

26-4

猪瘟病毒單源抗體診斷試劑之研製

劉培柏¹ 黃天祥¹ 劉宏仁¹ 潘居祥¹ 張文發²

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 台灣養豬科學研究所

猪瘟病毒A 76株以PK-15猪腎株化細胞增殖後，以蔗糖梯度密度離心及超高速離心法製備抗原，免疫Balb/c小白鼠，取小白鼠的脾臟細胞和NS-1骨髓瘤細胞融合，用間接螢光標示抗體染色（IFA）法篩選出一株融合瘤細胞A 76 # 5株。A 76 # 5融合瘤細胞所分泌的單源抗體，以IFA法可用於診斷感染ALD株猪瘟強毒猪隻扁桃腺冷凍切片，但對接種LPC株病毒的兔單層細胞，或接種A 76株病毒的PK-15株化細胞染色試驗，於細胞核呈現顆粒狀螢光，原因不明。應用此株單源抗體，以免疫過氧化氫酶單層細胞分析（IPMA）法，雖可檢出細胞質中的猪瘟病毒抗原，但無法區別A 76株或LPC株病毒抗原。

猪瘟病毒目前歸類於披衣病毒科（Togaviridae）之瘟疫病毒屬（Pestivirus）（Mattews 1982，Westaway等1985）。其抗原性（Darbyshire 1960，Mengeling等1963）及結構上（Enzmann和Weiland 1978）和牛病毒性下痢病毒類似。

以免疫螢光試驗（Immunofluorescence test, IFT）（Ressang和Den Boer, 1967）使用猪瘟高度免疫血清用於診斷感染猪瘟病毒之培養細胞及塗抹片，發現其無法分辨野外猪瘟病毒，中國株猪瘟病毒及牛病毒性下痢病毒。由於鑑別診斷費時且需使用動物接種，頗

不經濟。對猪瘟病毒抗原決定位（Antigenic determinants）有特異性的單源抗體（Monoclonal antibody）將可用於解決此難題，對猪瘟之驗室診斷為一利器。

本試驗的目的為培養一具有製造猪瘟單源抗體的融合瘤細胞，供予研製猪瘟之診斷試劑。

材料與方法

一病毒株：猪瘟強毒A 76株，該病毒供為END法測定猪瘟中和抗體之用。自日本家畜衛生試驗場分讓。

二細胞株：PK-15猪腎株化細胞，供為A 76

株病毒增殖之用。

三、單源抗體製備法：

1. 豬瘟病毒抗原之製備：以 PK-15 株化細胞增殖的 A76 株病毒，用 Enzmann 及 Weiland (1978) 報告的方法純化。收集的病毒液，經以 11,325 xg 離心 40 分鐘。取上清液，用 20% 蔗糖液為墊底，90,000 xg，離心 3 小時，取沉澱，用 TEN 緩衝液 (0.02 M Tris-HCl, pH8.4, 加 0.5 mM EDTA 和 0.1 M NaCl) 溶解，再以 15 ~ 45 % 蔗糖梯度密度離心純化 (150,000 xg, 3 小時)。抽取病毒層之溶液，置透析膜內，再以 TEN 緩衝液透析 24 小時，供為病毒抗原。以免隻增殖的 LPC 株病毒，則以感染之兔脾臟，用 TEN 緩衝液作成乳劑，經 11,325 xg 離心 40 分鐘，取上清液，加入 PEG-6000 (8%)，於 4 °C 攪拌 24 小時，取沉澱物，加入原體積 1/20 的 TEN 緩衝液，使其溶解。再以同上之蔗糖梯度密度離心及透析處理，製備病毒抗原。
2. 病毒抗原免疫 Balb/c 小白鼠：將 1. 製備的病毒抗原和等量的福氏完全佐劑混合，以 0.5 ml 皮下注射 5 週齡的小白鼠，每隔 2 週注射一次，第 4 次則直接取抗原 0.1 ml 由尾靜脈注射，1 週後取脾臟供為融合瘤製備之用。
3. 融合瘤之製備：用注射針筒，以不含血清的 RPMI-1640 培養液 (Flow, 美製)，將脾臟細胞沖洗出來，以骨髓瘤細胞 (NS-1) 脾臟細胞 = 1:1 比例混合，緩緩加入 PEG1500 (Boehringer Mannheim, 西德製)，並混合 30 秒，再置 37°C 水浴中 90 秒，最後加入不含血清之 RPMI-1640 培養液，於 37°C 中 5 分鐘，再以低速離心，取沉澱細胞，加入含 HAT (Boehringer Mannheim, 西德製) 試劑及 15 % 胎牛血清 (Gibco, 美製) 的 RPMI-1640 培養液，使細胞呈 5×10^5 個/ml 之懸浮液。分裝於 96 孔微量培養平盤，每孔 0.2 ml，置 5 % CO₂，37 °C 恆溫箱中培養，每日觀察並添換新培養液。

四、間接螢光標示抗體染色 (IFA) 法：於 96 孔微量培養平盤，每孔加入含 PK-15 株化細胞之培養液 0.2 ml，於培養液中並各含有 100 TCID₅₀/0.1 ml 的 A76 株病毒。經 48 小時培養後，以甲醇固定 10 分鐘。每孔加入待篩選的融合瘤培養液 0.05 ml，於 37°C 中作用 1 小時，再以磷酸緩衝液 (PBS 溶液) 洗滌 3 次，再加入山羊抗小白鼠免疫球蛋白 IgG 螢光標示抗體液 0.05 ml (Bio-Yeda, 以色列製，使用時稀釋或 1/100 濃度，稀釋液使用 PBS 溶液)。於 37°C 作用 1 小時，再以 PBS 溶液洗滌 3 次，風乾，以螢光顯微鏡觀察細胞質中特异性螢光，判定融合瘤是否具有分泌豬瘟抗體的能力。感染 ALD 株豬瘟強毒的豬隻扁桃腺冷凍切片，則用冰冷的丙酮固定後，用上述 IFA 法測定。

五、免疫過氧化氫酶單層細胞分析 (IPMA) 法：

依照 Wensvoort 等 (1986) 報告的方法施行。自感染 A76 株病毒的 PK-15 單層細胞或感染經選殖的 LPC 株病毒的兔單層細胞的微量培養平盤，倒棄培養液，以 0.15 M 生理鹽水洗滌 2 次。將培養盤置 37 °C 中乾燥至少 1 小時，再以透明膠帶封貼，置 -20 °C 冰櫃中至少 1 小時，或將培養盤持續保存於該溫度之下。染色時，取出培養盤，以冰冷的 4 % 三聚甲醛 (Paraformaldehyde) 固定 5 分鐘，再以 0.15 M 生理鹽水洗滌 2 次，加入適當稀釋的豬隻豬瘟免疫血清〔在本試驗中，將豬瘟高度免疫血清 (抗體力價 1,024 倍) 以含有 0.5 % Tween 80 的 0.15 M 生理鹽水稀釋成 1/100 濃度以後備用〕，或待篩選的融合瘤培養液，每孔加入 50 μl，置 37°C 中 30 分鐘後，以含 0.5 % Tween 80 的生理鹽水洗滌 2 次，再加入 50 μl 經適當稀釋的山羊抗豬 IgG 或抗小白鼠 IgG 過氧化氫酶標示抗體 (批號 032, 以色列 Bio-Yeda 公司製品。使用時稀釋成 1/500 濃度，稀釋液為含 1 % Tween 80 的 0.5 M 氯化鈉溶液)，再置 37°C 中 30 分鐘後，用含 0.5 % Tween 80 的 0.15 M 生理鹽水洗滌 2 次，最後加入用 0.05 M Acetate buffer 配成的 3 -

amino - 9 - ethylcarbazole (AEC, 美國 Sigma 公司製品) 為受質使呈色。呈色後倒去液體或用蒸餾水洗滌之再乾燥保存。鏡檢時, 在細胞質呈褐色反應者為陽性。六單源抗體亞型的定性: 使用單源抗體 Iso - typing Kit (Chemicon, 美製) 測定融合瘤細胞培養液中之抗體種類, 以免疫鏈酶試驗 (ELISA) 測定之。

結 果

本試驗由 7 次融合瘤製備中, 使用 IFA 法篩選 54 個融合瘤, 在其中選取呈現螢光最強的 1 株單源抗體, 即 A76 # 5, 作進一步分析及試驗工作。該株單源抗體為由 A76 株病毒抗原製備而來, 此株單源抗體經定性結果, 屬於 IgG_{2a}, 帶 K 輕鏈。A76 # 5 株融合瘤所分泌的單源抗體, 以 IFA 法, 在感染 ALD 株豬瘟強毒豬隻扁桃腺之腺窩及上皮細胞的細胞質

, 呈現極強的特異性螢光 (圖 1)。LPC 株病毒接種於兔睪丸細胞, A76 株病毒接種於 PK-15 株化細胞, 再應用 A76 # 5 株單源抗體作 IFA 試驗, 於兔睪丸單層細胞中陽性反應細胞分散, 而於 PK-15 株化細胞則呈斑灶 (圖 2)。在這兩種細胞中之陽性反應細胞, 於細胞核常見顆粒狀螢光, 原因不明。

應用此二株單源抗體, 以 IPMA 法, 可檢出感染增殖於兔睪丸細胞中的 LPC 株病毒及由其選殖的病毒, 於單層細胞中之陽性細胞分散, 其細胞質呈明顯的褐色反應, 而感染 A76 株病毒的 PK-15 株化細胞, 於單層細胞中之陽性細胞則呈斑灶狀 (圖 2), 褐色反應較明顯, 有些細胞且於細胞核周圍之呈色較深; 雖然如此, 却無法由陽性反應細胞分辨 LPC 株, 或經組織培養選殖的 LPC 株, 或 A76 株病毒抗原性。

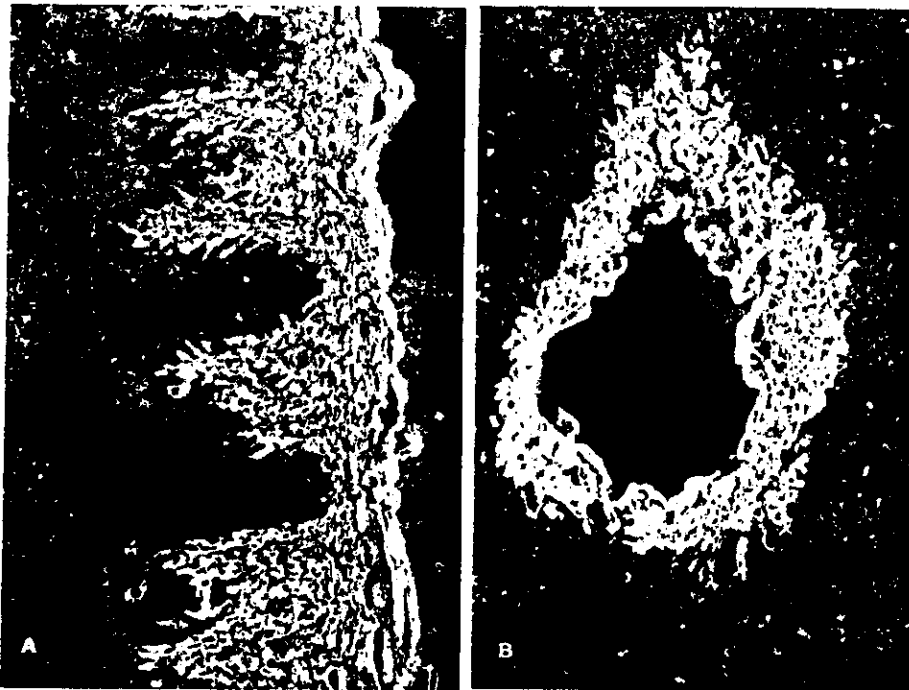


圖 1 豬瘟強毒 ALD 株感染豬隻扁桃腺之冷凍切片, 以 A76 # 5 單源抗體作間接螢光標示抗體染色法 (IFA) 分析, 於上皮細胞(A)和腺窩細胞(B)呈現特異性的強螢光反應。

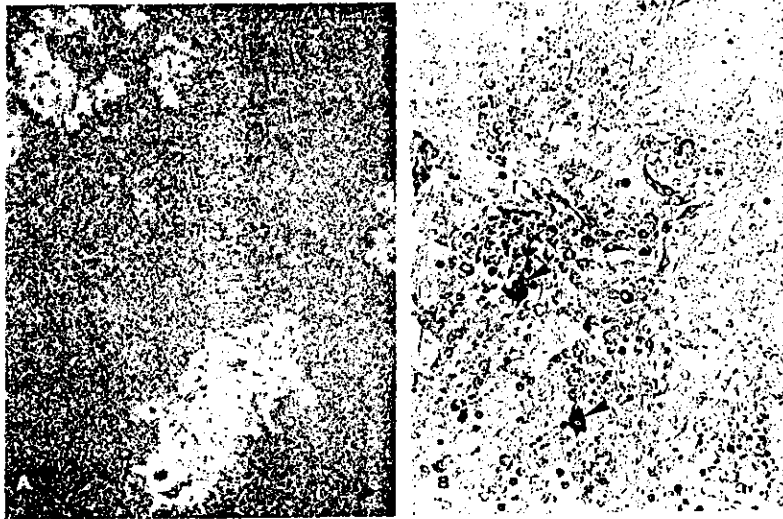


圖 2 PK-15 株化細胞感染豬瘟病毒 A76 株，48 小時後以 A76 #5 單源抗體作間接螢光標示抗體染色法 (IFA) 分析，特异性螢光反應細胞呈灶狀，(A)。於免疫過氧化氫酶單層細胞分析法 (IPMA) 陽性反應細胞之細胞質呈特异性褐色反應，有些細胞在核周圍呈色較深 (箭頭)，(B)。

討 論

於本試驗中，以 IFA 法及 IPMA 法可作豬瘟抗體分泌陽性之融合瘤細胞之篩選。而 IPMA 法之陽性細胞呈現之反應明顯，更易判定 (圖 2)，或可作為將來豬瘟病毒之定性定量之用。雖然於本試驗所選殖的 A76 #5 單源抗體無法區別強毒及疫苗病毒的抗原性，作為實驗室之快速診斷試劑，則頗具價值。

Wensvoort 等 (1986) 應用豬瘟單源抗體及 IPMA 法作接種於培養細胞的瘟疫病毒 (Pestivirus) 屬病毒的檢出，並以單源抗體和冷凍切片免疫過氧化氫酶試驗作感染於豬隻扁桃腺之該屬病毒抗原的檢出。由試驗結果顯示，單源抗體可用於鑑別牛病毒性下痢病毒、野外豬瘟病毒和疫苗病毒。Hess 等 (1988) 曾應用 4 種豬瘟單源抗體區別 90 株野外分離病毒間之差異，但由於此等單源抗體對抗抗原的部份不明而未能如願。因此，於本試驗，用於區別豬瘟強弱毒或 LPC 病毒抗原性之單源抗體，則有待進一步製備分析。

本研究由行政院農業委員會補助經費 (計

畫編號：78 農業 - 7.1 - 牧 - 48)，謹誌謝忱。

參 考 文 獻

1. 林再春。1968。螢光抗體—組織培養法對於豬瘟病毒檢出及定量之研究。台灣省畜衛試研報。5：1~22。
2. 林再春、賴秀穗。1970。兔化豬瘟病毒之試管內 (in vitro) 檢出及定量法之研究。台灣省畜衛試研報。7：1~12。
3. 林再春、李崇道。1981。兔化豬瘟疫苗種毒—LPC 株之開發研究綜合報告。國科會專刊第 5 號。
4. 楊喜金、黃文徹、詹益波、林再春。1983。家兔腎細胞馴化兔化豬瘟毒性狀之研究。七十二年度畜產試驗工作報告。444~448。
5. 劉培柏、傅祖慧、周財發、李進海、詹益波、邱仕炎。1984。兔化豬瘟毒組織培養疫苗之研製—一種毒之開發。七十三年度畜產試驗工作報告。574~581。
6. Darbyshire, J.H. 1960. A serolog-

- ical relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Med.* 72: 331.
7. Enzmann, P.J. and F. Weiland. 1978. Structural similarity of hog cholera virus with togaviruses. *Arch. Virol.* 57: 339-348.
 8. Hess, R.G., C.O.Z. Coulibaly, I. Greiser-wilke, V. Moennic and B. Liess. 1988. Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 16: 315-321.
 9. Köhler, G. and C. Wilstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256: 495-497.
 10. Liu, Y.H. 1976. Properties in tissue culture of lapinized hog cholera virus and distribution of the virus in the body of infected rabbit. *Bull. Arabu. Vet. Coll.* 31: 103-132.
 11. Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 17: 1-109.
 12. Mengeling, W.L., D.E. Gutekunst, H.L. Fernelius and E.C. Pirtle. 1963. Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and bovine viral diarrhoea viruses by immunofluorescence. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27: 161-164.
 13. Ressang, A.A. and J.L. Den Boer. 1967. A comparison between the cell culture, frozen tissue section impression and mucosal smear techniques for fluorescent antibody in the diagnosis of hog cholera. *Tijds. Diergen.* 92: 567-586.
 14. Wensvoort, G., C. Terpstra, J. Boonstra, M. and D. Van Zaane. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbic.* 12: 101-108.
 15. Wensvoort, G., M. Bloemraad and C. Terpstra. 1988. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbio.* 17: 129-140.
 16. Westaway. E.G., M.A. Brinton, S. Ya. Gaidamovich, M.C. Horzinek, A. Igarashi, L. Kääriäinen, D.K. Lvov, J.S. Porterfield, P.K. Russell and D.W. Trent. 1985. Togaviridae. *Interviol.* 24: 125-139.

Preparation of Hog Cholera Virus Monoclonal Antibody for Diagnostic Reagent

Liou, P.P¹. Huang, T.S². Liu, H.J². Pan, C.S¹. Chang, W.F².

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
2. Pig Research Institute, Taiwan.

SUMMARY

Hog cholera (HC) virus A76 strain propagated in PK-15 Cultured cells was purified by sucrose density gradient centrifugation and ultracentrifugation. One hybridoma designated as A76 #5 was obtained from spleen cells of Balb/c mice immunized with A76 strain of purified HC virus fused with NS-1 myeloma cells. It was capable to secrete monoclonal antibodies against HC viral antigen detected by indirect immunofluorescent techniques (IFA). Monoclonal antibody secreted by A76 #5 hybridoma was applied in IFA to detect ALD strain of HC viral antigen in the infected tonsillar tissue prepared by frozen sections and to detect the HC viral antigens propagated in the rabbit testicle and PK-15 cells. The fluorescence-stained particles in the nuclei of cultured cells were noted. This phenomenon is still inexplicable. The immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) performed on cultured cells was capable of detecting HC viral antigens in the cytoplasm; however, it is not yet possible to differentiate between the A76 and LPC strains of viral antigens with A76 #5 monoclonal antibody.

1. Taiwan Povincial Research for Animal Health. Tamsui, Taiwan, R.O.C.
2. Pig Research Institute, Taiwan. R.O.C.