

## 豬瘟病毒 Erns 糖蛋白之選殖表現及其單株抗體之製備

林育如

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 緒言

豬瘟 (Classical swine fever; Hog cholera) 是由豬瘟病毒 (Classical swine fever virus) 所引起之高傳染性與高致死性疾病，主要以高熱及出血為特徵，一旦爆發疫情常造成嚴重的經濟損失。豬瘟病毒，分類屬於黃病毒科 (Flaviviridae) 中之瘟疫病毒屬 (Pestivirus)，其基因體為單股正向的 RNA，大小約為 12.3 kb，包含一個 open reading frame (ORF)，5'端及 3'端的非轉譯區。其中 ORF 轉譯出的 polyprotein 經由蛋白酶切割為 4 個結構性蛋白 (C、E<sup>ns</sup>、E1 和 E2) 和 8 個非結構性蛋白 (N<sup>pro</sup>、P<sup>7</sup>、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 及 NS5B)。目前研究指出 E2、Erns 及 NS3 會誘發宿主產生抗體反應，然而非結構蛋白 NS3 為病毒的高度保留區，因此抗體可能會與其他之 pestivirus 產生交叉反應 (cross-reaction)。為配合 E2 的次單位標示疫苗的開發及使用，我們嘗試利用桿狀病毒表現系統表達 Erns 蛋白作為區別診斷的標的物，並製備其單株抗體以進一步開發有效區別免疫動物及自然感染動物 (Differentiate the infected from vaccinated animals) 的配套檢驗試劑。

### 材料與方法

本實驗以 TD/96/TWN 豬瘟病毒株的 cDNA 作為模板增幅封套糖蛋白 Erns 基因核酸，構築適用桿狀病毒表現系統之轉置載體。將構築完成之轉置載體與線狀桿狀病毒 DNA 送入昆蟲細胞株 Sf9 中進行轉染作用。並於第四天後收取病毒液。並將以重組桿狀病毒感染之昆蟲細胞，以蛋白質電泳與西方墨點法分析重組蛋白之分子量與抗原性。待大量表現蛋白後，以管柱層析法純化。取純化之重組蛋白，與佐劑 1:1 混合均勻後，免疫 Balb/C 小鼠。待完成兩次免疫後，與 NS-1 骨髓瘤細胞進行融合瘤實驗，並配合豬瘟病毒抗原盤進行陽性細胞株的篩選。

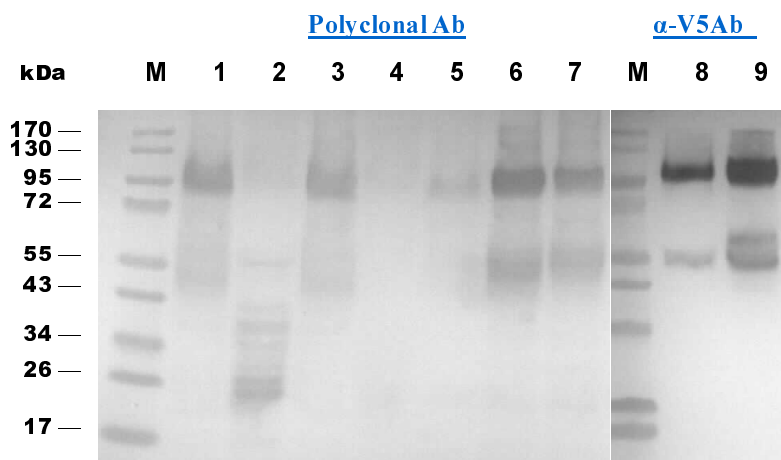
### 結果與討論

本實驗以 1996 年之台東分離株 TD/96/TWN 病毒 cDNA 為模版以聚合酵素連鎖反應增幅 Erns 基因。將 Erns 基因與轉置載體接合，目前以成功挑選出具有 Erns 基因載體之大腸桿菌。將構築完成之轉置載體與線狀桿狀病毒 DNA 送入昆蟲細胞株 Sf9 中進行轉染作用。並於第四天收取病毒液。取已重組桿狀病毒 rBV/Erns 感染之昆蟲細胞進行蛋白質膠體電泳與西方墨點法分析重組蛋白。我們分別利用抗 V5 epitope 的抗體及抗 Erns 的多源抗體來偵測重組蛋白的表現。結果均有一約 50KD 之蛋白質產物能夠被抗體辨識，表示經重組桿狀病毒感染之昆蟲細胞可表現出重組蛋白

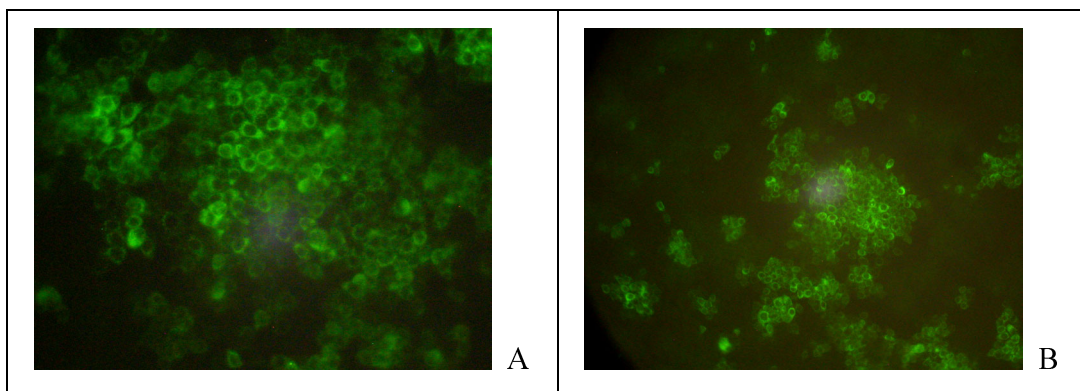
Erns (圖一)。應用桿狀病毒表現系統大量表現 Erns 重組蛋白，以親和層析法初步純化之 Erns 抗原，免疫 BALB/c 小鼠後，與 NS-1 骨髓瘤細胞進行融合瘤實驗，並配合抗原盤進行篩選陽性細胞株。結果成功製備了七株抗豬瘟病毒 Erns 之特異性單株抗體。將豬腎細胞感染豬瘟病毒 (TD/96/TWN) 後，再分別以七株抗 Erns 的單株抗體進行間接螢光染色。結果可見七株單株抗體在細胞質中均具有相似的染色結果，有明顯的豬瘟病毒斑 (圖二)。分別以 LPC (subgroup 1.1) 及 TD/96/TWN (subgroup 2.1) 作為抗原盤，再以 Erns 的單株抗體進行間接螢光染色分析。結果有六株單株抗體，可同時辨認 LPC 及 TD/96/TWN；一株單株抗體僅可辨認 TD/96/TWN 病毒株 (表一)。未來將嘗試將結合 Erns 抗原及抗體，開發能夠區別免疫動物及自然感染動物的檢驗試劑；此外，也將進一步分析各抗體辨認的部分，以瞭解 Erns 蛋白的構形。

表一、單株抗體特性分析

No. of mAb	CSFV strain	
	Subgroup 1.1 LPC	Subgroup 2.1 TD/96/TWN
6	+	+
1	-	+



圖一、利用西方墨點法分析重組蛋白 Erns 之表現。1~7 是取不同的重組桿狀病毒感染細胞後之細胞萃取物，以多價抗體進行反應。8, 9 是收取經重組桿狀病毒感染細胞後之細胞培養液及細胞萃取物，以單株抗體（anti-V5）進行反應。Erns 分子量約為 50 kDa。



圖二、將豬腎細胞感染 LPC (A) 及 TD/96/TWN (B) 以抗 Erns 之單株抗體進行間接螢光染色，可見明顯之病毒斑。