

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 應用昆蟲細胞轉染法研究蝦白點症病毒的基因功能

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：CNBT-93-09

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：田 乃 月

共同主持人：無

計畫參與人員：黃明宏

執行單位：生物科技系

中華民國 九十四 年 二 月 二十六 日

## 摘要

本研究針對白點症病毒(white spot syndrome virus, WSSV) 基因體庫中的基因片段 wssv071 進行分析。wssv071 基因具有 393 bps，預估可轉譯出 130 個胺基酸。將段基因以 PCR 方法合成並剪接入載體選殖，再純化轉染入昆蟲細胞株 Sf9，進行基因表現作用，利用載體附加的螢光蛋白表現，佐證基因表現。由本實驗結果觀察，可觀察到有 wssv071 基因轉染的昆蟲細胞有呈現螢光反應，證實此段病毒基因是可在同為節肢動物的真核細胞中進行表現，是依段有功能性的病毒基因。

關鍵詞：白點症病毒，蝦類，轉染法，昆蟲細胞。

## 前言暨文獻探討

蝦類養殖是一種獲利性高的水產養殖業，但是因各種傳染性疾病感染對養蝦業造成莫大的損失，近年發現一新興病毒感染原是白點症病毒( white spot syndrome virus, WSSV)。遭此病毒感染的蝦體外骨骼(蝦殼)會呈現大小不一的白點，尤以頭胸部最為明顯 (Chou, *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1995)，故命名為白點症病毒 (WSSV)。罹病的蝦類遭逢環境緊迫以及產卵等壓力後，白點症病毒便開始於蝦體大量複製，病蝦會出現虛弱及倦怠情形，並在池邊迴游、食慾減低、頭胸甲變成紅色。感染白點症病毒的蝦體為發病快 (7~10 天)、死亡率極高 (90~100%)，並具有水平及垂直感染力(Hsu *et al.*, 1999)。

蝦類白點症病毒的基因體為環狀雙股 DNA，病毒顆粒呈現橢圓狀，有一絲狀尾巴，長度約為 275nm 且寬度約為 120nm (Westenberg *et al.*, 2000)，並具有由三層膜包裹組成的棒狀核蛋白鞘。2002 年 ICTV 將 WSSV 歸類於一新成立的病毒科: *Nimaviridae*，屬名為 *Whispovirus* (Vlak *et al.*, 2002, Marks *et al.*, 2003)。目前已知五種主要病毒蛋白，計有: VP28, VP19, VP26, VP24 及 VP15；另有 VP26, VP24 及 VP15 三種病毒蛋白位於核蛋白鞘上，以及 VP28, VP19 兩種位於病毒套膜( Westenberg *et al.*, 2000)。

利用點墨雜合反應及特定 PCR 片段限制酶圖譜分析不同地區所分離出的白點症病毒，目前已知亞洲地區的白點症病毒(WSSV)有下列三株不同的基因組型態：臺灣株、中國株、泰國株，其 GenBank 編號及基因體大小分別定為 AF440570 (307, 287bp) (Tsai *et al.*, 2000)、AF332093 (305, 107bp) (Yang *et al.*, 2001)、AF369029 (292, 967bp) (Peters *et al.*, 2001)。

白點症病毒台灣分離株(Taiwan isolate; Lo *et al.*, 1999)基因體序列經由電腦軟體進行分析，結果得到 532 個預測性的開放譯讀區(open reading frame, ORF)，在配合不同分離株的研究後，發現約有 181 個 ORFs 可能轉譯出功能性蛋白質，將其中 18 個 ORFs 所轉譯的預測性或已驗證的蛋白質序列，與其他病毒或物種的序列相較，發現在已知的蛋白質功能區(functional domain)約有 40%~60%的相似度；另外 30 個 ORFs 序列，則僅有 20%~30%的相同度，或僅有 1~2 段序列與功能區有相似性；其餘的 ORFs 則完全與已知蛋白質功能區序列有相似性 (陳威宇, 2003)。因此對於 WSSV 基因的表現有許多

尚待研究探討的空間，本研究即嘗試選取部份 WSSV 的 ORFs 序列進行質體選殖，在真核細胞表現系統進行蛋白質表現的研究。

因在養殖環境中無法阻絕白點症病毒散布的情況下，唯有進行此病毒的基礎研究，深入瞭解其外觀構造、基因體複製模式、分子生物層次之基因特性、以及與宿主間互動關係等，以期能找出對抗此疾病的方法。

## 研究目的

本研究欲針對 WSSV 基因體上的基因片段進行研究，以期了解 WSSV 基因表現調控機制及各基因的功能；因目前並無適合的蝦類細胞株及表現基因載體系統以供試驗，故擬採用將 WSSV 基因轉染入昆蟲細胞進行基因表現，以求能進一步探討分析基因所表現的蛋白質功能。

## 研究方法

### 一、製備勝任細胞(competent cell)

將單一菌落的大腸桿菌(*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$ )置於 3 ml LB 培養液(1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.5)中，於 37°C 培養 12~16 小時。取此培養液 1 ml 加入 100 ml LB 培養液繼續培養 2~2.5 小時後，在 4°C 以 3000 rpm 離心 10 分鐘收集細菌沉澱塊，將其懸浮於 10 ml CaCl<sub>2</sub> (60mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 15% glycerol, pH7.0)，過程於冰上操作，混合均勻後，在 4°C 以 2500 rpm 離心 5 分鐘再次將細菌沉澱下來，此細菌沉澱塊再均勻混合於 10 ml CaCl<sub>2</sub>，插於冰中作用 30 分鐘。在 4°C 以 2500 rpm 離心 5 分鐘將細菌沉澱下來，使菌塊懸浮於 2 ml CaCl<sub>2</sub>，並將此菌液進行少量分裝，保存於-80°C。

### 二、聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

1 $\mu$ l 模板 DNA、1 $\mu$ l 正向引子、1 $\mu$ l 負向引子、5 $\mu$ l 10X buffer (*Ex taq*)、4 $\mu$ l 2.5mM dNTP (*Ex taq*)、0.5 $\mu$ l *Ex taq* 聚合酶、38.5 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 於 0.2 ml PCR 小管中加入，混合均勻後，放置於熱循環機中，設定 PCR 作用程式如下：(1) 94°C 預熱 3 分鐘；(2) 溫度為 94°C 變性 1 分鐘；(3) 溫度為 55°C 黏合 1 分鐘；(4) 溫度為 72°C 延展 1 分鐘；(5) 將步驟 (2) 到 (4) 重複 40 次，(6) 最後以 72°C 反應進行最後的延伸 (final extension) 10 分鐘。取 3 $\mu$ l PCR 產物進行 1.5% 瓊脂膠片電泳(agarose gel) 電泳分析。

### 三、純化 PCR 產物

以 GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciencia) 來純化 PCR 產物，參照試劑組所附的操作手冊；首先將 PCR 產物移入 1.5 ml 微量離心管(ependorf tube)中，加入 500 $\mu$ l capture buffer 後，混合均勻，在 4°C 以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，將上清液移置於 GFX<sup>TM</sup> column 中，並以 4°C，13000 rpm 離心 1 分鐘，把濾液除去，餘下之 DNA 吸附在 column 濾膜上，再加入 500 $\mu$ l wash buffer，以 4°C，13000 rpm 離心 1 分鐘，濾洗吸附 DNA 的濾膜。之後將 GFX<sup>TM</sup> column 移置於一枚新的 1.5 ml 微量離心管上，於 column 中加入適量的無菌

ddH<sub>2</sub>O, 靜置室溫 5 分鐘, 以便將濾膜上吸附之 DNA 溶出, 其後在 4°C 以 13000 rpm 離心 2 分鐘, 即獲得 PCR DNA 純化物, 可取 3μl PCR DNA 純化物進行 1.5 % 瓊脂膠片電泳( agarose gel )電泳分析。

#### 四、以限制酵素( Restriction enzyme )分別處理 insert DNA 與載體 DNA ( vector DNA )

取 1μl EcoRI ( 20 U/μl ) ( *Bio Lal* )、1μl EcoRV ( 20 U/μl ) ( *Bio Lal* )、15μl insert DNA (即先前所得之 PCR 純化物)、3μl 10X buffer 2、3μl 10X BSA、7μl ddH<sub>2</sub>O 加入於 1.5 ml 微量離心管中, 混合均勻, 在 37°C 水浴器( water bath )下反應 2 小時, 可取 3μl 反應物進行 1.5 % 瓊脂膠片電泳( agarose gel )電泳分析。

取 10μl vector(pIZ/V5-His 的載體上, 於 MCS 後面有加掛 EGFP 的序列)以上述相同方法作切割製備。

#### 五、純化經過限制酵素( Restriction enzyme, RE )處理的反應物

以 GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit ( Amershan Biosciencia )來純化, 操作方法如同材料與方法三(純化 PCR 產物)。 insert DNA: 於 1.5 % agarose gel 進行電泳分析; vector: 於 0.8 % agarose gel 進行電泳分析。

#### 六、接合反應 ( Ligation )

取 7μl insert DNA (經過純化)、1μl vector (經過純化)、1μl 10X buffer ( T4 DNA ligase )、1μl T4 DNA ligase, 加入於 1.5 ml 微量離心管中, 混合均勻, 在 16°C 進行接合反應作用隔夜。

#### 七、轉型作用 ( Transformation )

於含有 100 μl 勝任細胞 [大腸桿菌(DH5α)] 1.5 ml 微量離心管中, 加入 10μl 接合反應物, 插於冰中作用 30 分鐘(期間每隔 10 分鐘, 輕敲管壁混勻作用物), 在 42°C 下 ligation mixture 進行 1 分鐘又 30 秒的熱休克處理( heat shock ), 其後插於冰中 2~3 分鐘, 再加入 300μl LB 培養液, 以 200 rpm 於 37°C 培養 1 小時。取培養的菌液 200μl, 塗抹於 LB plate (含 1000X 稀釋的 Ampicillin), 於 37°C 培養隔夜。

#### 八、PCR 篩選菌落法( Colony polymerase chain reaction, Colony PCR )

取 2μl 10X buffer ( DyNAzyme )、2μl 2mM dNTP、0.1μl DyNAzyme、0.1μl 正向引子、0.1μl 負向引子、15.7μl ddH<sub>2</sub>O, 加入於 0.2 ml PCR 小管, 由材料與方法七所得之菌盤, 沾取單一菌落置入 PCR 小管中, 並同時將此菌株塗抹於另一個新的 LB/kana<sup>+</sup> 培養盤上, 以便培養而保存菌株。將含菌之 PCR 小管放置於熱循環機中, 於下列 PCR 程式中反應: (1) 94°C 預熱 5 分鐘; (2) 溫度為 94°C 變性 30 秒; (3) 溫度為 55°C 黏合 30 秒; (4) 延展溫度為 72°C 延展 1 分鐘; (5) 將步驟 (2) 到 (4) 重複 25 次, (6) 最後以 72°C 反應進行最後的延伸( final extension ) 10 分鐘。於 Colony PCR 結束, 取 3μl 此產物進行 1.5 % 瓊脂膠片電泳( agarose gel )電泳分析。

#### 九、昆蟲細胞轉染作用(transfection)

萃取純化大腸桿菌內的 WSSV071-pIZ/V5-EGFP 並將之濃度定量。以 24well 細胞培養盤(內放置以滅菌的圓形載玻片, 直徑 15mm)種植 Sf9 昆蟲細胞(3x10<sup>5</sup> cells/0.3 ml media / well), 先靜置於 37°C 培養箱, 待細胞附著。

準備轉染液: (A)將 SF900II 昆蟲細胞培養液與重組質體 DNA(2 μg)混合, 兩

者總體積量為 100  $\mu\text{L}$ 。(B) 將 Cellfectin reagent (Invitrogen, cat#10362-010) 3  $\mu\text{L}$  混合 SF900II 昆蟲細胞培養液 97  $\mu\text{L}$ ，兩者總體積量為 100  $\mu\text{L}$ 。(C)將 A、B 兩項配置液混合，總體積量為 200  $\mu\text{L}$ ，靜置室溫下 30 分鐘。

進行轉染作用：先將先前準備之 200  $\mu\text{L}$  轉染液，置入 800  $\mu\text{L}$  新培養液。將 24well 細胞培養盤內之培養液移去，加入 1000  $\mu\text{L}$  的轉染液，靜置於 37°C 培養箱作用 5 小時，再移除轉染液更換 500  $\mu\text{L}$  的新鮮細胞培養液，置於 37°C 培養箱，並於每日定時以島利螢光顯微鏡觀察螢光表現情形。

## 結 果

### 一、 WSSV071 基因片段之合成

以感染三十六小時之病蝦 cDNA 作為模板 DNA，使用引子對( WSSV071F/R primers )來合成所需基因片段，此引子對的設計如下：

正向引子(WSSV071- *Bam*HF)：5'-GGGGATCCCATGTCGGTATCTTCAA-3'

負向引子(WSSV071- *Hind*III-R)：5'-GGGAAGCTTTTAAAGCTGTTTCTGTGTT-3'

利用 PCR 技術來合成出大量的 WSSV071 基因片段，得以方便從事構築的工作。完成 PCR 後，進行 1.5%瓊脂膠片電泳( agarose gel )來分析，以確認合成出來的基因片段分子量約位於 393bp(圖一)。

### 二、 重組質體 WSSV071-pIZ/V5-EGFP 之構築

將 PCR 產物( WSSV071 基因 DNA )純化後，進行 1.5 %瓊脂膠片電泳來分析，再次確認其分子量(圖二)，以限制酵素(*Eco*RI/ *Eco*RV)分別處理 insert DNA ( WSSV071 )以及載體 DNA(pIZ/V5-EGFP)，並以 1.5 %瓊脂膠片電泳分析確認兩者被限制酵素處理的情況，將反應物純化(圖三)，使其反應物的純度提升，以利進行接合反應後，產生 WSSV071-pIZ/V5-EGFP 之重組質體。

### 三、 篩選含有正確重組質體之菌株

進行接合反應即轉型入大腸桿菌(DH5 $\alpha$ )後，由所培養的菌盤上挑選菌落進行 Colony PCR 篩選，所獲得的 Colony PCR 產物則以 1.5 %瓊脂膠片電泳進行分析，確認初步篩選含正確重組質體的菌株 (圖四)，其後再將初步篩選菌株送交定序。判定重組質體上所含之 WSSV 基因序列完全正確。

### 四、EGFP 螢光反應

將進行轉染作用後的細胞以倒立螢光顯微鏡觀察，與對照組(直接轉染 pIZ/V5-EGFP 載體 DNA)相互比對，發現對照組在轉染 24 小時後即有明顯螢光反應呈現，而轉染重組質體 WSSV071-pIZ/V5-EGFP 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，只是反應強度不若對照組強烈。

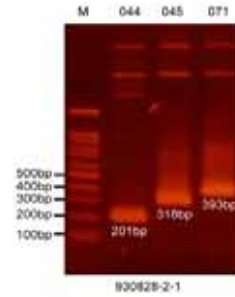
## 討 論

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 基因片段確有轉錄轉譯等基因表現功能，接續實驗將嘗試利用原核細胞探討研究其所表現的蛋白質功能與性質，並將探討此蛋白質在真核細胞內表現的特性等等。

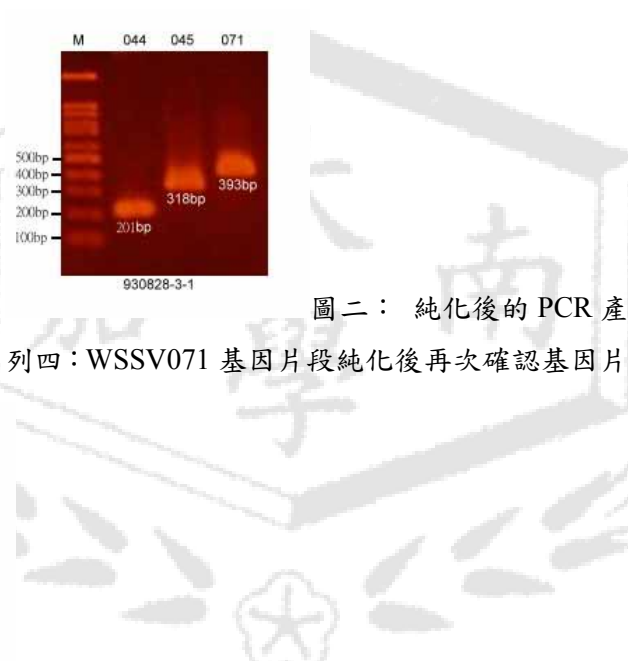
## 參 考 文 獻

- Chen,L.L. , Leu, J.H. , Huang, C.J. , Chou, C.M. , Chen, S.M. , Wang,C.H. ,Lo,C.F. and Kou, G.H. , (2002) , Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome Virus and characterization of the motif Important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells , *Virology* , 293: 44-53.
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC, Lo CF . 1995 . Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23:165-173
- Hsu HC, Lo CF, Lin SC, Liu KF, Peng SE, Chang YS, Chen LL, Liu WJ, Kou GH. . 1999 . Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis Aquat Organ.* 22;39(1):13-9.
- Marielle C. W. van Hulten, Westenberg, M. , Goodall, S.D. , and Vlak, J.M. , (2000) , Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp , *Virology* , 266: 227-236.
- Marielle C. W. van Hulten, Witteveldt, J. , Peters,S. , Kloosterboer, N. , Tarchini, R. , Fiers,M. , Sandbrink, H. , Lankhorst, R.K. and Vlak, J.M. , (2001) , The white spot syndrome virus DNA genome sequence , *Virology* , 286: 7-22.
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM. . 2001 . The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology.*286(1):7-22.
- Vlak, J.M. , Bonami, J.R. , Flegel, T.W. , Kou, G.H. , Lightner, D.V. , Lo, C.F. , Loh,P.C. and Walker, P.J. , (2002) , *Nimaviridae* a new virus family infecting aquatic invertebrates ,X th international congress of Virology , Paris.
- Wang CH., Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH . 1995 . Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23: 239-242



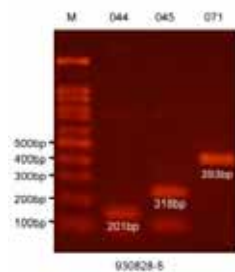
圖一： 確認PCR所合成的WSSV071基因片段(393bp)。

列一：蛋白質標記 ；列四：WSSV071 基因片段進行 1.5%瓊脂膠片電泳來分析，確認合成出的基因片段分子量約位於 393bp。



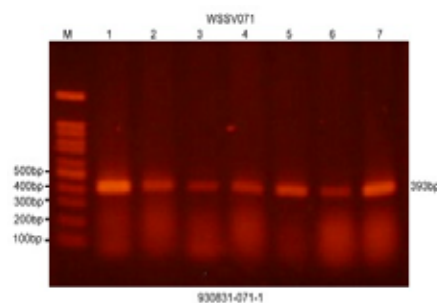
圖二： 純化後的 PCR 產物電泳圖。

列一：蛋白質標記 ；列四：WSSV071 基因片段純化後再次確認基因片段約位於 393bp。



圖三：純化限制酵素處理的 insert DNA (WSSV071)。

列一：蛋白質標記；列四 WSSV071 基因片段 393bp 純化限制酵素(EcoRI/ EcoRV)處理 insertDNA(WSSV071) ，進行 1.5 %瓊脂膠片電泳分析限制酵素處理的情況



圖四： 以 Colony PCR 方法初步篩選含有重組質體的菌株。以所獲得 Colony PCR 產物進行 1.5 %瓊脂膠片電泳來分析，確認所篩選的菌株，為含有正確重組質體之菌株。