

國立臺灣大學生命科學院動物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Zoology  
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

蝦白點病毒極早期表現蛋白WSSV IE1 在白蝦原酚氧化酶活化系統上的角色探索

The Role of WSSV IE1 in Prophenoloxidase Activating  
System in *Penaeus vannamei*

袁芳煜

Fang-yu Yuan

指導教授：郭光雄 博士

羅竹芳 博士

Advisor: Guang-Hsiung Kou, Ph.D.

Chu-Fang Lo, Ph.D.

中華民國102 年8 月

August 2013


## 致謝

本篇論文完成首先要感謝郭光雄老師和羅竹芳老師兩年來的指導，兩位老師在這兩年給予的幫助和細心指導，讓學生感激不已，老師們總是能在我實驗和人生遇到困難的時候給我適當的建議和鼓勵，萬分感謝。謝謝張震東老師和李博士百忙中抽空給予學生實驗上的建議和解惑。

在 818 實驗室的這兩年，首先要感謝各位學長姐和學弟妹們的幫忙，謝謝小康學姐在實驗和論文撰寫上的建議，辛苦妳了。宛菁學姐也要謝謝妳百忙中抽空幫我修改論文，育萱學姐和欣蕙學姐也很謝謝你們兩年來的支持和鼓勵，不管我在實驗上或人生上遇到什麼困難，找你們就對啦，你們總是很有耐心的聽我說完給我意見，另外，贊吉學長也要感謝你兩年來的支持以及不間斷的笑聲陪伴，如果沒有你在最後的關頭支持我，我想我也很難渡過這難關，同時也要感謝實驗室的其他成員怡婷學姐、同同學長、學妹們、Pum、Pray、冠樑等人的支持，也要感謝阿貓學長在實驗上的指導，辛苦你了。此外，更要感謝阿雄學長提供純化後的病毒顆粒。

最後要感謝許多朋友的鼓勵和陪伴冠甫、佳明、奕睿、芳芸、Betty、郁慧、Duke、Micheal、Rxe、Paul 你們給予的幫助和陪伴真的很重要，感謝兩年來經歷的大小事能有你們的支持與鼓勵，還要感謝爸媽、哥哥兩年來的支持與鼓勵，讓我可以順利完成學業。

## 中文摘要



本論文在探討白點症病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 極早期表現蛋白 WSSV IE1 於白蝦原酚氧化酶活化系統 (prophenoloxidase activating system) 所扮演之角色。以蛋白質層析儀進行 WSSV IE1 純化，發現含有 10% glycerol 的緩衝液 A 能穩定 WSSV IE1 重組蛋白。首先進行遠端西方墨點法分析，發現 IE1 能與白蝦之原酚氧化酶活化系統的上游蛋白相互作用，包括轉谷氨酰胺酶 (transglutaminase)、原酚氧化酶 (prophenoloxidase) 及血藍素 (hemocyanin)。於注射白點症病毒顆粒後分析白蝦酚氧化酶的活性變化，發現白蝦在注射白點症病毒顆粒 4 小時後，白蝦酚氧化酶的活性能被激活，但於注射後 8-12 小時其活性則急速降低。依據白蝦酚氧化酶活性分析結果，發現 WSSV IE1 能抑制酚氧化酶的活性，然負控制組 WSSV364 則未能抑制酚氧化酶活性。實驗結果證明 WSSV IE1 會抑制白蝦酚氧化酶活性，使得經 LPS 活化劑處理後的白蝦酚氧化酶活性與控制組無顯著差異。推測 IE1 可能具有抑制原酚氧化酶活化途徑的功能，關於其作用機制猶待進一步之實驗分析以確認之。

關鍵字：白點病毒極早期表現蛋白、遠端西方墨點法、原酚氧化酶活化系統、原酚氧化酶、血藍素

## ABSTRACT



In the thesis, we explored the role of white spot syndrome virus (WSSV) immediate early gene (IE1) in prophenoloxidase activating system. The SDS-PAGE results revealed that 10% glycerol Buffer A could stabilize WSSV IE1 purification. After far-western blotting analysis, it revealed that WSSV IE1 could interact with transglutaminase, prophenoloxidase and hemocyanin. We validated temporal phenoloxidase activity in *Penaeus vannamei* after WSSV viral particle injection, and it indicated that phenoloxidase activity in *Penaeus vannamei* could be upregulated in 4 hours and downregulated in 8-12 hpi. According to the phenoloxidase activity assay, it revealed that WSSV IE1 could suppress phenoloxidase activity in *Penaeus vannamei*; WSSV364 was used as negative control in this phenoloxidase activity assay. According to the phenoloxidase activity in *Penaeus vannamei* with WSSV IE1 pretreatment, it could be concluded that IE1 inhibited prophenoloxidase activating pathway. It suggested that IE1 could have suppressive function in prophenoloxidase activating pathway.

**Key Words** : WSSV IE1 、 Far-western blot 、 prophenoloxidase activating system 、 prophenoloxidase 、 hemocyanin



目錄	
口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	i ii
英文摘要.....	iv
前言.....	1
材料方法.....	9
1. 實驗動物.....	9
2. 白點症病毒顆粒純化.....	9
3. 白點症病毒液製備及人工注射感染實驗.....	10
4. 血球細胞蛋白之萃取.....	10
5. 大腸桿菌轉型作用.....	11
6. 重組蛋白表現與純化.....	11
7. 西方墨點法.....	12
8. 遠端西方墨點法.....	13
9. 膠體內水解.....	14
10. 酚氧化酶活性檢測.....	14
結果.....	16
1. 含有 10% Glycerol 之緩衝液 A 穩定純化 IE1.....	16
2. Thrombin 與 GST- IE1 低溫 4°C 反應.....	16

3. 純化重組蛋白 IE1.....	17
4. 西方墨點法分析純化之重組蛋白 IE1.....	17
5. 遠端西方墨點法.....	17
6. 病毒顆粒對酚氧化酶的活性影響.....	18
7. <i>in vivo</i> 酚氧化酶活性於注射病毒顆粒後時序變化.....	18
8. <i>in vivo</i> 酚氧化酶活性於注射病毒液後時序變化.....	19
9. WSSV364 與 WSSV IE1 重組蛋白純化.....	20
10. IE1 對酚氧化酶活性影響.....	20
11. IE1 對原酚氧化酶活化前後活性之影響.....	21
討論.....	23
結論.....	28
未來研究方向.....	29
參考文獻.....	30
附錄及圖表.....	41



## 前言



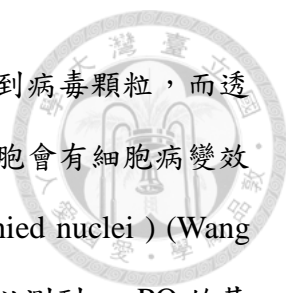
## 白點症病毒

1968年人工養殖蝦類技術的建立，使台灣在1980年間在世界的水產養殖蝦上佔有重要的地位 (Liao *et al.*, 1969)。1987年草蝦的養殖產量達到高峰，但隔年台灣的草蝦養殖產量則減至1987年的1/3 (Liao, 1992)。重創蝦類水產養殖的原因可以大致區分成兩類：非生物性因子和生物性因子。非生物性因子方面如：水質、含氧量、溫度等，皆會影響蝦類養殖情況，例如：因為養殖於高溫32°C的環境下相較於一般25°C環境下的白蝦存活率高，32°C的白蝦存活率可以達到80%以上，與一般未感染白點症病毒的白蝦差異不大 (Oscar *et al.*, 2001)，非生物因素在蝦類水產養殖上扮演一重要角色。在生物性因子方面，蝦類在養殖的過程中，會因環境的好壞機緣性的感染病毒、細菌、真菌、原生生物等致病因子，影響蝦類水產養殖的過程 (Liao, 1992)，其中病毒的感染尚未有有效的抗體或藥能輔以治療。感染蝦類的病毒約有20餘種，其中以黃頭病毒 (Yellow head virus) (Nadala *et al.*, 1997)、傳染性表皮與造血組織壞死症病毒 (IHHNV) (Lightner *et al.*, 1992)、套拉症病毒 (Taura syndrome virus) (Hasson *et al.*, 1995)和白點症病毒 (White spot syndrome virus) (Chou *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996) 的感染狀況最為嚴重 (Flegel, 1997)。感染白點症病毒的對蝦類生物身體外觀上會出現明顯白點的病徵，在感染後3-5天死亡率會到達100% (Lo and Kou, 1998; Chou *et al.*, 1995)。白點症病毒之感染力極高曾對蝦類養殖造成嚴重威脅，至今仍缺乏有效預防和治療之方法 (Lotz *et al.*, 1995)。白點症病毒於1992年福建省漳浦地區之養蝦場爆發蔓延開來，使台灣、泰國、中國大陸、印度、日本及美國等養蝦業產量驟減並對全世界之養蝦業造成經濟衝擊及損失 (Inouye *et al.*, 1994; Inouye *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Flegel,

1997; Karunasagar *et al.*, 1997, 1998; Lo & Kou, 1998; Loh *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Magbanua *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Sangamaheswaran and Jeyaseelan, 2001; Soto and Lotz, 2001)。

白點症病毒依據其基因體特性及序列比對結果，顯示與任何已知病毒之親緣關係甚遠，國際病毒分類學會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 於 2004 年設立新病毒科 *Nimaviridae*，其下設立新病毒屬 *Whispovirus*，白點症病毒為代表種 (type species) (Tai *et al.*, 2000a; Tsai *et al.*, 2000b; Liu *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2002b; Marks *et al.*, 2003)。白點症病毒為具有套膜之環狀雙股 DNA 病毒 (dsDNA virus)，基因體大小約為 300kb，外觀呈現橢圓狀或桿狀，規則對稱，長約 250-380 nm，寬約 80-120 nm，白點症病毒在其尾端有一明顯的尾狀突出物 (tail-like extension) 特徵 (Wang *et al.*, 1995; Stephanie *et al.*, 1997)，白點症病毒的傳播途徑可分為垂直傳染和平行傳染 (Lo and Kou, 1998)，而平行傳染的方式為蝦類間的相互殘食或經由水體媒介的傳染等。先前研究由蘇木紫伊紅染色法 (Hematoxylin-Eosin staining, H&E) 染色，TEM，原位雜合 (In situ hybridization)，聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 等檢測法的結果確認 (Lo *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1999; Chou *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996)，白點症病毒的感染宿主主要為對蝦類：草蝦、斑節蝦、藍蝦、白蝦、螃蟹類、卷折饅頭蟹、銹斑蟊、紅樹林蟹、龍蝦類：錦繡龍蝦、其他饒足類等甲殼類生物 (Flegel, 1997)。感染白點症病毒後的蝦子，可以在外胚層或中胚層的組織發現病毒顆粒，或在皮下細胞和皮下結締組織等，白點症病毒的組織趨性 (tissue tropism) 有觸角腺 (antennal gland)，造血器官 (haematopoietic organ)，泳足 (pleopods)，鰓 (gill)，血淋巴液 (hemolymph)，血球細胞 (hemocyte)，胃 (stomach)，腹部肌肉 (abdominal muscle) 等全身器官 (Chang *et al.*, 1996)，而感染白點症病毒的蝦血球細胞經由穿透式電子顯微鏡觀察，發現僅在顆粒球 (granular hemocyte)





和半顆球 (semi-granular hemocyte) 的細胞核和細胞質可以觀察到病毒顆粒，而透明球 (Hyaline) 則未有白點症病毒顆粒，在感染白點症病毒的細胞會有細胞病變效應 (Cytopathic effect, CPE) 如：細胞核肥大之細胞 (Hypertrophied nuclei) (Wang *et al.*, 2000)。此外，先前的研究也發現在不同的白蝦器官皆可以測到 proPO 的基因表現量，但以白蝦血球細胞的 proPO 基因表現量較高 (Yeh *et al.*, 2009a)。

### 極早期表現基因

在多數 DNA 病毒感染後的基因表現時序可以分成極早期表現基因，早期表現基因及晚期表現基因 (Blissard, 1996; Blissard and Rohrmann, 1990; Friesen and Miller, 1986; Honess and Roizman, 1974)，而極早期表現基因的基因表現需要依靠宿主的細胞相關機制與病毒蛋白的合成進行基因表現 (Friesen, P.D., 1986)。先前的研究發現感染白點症病毒的白蝦，於蛋白合成抑制劑 (cycloheximide, CHX) 處理後，並利用微陣列 (microarray) 分析發現白點症病毒的極早期表現基因約有 60 幾種，而 ORF126、ORF242、ORF418 由 RT-PCR 的確認分別為極早期表現基因 *ie1*, *ie2*, *ie3* (Liu *et al.*, 2005)。Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) 為脊椎和無脊椎動物一重要抗病毒反應，而白點症病毒則能利用 STAT 增加其極早期表現基因 *ie1* 基因的表現量 (Liu *et al.*, 2007)。此外，也發現白點症病毒的極早期表現基因 *ie1* 為轉錄因子 (transcriptional factor)，具有 transactivating domain、dimerization domain 及 DNA-binding 的活性 (Liu *et al.*, 2008)。接續研究也發現與白點症病毒極早期表現蛋白 WSSV IE1 能與草蝦 TATA box-binding protein (PmTBP) 蛋白交互作用，而 PmTBP 能增強白點症病毒極早期表現基因 IE1 的 transactivation 活性與病毒基因表現 (Liu *et al.*, 2011)。近來研究更發現，白點症病毒極早期表現基因 IE1 草蝦的硫氧還蛋白 (thioredoxin) 具有交互

作用，並且在與 thioredoxin 的結合下能恢復氧化態的 WSSV IE1 之 DNA 結合活性 (Huang *et al.*, 2012)。



### 甲殼類生物的免疫機制

甲殼類生物 (crustacean) 抵禦微生物入侵的方式，除了具有堅硬外殼的物理和化學屏障能抵擋寄生蟲外，其先天性免疫防禦系統也能抵抗機原性 (opportunistic) 或致病性 (pathogenic) 微生物由傷口或於脫殼時的入侵 (Soderhall and Cerenius, 1998)，甲殼類生物與其它動物相同，其免疫力主要也是依據血球細胞 (hemocyte) 的活性進行抵抗，而血球在免疫反應中極為重要且具有吞噬 (phagocytosis)，包膜 (encapsulation)，細胞毒性 (cytotoxicity) 的調節作用及原酚氧化活化系統 (prophenoloxidase activating system) 等功能 (Soderhall and Cerenius, 1992; Johansson and Soderhall, 1989)。此外，甲殼類生物有迅速的血液凝集反應 (clotting reaction) 抵抗微生物的入侵 (Nagai *et al.*, 2000)。依據血球的型態和生物功能可以分為透明球 (Hyaline)、半顆粒球 (semigranular)、顆粒球 (granular) (Martin and Graves, 1985; Soderhall and Smith, 1983; Sun, 2010)：透明球主要具有吞噬微生物的能力；半顆粒球則具有包覆、細胞毒性及原酚氧化活化系統等 (Soderhall *et al.*, 1986)；顆粒球有細胞毒性、原酚氧化活化系統和微弱的包膜能力 (Hose and Martin, 1989)。利用 TEM 觀察血球在與革蘭性陰性菌反應後的吞噬能力，發現半顆粒球具有微弱吞噬能力，而型態上的差異發現顆粒性和半顆粒血球有顆粒散佈於血球細胞內然透明球則未有顆粒散佈 (Martin and Graves, 1985; Hose and Martin, 1989; Soderhall *et al.*, 1986)。大部分的蝦類血球中含有 5 – 10% 的透明血球，95 -85% 的顆粒球，但非所有的蝦類都有透明球。吞噬作用是一種常見的細胞型免疫策略 (Martin and Graves, 1985)，對於已突破外殼物理屏障入侵的微生物能進行第一道的



防護，例如：入侵蝦類後的真菌會釋放出 $\beta$ -1,3-glucan 活化原酚氧化系統及誘發吞噬作用效率 (Soderhall *et al.*, 1986; Johansson and Soderhall, 1989)。在包膜作用方面，當入侵的微生物太大難以被吞噬時，半顆粒球會產生細胞與細胞間的溝通並協助地將微生物包膜，例如：革蘭式陰性菌之脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) 與真菌的 $\beta$ -1,3-glucan 會刺激半顆粒球將病原菌包膜 (Fagutao *et al.*, 2009; Soderhall *et al.*, 1990; Soderhall and Cerenius, 1998)，在先前的研究也發現蝦類具有一種多功能的 76 kD 蛋白能夠具有調節素 (opsonin) 的功能，能協助包膜作用進行並會參與原酚氧化酶系統的活化反應 (Soderhall *et al.*, 1990; Manickam and Nellaiappan, 1991; Johansson and Soderhall, 1989)。另外，在細胞毒性研究，先前的研究也發現歐洲淡水龍蝦及澳洲淡水龍蝦的血球細胞皆能毒殺腫瘤細胞株和非腫瘤的細胞株 (Tyson and Jenkin, 1974)。

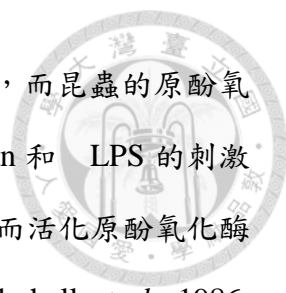
### 原酚氧化酶系統

昆蟲和甲殼類動物體內有原酚氧化活化系統，是一種鈣離子依賴型 (calcium dependent) 的非專一型免疫防禦系統 (Nappi and Vass, 1993; Hoffmann, 2003; Sung *et al.*, 1998; Sugumaran, 2002; Smith and Soderhall, 1991; Washington and Dankert, 1997)。其中原酚氧化酶會先以一種 proenzyme 的形式存在，再因受入侵微生物的釋放物刺激而活化原酚氧化酶成酚氧化酶 (phenoloxidase) 進行黑化反應 (melanization) (如附圖一) (Nappi and Vass, 1993; Soderhall *et al.*, 1990; Soderhall and Cerenius, 1998; Johansson and Soderhall, 1989)。先前的研究指出酚氧化酶反應所需的受質有：L-DOPA、Methylcatechol、Catechol、Tyrosine、Tyramine、Phenol、Hydroquinone、Resorcinol 等 (Aspan *et al.*, 1995; Teresa *et al.*, 1999)。此外，酚氧化酶也能經由生物或非生物的多醣分子、脂肪酸、磷酸脂和陰離子、



陽離子等介面活化劑刺激反應速率。目前已知的酚氧化酶活化劑 (activator) 有多糖分子： $\beta$ -1,3-glucan、LPS、Zymosan (Sung *et al.*, 1998; Manickam and Nelliappan, 1991; Washinton and Dankert, 1997)；脂肪酸類的活化劑：Linoleate、Oleate、Linolenate、Palmitate、Stearate、Laurate、Myristate 等 (Kaliappan and Sugumaran, 1996; Nelliappan, 1992)；磷酸脂類的活化劑：Lysolecithin、Phosphatidyl choline、Phosphatidyl glycerol、sphingomyelin、phosphatidyl ethanolamine、phosphatidyl serine 等；陰離子介面劑：SDS；陽離子介面劑：Cetylpyridinium chloride 等(Nelliappan and Sugumaran, 1996; Manickam and Nelliappan, 1991)。血球細胞中會因微生物的入侵後由胞吐 (exocytosis) 的方式將原酚氧化酶釋放至血漿中，先前的研究多在血球組織進行酚氧化酶的活性測試，血漿因含有大量的抑制劑：serpin、 $\alpha$ -2 macroglobin 等則無法測到酚氧化酶的活性 (Nelliappan, 1992)，另外，酚氧化酶已知的抑制劑有 EGTA、Phenylthiourea、Sodium azide、EDTA、Thiourea、Diethyl thiocarbamate 等 (Aspan *et al.*, 1995; Teresa *et al.*, 1999)。因為酚氧化酶是一種鈣離子依賴型的反應，因此不同濃度下的鈣離子甚至是鎂離子皆為活化酚氧化酶的影響因素 (Sung *et al.*, 1998)。


先前的研究發現  $\beta$ -1,3-glucan 結合蛋白 ( $\beta$ -1,3-glucan binding protein) 與原酚氧化酶系統有關 (Soderhall and Cerenius, 1998)。由昆蟲體內純化之原酚氧化酶的分子量大小約為 80 kD 左右，龍蝦或甲殼類之原酚氧化酶分子量大小約為 76 kD 左右，經由生物體內的絲氨酸蛋白酶 (serine protease) 或商業化蛋白酶切割後分別能產生 62 kD 和 60 kD 的酚氧化酶及 5 kD 胜肽片段。目前對於真菌細胞壁上的  $\beta$ -1,3-glucan 和革蘭氏陰性菌的 LPS 在原酚氧化酶系統上的活化途徑仍未知 (Aspan *et al.*, 1995; Soderhall and Cerenius, 1998)。



甲殼類生物的原酚氧化系統主要存在於顆粒及半顆粒球中，而昆蟲的原酚氧化系統存在位置仍未知，先前的研究發現血球能經由 $\beta$ -1,3-glucan 和 LPS 的刺激後胞吐血球的原酚氧化酶及相關蛋白 76 kD protein 至血漿中進而活化原酚氧化酶及其酵素的活性 (Soderhall *et al.*, 1990; Kallaya *et al.*, 1999; Soderhall *et al.*, 1986; Manickam and Nellaiappan, 1991)，而活化態的酚氧化酶是一種氧化還原酵素能氧化酚類化合物成為醌 (quinone) 再聚合成黑色素 (melanin)；黑色素的生合成需要經由兩個步驟，先水解 monophenols 成 o-diphenols，再氧化形成 o-quinones (Aspan and Soderhall, 1991; Soderhall *et al.*, 1990; Nellaiappan and Sugumaran, 1996)。此外，黑色素的形成也與電子傳遞和氧化還原的反應有關，反應過程中會產生一些潛在細胞毒性的間質如：semiquinones 和 trihydroxyphenols，則 semiquinones 具有親核的特性（如附錄一），並會依據醌的細胞毒殺特性與外來微生物細胞表面物質結合產生氧化反應，因此入侵的微生物會因為與這些反應間質的結合而帶有黑色素且被還原態氧消滅 (Nappi and Vass, 1993)。

#### 原酚氧化酶系統與病毒的抗衡機制

目前對於甲殼類動物和昆蟲的免疫系統與微生物之間的抗衡探索，在細菌、真菌與酚氧化酶系統如何引起免疫反應有較多的了解，但在病毒如何活化或抑制原酚氧化酶活化系統的作用機制尚不清楚。在昆蟲方面，先前的研究指出在感染 *Microplitis demolitor* bracovirus (MdBV) 後，*M. demolitor* 會因為病毒早期釋放出的 Egf1.0 蛋白抑制酚氧化酶的活性而無法進行黑化機制 (Beck and Strand, 2007)。在甲殼類動物方面，感染白點症病毒後的龍蝦血細胞，能於半顆粒血球中發現許多的白點症病毒而顆粒球的白點症病毒較少，也由原位雜合觀察發現白點症病毒集中於細胞核 (Pikul *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002)且感染白點症病毒後的草蝦酚氧



化酶活性也會降低 (Ji *et al.*, 2011; Leu *et al.*, 2007; Suseela *et al.*, 2007)。除白點症病毒外，甲殼類生物也會因感染其他病毒或同時感染兩種病毒而影響其酚氧化酶的活性和其基因表現量。前人研究發現，白蝦在同時感染傳染性表皮與造血組織壞死症病毒與白點症病毒時，其酚氧化酶活性和基因表現量會比僅感染白點症病毒時高 (Yeh *et al.*, 2009b)。甲殼類動物在感染黃頭症病毒的時候也有相似的情況，利用微陣列分析感染後的基因表現量變化後發現，原酚氧化酶的基因表現量會隨著感染後的時序下降 (Siriporn *et al.*, 2008)。但白蝦在感染套拉病毒後，其免疫相關基因或原酚氧化酶基因的表現量卻是上升 (Song *et al.*, 2003)。因此，病毒在入侵宿主後，如何與宿主的免疫系統相互抗衡的關係仍需要更深入的探索。

## 研究方向

本論文主要在 WSSV IE1 與白蝦宿主感染初期的抗衡關係進行探索，選擇細胞型免疫的白蝦血球細胞進行相關研究，預期在研究抗衡關係的過程中，觀察白蝦感染白點症病毒後 0, 2, 4, 8, 12, 24 小時的酚氧化酶活性變化，並探索 WSSV IE1 在中病毒與宿主間的拮抗關係與可能的作用途徑。

## 材料與方法



### 1. 實驗動物

本實驗所選用之白蝦取自國立海洋大學水生生物實驗中心，將白蝦蓄養於連續曝氣且溶氧量充足的海水中。每日投餵兩次沉性粒狀飼料，並隨時監控水質。蝦體平均體重為  $15.20 \pm 2.13$  g (mean  $\pm$  S.E.)。

### 2. 白點症病毒顆粒純化

選取 2-3 隻 WSSV 人工感染五天左右之瀕死螯蝦，剝取頭胸甲並以鑷子去除肝胰腺，以自來水稍加沖洗乾淨，置於冰上燒杯中備用。以剪刀將蝦體剪碎後，加入 400-500 ml 預冷的 TESP (200 mM PMSF, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH8.5)，置於冰浴中以均質機 (Polytron, PT-MR 3000) 將之均質化，再於  $4^{\circ}\text{C}$   $3,500 \times g$  離心五分鐘，取一乾淨燒杯於杯口包上兩層紗布，以滴管吸取上清液加於其上，使其自行滴落，過濾後之尚清液，於  $4^{\circ}\text{C}$   $30,000 \times g$  離心 20-30 分鐘 (28SA, 15.1Krpm)。以滴管吸掉約 1/2 上清液，在沿管壁將覆蓋在底部的”蝦組織碎片”輕輕沖起，待整片組織脫離底部，即可直接倒掉溶液，加入 2-3 ml TESP 將沉澱物懸浮起來，移入 50 ml 離心瓶中，於  $4^{\circ}\text{C}$  8,000 rpm 離心五分鐘，將上清液燒入新管，並以  $4^{\circ}\text{C}$   $30,000 \times g$  離心 20-30 分鐘 (28SA, 15.1K rpm)，沿管壁將蝦體組織碎片輕輕沖起，並倒掉溶液。加入 1 ml TESP 懸浮沉澱物，並移至 1.5 ml 離心管，於  $4^{\circ}\text{C}$  3,000 rpm 離心三分鐘，並將上清液移至新管，重複離心至無沉澱物。於  $4^{\circ}\text{C}$  13,000 rpm 離心 20 分鐘，將病毒顆粒沉澱下來，加入 300-500  $\mu\text{l}$  TM (50 mM, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.5)，將病毒顆粒輕輕懸浮起來再移至新管中，於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存之。



### 3. 白點症病毒液製備及人工注射感染實驗

將保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 之1994年嚴重感染白點症病毒之病蝦體樣本取出，剝取其頭胸甲及表皮置於與冷之研鉢中，每客組織加入9 ml 0.9% 氯化鈉 (NaCl) 溶液研磨之，使其均質化，將此上清液以  $1000 \times g$  離心 10 分鐘，吸取其上清液，再以  $0.45 \mu\text{m}$  濾膜過濾，收取病毒液保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。取出病毒液以 0.9% 氯化鈉溶液稀釋十倍，以此病毒液以人工注射感染無帶原之草蝦，每 20g 注射約  $50 \mu\text{l}$  之稀釋病毒液，在第四及第五體節的肌肉部位注射之，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 5 倍稀釋後，分裝於離心管中，並置於 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存之，此血淋巴液及為日後人工感染之病毒液原液。

### 4. 血球細胞蛋白之萃取

將純化的病毒顆粒注射到白蝦第二及第三體節的肌肉部位，分別收取未注射及人工注射後不同時間點 (0, 2, 4, 8, 12, 24 hpi) 之白蝦血球細胞樣本，將生理緩衝液 (PBS) 以  $3\times \text{ddH}_2\text{O}$  稀釋之，置於冰上預冷，其後加入樣本中使其均質化，萃取血球細胞溶解液 (hemocyte lysate) 以蛋白質定量分析試劑 (Bio-Rad) 進行定量。





## 5.大腸桿菌轉型作用 (transformation)

將適量之重組質體 DNA 與勝任細胞混合均勻，置於冰上 30 分鐘，再以 42°C 熱處理 90 秒，立即置於冰上待其冷卻。加入 250µl LB 培養液，於 37°C 旋轉培養 40 分鐘後，取適量菌液均勻塗佈於含有特定抗生素的 LB 培養皿，於 37°C 培養 16 小時，再進行菌落之挑選。

## 6.重組蛋白表現與純化


大腸桿菌基因表現系統採用 pGEX-4T-1 之質體，其可利用 IPTG 誘導重組基因表現重組蛋白質；pGEX-4T-1 有多種限制酶切割與接合位置，方便外來 DNA 片段植入其中；重組蛋白在其 N 端可帶有 GST，利用 GST 與 GST beads 的結合能力，進行蛋白質層析儀 (Fast Protein Liquid Chromatography ,FPLC AKTAprime plus) 純化重組蛋白。針對 pGEX-4T-1-wssv126 之選殖，本研究設計一組引子對：

wssv126-F-EcoR1: 5'-CCCGAATTCGATGGCCTTTAATTTTGAAGA-3'

wssv126-R-Xho1 : 5'-GGGCTCGAGTTACAAAGAATCCAGAAATC-3'

wssv126-F-EcoR1 外掛 EcoR1 限制酶切割位，wssv126-R-Xho1 外掛 Xho1 限制酶切割位。利用此引子對進行 PCR，PCR 反應溫度和時間依照 (Lo *et al.*,1996) 所發表之程式。將反應產物以限制酶 EcoR1 和 Xho1 進行切割，純化後與同樣經 EcoR1 及 Xho1 限制酶切割並純化之 pGEX-4T-1 質體，以 T4 DNA Ligase 進行接合反應 (Progenia Inc.)。經轉型作用送入勝任細胞中，挑選經定序後無物的菌落。

。帶有重組基因表現載體 pGEX-4T-1 的轉型細菌，置於含 Ampicillin (50 µg/ml) 的 LB 培養液中，於 37°C 培養箱旋轉培養至少 16-18 小時，將此菌液稀釋 50 倍 (1 ml 菌液加至 50 ml 含有 ampicillin (50 µg/ml) 的 LB 培養液中)，於 37°C 重新培養 2 小



時，加入 IPTG (最終濃度 1 mM) 於 15°C 培養 16-18 小時，以 5,800 × g 離心 20 分鐘收集細菌沉澱物，倒去上清液，加入 50 ml 緩衝液 A (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol, pH 7.8) 懸浮細菌沉澱物，將其置於冰上預冷，利用超音波震盪器 (Ultrasonic Processor UP-50H, Dr. Hielscher GmbH) 以 100% 均勻震盪 5 秒停止 5 秒。以 5,800 × g 離心 20 分鐘收集上清液，以 0.22 μm 的 filter (Millipore) 進行過濾，再利用 GST column (Amersham Biosciences) 進行純化，最後以緩衝液 B (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1mM DTT, 10mM reduced glutathione, 10% Glycerol pH 7.8) 純化帶有 GST 的 IE1 重組蛋白，並以濃縮管 (Millipore) 置換成緩衝液 A，此即為帶有 GST 的 IE1 重組蛋白。另外加入 Thrombin (10 U/ 10 mg proteins, Novagen) 與帶有 GST 的 IE1 重組蛋白於 4°C 反應 16-18 小時，再利用 GST column 吸附 GST 蛋白，得到的 IE1 蛋白再以蛋白質定量分析試劑 (Bio-Rad) 進行定量分析並以 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳分析重組蛋白的純度。

## 7. 西方墨點法

將純化後的 IE1 重組蛋白利用 Bradford assay 方法測定濃度後，取 0.3 μg 蛋白質加入 5 × SDS sample buffer (1 × 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，再進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析，之後再利用半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting) 轉印至 PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, Minipore) 膜上。轉印完成後，將 PVDF 膜以 3% 脫脂奶粉 (Difco Laboratories ; 以 W/V 溶於 TBST [0.2 M NaCl, 50 mM Tri-HCl, 0.5% Tween-20, pH 7.4]) 於 4°C 進行 blocking 16-18 小時。再以稀釋 5000 倍的兔子抗 IE1 多株抗體血清 (polyclonal rabbit anti-IE1 antibody) 或兔子抗 proPO

多株抗體血清 (polyclonal rabbit anti-IE1 antibody) 4°C 反應 16-18 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 10000 倍接有 HRP (Horseradish peroxidase) 之山羊抗兔子之多株抗體 (goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody, Sigma) 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，並以底片 (Fuji<sup>super</sup>RX) 於室溫下曝光，曝光時間為 3 分鐘，經顯影後即可知反應結果。

## 8. 遠端西方墨點法 (Far-western blot)

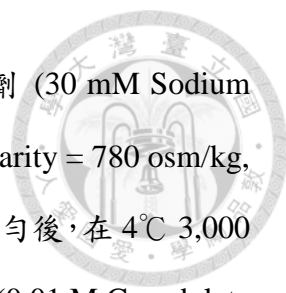
依據前人的方法 (Wu *et al.*, 2007)，將萃取的血球組織溶解蛋白由 Bradford assay 方法測定單位濃度後，取 3 µg 蛋白質加入 5 × SDS sample buffer (1 × sample buffer : 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8)，以 100°C 煮 10 分鐘，再進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析，之後再利用半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting)，轉印至 PVDF (polyvinylidene difluoride membrane, Minipore) 膜。轉印完成後，依據 Table. 1 的配方先以 6 M 的溶液室溫浸泡 15 mins 後；以 5 M 的溶液室溫浸泡 15 mins；4 M 的溶液室溫浸泡 15 mins；3 M 的溶液室溫浸泡 15 mins；2 M 的溶液室溫浸泡 15 mins；1 M 的溶液室 4°C 泡 15 mins；0.5 M 的溶液室 4°C 泡 15 mins；0 M 的溶液 4°C 浸泡 16-18 hours。再將純化的 IE1 蛋白加入 Binding buffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% Tween-20, 2% skim milk powder and 1 mM DTT, pH 7.6) 與完成轉印的 PVDF 於 4°C 冷房 shaker 搖晃 16-18 hours。再以稀釋 5000 倍的兔子抗 IE1 多株抗體血清在 4°C 反應 16-18 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 10000 倍接有 HRP (Horseradish peroxidase) 之山羊抗兔子之多株抗體於 4°C 反應 16-18 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，並以底片 (Fuji superRX) 進行曝光後經顯影得知反應結果。

## 9. 膠體內水解 (In-Gel digestion)

將實驗所需的 PP tube 以 Methanol 浸泡 5 mins，再以二次去離子水清洗三次後放置於 Methanol 擦拭過後的試管架上晾乾，將樣本蛋白從 SDS 聚丙烯醯胺膠上切除存放於 PP tube 內，加入 100  $\mu$ l Reduction buffer (50 mM DTT and 25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5) 於 37°C 浸泡 1hours，10,000  $\times$  g 離心 1min 移除上清液，再加入 100  $\mu$ l Alkylation buffer (100 mM IAA and 25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5) 於室溫避光浸泡 1hours，10,000  $\times$  g 離心 1min 移除上清液。加入 100 $\mu$ l (50% Acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5) 室溫 15mins，10,000  $\times$  g 離心 1min 移除上清液，重複此步驟至染劑完全移除。在加入 100 $\mu$ l 100% Acetonitrile 浸泡 5mins，10,000  $\times$  g 離心 1min 移除上清液，將膠體置於 Lamina flow 使其乾燥。加入適量的 Trypsin 溶液 (0.1  $\mu$ g trypsin 溶於 10  $\mu$ l 25 mM ammonium bicarbonate) 於 37°C 反應 16-18 小時。在加入 50  $\mu$ l 50% Acetonitrile/ 5% TFA，重複震盪 10 秒停 10 秒十次，10,000  $\times$  g 離心 1min 將上清液移至新的 PP tube，重複此步驟。再利用真空抽乾機 (EYELA centrifugal evaporator CVE-2000) 將上清液抽乾後送測。

## 10. 酚氧化酶活性檢測



參考前人的實驗 (Sung *et al.*, 1998)，利用 1 倍體積的抗凝血劑 (30 mM Sodium Citrate, 338 mM NaCl, 115 mM Glucose, 277U/ mg Heparin, Osmolarity = 780 osm/kg, pH 7.55) 混和三倍體積的蝦血，抽出後的蝦血球細胞將其混合均勻後，在 4°C 3,000 × rpm 離心 10 分鐘，移除上清液。再利用 Cacodylate-citrate buffer (0.01 M Cacodylate, 0.45 M sodium Chloride, 0.1 M Sodium Citrate, pH 7) 懸浮細胞以 4°C 3,000 × rpm 離心 10 分鐘，重複此步驟兩次後，移除上清液。收取細胞並以 1/3 × PBS 溶解血球細胞，此時再進行 4°C 10,000 × rpm 離心 2 分鐘，移除細胞溶解沉澱物，吸取細胞溶解上清液進行 Bradford assay 蛋白定量測定，測定總血球蛋白量為 12 μg/μl，加入 96 孔盤後，再分別加入重組病毒蛋白 WSSV IE1 0.3, 1, 3 μg、WSSV364 0.3, 1, 3 μg，以及 30 μl 活化劑 (3 mg/ml LPS)、30 μl 5% SDS，抑制劑 30 μl 1 mM Phenylthiourea (PTU) 於 30°C 各別同時反應 10 分鐘，再加入受質左旋多巴胺 (3 mg/ml L-DOPA) 30°C 反應 10 分鐘，並以 Cacodylate (CAC) buffer (0.01 M cacodylate, 0.45 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.26 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7) 補充每孔最終體積至 120 μl，測定 OD 490 吸光值。



## 結果

### 1 純化重組蛋白 WSSV IE1

在比較含有不同濃度 glycerol 的緩衝液 A (50 mM Tris-HCl , 500 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.8) 於 IE1 純化過程的差別後，發現以未含有 glycerol 的緩衝液 A 純化之 IE1 容易降解 (Fig. 1, Panel A); 而以含有 10% glycerol 的緩衝液 A 純化之 IE1 較為穩定 (Fig. 1, Panel B) 且以含有 20% glycerol 的緩衝液 A 純化之 IE1 也較為穩定 (Fig. 1, Panel C)，因此純化過程中的緩衝液需至少含有 10% glycerol 以穩定 IE1 蛋白之純化過程。

### 2 Thrombin 與 GST-IE1 於低溫 4°C 之反應

將純化後 GST-IE1 置於緩衝液 A (50 mM Tris-HCl , 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol, pH 7.8)，進行離心濃縮，再與 Thrombin 在低溫 4°C 下反應約 20 小時移除 GST-IE1 的 GST 蛋白，移除後的 GST 和 IE1，其分子量大小皆為 26 kD (Fig. 2, Lane 1)；GST-IE1 與 Thrombin 在室溫 20°C 下反應約 3 小時後的 GST 和 IE1，其分子量大小約為 26kD (Fig. 2, Lane 2)，thrombin 於 4°C 下仍可與 GST-IE1 作用且不會有蛋白沉澱的現象。



### 3 純化重組蛋白 IE1 鑑定

將與 thrombin 於 4°C 下反應 20 小時後的 GST-IE1 蛋白再以 GST column 純化 IE1，IE1 之分子量大小約為 26kD，由 N 端定序後發現該蛋白的胺基酸序列 GSPEFMAFNEE 中的 GSPEF 為 vector pGEX 4T-1 的 GST 部分序列，而 MAFNEE 始為 IE1 蛋白序列 (Fig. 3, Lane 1)。

### 4 西方墨點法分析純化之重組蛋白 IE1

將所純化之重組蛋白 0.3  $\mu\text{g}$  IE1 進行 15% SDS 聚丙烯醯胺膠電泳後，再進行西方墨點法分析。將 0.3  $\mu\text{g}$  IE1 蛋白轉印至 PVDF 膜後利用抗體-抗原的辨認方式，可以在分子量大小約 26kD 處看到經由 Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Science) 進行呈色並以底片 (Fuji superRX) 進行曝光後的 IE1 訊號 (Fig. 4)。

### 5 遠端西方墨點法

取 3  $\mu\text{g}$  的白蝦血球溶解液進行 12.5% SDS 聚丙烯醯胺膠電泳後，再轉印至 PVDF 膜並加入 50  $\mu\text{g}$  IE1 作為釣餌蛋白以 IE1 抗體進行抗體-抗原的辨認，於分子量大小約 100 kD、80 kD、76 kD 辨認出與 IE1 交互作用的蛋白，再經由液相層析串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 鑑定蛋白後分別為白蝦血球內 100 kD 的轉谷氨酰

胺酶、80 kD 的原酚氧化酶、76 kD 血藍素等 (Fig. 5)。




## 6 病毒顆粒對酚氧化酶的活性影響

抽取 9 隻白蝦樣本 (每組 3 隻) 的白蝦血球細胞以  $1/3 \times$  PBS 溶解後進行 Bradford assay 的蛋白濃度定量，加入  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液到 96 孔盤的待測試孔中進行酚氧化酶活性分析，發現僅有 CAC 緩衝液與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為控制組之酚氧化酶吸光值約為 0.5； $0.4 \mu\text{g}$  的白點症病毒顆粒與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組之酚氧化酶吸光值約為 0.5 並與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )； $1.2 \mu\text{g}$  的白點症病毒顆粒與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組之酚氧化酶吸光值約為 0.5 並與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )； $2.8 \mu\text{g}$  的白點症病毒顆粒與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組之酚氧化酶吸光值約為 0.7，是控制組的 1.5 倍且與控制組有顯著差異 ( $P < 0.05$ )； $30 \mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為陽性對照組之酚氧化酶吸光值約為 1.6，是控制組的三倍且與控制組有顯著差異 ( $P < 0.005$ )； $30 \mu\text{l}$  1 mM PTU 與  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為陰性對照組之酚氧化酶吸光值約為 0.1，是控制組的三分之一倍且與控制組有顯著差異 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6)。

## 7. *in vivo* 酚氧化酶活性於注射病毒顆粒後時序變化

分別抽取注射白點症病毒顆粒及  $60 \mu\text{l}$   $1 \times$  PBS 緩衝液的白蝦血球細胞，於注射後 24 小時內各時間點 (0, 2, 4, 8, 12, 24 hpi.) 抽取 9 隻白蝦樣本(每組 3 隻)的白蝦血球細胞後，再以  $1/3 \times$  PBS 溶解進行 Bradford assay 的蛋白濃度定量，加入 12





$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  白蝦血球細胞溶解液到 96 孔盤的待測試孔中進行酚氧化酶活性分析，發現僅以 PBS 緩衝液注射後之白蝦血球細胞溶解液為控制組其酚氧化酶吸光值於注射 0 小時後約為 0.4 且注射 PBS 後 24 小時內各時間點的酚氧化酶數值皆無顯著差異 ( $P < 0.05$ )；注射  $1 \mu\text{g}$  白點症病毒顆粒的白蝦血球細胞溶解液為實驗組其酚氧化酶吸光值於注射後 0 小時約為 0.5 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，於注射後第 4 小時後其酚氧化酶吸光值上升約為 0.6 是控制組的 1.5 倍有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，注射後第 12 小時後其酚氧化酶吸光值下降至 0.2 為控制組的 1/2 倍無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，注射後第 24 小時其酚氧化酶吸光值回復至 0.4 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；注射  $3 \mu\text{g}$  白點症病毒顆粒的白蝦血球細胞溶解液為實驗組其酚氧化酶吸光值於注射後 0 小時約為 0.5 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，於注射後第 4 小時後其酚氧化酶吸光值上升約為 1.0 是控制組的 2.5 倍有顯著差異 ( $P < 0.005$ )，注射後第 12 小時後其酚氧化酶吸光值下降至 0.2 為控制組的 1/2 倍無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，注射後第 24 小時其酚氧化酶吸光值回復至 0.4 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (Fig. 7)

#### 8. *in vivo* 酚氧化酶活性於感染病毒液後時序變化

分別抽取注射白點症病毒顆粒及  $60 \mu\text{l}$   $1 \times$  PBS 緩衝液的白蝦血球細胞，於注射後 24 小時內各時間點 (0, 2, 4, 8, 12, 24 hpi.) 抽取 9 隻白蝦樣本(每組 3 隻)的白蝦血球細胞後，再以  $1/3 \times$  PBS 溶解進行 Bradford assay 的蛋白濃度定量，加入  $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  白蝦血球細胞溶解液到 96 孔盤的待測試孔中進行酚氧化酶活性分析，發現僅以 PBS 緩衝液注射後之白蝦血球細胞溶解液為控制組其酚氧化酶吸光值於注射 0 小時後約為 0.2 且注射 PBS 後 24 小時內各時間點的酚氧化酶數值皆無顯著差異 ( $P < 0.05$ )；注射稀釋 100 倍的白點症病毒液  $60 \mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組

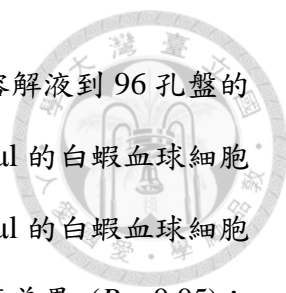
其酚氧化酶吸光值於注射後 0 小時約為 0.2 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，於注射後第 4 小時後其酚氧化酶吸光值上升約為 0.35 是控制組的 1.5 倍有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，注射後第 12 小時後其酚氧化酶吸光值下降至 0.2 為控制組的 0.8 倍無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，注射後第 24 小時其酚氧化酶吸光值回復至 0.2 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；注射稀釋 100000 倍白點症病毒液 60  $\mu$ l 白蝦血球細胞溶解液為實驗組其酚氧化酶吸光值於注射後 0 小時約為 0.2 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，於注射後第 4 小時後其酚氧化酶吸光值上升約為 0.75 是控制組的 3.5 倍有顯著差異 ( $P < 0.005$ )，注射後第 12 小時後其酚氧化酶吸光值下降至 0.2 為控制組的 1/2 倍無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，注射後第 24 小時其酚氧化酶吸光值回復至 0.2 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (Fig. 8A)，同時以 proPO 抗體定量各時間點的 proPO 含量變化，發現控制組各時間的 proPO 變化量不大，而感染後的 proPO 變化量也不大 (Fig. 8B)。

## 9. WSSV364 與 WSSV IE1 重組蛋白的純化

由大腸桿菌表現後的重組蛋白 GST-364 及 GST-IE1，通過 GST column 純化後的產物與 Thrombin 在 4°C 下作用至少 13 小時後，再次通過 GST column 後得到分子量大小約 51 kD 的 WSSV 364 (Fig. 9, Lane 1) 與分子量大小約 26 kD 的 WSSV IE1。WSSV 364 則作為酚氧化酶活性分析的負控制組；WSSV IE1 則做為酚氧化酶活性分析的實驗組。

## 10. IE1 對酚氧化酶活性之影響

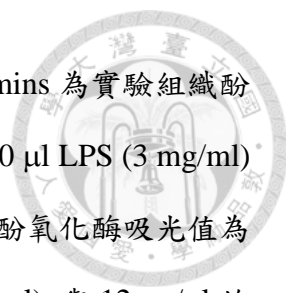
共抽取 9 隻白蝦樣本（每組 3 隻）的白蝦血球細胞，再以 1/3  $\times$  PBS 溶解進行



Bradford assay 的蛋白濃度定量，加入 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液到 96 孔盤的待測試孔中進行酚氧化酶活性分析，僅有 CAC 緩衝液與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液控制組的酚氧化酶吸光值約為 0.4；0.3  $\mu\text{g}$  IE1 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液之實驗組酚氧化酶吸光值為 0.25，是控制組的 1/7 倍有顯著差異 ( $P < 0.05$ )；1  $\mu\text{g}$  IE1 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組之酚氧化酶吸光值為 0.15 是控制組的 1/3 倍有顯著差異 ( $P < 0.005$ )；3  $\mu\text{g}$  IE1 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組織酚氧化酶吸光值為 0.15 是控制組的 1/3 倍有顯著差異 ( $P < 0.005$ )；0.3  $\mu\text{g}$  WSSV364 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組織之酚氧化酶吸光值為 0.4，與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；1  $\mu\text{g}$  WSSV364 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組織之酚氧化酶吸光值為 0.4，與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；3  $\mu\text{g}$  WSSV364 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為實驗組織之酚氧化酶吸光值為 0.38，與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )；30  $\mu\text{l}$  5% SDS 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為陽性控制組之酚氧化酶吸光值為 1.4，控制組的 3.5 倍且有顯著差異 ( $P < 0.0005$ )；30  $\mu\text{l}$  1 mM PTU 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為陰性對照組之酚氧化酶吸光值約為 0.1，是控制組的 1/4 倍且與控制組有顯著差異 ( $P < 0.005$ ) (Fig. 10)。

## 11. IE1 對活化前後酚氧化酶活性之影響

抽取 9 隻白蝦樣本（每組 3 隻）的白蝦血球細胞，再以 1/3  $\times$  PBS 溶解後進行 Bradford assay 的蛋白濃度定量，加入 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液到 96 孔盤的待測試孔中進行酚氧化酶活性分析，僅有 CAC 緩衝液與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  白蝦血球細胞溶解液之控制組的酚氧化酶吸光值約為 0.1；3  $\mu\text{g}$  IE1 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液反應 10mins 為實驗組織酚氧化酶吸光值為 0.05 是控制組的 1/2 倍有顯著差異




( $P < 0.05$ ); 3  $\mu\text{g}$  IE1 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液反應 5mins 為實驗組之酚氧化酶吸光值為 0.05 是控制組的 1/2 倍有顯著差異 ( $P < 0.05$ ); 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液反應 10mins 之陽性控制組之酚氧化酶吸光值為 0.7，控制組的 7 倍且有顯著差異 ( $P < 0.0005$ ); 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液反應 5mins 為陽性控制組之酚氧化酶吸光值為 0.7，控制組的 7 倍且有顯著差異 ( $P < 0.0005$ ); 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液先與 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 反應 10mins 後再與 3  $\mu\text{g}$  IE1 反應 5mins 後的酚氧化酶吸光值為 0.37 是控制組的 4 倍 ( $P < 0.005$ )，僅以 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 處理之陽性控制組的 1/2 倍且有顯著差異 ( $P < 0.005$ ); 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液先與 3  $\mu\text{g}$  IE1 反應 10mins 後再與 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 反應 5mins 後的酚氧化酶吸光值為 0.1 與控制組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，為僅以 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) 處理之陽性控制組的 1/7 倍有顯著差異 ( $P < 0.005$ ); 30  $\mu\text{l}$  1 mM PTU 與 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的白蝦血球細胞溶解液為陰性對照組之酚氧化酶吸光值約為 0.05，是控制組的 1/2 倍且與控制組有顯著差異 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11)。

## 討論




依據先前的實驗方法純化的 IE1 蛋白較不穩定且蛋白容易在純化的過程降解 (Fig. 1, panel A), 因此增加了純化過程中的穩定劑 BSA 或甘油 (Celeste and Pierson, 1980; Shelby and Jakoby, 1972) 以穩定純化蛋白, 在嘗試各種不同百分比的甘油 0%、10%、20% 後發現 10% 的甘油始能穩定 IE1 的純化過程 (Fig. 1, panel B)。抗凝劑的使用是為了避免抽取白蝦血球細胞過程中的血液的凝集, 依據前人的研究發現 pH 值接近 4 左右的抗凝劑會對粗抽血球蛋白造成沉澱的現象而 pH 5.6、6.6、7.3 的抗凝劑在抽取血球細胞時較不會造成粗抽之血球蛋白沉澱 (Francisco *et al.*, 1993; Teresa *et al.*, 1999)。另外, 抗凝劑的選擇有 Heparin 和 EDTA 兩種, 若使用 EDTA 做為抗凝劑的話在酚氧化酶的活性分析上會造成活性抑制的現象 (Francisco *et al.*, 1993; Kaliappan and Sugumaran, 1996), 因此本實驗選用 Heparin (500 Units/ml) 做為本次實驗的抗凝劑。本次實驗的 CAC 緩衝液不會對酚氧化酶的活性造成影響, 且選用 pH 7-8 的範圍對酚氧化酶會有較好的酵素活性 (Chen *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2011)。本次實驗的酚氧化酶活性分析實驗控制組為僅以 CAC buffer (pH 7.5) 與白蝦血球溶解液反應 10mins (Fig. 6, 7, 9, 10); 抗凝劑與抽取血球細胞之比例為 1:3, 以一倍體積的抗凝劑混合三倍體積之蝦淋巴液較為適當, 也較不會有部分血液凝集的現象。


依據前人的研究發現, 蝦血球細胞含有約 90% 的顆粒球及半顆粒球與約 10% 的透明球 (Gary and Graves, 1985; Soderhall and Smith, 1983), 本次實驗直接利用抗凝劑抽取蝦血球細胞進行酚氧化酶活性分析, 粗抽後的血球細胞及血淋巴液含有許多原酚氧化酶系統的相關蛋白因子 (Soderhall *et al.*, 1990), 而無脊椎動物的原酚氧化酶可能存在血淋巴液或血球細胞中 (Sung *et al.*, 1998; Kaliappan and



Sugumaran, 1996; Soderhall and Cerenius, 1992, 1998; Johansson and Soderhall, 1989; Pikul *et al.*, 2006; Teresa *et al.*, 1999; Washington and Danker, 1997; Yeh *et al.*, 2009a)。  
前人研究對於粗抽之血淋巴液進行酚氧化酶活性分析而未能有活性反應；對粗抽血球細胞進行酚氧化酶活性分析則可測到酚氧化酶酵素的活性反應 (Sung *et al.*, 1998; Soderhall and Hall, 1984; Teresa *et al.*, 1999)，因血淋巴液中含有許多的蛋白酶抑制劑，如： $\alpha$ -2 macroglobulin、serpin 等 (Soderhall *et al.*, 2009b; Kallaya and Soderhall, 2000) 會抑制血淋巴液中酚氧化酶活性，使其活性測試需要反應約 24 小時後才能測到活性反應 (Nellaiappan, 1992)，本次實驗選用白蝦血球溶解液進行酚氧化酶活性分析。前人的研究發現白蝦原酚氧化酶有兩種型式：LvproPO-1 和 LvproPO-2，此兩種原酚氧化酶皆存在蝦的血球細胞中，但序列的相似度僅有 72% 左右 (Yeh *et al.*, 2009a)。先前的研究指出白蝦在感染了白點症病毒、黃頭病毒後的酚氧化酶活性或相關的免疫基因表現量會迅速下降，但對於其中免疫基因表現下降或酚氧化酶的活性下降的機制仍然未清楚 (Siriporn *et al.*, 2008; Suseela *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2009a; Yeh *et al.*, 2009b)。感染白點症病毒後的蝦其酚氧化酶下降的原因可能與白點症病毒極早期蛋白有關，所以利用遠端西方墨點法，探索能與 IE1 交互作用的未知蛋白 (Fig. 5)；遠端西方墨點法參照前人的方法 (Wu *et al.*, 2007) 並修改部分的配方 (如 Table.1)，發現純化後的 IE1 能與蝦血球粗抽蛋白的某些蛋白進行交互作用，經由 LC MS/MS 鑑定後發現為谷氨酰胺轉胺酶、原酚氧化酶及血藍素等 (Fig. 5)，均為原酚氧化酶系統的上游蛋白。研究發現感染白點症病毒後的 LvproPO-2 的基因表現量會先上升再降低，並推測可能是 LvproPO-2 具有抗病毒的功能才會在感染後造成基因表現量降低 (Yeh *et al.*, 2009a)，這與前人在感染後酚氧化酶活性和基因表現量迅速下降的情形不同 (Siriporn *et al.*, 2008; Suseela *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2009b) 因此利用純化後的病毒顆粒進行酚氧化酶活性分析，發現能隨著病毒顆粒劑量增加而刺激酚氧化酶活性上升 (Fig. 6)。本篇論文利用純化



後的病毒顆粒進行活體肌肉注射，將由 Bradford assay 定量好的病毒顆粒注射入白蝦體內後 (Li *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2011)，觀察感染時序上的變化，發現 15 g 的白蝦在各別注射 1 和 3  $\mu\text{g}$  的病毒顆粒後其酚氧化酶活性會於注射後 4 小時上升至控制組的 1.5-2.5 倍，再於注射後 8-12 小時下降 (Fig. 7)，此現象與前人白蝦酚氧化酶在感染後酚氧化酶下降的實驗結果有異 (Yeh *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2005)；此外，在病毒液稀釋 100 倍的劑量觀察感染後 24 小時的酚氧化酶活性變化，則發現酚氧化酶活性會於感染白點病毒後立即降低 (Fig. 8A)與前人實驗相同 (Ji *et al.*, 2011)，但在病毒液稀釋 100000 倍的劑量下，則發現酚氧化酶活性會於感染後 2-4 小時上升，在於感染後 8-24 小時活性下降 (Fig. 8A)，同時利用 proPO 抗體進行感染後各時間點 proPO 等量分析，發現在感染後各時間點的酚氧化酶活性分析量一致 (Fig. 8B)，同時也有利用 IE1 抗體進行感染後各時間點的表現量分析，但實驗結果不理想未能測到 IE1 表現量變化，故未呈現。原酚氧化酶活化系統受入侵微生物的刺激活化或抑制之機制尚未清楚，前人的研究指出生物或非生物因子的活化劑都能成功的活化原酚氧化酶活化系統的酵素活性，如：LPS 或  $\beta$  1-3 glucan 等生物因子都能成功的活化酚氧化酶活性，而病毒與原酚氧化酶活化系統間之抗衡機制也尚未明瞭 (Soderhall and Cerenius, 1998)。除了甲殼類動物外，昆蟲的酚氧化酶也會因為病毒的感染而下降 (Beck and Strand, 2007)。對於酚氧化酶活性上升和檢測的方法則是依據前人的實驗方法：在測定活性方面，將萃取的血球蛋白進行蛋白等量定量 (Sung *et al.*, 1998; Soderhall *et al.*, 2009)，雖然每次進行實驗的總蛋白量有經過定量且為同等蛋白量，但是每隻蝦子所含有的酚氧化酶在總蛋白的比例不同，且蝦子的酚氧化酶在蝦子脫殼前階段的酚氧化酶活性會上升而脫殼後的酚氧化酶會下降 (Liu *et al.*, 2006)，因此蝦子的個體差異可能會造成實驗上的誤差，因此本實驗的測定時間點都有增加樣本數且三重複以減少個體誤差 (Fig. 7)。由於利用總粗抽蛋白的測定活性方式僅能測定到相對的活性變化，而本

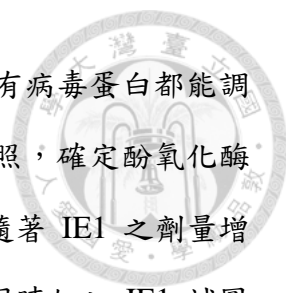


次實驗皆以定量後的總粗抽蛋白進行實驗 (Fig. 6, 7, 8, 10, 11)，所以不能排除酚氧化酶活性的上升和下降是受到其他非病毒的相關因子干擾，例如：ROS 的反應或者白蝦的血液凝集系統等都有可能影響蝦子的酚氧化酶活性 (Ji *et al.*, 2011; Nagai *et al.*, 2000; Cammarata and Parrinello, 2009)；此外，前人也利用 blue sepharose 及 phenyl sepharose column 移除甲殼類血液的血藍素並將蠶的原酚氧化酶純化出來並進行酵素的活性測定，因此在活性測定方面可以較精準的測到比活性 (Aspan and Soderhall, 1991; Teresa *et al.*, 1999)。前人研究發現，純化後的原酚氧化酶的分子量大小為 76 kD 左右且經由蛋白酶的截切後產生分子量大小 60 kD 和 62 kD 的酚氧化酶及分子量大小 5 kD 的胜肽片段 (Aspan and Soderhall, 1991)，與本次實驗鑑定出的原酚氧化酶分子量大小相同 (Fig. 5)。

另外，前人的研究發現，原酚氧化酶和蝦子血液的血藍素 (hemocyanin) 相似度高達 46-76%，且原酚氧化酶和血藍素的分子量大小皆為 76 kD，與本次實驗鑑定出的血藍素分子量大小相同 (Fig. 5)，血藍素的 N-terminal 再經由蛋白酶截切後同樣也能具有酚氧化酶的活性功能 (Decker *et al.*, 2001)。感染白點症病毒後，發現肝胰腺血藍素的基因表現量變化，發現在感染後的 12 小時血藍素會基因表現量先上升再下降，推測血藍素也具有抗病毒的作用 (Lei *et al.*, 2008)。此外，血藍素的 C-terminal 也能做為抗微生物生長的抗菌胜肽抑制真菌的生長 (Lee *et al.*, 2003)。本次實驗的酚氧化酶活性測試，控制組的白蝦酚氧化酶數值為 0.1-0.4 且與活化劑反應的酚氧化酶數值會為正常值的 2-7 倍 (Fig.6, 7, 8, 10, 11)，而前人實驗的酚氧化酶活性數值會採用與控制組相除的相對活性數值 (Sung *et al.*, 1998)。

為證明遠端西方墨點法的結果 (Fig. 5)，則將純化之 IE1 依據不同的劑量加入酚氧化酶的活性測試，發現酚氧化酶的活性會隨著 IE1 之劑量增加而降低活性，






測定活性的同時也加入了 WSSV364 做為負控制組顯示不是所有病毒蛋白都能調控酚氧化酶的活性下降，並同時加入了活化劑和抑制劑做為對照，確定酚氧化酶活性分析平台是可以正常進行實驗 (Fig.10)，發現酚氧化酶能隨著 IE1 之劑量增加而下降 (Fig.10)，隨後做了活化前後的酚氧化酶活性分析並同時加入 IE1 試圖探索 IE1 在酚氧化還原酵素活化系統中可能作用之途徑，發現在先加入 IE1 蛋白後再活化酚氧化酶的實驗組活性數值僅為以活化劑處理之酚氧化酶活性 1/2-1/4 倍 (Fig.11)，且與控制組無顯著差異 ( $p < 0.05$ )，顯示 IE1 病毒蛋白確實能與原酚氧化酶活化系統的上游蛋白作用阻擋原酚氧化酶活化路徑。


儘管如此，在探索 IE1 如何降低白蝦酚氧化酶活性的途徑上仍是需要持續努力，因為目前的研究在病毒與酚氧化酶的報告相當不清楚。未來的研究除了持續探索可能的交互作用因子之外也需要探索白點症病毒其餘 15 個極早期表現基因的功能和是否能抑制或刺激酚氧化酶的活性上升。另外，除了利用蛋白體的方法持續探索外也該利用其他的交互作用方法探索其他能與酚氧化酶交互作用的白點症病毒蛋白。先前的研究利用免疫螢光檢測證實原酚氧化酶主要存在血球細胞的顆粒和半顆粒球中，但是對於顆粒和半顆球中的顆粒是否含有原酚氧化酶及是否含有可能影響酚氧化酶活化或抑制的可能因子仍需要進行免疫螢光染色等方法證明之。

## 結論



本篇論文主要為白點病毒極早期表現基因 IE1 於原酚氧化酶活化系統上的角色探索，先前的研究發現甲殼類生物在感染白點症病毒後白蝦酚氧化酶的活性與其基因表現量會迅速的降低，然宿主與病毒間的抗衡機制尚未清楚，因此本篇論文假設感染白點症病毒的白蝦酚氧化酶之活性下降與白點症病毒極早期表現基因 IE1 有關，在測試不同的緩衝液系統並穩定白點病毒極早期表現基因 IE1 後，隨即進行遠端西方墨點法的交互作用分析，發現 IE1 能與原酚氧化酶系統中的上游蛋白血藍素、原酚氧化酶和轉谷氨酰胺酶交互作用。此外，將純化病毒顆粒於 *in vitro* 實驗分析，發現白點病毒顆粒會刺激酚氧化酶活性上升，隨後將白點病毒顆粒注射於白蝦體內，觀察注射後 24 小時內白蝦酚氧化酶活性的時序變化，發現注射純化病毒顆粒四小時後，白蝦酚氧化酶的活性會上升，隨後其酚氧化酶的活性則於注射後 8-12 小時急劇降低，於注射白點病毒顆粒後 24 小時的白蝦酚氧化酶活性能恢復至與控制組無顯著差異；另外，在利用病毒液進行人工注射感染後，觀察感染後 24 小時的酚氧化酶活性變化也有相同的趨勢。更利用純化的白點病毒極早期表現基因 IE1 進行酚氧化酶活性分析，發現白點症病毒極早期表現基因 IE1 能有效抑制白蝦酚氧化酶活性；原酚氧化酶活化前後分別加入白點病毒極早期表現基因 IE1 發現其酚氧化酶活性皆較僅以活化劑激活的酚氧化酶活性低，因此白點病毒極早期表現基因 IE1 能與原酚氧化酶活化系統的原酚氧化酶交互作用並抑制其活化途徑與酵素活性。

## 未來研究方向



白點症病毒極早期表現蛋白 IE1 能抑制酚氧化酶的活性且能與原酚氧化酶活化系統的上游蛋白交互作用而抑制其活化路徑；但仍需增加交互作用的驗證方法確認 WSSV IE1 與交互作用的蛋白為確實的現象，將嘗試構築谷氨酰胺轉胺酶、原酚氧化酶及血藍素進行 pull-down assay 及 coimmunoprecipitation 證實是否有交互作用；此外，也需利用 blue sepharose 移除白蝦血球溶解液的血藍素，再利用該白蝦血球溶解液進行遠端西方墨點法分析，以排除血藍素的沾黏與訊號干擾，而 WSSV IE1 是否能與蛋白酶抑制劑有交互作用也仍需驗證。若確認 WSSV IE1 能與蛋白酶抑制劑交互作用後則能在原酚氧化酶活化系統與白點症病毒之間的關係提供重要的參考資訊。

## 參考文獻

Aspan A, Soderhall K (1991) Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem* 21: 363-373

Aspan A, Huang TS, Cerenius L, Soderhall K, (1995) cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *PNAS* 92: 939-943

Beck MH, Strand MR (2007) A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *PNAS* 104: 19267-19272

Blissard GW (1996) Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20: 73– 93

Blissard GW, Rohrmann GF (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* 35: 127– 155

Bradbury SL, Jakoby WB (1972) Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase. *PNAS* 69: 2373-2376

Cammarata M, Parrinello N (2009) The ascidian prophenoloxidase activating system. *ISJ* 6:S67-S76

Celeste NP, Pierson DL (1980) Stabilization and purification of ornithine transcarbamylase from *Neisseria gonorrhoeae*. *J bacteriol* 141: 544-549

Chang PS, Lo CF, Wang YC, Kou GH (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by In Situ Hybridization. *Dis Aquat Org* 27: 131-139

Chen C, Durrant HJ, Newton RP, Patcliffet NA (1995) A Study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *Biochem J* 310: 23-31

Chen LL, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, Kou GH (2002a) Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for target VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* 293: 44-53

Chen LL, Wang HC, Huang CJ, Peng SE, Chen YG, Lin SJ, Chen WY, Dai CF, Yu HT, Wang CH, Lo CF, Kou GH (2002b) Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301: 136-147

Chou HY, Huang CY, Wang CH, Kou GH, Lo CF (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23:165-173

Decker H, Ryan M, Jaenicke E, Terwilliger N (2001) SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J Biol Chem* 276: 17796-17799

Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito TT, Kondo H, Aoki T, Hirono (2009) Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS Journal* 276: 5298-5306

Fan TJ, Jing Z, Fan XY, Yu MM, Jiang GJ (2011) Purification and characterization of phenoloxidase from brine shrimp *Artemia sinica*. *Acta Biochim Biophys Sin* , p1-7

Flegel TW (1997) Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J microbiology & Biotechnology* 13: 433-442

Francisco VA, Guzman MA, Ochoa JL (1993) An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Physiol* 106A: 299-303

Friesen PD, Miller LK (1986) The regulation of baculovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 131: 31– 49

Gary GM, Graves BL (1985) Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J Morphol* 185: 339-348

Hasson KW, Lightner DV, Poulos BT, Redman RM, White BL, Brock JA (1995) Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis Aquat Org* 23: 115-126

Hoffmann JA (2003) The Immune Response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38

Honess RW, Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: I. cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14: 8– 19

Hose JE, Martin GG (1989) Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *J Invertebr Pathol* 53: 335-346

Huang JY, Liu WJ, Wang HC, Lee DY, Leu JH, Wang HC, Tsai MH, Kang ST, Chen IT, Kou GH, Chang GD, Lo CF (2012) *Penaeus monodon* thioredoxin restores the DNA binding activity of oxidized white spot syndrome virus IE1. *Antioxid Redox Signaling* 17: 914-926

Inouye K, Miwa S, Oseko N, Nakano H, Kimura T, Momoyama K, Hiraoka M (1994) Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol* 29: 149-158

Inouye K, Yamano K, Ikeda N, Kimura T, Nakano H, Momoyama K, Kobayashi J, Miyajima S (1996) The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol* 31: 39-45

Ji PF, Yao CL, Wang ZY (2011) Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Dis Aquat Org* 96: 9-20

Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Soderhall I, Soderhall K (2006) White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20: 718-727

Johansson MW, Soderhall K (1989) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol Today* 5: 171-176

Johansson MW, Soderhall K (1988) Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J Cell Biol* 106: 1795-1803

Kaliappan N, Sugumaran M (1996) On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the Horseshoe Crab, *Limulus*. *Comp. Biochem. Physiol* 113B: 163-168

Karunasagar I, Otta SK, Karunasagar I (1997) Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture* 153: 9-13

Kallaya S, Lage C, Soderhall K (1999) Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 23: 179-186

Kallaya S, Soderhall K (2000) The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 91: 53-69

Lee SY, Lee BL, Soderhall K (2003) Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 278: 7927-7933

Lei K, Li F, Zhang M, Yang H, Luo T, Xu X (2008) Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Dev Comp Immunol* 32: 808-813

Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC (2007) Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC genomics* 8: 120-134

Li Y, Zhang Xh, Xiao N, Dai LF, Chen WZ, Zhao RH, Jia CS, Hemmingsen SM, Dai HP (2006) Identification of a WSSV neutralizing scFv antibody by phage display technology and in vitro screening. *Dis Aquat Org* 73: 93-99

Liao IC, Huang TL, Katsutani K (1969) A preliminary report on artificial propagation of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Jt Comm Rural Reconstr Fish Ser* 8: 67-71

Liao IC (1992) Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan: a review from 1977 to 1991. p113-137

Lightner DV, Pouulos BT, Redman R.M, Mari J, Bonami JR (1992) New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In: Fulks W, Main K (eds) proceedings of the asian interchange program workshop on the diseases of cultured penaeid shrimp, asian interchange program. The Oceanic Institute, Oahu, HI, p 233-253

Lightner DV (1996) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana

Liu CH, Tseng DY, Lai CY, Cheng WT, Kuo CM (2006) Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. Fish Shellfish Immunol 21: 60-69

Liu WJ, Chang YS, Wang CH, Kou GH, Lo CF (2005) Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. Virology 334: 327-341

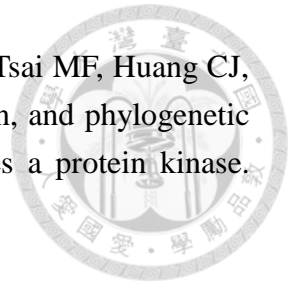
Liu WJ, Chang YS, Wang Andrew HJ, Kou GH, Lo CF (2007) White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the Immediate-Early Gene ie1. J Virol 81: 1461-1471

Liu WJ, Chang YS, Wang HC, Leu JH, Kou GH, Lo CF (2008) Transactivation, dimerization, and DNA-binding activity of white spot syndrome virus immediate-early protein IE1. J Virol 82: 11362-11373

Liu WJ, Chang YS, Huang WT, Chen IT, Wang KC HC, Kou GH, Lo CF (2011) *Penaeus monodon* TATA box-binding protein interacts with the white spot syndrome virus transactivator IE1 and promotes Its transcriptional activity. J Virol 85: 6535-6547



Liu WJ, Yu HT, Peng SE, Chang YS, Pien HW, Lin CJ, Huang CJ, Tsai MF, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Lo CF, Kou GH (2001) Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. *Virology* 289: 362-377



Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, Ho CH, Peng SE, Kou GH, Lightner DV (1999) Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org* 35: 175-184

Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, Chou CM, Yeh PY, Huang CJ, Chou HY, Wang CH, Kou GH (1996) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25: 133-141

Lo CF, Kou GH (1998) Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol* 33: 365-371

Loh PC, Cesar E, Nadala JB, Tapay LM, Lu Y (1998) Recent developments in Immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*, national center for genetic engineering and biotechnology, Bangkok, p 255-259

Lotz JM, Browdy CL, Carr WH, Frelief PF, Lightner DV (1995) USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. In: Browdy CL, Hopkins JS (eds) *swimming through troubled water*, proceedings the special session on shrimp farming, aquaculture '95 World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, p 66-75

Magbanua FO, Natividad KT, Migo VP, Alfafara CG, de la Pena FO, Miranda RO, Albaladejo JD, Nadala EC, Jr., Loh PC, Mahilum TL (2000) White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org* 42: 77-82

Martin GG, Graves BL (1985) Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J Morphol* 185: 339-348

Marks H, Mennens M, Vlak JM, van Hulten MC (2003) Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes. *J Gen Virol* 84: 1517-1523

Markus HB, Michael RS (2007) A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *PNAS* 104: 19267-19272

Mathew S, Kumar KA, Anandan R, Viswanathan Nair PG, Devadasan K (2007) Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145: 315-320

Manickam S, Nellaiappan K (1991) Lysolecithin-a potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 1371-1376

Mohan CV, Shankar KM, Kulkarni S, Sudha PM (1998) Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis Aquat Org* 34: 9-12

Nadala ECB, Tappy LM, Loh PC (1997) Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 31:41-146

Nagai T, Kawabata SI (2000) A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem* 275: 29264-29267

Nappi AJ, Vass E (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigm Cell Res* 6: 117-126

Nellaiappan K (1992) On the latency of blood phenoloxidase of painted locust *Poeciloceros pictus*. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 100: 223-229

Nellaiappan K, Sugumaran M (1996) On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*. *Comp Biochem Physiol* 113B: 163-168

Oscar MV, Clarissa BG, Anguren F (2001) A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J World Aquac Soc* 32: 364-372

Park JH, Lee YS, Lee S, Lee Y (1998) An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org* 34: 71-75

Pikul J, Siripavee S, Soderhall I, Soderhall K (2006) White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20: 718-727

Sangamaheswaran AP, Jeyaseelan MJP (2001) White spot viral disease in penaeid shrimp - a review. *The ICLARM Quarterly* 24: 16-22

Shelby LB, Jakoby WB (1972) Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase. *PNAS* 69: 2373-2376

Siriporn P, Sureerat T, Suleeporn B, Aoki T, Hirono I, Yasuike M, Tassanakajon A (2008) Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Reports*, p 670-677

Soderhall K, Aspan A, Duvic B (1990) The proPO-system and associated proteins: role in cellular communication in arthropods. *34th Forum in Immunology*, p 896-907

Soderhall K, Hall L (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. *Biochimica et Biophysica Acta* 797: 99-104

Soderhall I, Washinton C, Marian N, Bok LL, Soderhall K (2009) A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 284: 6301-6310

Soderhall K, Cerenius L (1992) Crustacean immunity. *Annual Rev of Fish Diseases*, p 3-23

Soderhall K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10: 23-28

Soderhall K, Smith VJ (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 7: 229-239

Smith VJ, Soderhall K (1991) A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev Comp Immunol* 15: 251-261

Soderhall K, Smith VJ, Johansson MW (1986) Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* 245: 43-49

Song YL, Yu CI, Lien TW, Huang CC, Lin MN (2003) Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 14: 317-331

Soto MA, Lotz JM (2001) Epidemiological parameters of White Spot Syndrome Virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J Invertebr Pathol* 78: 9-15

Sritunyalucksana K, Cerenius L, Soderhall K (1999) Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus Monodon*. *Dev Comp Immunol* 23: 179-186

Sritunyalucksana K, Soderhall K (2000) The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 91: 53-69

Stephanie D, Lightner DV, Redman RM, Bonami JR (1997) Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis Aquat Org* 29: 205-211

Sugumaran M (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigm Cell Res* 15: 2-9

Sun J (2010) Flow cytometric analysis of defense functions of hemocytes from the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 41: 92-105

Sung HH, Chang HJ, Her CH, Chang JC, Song YL (1998) Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *J Invertebr Pathol* 71:26-33

Suseela M, Kumar KA, Anandan R, Viswanathan Nair PG, Devadasan K (2007) Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem* 145: 315-320

Tao M, Annasaheb BK, Tanja KK, Vincent TK Chow, Kwang J (2011) Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in Mice. *PLoS One* 6: 1-12

Tsai MF, Lo CF, van Hulten MC, Tzeng HF, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Vlaskovic JM, Kou GH (2000a) Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-99

Tsai MF, Yu HT, Tzeng HF, Leu JH, Chou CM, Huang CJ, Wang CH, Lin JY, Kou GH, Lo CF (2000b) Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277:100-110

Teresa GG, Jorge HL, Francisco VA (1999) Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem* 122: 77-82

Tyson CJ, Jenkin CR (1974) The cytotoxic effect of haemocytes from the crayfish (*Parachanna bicarinatus*) on tumour cells of vertebrates. *Austr J Exp Biol Med Sci* 52: 915-923

Valerie JS, Soderhall K (1991) A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev Comp Immunol* 15: 251-261

Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23: 239-242

Wang CH, Yang HN, Tang CY, Lu CH, Kou GH, Lo CF (2000) Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis Aquat Org* 41: 91-104

Washington C, Dankert JR (1997) Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 7: 283-295

Wang Q, Nunan LM, Lightner DV (2000) Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat Org* 43: 175-181

Wang YT, Liu W, Seah JN, Lam CS, Xiang JH, Korzh V, Kwang J (2002) White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis Aquat Org* 52: 249-259

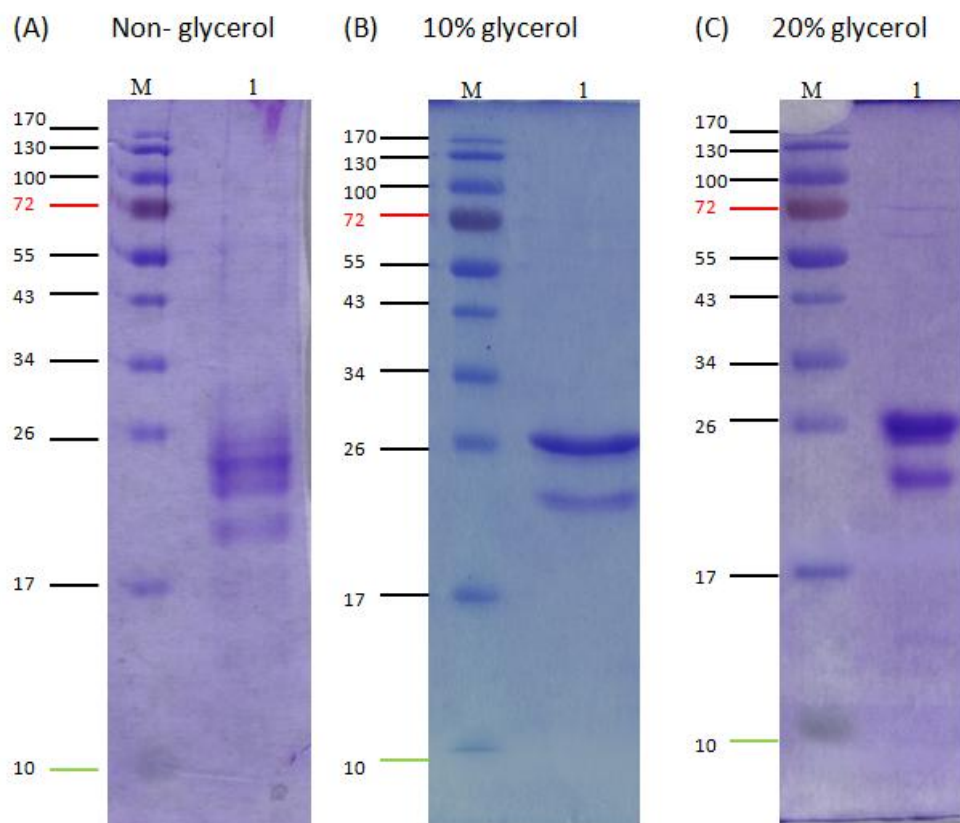
Wu YL, Li Q, Chen XZ (2007) Detecting Protein-Protein Interactions by Far Western Blotting. *Nat Protoc* 2: 3278-3284

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

Yeh MS, Lai CY, Liu CH, Kuo CM, Cheng WT (2009a) A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. *Fish Shellfish Immunol* 26: 49-55

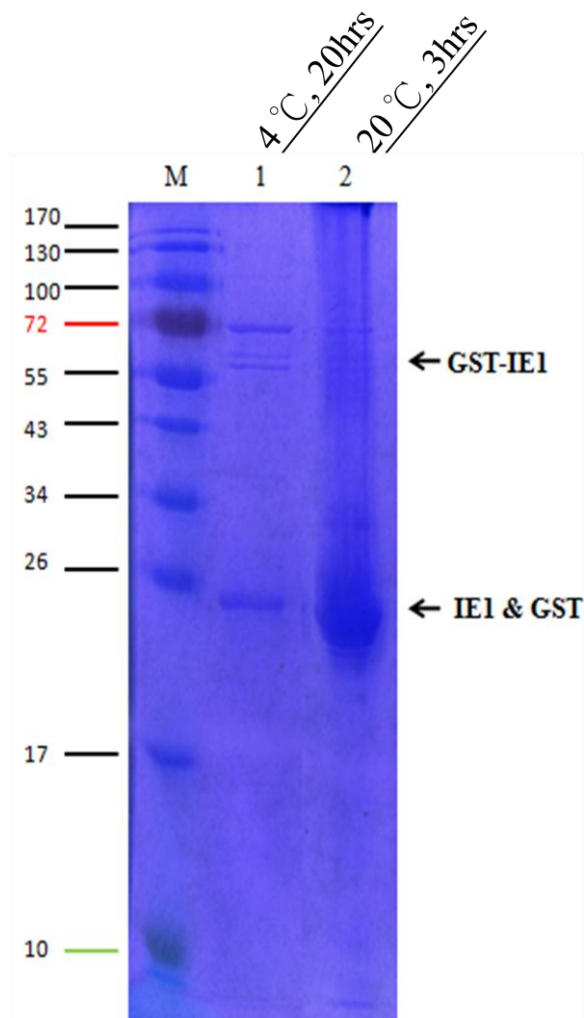
Yeh SP, Chen YN, Hsieh SL, Cheng W, Liu CH (2009b) Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol* 26: 582-588

Zhang ZF, Shao MY, Kang KH (2005) Changes of enzyme activity and hematopoiesis in chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A. *Aquacult Res* 36: 674-681



**Fig. 1 Comparison of purified IE1 in (A) non-glycerol buffer A, (B) buffer A with 10% glycerol and (C) buffer A with 20% glycerol.**

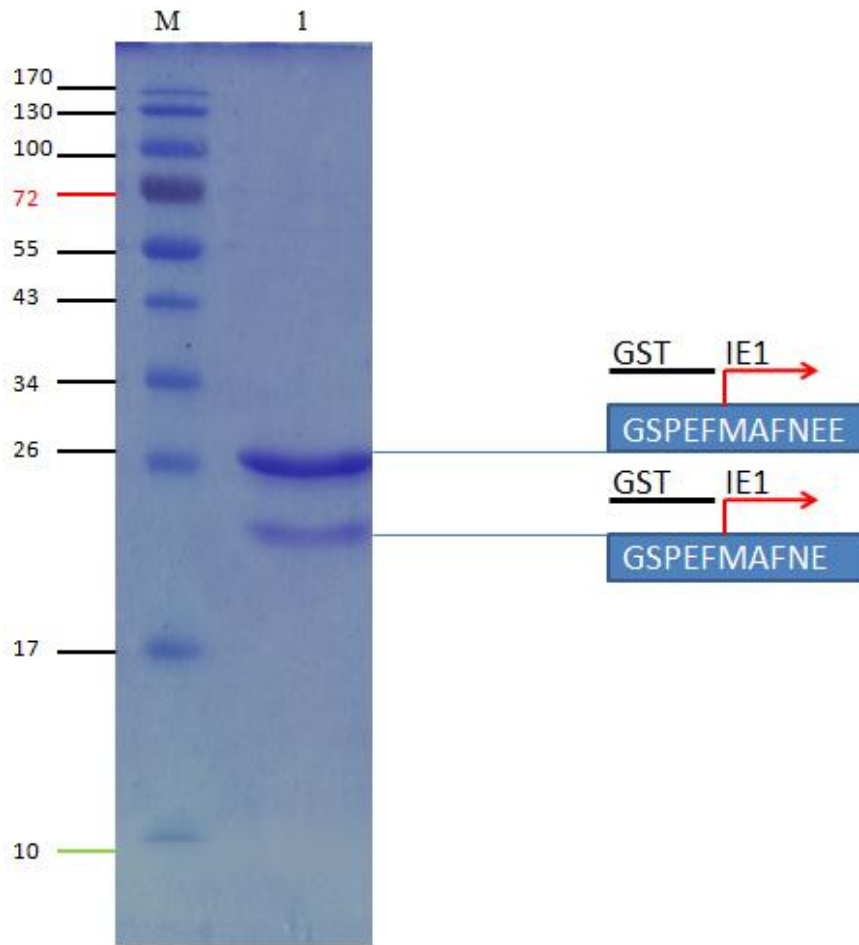
(A), 2  $\mu$ g IE1 was purified using non-glycerol buffer A; (B), 2  $\mu$ g IE1 was purified using buffer A containing 10% glycerol; (C), 2  $\mu$ g IE1 was purified using buffer A containing 20% glycerol. Lane M, low molecular weight protein markers (Biomax). Molecular weights of protein bands are shown in kDa; 15% gel was used and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.



**Fig. 2 SDS-PAGE profile of thrombin incubated with GST-IE1 under different temperature.**

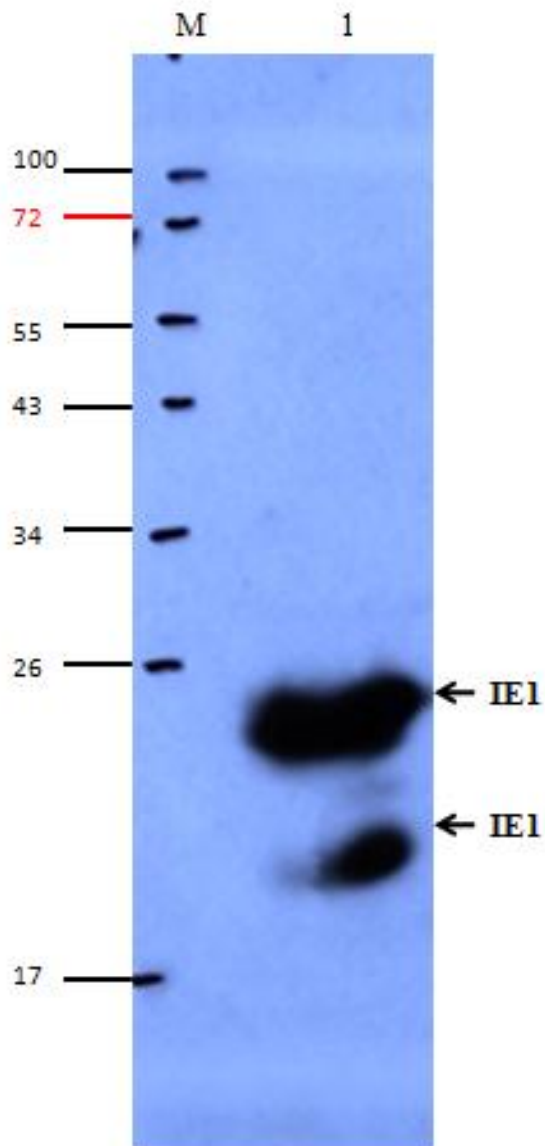
Lane M, low molecular weight protein markers (Bioman); Lane 1, 1  $\mu\text{g}$  GST-IE1 was incubated with thrombin 20 hrs under 4°C; Lane 2, 3  $\mu\text{g}$  GST-IE1 was incubated with thrombin 3 hrs under 20°C. Molecular weights of protein bands are shown in kDa; 15% gel was used and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.





**Fig. 3 SDS-PAGE profile of recombinant IE1 production and N-terminal sequence**

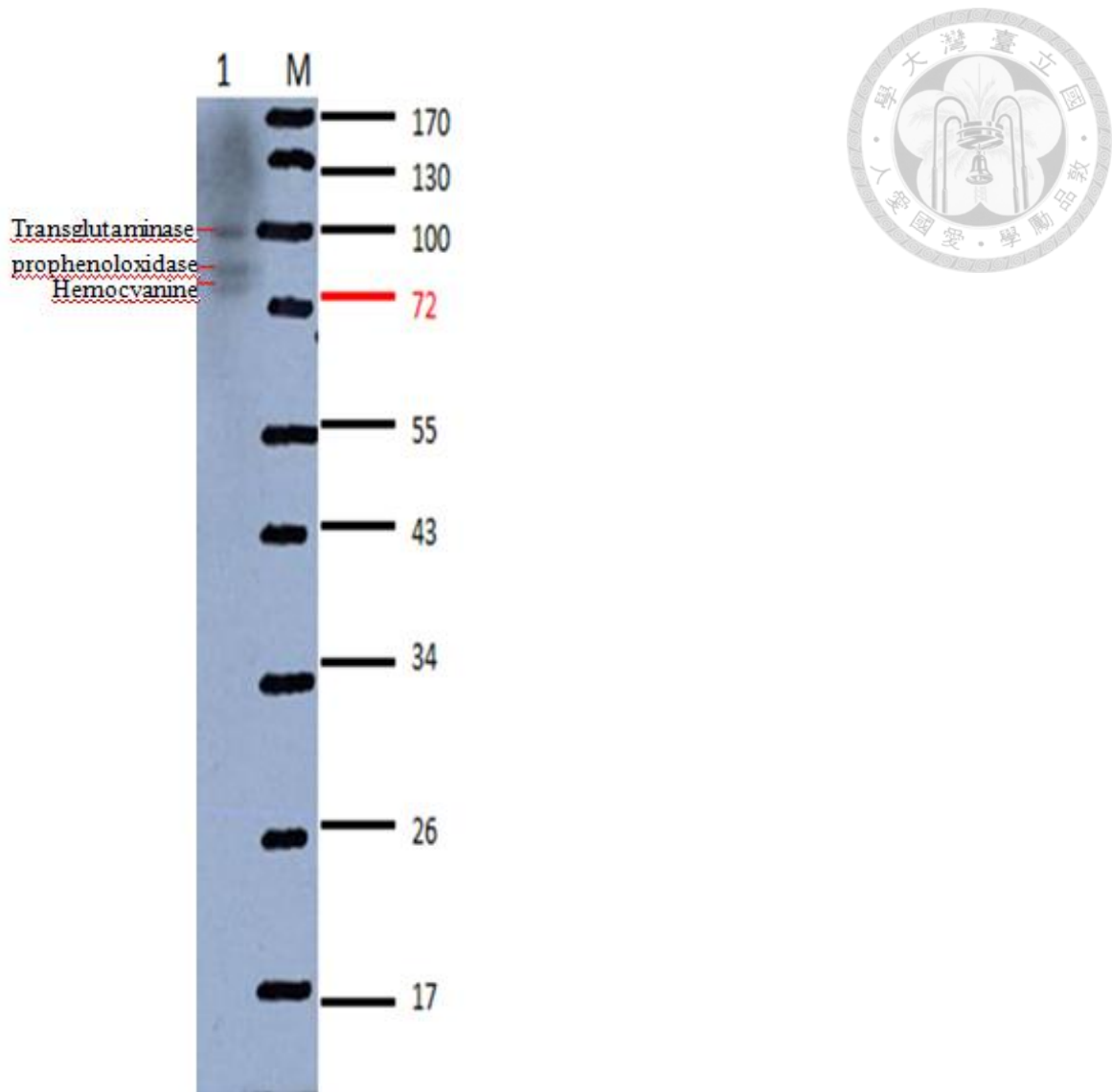
Lane M, low molecular weight protein markers (Biomax); Lane 1, 2  $\mu\text{g}$  IE1. N-terminal sequence identified the amino sequence of IE1, MAFNEE. Molecular weights of protein bands are shown in kDa; 15% gel was used and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.



**Fig. 4 Detection of IE1 production by western blot analysis.**

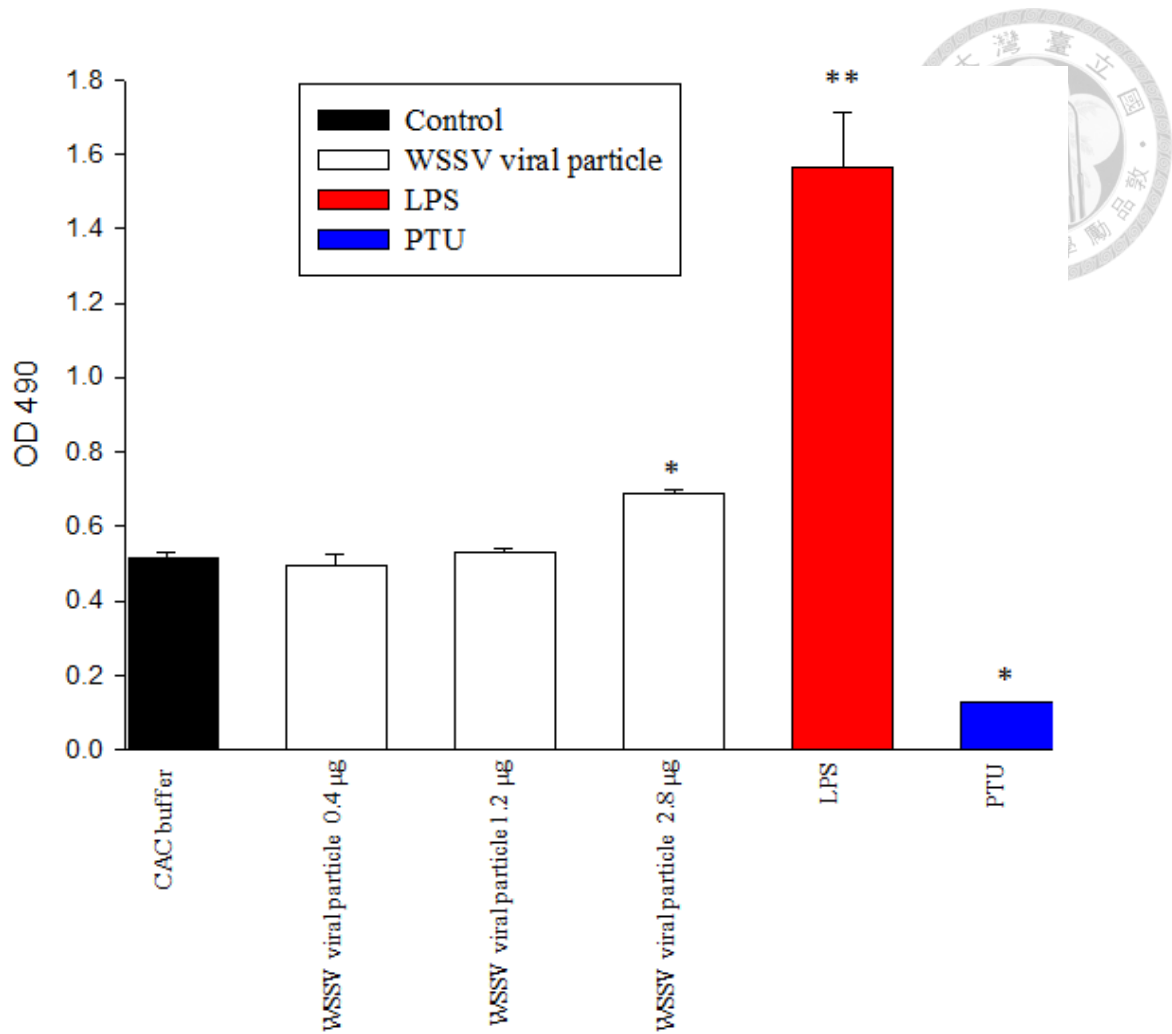
Lane M, low molecular weight protein markers (Biomax); Lane 1, 0.3  $\mu\text{g}$  IE1 was separated on 15% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Anti-IE1 polyclonal antibody was used to detect IE1 antigen. The arrows indicated 26 kD IE1.

Two protein species of 26 kD were visible.



**Fig. 5 Results from far-western blotting showed the binding protein of IE1 in hemocyte lysate of *Penaeus vannamei*.**

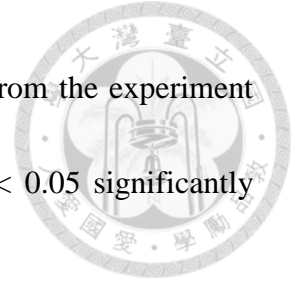
Lane M, low molecular weight protein markers (Biomann). Lane 1, 3  $\mu$ g hemocyte lysate protein was separated on 12.5% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane incubated with IE1 then probed with anti-IE1 antibody revealed three IE1-reactive bands.

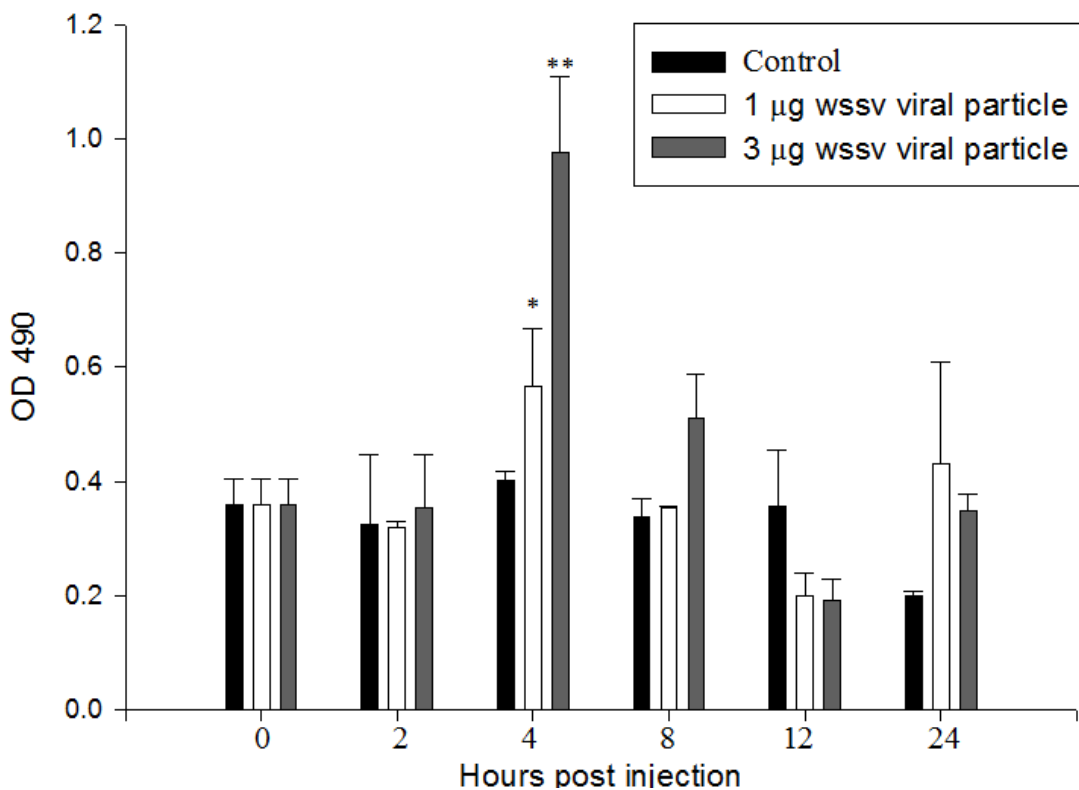


**Fig. 6 Stimulative effects of WSSV viral particle on phenoloxidase activity in the hemocyte lysate of *Penaeus vannamei*.**

The treatment and dosage of each column : the first to the sixth column, Control, hemocyte lysate prepared in CAC buffer only; WSSV viral particle, hemocyte lysate prepared in CAC buffer containing various viral particle at 0.4, 1.2, 2.8 µg ; LPS, hemocyte lysate prepared in CAC buffer treated with 30 µl LPS (3 mg/ml) ; PTU, hemocyte lysate prepared in CAC buffer treated with 30 µl 1mM PTU. Each treatment

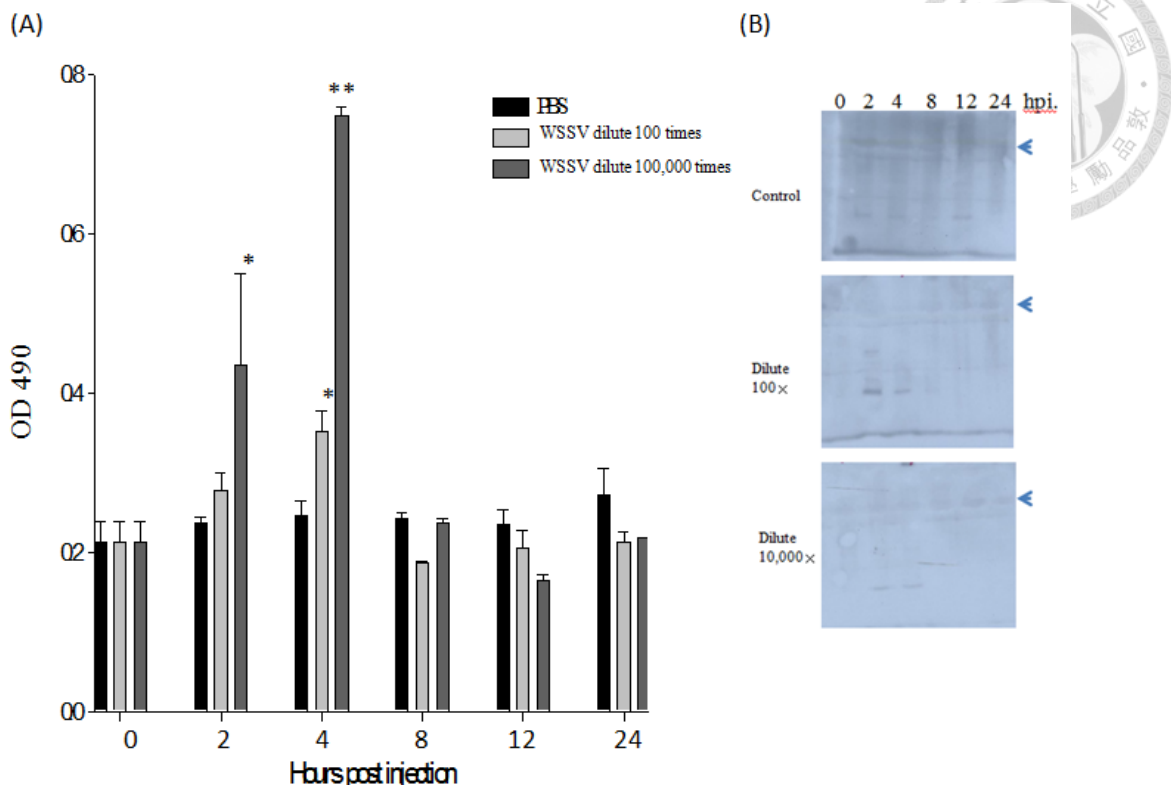
of phenoloxidase activity was detected after 10 mins. The results from the experiment ( $n = 9$ )  $\pm$  SD performed in triplicate are shown.  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$  significantly different compared with control by Student T-test.





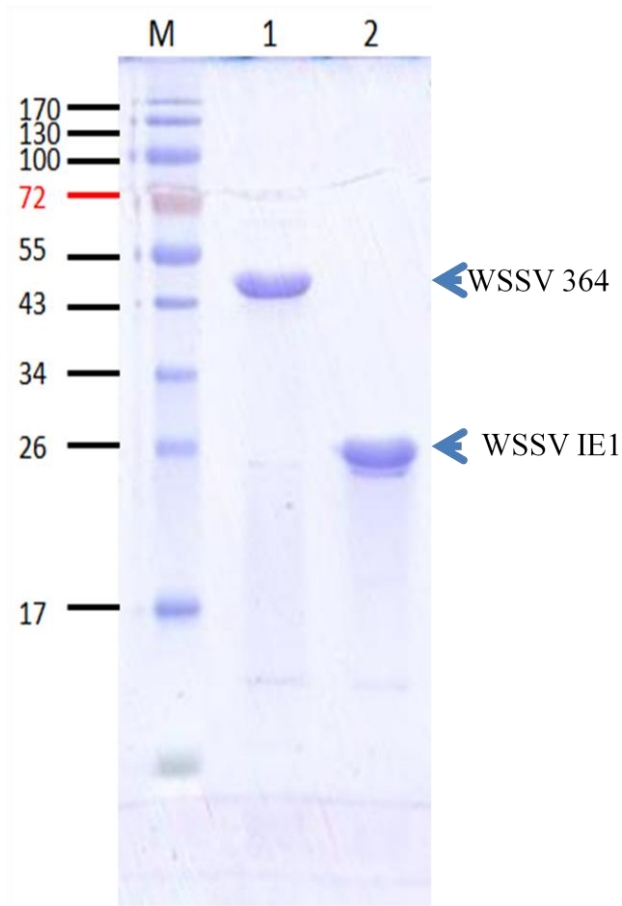
**Fig. 7 Temporal phenoloxidase activities in hemocyte of control and after WSSV viral particle injected *Penaeus vannamei*.**

At the indicated times post injection, total lysate proteins were extracted from hemocyte and analyzed for the phenoloxidase activity. Control , inject 60 µl PBS; 1µg WSSV viral particle, inject 1µg WSSV viral particle ; 3 µg WSSV viral particle, inject 3 µg WSSV viral particle. Phenoloxidase of each group was detected in 10 mins after extraction. The results from the experiment ( $n = 9$ )  $\pm$  SD performed in triplicate are shown.  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$  significantly different compared with control by Student T-test.



**Fig. 8 Temporal phenoloxidase activities in hemocyte of control and after WSSV injected *Penaeus vannamei* (A) detection of proPO by western blot analysis(B)**

(A) At the indicated times post injection, total lysate proteins were extracted from hemocyte and analyzed for the phenoloxidase activity. Control , inject 60  $\mu$ l PBS; WSSV dilute 100 times, inject 60  $\mu$ l ; WSSV dilute 100,000 times, inject 60  $\mu$ l. Phenoloxidase of each group was detected in 10 mins after extraction. The results from the experiment ( $n = 9$ )  $\pm$  SD performed in triplicate are shown.  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$  significantly different compared with control by Student T-test. (B) Western blot analysis quantified the proPO at the indicated times , 0, 2, 4, 8, 12, 24 hpi, post injection using proPO antibody.



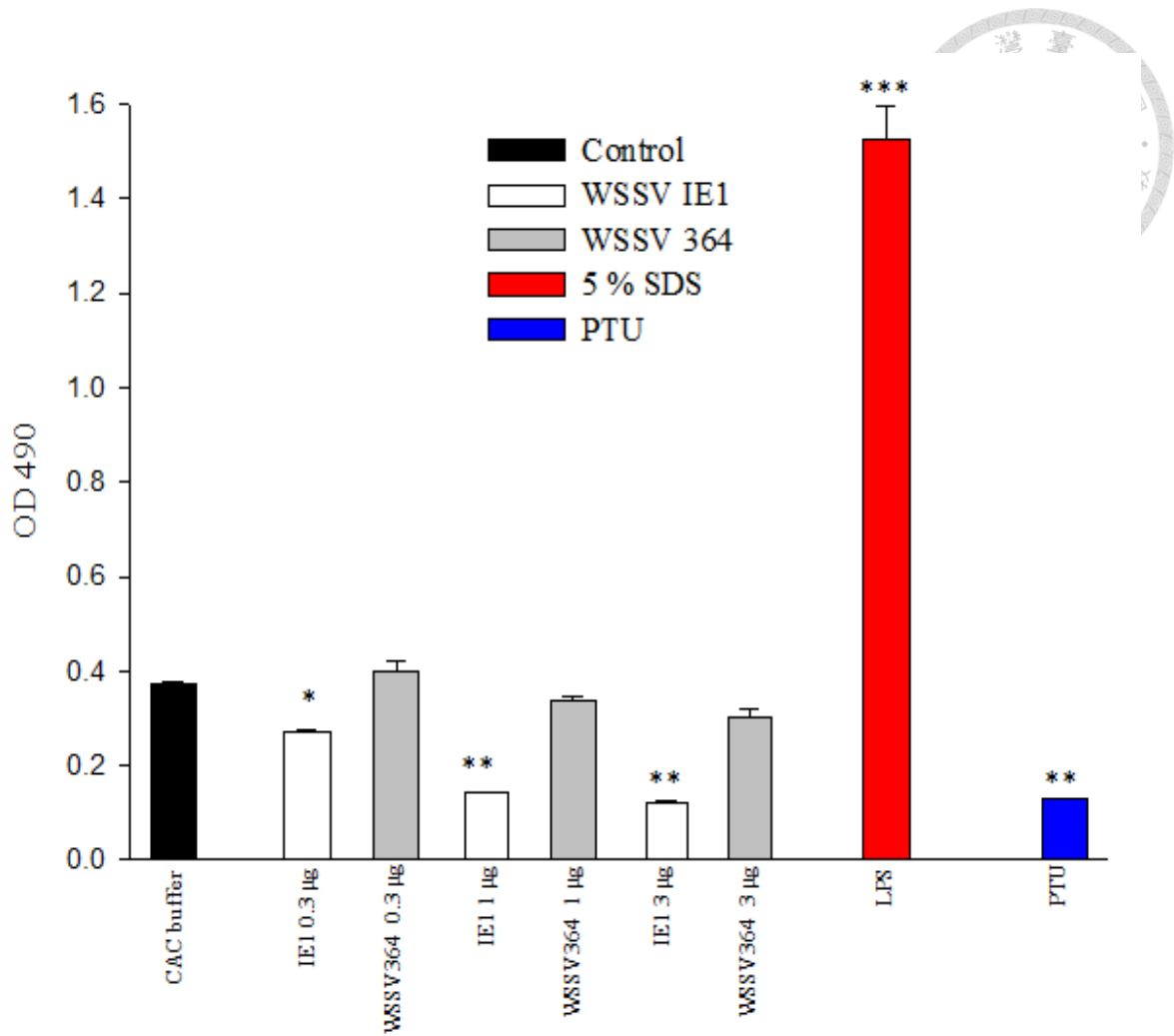
**Fig. 9 SDS-PAGE profile of recombinant WSSV 364 and WSSV IE1**

Lane M, low molecular weight protein markers (Biomax) ; Lane 1, 2  $\mu\text{g}$  WSSV 364 ;

Lane 2, 2  $\mu\text{g}$  WSSV IE1. Molecular weights of protein bands are shown in kDa; 15%

gel was used and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

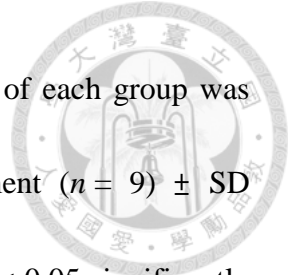


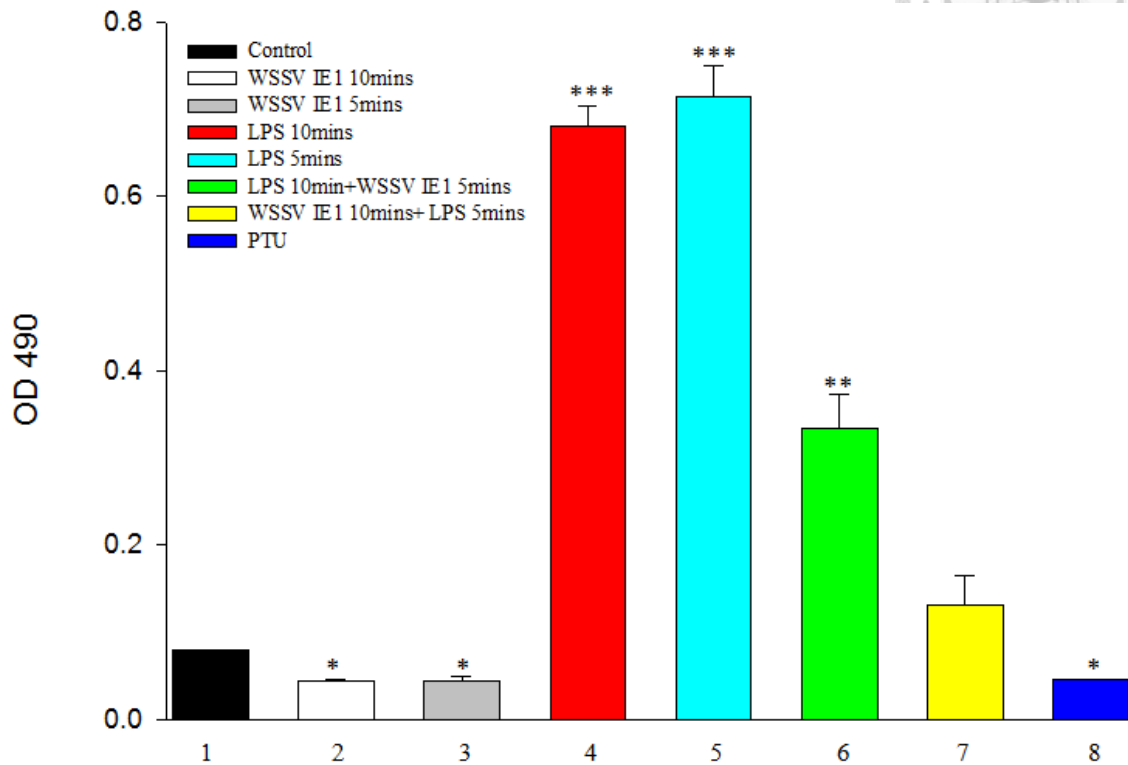


**Fig. 10** Suppressive effects of WSSV IE1 on phenoloxidase activity in the hemocyte lysate of *Penaeus vannamei*.

The treatment and dosage of each group : the first to the sixth group, Control, hemocyte lysate prepared in CAC buffer only; IE1, hemocyte lysate prepared in CAC buffer containing various dosage at 0.3, 1, 3 µg ; WSSV 364, hemocyte lysate prepared in CAC buffer containing various dosage at 0.3, 1, 3 µg ; LPS, hemocyte lysate prepared in CAC buffer treated with 30 µl LPS (3 mg/ml) ; PTU, hemocyte lysate prepared in


CAC buffer treated with 30  $\mu$ l 1mM PTU. Phenoloxidase activity of each group was detected after 10 mins treatment. The results from the experiment ( $n = 9$ )  $\pm$  SD performed in triplicate are shown. \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  significantly different compared with control by Student T-test.





**Fig. 11 Inhibition of phenoloxidase activity when IE1 was added to the pro-PO activation fraction before or after the elicitor**

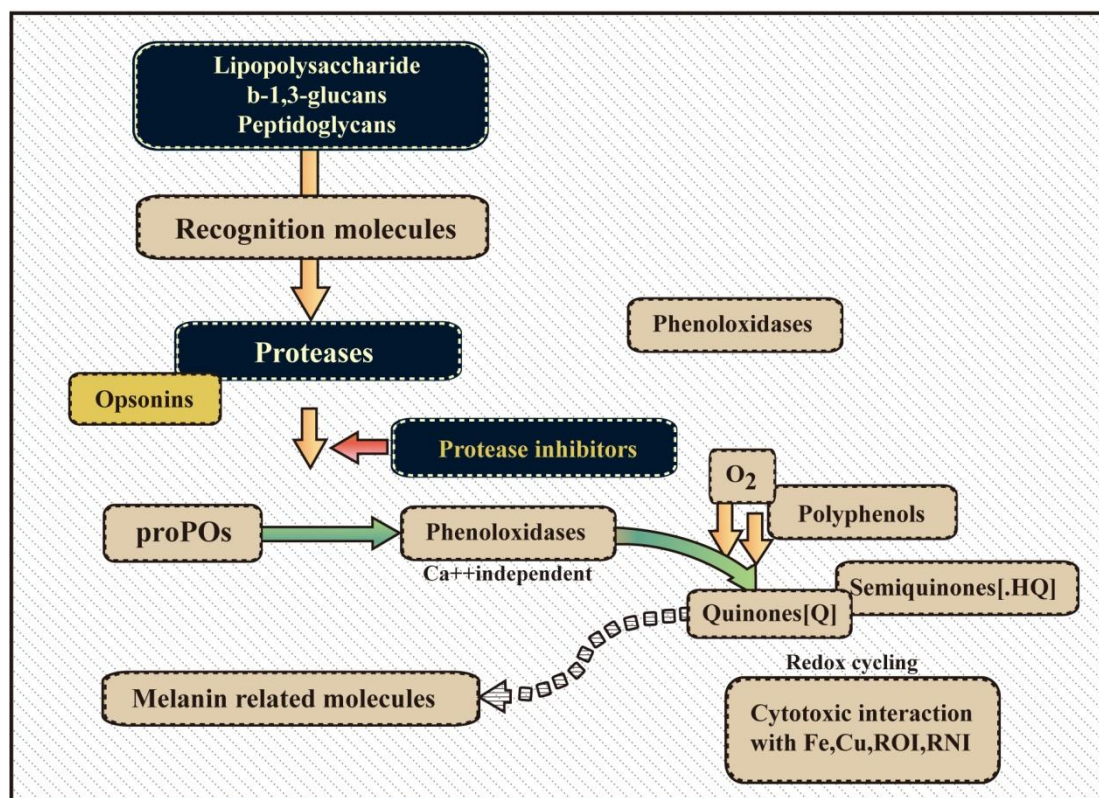
The treatment and dosage of each group : the first to the eighth group, column 1,control, hemocyte lysate prepared in CAC buffer only; column 2 and 3, IE1, hemocyte lysate prepared in CAC buffer containing 3  $\mu$ g IE1 in 10 mins and 5 mins ; column 4 and 5, LPS, hemocyte lysate prepared in CAC buffer treated with 30  $\mu$ l LPS (3 mg/ml) in 10 mins and 5 mins ; column 6, LPS + IE1, hemocyte lysate prepared in CAC buffer incubated with 30  $\mu$ l LPS (3 mg/ml) in 5 mins and then incubated with 3  $\mu$ g IE1 in 5



mins ; column 7, IE1 + LPS, hemocyte lysate prepared in CAC buffer incubated with 3  $\mu\text{g}$  IE1 in 5 mins and then incubated with 30  $\mu\text{l}$  LPS (3 mg/ml) in 5 mins; column 8, PTU, hemocyte lysate prepared in CAC buffer treated with 30  $\mu\text{l}$  1mM PTU. Phenoloxidase activity of each group was detected after 10 mins treatment. The results from the experiment ( $n = 9$ )  $\pm$  SD performed in triplicate are shown. \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  significantly different compared with control by Student T-test.



附錄一



Cammarata M and Parrinello N., ISJ. 2009; S67-S76.



**Table. 1 Buffer with various concentrations of Guanidine-HCl used in denaturing and renaturing.**

	Guanidine-HCl	6 M buffer	5 M buffer	4 M buffer	3 M buffer	2 M buffer	1 M buffer	0.5 M buffer	0 M buffer
100%	Glycerol (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
5 M	NaCl (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1 M , pH 7.5	Tris (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
0.5 M	EDTA (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
10%	Tween-20 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
8 M	Guanidine-HCl (ml)	18.75	15.625	12.5	9.375	6.25	3.125	1.5625	0
	Milk(g)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1 M , pH 7.5	DTT ( $\mu$ l)	25	25	25	25	25	25	25	25
	dd water (ml)	2.45	5.575	8.7	11.825	14.95	18.075	19.6375	21.2
Time / Temp		15mins/ RT	15mins/ RT	15mins/ RT	15mins/ RT	15mins/ RT	15mins/ 4 °C	15mins/ 4 °C	O/N / 4 °C

Buffer should be freshly prepared

Wu *et al.*, Nature Protocol. 2007; 2 : 3278-3284.