

出國報告（出國類別：其他-研習）

赴美研習豬瘟及非洲豬瘟病毒基因操作 技術

服務機關：農業部獸醫研究所

姓名職稱：陳蒼宇助理研究員、許偉誠副研究員

派赴國家：美國

出國期間：113年5月5日至5月18日

報告日期：113年8月1日

赴美國參加 2023 年獸醫診斷實驗室品質保證研討會

摘要

本次出國赴美國康乃爾大學獸醫學院群體健康醫學與診斷科學部 (Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University) 張永富教授實驗室，研習豬瘟及非洲豬瘟病毒基因操作技術的主要目的是學習先進的動物疫苗設計理念及技術，提升我國在疫苗及診斷試劑研發方面的能力，從而加強亞洲地區對動物疾病的防禦。此次學習疫苗病毒株基因組的編輯與重組技術如 mRNA 疫苗及多抗原表位疫苗 (Multi-epitope vaccine) 設計，不僅提高了疫苗設計的效率和效力，還減少了實驗動物的使用，符合人道實驗的要求。同時也參訪了康乃爾大學動物衛生診斷中心，該中心是紐約州政府支持的重要診斷實驗室，也是美國國家動物衛生實驗室網絡的 level 1 實驗室，配有先進的診斷技術和嚴格的安全管理。總體而言，本次研習除了提高我們在相關技術領域的專業知識，亦有助於未來疫苗研發工作中取得更多突破，進而提升我國防禦海外動物疾病的能力。

目錄

壹、緣起與目的.....	4
貳、行程安排.....	5
參、研習過程.....	6
一、研習地點簡介.....	6
二、課程內容摘要.....	8
肆、心得與建議.....	14
伍、致謝.....	16
陸、附錄.....	17

壹、緣起與目的

口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟為豬隻三大重要病毒性疾病，我國現為口蹄疫非疫區，豬瘟有望於今（113）年 6 月後提出非疫國申請，並成功力阻非洲豬瘟於國境之外。在亞洲地區目前僅剩台灣及日本為非洲豬瘟非疫國，然而非洲豬瘟因病毒基因型複雜，不同病毒分離株誘發之抗體也常無交叉保護力，自 1927 首次於東非發生，至今全球尚無成功研發出廣泛且有效疫苗。美國農業部與越南合作開發疫苗，目前仍未獲世界動物衛生組織（WOAH）認可。另外，儘管我國撲滅豬瘟已進入全面停打疫苗階段，借鏡日本時隔 26 年再現的豬瘟疫情，提醒我們必須持續精進防疫措施。透過本次研習機會，本所派兩名研究人員赴美國康乃爾大學獸醫學院群體健康醫學與診斷科學部張永富教授實驗室，學習美國當前最新動物疫苗設計理念，並研究豬瘟及非洲豬瘟病毒的疫苗研發與病毒基因操作技術，以增強本所在疫苗及診斷試劑研發之能力，有助於提升我國於亞洲地區防禦海外動物疾病的能力。

貳、行程安排

本次赴美國康乃爾大學獸醫學院群體健康醫學與診斷科學部張永富教授實驗室研習，行程為 113 年 5 月 5 日至 113 年 5 月 18 日止共 14 天(詳如行程表)。

行 程 表			
月	日 (星期)	內容	地點
5	5(日)	- 去程，桃園國際機場→舊金山國際機場→	桃園- 美國紐約州伊 薩卡市 (Ithaca)
	至 5(日)	紐華克自由國際機場→伊薩卡湯普金斯地 方機場)	
5		- 實驗室、獸醫學院參觀	康乃爾大學獸 醫學院-張永富 教授實驗室
	6(一)	- 研討會： (1)Comparative osteosarcoma research efforts to identify high-risk canine patients with translational value for humans	
	至 10(五)	(2)Pathogenesis of Enteric Fever - 病原基因操作技術研習：mRNA 疫苗	
5	13(一)	- 動物衛生診斷中心參觀	康乃爾大學獸 醫學院-張永富 教授實驗室、疾 病診斷中心
	至 16(四)	- 研討會：Human Monoclonal Antibodies for Emerging infection - 病原基因操作技術研習：多抗原表位 (multi-epitope)疫苗	
5	17(五)	- 回程，伊薩卡湯普金斯地方機場→紐華克 自由國際機場→ 舊金山國際機場→桃園 國際機場	美國紐約州- 桃園
	至 18(六)		

參、研習過程

一、研習地點簡介

(一) 美國康乃爾大學獸醫學院

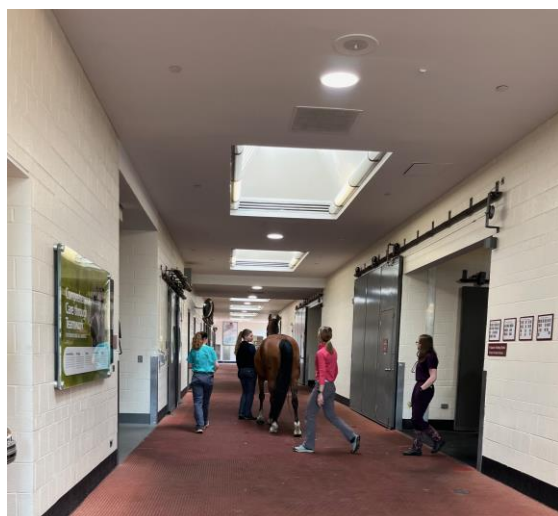
擁有超過 150 年歷史的康乃爾大學創立於 1865 年是私立常春藤盟校大學之一，學院跨足理工、藝術人文、農業、商學及醫學等多個領域，部分學院的經費接受自紐約州政府的資助又稱合約學院（contract colleges），其中包含獸醫學院。獸醫學院創立於 1894 年，學院內有 6 個部門（departments）、6 個醫學中心（centers）及 3 個研究所（institutes），並設有 3 所大學動物醫院-伴侶動物醫院、馬科動物醫院及農場動物醫院。不論是在動物疾病的研究、診斷及醫療都有卓越的成績，如 1872 年第 2 屆獸醫系學生 Daniel Salmon 首次鑑別出沙門氏菌、犬瘟熱疫苗研發、犬布氏桿菌診斷、馬胚胎移植及動物先天疾病的基因療法等。該學院獸醫學人才輩出，中華民國獸醫病理學會之父-李崇道博士亦為校友之一。



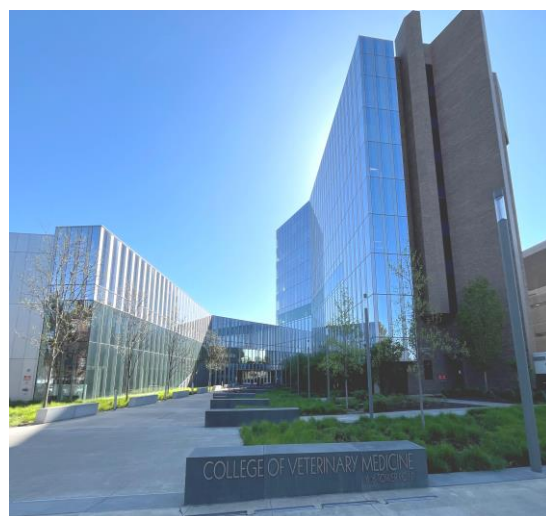
康乃爾大學獸醫學院農場動物醫院



康乃爾大學獸醫學院伴侶動物醫院



康乃爾大學獸醫學院馬科動物醫院



康乃爾大學獸醫學院研究大樓

(二) 張永富教授實驗室

張永富教授為國際知名動物疫苗研發專家，曾於 1974-1979 年任職本所擔任病理獸醫師，之後赴美進修，於美國德克薩斯州農工大學研習微生物學與免疫學並取得博士學位，1989 年起任職於康乃爾大學獸醫學院，現任群體健康醫學與診斷科學部教授。張教授獲任屏東科技大學榮譽校友、多篇國際知名學術研究期刊編輯（Journal of Veterinary Science、PLoS One 及 Advance in Microbiology 等）、美國獸醫診斷學家、美國獸醫微生物學家等殊榮。其實驗室專攻傳染病的分子生物學、DNA 和重組次單位疫苗的開發、微生物致病機制與免疫病理學、比較基因體學和蛋白質體學等，同時也致力於發展奈米微粒與減毒沙門氏菌作為疫苗佐劑及載體。



張永富教授帶領本所許偉誠副研究員參訪實驗室



張永富教授與本所陳蒼宇助理研究員討論實驗設計

(三) 康乃爾大學動物衛生診斷中心

康乃爾大學動物衛生診斷中心（Animal Health Diagnostic Center, AHDC）屬於紐約州政府支持的診斷實驗室，具有 BSL-3 的診斷實驗室，符合美國獸醫實驗室診斷師協會（American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, AAVLD）的認可，也通過美國實驗室認證協會（American Association of Laboratory Accreditation, A2LA）的生物學範圍認證，同時也隸屬於美國國家動物衛生實驗室網絡（National Animal Health Laboratory Network, NAHLAN）之 level 1 實驗室。該中心 2023 年有 230 名正職人員與員工，超過 300,000 例的送檢病例，其中以馬的病例最多（163,183 例，377,277 件檢體），其次則為狗的病例（75,492 例）及牛的病例（29,371 例，351,173 件檢體）。



康乃爾獸醫學院張永富教授與本所許偉誠副研究員與陳蒼宇助理研究員於動物衛生診斷中心前合照

二、課程內容摘要

(一) 病原基因操作技術-以疫苗研發為目標

(1) 多抗原表位疫苗 (Multi-epitope vaccine)

現行疫苗研發應著重於電腦分析，利用 AI 與大數據分析適合作為疫苗的 epitope，除了增加製程的效率及疫苗效力外，亦可達到精簡實驗動物的使用，目前常使用的軟體簡述如下，軟體功能及使用條件/公式詳列如附錄：

- a. 找尋標的蛋白氨基酸序列：NCBI、Uniprot、pSORTb、KEGG、STRING
- b. 預測候選的 epitope：VxaiJen v 2.0、Vaxign2、Blastp version 2.13.0+、VirulentPred
- c. 篩選具 B 淋巴球辨識潛力的 epitope：ABCpred、VaxiJen v 2.0.
- d. 篩選具 T 淋巴球辨識潛力的 epitope：NetMHCPan4.1、IEDB、NetMHCpanII、IFN- γ server
- e. 將數個 epitope 排列組合，篩選適合作為疫苗的抗原，建立 multi-epitope 質體：Epitope Cluster Analysis Tool、Protparam、Swiss-Protparam、Solpro、Toxinpred、AllerTOP、VaxiJen v2.0
- f. 預測 multi-epitope 疫苗的三級結構：PSIpred、RaptorX、I-tasser、Galaxy web refine、ProSA、ggplot2 of R、ERRAT

g. 模擬 multi-epitope 疫苗與免疫細胞的交互反應：UniProt、SWISS-MODEL server、Galaxy web、HDOCK、HADDOCK、LigPlot+、Gromacs 2023、Amber99SBorce field、TIP3P water model

h. 修飾 multi-epitope 基因序列：JCat

本次研習以非洲豬瘟為標的，重要的抗原蛋白如 P72、P54、P30 及 CD2v；豬瘟病毒則以 E2 作為標的抗原，由張教授指導，實際操作電腦分析練習挑選適合作為 epitope 的疫苗。首先，於基因資料庫（GeneBank）整理重要抗原蛋白的氨基酸序列，再利用 IEDB 線上軟體分析適合做為 T 淋巴球及 B 淋巴球的 epitope，並以 IEDB 篩選對細胞毒殺型 T 淋巴球免疫原性（immunogenicity）較佳的 epitope（immunogenicity score >1），及 IFN- γ server 篩選可誘發輔助型 T 淋巴球分泌 IFN- γ 的潛力的 epitope；VxaiJen v 2.0 分析 B 淋巴球 epitope 的抗原性（antigenicity）。

(2) mRNA 疫苗

mRNA 疫苗是一種相對新型的疫苗技術，在 COVID-19 疫情後蓬勃發展，具有開發迅速、安全有效、可應用於各種病原體且生產過程不會有異源蛋白（如 E. coli 表現系統或活病毒）污染等優點。目前，mRNA 疫苗在動物疫苗領域的應用受到成本方面的考量，但其前瞻性極高，值得提前進行研究和探索。有關 mRNA 疫苗的研發重點如下：

- a. mRNA 的製造與純化：重要抗原的 mRNA 不一定要使用全長序列，同樣可利用前述軟體分析適合的 epitope 短片段序列作為疫苗。mRNA 序列需經過修飾以延長穩定度、延長半衰期、減少接種者過敏及增加轉譯率。修飾方式包含 a.) 上游加入 UTR 序列、b.) 置換核苷酸（包含 pseudouridine、1-methylpseudouridine 及 5-methylcytosine）、c.) 5' 端加入保護 RNA 的 cap 序列、d.) 3' 端加入 poly A-tail 序列及 e.) 使用 FPLC 純化。
- b. 脂質奈米粒子包覆：需要有生產奈米粒子的能力與專業的混合機器，否則可委外廠商協助製成。奈米粒子建議有四個成分組成：pKa 約 6.0–6.8 帶正電「可解離」的脂蛋白、可改善膠體穩定性的聚乙二醇共軛脂質（polyethylene glycol (PEG)-conjugated lipid）、膽固醇和 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸膽鹼（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）。可解離的脂蛋白在細胞吞噬後，在酸

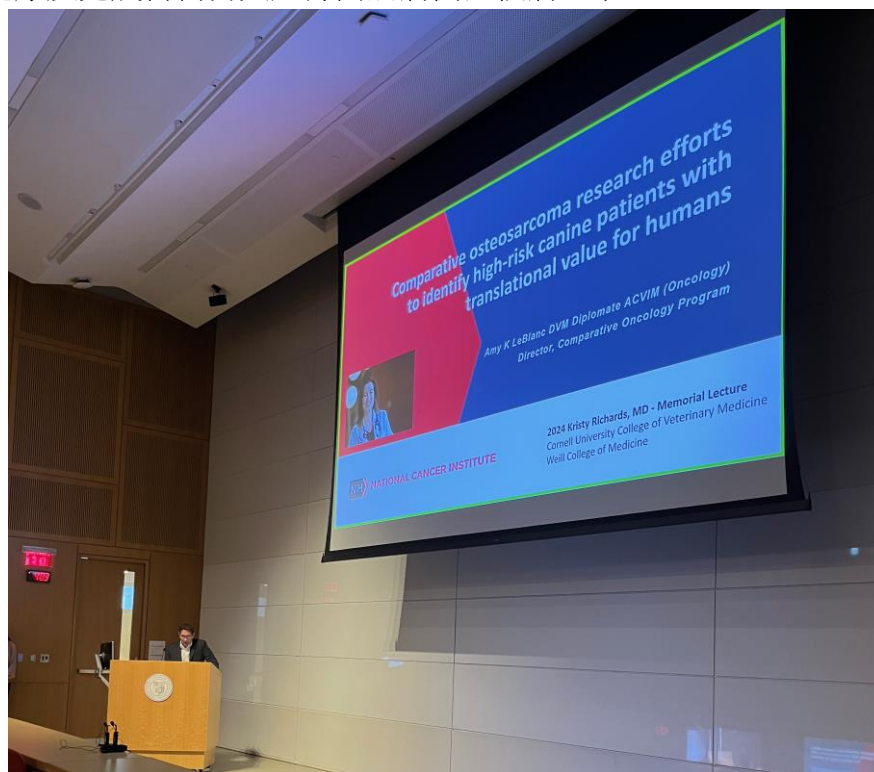
化的吞噬小體（endosome）中會帶正電，有助於破壞吞噬小體的膜，釋放 mRNA 至細胞質，此項技術在 COVID-19 期間證明相當有益 mRNA 疫苗的效力。

（二）學術研討會

（1）骨肉瘤在人與狗之間的比較醫學(Comparative osteosarcoma research efforts to identify high-risk canine patients with translational value for humans)

講師：Amy K. LeBlanc, D.V.M，美國國家癌症研究所比較腫瘤學計畫主任

分析犬隻骨肉瘤病例的臨床病例可應用於預測生物標識（biomarker），分析的工具包含 mRNA 定序、流式細胞儀癌症細胞分群、使用人工智慧（AI）和機器學習（ML）等技術。該研究計畫目前致力於狗及人類的骨肉瘤全基因定序、轉錄分析、甲基化定序及完成首篇狗與人骨肉瘤病例比較病理學。



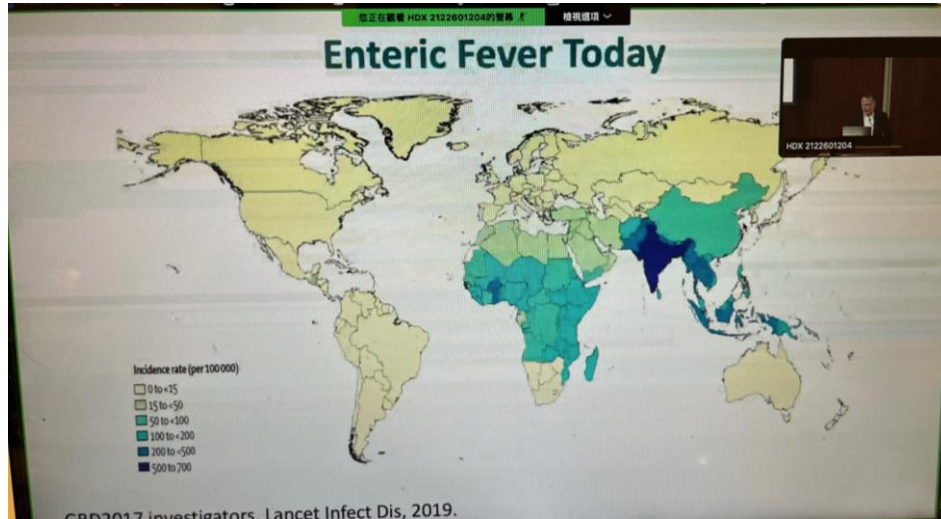
美國國家癌症研究所比較腫瘤學計畫主任 Amy K. LeBlanc 講授骨肉瘤在人與狗之間的比較醫學

（2）腸熱（傷寒沙門氏菌）的致病機制（Pathogenesis of Enteric Fever）

講師：Ferric C. Fang，華盛頓大學醫學院檢驗醫學病理學和微生物學教授

傷寒沙門氏菌（Salmonella Typhi）不同血清型之間可能展現不同的致病機制與流行病學。相較於其他沙門氏菌，傷寒沙門氏菌致病機制展現較少的 C3b/IgM

結合能力與毒素釋放（anaphylatoxin），進而抑制宿主早期的免疫反應。將傷寒沙門氏菌感染基因改造人體化的小鼠，並藉由全基因定序發現重要的代謝基因如 Vi capsule、LPS、iron acquisition，而非過去熟知的 PhoP、SPI-2 或 typhoid toxin。當傷寒沙門氏菌的某段致病因子有缺失時（non-typhoid salmonella SPI-2 effectors），會導致無法有效誘發宿主細胞的免疫反應，使之於巨噬細胞中持續感染。

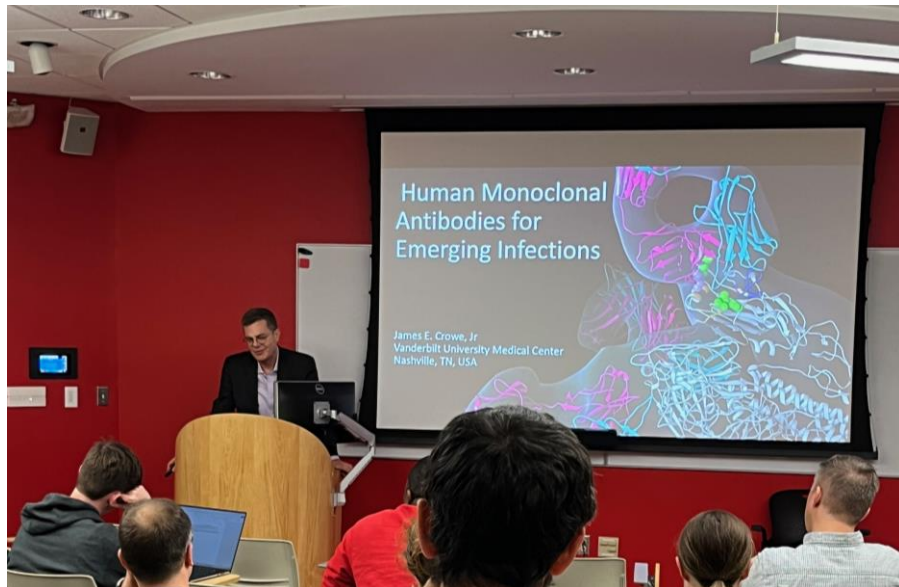


華盛頓大學醫學院檢驗醫學病理學和微生物學教授 Ferric C. Fang 視訊講授腸熱（傷寒沙門氏菌）的致病機制

(3) 人類單株抗體於新興疾病感染的應用（Human Monoclonal Antibodies for Emerging infection）

講師：James E. Crowe, Jr，范德比爾特大學醫學中心兒科和病理學、微生物學和免疫學教授

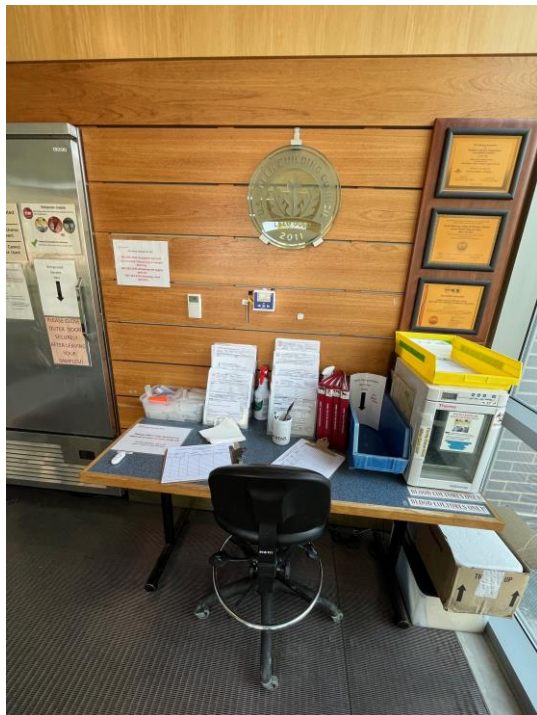
人類醫學開始研究使用單株抗體治療新興疾病感染，致力於電腦分析與單株抗體製程改良，用合成（mRNA）或酵母菌表現系統的方式大量生產單株抗體，甚至可以為個別病人客製化抗體。合成並改良的單株抗體有更長的半衰期，有助於長期預防疾病。



范德比爾特大學醫學中心兒科和病理學、微生物學和免疫學教授 James E. Crowe, Jr 講授人類單株抗體於新興疾病感染的應用

(三) 動物衛生診斷中心參觀

康乃爾大學動物衛生診斷中心 (AHDC) 受理國家級動物疾病監測計畫、牧場或伴侶動物獸醫師送檢的檢體，由單一收件窗口收件及檢體前處理，再分送病例至解剖學、病理學、臨床病理學、細菌學、病毒學、寄生蟲學、分子診斷、血清學及毒理學實驗室進行感染性疾病檢測。



AHDC 檢體統一收件窗口



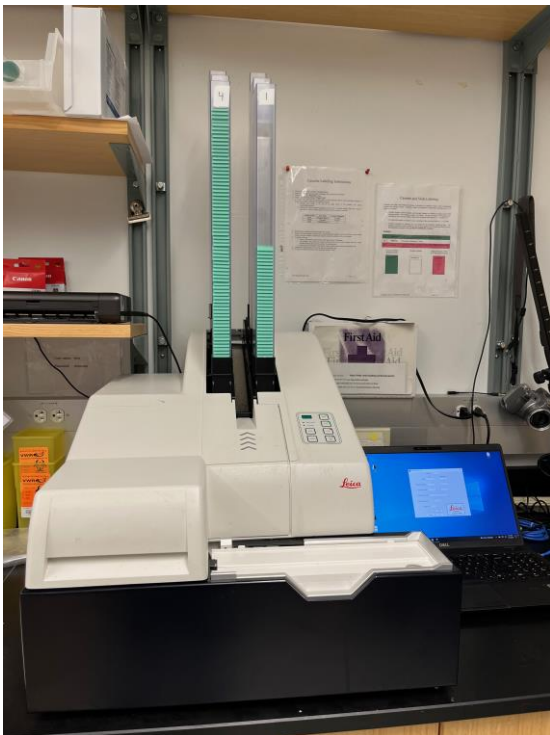
AHDC 大型動物解剖房



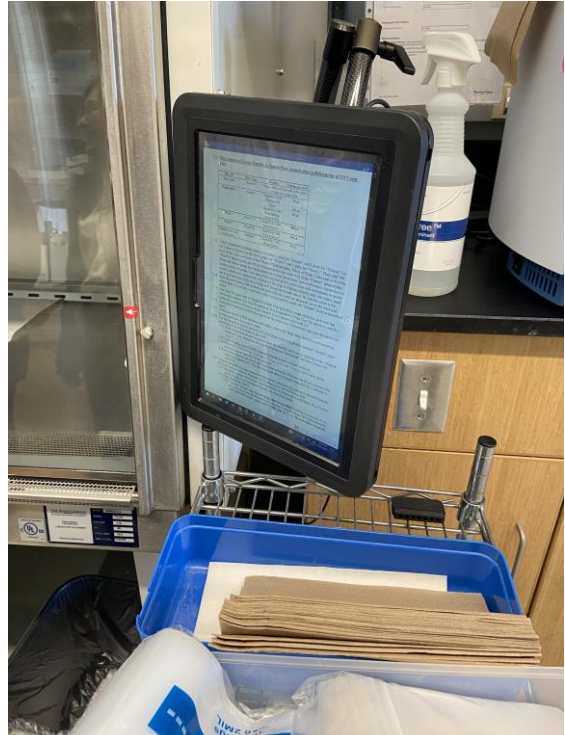
AHDC 檢體前處理完後依照檢驗需求，分送各實驗室



AHDC 分子診斷實驗室採用訂製保護罩，避免落塵汙染儀器設備



AHDC 病理學實驗室採用之蠟塊自動標籤系統



AHDC 實驗室標準作業程序書電子化，確保工作人員使用最新版文件及避免汙染

肆、心得與建議

在研習過程中，我們深刻體會到學術研究的艱辛與價值。首先，張永富教授即使已年屆七旬，仍然保持著對知識的渴求與學習的激情，每天的行程充實，不外乎鑽研期刊、參與研討會、撰寫並審查研究計畫等大量腦力激盪又耗能的工作，這種孜孜不倦的精神令人著實佩服。張教授嚴謹的態度和對細節的注重，在他的指導與經驗分享下，意識到學術研究是一場長期的投入，需要持續不斷地學習、探索、推敲和驗證，才能達到真理的彼岸。

其次，跨領域合作的重要性也給我們留下了深刻的印象。參與的 3 場學術研討會講者皆為人類醫學的專家或跨領域合作，跳脫獸醫學的專業，讓我們能夠從不同的角度來看待並解決問題。延伸到動物用疫苗的研發，結合材料科學、蛋白質體學與物理學，應用電腦預模擬和預測，能以更高效和更人道的方式來進行動物實驗前的預測性分析，從而減少動物實驗的次數和成本。尤其像是因應尚未入侵我國的非洲豬瘟病毒或其他跨境傳染病，蒐集周邊國家發表的病毒基因序列或邊境監測檢體中的病毒核酸序列，運用電腦分析可以幫助我們預先篩選出最有潛力且適合我們國家的疫苗抗原。

值得一提的是，美國實驗室對員工身心健康的重視超乎想像。實驗室每層樓不僅設有舒適的員工休息室，還提供專業的心理諮詢服務。這種關懷讓員工能夠在工作之餘得到充分的放鬆和支持，有助於提升工作效率和創造力。這種人性化的管理方式，是我們國內實驗室可以借鏡和學習的。

總結來說，此次研習收穫豐富，不僅提升我們在豬瘟及非洲豬瘟病毒基因操作技術方面的知識和技能，也深刻體會學術研究的艱辛與價值，並見識康乃爾大學如何透過與其他國際頂尖研究機構的合作，能夠更快地掌握全球最新的研究動態和技術趨勢。期許將這些經驗和學習成果帶回國內，應用到我們的研究工作中，為我國的動物疾病防疫和疫苗研發做出更大的貢獻。

有關此次短期技術研習幾項建議如下：

- 一、建立長期學習機制：鼓勵本所研究人員不斷學習和更新知識。例如建立經驗傳承制度及給予充分的研究資源與時間，也應該加強對研究人員的身心關懷，使之在專業知識和研究技能上得到更全面的提升。具體來說，經驗傳承制度可以讓資深研究人員事半功倍的經驗或技術分享給新進人員，減少誤入實驗中的歧途，並促進知識和技能的代代相傳。提供充分的研究資源，包括

先進的設備、專業的分工和充足的研究經費，能夠確保研究人員在工作中不會受到資源短缺的限制，從而更專注於科學研究工作。除了物質上的支持，對研究人員的身心關懷也至關重要。保持良好的心理健康狀態，更能提高工作效率和創造力。這樣的長期學習機制不僅能提升研究人員的專業能力，還能促進他們的整體發展，使其在職業生涯中不斷進步。

- 二、推動電腦分析技術應用：跨領域合作並將電腦分析技術應用於動物用疫苗研發，將有助於提高研究效率，減少動物實驗的需求，促進實驗動物的福祉。在動物用疫苗研發中，電腦分析技術可以用來模擬和預測不同抗原對宿主的效果和安全性，從而篩選出最有潛力的候選疫苗。這不僅縮短了實驗的周期，還減少了大量的動物實驗，節省了時間和資源。例如，利用生物資訊學（bioinformatics）技術，可以快速分析大規模基因數據，預測病毒抗原的結構和功能，設計出更具特異性的疫苗。同時，跨領域合作能夠引入更多的專業知識和技術，例如結合材料科學、蛋白質體學與物理學等領域的最新成果，能開發出更先進的疫苗載體和遞送系統，提高疫苗的免疫效果和安全性；又或者與人類醫學專家的合作，可以借鏡他們在疫苗研發中的成功經驗和方法，進一步提升動物用疫苗的質量和效果。

伍、致謝

感謝農業部核予計畫（113 農科-1.3.1-醫-02）提供經費支持，並誠摯感謝張教授永富無私的傳承經驗，為台灣獸醫界奉獻心力。

陸、附錄

常用抗原表位預測分析軟體統整

軟體	功能	條件/公式
Proteomic analysis by LC/MS-MS		
Proteome Discoverer 2.2	SDS-PAGE 分離得來的 protein 經 LC/MS-MS 分析的 raw data，由此軟體搜尋為何種 peptide 及 protein	Sequest HT algorithm.
- Uniprot (https://www.uniprot.org/) - NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	得到 peptide 的 a.a.序列	
pSORTb (https://www.psort.org/psortb/)	確認蛋白的位置，如細胞質、細胞膜或分泌蛋白	
- KEGG pathway database (https://www.genome.jp/kegg/) - STRING (https://string-db.org/)	了解此蛋白的代謝路徑	
Screening of MVs proteins for vaccine candidates		
VxaiJen v 2.0 (http://www.ddg-pharmac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html)	分泌蛋白抗原性(antigenicity)分析	value of ≥ 0.5 (antigenicity)
Vaxign2 (https://violinet.org/vaxign2)	分泌蛋白黏合能力(adhesion capability)分析	≥ 0.51 (adhesion)
Blastp version 2.13.0+	和牛的自體蛋白同源性分析	homology $\geq 30\%$ 就排除
VirulentPred (http://203.92.44.117/virulent/in)	毒力因子預測	

dex.html)		
Identification of B-cell epitopes		
ABCpred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)	篩選 B cell epitope	length of 16mers and a threshold value of ≥ 0.5
VaxiJen v 2.0.	篩選出來的 B cell epitope，再做抗原性分析	antigenicity ≥ 1.0 即做為最終的 B cell epitope
Identification of T-cell epitopes		
NetMHCpan4.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1)	挑選出會結合至 BoLA DRB3 alleles 的 MHC-I (CTL) epitope	Epitopes with a length of 9mer and a strong binding affinity of $\leq 0.5\%$
IEDB)-based MHC-I immunogenicity tool (http://tools.iedb.org/immunogenicity/)	評估挑選出來的 MHC-I epitope 的免疫原性	immunogenicity score 是正的就可以作為候選
NetMHCpanII (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0)	挑選出會結合至 BoLA DRB3 alleles 的 MHC-II (HTL) epitope	採用預設參數，15mer length and a binding score of $\leq 1\%$
IFN- γ server (https://webs.iitd.edu.in/raghava/ifnepitope/index.php)	評估選出的 MHC epitope 是否會誘發 IFN- γ	
Construction of MEV against MAP		
Epitope Cluster Analysis Tool” (http://tools.iedb.org/cluster/)	將適合的 B cell epitopes, MHC-I 及 MHC-II epitopes 聚集起來	threshold value of 70%，每一個候選的 MEV 須包含 B cell, MHC-I 及 MHC-II epitopes

Protparam (https://web.expasy.org/protparam/)	評估候選 MEV 的 hydropathy index	grand average of hydrophobicity (GRAVY)
Swiss-Protparam (https://web.expasy.org/protparam/)	評估 MEV 各種特性: MW, pI, half-life, aliphatic index, and GRAVY	
Solpro (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/)	評估 Solubility	
Toxinpred (http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/)	評估 Toxicity	
AllerTOP (https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/)	評估 allergenicity	
VaxiJen v2.0	評估 antigenicity	
Prediction of secondary and tertiary structure and its validation		
PSIpred (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)	分析 MEV 的結構: Helix, sheet 及 Coils	
RaptorX (http://raptorx6.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/)	分析暴露在表面的 residue	
I-tasser (https://zhanggroup.org/I-TASSER/)	預測 MEV 的三級結構	C-score lies between - 5 to 2. 最好的 model, 其 C-score 越高
Galaxy web refine (https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE)	強化 MEV 的 3 級結構	
ProSA	產生 quality score (Z-score) 驗證三	

(https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php)	級結構	
ggplot2 of R	產生 Ramachandra plot 驗證，用以評估 MEV 的幾何形狀與立體化學性質	
ERRAT (http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/)	計算 MEV 整體的 quality factor	
Molecular docking and simulation (docking 的分析，和 TLR 結合的專一性有關，有助於作為疫苗抗原效力的評估)		
- UniProt - SWISS-MODEL server	因為牛的 TLR2 沒有在 Protein Data Bank，因此先從 UniProt (TLR-2 Q95LA9) 下載，再至 SWISS-MODEL server 構型	
- Galaxy web (http://galaxy.seoklab.org/) - Ramachandran plot,	建構好的 TLR2 再以 Galaxy web 修飾，與 Ramachandran plot 驗證	
HDOCK (http://hdock.phys.hust.edu.cn/)	評估 MEV 和 TLR 結合力	
HADDOCK (https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/)	修正結構，增加與 TLR 的結合力	
LigPlot+	將 MEV 與 TLR 接合處結構視覺化	standalone DIMPLOT program
Gromacs 2023	評估 MEV-TLR2 之間的穩定度與降低結合動能，並以 pdb2gmx tool 生成 protein topology 檔案	pdb2gmx tool
Amber99SBorce field TIP3P water model	模擬	

Codon optimization and in silico cloning of MEV		
JCat (http://www.prodoric.de/JCat)	修飾 epitope 的 codon，包含正確轉譯與避開切割位，使之更適合於細菌內表現	
Bioinformatics analysis		
NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	比對 PMT 在 <i>P. multocida</i> A-D 型中高度保留>98.5%，適合做為疫苗	
ExPaSy ProtParam tool website (https://swissmodel.expasy.org/workspace/)	PMT 基本生化特性分析	
SignalP-6.0 Server (https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)	分析 PMT 的 signal peptide	
DeepTMHMM Server (https://dtu.biolib.com/app/DeepTMHMM/run)	分析 PMT 的跨膜蛋白	
SOPMA server (https://npsa-pbil.ibcp.fr/).	分析二級結構	
DNASTar Protean (version 7.1, USA)	分析 hydrophilicity, antigenic index, surface probability, and flexibility	
Analysis and screening of B-cell and T-cell dominant epitopes		
IEDB (https://tools.immune-epitope.org/main/)	預測 B cell epitope	高 hydrophilicity, antigenic index, surface probability, and flexibility，沒有 no signal peptide 或 transmembrane domain，高比例 alpha-helices 及 random curls 為適合

		做 epitope 的序列
- IEDB - SYFPEITHI	分析 MHC-I (CTL)和 MHC-II (HTL) epitope	HLA-A*1101 用來預測 MHC-I (CTL) , HLA-DRB1* 0701 用來預測 MHC-II (HTL) 。 序列有高 SYFPEITHI score, 低 IEDB 百分位、高 hydrophilicity, antigenic index, surface probability and flexibility、沒有 signal peptide 或 transmembrane domain, 高比例 alpha-helices 及 random curls, 為適合做 epitope 的序列
Design of rPMT and synthesis of the multi-epitope gene rpmt		
- ExPaSy ProtParam - SignalP-6.0 Server - DeepTMHMM Server - SOPMA server - IEDB - SYFPEITHI	Epitope 排列組合後分析生化特性	

MVs: Membrane vesicles

PMT: P. multocida toxin

參考文獻：

1. Lee JJ, Abdullah M, Liu J, Carvalho IA, Junior AS, Moreira MAS, Mohammed H, DeLisa MP, McDonough SP, Chang YF. Proteomic profiling of membrane vesicles from

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Navigating towards an in silico design of a multi-epitope vaccine targeting membrane vesicle proteins. *Journal of Proteomics*, 292, 105058, 2024.
2. Liang W, Xiao H, Chen JY, Chang YF, Cao SJ, Wen YP, Wu R, Du SY, Yan QG, Huang XB, Zhao Q. Immunogenicity and protective efficacy of a multi-epitope recombinant toxin antigen of *Pasteurella multocida* against virulent challenge in mice. *Vaccine*, 41(14), 2387-2396, 2023.
 3. 張教授尚未發表之文獻