

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 豬繁殖與呼吸道症候群及假性狂犬病複合疫苗之開發

### Development of PRRS and PR Virus Chimeric Vaccine

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-069

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：國立台灣大學獸醫系賴秀穗教授

#### 一、中文摘要

豬繁殖與呼吸道症候群(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 與假性狂犬病 (Pseudorabies, PR) 為豬重要的傳染病。為了研究可否利用減毒假性狂犬病病毒做為載體來攜帶一段 PRRS 病毒基因，以便構築雙價疫苗，做為防疫該兩大疾病之用。本實驗將 PRRS 病毒的 GP3 醣蛋白基因(即 ORF3 基因)植入取代 PR 病毒醣蛋白基因內，以構築 PRRS/PR 複合病毒(chimeric virus)。本實驗首先利用反轉錄聚合酶鏈反應增幅出 PRRS 病毒的 GP3 醣蛋白基因片段，再將之植入 pGEX-2T 原核表現載體，並進行大量表現獲得分子量約 30 kDa 的 GST-GP3 融合重組蛋白，然後利用此重組蛋白製備單株抗體做為篩選和確認 PRRS/PR 複合病毒之用。經過單株抗體的融合製備，順利獲得抗 GP3 重組蛋白單株抗體，該單株抗體具有辨識 PRRS 病毒 GP3 醣蛋白的能力；但不具中和 PRRS 病毒功能。另一方面，同樣利用反轉錄聚合酶鏈反應的選殖方式，將 PRRS 病毒的 GP3 醣蛋白基因，選殖入含 PR 病毒 gG 基因片段的 pGX 載體內，再將含 GP3 基因的 pJ3X 重組質體與減毒的 PRV-gE'-TK' 病毒完整 DNA 共同感染 RK-13 細胞進行同源重組(Homologous recombination)後，成功構築出 PRRS/PR 重組複合病毒(J3X)，經由南方轉漬試驗、西方免疫轉漬試驗、免疫螢光染色試驗及免疫過氧化酶染色試驗的驗證得知 J3X 複合病毒基因體內確實嵌有 PRRS 病毒的 GP3 醣蛋白基因，並可表現出 GP3 重組醣蛋白。J3X 複合病毒在細胞株所形成的病毒斑，比 PR 病毒強毒株的病毒斑小，未來將進行該複合病毒的抗原性試驗。

#### Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and Pseudorabies (PR) are two important infectious diseases of swine. In order to construct a chimeric virus, PR virus was used as a vector to carry a foreign virus gene fragment ORF 3 of PRRS. The total fragment of ORF3 gene was amplified by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The resulting cDNA was inserted into prokaryotic expression vector (pGEX-2T) system. GST-GP3 (glutathione-S-Transferase-glycoprotein5) expressed fusion proteins having molecular weight about 30 kDa was obtained. The fusion proteins were used as antigens to prepare monoclonal antibodies (Mabs), and a hybridoma capable of secreting the Mabs against the GP3 fusion proteins was successfully produced. The Mabs against GP3 fusion proteins was used for screening and confirming PRRS/PR chimeric virus carrying the ORF 3 gene expressed proteins. The Mabs can identify native GP3 proteins of PRRS virus, but not to neutralize PRRS virus. Furthermore, the RT-PCR products GP3 gene fragments were cloned into the pGX vector contained the gG gene fragment of PR virus. Then, the constructed pJ3X plasmid DNA contained gG gene fragment of PR virus and GP3 gene fragment of PRRS virus and DNA of the attenuated PRV-gE'-TK' virus were co-transfected into RK-13 cells. Following homologous recombination in the cells, a PRRS/PR chimeric virus (designated as J3X chimeric virus)

carried GP3 gene fragment in the genome of PR virus was successfully constructed. GP3 recombinant proteins of PRRS/PR chimeric virus were detected by Southern blotting, Western blotting, Immunofluorescent assay and Immuno-peroxidase staining. Plaques produced by J3X chimeric virus in RK-13 cell lines were much smaller than those produced by wild-type PR virus. The chimeric virus J3X will be further investigated on its immunogenicity in pigs.

## 二、緣由與目的

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,本實驗室於1993年從病豬分離到的病毒命名為FI株,並將7個ORF的核酸序列定序,並與美洲與歐洲分離株比較結果發現,本省分離株的核酸序列與美洲株之相似度較高.(Lee,1996)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病毒蛋白(Yoon *et al.*,1995),所以PRRSV中重要的抗原決定位都與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。在88年度國科會補助計畫中,對台灣分離株FI之ORF5基因進行表現及轉譯的蛋白做進一步抗原性的研究。該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,試驗結果FI株ORF5基因表現蛋白及以ORF5DNA免疫BALB/c鼠後,ORF5表現蛋白誘發的中和抗體力價很低,而以ORF5DNA所誘發者較強。PRRS之ORF3基因表現的蛋白特性及功能尚未有人報告,本實驗以選殖及表現ORF5的模式來分析ORF3表現蛋白的特性,瞭解後擬以構築一個PR病毒為載體帶有PRRS,ORF5及ORF3基因的chimeric virus以供研製複合病毒疫苗之材料。

## 三、結果與討論

以RT-PCR先將PRRS,ORF3基因片段275bp

增幅後,再以核酸定序證明該片段確實為PRRS病毒之ORF3基後,選殖植入含PR病毒gG基因片段的pGX載體內,再將含GP3基因的PJ3X重組質體與減毒的PRV-gE-TK病毒完整DNA共同感染RK-13細胞進行同源重組後,獲得J3X的PR-PRRS,ORF3的複合病毒該複合病毒,經南方轉漬試驗,西方免疫轉漬試驗,免疫螢光染色試驗及免疫過氧化酵素染色試驗證實之。

本實驗雖然證實PRRS,ORF3基因表現的病毒無病毒中和能力,但因前人報告ORF5加上ORF3及ORF7表現的蛋白混合免疫豬時的免疫性極佳,因而本研究計畫最終的目的擬以PR病毒為載體構築一含PRRS,ORF5,3及7的複合病毒做二價疫苗之用,擬於明年計畫先構築PRV-PRRS-ORF5-ORF3的複合病毒並進行豬體的免疫效力試驗。

## 四、參考文獻

- [1] 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. 台大獸醫系碩士論文.
- [2] 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.
- [3] Bourne N, Stanberry LR, Bernstein DI. 1996. DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus. *J Infect Dis* 173:800-807.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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, vant 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

- [9] 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.