

第十五屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA15-447

作品名稱：登革熱病毒非結構性蛋白 NS4B 對
單核球分化巨噬細胞的影響

姓名：陳睿琪

關鍵字：登革熱病毒、單核球、巨噬細胞 M1

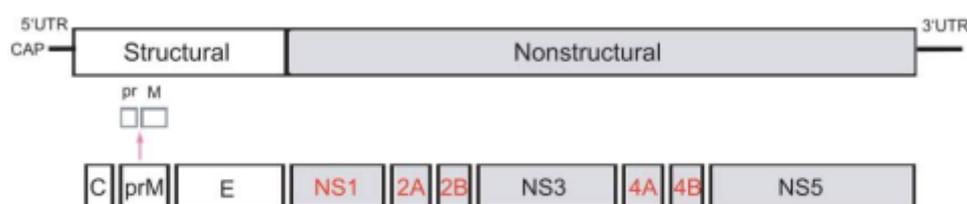
摘要

本實驗將含有登革熱病毒的「非建構性蛋白 4B (NS4B)」的基因載體置入慢病毒 (lentivirus) 中，再以 Tet-On 系統操縱感染單核球，利用流式細胞技術及測量細胞激素濃度來判斷單核球的分化情形。實驗結果顯示，感染後的單核球分化成**典型活化巨噬細胞** (classical activated macrophage ; M1) 的數量急遽上升，而 M1 所分泌的細胞激素 IL6 及 TNF- α 會誘發劇烈的發炎反應，因此推斷其為登革熱症狀中產生劇烈發炎、發燒的原因之一。

壹、研究動機

因地球暖化的關係，蚊子的棲息地不斷向北擴張進而導致登革熱的疫情再次升溫。登革熱輕則無症狀，亦稱為無症狀感染，或者像普通感冒一樣，重則可能導致出血、休克，甚至死亡，如登革出血熱及登革休克症候群。近年來，南部地區登革熱疫情日益嚴重，受感染而死亡的人數也逐年增加。由於至今尚未發展出有效疫苗及治療方式，因此了解病毒的蛋白質與寄主細胞之交互作用已成為重要的議題。

登革熱病毒的基因組分為兩部分，可表現出結構性蛋白(structural protein)及非結構性蛋白(nonstructural protein)，其中非結構性蛋白再分為 NS1，NS2A，NS2B，NS3，NS4A，NS4B 及 NS5，共七種。已知登革熱病毒在人體中可感染單核球、樹突細胞、肝細胞及內皮細胞。由於非結構性蛋白 NS4B 可能影響單核球演分化為巨噬細胞。而巨噬細胞是免疫反應中極為重要的一環，因此我們利用基因轉殖方式製成能單獨表現登革熱病毒非結構性蛋白 NS4B 的病毒，來感染單核球並探討其分化為巨噬細胞的後續反應。



課程相關部份：

高中基礎生物(上冊) 第三章第四節 防禦

高中基礎生物(下冊) 第四章第四節 基因轉殖技術及其應用

高中基礎生物(下冊) 第五章第二節 病毒的基本構造及地位

貳、研究目的

- 一、利用基因轉殖技術製備含有登革熱病毒 NS4B 基因的慢病毒，並感染單核球。
- 二、利用 Tet-on 表現系統，觀察 NS4B 蛋白影響單核球分化為巨噬細胞的情形。
- 三、分析巨噬細胞所釋放的細胞激素種類，進一步探討出血性登革熱的原因。

參、研究設備及器材

一、儀器設備

- (一) 聚合酶連鎖反應儀
- (二) 電泳裝置設備
- (三) 低溫高速離心機
- (四) 螢光顯微鏡
- (五) 桌上型離心機
- (六) 無菌操作台
- (七) 細胞培養箱(37°C, 5% CO₂)
- (八) 4°C 冰箱
- (九) -20°C 冷凍冰箱
- (十) -80°C 冷凍冰箱
- (十一) UV 燈
- (十二) 恆溫水浴槽
- (十三) 可調光譜動態分析儀
- (十四) 流式細胞儀
- (十五) 酵素免疫分析儀

二、實驗器材

- (一) 微量滴管
- (二) 細胞計數玻片
- (三) 細胞培養瓶
- (四) 離心液收集管
- (五) DF 離心管
- (六) 細胞計數盤

三、藥品

- (一) PCR

1. 10X PCR 緩衝液
2. 去氧核苷三磷酸 (dNTP)
3. DNA 聚合酶(Taq 酶)

(二) DNA 電泳

1. 洋菜膠
2. 1KB DNA Ladder
3. 100bpDNA Ladder
4. 6X loading dye
5. 上樣緩衝液(loading buffer)

(三) 質體萃取

1. 質體純化 solution I II III
2. 洗滌液(wash buffer)
3. 純化緩衝液(elution buffer)

(四) 藍白篩

1. X-Gal (5 -溴-4 -氯-3 -吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷)
2. IPTG (異丙基- β -D-硫代半乳糖苷)
3. 盤尼西林(Ampicillin)

(五) 其他

1. 二甲基亞砷 (Dimethyl sulfoxide, 簡稱 DMSO)
2. DF 緩衝液
3. 去氧澗四環素(Doxycycline)

四、限制酶 (廠牌：NEW ENGLAND BioLabs)

(一) EcoR I

(二) BgIII

(三) BamH I

(四) Sph I

(五) Sma I

(六) Afe I

(七) Nhe

(八) Mlu I

五、細胞株與質體

(一) 單核球 THP-1

表一、單核球細胞株的取得來源

生物	人類 <i>Homo sapiens, human</i>
細胞種類	單核球 monocyte
組織	周邊血液 peripheral blood
疾病	急性骨髓性白血病 acute monocytic leukemia
產品規格	冰凍 frozen
型態	單核球 monocyte
培養型態	懸浮 suspension

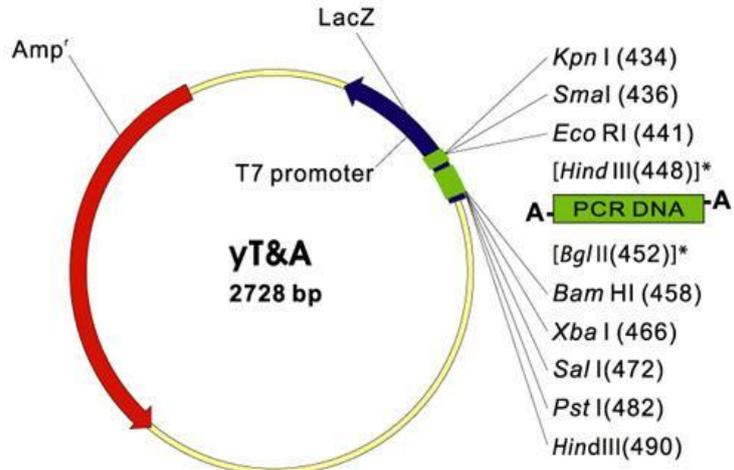
(二) 大腸桿菌勝任細胞

1. HIT Blue

2. HIT DH-5 alpha

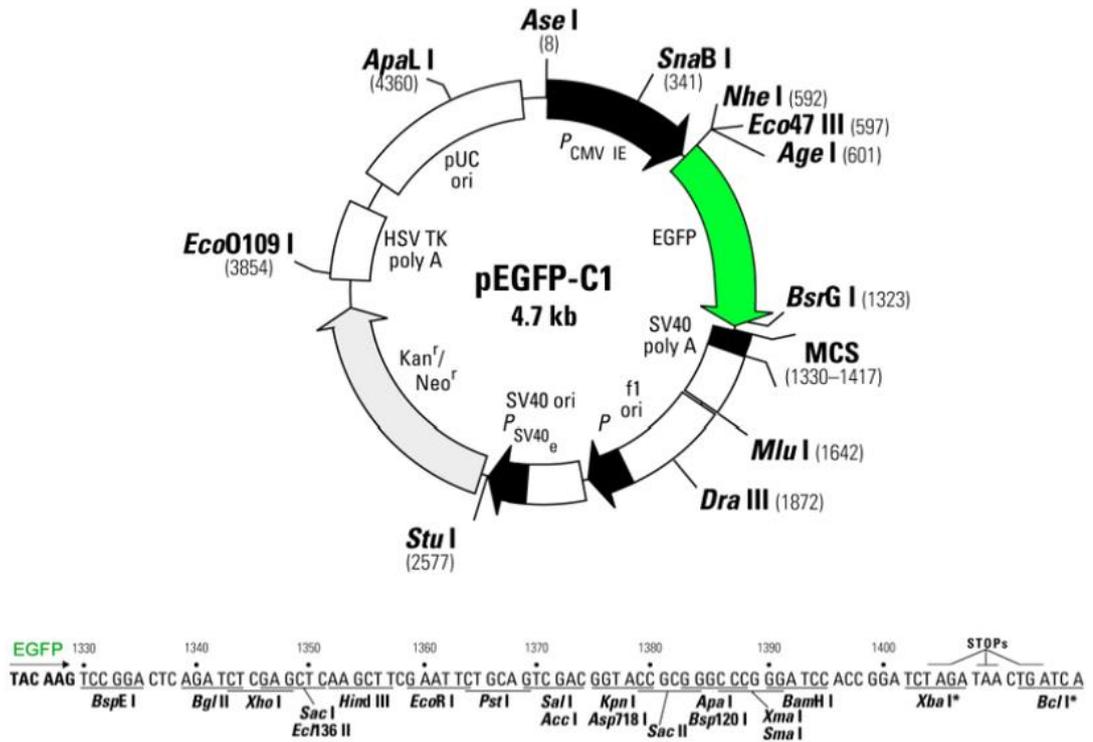
(三) 質體

1. yT&A



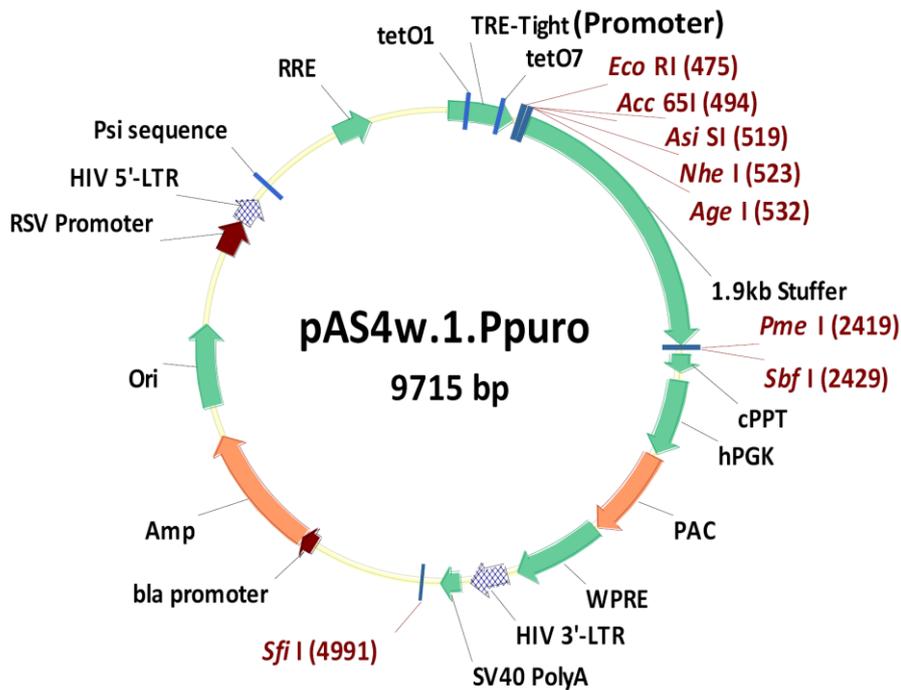
圖一、yT&A 質體

2. pEGFP-C1



圖二、pEGFP-C1 質體

3. pAS4w.1.Ppuro



圖三、pAS4w.1.Ppuro 質體

(四) DNA 片段

1. 登革熱病毒非結構性蛋白 4B (NS4B)

六、單核球培養液配方

- (一) RPMI 1640 (1 包)
- (二) 丙酮酸鈉(10 cc.)
- (三) 2-巰基乙醇 (40 μ l)
- (四) 4-羥乙基哌嗪乙磺酸 (10cc)
- (五) 碳酸氫鈉 (1500mg /L)
- (六) 胎牛血清 (10 % 100cc)

七、大腸桿菌培養液配方

(一) LB 培養基：

1. 胰蛋白胨(10g/ L)
2. 酵母粉(5g/ L)

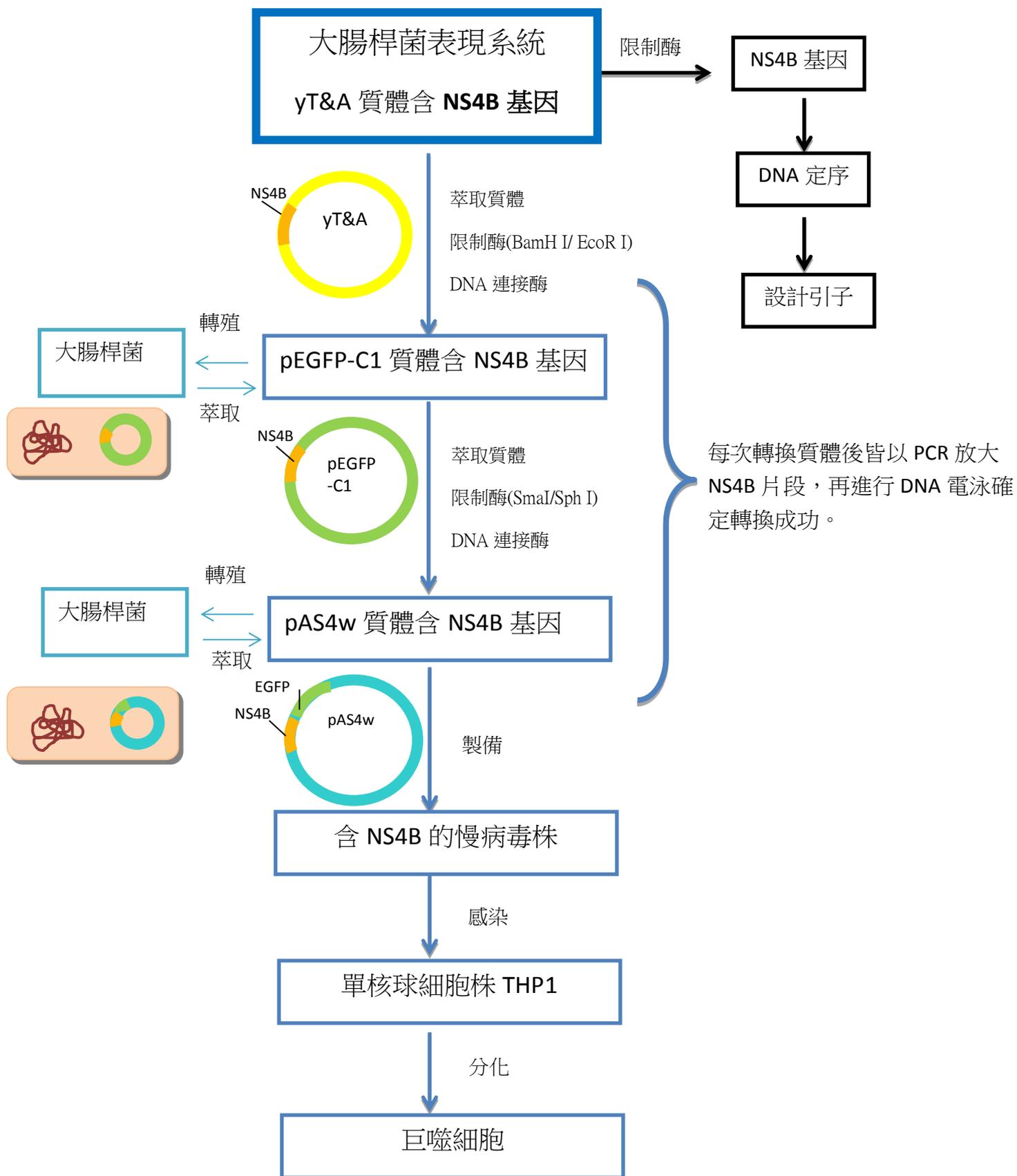
3. 氯化鈉(10g/ L)
4. 瓊脂(15g/ L)
5. 抗生素 Ampicillin 或 Kanamycin (50 μ g/ ml)

(二) SOC 培養液：

1. 胰蛋白胍 (20g/ L)
2. 酵母粉 (5g/ L)
3. 氯化鈉 (0.5g/ L)
4. 氯化鉀 (0.2g/ L)
5. 氯化鎂(0.95g/ L)
6. 硫酸鎂(1.2g/ L)
7. 葡萄糖(3.2g/ L)

肆、研究過程及方法

研究流程



一、細胞轉型(transformation)

取 $20\ \mu\text{l}$ 的大腸桿菌 HIT 勝任細胞放於冰上退冰後，加入目標之質體 DNA，置於冰桶約 10 分鐘後，放入水中以 42.5°C 加熱 45 秒。再放入冰桶 5 分鐘，加入 soc 培養基 $500\ \mu\text{l}$ 。最後置於震盪培養箱(37°C) 45 分鐘。

二、設計引子

取得質體後，進行細胞轉型 (transformation)，使質體轉殖入大腸桿菌，接著塗盤置於 37°C 恆溫箱中培養，隔天即挑選菌落保存並萃取質體後，以電泳確認質體大小，確認無誤後送機關定序，並各從 3'端及 5'端取 21 個鹼基對製成引子。

三、小量質體 DNA 萃取

將大腸桿菌接種於 20ml 的 LB 培養液，置於 37°C 震盪培養箱中培養 14 小時之後，取 2ml 於小型離心機中 4°C 離心 5 分鐘後去除上清液。先加入 $200\ \mu\text{l}$ Solution I Buffer 至微量離心管中，接著加入 $250\ \mu\text{l}$ Solution II Buffer 混和均勻後，再加入 $300\ \mu\text{l}$ Solution III Buffer 混和均勻。以小型離心機離心 1 分鐘後取上清液至離心管中離心 1 分鐘，倒掉收集管內液體。加入 $600\sim 700\ \mu\text{l}$ 洗滌液，離心 1 分鐘並倒掉收集管內液體。最後加入純化緩衝液 $100\ \mu\text{l}$ 離心 1 分鐘，取離心體。

四、酵素切割 DNA 片段及萃取

加入水 $85\ \mu\text{l}$, DNA $5\ \mu\text{l}$, 適當酵素各 $1\ \mu\text{l}$ 及其對應緩衝液 10ul。混合後放入其酵素對應溫度中 2~3 小時，並在反應完成後利用洋菜膠體電泳分析。再以紫外光照射，用手術刀切下螢光的部分放入離心管。於管中加入比膠體大兩倍的 DF 緩衝液，於 65°C 水浴槽加熱至完全溶解。再將離心管中液體取至 DF 離心管，以桌上型離心機離心五秒。之後加入沖洗緩衝液(wash buffer) $650\ \mu\text{l}$ 並離心 1 分鐘。倒掉收集管內的液體再加入純水，離心後收集離心液。

五、聚合酶連鎖反應 (PCR)

(一) 配方配製

1. 配方(單位： μl)：

表二、PCR 配方

Primer 1	0.2
Primer 2	0.2
10X PCR buffer	5
dNTP	0.3
Taq	0.5
水	43.8

2. 步驟：

- (1) 將配方乘以所需管數加入 2ml 管。
- (2) 將 $50\mu\text{l}$ 取出放入各個 PCR 管。
- (3) 進行 PCR。

(二) PCR 條件

表三、PCR 條件

	溫度	時間	循環數	反應
第一階段	94°C	5 min	1 cycle	Denaturing
第二階段	94°C	30 sec	3+36 cycle	Denaturing
	56°C	30 sec		Annealing
	72°C	1 min 20 sec		Extension
第三階段	72°C	5 min	2 cycle	Extension

六、轉換質體

(一) NS4B

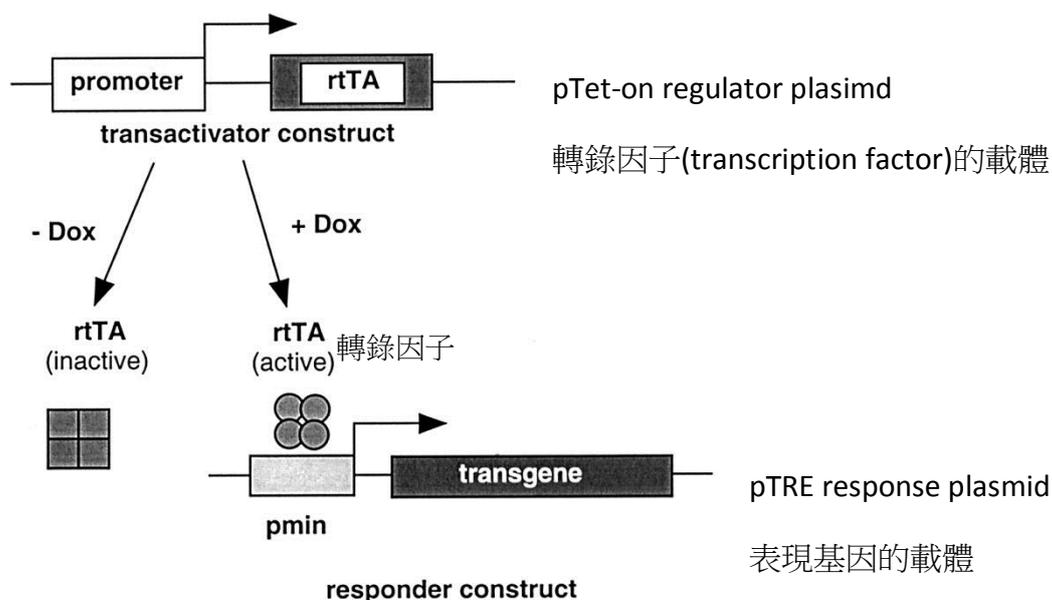
取得質體後以限制酶 BamH I 及 EcoR I 切下含有 NS4B 基因之片段並將片段接入載體 (yT&A)，並轉殖入大腸桿菌中放大。塗菌培養後，挑選菌落保存。以 M13 和 DV4B 3'為引子進行 PCR(聚合酶連鎖反應)，再電泳確認大小，挑選正確之菌落加以培養。

純化上述質體後，以 Sam I 及 Sph I 切下含有 NS4B 基因之片段再將之接入載體(pEGFP-C1)。之後將整段 DNA 放大並再次塗菌培養，挑選菌落後以 DV4B'和 C1-5'為引子進行 PCR，並以電泳確認大小，再挑選較適合的菌種進行純化。純化後以 Nhe 及 MluI 切下含有 NS4B 以及 EGFP 基因之片段，再將之接入載體(pAS4w)

七、蛋白質表現機制

(一) Tet-On system

pAS4w 載體中的 TRE-tight 在系統中擔任啟動子(Tet-inducible promoter)，pTet-on regulator plasmid 會不斷表現出 rtTa 蛋白質(無活性)，一旦加入去氧四環素(Doxycycline, Dox)進入細胞與 rtTa 蛋白質結合，使 rtTa 改變結構(有活性)，便可以使下游的基因開始表現。



圖四、Tet-on 系統

八、大腸桿菌培養及菌落挑選

(一) 培養環境：37°C, 300rpm, 振盪培養

(二) 菌落挑選：

將轉型完成的 HIT 勝任細胞塗抹於含有盤尼西林、X-Gal 和 IPTG 的瓊脂培養基，並置於 37 ° C 下培養。隔天進行藍白菌落篩選，選擇白色較大的菌落進行 PCR，確認轉型的結果。

九、THP1 單核球細胞培養

(一) 培養環境：恆溫 37 ° C，CO₂ 濃度 5%。

(二) 配製培養液：

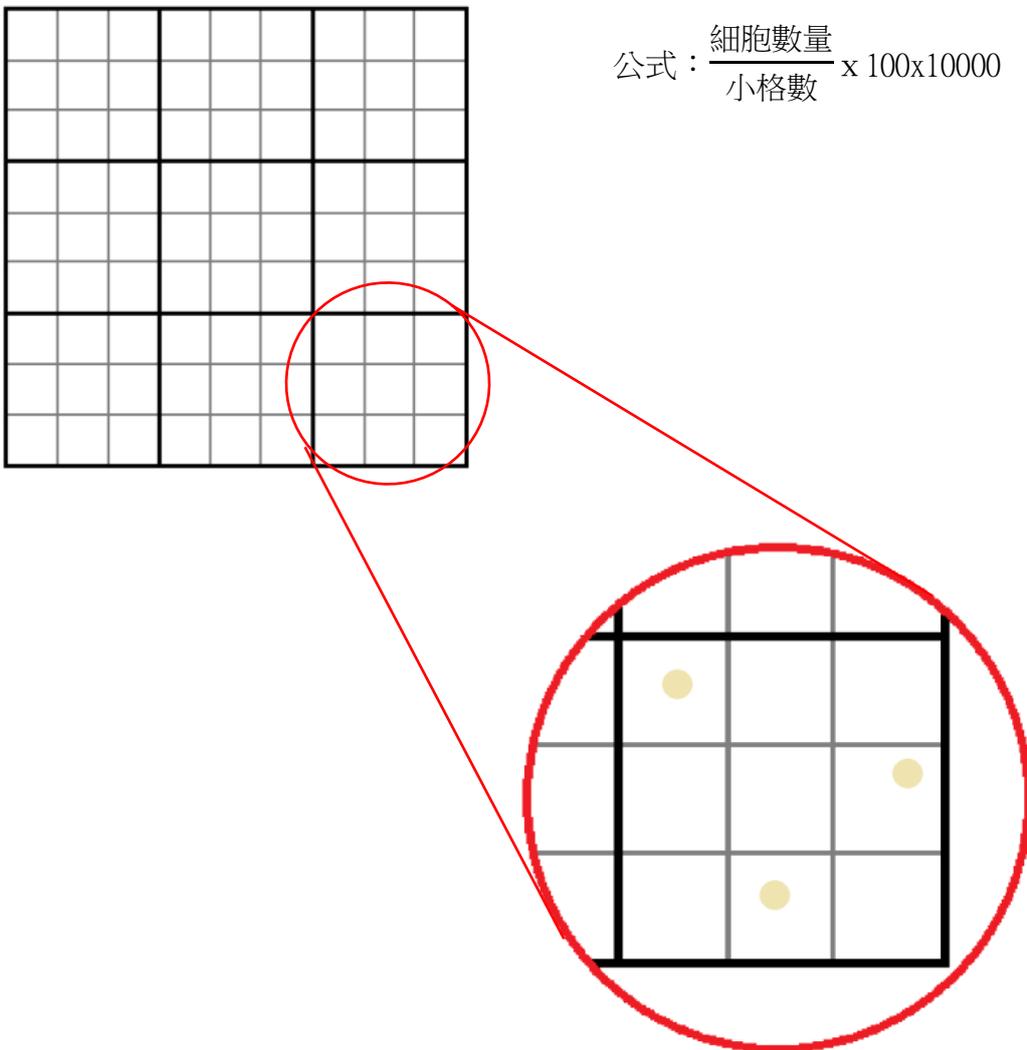
1. 將 RPMI1640 培養液粉末一包、去離子水 (890mL)、胎牛血清(10 % 100mL)、丙酮酸鈉(10cc)、2-巰基乙醇(40 μ l)、碳酸氫鈉(1500mg)、4-羥乙基哌嗪乙磺酸(10cc)加入已滅菌的燒杯，置於電磁加熱攪拌器由磁攪拌子攪拌。
2. 用酸鹼度計測酸鹼值，再以鹽酸與氫氧化鈉調整 pH 值至約 7.3。
3. 抽氣過濾培養液。

(三) 細胞培養

取冷凍 THP1 單核球細胞，解凍後置於細胞培養液 (10ml) 中。培養於 37 ° C 恆溫箱中。每隔三天換一次培養液。

(四) 細胞計數

1. 將沉澱細胞與細胞培養液混合均勻
2. 取 $10\mu\text{l}$ 的液體與 $990\mu\text{l}$ 生理食鹽水混合均勻放入細胞計數盤，以顯微鏡觀察之。
3. 計算 9×9 格中的細胞數量，將其代入公式，所得結果即為原培養液中約略的細胞數量。



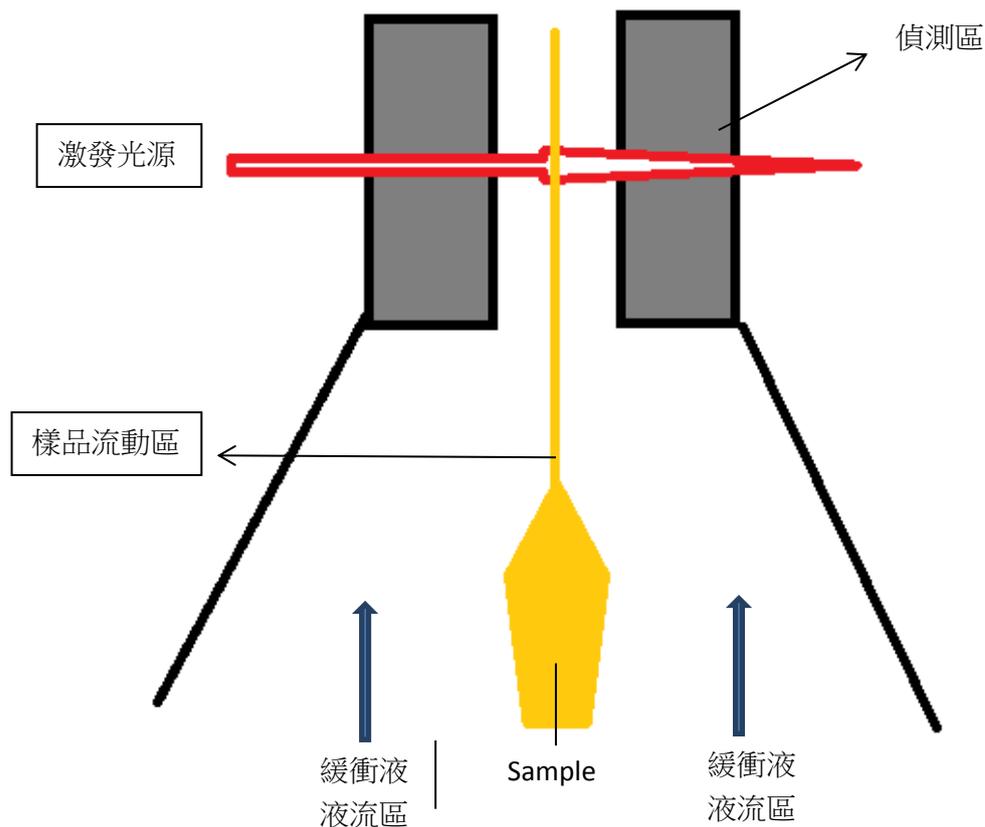
圖五、細胞計數

十、分析細胞表面受體蛋白

(一) 流式細胞技術：

1. 步驟

- (1) 將待測細胞經特異性螢光染料染色後放入樣品管中
- (2) 細胞在氣體的壓力下進入充滿鞘液的流動室
- (3) 細胞排成單列由流動室的噴嘴噴出，形成細胞柱
- (4) 細胞柱與入射的雷射光束垂直相交，液柱中的細胞被雷射激發產生螢光產生信號
- (5) 電腦系統收集、儲存、顯示並分析被測定的各種信號
- (6) 得到之結果用 t-test 統計法分析



圖六、流式細胞技術

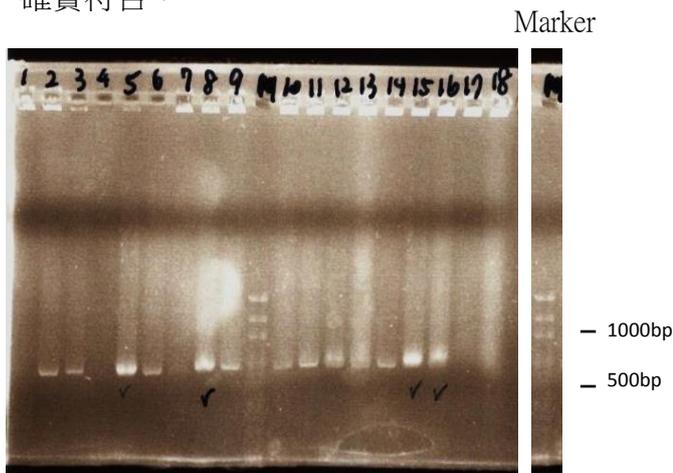
伍、研究結果

一、電泳純化確認圖

(一) NS4B

1. NS4B-yT&A PCR

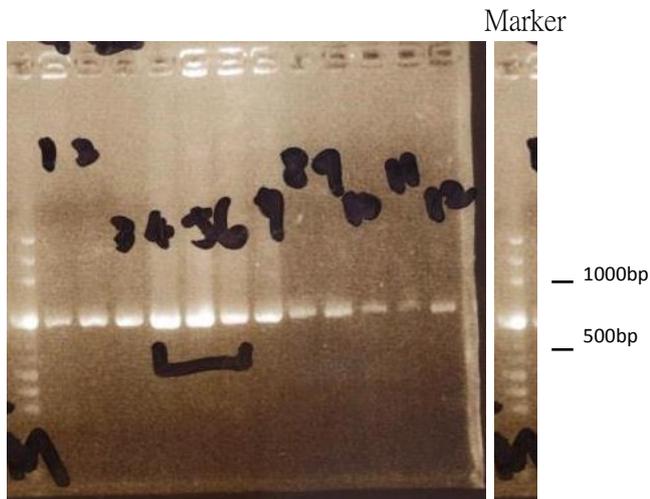
由參考資料得知，NS4B 基因片段之大小為 744bp。而據此電泳圖知其片段大小確實符合。



圖七、NS4B 電泳圖

2. NS4B- pEGFP-C1 PCR

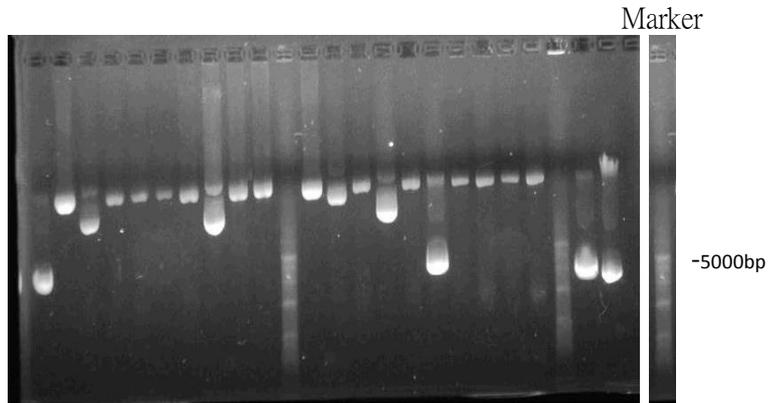
由參考資料得知，NS4B 基因片段之大小為 744bp。而據此電泳圖知其片段大小確實符合



圖八、NS4B 電泳圖

3. 包含 NS4B 基因片段的 pAS4w.Ppuro 質體

由參考資料得知，包含 NS4B 基因片段的 pAS4w.Ppuro 質體大小為 9715bp。而據此電泳圖知其片段大小確實符合

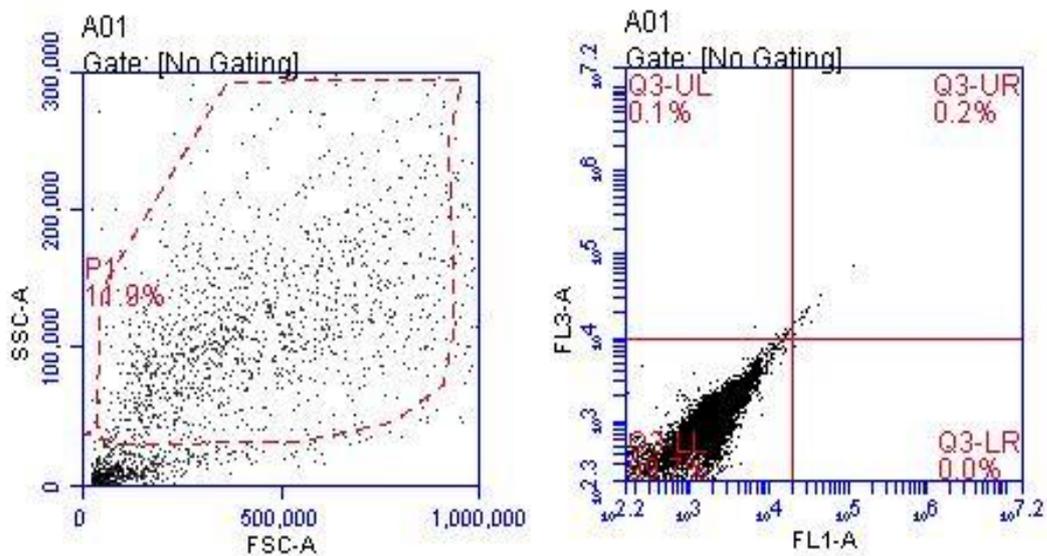


圖九、含 NS4B 基因片段的 pAS4w.Ppuro 電泳圖

二、感染後單核球分化結果

(一) 流式細胞儀分析單核球分化

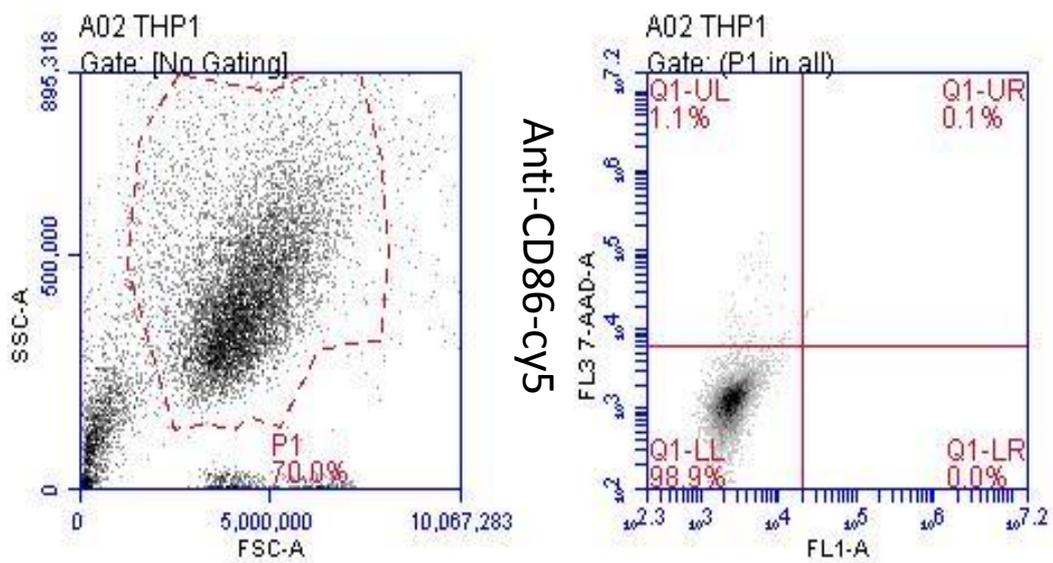
1. 對照組(blank)：未標定螢光染劑(PE)



圖十、對照組(blank)：未標定螢光染劑(PE)

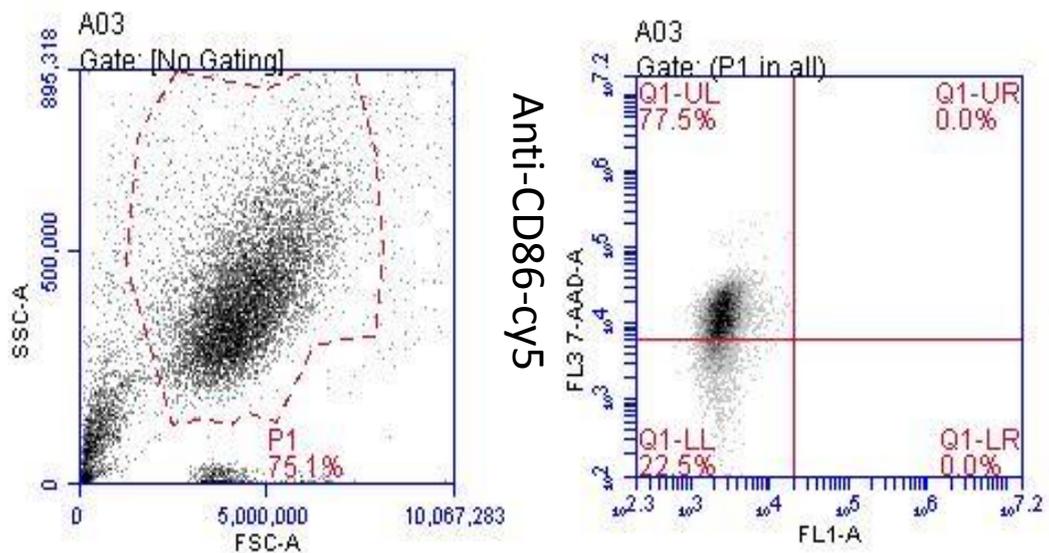
2. 八小時後細胞分析

(1) 對照組：未加入去氧羥四環素



圖十一、八小時後，對照組：未加入去氧羥四環素

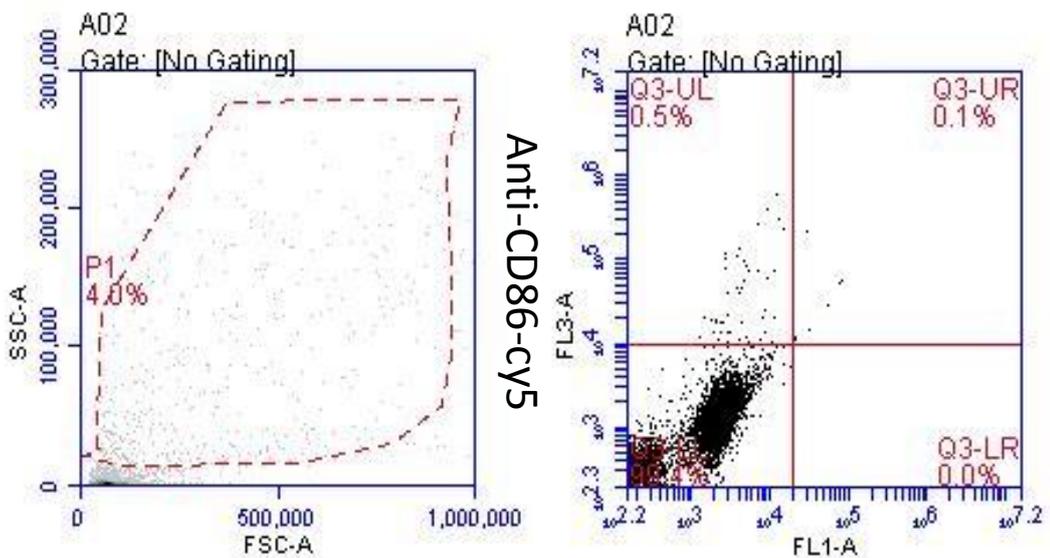
(2) 實驗組：加入去氧羥四環素



圖十二、八小時後，實驗組：加入去氧羥四環素

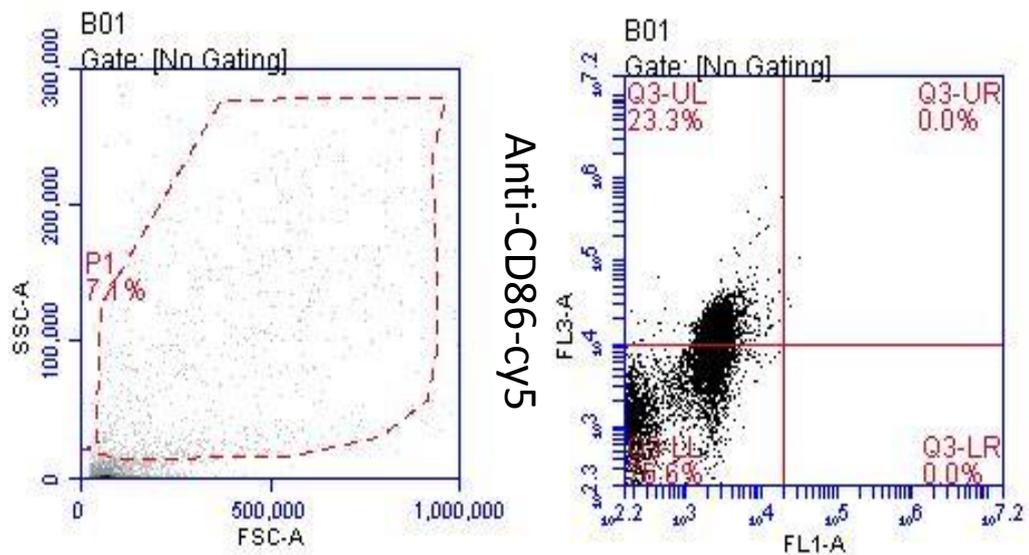
3. 十六小時後細胞分析

(1) 對照組：未加入去氧羥四環素



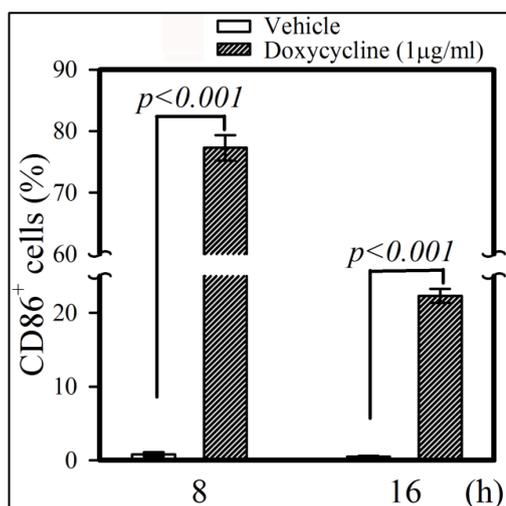
圖十三、十六小時後，對照組：未加入去氧羥四環素

(2) 實驗組：加入去氧羥四環素



圖十四、十六小時後，實驗組：加入去氧羥四環素

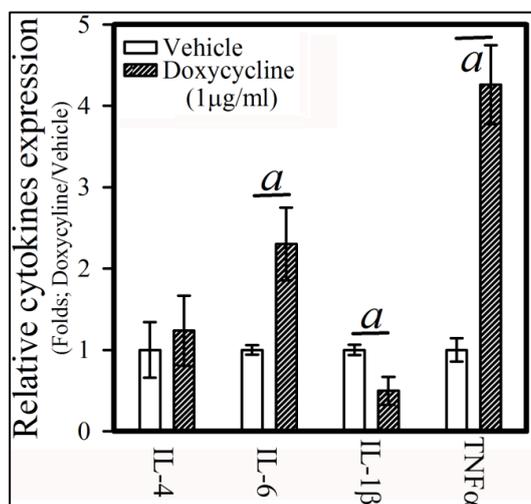
經流式細胞儀分析，加入去氧羥四環素的實驗組具有受體 CD86 的細胞比例在八小時後約為 78.2%，十六小時為 23.3%，而無加入去氧羥四環素的對照組受體 CD86 的細胞比例約為 0.5%。由此可知，受 NS4B 感染後分化之巨噬細胞中，具有受體 CD86 之細胞比例上升，因此推論單核球分化為的巨噬細胞 M1 數量亦上升(如圖十五)。



圖十五、去氧羥四環素的加入與否及具有 CD86 受體之細胞產生數關係圖

(二) 細胞激素

由酵素免疫分析法測定細胞激素產生情況(圖十六)，未加入去氧羥四環素的對照組 IL6 的濃度為 1 (µg/ml)，而加入去氧羥四環素的實驗組 IL6 的濃度約為 2.5 (µg/ml)；另外，未加入去氧羥四環素的對照組 TNFα 的濃度為 1 (µg/ml)，而加入去氧羥四環素的實驗組 TNFα 的濃度約為 4.5 (µg/ml)。由此可知，受 NS4B 感染後 IL6 以及 TNFα 分泌之濃度急遽上升，尤其以 TNFα 濃度的上升更為顯著，因此我們推論受 NS4B 感染之單核球分化為的巨噬細胞 M1 數量應急遽增加。

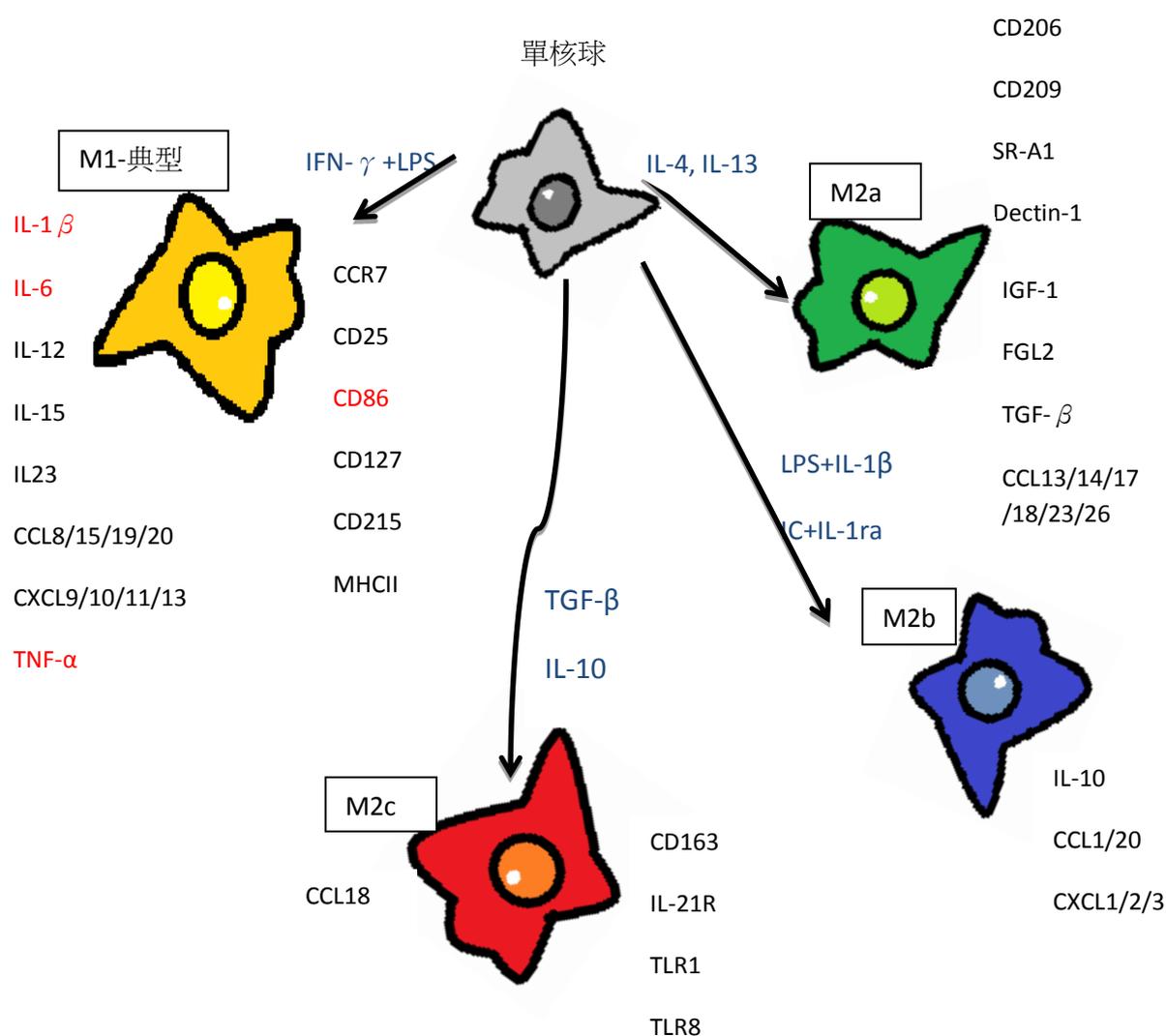


圖十六、細胞激素於 tet-on 系統中改變情形

陸、討論

一、單核球的分化

單核球在分化為巨噬細胞時主要分為兩大類—典型活化巨噬細胞（classical activated macrophage；M1）以及替代活化巨噬細胞（alternatively activated macrophage；M2）。M1 的吞嚥能力較強，分泌的細胞激素 IL6 及 TNF α 亦會產生較強烈的發炎反應，其目的為快速將入侵體內的病原體吞嚥並分解；而 M2 所分泌的細胞激素 IL10 則會抑制發炎反應，其功能主要為引發對抗細胞外寄生蟲入侵的免疫反應，以及參與受傷組織的修復。因此我們推測登革熱的症狀中會引起劇烈的發炎、發燒反應與單核球分化出較多的 M1 有關。



圖十七、單核球分化為各種巨噬細胞

二、具 CD86 的細胞比例較多，可判斷單核球大多數分化為 M1

由圖十七可知，單核球主要分化為兩種巨噬細胞 M1 和 M2，M2 又再細分為 M2a、M2b 和 M2c，這些巨噬細胞的表面分化叢集分子(cluster of differentiation；CD)各不相同，其中 M1 具有 CD86，而 M2 缺乏，故我們可以利用是否有較多的細胞表面具有 CD86，來判斷單核球的分化情形。

三、比較 IL6 及 TNF α 濃度，可判斷單核球大多數分化為 M1

由圖十七可知，IL-6 和 TNF α 主要是由 M1 所產生，M2 並不產生這兩種細胞激素，因此可由之推測 NS4B 感染後的單核球，主要會分化成 M1 典型細胞，進而誘發較為嚴重的發炎反應，如發高燒等。

四、M1 細胞比例升高與登革熱重症相關

因受 NS4B 感染而分化的巨噬細胞以 M1 居多，而 M1 分泌的細胞激素 IL6 會活化 B 細胞分化為漿細胞分泌大量抗體、誘導急性期蛋白質的生成及合成，亦會激活 T 細胞及其他細胞誘發發炎反應，導致紅、腫、熱、痛等反應的出現，因此我們推斷受登革熱病毒感染後所引發的劇烈發炎、發燒反應與病毒中的 NS4B 蛋白有關。

柒、結論

- 一、登革熱病毒非結構性蛋白 NS4B 可使單核球分化出具有 CD86 的巨噬細胞，即 M1。
- 二、登革熱病毒非結構性蛋白 NS4B 可使單核球分化出能分泌 IL6 及 TNF α 的巨噬細胞，即 M1。
- 三、M1 會產生較嚴重的免疫反應，因此登革熱病毒的非結構性蛋白 NS4B 和導致登革熱重症的關係密切。

捌、未來展望

登革熱病毒一共包含三種結構性蛋白以及七種非結構性蛋白，而在本次實驗中，我們用了 NS4B 病毒蛋白來觀察其對單核球分化的影響。我們希望有機會測試其他登革熱蛋白的影響。進而了解感染出血性登革熱症狀較嚴重的原因。此外，我們也希望未來可以測試其他細胞對登革熱病毒蛋白的反應，並了解不同細胞感染後的交互作用，最後找出藥物抑制登革熱蛋白之作用，達到治療登革出血熱的目的。

玖、參考資料

- 一、 陳維鈞(2003)。蚊子傳播登革病毒的機制。科學發展。368期。54-59
- 二、 徐惠琳 (2006)。登革熱病毒 RNA 分離方法的評估及其感染肝細胞凋亡之研究。國立中山大學生物科學研究所碩士論文
- 三、 藍敏書 (2009) 。以大腸桿菌 C41 與 C43 菌株表現登革熱病毒蛋白 NS1、NS2、NS4 與 E。國立交通大學生物醫學研究所碩士論文
- 四、 劉慧萍，謝東呈(2011)。弘光學報 65 期·17 登革病毒感染之免疫病理機轉及未來治療之展望
- 五、 陳薇琳 (2012) 。臺灣登革熱疫情之時空群集研究。國立陽明大學生物醫學資訊研究所碩士論文
- 六、 林建宏 (2013) 。探討登革熱核心蛋白與正轉錄延長因子之交互作用。國立陽明大學藥理學研究所碩士論文
- 七、 中華民國九十二年四月一日高醫醫訊月刊第二十二卷第十一期，取自：
<http://www.kmuh.org.tw/www/kmcj/data/9204/7.htm>
- 八、 衛生福利部(無日期)。登革熱 - 衛生福利部疾病管制署專業人士版。民國一〇五年二月二十一日，取自：<http://www.cdc.gov.tw/professional/Dengue>
- 九、 James F. Kelley ,Pakieli H. Kaufusi , Esther M. Volper , Vivek R. Nerurkar(2011). Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*. 418, 27-39
- 十、 Michael S. Diamond, Theodore C. Pierson(2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*. 162, 489-492
- 十一、 Jordan V. Price, Russell E. Vance (2014) , The Macrophage Paradox[http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(14\)00391-4](http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(14)00391-4)

拾、附錄

一、含 4B 非建構性蛋白(NS4B)之 yT&A-DNA 定序

```
10      20      30      40      50      60      70
CAAATGGCGG TAGGCGTGTA CGTGGGAGGT CTAATAAGCA GAGCTCTCTG GCTACTAGAG ACCCACTGCT
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>
b_____1 TO 125 OF 4B-1_BGHR.TXT [SPLIT]_____b_____>

80      90      100     110     120     130     140
ACTGCTATCG AAATTATACG ACTCACTATA GGAGACCCAA GCTGGCTAGT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>
b_1 TO 125 OF 4B-1_BGHR.TXT [SPLIT]_____b_____>

150     160     170     180     190     200     210
ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATCTGTC AGATATCCAG CACAGTGGCG GCCGCTCGAG CGCCACCATG
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

220     230     240     250     260     270     280
AACGAGATGG GTTTCCTAGA AAAAACGAAG AAAGATCTCG GATTGGGAAG CATTGCAACC CAGCAACCCG
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

290     300     310     320     330     340     350
AGAGCAACAT CCTGGACATA GATCTACGTC CTGCATCAGC ATGGACGCTG TATGCCGTGG CCACAACATT
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

360     370     380     390     400     410     420
TGTTACACCA ATGTTGAGAC ATAGCATTGA AAATTCCTCA GTGAATGTGT CCCTAACAGC TATAGCCAAC
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

430     440     450     460     470     480     490
CAAGCCACAG TGTTAATGGG TCTCGGGAAG GGATGGCCAT TGTCAAAGAT GGACATCGGA GTTCCCTTC
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

500     510     520     530     540     550     560
TCGCCATTGG ATGCTACTCA CAAGTCAACC CCATAACTCT CACAGCAGCT CTTTCTTAT TGGTAGCACA
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

570     580     590     600     610     620     630
TTATGCCATC ATAGGGCCAG GACTCCAAGC AAAAGCAACC AGAGAAGCTC AGAAAAGAGC AGCGGGGGGC
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

640     650     660     670     680     690     700
ATCATGAAAA ACCCAACTGT CGATGGAATA ACAGTGATTG ACCTAGATCC AATACCTTAT GATCCAAAGT
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

710     720     730     740     750     760     770
TTGAAAAGCA GTTGGGACAA GTAATGCTCC TAGTCCTCTG CGTGACTCAA GTATTGATGA TGAGGACTAC
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

780     790     800     810     820     830     840
ATGGGCTCTG TGTGAGGCTT TAACCTTAGC TACCGGGCCC ATCTCCACAT TGTGGGAAGG AAATCCAGGG
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

850     860     870     880     890     900     910
AGGTTTTGGA ACACTACCAT TGCGGTGTCA ATGGCTAACA TTTTGTAGAG GAGTTACTTG GCCGGAGCTG
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

920     930     940     950     960     970     980
GACTTCTCTT TTCTATTATG AAGAACACAA CCAACGCAAG AAGGCTCGAG TCTAGAGGGC CCTTCGAACA
a_____a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>

990     1000    1010    1020    1030    1040
AAAACTCATC TCAGAAGAGG ATCTGAATAT GCATACCGGT CATCATCACC ATCACCATTG A
a_____2 TO 1042 OF 4B-1_T7.TXT_____a_____a_____>
```

二、含 4B 非建構性蛋白(NS4B)之 pEGFP-C1-DNA 定序

```

10      20      30      40      50      60      70
CCCGTCTAAA CTCTCGGCAT GGACGAGCTG TACAAGTCCG GACTCAGATC CAGATCTATG AACGAGATGG

80      90      100     110     120     130     140
GTTTCCTAGA AAAAACGAAG AAAGATCTCG GATTGGGAAG CATTGCAACC CAGCAACCCG AGAGCAACAT

150     160     170     180     190     200     210
CCTGGACATA GATCTACGTC CTGCATCAGC ATGGACGCTG TATGCCGTGG CCACAACATT TGTTACACCA

220     230     240     250     260     270     280
ATGTTGAGAC ATAGCATTGA AAATTCCTCA GTGAATGTGT CCCTAACAGC TATAGCCAAC CAAGCCACAG

290     300     310     320     330     340     350
TGTTAATGGG TCTCGGGAAA GGATGGCCAT TGTCAAAGAT GGACATCGGA GTTCCCCTTC TCGCCATTGG

360     370     380     390     400     410     420
ATGCTACTCA CAAGTCAACC CATAACTCTC ACAGCAGCTC TTTTCTTATT GGTAGCACAT TATGCCATCA

430     440     450     460     470     480     490
TAGGGCCAGG ACTCCAAGCA AAAGTAACCA GAGAAGCTCA GAAAAGAGCA GCGGCGGGCA TCATGAAAAA

500     510     520     530     540     550     560
CCCAACTGTC GATGGAATAA CAGTGATTGA CCTAGATCCA ATACCTTATG ATCCAAAGTT TGAAAAGCAG

570     580     590     600     610     620     630
TTGGGACAAG TAATGCTCCT AGTCCTCTGC GTGACTCAAG TATTGATGAT GAGGACTACA TGGGCTCTGT

640     650     660     670     680     690     700
GTGAGGCTTT AACCTTAGCT ACCGGGCCCA TCTCCACATT GTGGGAAGGA AATCCAGGGA GGTTTTGGAA

710     720     730     740     750     760     770
CACTACCATT GCGGTGTCAA TGGCTAACAT TTTTAGAGGG AGTTACTTGG CCGGAGCTGG ACTTCTCTTT

780     790     800     810     820     830     840
TCTATTATGA AGAACACAAC CAACGCAAGA AGGCTCGGGT CTAGAGGGCC CTTCGAACAA AAACCTCATCT

850     860     870     880     890     900     910
CAGAAGAGGA TCTGAATATG CATACCGGTC ATCATCACCA TCACCATTAA GCTTGGGAAT CTGCAGTCGA

920     930     940     950     960     970     980
CGGTACCGCG GGCCCGGGAT CCACCGGATC TAGATAACTG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG

990     1000    1010    1020    1030    1040    1050
GTTTTACTTG CTTTAAAAAC CTCCCACACC TCCCCCTGAA CCTGAAACAT AAAATGAATG CAATTGTTGT

```

三、含 4B 非建構性蛋白(NS4B)之 pAS4w.Ppuro-DNA 定序

```

10          20          30          40          50          60          70
AACGGGCAGT CGAGTGCCT CCGAGGCTTG CAGAATGCGG AACACCGCGC GGGCAGGAAC AGGGCCCACA

80          90          100         110         120         130         140
CTACCGCCCC ACACCCCGCC TCCCGCACCG CCCCTTCCCG GCCGCTGCTC TCGGCGCGCC CTGCTGAGCA

150         160         170         180         190         200         210
GCCGCTATTG GCCACAGCCC ATCGCGGTCT GCGCGCTGCC ATTGCTCCCT GGCCTGTCTC GTCTGCGAGG

220         230         240         250         260         270         280
GTACTAGTGA GACGTGCGGC TTCCGTTTGT CACGTCCGGC ACGCCCGCAA CCGCAAGGAA CCTTCCCGAC

290         300         310         320         330         340         350
TTAGGGGCGG AGCAGGAAGC GTCGCCGGGG GGCCACAAG GGTAGCGGGC AAGATCCGGG TGACGCTGCG

360         370         380         390         400         410         420
AACGGACGTG AAGAATGTGC GAGACCCAGG GTCGGCGCCG CTGCGTTTCC CGGAACCACG CCCAGAGCAG

430         440         450         460         470         480         490
CCGCGTCCCT GCGCAAACCC AGGGCTGCCT TGGAAAAGGC GCAACCCGGG CCCCTCGAG CCGGCGCCAA

500         510         520         530         540         550         560
AGTGGATCTC TGCTGTCCCT GTAATAAACC CGAAAATTTT GAATTTTGTG AATTTGTTTT TGTAATTCCT

570         580         590         600         610         620         630
TAGTTTGTAT GTCTGTTGCT ATTATGTCTA CTATTCCTTC CCCTGCACTG TACCCCCCAA TCCCCCTTT

640         650         660         670         680         690         700
TCTTTTAAAA TTGTGGATGA ATACTGCCAT TTGTCTCAAG ATCTACCTGC AGGGTTTAAA CGCGTTAAGA

710         720         730         740         750         760         770
TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG

780         790         800         810         820         830         840
ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCATTT

850         860         870         880         890         900         910
TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGG AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT

920         930         940         950         960         970         980
GGCTGATTAT GATCAGTTAT CTAGATCCGG TGGATCCCGG GCCCGCGGTA CCGTCGACTG CAGAATTTCC

990         1000        1010        1020        1030        1040        1050
AAGCTTAATG GGTGATGGTG ATGATGACCG GTATGCATAT TCGGATCCTC TTCTGAGATG AGTTTTTGTT

```