

豬水疱病病毒 VP1 及 VP2 蛋白之表現及分析

潘居祥*、陳姿菡、王明隆、洪鈴柱、王羣、于維玲、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 本試驗以原核系統表現豬水疱病毒結構蛋白，測試不同表現載體對於產製可溶性重組蛋白之影響，比較不同方式純化重組蛋白並應用 Indirect ELISA 方法測試 SVD 血清抗體。以 RT-PCR 方式增幅 SVDV 之 VP1 及 VP2 全長基因，將 RT-PCR 產物以 TA (TA cloning) 選殖方式植入 TOPO 載體，並以定序方式確認序列。將 VP1 及 VP2 標的基因分別次選殖入 pET28、pET32、SUMO、pCold 等四種不同表現載體中，經定序確認後質體分別轉形至 BL-21 (DE3) 菌株，以異丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 誘導後測試表現重組蛋白之水溶性，結果顯示，pCold 載體表現之重組蛋白可大幅提高蛋白質溶解度，其餘載體表現之重組蛋白皆以不可溶狀態的包涵體存在。重組蛋白經純化後以 Western blot 測試顯示可辨識 SVD 陽性豬血清，且 VP1 重組蛋白抗原性高於 VP2 蛋白。將表現之水溶性重組蛋白以市售不同廠牌 His-tag 融合蛋白質純化及膠體純化方式比較純化後重組蛋白之純度，結果顯示，以膠體純化方式所得之純度最高。將純化之 VP1 重組蛋白以 2.5 μ g/ml 濃度披覆於 96 孔微量盤，以 Indirect ELISA 方式測試 2 倍連續稀釋之陽性豬血清，可得到線性曲線。本法用於測試 6 支已知中和抗體力價之 SVD 參考血清，結果顯示 OD 值與中和抗體力價呈正相關。本法應用於送檢血清 SVD 抗體測試，可區別陽性與陰性血清，但檢測背景值較高。

關鍵字：豬水疱病、反轉錄聚合酶鏈反應、酵素連結免疫吸附法、病毒血清中和試驗。

緒言

豬水疱病 (Swine Vesicular Disease ; SVD) 是由豬水疱病病毒 (Swine Vesicular Disease virus ; SVDV) 引起的豬隻傳染性病毒性疾病，其特徵是皮膚出現水疱病變及繼發口、鼻和蹄的上皮糜爛。由於 SVD 所引起的臨床病變與口蹄疫及水疱性口炎極為相似，臨床外觀難以區別。雖然 SVD 不會造成豬隻致命性感染，由於與 FMD 之臨床外觀容易混淆，因此被世界動物衛生組織 (OIE) 歸類為必須通報的疾病，歐洲各國皆以撲殺及嚴格限制牲畜移動方式來控制本病 [9,11]。本病最早於 1966 年首次發生於義大利，1971 年香港，爾後相繼在歐洲諸多國家及亞洲地區之日本、韓國、澳門、寮國、黎巴嫩和台灣等地發生。

豬水疱病常有不顯性感染發生，近年來義大利大多數病例並非依臨床症狀而是經由血清抗體的篩檢發現，據此推測實際發生 SVD 的國家可能要比正式向 OIE 提報的國家還多 [2,10]。

SVD 抗原性與人類腸病毒中的克沙奇病毒 B5 群 (Coxsackie virus B5 group) 相似性極高，採用免疫血清學方法難以區別 [4]。從多株抗體研究顯示，SVDV 不同分離株間之抗原性差異性非常小，因此一般認為 SVDV 只有一種血清型 [8]。然而藉由單株抗體反應模式，或利用病毒結構蛋白 VP1 基因核酸序列分析結果，可將 SVDV 分為四種基因群，而不同基因群之間病毒的抗原性及毒力會有所差異 [10]。根據 OIE 陸生動物衛生法典所載，抗體檢測是診斷本病的重要方

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

法，亦是撲滅本病的重要工具[11]。利用 ELISA 方法檢測 SVD 抗體已有多篇報告[1,3,5,7]，國內檢測 SVD 抗體係採用進口試劑套組，除了售價昂貴之外，用於田間血清檢測時常會出現偽陽性，常造成抗體檢測判定上的困難，有必要開發適合台灣本土型 SVD 使用的 ELISA 檢測方法。

材料及方法

病毒株選擇

豬水疱病病毒核酸序列分析：自 NCBI 網站基因庫 (GenBank) 下載有關 SVD 病毒之 VP1 及 VP2 結構蛋白核酸序列，並定序國內 SVD 病毒之 VP1 及 VP2 結構蛋白，以 DNASTAR (Madison, Wisconsin, USA) 軟體比較分析 20 株國內外病毒株核酸序列差異，作為設計表達重組蛋白所需引子之合適病毒株序列。

引子設計及 RT-PCR 增幅 VP1 及 VP2 基因

針對 VP1 及 VP2 結構蛋白基因設計特异性引子，並於引子 5' 端加入 BamHI 及 HindIII 限制酶切位，以單一步驟 (One-step) RT-PCR 方式分別增幅 VP1 及 VP2 全長基因，並以 2% 洋菜膠進行電泳分析。

VP1 及 VP2 基因分子選殖

將 VP1 及 VP2 基因之 RT-PCR 產物經 2% 洋菜膠電泳後於 UV 燈下以刀片切取反應條帶，將切下之膠體以 Qiagen 膠體純化套組進行純化，純化後之 RT-PCR 產物以分子選殖套組 (TOPO TA Cloning Kit) 將 VP1 及 VP2 基因選殖到 YT&A 載體 (Vector)。以 Colony PCR 方式篩選陽性選殖株，陽性選殖株以 DNA 核酸定序方式確認核酸序列正確。

不同表現質體 (Plasmid) 之構築

將選殖至 YT&A 質體之全長 VP1 及 VP2 基因以限制酶 BamHI 及 HindIII 切下後分別次選殖至 pET28、pET32、SUMO、pCold 等 4 種表現載體。每一種質體皆以 Colony PCR 方式篩選陽性選殖株，陽性選殖株以 DNA 定序方式確認核酸序列。構築完成的表現質體先轉形 (Transformation) 至 DH5 α 勝任

細胞進行量產及質體純化，再將純化之 4 種帶有標的基因之表現質體以化學法轉形至大腸桿菌 BL-21 (DE3) 株表現重組蛋白。

重組蛋白之表現及純化

將含有 VP1 及 VP2 片段之 pET28、pET32、SUMO、pCold 等表現質體轉形至 BL-21 (DE3) 菌株，再分別培養於含有 ampicillin 抗生素之 LB 培養基，於 37°C 培養箱中震盪培養至 OD₆₀₀ 值介於 0.5~0.6 之間。加入異丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-galactopyranoside; IPTG) 誘導 4 小時，將其菌液離心下來放置於 -80°C 冰箱隔夜。將菌塊 (pellet) 從冰箱取出加入 500 μ l 磷酸緩衝液 phosphate buffer saline (PBS) 回溶後用超音波細胞粉碎機 (sonicator) 於 4°C 下破菌，溶菌物 (lysate) 經離心後取其上清液及沉澱物 (ppt)。利用市售不同廠牌 Ni-NTA 快速純化套組及膠體分子篩 (gel filtration) 依其操作方法，將 VP1 及 VP2 蛋白質純化出來，以蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE assay) 測試是否為可溶性重組蛋白。

重組蛋白 SDS-PAGE 及西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay)

將純化的 VP1 及 VP2 蛋白質用 12% SDS-PAGE，以 Bio-Rad 蛋白質迷你電泳槽跑膠並用 Coomassie blue 染色或轉印到硝化纖維膜 (Nitrocellulose filter membrane) 進一步作西方墨點轉漬法。將硝化纖維膜用含有 1% Casein 的磷酸鹽緩衝液 (Phosphate Buffered Saline Tween 20; PBST) 阻斷 1 小時後，再用 PBST 洗 3 次。利用 anti-His-Tag 單株抗體當作一級抗體 (1,000x 稀釋) 反應 1 小時，用 PBST 洗 3 次，再用標有 Horseradish peroxidase (HRP-IgG) 山羊抗鼠抗體作為二級抗體 (2,500x 稀釋) 反應 1 小時，二抗反應完後再以 Tetramethylbenzidine (TMB) 呈色。

重組蛋白之抗原性分析

以市售 SVDV 單株及多株抗體及 SVD 陽性豬血清，分別以西方墨點轉漬分析法[12]測試 SVDV VP1 及 VP2 重組蛋白之抗原性。

可溶性重組蛋白產量之提高

將構築於 pET28、pET32、SUMO、pCold 四種載體之表現質體轉形至大腸桿菌 BL-21 (DE3) 株後進行重組蛋白之表現，採用不同誘導條件及反應溫度提高可溶性重組蛋白之產量。

Indirect ELISA 抗體檢測方法

將純化之 VP1 及 VP2 重組蛋白以 2.5ug/ml 濃度披覆於 ELISA 抗原盤，以 1% casein 進行 blocking 一小時，使用單株或多株抗體作用一小時，PBST 清洗三次後加入與一次抗體相對應標記 HRP 二次抗體於 37°C 反應 30 分鐘，以 PBS T 清洗三次後用乾抗原盤，最後加入呈色劑，經 20 分鐘後以 OD₄₀₅ 波長讀取 OD 值。

SVD 陽性豬血清測試

取出高力價 SVD 陽性豬血清進行 2 倍連續稀釋，以 Indirect ELISA 方式測試線性關性。另將田間收集及國外進口豬隻採集之血清樣品進行 Indirect ELISA 測試

結果

核酸序列分析及引子設計

將收集之 20 株 SVD 病毒核酸序列截取 VP1 及 VP2 基因分別進行核酸序列分析，結果選定 SVDV 台灣株 (SVD-TW-99) 為本試驗之標的株。針對 VP1 及 VP2 基因設計可增幅之引子並加入限制酶切位 BamHI 及 HindIII，序列如下：

1.SVD-VP1-BamHI-F

5'-GGATCCGGACCCCCAGGGGAG-3'

2.SVD-VP1-HindIII-R

5'-AAGCTTGGTGGTCCTCATGGTTGTTAT-3'

3.SVD-VP2-BamHI-F

5'-GGATCCTCCCCATCAGCAGAGGAGTG-3'

4.SVD-VP2-HindIII-F

5'-AAGCTTTTGTGGTGGCAGGCTAGACGC-3'

反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 增幅 VP1 及 VP2 基因

針對豬水疱病毒全長 VP1 及 VP2 基因設計之引

子，以 SVDV 臺灣株進行 RT-PCR 增幅，並以 2% 洋菜膠進行電泳分析，得到產物長度 VP1 基因為 858 bp，VP2 基因為 759 bp (圖 1)。

VP1 及 VP2 基因選殖

將 RT-PCR 產物以 T-Acloning 方式選殖入 TOPO 載體，將選殖好之質體轉殖於大腸菌內，經 Colony PCR 確認後抽取質體，經定序反應確認完成 VP1 及 VP2 兩種質體。

VP1 及 VP2 基因次選殖至 pET 表現載體

以 Bam HI 及 Hind III 限制酶分別將 VP1 及 VP2 基因自 TOPO 載體切下後次選殖到 pET 表現載體，並轉形至 DH5 α 勝任細胞，以 colony PCR 方法篩選確定選殖成功 (圖 2)。

pET 表現質體之轉形及誘導

含標的基因之 pET28a 表現質體轉形於 BL-21 表現宿主，經 1mM IPTG 誘導表現 VP1 及 VP2 重組蛋白，破菌後將上清液及沉澱分別以 SDS-PAGE 跑膠後以 Coomassie blue 染色。結果顯示 pET28a 表現質體表現之 VP1 及 VP2 重組蛋白皆形成不溶性的包涵體 (inclusion bodies)，由於 pET28a 載體不含融合蛋白 (fusion protein)，其表現的重組蛋白分子量約 32 kDa (VP1) 及 29 kDa (VP2)，與預期相符 (圖 3)。

VP1 及 VP2 基因次選殖至 pET32a 表現質體及誘導表現

將 VP1 及 VP2 基因次選殖至 pET32a 表現質體，經 IPTG 誘導表現之重組蛋白以超音波破菌，經 SDS-PAGE 跑膠及染色，結果顯示 pET32a 表現質體表現之 VP1 及 VP2 重組蛋白皆為不可溶的包涵體。由於 pET32a 帶有融合蛋白之分子量為 18 kDa，因此整體 VP1 及 VP2 重組蛋白分子量分別為 50 kDa 及 47 kDa 與預期相符 (圖 4)。

VP1 及 VP2 基因次選殖至 pCold 及 SUMO 表現質體及誘導表現

將 VP1 及 VP2 基因分別次選殖至 pCold 及 SUMO 等 2 種載體，並誘導表現重組蛋白，經破菌後

以 SDS-PAGE 跑膠及染色。結果顯示 SUMO 質體表現之 VP1 及 VP2 重組蛋白形成不溶性的包涵體，只有 pCold 質體表現之 VP1 及 VP2 重組蛋白為可溶性蛋白（圖 5）。由於 pCold 質體本身帶有融合蛋白分子量為 48 kDa，因此整體 VP1 及 VP2 重組蛋白分子量分別為 80 kDa 及 77 kDa。SUMO 質體本身帶有融合蛋白分子量為 12 kDa，因此整體 VP1 及 VP2 重組蛋白分子量分別為 44 kDa 及 41 kDa 與預期相符（圖 5），比較 pCold 及 SUMO 兩種質體對於 VP1 及 VP2 重組蛋白產量影響，以 pCold 質體之產量最大。

VP1 重組蛋白之純化

以 pCold 質體表現之可溶性 VP1 重組蛋白，菌體以超音波擊碎法破菌後，以 Ni-NTA 管柱純化重組蛋白，再以 100-250 mM 不同濃度之 imidazole 沖洗並分管收集後跑 SDS-PAGE 及染色，結果顯示，Ni-NTA 管柱純化後之重組蛋白於 80 kDa 主要條帶（Major band）旁出現多條雜帶（圖 6）。

以 Bio-GelP100 膠體分子篩（Gel filtration）純化 pCold-VP1 重組蛋白

pCold 質體表現之可溶性 VP1 重組蛋白，菌體以超音波擊碎法破菌後，先以 Ni-NTA 管柱純化，再以低壓層析系統（BioLogic LP System）配合 Bio-Gel P100 膠體分子篩（Gel filtration）純化 pCold-VP1 重組蛋白，經 Fraction collector 分管收集後進行 SDS-PAGE 電泳，結果顯示重組蛋白呈現斷裂現象（圖 7）。

聚丙烯醯胺膠體電泳及負染色切膠體純化

菌體以超音波擊碎法破菌後取上清液直接以聚丙烯醯胺膠體（Polyacrylamide gels）電泳後，以 VisPRO 5 minutes Protein Stain Kit 將 SDS-PAGE 進行負染色（Negative staining），以刀片切下未著色之 pCold-VP1 重組蛋白。將切下之膠體放入膠體電泳槽（Model 422 Electro-Eluter, Bio-Rad），以固定電流（每根玻璃管提供 8-10 mA 的電流），回收 3-5 小時，小心將回收槽取出，從玻璃管下方移除白色套筒，將膜杯內的回收液移至新的離心管（約 400 μ l），將回收液進行 SDS-PAGE 電泳，結果顯示以本方法純

化蛋白之純度最高，主要條帶出現在 80 kDa 處，其他雜帶已被消除（圖 8）。

膠體純化之 VP1 重組蛋白進行 Western blot 分析

膠體純化之 VP1 重組蛋白以抗 SVDV 豬隻多株抗體以 100X 稀釋後進行 Western Blot 染色圖，結果顯示膠體純化之純化效果最佳，亦不影響重組蛋白之抗原性。將膠體純化之 VP1 重組蛋白以 SVD 陽性豬血清進行 Western blot 試驗，顯示純化後之 VP1 重組蛋白抗原性佳（圖 9）。

以 SVD 陽性血清連續稀釋比較 VP1 及 VP2 重組蛋白抗原性

將高力價之 SVD 陽性豬血清連續稀釋並與分別披覆（Coating）VP1 及 VP2 重組蛋白之抗原盤以 Indirect ELISA 法測試其抗原性，結果顯示，同一血清測得 VP1 之 OD 值大於 VP2。不同純化方式所得重組蛋白以 SDS-PAGE 及 Western blot 方式檢視，顯示以切膠純化方式所得之純度最高。將純化之 VP1 重組蛋白以 2.5 μ g/ml 濃度披覆於 ELISA 抗原盤，以 Indirect ELISA 方式測試連續稀釋之 SVD 陽性豬血清，可得到線性曲線（圖 10）。

以 Indirect ELISA 法測試 SVD 參考血清

應用 Indirect ELISA 法測試 2 支 FMD 陽性豬血清、2 支 SVD 陽性豬血清、1 隻 SPF 豬血清及 6 支國外進口之 SVD 參考血清（RS1 至 RS6 中和抗體力價分別為 0.78、2.55、1.53、1.6、2.04、1.95），結果顯示 6 支 SVD 參考血清之 OD 值與中和抗體力價呈現正相關（圖 11）。

進口豬隻血清樣品測試 SVD 抗體

272 個進口豬隻採集之血清樣品以 25 倍稀釋後進行 Indirect ELISA 法測試 SVD 抗體，結果顯示，雖然檢測背景值較高，大致尚可區別陽性與陰性血清，OD 值 0.8 以下判定為陰性，OD 值 0.8 以上判定為陽性（圖 12）。

討論

SVD 病毒外層係由 VP1、VP2、VP3 及 VP4 等

4 個外鞘蛋白 (Capsid protein) 所構成。其中以 VP1 蛋白抗原性最強，由於 VP1 蛋白較無轉譯後修飾問題，因此採用原核系統表現 VP1 重組蛋白可得大量重組蛋白且可保有良好的抗原性。使用於 ELISA 試驗之重組蛋白若為可溶性蛋白將有較佳之抗原性，因此重組蛋白之表現皆以可溶性蛋白為考量。市售表現質體常會加入融合蛋白以提高重組蛋白的溶解度，融合蛋白分子量越大，幫助重組蛋白溶解的效果越好，本實驗測試 pET28、pET32、SUMO、pCold 等不同表現載體以尋求可溶性重組蛋白之產製，結果顯示，以 pCold 載體表現 VP1 可得水溶性重組蛋白 (圖 5)。pCold 載體表現重組蛋白會出現 4-8 kDa 大小的融合蛋白，因而提高重組蛋白的水溶性。比較 pCold 及 SUMO 兩種質體對於 VP1 及 VP2 重組蛋白產量影響，以 pCold 質體產生的重組蛋白產物量最多 (圖 5)。由於 SVD 結構蛋白 VP1 是主要抗原，VP2 是次要抗原 [10]，Indirect ELISA 結果顯示 VP1 之 OD 值高於 VP2，表示 VP1 抗原性較高。

重組蛋白純化之潔淨度關係著 ELISA 試驗之背景值，純度越高之重組蛋白越能降低實驗之背景值，本實驗經由切膠純化方式可得最高純度之蛋白 (圖 8) 以 Western Blot 染色法測試抗原性，結果顯示切膠純化不會影響其抗原性，VP1 重組蛋白與陽性 SVD 血

清有良好反應 (圖 9)。將純化之 VP1 重組蛋白以 2.5 μ g/ml 濃度披覆於 ELISA 盤，以 Indirect ELISA 方式測試連續稀釋之 SVD 陽性豬血清，可得到線性曲線 (圖 10)。同一血清測得 VP1 之 OD 值大於 VP2，表示 VP1 抗原性大於 VP2。本方法應用於測試 6 支 SVD 參考血清，OD 值與中和抗體力價呈正相關。本法應用送檢血清 SVD 抗體測試，呈現背景值較高，若要降低 ELISA 的背景值，則要利用單株抗體發展競爭型 ELISA 方式來降低背景值。

SVD 血清學診斷時常會看到豬群中出現少數 SVD 抗體陽性豬隻，但卻又無任何臨床症狀，不曾接觸過發病豬，亦無疾病史。此現象稱為單一反應 (Singleton Reactor; SR) [6]。目前對於田間血清及進口動物血清執行血清學檢測 SVD 抗體時常會碰到 SR 血清的出現，引起 SR 反應的原因尚未清楚，可能單純只是血清中含有高力價的非特異性抗體，特別是 IgM 的存在造成偽陽性。亦有可能豬隻被其他具有與 SVDV 相同抗原決定位 (epitopes) 的病毒所感染，也可能是 Coxsackie B5 病毒感染引起的抗體交叉反應。重組蛋白的純度影響 ELISA 試驗之背景值，為了降低非特異性反應，提高 ELISA 試驗之專一性，因此本試驗採用切膠純化方式來提高重組蛋白之純度，降低 ELISA 試驗之背景值。

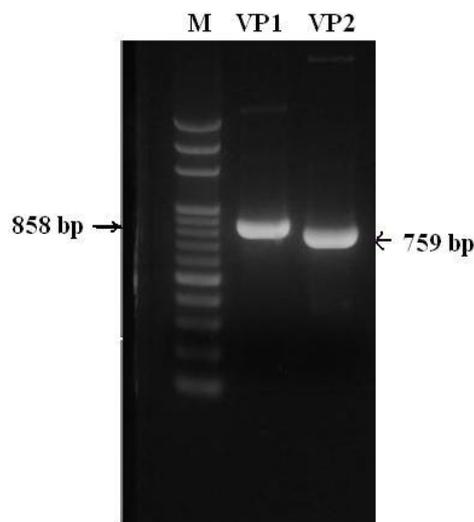


圖 1、針對豬水疱病毒全長 VP1 及 VP2 基因設計之引子，以 SVDV 臺灣株進行 RT-PCR 增幅，得到 RT-PCR 產物長度 VP1 為 858 bp，VP2 為 759 bp，M:100 bp DNA 梯型標誌。

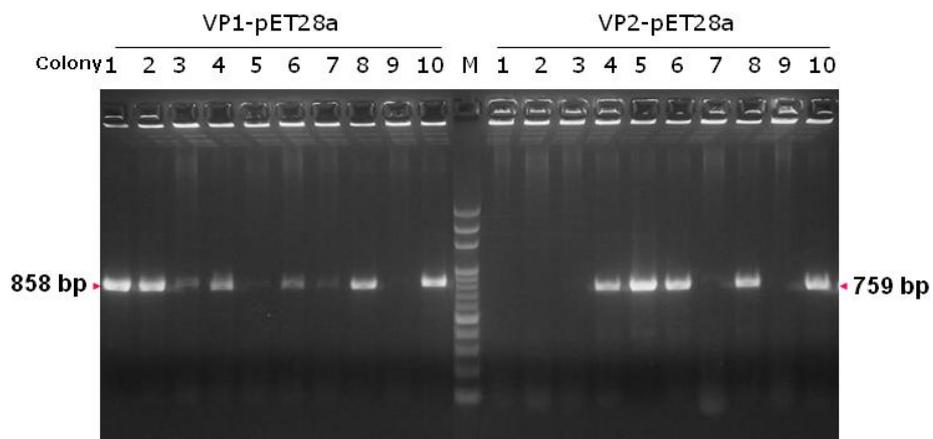


圖 2、以 colony PCR 方法篩選確定 VP1 (左邊 1-10 行) 及 VP2 (右邊 1-10 行) 選殖成功，M:100 bp DNA 梯型標誌。

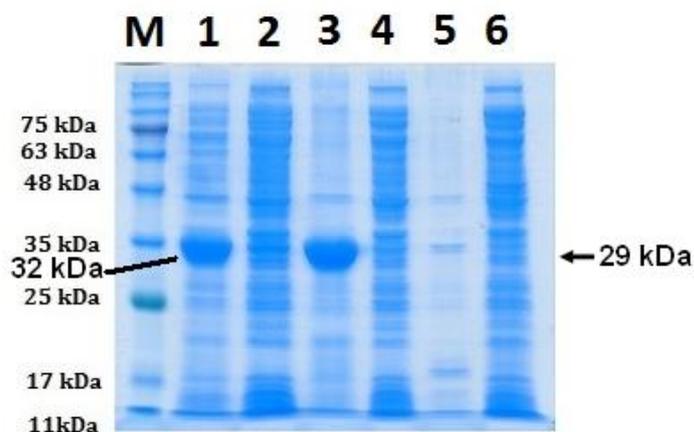


圖 3、pET28a 質體轉形至 BL-21 表現宿主，以 IPTG 誘導表現 VP1 及 VP2 重組蛋白經破菌離心後，將上清液及沉澱分別以 SDS-PAGE 跑膠後以 Coomassie blue 染色結果。

1. SVD-VP1-pET28a 之不可溶沉澱物。
2. SVD-VP1-pET28a 之可溶上清液。
3. SVD-VP2-pET28a 之不可溶沉澱物。
4. SVD-VP2-pET28a 之可溶上清液。
5. pET28a vector only 質體對照組之不可溶沉澱物。
6. pET28a vector only 質體對照組之可溶上清液。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌。

豬水疱病病毒 VP1 及 VP2 蛋白之表現及分析

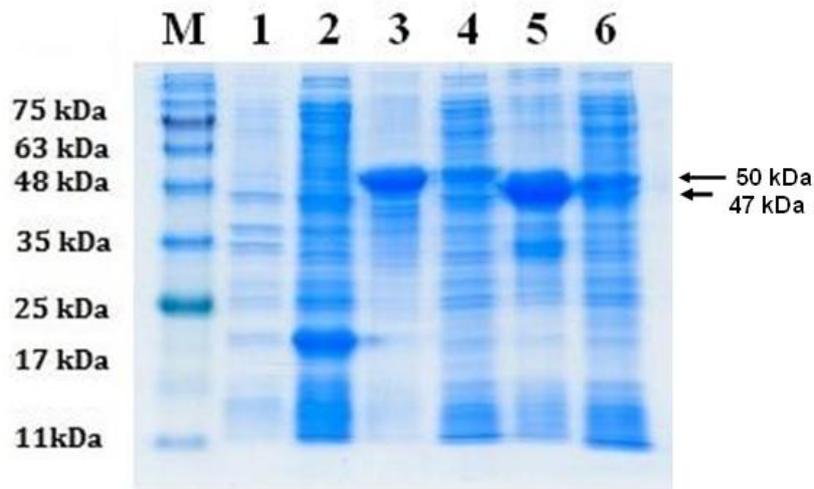


圖 4、pET32a 表現質體轉形於 BL-21 表現宿主，經 IPTG 誘導表現 VP1 及 VP2 重組蛋白，經破菌離心後將上清液及沉澱分別以 SDS-PAGE 跑膠後染色結果。

1. PET32a vector only 質體對照組之不可溶沉澱物
2. PET32a vector only 質體對照組之可溶上清液
3. SVD-VP1-PET32a 之不可溶沉澱物。
4. SVD-VP1-PET32a 之可溶上清液。
5. SVD-VP2-PET32a 之不可溶沉澱物。
6. SVD-VP2-PET32a 之可溶上清液。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌

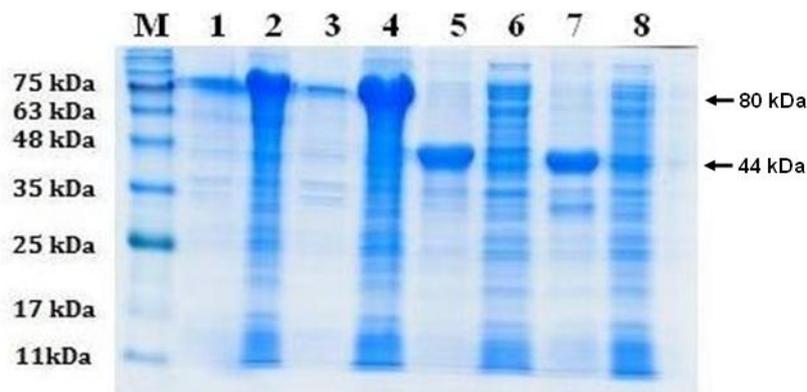


圖 5、將 VP1 及 VP2 基因分別次選殖至 pCol d 及 SUMO 質體，並誘導表現重組蛋白，經破菌離心後以 SDS-PAGE 跑膠及染色。

1. SVD-VP1-pCol d 之不可溶沉澱物。
2. SVD-VP1-pCol d 之可溶上清液。
3. SVD-VP2-pCol d 之不可溶沉澱物。
4. SVD-VP2-pCol d 之可溶上清液。
5. SVD-VP1-SUMO 之不可溶沉澱物。
6. SVD-VP1-SUMO 之可溶上清液。
7. SVD-VP2-SUMO 之不可溶沉澱物。
8. SVD-VP2-SUMO 之可溶上清液。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌

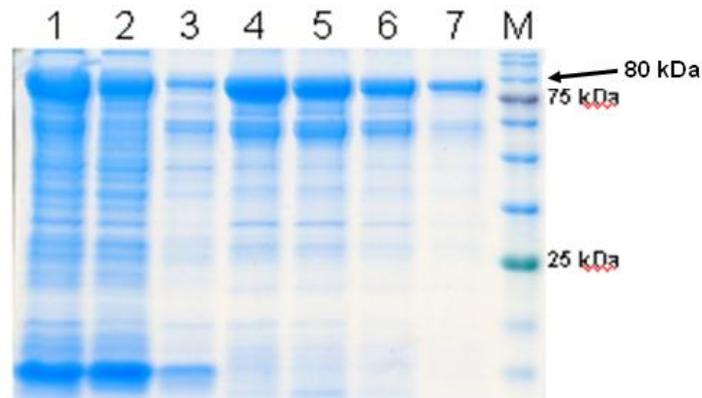


圖 6、pCold 質體表現之可溶性 VP1 重組蛋白，以 Ni-NTA 管柱純化重組蛋白，以 100-250 mM 不同濃度之 imidazole 沖洗並分管收集後跑 SDS-PAGE 圖。

1. 細菌全菌裂解物。
2. 通過 Ni-NTA 管柱之液體。
3. PBS 清洗。
4. 以 100mM imidazole 清洗第 1 次引流物。
5. 以 100mM imidazole 清洗第 2 次引流物。
6. 以 150mM imidazole 清洗第 3 次引流物。
7. 以 250mM imidazole 清洗第 4 次引流物。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌。

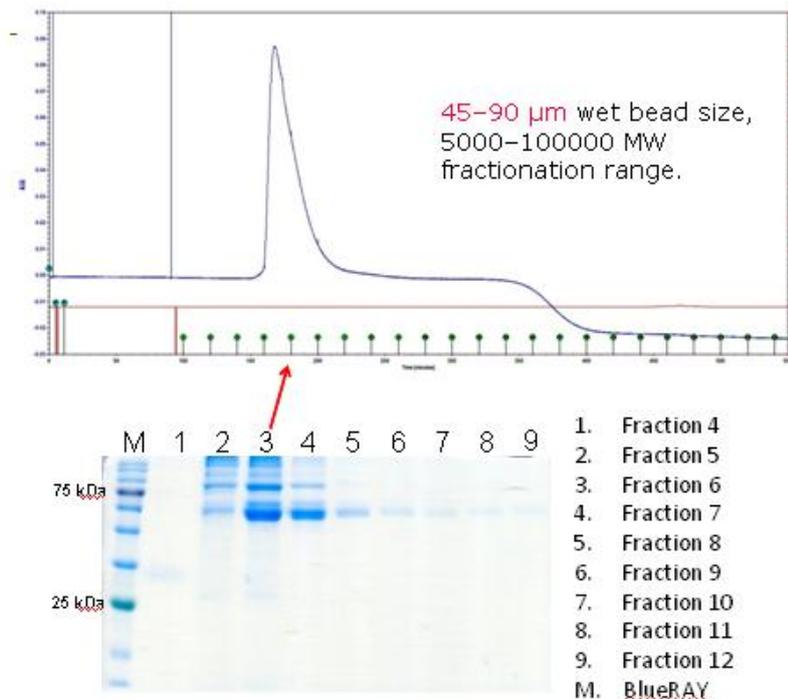


圖 7、pCold 質體表現之可溶性 VP1 重組蛋白，以低壓層析系統 (BioLogic LP System) 配合 Bio-Gel P100 膠體分子篩 (Gel filtration) 純化 pCold-VP1 重組蛋白。

豬水疱病病毒 VP1 及 VP2 蛋白之表現及分析

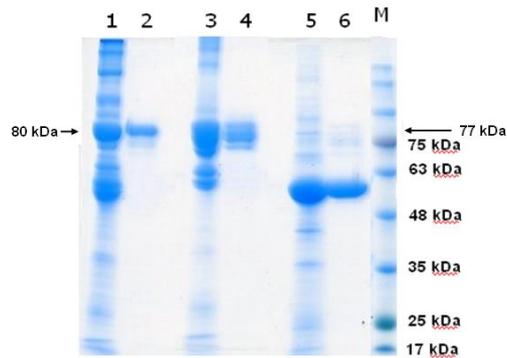


圖 8、聚丙烯醯胺膠體電泳及切膠體純化 VP1 重組蛋白。

1. Vp1-pCold 全菌裂解物。
2. Vp1-pCold 膠體純化。
3. Vp2-pCold 全菌裂解物。
4. Vp2-pCold 膠體純化。
5. pCold vector only 全菌裂解物。
6. pCold vector only 膠體純化。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌。

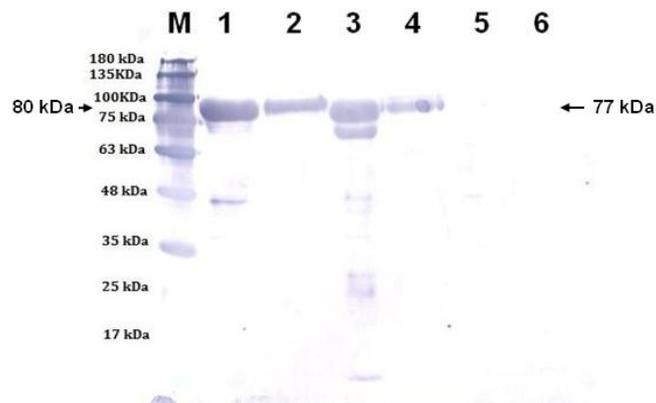


圖 9、膠體純化之 VP1 重組蛋白 Western blot 分析。

- M. BlueRAY protein marker
1. VP1-pCold 全菌裂解物。
2. VP1-pCold 膠體純化。
3. VP2-pCold 全菌裂解物。
4. VP2-pCold 膠體純化。
5. pCold vector only 全菌裂解物。
6. pCold vector only 膠體純化。
- M. Blue RAY 蛋白質分子量標誌。

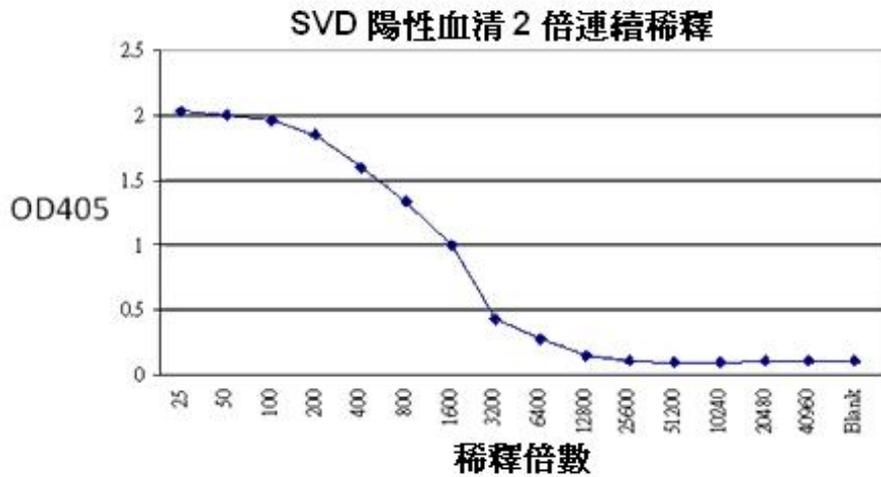


圖 10、以 VP1 重組蛋白披覆 96 孔微量盤，以 Indirect ELISA 法測試 2 倍連續稀釋之高力價 SVD 陽性豬血清。

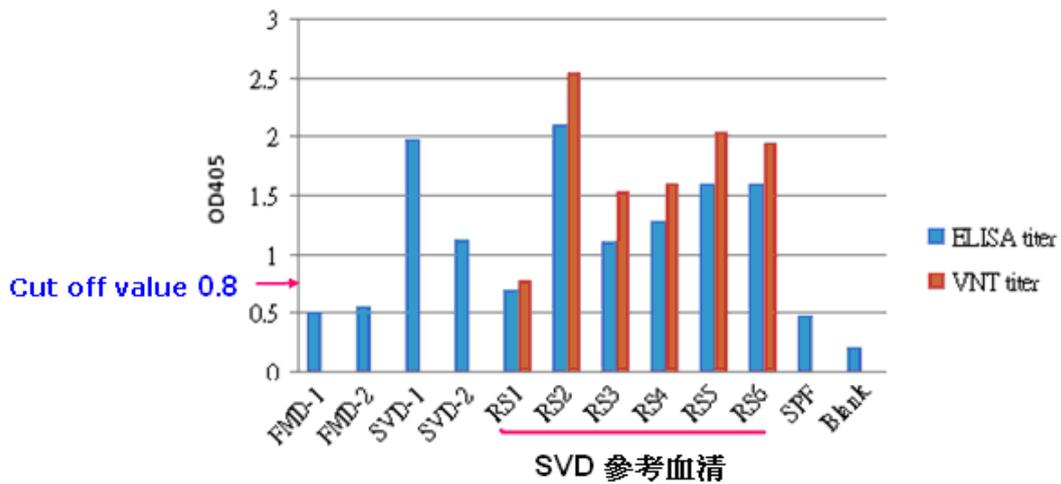


圖 11、以 Indirect ELISA 法測試 SVD 參考血清 (RS1 至 RS6 中和抗體力價分別為 0.78, 2.55、1.53、1.6、2.04、1.95)。

RS1：陰性對照血清；RS2：強陽性對照血清；RS3：弱陽性血清；RS4：弱陽性血清；RS5：豬隻感染初期之弱陽性血清；RS6：豬隻感染初期之弱陽性血清。

豬水疱病病毒 VP1 及 VP2 蛋白之表現及分析

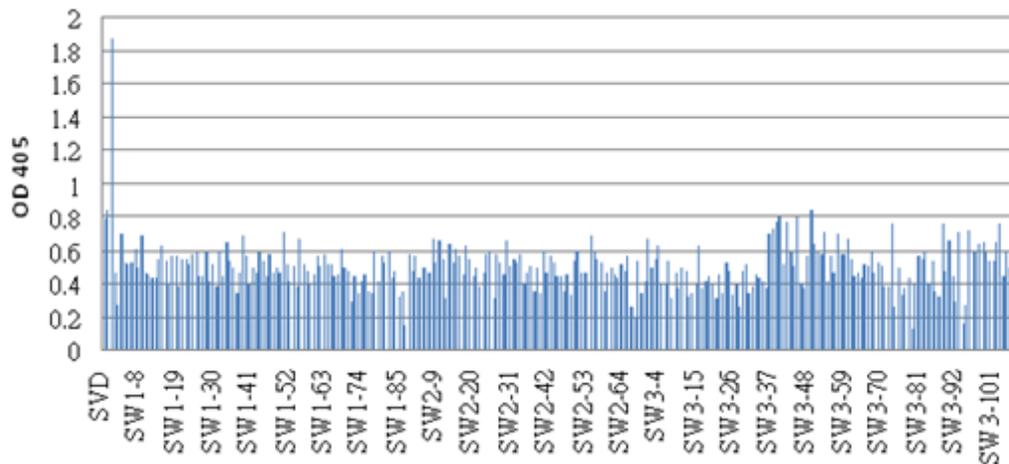


圖 12、272 件進口輸入豬隻採集之血清樣品以 Indirect ELISA 法測試 SVD 抗體結果。

參考文獻

1. Armstrong RM, Barnett IT. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantification of antibodies against swine vesicular disease virus (SVDV). *J Virol Methods*. 25 (1) :71-79, 1989.
2. Bellini S, Santucci U, Zanardi G, Brocchi E, Marabelli R. Swine vesicular disease surveillance and eradication activities in Italy. *Rev Sci Tech*. Dec;26 (3) : 585-593, 2007.
3. Brocchi E, Berlinzani A, Gamba D, Desimone F. Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *J Virol Methods*. 52, 155-167, 1995.
4. Brown F, Talbot P, Burrows R. Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to coxsackie B5 virus. *Nature (London)* . 245:315-316, 1973.
5. Chenard G, Bloemraad M, Kramps, JA, Terpstra C, Dekker A. Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J Virol Methods*. 75:105 - 112, 1998.
6. De Clercq K. Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J Virol Methods*. 70:7 - 18, 1998.
7. Ferris NP, Powell H, Donaldson AI. Use of pre-coated immunoplates and freeze-dried reagents for diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods*. 19:197 - 206, 1988.
8. Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E. The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J Virol*. 75 (2) : 1044-1047, 2001.
9. Lin F, Kitching RP. Swine vesicular disease: an overview. *Vet J*. Nov;160 (3) :192-201, 2000.
10. Lubroth J, Rodriguez L, Dekker A. Vesicular Diseases. In: *Diseases of Swine*. 9th edn. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Alaire and D. J. Taylor. Ninth Edition. Chapter 31. pp. 517-535. Blackwell, Publishing. 2006.
11. World Organization for Animal Health (OIE) . Chapter 2.8.9. Swine vesicular disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th Edition. OIE, Paris, France, 2013.

Expression and analysis of recombinant VP1 and VP2 capsid protein of swine vesicular disease virus

CH Pan*, TH Chen, MK Wang, LC Hung, C Wang, WL Yu, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The purpose of this study was to express the structure proteins of SVDV and to compare different expression vectors for the production of soluble prokaryotic recombinant proteins. Different purification systems were used to purify the recombinant proteins and indirect ELISA was used to test SVD positive pig sera. Full length of VP1 and VP2 genes of SVDV were amplified by RT-PCR. The RT-PCR amplicons were cloned into a TOPO vector using TA cloning kit; correct clones were confirmed by sequencing. The target genes were subcloned into the pET28, pET32, SUMO and pCold expression vectors. The expression plasmids were transformed into host cell of BL-21 (DE3), then IPTG was used to induce the expression of cloned genes. The solubility of recombinant proteins was tested after induction. Results showed that only pCold vector expressed a soluble protein. His tag protein purification and gel extraction by slicing were used to compare the purity of recombinant proteins. Results demonstrated that gel slicing could obtain a high purity recombinant protein. The ELISA plates were coated with purified recombinant VP1 protein and indirect ELISA method was used to test serial dilutions of pig sera which were obtained from the experimental SVDV infected pigs. Results revealed that linear curve could be observed in the indirect ELISA assay. A panel of standardized SVD reference pig sera was also tested by indirect ELISA. Results showed that high positive correlation was observed between ELISA test and virus neutralization test (VNT).

Keywords: *swine vesicular disease (SVD), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), virus neutralization test (VNT).*