

國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Fisheries Science

College of Life science

National Taiwan University

Master Thesis

以即時定量聚合酶鏈鎖反應為平台分析虹彩病毒感染

後點帶石斑之基因表現

Using real-time quantitative polymerase chain reaction as
a platform for the analysis of gene expression of orange
spotted grouper infected with iridovirus

劉于正

Yu-Cheng, Liu

指導教授：廖文亮 博士

張繼堯 博士

Advisor: Chi-Yao, Chang, Ph.D.

Wen-Liang, Liao, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

誌謝

能在短短的兩年碩士班生涯中完成這篇論文，首先要感謝我的兩位指導老師，張繼堯老師以及廖文亮老師所給予的各種建言及方法以助我突破實驗的瓶頸。以及中研院細生所 R336 實驗室中的朝安學長、秋月學姊、志鴻學長、建文學長、明山學長、耀錫學長、琇婷學姊、香爾學姊的實驗上的幫助，同學靖惠以及佳慧的互相建議，政霖以及賓鴻兩位學弟幫忙實驗魚隻的飼養以及犧牲。以及其他就讀於其他研究所的高中同學間的鼓舞打氣，最後更要感謝爸媽辛苦的培育我就學並讓我可以選擇自己想唸的研究所且支持我。



摘要

虹彩病毒是一可感染點帶石斑之生活史各階段，並會造成嚴重死亡之病毒，其為一遺傳物質全長 140 kb 之雙股 DNA 病毒，其主要感染石斑魚之免疫器官，如脾臟、腎臟等部位。截至今日為止，雖然虹彩病毒之基因序列已全部解序，其各別基因也已有不少研究成果發表，但對於病毒入侵後石斑魚體內基因表現量之調控研究仍尚缺乏。本實驗室於 2008 年以點帶石斑魚的腎臟製作成的功能性基因體微陣列晶片以研究經注射過虹彩病毒、lipopolysaccharide (LPS)、poly I:C 之點帶石斑腎臟於不同時間點之基因表現量的變化，篩選出 18 個 2 倍正調控與 23 個 2 倍負調控基因群。

本實驗重新以 GeneSpring GX 11.5 軟體檢視微陣列晶片，排除背景值後篩選出 39 個兩倍正調控與 48 個兩倍負調控之基因群。本實驗進一步以即時定量聚合酶鏈鎖反應來分析這些差異性表現的基因群。實驗中共分析 24 個微陣列晶片篩選出的基因以及 6 個免疫相關基因，其中 RNA helicase DHX58 homolog、CD9 antigen、interferon stimulated gene 15、HECT E3 ubiquitin ligase、reverse transcriptase-like protein、vig-1、very large inducible GTPase-1、urokinase plasminogen activator surface receptor、26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog、interleukin-1 β 、interleukin-8、interferon-induced GTP-binding protein MxI、tumor-necrosis factor α 和 cyclooxygenase-2 等 15 個基因，其注射虹彩病毒處理組之頭腎組織基因表現量比無注射之控制組高 20 倍以上。而 UDP-glucose 6-dehydrogenase 在病毒處理中的基因表現量則較控制組低了近 100 倍。本實驗分析出虹彩病毒感染石斑魚之頭腎基因差異表現之基因群將有助於了解病毒與宿主間的交互作用。

Abstract

Grouper iridovirus (GIV), a double-strand DNA virus, can infect with all life stages of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), and causes groupers serious death. It mainly attacks immune system of host, such as spleen and kidney. Until now, the total 140 kb genome size of GIV had been sequenced and the research of several virus genes expression upon infection had been studied. However, investigation of host gene expression during GIV infection is still know very little. The grouper gene expression profiles after different kinds of challenges including GIV, lipopolysaccharide, and poly I:C using GIV-infected grouper kidney cDNA microarray had been established in our lab previously.

We reanalyzed the previous array data of GIV-challenged only, and the newly 39 up-regulated and 48 down-regulated genes under two-fold threshold were selected. To validate the result of microarray analysis, the quantitative real-time RT-PCR was performed. The kidney parts of non-injected control groupers and GIV-, lipopolysaccharide-, poly I:C-treated of groupers were collected at 1, 3, 5 day post-injection and the total RNAs were extracted for further RT-qPCR. Twenty four candidate genes from microarray analysis and another 6 immune-related genes were estimated. Fifteen genes including RNA helicase DHX58 homolog, CD9 antigen, interferon stimulated gene 15, HECT E3 ubiquitin ligase, reverse transcriptase-like protein, vig-1, very large inducible GTPase-1, urokinase plasminogen activator surface receptor, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog, interleukin-1 β , interleukin-8, interferon-induced GTP-binding protein MxI, tumor-necrosis factor α and cyclooxygenase-2 are significant expression up to 20 fold compared to non-injected control candidate gene, but UDP-glucose 6-dehydrogenase is suppressed down to around 100 fold after GIV-injected treatment. Based on this

experiment, we believe that those genes with significant expressed or suppressed may participate in the host-viral interaction.



目 錄

誌謝.....	II
中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
第一章 前言.....	1
1.1 石斑魚之簡介與其養殖產業.....	1
1.2 魚類虹彩病毒之研究史.....	2
1.3 魚類之免疫系統.....	6
1.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應.....	8
1.5 虹彩病毒感染石斑魚之相關研究.....	9
第二章 材料與方法.....	12
2.1 虹彩病毒誘發之點帶石斑之微陣列晶片分析.....	12
2.2 勝任細胞之製備與轉型作用.....	12
2.3 質體 DNA 之純化及定序校準比對.....	13
2.4 實驗用點帶石斑之飼養.....	14
2.5 細胞繼代培養.....	15
2.6 虹彩病毒之增殖.....	16
2.7 病毒效價之測定.....	16
2.8 石斑魚之免疫刺激物注射及頭腎、脾藏組織收集.....	17

2.9 石斑魚頭腎組織與脾臟組織之 RNA 萃取及純化.....	18
2.10 cDNA 之合成.....	19
2.11 即時定量聚合酶鏈鎖反應之專用引子設計.....	19
2.12 即時定量聚合酶鏈鎖反應.....	20
2.13 即時定量聚合酶鏈鎖反應結果之分析.....	20
第三章 結果	
3.1 虹彩病毒誘發之點帶石斑之微陣列晶片分析.....	22
3.2 質體 DNA 定序及校準比對.....	22
3.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應之專用引子設計.....	25
3.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應後之目標基因表現量結果.....	25
第四章 討論.....	27
參考文獻.....	33
附錄.....	43

第一章 前言

1.1 石斑魚之簡介與其養殖產業

台灣四面環海，黑潮終年流經台灣東西岸海域，且位處熱帶及亞熱帶之間，因此對於發展海水養殖業具有絕佳的先天條件。目前台灣養殖魚業主要分佈在台灣西南沿海地區，其主要的養殖物種以石斑及鯛類魚最具代表性。石斑魚之分類地位為輻鰭魚綱 (Actinopterygii)、鱸形目 (Perciformes)、鮨科 (Serranidae)、石斑屬 (*Epinephelus*)，其種類依 Nelson (2006) 粗略將全球之鮨科魚分為 3 亞科，63 屬，449 種，分佈於熱帶及亞熱帶海域，在台灣所記錄的種類有 114 種。石斑魚在民間俗稱過魚、格也魚、鮨桂魚、鱸貓等，體形長且粗壯呈橢圓形，側扁頭大，吻短鈍圓，口大且平裂或略傾斜，上頷骨發達使其能略向前伸出，體表披有細小櫛鱗片、圓鱗 (曾，1988)。石斑多半屬日行性魚類，其水溫適溫範圍為 15-34 °C 間，最適生長水溫則是 22-28 °C，石斑魚生性兇殘並具有領域性以及擬態的行為，且大多以魚、蝦、蟹、端足類為食，且其生性兇，多半分佈於沿岸海域，喜好棲習於岩礁、珊瑚礁、洞穴等隱密處，幼魚則常聚集於海島密佈之海域。棲息海域的深度會依水溫的變化而隨之上升下降，在春夏季海水溫度高時分佈於較淺層的 10-30 米處，秋季水溫低時棲息深度則下降到水深 40-80 米之較深水域。

石斑為雌雄同體 (hermaphroditism) 之魚類，雌性雄性無法從外表分辨，石斑在幼年期為雌性，在雌性性徵成熟後，經由性轉變變為具有雄行產精器官之雄性，為先雌後雄的魚類。台灣目前主要的石斑養殖魚種有瑪拉巴石斑 (*Epinephelus malabaricus*)、點帶石斑 (*Epinephelus coioides*)、青石斑 (*Epinephelus aowora*)、老虎斑 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 及龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 這五種。台灣的石斑繁殖方法有自然授精法與人工授

精法兩種，而養殖方式主要分為三階段，第一階段：卵至 0.5-9.6 g 白身苗；第二階段：白身苗至 6-7 g 魚苗；第三階段：魚苗至成魚，一般石斑魚在養殖八個月到一年即可達上市體型銷售。目前石斑的養殖主要遭受到的病害有兩種，一種為在白身苗期感染魚腦使魚腦空洞化並出現迴旋泳姿的神經壞死病毒（nervous necrosis virus），另一種是在石斑生活史各階段皆會感染腎臟、脾臟及造血組織使器官腫大出血壞死的虹彩病毒（iridiovirus）。

石斑魚因肉質鮮嫩肥美所以廣受華人地區喜好，需求也在逐年增加中，因為供不應求的緣故使得台灣石斑魚養殖業的年產量從 1998 年的年產量 5,000 公噸至 2008 年提高到了年產量 17,000 噸，年產值也從 10 億增加了五倍，而近五年來每公頃的石斑產量也由原本的 1 萬 8 千多公斤增加了三成。而又因今年三月日本關東大地震造成福島核能發電廠的含輻射廢水大量排入太平洋中，進而隨著洋流擴散到世界各大海域，導致海洋生物遭受污染，如不慎食用到體內可能會對人體造成病害。因為這樣的危險使得人們對於海洋魚類的需求從捕撈轉換到養殖的海水魚類，這類需求的提升讓近幾個月來石斑每公斤的售價上升了四成之多，相信伴隨著海洋魚類資源的逐漸匱乏，但人類對魚類的需求只增不減的情況下，石斑養殖業的前景會是一片光明。

1.2 魚類虹彩病毒之研究史

虹彩病毒是一廣泛存在於無脊椎及脊椎動物間的病毒疾病，在脊椎動物中主要感染兩生類及魚類，其英文名 iris 在希臘字中代表著彩虹（rainbow）之意，這是因虹彩病毒在感染昆蟲後會使蟲體可以被光折射出彩虹的光芒故得其名（Goorha, 1995）。虹彩病毒內含遺傳物質為雙股去氧核糖核酸之正二十面體病毒，其基因體大小介於 103-212 kb 之間，病毒顆粒直徑為 125-300 nm 之間，虹彩病毒之結構由內自外分別為核蛋白（nucleoprotein）、脂質內膜（lipid inner membrane）、

蛋白鞘 (capsid)，某些種類之虹彩病毒具有被膜 (envelope) 的存在。虹彩病毒在宿主細胞中複製增殖後以出芽 (rainbow) 的方式離開宿主細胞，再以內胞飲 (endocytosis) 的方式進入鄰近的細胞(Qin et al., 2001)。在電子顯微鏡之觀察下可見到受感染細胞的細胞質中有處於不同複製階段中的虹彩病毒顆粒的存在，在細胞質中可見到病毒呈分散或類晶體狀之整齊排列，在宿主細胞內也會有包涵體 (inclusion body) 的形成(Kasornchandra and Khongpradit, 1997; Tapiovaara et al., 1998)。虹彩病毒科之病毒主要感染的宿主分佈極廣，主要包括無脊椎動物以及除了哺乳類以外之脊椎動物(Castric and De Kinkelin, 1984)，可分為五個屬：(1) *Iridovirus*：感染多種類之無脊椎動物，主要感染之生物為昆蟲，病毒顆粒直徑為 120 nm，代表性病毒為 Chilo iridescent virus (IV6，或稱為 CIV)。(2) *Chloriridovirus*：主要感染蚊蟲為主，病毒顆粒直徑約為 180 nm，代表性病毒為 Mosquito iridescent virus (IV3)。(3) *Ranavirus*：五個屬中唯一感染之宿主為兩棲類及爬蟲類的屬，也可感染硬骨魚類，並對水產養殖業造成了不少影響 (Murali et al., 2002)，最近也被指出與近年來兩棲類的大量減少有關，其代表性病毒為 frog virus 3 (FV3)。(4) *Lymphocystivirus*：可感染多數硬骨魚類，病毒顆粒大小約為 300 nm，代表性病毒為 Lymphocystivirus type 1 (LCDV-1)，此病毒屬於慢性疾病，感染部位為真皮層的纖維細胞 (fibroblast)，感染細胞後會造成細胞腫大形成肉眼可見之結節，而腫大之纖維細胞在組織病理學觀察下可見到嗜鹼性細胞質內包涵體，此病毒感染魚隻後造成的死亡率不高，大部分受感染魚隻可自行康復。(5) *Megalocytivirus*：近年來才新建立之病毒屬，感染對象主要為淡水及海水魚類，尤其是暖水性魚類，在水產養殖業上爆發過重大的疫情，代表性病毒如 ISKNV (infectious spleen and kidney necrosis virus)、RSIV (red sea sbream iridovirus) 以及 TGIV (grouper Iridovirus of Taiwan) 等。

虹彩病毒最早被報告感染魚類是於 1983 年，在美國波士頓 (Boston) 地區之養殖金魚 (goldfish, *Carassius auratus* L)。而在 1984 年暴發的河鱸 (redfin

perch, *Perca fluviatilis*) 幼魚體中，自其內臟內分離出病毒。因此病屬於動物的流行疾病 (epizootic disease)，在病魚的造血組織、肝臟、脾臟及胰臟內發現臟器局部出現壞死的病徵，所以又被稱作為 epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) (Langdon and Humphrey, 1987; Langdon et al., 1986)。受病毒感染之細胞在穿透式電子顯微鏡觀察下可發現在細胞質中有呈類晶體狀排列之直徑約 148-167 nm，外鞘厚度約 11-15 nm，緻密核心約為 88-110 nm 之病毒顆粒。而在 1985 年澳洲的養殖虹鱒(rainbow trout, *Salmon gairdneri*) 也有虹彩病毒感染症病例之爆發，其病原在經檢測後發現與 EHNV 極為類似，被感染魚隻體色變黑、食慾下降且運動失調(ataxia)，出現病狀之魚隻致死率高達 100%，解剖後發現病魚之腎臟及脾臟腫大，經組織病理學檢測後發現病魚脾臟之紅髓、白髓、肝臟及腎臟出現局部壞死的現象，且在肝細胞中可見到具嗜鹼性之細胞內包涵體 (Langdon et al., 1988)。1990 年在美國奧勒岡州之哥倫比亞河下游發生白鱈魚 (white sturgeon, *Acipenser transmontanus*) 受虹彩病毒之感染，此病毒被命名為 white sturgeon iridovirus (WSIV)，在河流中成魚後代體內也被檢測出有虹彩病毒之存在，被感染之魚隻死亡率達 23%，組織病理觀察發現到在鰓絲有腫大且深染之細胞，而經穿透式病毒顯微鏡觀察可見到直徑約 267 nm 的病毒顆粒 (Lapatra et al., 1994)。1992 年在新加坡以箱網飼養的鱸滑石斑(brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*) 也有虹彩病毒感染的爆發，被感染的魚隻行為極不活潑且呈昏睡狀，因此被稱為 sleep grouper disease，魚隻一旦出現臨床症狀，在短短一星期內便會開始死亡，死亡率約為 50%，被感染的鱸滑石斑體型介於 0.1 kg 至 4 kg 間皆有。被感染魚隻的脾臟比一般石斑的脾臟要大上 2-3 倍，鰓呈蒼白色，腸內容物為白色，腎臟偶爾可見蒼白腫大。由組織病理學可見受感染魚隻脾臟有大範圍壞死，心肌纖維化腫大並有心肌炎及心內膜炎，以穿透式電子顯微鏡觀察得知病毒顆粒型態為正二十面體，大小為 130-160 nm (Chua et al., 1994)。1994 至 1997 年間在中國大陸廣東省所養殖的鰻魚(mandarin fish, *Siniperca chuatsia*) 發生虹彩

病毒感染，在 1998 年造成嚴重的虹彩病毒爆發，造成養殖之鰻魚死亡率高達 50%，而被感染的鰻魚之 7-10 天累計死亡率高達 100%。其臨床症狀有食慾不振、泳姿異常以及鰓絲蒼白，由組織切片觀察可見腎臟及脾臟細胞腫大，而病毒顆粒直徑約 150 nm，內部有一大小約 105 nm 之圓形核心(He et al., 2000)。1992 年臺灣澎湖地區養殖之嘉臘魚發生大量死亡現象，經穿透式顯微鏡觀察後初步推斷為虹彩病毒感染症(Chou et al., 1994)，臺灣從 1995 年起，在南部之養殖場的石斑陸續爆發虹彩病毒感染症(Chou et al., 1998)，被病毒感染之魚隻外表無明顯病徵，但染病魚出現活力下降、食慾不振，被感染石斑的累計死亡率為 60%，將病毒接種至 KRE (embryo of a hybrid of kelp and red spotted grouper) 細胞株後，會導致細胞出現圓形化之細胞病變 cytopathic effect (CPE)，但病毒經由此細胞株繼代後病毒之效價出現下降的趨勢。組織病理學檢查可見脾臟有巨大細胞 (giant cells) 出現，穿透式電子顯微鏡觀察病毒直徑為 230 ± 10 nm，內有一 120 ± 10 nm 核心，如將此病毒感染健康的石斑魚苗，被感染的石斑魚苗在十天內的累計死亡達 100%，而此病毒命名為 grouper iridovirus of Taiwan (TGIV)。

截至目前為止，總共已經 13 株虹彩病毒完成了完整的基因體序列定序工作，這些病毒包括了 *Iridovirus* 屬的 CIV(Jakob, 2001)；*Chloriridovirus* 屬的 IIV-3(Delhon et al., 2006)；*Ranavirus* 屬的 ATV(Jancovich et al., 2003)、TFV(He et al., 2002)、SGIV(Song et al., 2004)、GIV(Tsai et al., 2005)與 STIV(Huang et al., 2009)；*Lymphocystivirus* 屬之 LCDV-1(Tidona and Darai, 1997)以及 LCDV-2(Zhang et al., 2004)；*Megalocytivirus* 屬的 ISKNV(He, 2001)、RBIV ((Do et al., 2004)、OSGIV(Lu et al., 2005)以及 TRBIV0(Shi et al., 2010a)，有了這些完整的病毒基因體序列後將有助於我們更進一步了解在虹彩病毒科中不同病毒株間的演化分類地位，且借由研究病毒之各個開放讀架後，可有助於讓我們了解不同開放讀架在病毒感染宿主個體後不同時期中所扮演的角色以及重要程度。

本實驗室所使用之 grouper iridovirus (GIV) 為 1998 年自南部所養殖之石斑

體內分離所得到，並在 2005 年完成其病毒之全部基因體的序列定序與分析工作 (Tsai et al., 2005)。由分析後的結果得知 GIV 之基因序列中包含了 139 個開放讀架 (open reading frames, ORF) (Tsai et al., 2007)，將此病毒與其他已發表過的虹彩病毒基因序列比較分析後，發現 GIV 具有以下幾種特徵：(1) GIV 是感染兩棲類動物的 Ranavirus 屬中感染魚類的病毒。(2) GIV 序列中的 CpG 序列沒有 methylation 並且缺少 DNA methyltransferase 基因。(3) GIV 含有 purine nucleoside phosphorylase 基因，此種特徵僅在 GIV 及 SGIV (singapore grouper iridovirus) 中發現。

1.3 魚類之免疫系統

免疫系統是生物為了抵抗外來病原入侵生物體進而導致生命遭受威脅，所演化出來保護生物本身的一套具有排除並消滅病原的特殊系統，免疫系統主要可分為兩類，其中一類稱為先天性免疫系統 (innate immune system) 或非專一性免疫系統 (non-specific immune system)，這類免疫系統主要的特點是不針對特定專一性的外來病原，對入侵的病原不分種類一律排除消滅，且可在短時間內達到保護的作用，但其效果維持的時間短。先天性免疫反應可分為兩種屏障，物理化學屏障 (humoral and chemical barriers) 以及細胞性屏障 (cellular barriers) 兩種；在物理化學屏障中又可再細分為 (1) 發炎反應 (inflammation)：經由二十碳之脂肪酸 (eicosanoids) 及細胞激素 (cytokines) 這兩類化合物所誘發，是外來病原入侵體內時最早出現的免疫反應之一。(2) 補體系統 (complement system)：藉由攻擊外來病原表面所引起的生化連鎖反應，破壞病原體細胞膜或促使巨噬細胞吞噬病原以消滅外來病原。而細胞性屏障則是依靠體內白血球細胞如巨噬細胞、嗜中性白血球、肥大細胞、嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球等，其特徵為這類細胞會吞噬掉病原體，病原體被白血球細胞吞噬後會被包覆入被稱為吞噬小體

(phagosome) 的細胞內胞器中，而後被胞器內的酵素分解掉，或被細胞內所釋放出的自由基所分解。這類白血球在平常時會遊走在生物體內搜尋病原體，且在接收到細胞激素的訊息後會移動到病原體所在地點將其消滅。第二類的免疫系統則稱為後天免疫系統 (acquired immune system) 或專一性免疫系統 (specific immune system)，這類免疫系統是由一群高度專一性特化、系統性的免疫細胞如 B 細胞、T 細胞等針對特定病原體進行作用，這類免疫系統特徵為具有可辨識非自體的病原體專一性抗原 (specific antigen)；B 細胞可經由體細胞基因體重組 (somatic gene recombination) 修飾產生具高度變異性的抗體 (antibody)、記憶性 B 細胞可記憶曾經入侵過的病原體抗原，如相同的病原體入侵可在短時間內迅速表現出專一性抗體以消滅病原體。

而目前已知魚類主要的免疫器官有胸腺(Fishelson, 1995; Willett et al., 1997a; Willett et al., 1997b)、腎臟(Fänge, 1986)、脾臟(Secombes and Manning, 1980)、肝臟、腸道以及黏膜組織(Dalmo et al., 1997)等，雖然在魚類上所發現到的免疫器官與其它較高等脊椎動物之免疫器官相同，也具有相似的功能，但在免疫系統的結構與形態上還是有著明顯的差異性，魚類因為缺乏骨髓與淋巴結的結構，取而代之演化出特化器官頭腎 (head kidney) 來扮演初級淋巴器官的角色(Hansen, 1997; Hansen and Kaattari, 1995; Hansen and Kaattari, 1996; Willett et al., 1997a; Willett et al., 1997b)。而魚類的後天免疫系統也與高等脊椎動物不盡相同，相較於在哺乳類動物身上發現到的五種不同型態且各有其功能之免疫蛋白如 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD。而在魚類上，除了較低等的無顎魚類 (agnathan fish) 並無發現免疫蛋白外，其餘魚類如軟骨魚類 (chondrichthyan fish)、硬骨魚 (osteichthyan fish) 類除了發現到結構組成與 IgM 類似的免疫蛋白之外，尚還有發現與 IgD、IgT、IgZ 等結構相似之免疫球蛋白。IgM 為目前已知最原始的免疫蛋白，魚體內的 IgM 主要以兩種型式存在，一種為主要存在於血液循環系統中的分泌型，另一種為存在於 B 細胞細胞膜上的膜蛋白型，魚類 IgM 的變異度也低於高等的脊椎動物；

IgD 是一種於 1997 年在斑點叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*) 體內發現之免疫蛋白，其功能可能為 B 細胞之受體(Wilson et al., 1997)；而 IgZ 與 IgT 則是於 2005 分別於斑馬魚 (zebrafish) 與虹鱒 (rainbow trout) 體內中發現，此兩種可能為硬骨魚類所特有之免疫蛋白(Danilova et al., 2005; Hansen et al., 2005)。魚類的免疫系統雖與高等脊椎動物類似，但相較之下在免疫系統運作的效率上卻遠不及高等脊椎動物也較為原始，但至目前為止的研究中仍還有不少魚類免疫反應的詳細機制還尚未完全明朗。

1.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應

即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Q-RT PCR, Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) 是改良自一般常見之聚合酶鏈鎖反應 (PCR, Polymerase Chain Reaction)，此種反應與一般的反應不同的地方在於即時定量聚合酶鏈鎖反應在反應的過程中添加了可辨認標的序列並且會發出螢光之螢光物質，這使得即時定量聚合酶鏈鎖反應比一般的聚合酶鏈鎖反應所需耗費的時間更短，並且可一次處理更多的樣本。

即時定量聚合酶鏈鎖反應所使用的螢光染劑可分為目標專一性探針 (specific labeled probes) 及非專一性染劑 (non-specific binding dye) 兩種，目標專一性探針的方式是設計出一段可辨識特定序列其中一小片段的探針，並將螢光物質 (Fluorescein) 鍵結至探針 5' 端上，而螢光抑制物 (Quencher) 則鍵結在另一端上抑制螢光的激發，因此辨識到欲偵測之特定片段且形成雙股後，在即時定量聚合酶鏈鎖反應的延長 (elongation) 過程中會受 DNA polymerase 5'-exonuclease 的作用使兩物質分離開來，當螢光物質與螢光抑制物距離變遠後，螢光強度也跟著變強，因此可在雙股 DNA 延長 (elongation) 時偵測到，其代表性的螢光探針有 TaqMan。而另一種非專一性螢光染劑是利用其可插入雙股之

DNA 而釋放出螢光的特性，因此在每次反應中引子有辨識到目標基因序列進而合成出 DNA 時，此時非專一性螢光染劑便會嵌入雙股 DNA 的小凹槽（minor groove）中，如所合成出之 DNA 產物越多，則嵌入之螢光染劑所發出的螢光也隨之增加。

即時定量聚合酶鏈鎖反應之特點是在於每次合成雙股 DNA 的反應時，因其所使用的螢光染劑或探針的關係，所以可偵測每一次循環後染劑或探針與目標基因序列作用後所發出的特定波長之螢光強度而精準推算出其目標 DNA 序列的原始濃度，因此比傳統之聚合酶鏈鎖反應對於目標之原始目標 DNA 序列濃度頂多只能達到半定量（semi-quantitative）的程度還要精準，且其擁有其偵測範圍廣，擁有高度靈敏度、準確性高、具專一性、節省時間等優點，因此在近年來廣泛被運用在疾病之致病原的檢測、細菌量偵測、癌細胞的數量、藥物對特定基因之用藥量所造成的影響。

1.5 虹彩病毒感染石斑魚之相關研究

魚類與病毒間的交互作用一直是被人們所好奇與重視的，病毒是如何在魚體內增殖擴散，而魚體是以何種機制來抵禦病毒的入侵至今仍還有許多部分尚待釐清。一旦病毒入侵宿主體內後，當宿主體內之免疫系統偵測到病毒的存在後，便會開始進行一連串之反應以阻止病毒的複製，但經過長久的交互演化之故，病毒同時也衍生出可以阻止或避免免疫系統的攻擊之方法。病毒入侵生物體時所碰到最初的生物防線就是皮膚、黏液等物理屏障，並伴隨發燒及發炎反應所產生的酸性體液，如無法完全消滅病毒的話，生物體便會開始表現與免疫系統有關之基因以提高或加速如干擾素、補體、免疫球蛋白等免疫相關蛋白的表現量來進行先天性免疫反應與後天性免疫反應，但是進入宿主細胞的病毒同時也會借由調控宿主細胞本身與免疫相關之基因來抑制宿主的免疫反應蛋白的合成或中和免疫反應

作用來避免宿主所展開的攻勢，但是在宿主用來撲殺病毒以及病毒用來對抗宿主免疫系統攻擊間的交互作用目前仍有許多疑點還在等待解答中。

在目前有幾種方法可從基因表現的層面研究在這些交互作用中哪類基因扮演著關鍵的角色，而目前最廣為被利用的方法則是使用微陣列晶片 (microarray) 來進行篩選的動作，微陣列晶片之原理是將上萬個不同的小片段之 DNA 大量且高密度的點在一玻璃片上並將其點固定，即是一般所稱之微陣列晶片。而製備好之晶片再與欲研究之 DNA 片段接上發綠光的 Cyanine 3-CTP 與發紅光的 Cyanine 5-CTP 之螢光染劑的探針進行與晶片雜合 (hybrid) 的動作，待雜合完畢後，以共軛交雷射掃瞄器 (confocal microscope) 讀取晶片上所發出的螢光訊號後，再以軟體運算即可知結果，本實驗室於 2008 年使用健康之點帶石斑魚之頭腎組織所萃取製備的 total cDNA 製作 cDNA 微陣列晶片 (黃, 2008)，與經脂多糖 (LPS, lipopolysaccharide)、poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid)、GIV 病毒液等免疫刺激物進行腹腔注射過的點帶石斑魚之頭腎組織所製成的小片段 cDNA 探針進行雜合，其實驗之結果可得到注射 GIV 病毒液之點帶石斑與無注射之點帶石斑間的基因表現差異性，注射 GIV 病毒液後之點帶石斑頭腎組織中有明顯 2 倍表現或降低的現存資料庫中已知基因共有 41 個，其中正調控表現的基因占了 18 個，負調控降低的基因有 23 個。而此 41 個基因依其蛋白質功能進行歸類後，分別為：粒線體呼吸鏈 (29%)、代謝 (10%)、紅血球生成 (7%)、細胞組成骨架/細胞構形 (17%)、免疫反應 (17%)、汎素/類汎素調控之蛋白質降解路徑 (12%)、轉錄 (5%)、轉譯 (2%)、細胞凋亡 (5%) 這 10 類功能基因群。

本實驗系以此 cDNA 微陣列晶片與虹彩病毒病毒液處理組石斑所製成的探針雜合之結果，因當時是以施打 LPS、poly I:C 以及虹彩病毒處理組所製成的所有晶片結果為範圍標準化後，再進行大範圍篩選出表現量較高或較低之基因，而此次則是僅針對注射虹彩病毒處理組之晶片特別使用軟體以不同之條件及方法進行小範圍篩選後所得之基因，再佐以可能在虹彩病毒感染點帶石斑並複製增殖

的過程中魚體內可能參與交互作用的免疫相關基因，並使用即時定量聚合酶鏈鎖反應更精準偵測在感染後不同天數中的基因表現變化，以證實受虹彩病毒感染之點帶石斑後之特定基因的表現量是否有明顯的增加或減少，此一實驗可以了解究竟何種基因對於此病毒與魚體間的攻防過程中扮演著關鍵性的作用，並可供未來更進一步詳細的研究特定基因其蛋白質的作用功能，以及如何調控病毒在魚體內擴散的防禦機制。



第二章 材料與方法

2.1 虹彩病毒誘發之點帶石斑之微陣列晶片分析

以 GeneSpring GX 11.5 (Agilent Technologies) 軟體進行分析虹彩病毒誘發之點帶石斑頭腎基因微陣列晶片，首先以 baseline transformation 將背景值平均化後，就可進行扣除系統性誤差 (systematic variation) 之步驟。而為了避免因大多數無顯著差異表現的基因使扣除系統性誤差正常化後可能會產生較大誤差，因此再使用 LOWESS (Locally Weighted Scatterplot Smoother) normalization 將其正常化。以虹彩病毒誘發處理組中任一天基因表現量有大於兩倍或小於兩倍為基準。篩選出符合條件的候選基因，並挑選出候選基因之質體以進一步進行轉型作用 (transformation)。

2.2 勝任細胞之製備與轉型作用

材料：

Escherichia coli DH-5 α strain

LB broth (Sigma)

Agar (Sigma)

Ampicillin (MDBio, Inc)

pBlueScript SK(-) vector (Stratagen)

挑選一個大腸桿菌之 DH-5 α 菌株之單一菌落置於 3 ml 之 LB 培養液中，在

37°C 環境下以 200 rpm 之轉速旋轉培養隔夜。將 3 ml 之菌液倒入滅菌過之 100 ml LB 培養液中，以 200 rpm 轉速培養，直至 OD₆₀₀ 值約 0.4 至 0.6 之間。之後將菌液冰浴 10 分鐘，再分裝至 50 ml 離心管 (Falcon) 中，以轉速 4,000 rpm 離心 15 分鐘，吸去上清液，以 5 ml 之 0.1 M CaCl₂ 溶液將細菌打散懸浮並冰浴 5 分鐘。將打散均勻之菌液在 4°C 環境下以 4,000 rpm 之轉速離心 15 分鐘，離心後吸去上清液，以 5 ml 之 0.1 M CaCl₂ 溶液將細菌打散懸浮並冰浴 5 分鐘。將打散均勻之菌液在 4°C 環境下以 4,000 rpm 之轉速離心 15 分鐘，將細菌懸浮於 2 ml 含 0.1 M CaCl₂、15% glycerol 溶液中，置於冰上隔夜。每 50 μl 分裝於微量離心管中，保存於 -80°C 環境中，此即勝任細胞 (competent cells)，可做為質體 DNA 轉型作用使用。

將製備好之 50 μl DH-5α 勝任細胞置於冰上解凍後，加入 10 ng 之質體 DNA 混合均勻後置於冰上冰浴 30 分鐘。再放入 42°C 水浴 90 秒進行熱休克 (heat shock) 後快速插入冰中冰浴 2 分鐘，加入 1 ml 之 LB 培養液於 37°C、200 rpm 轉速下旋轉培養 30 分鐘。取 100 μl 菌液塗佈平板於經 37°C 預熱過之含 100 μg/ml 之 ampicillin 的 LB 培養基上，在 37°C 下培養至隔夜。

2.3 質體 DNA 之純化及定序校準比對

材料：

LB broth (Sigma)

Ampicillin (MDBio, Inc)

High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)

挑取經轉型作用培養於含 100 μg/ml ampicillin 的 LB 培養基上之單一菌落，置於 3 ml 之含 100 μg/ml ampicillin LB 培養液中，在 37°C 下培養隔夜。將菌液倒

入 1.5 ml 微量離心管中以 5,000 x g 離心 5 分鐘，倒去上清液，再將剩餘之菌液倒入 1.5 ml 微量離心管中以 5,000 x g 離心 5 分鐘，倒去上清液，使用 Geneaid 之 High-Speed Plasmid Mini Kit 進行質體 DNA 之純化。首先加入 200 µl 之 PD1 Buffer 使細菌完全懸浮均勻後，加入 200 µl PD2 Buffer 並輕微顛倒混合均勻，再加入 300 µl PD3 Buffer 並立即上下顛倒混均後，以 14,000 x g 轉速離心 3 分鐘。離心後取其澄清上清液加入含 PD Column 之 2 ml 收集管中以 14,000 x g 轉速離心 1 分鐘後，倒去流過管柱之液體。加入 400 µl W1 Buffer，以轉速 14,000 x g 離心 1 分鐘，倒去通過管柱液體。再加入 600 µl Wash Buffer 後，使用 14,000 x g 轉速離心 1 分鐘，倒去流通管柱液體後再以轉速 12,000 x g 離心 5 分鐘。將 PD Column 移至另一管全新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 50 µl 滅菌過之二次蒸餾水並等待兩分鐘後，以 12,000 x g 轉速離心 5 分鐘，所得液體即為質體 DNA。

質體 DNA 之定序步驟是使用 ABI 3730 DNA analyzer 定序儀並以 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 及 FS AmpliTaq DNA polymerase (Perlin-Elmer) 以質體 DNA 的 T3 及 T7 啟動子引子開始進行 DNA 核酸定序。在得到不包含載體之基因序列後使用 DNASTar software 去除掉 5' 端之 *EcoR* I 限制酶切位及 adaptor 序列以及 3' 端之不明的序列片段後，去除完後的全部基因序列再使用 DNASTar Lasergene 7.1 軟體進行相似性比對校準 (alignment) 後相同的序列片段會排列形成連續體 (contig)，比對出來之連續體再由 NCBI 之 BLASTX 程式中的已知基因序列資料庫進行比對。如有比對出已知之基因序列再使用 UniProt Knowledgebase 確認其蛋白質之功能，再依其功能性進行分類。

2.4 實驗用點帶石斑之飼養

材料：

Epinephelus coioides

將平均長度 8.8 ± 0.4 cm、體重 12.4 ± 1.8 g 之點帶石斑以每 15 隻為一單位，每一單位飼養在含 10 L 之鹽度為千分之 30 的海水缸中，在飼養及實驗期間每日換海水二分之一、餵食兩次，光週期暗週期各 12 小時，飼養期間海水溫度為 25°C 。

2.5 細胞繼代培養

材料：

GK-2 細胞株

75T 培養瓶 (BD Flcon)

Fetal Bovine Serum (GIBCO)

Penicillin G sodium, 100 units/ml (GIBCO)

Streptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GIBCO)

L-glutamine (GIBCO)

Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)

Phosphate Buffered Saline (GIBCO)

0.25% trypsin solution (GIBCO)

本實驗室所使用之石斑魚腎臟細胞株 (GK-2 cell line) 由點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 腎臟細胞初代分離而來 (Yeh et al., 2008) 以 GK-2 細胞株培養於 75T 培養瓶內，使用 10% FBS (Fetal Bovine Serum)、penicillin-streptomycin (Penicillin G sodium, 100 units/ml; Streptomycin sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.85% Saline) 及 2 mM L-glutamine 的 Leibovitz's L-15 medium (含 10% 胎牛血清之 L-15 培養液) 培養於 28°C 培養箱中。待細胞長滿後，吸去培養瓶中原本之培養液後以滅菌過之 PBS (Phosphate Buffered Saline) 清洗兩次並吸去後，加入 1 ml 含 0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin) 之 PBS 溶液作用。待作用至細胞懸浮後，加入適量之含血清培

養液中胰蛋白酶之活性並將細胞打散至均勻，之後吸去 2/3 體積細胞液後再加入適量培養液。

2.6 虹彩病毒之增殖

材料：

GIV (本實驗室)

GK-2 細胞株 (本實驗室)

175T 培養瓶 (BD Falcon)

10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)

2% Fetal Bovine Serum (GIBCO)

Penicillin G sodium, 100 units/ml (GIBCO)

Streptomycin, 100 µg/ml (GIBCO)

L-glutamine (GIBCO)

Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)

Phosphate Buffered Saline (GIBCO)

0.25% trypsin solution (GIBCO)

將 GK-2 細胞培養於 175T 之培養瓶中，再將細胞繼代並增加至共 10 盒 175T 培養瓶後，待細胞生長至八分滿後即可進行細胞接種。將 GIV 病毒以 MOI (multiplicity of infection) 為 0.01 接種到 GK-2 細胞株之後，將原本之培養液吸去後補入含 2% FBS-L-15 培養液，在 28°C 環境下培養 7 天，待 CPE (cytopathic effect) 現象完全出現後收集其培養液。

2.7 病毒效價之測定

材料：

GIV (本實驗室)

GK-2 細胞株 (本實驗室)

Fetal Bovine Serum (GIBCO)

Penicillin G sodium, 100 units/ml (GIBCO)

Streptomycin, 100 µg/ml (GIBCO)


L-glutamine (GIBCO)

Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)

Phosphate Buffered Saline (GIBCO)

0.25% trypsin solution (GIBCO)

24 well plate (Nunc)



將 GK-2 細胞以每孔含 1×10^5 個細胞培養於 24 孔細胞培養盤中，在 28°C 下培養隔夜後，待細胞貼附於盤底上並且生長至密度為 50% 滿之單層細胞後即可進行病毒效價之測定。實驗用之 GIV 病毒株取自 1999 年於小琉球地區罹病石斑魚脾臟器官中分離出之病毒株 (Lai *et al.*, 2000)。首先將待測病毒以 2% FBS-L-15 培養液進行十倍之序列稀釋將病毒稀釋至濃度為 10^{-1} 至 10^{-8} ，然後將原本於 24 孔細胞培養盤中之培養液吸去後，加入 PBS 清洗並吸去後，每一稀釋倍率 4 重覆依序加入不同之稀釋倍數的病毒液 1 ml，而對照組則加入 1 ml 之不含病毒的 2% FBS-L-15 培養液，培養於 28°C 環境中，且每日以倒立式顯微鏡觀察其細胞之病變的情形，連續觀察 7 日後並紀錄，而後再以 Reed and Muench (1938) 之方法進行病毒效價之測定。

2.8 石斑魚之免疫刺激物注射及頭腎、脾藏組織收集

材料：

Lipopolysaccharide (Sigma)

Polyinosinic:polycytidylic acid (Sigma)

GIV (本實驗室)

將平均長度 8.8 ± 0.4 cm、體重 12.4 ± 1.8 g 之點帶石斑禁食一天後，以每處理組各 15 隻為一組，分別注射 200 μ g LPS、200 μ g poly I:C、100 μ l 10^7 TCID₅₀/ml GIV 之病毒液，並取無注射過任何藥劑之 5 隻魚做為控制組。分別在注射後 1、3、5 天，每處理組中隨機取 5 隻魚之頭腎及脾臟組織，而控制組也將魚隻犧牲後取出其頭腎及脾臟組織。

2.9 石斑魚頭腎組織與脾臟組織之 RNA 萃取及純化

材料：

Trizol (Invitrogen)

Chloroform (Merck)

Ethanol (Merck)

DEPC (Sigma)

DNaseI (Roche)

RNA clean & Concentrator (ZYMO RESEARCH)

頭腎組織及脾臟組織取出後，將之放入 250 μ l 之 Trizol 溶劑中用研磨棒搗碎，待組織完全磨碎後，加入 50 μ l chloroform 混合均勻後置於冰上五分鐘。以 13,000 x g、4°C 低溫離心 15 分鐘，離心後取其澄清上清液加入 200 μ l 絕對酒精中，以 13,000 x g、4°C 低溫離心 15 分鐘並移走上清液，待酒精蒸散完全後加入 DEPC

處理過的水回溶沉澱物。回溶後之溶液使用 DNase I (Roche) 處理去除 DNA 並以 ZYMO RESEARCH 之 RNA clean & Concentrator 進行 RNA column-purification 純化。

2.10 cDNA 之合成

材料：

Hexamer (Sigma)

dNTP (Sigma)

DTT (Sigma)

Reverse transcriptase (Stratagene)

DEPC (Sigma)

將純化好的 RNA 以同一處理組每一樣本各取 1 μg 之 total RNA 混合，混合均勻後之混合物取 1 μg total RNA 出來，置於 70°C 五分鐘以解開其二級結構，之後迅速插入冰中冰浴。之後再加入 1 μl 之 10 mM hexamer、1 μl 之 10 mM dNTP、1 μl 之 0.1 M DTT、1 μl 之 50 U 反轉錄酶 (Stratagene) 以及 2 μl 10 X buffer，使用 DEPC 處理過的水補至最終體積為 20 μl ，以 37°C 反應一小時、92°C 五分鐘中止反應之條件，合成出的 cDNA，並保存於 -80°C 環境中以待後續實驗使用。

2.11 即時定量聚合酶鏈鎖反應之專用引子設計

即時定量聚合酶鏈鎖反應中所使用之引子對係根據所需偵測之目標基因序列，使用 Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) 軟體設計，並挑選用於 SYBR Green I 之引子，所選擇之引子需避免引子間無二聚體 (primer dimer) 與交錯的

二聚體 (cross dimer)，引子自身無莖環結構 (hairpin)，單一引子無法形成二聚體 (self-dimer)，鍵結數及 GC 間的鍵結相對較少，且 T_m 值介於 58-60°C。

2.12 即時定量聚合酶鏈鎖反應

材料：

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas)

即時定量聚合酶鏈鎖反應之步驟是使用 LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) 儀器運作，利用的螢光染劑為非專一性的 SYBR Green I。取 20 ng cDNA 加入內含 200 nM 之先前所設計好的目標基因專一性引子對、2.5 μ l Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas) 之混合液中，最後加入 DEPC 處理過之水將最終體積補足至 5 μ l。qPCR 之反應溫度循環條件為：起始溫度 95°C 5 分鐘，接著為 60 個循環之 95°C 10 秒；60°C 10 秒；72°C 10 秒，最後以 65°C (1.5°C/s) 1 分鐘；最後溫度下降至 40°C，最後以解離曲線 (melting curve) 測試其 T_m 值，以確定引子對之間是否會自行鍵結互補形成雙股 DNA，或是樣本在實驗過程中是否被污染，此步驟每樣本各基因進行三重覆，以 18s rRNA 為基準求得各基因之相對表現量。

2.13 即時定量聚合酶鏈鎖反應結果之分析

由即時定量聚合酶鏈鎖反應運算出之不同樣本的特定基因 C_T 值與同一樣本中穩定表現之 18s rRNA 基因 C_T 值相減後所算出之閾值 ΔC_T ，而注射免疫刺激物處理組之特定基因 ΔC_T 再與對照組相之相同特定基因 ΔC_T 扣除後可再得 $\Delta\Delta C_T$ 值，再將其值代入 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 運算，詳細計算公式如下：

$$\Delta C_T = C_T \text{ (target gene)} - C_T \text{ (reference gene)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ (treatment target gene)} - \Delta C_T \text{ (control target gene)}$$

$$\text{Relative expression of target gene} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$



第三章 結果

3.1 虹彩病毒誘發之點帶石斑之微陣列晶片分析

使用 GeneSpring GX 11.5 (Agilent Technologies) 軟體分析虹彩病毒處理組與無注射之對照組晶片子經雜合反應之結果後，以正調控或負調控大於對照組兩倍以上或以下為條件進行篩選後總共可得到 315 個選殖株。其中正調控兩倍以上方面有 124 個選殖株，負調控兩倍以下基因則篩選出 202 個選殖株，其中有 11 個 clone 是在正調控兩倍以上及負調控兩倍以下的篩選條件下皆有出現，將此 315 個選殖株進行轉型的步驟後，挑選單一菌落小量放大後抽取其質體後定序。

3.2 質體 DNA 定序及校準比對

純化之步驟後所得到之選殖株，以 T3 與 T7 啟動子引子進行定序的過程。將定序出來的 315 個全部序列經過校準 (alignment) 後，出現了總共 161 個的連續體，再將此 161 個連續體序列整段使用 BLASTX 程式比對 NCBI 網站中的蛋白質資料庫後，總共比對出現 81 個基因，其相似度介於 36% 到 100% 之間，其中正調控兩倍以上共比對出 39 個基因，而負調控兩倍以下者則比對出 48 個基因，5 個基因是在正調控兩倍以上及負調控兩倍以下皆有比對出。而另外的 80 個連續體在 NCBI 的蛋白質資料庫中則比對不出相似的基因，其中有 33 個正調控兩倍以上篩選出的連續體以及 54 個負調控兩倍以下的連續體，7 個連續體在兩組中都有出現。將比對出來之基因從 Uniprot 資料庫中比對其蛋白質依其所標示之功能分門別類將相似功能基因歸類在一起，在正調控兩倍以上所比對出的 39 個基因中 (表一)，其中主要為訊息傳遞 (signal transduction) 功能，佔 21%，包含 bloodthirsty、CD9 antigen、Ly-6/neurotoxin-like protein 1、insulin-like growth

factor binding protein、neoverrucotoxin subunit homolog、Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2、urokinase plasminogen activator surface receptor 以及 very large inducible GTPase-1 等八個基因；第二大族群為佔 18% 的新陳代謝 (metabolism) 功能，含有 betaine-homocysteine S-methyltransferase、carboxypeptidase N catalytic chain、ferritin heavy subunit、fructose-bisphosphate aldolase B、hemoglobin alpha chain、hemoglobin beta chain 以及 Mid1-interacting protein 1 等七個基因；其次分別為免疫反應 (immune response) 佔 16%，共有 asparaginyl endopeptidase (legumain)、beta-2 microglobulin、immunoglobulin mu heavy chain、interferon stimulated gene 15、vig-1 以及 RNA helicase DHX58 homolog 等六個基因；結構 (structure) 相關基因有 cofilin-2、collagen type I alpha 1、profilin 1 以及 sorting nexin 3 等四個基因，佔 11%；與能量 (energy) 相關之基因佔 10%，包含 ATP synthase F0 subunit 6、cytochrome b、cytochrome c oxidase subunit III 以及 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1 等四個基因；而參與蛋白質合成 (protein synthesis) 路徑的基因則含 8%，共計有 60S ribosomal protein L34、60S ribosomal protein LP1、pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor 等三個基因；調控蛋白質降解 (protein degradation) 過程的基因佔 8%，包含 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog、HECT E3 ubiquitin ligase 以及 ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2 等三個基因；與轉錄及轉譯調控 (transcription/translation regulation) 有關之基因佔 8%，分別為 poly A binding protein、cytoplasmic 1 b、bromodomain-containing protein 1 以及 reverse transcriptase-like protein 等三個基因 (圖一)。

而在負調控兩倍以下條件之連續體群中所比對出的基因中經過依其轉譯出之蛋白質功能分類後 (表二)。其中 43% 為新陳代謝相關之基因，分別是 acyl-coenzyme A thioesterase 13、alanine aminotransferase、alcohol dehydrogenase Class VI、aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor、betaine-homocysteine

S-methyltransferase、cathepsin A、CNDP dipeptidase 2、Glutathione S-transferase theta-1、NAD-dependent deacetylase sirtuin-5、omega-amidase NIT2、hemoglobin alpha chain、Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、dihydrolipoamide S-succinyltransferase、peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase 以及 protein disulfide isomerase A6、pyruvate kinase、serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase、sorcin 以及 UDP-glucose 6-dehydrogenase 等 20 個基因；其次為能量合成相關，占 21%，共 10 個基因，分別為 ATP synthase F0 subunit 6、cytochrome b、cytochrome c oxidase subunit 8B、cytochrome c oxidase subunit I、cytochrome c oxidase subunit II、cytochrome c oxidase subunit III、NADH dehydrogenase subunit 1、NADH dehydrogenase subunit 4、NADH dehydrogenase subunit 5 以及 NADH dehydrogenase subunit 6；與構形相關的基因占 16%，分別為 coronin-1A、FAM18B、keratin 8、keratin type II E3、NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1、PDZ domain-containing protein 1 以及 tropomyosin alpha-4 chain、troponin C 等八個基因；與蛋白質合成路徑相關基因有六個，分別是 40S ribosomal protein S2、40S ribosomal protein S4、40S ribosomal protein S15、40S ribosomal protein S27、60S ribosomal protein L4 以及 60S ribosomal protein L17，占了 12%；而轉錄與轉譯調控相關基因僅占 4%，只有 thioredoxin interacting protein 與 eukaryotic translation elongation factor 2 兩個基因；免疫反應相關之基因也僅占了 4%，僅 heat shock protein 90 和 peptidylprolyl isomerase A 等兩個基因（圖二）。

此次以不同條件分析出來之病毒處理組表現量相較於無注射控制組差距兩倍以上或以下之基因，與 2008 年所篩選出之 18 個病毒處理組表現量高於對照組表現量兩倍之基因以及 23 個負調控兩倍以下之基因比較後發現，在正表現兩倍以上的基因中有 9 個基因與此次所篩選出之基因一致，而負調控兩倍以下基因群中則有 10 個基因和今次所篩選出基因群結果相符（圖三）。

3.3 即時定量聚合酶鏈鎖反應之專用引子設計

由正、負調控兩倍以上或以下比對出來的基因中挑選可能在病毒與魚體間的交互功防作用較有關係者，且加入現有已知之魚類體內參與免疫反應調控有關且在點帶石斑魚體內也有之基因如 NF-kappa B (Kong et al., 2011)、interferon-induced GTP-binding protein MxI (Lin et al., 2006)、interleukin 8(Sun et al., 2011)、interleukin 1 β (Lu et al., 2008)、tumor-necrosis factor α (Pavlikova and Arukwe, 2011)、cyclooxygenase-2 (Castillo-Briceño et al., 2011)，並依據點帶石斑之基因序列以 Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) 軟體設計出之 30 組即時定量聚合酶鏈鎖反應專用之引子對 (表三)。

3.4 即時定量聚合酶鏈鎖反應後之目標基因表現量結果

用即時定量聚合酶鏈鎖反應分析微陣列晶片所篩選出的正調控組之 17 基因中依各基因在施打虹彩病毒處理組中不同時間點表現量之趨勢可大制分為三類，第一類為在注射後第一天達到最高點再逐漸下降之趨勢，總共有 beta-2-microglobulin、CD9 antigen、asparaginyl endopeptidase、ferritin heavy subunit、reverse transcriptase-like protein 以及 insulin-like growth factor binding protein 這六個基因；第二類為在注射後第五天其表現量達到高峰，分別為 vig-1、RNA helicase DHX58 homolog、interferon-stimulated gene 15、HECT E3 ubiquitin ligase、26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog、Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2、urokinase plasminogen activator surface receptor 以及 very large inducible GTPase-1 這八種基因；而第三類則是在施打後一、三、五天中表現量無明顯上升或下降，皆為穩定表現出一定量之基因，如 ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2、immunoglobulin mu heavy chain 以及 Ly-6/neurotoxin-like protein 1 這三個基因 (圖四)。

用即時定量聚合酶鏈鎖反應分析微陣列晶片所篩選出的4個負調控基因中，依注射虹彩病後一、三、五天之基因表現量趨勢可細分為二類，第一類為其表現量在第一天即達到最高量之基因，僅 cytochrome c oxidase subunit I 一種；第二類為表現量逐漸增加，在施打後第五天達到最高者，包含 peptidylprolyl isomerase A、UDP-glucose 6-dehydrogenase 以及 heat shock protein 90 等三種基因（表四與圖五）。

而在正調控與負調控篩選中皆有出現並用於即時定量聚合酶鏈鎖反應的三個基因中，依據各基因於不同時間點表現量之趨勢分析後可分為，第一類，表現量逐漸上升，並於注射虹彩病毒後第五天其表現量達到最大量，即為 Betaine-homocysteine S-methyltransferase 基因；第二類為其表現量於施打後第三天出現最大量，即是 hemoglobin alpha chain 基因；第三類為在注射虹彩病毒後一、三、五天間的表現量均很接近，為 cytochrome B 基因（表四與圖六）。

六個挑選的石斑魚免疫相關基因依其施打虹彩病毒後不同時間點表現量之表現量趨勢可分為兩類，一類為施打後第一天即大量表現，其後逐日降低，共有 Interleukin-1 β 、Interleukin-8、tumor-necrosis factor α 以及 cyclooxygenase-2 等四種基因；而另一類則是其表現量在第五天出現大量，分別是 Interferon-induced GTP-binding protein MxI 以及 NF- κ B c-Rel subunit 等兩個基因（圖七）。

第四章 討論

由於 2008 年所分析之微陣列晶片資料包含 LPS 處理組、Poly I:C 處理組以及虹彩病毒處理組，而今次僅以虹彩病毒處理組之晶片資料進行分析，故導致軟體演算結果彼此之間有所不同。雖然如此，但是在正調控高於兩倍和負調控高於兩倍之基準上，仍分別有 9 個與 10 個基因均有篩選出。而從此次篩選出之候選基因中選出 24 個可能較具重要性之基因以及另外 6 種魚類中已知可參與免疫反應之相關基因研究點帶石斑經施打虹彩病毒後其各基因的表現量。由結果可知大部分之虹彩病毒處理的基因其表現量相較於無注射控制組來說，其表現量皆大於控制組，而其中 CD9、Vig-1、RTL、DHX58、IGFBP5、PSMD1、VLIG1、NF-Kb 等基因可高達控制組表現量的 10 至 20 倍以上，且在 PLAUR、HERC、ISG15、IL-1b、IL-8、MxI 等基因其表現量最大時更高於控制組 100 倍之多，顯示基因可能在點帶石斑頭腎組織中對於病毒之入侵有較高之感受性，且可能是魚體抵禦病毒入侵的重要工具。

病毒攻擊時，宿主細胞的第一道防線為細胞膜，膜上的蛋白質參與許多病毒進出細胞與免疫調控作用，在由正調控組中所選出進行分析之基因中，beta-2-microglobulin (B2M) 基因是一會在淋巴細胞之膜上表現的小分子量膜蛋白，B2M 參與了淋巴細胞辨識外來抗原之任務，而研究也證實了當人體受 HIV 感染後，血清中的 B2M 會增加，因此可做為一生物指標 (biomarker) (Chitra et al., 2011; Zijlstra et al., 1990)。

CD9 antigen 是一種分佈在細胞表面之四穿膜蛋白 (tetraspanin)，其特點為具有四個疏水性區域穿插入細胞膜中，四穿膜蛋白主要參與了細胞之移動、生長、貼附、訊息傳遞、細胞型態、細胞間的融合、癌症生成 (carcinogenesis) 以及與外來病原體的感染有關。而近年研究指出 HTLV-1 (human T-lymphotropic virus-1) 與 HIV-1 會在細胞膜上之 TEM (tetraspanin-enriched microdomains) 中行出芽 (budding) 動作將細胞內組裝好的病毒顆粒送出，而將受 HIV-1 感染之 HeLa

細胞與抗 CD9 之抗體作用後會導致釋放出細胞的 HIV-1 產量減少，顯示 CD9 可能含有調節病毒離開宿主細胞的能力(Krementsov et al., 2010; Krementsov et al., 2009)。

Urokinase plasminogen activator surface receptor (PLAUR) 是一分佈於細胞表面之接受體 (receptor)，其在發炎反應時以及人類癌細胞上均會大量表現，且促使細胞外基質 (extracellular matrix) 的纖維化溶解 (fibrinolysis) 來分解物質形成組織重組的功用，而具有聚集細胞之功能也可使巨噬細胞、嗜中性細胞以及單核球 (monocyte) 等細胞活化並且聚集至外來病原體所在處並將其消滅，而如樹突細胞 (dendritic cell)、單核球細胞與巨噬細胞之類的抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell) 也會大量表現 urokinase plasminogen activator surface receptor，顯示其可能也有一定程度的參與了後天免疫系統的表現(Martinez et al., 2007; Mondino and Blasi, 2004)。

Cyclooxygenase-2 是膜蛋白的一種，又名 prostaglandin-endoperoxide synthase 2，會將二十碳四烯酸 (arachidonic acid) 轉變為前列腺素內過氧化物 H₂ (prostaglandin endoperoxide H₂)，cyclooxygenase-2 是一會被發炎反應訊息影響而快速表現的基因，在其表現後進而合成可作為激素之二十碳酸 (eicosanoid) 用於促進發炎反應的進行(Dong et al., 2010)。

ISG15 (interferon-stimulated gene 15) 是最早被 INF- α / β 刺激而活化的基因之一，是一抗病毒蛋白質，其蛋白質結構中含有兩個汎素相似 (ubiquitin-like) 區域，因此有著與汎素相似的功能，可借由 ISGylation 作用來與目標蛋白質結合進而調控目標蛋白降解或是抑制其活性，在人類與小鼠中也發現到 ISG15 可抑制數種病毒的複製，缺少 ISG15 基因的基因剔除小鼠 (knockout mice) 中也發現小鼠對病毒的感染入侵變得十分之敏感(Lai et al., 2008)，在魚類中最初是在虹鱒中被發現到，名為 VHSV-induced gene (vig-3) (O'Farrell et al., 2002)。在與巨噬細胞相似的 TO 細胞株也發現如被 Salmon Alpha Virus-3 感染後細胞會大量表現出

ISG15(Xu et al., 2010)，而被 IPNV (infectious pancreatic necrosis virus) 感染後之大西洋鱈魚稚魚之頭腎組織中也發現到 ISG15 的大量表現(Jensen et al., 2009)，顯示魚類中之 ISG15 對於病毒的入侵可能與較高等之脊椎動物中所發現到可抑制病毒的作用類似。

Vig-1 (viperin) 是一含有可作為酵素合成之輔因子 (cofactor) 之 MoaA (molybdenum cofactor biosynthesis protein A domain) 結構 (Boudinot et al., 1999)，可被不同之干擾素如 type-1 interferons 及不同之病毒激發活化並在早期的病毒入侵階段進行作用，在魚類方面的研究中也顯示受 ISAV (infectious salmon anaemia virus) 感染之大西洋鮭魚的巨噬體細胞之細胞株中 Vig-1 會被大量表現 (Workenhe et al., 2009)。Vig-1 抑制病毒感染的功能可能是其對於細胞膜之流動性之影響，而在 2009 年 Wang 等人也證實了 Vig-1 可與 farnesyl diphosphatase synthase 結合並抑制其活性進一步的降低細胞的流動性(Wang et al., 2007)。

Very large inducible GTPase-1 為一可受干擾素誘發而大量表現之基因，最早在小鼠中被發現，其蛋白質產物為一 IFN-inducible GTPase 相似物，也可被 type I interferon (interferon α 、 β) 以及 type II interferon (interferon γ) 誘導產生活性(Kim and Zhang, 2003)。由其具有可被干擾素相關之基因誘導的特性可推測其可能也參與了干擾素所誘發之抵抗外來病原體入侵時早期的初級免疫反應，而在經細菌性病原菌感染後之帝王鮭 (Chinook salmon) 腎臟組織中也發現到 VLIG1 表現量的上升(Rhodes et al., 2009)，也顯示出在魚類中 VLIG1 可能也參加了早期之初級免疫反應。而在實驗中三種注射過之免疫刺激物處理組中，以注射虹彩病毒處理組在三個時間點皆較其餘兩種處理組有相對高之表現量，尤其在第五天中表現量更是達到了無注射之控制組表現量的 20 倍之多，故推測其可能參與較多之魚體抵禦 DNA 病毒感染的路徑。

DHX58 (laboratory of gene and physiology, LGP2) 是 RIG-1 (retinoic acid inducible gene I) 之相似物，與其相似物 RIG-1 及 MDA5 同樣參與了 interferon

system 之調控(Chopy et al., 2011)，而在 2010 年的研究中顯示了遭受 VHSV(viral hemorrhagic septicemia virus) 感染過的比目魚(japanese flounder) 頭腎組織中的 DHX58 基因會大量表現，並會刺激干擾素相關基因的表現進而抑制病毒的感染(Ohtani et al., 2010)。

Interleukin 1 β 是眾多 IL-1 (interleukin 1) 中的一員，可引起發炎反應(inflammatory response)，而 IL-1 是發炎反應中最早表現可以促使發炎反應(pro-inflammatory) 出現的細胞激素之一，其表現後可引起一連串之連鎖反應來激發其餘之細胞激素以及趨化素(chemokine) 表現量的上升或是下降。而 Interleukin 1 β 需經由 caspase IL-1 β converting enzyme 修飾後方能有活性(Miller et al., 1993)，一旦 IL-1 β 開始活化後，接著就可引發訊息傳遞並且活化 NF- κ B 路徑的活性。而屬於趨化素(chemokine) 之 interleukin 8 則也可引起發炎反應，IL-8 主要由巨噬細胞所分泌，其對嗜中性細胞(netrophile) 具有很高之細胞趨化功能，可指引嗜中性細胞移動至特定位置釋放水解酵素分解吞噬外來病原(Das et al., 2011)。IL-1 β 與 IL-8 均為早期就可表現並促進發炎反應之細胞激素，而在本實驗中也發現到這兩種基因其表現量皆在第一天即達到最高值，這結果也符合此二基因可在病毒感染過程的早期即可進行反應並進行消滅病毒的行為。

Tumor-necrosis factor α (TNF- α) 可起引促發炎反應(pro-inflammatory)，可增強胞噬體(phagocytosis) 的能力及引發免疫反應以排除生物體內的外來病原體，而在病毒感染的過程中，TNF- α 也可能扮演著調控細胞激素以及金屬蛋白酶(metalloproteinases) 的表現量之角色，在近年來研究結果也顯示 TNF- α 可根據細胞內容物行調控促進 NF- κ B 活性的路徑或是促進細胞凋亡(apoptosis) 反應之 caspase 路徑(Rahman and McFadden, 2006)，而於 2011 年也在點帶石斑中發現 TNF- α 的存在並在受病原細菌刺激後其表現量也會上升，代表所發現的 TNF- α 與高等脊椎動物一樣如受到內毒素、疫苗與病原體顆粒刺激後其體內之 TNF- α 便會活化，TNF- α 因此被用於監測魚隻健康度與疫苗效率之生物指標(Lam et al.,

2011)。

NF- κ B c-Rel subunit 為 NF- κ B 蛋白質中的一次單元體，NF- κ B 在調控免疫反應的過程以及抗細胞凋亡的路徑中均扮演著極為重要的角色，其平常時會在細胞質中與 I κ B (inhibition kappa B) 結合而呈不活化的狀態，而一旦細胞開始表現 IL-1 β 時，NF- κ B 會受 IL-1 β 刺激進而使 I κ B 被泛素所降解促使 NF- κ B 開始活化並抑制細胞凋亡 (apoptosis) 的現象出現(Cheng and Gilmore, 2006)。

Cytochrome b 為 respiratory chain complex III 的次單元體之一而 Cytochrome c oxidase subunit I 則為 respiratory chain complex IV 的次單元體，這兩者皆為細胞中粒線體的膜蛋白，平時在細胞中主要參與了粒線體之電子傳遞鏈以產生 ATP 供細胞使用，Cytochrome c oxidase subunit I 在 respiratory chain complex IV 中扮演的角色為催化反應的進行(Jung et al., 2011)。雖然此兩個基因在微陣列晶片篩選所得之結果為負調控，但此次經即時定量聚合酶鏈鎖反應實驗後卻現為正表現的現象，其詳細原因尚待進一步的實驗才能得知。

Interferon-induced GTP-binding protein MxI 為一可受第一型干擾素誘發而表現的抗病毒蛋白質，一般位於細胞質或細胞核中，可在 RNA 病毒入侵的早期就開始作用並對抗病毒，目前在魚類已被廣泛發現，如大西洋鮭魚(atlantic salmon)、虹鱒 (rainbow trout)、美洲河魴 (channel catfish)、比目魚 (japanese flounder) 以及石斑 (grouper) 等多種魚類中均有發現到 MxI 的存在(Fernández-Trujillo et al., 2011; Lin et al., 2006)。

HECT E3 ubiquitin ligase 是一汎素相關之基因，其蛋白質因含有一具備汎素 E3 連接酶 (ligase) 之區域，因此汎素降解蛋白質的過程中扮演著決定是否要將目標蛋白質分解的角色，而其中有一類名為 HERC5 之 HECT E3 ubiquitin ligase 具有可扮演 ISG15 之 ISGylation 作用中的 E3 連接酶之任務，以便調控 ISG15 的作用與否，以達到抗病毒的效果，且缺乏此 E3 連接酶表現之細胞對於病毒的感受性也會提高(Shi et al., 2010b)。而在此次實驗的結果中發現不管在任何處理組

中，HERC 之趨勢與 ISG15 之趨勢皆完全相同，故推論 HERC 與 ISG15 兩者之間可能有著一定程度的關係。

26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog (PSMD1) 是 26S proteasome 中的次單元體 (subunit)，26S proteasome 在細胞中的功能之一是參與了泛素調控的蛋白質降解路徑，而 PSMD1 在注射免疫刺激物的處理組中由第一天就開始上升，或許與其所組裝成的 26S proteasome 可能參與了泛素降解病毒所合成的蛋白質的過程，或是分解因病毒感染後已經死亡之細胞殘骸(Deng et al., 2007; Voges et al., 1999)。

UDP-glucose 6-dehydrogenase 為一可將 UDP-Glc (UDP- α -D-glucose) 轉變為活化型的 UDP-GlcA (UDP- α -D-glucuronic acid) 的酵素，UDP-GlcA 在細胞參與了許多的代謝合成反應以及排毒作用 (detoxification) 的過程，而假使細胞中具活性之 UDP-GlcA 含量減少進而限制了透明質酸 (hyaluronan) 之合成，將會抑制腫瘤的增長(Huh et al., 2005; Lee and Spicer, 2000)。UGDH 在本實驗中於病毒處理組第一天時之表現量較控制組有明顯下降之勢，這表示 UGDH 產量的減少可能對於病毒在體內之感染擴散有其抑制的效果，但其詳細作用仍尚待進一步研究來釐清。

reverse transcriptase-like protein 雖然在魚類中尚無找到相似的蛋白質，但在端粒酶 (telomerase) 中也發現到極具保留性的 reverse transcriptase-like 區域，端粒酶是一含 RNA 與蛋白質的複合體 (ribonucleoprotein, RNP)，其在細胞內的作用是用於穩定染色體之結構及完整性，其具有調控細胞之生長以及細胞凋亡 (apoptosis) 現象的出現的功用(Huard et al., 2003)。

參考文獻

- 黃聖翔。虹彩病毒感染點帶石斑魚腎臟基因表現之研究。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文，台北，2008年。
- 曾文陽。石斑魚養殖學。前程出版社，1998年。
- Boudinot, P., Massin, P., Blanco, M., Riffault, S., Benmansour, A., 1999. *vig-1*, a New Fish Gene Induced by the Rhabdovirus Glycoprotein, Has a Virus-Induced Homologue in Humans and Shares Conserved Motifs with the MoeA Family Journal of Virology. 73, 1846-1852.
- Castillo-Briceño, P., Bihan, D., Nilges, M., Hamaia, S., Meseguer, J., García-Ayala, A., Farndale, R. W., Mulero, V., 2011. A role for specific collagen motifs during wound healing and inflammatory response of fibroblasts in the teleost fish gilthead seabream. Molecular Immunology. 48, 826-834.
- Castric, J., De Kinkelin, P., 1984. Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. Aquaculture. 41, 203-212.
- Cheng, Z., Gilmore, R., 2006. Slow translocon gating causes cytosolic exposure of transmembrane and luminal domains during membrane protein integration. Nature Structural. Molecular Biology. 13, 930-936.
- Chitra, P., Bakthavatsalam, B., Palvannan, T., 2011. Beta-2 microglobulin as an immunological marker to assess the progression of human immunodeficiency virus infected patients on highly active antiretroviral therapy. Clinica Chimica Acta. 412, 1151-1154.
- Chopy, D., Pothlichet, J., Lafage, M., Megret, F., Fiette, L., Si-Tahar, M., Lafon, M., 2011. Ambivalent Role of the Innate Immune Response in Rabies Virus Pathogenesis. Journal of Virology. 85, 6657-6668.

- Chou, H. Y., Chang, S. J., Chen, L. M., 1994. Investigation on the viral diseases of cultured grouper (*Epinephelus* sp.) and red sea bream (*Pagrus major*). Reports on Fish Disease Research (XIV). COA Fisheries Series. 46, 41-49.
- Chou, H. Y., Hsu, C. C., Peng, T. Y., 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. Fish Pathology. 33, 201-206.
- Chua, F. H. C., Ng, M. L., Ng, K. L., Loo, J. J., Wee, J. Y., 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. Journal of Fish Diseases. 17, 417-427.
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., Bøgwald, J., 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases. 20, 241-273.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L. A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. Nature Immunology. 6, 295-302.
- Das, A., Sahoo, P. K., Mohanty, B. R., Jena, J. K., 2011. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. Veterinary Immunology and Immunopathology. 142, 207-218.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F., Rock, D. L., 2006. Genome of Invertebrate Iridescent Virus Type 3 (Mosquito Iridescent Virus). Journal of Virology. 80, 8439-8449.
- Deng, S., Zhou, H., Xiong, R., Lu, Y., Yan, D., Xing, T., Dong, L., Tang, E., Yang, H., 2007. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the

- methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Research and Treatment*. 104, 21-30.
- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*. 325, 351-363.
- Dong, W., Matsumura, F., Kullman, S. W., 2010. TCDD Induced Pericardial Edema and Relative COX-2 Expression in Medaka (*Oryzias Latipes*) Embryos. *Toxicological Sciences*. 118, 213-223.
- Fange, R., 1986. Lymphoid organs in sturgeons (*Acipenseridae*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12, 153-161.
- Fernández-Trujillo, M. A., Novel, P., Manchado, M., Sepulcre, M. P., Mulero, V., Borrego, J. J., Álvarez, M. C., Béjar, J., 2011. Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Molecular Immunology*. 48, 1216-1223.
- Fishelson, L., 1995. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (*Cichlidae*, Teleostei). *Journal of Morphology*. 223, 175-190.
- Hansen, J. D., 1997. Characterization of rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics*. 46, 367-375.
- Hansen, J. D., Kaattari, S. L., 1995. The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics*. 42, 188-195.
- Hansen, J. D., Kaattari, S. L., 1996. The recombination activating gene 2 (RAG2) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics*. 44, 203-211.
- Hansen, J. D., Landis, E. D., Phillips, R. B., 2005. Discovery of a unique Ig

- heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 6919-6924.
- He, J. G., 2001. Complete Genome Analysis of the Mandarin Fish Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus. *Virology*. 291, 126-139.
- He, J. G., Lü, L., Deng, M., He, H. H., Weng, S. P., Wang, X. H., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., Chan, S. M., 2002. Sequence Analysis of the Complete Genome of an Iridovirus Isolated from the Tiger Frog. *Virology*. 292, 185-197.
- He, J. G., Wang, S. P., Zeng, K., Huang, Z. J., Chan, S. M., 2000. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarinfish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases*. 23, 219-222.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y., Qin, Q., 2009. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. *BMC Genomics*. 10, 224.
- Huard, S., Moriarty, T. J., Autexier, C., 2003. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Research*. 31, 4059-4070.
- Huh, J.-W., Choi, M.-M., Yang, S.-J., Yoon, S. Y., Choi, S. Y., Cho, S.-W., 2005. Inhibition of Human UDP-Glucose Dehydrogenase Expression Using siRNA Expression Vector in Breast Cancer Cells. *Biotechnology Letters*. 27, 1229-1232.
- Jakob, N., 2001. Analysis of the First Complete DNA Sequence of an Invertebrate Iridovirus: Coding Strategy of the Genome of Chilo Iridescent Virus. *Virology*. 286, 182-196.
- Jancovich, J. K., Mao, J., Chinchar, V. G., Wyatt, C., Case, S. T., Kumar, S., Valente,

- G., Subramanian, S., Davidson, E. W., Collins, J. P., Jacobs, B. L., 2003. Genomic sequence of a ranavirus (family *Iridoviridae*) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*. 316, 90-103.
- Jensen, I., Seppola, M., Steiro, K., Sandaker, E., Mennen, S., Sommer, A. I., 2009. Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua* juveniles to different routes of experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 85, 105-113.
- Jung, S.-J., M, E.-Y., Strüder-Kypke, M., Kitamura, S.-I., Woo, P., 2011. Small subunit ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 gene sequences of 21 strains of the parasitic scuticociliate *Miamiensis avidus* (*Ciliophora*, Scuticociliatia). *Parasitology Research*. 108, 1153-1161.
- Kasornchandra, J., Khongpradit, R., 1997. Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabaricus*. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds., 61-66.
- Kim, K. I., Zhang, D.-E., 2003. ISG15, not just another ubiquitin-like protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307, 431-434.
- Kong, H. J., Moon, J.-H., Moon, J.-Y., Kim, J.-M., Nam, B.-H., Kim, Y.-O., Kim, W.-J., Lee, S.-J., 2011. Cloning and functional characterization of the p65 subunit of NF- κ B from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 406-411.
- Krementsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.-E., Thali, M., 2010. HIV-1 Assembly Differentially Alters Dynamics and Partitioning of Tetraspanins and Raft Components. *Traffic*. 11, 1401-1414.
- Krementsov, D. N., Weng, J., Lambel , M., Roy, N. H., Thali, M., 2009. Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology*. 6, 64.

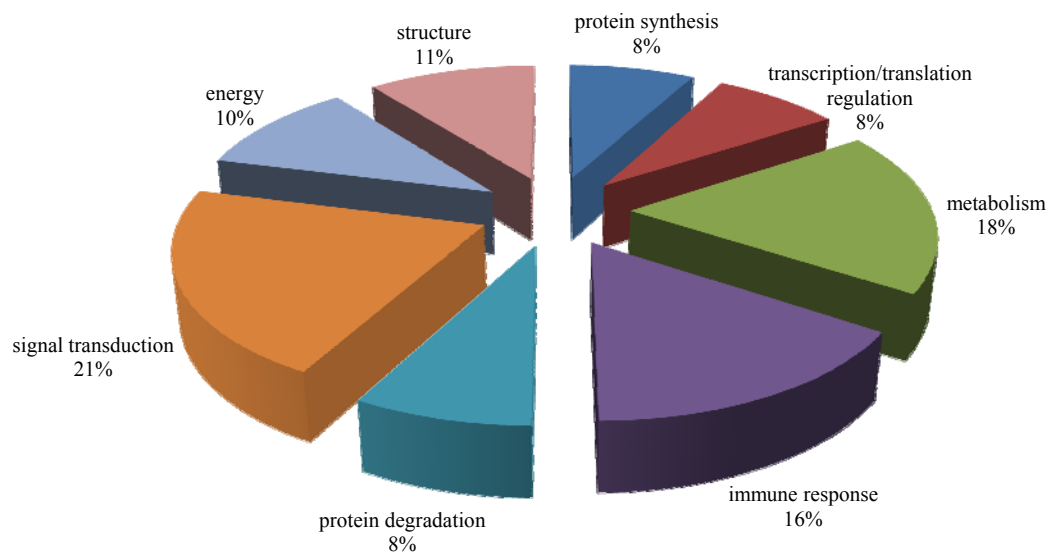
- Lai, C., Struckhoff, J. J., Schneider, J., Martinez-Sobrido, L., Wolff, T., Garcia-Sastre, A., Zhang, D. E., Lenschow, D. J., 2008. Mice Lacking the ISG15 E1 Enzyme UBE1L Demonstrate Increased Susceptibility to both Mouse-Adapted and Non-Mouse-Adapted Influenza B Virus Infection. *Journal of Virology*. 83, 1147-1151.
- Lam, F. W.-S., Wu, S.-Y., Lin, S.-J., Lin, C.-C., Chen, Y.-M., Wang, H.-C., Chen, T.-Y., Lin, H.-T., Lin, J. H.-Y., 2011. The expression of two novel orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TNF genes in peripheral blood leukocytes, various organs, and fish larvae. *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 618-629.
- Langdon, J. S., Humphrey, J. D., 1987. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *Journal of Fish Diseases*. 10, 289-297.
- Langdon, J. S., Humphrey, J. D., Williams, L. M., 1988. Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Diseases*. 11, 93-96.
- Langdon, J. S., Humphrey, J. D., Williams, L. M., Hyatt, A. D., Westbury, H. A., 1986. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*. 9, 263-268.
- Lapatra, S. E., Groff, J. M., Munn, B., Patterson, T. L., Holt, R. A., Hauck, A. K., Levy, J. A., Fraenkel-Conrat, H., Owens, R. A., 1994. *Virology*. Prentice Hall International, New Jersey. 204-205.
- Lee, J. Y., Spicer, A. P., 2000. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*. 12, 581-586.
- Lin, C.-H., Christopher John, J. A., Lin, C.-H., Chang, C.-Y., 2006. Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 351, 534-539.

- Lu, D.-Q., Bei, J.-X., Feng, L.-N., Zhang, Y., Liu, X.-C., Wang, L., Chen, J.-L., Lin, H.-R., 2008. Interleukin-1[β] gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction. *Molecular Immunology*. 45, 857-867.
- Lu, L., Zhou, S., Chen, C., Weng, S., Chan, S., He, J., 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper. *Virology*. 339, 81-100.
- Martinez, I., Lombardia, L., Garcia-Barreno, B., Dominguez, O., Melero, J. A., 2007. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *Journal of General Virology*. 88, 570-581.
- Miller, D. K., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Molineaux, S. M., Thornberry, N. A., The IL-1-BETA converting-enzyme as a therapeutic target. *Immunosuppressive and Antiinflammatory Drugs*, Vol. 696. New York Acad Sciences, New York, 1993, pp. 133-148.
- Mondino, A., Blasi, F., 2004. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends in Immunology*. 25, 450-455.
- O'Farrell, C., Vaghefi, N., Cantonnet, M., Buteau, B., Boudinot, P., Benmansour, A., 2002. Survey of Transcript Expression in Rainbow Trout Leukocytes Reveals a Major Contribution of Interferon-Responsive Genes in the Early Response to a Rhabdovirus Infection. *Journal of Virology*. 76, 8040-8049.
- Ohtani, M., Hikima, J. i., Kondo, H., Hirono, I., Jung, T. S., Aoki, T., 2010. Evolutional Conservation of Molecular Structure and Antiviral Function of a Viral RNA Receptor, LGP2, in Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *The Journal of Immunology*. 185, 7507-7517.
- Pavlikova, N., Arukwe, A., 2011. Immune-Regulatory Transcriptional Responses in

- Multiple Organs of Atlantic Salmon After Tributyltin Exposure, Alone or in Combination with Forskolin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 74, 478-493.
- Qin, Q. W., Lam, T. J., Sin, Y. M., Shen, H., CHang, S. F., Ngoh, G. H., Chen, C. L., 2001. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *Journal of Virological Methods.* 98, 17-24.
- Rahman, M. M., McFadden, G., 2006. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens.* 2, e4.
- Rhodes, L., Wallis, S., Demlow, S., 2009. Genes associated with an effective host response by Chinook salmon to *Renibacterium salmoninarum*. *Developmental & Comparative Immunology.* 33, 176-186.
- Secombes, C. J., Manning, M. J., 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases.* 3, 399-412.
- Shi, C.-Y., Jia, K.-T., Yang, B., Huang, J., 2010a. Complete genome sequence of a Megalocytivirus (family *Iridoviridae*) associated with turbot mortality in China. *Virology Journal.* 7, 159.
- Shi, H. X., Yang, K., Liu, X., Liu, X. Y., Wei, B., Shan, Y. F., Zhu, L. H., Wang, C., 2010b. Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification. *Molecular and Cellular Biology.* 30, 2424-2436.
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F., Hew, C. L., 2004. Functional Genomics Analysis of Singapore Grouper Iridovirus: Complete Sequence Determination and Proteomic Analysis. *Journal of Virology.* 78, 12576-12590.
- Sun, J.-s., Zhao, L., Sun, L., 2011. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a

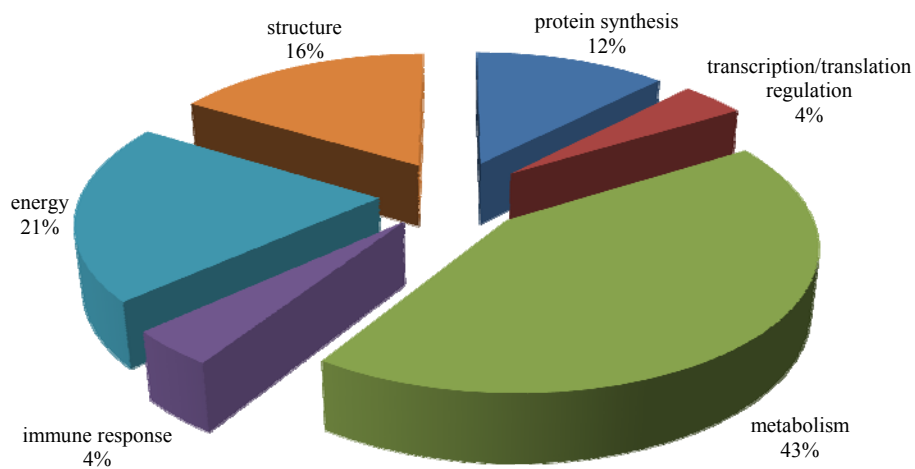
- chemoattractant with immunoregulatory property. *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 1362-1367.
- Tapiovaara, H., Olesen, N., Lindén, J., Rimaila-Pärnänen, E., CH., v. B., 1998. Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis Aquat Organ*. 32, 185-193.
- Tidona, C. A., Darai, G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virology*. 230, 207-216.
- Tsai, C., Lin, C., Chang, C., 2007. Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. *Virus Research*. 126, 196-206.
- Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C., Chang, C. Y., 2005. Complete Genome Sequence of the Grouper Iridovirus and Comparison of Genomic Organization with Those of Other Iridoviruses. *Journal of Virology*. 79, 2010-2023.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*. 68, 1015-1068.
- Wang, X., Hinson, E. R., Cresswell, P., 2007. The Interferon-Inducible Protein Viperin Inhibits Influenza Virus Release by Perturbing Lipid Rafts. *Cell Host & Microbe*. 2, 96-105.
- Willett, C. E., Cherry, J. J., Steiner, L. A., 1997a. Characterization and expression of the recombination activating genes (*rag1* and *rag2*) of zebrafish *Immunogenetics*. 45, 394-404.
- Willett, C. E., Zapata, A. G., Hopkins, N., Steiner, L. A., 1997b. Expression of zebrafish *rag* genes during early development identifies the thymus. *Developmental Biology*. 182, 331-341.

- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N. W., Clem, L. W., DuPasquier, L., Warr, G. W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 4593-4597.
- Workenhe, S. T., Hori, T. S., Rise, M. L., Kibenge, M. J. T., Kibenge, F. S. B., 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Molecular Immunology*. 46, 2955-2974.
- Xu, C., Guo, T. C., Mutoloki, S., Haugland, O., Marjara, I. S., Evensen, O., 2010. Alpha Interferon and Not Gamma Interferon Inhibits Salmonid Alphavirus Subtype 3 Replication In Vitro. *Journal of Virology*. 84, 8903-8912.
- Yeh, C. H., Chen, Y. S., Wu, M. S., Chen, C. W., Yuan, C. H., Pan, K. W., Chang, Y. N., Chuang, N. N., Chang, C. Y., 2008. Differential display of grouper iridovirus-infected grouper cells by immunostaining. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 372, 674-680.
- Zhang, Q. Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z. Q., Gui, J. F., 2004. Complete Genome Sequence of Lymphocystis Disease Virus Isolated from China. *Journal of Virology*. 78, 6982-6994.
- Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N. E., Loring, J. M., Raulet, D. H., Jaenisch, R., 1990. [beta]2-Microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells. *Nature*. 344, 742-746.



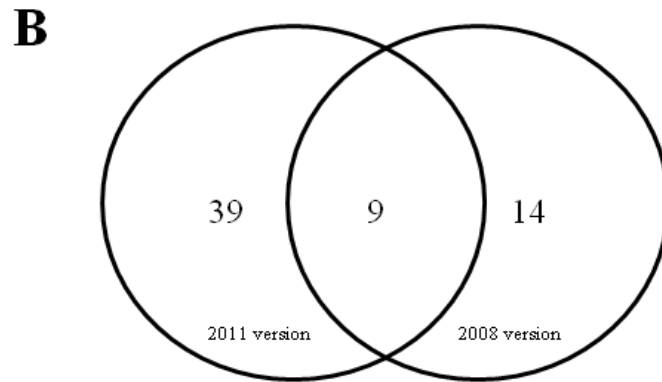
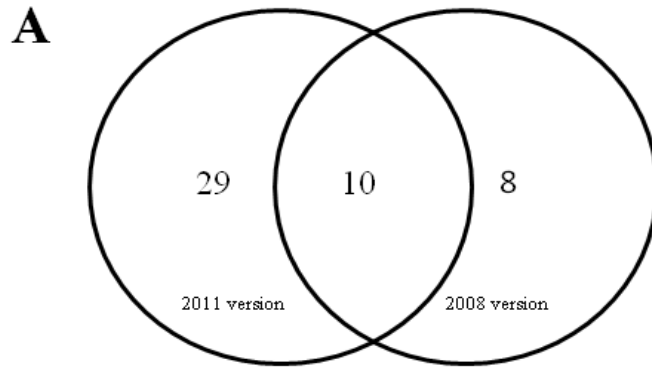
圖一、依基因功能歸類之表現量兩倍以上調控之基因群。

正調控兩倍以上之 39 個基因依其功能分類後共可分為 8 群，分別為免疫反應 (immune response)、蛋白質降解 (protein degradation)、訊息傳遞 (signal transduction)、能量相關 (energy)、結構 (structure)、蛋白質合成 (protein synthesis)、轉錄轉譯調控 (transcription/translation regulation) 和代謝作用 (metabolism)。



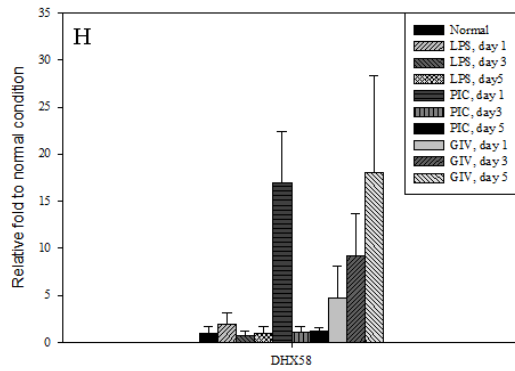
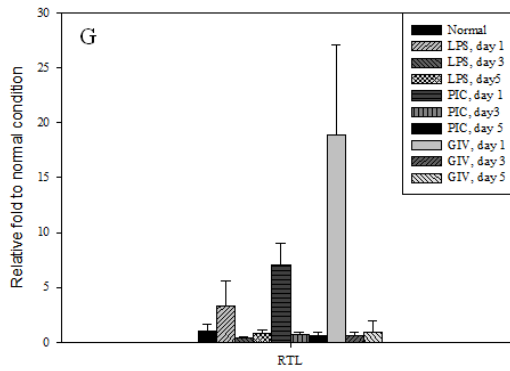
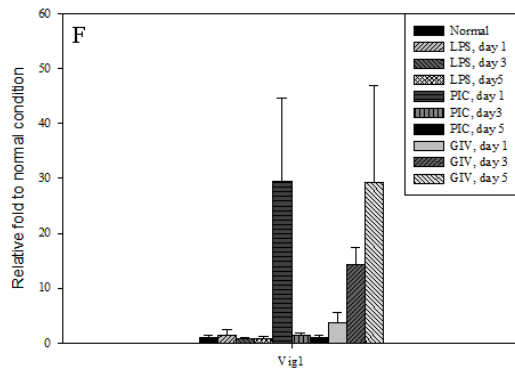
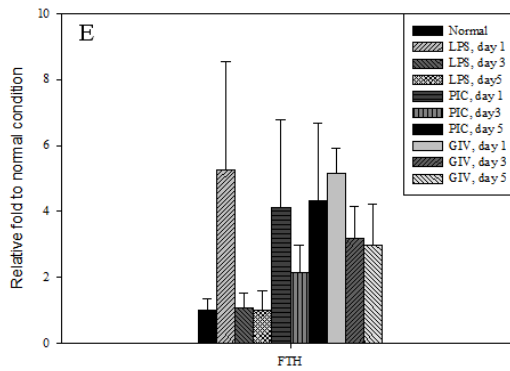
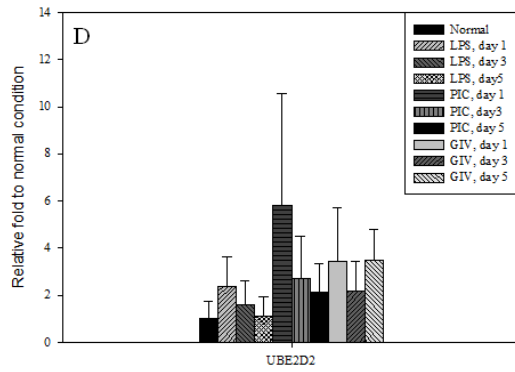
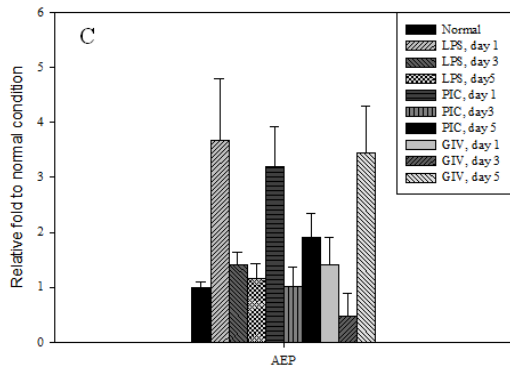
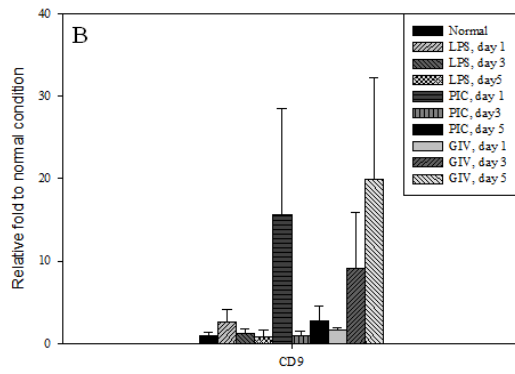
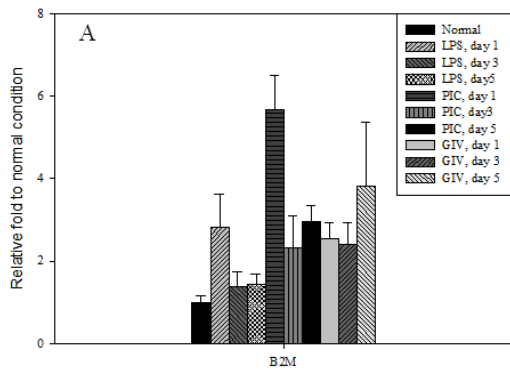
圖二、依基因功能歸類之表現量兩倍以下調控基因群。

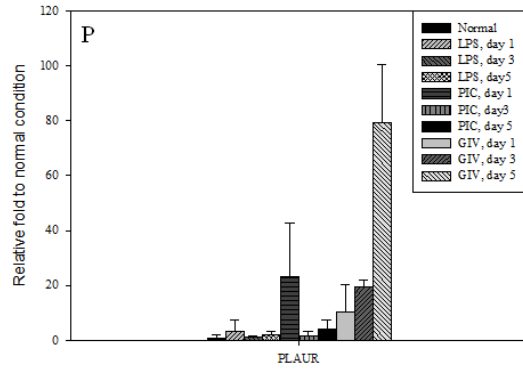
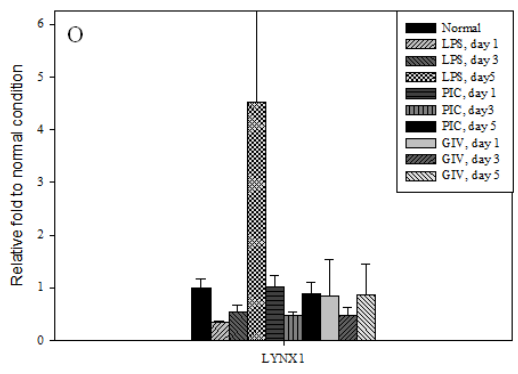
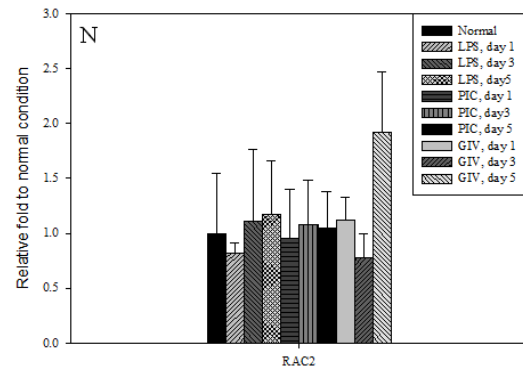
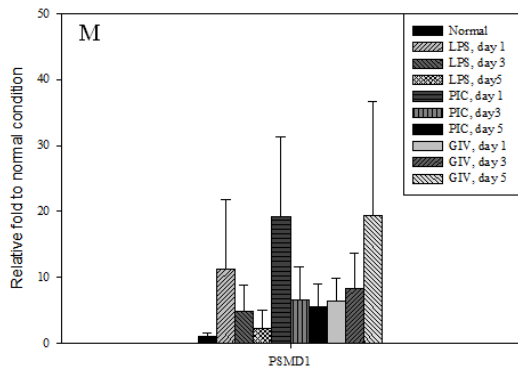
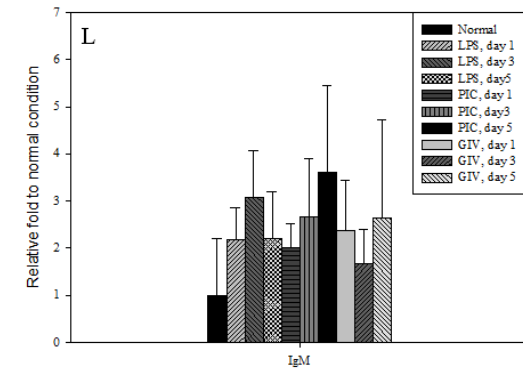
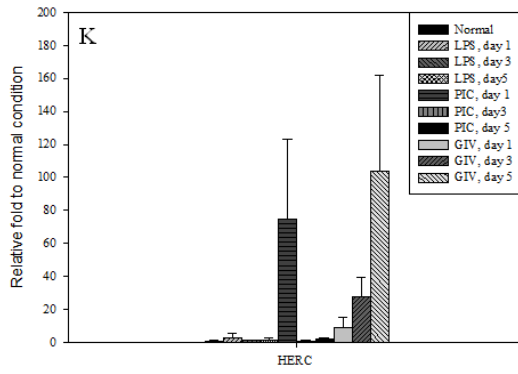
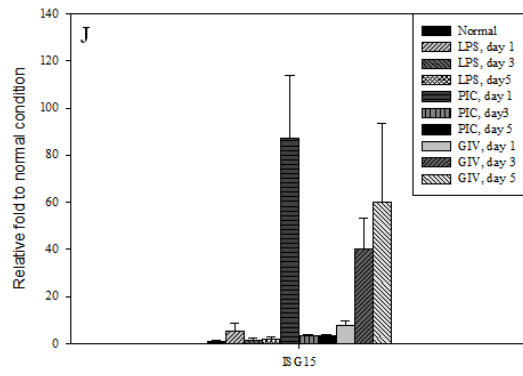
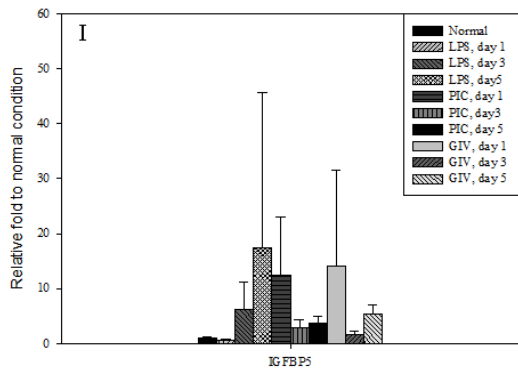
負調控兩倍以下之 48 個基因依其功能分類後共可分為 6 群，分別為免疫反應 (immune response)、能量相關 (energy)、結構 (structure)、蛋白質合成 (protein synthesis)、轉錄轉譯調控 (transcription/translation regulation) 和代謝作用 (metabolism)。

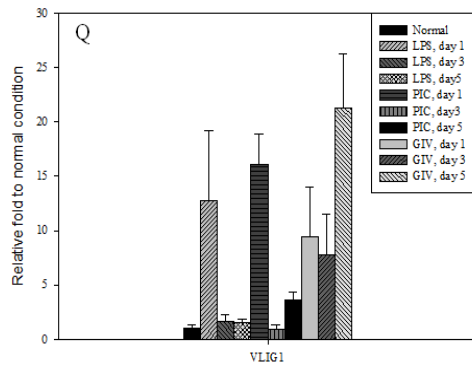


圖三、2011 年經微陣列晶片分析所得之基因群與 2008 年所得結果之相較。

以虹彩病毒處理組資料為母體，重新分析 2008 年微陣列晶片數據後，在正調控兩倍以上中可得到 39 個基因，其中有 10 個與 2008 年所分析之結果相符合 (A)；在負調控兩倍以下中可得到 48 個基因，其中有 9 個與 2008 年所分析之結果相符合 (B)。

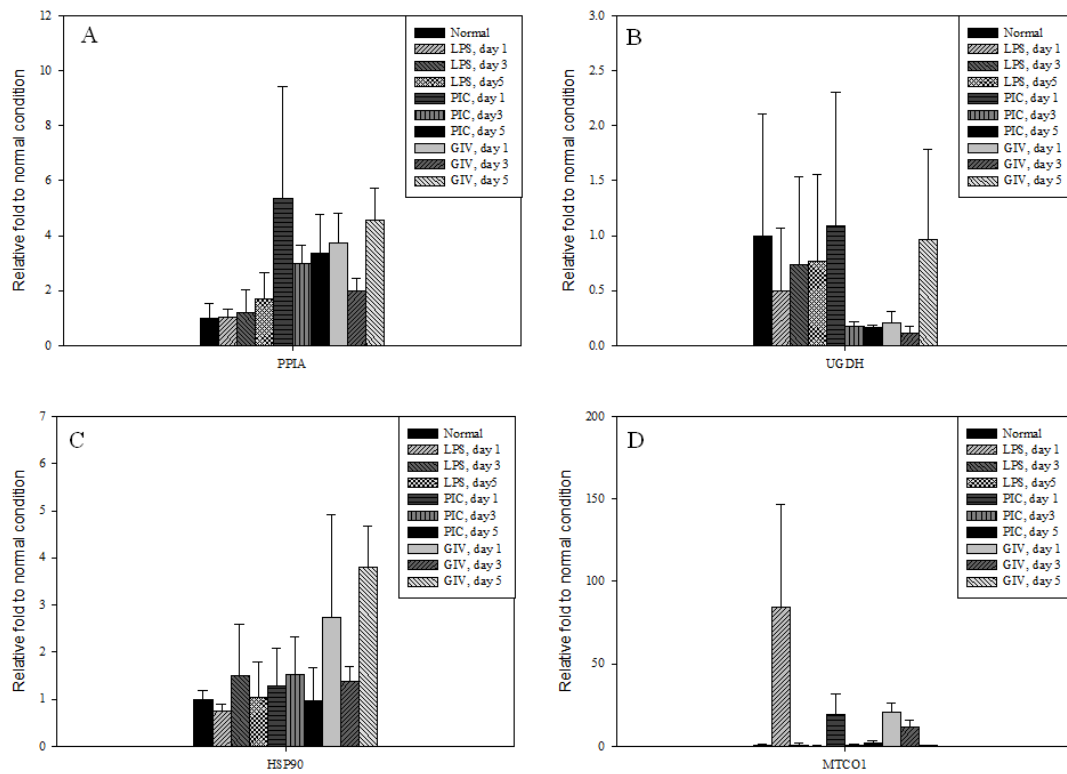






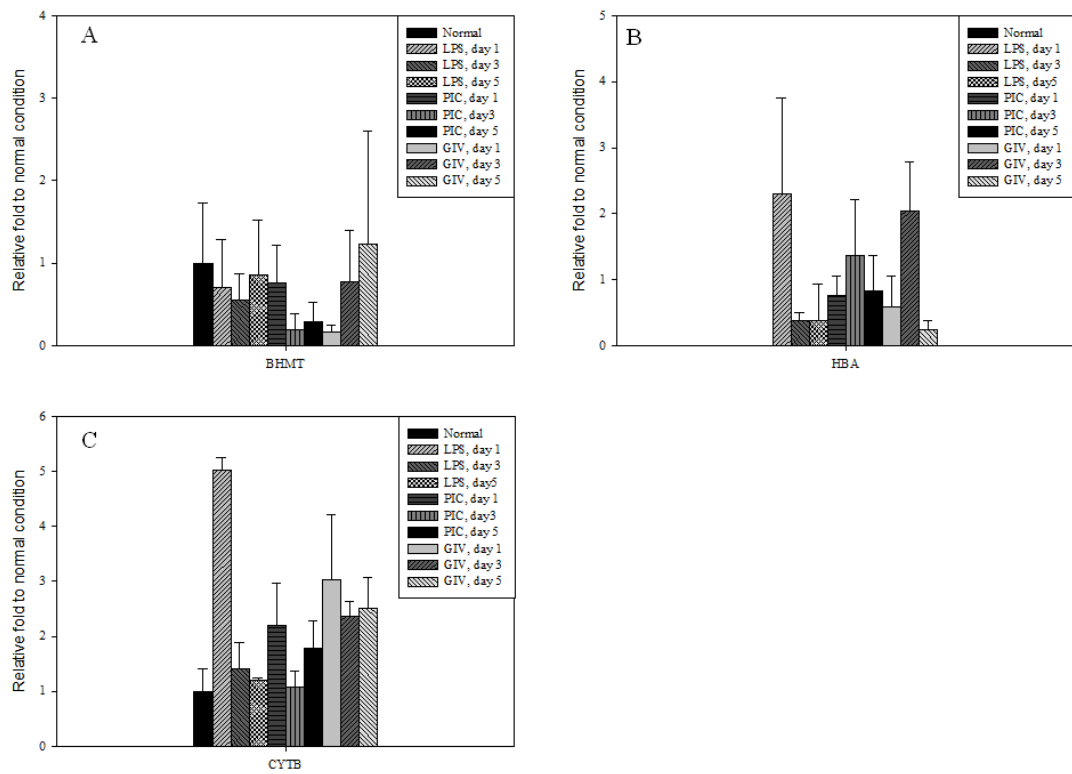
圖四、經不同免疫刺激物處理後之點帶石斑腎臟其正調控候選基因表現情形。

將點帶石斑分成三組，分別施打 LPS、poly I:C、虹彩病毒，並於注射後第 1、3、5 天取其腎臟組織 (n = 5)，以即時定量聚合酶鏈鎖反應分析經微陣列晶片篩選後之正調控候選基因。將未注射之點帶石斑作為控制組，計算其他各處理組之不同基因相對表現量。B2M (beta-2-microglobulin, A)；CD9 (CD9 antigen, B)；AEP(asparaginyl endopeptidase, C)；UBE2D2(ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2, D)；FTH (ferritin heavy subunit, E)；；Vig 1 (F)；RTL (reverse transcriptase-like protein, G)；DHX58 (RNA helicase DHX58 homolog, H)；IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein, I)；ISG15 (interferon stimulated gene 15, J)；HERC (HECT E3 ubiquitin ligase, K)；IgM(immunoglobulin mu heavy chain, L)；PSMD1 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog, M)；RAC2 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2, N)；LYNX1 (Ly-6/neurotoxin-like protein 1, O)；PLAUR(urokinase plasminogen activator surface receptor, P)；VLIG1 (very large inducible GTPase-1, Q)。



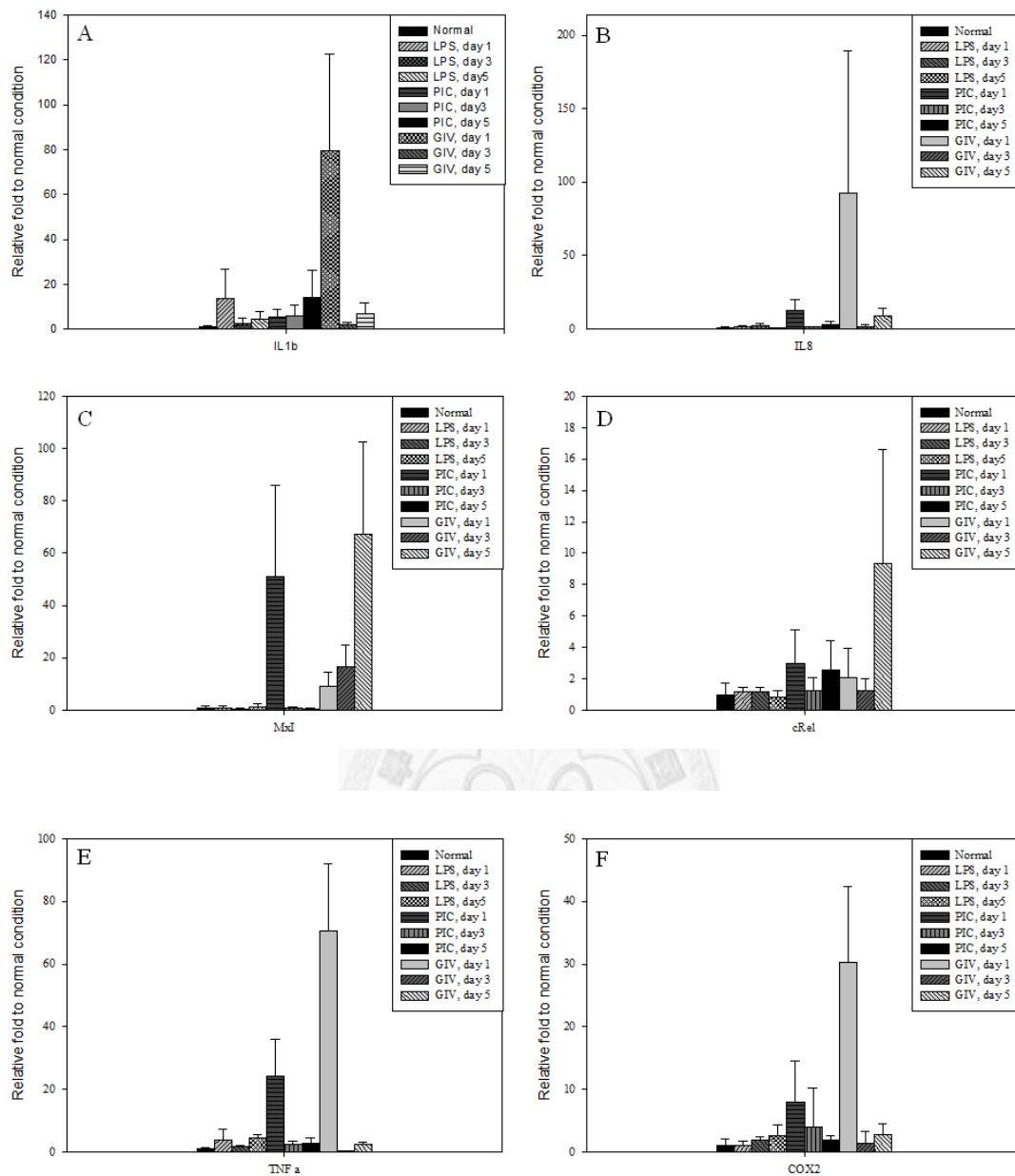
圖五、經不同免疫刺激物處理後之點帶石斑腎臟其負調控候選基因表現情形。

將點帶石斑分成三組，分別施打 LPS、poly I:C、虹彩病毒，並於注射後第 1、3、5 天取其腎臟組織 (n = 5)，以即時定量聚合酶鏈鎖反應分析經微陣列晶片篩選後之負調控候選基因。將未注射之點帶石斑作為控制組，計算其他各處理組之不同基因相對表現量。PPIA (peptidylprolyl isomerase A, A)；UGDH (UDP-glucose 6-dehydrogenase, B)；HSP90 (heat shock protein 90, C)；MTCO1 (cytochrome c oxidase subunit I, D)。



圖六、經不同免疫刺激物處理後之點帶石斑腎臟其正/負調控候選基因表現情形。

以即時定量聚合酶鏈鎖反應分析三個經微陣列晶片篩選後之正/負調控候選基因。BHMT (Betaine-homocysteine S-methyltransferase, A) ; HBA (hemoglobin alpha chain, B) ; CYTB (cytochrome B, C)。



圖七、經不同免疫刺激物處理後之點帶石斑腎臟其免疫相關基因表現情形。

將點帶石斑分成三組，分別施打 LPS、poly I:C、虹彩病毒，並於注射後第 1、3、5 天取其腎臟組織 (n = 5)，以即時定量聚合酶鏈鎖反應分析免疫相關基因。將未注射之點帶石斑作為控制組，計算其他各處理組之不同基因相對表現量。IL1b (Interleukin-1 β , A) ; IL8 (Interleukin-8, B) ; MxI (Interferon-induced GTP-binding protein MxI, C) ; cRel (NF- κ B c-Rel subunit, D) ; TNF α (tumor-necrosis factor α , E) ; COX2 (cyclooxygenase-2, F) 。

表一、虹彩病毒感染處理組中點帶石斑之頭腎組織內正調控兩倍以上之基因群。

Gene name	Clone(s)	BLASTX identification of select grouper contig			
		Species	Identity	E-value	Accession number
<i>Protein synthesis</i>					
60S ribosomal protein L34	1	<i>Salmo salar</i>	99%	8e-32	ACN10048
60S ribosomal protein LP1	1	<i>Epinephelus coioides</i>	100%	1e-27	ACH73062
pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor	1	<i>Danio rerio</i>	77%	3e-36	NP_956373
<i>Transcription/translation regulation</i>					
poly A binding protein, cytoplasmic 1 b	1	<i>Danio rerio</i>	90%	2e-85	NP_957176
bromodomain-containing protein 1	1	<i>Danio rerio</i>	55%	1e-32	NP_001104751
reverse transcriptase-like protein	3	<i>Paralichthys olivaceus</i>	69%	4e-108	AAN15747
<i>Metabolism</i>					
betaine-homocysteine S-methyltransferase	16	<i>Perca flavescens</i>	94%	2e-169	ABU63967
carboxypeptidase N catalytic chain	1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	94%	5e-153	CBN81456
ferritin heavy subunit	1	<i>Epinephelus awoara</i>	94%	7e-97	ABI95136
fructose-bisphosphate aldolase B	2	<i>Thunnus albacares</i>	96%	0.0	CAX62602
hemoglobin alpha chain	1	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	76%	3e-57	ABC54635
hemoglobin beta chain	1	<i>Epinephelus coioides</i>	99%	2e-79	AAK38736
Mid1-interacting protein 1	1	<i>Epinephelus bruneus</i>	98%	8e-80	AEB31291
<i>Immune response</i>					
asparaginyl endopeptidase (legumain)	1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	80%	2e-66	ABM88796
beta-2 microglobulin	1	<i>Epinephelus coioides</i>	98%	1e-64	ACZ97569
immunoglobulin mu heavy chain	1	<i>Epinephelus coioides</i>	74%	2e-139	AAX78211
interferon stimulated gene 15	1	<i>Sebastes schlegelii</i>	71%	1e-54	BAG72218
RNA helicase DHX58 homolog	1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	70%	7e-61	ADI75503
vig-1	1	<i>Epinephelus coioides</i>	98%	7e-66	ACL98115
<i>Protein degradation</i>					
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog	4	<i>Osmerus mordax</i>	93%	2e-85	ACO09226

HECT E3 ubiquitin ligase	2	<i>Danio rerio</i>	50%	1e-92	XP_688463
ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	1	<i>Osmerus mordax</i>	93%	2e-33	ACO09151
Signal transduction					
Bloodthirsty	1	<i>Chaenocephalus aceratus</i>	54%	5e-64	AAX12162
CD9 antigen	1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	69%	2e-49	ACQ58340
Ly-6/neurotoxin-like protein 1	1	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>	35%	1e-05	ABZ89719
insulin-like growth factor binding protein	1	<i>Seriola quinqueradiata</i>	98%	1e-66	ACD11357
neoverrucotoxin subunit homolog	1	<i>Synanceia verrucosa</i>	41%	8e-53	A0ZSK3
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	1	<i>Pagrus major</i>	99%	1e-107	AAP20195
urokinase plasminogen activator surface receptor	19	<i>Danio rerio</i>	41%	2e-37	XP_002664937
very large inducible GTPase-1 (VLIG1)	3	<i>Danio rerio</i>	40%	5e-116	XP_682842
Energy					
ATP synthase F0 subunit 6	1	<i>Epinephelus coioides</i>	97%	6e-85	YP_002117859
cytochrome b	1	<i>Epinephelus coioides</i>	95%	5e-159	YP_002117866
cytochrome c oxidase subunit III	1	<i>Epinephelus coioides</i>	94%	5e-129	YP_002117860
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1	1	<i>Danio rerio</i>	76%	6e-127	NP_001013326
Structure					
cofilin-2	2	<i>Epinephelus coioides</i>	100%	3e-73	ACL98108
collagen type I alpha 1	2	<i>Oryzias latipes</i>	96%	8e-65	NP_001116390
profilin 1	1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	36%	3e-15	ACQ58331
sorting nexin 3	1	<i>Danio rerio</i>	85%	5e-31	NP_001032183
Unknown					
hypothetical protein 19h2, 26h12	42				
EcfgEST0001, 0018, 0039, 0048, 0076, 0077, 0078, 0079, 0081, 0082, 0083, 0084, 0086, 0087, 0088, 0089, 0090, 0093, 0094, 0096, 0097, 0098, 0100, 0101, 0102, 0103, 0118, 0123, 0124, 0127, 0136					

表二、虹彩病毒感染處理組中點帶石斑之頭腎組織內負調控兩倍以下之基因群。

Gene name	Clone(s)	BLASTX identification of select grouper contig			
		Species	Identity	E-value	Accession number
<i>Protein synthesis</i>					
40S ribosomal protein S2	3	<i>Solea senegalensis</i>	98%	9e-132	BAF45464
40S ribosomal protein S4	1	<i>Epinephelus coioides</i>	99%	6e-140	ADG29131
40S ribosomal protein S15	1	<i>Salmo salar</i>	83%	2e-50	ACN10008
40S ribosomal protein S27	1	<i>Anolis carolinensis</i>	99%	8e-35	XP_003229145
60S ribosomal protein L4	2	<i>Pagrus major</i>	87%	3e-141	AAP20200
60S ribosomal protein L17	1	<i>Epinephelus bruneus</i>	100%	1e-93	AEB31310
<i>Transcription/translation regulation</i>					
thioredoxin interacting protein	1	<i>Danio rerio</i>	61%	1e-92	NP_956381
eukaryotic translation elongation factor 2	1	<i>Danio rerio</i>	90%	0.0	AAH45488
<i>Metabolism</i>					
acyl-coenzyme A thioesterase 13	1	<i>Danio rerio</i>	89%	3e-64	CAK05423
alanine aminotransferase	1	<i>Sparus aurata</i>	85%	8e-62	AAP42512
alcohol dehydrogenase Class VI	1	<i>Gadus callarias</i>	85%	2e-58	1CDO_A
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	1	<i>Salmo salar</i>	91%	9e-64	ACI33614
betaine homocysteine S-methyltransferase	4	<i>Perca flavescens</i>	94%	2e-169	ABU63967
cathepsin A	1	<i>Pan troglodytes</i>	74%	4e-16	XP_001159669
CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	1	<i>Oreochromis niloticus</i>	94%	8e-43	BAE45263
Glutathione S-transferase theta-1	1	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	86%	4e-118	ADY80025
NAD-dependent deacetylase sirtuin-5	1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	86%	3e-91	ACQ58544
omega-amidase NIT2	1	<i>Danio rerio</i>	83%	4e-97	NP_991174
dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST, E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	1	<i>Danio rerio</i>	94%	7e-83	AAH65943
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	88%	2e-15	CBN81572
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2	<i>Epinephelus bruneus</i>	98%	6e-166	AEB31345

hemoglobin alpha chain	7	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	76%	3e-57	ABC54635
peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	1	<i>Salmo salar</i>	80%	6e-54	NP_001134524
protein disulfide isomerase A6	1	<i>Danio rerio</i>	90%	2e-31	AAK71636
pyruvate kinase	2	<i>Takifugu rubripes</i>	96%	5e-102	BAC02918
serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase	1	<i>Osmerus mordax</i>	87%	4e-148	ACO09121
Sorcin	2	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	72%	4e-68	NP_001016667
UDP-glucose 6-dehydrogenase	1	<i>Danio rerio</i>	92%	1e-118	NP_001103872
Immune response					
heat shock protein 90	1	<i>Epinephelus coioides</i>	99%	1e-70	ACV04938
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1	<i>Branchiostoma floridae</i>	87%	3e-47	XP_002597453
Energy					
ATP synthase F0 subunit 6	6	<i>Epinephelus coioides</i>	97%	6e-85	YP_002117859
cytochrome b	51	<i>Epinephelus coioides</i>	95%	5e-159	YP_002117866
cytochrome c oxidase subunit 8B	1	<i>Danio rerio</i>	66%	1e-15	XP_698270
cytochrome c oxidase subunit I	12	<i>Epinephelus coioides</i>	96%	0.0	YP_002117856
cytochrome c oxidase subunit II	7	<i>Epinephelus coioides</i>	95%	1e-106	YP_002117857
cytochrome c oxidase subunit III	4	<i>Epinephelus coioides</i>	94%	5e-129	YP_002117860
NADH dehydrogenase subunit 1	2	<i>Anyperodon leucogrammicus</i>	97%	8e-102	YP_002907413
NADH dehydrogenase subunit 4	1	<i>Epinephelus coioides</i>	94%	5e-54	YP_002117863
NADH dehydrogenase subunit 5	1	<i>Epinephelus coioides</i>	96%	2e-94	YP_002117864
NADH dehydrogenase subunit 6	3	<i>Epinephelus coioides</i>	100%	2e-62	YP_002117865
Structure					
coronin-1A	1	<i>Salmo salar</i>	66%	9e-15	ACN10578
FAM18B	1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	97%	2e-42	ACQ58161
keratin 8	1	<i>Danio rerio</i>	93%	6e-148	CAD31062
keratin type II E3	2	<i>Dicentrarchus labrax</i>	78%	0.0	CBN80922
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1	1	<i>Danio rerio</i>	57%	2e-65	XP_697912
PDZ domain-containing protein 1	1	<i>Salmo salar</i>	58%	7e-85	NP_001133562

tropomyosin alpha-4 chain	1	<i>Danio rerio</i>	91%	3e-71	NP_998323
troponin C, fast skeletal	1	<i>Epinephelus coioides</i>	100%	1e-76	ACM41865

Unknown

hypothetical protein 19h2, 26h12 60

EcfgEST0001, 0003, 0009, 0014, 0025, 0026, 0028, 0036, 0042,
0045, 0056, 0057, 0080, 0083, 0085, 0088, 0091, 0092, 0095,
0099, 0100, 0103, 0104, 0105, 0106, 0107, 0108, 0109, 0110,
0111, 0112, 0113, 0114, 0115, 0116, 0117, 0119, 0120, 0121,
0122, 0125, 0126, 0128, 0129, 0130, 0131, 0132, 0133, 0134,
0135, 0137, 0138



表三、用於即時定量聚合酶鏈鎖反應之專用引子對。

Primer Name	Sequence (5'-3')	Gene sequence
18s-F	5'- CGCTCTGAGGGTAACTGATGG -3'	18s rRNA
18s-R	5'- GTCCTTTGGGAGCAGCCATG -3'	
AEP-F	5'- ACTGCTACAACCTGGCACAAAACA -3'	asparaginyl endopeptidase
AEP-R	5'- CACAGGTTCCACCAGAGCGTACA -3'	
BHMT-F	5'- TTACCACATCAGGGCTATTGCA -3'	Betaine-homocysteine S-methyltransferase
BHMT-R	5'- TGAGGCAGCGGCCATT -3'	
B2M-F	5'- GCCCAAGGTTTCAGGTGTACAG -3'	Beta-2-microglobulin
B2M-R	5'- ACATGGCAGATCAGGGTGTTG -3'	
CD9-F	5'- AACAGGGATGAGTTTGGCTTGA -3'	CD9 antigen
CD9-R	5'- CTCCGCCGGTCACATACAG -3'	
CYTB-F	5'- GCACCCTCCAACATTTCCATT -3'	cytochrome B
CYTB-R	5'- GGCCTGTGAGAATTTGAGCAA -3'	
DHX58-F	5'- AACAGAGAAGAGGAGTCGCAACAC -3'	RNA helicase DHX58 homolog
DHX58-R	5'- AGAGGCCACAGACCTGAAACA -3'	
FTH-F	5'- CCCACATTTGTGCGATTTCA -3'	ferritin heavy subunit
FTH-R	5'- GTCTGCCAGCTCTTTGATGGA -3'	
HBA-F	5'- CAGTCTACCCGCAAACCAAGA -3'	hemoglobin alpha chain
HBA-R	5'- GGGACAGAGCCGGGAGTAAG -3'	
HSP90-F	5'- CCAAGAAGCACCTGGAGATCA -3'	heat shock protein 90
HSP90-R	5'- TCACAGCCTTGTCGTTCTTGTC -3'	
HERC-F	5'- ACGCTGCTGACATCCATTTG -3'	HECT E3 ubiquitin ligase
HERC-R	5'- CCTCTCGTAGATAGGCAGCAGTAAC -3'	
IgM-F	5'- ATACGTCGCTTTACTTCCCATCA -3'	immunoglobulin mu heavy chain
IgM-R	5'- TTCCTTAAGTGGCTCTATCCAGTCTT -3'	
IGFBP5-F	5'- TCCCCTCTGCCCATCGA -3'	insulin-like growth factor binding protein
IGFBP5-R	5'- TGAATGATCCCATCCAGTTTTCT -3'	

ISG15-F	5'- TGTCCCTGCTGGTGATCGA -3'	interferon stimulated gene 15
ISG15-R	5'- TCCCCTTCTCGTTTCTGACAA -3'	
LYNX1-F	5'- CTGCAGCGTTTGGGTTGAG -3'	Ly-6/neurotoxin-like protein 1
LYNX2-R	5'- GGGCCGGTGCAGGATT -3'	
MT-CO1-F	5'- CTGCCCTCCCCCATATCAC -3'	cytochrome c oxidase subunit I
MT-CO1-R	5'- TTCAACTCCTCCCTTTCTCGTT -3'	
PLAUR-F	5'- CCCCCGAGCCCATCAA -3'	urokinase plasminogen activator surface receptor
PLAUR-R	5'- TTGTCCATCACAGGTGAAGCA -3'	
PPIA-F	5'- CCGGCCCAAACACGAA -3'	peptidylprolyl isomerase A
PPIA-R	5'- CTTCCCGTTCGAGCCATGAT -3'	
PSMD1-F	5'- CCTGCCGAGAGCTACACCTT -3'	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog
PSMD1-R	5'- TCTATGCATCCTGCGATCTCAT -3'	
RAC2-F	5'- AATGTGTGGTCGTGGGAGATG -3'	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
RAC2-R	5'- GGAAGGCATTGGTTGTGTAG -3'	
RTL-F	5'- GAATGCAGCAGCACGTGTACTAA -3'	reverse transcriptase-like protein
RTL-R	5'- GAGCCAGTGCAGAGAAGCTAAAAC -3'	
UBE2D2-F	5'- CTTCTCTCCATTTGCTCACTCCTAT -3'	ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2
UBE2D2-R	5'- TCGTGCGATCTCTGGCACTA -3'	
UGDH-F	5'- GTCAACGAGTCCCGCATCA -3'	UDP-glucose 6-dehydrogenase
UGDH-R	5'- TTCAGACCCGGCTCATATATGG -3'	
vig-1-F	5'- CGAGCAGCTGACGATAATGAAT -3'	vig-1
vig-1-R	5'- GAGGCCATGTTTCATCCAGAAC -3'	
VLIG1-F	5'- GGAAGCTCATCTGCTGTTGTGT -3'	very large inducible GTPase-1
VLIG1-R	5'- ACGGCCTCAACAGTGGA ACT -3'	
cRel-F	5'- TACAATGAGAAAAAGCGCAGAAGA -3'	NF-κB c-Rel subunit
cRel-R	5'- CAACAAAAGGACCACCTGACAA -3'	
MxI-F	5'- AAGTGGTGCGGGAAGATAAGC -3'	Interferon-induced GTP-binding protein MxI
MxI-R	5'- AGAGGCAATGTCCAGGGTGAT -3'	

IL1 β -F	5'- CCCAGATGACATGCAACGTT -3'	Interleukin-1 β
IL1 β -R	5'- GCCACGTGCTTCATTGTCAGT -3'	
IL8-F	5'- CCTGACAGAGAGCAAACCCATT -3'	Interleukin-8
IL8-R	5'- CTTTCTTCACCCAGGGAGCTT -3'	
TNF α -F	5'- CTCAGGGCGGCTTCACACT -3'	tumor-necrosis factor α
TNF α -R	5'- TCGCTGCAGGAGACTCTGAAC -3'	
COX2-F	5'- AGAGGCAGCACAAGCTCAGACT -3'	cyclooxygenase-2
COX2-R	5'- TCGACACCCACTTCCTTGACT -3'	



表四、不同免疫刺激物處理下各基因相對於正常狀態之表現倍數。

Gene name	Treatment	LPS			Poly I:C			GIV		
	Day post injection	1	3	5	1	3	5	1	3	5
asparaginyl endopeptidase		3.68	1.42	1.17	3.20	1.03	1.92	1.40	0.48	3.45
Betaine-homocysteine S-methyltransferase		0.71	0.56	0.85	0.76	0.20	0.29	0.17	0.78	1.23
Beta-2-microglobulin		2.82	1.38	1.44	5.67	2.32	2.97	2.54	2.39	3.82
CD9 antigen		2.67	1.30	0.85	15.70	0.97	2.74	1.70	9.13	19.90
cytochrome B		5.03	1.40	1.19	2.19	1.09	1.79	3.04	2.37	2.52
RNA helicase DHX58 homolog		1.94	0.73	1.00	17.01	1.12	1.24	4.76	9.18	18.00
ferritin heavy subunit		5.26	1.09	1.02	4.13	2.16	4.34	5.17	3.17	2.99
hemoglobin alpha chain		2.31	0.38	0.38	0.75	1.36	0.84	0.59	2.05	0.24
heat shock protein 90		0.75	1.50	1.04	1.28	1.52	0.97	2.74	1.38	3.81
HECT E3 ubiquitin ligase		2.90	1.03	1.69	74.87	0.96	1.76	8.96	27.73	104.07
immunoglobulin mu heavy chain		2.34	3.30	2.41	2.02	2.89	3.95	2.69	1.78	2.65
insulin-like growth factor binding protein		0.64	6.15	17.48	12.46	2.89	3.76	14.08	1.74	5.48
interferon stimulated gene 15		5.29	1.47	1.85	87.39	3.21	3.26	7.86	39.96	59.87
Ly-6/neurotoxin-like protein 1		0.34	0.53	4.52	1.02	0.48	0.90	0.85	0.47	0.87
cytochrome c oxidase subunit I		84.10	0.87	0.27	19.31	1.01	2.17	20.97	11.75	0.54
urokinase plasminogen activator surface receptor		3.38	1.31	2.05	23.06	1.74	3.98	10.27	19.39	79.44
peptidylprolyl isomerase A		1.04	1.18	1.68	5.38	3.01	3.37	3.72	1.99	4.55
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog		11.29	4.90	2.20	19.13	6.66	5.59	6.45	8.37	19.34

Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	0.82	1.11	1.18	0.95	1.08	1.05	1.12	0.78	1.92
reverse transcriptase-like protein	3.36	0.40	0.84	7.07	0.68	0.61	18.94	0.63	0.93
ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	2.39	1.62	1.13	5.84	2.73	2.12	3.44	2.18	3.51
UDP-glucose 6-dehydrogenase	0.50	0.74	0.76	1.09	0.18	0.16	0.21	0.11	0.97
vig-1	1.54	0.80	0.80	29.53	1.56	1.06	3.78	14.40	29.20
very large inducible GTPase-1	12.79	1.61	1.51	16.13	0.96	3.62	9.40	7.80	21.30
NF- κ B c-Rel subunit	1.20	1.16	0.82	2.97	1.24	2.52	2.10	1.22	9.35
Interleukin-8	1.43	2.01	0.51	12.70	1.54	2.91	92.87	1.65	8.94
tumor-necrosis factor α	3.91	1.77	4.48	24.17	2.26	2.71	70.50	0.29	2.30
cyclooxygenase-2	0.97	1.85	2.67	7.91	3.96	1.95	30.29	1.34	2.83
Interferon-induced GTP-binding protein MxI	0.93	0.46	1.32	51.18	0.78	0.60	8.99	16.39	67.30
Interleukin-1 β	13.67	2.78	4.63	5.67	5.75	14.38	79.54	1.92	6.73