及 5 % 甘油緩衝液下透析，移去 CsCl。

螯合劑 (chelator) EDTA 及還原劑 DTT 對 capsid 穩定度的影響

在 50 ul 已透析移去 CsCl 的 JCV VP1 capsid，加入(1) EDTA 最終濃度為 10 mM，(2)新鮮配製 DTT，終濃度為 3 mM，或(3)同時加入 10 mM EDTA 及 3 mM DTT (終濃度)，上述三種處理的 capsid，分別在 1, 2, 3, 4 小時之後測其血液凝集活性。

溫度對 capsid 穩定度的影響

50 ul 已透析移去 CsCl 的 JCV VP1 capsid 分別在 37 °C，42 °C，65 °C，72 °C 水浴下作用 10 分鐘，30 分鐘，60 分鐘之後，分別測血液凝集活性。

pH 對 capsid 穩定度的影響

50 ul 已透析的 JCV VP1 capsid，分別加入不同濃度的酸或鹼，使其 pH 達 1.15, 2.08, 3.01, 4.03, 5.34, 6.58, 7.03, 8.49, 9.52, 10.51, 12.11，室溫下靜置 4 小時後，測其血液凝集活性。

二價離子對 capsomere 重組成 capsid 的影響

在已解離成 capsomere 的溶液中分別加入 1, 5, 10, 20, 40, 80 mM 的 Ca^{2+} ， Mg^{2+} ， Zn^{2+} ， Cd^{2+} 等二價離子，室溫靜置 4 小時，分別測其血液凝集活性。

螯合劑 EDTA 及還原劑 DTT 對再組回 capsid 的穩定度的影響

因加入二價金屬離子而再組裝成 capsid 的 JCV VP1 蛋白質，分別加入 EDTA 及 DTT，使其終濃度為 10 mM 及 3 mM，室溫作用 4 小時之後，測其血液凝集活性。

原子吸收光譜 (atomic absorption) 測殼體所含金屬種類

以超高速純化出的 VP1 殼體，透析在緩衝溶液 10 mM Tris, pH7.4 及 5 % glycerol，4 °C，隔夜。濃度約為 0.1 mg/ml。因生物檢體較複雜，所以 VP1 需先用基質修飾劑 (磷酸二氫氨，硝酸鎂) 處理，以除去雜質。然後用石墨式原子吸收光譜儀 (Perkin-Elmer 5100PC) 測定 VP1 中鋅、鎘含量。

結果

VP1 基因選殖

在先前的實驗中，我們已將 JCV VP1 的基因選殖到 pGEX-4T-1 的 *Bam*HI 位置 (10)，因為是在原核細胞 (*E. coli*) 表達，又有融合蛋白 GST，所以我們想將 VP1 基因選殖到桿狀病毒，在昆蟲細胞表達，較接近動物細胞修飾作用，更接近實際生理狀況。利用 *Bam*HI 切出 1065 bp VP1 DNA 片段及 4969 bp 的 pGEX-4T-1 質體 DNA，於 1 % agarose 電泳，純化出 VP1 DNA，再跟用 CIP 處理過的 pBacPAK8 質體進行 ligation 作用 (圖 6)，再轉殖 (transformed) 到 JM109 *E. coli* 上。再用限制酶 *Eco*RI 來確定 JCV VP1 的方向。若有正接，可用 *Eco*RI 切出 5741 及 861 bp 的 DNA 片段 (圖 9，Lane 2)。此新質體命名為 pBJCV1。

重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 的構築

經由 restriction mapping，確定 JCV VP1 在質體 pBacPAK8 的方向性是正確的，在 polyhedrin promoter 之後，所以我們就開始著手構築重組病毒。重組質體 pBJCV1 跟 BacPAK6 DNA (*Bsu*36 I digest) 一起轉感染 (cotransfection) 到 Sf21 細胞。由於重組質體 pBJCV1 的重組序列跟 BacPAK6 有同源性 (homology)，所以可在細胞內進行重組，而將 JCV VP1 接到 Baculovirus 上，如圖 7。

以 SDS-PAGE 及西方墨點法 (Western blotting) 偵測 JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞表達情形

由於被共轉感染 (cotransfection) 的細胞數不多，所以無法在初期以 SDS-PAGE 辨識 VP1 蛋白質 (圖 10 A)，必須以西方墨點法確認。收集共轉感染 (cotransfection) 後第五天懸浮於培養液的細胞碎片，以 12.5 % SDS-PAGE 分析，再轉印到 nitrocellulose paper 上，再用 anti-JCV VP1 的抗體確認，跟已知在 *E. coli* 表達的 VP1 蛋白質做比較 (圖 10 B，lane 2)，發現對照組昆蟲細胞沒有 JCV VP1 蛋白質 (圖 10 B，lane 1)，而經 pBJCV1 及桿狀病毒 pBacPAK6 的病毒 DNA 共轉感染的昆蟲細胞，即可表達 JCV VP1 蛋白質 (圖 10 B，lane 3)。由此可知 JCV VP1 已被選殖到桿狀病毒 polyhedrin 起動子之後，且能在昆蟲細胞表達 JCV VP1 蛋白質。

Sf21 昆蟲細胞在不同時間被重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染之後的形態

重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染昆蟲細胞，分別在 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 小時後，以相位差顯微鏡 (phase contrast) 觀察昆蟲細胞形態的改變。未感染病毒的昆蟲細胞 (圖 11 A) 在顯微鏡下呈現圓形光亮的形態，感染後 12, 24, 36 小時跟未感染的細胞在形態上沒有明顯差異 (圖 11 B, C, D)，然而隨著感染時間的增長，在 48 小時之後 (圖 11 E)，明顯看到細胞膜呈溶解 (lysis) 現象，也失去了光亮的圓形形態。感染後 72, 96, 120 小時 (圖 11 F, G, H)，這種溶解現象更明顯。

重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 在不同時間感染昆蟲細胞後以 SDS-PAGE 及西方墨點法分析

VP1 基因是在 polyhedrin promoter 的控制之下，由於其為強 promoter，在病毒感染後期，會促使其下游基因大量表現。為了明白是否 VP1 蛋白質可在昆蟲細胞大量表現，所以我們做了 SDS-PAGE 的 time course。重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染昆蟲細胞，分別在 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 小時之後，收集昆蟲細胞，溶於溶解緩衝液，以 50 ug/ lane 的蛋白質濃度，以 12.5 % SDS-PAGE 分析。在 72 小時之後 (圖 12 A, lane 7) 有一明顯 42Kd 左右的 JCV VP1 蛋白質出現。以西方墨點法分析，結果顯示 JCV VP1 蛋白質在細胞被感染後 24 小時開始被偵測到 (圖 12 B, lane 4)，72 小時的表達量到達最高 (圖 12 B, lane 7)，而後持平到感染後 120 小時 (圖 12 B, lane 9) 表達量又略為降低。

以免疫螢光染色探討重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 在不同時間感染昆蟲細胞後，JCV VP1 蛋白質的表達情形

除了瞭解 VP1 蛋白質表達的量之外，我們也希望探討 VP1 在昆蟲細胞表現的位置，所以以免疫螢光染色。重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染昆蟲細胞後，分別在 24, 48, 72 及 120 小時，將細胞固定。螢光染色之後，於螢光顯微鏡下觀察。細胞在感染 24 小時之後開始表達 VP1 並出現在細胞質內，感染 48 小時後 (圖 13 C) 大部份的 VP1 存在細胞質內。72 小時 (圖 13 D) 之後直到 120 小時 (圖 13 E)，大部份 VP1 才被轉送到細胞核。

JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞表達後之血液凝集活性

鼠類 polyomavirus VP1 在昆蟲細胞表達可形成殼體 (48)。根據我們推測人類 JCV VP1 在昆蟲細胞內表達也可能會自己組合成殼體。因此我們以血液凝集試驗來初步證實 JCV VP1 是否在昆蟲細胞內自組殼體。重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染昆蟲細胞 72 小時之後，收集細胞，溶於 200 ul 的溶解緩衝液，以連續稀釋法測定蛋白質血液凝集活性。病毒感染的昆蟲細胞有 10×2^{13} hemagglutination activity (HA) (圖 14 A (a))，而未經病毒感染的昆蟲

細胞則不具血液凝集特性(圖 14 A (b))。爲了確定此血液凝集具有專一性，加入 JCV VP1 的抗體，測定血液凝集抑制 (Hemagglutination inhibition) 試驗 (圖 14 B)。未加入抗體前檢體爲 2^9 HA (圖 14 B (a))，加入兔子免疫前血清則爲 2^8 HA (圖 14 B (b))，但若加入兔子 anti-JCV VP1 抗體，則可使血液凝集活性降至爲 0 (圖 14 B (c))。此實驗初步證明 JCV VP1 在昆蟲細胞內確實可自組爲殼體。

JCV VP1 蛋白質的純化

由 HA 證實 JCV VP1 在昆蟲細胞內可自組爲殼體。完整病毒顆粒 (virion) 密度爲 1.32 g/ml，空殼顆粒 (empty capsid) 密度爲 1.29 g/ml，而一般蛋白質的密度爲 1.25 g/ml，所以我們利用此特性以 CsCl 超高速離心純化 JCV VP1 蛋白質。CsCl 密度梯度離心之後，以約 200 ul 爲一 fraction，收集在 1.5 ml eppendorf 離心管，測定血液凝集特性，DNA 濃度，蛋白質密度，及 SDS-PAGE 測蛋白質純度。從血液凝集特性可見 fraction 22 到 28 有 HA 活性高峰 (圖 15 A)。以 fluorometer 測定 DNA 含量，發現較高密度的 fractions 含有 DNA (fractions 2 - 10)，到後來幾乎完全不含 DNA。綜合而言，最高血液凝集部份不含 DNA，密度爲 1.28 - 1.30 g/ml。從 SDS-PAGE 上也可發現 fraction 22 到 28 確實含有純度高的 VP1 蛋白質 (圖 15 B，lane 2 到 8)。以這些結果推測，純化出的 VP1 可能爲空殼體。

JCV VP1 與 DNA 的結合能力

鼠類 polyomavirus VP1 的 DNA 結合區位於 N 端的 5 個氨基酸 (13)，VP1 的 DNA 結合能力，可能跟殼體組成過程中，病毒蛋白質跟 minichromosome 結合有關 (47)。爲了瞭解在昆蟲細胞表達的 JCV VP1 蛋白質是否具有 DNA 結合能力，我們以 Southwestern 方法偵測，鼠類 polyomavirus VP1 做正控制組 (圖 16 A，lane 1)，證實在 Sf21 細胞內表達的 JCV VP1 蛋白質能與 DNA 結合 (圖 16 A，lane 3)。

JCV VP1 蛋白質的回收率

以 SDS-PAGE 來分析 JCV VP1 蛋白質的每一個純化步驟。經由 sucrose cushion 的步驟，可除去許多雜蛋白 (圖 17 A，lane 2)。以 CsCl 密度梯度離心可得到高純度的 VP1 (圖 17 A，lane 3) 再經由西方墨點法確認而得知此純化出的蛋白質確實爲 JCV VP1 蛋白質 (圖 17 B，lane 3)。

以 Densitometry (密度分析儀) 探討 VP1 蛋白質在各純化步驟中，所佔的比率，而計算出回收率 (表一)。VP1 在 4×10^7 Sf21 細胞內 total lysate 的量爲 0.43 mg，經 sucrose cushion 及 CsCl 純化之後，得到 0.094 mg VP1，回

收率約為 22 %。雖然損失了部份的 VP1，但收集到的 VP1 純度達 96 %。

JCV VP1 蛋白質組成殼體的穿透式電子顯微鏡圖

以陰染 (negative stain) 觀察純化的 VP1 殼體形態。在穿透式電子顯微鏡下可見其為空殼體 (empty capsid)，亦即沒有包裹 DNA，大小約為 45 nm，並由 capsomere 所組成 (圖 18)。

2D gel 分析

JCV VP1 在 in vivo 的 species 尚未被報告，有待進一步分析。但在鼠類 polyomavirus 病毒顆粒 VP1 species 有 6 種 (4)，但 Forstova 等人發現在昆蟲細胞表達的 VP1 跟病毒顆粒 VP1 species 均為 10 種，只是量不同 (22)。Montross 等人 (48) 發現 VP1 在昆蟲細胞中有三種 species 與 virion 相同。在我們實驗中，Sf21 所表達的人類 polyomavirus JCV VP1 約有 6 種 (圖 19)。pI 值介於 5.8 到 6.4 之間。

超薄切片的電子顯微鏡圖

未被重組病毒 JCV VP1/Baculovirus 感染及病毒感染 48 小時的昆蟲細胞切片於電子顯微鏡下觀察。未感染的細胞不論在細胞質或細胞核均未看到 JCV VP1 蛋白質組裝成殼體 (圖 20)。然而，感染 48 小時之後，在細胞質及細胞核 (圖 21)，均可看到 VP1 蛋白質組裝成殼體。這個結果跟螢光染色的結果一致 (圖 13 C)。因此我們推測 JCV VP1 蛋白質在細胞質可能已組裝成殼體，再轉送到細胞核。

EDTA 及 DTT 對 VP1 殼體穩定性的影響

由鼠類 polyomavirus 的研究得知，金屬離子在病毒顆粒完整性扮演重要角色 (7)。為了瞭解 JCV 殼體穩定性，我們以 EDTA，DTT，來探討對 JCV 殼體穩定度的影響。當還原劑 DTT 及螯合劑 EDTA 同時存在時，在 1 小時內，即可讓形成殼體的 VP1 蛋白質解離而失去 HA 活性 (圖 22)。然而，EDTA 或 DTT 單獨存在的情況，即使四小時之後，血液凝集的特性仍然存在，亦即尚保持殼體的完整性 (圖 22)。

VP1 蛋白質解離成 capsomere 的穿透式電子顯微鏡圖

圖 23 B 是殼體加了 EDTA 及 DTT，解離成 capsomere 的形態，以 UA 陰染結果。由於 capsomere 較小，只有 10 nm，一般的陰染較難以辨識。所以我們利用各種方法來確認 capsomere 的存在。23 C 圖則是以免疫金染色的結果，確定在電子顯微鏡下所看到的的確為 capsomere。若用免疫電子顯微鏡 (Immune electromicroscope) 來處理則可見 capsomere 因抗體加入呈現聚集

的現象 (圖 23 D)。

二價離子對 capsomere 重新組合成 capsid 之影響

爲了瞭解二價離子在 JCV 殼體穩定所扮演的角色,我們以各種不同濃度(1, 5, 10, 20, 40, 80 mM)的二價離子 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 加到 capsomere 溶液中,測其 HA。 CaCl_2 , MgCl_2 在濃度爲 40 mM 時,依然沒有 HA。當濃度提高到 80 mM 時, CaCl_2 只有 20 HA, MgCl_2 則爲 0; 在濃度爲 20 mM 時, ZnCl_2 , CdCl_2 的 HA 分別是 20, 0; 40 mM 時,分別是 160, 320 HA; 80 mM 時,分別是 320, 640 HA。(圖 24)。

原子吸收光譜測純化的殼體所含的金屬

除了以生物特性 (HA) 來測定殼體形成所需的二價離子爲 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 之外,我們也希望直接以原子吸收光譜來測 VP1 內所含的金屬種類。從昆蟲細胞純化出來的殼體確實含有 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} , 數值分別爲 21 ppb 及 4 ppb, 背景值則分別爲 8 ppb 及 0 ppb (圖 25)。

還原劑或螯合劑對重新組合的殼體之影響

依照圖 22 的結果顯示, EDTA 與 DTT 必須同時存在,才能使殼體解離成 capsomere。因此我們懷疑雙硫鍵具有保護金屬離子的功能。如果雙硫鍵具保護金屬離子被移去的作用,則在重新組合的 VP1 殼體因缺乏雙硫鍵形成,只要 EDTA 存在應就可以使其解離成 capsomere。因此我們將 capsomere 加入 Zn^{2+} 後,使其形成殼體,然後再加入 EDTA 或 DTT,結果發現只要 EDTA 就可以使 VP1 殼體完全解離失去 HA,而只有 DTT 並無法完全使殼體解離(圖 26)。

溫度對殼體的影響

爲提供流行病學上一些 JC 病毒的特性,我們也測定環境溫度對殼體穩定性影響。我們選用了四種溫度, 37, 42, 65, 72 °C。殼體在 37, 42 °C 維持一小時, HA 仍然不變,但 65, 72 °C 10 分鐘,則迅速失去 HA 活性(圖 27)。此結果說明 JCV 病毒顆粒在 65 °C 以上時其穩定性將會被破壞。

pH 對殼體穩定度的影響

除了溫度以外,我們也想了解環境 pH 對殼體的影響。VP1 殼體在鹼性下 pH 10.5, 仍保有 HA 活性,當 pH 值高於 10.5, 則會破壞病毒顆粒完整性。若殼體於酸性環境 (pH 5 以下), 則迅速解離,失去 HA 活性(圖 28)。

討論

JCV 跟 PML 的關係於 1965 年就由 ZuRhein 等人利用電子顯微鏡觀察而確定 (74)，然而由於 JCV 在體外有嚴格的宿主限制，直到 1971 年才由 Padgett 等人利用 PML 病人腦組織接種到人類胎兒腦細胞株才分離出 JCV (57)。由於 JCV 只能生長在源自人類腦神經的細胞，而非腦細胞類的胚胎、肺、腦、腎羊水等則不能生長的特性 (46, 64)，使得目前對 JCV 的研究進展少於其它動物的多瘤性病毒，如猿猴類的 SV40，鼠類的多瘤性病毒。因此為了瞭解人類多瘤性病毒 JCV 主要殼體蛋白 VP1 在病毒結構完整性，跟宿主細胞受體交互作用，紅血球凝集，DNA 包裝及病毒組裝 (assembly) 所扮演的角色，我們將源自於類風溼性關節炎病人尿液的 Taiwan-3 JCV VP1 結構基因送到昆蟲細胞表達。由於桿狀病毒 (Baculovirus) 感染昆蟲細胞後，在後期會大量表達 polyhedrin 基因 (38)，所以將 VP1 基因接到桿狀病毒 polyhedrin 的起動子 (promoter) 之後，即可在病毒感染細胞後期 (late phase)，表達大量 VP1 蛋白質。在昆蟲細胞表達的蛋白質的修飾作用類似於在哺乳類細胞的修飾作用，如磷酸化，acetylation 等 (38)。由 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) 的 VP1 蛋白質分析，在昆蟲細胞表達的有 6 種，而在原核細胞 *E. coli* 所表達的蛋白質則有 4 種 (未發表結果)。VP1 蛋白質的修飾作用可能跟病毒顆粒的組裝 (assembly) 有關 (4)。同一 polypeptide 不同的修飾，是否造成不同的生物功能，目前尚不明瞭，需要更進一步分析。

Montross 等人 (48) 將鼠類 polyomavirus 主要結構蛋白 VP1 基因在昆蟲細胞表達，電子顯微鏡超薄切片免疫金染色的方法得知，VP1 蛋白質在昆蟲細胞可以組成殼體。為了確定我們在昆蟲細胞表達的 VP1 蛋白質是否能形成殼體，我們利用 JC virus 具有凝集人類 O 型血球的特性 (56)，取被 JCV VP1/Baculovirus 感染的昆蟲細胞的 total lysate 來測定血液凝集特性。結果發現在昆蟲細胞表達的 VP1 蛋白質確定具有 HA (圖 14 A (a))。此外，以兔子 anti-JCV VP1 抗體來測血液凝集抑制 (Hemagglutination inhibition)，確知此種血液凝集具有專一性，所以 JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞內已形成殼體。JC virus 的結構蛋白除了主要結構蛋白 VP1 以外，尚有 VP2 及 VP3 蛋白質。VP1 蛋白質與 VP2、VP3 及病毒微小染色體 (minichromosome) 有交互作用，因此可能參與完整病毒顆粒 (virion) 的組裝。然而，經由血液凝集測試說明即使其它病毒蛋白質不存在，VP1 蛋白質依然可在 Sf21 細胞內形成殼體，而且殼體的結構與 in vivo 產生的病毒相近。

JCV VP1 蛋白質在昆蟲細胞的表達量約佔所有蛋白質的 4.5%，經由 sucrose cushion 可將 VP1 量增加至 13%，再經 5-step CsCl 離心之後，則可純化至 96%。每 4×10^7 的 Sf21 細胞可獲得約 94 ug 的 VP1 蛋白質，回收率約為 22%。這些高純度的殼體可以提供未來生理及臨床分析。

在病毒殼體穩定性方面，就目前的資料顯示，同屬 IIB 族的二價金屬離子 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 可能是病毒內部的一部份。除此，雙硫鍵在病毒顆粒穩定性上也扮演一重要角色。依我們的研究結果推測，還原劑 DTT 破壞雙硫鍵，EDTA 除去二價離子，才能使殼體解離成 capsomere。在鹼性環境下 (pH10.5) 以上才能使失去血液凝集特性。若在酸性環境下，殼體就較不穩定，pH 5 以下就使其失去血液凝集特性。在過去鼠類多瘤性病毒的研究 (7, 63) 也曾發現在還原劑及螯合劑同時存在，才能使殼體解離成 capsomere。在我們的實驗中藉由電子顯微鏡觀察，我們也確定加入 EDTA 及 DTT 使殼體失去血液凝集活性，是因解離成 capsomere 所致。解離成 capsomere 的溶液利用透析移去 EDTA 及 DTT，若再加入二價金屬離子 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} ，會使部份的血液凝集活性恢復。有趣的是，若在此時只加入 EDTA，就可以使其失去血液凝集活性。因為加入 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 而恢復血液凝集，亦即恢復成殼體的結構，並沒有雙硫鍵的保護，所以只有 EDTA 就可以使其解離成 capsomere。經由上面的結果我們發現二價金屬離子 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 是殼體完整性所必須，而雙硫鍵則是保護殼體的二價金屬離子被螯合劑移去。從 polyomavirus (7) 及 SV40 (14) 的殼體穩定性試驗，證實還原劑是使殼體解離所必須。因此推測需要雙硫鍵幫忙穩定病毒顆粒，而使這些鍵還原則是病毒脫殼 (uncoating) 過程很重要的步驟之一。然而從 Liddington 1991 (36) 年對 SV40 VP1 蛋白質所作的 X-ray 繞射三度空間圖來看，在 VP1 subunit 或 pentamer 並沒有發現形成雙硫鍵的地方，較有可能形成的地方在於 CD loops 上的 Cys 104 跟相鄰的 pentamer 因三度空間交互作用的關係而形成雙硫鍵。

二價金屬 Ca^{2+} 對猿猴類 SV40 及鼠類 polyomavirus 病毒穩定性佔一重要角色，Liddington 等人 (36) 利用 X-ray 繞射三度空間圖分析 SV40 VP1 蛋白質，發現 EF loops 上的 Glu157, 160 及 C-arm 的 Asp345 可能為金屬結合位置。Haynes (28) 等人則認為 GH loops 上的 Asp266 到 Glu277 可能是 polyomavirus 上重要的鈣離子結合位置。然而在本篇的實驗中加入鈣，並無法使人類 JCV VP1 capsomere 重組回殼體，加入鋅及鎘卻具有此能力。以原子吸收光譜測定，證實在昆蟲細胞內形成的殼體確實含有鋅及鎘原子。然而在 in vivo 中所形成的 JCV virion 是否一樣含有這兩種原子則須更進一步分析。

鼠類 polyomavirus VP1 是個核蛋白，Nuclear localization signal 位於 N 端的 12 個氨基酸，VP1 蛋白質合成之後旋即被送入細胞核 (12)。在昆蟲細胞所表達的 polyomavirus VP1 蛋白質，在早期 (感染後 24 小時)，大部份在細胞核發現 (22)，在稍晚期 (感染後 48 小時)，才有少量 VP1 蛋白質因大量表達的關係在細胞質被偵測到。在我們實驗中，昆蟲細胞表達的蛋白質藉由螢光染色而得知人類 JCV VP1 蛋白質在感染後 24 小時即在細胞質被偵測到，直到 48 小時依然可見是在細胞質，直到 72 小時後才進入細胞核。藉由超薄切片，我們也發現在細胞質可看到殼體-like 的構造。這跟鼠類 polyomavirus 主要在細胞核的情形不同。在我們的實驗中也證明 JCV VP1 具 DNA 結合能力。然而從我們

的純化出的殼體在電子顯微鏡下均為 empty 殼體，不含 DNA。這跟 DNA 結合能力的結果似乎有點衝突，然而似乎可用 VP1 組成殼體在細胞的位置來說明。從超薄切片結果發現 VP1 在細胞質形成殼體，所以沒有辦法跟位於核內的 DNA 接觸，組成 pseudovirion 的結構。

JCV 主要結構蛋白 VP1 已經選殖到桿狀病毒，而且也在昆蟲細胞表達。由於在昆蟲細胞表達的是形成殼體構造，純化出此殼體，打入兔子體內，得到的是抗殼體的抗體。在生理特性上較近似於人類對 JCV 產生的抗體。得到此抗體，我們實驗室已用來探討 JCV 各 epitope 的抗原性。重組蛋白將來也可用來做單株抗體，探討跟細胞受體，血液凝集 epitope 等之間的關係。

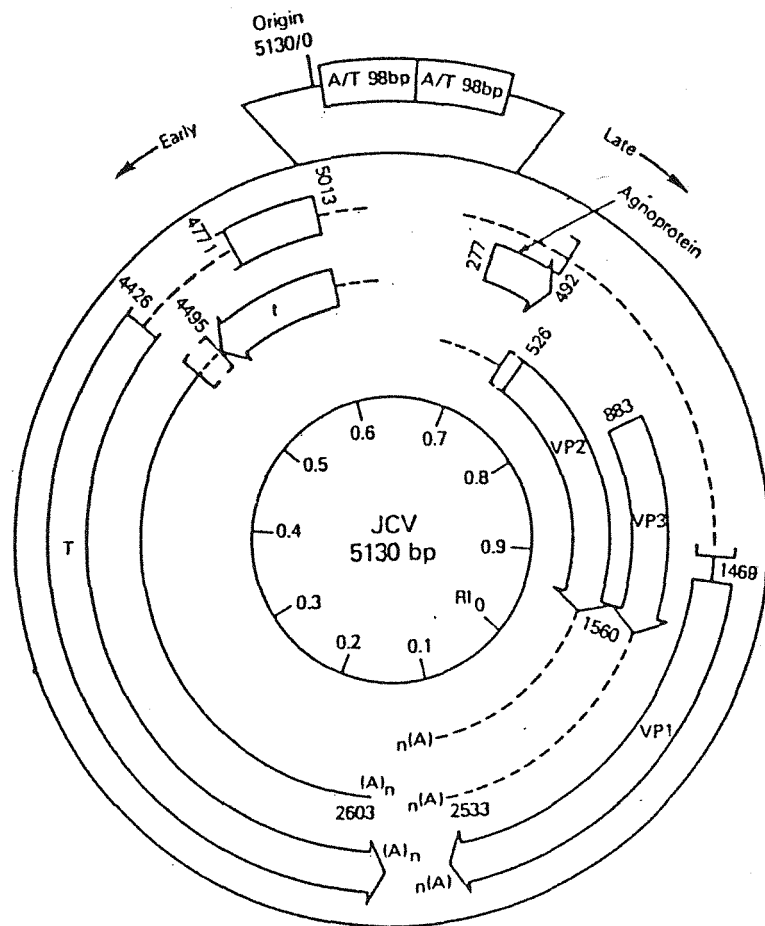


圖 1. JCV 的基因圖。圓形圖顯示相對的 open reading frame 的起始點及終點 (19)。兩個 open reading frame (T 及 t) 是早期區，位於左邊，而四個 open reading frame 表示為 agnoprotein, VP1, VP2, VP3 是晚期區。非轉錄區的 DNA 複製起始點及 98 bp 重覆序列顯示於上方。

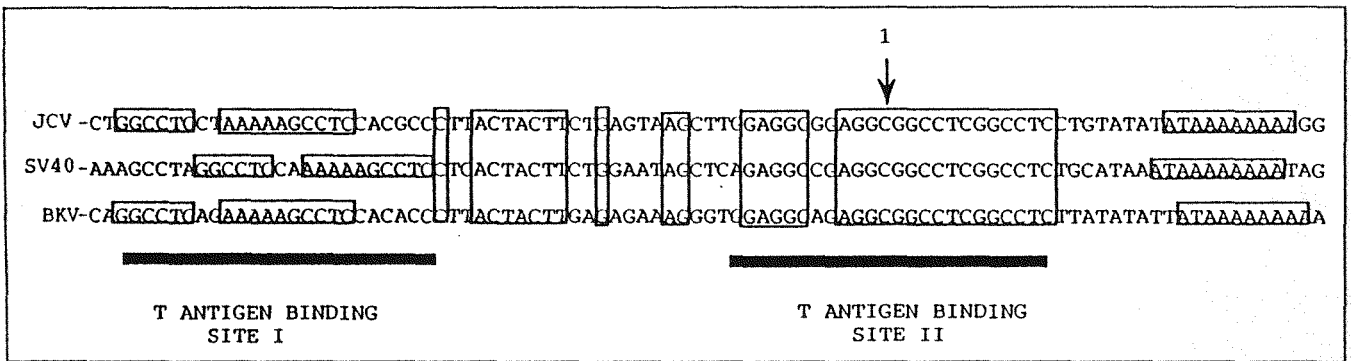


圖 3. JCV , BKV 及 SV 40 的複製起始點及 T 蛋白質結合位置 (68) 。

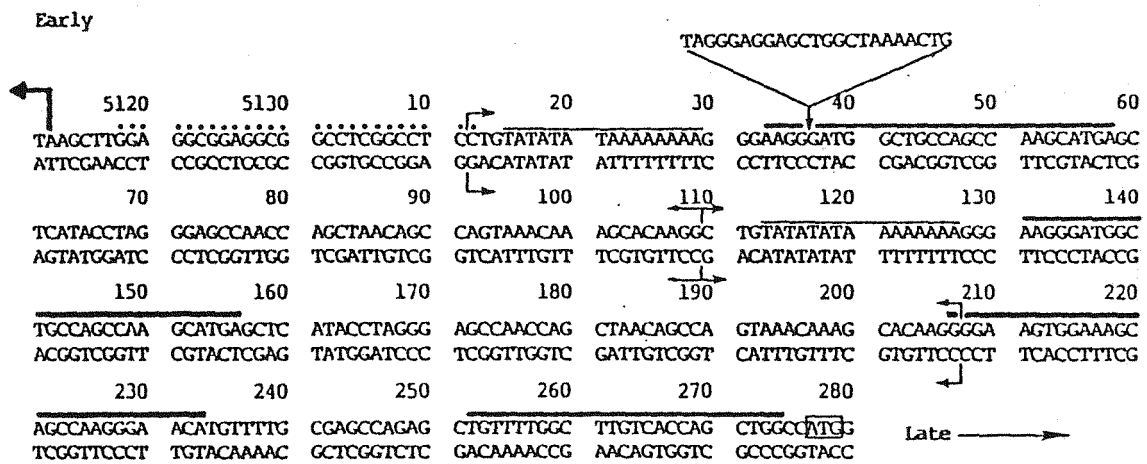


圖 4. JCV (Mad-1) 基因體未轉錄區的核苷酸順序 (19) 。有箭頭方括弧的代表 98-bp 的重覆區，粗直線表 TATA box，23- bp 插入位置顯示在 98-bp 的重覆區之上。粗箭頭表早期基因轉錄開始，圓點表 DNA 複製起始點。

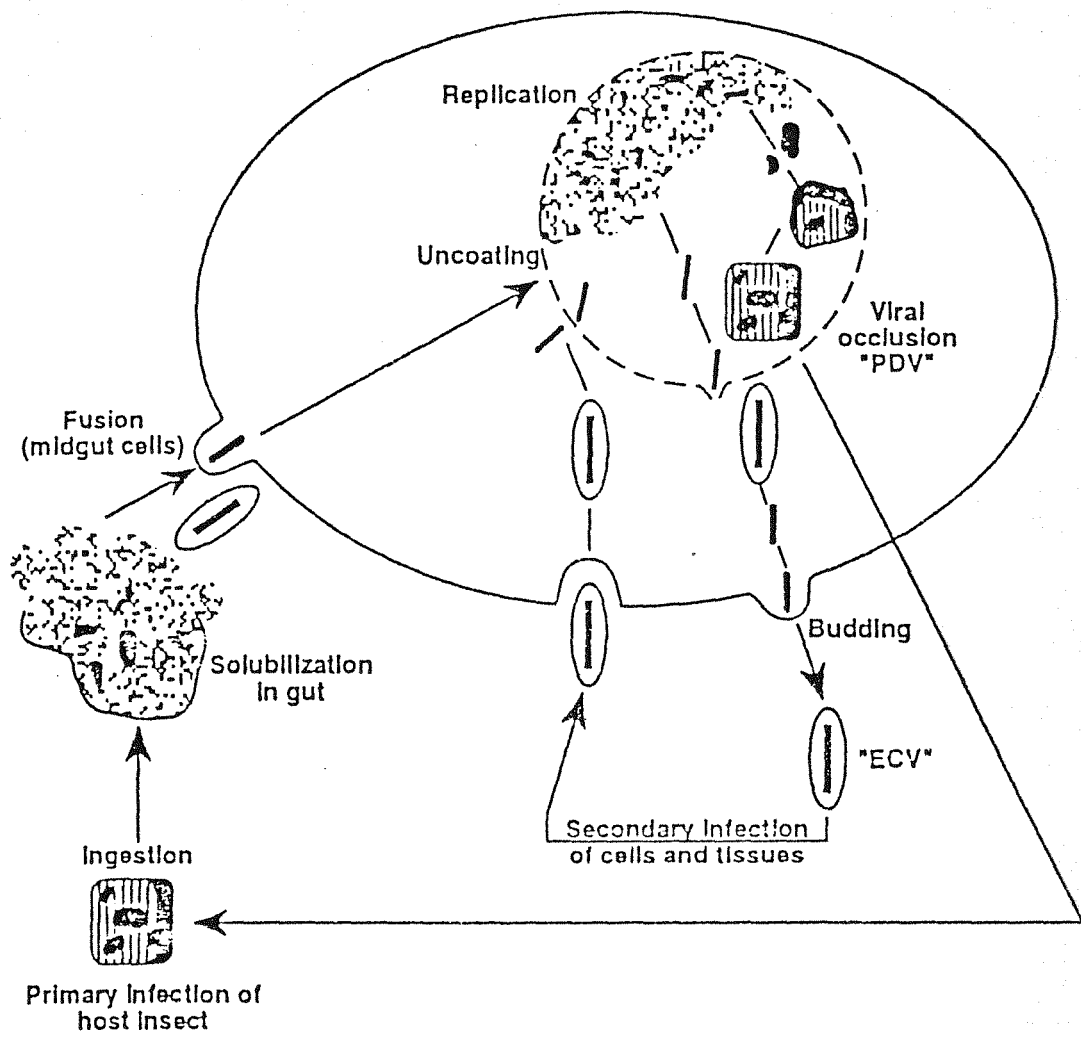
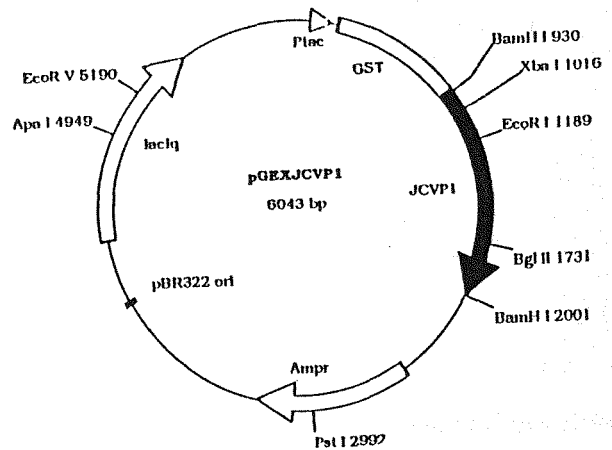
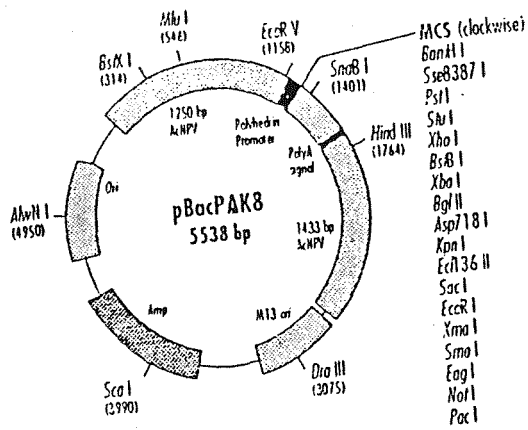


圖 5. Baculovirus 的生活史。此圖形描述典型的 Baculovirus 的 biphasic 生活史 (66a)。



BamHI digestion

BamHI digestion

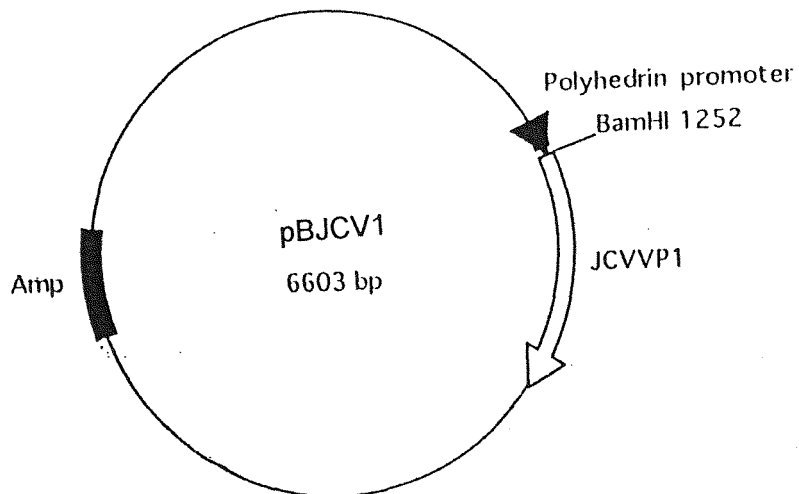
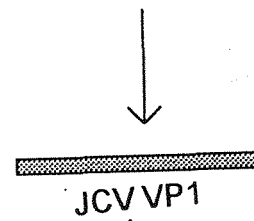


圖 6. 構築重組質體 pBJCV1。將 JCV VP1 的 DNA 片段從質體 pGEX - JCVP1 以 *Bam*HI 切下，再接到 pBacPAK8 的 *Bam*HI 位置，而構成 pBJCV1。

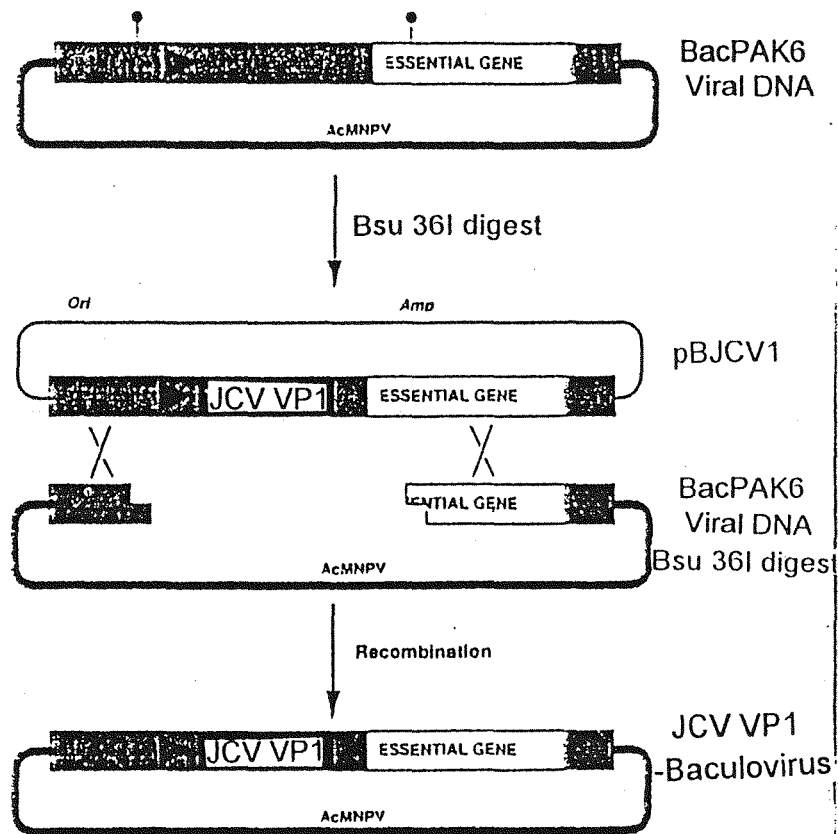
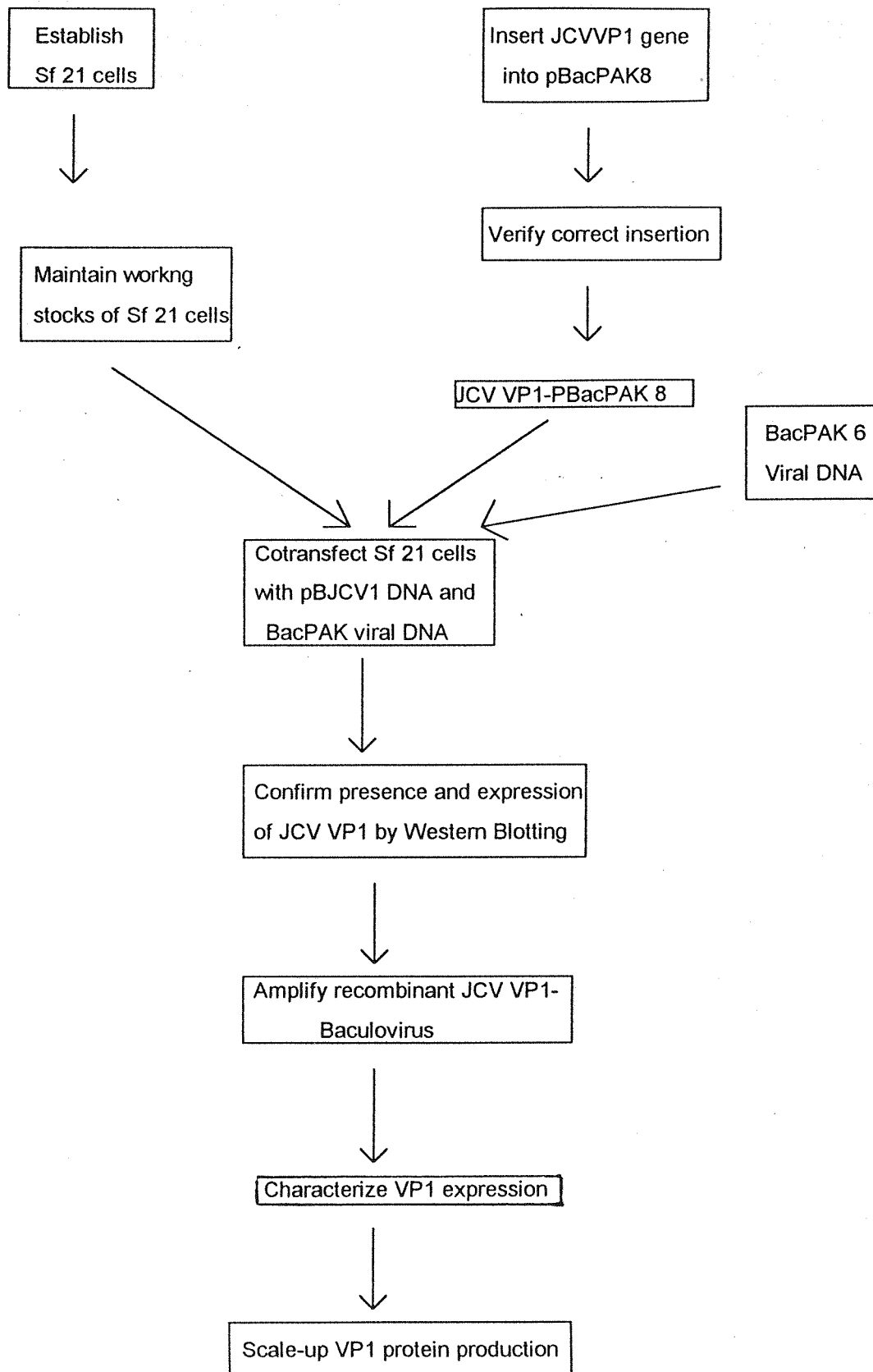


圖 7. 構築重組病毒 JCV VP1/Baculovirus。JCV VP1 的基因接到 pBacPAK8 的 *Bam*HI 位置上，而形成重組質體 pBJCV1。重組質體上有重組序列跟 BacPAK6 病毒重組序列同源。BacPAK6 DNA 上有一必須基因被刪除，重組質體上含有此完整必須基因。將二者同時轉感染到 Sf21 細胞後，在 Sf21 細胞內進行 recombination，而得到一重組病毒，含有 JCV VP1 基因。JCV VP1 基因在 polyhedrin promoter 的控制之下，在病毒感染晚期可製造大量 VP1 蛋白質（30）。

圖 8. JCV VP1 在 BacPAK 表達系統操作流程圖。在進行 JCV VP1 基因選殖期間，先培養 Sf21 細胞，並將部份細胞做細胞冷凍保存。等確定 VP1 已選殖到質體之後，再跟 BacPAK 6 病毒 DNA 共轉感染到 Sf21 細胞。之後以西方墨法確認 VP1 蛋白質表達。再培養出更多重組病毒，表達 VP1 蛋白質，並做其特性化探討。然後大量培養以得到大量 VP1 蛋白質。



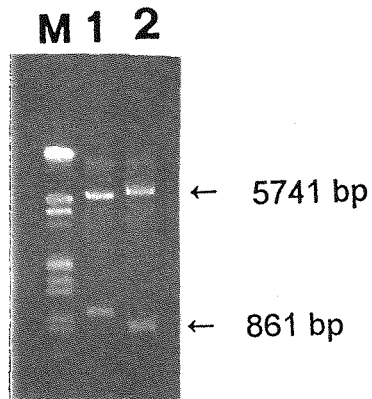


圖 9. pBJCV1 的 restriction map。將 pBJCV1 轉殖到 *E. coli* JM109 細胞後，在含 ampicillin 的培養基培養並純化出質體 DNA，以限制酶來切割確定篩選到的菌落。Lane M: Lambda DNA 被 *EcoRI* 及 *HindIII* 切後的片段，做為分子量 marker。Lane 1: 以 *BamHI* 切，可切出 5,538 bp 的 pBacPAK8 質體，及 1,065 bp 的 JCV VP1。Lane 2: pBJCV1 以 *EcoRI* 切，正接則可切出 5,741 及 861 bp 的 DNA 片段。

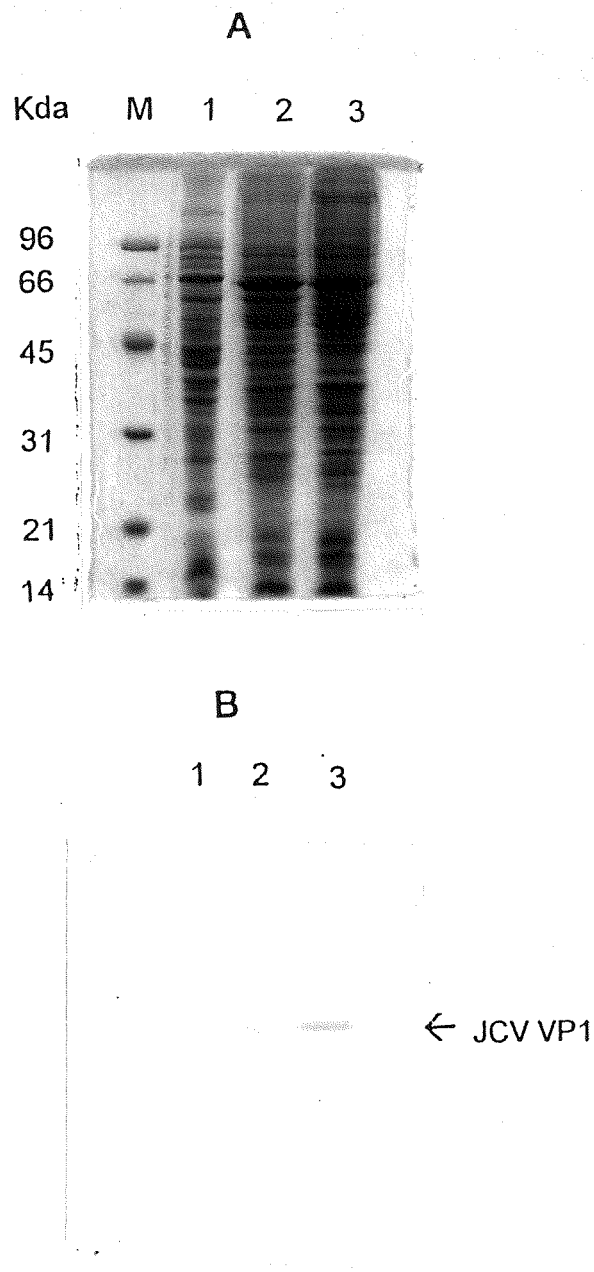


圖 10. SDS-PAGE 及西方墨點法分析被 JCV VP1/Baculovirus 共轉感染的昆蟲細胞。被共轉感染或未被共轉感染的 Sf21 細胞收集之後，以 12.5% SDS-PAGE 分開，再以 Coomassie blue 染色 (A)。另一組為 SDS-PAGE 之後，再轉印到 nitrocellulose paper，再用兔子 anti-JCV VP1/pFlag 抗體作確認，以 DAB 呈色 (B)。Lane M: 分子量 marker。Lane 1: 未感染的 Sf21 細胞。Lane 2: JCV VP1/pFlag/JM109 做為正控制組。Lane 3: 感染 JCV VP1/Baculovirus 的 Sf21 細胞。

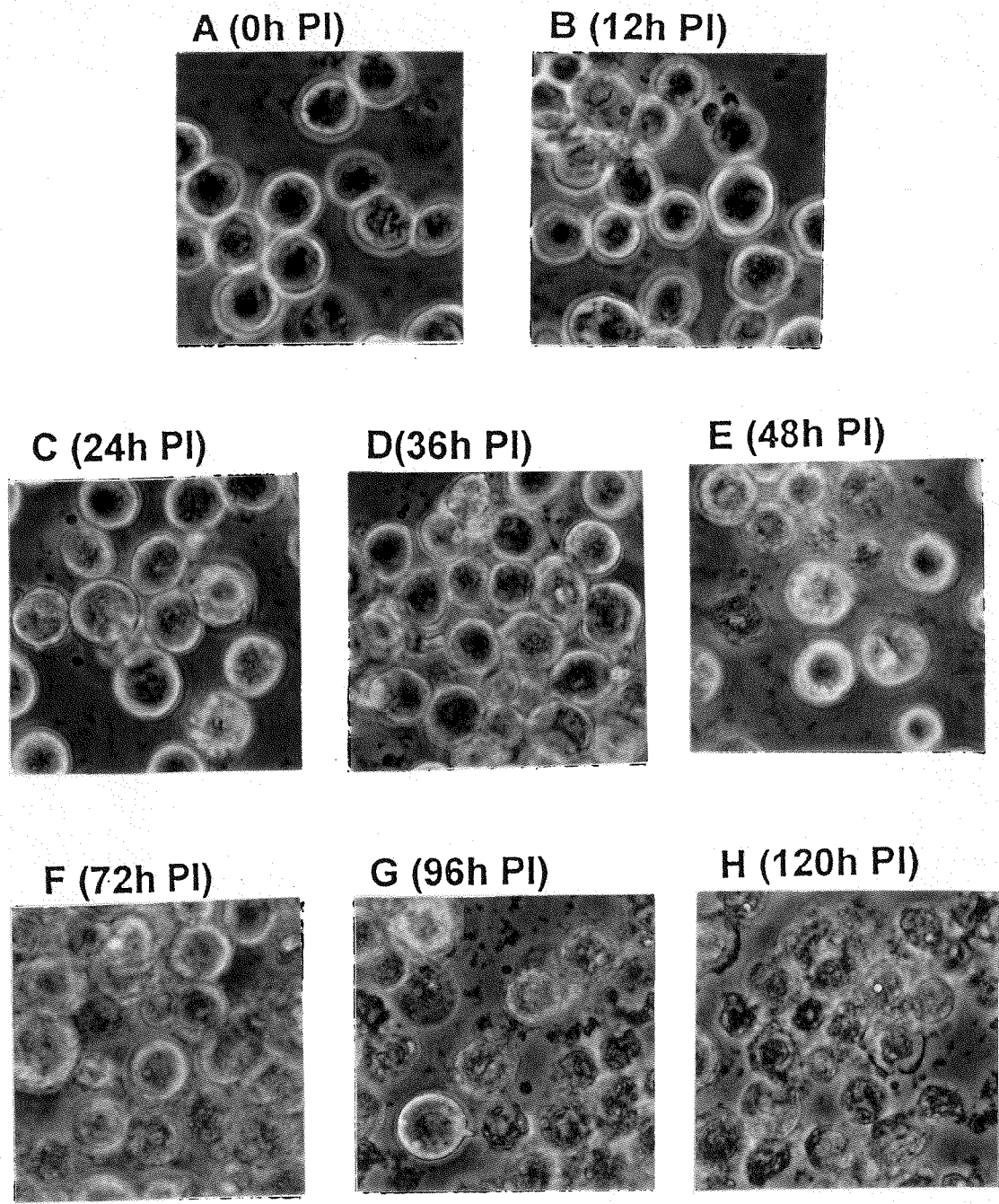


圖 11. Sf21 細胞被 JCV VP1/Baculovirus 感染不同時間之後的形態變化。A 到 H 分別是 Sf21 被 JCV VP1/Baculovirus 感染後 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 小時。

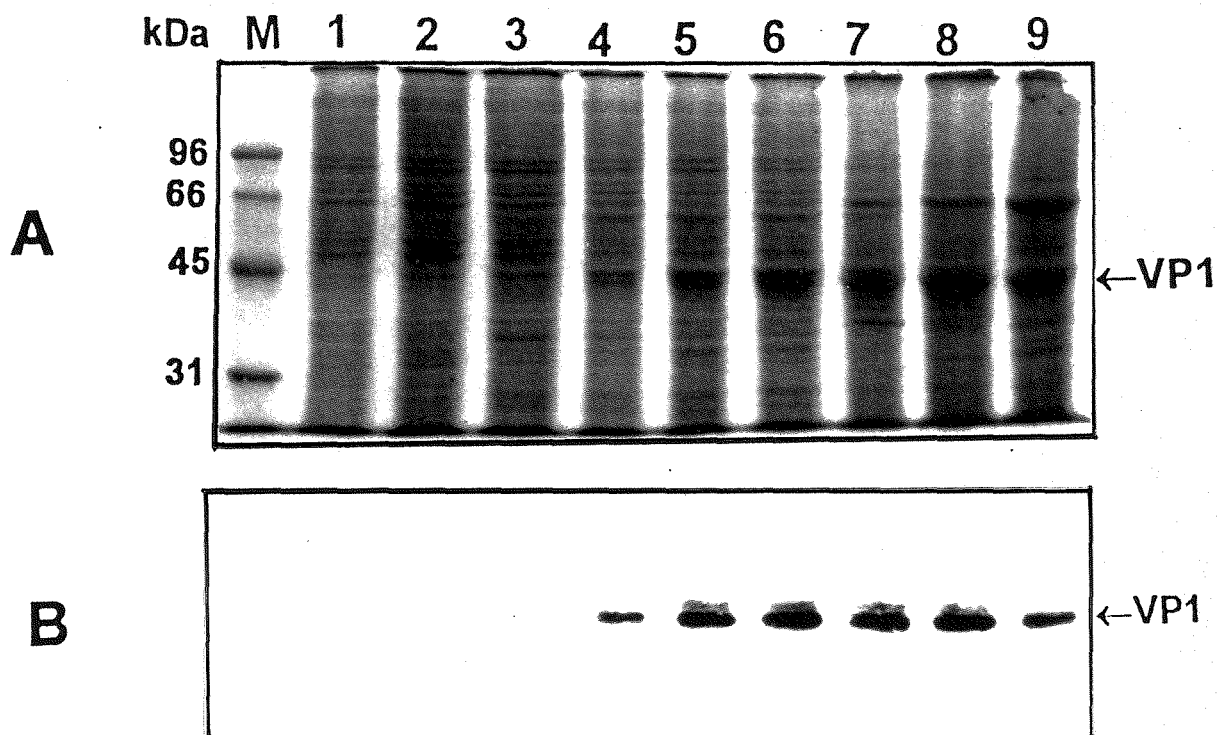


圖 12. Sf21 細胞被 JCV VP1/Baculovirus 感染不同時間之後，VP1 蛋白質表達情形。(A) 12.5% SDS-PAGE 以 Coomassie blue 染色，(B) 西方墨點法以 anti-JCV VP1 抗體辨認 VP1。Lane M: 分子量 marker；Lane 1: 0h；Lane 2: 6h；Lane 3: 12h；Lane 4: 24h；Lane 5: 36h；Lane 6: 48h；Lane 7: 72h；Lane 8: 96h；Lane 9: 120h。

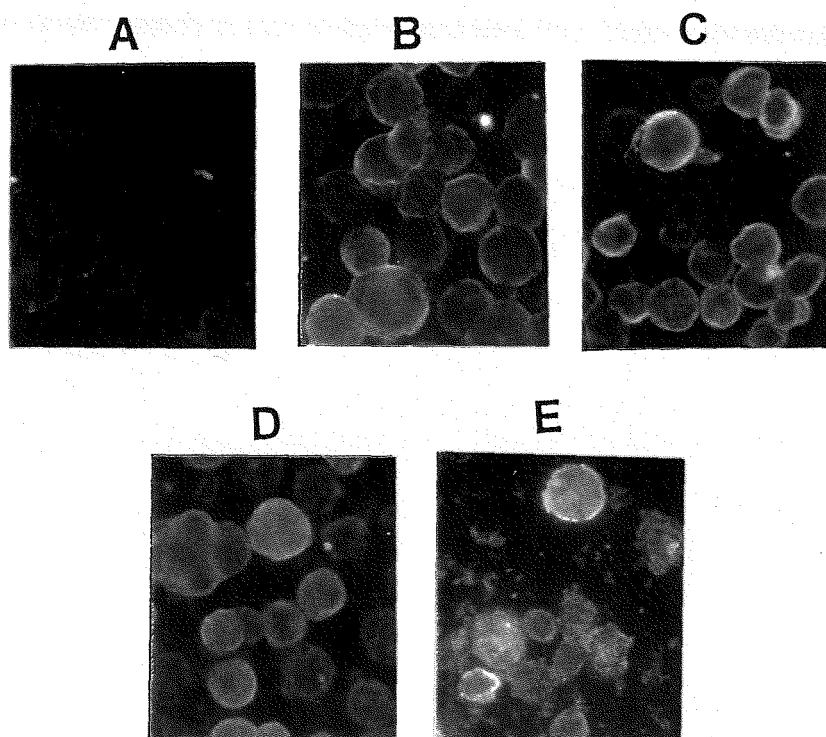


圖 13. 免疫螢光染色分析 VP1 在各不同時間於細胞內的表達情形。(A) 0h ,
(B) 24h , (C) 48h , (D) 72h , (E) 120h 。

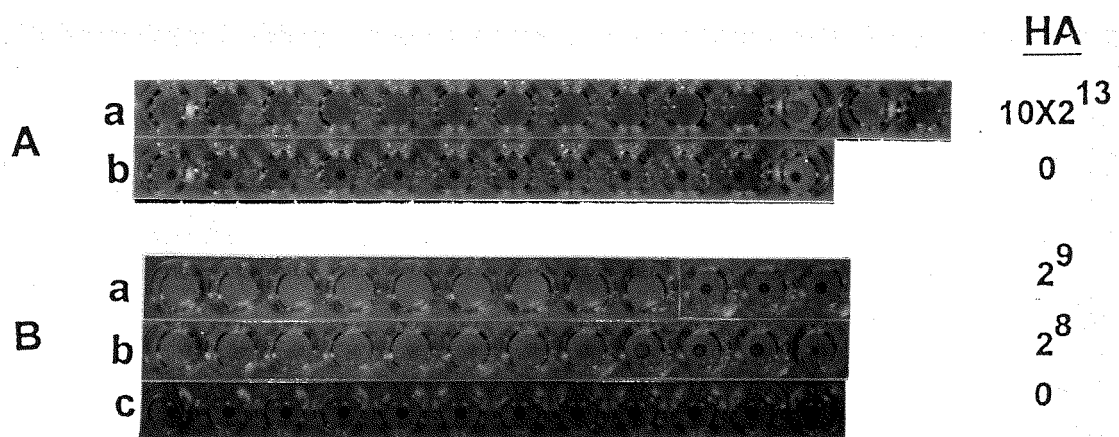


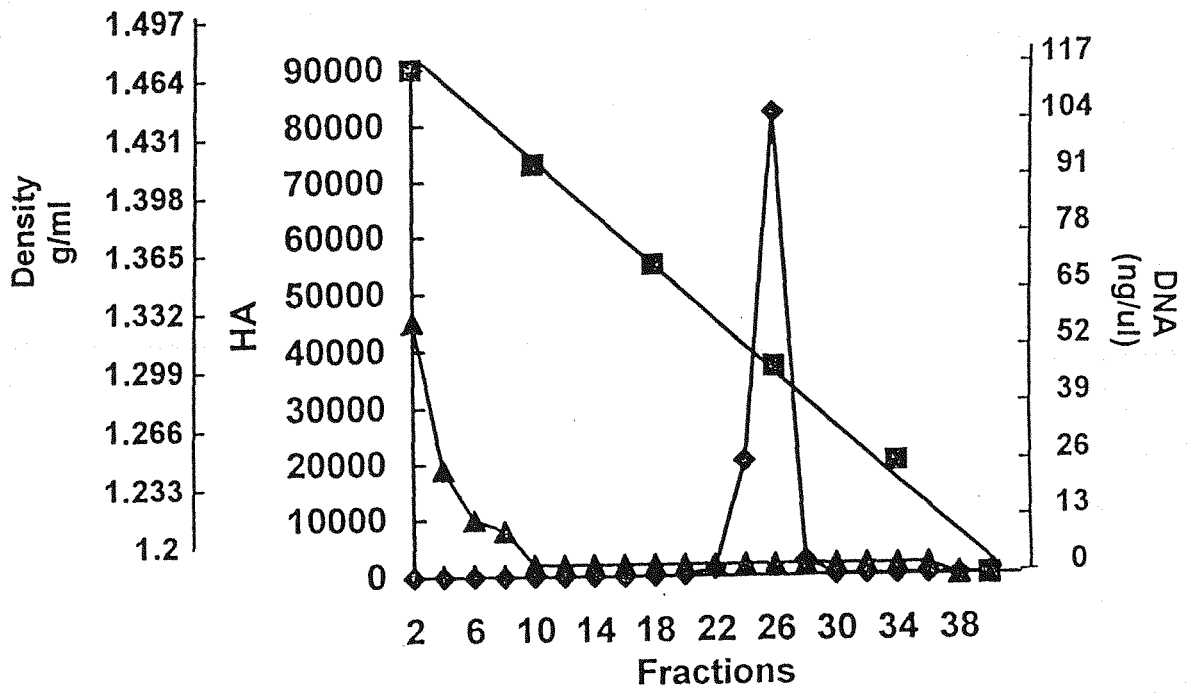
圖 14. Sf21 細胞被 JCV VP1/Baculovirus 感染之後，血液凝集及血液凝集抑制的特性。(A) 血液凝集，感染 JCV VP1/Baculovirus (a) 及未感染(b) 的昆蟲細胞 total lysate 與人類 O 型血球反應。(B) 血液凝集抑制，被感染細胞 total lysate，未加入抗體(a)，或加入兔子免疫前血清(b)及，加入抗體(c)後血液凝集抑制情形。

圖 15. CsCl 密度梯度離心純化的 JCV VP1 蛋白質在各 fraction 的密度， DNA 含量及血液凝集 (A)，及在 12.5 % SDS-PAGE 的分析 (B)。 JCV VP1 蛋白質的純化方法描述於材料及方法中。(A) JCV VP1/ Baculovirus 感染 Sf21 細胞 72 小時之後，經由 sucrose cushion 及 CsCl 密度梯度離心純化之後，每 fraction 測定 DNA 含量、密度，及血液凝集活性。(B) 以 12.5 % SDS-PAGE 分析 CsCl 密度梯度離心後含有 HA 活性的 fractions 的 VP1。 Lane 1-9，分別為 fraction 21 -29。

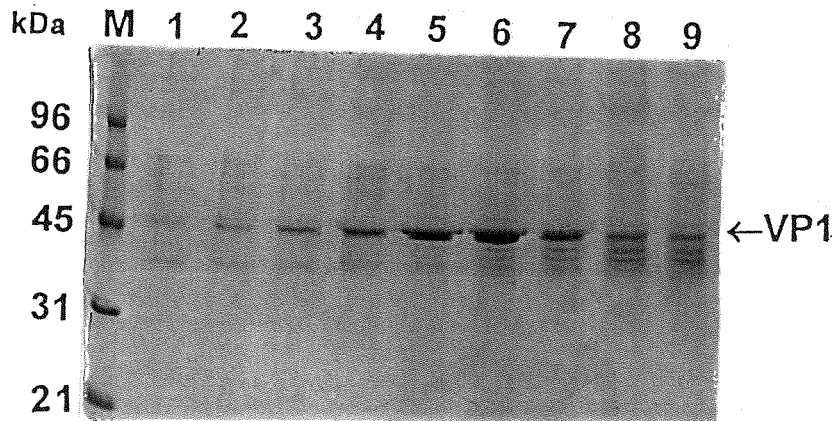
■：表蛋白質密度。

◆：表 HA 活性。

▲：表 DNA 含量。



B



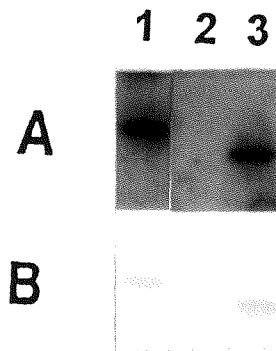


圖 16. JCV VP1 與 DNA 結合的能力。(A) Southwestern blot，TW-3 genome 以 ^{32}P 標幟做為探針，測定 DNA 結合能力。(B) 西方墨點法。 Lane 1 以 anti - polyomavirus VP1 抗體， Lane 2 及 Lane 3 以 anti - JCVP1 抗體來偵測，以 DAB 呈色。 Lane 1：Polyomavirus VP1 做為正控制組； Lane 2：未感染病毒的 Sf21 細胞； Lane 3：JCV VP1/Sf21，病毒感染 72 小時的 Sf21 細胞 total lysate。

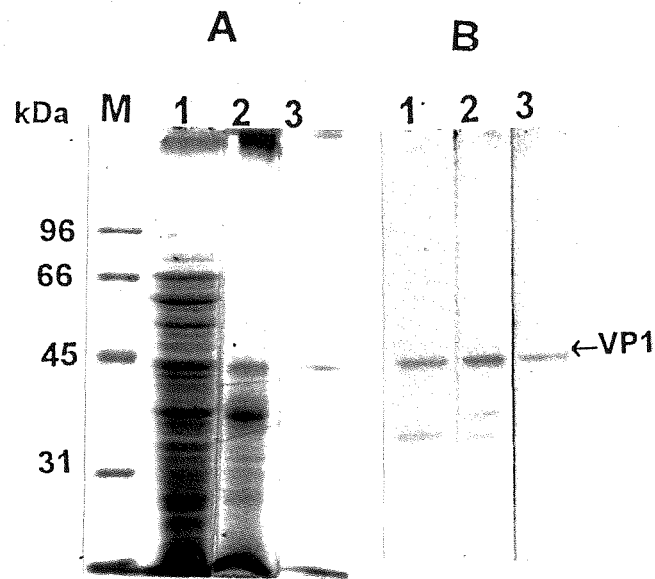


圖 17. JCV VP1 各純化過程的結果。(A) 12.5% SDS-PAGE，(B) 西方墨點法。Lane M：分子量 marker。Lane 1：表達 VP1 昆蟲細胞的 total lysate。Lane 2：經 sucrose cushion 部份純化之樣品。Lane 3：CsCl 密度梯度離心後之 VP1。

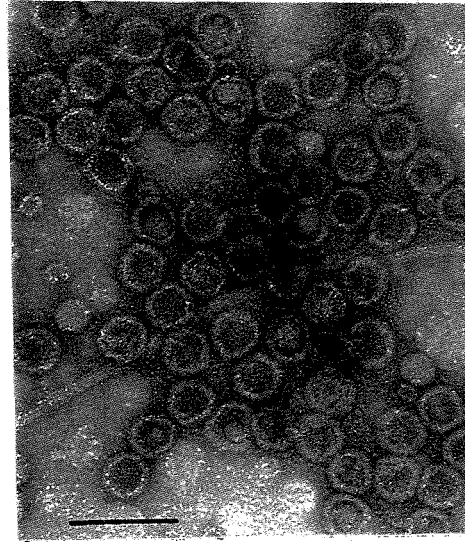


圖 18. JCV VP1 殼體的電顯圖。純化的 JCV VP1 殼體，以 uranyl acetate 染色，以 TEM 觀察其外形。圖中的 bar 為 100 nm。



圖 19. 2D gel 分析在昆蟲細胞內表達的 JCV VP1 蛋白質。含有 JCV VP1 昆蟲細胞的 total lysate 以 IEF 及 SDS-PAGE 分離後，以 anti-JCV VP1 抗體鑑定 VP1 的 subspecies

圖 20. 未被 JCV VP1/Baculovirus 感染的 Sf21 的超薄切片電子顯微鏡圖。無論在細胞質或核，均未出現殼體 - like 結構。(Nu : 細胞核, NM : 細胞核膜, Cy : 細胞質)。

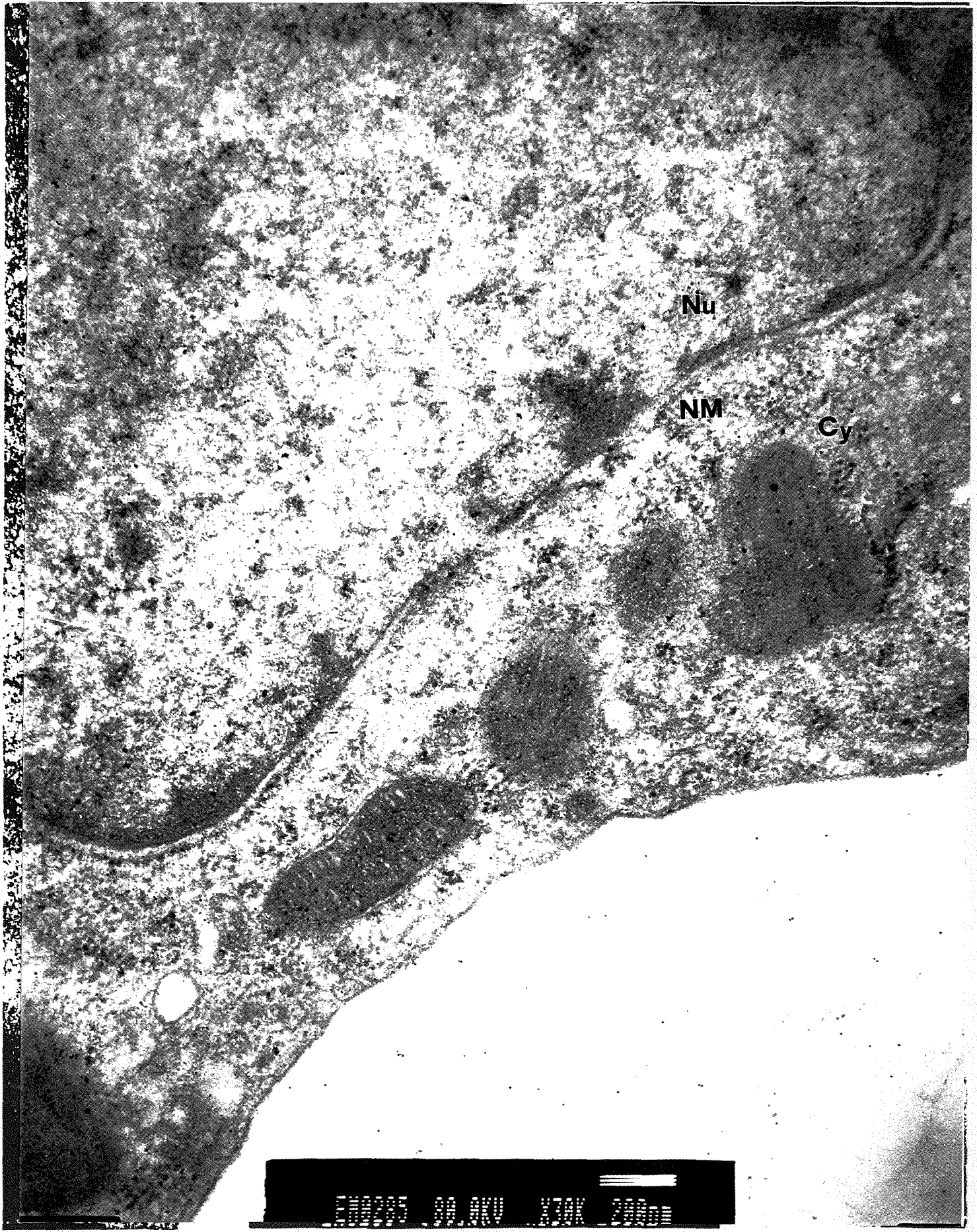
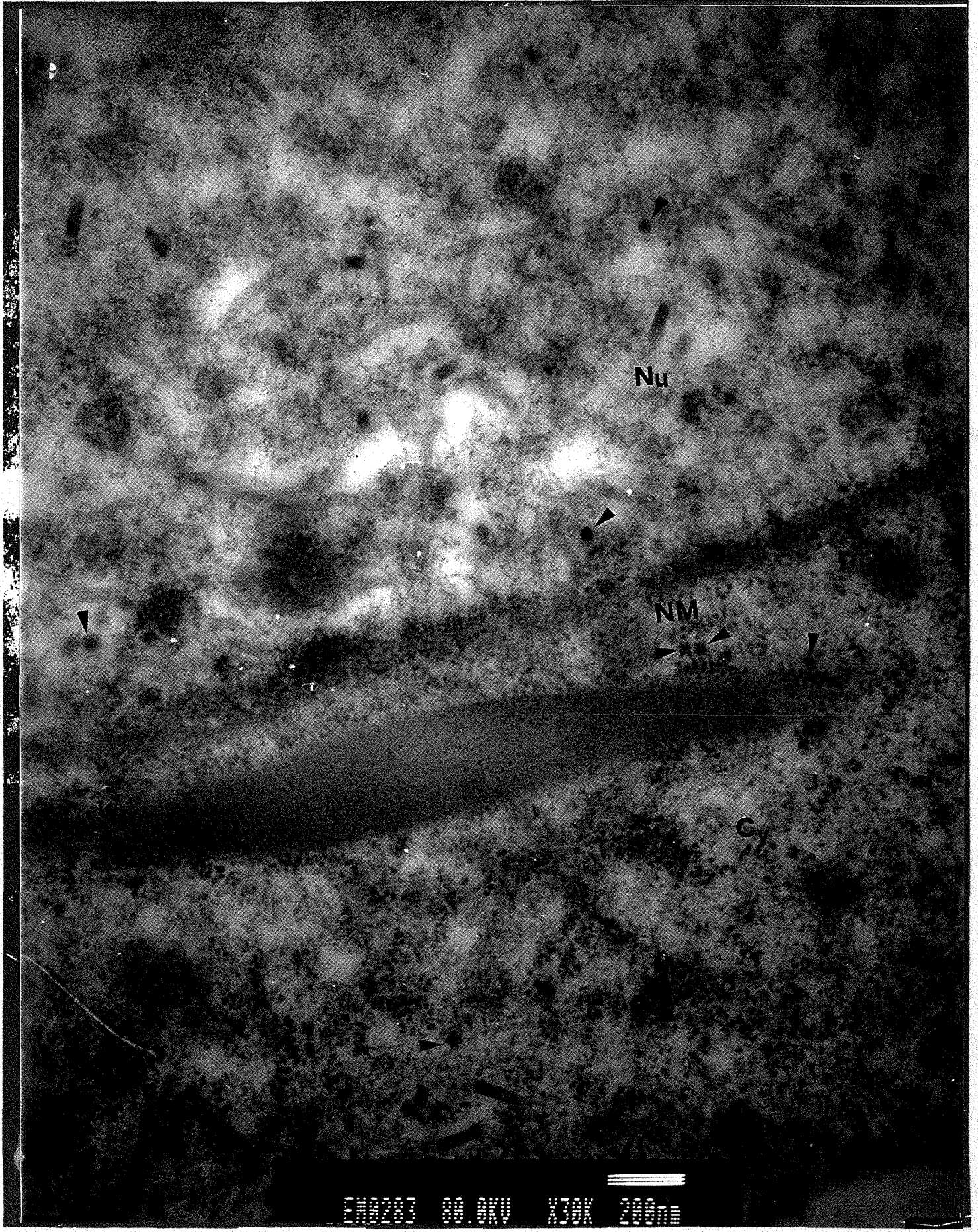


圖 21. JCV VP1/Baculovirus 感染 Sf21 細胞的超薄切片電子顯微鏡圖。箭頭指示類似殼體的構造。(Nu : 細胞核, NM : 核膜, Cy : 細胞質)。



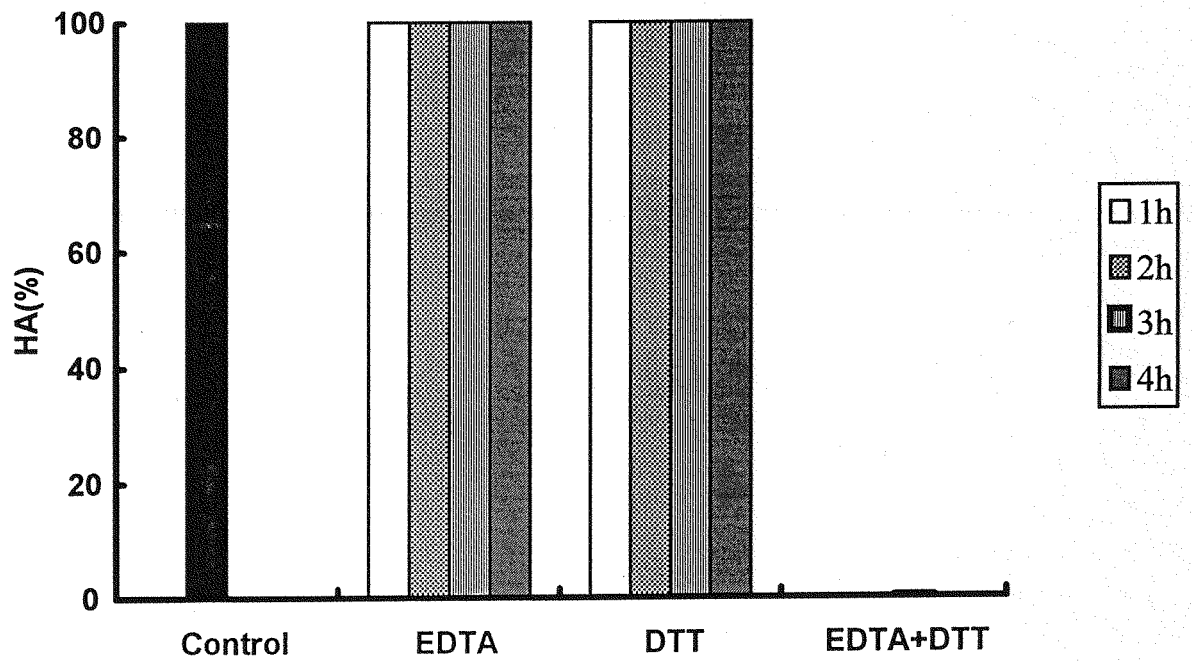


圖 22. EDTA 及 DTT 對殼體穩定性之影響。純化的 JCV VP1 殼體，分別以 10 mMEDTA，3 mM DTT 或二者同時存在作用 JCV VP1 殼體 1，2，3，4 小時之後，測血液凝集活性。

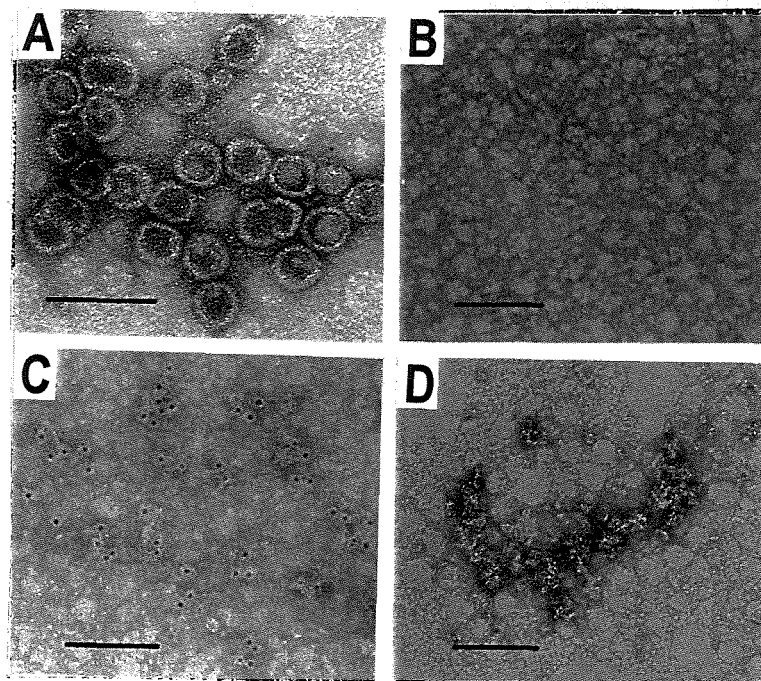


圖 23 殼體及 capsomere 的電顯圖。純化的為 45 nm 的空殼體 (A) 及殼體加入 EDTA 及 DTT 之後的 capsomere (B)。Capsomere 以 immunogold 染色。(C) 及 immunoelectromicroscope (D) 處理。詳細步驟如材料及方法。(圖中的 bar 為 100 nm)。

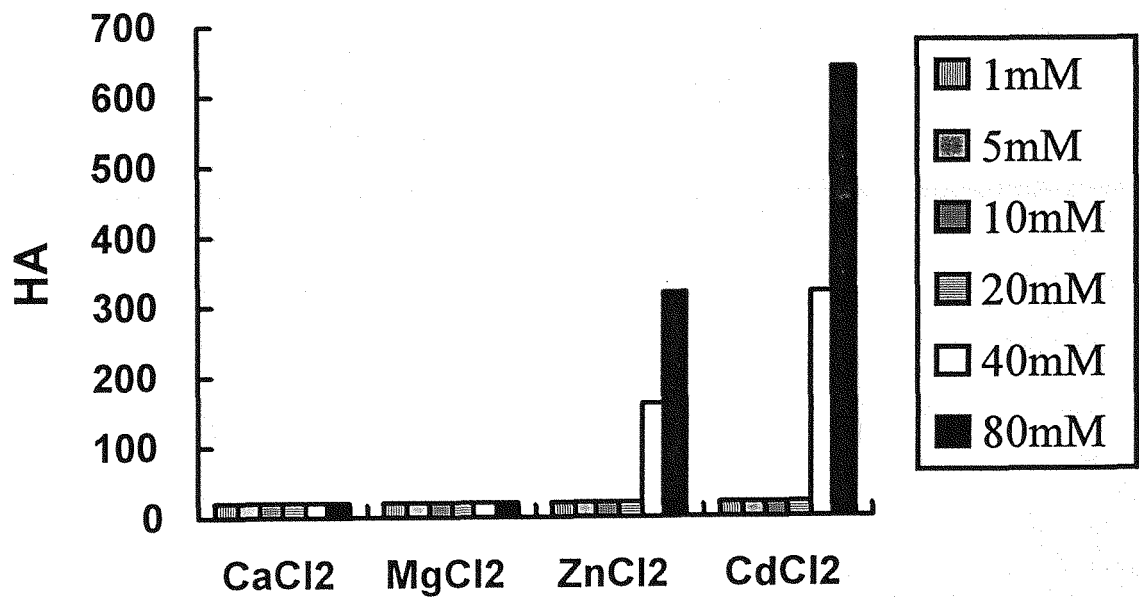


圖 24. Capsomere 加入二價離子再組合成殼體的情形。分別在 capsomere 溶液中加入不同濃度的 CaCl_2 ， MgCl_2 ， ZnCl_2 ， CdCl_2 ，測其 HA。血液凝集的定義參考材料與方法。

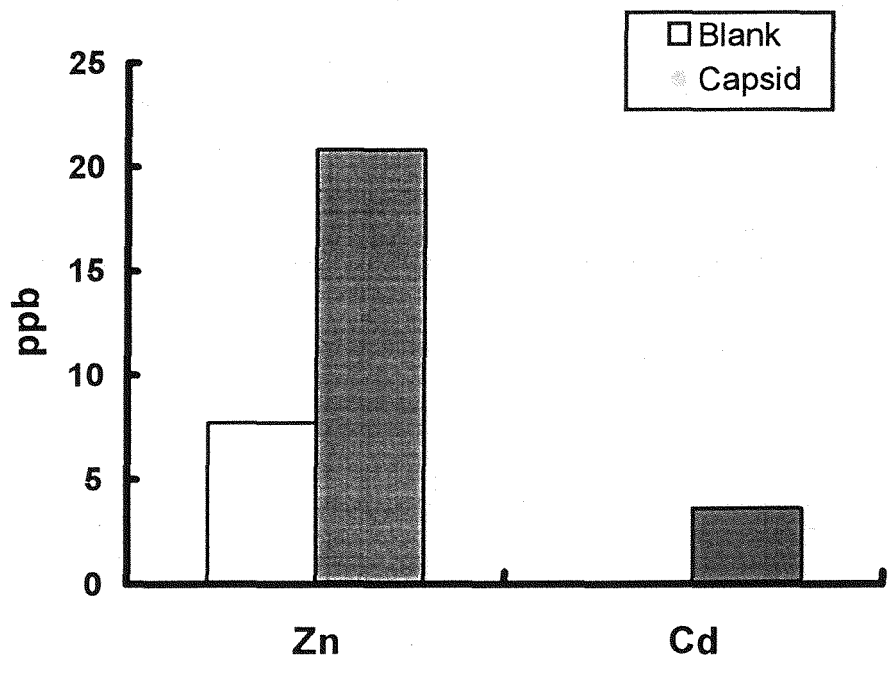


圖 25. 以原子吸收光譜測殼體溶液中所含的 Zn^{2+} 及 Cd^{2+} 的濃度。

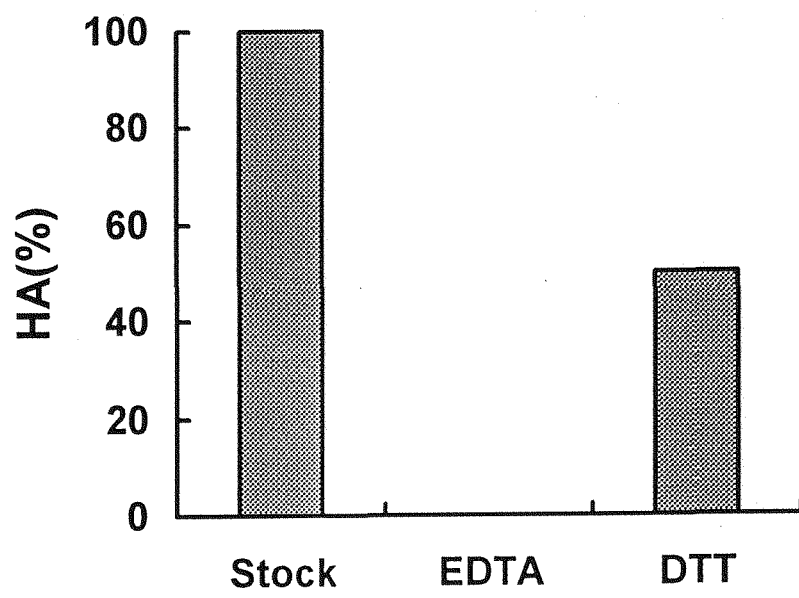


圖 26. EDTA 及 DTT 對再組合的殼體的影響。

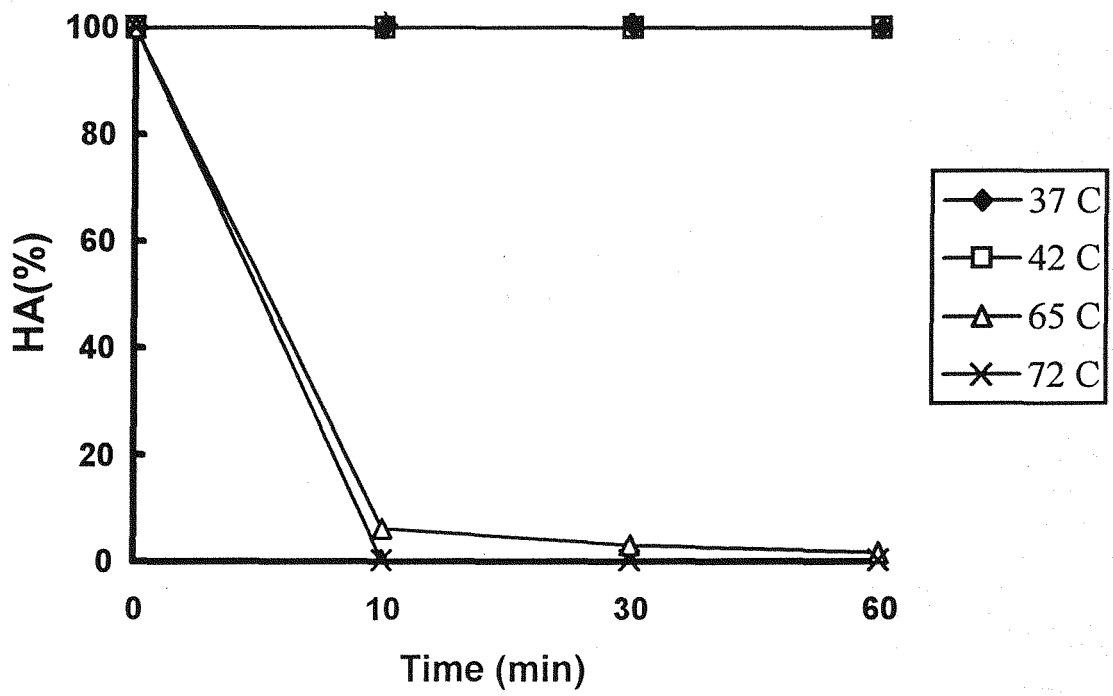


圖 27. 不同溫度 (37, 42, 65, 72 °C) 對殼體的穩定性的影響。

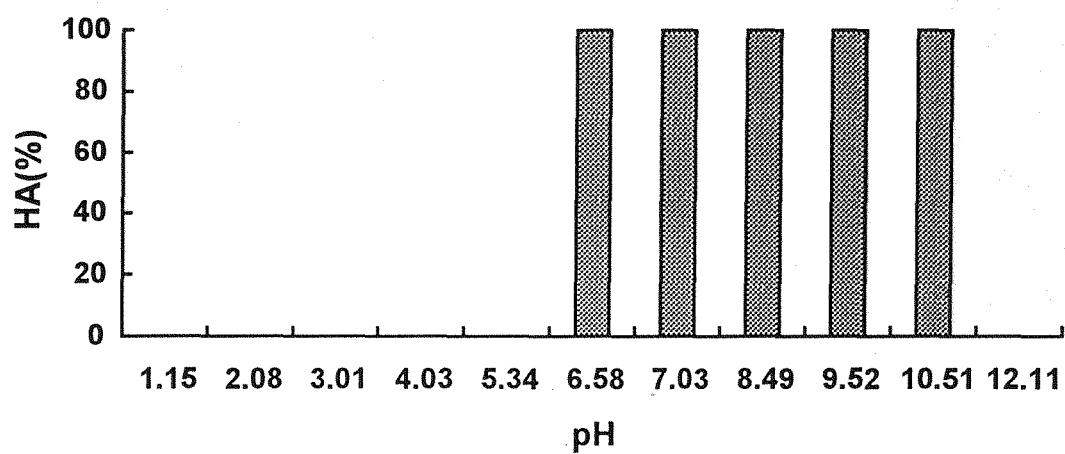


圖 28. pH 對殼體穩定性的影響。在殼體溶液中，加入酸或鹼使其有不同 pH，作用 4 小時之後，再測其 HA。

Table 1. Summary of VP1 recovery

Purification stage	Volume (ml)	Total protein (mg)	% of VP1 by densitometry	Total VP1 protein (mg)	Yield (%)
Lysate (soluble)	8.0	9.500	4.5	0.430	100.00
Sucrose cushion	0.5	2.400	13.0	0.312	72.60
CsCl gradient	1.2	0.098	96.0	0.094	21.86

註：本表結果取自 4×10^7 cells。

參考文獻

1. Ahmed, S., J. Rappaport, H. Tada, D. Kerr, and K. Khalili. 1990. A nuclear protein derived from brain cells stimulates transcription of the human neurotropic virus promoter, JCV_E, in vitro. *J. Biol. Chem.* 265:13899-13905.
2. Aksamit, A. J., E. O. Major, N. R. Ghatak, G. S. Sidhu, J. E. Paris, and J. G. Guccion. 1987. Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by brain biopsy with biotin labeled DNA: DNA in situ hybridization. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46:556-566.
3. Astrom, K.-E., E. L. Mancall, and E. P. Richardson, Jr. 1958. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain* 81:93-127.
4. Bolen, J. B., D. G. Anders, J. Trempy, and R. A. Consigli. 1981. Differences in the subpopulations of the structural protein of polyoma virions and capsids: Biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37:80-91.
5. Bollag, B., W.-F. Chuke, and R. J. Frisque. 1989. Hybrid genomes of the polyomavirus JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J. Virol.* 63:863-872.
6. Brady, J. N., and N. P. Salzman. 1986. The papovavirus. General properties of polyoma and SV 40, p. 1-26. Plenum Press, New York.
7. Brady, J. N., V. D. Winston, and R. A. Consigli. 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23:717-724.
8. Brown, P., T. Tsai, and D. C. Gajdusek. 1975. Seroepidemiology of human papovavirus: discovery of virgin population and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102:331-340.
9. Cavanagh, J. B., D. Greenbaum, A. Marshall, and L. Rubinstein. 1959. Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet* ii:524-529.
10. Chang, D., Z.-M. Liou., W.-C. Ou, K.-Z. Wang, M. Wang, C.-Y. Fung., and R.-T. Tsai. 1996. Production of the antigen and the antibody of JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Method.* In press.

11. Chang, D., R. -T. Tsai, M. Wang, and W. -C. Ou. 1996. Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:204-209.
12. Chang, D., J. Haynes II., N. J. Brady, and R. A. Consigli. 1992. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major 殼體 protein-VP1. *J. Virol.* 189:821-827.
13. Chang, D., X. Cai, and R. A. Consigli. 1993. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus 殼體 proteins. *J. Virol.* 67:6327-6331.
14. Christiansen, G., T. Landers., J. Griffin, and P. Berg. 1977. Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40. *J. Virol.* 21:1079-1284.
15. Cripe, T. P, S. E. Delos, P. A. Estes, and R. L. Garcea. 1995. In vivo and vitro association of hsc70 with polyomavirus 殼體 proteins. *J. Virol.* 69:7807-7813.
16. Chuke, W.-F., D. L. Walker, L. B. Peitzman, and R. J. Frisque. 1986. Construction and characterization of hybrid polyomavirus genomes. *J. Virol.* 60:960-971.
17. Dorries, K., G. Loeber, and J. Meixensbarger. 1987. Association of polyomavirus JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology.* 160: 268-270.
18. Feigenbaum, L., K. Khalili, E. O. Major, and G. Khoury. 1987. Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 3695-3698.
19. Frisque, R. J., G. Bream, and M. Cannella. 1984. Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51:458-469.
20. Frisque, R. J., J. D. Martin, B. Padgett, and D. L. Walker. 1979. Infectivity of the DNA from four isolates of JC virus. *J. Virol.* 32:476-482.
21. Frisque, R. J., D. B. Rifkin, and D. L. Walker. 1980. Transformation of primary hamster brain cells with JC virus and its DNA. *J. Virol.* 35:265-269.
22. Forstova, J., N. Krauzewicz, S. Wallace, J. A. Street., M. S. Dilworth, S.

- Beard, and E. B. Griffin. 1993. Cooperation of structural protein during late events in the life cycle of polyomavirus. 67:1405-1413.
23. Gardner, S. D. 1973. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK) . Br. Med. J. 1:77-78.
24. Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, and B. Hulme. 1971. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. Lancet i :1253-1257
25. Grinnell, B. W., J. D. Martin, B. L. Padgett, and D. L. Walker. 1982. Is progressive multifocal leukoencephalopathy a chronic disease because of defective interfering particles or temperature-sensitive mutants of JC virus? J. Virol. 43:1143-1150.
26. Grinnell, B. W., B. L. Padgett, and D. L. Walker. 1983. Comparison of infectious JC virus DNAs cloned from human brain. J. Virol. 45:299-308.
27. Haggerty, S., D. L. Walker, and R. J. Frisque. 1989. JC virus-simian virus 40 genomes containing heterologous regulatory signals and chimeric early regions: identification of regions restricting transformation by JC virus. J. Virol. 63:2180-2190.
28. Haynes, J., D. Chang, and R. A. Consigli. 1993. Mutation in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect 殼體 assembly. J. Virol. 67:2486-2495.
29. Hink, W. F. 1970. Establish insect cell line from cabbage *Trichoplusia ni* Nature (London) 226:466-467.
30. Hou-Jong, M.-H. J., S. H. Larson, and A. Roman. 1987. Role of the agnoprotein in regulation of simian virus 40 replication and maturation pathways. J. Virol. 61:937-939.
31. Jay, G., S. Nomura, C. W. Anderson, and G. Khoury. 1981. Identification of the SV40 agnogene product : a DNA binding protein. Nature (London) 291: 346-349.
32. Kenney, S., V. Natarajan, D. Strike, G. Khoury, and N. P. Saltzman 1984. JC virus enhancer-promoter active in human brain cells. Science 226:1337-1339.

33. Kitts, P. A. and R. D. Possee. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Bio. Techniques*. 14:810-817.
34. Khalili, K., L. Feigenbaum, and G. Khoury. 1987. Evidence for a shift in 5' termini of early viral RNA during the lytic cycle of JC virus. *Virology* 158:469-472.
35. Khalili, E., J. Rappaport, and G. Khoury. 1988. Nuclear factors in human brain cells bind specifically to the JCV regulatory region. *EMBO J.* 7:1205-1210.
36. Liddington, R. C., Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison. 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278-284.
37. Loeber, G., and K. Dories. 1988. DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain G5. *J. Virol.* 62:1730-1735.
38. Killer, L. 1988. Baculovirus as gene expression vector. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.
39. London, W. T., S. A. Houff, D. L. Madden, D. A. Fuccilo, M. Gravell, W. C. Wallen, A. E. Palmer, J. L. Sever, B. L. Padgett, D. L. Walker, G. M. ZuRhein, and T. Ohashi. 1978. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyoma virus (JC virus). *Science* 201:1246-1249.
40. Lynch, K. J, and R. J. Frisque. 1990. Identification of critical elements within the JC virus DNA replication origin. *J. Virol.* 64:5812-5822.
41. Lynch, K. L., and R. J. Frisque. 1991. Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus. *Virology.* 180:306-317.
42. Major, E. O., A. E. Miller, P. Mourrain, R. Traub, E. De Wider and J. L. Sever. 1985. Establishment of a line of human glial cells that supports JC virus multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1257-1261.
43. Major, E. O., K. Amekiya, C. S. Tornatore, S. A. Houff, and J. R. Berger 1992. Pathogenesis and Molecular Biology of Progressive Multifocal leukoencephalopathy. the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clinical Microbiology Reviews* 5:49-73.

44. Mandl, C. W., and R. J. Frisque. 1986. Characterization of cells transformed by the human polyomavirus JC virus. *J. Virol.* 67:1733-1739.
45. Mandl, C., D. L. Walker, and R. J. Frisque. 1987. Derivation and characterization of POJ cells, transformed human fetal glial cells that retain their permissivity for JC virus. *J. Virol.* 61:755-763.
46. Martin, J. D., B. L. Padgett, and D. L. Walker. 1983. Characterization of tissue culture-induced heterogeneity in DNAs of independent isolates of JC virus. *J. Gen. Virol.* 64:2271-2290.
47. McMillen, J., and R. A. Consigli. 1974. Characterization of polyoma DNA protein complex I. Electrophoretic identification of the proteins in a nucleoprotein complex isolated from polyoma-infected cells. *J. Virol.* 14:1326-1336.
48. Montross, L., S. Watkins, R. B. Moreland, H. Donald, L. D. Capar, and R. L. Garcea. 1991. Nuclear assembly of polyomavirus 殼體 s in insect cells expressing the major 殼體 protein Vp1. *J. Virol.* 65:4991-4998.
49. Miyamura, J., A. Furuno, and K. Yoshiike. 1985. DNA rearrangement in the control region of early transcription in a human polyomavirus JC host range mutant capable of growing in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* 54:750-756.
50. Myers, C., R. J. Frisque, and R. R. Arthur. 1989. Direct isolation and characterization of JC virus from urine samples of renal and bone marrow transplant patients. *J. Virol.* 63:4445-4449.
51. Myers, R. M., D. C. Rio, A. K. Robbins, and R. Tjian. 1981. SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T antigen to DNA. *Cell.* 25:373-384.
52. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
53. Padgett, B. L., L. M. Rogers, and D. L. Walker. 1977. JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy, additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect. Immu.* 15:656-662.
54. Padgett, B. L., and D. L. Walker. 1983. Virologic and serologic studies of

- progressive multifocal leukoencephalopathy. *Prog. Clin. Biol. Res.* 105:107-117.
55. Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. ZuRhein, A. E. Hodach, and S. M. Chou. 1976. JC papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 133:686-690.
56. Padgett, B. L. and D. L. Walker. 1973. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 127:467-470.
57. Padgett, B. L., G. ZuRhein, D. L. Walker, R. Echroade, and B. Dessel. 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* i:1257-1260.
58. Perry, J., C. M. To, and R. A. Consigli. 1969. Alkaline degradation of polyoma virus. *J. Gen. Virol.* 4:403-411.
59. Rayment, I., T. S. Baker, D. L. D. Caspar, and W. T. Murakami. 1982. Polyomavirus 殼體 structure at 22.5A resolution. *Nature* 295:110-115.
60. Rentier-Delrue, F., A. Lubiniecki, and P. M. Howley. 1981. Analysis of JC virus DNA purified directly from human progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *J. Virol.* 38:761-769.
61. Richardson, E. P., Jr. 1961. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 265:815-823.
62. Rziha, H. J., G. Bornkamm, and H. ZurHausen. 1978. Seroepidemiological studies and serologic response to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 165:73-92.
63. Salumke, D. M., D. L. D. Caspar, and R. L. Garcea. 1989. Polymorphism in the assembly of polyomavirus 殼體 protein VP1. *J. Virol.* 56:887-900.
64. Shein, H. M. 1965. Propagation of human fetal spongiblasts and astrocytes in dispersed cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 40:554-569.
65. Stomatos, N. M., S. Chakrabart., B. Moss, and J. D. Hare. 1987. Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J. Virol.* 61:516-525.

66. Stoner, G. L., D. Soffer, C. F. Ryschkewitsch, D. L. Walker, and H. D. Webster. 1986. JC papovavirus large tumor (T)- antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:2271-2275.
- 66a. Summers, M. D., and G. E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin. No.1555. College Station.
67. Tada, H., Lashgari, J. Rappaport, and K. Khahili. 1989. Cell type-specific expression of JC virus early promoter is determined by positive and negative regulation. J. Virol. 63:463-466.
68. Tornatore, C., K. Amemiya, W. Atwood, K. Conant, and E. O. Major. 1994. JC virus: Current concepts and controversies in the molecular virology and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. Reviews in medical virology. 4:197-219.
69. Vacante, D. A., R. Traub, and E. O. Major. 1989. Extension of JC virus host range to monkey cells by insertion of a simian virus40 enhancer into the JC virus regulatory region. Virology 170 353-361.
70. Varakis, J., G. M. ZuRhein, B. L. Padgett, and D. L. Walker. 1978. Induction of peripheral neuroblastomas in Syrian hamster after injection as neonates with JC virus, a human polyomavirus. Cancer Res. 38:1718-172.
71. Walker, D. L., B. L. Padgett, G. M. ZuRhein, A. E. Albert, and R. F. Marsh. 1973. Human papovavirus (JC) : induction of brain tumor in hamsters. Science 181:674-676.
72. Yogo, Y., T. Kitamura, C. Sugimoto, J. Ueki, Y. Aso, K. Harra, and F. Taguchi. 1990. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmune-compromised individuals. J. Virol. 64:3139-3143.
73. Yoshiike, E., T. Miyamura, H. W. Chan, and K. K. Takemoto. 1982. Two defective DNAs of human polyomavirus JC adapted to growth in human embryonic kidney cells. J. Virol. 42:395-401.
74. ZuRhein, G. M., and S. M. Chou. 1965. Particles resembling papovavirions in human cerebral demyelinating disease. Science 148:1477-1479.