

# 白點症病毒核鞘性蛋白質 VP664 (ORF419)交互作用之鑑定

## Identification of the interaction protein of white spot syndrome virus (WSSV) nucleocapsid protein VP664 (ORF419)

鄭雅云<sup>1\*</sup> 王品涵<sup>1\*</sup> 張雲祥<sup>1#</sup>

大葉大學(彰化縣大村鄉學府路 168 號)

<sup>1\*</sup>F9861007(aaa94789@gmail.com)

<sup>1\*</sup>F9861028(pinhan714@gmail.com)

<sup>1#</sup>yschang@dyu.edu.tw

### 摘要

白點症病毒(White spot syndrome virus)是一個高致病性的病原體，在世界各地的水產養殖業造成了嚴重的經濟損失。白點症病毒是一個具有套模的病毒，白點症病毒顆粒由三個結構層:外套膜、中間層和核鞘蛋白，圍繞其核心 DNA 構成。VP664 則是白點症病毒裡最主要的核鞘蛋白，其在病毒核鞘蛋白的組裝扮演重要的角色。本篇主要針對 VP664 之其中兩段 nt.4681-6240 和 9031-10770 進行研究且分別命名為 VP664-4 和 VP664-7。利用酵母菌雙雜交篩選 VP664 與白點症病毒結構性蛋白質之間的交互作用，經結果顯示 VP664-4 與 25 個病毒結構性蛋白質及 2 個 *Penaeus monodon* 細胞受體蛋白具有交互作用;VP664-7 與 9 個病毒結構性蛋白質具有交互作用，再經共免疫沉澱分析(Co-immunoprecipitation)，確認酵母菌雙雜交系統篩選之結果。由上述可知 VP664 在病毒顆粒的組裝扮演之重要角色。

**關鍵字：**白點症病毒、結構性蛋白質、蛋白質交互作用、VP664

### 前言

白點症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)

在過去二十年之中，全世界的水產養殖業快速的蓬勃發展，尤其是亞洲地區的水產養殖產量更居世界之冠，而蝦類在漁業產品中更是重要的商品，佔國際貿易總值的 20%，但蝦類養殖所面臨的問題亦是最多的，包含：病毒和病菌威脅、生態環境破壞、養殖排放水汙染河川及海洋、耗費水資源、抗生素的不當使用、室外養殖池之氣候、溫度、酸雨造成養殖死亡、蝦之生產地受氣候、水文條件及土地臨海之限制，其中又以病毒感染是目前急需解決之問題。而在病毒感染當中則以白點症病毒對全球的蝦類養殖業造成重大的損失。白點症病毒為一種廣宿主病毒，能感染多數的水生甲殼類動物及某些昆蟲，感染地區遍布全球 (Liu *et al.*, 2009)。受白點症病毒感染之蝦食慾減退，游動緩慢，感染後 3-10 天內死亡，其死亡率高達 100%，感染之病蝦體色會呈淺紅色且在外骨骼會出現白點或白斑，其中又以頭胸甲最為明顯，故稱之為白點症 (Chou *et al.*, 1995)。目前並無有效的治療方式可治療受感染之蝦所引發的疾病，因此目前的因應對策為提升蝦類的自體免疫系統、無病毒種蝦及蝦苗之培育及養殖場環境的管理等。白點症病毒為大型雙股環狀 DNA 病毒 (Yang *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2009)，以電子顯微鏡觀察純化的病毒外觀為橢圓形、紡錘形或桿形，具有套模長約 275 毫微米寬約 120 毫微米橢圓形的大型病毒 (Inouye *et al.*, 1993; Nakano *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995)，白點症病毒顆粒由三個結構層圍繞其核心 DNA: 外套膜、

中間層和核鞘蛋白。WSSV 基因體大小約 300 kbp (Chen *et al.*, 2002ab; van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001)，目前以之白點症病毒基因體序列分別來自三株病毒分離株：草蝦純化之台灣病毒株 (WSSV T-1, GenBank Accession NO.AF440570) (Chen *et al.*, 2008)、斑節蝦純化之中國大陸病毒株 (GenBank Accession NO.AF332093) 及草蝦純化之泰國病毒株 (GenBank Accession NO.AF369029)，由於白點症病毒的基因體分析顯示出此病毒不屬於目前已知的病毒科，因此國際病毒分類學會 (The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 建立了一個新的病毒科 Nimaviridae，在其下新的病毒屬 Whispovirus，白點症病毒種 (White spot syndrome virus I) 為唯一代表種 (type species) (vlak *et al.*, 2004)。

### 白點症病毒結構性蛋白質之重要性

目前白點症病毒的基因體序列以解序完成，但病毒蛋白質與宿主細胞的交互作用機制尚未明瞭。在病毒中結構性蛋白質是很重要的，因結構性蛋白質為構成型態成熟且具感染性的病毒顆粒所必要的，於細胞標定、病毒進入宿主細胞、病毒聚集、病毒組裝 (Campadelli-Fiume *et al.*, 2007; Chazal *et al.*, 2004; Mettenleiter, 2004; Mettenleiter *et al.*, 2006; Rajcani, 2003) 和引發宿主防禦機制等方面扮演關鍵的角色。目前已鑑定出的 WSSV 結構性蛋白質有 58 個，有 30 個以上被認為是外套膜蛋白質 (Li *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004) 病毒的外套膜蛋白質在病毒感染宿主時，為第一個與宿主作用的分子，目前已知外套膜蛋白質與病毒感染宿主有關，亦被認為能用來生產抗體或疫苗 (Li *et al.*, 2006)，來防止病毒的外套膜蛋白質與宿主細胞的受體作用 (Li *et al.*, 2006; van Hulten *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005; Zie *et al.*, 2006) 達到對抗病毒感染的效果。

### 蛋白質交互作用重要性

蛋白質交互作用於細胞中扮演相當重要的環節，蛋白質會彼此結合形成複合體，執行特殊的功能，如細胞週期的調控、訊息傳遞、細胞生長、分化代謝等，皆與蛋白之間的交互作用有關，因此須先了解蛋白質複合體的組成，才可以知道蛋白質是如何執行功能。

## 材料方法

### 酵母菌雙雜交質體 DNA 構築

使用 Matchmaker™ Gold (Clontech) 所附之 pGBKT7 且帶有 C-Myc 標幟之載體，分別利用限制酵素切位 *Xma*I/*Bam*HI, *Nde*I/*Bam*HI 選殖 VP664-4<sub>4681-6240</sub>, VP664-7<sub>9031-10770</sub> 基因片段，送入 pGBKT7 載體中，構築成質體 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7。構築完成之質體 DNA 送至生物技術公司定序，定序完成且經序列比對正確之菌株 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 置於含有 20% glycerol 培養液中存放於 -80°C 保存。

### 酵母菌轉形

取酵母菌 Y2HGold (Clone tech) 1 ml 至 1.5ml 離心管中，以 4°C，4,000 rpm，離心 5 分鐘，去除上清

液後加入 100  $\mu$ L 以 0.45  $\mu$ M filter (Bell) 過濾之 one step buffer [ 0.2M Lithium Acstate ( pH 5.5 ) ( SIGMA ) 100  $\mu$ L 、 40% PEG3350 ( SIGMA ) 、 1.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ] , 加入 2  $\mu$ l ssDNA ( salmon sperm DNA ) 和 2  $\mu$ l pGBKT7-VP664 質體 , 42°C 水浴 30 分鐘 , 每 5~10 分鐘輕彈一次 , 再以 4°C , 4,000 rpm , 離心 10 分鐘去除上清液加入 100  $\mu$ l 以 0.45  $\mu$ M filter (Bell)過濾之 DDW 回溶 , 混合均勻後將菌液塗至缺失 Trp 胺基酸之培養基 ( SD/-Trp , L-TRYPTOPHAN ) ( Clontech ) , 30°C 培養 2-3 天 , 使菌落長至直徑 2 mm 大小。

#### 酵母菌蛋白表現分析

將轉形成功帶有質體 DNA ( pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 ) 之酵母菌株 Y2HGold 培養於 5 mL SD/-Trp 缺失之培養液中 2 天後以 4°C , 4,000 rpm , 離心 10 分鐘 , 去除上清液 , 加入 DDW 100  $\mu$ L 回溶並移至新的 1.5 mL 離心管中 , 加入 100  $\mu$ L 0.2N NaOH , 室溫靜置 5 分鐘 , 以 4°C , 4,000 rpm , 離心 5 分鐘 , 去除上清液 , 加入 50  $\mu$ L SDS 樣品緩衝液 ( 200 mM DDT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 6.8 ) 以 100°C 加熱 10 分鐘 , 取 20  $\mu$ l 之上清液加到 10% SDS 聚丙烯醯胺膠 , 進行 SDS 聚丙烯醯胺膠之電泳分析。後續將 SDS 聚丙烯醯胺膠 , 進行蛋白質轉印法 ( Transfer ) : 浸泡 PVDF 膜 ( Polyvinylidene difluoride membrane ) ( PerkinElmer<sup>®</sup> ) 於甲醇使活化、以 DDW 清洗 3 次後再浸泡於 Transfer buffer [ 10 mM CAPS ( Bioman ) , pH 11.0, 10% methanol ] 備用 , 於 Transfer buffer 內置放順序為一張 3M paper ( Sartorius Stedim ) 、 SDS 聚丙烯醯胺膠 、 PVDF 膜 、 3M paper , 並確認皆浸濕無氣泡產生 , 以 250 mA 轉印 80 分鐘使蛋白質轉印至 PVDF 膜 , 轉印完成後將 PVDF 膜置放於 5% skim milk 溶解於 TBST ( 0.2M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5% Tween-20, pH 7.5 ) blocking 於 4°C , 1 小時 , 接著進行西方墨點法 ( Western blot ) 分析 , 將 PVDF 膜換至 5,000 倍稀釋於 5% skim milk 之 Rabbit polyclonal to c-Myc antibody ( abcam ) , 於室溫下作用 2 小時 , PVDF 膜再以 TBST 清洗 3 次 , 每次 10 分鐘 , 再將 PVDF 膜換至 5,000 倍稀釋於 5% skim milk 之 Goat polyclonal to Rabbit IgG-H & L ( HRP ) antibody ( abcam ) 於室溫下作用 1 小時 , 再以 TBST 清洗 3 次 , 每次 10 分鐘 , 清洗完成後 PVDF 膜以 Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescence HRP Substrate ( Millipore ) 進行顯色 , 之後以 Fuji<sup>super</sup> RX 底片進行壓片 , 使用顯影、定影液處理底片 , 觀察實驗結果。

#### 酵母菌自體激活測試

為了確保實驗的準確性 , 避免偽陽性之情形產生。將轉形成功之酵母菌株塗至胺基酸缺失之培養基 SD/-Trp plate , 以順時鐘方向依次塗上正控制組、負控制組與 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 轉形成功之酵母菌株於 30°C 培養 3 天 , 3 天後將 SD/-Trp 培養基上之酵母菌塗至含有 X- $\alpha$ -gal ( 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside ) ( MDbioinc ) 及含有篩選藥物 Aba ( Aureobasidin A ) 之胺基酸缺失培養基 SDO/X ( single dropout medium/X- $\alpha$ -gal ) 及 SDO/X/A ( single dropout medium/X- $\alpha$ -gal/Aba ) plate , 於 30°C 培養 3-5 天並掃描培養基記錄其實驗結果。

#### 雜合反應

將確認無自體激活轉染成功之酵母菌培養 10 mL 胺基酸缺失之 SD/-Trp 培養液中培養 2 天後以 4,000 rpm , 4°C , 離心 10 分鐘 , 去除少許上清液 , 將菌塊與上清混勻倒在無菌培養皿上備用。取出本實驗室

先前製備完成存放於 96 well 中之 AD library 包含 49 個 WSSV 結構性蛋白質及 3 個草蝦細胞受體蛋白之酵母菌以八爪微量吸管將 well 中之酵母菌混合均勻備用。將剛備用之酵母菌液(pGBKT7-VP664-4,pGBKT7-VP664-7) 2  $\mu$ L 菌液以八爪微量吸管將菌液點在 2xYPDA (bio BASIC INC.) plate 上；等菌液於培養基上乾燥後再取出備用之酵母菌(AD library) 2  $\mu$ L 重疊點在乾燥的酵母菌液上以 30°C 培養 24 小時。培養完後以滅菌之牙籤輕輕沾菌落塗至新的胺基酸缺失培養基 SD/-Leu-Trp (double dropout medium, DDO) plate 以 30°C 培養 3-5 天。培養完成後將 DDO plate 上之菌落用經高溫高壓滅菌之牙籤輕沾取菌落塗至含有 X- $\alpha$ -gal 以及 Aba 之胺基酸缺失培養基 DDO/X/A plate 上以 30°C 培養 3-5 天。培養完成後將 DDO/X/A plate 上生長且顏色變為藍色之菌落以經高溫高壓滅菌之牙籤輕沾菌落塗至含有 X- $\alpha$ -gal 以及 Aba 之 4 種胺基酸 (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp) 缺失培養基 QDO/X/A (quadruple dropout medium, QDO) plate 上以 30°C 培養 3-5 天，DDO/X/A plate 上生長之菌落為具有交互作用之蛋白質，培養 3-5 天後 QDO/X/A plate 仍有生長之藍色菌落為具有強交互作用之蛋白質。

#### 共免疫沉澱分析 (Co-immunoprecipitation) 質體 DNA 構築

利用台灣大學動物所羅竹芳教授實驗室贈與之帶有果蠅 (*Drosophila*) 熱休克蛋白 70 (Heat shock protein70, Hsp70) 啟動子以及含有 V5 或 FLAG 與 His 標幟之載體 pDHsp70-V5-His 或 pDHsp70-FLAG-His (Leu *et al.*, 2006)，分別嵌入 VP664-4, VP664-7 基因，以及利用酵母菌雙雜交系統所篩選出與 VP664-4, VP664-7 進行交互作用之白點症病毒結構性蛋白，利用 PCR 方式擴增目標片段，再以限制酵素切位分別為 *HindIII/BamHI*，*NdeI/BamHI* 選殖入 pDHsp70-V5-His 及 pDHsp70-FLAG-His 空載體構築成質體 pDHsp70-FLAG-His-VP664-4、pDHsp70-FLAG-His-VP664-7、pDHsp70-V5-His-VP664-4。

#### 秋行軍蟲 (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 細胞蛋白表現分析

將構築完成帶有 FLAG 標幟之質體 DNA (pDHsp70-FLAG-His-VP664-4、pDHsp70-FLAG-His-VP664-7) 以及構築於帶有 V5 標幟之質體 DNA (pDHsp70-V5-His-VP664-4) 分別轉染送入秋行軍蟲 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞株 Sf9 細胞內進行蛋白表現分析。首先於 4 well dish (Nunc) 接種 Sf9 細胞  $1 \times 10^5$ /well，於總體積 200  $\mu$ L 細胞培養液中加入使用 QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit 所抽取之質體 DNA；將總濃度為 0.4  $\mu$ g 的質體 DNA 加入轉染試劑 Effectene<sup>®</sup> Transfection Reagent Kit (QIAGEN<sup>®</sup>) 中之 EC buffer 60  $\mu$ L 以及 Enhancer 3  $\mu$ L 並 vortex 1 秒鐘並靜置室溫 3 分鐘，完成後加入 Effectene<sup>®</sup> Transfection Reagent 4  $\mu$ L 混合均勻，vortex 10 秒並靜置室溫 10 分鐘；Sf9 細胞先以細胞培養液清洗一次，在將上述混合液與 200  $\mu$ L 細胞培養液加入培養盤中，27°C 培養過夜。隔日將細胞培養盤以 42°C 水浴進行熱休克 (heat-shock) 反應 30 分鐘，完成後培養盤以 27°C 培養 6 小時，6 小時後取出細胞培養盤以 PBS 清洗 1 次，加入 20  $\mu$ L lysis buffer 與等量的 SDS 樣品緩衝液收集細胞，收集完之細胞加熱 100°C，10 分鐘後離心取上清液 20  $\mu$ L 進行 10% SDS 聚丙烯醯胺膠，完成後將蛋白轉印至 PVDF 膜，再將此轉印完成之 PVDF 膜至於 5% skim milk 中 4°C blocking 至隔日。接著利用 Rabbit polyclonal to V5 antibody (abcam) 或 Rabbit polyclonal to FLAG antibody (abcam) 以及 Goat polyclonal to Rabbit IgG-H&L (HRP) antibody (abcam) 進行西方墨點法分析蛋白表現。

#### 共免疫沉澱反應

將構築完成帶有 FLAG 標識之質體 (pDHsp70-FLAG-His-VP664)以及帶有 V5 標識之目標基因質體以 Effectene<sup>®</sup> Transfection Reagent Kit 共轉染 (co-transfection)至 Sf9 細胞中表現，分析其交互作用。首先將 6 well dish (Nunc)接種  $1.2 \times 10^6$ /well 之 Sf9 細胞，於 100  $\mu$ L EC buffer 中分別加入總濃度為 0.6  $\mu$ g 的質體 DNA 與 Enhancer 6  $\mu$ L vortex 1 秒鐘並靜置室溫 3 分鐘，完成後加入 Effectene<sup>®</sup> Transfection Reagent 8  $\mu$ L 混合均勻，vortex 10 秒並靜置室溫 10 分鐘；Sf9 細胞先以細胞培養液清洗 1 次，在將上述混合液與 800  $\mu$ L 細胞培養液加入培養盤中以 27 $^{\circ}$ C 培養過夜。隔日將細胞培養盤以 42 $^{\circ}$ C 水浴進行熱休克 (heat-shock) 反應 30 分鐘，之後以 27 $^{\circ}$ C 培養 6 小時，6 小時後培養盤內細胞以 PBS 清洗 1 次，每 well 中加入 150  $\mu$ L lysis buffer 置冰 10 分鐘並不時搖動。完成後將細胞裂解物用微量吸管反覆沖洗並收集於 1.5 mL 離心管中，以 4 $^{\circ}$ C，12,000 rpm 離心 5 分鐘，取 20  $\mu$ L 上清液加入等量之 SDS 樣品緩衝液，混合均勻後以 100 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後存放於 -20 $^{\circ}$ C 備用，剩於上清液移至微量離心管中分別加入 15  $\mu$ L anti-FLAG M2 beads (SIGMA)，於 4 $^{\circ}$ C 試管旋轉混合器上旋轉過夜。隔日將微量離心管以 4 $^{\circ}$ C，6,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液後在加入 150  $\mu$ L lysis buffer 以 4 $^{\circ}$ C，旋轉 10 分鐘，以 4 $^{\circ}$ C，6,000 rpm，離心 30 秒，重複上述步驟 5 次，完成後加入 15  $\mu$ L SDS 樣品緩衝液以 100 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，完成後與存放於 -20 $^{\circ}$ C 備用之樣品取適量進行 SDS 聚丙烯醯胺膠，分離完成後利用濕式蛋白質轉印法將蛋白質轉印至 PVDF 膜上，此帶有蛋白之 PVDF 膜置於 5% skim milk 中 4 $^{\circ}$ C blocking 過夜。隔日將 PVDF 膜分別置於 5,000 倍稀釋於 5% skim milk 之 Rabbit polyclonal to V5 antibody 與 anti-FLAG 兔子多株抗體，作用完成後進行西方墨點法分析所構築之帶有 FLAG 標識之質體與帶有 V5 標識之白點症病毒結構蛋白間交互作用。

## 實驗結果

白點症病毒主要結構蛋白質之交互作用分析 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 轉形 酵母菌之蛋白質表現分析

將構築於 pGBKT7 載體之 VP664-4, VP664-7 質體 DNA 轉形進入酵母菌株 Y2HGGold 進行蛋白質表現分析。VP664-4 理論蛋白質分子量約為 56.41 kDa，而 pGBKT7 的大小為 17 kDa，則 pGBKT7-VP664-4 預測大小為 73 kDa；VP664-7 理論蛋白質分子量約為 62 kDa，加上 pGBKT7 大小則為 79 kDa，但因蛋白質表現量太低或其他因素以至於在西方墨點法中並未看見其表現。

pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 於轉形 酵母菌自體激活分析

將表現 pGBKT7-VP664-4 及 pGBKT7-VP664-7 之 Y2HGGold 酵母菌株進行自體激活分析，以確認 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 於酵母菌雙雜交系統中是否具有自體激活特性，進而影響此系統篩選交互作用蛋白之正確性。結果顯示 pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 於酵母菌雙雜交系統中無自體激活之特性。

pGBKT7-VP664-4, pGBKT7-VP664-7 與白點症病毒結構性蛋白質交互作用篩選

使用轉形pGBKT7-VP664-4 之酵母菌與白點症病毒酵母菌雙雜交資料庫進行交合法(matting)分析pGBKT7-VP664-4、pGBKT7-VP664-7與白點症病毒結構性蛋白質具交互作用。經酵母菌基因庫篩選結果顯示pGBKT7-VP664-4 與 7 個外套膜蛋白質、1 個中間層蛋白質、5 個核鞘蛋白、11 個未知定位之結構性蛋白質、wsv010 以及 2 個受體蛋白，共 27 個病毒結構性蛋白質具有交互作用；pGBKT7-VP664-7 可與 1 個外套膜蛋白質，1 個中間層蛋白質與 2 個核鞘蛋白以及 5 個未知定位之結構性蛋白質，共 9 個病毒結構性蛋白質進行交互作用。

pDHsp70-FLAG-VP664-4, pDHsp70-FLAG-VP664-7 於秋行軍蟲細胞株 Sf9 蛋白表現分析

欲使用共免疫沉澱法分析 pGBKT7-VP664-4、pDHsp70-FLAG-VP664-7 與白點症病毒結構性蛋白質間交互作用關係，首先於秋行軍蟲細胞株 Sf9 進行蛋白表現分析確認 pGBKT7-VP664-4 及 pDHsp70-FLAG-VP664-7 蛋白質是否能於此系統中表現。pGBKT7-VP664-4 蛋白質分子量約 56.41 kDa；pDHsp70-FLAG-VP664-7 蛋白質分子量約 62 kDa，結果與原始大小相符。上述結果顯示 pGBKT7-VP664-4 及 pDHsp70-FLAG-VP664-7 能於 Sf9 細胞內表現，因此可進行共免疫沉澱分析 pGBKT7-VP664-4、pDHsp70-FLAG-VP664-7 與白點症病毒結構性蛋白質交互作用。

pDHsp70-FLAG-VP664-4、pDHsp70-FLAG-VP664-7 與白點症病毒結構性蛋白質之共免疫沉澱分析

為驗證酵母菌雙雜交資料庫系統篩選結果之真實性，本篇研究以共免疫沉澱法進一步驗證酵母菌篩選交互作用之結果。因 pGBKT7-VP664-4 及 pDHsp70-FLAG-VP664-7 經酵母菌雙雜交系統篩選出之結構性蛋白為數眾多，所以首先選擇本實驗室已構築好且具有強交互作用之質體進行共免疫沉澱分析。結果顯示 pDHsp70-FLAG-VP664-4 與 VP664-7 並無交互作用；pDHsp70-FLAG-VP664-7 與 pDHsp70-V5-VP53B 無交互作用之情形。

## 討論

本篇研究為白點症病毒 VP664 結構性蛋白質與白點症病毒結構性蛋白質交互作用之探討，VP664 基因體龐大，分子量大小為 664kDa，其為白點症病毒核鞘蛋白的主要組成，結構類似橄欖狀並層層堆疊具有成熟的病毒顆粒，已知其 N 端暴露在核外，使抗體易與其結合，所以針對其特性做進一步的分析。

我們主要初步利用酵母菌雙雜交分析 VP664-4、VP664-7 與白點症病毒結構性蛋白質之交互作用，其分析結果顯示 VP664-4 與 25 個結構性蛋白及 2 個受體蛋白具有交互作用；VP664-7 與 9 個結構性蛋白質具有交互作用。同時亦利用共免疫沉澱分析重覆驗證酵母菌雙雜交篩選之結果準確性。經試驗分析後之結構性蛋白質卻仍有許多問題等待探討，例如為何經過共免疫沉澱分析後，還是不具有交互作用？

圖

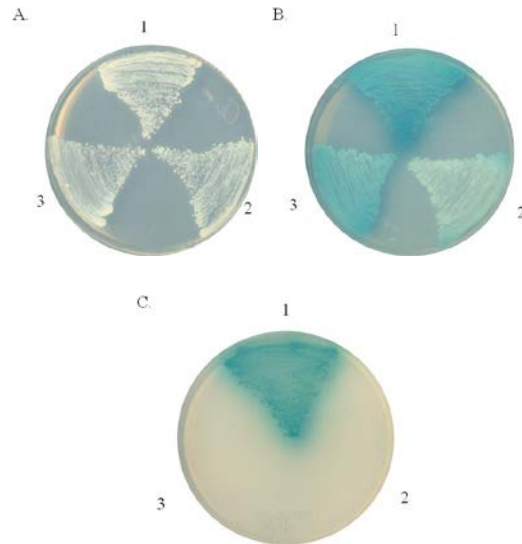


圖 1 pGBKT7-VP664-4 於酵母菌雙雜交資料庫篩選系統之自體激活分析圖

1: pGBKT7-53/pGADT7-RecT(正控制組); 2: pGBKT7-Lam/pGADT7-RecT(負控制組) ;  
3: pGBKT7-VP664-4。A: SDO (SD/-Trp) ; B: SDO/X (SD/-Trp+X- $\alpha$ -gal) ; C: SDO/X  
/A(SD/-Trp+X- $\alpha$ -gal+Aba)。

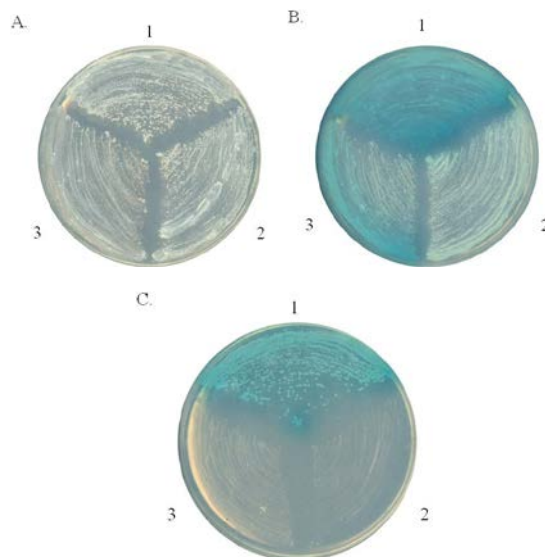


圖 2 pGBKT7-VP664-7 於酵母菌雙雜交資料庫篩選系統之自體激活分析圖

1: pGBKT7-53/pGADT7-RecT(正控制組); 2: pGBKT7-Lam/pGADT7-RecT(負控制組) ;  
3: pGBKT7-VP664-7。A: SDO (SD/-Trp) ; B: SDO/X (SD/-Trp+X- $\alpha$ -gal) ; C: SDO/X

/A(SD/-Trp+X- $\alpha$ -gal+Aba)。

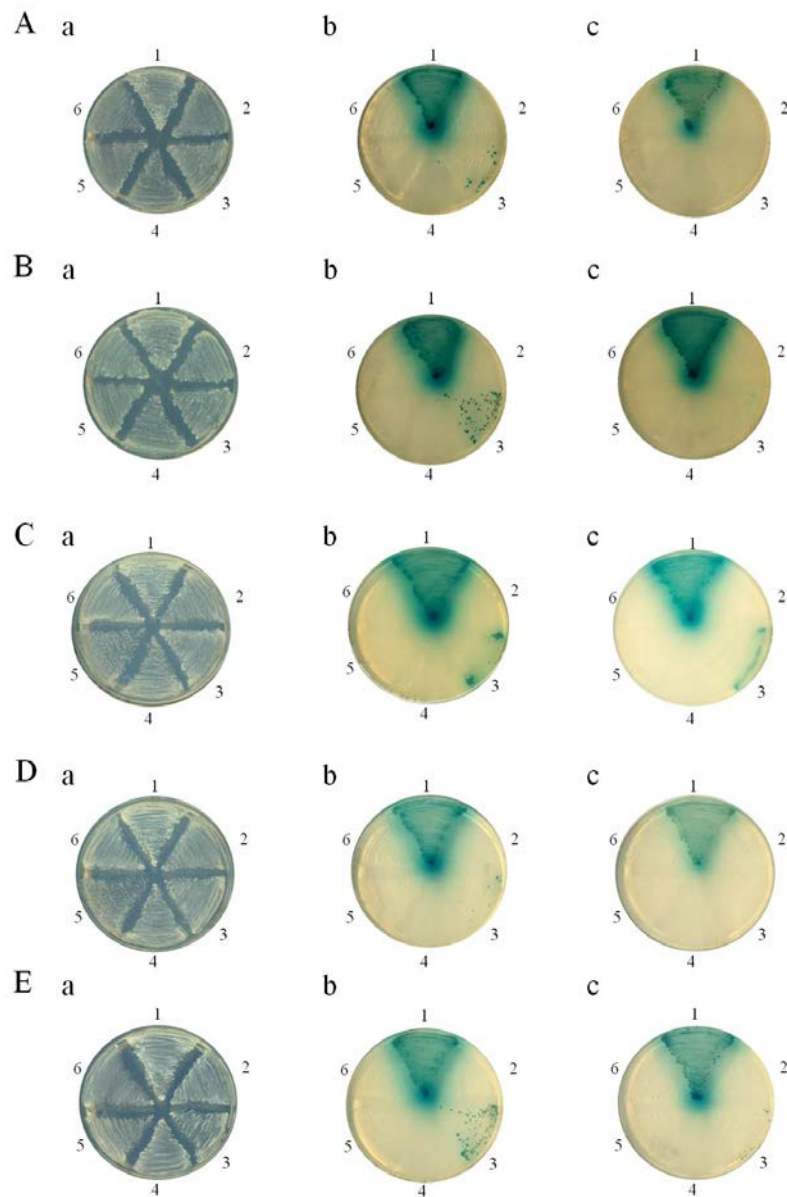


圖 3 酵母菌雙雜交系統之VP664-4 與F<sub>1</sub>ATP synthase beta subunit、pmRACK1 之交互作用，VP664-7 與VP110、VP664-4、VP36A之交互作用圖

1：pGBKT7-53/pGADT7-RecT(正控制組)；2：pGBKT7-Lam/pGADT7-RecT(負控制組)；  
3：pGBKT7-VP664-4 與目標基因pGADT7 轉形酵母菌matting之結果；4：  
pGBKT7-VP664-4 與pGADT7 空載體轉形酵母菌matting之結果；5：目標基因pGADT7  
與pGBKT7 空載體轉形酵母菌matting之結果；6： pGBKT7 空載體與pGADT7 空載體轉  
形酵母菌matting之結果。A：VP664-4 與F<sub>1</sub>ATP synthase beta subunit之交互作用；B：  
VP664-4 與pmRACK1 之交互作用；C：VP664-7 與VP110 之交互作用；D：VP664-7 與



VP664-4 之交互作用；E：VP664-7 與VP36A之交互作用。a：DDO(SD/-Leu-Trp)；b：DDO/X/A(SD/-Leu-Trp+X-a-gal+Aba)；c：QDO/X/A (SD/-Leu-Trp-His-Ade+X-a-gal+Aba)。

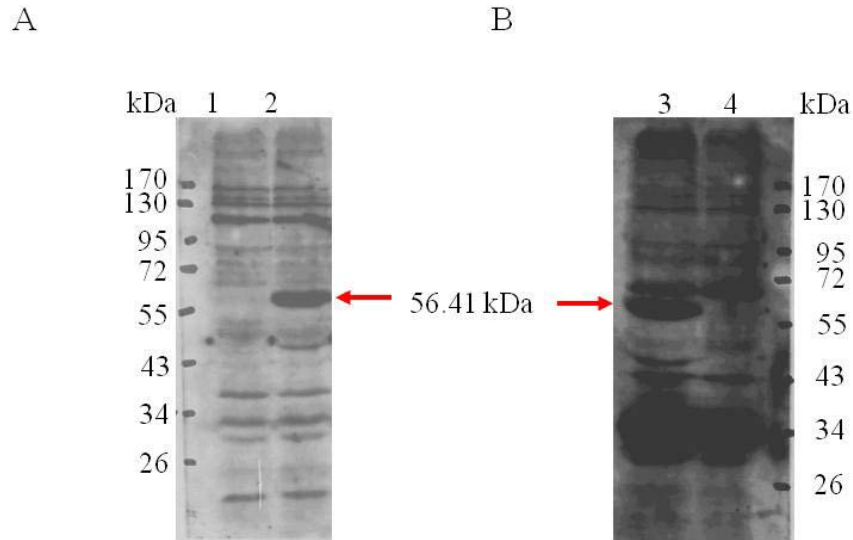


圖 5 白點症病毒結構性蛋白質 VP664-4 於秋行軍蟲細胞 Sf9 中蛋白表現分析圖

pDHsp70-FLAG-VP664-4 轉染 Sf9 細胞並利用西方墨點法分析細胞中重組 VP664-4 之表現。(A) Lane 1：cell only；Lane 2：細胞表現重組 VP664-4-FLAG，以 FLAG 抗體進行辨識。(B) Lane 3：細胞表現重組 VP664-4-V5；Lane 4：cell only，以 V5 抗體進行辨識。

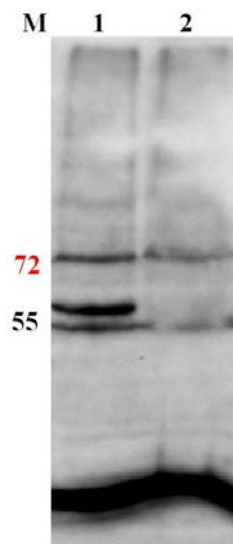


圖 6 白點症病毒結構性蛋白質 VP664-7 於秋行軍蟲細胞 Sf9 中蛋白表現分析圖

lane1：細胞表現重組 pDHsp70-FLAG-VP664-7；lane 2：cell only，以 FLAG 抗體進行辨識。

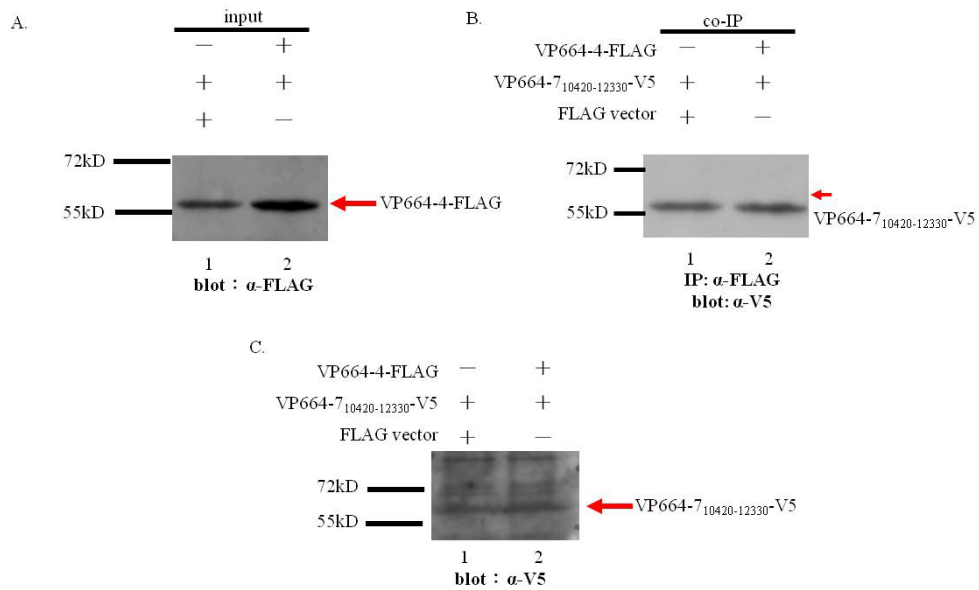


圖 7 白點症病毒結構性蛋白質VP664-4/VP664-7<sub>10420-12330</sub>交互作用圖

Lane 1：共轉染FLAG與VP664-7<sub>10420-12330</sub>-V5 質體；Lane 2：共轉染VP664-4-FLAG與VP664-7<sub>10420-12330</sub>-V5 質體。(A) 以anti-FLAG抗體辨識；(B) 以anti-V5 抗體辨識；(C) 利用anti-FLAG M2 與其結合，再以anti-V5 抗體辨識。

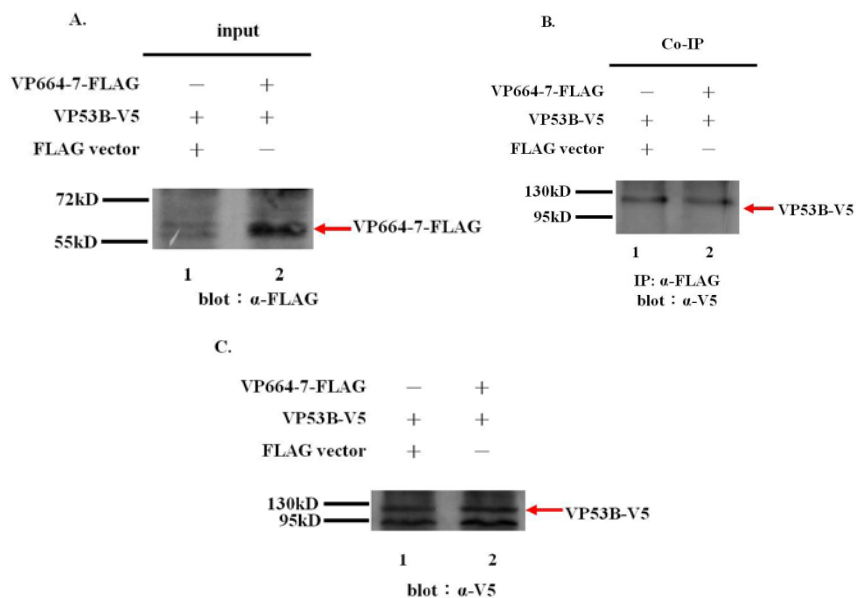


圖 10 白點症病毒結構性蛋白質 VP664-7/VP53B 交互作用圖

Lane 1 : 共轉染 FLAG 與 VP53B-V5 質體 ; Lane 2 : 共轉染 VP664-7-FLAG 與 VP53B-V5 質體 。 (A) 以 anti-FLAG 抗體辨識 ; (B) 以 anti-V5 抗體辨識 ; (C) 利用 anti-FLAG M2 與其結合 , 再以 anti-V5 抗體辨識 。

表

表 1 VP664-4 於酵母菌雙雜交系統所篩選到之白點症病毒結構性蛋白質之分析表

名稱	分類	交互作用	
		yeast	CO-IP
VP110	Envelope protein	+	ND
VP51A	Envelope protein	+	ND
VP160B(VP264C)	Envelope protein	+	ND
VP19	Envelope protein	+	ND
VP36B	Envelope protein	+	ND
VP38A	Envelope protein	+	ND
VP16	Envelope protein	+	ND
VP35	Nucleocapsid protein	+	ND
VP136A	Nucleocapsid protein	+	ND
VP664-7	Nucleocapsid protein	+	-
VP664-8	Nucleocapsid protein	+	ND
VP136A	Nucleocapsid protein	+	ND
VP24	Tegument protein	+	-
VP68	Structure protein	+	ND
VP38B	Structure protein	+	ND
VP180(052N)	Structure protein	+	ND
VP160B(094C)	Structure protein	+	ND
VP216	Structure protein	+	ND
VP180(052C)	Structure protein	+	ND
VP36A	Structure protein	+	ND
VP15	Structure protein	+	ND
VP39A	Structure protein	+	ND
VP12	Structure protein	+	ND
VP53B	Structure protein	+	ND
WSV010			ND
pmRACK1	Receptor protein	+	ND

F <sub>1</sub> ATP synthase <input type="checkbox"/> subunit(#7)	Receptor protein	+	ND
---	------------------	---	----

+：表示兩蛋白質具交互作用；++：表示兩蛋白質具強交互作用；-：表示 co-IP 無進行交互作用；ND 表示未進行 co-IP。

表 2 VP664-7 於酵母菌雙雜交系統所篩選到之白點症病毒結構性蛋白質之分析表

名稱	分類	交互作用	
		yeast	CO-IP
VP110	Envelope protein	++	ND
VP26	Tegument protein	+	ND
VP36A	Structure protein	++	ND
VP39A	Structure protein	+	ND
VP136B	Structure protein	+	ND
VP53B	Structure protein	++	-
VP32	Structure protein	+	ND
VP136A	Nucleocapsid protein	+	ND
VP664#4	Nucleocapsid protein	+	ND

+：表示兩蛋白質具交互作用；++：表示兩蛋白質具強交互作用；-：表示 co-IP 無進行交互作用；ND 表示未進行 co-IP。

#### 致謝

感謝，大葉大學張雲祥老師，提供了一切的資源和經費讓我們可以完成這份專題論文。

#### 參考文獻

- Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, et al. (2007) The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17: 313–326.
- Chang, P. S., Lo, C. F., Wang, Y. C., and Kou, G. H. (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSSV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon*, by in situ hybridization. *Dis Aquat Org* 27:131-139.
- Chang, J., Yang, S. H., Cho, Y. G., Hwang, S. B., Hahn, Y. S., and Song, Y. C. (1998) Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 72:3060-3065.
- Chang Y-S, Liu W-J, Lee C-C, Chou T-L, Lee Y-T, et al. (2010) A 3D Model of the Membrane Protein Complex Formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Proteins. *PLoS ONE* 5(5): e10718. doi:10.1371/journal.pone.0010718
- Chazal, N. & Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 226–237.
- 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. (2002a) 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.
- Chen, L. L., Wang, H. C., Huang, C. J., Peng, S. E., Chen, Y. G., Lin, S. J., Chen, W. Y., Dai, C. F., Yu, H. T., Wang, C. H., Lo, C. F., and Kou, G. H. (2002b) Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301:136-147.

- Chen, K. Y., Hsu, T. C., Huang, P. Y., Kang, S. T., Lo, C. F., Huang, W. P., and Chen, L. L. (2009). *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol* 27(3), 460-5.
- Chou, H. Y., Huang, C. Y., Wang, C. H., Chiang, H. C., and Lo, C. F. (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23:165-173.
- Li, Z., Lin, Q., Chen, J., Wu, J. L., Lim, T. K., Loh, S. S., Tang, X., and Hew, C. L. (2007) Shotgun identification of structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics*.
- Liang, Y., Cheng, J. J., Yang, B., and Huang, J. The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H., Liu, K. F., Chiu, Y. L., Yeh, P. Y., Peng, S. E., Hsu, H. C., Liu, H. C., Chang, C. F., Su, M. S., Wang, C. H., and Kou, G. H. (1997) Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org* 30:53-72.
- Lo, C. F., and Kou, G. H. (1998) Virus associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol* 33:365-371.
- Mayo, M. A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved ICTV. *Arch Virol* 147, 1655–1656.
- Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106: 167–180.
- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9: 423–429.
- Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., and Oseko, N. (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29:135-139.
- Rajca'ni J (2003) Molecular mechanisms of virus spread and virion components as tools of virulence. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50: 407–431.
- Sahul Hameed, A. S., Yoganadhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Murugan, V. & Jayaraman, K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201, 179–186.
- Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Lo, C. F., and Flegel, T. W. (2006). PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *J Virol* 80(21), 10734-42.
- Tonganunt, M., Saelee, N., Chotigeat, W., and Phongdara, A. (2009). Identification of a receptor for activated protein kinase C1 (Pm-RACK1), a cellular gene product from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) interacts with a protein, VP9 from the white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 26(3), 509-14.
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Hsiao, H. H., Wang, A. H., Kou, G. H., and Lo, C. F. (2004) Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol* 78:11360-11370.
- Tsai, M. F., Lo, C. F., van Hulten, M. C., Tzeng, H. F., Chou, C. M., Huang, C. J., Wang, C. H., Lin, J. Y., Vlak, J. M., and Kou, G. H. (2000a) Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92-99.
- Tsai, M. F., Yu, H. T., Tzeng, H. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Huang, C. J., Wang, C. H., Lin, J. Y., Kou, G. H., and Lo, C. F. (2000b) Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277:100-110.
- Tsai J-M, Wang H-C, Leu J-H, Wang AH-J, Zhuang Y, et al. (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol* 80: 3021–3029.
- Van Hulten, M. C., and Vlak, J. M. (2001) Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. *Virus Genes* 22:201-207.
- Van Hulten, M. C., Witteveldt, J., Snippe, M., and Vlak, J. M. (2001) White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. Jul 285:228-233.
- Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H. Y., E. T. M., Chang, C. F., Su, M. S., and Kou, G. H. (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239-242.
- Wang, Y.-C., Lo, C.-F., Chang, P.-S. & Kou, G.-H. (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164, 221–231.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassankajon, A., Withyanchumnarnkul, B., and Flegel, T. W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77.
- Xie X, Yang F (2006) White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. *J*

Gen Virol 87: 1903–1908.

Xie X, Xu L, Yang F (2006) Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol* 80: 10615–10623.

Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., and Xu, X. (2001) Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol* 75:11811-11820.

Zhou Q, Xu L, Li H, Qi YP, Yang F. Four major envelope proteins of white spot syndrome virus bind to form a complex. *J Virol*. 2009; 83(9):4709-4712.