

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

抗口蹄疫病毒結構蛋白 VP1 單源抗體

應用於酵素連結免疫吸附試驗

Establishment of ELISA with Monoclonal Antibody against
Structural Protein VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus

甘昀騏

Jiun-Chi Gan

指導教授：鄭益謙 博士

Advisor : Ivan-Chen Cheng, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

抗口蹄疫病毒結構蛋白 VP1 單源抗體

應用於酵素連結免疫吸附試驗

Establishment of ELISA with Monoclonal Antibody against
Structural Protein VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus

本論文係 甘昀騏 君（學號 R99629024）在國立臺灣大學獸醫學系、所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 7 月 10 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

鄭益達 (簽名)

(指導教授)

王金秋 (簽名)

陳忠慶

莊向宇

林有良

系主任、所長

周志鴻 (簽名)

致謝

兩年的研究生活即將劃上句點，這一路要感謝好多的人。感謝指導老師 鄭益謙博士這些日子以來用心的教導，無論在學業上、生活上及待人處事、應對進退都不吝給予提點，著實讓我獲益匪淺；同時也感謝共同指導老師 王金和博士在實驗設計及統計分析的傾囊相授；還有辛苦的口試委員們，感謝 林有良博士提供口蹄疫病毒株、血清樣本及 P3 實驗室的大力相助，感謝 陳啟銘博士平時慷慨分享自身的實驗經驗及實驗材料上的協助，感謝 蔡向榮博士點出許多本實驗與政策結合的思維及運用方式；感謝您們在繁忙的工作中仍然抽空審閱及校訂這本論文，提供了許多寶貴的意見，讓此論文更加完善，在此至上最深的謝意。

特別也要感謝動科所助理研究員 李明昌先生提供了一個優良的實驗室環境、結構蛋白 VP1 菌株及血清樣本，以及平時對我的指導及照顧，真的非常感謝；另外，動科所的修淯、貴元及宗益學長，謝謝你們在我初學實驗的開始，如此細心耐心的慢慢引導，讓我也能夠逐步踏入研究的領域；還有游姐、裴凌、明萱、美雲、國隆、巧雯、葉姐、王阿姨、敏杏及豫芬姐，謝謝你們這兩年來對我的幫助及照顧，使研究生活變得豐富而有趣；感謝家衛所淑卉姐的幫忙，讓我在 P3 實驗室能夠順利完成實驗；當然不能忘記學校 311 實驗室的學長姐們，俊光、金芳、曜亘、韻安及魚病室的同班同學沛君，謝謝你們精彩了我的生活，有你們在的日子真的非常開心。

最後，感謝親愛的父母及家人，總是在背後支持著我，給我無限的關懷與鼓勵；也非常感謝這兩年來對我視如己出、非常照顧我的姑姑、姑丈一家人，讓我能夠心無旁騖順利完成學業；還有多年摯友康康及小不點，無論快樂悲傷都有你們在左右，真的很謝謝你們。謹以此文獻給所有幫助及關懷我的人，與大家一同分享這份喜悅。

摘要

口蹄疫疫苗免疫後，主要是透過血清中和試驗 (serum neutralization test, SN test) 來了解免疫動物獲得中和抗體保護力的情形，但 SN test 必須使用口蹄疫的活病毒，因而衍生許多的不便及限制。本實驗室使用口蹄疫病毒 O/TW/97 所製備的單源抗體 Q10E-3，已被證明能夠精準辨認口蹄疫病毒涵蓋 RGD 的中和抗原決定位 Site 1 序列；利用此單源抗體為 tracer Ab，搭配原核系統所表現的口蹄疫重組結構蛋白 VP1，建構一個重組結構蛋白 VP1 阻斷型酵素連結免疫吸附試驗 (recombinant VP1 blocking enzyme-linked immunosorbent assays, rVP1- bELISA)，來檢測免疫動物體內的抗體，並以 SN test 作為黃金標準 (gold standard)。試驗樣本包含不同物種及不同 SN 力價的血清，分別為豬血清 674 個、牛血清 100 個及羊血清 100 個。結果顯示，以樣本 PI 值 (percentage inhibition value) 與 SN 力價所繪製的標準曲線圖，可看出兩個試驗在三種種別動物樣品皆有極顯著的相關性 ($p < 0.001$)。而試驗血清所得之 cut-off 值、敏感性及特異性，在豬血清樣本為 20%、58.8% (173/294)、92.9% (353/380)，牛血清樣本為 10%、66.7% (40/60)、67.5% (27/40)，羊血清樣本則為 30%、73.3% (44/60)、67.5% (27/40)。推測同一組 SN 力價血清樣本經過 rVP1-bELISA 檢測後 PI 值的差異，可能是因為血清樣本中含有抗不同中和抗原決定位的抗體，或是血清樣本影響了 tracer Ab 與 rVP1 的結合所致。本實驗的結果證明了 rVP1-bELISA 與 SN test 的正相關性，或許未來可以嘗試加入口蹄疫病毒的其他結構蛋白，再篩選出抗各個中和抗原決定位的單源抗體去搭配組合作用，以獲得更佳的敏感性及特異性，而更能精準地呈現出 SN test 的檢測結果。

關鍵詞：口蹄疫、單源抗體、結構蛋白 VP1、阻斷型酵素連結免疫吸附試驗、血清中和試驗

Abstract

To know the protection of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine, intensive serological surveillance has been implemented. And serum neutralization test (SN test) is a conventional serological assay of FMD. The test operates live virus desperately, so it should be handled in P3 class laboratory. To overcome the restriction, we try to establish a recombinant structural protein VP1 blocking enzyme-linked immunosorbent assays (rVP1-bELISA) to replace the SN test in the future hopefully. The rVP1 was expressed by prokaryotic system. The monoclonal antibody (MAb) Q10E-3 recognizing neutralization antigenic site 1 (RGD motif) on VP1 was raised by the immunization against FMDV O/Taiwan/1997. The rVP1-bELISA was checked with swine, cattle and goat sera samples with different SN titers with sample size 674, 100 and 100 respectively. SN test is the gold standard in this experiment. The current result shows the significant correlation between rVP1-bELISA and SN test ($p < 0.001$) among three species samples. The cut-off value, sensitivity and specificity of swine, cattle and goat samples is 20%, 58.8% (173/294), 92.9% (353/380); 10%, 66.7% (40/60), 67.5% (27/40) and 30%, 73.3% (44/60), 67.5% (27/40), respectively. The reason of the variance of results between same SN titer sample, might be the effect of antibody that induced against different antigenic site. In the future, we can try to add other FMDV structural proteins and MAb that against different antigenic sites in our ELISA kit. It may be able to obtain better sensitivity, specificity and consistency between test results of rVP1-bELISA and SN test.

Keywords : foot-and-mouth disease, monoclonal antibody, structural protein VP1, blocking enzyme-linked immunosorbent assay, serum neutralization test

目錄

口試委員審定書	i
致謝	ii
摘要	iii
Abstract	iv
目錄	v
圖目錄	xi
表目錄	xiii
第一章 序言	1
第二章 文獻回顧	3
2.1 歷史背景與簡介	3
2.2 病毒特性	4
2.2.1 病毒分類與結構	4
2.2.2 病毒基因與蛋白	5
2.2.3 病毒抗原構造	5
2.2.4 病毒物理化學特性	6
2.2.5 病毒生長特性	6
2.3 病毒流行病學	7
2.3.1 傳播途徑	7
2.3.2 宿主動物	8
2.3.3 致病機轉	8
2.3.4 臨床症狀	9
2.3.5 組織病理變化	10
2.3.6 宿主免疫反應	10

2.4 診斷方法	11
2.4.1 補體結合試驗 (Complement Fixation Test, CFT).....	11
2.4.2 病毒分離 (Virus Isolation).....	11
2.4.3 酶素連結免疫吸附試驗 (ELISA)	12
2.4.4 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	12
2.4.5 血清中和試驗 (Serum Neutralization Test, SN test).....	13
2.5 預防與控制	13
2.5.1 移動管制	13
2.5.2 撲殺	13
2.5.3 疫苗免疫	14
2.5.4 血清學監控	14
2.6 酶素連結免疫吸附試驗	15
2.6.1 ELISA 原理	15
2.6.2 ELISA 分類	16
2.6.2.1 直接型 ELISA (Direct ELISA)	16
2.6.2.2 間接型 ELISA (Indirect ELISA)	16
2.6.2.3 三明治 ELISA (Sandwich ELISA)	16
2.6.2.4 競爭型 ELISA (Competitive ELISA)	17
2.6.2.5 阻斷型 ELISA (Blocking ELISA, bELISA).....	17
2.6.3 ELISA 應用	18
2.7 單源抗體	18
2.7.1 歷史背景	18
2.7.2 單源抗體原理	18
2.7.3 單源抗體應用	19
第三章 材料與方法	20

3.1 病毒製備	20
3.1.1 口蹄疫病毒株	20
3.1.2 細胞培養與繼代	20
3.1.3 口蹄疫病毒的增殖	21
3.1.4 口蹄疫病毒力價測定	21
3.1.5 口蹄疫病毒濃縮	21
3.2 單源抗體製備	22
3.2.1 單源抗體來源	22
3.2.2 單源抗體生產	22
3.2.3 單源抗體純化	23
3.2.4 單源抗體透析	23
3.2.5 單源抗體定量	24
3.2.6 單源抗體標示過氧化氫酶 (horseradish peroxidase, HRP)	24
3.3 重組結構蛋白質 (rVP1) 表現與確認	25
3.3.1 重組蛋白質表現	25
3.3.2 重組蛋白質之電泳分析與確認	26
3.3.2.1 聚丙烯醯胺膠片電泳 (SDS-PAGE)	26
3.3.2.2 西方墨點法 (Western blot, WB)	27
3.3.3 重組蛋白質純化	28
3.3.3.1 鎳離子親和層析管柱純化	28
3.3.3.2 切膠純化	28
3.3.4 重組蛋白質定量	29
3.3.5 重組蛋白質與單源抗體結合能力測試	29
3.3.6 重組蛋白質特異性分析與確認	30
3.4 多源抗體製備	30

3.4.1 實驗動物	30
3.4.2 免疫計畫	30
3.4.3 多源抗體特性分析	31
3.4.3.1 西方墨點法	31
3.4.3.2 血清中和試驗	31
3.5 血清樣本	31
3.5.1 標準血清	32
3.5.2 樣本血清	32
3.5.2.1 豬血清樣本	32
3.5.2.2 牛血清樣本	32
3.5.2.3 羊血清樣本	32
3.6 發展檢測血清中和抗體之阻斷型 ELISA	33
3.6.1 塗鍍重組結構蛋白 VP1 阻斷型 ELISA (rVP1-bELISA)	33
3.6.1.1 最佳化 rVP1-bELISA 條件	33
3.6.1.2 rVP1-bELISA 操作流程	33
3.6.1.3 rVP1-bELISA 標準血清分析與確認	34
3.6.1.4 rVP1-bELISA 樣本血清檢測	34
3.6.1.5 A_{450} 讀值轉換成抑制百分比 (PI value)	34
3.6.1.6 rVP1-bELISA 與 SN test 相關性之分析	34
3.6.1.7 rVP1-bELISA 之 cut-off 值、敏感性、特異性與一致性分析 ..	35
3.6.2 塗鍍口蹄疫全病毒阻斷型 ELISA (virus-bELISA)	36
3.6.2.1 最佳化 virus-bELISA 條件	36
3.6.2.2 virus-bELISA 操作流程	36
3.6.2.3 virus-bELISA 標準血清分析與確認	37
第四章 結果	38

4.1 病毒製備	38
4.1.1 口蹄疫病毒力價測定	38
4.2 單源抗體製備	38
4.2.1 單源抗體純化、透析與定量	38
4.2.2 單源抗體標示過氧化氫酶	38
4.3 重組結構蛋白質 (rVP1) 表現與確認	39
4.3.1 重組蛋白質表現	39
4.3.2 重組蛋白質純化與定量	39
4.3.3 重組蛋白質與單源抗體結合能力測試	39
4.3.4 重組蛋白質特異性分析與確認	40
4.4 多源抗體製備	40
4.4.1 多源抗體特性分析	40
4.4.1.1 西方墨點法	40
4.4.1.2 血清中和試驗	40
4.5 發展檢測血清中和抗體之阻斷型 ELISA	40
4.5.1 塗鍍重組結構蛋白 VP1 阻斷型 ELISA (rVP1-bELISA)	40
4.5.1.1 最佳化 rVP1-bELISA 條件	40
4.5.1.2 rVP1-bELISA 標準血清分析與確認	41
4.5.1.3 rVP1-bELISA 樣本血清檢測結果	41
4.5.1.3.1 豬血清樣本	41
4.5.1.3.2 牛血清樣本	41
4.5.1.3.3 羊血清樣本	42
4.5.1.4 rVP1-bELISA 與 SN test 相關性之分析	42
4.5.1.4.1 豬血清樣本	42
4.5.1.4.2 牛血清樣本	42

4.5.1.4.3 羊血清樣本	43
4.5.1.5 rVP1-bELISA 之 cut-off 值、敏感性、特異性與一致性分析 ..	43
4.5.1.5.1 豬血清樣本	43
4.5.1.5.2 牛血清樣本	43
4.5.1.5.3 羊血清樣本	43
4.5.2 塗鍍口蹄疫全病毒阻斷型 ELISA (virus-bELISA)	44
4.5.2.1 最佳化 virus-bELISA 條件	44
4.5.2.2 virus-bELISA 標準血清分析與確認	44
第五章 討論	45
參考文獻	51
附錄	95



圖 目 錄

圖一、口蹄疫病毒結構示意圖	63
圖二、口蹄疫病毒之基因組成	64
圖三、SDS-PAGE 確認表現重組蛋白口蹄疫病毒 VP1	65
圖四、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化	66
圖五、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化	67
圖六、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之 His-tag 片段抗原性	68
圖七、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化	69
圖八、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與單源抗體的結合能力 ...	70
圖九、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與 SN 724 及 SPF 豬血清的結合能力	71
圖十、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與兔子多源抗體的結合能力	72
圖十一、最佳化 rVP1-bELISA 條件	73
圖十二、rVP1-bELISA 標準血清分析與確認	73
圖十三、SPF 豬血清樣本 PI 值分佈圖	74
圖十四、SN 3 豬血清樣本 PI 值分佈圖	74
圖十五、SN 4 豬血清樣本 PI 值分佈圖	75
圖十六、SN 8 豬血清樣本 PI 值分佈圖	75
圖十七、SN 16 豬血清樣本 PI 值分佈圖	76
圖十八、SN 32 豬血清樣本 PI 值分佈圖	76
圖十九、SN 64 豬血清樣本 PI 值分佈圖	77
圖二十、SN 128 豬血清樣本 PI 值分佈圖	77
圖二十一、SN 256 豬血清樣本 PI 值分佈圖	78

圖二十二、SN 512 豬血清樣本 PI 值分佈圖	78
圖二十三、SN 4 牛血清樣本 PI 值分佈圖	79
圖二十四、SN 16 牛血清樣本 PI 值分佈圖	79
圖二十五、SN 32 牛血清樣本 PI 值分佈圖	80
圖二十六、SN 128 牛血清樣本 PI 值分佈圖	80
圖二十七、SN 512 牛血清樣本 PI 值分佈圖	81
圖二十八、SN 4 羊血清樣本 PI 值分佈圖	81
圖二十九、SN 16 羊血清樣本 PI 值分佈圖	82
圖三十、SN 32 羊血清樣本 PI 值分佈圖	82
圖三十一、SN 128 羊血清樣本 PI 值分佈圖	83
圖三十二、SN 512 羊血清樣本 PI 值分佈圖	83
圖三十三、豬血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 674)	84
圖三十四、牛血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 100)	84
圖三十五、羊血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 100)	85
圖三十六、豬血清樣本 ROC curve 分析 (n = 674)	85
圖三十七、豬血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析	86
圖三十八、豬血清樣本血清 rVP1-bELISA 敏感性分析	86
圖三十九、牛血清樣本 ROC curve 分析 (n = 100)	87
圖四十、牛血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析	87
圖四十一、牛血清樣本 rVP1-bELISA 敏感性分析	88
圖四十二、羊血清樣本 ROC curve 分析 (n = 100)	88
圖四十三、羊血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析	89
圖四十四、羊血清樣本 rVP1-bELISA 敏感性分析	89
圖四十五、最佳化 virus-bELISA 條件	90
圖四十六、virus-bELISA 標準血清分析與確認.....	90

表目錄

表一、抗口蹄疫病毒 O/97 單源抗體的特性分析	91
表二、口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 結構蛋白 VP1 上 131-159 氨基酸片段	92
表三、學生氏 <i>t</i> 分布表 (右單尾)	92
表四、豬血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 674)	93
表五、牛血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 100)	93
表六、羊血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 100)	94
表七、豬血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 674)	94
表八、牛血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 100)	94
表九、羊血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 100)	94



第一章 序言

口蹄疫（foot-and-mouth disease, FMD）是一種急性且具高度傳染力的疾病，主要感染所有的偶蹄類動物。西元 1514 年在義大利首先爆發，隨即傳遍歐、亞、非、南美洲等世界各大洲。口蹄疫是由口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus, FMDV）所引起，它屬於小核醣核酸病毒科（Picornaviridae）中的鵝口瘡病毒屬（Aphthovirus）。為一不具封套、正向單股的 RNA 病毒。共有 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 及 Asia1 等七種血清型，至少分為 81 種以上之亞型，這些血清之間是沒有交叉保護力的作用（Donaldson *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1997; Doel, 2003），甚至同個血清型中的不同亞型之間也不一定有完整的保護能力（Grubman and Mason, 2002）。

口蹄疫病毒為一正二十面體，直徑為 25 nm，基因體大小約 8.5 kb，感染動物後，病毒會利用宿主合成病毒外鞘之結構蛋白（structural protein, SP）和非結構蛋白（non-structural protein, NSP），病毒外鞘由 4 種主要的結構蛋白 VP1、VP2、VP3 及 VP4 組成，非結構蛋白則與病毒複製過程及處理蛋白質有關（Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2010）。

目前口蹄疫病毒已有五個中和抗原決定位（antigenic site）為人所知，其中有三個抗原決定位（Site 1, Site 3 及 Site 5）於結構蛋白 VP1 上，另外兩個則分別位於 VP2（Site 2）及 VP3（Site 4）上（Crowther *et al.*, 1993），在 VP1 上的三個抗原決定位中又以 Site 1 最受人關注，因為其胺基酸序列包含了 Arg-Gly-Asp (RGD) motif，被發現可以和宿主細胞上的 RGD-dependent integrin 結合，且和病毒的感染能力相關，因此，Site1 是目前公認 FMDV 最為重要的抗原決定位（Xie *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997）。

口蹄疫的傳播方式可分為三種，一為直接接觸感染動物的水泡液、尿液、唾

液、排泄物、精液及胎衣等，因為這些物質裡面含有大量的病毒，若是接觸到具感受動物則很容易造成病毒傳播。第二種則是間接的透過人、器具、鳥類、廚餘、昆蟲及車輛等方式傳播。最後則是透過空氣傳播，發病動物會經由呼吸而排出大量具有感染能力的病毒 (Donaldson and Kihm, 1997)。

感染動物會出現跛行、發燒、昏沉、食慾降低、足部冠狀溝皮膚變白及脫蹄等症狀，水泡病灶出現在蹄部冠狀溝、腳跟、口鼻吻、下頸及舌頭。成年動物感染後會自然痊癒，死亡率約 5%；病毒對於 8 週齡以下幼畜易造成急性心肌炎，導致心臟衰竭而死亡，死亡率可高達 100% (Kitching and Alexandersen, 2002)。

台灣在日據時代曾有兩次口蹄疫流行的記錄，經厲行發病場撲殺政策後撲滅。1997 年不幸遭 O 型 FMDV 入侵，此株病毒命名為 O / Taiwan / 97 簡稱 O/TW/97。1999 年又於金門發現感染牛隻的口蹄疫病毒 O / Taiwan / 99。直到 2012 年，口蹄疫在台灣仍未完全根除，而台灣因應疫情所採取的撲滅措施包括：感染場清場、全面接種疫苗及血清學監控。

現今全球使用的口蹄疫疫苗為全病毒不活化疫苗，所有的疫苗在製造生產過程中皆被嚴格要求純化處理，將 NSP 去除乾淨，因此注射疫苗的動物應只對結構蛋白產生抗體，而不會引發 NSP 抗體的產生 (Lu *et al.*, 2010)。動物免疫後，必須透過血清中和試驗 (serum neutralization test, SN test) 來得知動物體內抗體力價的高低，藉此瞭解動物是否獲得足夠的保護力，但由於 SN test 必須使用到活病毒，然而口蹄疫病毒的高度傳染性及藉由空氣傳播的特質，使得任何需要使用口蹄疫活病毒的試驗，都必須在密閉隔離且負壓的實驗室內進行，台灣目前只有行政院農業委員會家畜衛生試驗所內的「國家動物傳染病診斷實驗室」符合此項規定。

活毒的使用增加了口蹄疫防疫監測的繁複度及侷限性，因此本實驗嘗試藉由已得單源抗體 (monoclonal antibody, MAb) 的特異性及敏感性，搭配以原核系統所表現的口蹄疫病毒重組結構蛋白 VP1 建構一個檢測血清中和抗體的阻斷型 ELISA，並和現行 SN test 做比較。

第二章 文獻回顧

2.1 歷史背景與簡介

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 所引起的傳染性疾病，主要感染偶蹄類動物，此病毒為世界上第一個被發現的動物病毒 (Murphy *et al.*, 1999)。首次病例是西元 1514 年爆發於義大利，由於口蹄疫相當的急性且具有高度的傳染力，所以很快的就傳遍歐、亞、非、南美洲等世界各大洲。

台灣在日據時期曾經有兩次口蹄疫的爆發，分別於 1913-1916 及 1924-1929 年，當時採用全面撲殺、消毒及限制牲畜移動等政策將疫情撲滅 (Huang *et al.*, 2000; Lin, 2000)。此後的 68 年都沒有疫情傳出，但是到了 1997 年 3 月，不幸又再度受到口蹄疫的入侵，當年撲殺了四百萬頭以上的豬隻，造成嚴重的經濟損失及國際貿易的障礙 (Shieh, 1997; Yang *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2000)，此病毒株命名為 FMDV O/TW/97，在豬隻會造成典型的水泡病灶，但牛隻對此病毒卻沒有感受性 (Donaldson, 1997; Dunn and Donaldson, 1997; Beard and Mason, 2000; Carrillo *et al.*, 2007)。1999 年，於金門黃牛身上分離到另一株口蹄疫病毒 O/TW/99，可感染所有的偶蹄類動物。兩病毒株在宿主動物的差異，主要是因為 O/TW/97 在非結構蛋白 (non-structural protein, NSP) 3A 的基因序列發生突變所致 (Beard and Mason, 2000; Pacheco *et al.*, 2003)。

台灣政府因應口蹄疫的政策為感染動物撲殺清場、全面施打疫苗及血清學監控。政策執行後，疫情初步獲得控制，2001 年 2 月，台灣向世界動物衛生組織 (Office International des Epizooties, OIE) 通報當時的最後一個病例。OIE 遂於 2003 年 5 月認定台灣為施打疫苗的口蹄疫非疫區，台灣也從 2007 年 4 月開始分階段停止施打疫苗 (Lin *et al.*, 2010b)，並逐步邁向全面停止施打疫苗的目標。然而，2008 年 6 月防檢局

在肉品市場及屠宰場所執行的口蹄疫哨兵豬試驗中，發現國內環境依然殘存口蹄疫病毒，故決定暫不進入原訂的全面停打疫苗階段。2009年2月在彰化及雲林各一處養豬場確認豬隻感染口蹄疫 (Lin *et al.*, 2010a)，另經國內相關研究發現，環境中殘存之病毒有擴散趨勢，農委會為避免因農民未主動通報及豬隻無抗體保護力而引發大規模疫情，規定於2009年8月1日起，全面補強注射一劑口蹄疫疫苗，以提升豬群整體免疫保護力。一直到今日，口蹄疫在台灣仍舊有零星疫情出現，尚未能完全根除。

2.2 病毒特性

2.2.1 病毒分類與結構

口蹄疫病毒屬於小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*) 中的鵝口瘡病毒屬 (*Aphthovirus*)。在電子顯微鏡下，口蹄疫病毒是個表面平滑的圓形顆粒，直徑約為 25 nm (Bachrach, 1968; Grubman and Baxt, 2004)，核酸為正向單股沒有封套的核糖核酸 (RNA) 病毒。病毒的四個結構蛋白會形成一個單元體 (protomer)，結構蛋白 VP1、VP2 及 VP3 形成病毒外鞘蛋白的表面，VP4 則內襯於它們下面 (Fraenkel *et al.*, 1988) (圖一)；五個單元體會組成一個五元體 (pentamer)，一個完整的病毒顆粒是由 12 個五元體所組成的一個正二十面體 (Klug and Caspar, 1960; Burness *et al.*, 1970; Erickson *et al.*, 1983; Samina *et al.*, 1997)。

此病毒可以分成 7 種血清型，分別為 O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2 及 SAT 3，此 7 種血清型又可以再細分為 80 種以上的血清亞型。O、A、C 三型病毒在世界各地廣泛分布，其中以 O 型分布範圍最廣，次為 A 型，Asia 1 主要在亞洲地區，SAT 1、SAT 2 及 SAT 3 則大多分布在非洲。這些血清型別之間沒有交叉保護力的作用 (Donaldson *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1997; Doel, 2003)，甚至同個血清型中的不同亞型之間也不一定有完整的保護能力 (Grubman and Mason, 2002)。

2.2.2 病毒基因與蛋白

口蹄疫病毒的基因體約含有 8,450 個鹼基 (bases)，上有一個 open reading frame (ORF)，可轉譯出一條由 2,332 個胺基酸組成的 polyprotein (Forss *et al.*, 1984; Rueckert, 1996)，基因體的 5' 端有一個約 22-24 賽基酸大小且由磷酸雙酯鍵進行結合的基因連接蛋白 VPg (Grubman, 1980; Nayak *et al.*, 2006)。3' 端則帶有長約 100 個鹼基的聚腺嘌呤 (polyadenylic acid, poly-A-tail)。基因的兩端各有一段非轉譯區間 (non-translated region, NTR)，這些序列具有高度的保留性，5' 端的 NTR 由 1,300 個鹼基所構成 (Forss *et al.*, 1984; Grubman *et al.*, 1984)，可能與病毒轉譯、核糖核酸複製、決定宿主範圍及病毒毒力相關 (Svitkin *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 2003)；至於 3' 端的 NTR 則是核糖核酸複製過程所必需 (Barton *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2001)。

由 L、2A 及 3C 所形成的蛋白酶可將 polyprotein 產物進行切割 (Rueckert, 1996; Samuel and Knowles, 2001)，基因由 5' 端到 3' 端的排列依序為 L、1A、1B、1C、1D、2A、2B、2C、3A、3B、3C 及 3D。其中 1A、1B、1C 及 1D 的最終產物分別為結構蛋白 VP4、VP2、VP3 與 VP1，其餘產物則為非結構蛋白 (Borman *et al.*, 1994) (圖二)；口蹄疫的非結構蛋白和病毒 RNA 的複製及蛋白質的摺疊組裝有關 (Jelokhani-Niaraki *et al.*, 2010)，結構蛋白則是構成病毒的外鞘。

2.2.3 病毒抗原構造

目前 FMDV 已經找到五個中和抗原決定位 (antigenic site)，其中抗原決定位 Site 1、Site 3 及 Site 5 於結構蛋白 VP1 上，Site 2 及 Site 4 則分別位於 VP2 及 VP3 上 (Crowther *et al.*, 1993)，在 VP1 上的三個抗原決定位中又以 Site1 最受人關注，因為其胺基酸序列 140-160 (β G- β H loop) 突出於平滑的病毒表面，此立體結構就

了其免疫上的重要性，易於被宿主免疫系統辨認，可誘發中和抗體；另外，此段序列包含了 Arg-Gly-Asp (RGD)，被發現可以和宿主細胞上的 RGD-dependent integrin 結合 (Mason *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997)，而且這個序列在各血清型間具有高度保留性 (Mason *et al.*, 1994)，並且和病毒的感染能力有關，若將此序列 (RGD) 做單點突變，口蹄疫病毒則會喪失其感染能力 (Mason *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997)。因此，Site 1 是目前大家公認 FMDV 最為重要且較少結構依賴性 (less conformation-dependent site) 的中和抗原決定位 (Xie *et al.*, 1987)。

2.2.4 病毒物理化學特性

口蹄疫病毒因為不具有封套，所以對有機溶劑沒有敏感性。在冷藏、冷凍的低溫狀態及中性環境下很穩定，可以存活很長時間，但對高溫及酸鹼性很敏感，若是溫度高於 50°C 及 pH 值低於 6.5 則會被不活化 (Sellers, 1968; Davies, 2002)。病毒對於氫氧化鈉、碳酸氫鈉及檸檬酸鈉的化學藥品敏感，因此可利用清洗和消毒將病原清除。病毒可存在屠體中，但若是屠宰後 48 小時，骨骼肌 pH 值低於 6.0，病毒則會被不活化；然而病毒可存活於淋巴結或骨髓中 (Davies, 2002)，且若是此含有病毒的組織是冷凍保存，則病毒可以存活數年之久。

2.2.5 病毒生長特性

口蹄疫病毒可以在初代細胞及細胞株中生長，初代細胞如：牛甲狀腺細胞 (bovine thyroid cell)、小羊腎細胞 (newborn ovine kidney cell) 及豬腎細胞 (swine kidney cell) 增殖；也可以在細胞株例如：小倉鼠腎細胞 (baby hamster kidney cell, BHK-21 cell) 或豬腎細胞 (IB-RS-2 cell) 內生長，BHK-21 cell 為目前最常使用的細胞株 (Dunn and Donaldson, 1997)。

病毒的整個複製過程都在細胞質中進行，首先必須脫去外鞘蛋白使基因體進入細胞，此過程與結構蛋白 VP4 相關。基因體進入宿主細胞後，開始進行病毒遺傳訊息的複製、轉錄、轉譯、切割蛋白質、病毒顆粒組裝、釋放病毒同時抑制宿主細胞轉錄及轉譯作用。病毒感染一小時內，細胞形成染色質著邊 (marginated chromatin) 現象，感染後 2.5-3 小時，細胞質內出現膜狀空泡。當病毒複製完成後，宿主細胞破裂釋放出病毒顆粒而產生細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE) (Fraenkel *et al.*, 1988)。

2.3 病毒流行病學

2.3.1 傳播途徑

影響口蹄疫病毒傳播的因子有很多，包括了宿主種別、動物免疫及營養狀態、族群密度、動物移動及接觸其他野生宿主動物等，另外，環境及氣候也可能造成影響。

一般來說口蹄疫的傳播方式可以分為三種，第一為直接接觸到感染動物的水泡液、尿液、唾液、排泄物、精液及胎衣等，因為這些物質裡面含有大量的病毒，若是接觸到具感受性動物則很容易造成病毒傳播，此為 FMD 最常見的傳播方式 (Donaldson and Kihm, 1997)。第二種則是間接的透過人、器具、鳥類、廚餘、昆蟲及車輛等方式傳播，因為人進入疫區後，可以機械性的在鼻腔或是咽喉保毒 3-21 小時 (McCullough *et al.*, 1992)。車輛接觸病畜後，若未經徹底消毒，則很容易在牧場間散播病毒。另外，病毒可在骨髓、淋巴結及內臟中存活數日，若是餵食豬隻的餽水未經煮沸或是飼料中含有受汙染的成分如肉骨粉等，經具感受性的動物食用後也可能造成感染 (Donaldson and Kihm, 1997; Haydon *et al.*, 1998)。

最後一種則是空氣傳播，發病動物會經由呼吸而排出大量具有感染能力的病毒，造成場內感染；若是配合氣候條件，例如陰天、空氣涼爽、高濕度 (相對濕度

高於 60%)、雲層低、無對流及低風速往同一方向，則病毒可藉由空氣傳播達 100-250 公里，進而造成牧場間感染 (Donaldson *et al.*, 1982; Donaldson and Kihm, 1997)。

2.3.2 宿主動物

口蹄疫可以感染所有的偶蹄類動物，自然宿主包括了豬、牛、山羊、綿羊、鹿、駱駝、豪豬、羊駝及印度象等；實驗上經由人為接種可感染小白鼠、大白鼠、家兔及天竺鼠等動物。

就口蹄疫病毒而言，豬不是本病毒的保毒者，因為其感染後 14-28 天病毒就會被清除，沒有持續感染的情形 (Kitching, 1992; Salt, 1993)；但豬隻受到感染後，每日經由呼吸所排出的病毒量是牛、羊的 3,000 倍 (Donaldson and Kihm, 1997)，為口蹄疫病毒最重要的增幅動物 (Saiz *et al.*, 1993)。相對於豬隻，牛、羊雖然不會大量增幅病毒，但卻可以成為持續感染的保毒者，一般來說牛隻可以保毒 1-3 年，山羊和綿羊則分別為 4 及 9 個月 (Salt, 1993; Donaldson and Kihm, 1997)。

2.3.3 致病機轉

病毒大多由呼吸道、消化道、皮膚及黏膜等處侵入，利用 RGD 或其他方式附著進入宿主細胞 (Domingo *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2002)；首先在咽喉或扁桃腺複製，再由藍罕氏細胞 (Langerhan's cell) 經血液將病毒送往身體各處 (Di Girolamo *et al.*, 1985)。病毒對於口、鼻、吻部、舌、蹄冠、乳房及乳頭等上皮極具親和性，主要繁殖於這些細胞的細胞質內。

豬隻感染口蹄疫大多是經由食入被汙染的食物及接觸感染動物而造成，吸入病毒顆粒導致感染的情形較少見 (Alexandersen *et al.*, 2002)，但感染豬隻呼吸所排出的病毒量遠比牛、羊來得多，因此懷疑病毒可能主要在鼻腔黏膜複製 (Oleksiewicz *et al.*, 2001)。

牛隻主要由呼吸道吸入病毒顆粒而造成感染 (Donaldson *et al.*, 1987)，並且在咽喉或是肺部進行病毒複製，72 小時候再經由血液散佈到口腔表皮細胞、軟顎、扁桃腺、淋巴結及足部 (Sutmoller and McVicar, 1976; Burrows *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1996)。

羊隻對於噴霧方式感染病毒非常敏感，而且可以直接排出病毒，但感染後臨床症狀並不明顯，常會因此延誤疫情的控制 (Kitching and Hughes, 2002)。2001 年英國所爆發的口蹄疫就是因為沒有及早發現並隔離感染的羊隻而造成疫情難以控制，並且散播感染其他動物 (Scudamore and Harris, 2002)。

2.3.4 臨床症狀

豬隻感染口蹄疫的潛伏期依不同的病毒株、感染劑量、感染方式及個體不同而有所差異；普遍來說大約是兩天以上。感染豬隻會出現跛行、發燒、沉鬱、食慾降低、蹄部冠狀溝皮膚變白及脫蹄等症狀，水泡最常出現在冠狀溝，其他地方如腳跟、鼻吻、下頸及舌頭則較少發生。成年豬隻感染後會自然痊癒，死亡率約 5%；而 8 週齡以下的豬隻在病毒感染後容易造成急性心肌炎，導致心臟衰竭而死亡，死亡率可高達 100% (Kitching and Alexandersen, 2002)。

牛隻感染口蹄疫的潛伏期為 2-14 天 (Gailiunas *et al.*, 1966)。急性感染牛隻會出現流涎及鼻腔分泌物，患畜喜歡躺臥，乳牛泌乳量下降且常伴隨繼發性乳房炎。水泡常出現在舌頭、口鼻、牙齦、蹄部冠狀溝及趾間。感染動物大多最後會發展成病毒血症，幼年動物也可能因為病毒破壞心肌細胞而死亡 (Kitching, 2002)。

羊隻感染後潛伏期約 3-8 天，臨床症狀為口足病灶、跛行、病毒血症、發燒及泌乳量減少，但 25% 感染羊隻不會出現臨床症狀，另外 20% 只會出現單一種可見的病灶 (Kitching and Hughes, 2002)。

2.3.5 組織病理變化

組織病變主要出現在角化複層鱗狀上皮，細胞出現汽球樣變化 (ballooning degeneration) 且細胞質增加嗜酸性、細胞間水腫，最後細胞破裂、壞死並伴隨單核球及顆粒球浸潤；骨骼肌細胞會出現玻璃樣變化 (hyaline degeneration)。病毒感染年幼動物的心肌，發展為淋巴球組織球性心肌炎，病灶最常出現在左心室壁，肉眼下呈現灰色條紋，稱為虎斑心 (Kitching, 2002; Kitching and Alexandersen, 2002; Kitching and Hughes, 2002)。

2.3.6 宿主免疫反應

宿主動物經口蹄疫病毒自然感染及疫苗免疫後，最初以體液免疫為主，所誘發之專一性體液反應可保護動物免受同一血清型病毒的再次感染 (McCullough *et al.*, 1992; Salt, 1993)。這些免疫反應主要是針對病毒表面結構蛋白上的中和抗原決定位 (Mulcahy *et al.*, 1990; Salt *et al.*, 1996; Capozzo *et al.*, 1997)。感染早期，會先誘發免疫球蛋白 IgM，3-4 天後 IgG 被誘發而成為主要的抗體，這些抗體具有高度的血清特異性，感染後 7-10 天可以被偵測到。抗體反應使病症開始減輕，病毒釋出量降低及病毒血症終止，血清抗體的高峰約在第 28 天，牛隻體內檢測出抗體可長達 4.5 年 (Salt, 1993)。另外，在患畜上呼吸道及胃腸道的分泌物中可以偵測到所有的抗體 (Saiz *et al.*, 1993; Salt, 1993; Salt *et al.*, 1996)。巨噬細胞也可以利用吞噬作用中的調理素將病毒清除 (McCullough *et al.*, 1988; McCullough *et al.*, 1992; Rigden *et al.*, 2003)。

細胞免疫對於感染口蹄疫動物對抗病毒的重要性有許多爭議，經口蹄疫自然感染及疫苗免疫後，可在動物體內偵測到 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 細胞的存在 (Collen *et al.*, 1990; Garcia-Valcarcel *et al.*, 1996; Childerstone *et al.*, 1999; Bautista *et al.*, 2003)，因此推測動物體在持續感染的情況下，細胞免疫也會一同參與病毒清除 (Hynes, 1992;

Childerstone *et al.*, 1999)。

口蹄疫的保毒狀態是種不顯性的持續感染，可間歇的在咽喉分離到病毒 (Kitching, 1992; VaMateu *et al.*, 1995)，只有反芻動物會成為保毒者，豬隻感染恢復後 14-28 天病毒即從體內消失 (Kitching, 1992)。一般而言牛隻可保毒約 1-3 年、水牛約 22 個月；山羊及綿羊則分別為 4 及 9 個月 (Salt, 1993)。

2.4 診斷方法

能夠精確診斷口蹄疫的感染，對於疫情的控制及撲滅都是非常重要的，目前常使用的診斷方法如下所述。

2.4.1 補體結合試驗 (Complement Fixation Test, CFT)

CFT 可分為兩個部分，首先將已知抗原及待測抗體混合，再加入定量補體；若抗原抗體結合形成免疫複合物，則補體會被消耗。接著在此混合物中加入溶血素致敏化綿羊紅血球，若補體與免疫複合物完全結合，沒有多餘補體，則綿羊血球不會溶血，結果為陽性，表示待測檢體中有特異性抗體存在，出現陽性結果時血清檢體最高稀釋倍數為抗體的效價；反之則為陰性。

雖然 CFT 是一個快速的檢測方法，但其較不敏感且不具特異性，有時會受檢體內抗補體因子的干擾 (Ferris and Dawson, 1988; Donaldson and Kihm, 1997)。

2.4.2 病毒分離 (Virus Isolation)

病毒是細胞內寄生的生物，故需活體系統方可培養。口蹄疫病毒可以用初代細胞及細胞株來培養，最敏感的細胞是初代牛甲狀腺細胞 (Snowdon, 1966)；目前較常使用的細胞則為幼年倉鼠腎臟細胞株 (baby hamster kidney cell, BHK-21)。將待測樣本混合具感受性細胞培養於 37°C、48 小時，若出現細胞病變 (cytopathic

effect, CPE)，為陽性；若經過三次盲目繼代仍無 CPE 出現，則判定為陰性。

病毒分離的缺點主要是因為細胞培養系統不容易建立、維持系統耗費金錢、耗時、相對的敏感性較低，且活毒的操作需要於 P3 實驗室內進行同時還牽涉到操作人員的經驗累積 (Longjam *et al.*, 2011)。

2.4.3 酶素連結免疫吸附試驗 (Enzyme-Link Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA 的原理及介紹在第二章第六節有詳細說明。

2.4.4 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 非常廣泛的應用於各種以核酸為主的診斷技術，此技術利用 DNA 的變性、黏合及延伸等三步驟的循環，將病毒基因片段進行連續擴大增幅，確認病原的存在，對於病毒量稀少的檢體，也可有效的將病原檢出。

口蹄疫檢驗工作常用的 PCR 技術有三種，分別為反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、多重引子組聚合酶鏈鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction, mPCR) 及即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)。

RT-PCR 是很可靠的診斷工具，可直接利用 RNA 來進行增幅，依操作步驟可以分為一步法 (one-step) 及二步法 (two-step)。一步法 RT-PCR 操作流程較快速，可以減少汙染機會，但一般認為二步法敏感性較佳 (Suarez *et al.*, 2007)。mPCR 利用多個引子來同時增幅一個以上的目標序列，可以利用同一個病材來區分不同的病原，或是區分同一病原的不同病毒株。Real-time PCR 為一個快速、敏感、特異且可將病毒核酸定量的檢測技術，可提供精準的診斷 (Longjam *et al.*, 2011)。

2.4.5 血清中和試驗 (Serum Neutralization Test, SN test)

將待測血清連續稀釋並與定量病毒感染作，再加入對口蹄疫病毒具有感受性的細胞，培養 48 小時後觀察細胞是否出現 CPE 來判斷此待測血清的中和抗體力價高低。藉由中和抗體力價的高低，我們可以了解疫苗對於動物的免疫成效，但此試驗無法區別抗體來源是自然感染或是疫苗免疫 (Meyer *et al.*, 1997)。

2.5 預防與控制

在 19、20 世紀時，口蹄疫疫苗尚未研發出來，控制疫情的方法以移動管制、撲殺及消毒為主要。直到 1930 年，早期的口蹄疫疫苗問世，疫苗免疫及血清學監控也一併成為口蹄疫防治的重要策略。



2.5.1 移動管制

因為口蹄疫可藉由直接、間接的和感染動物、汙染物品、病畜製品接觸及透過空氣傳播而感染。因此，在疾病發生時，管控病畜的移動對於控制疫情擴散是個非常重要的因素，1997 年臺灣口蹄疫疫情快速擴散的原因之一，就是沒有立即關閉家畜拍賣市場 (Yang *et al.*, 1999)，同時病豬經由車輛裝載南北運送，造成疫情快速的擴散。

2.5.2 撲殺

執行撲殺政策前需要考量幾個因素，包括發病率的高低、疫情調查及通報效率、移動管制效率及經濟成本等因素 (Kitching, 1992)。施行撲殺的好處是，當最後一頭發病動物撲殺完成後，該國經過三個月即可迅速恢復為口蹄疫非疫國，而且在國際貿易上，可在短時間內恢復外銷。缺點為需要大量人力及造成嚴重經濟損失，且撲殺後若未確實做好屍體處理及周邊環境消毒，仍有散播病原的可能性。

2.5.3 疫苗免疫

1930 年, Waldmann 等人利用福馬林將感染動物上皮細胞及水泡液中的病毒不活化而成為死毒疫苗 (Brooksby, 1982)，但因為病毒量少，無法大量生產疫苗。到了 1947 年，Frenkel 利用病毒感染健康牛的舌頭，增加了病毒產量也解決了疫苗供應的問題 (Brown, 1992)。現今則是利用病毒可在細胞株 BHK-21 上大量增殖的特性，成為主要生產疫苗的方式之一 (Rweyemamu and Leforban, 1999)。

根據流行病學的統計，群體中 80% 以上的動物具保護力價的抗體，才能夠防止疾病的爆發 (Doel, 1999)，定期施打疫苗也可以減少帶原者的比例。因此，全面落實有效的疫苗免疫，對於防疫工作是非常重要的。

現今全世界所使用的口蹄疫疫苗，主要是以純化不活化的全病毒作為抗原成分 (Sørensen *et al.*, 1998)，因此免疫動物只會誘發對抗結構蛋白的抗體，自然感染動物則會同時誘發抗結構蛋白及非結構蛋白的抗體。藉由此差異，檢測抗非結構蛋白的抗體，可從免疫動物群體中區分出自然感染動物，目前已有商業化 ELISA 套組如 PrioCHECK® FMDV NS 及 UBI® FMDV NS ELISA，可用來協助診斷自然感染口蹄疫。而檢測抗結構蛋白的抗體，雖無法區分免疫或感染動物，但針對免疫動物檢驗可以得知免疫後動物體內保護抗體力價的高低。

2.5.4 血清學監控

動物經過免疫後，主要利用血清中和試驗 (serum neutralization test, SN test) 來檢測免疫後動物體內的抗體力價是否足以保護動物免於受到外來病毒的感染。SN test 的操作方法如 2-4.5 所描述，但因為其檢驗過程會用到口蹄疫活病毒，所以必須在密閉、隔離且負壓的 P3 實驗室內操作。

2.6 酵素連結免疫吸附試驗

大約從 1975 年開始，酵素連結免疫吸附試驗 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA) 普遍成為許多傳染性疾病的診斷工具，直到現今 ELISA 已經成為目前最常使用的血清學診斷工具之一。在診斷口蹄疫方面，最早的記錄是 Abu Elzein 及 Crowther 將間接型 ELISA (Indirect ELISA) 用於診斷牛隻口蹄疫的抗體 (Abu Elzein and Crowther, 1978)。後來的研究利用恢復期牛的免疫球蛋白 (convalescent bovine immunoglobulin) 作為捕捉抗體 (capture antibody) 及抗 146S 的天竺鼠血清作為偵測抗體 (detector antibody)，發展出三明治 ELISA (sandwich ELISA) 來偵測及定量感染組織培養液及上皮組織樣本中的口蹄疫病毒 (Crowther and Abu Elzein, 1979)；若是用兔抗 146S 的免疫球蛋白取代恢復期牛的免疫球蛋白作為 capture antibody，則可以增加整個 ELISA 系統的敏感性 (Ouldridge *et al.*, 1982)。後來發展的 ELISA 經過不同的修飾調整，可用來偵測、分型 (typing) 及區分不同的病毒株。

2.6.1 ELISA 原理

ELISA 的原理是將抗原或抗體塗鍍 (coating) 在固定相 (solid phase) 上，將酵素標示到抗體分子上，以偵測抗原抗體反應。由於酵素活性使受質 (substrate) 呈色，利用分光光度計判定呈色的強弱，可用於抗原或抗體之定性與定量試驗 (Crowther, 2001)。

固定相材質包括了 polyvinyl、polypropylene、polycarbonate、glass 及 silicone rubber 等 (Voller *et al.*, 1978)，而 polystyrene 是目前最普遍使用的材質。抗原塗鍍的型式有很多種，例如全病毒、次單位蛋白、重組蛋白及合成勝肽等。塗鍍的條件以 37°C 作用 1-3 小時和 4°C 作用隔夜最常使用，溫度太高可能對抗原造成傷害。

塗鍍完成後加入阻斷劑，例如胎牛血清、脫脂奶粉及清潔劑等，目的為阻斷固定相的結合位置及減少非特異性結合 (Crowther, 2001)。標示抗原或抗體的酵素

有 alkaline phosphatase (AP)、horseradish peroxidase (HRP)、glucose oxidase 及 β -d-galactosidase 等，又以前兩者較常使用 (Voller *et al.*, 1978)。

ELISA 的優點為快速且方便操作，可同時檢測大量樣品並具有較高的敏感性及特異性，且以機器判讀結果較無人為誤差 (Shafer *et al.*, 1998)。

2.6.2 ELISA 分類

2.6.2.1 直接型 ELISA (Direct ELISA)

將待測抗原塗鍍在微量盤上，加入標示酵素的抗體與抗原結合。多用於抗原的定性試驗，較少用於定量 (Crowther, 2001)。

2.6.2.2 間接型 ELISA (Indirect ELISA)

將抗原塗鍍在微量盤上，加入待測抗體為一抗與抗原反應，再加入標示酵素的抗體作為二抗與一抗結合。二抗為專一性對抗一抗來源動物免疫球蛋白之抗體 (Crowther, 2001)。目前已有商品化間接型 ELISA 套組，可用來檢測抗 FMDV 非結構蛋白的抗體，藉此從免疫動物群體中區分出感染動物。間接型 ELISA 的缺點為，需使用純度高的抗原來塗鍍，且二抗具有種別特異性，只適用於單一動物種別。

2.6.2.3 三明治 ELISA (Sandwich ELISA)

主要用於檢測抗原，可區分為直接型及間接型。直接型的做法為塗鍍抗體作為 capture antibody，加入抗原與其反應，再加入有標示酵素的 detector antibody 與抗原結合。capture antibody 與 detector antibody 的來源動物可為相同或不同種別 (Crowther, 2001)。一般以單源抗體作為 capture antibody 以提高特異性，且以選用抗不同 epitope 的單源抗體作為 detector antibody 可提高敏感性 (Bucher *et al.*, 1991)。

間接型與直接型的主要差別在於，間接型使用無標示酵素的抗體作為 detector antibody，另外再加入以標示酵素且抗 detector antibody 來源動物免疫球蛋白的抗體作為二抗。capture antibody 與 detector antibody 的來源動物需為不同種別，以防止二抗直接跟 capture antibody 反應而產生偽陽性 (Crowther, 2001)。以單源抗體作為 capture antibody 而多源抗體作為 detector antibody 的敏感性比以多源抗體為 capture antibody 而單源抗體做為 detector antibody 來得好 (Bucher *et al.*, 1991)。

2.6.2.4 競爭型 ELISA (Competitive ELISA)

競爭型 ELISA 可用於偵測抗原或是抗體。檢測抗體的方式可分為直接型與間接型，直接型競爭型 ELISA 的方法為塗鍍抗原，將待測抗體及已標示酵素的 tracer antibody 混合後與抗原反應以競爭 epitope。間接型的原理相同，但 tracer antibody 無標示酵素，另外再加入已標示酵素的抗 tracer antibody 來源動物免疫球蛋白的抗體作為二抗。待測血清與 tracer antibody 的來源需為不同動物種別，以防止二抗直接與待測血清反應而產生偽陽性 (Crowther, 2001)。

2.6.2.5 阻斷型 ELISA (Blocking ELISA, bELISA)

為競爭型 ELISA 的一種，也可分為直接與間接型。直接型作法為先在微量盤中塗鍍抗原，加入待測抗體與抗原感作一段時間後再加入已標示酵素的 tracer antibody 與抗原作用，以結合抗原上未與待測抗體結合的 epitope。間接型的原理相同，但 tracer antibody 無標示酵素，另外再加入已標示酵素的抗 tracer antibody 來源動物免疫球蛋白的抗體作為二抗。待測血清與 tracer antibody 的來源需為不同動物種別，以防止二抗直接與待測血清反應而產生偽陽性 (Crowther, 2001)。

2.6.3 ELISA 應用

檢測抗原、半抗原 (hapten) 及抗體，可用於內分泌學檢測、蛋白質檢測、感染性病源檢測及流行病學篩選時的抗體檢測 (Voller *et al.*, 1978)。

2.7 單源抗體

2.7.1 歷史背景

1975 年，Köhler 及 Milstein 將經綿羊紅血球免疫的 BALB/c 小鼠脾臟細胞及小鼠骨髓瘤細胞株 (myeloma) 融合，成為能夠分泌抗綿羊紅血球抗體的融合瘤細胞 (hybridoma)，此舉成功將兩種細胞的優勢結合，從此將生物醫學研究帶入一個新的時代，也開啟單源抗體 (monoclonal antibody, MAb) 生產的研究。兩位學者也因為傑出貢獻於 1984 年獲頒諾貝爾醫學獎 (Köhler and Milstein, 1975; Cambrosio and Keating, 1992)。

2.7.2 單源抗體原理

正常情況，一個 B 淋巴球只會分泌一種具有專一性且對抗一個 epitope 的抗體，但淋巴球的壽命有限，不可能無限制生長。而骨髓瘤細胞是由 B 淋巴球所轉變而成的腫瘤細胞，可以長期體外培養並且可以不斷分裂增生。Köhler 及 Milstein 利用化學物質 PEG (polyethylene glycol) 將經過特定抗原處理的 B 淋巴球及不會分泌抗體的骨髓瘤細胞融合而成融合瘤，此融合瘤細胞同時兼具了 B 淋巴球及骨髓瘤的特性，既能夠分泌特異性抗體又能夠離體培養持續分裂生長。

將此融合瘤細胞進行極限稀釋 (limiting dilution) 並進行專一性之篩選，經過單源化後的融合瘤所分泌的抗體即為單源抗體。單源抗體的生產方式可直接培養融合瘤細胞收集上清液或是打回小鼠腹腔收集腹水。

2.7.3 單源抗體應用

單源抗體有許多的優點，例如來源穩定、純化容易及對抗原具專一性。藉由這些特點單源抗體不僅可以運用在基礎研究技術上，例如西方墨點法、免疫組織化學染色、ELISA 及免疫沉澱法等；還可以實際的運用在臨床醫學的診斷及治療，如懷孕、腫瘤、愛滋病及感染源的診斷及自體免疫性疾病或藥物毒素的治療 (Tami *et al.*, 1986; Reichert and Pavolu, 2004; Saleem and Mustafa, 2010)。

單源抗體應用於口蹄疫診斷的方面，市售檢測口蹄疫非結構蛋白的商業化 ELISA 套組 PrioCHECK® FMDV NS，研發過程中一開始是利用多源抗體做為 capture antibody 及 tracer antibody，但是為了能夠將 ELISA 套組生產過程標準化，便以單源抗體取代多源抗體的使用 (Sørensen *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 2005)。根據 2006 年 Brocchi 等人所做的試驗，PrioCHECK® FMDV NS kit 對於檢出免疫後感染牛隻的敏感性及特異性分別高達 90% 及 99% 以上 (Brocchi *et al.*, 2006)。



第三章 材料與方法

3.1 病毒製備

3.1.1 口蹄疫病毒株

我們所使用的口蹄疫病毒為 1997 年臺灣所爆發口蹄疫的感染豬隻水泡病變組織所分離出的病毒株，FMDV O/TW/97 由行政院農業委員會家畜衛生試驗所分讓。

O/TW/97 病毒株為製備單源抗體的抗原，並且使用於免疫螢光染色法 (immunofluorescent assay, IFA) 及血清中和試驗，此毒株為親豬型病毒，在自然傳播途徑下，不會感染反芻動物。口蹄疫病毒的操作及使用過程，都是在行政院農業委員會家畜衛生試驗所 P3 實驗室內所執行。

3.1.2 細胞培養與繼代

使用對於口蹄疫病毒具有感受性的細胞株 BHK-21 (baby hamster kidney cell)，用於病毒增殖、免疫螢光染色法及血清中和試驗。將 BHK-21 細胞培養於含有 5% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 及 1% 廣效性抗生素 (ampicillin, streptomycin and amphotericin; Biological Industries, Israel) 的 Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, pH 7.0-7.2; Gibco, NY, USA)，並且放置於含有 5% 二氧化碳、37°C 的培養箱中培養。

BHK-21 細胞為貼覆型角型細胞，每週繼代兩次，當細胞長至八分滿時即可進行繼代。繼代培養時先將原培養瓶中的培養液倒掉，以 150T flask 為例，用 10 mL 滅菌 PBS 溶液 (Gibco, NY, USA) 清洗二次後倒掉，再加入 2 mL 0.16% Trypsin (Gibco, NY, USA) 消化細胞，室溫或 37°C 靜置約 2 分鐘，待細胞呈現圓形化時將細胞拍打下來，取 7 mL 培養液於 flask 中並將細胞沖散，之後將液體全部吸起，

留下 3 mL 細胞懸浮液，其他加入新的 flask 中，加入 DMEM 培養液到 25-30 mL，輕輕搖晃使細胞均勻懸浮分布，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養。

3.1.3 口蹄疫病毒的增殖

將已培養 2-3 日齡的單層 BHK-21 細胞株，倒去原有培養液；另外吸取 FMD O/97 病毒液 (10^7 TCID₅₀/0.1mL) 稀釋在適量的 DMEM 培養液中並且均勻混合，接著將稀釋好的病毒液倒入和單層 BHK-21 細胞置於 37°C 中感作 30 分鐘，緩慢震盪培養。倒去含有病毒的 DMEM 培養液，再加入 50 mL 含 2% 胎牛血清及 1% 廣效性抗生素的 DMEM 培養液，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中進行培養。約 12-16 小時候後可以觀察到 95% CPE，再將此病毒液經冷凍解凍二次後於 4°C 以 3,500 rpm 離心 20 分鐘 (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Germany) 去除病毒液中的細胞碎片，收集含有病毒的上清液集中保存於-80°C，以供病毒濃縮、純化及測定病毒力價使用。

3.1.4 口蹄疫病毒力價測定

根據 1938 年 Reed 及 Muench 所發表的 50% 細胞培養感染劑量 (50% tissue culture infection dose; TCID₅₀) 算法 (Reed and Muench, 1938)。使用 96 孔微量培養盤，利用細胞培養液將病毒液做 10 倍連續稀釋，每一稀釋倍數接種 8 孔，每孔加入 50 μL 病毒液。接著，於微量培養盤內加入 100 μL 的 BHK-21 細胞懸浮液 (2×10^5 cell/well) 感作，放置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養，兩天後觀察細胞之 CPE 情形並計算其力價。

3.1.5 口蹄疫病毒濃縮

取 100 mL 病毒液經過 2 次冷凍解凍後，使細胞破裂而釋出病毒，接著以 4°C、

3,500 rpm 離心 20 分鐘 (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Germany) 去除病毒液中的細胞碎片。將離心後的上清液倒至已滅菌之血清瓶中，加入約 3% 體積 (5 mL : 152 μ L) 的 0.1 M 2-binary ethylenimine (BEI; Sigma, St. Louis, USA; 0.1 M BEI 溶於 0.175 N NaOH 溶液)，置於 37°C 震盪 24-48 小時使病毒不活化。

取 50 mL 之高速離心管，加入 6 mL 30% 蔗糖溶液在底部當緩衝，貼壁緩慢加入不活化之病毒液 30 mL，避免破壞分層。將 50 mL 之高速離心管 (Ultra-ClearTM tubes, Beckman) 以 4°C、70,000 $\times g$ 離心 (AvantiTM J-25.5 Centrifuge, Beckman) 2 小時，倒去上清液，此時病毒 pellet 會附著於離心管底，將離心管加入適量 (50 μ L/tube) TEN buffer (Tris base 1.21 g, EDTA 0.38 g, NaCl 5.84 g, 溶於 1,000 mL distilled water) 於 4°C 放置隔夜，隔日將病毒 pellet 回溶即完成病毒濃縮。

3.2 單源抗體製備

3.2.1 單源抗體來源

過去本實驗室曾利用口蹄疫病毒 O/97 免疫 BALB/c 小鼠，來製備單源抗體 (Cheng *et al.*, 2006)，其中一株 Q10E-3 辨認的位置剛好就在口蹄疫病毒中和抗原決定位 Site 1 (RGD motif) (表一、表二)，本實驗便選用此株單源抗體來進行後續的研究。

3.2.2 單源抗體生產

選擇約 2 月齡之 BALB/c 小鼠以腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐劑 (Freund's adjuvant, incomplete, Sigma[®], Missouri, USA)，一週後取擴養滿一罐 25 cm^2 培養瓶之融合瘤細胞株 (細胞數約 1×10^6 個細胞) 進行小鼠腹腔注射。待 2-3 週後小鼠腹部膨大，表示已有腹水產生 (內含有高濃度單源抗體)，以無菌針筒抽取小鼠腹水，離心收取上清液並分裝於 1.5 mL eppendorf 後保存於 -20°C 中備用。

3.2.3 單源抗體純化

使用 Vivapure miniprepG spin column kit (Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Germany) 從小鼠腹水中純化出單源抗體，其原理主要是利用 protein G 對於抗體的親和力來吸附抗體，接著透過酸鹼度的改變而將抗體沖洗出來，而達到純化抗體的效用。

純化前先將腹水以 $7,000 \times g$ 離心 5 分鐘 (Microfuge® 16 Centrifuge, Beckman Coulter)，通過 $0.22 \mu m$ 過濾膜，以去除腹水中的細胞碎片等雜質，接著將過濾好的腹水及 binding buffer (0.1 M Sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 1 : 1 混合均勻。將含有 protein G 的栓子放入離心管，再將離心管放到收集管內，加入 0.65 mL binding buffer 以 $1,800 \times g$ 離心 1 分鐘，倒去收集管內的廢液，此步驟重複兩次做為前平衡。接著加入除去雜質且稀釋好的腹水 0.65 mL，以 $640 \times g$ 離心 6 分鐘，倒去廢液，再加入 0.65 mL binding buffer 以 $1,800 \times g$ 離心 1 分鐘清洗，此步驟共進行三次，並將離心管取出放入 2 mL eppendorf，並在 eppendorf 內先加入 65 μL 的 neutralization buffer (1 M Tris/HCl, pH 9.0)，最後加入 elute buffer (0.2 M Glycine/HCl, pH 2.5) 以 $1,800 \times g$ 離心 1 分鐘，此時離心下來的液體即為純化的單源抗體。

3.2.4 單源抗體透析

在純化單源抗體過程中，使用到的緩衝溶液內包含了 Glycine 及 Tris 等小蛋白質分子，為了避免這些小蛋白質分子影響到後續的單源抗體定量及標示過氧化氫酶等試驗，故先利用透析將這些小蛋白質去除。

首先，剪取適當長度的透析袋 (Molecular porous membrane tubing, Spectra/Por®) (molecular weight cutoff [MWCO], 12,000 to 14,000) (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) 以 DW 泡軟後即可使用，接著用透析夾 (Weighted closures,

Spectra/Por[®], Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) 將透析袋下端封閉，接著把純化好的單源抗體放入透析袋內，擠出袋內的空氣，將透析袋上端也夾緊封閉，放入 500 mL 燒杯，加入 100 倍體積的 PBS 來進行透析，並將燒杯放置於磁石加熱攪拌器 (Stirring hot plate, Corning[®], Corning Inc. USA) 上，利用旋轉子 (stir) 輕輕攪動 PBS，以利液體流動及蛋白質交換，透析過程放置於室溫隔夜，期間更換 1-2 次 PBS。

3.2.5 單源抗體定量

使用 Protein Quantification Assay kit (Macherey-Nagel, Germany) 來進行單源抗體濃度的測定。首先取 1 mL PSB (protein solving buffer) 將 BSA (bovine serum albumin) 粉末回溶至濃度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，再利用 PSB 將 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA 連續稀釋，製作成為 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.063 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.031 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 及 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白質標準溶液。

將每一個濃度的標準蛋白質溶液及待測單源抗體各取 20 μL 至 96 孔盤，每個標準稀釋倍數及樣本做二重複試驗，於每孔加入 40 μL PSB，再加入 40 μL QR (quantification reagent)，並且震盪 96 孔盤，直到樣本的顏色從藍色完全變成黃色為止，靜置室溫 30 分鐘後再輕微震盪 96 孔盤即可用分光光度計 (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent) 測 560 nm 波長之吸光值。以蛋白質標準溶液的吸光值繪製標準曲線以計算待測單源抗體的濃度。

3.2.6 單源抗體標示過氧化氫酶 (horseradish peroxidase, HRP)

使用 Lightning-LinkTM HRP Conjugation Kit (Innova Biosciences, Cambridge, UK) 將單源抗體標示 HRP 成為偵測單源抗體 (tracer MAb)。操作步驟依照產品說明書進行，先取 500 μL 單源抗體 (使抗體與 HRP 分子量比例介於 1:1 及 4:1 之

間) 與 50 μ L LL-Modifier 輕輕混合均勻後，將混合液倒入 HRP 粉末 (100 μ g) 中，靜置室溫 3 小時(或隔夜)後，加入 50 μ L 的 LL-Quencher，靜置室溫 30 分鐘即可使用。

3.3 重組結構蛋白質 (rVP1) 表現與確認

本實驗所使用含有 FMDV O/97 VP1 全長基因序列的大腸桿菌菌株，由台灣動物科技研究所動物醫學組李明昌助理研究員提供，部分資訊因牽涉台灣動物科技研究所的研究機密，故不便在此公開。

3.3.1 重組蛋白質表現

以滅菌吊菌環從冷凍保存的菌株(轉殖 FMDV O/97 VP1 基因序列的大腸桿菌)中吊菌並三部分割法至含有抗生素 Ampicillin 及 Kanamycin 的 Luria broth 固態培養基 (LB/Amp/Kana plate; 100 mg/L Ampicillin, 25 mg/mL Kanamycin, 25 g/L LB powder; Life Technologies, Frederick, MD, 15 g/L BactoTM agar powder; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, 高溫高壓蒸氣滅菌後置於 50°C 水浴槽半小時後加入 Ampicillin 及 Kanamycin 並混合均勻)，37°C 培養隔夜。

取單一菌落接種於 20 mL 含 Ampicillin (100 μ g/mL) 及 Kanamycin (25 μ g/mL) 之 LB 培養液 (LB/Amp broth; 100 mg/L Ampicillin, 25 mg/mL Kanamycin, 25 g/L LB powder 溶於 1,000 mL distilled water 中，高壓蒸氣滅菌後置於 50°C 水浴槽半小時後加入 Ampicillin 及 Kanamycin 並混合均勻)，於 37°C 震盪培養過夜。

隔日早晨，取 10 mL 過夜菌液，加入 200 mL 含有 Ampicillin 與 Kanamycin 之 LB 培養液，於 37°C 震盪培養 2 小時，至 600 nm 波長之吸光質為 0.6-0.8 間。再從 200 mL 菌液中取 20 mL 菌液，倒入 400 mL 含有 Ampicillin 與 Kanamycin 之 LB 培養液，於 37°C 震盪培養 2 小時，至 600 nm 波長之吸光質為 0.6-0.8 間。取 1 mL 菌液至 1.5 mL

eppendorf tube 中標記為 BI (before induce)。

剩餘菌液加入 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; GE healthcare, Uppsala, Sweden) 使最終濃度為 1 mM IPTG，置於 37°C 培養箱中震盪培養 3 小時，取 1 mL 菌液至 1.5 mL eppendorf tube 中標記為 AI (After induce)。

將 400 mL 菌液以 10,000 ×g 離心 30 分鐘 (HITACHI[®], Himac CR 22G, High-Speed Refrigerated Centrifuge)，倒去上清液後，以 40 mL lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 8.0) 回溶沉澱物，接著置於冰上以超音波震盪 (Vibra CellTM, SONICS) 破菌，以 20% 之強度反應 2 秒停 4 秒，連續作用 20 分鐘，可見菌液由混濁變為澄清。破菌完後先取 1 mL 菌液至 1.5 mL eppendorf tube 中，以 10,000 ×g 離心 1 分鐘 (Microfuge[®] 16 Centrifuge, Beckman Coulter) 後收集上清液與沉澱物並分別標示為 S 與 P，其餘菌液以 10,000 ×g 離心 10 分鐘 (HITACHI[®] RX series, Himac CF 15RX, High-Speed Micro Centrifuge) 倒去上清液保留沉澱物，待之後進行重組蛋白質純化。將標記 BI 及 AI 之 1.5 mL eppendorf tube 以 10,000 ×g 離心 1 分鐘 (Microfuge[®] 16 Centrifuge, Beckman Coulter) 後去除上清液，將標示 BI、AI、S 與 P 之產物進行蛋白質電泳。

3.3.2 重組蛋白質之電泳分析與確認

3.3.2.1 聚丙烯醯胺膠片電泳 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)

將表現重組蛋白與 6× protein sample buffer (0.06% bromphenol blue, 12% SDS, 60% glycerol, 300 mM Tris-HCl, 600 mM DTT, pH 6.8) 以體積比 5:1 於 100°C 加熱 10 分鐘後，置於冰上，準備蛋白質電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。SDS-PAGE 製備方法如下：先泡製 12% 下層膠 (分離膠; separating gel)，注入已組裝好 gel cassette 之玻璃片中，再輕輕加入水層，待膠

體凝固後再加入 5% 上層膠 (焦集膠體; stacking gel) 並插入所需電泳梳 (comb)，待膠凝固後放入電泳槽並加入 running buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)。將製備好之病毒液與標準 Protein Marker (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas, Harrington, USA) 或 Protein Marker (BLUeye Prestained Protein Ladder, Gene DireX, Inc. Nevada, USA)一同加入膠體中，電泳條件設定為 60 伏特 25 分鐘後轉換成 90 伏特 75 分鐘。電泳完成後將膠體轉漬 (transfer) 以進行西方墨點法。

3.3.2.2 西方墨點法 (Western blot, WB)

首先利用全濕式轉漬儀 (TE 22 tank transfer unit, Amersham Bioscience) 將膠體上的蛋白質轉漬到硝基纖維膜 (nitrocellulose membrane; NC membrane, 0.45 μ m, Protran[®], Schleicher & Schuell)。將 filter pad 與 NC membrane 及 filter paper 以 transfer buffer 沾濕後裝置於印卡夾內以 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% methanol) 沾濕後裝置於印卡夾內，轉漬條件為 90 volt、90 分鐘。完成後將 NC membrane 於 PBST (0.05% Tween-20, 1×PBS buffer, pH 7.3) 中清洗 3 次，每次 5 分鐘。將 NC membrane 膜置於 blocking buffer (0.05% Tween-20, 1% anchor milk in 1×PBS buffer, pH 7.3) 室溫感作 1 小時。加入以 blocking buffer 稀釋 500 倍之 mouse anti-his-tag MAb 作為一抗，於室溫下作用 1 小時，以 PBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。再加入以 blocking buffer 稀釋 5,000 倍之 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc., PA)，於室溫下感作 1 小時。以 PBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘，以 TMB/H (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) (TMB/H Substrate, Millipore Inc. California, USA) 進行呈色，之後以大量 DW 終止呈色。

3.3.3 重組蛋白質純化

3.3.3.1 鎳離子親和層析管柱純化

將親和層析管柱 (Econo-Pac chromatography columns, empty, includes upper bed supports, end caps, tip closures, 50 pc/pk, BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 固定於鐵架上，並加入 2 mL 親和層析膠體 (resin) (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 來進行表現蛋白之純化，其膠體內帶有鎳離子 (Ni^{2+}) 可結合 His-tag 重組蛋白。於管柱內輕輕緩慢加入 20 mL lysis buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 8.0)，待液體流出後加入 20 mL 之重組蛋白質上清液，流出後再依序加入 10 mL wash buffer I (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 6.3)、10 mL wash buffer II (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 5.9)、6 mL elution buffer I (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 4.3) 及 6 mL elution buffer II (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 10 mM imidazole, pH 8.0)，分別收集前述各種純化洗液並保存於 4°C。取部份各種純化洗液與 6× sample buffer 以體積 5 : 1 混合，進行 SDS-PAGE 電泳分析，電泳方法同 3.3.2.1，將電泳後膠體以 coomassie blue 進行染色，完成後以玻璃紙封存、乾燥膠片以保存。

3.3.3.2 切膠純化

將經過鎳離子親和性管柱純化後的蛋白質接著以厚片的 SDS-PAGE (0.2 cm) 進行電泳，電泳條件及試劑同 3.3.2.1。完成電泳後，將膠片浸泡於 0.3M KCl 並放置於碎冰上，待目標蛋白質出現白色沉澱線，將膠片取出置於玻璃片上，利用小刀沿著白色沉澱區域將目標蛋白質切割下，切割下的條狀膠片放入研鉢中將其磨碎，隨後將磨碎後的膠體放入 2 mL eppendorf tube 並加入約 2 倍體積的 gel elute

buffer (30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0)，放置於震盪混合器 (suspension mixer, SM3000, digisystem laboratory instruments Inc. Taiwan) 上，室溫旋轉隔夜。次日，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘 (Microfuge® 16 Centrifuge, Beckman Coulter) 後收集上清液，並重複加入 elute buffer、旋轉隔夜及離心等步驟，再次收集上清液，此連續兩天所收集的上清液即為切膠純化的蛋白質，接著進行蛋白質定量。

3.3.4 重組蛋白質定量

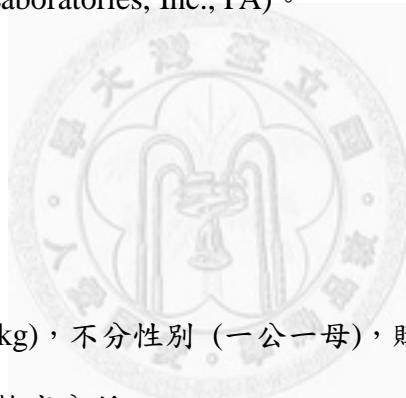
使用 Protein Quantification Assay kit (Macherey-Nagel, Germany) 來分別檢測通過鎳離子親和性管柱純化及切膠純化 rVP1 的濃度，操作方法同 3.2.5。

3.3.5 重組蛋白質與單源抗體結合能力測試

以西方墨點法測定重組蛋白與單源抗體之結合能力。將切膠純化後的 rVP1 重組蛋白質取適量體積混合 6× protein sample buffer，混合均勻，以 100°C 加熱 10 分鐘後置於冰上，準備進行 SDS-PAGE，方法同 3.3.2.1。配置 12% 下層膠與 5% 上層膠，取 10 μ L 樣本溶液與 5 μ L 標準 protein marker 分別注入樣本槽中，以 60 伏特進行電泳，25 分鐘後轉換成 90 伏特 75 分鐘。將膠體上的蛋白質轉濱到 NC membrane 上，轉濱條件為 90 volt、90 分鐘。將 NC membrane 以 PBST 清洗 3 次後置於 blocking buffer 中，置於 4°C 中震盪隔夜。隔日將 NC membrane 取出，加入以 blocking buffer 稀釋 500 倍之待測單源抗體 Q10E-3 腹水，於室溫下作用 1 小時，以 PBST 清洗 3 次後再加入以 blocking buffer 稀釋 5,000 倍之 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc., PA)，於室溫下作用 1 小時，以 PBST 清洗 3 次後以 TMB 進行呈色，之後以大量 DW 終止呈色。

3.3.6 重組蛋白質特異性分析與確認

豬血清以血清中和試驗 (SN test) 進行檢測，SN test 為目前檢驗血清內中和抗體力價的標準試驗，其原理是先將待測血清做兩倍連續稀釋，加入定量 FMDV 感作後，再加入對 FMDV 具感受性的 BHK-21 細胞，兩天後觀察是否有出現 CPE，來判斷待測血清的中和抗體力價高低。選擇高中和抗體力價血清 (SN 724) 及 SPF 豬血清，以西方墨點法檢測這兩種抗體力價血清與重組蛋白 VP1 之結合能力。以切膠純化後的 rVP1 作為抗原，方法同 3.3.2.1 及 3.3.2.2。將待測豬血清稀釋 500 倍，二抗為稀釋 5,000 倍之 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc., PA)。



3.4 多源抗體製備

3.4.1 實驗動物

2 隻傳統清淨兔 (1.2 kg)，不分性別 (一公一母)，購買自行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所。

3.4.2 免疫計畫

使用切膠純化後的重組結構蛋白 VP1 作為抗原，免疫劑量為 50 μg ，將抗原與弗氏完全佐劑 (Freund's adjuvant complete, SIGMA[®], St. Louis, MO, USA) 以 1 : 1 的方式混合均勻進行皮下多點注射。三週後，補強免疫劑量同為 50 μg ，將抗原與弗氏不完全佐劑 (Freund's adjuvant incomplete, SIGMA[®], St. Louis, MO, USA) 以 1 : 1 的方式混合均勻進行皮下多點注射。

免疫期間於第 0、21、42 及 63 天分別從耳靜脈採血，進行西方墨點法以確認抗體產生的情形，並於免疫後第 70 天大量採血。採好的血液放置於 37°C、20 分

鐘後移至 4°C 冷藏隔夜以利收集較多血清，最後以 5,000×g、30 分鐘離心，收集血清並於 -20°C 凍存待日後使用。

3.4.3 多源抗體特性分析

3.4.3.1 西方墨點法

以西方墨點法測定兔子抗體產生情形以及重組蛋白與兔多源抗體之結合能力。以切膠純化後的 rVP1 作為抗原，方法同 3.3.2.1 及 3.3.2.2。待測血清為稀釋 500 倍之兔血清 (2 隻兔子於免疫期間第 0、21、42 及 63 天所採血液樣本)，二抗為稀釋 5,000 倍之 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc., PA)。

3.4.3.2 血清中和試驗

試驗之前，將免疫後第 63 天所採兔血清以 56°C 非動化處理 30 分鐘，以去除非特異性物質，如補體等。於 96 孔培養盤中，待測血清以細胞培養液做 2 倍連續稀釋，每一稀釋倍數接種 2 孔，每孔加入 50 μ L，將口蹄疫病毒液稀釋至 100 TCID₅₀/50 μ L 後，每孔加入 50 μ L，將 96 孔培養盤置於 37°C 培養箱中感作 1.5 小時，每孔再加入 100 μ L 的 BHK-21 細胞懸浮液 (5×10^4 cell/well)，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養，2 天後觀察細胞有無細胞病變之情形，並以此結果計算兔血清中和抗體力價。

3.5 血清樣本

本實驗所檢測的血清樣本分別由行政院農業委員會家畜衛生試驗所豬瘟組林有良組長以及台灣動物科技研究所動物醫學組李明昌助理研究員提供。

3.5.1 標準血清

將經過 2 次 SN test 檢測確認為 SN 724 的豬血清做為高中和抗體力價的標準血清。另外，以 4 週齡第 2 代 SPF 幼豬的血清作為陰性標準血清。將標準血清分裝成每管 20 μ L 置於 4°C 保存備用。

3.5.2 樣本血清

3.5.2.1 豬血清樣本

根據不同的中和抗體力價，將豬血清樣本分成 10 組，分別為 SPF、SN 3、4、8、16、32、64、128、256 及 512，樣本數分別為 100、119、46、67、48、67、47、67、47 及 66，總共 674 個血清樣本，不同抗體力價的血清來源為台灣各地豬場疫苗免疫後送檢樣本，疫苗廠牌及實際免疫計畫則無從得知。每個樣本都至少經過 2 次 SN test 的檢測，以確認其中和抗體力價的穩定。病毒 back titration 力價約在 100 TCID₅₀ 左右，且樣本經過口蹄疫非結構蛋白檢測皆為陰性。

3.5.2.2 牛血清樣本

根據不同的中和抗體力價，將牛血清樣本分成 5 組，分別為 SN 4、16、32、128 及 512，每個抗體力價各 20 個樣本，總共 100 個牛血清樣本。血清來源為台灣各地牛場疫苗免疫後送檢樣本，疫苗廠牌及實際免疫計畫則無從得知。樣本皆經過兩次 SN 試驗，病毒 back titration 力價約在 100 TCID₅₀ 左右。

3.5.2.3 羊血清樣本

根據不同的中和抗體力價，將羊血清樣本分成 5 組，分別為 SN 4、16、32、128 及 512，每個抗體力價各 20 個樣本，總共 100 個羊血清樣本。血清來源為台

灣各地羊場疫苗免疫後送檢樣本，疫苗廠牌及實際免疫計畫則無從得知。樣本皆經過兩次 SN 試驗，病毒 back titration 力價約在 100 TCID₅₀ 左右。

3.6 發展檢測血清中和抗體之阻斷型 ELISA

3.6.1 塗鍍重組結構蛋白 VP1 阻斷型 ELISA (rVP1-bELISA)

3.6.1.1 最佳化 rVP1-bELISA 條件

以棋盤式設計進行 rVP1-bELISA 條件最佳化之測試，將 rVP1 以塗鍍緩衝溶液 (coating buffer) (Carbonate-Bicarbonate buffer, pH 9.6, SIGMA[®], Louis, Germany) 分別稀釋成 60、120、240 及 480 ng/50 μL 作為塗鍍抗原，每個稀釋倍數各取 50 μL 加入 96 孔 ELISA 盤 (F96 Maxisorp nunc-immuno plate, NuncTM, Thermo scientific, Denmark) 中，於 37°C 震盪 1 小時，完成塗鍍後以 200 μL/well PBST 清洗 1 次，再加入 100 μL/well 的 blocking buffer (PBST + 1% anchor milk)，於 37°C 震盪 1 小時。後以 200 μL/well PBST 清洗 3 次，將純化過且標示有 HRP 的單源抗體 Q10E-3 以 blocking buffer 稀釋成為 2.5、5、10、20、40、80 及 160 ng/50 μL，每個稀釋倍數各取 50 μL 加入 96 孔 ELISA 盤，於室溫與 rVP1 感作 1 小時，而後以 200 μL/well PBST 清洗 5 次，加入 100 μL/well 的 TMB (TMB single solution chromogen for ELISA, InvitrogenTM, Invitrogen Inc. Camarillo, CA) 呈色劑，於室溫暗處避光作用 15 分鐘，加入 100 μL/well 的 stop solution (1N HCl) 終止呈色反應，以分光光度計測，選取 A₄₅₀ 在 1.5 左右的條件做為最佳化條件來進行後續的 rVP1-bELISA。

3.6.1.2 rVP1-bELISA 操作流程

利用 coating buffer 將 rVP1 稀釋成 120 ng/50 μL，取 50 μL 加入 96 孔盤中，於 37°C 震盪 1 小時，完成塗鍍後以 200 μL/well PBST 清洗 1 次，再加入 100 μL/well 的 blocking buffer (PBST + 1% anchor milk)，於 37°C 震盪 1 小時。以 200 μL/well

PBST 清洗 3 次，將待測血清樣本以 blocking buffer 稀釋 5 倍，每個血清樣本取 50 μL 加入 96 孔盤中，於室溫作用 16 小時。再以 PBST 清洗 5 次，將 tracer MAb (Q10E-HRP) 以 blocking buffer 稀釋成為 20 ng/50 μL ，並取 50 μL 加入 96 孔盤中，於室溫作用 1 小時。再以 PBST 清洗 5 次，加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 TMB 呈色劑，於室溫暗處避光作用 15 分鐘，加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 stop solution (1N HCl) 終止呈色反應，以 ELISA reader 檢測 A_{450} 讀值。

3.6.1.3 rVP1-bELISA 標準血清分析與確認

以標準血清即高中和抗體力價 (SN 724) 及 SPF 豬血清，來進行 rVP1-bELISA 的初步測試，其操作流程同 3.6.1.2，並進行二重複試驗，目的是想要了解 rVP1-bELISA 是否可以將此兩極端中和抗體力價的豬血清明確地區分出來。

3.6.1.4 rVP1-bELISA 標本血清檢測

以 3.5.2 的豬、牛及羊血清樣本分別來進行 rVP1-bELISA 的檢測，每盤同時搭配對照組，即高中和抗體力價 (SN 724) 及 SPF 豬血清，其操作流程同 3.6.1.2，每個樣本都進行二重複試驗。

3.6.1.5 A_{450} 讀值轉換成抑制百分比 (percentage inhibition value, PI value)

將血清樣本的 A_{450} 讀值依 PrioCHECK® FMDV NS kit 說明書內的公式轉換成 PI 值： $100 - (\text{血清樣本 } \text{A}_{450}/\text{陰性對照血清 } \text{A}_{450}) \times 100\%$ 。

3.6.1.6 rVP1-bELISA 與 SN test 相關性之分析

將血清樣本檢測後的 A_{450} 讀值利用 3.6.1.5 的公式轉換成為 PI 值，再分別計算出每個血清樣本的 PI 值，依據樣本的 PI 值與血清中和抗體力價來繪製標準曲線圖，

藉此觀察 rVP1-bELISA 與 SN test 有無相關性；再將標準曲線之 R 平方值及總樣本數帶入學生氏 t 分布的公式計算 t 值，算出 t 值後查表三即可算出 p 值，以得知兩試驗相關性的顯著性， t 值公式如下：

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

n ：樣本數

r^2 ：標準曲線之 R 平方值

3.6.1.7 rVP1-bELISA 之 cut-off 值、敏感性、特異性與一致性分析

利用 receiver operating characteristic 曲線 (ROC curve) 來評估 cut-off 值，血清抑制百分比以 10% 為一區間，範圍為 10-90%。以具有保護力價的血清 (SN titer ≥ 32) 來計算敏感性做為 Y 值，而不具保護力價的血清 (SN titer < 32) 評估特異性，以 (1-特異性) 作為 X 值劃出 ROC curve，選取最靠近座標 (0, 1) 的點訂為 cut-off 值 (Fawcett, 2006)。而敏感性、特異性及一致性，計算的方法如下：

		SN test	
		陽性	陰性
rVP1-bELISA	陽性	A	B
	陰性	C	D

A : True positive

B : False positive

C : False negative

D : True negative

rVP1-bELISA 之敏感性 = A/(A+C)

rVP1-bELISA 之特異性 = D/(B+D)

rVP1-bELISA 之一致性 = (A+D)/(A+B+C+D)

3.6.2 塗鍍口蹄疫全病毒阻斷型 ELISA (virus-bELISA)

3.6.2.1 最佳化 virus-bELISA 條件

以棋盤式直接行 ELISA 檢測最佳化 virus-bELISA 之條件，將經過超高速離心且經過 BEI 不活化的口蹄疫病毒液以塗鍍緩衝溶液 (coating buffer) (Carbonate-Bicarbonate buffer, pH 9.6, SIGMA[®], Louis, Germany)，從病毒原液開始進行 2 倍連續稀釋至 512 倍，每個稀釋倍數各取 50 μ L 加入 96 孔 ELISA 盤 (F96 Maxisorp nunc-immuno plate, NuncTM, Thermo scientific, Denmark) 中，於 37°C 震盪 1 小時，完成塗鍍後以 200 μ L/well PBST 清洗 1 次，再加入 100 μ L/well 的 blocking buffer (PBST + 1% anchor milk)，於 37°C 震盪 1 小時。後以 200 μ L/well PBST 清洗 3 次，將 tracer MAb (Q10E-HRP) 以 blocking buffer 稀釋成為 20、60 及 100 ng/50 μ L，每個稀釋倍數各取 50 μ L 加入 96 孔 ELISA 盤，於室溫感作 1 小時，而後以 200 μ L/well PBST 清洗 5 次，加入 100 μ L/well 的 TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) (TMB single solution chromogen for ELISA, InvitrogenTM, Invitrogen Inc. Camarillo, CA) 呈色劑，於室溫暗處避光作用 15 分鐘，加入 100 μ L/well 的 stop solution (1N HCl) 終止呈色反應，以 ELISA reader 檢測 A_{450} ，選取 A_{450} 在 1.5 左右的條件做為最佳化條件來進行後續的 virus-bELISA。

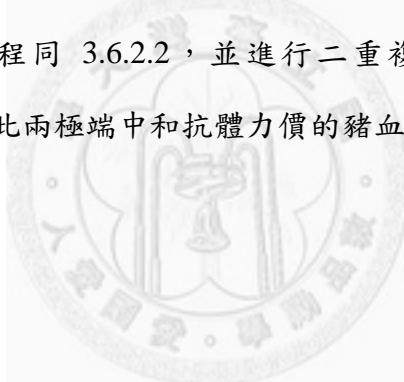
3.6.2.2 virus-bELISA 操作流程

利用 coating buffer 將高速離心後的口蹄疫病毒液進行 8 倍稀釋，取 50 μ L 加入 96 孔盤中，於 37°C 震盪 1 小時，完成塗鍍後以 200 μ L/well PBST 清洗 1 次，再

加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 blocking buffer (PBST + 1% anchor milk)，於 37°C 震盪 1 小時。後以 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBST 清洗 3 次，將待測血清樣本以 blocking buffer 稀釋 5 倍，每個血清樣本取 50 μL 加入 96 孔盤中，於室溫作用 16 小時。再以 PBST 清洗 5 次，將 tracer MAb (Q10E-HRP) 以 blocking buffer 稀釋成為 100 ng/50 μL ，並取 50 μL 加入 96 孔盤中，於室溫作用 1 小時。再以 PBST 清洗 5 次，加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 TMB 呈色劑，於室溫暗處避光作用 15 分鐘，加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 stop solution (1N HCl) 終止呈色反應，以 ELISA reader 檢測 A_{450} 讀值。

3.6.2.3 virus-bELISA 標準血清分析與確認

以標準血清即高中和抗體力價 (SN 724) 及 SPF 豬血清，來進行 virus-bELISA 的初步測試，其操作流程同 3.6.2.2，並進行二重複試驗，目的是想要了解 virus-bELISA 是否可以將此兩極端中和抗體力價的豬血清明確地區分出來。



第四章 結果

4.1 病毒製備

4.1.1 口蹄疫病毒力價測定

將不同稀釋倍數的病毒液感染 BHK-21 細胞株，培養兩天後觀察細胞 CPE 的情形，FMDV O/97 病毒力價為 10^7 TCID₅₀/0.1 mL。

4.2 單源抗體製備

4.2.1 單源抗體純化、透析與定量

將我們選用的單源抗體 Q10E-3，利用 Vivapure miniprepG spin column kit (Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Germany) 透過 protein G 從小鼠腹水中純化出單源抗體。接著進行透析隔夜將 Glycine 及 Tris 等這些小蛋白質去除。再利用 Protein Quantification Assay kit (Macherey-Nagel, Germany) 來進行單源抗體濃度的測定。依據 BSA 標準濃度及其吸光值繪製標準曲線圖，其 R² 為 0.99，單源抗體 Q10E-3 純化後共得兩管，計算出濃度分別為 396.9、392.9 ng/μL。

4.2.2 單源抗體標示過氧化氫酶

以單源抗體 Q10E-3，做為 tracer 利用 Lightning-Link™ HRP Conjugation Kit (Innova Biosciences, Cambridge, UK) 將單源抗體 Q10E-3 標示 HRP，標示後 Q10E-3 濃度為 330 ng/μL。

4.3 重組結構蛋白質 (rVP1) 表現與確認

4.3.1 重組蛋白質表現

將誘導前後的菌液與破菌完之上清液與沉澱物進行 SDS-PAGE 電泳分析，以 coomassie blue 進行染色，目標產物在 IPTG 誘導後大量表現，大小約為 30 kDa，且目標蛋白大多存在於破菌後以 PBS 回溶離心之 pellet 中 (圖三)，其餘菌液的沉澱物以 lysis buffer 回溶，而後進行重組蛋白之純化。

4.3.2 重組蛋白質純化與定量

將鎳離子親和性管柱所純化出的蛋白質進行 SDS-PAGE 電泳分析。一片以 coomassie blue 進行染色，可見 wash buffer 將細菌雜質沖洗出 (圖四)，而 elute buffer II 將所要的目標蛋白洗滌出來 (圖五)；另一片進行西方墨點法，將純化後之重組蛋白與 mouse anti-His-tag 單源抗體作用，呈色後可知 mouse anti-His-tag 單源抗體可與純化後之重組蛋白 VP1 作用 (圖六)。

另外，也將切膠純化後的蛋白質進行 SDS-PAGE 電泳分析 (圖七)，電泳結果除了目標蛋白外無其他蛋白質存在，接著進行蛋白質定量。

使用 Protein Quantification Assay kit (Macherey-Nagel, Germany) 來檢測切膠純化後的蛋白質濃度，依據 BSA 標準濃度及其吸光值繪製標準曲線圖，其 R^2 為 0.99，四管蛋白質，其濃度分別為 542.1、515.9、298.0、306.1 ng/ μ L。

4.3.3 重組蛋白質與單源抗體結合能力測試

利用西方墨點法將重組蛋白 VP1 與稀釋 500 倍之單源抗體 Q10E-3 腹水進行感作，單源抗體 Q10E-3 可與 30 kDa 大小的表現蛋白 VP1 結合 (圖八)。

4.3.4 重組蛋白質特異性分析與確認

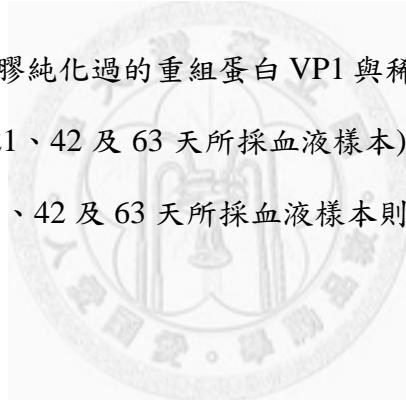
利用西方墨點法將重組蛋白 VP1 與 SN test 檢測為高中和抗體力價 (SN 724) 及 SPF 的豬血清進行感作，高中和抗體力價的豬血清可與 30 kDa 大小的表現蛋白 VP1 結合而 SPF 則沒有反應 (圖九)，顯示高中和抗體力價的豬血清中含有抗 VP1 的抗體，可特異性的辨識表現蛋白 VP1。

4.4 多源抗體製備

4.4.1 多源抗體特性分析

4.4.1.1 西方墨點法

利用西方墨點法將切膠純化過的重組蛋白 VP1 與稀釋 500 倍之待測兔血清 (2 隻兔子於免疫期間第 0、21、42 及 63 天所採血液樣本) 進行感作，在第 0 天兩隻兔子皆無抗體反應，第 21、42 及 63 天所採血液樣本則明顯可與 30 kDa 大小的表現蛋白 VP1 結合 (圖十)。



4.4.1.2 血清中和試驗

將免疫後第 63 天所採兔血清進行血清中和試驗，母兔中和抗體力價為 45，公兔則無中和抗體產生。

4.5 發展檢測血清中和抗體之阻斷型 ELISA

4.5.1 塗鍍重組結構蛋白 VP1 阻斷型 ELISA (rVP1-bELISA)

4.5.1.1 最佳化 rVP1-bELISA 條件

以棋盤式直接型 ELISA 檢測 rVP1-bELISA 的最佳條件，使用切膠純化後的重

組結構蛋白 VP1 作為塗鍍抗原，而標示 HRP 的單源抗體 Q10E 做為 tracer。選擇 A_{450} 讀值為 1.27 做為最佳化 rVP1-bELISA 的條件（圖十一），其塗鍍抗原重組結構蛋白 VP1 濃度為 120 ng/well，而 Q10E-HRP 濃度則為 20 ng/well。以此條件做為 rVP1-bELISA 的最佳條件來進行後續的 ELISA 試驗。

4.5.1.2 rVP1-bELISA 標準血清分析與確認

以最佳化的 rVP1-bELISA 條件來分別進行 SN 724 及 SPF 兩標準血清的二重複試驗，其 A_{450} 結果分別為 0.35、0.34、1.54 及 1.52（圖十二），兩者差距約為 4-5 倍 A_{450} 值，因此可以確認，兩標準血清在 rVP1-bELISA 的試驗裡是具有明顯差別的。



4.5.1.3 rVP1-bELISA 標本血清檢測結果

4.5.1.3.1 豬血清樣本

以 10 組不同中和抗體力價的樣本血清（ $n = 674$ ）來進行 rVP1-bELISA 的檢測，每盤同時搭配對照組，即高中和抗體力價（SN 724）及 SPF 豬血清，將每個樣本二重複的 A_{450} 讀值平均，再將 A_{450} 讀值轉換成 PI 值後，進行繪圖及分析。把這些樣本血清的 PI 值繪製成長條圖，即可看出每個組別內樣本 PI 值的分佈趨勢（圖十三、圖十四、圖十五、圖十六、圖十七、圖十八、圖十九、圖二十、圖二十一、圖二十二）。接著計算出每組的平均 PI 值及標準差整理於表格（表四）。

10 組樣本血清的平均 PI 值，除了 SN 4 這組外，其餘組別皆隨著中和抗體力價的上升而正向的攀升；而 PI 值標準差則是介於 7.5-26.3% 之間（表四）。

4.5.1.3.2 牛血清樣本

同豬血清樣本的做法，把這些樣本血清的 PI 值繪製成長條圖，即可看出每個

組別內樣本 PI 值的分佈趨勢（圖二十三、圖二十四、圖二十五、圖二十六、圖二十七）。接著計算出每組的平均 PI 值及標準差整理於表格（表五）。

5 組樣本血清的平均 PI 值，除了 SN 4 這組外，其餘組別皆隨著中和抗體力價的上升而正向的攀升；而 PI 值標準差則是介於 19.6-29.3% 之間（表五）。

4.5.1.3.3 羊血清樣本

同豬血清樣本的做法，把這些樣本血清的 PI 值繪製成長條圖，即可看出每個組別內樣本 PI 值的分佈趨勢（圖二十八、圖二十九、圖三十、圖三十一、圖三十二）。接著計算出每組的平均 PI 值及標準差整理於表格（表六）。PI 值標準差介於 13.3-28.0% 之間（表六）。



4.5.1.4 rVP1-bELISA 與 SN test 相關性之分析

4.5.1.4.1 豬血清樣本

以 rVP1-bELISA 檢測後計算出每個樣本的 PI 值為縱軸，而每組的血清中和抗體力價為橫軸來繪製標準曲線圖，其 R^2 為 0.473，可看出兩者具有正相關性（圖三十三）。利用學生氏 t 分布公式算出 t 值為 24.57，查表三可知其 $p < 2 (0.0005) = 0.001$ ，表示兩試驗有極顯著的相關性。

4.5.1.4.2 牛血清樣本

其標準曲線圖的 R^2 為 0.113，可看出兩者具有正相關性（圖三十四）。利用學生氏 t 分布公式算出 t 值為 3.53，查表三可知其 $p < 2 (0.0005) = 0.001$ ，表示兩試驗有極顯著的相關性。

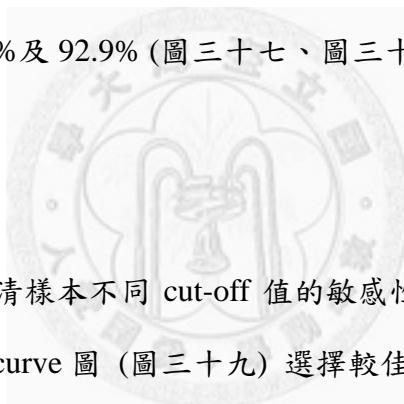
4.5.1.4.3 羊血清樣本

其標準曲線圖的 R^2 為 0.331，可看出兩者具有正相關性（圖三十五）。利用學生氏 t 分布公式算出 t 值為 6.96，查表三可知其 $p < 2(0.0005) = 0.001$ ，表示兩試驗有極顯著的相關性。

4.5.1.5 rVP1-bELISA 之 cut-off 值、敏感性、特異性與一致性分析

4.5.1.5.1 豬血清樣本

利用公式計算出豬血清樣本不同 cut-off 值的敏感性、特異性與一致性列於表格（表七），再根據 ROC curve 圖（圖三十六）選擇較佳的 cut-off 值為 20%，敏感性與特異性則分別為 58.8% 及 92.9%（圖三十七、圖三十八）。



4.5.1.5.2 牛血清樣本

利用公式計算出牛血清樣本不同 cut-off 值的敏感性、特異性與一致性列於表格（表八），再根據 ROC curve 圖（圖三十九）選擇較佳的 cut-off 值為 10%，敏感性與特異性則分別為 66.7% 及 67.5%（圖四十、圖四十一）。

4.5.1.5.3 羊血清樣本

利用公式計算出羊血清樣本不同 cut-off 值的敏感性、特異性與一致性列於表格（表九），再根據 ROC curve 圖（圖四十二）選擇較佳的 cut-off 值為 30%，敏感性與特異性則分別為 73.3% 及 67.5%（圖四十三、圖四十四）。

4.5.2 塗鍍口蹄疫全病毒阻斷型 ELISA (virus-bELISA)

4.5.2.1 最佳化 virus-bELISA 條件

以棋盤式直接型 ELISA 檢測 virus-bELISA 的最佳條件，使用高速離心後且經過 BEI 不活化的口蹄疫病毒液作為塗鍍抗原，而標示 HRP 的單源抗體 Q10E 做為 tracer。選擇 A_{450} 讀值為 1.44 做為最佳化 virus-bELISA 的條件 (圖四十五)，其塗鍍抗原為口蹄疫病毒液 8 倍稀釋，而 Q10E-HRP 濃度則為 100 ng/well。以此條件做為 virus-bELISA 的最佳條件來進行後續的 ELISA 試驗。

4.5.2.2 virus-bELISA 標準血清分析與確認

以最佳化的 virus-bELISA 條件來分別進行 SN 724 及 SPF 兩標準血清的二重複試驗，其 A_{450} 結果分別為 0.98、0.935、1.578 及 1.409 (圖四十六)，雖然可以看出兩者之間的差別，但 A_{450} 值僅差距約 0.6。



第五章 討論

在種種血清學診斷方法中，ELISA 不失為一個快速、方便、高敏感性及特異性的檢測方法，可同時檢測大量樣品且最後由機器判讀結果較無人為誤差的憂慮 (Shafer *et al.*, 1998)。所以，我們希望可以發展出一個檢測口蹄疫中和抗體的阻斷型 ELISA 檢驗套組，阻斷型 ELISA 的優點為，可同時檢測不同動物種別的樣本且不必擔心待測血清中含有對抗蛋白質表現系統的抗體干擾 (Sørensen *et al.*, 1998)。

根據過去的文獻資料所顯示，口蹄疫的五個中和抗原決定位中，有三個是在結構蛋白 VP1 的上面 (Crowther *et al.*, 1993)。這三個中和抗原決定位裡面包含了口蹄疫病毒最為重要且與病毒感染能力相關的中和抗原決定位，即含有 RGD motif 的 Site 1 (Xie *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2006)。遂在 ELISA 的設計當中，我們便以重組結構蛋白 VP1 作為裡面的抗原。

本實驗所使用的重組結構蛋白 VP1 是利用原核系統的大腸桿菌所表現，使用原核表現系統的優勢有蛋白質產量高、操作方便及價格便宜等。雖然會擔心待測樣本中可能含有抗表現系統 (大腸桿菌) 的抗體干擾，但我們所要發展的為阻斷型 ELISA，所以可以克服這方面的疑慮。

發展阻斷型 ELISA 的另一個重要因素，即為單源抗體。與一般的多源抗體 (polyclonal antibody) 比較起來，單源抗體具有高度特異性，且一旦製備完成，便能夠穩定且持續的產製高量且高品質的單源抗體。

我們實驗室使用口蹄疫病毒 O/97 來製備抗口蹄疫病毒的單源抗體，並利用 O/97 及 O/99 的病毒中和試驗及免疫螢光染色法還有間接型 ELISA (rVP1、P29) 來進行單源抗體的特性分析及篩選 (表一)，我們所製備的單源抗體中，有 5 株對於結構蛋白 VP1 的反應是很好的，在以 rVP1 作為抗原的間接型 ELISA 檢測結果中，其力價皆高於 10,000 倍。這 5 株單源抗體分別為 Q10E-3、S12G-6、N10E-1、P9E-1

及 T5H-12。然而，雖然對於 VP1 都有良好的反應，但這幾株單源抗體所辨認的位置也有很大的差異。表二中列出了口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 結構蛋白 VP1 上的 29 個胺基酸序列，簡稱 P29，其中包含了口蹄疫病毒的第一個中和抗原決定位，也就是 RGD motif 的部分，劃底線的部分則代表兩病毒株胺基酸序列相異的部分，若以 RGD 為中心，可明顯看出兩病毒株的胺基酸序列在 P29 左側相異度較高，右側則相似度較高。根據表一的分析結果及表二的胺基酸序列，即可推測上述這 5 株單源抗體所辨認的位置。

這 5 株單源抗體裡面我們使用到了其中的兩株，第一株為 Q10E-3，這株單源抗體對於 rVP1 及 P29 都有很強的反應，表示其所辨認的位置應該就是在 P29 上面，然而它又能夠中和 O/97 及 O/99，所以推測 Q10E-3 所辨認的位置應該就是在 P29 上面的中和抗原決定位，也就是含有 RGD 的 Site 1，而且較偏向 P29 的右側（兩病毒株序列相似度較高的序列）。利用此特性我們將 Q10E-3 純化後標示過氧化氫酶 (HRP)，以作為 tracer antibody。以單源抗體標示 HRP 作為 tracer，即不需再另外添加 HRP-goat anti-mouse IgG，不僅可以節省操作時間，也不必擔心抗鼠的二抗會跟塗鍍於抗原盤上作為 capture antibody 的單源抗體反應，避免不必要的干擾。

另一株則為單源抗體 P9E-1，這株單源抗體沒有中和 O/97 及 O/99 病毒的能力，也不會辨認 P29，所以推測它所辨認的位置雖是在 VP1 上但與三個中和抗原決定位都沒有關係，而且它在 IFA 能夠與 O/97 及 O/99 反應，所以此位置應為兩病毒株較為保守的序列。P9E-1 雖然沒有中和病毒的能力，但是能夠辨認結構蛋白 VP1，利用此特性將 P9E-1 作為 ELISA 系統內的 capture antibody。同時，也利用純化好的 VP1 免疫兔子製備抗 VP1 的多源抗體，同樣做為 capture antibody，目的是可以藉此比較在 ELISA 系統中，以單源或多源抗體作為 capture antibody 之間的差異。

我們所設計的 ELISA 主要是參考 1998 及 2005 年 Sørensen 等人所發表的文獻 (Sørensen *et al.*, 1998; Sørensen *et al.*, 2005)，主要架構為先塗鍍單源抗體 P9E-1 或是免抗 VP1 多源抗體於抗原盤上，接著放入抗原 VP1，再放入待測血清進行感作，

最後加入標示好 HRP 的單源抗體 Q10E-3，然後進行呈色及判讀。但是在測試的過程中發現，當以單源抗體 P9E-1 或是兔抗 VP1 多源抗體作為 capture antibody，再加入 VP1 與它們結合之後，Q10E-3 就無法與 VP1 結合，會有這樣的結果是讓人意外的，因為在單源抗體的特性分析中可以看到，P9E-1 及 Q10E-3 所辨認的位置是完全不同的，P9E-1 能夠辨認結構蛋白 VP1，但是沒有中和病毒的能力；Q10E-3 則是辨認結構蛋白 VP1 上的 Site 1，推測可能是因為 P9E-1 或兔多源抗體與 VP1 結合後，造成立體空間的阻礙才會使得 Q10E-3 無法與 VP1 結合。所以，後來我們便放棄了 capture antibody 這樣的設計，改為從塗鍍純化重組結構蛋白 VP1 這一層開始。

本實驗的最終目的是希望能夠取代血清中和試驗 (SN test)，而血清中和試驗主要是利用活細胞、活病毒及連續稀釋的待測血清，來模擬宿主動物受到外來病毒的感染情形，藉此了解免疫動物獲得體液免疫保護力的情形。遂以血清中和試驗的結果作為我們所設計 ELISA 的黃金標準 (gold standard)。但事實上要以血清中和試驗作為一個絕對的對照標準也是有些困難的，因為在進行 SN test 試驗時，使用活的 BHK-21 細胞以及活的口蹄疫病毒，每次的試驗會因為細胞生長的狀況及病毒力價的差異而有所不同，最後判定的結果也可能因為人為標準的差異而有所改變。所以，相對於 SN test 的變化性，ELISA 所使用的抗原及抗體都是能夠經由定量而控制每個反應所需的濃度，而最後是透過機器來判讀檢測結果，其穩定程度則相對提高。這也是除了 SN test 需要在 P3 實驗室內操作的不便之外，我們希望可以發展 ELISA 來取代 SN test 的主要原因之一，但要發展一個 ELISA 檢驗套組並非一蹴可幾，在剛起步的現階段，仍然必須以這個不一定很標準的試驗作為我們目前的黃金標準。所以，本實驗中所使用的血清樣本，至少都是經過兩次 SN test 的試驗，確認這兩次檢測的中和抗體力價結果都相同，才納入我們的血清樣本中。

除了將重組結構蛋白所發展的阻斷型 ELISA 和 SN test 對照之外，同時也嘗試

發展一個口蹄疫全病毒的阻斷型 ELISA 銜接於這兩個試驗之間，以經過高速離心且不活化的全病毒作為 ELISA 的抗原，將讓整個 ELISA 的條件與情況更接近於 SN test。病毒不活化的方法有很多種，其中，BEI 屬於一種 aziridines 的烷基化物質，主要作用於核酸使病毒不活化，因為 BEI 對於蛋白質的作用很小，所以不會影響病毒的抗原性 (Bahnemann, 1990)，可作為 ELISA 塗鍍抗原的不活化劑。

目前結果顯示，在 virus-bELISA 的部分，我們的標準血清 SN 724 及 SPF 豬血清的確有出現如預期的趨勢 (SN 724 血清 A_{450} 值低，而 SPF 血清 A_{450} 值高)，但還沒有辦法拉出一個大的差距，兩者 A_{450} 的讀值差距僅約 0.6 而已 (0.9-1.5)，因此 virus-bELISA 尚未進行大量的樣本測試。至於，兩標準血清拉不開差距的確實原因還不清楚，推測可能是因為作為抗原的病毒液未進一步純化所致。

而 rVP1-bELISA 的部分，一開始在兩標準血清 SN 724 及 SPF 豬血清的測試，可以看到兩者差距約為 4-5 倍 A_{450} 值，重複做了幾次也有相同的結果，因此便可確認，兩標準血清在 rVP1-bELISA 的試驗裡是具有明顯差別的。接著即進行樣本血清的測試，樣本血清依動物種別可分為豬、牛、羊血清，分別都包含有不同中和抗體力價的血清，總共為 674、100 及 100 個血清樣本。從樣本 PI 值及中和抗體力價的標準曲線圖中 (圖三十三、圖三十四、圖三十五)，可以看到 rVP1-bELISA 及 SN test 有明顯的正向關係，且 p 值均小於 0.001，代表兩試驗有極顯著的相關性。但仔細看樣本的 PI 值分佈長條圖，就會發現即便是相同中和抗體力價的樣本組別中仍有許多變異存在。不禁使人思考造成同一個中和抗體力價的血清經過 rVP1-bELISA 檢測結果差異的原因。

一般來說，以單源抗體所發展的阻斷型 ELISA 有個重點，就是單源抗體所辨認的抗原決定位 (epitope) 的重要性。因為整個試驗過程就是在反應單源抗體及待測血清對於這個抗原決定位的競爭結果。而本實驗所選擇的中和抗原決定位 Site 1，在過去的文獻資料中證實了它的重要性 (Xie *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997)，也經由單源抗體特性分析確認單源抗體 Q10E-3

辨認的位置就在 Site 1 (Cheng *et al.*, 2006)。

然而，不同於一般的阻斷型 ELISA，只要確認血清樣本中存在抗特定抗原的抗體，訂出了 cut-off 值即可區分出檢測樣本的陰陽性；檢測中和抗體的阻斷型 ELISA 要發揮效用，還需要考慮到另一個關鍵點，就是在疫苗免疫後動物所誘發的免疫反應中，究竟有多少比例的中和抗體是針對這個中和抗原決定位 (Site 1) 所產生？

因為口蹄疫病毒的 4 個結構蛋白上總共有 5 個中和抗原決定位，當以全病毒做為抗原，免疫動物後所誘發的中和抗體，此中和抗體力價理論上應是針對這 5 個中和抗原決定位所產生抗體的數量之總和，但是迄今並未見到任何期刊文獻資料描述免疫動物後每一個中和抗原決定位所誘發的抗體，在反映為中和力價的中和抗體整體中所佔比例為何？根據自行的推測，不同的動物個體及不同的生理狀態，對於這 5 個中和抗原決定位所誘發的中和抗體比例應該是不同的，意即即便經由血清中和試驗檢測結果顯示有相同的血清中和抗體力價，不同的血清樣本內針對每一個中和抗原決定位所產生的抗體比例也不一定相同，所以在這個前提之下，拿兩個相同中和抗體力價的血清樣本來進行 rVP1-bELISA，由於 rVP1-bELISA 只針對待測樣本及單源抗體兩者對於 Site 1 的競爭性來做呈現，若兩相同中和抗體力價的血清樣本，一者中和抗體多針對 Site 1 而另一者則主要針對其他中和抗原決定位，最後所呈現的檢測結果就會不同。因此，便不難理解為什麼 rVP1-bELISA 的試驗結果，在同樣中和抗體力價的樣本組別中會有這些差異存在。

上述的推論較適用於，SN 高的組別而樣本 PI 值卻呈現低值的狀況 (偽陰性)；另外一種反常的情形則是，SN 低的組別內樣本卻出現很高的 PI 值 (偽陽性)，這樣的情形不禁讓我們連想到，在一開始建構 rVP1-bELISA 進行 capture antibody 測試的時候，理論上沒有中和能力的單源抗體 P9E-1 一旦與 VP1 反應後，單源抗體 Q10E-HRP 就沒有辦法抓到 VP1，一度還讓我們懷疑 P9E-1 與 VP1 的結合能力，經過更進一步的測試才終於找到問題所在。所以，在 SN 低的組別內樣本卻出現很

高的 PI 值，便可能跟 P9E-1 一樣，雖然不是接合在中和抗原決定位上，但可能因為立體空間的影響，造成單源抗體 Q10E-HRP 沒有辦法抓到 VP1，遂在 rVP1-bELISA 的檢測結果中出現很高的 PI 值。

除了相同中和抗體力價的血清經過 rVP1-bELISA 檢測結果出現差異外，不同畜種的檢測結果似乎也存有變異，雖說阻斷型 ELISA 的優點即是可同時檢測不同畜種的樣本，但在我們的實驗結果中，同樣中和抗體力價的血清檢測後，牛、羊樣本 PI 值的標準差就比豬隻的結果來得大，推測可能是因為 rVP1 及單源抗體都是使用豬源病毒株來製備所致。

在敏感性及特異性的判定，目前是以 ROC curve 的方式來做選擇，然而在實際應用上可以配合政策的需求來進行 cut-off 值的調整。若需嚴格的把關免疫與否，則可將 cut-off 值稍微提升，反之則降低。

目前的實驗結果，顯示了 rVP1-bELISA 與 SN test 的正相關性，反映出 ELISA 取代 SN test 這條路的可能性，而這個實驗只是一個起步，先專注於口蹄疫最重要的中和抗原決定位 Site 1 做測試，或許未來可以嘗試加入口蹄疫病毒的其他結構蛋白，或是直接表現完整病毒外殼作為抗原，再進一步篩選出對抗各個中和抗原決定位的單源抗體去搭配組合作用，也許就能夠獲得更佳的敏感性及特異性，而能夠更精準地呈現出 SN test 的檢測結果。

參考文獻

Abu Elzein, E.M.E. and Crowther, J.R. 1978. Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research. *J Hyg Camb* 80: 391-399.

Alexandersen, S., Zhang, Z. and Donaldson, A.I. 2002. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals—the carrier problem. *Microbes Infect* 4: 1099-1110.

Bachrach, H.L. 1968. Foot-and-mouth disease. *Ann Rev Microbiol* 22: 201-244.

Bahnemann, H.G. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 8: 299-303.

Barton, D.J., O'Donnell, B.J. and Flanegan, J.B. 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *Embo J* 20: 1439-1448.

Bautista, E.M., Ferman, G.S. and Golde, W.T. 2003. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 61-73.

Beard, C.W. and Mason, P.W. 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 74: 987-991.

Borman, A.M., Deliat, F.G. and Kean, K.M. 1994. Sequence within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO J* 13: 3149-3157.

Brocchi, E., Bergmann, I.E., Dekker, A., Paton, D.J., Sammin, D.J., Greiner, M., Grazioli, S., De Simone, F., Yadin, H., Haas, B., Bulut, N., Malirat, V., Neitzert, E., Goris, N., Parida, S., Sørensen, K. and De Clercq, K. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of

foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 24: 6966-6979.

Brooksby, J.B. 1982. Portraits of viruses: foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* 18: 1-23.

Brown, C.C., Meyer, R.F., Olander, H.J., House, C. and Mebus, C.A. 1992. A Pathogenesis Study of Foot-and-Mouth Disease in Cattle, using in situ Hybridization. *Can J Vet Res* 56: 189-193.

Brown, C.C., Piccone, M.E., Mason, P.W., McKenna, T.S.-C. and Grubman, M.J. 1996. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J Virol* 70: 5638-5641.

Bucher, D.J., Mikhail, A., Popple, S., Graves, P., Meiklejohn, G., Hodes, D.S., Johansson, K. and Halonen, P.E. 1991. Rapid detection of type A influenza viruses with monoclonal antibodies to the M protein (M1) by enzyme-linked immunosorbent assay and time-resolved fluoroimmunoassay. *J Clin Microbiol* 29: 2484-2488.

Burness, A.T.H. and Clothier, F.W. 1970. Particle weight and other biophysical properties of encephalomyocarditis virus. *J Gen Virol* 6: 381-393.

Burrows, R., Mann, J.A., Garland, A.J.M., Greig, A. and Goodridge, D. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J Comp Pathol* 91: 599-609.

Cambrosio, A. and Keating, P. 1992. Between fact and technique: the beginnings of hybridoma technology. *J Hist Biol* 25: 175-230.

Capozzo, A.V., Periolo, O.H., Robiolo, B., Seki, C., La Torre, J.L. and Grigera, P.R. 1997. Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine* 15: 624-630.

Carrillo, C., Lu, Z., Borca, M.V., Vagnozzi, A., Kutish, G.F. and Rock, D.L. 2007. Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J Virol* 81: 11341-11351.

Cheng, I.C., Liang, S.M., Tu, W.J., Chen, C.M., Lai, S.Y., Cheng, Y.C., Lee, F., Huang, T.S. and Jong, M.S. 2006. Study on the porcinophilic foot-and-mouth disease virus I. production and characterization of monoclonal antibody against VP1. *J Vet Med Sci* 68: 859-864.

Childerstone, A.J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M. and Parkhouse, R.M. 1999. Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 80: 663-669.

Chu, R.M., Yang, P.C. and Cheng, I.C. 1997. Review: Foot-and-mouth disease. *J Chin Soc Vet Sci* 23: 477-491.

Collen, T. and Doel, T.R. 1990. Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J Gen Virol* 71: 309-315.

Crowther, J.R. 2001. The ELISA guide book. Humana Press Inc., Totowa.

Crowther, J.R. and Abu Elzein, E.M.E. 1979. Application of the enzyme linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease viruses. *J Hyg Camb* 83: 513-519.

Crowther, J.R., Faris, S., Carpenter, Q.C. and Samuel, A.R. 1993. Identification of a fifth neutralization site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J Gen Virol* 74: 1547-1553.

Davies, G. 2002. Foot and mouth disease. *Res Vet Sci* 73: 195-199.

de St. Groth, S.F. and Scheidegger, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* 35: 1-21.

Di Girolamo, W., Salas, M. and Laguens, R.P. 1985. Role of Langerhans cells in the infection of the guinea-pig epidermis with foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* 83: 331-336.

Doel, T.R. 1999. Optimization of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 17: 1767-1771.

Doel, T.R. 2003. FMD vaccines. *Virus Res* 91: 81-99.

Domingo, E., Verdaguer, N., Ochoa, W.F., Ruiz-Jarabo, C.M., Sevulla, N., Batanowski, E., Mateu, M.G. and Fita, I. 1999. Biochemical and structural studies with neutralizing antibodies raised against foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 62: 169-175.

Donaldson, A.I. and Kihm, U. 1997. Research and technological developments required for more rapid control and eradication of foot and mouth disease. *Rev Sci Tech* 15: 863-873.

Donaldson, A.I., Gibson, C.F., Oliver, R., Hamblin, C. and Kitching, R.P. 1987. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Res Vet Sci* 43: 339-346.

Donaldson, A.I., Gloster, J., Harvey, L.D. and Deans, D.H. 1982. Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreaks in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1981. *Vet Rec* 110: 53-57.

Donaldson, A.I., Kitching, R.P. and Barnett, P.V. 1996. Foot and mouth disease. In: OIE manual of standards for diagnostic test and vaccines, Office international des epizooties, Paris, Chapter 2.1.1., pp. 47-56.

Donaldson, A.L. 1997. Foot-and-mouth disease in Taiwan. *Vet Rec* 140: 407.

Dunn, C.S. and Donaldson, A.I. 1997. Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* 141: 174-175.

Eisenbarth, G.S. 1981. Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Anal Biochem* 111: 1-16.

Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Rossmann, M.G., Fout, G.S., Medappaand, K.C. and Rueckert, R.R. 1983. Crystallization of a common cold virus, human rhinovirus 14: “isomorphism” with poliovirus crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 931-934.

Fawcett, T. 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern recognition letters* 27: 861-874.

Ferris, N.P. and Dawson, M. 1988. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Vet Microbiol* 16: 201-209.

Forss, S.K., Strebel, K., Beck, E. and Schaller, H. 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* 12: 6587-6601.

Fraenkel-Conrat, H., Kimball, P.C. and Levy, J.A. 1988. Picornavirus. In: *Virology* 2nd ed: 83-93.

Gailiunas, P. and Cottral, G.E. 1966. Presence and persistence of foot-and-mouth disease virus in bovine skin. *J Bacterial* 91: 2333-2338.

Garcia-Valcarcel, M., Doel, T., Collen, T., Ryan, M. and Parkhouse, R.M.E. 1996. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J Gen Virol* 77: 727-735.

Grubman, M.J. 1980. The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch Virol* 63: 311-315.

Grubman, M.J. and Baxt, B. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbial Rev* 17: 465-493.

Grubman, M.J. and Mason, P.W. 2002. Prospects, including time-frames, for improved

foot and mouth disease vaccines. *Rev Sci Tech* 21: 589-600.

Grubman, M.J. Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M. and Dowbenko, D. 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 50: 579-586.

Haydon, D., Lea, S., Fry, L., Knowles, N., Samuel, A.R., Stuart, D. and Woolhouse, M.E. 1998. Characterizing sequence variation in the VP1 capsid proteins of foot and mouth disease virus (serotype O) with respect to virion structure. *J Mol Evol* 46: 465-475.

Herold, J. and Andino, R. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7: 581-591.

Huang, C.C., Jong, M.H. and Lin, S.Y. 2000. Characteristics of foot and mouth disease virus in Taiwan. *Virology* 59: 677-679.

Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.

Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D. and King, A.M.Q. 2002. Integrin $\alpha\beta$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76: 935-941.

Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R.A. Blakemore, W.E., Ellard, F.M., Simmons, D.L., Newman, J.W., Stuart, D.I. and King, A.M. 1997. Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin alpha(v)beta3 *in vitro*. *J Virol* 71: 8357-8361.

Jelokhani-Niaraki, S., Esmaelizad, M., Daliri, M., Vaez-Torshizi, R., Kamalzadeh, M. and Lotfi, M. 2010. Sequence and phylogenetic analysis of the non-structural 3A and 3B protein-coding regions of foot-and-mouth disease virus subtype A Iran 05. *J Vet Sci* 11: 243-247.

Kitching, R.P. 1992. The application of biotechnology to the control of foot-and-mouth

disease virus. *Br Vet J* 148: 375-388.

Kitching, R.P. 2002. Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech* 21: 499-504.

Kitching, R.P. and Alexandersen, S. 2002. Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. *Rev Sci Tech* 21: 513-518.

Kitching, R.P. and Hughes, G.J. 2002. Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Rev Sci Tech* 21: 502-512.

Klug, A. and Caspar, D.L.D. 1960. The structure of small viruses. *Adv Virus Res* 7: 225-325.

Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Leippert, M., Beck, E., Weiland, F. and Pfaff, E. 1997. Point mutations within the β G- β H loop of foot and mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol* 71: 1046-1051.

Lin, S.Y. 2000. The outbreaks and controls of foot-and-mouth disease in Taiwan. 11th FAVA, 262.

Lin, Y.L., Huang, Y.W., Jong, M.H., Chang, W.M., Huang, C.C., Chang, P.C. and Shieh, H.K. 2012 (a). Protective efficacy of foot-and-mouth disease vaccine (O/TAW/98) against challenge with the virus isolated in Taiwan in 2009. *Taiwan Vet J* 36: 214-221.

Lin, Y.L., Jong, M.H., Huang, C.C., Shieh, H.K. and Chang, P.C. 2010 (b). Genetic and antigenic characterization of foot-and-mouth disease viruses isolated in Taiwan between 1998 and 2009. *Vet Microbiol* 145: 34-40.

Longjam, N., Deb, R., Sarmah, A.K., Tayo, T., Awachat, V.B. and Saxena, V.K. 2011. Review article: A brief review on diagnosis of foot-and-mouth disease of livestock:

conventional to molecular tools. *Vet Med Int* 2011: 1-17.

Lu, Z., Zhang, X., Fu, Y., Cao, Y., Tian, M., Sun, P., Li, D., Liu, Z. and Xie, Q. 2010.

Expression of the major epitope regions of 2C integrated with the 3AB non-structural protein of foot-and-mouth disease virus and its potential for differentiating infected from vaccinated animals. *J Virol Methods* 170: 128-133.

Mason, P., Grubman, M.J. and Baxt, B. 2003. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91: 9-32.

Mason, P., Rieder, E and Baxt, B. 1994. RGD sequence of foot and mouth disease virus is essential for infecting cell via the natural receptor but can be bypassed by an antibody dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1932-1936.

Mateu, M.G., Andreu, D. and Domingo, E. 1995. Antibodies raised in a natural host and monoclonal antibodies recognize similar antigenic features of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 210: 120-127.

McCullough, K.C., Parkinson, D. and Crowther, J.R. 1988. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 65: 187-191.

McCullough, K.C., Simone, F.D., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J.R. and Kihm, U. 1992. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol* 66: 1835-1840.

Meyer, R.F., Babcock, G.D., Newman, J.F.E., Burrage, T.G., Toohey, K., Lubroth, J. and Brown, F. 1997. Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. *J Virol Methods* 65: 33-43.

Mulcahy, G., Gale, C., Robertson, P., Iyisan, S., DiMarchi, R.D. and Doel, T.R. 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to

foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8: 249-256.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. 1999. Chapter 35: Picornaviridae. *Veterinary Virology* 3th. A Division of Harcourt Brace. 517-532.

Nayak, A., Goodfellow, I.G., Woolaway, K.E., Birtley, J., Curry, S. and Belsham, G.J. 2006. Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* 80: 9865-9875.

Oleksiewicz, M.B., Donaldson, A.I. and Alexandersen, S. 2001. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J Virol Methods* 92: 23-35.

Ouldrige, E.J., Barnett, P. and Rweyemamu, M.M. 1982. The relative efficiency of two ELISA techniques for the titration of FMD antigen. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* 22: 142-151.

Pacheco, J.M., Henry, T.M., O'Donnell, V.K., Gregory, J.B. and Mason, P.W. 2003. Role of non-structural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 77: 13017-13027.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *American J Hygiene* 27: 493-497.

Reichert, J. and Pavolu, A. 2004. Monoclonal antibodies market. *Nat Rev Drug Discov* 3: 383-384.

Rigden, R.C., Carrasco, C.P., Barnett, P.V., Summerfield, A. and McCullough, K.C. 2003. Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs. *Vaccine* 21: 1466-1477.

Rueckert, R.R. 1996. Chapter 21 Picornaviridae: The virus and their replication. *Virology* 3th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 609-654.

Rweyemamu, M.M. and Leforban, Y. 1999. Foot-and-mouth disease and international

development. *Adv Virus Res* 53: 111-126.

Saiz, J.C., Sobrinho, F. and Dopazo, J. 1993. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type O. *J Gen Virol* 74: 2281-2885.

Saleem, M. and Mustafa, K. 2010. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application. *African Journal of Biotechnology* 7.

Salt, J.S. 1993. The carrier state of foot and mouth disease—an immunological review. *Br Vet J* 149: 207-223.

Salt, J.S., Mulcahy, G. and Kitching, R.P. 1996. Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of "carrier" and "non-carrier" cattle. *Epidemiol Infect* 117: 349-360.

Samina, I., Rones, Z.Z. and Peleg, B.A. 1997. Homologous heterologous antibody response of cattle and sheep after vaccination with foot and mouth disease and influenza viruses. *Vaccine* 16: 551-557.

Samuel, A.R. and Knowles, N.J. 2001. Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet* 17: 421-424.

Scudamore, J.M. and Harris, D.M. 2002. Control of foot and mouth disease: lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001. *Rev Sci Tech* 21: 699-710.

Sellers, R.F. 1968. The inactivation of foot-and-mouth disease virus by chemicals and disinfectants. *Vet Rec* 83: 504-506.

Shafer, A.L., Katz, J.B. and Eernisse, K.A. 1998. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis* 42: 28-34.

Shieh, H.K. 1997. The FMD situation in Taiwan. *J Chin Vet Sci* 23: 395-402.

Snowdon, W.A. 1966. Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of

calf thyroid cells. *Nature* 210: 1079-1080.

Sørensen, K.J., de Stricker, K., Dyrting, K.C., Grazioli, S. and Haas, B. 2005. Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals from vaccinated animals using a blocking ELISA based on baculovirus expressed FMDV 3ABC antigen and a 3ABC monoclonal antibody. *Arch Virol* 150: 805-814.

Sørensen, K.J., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Salt, J.S., Nqindi, J. and Mackay, D.K.J. 1998. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol* 143: 1461-1476.

Suarez, D.L., Das, A. and Ellis, E. 2007. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* 201-208.

Sutmoller, P. and McVicar, J.W. 1976. Pathogenesis of foot-and-mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J Hyg (Lond)* 77: 235-243.

Svitkin, Y.V., Pestova, T.V., Maslova, S.V. and Agol, V.I. 1988. Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of neurovirulent and attenuated strains. *Virology* 166: 394-404.

Tami, J.A., Parr, M.D., Brown, S.A. and Thompson, J.S. 1986. Monoclonal antibody technology. *Am J Hosp Pharm* 43: 2816-2825.

Tsai, C.P., Pan, C.H., Liu, M.Y., Lin, Y.L., Chen, C.M., Huang, T.S., Cheng, I.C., Jong, M.H. and Yang, P.C. 2000. Molecular epidemiological studies on foot-and-mouth disease type O Taiwan viruses from the 1997 epidemic. *Vet Microbiol* 74: 207-216.

VaMateu, M.G., Camarero, J.A., Giralt, E., Andreu, D. and Domingo, E. 1995. Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology* 206: 298-306.

Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E. 1978. Enzyme immunoassays with special

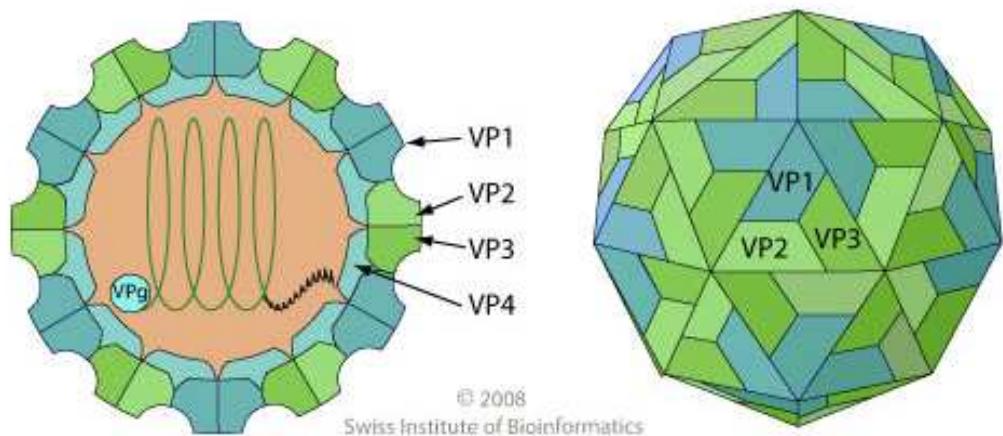
reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 31: 507-520.

Xie, Q-C., McCahon, D., Crowther, J.R., Belsham, G.H. and McCullough, K.C. 1987.

Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J Gen Virol* 68: 1637-1647.

Yang, P.C., Chu, R.M., Chung, W.B. and Sung, H.T. 1999. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet Rec* 145: 731-734.

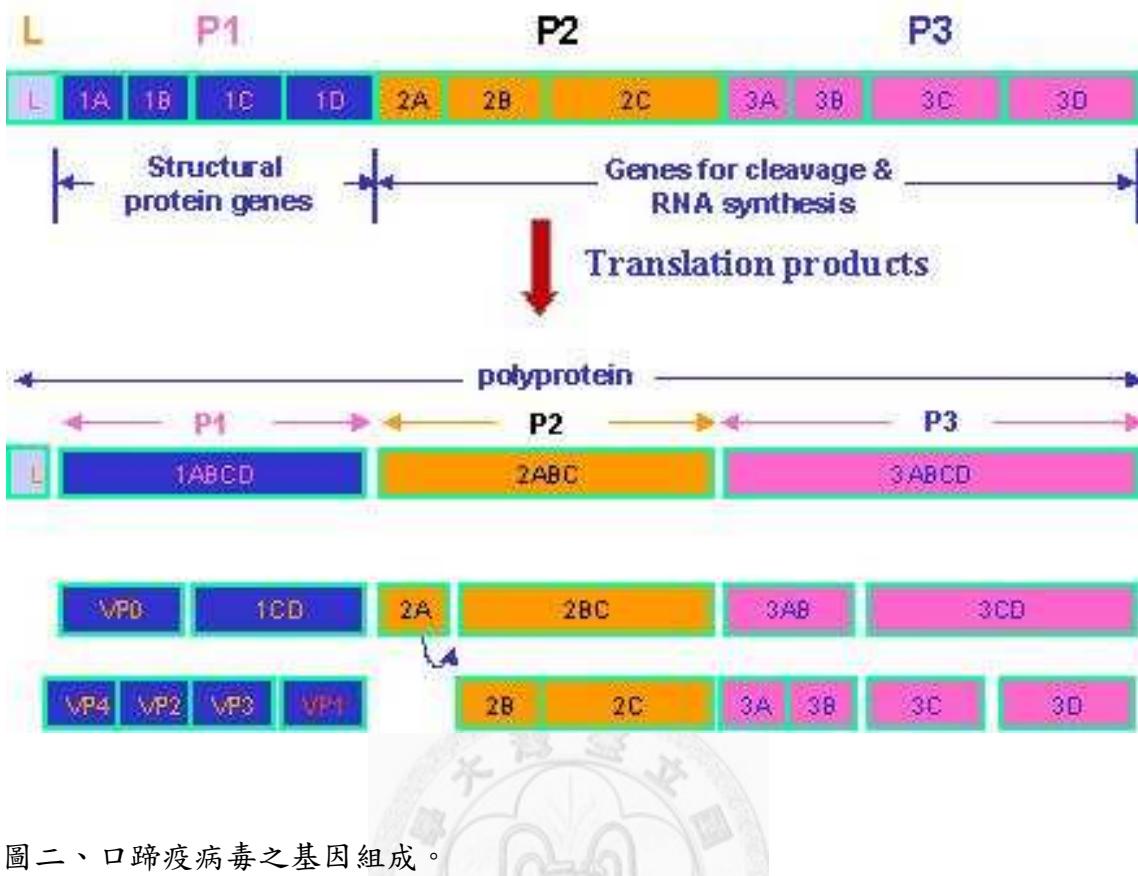




圖一、口蹄疫病毒結構示意圖。

病毒蛋白披衣由 60 個次蛋白披衣所組成，每個次蛋白披衣由 VP1、VP2、VP3 及 VP4 四個結構蛋白所組成，VP1、VP2 及 VP3 為於病毒表面，而 VP4 位於病毒內部 (http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/98.html)。





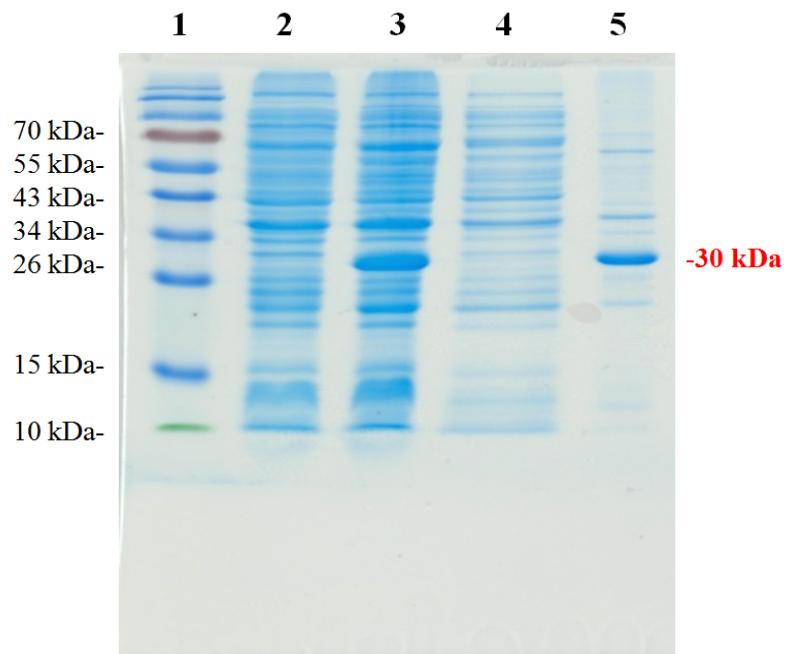
圖二、口蹄疫病毒之基因組成。

P1 經蛋白酶切割後形成四個結構蛋白 VP1-VP4，P2、P3 經蛋白酶切割後形成七個非結構蛋白。(<http://www.ubiasia.com.tw/images/fmdv-p.jpg>)

P1 : structural precursor protein 。

P2 : non- structural precursor protein 。

P3 : non- structural precursor protein 。



圖三、SDS-PAGE 確認表現重組蛋白口蹄疫病毒 VP1。

目標蛋白在 IPTG 誘導後大量表現，可得 30 kDa 大小之目標產物。目標蛋白主要存在於破菌後以 PBS 回溶離心的沉澱物中。

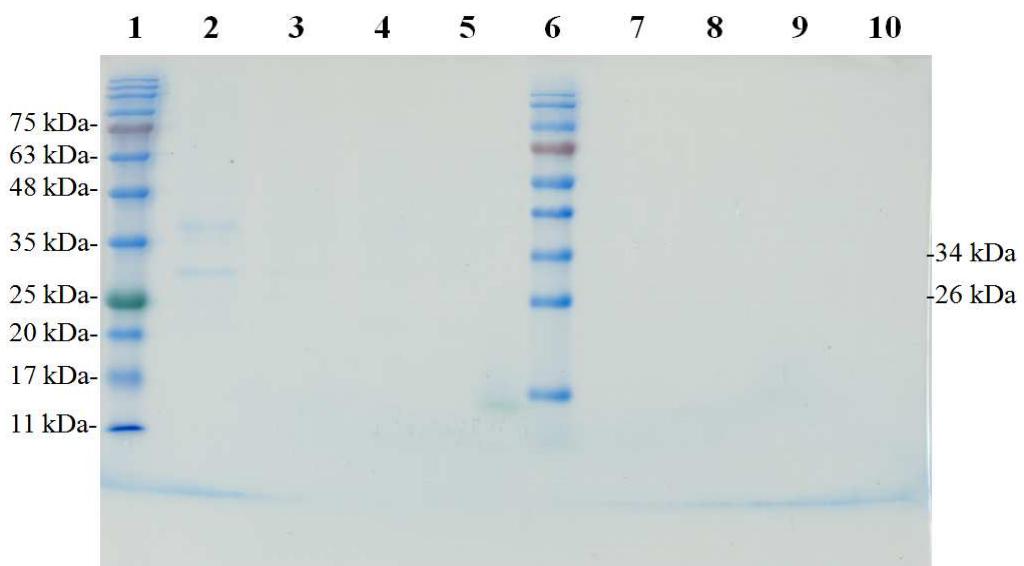
Lane 1 : Protein marker。

Lane 2 : IPTG 加入前 (BI, before induce)。

Lane 3 : IPTG 加入後 3 小時 (AI, after induce)。

Lane 4 : 超音波震盪破菌後以 PBS 回溶離心後之上清液 (S)。

Lane 5 : 超音波震盪破菌後以 PBS 回溶離心後之沉澱物 (P)。



圖四、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化。

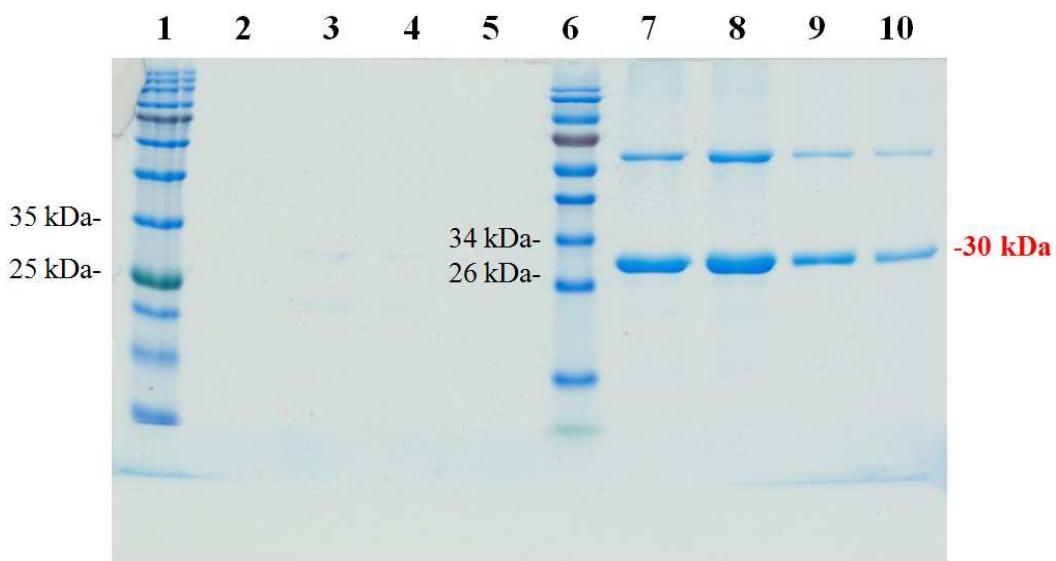
利用 SDS-PAGE 來檢視重組結構蛋白通過鎳離子親和性管柱純化的情形，在 wash buffer 的部分只有少許雜質流出，目標蛋白尚未出現。

Lane 1 : Protein marker 。

Lane 2-5 : 加入 wash buffer I 後所收集的液體。

Lane 6 : Protein marker 。

Lane 7-10 : 加入 wash buffer II 後所收集的液體。



圖五、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化。

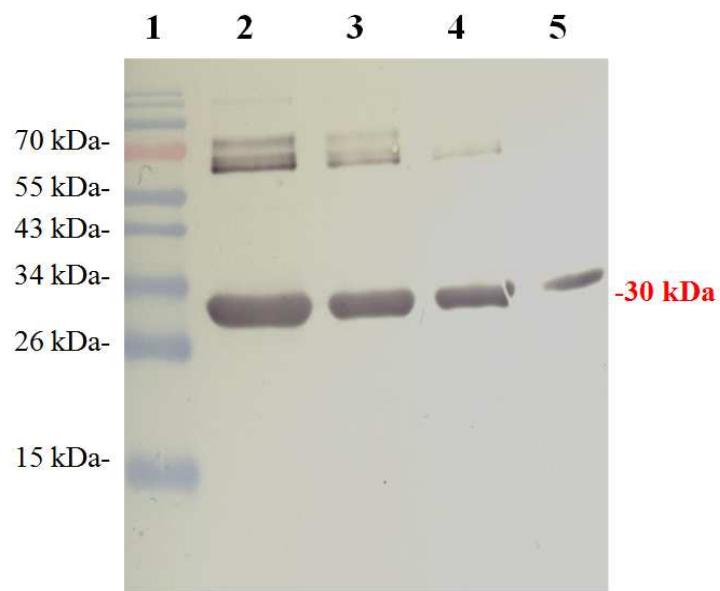
利用 SDS-PAGE 來檢視重組結構蛋白通過鎳離子親和性管柱純化的情形，在 elute buffer I 的部分目標蛋白尚未出現，直到 elute buffer II 目標蛋白出現大小約為 30 kDa。

Lane 1 : Protein marker 。

Lane 2-5 : 加入 elute buffer I 後所收集的液體 。

Lane 6 : Protein marker 。

Lane 7-10 : 加入 elute buffer II 後所收集的液體，可見目標蛋白大小為 30 kDa 。

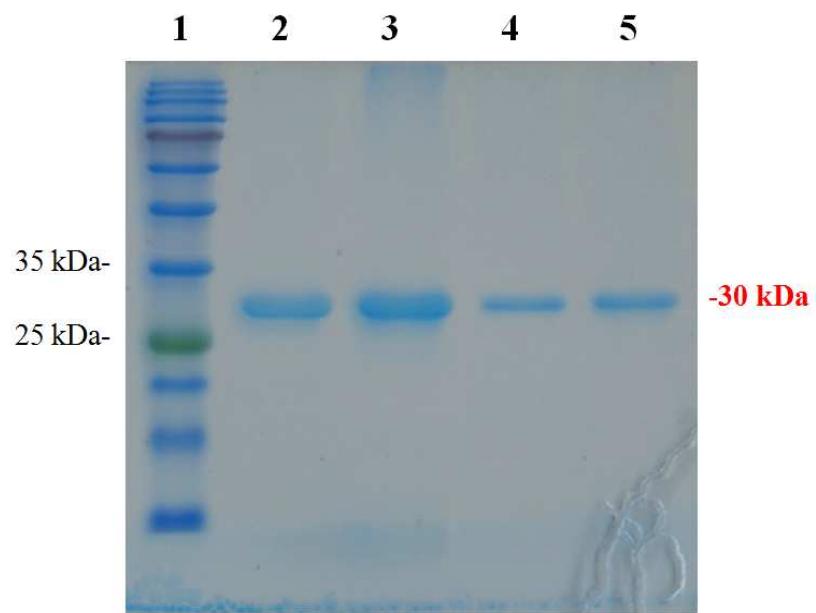


圖六、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之 His-tag 片段抗原性。

利用西方墨點法檢測經過鎳離子親和性管柱純化後重組結構蛋白 VP1 的 His-tag 片段抗原性，以稀釋 500 倍之單源抗體 mouse anti-His-tag 作為一抗，二抗為 HRP-conjugate goat anti-mouse IgG 稀釋 5,000 倍。結果顯示單源抗體 mouse anti-His-tag 能夠與 30 kDa 大小的重組結構蛋白 VP1 結合。

Lane 1 : Protein marker。

Lane 2-5 : 重組結構蛋白 VP1 + 單源抗體 mouse anti-His-tag。



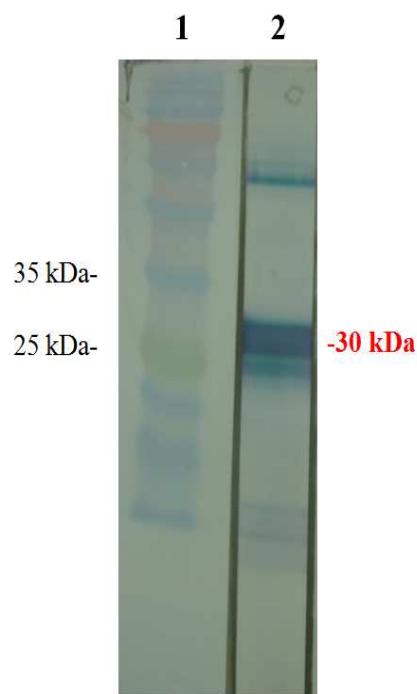
圖七、SDS-PAGE 檢視重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 之純化。

利用 SDS-PAGE 來檢視重組結構蛋白通過鎳離子親和性管柱及切膠純化後的情形，可看到目標蛋白出現大小為 30 kDa，且沒有其他的雜質。

Lane 1 : Protein marker。

Lane 2-3 : 切膠純化後第一天所收集的重組結構蛋白 VP1。

Lane 4-5 : 切膠純化後第二天所收集的重組結構蛋白 VP1。

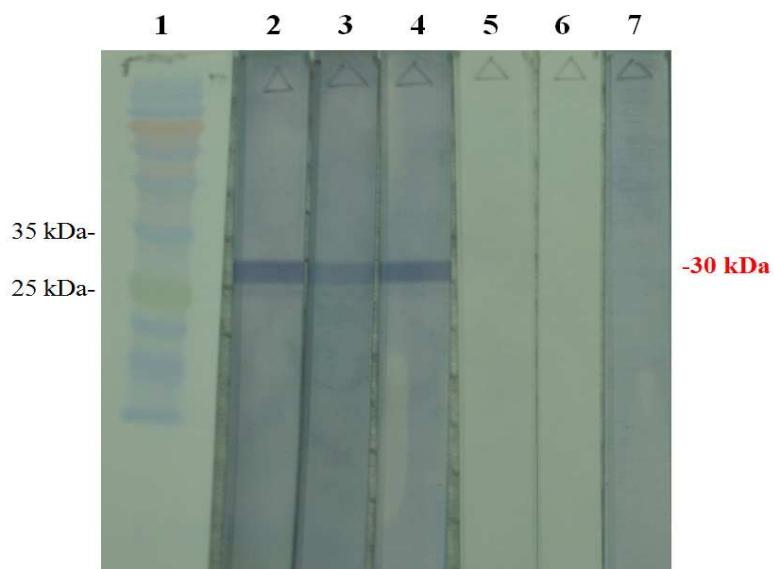


圖八、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與單源抗體的結合能力。

利用西方墨點法將切膠純化後的重組結構蛋白 VP1 與稀釋 500 倍之單源抗體 Q10E-3 進行感作，二抗為 HRP-conjugate goat anti-mouse IgG 稀釋 5,000 倍。結果顯示單源抗體 Q10E-3 能夠辨認重組結構蛋白 VP1。

Lane 1 : Protein marker。

Lane 2 : 重組結構蛋白 VP1 + 單源抗體 Q10E-3。



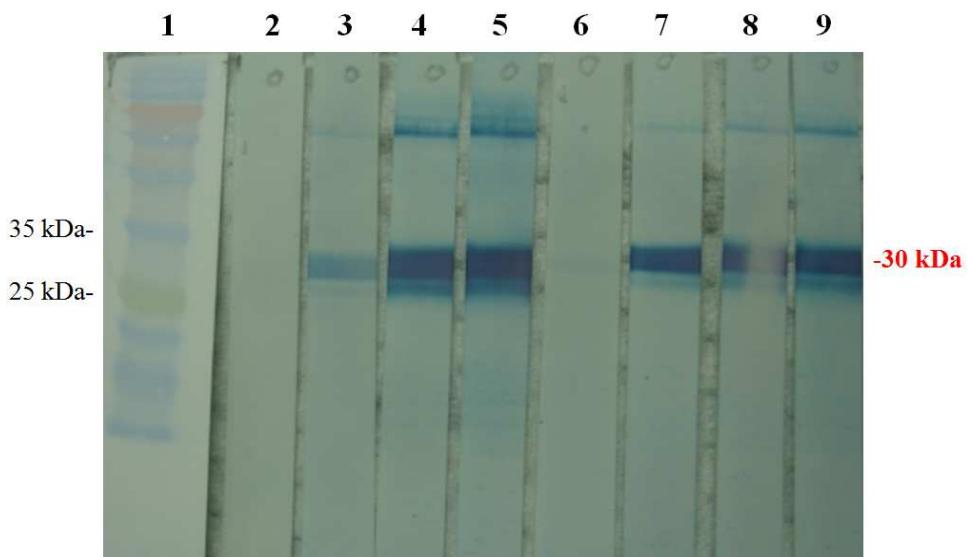
圖九、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與 SN 724 及 SPF 猪血清的結合能力。

利用西方墨點法將切膠純化後的重組結構蛋白 VP1 與稀釋 500 倍之高中和抗體力價及 SPF 猪血清進行感作，二抗為 HRP-conjugate goat anti-swine IgG 稀釋 5,000 倍。結果顯示高中和抗體力價豬血清能夠辨認重組結構蛋白 VP1，SPF 猪血清則否。

Lane 1 : Protein marker。

Lane 2-4 : 重組結構蛋白 VP1 + SN 724 猪血清。

Lane 5-7 : 重組結構蛋白 VP1 + SPF 猪血清。



圖十、西方墨點法檢測重組結構蛋白口蹄疫病毒 VP1 與兔子多源抗體的結合能力。

利用西方墨點法將切膠純化後的重組結構蛋白 VP1 與稀釋 500 倍之兔血清 (2 隻兔子於免疫期間第 0、21、42 及 63 天所採血液樣本) 進行感作，二抗為 HRP-conjugate goat anti-rabbit IgG 稀釋 5,000 倍。結果顯示第 0 天兩隻兔子皆無抗體反應，第 21、42 及 63 天所採血液樣本則明顯可與 30 kDa 大小的重組結構蛋白 VP1 結合。

Lane 1 : Protein marker。

Lane 2 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫前母兔血清。

Lane 3 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 21 天母兔血清。

Lane 4 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 42 天母兔血清。

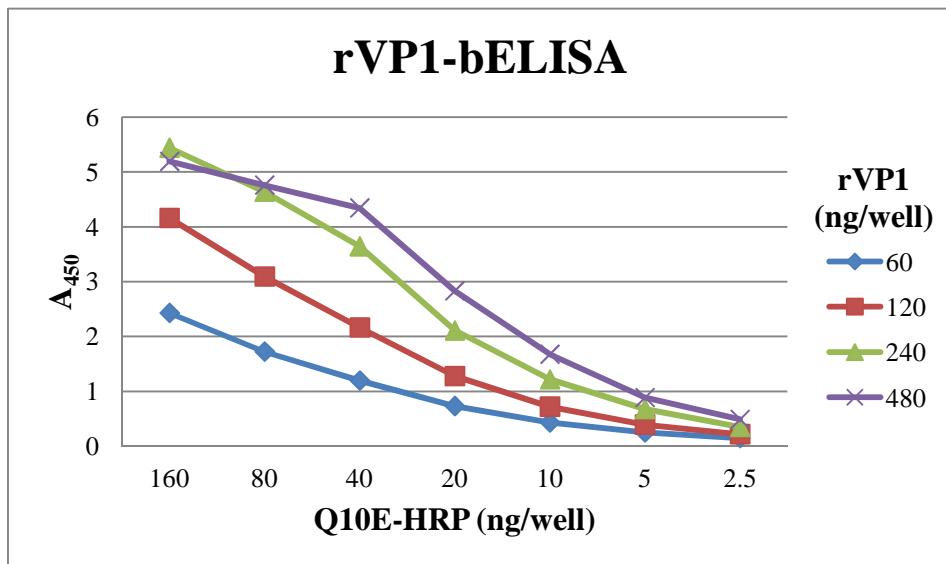
Lane 5 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 63 天母兔血清。

Lane 6 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫前公兔血清。

Lane 7 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 21 天公兔血清。

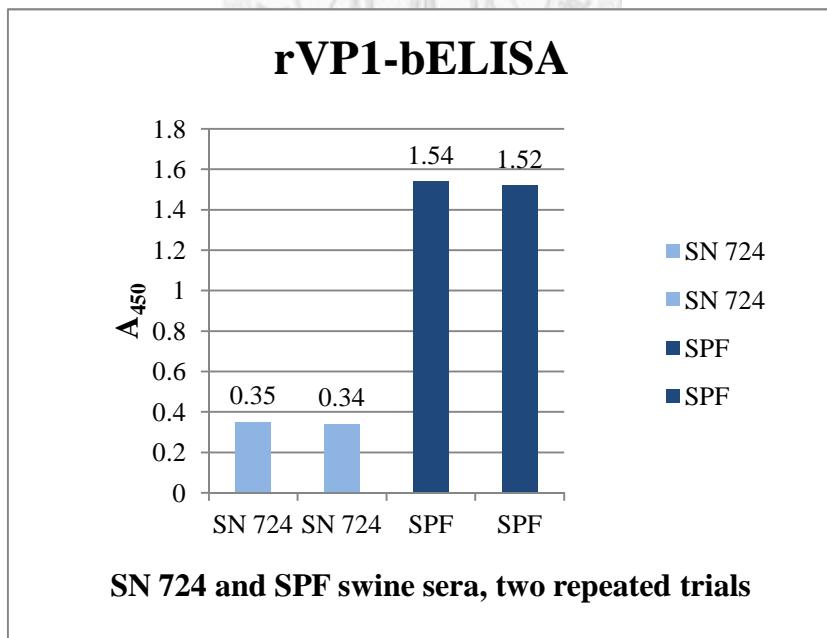
Lane 8 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 42 天公兔血清。

Lane 9 : 重組結構蛋白 VP1 + 免疫後第 63 天公兔血清。



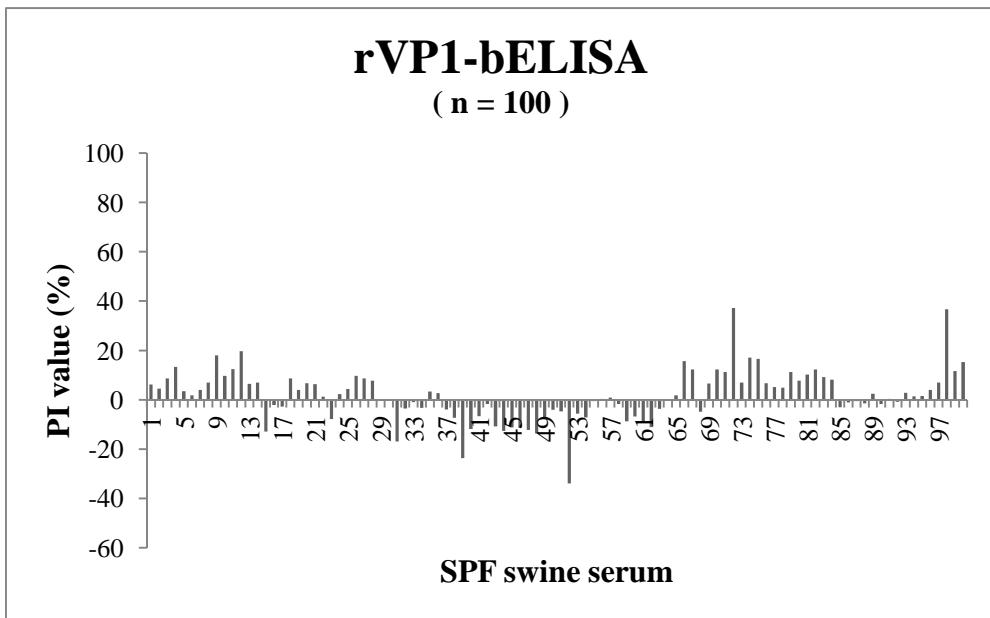
圖十一、最佳化 rVP1-bELISA 條件。

以棋盤式直接型 ELISA 檢測 rVP1-bELISA 的最佳條件。以切膠純化後的重組結構蛋白 VP1 作為塗鍍抗原，以標示 HRP 的單源抗體 Q10E 做為 tracer。選擇 A_{450} 讀值為 1.27 做為最佳化 rVP1-bELISA 的條件。其塗鍍抗原重組結構蛋白 VP1 濃度為 120 ng/well，而 Q10E-HRP 濃度則為 20 ng/well。



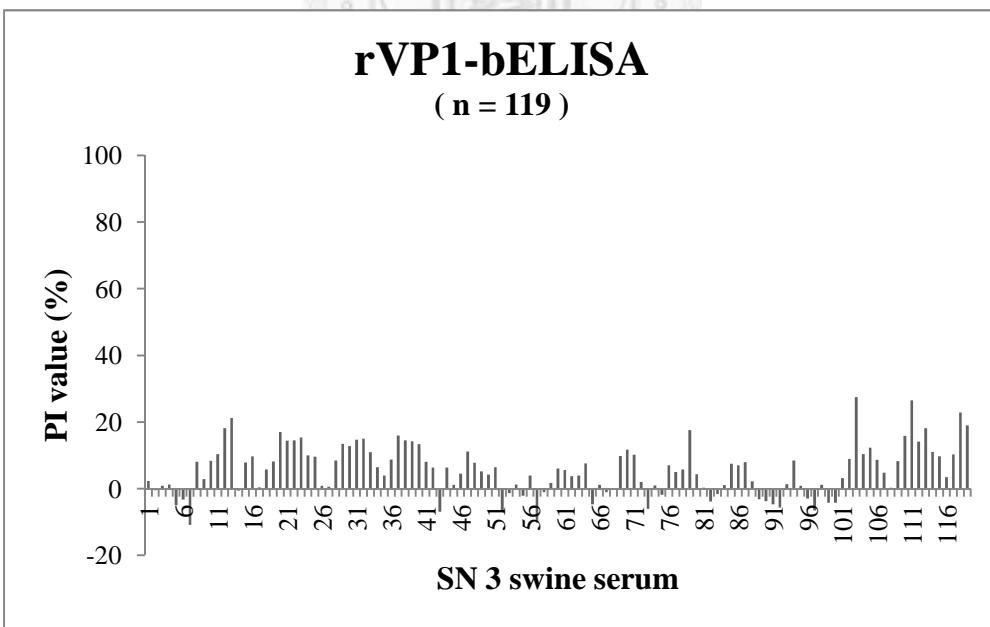
圖十二、rVP1-bELISA 標準血清分析與確認。

以最佳化的 rVP1-bELISA 條件來分別進行 SN 724 及 SPF 兩標準血清的二重複試驗。結果顯示兩者有明顯的差別，差距約 4-5 倍 A_{450} 值。



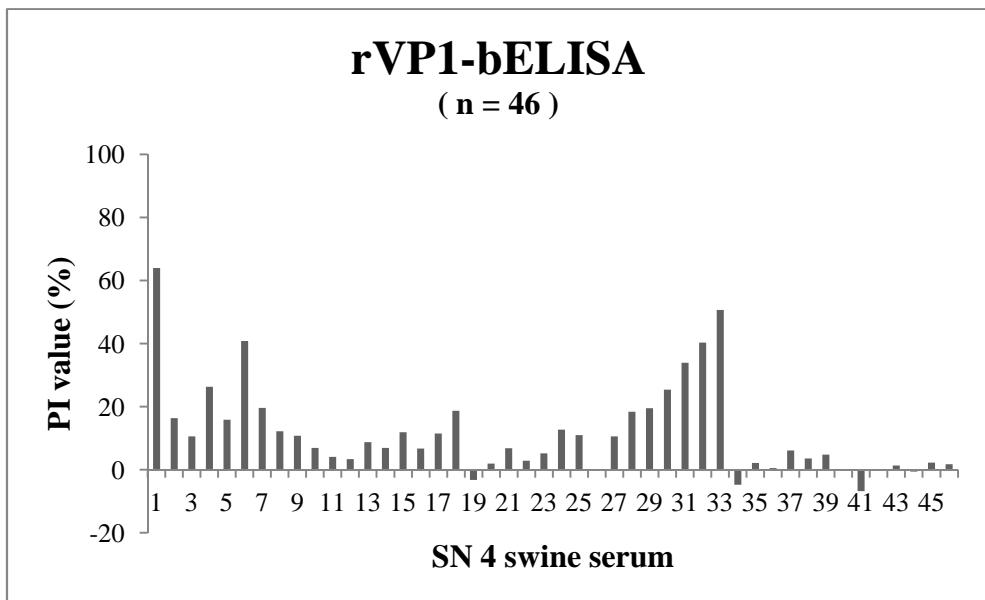
圖十三、SPF 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 100 個 SPF 豬血清樣本，平均 PI 值為 1.9，標準差為 10.4。



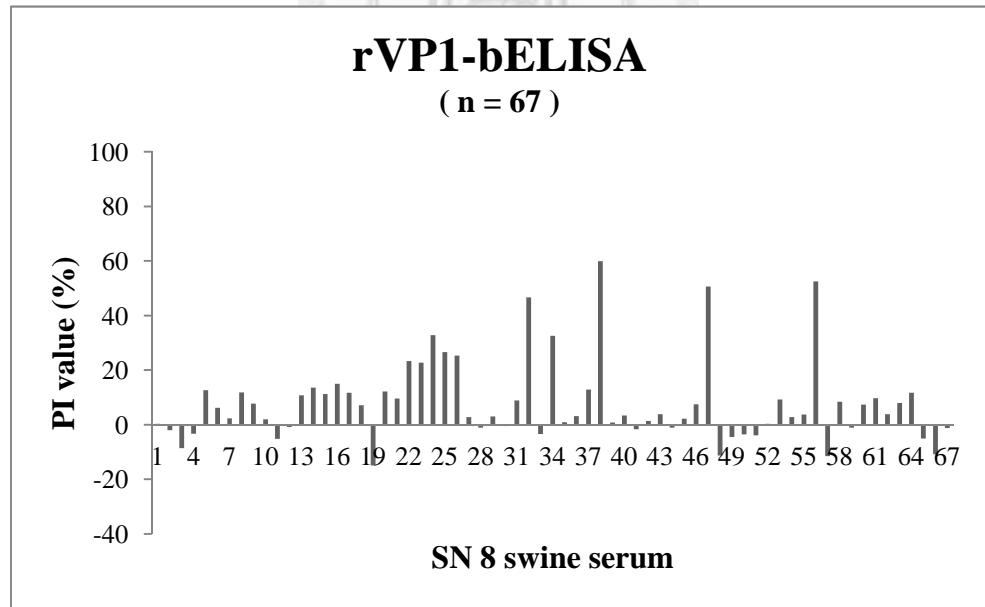
圖十四、SN 3 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 119 個 SN 3 豬血清樣本，平均 PI 值為 5.7，標準差為 7.5。



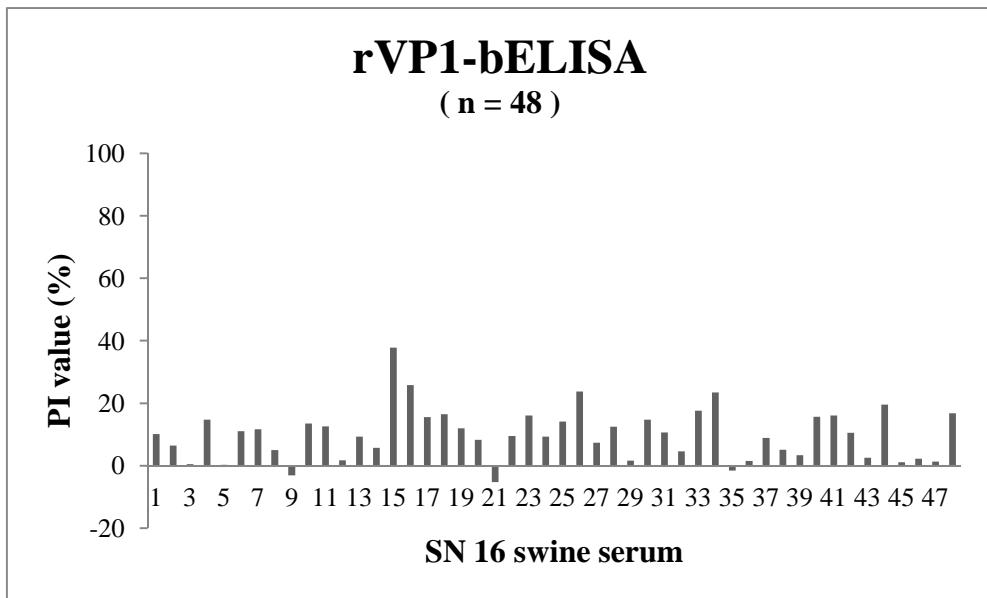
圖十五、SN 4 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 46 個 SN 4 豬血清樣本，平均 PI 值為 11.8，標準差為 14.6。



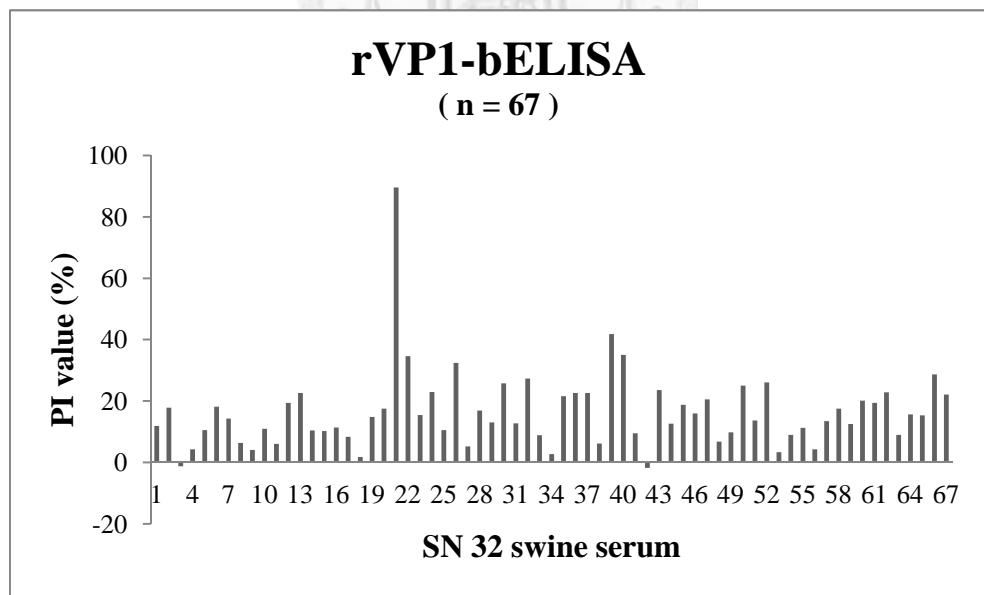
圖十六、SN 8 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 67 個 SN 8 豬血清樣本，平均 PI 值為 7.9，標準差為 14.9。



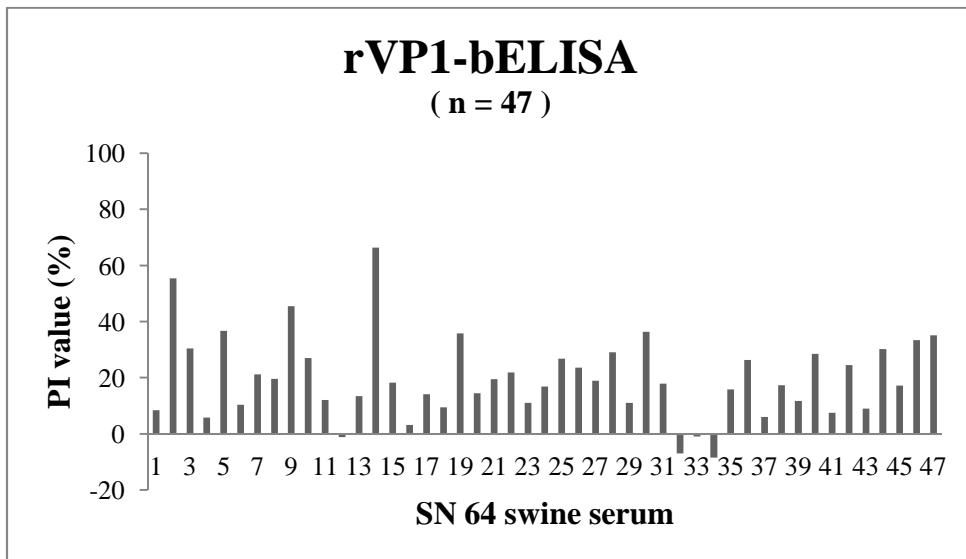
圖十七、SN 16 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 48 個 SN 16 豬血清樣本，平均 PI 值為 9.8，標準差為 8.3。



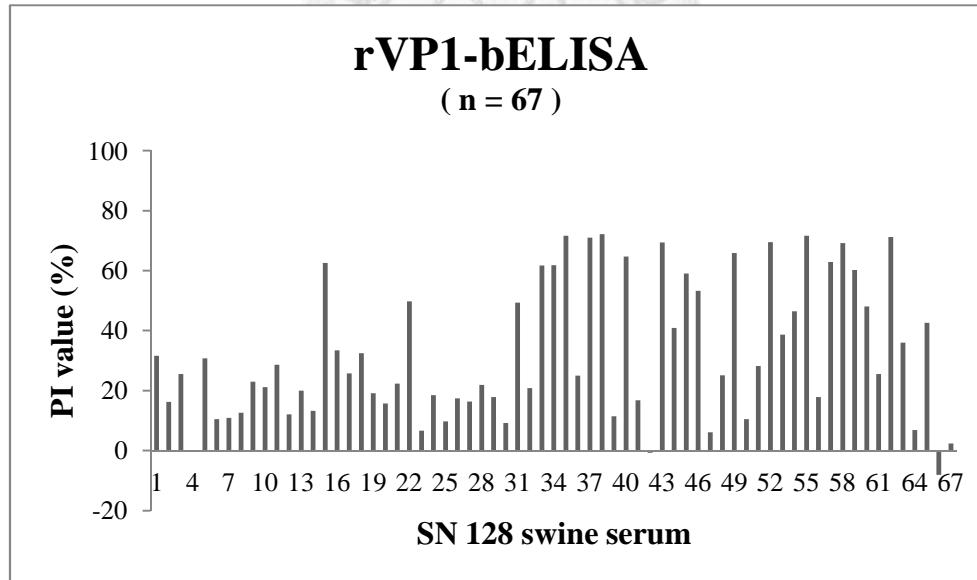
圖十八、SN 32 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 67 個 SN 32 豬血清樣本，平均 PI 值為 16.3，標準差為 12.7。



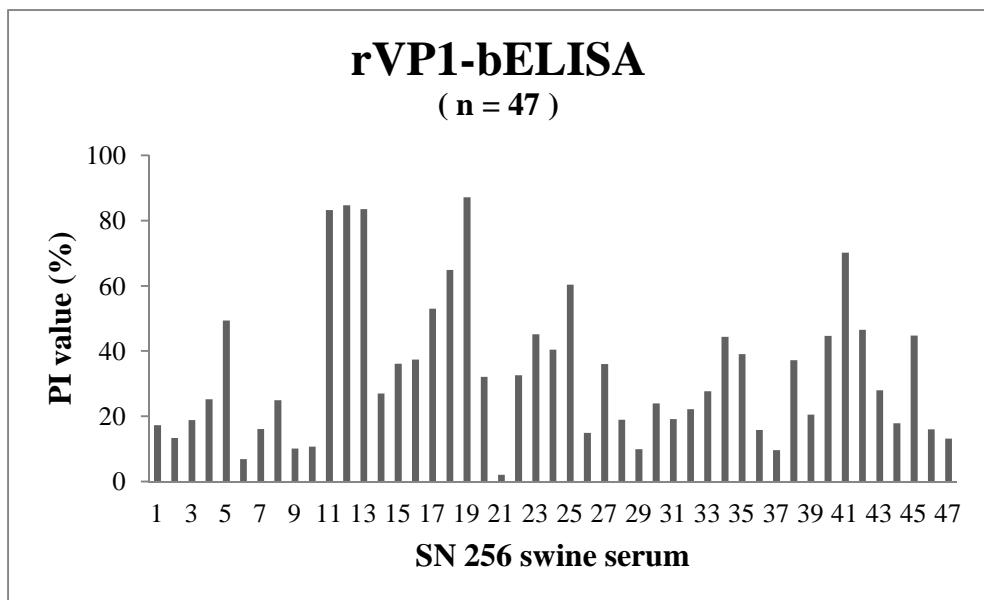
圖十九、SN 64 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 47 個 SN 64 豬血清樣本，平均 PI 值為 19.7，標準差為 14.7。



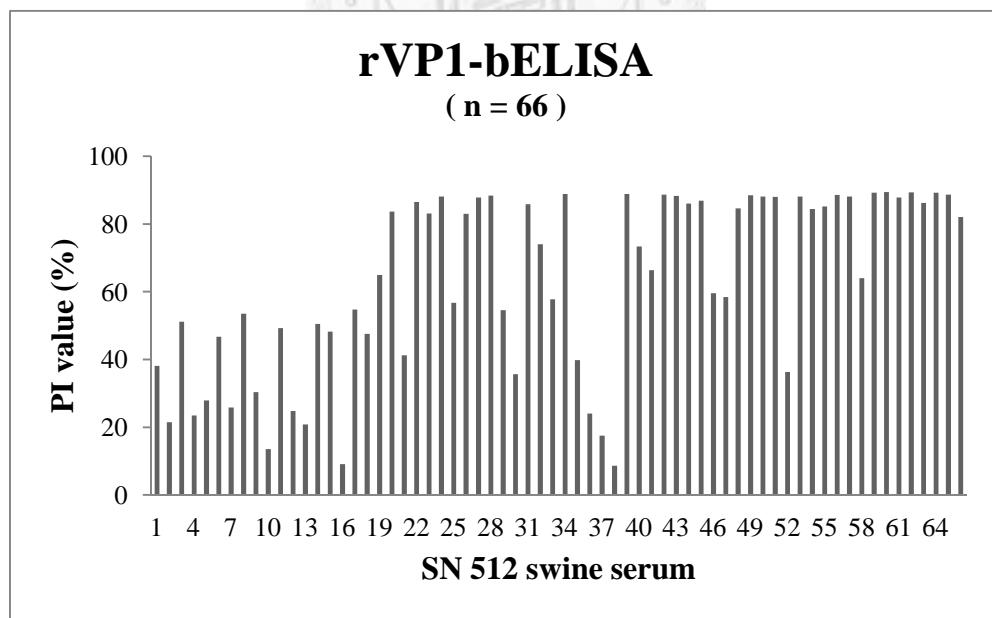
圖二十、SN 128 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 67 個 SN 128 豬血清樣本，平均 PI 值為 32.5，標準差為 22.9。



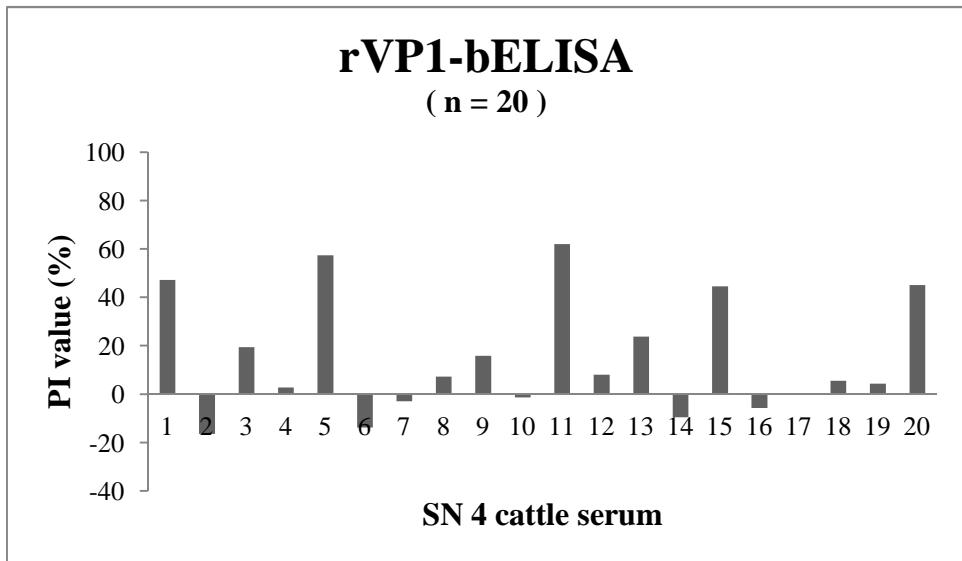
圖二十一、SN 256 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 47 個 SN 256 豬血清樣本，平均 PI 值為 33.7，標準差為 22.2。



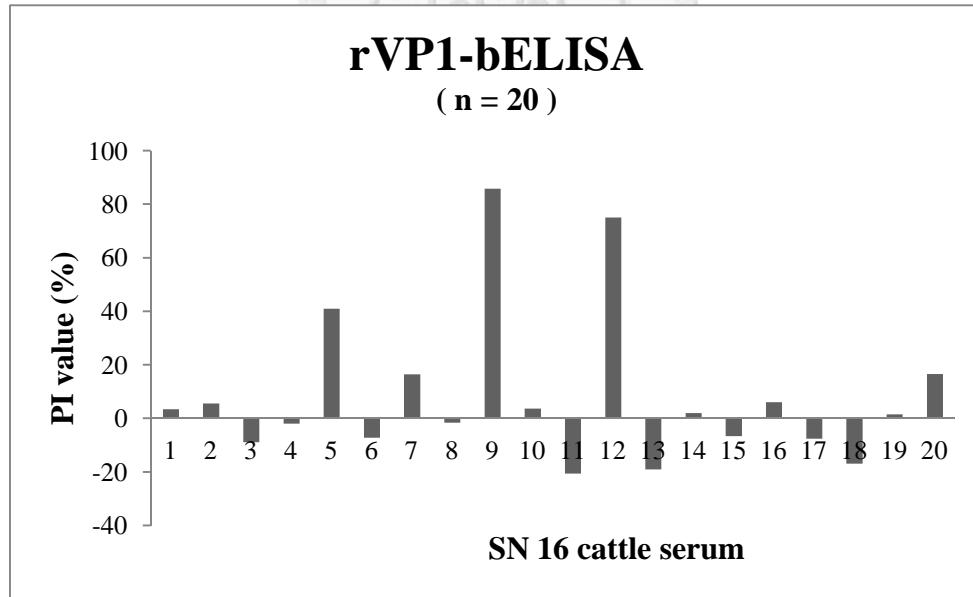
圖二十二、SN 512 豬血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 66 個 SN 512 豬血清樣本，平均 PI 值為 63.2，標準差為 26.3。



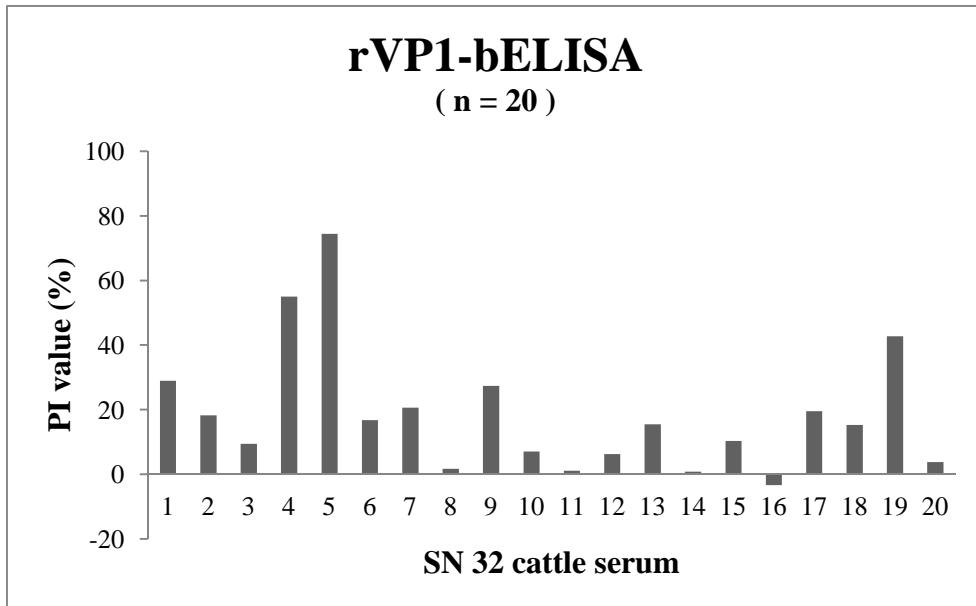
圖二十三、SN 4 牛血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 4 牛血清樣本, 平均 PI 值為 14.7, 標準差為 24.1。



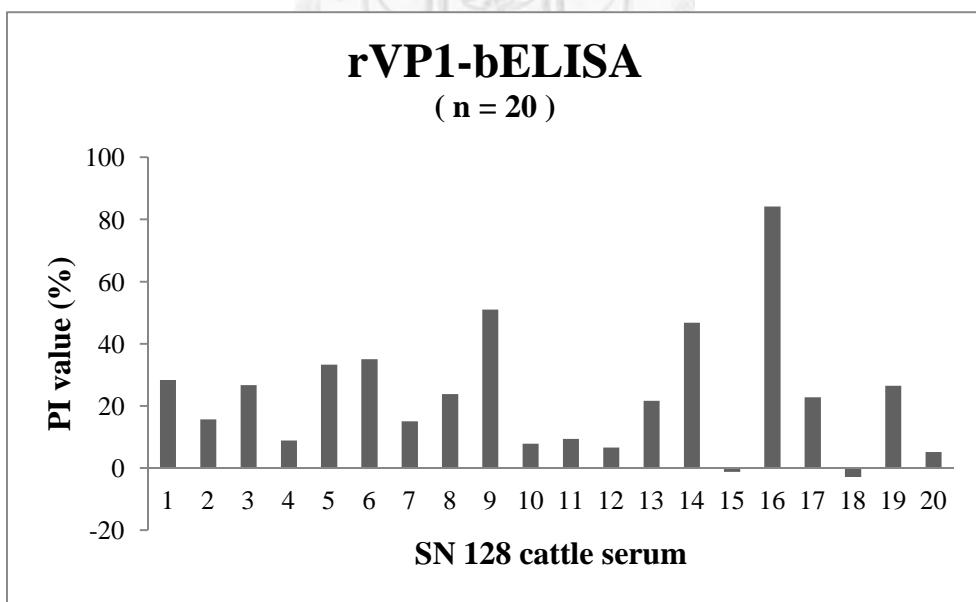
圖二十四、SN 16 牛血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 16 牛血清樣本, 平均 PI 值為 8.3, 標準差為 28.3。



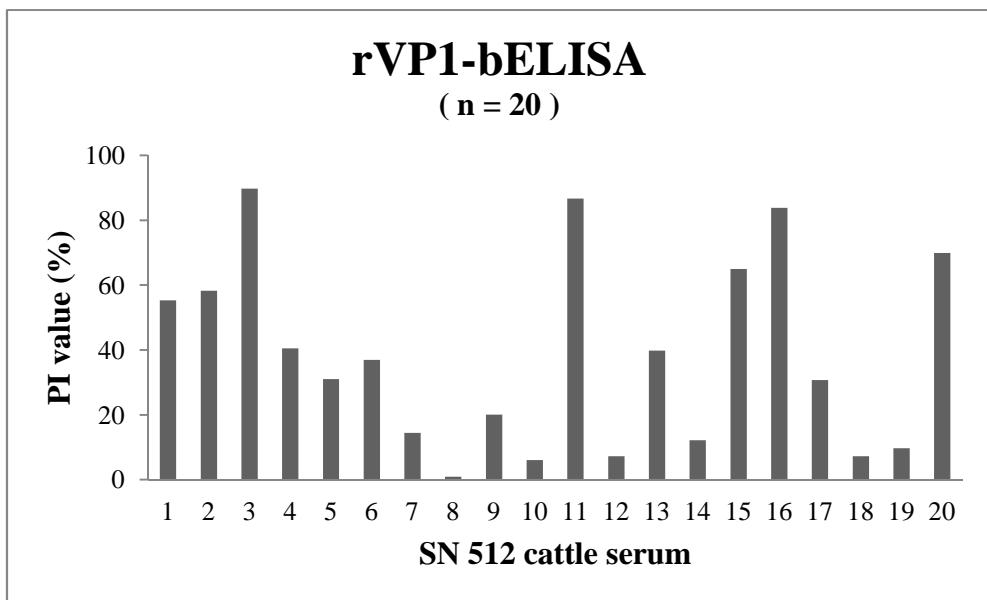
圖二十五、SN 32 牛血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 32 牛血清樣本，平均 PI 值為 18.6，標準差為 19.6。



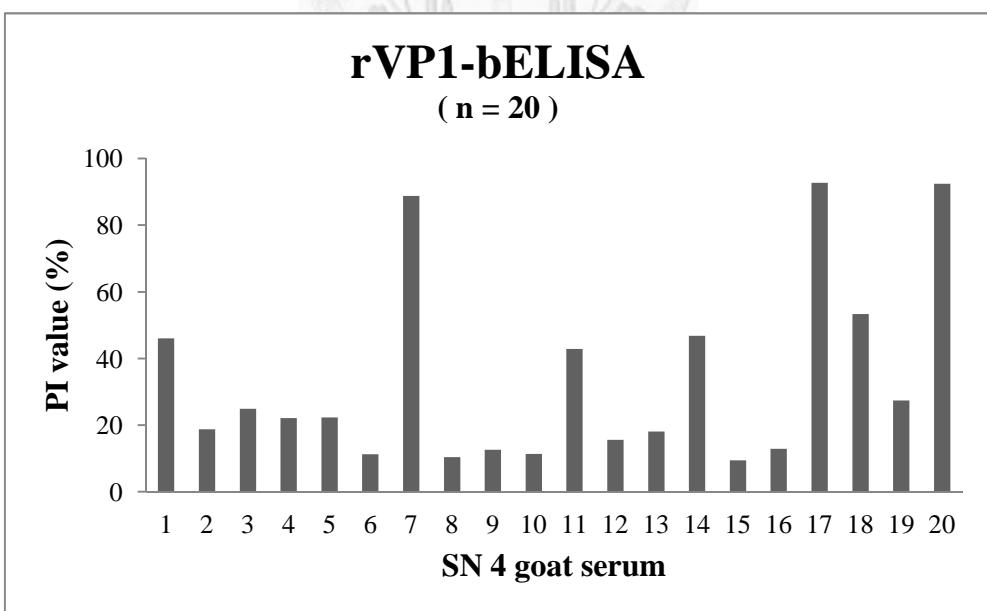
圖二十六、SN 128 牛血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 128 牛血清樣本，平均 PI 值為 23.2，標準差為 20.5。



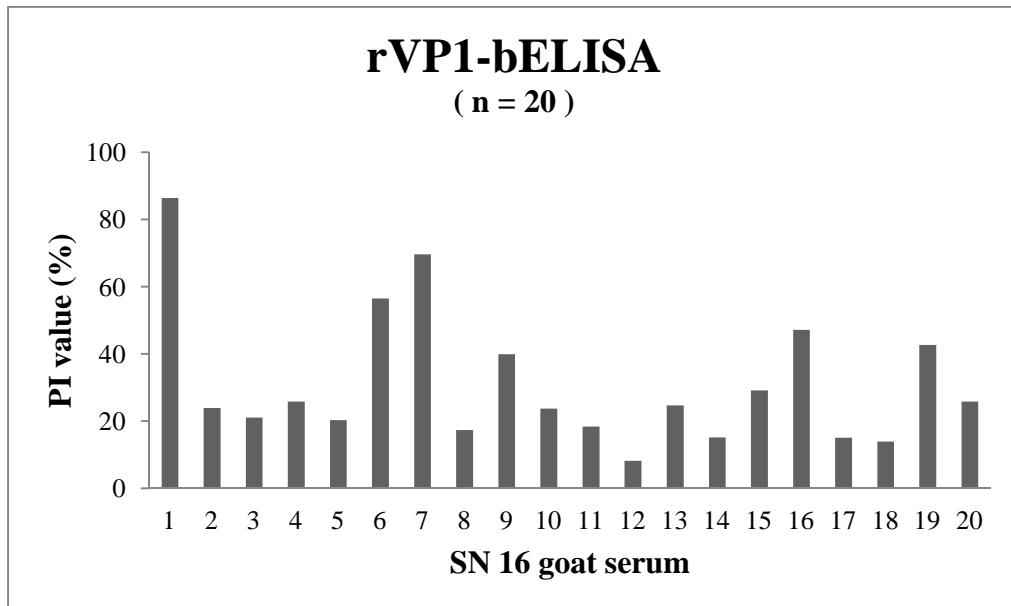
圖二十七、SN 512 牛血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 512 牛血清樣本，平均 PI 值為 38.3，標準差為 29.3。



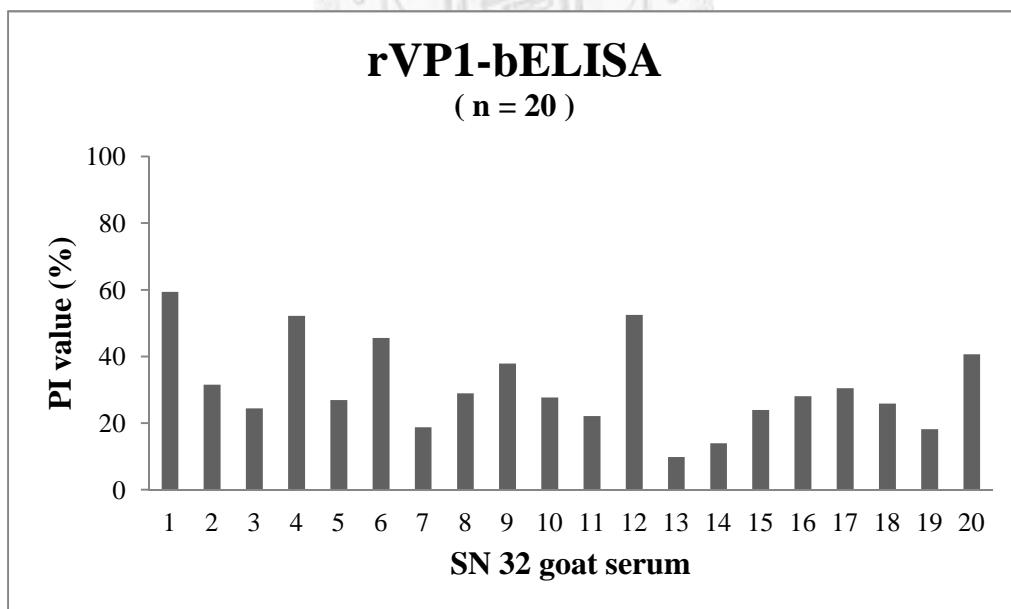
圖二十八、SN 4 羊血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 4 羊血清樣本，平均 PI 值為 34.0，標準差為 28.0。



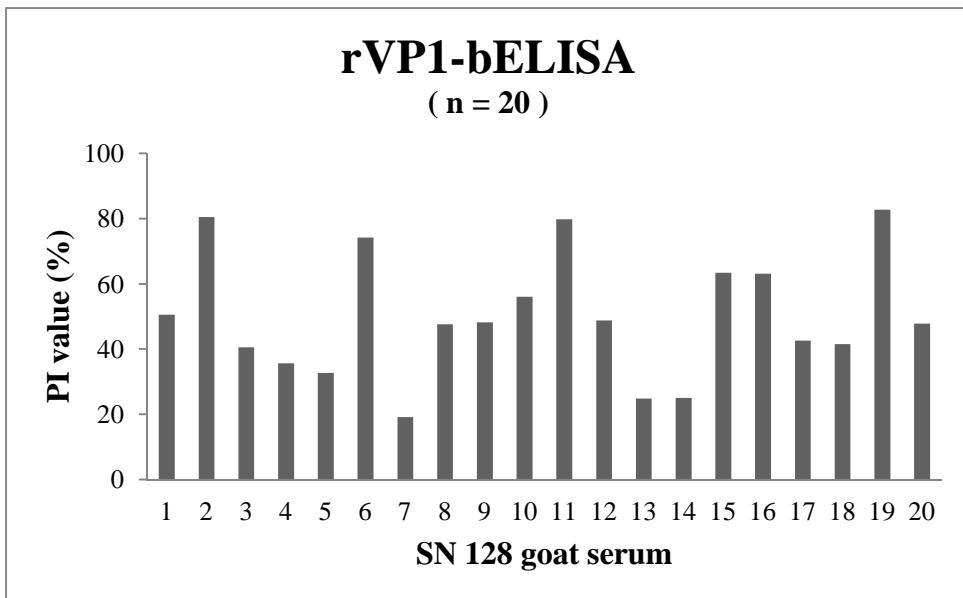
圖二十九、SN 16 羊血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 16 羊血清樣本，平均 PI 值為 31.2，標準差為 20.2。



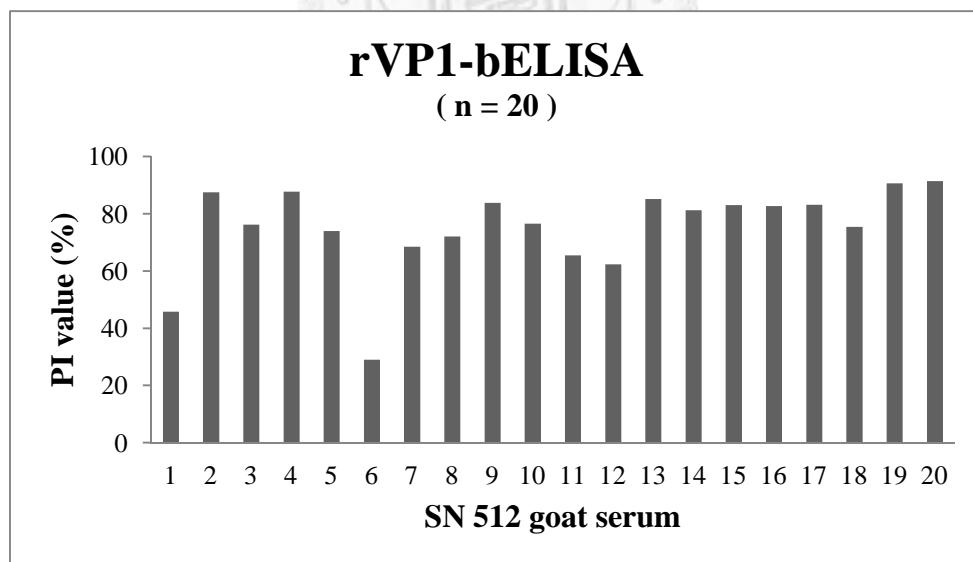
圖三十、SN 32 羊血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 32 羊血清樣本，平均 PI 值為 31.0，標準差為 13.3。



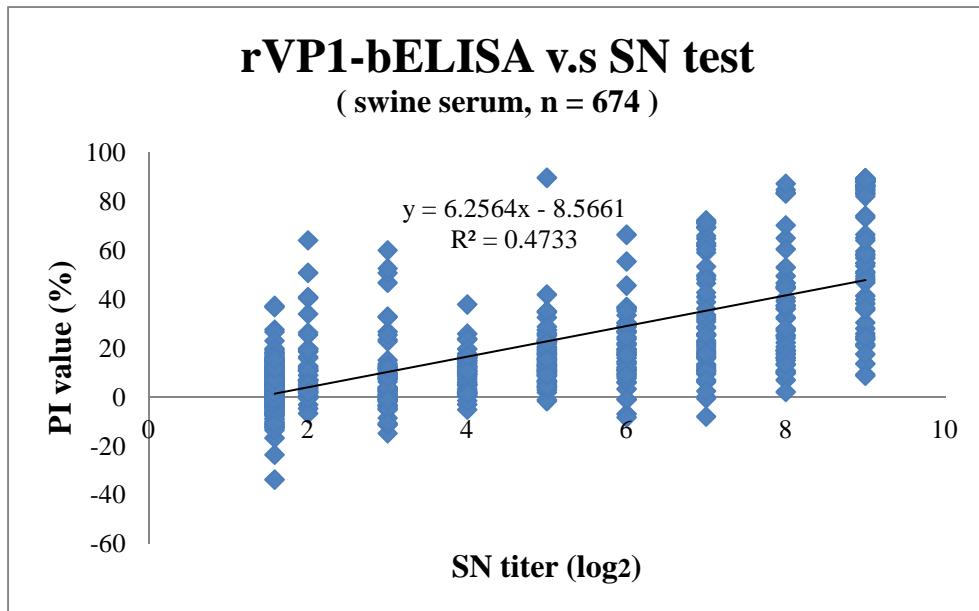
圖三十一、SN 128 羊血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 128 羊血清樣本，平均 PI 值為 50.2，標準差為 18.9。



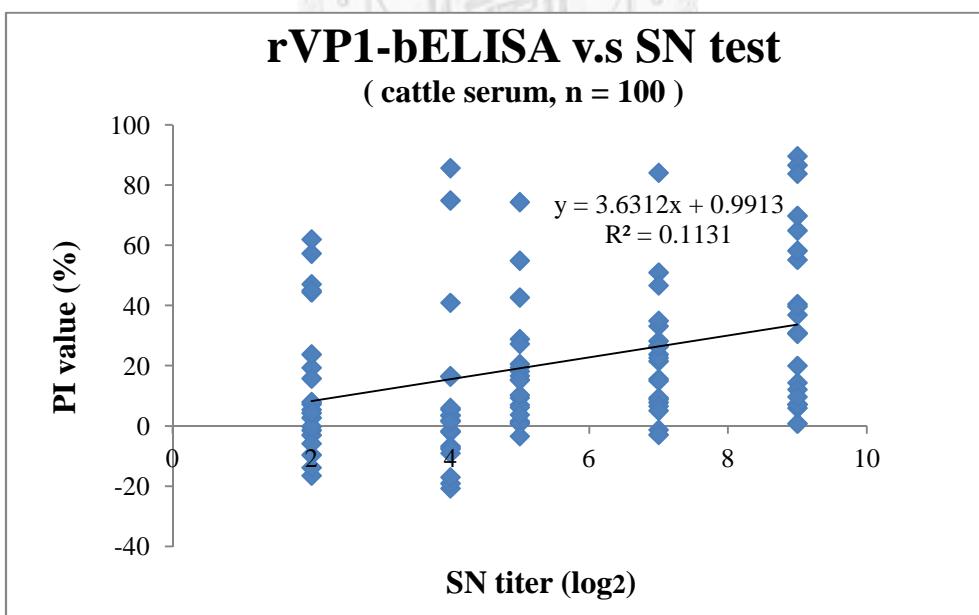
圖三十二、SN 512 羊血清樣本 PI 值分佈圖。

利用 rVP1-bELISA 檢測 20 個 SN 512 羊血清樣本，平均 PI 值為 75.1，標準差為 15.4。



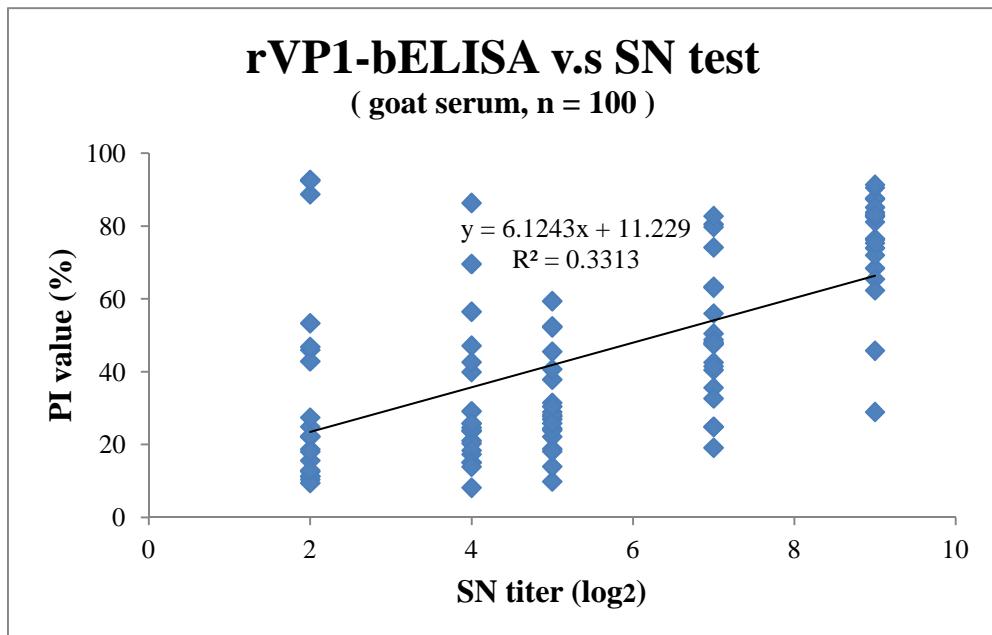
圖三十三、豬血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 674)。

利用 rVP1-bELISA 檢測 674 個豬血清樣本，依據每個樣本的 PI 值與血清中和抗體
力價繪製標準曲線圖。



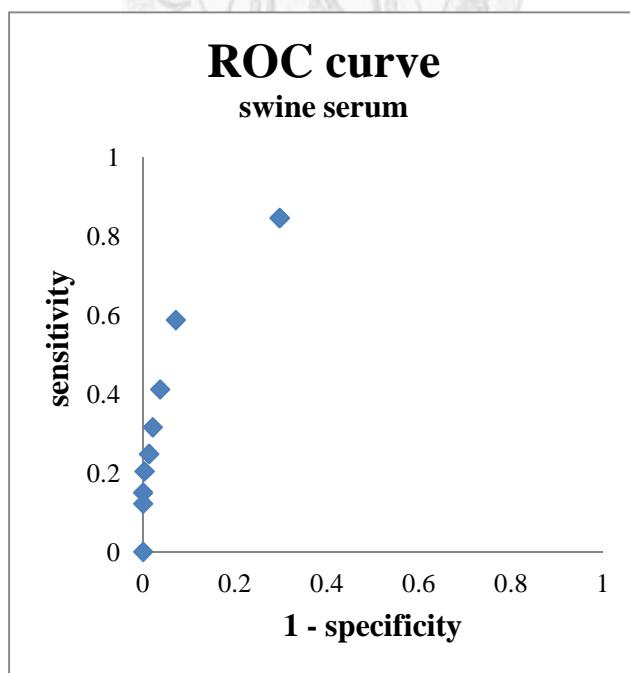
圖三十四、牛血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 100)。

利用 rVP1-bELISA 檢測 100 個牛血清樣本，依據每個樣本的 PI 值與血清中和抗體
力價繪製標準曲線圖。



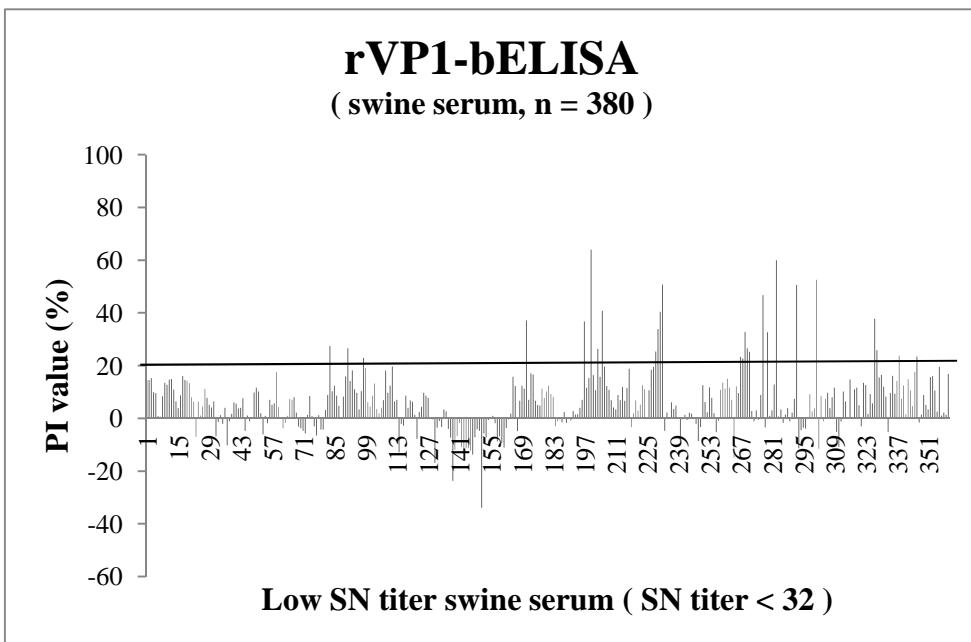
圖三十五、羊血清樣本 rVP1-bELISA 與 SN test 的相關性 (n = 100)。

利用 rVP1-bELISA 檢測 100 個羊血清樣本，依據每個樣本的 PI 值與血清中和抗體
力價繪製標準曲線圖。



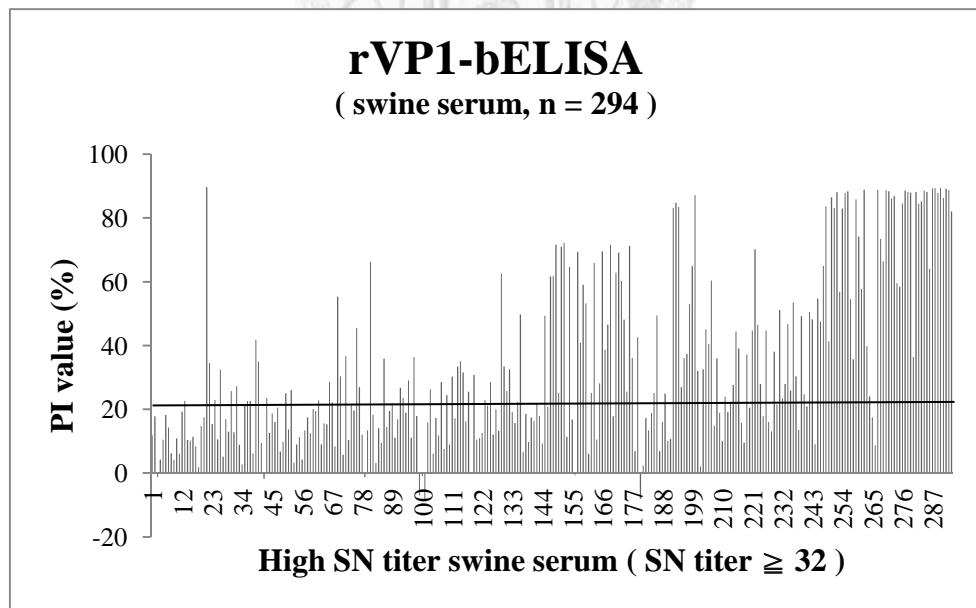
圖三十六、豬血清樣本 ROC curve 分析 (n = 674)。

選擇較佳的 cut-off 值為 20%，敏感性與特異性則分別為 58.8% 及 92.9%。



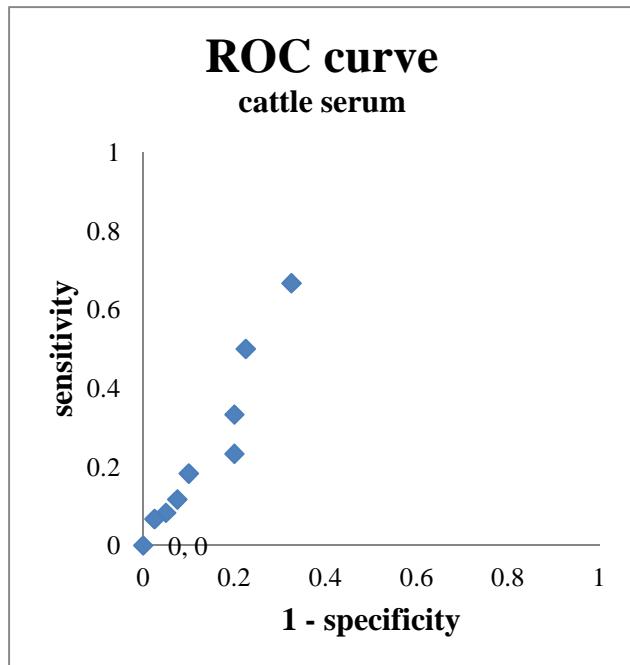
圖三十七、豬血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析。

豬血清樣本中 380 個低中和抗體力價樣本 (SN titer < 32)，其中有 27 個血清之血清抑制百分比大於 cut-off 值 (20%) 為偽陽性。



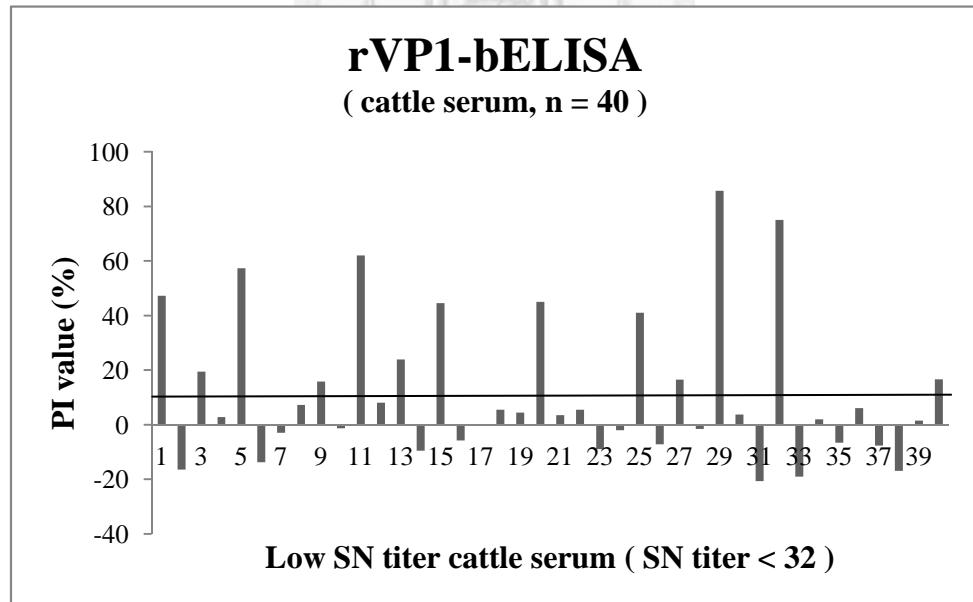
圖三十八、豬血清樣本血清 rVP1-bELISA 敏感性分析。

豬血清樣本中 294 個高中和抗體力價樣本 (SN titer ≥ 32)，其中有 121 個血清之血清抑制百分比小於 cut-off 值 (20%) 為偽陰性。



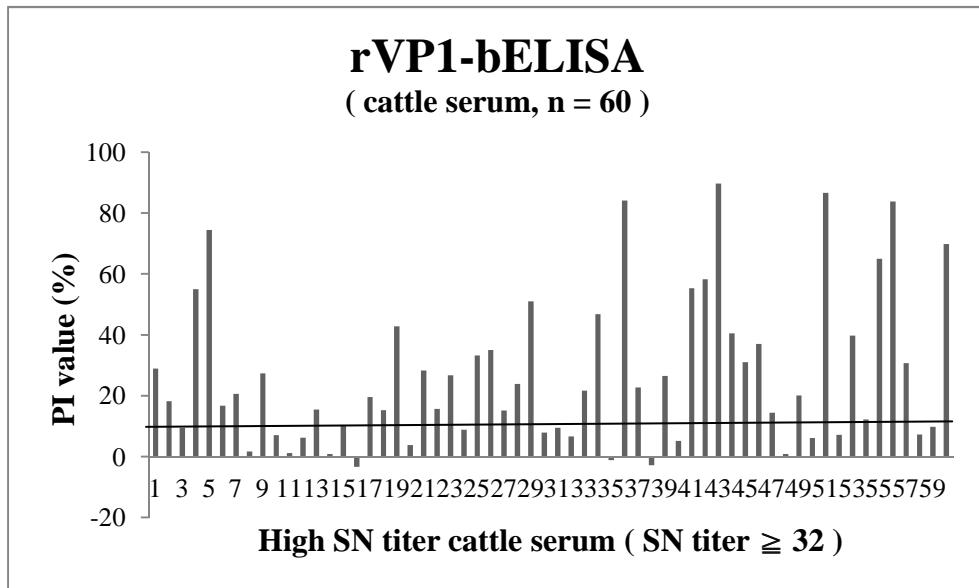
圖三十九、牛血清樣本 ROC curve 分析 (n = 100)。

選擇較佳的 cut-off 值為 10%，敏感性與特異性則分別為 66.7% 及 67.5%。



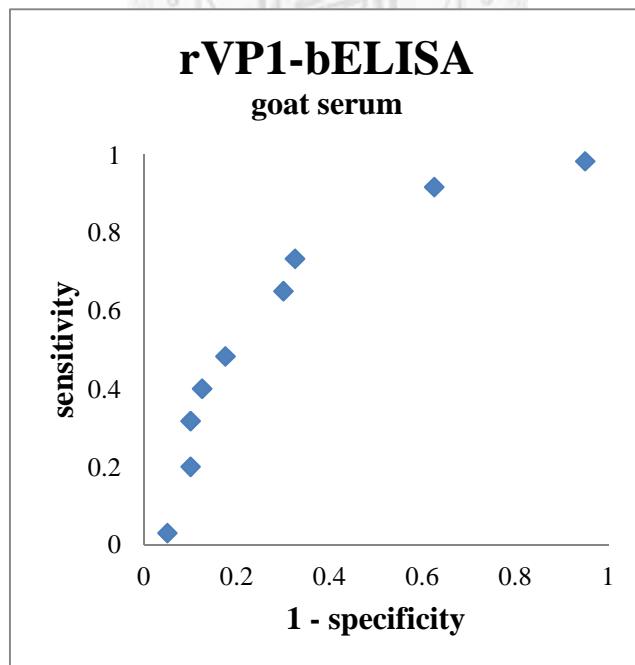
圖四十、牛血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析。

牛血清樣本中 40 個低中和抗體力價樣本 (SN titer < 32)，其中有 13 個血清之血清抑制百分比大於 cut-off 值 (10%) 為偽陽性。



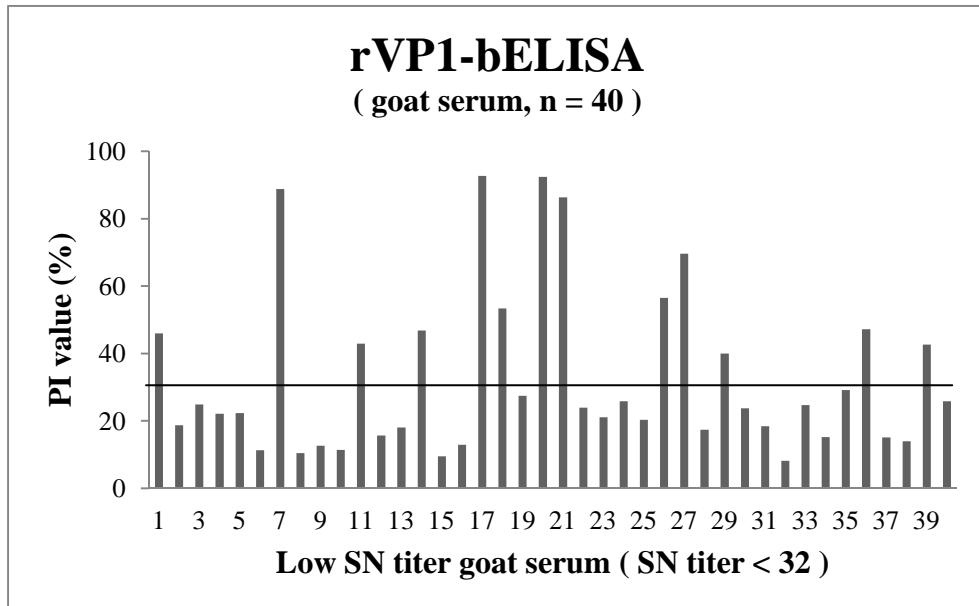
圖四十一、牛血清樣本 rVP1-bELISA 敏感性分析。

牛血清樣本中 60 個高中和抗體力價樣本 (SN titer ≥ 32), 其中有 20 個血清之血清抑制百分比小於 cut-off 值 (10%) 為偽陰性。



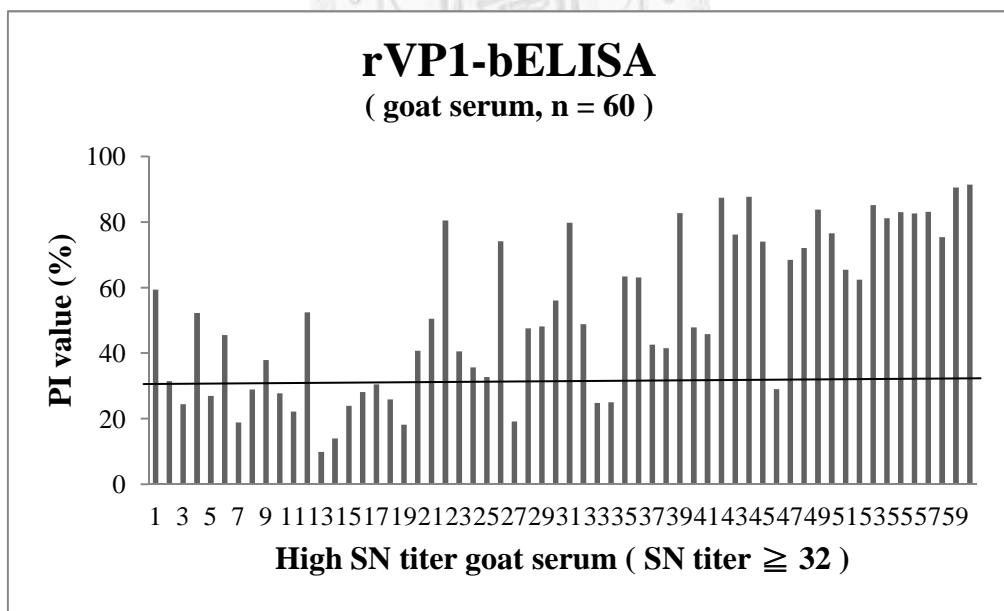
圖四十二、羊血清樣本 ROC curve 分析 (n = 100)。

選擇較佳的 cut-off 值為 30% , 敏感性與特異性則分別為 73.3% 及 67.5% 。



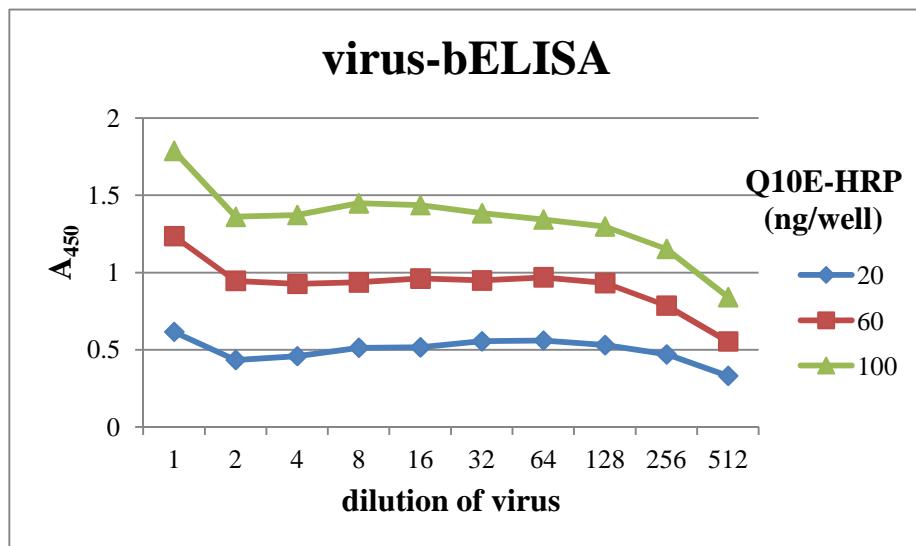
圖四十三、羊血清樣本 rVP1-bELISA 特異性分析。

羊血清樣本中 40 個低中和抗體力價樣本 (SN titer < 32), 其中有 13 個血清之血清抑制百分比大於 cut-off 值 (10%) 為偽陽性。



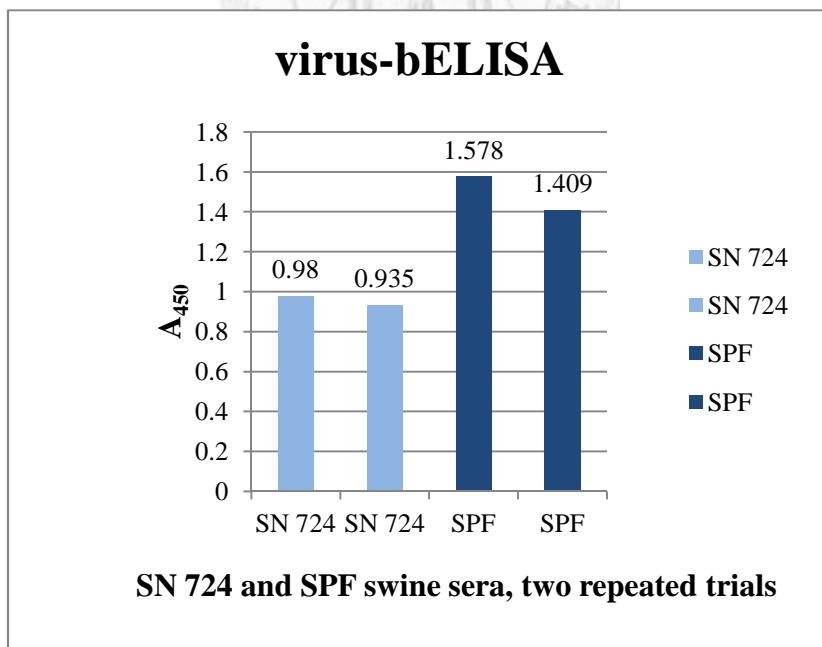
圖四十四、羊血清樣本 rVP1-bELISA 敏感性分析。

羊血清樣本中 60 個高中和抗體力價樣本 (SN titer \geq 32), 其中有 16 個血清之血清抑制百分比小於 cut-off 值 (10%) 為偽陰性。



圖四十五、最佳化 virus-bELISA 條件。

以棋盤式直接型 ELISA 檢測 virus-bELISA 的最佳條件。以高速離心後的口蹄疫病毒作為塗鍍抗原，以標示 HRP 的單源抗體 Q10E 做為 tracer。選擇 A₄₅₀ 讀值為 1.44 做為最佳化 virus-bELISA 的條件。其塗鍍抗原口蹄疫病毒的稀釋倍數為 8 倍稀釋，而 Q10E-HRP 濃度則為 100 ng/well。



圖四十六、virus-bELISA 標準血清分析與確認。

以最佳化的 virus-bELISA 條件來分別進行 SN 724 及 SPF 兩標準血清的二重複試驗。結果顯示兩者雖有差別，但 A₄₅₀ 讀值僅差距約 0.6。

表一、抗口蹄疫病毒 O/97 單源抗體的特性分析

Table 1. Characterization of MAbs against O/Taiwan/97 isolate

Cluster #	MAb Name	Heavy chain isotype	MN titer ^{a)}		IFA +++ titer ^{b)}		ELISA titer ^{c)}	
			O/Taiwan/97	O/Taiwan/KM1/99	O/Taiwan/97	O/Taiwan/KM1/99	Anti-rVP1	Anti-P29
1	N3C-3	G1	160	320	12,000	16,000	1,542	2,330
	N7H-2	G1	640	640	50,000	4,000	1,005	–
	Q11C-15	G1	2,560	2,560	32,000	32,000	1,019	–
2	Q10E-3	2a	10,240	5,120	16,000	16,000	606,000	205,280
	S2D-2	2a	12,800	10,240	20,000	8,000	4,097	1,202
	S10F-1	2a	25,600	10,240	60,000	16,000	3,069	1,338
	P12D-1	2a	1,280	640	10,000	32,000	1,282	–
3	S12G-6	2a	3,200	–	40,000	–	22,440	1,595
	P8C-5	2a	320	–	60,000	–	6,215	–
	M4F-16	2a	1,280	–	16,000	–	5,510	–
	Q5C-10	2a	2,560	–	16,000	–	1,451	3,119
4	N10E-1	2b	12,800	640	40,000	–	14,305	–
	P11A-15	2b	160	–	40,000	–	4,009	–
5	P2B-1	G3	2,560	320	16,000	8,000	4,712	1,683
	P3B-3	G3	2,560	640	20,000	8,000	3,463	–
	T7C-3	G3	3,200	320	16,000	8,000	1,106	1,050
6	O4A-1	G3	80	–	20,000	–	4,478	1,156
	O4D-1	G3	80	–	60,000	–	1,000	1,658
7	P9E-1	G1	–	–	16,000	8,000	25,099	–
	S3G-1	G1	–	–	16,000	8,000	4,342	1,325
8	R3C-10	G1	–	–	32,000	–	7,921	1,775
	S8B-1	G1	–	–	32,000	–	1,347	–
9	T5H-12	2b	–	–	40,000	–	23,755	5,690
	Q2B-13	2b	–	–	32,000	–	6,497	–
	S7C-10	2b	–	–	40,000	–	3,478	3,164

a) “–” Meant the MN titer of ascites less than 80 fold dilution.

b) “–” Meant the dilution of ascites to give strong IFA reaction less than 2,000 fold.

c) “–” Meant the ELISA titer of ascites less than 1,000 fold dilution.

利用口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 的病毒中和試驗、口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 的免疫螢光染色法及間接型 ELISA (rVP1 及 P29)，來分析抗口蹄疫病毒 O/97 單源抗體的特性。在這 25 株單源抗體裡面有 5 株對於 rVP1 的反應非常好的好，分別為 Q10E-3、S12G-6、N10E-1、P9E-1 及 T5H-12，力價都高達了 10,000 倍以上，其中 Q10E-3 對於 rVP1 的力價高達了 606,000 倍，對 P29 的力價也高達 205,280 倍，在 25 株單源抗體中表現搶眼。(Cheng *et al.*, 2006)

表二、口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 結構蛋白 VP1 上 131-159 氨基酸片段

Table 2. Alignment of VP1 a.a. 131–159 (P29) of O/Taiwan/97 and O/Taiwan/KM1/99

O/Taiwan/97	131 NGSSKYGDTSTNNVR <u>GDL</u> QVLAQKAERTL	159
O/Taiwan/KM1/99	131 NG <u>NCKYGE</u> SPVT <u>NVRGDL</u> QVLAQKA <u>ARTL</u>	159
identities: 72% (21/29)		

口蹄疫病毒 O/97 及 O/99 結構蛋白 VP1 上第 131-159 氨基酸片段，總共有 29 個氨基酸簡稱為 P29，此段序列包含了 RGD motif，也就是口蹄疫病毒的第一個中和抗原決定位 (Site 1)。劃底線的部分代表兩病毒株氨基酸序列不同的地方，若以 RGD 為中心，兩病毒株的氨基酸序列在 P29 的左側相異度較高，右側則相似度較高。(Cheng *et al.*, 2006)

表三、學生氏 *t* 分布表 (右單尾)

<i>n</i> \ α	0.20	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.001	0.0005
1	1.376	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.309	636.619
2	1.061	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.978	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.941	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.920	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.906	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.896	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.889	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.883	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.879	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.876	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.873	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.870	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.868	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.866	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.865	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.863	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.862	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.861	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.860	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.859	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.858	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.858	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.857	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.856	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.856	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.855	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.855	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.854	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.854	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.851	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.848	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
120	0.845	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.160	3.373
∞	0.842	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291

表四、豬血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 674)

組別	平均 PI 值 (%)	PI 值標準差 (%)
SPF	1.9	10.4
SN 3	5.7	7.5
SN 4	11.8	14.6
SN 8	7.9	14.9
SN 16	9.8	8.3
SN 32	16.3	12.7
SN 64	19.7	14.7
SN 128	32.5	22.9
SN 256	33.7	22.2
SN 512	63.2	26.3

表五、牛血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 100)

組別	平均 PI 值 (%)	PI 值標準差 (%)
SN 4	14.7	24.1
SN 16	8.3	28.3
SN 32	18.6	19.6
SN 128	23.2	20.5
SN 512	38.3	29.3

表六、羊血清樣本之平均 PI 值及 PI 值標準差 (n = 100)

組別	平均 PI 值 (%)	PI 值標準差 (%)
SN 4	34.0	28.0
SN 16	31.2	20.2
SN 32	31.0	13.3
SN 128	50.2	18.9
SN 512	75.1	15.4

表七、豬血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 674)

cut-off	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sensitivity	84.7	58.8	41.2	31.6	24.8	20.4	15	12.2	0
Specificity	70.3	92.9	96.3	97.9	98.7	99.7	100	100	100
Consistency	76.6	78	72.3	69	66.5	65.1	62.9	61.7	56.4

表八、牛血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 100)

cut-off	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sensitivity	66.7	50	33.3	23.3	18.3	11.7	8.3	6.7	0
Specificity	67.5	77.5	80	80	90	92.5	95	97.5	100
Consistency	67	61	52	46	47	44	43	43	40

表九、羊血清樣本不同 cut-off 值之敏感性、特異性及一致性 (n = 100)

cut-off	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sensitivity	98.3	91.7	73.3	65	48.3	40	31.7	20	3
Specificity	5	37.5	67.5	70	82.5	87.5	90	90	95
Consistency	61	70	71	67	62	59	55	48	40

附錄

Separating gel (12%)

名稱	體積
DW	3.3 mL
30% Acrylamide/Bis (29:1)	4.0 mL
1.5M Tris (pH8.8)	2.5 mL
10% SDS	0.1 mL
10% Ammonium persulfate	0.1 mL
TEMED	0.004 mL
Total volume	10 mL

Stacking gel (5%)

名稱	體積
DW	2.7 mL
30% Acrylamide/Bis (29:1)	0.67 mL
1.5M Tris (pH6.8)	0.5 mL
10% SDS	0.04 mL
10% Ammonium persulfate	0.04 mL
TEMED	0.004 mL
Total volume	4 mL