

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

第二名

052011

點穴止毒:精準控制細胞胞吞作用來抵抗病毒入侵

學校名稱： 新竹市私立曙光女子高級中學

作者： 高二 謝宜臻	指導老師： 陳彥宇
-------------------	------------------

關鍵詞： 新冠肺炎、胞囊運輸、細胞骨架

摘要

人類為對抗新冠肺炎，研發出疫苗以減少重症，卻難以阻隔病毒進入人體，且導致許多副作用。新冠病毒會結合細胞表面的 ACE2 受體再藉由胞吞作用進入細胞，注入相關分子或讓 ACE2 失活可減少病毒進入人體，但卻會嚴重影響 ACE2 原本的功能，因此我們想要發展精準抑制病毒入侵細胞的方法。利用囊泡黏合系統，我們成功地停止負責廣泛胞吞作用的 Rab5 囊泡運輸，但其無法抑制病毒進入細胞。接著我們將負責帶入病毒的 ACE2 囊泡停止在細胞膜周圍的微絲上，可以有效地抑制病毒進入細胞，且不會影響其他的胞吞作用，讓 ACE2 還可在細胞表面正常工作。我們成功地發展出新的策略去精準抑制病毒進入細胞，且能減少對其他功能的不良影響，此技術可望提供新的策略來對抗不同的病毒危害。

壹、前言

一、研究動機-現今對抗新冠病毒入侵細胞的技術限制

2019 年爆發的新冠肺炎(Covid-19)疫情，不只使經濟重創，死亡人數更逾七百萬(文獻 1)，是全球五大流行病之一。除了新冠病毒外，人類社會充斥許多病毒，會侵入人體細胞引發嚴重感染過程，目前已陸續研發出了對應的疫苗為人類提供免疫力，雖可有效避免重症，卻難以阻隔病毒進入人體，還會導致過敏、發燒、頭暈、嘔吐、心肌炎、心包膜炎、甚至休克致死的副作用(文獻 2)，為了降低副作用，必須針對病毒去發展新型的技術來更加精準地抑制病毒入侵人類細胞，改善其對人類的侵害。

新冠肺炎病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2)的表面的棘蛋白(Spike protein)會藉由人類細胞表面的 ACE2 受體(Angiotensin-converting enzyme 2 receptor; ACE2 receptor)結合到人體細胞上，接著再進入細胞引發後續感染的過程(文獻 3)(圖一)。科學上減少細胞與新冠肺炎病毒結合的方法有很多種，可主要分為針對棘蛋白及 ACE2 蛋白所發展的策略：1. 發展會辨識結合病毒棘蛋白的抗體覆蓋住新冠肺炎病毒，使其無法有效結合人類細胞引發感染(文獻 4)，但由於棘蛋白變異速度極快(文獻 5)，因此難以即時更新能有效結合棘蛋白的抗體；2. 藉由注入大量的重組人類“ACE2 蛋白”、“ACE2 抗體”或“ACE2 外泌體(Exosomes)”等來包覆住新冠肺炎病毒的棘蛋白，讓其無法有效跟人類細胞結合(文獻 6)或是注入能抑制 ACE2 蛋白的藥物來失活細胞的 ACE2 (文獻 7)。但 ACE2 能幫助心血管組織抗氧化及發炎(文獻 8)，減少肺臟組織損傷及抑制骨骼肌的纖維化等等，因此大量注入 ACE2 相

關分子或是讓 ACE2 失活都可能影響其原本所負責的功能，這也是傳統方法導致副作用的可能原因。為了能夠減低病毒進入人體細胞，且又要讓 ACE2 能夠在細胞上正常作用，因此我們想要發展新的技術來達到目的。

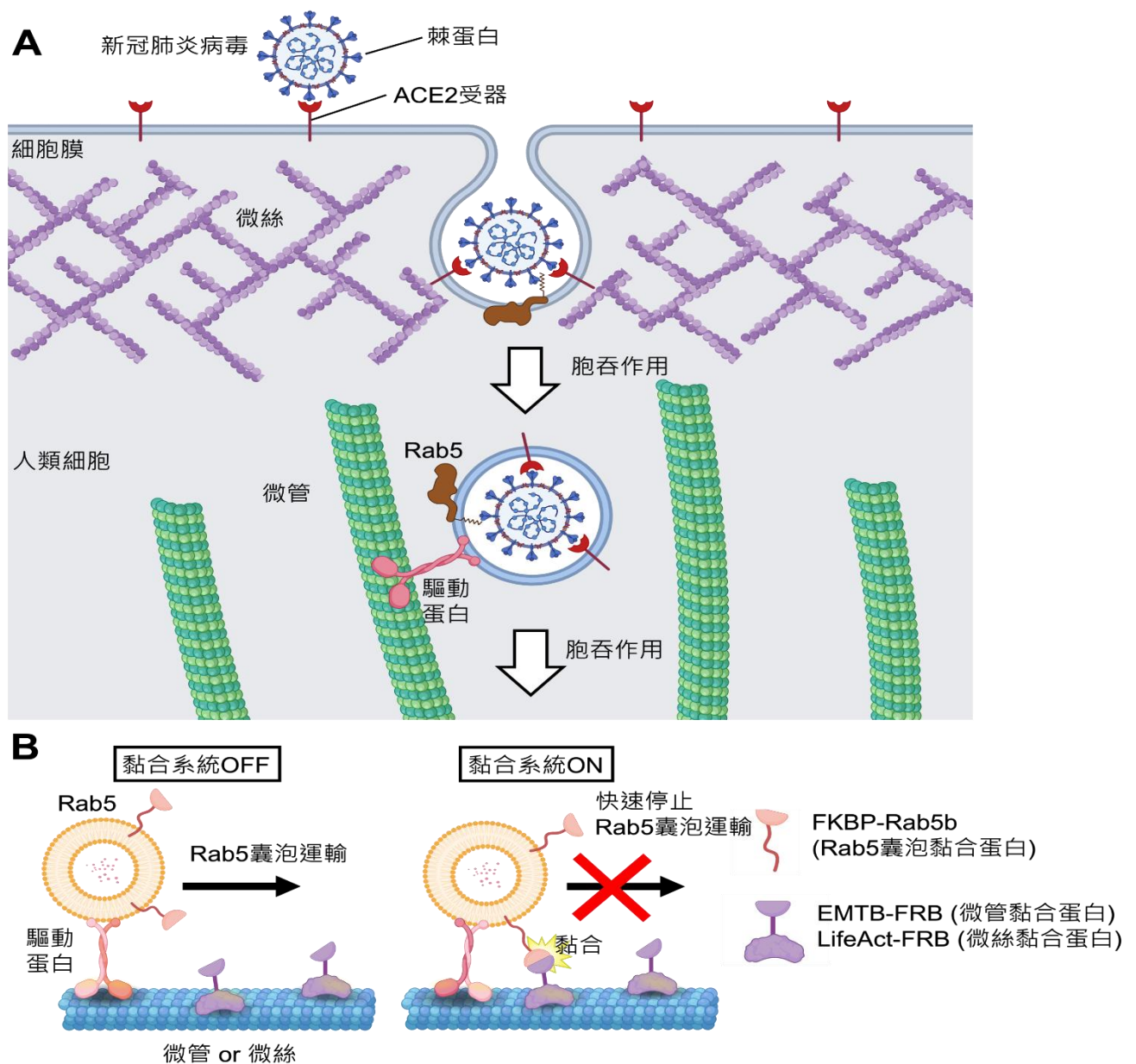
二、研究目的

- (一)、發展抑制病毒入侵細胞的新技術。
- (二)、測試停止 Rab5 囊泡運輸系統的專一性。
- (三)、測試停止 ACE2 受體運輸系統。
- (四)、測試停止 Rab5 囊泡或 ACE2 受體運輸是否能減少病毒入侵細胞。
- (五)、測試上述方法是否只影響病毒入侵，不影響其他細胞運輸系統。

三、文獻探討-簡介囊泡黏合系統

新冠肺炎病毒於細胞表面上結合 ACE2 受體後，會藉由胞吞作用(Endocytosis)進入細胞，以進行後續的感染過程(文獻 3)(圖一)。胞吞作用是細胞利用細胞膜上的接受器去結合外界的特定物質，將其內凹包裹進囊泡(Vesicles)(文獻 9)，進入細胞的囊泡會被 Rab5 蛋白質結合住，細胞中有許多行走在細胞骨架上的驅動蛋白(Motor proteins)會連接此 Rab5 囊泡(文獻 10)，再將其送往細胞中其他位置(圖一)。

FKBP 蛋白(FK506- and rapamycin-binding protein)跟 FRB 蛋白為兩種不同的蛋白，彼此間沒有親和性不會互相黏合，但加入化學小分子 Rapamycin(雷帕黴素)時，Rapamycin 可以作為橋樑將 FKBP 及 FRB 緊密的黏合在一起(文獻 11)，此為本研究中大量使用的化學誘導蛋白黏合系統。我們在實驗室利用分子生物學重組基因的方式將 Rab5 蛋白與 FKBP 結合起來，製作成 FKBP-Rab5 複合蛋白(簡稱 Rab5 囊泡黏合蛋白)。另一方面，將 FRB 與會跟微管結合的蛋白 EMTB 及會跟微絲結合的蛋白 LifeAct 分別接合成 EMTB-FRB 複合蛋白(簡稱微管黏合蛋白)及 LifeAct-FRB 複合蛋白(簡稱微絲黏合蛋白)，這兩個複合蛋白一旦加入 Rapamycin，則會將 Rab5 囊泡快速跟微管或微絲上的黏合蛋白結合起來，而讓 Rab5 囊泡黏在微管或微絲上無法繼續進行胞吞作用(圖一 B)，因此本研究想要測試是否能夠利用停止胞吞作用來抑制新冠病毒入侵細胞。



圖一、新冠肺炎病毒入侵細胞方式及囊泡黏合系統。(A) 新冠肺炎藉由胞吞作用進入人類細胞。(B)利用囊泡黏合系統將 Rab5 囊泡黏合於細胞骨架上。(研究者自製)

貳、研究設備及器材

一、 分生實驗相關設備

相關設備	相關藥品
1. 微量滴管(Thermo Scientific)	1. DH5 α
2. -20°C 冰箱(PHCbi)	2. LB(E.coli 培養液)

3. 桌上型離心機(Cubee Gene Reach)	3. 限制內切酶 XhoI, EcoRI, NheI, AgeI
4. CellDropBF 核酸濃度測量儀 (DeNovix)	4. T4 DNA ligase
	5. PD1 buffer(Tris/EDTA/Glucose/RNaseA)
	6. PD2 buffer(NaOH/SDS)
	7. PD3 buffer(Potassium acetate)
	8. 異丙醇
	9. 乙醇
	10. PCR 套組

(研究者自製)

二、細胞實驗相關設備

相關設備	相關藥品
1. 細胞培養箱(Thermo Scientific)	1. 培養液(DMEM+10%胎牛血清+1%P/S/A 三合一抗生素)(Nunc)
2. 無菌操作台(Thermo Scientific)	2. 胰蛋白酶(Nunc)
3. 相位差顯微鏡(Nikon T2)	3. 生理食鹽水(Nunc)
4. 落地型離心機(KUBOTA)	4. Poly-D-lysine(Thermo Scientific)
5. 水浴槽(JYO)	5. ddH2O
6. 微量滴管 (Thermo Scientific)	6. OptiMEM(Thermo Scientific)
7. 定量吸管(Thermo Scientific)	7. Rapamycin(Sigmaaldrich)
8. 廢液吸取器(Thermo Scientific)	8. Turbofect transfection reagent(Thermo Scientific)

(研究者自製)

三、細胞影像相關設備

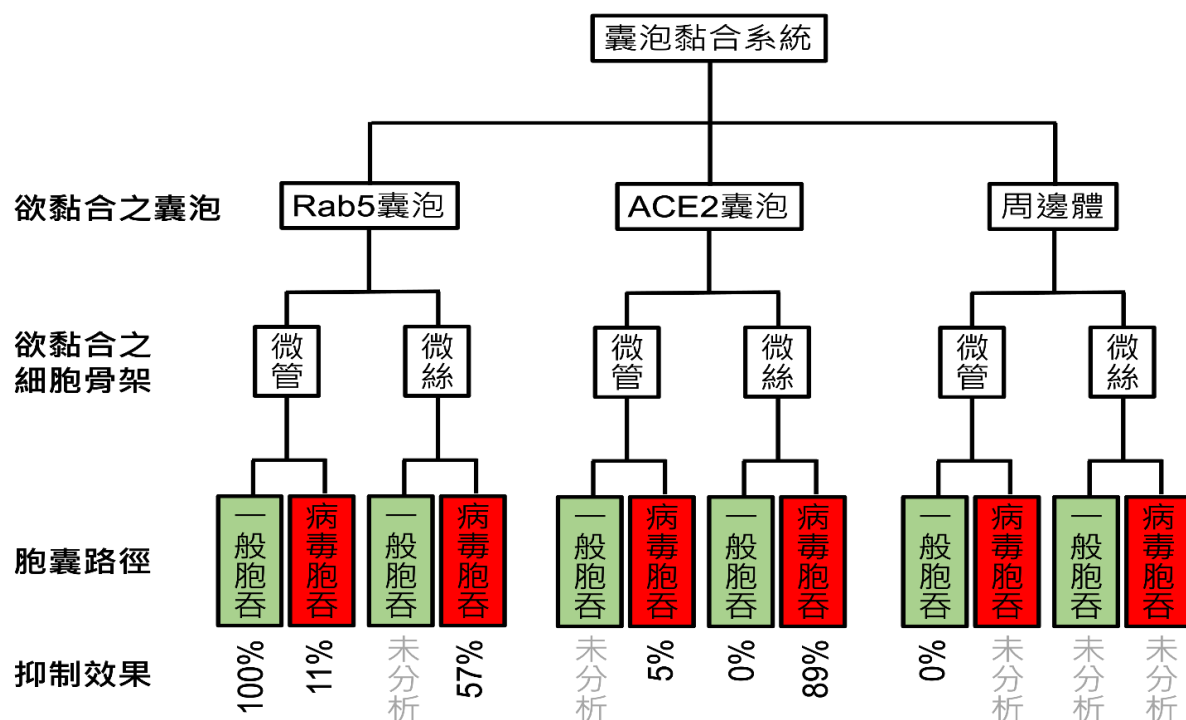
相關設備
1. 倒立式螢光顯微鏡(Nikon Ti2)
2. 細胞控溫 CO2 培養台(Live cell imaging Chamber; LSI)
3. 60x 油鏡(Nikon)
4. 影像拍照軟體(Nikon element NIS)
5. 影像 deconvolution 軟體(Nikon element NIS)
6. 囊泡移動速度分析軟體(Fiji 加上 trackmate)

(研究者自製)

參、研究過程與方法

一、實驗架構圖

本計畫將利用胞囊黏合技術，將三種胞囊(Rab5 囊泡、ACE2 囊泡及周邊體)分別黏合在兩種細胞骨架上(微管及微絲)，並測試不同組合下對一般胞吞作用及病毒胞吞作用抑制的效果，期望找出能有效抑制病毒胞吞但卻不影響一般胞吞的黏合組合(圖二)。



圖二、實驗架構圖。本計畫測試將三種囊泡黏合在兩種不同細胞骨架上，分析哪種組合可有效抑制病毒胞吞(紅色)，卻不影響一般胞吞(綠色)。(研究者自製)

二、研究方法

(一)、建構 mNeon-FKBP-Rab5 及 ACE2-mNeon-FKBP 重組基因

1. 使用 GFP-Rab5 及 ACE2-GFP 的重組質體為模板，使用聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction; PCR)將 Rab5 基因片段及 ACE2 基因片段兩端加上各自的限制內切酶 XhoI/EcoRI, NheI/AgeI 切點。
2. 利用 XhoI/EcoRI 及 NheI/AgeI 限制內切酶分別切割 Rab5, ACE2 及 mNeon-FKBP 質體，之後再用 T4 ligase 接合成 mNeon-FKBP-Rab5 及 ACE2-mNeon-FKBP 重組基因，兩組重組基因都經過基因定序確認其序列正確性。

(二)、培養 HeLa 細胞及 COS7 細胞

本計畫使用兩種細胞株 HeLa 細胞及 COS7 細胞，兩種細胞培養於細胞培養液中 (DMEM+10% 胎牛血清; Corning)，並且置於細胞培養箱中培養(37°C, 5% CO₂; Thermo Scientific)，定期會將細胞進行繼代培養其步驟如下。

1. 將舊的培養液抽走。
2. 使用生理實驗水 (Phosphate buffered solution; PBS; Nunc) 小心沖洗培養皿中殘留的培養液。
3. 使用 0.25% 胰蛋白酶(Trypsin; Corning)處理細胞將其脫離培養皿。
4. 使用培養液將細胞懸浮並且收集至 15 毫升離心管，並藉由離心機(Kubota)離心收集細胞於底部(1500 rpm, 10 分鐘)。
5. 小心抽走上清液後，再用新鮮的培養液將細胞懸浮轉移到新的培養皿中。

(三)、重組 DNA 萃取

1. 將質體 DNA 利用 heat shock(42°C, 45 秒)送入 DH5 α component cells 中。
2. 將轉型好的細菌放入培養箱搖晃培養 16 小時(260rpm, 37°C)，細菌培養好後利用離心收集帶有質體 DNA 的細菌(4000rpm, 5 分鐘，室溫)。
3. 去掉上清液後，加入 250 μ l PD1 buffer，並且將細菌徹底懸浮於 PD1 buffer 中。
4. 接著加入 250 μ l PD2 buffer 及 250 μ l PD3 buffer。
5. 將混合液離心(15000rpm, 10 分鐘，室溫)，小心抽取上清液。
6. 與 500 μ l 異丙醇混合，離心以將質體 DNA 加速沈澱(15000rpm, 10 分鐘，室溫)，並去掉上清液。

7. 利用 500 μ l 無水酒精沖洗殘留在試管中的有機溶劑，離心將質體 DNA 加速沈澱 (15000rpm, 10 分鐘, 室溫)，並去除掉上清液。
8. 將整個試管風乾，利用 30 μ l ddH₂O 溶解質體 DNA。
9. 利用 CellDropBF 核酸濃度測量儀測量質體 DNA 濃度及純度。
10. 放入冰箱備用。

(四)、轉殖重組基因進 HeLa 細胞及 COS7 細胞

1. 將每個相關的重組基因(各個重組基因取 1 μ g)加入 40 μ l OptiMem 培養液中。
2. 加入 Turbofect 轉殖試劑(以 1 μ g 重組基因 :1 μ l 轉殖試劑比例搭配)，混合好置於室溫 15 分鐘。
3. 加入 1×10^5 細胞，混合好後將細胞種到已經事前放好圓形玻片的 6 孔培養盤。
4. 經過 24 小時的培養，接著可將細胞做其他後續的實驗。

(五)、活細胞影像

1. 將種有轉殖好細胞的玻片裝置於金屬環中(Attofluor Cell Chamber; ThermoFisher)
2. 加入 900 μ l 培養液(DMEM+10%FBS)，隨即放入裝有細胞培養箱(Live cell imaging Chamber; LSI)的倒立式螢光顯微鏡(TiE inverted microscopy; Nikon)，並且控制溫度為 37°C, 5% CO₂。
3. 使用 60x 物鏡拍攝活細胞影像。
4. 影像數據使用 Nikon NIS Elements 進行 deconvolution 處理及後續分析。

(六)、細胞染色

1. 將轉殖好的細胞種於 8 孔盤的玻片中(8-well chamber slides; Nunc Lab-Tek ChamberSlide)，
2. 加入 1.2 ng/ μ l SARS-CoV-2 棘蛋白(S1 subunit, Fc tag)與細胞培養 5 分鐘，接著清洗掉未結合的棘蛋白。
3. 將細胞置於 37°C 培養一個小時。
4. 使用 4% 福馬林(Electron Microscopy Sciences)於室溫下固定細胞 15 分鐘。
5. 接著使用 2% 胎牛血清球蛋白於室溫下處理細胞 30 分鐘來進行 blocking。

6. 為了標定表面的 SARS-CoV-2 棘蛋白，細胞先用 Alexa Fluor™ 594 接合的 Goat-anti Human IgG (H+L) 抗體(稀釋比例 1:1000)處理一小時。
7. 清洗掉過多的抗體後，加入 0.1% Triton X-100 介面活性劑於室溫下處理 30 分鐘來將細胞打洞。
8. 打洞完後將細胞處理 Alexa Fluor™ 647 接合的 Goat anti Human IgG(H+L)抗體(稀釋比例 1:1000)處理一小時來標記所有的棘蛋白，清洗完過多的抗體後即可進行拍照。

(七)、囊泡運輸速率分析

1. 將用螢光蛋白標定好囊泡的 Cos7 或是 HeLa 細胞，利用倒立式螢光顯微鏡每 2.5 秒或 5 秒為間隔進行縮時攝影。
2. 根據 Fiji 軟體的 plugin，trackmate 分析的數據得到囊泡運輸的軌跡。
3. 接著使用 Moment Scaling Spectrum analysis 中的 DoG detector and Simple LAP tracker 追蹤和分析移動位置和速度，估計囊泡點的直徑為 0.8-1 微米，設定追蹤最大距離為 1.2 微米，間隙閉合距離為 2 微米，間隙閉合最大值為 1，並且利用軟體輸出每個囊泡的實時移動速率。

(八)、統計分析

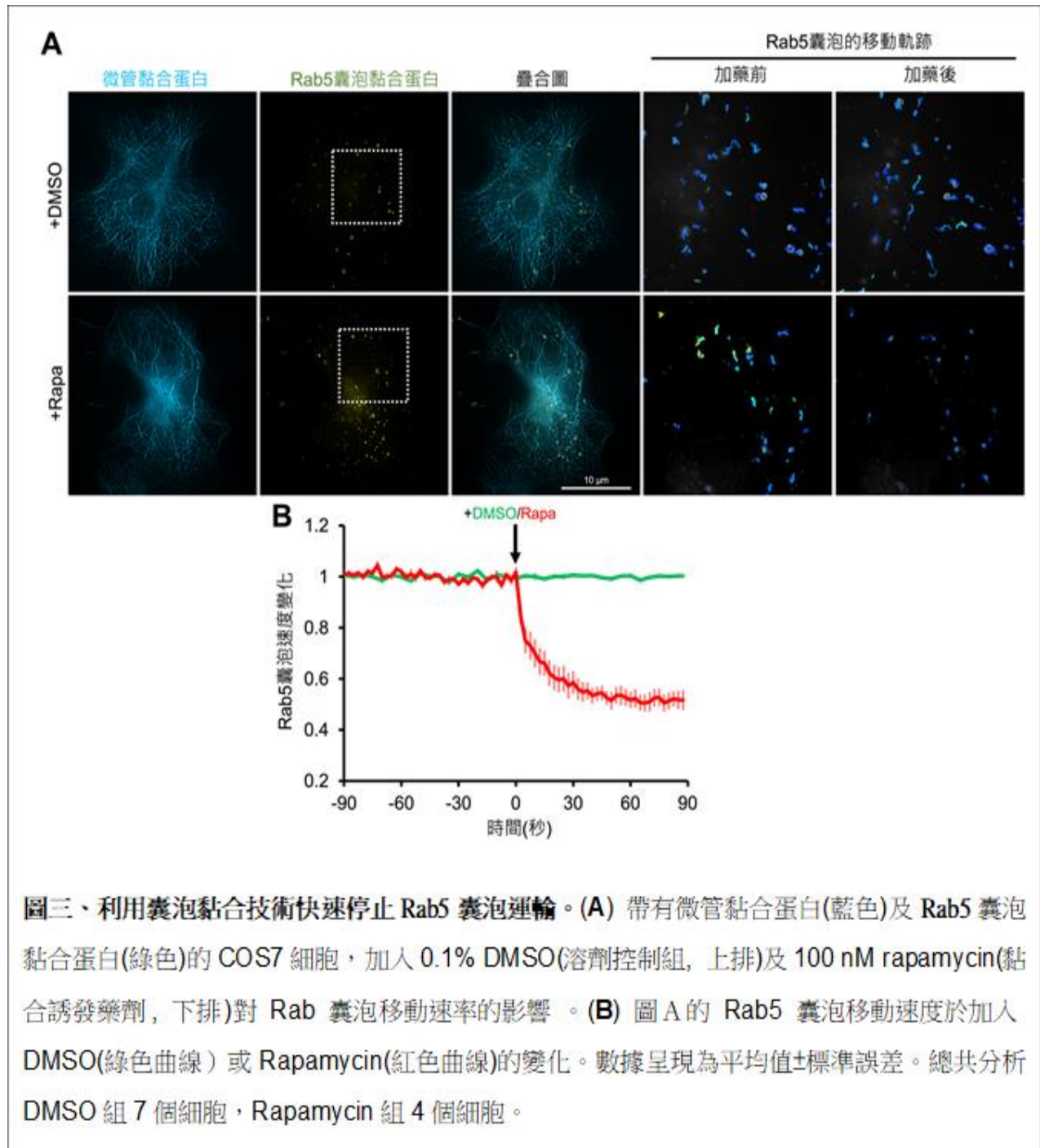
1. 首先使用 F-test 觀察變異數是否相同。
2. 透過 Excel 軟體雙尾檢定平均數去計算 P 值。P 值若小於 0.05 表示有顯著差異，而 P 值若小於 0.01 表示有極顯著的差異。

肆、研究結果

一、用囊泡黏合技術快速停止 Rab5 囊泡運輸

我們首先想要測試是否可以用囊泡黏合技術讓 Rab5 囊泡停止下來。因此我們將 Rab5 蛋白與綠色螢光 mNeon 及 FKBP 接合成 mNeon-FKBP-Rab5(Rab5 囊泡黏合基因)。接著將 Rab5 囊泡黏合基因及微管黏合基因共同送進細胞，等待 24 小時後，成功送入基因的細胞即會表現 Rab5 囊泡黏合蛋白(黃色)及微管黏合蛋白(藍色)(圖三)。之後將轉殖好的細胞加入 0.1% DMSO(溶劑控制組;圖三 A 上排)或是 Rapamycin(100 nM; 圖三 A 下排)，利用縮時攝影拍照分

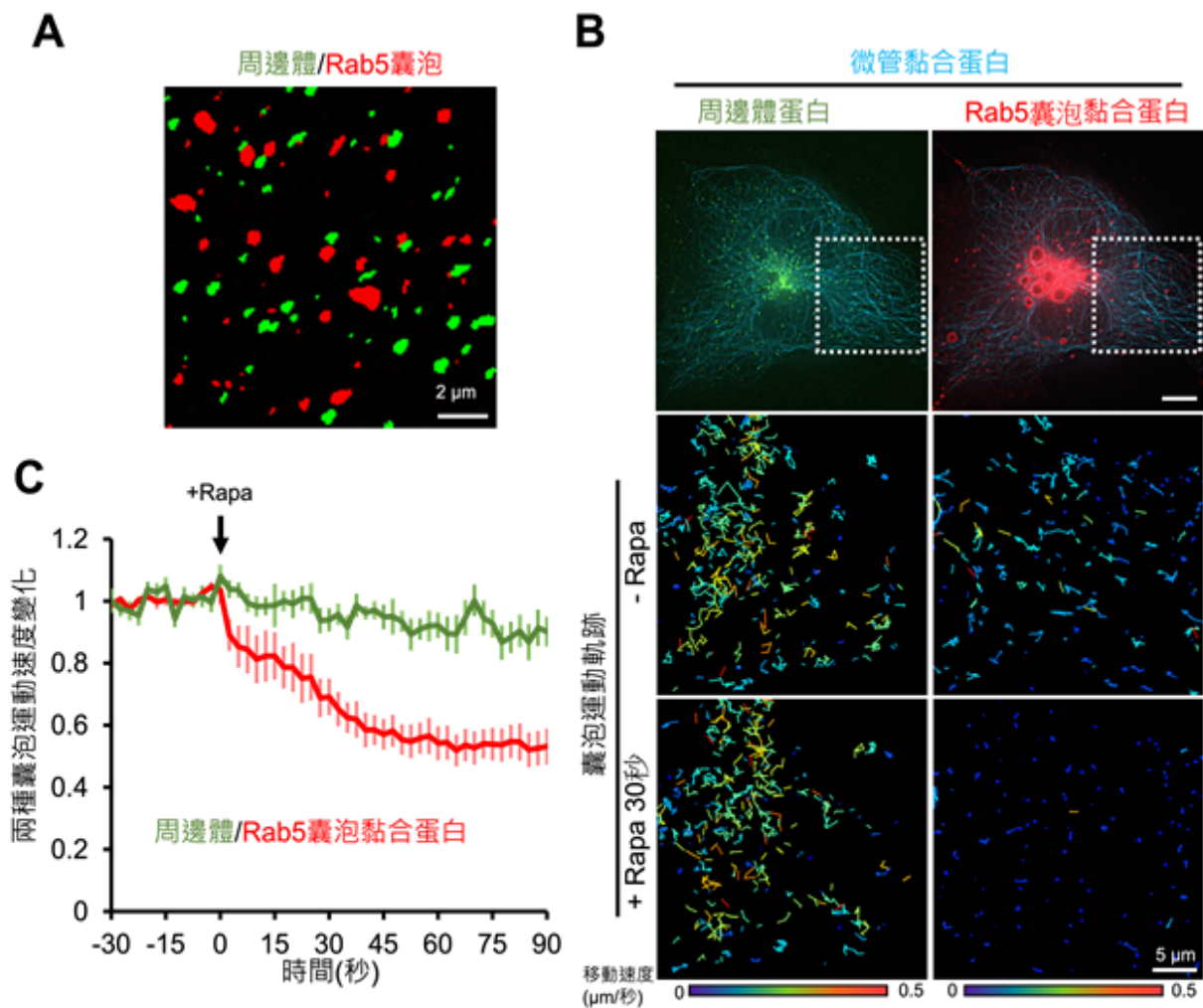
析 Rab5 囊泡的移動速率。由軟體所呈現的一分鐘內移動軌跡(圖三 A)及所分析的速度(圖三 B)可以看到，加入 0.1% DMSO 並不會影響 Rab5 囊泡移動速度(圖三 B 綠色曲線)。加入 Rapamycin 會導致 Rab5 囊泡黏合在微管上而停止移動(圖三 B 紅色曲線)，這些結果驗證我們成功地利用囊泡黏合技術快速停止 Rab5 囊泡運輸。



(研究者自製)

二、精準停止 Rab5 囊泡運輸

細胞內有多種不同囊泡都會以微管當作軌道去移動運輸貨物，我們藉由黏合 Rab5 蛋白在微管上可以讓 Rab5 囊泡快速停止下來(圖三)，但將 Rab5 囊泡停止在微管的軌道上可能會影響其他的囊泡運輸。因此，我們想要測試囊泡黏合系統是否只會精準地讓目標囊泡停止下來，而不會影響細胞內其他運輸的囊泡。PCM1F2 會標記到周邊體(Centriolar satellites)(文獻 12)，我們利用分生方法接合綠色螢光 mNeon 基因及 PCM1F2 基因，並將 PCM1F2-mNeon 複合基因(之後稱為綠色周邊體蛋白)送進細胞中。可以看到胞內體(紅色)與周邊體(綠色)分佈在細胞中不同的位置 (圖三 A)，利用囊泡黏合系統會快速停止紅色胞內體於微管上，但是卻不會影響綠色周邊體的運輸 (圖三 B,C)，證明我們可以精準地停止胞內體運輸，而不會影響到其他細胞的囊泡運輸。



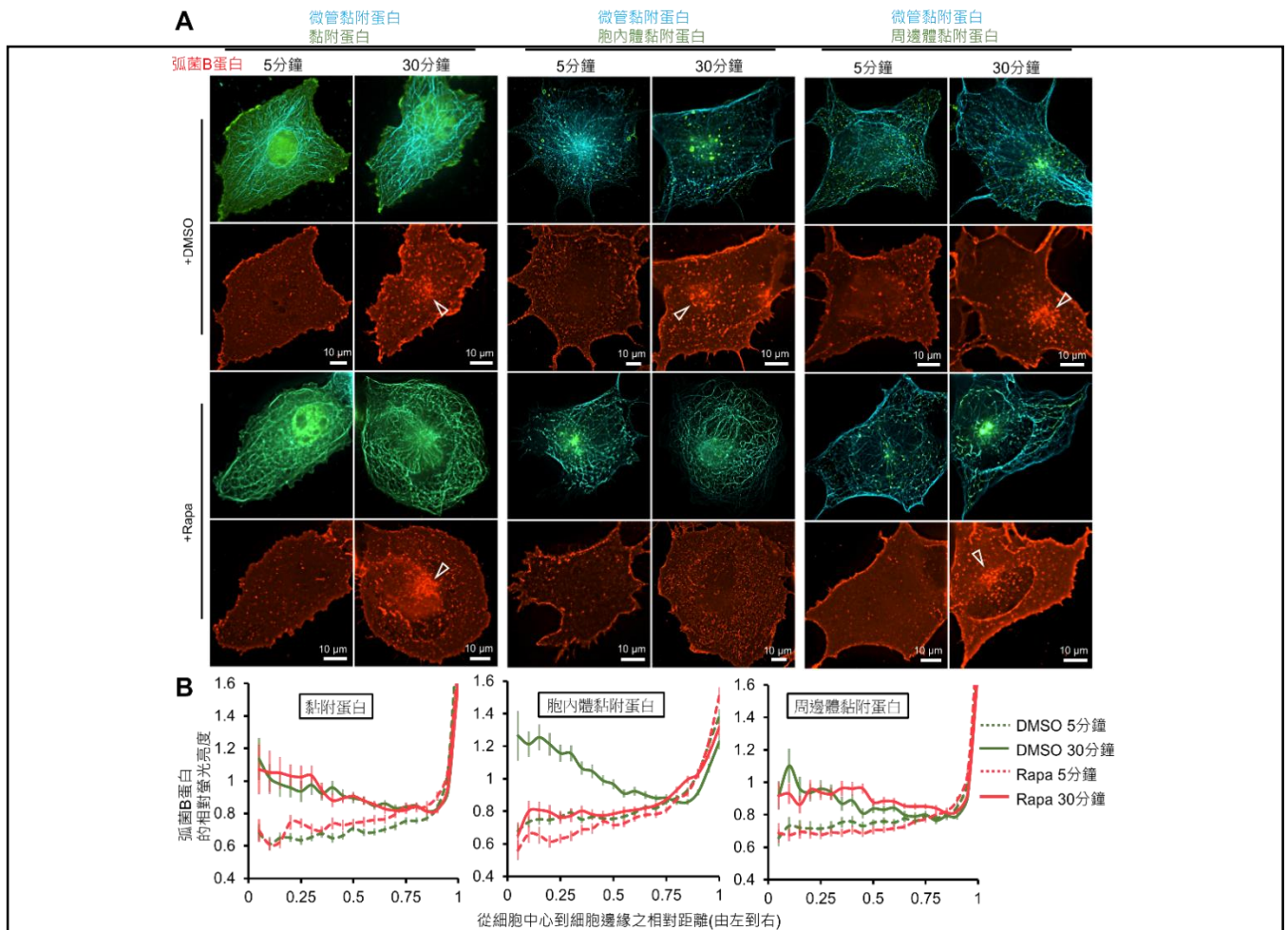
圖四、精準停止 Rab5 囊泡運輸。(A) 周邊體(綠色)及 Rab5 囊泡(紅色)分佈於細胞中不同的位置。(B) COS7 細胞中表現了藍色微管黏合蛋白(藍色)、紅色 Rab5 囊泡黏合蛋白(紅色)及綠色周邊體(綠色)。在此細胞中加入 Rapamycin(100 nM)前後，Rab5 囊泡及周邊體移動軌跡的變化呈現如下。(C) 圖 B 細胞中紅色 Rab5 囊泡黏合蛋白(紅色曲線)及綠色周邊體(綠色曲線)於加入 Rapamycin 前後移動速度的變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析 45 顆細胞。

(研究者自製)

三、快速停止 Rab5 囊泡運輸可抑制胞吞作用

霍亂弧菌毒素 B 次單元蛋白(簡稱弧菌 B 蛋白)常用於觀察細胞的胞吞作用(文獻 13)。在表現微管黏合蛋白及 mNeon-FKBP(無標記任何囊泡，之後稱空黏合蛋白)的控制組細胞中，不論加入 0.1% DMSO 或是 Rapamycin，都可以看到弧菌 B 蛋白在處理 5 分鐘時結合到細胞表面上(紅色)，處理 30 分鐘時會逐漸進入到細胞中央區域(圖五 A，左，空心箭頭)，利用軟體分析弧菌 B 蛋白從細胞中央到細胞邊緣的分佈情形，可以看出其在處理 30 分鐘後會大量移動到細胞中央位置(圖五 B，左)，證明其可以用來觀察細胞的胞吞作用。在表現微管黏合蛋

白及 Rab5 囊泡黏合蛋白的細胞中(圖五 A，中央)，加入 Rapamycin 會停止 Rab5 囊泡的移動(圖三)，並且弧菌 B 蛋白無法成功移動到細胞中央(圖五 B，中央)，證明停止 Rab5 囊泡的移動可以成功抑制細胞胞吞作用。除此，我們還測試另一個控制組，將與胞吞作用不相關的周邊體停止下來，也同樣用細胞影像(圖五 A，右)及軟體分析(圖五 B，右)驗證停止周邊體不會抑制胞吞作用。根據這些實驗結果，我們驗證精準停止 Rab5 囊泡可以有效抑制細胞胞吞作用。

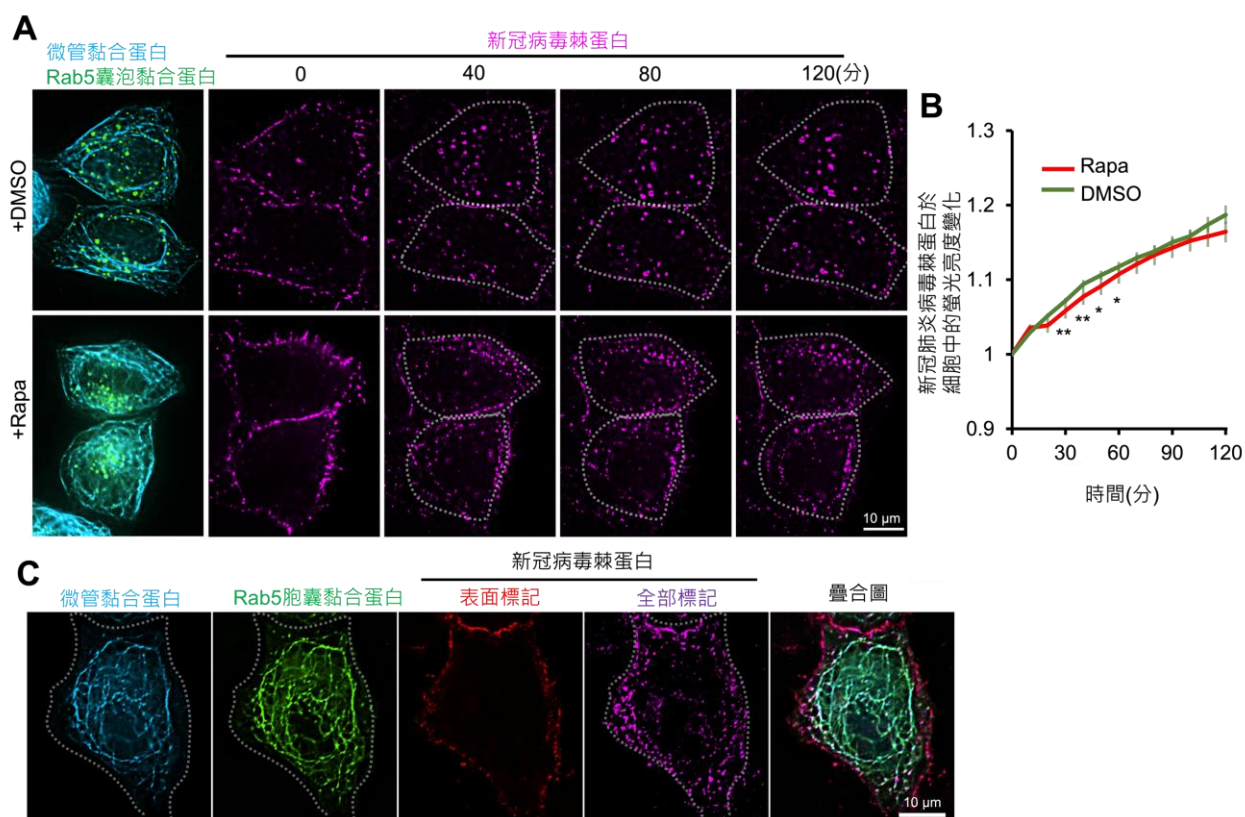


圖五、快速黏合 Rab5b 囊泡可抑制胞吞作用。(A) 在表現微管黏附蛋白(藍)及黏附蛋白(綠色; 左邊列細胞)、胞內體黏附蛋白(綠色; 中間列細胞)、或周邊體黏附蛋白(綠色; 右邊列細胞)的細胞中，先加入 0.1% DMSO(溶劑控制組)或是 100 nM rapamycin 後，再加入弧菌 B 蛋白(紅色)處理 5 分鐘及 30 分鐘，並觀察弧菌 B 蛋白是否會從細胞邊緣移動到細胞中心(空心箭頭)位置。(下頁接續)

(B) 在圖 A 細胞中，弧菌 B 蛋在細胞中心到細胞邊緣在加入 0.1% DMSO(綠色曲線)或 100 nM Rapamycin(紅色曲線)後不同時間(5 分鐘：虛線; 30 分鐘的螢光強度，數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析 60 個細胞。(研究者自製)

四、快速黏合 Rab5 囊泡於微管上無法抑制新冠病毒蛋白進入細胞中

過去的研究發現新冠病毒會藉由 Rab5 囊泡負責的胞吞作用進入細胞，再進行後續的感染(文獻 3)。我們想要停止 Rab5 囊泡於細胞微管上來抑制此病毒胞吞作用。在此實驗中，我們使用一個螢光標記的新冠肺炎病毒棘蛋白，將此蛋白與表現 ACE2 的 HeLa 細胞處理，會觀察到此棘蛋白會從一開始在細胞表面上漸漸移動到細胞中心位置(紫色; 圖六 A 上)，利用這個實驗，我們可以觀察到新冠肺炎病毒棘蛋白結合細胞並進入細胞的過程。我們將此有表現 ACE2 的 HeLa 細胞轉殖微管黏合基因及 Rab5 囊泡黏合基因，並且加入 Rapamycin 來停止 Rab5 囊泡於微管上，但發現新冠肺炎病毒棘蛋白還是會進入細胞內(紫色; 圖五六下)。我們利用軟體分析處理棘蛋白不同時間時，棘蛋白進入細胞內的螢光量(圖六 B)，結果同樣顯示與控制組相比(圖六 B，綠色曲線)，停止 Rab5 囊泡在微管上，雖說早期(30~60 分鐘)會減少一些棘蛋白進入細胞，但 60 分鐘後無法有效抑制新冠肺炎棘蛋白進入細胞中(圖六 B，紅色曲線)。除了利用棘蛋白在細胞中央或是細胞周圍來分辨它進入細胞中或是在細胞上(圖六 A,B)，我們還利用表面/全體標定棘蛋白來精準分析它是否進入細胞(圖六 C; 詳細方法敘述於 3.研究過程與方法)。將轉殖微管黏合蛋白及胞內體黏合蛋白的 HeLa 細胞加入 Rapamycin 後，再處理棘蛋白一小時後，我們利用抗體標定還位在細胞表面的棘蛋白(紅色訊號; 圖六 C)及全體的棘蛋白訊號(紫色訊號; 圖六 C)，驗證了大部份胞內體(綠色訊號)所攜帶的棘蛋白都已經進入細胞內。這些實驗數據都驗證將胞內體停止於微管上還是會讓新冠肺炎蛋白進入細胞中。



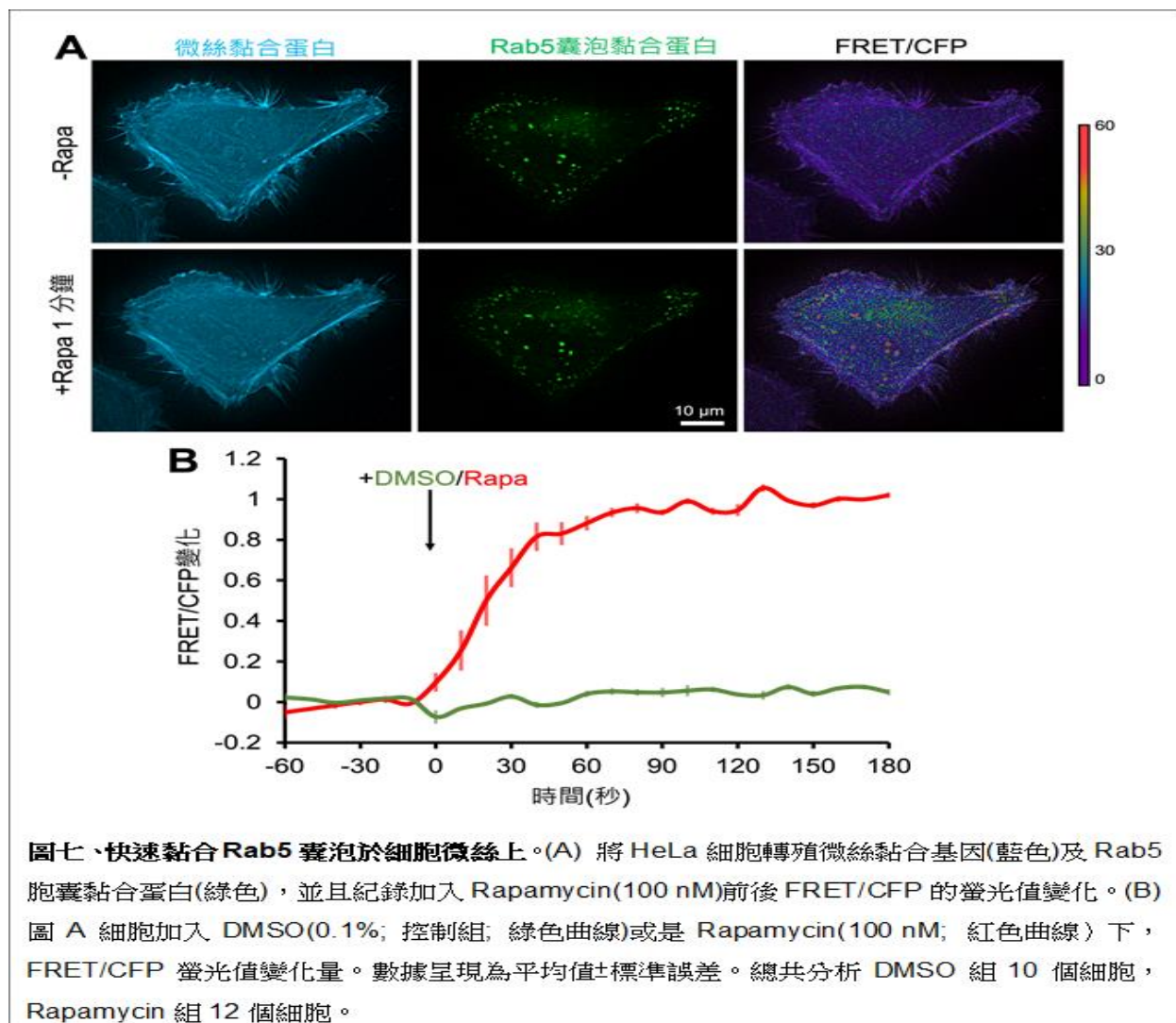
圖六、快速黏合 **Rab5** 囊泡於微管上無法抑制新冠肺炎蛋白進入細胞中。(A) 將表現 ACE2 受器的 HeLa 細胞轉殖微管黏合蛋白(藍色)及 Rab5 囊泡黏合蛋白(綠色)後，加入 Rapamycin(100 nM)或是 DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後，再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5 分鐘後沖洗掉，並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(B) 量化圖 A 中，新冠肺炎病毒棘蛋白在加入 0.1% DMSO(綠色曲線)或 100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析 DMSO 組 42 個細胞，Rapamycin 組 80 個細胞。*及**分別顯示 DMSO 跟 Rapamycin 兩組間有顯著(p 值小於 0.05)及極顯著差異(p 值小於 0.01)。(C) 將表現 ACE2 受器的 HeLa 細胞微管黏合蛋白(藍色)及 Rab5 囊泡黏合蛋白(綠色)後，加入 Rapamycin(100 nM)五分鐘，並且處理新冠肺炎棘蛋白 5 分鐘，等待 1 小時後，利用抗體表面標記及全部標記法偵測位在細胞表面(紅色)的棘蛋白及整體棘蛋白(紫色)。

(研究者自製)

五、快速黏合 Rab5 囊泡於細胞微絲上

相比於微管會廣泛地分佈在細胞中央位置，微絲則是主要分佈在鄰近細胞膜下方位置(圖一)，我們推測之前停止胞內體於細胞微管上無法有效抑制棘蛋白進入細胞中(圖六)，可能

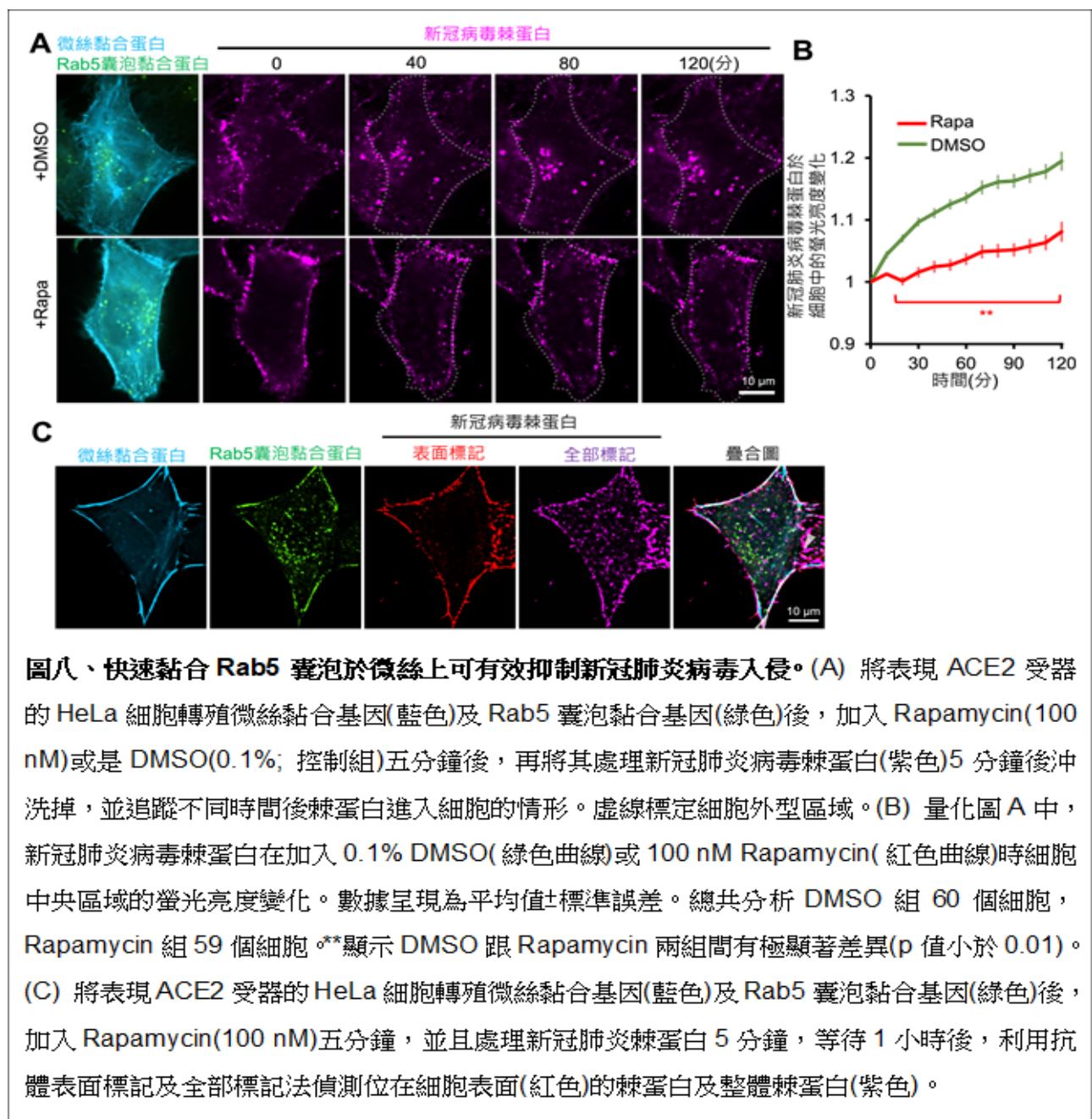
是因為微管分佈在細胞中央位置，此處所黏附的胞內體已經將病毒帶入細胞中。為了能在細胞膜附近就捕捉到帶有棘蛋白的胞內體，我們嘗試要將胞內體黏合在微絲上。我們首先設計一個實驗來測試是否能用 Rapamycin 誘導胞內體黏附蛋白與微絲黏附蛋白間的黏合反應，將 HeLa 細胞轉殖 mNeon-FKBP-Rab5b（綠色胞內體黏附蛋白）及 LifeAct-CFP-FRB（藍色微絲黏附蛋白），並利用 FRET 影像(Fluorescence Resonance Energy Transfer; 螢光共振能量轉移, 為一個利用螢光影像可即時分析 CFP 跟 mNeon 兩個螢光蛋白間的距離，當兩個螢光距離靠近時會產生螢光共振的能量轉移而被顯微鏡捕捉到)(維基百科-螢光共振能量轉移)來觀察加入 Rapamycin 後是否能讓綠色胞內體黏附蛋白及微絲黏附蛋白間距離拉近(即為黏合反應)。FRET 的影像結果呈現加入 Rapamycin 後會快速增加細胞膜附近 FRET 訊號(圖七 A 及 B 紅色曲線)，加入 0.1%DMSO 則不會改變 FRET 訊號(圖七 B 綠色曲線)。這些實驗結果驗證可以使用 Rapamycin 快速黏合胞內體於細胞膜附近的微絲上。



(研究者自製)

六、黏合 Rab5 囊泡於微絲上可有效抑制新冠病毒蛋白進入細胞中

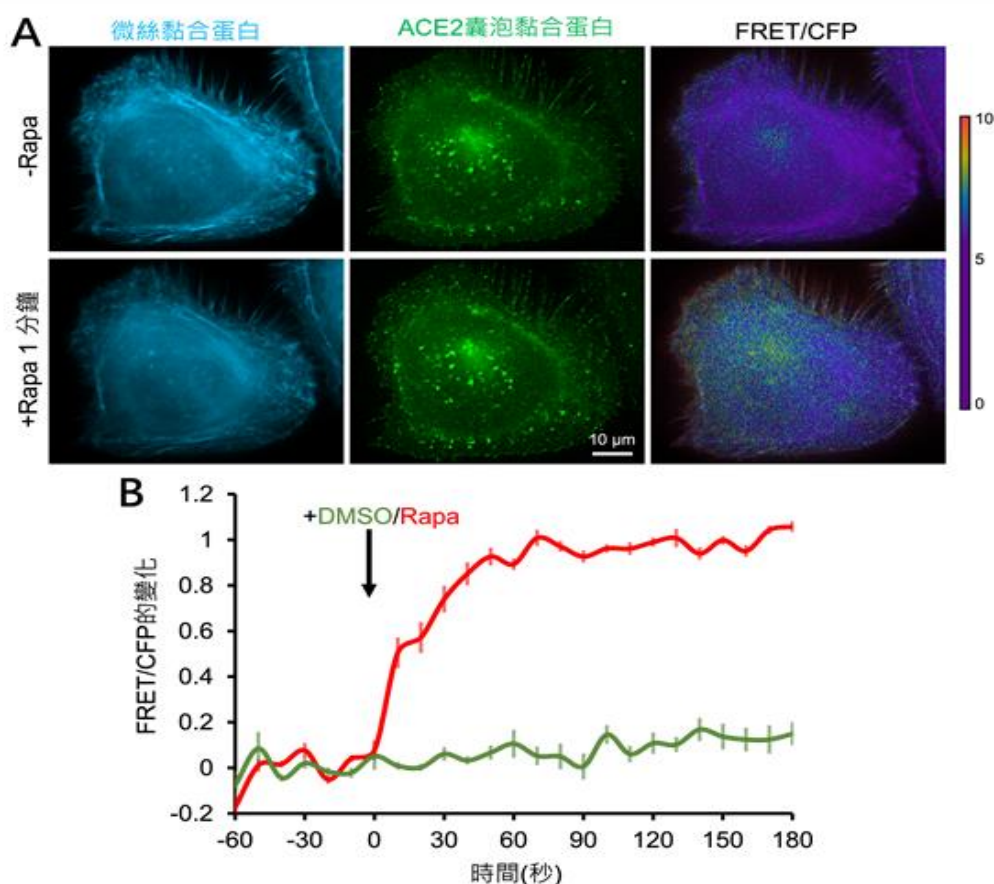
我們接著測試黏合 Rab5 囊泡於微絲上是否能抑制新冠肺炎蛋白進入細胞中。在此實驗中，我們將有表現 ACE2 的 HeLa 細胞轉殖微絲黏合基因及 Rab5 囊泡黏合基因，在加入 DMSO 的控制組中，新冠病毒棘蛋白會逐漸由細胞膜進入細胞中(圖八 A 上排，B 綠色曲線)。加入 Rapamycin 將 Rab5 囊泡黏合到微絲後，能夠有效將新冠病毒棘蛋白停留在細胞膜周圍區域而無法進入細胞中(圖八 A 下排，B 紅色曲線)。利用抗體去標定細胞表面及整體棘蛋白的實驗，驗證黏合 Rab5 囊泡於微絲，可以讓大量的棘蛋白停留在細胞表面，無法進入細胞中(圖八 C)。這些研究數據驗證了將 Rab5 囊泡黏合在微絲上可以有效地抑制新冠病毒蛋白進入細胞中。



(研究者自製)

七、快速黏合 ACE2 囊泡於細胞微絲上

Rab5 囊泡除了會幫助新冠病毒的進入外，還會負責多種不同的胞吞作用，這些與細胞訊息傳遞及多種生理功能都有關係，因此抑制 Rab5 囊泡運輸雖然可以減少新冠病毒入侵細胞，但也極有可能抑制了其他與胞吞作用相關的生理功能。為了能夠更加專一地抑制新冠病毒入侵路徑，我們聚焦在 ACE2 受器上，新冠病毒會結合到細胞的 ACE2 受器，接著凹陷入細胞中形成帶有 ACE2 的囊泡(圖一)，我們嘗試去黏合 ACE2 囊泡於微絲或是微管上，看是否能夠有效的抑制新冠病毒蛋白進入細胞。首先先利用 FRET 影像技術，及時觀察加入 Rapamycin 能否將 ACE2 囊泡黏合蛋白(連接著綠色螢光; ACE2-mNeon-FKBP)與微絲黏合蛋白(連接著藍色螢光; LifeAct-CFP-FRB)黏合起來(圖九 A)，實驗結果顯示在控制組中加入 DMSO，不會對產生任何 FRET 訊號(圖九 B 綠色曲線)，加入 Rapamycin 會快速誘導出 ACE2 囊泡黏合蛋白跟微絲黏合蛋白於細胞膜上

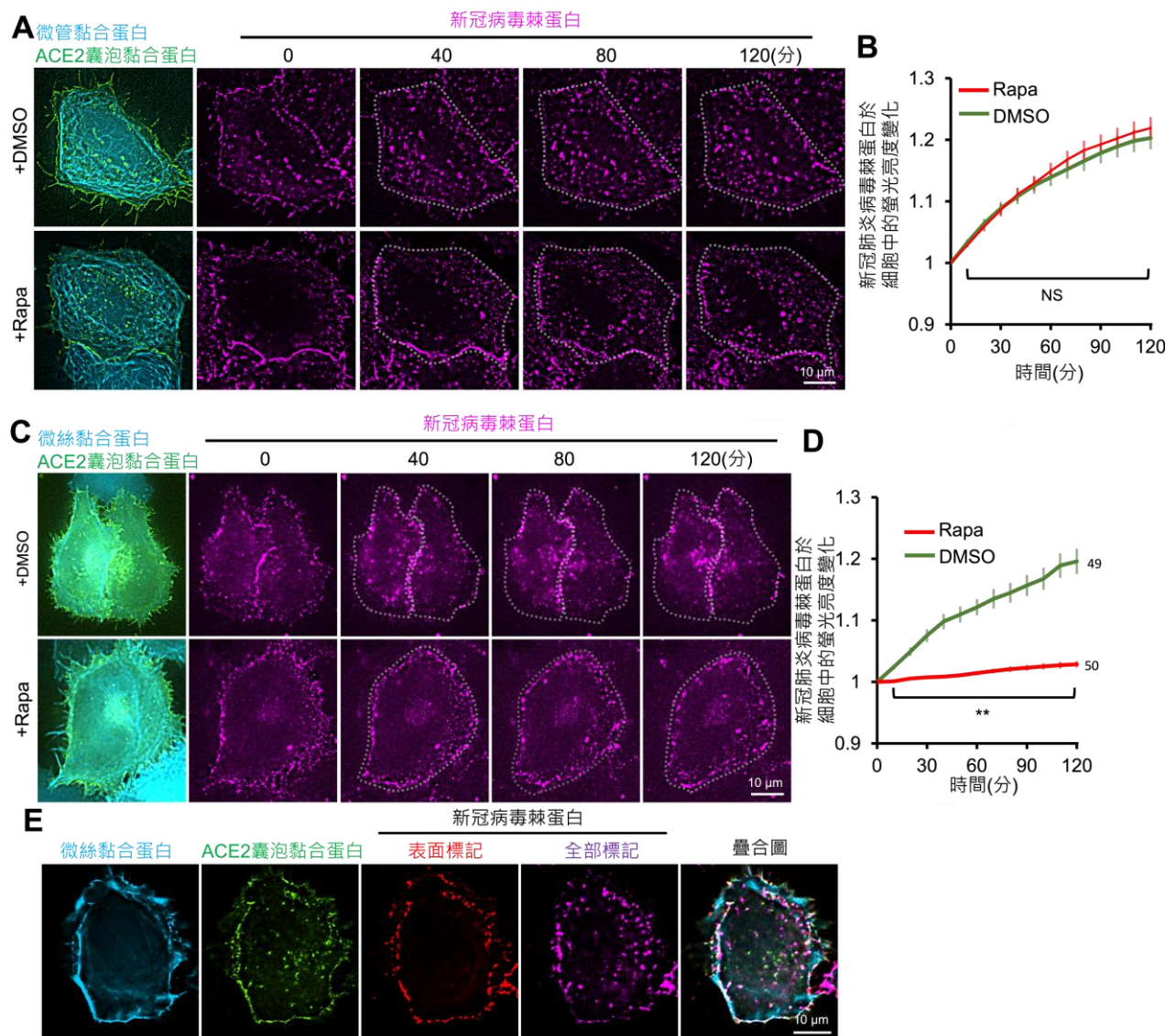


圖九、快速黏合 ACE2 囊泡於細胞微絲上。(A) 將 HeLa 細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及 ACE2 囊泡黏合蛋白(綠色)，並且紀錄加入 Rapamycin(100 nM)前後 FRET/CFP 的螢光值變化。(B) 圖 A 細胞加入 DMSO(0.1%; 控制組; 綠色曲線)或是 Rapamycin(100 nM; 紅色曲線)下 FRET/CFP 螢光值變化量。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析 DMSO 組 10 個細胞，Rapamycin 組 12 個細胞。

(研究者自製)

八、黏合 ACE2 囊泡於微絲上可有效抑制新冠病毒蛋白進入細胞中

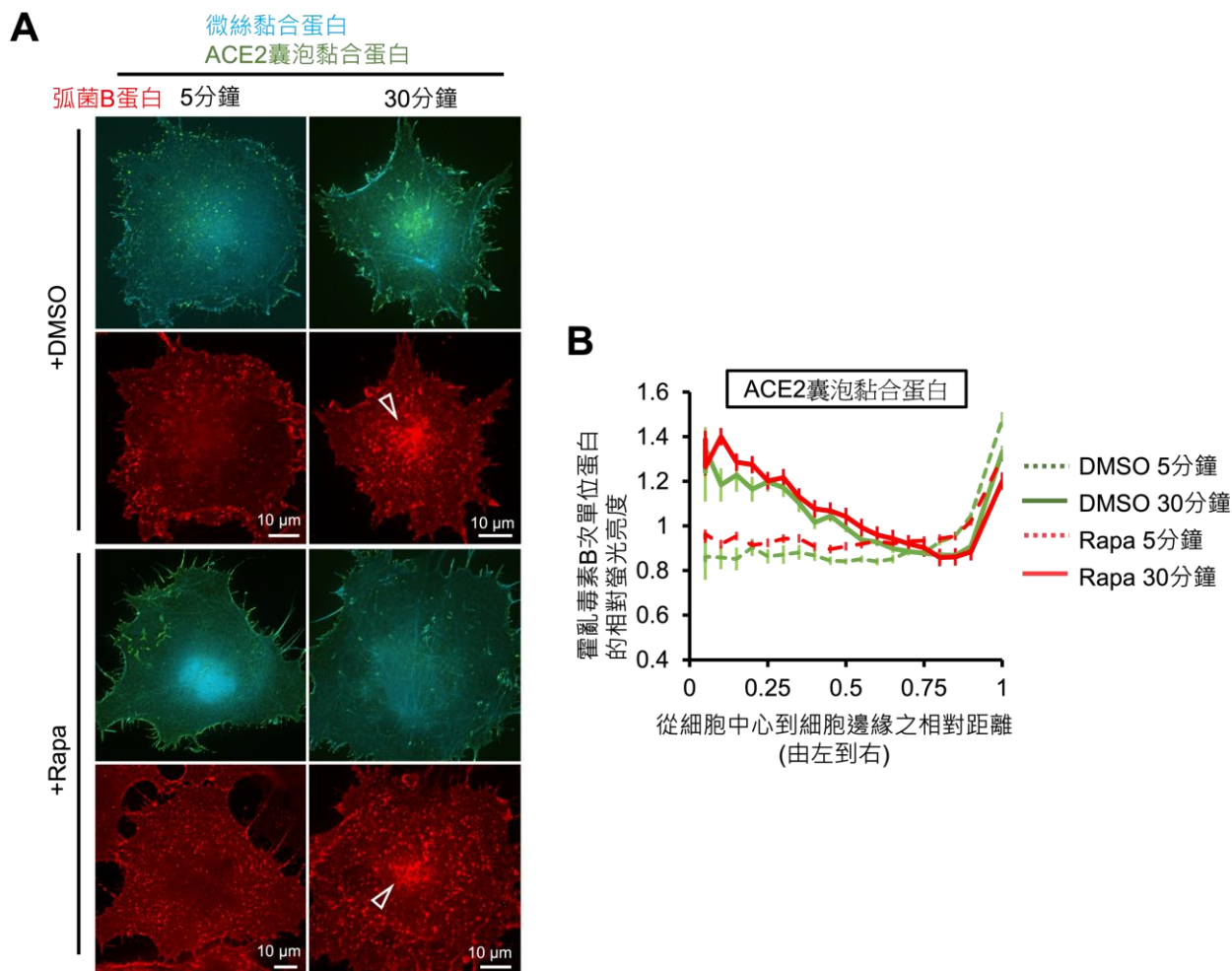
我們接下來將 ACE2 囊泡黏合於微管(圖十 A)或是微絲(圖十 C)，並測試是否能夠抑制新冠病毒蛋白進入細胞中。我們將有表現 ACE2 的 HeLa 細胞轉殖微管黏合基因及 ACE2 囊泡黏合基因，不論加入 DMSO 或是 Rapamycin 組別，新冠病毒蛋白都能夠進入細胞中(圖十 A, B)，說明將 ACE2 囊泡黏合在微管上無法有效抑制新冠病毒蛋白進入細胞中。此外，我們將有表現 ACE2 的 HeLa 細胞轉殖微絲黏合基因及 ACE2 囊泡黏合基因，加入 Rapamycin 去黏合 ACE2 囊泡至微絲上可以抑制幾乎 89% 以上的病毒蛋白進入細胞中(圖十 C, D 紅色曲線)。我們更進一步利用抗體去標定細胞表面/整理病毒蛋白，結果發現幾乎大部分的病毒蛋白都會停留在細胞表面上(圖九 E)。綜合這些結果，我們發現黏合 ACE2 囊泡於微絲上而非微管上能夠有效抑制新冠病毒蛋白進入細胞中。



圖十、快速黏合 ACE2 囊泡於微絲上可有效抑制新冠肺炎病毒入侵。(A) 將表現 ACE2 受器的 HeLa 細胞轉殖微管黏合基因(藍色)及 ACE2 囊泡黏合基因(綠色)後，加入 Rapamycin(100 nM)或是 DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後，再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5 分鐘後沖洗掉，並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(B) 量化圖 A 中，新冠肺炎病毒棘蛋白在加入 0.1% DMSO(綠色曲線)或 100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析 DMSO 組 83 個細胞，Rapamycin 組 54 個細胞。NS 顯示 DMSO 跟 Rapamycin 兩組間無顯著差異(p 值大於 0.05)。(C) 將表現 ACE2 受器的 HeLa 細胞轉殖微絲黏合蛋白(藍色)及 ACE2 囊泡黏合基因(綠色)後，加入 Rapamycin(100 nM)或是 DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後，再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5 分鐘後沖洗掉，並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。

九、快速黏合 ACE2 囊泡於微絲上不會抑制一般的胞吞作用

我們最後測試黏合 ACE2 囊泡於微絲上是否會抑制其他胞吞作用，藉此探討是否我們抑制病毒入侵的策略會影響其他正常生理功能。藉由紅色螢光標記的弧菌 B 蛋白能夠藉由胞吞作用進入細胞中央的機制來探討這個問題。COS7 細胞轉殖微絲黏合基因跟 ACE2 囊泡黏合基因後，加入 DMSO 或 Rapamycin，緊接著處理弧菌 B 蛋白，控制組細胞中(DMSO 組)可觀察到弧菌 B 蛋白首先會先於處理 5 分鐘時結合到細胞膜周圍，30 分鐘時則會藉由胞吞作用進入細胞中央位置(圖十一 A，箭頭)，軟體分析弧菌 B 蛋白於細胞中分佈的相對位置也可以驗證其會先結合到細胞膜附近，接著累積到細胞中央位置。而加入 Rapamycin 去誘導 ACE2 囊泡黏合在微絲上的細胞中，弧菌 B 蛋白依舊能夠有效進入到細胞中央(圖十一 A,B)。這個實驗驗證我們可以專一地黏合 ACE2 囊泡到微絲上，並藉此專一地抑制新冠病毒蛋白進入細胞中，卻不會影響其他正常的胞吞作用。



圖十一、快速黏合 **ACE2** 囊泡於微絲上不會抑制一般胞吞作用。(A) 在表現微絲黏合蛋白(藍)及 **ACE2** 囊泡黏合蛋白(綠色)的細胞中，先加入 0.1% **DMSO**(溶劑控制組)或是 100 nM rapamycin 後，再加入弧菌 B 蛋白(紅色)處理 5 分鐘及 30 分鐘，並觀察弧菌 B 蛋白是否會從細胞邊緣移動到細胞中心(空心箭頭)位置。(B) 在圖 A 細胞中，弧菌 B 蛋在細胞中心到細胞邊緣在加入 0.1% **DMSO**(綠色曲線)或 100 nM Rapamycin(紅色曲線)後不同時間(5 分鐘：虛線；30 分鐘的螢光強度，數據呈現為平均值 $\pm$ 標準誤差。總共分析 114 個細胞。

(研究者自製)

伍、討論

一、Rapamycin 對人體細胞的可能影響及克服方案

在本研究中大量使用 Rapamycin(雷帕黴素)去誘發黏合系統，不過 Rapamycin 除了讓兩種黏合蛋白 FRB 跟 FKBP 黏合以外，還會引發細胞內其他反應，如已知對細胞 mTOR(mammalian target of rapamycin)活性的抑制效果，並且可以作為殺死細菌的抗生素，甚至有免疫抑制、抗腫瘤的效果。若對使用 Rapamycin 有所疑慮，指導老師實驗室還有發展其他分子所誘發的黏合系統，如利用植物賀爾蒙吉貝素將另外兩個黏合蛋白 GAls 跟 mGID1 黏合起來，甚至用照射藍光讓 Cry2 跟 CIBN 蛋白黏合起來，都已經證實可以用於囊泡黏合系統。藉由這些實驗驗證只要能將囊泡與細胞骨架黏合起來，不見得需要 Rapamycin，可用於其他對人體可能影響更小的系統來抑制新冠肺炎病毒進入人體細胞。

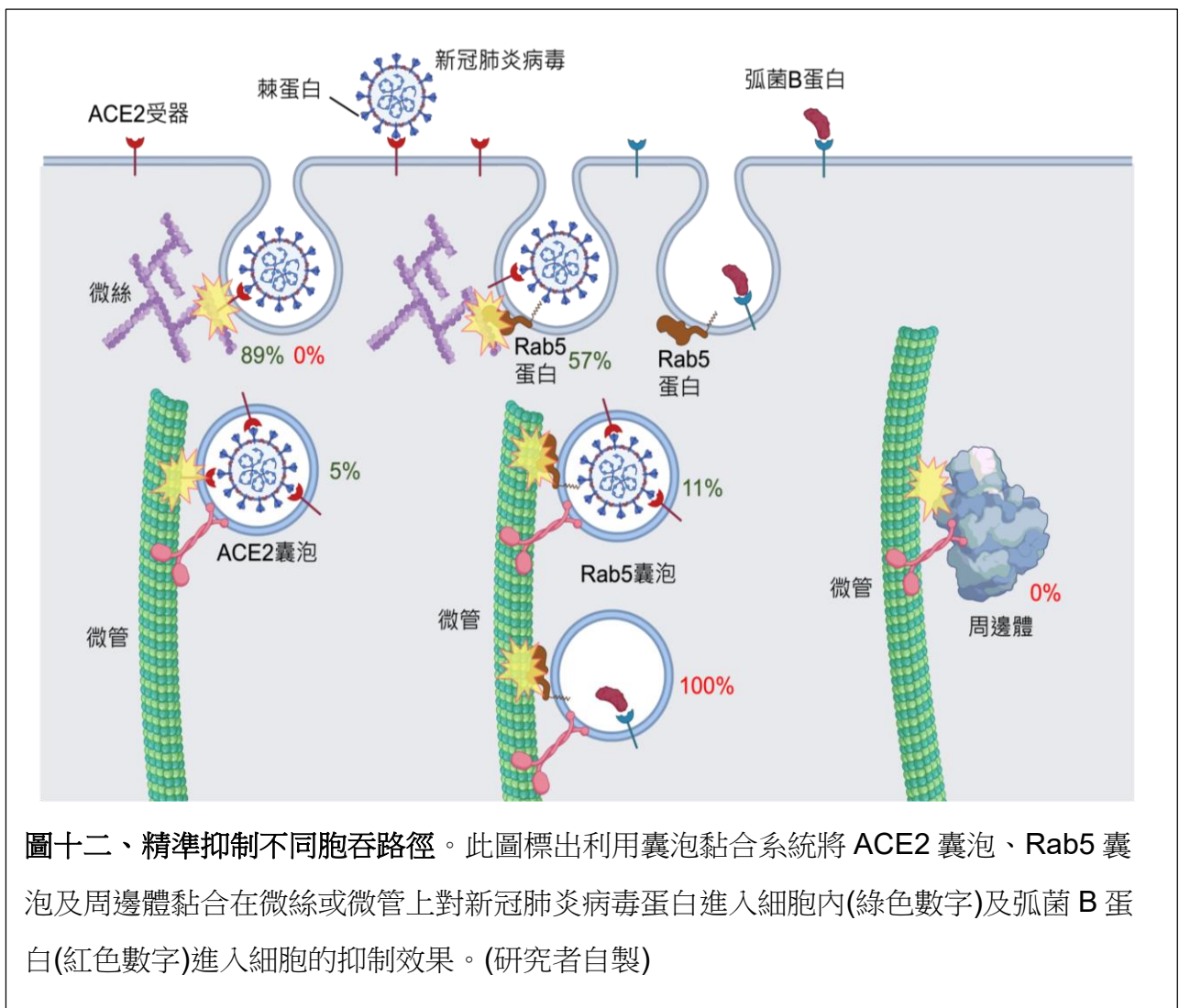
二、如何遞送黏合系統基因到人體中

要在人體細胞中建立起囊泡黏合系統必須要將相關的重組基因遞送至人體細胞中，因為新冠肺炎的影響，過去幾年科學界大力於發展基因治療的相關技術，也發展出利用腺病毒(Adenovirus)或是脂質奈米顆粒(Lipid nanoparticles)來遞送基因所建構的肺炎病毒疫苗，這些方法都已經成熟的運用在人體醫療上，未來若有需要，可以利用這些技術來遞送囊泡黏合系統基因到人體細胞來對抗病毒入侵。而這些基因進入人體是否會造成影響，還需要更多的詳細研究，如進行動物實驗，並且申請長期的臨床人體實驗，並非科展能夠進行的範疇，此計畫在於驗證於離體培養的人類細胞中，是否能夠黏合特定囊泡來抑制病毒入侵的前沿研究，也成功驗證其專一性的抑制病毒進入效果，可提供未來進一步研究的可能方案。

陸、結論

1. 利用囊泡黏合系統，我們成功地讓 Rab5 囊泡、ACE2 囊泡及周邊體快速黏合在微絲或是微管上(圖十二)。
2. 利用弧菌 B 蛋白為螢光探針觀察一般細胞胞吞作用的情形，結果發現黏合負責胞吞作用的 Rab5 囊泡於微管上，可以完全抑制弧菌 B 蛋白胞吞到高基氏體(紅色數字;抑制效果 100%)，但黏合其他運輸路徑的周邊體於微管上卻不會影響弧菌 B 蛋白胞吞作用(紅色數字;抑制效果 0%)，證明我們可以精準抑制細胞內特定系統如胞吞作用(圖十二)。

3. 雖然黏合 **Rab5** 囊泡於微管上可以有效抑制弧菌 **B** 蛋白進入高基氏體，但只能抑制 11%的新冠肺炎病毒蛋白進入細胞(綠色數字)。將 **Rab5** 囊泡黏合在細胞膜周圍的微絲上則可以更有效的減少新冠肺炎病毒蛋白進入細胞(綠色數字;57%)(圖十二)。
4. 黏合 **ACE2** 囊泡於微絲上(抑制效果 89%; 綠色數字)相比黏合其在微管上(抑制效果 5%; 綠色數字)可以更有效率抑制病毒蛋白進入細胞，卻不會影響弧菌 **B** 蛋白胞吞作用(0%;紅色數字)(圖十二)。
5. 利用精準抑制及量化的實驗驗證我們可以成功精準地抑制新冠肺炎病毒進入細胞，卻不會影響負責細胞其他功能的胞吞作用。未來可利用這項技術抑制病原體入侵人體(圖十二)。



柒、參考文獻資料

1. Who Covid-19 dashboard
2. www.cdc.gov
3. 科學月刊 604 期-新冠病毒的迫降
<https://www.scimonth.com.tw/archives/3861>
4. GENEONLINE,2020/8/11-COVID-19 治療新發現，有望對抗各類變種病毒的新型單株抗體!<https://geneonline.news/monoclonal-antibody-discovered-to-potentially-act-against-all-coronaviruses/>
5. 泛科學,2022/01/25-為何新冠病毒突變之後傳染力更強？——關鍵在於變異株的棘蛋白結構 <https://pansci.asia/archives/342431>
6. HEHO,2020/04/19-《細胞》：不用疫苗也能防新冠感染!人造蛋白或成新治療思路;超基因生技,2021/01/19-新冠治療新曙光!中研院研發誘餌抗體，阻斷病毒感染路徑；外泌體資訊,2022/01/30-Nature 子刊:外泌體 ACE2 誘捕新冠病毒，可預防和治療不同 SARS-CoV-2 突變株的感染
7. 科技·新南向,2021/05/06-陽明交大跨國團隊開發抑制 COVID-19 感染藥物篩選平台
<https://nsstc.narlabs.org.tw/NSTC/News.aspx?cate=2055&entry=2604>
8. 維基百科-血管收縮素轉化酶 2
<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%A1%80%E7%AE%A1%E7%B4%A7%E5%BC%A0%E7%B4%A0%E8%BD%AC%E5%8C%96%E9%85%B62>
9. 維基百科-胞吞作用
<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%83%9E%E5%90%9E%E4%BD%9C%E7%94%A8>
10. 維基百科-驅動蛋白
<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E9%A9%B1%E5%8A%A8%E8%9B%8B%E7%99%BD>
11. KSP 檢測系統 <https://min.news/zh-hant/science/4734ddd61cdda3ad506f018697183905.html> 網頁中第七項
12. Cheng et al., EMBO Rep, 2022<https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.202254935>
13. 微生物學通報-病毒入胞機制研究方法及其研究進展
<https://wsxwtb.ijournals.cn/wsxwtbcn/article/pdf/tb10010103>
14. 維基百科-螢光共振能量轉移
<https://zh.wikipedia.org/zhtw/%E8%8D%A7%E5%85%89%E5%85%B1%E6%8C%AF%E8%83%BD%E9%87%8F%E8%BD%AC%E7%A7%BB>

【評語】 052011

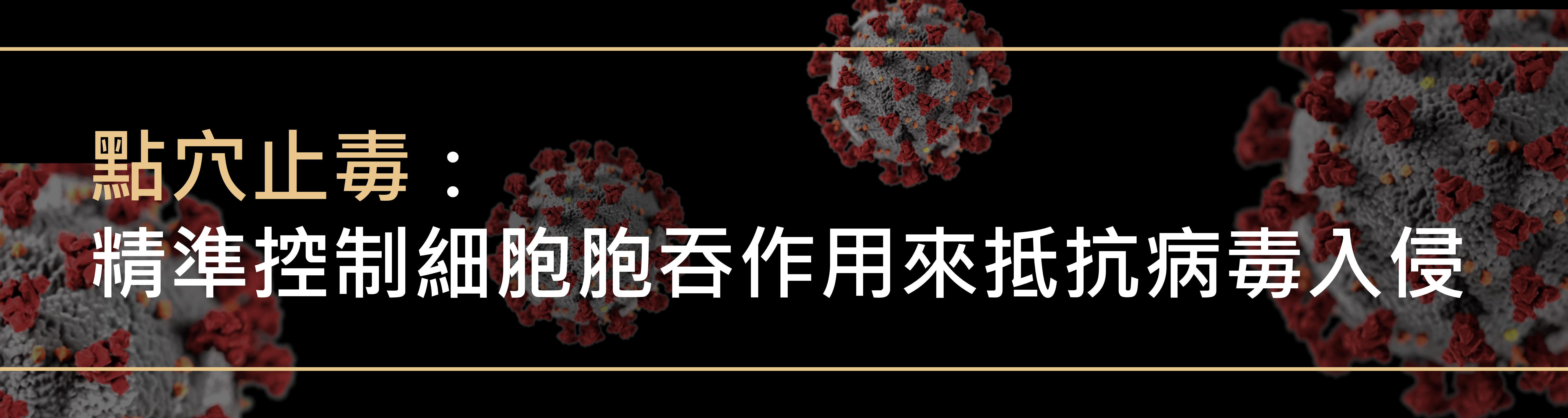
本研究目的為：

- (一) 發展抑制病毒入侵細胞的新技術。
- (二) 測試停止 Rab5 囊泡運輸系統的專一性。
- (三) 測試停止 ACE2 受體運輸系統。
- (四) 測試停止 Rab5 囊泡或 ACE2 受體運輸是否能減少病毒入侵細胞。
- (五) 測試上述方法，是否只影響病毒入侵，不影響其他細胞運輸系統。

這篇研究的主要強項在於成功開發出一種精準抑制新冠病毒進入細胞的方法，卻不會影響負責細胞其他功能的胞吞作用，並且相對於以往方法，能夠減少對細胞其他功能的不良影響。具體來說，他們利用囊泡黏合系統，成功阻止了負責胞吞作用的 Rab5 囊泡運輸。發展新冠肺炎的精準療法，減少對生物其他傷害，是非常好的想法，有些建議如下：

1. 雖然這項研究的成果有著明顯的潛力，但是這種方法在不同細胞型態和不同病毒株上的效果是否一致，以及實際應用於體內模型和臨床實驗的可行性等問題都是未來研究需要深入探討的方向。
2. 作者提供都是細胞株的數據，未來還是要建立一套病毒的系統，來驗證假說。
3. 本研究在實驗、數據處理、結果討論部分都整理得很好，唯有文獻探討部分需加強。
4. 本研究中大量使用 Rapamycin（雷帕黴素）去誘發黏合系統，Rapamycin 在醫學的使用上仍有很大疑慮，或許如作者所說可朝其他安全、精準的方向做深入研究。

作品簡報



點穴止毒： 精準控制細胞吞作用來抵抗病毒入侵

摘要

人類為對抗新冠肺炎，研發出疫苗以減少重症，卻難以阻隔病毒進入人體，且會導致過敏、發燒、頭暈、嘔吐、心肌炎、心包膜炎、甚至休克致死的副作用。新冠病毒會結合細胞表面的ACE2受體再藉由胞吞作用進入細胞，注入相關分子或讓ACE2受體失活可減少病毒進入人體，但卻會嚴重影響ACE2原本的功能，因此我們想要發展精準抑制病毒入侵細胞的方法。利用囊泡黏合系統，我們成功地停止負責廣泛胞吞作用的Rab5囊泡運輸，但其無法抑制病毒進入細胞。接著我們將負責帶入病毒的ACE2囊泡停止在細胞膜周圍的微絲上，可以有效地抑制病毒進入細胞，且不會影響其他的胞吞作用，讓ACE2還可在細胞表面正常工作。我們成功地發展出新的策略去精準抑制病毒進入細胞，且能減少對其他功能的不良影響，此技術可望提供新的策略來對抗不同的病毒危害。

壹、研究動機

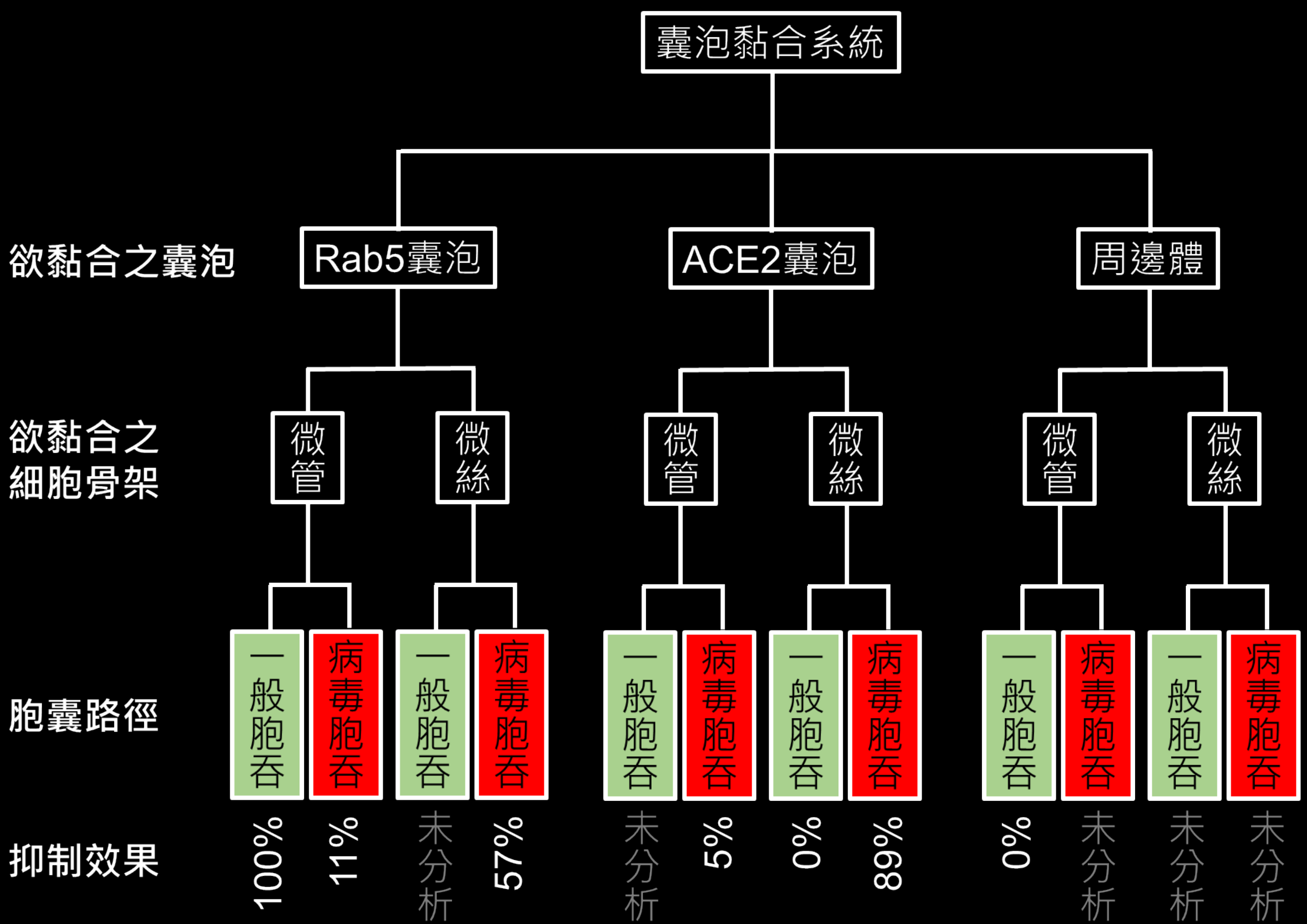
新冠肺炎病毒表面上的棘蛋白(Spike protein)會藉由人類細胞表面的ACE2受體結合到人體細胞上，接著再進入細胞引發後續感染的過程(圖一)。科學上減少細胞與新冠肺炎病毒結合的方法有很多種，可主要分為針對棘蛋白及ACE2蛋白所發展的策略：1. 發展會辨識結合病毒棘蛋白的抗體覆蓋住新冠肺炎病毒，使其無法有效結合人類細胞引發感染，但由於棘蛋白變異速度極快，因此難以即時更新能有效結合棘蛋白的抗體；2. 藉由注入大量的重組人類“ACE2蛋白”、“ACE2抗體”或“ACE2 外泌體等來包覆住新冠肺炎病毒的棘蛋白，讓其無法有效跟人類細胞結合或是注入能抑制ACE2蛋白的藥物來失活細胞的ACE2。但ACE2能幫助心血管組織抗氧化及發炎，減少肺臟組織損傷及抑制骨骼肌的纖維化等等，因此大量注入ACE2相關分子或是讓ACE2失活都可能會影響其原本所負責的功能，這也是傳統方法導致副作用的可能原因。為了能夠減低病毒進入人體細胞，且又要讓ACE2能夠在細胞上正常作用，因此我們想要發展新的技術來達到目的。

貳、研究目的

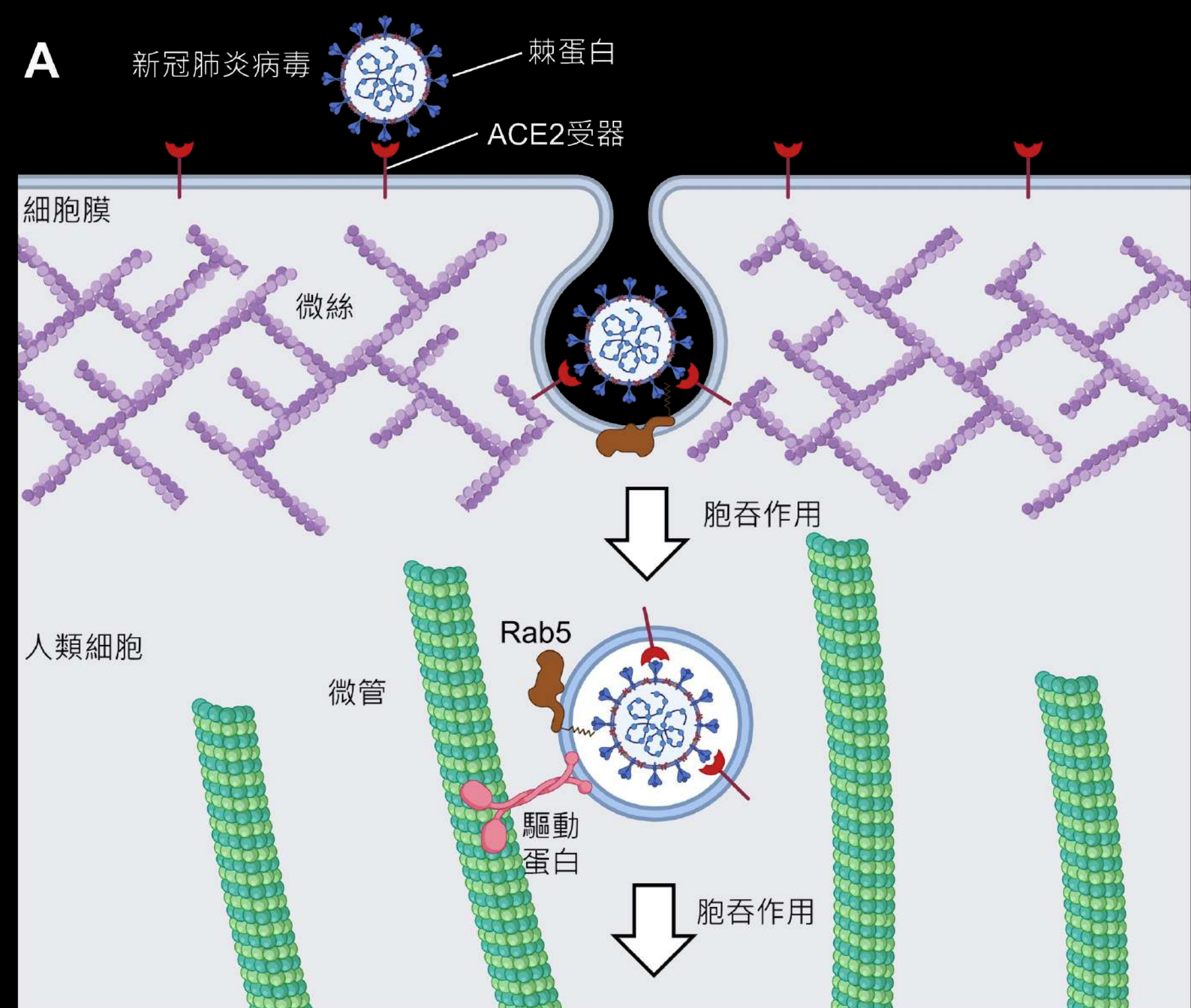
- (一)、發展抑制病毒入侵細胞的新技術。
- (二)、測試停止Rab5囊泡運輸系統的專一性。
- (三)、測試停止ACE2受體運輸系統。
- (四)、測試停止Rab5囊泡或ACE2受體運輸是否能減少病毒入侵細胞。
- (五)、測試上述方法是否只影響病毒入侵，不影響其他細胞運輸系統。

參、實驗流程

圖二、實驗流程圖及不同路徑抑制效果

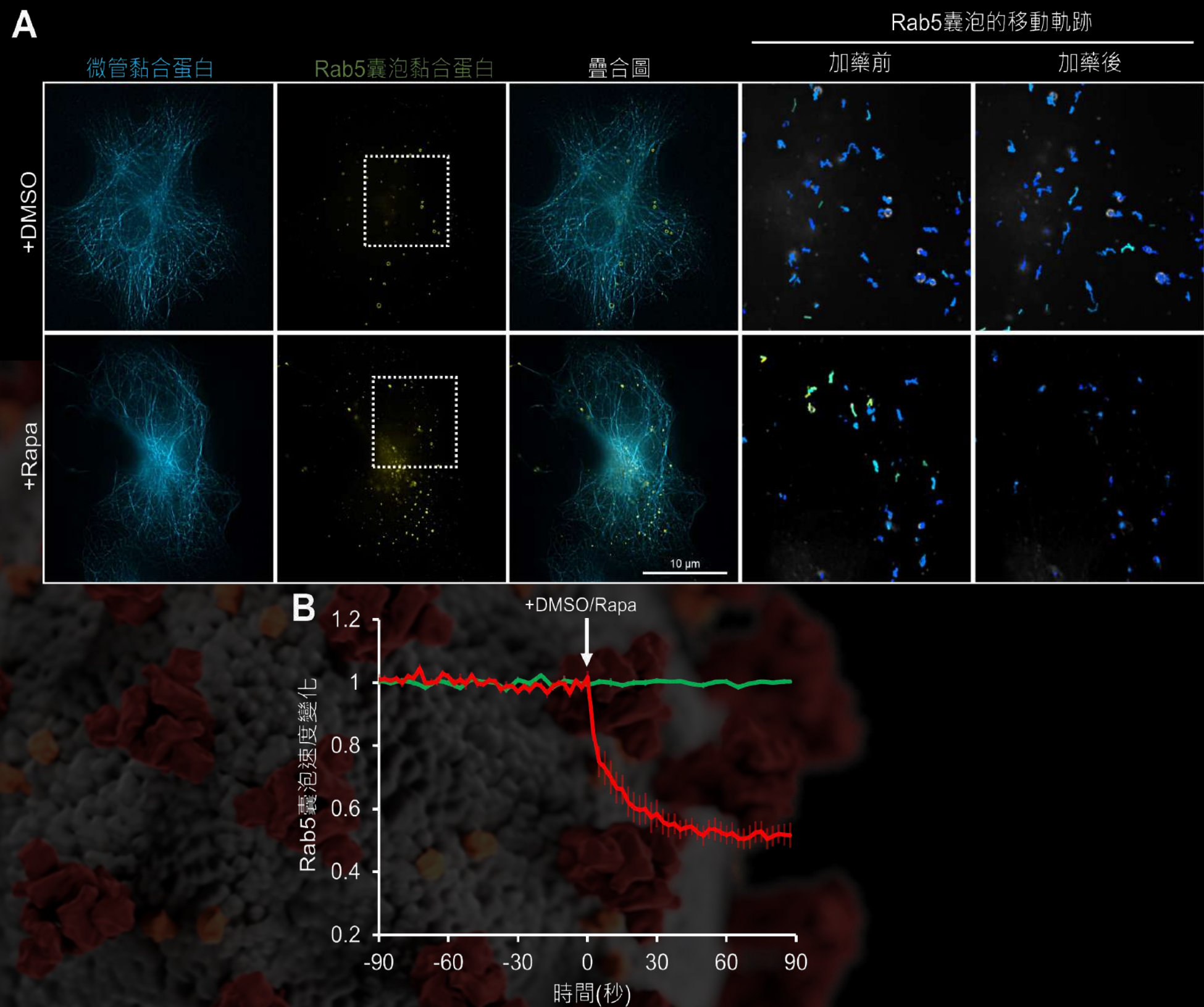


圖一、新冠肺炎病毒入侵細胞方式及囊泡黏合系統



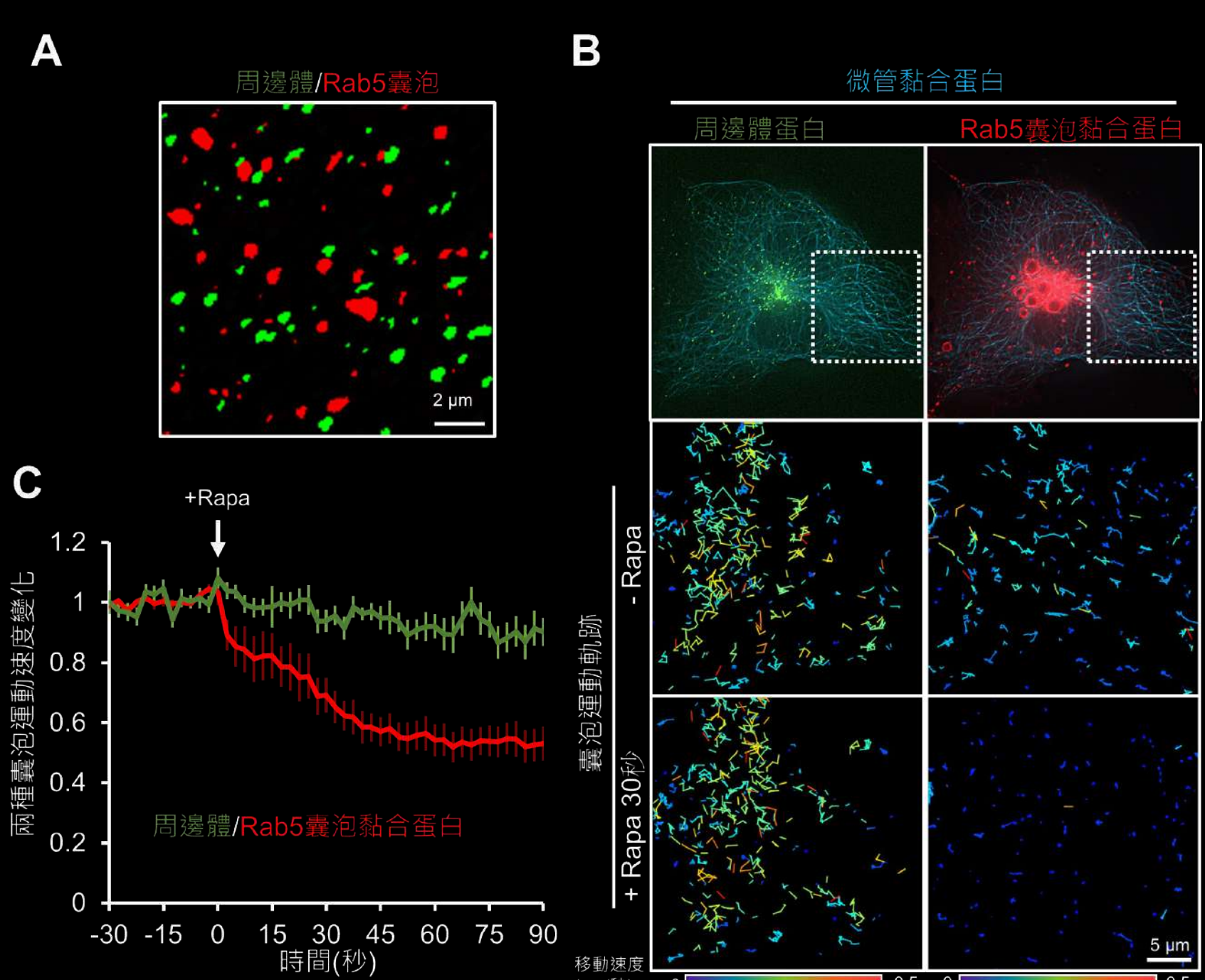
肆、研究結果

圖三、利用囊泡黏合技術快速停止Rab5囊泡運輸



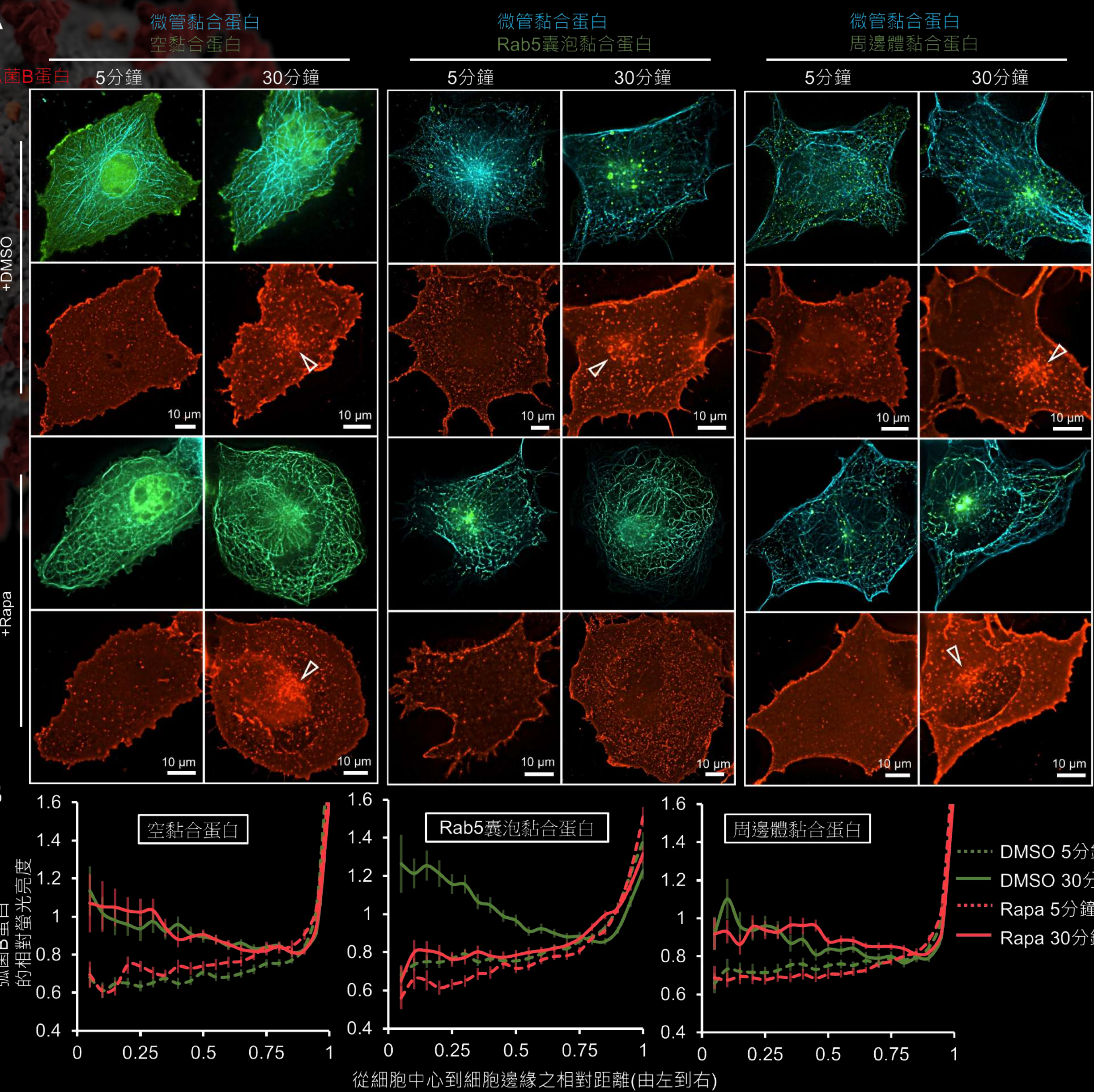
(A) 帶有微管黏合蛋白(藍色)及Rab5囊泡黏合蛋白(黃色)的COS7細胞，加入0.1% DMSO(溶劑控制組，上排)及100 nM rapamycin(黏合誘發藥劑，下排)對Rab囊泡移動速率的影響。(B) 圖A的Rab5囊泡移動速度於加入DMSO(綠色曲線)或Rapamycin(紅色曲線)的變化。數據呈現為平均值 $\pm$ 標準誤差。總共分析DMSO組7個細胞，Rapamycin組4個細胞。

圖四、精準停止Rab5囊泡運輸



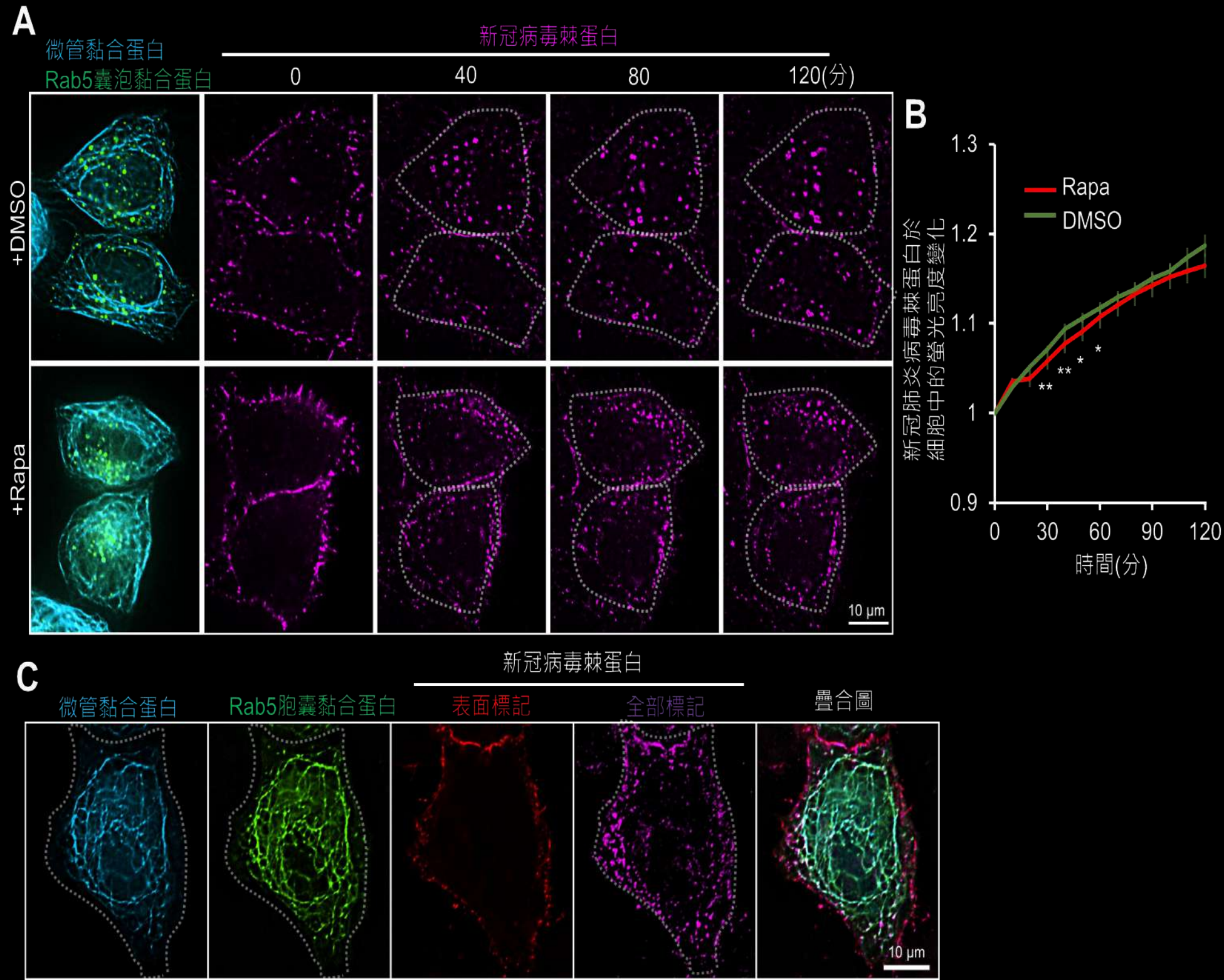
(A) 周邊體(綠色)及Rab5囊泡(紅色)分佈於細胞中不同的位置。(B) COS7細胞中表現了藍色微管黏合蛋白(藍色)、紅色Rab5囊泡黏合蛋白(紅色)及綠色周邊體(綠色)。在此細胞中加入Rapamycin(100 nM)前後，Rab5囊泡及周邊體移動軌跡的變化呈現如下。(C) 圖B細胞中紅色Rab5囊泡黏合蛋白(紅色曲線)及綠色周邊體(綠色曲線)於加入Rapamycin 前後移動速度的變化。數據呈現為平均值 $\pm$ 標準誤差。總共分析45顆細胞。

圖五、快速黏合Rab5b囊泡可抑制胞吞作用



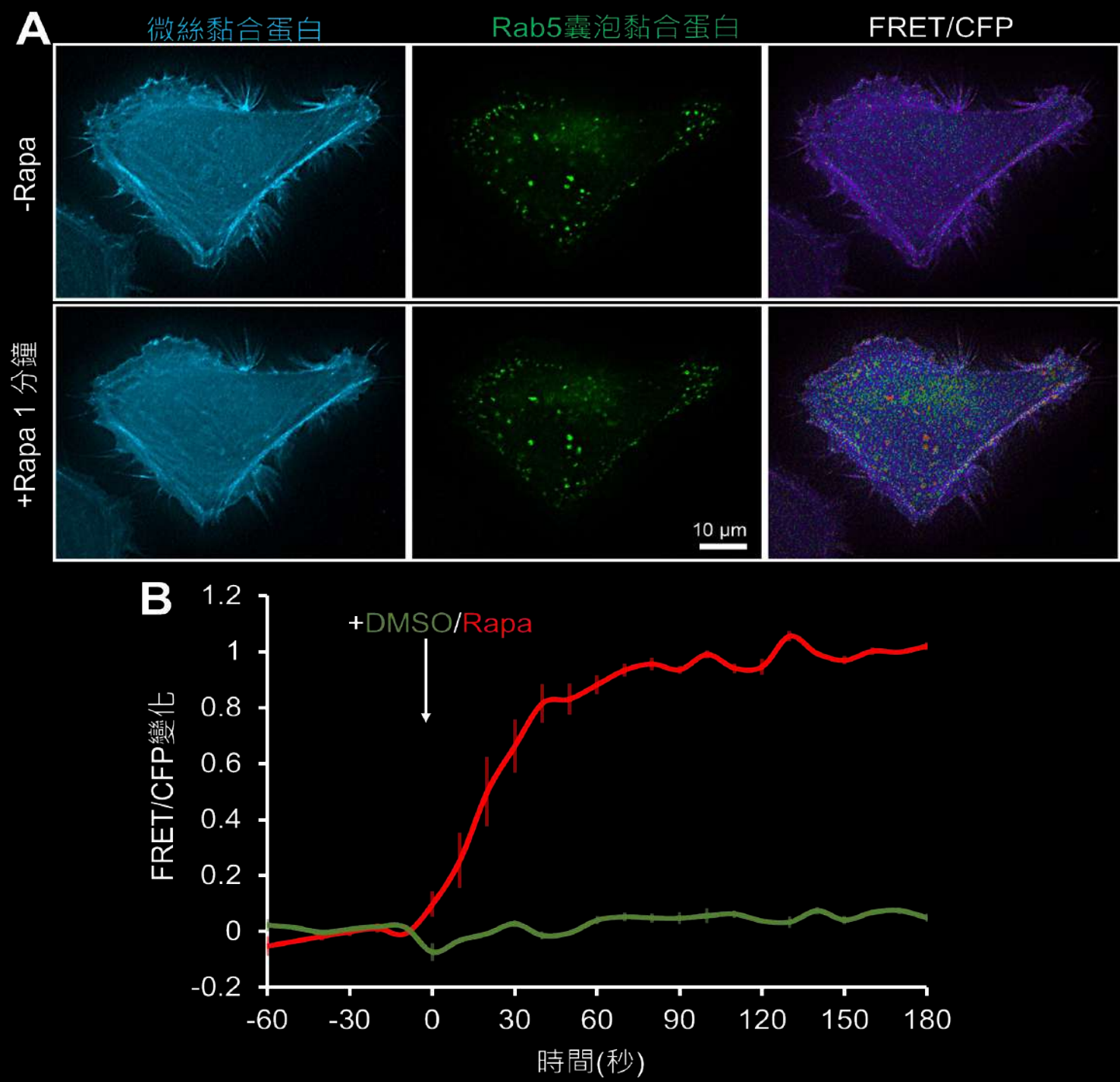
(A) 在表現微管黏合蛋白(藍)及空黏合蛋白(綠色; 左邊列細胞)、Rab5囊泡黏合蛋白(綠色; 中間列細胞)、或周邊體黏合蛋白(綠色; 右邊列細胞)的細胞中, 先加入0.1% DMSO(溶劑控制組)或是100 nM rapamycin後, 再加入弧菌B蛋白(紅色)處理5分鐘及30分鐘, 並觀察弧菌B蛋白是否會從細胞邊緣移動到細胞中心(空心箭頭)位置。(B) 在圖A細胞中, 弧菌B蛋白在細胞中心到細胞邊緣加入 0.1% DMSO(綠色曲線)或100 nM Rapamycin(紅色曲線)後不同時間(5分鐘: 虛線; 30分鐘的螢光強度, 數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析60個細胞。

圖六、快速黏合Rab5囊泡於微管上無法抑制新冠肺炎蛋白進入細胞中



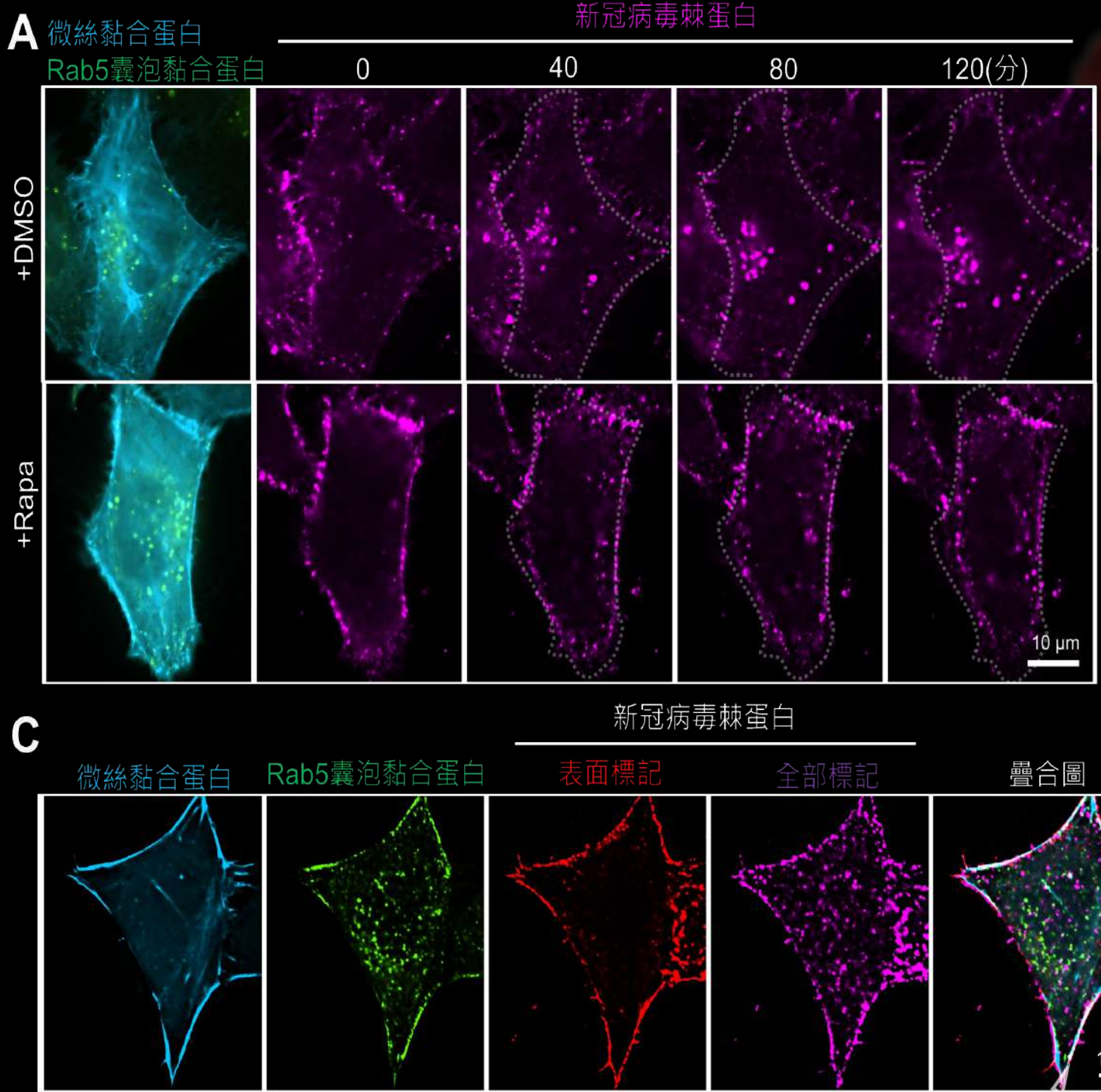
(A) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微管黏合蛋白(藍色)及Rab5囊泡黏合蛋白(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)或是DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後, 再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5分鐘後沖洗掉, 並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(B) 量化圖A中, 新冠肺炎病毒棘蛋白在加入0.1% DMSO(綠色曲線)或100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組42個細胞, Rapamycin組80個細胞。*及**分別顯示DMSO跟Rapamycin兩組間有顯著(p值小於0.05)及極顯著差異(p值小於0.01)。(C) 將表現ACE2受器的HeLa細胞微管黏合蛋白(藍色)及Rab5囊泡黏合蛋白(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)五分鐘, 並且處理新冠肺炎棘蛋白5分鐘, 等待1小時後, 利用抗體表面標記及全部標記法偵測位在細胞表面(紅色)的棘蛋白及整體棘蛋白(紫色)。

圖七、快速黏合Rab5囊泡於細胞微絲上



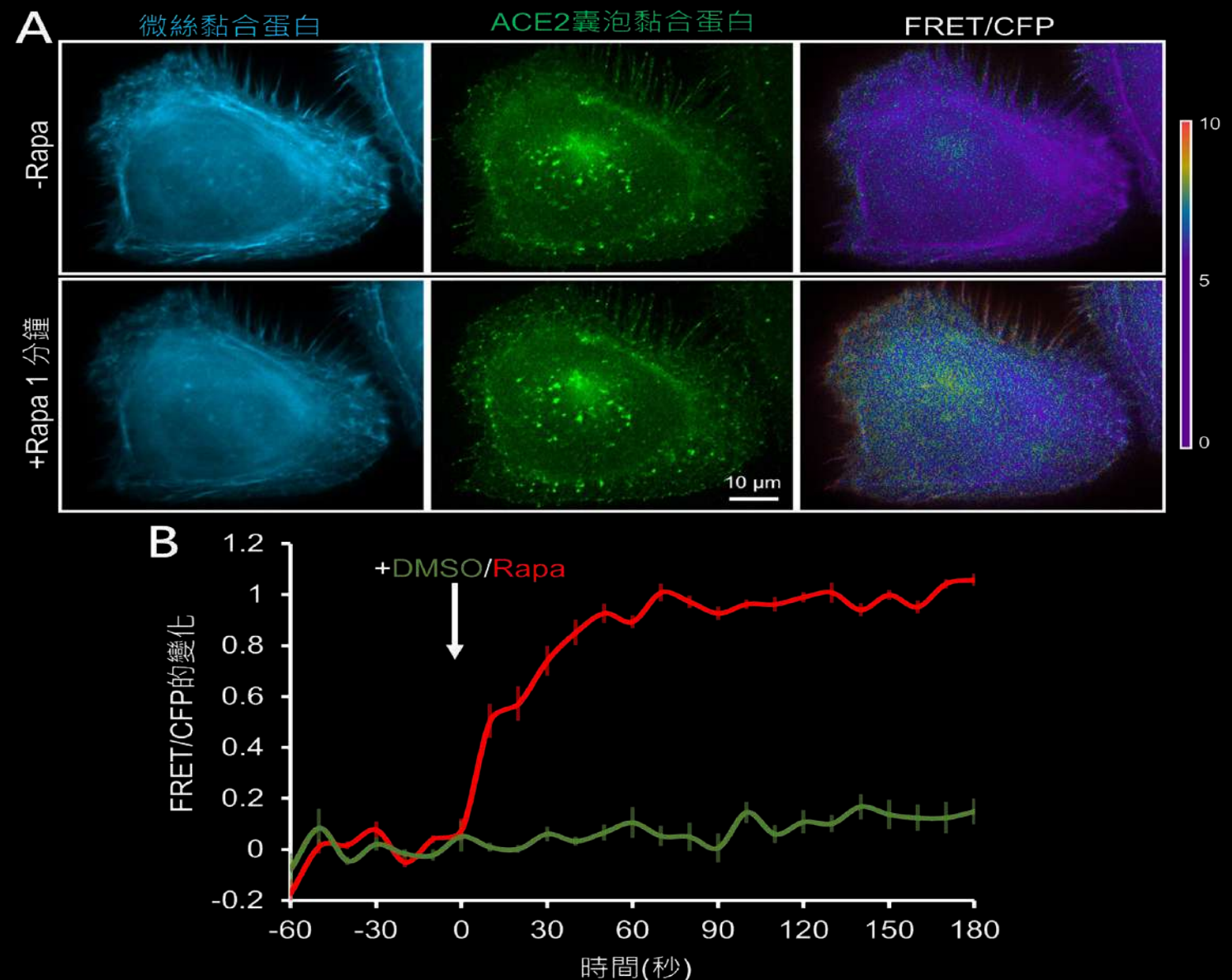
(A) 將HeLa細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及Rab5胞囊黏合蛋白(綠色), 並且紀錄加入Rapamycin(100 nM)前後FRET/CFP的螢光值變化。(B) 圖A細胞加入DMSO(0.1%; 控制組; 綠色曲線)或是Rapamycin(100 nM; 紅色曲線)下, FRET/CFP螢光值變化量。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組10個細胞, Rapamycin組12個細胞。

圖八、快速黏合Rab5囊泡於微絲上可有效抑制新冠肺炎病毒入侵



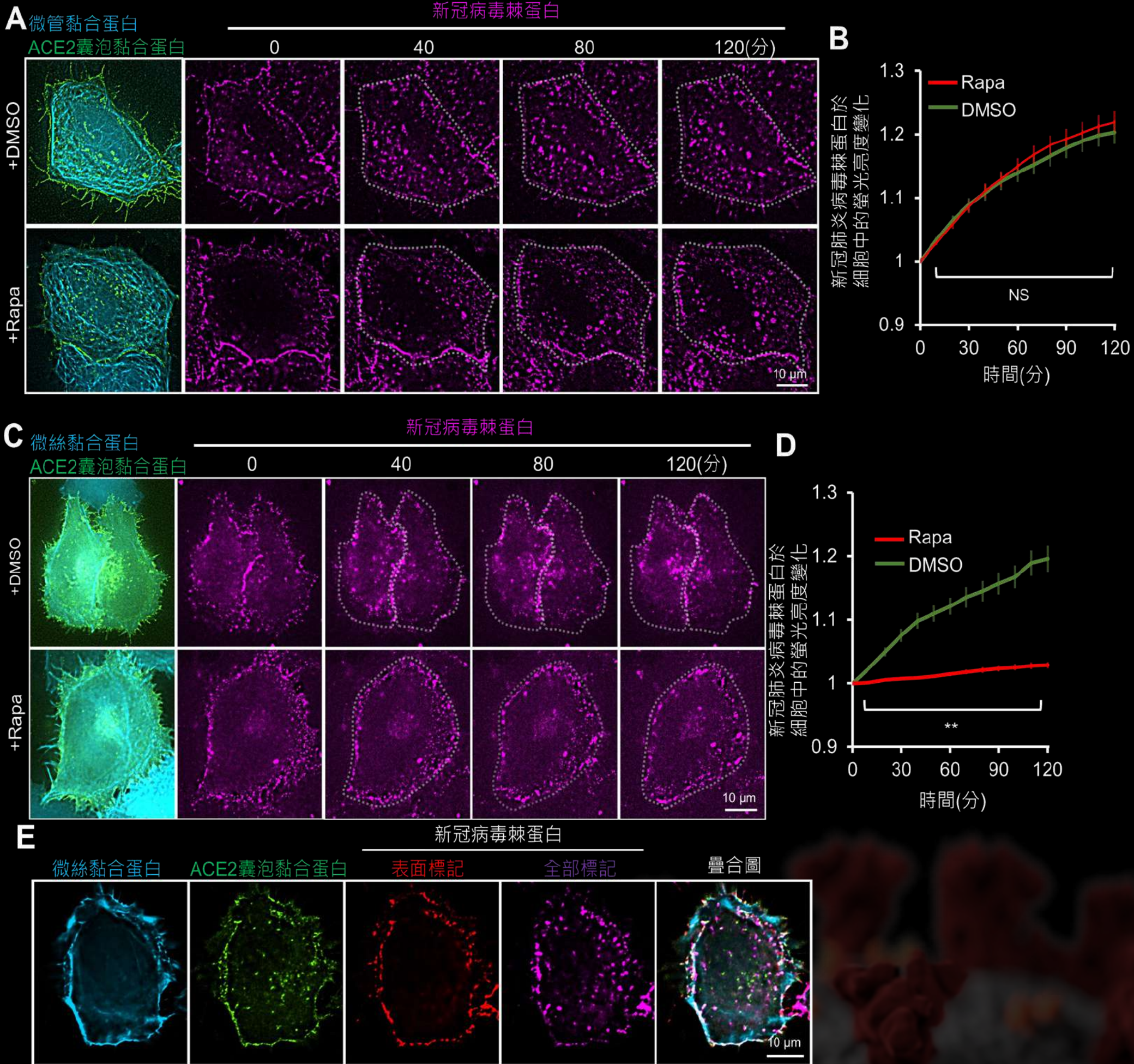
(A) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及Rab5囊泡黏合基因(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)或是DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後, 再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5分鐘後沖洗掉, 並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(B) 量化圖A中, 新冠肺炎病毒棘蛋白在加入0.1% DMSO(綠色曲線)或100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組60個細胞, Rapamycin組59個細胞。**顯示DMSO跟Rapamycin兩組間有極顯著差異(p值小於0.01)。(C) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及Rab5囊泡黏合基因(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)五分鐘, 並且處理新冠肺炎棘蛋白5分鐘, 等待1小時後, 利用抗體表面標記及全部標記法偵測位在細胞表面(紅色)的棘蛋白及整體棘蛋白(紫色)。

圖九、快速黏合ACE2囊泡於細胞微絲上



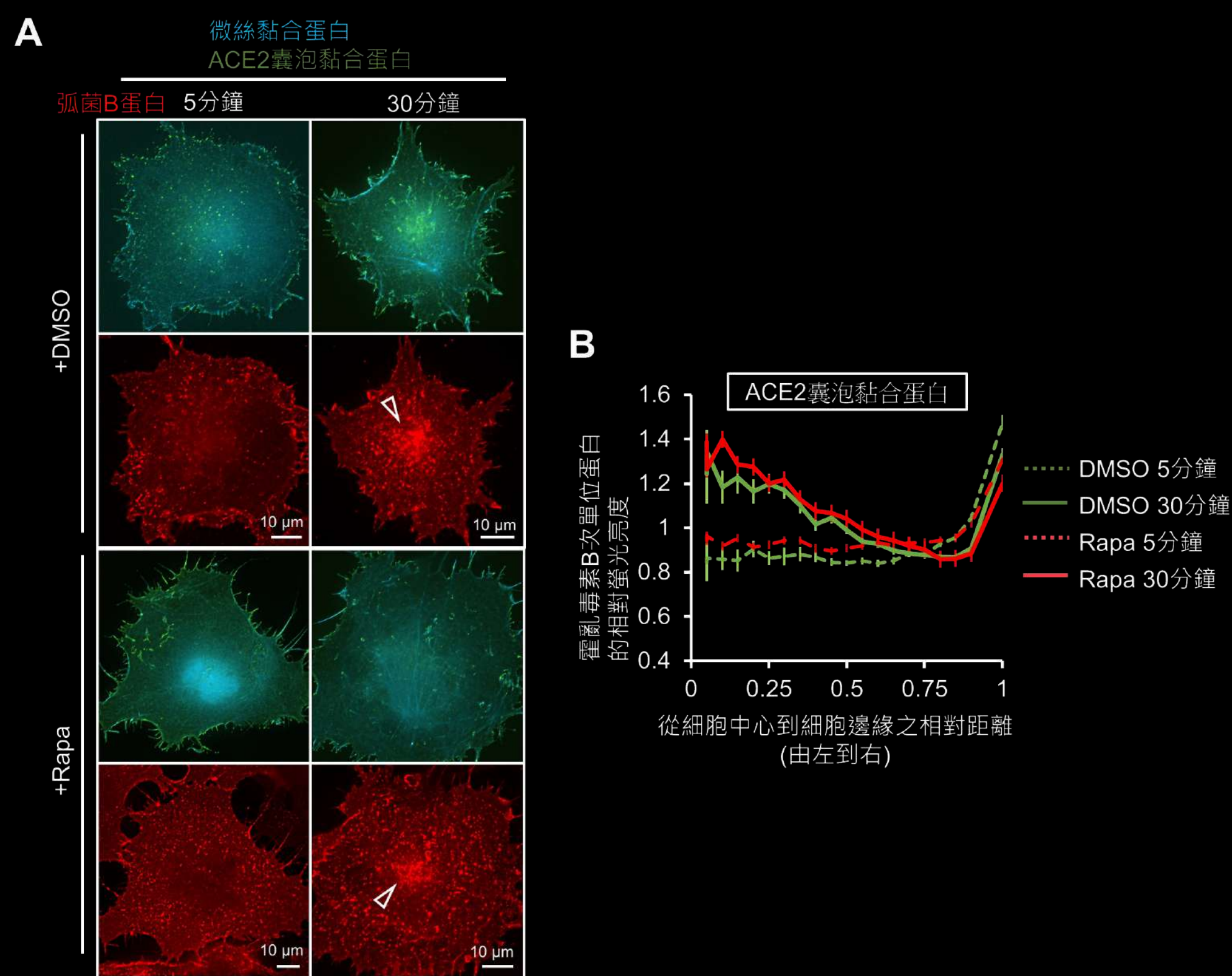
(A) 將HeLa細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及ACE2囊泡黏合蛋白(綠色), 並且紀錄加入Rapamycin(100 nM)前後FRET/CFP的螢光值變化。(B) 圖A細胞加入DMSO(0.1%; 控制組; 綠色曲線)或是Rapamycin(100 nM; 紅色曲線)下, FRET/CFP螢光值變化量。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組10個細胞, Rapamycin組12個細胞。

圖十、快速黏合ACE2囊泡於微絲上可有效抑制新冠肺炎病毒入侵



(A) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微管黏合基因(藍色)及ACE2囊泡黏合基因(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)或是DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後, 再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5分鐘後沖洗掉, 並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(B) 量化圖A中, 新冠肺炎病毒棘蛋白在加入0.1% DMSO(綠色曲線)或100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組83個細胞, Rapamycin組54個細胞。NS顯示DMSO跟Rapamycin兩組間無顯著差異(p值大於0.05)。(C) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微絲黏合蛋白(藍色)及ACE2囊泡黏合基因(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)或是DMSO(0.1%; 控制組)五分鐘後, 再將其處理新冠肺炎病毒棘蛋白(紫色)5分鐘後沖洗掉, 並追蹤不同時間後棘蛋白進入細胞的情形。虛線標定細胞外型區域。(D) 量化圖C中, 新冠肺炎病毒棘蛋白在加入0.1% DMSO(綠色曲線)或100 nM Rapamycin(紅色曲線)時細胞中央區域的螢光亮度變化。數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析DMSO組49個細胞, Rapamycin組50個細胞。**顯示DMSO跟Rapamycin兩組間有極顯著差異(p值小於0.01)。(E) 將表現ACE2受器的HeLa細胞轉殖微絲黏合基因(藍色)及ACE2囊泡黏合基因(綠色)後, 加入Rapamycin(100 nM)五分鐘, 並且處理新冠肺炎棘蛋白5分鐘, 等待1小時後, 利用抗體表面標記及全部標記法偵測位在細胞表面(紅色)的棘蛋白及整體棘蛋白(紫色)。

圖十一、快速黏合**ACE2**囊泡於微絲上不會抑制一般胞吞作用



(A) 在表現微絲黏合蛋白(藍)及**ACE2**囊泡黏合蛋白(綠色)的細胞中，先加入**0.1% DMSO**(溶劑控制組)或是**100 nM rapamycin**後，再加入弧菌B蛋白(紅色)處理**5分鐘**及**30分鐘**，並觀察弧菌B蛋白是否會從細胞邊緣移動到細胞中心(空心箭頭)位置。(B) 在圖A細胞中，弧菌B蛋在細胞中心到細胞邊緣在加入 **0.1% DMSO**(綠色曲線)或**100 nM Rapamycin**(紅色曲線)後不同時間(**5分鐘**：虛線；**30分鐘**的螢光強度，數據呈現為平均值±標準誤差。總共分析**114**個細胞。

伍、討論

一、Rapamycin對人體細胞的可能影響及克服方案

在本研究中大量使用Rapamycin(雷帕黴素)去誘發黏合系統，不過Rapamycin除了讓兩種黏合蛋白FRB跟FKBP黏合以外，還會引發細胞內其他反應，如已知對細胞mTOR(mammalian target of rapamycin)活性的抑制效果，並且可以作為殺死細菌的抗生素，甚至有免疫抑制、抗腫瘤的效果。若對使用Rapamycin有所疑慮，指導老師實驗室還有發展其他分子所誘發的黏合系統，如利用植物賀爾蒙吉貝素將另外兩個黏合蛋白GAIs跟mGID1黏合起來，甚至用照射藍光讓Cry2跟CIBN蛋白黏合起來，都已經證實可以用於囊泡黏合系統。藉由這些實驗驗證只要能將囊泡與細胞骨架黏合起來，不見得需要Rapamycin，可用於其他對人體可能影響更小的系統來抑制新冠肺炎病毒進入人體細胞。

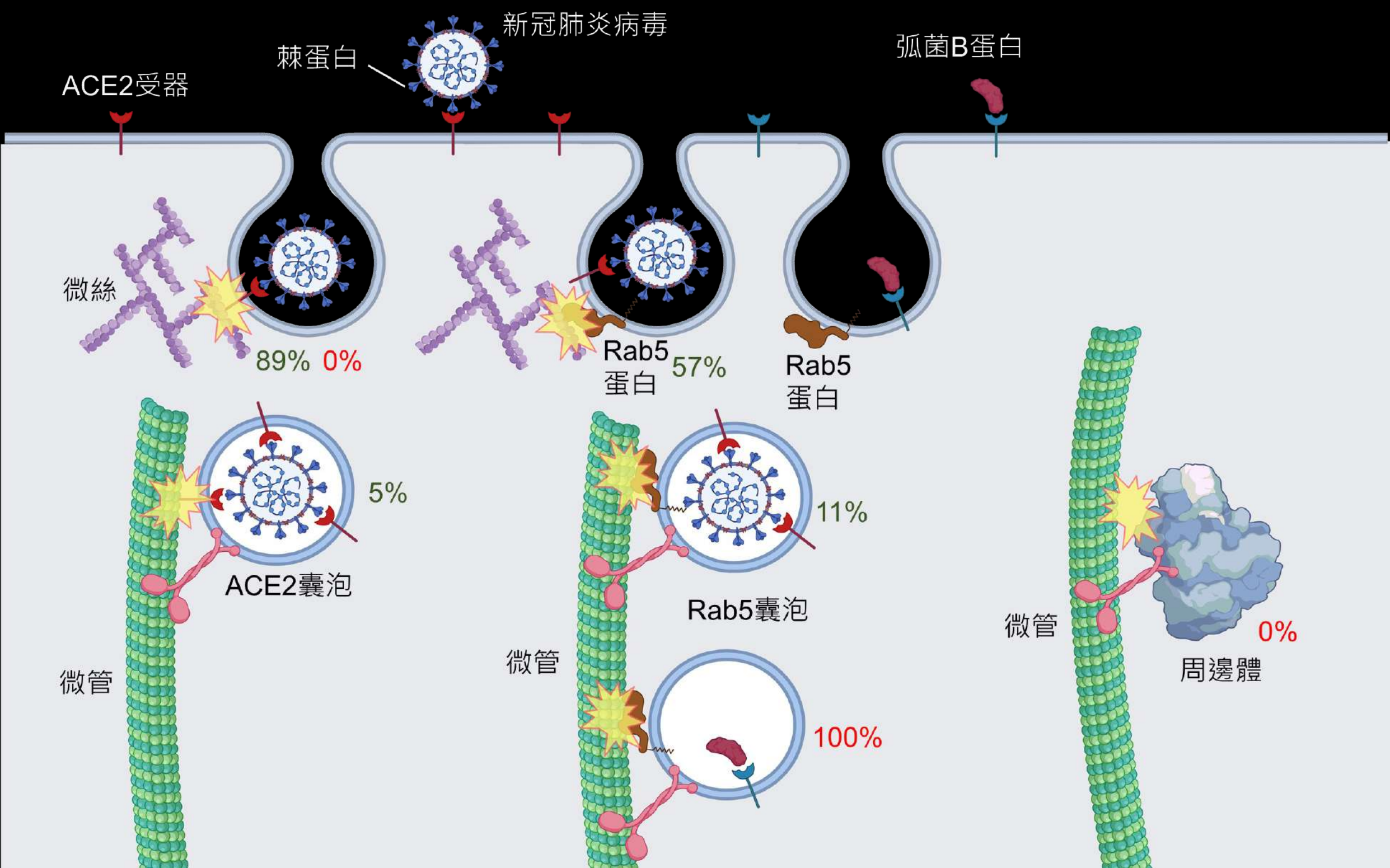
二、如何遞送黏合系統基因到人體中

要在人體細胞中建立起囊泡黏合系統必須要將相關的重組基因遞送至人體細胞中，因為新冠肺炎的影響，過去幾年科學界大力於發展基因治療的相關技術，也發展出利用腺病毒(Adenovirus)或是脂質奈米顆粒(Lipid nanoparticles)來遞送基因所建構的肺炎病毒疫苗，這些方法都已經成熟的運用在人體醫療上，未來若有需要，可以利用這些技術來遞送囊泡黏合系統基因到人體細胞來對抗病毒入侵。而這些基因進入人體是否會造成影響，還需要更多的詳細研究，如進行動物實驗，並且申請長期的臨床人體實驗，並非科展能夠進行的範疇，此計畫在於驗證於離體培養的人類細胞中，是否能夠黏合特定囊泡來抑制病毒入侵的前沿研究，也成功驗證其專一性的抑制病毒進入效果，可提供未來進一步研究的可能方案。

陸、結論

- 1.利用囊泡黏合系統，我們成功地讓**Rab5**囊泡、**ACE2**囊泡及周邊體快速黏合在微絲或是微管上(圖十二)。
- 2.利用弧菌B蛋白為螢光探針觀察一般細胞胞吞作用的情形，結果發現黏合負責胞吞作用的**Rab5**囊泡於微管上，可以完全抑制弧菌B蛋白胞吞到高基氏體(紅色數字;抑制效果100%)，但黏合其他運輸路徑的周邊體於微管上卻不會影響弧菌B蛋白胞吞作用(紅色數字;抑制效果0%)，證明我們可以精準抑制細胞內特定系統如胞吞作用(圖十二)。
- 3.雖然黏合**Rab5**囊泡於微管上可以有效抑制弧菌B蛋白進入高基氏體，但只能抑制11%的新冠肺炎病毒蛋白進入細胞(綠色數字)。將**Rab5**囊泡黏合在細胞膜周圍的微絲上則可以更有效的減少新冠肺炎病毒蛋白進入細胞(綠色數字;57%)(圖十二)。
- 4.黏合**ACE2**囊泡於微絲上(抑制效果89%; 綠色數字)相比黏合其在微管上(抑制效果5%; 綠色數字)可以更有效率抑制病毒蛋白進入細胞，卻不會影響弧菌B蛋白胞吞作用(0%; 紅色數字)(圖十二)。
- 5.利用精準抑制及量化的實驗驗證我們可以成功精準地抑制新冠肺炎病毒進入細胞，卻不會影響負責細胞其他功能的胞吞作用。未來可利用這項技術抑制病原體入侵人體(圖十二)。

圖十二、精準抑制不同胞吞作用



此圖標出利用囊泡黏合系統將**ACE2**囊泡、**Rab5**囊泡及周邊體黏合在微絲或微管上對新冠肺炎病毒蛋白進入細胞內(綠色數字)及弧菌B蛋白(紅色數字)進入細胞的抑制效果。

柒、參考文獻

1. Who Covid-19 dashboard
2. www.cdc.gov
3. 科學月刊604期-新冠病毒的迫降<https://www.scimonth.com.tw/archives/38614>.GENEONLINE,2020/8/11-COVID-19治療新發現，有望對抗各類變種病毒的新型單株抗體!<https://geneonline.news/monoclonal-antibody-discovered-to-potentially-act-against-all-coronaviruses/>
4. 泛科學,2022/01/25-為何新冠病毒突變之後傳染力更強？——關鍵在於變異株的棘蛋白結構 <https://pansci.asia/archives/342431>
5. HEHO,2020/04/19-《細胞》：不用疫苗也能防新冠感染!人造蛋白或成新治療思路;超基因生技,2021/01/19-新冠治療新曙光!中研院研發誘餌抗體，阻斷病毒感染路徑；外泌體資訊,2022/01/30-Nature子刊:外泌體ACE2誘捕新冠病毒，可預防和治療不同SARS-CoV-2突變株的感染
6. 科技・新南向,2021/05/06-陽明交大跨國團隊開發抑制COVID-19感染藥物篩選平台 <https://nsstc.narlabs.org.tw/NSTC/News.aspx?cate=2055&entry=2604>
7. 維基百科-血管收縮素轉化酶2<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%A1%80%E7%AE%A1%E7%B4%A7%E5%BC%A0%E7%B4%A0%E8%BD%AC%E5%8C%96%E9%85%B62>
8. 維基百科-胞吞作用 <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E8%83%9E%E5%90%9E%E4%BD%9C%E7%94%A8>
9. 維基百科-驅動蛋白
10. KSP檢測系統<https://min.news/zh-hant/science/4734ddd61cdda3ad506f018697183905.html>網頁中第七項
11. Cheng et al., EMBO Rep, 2022
12. 微生物學通報-病毒入胞機制研究方法及其研究進展 <https://wsxwtb.ijournals.cn/wsxwtbcn/article/pdf/tb10010103>
13. 維基百科-螢光共振能量轉移 <https://zh.wikipedia.org/zhtw/%E8%8D%A7%E5%85%89%E5%85%B1%E6%8C%AF%E8%83%BD%E9%87%8F%E8%BD%AC%E7%A7%BB>