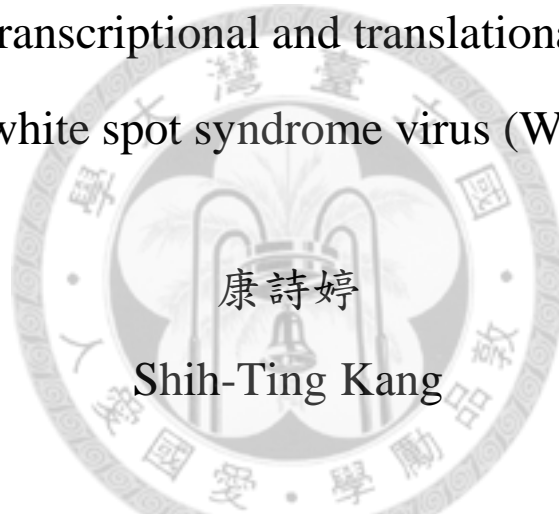


國立臺灣大學生命科學院動物學研究所
博士論文

Institute of Zoology
College of Life Science
National Taiwan University
Doctoral Dissertation

蝦白點症病毒基因轉錄及轉譯機制之研究

Study of the transcriptional and translational mechanisms
of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes



康詩婷

Shih-Ting Kang

指導教授：郭光雄 博士

Advisor: Guang-Hsiung Kou, Ph.D.

指導教授：羅竹芳 博士

Advisor: Chu-Fang Lo, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July 2012

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

蝦白點症病毒基因轉錄及轉譯機制之研究

Study of the transcriptional and translational mechanisms of
shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes

本論文係康詩婷君 (D94b41007) 在國立臺灣大學動物
所學系、所完成之博士學位論文，於民國 101 年 7 月 20 日
承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

郭文雄

(指導教授)

蘇竹芳

(指導教授)

呂偉宏

郭文雄

李冠展

王涵春

動物學研究所所長

潘建源

(簽名)

誌 謝

在博士班的求學生涯中，首要感謝郭光雄教授以及羅竹芳教授給予機會讓我能夠進入 R818 甲殼類病毒學實驗室，除了在遇到研究瓶頸時耐心指導學生如何突破困境外，也常關懷學生日常生活，感激之情溢於言表。感謝口試委員趙裕展教授、呂健宏教授、王涵青教授給予本論文的建議與指正，感謝陳歷歷教授平日在研究上之教導，同時亦感謝 Paul Barlow 在英文寫作上不吝給予協助與修正。

能夠進入 818 實驗室是一件很幸運的事情，郭老師及羅老師以自身豐富的研究經驗帶領學生進行研究，除了時常關心學生的實驗進展外，還給予充分的研究資源，讓學生能毫無後顧之憂地沉浸於研究之中。818 實驗室的學長姐皆為值得學習的優良典範，在實驗上傾囊相授不藏私，細心指導幫助後輩解決問題，在此感謝所有指導過我的前輩們。而學弟妹們也樂於給予實驗上之協助，有你們的幫忙讓我能夠順利完成許多龐大又複雜的活體實驗，與你們一起熬夜收樣本雖然辛苦卻是我最開心的回憶。感謝曾經待過 818 的每一個成員，很開心我能在這個具有人情味又溫暖的大家庭中學習成長，完成博士學位，你們每一個人的好我將永遠銘記在心。

感謝我的父母及弟弟、妹妹在我念博士班期間給予最大的包容及支持，感謝我的老公在假日時還犧牲休息時間陪著我一起做實驗，沒有你們的鼓勵與加油我將無法順利完成學業，謹以本論文獻給我最愛的你們。

目 錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
第一章、文獻探討.....	1
第一節、真核細胞之轉譯調控機制.....	1
第二節、蝦白點症病毒.....	4
第二章、白點症病毒廣泛使用多順反子mRNA與IRES進行結構性蛋白基因之轉錄與轉譯作用.....	7
第一節、中文摘要.....	7
第二節、英文摘要.....	8
第三節、前言.....	9
第四節、材料與方法.....	12
第五節、結果.....	25
第六節、討論.....	34
第七節、圖表與說明.....	38
第三章、白點症病毒利用IRES序列調控高表現基因 <i>icp35</i> 之轉譯作用.....	50
第一節、中文摘要.....	50
第二節、英文摘要.....	52
第三節、前言.....	53

第四節、材料與方法.....	55
第五節、結果.....	68
第六節、討論.....	77
第七節、圖表與說明.....	83
參考文獻.....	98



第一章、文獻探討

第一節、真核細胞之轉譯調控機制

1. 帽依賴型轉譯作用 (Cap-dependent translation)

蛋白質合成是一個複雜且精密的過程，轉譯作用 (translation) 主要包括起始 (initiation)、延長 (elongation) 以及終止 (termination) 三大階段，其中需要許多轉譯起始因子 (eukaryotic initiation factors, 簡稱 eIF) 以及核糖體 (ribosome) 共同合作以完成上述過程。真核細胞的基因轉譯調控機制主要為帽依賴型轉譯作用 (Cap-dependent translation)，其 mRNA 在 5' 端有一個 稱為帽 (cap) 的 m^7GpppN 結構，可被轉譯起始因子 eIF4E 辨識，進而與 eIF4A、eIF4G 在 mRNA 的 5' 端形成 eIF4F cap-binding complex；而 40S 核糖體次單位 (ribosomal subunit) 會先與 eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} ternary complex 結合形成 43S preinitiation complex；當 43S preinitiation complex、eIF3 與 eIF4F cap-binding complex 在 mRNA 上結合後，會透過 eIF1 與 eIF1A 沿著 mRNA 進行掃描 (scanning)，在遇到最接近 5' 端的第一個起始密碼 AUG (initiation codon) 時形成 48S complex，再與 60S 核糖體次單位共同形成 80S 核糖體，並開始進行轉譯作用 [1-3]。接著，核糖體會沿著 mRNA 進行多胜肽鏈 (polypeptide chain) 的延長作用 (elongation)，一旦在轉譯過程中遇到終止密碼 TAA、TAG、TGA (stop codon)，多胜肽鏈會立即從核糖體釋放，此時核糖體亦會脫離 mRNA，轉譯作用隨即終止 (termination) [4]。

2. 內部核糖體進入位置 (Internal ribosome entry site)

真核細胞之轉譯機制除了上述帽依賴型轉譯作用外，尚可利用非帽依賴型轉譯作用 (cap-independent translation) 進行蛋白合成。內部核糖體進入位置 (internal ribosome entry site, 簡稱 IRES) 屬於非帽依賴型轉譯作用，其位於起始密碼 ATG 的上游或附近，不需要透過 mRNA 的 5' 端帽結構或是某些蛋白轉譯相關因子之幫助，便可直接以本身 RNA 序列吸引 40S ribosome subunit 與其結合，由 mRNA 的內部進行轉譯起始作用並合成蛋白 [5-7]。

IRES 轉譯作用最早於 1988 年在小兒麻疹病毒 (poliovirus) 中被發現 [7]，該病毒之基因體為正股 RNA (positive single-strand RNA)，在 5' 端並無帽結構，無法於宿主細胞中利用帽依賴型轉譯作用，因此在 5' 端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 具有可形成穩定二級結構之 IRES 序列，用以合成病毒蛋白。後續如 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV)、鼻病毒 (rhinovirus) 等陸續被發現可利用此機制使宿主細胞傾向合成病毒蛋白。研究報導顯示，在極度相近的病毒間，例如 HCV 與豬瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) [8, 9] 或是腦心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV) 與其他心病毒屬 (Cardiovirus) 之病毒 [10]，其 IRES 序列在初級核苷酸序列上雖無相似性，但在 RNA 二級結構具有相似性 [11, 12]；除此以外，不同病毒間之 IRES 序列的核苷酸序列、長度以及二級結構之差異極大，難以由電腦預測判斷該基因上游是否具有 IRES 序列，必須透過嚴謹的實驗加以鑑定。由於缺乏序列相似性，因此普遍而言 IRES 序列的共通點被認為是可以形成一個穩定而獨特之 RNA 二級結構，其在功能上可取代帽結構或部分 eIF 分子，並直接與核糖體次單位產生交互作用，在 mRNA 內部進行蛋白合成 [13-15]。

雖然不同病毒對於宿主之依賴程度有所不同，但不論是 DNA 或 RNA 病毒，皆須依賴宿主細胞所提供的核苷酸及胺基酸等原料、轉錄及轉譯等相關因子及核糖體等進行其結構性及非結構性蛋白質合成 [16]。而病毒對於宿主的轉譯依賴性 (translational dependence) 使其演化出與宿主不同的轉譯策略 (translational strategy)，能更有效率地讓宿主細胞傾向選擇轉譯病毒之 mRNA [17]。例如 poliovirus 或 rhinovirus 等在感染宿主細胞後，會利用病毒蛋白 protease 2A 將負責集成 mRNA-ribosome initiation complex 的 eIF4G 蛋白水解成 amino-terminal polypeptide 以及 carboxyl-terminal fragment 兩部分，進而破壞宿主帽依賴型轉譯作用，造成宿主蛋白合成關閉 (host shutoff)，但病毒 RNA 仍可利用 IRES 進行轉譯作用而不受影響 [18-21]。

真核細胞在某些狀況下如細胞分裂 (mitosis)、細胞分化 (cell differentiation) 或遭受逆境 (stress) 如病毒感染、缺氧 (hypoxia)、營養受限 (nutrient limitation) 等狀況下，帽依賴型轉譯作用之效率會受到抑制，此時細胞的一些重要基因如原致癌基因 (proto-oncogenes) *c-myc* [22]、逆境蛋白 (stress response protein) Bip [23]、細胞凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis) XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) [24] 等會由 mRNA 內部進行轉譯起始作用，以維持上述蛋白之合成。這些蛋白可以保護細胞避免受到逆境的傷害，或避免其走向細胞凋亡 (apoptosis) [25-27]。綜觀大部分病毒之 IRES 序列多具有穩定之 RNA 二級結構，然而最近的研究顯示細胞之 IRES 序列不同於病毒，雖然缺乏較穩定的二級結構卻依然具有 IRES 活性 [15]。例如，將 XIAP 的 IRES 序列進行點突變 (point mutation) 改變其二級結構，卻發現此改變並不影響 IRES 之活性 [28]。

第二節、蝦白點症病毒 (Shrimp white spot syndrome virus)

白點症 (White spot disease, WSD) 為目前影響養蝦產業經濟最為嚴重的蝦類疾病之一，其病原體為白點症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)，受到病毒感染之蝦體遭遇到生理壓力時，會造成體內潛伏之病毒大量爆發，自觀察到甲殼上沈積之白點後，不論是幼蝦或成蝦在一週內會相繼死亡，且死亡率高達 100% [29]。白點症病毒的宿主主要為甲殼類動物 (Crustacean)，包括草蝦 (*Peneus monodon*)、斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*)、白蝦 (*Litopenaeus vannamei*)、中國對蝦 (*P. chinensis*) 以及淡水長腳大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 等重要經濟養殖蝦種，其他諸如紅星梭子蟹 (*Portunus sanguinolentus*)、逍遙鰓頭蟹 (*Calappa philarigus*) 等野生或養殖蟹類，橈腳類 (*Copepoda: Schmackeria dubia*)、輪蟲之休眠卵或豐年蝦卵 (*Artemia cysts*) 等，都會受到白點症病毒之感染 [30-34]。

白點病最顯著之病理特徵為在受到感染之甲殼上會出現白點或白斑，直徑大小約為 0.2-2 mm，尤其以頭胸甲之症狀最為明顯 [35-37]。自 1992 年於福建省漳浦地區爆發疾病以後，便迅速蔓延至世界各地，不僅使得台灣養蝦產業年產量驟減以致一蹶不振，對於全球之養蝦產業亦造成極為嚴重的經濟損失與威脅 [29, 35, 38-44]。

白點症病毒為具有外套膜 (envelope) 之橢圓形病毒，其大小約為 80-120 × 250-380 nm，而核蛋白鞘 (nucleocapsid) 之大小約為 58-67 × 330-350 nm，在電顯下可觀察有些病毒顆粒之一端具有尾部突起之構造 (tail-like projection) [45]。白點症病毒之基因體為大型雙股螺旋 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)，目前已有三株病毒分離株之基因體被定序，分別為泰國病毒株 (WSSV-TH, GenBank accession no. AF369029)、中國大陸病毒株

(WSSV-CN, GenBank accession no. AF33209) 以及臺灣分離株 (WSSV-TW, GenBank accession no. AF440570) [46-48], 其基因體大小依序為 292,967 bp、305,107 bp 以及 307,287 bp。根據基因體分析及序列比對結果, 顯示此病毒與目前已知任何病毒皆無相近之親緣關係, 有鑑於其獨特性, 國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 於 2004 年設立新病毒科 *Nimaviridae* 及新病毒屬 *Whispovirus*, WSSV 為其下唯一之代表種 [46, 47, 49-52]。

根據電腦預測結果顯示, 若設定每個開放譯讀區 (open reading frame, 簡稱 ORF) 之長度皆大於 60 個胺基酸序列以上, 在臺灣分離株可預測到 532 個開放譯讀區, 71.3 % 在其轉譯終點前後具有聚腺嘌呤訊號 (poly(A) signal, AATAAA), 但 28.2 % 在其轉譯終點前後無此訊號之存在 [53], 推測其可能與其下游之開放譯讀區共用同一個聚腺嘌呤訊號及加聚腺嘌呤位置 (poly(A) addition site), 並轉錄出包含有兩個開放譯讀區或以上之多順反子 mRNA (polycistronic mRNA)。我們進一步分析白點症病毒結構性蛋白及非結構性蛋白基因在基因體上之分佈位置, 可以看到兩個或三個以上基因之位置非常相近, 且具有同一轉錄方向, 推測其可能形成同向轉錄基因群 (gene cluster)。其中, 有些同向基因轉錄群如 *vp31/vp39b/vp11*、*vp22/vp39a/wssv363/vp51c* 與 *vp60b/wssv478/wssv479/vp28* 等, 排列於前的基因在轉譯終點前後並無聚腺嘌呤訊號, 只有排列在最後之基因其轉譯終點前後才有此訊號之存在, 因此我們進一步推測這些同向轉錄基因群極有可能利用位於第一個基因上游的啟動子 (promoter) 產生一條多順反子 mRNA, 再以非帽依賴型轉譯機制 (cap-independent translation mechanism) 如轉譯作用再起始 (translation reinitiation)、內部核

醣體進入位置 (internal ribosome entry site, 簡稱 IRES) 等進行蛋白合成，同時產生不同的結構性或非結構性蛋白。

本實驗室蔡等人 [53] 經由液相層析串聯式質譜儀 (LC-nanoESI-MS/MS) 之分析結果得知，白點症病毒目前約有 39 個以上之結構性蛋白質，並可將這些結構性蛋白根據其所在位置分為以下三種屬性不同之蛋白族群 [54]：外套膜蛋白 (envelope protein)，如 VP19、VP28、VP31 等，其位於外套膜上；核蛋白鞘蛋白 (nucleocapsid protein)，如 VP664、VP15、VP60B 等，此類蛋白位於核蛋白鞘上；夾層蛋白 (tegument protein)，如 VP26、VP39A 等，此類蛋白位在外套膜與核蛋白質鞘之間。

本論文主要針對白點症病毒結構性蛋白或非結構性蛋白基因之同向轉錄基因群進行轉錄及轉譯分析，並深入探討 *vp31/vp39b/vp11* 與包含 *wssv023/wssv019(icp35)* 之基因群，以得知白點症病毒是否會採取非帽型轉譯機制如 IRES 等進行轉譯作用合成蛋白質，進而瞭解白點症病毒基因轉錄及轉譯機制之特殊性。

第二章、白點症病毒廣泛使用多順反子 mRNA 與 IRES 進行結構性蛋白基因之轉錄與轉譯作用

第一節、中文摘要

根據白點症病毒台灣株基因體之分析顯示，許多結構性蛋白基因及非結構性蛋白基因之位置排列極為相近，且具有同一轉錄方向，推測這些基因可能形成同向轉錄基因群 (gene cluster)。本論文利用北方轉印法 (Northern blot analysis) 進行分析，結果證實至少有四個基因群會轉錄出多順反子 mRNA，因此本研究針對其中一個基因群 *vp31/vp39b/vp11* 之轉錄及轉譯機制進行深入探討。*vp31/vp39b/vp11* 基因群會產生兩個轉錄本，分別為包含三個基因的 3.4-kb 多順反子 mRNA，以及僅帶有 *vp11* 的單順反子 mRNA (1.6 kb)；然而，沒有 *vp39b* 之單順反子 mRNA 被偵測到。根據試管內轉錄及轉譯反應 (TNT) 以及試管內轉錄反應 (*in vitro* translation) 之分析結果，顯示 *vp39b* 之轉譯作用與 *vp31* 並無直接關係，也排除 *vp39b* 蛋白合成是經由轉譯作用再起始 (translation reinitiation) 所調控之可能性。本研究以雙冷光酵素報導基因分析系統 (dual luciferase reporter assay) 證實在 *vp31/vp39b* 編碼區內 (coding region) 具有一特別之 IRES 序列，負責調控雙冷光酵素報導基因載體中位於其下游之螢火蟲冷光酵素 (firefly luciferase) 的表現。*vp31/vp39b/vp11* 之研究成果不僅在探討 WSSV 特殊轉譯及轉錄機制的研究領域具有代表性，據此成果我們亦可進一步推測其他會產生多順反子 mRNA 的結構性/非結構性蛋白基因群也有可能利用 IRES 序列調控下游基因之轉譯作用。

關鍵詞：多順反子 mRNA；內部核糖體進入位置；白點症病毒；基因群；草蝦

第二節、英文摘要

The genome of the white spot syndrome virus (WSSV) Taiwan isolate has many structural and non-structural genes that are arranged in clusters. Screening with Northern blots showed that at least four of these clusters produce polycistronic mRNA, and one of these (*vp31/vp39b/vp11*) was studied in detail. The *vp31/vp39b/vp11* cluster produces two transcripts, including a large 3.4-kb polycistronic transcript of all three genes. No monocistronic *vp39b* mRNA was detected. TNT (coupled transcription and translation) and *in vitro* translation assays showed that *vp39b* translation was independent of *vp31* translation, and that ribosomal reinitiation was not a possible mechanism for *vp39b*. An unusually located IRES (internal ribosome entry site) element was identified in the *vp31/vp39b* coding region, and this region was able to promote the expression of a downstream firefly luciferase reporter. We show that *vp31/vp39b/vp11* is representative of many other WSSV structural/non-structural gene clusters, and argue that these are also likely to produce polycistronic mRNAs and that use an IRES mechanism to regulate their translation.

KEYWORDS: polycistronic mRNA; internal ribosome entry site (IRES); white spot syndrome virus (WSSV); gene cluster; *Penaeus monodon*

第三節、前言

真核生物具有兩種轉譯機制可進行蛋白合成，分別為帽依賴型 (cap-dependent) 或是非帽依賴型轉譯作用 (cap-independent translation)。一般而言，真核細胞的 mRNA 皆採取帽依賴型轉譯作用，此種轉譯作用首先需要透過 eIF4F (由 eIF4E、eIF4A 與 eIF4G 組成之複合物) 辨識 mRNA 5' 端的帽結構 (cap structure) m^7GpppN ，接著再吸引由 40S 核糖體次單位與 eIF2-GTP-tRNA_i^{Met} ternary complex 等組成的 43S pre-initiation complex 共同結合到 mRNA 上，之後 43S pre-initiation complex 便可開始沿著 mRNA 進行掃描 (scanning)，當其遇到第一個轉譯起始密碼 (通常為 AUG) 後會形成 48S complex，而後 60S 核糖體次單位會受到吸引再與其結合形成 80S initiation complex，則轉譯作用便可以開始進行 [1, 2]。

非帽依賴型轉譯作用首先在小兒麻痺病毒 (poliovirus) 中被發現，此病毒之基因體為單股正向 RNA (single-stranded positive-sense RNA)，其 5' 端並無帽結構，因此需要透過非帽依賴型之 IRES 轉譯機制幫助其在宿主細胞中合成病毒蛋白 [7]。後續研究也發現其他正股 RNA 病毒如 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) [55]、腦心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV) [56] 等具有 IRES 序列。此外，研究也陸續發現在真核細胞內某些與細胞週期 (cell cycle) 或是細胞生存 (cell survival) 或死亡 (death) 等有關的重要調節基因如 p53、XIAP、*c-myc* 也受到 IRES 之調控 [27]。Bielecki 等人 (2001) 首度證明 DNA 病毒可以利用 IRES 轉譯機制，此病毒為卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV)。以往所鑑定之 IRES 序列多位於 5' UTR，KSHV IRES 序列是第一次被發現位於 vCyclin 基因之編碼區內，並負責開啟下游 vFLIP 基因之轉

譯作用，推測此種 IRES 之調控機制可能不同於位於 5' TUR 之 IRES [57-59]。目前僅有少數 DNA 病毒被發現利用 IRES 轉譯機制調控病毒蛋白之合成，例如單純皰疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 之 thymidine kinase 基因 [60]、猴病毒 40 (simian virus 40, SV40) 的結構性蛋白基因 *vp3* [61]，以及白點症病毒 (white spot syndrome virus; WSSV) 的結構性蛋白基因 *vp28* [62] 等，這些基因上游皆具有 IRES 序列。

利用電子顯微學技術可觀察到 WSSV 外觀呈現橢圓形 (ellipsoid)、具有外套膜 (enveloped)，在病毒顆粒某一端有尾狀突起構造 (tail-like projection)，且其基因體大小約為 300 kbp，屬於大型雙股 DNA 病毒 [45]。WSSV 主要有三個病毒分離株，分別為大陸株 (WSSV-CN, GenBank accession no. AF332093) [47]、台灣株 (WSSV-TW, GenBank accession no. AF440570) [46]，以及泰國株 (WSSV-TH, GenBank accession no. AF369029) [48]，各基因體皆已解序完成。WSSV 台灣株根據電腦軟體預測結果顯示，大於 60 個胺基酸序列以上的 open reading frame (ORF) 共有 532 個，其中大約 30% 的 ORF 在轉譯終止密碼 (stop codon) 前後具有聚腺嘌呤訊號 (polyadenylation signal, AATAAA)。根據本實驗室之研究成果顯示，WSSV 至少有 39 個結構性蛋白，其中具有聚腺嘌呤訊號的結構性蛋白基因約有 24 個 (60%)，其餘 15 個則無此訊號 [53]；觀察 WSSV 基因體上結構性蛋白基因的相對分布位置，可看到這些基因隨機分布於基因體上，但其中某些基因的位置及距離非常接近，並且具有相同的轉錄方向，極有可能形成同向轉錄基因群。此外，分析其中幾個基因群如 *vp31/vp39b/vp11*、*vp22/vp39a/wssv363/vp51c* 以及 *vp60b/wssv478/wssv479/vp28* 等，可看到聚腺嘌呤訊號僅存在於這些基因群內最後一個基因的 3' UTR，排列於前的基因皆無此訊

號。因此，我們推測上述基因群可能會產生一條長的多順反子 mRNA (polycistronic mRNA) 並共用同一個聚腺嘌呤訊號。

本實驗室諸多研究報導已證實 WSSV 會轉錄出多順反子 mRNA，例如利用 *wssv019* 反向 RNA 探針 (riboprobe) 進行北方轉印法 (Northern blot analysis)，可以偵測到兩個轉錄本，分別為 5.5 kb 之多順反子 mRNA 以及 1.3 kb 之單順反子 mRNA [46]；利用 *ribonucleotide reductase 2 (rr2)* 反向 RNA 探針可以偵測到 *wssv237/wssv240/wssv243 (rr2)* 基因群具有兩個轉錄本，各為 4.5 kb 之多順反子 mRNA 以及 1.4 kb 之單順反子 mRNA [49]；*protein kinase 1* 反向 RNA 探針亦可偵測到兩個轉錄本，大小各為 5.7 kb 之多順反子 mRNA 以及 2.7 kb 之單順反子 mRNA [50]。

本論文首先利用北方轉印法證實下列基因群 *vp60b/wssv478/wssv479/vp28*、*vp31/vp39b/vp11*、*wssv130/wssv133/vp36a* 以及 *vp36b/vp51b/vp38a* 可產生多順反子 mRNA。為了研究這些會產生多順反子 mRNA 的基因群是否有可能利用特殊的非帽型轉譯作用合成病毒蛋白，我們選擇其中一個結構性蛋白基因群 *vp31/vp39b/vp11* 進行深入探討，以期了解 WSSV 結構性蛋白之轉錄及轉譯機制。

第四節、材料與方法

1. 白點症病毒液之製備及人工注射感染試驗

將保存於 -80°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，置於預冷之研鉢中，每克組織加入 9 ml 0.9% 氯化鈉 (NaCl) 溶液研磨之，使其均質化 (homogenization)，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°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 20 g 注射約 50 μl 之稀釋病毒液，在第四及第五體節的之肌肉部位注射之，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 (PBS) 5 倍稀釋後，分裝於離心管中，並置於 -80°C 保存之，此血淋巴液即為日後人工感染之病毒液原液。

本實驗所選用之草蝦來自於宜蘭養殖池，選取平均體重約為 30-40 g 之草蝦以進行人工感染試驗。將嚴重感染草蝦之血淋巴液自 -80°C 冰箱取出，以 PBS 稀釋 1000 倍，此即為人工感染試驗之病毒液，將此病毒液注射到第四及第五體節之肌肉部位以進行人工感染。收取未感染及感染後不同時間點之蝦體組織 (0 [未感染]、2、4、6、8、12、18、24、36 及 60 hr p.i., hours post infection)，利用火焰燒紅消毒之鑷子分別將蝦的鰓、泳足、步足、表皮、肌肉、淋巴、胃、肝胰腺及心等器官取出，儘速放於液態氮中保存之，以供未來抽取 RNA 或萃取蛋白質。同時收取蝦體一隻步足樣本，置於 1.5 ml 微量離心管中，並保存於 -20°C ，可抽取 DNA 以進行病毒帶原程度之檢測。

2. 純化白點症病毒顆粒及結構性蛋白分離技術

本試驗使用之病毒液，其純化過程係依照 Xie 等人 (2006) 所發表之方法 [63]。將嚴重感染草蝦之血淋巴液自 -80°C 冰箱取出，以 PBS 稀釋後，利用孔徑為 $0.45\ \mu\text{m}$ 之濾膜過濾，將此病毒液注射到 20-25 g 之健康螯蝦 (crayfish, *Procambarus clark*) 之第二及第三體節之肌肉部位，以進行人工感染。主要實驗步驟簡述如下，於人工感染七天後，將 5-6 隻瀕死螯蝦之肝胰腺去除，其餘所有組織加入含有蛋白抑制劑 (protease inhibitor [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, and 1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$]) 之 TNE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) 中，並以均質機進行均質化作用 (homogenization)，接著在 4°C 以 $3,500 \times g$ 離心 5 分鐘，收取第一次上清液保存之。將剩餘之組織沉澱物再次進行均質化後收取第二次上清液，將兩次上清液合併，利用尼龍網 (400 mesh nylon net) 進行過濾後，以 $30,000 \times g$ 離心 30 分鐘。離心完成後，小心倒去上清液，將上層之粉紅色鬆散層 (upper loose layer) 以巴式吸管 (Pasteur pipette) 小心沖洗，並將下層之灰色緊實層 (lower compact layer) 重新懸浮於 TM 緩衝液中 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7.5)，再以 $3,000 \times g$ 離心 5 分鐘。接著收取上清液，以 $30,000 \times g$ 離心 20 分鐘，倒去上清液並去除粉紅色鬆散層後，將白色病毒顆粒沉澱物重新懸浮於含有 0.1% NaN_3 之 TM 緩衝液中，並置換到新的 1.5 ml 微量離心管中，以 $650 \times g$ 離心 5 分鐘，重複此離心步驟三至五次以去除粉紅色之不純物，即可得到已純化完成之白色病毒顆粒，並置於 4°C 保存之。白點症病毒顆粒之製備純度可利用負染法 (Negative staining) 並以穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope) 觀察之。

本研究將純化之病毒顆粒進一步分離為外套膜蛋白 (envelope proteins) 及核蛋白質鞘 (nucleocapsid proteins)，係依照 Xie et al. (2006) 所發表之方法進行製備 [63]

。本實驗主要操作過程簡述如下，取出純化之病毒液，在 4°C 以 20,000 × g 離心 30 分鐘後，將沉澱物重新懸浮於含鹽之 TMN 緩衝液中 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 7.5)，接著加入 1% Triton X-100 (TX)，於室溫中輕微晃動 30 分鐘後，在 4°C 以 20,000 × g 離心 20 分鐘。離心完成後，收取上清液，此為外套膜蛋白，接著將沉澱物用 ddH₂O 潤洗以去除殘餘之上清液，再將其重新懸浮於 TMN 緩衝液中，此即為核鞘蛋白，均保存於 -20°C 中。

3. 抗體之製備 (Antibody preparation)

本研究設計三組引子對 (*vp31*-EcoRI-F1/*vp31*-NotI-R1, *vp39b*-BamHI-F1/*vp39b*-EcoRI-R1, *vp11*-N148-BamHI-F1/*vp11*-C538-HindIII-R1) 將全長之 *vp31* 及 *vp39b*，與部分片段之 *vp11* 送入 pET28b 進行質體選殖

挑選出帶有重組基因表現載體 pET28b 的轉型細菌，置於含 kanamycin (50 g/ml) 的 LB 培養液中，於 37°C 旋轉培養 16-18 小時，將此菌液稀釋 50 倍 (1 ml 菌液加至 50ml 含 ampicillin 的 LB 培養液中)，於 37°C 重新培養 2 小時，加入 IPTG (最終濃度為 1 mM) 於 37°C 再培養 3 小時，以 10,000 × g 轉速離心 5 分鐘收集細菌沈澱物，倒去上清液，以 500 μl 緩衝液 A (PBS [BDH Laboratory Supplies] 內含 10% glycerol) 懸浮沈澱物，將其置於冰上，利用超音波震盪器 (Ultrasonic processor UP-50H, Dr. Hielscher GmbH) 以 80% 功率均

勻震盪 20 秒後停止 10 秒，重複 4-5 次。以 $10,000 \times g$ 轉速離心 5 分鐘，倒去上清液，加入 4 ml 緩衝液 B (PBS 內含 1.5% sarcosine, pH 8.0) 懸浮沈澱物，於 4°C 低速震盪 4-5 小時至液體澄清，以 $10,000 \times g$ 轉速離心 5 分鐘，收取上清液，加入 1/10 體積帶有二價鎳離子 (Ni^{2+}) 的 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) (Quigen Inc.) 樹脂膠粒溶液，於 4°C 搖轉 16 小時。以 $10,000 \times g$ 轉速離心 5 分鐘，小心倒去上清液，加入 500 μl 緩衝液 C (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 沖洗沈澱物，再以 $10,000 \times g$ 轉速離心 5 分鐘，倒去上清液，重複 2-3 次清洗動作，最後加入適量緩衝液 C，將附著於 NTA 樹脂膠粒上的重組蛋白，保存於 -20°C ，作為抗白點症病毒結構性蛋白質 VP31、VP39B 及 VP11 抗體之抗原。

4. 西方轉印法 (Western blot assay)

將蛋白質樣本加入等體積之 $2 \times$ SDS sample buffer ($1 \times$ SDS sample buffer : 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8)，置於 100°C 乾浴槽中 10 分鐘，之後以 $10,000 \times g$ 於室溫下離心 3 分鐘，取適量的上清液加到 SDS 聚丙烯醯胺膠，進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。先以 80 伏特電壓進行 stacking running 後，再轉為 120 伏特電壓進行電泳，當染劑 (tracking dye) 到達凝膠底部即停止。將膠體小心取下，利用半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting) 轉印至 PVDF 膜上 (polyvinylidene difluoride membrane, Minipore)。轉印完成後，將 PVDF 膜置於 5% skim milk (Difco Laboratories; 以 w/v 溶於 TBST [0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5% Tween-20, pH 7.4])，於 4°C 進行 blocking 16 小時。將

PVDF 轉換至以 2.5% skim milk 稀釋 5,000 倍的一級抗體中，於室溫下反應 1 小時，之後 PVDF 膜以 washing buffer (TBST 內含 0.5% Tween-20) 清洗 3 次，每次 15 分鐘，再將 PVDF 膜轉換至以 2.5% skim milk 稀釋 5,000 倍之二級抗體 (goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody, Sigma) 中，於室溫下反應 1 小時，再以 washing buffer 清洗 3 次，每次 15 分鐘。最後 PVDF 膜以 Western Lightning® Plus-ECL reagents (PerkinElmer) 進行呈色，並以 Fuji *super* RX 底片於室溫下壓片，經顯影後即可知反應結果。

5. 北方轉印雜合法 (Northern blot hybridization)

³²P-labeled riboprobe 之製備依照 RNA polymerase promoter addition kit-Lig'nScribe™ (Ambion) 之說明書步驟進行。首先設計若干引子對 (Table1)，以病蝦 DNA (100-200 ng) 為模版，並進行 PCR 反應。接著，取 25 ng 的 PCR 產物，加入 1 μl 10 × ligation buffer、1 μl T4 DNA ligase、1 μl T7 promoter adapter，最後加入 ddH₂O 至反應總體積為 10 μl，置於室溫 30-60 分鐘進行接合反應 (ligation)，之後取 1 μl 接合反應產物與 T7 adapter primer 1 (5'-CATTAATGCAGCTGGCTTATCGAAAT-3') 及適當之 5' 端引子再次進行 PCR 反應。將 3' 端帶有 T7 adaptor 的 PCR 產物以 gel extraction kit (Viogene) 進行純化之，各取 3.6 μl 進行試管內轉錄反應，於 37°C 作用 1 小時後，再追加 1 μl T7 RNA polymerase 繼續於 37°C 反應 1 小時，之後加入 RNase-free DNase I (Invitrogen) 於室溫下反應 15 分鐘以去除 DNA，最後加入適量之 EDTA 並在 65°C 作用 10 分鐘終止反應。將反應產物通過 Sephadex G50 管柱，純化後之產物則為 riboprobe，可置於 -20°C 保存至 ³²P 衰退。北方轉印製備膜的詳細步

驟參考 Sambrook et al. (1989) 所著的 Molecular cloning 一書 [64]。將轉印好的 Hybond-N⁺ 膜取出，浸泡於雜合反應溶液 (hybridization buffer; 250 mM phosphate buffer [0.5 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaH₂PO₄], 1 mM EDTA, 1% BSA, 7% SDS)，於 65°C 旋轉作用 1 小時進行前雜合反應 (prehybridization)。將放射線標定之 riboprobe 以雜合反應溶液稀釋 1,000 倍，於 65°C 旋轉反應 16 小時。雜合反應完成後將 Hybond-N⁺ 膜以 washing buffer I (2× SSC, 0.5% SDS) 在室溫下清洗 5 分鐘，再以 washing buffer II (2× SSC, 0.1% SDS) 在室溫下清洗 20 分鐘，最後用 washing buffer III (0.1× SSC, 0.5% SDS) 在 65°C 清洗 1 小時。利用 Kodak BioMax MR 底片壓片，置於 -70 °C 作用，經顯影後即知雜合反應的結果。

Digoxigenin (DIG)-labeled riboprobe 之製備依照 DIG System User's Guide (Roche Applied Science) 說明書步驟進行。首先設計預備雜交基因之專一性引子對，並以病蝦 DNA 為模板進行 PCR 反應後，取 10-25 ng PCR 產物與 T7 adaptor (5'-CATTAATGCAGCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3') 進行接合反應。取 1 μl 接合反應產物與 T7 adapter primer 1 及 5' 引子進行 PCR 反應，再以 gel extraction kit (Viogene) 進行純化後，可得到在 3'端帶有 T7 adaptor 的 probe。取 100-200 ng probe 加入 5× DIG-RNA labeling mix (Roche Applied Science)、T7 RNA polymerase (Promega) 與 5× transcription buffer 等進行試管內轉錄反應 (*in vitro* transcription)，在 37°C 下作用 2 小時。反應結束後，以 DNaseI (Invitrogen) 去除 DNA。在進行雜合反應前，首先將合成好的 DIG-labeled antisense RNA probe 在 95°C 作用 5 分鐘使 RNA 變性 (denaturation)，之後立即放在冰上至少 1 分鐘。接著將 probe 與已在 68°C 預熱好的雜合反應溶液 (50% formamide

[v/v] deionized, 5× SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine [w/v], 0.02% SDS [w/v], 2% blocking solution [1/5 volume of 10× blocking solution]) 混和，並與已完成前雜合反應的 Hybond-N⁺ 膜在 68°C 進行雜合作用 16 h。反應完成後，取出 Hybond-N⁺ 膜，以 washing buffer I (2× SSC/0.1% SDS) 在室溫下清洗兩次各 5 分鐘，再以 washing buffer II (0.1× SSC/0.1% SDS) 在 68 °C 下清洗兩次各 15 分鐘。接著，將膜浸泡在 Washing buffer (DIG Wash and Block Buffer Set; Roche Applied Science) 1-5 分鐘，再置入 blocking solution (DIG Wash and Block Buffer Set; Roche Applied Science) 中作用 30 分鐘，最後與 anti-digoxigenin-AP, Fab fragment (1:10,000 倍稀釋於 blocking solution 中) 進行反應 30 分鐘。將 Hybond-N⁺ 膜以 washing buffer 清洗兩次各 15 分鐘後，放在 Detection buffer (DIG Wash and Block Buffer Set; Roche Applied Science) 中平衡 3 分鐘，之後以 CDP-Star, ready-to-use (Roche Applied Science) 進行呈色，並以 X-ray 底片壓片，經顯影後即可得知雜交反應之結果。

6. 全 RNA 萃取 (total RNA extraction)

將蝦組織置於研鉢中，以液態氮磨碎後，每 0.05-0.1 g 組織加入 1 ml TRIzol 試劑 (Invitrogen)，均勻混合後置於室溫 5 分鐘，每 1 ml TRIzol 試劑再加入 0.2 ml 氯仿 (chloroform)，以手搖晃 15 秒，置於室溫 3 分鐘，接著在 2-8°C 以 12,000 × g 離心 15 分鐘，收取上清液加入等量異丙醇 (2-propanol)，於室溫放置 10 分鐘，再以 12,000 × g 離心 15 分鐘，得到的沈澱物即為 RNA。加入 1 ml 75% ethanol 清洗 RNA 沉澱物，在 2-8°C 以 7500

× g 離心 5 分鐘後，小心去除 75% ethanol，並置於室溫下 5-10 分鐘以風乾 RNA 沉澱物，最後再以 nuclease-free H₂O 溶解 RNA，保存於-80°C。

6. 快速增殖 cDNA 末端 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)

將感染後 56 小時之淋巴組織自液態氮桶中取出，磨碎均質化，以 Trizol 試劑 (Invitrogen) 萃取 total RNA。

5' RACE 之步驟依照 FirstChoice® RLM-RACE kit (Ambion, Inc., Austin, Tex.) 之說明書進行，利用 random decamer 將 total RNA 反轉錄成 cDNA。5'RACE 之分析分別利用 *vp31-5'-RACE-sp1*、*vp39b-5'-RACE-sp1* 和 *vp11-5'-RACE-sp1* (Table 1) 與 kit 內附的 5'RACE outer primer 進行 first PCR；接著將 first PCR 產物以 *vp31-5'-RACE-sp2*、*vp39b-5'-RACE-sp2* 和 *vp11-5'-RACE-sp2* 與 5'RACE inner primer 進行 second PCR；將 second PCR 產物與 pGEM-T 載體進行接合作用 (ligation)，再經轉型作用 (transformation) 送入勝任細胞中，之後進行藍白菌篩選，挑選白色菌落進行定序。

3' RACE 則利用 oligo(dT) anchor primer 合成 first strand cDNA，再利用 *wssv397-R1* 以及 *vp39b-R2* 之 gene specific primer 與 anchor primer 進行 PCR 擴增反應，將產物與 pGEM-T 載體進行接合作用 (ligation)，再經轉型作用 (transformation) 送入勝任細胞中，之後進行藍白菌篩選，挑選白色菌落進行定序。

7. 質體構築：

本研究設計不同之引子對針對 pcDNA3-HA-*vp31/vp39b* (*vp31*-BamHI-F3/*vp39b*-EcoRI-R1; Table 1) 、 pcDNA3-HA-*vp31-T/vp39b* (*vp31*-BamHI-F3/*vp31*-REV489, *vp31*-MU491(T→A)/*vp39b*-EcoRI-R1; Table 1) 以及 pcDNA3-HA-*vp31-F/vp39b* (*vp31*-D4FS-BamHI-F4/ *vp39b*-EcoRI-R1; Table 1) 進行 PCR 反應，將產物純化後，與 pcDNA3-HA 進行接合反應，再經轉型作用送入勝任細胞中增殖，萃取 plasmid。Plasmid 經 NotI 切割成 linear form，純化後進行試管內轉錄及轉譯反應。

為利用雙冷光酵素報導基因分析系統 (dual luciferase reporter assay) 進行 IRES 活性分析，本研究根據 Bieleski & Talbot (2001) 等人所述之方法構築雙冷光蛋白酶基因表達載體 (pRL-FL) [57]。接著，為構築適用於 Sf9 細胞中之表現載體，我們首先利用 SacI 以及 NheI 切割位將白點症病毒之 IE1 promoter- *wssv ie1*(-94/+52) [65] 送入 pRL-FL 載體中，進行 *ie1*/pRL-FL 之構築。利用不同之引子對進行 PCR 反應擴增 IRES₁₂₃₋₉₁₉ (*vp31*-IRF1-N123-SmaI/*vp39b*-IRR1-C919-NcoI; Table 1) 、 IRES₉₁₉₋₁₂₃ (*vp39b*-IRF1-C919-SmaI-F/*vp31*-IRR1-N123-NcoI-R; Table 1) 以及 *vp28*-IRES (*vp28*IRES-SmaI-F/*vp28*IRES-NcoI-R; Table 1) 等片段，再利用 SmaI 及 NcoI 之切割位，送入 *ie1*/ pRL-FL 中，進行質體選殖，將其命名為 *ie1*/IRES₁₂₃₋₉₁₉、*ie1*/IRES₉₁₉₋₁₂₃ 以及 *ie1/vp28*-IRES。

為進行試管內轉錄反應，本研究將以 *ie1*/ pRL-FL 為骨架之系列質體利用 SacI 及 NheI 限制酶酵素進行切割作用將 *ie1* 啟動子置換為 T7 啟動子，將其命名為 T7/ pRL-FL、T7/IRES₁₂₃₋₉₁₉、T7/IRES₉₁₉₋₁₂₃ 以及 T7/*vp28*-IRES。

為抑制 ribosome scanning 或是 translational reinitiation，本研究依照 Bieleski and Talbot (2001) 等人所述之方法 [57] 將 60- nucleotide (5'-GCTAGCGGTACGGCAGTGCCGTACGACGAATTCGTCGTACGGCACTGCCGTACC GCACTGCCGTACCGCTAGC-3') 以 NheI 限制酶酵素切位送入 *Renilla luciferase* start codon 之上游位置，其會形成穩定之 28-bp stem-loop 二級結構 ($\Delta G = -62$ kcal/mol)，將其命名為 T7/SL- IRES₁₂₃₋₉₁₉、T7/SL-IRES₉₁₉₋₁₂₃、T7/SL- *vp28*-IRES 以及 T7/SL-pRL-FL。上述各質體經轉型作用送入勝任細胞中進行增殖後，萃取質體，保存於-20°C。

8. 試管內轉錄和轉譯反應 (*in vitro* transcription and translation, TNT)

本研究利用 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega Inc.) 進行試管內轉錄和轉譯反應。取 1 μ g 已構築好的 pcDNA3-HA-*vp31/vp39b*、pcDNA3-HA-*vp31-F/vp39b*、pcDNA3-HA-*vp31-T/vp39b* 以及控制組 pcDNA3-HA 質體，加入 20 μ l TNT Quick Master Mix 中，再加入 1 μ l [³⁵S] methionine，最後加入 nuclease-free H₂O 使反應總體積為 25 μ l，置於 30°C 反應 90 分鐘。反應完成之產物加入等體積之 2 \times SDS sample buffer (1 \times SDS sample buffer: 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8)，置於 65°C 15 分鐘後，以 10,000 \times g 於室溫下離心 3 分鐘，取適量的上清液加到 SDS 聚丙烯醯胺膠，進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。將 SDS 聚丙烯醯胺膠置於 50% 甲醇 (methanol) 中 30 分鐘，再以 ddH₂O 浸泡 15 分鐘，將膠體置於 3MM 濾紙上，其上覆蓋保

鮮膜，以膠體乾燥機 (Gel dryer Model 583, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 於 80°C 烘乾 90 分鐘。最後以 Kodak BioMax^{film} 底片於室溫下壓片 16 小時，經顯影後即可知結果。

9. 試管內轉錄反應 (*in vitro* transcription)

試管內轉錄反應之操作步驟依照 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 kit (Promega) 所附說明書進行。將各個質體 (T7/IRES₁₂₃₋₉₁₉, T7/IRES₉₁₉₋₁₂₃, T7/vp28-IRES, T7/pRL-FL, T7/SL-IRES₁₂₃₋₉₁₉, T7/SL-IRES₉₁₉₋₁₂₃, T7/SL-vp28-IRES, T7/SL-pRL-FL) 利用 NotI 進行切割以產生線性質體 DNA (linearized plasmid DNA)。各取 1 μg 線性質體 DNA，利用 T7 RNA polymerase (Promega) 於 37°C 下進行轉錄作用 2 小時，以合成非帽型 (uncapped) 轉錄本，再以 RNase-free DNase I (Invitrogen) 去除質體 DNA 模板。將轉錄完成之 RNA 以 1% agarose-formaldehyde gel 進行膠體電泳，以確定其大小。

10. 試管內轉譯反應 (*in vitro* translation)

將上述步驟所合成之非帽型轉錄本加入 Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL; Promega) 進行試管內轉譯反應，操作步驟依照說明書之指示。取 1.5 μg uncapped RNA 加入至總體積 25 μl 之反應混合物中 (16.5 μl of RRL, 1 μl of [³⁵S] methionine, 0.5 μl of amino acid mixture minus methionine, 0.5 μl of RNasin® ribonuclease inhibitor (40 U/μl; Promega), 0.5 μl of 100 mM DTT, and 0.4 μl of 2.5 M potassium chloride [最終 potassium ion concentration 為

40 mM)]，接著置於 30°C 反應 90 分鐘。取出 5 µl 反應完成之產物，依照前述步驟進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳，將膠體乾燥後進行壓片，經顯影即可得知反應結果。

11. IRES 活性分析

將帶有 IRES 片段的雙冷光蛋白酶基因質體，利用 effectene transfection reagent (Qiagen) 進行轉染作用 (transfection) 送入 Sf9 細胞株中。在細胞轉染後 48 小時，將細胞以 1 PBS 清洗一次，加入 100 µl passive lysis buffer (Promega)，置於震盪器上 15 分鐘使細胞完全裂解，取 10µl 利用 Dual-Luciferase[®] Reporter (DLRTM) Assay System (Promega) 進行螢火蟲 (Photinuspyralis) 與珊瑚蟲 (Renilla reniformis, sea pansy) 兩種冷光酵素活性之分析，測量方法依照其所附的手冊說明步驟進行之。將測量出來的螢火蟲酵素活性除以珊瑚蟲酵素活性 (firefly luciferase/Renilla luciferase)，其所得之比值作為測量 IRES 活性之依據。每組實驗結果皆重複進行至少三次以上之獨立實驗，實驗數據以平均值±標準差(means ± SD [standard deviation])表示，並進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。

12. 反轉錄酶-聚合酶鏈反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)：

取 1 µg RNase-free DNase I (Invitrogen) 處理過的 total RNA，加入 0.5 µl 之 oligo-dT (100 µM) 引子以及 0.5 µl 之 dNTP (10 mM)，於 65°C 加熱 5 分鐘後，迅速置於冰上待其冷卻，之後再加入 1 µl 0.1M DTT、4 µl 5× transcription buffer、1 µl SuperScript[®] III Reverse

Transcriptase (Invitrogen)與 1 μ l RNaseOUT (Invitrogen)，，於 50°C 下進行反轉錄反應 30-60 分鐘以合成 cDNA，再於 70 °C 加熱 15 分鐘終止反應。

反轉錄酶 - 聚合酶鏈反應以 cDNA 為模版，利用引子對 P1/P2 (pRL-FL-N219-F/pRL-FL-C1732-R, Table 1) 以及 P3/P4 (pRL-FL-N1071-F/pRL-FL-C2654-R, Table 1) 進行 PCR 反應。將反應所得之產物純化後進行定序。



第五節、結果

1. 白點症病毒同向轉錄基因群之轉錄本分析

我們首先選擇四個同向轉錄基因群進行轉錄本分析 (Fig. 1A)。收取未感染 0 小時及人工感染後 60 小時之蝦體樣本，抽取組織 RNA 以進行北方雜合反應。利用各基因片段轉錄出對此基因具有專一性之探針，並以 ^{32}P 標定之，以此探針進行北方雜合反應後，可得基因群轉錄本之分析結果。根據 Figure 1B 之結果顯示，四個基因群都會產生多順反子、雙順反子 (bicistronic) 及單順反子 (monocistronic) mRNA。其中，基因群 *vp60b/wssv478/wssv479/vp28* 利用對 *vp60b* 及 *vp28* 具有專一性之探針進行反應，可偵測到 3.4-kb 之多順反子 mRNA，可編碼出 (encode) VP60B 及 VP28 蛋白；且 *vp28* 探針尚可偵測到包含 *wssv479* 及 *vp28* 之 1.3-kb 雙順反子 mRNA，及只包含 *vp28* 之 1.0-kb 單順反子 mRNA (Fig. 1B)。 *wssv130/wssv133/vp36a* 基因群利用 *vp36a* 探針進行反應，結果顯示可偵測到三條轉錄本，分別為包含三個基因之 3.2-kb 多順反子轉錄本，包含 *wssv133/vp36a* 之 1.8-kb 雙順反子轉錄本，以及僅有單一基因 *vp36a* 之 1.1-kb 單順反子轉錄本 (Fig. 1B)。針對基因群 *vp36b/vp51b/vp38a*，我們以 *vp38a* 探針進行反應，結果顯示有兩條轉錄本，一為包含三個基因之 3.3-kb 多順反子轉錄本，另一為具有單一基因 *vp38a* 之 1.1-kb 單順反子轉錄本 (Fig. 1B)。 *vp31/vp39b/vp11* 基因群利用對 *vp31*、*vp39b* 及 *vp11* 具有專一性之探針進行反應，皆可偵測到一條 3.4-kb 之多順反子 mRNA，此外 *vp11* 之探針尚可偵測到 1.6-kb 之單順反子 mRNA (Fig. 1B)。

根據上述北方轉印雜合法之結果，我們發現其中一個基因群 *vp31/vp39b/vp11* 所轉錄出之多順反子 mRNA (polycistronic mRNA, 3.4 kb)，可利用 5' 端帽結構成功轉譯出結構性蛋白質 VP31；包含有 *vp11* 之單順反子 mRNA (monocistronic mRNA, 1.6 kb) 亦可以 5' 端帽結構轉譯出結構性蛋白質 VP11；但 *vp39b* 並無單順反子 mRNA 可利用 5' 端帽結構進行轉譯作用。再者，根據本實驗室以純化過之病毒顆粒進行液相層析串聯式質譜儀之鑑定結果，位於多順反子 mRNA 中之 *vp39b* 基因確實能進行轉譯作用合成結構性蛋白質 VP39B，因此本研究基於上述結果，遂針對結構性蛋白質基因 *vp31* 及 *vp39b* 間之特殊轉譯機制進行深入探討，以瞭解其是否利用非帽依賴型轉譯調控機制。

2. 白點症病毒同向轉錄基因群 *vp31/vp39b/vp11* 5' 端轉錄起始點與 3' 端加聚腺嘌呤位置分析

為進一步確認上述北方轉印雜合法之結果及轉錄本大小，我們利用 5' 及 3' 快速增殖 cDNA 末端技術以分析同向轉錄基因群 *vp31/vp39b/vp11* 5' 端轉錄起始點與 3' 端加聚腺嘌呤位置。根據 5' RACE 定序結果顯示，*vp31* 及 *vp39b* 皆具有兩個相同之 5' 端轉錄起始點 (transcription initiation sites, TIS)，其位在距離 *vp31* 轉譯起始密碼 ATG 上游第 32 及 35 個核苷酸處 (**GTTG** [the bold and underlined nucleotides are the initiation sites]; Fig. 2B)。而 *vp11* 僅具有一個 TIS，其位於 ATG 上游第 205 個核苷酸處 (**TAGT**; Fig. 2B)。

由基因體序列分析結果，得知 *vp31* 及 *vp39b* 基因之 3' 端轉譯終點前後序列並無真核生物之聚腺嘌呤訊號 (AATAAA, poly A signal)，而 *vp11* 基因之聚腺嘌呤訊號位於轉譯終點

後第 38 個核苷酸處。由 3' RACE 定序結果顯示，三個基因皆具有相同之加聚腺嘌呤位置 (poly A addition site)，其位在 *vp11* 基因轉譯終點後之聚腺嘌呤訊號下游第 17 個核苷酸處 (Fig. 2B)，且此 3' 端加聚腺嘌呤位置符合真核生物之聚腺嘌呤訊號規則。

綜合上述 5'/3' RACE 之結果，我們確認 *vp31/vp39b/vp11* 基因群可轉錄出兩條 mRNA，一為包含三個基因之 3.4-kb 大轉錄本，另一為包含 *vp11* 單一基因之 1.6-kb 小轉錄本，與北方轉印雜合法所得之結果相符合；此外，我們也證實 *vp31*、*vp39b* 以及 *vp11* 基因共用同一個 3' 端加聚腺嘌呤位置，且 3' 端加聚腺嘌呤位置符合真核生物之聚腺嘌呤訊號規則。

3. 結構性蛋白質 VP31、VP39B 以及 VP11 位於白點症病毒顆粒上之位置

利用抗 *wssv396*、*wssv395* 及 *wssv394* 之多株抗體對病毒顆粒 (virion)、病毒封套膜 (envelope protein) 及核蛋白鞘 (nucleocapsid protein) 三個樣本進行西方轉印法。結果顯示在病毒顆粒蛋白可偵測到三個基因所編碼之 VP31、VP39B 與 VP11 蛋白訊號之存在，其大小分別為 31 kDa、39 kDa 及 37 kDa，證明三者皆確實為白點症病毒結構性蛋白 (Fig. 3)，此結果與本實驗室先前蔡等人 [53] 之蛋白質體學研究相符合，且三者皆位於白點症病毒之封套膜上 (Fig. 3)。根據三個多株抗體之西方轉印法分析結果，發現在約 28 kDa 之位置皆有一微弱訊號出現 (Fig. 3)，推測其可能為一級抗體對於白點症病毒主要蛋白 (major protein) VP28 之非專一性訊號所致。

其中，VP31 與 VP39B 在病毒顆粒樣本上偵測到之大小與 *wssv396* 及 *wssv395* 基因預測之分子量相同；*wssv394* 基因預測之分子量為 48 kDa，而蔡等人 [53] 利用液相層析串聯

式質譜儀之鑑定結果顯示 *wssv394* 基因所編碼之 VP11 蛋白僅有 11 kDa，本研究以抗 *wssv394* 之多株抗體進行西方轉印法所偵測到 VP11 之分子量為 37 kDa (Fig. 3)。透過 Peptidecutter 及其他軟體之預測分析，得知 VP11 之胺基酸序列上具有多個蛋白酶作用切位 (proteolytic cleavage sites)，因此我們推測由 *wssv394* 基因所轉譯出之蛋白可能受到蛋白酶 (protease) 切割或是降解作用 (degradation)，而產生 37 kDa 與 11 kDa 之蛋白，然此推測尚待進一步實驗加以釐清。

4. 探討白點症病毒結構性蛋白 VP39B 之非帽依賴型轉譯調控機制

由北方轉印雜合法之結果，我們得知 VP31 與 VP11 蛋白之合成係分別利用 3.4-kb 及 1.6-kb mRNA 之 5' 端帽結構以進行帽依賴型轉譯作用，然而 VP39B 之合成卻無法透過單順反子 mRNA 之 5' 端帽結構進行轉譯作用，因此推測其可能從 3.4-kb 之多順反子 mRNA 利用非帽依賴型轉譯機制合成蛋白質。為瞭解同向轉錄基因群 *vp31/vp39b/vp11* 是否利用 IRES 或 translation reinitiation 等特殊轉譯機制進行 *vp39b* 之轉譯作用，本研究接下來即針對 VP39B 蛋白之轉譯機制進行深入探討。

為確認 VP39B 之合成是否經由非帽型轉譯機制所調控，我們將白點症病毒基因體上 *vp31/vp39b* 全長完整基因片段 (Fig. 4A) 選殖送入基因表現載體 pcDNA3-HA，命名 pcDNA3-HA-*vp31/vp39b*，利用 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) 進行試管內轉錄及轉譯反應 (*in vitro* translation and translation, TNT)，以確認結構性蛋白質 VP31 及 VP39B 是否可成功被轉譯出來，其中，轉譯出之 VP31 由於在 N 端帶

有 HA tag，預測其分子量約為 33 kDa。初步結果顯示其主要反應產物訊號之分子量為 33 kDa 及 39 kDa，符合 VP31 及 VP39B 分子量 (Fig. 4B, lane 1)。根據此結果，推測在試管內轉錄及轉譯反應中，VP31 及 VP39B 皆可進行轉譯作用並合成蛋白質。本實驗以 pcDNA3-HA 載體作為負控制組 (Negative control; Fig 4, lane 4)。

為確認 *vp31/vp39b* 雙順反子表現質體中，下游基因之蛋白表現與上游基因之蛋白表現是否有相關性，本研究設計一組引子對針對 *vp31* 基因進行開放譯讀區框架位移突變 (frame shift mutation)，將 *vp31* 基因轉譯起始點下游第四個核苷酸刪除 (deletion)，造成整個框架位移並使轉譯作用提早終止。將 *vp31*-frameshift/*vp39b* 基因片段植入表現載體 pcDNA3-HA 上，命名為 pcDNA3-HA-*vp31*-F/*vp39b* (Fig. 4A)，以 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) 進行試管內轉錄和轉譯反應，則帶有 HA tag 之 *wssv396* 只能轉譯出約二十個胺基酸序列，此反應產物分子量過小以致無法被偵測到。結果顯示，原先推測為 VP31 (33 kDa) 反應產物之訊號並無出現 (Fig. 4B, lane 2)，而約 39 kDa 符合 VP39B 之蛋白質訊號有出現 (Fig. 4B, lane 2)。本實驗以 pcDNA3-HA 載體作為負控制組 (Fig. 12, lane 4)。綜合上述結果，本研究證實在試管內轉錄及轉譯反應中，當 VP31 蛋白無法成功表現時，*vp39b* 基因不受影響仍可進行轉譯作用表現蛋白質，顯示兩者之表現並無相關性。

根據 Kozak (1987) 及 Low 等人 (2001) 之研究報導，轉譯作用再啟始之上游 ORF (upstream ORF, uORF) 通常小於 30 codon，且兩個 ORF 間之基因間區 (intergenic region) 為 80 bp 時，可得到最佳轉譯效率，當大於或小於 80 bp 時會降低其效率 [59, 66]。雖然本研

究之 uORF 即 *vp31* 具有 262 個 codon，理論上無法利用轉譯作用再啟始之機制，然而 Poyry 等人 (2007) 之研究發現，貓卡里西病毒 (feline calicivirus) 之 uORF 為 75 kDa 之 VP1 前驅 (precursor) 蛋白，亦可啟動轉譯作用再啟始機制調控下游蛋白 VP2 之合成 [67]。因此我們設計一對針對 *vp31/vp39b* 完整基因片段進行 *vp31* 基因截斷 (truncation) 以了解調控 VP39B 合成之非帽依賴型機制是 IRES 抑或轉譯作用再起始。我們將 *vp31* 轉譯起始點下游第 491 個核苷酸 T 突變成 A，使第 164 個 codon 變成轉譯終止密碼，則轉譯作用會提早停止並合成約 20 kDa 之 VP31 截斷蛋白質 (truncated protein)。將 *vp31-truncation/vp39b* 基因片段選殖入表現載體 pcDNA3-HA 上，命名為 pcDNA3-HA-*vp31-T/vp39b* (Fig. 4A)，此質體不僅可以表現出截斷之 VP31 蛋白質，且將上、下游之基因間區由 3 bp 延長為 297 bp，而此長度不利於啟動轉譯作用再啟始機制。接著我們同樣以 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) 進行試管內轉錄和轉譯反應。結果顯示在約 39 kDa 處仍可偵測到反應產物之訊號，符合 VP39B 蛋白質之大小 (Fig. 4B, lane 3)，顯示基因間區為 297 bp 時，VP39B 依舊可以成功被轉譯出來；而在 20 kDa 處，亦可觀察到反應產物之訊號，符合 VP31 蛋白質之大小 (Fig. 4B, lane 3)。

由上述兩個突變質體之實驗結果，我們推測 VP39B 蛋白質之表現並非透過轉譯作用再起始機制，而是受到 IRES 序列的調控。為了進一步探究 *vp31/vp39b* 編碼區內是否確實存在具有功能性之 IRES 序列，我們接著進行下列實驗加以證實。

5. 利用雙冷光酵素報導基因分析系統 (dual luciferase reporter vector assay) 進行

vp31/vp39b 基因片段之 IRES 活性分析

由於無法正確得知 IRES 片段之 5' 與 3' 邊界，我們首先截取 *vp31* 第 123 個核苷酸至 *vp39b* 第 130 個核苷酸 (797 bp, Fig. 5A)，選殖送入帶有 T7 啟動子之雙冷光酵素報導基因載體中—T7/pRL-FL (Fig. 5B)，命名為 T7/IRES₁₂₃₋₉₁₉ (Fig. 5B)，且由於 *vp39b* 之 ATG 起始密碼與下游之 firefly luciferase 基因為 in-frame，若能成功轉譯，則會產生帶有部分 VP39B 胺基酸片段 (將近 5 Kda) 之 FL 融合蛋白 (fusion protein)；本研究同樣將反向之 IRES 片段殖入 T7/pRL-FL，命名為 T7/IRES₉₁₉₋₁₂₃ (Fig. 5B)，作為負控制組；此外，我們亦將 Han 等人 (2006) 發表之 *vp28*-IRES 片段 [62] 送入載體中，命名為 T7/*vp28*-IRES 以作為正控制組 (Fig. 5B)。接著，將上述已線性化之質體進行試管內轉錄反應合成一條雙順反子轉錄本後，再將此雙順反子轉錄本進行試管內轉譯反應以合成蛋白。Fig. 5C 之結果顯示，IRES₁₂₃₋₉₁₉ (lane 1) 之活性稍高於 IRES₉₁₉₋₁₂₃ (lane 2)，但較未殖入 IRES 片段之 T7/pRL-FL empty vector (lane 4) 為低。

根據上述實驗結果，本研究為了抑制及排除核糖體連讀轉譯作用 (ribosomal read-through) 或是轉譯作用再起始機制導致下游 FL 蛋白之表現，我們將一個極穩定之莖環結構 (stem-loop, SL) 置入 RL 基因之 ATG 上游，使 ribosome 無法表現 RL 蛋白。根據 Fig. 5D 之結果，顯示由四個雙順反子轉錄本合成之 RL 蛋白質訊號及表現相較於 Fig. 5C 皆大幅降低 (比較 Figs. 5C and D)，但由 T7/SL-IRES₁₂₃₋₉₁₉ 之雙順反子轉錄本所合成之 FL 蛋白訊號皆高於其他三個雙基因轉錄本 (Fig. 5D)。綜合上述結果，可知莖環結構成功抑制

核糖體連讀轉譯作用，也因而大幅降低轉譯作用再起始機制之可能性，故我們證實由 T7/IRES₁₂₃₋₉₁₉ 之雙順反子轉錄本所合成之 FL 蛋白是透過 IRES 序列調控而產生，且下游 FL 蛋白與上游 RL 蛋白之轉譯作用為相互獨立不受彼此影響。

6. 分析 IRES 序列於 Sf9 細胞株之活性

為測試 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 片段於 Sf9 細胞中是否具有活性，本研究將不同基因片段殖入帶有白點症病毒及早期基因啟動子—*iel*/pRL-FL 載體中，分別命名為 *iel*/IRES₁₂₃₋₉₁₉、*iel*/IRES₉₁₉₋₁₂₃ (負控制組)及 *iel*/vp28-IRES (正控制組)。我們將上述質體以轉染作用送入 Sf9 細胞中，經過 48 小時後，收集細胞以進行雙冷光酵素活性分析，其中上游之 RL 蛋白是利用 5' 端帽結構進行轉譯作用，並可當作內部參照組 (internal control)，而下游之 FL 蛋白若能成功被轉譯出來則是透過 IRES 機制之調控。本研究利用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) 進行分析，其可分別偵測兩種冷光數值，將 FL 之數值除以 RL 之數值 (FL/RL)，其所得之比值可作為測量 IRES 活性之依據，本實驗共進行三次獨立實驗，每次皆三重覆，數據以平均值±標準偏差 (mean ± SD) 表示。

根據 Fig. 6 之結果，*iel*/IRES₁₂₃₋₉₁₉ 所得到之相對冷光酵素活性數值，相較於正控制組 (*iel*/vp28-IRES) 高出約 1.7 倍，相較於 empty vector (*iel*/pRL-FL) 亦高出約 43 倍之多；而負控制組 *iel*/IRES₉₁₉₋₁₂₃ 所得到之相對活性數值極低。綜合上述結果，我們再次證實，在 *vp31/vp39b* 編碼區中，的確具有 IRES 序列之存在，可調控下游基因之蛋白表現，且此 IRES 序列在 Sf9 細胞中亦具有活性。

7. *ie1*/IRES₉₁₉₋₁₂₃ 雙順反子轉錄本之反轉錄酶-聚合酶鏈反應分析 (RT-PCR analysis)

為瞭解帶有 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 之雙冷光酵素報導基因載體經轉染作用送入 sf9 細胞株後，其所轉錄出之雙順反子 mRNA 會否產生異常之剪接事件 (abnormal splicing event) 而產生只含有 FL 基因之單順反子 mRNA，在此情況下 FL 蛋白之合成是經由此單順反子 mRNA 而非透過雙順反子 mRNA 之 IRES 機制，故我們設計兩對引子對 P1/P2 以及 P3/P4 進行 RT-PCR 以釐清是否有異常之剪接事件發生。實驗結果顯示，P1/P2 及 P3/P4 之 RT-PCR 產物皆符合預期之大小，各為 2310 bp 以及 2722 bp (Fig. 7)，定序結果亦正確無誤，證明 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 之雙順反子 mRNA 並無異常之剪接作用產生。



第六節、討論

根據本研究針對 *vp31/vp39b/vp11* 轉錄群進行北方轉印雜合法之結果，證明在受病毒感染蝦體之 RNA 中，確實可偵測到包含此三個基因之 3.4-kb 多順反子 mRNA，以及 1.6-kb 之僅包含 *vp11* 之單順反子 mRNA；此外，從受感染蝦體 RNA 所得之 5'/3' RACE 分析結果，亦與北方轉印雜合法之結果一致，同時也再次證實自受感染蝦體之 total RNA 中，並無偵測到 *vp39b* 之單順反子 mRNA (Fig. 1 and Fig. 2)。再者，根據 Fig. 3 之結果，顯示 VP39B 於受感染之蝦組織內可成功被轉譯出來，推測 VP39B 可能利用某種非帽依賴型轉譯機制從 3.4-kb 多順反子 mRNA 進行蛋白合成。

本研究在進一步的實驗設計中，排除轉譯作用再啟始之可能性後 (Fig. 4 及 Fig. 5)，我們證實 VP39B 蛋白成功被表現是透過上游 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 序列之調控。綜合試管內轉錄及轉譯反應 (Fig. 4)、試管內轉譯反應 (Fig. 5)，以及雙冷光酵素活性分析 (Fig. 6) 之結果，我們證明 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 序列片段不管在兔子內質網紅血球溶出液 (RRL) 或是 Sf9 細胞株中皆具有活性，並可調控其下游之基因進行轉譯作用合成蛋白。根據 Fig. 4、Fig. 5 及 Fig. 6 之實驗結果，我們觀察到下列幾個現象：(1) IRES₁₂₃₋₉₁₉ 序列片段之活性在 RRL 中，FL 蛋白之表現訊號相較於 RL 蛋白微弱許多 (Fig. 5)，而在 Sf9 細胞中 IRES 效率相較於帽依賴型轉譯作用 (100%) 亦較低 ($64.3 \pm 12.9\%$, Fig. 6)。故我們推測原因可能是因為這些分析系統如 Sf9 細胞或是 RRL 缺乏蝦細胞內特有之 IRES 反式活化因子 (IRES-transacting factors, ITAFs)，此因子或許可幫助增進 IRES 序列之活性 [68, 69]；而本研究在雙順反子質體中將 *vp39b* N 端之部分胺基酸 (5 kDa) 與下游 FL 蛋白進行融合，亦有可能干擾 FL 之轉譯效率

或影響其酵素活性。(2) 我們利用帶有穩定莖環結構之質體進行試驗以排除轉譯作用再啟始或核糖體連讀轉譯之可能性，從實驗結果觀察到當上游 RL 蛋白之表現量受到抑制而大幅降低後，會造成下游 FL 蛋白之表現量提高 (比較 Figs. 5C 及 5D)，推測其可能是因為當帽依賴型轉譯機制受到抑制而無法與之競爭 ribosome 後，更多 free ribosome 可供給 IRES 序列以進行下游蛋白之表現，因而促進其轉譯效率提升。(3) 根據 Figs. 5D 與 6 之分析結果比較，我們發現 *vp28*-IRES 在 Sf9 細胞中 (*ie1/vp28*-IRES) 之活性相較於 T7/SL-*vp28*-IRES 於 RRL 系統之活性為高。我們從諸多文獻之紀錄得知，IRES 序列於不同之分析系統中會有不同的活性表現 [70-74]，上述原因可能可以解釋 *vp28*-IRES 在兩個系統中具有不同活性之結果，尚待進一步實驗證實之。

雖然大部分 IRES 序列皆位在轉錄本之 5' UTR 區域或是基因間區中，然而根據本研究之結果發現 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 序列片段位於 *vp31/vp39* 之編碼區中，此與一般 IRES 序列所在位置大不相同，且目前僅有幾個已被鑑定的 IRES 序列是位於 DNA 或 RNA 病毒之編碼區中進行下游蛋白之調控，這些病毒之 IRES 序列位在 KSHV 之 vCyclin ORF 中 [57, 59]、單純皰疹病毒 (herpes simplex virus) 之胸腺嘧啶激酶 (thymidine kinase) 基因中 [60]、simian virus 40 之 VP2 ORF 中 [61]，以及第一型人類後天免疫缺乏症候群病毒 (human immunodeficiency virus type 1) 之 gag 基因中 [75]。綜合以上所述，位於基因編碼區之 IRES 序列可能代表一種新型態之 IRES，其調控及作用機制目前皆屬未知，有待未來更多的研究加以釐清其編碼區域如何同時受到 5' 端帽依賴型轉譯調控進行自身蛋白之合成，又可作為 IRES 序列以調控下游蛋白之合成。

根據本實驗室之研究結果指出，白點症病毒基因體上具有許多結構蛋白基因或/與非結構性蛋白基因群聚在一起之同向轉錄基因群 (cluster)，除了本論文發表之四個基因群外，其他還有 *vp60b(-)/wssv478(-)/wssv479(-)/vp28(+)*、*wssv130(+)/wssv133(-)/vp36a(+)*、*vp36b(+)/vp51b(+)/vp38a(+)*、*vp31(-)/vp39b(-)/vp11(+)*，此外尚有 *vp22(-)/vp39a(-)/wssv363(-)/vp51c(+)*、*vp41a(-)/vp51a(+)/vp41b(-)/wssv299(+)*、*wssv237(-)/wssv240(+)/wssv243(+)*、*wssv285(+)/wssv287(-)/wssv288(+)* 以及 *wssv038(-)/wssv035(-)/wssv033(+)* 等 (+號代表此基因之轉譯終止密碼前後具有聚腺嘌呤訊號—AATAAA) [76]。上述這些同向轉錄基因群皆可能有 IRES 序列存在於其中，以調控下游基因之表現，其中 *wssv038(-)/wssv035(-)/wssv033(+)* 之可能性最高，因為前兩個上游基因之終止密碼附近皆無 AATAAA 之訊號，與本研究之 *vp31(-)/vp39b(-)/vp11(+)* 基因群結構相似，此假設有待後續之研究證明。本論文證實至少有四個同向基因轉錄群會產生單、雙及多順反子 mRNA (Fig. 1)，加上先前之研究報導，目前已證實白點症病毒至少有七個以上之同向轉錄基因群會表現單順反子、雙順反子或多順反子 mRNA [46, 49, 50, 76]；且在這些基因群中至少有兩個基因群 (*vp60b/wssv478/wssv479/vp28* 及 *vp31/vp39b/vp11*) 之 *vp28* 及 *vp39b* 基因上游具有 IRES 序列，可調控下游蛋白之合成 [62, 76]。綜上所述，我們證實白點症病毒會產生許許多多順反子 mRNA，並利用特殊之 IRES 序列進行結構性蛋白的轉譯作用。

雖然 IRES 轉譯機制對於白點症病毒蛋白表現之重要性尚未釐清，但根據 Gale 等人 (2000) 之報導指出，當病毒感染宿主細胞後，若出現病毒誘發之 host shutoff 而使帽依賴型

轉譯作用效率降低之不利情況下，仍可透過非帽依賴型轉譯機制如 IRES 序列進行病毒蛋白之表現，以確保病毒顆粒可順利進行複製 [5]。例如，部分病毒如小 RNA 病毒 (Picornavirus) 或是菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus)，在其侵入宿主細胞後，會設法破壞 5' 端帽依賴型轉譯作用造成 host shutoff，病毒得以利用 5' 端非帽依賴型轉譯作用或是其他方法使宿主細胞傾向選擇病毒 mRNA 以合成其蛋白質 [5, 17, 77, 78]。其他非帽依賴型轉譯機制亦可達到上述目的，例如人類乳突病毒 (Human papillomavirus) 會產生雙或多順反子 mRNA，在 host shutoff 期間利用 leaky scanning 或是轉譯作用再啟始等調控機制以進行下游 ORF 之轉譯作用 [79]。結構性蛋白對於病毒顆粒相當重要，若缺乏任何一個結構性蛋白即可能使病毒顆粒無法順利組成，或某些功能無法執行，因此對於白點症病毒而言，我們根據現有之研究結果加以推測，其利用 IRES 序列之調控機制可能是為了確保在任何不利病毒生存之狀況下，重要結構性蛋白如 VP28 及 VP39B 等可以成功被轉譯出來，使病毒顆粒能順利組裝完成。上述推測仍須後續相關之研究加以證實。

未來我們可針對白點症病毒 *vp31/vp39b* 雙順反子 mRNA 進行更深入之分析及探討，例如利用逐步刪除法確認活性最佳之 IRES 序列位置，再進一步找出參與 IRES 轉譯機制中所參與之轉譯起始因子 (translational initiation factor) 或是 IRES 反式活化因子 (IRES-transactivating factor, ITAF)，透過上述實驗我們將可深入瞭解白點症病毒之特殊轉譯機制，希冀藉由此研究成果，能夠提供阻斷白點症病毒顆粒組成之曙光。

第七節、圖表與說明

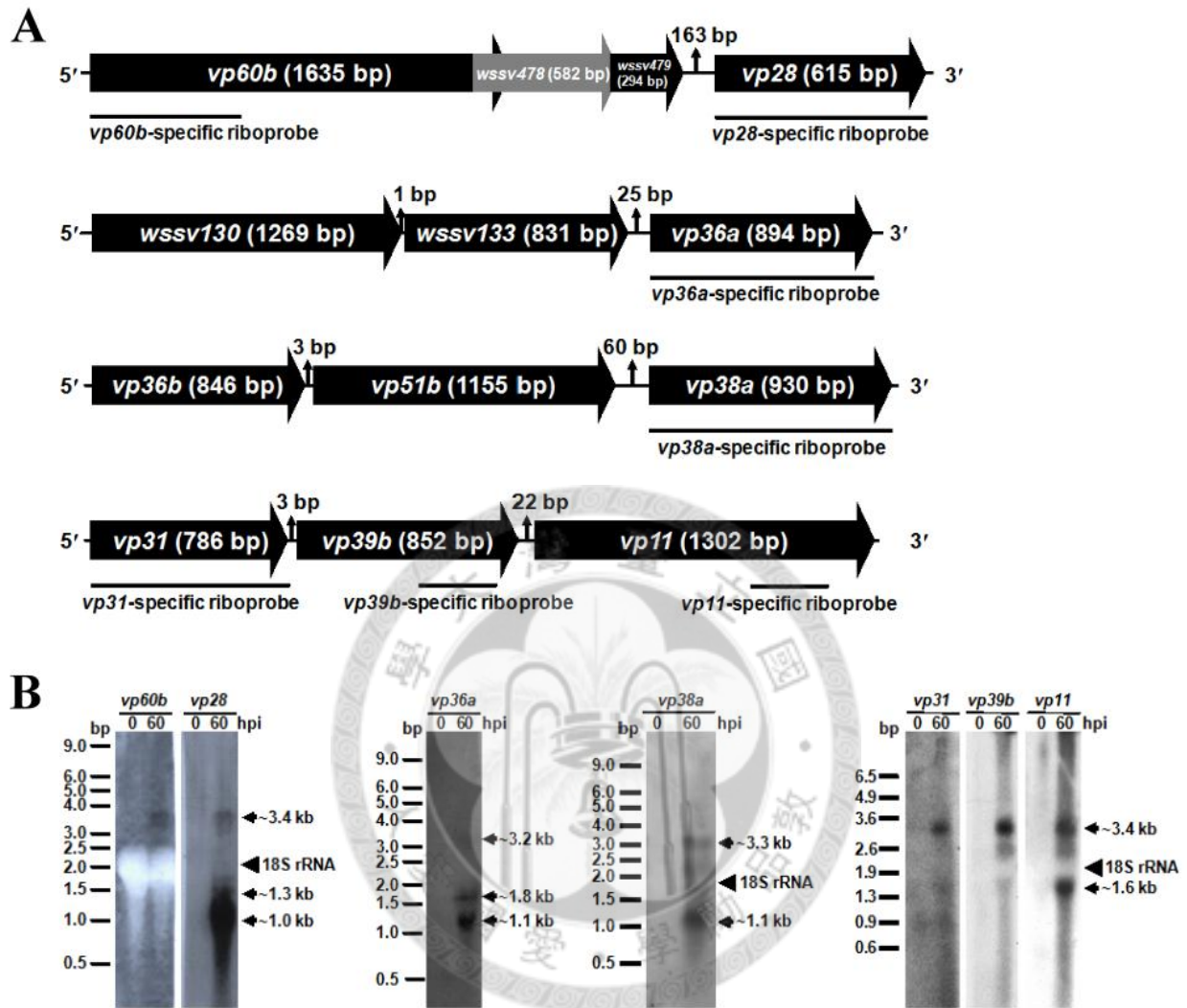


Fig. 1 Polycistronic mRNAs were transcribed from WSSV gene clusters. (A) Schematic diagrams of the WSSV gene clusters *vp60b/wssv478/wssv479/vp28*, *wssv130/wssv133/vp36a*, *vp36b/vp51b/vp38a* and *vp31/vp39b/vp11*. The gene-specific riboprobes used for Northern blot analysis are indicated by solid lines. (B) Northern blot analysis of total RNA isolated from the pleopods or gills of healthy (0 hpi) and WSSV-infected *P. monodon* (60 hpi) using *vp60b*, *vp28*, *vp36a*, *vp38a*, *vp31*, *vp39b* and *vp11*-specific riboprobes. For the first 3 clusters, about 20 μ g of

total RNA was isolated at 0 and 60 hpi, electrophoresed in the presence of formaldehyde, transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane and probed with the DIG-labeled gene-specific probes. For the *vp31/vp39b/vp11* cluster, about 30 µg of total RNA was isolated at 0 and 60 hpi, electrophoresed in the presence of formaldehyde, transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane and probed with the ³²P-labeled gene-specific probes. The size standards are based on RNA markers (Amersham Pharmacia Biotech, USA or Promega). The arrows indicate the monocistronic, bicistronic, and polycistronic mRNA transcripts. The 18S rRNA is also indicated (arrowhead).



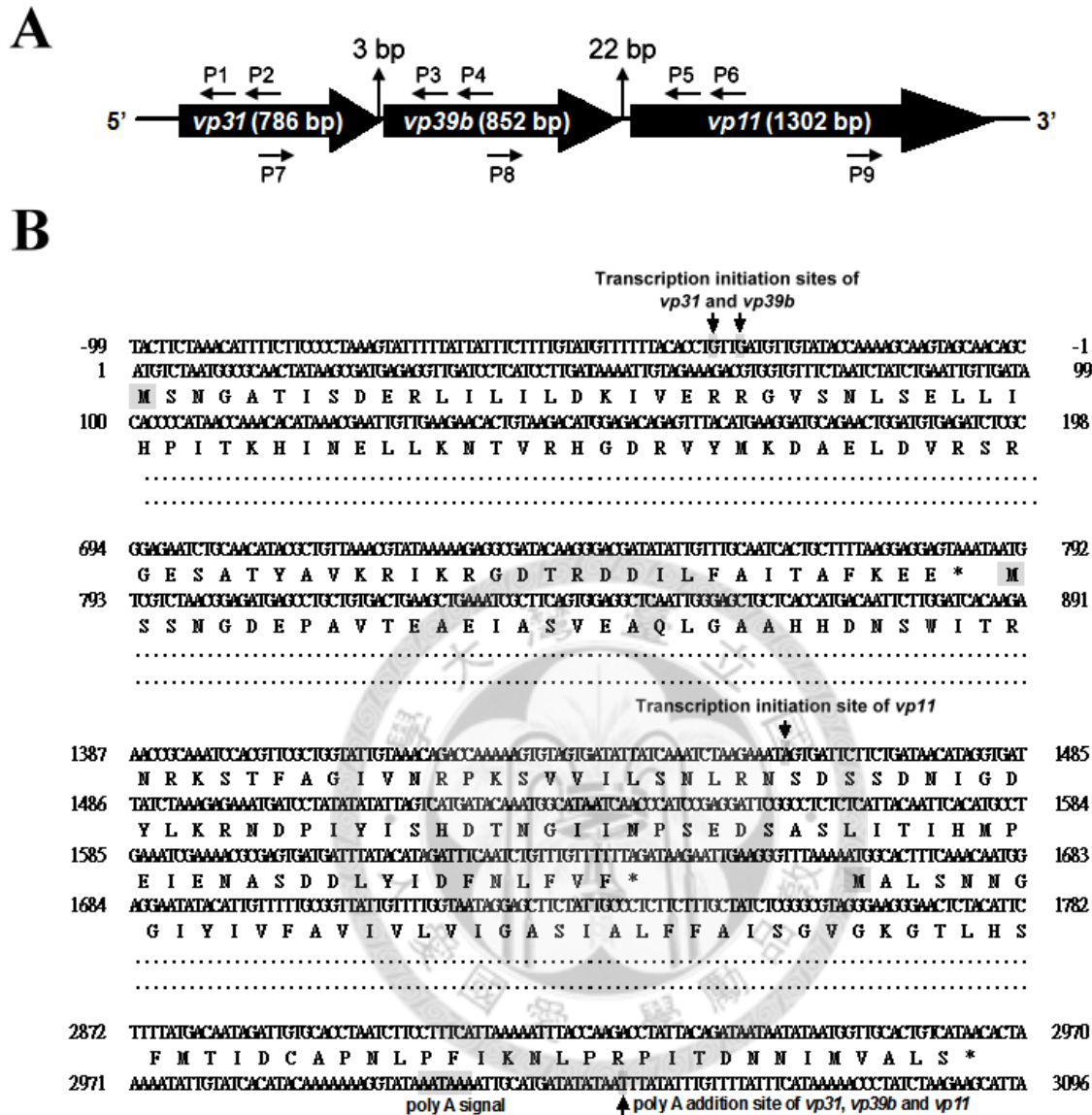


Fig. 2 Mapping the 5' and 3' end of the *vp31*, *vp39b* and *vp11* transcripts by 5'/3' RACE. (A)

Schematic diagram showing the locations of the primers used in the 5'/3' RACE. (P1: *vp31*-5'-RACE-sp2, P2: *vp31*-5'-RACE-sp1, P3: *vp39b*-5'-RACE-sp2, P4: *vp39b*-5'-RACE-sp1, P5: *vp11*-5'-RACE-sp2, P6: *vp11*-5'-RACE-sp1, P7: *wssv397*-R1, P8: *vp39b*-R2, P9: *vp11*-3'RACE; see Table 1) (B) The deduced amino sequence and corresponding nucleotides of

the three genes (*vp31*: nt 1→786; *vp39b*: nt 789→1641; *vp11*: nt 1664→2965). The shaded “M” and asterisk respectively represent the first amino acid methionine and stop codon of each gene. The poly-adenylation signal (AATAAA) is shaded. The transcriptional start sites and the poly “A” addition site are indicated by arrows.



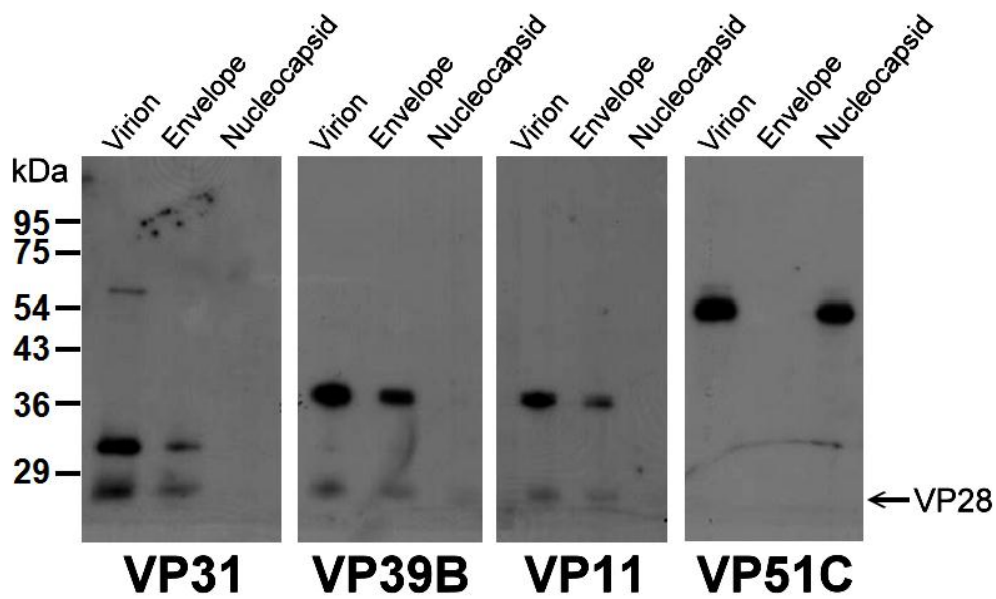


Fig. 3 Western blot analyses of VP31 VP39B and VP11. VP31, VP39B and VP11 were all detected in the purified total WSSV virions and in the envelope fraction. The nucleocapsid protein VP51C [53] was used as a fractionation quality control and was detected only in the total virions and the nucleocapsid fraction. Non-specific signals from the major envelope protein VP28 were also detected by the VP31, VP39B and VP11 antibodies.

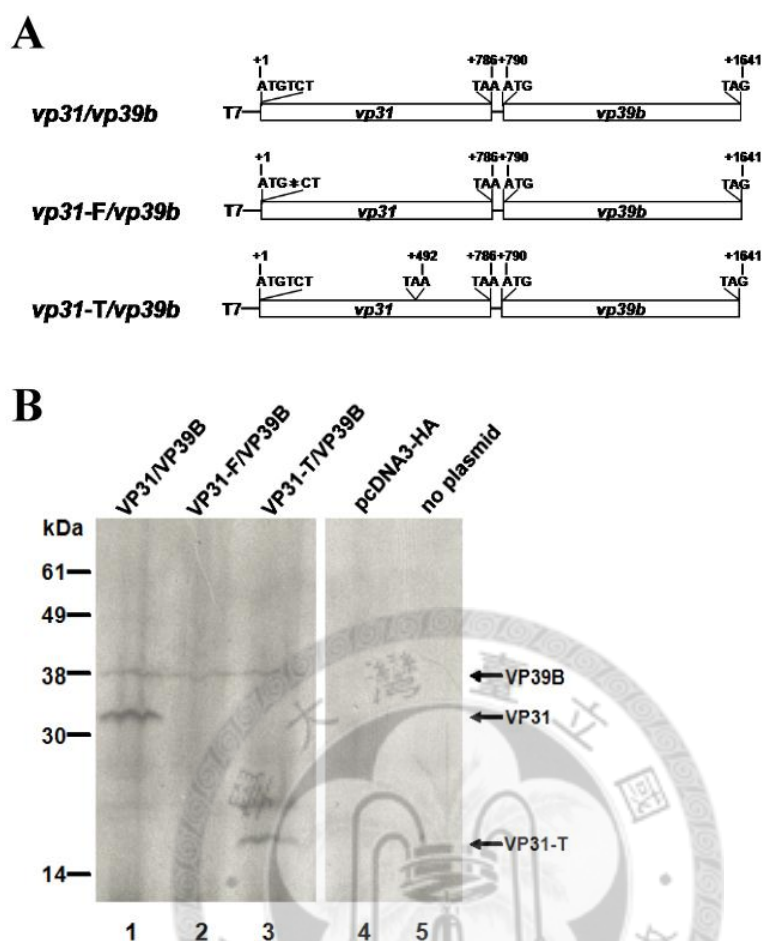


Fig. 4 Coupled *in vitro* transcription-translation of frame-shifted and truncated *vp31/vp39b* constructs. (A) Two mutant forms of the pcDNA3-HA-*vp31/vp39b* bicistronic plasmid were constructed. In the frame shift mutant, *vp31-F/vp39b*, a base from the second codon of *vp31* was deleted to generate a 20-codon nonsense open reading frame. In the truncation mutant, *vp31-T/vp39b*, codon 164 of *vp31* was mutated to a stop. (B) Translation products from the indicated constructs. Size standards were determined by protein prestained marker (Biomax).

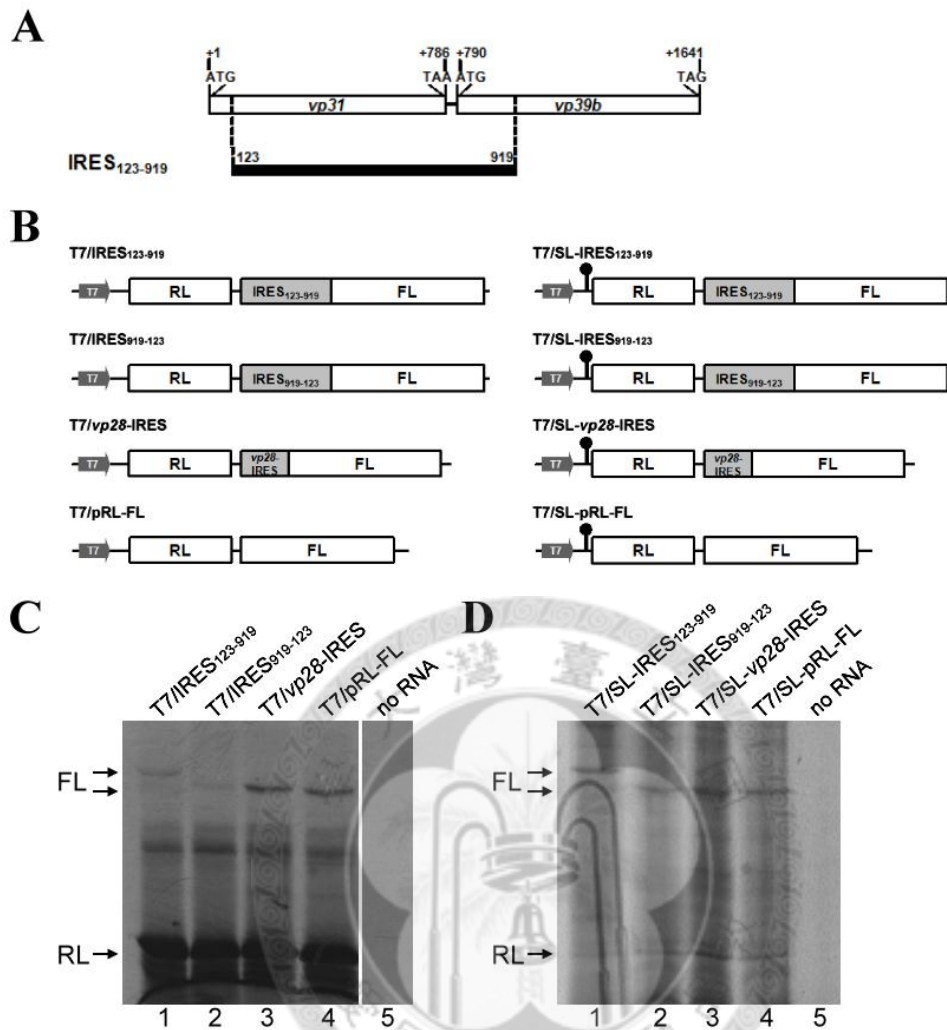


Fig. 5 The *vp31/vp39b* coding region exhibits IRES activity *in vitro*. (A) Location of the putative IRES element in the *vp31/vp39b* coding region. (B) Schematic diagrams of the dicistronic constructs of T7/pRL-FL and T7/SL-pRL-FL (SL: stem-loop). The stable stem-loop structure with a free energy of -62 kcal/mol was introduced upstream of the *Renilla* ORF in the vector T7/SL-pRL-FL (C)(D) After *in vitro* synthesis with T7 RNA polymerase, the indicated uncapped dicistronic transcripts were translated in Flexi RRL (Promega).

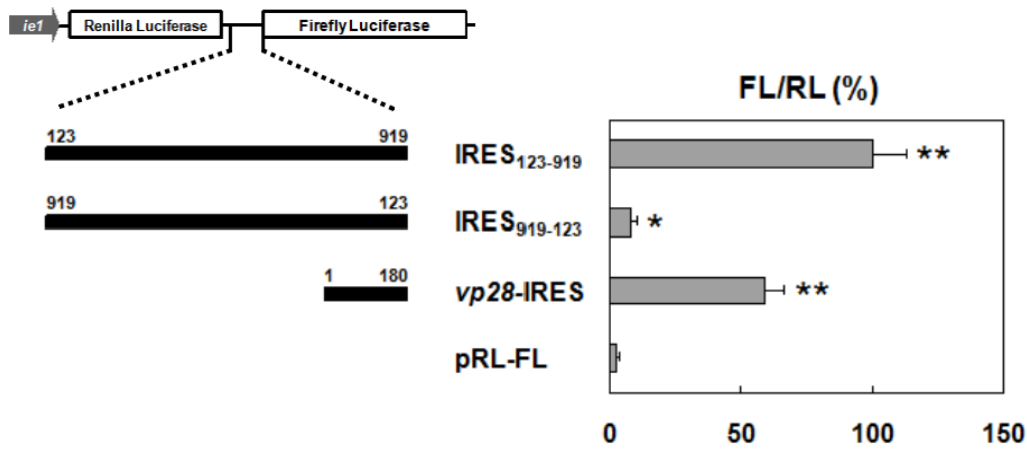


Fig. 6 The IRES element is active in Sf9 cells. The indicated IRES₁₂₃₋₉₁₉, IRES₉₁₉₋₁₂₃ and vp28-IRES fragments were cloned into a bicistronic pRL-FL plasmid with a WSSV *ie1*(-94/+52) promoter and transfected into Sf9 cells. Cells were harvested 48 h post-transfection, and the *Renilla* and firefly luciferase activities were measured. The ratio of firefly to *Renilla* luciferase was used as a indicator of IRES activity. Values were adjusted relative to *ie1*/ IRES₁₂₃₋₉₁₉, which was set to 100 %. Three independent transfection assays were performed, and the mean \pm SD was calculated. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ by one-way analysis of variance [ANOVA], relative to pRL-FL.)

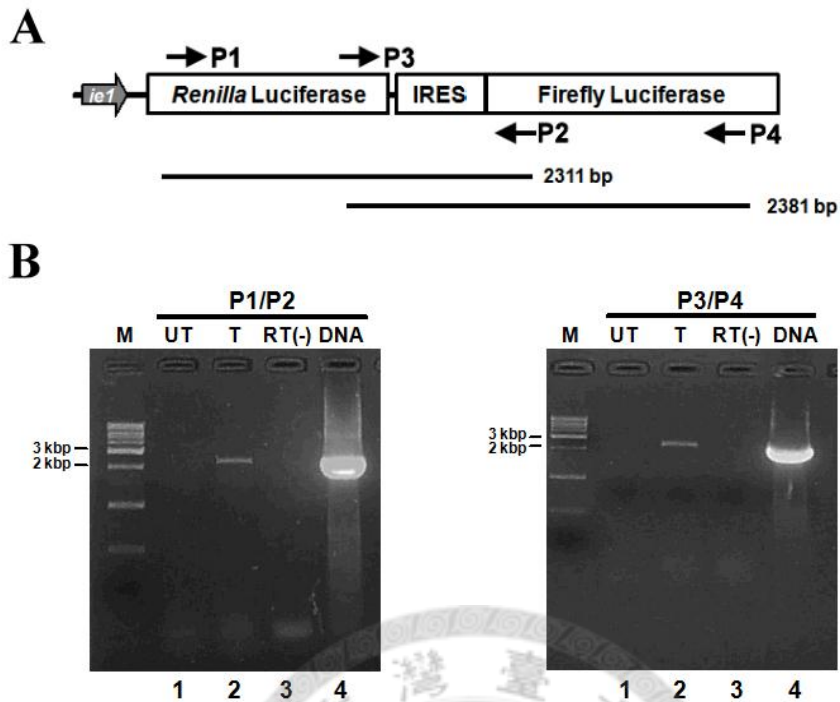


Fig. 7 The *ie1*/ IRES₁₂₃₋₉₁₉ transcript has no internal splice sites. (A) Schematic diagram of the *ie1*/pRL-FL-based dicistronic construct and the two primer sets used for reverse transcription (RT)-PCR. The primers P1/P2 and P3/P4 represent pRL-FL-N219-F/pRL-FL-C1732-R and pRL-FL-N1071-F/pRL-FL-C2654-R, respectively (see Table 1). (B) RT-PCR results for total RNA extracted from Sf9 cells transfected (T) or untransfected (UT) with the *ie1*/ IRES₁₂₃₋₉₁₉ bicistronic plasmid. In the negative RT(-) controls, RTase was omitted to verify that the RT-PCR products were specifically amplified from RNA and not from any contaminating plasmid DNA. The DNA lanes denote the PCR products from the *ie1*/ IRES₁₂₃₋₉₁₉ plasmid and were used as a positive size control. Lane M shows 1 kb DNA ladder I markers (LAMDA Biotech Inc.)

TABLE 1 primers used in this study

Primer name	Sequence	Usage
<i>vp31</i> -EcoRI-F1	5'-GAATTCGATGTCTAATGGCGCAAC-3'	Antibody preparation
<i>vp31</i> -NotI-R1	5'-AGGCGGCCGCTTACTCCTCCTTAAAAGCAG-3'	Antibody preparation/ Riboprobe for <i>vp31</i>
<i>vp39b</i> -BamHI-F1	5'GAGGATCCAATGTCGTCTAACGGAGATG-3'	Antibody preparation
<i>vp39b</i> -EcoRI-R1	5'-ATGAATTCCTAAAAACAAACAGATTGAAATC -3'	Antibody preparation/ Plasmid construction for TNT
<i>vp11</i> -N148-BamHI-F1	5'-GTGGATCCATATAAAATTAGACTCTAAATACAC-3'	Antibody preparation
<i>vp11</i> -C538-HindIII-R1	5'-TTC AAGCTTAATTGGTAGATTTTTGTGCAAC-3'	Antibody preparation
<i>vp31</i> -5'-RACE-sp1	5'-ATACCAATGTACAAGATTTTTGCGTTAG-3'	5'RACE for <i>vp31</i>
<i>vp39b</i> -5'-RACE-sp1	5'-GGATTGAAAGCGTCTTCGTAAAGATG-3'	5'RACE for <i>vp39b</i>
<i>vp11</i> -5'-RACE-sp1	5'-GCTCTCTCGTTTGACGTTGAAGCGCTG -3'	5'RACE for <i>vp11</i>
<i>vp31</i> -5'-RACE-sp2	5'-AGGCGAGATCTCACATCCAGTTCTGCATCC -3'	5'RACE for <i>vp31</i>
<i>vp39b</i> -5'-RACE-sp2	5'-CCGAATAGGCAATTGCACCTAAGCG-3'	5'RACE for <i>vp39b</i>
<i>vp11</i> -5'-RACE-sp2	5'-GTCGTCAGTTTTTTCATCATCGTCAGTG -3'	5'RACE for <i>vp11</i>
<i>wssv397</i> -R1	5'-CTGGTCAAGTAGGGCGGTGT-3'	3'RACE for <i>vp31</i>
<i>vp39b</i> -R2	5'-GGATCATGGAACCCAGGGAA-3'	3'RACE for <i>vp39b</i> / Riboprobe for <i>vp39b</i>

<i>vp11-3</i> 'RACE	5'-GCTCTGCAAGCACAGCTAAGG-3'	3'RACE for <i>vp11</i>
<i>vp31</i> -BamHI-F2	5'-GGGGATCCATGTCTAATGGCGCAACTATAAG-3'	Riboprobe for <i>vp31</i>
<i>vp39b</i> -F2	5'-CGAATCCTCGGATGGGTGA-3'	Riboprobe for <i>vp39b</i>
<i>vp11</i> -F2	5'-AGCGTATACCCGTACACGGT-3'	Riboprobe for <i>vp11</i>
<i>vp11</i> -R2	5'-AGACCCAGACGCAGAAATGG-3'	Riboprobe for <i>vp11</i>
<i>vp36a</i> -F	5'-ATGGATCCAATGGCATTACAGGAAAAGG-3'	DIG-labeled probe for <i>vp36a</i>
<i>vp36a</i> -R	5'-GGAAGCTTTCAAATACTACTACTATACATATT-3'	DIG-labeled probe for <i>vp36a</i>
<i>vp60b</i> -F	5'-GGGGATCCGATTGATAGGAGCGGAATTG-3'	DIG-labeled probe for <i>vp60b</i>
<i>vp60b</i> -R	5'-TTGAATTCTTACGTCGATAGCCAAAAGCTTTG-3'	DIG-labeled probe for <i>vp60b</i>
<i>vp28</i> -F	5'-CCCATATGGATCTTTCTTTCACTCTTTC-3'	DIG-labeled probe for <i>vp28</i>
<i>vp28</i> -R	5'-CCCTCGAGTTACTCGGTCTCAGTGCCAGAGT -3'	DIG-labeled probe for <i>vp28</i>
<i>vp38a</i> -F	5'-AAGGATCCCATGTCTTCTTCGTCTTCTG-3'	DIG-labeled probe for <i>vp38a</i>
<i>vp38a</i> -R	5'-AAGAATTCTTATGAACATGTTACAATTATTCG-3'	DIG-labeled probe for <i>vp38a</i>
<i>vp31</i> -BamHI-F3	5'-AGGGATCCCATGTCTAATGGCGCAACTATAAG-3'	Plasmid construction for TNT
<i>vp31</i> -MU491(T→A)	5'-TAGTTTCGTTCCATAAATGATGAGGATG -3'	Plasmid construction for TNT
<i>vp31</i> -REV489	5'-TTTTGCCGTTATTTTAAAATCTCCCAAGG -3'	Plasmid construction for TNT
<i>vp31</i> -D4FS-BamHI-F4	5'-GGGGATCCAATGCTAATGGCGCAACTAT-3'	Plasmid construction for TNT
<i>ie1</i> promoter-SacI-F	5'-AGGAGCTCCCTTGTTACTCATTTATTCCTA-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay

<i>iel</i> promoter-NheI-R	5'- <u>CCGCTAGC</u> CTTGAGTGGAGAGAGAGA - 3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp31</i> -IRF1-N123-SmaI	5'- <u>CACCCGGG</u> CGAATTGTTGAAGAACACTG-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp39b</i> -IRR1-C919-NcoI	5'- <u>AACCATGG</u> CTAAGCGATACTTTAATTG-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp39b</i> -IRF1-C919-SmaI-F	5'- <u>AACCCGGG</u> CTAAGCGATACTTTAATTGG-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp31</i> -IRR1-N123-NcoI-R	5'- <u>CACCATGG</u> CGAATTGTTGAAGAACACTG-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp28</i> IRES-SmaI-F	5'- <u>TGCCCGGG</u> TAGACCCTGGCTTACTGTA-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
<i>vp28</i> IRES-NcoI-R	5'- <u>TCCCATGG</u> GACGAGTTTTTTTTCTTTATC-3'	Plasmid construction for dual luciferas assay
pRL-FL-N219-F	5'-GTCCGCAGTGGTGGGCCAGATG-3'	RT-PCR assay
pRL-FL-C1732-R	5'-CGAAGGACTCTGGCACAAAATCGT -3'	RT-PCR assay
pRL-FL-N1071-F	5'-CGTTCGTTGAGCGAGTTCTC -3'	RT-PCR assay
pRL-FL-C2654-R	5'-GTCATCGTCTTTCCGTGCTC-3'	RT-PCR assay

第三章、白點症病毒利用 IRES 序列調控高表現基因 *icp35* 之轉譯作用

第一節、中文摘要

蝦白點症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 為一大型 dsDNA 病毒，其基因體大小約為 300 kbp。先前研究證實 WSSV 經由轉錄作用可產生許多多順反子 mRNA (polycistronic mRNA)，並且可利用內部核糖體進入位置 (internal ribosome entry site; IRES) 進行轉譯作用。非結構性蛋白基因 *icp35* 為一高表現量基因，且可與其他基因共同被轉錄成一個多順反子 mRNA，因此我們利用雙冷光酵素報導基因分析系統 (dual luciferase reporter assay) 證實 *icp35* 之 5' UTR 具有一個 IRES 序列可調控該蛋白之轉譯作用。根據刪除法 (deletion analysis) 之分析結果，發現莖環結構 (stem loop) VII 及 VIII 主要負責 *icp35* IRES 之活性。利用無啟動子 (promoterless) 實驗、RT-PCR 以及置入一穩定莖環結構於水母冷光酵素 (*Renilla luciferase*) ATG 上游等分析，已排除此 IRES 活性是來自於潛在啟動子 (cryptic promoter)、異常剪接作用 (abnormal splicing) 或是核糖體連讀轉譯 (ribosomal read-through) 之可能性。利用 *icp35* 的雙股 RNA 干擾 (dsRNAi) 技術進行基因靜默化後，會導致 WSSV 攻毒實驗之死亡率以及病毒複製量呈現顯著性下降，因此我們推論 ICP35 對於 WSSV 之複製增殖具有重要性。利用 tunicamycin 處理細胞，eIF2 α 會受到磷酸化進而導致宿主之帽依賴型轉譯作用受到抑制，同時我們也發現 *icp35* IRES 活性亦會受到影響而下降，顯示此 IRES 活性需要 eIF2 之參與。本研究證實一個核酸嵌入劑 (nucleic acid intercalating drug) quinacrine (QC) 在細胞實驗中對於 *icp35* IRES 具有顯著性的抑制作用；

此外，WSSV 攻毒試驗結果也顯示若同時施打 WSSV 病毒液與 QC 會降低死亡率以及病毒複製量。

關鍵詞：蝦；白點症病毒；內部核醣體進入位置；多順反子 mRNA；ICP35



第二節、英文摘要

Although shrimp white spot syndrome virus (WSSV) is a large dsDNA virus (~300 kbp), it expresses many polycistronic mRNAs that are likely to use internal ribosome entry site (IRES) elements for translation. The gene of the highly expressed non-structural protein ICP35 is encoded by a polycistronic mRNA, and here we use a dual luciferase assay to demonstrate that this protein is translated cap-independently by an IRES element located in the 5' UTR of *icp35*. A deletion analysis of this region showed that IRES activity was due to stem loops VII and VIII. A promoterless assay, an RT-PCR analysis and a stable stem-loop insertion upstream of Renilla luciferase ORF were respectively used to rule out the possibility that cryptic promoter activity, abnormal splicing or read-through were contributing to the IRES activity. The importance of ICP35 to viral replication was demonstrated in a dsRNAi knockdown experiment in which the mortality of the *icp35* dsRNA group was significantly reduced. Using tunicamycin, we further show that eIF2 α is required for *icp35* IRES activity. We also found that the intercalating drug quinacrine significantly inhibited *icp35* IRES activity *in vitro*, and reduced the mortality rate and viral copy number in WSSV-challenged shrimp.

KEYWORDS: Shrimp; white spot syndrome virus (WSSV); internal ribosome entry site (IRES); polycistronic mRNA; ICP35

第三節、前言

真核生物與病毒皆可利用帽依賴型 (cap-dependent) 及非帽依賴型轉譯機制 (cap-independent translation mechanism) 進行蛋白合成之調控。帽依賴型轉譯作用需要透過 eIF4F 先辨識 mRNA 5' 端之帽結構 (cap structure, m⁷GpppN)，方能與 43S pre-initiation complex 結合，並進行後續的轉譯起始、延長及終止等步驟；然而，非帽依賴型轉譯作用不需要透過帽結構，可直接從 mRNA 內部開始進行蛋白之合成，此種特殊轉譯作用包括內部核糖體進入位置 (internal ribosome entry site; IRES)、遺漏性掃描 (leaky scanning)，或是轉譯作用再起始 (translation reinitiation) 等 [5, 7, 80]。

IRES 序列由 RNA 分子組成，通常可形成穩定之二級或三級結構，透過本身的結構可以直接吸引宿主的轉譯系統與其結合，因此可以由 mRNA 內部進行蛋白合成 [5-7]。根據目前有關 IRES 轉譯機制之研究報導，可以發現許多病毒會利用 IRES 轉譯機制調控病毒蛋白之合成，其中有關 RNA 病毒之研究佔多數，例如微小 RNA 病毒科 (Picornaviruses)、黃病毒科 (Flaviviruses)、雙順反子病毒科 (Dicistroviruses) 等至少五個 RNA 病毒科下的部分病毒皆具有 IRES 序列 [81]；然而，至今被證實具有 IRES 序列的 DNA 病毒僅有少數，相關研究也較少，包括卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV) [57-59]、EB 病毒 (Epstein-Barr virus ; EBV) [82]、單純皰疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) [60]、鼠疱疹病毒 68 型 (Murine gammaherpesvirus 68, MHV-68) [83]、馬立克病毒 (Marek's disease virus; MDV) [84]，以及猴病毒 40 (Simian virus 40, SV40) [61]。此外，先前之研究報導亦指出大型 dsDNA 病毒—蝦白點症病毒 (White spot syndrome virus,

WSSV) 具有兩個 IRES 序列，分別位於結構性蛋白基因 *vp28* 之 5' TUR 以及 *vp31/vp39b* 編碼區內 (coding region)，負責調控 VP28 以及 VP39B 之表現 [62, 76]。

Chen 等人 (2002a) 利用 *wssv019* 之反向 RNA 探針進行北方轉印法，發現其可偵測到兩個轉錄本，一為帶有 *wssv023*、*wssv019* 及其他基因之多順反子轉錄本 (5.5 kb)，另一為只包含 *wssv019* 的單順反子 mRNA (1.3 kb) [46]，因此我們推測 *wssv019* 有可能透過非帽依賴型轉譯作用進行蛋白合成。本論文之研究成果已鑑定在 *wssv019* 之 5' UTR 具有一個 IRES 序列，活性高於其他兩個 WSSV IRES 序列。此外，Chen 等人 (2002a) 先前曾發表 WSSV019 為結構性蛋白 VP35 [46]，然而根據我們的研究結果，顯示 WSSV019 為高表現量之非結構性蛋白，因此重新命名其為 ICP35。



第四節、材料與方法

1. 實驗動物

本研究所選用之實驗動物為南美白對蝦 (*Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei*)，平均體重約 4 g，購於國立台灣海洋大學之水生動物中心 (Aquatic Animal Center in National Taiwan Ocean University)，或是來自東港養殖池。在實驗開始前，先畜養於實驗室之養殖缸中 (30 ± 1 ppt, $26 \pm 1^\circ\text{C}$) 至少 3-5 天，並利用 IQ2000™ WSSV diagnostic kit (GeneReach Biotechnology Corp.) 進行 WSSV 病毒檢測，檢測結果顯示為未感染 (WSSV-free) 之蝦隻方能進行後續實驗。

2. 白點症病毒液之製備及人工注射感染試驗

本實驗方法如同第二章之材料與方法所述，唯製備病毒液所選用蝦隻改為無帶原之夏威夷白蝦種蝦 (Specific Pathogen Free, SPF)。將保存於 -80°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，置於預冷之研鉢中，每克組織加入 9 ml 0.9% 氯化鈉 (NaCl) 溶液研磨之，使其均質化 (homogenization)，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°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體重約為 35 g 之無帶原夏威夷白蝦種蝦，每 20 g 注射約 50 μl 之稀釋病毒液，在第四及第五體節之肌肉部位注射之，在人工感染後 72 小時，抽取嚴重感染白蝦之血淋巴液，以生理緩衝液 (PBS) 5 倍稀釋後，分裝於離心管中，並置於 -80°C 保存之，此血淋巴液即為日後人工感染之病毒液原液。

將病毒液原液自-80°C 冰箱取出，以 PBS 進行連續稀釋至適當之稀釋倍數，此即為人工感染試驗之病毒液，將此病毒液注射到第四及第五體節之肌肉部位以進行人工感染。收取未感染及感染後不同時間點之蝦體組織 (0 [未感染]、2、4、6、8、12、18、24、36 及 60 hr p.i., hours post infection)，利用火焰燒紅消毒之鑷子分別將蝦的鰓、泳足、步足、表皮、肌肉、淋巴、胃、肝胰腺及心等器官取出，儘速放於液態氮中保存之，以供未來抽取 RNA 或萃取蛋白質。同時收取蝦體一隻泳足樣本，置於 1.5 ml 微量離心管中，並保存於-20 °C，可抽取 DNA 以進行病毒帶原程度之檢測。

3. 純化白點症病毒顆粒

本實驗方法如同第二章之材料與方法所述。本試驗製備之 WSSV 病毒顆粒，其純化過程係依照 Xie 等人 (2006) 所發表之方法 [63]。將嚴重感染白蝦之血淋巴液自-80°C 冰箱取出，以 PBS 稀釋後，利用孔徑為 0.45 μm 之濾膜過濾，將此病毒液注射到 20-25 g 之健康螯蝦 (crayfish, *Procambarus clark*) 之第二及第三體節之肌肉部位，以進行人工感染。主要實驗步驟簡述如下，於人工感染四至六天後，將 5-6 隻瀕死螯蝦之肝胰腺去除，其餘所有組織加入含有蛋白抑制劑 (protease inhibitor [1 mM]phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, and 1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 之 TNE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) 中，並以均質機進行均質化作用 (homogenization)，接著在 4°C 以 3,500 \times g 離心 5 分鐘，收取第一次上清液保存之。將剩餘之組織沉澱物再次進行均質化後收取第二次上清液，將兩次上清液合併，利用尼龍網 (400 mesh nylon net) 進行過濾後，以 30,000 \times

g 離心 30 分鐘。離心完成後，小心倒去上清液，將上層之粉紅色鬆散層 (upper loose layer) 以巴式吸管 (Pasteur pipette) 小心沖洗，並將下層之灰色緊實層 (lower compact layer) 重新懸浮於 TM 緩衝液中 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5)，再以 3,000 × g 離心 5 分鐘。接著收取上清液，以 30,000 × g 離心 20 分鐘，倒去上清液並去除粉紅色鬆散層後，將白色病毒顆粒沉澱物重新懸浮於含有 0.1% NaN₃ 之 TM 緩衝液中，並置換到新的 1.5 ml 微量離心管中，以 650 × g 離心 5 分鐘，重複此離心步驟三至五次以去除粉紅色之不純物，即可得到已純化完成之白色病毒顆粒，並置於 4°C 保存之。白點症病毒顆粒之製備純度可利用負染法 (Negative staining) 並以穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope) 觀察之。

4. 西方轉印法 (Western blot assay)

本實驗方法如同第二章之材料與方法所述，唯使用之 blocking buffer、一級抗體稀釋倍數等依各抗體而有所不同。將蝦組織自液態氮中取出，並在研鉢中以液態氮磨碎，取出已預冷好並添加蛋白酶抑制劑 (complete protease inhibitor cocktail; Roche) 之 1/3× PBS 與磨碎之粉末均勻混合，置於冰上作用十分鐘使細胞完全裂解。之後在 4°C 下以 12000 × g 離心 15 分鐘，待離心完成後，小心收取上清液，此即為全蛋白 (total protein)，保存於 -80°C。全蛋白之濃度及定量方式採用 Bradford 蛋白質定量法 (Bio-Rad Bradford Protein Assay)。

將蛋白質樣本加入等體積之 2× SDS sample buffer (1× SDS sample buffer : 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH

6.8) ，置於 100°C 乾浴槽中 10 分鐘，之後以 10,000 × g 於室溫下離心 3 分鐘，取適量的上清液加到 SDS 聚丙烯醯胺膠，進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。先以 80 伏特電壓進行 stacking running 後，再轉為 120 伏特電壓進行電泳，當染劑 (tracking dye) 到達凝膠底部即停止。將膠體小心取下，利用濕式蛋白質轉印法 (wet transfer method; Hoefer apparatus) 轉印至 PVDF 膜上 (polyvinylidene difluoride membrane, Minipore)，轉印好之 PVDF 膜可立即進行後續之實驗。

在進行 WSSV 蛋白時序表現分析實驗 (time course expression experiments) 時，首先將轉印好之 PVDF 膜置於 5% skim milk (Difco Laboratories; 以 w/v 溶於 0.5% TBST [0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5% Tween-20, pH 7.4])，在 4°C 進行 blocking 16 小時。將 PVDF 轉換至以 5% skim milk 稀釋 10,000 倍的一級抗體中 (ICP35, VP28, VP51C or β -tubulin)，於室溫下反應 1 小時，之後 PVDF 膜以 washing buffer (0.5% TBST) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再將 PVDF 膜轉換至以 5% skim milk 稀釋 10,000 倍之二級抗體 (goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody, Sigma) 中，於室溫下反應 1 小時，再以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘。最後 PVDF 膜以 Western Lightning® Plus-ECL reagents (PerkinElmer) 進行呈色，並以 Fuji *super* RX 底片於室溫下壓片，經顯影後即可知反應結果。

5. 合成 *icp35* 及 EGFP dsRNA

首先針對 *icp35* 與 EGFP 基因設計專一性引子對 (*icp35*-F1/*icp35*-R687 and *EGFP*-F/*EGFP*-R; Tablev 1) 並進行 PCR 反應，反應完成後將 PCR 產物以 gel extraction kit

(Qiagen) 進行純化。將上述 PCR 片段作為 DNA 模板，利用 5' 端帶有 T7 promoter 序列的專一性引子與 R 端引子進行第二次 PCR 反應 (*icp35*-dsRNA-T7-F1/*icp35*-R687 and *EGFP*-T7-F/*EGFP*-R; Table 1), 可得到 5' 端有 T7 promoter 的 PCR 產物, 反應完成後將 PCR 產物以 gel extraction kit (Qiagen) 進行純化; 以 3' 端帶有 T7 promoter 序列專一性引子與 F 端引子進行第二次 PCR 反應 (*icp35*-F1/ *icp35*-dsRNA-T7-R687 and *EGFP*-F/*EGFP*-T7-R; Table 1), 可得到 3' 端有 T7 promoter 的 PCR 產物, 反應完成後將 PCR 產物以 gel extraction kit (Qiagen) 進行純化。各取 1 μ g 5' 與 3' 端帶有 T7 promoter 的 PCR 產物作為 DNA 模板, 利用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) 試劑組進行試管內轉錄作用 (*in vitro* transcription), 可分別合成正向 (sense) 與反向 (anti-sense) 單股 RNA (ssRNA)。將兩種單股 RNA 均勻混合, 至於 70°C 作用十分鐘解開個別之二級結構, 接著置於室溫下至少 20 分鐘, 使兩個互補的單股 RNA 相互黏合成雙股 RNA (dsRNA)。當黏合反應完成後, 利用 DNase I (Invitrogen) 之處理去除 DNA 模板, 再經過 phenol/chloroform 萃取及酒精沉澱等步驟以純化 dsRNA, 最後以 NanoDrop® (ND-1000) spectrophotometer 測定 dsRNA 濃度及純度。

6. 利用雙股 RNA 干擾技術 (dsRNA-mediated interference) 進行 *icp35* 基因之功能性分析

本實驗將平均重約 4 g 的白蝦隨機分為兩大組 (set), 將各大組再次分為三小組 (group), 每小組 10-12 隻。各大組內的其中兩小組分別注射 *icp35* dsRNA 或 *EGFP* dsRNA, 每隻蝦施打 50 μ l 內含 4 μ g dsRNA (1 μ g/g body weight) 之 PBS, 另一小組則施打 50 μ l

PBS。在注射 dsRNA 或 PBS 48 小時後，一大組施打 50 μ l 以 PBS 稀釋 50 \times 之 WSSV 病毒液 (組別命名為 *icp35/WSSV*、*EGFP/WSSV* 及 *PBS/WSSV*)，另一大組則施打 50 μ l PBS 作為控制組 (組別命名為 *icp35/PBS*、*EGFP/PBS* 及 *PBS/PBS*)。在感染後 0、24、48 及 96 小時，每小組隨機選取 3 隻蝦進行組織採樣，置於液態氮中保存；同時收取兩隻泳足作為後續 RT-PCR 分析以及進行白點症病毒絕對定量之用。

此外，我們同時重複上述實驗以觀察各組別之死亡率，此實驗組別與上述實驗組別皆相同 (共有兩大組及六小組)，每 12 小時內至少觀察一次以上並記錄各組之死亡隻數。

7. 反轉錄酶-聚合酶鏈反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

本實驗方法如同第二章之材料與方法所述。全 RNA (total RNA) 之萃取係利用 TRIzol reagent (Invitrogen)，並依照所附之說明書步驟進行。取 1 μ g RNase-free DNase I (Invitrogen) 處理過的 total RNA，加入 0.5 μ l 之 oligo-dT (100 μ M) 引子以及 0.5 μ l 之 dNTP (10 mM)，於 65 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，迅速置於冰上至少一分鐘待其冷卻，之後再加入 1 μ l 0.1M DTT、4 μ l 5 \times transcription buffer、1 μ l SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 與 1 μ l RNaseOUT (Invitrogen)，於 50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄反應 30-60 分鐘以合成 cDNA，再於 70 $^{\circ}$ C 加熱 15 分鐘終止反應。

反轉錄酶-聚合酶鏈反應以 cDNA 為模版，利用 *icp35*、*iel* 及 *EF-1 α* 之專一性引子對 (Table 1) 進行 PCR 反應，反應程序設定如下：(1) 94 $^{\circ}$ C 反應 3 分鐘；(2) Denaturing 溫度為 94 $^{\circ}$ C，反應 30 秒；(3) Annealing 溫度為 55 $^{\circ}$ C，反應 30 秒；(4) Elongation 溫度為 72 $^{\circ}$ C，

反應 30 秒；(5) 將步驟 (2) 到 (4) 重複 35 次；(6)以 72°C 20 分鐘進行最後延伸 (final extension)。

8. 白點症病毒之絕對定量 (Absolute quantification of WSSV loads)

為確認在 *icp35* dsRNA 干擾實驗中，白點症病毒之複製增殖是否受到影響，本實驗利用 IQ REAL WSSV quantitative system (GeneReach Biotechnology Corp.) 進行白點症病毒之絕對定量。首先取出感染後 48 及 96 小時之泳足樣本，利用試劑組所附之 silica-based resin 進行 genomic DNA 之萃取，萃取方式依照說明書之步驟進行。取適量之 genomic DNA 依照試劑組說明書步驟以 ABI PRISM 7300 機器進行即時定量聚合酵素連鎖反應。白點症病毒量 (WSSV load) 之計算方式係以各樣本中所得之 WSSV genomic DNA 數值除以蝦 genomic DNA 數值。每一個實驗組在各個感染時間點皆隨機採樣 3 隻蝦泳足進行白點症病毒載量 (WSSV loads) 之絕對定量分析，實驗數據以平均值±標準差 (means ± SD [standard deviation]) 表示，並進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。

9. 質體構築 (Plasmid construction)

本實驗方法如同第二章之材料與方法所述。為利用雙冷光酵素報導基因分析系統 (dual luciferase reporter assay) 進行 IRES 活性分析，本研究根據 Bieleski & Talbot (2001) 等人所述之方法構築雙冷光蛋白酶基因表達載體 (pRL-FL) [57]。接著，為構築適用於 Sf9 細

胞中之表現載體，我們首先利用 SacI 以及 NheI 切割位將白點症病毒之 IE1 promoter- wssv *ie1*(-94/+52) [65] 送入 pRL-FL 載體中，進行 *ie1*/ pRL-FL 之構築。利用不同之引子對進行 PCR 反應擴增不同長度之 *icp35* IRES 序列、IRES₁₂₃₋₉₁₉、以及 *vp28*-IRES (Table 1) 等片段，再利用 SmaI 及 NcoI 之切割位，送入 *ie1*/ pRL-FL 中，進行質體選殖並完成定序。質體 *ie1*/IRES₁₂₃₋₉₁₉ 以及 *ie1*/*vp28*-IRES 作為與 *icp35* IRES 序列比較之控制組；而 *ie1*/ pRL-FL 作為負控制組 (negative control)。

為進行無啟動子實驗 (promoterless assay)，我們將質體 *ie1*/pRL-*icp35*(-291/-1)-FL 以及 *ie1*/pRL-*icp35*(-198/-1)-FL 之 *ie1* 啟動子利用 SacI 及 NheI 切割位進行移除後，利用 Klenow 酵素將黏性末端 (sticky end) 補齊成為平端 (blunt end)，再以 T4 DNA ligase (Promega) 進行接合作用 (ligation)，最後利用大腸桿菌 DH5 α 進行轉型作用 (transformation)。待質體選殖及定序完成後，可得到 pRL-*icp35*(-291/-1)-FL(-P) 以及 pRL-*icp35*(-198/-1)-FL(-P) 質體進行無啟動子實驗。

為排除核糖體進行連讀轉譯 (ribosomal read-through) 之可能性，本研究依照 Bielecki and Talbot (2001) 等人所述之方法 [57] 將 60- nucleotide (5'-GCTAGCGGTACGGCAGTGCCGTACGACGAATTCGTCGTACGGCACTGCCGTACCGACTGCCGTACCGCTAGC-3') 以 NheI 限制酶酵素切位送入 *Renilla* luciferase start codon 之上游位置，其會形成穩定的 28-bp stem-loop 二級結構 ($\Delta G = -62$ kcal/mol) 並抑制 *Renilla* luciferase 之蛋白合成作用。在進行質體選殖並完成定序後，可得到 *ie1*/SL-pRL-*icp35*(-198/-1)-FL 進行後續實驗。

10. IRES 活性分析

將帶有 IRES 片段的雙冷光蛋白酶基因質體，利用 effectene transfection reagent (Qiagen) 進行轉染作用 (transfection) 送入 Sf9 細胞株中。在細胞轉染後 48 小時，將細胞以 1 PBS 清洗一次，加入 100 μ l passive lysis buffer (Promega)，置於震盪器上 15 分鐘使細胞完全裂解，取 10 μ l 利用 Dual-Luciferase[®] Reporter (DLRTM) Assay System (Promega) 進行螢火蟲 (Photinuspyralis) 與珊瑚蟲 (Renilla reniformis, sea pansy) 兩種冷光酵素活性之分析，測量方法依照其所附的手冊說明步驟進行之。將測量出來的螢火蟲酵素活性除以珊瑚蟲酵素活性 (firefly luciferase/Renilla luciferase)，其所得之比值作為測量 IRES 活性之依據。每組實驗結果皆重複進行至少三次以上之獨立實驗，實驗數據以平均值 \pm 標準差 (means \pm SD [standard deviation]) 表示，並進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。

為確認在 Sf9 細胞進行轉染作用 (transfection) 時，雙順反子 mRNA 是否發生異常剪接作用導致產生只帶有 firefly luciferase 的單順反子 mRNA，我們利用專一性引子 P1/P2 (Table 1) 進行 RT-PCR 分析，反應程序設定如下：(1) 94 $^{\circ}$ C 反應 3 分鐘；(2) Denaturing 溫度為 94 $^{\circ}$ C，反應 30 秒；(3) Annealing 溫度為 60 $^{\circ}$ C，反應 30 秒；(4) Elongation 溫度為 72 $^{\circ}$ C，反應 2 分鐘；(5) 將步驟 (2) 到 (4) 重複 32 次；(6) 以 72 $^{\circ}$ C 20 分鐘進行最後延伸 (final extension)。將所得之 PCR 產物與 pGEM-T easy 載體 (Promega) 以 T4 DNA ligase 進行接合作用，再經轉型作用送入勝任細胞 DH5 α 中，加入適量之 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) 及 isopropyl- β

-D-thiogalactopyranoside (IPTG)，於 37°C 培養隔夜後，挑選白色菌落再次以 P1/P2 引子對進行 PCR 反應以確認哪些菌落帶有該片段，並進行定序。

為了解 *icp35* IRES 之活性是否需要 eIF2 α ，我們取 1 μ g 質體 *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* 在 24-well plate 中以 SuperFect transfection reagent (Qiagen) 進行轉染作用，轉染方法依照其所附之說明書步驟。在轉染 24 小時後，於各 well 中加入 tunicamycin (Sigma) 使其最終濃度為 2.5 μ g/ml，或是加入等量之 DMSO (100%) 作為控制組 (control)。待藥物處理 15 小時後，隨即將細胞裂解，並利用 Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) Assay System (Promega) 進行兩種冷光酵素之活性分析。上述實驗皆重複進行至少三次之獨立實驗，實驗數據以平均值 \pm 標準差 (means \pm SD [standard deviation]) 表示，並進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。此外，為確認在 tunicamycin 處理後 eIF2 α 之磷酸化程度，我們完成另一重複之獨立實驗進行西方轉印法分析。主要實驗步驟簡述如下，首先將 2 \times sample bufferr 直接與細胞混和，置於 100°C 乾浴槽作用 10 分鐘，再以 12000 \times g 離心 3 分鐘，並收取上清液。將 15 μ l 上清液進行進行 SDS 聚丙烯醯胺膠電泳，並以濕式轉印法進行轉印作用。待轉印完成後，取出 PVDF 膜置入 5% BSA 中 (Bovine serum albumin, BSA; 以 w/v 溶於 0.1% TBST [0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4])，於室溫下進行 blocking 作用 1 小時。之後將 PVDF 膜轉換至以 2.5% BSA 稀釋 1000 倍的一級抗體 Phospho-eIF2 α (Ser51) (Cell Signaling) 或是 EIF2S1 (Abcam) 溶液之中，於 4°C 作用 16 小時。反應完成後以 washing buffer (0.1% TBST) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再將 PVDF 膜置入以以 2.5% BSA 稀釋 10,000 倍的二級抗體之中 (anti-Rabbit 或是 anti-Mouse IgG

secondary antibody [Santa Cruz Biotechnology])，於室溫下作用 1 小時。最後再以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘。將 PVDF 膜以 Western Lightning® Plus-ECL reagents (PerkinElmer) 進行呈色，並以 Fuji ^{super} RX 底片於室溫下壓片，經顯影後即可知反應結果。

為確認核酸嵌入劑 quinacrine (QC) 是否會影響 *icp35* IRES 之活性，取 0.4 µg 質體 *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* 在 24 well 中以 Effectene transfection reagent (Qiagen) 進行轉染作用，轉染方法依照說明書之步驟。在加入轉染混和物後，隨即加入 quinacrine (quinacrine dihydrochloride [Sigma-Aldrich]; 以 ddH₂O 配置成 10 mM stock solution，並以 0.22 µm filter 進行過濾，置於 -20°C 保存之)，使各 well 中之最終濃度為 0 µM、5 µM、10 µM 或是 25 µM。在 48 小時後，隨即將細胞進行裂解作用，隨即將細胞裂解，並利用 Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (Promega) 進行兩種冷光酵素之活性分析。上述實驗皆重複進行至少三次之獨立實驗，實驗數據以平均值±標準差 (means ± SD [standard deviation]) 表示，並進行單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。

11. 蝦活體注射 quinacrine (QC) 實驗與白點症病毒攻毒實驗 (*In vivo* quinacrine assay and WSSV challenge experiment)

為確定在蝦體中 QC 之最適施打劑量，本實驗隨機將平均體重 4 g 之白蝦分為四組，每組各 20 隻蝦。其中三組分別施打不同劑量之 QC (10 mg/mL stock solution in PBS)，每克蝦重注射 0.5 µg、2.5 µg 以及 5 µg 之 QC 溶液 (50 µl)，另一組則注射等量 50 µl 之 PBS 作為負控制組。實驗過程中每 12 小時至少觀察一次以上，並記錄各組之死亡隻數。根據實

驗分析結果，顯示最高劑量即每克蝦施打 5 μg QC 並不會造成蝦子死亡或異常，因此以此劑量作為後續攻毒實驗之用。

在進行白點症病毒攻毒實驗時，首先將平均體重 4 g 之白蝦隨機分成四組，每組各 14 隻。其中兩組先行注射 50 μl 已用 PBS 稀釋 100 \times 之 WSSV 病毒液，接著立即注射 50 μl QC (5 $\mu\text{g}/\text{g}$; WSSV+QC 組)，或是 50 μl PBS (WSSV+PBS 組) 作為病毒感染之正控制組 (positive control)；另兩組則先注射 50 μl PBS，接著立即注射 50 μl QC (5 $\mu\text{g}/\text{g}$; PBS+QC 組)，或是 50 μl PBS (PBS+PBS 組) 作為負控制組。在感染後第 0、1、2、6 及 9 天時，隨機從各組選取 3 隻蝦並進行組織採樣，保存於液態氮中，作為病毒感染程度檢測之用。

此外，我們同時重複上述整個實驗以觀察死亡率，實驗組別與上述四組相同，每 12 小時至少觀察一次以上，並記錄各組之死亡隻數。

12. 測定白點症病毒之感染程度 (Determination of WSSV infection status)

本實驗利用商業化白點症病毒檢測試劑組 IQ2000 WSSV Detection and Prevention System (GeneReach Biotechnology Corp.) 測定蝦樣本中白點症病毒之感染程度，實驗操作方式依照所附之說明書步驟進行。主要步驟簡述如下，將蝦泳足樣本進行 DTAB/CTAB 萃取 (由試劑組提供)，可得到純化之蝦 genomic DNA。接著，依照說明書建議取適量之蝦 genomic DNA 進行競爭性巢式聚合酶連鎖反應 (competitive nested PCR analysis)。反應完成後，將 PCR 產物以 2% 洋菜膠 (agarose gel) 進行電泳分析，對照試劑組說明書所提供各種

感染程度之 PCR 產物條帶圖譜型式 (pattern of bands)，可確認各樣本白點症病毒之感染狀況。



第五節、結果

1. WSSV ICP35 為高表現量之非結構性蛋白 (WSSV ICP35 is a highly-expressed non-structural protein)

wssv019 基因根據 chen 等人 (2002a) 的研究報導指出其為結構性蛋白基因 *vp35* [46]，但由於病毒純化技術漸趨成熟精進，為再次確認其是否為結構性蛋白，我們純化白點症病毒顆粒並利用抗 WSSV019 抗體進行西方轉印法。分析結果顯示抗 WSSV019 抗體並未在白點症病毒顆粒上偵測到任一訊號 (Fig. 1A)，因此我們證實 WSSV019 為非結構性蛋白，並將其重新命名為 ICP35。本實驗將抗 VP28 抗體 (envelope protein) 以及抗 VP51C 抗體作為正控制組 (positive control)，兩者分別可偵測到外套膜蛋白 VP28 (envelope protein) 以及核鞘蛋白 VP51C (nucleocapsid protein)，以確認病毒顆粒樣本之品質。

我們利用西方轉印法完成 ICP35 蛋白於受感染蝦泳足之時序性 (time course) 表現分析，結果顯示 ICP35 於感染後 24 小時開始可偵測到微弱訊號，接著訊號強度持續增加至 72 小時，其中在感染後 60 小時訊號最強 (Fig. 1B)。此外，我們同時完成主要結構性蛋白 VP28 之時序性分析，結果顯示在感染後 48-72 小時可開始偵測到訊號，至 72 小時訊號最強。綜合上述結果，我們得知在蝦組織中，ICP35 為高表現之非結構性蛋白。本實驗以抗 VP28 作為正控制組，抗 β -tubulin 抗體作為內部參照組 (internal control)。

2. 以雙股 RNA 干擾技術進行 *icp35* 基因靜默化後，會造成蝦體內白點症病毒複製能力下降 (dsRNA silencing of *icp35* reduces WSSV replication in shrimp)

為研究 ICP35 對於白點症病毒之致病機轉是否具有重要性，我們利用雙股 RNA 干擾技術進行基因靜默化實驗，在病毒感染時期降低 *icp35* 之表現。首先以 RT-PCR 進行分析，以了解病毒在感染後 24、48 及 96 小時各時間點收取的三隻蝦樣本中 *icp35* 基因靜默化的效率；此外，我們同步利用 RT-PCR 分析極早期基因 *iel* 之表現，藉此可得知病毒感染後的狀況。結果如 Fig. 2A 所示，在感染後 48 小時，施打 *icp35* dsRNA 的實驗組 (*icp35*/WSSV)，其 *icp35* 與 *iel* 基因之表現量皆明顯低於 *EGFP* dsRNA 組 (*EGFP*/WSSV) 與 PBS (PBS/WSSV) 正控制組；而在感染後 96 小時，*icp35* dsRNA 實驗組的 *icp35* 與 *iel* 基因之表現量仍然低於其他兩組。本實驗以 housekeeping gene *EF-1 α* 作為內部參照組 (internal control)。

而在累積死亡率 (cumulative mortality rate) 之分析中 (Fig. 2B)，我們亦可得到與上述實驗相似的結果，PBS/WSSV 與 *EGFP*/WSSV 兩組之死亡率分別在感染後第四天與第七天快速上升至 100%；相較之下，*icp35*/WSSV 組之死亡率僅達到約 33%，其餘 67% 皆存活至實驗結束為止。Fig. 2C 為僅施打 dsRNA 但未進行政毒的對照組，根據累積死亡率之分析結果顯示在施打 *icp35* (*icp35*/PBS) 或 *EGFP* dsRNA (*EGFP*/PBS) 後，相較於未施打 dsRNA 組 (PBS/PBS)，在整個實驗過程中其死亡率皆無明顯差異，且皆低於 20% 以下。

為確認白點症病毒之載量 (WSSV loads)，本實驗利用 IQ REAL WSSV quantitative system (GeneReach Biotechnology Corp.) 進行絕對定量分析。分析結果顯示在感染後 48 小時，*icp35*/WSSV 與 *EGFP*/WSSV 兩組之病毒載量顯著低於 PBS/WSSV 組 ($p < 0.005$) (Fig. 2D)，顯示施打 dsRNA 初期會引發非專一性之抗病毒效果 (anti-viral effect)；然而，在感染

後 96 小時，*icp35*/WSSV 組之病毒載量依然明顯低於其他兩組 (Fig. 2D)。綜合上述實驗結果，一旦 *icp35* 之表現量受到抑制，則病毒複製能力也會受到影響，因此我們推測 ICP35 對於白點症病毒之複製增殖具有重要性。

3. *wssv icp35* 之 5' UTR 具有 IRES 序列可由 mRNA 內部調控轉譯起始作用 (initiation of translation)

為確認 *icp35* 在 5' UTR 是否具有 IRES 序列，我們將介於起始密碼 (ATG 之 A 為+1) 與多重重複序列 (multiple repeats) TTTTCTCC 之間的核苷酸片段，大小為 468 bp (-468/-1)，選殖送入雙冷光酵素報導基因載體 *ie1/pRL-FL* (Fig. 3A)，將其命名為 *ie1/pRL-icp35(-468/-1)-FL*。*ie1/pRL-FL* 載體上有兩個基因，第一個基因 *Renilla luciferase* (RL) 之表現係透過帽依賴型轉譯作用，而第二個基因 *firefly luciferase* (FL) 若有表現則可推測其透過置入於兩個基因之間的 IRES 序列進行非帽依賴型轉譯作用。我們將質體 *ie1/pRL-icp35(-468/-1)-FL* 以轉染作用送入 Sf9 細胞中進行表現，並在轉染後 48 小時測量 RL 與 FL 之活性，將 FL 數值除以 RL 數值所得之比值可代表 IRES 活性 (FL/RL ratio)。已發表之 WSSV IRES 序列 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 與 *vp28-IRES* 在本實驗中作為正控制組，而未置入任何 IRES 序列之 *ie1/pRL-FL* 則作為負控制組 (Fig. 3A)。結果如 Fig. 3B 所示，*icp35(-468/-1)* 片段可促進下游 FL 冷光酵素之表現，而且此片段之 IRES 活性皆高於 IRES₁₂₃₋₉₁₉ 與 *vp28-IRES* 序列。

為能更精確得知 *icp35* IRES 主要具有活性的區域位置，我們利用 RNA Mfold 軟體預測 *icp35(-468/-1)* 之 RNA 二級結構，可看到此 RNA 片段主要摺疊成九個莖環結構 (stem loop, SL) (Fig. 4A)。接著，參照這些莖環結構依序由 5' 端及 3' 端將 *icp35(-468/-1)* 片段進行逐步刪除，並將所得到不同長度之 IRES 序列分別選殖送入 *ie1/pRL-FL* 載體中 (Fig. 4B)，再以轉染作用送入 Sf9 細胞中，並進行 IRES 活性分析。結果如 Fig. 4C 所示，在進行逐步刪除實驗後發現具有最高 IRES 活性且序列最短的區域為 *icp35(-198/-1)* 片段，此片段由 SL VII、VIII 及 IX 組成。若繼續將 SL VII 進行刪除只保留 SL VIII 及 IX (*icp35[-128/-1]*) 片段, Fig. 4B), 則 IRES 活性會由最大值顯著下降至背景值 (background level), 顯示 SL VII 對於 IRES 活性相當重要；然而，若只保留 SL VII (*icp35[-198/-112]*) 片段, Fig. 4B) 亦無法具有 IRES 活性。綜合上述實驗結果，我們得知由 SL VII、VIII 及 IX 組成的 *icp35(-198/-1)* 片段為主要負責 IRES 活性之重要區域。IRES₁₂₃₋₉₁₉ 與 *vp28-IRES* 在本實驗中作為正控制組；本實驗將 *icp35(-468/-1)* 與 *icp35(-426/-1)* 之反向 (anti-sense) 序列 — *icp35(-468/-1)as* 與 *icp35(-426/-1)as*，以及 *ie1/pRL-FL* 作為負控制組 (Fig. 4C)，根據分析結果顯示反向序列並不具有 IRES 活性。

我們進一步將 *icp35(-198/-1)* 進行序列刪除實驗 (Fig. 4D)，結果顯示由部份 SL VII 與 VIII 組成的 *icp35(-171/-38)* 片段，為長度最短但仍然具有高活性之 IRES 序列 (Fig 4E)。綜合上述實驗結果，我們得知只有 SL VIII、IX 的 *icp35(-128/-1)* 或是只有 SL VII 的 *icp35(-198/-112)* 片段皆不具有 IRES 活性，據此可進一步推論 SL VII 及 VIII 為主要負責 IRES 活性的 RNA 二級結構，兩者需要共同合作方能具有 IRES 活性，缺一不可。

4. *icp35* IRES 片段並不具有潛在性啟動子 (cryptic promoter) 之活性或是隱藏性剪接位點 (cryptic splice sites)

為排除 *icp35*(-198/-1) 片段具有潛在性啟動子之活性，因而轉錄出單順反子 mRNA 使得下游 FL 蛋白得以合成，導致誤判此片段具有 IRES 活性，因此我們從雙冷光酵素報導基因質體 *ie1/pRL-icp35*(-291/-1)-FL 以及 *ie1/pRL-icp35*(-198/-1)-FL 上將 *wssv ie1* 啟動子刪除 (Fig. 5A)，並進行無啟動子實驗 (promoterless assay)，加以確認此片段是否確實具有 IRES 功能及活性。Fig. 5B 結果顯示在去除啟動子後，由帽依賴型轉譯作用調控之 RL 因為沒有雙順反子 mRNA 被轉錄出來而不會表現蛋白；FL 在 *pRL-icp35*(-291/-1)-FL(-P) 之表現量相較於具有 *ie1* 啟動子之控制組 (100%) 尚有約 23% 之表現量，顯示 *icp35*(-291/-1) 片段具有微弱之潛在啟動子活性；然而，FL 之表現量在 *pRL-icp35*(-198/-1)-FL(-P) 質體僅有約 5%，接近於背景值，顯示 *icp35*(-198/-1) 片段並無潛在啟動子活性。綜合上述結果，我們推論在 *ie1/pRL-icp35*(-198/-1)-FL 中 FL 之所以能夠表現是經由 *icp35*(-198/-1) IRES 序列 (SL VII、VIII 及 IX) 所調控之轉譯作用。

在 *ie1/pRL-icp35*(-198/-1)-FL 中 FL 活性被偵測到的另一個可能性，是由於置入雙冷光酵素報導基因載體中的 *icp35*(-198/-1) 片段具有隱藏性剪接位點，使得轉錄出來的雙順反子 mRNA 發生異常剪接作用 (abnormal splicing event)，因而剪接出只帶有 FL 的單順反子 mRNA，導致我們誤判 FL 蛋白之表現是透過 IRES 轉譯機制。因此，為了排除上述可能性，並確認 *icp35*(-198/-1) 片段是否具有隱藏性剪接位點，我們設計一組專一性引子對 P1 及 P2，分別位於 *ie1* 啟動子的 3' 端與 FL 基因的 5' 端 (Fig. 6A)，並利用靈敏度高的 RT-PCR 進

行分析，以確認在 Sf9 細胞中轉錄出來的雙順反子 mRNA 是否完整，或有可能因為異常剪接作用而產生較小的轉錄本。分析結果顯示只有一條如預期大小 1276 bp 且定序無誤的 PCR 產物可以被擴增出來 (Fig. 6B)，同時並未看到其他較小的 PCR 產物。根據上述結果，我們得知在 Sf9 細胞進行轉染作用時，此雙順反子 mRNA 並無發生異常性的剪接作用導致 FL 被表現出來，而 *icp35(-198/-1)* 片段也沒有隱藏性剪接位點之存在。

綜合上述結論，我們可以確定 *icp35(-198/-1)* 片段並不具有潛在性啟動子活性或是隱藏性剪接位點。

5. 排除 *icp35* IRES 活性是由於核糖體連讀轉譯作用 (ribosomal read-through) 之可能性

為排除所偵測到的 FL 活性是來自於核糖體之連讀轉譯作用，意即 RL 轉譯終止作用失敗，由該離開卻未離開 mRNA 的核糖體繼續往下游進行轉譯作用，因而表現 FL 蛋白。因此，我們將一穩定的 28-bp 莖環結構 ($\Delta G = -62$ kcal/mol) 置入到 RL 起始密碼 ATG 之前 (Fig. 7A)，則核糖體會受到此結構之干擾而抑制 RL 之轉譯作用，進而阻斷了連讀轉譯作用之可能性。結果如 Fig. 7B 所示，帶有莖環結構之質體 *ie1/SL-pRL-icp35(-198/-1)-FL*，其 RL 表現量相較於控制組 (100%) 顯著性地降低至 19%，但 FL 之表現量則不受到影響。因此，我們確認 FL 之表現並非經由連讀作用，而是透過 *icp35(-198/-1)* IRES 片段所調控之轉譯作用。

6. *icp35* IRES 需要 eIF2 之參與以進行轉譯起始作用 (Initiation of translation on the *icp35* IRES requires eIF2)

為確認 *icp35* IRES 調控之轉譯起始機制是否需要 eIF2 之參與，我們利用內質網壓力誘導藥物 (ER stress inducer) tunicamycin 處理 Sf9 細胞使得 eIF2 α 被磷酸化，由於真核細胞之帽依賴型轉譯作用需要 eIF2，一旦 eIF2 α 被磷酸化後則會抑制宿主的蛋白合成 [85, 86]，造成宿主蛋白合成關閉 (host shutoff)。若 *icp35* IRES 之轉譯起始作用亦需要 eIF2 之協助，則代表其 IRES 活性也會受到影響。分析結果顯示，當 eIF2 α 被磷酸化後，RL 與 FL 之活性相較於未加任何藥物之控制組 (Control) 或 DMSO 控制組而言，皆呈現顯著性地下降 (Fig. 8B)。此外，我們也利用抗磷酸化 eIF2 α 抗體進行西方轉印法，以確認在進行 tunicamycin 處理後 SF9 細胞內 eIF2 α 磷酸化之程度。結果顯示磷酸化 eIF2 α (P-eIF2 α) 訊號在受到 tunicamycin 處理後明顯增強 (Fig. 8C)。利用抗 eIF2 α 抗體可偵測到細胞內所有未磷酸化及磷酸化的 eIF2 α 訊號，可作為內部參照組 (Fig. 8C)。綜合上述結果，我們推論 *icp35* IRES 為 eIF2 依賴型轉譯起始作用。

7. 核酸嵌入劑 quinacrine (QC) 會降低 *icp35* IRES 之轉譯活性，並且具有抗白點症病毒之功效 (QC reduces *icp35* IRES activity and has an anti-WSSV effect)

根據 Malina 等人 (2005) 之研究指出，小分子核酸嵌入劑如 ethidium bromide (EtBr) 與 acriflavine 在低劑量時 (10 μ M) 可以抑制 HCV 及 CrPV IRES 之活性，但對於帽依賴型轉譯作用並無影響 [87]。QC 亦為小分子核酸嵌入劑，已知可抑制 DNA 複製以及 RNA 轉

錄作用 [88]，而且最近研究報導證實 QC 可以與 EMCV、HCV 與 poliovirus IRES 的高度複雜 RNA 二級結構 (highly complex RNA secondary structure) 結合，進而抑制 IRES 的轉譯活性 [89]；在此篇研究中亦證實了不具有複雜 RNA 二級結構 (less complex RNA secondary structure) 之細胞 p53 IRES 序列，其活性並不會受到 QC 之抑制作用。因此，為了解同樣具有複雜 RNA 二級結構之 *icp35* IRES 序列 (Fig. 4A) 是否會受到 QC 之抑制，我們利用轉染作用將帶有 *icp35* IRES 序列之雙冷光酵素報導基因質體 (Fig. 9A) 送入 Sf9 細胞中，並加入不同濃度之 QC，觀察 IRES 活性是否會受到影響。分析結果如 Fig. 9B 所示，在 25 及 30 μM 時，FL 活性皆受到顯著性之抑制作用而下降約 33-34% ($p < 0.05$, $p < 0.005$)，但 RL 活性並無受到顯著影響，因此我們推論 QC 可與 *icp35* IRES 產生交互作用，並影響其轉譯效率。

白點症病毒除了目前已發表之兩個 WSSV IRES 序列以及本論文新發現的一個 *icp35* IRES 外，可能還存在許多未被發現之 IRES 序列負責調控其他病毒蛋白，因此在觀察到 QC 可以降低 *icp35* IRES 活性後，我們下一步即進行 WSSV 攻毒實驗，以了解在活體中 QC 會否透過抑制其他具有複雜 RNA 二級結構之 WSSV IRES 活性進而影響到 WSSV 複製增殖之能力。實驗結果顯示當施打完 WSSV 病毒液後，未施打 QC 之對照組於感染後第六天死亡率超過 50%，至第九天即達到 100% (WSSV+PBS 組) (Fig. 9C)，顯示本次攻毒實驗感染成功；但若攻毒後立即再施打劑量為 5 $\mu\text{g/g}$ 之 QC (WSSV+QC 組)，其死亡率則顯著性降低約 70% (Fig. 9C)。我們進一步利用商業化白點症病毒檢測試劑組 IQ2000 WSSV Detection and Prevention System (GeneReach Biotechnology Corp.) 進行競爭性巢式聚合酶

連鎖反應，以測定 WSSV 之感染程度。Fig. 9D 為觀察死亡率時將已死亡之蝦體採取泳足樣本並進行檢測，以瞭解蝦體是否確實因為受到病毒感染而死亡。結果顯示在 WSSV+PBS 之正控制組中，除了感染後 51 小時死亡之蝦子並無檢測到 WSSV 之外，其餘時間點死亡的蝦子皆呈現重度感染，代表此次攻毒之感染狀況正常；而在觀察死亡率之 WSSV+QC 組別中，可看到感染後 161 小時死亡所採樣之蝦子，經檢測確認為重度感染狀態，我們推測其有可能因為蝦子之個體差異造成此結果。

此外，我們亦重複與觀察死亡率時相同之四個實驗組別，並在固定感染時間點隨機選取 3 隻蝦子進行採樣。經病毒檢測後，可得知 WSSV+PBS 組在感染後第 1、2 天並無檢測到 WSSV；在感染後第 6 天，三隻中有兩隻已呈現重度感染；而在感染後第九天由於死亡率已趨近 100%，因此只剩下一隻存活的白蝦可供採樣，檢測結果依然為重度感染 (Fig. 9E, lower panel)。而在 WSSV+QC 組，於感染後第 1、2 天之檢測結果與 WSSV+PBS 組相同，並無檢測到 WSSV；在感染後第 6 及第 9 天，採樣的三隻蝦中有兩隻呈現輕度感染 (Fig. 9E, upper panel)，顯示有施打 QC 組之感染狀況相較於 WSSV+PBS 組呈現延緩之現象。在感染後第 6 及 9 天，受檢測之三隻蝦有兩種不同感染程度 (未檢測到病毒與輕度感染)，推測是由於蝦子個體差異所造成的結果。

第六節、討論

先前研究報導利用 DNA 微陣列晶片 (DNA microarray) 以及表現序列標幟 (Expressed sequence tag, EST) 進行分析，發現 *icp35* (*wssv019*) 為表現量最高的 WSSV 基因之一 [90]。而根據本論文之 ICP35 蛋白表現時序性分析結果，亦顯示出此非結構性蛋白在受感染蝦體之表現量高於主要結構性蛋白 VP28 (Fig. 1B)。因此，本論文下一步欲了解此高表現之非結構性蛋白 ICP35 對於白點症病毒之致病機轉 (pathogenesis) 是否具有相關性及影響性。Lan 等人於 2002 年發現一個白點症病毒大陸突變株，此突變株是由於基因體之不穩定性 (genomic instability) 而造成基因體缺失 (genomic deletion)，該缺失片段大小為 4.8 kb，包括 5 個 ORF，其中一個 ORF 即為 *icp35*。此外，根據 WSSV 攻毒實驗結果，顯示具有基因體缺失之突變株對於螯蝦之致病力 (virulence) 明顯低於原生型 [91]。此外，此篇研究認為缺失的 5 個 ORF 有可能與病毒致病力有關，其中 ICP35 具有一酸性區 (acidic region)，其功能亦可能與轉錄活化之調控有關。[91]。然而，另一個研究指出，具有 13 kb 基因體缺失之泰國株 WSSV-TH (GenBank accession no. AF369029)，雖然同樣不具有 *icp35* 基因，但其致病力卻高於目前擁有最大基因體 (312 kb) 之 TH-96-II 分離株 [92]。關於上述兩個研究報導呈現不一致性的原因目前尚未釐清，但本論文的研究結果亦指出若將 *icp35* 基因之表現利用 dsRNA 干擾技術進行靜默化後再進行攻毒實驗，則會使得 WSSV 病毒量及所造成之死亡率呈現顯著性下降 (Fig. 2)，因此我們所得到的結果與 Lan 等人 (2002) 之研究成果相符合。

由於 *icp35* 基因在感染後 2 小時即開始表現 [46]，加上本論文之研究成果 (Fig. 1 and 2)，我們推測 ICP35 可能在病毒感染早期即扮演重要之角色，而且可能與病毒之複製增殖相關，因此針對該蛋白之功能進行深入探討將成為後續實驗主要之研究方向。根據先前 *icp35* 基因序列分析及預測結果 (PROSITE, ESLpred and Motif Scan)，顯示其具有兩個可能的細胞核定位訊號 (nuclear localization signal, NLS)，分別為 ²⁴KRKR²⁷ 與 ⁵³KRPR⁵⁶，而 Chen 等人已證實 ICP35 為核蛋白 (nuclear protein)，且只有 ²⁴KRKR²⁷ 為具有功能性的細胞核定位訊號 [46]；此外，ICP35 第 28-97 個胺基酸序列為 Glutamic acid-rich region [46]，以往諸多研究發現此種高度酸性區 (highly acidic domain) 常存在於許多轉錄因子 (transcription factor) 的轉錄活化區域 (transactivation domain) 之內，且該酸性區對於轉錄因子與 RNA polymerase II 之結合極為重要 [93-97]。雖然根據序列預測結果顯示 ICP35 不具有 DNA 結合區 (DNA-binding domain)，但由於其為核蛋白，又具有可能是轉錄活化區域的酸性區，因此我們推測 ICP35 可能為 WSSV 之轉錄活化因子 (transactivator)。有些病毒具有此類轉錄活化因子，例如 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的 X protein (簡稱 HBx) 雖然不具有 DNA 結合區，但可與許多轉錄因子如 ATF-2, AP-2, CREB, HNF1, NFκB, and DDB1 等結合並修飾其活性，進而促進下游基因之轉錄作用 [98-104]。Xu 等人之研究更進一步指出 HBx 蛋白可提高 HBV 病毒基因的表現以及後續病毒 DNA 基因體之複製作用 (Xu et al., 2002)。綜上所述，我們推測 ICP35 可能為不具有 DNA 結合區之轉錄活化因子，並且與 WSSV 複製增殖之效率有關，然而此假設仍待後續研究加以證實。

真核細胞的轉譯起始機制有兩個決定性之調控步驟，一個是由 eIF2、GTP 與 Met-tRNA_i 共同形成 eIF2 ternary complex [105]，另一個是由 eIF4A、eIF4E、eIF4G 在 mRNA 的 5' 端帽結構上形成 cap-binding initiation complex eIF4F [106]。許多缺乏 5' 端帽結構的 RNA 病毒會破壞 eIF4F complex 以降低宿主細胞的帽依賴型轉譯作用之效率，進而造成宿主蛋白合成關閉 (host shutoff)，此舉會使得宿主之轉譯系統傾向進行非帽依賴型轉譯作用，轉而促進病毒蛋白之合成 [107-109]。例如，某些腸病毒 (enteroviruses) 會利用病毒蛋白酶 (Protease) 切斷 eIF4G 使得 eIF4F 複合體無法形成 [110]；EMCV 則會活化轉譯抑制因子 (translational repressor) 4EBP1，使其與 eIF4E 結合進而阻礙 eIF4F 複合物之形成 [77]。與上述 RNA 病毒相較之下，許多 DNA 病毒所轉錄出來的 mRNA 具有 5' 端帽結構，須利用帽依賴型轉譯作用進行病毒蛋白之合成，反而會採取逆向策略，幫助促進 eIF4F 複合體的形成以提高病毒複製之效率 [108]。當病毒感染宿主時會引起先天性宿主反應 (innate host response)，使得 eIF2 α 被磷酸化並導致 eIF2 ternary complex 無法組成，進而全面性抑制帽依賴型轉譯作用；然而在病毒蛋白合成過程中，不管是透過帽依賴型轉譯作用，或是利用 IRES 轉譯機制，也都需要 eIF2 之參與方能啟動轉譯起始作用，因此某些 RNA 與 DNA 病毒已成功演化出替代性策略，如抑制 eIF2 α kinase 或是活化 eIF2 α phosphatase 等以防止或逆轉 (reverse) eIF2 α 之磷酸化作用 [108]；其他較為特殊之替代性策略如下：例如 HCV IRES 在逆境時可以利用 eIF2A 取代之 eIF2 α 功能 [111]，或是雙順反子病毒科 (Dicistroviridae) 不需要任何 eIF 之參與便可利用自身之 RNA 二級結構吸引 40S 核糖體次單位與其結合 [112]。由於白點症病毒為大型 dsDNA 病毒，其所轉錄出來之 mRNA 皆具

有 5' 端帽結構，因此我們認為白點症病毒不僅會利用帽依賴型轉譯作用進行病毒蛋白之合成，還可利用 IRES 序列進行非帽依賴型轉譯作用；再者，根據本論文之研究結果，顯示 *icp35* IRES 為 eIF2 依賴型轉譯機制 (Fig. 8)，因此當白點症病毒感染宿主後是否會有如上所述之替代性策略以阻止或逆轉 eIF2 α 受到磷酸化，使得帽依賴型與 IRES 轉譯機制皆可繼續進行，尚待後續研究加以確認。目前針對各個 IRES 序列所需之轉譯起始因子或是 IRES 反式活化因子 (IRES-transactivating factor, ITAF) 的研究有限，因此瞭解哪些因子會參與 IRES 轉譯機制之調控已逐漸成為重要且熱門之研究領域，後續我們也將針對 WSSV IRES 序列所需之轉譯起始因子或是 IRES 反式活化因子進行深入之研究。

相較於對 IRES 序列研究較為廣泛深入的 RNA 病毒而言，迄今僅有少數研究文獻記載關於 DNA 病毒利用 IRES 轉譯機制進行病毒蛋白合成，因此目前對於 DNA 病毒如何利用 IRES 序列進行轉譯機制之調控所知甚少 [113]。儘管目前針對 DNA 病毒之 IRES 轉譯機制進行深入探討之研究有限，但可以確定的是，在某些不利病毒進行複製之狀況下，如宿主之抗病毒反應 (host-induced antiviral response) 或是病毒引起之 host shutoff，IRES 轉譯機制可幫助 DNA 病毒繼續進行某些重要病毒蛋白之合成，以利病毒生存複製 [84, 113, 114]。因此，IRES 轉譯機制不論對於 DNA 病毒或是 RNA 病毒之重要性皆相同。先前研究報導已鑑定出兩個來自於不同多順反子 mRNA 之 WSSV IRES 序列 [62, 76]，分別調控病毒結構性蛋白 VP28 與 VP39B 之合成；本論文也發現一個新的位於 *icp35* 5' UTR 的 IRES 序列，此序列同樣也位於一個大小約 5.5 kb 之多順反子 mRNA 中，負責調控下游非結構性蛋白 ICP35 之合成。綜上所述，IRES 轉譯機制對於白點症病毒之複製生存可能扮演相當重

要的角色，因為白點症病毒已知可產生許許多多順反子 mRNA [46, 49, 50, 76]，故我們進一步推測其可能利用大量 IRES 序列進行病毒蛋白之轉譯作用。

Quinacrine 為眾所周知之小分子核酸嵌入劑，特性為可嵌入 dsDNA 與具有高度結構性的 RNA 分子中，依據不同的最適濃度可以分別抑制 DNA 複製、RNA 轉錄作用以及蛋白合成 [115-119]。QC 以往廣泛應用於治療瘧疾 (malaria) 及梨形鞭毛蟲病 (giardiasis) [120, 121]，但最近研究發現 QC 除了上述功用外，還具有許多極富發展潛力之可能性，例如 QC 可同時抑制核蛋白因子 NF- κ B 並活化 p53 訊息傳導途徑，因此極有潛力發展為抗癌藥物 [88, 122, 123]；有研究顯示 QC 可以抑制變性普利昂蛋白 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) 之形成 [124, 125]；Sasvari 等人 (2009) 之研究發現 QC 尚可以在植物與原生質體 (protoplast) 中抑制蕃茄叢生矮化病毒 (Tomato bushy stunt virus, TBSV; a positive sense RNA virus) RNA 基因體之複製 [126]。本論文之研究顯示 QC 在 Sf9 細胞中對於 *icp35* IRES 活性 (FL 與 FL/RL ratio) 具有顯著性的抑制效果 ($p < 0.05$, $p < 0.005$)，但對於帽依賴型轉譯作用 (RL) 並無顯著影響 (Fig. 9B)。由於 QC 對於高度複雜之 RNA 二級結構具有較佳的結合親和力 (binding affinity) [89]，因此我們推測 QC 在與 *icp35* IRES 之 RNA 二級結構結合後，進而影響到 40S 核糖體次單位與 IRES 產生交互作用，導致 IRES 活性下降，此假設尚待後續實驗加以驗證。再者，由於 WSSV 具有許多同向轉錄基因群，可產生出許許多多順反子 mRNA，同時有可能利用大量 IRES 序列調控病毒蛋白之表現，由此我們進一步推測 QC 除了可降低 *icp35* IRES 活性外，也有可能抑制其他未發現但具有複雜 RNA 二級結構之 IRES 序列，進而阻礙某些重要病毒蛋白之合成，此推測也可解釋為何在活體實驗中同時施打 WSSV 病

毒液與 QC 後，會造成蝦子死亡率呈現顯著性地下降 (Fig. 9C)，而且病毒感染程度亦會受到抑制 (Fig. 9E)，然而上述推論仍待後續研究加以證實。先前研究報導利用體外 (*in vitro*) 試驗發現高濃度 QC (超過 700 μM) 可以成功抑制 HBV DNA 基因體進行複製作用 [127]；另一研究利用活體 (*in vivo*) 實驗也發現高濃度 QC (1600 μM) 可以抑制 TBSV RNA 基因體之複製 [126]。根據本論文之研究結果，WSSV+QC 組在感染後第 6 及 9 天，每三隻隨機取樣蝦子中便有兩隻呈現輕度感染 (Fig. 9E)，顯示在低濃度 QC 下 (蝦血中之濃度估計為 28-62 μM) 白點症病毒依舊可以進行 DNA 基因體之複製作用，故我們推測低濃度 QC 之所以能夠降低白點症病毒造成之死亡率以及延緩病毒之複製速度，可能是由於 QC 抑制或降低了某些 IRES 序列之轉譯活性，導致這些 IRES 序列負責調控之重要結構性或非結構性蛋白合成作用受到影響，這些推測有待後續實驗加以證實。綜上所述，本論文成果對於治療及預防白點症病毒開啟了另一條嶄新的研究之路，未來可以以 QC 實驗為基礎，繼續尋找具有抑制 IRES 活性之小分子化合物，再個別進行化學結構修飾以合成更多衍生物，最終希望可研發出與 WSSV IRES 序列具有更高結合親和力之小分子藥物，相信未來極有潛力可以發展成抗白點症病毒藥物。

第七節、圖表與說明

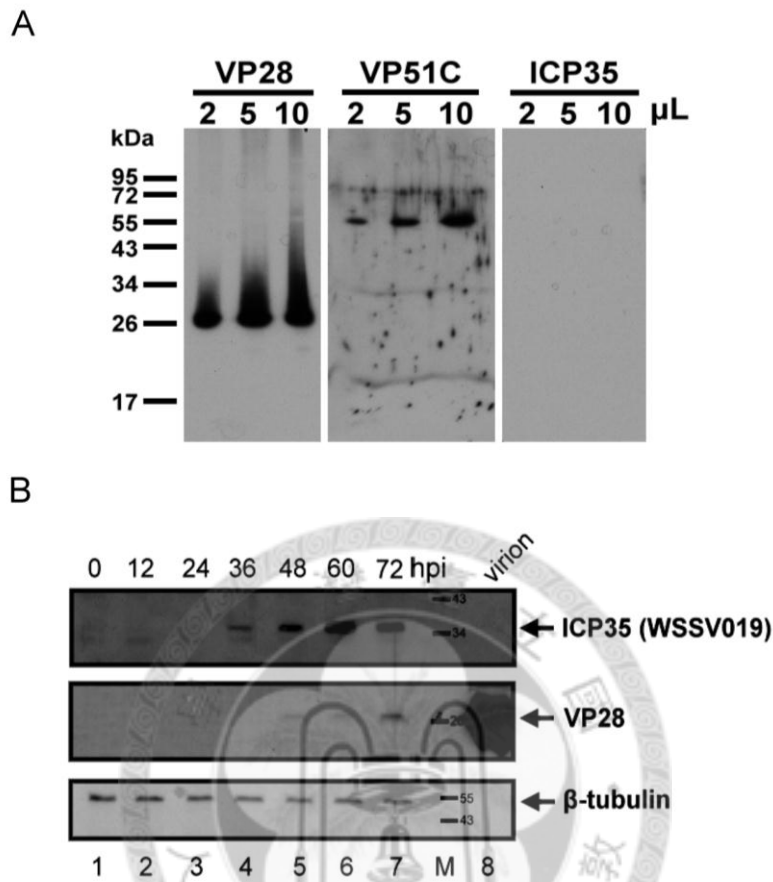


Fig. 1 The highly expressed protein ICP35 is a non-structural protein. (A) Western blot analysis of purified total WSSV virions detected the envelope protein VP28 and the nucleocapsid protein VP51C (structural protein positive controls), but did not detect ICP35. (B) Time course analysis of WSSV ICP35 (WSSV019) expression. Total protein was extracted from shrimp pleopod at 0, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 hpi, and quantified using the Bradford assay. Each extract (18 μg) was separated on 15% SDS-PAGE, and then probed with antiserum against ICP35, VP28 or β -tubulin. Anti-VP28 antibody was used for comparison, and anti- β -tubulin antibody was used as an internal control.

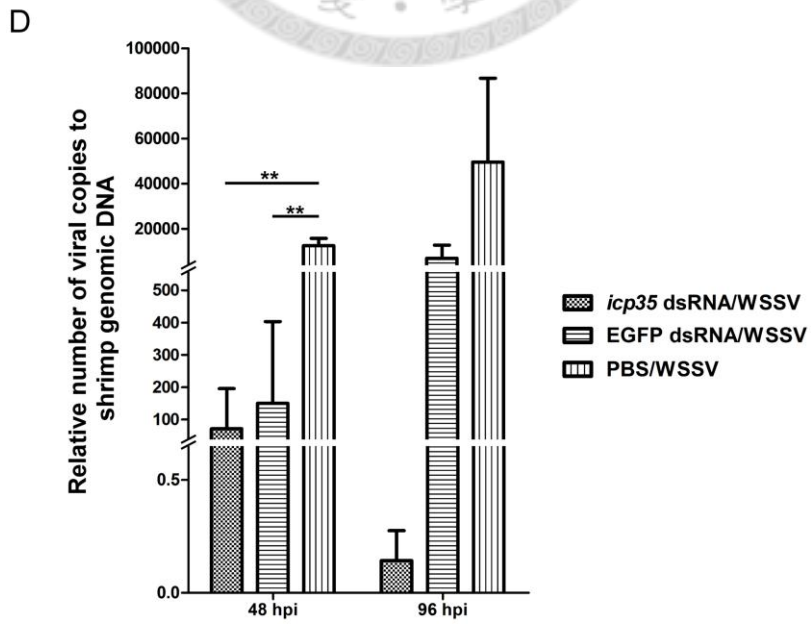
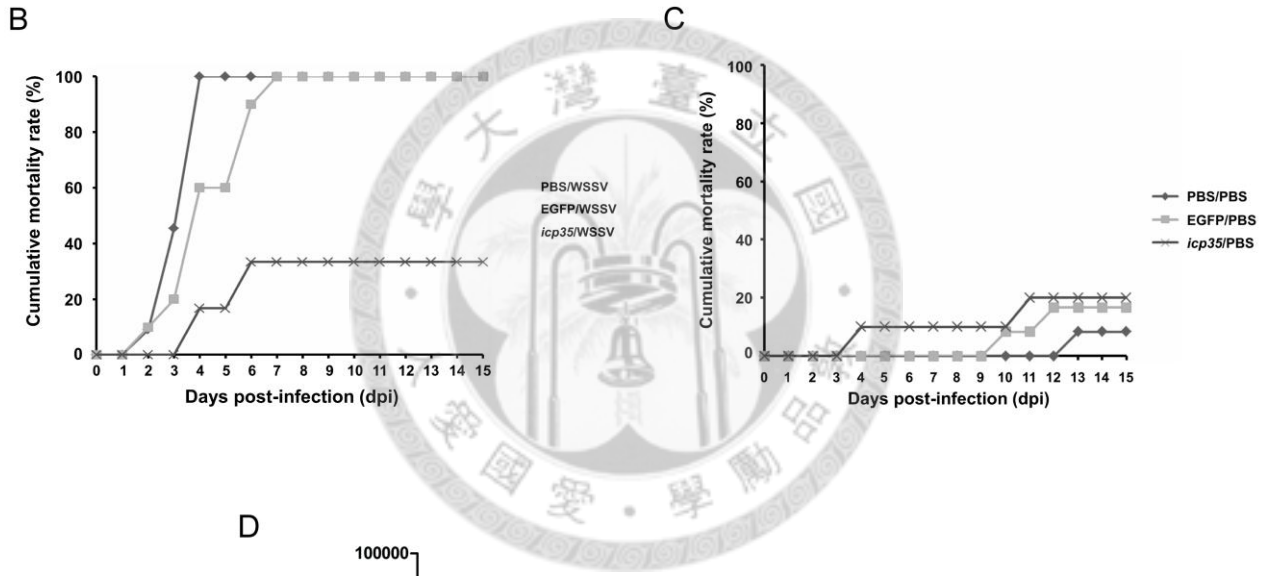
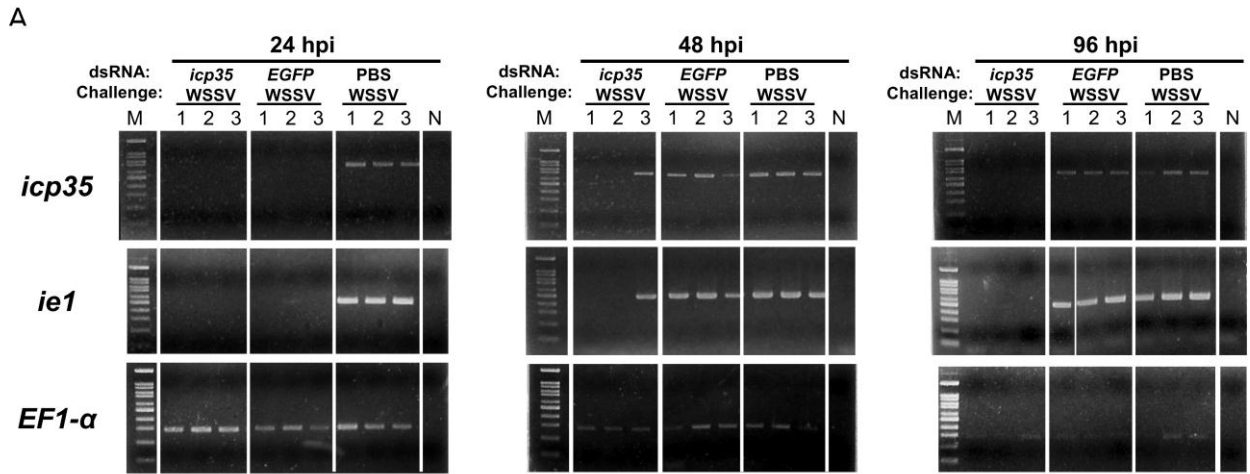


Fig. 2 The effects of *icp35* dsRNA gene silencing in WSSV-challenged shrimp. For this dsRNA-mediated gene silencing experiment, shrimp (*L. vannamei*; mean weight 4 g) were injected with *icp35* dsRNA, *EGFP* dsRNA (1 µg/g body weight) or PBS. Two days after dsRNA or PBS treatment, the shrimp were challenged by injection with diluted WSSV viral stock or PBS. Each experimental group contained 10-12 shrimp. (A) The expression levels of *icp35* and *ie1* in pleopod at 24 and 48 hpi, and in stomach at 96 hpi were monitored by RT-PCR analysis. *EF-1α* was used as an internal control. (B) Experimental protocols were as described above. Cumulative mortalities were observed and recorded every 12 h. (C) Cumulative mortality data for the mock-infected PBS controls are shown separately for clarity. (D) Time course study of WSSV loads after dsRNA silencing. WSSV copy number and shrimp genomic DNA were measured using the IQ REAL WSSV quantitative system (GeneReach Biotechnology Corp.). (** $P < 0.005$ by one-way analysis of variance [ANOVA]).

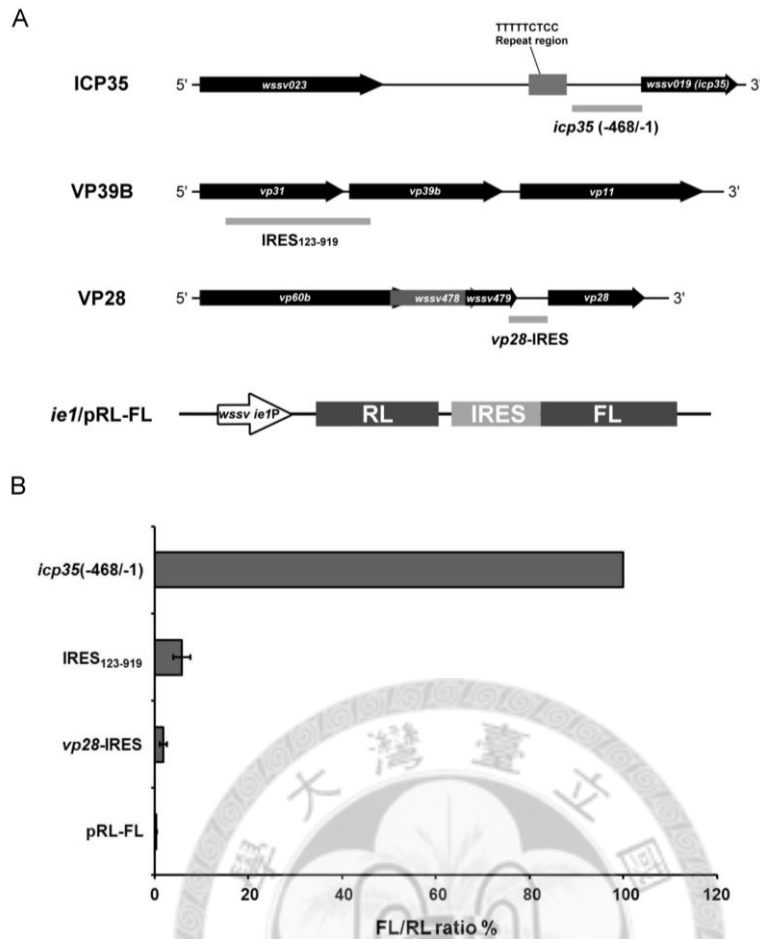
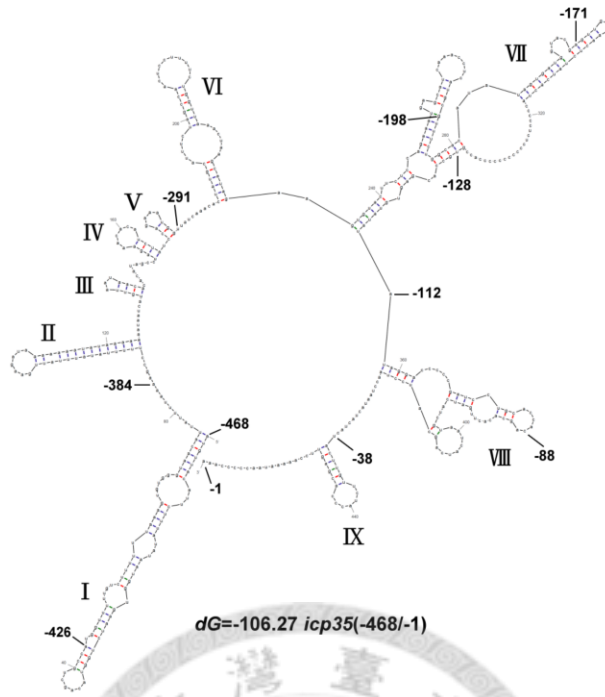
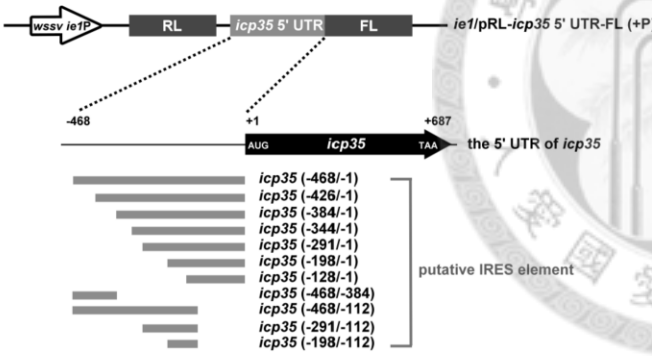


Fig. 3 The 5' UTR of WSSV *icp35* mRNA contains a functional IRES element. (A) Schematic representation of the WSSV gene clusters *wssv023/wssv019 (icp35)*, *vp31/vp39b/vp11*, and *vp60b/wssv478/wssv479/vp28*. The 5' UTR fragment of *icp35(-468/-1)* or the IRES elements of VP39B or VP28 were inserted into the intercistronic region of the bicistronic reporter plasmid *ie1/pRL-FL*. (B) Bicistronic plasmids of *icp35(-468/-1)* or IRES₁₂₃₋₉₁₉ or vp28-IRES were transfected into Sf9 cells, and *Renilla* and firefly luciferase activities were measured at 48 h post-transfection. The ratio of firefly to *Renilla* luciferase was used as an indicator of IRES activity. The FL/RL ratio for *icp35(-468/-1)* was set to 100%. Three independent transfection assays were performed, and the mean \pm SD was calculated.

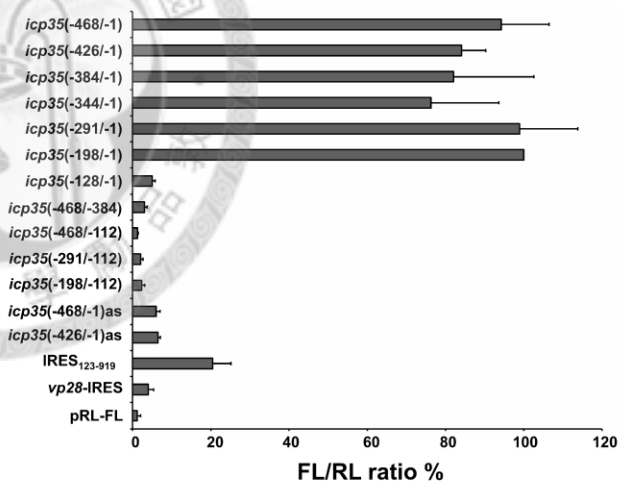
A



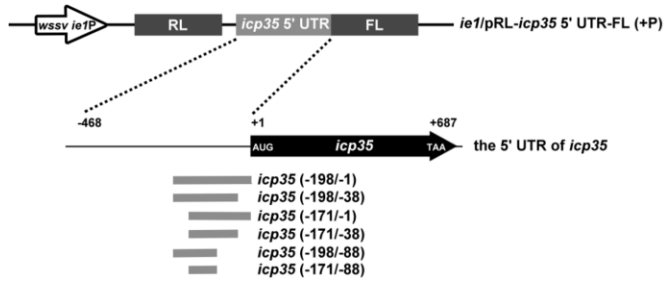
B



C



D



E

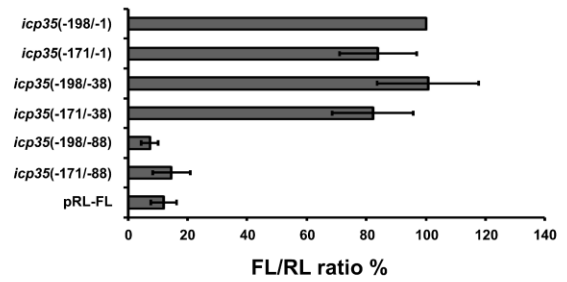


Fig. 4 5'- and 3'-end deletion analysis of the *icp35* IRES element. (A) RNA MFold prediction of the secondary structure of *icp35* 5' UTR at 25°C. (B) Schematic diagram of the bicistronic vector pRL-FL with the *wssv ie1* promoter and the 5' UTR structure of *icp35*. Various 5'- and 3'-end deleted fragments in the 5' UTR of *icp35* were subcloned into the intercistronic region between the *Renilla* luciferase and firefly luciferase. (C) Sf9 cells were transiently transfected with the bicistronic plasmids, and at 48 h post-transfection *Renilla* and firefly luciferase activities were measured. The ratios of firefly to *Renilla* luciferase for each bicistronic plasmid are shown, and the highest IRES activity [*icp35*(-198/-1)] was set to 100%. The actual ratio was 1.32 ± 0.20 . Three independent transfection assays were performed and the mean \pm SD was calculated. (D) and (E) are analogous to the schematics and results in (B) and (C) except that the deletion fragments were derived from *icp35*(-198/1-) instead of the entire *icp35* 5' UTR.

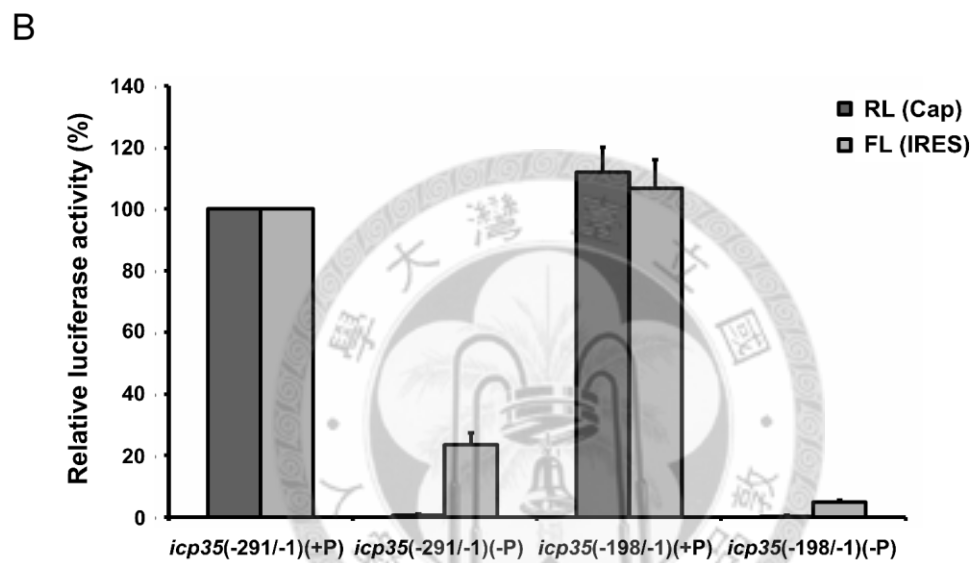
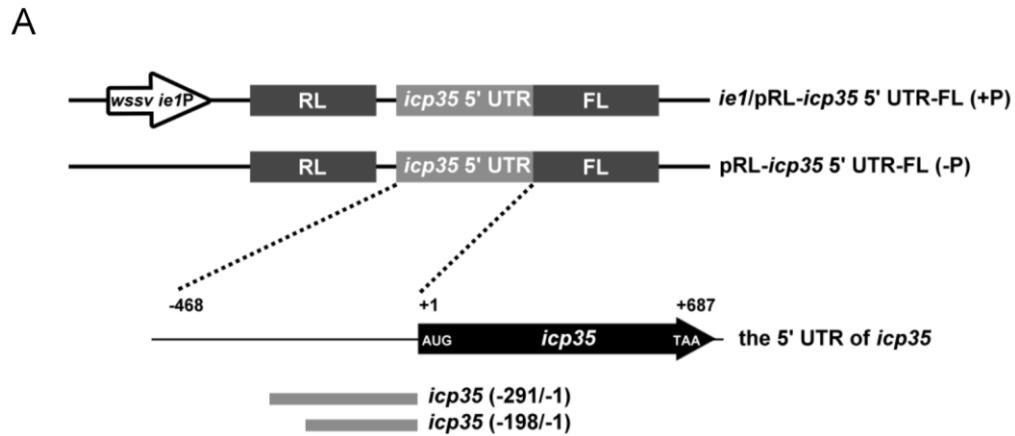


Fig. 5 The *icp35*(-198/-1) bicistronic plasmid does not show cryptic promoter activity. (A)

Schematics of bicistronic plasmids containing *icp35*(-291/-1) and *icp35*(-198/-1) fragments with the WSSV *ie1* promoter (+P) or without the WSSV *ie1* promoter (-P). (B) Plasmids were transfected into Sf9 cells, and 48 h later FL (gray bar) and RL (dark gray bar) activities were measured. FL and RL data for the control plasmid *icp35*(-291/-1)(+P) were set to 100%. Three independent transfection assays were performed and the mean \pm SD was calculated.

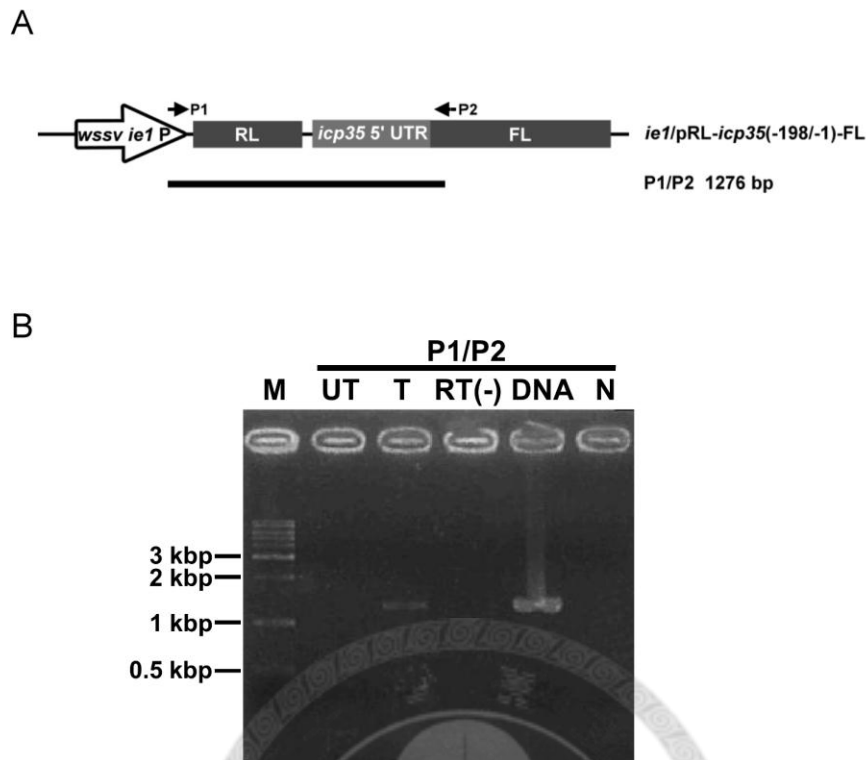


Fig. 6 The *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* bicistronic transcript has no internal splice sites. (A) Schematic diagram of the *ie1/pRL-FL*-based bicistronic construct and the two primers used for reverse transcription (RT)-PCR. The primer set P1/P2 represents *ie1P(+3/+31)-F/pRL-FL-R1241* (see Table 1). (B) RT-PCR results for total RNA extracted from Sf9 cells transfected (T) or untransfected (UT) with the *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* bicistronic plasmid. In the negative RT(-) controls, RTase was omitted to verify that the RT-PCR products were specifically amplified from RNA and not from any contaminating plasmid DNA. The DNA lane denotes the PCR product from the *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* plasmid and is used as a positive size control. Lane M shows 1 kb DNA ladder I markers (LAMDA Biotech Inc.), and lane N is the negative control (no cDNA).

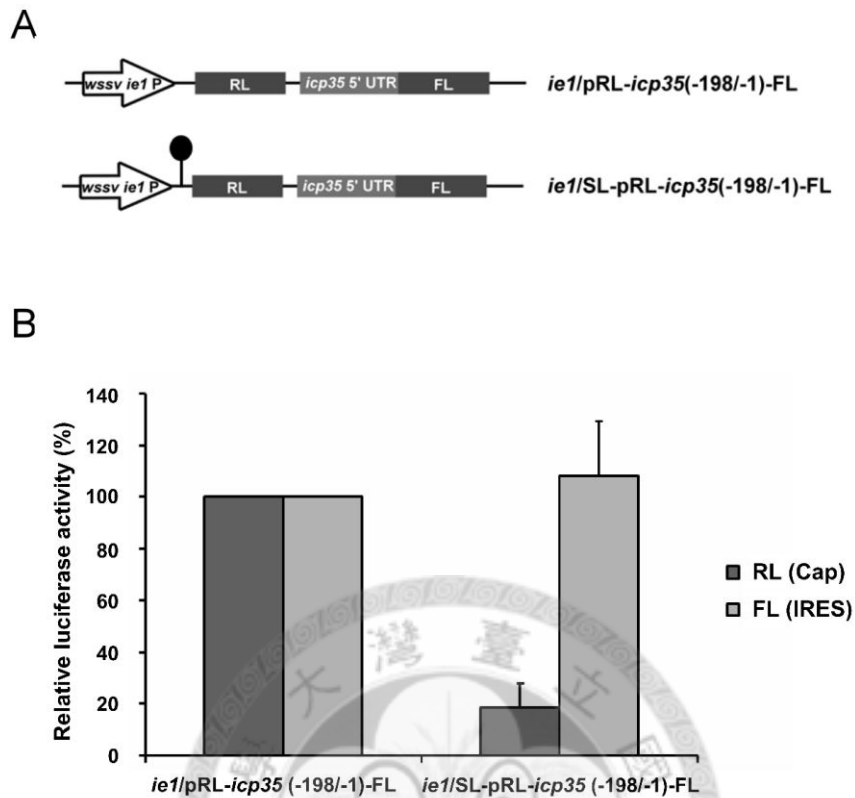


Fig. 7 The FL activity was not a result of ribosomal read-through. (A) Schematic diagrams of bicistronic plasmids containing *icp35(-198/-1)* with or without a stable stem-loop (SL) upstream of the RL ORF. (B) The plasmids were transiently transfected into Sf9 cells, and 48 h later the *Renilla* (RL) and firefly (FL) luciferase activities were measured. Fold changes are shown with respect to the corresponding control levels for *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL*, which were set to 100%. Three independent transfection assays were performed and the mean \pm SD was calculated.

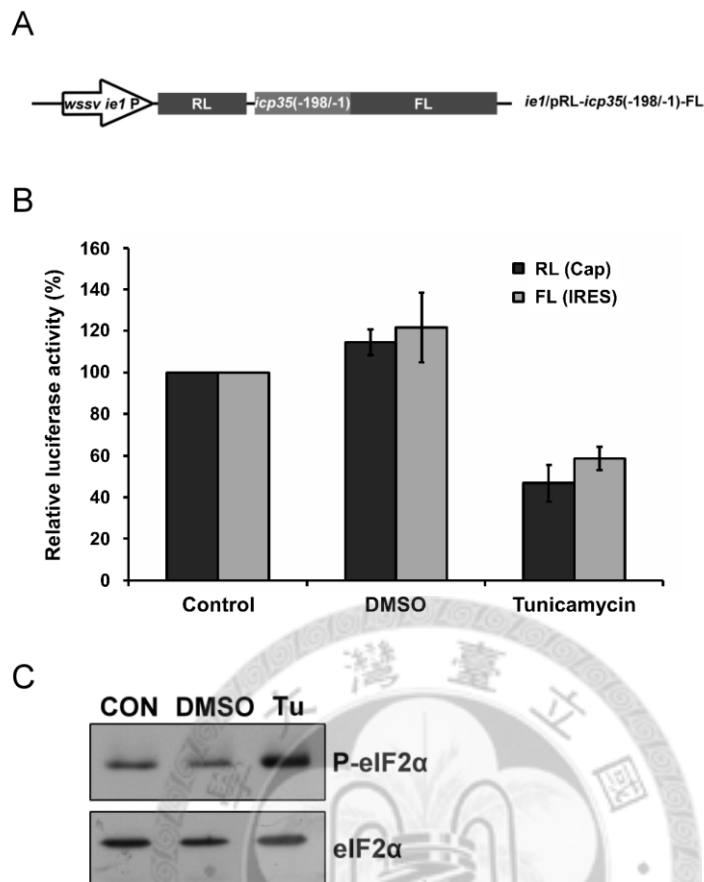


Fig. 8 When eIF2 α is inactivated by tunicamycin-induced ER stress, the IRES activity of *icp35(-198/-1)* is reduced. (A) Schematic diagram of the bicistronic plasmid containing the *icp35(-198/-1)* IRES element. (B) The bicistronic plasmid *ie1/pRL-icp35(-198/-1)-FL* was transiently transfected to Sf9 cells, and 24 h later, the cells were treated with tunicamycin (2.5 μ g/ml) or DMSO (100%). Luciferase activities were measured at 15 h post-transfection. Luciferase activities are expressed relative to the levels in untreated (control) cells, which were set to 100%. (C) The level of phosphorylated eIF2 α in the Sf9 cells at 15 h post-transfection was detected by Western blot analysis using the antibodies for phospho-eIF2 α and total eIF2 α .

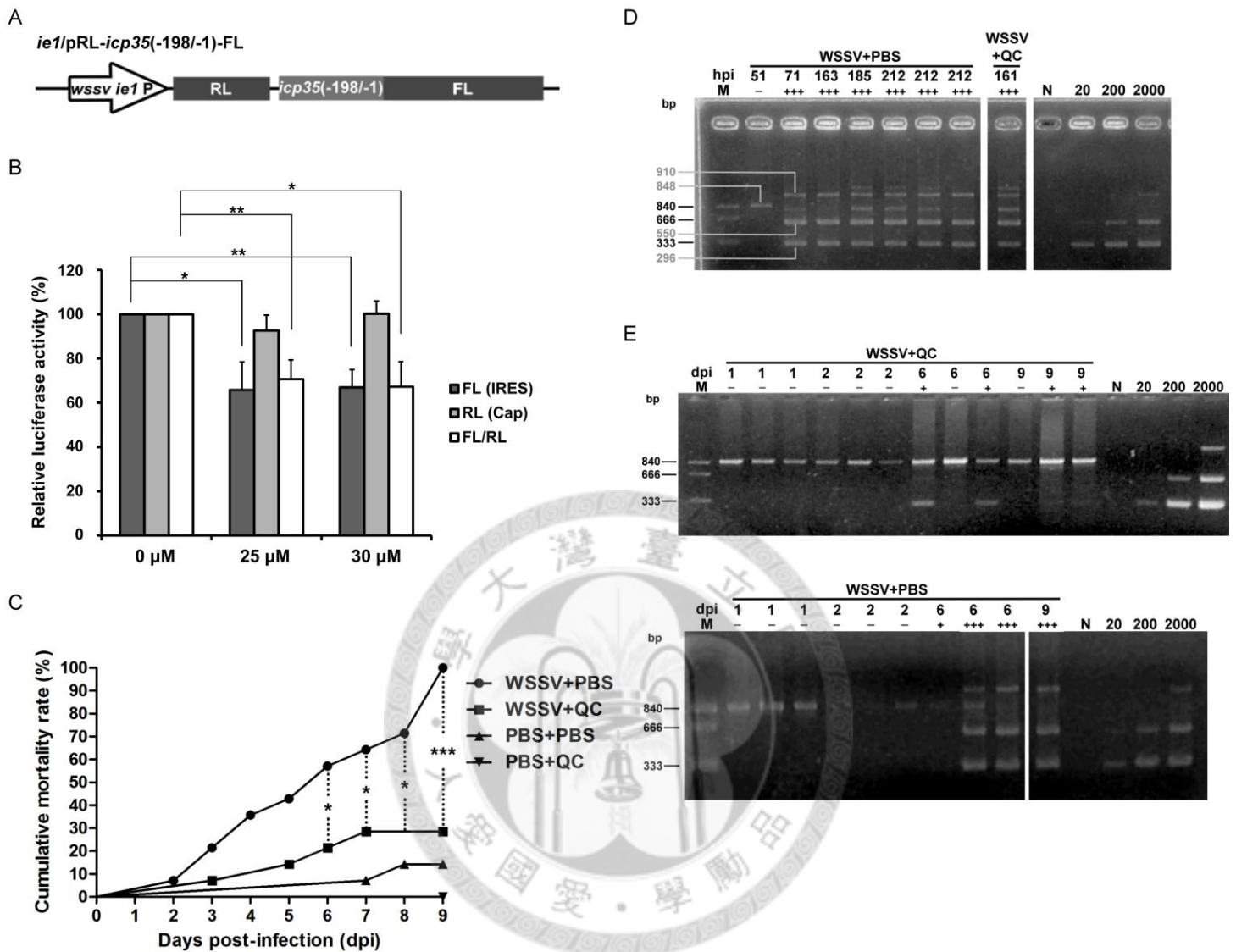


Fig. 9 *icp35* IRES-mediated translation was affected by quinacrine (QC). (A) Schematic diagram of the IRES-containing bicistronic reporter plasmid. (B) Bicistronic plasmids were transfected into Sf9 cells with or without QC (0, 25, or 30 μM). Luciferase activities were measured at 48 hour post-transfection. The Figure shows changes relative to the corresponding untreated mock controls (0 μM), which was set to 100%. Four independent transfection assays

were performed and the mean \pm SD was calculated. (* p <0.05, ** p <0.005 by one-way analysis of variance [ANOVA]) (C) Shrimp (*L. vannamei*; 4 g mean weight; 14 shrimp per group) were first injected with 50 μ l WSSV inoculum or PBS, and then immediately injected with QC (5 μ g/g) or PBS. The cumulative mortality of each group was recorded every 12 h, with dead shrimp being removed from the tank as soon as possible. Data were analyzed using a Kaplan-Meier log rank χ^2 test (Graphpad). Asterisks indicate significant cumulative differences between groups (* p <0.05, *** p <0.005). (D) The swimming legs from some of the dead shrimp in the WSSV-challenged groups were tested with an IQ2000 kit to determine the WSSV infection level. The hpi above each lane indicates time of collection. The bands of size 296, 550, and 910 bp represent WSSV genes, and the band of size 848 bp represents shrimp genomic DNA. Samples for the marker bands (M) of size 333, 666 and 840 bp, and the positive infection controls (20, 200, and 2000 copies/reaction; right hand panel) were provided by the kit. The positive infection controls respectively represent a light (+), moderate (++), and heavy (+++) infection. Lane N is the negative control. (E) Two other replicate groups (WSSV+PBS and WSSV+QC) were used to collect live shrimp samples at 1, 2, 6 and 9 days post-injection (dpi). WSSV infection levels were determined using the IQ2000 kit as described above.

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence	Usage
<i>ie1</i> promoter-SacI-F	5'-AGGAGCTCCCTTGTACTCATTTATTCCTA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>ie1</i> promoter-NheI-R	5'-CCGCTAGCCTTGAGTGGAGAGAGAGA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-468)-F	5'-ATGTTACATTCTTTATATAATGGTGAATC-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-1)-NcoI-R	5'-TTTCCATGGTTTGGGGTATTTTTGGA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-426)-SmaI-F	5'-GGCCCGGGATGGTTTTTGTCTTTTTAAAG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-384)-F	5'-AAGCCTTTTTATATTGAAGATAA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-344)-SmaI-F	5'-AACCCGGGAATAATCATGTTAATAACAC-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-291)-SmaI-F	5'-GGCCCGGGTTATCAAACACTATGCATTTTC-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-198)-SmaI-F	5'-TTCCCGGGTTTCTGGCACATATAGTGATG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-128)-SmaI-F	5'-TTCCCGGGTGCCACGAGTGTATATATAGGA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-171)-SmaI-F	5'-TTCCCCGGGAGTTGGCAACTCTATCACTA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-112)-NcoI-R	5'-TTTCCATGGATATACTCGTGGCACGGTG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-1)-F	5'-TTTGGGGTATTTTTGGAAGTCTCGTG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-468)-NcoI-R	5'-TTTCCATGGTGTACATTCTTTATATAATG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-426)-NcoI-R	5'-GGCCATGGATGGTTTTTGTCTTTTTAAAG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>icp35</i> (-88)-NcoI-R	5'-TTTCCATGGGTGGTGCAGGATCGGGGGTC-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay

<i>icp35(-38)-NcoI-R</i>	5'-TTT <u>CCATGG</u> AGTAGTAGTATTAGGTTAG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>vp31-IRF1-N123-SmaI</i>	5'-CAC <u>CCGGG</u> GCGAATTGTTGAAGAACACTG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>vp39b-IRR1-C919-NcoI</i>	5'-AAC <u>CCATGG</u> CTAAGCGATACTTTAATTG-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>vp28-IRES-SmaI-F</i>	5'-TG <u>CCCGGG</u> TAGACCCTGGCTTACTGTA-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
<i>vp28-IRES-NcoI-R</i>	5'-T <u>CCCATGG</u> GACGAGTTTTTTTTCTTTATC-3'	Plasmid construction for dual luciferase assay
P1 (<i>ie1P</i> [+3/+31]-F)	5'-CACAAGAGCGCACACACACGCTTATAACT-3'	RT-PCR assay
P2 (pRL-FL-R1241)	5'-CCAGCGGTTCCATCTTCCAGCGGATA-3'	RT-PCR assay
<i>icp35-F1</i>	5'-ATGGTCTCTTCTAGAACATCAACA-3'	For dsRNA-mediated gene silencing and RT-PCR assay
<i>icp35-R687</i>	5'-TTACCAACAAGGATCATCAATCA-3'	For dsRNA-mediated gene silencing and RT-PCR assay
<i>icp35-dsRNA-T7-F1</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTCTCT TCTAGAACATCAACA-3'	For dsRNA-mediated gene silencing
<i>icp35-dsRNA-T7-R687</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATTACCAACA AGGATCATCAATCA-3'	For dsRNA-mediated gene silencing
EGFP-F	5'-GTTCAGCGTGTCCGGCGAG-3'	For dsRNA-mediated gene silencing
EGFP-R	5'-GTTCTTCTGCTTGTCGGCC-3'	For dsRNA-mediated gene silencing
EGFP-T7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCAGCGT GTCCGGCGAG-3'	For dsRNA-mediated gene silencing

EGFP-T7-R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTCTTCTG CTTGTCGGCC-3'	For dsRNA-mediated gene silencing
<i>ie1</i> -F	5'-GACTCTACAAATCTCTTTGCCA-3'	RT-PCR assay
<i>ie1</i> -R	5'-CTACCTTTGCACCAATTGCTAG-3'	RT-PCR assay
EF-1 α -F	5'-GGAGATGCACCACGAAGCTC-3'	RT-PCR assay
EF-1 α -R	5'-TTGGGTCCGGCTTCCAGTTC-3'	RT-PCR assay



七、參考文獻

1. Kozak, M., *How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in nessenger RNA?* Cell, 1978. **15**: p. 1109-1123.
2. Pestova, T.V., S.I. Borukhov, and C.U. Hellen, *Eukaryotic ribosomes require initiation factors I and IA to locate initiation codons.* Nature, 1998. **394**(6696): p. 854-9.
3. Pestova, T.V. and V.G. Kolupaeva, *The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection.* Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2906-22.
4. Zhouravleva, G., et al., *Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3.* Embo J, 1995. **14**(16): p. 4065-72.
5. Gale, M., Jr., S.L. Tan, and M.G. Katze, *Translational control of viral gene expression in eukaryotes.* Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(2): p. 239-80.
6. Jang, S.K. and E. Wimmer, *Cap-Independent Translation of Encephalomyocarditis Virus-Rna - Structural Elements of the Internal Ribosomal Entry Site and Involvement of a Cellular 57-Kd Rna-Binding Protein.* Genes & Development, 1990. **4**(9): p. 1560-1572.
7. Pelletier, J. and N. Sonenberg, *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA.* Nature, 1988. **334**(6180): p. 320-5.

8. Brown, E.A., et al., *Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5041-5.
9. Lemon, S.M. and M. Honda, *Internal ribosome entry sites within the RNA genomes of hepatitis C virus and other flaviviruses*. Seminars in Virology, 1997. **8**(3): p. 274-288.
10. Pilipenko, E.V., et al., *Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphthovirus RNAs*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(14): p. 5701-11.
11. Boehringer, D., et al., *Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES*. Structure, 2005. **13**(11): p. 1695-706.
12. Schuler, M., et al., *Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1092-6.
13. Baird, S.D., et al., *Searching for IRES*. Rna-a Publication of the Rna Society, 2006. **12**(10): p. 1755-1785.
14. Kieft, J.S., *Viral IRES RNA structures and ribosome interactions*. Trends in Biochemical Sciences, 2008. **33**(6): p. 274-283.
15. Xia, X.H. and M. Holcik, *Strong Eukaryotic IRESs Have Weak Secondary Structure*. Plos One, 2009. **4**(1): p. e4136.

16. Merrick, W.C. and J.W.B. Hershey, *The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis*, in *Translational control*, H.J.W. B, M.M. B., and S. N., Editors. 1996, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. p. 31-70.
17. Aranda, M. and A. Maule, *Virus-induced host gene shutoff in animals and plants*. *Virology*, 1998. **243**(2): p. 261-7.
18. Gradi, A., et al., *Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(19): p. 11089-94.
19. Lamphear, B.J., et al., *Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(37): p. 21975-83.
20. Wyckoff, E.E., *Inhibition of Host-Cell Protein-Synthesis in Poliovirus-Infected Cells*. *Seminars in Virology*, 1993. **4**(4): p. 209-215.
21. Borman, A.M., et al., *eIF4G and its proteolytic cleavage products: Effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs*. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 1997. **3**(2): p. 186-196.
22. Nanbru, C., et al., *Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 32061-6.

23. Yang, Q. and P. Sarnow, *Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA: Evidence for specific RNA-protein interactions*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(14): p. 2800-2807.
24. Holcik, M. and R.G. Korneluk, *Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4648-4657.
25. Graber, T.E. and M. Holcik, *Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis*. Mol Biosyst, 2007. **3**(12): p. 825-34.
26. Holcik, M. and N. Sonenberg, *Translational control in stress and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 318-27.
27. Komar, A.A. and M. Hatzoglou, *Cellular IRES-mediated translation The war of ITAFs in pathophysiological states*. Cell Cycle, 2011. **10**(2): p. 229-240.
28. Baird, S.D., et al., *A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(14): p. 4664-4677.
29. Lo, C.F. and G.H. Kou, *Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review*. Fish Pathology, 1998. **33**(4): p. 365-371.
30. Yan, D.C., et al., *White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments*. Dis Aquat Organ, 2004. **59**(1): p. 69-73.

31. Chang, Y.S., et al., *Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (Callinectes sapidus) from American Coastal Waters*. Mar Biotechnol (NY), 2001. **3**(2): p. 163-71.
32. Chen, L.L., et al., *Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab Scylla serrata*. Dis Aquat Org, 2000. **40**(2): p. 157-61.
33. Lu, C.P., et al., *Electron microscopic observation on a non-occluded baculo-like virus in shrimps*. Arch Virol, 1997. **142**(10): p. 2073-8.
34. Lightner, D.V. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp in World Aquaculture Society*. 1996. Baton Rouge, Louisiana.
35. Chou, H.Y., et al., *Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan*. Diseases of Aquatic Organisms, 1995. **23**(3): p. 165-173.
36. Huang, J., et al., *Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp*. Marine Fisheries Research, 1995. **16**(7).

37. Huang, J., et al., *Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp*. Mar. Fish. Res, 1995. **16**(1): p. 11-23.
38. Inouye, K., et al., *Mass Mortalities of Cultured Kuruma Shrimp *Penaeus-Japonicus* in Japan in 1993 - Electron-Microscopic Evidence of the Causative Virus*. Fish Pathology, 1994. **29**(2): p. 149-158.
39. Nakano, H., et al., *Mass Mortalities of Cultured Kuruma Shrimp, *Penaeus-Japonicus*, in Japan in 1993 - Epizootiological Survey and Infection Trials*. Fish Pathology, 1994. **29**(2): p. 135-139.
40. Inouye, K., et al., *The Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes Penaeid acute viremia (PAV)*. Fish Pathology, 1996. **31**(1): p. 39-45.
41. Karunasagar, I., S.K. Otta, and I. Karunasagar, *Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India*. Aquaculture, 1997. **153**(1-2): p. 9-13.
42. Park, J.H., et al., *An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea*. Diseases of Aquatic Organisms, 1998. **34**(1): p. 71-75.
43. Magbanua, F.O., et al., *White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines*. Diseases of Aquatic Organisms, 2000. **42**(1): p. 77-82.

44. Soto, M.A. and J.M. Lotz, *Epidemiological parameters of White Spot Syndrome Virus infections in Litopenaeus vannamei and L. setiferus*. J Invertebr Pathol, 2001. **78**(1): p. 9-15.
45. Wang, C.H., et al., *Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 1995. **23**(3): p. 239-242.
46. Chen, L.L., et al., *Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells*. Virology, 2002. **293**(1): p. 44-53.
47. Yang, F., et al., *Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11811-20.
48. van Hulten, M.C., et al., *The white spot syndrome virus DNA genome sequence*. Virology, 2001. **286**(1): p. 7-22.
49. Tsai, M.F., et al., *Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus*. Virology, 2000. **277**(1): p. 92-9.
50. Liu, W.J., et al., *Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase*. Virology, 2001. **289**(2): p. 362-377.

51. Marks, H., et al., *Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes*. Journal of General Virology, 2003. **84**: p. 1517-1523.
52. Chen, L.L., et al., *Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus*. Virology, 2002. **301**(1): p. 136-47.
53. Tsai, J.M., et al., *Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus*. Journal of Virology, 2004. **78**(20): p. 11360-11370.
54. Tsai, J.M., et al., *Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 3021-9.
55. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
56. Jang, S.K., et al., *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2636-43.
57. Bielecki, L. and S.J. Talbot, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1864-1869.
58. Grundhoff, A. and D. Ganem, *Mechanisms governing expression of the v-FLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1857-63.

59. Low, W., et al., *Internal ribosome entry site regulates translation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus FLICE inhibitory protein*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2938-45.
60. Griffiths, A. and D.M. Coen, *An unusual internal ribosome entry site in the herpes simplex virus thymidine kinase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9667-72.
61. Yu, Y. and J.C. Alwine, *19S late mRNAs of simian virus 40 have an internal ribosome entry site upstream of the virion structural protein 3 coding sequence*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6553-8.
62. Han, F. and X. Zhang, *Internal initiation of mRNA translation in insect cell mediated by an internal ribosome entry site (IRES) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV)*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 893-9.
63. Xie, X., L. Xu, and F. Yang, *Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus*. Journal of Virology, 2006. **80**(21): p. 10615-23.
64. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn*. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
65. Liu, W.J., et al., *White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene ie1*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1461-71.

66. Kozak, M., *Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(10): p. 3438-45.
67. Poyry, T.A., et al., *The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation*. Genes Dev, 2007. **21**(23): p. 3149-62.
68. Byrd, M.P., M. Zamora, and R.E. Lloyd, *Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18610-22.
69. Pudi, R., et al., *Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12231-40.
70. Collier, A.J., S. Tang, and R.M. Elliott, *Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 10): p. 2359-66.
71. Creancier, L., et al., *Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation*. J Cell Biol, 2000. **150**(1): p. 275-81.

72. Hennecke, M., et al., *Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(16): p. 3327-34.
73. Kamoshita, N., et al., *Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors*. Virology, 1997. **233**(1): p. 9-18.
74. Woolaway, K.E., et al., *The 5' untranslated region of Rhopalosiphum padi virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems*. J Virol, 2001. **75**(21): p. 10244-9.
75. Buck, C.B., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 181-91.
76. Kang, S.T., et al., *Polycistronic mRNAs and internal ribosome entry site elements (IRES) are widely used by white spot syndrome virus (WSSV) structural protein genes*. Virology, 2009. **387**(2): p. 353-363.
77. Gingras, A.C., et al., *Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5578-83.

78. Crum, C.J., et al., *Tobacco mosaic virus infection stimulates the phosphorylation of a plant protein associated with double-stranded RNA-dependent protein kinase activity*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(26): p. 13440-3.
79. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 2286-302.
80. Lopez-Lastra, M., A. Rivas, and M.I. Barria, *Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation*. *Biological Research*, 2005. **38**(2-3): p. 121-146.
81. Fitzgerald, K.D. and B.L. Semler, *Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2009. **1789**(9-10): p. 518-528.
82. Isaksson, A., M. Berggren, and A. Ricksten, *Epstein-Barr virus U leader exon contains an internal ribosome entry site*. *Oncogene*, 2003. **22**(4): p. 572-81.
83. Coleman, H.M., I. Brierley, and P.G. Stevenson, *An internal ribosome entry site directs translation of the murine gammaherpesvirus 68 MK3 open reading frame*. *J Virol*, 2003. **77**(24): p. 13093-105.
84. Tahiri-Alaoui, A., et al., *Identification of an intercistronic internal ribosome entry site in a Marek's disease virus immediate-early gene*. *J Virol*, 2009. **83**(11): p. 5846-53.

85. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, *A trip to the ER: coping with stress*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 20-8.
86. Dhar, D., S. Roy, and S. Das, *Translational control of the interferon regulatory factor 2 mRNA by IRES element*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(16): p. 5409-21.
87. Malina, A., et al., *Inhibitory properties of nucleic acid-binding ligands on protein synthesis*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 79-89.
88. Ehsanian, R., C. Van Waes, and S.M. Feller, *Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 13.
89. Gasparian, A.V., et al., *Inhibition of encephalomyocarditis virus and poliovirus replication by quinacrine: implications for the design and discovery of novel antiviral drugs*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9390-7.
90. Wang, H.C., et al., *Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV)*. Diseases of Aquatic Organisms, 2007. **74**(3): p. 179-189.
91. Lan, Y.S., W. Lu, and X. Xu, *Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence*. Virus Research, 2002. **90**(1-2): p. 269-274.
92. Marks, H., et al., *Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp*. Virus Research, 2005. **110**(1-2): p. 9-20.

93. Courey, A.J. and R. Tjian, *Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif*. Cell, 1988. **55**(5): p. 887-98.
94. Hope, I.A. and K. Struhl, *Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast*. Cell, 1986. **46**(6): p. 885-94.
95. Mitchell, P.J. and R. Tjian, *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. Science, 1989. **245**(4916): p. 371-8.
96. Takada, N., et al., *Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas*. Cancer Research, 1999. **59**(12): p. 2810-2814.
97. Trautwein, C., et al., *Transactivation of Lap/Nf-Il6 Is Mediated by an Acidic Domain in the N-Terminal Part of the Protein*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(25): p. 15130-15136.
98. Yen, T.S., *Hepadnaviral X Protein: Review of Recent Progress*. J Biomed Sci, 1996. **3**(1): p. 20-30.
99. Wentz, M.J., S.A. Becker, and B.L. Slagle, *Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein*. Virus Research, 2000. **68**(1): p. 87-92.
100. Zheng, Y.Y., et al., *Enhancement of gene transactivation activity of androgen receptor by hepatitis B virus X protein*. Virology, 2007. **363**(2): p. 454-461.

101. Li, J., et al., *Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 5875-81.
102. Maguire, H.F., J.P. Hoeffler, and A. Siddiqui, *Hbv X-Protein Alters the DNA-Binding Specificity of Creb and Atf-2 by Protein-Protein Interactions*. Science, 1991. **252**(5007): p. 842-844.
103. Seto, E., P.J. Mitchell, and T.S.B. Yen, *Transactivation by the Hepatitis-B Virus-X Protein Depends on Ap-2 and Other Transcription Factors*. Nature, 1990. **344**(6261): p. 72-74.
104. Williams, J.S. and O.M. Andrisani, *The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3819-23.
105. Clemens, M.J., *Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis*. Prog Mol Subcell Biol, 2001. **27**: p. 57-89.
106. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
107. Schneider, R.J. and I. Mohr, *Translation initiation and viral tricks*. Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(3): p. 130-136.

108. Walsh, D. and I. Mohr, *Viral subversion of the host protein synthesis machinery*. Nature Reviews Microbiology, 2011. **9**(12): p. 860-875.
109. Bushell, M. and P. Sarnow, *Hijacking the translation apparatus by RNA viruses*. Journal of Cell Biology, 2002. **158**(3): p. 395-399.
110. Lloyd, R.E., *Translational control by viral proteinases*. Virus Research, 2006. **119**(1): p. 76-88.
111. Kim, J.H., et al., *eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions*. EMBO J, 2011. **30**(12): p. 2454-64.
112. Plank, T.D. and J.S. Kieft, *The structures of nonprotein-coding RNAs that drive internal ribosome entry site function*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(2): p. 195-212.
113. Hanson, P.J., et al., *IRES-Dependent Translational Control during Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 92.
114. Sarnow, P., *Viral internal ribosome entry site elements: Novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis*. Journal of Virology, 2003. **77**(5): p. 2801-2806.
115. Bogdanovsky, D. and M. Pierre, *Effect of tilorone and quinacrine on translation in reticulocyte lysates*. Biochem Pharmacol, 1979. **28**(24): p. 3683-5.
116. Ciak, J. and F.E. Hahn, *Quinacrine (atebrin): mode of action*. Science, 1967. **156**(3775): p. 655-6.

117. Leduc, E.H., et al., *Effect of quinacrine on nuclear structure and RNA synthesis in cultured rat hepatocytes*. *Cancer Research*, 1981. **41**(7): p. 2832-41.
118. Pritchard, N.J., A. Blake, and A.R. Peacocke, *Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA*. *Nature*, 1966. **212**(5068): p. 1360-1.
119. Sinha, R., M. Hossain, and G.S. Kumar, *RNA targeting by DNA binding drugs: structural, conformational and energetic aspects of the binding of quinacrine and DAPI to A-form and H(L)-form of poly(rC).poly(rG)*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1770**(12): p. 1636-50.
120. Greenwood, D., *Conflicts-of-Interest - the Genesis of Synthetic Antimalarial Agents in Peace and War*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1995. **36**(5): p. 857-872.
121. Gardner, T.B. and D.R. Hill, *Treatment of giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001. **14**(1): p. 114-128.
122. Guo, C., et al., *9-Aminoacridine-based anticancer drugs target the PI3K/AKT/mTOR, NF-kappaB and p53 pathways*. *Oncogene*, 2009. **28**(8): p. 1151-61.
123. Preet, R., et al., *Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity*. *International Journal of Cancer*, 2012. **130**(7): p. 1660-1670.
124. Spilman, P., et al., *A gamma-secretase inhibitor and quinacrine reduce prions and prevent dendritic degeneration in murine brains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p. 10595-600.

125. Korth, C., et al., *Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(17): p. 9836-9841.
126. Sasvari, Z., et al., *Inhibition of RNA Recruitment and Replication of an RNA Virus by Acridine Derivatives with Known Anti-Prion Activities*. Plos One, 2009. **4**(10): p. e7376.
127. Hirschman, S.Z. and E. Garfinkel, *Inhibition of Hepatitis-B DNA-Polymerase by Intercalating Agents*. Nature, 1978. **271**(5646): p. 681-683.

