

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號

090013

參展科別

醫學與健康科學

作品名稱

天狗現形劑-研發分辨四型登革病毒之抗原快篩試劑

就讀學校

臺北市立永春高級中學

指導教師

呂瑞旻
李映璇

作者姓名

許赫庭
張新悅

關鍵詞

抗原快篩試劑、登革病毒、NS1

作者簡介



各位教授、老師、同學大家好！我們是永春高中數理資優班二年級學生許赫庭、張新悅。秉持著對生物知識充滿學習的熱忱以及對實驗的熱愛，使我們開始投入專題研究。感謝數資班的課程安排，使我們有機會進入中研院學習，並進行生物研究。同時也希望我們的實驗結果能提供醫療參考與技術支持。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別： 北區

科別： 醫學與健康科

作品名稱：天狗現形劑-研發分辨四型登革病毒之抗原快篩試劑

關鍵詞：抗原快篩試劑、登革病毒、NS1

編號：090013

摘要

登革熱(Dengue Fever)俗稱天狗熱，由登革病毒(Dengue virus; DENV)透過埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)和白線斑蚊(*Aedes albopictus*)傳播並於熱帶及溫帶地區肆虐。每年全球約有五千萬至一億人感染登革病毒，約有五十萬人因登革出血熱(Dengue Hemorrhagic Fever; DHF)而住院。登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，尤其是與台灣頻繁往來的東南亞國家，其中一型與二型在東南亞國家病例數較高。當不同血清型登革病毒交錯感染容易引發登革出血熱以及登革休克症候群(Dengue Shock Syndrome)，對公共衛生構成重大挑戰。因此研發可快速辨識四型登革病毒之檢驗試劑將有助於提升臨床診斷與後續治療。本報告的研究結果有三項，**(1)四型登革病毒 NS1 (Nonstructural Protein 1)蛋白的表達與純化**：利用分子生物技術成功構建載體並純化四型 NS1 蛋白，作為免疫原蛋白用於小鼠免疫；**(2)單株抗體的篩選與親和性測試**：經三次免疫後，利用小鼠脾臟細胞與骨髓瘤細胞進行融合，篩選並生產針對 NS1 蛋白的單株抗體(monoclonal antibody, mAb)，並通過酵素結合免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)驗證抗體的專一性及親和力；**(3)快篩試劑的開發與性能測試**：運用側向流體免疫層析法(lateral flow immunoassay)設計並組裝快篩試劑，先以重組蛋白進行初步測試，隨後將使用去活性病毒進行性能驗證，確保試劑的靈敏度與準確性。期望這些研究成果有助於台灣登革熱防疫且為臨床治療提供參考。

Abstract

Dengue virus, commonly known as "breakbone fever", is transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and is a significant public health concern in tropical and subtropical regions. Annually, it infects an estimated 50 to 100 million individuals worldwide, with approximately 500,000 cases progressing to Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), requiring hospitalization. Dengue fever is particularly prevalent in Southeast Asia, a region with frequent interactions with Taiwan, where serotypes 1 and 2 are dominant. Secondary infections with different dengue virus serotypes are associated with severe complications, including DHF and Dengue Shock Syndrome (DSS), posing significant challenges to public health. To address these challenges, the development of rapid diagnostic tools capable of distinguishing all four dengue virus serotypes is critical for improving clinical diagnostics and guiding therapeutic interventions. This study presents the following key outcomes: **(1) Expression and purification of four NS1 proteins:** Using molecular biotechnology, we successfully constructed vectors and purified the NS1 proteins of all four dengue virus serotypes as immunogens for mouse immunization; **(2) Selection and characterization of monoclonal antibodies:** After three rounds of immunization, mouse splenocytes were fused with myeloma cells to produce and screen monoclonal antibodies (mAbs) targeting the NS1 proteins. The specificity and binding affinity of these antibodies were confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); **(3) Development and validation of a rapid diagnostic test:** A lateral flow immunochromatographic assay was designed and assembled. Initial performance testing was conducted using recombinant proteins, followed by further validation with inactivated viruses to ensure the sensitivity and accuracy of the rapid test. The findings of this research are anticipated to contribute to the enhancement of dengue prevention efforts in Taiwan and provide valuable insights for clinical applications.

壹、 前言

一、研究動機

登革熱俗稱天狗熱或斷骨熱，由黃病毒科(Flaviviridae)黃病毒屬(Flavivirus)中的登革病毒亞屬所引起，而依據 E protein，登革病毒分為 DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4 四種血清型別，而可分成每一型都具有能感染致病的能力。根據世界衛生組織的資料，1960 年之前，原本僅限於少數熱帶國家有登革出血熱的病例在短短約幾十年之間便已擴及到整個熱帶以及大部份亞熱帶的國家(WHO, 2000)。而若重複感染到不同型別的病毒，發生登革出血熱(dengue hemorrhagic fever)及的登革休克症狀(dengue shock syndrome; DSS)的機會較高，而登革出血熱的死亡率高達 50%(衛生福利部疾病管制署，2001)，目前廣為使用的檢驗方法：包含病毒培養、反轉錄聚合酶鏈反應(Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)、針對病毒 NS1 蛋白質進行抗原抗體結合作用等。其中針對病毒 NS1 蛋白質進行抗原抗體結合作用的方法如：及免疫層流分析法(lateral flow immunoassay, LFIA)及酵素結合免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

目前市面上有兩種快篩試劑分為抗原試劑以及血清試劑，其中血清試劑主要偵測的是血清中是否存在對抗登革病毒的專一性 IgM 與 IgG 抗體(衛生福利部疾病管制署 2024)。然而針對病毒急性感染，目前市面上缺少可精準區別四型的高靈敏抗原快篩，原因是具有高度專一性、足以鑑別四型的單株抗體開發難度高。另一方面由於登革病毒是 RNA 病毒如(圖 1)，由於 RNA 病毒之核酸中的 E protein 序列容易突變，突變的病毒株之抗原構造改變。而 NS1 為不易突變之區域，並且病毒會複製釋出病毒顆粒及 NS1 聚合體，因此可以依據 NS1 的有無來判斷是否受到感染。因此我們以四型的 NS1 蛋白作為目標抗原，採用融合瘤細胞技術(Hybridoma technology)研發對抗高特異性單株抗體，進一步開發為分辨登革病毒四型的抗原試劑，期望有助於台灣登革熱防疫且為臨床治療提供參考。

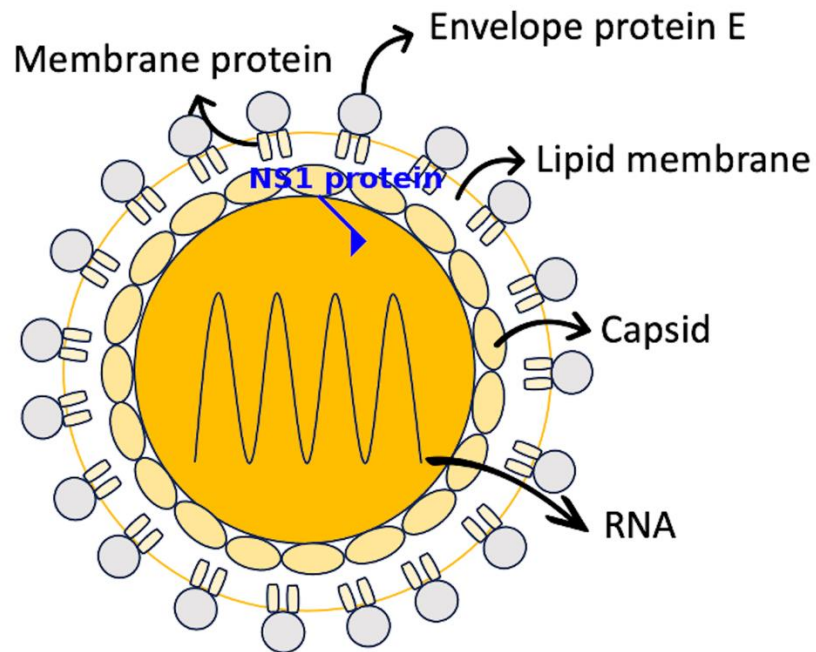


圖 1：登革病毒結構示意圖

二、研究背景

(一)登革熱流行病學

登革病毒是透過埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)和白線斑蚊(*Aedes albopictus*)來傳播的，主要在熱帶和亞熱帶地區流行。這種病毒有四個不同的血清型，分別是 DENV-1、DENV-2、DENV-3 和 DENV-4。雖然這四個血清型之間大約有 65%的基因序列相同，且每種血清型與人體免疫系統的反應不同，但即便在同一血清型內，也會有遺傳變異。儘管如此，這些不同的血清型所引起的疾病症狀和表現卻非常相似(Beasley, D. W. C. & Barrett, A. D. T. 2008)。目前，登革病毒已在世界衛生組織劃定的多個區域，包括非洲、美洲、東南亞和西太平洋地區廣泛傳播，影響了超過 100 個國家。其中，美洲、東南亞和西太平洋地區的疫情特別嚴重，亞洲地區的登革熱負擔占全球的 70%(衛福部，2024)。

(二)登革病毒感染的臨床症狀

登革熱是一種由蚊子傳播的病毒性疾病，主要在熱帶和亞熱帶地區流行。登革熱的臨床症狀範圍很廣，從無症狀的輕微感染到可能導致多重器官衰竭的嚴重感染，感染前兩週的檢驗方式為偵測病毒抗原，一旦超過兩週則是以偵測血清抗體。登革出血熱是登革熱的一種亞型，其特徵是血漿滲漏(即臨界期)，這種滲漏通常發生在胸部和腹腔，需要密切監控和精細的液體復甦。此外，登革熱還可能引發影響心臟、肝臟、腎臟及大腦等器官的長期或異常症狀。針對這種全球範圍的疾病，目前疫苗研發和病媒控制方面的研究仍在持續進行(衛生福利部，2015)

(三)登革病毒介紹

登革病毒(DENV)的非結構性 NS1 蛋白在病毒生命週期中扮演著多重功能。NS1 經過多肽切割後，會形成與病毒 RNA 複合體相關的同源二聚體，並與 PrM 和 E 蛋白互作，促進病毒顆粒的組裝。此外，NS1 的疏水性特徵使其參與囊泡包裹的形成，這些結構對病毒複製過程至關重要，因為它們是宿主細胞內承載病毒複製機制的關鍵。值得注意的是，NS1 以可溶的六聚體形式循環於感染者的血液中，並且是登革病毒急性期中唯一可檢測到的非結構性蛋白。在登革病毒的急性期，分泌型可溶性 NS1(sNS1)在血液中循環，並與高密度脂蛋白(HDL)表現出極大的結構相似性。這些高密度脂蛋白攜帶三酸甘油酯、膽固醇酯和磷脂質，並與 sNS1 互動。sNS1 在感染者血液中的濃度可高達 50 µg/mL，這一現象促使基於 sNS1 免疫捕獲技術的診斷試劑盒的開發，並成為登革病毒急性期診斷的重要依據(MDPI, 2021)。

(四)登革病毒偵測方法

1.病毒核酸檢測：反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR)

首先，萃取病毒 RNA，接著加入專一性引子(primer)與反轉錄酶反應，製作 cDNA。PCR 反應中的初始變性步驟對於確保模板 DNA 有效分離至關重要。此步驟的目的是將雙股 DNA 分離成單股，以便引子結合並啟動延伸過程。通常在 94–98°C 的高溫下進行 1 至 3 分鐘，這樣的溫度有助於消除樣品中的不耐熱蛋白酶和核酸酶活性，對熱穩定性 DNA 聚合酶影響最小。此外，高溫有助於激活熱啟動型 DNA 聚合酶，若有需要則可進行單獨的啟動步驟。根據不同的模板 DNA 特性，變性時間與溫度可進行調整(QIAGEN, 2013)。

2.抗原檢測：ELISA 和 LFIA

ELISA 和 LFIA 是常見的抗原檢測方法，兩者都基於抗原與抗體的特異性結合。其中 ELISA 為先將抗原或抗體固定在板孔上，接著加入樣本待時間到後洗滌並加入酵素標記抗體，再次洗滌，最後加入呈色劑以檢測結果(LISA 原理介紹，年份不詳)。而 LFIA 則是將樣本與緩衝液稀釋後，將其滴上快篩劑上的樣品區(sample pad)上，接著樣本會藉由毛細作用開始流動，而樣本中的抗原會與結合區的標記檢測抗體結合成抗原-抗體複合物，當複合物到達測試線(test line)時，若樣本中含有目標抗原，複合物會被測試線的固定抗體截留並顯色。無論樣本是否含抗原，對照線(control line)都應顯色以確認檢測的有效性(LEADGENE，年份不詳)。

3. 抗體檢測：ELISA 和間接免疫螢光法 (IFA)

IFA 免疫螢光技術是一種結合免疫學、生物化學與顯微鏡技術的研究方法。它基於抗原與抗體之間的特異性反應，將已知的抗原或抗體用螢光基團標記後，作為探針用於檢測細胞或組織中的對應抗原或抗體。透過螢光顯微鏡，可以觀察螢光信號的位置，從而確定目標抗原或抗體的分佈與特性。此外，還可以使用流式細胞儀等定量工具來測量其含量(斯博利康，2021)。

(五)免疫層流分析法(lateral flow immunoassay, LFIA)

LFIA(側向流動免疫分析)原理基於毛細作用，將樣本放入樣本墊(sample pad)，樣本中的目標分析物與具有膠體金的抗體的檢測標籤(conjugate pad) 結合，隨著液體的流動，通過測試模(Nitrocellulose membrane, NC membrane)。在測試膜上，會有預先印刷的另一株捕捉抗體，

當樣本流過測試線(test line)，若樣本中存在目標分析物時，捕捉抗體會與分析物進行特異性結合，而累積成肉眼可見的色帶，而每一條試紙上都有具有品管指示線 (control line)，該區抗體會結合所流過具有膠體金標記之抗體而累積呈色，因此在 NC membrane 上呈現兩條線表示陽性，若無目標分析物則只呈現一條線(control line)表示陰性，最後樣本流入吸收墊(Absorbent pad)防止樣本回流。這種方法的結果依賴於目標分析物的存在與否，以及特定的測試條件 (LEADGENE，年份不詳)。

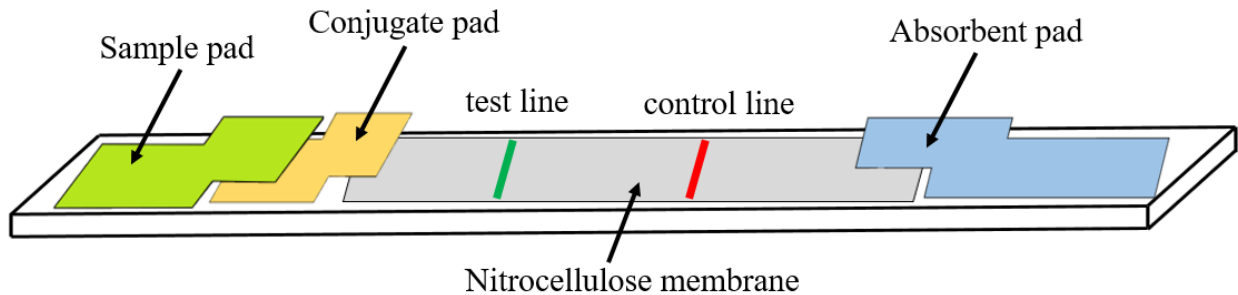


圖 2：快篩結構示意圖

三、研究目的

- (一)純化及生產分辨登革四型的 NS1 單株抗體。
- (二)探討抗體對登革四型抗原的結合能力差異。
- (三)NS1 單株抗體與膠體金粒子結合。
- (四)製作快篩。
- (五)快篩性能測試。

貳、 研究方法與過程

一、研究架構

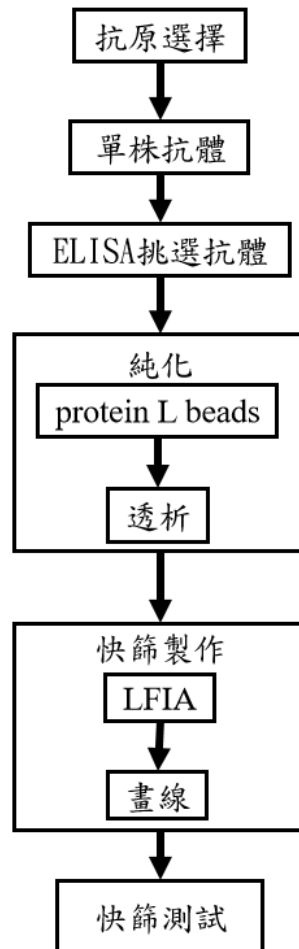


圖 3：研究架構流程圖

二、研究設備與材料

電動吸管(pipette aid)、分度吸量管(serological pipette)、微量吸管分注器(pipette)、微量吸管尖(pipette tip)、15mL 離心管、50mL 離心管、濃縮管、微量離心管、4°C冰箱、-20°C冰箱、-80°C冰箱、離心機、NanoDrop、拭鏡紙、分光光譜儀、保鮮膜、鋁箔紙、秤量紙、量筒、電子秤、電腦、針筒過濾器、針筒、96 孔細胞培養盤、錐形瓶、奇異筆、PBS、BSA、NC membrane、absorbent pad、conjugate pad、sample pad、快篩劃線機、快篩試紙裁切機、Back card、奈米金(Colloidal gold solution)。Protein L beads: Protein L 是一種免疫球蛋白結合蛋白，來自於 *Peptostreptococcus magnus*。它具有與 IgG 輕鏈區域結合的能力，能夠有效地與大多數免疫球蛋白結合。由於其高效的抗體結合特性，Protein L 常用於純化單株或多株抗體(生工 Sangon Biotech，年份不詳；泰鼎生物有限公司，年份不詳)。

三、研究方法

(一)抗原選擇

登革病毒的結構包括 3 種結構蛋白：capsid、membrane protein 及 envelope glycoprotein 和 7 種非結構蛋白：NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 及 NS5，其中非結構蛋白 NS1

antigen 在感染初期可於感染者血清中偵測到，所以用來研發登革熱快速診斷試劑(行政院衛生署，2005)。除此之外，倘若登革病毒的 RNA 序列改變，NS1 亦不易發生變化。

(二)單株抗體(monoclonal antibody, mAb)

抗原蛋白質與抗體結合的部位稱為抗原決定位，每個抗原蛋白質可能含有一個或多個抗原決定位，也就是可被一種或多種抗體所辨識(科技大觀園，2015)。每一種抗體是由單一 B 細胞所產生，若能把 B 細胞單獨培養成細胞株，就可以得到特定的抗體。大量培養此細胞株，即為單株抗體。然而 B 細胞不易在培養基中培養，而癌細胞則容易在培養基中培養，且目前已有很多建立好的癌細胞株，若能把癌細胞永生的特性，利用細胞融合導入可生產特定抗體的 B 細胞中，就可以得到能在培養基中建立的不朽化 B 細胞株，此即為融合瘤細胞株。以 NS1 作為抗原注入小鼠，使其發生免疫反應並產生抗體，再將 B 細胞由小鼠脾臟中挑出來，與癌細胞融合，則可得到在培養基中永久生長的融合瘤細胞株，再經過篩選及單株化後，即可得到專一性高的單株抗體。此方法可以得到高親和力之抗體，篩選出良好的抗體配對，進而製作出高專一性的登革熱快篩試劑。

(三)抗體純化與定性

1. 使用連接酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分析融合瘤單株抗體的專一性

ELISA 原理是利用抗體與抗原之間的專一性結合，配合呈色劑(如：四甲基聯苯胺(TMB)、鄰苯二胺(OPD)、對硝基苯基磷酸(PNPP)等)反應，通過呈色的深淺來定量樣品中特定目標蛋白質的含量。ELISA 的優勢在於，它只需要少量樣品即可進行檢測，並且具有高敏感性，能夠同時檢測多種抗體(ACE Biolabs，年份不詳)。首先，將抗原序列分別稀釋至 0.5、0.1、0.02、0.004 $\mu\text{m}/\text{ml}$ ，並使其附著於 96 孔細胞培養盤中(圖 4 Step1)。隨後，用 PBST 洗去未附著的抗原。此時，ELISA 板上會留下疏水性空間(phobic sites)，這些空隙需要用蛋白質填充，以防止反應物或後續的抗體與抗原附著在這些空隙中，從而影響測量結果。常見的填充蛋白包括 BSA、脫脂乳粉、酪蛋白或明膠等(費軫尹，年份不詳)，本實驗中選擇使用 BSA。接著，將一級抗體(mouse IgG)加入各孔中 (圖 4 Step2)，並在 4 分鐘後洗去未與抗原結合的一級抗體，接著為了檢測一級抗體與抗原的結合成效，所以在各個孔內加入二級抗體(goat anti-mouse IgG)(圖 4 Step3)，二級抗體上會付有酵素 HRP(horseradish peroxidase)，4 分鐘後在各個孔內同時加入呈色劑 TMB(tetramethylbenzidine)，HRP 會分解 TMB 使其呈現藍色，當藍色越深時，代表結合的數量越多，4 分鐘後在各個孔內同時加入鹽酸來酸鹼中和已終止 TMB 的反應，使溶液呈現黃色。

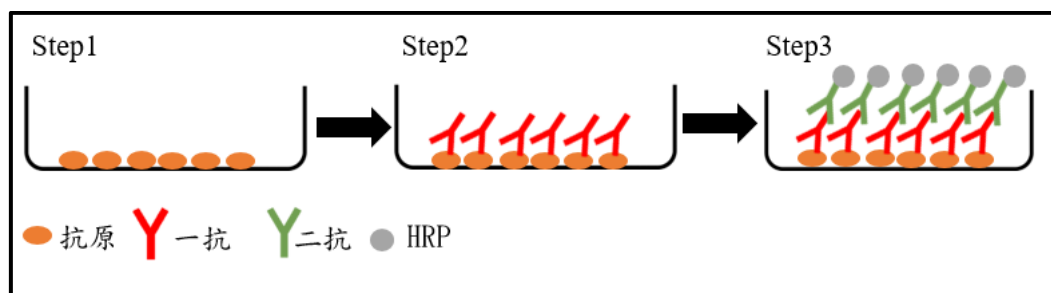


圖 4:ELISA 流程圖

2. 抗體純化(Antibody purification)

首先，將培養基使用孔徑為 4.5 μ m 的針筒過濾器過濾。接著，將 protein L beads 倒入底部含有膠體的純化管柱，然後將培養基倒入管柱中，培養基會從管柱底部流入下方的燒杯，燒杯則收集過濾後的培養基，而抗體會被 beads 吸附。待培養基完全流完後，將燒杯內的濾液全數倒回純化管柱，此步驟重複三次，以確保培養基中的抗體完全被 beads 吸附。接下來，為了將 beads 固定於膠體上，需沿管壁緩慢加入 pH=4 的 Binding Buffer，直到達到 10ml 刻度，此時管柱底部流出的液體為廢液。為了中和收集後抗體的 pH 值，需在將液體轉移至微量離心管前，於離心管內加入 pH=9 的 Tris-HCl (20 μ m)。接著，為了使抗體與 beads 分離，需沿管壁緩慢加入 pH=2 的 Elution Buffer，直到達到 10ml 刻度。此時，流出的液體的前兩滴不含抗體，應該排除，從第三滴(抗體濃度最高)開始收集。每個離心管應收集 1ml 的液體後，再更換至下一個離心管。接著以透析法(Dialysis)置換抗體的溶劑，我們首先使用 NanoDrop 測出每個蛋白質的濃度，留下濃度高於 0.1mg/ml 的，準備一個 5L 的量桶並在裡面加入 1 倍的 PBS 5L，再將孔徑為 3.5KDa 的透析膜(snakeskin)用 PBS 浸潤，並將一端摺疊後使用透析夾使其封閉，接著將透析膜內的 PBS 用 pipette 吸出，在透析模內加入抗體樣本，再使用透析夾將透析膜另一端封閉，以鐵絲固定在浮板上放入 PBS 中，在 4 度冰箱中以轉速 100 rpm 進行 24 小時攪拌。最後測量透析後的蛋白質濃度，再將產物保存於-80 度冰箱。

3.使用十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS PAGE)確認抗體純度

SDS(十二烷基磺酸鈉)分子具有長疏水性尾部，能與蛋白質的疏水性區域結合，而其極性頭部則指向水相。這樣的結構使得蛋白質帶上負電荷。由於 SDS 與蛋白質結合，蛋白質表面的負電荷密度變得均勻，這使得在進行電泳時，所有蛋白質的遷移速率主要受其分子量的影響，分子量大的蛋白速率較慢，較靠近負極，分子量小則反之。因此，分子量大小不同的蛋白質在凝膠中移動不同的距離，從而可以通過它們在凝膠中的位置來估算其分子量(國立台灣大學，年份不詳)。我們進行跑膠使用的電壓為上膠 80V，下膠 120V。跑膠完成後，使用 coomassie blue 染劑，於室溫染色約 60 分鐘。將染劑倒掉後再加入適量去離子水，於室溫退染 30-60 min。為了使長期儲存不易氧化，造成結果不同，所以用 reducing sample buffer 來打斷蛋白間的雙硫鍵，使蛋白形成線性結構。

(四)快篩製作

1.側向流體免疫層析法(lateral flow immunochromatographic assay, LFIA)的製作步驟

快篩試劑的 Conjugate pad 所使用的膠體金分為三種： Colloidal Gold、Gold Nanoshells、Latex Particles，而我們選用 Colloidal Gold。因為 Colloidal Gold 不但靈敏度很好，更重要的是其價格便宜，可有效降低往有大量需求的快篩製造成本。在乾燥環境(低於 30%)下，我們利用抗體與抗原專一性結合的特性，配合呈色劑反應，利用呈色深淺來定量樣品中特定目標抗原的含量，用膠體金與免疫複合物沉澱在測試線(test line)上。NC 模板(Nitrocellulose membrane)上有 test line 及 control line 兩條，其中 control line 上的抗體可以與四種抗原結合，因此必定

會成色，以確保快篩劑是正常運作的。LFIA 的優勢在於，只需要少量樣品即可進行檢測、敏感性高並且可以同時檢測多種抗體。

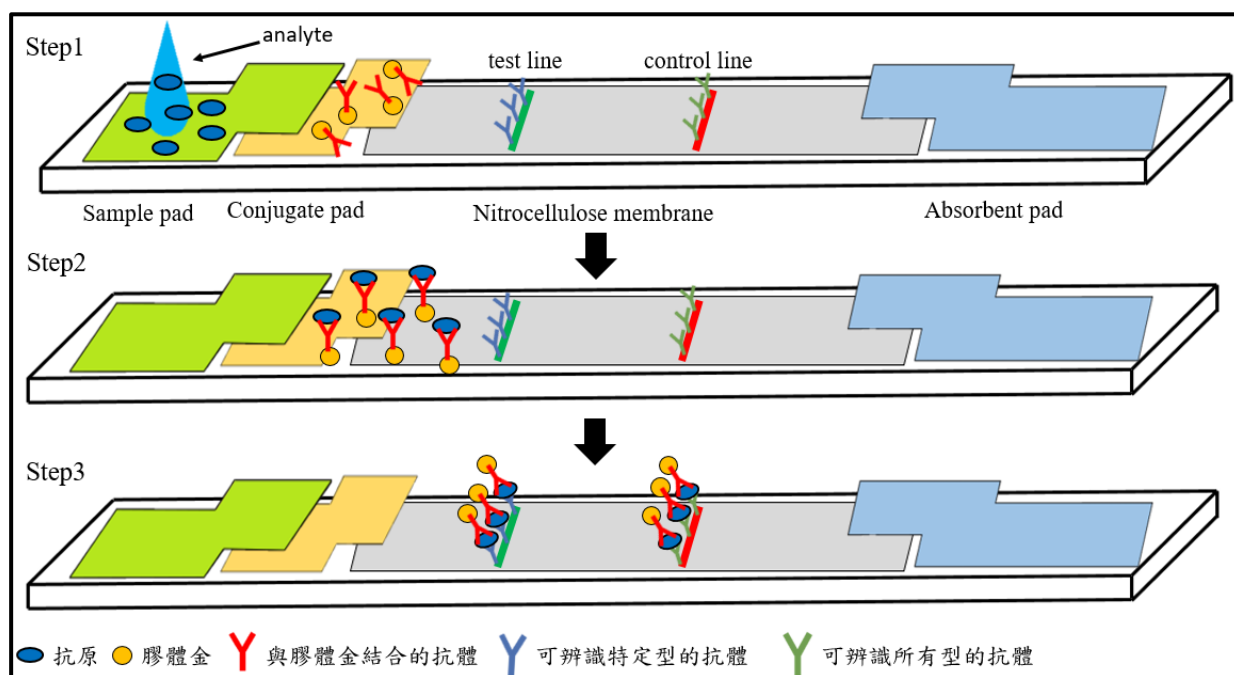


圖 5：快篩流程示意圖

2.配置畫線用抗體溶液

先貼好 NC 模板，分別以濃度 1.265(mg/mL)的 DA12-4/2、濃度 1.266(mg/mL)的 DA13-2/1、濃度 1.014(mg/mL)的 DA15-3、濃度 1.016(mg/mL)的 DC5-1、濃度 1.132(mg/mL)的 DD33-2 各 50 μ g 及濃度為 3.104(mg/mL)的 Goat Anti-mouse IgG 200 μ g 中，都加入 methanol 和 64% sucrose。因為抗原或抗體需要固定在 NC 模板，methanol 可以改變表面性質，幫助蛋白質更牢固地附著在表面，而 sucrose 可以穩定抗體在乾燥條件下的活性，接著就可以放入畫線機進行畫線。

3.畫線

使用畫線機，加入要進行用於繪製 test line 及 control line 的抗體，完成設定並啟動即能完成硝化纖維膜上 test line 及 control line 的繪製。

參、研究結果與討論

一、ELISA 結果

我們利用 ELISA 方法確認其辨識 NS1 之蛋白型。並且我們將 96 孔細胞培養盤放入分光光譜儀，在波長 450nm 下測定吸光值(OD)，並把結果以柱狀圖進行量化(圖 6)。

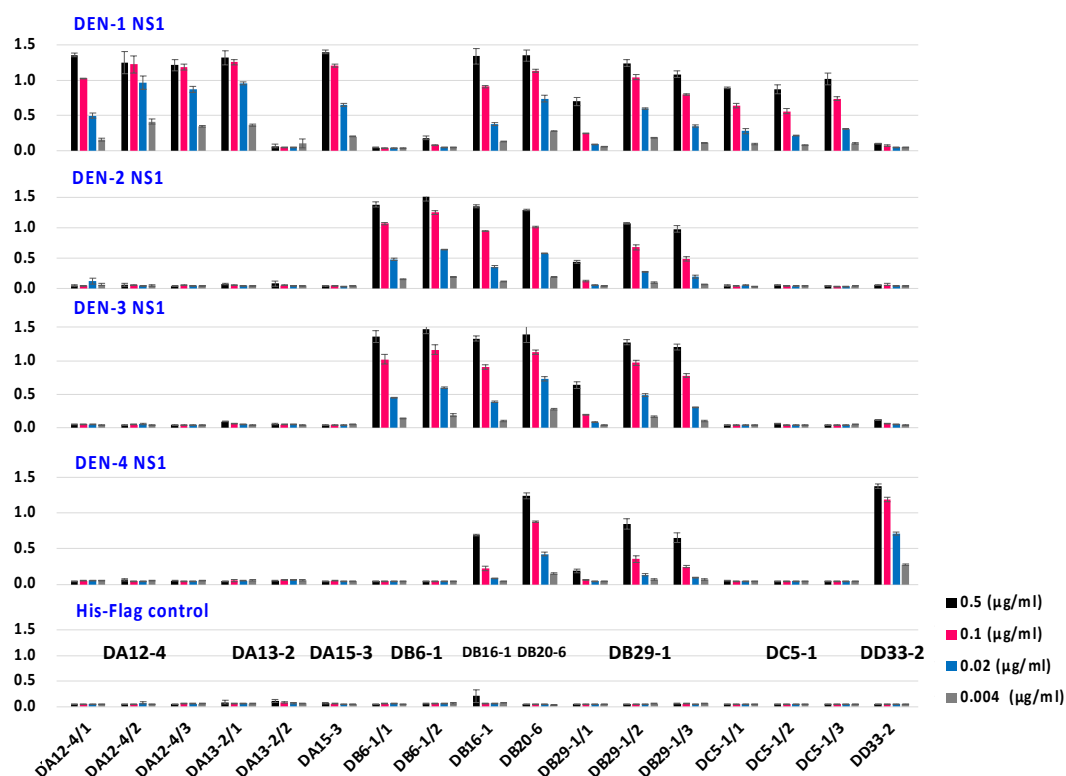
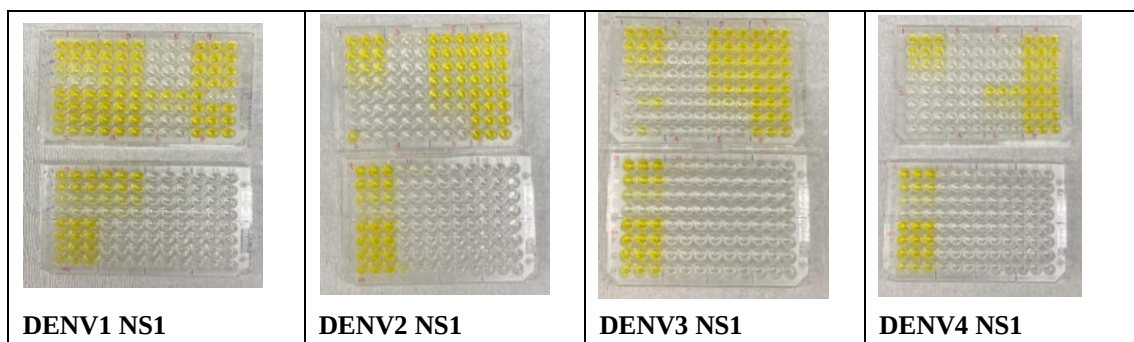


圖 6：ELISA 結果與登革四型結合數據長條圖

二、抗體選用結果

根據 ELISA 的結果，我們發現 DA12-4、DA13-2、DA15-3、DC5-1 對 DENV-1 的辨識能力較高；DB6-1 對 DENV-2 及 DENV-3 的辨識能力較高；DD33-2 對 DENV-4 的辨識能力較高；而 DB16-1、DB20-6、DB29-1 對四型都有不錯的辨識能力。因此我們用 DB16-1、DB20-6、DB29-1 作為之後用於 Conjugate pad 的抗體。而 test line 則以 DA12-4、DA13-2、DA15-3、DC5-1 來辨識 DENV-1；DB6-1 用於辨識 DENV-2 及 DENV-3；DD33-2 用於辨識 DENV-4，並將結果統整成圖 9，數據表顯示目前研發的抗體還無法分別辨識第二、三型。

不僅如此，我們從 NCBI 查詢登革四型 NS1 之胺基酸序列，並且比對出四型 NS1 序列之差異(圖 7)，我們進一步分析四型 NS1 序列彼此的相同度(identity)如圖 8 所示。結果顯示各型之間並沒有高度相同(>90%)的情形，DENV-1 與 DENV-3 的相同度最高(80.11%)，表明這兩型可能在基因序列或特徵上最接近。這可能反映它們在某些病毒結構或功能上的高度重疊。DENV-1 與 DENV-4 的相同度最低(69.32%)，表明這兩型之間的差異最大，可能代表不同的

進化特徵或不同的免疫交叉反應。但第二、三型的 NS1 序列卻並非很相似(74.43%)，因此推測抗體較無法區分的原因為雖然二、三型並非高度相似，推測他們的差異可能是在蛋白內部，所以能被抗體辨識的外殼區域還是較為相似。

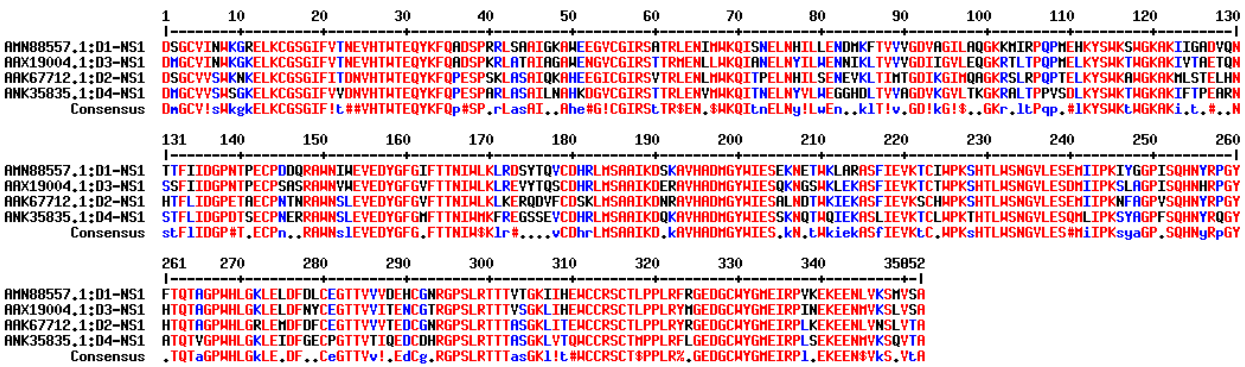


圖 7：登革病毒四型 NS1 胺基酸相似度比較

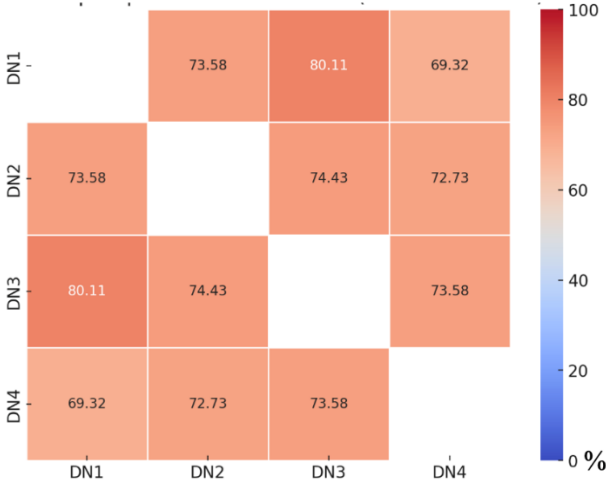


圖 8：登革病毒四型 NS1 胺基酸序列之相同度比較

Strains of Dengue NS1	Hybridoma clones
DENV 1	4 (DA12-4, DA13-2, DA15-3, DC5-1)
DENV 2	1 (DB6-1)
DENV 3	
DENV 4	1 (DD33-2)
All (DENV 1-4)	3 (DB16-1, DB20-6, DB29-1)

圖 9：登革四型之辨識統整表

三、 SDS-PAGE 分析結果

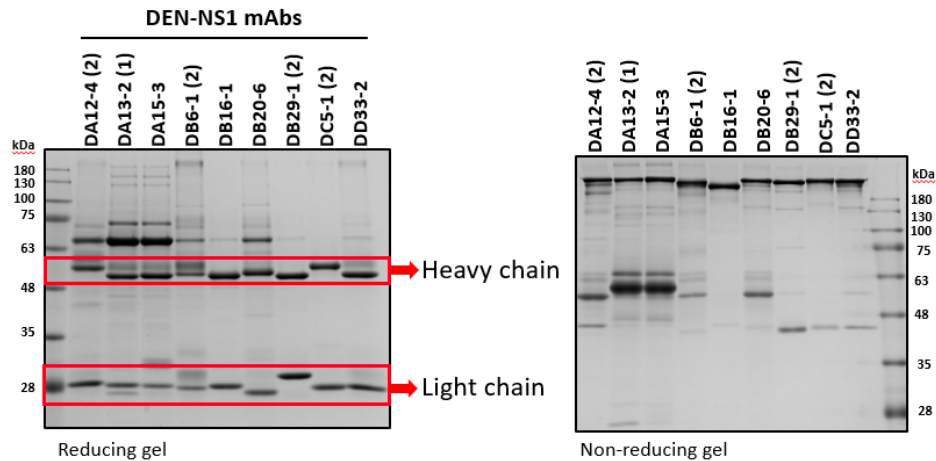


圖 10：SDS-PAGE 結果

圖 10 為 SDS-PAGE 分析 anti-NS1 monoclonal antibodies(mAbs)結果，並以 Coomassie blue 進行染色。可以發現在 reducing gel 的圖中，顯示重鏈和輕鏈的條帶清晰，表示抗體在此條件下的結構較完整；在 non-reducing gel 中抗體呈現完整的輕重鏈形式(150kDa)但發現在小分子的地方有一些蛋白質色帶的純度較低，低分子量區域有額外的條帶，表明可能存在非目標蛋白的雜訊，接著我們進行抗體配對實驗，找尋偵測病毒蛋白的最佳配對。

四、測試結果

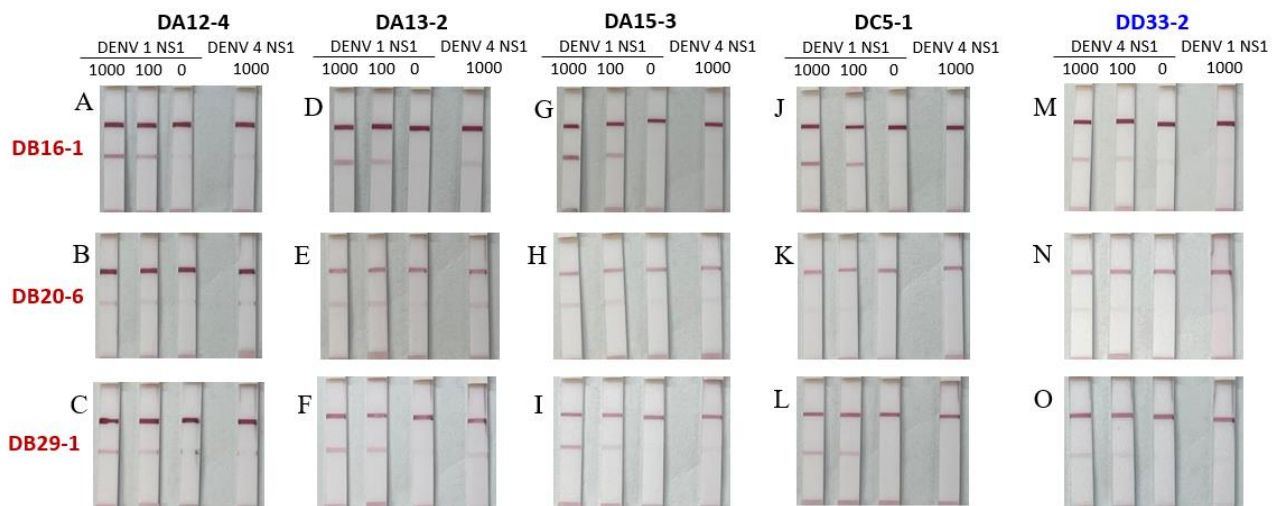


圖 11-1：測試結果

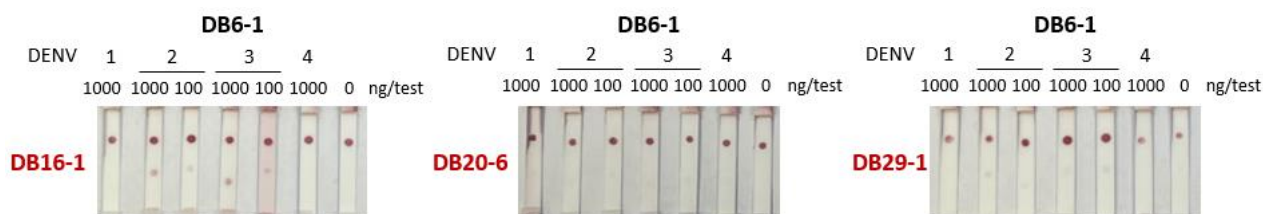


圖 11-2：測試結果

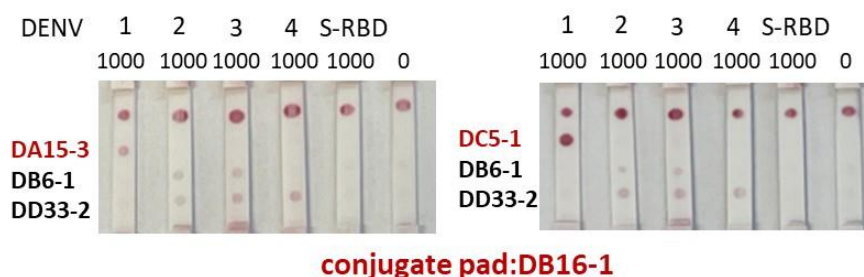


圖 11-3：測試結果

如圖 11-1 所示，我們把用於 test line 的抗體序列稀釋，並配對所有用於 Conjugate pad 的抗體。使用一、四型抗原比較各抗體的專一性及靈敏度，圖中 A~F 可以發現 DA12-4、DA13-2 使用第一型與第四型的抗原測試皆會使 test line 呈色，表示 DA12-4、DA13-2 特異性不夠，若用於實際檢測可能造成誤判。而用第四型的抗原測試時，從圖 G、J、K、L 中發現 test line 皆無明顯呈色，因此選用 DA15-3、DC5-1 用於後續製作快篩以辨識第一型。

快篩的判讀區只有 16×4mm 的大小，若 test line 與 control line 用之前的線條方式呈現，會導致樣本流過時互相混和在一起影響判讀，所以我們決定在第二次測試將測試快篩的方法從線條改為點狀。由圖 11-2 可以得知 DB6-1 搭配 DB16-1 呈色最明顯，因此我用 DB16-1 作為下次測試的 Conjugate pad 抗體。

而為了測試 DA15-3 和 DC5-1 哪個更適合作為辨識第一型的抗體我們進行圖 11-3 的測試，可以發現 DC5-1 的結果較為明顯，且在使用二三型抗原進行測試時，皆伴隨 DD33-2 的反應。但在 ELISA 測試結果中顯示，第一型與第四型均能被獨立辨識，所以我們推測原因是由於 ELISA 的抗體是在液態環境中進行，而快篩上的抗體則是經過處理後在常溫下操作，可能因環境濕度的變化導致抗體結構發生改變，進而影響結果。此外，我們在 ELISA 選用的抗體數量相對較少，因此未來計劃將持續尋找適合的抗體，希望可以得到特異性高不會與第二型和第三型交叉反應的抗體，並增加抗體的使用數量以提升測試的準確性。

肆、 結論與應用

目前我們的快篩能辨認第一型、第四型及第二三型混合的登革病毒蛋白，未來我們將持續進行實驗，找出可用於快篩上區分第二、三型的特異性抗體，使快篩檢測結果更為完整；更為重要的是，確認快篩試劑對於真正的登革病毒與臨床檢體是否仍具高效能的偵測能力，這需要繼續努力研發與證驗。我們期望此研究成果擁有高敏感度與專一性，在第一線幫助於醫療人員快速偵測及確認病例，提早採取防治作為，降低患者因重複感染發展為登革出血熱的風險，以增進台灣人民的健康。

不僅如此，我們也展望這項研究成果，未來可以繼續橫向合作，結合四型登革快篩試劑(本成果)搭配自動化捕捉病媒蚊裝置(圖 12)，開發檢測病媒蚊血液中登革病毒之技術。在疫情即將盛行之際，超前部署這些設備於可能的疫區，檢驗哪些區域的蚊子已帶原登革病毒，在人類尚未被叮咬導致感染前，優先撲滅該區病媒蚊，將防疫範圍延伸於人體之外，以期達到精準且科學之防疫策略。



圖 12：病媒蚊血液快篩示意圖

伍、 參考文獻

1. ACE biolabs ELISA 原理介紹：<https://www.acebiolab.com/TW/news/40>
2. 太鼎生物科技有限公司 登革病毒 NS1 蛋白抗體：<https://biopioneer.com.tw/?p=39661>
3. 行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫 腸病毒 71 型快速檢驗試劑(IgM Capture ELISA)之研發及評估(2011)：<https://reurl.cc/G41E6p>
4. 莊榮輝，單株抗體之癌細胞可在培養基中永久生長，台灣大學課程講義(2018)：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/monoclonal.htm#2E>
5. 國家衛生研究院電子報 本院與國防醫學院預防醫學研究所共同舉辦新型冠狀病毒快篩試劑非專屬授權技術說明會(2020)：<https://enews.nhri.edu.tw/research/3377/>
6. 彰化督教醫院 檢驗資訊查詢系統：https://www2.cch.org.tw/labsearch/Lab_Detail.aspx?CODE=FVPDEN
7. 衛生福利部疾病管制署 (2023)。疾病介紹：<https://www.cdc.gov.tw/Category/Page/e6K1xXr0VJQ7FuxsMtMVhw>
8. 衛生福利部疾病管制署(2001)。認識埃及斑蚊及白線斑蚊，勤倒積水，嚴防登革熱：<https://reurl.cc/Z9mb3p>
9. 衛生福利部疾病管制署。就醫治療篇 - 登革熱：<https://www.cdc.gov.tw/En/Category/QAPage/IMf7ZouyXJCHiq3c3iwM9Q>
10. 科技大觀園(2015)。尋找 B 細胞抗原決定位的利器：<https://scitechvista.nat.gov.tw/Article/C000003/detail?ID=32c642b2-4ca1-46bf-be14-2496401afcb4>
11. 泛科學(2021)。COVID-19 快篩原理和常見 QA：<https://pansci.asia/archives/321574>
12. 行政院衛生署 九十四 年度委託研究計畫(2005)。登革病毒非結構性蛋白之昆蟲細胞大量表現系統：<https://www.cdc.gov.tw/uploads/files/6e9a51cb-9df7-428f-b62d-925d16d29a9b.pdf>
13. 行政院衛生福利部疾病管制署 103 年度科技研究發展計(2014)。台灣地區登革病毒及其他病媒病毒之監測與特性分析：<https://www.cdc.gov.tw/Uploads/files/2de41057-5ef6-4c6d-b032-bf95c186d60b.pdf>
14. 衛生福利部疾病管制署(2024)。登革病毒非結構性蛋白之昆蟲細胞大量表現系統：<https://www.cdc.gov.tw/uploads/files/6e9a51cb-9df7-428f-b62d-925d16d29a9b.pdf>
15. 衛生福利部(2016)。「登革熱快篩」早期診斷，及時治療：<https://www.mohw.gov.tw/cp-2629-18980-1.html>
16. 向流體免疫分析(快篩)平台開發，LEADGENE：https://www.leadgenebio.com/zh/services/index/lateral-flow-assay-development-ch?utm_source=chatgpt.com
17. 莊榮輝、吳建興。細胞融合與單株抗體 Cell Fusion and Monoclonal Antibodies：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/monoclonal.htm#%E4%B8%89>
18. NCBI：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

19. 柏森生技。輕鬆了解四種主要的 IHC 間接呈色檢測方式：[https :
//www.blossombio.com/eNews/20190708/index.html](https://www.blossombio.com/eNews/20190708/index.html)
20. 費軫尹。ELISA 的愛與愁酵素連結免疫吸附法的煩惱就交給專家吧！：[https :
//webbuilder5.asiannet.com/ftp/2627/Vol24ELISAFAQ.pdf](https://webbuilder5.asiannet.com/ftp/2627/Vol24ELISAFAQ.pdf)
21. 重組蛋白 L，泰鼎生物有限公司：<https://biopioneer.com.tw/?p=5518>
22. Protein L 4FF 琼脂糖纯化树脂，生工 sangon biotech:<https://store.sangon.com/productDetail?productInfo.code=C600697>
23. 斯博利康(2021)，免疫荧光(Immunofluorescence, IF)实验方法、原理、具体操作步骤和注意事项：https://www.sperikon.com/1816.html?utm_source=chatgpt.com
24. Koczula and Gallotta(2016).Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process.<https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2022.922772/full>
25. Senanayake Abeysinghe Kularatne(2022)Global importance, immunopathology and management, National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35078789/>
26. Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,National Library of Medicine: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/>
27. Shih, L., et al. (2011). "The Role of SDS in Protein Denaturation." *International Journal of Molecular Sciences*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19523473/>
28. Wilkins, M.R., et al. (1996). "SDS-PAGE: A New Method for Protein Identification and Analysis:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11237758/>
29. Beasley, D. W. C. & Barrett, A. D. T. (2008)"The Infectious Agent." In *Dengue: Tropical Medicine: Science and Practice*, vol. 5, eds. G. Pasvol & S. L. Hoffman: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925/>
30. Grégoire Lebeau, Alisé Lagrave, Eva Ogire, Lauriane Grondin, Soundary Seriacaroupin, Cédric Moutoussamy, Patrick Mavingui, Jean-Jacques Hoarau, Marjolaine Roche, Pascale Krejbich-Trotot, Philippe Desprès, Wildriss Viranaicken(2021). Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine,MDPI: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/9/946>
31. Multiplesequence alignment by Florence Corpet :
<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>
32. Real time RT PCR.(2013)QIAGEN: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/real-time-rt-pcr/guidelines-for-rt-pcr>

附錄

登革病毒 NS1 胺基酸序列

登革病毒第一型：Dengue virus type 1(DEN-1) – NS1

>AMN88557.1 : 776-1127 polyprotein [Dengue virus]

DSGCVINWKGRELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKFQADSPRRLSAAIGKAWEEGVCGIRSA
TRLENIMWKQISNELNHILLENDMKFTVVVGDVAGILAQGGKMMIRPQPMCHKYSWKSWG
KAKIIGADVQNTTFIIDGPNTPECPDDQRAWNIWEVEDYGFQFTTNIWLKLRDSYTVCDH
RLMSAAIKDSKAVHADMGYWIESEKNETWKLARASFIEVKTCIWPKSHTLWSNGVLESEM
IIPKIYGGPISQHNRYRPGYFTQTAGPWHLGKLELDFDLCEGTTVVVDEHCGNRGPSLRTTTV
TGKIIHEWCCRSCTLPLRFRGEDGCWYGMEIRPVKEKEENLVKSMVSA

登革病毒第二型：Dengue virus type 2 (DEN-2)– NS1

>AAK67712.1 : 776-1127 polyprotein [dengue virus type 2]

DSGCVVSWKNKELKCGSGIFITDNVHTWTEQYKFQPEPSKLASAIQKAHEEGICGIRSVTR
LENLMWKQITPELNHILSENEVKLTIMTGDIKGIMQAGKRSLRPQPTTELKYSWKAWGKAK
MLSTELHNHTFLIDGPETAECPTNRAWNSLEVEDYGFQVFTTNIWLKLERQDVFCDSKL
MSAAIKDNRAVHADMGYWIESALNDTWKIEKASFIEVKSCHWPKSHTLWSNGVLESEMI
PKNFAGPVSQHNRYRPGYHTQTAGPWHLGRLEMDDFDFCEGTTVVVTEDCGNRGPSLRTTT
ASGKLITEWCCRSCTLPLRFRGEDGCWYGMEIRPLKEKEENLVNSLVTA

登革病毒第三型：Dengue virus type 3 (DEN-3)– NS1

>AAX19004.1 : 774-1125 polyprotein [dengue virus type 3]

DMGCVINWKGKELKCGSGIFVTNEVHTWTEQYKFQADSPKRLATAIAGAWENGVCIRST
TRMENLLWKQIANELNYILWENNIKLTVVVGDIIGVLEQGGKRTLTTPQPMELKYSWKTWGK
AKIVTAETQNSSFIIIDGPNTPECPASRAWNVWEVEDYGFQVFTTNIWLKLREYVTQSCDH
RLMSAAIKDERAVHADMGYWIESQKNGSWKLEKASFIEVKTCTWPKSHTLWSNGVLESD
MIIPKSLAGPISQHNHRPGYHTQTAGPWHLGKLELDFNYCEGTTVVITENCGTRGPSLRTTT
VSGKLIHEWCCRSCTLPLRYMGEDGCWYGMEIRPINEKEENMVKSLVSA

登革病毒第四型：Dengue virus type 4(DEN-4) – NS1

>ANK35835.1 : 775-1126 polyprotein [dengue virus type 4]

DMGCVVSWSGKELKCGSGIFVVDNVHTWTEQYKFQPESPARLASAILNAHKDGVCGIRST
TRLENVMWKQITNELNYVLWEGGHDLTVVAGDVKGVLTKGKRALTPPVSDLKYSWKTW
GKAKIFTPEARNTFLIDGPDSECPNERRAWNSLEVEDYGFQVFTTNIWMKFREGSSEVC
DHRLMSAAIKDQKAVHADMGYWIESSKNQWQIEKASLIEVKTCWPKHTLWSNGVLE
SQMLIPKSYAGPFSQHNRYRQGYATQTVGPWHLGKLEIDFGCEPGTTVTIQEDCDHRGPSLR
TTTASGKLVTQWCCRSCTMPPLRFLGEDGCWYGMEIRPLSEKEENMVKSQVTA

【評語】 090013

1. 創新性與重要性:

本研究旨在開發可辨識四型登革病毒的快篩試劑，這在登革熱防治和臨床診斷方面具有重要意義。登革熱在熱帶和亞熱帶地區廣泛流行，尤其是與台灣往來頻繁的東南亞國家。不同血清型登革病毒的交叉感染可能導致嚴重的登革出血熱和登革休克症候群。因此，開發能夠準確識別四種血清型的快篩試劑對於及時診斷和適當治療至關重要。該研究採用分子生物技術和免疫學方法，旨在生產特異性單株抗體並開發快速、準確的診斷工具，這對於改善登革熱的診斷和管理具有潛在的創新價值。

2. 優點:

該研究通過分子生物技術構建載體並純化 NS1 蛋白質作為免疫原，這為生產高特異性抗體奠定了基礎。其次，利用小鼠免疫和細胞融合技術來生產單株抗體，這種方法可以獲得高度特異和親和力的抗體。研究還使用了 ELISA 來確認抗體的親和力，這有助於篩選出最佳的抗體候選物。最後，採用側向流體免疫層析法開

發快篩試劑，這種方法簡單、快速，適合現場使用。研究計劃使用重組蛋白和去活性病毒進行性能測試，這有助於初步評估試劑的有效性和可靠性。

3. 待改進的部分：

該研究具仍存在一些需要改進的方面。首先，研究未能達到原定目標，即開發可識別所有四種血清型登革病毒的單株抗體。目前的快篩試劑僅能辨識第一型（DEN-1）和第四型（DEN-4）登革病毒，這限制了其在臨床應用中的全面性。其次，研究未充分考慮登革病毒作為 RNA 病毒的高突變率，這可能影響抗體的長期有效性。此外，研究未探討單株抗體可能存在的交叉反應問題，這可能影響試劑的特異性。最後，研究缺乏使用真實患者樣本進行臨床驗證，這是評估診斷工具實際性能的關鍵步驟。為了提高研究的完整性和實用性，建議優化實驗設計以開發識別所有四種血清型的抗體，進行更全面的交叉反應研究，並在未來進行臨床樣本的驗證試驗。