

對抗豬生殖與呼吸綜合症之 新型次單位疫苗之開發

吳美莉 教授

國立屏東科技大學食品科學系 | 聯絡電話：08-7703202分機7064

E-mail: mlwu@mail.npust.edu.tw

(一)源起

豬繁殖與呼吸道綜合症(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 於1987年首度在北美發現，之後數年陸續於全球養豬場爆發，對於養豬產業造成極大損失，因此如何防治PRRS成為全球養豬產業亟待解決之問題(Beyer et al., 2000)。各年齡層豬隻皆可能感染PRRS，除了造成豬隻生殖障礙之外，還會發生呼吸道症狀並死亡(Lager et al., 2003)。PRRS由豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)感染所造成，此病毒隸屬動脈病毒科 (Arteriviridae)，含正向(+)單股RNA genome，具有封套，其直徑約為 50-70nm(Barfoed et al., 2004)。目前市售PRRSV疫苗有保護效力不足且有排毒與返毒風險，且由於PRRSV為RNA病毒，其演化突變速度相當迅速，因此開發安全、不具排毒與返毒風險且具保護效力之疫苗實為當務之急。

(二)設計概念

本技術選用昆蟲細胞作為表達宿主，其優點包括：(1)重組蛋白質之表達量遠高於哺乳動物細胞；(2)昆蟲細胞可以懸浮培養，容易放大，可利用生物反應器大量生產重組蛋白質；(3)重組蛋白質多為可溶性，且具有與哺乳動物細胞相似之轉譯後修飾作用，表現的蛋白質具有正常的生物功能性並且會運送至與原哺乳動物細胞相同之胞器位置；(4)桿狀病毒對脊椎動物不具有感染力，因此具高安全性。PRRSV含15kb之基因組，有10個Open reading frames (ORFs) (Li et al., 2009; Cruz et al., 2010; Das et al., 2011)。本技術構築選修飾融合基因，其基因序列源自PRRSV之兩種不同ORFs，二者之基因產物均可誘發中和抗體反應，將此二基因進行修飾以增加其於宿主細胞產量並將基因融合。首先利用大腸桿菌系統將融合基因構築於適當轉移載體，再轉染至昆蟲細胞，以同源重組方式將融合基因與桿狀病毒基因進行接合形成重組桿狀病毒，經數次感染增殖至足夠病毒量後，再感染適當昆蟲宿主細胞生產抗原蛋白，將抗原蛋白混合適當佐劑配置成疫苗，以豬隻毒力試驗以及免疫攻毒試驗確認新型次單位疫苗效能。

(三)技術開發

本技術平台首先設計基因融合序列，其融合基因含有兩種經修飾之PRRSV之ORFs基因序列。將修飾融合基因構築於適當載體後，分別以限制酶雙重切割，並接至轉移載體，轉型至大腸桿菌宿主擴增質體DNA。將重組成功之質體進行核苷酸序比對無誤後，再轉染至昆蟲宿主細胞與桿狀病毒進行同源重組，待培養至病毒感染徵狀出現，過程中可看到昆蟲細胞細胞核脹大，細胞膜裂解，逐漸出現空泡化，及細胞死亡後漂浮之現象。於細胞死亡率達到一定比例時收集病毒液，取含有病毒之培養基上清液，抽取此重組桿狀病毒之DNA，以專一性引子對進行PCR確認目標基因。收集重組桿狀病毒經數次感染宿主細胞以進行病毒增殖，最後將重組桿狀病毒感染宿主細胞，進行抗原蛋白表現。經數天後收取細胞後並萃取抗原蛋白，測定蛋白濃度並進行SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)及Western blot分析以確認此重組蛋白之



圖1 以瓊脂糖泳分析融合基因產物

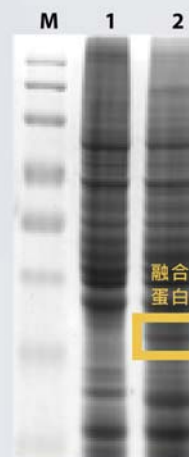


圖2 以SDS-PAGE分析重組融合蛋白表現

分子量與表現，再以BSA建構檢量線再以UVIDoc軟體定量分析目標蛋白之產量。將抗原蛋白加入佐劑與免疫增強劑製成次單位疫苗，最後經動物試驗確認疫苗效能。動物實驗包括豬隻毒力試驗以及免疫攻毒試驗均顯示此次單位疫苗之接種可保護豬隻免受PRRSV感染。

(四)技術競爭力

目前市售PRRSV疫苗主要有三類，包括活毒減毒疫苗、死毒疫苗以及由大腸桿菌生產之次單位疫苗。活毒減毒疫苗雖可同時誘發細胞性與體液性免疫反應，但其中和抗體力價偏低，保護效力不足且有排毒與返毒風險。死毒疫苗雖無返毒風險但只能誘發體液性免疫反應，需免疫兩次才可達到保護效果，且對異源性病毒完全失去保護力。此外，目前並無確切數據顯示由大腸桿菌生產之次單位疫苗具備保護效力。本技術之修飾融合基因序列利用昆蟲細胞表現一新穎之融合抗原蛋白，蛋白產量較原始基因高，而利用昆蟲細胞進行表現，可以懸浮培養，容易放大，且具有與哺乳動物細胞相似之轉譯後修飾作用，可生產保有原來功能之蛋白，動物實驗顯示此疫苗保護效力高達100%。由本技術平台所生產之新式次單位疫苗安全性高，保護效力更好，且不具返毒風險。經上述結果顯示此新式疫苗具前瞻性以及經濟效益，經商品化後可望應用在新式PRRSV疫苗之開發並用於防治豬繁殖與呼吸道綜合症。

(五)研發成果

本計畫之技術平台已提出專利申請，技術內容含經修飾且證實可誘發中和抗體產生之基因融合序列，此融合基因含有兩種PRRSV之ORFs，將其轉染至桿狀病毒/昆蟲細胞表現系統可成功生產重組桿狀病毒，再經感染宿主細胞後可表現抗原蛋白以生產新型次單位疫苗。本技術平台之基因序列除可表現一新穎且保有抗原性之融合抗原蛋白，動物實驗顯示此新式次單位疫苗具高度保護效力。此外，融合抗原蛋白產量高於原始基因高且可進行懸浮培養，具備量產潛力，此技術可望應用在防治豬繁殖與呼吸道綜合症，相當具有產業利用性。

參考文獻

- Barfoed AM, Blixenkrone-Møller M, Jensen MH, Botner A, and Kamstrup S. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 22: 3628-3641, 2004.
- Beyer J, Fichtner D, Schirmer H, Polster U, Weiland E, and Wege H. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* 47: 9-25, 2000.
- Cruz JL, Zuniga S, Becares M, Sola I, Ceriani JE, Juanola S, Plana J, and Enjuanes L. Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Res* 154: 150-160, 2010.
- Das PB, Vu HL, Dinh PX, Cooney JL, Kwon B, Osorio FA, and Pattnaik AK. Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response. *Virology* 410: 385-394, 2011.
- Lager KM, Mengeling WL, and Wesley RD. Strain predominance following exposure of vaccinated and naive pregnant gilts to multiple strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian journal of veterinary research-Revue canadienne de recherche veterinaire* 67: 121-127, 2003.
- Li B, Xiao S, Wang Y, Xu S, Jiang Y, Chen H, and Fang L. Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic ORF5 gene. *Vaccine* 27: 1957-1963, 2009.