

國立台灣大學生命科學院動物學研究所

博士論文

Institute of Zoology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Thesis

草蝦硫醇氧化還原蛋白與蝦白點症病毒極早期表現蛋白 IE1 蛋白質交

互作用之機制研究

**Study of the interaction mechanisms between white spot syndrome  
virus (WSSV) immediate early gene #1 (IE1) and *P. monodon*  
thioreodxin**

黃俊諺

**Jiun-Yan Huang**

指導教授：郭光雄 博士

**Advisor: Guang-Hsiung Kou, Ph.D.**

指導教授：羅竹芳 博士

**Advisor: Chu-Fang Lo, Ph.D.**

中華民國 101 年 7 月

**July, 2012**

## 誌謝

七年

這本論文是敘述一個關於蛋白質跟空氣接觸久了會壞掉的故事

這個故事讓一個在高中因為太多學科不及格而被留級的少年完成他的博士論文

首先要謝謝我的父母親及家人，自幼以來一直縱容我的任性，總是放手讓我去做我想做的事情。雖然同住一個屋簷下，但慚愧的是七年來平日晚上從未在家一起用餐過。謝謝您們的包容，也希望沒有辜負您們的期待。

謝謝兩位指導教授郭光雄老師與羅竹芳老師，兩位老師總是可以一針見血的點出我的不足之處，學生自認資質駑鈍，但從兩位老師身上深深感受到的是沒有不夠聰明、只有還不夠努力的道理。謝謝張震東老師，張老師強大的背景知識與細膩的方法學讓學生突破許多研究上的瓶頸，更帶領著白點症病毒朝向一個新的領域來發展。謝謝蔡孟勳老師，在蔡老師的幫忙下進行數據分析及比對，讓我們鎖定了最初的研究方向。謝謝呂健宏老師及王涵青老師，學生一路上看著兩位前輩的身影，從兩位前輩身上發現太多值得我效法與學習的事情，亦師亦友的情感，我很珍惜。

謝謝 818 這個大家庭，感謝在這段時間當中我所認識的每一個人，我可以從你們每一個人身上看到我所沒有的優點，並且經由你們的提醒與叮嚀注意到自己需改進的地方，在這幾年的朝夕相處之中，謝謝你們對我的包容，請原諒我不擅長表達內心的情感，若不是有每一個人盡心盡力的用自己的方式相互支援及扶持，不可能會有今天的我，在此深深的謝謝你們所有人。

謝謝佳薇，這幾年來一直都是支持著我不要停下腳步的最大動力來源，總是讓我忍不住的開懷大笑，但也虧欠妳最多，這幾年辛苦妳了，往後的日子還請多多指教。:)

## 中文摘要：

硫醇氧化還原蛋白為生物內參與許多氧化還原反應之蛋白質，利用硫醇-二硫化物間的轉換提供氫離子及電子以進行氧化還原反應。在本研究中發現到當利用本實驗室所產製的草蝦 cDNA 微陣列晶片觀測草蝦感染白點症病毒後基因表現量的變化時，發現草蝦硫醇氧化還原蛋白基因的表現量有升高之趨勢，在佐以即時定量核酸聚合酶鏈鎖反應確認此一結果後，接續利用西方點墨法得知在轉譯層次上草蝦硫醇氧化還原蛋白在草蝦感染白點症病毒後其蛋白表現量也有上升的現象，顯示草蝦硫醇氧化還原蛋白在白點症病毒感染草蝦過程中應該有重要的角色。硫醇氧化還原蛋白的目標蛋白通常含有 Cys-x-x-Cys motif，故我們對白點症病毒基因進行序列比對，共發現有 70 個白點症病毒開放轉譯區皆含有此 motif，其中一個即是白點症病毒極早期表現基因 IE1。硫醇氧化還原蛋白會幫助轉錄因子維持其還原態構型，使轉錄因子保有可以與目標 DNA 啟動子區域結合的能力，故我們先針對草蝦硫醇氧化還原蛋白是否會與白點症病毒極早期表現基因 IE1 有蛋白交互作用進行試驗分析。我們利用體外試驗的 His pull down 分析法証實當在有硫醇氧化劑 Diamide 的處理下，草蝦硫醇氧化還原蛋白會與白點症病毒極早期表現基因、同時也是轉錄因子的 IE1 有蛋白交互作用的產生，並且鑑定出在草蝦硫醇氧化還原蛋白藉由 Cys<sup>62</sup> 半胱氨酸與 IE1 結合。接續以昆蟲細胞株 SF9 進行共免疫沉澱法的體內試驗當中發現到，當細胞株受到氧化壓力如過氧化氫的處理時，草蝦硫醇氧化還原蛋白會與白點症病毒 IE1 有蛋白交互作用的現象產生，我們進一步的推測白點症病毒 IE1 其蛋白活性與功能會受到氧化還原的調控，進而我們利用 EMSA 証實了當白點症病毒 IE1 受到硫醇氧化劑 Diamide 處理過後會喪失與 DNA 結合的能力，而硫醇還原劑如 dithiothreitol 與 beta-mercaptoethanol 皆可以使其恢復活性、使白點症病毒 IE1 重獲與 DNA 結合的能力。進一步我們也証實了 IE1 蛋白其 Cys<sup>55</sup>、Cys<sup>189</sup> 與 Cys<sup>192</sup> (CXXC motif) 半胱氨酸對 IE1 的 DNA 結合活性有重要的影響，我們証實了草蝦硫醇氧化蛋白可以直接幫助白點症病毒的

轉錄因子 IE1 維持或恢復其與 DNA 結合的能力，而以 LC/MS/MS 分析法發現氧化壓力指標之一的 GSH/GSSG 比值在蝦體感染白點症病毒 24 小時後有上升的趨勢，在感染後 48 小時會有顯著性的下降；而在 *Trx* 基因靜默化的蝦體中，白點症病毒的複製套數以及蝦體感染白點症病毒的死亡率都會有顯著性的下降，本研究結果讓我們對硫氧化蛋白所扮演的功能有更多的了解之外，對於白點症病毒的致病機制與在宿主細胞中生存策略提供不同的視野與新思維。



## Abstract

A shrimp cDNA microarray and immunoblotting were used to confirm that white spot syndrome virus (WSSV) infection up-regulated expression of the important redox regulator thioredoxin (Trx). WSSV immediate early gene #1 (IE1) was identified as a possible target protein of Trx and selected for further study. In a pull down assay, we found that recombinant Trx bound to IE1 under oxidizing conditions, and a co-immunoprecipitation assay showed that Trx bound to WSSV IE1 when the transfected cells were subjected to oxidative stress. A pull down assay with Trx mutants showed that no IE1 binding occurred when cysteine 62 was replaced by serine. EMSA showed that the DNA binding activity of WSSV IE1 was down-regulated under oxidative conditions, and that PmTrx restored the DNA binding activity of the inactivated, oxidized WSSV IE1. Another EMSA experiment showed that IE1' s Cys-X-X-Cys motif and cysteine residue 55 were necessary for Trx binding. Measurement of the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione (GSH/GSSG) in WSSV-infected shrimp showed that oxidative stress was significantly increased at 48 hpi. The biological significance of *Trx* was also demonstrated in a dsRNA *Trx* knockdown experiment where suppression of shrimp *Trx* led to significant decreases in mortality and viral copy numbers. Based on all of these results, we hypothesize that Trx uses the same binding sites and redox control mechanism *in vitro* and *in vivo*, and that Trx increase WSSV' s pathogenicity by rescuing IE1' s DNA binding ability *in vivo*.

## 目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
第一章 文獻回顧.....	1
第二章 草蝦硫醇氧化還原蛋白與蝦白點症病毒極早期表現蛋白 IE1 蛋白質交互 作用之機制研究.....	32
文獻探討.....	32
研究方法.....	38
結果.....	48
討論.....	57
圖.....	69
表.....	88
參考文獻.....	94
個人相關著作.....	101
研討會論文.....	102

## 第一章 文獻回顧

### 1. 氧化還原反應(Redox reaction)

廣義的氧化還原反應的定義為：失去電子為氧化反應，接受電子為還原反應；而當一分子接受一個電子時(被還原)，同時間一定有另一分子失去電子(被氧化)，是故氧化反應必定伴隨著還原反應的發生，故總體來說稱為氧化還原反應。進一步的說，氧化劑/還原劑是一種相對的概念，氧化劑本身會接受電子(被還原)並讓與之反應的物質失去電子(被氧化)；還原劑則會將本身的電子傳遞出去(被氧化)並讓與之反應的物質得到電子(被還原) (40)。

依照電化學標準狀態所測出的還原電位，兩個物質在一起，則：

標準還原電位大者當氧化劑

標準還原電位小者當還原劑

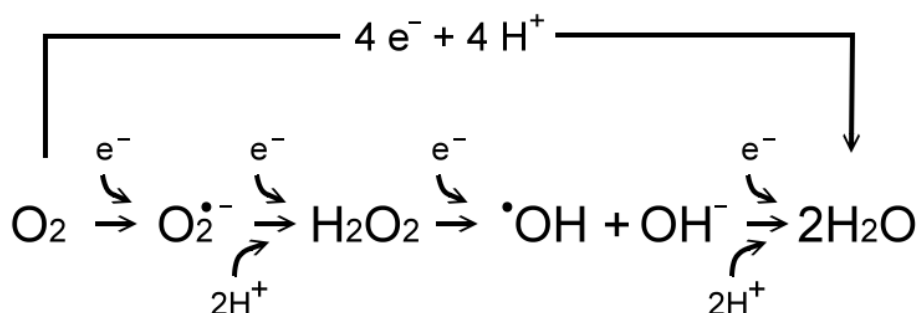
以下是一些生物體中常見分子的標準還原電位(3,36,40)

	Half-reaction	$E^{0\prime} =$ Stand reduction potential (V)
low oxidizing agent	DTT-oxi / DTT-red	-0.33
	$O_2 / O_2^{\cdot -}$	-0.33
	GSSG, 2 $H^+$ / 2GSH	-0.24
	Trx-S <sub>2</sub> , 2 $H^+$ / Trx[SH] <sub>2</sub> (Thioredoxin)	-0.24
	Grx-S <sub>2</sub> , 2 $H^+$ / Grx[SH] <sub>2</sub> (Glutaredoxin)	-0.22
	$H_2O_2, H^+$ / $H_2O, HO^{\cdot}$	+0.32
Strong oxidizing agent	$O_2^{\cdot -}, H^+$ / $H_2O_2$	+0.94
	$HO^{\cdot}, H^+$ / $H_2O$	+2.33

## 2. 氧化壓力(Oxidative stress)

對於所有的耗氧生物體(aerobic organisms)而言，生物體必需進行有氧呼吸以產生能量來源--ATP，藉由 ATPase 幫浦讓氫離子進入粒腺體內以產生 ATP，而粒腺體內的過多的氫離子需要靠電子傳遞鏈(electron transport chain)再將氫離子送出粒腺體外，在進行電子傳遞的反應時，NADH 作為電子的提供者(electron donor)、，而氧氣作為電子的接受者(electron receptor)，在行有氧呼吸時，約有 90%的 O<sub>2</sub> 會走入電子傳遞鏈，以 cytochrome oxidase 作為電子的攜帶者(electron carrier)將四個電子給予氧氣以生成水(H<sub>2</sub>O)；但約有 10%的氧分子會分別形成不同的氧衍生物(oxygen derived)，這些氧衍生物又稱為活性氧 (Reactive oxygen species ; ROS)

生物體內氧催化代謝路徑如圖所示



造成生物體內氧化壓力的物質主要由 ROS 所造成，ROS 其成員為氧衍生物形成的活性代謝物(Reactive metabolites)，其種類繁多，最廣泛被研究的如屬於自由基分子的超氧陰離子(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)與氫氧自由基(hydroxyl radical, •OH)，另外是非自由基分子的過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。細胞內氧化物的產生與代謝為一種動態平衡；而氧化壓力意指在生物體內氧化物的生成與消去之速度處於一種失衡狀態(imbalance)，當過量的 ROS 產生、又缺少足夠的抗氧化物質(anti-oxidants)時，就會破壞生物體內的平衡狀態，造成氧化強化劑(Pro-oxidants)的累積，進而有氧化壓力的產生(54)，而不正常氧化壓力的累積，會使得細胞受到損傷之外，也會伴隨著許多疾病的產生(39)。



## 2.1 自由基與活性氧族之介紹

### 2.1.1 自由基

分子由原子所組成，而原子又由質子、中子與電子所構成，一般而言，帶有偶數電子對的分子才會達到安定的化學狀態。自由基(Free radical)是指具有不成對電子的原子、離子或分子，故自由基是一種不安定的物質，並且會主動想要再獲得一個電子讓自己達到穩定狀態，也因如此，自由基物質在生物體中具有高度的生物反應性，而與之反應的分子因為其奇數電子的失去(氧化反應)而形成一個新的自由基物質，並同時也可能改變了分子原有的功能與特性，往往造成了不可逆的損傷；而新生成的自由基物質接續又會與別的分進行反應，導致產生一連串的放大連鎖反應並對細胞或整體組織造成傷害，在生物體當中為了要停止這種連鎖反應，必需藉由體內的抗氧化物質(anti-oxidants)，讓這種帶有不成對電子的自由基跟另外一個也具有不成對電子的自由基物質進行反應，以消去帶有不成對電子的自由基。

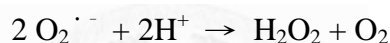
自由基的生成主要有外在因子與內生性因子(exogenous and endogenous factors)兩種來源，外在因子主要為 UV 光、香煙燃燒不完全所產生的煙霧、游離輻射源、除草劑或是殺蟲劑等；內生性因子主要為粒腺體電子傳遞系統(mitochondrial electron transport system)進行有氧呼吸時所產生電子逸漏的現象，另外如細胞內進行氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、核苷酸的代謝與細胞內啟動防禦機制時皆會有自由基的產生(23,56,81)，生物體內自由基的種類繁多，本論文後續僅回顧在氧氣代謝過程當中所產生的自由基分子。

### 2.1.1 超氧陰離子(superoxide anion, $O_2^{\cdot -}$ )

超氧陰離子與其它 ROS 物質相較之下並不是一個具活潑性質的 ROS，缺少可以自由通透脂膜 (lipid membrane) 的能力，雖然可以藉由擴散作用穿透生物膜，但其速率極為緩慢( $2.1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ )(11,27)。超氧陰離子大多受到細胞內的生物因

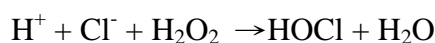
子所產生，如在粒腺體內膜上的電子傳遞系統中，大量電子的存在會造成電子洩漏(leakage)，致使氧氣自發性的生成超氧陰離子。超氧陰離子也是生物體當中許多生化反應中不可避免的副產物，如在 ATP 代謝的過程當中會形成嘌呤的衍生物次黃嘌呤(hypoxanthine)，而次黃嘌呤的代謝需經黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)氧化，隨後即會形成黃嘌呤(xanthine)與副產物--超氧陰離子和過氧化氫，而黃嘌呤氧化酶可繼續將黃嘌呤氧化形成尿酸排出體外，但此時一樣會有副產物超氧陰離子和過氧化氫的產生(58)。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) 可幫助超氧陰離子的代謝，藉由金屬離子 Cu/Zn 或 Mn 的參與下可將超氧陰離子轉換成過氧化氫與氧氣(77,117)。

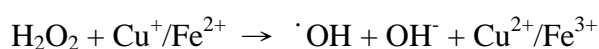


### 2.1.2 過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

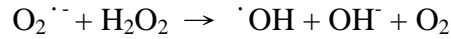
過氧化氫並不是自由基分子，是形成自由基過程中的一個中間分子，但也歸類為 ROS (85)。生物體內除了由超氧陰離子還原形成過氧化氫之外，過氧化氫本身為電中性(uncharged)，並有著可以自由進出生物體細胞膜的特性，讓過氧化氫成為細胞內訊息傳遞的一個重要分子，參與細胞凋亡調控機制(40)，並在防禦機制上扮演著重要的角色(86,91)。如白血球之中性粒細胞(neutrophil)內的骨髓過氧化酶(Myeloperoxidase)可將過氧化氫轉變為次氯酸(hypochlorous acid, HOCl)，進而利用次氯酸殺死外來物如細菌等(116)。



在有金屬離子的存在下，當過氧化氫接受一個電子後，有兩種方式會形成最不穩定的自由基分子--氫氧自由基，一者為著名的 Fenton's reaction (26)。



另一種可能性是超氧陰離子與過氧化氫反應以生成氫氧自由基，此為 Haber-Weiss reaction (55)



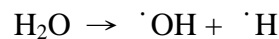
而受到 UV 光的照射也會使過氧化氫均裂(homolytic fission)為氫氧自由基



有三種酵素能在細胞內直接將過氧化氫代謝為水，分別為過氧化氫酶(catalase)、麩胱甘肽過氧化酵素(glutathione peroxidase, GPx) 與過氧化物還原酶(peroxiredoxin, Prx)，這些機制在後續有論述。

### 2.1.3 氫氧自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$ )

當過氧化氫本身得到一個電子被還原後即會形成氫氧自由基，而氫氧自由基在 ROS 當中具有最活躍的生物反應性，標準還原電位為  $E=2.59$ ，在體內極端的不穩定，並會與細胞內各種分子/巨分子進行氧化還原反應，雖然單一氫氧自由基在體內存在的週期(life time)只有  $10^{-9}$  秒(11,27,98)，並當氫氧自由基再獲得一個電子會形成氫氧根離子( $\text{OH}^-$ )，隨後與氫離子反應下即會完成氧氣在生物體內代謝的最終產物—水。但氫氧自由基其對生物體所造成的的傷害確最為重大，可以跟核酸(DNA and RNA)、蛋白質(protein)、脂質(lipid)或是小分子代謝物等進行氧化還原反應，並可能進而改變氧化目標的結構與分子特性。除了由超氧陰離子或過氧化氫轉變成氫氧自由基之外，游離輻射能的照射亦可使體內的水均裂(homolytic fission)為氫氧自由基與氫自由基。



## 2.2 活性氧在生物體中造成的傷害(Cellular damages by ROS)

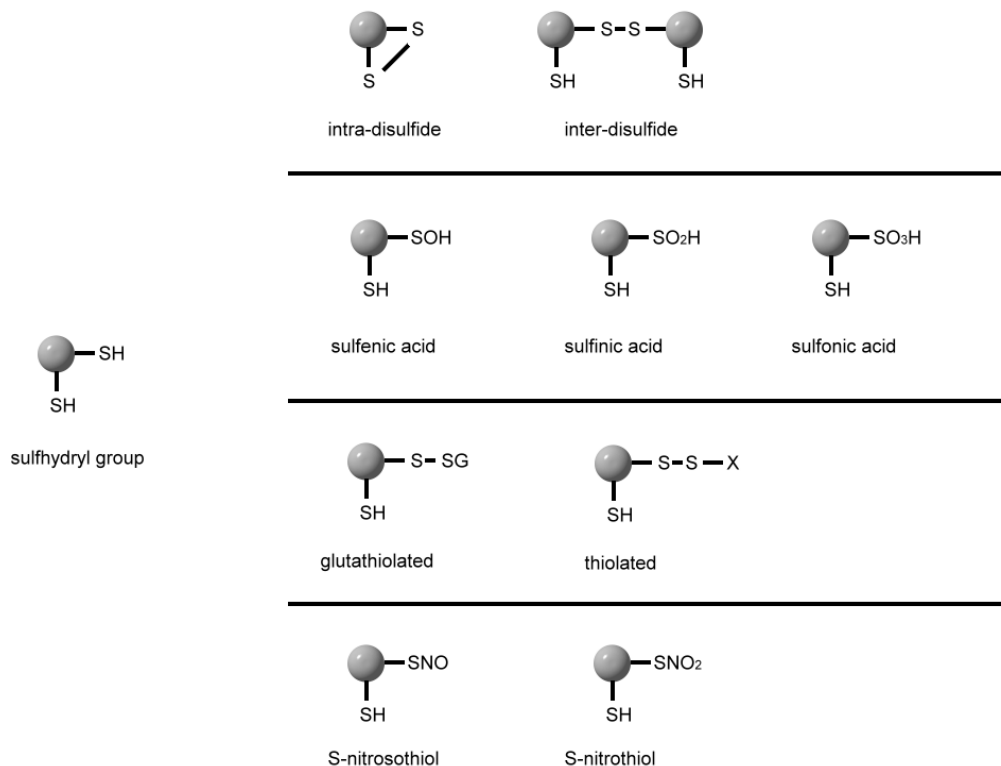
ROS 在生物體中是細胞內各種生化反應下無法必免的副產物(by-product)，例如當進行有氧呼吸、或是活化嗜中性白血球時必定伴隨著 ROS 的產生，而 ROS 對於生物體本身主要攻擊的目標為核酸(DNA and RNA)、蛋白質(protein)與脂質(lipid)，所造成的影響分述如下。

## 核酸(DNA and RNA)

核酸(DNA and RNA)為受到 ROS 攻擊的主要目標之一，且被認為是一種核酸誘變劑(mutagenic)，因為 ROS 會造成單股或雙股的核酸骨架斷裂，並產生多餘的含氮鹼基，而這些受損的含氮鹼基會與正常的含氮鹼基或其它分子配對形成共價鍵結(99)；在體外(*in vitro*)與體內(*in vivo*)試驗的研究結果顯示當 DNA 受到 ROS(特別是氫氧自由基)攻擊後會造成核酸構型異常扭曲，進而與蛋白質有架橋連結(thymine-tyrosine cross-link)的現象產生(22,75)。

## 蛋白質(Protein)

在體外試驗的結果指出，ROS 會與胺基酸產生反應並造成電性的改變，使蛋白質產生肽鏈斷裂，蛋白的聚集(aggregation)與雙硫鍵異常的架橋作用(disulfide bonds cross-linking)或是對蛋白質產生碳醯化修飾作用(carbonyl modified proteins) (66)，而生物體當中的 ROS 也被認為可調控帶有硫醇蛋白之活性，利用 ROS 所產生的氧化壓力對不同的蛋白質其活性產生不同的影響(68)；生物體中容易被氧化的胺基酸有四個，分別為 cysteine、methionine、tyrosine 與 tryptophan (92)，而在這四個胺基酸中最廣範被研究的即是以 Cysteine 為主的氧化反應，Cys 也是唯一擁有數種不同氧化方式的胺基酸，主要藉由 Cys 本身的硫氫基(Sulfhydryl group)氧化形成多種不同氧化狀態(25)，大致上分成四種氧化型態：雙硫鍵的形成 (inter or intra disulfide bond formaton)、與過氧化氫的氧化反應(sulfenic acid、sulfinic acid or sulfonic acid formation) 、與 GSH 鍵結的氧化反應(glutathiolation)以及與一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)相關的氧化反應(S-Nitrosylation)，反應示意圖如下：



在細胞外(extracellular space)與位於內質網(endoplasmic reticulum)的蛋白大多藉由雙硫鍵的形成以維持自身蛋白正確的折疊構型(6)，相較之下，細胞質內是一個充滿還原力的環境，在細胞質內的蛋白其酵素活性作用區位、與金屬離子的結合或是催化反應等皆是藉由還原態的 Cys (61)，生物體當中並不是所有蛋白質上的 Cys 皆與氧化還原相關，在蛋白質不同折疊構型的情況下大部份的 Cys 無法進行氧化還原反應，但 Cys 所受到的氧化還原反應確實是生物體內很重要的調控機制(95)，許多 Chaperone (45)、代謝相關的酵素活性(21)、轉錄因子的活性(48,89,121)以及激酶或磷酸酶 (kinase and phosphatase)(35,62)的活性皆與氧化壓力所造成的氧化還原反應有相關。

## 脂質(Lipid)

在脂質方面，ROS 會攻擊在膜上的多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid)並造成脂質的過氧化(lipid peroxidation)，當不飽和脂肪酸被氫氧自由基攻擊失去一個電子後會形成脂質自由基(lipid radical)，與氧氣和其它的不飽和脂肪酸

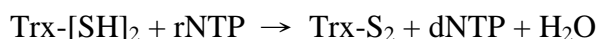
接續反應後即會形成脂質過氧化物(lipid peroxide)，整個代謝路徑也會產生脂質氧化的連鎖反應(lipid peroxidation chain reaction)，並在連鎖反應的情況下使整體細胞膜的流動性降低，進而改變細胞膜的特性並造成膜蛋白的不穩定，需要藉由 Chain Breaking 的機制中止連鎖的氧化反應(82)。若脂質的氧化發生在粒腺體時，更會同時對在粒腺體中的多種酵素產生不同的影響，導致對細胞產生毒性(cytotoxic)進而啟動細胞凋亡反應 (37)。

### 2.3 抗氧化系統--硫醇氧化還原蛋白與穀胱氧還蛋白系統 (Thioredoxin and Glutaredoxin system)

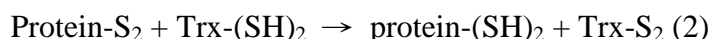
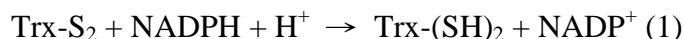
生物體當中有兩個主要針對硫醇(thiol)的抗氧化系統，分別為硫醇氧化還原蛋白系統(Trx system)與穀胱氧還原蛋白系統(Grx system)，這兩個系統會在生物體內執行相類似的氧化還原反應，並且是細胞質中供給受質蛋白還原力的主要來源；讓細胞質內維持還原的環境(reducing redox environment)(95)，主要機制有三種，第一是透過雙硫醇與雙硫鍵的轉換(dithiol-disulfide exchange)將受質蛋白其雙硫鍵還原為硫醇，第二是受質蛋白質與 GSH 鍵結的巯胺基硫反應或去巯胺基硫反應(glutathionylation or de-glutathionylation)，第三是參與蛋白異構化反應(isomerization)，將受質蛋白的雙硫鍵鍵結位置改變以形成異構蛋白(38,41,78)。

#### 硫醇氧化還原蛋白系統 (Thioredoxin system)

硫醇氧化還原蛋白系統主要由 Thioredoxin (Trx)與 Trx reductase (TR)所組成，Trx 主要維持生物體內硫醇與雙硫鍵(thiol: disulfide)比例的衡定，例如可以促進胰島素雙硫鍵的還原等，最早由 Laurent 等人發現在 DNA 合成過程當中需要硫醇氧化還原蛋白的參與(59)，核糖核酸(ribonucleotide, rNTP)在核糖核酸還原酶(ribonucleotide reductase, RR)催化下可被 Trx 還原為去氧核糖核酸(deoxy ribonucleotide, dNTP) (42)，反應式如下

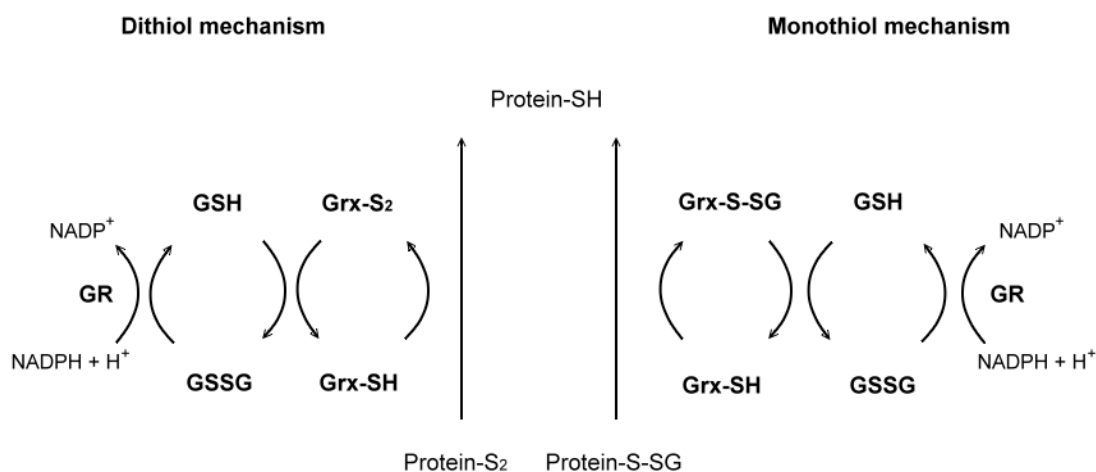


氧化態的 Trx 藉由 Trx 還原酶(thioredoxin reductase, TR)利用 NADPH 可將氧化態的 Trx 進行還原作用，反應式如下



### 2.3.2 穀胱還蛋白系統 (Glutaredoxin system)

穀胱甘肽(Glutathione, GSH)，穀胱還蛋白(Glutaredoxin, Grx)與穀胱甘肽還原酶(Glutathione reductase, GR) 這三個蛋白質共同組成穀胱還蛋白系統，GSH 是由 glutamate、cysteine 與 glycine 三種胺基酸組合而成的三胜肽，細胞內 GSH 含量很高，可以達 milli-molar (mM) (14)，Glutaredoxin 分子量在不同物種之間略有差異，分子量約為 9-12 kDa，其作用活性區位亦為 CxxC motif(通常為 CPYC motif)，目前至少有約 30 種不同的 Grx 被鑑定出，除了像 Trx 系統一樣可以對雙硫鍵進行 Dithiol 的還原反應之外，還可以對單硫醇進行 glutathiolation 相關的 Monothiol 氧化還原反應，Grx 系統的反應式如下

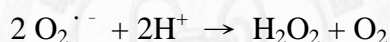


另外 Glutathione-S transferase (GST) 可以將 GSH 與其它分子進行接合反應，為生物體當中 de-toxic 反應的中間步驟，而在缺少 GR 酵素活性的果蠅品系之中，氧化態的 GSH 可以作為 Trx 的受質，由 Trx 直接將 GSSG 還原為 GSH (50)。

## 2.4 其它的抗氧化酵素

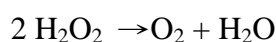
### 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)

超氧化物歧化酶是第一個被鑑定出其酵素功能為參與自由基的代謝(77)，在真核生物體中有兩種超氧化物歧化酶，分別在不同位置執行任務，而這兩種超氧化物歧化酶在其酵素活性區位上皆需要金屬離子的參與才能保酵素活性(8,57)；在細胞質中為 Cu/Zn-SOD 執行清除超氧陰離子的工作，而 Mn-SOD 在粒腺體內則扮演著很重要的角色，主要將有氧呼吸中電子傳遞鏈所產生的超氧陰離子轉換成過氧化氫(77,117)。



### 過氧化氫酶(Catalase)

過氧化氫酶是含鐵的酵素(heme-containing enzymes)並以四聚體的形式聚合，以致於以超過 220 kDa 的蛋白大小存在生物體中 (93)，過氧化氫酶普遍存在於細胞內各處，包含細胞質粒腺體與過氧化氫體(peroxisome)。NADPH 會與過氧化氫酶結合並對其產生保護作用之外，更能促進其酵素活性(51-52)。過氧化氫酶最主要的功能就是將  $\text{H}_2\text{O}_2$  轉變為氧氣和水，對過氧化氫有相當高的  $K_m$  值，生物體中而 Gpx/Prx 與 Catalase 兩者都可以直接將過氧化氫轉變為水，但是在生物體中以 Gpx 對過氧化氫的親合力較佳(46)。

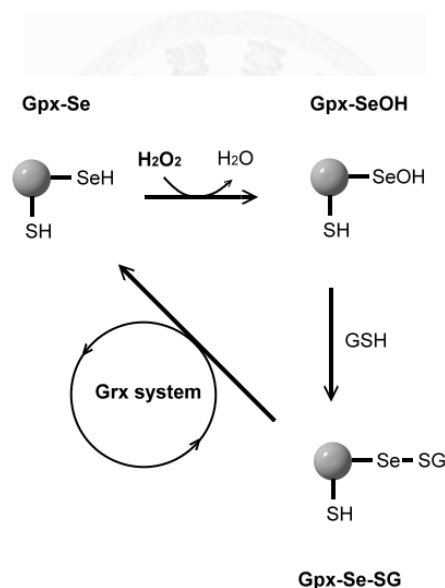




## 麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, Gpx)

於哺乳動物中發現至少有四種不同的 Gpx，分別為 Gpx1-Gpx4，並在其酵素活性區位上皆有硒氨酸(selenocysteine)的存在，故 Gpx 必需要藉助硒元素(selenium-dependent)來保有其酵素活性(106)。Gpx1 為細胞質中表現量很高的酵素，並幾乎在所有的組織皆可以偵測到 Gpx1 的存在(28)，Gpx4 在粒腺體中的含量最高並可代謝脂質過氧化物(lipid hydroperoxides)，可將脂類過氧化物還原為醇類(alcohols)(31)，Gpx2 與 Gpx3 在高等生物體中主要為細胞外酵素，分別存在於消化道與血漿當中(19-20,97,105)。

Gpx 可直接將過氧化氫還原為水，自己則形成帶有 sulfinic acid 的 Gpx-SOH，Gpx-SOH 必需再藉著前述之機制由 Grx 系統內 GSH、GR 與 NADPH 的幫忙下回復成還原態的 Gpx。

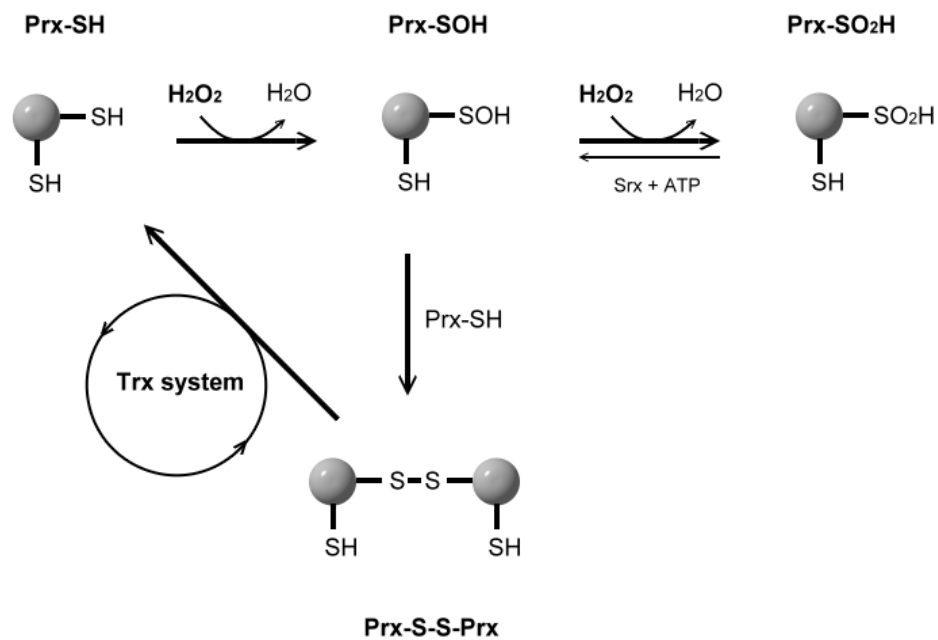


## 過氧化物還原酶 (peroxiredoxin, Prx or Tpx)

過氧化物還原酶 Prx 亦是含鐵的酵素(heme-containing enzymes)，在生物體內分子大約為 30 kDa，可以還原過氧化物(peroxides)，例如過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)或是烷基過氧化物(ROOH)。Prx 為 Trx 的受質，氧化態的 Prx 必需要藉由 Trx 的幫助之下回復為還原態的 Prx-SH，Prx-SH 可以與過氧化氫反應將過氧化氫代謝為水，而 Prx 自己形成 sulfenic acid 的 Prx-SOH，Prx-SOH 除了可以再代謝一個過氧

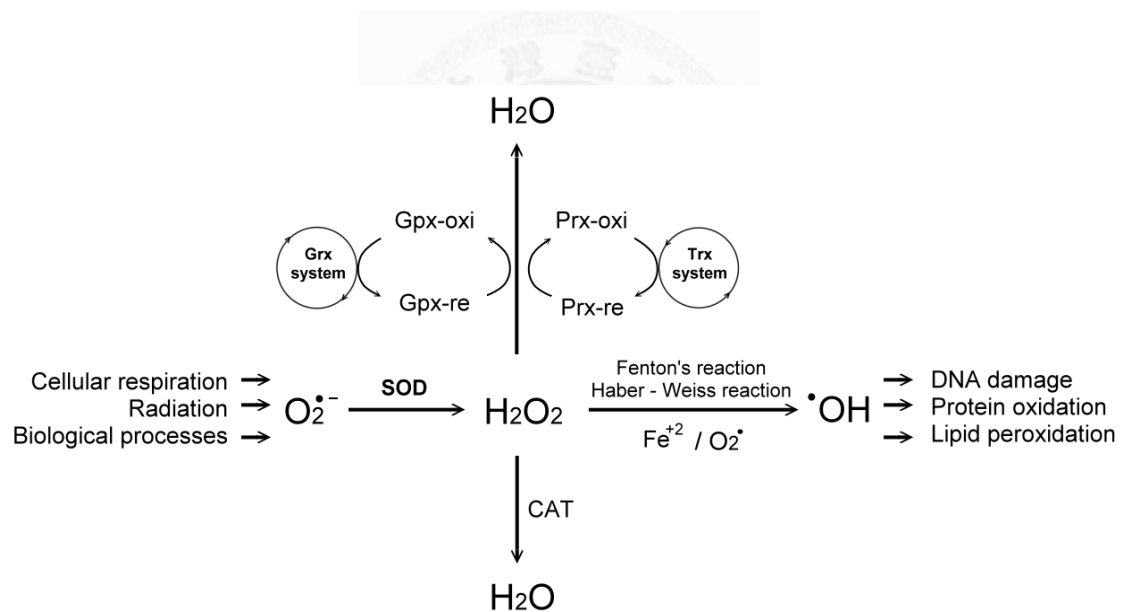
化氫形成帶有 sulfinic acid 的 Prx-SOOH 之外，Prx-SOH 也可以跟還原態的 Prx-SH 自發性形成雙硫鍵鍵結的 Prx-S-S-Prx，再依賴 Trx 將 Prx-S-S-Prx 還原為 Prx-SH (94)，而 Prx-SOOH 必需藉由 sulfiredoxin (Srx)與消耗 ATP 的情況下還原為 Prx-SOH (7)。

整體反應路徑如下圖所示



綜合第二章所談到的 ROS 與抗氧化分子，用以下這張圖來同整體內氧氣代謝的過程中所產生的 ROS，以及生物體內如何代謝這些 ROS 作個整體，首先是當細胞接受到外界的 Stress(如 UV 光或是游離輻射)、或是進行有氧呼吸等的生物反應時，細胞內會產生 superoxide，superoxide 不能自由通透生物膜 (或說通透的速度極為緩慢)，主要會在胞內流竄，而 SOD 是主要代謝 superoxide 的酵素，SOD 可將 superoxide 轉換成過氧化氫，過氧化氫的分子量很小，可以自由的通透生物膜，生物體內至少有三種酵素可以將過氧化氫直接代謝為水，這三種酵素分別為 Gpx (與 Grx 系統相關)、Prx(與 Trx 系統相關)以及 Catalase (CAT)這三種酵素，其中又以 CAT 對過氧化氫的具有最高的生物反應性；而過氧化氫有兩種

主要的方式自發性的形成氫氧自由基，一種是藉助生物體內  $\text{Fe}^{+2}$  或是  $\text{Cu}^{+}$  的催化下進行 Fenton reaction 反應以產生氫氧自由基；另一種是  $\text{Fe}^{+3}$  金屬離子先與 superoxide 進行反應生成  $\text{Fe}^{+2}$  後、 $\text{Fe}^{+2}$  再與過氧化氫發生 Fenton reactoin 以產生氫氧自由基(兩步驟合併起來稱為 Haber-Weiss reaction)，氫氧自由基在生物體當中具有極高的生物反應性，相較之下有很強的還原電位，對生物體而言是極強的氧化劑，幾乎可以隨意的奪取周遭分子的電子，讓周圍原本穩定的分子變成不穩定的自由基分子，也因這種極強的反應性，氫氧自由基在生物體中存在週期很短，只有  $10^{-9}$  秒，但是卻會讓細胞內不論是核酸、蛋白或是脂質生物膜等發生不可逆轉的損傷。



### 3 蝦類抗氧化相關基因之研究現況

#### 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)

對於真核生物來說，包含線蟲、昆蟲、貝類、魚類、或是人類而言，在細胞質內都是由 Cu/Zn-SOD 作為清除自由基的酵素，而在粒腺體中是由 Mn-SOD 來清除超氧陰離子，但非常讓人意外的是，各種在十足目中的蝦類與水生甲殼類動物，其細胞質內並沒有 Cu/Zn-dependent SOD 的存在，對於蝦類而言，竟然是有兩種的 Mn-SOD 分別在細胞質內與粒線體當中執行清除自由基的任務(9-10)，後來的研究者將細胞質中的 SOD 命名為 cytMn-SOD 或是 cMn-SOD，其蛋白分子量為 25 kDa，並且不論在中國對蝦或是南美白蝦之中都已經將此基因選殖與作功能上的鑑定分析，並且在全身性器官包含血球、心臟、肝胰臟、腸道、神經、肌肉、泳足與鰓皆可偵測到有 SOD 基因的表現(18,29,32,67)。

免疫刺激物如 beta-glucan 與 sulfated polysaccharide 可以增加 SOD 的活性(12)，在等足目(*Probopyrus ringueleti*)所寄生感染的蝦體(*Palaemonetes argentinus*)中其 SOD 酵素活性會有顯著性的下降(83)。在將 cMn-SOD 基因靜默化後佐以缺氧與缺氧後覆氧試驗當中，蝦體內的鰓與肝胰臟其 SOD 活性與超氧陰離子的含量會因為缺氧而下降；而缺氧後覆氧會造成 SOD 活性與超氧陰離子的含量的增加(29)。另外在受到白點症病毒感染的蝦體中，SOD 基因的表現在感染後一小時會有顯著性的上升，而隨著感染時間增加其基因表現會降低，並在感染後 12 小時會有顯著性的下降(33)。

#### 過氧化氫酶(Catalase, CAT)

過氧化氫酶在蝦類的研究當中相對較少，目前的文獻指出在蝦體中肝胰臟、血球、淋巴組織、腸道、卵巢、肌肉與鰓皆可偵測到 Catalase 的基因表現(120)，並在肝胰臟可以偵測到其蛋白質的表現(101)；在受到白點症病毒感染的蝦體中，血球中 Catalase 基因的表現在感染後 14 小時有顯著性的上升；肝胰臟中 Catalase

基因的表現則在感染後 37 小時有顯著性的升高(120)。經微囊藻毒(Microcystin) 攻毒的蝦體其 Catalase 基因的表現與活性皆會升高(34)，急性 pH 值改變的處理也可以造成蝦體內 Catalase 基因表現量的變化，在酸性(pH5.4, 24 hpi; pH6.7, 72 hpi)或是鹼性處理(pH9.3, 48 hpi)其 Catalase 基因表現量會上升；但當酸/鹼性處理超過 72 小時後其基因表現量皆有顯著性的下降(113)。

### **麩胱甘肽過氧化酵素(glutathione peroxidase , Gpx)**

蝦類 Gpx 在 2007 年由 Liu 等人進行選殖與鑑定，在南美白蝦與草蝦其 Gpx 蛋白分子量大小約為 20 kDa，全身性的組織如血球、鰓、心臟、肝胰臟、腸道與肌肉組織等皆有 Gpx 的基因表現，在親源關係方面蝦類 Gpx 比較近似於人類的 Gpx1 與 Gpx2，在弧菌與白點症病毒的攻毒試驗之中，Gpx 基因的表現階會有顯著性的上升，而酵素活性則是波動較大，雖有顯著性差異但真實情況還需更多的文獻報告來証實(69-70)。

### **過氧化物還原酶 (peroxiredoxin, Prx)**

蝦類的 Prx 直到 2007 年才由 Zhang 等人進行選殖與鑑定，在中國對蝦中 Prx 其開放轉譯區序列有 594 bp，蛋白質分子量大小為 22 kDa，與果蠅的蛋白質序列相似度有 72%，並全身性的組織皆有 Prx 基因的表現，在弧菌攻毒試驗中發現肝胰臟與血球中 Prx 基因的表現會有顯著性的變化，在肝胰臟中 8 hpi 其 Prx 基因的表現量會有顯著性的下降，而 37 hpi 後則會有顯著性的上升；在血球中 5 hpi 與 37 hpi 其 Prx 基因表現量會有顯著性的上升，而 14 hpi 則會有顯著性的下降(119)。對斑節蝦施打免疫刺激物 peptidoglycan 過後心臟及淋巴器官之 Prx 基因表現量會有顯著性的下降(4)；而當草蝦施打免疫刺激物 lipopolysaccharide 後肝胰臟之 Prx 基因表現量會有顯著性的上升(88)；至於感染白點症病毒的蝦體其 Prx 基因有下降的趨勢(53)。

### 硫醇氧化還原蛋白(Trx)系統

直至 2008 年在蝦類才首度有 Trx 的相關研究報告出現，其 Trx 開放轉譯區有 315 bp，蛋白質分子量大小為 12 kDa，其基因並不具有入核訊號，並且含有四個 Cysteine，其中兩個 Cysteine 為在所有物種具有高度保守性的 CxxC motif (-Cys<sup>32</sup>-X-X-Cys<sup>35</sup>-)，並且在全身各器官都可以測得 Trx 的基因表現而主要在鰓、肝胰臟與泳足有高量表現(1,90)，但令人意外的是，不論對蝦體進行缺氧或是缺氧後復氧的處理，在鰓組織中的 Trx 其基因表現皆沒有達到顯著性的差異(1)，

### 穀氧還蛋白(Grx)系統

要分析 Grx 系統中 GSH 或 GSSG 基因特性是一件困難的事，因為 GSH 是由三個胺基酸所組成，幾乎不太可能用分生技術(如 RT-PCR 或是 Western Blot)對其基因/蛋白的表現量做測定，大部份的研究者目前仍是就市售的 GSH 活性測定試劑組對 GSH 進行量測，在蝦類研究當中，針對 GSH/GSSG/GR/Grx 此系統之文獻報告相較之下仍非常稀少，一般認為 GSH 會對各種不同的逆境壓力(Stress)作出反應，在對長臂蝦(*Palaeomonetes pugio*)進行不同的處理試驗發現到，高濃度金屬離子氯化鎘(Cadmium chloride)、高溫(30°C)、養殖環境中含有不同濃度的原油或柴油(Bunker or Diesel Fuel)與養殖環境中含有不同濃度的除草劑(Atrazine)處理後，皆會造成 GSH 活性會有顯著性的上升(24)，在 2012 年我們等人以 LC/MS/MS 的分析法測定 GSH/GSSG 的比值，指出當蝦體感染白點症病毒過後，在 24 hpi 時 GSH/GSSG 比值相較控制組而言有上升的趨勢，48 hpi 時則會有顯著性的下降(44)。這些研究報告代表逆境壓力會使正常蝦體的抗氧化系統啟動，造成抗氧化活性上升進而抵抗氧化壓力。

#### 4. 蝦類與氧化壓力之關聯性 (Aquatic animals and oxidative stress)

對生物體而言，各種逆境(Stress)的環境即往往會伴隨著不同的氧化壓力產生，對於不同的水生生物而言，共通的環境逆境約可區成為溫度、水中含氧量、鹽度、pH 質等，這些分別論述如下。

##### 溫度

溫度對於所有的水生生物而言都是一個重要的環境因子，不論溫度的升高或是降低對於許多的水生生物皆會造成氧化壓力，就熱力學而言溫度的升高會加速各種代謝的反應，理論上會造成副產物—ROS 的累積；溫度對於青蛙(5)、魚(76)、貝類(107)以及蟹類(80)等皆會造成氧化壓力；而當將蝦類養殖溫度從 15°C 急速升高至 28°C 時，讓蝦體受急性熱刺激(acute heat stress)的處理後，逆境指標(stress marker)之一的熱刺激蛋白(heat shock protein, HSP)--HSP60 與 HSP70 其基因與蛋白質表現量會有顯著性的上升之外，蝦體內各抗氧化蛋白(SOD, Catalase, GPx 與 GST)其基因表現量亦會有顯著性的上升 (122)。雖然降低溫度可能會減少氧化壓力的產生，但也有研究指出溫度的降低亦會對生物體造成氧化壓力(74,84)，對蝦類而言若將養殖水溫溫度從 25°C 急遽降低至 12°C，蝦血球內 ROS 的測量數值在處理後 3 小時與 6 小時會有顯著性的升高，並會造成 DNA 的損傷與脂膜滲透壓的降低(87)。

##### 水中含氧量

水中含氧量的濃度為造成氧化壓力的主要因素之一，在缺氧環境 (1 mg O<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup>) 的情況下處理 24 小時後，蝦體中的總血球數量(total haemocyte count)會有明顯的降低之外，血球中的透明球(hyaline cell)及半顆粒球(semi-granular cell)數量也會有顯著性的降低；此外，對於凝血系統(prophenoloxidase system)的酵素活性也會減弱，而對蝦體進行弧菌(*Vibrio alginolyticus* or *Vibrio parahaemolyticus*)

的攻毒試驗當中，在缺氧的條件下對弧菌的死亡耐受性明顯的會降低(60,79)，由這些試驗結果可以推論出缺氧可能會造成蝦體的免疫機制下降，進而造成對外來入侵物抵抗性的降低。而若當經過缺氧處理(1 mg O<sub>2</sub>/L)的蝦體、再以覆氧(Reoxygenation)處理後，在蝦體的肌肉及肝胰臟的組織皆觀測到超氧陰離子的含量有顯著性的上升以及抗氧化酵素活性的下降，並且在肌肉組織中還可以測量到脂質氧化的比例降低(118)，而在此篇報告當中值得注意的是，此缺氧條件的處理或是缺氧後的覆氧並不會造成鰓組織當中有 ROS 升高或是抗氧化酵素的活性上升，作者推論是鰓組織對於含氧量的變動有較高的耐受能力，但是肌肉或肝胰臟所增加的 ROS 可能會在不同的組織之間傳遞並對不同組織造成損傷。

## 鹽度

一般而言蝦類對水質鹽度的耐受性較為廣泛，幼蝦或成蝦對於高/低滲透壓(hyper/hypo-osmoregulators)皆具有較高的容忍度(13)，但不同濃度的鹽度緊迫試驗(salinity stress test)一直是測試蝦苗健康與否的方法之一，在 PL1 之幼蝦以 10 ppt 鹽濃度浸泡處理 2 小時的情況下即達到過半致死劑量(2,96)，而不論在急性高鹽(從 30 ppt 至 50 ppt)或是急性低鹽(從 30 ppt 至 5 ppt)處理的情況下，SOD 與 GPx 的酵素活性會有顯著性的下降(71)，雖然在本篇報告當中 Liu 等人亦有測量 Catalase 與 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 的酵素活性，但不論在急性高/低鹽的條件處理下，皆沒有達到統計上的顯著差異，但由 SOD 與 GPx 有明顯變動的結果來看，還是暗示了雖然蝦類為廣鹽性的水生生物，但在環境因子--鹽度快速且劇烈改變的情況下，蝦體內仍會有 ROS 的堆積。

## pH 質

相較於中性(pH=7.5-7.7)的環境下，在酸性(pH=4.6 - 5.0)與鹼性(pH=9.0-9.5)的環境之中蝦體內總血球數量皆會有顯著性的下降(17)，而當蝦子處於鹼性環



境下 12 小時後，在血淋巴液中 GST 的酵素活性會有顯著性的下降，但在肝胰臟與鰓當中並不會有異常的變動；而在酸性環境 12 小時後，在肝胰臟與鰓中 GST 的酵素活性則會有顯著性的上升，但血淋巴液中 GST 的酵素活性卻不會有異常的變動(123)。



## 5 蝦白點症病毒

對於所有的蝦類而言蝦白點症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是一個危害相當巨大的病毒，它具有雙股 DNA，外套膜蛋白，並有尾狀突起的構型，其基因體大小約為 300 kbp，有 532 個長度大於 60 個胺基酸的開放轉譯區(open reading frame, ORF) (16,108)。宿主範圍極為廣泛，所有的甲殼類生物皆會感染白點症病毒(72-73)，而白點症病毒超過 90 % 的 ORFs 皆與目前已知的蛋白毫無相似之處(65)，也因白點症病毒這種獨特的特性，國際病毒分類學會 ICTV 於 2004 年正式讓白點症病毒在分類學上單獨自成一科(*Nimaviridae*)與屬(*Whispovirus*) (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy>)。目前 WSSV 已鑑定出超過 40 個結構性蛋白(102-103)，在非結構性蛋白的部份大致上分為早/中/晚期表現基因、泛素化作用(ubiquitination)相關基因、抗細胞凋亡相關基因、DNA 擬態基因以及與複製相關基因如 viral DNA polymerase 及 RR (ribonucleotide reductase)等(65,110)；白點症病毒其宿主範圍很廣，所有的十足目與甲殼類都會受到白點症病毒的感染，其致病歷程極為快速，對蝦類蝦種(*penaeid shrimps*)感染白點症病毒後三到七天即可造成百分之百的死亡率，如此獨特的病毒但我們對其詳細的致病機制仍有太多的疑團未解 (65)。

目前在白點症病毒的感染機制的研究中，在早期除了對白點症病毒中具較高保守性之功能性基因進行鑑定之外，也發現到白點症病毒會有其獨特的對抗宿主細胞凋亡的機制(63-64)與利用 IRES (internal ribosome entry site)的轉譯機制(49)；亦發現白點症病毒高量表現蛋白 ICP11 為 DNA 擬態蛋白，會與宿主的組蛋白(histone protein)的 DNA 結合區位進行結合，形成宿主體內 DNA 的競爭性抑制作用(competitive inhibition)，並造成組蛋白無法與目標 DNA 結合，進而導致宿主 DNA 的受損以及細胞瓦解(109)；而在利用蛋白質體學技術進行白點症病毒感染前後的蛋白表現差異分析結果出可以發現，具差異性表現的蛋白主要會與粒腺體相關路徑(mitochondrial pathway)、能量產生(energy production)、核酸生成(nucleic

acid synthesis)、氧氣傳遞(oxygen carrier/transportation)、鈣離子調控(calcium homeostasis)、訊息傳導(signaling/communication)以及與類泛素蛋白質修飾(small ubiquitin-like modifier, SUMO)相關的反應(111);其中以粒腺體相關調控機制已經有初步的成果,VDAC (voltage dependent anion channel)是粒腺體外膜的主要蛋白,與粒腺體所產生的細胞凋亡有高度正相關性,除了在白點症病毒感染的蝦體中發現 VDAC 基因表現量的上升之外(111),對於 VDAC 基因靜默化的蝦體更會造成白點症病毒感染流程的延遲(112),這些皆暗示了蝦體內之粒腺體與白點症病毒的致病機轉有著密不可分的關係。

近年來也發現白點症病毒會引起蝦體產生瓦式效應(Warburg effect),瓦式效應為諾貝爾獎得主 Otto Heinrich Warburg (October 8, 1883 - August 1, 1970)所提出的理論,通常在探討癌細胞與正常細胞兩者間最主要的差別之一在於利用能量的方式不同,癌細胞有別於一般正常細胞進行的有氧呼吸,其偏好利用醱解作用(glycolysis)以取得能量(30,114);而在白點症病毒感染的蝦體中,感染早期(12 hpi)蝦體內 glucose 消耗速率會有顯著性的增加、以及在五碳醱磷酸鹽路徑(Pentose phosphate pathway)中的關鍵酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性的上升,皆透露出白點症病毒會造成蝦體代謝的異常(15)。

目前對於白點症病毒的研究已經漸漸的朝向全面化進行探討,不論是宿主-病毒之間的交互作用、或病毒本身的致病機轉方面近年來都有重大進展,另外也亦有研究者的興趣是試圖找尋出與病毒作第一線接觸的膜蛋白分子(43,100,115);也不斷的有新病毒檢疫平台出現(104)或是白點症病毒的體外試驗系統(47),這些都讓研究者們對於病毒-宿主之間這場永無止盡的鬥爭提供全新視野與思維,持續的發現生物學上的新知識。

## 参考文献

1. Aispuro-Hernandez E, Garcia-Orozco KD, Muhlia-Almazan A, Del-Toro-Sanchez L, Robles-Sanchez RM, Hernandez J, Gonzalez-Aguilar G, Yepiz-Plascencia G, Sotelo-Mundo RR. Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 148: 94-9, 2008.
2. Alvarez AL, Racotta IS, Arjona O, Palacios E. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 237: 237-249, 2004.
3. Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *Journal of Biological Chemistry* 272: 30780-30786, 1997.
4. Bacano Maningas MB, Koyama T, Kondo H, Hirono I, Aoki T. A peroxiredoxin from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, inhibited by peptidoglycan. *Dev Comp Immunol* 32: 198-203, 2008.
5. Bagnyukova TV, Storey KB, Lushchak VI. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology* 28: 21-28, 2003.
6. Bardwell JC. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* 14: 199-205, 1994.
7. Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425: 980-4, 2003.
8. Bordo D, Djinnovic K, Bolognesi M. Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol* 238: 366-86, 1994.
9. Brouwer M, Brouwer TH, Grater W, Enghild JJ, Thogersen IB. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochemistry* 36: 13381-8, 1997.
10. Brouwer M, Hoexum Brouwer T, Grater W, Brown-Peterson N. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem J* 374: 219-28, 2003.
11. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58: 79-110, 1989.
12. Campa-Cordova AI, Hernandez-Saavedra NY, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133: 557-65, 2002.
13. Castille FL, Lawrence AL. The Effect of Salinity on the Osmotic, Sodium and Chloride Concentrations in the Hemolymph of Euryhaline Shrimp of the Genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 68: 75-80, 1981.
  14. Chang TC, Chang MJ, Hsueh S. Glutathione concentration and distribution in cervical cancers and adjacent normal tissues. *Gynecol Obstet Invest* 36: 52-5, 1993.
  15. Chen IT, Aoki T, Huang YT, Hirono I, Chen TC, Huang JY, Chang GD, Lo CF, Wang HC. White Spot Syndrome Virus Induces Metabolic Changes Resembling the Warburg Effect in Shrimp Hemocytes in the Early Stage of Infection. *Journal of Virology* 85: 12919-12928, 2011.
  16. Chen LL, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, Kou GH. 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, 2002.
  17. Cheng W, Chen JC. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 387-391, 2000.
  18. Cheng W, Tung YH, Liu CH, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 20: 438-49, 2006.
  19. Chu FF. The Human Glutathione-Peroxidase Genes Gpx2, Gpx3, and Gpx4 Map to Chromosome-14, Chromosome-5, and Chromosome-19, Respectively. *Cytogenetics and Cell Genetics* 66: 96-98, 1994.
  20. Chu FF, Esworthy RS, Ho YS, Bermeister M, Swiderek K, Elliott RW. Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomedical and Environmental Sciences* 10: 156-162, 1997.
  21. Cotgreave IA, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Lind C. S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Methods Enzymol* 348: 175-82, 2002.
  22. Dizdaroglu M, Gajewski E, Reddy P, Margolis SA. Structure of a Hydroxyl Radical Induced DNA Protein Cross-Link Involving Thymine and Tyrosine in Nucleohistone. *Biochemistry* 28: 3625-3628, 1989.
  23. Dowell FJ, Hamilton CA, McMurray J, Reid JL. Effects of a xanthine

- oxidase/hypoxanthine free radical and reactive oxygen species generating system on endothelial function in New Zealand white rabbit aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 792-7, 1993.
24. Downs CA, Fauth JE, Woodley CM. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar Biotechnol (NY)* 3: 380-97, 2001.
  25. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med* 40: 1889-99, 2006.
  26. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65: 899-910, 1894.
  27. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201: 1203-9, 1998.
  28. Fujii T, Endo T, Fujii J, Taniguchi N. Differential expression of glutathione reductase and cytosolic glutathione peroxidase, GPX1, in developing rat lungs and kidneys. *Free Radical Research* 36: 1041-1049, 2002.
  29. Garcia-Triana A, Zenteno-Savin T, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Dev Comp Immunol* 34: 1230-5, 2010.
  30. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4: 891-899, 2004.
  31. Godeas C, Sandri G, Panfili E. Distribution of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione-Peroxidase (Phgpx) in Rat Testis Mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1191: 147-150, 1994.
  32. Gomez-Anduro GA, Ascencio-Valle F, Peregrino-Uriarte AB, Campa-Cordova A, Yepiz-Plascencia G. Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* are differentially expressed in response to lipopolysaccharides, white spot virus and during ontogeny. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 162: 120-5, 2012.
  33. Gomez-Anduro GA, Barillas-Mury CV, Peregrino-Uriarte AB, Gupta L, Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Yepiz-Plascencia G. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev Comp Immunol* 30: 893-900, 2006.
  34. Goncalves-Soares D, Zanette J, Yunes JS, Yepiz-Plascencia GM, Bainy AC. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa*

- strain. *Marine Environmental Research* 75: 54-61, 2012.
35. Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28: 1349-61, 2000.
  36. Green DE. The reduction potentials of cysteine, glutathione and glycylcysteine. *Biochem J* 27: 678-89, 1933.
  37. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12, 1998.
  38. Greetham D, Vickerstaff J, Shenton D, Perrone GG, Dawes IW, Grant CM. Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bmc Biochemistry* 11, 2010.
  39. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-4, 1994.
  40. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C. . Free radicals in Biology and Medicine. *New York: Oxford Univ. Press.*, 1999.
  41. Hill BG, Bhatnagar A. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. *IUBMB Life* 59: 21-6, 2007.
  42. Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627-32, 1979.
  43. Huang HT, Leu JH, Huang PY, Chen LL. A putative cell surface receptor for white spot syndrome virus is a member of a transporter superfamily. *PLoS ONE* 7: e33216, 2012.
  44. Huang JY, Liu WJ, Wang HC, Lee DY, Leu JH, Tsai MH, Kang ST, Chen IT, Kou GH, Chang GD, Lo CF. *Penaeus monodon* Thioredoxin Restores the DNA Binding Activity of Oxidized White Spot Syndrome Virus IE1. *Antioxid Redox Signal*, 2012.
  45. Jakob U, Muse W, Eser M, Bardwell JC. Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96: 341-52, 1999.
  46. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys* 210: 505-16, 1981.
  47. Jose S, Jayesh P, Sudheer NS, Poulouse G, Mohandas A, Philip R, Singh ISB. Lymphoid organ cell culture system from *Penaeus monodon* (Fabricius) as a platform for white spot syndrome virus and shrimp immune-related gene expression. *Journal of Fish Diseases* 35: 321-334, 2012.
  48. Kang JG, Paget MS, Seok YJ, Hahn MY, Bae JB, Hahn JS, Kleanthous C, Buttner MJ, Roe JH. RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J* 18: 4292-8, 1999.
  49. Kang ST, Leu JH, Wang HC, Chen LL, Kou GH, Lo CF. Polycistronic mRNAs and

- internal ribosome entry site elements (IRES) are widely used by white spot syndrome virus (WSSV) structural protein genes. *Virology* 387: 353-363, 2009.
50. Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, Schnewly S, Schirmer R, Becker K. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291: 643-6, 2001.
  51. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4343-7, 1984.
  52. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 274: 13908-14, 1999.
  53. Kiruthiga C, Rajesh S, Rashika V, Priya R, Narayanan RB. Molecular cloning, expression analysis and characterization of peroxiredoxin during WSSV infection in shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *J Invertebr Pathol* 109: 52-8, 2012.
  54. Koharyova M, Kolarova M. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys* 27: 71-84, 2008.
  55. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep* 6: 229-34, 2001.
  56. Kristal BS, Chen J, Yu BP. Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species. *Free Radic Biol Med* 16: 323-9, 1994.
  57. Kroll JS, Langford PR, Wilks KE, Keil AD. Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology* 141 ( Pt 9): 2271-9, 1995.
  58. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264: 9880-4, 1989.
  59. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. *J Biol Chem* 239: 3436-44, 1964.
  60. Le Moullac G, Soyeux C, Saulnier D, Ansquer D, Avarre JC, Levy P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 621-629, 1998.
  61. Leichert LI, Jakob U. Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* 2: e333, 2004.
  62. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J* 22: 5501-10, 2003.
  63. Leu JH, Chen LL, Lin YR, Kou GH, Lo CF. Molecular mechanism of the



- interactions between white spot syndrome virus anti-apoptosis protein AAP-1 (WSSV449) and shrimp effector caspase. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 1068-1074, 2010.
64. Leu JH, Wang HC, Kou GH, Lo CF. Penaeus monodon caspase is targeted by a white spot syndrome virus anti-apoptosis protein. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 476-486, 2008.
  65. Leu JH, Yang F, Zhang X, Xu X, Kou GH, Lo CF. Whispovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 328: 197-227, 2009.
  66. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32: 790-6, 2002.
  67. Lin YC, Lee FF, Wu CL, Chen JC. Molecular cloning and characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMnSOD) and mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 28: 143-50, 2010.
  68. Linke K, Jakob U. Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxid Redox Signal* 5: 425-34, 2003.
  69. Liu CH, Tseng MC, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol* 23: 34-45, 2007.
  70. Liu KF, Yeh MS, Kou GH, Cheng W, Lo CF. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Dev Comp Immunol* 34: 935-44, 2010.
  71. Liu Y, Wang WN, Wang AL, Wang JM, Sun RY. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture* 265: 351-358, 2007.
  72. Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH, Hsu HC, Chiu YL, Chang CF, Liu KF, Su MS, Wang CH, Kou GH. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 215-225, 1996.
  73. Lo CF, Kou GH. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. *Fish Pathology* 33: 365-371, 1998.
  74. Malek RL, Sajadi H, Abraham J, Grundy MA, Gerhard GS. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 138: 363-373, 2004.

75. Margolis SA, Coxon B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Structure of a Hydroxyl Radical Induced Cross-Link of Thymine and Tyrosine. *Biochemistry* 27: 6353-6359, 1988.
76. Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 75-88, 2005.
77. Mccord JM, Fridovic.I. Superoxide Dismutase an Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-8, 1969.
78. Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* 43: 335-67, 2009.
79. Mikulski CM, Burnett LE, Burnett KG. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Shellfish Research* 19: 301-311, 2000.
80. Moresino RDH, Helbling EW. Combined Effects of UVR and Temperature on the Survival of Crab Larvae (Zoea I) from Patagonia: The Role of UV-Absorbing Compounds. *Marine Drugs* 8: 1681-1698, 2010.
81. Munday R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic Biol Med* 7: 659-73, 1989.
82. Neale TJ, Kerjaschki D, Witztum J, Davis P, Ruge B. Reactive Oxygen Species (Ros) and Lipid-Peroxidation (Lpo) in Proteinuric Experimental Renal-Disease. *Kidney International* 46: 926-926, 1994.
83. Neves CA, Santos EA, Bainy AC. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis Aquat Organ* 39: 155-8, 2000.
84. Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta AG. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 52: 13-26, 2001.
85. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-312, 2001.
86. Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-91, 2001.
87. Qiu J, Wang WN, Wang LJ, Liu YF, Wang AL. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 154: 36-41, 2011.

88. Qiu L, Ma Z, Jiang S, Wang W, Zhou F, Huang J, Li J, Yang Q. Molecular cloning and mRNA expression of peroxiredoxin gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mol Biol Rep* 37: 2821-7, 2010.
89. Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* 15: 3892-903, 1995.
90. Ren Q, Zhang RR, Zhao XF, Wang JX. A thioredoxin response to the WSSV challenge on the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151: 92-8, 2010.
91. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 3: 1129-34, 2002.
92. Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J Exp Bot* 59: 3781-801, 2008.
93. Romantsev FE, Prozorovskii VN, Andrianova LE. [Isolation from *Micrococcus* sp. n. of a homogeneous heme-containing catalase and a crystalline protein with catalase activity]. *Biokhimiia* 48: 2023-7, 1983.
94. Roos G, Messens J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med* 51: 314-26, 2011.
95. Ruddock LW, Klappa P. Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch. *Curr Biol* 9: R400-2, 1999.
96. Samocha TM, Guajardo H, Lawrence AL, Castille FL, Speed M, McKee DA, Page KI. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 165: 233-242, 1998.
97. Schwaab V, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. GPx3: The plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. *Molecular Reproduction and Development* 51: 362-372, 1998.
98. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-9, 1993.
99. Sies H, Menck CFM. Singlet Oxygen Induced DNA Damage. *Mutation Research* 275: 367-375, 1992.
100. Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, Flegel TW. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology* 80: 10734-10742, 2006.
101. Tavares-Sanchez OL, Gomez-Anduro GA, Felipe-Ortega X, Islas-Osuna MA, Sotelo-Mundo RR, Barillas-Mury C, Yepiz-Plascencia G. Catalase from the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138: 331-7, 2004.
102. Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Hsiao HH, Wang AHJ, Kou GH, Lo CF. Genomic and

- proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 78: 11360-11370, 2004.
103. Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Wang AHJ, Zhuang Y, Walker PJ, Kou GH, Lo CF. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology* 80: 3021-3029, 2006.
  104. Tsai YL, Lin YC, Chou PH, Teng PH, Lee PY. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions. *J Virol Methods* 181: 134-7, 2012.
  105. Tsuji T, Watanabe Y, Katoh H, Sato K, Kunieda T. Cloning and mapping of the mouse Gpx2 gene encoding gastrointestinal glutathione peroxidase. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 651-654, 1998.
  106. Ursini F, Maiorino M, Brigeliusflohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of Glutathione Peroxidases. *Biothiols, Pt B* 252: 38-53, 1995.
  107. Verlecar XN, Jena KB, Chainy GB. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem Biol Interact* 167: 219-26, 2007.
  108. Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 239-242, 1995.
  109. Wang HC, Ko TP, Lee YM, Leu JH, Ho CH, Huang WP, Lo CF, Wang AH. White spot syndrome virus protein ICP11: A histone-binding DNA mimic that disrupts nucleosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20758-63, 2008.
  110. Wang HC, Wang HC, Ko TP, Lee YM, Leu JH, Ho CH, Huang WP, Lo CF, Wang AHJ. White spot syndrome virus protein ICP11: A histone-binding DNA mimic that disrupts nucleosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20758-20763, 2008.
  111. Wang HC, Wang HC, Leu JH, Kou GH, Wang AHJ, Lo CF. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 672-686, 2007.
  112. Wang KCHC, Kondo H, Hirono I, Aoki T. The *Marsupenaeus japonicus* voltage-dependent anion channel (MjVDAC) protein is involved in white spot syndrome virus (WSSV) pathogenesis. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 94-103, 2010.
  113. Wang WN, Li BS, Liu JJ, Shi L, Alam MJ, Su SJ, Wu J, Wang L, Wang AL. The respiratory burst activity and expression of catalase in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during long-term exposure to pH stress. *Ecotoxicology*,

- 2012.
114. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-14, 1956.
  115. Watthanasurorot A, Jiravanichpaisal P, Soderhall I, Soderhall K. A gC1qR prevents white spot syndrome virus replication in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Virol* 84: 10844-51, 2010.
  116. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 7: 53-8, 2000.
  117. Yost FJ, Jr., Fridovich I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 248: 4905-8, 1973.
  118. Zenteno-Savin T, Saldierna R, Ahuejote-Sandoval M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 142: 301-308, 2006.
  119. Zhang Q, Li F, Zhang J, Wang B, Gao H, Huang B, Jiang H, Xiang J. Molecular cloning, expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein. *Mol Immunol* 44: 3501-9, 2007.
  120. Zhang Q, Li F, Zhang X, Dong B, Zhang J, Xie Y, Xiang J. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 24: 584-91, 2008.
  121. Zheng M, Aslund F, Storz G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-21, 1998.
  122. Zhou J, Wang L, Xin Y, Wang WN, He WY, Wang AL, Liu YA. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology* 35: 284-289, 2010.
  123. Zhou J, Wang WN, Wang AL, He WY, Zhou QT, Liu Y, Xu J. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 150: 224-230, 2009.

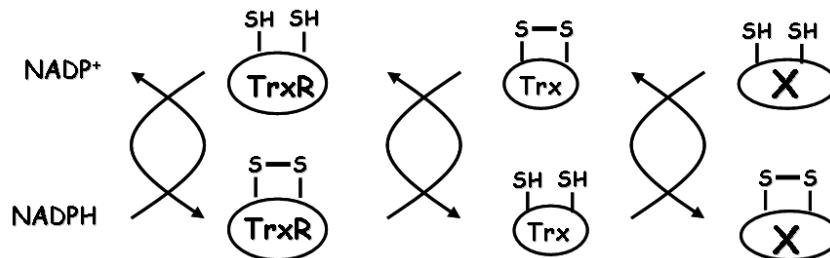
## 第二章 草蝦硫醇氧化還原蛋白與蝦白點症病毒極早期表現蛋白 IE1 蛋白質交互作用之機制研究

### 一、文獻探討

#### 1. 硫醇氧化還原蛋白(Thioredoxin)

##### 1.1 硫醇氧化還原蛋白基本特性簡介

硫醇氧化還原蛋白 (thioredoxin, 簡稱 Trx) 為體內普遍存在 (ubiquitous) 的一種蛋白質，從原核生物 (prokaryotic) 至真核生物 (eukaryotic) 體內皆有 Trx 的存在，最早由 Laurent 等人在 1964 年於大腸桿菌體內分離並鑑定出 Trx 的功能(31)，而在哺乳類動物中 Trx 開放讀碼區 (open reading frame, ORF) 可轉譯出 105 個胺基酸，分子量約為 12 kDa。Trx 家族蛋白皆擁有一高度保守性的催化區域 (catalytic site) -Cys<sup>32</sup>-Gly-Pro-Cys<sup>35</sup>-，當催化區域的兩個半胱氨酸(Cysteine, Cys) 形成胱氨酸間雙硫鍵鍵結 (Cystine disulfide bonding; Trx-S<sub>2</sub>) 時，稱為氧化態的構型 (Oxidative form)；而硫醇氧化還原蛋白還原酶 (Thioredoxin Reductase, TrxR) 在 NADPH 的存在下時，可將氧化態還原為具有雙硫醇之半胱氨酸，並轉換為還原態的 Trx (Reduced form; Trx-(SH)<sub>2</sub>)。Trx 參與生物體內許多硫氧的氧化還原反應，利用雙硫醇 (dithiol) 中的氫離子對目標蛋白質中的雙硫鍵 (disulfide bond) 進行氧化還原反應(25)，其反應式如下：



TrxR : Thioredoxin Reductase, Trx : Thioredoxin, X : Target protein

##### 1.2 硫醇氧化還原蛋白與轉錄因子之調控關係

轉錄因子 (transcription factor) 與目標基因啟動子 (promoter) 區域結合的能力 (DNA binding activity) 會影響基因的表現與否，再者反應環境中的還原狀態 (Reducing condition) 對許多轉錄因子而言扮演著維持其可與 DNA 結合的關鍵角色，當轉錄因子處於還原態的情況下可以維持其活性，反之，若處在氧化態情況下即會失去與 DNA 結合的能力。目前已知 Trx 會與一些轉錄因子的氧化還原態之調控具有高度相關性，如 Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 蛋白活性即受 Trx 所調控，當 NF- $\kappa$ B 進入細胞核內，Trx 會使 NF- $\kappa$ B 之 p50 次單元(subunit) 還原或保持還原態，進而使 NF- $\kappa$ B 具有與 DNA 結合的能力(52)。此外，Trx 會與還原因子 (redox factor-1, Ref-1) 結合之後共同調控與促進轉錄因子 AP-1 (activating protein-1) 與 DNA 結合的能力(22)。根據 Huang 等人之體外 (*in vitro*) 試驗中，加入硫醇氧化劑 Diamide 或雙氧水 ( $H_2O_2$ ) 會使促進轉錄因子 AP-2 (activating protein-2) 變成氧化態並抑制其與 DNA 結合的能力，然而加入 Trx 可以使經氧化劑處理後的 AP-2 恢復為還原態 (restoration)，使 AP-2 重獲與 DNA 結合之能力(28)。Trx 除了可使在氧化還境中失去與 DNA 結合能力的腎上腺糖皮質激素接受體(glucocorticoid receptor, GR) 再次恢復活性，並且根據體外試驗之結果發現經過 Diamide 的處理之下更能增強 Trx 與 GR 直接的蛋白交互作用 (protein direct association)(49)。

## 2. 病毒感染與硫氧還原蛋白之相關性

研究顯示 Trx 與某些病毒感染具有相關性，例如在感染 HIV 的患者中，因感染病毒造成體內氧化壓力(Oxidative stress)的升高會造成氧化還原平衡失調，在感染 HIV 數週內的急性感染時期 (acute phase)，患者體內原本在淋巴結組織中高表現量的 Trx 表現量會大幅降低(51)；但在 HIV 感染末期，HIV 會誘

導 Trx 的表現，導致患者血漿中 Trx 的含量有顯著性的上升(54)；在受到 C 型肝炎病毒感染的患者血漿中 Trx 蛋白的表現量亦會有顯著性的升高(63)。在細胞株實驗模式中，當受到第一型親人類 T 細胞病毒(human T-lymphotropic virus type I, HTLV-1) HTLV-1、或第四型人類疱疹病毒(human herpesvirus 4, HH4; 又稱 Epstein-Barr virus, EBV) 或人類乳突病毒(human papillomavirus, HPV) 感染時，內源性(endogenous) Trx 蛋白表現量皆會有顯著性的上升(13,61,64)。HTLV-1 具有一轉活化因子(transactivator)--Tax 蛋白，是調控 HTLV-1 基因表現與否之重要的病毒轉錄因子，將 Tax 基因轉染(transfection) 至細胞株中，使其過量表現(over expression) Tax 蛋白時，會造成內源性的 Trx 表現量有顯著性的上升，目前也已証實 Tax 蛋白可啟動 Trx 基因的表現，可視為 Trx 之轉錄因子(59)。在受到第一型單純疱疹病毒 (Type I Herpes Simple Virus, HSV-1) 感染的細胞株中，細胞內源性的 Trx 對 HSV 為氫離子的提供者 (Hydrogen Donor)，提供 HSV 之核糖核苷酸還原酶(ribonucleotide reductase) 所需的氫離子並參與 HSV 本身去氧核糖核苷酸 (Deoxyribonucleotides) 之合成(8)。

### 3. 簡介蝦白點症病毒

蝦白點症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)為大型桿狀(rod-shape)之雙股 DNA 病毒，具有外套膜(envelope) 在其顆粒一端具有似尾狀突起物(tail-like projection)，其基因組全長約為 292 至 307 kb，目前國際病毒分類學會(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)已正式將蝦白點症病毒規類於 *Nimaviridae* 科、*Whispovirus* 屬(35)。雖然白點症病毒基因組全長已經解序完成許久，但對於白點症病毒本身不同的開放轉譯區之蛋白的功能所知還是非常的有限，以台灣分離株為例(GeneBank accession number : AF440570)，在五百多個開放轉譯區中只有不到 6%的開放轉譯區在 NCBI 內



有同源性的基因，在病毒之非結構蛋白層次上，其含有核糖核酸還原酶(ribonucleotide reductase, RR)(68)、胸腺磷酸激酶(thymidylate kinase, TMK)(69)、DNA 聚合酶(DNA polymerase)(7)等；而於 2005 年由 Liu 等人鑑定出三個白點症病毒之極早期表現基因 *ie1*、*ie2* 及 *ie3*(44)，並在後續的研究中發現蝦轉錄因子 STAT(signal transducer and activator of transcription, STAT)可與白點症病毒 *ie1* 啟動子區域(promoter region)結合且使下游基因表現之外(42)，*ie1* 也是病毒本身的一轉錄因子，具有 DNA 結合區位 (DNA binding domain)、轉活化區位(transactivation domain)與可自發性的形成雙單元(dimerization)等轉錄因子的特性與功能(46)，並且可以與蝦體內的 TATA box 結合蛋白產生蛋白交互作用(40)，但 *ie1* 其所調控下游的目標基因為何與自身是如何被調控等的機制仍有待更多的相關研究來証實。

#### 4. 蝦硫氧還原蛋白在蝦類研究之現況

Trx 蛋白於無脊椎動物中的研究相較於脊椎動物而言少很多，在蝦類中僅有南美白蝦(*L. vannamei*)及中國對蝦(*F. chinensis*) 之 Trx 序列分別被發表於 2008 年與 2010 年(2,57)。蝦類 Trx 之開放轉譯區可轉譯出 105 個胺基酸，分子量大約為 12kDa，並一樣具有高度保留性的氧化還原活性區域 Cys<sup>32</sup>-Gly-Pro-Cys<sup>35</sup>，利用大腸桿菌系統表現 Trx 重組蛋白時，其蛋白也具有高度的還原活性。在組織分佈表現量方面，蝦體的血球、心臟、肝臟腺、鰓、胃、腸道、泳足及肌肉皆可偵測到 Trx 的轉錄表現，其中鰓跟泳足是具有較高表現量的組織。值得注意的是，當蝦體受到缺氧處理(Hypoxia)及缺氧後覆氧處理(Re-oxygenated)過後，Trx 基因表現量的變化相較於常氧處理組(Normaixa)而言並沒有達到統計上的顯著差異(2)；當蝦類所處的環境中 pH 值改變時，會導致蝦體遭受氧化逆境的壓力(Oxidative stress)，則 Trx 之 mRNA 表現量會有上升的反應。在病毒感染方面，當白蝦受到白點症病毒感染後，

鰓部的 Trx 其 mRNA 表現量會有上升的趨勢，但在肝胰腺中其 Trx 之基因表現量在病毒感染早期會有下降的趨勢(14,57)，而在轉譯層次(translation level)中，當白蝦感染白點症病毒後在鰓部的 Trx 蛋白表現量有上升的趨勢(57)。在 Leu 等人於 2007 年的研究顯示，以感染白點症病毒之草蝦後尾幼蟲(postlarvae) 構築 cDNA library 後的分析結果顯示草蝦 Trx 表現量亦有顯著性的上升(32)。



## 二、研究動機及前驅試驗結果

Trx 本身是一多功能性的蛋白質，當其在細胞外可作為促細胞生長因子卻也會幫助腫瘤細胞的生長，進而有抑制 Trx 之抗癌藥物的出現；Trx 在細胞中為重要抗氧化蛋白、可以清除體內過多的自由基，對無脊椎動物而言這些自由基物質可以幫助宿主攻擊外來入侵的病菌，但因感染疾病而昇高的自由基卻同時又會因 Trx 的升高而清除過多的自由基。Trx 雖然已經被發現長達 40 多年，但對其所扮演亦敵亦友的角色屬性歸類一直有其爭議，故草蝦 Trx 在白點症病毒感染的過程當中可能扮演什麼樣的角色是我們極欲證明的。依據前述文獻回顧我們可以得知，Trx 的研究在蝦類當中僅為剛起步的階段，目前大多針對 Trx 進行了定性方面（組織表現量分佈、病毒感染後表現量的變化與缺氧處理後基因表現量的變化）的研究分析，在功能分析方面僅確認了蝦類 Trx 也與其它物種之 Trx 一樣是具有高度還原性的一種硫醇氧化還原蛋白。我們最初從本實驗室先前所建構的感染白點症病毒與未感染白點症病毒之草蝦後尾幼蟲 (postlarvae) EST library 進行分析，發現到草蝦後尾幼蟲在感染白點症病毒過後 Trx 表現量有顯著性的上升。為了更加確認草蝦 Trx 與白點症病毒感染關係，先行產製出了草蝦 cDNA 微陣列晶片，用來觀測草蝦感染白點症病毒過後的基因變化，佐以即時定量核酸聚合酶鏈鎖反應進行分析，並同時進行草蝦 Trx 抗體的產製供後續實驗所需，從中試圖找尋出在白點症病毒感染草蝦的過程當中，草蝦 Trx 所可能扮演的角色。

### 三、研究方法：

#### 1 白點症病毒液之製備及人工注射感染試驗

將 1994 年嚴重感染白點症病毒之病蝦體樣本取出，取其頭胸甲之表皮，秤其重量，每克組織加入 0.9% 9 ml NaCl 溶液研磨，將此溶液以 1000 g 離心 10 分鐘，取上清液並以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，再以 0.9% NaCl 稀釋 10 倍，以此病毒液人工注射感染無帶原之草蝦，每 10 克重注射約 50  $\mu\text{l}$  之稀釋病毒液，在人工感染後 72 小時，抽取嚴重感染草蝦之血淋巴液，以生理緩衝液 (PBS) 5 倍稀釋後，分裝於離心管中，並置於  $-80^{\circ}\text{C}$  保存之，此血淋巴液即為日後人工感染之病毒液原液。本實驗所選用之草蝦來自於東港水產試驗所，選取平均體重約為 30-40 g 之草蝦以進行人工感染試驗。將嚴重感染草蝦之血淋巴液自  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱取出，以 PBS 稀釋 100 倍，此即為人工感染試驗之病毒液，將此病毒液 200  $\mu\text{l}$  注射到第四及第五體節之肌肉部位以進行人工感染，對照組則注射 PBS，之後收取不同時間點之蝦體組織 (0 [未感染]、6、24 及 48 hpi., hours post infection)，並存於液態氮中保存之。

#### 2 蝦微陣列晶片之點製

依 Leu 等人所建構的草蝦 EST library 進行草蝦基因的挑選(33)，共挑選出 3988 個獨特的 contigs 進行晶片的點製；另外在此微陣列晶片上亦有其它但在本論文中並沒有使用的基因如下：依照 Tassanakajon 等人利用不同草蝦組織所建構的 EST library 挑選出 735 個不與前述有重覆的草蝦基因進行點製(65)，並也將白點症病毒(Genbank accession number AF440570)其 526 個預測的開放轉譯區與黃頭症病毒(Genbank accession number EU487200)。選定的基因利用 PCR 核酸擴增的技術獲得目標基因的 amplicon，每一 amplicon 單獨進行純化回收後至少三重覆點製於已經 coating poly-L-lysine 的玻璃片上 (UltraGAPS<sup>TM</sup>, Corning)，點製好的晶片置於電子防潮箱中收存。

### 3 RNA 萃取與 Cy3/Cy5 螢光標定

將感染白點症病毒的蝦鰓組織從液態氮中取出並利用 RNeasy Midi Kit (Qiagen)進行RNA 萃取後以 TURBO DNA-free™ Kit (Ambion)之DNase 處理，以完全移除 DNA 的干擾，再進行定量與電泳觀察 RNA 的品質，28S 比上 18S 目視至少要達 1 比 1 的狀態下才能進行後續螢光標定。標定流程如下：將感染白點症病毒的樣本取 40 µg (準備標定 Cy5)、PBS 控制組取 20 µg (準備標定 Cy3)，並混入 1 µg poly (dT) 與 1 µl low T-dNTP (10 mM ATP, GTP, CTP and 4 mM dTTP in DEPC ddH<sub>2</sub>O)，以 65°C 加熱 5 分鐘後，以 Superscript III 反轉錄酶 (Invitrogen) 進行反轉錄為 cDNA 的同時混入 1 mM 的 Cy3/C5-dUTP 進行螢光標定，總終反應體積為 20 µl，於 50°C 反應 30 分鐘、再以 70°C 反應 10 分鐘後所得產物即為 Cy3/Cy5-labeled cDNA，此產物再以 45 mM EDTA 與 0.2 M NaOH 於 65°C 反應 1 小時以水解 RNA，並在反應完成後利用 0.3 M Tris-HCl (pH7.6)進行中和，再使用 PCR 純化試劑組 (Qiagen) 與 10 kDa 的微量濃縮離心管(Millipore)進行樣本純化並將最終體積調整為 18 µl 後，即可與微陣列晶片進行雜合反應。

### 4 微陣列雜合反應與數據分析

微陣列晶片先以預雜合緩衝液(5X SSC, 0.1% SDS and 1% BSA)，以 42°C 水浴的方式作用一小時，以去離子水將晶片洗滌一次、再以 isopropanol 洗滌一次即可將晶片離心(500 ×g 兩分鐘)使其乾燥；進行雜合反應之前，先將已標定螢光的 cDNA 產物 18 µl 加入 1 µl Cot-1 DNA (1 µg)與 1 µl poly-A (30mer, 1 µg)、再以 95°C 加熱將 cDNA 維持在單股的狀態，再加入 20 µl 相同體積(50% formamide, 10X SSC and 5% SDS)的雜合反應溶液後，即可在水浴槽內以 42°C 與晶片進行隔夜(16 至 24 小時)的雜合反應；反應完成後的晶片以四種不同 SSC 濃度的 wash buffer 進行晶片的洗滌，濃度由高至低依次為 2× SSC 與 0.1%

SDS、 $1\times$  SSC 與  $0.1\%$  SDS、 $0.2\times$  SSC 以及最後一組是  $0.05\times$  SSC 進行清洗，最後將晶片離心使其乾燥後即可進行螢光數據的讀取。

利用 GenePix Personal 4100A (Axon Instrument)對晶片進行掃瞄以獲得晶片螢光量化的數值，再將原始數質以分析軟體 GeneSpring 11 software (Aligent)進行資料的處理並利用 LOWESS 法對所有數據進行校正(normalization)，並剔除量化後原始螢光數值在所有的時間點皆同時未超過 200 的基因後，即可獲得與 Trx 相關基因之微陣列分析結果。

## 5 即時定量核酸聚合酶鍊鎖反應

將保存的鰓組織取出，置入預冷之研钵以液態氮研磨均質化，加入適當 Trizol 試劑 (Invitrogen)並依照說明書進行全 RNA 的萃取，經分光光度計定量後取  $1\ \mu\text{g}$  做為模版，再加入  $4\ \mu\text{l}$  之反應緩衝液、 $2\ \mu\text{l}$  DTT ( $100\ \text{mM}$ )、 $1\ \mu\text{l}$  oligo-dT 引子 ( $50\ \text{mM}$ )、 $1\ \mu\text{l}$  之 dNTP ( $10\ \text{mM}$ )、及  $1\ \mu\text{l}$  反轉錄酶(Invitrogen)，以 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  調整體積至  $20\ \mu\text{l}$ ，於  $50^\circ\text{C}$  反應 30 分鐘、再以  $70^\circ\text{C}$  反應 10 分鐘，所得產物即為互補 DNA(complementary DNA, cDNA)，即可以 7300 Real Time PCR System (ABI)進行即時定量聚合酶鍊鎖反應，引子對為 PmTrx-QPCR-F/PmTrx-QPCR-R, 5'-TAAGCAGCTAAACGAAGCT-3' and 5'-TCGTCCACATCCACCTTCA-3'; EF-1 $\alpha$ -QPCR-F/EF-1 $\alpha$ -QPCR-R, 5'-TGCTCTGGACAACATCGAGC-3' and 5'-CGGGCACTGTTCCAATACCT-3'，後續反應步驟如下：將先前所得到的 cDNA 稀釋 20 倍後取  $2\ \mu\text{l}$  做為模版， $2\ \mu\text{l}$  正股引子 ( $3\ \text{mM}$ )、 $2\ \mu\text{l}$  負股引子 ( $3\ \text{mM}$ )、 $10\ \mu\text{l}$  SYBR 反應液 (ABI)與  $4\ \mu\text{l}$  滅菌水，反應總體積為  $20\ \mu\text{l}$ 。每個 PCR 反應皆為二重覆，反應溫度與時間如下：(1)  $50^\circ\text{C}$  反應兩分鐘；(2)  $95^\circ\text{C}$  反應 10 分鐘；(3)  $95^\circ\text{C}$  反應 15 秒；(4)  $60^\circ\text{C}$  反應 1 分鐘；(5)將步驟(3)至步驟(4)重覆 40 個循環，結果以 7300 Real Time PCR System 所附軟體分析過後，可得各 PCR 反應之  $C_T$  值，先以 EF1 $\alpha$  之  $C_T$

值與 Trx 之  $C_T$  值相減，所得數值即為  $\Delta C_T$  值，再將同一時間點之 PBS 組與白點症病毒感染組之  $\Delta C_T$  值相減，即可得到  $\Delta\Delta C_T$  值，即可利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法(47)求得各個時間對相對於 PBS 組之倍數變化，再利用 Student's t test 來檢驗實驗組與對照組是否有顯著差異，當 p 小於 0.05 時視為有顯著差異。

## 6 草蝦硫氧還原蛋白基因序列分析

將草蝦 Trx 之 cDNA 全長序列從草蝦 EST library 中調出(33)，不同物種之 Trx 胺基酸序列自 Genebank 下載，再利用 ClustalX 程式進行比對，再輔以 GeneDoc 程式進行圖像編輯，即可獲得序列排序圖譜。所使用的序列來自中國對蝦(*F. chinensis* thioredoxin, FcTrx; ACX30746)，南美白蝦 (*L. vannamei* thioredoxin LvTrx, ACA60746)，人類 (*H. sapiens* thioredoxin 1, HsTrx; AAF86466) 與果蠅 (*D. melanogaster* thioredoxin, DmTrx; 1XWA\_A)。

## 7 草蝦硫氧還原蛋白及白點症病毒 IE1 重組蛋白的純化

本實驗利用 pET28b 重組基因表現載體構築了共六株草蝦 Trx 之質體，其中一株為未突變株、另外五株為突變株，如圖七(A)所示，分別為單一點突變的 smTrx (Cys<sup>32</sup>→Ser<sup>32</sup>)、雙點突變的 dmTrx (Cys<sup>32, 35</sup>→Ser<sup>32, 35</sup>)、兩株三點突變的 tmTrx-C62S (Cys<sup>32, 35, 62</sup>→Ser<sup>32, 35, 62</sup>)與 tmTrx-C73S (Cys<sup>32, 35, 73</sup>→Ser<sup>32, 35, 73</sup>)以及四點突變的 qmTrx(Cys<sup>32, 35, 62, 73</sup>→Ser<sup>32, 35, 62, 73</sup>)，突變株所需引子如表四與表五所示，隨後將這些載體轉型於 BL21 之大腸桿菌，置於含 kanamycin 抗生素 (50 g/ml) 的 LB 培養液中，置 37°C 旋轉培養 16-18 小時，隔天將此菌液稀釋 50 倍後於 37°C 重新培養 2 小時，加入 IPTG (final 1 mM) 於 37°C 再培養 6 小時，以 3000 g 離心 5 分鐘，去上清液，再以 10 ml 緩衝液 (PBS with 10 mM imidazol) 懸浮沈澱物，將其置於冰上，利用超音波震盪器進行破菌，再以 12,000 g 離心 5 分鐘，收取上清液，加入 100  $\mu$ l 體積帶有二價鎳離子的

樹脂膠粒溶液(Quigen),於4°C搖轉2小時。以清洗液(PBS with 20 mM imidazol)重複2-3次清洗動作,最後加入含250 mM imidazol之PBS緩衝液,將附著於NTA樹脂膠粒上的重組蛋白洗下,再依後續實驗所需,以含1 mM DTT的PBS或是不含還原劑的PBS緩衝液置換溶液後即可保存於4°C,作為後續實驗所需之重組蛋白。

本實驗利用pGEX5T-1重組基因表現載體構築了六株白點症病毒IE1之質體,其中一株為正常株IE1,其於為五株共含概六個突變點位的白點症病毒IE1突變株的重組蛋白,如圖十二(A)所示,分別為單一突變點位的IE1-C55S (Cys<sup>55</sup>→Ser<sup>55</sup>)、IE1-C90S (Cys<sup>90</sup>→Ser<sup>90</sup>)、IE1-C113S (Cys<sup>113</sup>→Ser<sup>113</sup>)、IE1-C194S (Cys<sup>194</sup>→Ser<sup>194</sup>)與CXXC motif雙點位的突變株IE1-C189S-C192S (Cys<sup>189,192</sup>→Ser<sup>189,192</sup>),突變株所需引子如表四與表五所示,隨後將這些質體轉型於BL21之大腸桿菌,置於含ampicillin抗生素(50 g/ml)的LB培養液中,置37°C旋轉培養16-18小時,隔天將此菌液稀釋50倍後於37°C重新培養2小時,加入IPTG (final 1 mM)於15°C再培養16-18小時,隔天以3000 g離心5分鐘,去上清液,再以10 ml緩衝液(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 300 mM NaCl, 1 mM DTT, and 1 mM EDTA)懸浮沈澱物,再利用GST column (Amersham Biosciences)進行純化,最後以洗出溶液(50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 與10 mM reduced glutathione)將帶有GST的IE1重組蛋白洗出,並利用濃縮置換buffer為1倍的PBS,此即為帶有GST蛋白的IE1。另外可將GST移除以獲得得IE1蛋白,加入thrombin (10 U / 10 mg protein, Novogen)於22°C進行截切16小時,隔天再利用GST column以移除截切後的GST蛋白,得到的IE1蛋白以蛋白定量分析試劑(Bio-Rad)進行定量並以SDS聚丙烯醯胺膠電泳分析各重組蛋白之純度。

## 8 西方墨點法



將胃組織樣本以 1/3 倍 PBS 佐以液態氮溶液均質化後，將溶液以 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液利用 bradford assay 方法測定濃度後存放於 -20°C。取 20 µg 蛋白質加入 2 × SDS sample buffer (1 × SDS sample buffer : 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) ，以 100°C 煮 10 分鐘，進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ，之後再利用半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting) 轉印至 PVDF 膜上 (polyvinylidene difluoride membrane, Minipore)。轉印完成後，將 PVDF 膜以 3% skim milk (Difco) 於 4°C 進行 blocking 16 小時。再以稀釋 5,000 倍的兔子抗 Trx 之多元抗體血清、或稀釋 100 倍的兔子抗 IE1 之多元抗體血清、或是稀釋 5,000 倍的兔子抗 tubulin 之多元抗體血清於室溫下反應 1 小時，以 washing buffer (TBST 內含 0.5% Tween-20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再與稀釋 5,000 倍並鍵結 HRP (horseradish peroxidase) 之山羊抗兔子之多株抗體中於室溫下反應 1 小時，隨後以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Sciences) 進行呈色，並以 Fuji superRX 底片曝光後經顯影即可知反應結果。

## 9 HIS Pull down 分析試驗

此試驗是依照 Makino 等人於 1999 年的試驗方法經調整而進行(49)。步驟如下：取 0.5 µg 的 IE1 重組蛋白與 5µg 的草蝦 Trx 重組蛋白或 Trx 突變株重組蛋白，混入含有 1 mM DTT 或 1 mM diamide 200 ul 的 NPIT 反應溶液(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.005% Tween 20, pH 8.0) ，於室溫反應 30 分鐘後，加入 15 µl nickel 接合的樹脂膠粒溶液(Qiagen), 反應 5 分鐘後隨即以 NPIT 反應液清洗 5 次，每次 10 分鐘後，去除上清液，加入 15 µl 之 2 倍 SDS sample buffer，以 100°C 煮 10 分鐘，進行 SDS 聚丙烯醯胺膠

電泳，之後再利用半乾式蛋白質轉印法轉印至 PVDF 膜上。轉印完成後，將 PVDF 膜以 3% skim milk (Difco) 於 4°C 進行 blocking 16 小時。再以稀釋 200 倍的兔子抗 IE1 之多元抗體血清或是稀釋 5,000 倍的兔子抗 Trx 之多元抗體血清於室溫下反應 1 小時，以 washing buffer (TBST 與 0.5% Tween-20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再與稀釋 5,000 倍並鍵結 HRP (horseradish peroxidase) 之山羊抗兔子之多株抗體中於室溫下反應 1 小時，隨後以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Sciences) 進行呈色，並以 Fuji superRX 底片曝光後經顯影即可知反應結果。

## 10 共免疫沉澱分析

將構築好帶有 Flag 與 EGFP-V5 tag 之質體 (pdHSP70-EGFP-V5、pdHSP70-EGFP-Trx-V5、pdHSP70-Flag 與 pdHSP70-IE1-Flag) 利用轉染試劑 Effectene (Qiagen) 對昆蟲細胞 Sf9 細胞株進行共轉染，Sf9 以 Sf-900II 培養液 (Invitrogen) 培養於 27°C 的恆溫培養箱中，先在六孔細胞培養盤中接種  $8 \times 10^5$  cell/well 內待其貼平，在 100  $\mu$ l 的 EC 緩衝液中加入 0.2  $\mu$ g 的質體 DNA 與 3.2  $\mu$ l 的 Enhancer，混合後於室溫反應 5 分鐘，之後加入 10  $\mu$ l 的 Effectene，混合後室溫反應 10 分鐘，即可加入細胞培養盤，置於 27°C 培養 16-18 小時，隔天以 42°C 水浴反應 30 分中，再於 27°C 培養 6 小時，轉染作用即完成，接續利用過氧化氫處理細胞株使其造成氧化壓力，先將轉染作用完成的細胞以 1X 的 PBS 清洗一次，加入 5 mM 的過氧化氫，對照組加入 1X 的 PBS，皆置於 27°C 中培養 30 分鐘，反應即完成，隨後將培養液吸起，以 1X 的 PBS 清洗一次，以 150  $\mu$ l 溶解液溶解細胞 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl and 1% Nonidet P-40) 後，各別加入 15  $\mu$ l 之 anti-FLAG M2 的樹脂膠粒溶液 (Sigma)，於 4°C 旋轉反應 16-18 小時，隔日以溶解液清洗 5 次，每次 10 分鐘，去除上清液後，加入 15  $\mu$ l 之 2 倍 SDS sample buffer，以 100°C 煮 10 分鐘，進行 SDS

聚丙烯醯胺膠電泳，之後再利用半乾式蛋白質轉印法轉印至 PVDF 膜上。轉印完成後，將 PVDF 膜以 3% skim milk (Difco) 於 4°C 進行 blocking 16 小時。分別再以稀釋 5,000 倍的兔子抗 V5 之單株抗體(Sigma)或稀釋 5,000 倍的兔子抗 Flag 之多株抗體(Sigma)於室溫下反應 1 小時，以 washing buffer (TBST 與 0.5% Tween-20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再與稀釋 5,000 倍並鍵結 HRP (horseradish peroxidase) 之山羊抗兔子之多株抗體中於室溫下反應 1 小時，隨後以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Sciences) 進行呈色，並以 Fuji superRX 底片曝光後經顯影即可知反應結果。

## 11 電泳流動性轉移分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

圖 10 至圖 13 試驗是依照 Liu 等人於 1999 年的試驗方法經稍微調整而進行。先利用 PCR 放大增幅反應的同時標定上 $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{dCTP}$ ，完成探針的製備，步驟如下：取 1 $\mu\text{l}$  合成的 79 bp 長並且中間為 25 個隨機配對的單股核甘酸 (5'-GTCGCTCGAGCGGTATGACGAGATCTA(N)<sub>25</sub>TAGATCTGCGTCAC TAGTCTAGACTAG-3') 作為模版，加入 1  $\mu\text{l}$  的正向引子 (5'-GTCGCTCGAGCGGTATGACG-3', 10 mM) 與 1  $\mu\text{l}$  的負向引子 (5'-CTAGTCTAGACTAGTGACGC- 3', 10 mM) ，3  $\mu\text{l}$  的 Low C dNTP ( 2.5mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dGTP, 0.25 mM dCTP) ，5  $\mu\text{l}$  的 PCR 反應溶液，3  $\mu\text{l}$  的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{dCTP}$ ，以滅菌水補至總體積為 50 $\mu\text{l}$ ，隨後進行 PCR 放大增幅反應，反應溫度與時間如下：(1) 95°C 反應 3 分鐘；(2)95°C 反應 30 秒；(3)55°C 反應 30 秒；(4)72°C 反應 30 秒；(5)將步驟(2)至步驟(4)重覆 12 個循環；(6) 72°C 反應 15 分鐘；(7) 25°C 反應 30 秒以完成探針的製備。蛋白與 DNA 結合的試驗反應步驟如下：將 3 $\mu\text{g}$  的 IE1 重組蛋白先與不同濃度的 Diamide 於反應液(10 mM HEPES (pH 7.9), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM KCl, 0.05% NP-40, 50 ng

poly(dI-dC), 10% glycerol)中混合後於室溫作用 30 分鐘，實驗組再加入 DTT(10 mM)或是  $\beta$ -ME (10 mM)，再加入 1  $\mu$ l 的探針於室溫反應 30 分鐘，其中需要加入抗 IE1 抗體的陽性對照組則先行將 3 $\mu$ g 的 IE1 重組蛋白與 1  $\mu$ l 的抗 IE1 抗體於反應液中室溫作用 1 小時，隨後再加入 1  $\mu$ l 的探針於室溫反應 30 分鐘，最後利用 7.5% 聚丙烯醯胺膠電泳進行電泳流動性轉移分析，以 30 伏電壓反應 16 小時後，將膠體乾燥後並以 Fuji superRX 底片曝光後經顯影即可知反應結果。

圖 14 及圖 17 之 EMSA 試驗方法依照上述流程進行，僅有在 IE1 前處理的步驟有所不同，在圖 14 的 EMSA 試驗中，純化後的 IE1 先以 5 mM IAM 於室溫反應 30 分鐘後，再加入 15 mM DTT 反應 30 分鐘，隨後即照上述方法進行 EMSA 試驗，並適情況需要將反應液中混入最終濃度為 1 mM 的 DTT；在圖 17 的 EMSA 中，純化後的 IE1 以不同濃度的過氧化氫與探針一同於室溫反應 30 分鐘，並且在 lane 9 與 lane 10 以 DTT 進行兩種不同處理，在 lane 9 當中，DTT 是隨著過氧化氫與探針一同與 IE1 進行反應，而 lane 10 的 DTT 是當 IE1 與過氧化氫和探針反應 30 分鐘後、才添加最終濃度為 10 mM 的 DTT 再於室溫反應 30 分鐘，隨後即照前述方法進行 EMSA 試驗。

## 12 GSH/GSSG 比值之量測

GSH/GSSG 之比值是量測氧化壓力的一種常見的標記因子(Marker) (12,56)，在本試驗中我們選取蝦胃組織進行總代謝物的萃取，步驟如下，利用液態氮將蝦胃組織均質化後混入 20 倍 (重量體積比)、100 % 的甲醇，隨後 12000 g 離心 10 分鐘，將上清液取出並利用真空濃縮機(CVE-2000, EYELA)進行乾燥即完成代謝物的萃取。GSH/GSSG 比值之量測是利用超高解析四極桿飛行時間式串連質譜儀(Bruker maXis UHR-QTOF)並以正電噴灑離子化(positive electrospray ionization)的方式進行分析。

### 13 以雙股 RNA 進行蝦體內特定基因靜默化試驗

在本試驗中是利用 T7 RiboMAX Express Large Scale RNA System (Promega) 以產製作為負控制組的雙股 EGFP 的 RNA(dsEGFP RNA)與作為實驗組的雙股 Trx 的 RNA (dsTrx RNA)，dsEGFP RNA 產製的步驟與 Wang 等人的方法相同(74)，而 dsTrx RNA 的產製步驟如下：Trx 的模版與 T7 啟動子是利用 PCR 擴增的方式與適當的引子對(LvTrx-ds-F/LvTrx-ds-R, 5'-ATGGTTTACCAAGTGAAAG-3'與 5'-CTTGTTCTTCTCAACGAGTTC-3'; Lv-Trx-T7ds-F/Lv-Trx-T7ds-R 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTTTACCAAGTGAAAG-3' 與 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTTCTTCTCAACGAGTTC-3' )，即可得到兩種具互補性的 Trx 單股 RNA，隨後將之混合以 95 加熱 5 分鐘後緩慢降溫以獲得 dsTrx 的 RNA。

在特定基因靜默化試驗中，以肌肉注射方式對蝦體施打 dsTrx 或 dsEGFP 的 RNA (1 µg/g, in 100 µl PBS)，另也有第二組負控制組僅施打 PBS；經過 48 小時後收取蝦體的鰓組織並萃取 RNA 後進行 RT-PCR 以觀察蝦體內特定基因是否有靜默化的現象，在此試驗中 RT-PCR 的引子對分別為 (LvTrx-F/LvTrx-R, 5'-ACTGCTCTCTCTGGCACCAAG-3' 與 5'-ATTCACCTGAAATAATTAGC-3'; EF-1α-F/EF-1α-R, 5'-ATGGTTGTCAACTTTGCCC-3'與 5'-TTGACCTCCTTGATCACACC-3')

在觀測蝦體死亡率的試驗當中，每一組別各有 30 隻蝦體施打 dsRNA 後 48 小時再進行攻毒試驗，在試驗當中至少每 12 小時進行一次觀測並移除死亡的蝦體，每天進行累積死亡率的統計。利用 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA)進行數據的分析及繪圖，以 log rank  $\chi^2$  test 進行統計分析，當  $p < 0.05$  時視為有顯著差異。

#### 四、結果:

##### 4.1 白點症病毒感染後草蝦於微陣列晶片上之基因變化

利用本實驗室先前所產製的草蝦 cDNA 微陣列晶片，將經螢光標定之草蝦 cDNA (感染白點症病毒組標定 Cy5；注射緩衝生理食鹽水組標定 Cy3) 與晶片進行雜合反應，利用軟體 GenePix 進行晶片訊號的讀取及轉換，再進一步的利用軟體 GeneSpring11 進行校正並以 LOWESS 方法進行數據的標準化 (Normalization) 後，即可針對草蝦感染白點症病毒過後其基因表現變化進行分析。在感染後 48 小時中的分析結果中可以發現，如圖一所示，五個不同 contig 的草蝦 Trx 基因在感染白點症病毒後相較於 0 小時上升了 2-7 倍之多。

##### 4.2 以即時核酸聚合酶鏈鎖反應偵測 Trx 感染白點症病毒後之基因變化

根據草蝦 cDNA 微陣列晶片分析草蝦感染白點症病毒基因變化得到的結果顯示 Trx 於感染白點症病毒後表現量會上升，我們進一步利用即時定量核酸聚合酶鏈鎖反應來確認此一現象，在每個感染時間點的兩個組別 (感染白點症病毒組與注射緩衝生理食鹽水組) 各收取三隻不同蝦體的總組織進行 RNA 的萃取與經反轉錄反應以獲得 cDNA 後，即可進行即時定量核酸聚合酶鏈鎖反應，反應結果如圖二所示，在感染後 48 小時，Trx 基因表現量變化相較於同時時間點注射生理食鹽水組有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，48 小時感染白點症病毒試驗組草蝦總組織之 Trx 表現量平均上升超過了 30 倍之多。

##### 4.3 草蝦 Trx 之 cDNA 及胺基酸預測

在確認草蝦基因 Trx 經感染白點症病毒後於轉譯層次會有顯著性上升過後，首先從本實驗室先前所建立的草蝦 EST 資料庫中獲得 Trx 的開放轉譯區序列全長，結果如圖三所示，草蝦 Trx 開放轉譯區有 318bp 可轉錄出 105 個胺基酸，分子量大小約為 12 kDa，於 3' 端非轉譯區 (3' untranslated region, 3'

UTR) 具有聚腺嘌呤訊號 (poly A signal, AATAAA) ，並具有高度保守性的催化活性區位-Cys<sup>32</sup>-Gly-Pro-Cys<sup>35</sup>-，草蝦總共具有四個半胱氨酸，位置分別在-Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>73</sup>-，目前已知 Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup> 與氧化還原活性區位有關之外，在人類 Trx-1 當中會藉由 Cys<sup>73</sup> 與自身形成雙單元 (homodimer) (78)。進行不同物種之多序列胺基酸比對結果如圖四所示，草蝦 Trx 與中國對蝦 Trx 有最高的相似度(98%)、與南美白蝦 Trx 有 94%的相似度、與果蠅 Trx 有 59%的相似度而與人類 Trx-1 有 53%的相似度。

#### 4.4 以西方墨點法偵測草蝦 Trx 感染白點症病毒後蛋白表現變化

收取草蝦感染白點症病毒後 0 小時(未感染)、24 小時及 48 小時的胃組織，以 1/3 倍緩衝生理食鹽水進行總蛋白質萃取，經定量後取 25 µg 總蛋白以 17.5%的 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳進行電氣泳動，待蛋白分離至適當程度時將總蛋白電轉漬於 PVDF 膜，再分別以兔子抗草蝦 Trx 抗體、兔子抗白點症病毒 IE1 抗體與兔子抗 tubulin 抗體進行西方墨點法分析，分析結果如圖五所示，在感染後 24 小時可以偵測到白點症病毒 IE1 的蛋白表現，而草蝦 Trx 的蛋白表現隨著感染時間點在 48 小時會有明顯的上升。

#### 4.5 分析 Trx 可能作用的目標蛋白

由文獻回顧中我們得知 Trx 所調控的蛋白包含了某些硫醇-雙硫鍵的氧化還原酶(thiol:disulfide oxidoreductases)，並且這些氧化還原酶本身的酵素活性區位皆為 CxxC motif (10)，進而我們假設含有 CxxC motif 的蛋白有可能為 Trx 的目標蛋白，故我們對白點症病毒基因進行分析，找尋含有 CxxC motif 的白點症病毒開放轉譯區(open reading frame)，分析結果如表一至表三所示，一共有 70 個 WSSV ORFs 有含有至少一個 CxxC motif，其中有 14 個非結構性蛋

白(包含了 DNA pol、RR1、TK-TMK 與極早期表現基因 IE1)與 7 個結構性蛋白(VP362、VP36A、VP320、VP387、VP184、VP664 與 VP136B)。在 14 個非結構性蛋白當中，有高達 9 個皆為極早期表現基因。

#### 4.6 以 HIS pull down 分析草蝦 Trx 與白點症病毒極早期表現基因 IE1 在氧化/還原條件下之蛋白交互作用

由文獻回顧中我們得知，Trx 會利用氧化還原反應調控許多轉錄因子的表現，並且會有直接的蛋白交互作用產生，並這些交互作用可能是透過 Cysteine 鍵結形成 disulfide bridge，故首先我們由表一中挑選出白點症病毒 IE1 進行驗證，我們假設草蝦 Trx 或許會與白點症病毒極早期表現基因、同時又是轉錄因子的 IE1 會有蛋白質交互作用的產生。首先我們製備純化後的重組蛋白 IE1 (不帶有 His-tag)與帶有 His-tagged 的重組蛋白 Trx，並利用兩種氧化還原藥物 DTT (Dithiothreitol)與 Diamide 進行 His pull down 試驗。DTT 是一種小分子的強還原劑，利用自身所擁有的二硫醇對目標蛋白中的雙硫鍵進行還原反應，可以防止蛋白質中的 Cysteine 形成分子內或是分子間的雙硫鍵；Diamide 則與 DTT 的作用相反，是一強氧化劑，專一性將 Cysteine 上的硫醇進行氧化，形成分子內或是分子間的雙硫鍵。結果如圖六所示，在對照組 Ni-Beads only 試驗當中，白點症病毒重組蛋白 IE1 在不論有 DTT 或是 Diamide 的添加下並不會與 Ni-Beads 有蛋白交互作用的產生，在實驗組中的結果顯示在有 DTT 的情況下草蝦重組蛋白 Trx 並不會與白點症病毒重組蛋白 IE1 有蛋白交互作用的產生，但當反應液中將 DTT 以 Diamide 取代時，白點症病毒重組蛋白 IE1 即會與草蝦重組蛋白 Trx 有明顯的蛋白-蛋白交互作用的產生。由此結果可以推測草蝦 Trx 與白點症病毒極早期表現基因 IE1 的蛋白交互作用的產生是藉由分子間 Cystine 形成雙硫鍵的鍵結，故更進一步的，我們針對草蝦 Trx 的 Cysteine 進行點突變，以化學式最相近的 Serine 取代 Cysteine，產



製出五種不同的 Trx 突變株，分別為單一點突變的 smTrx (Cys<sup>32</sup>→Ser<sup>32</sup>)、雙點突變的 dmTrx (Cys<sup>32, 35</sup>→Ser<sup>32, 35</sup>)、兩株三點突變的 tmTrx-C62S (Cys<sup>32, 35, 62</sup>→Ser<sup>32, 35, 62</sup>)與 tmTrx-C73S (Cys<sup>32, 35, 73</sup>→Ser<sup>32, 35, 73</sup>)以及四點突變的 qmTrx(Cys<sup>32, 35, 62, 73</sup>→Ser<sup>32, 35, 62, 73</sup>)，圖七為經 SDS-PAGE 並經 Coomassie Brilliant blue 分析純化經定量過後的各突變重組蛋白 Trx 之結果。接續再將這些突變株重組蛋白與 IE1 進行 HIS pull down 分析，結果如圖八所示，在反應液皆有加入 diamide 的情況下，雙點突變的 dmTrx (Cys<sup>32, 35</sup>→Ser<sup>32, 35</sup>)與其中一株三點突變株 tmTrx-C73S (Cys<sup>32, 35, 73</sup>→Ser<sup>32, 35, 73</sup>)還可以跟 IE1 有蛋白交互作用的產生，但三點突變株 tmTrx-C62S (Cys<sup>32, 35, 62</sup>→Ser<sup>32, 35, 62</sup>)與 IE1 蛋白交互作用反應訊號大幅度的降低，與沒有 Cysteine 的 qmTrx 有相近於背景值的訊號強度。本試驗除了鑑定出 Trx 與 IE1 的蛋白交互作用是透過雙硫鍵的氧化還原反應之外，亦鑑定出 Trx 與 IE1 的蛋白交互作用是透過 Trx 四個 Cysteine 中的 Cys<sup>62</sup> 進行鍵結。

#### 4.7 以共免疫沉澱法分析草蝦 Trx 與白點症病毒極早期表現基因 IE1 於氧化壓力下之蛋白交互作用

在體外試驗(*in vitro*)當中得知草蝦 Trx 確實會與 IE1 產生蛋白質交互作用後，欲進一步的進行細胞層次的體外試驗，我們利用昆蟲細胞 Sf9 進行共轉染(cotransfection)，於細胞內共表現草蝦 Trx 與白點症病毒 IE1，並以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理轉染後的細胞再進行共免疫沉澱法分析，得以觀察當細胞遭受到氧化壓力時，草蝦 Trx 與白點症病毒 IE1 的蛋白交互作用的情況為何。試驗結果如圖九所示，在未經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理下，草蝦 Trx 與白點症病毒 IE1 結合的程度與陰性對照組相當，僅有少量的背景值，而在經 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理後，可以觀測到草蝦 Trx 與白點症病毒 IE1 結合的程度有明顯的增加。

#### 4.8 以電泳流動性轉移試驗(EMSA)分析白點症病毒 IE1 是否受到氧化還原反應的調控

在體外及體內試驗當中証實草蝦 Trx 與白點症病毒 IE1 會產生蛋白交互作用之後，更深入的我們推測草蝦 Trx 會影響到白點症病毒 IE1 的活性、與 IE1 對 DNA 結合的能力有關係。但首先我們必需針對白點症病毒 IE1 其與 DNA 結合的能力是否會受到氧化還原的調控進行試驗，試驗結果如圖十所示，當白點症病毒 IE1 經 5 mM 硫醇氧化劑 Diamide 的處理過後，IE1 與 DNA 結合的能力有顯著性的下降，而將經 Diamide 處理過後失去與 DNA 結合能力的 IE1 再經過 10 mM 硫醇還原劑 DTT 或  $\beta$ -ME 的處理之下，則可以恢復其與 DNA 結合的能力，並且在陽性控制組中加入抗白點症病毒 IE1 的抗體時，目標 DNA-protein 複合物會有超位移(supershift)的現象，而陰性對照組中加入了抗 His 的抗體時此複合物並沒有產生超位移的現象(IE1 為不含 His-tag 的重組蛋白)，更進一步的確認了我們觀測現象的確實是 DNA 與 IE1 蛋白所產生的複合物；至此我們確認了白點症病毒 IE1 與 DNA 結合的能力確實受到氧化還原的調控，IE1 在還原態時會具有與 DNA 結合的蛋白活性，而氧化態的 IE1 則會失去與 DNA 結合的能力。

#### 4.9 以電泳流動性轉移試驗(EMSA)分析草蝦硫氧還原蛋白 Trx 是否可以對白點症病毒 IE1 進行氧化還原反應的調控

更進一步的，我們對草蝦硫氧還原蛋白 Trx 是否可以將白點症病毒 IE1 產生氧化還原反應調控進行試驗分析，在前驅試驗當中，我們發現若在有 Diamide 存在的狀態下，Trx 並不能夠直接回復白點症病毒 IE1 其與 DNA 結合的活性，我們推測因為 Diamide 也會直接抑制 Trx 的活性，故在本試驗中，我們將 DTT 或是 Diamide 反應後的 IE1 蛋白進行緩衝液(buffer)的置換，以去除 DTT 或 Diamide，因而得到了還原態或氧化態的白點症病毒 IE1，再以草

蝦硫氧還原蛋白 Trx 進行試驗，結果如圖十一所示，隨著 Trx 濃度的增加，原本是氧化態的 IE1 可以回復其與 DNA 結合的能力，至此我們証實白點症病毒 IE1 其蛋白活性不僅受到氧化還原的調控影響，當處於還原態時會保有其活性、處於氧化態時則會失去其活性，而當白點症病毒 IE1 失去與 DNA 結合的活性時，草蝦 Trx 可以讓失去活性、同時也是氧化態的白點症病毒 IE1，再次獲得 DNA 結合的能力。

#### 4.10 鑑定白點症病毒 IE1 其 Cysteine 對 DNA 結合能力的影響

在前述的試驗當中，我們已經知道 Diamide 會氧化 IE1 使其失去與 DNA 結合的能力，而 Diamide 會造成 Cys 上有雙硫鍵的形成，故我們推測白點症病毒 IE1 的氧化還原的調控可透過 Cysteine 來進行，故我們針對白點症病毒 IE1 之 Cysteine 進行分析試驗，找尋出哪一個區位的 Cysteine 會直接影響到其與 DNA 結合的能力。白點症病毒 IE1 含有七個 Cysteine 分別位於 -Cys<sup>55</sup>-Cys<sup>90</sup>-Cys<sup>113</sup>-Cys<sup>189</sup>-Cys<sup>192</sup>-Cys<sup>194</sup>-Cys<sup>218</sup>，本試驗擬產製七株不同的白點症病毒 IE1 Cysteine 的突變株、再進行 EMSA 試驗分析，試圖找尋出哪一個半胱氨酸對白點症病毒與 DNA 結合的能力具有關鍵性的影響，而在突變株製備的過程當中，我們發現在表現白點症病毒 IE1 突變株 IE1-C218S (Cys<sup>218</sup>→Ser<sup>218</sup>) 的重組蛋白時其蛋白表現量會變得極為微弱，致使純化回收後的產量極低，因此最後我們得到了含概六個突變點位的五個白點症病毒 IE1 突變株的重組蛋白，如圖所示，分別為單一突變點位的 IE1-C55S (Cys<sup>55</sup>→Ser<sup>55</sup>)、IE1-C90S (Cys<sup>90</sup>→Ser<sup>90</sup>)、IE1-C113S (Cys<sup>113</sup>→Ser<sup>113</sup>)、IE1-C194S (Cys<sup>194</sup>→Ser<sup>194</sup>) 與 CXXC motif 雙點位的突變株 IE1-C189S-C192S (Cys<sup>189, 192</sup>→Ser<sup>189, 192</sup>)，純化後各 IE1 的突變株重組蛋白經定量後進行電泳後的染色分析，結果如圖十二所示。將各 IE1 的突變株重組蛋白進行 EMSA 分析的結果如圖十三所示，單一點突變的 IE-C55S 與 CXXC motif 雙點位的突變株

IE1-C189S-C192S 其與 DNA 結合能力明顯有降低的趨勢，故得知至少白點症病毒 IE1 之 Cys<sup>55</sup> 與 CXXC motif 的 Cys<sup>189, 192</sup> 對於其與 DNA 結合的能力扮演著關鍵的角色。

#### 4.11 以電泳流動性轉移試驗(EMSA)分析氧化劑 IAM 是否會抑制白點症病毒 IE1 與 DNA 的結合活性

在前述試驗當中，雖然我們得知將白點症病毒 IE1 的 Cys<sup>55</sup> 與 Cys<sup>189, 192</sup> 進行點突變後會降低其與 DNA 結合的能力，但 EMSA 的結果也顯示，此活性並不是完全的失去、而是減低，但因為 IE1 蛋白本身的特性以及技術上的限制，目前我們仍無法取得將七個 Cysteine 同時進行點突變的 IE1 以進行 EMSA 試驗；因此我們利用可以對 sulfhydryl group 修飾的藥物 IAM 與 IE1 進行反應，與 Diamide 不同之處在於 IAM 造成的修飾是不可逆的反應，DTT 等的還原藥物並無法進行逆反應。我們首先針對 IAM 處理前/後的 IE1 重組蛋白進行電泳後染色分析，其結果如圖十四(A)所示，証實 IAM 處理後的 IE1 並不會有蛋白降解的現象，再進行 EMSA 試驗分析，結果如圖十四(B)所示，IAM 處理後的 IE1 會完全失去與 DNA 結合的能力，證實了 IE1 的 Cysteine 其與 DNA 結合的能力扮演著關鍵的角色。

#### 4.12 以 LC/ESI/MS 測量感染白點症病毒的蝦胃組織其 GSH/GSSG 比值之變化

為了解感染白點症病毒過後的蝦體細胞內整體的氧化還原狀態(redox state)是否有氧化壓力的產生，我們利用 LC/ESI/MS 分析氧化壓力指標—還原態的 glutathione (GSH)與氧化態的 GSH (GSSG)之比值觀測蝦體在感染白點症病毒的過程中其氧化壓力的變化，結果如圖十五所示，與對照組相較之下 (PBS injection only)，在感染白點症病毒後 24 小時，GSH/GSSG 的數值會有顯著性的上升，而在感染白點症病毒後 48 小時，GSH/GSSG 的數值會有顯著

性的下降，這代表在 48 hpi 時蝦體中有氧化壓力的產生，意外的是在 24 hpi 雖然在感染白點症病毒蝦體內的還原力有顯著性的上升，這亦代表在 24 hpi 之前蝦體有受到氧化壓力的刺激，造成體內抗氧化系統啟動而整體的還原力提升。

#### 4.13 以電泳流動性轉移試驗(EMSA)分析過氧化氫是否會抑制白點症病毒 IE1 與 DNA 的結合活性

在了解感染白點症病毒會造成蝦體受到氧化壓力後，我們開始關注過氧化氫對白點症病毒產生的影響，與 diamide 不同的是，過氧化氫是體內存在的 ROS 之一，但蝦體內並不會有內生性的 diamide 產生，故我們擬直接利用活性氧物質之一的過氧化氫是否可以影響 IE1 與 DNA 結合的能力以 EMSA 進行驗證，首先我們將 IE1 重組蛋白置換到不含有還原劑中的 PBS 緩衝液，再與不同濃度的過氧化氫在室溫混合，結果如圖十六所示，IE1 與 DNA 結合的能力會隨著過氧化氫濃度的提高(1  $\mu$ M to 10 mM)而降低，並且我們針對是否含有還原劑 DTT 作了兩組試驗-- DTT 同時混入含過氧化氫與 IE1 的反應液 (lane 9)、或是當過氧化氫與 IE1 室溫反應之後、再添加 DTT (lane 10)，圖中的結果顯示出當 DTT 與過氧化氫同時存在時，可以對 IE1 產生保護效果並且維持 IE1 與 DNA 結合的能力，但如果 DTT 是後添加進入反應液、則 DTT 並對 IE1 並無法維持其與 DNA 結合的活性，依結果推論，IE1 可以跟過氧化氫反應產生帶有 sulfenic acid 的 IE1-SOH，部份的 IE1-SOH 可以跟還原態的 IE1-SH 自發性形成 IE1-S-S-IE1，再被 DTT 還原為帶有活性的 IE1-SH，但若大部份的 IE1 都形成 IE1-SOH 或 IE1-SO<sub>2</sub>H 時，即使有 DTT 的作用也無法新生成還原態的 IE1-SH。

#### 4.14 利用專一性 dsRNA 所產生的特定基因靜默化試驗 Trx 對白點症病毒感染蝦體過程當之影響

最後我們針對白點症病毒在感染蝦體的過程中是否需要 Trx 進行試驗，首先利用體外合成的 Trx 雙股將蝦體中的 Trx 產生基因靜默化效果，在前驅試驗當中，高劑量(5  $\mu\text{g}$ /每克蝦)的 Trx dsRNA 注射蝦體雖然能抑制 Trx 基因的表現，但同時也容易造成蝦體的死亡，故在本試驗中以 1 $\mu\text{g}$ /每克蝦的劑量對蝦體進行施打；在以 Trx dsRNA 注射 48 小時後，結果如圖十七(A)所示，RT-PCR 的結果顯示在鰓組織中 Trx 的基因表現比起對照組(PBS injection only 與 EGFP dsRNA)有明顯的下降；接續以白點症病毒進行兩組的攻毒試驗，一組攻毒試驗的目的在觀測白點症病毒複製數目的差異，另一組的目的是觀測死亡率的變化，結果如圖十七(B)與圖十七(C)所示，經白點症病毒感染三天後 dsTrx-WSSV 組別其白點症病毒複製數目與 dsRNA 控制組(dsEGFP-WSSV)相較之下有顯著性的降低( $p < 0.01$ )，而死亡率亦會在攻毒第四天之後有顯著性的降低( $p < 0.01$  與  $p < 0.005$ )，結果顯示在白點症病毒感染蝦體的過程當中需要宿主的 Trx 來增進白點症病毒的致病力(pathogenicity)。

## 五、討論:

### Trx 基本特性之論述

Trx 為普遍性存在的一個蛋白質，從原核生物至真核生物皆擁有此蛋白，最初在大腸桿菌體內發現 Trx 時，功能為氫離子及電子的提供者 (Hydrogen Donor) 並參與去氧核糖核苷酸 (Deoxyribonucleotides) 之合成(31)。但隨著研究發現 Trx 其功能與角色非常的多樣化，在細胞外時具有促進細胞生長發育的功能，為一種促細胞生長因子 (cell growth factor)；在細胞質當中主要功能為抗氧化劑 (antioxidant) 以及胞內還原劑之輔因子 (reductant cofactor)；在細胞核內主要功能為調控轉錄因子之活性(25)，雖然 Trx 本身缺少入核訊號 (nuclear localization sequence)，但當生物體或是細胞遭受到不同種類的逆境壓力 (stress) 時，如當細胞受到雙氧水的處理(49)、UV 光的照射(50)、缺氧處理(hypoxia)(9)或是抗癌藥物 cisplatin 的處理時(71)，皆會導致 Trx 有入核的情況產生，進而利用本身還原蛋白的特性幫助轉錄因子維持其還原態，使轉錄因子可以與目標基因啟動子區域結合。在細胞株實驗當中更進一步的發現，當過量表現 Trx 蛋白時，Trx 在細胞質中會抑制 Ik-B 蛋白的降解，進而抑制 NF- $\kappa$ B 的表現，但當 Trx 進入核內時，會直接增進 NF- $\kappa$ B 的活性(23)，以此結果而言，Trx 在細胞質中與在細胞核內對於 NF- $\kappa$ B 是扮演著相對立的功能。

在圖四中序列分析的結果顯示，草蝦 Trx 開放轉譯區大小為 315 bp，其蛋白質分子量大小約為 10 kDa，並且草蝦(*P. monodon*)、白蝦(*L. vannamei*)與中國對蝦(*F. chinensis*)三者 Trx 胺基酸相似度均超過 90%，雖然與人類 Trx-1 僅有約 50% 的胺基酸相似度，但仍具有四個 Cysteine (-Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>73</sup>-)並活性作用區位依舊為高度保守性的 CxxC motif (-Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup>-)；Trx 會自發性的藉由兩 Trx 的 Cys<sup>73</sup> 相互鍵結而形成雙單元(homodimer) (78)，並且雙單元的 Trx 會失去促進細胞生長的能力，針對促生長因子這個角色而言，反而可以利用點突變的技術產製 Cys<sup>73</sup>→Ser<sup>73</sup> 的 Trx，將有利於維持 Trx 促進細胞生長的能力(15)。人類 Trx-1

總共有五個 Cysteine (-Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>69</sup>-Cys<sup>73</sup>-)，除了 CXXC motif 之外尚含有另外三個 Cys，分別位於 Cys<sup>62</sup>、Cys<sup>69</sup> 與 Cys<sup>73</sup>，目前的研究皆指出這三個 Cys 各自擁有不同的功能，目前較為被接受的是 Trx 會藉由 Cys<sup>73</sup> 形成分子間的雙硫鍵以產生 Trx 的雙聚體、與 Trx 會藉由 -Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>69</sup>- 形成第二對分子內的雙硫鍵，並且這對雙硫鍵亦受氧化還原的調控 (19,77)；但除了雙硫鍵的形成之外，亦有研究報告指出在體外試驗的模式中這三個 Cys 可以進行 S-nitrosylation 反應 (17,19)，並調控著 Trx 本身的功能以及後續的生物反應路徑(60)。而蝦類的 Trx 相較於人類 Trx 缺少了 Cys<sup>69</sup>，故蝦類 Trx 是否會有第二對分子間的雙硫鍵鍵結目前仍不清處，而蝦類 Trx 的 Cys<sup>62</sup> 與 Cys<sup>73</sup> 是否亦可進行 S-nitrosylation 反應目前也尚未有任何的研究報告出現。

在大腸桿菌進行的研究發現，過氧化氫會造成體內受質蛋白雙硫鍵的形成，而 Trx 可以有效將這些因為過氧化氫處理後失去活性的受質蛋白還原並恢復其活性，甚至 Trx 活性效率比 DTT 還要更加快速，換句話說，Trx 在體內亦是一個即有效率的自由基移除系統(62)。

從文獻顯示，雖然 Trx 已經被研究有超過 50 年的歷史，但近年來還是一直不斷有關於 Trx 的新功能或是新的 Trx 生物反應路徑被發現，在不同的生物體內 Trx 所作用的受質分子也會稍有不同，例如生物體內氧化態的 Prx 需要藉由 Trx system(Trx-1)幫忙進行還原作用，但在果蠅中發現，果蠅的 Trx-2 才是 Prx 的受質分子，並非如同哺乳動物系統中的 Trx-1(5)。

另外也有越來越多的證據顯示，Trx system 與 Grx system 會有 cross-talk 的可能性，利用放射線標定過後的 GSH 與細胞株進行培養後的體外試驗中發現，Trx 會利用 Cys<sup>73</sup> 與 GSH 進行結合(glutathionylation, Trx-S-SG)，而 Trx-S-SG 除了會失去將 insulin 還原的酵素活性之外，即使 Trx reductase 與 NADPH 亦無法回復 Trx-S-SG 的酵素活性(6)；而在缺少 GR 酵素活性的果蠅品系之中，原本預期在氧化劑的處理後會因為無法藉由 GR 讓 GSSG 還原為 GSH 而造成 GSSG 的累積，



但在此試驗中發現 Trx 可以將 GSSG 還原為 GSH，直接參與 Grx system 的調控 (29)。

### 白點症病毒的 CXXC motif

有些病毒會攜帶自己的 Glutaredoxin 或是 thioredoxin 基因，如同屬於痘病毒科的 Vaccinia virus 與 Ectromelia virus；或是藻類病毒(chlorella virus)與 T4 phage (1,4,11,16,55,79)(或是於 pubmed 的蛋白資料庫中搜尋” virus thioredoxin” )，故對於白點症病毒而言，有很大的可能性會有白點症病毒自己的氧化還原調控相關基因，對於尚為有註解但是有 CxxC motif 的蛋白當中，有些 ORF 可能為氧化還原相關蛋白，如 WSSV240 (AAL89108.1)，其胺基酸序列具有通常在 Nucleoredoxin 其活性區位的 CPPC motif (30)；另外如 WSSV009 (AAL88877.1) 以及 WSSV263 (AAL89131.1)，其 CxxC motife 剛好皆坐落於-Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>35</sup>-；WSSV187 (AAL89055.1)，與 Vaccinia virus 之 thioredoxin-like 蛋白(YP\_232963.1) 有相同的 CxxC motif 位置，皆位於 Cys<sup>13</sup>-Cys<sup>16</sup>；另外氧化還原蛋白(如 GSH·GSSG、Grx 與 Trx)其分子量通常都在 10 kDa 左右，如果搭配 pubmed 中其它病毒所攜帶的 thioredoxin-like 基因來看，其序列大約在 150 個胺基酸上下，故我們可以先將 WSSV 在 20 kDa 以內的 ORF 進行鑑定，而符合這些條件的有 WSSV022、WSSV032、WSSV060、WSSV107、WSSV114、WSSV150、WSSV158、WSSV163、WSSV181、WSSV187、WSSV199、WSSV216、WSSV225、WSSV258、WSSV263、WSSV303、WSSV328、WSSV346、WSSV371、WSSV389、WSSV438、WSSV456、WSSV464、WSSV493 與 WSSV527。

### Trx 與 IE1 之蛋白-蛋白交互作用

根據 Wang 等人的研究指出 Trx 亦會調控肌動蛋白(actin)其氧化還原的狀態，且在有氧化壓力(oxidative stress)存在下時會增進與 Trx 的蛋白-蛋白交互作用，更

進一步 Wang 等人利用點突變技術構築不同 Cys 突變的 Trx 突變株後進行共免疫沉澱分析法後可以發現，Trx 與 actin 蛋白交互作用之機制並非藉由 Trx 中 Cys<sup>32</sup> 或 Cys<sup>35</sup> 與肌動蛋白產生鍵結，而是藉由 Trx 上 Cys<sup>62</sup> 與肌動蛋白產生蛋白交互作用(75)，我們也在 Trx 與 IE1 的蛋白-蛋白交互作用中發現類似的狀況；如圖六及圖七所示，diamide 是具專一性可催化雙硫鍵形成的氧化劑，在有 diamide 一同反應的情況下，Trx 可以跟 IE1 產生專一性的鍵結，原本我們預測此專一性鍵結是透過 Trx 本身的活性作用區位 Cys<sup>32</sup>-x-x-Cys<sup>35</sup> 與 IE1 產生蛋白交互作用，但以活性區位雙點突變株的 Trx 在有 diamide 存在下仍可以跟 IE1 產生蛋白交互作用，只有包含 Cys<sup>62</sup> 的三點突變株 tmTrx 與全部 Cys 皆突變為 Ser 的 qmTrx 才會造成與 IE1 蛋白交互作用的失去，這個結果証實 Trx 的 Cys<sup>62</sup> 對於 Trx 與 IE1 產生蛋白-蛋白交互作用是重要的胺基酸，並這裡會產生兩種推論，在有 diamide 的情況下，Trx 與 IE1 是直接透過雙硫鍵進行鍵結，另一種推論為將 Cys<sup>62</sup> 突變為 Ser 後會對 Trx 的結構產生改變，使其就算有 diamide 的狀況下其結構亦無法與 IE1 結合，要解開這個問題，可利用 X-ray 晶體繞射解出結構方面著手。而雖然在本篇論文中只驗證了 Trx 與 IE1 的蛋白交互作用，但亦有極高的可能性在另外的 69 個具有 CxxC motif 的白點症病毒 ORF 中，還會有可以與 Trx 產生不論是蛋白交互作用或是功能上受到比此調控的 ORFs，這些都可以提供其他蝦類學者一個研究的方向。

### IE1 與 DNA 結合能力的調控機制

病毒本身極早期基因之表現主要是利用宿主細胞內蛋白質的調控，在先前由 Liu 等人已經証實蝦轉錄因子 STAT 可與白點症病毒 *ie1* 啟動子區域結合且使下游基因表現(42)，並且還可以與宿主體內的 TATA-box 結合蛋白產生蛋白-蛋白交互作用(41)，但 IE1 本身又是怎麼樣被調控直到本篇論文始有初步的探討(27)；蛋白質本身二硫醇與二硫化物(dithiol-disulfide)的轉換會導致蛋白質的構型不同，

進而影響到蛋白質的功能(24)，故以本篇 EMSA 試驗的結果得知，白點症病毒 IE1 本身的調控是受到氧化還原反應的影響，在氧化態時會失去活性，而 Trx 其功能與 DTT 相近，能針對硫醇-二硫化物之雙硫鍵進行氧化還原反應，故推論白點症病毒 IE1 應可以利用宿主的 Trx 幫助其恢復或維持還原態的構型而保有與 DNA 結合的能力，這也是繼細胞內源性的 Trx 可以為第一型單純疱疹病毒之氫離子提供者 (Hydrogen Donor) 並參與病毒本身去氧核糖核苷酸 (Deoxyribonucleotides) 之合成後(8)，我們認為可以用 WSSV IE1 來證實宿主本身的 Trx 還可以直接參與病毒轉錄因子的活性調控。

許多轉錄因子與 DNA 結合的活性主要藉由 Zinc finger motif 所調控，Zinc finger motif 又是由 Cysteine/Histidine 所構成，而在 IE1 胺基酸序列進行分析之結果顯示 IE 含有九個半胱氨酸之外並具有 Cys2/His2-type zinc finger motif，但依先前 Lui 等人的研究指出(46)，雖然此一區位有可能對轉錄因子與 DNA 結合的能力扮演關鍵性的角色，但在針對 IE1 Zinc finger motif 之 Cysteine 進行點突變後進行 EMSA 試驗分析結果顯示，Cys<sup>189, 194</sup>→Ala<sup>189, 194</sup> 之 IE1 突變株仍保有與 DNA 結合的活性，以及在另外的 EMSA 試驗中，不論有無添加 Zinc，皆不會影響到 IE1 對 DNA 結合的活性(45)，由此結果推論出 IE1 與 DNA 結合的能力不是透過 Zinc finger motif 進行調控。在本篇論文中，我們試圖產製七種不同的 IE1 突變株，但在純化重組蛋白時碰到很大的困難，IE1 原本就是一個很不穩定的蛋白質，以大腸桿菌進行表現時可以拿到大量且純度佳的 GST-IE1 融合蛋白，但當以 thrombin 截切移除 GST 蛋白後，IE1 即使保存在有 1 mM DTT 的緩衝液中其活性仍然會快速的降低，進行 EMSA 試驗時以三天內的 IE1 為佳(當天純化完畢隨即進行 EMSA 反應最好)，經過七天之後 IE1 的活性會大為遞減，幾乎無法順利在 EMSA 試驗中有成功的反應，在以 SDS-PAGE 分析存放超過七天的 IE1 蛋白之狀態時，可以發現蛋白大量的降解的情況出現；而這種情況在突變株的 IE1 情況更是嚴重，帶有 GST 的 GST-IE1 突變株其蛋白表現量會稍微降低，除了

GST-IE1-Cys<sup>216</sup> 之外仍可以拿到純度佳且足量的 GST-IE1(但 GST-IE1-Cys<sup>216</sup> 應該可以多重複試幾次看看，或許就又可以順利拿到了)，可是一但將 GST 移除，突變的 IE1 其水溶性更是大為降低，並且在截切 thrombin 過程當中，會看到大量的 IE1 隨即降解，當進行純化最後步驟的緩衝液置換時，濃縮前與濃縮後其 IE1 的單位濃度幾乎完全沒變，大幅增加了 EMSA 試驗分析的難度，但至少在後續的分析鑑定中，証實了 IE1 蛋白至少一個半胱氨酸 Cys<sup>55</sup> 與 CxxC motif (Cys<sup>189</sup> 與 Cys<sup>192</sup>) 對 IE1 的 DNA 結合的能力扮演著關鍵的角色，而接續以 IAM 處理對 Cysteine 進行不可逆轉的修飾後的 EMSA 試驗中發現，IAM 處理後的 IE1 其蛋白並不會出現降解的現象(圖十四 A)，但會完全失去與 DNA 結合的能力(圖十四 B)。

另外在過氧化氫與 IE1 DNA 結合活性的試驗當中，如圖十六所示，過氧化氫亦可以氧化 IE1 而降低 IE1 與 DNA 結合的活性，但當我們加入 DTT 的順序不同時，我們看見兩種結果，一種是反應同時混入 DTT，則 DTT 會對 IE1 的活性具保護效果，另一種是反應後再添加入 DTT，則 IE1 的活性仍是大為降低，DTT 是對雙硫鍵具專一性反應的還原劑，DTT 無法直接作用於帶有 sulfenic acid 的分子上，故依結果推論為 IE1 被過氧化氫氧化為帶有 sulfenic acid 的 IE1-SOH，而 IE1-SOH 會失去與 DNA 結合的活性，但 IE1-SOH 應該是與還原態的 IE1-SH 自發性的形成分子間的 IE1-S-S-IE1，或是 IE1-SOH 會與自身的 SH group 形成分子內的雙硫鍵(IE1-S<sub>2</sub>)，而不論是 IE1-S-S-IE1 或是 IE1-S<sub>2</sub> 皆可以被 DTT 還原為具有與 DNA 結合能力的 IE1，但當以 10 mM 過氧化氫反應 15 分鐘之後，大部份的 IE1-SH 應該都轉變成 IE1-SOH，IE1 反而不會有分子間或分子內的雙硫鍵形成，故 DTT 也無法再讓 IE1 回復其活性；而另一種相類似的可能性為，依照 Vivancos 等人的研究中指出，當使用細胞株並以不同濃度的過氧化氫處理、觀察 Tpx (peroxiredoxin) 形成 Sulfenic acid 的速率結果顯示，在低濃度(0.2 mM)過氧化

氫對細胞處理 5 分鐘後僅有少量的 Tpx-SO<sub>2</sub>H 形成，但若以高濃度(1 mM)過氧化氫處理 45 分鐘後即有超過 50% 的 Tpx 會轉變成 Tpx-SO<sub>2</sub>H (73)，雖然每一種會被過氧化氫氧化的蛋白質其轉變為 Sulfinic acid 的反應速率皆不相同，但以圖十六之結果推論，在試管內過氧化氫反應濃度為 10 mM 並處理 15 分鐘的處理條件下，應有一定比例的 IE1 會轉變為 IE1-SO<sub>2</sub>H、IE1-SOH 與低含量的 IE1-SH，結果一樣造成氧化的 IE1 無法與 IE1-SH 形成分子間或分子內的雙硫鍵 IE1、也無法讓 DTT 將之還原為具有 DNA 結合活性的 IE1-SH，因而形成這種試管內不可逆轉的狀態。

### 白點症病毒與氧化壓力

蝦類在感染白點症病毒過後體內的呼吸爆活性 (respiratory burst activity) 會上升(48,80)，呼吸爆是蝦類在病原入侵或遭受氧化壓力時自身所產生的防禦機制之一，細胞內會大量的生成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 物質，包含超氧化自由基 (superoxide anion radical)、過氧化氫 (hydrogen peroxide) 及氫氧自由基(hydroxyl radical)等 ROS，進而導致細胞內有大量的自由基 (free radical) 產生，得以攻擊外來的入侵物；而要清除體內過多的自由基則要藉由抗氧化系統；在生物體中主要的抗氧化系統之一即為 Trx 系統，因為各種 ROS 有可能會間接造成蛋白雙硫鍵的氧化，而 Trx 可以將這些氧化的蛋白進行還原反應。在圖九當中，我們對昆蟲細胞轉染白點症病毒 *iel* 與草蝦 *Trx* 進行共免疫沉澱分析時，結果發現當細胞受到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的處理使細胞處於氧化壓力的狀態下時，白點症病毒 IE1 與草蝦 Trx 有蛋白交互作用的產生。文獻指出，在氧化壓力之下，對於氧化還原反應敏感的蛋白質常易形成雙硫鍵(3)，如大腸桿菌之轉錄因子 OxyR 即會受到過氧化氫的影響間接形成雙硫鍵進而調控其蛋白活性(82)，故在細胞內白點症病毒 IE 亦可能也是受到氧化壓力的影響間接形成分子內或分子間雙硫鍵，因而與草蝦硫醇氧化還原蛋白 Trx 產生蛋白交互作用；並且在搭配圖十六所得到的結果更

能增強此推論的強度，當細胞內產生過多的自由基或是  $H_2O_2$  時，會使白點症病毒 IE1 氧化形成帶有 sulfenic acid 的 IE1-SOH 並失去活性，而 IE1-SOH 會有機會與細胞內尚處於還原態的 IE1-SH 自發性的以雙硫鍵結合形成 IE1-S-S-IE1，再與 Trx 產生蛋白交互作用，進而產生還原態的 IE1-SH，但若當 IE1-SOH 再氧化為帶有 sulfinic acid 的 IE1-SO<sub>2</sub>H 或甚至是帶有 sulfonic acid 的 IE1-SO<sub>3</sub>H 時，目前仍不清楚蝦體當中是否有 Sulfiredoxin 蛋白可以將 IE1-SO<sub>2</sub>H 還原為 IE1-SOH。

在圖十五之中我們可以測量到在白點症病毒感染後 48 小時 GSH/GSSG 的比值有顯著性的下降，而 GSH/GSSG 的下降代表細胞內整體還原力相對減弱，間接表示在此時間點確實有氧化壓力的累積；而白點症病毒感染後 24 小時 GSH/GSSG 的比值卻有顯著性的上升，這代表在此時間點大部份蝦體的細胞還原力充足，這些結果產生了數種不同的推論：

對於 48 hpi 這個時間點來說，在此時間點所測到的氧化壓力反應出受到白點症病毒感染之細胞內真實整體的氧化還原狀態是趨向於氧化態，也就是有氧化壓力的累積，而 IE1 是極早期表現基因，但 WSSV IE1 獨特的是 IE1 基因表現並不像一般所認知的極早期表現基因、在感染開始後不久其基因的表現就會關閉，而是隨著感染時間一直持續高表現量直至蝦體死亡，IE1 所扮演的功能角色是否有隨著感染初期與完成病毒增殖後有所不同？又在此時間點基因與蛋白表現量皆上升的 Trx 對白點症病毒本身或是 IE1 而言，真正在活體內所執行的功能為何？會一樣是幫助 IE1 保有其 DNA bind 的活性嗎？這些皆是值得深入研究的地方。但我們也意識到在 48 hpi 蝦體中 WSSV 已經經過了兩個完整的複製循環 (replication cycle)，此時全身組織中的病毒套數皆大量增加並且超過 50% 的蝦體已經死亡，剩下的個體可能皆呈現一種瀕臨死亡的狀態，雖然我們在收取 48 小時的時間點上、所選擇的蝦體當中會有過半的比例是可以存活超過 48 小時，並且在收取樣本時一定是選擇尚未死亡的蝦體，在某種程度上無法避免的已經造成一種篩選，此時所代表的生物性意義仍則較為薄弱，在將來一旦有蝦類細胞株可

供使用時，將可精準的控制所試驗的細胞株全部細胞同時間一起受到病毒的感染 (MOI=1)，即可更精準的量測細胞所產生的氧化壓力與宿主基因的變化；另一可行的方法是利用蝦組織(如淋巴細胞)進行初代細胞培養並感染白點症病毒後再進行氧化壓力的量測。

對於感染後 24 小時的時間點細胞內的氧化還原狀態仍有比較大的爭議，就數據而言細胞質內此時的還原力是上升的狀態，推論為樣本中大部份的細胞是未受到病毒感染的細胞，細胞此時對於病毒的感染過程(viral progression)或是宿主的防禦機制等均提供了充足的還原力，病毒與宿主仍熱烈的交戰之中，但當病毒的套數全面性的爆增之後，宿主即無法維持氧化還原的平衡或持續提供充足的還原力，但值得我們注意的是，24 hpi 細胞內的還原力有顯著性的升高亦代表著在此時間點之前，細胞有受到氧化壓力的刺激，因而啟動宿主抗氧化機制，才會導致此時間點的還原力增加，這是一個間接的證據顯示白點症病毒感染 24 小時之內曾經造成宿主受到氧化壓力影響而起動抗氧化系統，這亦顯示了白點症病毒感染剛開始時，細胞中會產生抵禦性氧化壓力，因此極有可能需要 Trx 維持 IE1 的功能與活性。

### 蝦類氧化壓力之測量

目前對於量測生物體內的氧化壓力的方法當中，尚未有具較嚴謹及可信的方法出現，由於氧化還原反應在生物體當中是以即時且動態的反應在進行，自由基分子在體內存在的時間又極為短暫，如氫氧自由基的存在週期僅為  $10^{-9}$  秒、即會奪取電子成為氫氧根離子，並且生物體內同時又不斷有新的自由基分子在形成，故幾乎無法精確的量測或是追蹤單一自由基在活體中的變化，目前要直接對活體測量 ROS 在技術上仍然有待突破，各種不同的直接量測法皆有其盲點存在，大多還是以間接方法量測抗氧化蛋白的酵素活性後，推估氧化壓力的有無，如在蝦類測定呼吸爆(respiration burst)的方法是利用 NBT 還原分析法 (nitroblue

tetrazolium reduction test)，主要是針對超氧陰離子進行定量，因為超氧陰離子會將 NBT 還原為 formazan，而 formazan 呈現紫色結晶狀，即可用分光光譜儀進行定量。但此方法適用於測定”活細胞”並且是”吞噬細胞”所產生超氧陰離子的能力，其原理概念為當生物體受到病菌的侵犯時，吞噬細胞(如人體中的嗜中性白血球)會自發性產生超氧陰離子，進而產生過氧化氫，再經由骨髓過氧化酶(Myeloperoxidase)將過氧化氫轉變為次氯酸(hypochlorous acid, HOCl)，進而利用次氯酸殺死外來物；所以可以針對吞噬細胞以 NBT 進行染色過後，進行不同條件處理試驗以得知吞噬細胞對抗外來刺激的反應為何，但此法應用在蝦類血球時尚屬合理，但有些蝦類相關文獻報告描述其呼吸爆活性測定法是先將不同組織(例如鰓或肝胰臟)以緩衝液進行內含物的萃取過後，再加入 NBT 進行反應後以分光光度計進行定量，這種數據的可信度必需審慎考量。

目前對蝦體與氧化壓力研究的現況當中，看到許多文獻中僅單憑某一非決定性基因其 mRNA 表現量的改變即對蝦體是否受氧化壓力做出結論，但此基因表現量的變化跟抗氧化酵素活性或 ROS 累積的多寡完全不一定具正相關性，甚至此抗氧化基因其酵素活性的改變也無法完全代表當下 ROS 數量的多寡，其代表的意義有以下幾種可能性

1. 有過多的 ROS 存在，故造成酵素活性上升
2. 先前有過多的 ROS 存在，但此時 ROS 累積的量已經下降至正常的平衡狀態，可是此時的抗氧化相關酵素活性仍明顯高於對照組
3. ROS 會同時透過數種不同的代謝模式，例如雙氧水至少有三種不同的酵素可同時對雙氧水進行代謝，某單獨一種的酵素活性改變(Prx, Gpx or CAT)或是未改變皆無法完全反應出當下過氧化氫含量是上升或下降

而若我們再進行更細微的檢視可以發現，目前量測酵素活性的方法皆要對樣本進行各種前處理，但前處理的方法是否恰當？在蝦類樣本有極易降解的特性之下，仿照其他物種樣本前處理法的製備過程中，各種蝦類生化生理或降解反應可



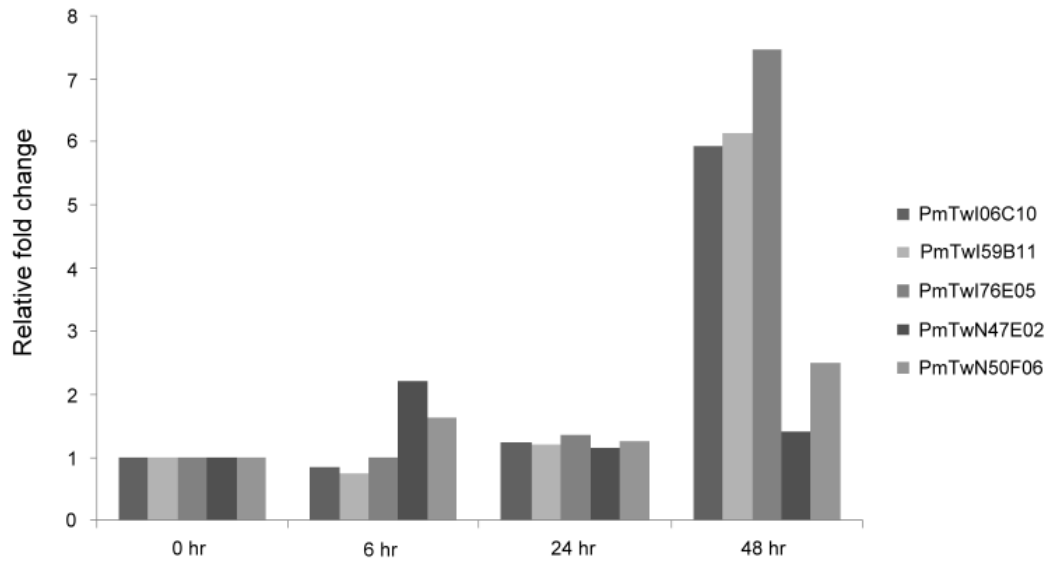
能皆仍在進行中(還是以極快的反應速率在進行)，我們很難對處理完成的樣本進行品質的確認，就算處理完成進行 SDS-PAGE 分析也只能得知當下蛋白質狀況是否良好，但無法確認此時樣本的狀況是否真的代表收取樣本當下細胞內各種代謝物的狀況；如此得到的測定結果是否真的具代表性？目前在不同的蝦類氧化壓力研究報告中很容易看到互相衝突的實驗結果，但在缺少全面性的分析下很難判定誰的結論較為真實，這些都是研究者必需考量的問題。在本試驗中我們以 LC/MS/MS 直接對還原態的 GSH 與氧化態的 GSSG 進行量測，樣本固定以 1:10 或 1:20 w/v、100 % 的 MeOH 直接進行代謝物的萃取，MeOH 會造成全體蛋白的變性，將可大幅降低樣本中蛋白的干擾，而以 LC/MS/MS 可以精準的對 GSH/GSSG 進行量測；在數據判讀的部份，理論上細胞內的 GSH+GSSG 的總量是固定的，故可直接以 GSH/GSSG 的比值進行不同樣本間的比對判讀，更能反應出細胞內真實的情況。

對於蝦類抗氧化相關基因的研究，不論是文獻的數量或是機制層面的探討相較之下都很少，相關研究也起步的較慢，對於本論文中所提及的抗氧化相關分子當中，如 Glutathione reductase (GR)、與 Prx 還原有關的 Sulfiredoxin (Srx)或是本段落後續會提到的 heme oxygenase (HO)，這些對於氧化還元都是極為重要的基因，極有可能在各種不同的病菌(或病毒)與宿主的交互作用中都扮演的很重要的角色，但這些基因在蝦類都尚未被報導或選殖出來。

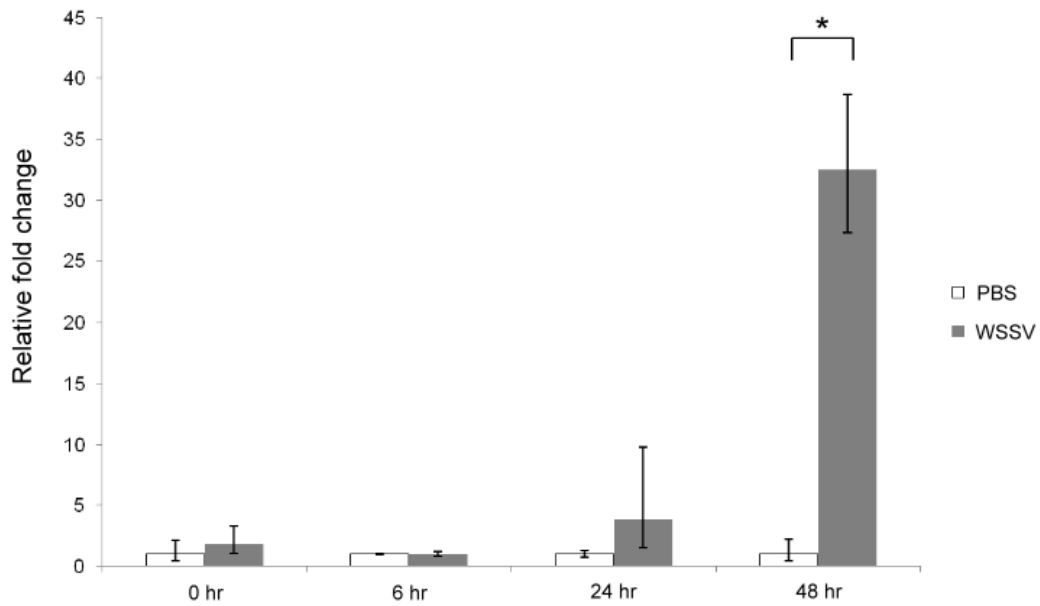
另外像目前眾人接受 Catalase 可以直接將過氧化氫代謝為水，但其詳細的作用機制仍尚未明瞭，普遍推測因為 CAT 是含鐵的蛋白，其氧化還元機制應該還是與鐵離子有關。鐵離子與生物體內的氧化壓力有密不可分的關係，產生氫氧自由基的 Fenton reacton 或是 Haber-Weiss reaction 皆須要鐵離子參與並催化反應速率的進行，一個控制體內鐵離子含量多寡很重要的蛋白是儲鐵蛋白 (Ferritin)，而 Ferritin 是一個功能性極為多樣化的一個蛋白，參與生物體內眾多機制的調控如解毒、發炎反應、胚胎生長發育以及神經的分化等(36,53,72)，當蝦體以肌肉

注射的方式給予額外的 Ferritin 時，會對蝦體產生抗白點症病毒的效果，並且蝦體內的呼吸爆(superoxide)含量會有顯著性的會升高之外，也會使 SOD 活性有顯著性的上升(58)。但若以氧化壓力與氧氣代謝路徑的角度來看，Ferritin 的給予應該會造成蝦體內二價鐵含量降低，會導致 Fenton reaction 或是 Haber-Weiss reaction 反應速率的降低，結果造成氫氧自由基的減少，是否因為在 Ferritin 的給予下，氫氧自由基的生成速率降低導致過氧化氫含量的升高，進而亦使得 superoxide 含量升高，這還需要更多的實驗數據佐証。另一個生物體控制鐵離子含量多寡的重要分子是 heme oxygenase (HO)，HO 可以將 heme group 代謝為鐵(iron)、膽綠質(biliverdin) 以及一氧化碳(carbon monoxide)，而經由 HO 所釋放出的鐵(iron)將儲存於 Ferritin 上，造成 Fenton reaction 所產生氫氧自由基的速率下降，進而降低氧化壓力的產生；而蝦病領域中目前尚未有 HO 相關的研究報告，雖然有 oxygenase 相關的 EST clone (例如 Genbank Acc. No. EE662804.1)，但其 doamin 並非與 HO 功能相關有相關性。

## 六、圖表與說明



**Figure 1.** The expression level of shrimp thioredoxin after WSSV challenging by microarray analysis and validation by qRT-PCR. (A) The relative fold change at 48 hour post infection was obtained as compared to that at 0 hour. The results were analyzed by GeneSpring 11.



**Figure 2. Quantitative real-time RT-PCR.** The mRNA expression level of shrimp thioredoxin during virus infection. Relative fold change in WSSV-infected shrimps compared to PBS-injected shrimps was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The internal control gene, elongation factor 1 $\alpha$ , was measured in WSSV-infected shrimps (n = 3) and PBS-injected shrimps (n=3) at 0, 6, 24 and 48 hours post injection. Student's t-test was used for statistical analysis.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

1 GCACGAGATAAGACTTGCAAATTAATCCTCCGTCCTTCGTGCTCTTCTTCAATCGCCAAGATGGTGTACCAAGTGAAAGATCAGGAAGATTTTACT  
M V Y Q V K D Q E D F T

100 AAGCAGCTAAACGAAGCTGGAAACAAGCTGGTCGTCGACTTCTACGCCACCTGGTGTGGGCCATGCAAAATGATTGCACCTAAGCTGGAGGAGCTG  
 K Q L N E A G N K L V V I D F Y A T W C G P C K M I A P K L E E L

199 AGTCAGTCGATGAGCGATGTGGTTTTCTGAAGGTGGATGTGGACGAATGCGAAGACATTGCCCAAGATAACCAGATTGCATGCATGCCTACTTTTCTG  
 S Q S M S D V V F L K V D V D E C E D I A Q D N Q I A C M P T F L

298 TACATGAAGAATGGCCAGAAGCTTGACAGCTTGTCTGGTGCCAACTACGAAAAGCTTGTGCAACTCATCGAGAAGCACAAGTAATCCATCCACTGCTC  
 Y M K N G Q K L D S L S G A N Y E K L V E L I E K H K \*

397 TCTCTGGCACCAAGAGCATGAAAGATGGACCATCTTTGCAAATTAGATCTGCTTAAAGTATTTTGTTTTAGGTTAATAGTGTGTGATTAAGACAAA

496 AGCAAACGTTTTGTTGTTACGGTCATAAATATTCACCTTTTTTCCAAATTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGATTTAAACAAGCACCTGTTGTGGA

595 AATAATTTCTTTTGTGTTGATGAAAATAGTTTAGGCGGCTAATTATTCAGGTGAATATCCAAGATCTTTTCATTATTGCATTAACCTACCAGTGAC

694 TGTTTGTGCCTTTTATGTAATGTAGAGCTTGGATTATAAGATTTCAATAAAGTCTGAATATCTACCAAAAAAAAAAAAAAAAA



**Figure 3. The full length cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence *P.monodon* thioredoxin. The catalytic site (CPGC) and the polyadenylation signal (AATAAA) are underlined.**

```

      *           20           *           40           *           60
EmTrx : MVYQVKDQEDFTKQLNEAGNKLVVIDFYATWCGPCKMIAPKLEELSQSMSDVVFLKVDVD : 60
FcTrx : MVYQVKDQEDFTKQLNEAGNKLVVIDFYATWCGPCKMIAPKLEELSQSMSDVVFLKVDVD : 60
LvTrx : MVYQVKDQEDFTKQLNEAGNKLVVIDFYATWCGPCKMIAPKLEELSQSMSDVVFLKVDVD : 60
HsTrx : MVKQIESKTAFAQEALDAAGDKLVVVDFAATWCGPCKMINEFFHSLSEKYSNVIFLEVDVD : 60
LmTrx : MVYQVKLKAALDGCITKASGKLVVLDFAATWCGPCKMISPKLVLELSTQFADNVVVLKVDV : 60
      MVyQ6kd d qL Ag KLVV6DF ATWCGPCKMI Pkl eLS siv6f6 vdvd

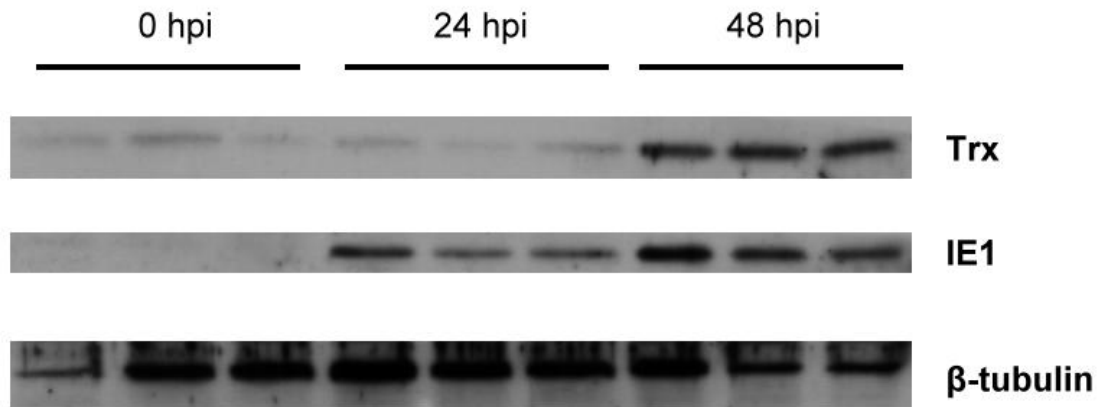
      *           80           *           100
EmTrx : ECEDIAQDNQIACMPTFLYMKNGQKLDLSL SGANYEKLVELTERHK- : 105
FcTrx : ECEDIAQDNQIACMPTFLYMKNGQKLDLSL SGANYDKLVELTERHK- : 105
LvTrx : ECEDIAQDNQIACMPTFLYMKNGQKLDLSL SGANYDKLLELTERNK- : 105
HsTrx : DCQDVASECEVKCTPTTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKLEATNELV- : 105
LmTrx : DECEDIAMEYNISSMPTFVFLKNGVKVEEFAGANAKRLDVIKANI : 106
      c d a c ptf k gqk sgan Kl e 6 k

```

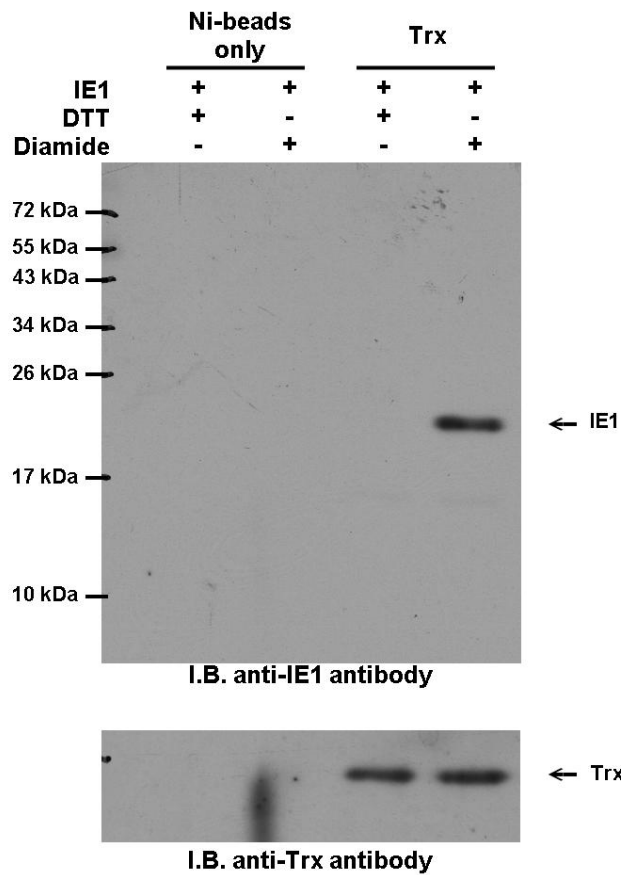


**Figure 4. Multiple sequence alignment of thioredoxin between four species.**

Shaded indicate the percentage of identical amino acid (black is 100%, gray with white letters is 80% and gray with black letters is 60%). LvTrx: *L. vannamei* thioredoxin (ACA60746), FcTrx: *F. chinensis* thioredoxin (ACX30746), PmTrx: *P. monodon* thioredoxin , HsTrx: *H. sapiens* thioredoxin 1 (AAF86466) and DmTrx: *D. melanogaster* thioredoxin (1XWA\_A).



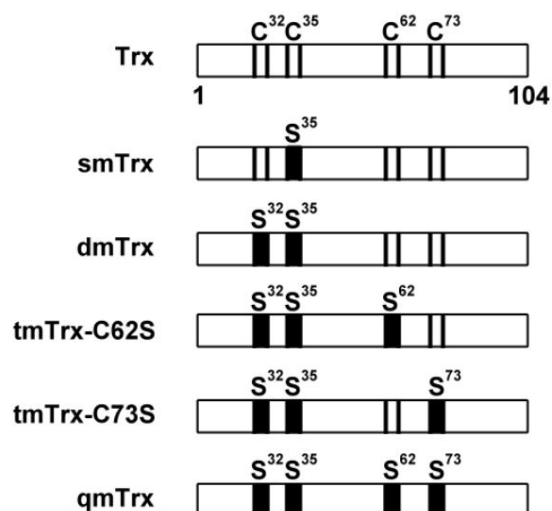
**Figure 5. Protein expression levels of *P. monodon* thioredoxin and WSSV IE1 after WSSV challenge.** Immunoblots with anti-thioredoxin antibody or anti-IE1 antibody of total protein (20  $\mu$ g) extracted from the stomachs of nine individual shrimps. Anti-tubulin antibody was used as the internal control. hpi: number of hours post WSSV challenge.



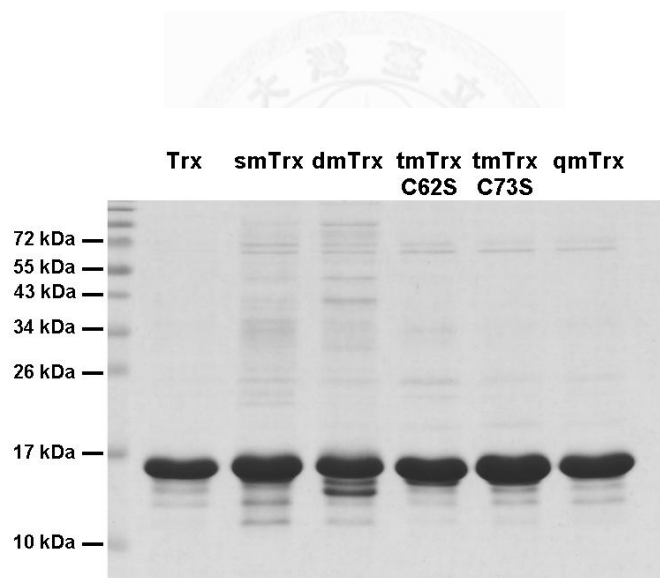
**Figure 6. Pull-down assay of interactions between IE1 and Trx.** Purified, His-tag free IE1 (from pGEX5T-1-IE1) (0.5  $\mu$ g) was mixed with His-tagged Trx (5  $\mu$ g) in NPIT buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole and 0.005% Tween 20, pH=8.0) with 1 mM DTT or 1 mM diamide to a total volume of 200  $\mu$ l. After 30 min incubation at room temperature, 15  $\mu$ l nickel agarose beads were added to the mixture to pull down Trx. After five washes with NPIT buffer, bound protein was eluted by 2 $\times$  sample buffer (25 mM Tris-HCl pH=6.8, 1% SDS, 10% glycerol, 2% beta-mercaptoethanol and 0.005% bromophenol blue). Anti-PmTrx antibody was used to confirm that Trx was pulled-down successfully (lower panel), and anti-IE1 antibody was used to detect the target protein (main panel).



(A)

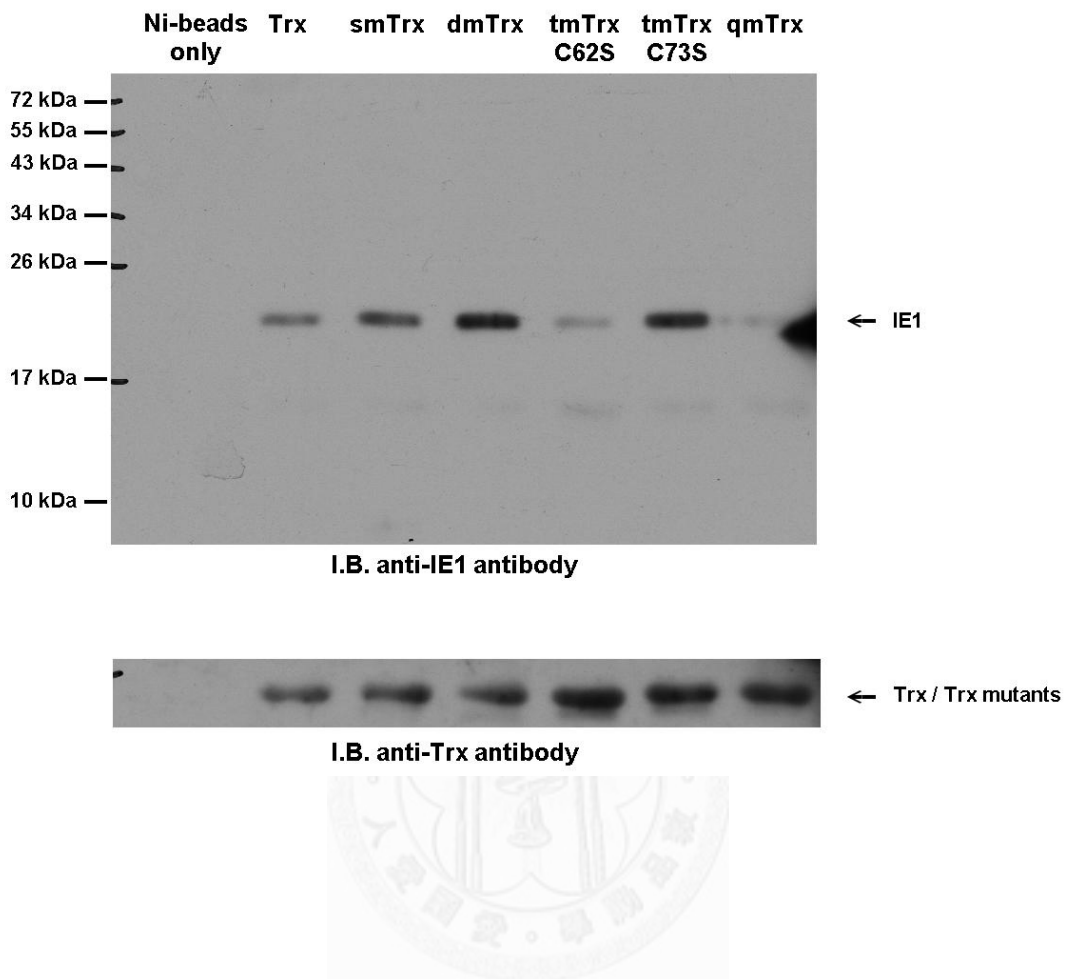


(B)

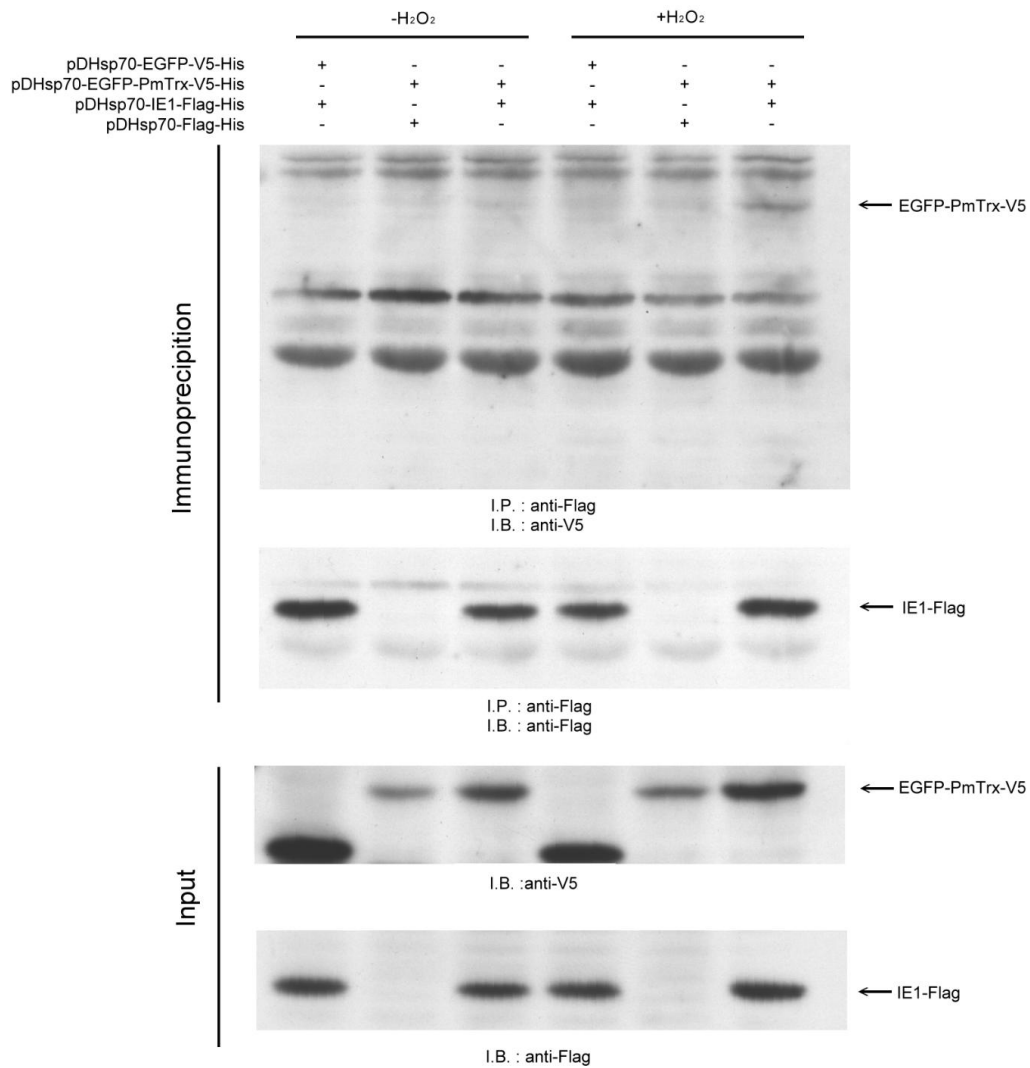


(C. B. B. stained)

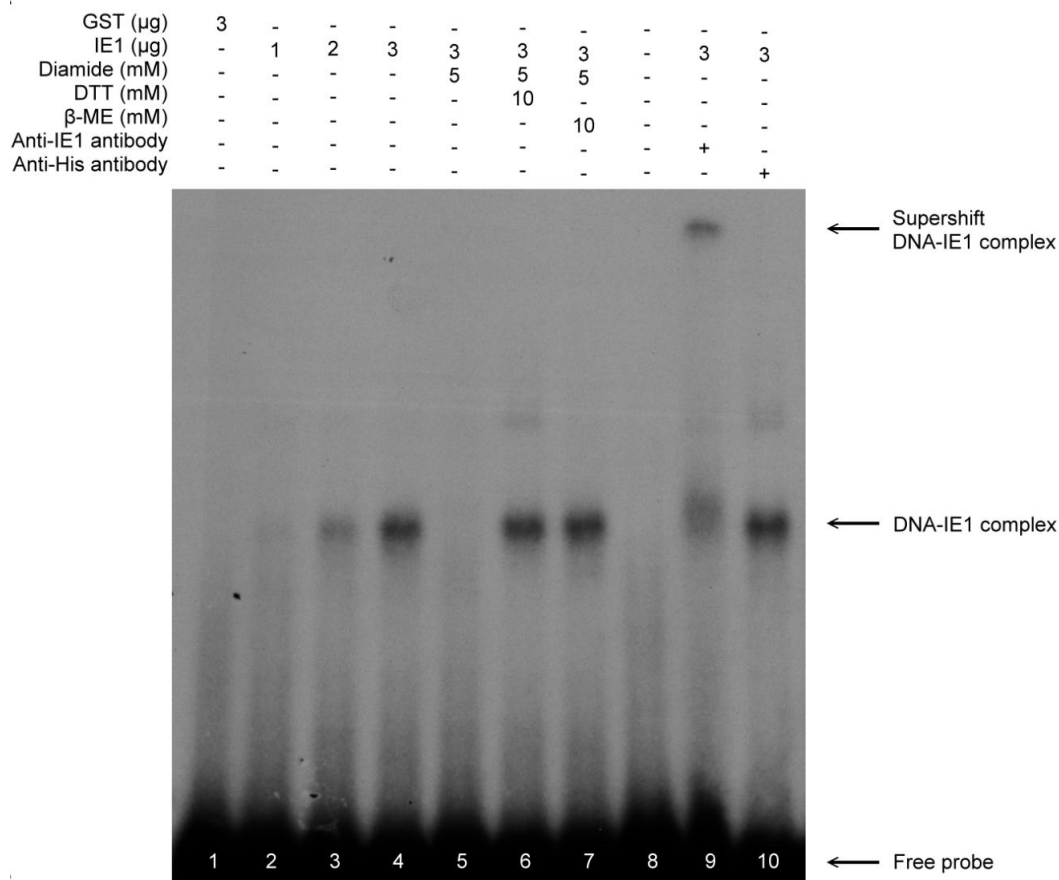
**Figure 7. SDS-PAGE analysis to confirm the expression of the purified Trx and its mutants that were used in the pull-down assay.** (A) Schematic showing the point replacement of cysteine residues by serine residues in the Trx mutants. (B) Five  $\mu\text{g}$  Trx or Trx mutants were loaded on 15 % SDS-PAGE. The results were stained with Coomassie Brilliant Blue.



**Figure 8. Pull-down assay of interactions between IE1 and Trx.** The pull-down assay for the Trx mutants was conducted in the presence of diamide (1mM to a total volume of 200  $\mu$ l). All other conditions were the same as those described above.

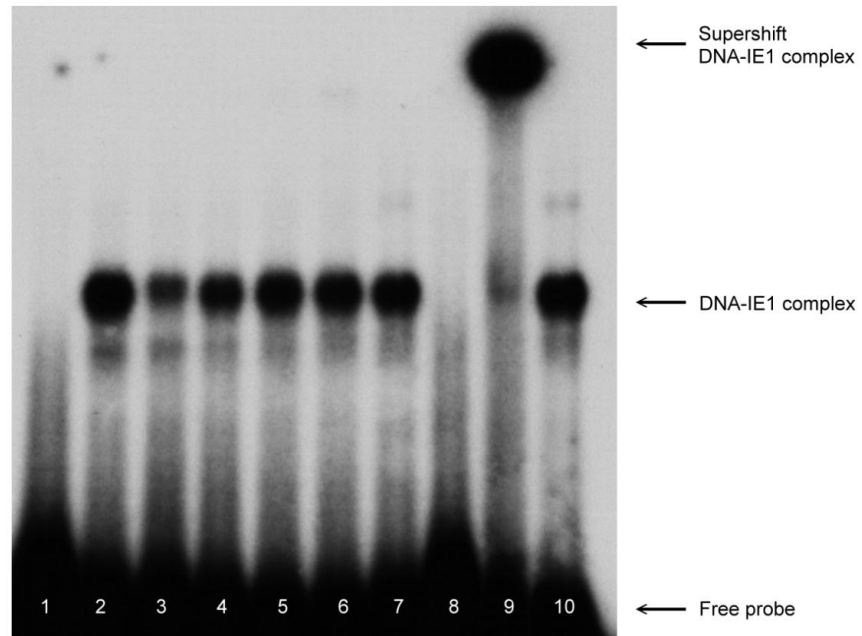


**Figure 9. Protein interaction between shrimp thioredoxin and WSSV IE1 via co-immunoprecipitate assay in Sf9 cell.** After heat shock 6 hours, the transfected Sf9 cells were treated with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min before cells were harvested. The input expression and immunoprecipitated results were confirmed by Western blotting using either anti-V5 antibody or anti-FLAG antibody. The arrows indicate the expressed V5-tagged EGFP, V5-tagged Trx and FLAG-tagged IE1.



**Figure 10. Redox modulation of the DNA binding activity of WSSV IE1.** The DNA binding activity of WSSV IE1 was suppressed by the thio specific oxidant diamide. For this electrophoresis mobility shift assay (EMSA), the purified IE1 protein was pre-incubated at room temperature with 5 mM diamide for 30 min, followed by treatment with 10 mM DTT or 10 mM  $\beta$ -ME for 30 min, and incubation with the  $\alpha$ - $^{32}$ P labeled probe for 30 min (lanes 5-7). Other protocols were as indicated by the lane headings. Lanes 9 and 10 include incubation with an IE1-specific and non-specific (anti-His) antibody, respectively, confirming that the DNA-protein complex contained IE1. IE1-DNA complex as indicated by the arrow.

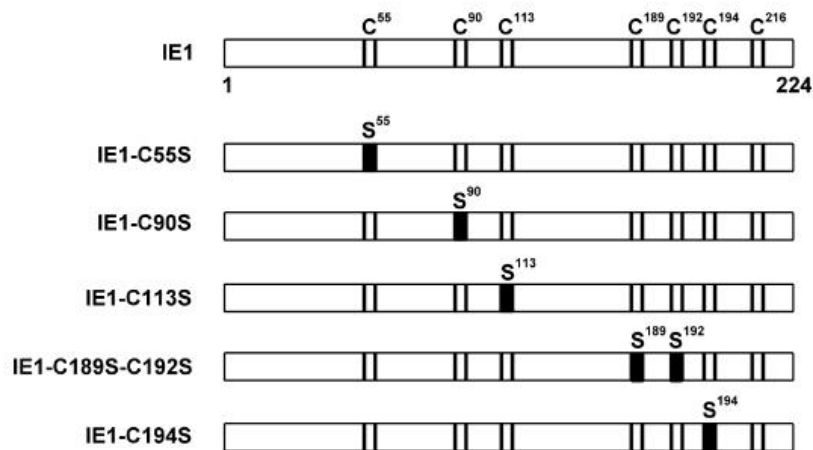
GST ( $\mu\text{g}$ )	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IE1-reduced ( $\mu\text{g}$ )	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IE1-oxidized ( $\mu\text{g}$ )	-	-	1	1	1	1	1	-	1	1
DTT (mM)	-	-	-	-	-	-	10	-	10	10
Anti-IE1 antibody	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Anti-His antibody	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trx ( $\mu\text{g}$ )	-	-	-	1	3	5	-	-	-	-



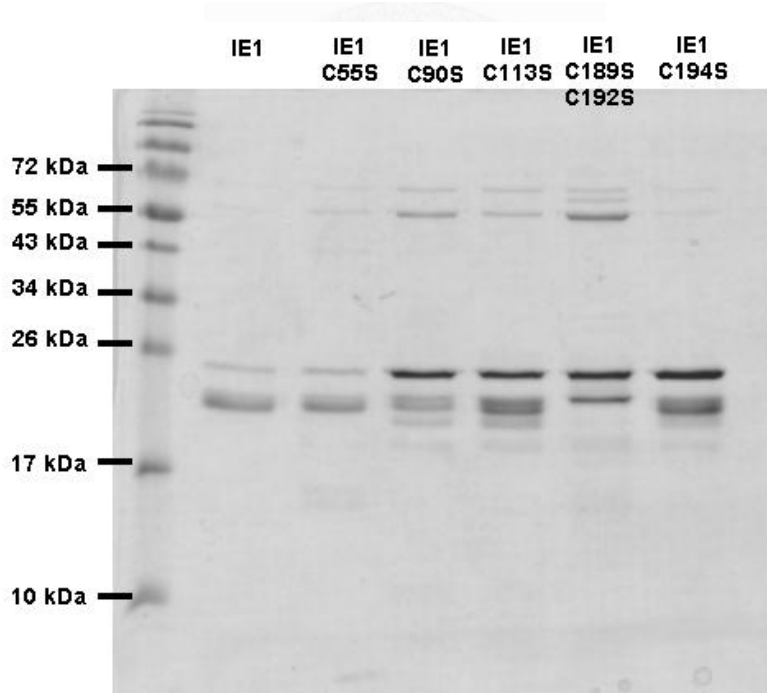
**Figure 11. Thioredoxin restores the DNA binding activity of oxidized WSSV IE1.**

In this EMSA, purified oxidized IE1 protein (1  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 1-5  $\mu\text{g}$  of PmTrx (lanes 4-6). Other protocols were as indicated in the lane headings. IE1-DNA complex is indicated by the arrow.

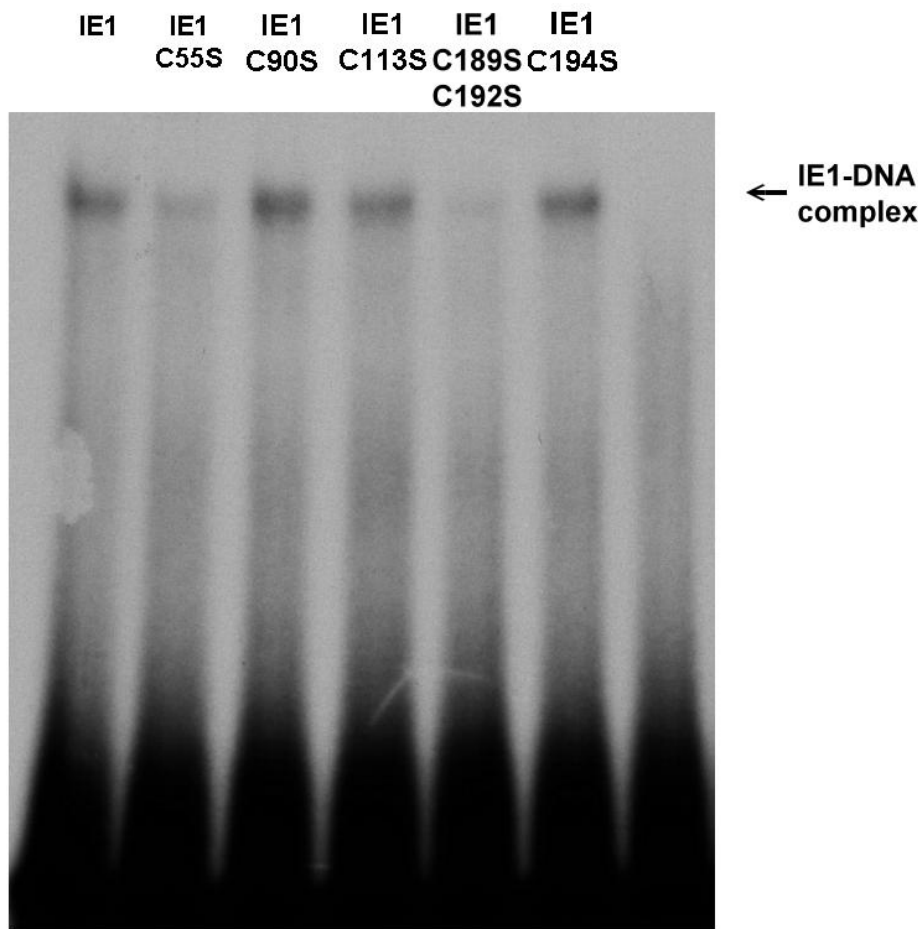
(A)



(B)

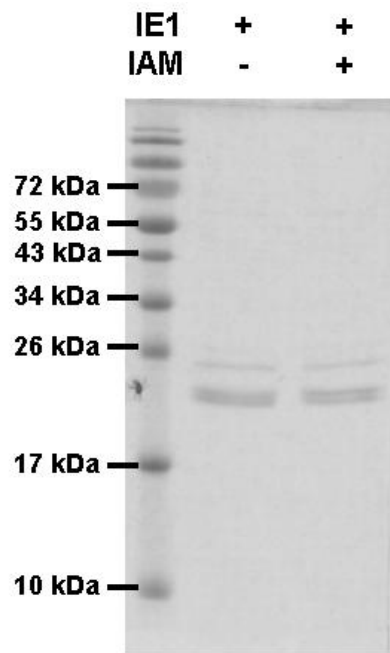


**Figure 12. SDS-PAGE analysis the purified IE1 and its mutants that were used in the EMSA assay.** (A) Schematic showing the point replacement of cysteine residues by serine residues in the WSSV IE1 mutants. (Note: IE1-C216S is not shown because we were unable to express and purify this mutant in sufficient quantity.) (B) To confirm protein expression, 1  $\mu$ g of the purified IE1 and its mutants were loaded on 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue.



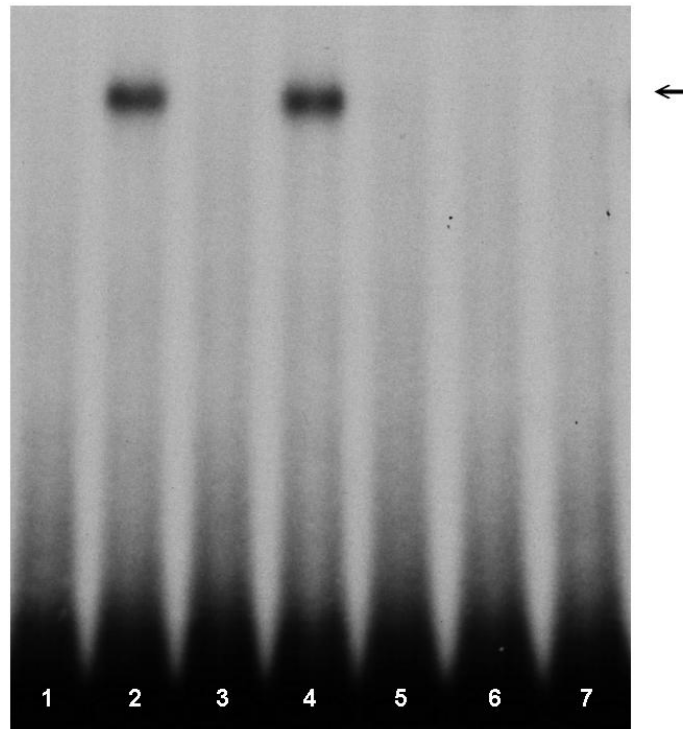
**Figure 13. Identifying the WSSV IE1 cysteine residues that are critical for DNA binding activity.** EMSA reaction using the same protocol described above. IE1-DNA complex is indicated by the arrow.

(A)



(B)

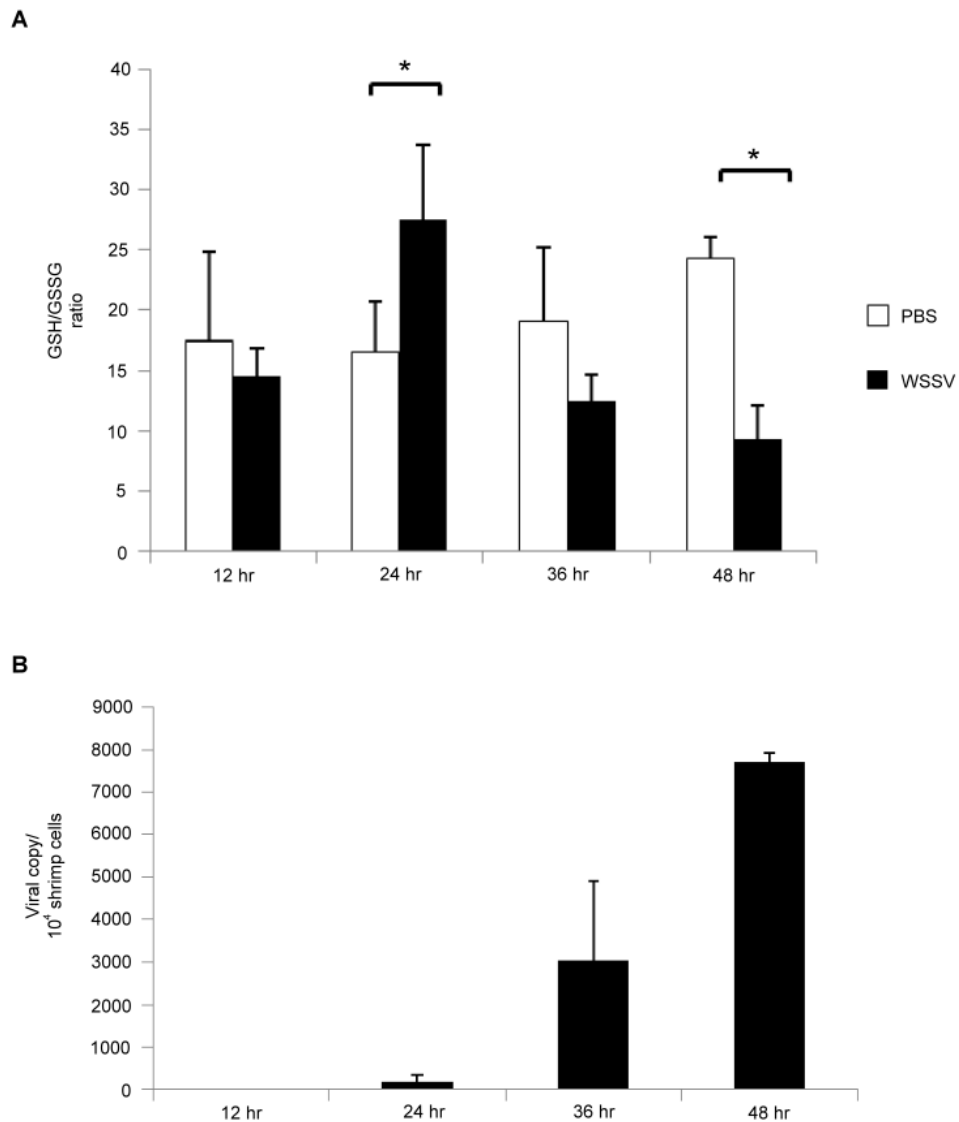
IE1	-	+	+	+	+	+	+
IAM	-	-	-	-	+	+	+
Diamide	-	-	+	+	-	+	+
DTT	-	-	-	+	-	-	+



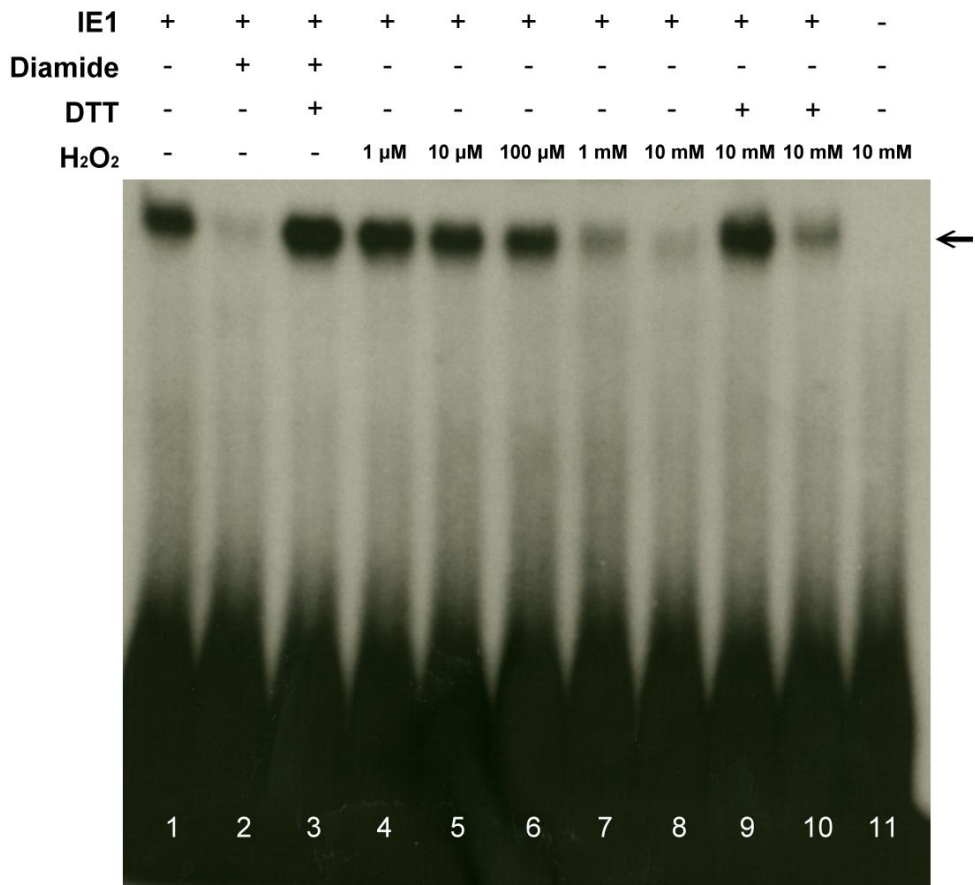


**Figure 14. Irreversible sulfhydryl modifying reagent iodoacetamide inhibits the DNA binding activity of WSSV IE1.** (A) Purified IE1 was treated with 5 mM IAM for 30 min, loaded on 15% SDS-PAGE, and stained with Coomassie Brilliant Blue. The panel shows that there was no degradation of IE1 protein after IAM treatment. (B) IE1 or IAM-treated IE1 was treated with 5 mM diamide for 30 min, and then 15 mM DTT for another 30 min as indicated by the lane headings. The EMSA result suggests that IAM treatment successfully alkylated all of the free cysteine residues and irreversibly prevented formation of the IE1-DNA complex.



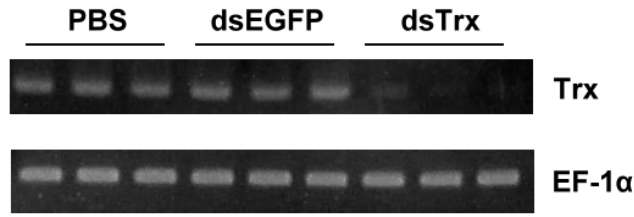


**Figure 15. Oxidative stress in WSSV-infected shrimps.** (A) Shrimps (n=4 for each group; at least 3 different groups for each time point) were injected with WSSV inoculum or PBS, and the GSH/GSSG ratio was measured at 12, 24, 36, 48 hours after challenge. (B) Real-time PCR quantification of the WSSV viral load. Data represent WSSV copy numbers in WSSV-infected shrimp at 12, 24, 36 and 48 hours post challenge. Samples were taken from the same experimental shrimps that were used in the GSH/GSSG assay, and quantified in duplicate. All values are means  $\pm$  SD. An asterisk indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ).

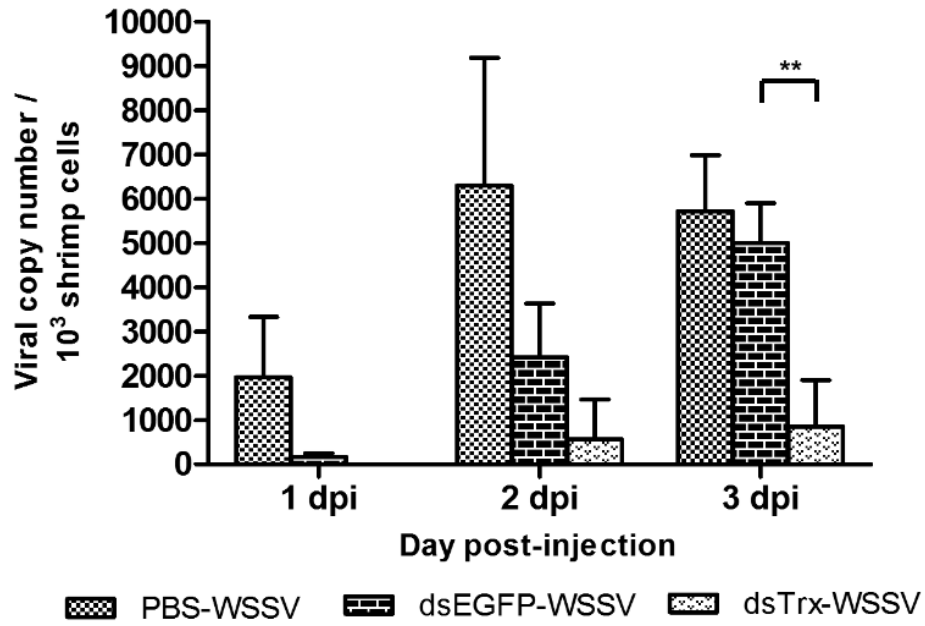


**Figure 16. Hydrogen peroxide inhibit the DNA binding activity of IE1.** For this electrophoresis mobility shift assay (EMSA), the purified IE1 protein was pre-incubated with or without DTT/Diamide at room temperature for 30 min (lane 1 - lane 3), followed by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for another 30 min. Other protocols were as indicated by the lane headings. Lanes 9 included incubation with 10 mM DTT when hydrogen peroxide was supplied in the reaction. Lane 10 included incubation with 10 mM DTT for 30 min after the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment, respectively. IE1-DNA complex is indicated by the arrow.

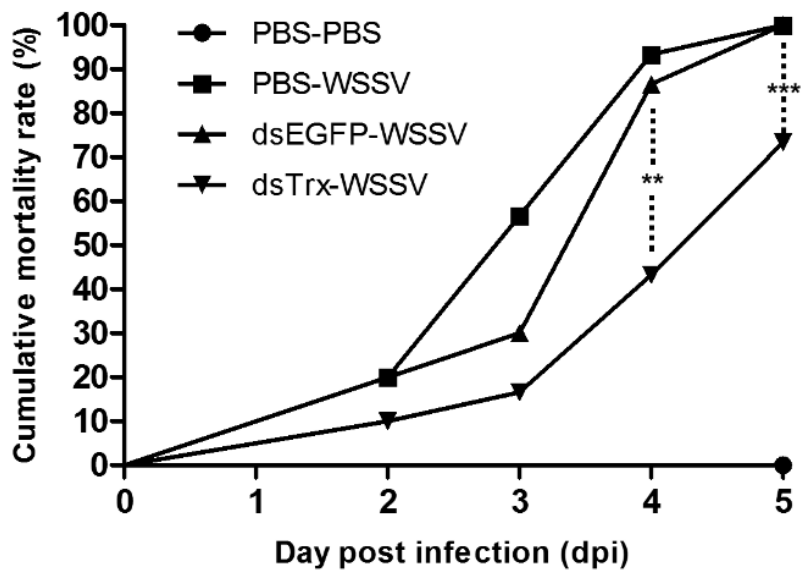
A



B



C



**Figure 17. dsRNA silencing of the shrimp thioredoxin gene and its effects on WSSV challenge.** (A) RT-PCR of total RNA extracted from gill tissue showed that expression of the shrimp thioredoxin gene was suppressed two days after injection with thioredoxin dsRNA. PBS and EGFP dsRNA were used as controls. Each lane represents an individual shrimp. EF-1 $\alpha$  was used as the internal control. (B) Real-time PCR was used to quantify the WSSV viral load in WSSV-infected shrimp at 1, 2 and 3 days post infection. Three shrimps were taken at each time point and quantified in duplicate. All values are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.01$ ). (C) Shrimp ( $n=30$  for each group) were injected with thioredoxin dsRNA, EGFP dsRNA or PBS 2 days prior to WSSV challenge (or PBS injection). Data are presented using a Kaplan-Meier plot. A log rank  $\chi^2$  test found that the dsTrx-injected shrimps had significantly lower mortality than the dsEGFP-injected shrimps at 4 dpi ( $p < 0.01$ ) and 5 dpi ( $p < 0.005$ ).

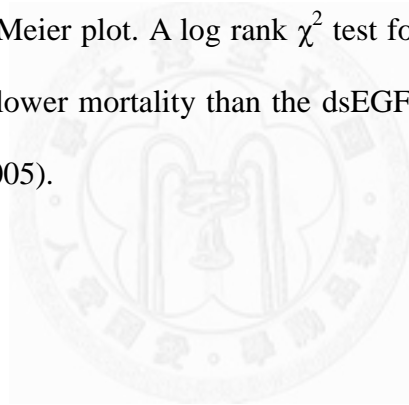


Table 1. Potential non-structural target proteins of thioredoxin based on the presence of a CXXC motif in WSSV annotated ORFs.

WSSV ORF	Protein	Characteristics/Function	GenBank Number	CXXC motif	Location	Reference
WSSV004	WSSV004	Early gene	AAL88872.1	CSAC	169-172	(18)
WSSV039	DNA polymerase	DNA replication	AAL88907.1	CIAC	342-345	(7)
				CLSC	2346-2349	
WSSV108	WSSV108	Immediate-early gene	AAL88976.1	CYTC	64-67	(37)
				CDYC	155-158	
WSSV113	WSSV113	Immediate-early gene	AAL88981.1	CKTC	190-193	(38)
WSSV126	IE1	Immediate-early gene	AAL88994.1	CNAC	189-192	(43-44,46)
WSSV135	WSSV135	Immediate-early gene	AAL89003.1	CASC	67-70	(37)
WSSV136	WSSV136	Immediate-early gene	AAL89004.1	CPIC	13-16	(37)
				CPMC	63-66	
WSSV150	WSSV150	Immediate-early gene	AAL89018.1	CYYC	51-54	(37)
				CYYC	56-59	
				CCYC	65-68	
				CYCC	66-69	
				CYYC	69-72	
				CCCC	72-75	
				CYHC	75-78	
WSSV156	WSSV156	Immediate-early gene	AAL89024.1	CNRC	584-587	(37)
WSSV228	Ribonucleotide reductase large subunit (RR1)	Nucleotide metabolism	AAL89096.1	CEMC	843-846	(39,68)
WSSV277	WSSV277	E3 ligase	AAL89145.1	CGVC	308-311	(20)
				CPMC	355-358	
WSSV304	WSSV304	Immediate-early gene/E3 ligase	AAL89172.1	CVNC	310-313	(76)
				CEKC	354-357	
WSSV454	ChimericThymidine Kinase and Thymidylate Kinase (TK-TMK)	Nucleotide metabolism	AAL89322.1	CMIC	141-144	(69-70)
				CRDC	178-181	
WSSV462	WSSV462	Immediate-early gene/E3 ligase	AAL89330.1	CVGC	271-274	(21,38)
				CVKC	309-312	

Table 2. Potential structural target proteins of thioredoxin based on the presence of a CXXC motif in WSSV annotated ORFs.

WSSV ORF	Protein	Characteristics/Function	GenBank Number	CXXC motif	Location	Reference
WSSV030	VP362	Structural protein	AAL88898.1	CYKC	70-73	(81)
				CPSC	354-357	
				CWIC	379-382	
WSSV134	VP36A	Tegument protein	AAL89002.1	CNNC	251-254	(66-67)
WSSV254	VP320	Structural protein	AAL89122.1	CAIC	743-746	(81)
				CGHC	761-764	
				CPSC	792-795	
WSSV315	VP387	Structural protein	AAL89183.1	CDGC	160-163	(81)
WSSV359	VP184	Structural protein	AAL89227.1	CNAC	696-699	(26)
				CTSC	715-718	
WSSV419	VP664	Capsid protein	AAL89287.1	CQQC	4104-4107	(34,66-67)
WSSV524	VP136B	Immediate early gene/ Structural protein	AAL89392.1	CKGC	464-467	(38,66)
				CKRC	865-868	
				CLRC	884-887	
				CVEC	988-991	
				CDCC	991-994	
	CPWC	1013-1016				

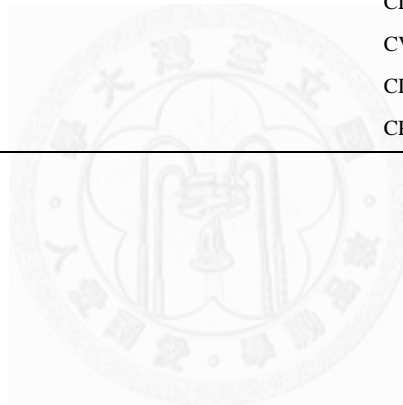


Table 3. Potential target proteins of thioredoxin based on the presence of a CXXC motif in WSSV non-annotated ORFs.

WSSV ORF	GeneBank Number	CXXC motif	Location
WSSV009	AAL88877.1	CHIC	32-35
WSSV013	AAL88881.1	CHRC	632-635
WSSV022	AAL88890.1	CWCC	33-36
WSSV025	AAL88893.1	CSSC	173-176
WSSV027	AAL88895.1	CCMC	462-465
WSSV032	AAL88900.1	CLNC	78-81
WSSV060	AAL88928.1	CSSC	47-50
WSSV107	AAL88975.1	CCRC	57-60
WSSV114	AAL88982.1	CFKC	156-159
WSSV150	AAL89018.1	CYYC	51-54
		CYYC	56-59
		CCYC	65-68
		CYCC	66-69
		CYYC	69-72
		CCCC	72-75
		CYHC	75-78
WSSV158	AAL89026.1	CTVC	5-8
WSSV163	AAL89031.1	CASC	20-23
WSSV175	AAL89043.1	CMAC	562-565
WSSV181	AAL89049.1	CWCC	59-62
		CCCC	61-64
		CCCC	62-65
		CCCC	63-66
		CCCC	64-67
		CCCC	72-75
WSSV186	AAL89054.1	CANC	225-228
WSSV187	AAL89055.1	CHLC	13-16
WSSV188	AAL89056.1	CSFC	43-46
WSSV194	AAL89062.1	CRKC	638-641
WSSV199	AAL89067.1	CSNC	130-133
WSSV216	AAL89084.1	CFLC	32-35
		CYDC	971-974
		CWIC	986-989
		CTLC	1023-1026
WSSV225	AAL89093.1	CNVC	44-47



WSSV ORF	GeneBank Number	CXXC motif	Location
WSSV240	AAL89108.1	CEKC	276-279
		CDRC	297-300
		CNKC	388-391
		CPPC	408-411
WSSV258	AAL89126.1	CVRC	108-111
WSSV262	AAL89130.1	CRNC	83-86
WSSV263	AAL89131.1	CFSC	32-35
WSSV264	AAL89132.1	CISC	81-84
WSSV282	AAL89150.1	CEKC	75-78
WSSV303	AAL89171.1	CCYC	70-73
		CYCC	71-74
WSSV307	AAL89175.1	CTLC	497-500
WSSV322	AAL89190.1	CSIC	129-132
WSSV328	AAL89196.1	CSWC	62-65
WSSV340	AAL89208.1	CNNC	782-785
WSSV346	AAL89214.1	CCCC	13-16
		CCCC	14-17
		CCFC	16-19
WSSV350	AAL89218.1	CSDC	47-50
WSSV355	AAL89223.1	CISC	46-49
WSSV371	AAL89239.1	CCYC	24-27
WSSV383	AAL89251.1	CQRC	484-487
WSSV388	AAL89256.1	CAAC	174-177
WSSV389	AAL89257.1	CAYC	38-41
WSSV399	AAL89267.1	CPNC	2723-2726
WSSV401	AAL89269.1	CELC	101-104
WSSV438	AAL89306.1	CSCC	8-11
WSSV456	AAL89324.1	CVIC	168-171
WSSV464	AAL89332.1	CMKC	176-179
WSSV477	AAL89345.1	CLGC	22-25
WSSV493	AAL89361.1	CFTC	120-123
WSSV500	AAL89368.1	CPSC	130-133
WSSV527	AAL89395.1	CPSC	21-24

Table 4. The primer sets used for the construction of various expression plasmids.

Plasmid	primer sets	Usage	Vector
pET28b-IE1	IE1-F/IE1-R	protein expression	pET-28b
pET28b-Trx	Trx-F/Trx-R	protein expression	pET-28b
pET28b-sm-Trx *	smTrx-F/smTrx-R	protein expression	pET28b-Trx
pET28b-dm-Trx †	dmTrx-F/dmTrx-R	protein expression	pET28b-Trx
pET28b-tm-Trx-C62S ‡	tmTrx-C62S-F/tmTrx-C62S-R	protein expression	pET28b-dm-Trx
pET28b-tm-Trx-C73S ‡	tmTrx-C73S-F/tmTrx-C73S-R	protein expression	pET28b-dm-Trx
pET28b-qm-Trx §	tmTrx-C73S-F/tmTrx-C73S-R	protein expression	pET28b-tm-Trx-C62S
pGEX5T-1-IE1-C55S	IE1-C55S-F/IE1-C55S-R	protein expression	pGEX5T-1-IE1
pGEX5T-1-IE1-C90S	IE1-C90S-F/IE1-C90S-R	protein expression	pGEX5T-1-IE1
pGEX5T-1-IE1-C113S	IE1-C113S-F/IE1-C113S-R	protein expression	pGEX5T-1-IE1
pGEX5T-1-IE1-C189S-C192S	IE1-C189S-C192S-F/IE1-C189S-C192S-R	protein expression	pGEX5T-1-IE1
pGEX5T-1-IE1-C194S	IE1-C194S-F/IE1-C194S-R	protein expression	pGEX5T-1-IE1
pDHsp70-EGFP-V5-His	EGFP-V5-F/EGFP-V5-R	Coimmunoprecipitation	pDHsp70-V5-His
pDHsp70-EGFP-PmTrx-V5-His	Trx-V5-F/Trx-V5-R	Coimmunoprecipitation	pDHsp70-EGFP-V5-His
pDHsp70-IE1-Flag-His	IE1-Flag-F/IE1-Flag-R	Coimmunoprecipitation	pDHsp70-Flag-His

\*sm- single mutation

†dm- double mutation

‡tm-triple mutation

§qm-quadruple mutation

Table 5. Primer sequences used in this study.

Primer Sets	primer sequences (5'-3')*
IE1-F	5'- <u>CCCGGATCCGATGGCCTTTAATTTTGAAGA</u> -3'
IE1-R	5'-GGG <u>CTCGAGTACAAAGAATCCAGAAATC</u> -3'
Trx-F	5'- <u>CCGGGATCCGATGGTGTACCAAGTGAAAGATC</u> -3'
Trx-R	5'- <u>CCCCTCGAGCTTGTGCTTCTCGATGAGTTC</u> -3'
smTrx-F	5'- <u>TCCAAAATGATTGCACCTAAG</u> -3'
smTrx-R	5'-TGGCCCACACCAGGTGGCGTAG-3'
dmTrx-F	5'- <u>TCCAAAATGATTGCACCTAAG</u> -3'
dmTrx-R	5'-TGGCCC <u>AGACC</u> AGGTGGCG-3'
tmTrx-C62S-F	5'-GA <u>ATCCGAAGACATTGCC</u> -3'
tmTrx-C62S-R	5'-GTCCACATCCACCTCAGG-3'
tmTrx-C73S-F	5'-GCA <u>TCCATGCCTACTTTTCTG</u> -3'
tmTrx-C73S-R	5'-AATCTGGTTATCTTGGGC-3'
IE1-C55S-F	5'-AAG <u>TCTGGGAATTTTGAAGC</u> -3'
IE1-C55S-R	5'-TCCTTGCCGTACGAGACGCC-3'
IE1-C90S-F	5'-ACAAAC <u>TCTTGGCATTATTC</u> -3'
IE1-C90S-R	5'-CTTGACATGGGAACCACTGTTG-3'
IE1-C113S-F	5'-TAC <u>TCTACTTTTCCCAATAC</u> -3'
IE1-C113S-R	5'-CTGTCCATGTCGATCAGTCTC-3'
IE1-C189S-C192-F	5'-TA <u>TCTAATGCGTCTAGGTGC</u> -3'
IE1-C189S-C192-R	5'-CAGAAAACATTGGGTTTGAT-3'
IE1-C194S-F	5'-AGG <u>TCCAAGTACCCAGGCC</u> -3'
IE1-C194S-R	5'-ACACGCATTACATACAGAAAAC-3'
EGFP-V5-F	5'-CCC <u>AAGCTT</u> ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
EGFP-V5-R	5'-CGCGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
Trx-V5-F	5'-GGG <u>CCGCGGATGGTGTACCAAGTGAAAGA</u> -3'
Trx-V5-R	5'-GGG <u>CCGCGGCTTGTGCTTCTCGATGAGTT</u> -3'
IE1-Flag-F	5'-CCC <u>AAGCTT</u> CTCAAGATGGCCTTTAATTTG-3'
IE1-Flag-R	5'-TCCC <u>GCGGTACAAAGAATCCAGAAATCTCA</u> -3'

\*Restriction enzyme cutting sites and mutated sites are underlined.

## 文獻探討

1. Ahn BY, Moss B. Glutaredoxin homolog encoded by vaccinia virus is a virion-associated enzyme with thioltransferase and dehydroascorbate reductase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7060-4, 1992.
2. Aispuro-Hernandez E, Garcia-Orozco KD, Muhlia-Almazan A, Del-Toro-Sanchez L, Robles-Sanchez RM, Hernandez J, Gonzalez-Aguilar G, Yepiz-Plascencia G, Sotelo-Mundo RR. Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 148: 94-99, 2008.
3. Aslund F, Beckwith J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* 96: 751-3, 1999.
4. Bacik JP, Brigley AM, Channon LD, Audette GF, Hazes B. Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of an ectromelia virus glutaredoxin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61: 550-2, 2005.
5. Bauer H, Kanzok SM, Schirmer RH. Thioredoxin-2 but not thioredoxin-1 is a substrate of thioredoxin peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of a second thioredoxin in *D. Melanogaster* and evidence for distinct biological functions of Trx-1 and Trx-2. *J Biol Chem* 277: 17457-63, 2002.
6. Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massignan T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9745-9, 2002.
7. Chen LL, Wang HC, Huang CJ, Peng SE, Chen YG, Lin SJ, Chen WY, Dai CF, Yu HT, Wang CH, Lo CF, Kou GH. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301: 136-47, 2002.
8. Darling AJ. The Principal Hydrogen Donor for the Herpes-Simplex Virus Type-1-Encoded Ribonucleotide Reductase in Infected-Cells Is a Cellular Thioredoxin. *Journal of General Virology* 69: 515-523, 1988.
9. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18: 1905-14, 1999.
10. Fabianek RA, Hennecke H, Thony-Meyer L. Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 303-16, 2000.
11. Fitzgerald LA, Zhang Y, Lewis G, Van Etten JL. Characterization of a monothiol

- glutaredoxin encoded by Chlorella virus PBCV-1. *Virus Genes* 39: 418-26, 2009.
12. Fraternali A, Paoletti MF, Casabianca A, Nencioni L, Garaci E, Palamara AT, Magnani M. GSH and analogs in antiviral therapy. *Mol Aspects Med* 30: 99-110, 2009.
  13. Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Masutani H, Yodoi J. Coexpression of adult T-cell leukemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, and human papillomavirus DNA in neoplastic cervical squamous epithelium. *Cancer* 68: 1583-91, 1991.
  14. Garcia-Orozco KD, Sanchez-Paz A, Aispuro-Hernandez E, Gomez-Jimenez S, Lopez-Zavala A, Araujo-Bernal S, Muhlia-Almazan A. Gene expression and protein levels of thioredoxin in the gills from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with two different viruses: the WSSV or IHNV. *Fish Shellfish Immunol* 32: 1141-7, 2012.
  15. Gasdaska JR, Kirkpatrick DL, Montfort W, Kuperus M, Hill SR, Berggren M, Powis G. Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys73-->Ser mutation. *Biochem Pharmacol* 52: 1741-7, 1996.
  16. Gvakharia BO, Koonin EK, Mathews CK. Vaccinia virus G4L gene encodes a second glutaredoxin. *Virology* 226: 408-11, 1996.
  17. Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol* 4: 743-9, 2002.
  18. Han F, Xu J, Zhang X. Characterization of an early gene (wsv477) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Virus Genes* 34: 193-8, 2007.
  19. Hashemy SI, Holmgren A. Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues. *J Biol Chem* 283: 21890-8, 2008.
  20. He F, Fenner BJ, Godwin AK, Kwang J. White spot syndrome virus open reading frame 222 encodes a viral E3 ligase and mediates degradation of a host tumor suppressor via ubiquitination. *J Virol* 80: 3884-92, 2006.
  21. He F, Kwang J. Identification and characterization of a new E3 ubiquitin ligase in white spot syndrome virus involved in virus latency. *Virol J* 5: 151, 2008.
  22. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3633-8, 1997.
  23. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem*

- 274: 27891-7, 1999.
24. Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 210-214, 2003.
  25. Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-71, 1985.
  26. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hu Z, Hew CL. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Mol Cell Proteomics* 1: 223-31, 2002.
  27. Huang JY, Liu WJ, Wang HC, Lee DY, Leu JH, Tsai MH, Kang ST, Chen IT, Kou GH, Chang GD, Lo CF. Penaeus monodon Thioredoxin Restores the DNA Binding Activity of Oxidized White Spot Syndrome Virus IE1. *Antioxid Redox Signal*, 2012.
  28. Huang Y, Domann FE. Redox modulation of AP-2 DNA binding activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 307-12, 1998.
  29. Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Muller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer R, Becker K. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in Drosophila melanogaster. *Science* 291: 643-6, 2001.
  30. Kurooka H, Kato K, Minoguchi S, Takahashi Y, Ikeda J, Habu S, Osawa N, Buchberg AM, Moriwaki K, Shisa H, Honjo T. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* 39: 331-9, 1997.
  31. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B. *J Biol Chem* 239: 3436-44, 1964.
  32. Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected Penaeus monodon. *BMC Genomics* 8, 2007.
  33. Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected Penaeus monodon. *BMC Genomics* 8: 120, 2007.
  34. Leu JH, Tsai JM, Wang HC, Wang AH, Wang CH, Kou GH, Lo CF. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *J Virol* 79: 140-9, 2005.
  35. Leu JH, Yang F, Zhang X, Xu X, Kou GH, Lo CF. Whispovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 328: 197-227, 2009.
  36. Levenson CW, Fitch CA. Effect of altered thyroid hormone status on rat brain

- ferritin H and ferritin L mRNA during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 119: 105-9, 2000.
37. Li F, Li M, Ke W, Ji Y, Bian X, Yan X. Identification of the immediate-early genes of white spot syndrome virus. *Virology* 385: 267-74, 2009.
  38. Lin F, Huang H, Xu L, Li F, Yang F. Identification of three immediate-early genes of white spot syndrome virus. *Arch Virol*, 2011.
  39. Lin ST, Chang YS, Wang HC, Tzeng HF, Chang ZF, Lin JY, Wang CH, Lo CF, Kou GH. Ribonucleotide reductase of shrimp white spot syndrome virus (WSSV): expression and enzymatic activity in a baculovirus/insect cell system and WSSV-infected shrimp. *Virology* 304: 282-90, 2002.
  40. Liu WJ, Chang YS, Huang WT, Chen IT, Wang KC, Kou GH, Lo CF. Penaeus monodon TATA Box-Binding Protein Interacts with the White Spot Syndrome Virus Transactivator IE1 and Promotes Its Transcriptional Activity. *J Virol* 85: 6535-47, 2011.
  41. Liu WJ, Chang YS, Huang WT, Chen IT, Wang KCHC, Kou GH, Lo CF. Penaeus monodon TATA Box-Binding Protein Interacts with the White Spot Syndrome Virus Transactivator IE1 and Promotes Its Transcriptional Activity. *Journal of Virology* 85: 6535-6547, 2011.
  42. Liu WJ, Chang YS, Wang AH, Kou GH, Lo CF. WSSV has Successfully Annexed a Shrimp STAT To Enhance the Expression of the Immediate Early Gene (ie1). *J Virol*, 2006.
  43. Liu WJ, Chang YS, Wang AH, Kou GH, Lo CF. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene ie1. *J Virol* 81: 1461-71, 2007.
  44. Liu WJ, Chang YS, Wang CH, Kou GH, Lo CF. Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. *Virology* 334: 327-41, 2005.
  45. Liu WJ, Chang YS, Wang HC, Leu JH, Kou GH, Lo CF. Transactivation, Dimerization, and DNA-Binding Activity of White Spot Syndrome Virus Immediate-Early Protein IE1. *Journal of Virology* 82: 11362-11373, 2008.
  46. Liu WJ, Chang YS, Wang HC, Leu JH, Kou GH, Lo CF. Transactivation, dimerization, and DNA-binding activity of white spot syndrome virus immediate-early protein IE1. *J Virol* 82: 11362-73, 2008.
  47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402-8, 2001.
  48. Mai WJ, Wang WN. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp

- lysozyme. *Fish Shellfish Immunol* 28: 727-33, 2010.
49. Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H. Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* 274: 3182-8, 1999.
  50. Masutani H, Hirota K, Sasada T, Ueda-Taniguchi Y, Taniguchi Y, Sono H, Yodoi J. Transactivation of an inducible anti-oxidative stress protein, human thioredoxin by HTLV-I Tax. *Immunol Lett* 54: 67-71, 1996.
  51. Masutani H, Naito M, Takahashi K, Hattori T, Koito A, Takatsuki K, Go T, Nakamura H, Fujii S, Yoshida Y, et al. Dysregulation of adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/thioredoxin in HIV infection: loss of ADF high-producer cells in lymphoid tissues of AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1707-15, 1992.
  52. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20: 3821-30, 1992.
  53. Munro HN, Linder MC. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev* 58: 317-96, 1978.
  54. Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, Holmgren A, Herzenberg LA. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 8: 603-11, 1996.
  55. Nilsson O, Tapia O, van Gunsteren WF. Structure and fluctuations of bacteriophage T4 glutaredoxin modelled by molecular dynamics. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 581-8, 1990.
  56. Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* 28: 1405-20, 2000.
  57. Ren Q, Zhang RR, Zhao XF, Wang JX. A thioredoxin response to the WSSV challenge on the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151: 92-8, 2010.
  58. Ruan YH, Kuo CM, Lo CF, Lee MH, Lian JL, Hsieh SL. Ferritin administration effectively enhances immunity, physiological responses, and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 542-548, 2010.
  59. Sasada T, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Sono H, Takabayashi A, Yodoi J. Thioredoxin-mediated redox control of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) gene expression. *Mol Immunol* 38: 723-32, 2002.
  60. Sengupta R, Holmgren A. Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal*, 2012.



61. Sono H, Teshigawara K, Sasada T, Takagi Y, Nishiyama A, Ohkubo Y, Maeda Y, Tatsumi E, Kanamaru A, Yodoi J. Redox control of Epstein-Barr virus replication by human thioredoxin/ATL-derived factor: differential regulation of lytic and latent infection. *Antioxid Redox Signal* 1: 155-65, 1999.
62. Spector A, Yan GZ, Huang RR, McDermott MJ, Gascoyne PR, Pigiet V. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J Biol Chem* 263: 4984-90, 1988.
63. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, Yodoi J. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 33: 616-22, 2000.
64. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai K, Yokota T, Wakasugi H, et al. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J* 8: 757-64, 1989.
65. Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, Sritunyalucksana K, Phongdara A, Pongsomboon S, Supungul P, Tang S, Kuphanumart K, Pichyangkura R, Lursinsap C. Penaeus monodon gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 384: 104-12, 2006.
66. Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Hsiao HH, Wang AH, Kou GH, Lo CF. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol* 78: 11360-70, 2004.
67. Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Wang AH, Zhuang Y, Walker PJ, Kou GH, Lo CF. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol* 80: 3021-9, 2006.
68. Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Vlak JM, Kou GH. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-9, 2000.
69. Tsai MF, Yu HT, Tzeng HF, Leu JH, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Kou GH, Lo CF. 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: 100-10, 2000.
70. Tzeng HF, Chang ZF, Peng SE, Wang CH, Lin JY, Kou GH, Lo CF. Chimeric polypeptide of thymidine kinase and thymidylate kinase of shrimp white spot syndrome virus: thymidine kinase activity of the recombinant protein expressed in a baculovirus/insect cell system. *Virology* 299: 248-55, 2002.
71. Ueno M, Masutani H, Arai RJ, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, Inamoto T,

- Yamaoka Y, Yodoi J, Nikaido T. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274: 35809-15, 1999.
72. VanLandingham JW, Levenson CW. Effect of retinoic acid on ferritin H expression during brain development and neuronal differentiation. *Nutr Neurosci* 6: 39-45, 2003.
73. Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, Toledano MB, Hidalgo E. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8875-80, 2005.
74. Wang KC, Kondo H, Hirono I, Aoki T. The *Marsupenaeus japonicus* voltage-dependent anion channel (MjVDAC) protein is involved in white spot syndrome virus (WSSV) pathogenesis. *Fish Shellfish Immunol* 29: 94-103, 2010.
75. Wang X, Ling S, Zhao D, Sun Q, Li Q, Wu F, Nie J, Qu L, Wang B, Shen X, Bai Y, Li Y. Redox Regulation of Actin by Thioredoxin-1 Is Mediated by the Interaction of the Proteins via Cysteine 62. *Antioxid Redox Signal*, 2010.
76. Wang Z, Chua HK, Gusti AA, He F, Fenner B, Manopo I, Wang H, Kwang J. RING-H2 protein WSSV249 from white spot syndrome virus sequesters a shrimp ubiquitin-conjugating enzyme, PvUbc, for viral pathogenesis. *J Virol* 79: 8764-72, 2005.
77. Watson WH, Pohl J, Montfort WR, Stuchlik O, Reed MS, Powis G, Jones DP. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J Biol Chem* 278: 33408-15, 2003.
78. Weichsel A, Gasdaska JR, Powis G, Montfort WR. Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* 4: 735-51, 1996.
79. White CL, Weisberg AS, Moss B. A glutaredoxin, encoded by the G4L gene of vaccinia virus, is essential for virion morphogenesis. *J Virol* 74: 9175-83, 2000.
80. Yeh SP, Chen YN, Hsieh SL, Cheng WT, Liu CH. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 582-588, 2009.
81. Zhang X, Huang C, Tang X, Zhuang Y, Hew CL. Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. *Proteins* 55: 229-35, 2004.
82. Zheng M, Aslund F, Storz G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-21, 1998.

### 個人相關著作

1. **Huang JY\***, Liu WJ, Wang KH, Lee DY, Leu JH, Wang HC, Tsai MH, Kang ST, Chen IT, Kou GH, Chang GD, Lo CF. *Penaeus monodon* thioredoxin restores the DNA binding activity of oxidized WSSV IE1. *Antioxid Redox Signal*, 17(6): 914-926, 2012. [IF=8.456, Endocrinology & Metabolism, ranking 5/121 =Top 4.1 %; Biochemistry and Molecular biology, ranking 25/289=Top 8.7 %]
2. Leu JH, Lin SJ, **Huang JY**, Chen TC, Lo CF. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish Shellfish Immun.* 2012. (Accepted) [IF=3.044, Veterinary Science, ranking 4/145=Top 2.75%; MARINE & FRESHWATER BIOLOGY, ranking 9/93=Top 9.67%; Fisheries, ranking 5/46 =Top 10.8%; Immunology, ranking 58/134 =Top 43.28%;]
3. Lin SJ, Hsia HL, Liu WJ, **Huang JY**, Liu KF, Chen WY, Yeh YC, Huang YT, Lo CF, Kou KH, Wang HC. Spawning stress triggers WSSV replication in brooders via the activation of shrimp STAT. *Dev Comp Immunol.* 2012. (Accepted) [IF=3.293, Zoology, ranking 4/145=Top 2.8%; Immunology, ranking 51/134=Top 38%]
4. Chen IT, Aoki T, Huang YT, Hirono I, Chen TC, **Huang JY**, Chang GD, Lo CF, Wang HC. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J Virol* 85: 12919-28, 2011. [IF=5.189, Virology, ranking 5/33=Top 15.2%]
5. Chang YS, Liu WJ, Lee CC, Chou TL, Lee YT, Wu TS, **Huang JY**, Huang WT, Lee TL, Kou GH, Wang AH, Lo CF. A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins. *PLoS ONE* 5: e10718, 2010. [IF=4.411, Biology, ranking 12/86=Top 14%]

## 研討會論文

1. J. Y. Huang. 2012. *Penaeus monodon* thioredoxin restores the DNA binding activity of oxidized WSSV IE1. The 27th joint annual conference of biomedical sciences, Taipei, Taiwan. (Oral presentation)
2. J. Y. Huang, W. J. Liu, H. C. Wang, G. D. Chang and C. F. Lo. 2011. *Penaeus monodon* thioredoxin restores the DNA binding activity of oxidized WSSV IE1. Eighth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Mangalore, India.
3. J. Y. Huang, G. H. Kou, G. D. Chang and C. F. Lo. 2010. Redox controls the DNA binding activity of white spot syndrome virus (WSSV) immediate early protein #1 (IE1). Kanagawa University-National Taiwan University Symposium, Taipei, Taiwan.
4. J. Y. Huang, M. F. Tsai, G. H. Kou and C. F. Lo. 2008. Gene Expression Profiling of White Spot Syndrome Virus- Challenged *P. monodon* Shrimp. Seventh Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Taipei, Taiwan.