

公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：140201B904

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局九十六年度科技 計畫研究報告

計畫名稱： 利用免疫蛋白體學尋找兔化豬瘟疫疫苗株與野外毒
力株抗原差異之研究 (第1年/全程1年)

(英文名稱) **Development of immunoproteomics platforms to
identify candidate antigens of classical swine fever
virus for discriminating diagnosis**

計畫編號： 96農科-14.2.1-檢-B9(4)

全程計畫期間： 96年8月29日至96年12月31日
本年計畫期間： 96年8月29日至96年12月31日

計畫主持人： 梁有志
執行機關： 私立台北醫學大學
合作機關： 行政院農業委員會家畜衛生試驗所



公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：140201B904

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局九十六年度科技 計畫研究報告

計畫名稱：**利用免疫蛋白質學尋找兔化豬瘟疫苗株與野外毒力株抗原差異之研究 (第1年/全程1年)**

(英文名稱) **Development of immunoproteomics platforms to identify candidate antigens of classical swine fever virus for discriminating diagnosis**

計畫編號：**96農科-14.2.1-檢-B9(4)**

全程計畫期間：**96年8月29日至96年12月31日**

本年計畫期間：**96年8月29日至96年12月31日**

計畫主持人：**梁有志**

執行機關：**私立台北醫學大學**

合作機關：**行政院農業委員會家畜衛生試驗所**

一、中文摘要：

防治豬瘟疾病，都是經由注射兔化豬瘟疫苗，達到預防豬瘟的發生與擴散。然而在不注射疫苗的撲滅病毒政策下(non-vaccination stamping-out policy)，在不久的將來，勢必做到不注射豬瘟疫苗，而卻不發生疫情，在這過程中冒然中斷注射疫苗，風險非常的大。所以首先需區別感染豬與接種豬，找出感染豬並撲滅之，即能逐步消滅豬瘟病毒。在這個計劃中我們試圖以免疫蛋白體學(Immunoproteomic)相關技術，尋找兔化豬瘟疫苗和野外病毒感染，是否會引起豬隻產生不同的抗体反應，若能找到差異性的抗原，即可做成檢驗試劑，區別感染豬與接種豬。首先我們從病毒感染的PK15細胞，收集LPC及野生CSFV病毒顆粒，再萃取粗蛋白質。其次以二維電泳法層析這兩種病毒蛋白質，以Sypro Ruby染色或轉置到PVDF薄膜進行西方點墨分析。在二維電泳法層析中，雖然發現野生CSFV病毒與LPC病毒蛋白質點表現有所不同，然而以野外感染豬與疫苗接種豬的血清，進行西方點墨分析，卻找不到具有區別性的抗体抗原反應，雖然很多的研究利用免疫蛋白體學相關技術，尋找到新的抗原如，塵 及結核桿菌。然而合併前一年的計劃，我們都沒有找到區別性的抗原，我們認為可能有三大原因。第一，是收集到的病毒及野外病毒感染豬血清的樣品不足且批號不夠多；第二，可能是兔化豬瘟疫苗和野外病毒感染所引起的抗体反應是一樣的。第三，兔化豬瘟疫苗和野外病毒感染所引起的抗体反應有些微不同，然利用免疫蛋白體學相關技術不足以呈現之。

二、英文摘要：

The prevention of CSF usually uses the vaccine which made from attenuated LPC strain. At present, the non-vaccination stamping-out policy is in progress. If suddenly disrupt the vaccination, there would arise CSFV disease around nation-wide. Before stop of vaccination, how to differ the pigs between vaccinated and infected is a very important. In this plan, we want to discriminate between LPC-vaccinated and wild CSFV-infected pigs by immunoproteomic technique. First, we harvested the virus particles from PK15 cells cultured medium and then collected the total protein lysate both of LPC and wild CSFV. Second, the protein lysate were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE), and gain the 2-DE maps of the LPC strain and wild CSFV strain by Sypro Ruby staining. Third, 2-DE membranes of LPC strain and wild CSFV strain were immunoblotted with pooled sera from LPC-vaccinated pig or wild CSFV-infected pig. Although there are several different proteins between the LPC and wild CSFV strains in the 2-DE maps, it seems have no any different spots by immunoblotting assay. Many studies successfully discovery the new antigens by immunoproteomic technique, such as 塵 及結核桿菌. However, we unable to find the new antigen for discriminate between LPC-vaccinated and wild CSFV-infected pigs by immunoproteomic technique. It is possible that 1). the number or amounts of virus samples is not enough to analyze in 2-D system; 2) they produced same antibody pattern; 3) they may have a litter of difference in the antibody pattern, but can not detect by immunoproteomic technique.

三、計畫目的：

過去的研究發現豬瘟病毒，會引起三種抗體的反應，分別是豬瘟病毒的E2，Erns & NS3等蛋白，其中E2蛋白是最主要的免疫原，引起的抗體具有高度中和病毒活性；Erns蛋白引起的抗體具有中度中和病毒活性；而NS3蛋白引起的抗體具不具中和病毒活性。在不注射疫苗的撲滅病毒政策下(non-vaccination stamping-out policy)，最終會做到撲滅豬瘟病毒且不再注射豬瘟疫苗，在這過程中冒然中斷注射疫苗，風險非常的大。所以首先工作是需區別感染豬與接種豬，找出感染豬並撲滅豬 即能逐步將豬瘟病毒撲滅。然而目前使用的LPC減毒豬瘟疫苗，與野外病毒豬所引起的抗體反應是一樣的。因此在本計劃中，我們要以蛋白體學的相關技術，發掘潛在感染或接種疫苗豬隻之血清抗體是否有所差異，期望能做出具有鑑別能力的檢驗試劑，順利找出感染野外病毒的豬隻。

四、重要工作項目及實施方法：

1. 血清收集:

收集接種兔化豬瘟疫苗豬隻的血液及野病毒株感染的血液，分離細胞收集血清，置於冷藏備用。

2. 病毒收集及蛋白質萃取

以PK15豬腎細胞株培養兔化豬瘟病毒及野病毒株，收集細胞培養液上清液，再以下述步驟萃取其蛋白質:

- a. 以PEG8000濃縮上清液;
- b. 以TCA沉澱蛋白質;
- c. 以丙酮清洗沉澱的蛋白質;
- d. 沉澱乾燥後以Lysis C Buffer 溶解樣品;
- f. 測量蛋白質濃度

3. 二維電泳

兔化豬瘟病毒及野病毒株蛋白質約200 μ g，進行二維電泳層析其蛋白質，條件如下:

- a. 1-D 使用13 cm, pH 3 ~10的strip
- b. rehydration 12 hr, total electrophoresis 80000 Vhr
- c. 2-D使用15 \times 15 cm, 15 % PAGE gel
- d. 2-D膠片固定，以Sypro Ruby染色，再以Bio-Rad軟體分析兔化豬瘟病毒及野病毒株蛋白質的2-D圖譜; 或將2-D膠片上的蛋白質點轉置PVDF膜上，進行西方墨點法。

4. 西方墨點法

以收集到的接種兔化豬瘟疫苗豬隻的血清及野病毒株感染的血清，進行Western blot，再以ECL kit進行冷光呈色。

五、結果與討論：

病毒顆粒收集後，做二維電泳層析之，相同條件的二維電泳進行十次以上，以Sypro Ruby染色，僅呈現代表性的圖。因病毒顆粒是由PK15細胞增殖的，收集含病毒的細胞培養上清液，所以有胎牛血清蛋白(bovine serum albumin)的干擾，做二維電泳時在電泳膠片上有大而積的BSA區域(Figs. 1&2, 60~70 kDa左右)。結果發現野生CSFV病毒與LPC病毒有多處蛋白質點表現有差異(Figs. 1&2, 紅圈處)；但進行西方墨點法後，僅發現微弱少數反應點(Figs. 3&4, 紅圈處)，在BSA區域也出現反應點，應該是非特一性反應點。在本次計劃中我們未找到非常明確的區別性抗原。檢討原因有三。第一，是收集到的病毒及野外病毒感染豬血清的樣品不足且批號不夠多，病毒顆粒是利用PK15細胞增殖，此部份實驗所獲得的病毒不多且有胎牛血清蛋白的干擾；第二，可能是兔化豬瘟疫苗和野外病毒感染所引起的抗体反應是一樣的。第三，兔化豬瘟疫苗和野外病毒感染所引起的抗体反應有些微不同，然利用免疫蛋白體學相關技術不足以呈現之。第二及第三點，可能原因是所獲得的抗體力價不足，進行西方點墨分析，找不到明顯的抗体抗原反應；也可能是抗体只認識具完整立體結構的抗原，在SDS-PAGE中抗原已是去自然狀態(denature) 所以無法反應。

六、結論

根據我們的研究，初步判定使用免疫蛋白體學的技術，似乎無法找到具有區別接種兔化豬瘟疫苗與野外病毒感染豬的新抗原，但或許受限於種種因素，如病毒數量的不足，血清抗體力價過低及批數不夠多等種種因素，我們會繼續收集上述樣品，進行分析，期望能找到新抗原。

七、參考文獻：

1. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*. 1991 Sep;65(9):4705-12.
2. Esteves A, Marques MI, Costa JV. Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology*. 1986 Jul 15;152(1):192-206.
3. Zhang F, Yu M, Weiland E, Morrissy C, Zhang N, Westbury H, Wang LF. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library. *Arch Virol*. 2006 Jan;151(1):37-54.
4. Pearson JE. Hog cholera diagnostic techniques. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1992 Jul;15(3):213-9. Review.
5. Rumenapf T, Meyers G, Stark R, Thiel HJ. Molecular characterization of hog cholera virus. *Arch Virol Suppl*. 1991;3:7-18. Review.
6. Lin YF, Wu MS, Chang CC, Lin SW, Lin JT, Sun YJ, Chen DS, Chow LP. Comparative immunoproteomics of identification and characterization virulence factors from *Helicobacter pylori* related to gastric cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jun 11; [Epub ahead of print]
7. Kao SH, Hsu CH, Su SN, Hor WT, Chang T WH, Chow LP. Identification and immunologic characterization of an allergen, alliin lyase, from garlic (*Allium sativum*). *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan;113(1):161-8.
8. Yu CJ, Chiou SH, Lai WY, Chiang BL, Chow LP. Characterization of a novel allergen, a major IgE-binding protein from *Aspergillus flavus*, as an alkaline serine protease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 11;261(3):669-75.
9. Al Dahouk S, Nockler K, Scholz HC, Tomaso H, Bogumil R, Neubauer H. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. *J Immunol Methods*. 2006 Feb 20;309(1-2):34-47.
10. Kurupati P, Teh BK, Kumarasinghe G, Poh CL. Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. *Proteomics*. 2006 Feb;6(3):836-44.
11. Corti V, Cattaneo A, Bachi A, Rossi RE, Monasterolo G, Paolucci C, Burastero SE, Alessio M. Identification of grass pollen allergens by two-dimensional gel electrophoresis and serological screening. *Proteomics*. 2005 Feb;5(3):729-36.
12. Zhang F, Yu M, Weiland E, Morrissy C, Zhang N, Westbury H, Wang LF. Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library. *Arch Virol*. 2006 Jan;151(1):37-54. Epub 2005 Aug 26.

Figure legends

- Fig. 1 二維電泳分析LPC病毒株。三百毫克的LPC病毒蛋白，以pH3~10, 13 公分的strip進行第一次電泳，再以15% SDS-PAGE進行第二電泳，之後以Sypro Ruby dye染色。僅呈現代表性成果。紅圈處代表差異點。
- Fig. 2 二維電泳分析field strain 病毒株。三百毫克的field strain 病毒蛋白，以pH3~10, 13 公分的strip進行第一次電泳，再以15% SDS-PAGE進行第二電泳，之後以Sypro Ruby dye染色。僅呈現代表性成果。紅圈處代表差異點。
- Fig. 3 西方墨點法分析LPC病毒株。三百毫克的LPC病毒蛋白，以pH3~10, 13 公分的strip進行第一次電泳，再以15% SDS-PAGE進行第二電泳，之後轉置到PVDF薄膜，再以field strain-infected sera進行blotting。僅呈現代表性成果。紅圈處代表差異點。
- Fig. 4 西方墨點法分析field strain 病毒株。三百毫克的field strain 病毒蛋白，以pH 3~10, 13 公分的strip進行第一次電泳，再以15% SDS-PAGE進行第二電泳，之後轉置到PVDF薄膜，再以field strain-infected sera進行blotting。僅呈現代表性成果。紅圈處代表差異點。

Fig. 1

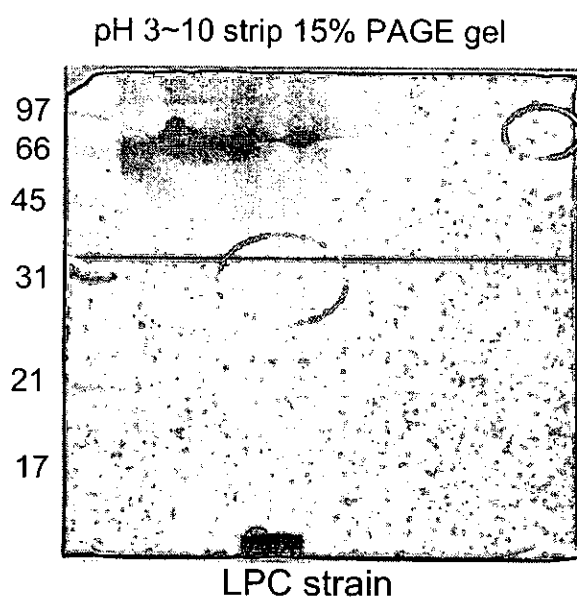


Fig. 2

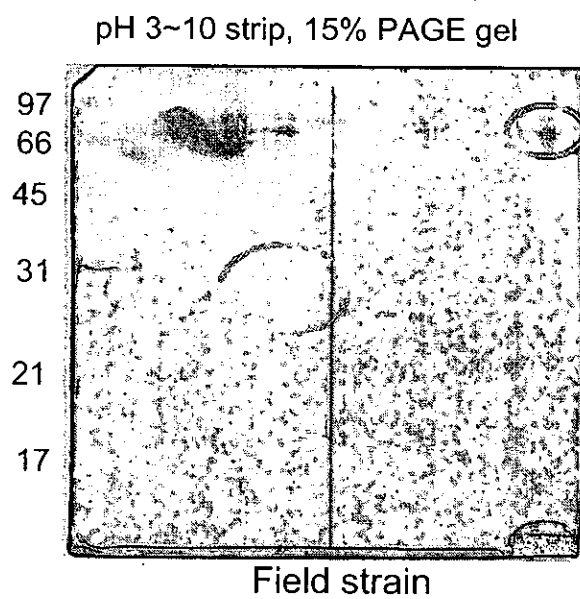
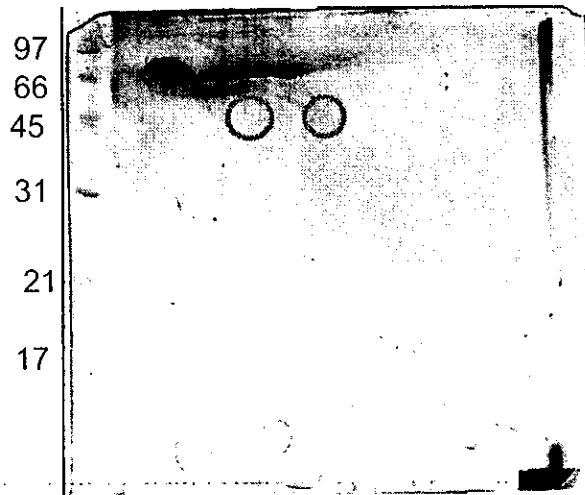


Fig. 3

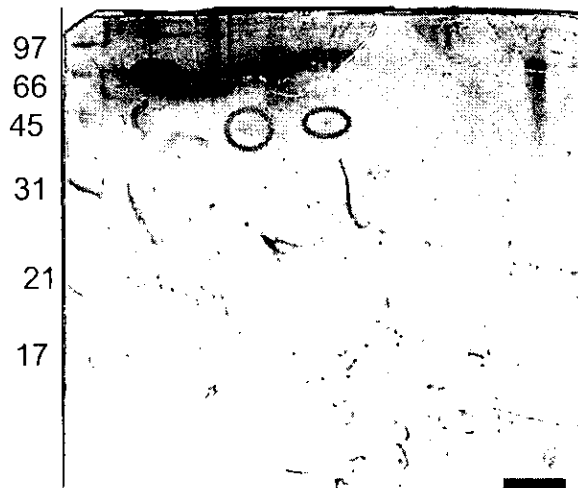
Blot with sera from field strain-infected swine



LPC strain

Fig. 4

Blot with sera from field strain-infected swine



Field strain