

牛呼吸道融合病毒融合醣蛋白單株抗體之研製

馬屏禾* 曹素華 費昌勇

台灣省家畜衛生試驗所

以牛呼吸道融合病毒 (Bovine Respiratory Syncytial Virus) 之可溶性蛋白為抗原，研製得 6 株抗此病毒之單株抗體融合瘤。以 Western blot 分析得知此 6 株均為抗 VF 70 (融合蛋白質) 之單株抗體。其中有兩株具中和能力，二者中僅 1 株具抗細胞融合之能力，故知必須是針對融合蛋白質某些特殊位置 (epitopes) 之單株抗體，才可抑制細胞之融合作用。此外，以抗鼠 IgG 之螢光標幟抗體，在丙酮固定之病毒感染細胞上，以間接螢光法測定，顯示具中和能力之單株抗體螢光較強。

牛呼吸道融合病毒 (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV) 是造成牛、羊呼吸道嚴重感染之重要病毒。已先後在美國、歐洲、及日本等地發生⁽¹⁾。此病毒係 Paramyxoviridae 科之 Pneumovirus 屬。其病毒學之各項特性，各國均積極研究中，但尚無具體報告。由感染幼兒呼吸道之人型呼吸道融合病毒 (Human Respiratory Syncytial Virus) 之研究，已得知此類病毒蛋白質複雜，分子量介於 20 萬至 9 千之間^(2,3)。其中與感染有關之病毒胞衣醣蛋白 (envelope glycoprotein) 有兩種^(6,9)，均會與中和抗體反應^(10,2)。一為 GP 90，分子量 9 萬，負責病毒感染細胞時之附著 (attachment) 作用，與一般 Paramyxovirus 之機轉相似⁽⁸⁾。另一為 VF 70，分子量 7 萬，已知為病毒之融合蛋白質 (fusion protein)^(5,13,14)，其功能是使感染細胞之細胞膜與鄰近健康細胞之細胞膜發生融合，造成細胞間病毒之傳播。抗 GP 90 之抗體，雖可抑制病毒對細胞之附著，具中和作用，但不能抑制細胞與細胞間之融

合感染⁽¹²⁾，而抗 VF 70 之抗體因可抑制病毒對細胞之融合，故可完全抑制病毒之傳播^(11,13)。

本文在研製抗牛 RSV 之單株抗體，並探討其對病毒融合現象之抑制作用。

材料與方法

病毒與細胞

病毒係美國愛荷華州立大學獸醫學院微生物系於牛肺株化細胞中順化之標準牛 RSV 病毒。細胞以 10% 馬血清之 MEM (GIBCO) 培養於迴轉瓶中，以 0.1 m.o.i. (multiplicity of infection) 之病毒量接種，待 CPE 達 90% 時，以 PBS 洗去上清液，然後加 20 ml 之 non-denaturing lysing buffer⁽¹²⁾，於室溫溶解感染病毒之細胞，使病毒之醣蛋白得以釋出。30 min 後以 20,000 rpm 離心 2 hr，取上清液，置 -70 °C 冰箱中備用。

單株抗體製備⁽¹⁰⁾

以上述之病毒蛋白液經 PBS 透析，取 0.2

* 國立台北護理專科學校

ml 以腹腔注射免疫Robertsonian mice (美國 Jackson Laboratories 出售)。每週 1 次, 於第 5 次免疫後 3 天, 取脾臟, 分離細胞, 與 2 倍總細胞量之 Taggart⁽¹⁰⁾ 細胞混合, 以 PEG 1540 (Merck) 融合。培養 7 天後, 取融合瘤之上清液, 以螢光標識之抗鼠 IgG (H+L) 抗體, 在丙酮固定之 RSV 感染細胞上, 以間接螢光法測定⁽¹¹⁾。呈現陽性反應之融合瘤以機械法再株化 (Subcloning), 經大量繁殖後, 取上清液即得單株抗體。單株抗體免疫球蛋白之分類 (isotyping), 係使用 MAb-Isotyping Kit (Antigenex, San Francisco) 測定。

中和試驗及融合抑制分析

中和抗體在 96 孔細胞培養盤內進行。取 100 TCID₅₀/ml 之病毒液 50 μ l, 與等體積單株抗體, 於 37 °C 作用 1 小時後接種 200 μ l 之牛肺細胞懸浮液。5 天後以 CPE 判定結果。融合抑制分析在 24 孔細胞培養盤內進行。先接種病毒於單層牛肺細胞, 8 小時後洗去上清液, 代之以含單株抗體之細胞培養液, 兩天後洗淨上清液, 以陽性感染牛之高度免疫血清及抗牛 IgG 之螢光標識抗體做間接螢光染色。由細胞之病毒感染範圍 (即螢光出現範圍) 可測知融合現象之抑制能力⁽¹²⁾。

SDS - PAGE 電泳及 Western blot

上述之病毒蛋白液與等量之樣本液 (0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 4% SDS) 混合, 於 12% 之 SDS - polyacrylamide 中進行 SDS - PAGE 電泳分

析⁽¹³⁾。電泳完成後立即將病毒蛋白通電轉換至 Nitrocellulose 紙上, 然後按 Bio-Rad 公司之步驟進行酵素免疫染色 (Immunoprecipitation)。

結 果

單株抗體之各項特性

本研究共得 6 株陽性反應之單株抗體。其各項特性列於表 1。由表 1 可知, 本文所研製之單株抗體, 均為抗融合蛋白質 (VF 70) 之單株抗體。本文僅舉 2-8E6-1 為例, 顯示其 Western blot 分析之結果 (圖 1)。由圖 1 可知免疫酵素所染病毒之 VF 70 在 140K 及 70K 兩處均出現反應線 (箭頭所指), 可能是有些 VF 70 未完全被 SDS 拉開, 呈現 dimer 之現象 (詳見討論)。於 6 株中具中和能力者有 2-8E6-1 及 1-13E8-6 2 株, 能抑制細胞融合者僅 2-8E6-1 1 株 (圖 2)。在螢光強度方面, 以間接螢光法測定得知以具中和能力之單株抗體較未具中和能力之單株抗體, 對病毒之螢光反應較強。在免疫球蛋白之分類上, 得知 6 種單株抗體均屬 IgG 2a, 輕鏈均為 Kappa 鏈。

融合抑制試驗

感染病毒 8 小時之單層牛肺細胞, 經改換含單株抗體之培養液培養 2 天後, 僅 2-8E6-1 1 株可抑制融合現象, 病毒之螢光僅呈微小之點狀, 顯示病毒並未擴散 (圖 2)。反之, 經其他 5 株之上清液處理者, 與陽性對照組一樣, 螢光呈塊狀, 顯示病毒已使細胞發生融合, 向外擴散 (圖 2)。

表 1 抗牛 RSV 單株抗體之各項特性

| 特 性 | 單 株 抗 體 | | | | | |
|----------|---------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| | 2-8E6-1 | 1-13E8-6 | 2-11A12-1 | 1-13E5-1 | 3-11E8-3 | 2-1C4-2 |
| isotype | IgG2a-K | IgG2a-K | IgG2a-K | IgG2a-K | IgG2a-K | IgG2a-K |
| 中和試驗 | + | + | - | - | - | - |
| 對應抗原之分子量 | 70K | 70K | 70K | 70K | 70K | 70K |
| 細胞融合抑制能力 | + | - | - | - | - | - |
| 對病毒之螢光強度 | +++ | +++ | + | + | + | + |

註: K 即 Kappa 輕鏈

中和試驗

中和試驗顯示，1-13 E 8-6 之中和能力不能維持長久，於中和試驗開始判定後 5 天內可完全抑制病毒之發育，但自第 7 天開始就出現 CPE。但具抑制融合現象之 2-8 E 6-1，即使中和試驗進行至 20 天，且細胞已開始脫落，亦無 CPE 出現。

討 論

本文是對牛呼吸道融合瘤病毒之一項深入研究。由結果(表 1)得知本報告所研製之 6 株單株抗體全為抗融合蛋白質(VF 70)之抗體，彼等雖均與 VF 70 反應，但僅 2 株具有中和作用，且此兩株中又僅有 1 株具有抗融合作用，足證必須是針對以融合蛋白質之某些特殊位置(epitope)反應之抗體，才可抑制融合作用。而以抗 VF 70，且具中和能力之兩株抗體，亦顯示除病毒之附著蛋白質(VP 90)外，藉抑制融合蛋白質之某些 epitopes，亦可中和病毒。故知中和作用之機轉相當複雜。此結果與人型 RSV 之研究完全相符^(12,14)。本病毒之 VF 70，在圖 1 顯示 140 K 及 70 K 兩

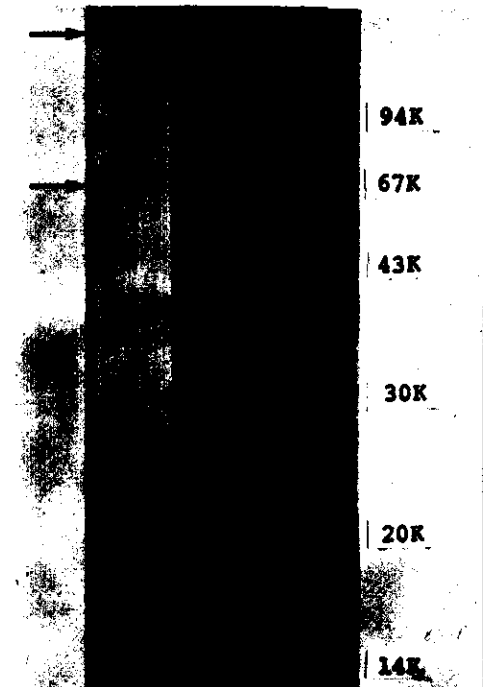
處出現反應線。據人型 RSV 之研究，亦顯示若 SDS 反應不夠，此蛋白仍為 140 K 之 dimer^(12,14)，圖 1 所出現之兩條線，應亦屬同理。關於此點，筆者等擬繼續研究。此外，單株抗體亦可用於臨床上不同變異病毒株之分類⁽¹⁾或鑑定，後者已實際應用於新城雞瘟病毒⁽⁷⁾。

由於以傳統之生化方法純化病毒蛋白質無法避免細胞蛋白質之污染，致使病毒蛋白質之研究十分困難。若以單株抗體做親和性色層分析(affinity Chromatography)，則可獲得完全純淨之病毒醣蛋白⁽¹²⁾，再配合單株抗體，是研究 epitopes 特性之最佳方法。

以間接螢光法染色牛 RSV 病毒感染之細胞，顯示具中和能力之單株抗體螢光較強，可能是此類抗原之 epitopes 所佔比例較多之故。

應用螢光來觀察病毒感染細胞後之融合現象，係一十分快速且方便之方法。此法對融合現象之是否受到抑制，在螢光顯微鏡下有相當明顯之差異，此方法似亦可於日後發展成測定 plaque 之另一方法。

圖 1 以 Western blot 分析 2-8 E 6-1 單株抗體對牛型 RSV 病毒蛋白之反應位置。圖之右側為低分子量標準蛋白質，中間是本病病毒培養濃縮液，左側是免疫酵素染色之測定結果。由本圖可知在 140 K 及 70 K 處出現反應線(箭頭所示)。



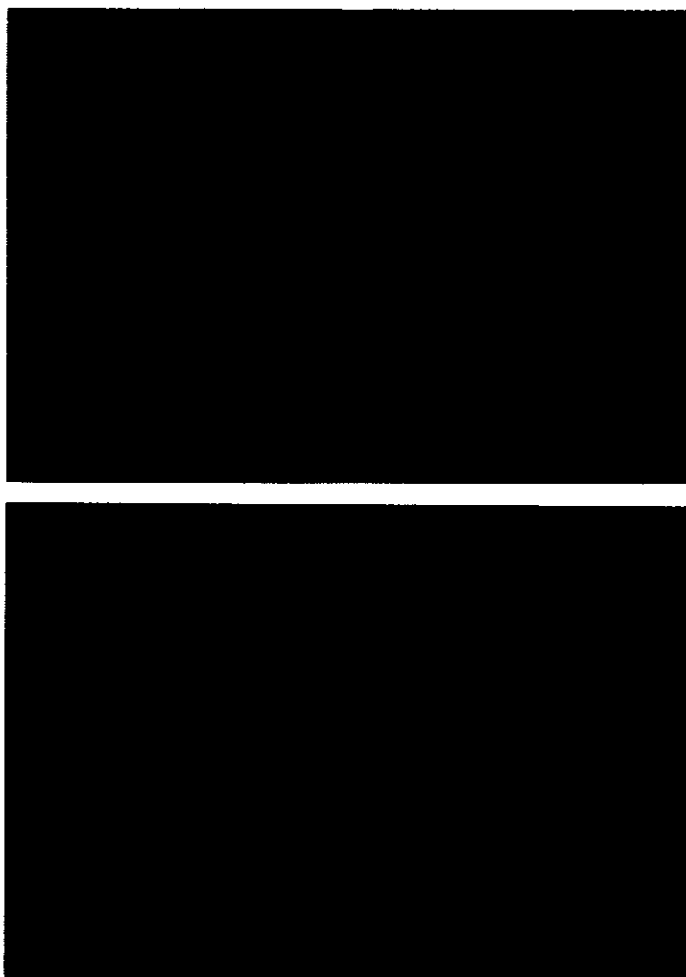


圖2 以牛型 RSV 感染牛肺細胞 8 小時，再以 $2-8 E 6-1$ 單株抗體培養 2 天後可知其可抑制病毒對細胞之繼續融合感染（上圖）。若不加單株抗體，則病毒會繼續進行融合感染（下圖）。

參考文獻

1. ANDERSON, L. J., J. C., HIER-HOLZER, C. TSUO, R. M. HENDEY, B. F. FERNIE, Y. STONE, and K. MCINTOSH. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus with monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases* 151:626-633.
2. CASH, P., W. H. WUNNER, and C.R. PRINGLE, 1977. A comparison of the polypeptides of human and bovine respiratory syncytial viruses and murine pneumonia virus. *Virology* 82:369-379.
3. DUBOVI, E. J. 1982. Analysis of proteins synthesized in respiratory syncytial virus-infected cells. *Journal of Virology* 41:372-378.
4. Feneer, F., P.A. Bachmann, E. P. J. Gibbs, F.A. Murphy M. J.

- Studdert, D. D. white 1987 Paramyxoviridae p. 485-503. In *Veterinary virology* 1st ed. Academic press, INC.
5. FERNIE, B. F. and J.L. GERIN, 1982. Immunochemical identification of viral and non-viral proteins of respiratory syncytial virus virion. *Infection and Immunity* 37:243-249.
 6. GRUBER, C. and S. LEVINE, 1983. Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. *Journal of General Virology* 64:825-832.
 7. IORIO, T.M., A.K. LAWTON, P.M. NICHOLSON and A.M. BRATT. 1984. Monoclonal antibodies identify a strain-specific epitope on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus strain Australian-Victoria. *Virus Research* 1:513-525.
 8. MERZ, D.C., A. SCHEID, and P. W. CHOPPIN, 1981. Immunological studies of the functions of Paramyxovirus glycoproteins. *Virology* 109:94-105.
 9. PEEPLES, M. and S. LEVINE, 1979. Respiratory syncytial virus polypeptides: their location in the virion. *Virology* 95:137-145.
 10. Taggart, R.T. and I.M. Samloff 1983. Stable antibody producing murine hybridomas. *Science* 219: 1228-1230.
 11. WALSH, E.E. and J. HRUSK, 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *Journal of Virology* 47: 171-177.
 12. WALSH, E.E., J.J. SCHLESINGER, and M.W. BRANDRISS. 1984. Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 65:716-767.
 13. WALSH, E.E., J.J. SCHLESINGER, and M.W. BRANDRISS. 1985. Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *Journal of General Virology* 66: 409-415.
 14. WALSH, E.E., P.J. COTE, B.F. FERNIE, J.J. SCHLESINGER, M.W. BRANDRISS, 1986. Analysis of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Using monoclonal and Polyclonal Antibodies *Journal of General Virology* 67:505-513.

**MONOCLONAL ANTIBODIES TO BOVINE RESPIRATORY
VIRUS : IDENTIFICATION OF THE FUSION PROTEIN**

P.H. Mar*, S.H. Tsao, Andrew C.Y. Fei

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Six monoclonal antibodies directed against bovine respiratory syncytial virus proteins were produced. Each was characterized by immunoprecipitation and indirect immunofluorescence. All of them were directed against the fusion protein, VF70. Two of them neutralized virus without complement, but only one of the neutralizable monoclonal antibodies inhibited cell-cell fusion of previously infected bovine lung cells. The two neutralizable monoclonal antibodies were more glaring than the other four monoclonal antibodies under the indirect immunofluorescent test.

* National Taipei College of Nursing.