

利用昆蟲桿狀病毒表現載體系統生產魚類傳染性胰臟壞死病毒抗原

羅竹芳、田乃月、周申如、郭光雄

台灣大學動物系

摘 要

本研究利用生物技術的方法，生產傳染性胰臟壞死病毒(IPNV)抗原，以供疫苗之製備及抗體檢驗系統之建立。由於桿狀病毒表現載體系統是目前廣被利用為生產重組蛋白質之生物技術，因此本研究將IPNV A段基因的cDNA送入桿狀病毒表現載體系統中，以生產IPNV抗原。

利用Hind III與Bam HI兩種限制酶，將A段基因自pT7-2/A中切出，並與桿狀病毒傳送載體pYPLT7黏合，再轉形入大腸桿菌DH5 α 菌株。利用限制酶及DNA定序法分析，篩選出含IPNV SP A段cDNA之重組質體pAcIPNV-A，再與桿狀病毒基因體DNA共轉形於昆蟲細胞中，以生產重組桿狀病毒。

分析感染重組桿狀病毒AcIPNV-A的SF21-AE昆蟲細胞中的蛋白質，結果可檢測到A段基因產物VP2及VP3。至於重組蛋白質中，亦應包括非構造蛋白質NS，不過因檢測用之抗體不含抗NS之抗體，所以在分析結果中，無法觀察到NS蛋白質。目前進行之研究即利用所生產出之重組蛋白質，開發檢測魚體中抗IPNV抗體之試劑組，以及重組病毒蛋白疫苗之製備。

一、前 言

魚類病毒的存在對養殖業是一嚴重威脅，因為多數魚類病毒會造成魚群發生突發性死亡，又無有效療劑。魚類病毒病的研究始於1941年，但至1962年Wolf和Quimby才分離出第一個魚類病毒—魚類傳染性胰臟壞死病

毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)。1981年，本病毒與其它生化和形態上相似之動物病毒如感染雞的IBDV (Infectious bursal disease virus)及感染果蠅的DXV(Drosophila X virus)、感染牡蠣的OV (Oyster virus)，以及感染雙貝類的TV (Tellina virus)等被歸類為兩段雙股核糖核酸定病毒科(Birnaviridae)。

近年來國內經濟養殖魚類備受病毒威脅，引起各方面的注意，並加強魚類病毒的研究。其中有關IPNV方面，Hedrick等自1980年起嘗試由國內一些養殖魚，如吳郭魚、虱目魚、鯉魚、白鰱、金魚、鰻魚、虹鱒等分離病毒研究，結果在鹿港附近的虹鱒分離出IPNV VR-299株，而在台灣北部，淡水附近的日本鰻及吳郭魚，以及鹿港的日本鰻魚分離出IPNV Ab株。爾後，多位研究者相繼自虱目魚、泥鰍及鱸魚等分離出IPNV，顯見IPNV在台灣分佈非常廣，無論中部、南部或北部，都曾發現IPNV感染魚(Chen et al. 1984, Hedrick et al. 1983, Lipipun et al. 1989)。雖然，由生化特性及血清學上之研究顯示，台灣的IPNV與歐洲的Ab株近似，但台灣所發現之類IPNV Ab株卻有其獨有的特性，即一般IPNV Ab株無法在FHM細胞株(fathead minnow cell line)中增殖，但台灣所分離之類IPNV AB株，如泥鰍兩段核糖核酸病毒(loach birnavirus, LBV)，會使FHM細胞株形成明顯細胞病變(cytopathic effect)。又這些病毒之最適增殖溫度為攝氏25度至30度，而攝氏30度對一般IPNV而言，是過高溫而無法增殖。因此台灣的IPNV可能是隨國外引進之發眼卵或魚苗傳入國內，之後可能因寄主的變遷或某種環境因子的影響而改變了特性(Chen et al. 1984, Chow et al. 1992, Lo et al. 1988)。

又傳染性造血組織壞死病毒(Infectious Hematopoietic necrosis virus, IHNV)常使虹鱒及各種鮭魚發生急性病，而且死亡率非常高，病魚腹部腫大、眼睛凸出(exophthalmus)。在1983年前，台灣並未有IHN病毒的病例，但1983年2月養殖戶自日本引進受精卵，結果該批卵所孵化的稚魚都發生典型的傳染性造血組織壞死症病徵，而且最後都死亡(Chen et al. 1983)。因此自國外引進魚苗必須謹慎，而且事先檢疫是絕對必要的。對於高經濟效益之魚種最好施用疫苗以防止傳染性高的病毒感染。又感染病毒的殘存魚常成帶原魚，造成疾病的蔓延。因此在放養魚前宜做病毒帶原性檢驗，以防疾病蔓延及經濟損失。一般帶原魚體內之病毒產量低，因此不易以抗原檢測法檢出帶原魚。由疫苗施用之研究顯示，魚類會對病毒產生抗體。因此本研究室擬利用IPNV感染症為模式，建立魚體中抗病毒抗體之檢測試劑，以瞭解放養魚群，是否來自疫區。由於桿狀病毒表現載體系統是目前廣被利用為生產重組蛋白質之生物技術，因此本研究將IPNV A段基因送入桿狀病毒表現載體系統中，並且在昆蟲細胞中生產IPNV抗原，以供疫苗及檢測魚抗病毒抗體試劑之製備。

桿狀病毒表現載體系統之基本應用原理，是將載有外來基因之重組病

毒感染昆蟲細胞，利用病毒基因啓動子(promoter)驅動此一外來基因，以產生大量重組蛋白質(Smith et al. 1983)。由於本系統中常選用強勢病毒基因啓動子，因此常可得極高量之重組蛋白質，其產量達 1mg/L至 500mg/L。再則，昆蟲細胞爲真核細胞(eukaryotic cell)具轉譯後修飾(post-translational modification)之功能，因此重組蛋白質不論在抗原性(antigenicity)、免疫性(immunogenicity)以及生物活性上均與原來蛋白質相似(Luckow and Summers 1988)，因此極適合做疫苗製備。又由於昆蟲細胞之抗原，一般不會與脊椎動物血清產生交叉反應，因此在昆蟲細胞中所生產之抗原，一般可以不經純化，即可做爲魚類或其他脊椎動物血液中抗該抗原之抗體檢測試劑。由初步酵素鍵結免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent analysis; ELISA)，本研究室生產之重組 IPNV 抗原粗萃取液做之覆被抗原(Coating antigen)，確可檢測到抗病毒之抗體。至於用做疫苗之功效，則有待進一步試驗結果再行評估。

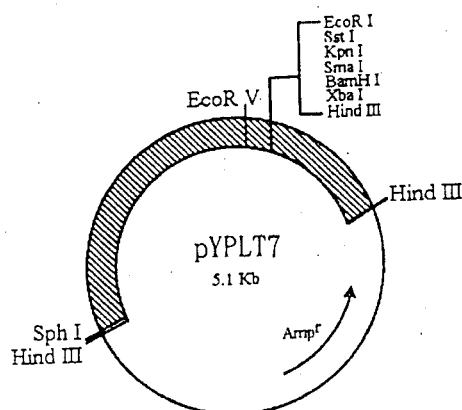
二、材料與方法

(一)、供試的細胞株：

供試的細胞株爲秋行軍蟲細胞株SF 21-AE。細胞培養於含10%胎牛血清，50 IU/ml鏈黴素(streptomycin)，1.75 μ g/ml抑黴素(fungizone)和50 IU/ml青黴素(pencillin)的TNM-FH培養液。培養溫度爲28°C，每隔三天進行一次繼代培養。

(二)、各式質體之來源：

1. pYPLT7：爲本實驗室所構築之昆蟲桿狀病毒傳送載體，此載體具有桿狀病毒多角體蛋白基因的完整啓動子序列，及多個限制酶切割位(restriction enzyme sites)供嵌接外來基因。(圖一)



圖一 桿狀病毒傳送載體pYPLT7之部份限制酶切割位圖。

2. zpT7-2/A：為含IPNV SP病毒株基因體 A 段RNA之cDNA。本質體是由美國奧瑞岡州立大學之Dr. Jo Ann C. Leong所贈予。(圖二)

(三)、構築含IPNV (SP病毒株) A 段RNA基因體cDNA片段的昆蟲桿狀病毒傳送載體之策略：

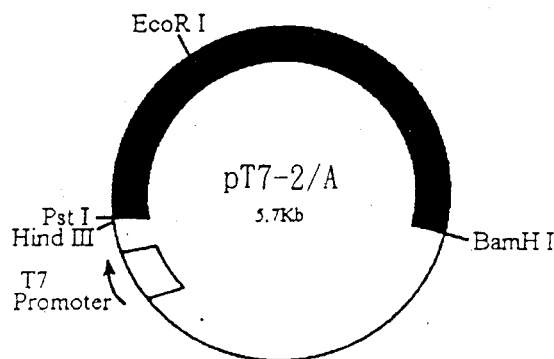
利用Hind III與Bam HI兩種限制酵素，將A段基因自pT7-2/A中切出，並以Klenow酵素(Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I)將其兩端補平。傳送載體pYPLT7以Sma I限制酵素切開，再以HK phosphatase處理後，即與上述處理過之pT7-2/A片段以T4 DNA黏合酵素(ligase)黏合，並轉形於大腸桿菌DH5 α 菌株中。再利用限制酵素及DNA定序法分析，篩選含IPNV SP A段cDNA之重組質體pAcIPNV-A(圖三)，供進行接續之共轉形作用(cotransfection)，以生產重組病毒。

(四)、共轉型感染(Cotransfection)：

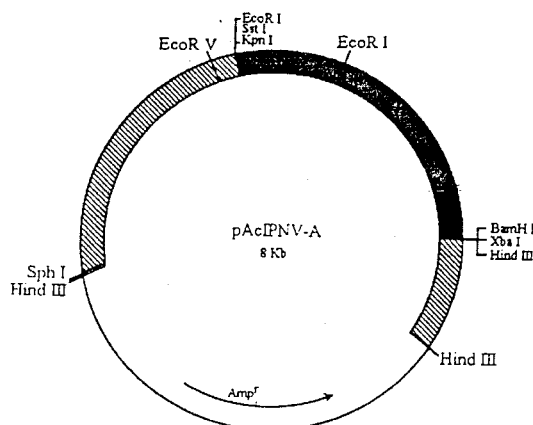
本方法之藥品皆使用Baculo Gold試劑組(Pharmigen)。於60mm大小的培養皿中，接入 3×10^6 個SF 21-AE的細胞量，加入後立刻搖動使細胞均勻分布在培養皿上，靜置30分鐘使細胞附著後，吸去原有的培養液，加入1ml轉形緩衝液A。另外在1.5ml離心管中混合0.5 μ g Baculo Gold桿狀病毒DNA和2 μ g AcIPNV-A, 5分鐘後加入1ml Baculo Gold轉形緩衝液B，並緩慢且均勻的將此混合液加入上述培養皿中，在27 $^{\circ}$ C恆溫箱中培養4小時。之後吸掉培養皿中的緩衝液，加入含10%胎牛血清的TMN-FH細胞培養液，在27 $^{\circ}$ C恆溫箱中培養五至七天後，即可收集上清液，供重組病毒的純化。

(五)、純化及篩選重組病毒的方法：

收集經過共轉型感染五至七天後的細胞培養液，經過適當的稀釋



圖二 含IPNV SP病毒株 A 段RNA之cDNA質體pT7-2/A之部份限制酶切割位圖。



圖三 含IPNV SP病毒株A段基因cDNA之重組質體pAc IPNV-A之部份限制酶切割位圖

(原液的 10^{-6} 、 10^{-6} 和 10^{-10})後，與細胞混合均勻，接種在96孔微量培養皿中，每微 $200\mu\text{l}$ 細胞病毒混合液，其中含細胞數 1×10^4 個。在 28°C 中培養七天後，自每微孔吸出 $50\mu\text{l}$ 的培養液，加入點墨雜合器(dot-blot apparatus)中，利用真空抽氣將培養液抽乾，使病毒粒子吸附在Hybond-N紙上(購自Amersham公司)，將Hybond-N紙置於室溫中晾乾後，於變性溶液和中和溶液中各作用10分鐘，再以2X SSC浸潤後，將紙晾乾一小時後，即以UV的連結法(UV crosslinking)，將DNA連結在紙上。經12至16小時雜合反應，再利用DIG標示的IPNV A段cDNA探針進行雜合反應(hybridization)，便可進行化學螢光偵測法(chemiluminescent detection)，其方法參照Boehringer Mannheim所附使用書。

(六)、蛋白質的分析：

將感染重組病毒的細胞蛋白，經電泳分離並轉印至硝化纖維紙後，即將硝化纖維紙進行免疫呈色反應。使用之抗體分別為兔子抗IPNV-SP抗體及HRP標示之山羊抗兔子免疫球蛋白抗體。

三、結 果

(一)、含 IPNV A 段cDNA桿狀病毒傳送載體pAc IPNV-A之鑑定：

利用 EcoRI 限制酶切割片段分析重組桿狀病毒傳送載體，結果 pAcIPNV-A 3 被 EcoRI 限制酶切割成二個片段，分別為 450bp 及 7.6Kb，所以是為 IPNV A 段cDNA以正確方向接入傳送載體之重組質體(圖四)。因此，pAcIPNV-A即被採用與病毒DNA共轉形於昆蟲

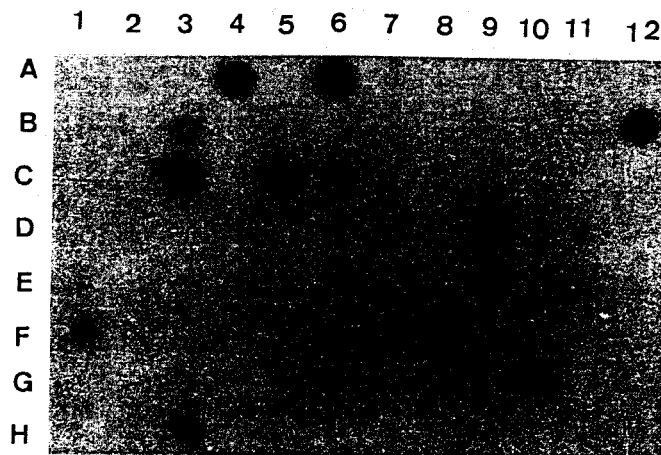


圖四 以EcoRI限制酶分析IPNV SP病毒株 A 段cDNA之桿狀病毒傳送載體pIPNV-A結果。1: λ /Hind III DNA標記 2: pAcIPNV-A 3: pGEM-DNA標記

細胞中，以生產重組病毒。

(二)、含 IPNV A 段cDNA的重組桿狀病毒之純化與篩選：

將共轉型後收集的病毒液稀釋成原液的 10^{-7} ，再將之感染96微孔培養皿，一週後自96微孔培養皿中取細胞培養液至 hybrid N 紙上，再與 IPNV A 段基因之cDNA探子做點墨雜合，結果挑選出有正反應的病毒株(圖五)。本研究選出其中一株AcIPNV-A進行接續之實驗，



圖五 利用限數稀釋及點墨雜合法分析，正反應者即為含 IPNV A 段cDNA之重組病毒株。

以生產重組蛋白。

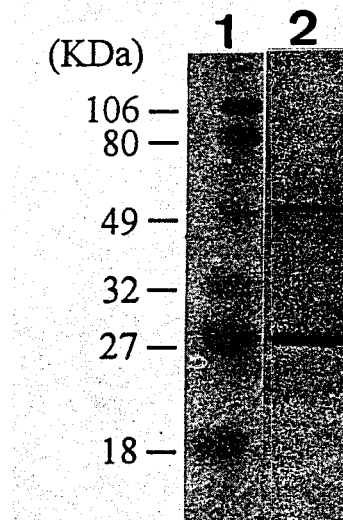
(三)、蛋白質分析：

將重組病毒AcIPNV-A感染昆蟲細胞三天後，將細胞抽出物做電泳分離，再進行免疫轉印及染色，結果可看出重組病毒表現出IPNV的病毒蛋白質：63KD的pVP2（為54KD的VP2的前身）和31KDa（圖六）的VP3。因此本研究已成功地在昆蟲細胞合成出IPNV之抗原。

四、討論

本研究利用Baculogold試劑組進行共轉作用。由於本試劑組所利用的原理主要是將AcMNPV病毒DNA加以修飾處理，造成一致死性的基因缺失突變(deletion)，此種病毒DNA即使傳送入昆蟲細胞中，亦無法利用寄主細胞的酵素系統進行複製，繁殖出正常的病毒子代。不過當此種病毒與重組桿狀病毒傳送載體發生了同源序列置換作用，則可得正常複製之重組病毒，能在昆蟲細胞中繁殖。所以共轉形所得的病毒粒子有99%以上含有外來基因，至於產生野生型病毒的機率非常低，所以通常只要做一次限數稀釋與點墨雜交法，即可得多株重組病毒，節省不少人力物力。

IPNV A 段基因的主要蛋白質產物為VP2、VP3與NS蛋白，其分子



圖六 以SDS PAGE及免疫轉印法分析重組桿狀病毒AcIPNV-A所感染的SF-21AE中之蛋白質，結果顯示本系統中有IPNV抗原產生。

1：蛋白質分子量標記 2：AcIPNV-A實驗試料

量分別為54KDa、31KDa和29KDa。由免疫轉印分析的結果可看出在昆蟲桿狀病毒表現載體系統中所表現出的IPNV A段基因產物，有二種蛋白質形成，所在的位置分別是63KDa與31KDa，以IPNV感染細胞中的病毒蛋白為對照，推測31KDa的產物應為VP3，而63KDa的產物則為VP2的前驅物(precursor, pVP2)，由此顯示，IPNV A段基因已成功的在昆蟲桿狀病毒表現載體系統表現。

由免疫轉印結果中，無法檢測顯示NS蛋白質的存在，此乃因本實驗所用之抗體未含有抗NS抗體之故。NS蛋白質為病毒的非構造型蛋白質，在形成病毒粒子的組合過程(assembly)中不會被包入病毒粒子之中，所以本實驗室利用純化病毒粒所製備之抗血清中，不含抗NS的抗體，因此無法檢測到NS蛋白質。

由於桿狀病毒多角體蛋白基因乃屬於病毒的最晚期基因(very late gene)，在病毒感染細胞後18到24小時，方才啟動進行合成蛋白質，故利用多角體蛋白基因啟動子驅動外來基因的表現，幾乎無法在前24小時內檢測到外來蛋白質的形成；而在24小時之後，最晚期蛋白質產物逐漸生成而累積，故於病毒感染細胞後48至60小時，蛋白質產量不斷的增加；在感染後第三到四天，寄主細胞會大量的死亡解體，釋放出病毒粒子，同樣地，累積於細胞內的重組蛋白質亦被釋放到培養基中。由於細胞解體後釋出的蛋白質水解酵素(protease)，因此會降低重組蛋白之產量。

Manning與Leong (1990)利用大腸桿菌中表現出之IPNV A段基因產物做為疫苗，可顯著降低IPNV所造成之虹鱒死亡率。至於本研究利用昆蟲桿狀病毒表現載體系統中所表現出的IPNV A段基因產物，亦應可做為疫苗使用，至於其效用則有待進一步評估。除供做疫苗試驗外，經初步研究資料顯示，本研究所產生之IPNV重組蛋白亦可做為抗IPNV抗體之檢驗試劑。目前正進行之計畫即利用昆蟲細胞所生產之重組蛋白開發，利用酵素鍵結免疫吸附分析法檢驗魚體中抗IPNV抗體之試劑組，以及重組病毒蛋白疫苗效果評估。

參考文獻

- Chen SN, SC Chi, HH Shih, GH Kou. 1983. The Occurrence on Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Cultured Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Taiwan. Proceeding of the Republic of China-Japan Cooperative Science Seminar of Fish Disease. NSC Symposium Series No. 10: 56-58.
- Hedrick RD, JL Fryer. 1982. Persistent infections of salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). A model for the carrier state in trout. Fish Pathol. 16: 163-172.

- Lipipun VP Caswell-Reno, UL Hsu, J-L W, MC Tung, PW Reno, WW Vijarn, BL Nicholson. 1989. Antigenic analysis of Asian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies. *Fish Pathol.* 24: 155-160.
- Lo CF, YW Hong, SY Huang, CH Wang. 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* 23: 147-154.
- Luckow VA, Summers MD. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vector. *Bio/Technology* 6: 47-55.
- Manning DS, Leong JC. 1990. Expression in *Escherichia coli* of large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179: 16-25.
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. 1983. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 2156-2165.