

R
008.8
8044

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 免疫反應性及作用區域之分子研究

Molecular investigation of immunoreactivities and interacting domains of human polyomavirus JCV major capsid protein VP1



研究生 曹本郁
指導教授 張德卿 教授

參考書恕不外借

中華民國八十六年六月

中山醫學院圖書館



C046152

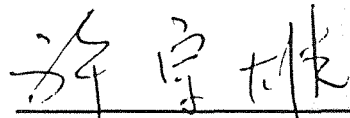
本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院生物化學研
究所碩士論文考試委員會審查合格及口試
通過

口試委員

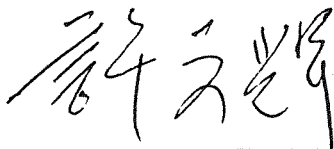
工研院化工所


熊光濱 教授

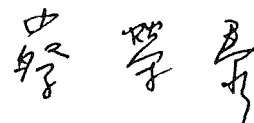
清華大學生命科學研究所


許宗雄 教授

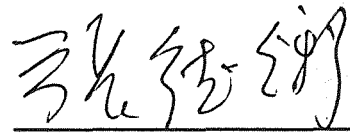
中興大學分子生物研究所


許文輝 教授兼所長

中山醫學院醫學研究所


蔡榮泰 副教授

中山醫學院醫學系微生物科
(論文指導教授)

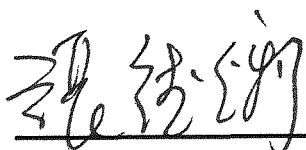

張德卿 教授兼主任

中華民國八十六年六月

學生 曾才郁 論文題目為“人類多瘤性病毒 JC 病毒主要殼體蛋白 VP1 免疫反應性及作用區域之分子研究”，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：



中華民國八十六年七月二十三日

目 錄

	頁次
誌謝.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
第一節 前言.....	4
第二節 研究的目的及意義.....	9
第三節 材料與方法.....	11
第四節 結果.....	22
第五節 討論.....	27
第六節 圖表.....	31
第七節 參考文獻.....	53

誌 謝

學習就如同在茫茫無邊際的大海航行、探索，在這之中有著無數驚奇及無窮盡的新知待你去搜尋、吸收；但也充滿著危機，必須時時小心，才能有所收穫並且航向終點。

回首來時路，短短兩年研究生涯跟隨吾師 張德卿教授學習期間，恩師無論在傳道、授業、解惑均不遺餘力悉心的教導令學生獲益良多。而在日常生活中亦師亦友相處的方式，令學生在不知不覺中耳濡目染了恩師宏觀的人生哲學。此外在文稿初成時，恩師連夜斧正、圈點眉批，如此師恩，點滴在心頭。

感謝工研院熊光濱教授、清華大學生命科學院許宗雄教授、中興大學分子生物研究所所長許文輝教授及本校醫研所蔡榮泰教授在文稿初成時的細心斧正及撥冗參與口試，使得此論文更臻至完善，謹此致上最誠摯的謝意。

在這短短兩年求學研究期間，感謝中山醫院蔡榮泰醫師，協助檢體收集，使研究工作得以順利進行及本校生化所所長王朝鐘教授和毒理所所長李輝教授在學業上的指導。感謝微生物科歐威志學長、王梅林學姐和黃亦樂同學在生活細節上的關心及實驗上的指導以及黃玉珍小姐、賴瑞芬、曾玉伶學妹和瓊瑤學姐等所有關心、幫助過我的朋友，使得學業得以順利完成，在此一併致上由衷的謝意。

最後感謝愛我疼我的父親、母親、家人們及玉純對我的關懷、包容及支持。對各位關心和愛我的人再說一句：感謝您們！

曾才卿

謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十六年七月二十一日

摘 要

為了瞭解 JC 病毒抗原與抗體之間的關係。以便提供臨床檢測 JC 病毒之訊息，我們利用血球凝集抑制反應及 immunoblot 的方法進行分析。結果發現人體抗 JC 病毒的抗血清只能與 native 的 JC 病毒顆粒反應因而在血球凝集抑制及 dot blot 呈陽性反應。但無法與 denatured JC 病毒 VP1 反應，所以 Western blot 呈陰性反應。

藉由以上的訊息我們利用血球凝集抑制反應進行偵測健康人(221 人)，孕婦(100 人)，自體免疫疾病病人(81 人)的血清。以前的研究顯示這三個族群的尿液排放 JC 病毒率各為 13.3 %，26.0 %及 37.5 %。在我們的偵測結果發現這三個族群皆有約 76 %為 JC 病毒抗體陽性反應。另外我們也偵測 713 名兒童血清，0-11 歲，結果發現年齡越高者 JC 病毒抗體陽性率愈高。但總平均值為 46.5 %，遠低於成人的 76 %。此結果意味著 JC 病毒感染起自兒童時期。

為了更進一步探討病毒顆粒表面抗原決定部位，我們將 JC 病毒主要殼體蛋白 VP1 片段分別於 *E.coli* 表達並純化以進行免疫反應，結果發現 BC loop (氨基酸 57-90) 為主要參與抗體反應的區域。

此外，為了瞭解與 JC 病毒結合的紅血球表面分子，我們將紅血球以 neuraminidase 處理後發現紅血球無法與 JC 病毒結合而失去血球凝集反應。相反地，當以 neuraminidase 處理的紅血球插入含有 sialic acid 的 ganglioside 後，該紅血球又能與 JC 病毒結合而產生血球凝集反應。此結果證實紅血球表面的 sialic acid 為直接參與和 JC 病毒結合之分子。然而一些 JC 病毒的 permissive cells，如人類腦細胞及腎臟細胞的接受體(receptor)是否也含有 sialic acid 分子須更進一步探討。

ABSTRACT

In order to understand the antigenicity of human JC virus, hemagglutination inhibition (HAI) and immunoblot were performed. The results showed that human anti-JCV serum could only react with native JCV capsid rather than denatured VP1 protein as demonstrated by HAI, dot blot and Western blot.

Based on the results mentioned above, HAI was employed to screen human sera collected from 221 healthy individuals, 100 pregnant women and 81 autoimmune disease patients. These three groups were previously demonstrated to shed JCV in the urine sample at 13.3%, 26% and 37.5% respectively. The HAI results showed that about 76% of the examined serum samples from these groups were JCV positive. In addition, 713 children sera were also examined by HAI . It is found that the positive rate was increased with age. It may indicate that JCV infection occurs during childhood.

To investigate antigenic epitope of JCV, the fragments of the major capsid protein VP1 were expressed in *E.coli* and purified for immunological examination. The results showed that BC loop, amino acid 36 to 90, was involved in immunoreactivity.

Furthermore, the interacting molecular on red blood cell (RBC) to JCV was also investigated. RBC treated with neuraminidase were not able to interact with JCV and abolished hemagglutination activity. When ganglioside was added to the neuraminidase treated RBC, the hemagglutination activity was restored. These results indicate that sialic acid on RBC may be involved in the interaction between RBC and JCV.

前 言

一、多瘤性病毒簡介

多瘤性病毒 (Polyoma virus) 是屬於乳多瘤病毒科 (Papovaviridae) 的一屬，其大小約 45 nm，不含套膜 (envelope)，外殼結構是二十面體 (icosahedron) 對稱結構，結構殼體 (capsid) 由七十二個次殼體 (capsomere) 組成，在結構蛋白內包裹了一環形 (circular) 雙股 DNA 基因組 (genome)，約有 5000 對核苷酸。多瘤性病毒又依不同宿主可分為 murine polyoma virus、SV40、JCV、BKV 及 BFDV 等，其中 murine polyoma virus 的宿主動物是鼠類，SV40 的天然宿主動物是恆河猴，JCV 和 BKV 的宿主動物是人類，而 BFDV 的天然宿主動物是鳥類。

二、人類多瘤性病毒的分離

人類多瘤性病毒包括 JCV 和 BKV。而 JC 病毒於 1965 年時，Silverman 等人用電子顯微鏡在進行性多病灶腦白質病 (progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) 病人的腦部組織觀察到 (114)。一直到了 1971 年才從進行性多病灶腦白質病病人的腦部組織中分離出 JC 病毒 (99)。同年 BK 病毒也從一位 39 歲的腎臟移植病人的尿液中分離出來 (48)。兩者皆依病人之姓名命名。1977 年 Padgett 等人廣泛篩檢不同動物的檢體，都沒有偵測到 JC 病毒的抗體，所以 JC 病毒完全是屬於人類感染的病毒 (98)。

三、人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組 (Genome) 分析

人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組 (圖 1) 是一約有 5000 個左右核苷酸的雙股環形 DNA，分子量約為 3×10^6 dalton，基因組的功能包含了 (a) 從複製起始點 (ori site) (於 0.67 map unit) 開始複製。(b) 以雙方向不連續方式複製 DNA。(c) 分離子股 DNA (機制不明)。(d) 兩個步驟方式轉錄基因 (包含 early gene 與 late gene)。在早期研究發現，JCV、BKV、SV40 三種病毒的基因組分別可產生兩種 early gene 產物，即 large T 及 small T 調節蛋白 (regulatory protein)。large T 調節蛋白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 調節蛋白為 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。small T 調節蛋白的功能則尚未清楚。因最早這些蛋白是由被 SV40 感染而產生癌

症的倉鼠所產生的抗體偵測到，所以這些蛋白又稱為腫瘤抗原。

除了 early gene 外，另一個與早期基因的方向相反的晚期基因 (late gene)，共決定 4 種蛋白質 (46)。在晚期基因的 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 (17)。在 SV40，此 agnoprotein 已知具有 DNA binding 的能力 (64)，且可能參與病毒成熟步驟 (63)。最大的 open reading frame 位於 3' 端，encode 一 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。

四、多瘤性病毒結構蛋白 (structure protein)

JC 病毒的基因組轉譯三種結構蛋白 VP1，VP2，及 VP3 分子量分別是 40，37，及 26 KDa (27)。40 KDa 的 VP1 是外殼蛋白的主要部分，約佔 70-75% (123)，因此 VP1 蛋白與細胞接受體 (cell receptor)，血球凝集反應，及抗原反應 (antigenic reaction) 有很大的相關 (134)。

到目前為止，對鼠類 (murine polyoma virus) 及猿猴類 (SV40) 的多瘤性病毒研究較多，這些病毒外殼蛋白是屬 20 面體對稱。早在 1965 年研究發現 murine polyoma virus 外殼蛋白是由 12 個 five-coordinated 及 60 個 six-coordinated capsomere 所組成 (69)，而最近的 X-ray 繞射研究卻推測組成 murine polyoma virus 外殼蛋白的 72 個 capsomere 全都是 VP1 pentamer，同時這些 protein subunit 的接觸是不相等的 (103)。這些 pentamer 的聚集可能是處於一個變異的鍵結狀態，1983 年時 Klug (69) 指出這些變異可能是 VP1 蛋白在不同環境狀況下的化學修飾或是因為與外殼蛋白中少數的 VP2，VP3 結構蛋白交互作用所造成。此外目前也知道鈣離子會與病毒顆粒 associated 在一起，若加入還原劑及 chelator 會使病毒解離成 48S DNA-protein complex，及 capsomere subunit (18)。同時 virion 與 capsid 對 cellular adsorption 情形不同，也會影響 polyoma virion 在 monopinocytotic vesicle (57) 運輸到核膜 (58) 及核。polyoma virion uncoating 後會從 cell nuclear isolate 出來與 nuclear matrix associated。然後在細胞質內合成結構蛋白再送到細胞核 (41)。且這些結構蛋白的 nuclear localization signal sequence 也已經鑑定出來 (27, 28)。VP1 由於 modification 又分成 6 個 species 與其 associate minichromosome，hemagglutination activity，cellular adsorption，及 hexavalent 或 pentavalent structure 有關 (14)。SV40 的晶體結構也於 1991 年被鑑定出來 (73)，SV40 的 shell 是由 360 個 VP1 組成。形成 72 個 pentamer。這 72 個 pentamer 又由 12 個 5-coordinated pentamer 及 60 個 6-coordinated pentamer 組成。每個 VP1 subunit 的 BC，DE 及 HI loops

構成 pentamer 的 top surface，這些暴露在病毒外表的部分可能與病毒的 cellular binding，hemagglutination，及 antigenicity 有關。最近，Stehle (118) 等人找到 murine polyoma virus VP1 在感染時會與 oligosaccharide receptor 結合，而此一結合位置相對於 SV40 為 BC，DE 及 HI loops 所形成之 pocket。

五、多瘤性病毒 JC 病毒所引發的 PML 致病機轉

多瘤性病毒 JCV 是一種人類的伺機致病原，會造成少見的髓鞘脫失疾病 PML (progressive multifocal leukoencephalopathy；進行性多病灶腦白質病) (129、130)。進行性多病灶腦白質病的特性是髓質病灶逐漸的變多與擴大。在大多數進行性多病灶腦白質病的病人其免疫功能受到抑制 (19、130)，由於免疫功能的缺失，可能導致 JCV 的伺機感染 (opportunistic infection)。JCV 會破壞寡突膠細胞，寡突膠細胞負責產生中樞神經系統的髓質，是一種中樞神經系統 (central nervous system) 退化的疾病 (131、136)。

大部份進行性多病灶腦白質病的病人會有細胞免疫缺陷，符合進行性多病灶腦白質病是 JCV 所造成的中樞神經系統伺機性感染的說法。由 Willoughby 等人 (136) 發現進行性多病灶腦白質病的病人會產生細胞免疫的缺陷及不完全的抗體免疫反應 (20)。大部分病人在病程時特異性 IgG 效價沒有提高，腦脊髓液也無特異性 (13)。進行性多病灶腦白質病在臨床上頗受注意，是因為患進行性多病灶腦白質病的病人在出現症狀後的十八個月內就會死亡，有 80% 在九個月內會死亡 (136)。若是患 AIDS 又同時患進行性多病灶腦白質病通常四個月就會死亡 (114)。

現在 PML 廣泛被接受的致病機轉是 JCV 破壞製造髓質的寡突膠細胞，而使腦部功能缺損，且 JCV 通常是伺機性感染，但 JCV 是如何在人與人之間傳播及 JCV 原發性感染是在腦部或是在腎臟仍是未知，且如何抵達腦部仍有待了解。假如 JCV 一開始便潛入人體，則人體如何對付潛伏性感染都有待更進一步了解。

六、多瘤性病毒 JC 病毒致癌性

在以前研究報告指出將 BKV、JCV 及 SV40 以皮下注射、靜脈注射、腦內及腹腔內等各種不同的方式送入倉鼠體內，經常會引發腫瘤。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 (transform) (47)，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 (81)。研究顯示，將 JCV 送入倉鼠腦內，則具有高致癌性，會引發多種組織不同的腦瘤 (135、144)。約 83% 的新生倉鼠經過六個月的病毒培

養會長出腦瘤，其中 95% 的腦瘤是小腦髓質母細胞瘤（144、145）。以不同方式培養 JCV，則會引發內臟肌瘤、週邊神經母細胞瘤及松果體細胞瘤等（144）。到目前為止 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 predisone 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（74）。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（38）。

比較前人所作的研究，Uchida 等人（125）報告了新生倉鼠注入 BKV 有很高頻率發生腫瘤。以皮下注射有 79% 產生 osteosarcoma 或 insulinoma；送入腹膜內則有 64% 造成 osteosarcoma、rhabdomyosarcoma 或 insulinoma；而送入腦內則有 86% 會長出腦瘤（ependymoma、choroid plexus、papilloma、neuroblastoma、pinealoma），abdominal tumors（insulinoma、peritoneal tumours）osteosarcoma 或其他腫瘤；以靜脈注射入病毒，則會發展出惡性或轉移性的 islet cell tumors（125）。因此，BKV 和 JCV 很相似，都是會在很多地方發生腫瘤。

七、人類多瘤性病毒的流行病學(epidemiology)研究

自 1971 年 Padgett 等人從 PML 病人的腦組織分離出 JC 病毒後（99），於 1970 年中期大量篩檢一般成人血清中是否有抗 JCV 的抗體，竟高達 65%，之後陸續更從孕婦（32）及免疫抑制病人如腎臟移植的病人尿中偵測到 JC 病毒。由這些結果推測 JC 病毒可能原發性感染是在孩童時期，且是寄生於腎臟組織中，待病人處於免疫抑制狀態下 JC 病毒便活化再透過血流散佈到其它器官組織中，但至今這些結果都只是推測的，並無直接的證據。因此也有另一種說法認為 JC 病毒原發性的感染是在腦部所以至今 JC 病毒在體內傳播的情形仍有待證實。

先前的報告已知高於 70% 的成年人的體內帶有抗人類多瘤性病毒的抗體（20、30、102、120），但是在不同地區、不同族群中到底有多少帶原者，則是所知有限。Kitamura 等人（66）發表了在日本東京地區，20 歲到 29 歲的年齡群中有 45.7% 的人受 JCV 的感染。而早在 1975 年 Brown 等人篩檢一般成人血清中即發現有 70% 以上的受檢血清中有 BKV 抗體的存在。可見人類多瘤性病毒是廣泛地流行於世界各地，而 JCV 和 BKV 流行病學的分佈似乎有所不同。

八、多瘤性病毒血球凝集 (hemagglutination; HA) 的特性

在多瘤性病毒中除了SV40外，JCV 及BKV 都可使人類O型、雞及天竺鼠的紅血球產生血球凝集 (Hemagglutination ; HA) 的特性。已知 BKV 的接受體 (receptor) 是位於紅血球表面上的高分子量醣蛋白ganglioside (109、113)，而 JCV 其接受體並不清楚。血球凝集的特性可用具感染性的病毒或只有不具感染性的結構蛋白外殼 (capsid) 偵測到。而當 capsid 破壞成 capsomere 時就測不到血球凝集的現象。通常一個 HA unit 代表 3×10^6 個病毒，BKV HA 在pH 7 或更低，溫度 0至4°C及高的鹽 (NaCl) 濃度下可測得最高效價。而 JCV HA在 pH 6.5至 10.5，溫度 37 至42°C及有二價金屬離子存在下可測得穩定效價 (25)。

本研究的目的是及意義

人類 JC 病毒是人類多瘤性病毒的一種，相關的病毒包括了 murine polyoma virus, SV40, 及人類 BK 病毒及其它動物宿主之多瘤性病毒等 (123), JC 病毒廣泛的存在人類的族群中 (134)。JC 病毒的基因組轉譯三種結構蛋白 VP1, VP2 及 VP3 分子量分別是 40, 37 及 26 KDa (27)。40 KDa 的 VP1 是外殼蛋白的主要部分,約佔 70-75% (123), 由於 VP1 位於病毒顆粒表面,所以可能跟細胞接受體,血球凝集反應及抗原反應有關。

到目前為止,對鼠類及猿猴類的多瘤性病毒了解得較為多。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 (103) 及 1991 (73) 被訂定出來這些病毒外殼蛋白是對稱的二十面體構造,由 12 個 five-coordinated penton 及 60 個 six-coordinated hexon capsomere 所組成。而這些 capsomere 均由 5 個 VP1 所形成的 pentamer 構成,每個 VP1 subunit 的 BC, DE 及 HI loop 構成 pentamer 的 top surface, 這些暴露在病毒外表的部分可能與病毒的細胞接受體 (cell receptor), 血球凝集反應 (hemagglutination) 及抗原反應 (antigenic reaction) 有關。最近, Stehle (118) 等人以 X-ray 解析 murine polyoma virus VP1 在與 oligosaccharide receptor 結合之結構。細胞膜表面的 N-acetyl neuramic acid 與其感染性有關。

本論文第一部分是關於臨床血清學的檢測,人類多瘤性病毒 JCV 和 BKV 廣泛地存在於多數人的體內 (134), 在國外血清學的研究顯示大約有 70% 的成年人具有對抗病毒抗體 (20、30、102、120)。在先前本實驗室曾就正常人、孕婦及自體免疫疾病的病人等族群的尿液檢體利用 PCR 的方式進行篩檢 (24), 發現在平常人的尿液中有 13.3% (10/75), 孕婦有 26% (20/77), 自體免疫疾病病人的比率是 37.5% (18/48), 有人類多瘤性病毒的存在 (124)。但在臺灣地區尚無有關於人類多瘤性病毒血清學的研究報告。這部份的研究在於初步瞭解人類多瘤性病毒在臺灣地區感染情況, 以血球凝集抑制反應 (hemagglutination-inhibiting; HAI) 的方法偵測不同族群的血清中病毒抗體的存在性, 並建立其它臨床血清學的檢測方法如: HAI, Western blot, Dot blot。

第二部分是關於病毒殼體 (capsid) 表面可能跟紅血球凝集反應及抗原反應有關區域 (domains) 之研究。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 (29), 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 (26), 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 (氨基酸 127-148) 及 HI (氨基酸 268-278) loops 這些位於病毒顆粒表面的區域, 相似性則分別降至 54.5, 65 及 66.6%。為了更進一步了解 JCV 主要殼體蛋白 VP1 的生物特性, 包括其所可能跟紅血球凝集反應及抗原反應的區域等, 我

們設計全長 VP1 蛋白質和一連串不同長度的 VP1 蛋白片段包括殼體表面區域 BC, DE 及 HI loops 分別在昆蟲細胞及 *E.coli* 表達並進行其功能性探討。



材料與方法

昆蟲細胞培養(25)

昆蟲細胞 *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) (Clontech # 1601-1) 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 0.22 μ m 的濾膜過濾。此時 pH 約為 6.2，保存於 4 $^{\circ}$ C。胎牛血清初次使用前需先 56 $^{\circ}$ C，30 分鐘處理，將補體去活化。

JCV VP1 蛋白質的純化 (25)

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 $^{\circ}$ C，5 分鐘。上清液為病毒，保存於 -70 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C，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 \times 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 μ l/fraction 收集在 Eppendorf 離心管，測定血球凝集 (Hemagglutination)，密度，DNA 濃度，及 SDS-PAGE 分析蛋白質純度。

血球凝集試驗

先在 96 well 的 microtiter plate，加入 95 μ l PBS 到第一個 well 第一個 well，第二到第十二個 well 則加 50 μ l PBS，之後將純化之病毒殼體 (capsid) 5 μ l 加入第一個 well 後取出 50 μ l 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 μ l，最後加 50 μ l 0.5 % O 型紅血球懸浮液到每一個 well 中，混合均勻，室溫靜置 1 小時。

血球凝集抑制反應 (hemagglutination inhibition ; HAI) 偵測 antiserum

檢體血清先經由前處理，其方法如下：取 28 μ l 的血清至 eppendorf 離心管中置於 56 $^{\circ}$ C 水浴槽中 30 分鐘，inactive 補體活性，後加入 14 μ l 0.1M NaIO₄ 置於室溫 (RT) 30 分鐘，去除非特異性的抑制 (non-specific inhibitor)，再加入 14 μ l PBS-5 % glycerol。先在 96 well 的 microtiter plate，第二到第十二個 well 加 25 μ l PBS 之後，將經前處理的血清取 50 μ l 到第一個 well 後取出 25 μ l 到第二個 well，以此類推連續稀釋到第十二個 well，丟掉最後的 25 μ l，在加 25 μ l 含 8HA 的病毒殼體 (capsid) 於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，最後加 50 μ l 0.5 % O 型紅血球懸浮液到每一個 well 中，混合均勻，室溫靜置 2-3 小時。

西方墨點法偵測不同 antiserum

分別將選殖在 Δ pFlag 之 JCV VP1 基因於 JM109 中以 IPTG induction 融合蛋白表達後，取 1.5ml，12,000 rpm，30 秒，去除培養液，收集菌體並加入 100 μ l 1:4 稀釋的 SDS-PAGE sample buffer (1 % SDS，8 % glycerol，5 % β -mercaptoethanol，0.01 % bromophenol blue)，在 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮沸 5 分鐘，再以超音波震盪打斷 DNA，取出 5 μ l 以 12.5 % SDS-PAGE 分析。再將 SDS-PAGE 用 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/cm²，40 分鐘條件下轉印到 nitrocellulose paper 上，再用 10 ml 5 % 脫脂牛奶搖動，使均勻混合 blocking 30 分鐘。再分別加入來自昆蟲細胞產生的病毒殼體 (capsid) 所製成的抗體 anti-JCV capsid 抗體及由 *E. coli* 產生的兔子 anti-JCV VP1/ Δ pFlag、人類 JCV positive serum 及兔子 preimmunized serum (3000 倍稀釋)，室溫下搖 30 分鐘。再用 TBS-0.01 % Tween-20 洗三次，每次五分鐘。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，每次 5 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，每次 5 分鐘。最後加 diaminobenzidine solution (DAB，0.01 % final concentration)，及 H₂O₂ (0.012 % final concentration) 呈色分析。

Dot immunoblotting

將由昆蟲細胞純化出的病毒殼體 1 μ g，分別給予 2 % SDS 與 5 % β -mercaptoethanol 處理以及不處理後將抗原病毒殼體點 nitrocellulose paper 上，置於室溫風乾，再用 10 ml 5 % 脫脂牛奶搖動，使均勻混合 blocking 30 分鐘。再加入兔子 anti-capsid、兔子 anti-JCV VP1/ Δ pFlag、人類 JCV positive antiserum 及兔子 preimmunized serum (3000 倍稀釋)，室溫下反應 30 分鐘。再用 TBS-0.01 % Tween-20 洗三次，每次 5 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，每次 5 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，每次 5 分鐘。最後加 diaminobenzidine solution (DAB ， 0.01 % final concentration) ，及 H₂O₂ (0.012 % final concentration) 呈色分析。

人類血清來源

1. 孕婦：此部份的血清檢體來自懷孕第二或第三期的健康孕婦，檢體來自臺中市私立中山醫學院附設醫院婦產科，由中山醫學院附設醫院免疫風濕科蔡榮泰醫師協助收集，共有 100 個血清檢體。

2. 自體免疫疾病病人：由中山醫學院附設醫院免疫風濕科蔡榮泰醫師協助收集紅斑性狼瘡 SLE (systemic lupus erythematosus) 、類風濕性關節炎 RA (rheumatoid arthritis) 、皮膚炎/多發性肌炎 DM/PM (dermatomyositis /polymyositis) 、修格連氏症候群 SS (Sjogren's syndrom) 、成人型史迪爾氏疾病 (Adult Still's disease) 等病人的血清檢體，共有 81 個血清檢體。

3. 健康人：由私立中山醫學院醫事技術學系八十一級同學及本實驗室成員，共 221 人提供血清檢體。

4. 兒童：由中山醫學院附設醫院小兒科呂克桓醫師協助收集，共有 713 個血清檢體。

血球凝集抑制反應 (haemagglutination inhibition ; HAI)

檢體血清先經由前處理，其方法如下：取 28 μ l 的血清至 Eppendorf 離心管中置於 56 °C 水浴槽中 30 分鐘，inactive 補體活性，後加入 14 μ l 0.1M NaIO₄ 置於室溫 (RT) 30 分鐘，去除非特異性的抑制 (non-specific inhibitor) ，再加入 14 μ l PBS-5 % glycerol 。先在 96 well 的 microtiter plate ，第二到第十二個 well 加 25 μ l PBS 之後，將經前處理的血清取 50 μ l 到第一個 well 後取出 25 μ l 到第二個 well ，以此類推連續稀釋到第十二個 well ，丟掉最後的 25 μ l ，在加 25 μ l 含 8HA 的病毒殼體 (capsid) 於 37 °C 反應 1 小時，最後加 50 μ l 0.5 % O 型紅血球懸浮液到每一個 well 中，混合均勻，室溫靜置 2-3 小時。

E.coli 表達載體

本實驗所用的表達載體是 pGEX4T 購自 Pharmacia 公司，其上含有一 Glutathione-S-transferase (GST) 的基因，此載體提供了一個可供表達及純化偵測的系統，此載體上包含了一個 tac 啟動子 (promoter) ，可被化學物 Isopropyl

beta-D-thiogalactoside (IPTG) 誘發(induction)，同時提供了 ampicillin 及 lac Iq 兩個可供篩選的標記。 Multiple cloning site 緊接在 GST 基因之後，因此當蛋白質表現出來後，是以一融合蛋白的形式，即 GST 後接著所要的蛋白質。

另一個表達載體是 pQE-30 購自 QIAGEN 公司，其上含有六個 histidine 的基因及 phage T5 啟動子可被化學物 Isopropyl beta-D-thiogalactoside 誘發，同時也提供了 ampicillin 可供篩選的標記， multiple cloning site 緊接在六個 histidine 基因之後使得表達之蛋白質可藉由 Ni-NTA column 純化得到。

VP1 基因之選殖

1. VP1 基因之 PCR

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 *Bam*HI 選殖位置 (26)。此含有 JCV VP1 基因的 pGEX-4T-1 質體已轉殖 (transformation) 到 *E. coli* JM109 內將此 *E. coli* 接種到含有 ampicillin (100 µg/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 JCV VP1/pGEX-4T -1 質體。取出 1 µl plasmid DNA 當模板 (template) 再加入 JCV VP1 S1G (sense) primer 2 µl (20 pmole)，及 JCV VP1 AS1G (antisense) primer 2 µl (20 pmole) 及 8 µl 2mM dNTP (dATP，dTTP，dCTP，dGTP)，5 µl final concentration 2.5mM MgCl₂，5 µl 10X Taq Buffer，Taq enzyme 0.5 µl 及 ddH₂O 26.5 µl 共 50 µl 的反應物，最後再加入 30 µl 的礦物油。放入 thermocycler 中反應。反應條件如下: 95 °C，2 分鐘，1 個循環，95 °C，45 秒；55 °C，2 分鐘；72 °C，2 分鐘，共 35 個循環。其它不同長度的 VP1 及 BC、DE、HI loops 的基因也是以 JCV VP1/pGEX-4T-1 plasmid DNA 當模板再加入不同的引子 (Table 4) 以 PCR 將基因放大。

PCR 產物的純化是利用 QIAGEN gel elute Kit (QIAGEN)。首先將 PCR 產物 50 µl 去跑 1% agarose gel 電泳，切出含不同長度的 VP1 及 BC、DE、HI loops 基因的 band 裝在 Eppendorf 離心管，加入 Buffer QX1 將 gel 溶解，再加入一種可結合 200 base pairs 至 20 kilo base pairs DNA 的 resin 10 µl 混合均勻，並放於 56°C 水浴槽 incubation 10 min，後離心 12,000 rpm，30 秒移去上清液，再以 500 µl Buffer QX1 清洗一次，離心 12,000 rpm，30 秒移去上清液，緊接著以 500 µl 清洗液 (buffer PE) 清洗兩次，後以 air-dry 方式乾燥 pellet，最後加入預熱 60-70 °C 的滅菌水 40 µl 等一分鐘再離心 12,000 rpm，30 秒，則 DNA 產物便回收在水溶液中。

為方便接入載體中，所以須將回收的 DNA 產物兩端 blunt end VP1 DNA 利用 *Bam* HI 切成 stagger end 先將 JCV VP1 回收產物取出 42 μ l，加入 3 μ l/30 units 的 *Bam* HI enzyme (Promega)，再加入 5 μ l 10X Buffer，於 37 $^{\circ}$ C 反應 4 小時。再用 WizardTM DNA Clean Up System (Promega) 回收產物，將被 *Bam* HI，處理過的 PCR 產物加入 resin 1 ml，混合均勻，通入接在針筒前端的 column 將 DNA 留在 column 的 resin 上，再以 2ml 80% isopropanol 清洗，離心 12,000 rpm，20 秒將殘餘的 isopropanol 去除，最後加入預熱 60-70 $^{\circ}$ C 的滅菌水 40 μ l 至 column 中等 1 分鐘再離心 12,000 rpm，20 秒，則可獲得產物。

2. DNA 載體的 CIP 處理

含有 pGEX-4T-1 質體的 *E. coli* 菌株，培養在含 ampicillin (100 μ g/ml) 的 5 ml 已滅菌 L broth 中，37 $^{\circ}$ C，200 rpm 的轉速，隔夜培養。取出 1.5 ml 的菌液，以 WizardTM Minipreps DNA purification system (Promega) 純化出 50 μ l，約 10 μ g 的 pGEX-4T-1 質體，取出 40 μ l plasmid DNA 加入 5 μ l (10 unit/ μ l) *Bam* HI，再加入 5 μ l 10x buffer，在 37 $^{\circ}$ C 水浴下切割 3 小時。再加入 1 unit calf intestinal phosphatase (CIP) 及 6 μ l 10x buffer 於 37 $^{\circ}$ C 水浴反應 1 小時，以切除 5' 端的磷酸根。再於 72 $^{\circ}$ C 下水浴以破壞 CIP 的活性。以 1% agarose 電泳分析，切下 4969 bp 的 pGEX-4T-1 質體片段。以 QIAGEN gel elute Kit (QIAGEN) 純化 pGEX-4T-1 質體 DNA 的片段，即可用於基因選殖。以相同的方法處理另一個 DNA 載體 pQE-30。

3. 基因接黏 (ligation)

取 *Bam* HI 及 CIP 處理過 pGEX-4T-1 質體 1 μ l 約 20 ng，加 *Bam* HI 處理過的 JCV VP1BC、DE、HI loops insert 3 μ l 約 30 ng，再加入 1 μ l T4 DNA ligase (3 units)，1 μ l 10x buffer 及 5 μ l H₂O 共 10 μ l 於 15 $^{\circ}$ C 隔夜 ligation 反應。將此質體命名為 pGEXJCV1BC、pGEXJCV1DE、pGEXJCV1HI。以相同的方法選殖不同長短 JCV VP1 的基因到 pQE-30 DNA 載體。

E. coli 轉殖

Competent cell 的製備：將 *E. coli* JM109 接種於 5 ml 已滅菌的 L broth 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，5 分鐘，丟掉上層液，再用低溫已滅菌 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 $^{\circ}$ C，5 分鐘，移去上清液，加入已滅菌的低溫 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：取 0.1 ml 的 competent cell 加到 10 μ l ligate，冰浴靜置 30 分鐘，接著 42 $^{\circ}$ C 水浴 heat shock 3 分鐘。冰浴靜置 5 分鐘。再直接塗到含 ampicillin (100 μ g/ml) 的 LB agar plate 上，37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養隔夜。

重組基因之篩選

挑出長在含 ampicillin 的 LB agar plate 上的菌落，接種在含有 100 μ g/ml ampicillin 5 ml L broth，37 $^{\circ}$ 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 μ l 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 μ l 新鮮配製的 lysis solution (2 % SDS μ l，1 N NaOH μ l，H₂O μ l)，上下混合離心管，此時可見菌液呈清澈透明狀，再加入 150 μ l 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 μ l RNase (1 mg/ml)，37 $^{\circ}$ C 水浴，1 小時，以移去 RNA。再加入 500 μ l 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 μ l saturated phenol 及 250 μ l 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 μ l 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 倍體積低溫的絕對酒精，置於 -70 $^{\circ}$ C，30 分鐘，使質體沉澱。接著離心 16,000 rpm，4 $^{\circ}$ C，20 分鐘。倒掉上清液後，以 80 % 低溫酒精潤濕，於 Speed-Vac 5 分鐘乾燥，再溶於 50 μ l 已滅菌的 ddH₂O。

Restriction mapping

先在乾淨的 Eppendorf 離心管加入 4 μ l 已滅菌的二次去離子水，再加入 4 μ l 純化出的質體 DNA，再加入 1 μ l 10x buffer，1 μ l (10 units) 的限制酶，混合均勻後，於 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 2-3 小時。之後加入 2 μ l 的 6x loading dye，取出 6 μ l 於 1 % agarose 電泳分析。

DNA 序列分析

分析選殖之病毒結構蛋白基因 DNA sequence 是採用從廠商處購得的 DNA Sequenase Sequencing Kit (UBS)，首先將篩選到含有正接的選殖之病毒結構蛋白基因於載體中的菌種 37 $^{\circ}$ C，隔夜培養於含 ampicillin (100 μ g/ 1ml) 5 ml 的 L broth 中，次日則利用廠商購得的 WizardTM Minipreps DNA purification system

(Promega) 抽出載體提供分析，所用的引子 (primer) 是根據所接入載體序列所設計的，其序列如下：

pGEX N-25 (sense primer) : 5' GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG T 3'

pGEX C-25 (antisense primer) : 5' CAG ACA AGC TGT GAC CGT CTC CGG T 3'

pQE N-25 (sense primer) : 5' CAA TTT CAC ACA GAA TTC ATT AAA G 3'

pQE C-25 (antisense primer) : 5' GAT CTA TCA ACA GGA GTC CAA GCT C 3'

1. Sequencing gel 的製作

本實驗所使用的系統是 Bio-Rad Sequi-Gen Sequencing Cell (38 cm × 50 cm × 0.4 mm)。Gel solution 是 5 倍的 TBE 24 ml 加 40 % acrylamide 24 ml 加 2 % bis-acrylamide 24 ml 加 51g 的 urea，然後加水至 120 ml，待其溶解，以 0.45 μm 的 filter membrane 過濾。Sequencing gel 的封底是用 gel solution 20 ml 加 10 % APS (ammonium persulfate) 500 ul 加 TEMED 50 μl，而 running gel 是 gel solution 100 ml 加 10 % APS 475 μl 加 TEMED 90 μl。gel 作好後，至少要等上一個小時，讓它可以完全 polymerization。

2. Sequence reaction

a. Denature of double strand DNA

將純化之 DNA 取 18 μl (3-4 μg) 至 Eppendorf 離心管，加入 2 μl 含 2M NaOH，2mM EDTA 溶液，室溫下反應 5 分鐘。在加入 2 μl 含 2M ammonium acetate (pH 4.6)，中和 (neutralize) 後。加入 75 μl ethanol，混合均勻，置於 -70 °C，10 分鐘，離心 16,000rpm，10 分鐘，去除上清液再以 70 % ethanol 清洗，離心 16,000rpm，2 分鐘，去除上清液，air-dry pellet，溶於 7 μl 已滅菌的 ddH₂O。

b. Annealing

取 7 μl denature DNA，加入 2 μl 5X reaction buffer 及 1 μl 個別的引子 (primer，1-5 pmol)，置於 65 °C 水浴槽中 2 分鐘後，在 15-30 分鐘降至 35 °C 置於冰上。

c. Prepare termination tubes，labeling mix and sequenase enzyme

接著標示 Eppendorf 離心管並分別在每管加入 2.5 μl termination mixture (ddG，ddA，ddT，ddC/dNTP)。及分別稀釋 5X labeling mix 和 8X sequenase enzyme 到 working concentration。

d. Labeling reaction

取 10 μl annealed DNA mixture，加入 1 μl 0.1M DTT，2 μl Diluted labeling mix，0.5 μl [α³⁵S] dATP，2μl Diluted sequenase polymerase，混合均勻，於室溫反應 2-5 分鐘。

e. Termination reaction

將 termination tubes 預熱在 37 °C，1 分鐘，每個 termination tubes 加入 3.5 μ l labeling mixture，混合均勻置於 37 °C 反應 5 分鐘後加入 4 μ l stop solution。

3. Run sequence gel

將反應完成之產物取 3 μ l loading 於 7 M urea 的 8% acrylamide gel，1800V 下進行電泳，乾膠後以柯達 X 光底片壓片並置於 -70°C 進行放射顯影。

誘發VP1蛋白在 *E.coli* 內之表現

由於所用的載體是 pGEX4T 其為 expression vector，前有 tac promoter 所以當載體中有接入選殖之病毒結構蛋白基因時，可被 (IPTG) 誘導出高表達的 GST 及病毒結構蛋白的融合蛋白。將含有正接選殖之病毒結構蛋白基因於載體的 *E.coli* 於含有 ampicillin (100 μ g/1ml) 的 5 ml L broth 37°C 隔夜培養，次日取出 0.5 ml 菌液加入 50 ml L broth，於 37°C 培養約 2-3 個小時至 O.D 600 值到達 0.4-0.6 然後加入 10 μ l 0.5M IPTG (final concentration 1mM) 於 37°C incubator 培養 3 個小時後取出 1.5 ml 菌液，離心 12,000rpm，5 分鐘。

選殖基因蛋白的溶解度試驗

收集經誘發 VP1 之 *E.coli* 加入 Tris buffer saline (TBS) 將菌體打散再用超音波 (sonication) 將菌體打破之後離心 15,000 rpm，10 分鐘，取出上層液，再加入 TBS 於沉澱物中，均勻打散沉澱物，然後分別取出 7 μ l 可溶及不可溶部分加入 SDS-PAGE sample buffer 於 100°C 沸水中煮沸 5 分鐘，於 12.5% 的 SDS-PAGE 電泳觀察重組蛋白之溶解情形。

純化含 GST 及 poly-His 之 VP1 蛋白

1. Affinity column

a. GST column

將篩選到含有 VP1 及其片段基因於 pGEX4T-1 載體中的 *E.coli*，誘導融合蛋白的表現，4 小時後，離心 5,000 rpm，15 分鐘收集 1 liter 菌液菌體，再用 TBS 均勻打散菌體以清洗，離心 5,000 rpm，15 分鐘收集沉澱物再用 TBS 均勻打散菌體再清洗一遍，同樣離心 5,000 rpm，15 分鐘，再將菌體用 10 ml TBS 打散，然後加入 5mg Lysozyme 於室溫反應半小時，再用超音波均勻的打破菌體，然後離心 5,000 rpm，15 分鐘，取出上清液，通入 glutathione cross-linked 4% agarose beads (Sigma) 的 Affinity column 然後用 1X TBS 清洗，直到流出 column 的廢液 O.D 280 的值小於 0.003，然後再一次通入 1ml reduced form glutathione buffer (50mM Tris, 5mM glutathione，pH 8.0) 將蛋白 elute 出來。

b. Ni-NTA column

將篩選到含有不同長短JCV VP1基因於 pQE-30 載體中的 *E.coli*，O.D 600 值達 0.4-0.6 再加入 1mM IPTG (final concentration)，誘導融合蛋白的表現，四小時後，離心 5,000 rpm，15 分鐘收集 1 liter 菌液之菌體，再用 TBS 均勻打散菌體以清洗，離心 5,000 rpm，15 分鐘收集沉澱物再用 TBS 均勻打散菌體再清洗一遍，同樣離心 5,000 rpm，15 分鐘。加入 5 ml buffer A (6 M GuHCl, 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tirs/HCl, pH 8.0)，於室溫反應一小時，離心 10,000 xg，15 分鐘收集上清液，通入 Ni-NTA rise 的 affinity column 重複將上清液通入 Ni-NTA column 三次，後用 10 倍 column 體積的 buffer A 清洗，再以 5 倍 column 體積的 buffer B (8M urea, 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tirs/HCl, pH 8.0) 清洗，直到流出 column 的廢液 O.D 280 的值小於 0.01，再通入 buffer C (8M urea, 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tirs/HCl, pH 6.3) 清洗，直到流出 column 的廢液 O.D. 280 的值小於 0.01，然後依序以 buffer D (8M urea, 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tirs/HCl, pH 5.9)、buffer E (8M urea, 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tirs/HCl, pH 4.5)、buffer F (6 M GuHCl, 0.2 M acetic acid) 各 3ml，將蛋白 elute 出來。

2. Electroelution

將表達VP1 DE及HI 蛋白的 *E.coli* 菌體，加入 SDS-PAGE sample buffer 200 μ l 於 100°C 加熱 5 分鐘，於 12.5% 的 SDS-PAGE 上以 200 V，4.5 小時條件下分離蛋白，之後以 Coomassie blue (50% methanol, 10% acetic acid, 0.1 % Coomassie blue) 染色 10 分鐘，再用脫色溶液脫色 (50% methanol, 10% acetic acid) 然後用刀片切下正確位置約 32 及 33 Kd 處含有融合蛋白的膠，此蛋白並未在沒有 IPTG 誘導的 *E.coli* 出現以此判定為 GST-DE、GST-HI 蛋白。用刀片將該膠體切成細片，放入含有 10mM Tris-acetate pH 8.6，0.05% SDS 溶液的 cup 中，cup 外所加入的是 40mM Tris-acetate pH 8.6，0.05% SDS 的溶液，將 GST-DE、GST-HI 融合蛋白於 3 watts，5 小時的電力，將 GST-DE、GST-HI 融合蛋白從膠中萃取出來。

蛋白質濃度測定

將利用 affinity column 或 electroelution 方法純化出的融合蛋白，測量蛋白質濃度。所使用的是廠商所生產的試劑 Bio-Rad Protein Assay，其原理是利用一可與蛋白質結合的染料與蛋白質作用後在 595nm 的波長下比色，依據吸光度來計算蛋白質的濃度，測定之初先用一已知濃度的 BSA (bovine serum albumin) 溶液訂出標準曲線，sample 中的蛋白質與試劑反應比色後可在標準曲線中依據 O.D. 值算出蛋白質的濃度。

兔子抗VP1蛋白抗體之製備

於免疫兔子前先取兔子血,再將純化出的 GST、GST-BC、GST-DE、GST-HI 融合蛋白 200 μ g (於 Tris buffer pH 7.2 溶液中) 與 1 ml complete Freund's Adjuvant 以超音波 (sonication) 方式混合後全部注入兔子皮下,7 天後追加注射 (booster) 第一次,所追加的量是 100 μ g 融合蛋白與 1 ml incomplete Freund's Adjuvant 同樣以超音波方式混合,然後注入皮下,再隔7 天後追加注射第二次,追加的量與第一次追加的量相同,再隔 7 天後,第一次取血 (bleeding) 約 30 ml,再相隔 7 天後追加注射第三次,所注射的量與第一、二次的量相同,再相隔 7 天後追加注射第四次注射量與前三次相同,後將兔子每隔 7 天連續取血 5 次每次 30 ml。

VP1 蛋白片段抗體與殼體之競爭殼體抗體試驗

首先將病毒殼體免疫兔子產生之抗體分別稀釋成 50、100、200、400、800 倍,後分別加入 4 μ g 病毒殼體蛋白質、含有 BC loop 蛋白質(JCVP1 AS5) 及不含有 BC loop 蛋白質(JCVP1 Δ BC), 37 $^{\circ}$ C 反應一小時。另外取 2 μ g 病毒殼體點到 nitrocellulose paper 上,置於室溫風乾,再用 5% 脫脂牛奶搖動,使均勻混合室溫下 blocking 30 分鐘。再加入先前處理之抗體 50 μ l 到 2 ml 5% 脫脂牛奶,室溫下搖 30 分鐘。再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次,每次五分鐘。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,每次五分鐘,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,每次五分鐘。最後加 diaminobenzidine solution (DAB, 0.01% final concentration), 及 H₂O₂ (0.012% final concentration) 呈色分析。

醣類分子與紅血球競爭殼體試驗

先在 96 well 的 microtiter plate, 第二到第十二個 well 加 25 μ l PBS 之後,分別取不同的醣類分子 3'-sialyl lactose (1 μ g/ μ l; 3'-Acetylneuramin-lactose; Sigma)、6'-sialyl lactose (1 μ g/ μ l; 6'-Acetylneuramin-lactose; Sigma)、sialic acid (10 μ g/ μ l; N-Acetylneuraminic acid; Sigma)、ganglioside (1 μ g/ μ l; Sigma)、 α -lactose (10 μ g/ μ l; Sigma)、 β -lactose (10 μ g/ μ l; Sigma) 50 μ l 到第一個 well 後取出 25 μ l 到第二個 well, 以此類推連續稀釋到第十二個 well, 丟掉最後的 25 μ l, 在加 25 μ l 含 8 HA 的病毒殼體於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時,最後加 50 μ l 0.5% O 型紅血球懸浮液到每一個 well 中,混合均勻,室溫靜置 2-3 小時。

以血球凝集試驗分析人類 O 型紅血球表面之醣類分子

先取人類 O 型紅血球分別給予 neuraminidase (1U/ml)、PBS 處理及未處理於 37 °C 反應 1 小時，再用 PBS 洗三次，每次離心 1,500 rpm ， 5 分鐘，再做血球凝集試驗。另外將以 neuraminidase (1U/ml) 處理過之人類 O 型紅血球，加入 ganglioside (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 於 37 °C 反應 6 、 12 、 16 、 18 、 20 、 24 、 30 小時，再用 PBS 洗三次，每次離心 1,500 rpm ， 5 分鐘，再分別以血球液凝集試驗分析。

結 果

一、JC 病毒抗體反應性之探討

JC 病毒殼體可用在臨床偵測抗體，但是由於該抗原與抗體之間的反應性尚無研究報告，因此我們藉由 hemagglutination inhibition 及 immunoblot 的方法瞭解其間反應。

1. 血球凝集抑制反應偵測各種 antisera

由於 JC 病毒殼體蛋白具有血球凝集的特性，所以當其免疫動物或被感染人體所產生之 antiserum 便具有血球凝集抑制的現象。由 Table 1 的結果發現兔子 anti-capsid 及人類 JCV positive antiserum 相同皆具有血球凝集抑制的現象，但兔子 anti-JCV VP1/ Δ pFlag 抗體 (anti-denatured VP1 serum) 不具有血球凝集抑制的現象。

2. 西方墨點法偵測不同 antisera

由血球凝集抑制反應的結果發現 native 與 denatured 抗原所產生的抗體反應有所不同，可能是血球凝集抑制反應會有些干擾。所以我們利用較專一性的西方墨點法 (Western blot) 偵測不同 antiserum (圖 2)。意外發現兔子 anti-capsid 對 denatured VP1 辨識非常弱 (圖 2, lane 2)，接近正常血清非專一性反應 (圖 2, lane 3)，人類 JCV positive antiserum 完全無法辨識 denatured VP1，但由 denatured VP1 所產生的抗體卻如預期與 denatured VP1 有強烈反應 (圖 2, lane 1)。

3. Dot immunoblotting 偵測不同 antisera

以上 HAI 及 Western blot 得知 native 及 denatured VP1 對抗體反應截然不同，因此，我們更進一步利用 dot blot 證實以上的兩個實驗。

我們將由昆蟲細胞純化出的病毒殼體 1 μ g，分別給予 2%SDS 與 5% β -mercaptoethanol 處理以及不處理後將抗原病毒殼體 (native VP1) 點在 nitrocellulose paper 上，利用 dot immunoblotting 分析發現兔子 anti-JCV VP1/ Δ pFlag 抗體 (anti-denatured VP1) 可與 native VP1 (圖 3A, Dot 1) 及 denatured VP1 (圖 3A, Dot 2) 反應。但兔子 anti-capsid 抗體對 native VP1 反應強烈 (圖 3B, Dot 1)，對 denatured 病毒殼體蛋白 (圖 3B, Dot 2) 反應非常弱。而人類 JCV positive antiserum 與兔子 anti-capsid 相類似 (圖 3D, Dot 1 及 2)。

由以上HAI 及 immunoblotting 的結果得知受 JC病毒感染的人體血清抗體只能與 native 的 capsid 反應。因此可利用 HAI 及 dot blot 作為臨床篩檢之用而不能以 Western blot分析。

二、臨床血清篩檢

在過去本實驗室結果顯示在臺灣受測孕婦尿液中有26.0%出現JC病毒，37.5%自體免疫疾病病人尿液及13.3%健康人的尿液中有JC病毒存在(24、29、124)。然而這些不同族群尿液中排放不同比率的JC病毒是否因不同免疫狀況或因不同感染率引起的差異，仍然不能確定。因此我們利用HAI探討這三個族群受JC病毒感染的情況，結果發現74.66%(165/221)健康人，78%(78/100)的孕婦及76.54%(62/81)自體免疫疾病的病人為JC病毒抗體陽性反應(Table 2)。此結果說明在臺灣受測的不同族群JC病毒感染率大致為76%與先前國外的報告(17、30、102)相近。

過去國外的報告顯示JC病毒感染大多發生在兒童時期(5)。然而在臺灣地區兒童受JC病毒感染的情況尚不明瞭。因此我們偵測713名兒童(0-11歲)血清，結果發現約46.5%的檢體為JC病毒抗體陽性(Table 3)而且年齡愈高陽性率愈高的趨勢(Table 3及圖4)。

三、JC 病毒主要殼體蛋白 VP1 免疫反應區之探討

JC 病毒包含主要結構蛋白 VP1 (75%)，次要結構蛋白 VP2 (5%)，VP3 (5%)及基因組(minichromosome)(123)。由於JC病毒在體外繁殖困難，因此對該病毒之生理及病理研究相對減少。過去我們已成功地將JC病毒之主要結構蛋白VP1分別選殖及表達於*E.coli*(26)及昆蟲細胞(25)，以利於對JC病毒做進一步的生理及病理研究。猿猴類多瘤性病毒SV40主要結構蛋白VP1之立體結構已被解析出來(73)(圖5)。而JC病毒VP1與SV40VP1之氨基酸序列相似性高達77.3%(46)。因此SV40VP1之立體結構提供JC病毒VP1良好的參考模型。臺灣三號JCVP1與SV40VP1相比對(26)(圖6)。可推測出JC病毒VP1立體結構相關之部位(domains)。例如JC病毒VP1氨基酸36-90(BC loop)，91-153(DE loop)及234-288(HI loop)可能暴露於病毒顆粒表面，進而與外界產生反應作用，JC病毒與外界產生反應作用包括其專一性地與腦神經細胞之接受體(receptor)，進而感染該細胞。另外JC病毒亦可與紅血球結合而導致血球凝集及引發抗體反應。因此BC，DE及HI loops在致病機轉可能扮演重要角色。也因此我們將一系列VP1蛋白片段(圖7)分別在*E.coli*中表達，以利探討VP1之反應區。

1. JC 病毒 VP1 BC , DE 及 HI peptides 於 *E.coli* 內之表達

為了選殖 BC (氨基酸 57-90) , DE (氨基酸 127-148) 及 HI (氨基酸 268-278) loop peptide 於 *E.coli* 中, 我們利用 PCR 將這三段 VP1 DNA 片段放大。所使用的引子分別列在表四。然後將這三段 DNA 片段分別放入 pGEX4T-1 表達質體 (plasmid) 並 transformation 到 *E.coli* 內。這三段 VP1 於 *E.coli* 表達的情形以 SDS-PAGE 做為初步分析。圖 8, lane 4, 5 及 6 分別為 BC, DE 及 HI 於 *E.coli* 中表達的情形。由於與 GST 蛋白融合, 因此其分子量大約為 33 KDa。

2. BC, DE 及 HI peptides 之純化

由於 GST-BC 於 *E.coli* 中表達為可溶性, 因此我們利用 glutathione affinity column 將 BC peptide 純化 (圖 9, lane 2)。另外, GST-DE 及 GST-HI 為不可溶性, 因此我們利用 electroelution 的方法將之純化。圖 9, lane 3 及 4 分別為純化之 GST-DE 及 GST-HI 融合蛋白。

3. BC, DE 及 HI peptides 與抗全長 VP1 抗體之免疫反應

為了初步了解 JC 病毒顆粒表面區 BC, DE 及 HI loops 與抗 VP1 抗體之反應性, 我們以西方墨點法進行分析, 結果發現如預期的抗 VP1 抗體可與全長 VP1 有反應 (圖 10, lane 1)。意外發現 BC, DE 及 HI peptides 中只有 BC 與抗 VP1 抗體有反應 (圖 10, lane 4), 而 DE 及 HI peptides 與抗 VP1 抗體沒有反應 (圖 10, lane 5 及 6)。

4. 抗 BC, DE 及 HI peptides 抗體與全長 VP1 之反應性

為了進一步了解 BC, DE 及 HI loops 抗體與全長 VP1 之間的反應性。我們利用 glutathione affinity column 及 electroelution 方法純化出之 BC, DE 及 HI peptides 分別去免疫兔子產生抗體。再以西方墨點法進行分析, 結果發現由 BC peptide 所產生的抗體可與全長 VP1 及 BC 本身有反應 (圖 11A, lane 1 及 4), 而 DE 及 HI peptides 所產生的抗體對於全長 VP1 皆沒有反應 (圖 11B 及 C, lane 1)。另外, 我們也將 glutathione affinity column 純化出之 GST 蛋白免疫兔子產生抗體, 並以西方墨點法進行分析, 如預期的只與帶有 GST 融合蛋白及 GST 本身有反應 (圖 11D, lane 2, 4, 5 及 6), 而與全長 VP1 沒有反應 (圖 11D, lane 1)。

5. 以 dot blot 分析抗 BC, DE 及 HI peptides 抗體與 native VP1 殼體之反應性

由於 Western blot 實驗中其全長 VP1 屬於 denatured 狀況下的反應。而且在此之前實驗中發現 native 及 denatured VP1 對抗體反應截然不同, 因此, 我們更進一步利用 dot blot 證實。結果發現抗 VP1 抗體可與 native VP1 殼體有反應 (圖 12, spot 1)。而抗 BC, DE 及 HI peptides 抗體只有抗 BC 抗體與 native VP1 殼體反應 (圖 12, spot 2), 而抗 DE 及 HI 抗體與 native VP1 殼體沒有反應 (圖 12, spot 3 及 4)。

由以上 Western blot 及 dot blot 的結果發現抗 VP1 抗體只和 BC peptide 有反應，而抗 BC，DE 及 HI peptides 抗體中也只有抗 BC peptide 抗體對 native 及 denatured VP1 有反應。所以我們可以初步證明 BC loop 為病毒殼體的 surface epitope。

6. VP1 蛋白其他片段之表達

為了更進一步證明 BC peptides 為病毒殼體的 surface epitope，所以我們選殖其他不同長度的 VP1 片段 (AS2 : 1-252 ; AS3 : 1-202 ; AS4 : 1-152 ; AS5 : 1-90 ; Δ BC : 91-355) 於 *E.coli* 中。利用 PCR 方放大出不同長度的 VP1 DNA 片段，所使用的引子分別列在表四。然後將這些不同長度的 VP1 DNA 片段分別放入 pQE-30 表達質體並 transformation 到 *E.coli* 內。這些不同長度的 VP1 DNA 片段於 *E.coli* 表達的情形以 SDS-PAGE 做為初步分析。圖 13，lane 3，4，5，6，7 及 8 分別為 WT，AS2，AS3，AS4，AS5 及 Δ BC VP1 片段於 *E.coli* 中表達的情形。

7. VP1 蛋白片段之純化

由於不同長度的 VP1 DNA 片段放入之 pQE-30 表達質體會表達出帶有 poly-His 的融合蛋白，所以我們可用 Ni-NTA affinity column 分別純化得到不同長度的 VP1 的蛋白並以 SDS-PAGE (圖 14A) 及 Western blot (圖 14B) 鑑定分析。

8. VP1 蛋白片段與病毒殼體競爭抗病毒殼體抗體

在前面實驗初步證明 BC loop 為病毒殼體的 surface epitope。接下來我們以含有 BC loop 及不含有 BC loop VP1 蛋白片段分別與病毒殼體競爭抗病毒殼體抗體，並以 dot blot 分析。結果發現含有 BC loop VP1 蛋白片段 (AS5) 與病毒殼體競爭抗病毒殼體抗體效果明顯 (圖 15A, panel B)，而不含有 BC loop VP1 蛋白片段 (Δ BC) 與病毒殼體競爭抗病毒殼體抗體效果不明顯 (圖 15A, panel C)。由本實驗及前面實驗結果證明了 BC loop 為病毒殼體主要 surface epitope。

四、與 JC 病毒結合之紅血球表面醣類分子之研究

在多瘤性病毒中除了 SV40 外，JCV 及 BKV 與其它動物宿主的多瘤性病毒具有與人類 O 型、雞及天竺鼠的紅血球結合之血球凝集的特性。已知 BK 病毒的接受體 (receptor) 及紅血球表面上的 ganglioside (109、113) 能與 BKV 結合。在最近，Stehle (118) 等人以 X-ray 解析 murine polyoma virus VP1 在與 oligosaccharide receptor 結合時發現其與帶有 sialic acid 之醣分子有結合的能力。而 JC 病毒其紅血球結合之接受體至今並不清楚。所以我們利用以下實驗證明 JC 病毒與紅血球之間是否藉由糖分子結合。

1. 去除 sialic acid 後之紅血球與JC 病毒結合情形

我們利用可將 sialic acid 去除之 neuraminidase 處理人類O型紅血球後，觀察其與 JCV 病毒殼體結合產生血球凝集現象，我們發現 neuraminidase 處理 60 分鐘以上之人類O型紅血球會失去與 JCV 病毒殼體結合的能力 (Table 5)。由此可推測 sialic acid 可能參與JC 病毒和紅血球之結合。

2. Ganglioside 對 neuraminidase 處理之紅血球與JC 病毒結合情形

由上述實驗推測 sialic acid 可能參與 JC 病毒和紅血球之結合。所以我們進一步將已用 neuraminidase 處理過之人類 O 型紅血球加入含有 sialic acid 之 ganglioside 糖分子處理後，觀察其與 JCV 病毒殼體結合產生血球凝集現象結果發現加入 ganglioside 糖分子處理 8小時以上之人類O型紅血球開始恢復與 JCV 病毒殼體結合的能力，在20小時後可完全恢復與 JCV 病毒殼體結合的能力(圖16)。由此我們證實了 sialic acid 參與JC 病毒和紅血球之結合。

3. 各種糖分子與紅血球競爭JC 病毒試驗

在知道 sialic acid 參與JC 病毒和紅血球之結合。我們進一步想了解其他糖分子是否也參與紅血球和JC 病毒之結合。所以我們選用 3'-Acetylneuramin-lactose、6'-Acetylneuramin-lactose、sialic acid、 α -lactose、 β -lactose及 ganglioside 進行比較分析，結果顯示只有 sialic acid 與 ganglioside 具有與紅血球競爭JC 病毒的能力 (Table 6)。

以上結果顯示JC 病毒和紅血球之結合需藉由紅血球表面之 sialic acid 分子。

討 論

自 1971 年 Padgett 等人從 PML 病人的腦組織分離出 JC 病毒後 (99)，於 1970 年中期大量篩檢一般成人血清中是否有抗 JCV 的抗體存在，結果發現高達 65% 有陽性反應。之後陸續更從孕婦 (32) 及免疫抑制病人如腎臟移植的病人尿中偵測到 JC 病毒，由這些結果推測 JC 病毒可能原發性感染是在孩童時期，且是寄生於腎臟組織中，待病人處於免疫抑制狀態下 JC 病毒便活化再透過血流散佈到其它器官組織中，但至今這些結果都只是推測的，並無直接的證據。但就臨床上的個案發現一名患腦膜炎小孩的腦脊髓液中含有抗 JCV 的 IgM 抗體，因此也有另一種說法認為 JC 病毒原發性的感染是在腦部，所以至今 JC 病毒在體內傳播的情形仍有待證實。

先前的報告已知高於 70% 的成年人的體內帶有抗人類多瘤性病毒的抗體 (20、30、102、120)，但是在不同地區、不同族群中到底有多少帶原者，則是所知有限。Kitamura 等人 (66) 發表了在日本東京地區，20 歲到 29 歲的年齡群中有 45.7% 的人受 JCV 的感染。而早在 1975 年 Brown 等人篩檢一般成人血清中即發現有 70% 以上的受檢血清中有 BKV 抗體的存在。可見人類多瘤性病毒是廣泛地流行於世界各地，而 JCV 和 BKV 流行病學的分佈似乎有所不同 (124)。

已知 JCV 可凝集雞、天竺鼠及人類紅血球特性，可利用此血球凝集的特性來偵測病毒是否存在，血球凝集的方法比病毒斑試驗 (Plaque assay) 或是電子顯微鏡觀察來的便利。但血球凝集的方法有非特异性抑制的現象，而且需要培養及純化病毒，這對 JCV 而言是相當困難的。因此我們實驗室先前利用分子生物技術將 JCV 主要結構蛋白 VP1 基因送入原核 (*E. coli*) (26) 與真核細胞 (insect cell) (25) 中達 JCV 主要結構蛋白 VP1，可利用在 HAI、Western blot、dot blot 做血清學研究。

在本篇論文第一部份我們利用血球凝集抑制 (HAI)、Western blot、dot blot 三種方法探討 JC 病毒抗原與抗體之反應性。結果發現 JCV 病毒主要外殼蛋白其在 denatured 的狀況下因其病毒蛋白結構 unfolding 而失去 antigenic epitope 造成 Western blot 產生 false negative 的結果 (圖 2)。而由 HAI (Table 1) 及 immunoblotting (圖 3) 的結果得知受 JC 病毒感染的人體血清抗體只能與 native 的 capsid 反應。因此我們可利用 HAI 及 dot blot 作為臨床篩檢之用而不能以 Western blot 來分析。另外此結果也告訴我們病毒蛋白結構對於 antigenic epitope 的重要性。

本篇論文第二部份就已所生產的 JCV VP1 抗原希望可應用臨床血清篩檢，藉此了解台灣地區，JC 病毒是否也一樣廣泛存在人體中，更進一步了解一些因服用類固醇藥物處於免疫抑制的自體免疫疾病病人如紅斑性狼瘡 SLE，多發性硬化症

Multiple sclerosis 等病人篩檢其血中存在 JC 病毒的抗體或是免疫力較差的孕婦及小孩血液中是否存在 JC 病毒的抗體，以及建立臨床血清篩檢的方法。

在本篇論文中我們以血球凝集抑制反應 (Hemagglutination inhibition ; HAI) 方式初步進行篩檢正常人、孕婦、自體免疫疾病的病人及兒童四個族群的血清中人類多瘤性病毒，發現在正常人受檢血清中 JCV 的抗體存在率高達 74.66% (165/221)、孕婦有 78% (78/100) 及自體免疫疾病的病人 76.54% (62/81) 與先前國外的報告 (20、30、102) 相近。在先前本實驗室曾就正常人、孕婦及自體免疫疾病的病人等族群的尿液檢體利用 PCR 的方式進行篩檢 (24)，發現在平常人的尿液中有 13.3% (10/75)，孕婦有 26% (20/77)，自體免疫疾病病人的比率是 37.5% (18/48)，有人類多瘤性病毒的存在 (124)。比較結果發現正常人、孕婦及自體免疫疾病的病人三個族群中皆有 70% 以上的人感染過 JC 病毒且具有抗體，但先前用 PCR 的方式進行篩檢正常人、孕婦及自體免疫疾病的病人三個族群的尿液檢體中病毒排放結果發現在免疫力較差的孕婦及自體免疫疾病的病人其尿液檢體中病毒排放是正常人二倍以上，可見病毒的排放與免疫力的強弱有關。另一方面在篩檢兒童血清檢體發現有 46.5% (323/713) 感染過人類多瘤性病毒且具有抗體。這個結果證實 JC 病毒可能原發性感染是在孩童時期的推測另外在 Table 4 中 0 歲的兒童有高達 53.3% 的感染率與一般平均值有所差距，這可能因剛出生嬰兒體內含有母體抗體之故。

本篇論文第三部份是針對 JC 病毒結構蛋白表面紅血球與抗體反應區域加以探討。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 (103) 及 1991 (73) 被訂定出來，這些病毒外殼蛋白是對稱的二十面體構造，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。每個 VP1 subunit 互相 lock 外，其 BC (residue 57-88) 與 DE loop (residue 127-145) 及 HI (residue 269-276) loops 形成 VP1 分子的表面凸出區。五個分子 VP1 的 BC、DE 及 HI loops 剛好圍成一個環狀區域。由於這個凸出的環狀區位於病毒顆粒的最表面，因此 BC、DE 及 HI loops 被推測可能會直接參與與外界反應。這些暴露在病毒外表的部分可能與病毒的細胞接受體 (cell receptor)，血球凝集反應 (hemagglutination) 及抗原反應 (antigenic reaction) 有關。最近，Stehle (118) 等人找到 murine polyoma virus VP1 在感染時會與 oligosaccharide receptor 結合。並以 SV40 VP1 三級結構推測其結合位置是位於 BC、DE 及 HI loops 所形成之 pocket。而且將 JCV 與其他多瘤性病毒如：SV40、BFDV 及 murine polyoma virus 比較其 VP1 全長的氨基酸序列的相似性分別為 77.3%、48.9% 及 50.6%。所以 SV40 VP1 的三級結構可提供 JCV VP1 一些重要的參考依據。因此我們利用 SV40 VP1 的三級結構為模型推測 JCV 的 BC、DE 及 HI loops 氨基酸位置與設計出全長 VP1 蛋白質和一連串不同長度的 VP1 蛋白

質分別選殖並在 *E.coli* 表達進行研究。

我們研究結果發現所選殖並在 *E.coli* 表達之 BC、DE 及 HI peptides 經由 western blot (圖 10、11) 及 dot blot (圖 12) 方式我們初步發現 BC loop 是一個主要的 epitope，而我們更進一步以包含 BC loop (VP1AS5) 與不包含 BC loop (VP1 Δ BC) 的 VP1 對 anti-capsid serum 做競爭試驗發現包含 BC loop 的 VP1 可將大部份 anti-capsid 抗體 block 住，綜合以上結果可知 BC loop 是一個主要的 epitope。

在先前實驗中我們為了建立血球凝集抑制 (HAI) 臨床血清篩檢的方法，所以我們以兔子的 antisera 做測試 (Table 1) 的結果發現只有兔子 anti-capsid、anti-GSTBC sera 與 human JCV positive antiserum 一樣具有 HAI titer，這個結果證明了 BC loop 是血球凝集 domain 之一。此外在 1987 年 Sinibaldi 等人 (113) 發現 BKV 與紅血球結合是藉由紅血球膜上之高分子量的醣分子 ganglioside。而最近，Stehle (118) 等人找到 murine polyoma virus VP1 在感染時會與 oligosaccharide receptor 結合。且 JCV 與 BKV 同屬於人類多瘤性病毒，所以推測 JCV 與紅血球結合也應是相同或類似的醣分子。由不同醣分子對病毒殼體 (capsid) 的競爭作用 (Table 6) 發現病毒殼體 (capsid) 會與 sialic acid 及 ganglioside 醣分子結合。而當我們以 neuraminidase 處理紅血球時紅血球會失去與病毒殼體 (capsid) 結合的能力 (Table 5)，若將 ganglioside 醣分子加入已用 neuraminidase 處理過之紅血球中時則可恢復紅血球與病毒殼體 (capsid) 結合的能力 (圖 16) 可見 JCV 與紅血球結合是亦藉由紅血球膜上之高分子量的醣分子 ganglioside。

綜合實驗結果我們成功的建立血球凝集抑制 (HAI) 方法應用於臨床血清的篩檢，並發現病毒殼體結構的重要性。且以間接的方式證明了 JCV 外殼蛋白 VP1 上之 BC loop 是一個主要的 epitope 及血球凝集 domain 之一，也證明病毒殼體 (capsid) 與紅血球結合是藉由紅血球表面的糖分子為 sialic acid。而在未來我們必須以單株抗體 (monoclonal antibody) 進一步加以證明 JCV 外殼蛋白 VP1 上的 epitope 除了 BC loop 還包括哪些位置參與。

而關於臨床血清的篩檢方面，更可進一步建立快速而專一的 ELISA 臨床篩檢方法大量篩檢臨床血清以了解臺灣地區人類多瘤性病毒 JCV 的感染率與亞洲地區或甚至與歐美地區互相比較。另外也可運用相同方法來了解臺灣地區人類多瘤性病毒 BKV 的感染率，進而互相比較 JCV 與 BKV 兩者的感染率是否與先前報告所指出的在亞洲地區 JCV 較 BKV 感染率高，若為屬實則 JCV 與 BKV 感染人類是否與人種有關就值得深思。

另外當我們比較 JCV 與其他多瘤性病毒VP1 全長的氨基酸序列的相似性時發現JCV與SV40 VP1 全長的氨基酸序列的相似高達77.3%並且由 JCV VP1相對應的 DE、BC 及 HI 區域，兩者只有 53%、63% 及 62% 的相似性，此平均值 77.3 % 相似性還低，這個發現是否也意味著在感染途徑中，SV40 與 JCV 因其 VP1 的 DE、BC 及 HI 區域的不同而導致它們 tissue tropism 的不同，甚至有宿主專一性，這點很值得未來深入研究。

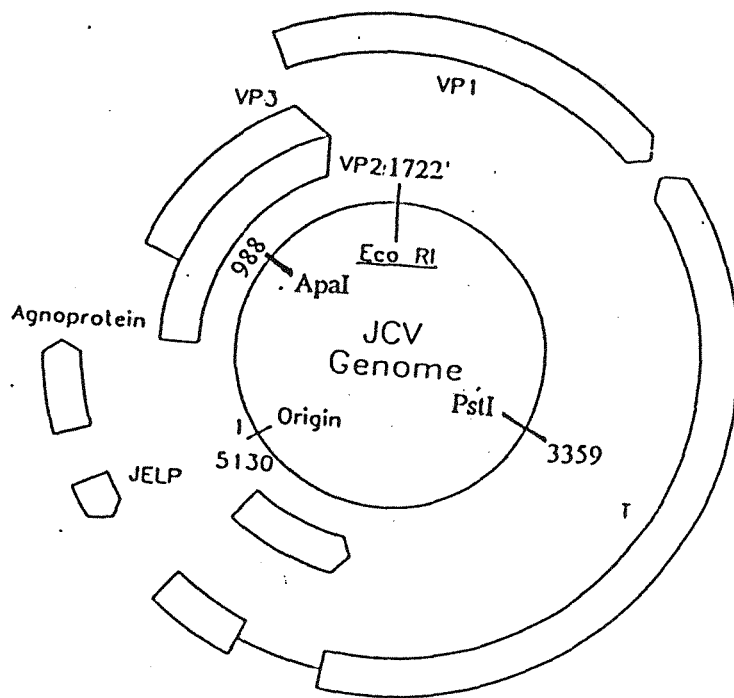


圖 1.人類多瘤性病毒 JCV Mad-1 strain 的基因圖(46)。JCV 的基因調控區包含 promoter , enhancer 及 replication origin , 位於 nucleotide (nt) 5086-289 。早期腫瘤蛋白基因位於 nt 5013-2603 。其中 nt 4772-4427 藉 differential splicing 切除而產生 Large tumor antigen 。 Small tumor antigen 位於 nt 5013-4495 。晚期結構蛋白則由順時鐘方向製造。VP1 位於 nt 1469-2533 , VP2 位於 nt 883-1560 , agnoprotein 位於 nt 277-492 。

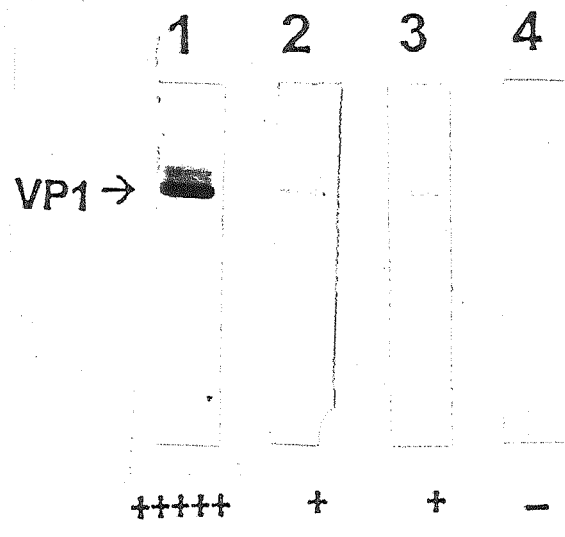


圖 2. 西方墨點法 (Western blot) 偵測不同 antisera。JCV/ Δ pFlag 經由 SDS-PAGE 分析後，將 SDS-PAGE 轉印到 nitrocellulose paper，再分別用兔子 anti-JCV/ Δ pFlag (denatured VP1；lane 1)、兔子 anti-capsid (lane 2)、兔子 preimmunized serum (lane 3)、人類 JCV positive antiserum (lane 4) 作確認，以 DAB 呈色。+：反應強度。

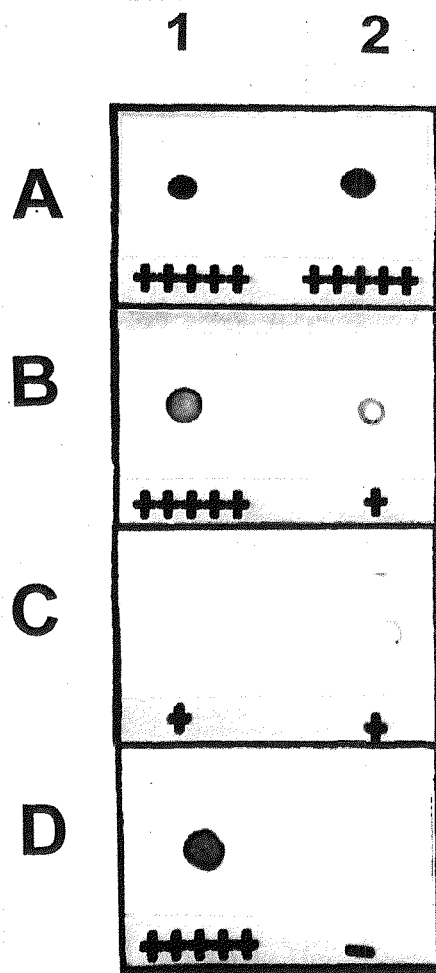


圖 3. Dot immunoblotting 偵測不同 antisera。分別將 native (Dot 1) 與 denatured JCV capsid (Dot 2) 點至 nitrocellulose paper 後，再分別用 兔子 anti-JCV / Δ pFlag (denatured VP1 ; panel A)、兔子 anti-capsid (panel B)、兔子 preimmunized serum (panel C)、人類 JCV positive antiserum (panel D) 及作確認，以 DAB 呈色。+：反應強度。

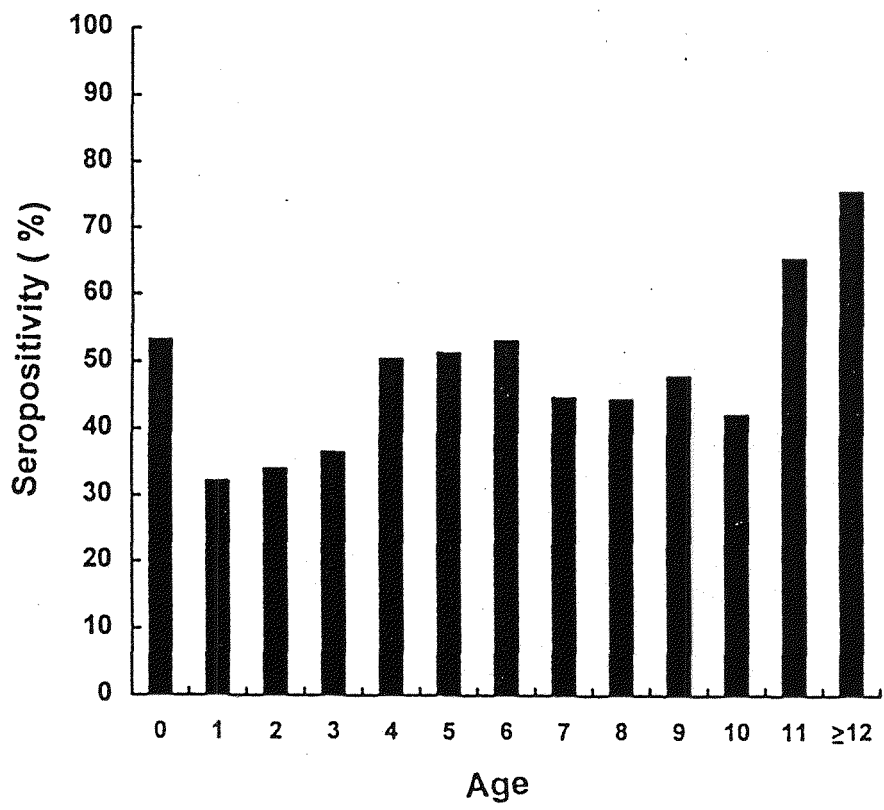


圖 4.不同年齡族群中 JC 病毒抗體的存在率之量化圖。橫軸為不同年齡族群，縱軸為病毒抗體的陽性率。

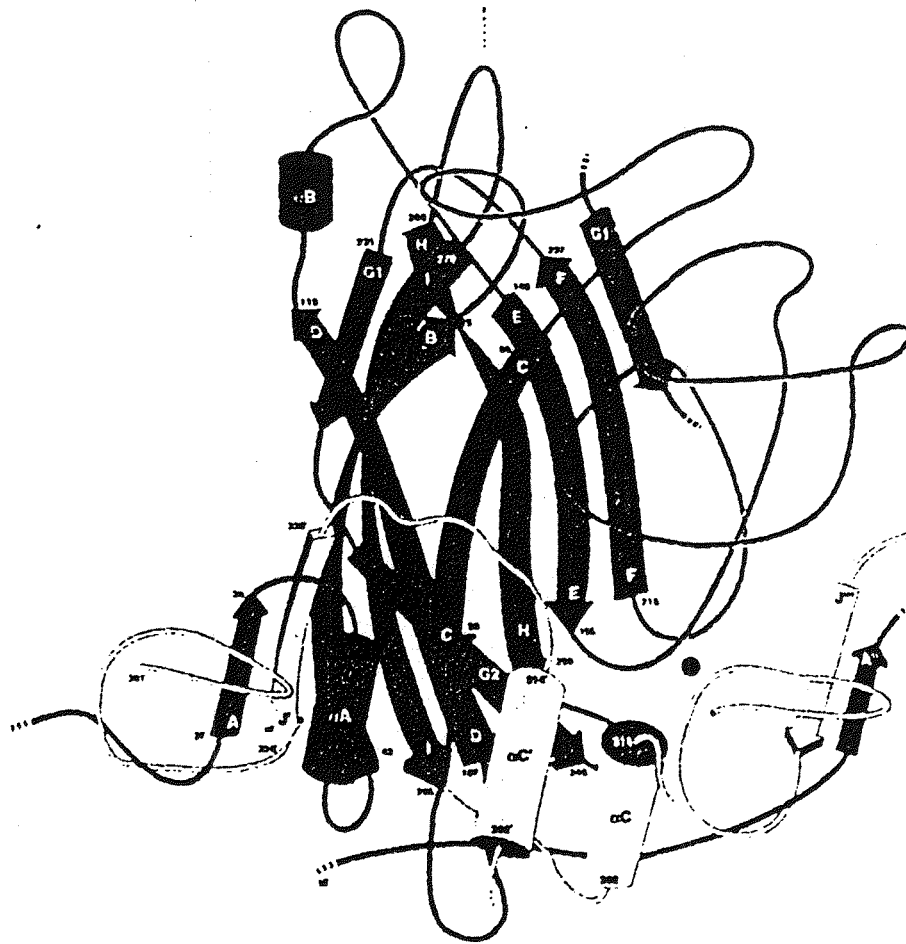


圖 5.SV40 VP1 晶體結構的解析圖(73)。SV40 三級結構乃於 1991 年由 Liddington 等人利用 X-ray 晶體繞射所發表。

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
SV40 APTKRRKGCPCGAAPKKPKPEVQVFKLVIRGGIEVLGVKTGVDSFTEVECFLNPMGNPDEHQKGLSKSLAAEKQFTDDSP
      < disordered >< N-arm ><β-A><α-A>< AB >< β-B >< BC loop
JCV  APTKRRKER-----KDPVQVFKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLTPMGNPDEHLRGPFSKISISIDTFESDSP
      **          *          * * * * *          *          * * *          * * *          * * * * *
      90      100     110     120     130     140     150     160
SV40 DKEQLPCYSVARIPLPNINEDLTCGNILMWEAVTVKTEVIGVTAMLNLHSGTQKTHENGAGKPIQGSNFHFFAVGGEPL
      >< β-C >< CD >< β-D > <α-B>< DE loop >< β-E ><
JCV  NKDMLPCYSVARIPLPNINEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEAL
      * * *          *          * * * * *          * * * * *          * * *          * * *
      170     180     190     200     210     220     230     240
SV40 LQGVLANYRTKYPAQTVTFKNATVDSQQMNTDHKAVLDDKDNAYPVECWVDPDPSKNENTRYFGTYTGGENVPPVLHITNTA
      EF-loop >< β-F > < β-G1 > <
JCV  LQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTA
      *          * * *          * * *          * * *          * * *          *
      250     260     270     280     290     300     310     320
SV40 TTVLLDEQGVGPLCKADSLYVSAVDICGLFTINTSGTQQWKGFLPRYFKITLRKRSVKNPYPISFLLSDLINRRTQRVDGQP
      β-G2>< GH-loop >< β-H ><HI-loop>< β-I >< ... < α-C >< C arm
JCV  TTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWGRGLSRYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPKVDGQP
      *          * * *          * * *          * * *          * * *          * * *          *
      330     340     350     360
SV40 MIGMSSQVEEVRVYEDTEELPGDPMIRYIDFEGQTTRMQ
      ... < β-J > ..C-arm ..< C-loop >>
JCV  MYGMDAQIEEVRVFEETELPGDPMIRYVDYRQQLQTKML
      * * *          * * *          * * *          * * *

```

圖 6. SV40 及 Taiwan-3 號 JC 病毒 VP1 氨基酸序列相同性之比較用單一的字母表示氨基酸的種類。在 JCV 病毒 VP1 的氨基酸字母底部畫線者為不同的 JCV strains 有突變的氨基酸。在 JC 病毒 VP1 的氨基酸字母底部打星號者表示該氨基酸為 SV40 及 JC 病毒 VP1 所不同的氨基酸(26)。



圖 7. 所選殖人類多瘤性病毒 JCV VP1 蛋白片段及其之胺基酸位置。

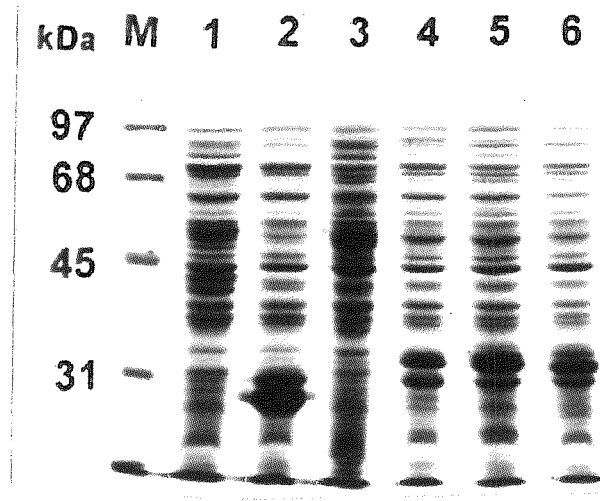


圖 8.SDS-PAGE分析選殖於pGEX4T-1載體之VP1 BC、DE及HI基因在*E.coli* JM109 strain表達。JCVP1BC、DE、HI loop 基因接入pGEX4T-1載體中並 transformation至*E.coli* 中(細節詳述於材料方法中)，於L broth培養再加入 IPTG induction 後 收集菌體於12.5%SDS-PAGE分析，並以 Coomassie blue 染色觀察。lane M：MW，lane 1：JCVP1/ΔpFlag/JM109，lane 2：pGEX4T-1/JM109，lane 3：JM109，lane 4：pGEX4T-1BC/JM109，lane 5：pGEX4T-1DE/JM109，lane6：pGEX4T-1HI/JM109。

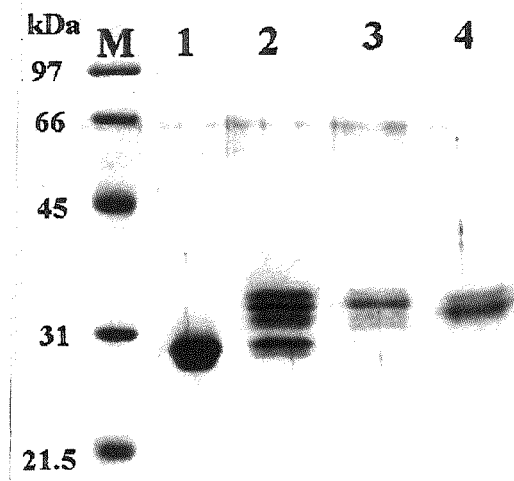


圖 9. SDS-PAGE 分析純化之 GSTBC、GSTDE、GSTHI peptides。將選殖出之 BC、DE、HI peptides 基因分別於 *E. coli* 表達後，以 affinity column 及 electroelution (細節詳述於材料與方法)。純化出並於 12.5 % SDS-PAGE 上分析。lane M：MW，lane 1：affinity column 純化之 GST，lane 2：affinity column 純化之 GST-BC，lane 3：electroelution 純化之 GST-DE，lane 4：electroelution 純化之 GST-HI。

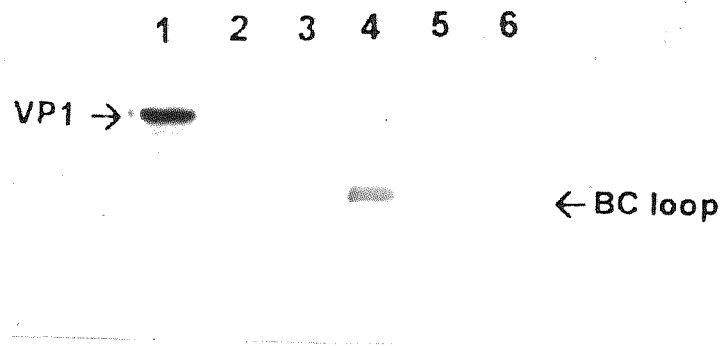


圖10.以西方墨點法分析WT VP1、BC、DE HI peptides。JCVP1BC、DE、HI loop 基因接入pGEX4T-1載體中並 transformation至*E.coli* 中(細節詳述於材料方法中)，IPTG induction 後收集菌體於12.5%SDS-PAGE分析，並轉印至 nitrocellulose paper，再用兔子抗全長VP1抗體作確認，以DAB呈色。lane M：MW，lane 1：JCVP1/ Δ pFlag，lane 2：pGEX4T-1，lane 3：JM109，lane 4：pGEX4T-1BC，lane 5：pGEX4T-1DE，lane 6：pGEX4T-1HI。

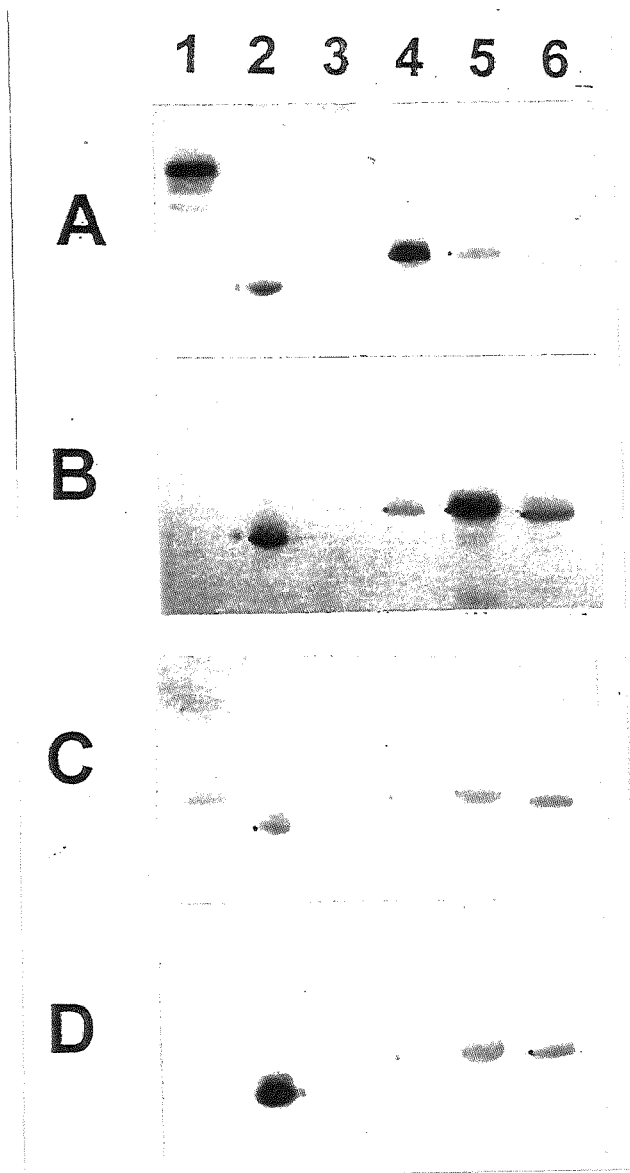


圖 11. 西方墨點法分析兔子抗 GST BC、GSTDE、GSTHI 及 GST 抗體。
 將含有 JCV VP1 及 BC、DE、HI peptides 基因 *E.coli* 以 IPTG 誘導後，
 以 SDS-PAGE 分析，經轉印到 nitrocellulose paper，再分別用兔子 anti-BC
 (panel A)、DE (panel B)、HI (panel C) peptides 及 GST (panel D) 抗
 體作確認，以 DAB 呈色。lane 1：JCVP1/ Δ pFlag/JM109，lane 2：
 pGEX4T-1/JM109，lane 3：JM109，lane 4：pGEX4T-1BC/JM109，
 lane 5：pGEX4T-1 DE/JM109，lane 6：pGEX4T-1HI/JM109。

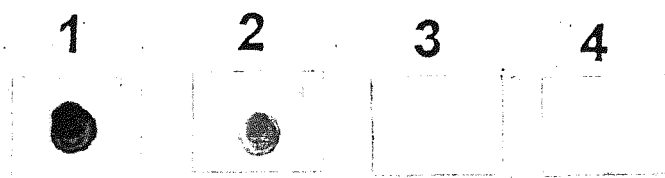


圖 12. Dot immunoblotting 分析不同抗體對病毒殼體蛋白 (capsid) 反應情形。

將病毒殼體蛋白 (capsid) 點上 nitrocellulose paper ，再分別用兔子 anti-JCV capsid 抗體 (spot 1) 及 GST-BC 抗體 (spot 2)、GST-DE 抗體 (spot 3)、GST-HI 抗體 (spot 4) 作確認，以 DAB 呈色。

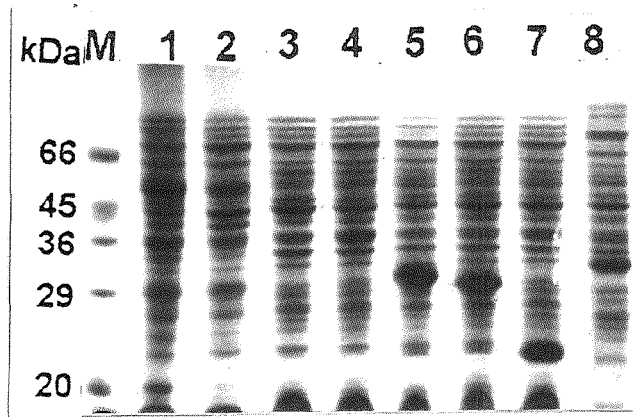


圖 13. SDS-PAGE 分析選殖於 pQE-30 載體之 VP1 片段基因在 *E. coli* JM109 strain 表達。Serial truncation JCVP1 基因接入 pQE-30 載體中並 transformation 至 *E. coli* 中 (細節詳述於材料與方法中) 於 L. broth 培養再加入 IPTG induction 後收集菌體於 12.5 % SDS-PAGE 分析並以 Coomassive blue 染色觀察。lane M : MW , lane 1 : JM109 , lane 2 : Δ pFlag/JCVP1 , lane 3 : Δ Flag/JCVP1 , lane 4 : pQE-30/WT , lane 5 : pQE-30/AS2 , lane 6 : pQE-30/AS3 , lane 7 : pQE-30/AS4 , lane 8 : pQE-30/AS5 , lane 9 : pQE-30/ Δ BC 。

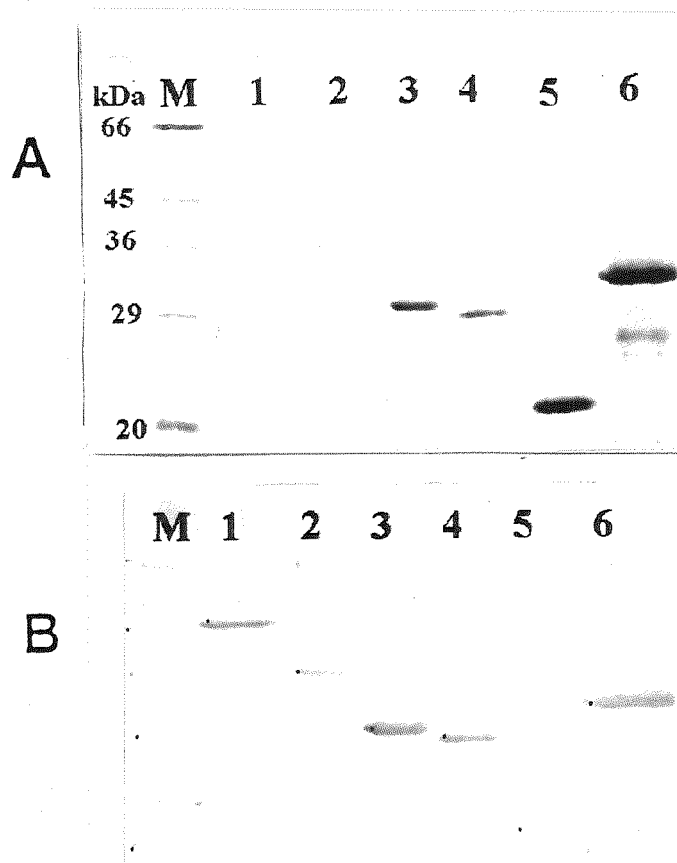
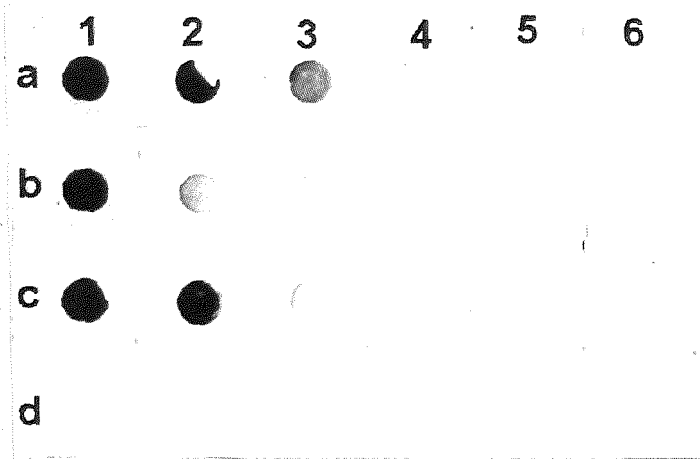


圖 14. SDS-PAGE 及 Western blot 分析純化之 VP1 片段蛋白。將選殖出之 serial truncation VP1 基因分別於 *E. coli* 表達後，以 Ni-NTA column 純化 serial truncation 之蛋白(細節詳述於材料與方法)，純化出並於 12.5 % SDS-PAGE 上分析，另一組 SDS-PAGE 經轉印到 nitrocellulose paper，再用兔子 anti-JCV / Δ pFlag 抗體作確認，以 DAB 呈色 (B)。lane M : MW，lane 1 : VP1WT，lane 2 : VP1 AS2，lane 3 : VP1AS3，lane 4 : Vp1AS4，lane 5 : VP1 AS5，lane 6 : Vp1 Δ BC。

A



B

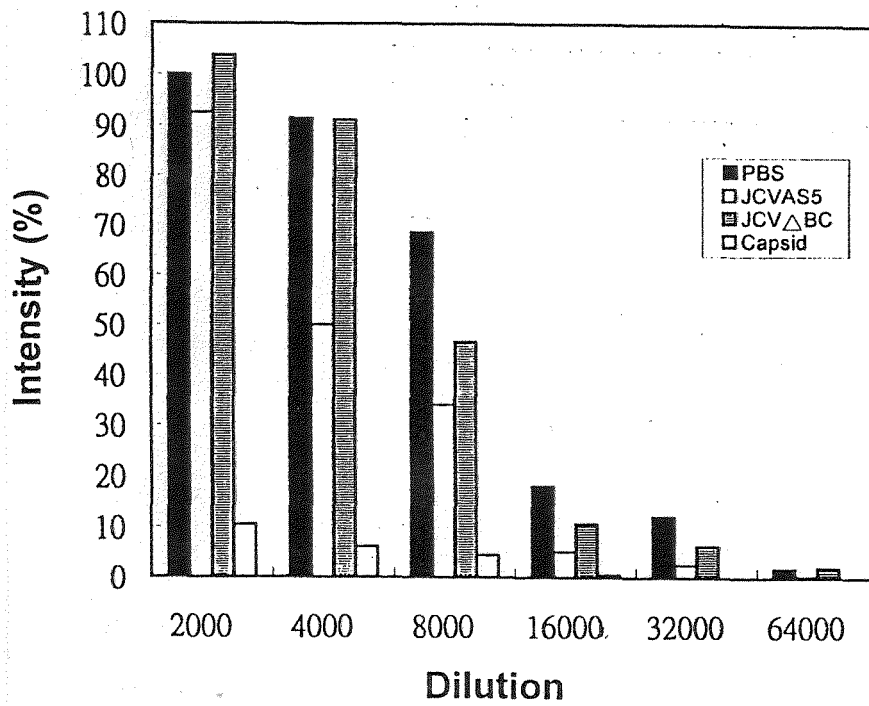


圖 15. Dot blot 分析不同 VP1 片段與不同稀釋倍數的兔子 anti- JCV capsid antiserum 之競爭作用。 panel a : PBS、panel b : 含有 BC loop VP1 (JCV P1 AS5)、panel c : 不含有 BC loop VP1 (JCV P1 Δ BC) 及 panel d : 病毒殼體 (capsid) (A)。 Dot 1 : 2,000, Dot 2 : 4,000, Dot 3 : 8,000, Dot 4 : 16,000, Dot 5 : 32,000, Dot 6 : 64,000 倍稀釋。 量化圖 (B)。

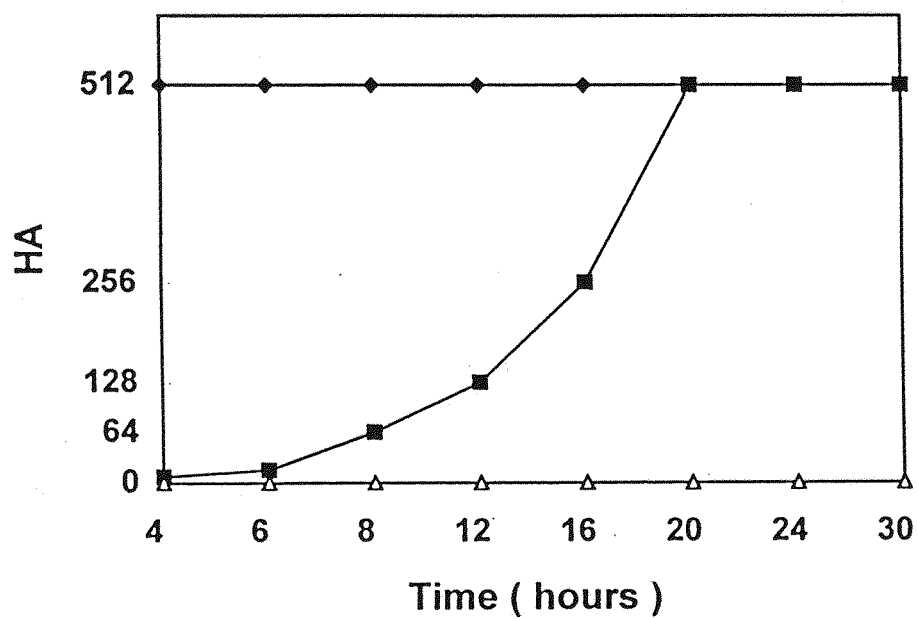


圖 16. 不同時間下以 ganglioside 恢復經 neuraminidase 處理之人類 O 型紅血球與 JCV 病毒殼體結合的情形。neuraminidase 處理之人類 O 型紅血球(△)，neuraminidase 處理後再加入 ganglioside (■)，未處理之人類 O 型紅血球 (◆)。

Table 1. Hemagglutination inhibition (HAI) of different antisera against JCV

Antiserum	HAI
Rabbit preimmunized	0
Rabbit anti-capsid VP1	2¹⁶
Rabbit anti-denatured VP1	0
Human JCV positive	2¹³
Human JCV negative	0

Table 2. Prevalence of antibody to human neurotropic JC virus in different population

Group	No. of sera tested	No. of HI positive	% of HI positive
Healthy individuals	221	165	74.66
Pregnant women	100	78	78.00
Autoimmune disease patents	81	62	76.54
Total	402	305	75.87

Table 3. Prevalence of antibody to human neurotropic JC virus in children

Age group (year)	No. of sera tested	No. of HAI positive	% of HAI positive
0	15	8	53.3
1	28	9	32.1
2	47	16	34.0
3	74	27	36.5
4	95	48	50.5
5	111	57	51.4
6	77	41	53.2
7	94	42	44.7
8	54	24	44.4
9	48	23	47.9
10	38	16	42.1
11	32	21	65.6
Total	713	332	46.5

Table 4. Primers used for PCR generation of VP1 fragments

Peptide	primer	sequence (5' → 3')	location
JCV VP1 BC	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG TCA ATT ACA GAG GTA GAA TGC	106- 129
	antisense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> TTA ATT GGG TAG TGG AAT TCT GGC	270- 247
JCV VP1 DE	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG CTA AAT GAG GAT CTA ACT TGT	271-294
	antisense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> TTA TTC TAA AGC CTC CCC CCC AAC	459- 457
JCV VP1 HI	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG ACA ACA GTG CTG CTT GAT GAA	700-723
	antisense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> TTA AAC CCT CCT TTT TCT TAG CTG	864- 841
JCV VP1 WT	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GCC CCA ACA	1- 12
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA CAG CAT TTT TGT CTG CAA	1065-1046
JCV VP1 AS2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GCC CCA ACA	1- 12
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA AAT TAA ATC AGT AAG	906- 889
JCV VP1 AS3	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GCC CCA ACA	1- 12
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA TAA GTT GTC ACC TTT	756- 739
JCV VP1 AS4	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GCC CCA ACA	1- 12
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA AAC CCA ACA TTC AAC	606- 589
JCV VP1 AS5	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GCC CCA ACA	1- 12
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA TAA AGC CTC CCC CCC	456- 439
JCV VP1 Δ BC	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG CTA AAT GAG GAT CTA ACT TGT	271- 294
	antisense	ACA TGT <u>GGA TCC</u> TTA CAG CAT TTT TGT CTG CAA	1065-1045

Table 5. Hemagglutination of neuraminidase treated RBC

RBC Treatment	HA		
	30 min	60 min	90 min
neuraminidase	2 ⁵	0	0
PBS	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹
untreated	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹

Table 6. Hemagglutination inhibition (HAI) of various sugar molecules

Sugar	HAI
3'-N-Acetylneuramin lactose	0
6'-N-Acetylneuramin lactose	0
Sialic acid	2
α-lactose	0
β-lactose	0
Ganglioside	2⁶

參考文獻

1. Aksamit, A. J., Major, E. O., and Ghatak, J. G. (1987) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by brain biopsy with biotin labeled DNA : DNA *in situ* hybridization. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 46, 556-566.
2. Aksamit, A. J., Mourrain, P., Sever, J. L., and Major, E. O. (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy : investigation of three cases using *in situ* hybridization with JC virus biotinylated DNA probe. Ann. Neurol. 18, 490-496.
3. Andrews, C. A., Shah, K. V., Daniel, R. W., Hirsch, M. S., and Rubin, R. H. (1988) A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. J. Infect. Dis. 158, 176-181.
4. Arthur, R. R., and Shah, K. V. (1989) Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. Prog. Med. Virol. 36, 42-61.
5. Arthur, R. R., Dagostin, S., and Shah, K. V. (1989) Detection of BKV and JCV in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 1174-1179.
6. Barbanti-Brodano, G., Minello, G. P., and Portolani, M. (1975) Structural proteins of a human papovavirus (BK virus) : a comparison with the structural proteins of simian virus 40. Virol. 64, 269-271.
7. Barkan, A., Welch, R. C., and Mertz, J. E. (1987) Missense mutations in the VP1 gene of simian virus 40 that compensate for defects caused by deletions in the viral agnogene. J. Virol. 61, 3190-3198.
8. Beckman, A. M., Shah, K. V., and Padgett, B. L. (1982) Propagation and primary isolation of papovavirus JC in epithelial cells derived from human urine. Infect. Immun. 38, 774-777.
9. Beckman, A. M., Shah, K. V., and Mounts, P. (1985) Genetic heterogeneity of the human papovaviruses BK and JC. J. Med. Virol. 15, 239-250.
10. Beckman, A. M., and Shah, K. V. (1983) Propagation and primary isolation of JCV and BKV in urinary epithelial cell cultures, Polyomaviruses and Human Neurological Disease. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York, pp 3-14.

11. Berger, J. R., Kaszovitz, B., Donovan Post, M. J., and Dickinson, G. (1987) Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. A review of the literature with a report of sixteen cases. *Ann. Inter. Med.* 107, 78-87.
12. Bergsma, D. J.; Olive, D. M., Hartzell, S. W., and Subramanian, K. N. (1982) Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 381-385.
13. Boerman, R. H., Arnoldus, E. P. J., Rapp, A. K., Peters, A. C. B., TerSchegget, J., and Van den Ploeg, M. (1989) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by hybridization techniques. *J. Clin. Pathol.* 42, 153-161.
14. Bolen, J. B., and R. A. Consigli (1979) Differential adsorption of polyoma virus and capsids to mouse kidney cells and guinea pig erythrocytes. *J. Virol.* 32, 679-683.
15. Borowiec, J. A., and Hurwitz, J. (1988) ATP stimulates the binding of simian virus 40 (SV40) large tumor antigen to the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 64-68.
16. Bouck, N., Beales, N., Shenk, T., Berg, P., and di Mayorca, G. (1978) New region of the simian virus 40 genome required for efficient viral transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2473-2377.
17. Brady, J. N., and N. P. Salzman. 1986. The papovavirus. General properties of polyoma and SV 40 · p. 1-26. Plenum Press, New York.
18. Brady, N. J., V. D. Winston, and R. A. Consigli (1977) Dissociation of polyoma virus by chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23, 717-724
19. Brooks, B. R., and Walker, D. L. (1984) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2, 299-313.
20. Brown, P., Tsai, T., Gajdusek Am, D. C. (1975) Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin population and some unusual patterns of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102, 331-340.
21. Buchman, A. R., Burnett, L., and Berg, P. (1981) The SV 40 nucleotide sequence, in DNA tumor viruses. *Molecular biology of tumor viruses.* 2nd Ed, 799-823.

22. Byrne, B. J., Davis, M. S., Yamaguchi, J., Bergsma, D. J., and Subramanian, K. N. (1983) Definition of the simian virus 40 early promoter region and demonstration of a host range bias in the enhancement effect of the simian virus 40 72-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 721-725.
23. Carswell, S., and Alwine, J. C. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60, 1055-1061.
24. Chang, D., Wang, M., Ou, W.-C., Tsai, R.-T., Fung, C.-Y., and Hwang, Y.-J. (1996) A simple method for detecting human polyomavirus DNA in urine by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 58, 131-136.
25. Chang, D., Fung, C.-Y., Ou, W.-C., Chao, P.-C., Li, S.-Y., Wang, M., Huang, Y.-L., Tzeng, T.-Y., and Tsai, R.-T. (1997) Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* In press.
26. Chang, D., Liou, Z.-M., Ou, W.-C., Wang, K.-Z., Wang, M., Fung, C.-Y., Tsai, R.-T. (1996) Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Meth.* 59, 177-187.
27. Chang, D. C., Haynes, J. I, Brady, J. N., and Consigli, R. A. (1992) Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 191, 978-983.
28. Chang, D. C., J. I. Haynes, J. H. Brady, and R. A. Consigli (1992) The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Viol.* 189, 821-827.
29. Chang, D., Tsai, R. -T., Wang, M., and Ou, W.-C. (1996) Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:204-209.
30. Chesters, P.M., Heritage, J., and McCance, D. J. (1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J. Inf. Dis.* 147, 676-684.
31. Chuke, W. F., Walker, D. L., Peitzman, L. B., and Frisque, R. J. (1986) Construction and characterization of hybrid polyomavirus genomes. *J. Virol.* 60, 960-971.
32. Coleman, D. V., Gardoner, S. D., Mulholland, C., Fridiksdottir, V., Porter, A. A., Lilford, R., and Valimarsson, H. (1983) Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 289-296.

33. Coleman, D. V., Wolfendale, M. R., Daniel, R. A., Dhanial, N. K., Gardner, S. D., Gibson, P. E., and Field, A. M. (1980) A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 142, 1-8.
34. Corallini, A., Altavilla, G., and Carra, L. (1982) Oncogenicity of BK virus for immunosuppressed hamsters. *Arch. Virol.* 73, 243-253.
35. Daniel, R., Shah, K., Madden, D., and Stagno, S. (1981) Serological investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JCV. *Inf. Imm.* 33, 319-321.
36. Dean, F. B., Dodson, M., Echols, H., and Hurwitz, J. (1987) ATP-dependent formation of a specialized nucleoprotein structure by simian virus 40 (SV40) large tumor antigen at the SV40 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 8981-8985.
37. Deb, S. A., and Tegtmeyer, P. (1987) ATP enhances the binding of simian virus 40 large T antigen to the origin of replication. *J. Virol.* 61, 3649-3654.
38. Dorries, K., G. Loeber, and J. Meixensbarger. 1987. Association of polyomavirus JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology.* 160: 268-270.
39. Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983) The promote-specific transcription factor SP1 binds to upstream sequences in the SV 40 early promoter. *Cell.* 35, 79-87.
40. Fareed, G. C., Takemoto, K. K., Gimbrone Jr, M. A., and Schlessinger, D. (1987) Interaction of simian virus 40 and human papovaviruses, BK and JC, with human vascular endothelial cells. in *Microbiology American Society for Microbiology, Washington, DC.* 427-431.
41. Fattaey, A. R., and R. A. Consigli (1989) Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *J. Virol.* 63, 3168-3175.
42. Feigenbaum, L., Khalili, K., Major, E., and Khoury, G. (1987) Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 3695-3698.
43. Freund, J., DiMayorca, G., and Subramanian, K. N. (1979) Mapping and ordering of fragments of BK virus DNA produced by restriction endonucleases. *J. Virol.* 27, 915-925.
44. Frisque, R. J., Martin, J. D., Padgett, B., and Walker D. L. (1979). Infectivity of the DNA from four isolates of JC virus. *J. Virol.* 32:476-482.

45. Frisque, R. J. (1983) Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. *J. Virol.* 46, 170-176.
46. Frisque, R. J., Bream, G. L., and Cannella, M. T. (1984) Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.
47. 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.
48. Gardner, S. D., Field, A. M., and Coleman, D. V. (1971) New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1, 1253-1257.
49. Gibson, P. E., Field, A. M., Gardner, S. D., and Coleman, D. V. (1981) Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 34, 674-679.
50. Goudsmit, J., Baak, M. L., and Slaterus, K. W. (1981) Human papovavirus isolated from the urine of a child with acute tonsillitis. *Br. Med. J.* 283, 1363-1364.
51. Goudsmit, J., Wertheim-van, D. P., and van Strien, A. (1982) The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* 10, 91-99.
52. Grasser, F. A., Mann, K., and Walter, G. (1987) Removal of serine phosphates from simian virus 40 large T antigen increases its ability to stimulate DNA replication in vitro but has no effect on ATPase and DNA binding. *J. Virol.* 61, 3373-3380.
53. Gribble, D. H., Haden, C. C., Schwartz, L. W., and Hendrickson, R. V. (1975) Spontaneous progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in macaque. *Nature (London).* 254, 602-604.
54. Grinnell, B. W., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Comparison of infectious JC virus DNAs cloned from human brain. *J. Virol.* 45, 299-308.
55. Grinnell, B. W., Padgett B. L., and Walker, D. L. (1983) Distribution of non-integrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 147, 669-675.
56. Grinnell, B. W., Martin, J. D., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Naturally occurring and passage-induced variation in the genome of JC virus, in *Polyomaviruses and Human Neurological Diseases*. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York, pp 61-77.

57. Griffith, G. R., and R. A. Consigli (1984) Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J. Virol.* 50, 77-81.
58. Griffith, G. R., S. J. Marriott, D. A. Rintoul, R. A. Consigli (1988) Early events in polyomavirus infection and fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Virus. Reserch.* 10, 41-52.
59. Holmberg, C. A., Gribble, D. H., Takemoto, K. K., Howley, P. K., Espana, C., and Osburn, B. I. (1977) Isolation of simian virus 40 from rhesus monkeys (*Macacca mulatta*) with spontaneous multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 136, 593-596.
60. Horgan, T. F., Padgett, B. L., Walker, D. L., Borden, E. C., and Frias, Z. J. L. (1983) Survey of human polyomavirus (JCV, BKV) infections in 139 patients with lung cancer, breast cancer, melanoma, or lymphoma, in *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. Sever, D. L. Madden, Alan R, Liss, New York, pp 311-324.
61. Horgan, T. F., Borden, E. C., McBain, J. A., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann. Intern. Med.* 92, 373-378.
62. Houff, S. A., Major, E. O., Katz, D. A., Kufta, C. V., Sever, J. L., Pittaluga, S., Roberts, R. J., and Gett, J. (1988) Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Eng. J. Med.* 318, 301-305.
63. 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.
64. 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.
65. Khalili, K., Brady, J., and Khoury, G. (1987) Translational regulation of SV40 early mRNA defines a new viral protein. *Cell.* 48, 639-645.
66. Kitamura, T., Kunitake, T., Guo, J., Tominaga, T., Kawabe, K., and Yogo, Y. (1994) Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2359-2363.

67. Klausung, K., Scheidtmann, K. H., Baumann, E. A., and Knippers, R. (1988) Effects of in vitro dephosphorylation on DNA binding and DNA helicase activities of simian virus 40 large tumor antigen. *J. Virol.* 62, 1258-1265.
68. Klausung, K., Scheffner, M., Scheidtmann, K. H., Stahl, H., and Knippers, R. (1989) DNA binding properties and replication activity of the T antigen related D2 phosphoprotein. *Biochemistry.* 28, 2238-2244.
69. Klug, A. J (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 424-431.
70. Korzak, M. (1984) Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: Effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 3873-3893.
71. Kozak, M. (1984) Complication and analysis of sequence upstream from the transcriptional start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 857-872.
72. Lee-Chen, G. J., and Woodworth-Gutai, M. (1986) Simian virus 40 DNA replication: functional organization of regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3086-3093.
73. Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., and Harrison, S. C. (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354:278-284.
74. Li, J. J., Peden, P. W. C., Dixon, R. A. F., and Kelly, T. (1986) Functional organization of simian virus 40 origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1117-1128.
75. Loeber, G., and Dorries, K. (1988) DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. *J. Virol.* 62, 1730-1735.
76. London, W. T., Houff, S. A., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Gravell, M., Wallen, W. C., Palmer, A. E., Sever, J. L., Padgett, B. L., Walker, D. L., Zu Rhein, G. M., and Ohashi, T. (1978) Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science.* 201, 1246-1249.
77. London, W. T., Houff, S. A., McKeever, P. E., Wallen, W. C., Sever, J. L., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1983) Viral-induced astrocytomas in squirrel monkeys, in *Polyomavirus and Human Neurological Disease.* Sever, D. L. Madden, and Alan R. Liss. 227-237.
78. Lynch, K. J., and Frisque, R. J. (1990) Identification of critical elements within the JC virus DNA replication origin. *J. Virol.* 64, 5812-5822.

79. Lynch, K. J., and Frisque, R. J. (1991) Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus. *Virology*. 180, 306-317.
80. Major, E. O., Mourrain, P., and Cummins, C. (1984) JC virus-induced owl monkey glioblastoma cells in culture: Biological properties associated with the viral early gene product. *Virology*. 136, 359-367.
81. Mandl, C. W., and R. J. Frisque. 1986. Characterization of cells transformed by the human polyomavirus JC virus. *J. Virol.* 67:1733-1739.
82. Mandl, C., Walker, D. L., and Frisque, R. J. (1987) Derivation and characterization of POJ cells, transformed human fetal glial cells that retain their permissivity for JC virus. *J. Virol.* 61, 755-763.
83. Mantyjarvi, R. A., Meurman, O. H., and Vihma, L. (1973) A human papovavirus (BK), biological properties and seroepidemiology. *Ann. Clin. Res.* 5, 283-287.
84. Martin, J. D., Padegtt, B. L., and Walker, D. L. (1983) Characterization of tissue-culture induced heterogeneity in DNAs of independent isolates of JC virus. *J. Gen. Virol.* 64, 2271-2280.
85. Martin, J. D., King, M., Slauch, J. M., and Frisque, R. J. (1985) Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J. Virol.* 53, 306-311.
86. Martin, J. D., and Foster, G. C. (1984) Multiple JC virus genomes from one patient. *J. Gen. Virol.* 65, 1405-1411.
87. Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wall, J. S., Dobson, M., Dean, F. B., and Hurwitz, J. (1989) ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature (London)*. 338, 658-662.
88. McCance, D. J. (1983) Persistence of animal and human papovaviruses in renal and nervous tissues, in *Polyomaviruses and Human Neurological Diseases*. Sever, D. L. Madden, Alan R, Liss, New York. 343-357.
89. McDeever, P. E., Chronwall, B. M., and Houff, S. A. (1983) Glial and divergent cells in primate central system tumors induced by JC virus isolated from human progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), in Sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Human Neurological Diseases*. New York, Alan R Liss. 105, 239-251.
90. McKey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D. R., Gluzman, Y., and Beach, D. (1989) Phosphorylation of large tumor antigen by cdc2 stimulates SV40 DNA replication. *Nature (London)*. 341, 503-507.

91. Miller, J. R., Barret, R. E., Britton, C. B., Tapper, M. L., Bahr, G. S., Bruno, P. J., Marquardt, M. D., Hays, A. P. J., McMurtry, G. I. I., Weissman, J. B., and Bruno, M. S. (1982) Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immunodeficiency. *N. Eng. J. Med.* 307, 1436-1438.
92. Miller, N. R., London, E., and Padgett, B. L. (1983) The detection of JC viral genome in owl monkey tumors, in Sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Human Neurological Diseases*. New York, Alan R Liss. 271-288.
93. Miyamura, T., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1985) DNA rearrangement in the control region for early transcription in a human Polyomavirus JC host range mutant capable of growing in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* 54, 750-756.
94. Mohr, I. J., Stillman, B., and Gluzman, Y. (1987) Regulation of SV40 DNA replication by phosphorylation of T antigen. *EMBO J.* 6, 153-160.
95. Mullarkey, M. F., Hruska, J. F., and Takemoto, K. K. (1974) Comparison of two human papovaviruses with simian virus 40 by structural protein and antigenic analysis. *J. Virol.* 13, 1014-1019.
96. Myers, C., Frisque, R. J., and Arthur, R. R. (1989) Direct isolation and characterization of JC virus from urine samples of renal and bone marrow transplant patients. *J. Virol.* 63, 4445-4449.
97. Nagashima, K., Yasui, K., Kimura, J., Washizu, M., Yamaguchi, K., and Mori, W. (1984) Induction of brain tumors by a newly isolated JC virus (Tokyo-1 strain). *Am. J. Pathol.* 116, 455-463.
98. Padgett, B. L., Rogers, C. M., and Walker, D. L. (1977) JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect. Immun.* 15, 656-662.
99. Padgett, B. L., Walker, D. L., Zu Rhein, G. M., Echroade, R. J., and Dessel, B. H. (1971) Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1, 1257-1260.
100. Padgett, B. L., Walker, D. L., Zu Rhein, G. M., Hodach, A. E., and Chou, S. M. (1976) JC papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 133:686-690.
101. Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Human papovavirus JCV : Natural story, tomorigenicity and interaction with human cells in culture. *Cold Spring Harbor Conf. Cell. Prolif.* 7, 319-327.

102. Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Inf. Dis.* 127, 476-470.
103. Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D., and Murakami, W. T. (1982) Polyomavirus capsid structure at 22.5A resolution. *Nature* 295:110-115.
104. Reith, K. G., DiChiro, G., London, W. T., Sever, J. L., Houff, S. A., Kornblith, P. L., McKeever, P. E., Buonomo, C., Padgett, B. L., and Walker, D. L. (1980) Experimental glioma in primates: A computed tomography model. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 4, 285-290.
105. Resnick, J., and Shenk, T. (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell to cell spread of virus. *J. Virol.* 60, 1098-1106.
106. Rhodes, R. H., Ward, J. M., Walker, D. L., and Ross, A. A. (1988) Progressive multifocal leukoencephalopathy and retroviral encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 1207-1213.
107. Rockwell, D., Rubin, F. L., Winklestein, A., and Mendelow, H. (1976) Absence of immune deficiencies in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Am. J. Med.* 61, 433-436.
108. Schneider, J., and Fanning, E. (1988) Mutations in the phosphorylation sites of simian virus 40 (SV40) T antigen alter its origin DNA-binding specificity for site I or site II and affect SV40 DNA replication activity. *J. Virol.* 62, 1598-1605.
109. Seganti, I., Mastromarino, P., and Superti, F. (1981) Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta. Virol. (Praha)* 25, 177-181.
110. Shapshak, P., Tourtellotte, W. W., Wolman, M., Verity, N., Verity, M. A., Schmid, P., Syndulko, K., Bedows, E., Boostanfar, R., Darvish, M., Nakamura, S., Tomiyasu, U., Steiner, R. C., Hawkins, S., Hawkins, D., Adhami, F., and Martinez, S. (1986) Search for nucleic acid sequences in postmortem human brain tissue using in situ hybridization technology with cloned probes; some solutions and results on progressive multifocal leukoencephalopathy and subacute sclerosing panencephalitis tissue. *J. Neurosci. Res.* 16, 281-301.
111. Shein, H. M. 1965. Propagation of human fetal spongioblasts and astrocytes in dispersed cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 40:554-569.

112. Simmons, D. T., Chou, W., and Rodgers, K. (1986) Phosphorylation downregulates the DNA-binding activity of simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 60, 888-894.
113. Sinibaldi, L., Viti, D., Goldoi, P., Cavallo, G., Caroni, C., and Orsi, N. (1987) Inhibition of BK virus haemagglutination by ganglioside. *J. Gen. Virol.* 68, 879-883.
114. Silverman, L., and Rubinstein, L. J. (1965) Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 5, 215-224.
115. Sleight, J. J., Topp, W. C., Hanish, R., and Sambrook, J. A. (1978) Mutants of SV 40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells. *Cell.* 14, 79-88.
116. Small, J. A., Scangos, G. A., Cork, L., Jay, G., and Khoury, G. (1986) The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell.* 46, 13-18.
117. Stam, F. C. (1966) Multifocal leukoencephalopathy with slow progression and very long survival. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.* 69, 453-459.
118. Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T. L., and Harrison, S. C. (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369, 160-163.
119. Stoner, G. L., Soffer, D., Ryschkewitsch, C. F., Walker, D. L., and Webster, HdeF. (1988) A double-label method detects both early T antigen and late capsid proteins of JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy brain tissue from AIDS and non-AIDS patients. *J. Neuroimmunol.* 17, 223-236.
120. Taguchi, F., Kajioaka, J., and Miyamura, T. (1982) Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC and BK virus in human sera. *Microbio. Imm.* 26, 1057-1064.
121. Telenti, A., Aksamit, A. J., Proper, J., and Smith, T. F. (1990) Detection of JC virus DNA by polymerase chain reaction in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 162, 858-861.
122. Tornatore, C. S., Berger, J. R., and Houff, S. A. (1992) Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* 31, 454-562.
123. Tooze, J (1981) Molecular biology of tumor viruses. part2. 2nd ed. DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor. N. Y.

124. Tsir, R.-T., Wang, M.-L., Ou, W.-C., Lee, Y.-L., Li, S.-Y., Fung, C.-Y., Huang, Y.-L., Tzeng, T.-Y., and Chang, D. (1997) Viruria incidence of JC virus is higher than that of BK virus in Taiwan. *J. Med. Virol.* In press.
125. Uchida, S., Watanabe, S., and Aizawa, K. (1979) Polyoncogenicity and insulinoma-inducing ability of BK virus, a human papovavirus, in Syrian golden hamsters. *J. Natl. Cancer. Inst.* 63, 119-126.
126. Uchida, S., Watanabe, S., and Aizawa, K. (1976) Induction of papillary ependymomas and insulinomas in the Syrian golden hamster by BK virus, a human papovavirus, *Gann.* 67, 857-865.
127. Vacante, D. A., Traub, R., and Major, E. O. (1989) Extension of JC virus host range to monkey cells by insertion of a simian virus 40 enhancer into the JC virus regulatory region. *Virology.* 170, 353-361.
128. van der Noordaa, J. V., and Wertheim-Van Dillon, P. (1977) Rise in antibodies to human papovavirus BK in clinical disease. *Letter. Br. Med. J.* 1, 1471.
129. Walker, D. L. (1978) Progressive multifocal leukoencephalopathy: An opportunistic viral infection of the central nervous system. in Vinken PJ, Bruyn GW (eds): *Handbook of Clinical Neurology.* Amsterdam, North-Holland Publishing Co. 18, 307-329.
130. Walker, D. L. (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy, in *Handbook of Clinical Neurology,* P. J. Vinken, G. W. Bruyn, and H. L. Elsevier Science. Amsterdam. 3, 503-524.
131. Walker, D. L. (1983) Progressive multifocal leukoencephalopathy, in *Comprehensive Virology Plenum,* B. L. Padgett, H. Frankel-Conrat, R. R. Wanger New York. 18, 161-193.
132. Walker, D. L. (1987) Progressive multifocal leukoencephalopathy and opportunistic viral infection of the central nervous system, in *Handbook of Clinical Neurology.* Vinken, P. J. and G. W. Bruyn, eds., North-Holland, Amsterdam. 34, 307-329.
133. Walker, D. L., Padgett, B. L., Zu Rhein, G. M., Albert, A. E., and Marsh, R. F. (1973) Current study of an opportunistic papovavirus, in *Slow Virus Diseases.* W. Zeman, and E. H. Lennette, Williams and Williams, Baltimore, MD. 49-58.
134. Walker, D. L., and Frisque, F. J. (1986) The biology and molecular biology of JC virus. In N. P. Saltzman (ed): *"The Papovaviridae".* New York: Plenum.

135. Walker, D. L., Padgett, B. L., and Zu-Rhein, G. M. (1973) Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science*. 181, 674-676.
136. Willoughby, E., Price, R. W., Padgett, B. L., Walker, D. L., and Dupont, B. (1980) Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML); in vitro cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology*. 30, 256-262.
137. Wright, P. J., and Di Mayorca, G. (1975) Virion polypeptide composition of the human papovavirus BK: comparison with simian virus 40 and polyoma virus. *J. Virol.* 15, 828-835.
138. Wroblewska, Z., Wellish, M., and Gildea, D. (1980) Growth of JC virus in adult human brain cell cultures. *Arch. Virol.* 65, 141-148.
139. Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K., and Taguchi, F. (1990) Isolation of a possible archetypical JC virus DNA sequence from non-immunocompromised individuals. *J. Virol.* 64, 3139-3143.
140. Yoshiike, E., Miyamura, T., Chan, H. W., and Takemoto, K. K. (1982) Two defective DNAs of human polyomavirus JC adapted to growth in human embryonic kidney cells. *J. Virol.* 42:395-401.
141. Zu Rhein, G. M. (1969) Association of papovavirions with a human demyelinating disease (progressive multifocal leukoencephalopathy). *Proc. Med. Virol.* 11, 185-247.
142. Zu Rhein, G. M. (1972) Virions in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Pathology of the Nervous System*, Minkler, J., ed., McGrawHill, New York. 3, 2893-2912.
143. Zu Rhein, G. M., and Chou, S. M. (1968) Papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.* 44, 307-362.
144. Zu Rhein, G. M. (1983) Studies of JC virus-induced nervous system tumors in the Syrian hamster: A review. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York. 205-221.
145. Zu Rhein, G. M., and Varakis, J. N. (1979) Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamsters by a human polyoma virus (JC). *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 51, 205-208.