76-5

# 猪瘟病毒核醣核酸之分離及分析

劉宏仁[1]　張天傑[2]　楊揚輝[1]　劉培柏[1]

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 國立中興大學獸醫學系

由RK-15猪腎株化細胞及猪瘟病毒（HCV）ALD株感染的RK-15細胞，分別在經Actinomycin D處理或未處理下抽取RNA。以電泳分析所抽取的RNA，發現在加有Actinomycin D者，於瓊膠上呈現一高分子量的病毒RNA。

中（英）文關鍵字

猪瘟病毒（Hog cholera virus）、核醣核酸（Ribonucleic acid）。

利用基因選殖及重組技術研製疫苗及診斷試劑為目前生物技術最大的成就，此不僅於學術上可對病毒分子結構有進一步的瞭解，且可作爲發展次單位疫苗及核酸檢驗試劑的基礎。

猪瘟爲本省最重要的猪隻病毒性傳染病，該病毒屬於Togaviridae科中的 Pestivirus屬，爲一種RNA病毒。本計畫的目的爲分離及分析猪瘟病毒核醣核酸，提供研製核酸檢驗試劑之基本資訊。

## 材料與方法

(一)病毒株：猪瘟病毒ALD株。

(二)細胞株：PK-15 猪腎株化細胞，供予病毒接種增殖。

(三)病毒純化：依Cunlifle 和 Rebers[2]、Laude[4]及 Ushimi 等[10] 浮力密度法，由感染細胞萃取病毒。以非連續性蔗糖溶液（15%）／碳氟化合物溶液，經32,000 rpm 2小時離心，取兩溶液界面之病毒帶，再以10%～35%連續性氯化銫層次比重溶液或15%～40%蔗糖溶液超高速離心。自離心管底部以針頭連續收集氯化銫溶液。收集每個病毒帶及每小部份氯化銫溶液及蔗糖溶液，以電子顯微鏡檢查病毒，並供爲病毒RNA之萃取之用。未感染病毒之細胞，以相同純化方法處理，供對照用。

(四)病毒增殖及RNA的萃取：依Maniatis等[6]方法備製病毒RNA。先將ALD株病毒接種於PK-15細胞，於37℃培養3天後，加入Actinomycin D於培養液中，使其濃度達0.05 μg／ml，繼續培養14小時後，刮取細胞。收集之細胞液以2,000 rpm 4℃離心5分鐘。取沉澱細胞加入適量TBS緩衝液，使細胞再懸浮，再以上述離心速度及時間沉澱細胞，重覆此清洗步驟數次。然後將細胞置於－70℃，經冷凍解凍後，加入等量PK buffer，並添加 proteinase K至200 μg／ml。於65℃作用1小時後

1. 臺灣省家畜衛生試驗所
2. 國立中興大學獸醫學系

，再加入5倍體積的異硫氰酸鳥糞啶溶液（Guanidinium isothiocyanate solution）。並將細胞碎片與反應液振盪混合均勻使呈水液狀不再粘稠為止。加入滅菌之氯化銫，每2.5 ml的反應液添加1 gm，並於65℃水浴加熱幫助氯化銫溶解。以適量5.7 M之氯化銫溶液為墊底，以35,000 rpm 離心12小時。由於RNA 之懸浮密度較大，可沉澱於管底，而大部份之DNA和蛋白質則懸浮於氯化銫溶液。以TE buffer 溶解RNA沉澱物。經Phenol／ Chloroform萃取數次，收集之水溶液加入1／10體積之3 M醋酸鈉（Sodium acetate pH5.2）和2.2倍體積酒精，置於－20 ℃達2小時。再以15,000 rpm離心10分鐘。以1ml之蒸餾水溶解沉澱物並以酒精沉澱之。所得之病毒 RNA溶解在70％酒精，置於－70℃備用。

(五)核酸電泳分析：依Maniatis 等[6] 之方法實施。以Formaldehyde 使病毒RNA變性後進行電泳分析。並以正常PK-15 細胞及經Actinomycin D處理的PK-15 細胞為對照，以1％瓊膠進行分析，電泳緩衝液為0.2 M MOPS（pH7.0），電壓為4伏特／公分。

## 結　　　果

猪瘟病毒ALD株接種於 PK-15 細胞增殖，並以猪瘟螢光標示抗體染色，於細胞質內可見特異性螢光。以非連續性蔗糖溶液／碳氟化物，再以10％～35％連續性氯化銫層次比重溶液或15％～40％蔗糖溶液超高速離心純化病毒，並取病毒帶作電子顯微鏡檢查，可觀察到病毒顆粒（圖一）。電泳分析經Actinomycin D 處理感染病毒細胞的 RNA，則未觀察到細胞 RNA，而可偵測到一高分子量的HCV RNA（圖二），它在Actinomycin D存在時仍可合成。另以正常PK-15細胞及經 Actinomycin D處理之PK-15 細胞作為對照，由圖二得知在Actinomycin D存在下，細胞的RNA合成受抑制，而 HCV之 RNA合成則不受影響，與Brinton[1]及Horzinek[3] 所報告的結果相似。

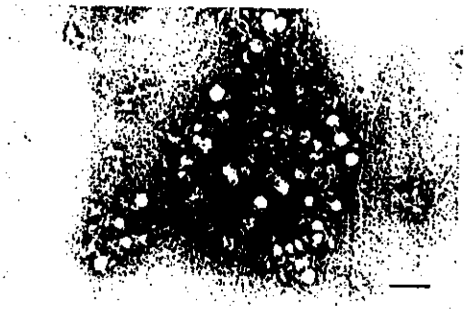
## 討　　　論

由於HCV在組織培養細胞增殖力價不高，極需大量細胞來增殖病毒。因此，取得足量病毒RNA較難。據Pirtle和Kni-azeff[7] 比較猪瘟病毒對各種哺乳動物細胞之感受性，結果顯示以猪來源細胞之感受性最高，尤以猪初代睪丸細胞能獲得較高力價。因此，以猪睪丸細胞來增殖猪瘟病毒將有助於病毒RNA取得。猪瘟病毒RNA萃取的方法，依Maniatis 等[6]報告的方法，以Guanidinium／cscl和蔗糖／碳氟化合物、氯化銫層次比重超高速離心法分別進行RNA之萃取。雖然經蔗糖溶液和氯化銫溶液純化之病毒純度並不高，但不致影響病毒RNA之萃取。雖然經蔗糖溶液和氯化銫溶液純化之病毒純度並不高，但不致影響病毒RNA之萃取。唯純化過程之機械性傷害，造成病毒量之損失則有待進一步克服。

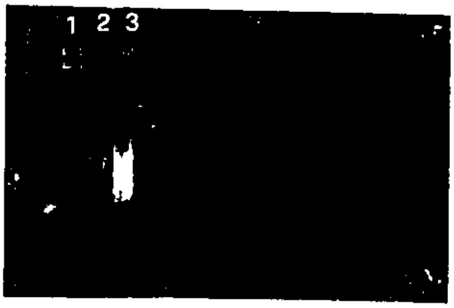
以電泳分析比較正常細胞RNA和感染病毒細胞RNA，在Actinomycin D存在下細胞的RNA合成受抑制，而 HCV 及RNA合成則不受影響（如圖二）。與Br-inton[1]及Horzinek[3]所報告相似。Act-inomycin D因可嵌入 DNA上連續的G三C鹼基配對處，造成 DNA 模板的變形，此種局部變形，阻止了DNA dependent RNA Polymerasc（DdRP）沿模板股之移動，而影響 DNA之轉錄[5]。因HCV DNA之複製不需DdRP的作用，故不受Actinomycin D之影響。加入Actinomycin D 在萃取病毒感染細胞的 RNA時，可減少許多細胞RNA的污染，經電泳分析只偵測出一高分子量的猪瘟病毒RNA。據Purchio等[8]和Renard等[9]對牛病毒性下痢病毒感染細胞抽取之RNA分析，也只發現單一的病毒Genomic RNA，而沒有發現其他的Su-bgenomic RNA。取得足量之病毒 RNA是進行分子選殖的第一步。因此，如何獲得高力價的病毒，取得足量病毒 RNA，將是進入分子選殖前的重要課題。

試驗結果顯示；從細胞純化病毒，濃度低

且純度不高，病毒核酸取得較為不易。因此，應從提高病毒力價著手，以利病毒核酸之取得。或由感染猪之血液或接種兔之脾臟純化病毒，提高病毒濃度。



圖一　經非連續性蔗糖溶液／碳氟化物離心，再經氯化銫溶液層次比重離心處理純化之病毒。電子顯微鏡檢查之病毒顆粒。bar＝100 nm




圖二　感染猪瘟病毒細胞與正常細胞，經 RNA 萃取之電泳分析。1.感染病毒細胞經 Actinomycin D 處理。2.正常細胞經 Actinomycin D 處理。3.正常細胞。

## 參考文獻


1. Brinton, M.A. 1980. Non-arbo togaviruses. In: The togaviruses, biology, structure, replication. Ed, R.W. Schlesinger, Academic press, New York, 623-666.
2. Cunliffe H.R. and P.A. Rebers. 1968. The purifecation and concentration of hog cholera virus with electron micrographs. Can. J. Comp. Med. 32: 409-411.
3. Horzinek, M.C. 1981. Non-arthropod-brone togaviruses. Academic press, New York.
4. Laude. H. 1977. Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. Arch. Virol. 54: 41-51.
5. Lehninger, A.L. 1982. Replication and transcription of DNA. P. 837-870. In "Principle of biochemistry", Worth publishers Inc. New York
6. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular coloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor, N.Y.
7. Pirtle, E.C. and A.J. Kniazeff. 1968. Susceptibility of cultured mammalian cells to infection with virulent and modified hog cholera viruses. Am. J. Vet. Res. 28: 1033-1040.
8. Purchio, A.F., R. Larson and M.S. Collect. 1983. Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cell infected with bovine viral diarrhea virus. J. Virol. 52: 973-975.

9. Renard, A., D. Schmetz, C. Guiot S. Brown-Shimmer, L. Dagenais, P.P. Pastoret, D. Dina and J. A. Martial. 1987. Molecular cloning of the bovine viral diarrhea genomic RNA. Ann. Rech. Vet. 18: 121-125.

10. Ushimi. C., M. Tajima, S. Tanaka H. Nakajima, Y. Shinizu and S. Furuushi, 1960. Purification and some physical properties of hog cholera virus. Natl. Inst. Anim. Hlth. Quart. 9: 28-34.

Exp. Rop. TPRIAH., No. 26: 29-33 (1990)



# Cloning of Hog Cholera virus (HCV) and Analysis of Its Expressive Materials: Isolation and Analysis of HCV RNA.

Liu, H.J., T.C. Chang, Y.H. Yang, P.P. Liou

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

## SUMMARY

Extractions of the RNAs from pk-15 cells infected with ALD strain of hog cholera virus and from uninfected cells were performed under the presence or ·abscence of actinomycin D.

The profile of nucleic acid electrophoresis in the extracted RNA revealed that a high molecular weight band of viral RNA was found in the actinomycin D treated sample.

---

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health. Tamsui, Taiwan, R.O.C.

2. National Chung-Sheng University. Taichung, Taiwan, R.O.C.