

# 應用腺病毒系統表達豬瘟病毒醣蛋白

報告人：張家宜 助理研究員（豬瘟研究組）

## 壹、緒言

豬瘟為高傳染性及高致病性之豬隻重要疾病，主要以高熱及出血為臨床表徵。豬瘟之病原為豬瘟病毒（Classical swine fever virus, CSFV），分類於黃病毒科（Flaviviridae）中之瘟疫病毒屬（Pestivirus）。豬瘟病毒為二十面體，具有封套的顆粒，直徑約為 40-50 nm。豬瘟病毒之基因體為單股正向的 RNA，大小約為 12.3 kb，含有一個 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、Erns、E1 和 E2）和 8 個非結構性蛋白（Npro、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 及 NS5B）。在豬瘟病毒醣蛋白部份的研究顯示，E2 醣蛋白位在病毒表面，為主要誘發感染豬隻產生中和抗體的結構蛋白。

近年來台灣田間之豬瘟病毒已由新入侵型取代本土型。目前使用之 LPC 疫苗免疫是否能完全保護豬隻不受新入侵型病毒之感染，仍需進一步研究探討。而由於現今施打 LPC 免化豬瘟疫苗之缺點為豬隻免疫後所產生之抗體無法與自然感染區別，為了在田間可以有效區別免疫豬隻與自然感染豬隻，因此許多研究利用不同表現系統表達 E2 醣蛋白以研發出能區別自然感染與免疫之豬瘟疫苗（differentiation of infected from vaccinated animals; DIVA）。例如以假性狂犬病病毒（pseudorabies virus）作為載體，將豬瘟病毒 E2 蛋白基因插入假性狂犬病病毒基因中製成重組鑲嵌病毒，經實驗證實可同時保護豬隻不受假性狂犬病及豬瘟的攻擊。而利用豬腺病毒（adenovirus）、豬痘病毒（swinepox virus）以及牛痘病毒（vaccinia virus）作為載體，將感染真核細胞後所表現之 E2 醣蛋白免疫豬隻，皆可保護豬隻不受豬瘟的感染，而使用桿狀病毒表現系統感染昆蟲細胞後所表現的 E2 醣蛋白同樣可保護豬隻不受到病毒感染，以上研究均證實單一 E2 蛋白即可誘發免疫豬隻產生保護性中和抗體。

## 貳、材料與方法

萃取豬瘟病毒核酸，設計具特異性之引子及限制酵素切割位進行 RT-PCR 反應增幅 E2 醣蛋白基因片段。將增幅出之 E2 醣蛋白基因片段選殖於選殖於腺病毒（adenovirus）載體，並將載體與腺病毒 DNA 重組並轉染於 293 細胞內，收集並篩選重組之病毒。大量增殖重組病毒，並測定感染病毒之力價。將重組病毒 transduction 至豬的腎臟細胞（PK-15），收集細胞與培養液之蛋白產物，通

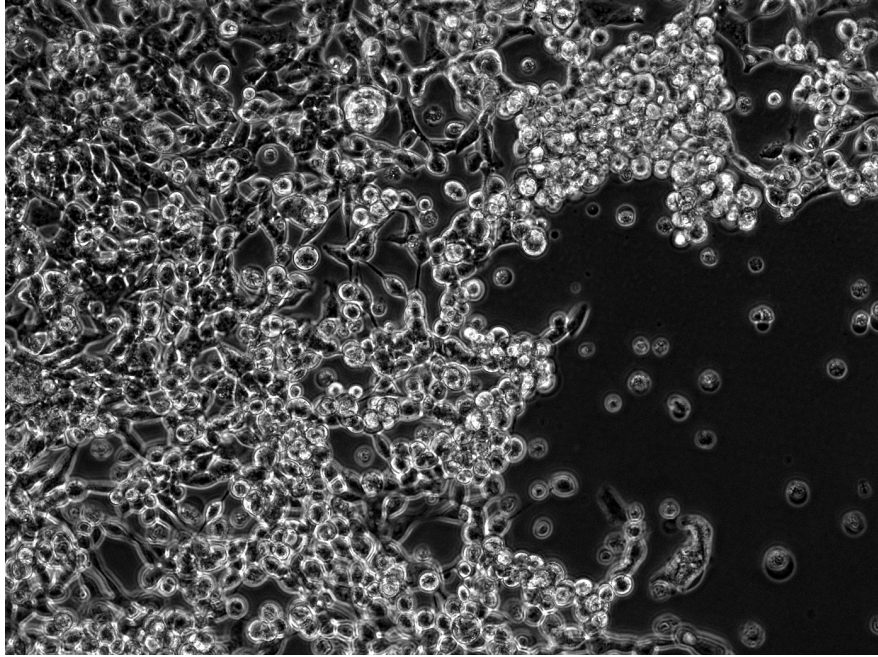
過管柱以純化表達蛋白。將重組病毒 transduction 的 PK-15 細胞進行間接螢光染色，再以標示螢光物質之二抗作用後，在螢光顯微鏡下觀察抗體之作用情形。收集細胞及培養液，萃取蛋白後進行蛋白質膠體電泳 (SDS-PAGE)，將電泳膠轉印到 NC membrane 上，之後進行西方墨點法 (Western Blot) 分析腺病毒表現之 E2 醣蛋白是否能被抗體所辨認。

## 參、結果與討論

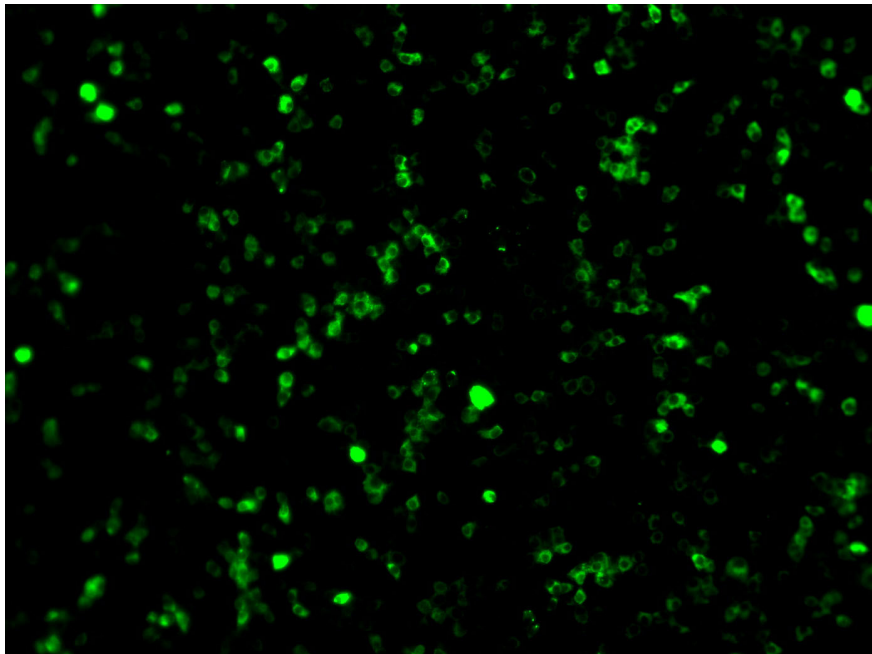
本實驗使用腺病毒 (adenovirus) 表現系統表達豬瘟病毒 E2 醣蛋白。由於腺病毒具有下列特性，使得重組腺病毒普遍成為基因傳遞與蛋白質表現的應用工具：腺病毒可感染的細胞種類廣泛，且無論是可複製或不可複製的細胞皆可感染，當細胞被腺病毒感染後，可產生高力價的重組病毒並可使轉殖入的基因高度表現，以上這些特性對於哺乳動物細胞蛋白的表現，皆扮演著相當重要的角色。且由於重組腺病毒之載體設計為 E1 基因缺失，需轉染至可穩定表現 E1 基因之特定細胞株，才能產生具有感染力的病毒，因此在實驗室操作上或應用至疫苗使用上較無生物安全方面之疑慮。

為了能更正確表現 E2 醣蛋白之構型，本實驗已成功的構築豬瘟病毒 E2 醣蛋白序列之載體，並建立腺病毒 transduction 至哺乳動物細胞表現系統之模式。載體與線狀腺病毒 DNA 重組並轉染於 293 細胞內，約一週後可觀察到細胞病變產生 (圖一)，而重組病毒大量增殖於 293 細胞後，約 2~3 天即可觀察到細胞病變，感染病毒之力價介於  $10^9 \sim 10^{10}$  pfu/ml 之間。收集細胞與培養液之蛋白產物經由管柱純化後，測得表現蛋白之濃度約為  $30 \mu\text{g/ml}$ 。

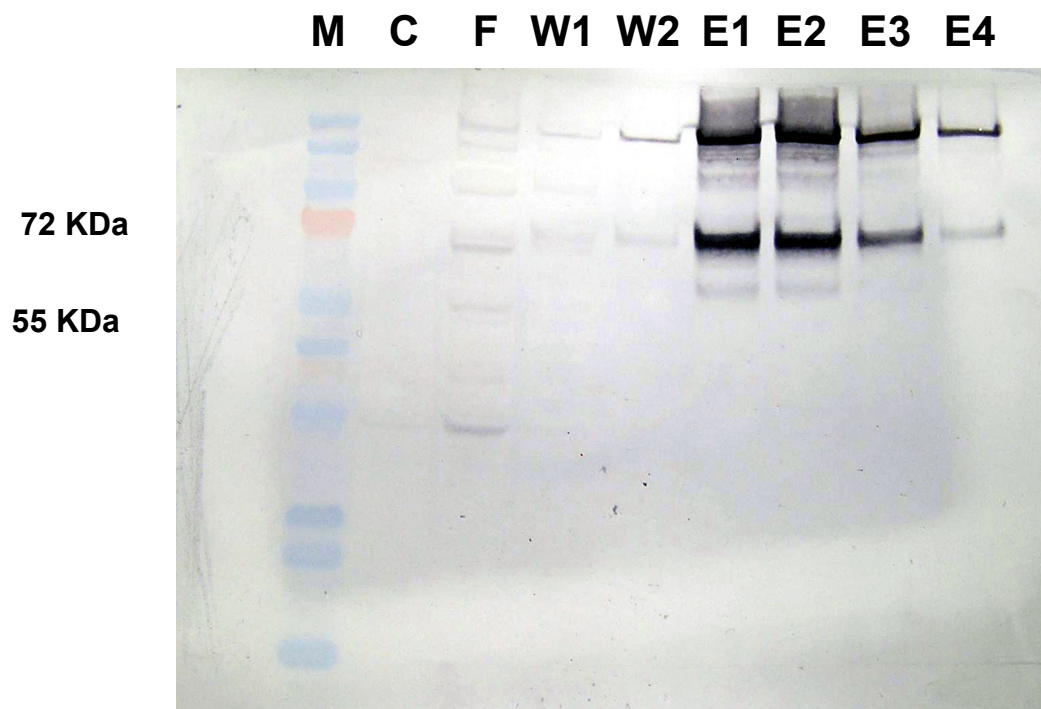
本實驗使用腺病毒系統表達之 E2 醣蛋白產物可經由間接螢光染色結果顯示偵測到表現蛋白 (圖二)，且經西方墨點法在非還原狀態下，表現蛋白分子量大小也與豬瘟病毒自然形成之 E2 醣蛋白 homodimer 相似，可得到兩條大小約為 120 KDa 與 65 KDa 的產物 (圖三)，顯示哺乳動物細胞表現之重組 E2 醣蛋白仍保有與自然感染豬瘟病毒產生之 E2 醣蛋白相似的抗原性。



圖一：重組腺病毒轉染於 293 細胞造成細胞病變



圖二：間接螢光染色法辨認重組豬瘟病毒 E2 醣蛋白



圖三：西方墨點法辨認純化之重組豬瘟病毒 E2 醣蛋白