

豚の繁殖と呼吸症候群のウイルスN遺伝子及び その原核の現れる産物の測定応用について

許立華

寧夏大学農学院

キーワード： 豚の繁殖と呼吸症候群ウイルス 核殻蛋白遺伝子 再組み合わせN蛋白
再組み合わせN蛋白 ELISA、乳濁液の凝集試験

主旨；

GenBank が公表した PRRSY ATCC VR2332 株の核殻蛋白遺伝子（N 遺伝子）の核グリコシド酸序列に従って、一对のプライマ（Primen）を設計した。また、RT-PCR 方法を使って、VR2332resp 株の目標遺伝子断片を拡大した。拡大した断片及び pET-32a 質粒をそれぞれ BamHI、XhoI の二種類の酵素で消化させて、T4DNA で酵素分子構造をつなげる。そこでつなげた物を BL21（DE3）の中に転化させる。さらに二つの酵素切の鑑定を経た後で、質粒 pETN を再び組み合わせることに成功した。転化して出現した菌を 30℃ の条件で OD 値 0.5-0.6 に培養した時に、IPTG を用いて誘導し出現させる。また、誘導条件を合理化させ、核殻蛋白を高効率的に出現するようにさせた。

His-bind 樹脂の層析柱を使って再び組み合わせた核殻蛋白を純化する。純化した産物が SDS-PAGE 電気泳動を経て、その純化効果を鑑定する。さらに、Western-blot を使って、その特異性を検証する。この上に再び組み合わせた N 蛋白を利用して、包まれた抗原にして、反応条件を合理化した後で、豚の繁殖の検査測定と呼吸症候群の血清抗体を再び組み合わせ N 蛋白 ELISA 試験を成り立たせた。そして、この方法を大量のサンプルの検査測定に使う。この方法は、IDEXX 社の ELISA 試薬セルでの検出による符合率が 91%に達した。同時に私達は純化した N 蛋白を乳濁液の粒に吸着させ、簡単でやり易い、抗体の検査測定の間接的な乳濁液の凝集による検査測定を成り立たせた。この方法は、ELISA 試薬セルでの検出による符合率が 78%に達した。

本研究は公表した PRRSY ATCC VR2332 株の核殻蛋白遺伝子とインフルエンザウイルス血凝固素遺伝子（HA 遺伝子）の核グリコシド酸序列に従って、一对のプライマ（Primen）を設計した。その中の一对のプライマ（Primen）には HA 遺伝子の主な核グリコシド酸序列が含まれている。拡大、コピーを経て、再び組み合わせた質粒 pETHN を成り立たせた。また、それを BL21（DE3）に転化させ、IPTG 誘導で出現させる。出現した産物を純化されたのを、すでに HA の単抗致敏の乳濁液に結合されたので、血清を検査測定する乳濁液の凝集試験が基本的に出来上がった。検査測定の結果を前の三つの方法と比較してみた。

PRRSV の核殻蛋白遺伝子の高度保守性を利用することで、RT-PCR 方法を使って、疑われそうな流産及び死産胎児に対する検査測定を行った。この方法で病原学の角度から PRRS を診断することができることが証明された。