

恆溫環式核酸增幅法應用於豬第二型環狀病毒之快速檢測

報告人：王 羣 助理研究員（豬瘟研究組）

壹、緒言

豬第二型環狀病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)，為引起豬離乳後多系統消耗性綜合症(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)PMWS 之主要病原。PCV2 常與其它病原混合感染，增加單獨分離此病毒的困難度，再者分離的 PCV2 病毒在細胞培養時其力價不高。1990 年代環狀病毒 RF DNA (replication form DNA)被構築成質體保存，並大量複製用以分析病毒基因序列(Meehan et al., 1997; Meehan et al., 1998; Todd et al., 1991)。同時也觀察到將所構築的質體中全長環狀病毒序列以限制酶切割釋放出來後，再轉染入 PK-15 細胞後可觀察到病毒抗原產生(Mahe et al., 2000; McNeilly et al., 2001)。感染性 PCV2 質體可以提供穩定單純的病毒來源，所以本次研究計畫參考 Fenaux 等人的研究，將 PCV2 台灣株構築成感染性 PCV2 質體，並觀察其於 PK-15 細胞中複製 PCV2 的能力。同時觀察病毒在 PK-15 細胞中增殖時，幾種主要病毒蛋白的表現情況，以及他們對病毒複製能力的影響。

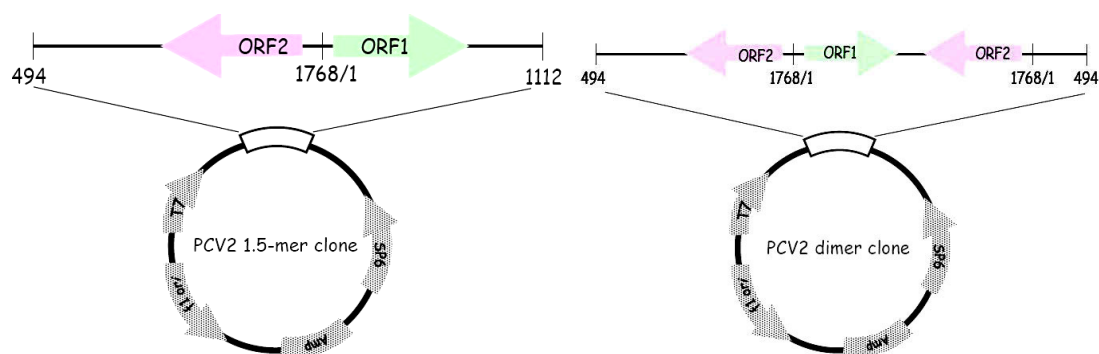
貳、材料與方法

以 PCV2 台灣株(GenBANK accession No: AF264094)作為模版，以含有 Sac II 限制酶切位之專一性引子對，利用 PCR 增幅出全長 PCV2 病毒 DNA。再將增幅出之 PCR 片段以 TA 接合方式構築入 pGEM-T® easy vector 載體，經定序確認為 PCV2 monomer clone。接著以相同的 PCV2 病毒株為模版，以含有 Bgl II 及 Spe I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列 381-1112 DNA 片段，以 Bgl II 及 Spe I 二切位構築入 PCV2 monomer clone，經定序確認後得到 PCV2 1.5-mer clone (圖一)。同時以含 Xba I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列全長，之後利用 Xba I 切位構築入 PCV2 monomer clone，經定序確認後得到 PCV2 dimer clone (圖一)。然後以 maxi-prep kit (Viogen) 抽取高品質的質體 DNA 並保存於-20℃。轉染後的 PK-15 細胞經過繼代累積病毒量後，將每代細胞利用-80℃冰箱冷凍解凍三次，細胞破裂使病毒釋放出來，以 250 g 4℃離心 5 分鐘，取上層之培養液，以微量試管分裝後，貯存於-80℃冰箱。以每孔 8000 個 PK-15 細胞加入在 96 孔細胞培養皿中培養過夜。隔日將培養液吸起，病毒 stock 以 DMEM 十倍序列稀釋後每孔以 100 µL 進行四重複感染，置於 5%二氧化碳 37℃培養箱感染 2 天，細胞以 PBS 清洗三次，並以-20℃ 50% methanol + 50% acetone 於室溫固定 10 分鐘。風乾後加入 100 µL PBS 於 4℃冰箱保存。固定後的細胞以對 PCV2

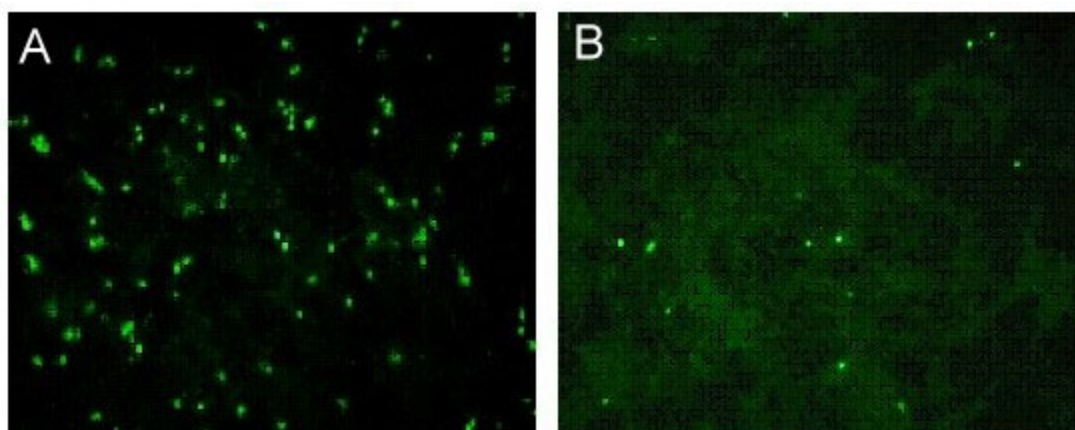
具有專一性之豬血清(Thermol, inc Lab)進行免疫螢光染色，並以螢光倒立顯微鏡觀察細胞，並計算其 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀)。將抗 PCV2 豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 以 PBS 稀釋 150 倍後每孔加入 50 μ L，室溫作用一小時，以 PBS 清洗三次後加入以 PBS 150 倍稀釋的 goat anti-porcine IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch lab)，於室溫中避光作用一小時。以 PBS 清洗三次後，每孔加入 100 μ L PBS，並以倒立螢光顯微鏡觀察螢光訊號。

參、結果與討論

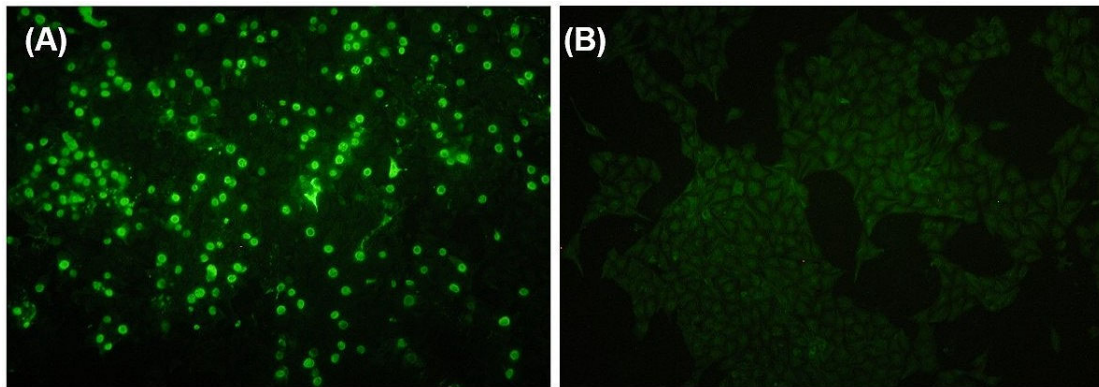
本實驗所構築出的 1.5-mer clone 及 dimer clone 感染性質體(圖一)轉染 PK-15 細胞後，細胞繼代第三代時，將細胞固定，以間接免疫螢光法觀察 PCV2 複製的情況。發現 dimer clone 感染性質體所產生的 PCV2 病毒顆粒比 1.5-mer clone 多(圖二)，所以之後的實驗都選用 dimer clone 感染性質體來進行。本實驗所構築出的 dimer clone 感染性質體轉染 PK-15 細胞，在經過 48 小時後，以間接免疫螢光法觀察，發現五成的細胞可呈現陽性反應，螢光訊號多集中在細胞核，但也可見到少數在細胞質或整顆細胞(圖三)。將上述所收集病毒液繼續感染 PK-15 細胞，並進行繼代約 6-7 次，同時每隔 24 小時收集病毒液，將不同代數細胞產生之病毒做序列稀釋，測試其病毒力價，經計算後估計所收集的 PCV2 病毒液力價最高可為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL (圖四)。豬環狀病毒感染性質體製備的方式各實驗室有不同之處，有人會以限制酶將 monomer clone 質體中病毒基因釋放出後，重新接合成環狀病毒 DNA 再做轉染(Mahe et al., 2000)。有人會選擇 1.5-mer clone (Roca et al., 2004)，也有人選擇 dimer clone (Fenau et al., 2004; Grasland et al., 2005)。本實驗所構築之 dimer clone 具較高生產病毒的能力，此結果與 Fenau 等人(2004)研究中提到 dimer clone 有較佳生產病毒能力是類似的。Roca 等人(2004)認為病毒的產生是在質體進入細胞內多出一倍基因體的部分進行同源重組，而產生病毒基因，dimer clone 可供進行同源重組的序列較多，或許是造成較多病毒產生的原因。此外也有可能是因為 dimer clone 具一個完整的 ORF1 且具二個完整的 ORF2 所致。



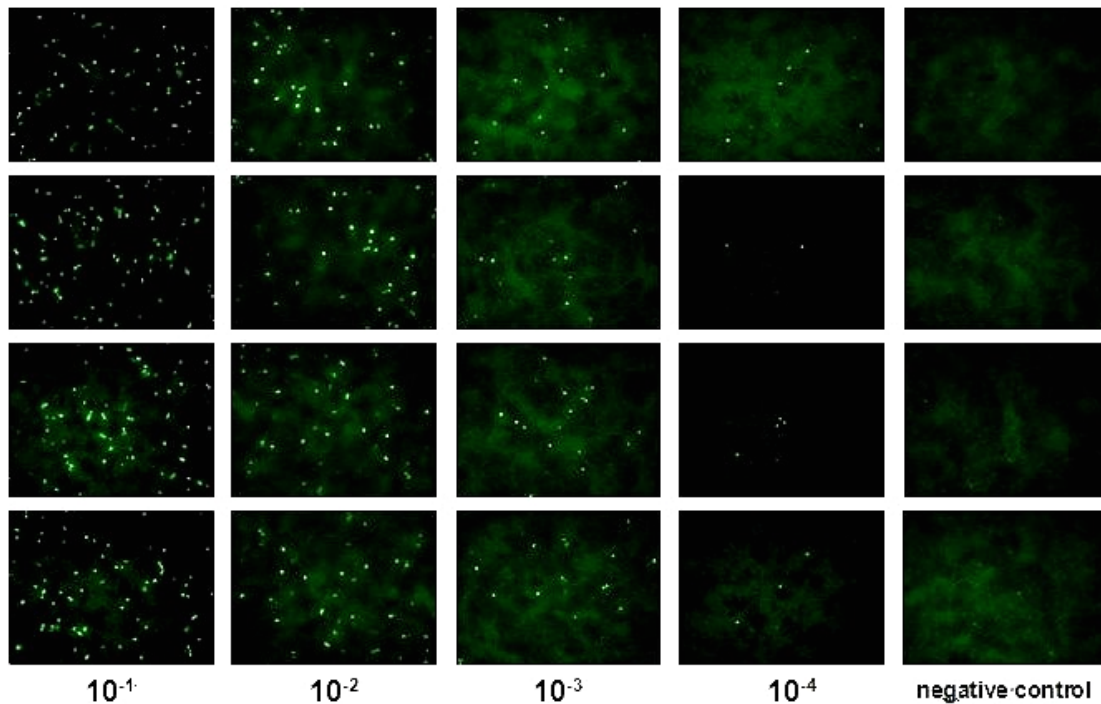
圖一：第二型豬環狀病毒感染性質體之構築。以含有 Sac II 限制酶切位之專一性引子對，利用 PCR 增幅出全長 PCV2 病毒 DNA 後以 TA 接合方式構築入 pGEM-T® easy vector 載體產生 PCV2 monomer clone。以含有 Bgl II 及 Spe I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列 381-1112 DNA 片段後，利用 Bgl II 及 Spe I 二切位構築入 PCV2 monomer clone 中，產生 PCV2 1.5-mer clone(A)。以含 Xba I 限制酶切位的引子對增幅 PCV2 核酸序列全長後，利用 Xba I 切位構築入 PCV2 monomer clone，得到 PCV2 dimer clone(B)。



圖二：PCV2 1.5-mer 與 dimer 感染性質體生產病毒能力之比較，PCV2 1.5-mer clone 或 PCV2 dimer clone 質體轉染至 PK-15 細胞後繼代第三代時，將細胞固定，以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測。(A) dimer clone 之 100X 放大倍率；(B) 1.5-mer clone 之 100X 放大倍率。其結果顯示 dimer clone 比 1.5-mer clone 有較強的複製能力。



圖三：(A)以 PCV2 dimer clone 質體轉染 PK-15 細胞後，將第一代所收取的病毒液感染 PK-15 細胞，經 48 小時之後將 PK-15 細胞固定，以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測。(B)未感染的陰性對照。



圖四：感染性質體所產生的病毒液之病毒力價測定。將 PCV2 dimer clone 質體轉染 PK-15 細胞，經 48 小時後，將收集的 PCV2 病毒液以 DMEM 十倍序列稀釋並進行四重複感染 PK-15 細胞，再經過 48 小時，將細胞固定，並以對 PCV2 有專一性的豬血清 (Anti-PCV2 polyclonal antibody, VMRD Inc) 進行 IFA 檢測，計算後可知病毒力價為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml。