

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT9506

計畫名稱：蝦白點症病毒新穎基因之表現與功能分析

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

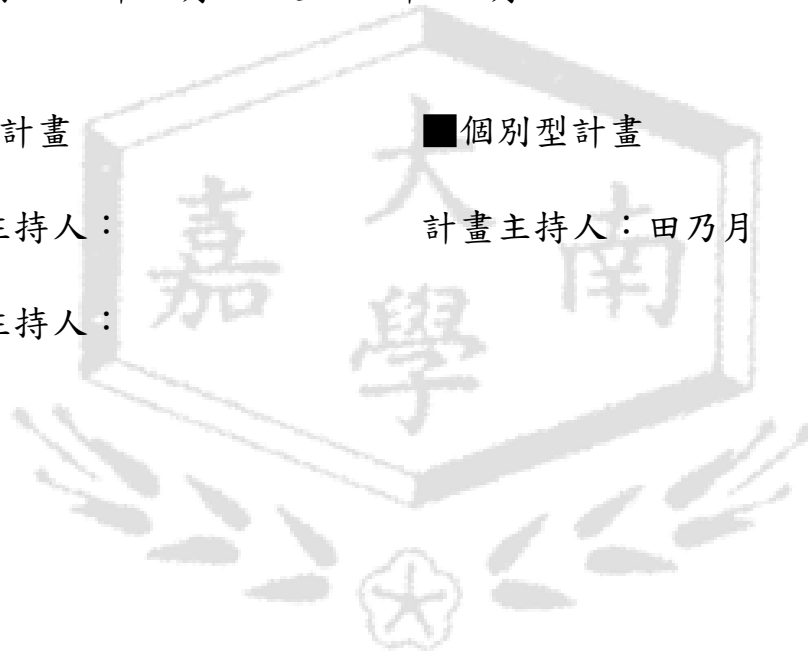
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：田乃月

子計畫主持人：



中華民國 96 年 3 月 12 日

摘要

白點症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是目前亞洲地區養殖蝦場危害最嚴重的病毒性病原體之一，是一種系統性病原體，主要侵犯中胚層及外胚層演化的組織細胞，病原性強致死率亦高。此大型 DNA 病毒被分類歸屬在全新病毒科 *Nimaviridae*，病毒屬 *Whispovirus*，其基因體大部分 ORF 序列的蛋白質功能均尚未明瞭，相當值得深入研究。故本研究擬就 WSSV 的疑似晚期基因片段(WSSV071)，計畫以昆蟲細胞表現 WSSV 基因的蛋白質統，先將 WSSV071 基因片段剪接送入帶有螢光基因的 pIZ/V5-His-EGFP 載體中，再以轉染法送入昆蟲細胞中表現出一個融合性蛋白質(兼具有螢光蛋白與 WSSV 病毒蛋白)，透過螢光顯微鏡觀察到昆蟲細胞內有綠螢光呈現，表示 EGFP 蛋白質有表現，因此作為判斷病毒基因蛋白應也有隨著 EGFP 融合表現出。

關鍵詞：白點症病毒，昆蟲細胞，螢光顯微鏡。

文獻回顧與前言

Smith 等人於 1983 年將昆蟲桿狀病毒 (baculovirus) - 苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV) 與昆蟲細胞開發成真核細胞表現載體 (eukaryotic expressing vector, EEV)，稱之為桿狀病毒/昆蟲細胞表現載體系統 (baculovirus / insect cell expression vector system)，以此載體系統生產外源蛋白，開展出嶄新且頗具潛力的昆蟲病毒與細胞生物技術領域。桿狀病毒是一種感染無脊椎動物的大型 DNA 病毒，主要寄主為昆蟲及部分節肢動物。人類及其他脊椎動物都不是桿狀病毒的寄主，因此桿狀病毒表現載體系統極具安全性，目前除基礎研究外，其應用領域涵蓋生物試劑生產、基因治療、呈現系統、生物農藥等等。

目前利用昆蟲細胞表現系統表現外源蛋白質或 RNA，將外源基因送入昆蟲細胞內的方法主要有二種：一是直接以重組質體核酸形式將預備表現之基因

以化學或物理方法轉染(transfection)至細胞；另一則是以桿狀病毒為媒介，由攜帶外源基因的重組病毒感染(infection)細胞。前者過程較為簡便，適用於快速表現檢測外源基因表現與否等要求，屬於暫時性表現模式，無法持續生產大量外源基因產物。後者的方法需經過將外源基因重組融入病毒基因體(genome)的程序，步驟較為繁雜；但優點是挑選出含外源基因的重組病毒後，外源基因即可長期且大量穩定的藉由昆蟲細胞生產外源蛋白。

白點症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是目前亞洲地區(包括台灣)養殖蝦場危害最嚴重的病毒性病原體之一，白點症病毒的病原性強，不論養殖蝦的幼體或成體自出現白點後約一週左右即死亡。WSSV 是一種系統性病原體，主要侵犯中胚層及外胚層演化的組織細胞，包括表皮、皮下組織、造血組織、結締組織、肌肉組織及神經組織等組織或器官，皆發現有細胞核脹大(hypertrophied nucleus)且有核內構造消失的病變細胞存在，另出現有染色均質化的嗜鹼性包涵體(basophilic inclusion)。台灣地區已於 1994 年自病蝦體內純化出白點症病毒台灣病毒株(Taiwan isolate; Lo *et.al.*,1999)，已知其具有雙股 DNA 基因體，由其病毒基因體限制酶圖譜及定序結果，推測其基因體大小為 300 kb，屬於大型 DNA 病毒。2002 年，白點症病毒正式被分類歸屬在新病毒科 *Nimaviridae*，病毒屬 *Whispovirus* 的一員，在白點症病毒病原性相關的基因中，大約只有 6% 的 ORF 與現今已知的蛋白質功能區序列相似，大部分為核苷酸代謝、DNA 複製和蛋白質修飾等 DNA 生合成相關的酵素基因。其餘的開放譯讀區則完全無法與現今已知的蛋白質功能區序列找到相似性，而無法利用現有基因庫資料分析得知其可能之功能，因此若要探討此病毒的各種基因功能作用機制，即需對其未知功能的基因序列進行轉錄轉譯表現分析。

因大型 DNA 病毒的基因表現皆有特定的調控機制，若表現調控著重於轉錄層次，不同病毒基因(早期基因、後期基因、末期基因等)表現間互有異位致活機制，且轉錄表現受控於其前一期基因的表現狀況。由於蝦白點症病毒與桿狀病毒同屬於大型 DNA 病毒，兩基因啟動間的模式與機制應有相似之處。以桿狀

病毒為例說明，其早期基因(early gene)在病毒感染後0至6小時開始進行轉錄作用，此時病毒可利用寄主細胞的RNA聚合酶 II (RNA polymerase II) 進行早期基因的轉錄工作，此時基因所表現出的蛋白，皆與其後病毒基因體複製時所需的因子及加速病毒複製作用的發生有關，所表現的主要基因是DNA聚合酶和核糖核酸還原酶(ribonucleotide reductase)等與病毒DNA複製有關之基因，此外，早期表現的基因必須在宿主細胞中進行病毒參與調節機制 (virus-mediated regulation)，以及逃避宿主細胞對抗病毒所產生的自殺行為，即細胞凋亡(apoptosis)；晚期基因(late gene)是在病毒感染後6至18小時開始進行轉錄作用，此時期病毒的RNA大量被表現，主要特色包括病毒的DNA複製及宿主細胞的轉錄、轉譯終止，主要合成的是病毒的構造型蛋白，如外鞘蛋白等；末期基因(very late gene)則在病毒感染後20 至72小時開始進行轉錄作用，主要的產物為p10 蛋白及多角蛋白(polyhedrin)等形成桿狀病毒封埋體(occlusion body)所需的物質；此階段包含宿主細胞的溶解(lysis)和封埋體病毒(occluded virus)的釋放。在桿狀病毒基因轉錄作用的研究中發現病毒早期轉錄作用並不需依靠病毒基因體複製及晚期基因表現，其起動子與宿主細胞之RNA聚合酶II進行作用，可能是起動子之結構組成與RNA聚合酶 II 反應基因(RNA polymerase II-responsive gene)相似。另外，病毒晚期及末期基因表現不是利用寄主的RNA聚合酶來進行基因轉錄，而是利用病毒自身在早期所表現出的病毒特有RNA聚合酶(virus-specific -amanitin-resistant RNA polymerase)來進行轉錄作用。

因目前並無適合的蝦類永久細胞株及表現基因載體系統，可供作 WSSV 病毒基因直接進行研究試驗，故擬採用與蝦類同屬節肢動物門的昆蟲表現載體系統與秋夜盜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的昆蟲細胞—Sf9 進行研究。經由 WSSV 的各段 ORF 轉錄表現時間分析，發現有部分 ORF 轉錄表現呈現似為晚期基因表現狀況，故擬嘗試將其中編號為 WSSV071 基因片段先以構築重組質體模式與轉染方式，送進入 Sf9 細胞中，探討是否有特定的 WSSV 基因產

物表現及其表現狀況。

研究方法

1. 細胞培養

本研究主要使用的細胞為秋夜盜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞株 – Sf9，培養於 Sf-900 II SFM (Invitrogen) 培養液，置於27°C培養箱中培養；另外可視狀況需要添加抗生素 – 每毫升(ml)培養液中添加 50 IU 青黴素 (penicillin) 及 50 IU 鏈黴素 (streptomycin)。

2. 製備重組質體

將欲表現之基因片段以引子對，配合下列材料：1µl 病蝦cDNA為模板、1µl引子對、5µl 10X Ex Taq buffer (TaKaRa)、4µl 2.5mM dNTP Mixture (TaKaRa)、0.5µl Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa)、38.5µl ddH₂O加入於0.2 ml PCR微量離心管中。PCR反應及溫度設定程式如下：(1) 94°C反應3分鐘；(2)變性作用 (Denaturing)溫度為94°C，反應1分鐘；(3) 黏合作用 (Annealing)溫度為55°C，反應1分鐘；(4)延長作用 (Elongation)溫度為72°C，反應1分鐘；(5)將設定步驟(2)到(4)重複40次，最後的延伸作用(final extension)溫度72°C，反應10分鐘。取3µl PCR產物於1.5 % 瓊脂膠(agarose gel)進行電泳分析確認合成片段長度。

將 PCR 產物移入 1.5 ml 微量離心管中，使用 GFXTMPCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences)，實驗操作步驟依據所附贈之說明書進行。取 3µl PCR 純化物於 1.5 % 瓊脂膠進行電泳分析確定。以限制酵素分別切割 1 PCR 產物與載體 pIZ/V5-EGFP-His，並將之黏合成重組質體。將重組質體轉型入大腸桿菌 DH5α 進行篩選，並經過 DNA 定序確認嵌入的基因序列正確性。

3. 轉染作用 (Transfection)

將 15mm 圓形蓋玻片置入 24 孔盤(24 well plate)中，並加入 Sf-900 II SFM 培養液 300 μ l。置入 3×10^5 個細胞數之 Sf-9 細胞液，輕搖使細胞分散均勻，加蓋靜置於 27 $^{\circ}$ C。準備下列各項反應試劑：(A)配製 DNA-medium 混和液：取 1.5ml 離心管(標上編號)，置入重組質體 DNA，並加入 Sf-900 II SFM 至總體積量為 100 μ l。(B)配製 Cellfectin-medium 混和液：取 1.5ml 離心管(標上編號)，置入 97 μ l 培養液並加入 3 μ l Cellfectin Reagent (Invitrogen) 至總體積量為 100 μ l。(C)配 DNA-Cellfectin 混和液：將(B)溶液加入(A)溶液混合均勻，靜置室溫 30 分鐘，再將 DNA-Cellfectin 混和液加入 800 μ l Sf-900 II SFM。吸除 24 孔盤中舊培養液，並將 DNA-Cellfectin 混和液輕輕加入 24 孔盤中，靜置 27 $^{\circ}$ C 培養箱作用 5 小時。然後吸去 DNA-Cellfectin 混和液，加入新培養液(500 μ l/well)，再置入 27 $^{\circ}$ C 培養，其後每天定時使用倒立螢光顯微鏡觀察轉染後之昆蟲細胞變化情形，持續約 5~9 天。

4. 螢光檢測昆蟲細胞內轉染成功所表現的 EGFP 蛋白質狀況

在培養盤中之轉染後的昆蟲細胞，以倒立螢光顯微鏡觀察因重組質體轉染入細胞內所產生的綠色螢光表現情形。將轉染後之昆蟲細胞直接倒掉 24well 中舊培養液，加入 1X PBS 清洗 2 次後，再加入固定劑 4% paraformaldehyde (溶於 PBS)，用量約 500 μ l/well，避光作用 10 分鐘後，直接倒掉 paraformaldehyde，沿孔壁緣加入 1X PBS 清洗 3 次，加入 Hoechst#33342(10000X) 用量約 500 μ l/well，避光作用 15 分鐘後，直接倒掉 Hoechst#33342，再以 1X PBS 清洗 3 次。將載玻片清潔並標示清楚後，滴適量 60% 甘油 (glycerol) 於玻片上，並將前述之圓形蓋玻片取出倒蓋於 60% 甘油上，以濾紙片吸掉過多之甘油，再以透明指甲油塗抹蓋玻片周圍，待風乾即完成封片。

封片後，即立刻以正立螢光顯微鏡觀察重組質體所表現的綠色螢光，及細胞核之藍色螢光。所使用的螢光顯微鏡廠牌型號：Zeiss Axioskop 2 plus，

操作方法參照所附贈之使用說明書。選用 DAPI 濾鏡觀察核酸螢光，以波長 350nm 紫外光激發，在螢光顯微鏡下可觀察到放射波長為 461nm 的藍色螢光；選用 DAPI 濾鏡觀察 EGFP 自發性螢光，以波長 395nm 紫外光激發，在螢光顯微鏡下可觀察到放射波長為 509nm 的綠色螢光。

結果與討論

將先前構築完成且含有 WSSV071 基因的重組質體 DNA-pIZ/V5-EGFP-His-WSSV071，與兩種政控制組質體 DNA(pIZ/V5-EGFP-His 與 pIZ/V5-EGFP-His #9)，分別以 lipofectin 試劑成功轉染進入 Sf9 昆蟲細胞，將進行轉染作用後的細胞以倒立螢光顯微鏡觀察，可發現不論實驗組正控制組細胞中均有綠色螢光表現。正控制組在轉染 24 小時後即有明顯螢光反應呈現，而實驗組之重組質體 DNA 的細胞尚無明顯螢光反應，但 48 小時以後則亦可觀察到螢光反應，隨著轉染後細胞培養時間延長至三天或九天的觀察，各組細胞內的螢光現象仍能清晰可見，只是實驗組反應強度依舊不若對照組強烈(參見圖一)。

將各組細胞進行細胞固定與以 Hoechst#33342 螢光染劑處理細胞核內的 DNA 後，利用正立螢光顯微鏡觀察，分別可觀察到呈現藍綠螢光的細胞核部份，以及有呈現綠色螢光的完整細胞狀況。另利用電腦影像重疊處理技術，將兩螢光圖像進行重疊比對，發現友質體 DNA 轉染表現的綠螢光出現再整個細胞，而非只在細胞核部分(參見圖二、三)。

本研究將白點症病毒的功能性未明基因片段 WSSV071，利用大腸桿菌載體(含螢光蛋白表現能力，並具有昆蟲桿狀病毒基因啟動子)剪接成重組質體，於選質成功後再利用進行轉染作用送入昆蟲細胞內，觀察在病毒基因在真核細胞內的表現與否。現階段結果證明 WSSV071 基因片段似乎有有跟隨 EGFP 基因共同轉染進入昆蟲細胞內表現，但疑問其螢光表現能力為何比未嵌接病毒

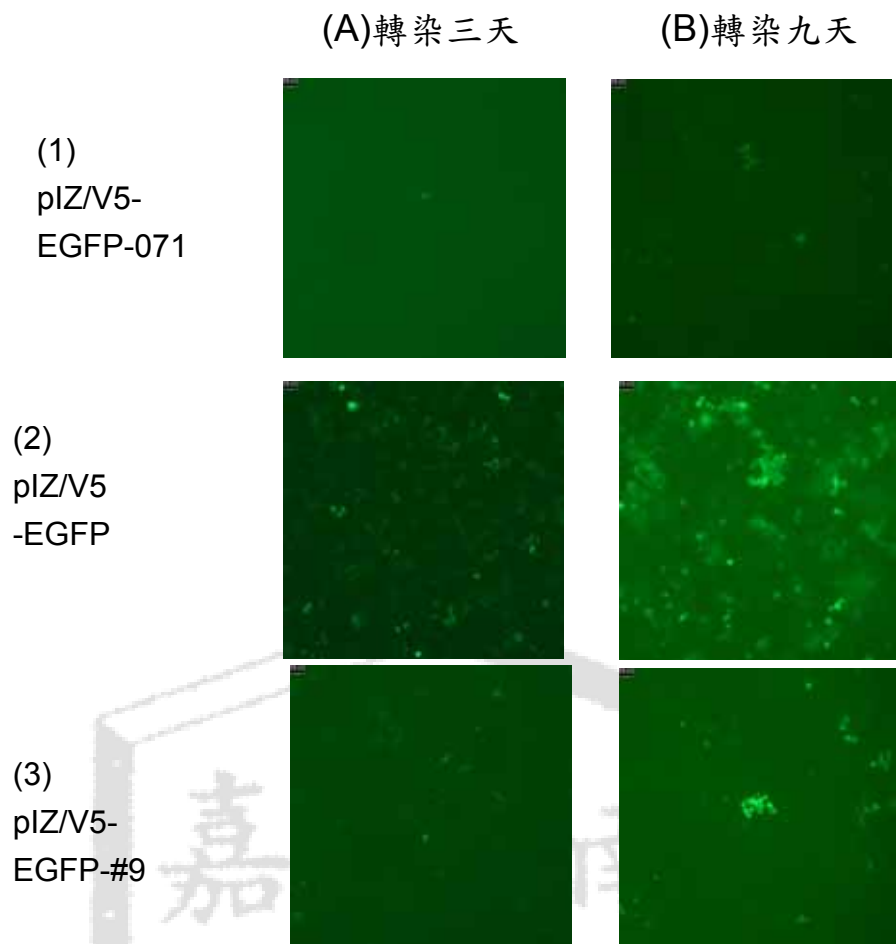
基因的载体 DNA 轉染表現螢光效力減弱許多，因此接續實驗將繼續探討造成此結果的可能因素，以便改良其轉染功效。

參 考 文 獻

1. 羅竹芳、周妮嫻。(2003)，組織培養及基因表現－動物系統，進階版生物技術第三章，教育部生物技術科技教育改進計畫，台大醫學院主編。
2. 陳歷歷，白點症病毒 *vp35* 及 *np1* 之表現及其性質鑑定。(2001)，國立台灣大學動物學研究所博士論文。
3. 易德明，蝦白點症病毒極晚期基因之篩選。(2004)，台灣大學動物學研究所碩士論文。
4. Fuchs LY, Woods MS, Weaver RF. (1983), Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. J Virol. 43: 641-646.
5. Lo CF, Hsu HC, Tsai MF *et al.* (1999), Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. Dis Aquat Org . 35: 175-185.
6. Miller LK . The Baculoviruses. (1997), Chapter 6, pp. 144. Plenum Press, New York and London.
7. Pullen SS, Friesen PD. (1995), Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. J Virol. 69: 156-165.
8. Smith GE, Fraser MJ, Summers MD. (1983), Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. J. Virol. 46: 584-593.

9. Thiem SM, Miller LK. (1989), Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Virol. 63: 2008-2018.
10. van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S *et al.* (2001), Rapid communication the white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology.; 286: 7-22.
11. Vlcek JM, Bonami JR, Flegel TW *et al.* (2002), Nimaviridae: A new virus family infecting aquatic invertebrates. XIIth International Congress of Virology. Paris.





圖一. 轉染後的Sf9細胞，以倒立螢光顯微鏡觀察細胞內EGFP表現情形(放大100倍)。(A)轉染病毒基因之Sf9細胞，三天後之螢光細胞表現情形。(B)轉染病毒基因之Sf9細胞，九天後之螢光細胞表現情形。

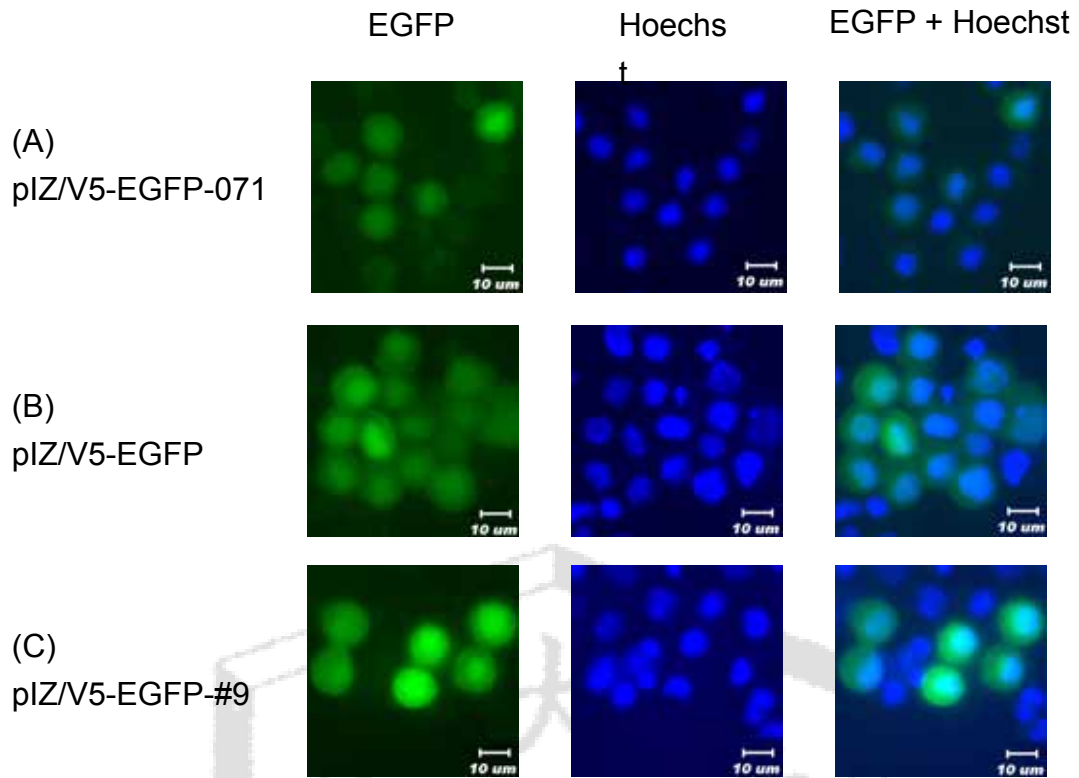


圖2. 正立螢光顯微鏡(Olympus)觀察重組質體轉染入Sf9細胞後，生長8天之螢光表現情形(放大400倍)。(1)為重組質體所表現的EGFP綠色螢光。列(2)為Hoechst33342 核酸螢光染色的細胞核藍色螢光。列(3)為EGFP綠色螢光與細胞核藍色螢光，經影像重疊比對之重組質體在細胞內表現情形。

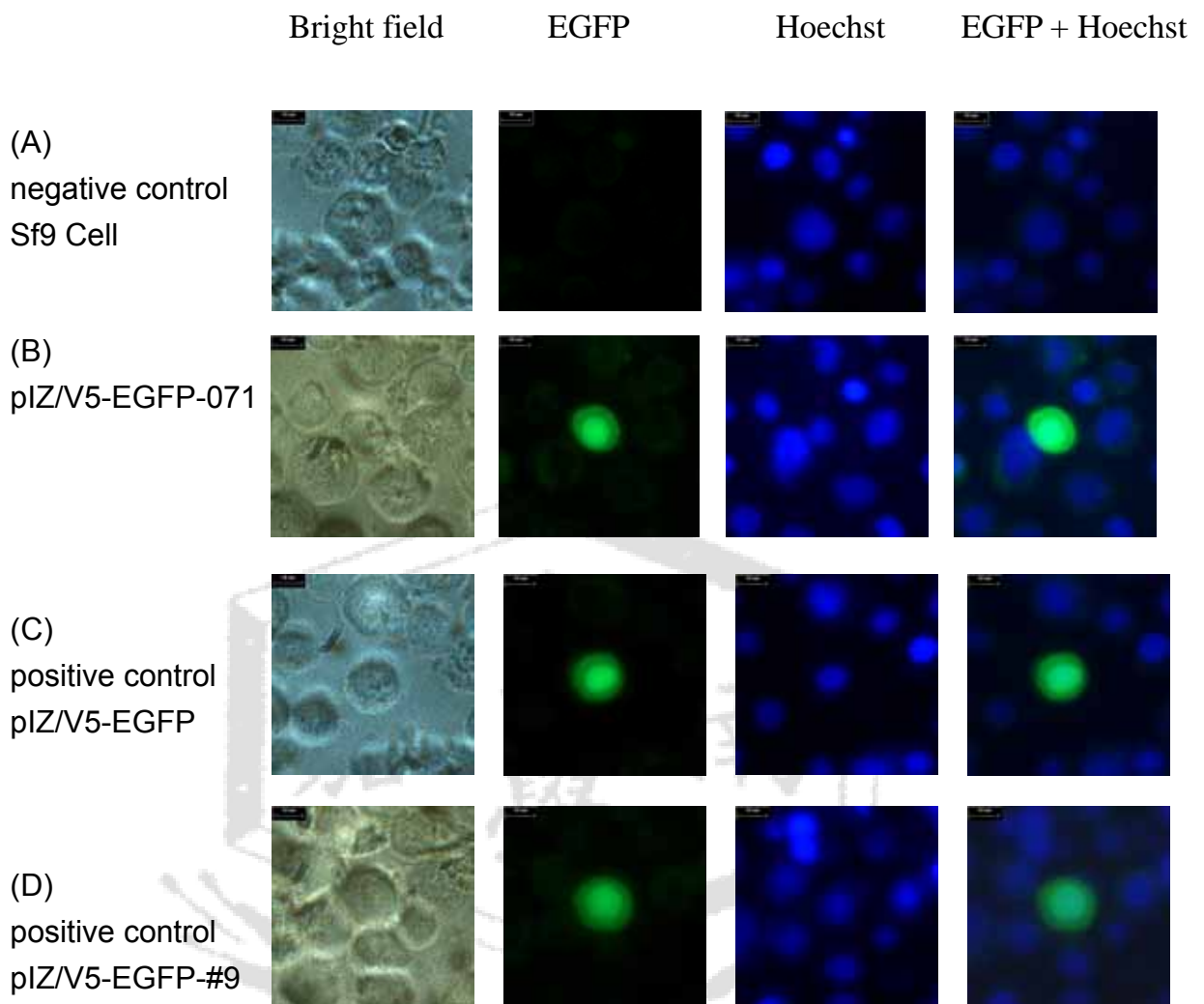


圖3. 以正立螢光顯微鏡(Zeiss Axioskop 2 plus)觀察重組質體轉染至Sf9細胞後，生長8天之螢光表現情形(放大400倍)。列(1)為重組質體轉染至Sf9細胞後的細胞狀況。(2)為重組質體所表現的EGFP綠色螢光。列(3)為Hoechst33342 核酸螢光染色的細胞核藍色螢光。列(4)為EGFP綠色螢光與細胞核藍色螢光，經影像重疊比對之重組質體在細胞內表現情形。