

國立台灣大學生命科學院漁業科學所

碩士論文

Graduate Institute of Fisheries Science


College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

石斑魚虹彩病毒 108L 極早期基因之特性鑑定

Identification and characterization of the ORF108L, an
immediate-early gene of grouper iridovirus



研究生：徐靖惠 撰

Ching-Hui Hsu

指導教授：陳秀男 博士

張繼堯 博士

Advisors: Shiu-Nan Chen, Ph.D

Chi-Yao Chang, Ph.D

中華民國100年7月

July, 2011

謝辭

兩年的碩士生涯轉眼間就結束了，首先感謝陳秀男老師與張繼堯老師的耐心指導，提供良好的研究環境，以及悉心地督促叮嚀，讓我能順利地完成碩士論文。此外感謝口試委員林正輝老師對本論文詳細地審閱，並提供寶貴的意見使本論文內容更為完善，再次謝謝各位老師的指導。

感謝志鴻學長與雅南學長不厭其煩地提醒實驗中需要注意的事項，並且辛苦地張羅實驗室大大小小的事務，使我能更安心、更順利地進行研究。感謝立雄學長與香爾學姐時常與我一起討論實驗結果，解決許多實驗上遇到的難題。感謝明山學長、建文學長、耀甥學長與琇婷學姐在實驗上的指教，培養我更縝密的邏輯思考，協助我學習到更多的實驗技巧。謝謝佳慧同學時常與我分享生活點滴，使我能保持愉悅的心情做實驗；謝謝于正同學時常泡咖啡，使得實驗室總能瀰漫著咖啡香氣，同時幫忙我跟佳慧處理一些公眾事務。謝謝政霖與賓鴻不時地分享釣魚和養魚的小知識，以及經常開玩笑增添實驗室歡樂的氣氛，此外也感謝滅菌室阿姨在實驗上的協助。感謝中研院細生所 R336 的每一位成員，謝謝你們的陪伴使得這兩年的實驗生活能夠更多采多姿。

最後感謝我的家人與仕成一路的陪伴與支持，包容我的任性，耐心地傾聽我在生活上遇到的困境，適時地提供寶貴意見並鼓勵我繼續完成學業。因為有你們我才能順利地完成碩士學位，謝謝大家。

摘要

石斑魚(*Epinephelus* spp.)為台灣重要的經濟養殖魚種之一，卻長期飽受虹彩病毒威脅，使得石斑魚養殖業面臨重大的經濟損害，因此研究虹彩病毒為刻不容緩的課題。石斑魚虹彩病毒(grouper iridovirus, GIV)的基因依據轉錄的先後順序可分為三大類：極早期基因(immediate early gene)、早期基因(early gene)和晚期基因(late gene)；其中，極早期基因能藉由調控病毒基因表現或改變宿主細胞的生理狀態，例如影響宿主細胞生長週期、細胞凋亡以及免疫防禦系統等，促進病毒進行複製增殖，因此極早期基因對於病毒感染宿主具有重要功能。本實驗室分析石斑魚虹彩病毒基因表現次序，推測其具有二十一個極早期基因，其中包含了 ORF108L。108L 基因全長為 1,149 個鹼基對，由 382 個胺基酸組成，蛋白質分子量 44.1 kDa，經由序列分析比對顯示其與 ICP46 蛋白相似，且在虹彩病毒科中具有高度的保留性，因此認為 108L 對於病毒感染應扮演十分重要的角色；然而，目前尚未發現 ICP46 具有已知有意義的功能區，所以它的功能仍是未知的。

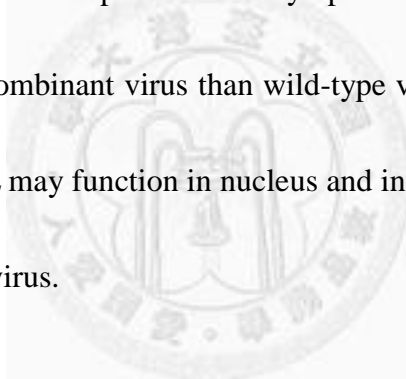
本實驗建構了原核表現載體 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L，並成功地在 *E. coli* 大腸桿菌 BL-21(DE3) 以 IPTG 誘導表現出可溶性的重組蛋白。經由反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)偵測石斑魚虹彩病毒感染石斑魚腎臟(GK)細胞病毒的基因表現，顯示 108L 於感染後 2 小時即開始轉錄，此外以轉錄抑制劑(cycloheximide)處理後仍可大量表現，證實 108L 基因確實屬於病毒極早期基因。藉由免疫細胞化學染色發現無論在 GK 或 HeLa 細胞內，108L 蛋白表現位置主要為細胞核；此外本實驗基於同源性重組(homologous recombination)概念建構 108L 基因剔除(108L gene knockout)的重組病毒，並比較野生型石斑魚虹彩病毒與 108L 基因剔除重組病毒感染石斑魚腎臟細胞的差異性，顯示重組病毒出現效價(titer)下降與病毒斑(plaque)變小之現象。本實驗結果顯示 108L 可能於細胞核內作用並參與石斑魚虹彩病毒增殖與複製調控。

Abstract

Grouper (*Epinephelus* spp.) is an important aquaculture fish species in Taiwan, but it is highly susceptible to iridovirus which often cause significant economic losses to grouper aquaculture. Accordingly, it is imperative to investigate the mechanisms of iridovirus infection and pathogenesis. The grouper iridovirus (GIV) genes can be classed into immediate early (IE), early (E) and late (L) genes according to their temporal synthesis upon infection. IE genes are regard as major roles in virus life cycle, because the transcripts of viral IE genes manipulate essential functions to benefit viral replication including controlling itself gene expression and altering host cell physiological status, such as cell cycle control, apoptosis and immune response. ORF108L is one of the immediate-early genes which our laboratory had identified from GIV. It contains 1,149 nucleotide and is composed of 382 amino acids which encode a 44.1 kDa protein. By comparative sequence analysis, 108L encodes infected cell polypeptide (ICP) 46 homolog which is highly conserved among the *Iridoviridae* family. However, there are no putative conserved domains have been found in ICP46 protein, so its actual function remains unknown.

The prokaryotic expression plasmid, pET-28a-CBP-Factor Xa-108L, was constructed and transformed into the *E.coli* strain BL-21 (DE3) for expression. Besides,

the best conditions of expression soluble 108L-his recombinant protein and purification by Ni²⁺ affinity column are well-established. The RT-PCR data confirmed that GIV108L is an immediate early gene of GIV, because the transcript of GIV108L was firstly detected at 2 hours post infection and still expressed after cycloheximide treatment. By immunocytochemistry assay, GIV108L protein was predominantly distributed at the nucleus both in GK and HeLa cells. Finally, the 108L gene knockout virus is generated by homologous recombination. Comparing wild-type virus with recombinant virus, the virus titeration is lower and the presence of cytopathic effect (CPE) obscured by infecting GK cells with recombinant virus than wild-type virus. In summary, this study demonstrated that GIV108L may function in nucleus and involve in the propagation and replication of grouper iridovirus.



目錄

摘要	I
Abstract.....	II
目錄	IV
圖目次	VII
表目次	VIII
第一章 前言	1
1.1 石斑魚之簡介與台灣養殖概況	1
1.2 虹彩病毒 (Iridovirus).....	2
1.2.1 虹彩病毒之分類	2
1.2.2 虹彩病毒之特性	4
1.2.3 石斑魚虹彩病毒極早期基因的發現	5
1.3 病毒極早期基因之功能	5
1.4 病毒之 ICP46 (Infected-Cell Protein 46).....	6
1.5 DNA 重組技術	6
1.6 研究動機	7
第二章 材料與方法	9
實驗材料與藥品試劑	9
實驗方法	14
2.1 細胞培養 (cell culture).....	14
2.1.1 細胞株及培養條件	14
2.1.2 細胞繼代 (passage) 培養	14
2.2 石斑魚虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV)增殖	14
2.3 質體構築 (construction of plasmids)	15

2.3.1 蛋白表現載體	15
2.3.2 108L 基因剔除載體.....	16
2.4 勝任細胞 (competent cell) 的製備	17
2.5 轉形作用 (Transformation).....	17
2.6 細胞轉染 (Transfection)	18
2.7 重組病毒的製備與純化	18
2.7.1 重組病毒的產生	18
2.7.2 病毒斑試驗 (Plaque assay).....	18
2.7.3 病毒液序列稀釋	19
2.8 DNA 萃取.....	19
2.9 RNA 萃取.....	19
2.10 RT-PCR.....	20
2.11 大腸桿菌重組蛋白之表現	21
2.12 大腸桿菌重組蛋白之純化	21
2.13 SDS-PAGE 電泳	22
2.14 西方墨點法 (Western blot).....	22
2.15 免疫螢光染色	22
第三章 結果	24
3.1 GIV108L 的序列與特性之分析.....	24
3.2 GIV108L 為極早期基因	24
3.3 以原核表現系統生產 GIV108L 可溶性重組蛋白.....	25
3.4 GIV 108L 蛋白在細胞內的表現位置與表現量.....	26
3.4.1 GIV108L 融合蛋白於細胞內之表現位置.....	26
3.4.2 GIV108L 融合蛋白於細胞內之表現量.....	26
3.5 GIV 108KO 重組病毒之產生	27

3.6 重組病毒之純化過程	28
3.6.1 病毒斑試驗純化重組病毒	28
3.6.2 流式細胞儀篩選發出綠色螢光的細胞	28
3.6.3 病毒液序列稀釋感染 GK 細胞	29
3.6.4 重組病毒感染之表現型(phenotype)變化	29
3.7 GIV 108KO 重組病毒之效價分析與野生型與重組型病毒之比例變化 ..	29
第四章 討論	31
參考文獻	36



圖目次

圖一、 石斑魚虹彩病毒 108L 之基因與胺基酸序列.....	44
圖二、 15 種已知序列的虹彩病毒之 ICP46 胺基酸序列比對分析.....	46
圖三、 15 種已知序列的虹彩病毒之 ICP46 胺基酸親緣性分析.....	47
圖四、 石斑魚虹彩病毒 108L 之蛋白質結構分析.....	48
圖五、 GK 細胞感染 GIV 病毒後不同時間點與蛋白合成抑制藥劑處理後 108L 之表現情形.....	49
圖六、 原核系統表現載體 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L 之建構.....	50
圖七、 利用大腸桿菌 BL-21 (DE3) 表現石斑魚虹彩病毒 108L-His 融合蛋白 ...	51
圖八、 利用 Ni ²⁺ 親和性層析管柱純化石斑魚虹彩病毒可溶性 108L-His 融合蛋白.....	52
圖九、 真核細胞表現載體 pEGFP-N1-108L 之建構.....	53
圖十、 GIV108L-EGFP 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現位置.....	55
圖十一、 真核細胞表現載體 pcDNA3CF-108L 之建構.....	56
圖十二、 GIV108L-Flag 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現位置.....	57
圖十三、 GIV108L-EGFP 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞內的表現量分析.....	58
圖十四、 GIV108L-Flag 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現量分析.....	59
圖十五、 pcDNA-3CF 載體於 GB 與 GK 兩種石斑魚細胞之轉染效率比較.....	61
圖十六、 p108KO 載體之建構.....	62
圖十七、 108KO 重組病毒之產生.....	64
圖十八、 病毒斑試驗之 108KO 重組病毒純化.....	65
圖十九、 流式細胞儀篩選之 108KO 重組病毒純化.....	66
圖二十、 序列稀釋感染之 108KO 重組病毒純化.....	68
圖二十一、 108KO 重組病毒純化過程之表現型(phenotype)變化.....	70
圖二十二、 PCR 檢測野生型與重組型病毒之比例變化與病毒效價分析.....	71

表目次

表一、實驗使用之引子序列	72
表二、15 種已知序列之虹彩病毒 ICP46 資料統整	73



第一章 前言

1.1 石斑魚之簡介與台灣養殖概況

石斑魚為海水魚類，在分類上屬於鱸形目(Perciformes)、鱸亞目(Percoidei)、鮨科(Serranidae)、石斑亞科(Epinephelinae)、石斑屬(*Epinephelus*)，種類繁多，科及亞科間之分類上仍有許多爭議，現今依據 Nelson(2006)將全世界鮨科分為3亞科，粗估為63屬，449種左右；而台灣所發現目前記錄為3亞科29屬114種，主要分布於熱帶及亞熱帶等溫暖海域。石斑魚適應性強且成長快速，飼料效率高，加上市場需求量大，價格高昂，因此成為重要的養殖對象。其形態一般為體長粗壯，側扁，頭大，多呈紡錘狀或橢圓形，吻短而鈍圓，口大平裂或略傾斜，有發達的上頷骨，能活動並可略向前伸出，體表被有細小櫛鱗片或圓鱗，其體色可隨環境變化而改變。石斑魚為雌雄同體(hermaphroditism)，外觀上無法分辨雌雄，但會有性轉換特徵，年幼期先有雌性相(female phase)，然後經過性的轉變，而呈現雄性產精器官的雄性相(male phase)，然而依種類不同，性轉換的時間也會不同。石斑魚分佈於沿近海域，棲息於岩礁、海底洞穴、珊瑚礁等可供其隱蔽之處，成魚一般不會成群活動，幼魚則常聚集於海島密佈之水域。其棲息水層隨水溫變化而有所升降，春夏季分佈於水深10~30公尺處，秋冬季則會因為水溫下降之故，潛至40~80公尺較深之水域，其生存溫度範圍為15~34℃，而最適水溫為22~28℃，但其對鹽度適應範圍極廣，可存活在鹽度10‰以上的水域。石斑魚大多數以魚類、蝦、蟹、端足類等為食，生性兇猛貪食，具有領域性(territorial)及擬態行為。台灣地區養殖的石斑魚種類以瑪拉巴石斑(*Epinephelus malabaricus*)、點帶石斑(*Epinephelus coioides*)、青石斑(*Epinephelus awora*)、老虎斑(*Epinephelus fuscoguttatus*)和龍膽石斑(*Epinephelus lanceolatus*)等為主，繁殖方法大多採用人工受精與自然產卵法。石斑魚的繁殖季節為春末至夏中，最盛產時期為七月末至八月中，受精卵為浮性卵，雌魚的懷卵量會隨魚體大小而有所差異，生長發育可分

為卵(egg)、卵黃期(larva)、魚花期(fry)、稚魚期(juvenile)以及成魚期(adult)等五階段，種苗的培育可分為魚花培養(受精卵至白身階段)和吋苗培養(白身至2吋苗階段)兩個階段，種苗的育成多為室內集約式養殖，一般養殖8-12個月即可達到上市體型(曾，1998)。

近年來由於人口的成長使水產品需求增加，聯合國糧農組織(FAO)預測，到西元2025年，全球對水產品的需求量，將由目前的一億噸增加到一億六千萬噸，而傳統漁撈由於濫捕以及海域污染等因素，造成自1992年後漁業捕獲量逐年下降，同時捕撈漁業的漁撈量也已經達到極限。種種結果顯示海洋資源逐漸匱乏，因此由水產養殖業來彌補漁業產品供應量的不足將是主要的趨勢，所以水產養殖將成為未來具有全球性經濟潛力的產業。由於台灣地狹人稠，不論陸上魚塢或海上箱網，多半採取高密度飼養，然而高密度養殖也使得石斑魚病害傳播情形日益嚴重。目前台灣石斑魚養殖的病毒性病害以虹彩病毒(iridovirus)和神經壞死病毒(nervous necrosis virus)最為嚴重，感染往往造成魚苗大量死亡，已經嚴重影響到石斑魚養殖業的發展(Chi et al., 1997)。

1.2 虹彩病毒 (Iridovirus)

1.2.1 虹彩病毒之分類

依照國際病毒分類委員會(International Committee on Taxonomy of Virus; ICTV) 2006年報告，將虹彩病毒科(Iridoviridae)歸類為雙股去氧核糖核酸病毒(Double-strand DNA virus)，病毒顆粒直徑大小為120~200 nm。虹彩病毒科主要宿主包括無脊椎動物及非哺乳類的脊椎動物(De Kinkelin and Bearzotti, 1981)，其可分為五個屬，而一般常說的虹彩病毒主要是指後面的三個屬，(1) *Iridovirus*：病毒直徑約185 nm，可感染多種無脊椎動物，大部分以昆蟲為主，代表性病毒為 *Chilo iridescent virus* (CIV, 又稱 IIV6)。(2) *Chloriridovirus*：病毒直徑約為180 nm，感染昆蟲類的蚊子為主，代表性病毒為 *Mosquito iridescent virus* (IIV3, Invertebrate

iridescent 3)。 (3) *Ranavirus*：主要宿主為兩棲動物，對其自然界之宿主- 豹蛙 (leopard frog, *Rana pipient*) 不會造成疾病，但對蝌蚪及蟾蜍則會致死，代表性病毒為 Frog virus 3 (FV3)，病毒直徑約 120 ~ 350 nm，由豹蛙的腎臟惡性腺瘤 (adenocarcinoma) 所分離，但 FV3 和腫瘤並無直接關係。最近此屬的 GIV 被報告可感染魚類 (Murali et al., 2002) 以及爬蟲類 (Jiang et al., 2009)。 (4) *Lymphocystivirus*：病毒大小約為 120 ~ 350 nm，可感染多種硬骨魚類，代表性病毒為 Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1)，屬慢性疾病，會侵犯真皮層的纖維母細胞 (fibroblast)，造成細胞腫大，形成肉眼可見的結節，而腫大的纖維母細胞在組織病理下可見嗜鹼性細胞質內包涵體，此病引起的死亡率低，大部分感染的魚體可自行復原。 (5) *Megalocytivirus*：此病毒屬為近年來新建立的虹彩病毒屬，可感染淡水及海水魚種，尤其是暖水魚類，造成重大疫情，其病毒大小約為 140 ~ 200 nm，如 ISKNV (infectious spleen and kidney necrosis virus)、RBIV (rock bream iridovirus)、RSIV (red sea bream iridovirus) 和 TGIV (grouper iridovirus of Taiwan) 等。

目前已有 15 株虹彩病毒完成完整基因體序列定序工作，這些病毒株包含 Iridovirus 屬的 CIV (Jakob et al., 2001)；Chloriridovirus 屬的 IIV-3 (Delhon et al., 2006; Jakob et al., 2002)；Ranavirus 屬的 ATV (Jancovich et al., 2003)、TFV (He et al., 2002)、FV3 (Tan et al., 2004)、STIV (Jiang et al., 2009)、EHNV (Jacobs et al., 2010)、SGIV (Song et al., 2004) 和 GIV (Tsai et al., 2005)；Lymphocystivirus 屬的 LCDV-1 (Tidona and Darai, 1997) 和 LCDV-C (Zhang et al., 2006)；以及 Megalocytivirus 屬的 ISKNV (He et al., 2001)、RBIV (Do et al., 2004)、RSIV 和 OSGIV (Lu et al., 2005)，這些完整的病毒基因體序列資料，將有助於了解虹彩病毒科內各病毒株的鑑定工作與演化分類地位，更有助於檢視其蛋白質體學上具有功能的病毒蛋白質。

1.2.2 虹彩病毒之特性

虹彩病毒，*Iris* 是希臘字虹彩 (rainbow) 的意思，因為從感染病毒的昆蟲純化出的病毒顆粒，具有彩虹般的折射光，故依此現象命名 (Goorha, 1995)。虹彩病毒為細胞質內增殖之 DNA 病毒，其基因體大小介於 103 ~ 212 kb，外觀形態為二十面體、病毒顆粒直徑從 120 ~ 350 nm 不等，具有球形核蛋白鞘 (nucleoprotein core)，其複製分兩階段，分別在細胞核及細胞質內進行。虹彩病毒有數層結構，由內而外分別為：核蛋白 (nucleoprotein)、脂質內膜 (lipid inner membrane)、蛋白鞘 (capsid) 及某些種別存在的外套膜 (envelope)。病毒可經由宿主的細胞膜芽出 (budding)，再以內胞飲 (endocytosis) 方式進入相鄰細胞 (Qin et al., 2001)。有研究指出，感染的細胞在電子顯微鏡下可觀察到不同複製時期的病毒顆粒，有時分散、有時呈現類晶體狀整齊排列在細胞質中，亦會在寄主細胞形成包涵體 (inclusion body) (Chou et al., 1998)。同時可見病毒具有數層構造，其周圍出現的一些電子緻密物質 (electron-dense materials)，推測這些電子緻密物質為核酸，而蛋白鞘裡的核蛋白，可能是由周圍的電子緻密物質進入空的蛋白鞘而形成，又同一部分的電子緻密物質可能同時進入兩個空蛋白鞘，組成成熟的兩病毒顆粒 (Qin et al., 2001)。病毒成分中 DNA 佔了 12 ~ 16%，GC 比為 28 ~ 54%，病毒由 36 個 胜肽鏈的複合物組成，其中一個為主要鞘蛋白 (major capsid protein) (Essani and Granoff, 1989)，而沒有外套膜的病毒顆粒則含有 5 ~ 17% 的脂質，以磷脂質 (phospholipid) 最多 (Williams, 1996)。

Grouper iridovirus (GIV) 為本實驗室在 1998 年自南部養殖石斑魚分離出的虹彩病毒，並完成其基因體序列之定序與分析工作 (Tsai et al., 2005)。GIV 包含了 139 個開放讀架 (Open reading frames) (Tsai et al., 2007)，並與已發表的虹彩病毒基因序列作比較，分析結果發現 GIV 具有幾個特徵：(1) 除了兩棲動物外，GIV 和 SGIV 是感染魚類的 Ranavirus 病毒。(2) 不像其他虹彩病毒，GIV 沒有 CpG 序列

的 methylation 以及缺少 DNA methyltransferase 基因。(3) GIV 含有 purine nucleoside phosphorylase 基因，此特徵只有在 GIV 及 SGIV 病毒中發現。這些資訊將有助於我們未來對於 GIV 的瞭解，更深入探討其相關機制與分子結構。

1.2.3 石斑魚虹彩病毒極早期基因的發現

本研究室藉由軟體分析石斑魚虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV)，歸納其基因體序列定序及分析的結果，共預測出 139 個開放讀架 (ORFs) (Tsai et al., 2005；Tsai et al., 2007)，藉此建構一個石斑魚虹彩病毒 DNA 微晶片。如同其他的 DNA 病毒，石斑魚虹彩病毒亦可依據其基因轉錄表現的次序分為三大類 (Williams, 1996)：極早期基因 (immediate early genes, IEGs)、早期基因 (early genes, EGs) 與晚期基因 (late genes, LGs)，因此本實驗室利用常見的蛋白質合成抑制劑 cycloheximide (CHX)、核酸合成抑制劑 aphidicoline (APH) 與 DNA 微晶片分析 GIV 病毒各個基因之轉錄表現的順序。歸納出 GIV 病毒之極早期基因包含 030L、050L、071L、078R、097L、098L、105L、108L ... 等，早期基因有 027L、029L、065R ... 等，晚期基因有 045R。進一步推估石斑魚虹彩病毒具有二十一個極早期基因 (immediate early genes, IEGs)。

1.3 病毒極早期基因之功能

大多數 DNA 病毒的基因依據其表現的順序分為三大類：極早期基因、早期基因與晚期基因，因為極早期基因在感染初期即表現，推論其主要功能與病毒感染宿主有關。病毒極早期基因通常會相互調控，進而影響病毒複製、顆粒組裝或病毒釋放等機制 (Tsurumi et al., 2009)；另外，病毒極早期基因也可能改變宿主細胞的生理狀態，以達到病毒增殖繁衍的目的 (Castillo and Kowalik, 2002; Stinski and Petrik, 2008)。總體而言，目前研究指出病毒極早期基因的功能包含扮演 transacting factor (Tang et al., 2010; Willis and Granoff, 1985)，調控宿主的生理狀態，如影響其轉錄作用、細胞凋亡、生長週期、免疫反應和訊息傳遞等作用 (Castillo et al., 2000;

Everett et al., 2009; Kinchington et al., 1992; Song and Stinski, 2005)

然而，對於病毒極早期基因的研究主要著重於人類病毒，例如 herpes simplex virus (HSV)、Epstein-Barr virus (EBV)、human cytomegalovirus (HCMV)、hepatitis B virus (HBV)和 varicella-zoster virus(VZV) (Everett and Orr, 2009; Kinchington et al., 1992; Slobedman et al., 2008)。針對虹彩病毒的極早期基因功能之了解仍然有限，目前已知關於虹彩病毒科的病毒之極早期基因功能研究，包含 Chilo iridescent virus (CIV)的 ORF193R 與 Grouper iridovirus (GIV) 的 ORF078R 具有抑制細胞凋亡的功能 (Lin et al., 2008; van Oers et al., 2008)，而 Singapore grouper iridovirus (SGIV)的 ORF086R 和 ORF162L 可能參與宿主細胞調控和病毒複製的過程 (Xia et al., 2009; Xia et al., 2010)，不過其調控的機制尚未確立。

1.4 病毒之 ICP46 (Infected-Cell Protein 46)

虹彩病毒 ICP46 最初於 FV3 內發現 (Beckman et al., 1988)，其蛋白質分子量大約為 46 kDa，因而被命名為 ICP46，主要研究其基因序列、轉錄調控與啟動子活性分析 (Pallister et al., 2005)，然而針對 ICP46 功能的認識仍然十分有限。近年來因為資訊科技發達，各式各樣的病毒基因庫一一建立，歸屬於虹彩病毒科的病毒種類日益增加，藉由基因體分析比對各種解序完成的虹彩病毒，揭示 ICP46 具有高度保留性(high conserved)，儘管 ICP46 序列中尚未發現特殊的功能區 (domain)，但可推測 ICP46 於虹彩病毒生活史中應該扮演非常重要的角色 (Eaton et al., 2007)。目前唯一關於其功能研究的文獻指出 SGIV 的 ICP46 (ORF162L)可能參與細胞生長與病毒複製的過程 (Xia et al., 2010)，但是詳細的機制仍不明，因此如果能進一步了解 GIV 的 ICP46 特性，有助於理解其在病毒感染宿主期間的重要性。

1.5 DNA重組技術

生物體內可偵測到染色體外遺傳物質(extrachromosomal DNA)嵌入染色體中，

目前只知道重組作用會隨機發生於不同的基因座 (locus)，然而重組作用的詳細機制迄今仍無法解釋，生物體內重組現象主要可分為三大類：(1) 同源性重組 (Homologous recombination)：主要發生於序列高度相似性的 DNA 片段，如細胞的減數分裂(meiosis)、DNA 修復以及大腸桿菌的 Rec 蛋白的同源性重組；(2) 專一性位置重組(Site-specific recombination)：此重組作用只侷限於某些 DNA 片段，如脊椎動物的免疫球蛋白基因重組(rearrangement)以及噬菌體(phage)或病毒的感染；(3) 轉位性重組(Transpositional recombination)：這類基因重組不需具備同源或相似性，為隨機發生重組，其特性為影響基因表現，如玉米顏色變化以及人類的 *Alu element*。基於重組作用的概念，科學家研發出可在體外獲得重組 DNA 分子的技術，藉由重組作用將目標基因嵌入宿主細胞的基因體或置換欲研究的目標基因，觀察當目標基因表現(gain of function)或缺失(loss of function)時對宿主細胞有何影響性，DNA 重組技術廣泛地用於生物技術以及醫藥學等研究。

病毒系統重組技術為最近研究基因功能的熱門技術之一，主要利用同源性重組的概念，將篩選基因(如 *neomycin*)或報導基因 (如 *gfp gene*)兩側接上欲進行重組位置之上、下游核酸序列片段，最後送入宿主細胞內進行同源性重組，一般而言同源性片段長度越長進行同源性重組的機會就越大，使得目標基因置換為篩選基因或報導基因。目前重組病毒技術研究主要著重於感染哺乳類病毒(herpesviruses)，例如 HCMV、EBV、KSHV 與 HSV(Borst et al., 1999; Lan et al., 2009; Tsurumi et al., 2009)，重組病毒技術除了用來研究病毒基因功能，其應用包含基因治療(gene therapy)、疾病研究、抗藥基因的發現和傳遞路徑的建立等(Georgens et al., 2005)。本實驗希望利用同源性重組策略生產石斑魚虹彩病毒 108LORF 基因剔除的重組病毒。

1.6 研究動機

本實驗室利用之前建構完成的石斑魚虹彩病毒 DNA 微晶片與蛋白質合成抑

制劑 cycloheximide (CHX) 分析石斑魚虹彩病毒基因具有 21 個極早期基因，極早期基因於病毒感染初期即表現，涉及許多病毒與宿主的基因調控，為了進一步研究 GIV 感染與致病機制，著手於病毒極早期基因成為刻不容緩的研究方針。此外，近年來各種虹彩病毒基因體序列一一揭露，許多文獻比較虹彩病毒各屬之間於演化過程的親緣性，同時分析各基因序列是否含有已知的功能區(domain)，進而推估各基因可能擁有的功能，另外，不同病毒的基因之間是否具有相似序列亦完整地歸納出來(Brunetti et al., 2010；Eaton et al., 2007)。其中 GIV108L 極早期基因序列於其他虹彩病毒中具有高度保留性，並被歸類為極早期蛋白 ICP46，儘管序列分析尚未指出其可能的功能為何，2010 年 Xia et al. 發表一篇關於 SGIV ICP46 的文獻，其觀察 ICP46 於宿主細胞內表現狀況與病毒感染期間 ICP46 表現的位置變化，初步推估其可能參與細胞生長調控與病毒複製，然而並未更深入地探討病毒缺乏 ICP46 或其表現量下降時，對宿主與病毒本身有何影響力。因此本實驗除了觀察並分析 GIV108L 基因與蛋白質的基本特性之外，同時希望藉由 DNA 重組的概念建構 108L 基因剔除(gene knockout)的重組病毒，並比較野生型病毒與重組病毒分別感染石斑魚腎臟(grouper kidney, GK)細胞對於病毒-宿主之間的感染機制有無差異性，推測 GIV108L 可能具有的功能以及在石斑魚虹彩病毒感染宿主時所扮演的角色，期望本實驗能更進一步了解石斑魚虹彩病毒其 108L 基因的功能與特性，進而對石斑魚虹彩病毒的研究有更多進展。

第二章 材料與方法

實驗材料與藥品試劑

- (1) Grouper Kidney cell (GK)
- (2) Grouper Brain cell (GB)
- (3) HeLa cell
- (4) *E.coli* DH-5 alpha strain (RBC Bioscience)
- (5) *E.coli* BL-21(DE3) strain (RBC Bioscience)
- (6) pcDNA3CF (Yao and Yang, 2003)
- (7) pET28a (+)-CBP-Factor Xa (Shih et al., 2002)
- (8) pEGFP-N1 (Clontech)
- (9) pDsRed2.1 (Clontech)
- (10) High-speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)
- (11) ZR Genomic DNATM Tissue MiniPrep (ZYMO RESERCH)
- (12) Gel Extraction kit (PRO tech)
- (13) PCR Clean Up Kit (PRO tech)
- (14) RNA Pure Kit (Geneaid)
- (15) FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO)
- (16) Penicillin-streptomycin (GIBCO)
- (17) 2 mM L-glutamine (GIBCO)
- (18) Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)
- (19) DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium)
- (20) PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline)
- (21) NaCl (MERCK)
- (22) Cycloheximide (CHX; Calbiochem)

- (23) LB-Broth base (Invitrogen)
- (24) 0.1 M Isopropyl-B-D-thiogalactoside, IPTG (MDBio, Inc)
- (25) 50 μ g/ml Kanamycin (SIGMA)
- (26) 100 μ g/ml Ampicillin sodium (MDBio, Inc)
- (27) 34 μ g/ml Chloramphenicol (SIGMA)
- (28) TRIzol[®] (Invitrogen)
- (29) Chloroform MERCK)
- (30) Phenol (MERCK)
- (31) Isopropanol (MERCK)
- (32) Ethanol (MERCK)
- (33) DNase I (TAKARA)
- (34) PFU polymerase (2.5 U/ μ l, Fermentas)
- (35) Econo Taq 2X Master Mix (Lucigen)
- (36) Restrictive enzyme of *Bam*HI, *Bsa*I, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I and *Xho*I (New England Biolabs, NEB)
- (37) T4 DNA Ligase (Roche)
- (38) T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs)
- (39) ATP (Straragene)
- (40) Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen)
- (41) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, SIGMA)
- (42) Two-well chamber slice (Millipore)
- (43) Paraformaldehyde (MERCK)
- (44) Triton X-100 (MERCK)
- (45) Tris-HCl (MERCK)
- (46) Low melting temperature agarose (UniRegin Bio-Tech)

- (47) 50X TAE Buffer(BIOMAN)
- (48) Seakem® LE Agarose (LONZA)
- (49) 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen)
- (50) Ethidium bromide (EtBr, Merck) (stock 10 mg/ml)
- (51) Mouse ANTI-Flag® M2 Monoclonal Antibody (SIGMA)
- (52) Rabbit anti-mouse IgG-h+1-FITC conjugated (BETHYL)
- (53) Polyclonal Goat anti-mouse Immunoglobins /AP (DAKO)
- (54) Monoclonal anti-GFP antibody, product in mouse (Millipore)
- (55) NBT / BCIP substrate solution (PerkinElmer)
- (56) PVDF membranes(Millipore)
- (57) Protein Marker (EZ color II)
- (58) 40% acrylamide/bis solution 37.5:1 (Bio-Rad)
- (59) 10% APS (ammonium persulfate) (SIGMA)
- (60) TEMED (N,N,N',N'- tetramethyl-ethylenediamine) (SIGMA)
- (61) Ni-NTA resin (Bio-Rad)
- (62) SDS-PAGE

Running gel

10% gel	5 ml	10 ml	15 ml	12% gel	5 ml	10 ml	15 ml
H ₂ O	2.42	4.82	7.15	H ₂ O	2.2	4.3	6.5
40% acrylamide	1.28	2.48	3.75	40% acrylamide	1.5	3	4.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8
10% SDS	0.05	0.1	0.15	10% SDS	0.05	0.1	0.15
10% APS	0.05	0.1	0.15	10% APS	0.05	0.1	0.15
TEMED	0.002	0.004	0.006	TEMED	0.002	0.004	0.006

Stacking gel:

4% gel	5 ml
H ₂ O	3
40% acrylamide	0.5
0.5 M Tris, pH 6.8	1.3
10% SDS	0.05
10% APS	0.05
TEMED	0.005

(63) 3X SDS loading buffer (pH 6.8)

- 150 mM Tris-HCl
- 6% SDS
- 0.6% Bromophenol blue
- 30% Glycerol
- 10% 2-mercaptoethanol

(64) 10X Protein Running Buffer (1L, pH 8.3)

- 30.28 g Tris-HCl
- 144.12 g Glycine
- 10 g SDS

(65) 10X PBS (1L, pH 7.4)

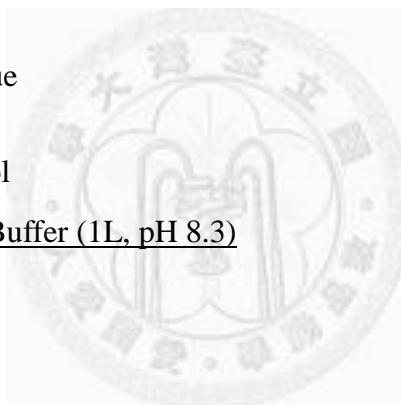
- 8 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g Na₂HPO₄
- 0.24 g KH₂PO₄

(66) 0.01%PBST

- 1 L 1XPBS
- 1 ml Tween-20

(67) 1X Transfer Buffer (pH 8.3)

- 39 mM Glycine
- 48 mM Tris-base
- 0.037% SDS
- 20% Methanol



(68) 0.2% Coomassie Blue staining solution

1 g Coomassie brilliant blue R250
250 ml Methanol
200 ml H₂O
50 ml Acetic acid

(69) Lysis solution (pH 7.4)

50 mM Tris-HC
150 mM NaCl
1% TritonX-100
1 mM EDTA

(70) Blocking solution

1 L 1XPBS
1 ml Tween-20
5% BSA

(71) Destain buffer (1 L)

500 ml Methanol
400 ml H₂O
100 ml Acetic acid

(72) Binding Buffer (pH 7.9)

20 mM Tris-HCl
0.5 M NaCl

(73) Washing Buffer (pH 7.9)

20 mM Tris-HCl
0.5 M NaCl
20 mM Imidazole

(74) Elute buffer (pH 7.9)

20 mM Tris-HCl
0.5 M NaCl
250 mM Imidazole

(75) 實驗用引子序列(表一)



實驗方法

2.1 細胞培養 (cell culture)

2.1.1 細胞株及培養條件

石斑魚腎臟細胞株 (grouper kidney, GK)，以10% FBS-L15 細胞培養液培養，培養液包含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 及 2 mM L-glutamine 的 Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)，在不需二氧化碳的 28°C 培養箱進行細胞培養。

子宮頸癌細胞(HeLa cell) 培養於去活化 10% FBS、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin 及 2 mM L-glutamine 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培養液，在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養。

2.1.2 細胞繼代 (passage) 培養

待細胞長至八、九分滿時，去除培養液，以 1×PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (GIBCO) 清洗 2 次後，取適量的 0.25% Trypsin-EDTA 處理約 3 分鐘，使細胞自培養皿底部脫落，再加入 10% 培養液中和 Trypsin-EDTA 之作用，並均勻沖散細胞成單一細胞，再將所有液體裝入離心管，以轉速 1,000 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液，再加入適量新鮮的 10% 培養液將細胞均勻沖散，留部分細胞於培養皿中繼續培養，約 3~4 天繼代一次。

2.2 石斑魚虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV) 增殖

病毒株來源為本實驗室於1998年在南部的石斑魚養殖場，採集數隻瀕死體長約 10~12 公分的青石斑魚 (yellow grouper, *Epinephelus awoara*)之腫大脾臟，再自脾臟分離病原。GIV病毒的製備則利用病毒感染GK細胞繁殖，感染期間以 2% FBS-L15 培養液培養，觀察七天，最後收集病毒液依據 Reed-Muench Method 的

方法計算病毒效價(50% tissue culture infection dose, TCID₅₀)。

2.3 質體構築 (construction of plasmids)

2.3.1 蛋白表現載體

將GIV 108L基因分別接入原核細胞蛋白表現載體：pET-28a-CBP-Factor Xa 載體；以及真核細胞蛋白表現載體：pEGFP-N1和 pcDNA3CF載體。

接入 pET-28a-CBP-Factor Xa 載體之 108L 片段引子設計如下：
108L-CBP-*Eco*RI-F1：5' - AATTC ATGGCTTTCGTCACAGACAAGCG - 3' 與
108L-CBP-*Eco*RI-F3：5' - C ATGGCTTTCGTCACAGACAAGCGAGA - 3'，
108L-CBP-*Xho*I-R2：5' - G CTCTTCTTCGTCGGGAAACTCCAAC - 3' 與
108L-CBP-*Xho*I-R4：5'- TCGAG CTCTTCTTCGTCGGGAAACTCC - 3'。以 GIV genomic DNA 為模板，以 F1、R2 引子為一管，F3、R4 引子為另一管，共兩管反應物。PCR 反應條件為 95°C 變性 5 分鐘，而後進行 95°C 變性 30 秒、55°C 黏合 30 秒、72°C 複製 2 分鐘計 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘終止，降溫到 15°C 結束。PCR 產物以 PCR Clean Up Kit 去除鹽類後，兩管 PCR 產物各取 20 μ l，取 2 μ l 的 T4 polynucleotide kinase，5 μ l 的 10X T4 polynucleotide kinase buffer 和 3 μ l 的 ATP (反應總體積為 50 μ l)，以 T4 polynucleotide kinase 磷酸化 PCR 產物的 5' 端，反應條件為 95°C 5 分鐘，再 65°C 10 分鐘，再將 *Eco*RI 和 *Xho*I 限制酶處理過的 pET-28a-CBP-Factor Xa 載體與之混合 (insert : vector = 3 : 1 莫耳比)，利用 T4 DNA ligase (Roche) 進行接合，轉形至 DH-5 alpha 大腸桿菌中，製備少量載體以限制酶處理和核酸定序確認序列無誤後，載體命名為 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L。

接入 pEGFP-N1 片段之引子設計如下：108L-pEGFP-*Xho*I-F：5' - GATCTCGAG ATGGCTTTCGTCACAGAC - 3'，108L-pEGFP-*Bam*HI-R：5' -

CGGGATCCGC CTCTTCTTCGTCGGGAAAC - 3' ; 接入 pcDNA3CF 片段之引子設計如下：108L-pcDNA-*Kpn* I-F : 5' - GGGGTACC ATGGCTTTCGTCAC AGAC - 3', 108L-pcDNA-*Xho*I-R: 5'- CCGCTCGAG CTCTTCTTCGTCGG GAAA - 3'。PCR 反應條件為 95°C 變性 5 分鐘，而後進行 95°C 變性 30 秒、55°C 黏合 30 秒、72°C 複製 2 分鐘計 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘終止，降溫到 15°C 結束。PCR 產物以 PCR Clean Up Kit 去除鹽類後，分別將載體與 PCR 產物以限制酶處理，取固定比例均勻混合(insert : vector = 3 : 1 莫耳比)，再利用 T4 DNA ligase (Roche)進行接合，轉形至 DH-5 alpha 大腸桿菌中，製備少量載體以限制酶處理和核酸定序確認序列無誤後，載體命名為 pEGFP-N1-108L 和 pcDNA-3CF-108L。

2.3.2 108L 基因剔除載體

將 108L 剔除片段接入 pDsRed 2.1 載體，首先將 108L 的上、下游片段分別以下列引子以聚合酶連鎖反應(PCR) 方式放大，下游片段之引子設計如下: Forward primer for *Sac*I restriction enzyme cutting site (108L-*Sac*I-1): 5' - CGAGCTC GCAATTTGCTACGATGACCCACC - 3' 和 Reverse primer for *Bsa*I restriction enzyme cutting site (108L-*Bsa*I-2): 5' - TTTGGTCTC TGTAAGCTGAA GAAAACCC AAAAAAAG - 3' ; 上游片段之引子設計如下: Forward primer for *Bsa*I restriction enzyme cutting site (108L-*Bsa*I-5): 5' - TTTGGTCTCT TTTTAA GTCTTCCAC AAGGGC - 3' 和 Reverse primer for *Eco*RI restriction enzyme cutting site (108L -*Eco*RI -6): 5' - GAATTC CCAAATTACGCCTTACCAGACGTG - 3'。再以 EGFP 基因取代 108L 基因，其引子設計如下: Forward primer for *Bsa*I restriction enzyme cutting site (108L-*Bsa*I-3): 5' - TTTGGTCTCT TTA CT TGTACAGC TCGTCCA - 3' 和 Reverse primer for *Bsa*I restriction enzyme cutting site (108L-*Bsa*I -4): 5' - TTTGGTCTC T AAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA - 3'。分別將三

個片段切膠純化後，以 *Bsa*I 限制酶處理後利用 T4 DNA ligase (Roche) 進行接合 (ligation)，三片段接合的莫耳數比例(molar ratio)為 1 : 1 : 1，再以聚合酶連鎖反應 (PCR) 放大此片段，PCR 產物以 DNA Extraction Kit 切膠純化後，再以 *Sac*I 和 *Eco*RI 限制酶處理後利用 T4 DNA ligase (Roche) 接入 pDsRed 2.1 載體中，製備小量載體以限制酶處理和核酸定序確認序列無誤，此質體命名為 p108KO 載體。

2.4 勝任細胞 (competent cell) 的製備

選殖(cloning host)用之大腸桿菌品系為 DH-5 alpha，表現(expression host)用之大腸桿菌品系為 BL-21 (DE3)，實驗前一晚將菌液均勻地塗於 LB 固體培養基，於 37°C 培養 12~16 小時。

取大腸桿菌單一菌落，個別接種於 3 ml LB (Luria-Bertani medium) 液體培養基中，於 37°C 震盪培養 12 ~ 16 小時；以 1 : 100 之接種量培養至 50 ml 新鮮的 LB 液體培養基，震盪培養至 OD₆₀₀ 為 0.4 ~ 0.6。將菌液分裝至 50 ml 離心管，置於冰上 30 分鐘使菌停止生長，以 4,000 rpm 於 4°C 下離心 20 分鐘收集菌體。倒棄上清液，加入 5 ml 冰的 0.1 M CaCl₂，輕輕地將沉澱菌體沖散，置於冰上 30 分鐘，再以 3,000 rpm 於 4°C 下離心 10 分鐘並將上清液倒除；以 2 ml 冰的 0.1 M CaCl₂ (含 30% glycerol) 溫和地打散菌體，放置 4°C 冰箱 12 ~ 16 小時，以每管 200 μ l 分裝至微量離心管中，並儲存於 -80°C 備用。

2.5 轉形作用 (Transformation)

將製備好的勝任細胞置於冰上退冰，加入 0.1 μ g ~ 1 μ g 的 DNA 載體，冰上靜置 30 分鐘，隨後於 42°C 加熱板 90 秒進行熱休克(heat shock)，再置於冰上 2 分鐘，加入 0.8 ml 無添加抗生素之 LB 液態培養基，37°C 震盪培養 1 小時，再將培養 1 小時過後的菌液離心濃縮，取部分菌液均勻塗於添加抗生素之 LB 固態培養基上，37°C 培養 12 ~ 16 小時，挑選單一菌落，依據實驗需求進行下一步實驗。

2.6 細胞轉染 (Transfection)

培養細胞至七、八成滿，以無血清細胞培養液輕輕地混合 Lipofectamine 2000 (μl): DNA (μg) = 1:1，混合液室溫靜置 20 分鐘，同時將細胞培養盤內的培養基去除，以無血清培養液清洗兩次，加入混合液之後將細胞放回培養箱內 4~6 小時，移除混合液後再加入新鮮的 10% FBS 培養液培養 24~48 小時，依據實驗需求進行下一步實驗。

2.7 重組病毒的製備與純化

2.7.1 重組病毒的產生

取 5×10^5 / well GK 細胞均勻分配至 6 well plate， 28°C 培養，隔天再將 p108KO 載體轉染至細胞內，以 10% FBS-L15 培養液培養 24 小時後，再分別以 m.o.i (multiplicity of infection) 為 0.01、0.05、0.1 與 1 的 GIV 病毒液感染 2 小時，於螢光顯微鏡下觀察細胞 2~5 天，若有重組病毒的產生則能觀察到綠色螢光的細胞，待細胞開始懸浮後，收集整個 well 內的培養液與細胞，再 freeze-thaw 三次使細胞內完全破裂，分別以不同的稀釋濃度將病毒液稀釋成不同倍數，以病毒斑試驗 (plaque assay) 挑選發出綠色螢光的病毒斑，以達到純度更高的重組病毒。

2.7.2 病毒斑試驗 (Plaque assay)

取 1.6×10^6 個 GK 細胞均勻分配至 6 cm 組織培養皿置於 28°C 培養，隔天以 10 倍序列稀釋濃度的重組病毒液感染，感染兩小時後吸去病毒液，再取事先預熱於 45°C 的 5% low melting temperature 以 2% FBS-L15 培養液稀釋成 0.5% 的洋菜膠 (agarose)，立即均勻覆蓋於每個 6 cm 培養皿上，於螢光顯微鏡下觀察 5~10 天，挑選最佳稀釋度的培養皿後，以滅菌的 filter tip 吸取出發綠色螢光的細胞，並回溶於 2% FBS-L15 培養液， 4°C 震盪培養一個晚上後，freeze-thaw 三次並以 $0.45 \mu\text{m}$ filter 過濾病毒液，接著以此病毒液依上述方式繼續進行病毒斑試驗，重複三次。

最後將進行三次病毒斑試驗所獲得的病毒液感染 GK 細胞，並以流式細胞儀分離出發綠色螢光的細胞，將收集的細胞 freeze-thaw 三次，再以此病毒液序列稀釋感染細胞，獲得純度更高的重組病毒液。

2.7.3 病毒液序列稀釋

取 2×10^4 / well GK 細胞均勻分配至 96 well 培養盤內置於 28°C 培養，隔天以不同稀釋倍數 ($10^{-1} \sim 10^{-4}$) 的重組病毒液感染，於螢光顯微鏡下觀察 7~14 天，挑選發光且具有單一病毒斑的 well，收集 well 內全部的病毒液，並取部分病毒液萃取 DNA，再以 IE108L-8 primer: 5' - CTTTCATGCTAAATAGCGTTTCATGC - 3' 與 IE108L-9 primer: 5' - ATCGTGTAATAAACTTGATTAGCGAG - 3'，PCR 反應條件為 95°C 變性 5 分鐘，而後進行 95°C 變性 30 秒、55°C 黏合 30 秒、72°C 複製 2 分鐘計 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘終止，降溫到 15°C 結束。取 5 μ l PCR 產物以 1% 洋菜膠進行電泳分析，並藉由 Image J 軟體分析野生型病毒(wild type GIV)與重組病毒 (108KO GIV)兩者條帶(band)之比例關係，並挑選含有較高比例的重組病毒液，繼續以序列稀釋方式感染 GK 細胞。

2.8 DNA 萃取

將病毒液體積調整為 100 μ l 後，加入 95 μ l 的 2X Digestion Buffer，5 μ l 的 Proteinase K，混合均勻後於 55°C 作用 1 小時，加入 700 μ l 的 Genomic Lysis Buffer 混合均勻後，取上清液至 Zymo-Spin™ IC Column 內，10,000 \times g 離心 1 分鐘，加入 200 μ l 的 DNA Pre-Wash Buffer，10,000 \times g 離心 1 分鐘，再加入 400 μ l 的 g-DNA Wash Buffer，10,000 \times g 離心 1 分鐘，最後將 Zymo-Spin™ IC Column 放至新的微量離心管，每管加入 40 μ l 的 DNA Elution Buffer(55°C 預熱)，室溫下靜置 2~5 分鐘，10,000 \times g 離心 1 分鐘。

2.9 RNA 萃取

將石斑魚腎臟細胞 (GK) 以 10% FBS-L15 培養在 6 cm 組織培養皿 (TC dish, NUNC) 中，每盤約加入 1.5×10^6 細胞。隔天 GK 細胞改以 2% FBS-L15 培養，加入 GIV 病毒液感染 1 小時，病毒液 m.o.i. = 10，是為了讓全部的細胞同時受到病毒的感染，之後依實驗設計的時間點收集細胞的總 RNA；若以蛋白合成抑制劑 (cycloheximide, CHX) 處理，則於感染病毒前 1 小時加入藥劑，cycloheximide 最終濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，並於感染後 6 小時收集總 RNA。

收集各時間點的細胞，首先將組織培養皿置於冰上 5 分鐘，吸除細胞培養液後加入預冷的 150 μl TRIzol[®] 試劑 (Invitrogen)，迅速搖晃使其覆蓋所有的細胞，以 pipetman 輕輕吸沖組織培養皿底部後，將組織培養皿內溶液收集至 1.5 ml 微量離心管中，加入 30 μl 之 chloroform，上下反轉數次，置於 4°C，5 分鐘。以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液(約 150 μl) 取至另一新的微量離心管中，加入 120 μl isopropanol，上下反轉數次，置於 -20°C，5 分鐘。然後以 7,500 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液，輕輕加入 100 μl 70% DEPC-treated 酒精清洗 RNA 沈澱物，再以 7,500 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液，稍微風乾 RNA 沈澱物後，加入 40 μl DEPC-treated ddH₂O 回溶。

2.10 RT-PCR

以石斑魚腎臟細胞萃取所得之總 RNA 為模板，以 DNase I 處理後以 RNA pure clean up kit 去除鹽類，取 1 μg RNA 於 70°C 加熱 5 分鐘，隨後插冰約 5 分鐘，並加入 2 μl 的 10X reaction buffer、1 μl 的 10 mM random hexamer 和 dNTP 以及 0.5 μl 的 MMLV reverse transcriptase 於 37°C 下反應 1 小時(反應總體積為 20 μl)，以 PCR clean up kit 去除鹽類，並定量每一管 cDNA 的濃度。取 100 ng 的 cDNA 作為 PCR 模板，以 108L-Forward primer: 5'- GGGGTACC ATGGCTTTCGTCA CAGAC-3'，108L-Reverse primer: 5'-CCGCTCGAG CTCTTCTTCGTCGGGAAA-3'，檢測 GK 感染 GIV 後 108L 基因於不同時間點的表現情形，以及檢測用

cycloheximide 處理的細胞，108L 基因是否會表現。PCR 反應條件為 95°C 變性 5 分鐘，而後進行 95°C 變性 30 秒、55°C 黏合 30 秒、72°C 複製 2 分鐘計 28 個循環，最後以 72°C 10 分鐘終止，降溫到 15°C 結束。取 5 μ l PCR 產物以 1.5% 洋菜膠 (agarose) 在 1 \times TAE buffer 中，以 100 V 進行電泳，EtBr 染色後於紫外燈下觀察結果並照相。

2.11 大腸桿菌重組蛋白之表現

將建構好的蛋白表現載體 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L 轉型至大腸桿菌 BL-21 (DE3) 中，隔日挑選轉型成功的單一菌落，以 3 ml LB 小量培養 12 ~ 16 小時，取 0.5 ml 菌液至 50 ml LB 液態培養基(接種比例 1:100)，於 37°C 培養至 OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.6(約 3 小時)，加入最終濃度 0.1 mM IPTG (iso-propyl-thiogalactoside) 於 20°C 下誘導表現 16 小時，以 4,000 \times g 於 4°C 離心 20 分鐘收集菌體，加入適量之 B-PER[®] (Bacterial Protein Extraction Reagent, Pierce) 打散菌體，於室溫下反應約 30 分鐘，再以超音波震盪法(turn-on 10 sec / turn-off 10 sec)打破菌體，破菌後液體略呈清澈，再以 15,000 \times g 於 4°C 離心 30 分鐘，分別取適量的上清液與包涵體 (inclusion body)，加入 3 \times SDS sample loading buffer 均勻混合，於 100°C 加熱 5 分鐘後，進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳，以 Coomassie blue 染劑 (0.2% Coomassie blue, 50% Methanol, 10% Acetic acid) 進行蛋白質染色 30 分鐘後，再以 Destaining buffer (50% Methanol, 10% acetic acid) 退染，直至背景接近無色透明為止，檢視重組蛋白誘發效果。

2.12 大腸桿菌重組蛋白之純化

取 2 ml Ni-NTA resin (Bio-rad) 加入管柱中，加入 10 ml Binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl) 平衡管柱，置入 5 ~ 10 ml 破菌並離心後的上清液，重複三次，使 Ni-NTA resin 能充分吸咐含 His-tagged 的目標蛋白質，再依序加入 10 ml Binding buffer 與 10 ml Wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl,

20 mM Imidazole)，將雜蛋白質充分去除後，加入10 ml Elution buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 M NaCl, 250 mM Imidazole)，將純化的重組目標蛋白質沖提出來，每管收集500 μ l，再以SDS-PAGE檢視目標蛋白純化的狀況。

2.13 SDS-PAGE 電泳

將培養於 6 cm培養皿的細胞加入預冷的PBS清洗兩次後，利用細胞刮棒將細胞懸浮於 1 ml的PBS中，10,000 rpm離心1分鐘後收集樣本，再以3X SDS loading buffer 均勻混合，100°C加熱處理 5 分鐘後，離心 12,000 rpm兩分鐘，並置於冰上或 -20°C備用。再以 12% SDS-PAGE電泳分離，以 Coomassie blue 染劑進行蛋白質染色或進一步進行Western blot檢視目標蛋白的表現情形。

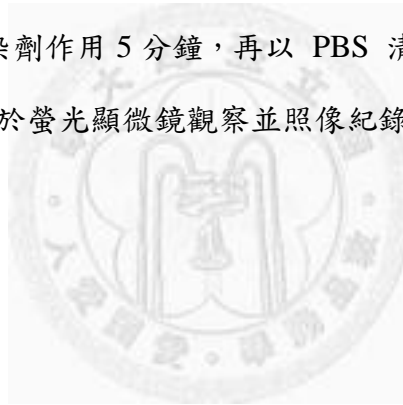
2.14 西方墨點法 (Western blot)

先將 PVDF膜 (Hybond-P)以甲醇浸潤後，與膠體浸泡於轉印緩衝液，以 Ready Gel® Precast Gel System 蛋白質轉印裝置，將膠體上的蛋白質以 300 mA固定電流轉印兩小時，使蛋白質能完全轉印到 PVDF 膜上。取下完成轉印的PVDF 膜，並以 Blocking solution (5% bovine serum albumin 於 0.1% Tween-20 / 1x PBS) 於室溫下作用 1 小時，之後再以 Blocking solution 稀釋 3,000 倍的一級抗體於 37°C下進行雜合反應 1 小時後，再以 0.1% Tween-20 / 1x PBS 緩衝液於室溫下清洗 10 分鐘，共三次，接著再以 Blocking solution 稀釋 3,000 倍的二級抗體於 37°C下進行雜合反應 1 小時，再以 0.1% Tween-20 / 1x PBS 緩衝液於室溫下清洗 10 分鐘共三次。最後以 NBT (4-nitro-blue tetrazolium chloride) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 進行呈色反應，待呈色完全後即可以清水沖洗掉未作用的 NBT / BCIP 使其停止反應，再將PVDF風乾並以掃描機掃描存檔。

2.15 免疫螢光染色

分別將 HeLa 細胞以 1×10^5 / well 與 GK 細胞以 2×10^5 / well 接種至 Two-well

chamber slice (Millipore)，隔夜培養後，各取 3 μ g 的 pcDNA3CF 和 pcDNA3CF/108L，以 Lipofectamine 2000 轉染至細胞中。培養 24 小時後，以冰冷的 1 \times PBS 清洗細胞 2 次，依序加入 200 μ l 的 PBS，400 μ l 的 4% paraformaldehyde / PBS，去除上清液後，再加入 600 μ l 的 4% paraformaldehyde / PBS，於室溫下固定細胞 20 分鐘(全程須避光)，以冰冷的 PBS 清洗兩次，每次 5 分鐘，再加入 0.25% Triton X-100 / 1 \times PBS 室溫下反應 5 分鐘，以冰冷的 PBS 清洗兩次，每次 5 分鐘，加入 1% BSA/PBS 於室溫下 blocking 1 小時，再以 200 倍稀釋的 mouse anti-flag[®] M2 Monoclonal Antibody 於室溫下反應 1 小時，再以 PBS 清洗 5 分鐘，重覆三次，最後以 200 倍稀釋的 rabbit anti-mouse IgG-h+1-FITC conjugated antibody 於室溫下反應 1 小時，再以 PBS 清洗 5 分鐘，重覆三次，以 2,000 倍稀釋的 DAPI 染劑作用 5 分鐘，再以 PBS 清洗 5 分鐘，重覆兩次，最後以透明指甲油封片，再於螢光顯微鏡觀察並照像紀錄。



第三章 結果

3.1 GIV108L的序列與特性之分析

根據 NCBI 資料庫分析比對顯示 GIV108L 與 ICP46 (Infected Cell Peptide 46) 蛋白序列高度相似，GIV108L 基因全長為 1149 鹼基對，蛋白質由 382 個胺基酸組成，蛋白質分子量為 44.1 kDa (圖一)。由 NCBI 資料庫比對可發現 ICP46 於虹彩病毒科中具有高度保留性，其中 GIV108L 與 SGIV162L 兩者的胺基酸序列相似性高達 97%，GIV108L 與其他歸類於 *Ranavirus* 屬的病毒相似性也有 49%，與其餘虹彩病毒科中病毒的相似性則只有 19 ~ 28%，然而 ICP46 胺基酸序列目前尚未發現功能區(domain)，因此無法推測 ICP46 的功能為何，不過經由 GeneDoc 分析軟體可發現各種虹彩病毒的某幾個胺基酸位置相似性極高(圖二)。接著利用多重序列比對 (Multiple sequence alignment) 軟體(MEGA 5)分析虹彩病毒科的五個病毒屬之各種病毒 ICP46 的演化關係，經由 1000 次的比對後得知 GIV108L 與 SGIV162L 的親緣性最接近，其次分別為其他歸類於 *Ranavirus* 屬、*Lymphocystivirus* 屬、*Megalocytivirus* 屬、*Chloriridovirus* 屬以及 *Iridovirus* 屬的病毒(圖三)。另外，藉由 I-TASSER 軟體分析之 108L 蛋白質二級結構與三級結構模擬圖(圖四)。

3.2 GIV108L為極早期基因

為了確定 108L 基因是否為極早期基因，因此利用 RT-PCR 方式檢視 108L 基因是否在病毒感染初期就表現。以 GIV (m.o.i=10) 感染 GK 細胞，收集不同時間點的總 RNA，利用反轉錄酶將 RNA 轉換成 cDNA 後，以偵測 108L 的引子進行 PCR。結果顯示在病毒感染 1 小時後即可觀察到些微的表現，隨感染時間的延長，108L 的表現量也隨之增加，大約在感染後 12 小時表現量達到極限(圖五 A)。同時利用蛋白合成抑制劑 (cycloheximide, CHX) 證實 108L 是否真的是極早期基因(Ross and Guarino, 1997)，藥劑最終濃度為 100 μ g/ml，GK 細胞於病毒感染前先以藥劑

處理 1 小時，於感染後 6 小時收集總 RNA，隨後將總 RNA 以 DNase I 處理後轉換成 cDNA，取固定量的 cDNA 作為 PCR 模板，加入偵測 108L、049L (PNP，早期基因) 和 045R (MCP，晚期基因) 的引子觀察三種基因的表現情形，結果顯示 108L 的基因表現在 CHX 處理後仍會表現(圖五 B)，故確定 108L 為石斑魚虹彩病毒極早期基因之一。

3.3 以原核表現系統生產 GIV108L 可溶性重組蛋白

因為在 GIV108L 基因序列內無法找到適合原核蛋白表現載體 (pET-28a-CBP-Factor Xa) 內的單一限制酶切位，因此需利用特殊的 PCR 方式，使嵌入子(insert) 5'端帶有 *EcoRI* 切位，3'端帶有 *XhoI* 切位，因此將 GIV108L 序列設計帶有限制酶切位的引子，5'端為 *EcoRI* 切位，3'端為 *XhoI* 切位，以 PCR 放大此片段，再將 PCR 產物 denature 和 renature，使之形成 5'端含有 *EcoRI* 切位與 3'端含有 *XhoI* 切位的黏合端(sticky end)，並以 T4 polynucleotide kinase 磷酸化，再接入 pET-28a-CBP-Factor Xa 載體內(圖六 A)，再以 *EcoRI* 與 *XhoI* 限制酶確認，可將 108L(1,149 bp)切割成 293 bp 與 856 bp 兩片段(圖六 B Lane 2)。

將建構好的載體轉型進入大腸桿菌 BL-21(DE3)大量表現 GIV108L 重組蛋白，誘導表現之測試條件分別為 37°C 誘導 4 小時 (IPTG 最終濃度為 0.1 mM 與 0.4 mM) 以及 20°C 誘導 16 小時 (IPTG 最終濃度為 0.1 mM)。收集誘導前、後的菌體總蛋白，以及破菌且離心後的上清液與沉澱物，以 12% SDS-PAGE 分析 3 種誘導條件下重組蛋白表現狀態，結果顯示 3 種誘導條件的菌體總蛋白在分子量約為 52 kDa 位置具有高度表現量(圖七 A Lane 2 與 Lane 5，圖七 B Lane 2)。確定蛋白有表現之後，收集菌體經超音波震盪器(sonicator)打破可將蛋白分為可溶性重組蛋白(soluble form) (圖七 A Lane 3 與 Lane 6，圖七 B Lane 3)，以及不可溶的包涵體(inclusion body) (圖七 A Lane 4 與 Lane 7，圖七 B Lane 4)，發現以 37°C 誘導的菌體所產生的融合蛋白不具可溶性，而 20°C 誘導的菌體則能產生大量的可溶性融合蛋白，可

溶性融合蛋白一般被視為較有可能成為具活性的蛋白質型態。接著將可溶性重組蛋白以 Ni-NTA resin (Bio-rad) 純化，收集純化過程中每一步驟的溶液並以 Coomassie Blue 染色分析蛋白純化過程，確定重組蛋白確實能緊緊與 Ni-NTA resin 結合，重組蛋白不會隨著 Binding Buffer (圖八 Lane 1 與 2) 或 Wash Buffer (圖八 Lane 3 與 4) 洗出，最後以 Elution Buffer 沖提出重組蛋白，發現重組蛋白主要集中於第 1、2 管(圖八 Lane 5 與 6)，且有不錯的產量。

3.4 GIV 108L 蛋白在細胞內的表現位置與表現量

3.4.1 GIV108L 融合蛋白於細胞內之表現位置

為瞭解 108L 蛋白在細胞內的表現位置，利用 108L 接上綠色螢光蛋白觀察其在 GK 細胞與 HeLa 細胞內主要的表現位置，因此將 pEGFP-N1 載體與建構完成的 pEGFP-N1/108L 載體(圖九)轉染到細胞內，再以 DAPI 染細胞核，於螢光顯微鏡 (Leica) 下以 63 倍油鏡觀察，結果顯示 108L-EGFP 蛋白質表現位置為細胞核，但是控制組 (EGFP) 與實驗組 (108L-EGFP) 於細胞內表現情況並無明顯差異(圖十)，因此無法排除 EGFP 會影響 108L 表現位置之可能性，故進一步以免疫螢光染色方式觀察。將 pcDNA3CF 載體與建構完成的 pcDNA3CF/108L 載體(圖十一)進行轉染，再以稀釋 200 倍的一級抗體(mouse anti-flag M2 monoclonal antibody)和稀釋 200 倍的二級抗體(rabbit anti-mouse IgG-h+1-FITC conjugated)進行雜合，結果發現 108L-Flag 在 GK 細胞(圖十二 A)和 HeLa 細胞(圖十二 B)內主要表現的位置皆為細胞核。

3.4.2 GIV108L 融合蛋白於細胞內之表現量

分別將 pEGFP-N1 和 pEGFP-N1-108L 載體轉染至 GK 細胞(圖十三 A、B)以及 HeLa 細胞(圖十三 C、D)，轉染後 24 小時以 SDS-PAGE 分離細胞總蛋白，並以 Coomassie blue 與 Western blot 分析蛋白表現狀況。Western blot 結果顯示無論在

GK 細胞(圖十三 B)或 HeLa 細胞(圖十三 D)中 pEGFP-N1-108L(分子量為 70 kDa)表現量都比 pEGFP-N1(分子量為 27 kDa)低。

同時也將 pcDNA3CF 和 pcDNA3CF-108L 載體轉染至 GK 細胞(圖十四 A、B)以及 HeLa 細胞(圖十四 C、D)，可發現 pcDNA3CF-108L 於 GK 細胞的表現量遠低於 HeLa 細胞，推測蛋白質表現量低的可能原因為 pcDNA3CF 在 GK 細胞的轉染效率不佳。有鑑於此利用 pcDNA3CF(作為 negative control)、pcDNA3CF-108L、pcDNA3CF-Mx II 以及 pcDNA3CF-MxIII (後面兩者作為 positive control) 4 種載體同時於 GK 與 GB 兩種石斑魚細胞株進行轉染，再以 G418 篩選兩個禮拜，待細胞長滿之後收集細胞總蛋白，並以 SDS-PAGE 分析蛋白表現狀況，Western blot 結果顯示 108L、MxII 和 MxIII 在 GB 細胞內皆可表現(圖十五 B)，然而在 GK 細胞內 3 種蛋白的表現量極低，只有 MxIII 勉強可看到些微的表現(圖十五 D)。因此 GK 細胞似乎不利於 pcDNA3CF 載體進行細胞轉染，另外從結果也可以發現 GIV108L 在 HeLa 細胞內表現量比在石斑魚細胞佳。

3.5 GIV 108KO 重組病毒之產生

基於同源性重組 (homologous recombinant) 作用的概念，使用便於實驗觀察的綠色螢光蛋白基因 (EGFP) 取代 108L 基因位置，並將 108L 基因下游片段(圖十六 B Lane 1)、綠色螢光蛋白基因(圖十六 B Lane 2)以及 108L 基因上游片段(圖十六 B Lane 3)以 *Bsa*I 限制酶處理後，再以 T4 接合酶接合 3 片段，接合後形成長度為 2,843 bp 的片段(圖十六 B Lane 4)，最後接入 pDsRed 2.1 載體(圖十六 A)，並以限制酶切割、DNA 電泳以及核酸定序確立建構完成的 p108KO 載體序列無誤。接著將建構完成的 p108KO 載體轉染至 GK 細胞後，隔日以 m.o.i 為 0.01、0.05、0.1 以及 1 的野生型石斑魚虹彩病毒感染 GK 細胞，感染後觀察 2~5 天，若有重組病毒產生則能於螢光顯微鏡下觀察到發出綠色螢光的細胞，實驗顯示在 m.o.i 為 0.05 的病毒感染下，大部分細胞可觀察到綠色螢光表現(圖十七 B)，收集細胞並以冷凍-解凍

方式將細胞打破，取部分細胞上清液萃取病毒 DNA，並以 PCR 方式檢視初步獲得之病毒液內野生型病毒(1,304 bp)與 108KO 重組病毒(875 bp)的比例，DNA 電泳結果顯示重組成功的病毒佔極少數，大部分都還是未重組成功的野生型病毒，重組型病毒：野生型病毒= 1：12 (圖十七 C)。

3.6 重組病毒之純化過程

3.6.1 病毒斑試驗純化重組病毒

重組病毒產生的同時也伴隨著多數野生型病毒的增殖，因此除了透過螢光顯微鏡的觀察之外，必須同步萃取病毒 DNA 以 PCR 方式偵測重組病毒(875 bp) 與野生型病毒(1,304 bp) 兩者之間的比例關係，挑選重組病毒佔多數的病毒液繼續純化。由實驗結果(圖十七 C)可發現初步獲得重組病毒的病毒液中仍含有大量野生型病毒，若繼續用液態細胞培養基進行病毒感染的話，將難以區分野生型病毒與重組病毒，因為細胞培養液中同時包含了兩種類型的病毒，因此需要利用固態培養基局限病毒感染的範圍。將初步獲得的重組病毒液十倍序列稀釋進行病毒斑試驗 (plaque assay)，於螢光顯微鏡下觀察 7~10 天，利用滅菌過的吸管於螢光顯微鏡下挑選單一旦發綠色螢光的病毒斑(圖十八 A)，將之回溶至 2% FBS / L15 液態培養液內，於 4°C 震盪一個晚上，使存在於固態培養基內的病毒能完全回溶於液態培養液，最後再以此病毒液十倍序列稀釋進行下一次的病毒斑試驗，重複三次後挑選 5 管病毒液並以 PCR 檢視病毒液中野生型與重組型病毒的比例(圖十八 B)，發現經過三次病毒斑試驗的挑選之後，野生型病毒比例明顯變低，其中五管病毒液中以第一管的野生型病毒較少，重組型病毒：野生型病毒= 4.5：1。

3.6.2 流式細胞儀篩選發出綠色螢光的細胞

選用第一管病毒液感染細胞，於感染後 5~7 天收集細胞，以流式細胞儀篩選會發螢光的細胞，並將細胞以冷凍-解凍方式打破後再次感染細胞，進行二次流式

細胞儀篩選(圖十九 A、B)，結果顯示重組病毒的比例有大幅增加的趨勢，又以發綠色螢光強度較強的細胞有較高比例的重組病毒(圖十九 C)。

3.6.3 病毒液序列稀釋感染 GK 細胞

挑選圖十八 B 中的 SH (sorting high light) 病毒液以十倍序列稀釋($10^{-2} \sim 10^{-4}$)方式感染 GK 細胞，每個稀釋濃度的病毒液感染一 96 孔盤(2×10^4 cell / well)，每一次感染都收集數個具有單一且發光病毒斑的 well，以 PCR 檢測並挑選重組病毒比例最高者繼續感染，經由第一次(圖二十 A)、第二次(圖二十 B)、第三次(圖二十 C)、第四次(圖二十 D)與第五次(圖二十 E)感染結果顯示重組病毒純度有漸漸變高的趨勢，其中第五次感染結果的 4A 和 10A 具有高純度的重組病毒，然而第六次感染結果卻顯示野生型病毒比例變高(圖二十 F)，且 10^{-3} 稀釋度的 96 孔盤細胞有發光的 well 只有三個，會發光的 well 數量明顯比之前相同稀釋度下的 96 孔盤細胞還要少(之前約 20 ~ 50 個不等)。

3.6.4 重組病毒感染之表現型(phenotype)變化

利用螢光顯微鏡觀察每一次純化過程中病毒發光以及造成細胞病變(cytopathic effects, CPE)的現象，同時根據 PCR 檢測每一次純化過程中的病毒液之野生型病毒與重組病毒的比例關係，發現隨著 108KO 重組病毒的純度愈高，病毒造成的病毒斑有愈來愈小且不明顯的現象(圖二十一)。

3.7 GIV 108KO 重組病毒之效價分析與野生型與重組型病毒之比例變化

經過一系列的重組病毒純化過程，挑選 4th - 11D (野生型：重組型=1：10)、5th - 4A(野生型：重組型=1：50)以及 5th - 10A (野生型：重組型=1：500) 3 種不同純度的重組病毒液進行增殖放大(圖二十二 A)，3 管重組病毒液分別進行十倍序列稀釋($10^{-2} \sim 10^{-5}$)，每個稀釋濃度的病毒液感染一個 well(5×10^5 cell / well)的 GK 細胞，以顯微鏡觀察病毒出現細胞病變的情況，並於感染 10 天後萃取病毒 DNA，以

PCR 檢測野生型與重組型病毒之比例，結果顯示重組病毒純度愈高者其病毒效價愈低，且野生型病毒隨病毒增殖放大，有明顯地增加的現象(圖二十二 B)。



第四章 討論

DNA 病毒的基因可根據其表現的次序分為三大類：極早期基因、早期基因以及晚期基因。由於極早期基因表現的時間最早被視為病毒感染宿主機制中重要角色，其功能包含調控病毒複製、顆粒組裝以及釋放，或者參與宿主細胞凋亡、訊息傳遞路徑、細胞生長週期與免疫防禦等機制，以達到複製增殖的目的 (Lin et al., 2008; Song and Stinski, 2005; Tang et al., 2010; Wadd et al., 1999; Wilcox et al., 1997)。本實驗室利用蛋白合成抑制劑(cycloheximide)與 DNA 微晶片分析，推估石斑魚虹彩病毒具有 21 個極早期基因，然而大部分極早期基因的功能仍未知，因此如果能進一步了解各基因的功能將有助於瞭解虹彩病毒的感染機制。

根據 NCBI 序列比對(blast)結果顯示石斑魚虹彩病毒 108L 與 ICP46 相似，其中與 SGIV ICP46 序列相似度高達 97%，不過 ICP46 胺基酸序列中尚未發現特殊的功能區(domain)，而過去關於 ICP46 的研究著重於序列分析(Beckman et al., 1988; Pallister et al., 2005)，因此其功能仍是未知的。雖然 ICP46 功能仍未知，ICP46 卻在 15 種定序完成的虹彩病毒基因庫內具有高度保留性(conserved)，由先前實驗室 DNA 微晶片分析(unpublished data)與 RT-PCR 結果(圖五)證實 GIV108L 屬於病毒極早期基因，因此推測 ICP46 可能在病毒複製過程中扮演十分重要的角色。從多重序列分析比對結果(圖二)顯示虹彩病毒 ICP46 蛋白的某幾個位置的胺基酸相似度很高，推測這些胺基酸可能與 ICP46 蛋白功能相關。另外，PDB (Protein Data Bank) 的蛋白質結構分析結果顯示 ICP46 可能與 T4 RNA ligase (El Omari et al., 2006)結構相似(圖四)，但序列相似度只有 11%；當大腸桿菌遭受 T4 噬菌體(T4 bacteriophage)感染時，會活化宿主的 anticodon nuclease，造成 tRNA^{Lys} 斷裂，而 T4 噬菌體可利用自身的 polynucleotide kinase 和 RNA ligase 修復斷裂的 tRNA^{Lys}，使得 T4 噬菌體可以利用宿主体內的 tRNA 進行複製與增殖，是 T4 噬菌體參與抵抗宿主防禦機制的一種策略，因此未來關於虹彩病毒 ICP46 的功能研究可以朝 RNA ligase 的方向

探討。

本實驗利用原核表現系統大量表現 GIV108L 重組蛋白，結果顯示大腸桿菌 BL-21(DE3)在 37°C 以 IPTG 誘導表現後，會產生大量的不可溶蛋白(Inclusion body)，為大腸桿菌大量表現重組蛋白經常碰到的問題，造成蛋白質不可溶的最大因素為蛋白摺疊錯誤，儘管目前不可溶蛋白能藉由許多 unfolding 和 refolding 的條件重新進行正確的蛋白摺疊，但是摺疊過程十分繁雜，耗時又費力，產物回收率低，而且不同蛋白質的 unfolding 和 refolding 條件也不盡相同 (Doyle, 2005)。因此若能使大腸桿菌表現可溶性重組蛋白則可省去不必要的麻煩，本實驗嘗試三種常用來增加可溶性重組蛋白的方式：(1)降低誘導溫度、(2)降低 IPTG 濃度與(3)使用不同品種的大腸桿菌，提高可溶性重組蛋白的產量。結果顯示 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L 表現載體在大腸桿菌 BL-21(DE3)中，並以 0.1 mM IPTG 在 20°C 環境下誘導培養 16 小時後，能獲得大量的可溶性重組蛋白(圖七)，而可溶性重組蛋白一般被視為較具有潛能性的活性蛋白，且經由鎳離子層析管柱純化後可獲得高純度的可溶性的重組蛋白(圖八)，未來可提供抗體製備、蛋白結構與蛋白活性分析等實驗。

為了瞭解 108L 的功能，本實驗利用螢光蛋白與 Western blot 分析其在細胞內的表現位置與表現量，結果顯示 GIV108L 主要在細胞核內表現(圖十二)，且在 HeLa 細胞內表現量最佳(圖十四 D)，而進入細胞核內表現的蛋白可能參與複製作用，儘管序列分析並未發現 108L 具有任何的 NLS (nuclear localization signal)，卻無法排除它是否能與其他蛋白相互作用因而造成 108L 在細胞內表現位置改變，例如 herpes simplex virus-1 (HSV-1)的 ICP 4 與 ICP 27 會改變 ICP 0 在細胞內的表現位置 (Elliott et al., 2005; Zhu et al., 1994)，Varicella zoster virus (VZV)的 IE62，herpes simplex virus-1 (HSV-1)的 ICP 0 與 ICP 4 等蛋白在細胞內的表現位置會隨著病毒感染時間自細胞核移至細胞質(Kinchington et al., 2001; Sedlackova and Rice, 2008)。因

此日後實驗可利用 HeLa 細胞表現 108L 蛋白並進行免疫沉澱試驗(immunoprecipitation)分析與 108L 相關的蛋白(associated protein)種類與功能，同時觀察細胞感染病毒後不同時間點 108L 表現位置是否產生改變。

本實驗除了利用基因獲得(gain of function)分析 GIV108L 特性之外，也利用同源重組作用生產 108L 基因剔除(gene knockout)的重組病毒，觀察石斑魚虹彩病毒缺乏 108L 時對於感染宿主細胞有何影響。獲得 108L 基因剔除重組病毒時發現分別以 m.o.i 為 0.01、0.05、0.1 與 1 的野生型虹彩病毒感染轉染 108KO 載體的 GK 細胞之後，於螢光顯微鏡下觀察細胞發出綠色螢光的情形，以 m.o.i 為 0.05 的病毒液條件產生之發綠色螢光的細胞數最多，代表此條件有利於病毒進行重組作用。病毒進行重組作用需仰賴宿主細胞提供催化重組反應之酵素，所以適當的病毒數量不但能使病毒複製的時間延長，更使得進行重組作用的機會增加；推測高 m.o.i 的病毒液產生重組病毒較少的原因，可能是病毒很快進行複製，造成細胞瓦解，不利於進行重組作用，而低 m.o.i 的病毒液則可能是細胞進行重組作用的機率本來就不高，因此病毒數量愈少重組發生的機率也會愈低。

另外，本實驗生產 108L 基因缺失重組病毒時，同時伴隨野生型病毒的增殖，因此須利用病毒斑試驗以及序列稀釋方式純化重組病毒，儘管 108KO 病毒至今仍無法完全純化，但是由實驗可觀察到 108KO 重組病毒與野生型 GIV 展現不同的表現型(phenotype)，隨著重組病毒純化的過程發現病毒斑(plaque)有變小且愈來愈不明顯的趨勢(圖二十一)。另外，以 3 種不同純度的重組病毒液(圖二十二)進行增殖放大，3 管重組病毒液分別進行十倍序列稀釋並感染 GK 細胞，於螢光顯微鏡下觀察，並於感染 10 天之後萃取病毒 DNA，以 PCR 檢測野生型與重組型病毒兩者的比例，發現重組病毒液純度愈高，病毒效價愈低，而且野生型病毒也有增加的趨勢，顯示野生型病毒增生速度比重組病毒快。

基於這些發現推論在病毒感染期間 108L 為造成此現象的重要推手，雖然未能

準確地推論 108L 是否對於病毒感染和複製有直接地影響力，不過許多文獻指出多數病毒的極早期基因具有 *trans-activation* 活性，能自我調控(*autoregulation*)以及調控病毒其他基因的表現 (Baudoux et al., 1995; Sedlackova and Rice, 2008)，所以病毒出現增生速度變慢、效價降低以及病毒斑變小等現象，其原因是否為病毒缺失 108L 表現進而影響其他負責病毒複製或顆粒組裝的基因表現所造成的結果，未來仍須進一步了解。另外，假設 GIV108L 於石斑魚虹彩病毒中具有重要功能的話，理論上病毒缺少 108L 後應該無法獲得 108L 基因剔除的重組病毒，然而重組病毒不但能產生而且還可被組裝成功並持續感染 GK 細胞，造成此現象的因素是否因為部分殘存的野生型病毒仍可表現 108L 提供重組病毒使用，使得重組病毒能繼續增殖並感染；抑或 108L 與病毒其他基因具有類似的功能，因此 108L 基因缺失時病毒仍可藉由其他基因補償 108L 活性的缺失，使得重組病毒仍能維持基本功能。針對前者假設本實驗擬利用表現 108L 的細胞進行感染，並觀察重組病毒是否能藉此被完全純化出來，同時檢視當 108L 表現時重組病毒出現增生速度變慢、效價降低以及病毒斑變小等現象是否能回復，然而目前針對 pcDNA3CF-108L 載體於 3 種能被石斑魚虹彩病毒感染的石斑魚細胞株中進行轉染效率之差異性比較，3 種細胞分別為石斑魚腎臟細胞(GK)、心臟細胞(GH)與肝臟細胞(GL)，初步結果顯示 108L 在 3 種細胞株內的表現量極低 (data not shown)，對此造成實驗上操作的不便性，故無法進一步釐清重組病毒純化時是否需要仰賴 108L 幫助；至於後者假設則有待未來對於虹彩病毒各基因功能有一定的認知才能瞭解。

經由本實驗針對 GIV108L 基因的研究結果得知，GIV108L 屬於為虹彩病毒極早期基因之一，且序列分析顯示 GIV108L 於虹彩病毒科中具有高度保留性。藉由原核表現系統能成功地以 IPTG 誘導表現出大量的可溶性 108L 重組蛋白，另外免疫細胞化學染色發現 108L 主要於細胞核內表現，以 108L 基因剔除的重組病毒感染石斑魚腎臟細胞，顯示當石斑魚虹彩病毒的 108L 表現下降時，病毒效價與病毒對宿主細胞的感染力有下降的趨勢，且形成的病毒斑也比野生型虹彩病毒小，因

此推論 GIV108L 可能參與石斑魚虹彩病毒的增殖與複製調控。



參考文獻

曾文陽。石斑魚養殖學。前程出版社，1998年。

- Baudoux, L., Defechereux, P., Schoonbroodt, S., Merville, M. P., Rentier, B., and Piette, J. (1995). Mutational Analysis of Varicella-Zoster Virus Major Immediate-Early Protein Ie62. *Nucleic Acids Research* **23**(8), 1341-1349.
- Beckman, W., Tham, T. N., Aubertin, A. M., and Willis, D. B. (1988). Structure and regulation of the immediate-early frog virus 3 gene that encodes ICR489. *Journal of Virology* **62**(4), 1271-7.
- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H., and Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *Journal of Virology* **73**(10), 8320-8329.
- Brunetti, C. R., Eaton, H. E., and Ring, B. A. (2010). The Genomic Diversity and Phylogenetic Relationship in the Family Iridoviridae. *Viruses-Basel* **2**(7), 1458-1475.
- Castillo, J. P., and Kowalik, T. F. (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* **290**(1-2), 19-34.
- Castillo, J. P., Yurochko, A. D., and Kowalik, T. F. (2000). Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *Journal of Virology* **74**(17), 8028-8037.
- Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E., and Chen, S. N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* **20**(3), 185-193.
- Chou, H. Y., Hsu, C. C., Peng, T. Y., Chou, H. Y., Hsu, C. C., and Peng, T. Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathology* **33**(4), 201-206.

- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z. Q., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F., and Rock, D. L. (2006). Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus). *Journal of Virology* **80**(17), 8439-8449.
- De Kinkelin, P., Bearzotti, M. (1981). Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Dev Biol Stand* **49**,431-439.
- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W., and Park, J. W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology* **325**(2), 351-363.
- Doyle, S. A. (2005). Screening for the expression of soluble recombinant protein in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* **310**, 115-21.
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., and Brunetti, C. R. (2007). Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology Journal* **4**.
- El Omari, K., Ren, J., Bird, L. E., Bona, M. K., Klarmann, G., LeGrice, S. F. J., and Stammers, D. K. (2006). Molecular architecture and ligand recognition determinants for T4 RNA ligase. *Journal of Biological Chemistry* **281**(3), 1573-1579.
- Elliott, G., Hafezi, W., Whiteley, A., and Bernard, E. (2005). Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *Journal of Virology* **79**(15), 9735-45.
- Everett, R. D., and Orr, A. (2009). Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP0 Aids Infection in Cells with a Preinduced Interferon Response but Does Not Impede Interferon-Induced Gene Induction. *Journal of Virology* **83**(10), 4978-4983.
- Everett, R. D., Parsy, M. L., and Orr, A. (2009). Analysis of the Functions of Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP0 That Are Critical for Lytic Infection and Derepression of Quiescent Viral Genomes. *Journal of Virology* **83**(10), 4963-4977.

- Georgens, C., Weyermann, J., and Zimmer, A. (2005). Recombinant virus like particles as drug delivery system. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **6**(1), 49-55.
- Goorha, R. (1995). Family Iridoviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P. et al. (Eds.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch Virol Suppl* **10**, 95-99.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., and Chan, S. M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* **291**(1), 126-139.
- He, J. G., Lu, L., Deng, M., He, H. H., Weng, S. P., Wang, X. H., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., and Chan, S. M. (2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology* **292**(2), 185-197.
- Jacobs, B. L., Jancovich, J. K., Bremont, M., and Touchman, J. W. (2010). Evidence for Multiple Recent Host Species Shifts among the Ranaviruses (Family Iridoviridae). *Journal of Virology* **84**(6), 2636-2647.
- Jakob, N. J., Kleespies, R. G., Tidona, C. A., Muller, K., Gelderblom, H. R., and Darai, G. (2002). Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate. *Journal of General Virology* **83**, 463-470.
- Jakob, N. J., Muller, K., Bahr, U., and Dara, G. (2001). Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate Iridovirus: Coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus. *Virology* **286**(1), 182-196.
- Jancovich, J. K., Mao, J. H., Chinchar, V. G., Wyatt, C., Case, S. T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E. W., Collins, J. P., and Jacobs, B. L. (2003). Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology* **316**(1), 90-103.
- Jiang, Y. L., Huang, Y. H., Huang, X. H., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z. L., Cui, H. C., Cao, J. H., Zhao, Y. T., Wang, X. J., and Qin, Q. W. (2009). Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. *Bmc Genomics* **10**.

- Kinchington, P. R., Fite, K., Seman, A., and Turse, S. E. (2001). Virion association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase. *Journal of Virology* **75**(19), 9106-9113.
- Kinchington, P. R., Hougland, J. K., Arvin, A. M., Ruyechan, W. T., and Hay, J. (1992). The Varicella-Zoster Virus Immediate-Early Protein Ie62 Is a Major Component of Virus-Particles. *Journal of Virology* **66**(1), 359-366.
- Lan, D., Shi, X., Wang, Y., Liu, C., Wang, M., Cui, H., Tian, G., Li, J., and Tong, G. (2009). [Construction of a recombinant HVT virus expressing the HA gene of avian influenza virus H5N1 via Rde/ET recombination system]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**(1), 78-84.
- Lin, P. W., Huang, Y. J., John, J. A. C., Chang, Y. N., Yuan, C. H., Chen, W. Y., Yeh, C. H., Shen, S. T., Lin, F. P., Tsui, W. H., and Chang, C. Y. (2008). Iridovirus Bcl-2 protein inhibits apoptosis in the early stage of viral infection. *Apoptosis* **13**(1), 165-176.
- Lu, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M., and He, J. G. (2005). Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology* **339**(1), 81-100.
- Murali, S., Wu, M. F., Guo, I. C., Chen, S. C., Yang, H. W., and Chang, C. Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* **25**(2), 91-100.
- Pallister, J., Goldie, S., Coupar, B., and Hyatt, A. (2005). Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP 18, ICP 46 and major capsid protein genes. *Archives of Virology* **150**(9), 1911-9.
- Qin, Q. W., Lam, T. J., Sin, Y. M., Shen, H., Chang, S. F., Ngoh, G. H., and Chen, C. L. (2001). Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *Journal of Virological Methods* **98**(1), 17-24.
- Ross, L., and Guarino, L. A. (1997). Cycloheximide inhibition of delayed early gene

expression in baculovirus-infected cells. *Virology* **232**(1), 105-113.

Sedlackova, L., and Rice, S. A. (2008). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27 is required for efficient incorporation of ICP0 and ICP4 into virions. *Journal of Virology* **82**(1), 268-77.

Shih, Y. P., Kung, W. M., Chen, J. C., Yeh, C. H., Wang, A. H. J., and Wang, T. F. (2002). High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Science* **11**(7), 1714-1719.

Slobedman, B., Stern, J. L., Cao, J. Z., Xu, J. K., and Mocarski, E. S. (2008). Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by the cellular transcription factor CCAAT displacement protein. *Virology* **378**(2), 214-225.

Song, W. J., Oin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F., and Hew, C. L. (2004). Functional Genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of Virology* **78**(22), 12576-12590.

Song, Y. J., and Stinski, M. F. (2005). Inhibition of cell division by the human cytomegalovirus IE86 protein: Role of the p53 pathway or cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1. *Journal of Virology* **79**(4), 2597-2603.

Stinski, M. F., and Petrik, D. T. (2008). Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. *Human Cytomegalovirus* **325**, 133-152.

Tan, W. G. H., Barkman, T. J., Chinchar, V. G., and Essani, K. (2004). Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family Iridoviridae). *Virology* **323**(1), 70-84.

Tang, Q. Y., Martinez, F. P., and Cosme, R. S. C. (2010). Murine cytomegalovirus major immediate-early protein 3 interacts with cellular and viral proteins in viral DNA replication compartments and is important for early gene activation. *Journal of General Virology* **91**, 2664-2676.

Tidona, C. A., and Darai, G. (1997). Molecular anatomy of lymphocystis disease virus. *Archives of Virology*, 49-56.

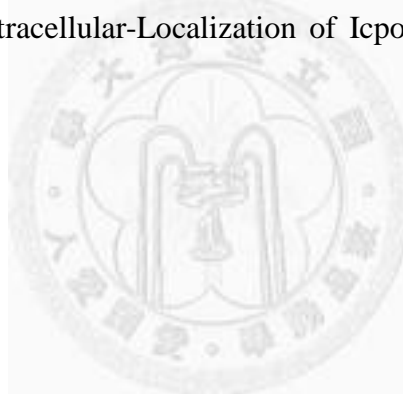
- Tsai, C. T., Lin, C. H., and Chang, C. Y. (2007). Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. *Virus Research* **126**(1-2), 196-206.
- Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C., and Chang, C. Y. (2005). Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *Journal of Virology* **79**(4), 2010-2023.
- Tsurumi, T., Murata, T., Isomura, H., Yamashita, Y., Toyama, S., Sato, Y., Nakayama, S., Kudoh, A., Iwahori, S., and Kanda, T. (2009). Efficient production of infectious viruses requires enzymatic activity of Epstein-Barr virus protein kinase. *Virology* **389**(1-2), 75-81.
- van Oers, M. M., Ince, I. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbag, Z., and Nalcacioglu, R. (2008). Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP). *Virology* **376**(1), 124-131.
- Wadd, S., Bryant, H., Filhol, O., Scott, J. E., Hsieh, T. Y., Everett, R. D., and Clements, J. B. (1999). The multifunctional herpes simplex virus IE63 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein K and with casein kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **274**(41), 28991-28998.
- Wilcox, C. L., Smith, R. L., Everett, R. D., and Mysofski, D. (1997). The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICPO is necessary for the efficient establishment of latent infection. *Journal of Virology* **71**(9), 6777-6785.
- Williams, T. (1996). The iridoviruses. *Advances in Virus Research, Vol 46* **46**, 345-412.
- Willis, D. B., and Granoff, A. (1985). Trans-Activation of an Immediate-Early Frog Virus-3 Promoter by a Virion Protein. *Journal of Virology* **56**(2), 495-501.
- Xia, L. Q., Cao, J. H., Huang, X. H., and Qin, Q. W. (2009). Characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication. *Archives of Virology* **154**(9), 1409-1416.
- Xia, L. Q., Liang, H. Y., Huang, Y. H., Ou-Yang, Z. L., and Qin, Q. W. (2010).

Identification and characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF162L, an immediate-early gene involved in cell growth control and viral replication. *Virus Research* **147**(1), 30-39.

Yao, Y. L., and Yang, W. M. (2003). The metastasis-associated proteins 1 and 2 form distinct protein complexes with histone deacetylase activity. *Journal of Biological Chemistry* **278**(43), 42560-42568.

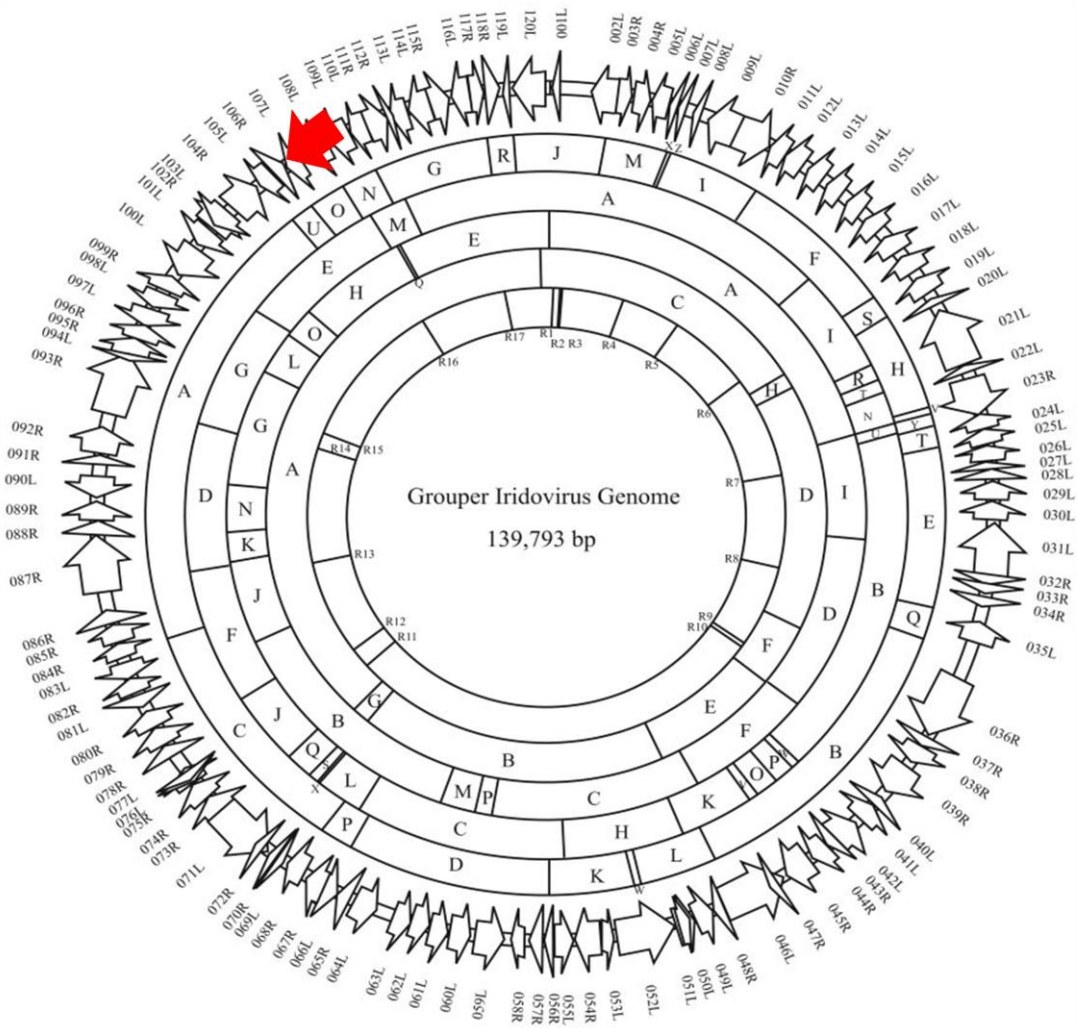
Zhang, Q. Y., Zhao, Z., Xiao, F., Li, Z. Q., and Gui, J. F. (2006). Molecular characterization of three *Rana grylio* virus (RGV) isolates and *Paralichthys olivaceus* lymphocystis disease virus (LCDV-C) in iridoviruses. *Aquaculture* **251**(1), 1-10.

Zhu, Z. M., Cai, W. Z., and Schaffer, P. A. (1994). Cooperativity among Herpes-Simplex Virus Type-1 Immediate-Early Regulatory Proteins - Icp4 and Icp27 Affect the Intracellular-Localization of Icpo. *Journal of Virology* **68**(5), 3027-3040.



A

ORF108L



B

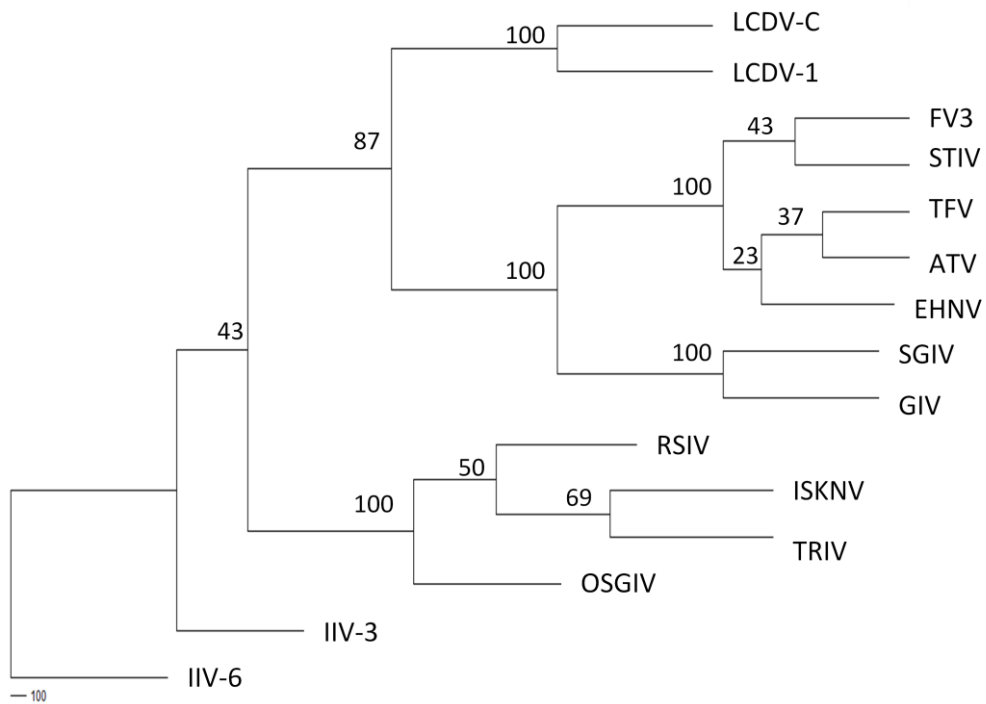
1	ATG	GCT	TTC	GTC	ACA	GAC	AAG	CGA	GAA	AAT	CTC	ACA	ATG	TCT	TGC	GCG	TCT	GCC	GAC	GCC
	M	A	F	V	T	D	K	R	E	N	L	T	M	S	C	A	S	A	D	A
61	GTG	GAA	CGG	TAT	CCG	GCA	GTT	CGC	GGA	CTC	GTA	CAC	TGC	GGA	AAG	AAC	GTC	ATC	TTT	CGC
	V	E	R	Y	P	A	V	R	G	L	V	H	C	G	K	N	V	I	F	R
121	AGC	TTG	CCG	CAC	CCT	TTG	GTG	CGC	GAG	ACG	ATT	CCC	AAA	GAA	CTC	ACG	CTC	AAA	GAC	TGT
	S	L	P	H	P	L	V	R	E	T	I	P	K	E	L	T	L	K	D	C
181	TTG	GTG	TAT	CCA	GCC	GTT	GAA	GGA	GCT	GTC	GTC	AAC	GTG	TTT	TAT	CAC	GAT	GAC	AAA	TGG
	L	V	Y	P	A	V	E	G	A	V	V	N	V	F	Y	H	D	D	K	W
241	ATG	ATT	TGC	TCA	AAT	AAA	AAG	TTT	GAC	ATT	TCA	AAA	TCA	TCT	TGG	TCT	GCA	GCT	CCC	GGA
	M	I	C	S	N	K	K	F	D	I	S	K	S	S	W	S	A	A	P	G
301	AGC	TTC	AAG	AGA	GCT	TTC	GTC	AAA	TGC	CTG	AGA	GCC	ACG	TGG	AAT	GAC	CAC	AGC	TCT	TGG
	S	F	K	R	A	F	V	K	C	L	R	A	T	W	N	D	H	S	S	W
361	GCA	GAT	CCT	TTC	GAC	AAA	AGC	TAC	TTG	CAA	CGG	TTT	TGC	GAG	GTA	AAT	CTG	TGT	TCC	GAG
	A	D	P	F	D	K	S	Y	L	Q	R	F	C	E	V	N	L	C	S	E
421	AAG	GGT	TAC	ATC	TTT	ATG	GTG	TTT	ACT	CCT	GAA	GAA	CGC	ATC	ATG	TGC	TCC	AAA	GAG	AAG
	K	G	Y	I	F	M	V	F	T	P	E	E	R	I	M	C	S	K	E	K
481	GAA	ACC	CTG	AAA	CTT	TTG	GCA	ACA	TAT	GAC	AGG	TTT	TCC	GAC	CAA	CAC	TGT	TAC	GAC	AAC
	E	T	L	K	L	L	A	T	Y	D	R	F	S	D	Q	H	C	Y	D	N
541	TAT	CTG	AGG	CTT	TCG	TGC	GGA	ACC	GAA	ATT	CAA	TGC	TCG	CAA	GCG	CTG	AAA	TTT	GGT	AAC
	Y	L	R	L	S	C	G	T	E	I	Q	C	S	Q	A	L	K	F	G	N
601	GCC	CAT	AAT	CTG	CTG	AAG	AAG	CTA	AAC	AAA	CAA	GAT	CCG	CGA	GAG	TCT	GCA	GGA	TTT	GTG
	A	H	N	L	L	K	K	L	N	K	Q	D	P	R	E	S	A	G	F	V
661	ATC	ATT	GCG	CCA	AAC	GGC	AAG	CAT	TAC	AAA	CTC	TTT	TCG	GCA	GAG	TAC	GCA	CGA	ATC	TTG
	I	I	A	P	N	G	K	H	Y	K	L	F	S	A	E	Y	A	R	I	L
721	AGC	GCC	AGA	GGC	GAA	CAG	CCC	AGA	ATC	AAC	CTC	AGA	TTC	CTC	CAA	CTC	AAA	GAG	GCT	GGA
	S	A	R	G	E	Q	P	R	I	L	N	R	F	L	Q	L	K	E	A	G
781	GAA	GAC	GGC	GAG	GAA	ATC	AAA	GTG	CTG	TGC	AAA	TAC	TAT	CCA	GAG	GTT	GCA	GAA	GCA	
	E	D	G	E	E	D	I	K	V	L	C	K	Y	Y	P	E	V	A	E	A
841	ACC	AAA	AAC	ATT	GAT	GAA	TTC	AGA	GAC	CGA	ATC	ATT	CAA	TGT	TAT	CTG	GCT	CTC	GCA	GAC
	T	K	N	I	D	E	F	R	D	R	I	I	Q	C	Y	L	A	L	A	D
901	AGA	GAT	TGG	GAA	CCT	CAA	GAA	TGG	ATG	AAC	AAA	CGC	GTG	GTA	AAG	ATG	GTT	TTG	ACA	ACT
	R	D	W	E	P	Q	E	W	M	N	K	R	V	V	K	M	V	L	T	T
961	CCG	TCA	GAA	TAC	GTT	CGC	GCT	TCG	CTC	GAA	GAA	ATG	ATG	AGG	ACA	ATG	TCT	TCT	GGA	CAA
	P	S	E	Y	V	R	A	S	L	E	E	M	M	R	T	M	S	S	G	Q
1021	CTC	AAG	AAA	CTG	TAC	AAG	ACG	CAC	AAG	TGT	CTT	GCA	GGA	GTT	GAC	GTG	TCT	TGG	CTC	ACT
	L	K	K	L	Y	K	T	H	K	C	L	A	G	V	D	V	S	W	L	T
1081	GCC	GAC	GCT	CCA	GTG	CGC	CCA	GAA	AAA	GAA	CTT	CAA	GAT	ATG	TTG	GAG	TTT	CCC	GAC	GAA
	A	D	A	P	V	R	P	E	K	E	L	Q	D	M	L	E	F	P	D	E
1141	GAA	GAG	TGA																	
	E	E	*																	

圖一、石斑魚虹彩病毒 108L 之基因與胺基酸序列

108L 基因位於石斑魚虹彩病毒基因庫上的位置(A)，其 ORF 的位置與方向如同箭頭所示；108L 基因序列與胺基酸序列如圖(B)，基因全長為 1,149 鹼基對，具有 382 個胺基酸，蛋白質分子量 44.1 kDa。*代表 stop codon。

圖二、 15 種已知序列的虹彩病毒之 ICP46 胺基酸序列比對分析

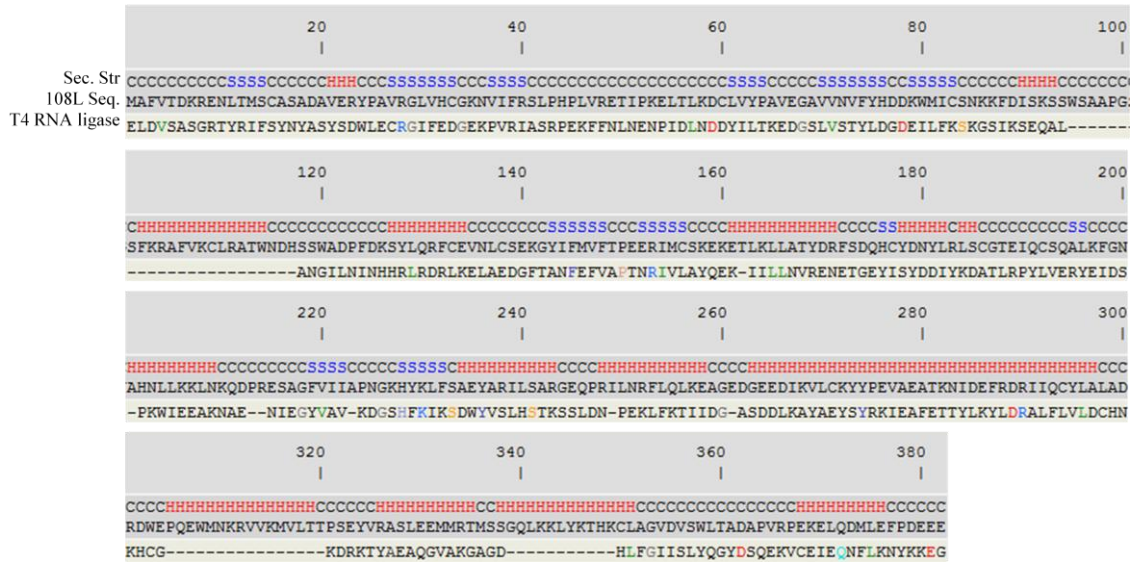
利用 NCBI 資料庫、UniPro 比對軟體以及 GeneDoc 分析軟體比對石斑魚虹彩病毒(GIV)與其他虹彩病毒之 ICP46 胺基酸序列的相似度，灰色代表於大部分虹彩病毒內具有高度相似度，黑色代表於全部虹彩病毒內具有高度相似度。病毒之全名與 accession number 如下：Grouper iridovirus (GIV, AAV91117)、Singapore grouper iridovirus (SGIV, AAS18177)、Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV, ACO25203)、Ambystoma tigrinum virus (ATV, AAP33190)、Soft-shelled turtle iridovirus (STIV, ACF42315)、Frog virus 3 (FV3, AAT09751)、Tiger frog virus (TFV, AAL77815)、Lymphocystis disease virus China (LCDV-C, AAU11006)、Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1, NP078648)、Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3, ABF82253)、Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6, AAK82253)、Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV, AAL98839)、Red sea bream iridovirus (RSIV, BAK14292)、Orange-spotted grouper iridovirus(OSGIV, AAX82421) 與 Turbot reddish body iridovirus (TRIV, ADE34450)。各病毒 ICP46 基因全長、胺基酸長度與蛋白質分子量見表二。



圖三、15種已知序列的虹彩病毒之ICP46胺基酸親緣性分析

利用 NCBI 資料庫與 MEGA 5 分析軟體比對石斑魚虹彩病毒(GIV)與其他虹彩病毒 ICP46 的親緣關係，演化關係以 neighbor-joining distance 表示。分支上的數字為採用 bootstrap 進行 1000 次重複取樣檢驗，並以 TreeView 進行演化樹輸出。

A



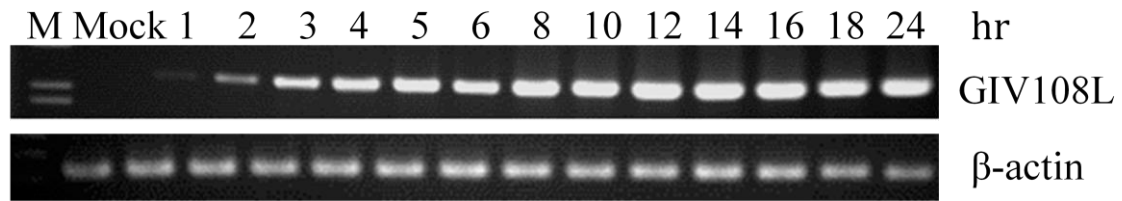
B



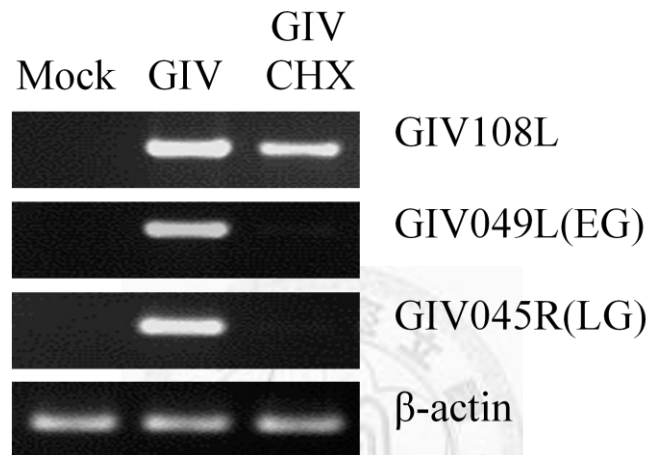
圖四、石斑魚虹彩病毒 108L 之蛋白質結構分析

利用 I-TASSER 分析軟體預測 108L 蛋白質結構。二級結構 (A) Sec. Str : secondary structure , C : coil , H : alpha helix , S : beta sheet ; 108L seq. : 108L 胺基酸序列 ; T4 RNA ligase : 與 108L 蛋白質結構最相近的蛋白質。三級結構 (B) , 比對結果之 108L 三級結構模擬圖 , C-score= -0.905 。

A



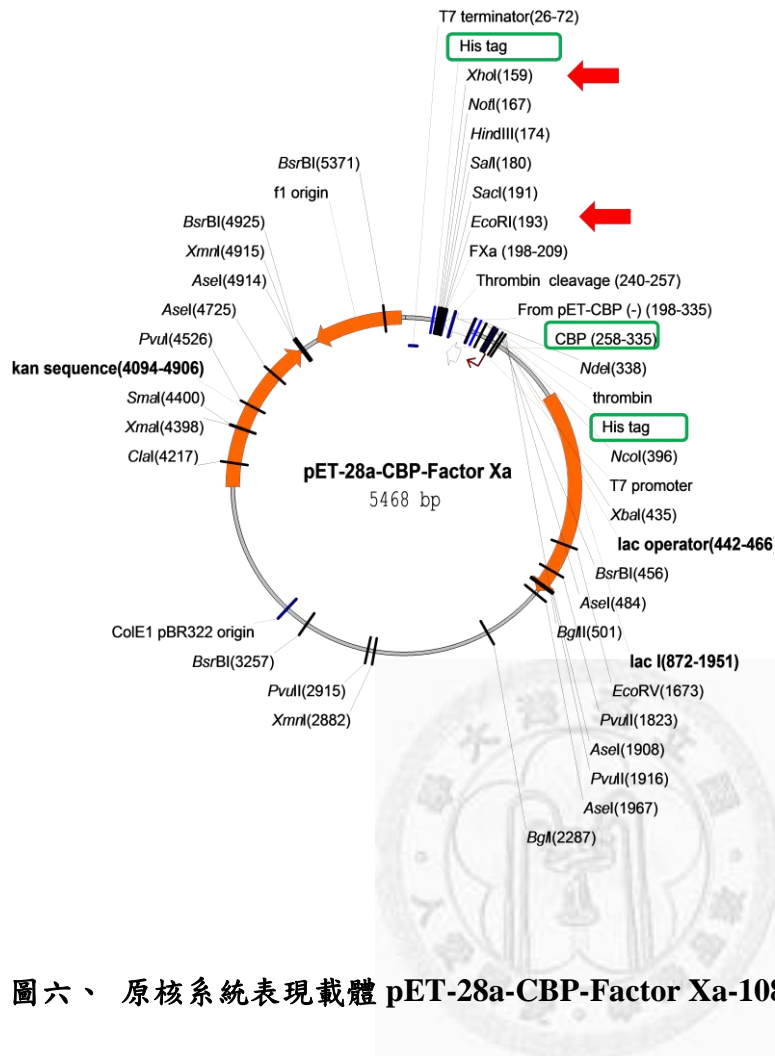
B



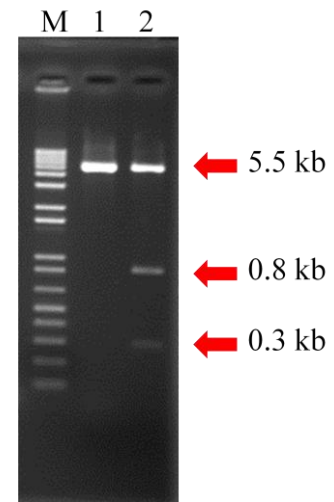
圖五、GK 細胞感染 GIV 病毒後不同時間點與蛋白合成抑制藥劑處理後 108L 之表現情形

以 RT-PCR 檢測 GK 細胞感染 GIV 病毒後 108L 於不同時間點之表現情形(A)；GK 細胞以蛋白質合成抑制劑 (cycloheximide, CHX；最終濃度為 $100 \mu\text{g/ml}$) 處理 1 小時後感染 GIV，病毒感染後 6 小時收集總 RNA，並分別以 108L、石斑魚虹彩病毒早期基因 (049L, PNP：purine nucleoside phosphorylase) 與晚期基因 (045R, MCP：major capsid protein) 的引子進行 RT-PCR 確認 108L 為極早期基因。M：1 Kb plus DNA ladder，Mock：未感染病毒，GIV：以 m.o.i.=10 病毒液感染 6 小時後收集總 RNA， β -actin：控制組。EG：early gene，LG：late gene。

A



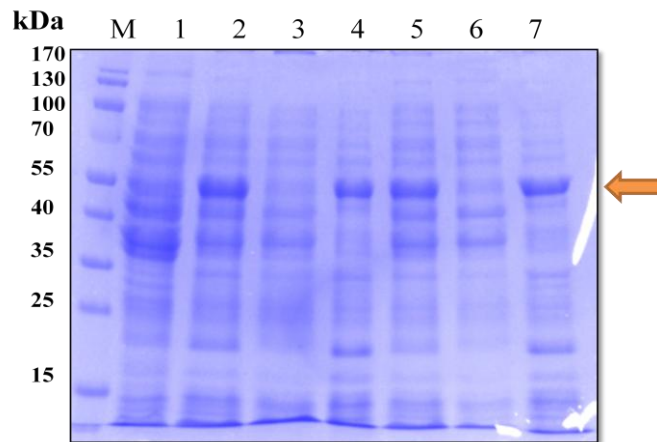
B



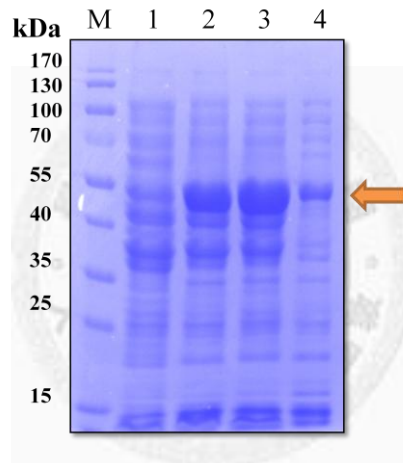
圖六、原核系統表現載體 pET-28a-CBP-Factor Xa-108L 之建構

原核系統表現載體為 pET-28a-CBP-Factor Xa (A)，箭頭所指為使用的限制酶切位，分別為 *Xho*I 和 *Eco*RI，方形框框代表用來純化融合蛋白的胺基酸小片段；載體以 *Xho*I 和 *Eco*RI 限制酶處理後，經 DNA 電泳分析的結果(B)，Lane 1：pET-28a-CBP-Factor Xa 與 Lane 2：pET-28a-CBP-Factor Xa-108L。pET-28a-CBP-Factor Xa 的長度為 5.5 kb，108L 可被切割成兩個小片段，分別為 0.8 kb 以及 0.3 kb。M：1 Kb plus DNA ladder。

A

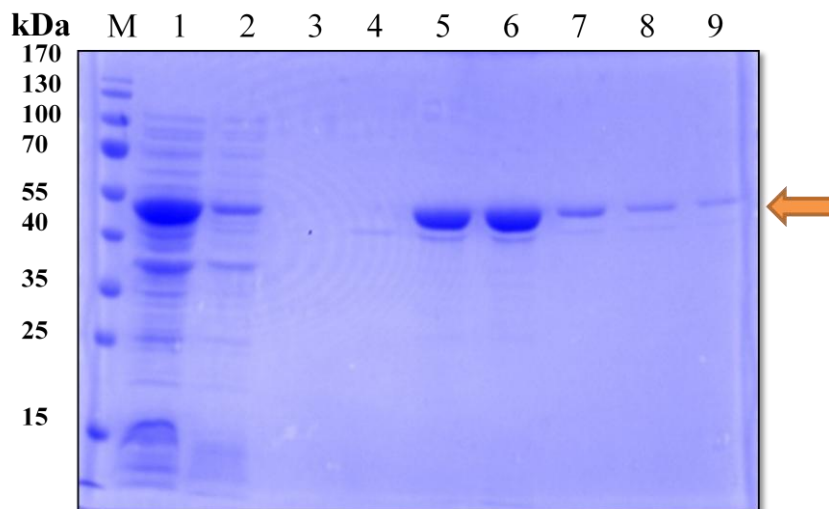


B



圖七、 利用大腸桿菌 BL-21 (DE3) 表現石斑魚虹彩病毒 108L-His 融合蛋白

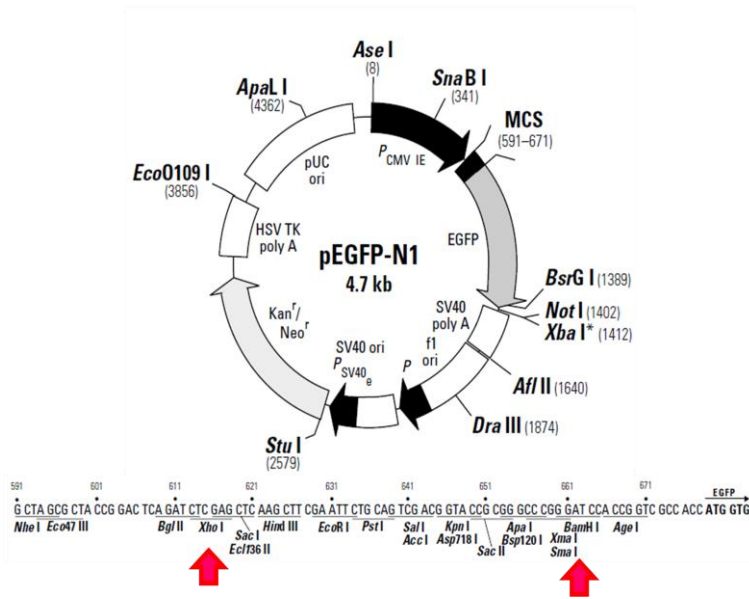
收集 IPTG 誘導前、後以及破菌並離心後的上清液(可溶性)與沉澱物(不可溶性)的蛋白，以 SDS-PAGE 分析蛋白表現的狀況，箭頭所指位置為 108L-His tag 融合蛋白質，分子量約為 52 kDa。圖(A) Lane 1 為 37°C 誘導前菌體總蛋白，Lane 2 ~ 4 (IPTG 最終誘導濃度為 0.1 mM) 分別為 37°C 誘導 4 小時後菌體總蛋白、破菌並離心後的上清液與沉澱物，Lane 5 ~ 7 (IPTG 最終誘導濃度為 0.4 mM) 分別為 37°C 誘導後菌體總蛋白、破菌並離心後的上清液與沉澱物。圖 (B) Lane 1 為 20°C 誘導前菌體總蛋白，Lane 2 ~ 4 (IPTG 最終誘導濃度為 0.1 mM) 分別為 20°C 誘導 16 小時後菌體總蛋白、破菌並離心後的上清液與沉澱物。M： Prestained protein ladder。



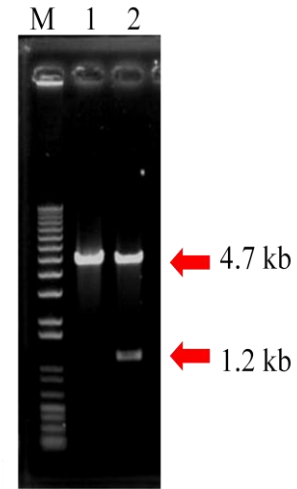
圖八、利用 Ni^{2+} 親和性層析管柱純化石斑魚虹彩病毒可溶性 108L-His 融合蛋白

離心收集 20°C ， 0.1 mM IPTG 誘導 16 小時後的菌體，經超音波震盪器打破菌體後收集可溶性重組蛋白，利用鎳 (Ni^{2+}) 離子親和力層析管柱純化 108L-His 融合蛋白，收集每個純化步驟的產物並以 SDS-PAGE 分析。Lane 1、2 分別為第 1、2 管以 Binding Buffer (0 mM imidazole) 洗出的產物，Lane 3、4 分別為第 1、2 管以 Wash Buffer (20 mM imidazole) 洗出的產物，Lane 5~9 分別為第 1~5 管以 Elution Buffer (250 mM imidazole) 洗出的產物。M：Prestained protein ladder。箭頭所指位置為 108L-His tag 融合蛋白質，分子量約為 52 kDa 。

A



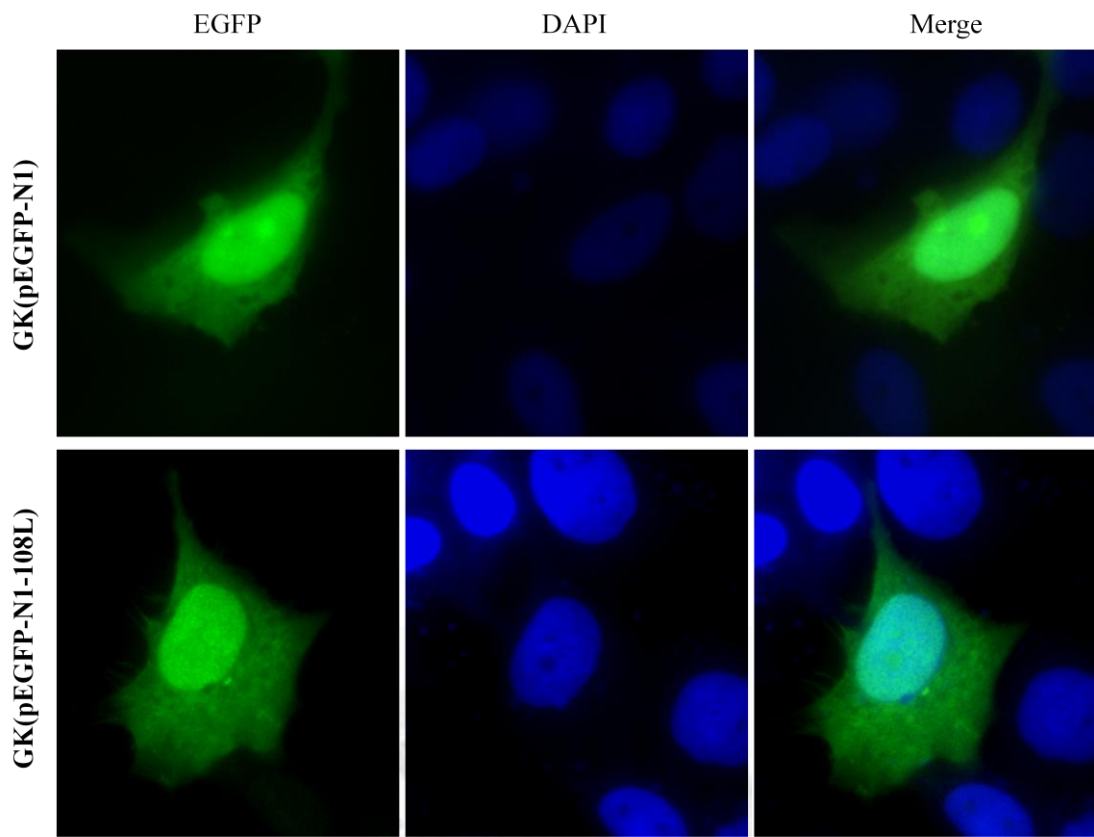
B



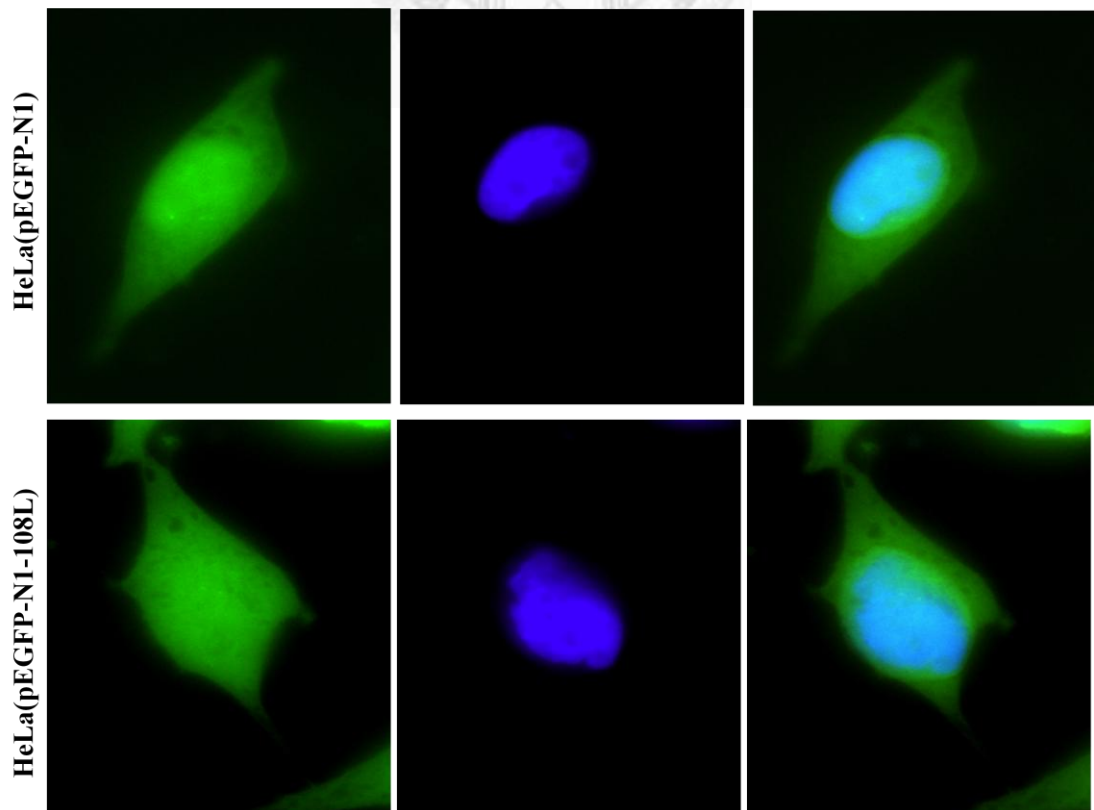
圖九、真核細胞表現載體 pEGFP-N1-108L 之建構

真核細胞表現載體為 pEGFP-N1 (A)，箭頭所指為使用的限制酶切位，分別為 *Xho*I 和 *Bam*HI。載體以 *Xho*I 和 *Bam*HI 限制酶處理後，經 DNA 電泳分析的結果(B)，Lane 1：pEGFP-N1 與 Lane 2：pEGFP-N1-108L。pEGFP-N1 的長度為 4.7 kb，108L 的長度為 1.2 kb，M：1 Kb plus DNA ladder。

A



B

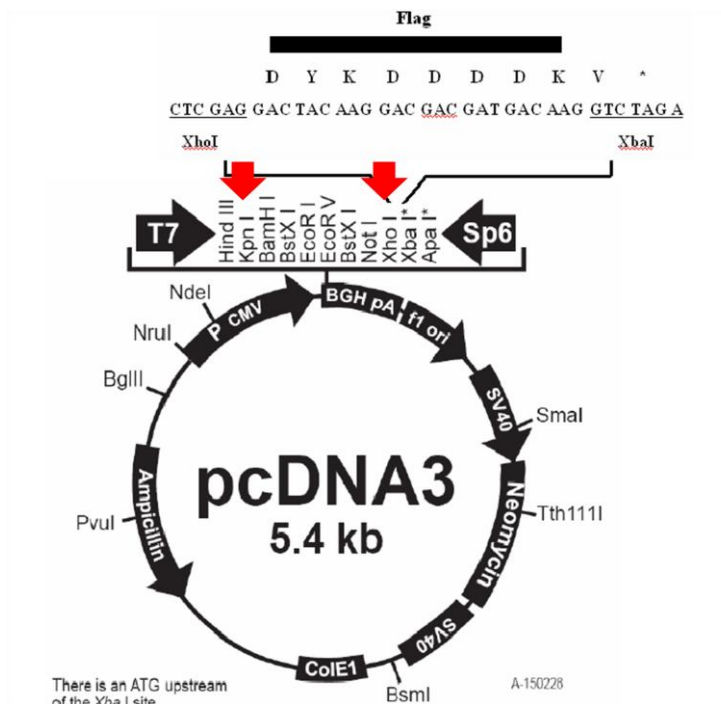


圖十、 GIV108L-EGFP 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現位置

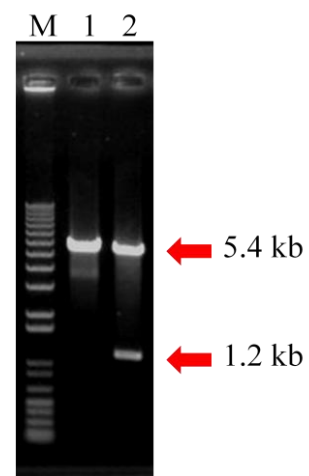
分別將 pEGFP-N1 與 pEGFP-N1/108L 兩種載體轉染至 GK 細胞(A)與 HeLa 細胞(B)，轉染 24 小時之後，以 4% paraformaldehyde 固定細胞，並用 DAPI 進行細胞染色。利用螢光顯微鏡 (63 倍油鏡) 觀察 EGFP 綠色螢光蛋白與 108L-EGFP 融合蛋白於細胞內的表現位置，藍色(DAPI)為細胞核的位置。



A

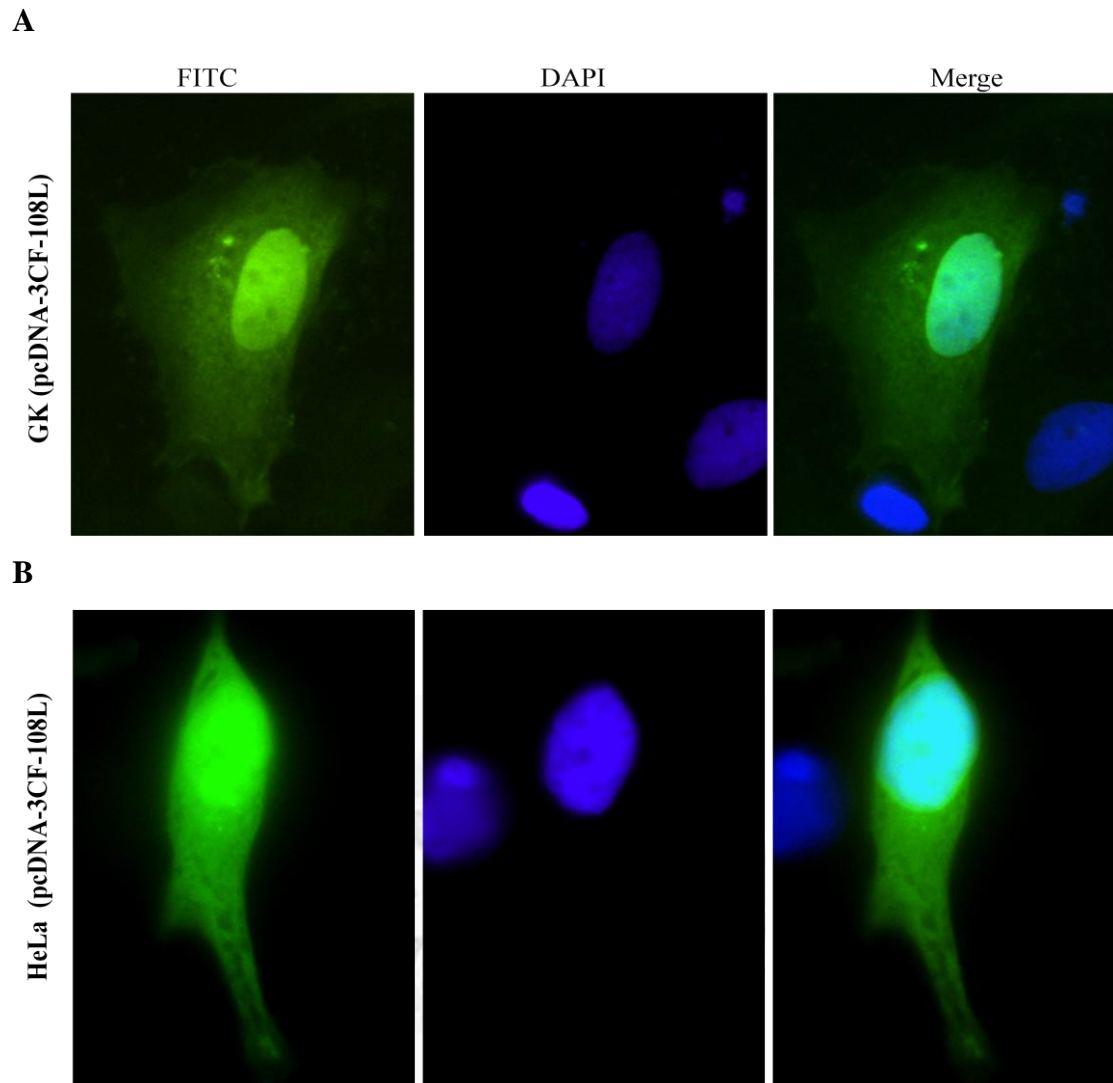


B



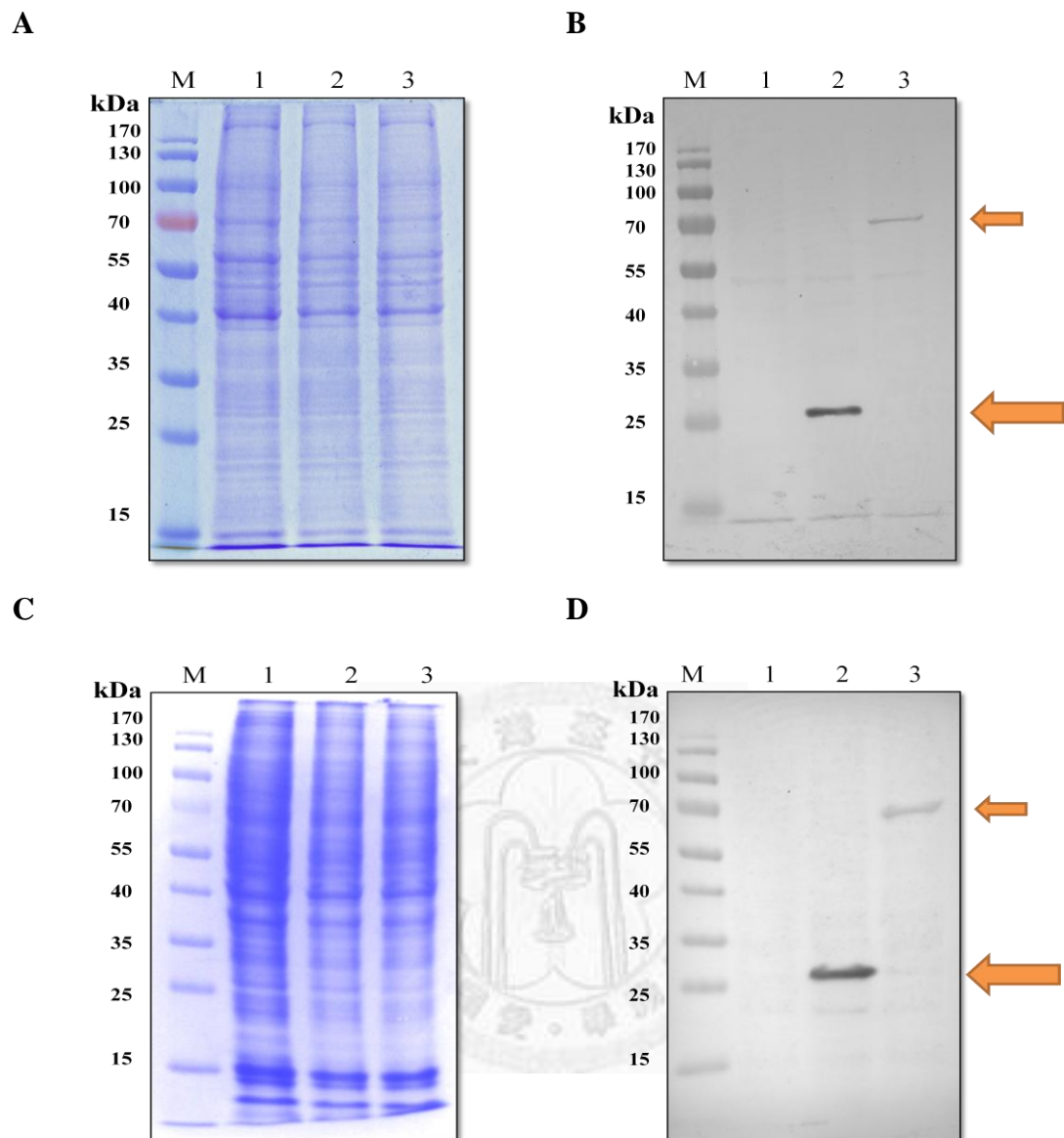
圖十一、真核細胞表現載體 pcDNA3CF-108L 之建構

真核細胞表現載體為 pcDNA3CF (A)，箭頭所指為使用的限制酶切位，分別為 *Kpn* I 和 *Xho* I。載體以 *Kpn* I 和 *Xho* I 限制酶處理後，經 DNA 電泳分析的結果(B)，Lane 1：pcDNA-3CF 與 Lane 2：pcDNA3CF -108L，pcDNA-3CF 的長度為 5.4 kb，108L 的長度為 1.2 kb，M：1 Kb plus DNA ladder。



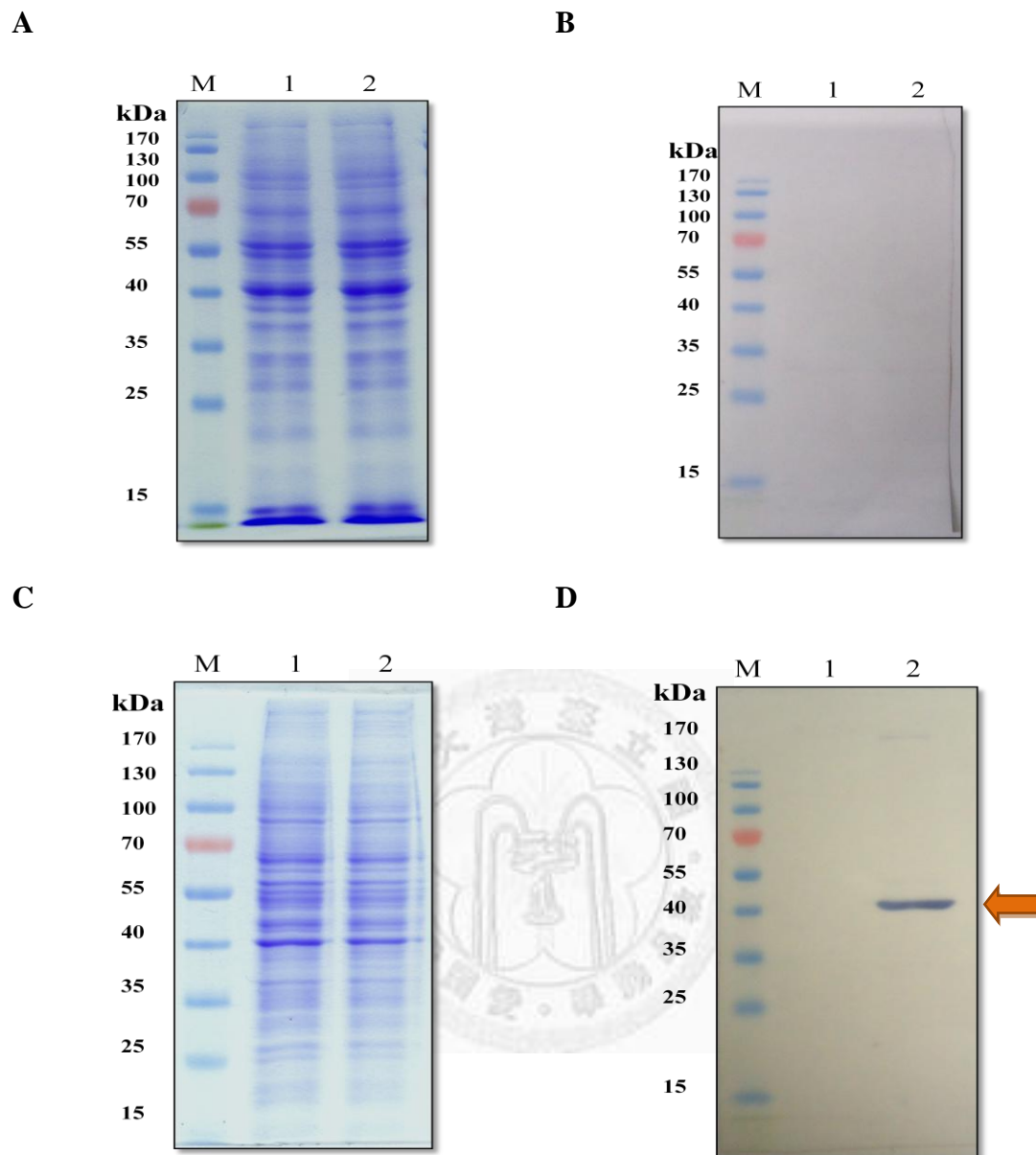
圖十二、 GIV108L-Flag 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現位置

分別將 pcDNA3CF 與 pcDNA3CF/108L 兩種載體轉染至 GK 細胞(A)與 HeLa 細胞(B)，轉染 24 小時之後，以 4% paraformaldehyde 固定細胞，並進行細胞免疫螢光染色。利用螢光顯微鏡 (63 倍油鏡) 觀察 108L 融合蛋白於細胞內的表現位置，藍色(DAPI)為細胞核的位置。免疫螢光使用的一級抗體為 mouse anti-flag M2 monoclonal antibody (1:200)，二級抗體為 rabbit anti-mouse IgG-h+1-FITC conjugated (1:200)。



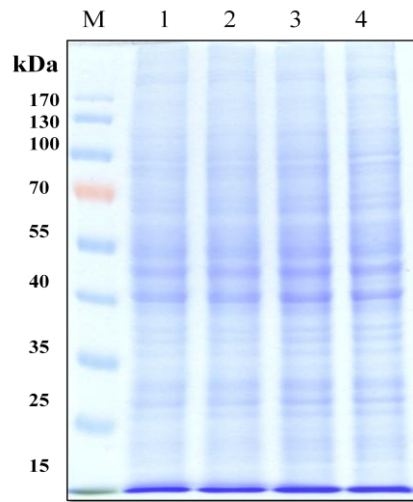
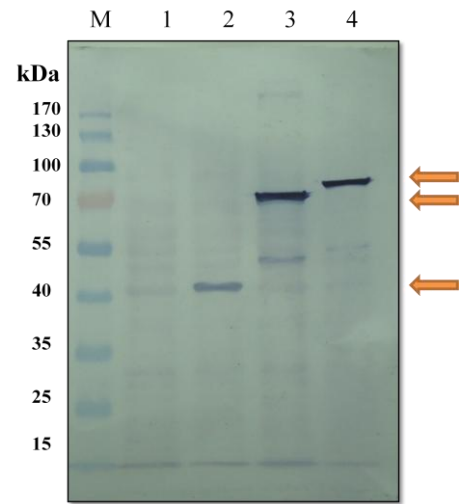
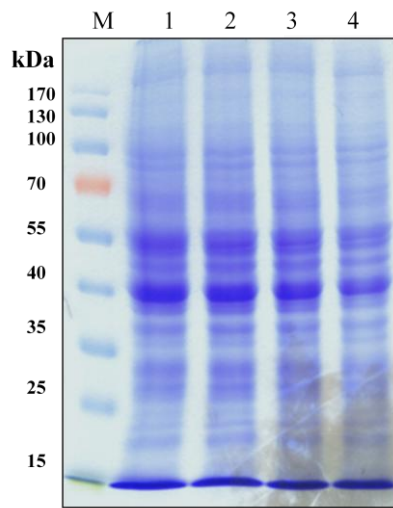
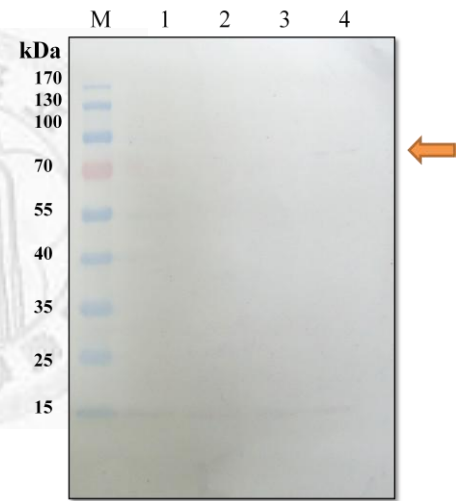
圖十三、 GIV108L-EGFP 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞內的表現量分析

於 GK 細胞(A, B)與 HeLa 細胞(C, D)內表現 EGFP 與 108L-EGFP 綠色螢光蛋白，轉染後 24 小時，利用 SDS-PAGE 分離細胞總蛋白，並以 Coomassie blue 染色 (A, C)和 Western blot (B, D)分析蛋白表現量。Lane 1 為未轉染之控制組，Lane 2 為細胞轉染 pEGFP-N1，EGFP 蛋白質之分子量約為 27 kDa (小箭頭)，Lane 3 為細胞轉染 pEGFP-N1-108L，108L-EGFP 之分子量約為 70 kDa (大箭頭)。Western blot 使用的一級抗體為 monoclonal anti-EGFP antibody (1 : 3000)，二級抗體為 polyclonal goat anti-mouse immunoglobins/AP (1 : 3000)。M : Prestained protein ladder。



圖十四、 GIV108L-Flag 融合蛋白在 GK 與 HeLa 細胞中的表現量分析

於 GK 細胞(A, B)與 HeLa 細胞(C, D)內表現 GIV 108L 蛋白，轉染後 24 小時，利用 SDS-PAGE 分離細胞總蛋白，並以 Coomassie blue 染色(A, C)和 Western blot (B, D)分析蛋白表現量。Lane 1 為細胞轉染 pcDNA3CF 載體，Lane 2 為細胞轉染 pcDNA3CF-108L，蛋白分子量大小約為 44 kDa (箭頭所指之處)。Western blot 使用的一級抗體為 monoclonal anti-flag M2 antibody (1 : 3000)，二級抗體為 polyclonal goat anti-mouse immunoglobins / AP (1 : 3000)。M : Prestained protein ladder。

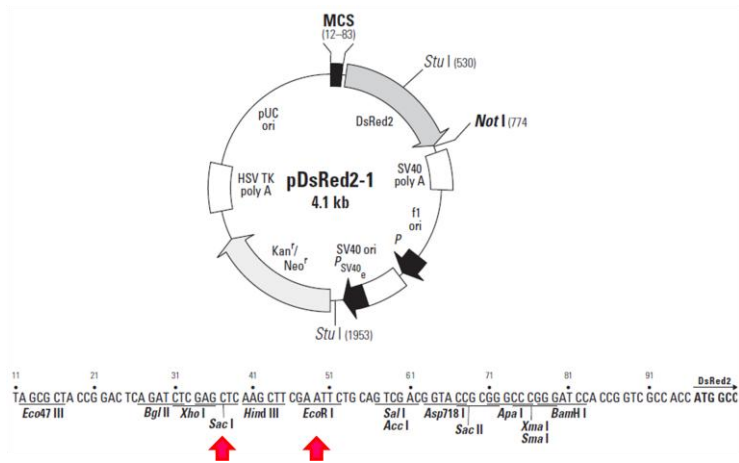
A**B****C****D**

圖十五、 pcDNA-3CF 載體於 GB 與 GK 兩種石斑魚細胞之轉染效率比較

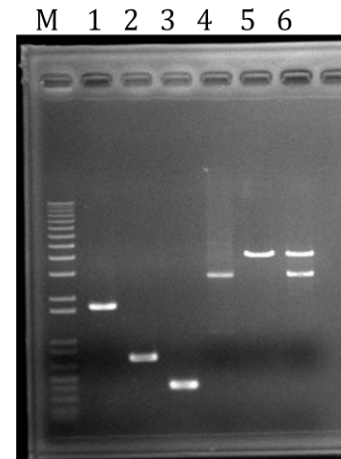
將建構完成的載體轉染進入 GB 細胞(A, B)與 GK 細胞(C, D)內表現蛋白，轉染後 24 小時，利用 SDS-PAGE 分離細胞總蛋白，並以 Coomassie blue 染色(A, C)和 Western blot (B, D)分析蛋白表現量，蛋白質表現位置如箭頭所示。Lane 1 為細胞轉染 pcDNA3CF 載體，Lane 2 為細胞轉染 pcDNA3CF-108L，蛋白分子量為 42.9 kDa，Lane 3 為細胞轉染 pcDNA3CF-Mx type II (點帶石斑魚抗病毒蛋白 Mx type II 蛋白)，蛋白分子量為 69.7 kDa，Lane 4 為細胞轉染 pcDNA3CF-Mx type III(點帶石斑魚抗病毒蛋白 Mx type III 蛋白)，分子量為 71.7 kDa。Western blot 使用的一級抗體為 monoclonal anti-flag M2 antibody (1 : 3000)，二級抗體為 polyclonal goat anti-mouse immunoglobins / AP (1 : 3000)。M : Prestained protein ladder。



A



B



圖十六、 p108KO 載體之建構

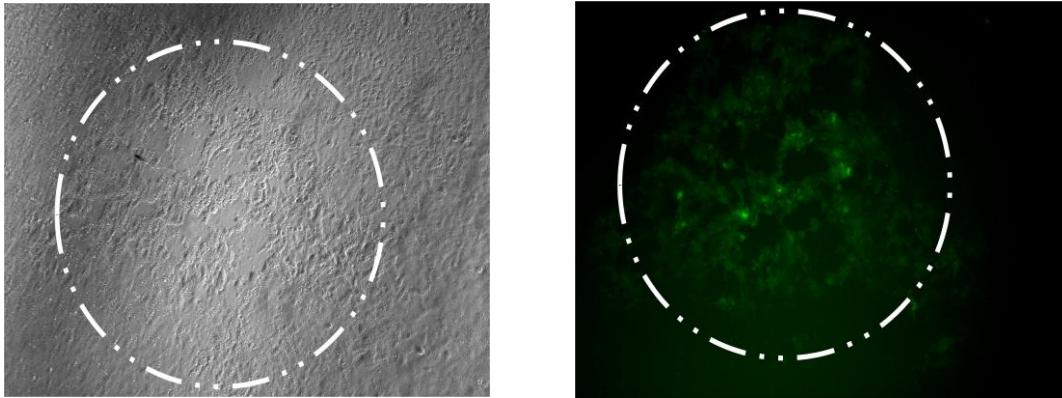
基因剔除使用的載體為 pDsRed2.1 (A), p108KO 載體建構檢測 DNA 電泳圖(B), Lane 1: 108L 基因下游片段(1,739 bp), Lane 2: EGFP 基因(720 bp), Lane 3: 108L 基因上游片段(384 bp), Lane 4: 108L 基因下游片段、EGFP 基因與 108L 基因上游片段分別以 *Bsa*I 限制酶處理後,再以 T4 接合酶接合形成的片段(2,843 bp), Lane 5: pDsRed2.1 以 *Sac* I 和 *Eco*RI 限制酶處理後,經 DNA 電泳分析的結果, pDsRed2.1 的長度為 4.1 kb, Lane 6: p108KO 載體以 *Sac* I 和 *Eco*RI 限制酶處理後,跑 DNA 電泳後的結果。M: 1 Kb plus DNA ladder。

圖十七、 108KO 重組病毒之產生

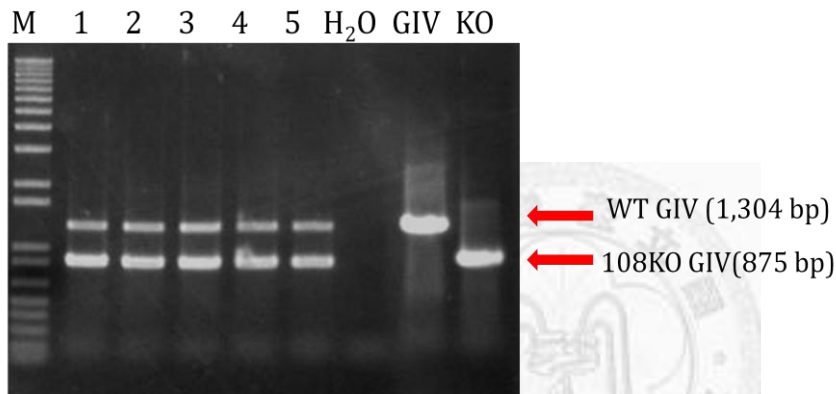
將建構完成的 p108KO 載體先轉染進入 GK 細胞，隔日以不同 m.o.i 的野生型石斑魚虹彩病毒感染細胞，感染後觀察 2 ~ 5 天，若 108KO 重組病毒產生則可於螢光顯微鏡下觀察到發綠色螢光的細胞。生產重組病毒示意圖(A)，於顯微鏡下觀察以 m.o.i=0.05 病毒感染之細胞(B)，左圖為明視野，右圖為螢光視野，同時利用 PCR 偵測病毒 DNA，從 DNA 電泳圖(C)可發現病毒液中具有野生型病毒 (WT GIV ; 1,304 bp) 以及重組型病毒(108KO GIV ; 875 bp)，重組型病毒：野生型病毒= 1：12。
M：1 Kb plus DNA ladder。



A

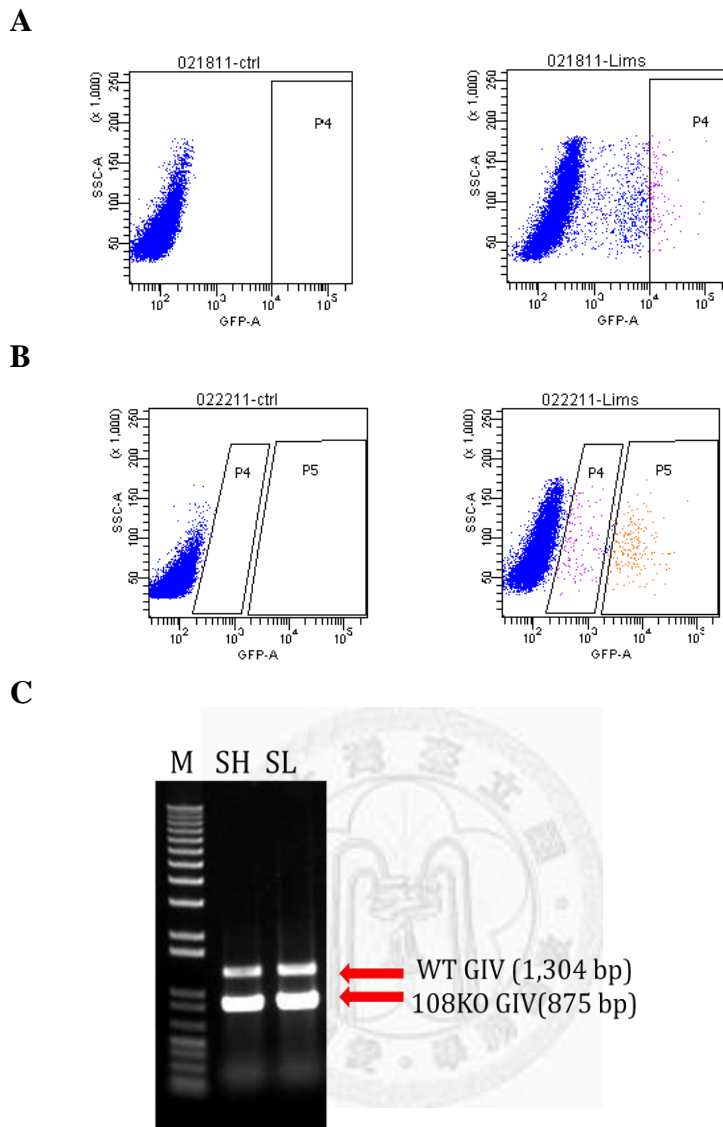


B



圖十八、病毒斑試驗之 108KO 重組病毒純化

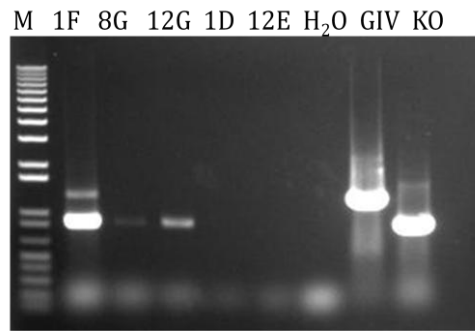
將第一次獲得的重組病毒液進行病毒斑試驗(Plaque assay)，並挑選單一且發光的病毒持續感染，進行三次病毒斑試驗。第三次病毒斑試驗於螢光顯微鏡(10 倍物鏡)下觀察到的單一病毒斑(A)，右圖為明視野，左圖為螢光視野。同時利用 PCR 檢測單一病毒斑的野生型與 108KO 重組病毒的比例(B)，若為重組病毒偵測到的片段大小為 875 bp，野生型病毒則為 1,304 bp。Lane 1 ~ 5 分別為第三次病毒斑試驗挑選出的 5 個發綠色螢光的病毒斑。M: 1Kb plus DNA ladder, H₂O: negative control, GIV: grouper iridovirus genomic DNA; KO: p108KO plasmid。



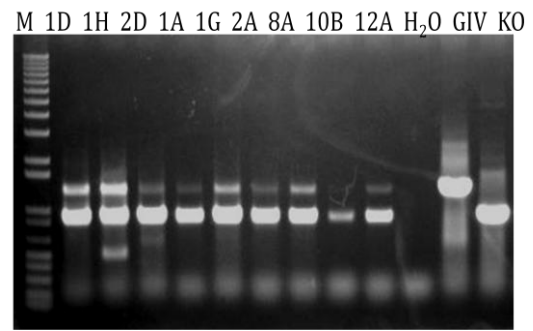
圖十九、流式細胞儀篩選之 108KO 重組病毒純化

以第三次病毒斑試驗獲得之病毒液，感染 GK 細胞 3 天後以流式細胞儀篩選發綠色螢光的細胞。流式細胞儀分析圖，左圖為控制組：未感染病毒之 GK 細胞，右圖為實驗組：感染重組病毒之細胞。第一次篩選(A)，P4：第一次細胞的收集範圍；第二次篩選(B)，P4：細胞綠色螢光較弱的收集範圍，P5：細胞綠色螢光較強的收集範圍。PCR 檢測第二次篩選後綠色螢光較弱(SL：sorting low light；(WT：108KO=1：2.6)與綠色螢光較強(SH：sorting high light；(WT：108KO=1：4.5)的細胞內野生型與重組型病毒之比例。M：1Kb plus DNA ladder。

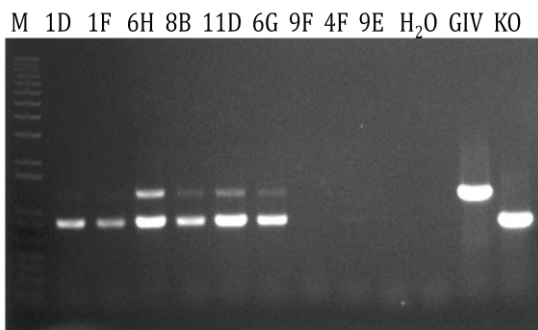
A



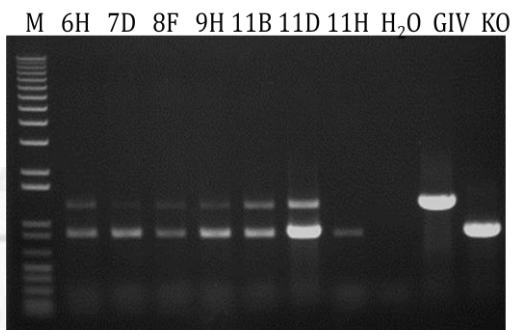
B



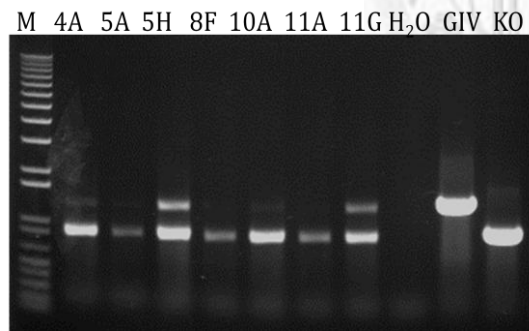
C



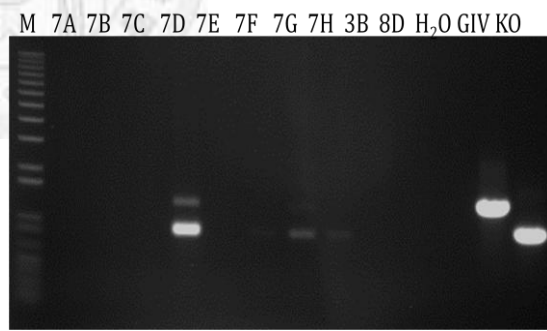
D



E

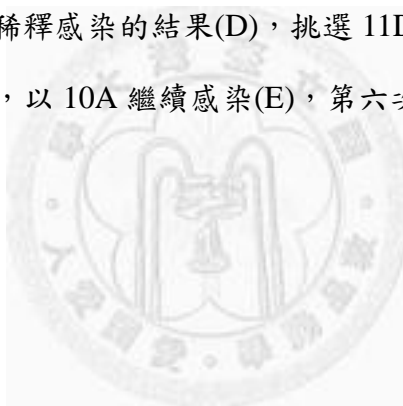


F

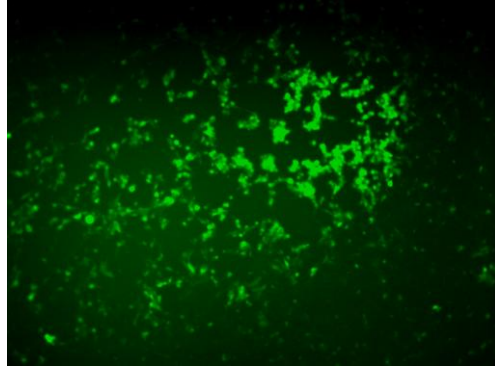
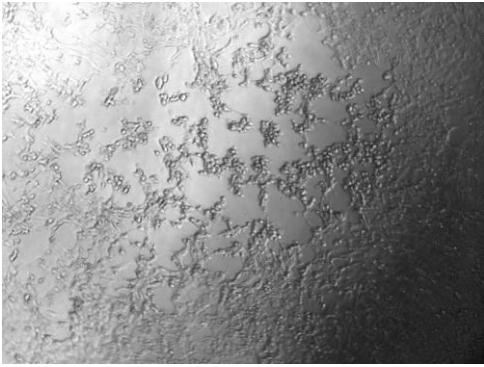


圖二十、 序列稀釋感染之 108KO 重組病毒純化

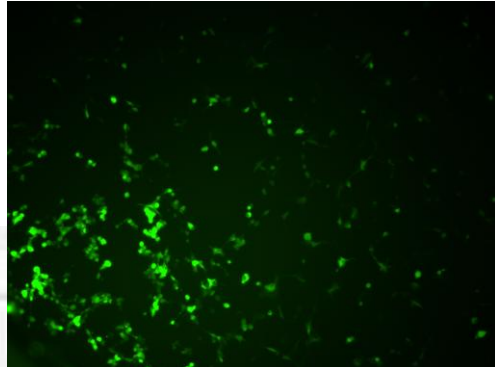
利用 IE108L-8 與 IE108L-9 引子檢測每一次 GIV(108KO 重組病毒與野生型)感染 GK 細胞後兩者的比例，若為重組病毒偵測到的片段大小為 875 bp，野生型病毒則為 1,304 bp，最後挑選每一次純化後 108KO 重組病毒比例最高的病毒液，繼續下一次的感染。M: 1Kb plus DNA ladder, H₂O: negative control, GIV: grouper iridovirus genomic DNA; KO: p108KO plasmid。將第二次流式細胞儀篩選之綠色螢光較強的細胞打破後，細胞上清液進行序列稀釋感染 GK 細胞。進行第一次序列稀釋感染的結果(A)，挑選 1F 進行第二次感染，第二次進行序列稀釋感染的結果(B)，挑選 1A 進行下一次感染，第三次進行序列稀釋感染的結果(C)，挑選 11D 進行下一次感染，第四次進行序列稀釋感染的結果(D)，挑選 11D 進行下一次感染，第五次進行序列稀釋感染的結果，以 10A 繼續感染(E)，第六次進行序列稀釋感染的結果(F)。



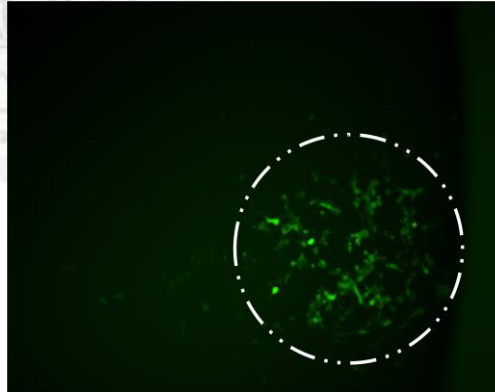
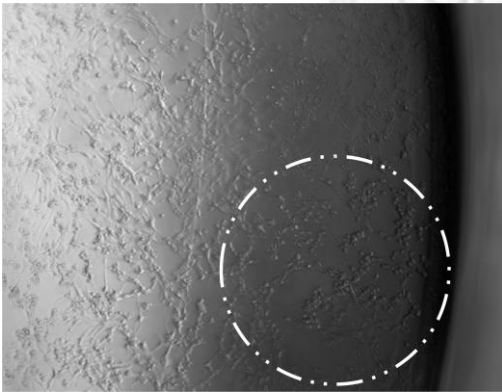
A



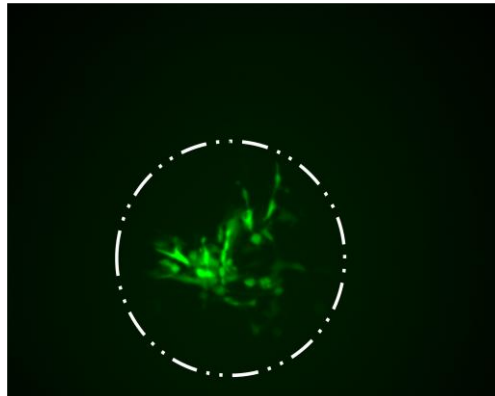
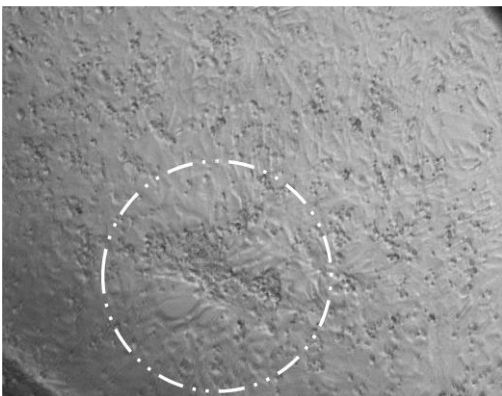
B



C



D

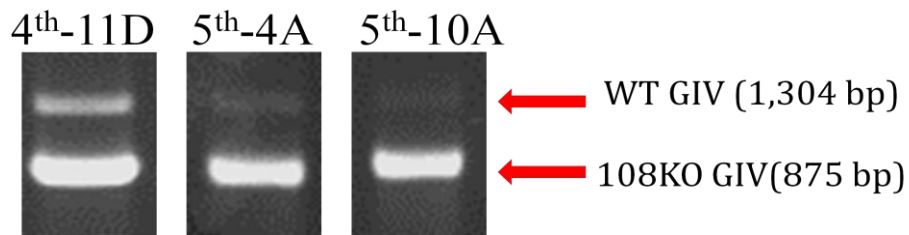


圖二十一、 108KO 重組病毒純化過程之表現型(phenotype)變化

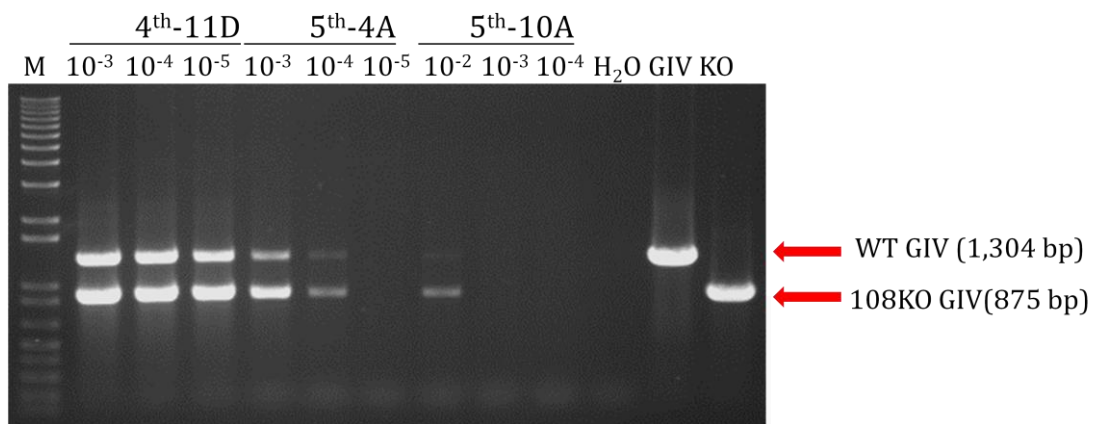
108KO 重組病毒感染細胞時，於螢光顯微鏡(10 倍物鏡)下觀察有無病毒斑產生，並同時觀察病毒斑是否發出綠色螢光，左圖為明視野，右圖為螢光視野。第一次序列稀釋的 1F (A)，第三次序列稀釋的 11D (B)，第四次序列稀釋的 7D (C)與第五次序列稀釋的 10A (D)。



A



B



圖二十二、 PCR 檢測野生型與重組型病毒之比例變化與病毒效價分析

以三種不同純度的重組病毒液(A)進行增殖放大，5th-10A (WT : 108KO=1 : 500) 純度高於 5th-4A (WT : 108KO=1 : 50) ，5th-4A 純度高於 4th-11D (WT : 108KO=1 : 10) ，三管重組病毒液分別進行十倍序列稀釋並感染 GK 細胞，感染 10 天後，觀察病毒效價並以 PCR 檢測野生型與重組型病毒之比例(B)。重組病毒偵測到的片段大小為 875 bp，野生型病毒則為 1,304 bp，M: 1Kb plus DNA ladder，H₂O : negative control，GIV : grouper iridovirus genomic DNA；KO : p108KO plasmid。

表一、實驗使用之引子序列

目的	代號	序列
建構 108KO 載體	IE108L- <i>Sac</i> I-1	5'- <u>CGAGCTC</u> GCAATTTGCTACGATGACCCACC-3'
	IE108L- <i>Bsa</i> I-2	5'-TTTGGTCTCT GTAAGCTGAAGAAAACCCAAAAAAG-3'
	IE108L- <i>Bsa</i> I-3	5'-TTT <u>GGTCTCT</u> TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'
	IE108L- <i>Bsa</i> I-4	5'-TTTGGTCTCT AAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
	IE108L- <i>Bsa</i> I-5	5'-TTT <u>GGTCTCT</u> TTTTTAAGTCTTCCACAAGGGC-3'
	IE108L- <i>Eco</i> RI-6	5'-GAATTC CCAAATTACGCCTTACCAGACGTG-3'
重組病毒檢測	IE108L-8	5'-CTTTCATGCTAAATAGCGTTTCATGC-3'
	IE108L-9	5'-ATCGTGTAATAAACTTGATTAGCGAG-3'
重組蛋白表現	108L-CBP- <i>Eco</i> RI-F1	5'- <u>AATTC</u> ATGGCTTTCGTCACAGACAAGCG-3'
	108L-CBP- <i>Xho</i> I-R2	5'- <u>G</u> CTCTTCTTCGTCGGGAAACTCCAAC-3'
	108L-CBP- <i>Eco</i> RI-F3	5'- <u>C</u> ATGGCTTTCGTCACAGACAAGCGAGA-3'
	108L-CBP- <i>Xho</i> I-R4	5'- <u>TCGAG</u> CTCTTCTTCGTCGGGAAACTCC-3'
	108L-pEGFP- <i>Xho</i> I -F	5'- GAT <u>CTCGAG</u> ATGGCTTTCGTCACAGAC-3'
	108L-pEGFP- <i>Bam</i> HI -R	5'-CGGGATCCGC CTCTTCTTCGTCGGGAAAC-3'
	108L-pcDNA - <i>Kpn</i> I-F	5'- GGG <u>TACC</u> ATGGCTTTCGTCACAGAC-3'
	108L-pcDNA- <i>Xho</i> I -R	5'-CCG <u>CTCGAG</u> CTCTTCTTCGTCGGGAAA-3'

表二、 15 種已知序列之虹彩病毒 ICP46 資料統整

Virus	Ab.	Genus	ICP46 length			Accession no.
			n.t.	a.a.	MW	
Grouper iridovirus	GIV	<i>Ranavirus</i>	1149	382	44.1	AAV91117
Singapore grouper iridovirus	SGIV	<i>Ranavirus</i>	1149	382	44.1	AAS18177
Epizootic haematopoietic necrosis virus	EHNV	<i>Ranavirus</i>	1188	395	45.6	ACO25203
Ambystoma tigrinum virus	ATV	<i>Ranavirus</i>	1188	395	45.6	AAP33190
Soft-shelled turtle iridovirus	STIV	<i>Ranavirus</i>	1188	395	45.6	ACF42315
Frog virus 3	FV3	<i>Ranavirus</i>	1188	395	45.6	AAT09751
Tiger frog virus	TFV	<i>Ranavirus</i>	1188	395	45.6	AAL77815
Lymphocystis disease virus China	LCDV-C	<i>Lymphocystivirus</i>	1170	389	46	AAU11006
Lymphocystis disease virus 1	LCDV-1	<i>Lymphocystivirus</i>	1125	374	43.5	NP 078648
Invertebrate iridescent virus 3	IIV-3	<i>Chloriridovirus</i>	1332	443	51.7	ABF82069
Invertebrate iridescent virus 6	IIV-6	<i>Iridovirus</i>	1365	454	52.8	AAK82253
Infectious spleen and kidney necrosis virus	ISKNV	<i>Megalocytivirus</i>	1101	336	38.3	AAL98839
Red sea bream iridovirus	RSIV	<i>Megalocytivirus</i>	1101	336	38.2	BAK14292
Orange-spotted grouper iridovirus	OSGIV	<i>Megalocytivirus</i>	1101	336	38.2	AAX82421
Turbot reddish body iridovirus	TRIV	<i>Megalocytivirus</i>	1101	336	38.2	ADE34450