

## 利用真核系統表現豬第二型環狀病毒之重組蛋白

王羣<sup>1,2</sup>、邱芮瑜<sup>1,2</sup>、黃天祥<sup>1</sup>、鍾明華<sup>1</sup>、趙磐華<sup>1</sup>、郭應誠<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup> 國立台灣大學獸醫學研究所

### 緒言

近幾年來，豬隻新浮現疾病例如豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2)、鐵士古病、赤羽病等陸續侵入我國，若再有細菌或其他病毒二次性感染，恐有引發畜禽死亡、育成率低落，造成農友重大損失之慮。本所由九十至九十二年間曾以間接免疫螢光法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 針對不同年齡層豬隻血清進行 PCV2 抗體檢測。惟 PCV2 之培養不易，往往所培養之病毒力價極低 (約  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml 以下)。因此發生製作豬隻血清檢測用抗原盤之技術不易建立，以及螢光過於微弱導致實驗結果之判讀相當困難等缺點，導致無法廣泛應用於田間試驗及血清學調查。該病毒的蛋白衣 (Capsid) 為刺激宿主產生專一性抗體之部分，而該病毒蛋白衣之胺基酸主要由第二開讀窗基因 (open reading frame 2; ORF2) 所轉譯。因此本次實驗主要以真核細胞進行 PCV2 基因之表現並開發為診斷抗原盤可行性。首先萃取台灣 PCV2 分離株之病毒核酸，然後利用聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅 PCV2-ORF2 基因全長片段。再將該基因片段植入適當之表現載體中，經篩選後，選擇嵌有該基因之重組質體，並將此重組質體轉染 (transfect) 至真核細胞 (PK-15 cell line) 內進行重組蛋白表現，並以 IFA 進行分析。

### 材料及方法

收集全國各地養豬場具有 PMWS 臨床症狀衰弱仔豬之檢體，作為萃取核酸之材料。純化好之病毒核酸以 PCR 方法分別增幅 ORF2 基因 (699 bp)。反應完畢後取 10  $\mu$ l 之產物於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 ethidium bromide (EtBr) 進行染色，並於紫外線下觀察後照像。本次實驗所選用之質體為 Promega 公司出品之 pCI-neo 質體。首先將 pCI-neo 質體 (圖 1) 及含 ORF2 基因之 PCR 產物以 Sac I 與 Hind III 等限制酶於 37°C 下切割 3-6 小時。然後以 T4 ligase 及其 buffer 加以連接，於 18 °C 感作 16 小時。然後轉型至 Top 10 大腸桿菌 (transformation)，並塗抹於含抗生素 (Ampicillin) 之 LB agar 上，於 37 °C 感作至隔天，然後挑選極有可能成功選殖入 pCI-neo 之重組質體接種於 5 ml LB 培養液 (含 ampicillin)，並在 37 °C 下振盪培養過夜，再抽取 pCI-neo 之重組質體。有關重組質體之確認，取 10  $\mu$ l 可能含有 PCV2-ORF2 基因之 pCI-neo 重組質體以 Sac I 與 Hind III 等限制酶於 37°C 下切割 3-6 小時。並取 2  $\mu$ l 之產物於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 EtBr 進行染色，然後於紫外線下觀察後照像。有關核酸之定序及分析，則利用 ABI PRISM 377

Automated Fluorescent DNA sequencer 進行 DNA 之分析定序。

在 PCV1-free 細胞之培養方面，選用 PCV1-free 的豬腎臟細胞株 (PK-15)，以含 5 %胎牛血清(GIBCO)以及 100 unit/l penicillin G 與 100 mg/l streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO)培養於 5 % CO<sub>2</sub> 之 37 °C 培養箱，預備進行重組質體之轉染。轉染的前一天在細胞培養盤內鋪  $5 \times 10^5$  顆 PK-15 細胞。取 6 µg 含 ORF2 基因體全長之 pCl-neo 重組質體 DNA 加入無抗生素無血清的 DMEM 中，接著加入 9.6 µL plus reagent (Invitrogen)，混勻稱做混合液 A (總體積 100 µl)，於室溫作用 20 分鐘。另外配置混合液 B，內含 91 µl 之無抗生素無血清之 DMEM 與 9 µl lipofectamine reagent (Invitrogen)。將混合液 B 加入混合液 A 中，室溫作用 20 分鐘。等待的過程中，將已貼附的 PK-15 細胞以 PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)清洗三次，並將培養液換成無抗生素及血清的 DMEM 2 ml。將作用完之混合液 A+B，緩緩均勻地滴在細胞上轉染，將細胞置於 5 %二氧化碳 37°C 培養箱作用 4-7 小時後，加入含 10 % 血清的 DMEM，使總血清量達到平常 PK-15 細胞適應的 5 %血清，隔天視 PK-15 細胞生長程度進行繼代，最後進行間接免疫螢光法之檢測以確定轉染之效果。首先將抗 PCV2-ORF2 之單株抗體以 PBS 稀釋 150 倍後每孔加入 250 µl，室溫作用一小時，以 PBS 清洗三次後加入以經由 PBS 作 150 倍稀釋的 goat anti-porcine IgG-FITC，於室溫中避光作用一小時。以 PBS 清洗三次後，每孔加入 250 µl 之 PBS，最後以倒立螢光顯微鏡觀察螢光訊號。

## 結果與討論

先以聚合酶鏈反應將 PCV2-ORF2 片段基因增幅之後，再予以構築入 pCl-neo 表現用載體已表現 PCV2-ORF2 基因蛋白。然後取 2 µl 之產物於 2 % Agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 EtBr，並於紫外線下觀察後照像。可觀察到約 699 bp 大小之片段，與預期之大小相同。(圖 2)。

將 pCl-neo 重組質體轉染 PK-15 細胞，在轉染 48 小時後，以間接免疫螢光法觀察，可發現三至五成的細胞呈現陽性反應，螢光訊號多集中在細胞核，但也可見到少數在細胞質或整顆細胞(圖 3)。經初步評估可有效開發為 PCV2 抗體檢測用試劑。

基於過往經驗，利用原核系統進行 PCV2 ORF2 表現往往容易出現許多問題。例如無法有較且穩定的進行重組蛋白表現，以及表現量過少。推測其原因，可能是原核系統所產生之重組蛋白表現在極短時間內即迅速溶解，或是該重組蛋白本身具有毒性，所以在剛開始表現出來時會抑制宿主細胞繼續表現該蛋白。另外因為 PCV2 ORF2 之序列在 N'端位置具有一段 Nuclear Location 序列(約 165 nts)，也會影響到該重組蛋白在原核系統之表現。故在執行期中改採用真核系統來進行重組蛋白表現，並以 PK-15 細胞作為載台，希望能有效解決上述之問題。

本實驗所構築之 pCI-neo 質體在轉染 PK-15 細胞後可以有效表達出 PCV2-ORF2 基因蛋白產物，並且開發為豬隻血清診斷試劑。對於過去數年來無法有效表現出 ORF2 基因體全長產物總算獲得了初步之解決。因為 PK-15 細胞能有效進行哺乳動物細胞的蛋白質轉譯後修飾作用，對於重組蛋白之品質以及穩定性具有極大助益，在構型上亦較接近原始之抗原結構。未來亦將朝向量產大量化之方面進行更多相關研究。

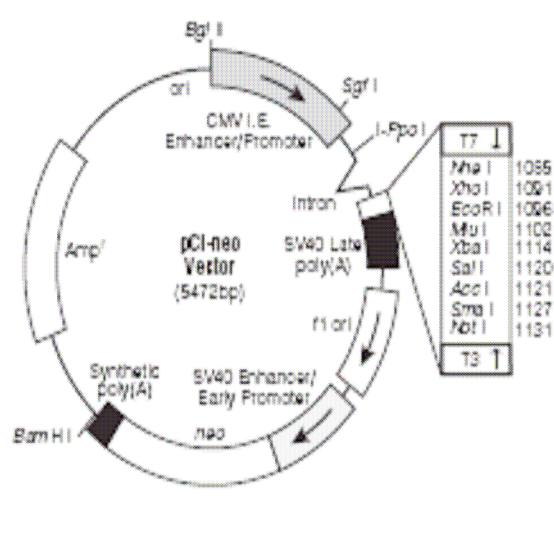


圖 1. pCI-neo 質體之圖譜

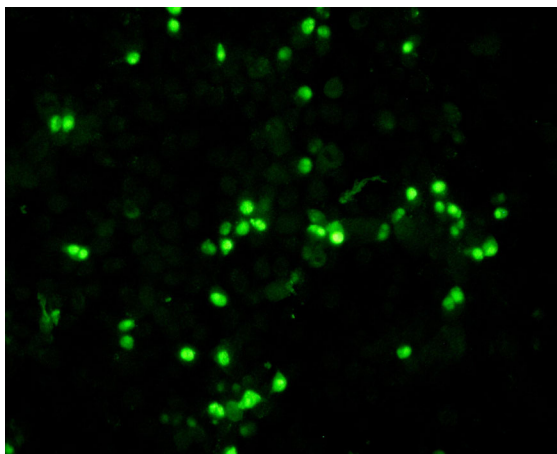
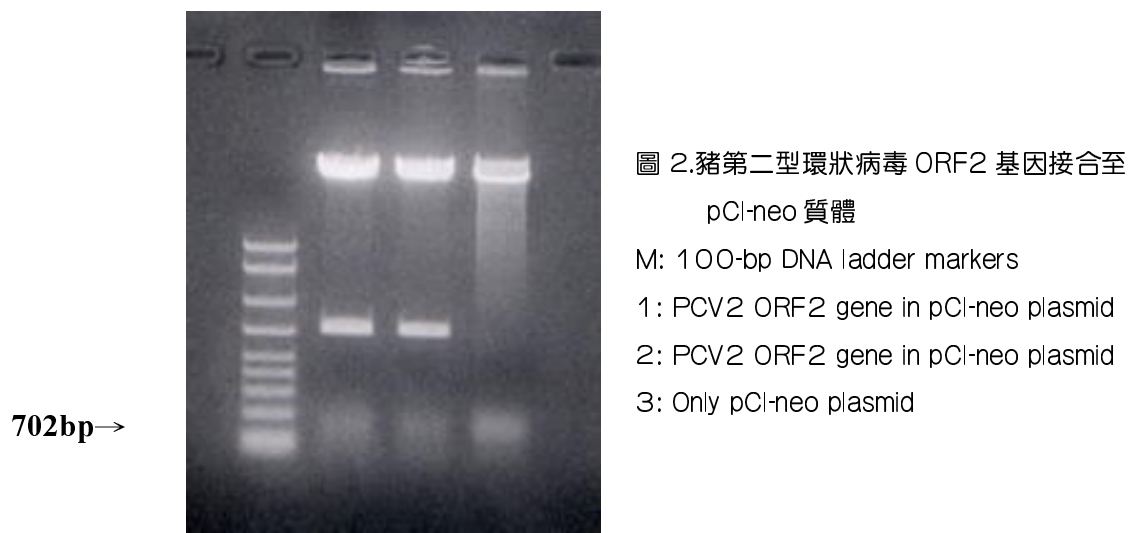


圖 3. PCV2-ORF2 基因之重組蛋白在 PK-15 細胞中成功表現出來，可在 PK-15 細胞之細胞核中觀察到特異性之螢光反應。