

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

PPRS 病毒各結構蛋白基因之表現及其抗原性之研究(II)

Expression of the structure proteins of PRRSV and
study on its antigenicity(II)

計劃類別：個別計劃

計劃編號：NSC-88-2313-B-002-071

執行期間：87 年 08 月 01 日 - 88 年 07 月 31 日

計劃主持人：賴秀穗教授

處理方式：可立即對外提供參考

執行單位：國立台灣大學獸醫系

中華民國 89 年 5 月 24 日

PRRS 病毒結構蛋白基因之表現及其抗原之研究(II)

中文摘要

豬生殖與呼吸症候群病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 屬於 Arteriviridae, 基因體全長 15.1 kb 且包含 8 個 open reading frames(ORFs)。從已知的文獻中可知, ORF5 基因轉譯之蛋白是 PRRSV 結構蛋白中, 與中和抗體產生最有關的蛋白。所以本篇論文的主要目的, 是針對台灣分離株 FI, 利用體外轉譯蛋白當抗原進行免疫及直接 DNA 免疫兩種方式, 探討其 ORF5 基因轉譯之蛋白是否具有誘發宿主產生中和抗體的能力。抽取台灣分離株 FI 之病毒核酸, 利用反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR), 增幅出 621 bp 之 ORF5 基因片段, 再將此 ORF5 基因片段植入 pMT/Bip/V5-HisA 表現載體中, 藉由 lipofectin reagent, 將此表現質體轉染至 Schneider 2 細胞內, 進行真核系統之蛋白質表現, 經硫酸銅誘發蛋白質表現(28kDa)後, 將此蛋白質表現產物免疫 BALB/c 小鼠, 結果顯示, 雖然能成功地產生 28 kDa 之蛋白質產物, 但此蛋白質產物僅能誘發低量的中和抗體產生。此外, 進行 DNA 免疫時, 重新設計引子並進行反轉錄聚合酶鏈反應, 再將此 PCR 產物植入 pKAN3224 載體中, 選擇嵌有 ORF5 基因之表現質體(pKAN-ORF5), 直接以肌肉注射之方式免疫 BALB/c 小鼠, 經中和抗體試驗果顯示, 所有實驗組之 BALB/c 小鼠皆有抗 PRRSV 之中和抗體產生。因此, 由實驗結果證明, PRRSV 之 ORF5 基因轉譯之蛋白, 確實具有誘發宿主產生中和抗體的能力, 且以 DNA 免疫的方式較以體外轉譯蛋白進行免疫方式更能有效地誘發中和抗體反應的產生。

關鍵詞：豬繁殖與呼吸道症候群，結構蛋白基因

緒言

豬生殖與呼吸症候群(porcine reproductive and respiratory syndrome)為一病毒性豬隻傳染病(Wensvoort *et al.*,1991 ; Terpstra *et al.*,1991),對於所有年齡的豬隻皆有感受性,近年來的研究指出,ORF5 基因所轉譯出的蛋白除了是依賴抗體增強作用(antibody-dependent enhancement, ADE)中主要存在之蛋白(Yoon *et al.*,1995)外,亦是與中和抗體產生最有關的蛋白(Yoon *et al.*,1995),所以 PRRSV 中重要的抗原決定位多與 ORF5 基因轉譯之蛋白有關。另外,在比較 PRRSV 各分離株間 ORF5 胺基酸序列之同源性時發現,台灣分離株 FI 與美國分離株 ATCC VR-2332 之 ORF5 胺基酸序列同源性雖可達 94%,但與歐洲分離株 LV 比較,則同源性僅為 56%,就連與台灣另一分離株 MD-001 比較,同源性也只有 82%(李,1996),顯示 PRRSV 各分離株間之抗原性確實是存有差異的,因此會有國外發展之疫苗並不一定適用於台灣的情形出現。故針對台灣分離株 FI 之 ORF5 基因轉譯的蛋白做進一步抗原性的研究,才具有真正的價值。所以本實驗將嘗試以體外轉譯蛋白進行免疫及直接 DNA 免疫兩種方式,探討 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯蛋白是否具有誘發宿主產生中和抗體的能力,藉以了解 ORF5 基因轉譯之蛋白在台灣分離株 FI 抗原性中所扮演的角色,並期能成為日後發展本土次單位疫苗及 DNA 疫苗的參考依據。

實驗方法及材料

豬生殖與呼吸症候群病毒ORF5基因之蛋白質表現

1. 病毒的增殖

MARC-145細胞先培養1日或2日齡,接種FI病毒液約0.01-0.1 M.O.I. (multiplicity of infection),並置於37 感作1小時,之後再加入含2%FCS之MEM培養,等細胞病變效應達90%時,經冰凍解凍數次後收集之,保存於-70 冰箱待用。

2. 病毒核酸的萃取

取細胞培養液500 μ l,以GTC 及phenol和chloroform/isoamylalcohol混合,離心後取上層水溶液,並加入等體積的isopropanol,混合後置於-70 冰箱沈澱,再離心並去除上清液,以70% ethanol清洗沉澱物,風乾後溶於DEPC水,保存於-20 備用。

3. 引子(primer)之設計

引子的設計乃根據李(1996)發表之PRRSV台灣分離株FI的核酸序列所設計出的。以能涵蓋PRRSV完整ORF5基因片段為主。同時各在正、負股引子的端分別加上 *KpnI*及 *EcoRI*之限制酶切割序列,以便於利用RT-PCR的方式將其cDNA產物選殖至真核表現載體pMT/Bip/V5-HisA(*Drosophila* Expression System)上,並應用Gene Runner軟體選取最適當的引子P5F/P5R。引子的核甘酸序列如下:

正股引子P5F : 5' GGGGTACCTATGTTGGGGAAATGCTTG 3'

負股引子P5R : 5' CGGAATTCTCTAATGACGACCCCATTTG 3'

畫線部份分別為加上之 *KpnI* 及 *EcoRI* 限制酶序列

4. 反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

取上述溶於DEPC水之RNA 20 μ l 先經70 $^{\circ}$ C 作用3分鐘後，急速冷卻於冰水上2分鐘，接著加入1 μ l 負股之primer(1 μ g/ μ l)、8 μ l 之dNTP(1.25 mM)、10 μ l 之10 \times Taq buffer、0.5 μ l 之RNasin(40 U/ μ l)及0.5 μ l 之AMV RTase(10 U/ μ l)，混合均勻後，置於42 $^{\circ}$ C 水浴，作用30分鐘，再加入1 μ l 正股之primer(1 μ g/ μ l)、8 μ l 之dNTP及0.5 μ l 之Taq polymerase(5 U/ μ l)，並用DDW將總體積補至100 μ l，混合均勻後，直接放入溫度控制器(Thermal Cycler)內，進行PCR反應。反應條件為95 $^{\circ}$ C 作用1分鐘後，再94 $^{\circ}$ C 1分鐘、63 $^{\circ}$ C 1分鐘、72 $^{\circ}$ C 1分鐘作用29循環，最後再以72 $^{\circ}$ C 作用8分鐘。反應後，取產物並進行電泳分析。

5. 接合反應(ligation)

取適量的PCR產物及載體(pMT/Bip/V5-HisA)，用 *KpnI* 及 *EcoRI* 於37 $^{\circ}$ C 作用3小時進行限制酶切割，作用完畢後，於載體反應液中加入1 μ l 之小牛腸鹼性磷酸酶CIP(Calf Intestinal Alkaline phosphatase)進行去磷作用，以防止載體回黏。再經酒精沉澱後，取上述之PCR產物與載體pMT/Bip/V5-HisA，並加入T4 DNA ligase，置於14 $^{\circ}$ C 水浴中，作用16小時以上，以進行接合反應。

6. 轉形作用(transformation)

勝任細胞(competant cell)解凍後，取接合反應液5-10 μ l 緩慢加入勝任細胞中，溫和地混合均勻，冰浴30分鐘後，於42 $^{\circ}$ C 水浴中熱休克(heat shock)處理90秒，並立即置回冰上5分鐘，然後加入500 μ l LB培養液，37 $^{\circ}$ C 振盪培養1小時，取50 μ l 及200 μ l 菌液均勻塗佈於含有ampicillin (100 μ g/ml)之LB培養基上，37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。

7. 質體的篩選與製備

經快速篩選(quick screen)後，將上述疑似嵌入DNA片段之陽性質體的菌落，鈎至LB培養液振盪隔夜培養。之後取1.5 ml至微量離心管中，離心並去除上清液後，再以Solution I, II, III 萃取質體DNA，並以適量TE buffer溶解之。

8. 限制酶切割反應

使用 *KpnI* 及 *EcoRI* 與質體進行限制酶切割反應。於37 $^{\circ}$ C 作用2小時，反應結束後進行電泳分析，若有如預期大小之嵌入物，則任取二至三菌株進行定序反應，以確定嵌入物的序列無誤。

9. 轉染作用 (transfection)

於 35 mm 組織培養皿中培養 Schneider 2 (S2)細胞，當細胞數達到約 $1-2 \times 10^5$ cells/ml 時，於 23 °C 培養，培養皿內約有 40-60% 的細胞數聚集時，即可進行轉染作用。使用無菌的離心管製備以下溶液，溶液 A：將 1-2 μg 的質體 DNA(pMT-ORF5)以無血清的 DES expression buffer 稀釋成 100 μl ；溶液 B：將 2-20 μl 的 lipofectin reagent 以無血清的 DES expression buffer 稀釋成 100 μl ，置於室溫 30-40 分鐘。將溶液 A 與溶液 B 輕輕地混合均勻，在室溫中作用 30 分鐘。使用無血清的 DES expression buffer 清洗細胞，並將 0.8 ml 不含血清的 DES expression buffer 於上述 A + B 溶液，輕輕地混和均勻後，將其加入細胞中使完全覆蓋於細胞，置於 23 °C 中培養 16-24 小時。作用結束後，使用含血清的 DES expression buffer 換液，再置於 23 °C 中繼續培養 48-72 小時。當細胞長至約 $2-4 \times 10^6$ cells/ml 時，加入 100 mM 之硫酸銅(copper sulfate)誘發蛋白質表現(硫酸銅需在作蛋白質分析前 24 小時加入)。

10. 西方轉漬法 (Western blotting)

A. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

進行電泳前，先收集經誘發作用後之 medium，離心 10 分鐘後去除上清液，加入適量之 PBS，將其與 sample buffer 以 1:1 的比例混合，放入 100 °C 加熱 5 分鐘後，注入電泳槽以進行電泳。

B. Western blotting

經 SDS-PAGE 後，取下膠片與硝化纖維膜及濾紙 6 張一同浸入轉印緩衝液 (transfer buffer)中約 10 分鐘，然後進行電泳轉印 60 分鐘。轉印完成之硝化纖維膜先浸在 5% skim milk，於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時進行 blocking。然後加入第一道抗體(抗 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯蛋白之單源抗體，)，於 37 °C 作用 1 小時，再以 TBST 洗滌 3 次。再加第二道抗體(標示 alkaline phosphatase 之抗老鼠 IgG，)，於 37 °C 作用 45 分鐘後，以 TBST 洗滌 3 次。洗後加受質(NBT + BCIP)呈色，再以清水終止呈色反應。

11. 實驗動物之免疫

8 隻 6-8 週齡之 BALB/c 小鼠，共分為 3 組，第 1 組：陽性對照組 2 隻，接種 PRRSV 活毒 (10^6 TCID₅₀/ml)；第 2 組：陰性對照組 2 隻，接種 DES expression buffer；第 3 組：實驗組 4 隻，接種重組蛋白。

取重組蛋白與等量的佐劑充分混合後，接種實驗組之 4 隻 BALB/c 小鼠，接種採腹腔注射之方式，每隻 BALB/c 小鼠接種抗原量為 50 μg /次。第一次注射是用弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)配製的抗原乳劑，以後 2 次皆用不完全佐劑配製的抗原，每隔 2 週補強接種 1 次，共免疫 3 次。最後 1 次免疫 2 週後，採血進行中和抗體試驗。

12. 中和抗體試驗

取上述之血清進行之。

二、DNA 質體免疫

1. DNA 質體之備製

根據台灣分離株 FI 之核酸序列重新設計引子(P'5F/P'5R), 利用 RT-PCR 增幅出 ORF5 基因片段, 將此基因片段與載體 pKAN3224 接合, 並送入 competent cell (Top10 F') 中進行轉形作用, 經快速篩選法及小量質體之製備後得到可能嵌入有 ORF5 基因片段之質體, 並利用限制酶切割作用 (*EcoRI* 及 *BamHI*) 及核酸定序作確認, 得到之質體(pKAN-ORF5) 用作免疫 BALB/c 小鼠之用。

重新設計之引子的核甘酸序列如下:

正股引子 P'5F: 5' CGGGAATTCATGTTGGGGAAATGCTTG 3'

負股引子 P'5R: 5' CGCGGATCCCTAATGACGACCCCATTTG 3'

畫線部份分別為加上之 *EcoRI* 及 *BamHI* 限制酶序列

2. 間接螢光抗體染色試驗

將 pKAN-ORF5 質體利用 lipofectin reagent 轉染至 96 孔細胞培養盤內未長滿的 Vero 細胞(約 80%), 經轉染作用 24 小時後, 加入固定液(丙酮: 甲醇 = 2: 8), 作用完後風乾, 加入抗 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯蛋白之單源抗體, 於 37°C 作用 1 小時後, 以 PBS 洗滌 3 次, 接著加入 FITC 標示的山羊抗小白鼠之 IgG 抗體, 作用 1 小時後即可觀察。

3. 實驗動物之免疫

10 隻 6-8 週齡之 BALB/c 小鼠, 分為 3 組, 第 1 組: 陽性對照組 2 隻, 接種 PRRSV 活毒 (10^6 TCID₅₀/ml); 第 2 組: 陰性對照組 2 隻, 接種載體 pKAN3224 或 PBS; 第 3 組: 實驗組 6 隻, 接種 DNA 質體(pKAN-ORF5)。

接種時, 先以 Ketamine 麻醉, 使用 0.3 ml 之 insulin syringe (Ultra-Fine) 以肌肉注射之方式, 將 100 µg 之 DNA 質體注射入 BALB/c 小鼠之兩腿肌肉內, 左右腿各 50 µg, 注射後輕輕按摩注射部位。每 2 週注射一次, 共注射 3 次, 注射前及最後一次注射後 2 週開始採血, 進行中和抗體之測試。

4. 中和抗體試驗

以上述免疫所得之血清進行之。

實驗結果

一、PRRSV 之 ORF5 基因的蛋白質表現

1. ORF5 基因的選殖與表現載體的構築

取台灣分離株 FI 之病毒液以抽取核酸，並利用 P5F/P5R 做引子，以增幅出 ORF5 基因片段。結果顯示可順利增幅出之 621 bp 之 PCR 產物(圖一)。將 PCR 產物用 *KpnI* 及 *EcoRI* 切割後，即可植入 pMT/Bip/V5-HisA 載體內，之後將此質體送入 Top10 勝任細胞中進行轉形作用，並利用快速篩選法進行質體的初步篩檢。經快速篩選法篩檢後，得到 4 株可能嵌有 ORF5 基因片段之陽性轉殖株，之後抽出菌株的質體並以限制酶切割後，進行電泳分析。結果可見有較小片段的嵌入物及分子量較大的 pMT/Bip/V5-HisA 質體(圖二)，由嵌入物大小符合預估的長度可知，嵌入的基因片段為 ORF5 基因片段。

2. 選殖基因的定序反應

但為了進一步確認嵌入的基因片段為 PRRSV 之 ORF5 基因片段，取 2 株陽性轉殖株進行核酸定序反應，並與已發表之台灣分離株 FI 之 ORF5 基因片段序列作比對。定序結果顯示，嵌入之基因與已發表之台灣分離株 FI 之 ORF5 基因片段之核甘酸序列同源性達 99%，而胺基酸序列同源性為 100%，故可以確定嵌入之基因片段確實為 PRRSV 之 ORF5 基因片段。

3. 轉染作用之確認

為了確定含有 pMT-ORF5 表現質體之轉殖株確實有被送入 S2 細胞內，故在轉染作用 24 小時後，抽取細胞之 DNA，進行 PCR(利用原先設計之引子 P5F/P5R)及限制酶切割(*KpnI*及 *EcoRI*)反應。結果顯示，經由 PCR 反應後，產生有 621 bp 大小之產物，且抽取的 DNA 經限制酶切割後，可見有 611 bp 大小之切割產物(圖三)，兩者產物皆符合預期產物之長度，所以確定含有 pMT-ORF5 表現質體之轉殖株已順利地被轉染至 S2 細胞中。

4. 重組蛋白之蛋白質表現與西方轉漬試驗的確認

在確定含有 pMT-ORF5 表現質體之轉殖株被轉染至 S2 細胞後，以硫酸銅誘發蛋白質表現，誘發 24 小時後，收集 medium 進行蛋白質分析。經 SDS-PAGE 作用後，利用抗 PRRSV 之 ORF5 轉譯蛋白的單源抗體進行西方轉漬試驗。反應結果顯示，含有 pMT-ORF5 表現質體之轉殖株經轉染至 S2 細胞後，可表現出分子量 28 kDa 的重組蛋白(Bip-gp5)，其表現產物的分子量大小符合預期的分子量，而在無轉染之宿主細胞的 medium 中 經轉染作用但未以硫酸銅誘發蛋白質表現之 medium 中，和以硫酸銅誘發後 12 小時即收集之 medium 中，則皆沒有此種分子量大小的蛋白質產生(圖四)。

5.血清中和試驗

為了進一步了解此重組蛋白(Bip-gp5)是否能誘發中和抗體之產生，於是將重組蛋白免疫 BALB/c 小鼠，然後採取血清，進行中和抗體試驗。試驗結果顯示，經 3 次注射後，4 隻實驗組之 BALB/c 小鼠中，僅有 2 隻 BALB/c 小鼠有低量抗 PRRSV 之中和抗體產生(2 倍)，而陽性對照組之 BALB/c 小鼠則可有 4 倍中和力價之中和抗體產生。2 個星期後，實驗組之 BALB/c 小鼠中仍然只有 2 隻產生低量之中和抗體(2 倍)，陽性對照組之中和抗體力價則升高至 8 倍，而 2 次測試中陰性對照組均沒有中和抗體的產生(表一)。

二、DNA 質體免疫

1. ORF5 基因的選殖與表現載體的構築

將台灣分離株 FI 感染 MARC-145 細胞株之後，當細胞病變效應(CPE)達 90%時，再經冰凍解凍數次後，取病毒液以 GTC buffer，抽取病毒核酸，進行反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)，以增幅出 ORF5 基因片段。結果顯示可順利增幅出 621 bp 之 PCR 產物(圖五)，其產物大小符合引子設計時的預期長度。因為當初在設計引子時，於 5'端和 3'端各加有 *EcoRI*及 *BamHI*之限制酶切割位，所以根據這對引子增幅出的產物亦會有此兩種限制酶切位。將 PCR 產物用 *EcoRI*及 *BamHI*切割後，即可植入同樣有此兩種限制酶切位 pKAN3224 的載體內，待植入後，將此質體送入 Top10F'勝任細胞中進行轉形作用，並利用快速篩選法進行質體的初步篩檢。經快速篩選法篩檢後，得到 2 株可能嵌有 ORF5 基因片段之陽性轉殖株，然後再以小量質體製備法來萃取轉殖株之質體 DNA，並用 *EcoRI*及 *BamHI*作酵素切割後，以 2%瓊脂膠體進行電泳分析。結果可見有較小片段的嵌入物及分子量較大的 pKAN3224 質體(圖六)，由嵌入物大小符合預估的長度可知，嵌入的基因片段為 ORF5 基因片段。

2.選殖基因的定序結果

由於限制酶切割的結果，初步確定嵌入的基因片段為 PRRSV 之 ORF5 基因片段，但為了進一步的確認，取 2 株陽性轉殖株進行核酸定序反應，並與已發表之台灣分離株 FI 之 ORF5 基因片段序列作比對。定序結果顯示，嵌入之基因與已發表之台灣分離株 FI 之 ORF5 基因片段之核甘酸序列同源性達 100%，而胺基酸序列同源性亦為 100%，由此可確定嵌入之基因確實為 PRRSV 之 ORF5 基因片段。

3.間接螢光抗體染色試驗

為了確定 ORF5 基因能在真核細胞中進行蛋白質表現，將含有 ORF5 基因表現質體之轉殖株，經 lipofectin reagent 轉染至 Vero 細胞中，並利用抗 ORF5 基因轉譯蛋白之單源抗體，進行間接螢光抗體染色試驗。試驗結果顯示，在轉染 24 小時後，可於轉染之 Vero 細胞中見有螢光反應產生(圖七)，顯示 ORF5 基因確實能在真核細胞中進行蛋白質表現。

4.血清中和試驗

在確定 ORF5 基因可於真核細胞中進行蛋白質表現後，將嵌有 ORF5 基因之 DNA 表現質體以肌肉注射之方式免疫 BALB/c 小鼠，然後採取血清，進行中和抗體試驗，以進一步了解其是否具有誘發中和抗體的能力。測試結果顯示，經 3 次注射後，6 隻實驗組之 BALB/c 小鼠均產生抗 PRRSV 之中和抗體，抗體力價平均為 8 倍，而陽性對照組則有 3.6 倍中和力價之中和抗體產生。實驗組之 BALB/c 小鼠於 3

次注射後 4 個星期，中和抗體產生達高峰(20.1 倍)，且在後來的 3 次測試中，中和抗體力價均高於 8 倍以上，陽性對照組則於注射 3 次後 6 個星期，中和抗體力價才升至高峰(11.3 倍)，而達到高峰後中和抗體力價則下降至 8 倍以下。在 5 次中和抗體測試中，陰性對照組均無中和抗體的產生(圖八)(表二)。

討論

一、豬生殖與呼吸症候群病毒 ORF5 基因之蛋白質表現

近年來，許多有關 ORF5 基因轉譯蛋白之研究，大多以原核表現系統表現之蛋白來探討其與 PRRSV 抗原性之關係(Pizadeh *et al.*,1997 ; 1998b)。但由於原核系統表現出之蛋白，和真核系統表現出之蛋白有差異，故利用原核系統表現之蛋白做為研究對象，常常不能代表病毒原始蛋白在宿主體內表現之情形。因此在真核系統進行 ORF5 基因之蛋白質表現，較能反映病毒原始蛋白之真實性。而進一步探討其是否具有誘發中和抗體產生的能力，應是在研究 PRRSV 抗原性時較佳的選擇。

當將選殖之 ORF5 基因片段，植入 pCR3-Uni 載體內，並送入 CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞中進行蛋白質表現時，發現其能被偵測到的蛋白質量相當少，推測其主要原因，可能是因為表現的蛋白質產物對細胞具有毒性，而導致細胞某部份功能喪失甚至死亡。解決的方法是將 ORF5 基因序列中之 putative transmembrane region 序列去除，使其不致產生具有毒性的蛋白，但由於怕移除部份序列會破壞 epitope 之完整性，而影響實驗結果，故改採用 Drosophila Expression

System 表現系統來進行 ORF5 基因之蛋白質表現。當選殖之 ORF5 基因植入 pMT/Bip/V5-HisA 載體內，在 S2 細胞中經硫酸銅誘發蛋白表現後，可偵測到其產生有 28 kDa 之蛋白質產物，且符合當初預估之產物大小。由此結果可知，經由該系統表現之蛋白質產物，並不會對 S2 細胞產生毒性，故可繼續利用該系統進行 stable expression，以便取得大量的蛋白質產物。

為了進一步了解此蛋白質產物，是否能誘發中和抗體的產生，於是將此蛋白質產物與佐劑混合後，免疫 BALB/c 小鼠。結果顯示，在 4 隻實驗組之 BALB/c 小鼠中，僅有 2 隻產生低量的抗 PRRSV 之中和抗體，此結果跟預期的 ORF5 基因轉譯之蛋白能誘發中和抗體的產生有出入。探討其原因可能有：(1)免疫時除含重組蛋白外，可能亦包含了 S2 細胞之蛋白及少量之 FCS,L-glutamine。所以，在進行免疫時，會因為免疫之蛋白純度不夠，而導致無法引起有效的中和反應產生。(2)由於昆蟲細胞之表現系統，可能在轉譯後之修飾作用上與哺乳類細胞表現系統不迥相同，故兩個系統表現出之蛋白質產物或許略有差異，可能就影響了與中和抗體有關之抗原決定位的結構，使其無法誘發或僅誘發低量之中和抗體的產生。(3)在進行蛋白質表現並用西方轉漬法分析蛋白質產物時，除了有 28 kDa 大小的蛋白質產物外，常常另有 42kDa 大小之蛋白質產物產生，推斷其可能為 28 kDa 大小蛋白質產物的 dimer，這些 dimer 由於雙硫鍵的形成，使其無法誘發中和抗體的產生。所以，若免疫時蛋白質含量中，dimer 佔較多量而 monomer 佔較少量，即可能出現雖有中和抗體產生但量很少的情形。(4)曾有報告指出，利用表現系統表現之蛋白進行免疫時，有時會出現對抗原決定位產生耐受性(tolerance)的情形(Pirzadeh *et al.*,1998b)。雖然目前原因還不清楚且可能性小，但亦不應排除此種現象發生之可能性。

想要解決中和抗體產生的問題，除了最好利用哺乳類細胞表現系統進行蛋白質表現，並減少 dimer 之產生外，調整免疫的時間及選用適當的佐劑，亦是可考慮之方法。另外，由許多報告中可知，某些表現蛋白雖然誘發的中和抗體力價相當低，甚至無法誘發中和抗體的產生，但仍能具有不錯的保護效力(Plana-Duran *et al.*,1997)，其原因可能與細胞性免疫反應之參與有關。

二、DNA 免疫

將此 DNA 質體直接以肌肉注射之方式免疫 BALB/c 小鼠，經 3 次注射後，實驗組之 6 隻 BALB/c 小鼠皆有抗 PRRSV 之中和抗體產生，且產生之中和抗體力價高於注射 PRRSV 活毒對照組之中和抗體力價。另外，注射 DNA 質體的小鼠，於第 3 次注射後 4 個星期，中和抗體即可達到高峰，且達高峰後中和抗體力價均維持在 8 倍以上，

而注射 PRRSV 活毒之對照組，則於第 3 次注射後 6 個星期，中和抗體才升至高峰，且達高峰後中和抗體力價便下降至 8 倍以下。由以上的結果可知，經由 DNA 免疫的方式，將選殖基因送入 BALB/c 小鼠體內，不但順利地使 ORF5 基因進行蛋白質表現，進而誘發抗 PRRSV 中和抗體產生，並且以 DNA 免疫方式所產生的免疫反應，不論在效果或效率上，皆優於以 PRRSV 活毒進行免疫時所產生的免疫反應。所以，ORF5 基因轉譯之蛋白確實是 PRRSV 誘發宿主免疫反應產生時相當重要的抗原，且直接 DNA 免疫之方式亦是一個能有效引起免疫反應的良好選擇。

雖然經實驗證明，以 DNA 免疫之方式，將嵌有 ORF5 基因之質體，直接送入體內，確實能誘發中和抗體的產生，但是由李(1996)發表的論文中可知，ORF5 基因在各 PRRSV 分離株間胺基酸序列同源性的差異相當大，就連台灣本土株之間也有只有 82% 的胺基酸序列相同，顯示其間差異是很大的。這些差異可能與中和性抗原決定位有關，進而影響 DNA 疫苗的效力。

此外，DNA 疫苗在對抗持續性感染上，較活毒疫苗有效(Martins *et al.*,1995; Bourne *et al.*,1996)。因 DNA 質體可在體內存在很長的時間，且能穩定表現達數月(Wolff *et al.*,1992)，故其免疫作用可持續較久，而且在提高劑量及調整免疫時間的情形下，更能有效地改善持續感染的狀況(Pirzadeh *et al.*,1998b)。因此，DNA 疫苗的使用或許能解決 PRRSV 持續性感染所帶來的困擾。

三、結論與展望

本論文嘗試以 PRRSV 之 ORF5 基因體外轉譯的蛋白進行免疫及 DNA 免疫兩種方式，來探討 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯的蛋白，是否具有誘發中和抗體產生的能力。實驗結果顯示，除了利用真核表現系統成功地將 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯的蛋白表現出外，更以 DNA 免疫之方式，進一步證實 PRRSV 之 ORF5 基因所轉譯的蛋白確實具有誘發中和抗體產生的能力。此外，以 DNA 免疫的方式免疫動物，不論在操作技術上，或實驗效果上，均較以體外轉譯蛋白進行免疫的方式，來得容易且有效。所以，DNA 免疫不僅是 PRRSV 抗原性研究上一個重要的工具，亦將是 PRRS 防疫工作上的一大利器。未來希望能結合細胞性免疫反應方面的研究，以對 ORF5 基因轉譯蛋白之保護效力，作完整性的評估，進而成為發展次單位疫苗及 DNA 疫苗重要的理論依據。

文獻探討

李麗芬. 1996. 豬繁殖與呼吸道症候群病毒結構蛋白的定序與分析. 碩士

論文. 台北. 台灣大學獸醫學研究所.

Bohm W, Mertens T, Schirmbeck R, Reimann J. 1998. Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 16:949-954.

Bourne N, Stanberry LR, Bernstein DI. 1996. DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus. *J Infect Dis* 173:800-807.

Galina L, Pijoan C, Sitjar M, Christianson WT, Rossow K, Collins JE. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* 134:60-64.

Haigwood NL, Nara PL, Brooks E, van Nest GA, Ott G, Higgins KW, Dunlop N, Scandella CJ, Eichberg JW, Steimer KS. 1992. Native but not denatured recombinant human immunodeficiency virus type 1 gp 120 generates broad-spectrum neutralizing antibodies in baboons. *J Virol* 66:172-182.

Piradeh B, Dea S. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78:1867-1873.

Pizadeh B, Dea S. 1998b. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79:989-999.

Suarez P, Doaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Neito A, Ortin J. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70:2876-2882.

Terpstra C, Wensvoort G, Pol JMA. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Quart* 13:131-136.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van Veld P, Groenland GJR, van Gennep JA, Voets MT, Verheijden JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands : the isolation of Lelystad virus. *Vet Quart* 13:121-130.

Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1:363-369.

Yokoyama M, Hassett DE, Zhang J, Whitton JL. 1997. DNA immunization can stimulate florid local inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site. Vaccine 15:553-560.

Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, McGinley MJ, Eernisse KA, Brevik A, Rhinehart LL, Frey ML, Hill HT, Platt KB. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J Vet Diagn Invest 7:305-312.

Expression of the structure proteins of PRRSV and study on its antigenicity(II)

Summary

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus represents the causative agent of a new porcine disease which spread in form of an epidemic all over the world in the past years. It belongs to the newly proposed virus family Arteriviridae. The genome of PRRSV is about 15.1 kb in length and contains eight open reading frames. In the previous studies demonstrated that the ORF5-encoded glycoprotein of PRRSV was associated with neutralizing epitopes. The purpose of the present study is to investigate the ability of ORF5-encoded glycoprotein of PRRSV to elicit the neutralizing antibodies in host by means of expressed protein immunization and DNA immunization. The viral RNA was extracted from FI-infected MARC-145 and the ORF5-encoding region was amplified by RT-PCR. The PCR product was inserted into the pMT/Bip/V5-HisA vector at the *KpnI/EcoRI* site. The Schneider 2 cell was transfected with pMT-ORF5 plasmid by lipofectin reagent. The 28 kDa recombinant protein was expressed after copper sulfate inducing and detected with anti-ORF5 encoded protein monoclonal antibody by Western blotting. Then, the intraperitoneal injection of recombinant protein into BALB/c mice was performed. Serum samples were collected and checked for PRRSV-specific neutralizing antibodies by virus neutralization test. The results show that recombinant protein expressed in the insect expression system could only induce low-level neutralizing antibodies. In addition, another approach to evaluate the ability of ORF5-encoded protein of PRRSV to induce the neutralizing antibodies in host is direct DNA immunization. The ORF5 gene fragment was amplified by RT-PCR using the redesigned primers and cloned into the pKAN3224 vector. BALB/c mice received intramuscular injection of pKAN-ORF5 plasmid bilaterally into the anterior tibial muscle. After that, serum samples was collected and tested for PRRSV-specific neutralizing antibodies by virus neutralization test. The results indicate that PRRSV-specific neutralizing antibodies were detected in serum of all DNA-immuned BALB/c mice. Consequently, the data obtained suggest that ORF5-encoded protein can indeed elicit neutralizing antibodies in the BALB/c mice. Furthermore, the ability to induce neutralizing antibodies by DNA immunization significantly exceeds that induce by expressed protein immunization.

Key word: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), structural genes

表一、 重組蛋白 (Bip-gp5) PRRSV 活毒及 DES expression buffer 免疫 Balb/c 小鼠後，以中和試驗法進行中和抗體檢測之結果

Immunogen	Neutralizing Ab titer at wk		
	0 ^a	2 ^b	4
Bip-gp5	0	2	2
PRRSV	0	4	8
DES expression buffer	0	0	0

a : 免疫前採血

b : 經 3 次注射後 2 個星期採血

表二、以 pKAN-ORF5 表現質體、PRRSV 活毒、pKAN3224 載體及 PBS 免疫 Balb/c 小鼠後以中和試驗進行中和抗體檢測之結果

Immunogen	Neutralizing Ab titer at wk					
	0 ^a	2 ^b	4	6	8	10
pKAN-ORF5	0	8 ^c	20.1	18	12.7	10
PRRSV	0	3.6	6.4	11.3	7.1	4.5
pKAN3224	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0

a : 免疫前採血

b : 經 3 次注射後 2 個星期採血

c : 以取 log₂ 值後，計算平均值，再換算回原來倍數表示之

圖一、PRRS 病毒 ORF5(GP5 糖蛋白) 基因之 RT-PCR 增幅和選殖

PRRSV 核酸利用引子 P5F/P5R，進行 RT-PCR，以 2% 瓊脂膠體電泳分析之結果。M 為 100 bp DNA ladder marker；lane 1 為台灣分離株 FI 經 RT-PCR 增幅之產物；lane 2 為台灣分離株 MD-001 經 RT-PCR 增幅之產物。

圖二、轉殖株的快速篩選

轉殖株經少量質體製備法萃取質體 DNA，並以 *KpnI* 及 *EcoRI* 切割後，進行 2% 瓊脂膠體電泳分析之結果。M 為 100 bp DNA ladder marker；lane 1,2 分別為快速篩選時，編號 4,10 之轉殖株經限制酶切割之結果。

圖三、轉染作用後細胞確認

轉染作用後，抽取細胞之 DNA，並以 *KpnI* 及 *EcoRI* 切割後，進行 2% 瓊脂膠體電泳分析之結果。M 為 100 bp DNA ladder marker；lane 1,2,3 分別為轉染作用 24,36,48 小時後，質體 DNA 經限制酶切割之結果。

圖四、轉染作用後蛋白表現

經轉染作用並以硫酸銅誘發蛋白質表現後，收集細胞之 medium，利用抗 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯蛋白之單源抗體，進行西方轉漬法偵測之結果。M 為 protein marker；lane 1 為未經轉染作用之細胞的 medium(陰性對照組)；lane 2 為經轉染作用但未以硫酸銅誘發之蛋白質偵測結果；lane 3 為經轉染作用並以硫酸銅誘發 12 小時後之蛋白質偵測結果；lane 4 為經轉染作用並以硫酸銅誘發 24 小時後之蛋白質偵測結果。

圖五、PRRS 病毒 ORF5(GP5 糖蛋白) 基因之 RT-PCR 增幅和選殖

PRRSV 核酸，利用引子 P'5F/P'5R，進行 RT-PCR，以 2% 瓊脂膠體電泳分析之結果。M 為 100 bp DNA ladder marker；lane 1 為台灣分離株 FI 經 RT-PCR 增幅之產物；lane 2 為台灣分離株 MD-001 經 RT-PCR 增幅之產物。

圖六、轉殖株的快速篩選

轉殖株經少量質體製備法萃取質體 DNA，並以 *EcoRI* 及 *BamHI* 切割後，進行 2% 瓊脂膠體電泳分析之結果。M 為 100 bp DNA ladder marker；lane 1,2 分別為快速篩選時，編號 9,11 之轉殖株經限制酶切割之結果。

圖七、ORF5 表現現質體轉染至 Vero 細胞後以間接螢光抗體染色結果
pKAN-ORF5 表現質體轉染至 Vero 細胞後，利用抗 PRRSV 之 ORF5 基因轉譯蛋白之單源抗體，以間接螢光抗體染色法檢測之結果。左圖為轉染 24 小時後之 Vero 細胞，經間接螢光抗體染色法檢測之結果；右圖為陰性對照組。

圖八、血清中和抗體檢測結果

以 pKAN-ORF5 表現質體及 PRRSV 活毒免疫 Balb/c 小鼠後，以中和試驗法進行中和抗體檢測之結果(以取 \log_2 值後，計算平均值，再換算回原來倍數表示之)