

國立臺灣大學生命科學系

博士論文



Department of Life Science  
National Taiwan University  
Doctoral Dissertation

CpG 寡去氧核糖核酸誘導石斑魚免疫反應及  
其在發展虹彩病毒疫苗上的應用

Immunostimulatory Effect of CpG Oligodeoxynucleotide  
in Grouper and its Application in the Development of  
Anti-iridovirus Vaccine

莊翔傑

Hsiang-Chieh Chuang

指導教授：羅竹芳 博士

邱品文 博士

Advisor: Chu-Fang Lo, Ph.D.

Pinwen Chiou, Ph.D.

中華民國 104 年 10 月

October, 2015



國立臺灣大學博士學位論文  
口試委員會審定書

CpG 寡去氧核糖核酸誘導石斑魚免疫反應及其在  
發展虹彩病毒疫苗上的應用

Immunostimulatory Effect of CpG Oligodeoxynucleotide  
in Grouper and its Application in the Development of  
Anti-iridovirus Vaccine

本論文係莊翔傑君 (d97b41004) 在國立臺灣大學生命  
科學系、所完成之博士學位論文，於民國 104 年 10 月 28 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：

羅竹芳 邱品文 (簽名)  
(指導教授)

鄧定雄 周信佑

賴福順 邱品文

林翰佑 呂明偉

生命科學系 系主任 閔明源 (簽名)

## 誌謝

當我開始在電腦鍵盤上敲打誌謝詞的同時，也代表這趟求學旅程即將畫上句點。首先感謝郭欽明教授鼓勵與提攜我走入博士生涯，從此開啟我這幾年非常與眾不同的人生，感謝羅竹芳教授當初二話不說就收我為博士研究生，無條件支持我任何研究資源，讓我總能安心衝刺實驗，感謝邱品文老師在我求學的這幾年對我諄諄教誨從不嫌累，啟發我的研究思維與訓練我的實驗組織能力，本論文得以完成，由衷感謝以上三位恩師。

博士班期間歷經許多波折，最後終於能夠順利完成並取得學位；再次感謝羅竹芳教授與邱品文老師的全力支持與幫忙，尤其在我人生最低落時伸出援手，讓我有勇氣能夠繼續往前走，準備口試期間，還花費許多心力修正我的論文只為了讓我可以表現得更好，我想我永遠也忘不了老師在口試前一晚仍然挑燈夜戰到凌晨四點，就為了這個隔天要舉行博士論文口試的小伙子。感謝每一位前來擔任學生口試的委員們；郭光雄教授、周信佑教授、賴裕順副教授、呂明偉副教授以及林翰佑副教授，感謝您們提供許多珍貴的意見，更讓我學習到從事學術研究應有的嚴謹態度與創新精神，您們的提點，除了使本論文更加完整，也啟發我許多在研究過程從未思考過的邏輯概念，整場博士論文口試，著實讓學生又成長許多。

漫長的博士班求學生涯，感謝所有曾經提攜、鼓勵過我的師長，以及各位好朋友、好同學與學弟妹們的協助與陪伴。由衷感謝冉繁華老師不時勉勵我要堅持到底、鄭安倉老師提點了我許多為人處事的道理，還有許多老師對我的勉勵。感謝中研院臨海研究站 B206 實驗室的燕華、方堯、仁宏、筠庭以及其他曾經共事過的同伴，感謝國立台灣大學 818 實驗室的大家；俊彥、小康、怡婷、育萱、雪芳和讚吉還有無法一一細數的各位，感謝國立成功大學羅竹芳老師實驗室的各位同事們，讓我的博士班後期研究能夠順利完成，總而言之，謝謝每一位無論如何仍然願意挺我到底的你們。

最後感謝總是默默支持我的家人們；阿公和摯愛的雙親從小含辛茹苦把我們拉拔長大，姑姑們對我的疼愛，蘇先生、蘇太太對我的照顧，弟妹的鼓勵與打氣，岳父母對我的信心，老婆乃瑜的付出與陪伴，沒有你們就無法成就今天的莊博士，也謝謝你們陪我走過這幾年精彩的人生。


## 中文摘要



先天性免疫之誘發有賴於免疫細胞能夠有效辨識病原體上稱為「病原相關分子模板」(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)的特殊結構；主要藉由一類特殊受體 PRR ( pattern-recognition receptor )來辨認 PAMPs，進而激發宿主產生免疫反應。點帶石斑魚的類鐸受體 9 (TLR9) 具有兩種亞型 (isofrom)，分別為 gTLR9A 以及經由選擇性剪切(alternative splicing)後，在 C 端 TIR domain 缺少 box3 結構而形成的 gTLR9B。研究結果發現 CpG ODN 能夠經由 TLR9 的訊息傳遞途徑，誘導 IL-1 $\beta$  的產生，而 gTLR9A 與 CpG ODN 結合後，會再與其轉接子 gMyD88 結合，隨後招募下游的 IRAK4 與 TRAF6，而 gTLR9B 亦會與 CpG ODN 結合，但在與轉接子 gMyD88 結合後，則無法招募下游的 IRAK4、TRAF6，且經由 CpG ODN (CpG 寡去氧核糖核酸) 刺激後，gTLR9A 及 gTLR9B 會隨處理時間增加而有不同趨勢的表現特性，研究結果也推測 gTLR9B 應是扮演 negative regulate 的功能。

CpG ODN 被 TLR9 辨識後會啟動先天性免疫反應，而 class A ODN 主要是刺激漿細胞樣樹突細胞成熟和誘導 IFN $\alpha$  分泌，本研究藉由改變 class A ODN 的組成結構後，再探討其所造成之影響，在體外實驗結果證實若改變 central palindromic 序列、phosphorothioate 修飾或 3 端 poly-G 尾巴的結構後，最終均會影響 IL-1 $\beta$  的表現量，而改變 class A ODN 的組成結構會影響巨噬細胞吞噬活性與細胞內超氧陰離子的作用。本研究也發現 gTLR9A 及 gTLR21 (點帶石斑魚類鐸受體 21) 與 CpG ODN、GpG ODN 均能產生專一性結合，此點與哺乳動物相較之下，可知 gTLR9A 及 gTLR21 兩者對於辨識不同 ODN motifs 的管控並不嚴謹，而在活體實驗部分，也發現以 class A ODN1966 誘導 IL-1 $\beta$  表現的效果最佳，且 class A ODN 1966 無論是於本研究 *in vitro* 或 *in vivo* 的實驗結果，均發現其對誘導 IL-1 $\beta$  的表現有最佳效果。

進一步以人工合成 CpG ODN 作為佐劑，並探討其在點帶石斑魚的免疫作用功效與作用機制後發現，不活化石斑魚虹彩病毒 (iGIV) 疫苗搭配佐劑 ODN 1966 一同免疫點帶石斑魚後，再以不同病毒劑量進行攻毒實驗之結果顯示，注射 iGIV 疫苗或將其搭配不同劑量之 ODN 佐劑的組別，與 PBS 組相較之下，均可顯著降低虹彩病毒感染後所造成的死亡率，且呈現 dose dependent 的效果，若分析石斑魚虹彩

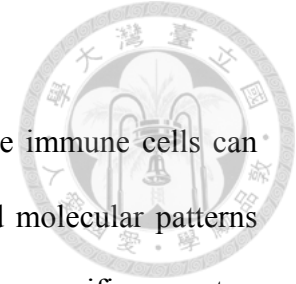


病毒 MCP 基因及 genomic DNA 表現量，也發現是呈現 dose dependent 降低的情況，顯示搭配 ODN 佐劑再免疫點帶石斑魚後，不僅能夠顯著降低虹彩病毒感染所造成的死亡率，更能降低魚體內所含的病毒量。另外，也發現 iGIV 疫苗本身即能提高石斑魚免疫後的抗體力價，若再添加低劑量之 ODN 佐劑使用，更能提升其力價，但過量則會呈現相反效果，推測可能與 ODN 在高濃度時會誘發其他免疫反應有關，因此本研究進一步分析免疫相關基因表現，發現除了在免疫後第一天即能開始誘導先天性免疫基因 gTLR9A、gIL-1 $\beta$ 、gTNF- $\alpha$  及 gMx 外，亦能在免疫後第七天開始誘導抗體的產生，gCD4 和 gCD8 在 iGIV 則是在疫苗免疫後第十四天有較高的表現量，而 gT-bet 和 gGATA-3 在 iGIV 疫苗免疫後第七天及第十四天的基因表現則呈現相反結果，且傾向誘發 Th1 的免疫反應途徑。

研究結果發現 iGIV 疫苗搭配適量的 ODN 佐劑使用，確實能夠顯著降低虹彩病毒感染後所造成的死亡率，及有效提高不活化病毒疫苗在免疫早期的抗病毒保護功效，同時也可顯著降低魚體內的病毒含量與提升其專一性抗體力價，再者，iGIV 疫苗除了能夠誘導先天性免疫基因之表現，也能在免疫後誘發毒殺性細胞和抗體參與抗病毒反應，本研究結果證實 iGIV 疫苗的抗病毒效果以及將其搭配 CpG ODN 佐劑免疫點帶石斑魚之可行性。

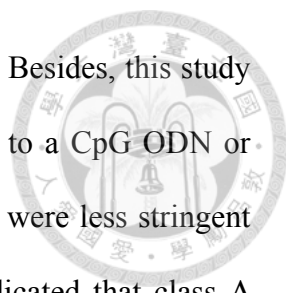
關鍵字: 類鐸受體9、類鐸受體21、虹彩病毒、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗、  
佐劑、CpG 寡去氧核糖核酸

## 英文摘要



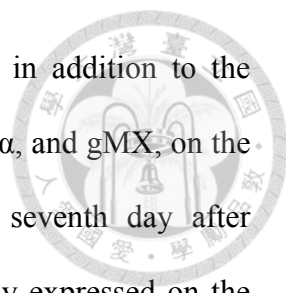
The induction of the innate immunity depends on whether the immune cells can effectively recognize specific structures called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on the pathogens. The immune cells mainly employ a specific receptor, pattern-recognition receptor (PRR), to recognize the PAMPs and stimulate the host immune response. The orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) has two TLR9 isoforms, namely gTLR9A and gTLR9B, which are formed via alternative splicing. The main difference between them is that in gTLR9B, the box3 structure is absent in the TIR domain of the C-terminus. Studies have found that CpG oligodeoxynucleotides (ODNs) can induce the production of IL-1 $\beta$  via the TLR9 signaling pathway. The binding of gTLR9A with a CpG ODN was followed by co-localization with the adaptor protein, gMyD88, and subsequent recruitment of the downstream IRAK4 and TRAF6. In contrast, gTLR9B binds to a CpG ODN but cannot recruit the downstream IRAK4 and TRAF6 after binding gMyD88. A further study also found that gTlr9A and gTlr9B possessed a differential expression profiles in a time-dependent manner after stimulated by CpG ODN. Therefore, it was speculated that gTLR9B played the role of a negative regulator.

The innate immune response is triggered after the recognition of CpG ODN by TLR9, and a class A ODN can stimulate the maturation of plasmacytoid dendritic cells and induce the secretion of IFN $\alpha$ . Hence, this study aimed at modifying the structure of a class A ODN to investigate the corresponding effects. The results from the in vitro experiments have confirmed that the modification of the central palindromic sequence, phosphorothioate, and 3'-end poly-G tail structure, affected the expression level of IL-1 $\beta$ . The structural changes of a class A ODN can also affect the phagocytic activity



of macrophages and the action of the intracellular superoxide anion. Besides, this study also found that both gTLR9A and gTLR21 could specifically bind to a CpG ODN or GpG ODN. When compared with mammals, gTLR9A and gTLR21 were less stringent in recognizing different ODN motifs. The in vivo experiments indicated that class A ODN 1966 was most effective in inducing the expression of IL-1 $\beta$ . Furthermore, both in vitro and in vivo experiments showed that class A ODN 1966 was the most effective in inducing the expression of IL-1 $\beta$ .

In this study, a synthetic CpG ODN was used as an adjuvant to further explore its effect and mechanism in the immune function of the orange-spotted grouper. Orange-spotted groupers were re-immunized with the inactivated Grouper Iridovirus (iGIV) vaccines in combination with the immunoadjuvant ODN 1966. The toxicity test using different doses of virus showed that after injecting the iGIV vaccine alone or the iGIV vaccine in combination with different doses of the ODN adjuvant, the mortality rate in the Grouper Iridovirus group was significantly reduced compared with that of the PBS group, in a dose-dependent manner. The analysis of the expression levels of the MCP gene and genomic DNA of the Grouper Iridovirus also showed a decrease in a dose-dependent manner, indicating that the co-immunization of orange-spotted groupers with the vaccine in combination with the ODN adjuvant significantly reduced mortality (a result of Grouper Iridovirus infection) as well as the viral load in the fish. The results in this study also showed that the iGIV vaccine could enhance the antibody titers after immunization of the groupers while the supplementation of ODN adjuvant at a low dose could further enhance the antibody titers of iGIV vaccine. However, excessive dosage of the ODN adjuvant would result in opposite effects, which might be related to the ODN-mediated induction of other immune responses at high concentrations. A further



analysis of the expression of immune-related genes revealed that in addition to the induction of innate immune genes, such as gTLR9A, gIL-1 $\beta$ , gTNF- $\alpha$ , and gMX, on the first day after immunization, antibodies were produced on the seventh day after immunization. Additionally, the gCD4 and gCD8 genes were highly expressed on the 14th day after immunization with the iGIV vaccine, while an opposite result was obtained for gT-bet and gGATA3 genes on the seventh and 14th day after immunization in the tendency to induce the Th1 response pathway.

Experimental results showed that the supplementing the iGIV vaccine with the ODN adjuvant in an appropriate amount could significantly reduce the mortality caused by the viral infection and improve the immune efficacy via early immunization with the inactivated virus vaccine. It could also effectively reduce the viral load in the fish and further enhance specific antibody titers. Furthermore, iGIV vaccine was found to induce the expression of innate immunity genes, and it might also induce cell apoptosis and involve antibodies in the antiviral responses after immunization. The above-mentioned points support the anti-viral efficacy of iGIV vaccines used in this study and the feasibility of supplementing the iGIV vaccine with a CpG ODN adjuvant for the immunization of the orange-spotted grouper.

**Key words:** TLR9, TLR21, Iridovirus, iGIV vaccine, adjuvant, CpG ODN



# 目 錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
第一章 文獻探討.....	1
1.1 免疫受體 PRRs 與類鐸受體 TLRs 之特性.....	1
1.2 不同類鐸受體 TLRs 的訊息調控機制.....	3
1.3 魚類的類鐸受體Toll like receptors, TLRs.....	4
1.4 類鐸受體Toll like receptor 9之特性.....	5
1.5 CpG oligodexynucleotides, CpG ODN 的特性與功能.....	6
1.6 CpG oligodexynucleotides, CpG ODNs 之類型.....	6
1.7 CpG ODNs 應用於魚類免疫與其作用機制.....	7
1.8 台灣地區石斑魚養殖現況.....	8
1.9 虹彩病毒簡介與病毒感染特性.....	9
1.10 應用於水產養殖過程之疫苗種類與不活化疫苗之開發...	10
1.11 不活化疫苗的作用機制.....	11
1.12 本論文研究動機與目的.....	12
第二章 材料與方法.....	13
2.1 實驗用點帶石斑魚.....	13
2.2 石斑魚腎臟細胞株(GK cell).....	13
2.3 寡去氧核糖核酸(Oligodexynucleotides, ODNs).....	13
2.4 表現質體構築(Construction of Expression Plasmids).....	13
2.5 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	13
2.6 去氧核糖核酸電泳分析(DNA Electrophoresis Analysis)....	14

2.7 洋菜膠體萃取(Gel Extraction).....	14
2.8 接合作用(Ligation).....	15
2.9 轉型作用(Transformation).....	15
2.10 小量質體萃取(Mini-extraction of Plasmids).....	15
2.11 基因定序分析(Sequencing).....	16
2.12 大量質體萃取(Maxi-extraction of Plasmids).....	16
2.13 細胞轉染(Transfection).....	17
2.14 雙冷光素酶活性分析(Dual-Luciferase Assay).....	17
2.15 初代細胞分離與培養(Primary Cell Isolate and Culture).....	18
2.16 體外試驗(In vitro Assay).....	18
2.17 IL1-β 測定(Determined of IL1-β).....	19
2.18 體內試驗(In vivo Assay).....	19
2.19 酵素免疫分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)...	20
2.20 吞噬活性試驗(Phagocytosis Assay).....	20
2.21 呼吸暴活性(Respiratory Burst Activity).....	21
2.22 共免疫沉澱分析(Co-Immunoprecipitation).....	21
2.23 去氧核糖核酸與受體接合試驗(DNA and Receptor Binding Assay).....	22
2.24 西方點墨法(Western Blotting).....	23
2.25 疫苗實驗設計(Experimental Design of Vaccine).....	23
2.26 Total RNA 萃取(Extraction of Total RNA).....	24
2.27 互補DNA之合成(Synthesis of Complementary DNA).....	24
2.28 基因體 DNA 萃取(Extraction of genomic DNA).....	25
2.29 即時定量 PCR 分析(Real-time Quantitative PCR).....	25
2.30 病毒增殖(Multiplication of Virus).....	26
2.31 病毒力價測定(Virus Titration).....	26



2.32 石斑魚虹彩病毒分離與純化(Isolation and Purification of Grouper Iridovirus).....	27
2.33 不活化石斑魚虹彩病毒製備(Preparation of Inactive GIV)....	27
2.34 病毒攻讀實驗設計(Experimental Design of Virus Challenge).28	
2.35 統計分析(Statistical Analysis).....	28
第三章 結果.....	29
第一節、探討 CpG ODN 誘發點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑.29	
1.1 分析點帶石斑魚 TLR9 RNA 選擇性剪接結果與組織表現情況.....	29
1.2 設計並篩選出能透過點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑並誘導下游基因表現之 ODN.....	29
1.3 不同型態 ODNs 於不同濃度處理對於誘導 IL-1 $\beta$ 啟動子表現之差異.....	30
1.4 探討於不同處理時間以不同濃度的 ODN 1214 處理石斑魚腎臟細胞後，細胞激素 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	30
1.5 點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 辨識 CpG ODN 1214 之分析.....	31
1.6 點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 共免疫沉澱分析.....	31
1.7 分析點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 分別與其轉接子 gMyD88 結合後，與下游蛋白間相互關係之差異分析	32
1.8 ODN 1214 以包埋方式處理後，藉由胞噬作用使其作用於石斑魚腎臟細胞後，比較於不同處理時間，gTLR9A 及 gTLR9B 表現量之差異以及與 IL-1 $\beta$ 之相關性.....	32
1.9 點帶石斑魚 TLR9 訊息調控機制.....	33

第二節、探討 class A CpG 寡核糖核酸之作用與如何調節點帶石斑魚免疫反應.....	33
2.1 以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞，探討對於誘導 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	33
2.2 以不同濃度 ODN1966 處理石斑魚腎臟細胞，並於不同時間點檢測 IL-1 $\beta$ 之表現.....	34
2.3 於石斑魚腎臟細胞及從點帶石斑魚頭腎組織分離出之巨噬細胞，利用不同組成結構之 ODNs 處理後，比較所誘導之 IL-1 $\beta$ 含量之差異.....	35
2.4 分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，吞噬活性之差異.....	36
2.5 分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，超氧陰離子表現之差異.....	36
2.6 探討 CpG 和 GpG ODN 與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR21 接合反應.....	36
2.7 於點帶石斑魚注射不同組成結構之 ODNs 後，檢測並比較 IL-1 $\beta$ 之誘導效果.....	37
第三節、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑對於點帶石斑魚抗病毒保護效果之探討.....	37
3.1 測試以石斑魚虹彩病毒進行感染實驗之最適劑量.....	37
3.2 檢測不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後的抗病毒保護效果.....	38
3.3 探討不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑後免疫魚隻，對於抗體生成力價之差異.....	39
3.4 探討不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫	

點帶石斑魚後，相關免疫基因之表現情況.....	40
3.4.1 免疫後點帶石斑魚 gTLR9A 基因之表現情況.....	40
3.4.2 免疫後點帶石斑魚 gIL-1 $\beta$ 基因之表現情況.....	41
3.4.3 免疫後點帶石斑魚 gTNF- $\alpha$ 基因之表現情況.....	41
3.4.4 免疫後點帶石斑魚 gMx 基因之表現情況.....	42
3.4.7 免疫後點帶石斑魚 gCD4 基因之表現情況.....	42
3.4.8 免疫後點帶石斑魚 gCD8 基因之表現情況.....	43
3.4.5 免疫後點帶石斑魚 gT-bet 基因之表現情況.....	43
3.4.6 免疫後點帶石斑魚 gGATA-3 基因之表現情況...	44
第四章 討論.....	46
第一節、探討 CpG ODN 誘發點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途 徑.....	46
第二節、探討 class A CpG 寡核糖核酸之作用與如何調節點帶石斑 魚免疫反應.....	49
第三節、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑 對於點帶石斑魚抗病毒保護效果之探討.....	53
第五章 參考文獻.....	60

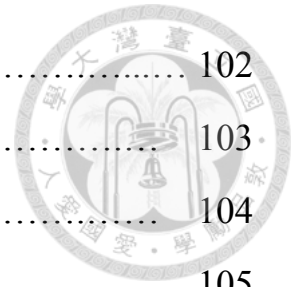
## 圖目錄

圖一、點帶石斑魚 TLR9 RNA 選擇性剪接與組織表現之分析.....	75
圖二、不同型態之 ODNs 作用於石斑魚腎臟細胞後，誘導 IL-1 $\beta$ 及 Mx 基因表現量之差異.....	76
圖三、不同型態 ODNs 於不同濃度處理對於誘導 IL-1 $\beta$ 啟動子表現之 差異.....	77
圖四、探討於不同處理時間以不同濃度的 ODN 1214 處理石斑魚腎臟 細胞，細胞激素 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	78
圖五、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 辨識 CpG ODN 1214 之分析	79
圖六、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 共免疫沉 澱分析.....	80
圖七、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 分別與其轉接子 gMyD88 結合 後，與下游蛋白相互關係之差異分析.....	81
圖八、ODN 1214 以包埋方式處理，再藉由胞噬作用使其作用於石斑魚 腎臟細胞後，比較於不同處理時間，gTLR9A 及 gTLR9B 表現 量之差異.....	82
圖九、ODN 1214 以包埋方式處理，再藉由胞噬作用使其作用於石斑魚 腎臟細胞後，於不同處理時間分析 IL-1 $\beta$ 之含量.....	82
圖十、繪述點帶石斑魚 TLR9 之訊息調控機制.....	83
圖十一、分別以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞，並探討 其對於誘導 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	84
圖十二、以不同濃度 ODN 1966 處理石斑魚腎臟細胞後，檢測 IL-1 $\beta$ 之表現.....	85
圖十三、於石斑魚腎臟細胞以 ODN 1966 處理後，於不同時間點檢測 IL-1 $\beta$ 之表現.....	86



圖十四、以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞，並探討其對於誘導 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	87
圖十五、分別以不同組成結構之 ODNs 處理自點帶石斑魚腎臟所分離出的巨噬細胞，並探討其對於誘導 IL-1 $\beta$ 表現之差異.....	88
圖十六、分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，吞噬活性之差異.....	89
圖十七、分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，超氧陰離子表現之差異.....	90
圖十八、探討 CpG 和 GpG ODN 與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR21 接合反應.....	91
圖十九、探討點帶石斑魚 TLR3 與 Poly (I:C) 之接合反應.....	92
圖二十、於點帶石斑魚注射不同組成結構之 ODNs 後，檢測並比較 IL-1 $\beta$ 之誘導效果.....	93
圖二十一、點帶石斑魚以不同劑量石斑魚虹彩病毒進行感染後之每日累積死亡率.....	94
圖二十二、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後的抗病毒保護效果.....	95
圖二十三、病毒感染後二十八天仍存活魚隻 MCP 基因表現情形...	96
圖二十四、病毒感染後二十八天仍存活魚隻 MCP genomic DNA 基因表現情形.....	97
圖二十五、以不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑後免疫魚隻對於抗體生成力價之影響.....	98
圖二十六、免疫後點帶石斑魚 gTLR9A 基因之表現情形.....	99
圖二十七、免疫後點帶石斑魚 gIL-1 $\beta$ 基因之表現情形.....	100
圖二十八、免疫後點帶石斑魚 gTNF- $\alpha$ 基因之表現情形.....	101

圖二十九、免疫後點帶石斑魚 gMx 基因之表現情形.....	102
圖三十、免疫後點帶石斑魚 gCD4 基因之表現情形.....	103
圖三十一、免疫後點帶石斑魚 gCD8 基因之表現情形.....	104
圖三十二、免疫後點帶石斑魚 gT-bet 基因之表現情形.....	105
圖三十三、免疫後點帶石斑魚 gGATA-3 基因之表現情形.....	106





## 表目錄



表一、本研究所使用之 ODNs 序列相關資訊.....	107
表二、本研究所使用之引子與其序列相關資訊.....	108
表三、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚 後，抗病毒保護效果.....	109



### 1.1 免疫受體 PRRs 與類鐸受體 TLRs 之特性

先天性免疫系統最初是藉由其 germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs) 辨識外來入侵的微生物；免疫受體 (PRRs) 能夠辨識微生物之特殊分子標記，即病原相關分子模板 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 以及來自宿主細胞受損時所產生的內生性危險訊號之損傷相關分子模板 (damage associated molecules patterns, DAMPs)。當免疫受體辨識到其專一性之分子模板時，會啟動下游訊息傳遞途徑並活化先天性免疫反應，然後進一步誘導與發炎反應相關的細胞發炎激素 (inflammatory cytokines)、第一型干擾素 (type I interferon, IFN) 及其他介質 (mediators) (Kawasaki and Kawai, 2014)，這些免疫反應過程不只會促使宿主抵禦外來微生物之入侵 (如：發炎反應)，並能誘導抗原專一性之適應性免疫 (antigen-specific adaptive immune) 反應 (Janeway and Medzhitov, 2002)。

哺乳動物的 PRRs 可區分為幾種不同類型，包括 Toll-like receptors (TLRs)、RIG-I-like receptors (RLRs)、Nod-like receptors (NLRs)、AIM2-like receptors (ALRs)、C-type lectin receptors (CLRs) 與 intracellular DNA sensors (如：cGAS) (Akira *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2014)，前述免疫受體之中，TLRs 是第一個被鑑定出來且對其特性與作用機制有最深入之研究與了解的，目前在人類已被鑑定出十個 TLRs，包含 TLR1-TLR10，在小鼠已被鑑定出十二個 TLRs，包含 TLR1-TLR9、LR11-TLR13。

Toll receptors 最早是在果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 中被發現，與果蠅之腹背發生模式 (dorsal-ventral pattern) 有關，為一形態發生素 (morphogen) (Anderson *et al.*, 1985; Gerttula *et al.*, 1988)，1996年果蠅之Toll 分子 (DmToll) 與其訊息傳遞路徑之下游分子亦被發現在抗真菌的免疫反應中扮演重要角色 (Lemaitre *et al.*, 1996)。而在哺乳類則發現了一類與 Toll 相似的分子，稱作TLR，它們在免疫系統亦佔有重要地位 (Beutler and Rietschel, 2003; Janeway and Medzhitov, 2002)，Toll 與 TLR之訊息傳遞途徑有極相似性，兩者在演化上應是來自共同分子 (Lemaitre and Hoffmann, 2007)，而哺乳類第一個被鑑定出來的TLR是人類的TLR4，其與果蠅的Toll 1屬於同源基因(orthologue) (Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998)，之後

TLRs陸續被發表在其他不同種類的脊椎動物(Roach *et al.*, 2005)。

TLRs 位於細胞表面 (cell surface) 或細胞內隔室 (intracellular compartments)，如:內質網 (endoplasmic reticulum, ER)、核內體 (endosome)、溶小體 (lysosome) 或是內體性溶酶體 (endolysosome)，可辨識不同或是部分相同的 PAMPs，如:脂質 (lipid)、脂蛋白 (lipoprotein)、蛋白質 (protein) 與核酸 (nucleic acid)。Toll/TLRs 是一種跨膜蛋白質(type I transmembrane proteins)，其胞外部份 (extracellular domain) 含有許多 leucine-rich repeat (LRR) 的區域，專司與 PAMPs 的結合，呈現類似馬蹄形 (horseshoe-like) 的結構特徵，而胞內部份 (intracellular domain) 則是一段具有調控下游訊息傳遞功能的 Toll/interleukin-1 receptor domain (TIR)。

TLRs 能夠辨識它們專一的 PAMPs 或是 DAMPs，並與共同受體 (co-receptor) 或是附帶分子 (accessory molecule) 形成同型二聚體 (homodimer) 或是異型二聚體 (heterodimer) (Botos *et al.*, 2011)。TLRs 與 PAMPs 或 DAMPs 結合後，能夠招募下游的轉接分子(TIR domain-containing adaptor protein)，如: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) 或 TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )，並啟動下游訊息傳遞途徑，激活 NF $\kappa$ B、IRFs 或是 MAP kinases 進而調節細胞激素 (cytokines)、趨化素 (chemokines) 與第一型干擾素 (type I IFNs) 的表現，以達到保護宿主抵抗微生物感染的功用。

TLRs 存在先天性免疫細胞中，例如: 樹突狀細胞 (dendritic cells, DCs)、巨噬細胞 (macrophages) 以及一些非免疫細胞，如: 纖維母細胞 (fibroblast cells) 與上皮細胞 (epithelial cells)，依其座落於細胞的所在位置而區分為兩大次家族 (subfamilies)，包含位於細胞表面的 TLRs (cell surface TLRs) 與位於細胞內的 TLRs (intracellular TLRs)；前者包括 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR10，而後者則坐落於核內體 (endosome)，包括 TLR3、TLR7、TLR8、TLR9、TLR11、TLR12 和 TLR13 (Celhar *et al.*, 2012; Kawai and Akira, 2010a)。


位於細胞表面的 TLRs 能夠辨識微生物的膜上組成物，如:脂質 (lipid)、脂蛋白 (lipoprotein)、蛋白質 (protein)，其中 TLR2 與 TLR1 或 TLR6 會形成異型二聚體 (heterodimer)，能夠辨識不同 PAMP，包括脂蛋白 (lipoproteins)、肽聚糖 (peptidoglycans)、脂磷壁酸 (lipotechoic acids)、酵母聚糖 (zymosan)、甘露聚糖

(mannan) 和 tGPI-mucin (Kawai and Akira, 2010a)。TLR4 能夠辨識細菌的 LPS (lipopolysaccharide)，TLR5 能夠辨識細菌的鞭毛 (flagellin) (Akira *et al.*, 2006)，TLR10 在小鼠屬於偽基因 (pseudogene)，主要是插入了終止密碼 (stop codon)，但是人類的 TLR10 會與 TLR2 共同合作去辨識李氏桿菌 (*listeria*) (Regan *et al.*, 2013)，也有研究發現 A 型流感病毒 (influenza A virus) 會被 TLR10 所辨識 (Lee *et al.*, 2014)。

位於細胞內的 TLRs 能夠辨識從細菌或病毒所衍生出的核酸 (nucleic acids) 或宿主本身的核酸，如：自體免疫 (autoimmunity) (Blasius and Beutler, 2010)。TLR3 能夠辨識病毒的雙股 RNA (viral double-stranded RNA, dsRNA)、小型干擾 RNA (small interfering RNAs) 與從受損細胞中所衍生出的自體 RNAs (self-RNAs) (Bernard *et al.*, 2012; Takemura *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2007)。TLR7 主要在漿細胞樣樹突細胞 (plasmacytoid DCs, pDCs) 表現，能夠辨識病毒的單股 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)，在傳統樹突細胞 (conventional DCs, cDCs) 中，能夠辨識 B 群鏈球菌 (*streptococcus B*) 的 RNA (Mancuso *et al.*, 2009)。人類的 TLR8 能夠辨識病毒與細菌的 RNA (Guiducci *et al.*, 2013)。TLR9 能夠辨識細菌或病毒的 DNA，主要是由於細菌或病毒 DNA 含有未甲基化的 CpG 雙核甘酸序列 (unmethylated CpG-DNA motifs)，而 TLR9 也被發現能夠辨識瘧原蟲色素 (hemozoin)；瘧原蟲色素是由惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*) 所產生的，是一種不溶的結晶狀物質，來自於消化分解宿主血紅素後的產物 (Coban *et al.*, 2010)。TLR11 坐落於內體性溶酶體 (endolysosome)，能夠辨識鞭毛 (Mathur *et al.*, 2012)。TLR12 則表現於骨髓細胞 (myeloid cells)，並與 TLR11 有高度相似性，能夠辨識弓漿蟲 (*Toxoplasma gondii*) 的組裝抑制蛋白 (profilin) (Koblansky *et al.*, 2013)，會形成同型二聚體 (homodimer) 或與 TLR11 形成異型二聚體 (heterodimer) (Andrade *et al.*, 2013; Broz and Monack, 2013)。TLR13 能夠辨識細菌的 23S rRNA (Oldenburg *et al.*, 2012)。

## 1.2 不同類鐸受體 TLRs 的訊息調控機制

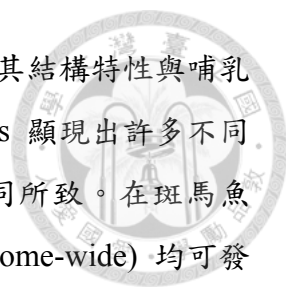
TLRs 在細胞內具有 Toll/interleukin-1 receptor domain (TIR) 的特性；受到配體 (ligands) 刺激後，TLRs 會去招募下游不同的轉接蛋白 (adaptor)，如：MyD88、



Mal (MyD88-adaptor-like)、TRAM (TRIF-related adaptor molecule) 與 TRIF，然後經由受體 TIR domain 與轉接蛋白之 TIR domain 相互影響後而啟動訊息傳遞途徑，除了 TLR3，大部份的 TLRs 與其配體結合後會招募 MyD88，再活化 MyD88 依賴訊息傳遞途徑 (MyD88-dependent signaling pathway)，而在 TLR2 與 TLR4 的訊息傳遞過程中，MyD88 需再與 Mal 協同合作後，才能進一步促進並活化其訊息傳導途徑。MyD88 被活化後會與 IRAKs (interleukin-1 receptor-associated kinase) 連結，再影響 TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)；TRAF6 是 E3 ubiquitin ligase，催化 Ubc13 和 Uev1A 形成複合物 (complex)，轉而活化 TAK1/TAB1/TAB2/3 複合物，然後磷酸化 I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\beta$  與 MAP kinase (MAPKs)，而 IKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$  和 NEMO (NF $\kappa$ B essential modulator) 複合物的活化使得 I $\kappa$ B 被降解，隨後 NF $\kappa$ B 就會轉位 (translocation) 至核內，激活 NF $\kappa$ B 的轉錄，而 MAP kinase 的活化作用是相當重要的，主要是能夠活化 AP-1，然後產生發炎反應細胞激素 (inflammatory cytokines) (Qian and Cao, 2013)。TLR3 與 TLR4 是活化 TRIF 依賴訊息途徑 (TRIF-dependent signaling pathway)；TLR4 與 TRIF 結合時需要另一轉接分子 TRAM，而 TRIF 會招募 TRAF6 或是藉由 RIP1 去活化 NF $\kappa$ B，其相似於 MyD88 依賴途徑。TRIF 也會去招募其他訊息複合物 TRAF3/TBK1/IKK-i 去磷酸化 IRF3 (interferon-regulatory factor 3)，進而誘導 type I IFN 基因的表現 (Kawai and Akira, 2010b)。

### 1.3 魚類的類鐸受體 Toll-like receptors, TLRs

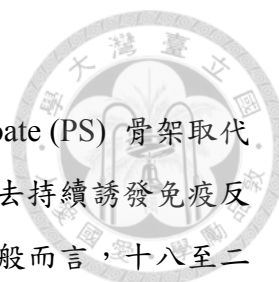
真骨魚類 (Bony fishes) 被認為具有原始的免疫系統，並且有不少科學家對牠們的先天性與適應性防禦機制感到興趣，魚類最早被發表關於 interleukin-1/Toll-like receptor 的研究是在 2000 年從虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 選殖出 interleukin-1 receptor 的 cDNA 序列，並發現其序列缺少了 cytosolic signal-transducing domain (Sangrador-Vegas *et al.*, 2000)，隨後 Subramaniam 等人在 2002 年也從大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) 選殖出了包含 C-terminal TIR domain 的 IL1R cDNA 序列 (Scapigliati *et al.*, 2004; Subramaniam *et al.*, 2002)，迄今至少有十七種 TLR (TLR1、2、3、4、5、5S、7、8、9、13、14、18、19、20、21、22、23) 在不同硬骨魚類 (teleost) 被鑑定出來 (Rebl *et al.*, 2010)。



魚類 TLRs 的特性和相關因子涉入其 signaling cascade，且其結構特性與哺乳動物的 TLR 系統具有高度相似性，相關研究也發現魚類的 TLRs 顯現出許多不同特徵，其差異可能源自於演化歷史以及牠們所棲佔的環境不同所致。在斑馬魚 (*Danio rerio*) 與河豚 (*Takifugu rubripes*) 的全基因組序列 (genome-wide) 均可發現 TLR 基因 (Jault *et al.*, 2004; Meijer *et al.*, 2004; Oshiumi *et al.*, 2003)，進一步比對這兩個物種的 TLRs profile 與人類的 TLRs orthologous，發現均有高度保守性，且硬骨魚類也具特有的 TLRs，此外，還有一些非哺乳動物的 TLRs 像是河豚與斑馬魚的 TLR14、21 和 22 已被確認並發表，TLR4b、19 以及 20 也發現只存在斑馬魚，點帶石斑魚已被確認並發表的 TLRs 包含 TLR1、TLR2、TLR3 (本實驗室發表)、TLR9 (本實驗室發表)、TLR21 和 TLR22。本實驗室目前主要研究與點帶石斑魚先天性免疫反應相關的一群可辨識外來病原菌侵襲，進而快速活化免疫反應的接受器之訊息傳遞機制，由於 PRRs 有許多成員，本研究選擇針對能夠辨識 CpG DNA 的 TLR9 作為研究對象，在點帶石斑魚中發現 TLR9 具有兩種亞型，包含 TLR9A 與 TLR9B (alternative splicing from)。

#### 1.4 類鐸受體 Toll like receptor 9之特性

類鐸受體 9 (TLR9) 能夠辨識未甲基化的 CpG 雙核甘酸序列 (unmethylated cytosine-phosphate-guanosine CpG dinucleotide) 並誘導免疫反應。發現 DNA 具有免疫活化作用最早是在 Bacille Calmette-Guerin (BCG) 中的 DNA 片段能夠誘導 type I interferon (IFN) 的產生，並可活化自然殺手細胞 (natural killer cell, NK)，具有抗腫瘤的特性 (Tokunaga *et al.*, 1984)。科學家研究發現細菌 DNA 是由於含有未甲基化的 CpG 雙核甘酸序列 (CpG motif)，使其可誘導免疫反應 (Krieg *et al.*, 1995a)，而雖然脊椎動物大部分的 CpG motif 序列均已被甲基化，但是若藉由人工合成含有 CpG motif 的寡去氧核糖核酸 (oligodeoxynucleotides, ODNs) 進行相關實驗，仍被證實其與細菌 DNA 所引起的作用機制相同，均具有免疫刺激的作用 (Yamamoto *et al.*, 1992)。哺乳動物的 TLR9 能夠辨識 CpG ODN，在雞則是缺乏 TLR9 但具有 TLR21，且雞的 TLR21 能夠辨識 CpG ODN，此點與哺乳動物 TLR9 能夠辨識 CpG ODN 相同 (Keestra *et al.*, 2010)，不過斑馬魚的 zebTLR9 和 zebTLR21 被證實能夠辨識不同特性的 CpG ODN (Yeh *et al.*, 2013)。




## 1.5 CpG oligodeoxynucleotides, CpG ODN 的特性與功能

在進行細胞實驗時，人工合成的 ODNs 必須以 phosphorothioate (PS) 骨架取代 phosphodiester (PO) 的部份，以避免進入細胞後被快速分解而失去持續誘發免疫反應的效用 (Boggs *et al.*, 1997; Krieg, 1996; Zhao *et al.*, 1996)，一般而言，十八至二十四個核苷酸長度的 ODNs 具有最佳效果，而且容易製造且價格便宜。人類的 TLR9 是在 B cells 和 plasmacytoid dendritic cells (pDCs) 中被表現 (Hornung *et al.*, 2002)，這些細胞受到 CpG DNA 的刺激後，能夠誘導先天性與適應性免疫反應，在針對 B cells 的相關研究中發現 CpG 與 TLR9 結合後，會藉由 NF $\kappa$ B 促進 B cell 分泌細胞激素，例如 IL-6、IL-10 和 IL-12 (Akira *et al.*, 2006; Klinman *et al.*, 1996; Krieg *et al.*, 1995a)，而 B cells 所分泌的 IL-6 和 IL-12 也會參與適應性免疫反應，例如 IL-6 可促進 B cells 的活化與增殖，並增加抗體產生 (Bernasconi *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2002)。

在先天性免疫系統中，存在 pDCs 的 TLR9 受到 CpG 刺激後會分泌細胞激素，包括 type I IFNs 和 TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha, TNF $\alpha$ ) (Asselin-Paturel *et al.*, 2005)，pDCs 除了能夠活化自然殺手細胞 (Ballas *et al.*, 1996)，也會誘導 TLR9 分泌 IL-12 和促進 T helper (Th) 0 分化成 Th1 (Hartmann *et al.*, 1999; Napolitani *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 1997)，IFN- $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa (IP10) 會誘導 Th1 遷移到 Lymph node 或 organs (Blackwell and Krieg, 2003; Vollmer *et al.*, 2004a)，隨後 B cells 會與 Th1 互相影響而分化成漿細胞 (plasma cells)，漿細胞具有產生抗體的能力，在適應性免疫扮演重要的角色，而 IFN- $\alpha$  則會促進 CD8-positive cytotoxic T lymphocyte 的反應 (Heit *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003)。

## 1.6 CpG Oligodeoxynucleotides, CpG ODNs 之類型

ODNs 的製備必須以 phosphorothioate (PS) 為骨架取代 phosphodiester (PO) 部份，以避免進入細胞後被 DNA 酵素 (DNase) 快速分解而失去效用，人工合成的 CpG ODNs 因不同的化學修飾可區分成四類，包含 Class A (又可稱為 type D) CpG ODN，具有自然存在的 phosphodiester 骨架伴同 palindromic CpG motifs 位於序列中間，且同時具有 phosphorothioate 骨架的 Poly (G) 序列位於序列 3' 和 5' 末端，這類的 CpG ODN 於 pDCs 能夠活化 TLR9 並誘導 IFN- $\alpha$  的產生，不過幾乎無法誘導



B cells 的增殖。Class B (又可稱為 type K) CpG ODN 其序列是整個由 phosphorothioate 骨架所組成，此類 ODN 能夠誘導 B cells 的增殖與活化，而在 pDCs 誘導 IFN- $\alpha$  的能力較低 (Krug *et al.*, 2001b)。Class C CpG ODN 則是包括一個或兩個 CpG motif (s) 伴同 phosphodiester 骨架位於序列的 5' 末端，以及包含一 palindromic 序列伴同 phosphorothioate 骨架位於序列的 3' 末端，這類的 CpG ODN 能誘導 B cells 的增殖以及在 pDCs 能夠誘導 IFN- $\alpha$  的產生，其特性介於 classes A 和 B 之間 (Hartmann *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2004b)。而 class P CpG ODN 具有兩個 palindromic motifs 伴同 phosphorothioate 骨架，具有高度誘導 IFN- $\alpha$  產生的能力，並會活化 NF $\kappa$ B (Samulowitz *et al.*, 2010)，在硬骨魚類 (teleost) 的相關研究中發現，CpG ODN 能夠活化不同程度之免疫反應，且於宿主受到病毒或細菌的攻擊時能夠提供適當之保護 (Carrington and Secombes, 2006)。

### 1.7 CpG ODN 應用於魚類免疫與其作用機制

目前 CpG ODN 廣泛應用於許多魚種，在牙鉾 (*Paralichthys olivaceus*) *in vitro* 及 *in vivo* 的相關實驗均證實人工合成的 CpG ODN 能夠提升吞噬後呼吸爆發 (respiratory burst) 的活性以及抗 *Edwardsiella tarda* 之能力 (Lee *et al.*, 2003)，也發現 CpG ODN 能夠誘導牙鉾 (*Paralichthys olivaceus*) 的相關免疫反應，抵抗細胞腫大病毒 (megalocytivirus) 的感染 (Zhou *et al.*, 2014)，在虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 的研究發現吞噬細胞與人工合成的 CpG ODN 預培養後，會明顯提升其吞噬活性，增加對 *Vibrio ordalii* 的抵抗力 (Nakatani *et al.*, 2007)，利用自大西洋鮭魚 (Atlantic salmon, *Salmo salar* L.) 脾臟和頭腎中分離的白血球，以 class A CpG ODN 和 class C CpG ODN 共同處理後，發現 IFN 會被大量的誘導出來，分離自大西洋鮭魚脾臟、血液和頭腎的白血球，以 class B CpG ODN 和 class C CpG ODN 共同處理後會刺激細胞的分化 (Strandskog *et al.*, 2007b)。將草魚的 (*Ctenopharyngodon idellus*) 吞噬細胞以 CpG ODN 處理後，能增強超氧陰離子 (superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 活性以及殺菌活性 (bactericidal activity) (Meng *et al.*, 2003)。也有研究證實將 10 種不同 ODN 串聯成 CpG rich 片段，再將此片段轉接到質體後，再將質體 DNA 注射到金魚 (*Carassius auratus*) 體內，發現其能夠明顯提升淋巴球的增殖以及白血球的活性 (Chen *et al.*,




2007)。再者，本實驗室先前研究也發現以 DNA 疫苗搭配 CpG ODN 1214 佐劑於點帶石斑魚利用肌肉注射方式進行免疫後，可顯著降低其感染神經壞死病毒後的致死率，且在相關免疫基因的表現量分析結果發現點帶石斑魚於免疫後兩星期 T-bet 基因 (Th1 特異性轉錄因子) 的表現量有顯著提高的趨勢，但 GATA-3 基因 (Th2 特異性轉錄因子) 的表現卻降低，可知 DNA 疫苗搭配 CpG ODN 1214 佐劑雖可顯著提高 Th1 的反應，卻不會因此而提升 pcMGNNV2 DNA 疫苗的保護效果 (Chen *et al.*, 2015)。

CpG ODN 能夠直接活化漿細胞樣樹突細胞 pDCs 與 B 細胞，有助於誘導先天性免疫與適應性免疫反應 (Bode *et al.*, 2011)；TLR9 辨識 CpG ODN 後，會刺激 B 細胞產生 IL-6、IL-12 (Kato *et al.*, 2004) 及分泌 IgM (Krieg *et al.*, 1995b)，且 B 細胞表面的 MHC-II、CD40、CD80 和 CD86 之表現量也會隨之上升，經過 CpG ODN 刺激的 B 細胞會增生並分化成漿細胞與記憶型 B 細胞 (Jung *et al.*, 2002)，TLR9 也能誘導 pDCs 產生 IL-1、IL-12、IL-6、IL-18 和 TNF- $\alpha$ ，並使細胞表面上的 CD40、CD54、CD80、CD86 和 MHC-II 的表現量增加。受 CpG ODN 刺激的 B 細胞與 pDCs 會誘導未分化的 T<sub>H</sub> 細胞分化成 T<sub>H</sub>1，並分泌 IFN- $\gamma$  與 IL-2，進而幫助 CD8<sup>+</sup> 前驅細胞完全分化成毒殺性 T 細胞 (CTL) (Bode *et al.*, 2011)，因此可利用 CpG ODN 當作佐劑進而促進 T<sub>H</sub>1 和毒殺型 T 細胞之反應，目前 CpG ODN 已廣泛應用在許多魚種，並證實能夠增加對於病原菌之抵抗力 (Carrington and Secombes, 2007; Jørgensen *et al.*, 2003; Jørgensen *et al.*, 2001)。

## 1.8 台灣地區石斑魚養殖現況

石斑魚屬高經濟價值的養殖魚種，主要分布於熱帶及亞熱帶海域，為台灣、中國大陸及東南亞地區重要的養殖經濟魚種，可為業者帶來極高的經濟效益，屬鮨科 (Serranidae)、石斑亞科 (Epinephelinae)、石斑屬 (*Epinephelus*)，全世界約有 400 多種，目前台灣地區以養殖點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 與龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 為主，另外雜交斑(如：珍珠龍膽)的繁養殖亦逐年增加當中。近年來由於氣候異常、環境汙染、水資源枯竭等問題導致養殖環境日益惡化，疾病問題成為石斑魚養殖產業發展的主要限制因子，另一方面，因為放養密度過高，魚體代謝廢物及長時間投餵的結果，也往往造成水質環境逐漸老化，使得魚




病問題接連爆發。目前石斑魚養殖常見的疾病主要可分為病毒性、細菌性與寄生蟲性疾病等，而在養殖過程受神經壞死病毒 (Nervous Necrosis Virus, NNV) (Chi *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 2003) 以及虹彩病毒 (Iridovirus) (Chou *et al.*, 1998a, b; Huang *et al.*, 2011) 的侵害，一旦感染往往造成大量魚苗或成魚死亡與影響業者的經濟收益，其中神經壞死病毒多好發於兩寸以下魚苗，且水溫越高，病徵出現越快，死亡率也越高，疫情於夏季達到高峰，若高密度飼養方式死亡率可高達80%以上，該病毒可感染多種石斑魚種，且魚苗運搬過程若受到緊迫就容易導致病原大量爆發，造成業者龐大損失，虹彩病毒則好發於夏、秋季兩季水溫偏高或季節交替時期，以兩寸以上之石斑魚苗為主要感染階段，若感染魚隻年齡越小死亡率越高，兩寸以下之魚苗感染率可達100%，平均致死率在60%以上，半斤以上之亞成魚在感染後仍可達30%以上的致死率，故對於疾病之防疫重要性不容忽視 (鄭安倉, 2012)。

### 1.9 虹彩病毒簡介與病毒感染特性

虹彩病毒科 (Iridoviridae) 由5個病毒屬所組成，分別為 *Iridovirus*、*Chloriridovirus*、*Lymphocystivirus*、*Ranavirus* 及 *Megalocytivirus*，為正二十面體 (icosahedral symmetry) 之雙股去氧核糖核酸病毒 (double-strand DNA virus)，直徑約界於 120 nm~350 nm 之間，可感染超過20種以上之魚種；*Iridovirus* 及 *Chloriridovirus* 主要感染昆蟲及無脊椎動物，*Megalocytivirus* 及 *Lymphocystivirus* 主要感染魚類，*Ranavirus* 主要造成魚類、爬蟲類及兩棲類的全身性嚴重感染，其中 *Ranavirus* 及 *Megalocytivirus* 會造成魚類高致死率，而 *Lymphocystivirus* 主要引起魚類上皮腫瘤，影響魚體外觀，但致死率不高 (Eaton *et al.*, 2007; Eaton *et al.*, 2010; Jancovich *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2005)。

由台灣養殖石斑魚所分離的虹彩病毒主要為台灣石斑虹彩病毒 (Grouper Iridovirus of Taiwan, TGIV) 和石斑虹彩病毒 (Grouper Iridovirus, GIV) 兩株 (Chao *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 1998a; Murali *et al.*, 2002)，依據其病理特徵與基因體分析之相關研究結果顯示，TGIV在分類上屬於 *Megalocytivirus* (Chao *et al.*, 2004)，而藉由 GIV 主要鞘蛋白 (major capsid protein, MCP) 基因定位、定序並且與其它虹彩病毒的同源基因比較後，顯示 GIV 的 MCP 基因與蛙病毒 (Frog virus 3, FV3) 的 MCP 基因



其核苷酸與胺基酸具有高度相似性，證實GIV是蛙病毒屬 (*Ranavirus*) 的其中一員 (Tsai *et al.*, 2005)。GIV於臨床的主要好發日齡為寸苗期，成魚期GIV的爆發大多合併其他細菌性疾病之感染，疾病的預防自仔魚後期至稚魚期即應進行主動性免疫策略，使得此免疫效力能在具有疾病感受性之日齡內，長期維持住免疫保護效果，達到養殖魚體的群體免疫力，進而抑制病毒的爆發。GIV之傳播途徑以水平感染為主，因此只要能夠控制魚體之群體免疫力，即能發揮其保護效果，因目前尚未有來自種魚之垂直性傳播途徑被證實，故種魚之傳染途徑尚未被評估研究 (黃淑敏, 2012)。

### 1.10 應用於水產養殖過程之疫苗種類與不活化疫苗之開發

現代化養殖管理的重點之一是疫苗的使用，而在面臨各種感染性疾病的侵襲之下，所幸硬骨魚類仍然具有如哺乳動物的免疫保護系統，因此可事先以疫苗接種的方式來預防感染，以保障養殖成果與收益。利用疫苗免疫魚體主要可分為三種方式，分別為注射、浸泡與口服，而目前魚用疫苗的種類主要也分為三種，第一種以是否包含活病原體而區分為死毒疫苗 (inactivated vaccine) 及活毒疫苗 (activated vaccine)，第二種是利用蛋白質工程技術所獲得之重組次單位疫苗 (recombinant subunit vaccine)，第三種是利用分子生物學技術所獲得之核酸疫苗 (DNA vaccine)，不同種類的魚用疫苗對於魚體的保護效果、所造成之副作用以及製造成本各有其優缺點。

已有研究證明嘉鱻魚與石斑魚以福馬林不活化虹彩病毒疫苗 (formalin-inactivated vaccines) 進行免疫後，對於嘉鱻虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSIV) 具有良好的保護效果 (Caipang *et al.*, 2006b; Nakajima *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 1997)，而(Ou-yang *et al.*, 2012a)的研究也指出僅施打 iSGIV 疫苗能夠降低點帶石斑魚攻毒後的致死率。

在先前研究報告顯示，不活化疫苗已廣泛被研究且應用於抗魚類病毒性疾病，例如病毒性出血敗血症 (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) (de Kinkelin *et al.*, 1995)、傳染性造血組織壞死症 (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) (Anderson *et al.*, 2008)、鯉魚春季病毒血症 (Spring viremia of carp virus, SVCV) (Tesarcik *et al.*, 1977)、傳染性胰臟壞死症 (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)

(Munang'andu *et al.*, 2012; Munang'andu *et al.*, 2013)、鮭魚胰腺病病毒 (Salmon pancreas disease virus, SPDV) (Lopez-Doriga *et al.*, 2001)、嘉臘虹彩病毒 (Red seabream iridovirus, RSIV) (Caipang *et al.*, 2006a)、新加坡石斑虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) (Ou-yang *et al.*, 2012b)、鯰魚病毒感染症 (Channel catfish virus, CCV)(Dixon, 1997)、鯉魚疱疹病毒第三型 (Cyprinid herpesvirus subtype-3, CyHV-3)(Yasumoto *et al.*, 2006)、病毒性神經壞死症 (Nervous necrosis virus, NNV)(Pakingking *et al.*, 2010; Pakingking *et al.*, 2009)、鮭貧血病毒 (salmon anemia virus, SAV) (Lauscher *et al.*, 2011)，上述研究均證實不活化疫苗具有抗病毒之保護效果。因此本研究有一部分是探討利用福馬林不活化虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑ODN 1966後，以其作為虹彩病毒疫苗佐劑之效用與可行性。

### 1.11 不活化疫苗的作用機制

不活化疫苗的作用機制是當抗原進到宿主抗原呈現細胞 (antigen presenting cells, APCs)後，會由外在 (extracellular) 路徑經由抗原內在化 (internalization) 進入核內體後再與溶小體融合形成 endosomal-lysosomal compartment，且具有 MHC-II 複合體，在 endosomal-lysosomal compartment 中，抗原會被降解成抗原胜肽 (peptides) 並組裝於 MHC-II 複合體上，之後抗原胜肽藉由 MHC-II complexes 呈現在細胞表面，這些帶有 MHC-II 複合體的細胞會遷移至淋巴結，接著 CD4<sup>+</sup>T 細胞上的 T 細胞接受器會辨識 MHC-II 複合體並且被活化並分化成 CD4<sup>+</sup>T 輔助細胞，進一步分泌細胞激素活化 B 細胞，之後再分化成漿細胞並分泌抗體，而另一方面，naïve B 細胞上的受器也能辨識從免疫部位遷移到淋巴結的外來抗原，經由降解後藉由 MHC-II 把抗原胜肽呈現給 CD4<sup>+</sup>T 細胞，進一步強化 B 細胞反應 (Munang'andu and Evensen, 2015)，這整個過程即稱為體液性免疫反應。

當抗原進到宿主抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APCs)後，會經由內在 (intracellular) 路徑，抗原被 proteasomes 降解成抗原胜肽 (peptides)，抗原胜肽運輸的過程是經由抗原呈現相關轉運蛋白 (transporter associated with antigen presentation, TAPs)，將抗原胜肽傳送到內質網 (endoplasmic reticulum, ER)，經過加工處理後，藉由 MHC-I (major histocompatibility complex class I) 分子將抗原胜肽呈現在細胞表面，之後這些抗原呈現細胞會遷移到淋巴結，CD8<sup>+</sup>T 細胞上的 T

細胞接受器便會辨識 MHC-I 複合體並且被活化，部分被活化的 CD8<sup>+</sup>T 細胞具有細胞毒殺功能，會辨識並殺死細胞表面有 MHC-I 複合體的細胞，故又稱為細胞毒殺性 T 細胞，這整個過程稱為細胞性免疫。



### 1.12 本論文研究動機與目的

台灣地區石斑魚養殖是一重要的經濟產業，為業者帶來經濟效益，然而在養殖過程中常容易受到虹彩病毒感染，往往造成養殖魚類大量死亡與漁民財物損失，因此針對石斑魚疾病的防禦，長久以來都受到重視，也有許多專家學者投入研究並有相當貢獻，若能再進一步研究探討其相關免疫調控機制，應能更加明瞭石斑魚的免疫調控過程，使疾病防禦之相關研究成果更能夠有效被應用。

目前相關研究已證實先天性免疫反應中有一群可辨識外來病原菌侵襲，進而快速活化免疫反應的接受器 (receptor)，稱為 PRRs，PRRs 家族有許多成員，本論文以目前於硬骨魚類較少被研究且能夠辨識 CpG DNA 的 TLR9 為主，探討其訊息傳遞途徑與其相關免疫調控機制，並進一步研究當改變 class A ODN 的組成結構特性後，是否會影響其誘發點帶石斑魚的相關免疫效果，最終期望以人工合成的 CpG ODN 當成佐劑，搭配不活化虹彩病毒疫苗免疫點帶石斑魚，探討其所誘發的相關免疫反應是否較單獨使用不活化虹彩病毒疫苗顯著，以評估利用不活化疫苗搭配 CpG ODN 佐劑之可行性，使養殖魚體經過免疫後，能夠有效提升其抗病力，改善目前仍好發於石斑魚養殖各階段的虹彩病毒感染症所造成的感染率或死亡率，突破產業發展瓶頸，以提高養殖戶的經營效益。

## 第二章、材料與方法



### 2.1 實驗用點帶石斑魚

自國立成功大學購入點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 後，飼養於中央研究院細胞與個體生物研究所臨海研究站之魚病區內，以半循環水養殖系統進行蓄養，每日定時投餵兩次，水溫控制於 24~26°C 之間，馴養至符合需求大小即進行實驗。

### 2.2 石斑魚腎臟細胞株 (GK cell)

石斑魚腎臟細胞株 (grouper kidney cell) 由國立宜蘭大學生物技術與動物科學系賴裕順副教授提供，約每 3 天以含有 10% FBS 的 L15 進行繼代培養，並作為本論文相關細胞實驗之材料。

### 2.3 寡去氧核糖核酸 (Oligodeoxynucleotides, ODNs)

寡去氧核糖核酸委由友和貿易股份有限公司代為合成，本論文所使用之 CpG ODN 自 PC0148 至 PC1966 共 20 條，其相關資訊分別列述於表一說明。

### 2.4 表現質體構築 (Construction of Expression Plasmids)

採用本實驗室已發表於美國國家生技資訊中心 NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 之點帶石斑魚 TLR9A (accession number : GQ358201)、TLR9B (accession number : GQ358202) 序列以及自行選殖之 MyD88 序列設計引子 (primers)，再委託百力生技公司製備合成。引子的設計概念是分別將 gTLR9A、gTLR9B 插入質體 pcDNA3.1-3flag 內 BamHI 的位置 (gTLR9A-3flag 和 gTLR9B-3flag)，gMyD88 則插入質體 pcDNA3.1-NF2-HA 內 BamHI/XhoI 的位置 (gMyD88-HA)，利用聚合酶連鎖反應技術擴增 DNA 分子，並以去氧核糖核酸電泳確認其大小後，將其與質體分別利用限制酶剪切，再將兩者同步進行接合作用，並完成轉型作用後，挑選單一菌落確認表現質體，若為預期大小，即送往基龍米克斯公司進行定序。

### 2.5 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

分別以 pcDNA3.1-3flag 及 pcDNA3.0-HA-NF2 當作模板，與自行設計之 gTLR9A、gTLR9B 和 gMyD88 專一性引子(列述於表二)，利用 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase 套組(New England Biolabs)進行聚合酶連鎖反應，使用機器為 Veriti®96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)，製備完成之預混液填充於 0.2 ml 微量試管中再放置於聚合酶連鎖反應基座，最後依據引子之最適熔點 (Tm) 與相關參數設定聚合酶連鎖反應條件。

## 2.6 去氧核醣核酸電泳分析 (DNA Electrophoresis Analysis)

配製 1.2% 洋菜凝膠 (agarose gel, Invitrogen, USA)，並將聚合酶連鎖反應之產物與 DNA 染劑充分混合 (6 倍 DNA loading dye)，隨後緩慢加入洋菜凝膠孔隙中並進行電泳，電泳條件為電壓 100 伏特持續 30 至 40 分鐘，將完成電泳反應的洋菜凝膠片置入含有溴化乙錠的染色盒染色約 5 至 10 分鐘，再以自來水進行退染，最後利用影像系統 (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad) 進行膠片顯像步驟。

## 2.7 洋菜膠體萃取 (Gel Extraction)

利用 QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN, Germany) 洋菜膠體萃取套組，將洋菜膠體於紫外光燈下以波長 312 nm 觀察所預期之 DNA 區帶，並將其切下置於 1.5 ml 微量試管中秤重待用。加入 DNA 洋菜膠片 3 倍體積的 QG buffer 於微量試管中，於 50°C 下作用 10 分鐘 (每隔 2~3 分鐘以手指輕彈微量試管使其能夠均勻混合)，待膠體完全溶解後放冷，再加入 DNA 洋菜膠片 1 倍體積的異丙醇後緩慢均勻混合，再將全部溶液移至已與 collection tube 組合完成的 QIAquick column 中，以轉速 13,000 x g 離心 1 分鐘，移除下層液，再加入 750 µl PE buffer，靜置室溫 3 分鐘，以轉速 13,000 x g 離心 1 分鐘，去除下層液，最後再以 13,000 x g 離心 1 分鐘 (確保已完全移除殘留酒精)，將 QIAquick column 移至另一新的 1.5 ml 微量試管中，並加入 15~20 µl EB buffer，靜置於室溫約 5 分鐘，以 13,000 x g 離心 1 分鐘，再蒐集微量試管內之 DNA 溶液以分光光度計 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo, USA) 測量 DNA 的濃度與品質，接著以洋菜膠體電泳檢測並確認產物，最後將所萃取的 DNA 溶液保存於 -20°C 中供後續實驗使用。



## 2.8 接合作用 (Ligation)

將萃取出之 DNA 片段與選定之真核表現載體 (pcDNA3.1-3flag) 進行接合反應。應是使用套組 pGEM®-T Easy Vector ligation kit (Promega, USA)，參照原廠操作手冊之建議按比例加入試量之 DNA、1  $\mu$ l 的 10 倍接合反應緩衝溶液 (10 倍 ligation buffer) 與 1  $\mu$ l DNA 接合酵素 (T4 DNA ligase)，DNA 與真核表現載體之接合反應莫耳數比建議為 1:1 與 1:3，充分混合並放置 4°C 冰箱中反應 16 小時後，即取出並進行轉型作用。

## 2.9 轉型作用(Transformation)

取保存於 -80°C 之勝任細胞 (*E. coli* DH5 $\alpha$ , Yeastern Biotech, Taiwan) 放置於冰上迴溫，再將完成接合作用之反應物取出加至已含勝任細胞之微量試管內，振盪 1 秒鐘後立即放置於冰上 5 分鐘，再利用乾式加熱器以 42°C 反應 45 秒，反應結束後將其放迴冰上，再利用塗抹棒將微量試管中之混合物均勻塗抹於固態培養基 (LB Agar, BD, USA) (固態培養基添加適量抗生素 Ampicillin 50 mg/ml, Sigma, USA)，於 37°C 培養箱中培養 16 小時，再挑選單一菌落先於 37°C 小量培養 1 小時 (以 50  $\mu$ l 之 LB/Amp 之培養液進行培養)，最後以基因專一性引子及載體上引子進行聚合酶連鎖反應，確認是否為陽性。

## 2.10 小量質體萃取 (Mini-extraction of Plasmids)

將經由 DNA 電泳判定為陽性反應之菌落分別接種並培養於含有 3 至 5 ml LB/Ampicillin 的養菌管(BD, USA)內，於 37°C 震盪培養 12-16 小時後進行質體萃取，使用套組為 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany)。首先將菌液收集於 2 ml 微量試管後以轉速 13000 x g 離心 5 分鐘 (Eppendorf, Germany)，捨棄上清液並重覆此步驟兩次，隨後加入 250  $\mu$ l buffer P1 (已添加 RNase A 和 LyseBlue reagent) 進行菌體復甦，再加入 250  $\mu$ l buffer P2 後，將微量試管上下清微晃動約 4 至 6 次使其充分混合 (因 buffer P1 含有 LyseBlue reagent，此反應過程溶液會轉變為藍色)，加入 350  $\mu$ l buffer N3 後將微量試管上下輕微搖晃約 4 至 6 次 (此反應過程混合液會轉變為無色)即以轉速 13000 xg 離心 10 分鐘，離心結束後將上清液移至 QIAprep spin column，再以轉速 13000 x g 離心 1 分鐘後捨棄下層濾液，並重置



QIAprep spin column 並加入已添加 99%酒精的 Buffer PE 0.75 ml, 隨後以轉速 13000 xg 離心 1 分鐘, 捨棄下層濾液再 13000 xg 空離 1 分鐘去除殘餘酒精, 最後加入 15 至 30  $\mu$ l 的 Buffer EB (elution buffer), 靜置 5 分鐘, 再以 13000 x g 離心 1 分鐘, 萃取出高純度質體, 最後以分光光度計 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo, USA) 測量質體 DNA 的濃度與品質, 篩選符合質量規定者進行最終定序確認。

## 2.11 基因定序分析 (Sequencing)

純化完成的質體 DNA 委託基龍米克斯生物科技股份有限公司進行定序, 定序後所得序列再利用美國國家生技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 所提供之核酸序列分析網頁介面軟體 Seq Web, 經由 Blast 分析軟體進行核酸及胺基酸比對分析。

## 2.12 大量質體萃取 (Maxi-extraction of Plasmids)

經序列比對分析後, 挑取已定序確認者接種於 3 ml LB/Ampicillin 培養液中, 於 37°C 震盪培養 12~16 小時, 隔日取 200  $\mu$ l 的新鮮菌液加入 100 ml LB/Ampicillin 培養液中, 於 37°C 繼續震盪培養約 8~10 小時後, 再加其移轉入含有 500 ml LB/Ampicillin 的培養液, 並於 37°C 培養 12~16 小時後, 即可進行大量質體之萃取。使用套組為 EndoFree® Plasmid Purification kit (QIAGEN, Germany), 首先將菌液分別倒入 500 ml 離心管 (Beckman, USA) 中, 以轉速 6000 x g 於 4°C 離心 15 分鐘後移除上清液, 加入 10 ml 的 buffer P1 (已添加 RNase A 和 LyseBlue reagent) 進行菌體復甦並充分懸浮沉澱物, 再加入 10 ml buffer P2 並將微量試管輕微晃動約 4 至 6 次 (因 buffer P1 含有 LyseBlue reagent, 故此步驟溶液會轉變為藍色), 靜置室溫 5 分鐘後加入 10 ml buffer P3, 並將微量試管輕微晃動約 4 至 6 次 (混合溶液轉變為無色), 接著將混合液倒入已架設完成之活塞筒內, 於室溫靜置 10 分鐘, 接著將推筒插入活塞筒內並緩慢地將向內推送以過濾雜質, 收集過濾後液體於 50 ml 離心管, 再加入 2.5 ml buffer ER, 輕微晃動約 10 次後置於冰上 30 分鐘。開始架設 QIAGEN-tip 500, 並加入 10 ml Buffer QBT 利用重力方式使其通過 QIAGEN-tip 500 而達到平衡作用, 待 30 分鐘後將前述所收集之液體加入 QIAGEN-tip 500 內, 使

其利用重力方式通過，使 DNA binding 在膜上，之後利用 30 ml Buffer QC 潤洗 QIAGEN-tip 500 共兩次，最後加入 15 ml Buffer QN 萃取 DNA，再加入 10.5 ml 的異丙醇沉澱後，以轉速 15,000 x g 於 4°C 離心 30 分鐘，離心後捨棄上層液，再加入 5 ml 的 endotoxin-free room-temperature 70%酒精 (利用套組提供的 the endotoxin-free water 配製而成)，並以 15,000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘後捨棄並確實去除上層液，最後放置於無菌操作台內中烘乾約 10 分鐘，再加入適量體積之 endotoxin-free Buffer TE 回溶 DNA，質體 DNA 萃取完成後以分光光度計 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo, USA) 測量其濃度與品質。

### 2.13 細胞轉染 (Transfection)

將 GK 細胞均勻種植於 12 well plate (Corning, USA) 中隔夜培養，使細胞密度 (cell/well) 於實驗進行前達到 95% 以上，轉染前分別配製 DNA 與轉染試劑 Poly-jet 預混液；先取適量 DNA (ODNs) 加入無血清的 L-15 中 (控制組為 endotoxic free water) 均勻混合備用，另一方面取適量 PolyJet 轉殖試劑 (PolyJet™ DNA In Vitro Transfection Reagent, SignaGen, USA) 加入無血清的 L-15 中均勻混合備用 (DNA: PolyJet = 1:4)。前述兩管預混液分別輕微震盪 1 秒後，隨即將 PolyJet 預混液加入 DNA 的預混液中並均勻混合後，震盪 1 秒再放置於室溫 15 分鐘備用。等待期間取出 12 well plate 中的細胞培養液，並以無血清 L-15 清洗細胞面 3 次，再加入適量之無血清 L-15 備用，最後分別加入適量 PolyJet 與 DNA 之預混液於每 well 中，再置於 28°C 恆溫培養箱進行轉染 1 小時後，以無血清 L-15 培養液清洗細胞面 2 次，最後加入 400  $\mu$ l 無血清 L-15 培養液至每一 well，再放回 28°C 恆溫培養箱，待實驗設定之時間點，即收集培養液與完成轉染之細胞，並進行後續分析實驗。

### 2.14 雙冷光素酶活性分析 (Dual-Luciferase Assay)

利用本實驗室所建立與篩選出的 Permanent GK cells (含 Rainbow trout IL-1 $\beta$  promoter)，並分別以不同濃度之 ODN 1214 (CpG)、1215 (GpC) 和 1216 (GpG) 處理 6 小時後，移除培養液，利用雙冷光素酶活性分析比較不同處理組別細胞表現 IL-1 $\beta$  表現之差異。使用套組為 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA)，進行分析前以 DEPC 水新鮮配製 1 倍的 Passive Lysis Buffer

(PLB)，而 Luciferase Assay Reagent II 試劑之配製是將套組中所附的 Luciferase Assay Buffer II 一次加入裝有 Luciferase Assay Substrate 的棕色瓶中，充分混合待其完全溶解後，分裝並儲存於-80°C 冰箱備用，每次實驗前取適量於室溫中回溶，Stop & Glo Reagent 之配製則是取套組中的 50 倍 Stop & Glo Substrate 200ul 一次加入 10 ml 的 Stop & Glo Buffer 中，充分混合均勻後，分裝並儲存於-20°C 冰箱備用，每次實驗前取適量於室溫中回溶。

收集待測樣品時須先移除培養液，並以 1 倍 PBS 清洗細胞面，以去除測量時可能影響判讀結果之背景值，然後於每一 well 中加入適量 PLB buffer 裂解細胞，於室溫作用約 15 分鐘，再將細胞裂解液轉移到微量試管中，並進行反覆冷凍解凍 2 次，以轉速 3,000 x g 於 4°C 離心 5 分鐘，取出上清液於另一微量試管中待測，測量前於專用白盤的每一 well 加入 20 µl 待測液並置於冰上，最後利用全自動光譜測定儀測量 *Firefly luciferase* (波長 560 nm) 與 *Renilla Luciferase* (波長 470 nm) 讀值，輸出實驗結果並進行後續分析。

## 2.15 初代細胞分離與培養 (Primary Cell Isolate and Culture)

首先將點帶石斑魚麻醉、解剖並取出頭腎 (head kidney) 組織，先以 75% 酒精消毒後立即將組織置於含有 1 倍綜合抗生素(Gibco™ Antibiotic-Antimycotic)而不含血清的 L15 中，利用解剖刀將組織切成小片狀，適力將細胞磨碎並經 100 µm Nylon 的 cell Strainer (Falcon, 352360)過篩於已含 1 倍綜合抗生素而不含血清的 L15 中，隨後利用不同濃度的 Percoll (GE Healthcare, 263663) 溶液進行梯度分離 (Percoll 原液使用前以 1.5 M 的 NaCl 配製成 100% percoll 溶液)，使用梯度下層為 50% percoll、中層為 30% percoll、上層為適量細胞懸浮液，以轉速 600 x g 慢速離心 40 分鐘 (Eppendorf Centrifuge 5702 R) 後，取出界於兩梯度間所呈現的白色條帶部分(嗜中性球或巨噬細胞)於另一微量試管，再利用適量且含 1 倍綜合抗生素而不含血清的 L-15 懸浮細胞後，以 400 x g 低速離心 10 分鐘清洗細胞，且重覆此步驟兩次，最後將細胞懸浮於含有 1 倍綜合抗生素以及 2% FBS 的 L15 培養液中，再等量種植於 12-well plate 並置於 28°C 培養，待隔日進行實驗。

## 2.16 體外試驗 (In vitro Assay)

將石斑魚腎臟細胞株 (GK cell) 等量(約 $4.0 \times 10^5$  cells/well)種植於12-well plate 中,使隔日細胞密度能達90%以上,並置於 $28^\circ\text{C}$ 恆溫培養箱,實驗前利用不含血清的L15清洗細胞面3次後,再分別加入預先配置好的各種ODNs試液(以不含血清之L15稀釋,控制組以二次水取代)或不同濃度之ODNs試液1 ml於well內,反應1小時後收集各組待測液至微量試管中,保存於 $-20^\circ\text{C}$ 待測,若採樣時間點為1小時後之組別,則於收集該組織待測液後,再以不含血清的L15清洗細胞面2次,於每well中分別加入400  $\mu\text{l}$  不含血清的L15,於設定時間點收集待測液並保存於 $-20^\circ\text{C}$ 等待分析。

### 2.17 IL1- $\beta$ 測定(Determined of IL1- $\beta$ )

取 96-well ELISA plate (Thermo, USA),將抗原 (culture medium)和標準曲線樣本  $2^{-1}$ (0.625  $\mu\text{g/ml}$ )~ $2^{-5}$ (0.039063  $\mu\text{g/ml}$ ) 於每 well 中加入 50  $\mu\text{l}$ ,再將其放置於無菌操作台風乾,隔日取出 96-well plate 並加入溶於 PBST 中的 5%脫脂奶粉 (skim milk),置於 $37^\circ\text{C}$ 恆溫箱反應1小時,倒出溶液並以PBST(含0.1% Tween 20)清洗四次後,於每 well 中加入 100  $\mu\text{l}$  的一級抗體 (anti-grouper IL1- $\beta$  抗體稀釋 10000 倍,抗體以 PBST with 5% skim milk 稀釋),再放置於室溫下反應 2 小時,之後倒出溶液並以 PBST (含 0.1% Tween 20) 清洗四次後加入二級抗體 (anti-rabbit IgG-HRP, Invitrogen, USA, 抗體稀釋 1000 倍),於室溫下反應 2 小時,之後再以 PBST (內含 0.1% Tween 20) 清洗四次後,加入 TMB 呈色試劑 (TetraMethylBenzidine, TMB, Invitrogen, USA),靜置室溫 10 分鐘後加入 100  $\mu\text{l}$  的 1N HCl (stop solution)終止反應,以 ELISA 測定儀 (Thermo, USA) 偵測 OD 450 nm 之吸光值。

### 2.18 體內試驗 (In vivo Assay)

實驗用點帶石斑魚 (Orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*) 購自於國立成功大學石斑魚育苗場,平均體重約 384 克,平日蓄養於 4 噸 FRP 桶內,水溫  $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ,鹽度  $32 \pm 1$  ppt,以人工方式每日定時定量投餵,利用半循環水系統養殖。

進行實驗之魚隻共分為 11 組,每組 6 尾魚,實驗前先以 MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma, USA)將魚麻醉以降低緊迫,再分別以腹腔注射最終濃度為 2  $\mu\text{M}$  的 ddH<sub>2</sub>O、ODN148、ODN 1966、ODN 2061、ODN 2062、ODN 2063、ODN 2064、ODN 2065、ODN 1942 和 ODN 1214,控制組魚隻未進行

注射，注射完畢將各組魚隻分別馴養於放置在 4 噸 FRP 桶的箱網內。於注射後第 6 及 24 小時每組採集三尾魚血液，以 3,000 x g 於 4°C 慢速離心 30 分鐘，抽取上層血清並保存於 -80°C 待測，進行 ELISA 分析前，先將血清以 1 倍 PBS 稀釋 250 倍後使用。



### 2.19 酵素免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

取 96-well ELISA plate (Thermo, USA)，將抗原 (inactivated GIV) 以 1 倍的 PBS 稀釋後於每 well 中加入 100 ng，再將其放置於無菌操作台風乾，隔日取出 96-well plate 並加入溶於 PBST 中的 5% 脫脂奶粉 (skim milk)，置於 37°C 恆溫箱反應 1 小時，倒出溶液並以 PBST (含 0.1% Tween 20) 清洗四次後，於每孔加入 50  $\mu$ l 經 250 倍稀釋後的血清，再於 37°C 恆溫箱反應 2 小時，倒出溶液並以 PBST (含 0.1% Tween 20) 清洗四次後，於每 well 中加入 100  $\mu$ l 的一級抗體 (anti-grouper IgM, 抗體稀釋 7000 倍)，再放置於 37°C 恆溫箱反應 1 小時，倒出溶液並以 PBST (含 0.1% Tween 20) 清洗四次後加入二級抗體 (anti-rabbit IgG-HRP, Invitrogen, USA, 抗體稀釋 1000 倍)，於 37°C 恆溫箱反應 1 小時，以 PBST (內含 0.1% Tween 20) 清洗四次後，加入 TMB 呈色試劑 (TetraMethylBenzidine, TMB, Invitrogen, USA)，靜置室溫 10 分鐘後加入 100  $\mu$ l 的 1N HCl (stop solution) 終止反應，以 ELISA 測定儀 (Thermo, USA) 偵測 OD 450 nm 之吸光值。

### 2.20 吞噬活性試驗 (Phagocytosis Assay)

吞噬活性試驗所使用之套組為 Vybrant™ phagocytosis assay kit (cat. no. V6694 molecular probes)。自點帶石斑魚取出頭腎 (headkidney) 組織並分離 macrophage (初代細胞培養)，接著分別將 100  $\mu$ l 不含血清的 L15 (負控制組) 及 100  $\mu$ l 細胞懸浮液 (正控制組和實驗組) 預培養在 96 孔盤中，每次實驗分別從三尾魚分離，每尾魚八重複，隨後將細胞置於 28°C 培養箱中貼附至隔天。實驗進行前將細胞培養液吸出，並用不含血清的 L15 清洗細胞面三次，再分別加入 100  $\mu$ l 不含血清的 L15 (負控制組和正控制組) 以及 100  $\mu$ l 預先配製好的 ODNs (實驗組) 於 96 孔盤中，置於 28°C 培養箱反應 1 小時，接著將培養液吸出，再用不含血清的 L15 清洗細胞面 2 次，並於每個 well 加入 100  $\mu$ l 不含血清的 L15，置於 28°C 培養箱反應 12 小時後

再將細胞培養液吸出，隨後加入已標記螢光之大腸桿菌 100  $\mu$ l (fluorescein-labeled Escherichia coli K-12 BioParticles, cat. no. life technologies co.) 至每個實驗 well，於 28°C 培養箱反應 2 小時，將每個實驗 well 的溶液吸出後，隨即加入 100  $\mu$ l 台盼藍 (trypan blue) 於每一實驗 well，於室溫中反應 1 分鐘後將其吸出，以螢光 reader (Thermo, USA) 偵測 480 nm 激發波長與 520 nm 放射波長。

## 2.21 呼吸爆活性 (Respiratory Burst Activity)

實驗所使用之樣本均來自三尾點帶石斑魚，分別取出頭腎 (head kidney) 組織並分離出 macrophage (初代細胞培養) 後，每尾魚以八重覆的方式將細胞 (100  $\mu$ l 之細胞懸浮液) 種植於 96-well plate 中，置於 28°C 培養箱培養至隔天。實驗進行前將細胞培養液吸出後，隨即加入 100  $\mu$ l NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma, cat. no. N6876) 以及 100  $\mu$ l Zymosan (Sigma, cat. no. Z4250)，放置室溫反應 30 分鐘後將反應液吸出，再加入 100  $\mu$ l 的 100% 甲醇 (methanol)，放置室溫反應 1 分鐘後將反應液吸出，最後以每次 100  $\mu$ l/well 的 70% 甲醇進行清洗三次，最後將 96-well plate 置於抽氣櫃內風乾約 2 小時後，隨即加入 140  $\mu$ l 的 DMSO (dimethyl sulphoxide, cat. no. 0231, amresco) 以及 120  $\mu$ l 的 2N KOH (cat. no. 3140-01, J. T. Baker) 後會呈現淡藍色反應結果，再以 ELISA reader (Thermo, USA) 偵測 OD 630 nm 吸光值。

## 2.22 共免疫沉澱分析 (Co-Immunoprecipitation)

HEK 293T 細胞平日以 DMEM+10%FBS 之培養液進行繼代，實驗進行前將細胞平均分養於 6-well plate，並置於 37°C 且含有 5% 二氧化碳的培養箱培養，隔日轉染前，以 1 倍 PBS 清洗細胞面兩次，再利用 Lipofectamine 2000 轉染試劑進行轉染，於轉染 6 小時後更換細胞培養液，再將其培養於 37°C 且含有 5% 二氧化碳的培養箱內，18 小時後將培養液吸出，收集分析樣品前以 1 倍的冰 PBS 清洗細胞面兩次後，於每 well 加入 200  $\mu$ l 的 NP40 lysis buffer (50 mM Tris pH7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Nonidet P40, 0.02% NaN<sub>3</sub>)；NP40 lysis buffer 含有額外添加的 1 mM PMSF 與 1 倍的 protease inhibitor cocktail (Sigma Cat.no. P-2714)，放置冰上 30 分鐘作用後，將細胞懸浮液轉移至微量試管中，以轉速 13,000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，再取上清液作為免疫沉澱分析之樣本。

取 50  $\mu$ l 約 1.5 mg 的 Dynabeads Protein G (invitrogen Cat.no.100.03D) 至 1.75 ml 的微量試管內，將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液，接著加入 monoclonal anti-FLAG (Sigma Cat.no. F3165) 與 monoclonal anti-HA (Sigma Cat.no. H9658) 各 5  $\mu$ g (抗體使用前須以 200  $\mu$ l PBS / Tween 20 進行稀釋)，於室溫反應 10 分鐘使抗體與 Protein G 結合，待反應完成後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液，再以 200  $\mu$ l 的 PBS / Tween 20 清洗，清洗後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液。清洗完成後進行 BS<sup>3</sup> cross-linked 步驟；首先以 200  $\mu$ l conjugation buffer (20 mM Sodium Phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 清洗 Ab-conjugated 磁珠兩次，並於第二次加完 conjugation buffer 後，將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液，再加入 250  $\mu$ l 的 5 mM BS<sup>3</sup>，於室溫均勻反應 30 分鐘後，接著加入 12.5  $\mu$ l 的 Quenching buffer (1 M Tris HCl pH 7.4)，置於室溫均勻混合 15 分鐘後以 200  $\mu$ l PBST (with 0.02% Tween 20) 清洗三次即完成 cross-linked 步驟 (每次清洗後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液)。

接著於微量試管中分別加入 580  $\mu$ l 的 cell lysates，於 4°C 反應 overnight 進行免疫沉澱目標抗原，隔日以 200  $\mu$ l 的 1 倍 PBS 清洗四次 (每次清洗後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液)，將未結合之抗原洗淨，最後將待測樣品加入 2 倍 SDS sample buffer 20  $\mu$ l，以 95°C 加熱 10 分鐘使抗原與磁珠分離，加熱後先於室溫下靜置，隨後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，保留上清液進行 SDS-PAGE 電泳分析。

### 2.23 去氧核糖核酸與受體接合試驗 (DNA and Receptor Binding Assay)

利用 Lipofectamine 2000 轉殖試劑分別轉染 gTLR9A-3flag (4  $\mu$ g)、gTLR9B-3flag (4  $\mu$ g)、gTLR21-3flag (4  $\mu$ g) 和 gTLR3-3flag (4  $\mu$ g) plasmid DNA 至已隔夜培養於 6-well 中的 HEK 293T 細胞 (控制組為未進行轉染之 HEK 293T 細胞)，轉染後 6 小時置換細胞培養液，且於轉染後 24 小時收集 cell lysates 待用。

實驗進行前分別將 cell lysates 與 3'-biotinylated phosphothioate-linked ODN 1966、2064、1214、biotin-polyIC 共同反應，接著再將其與 Dynabeads M-280 Streptavidin (life technologies co. cat. 11205D) (Streptavidin beads, 80  $\mu$ l blocking with

2% BSA and 0.1% Tween-20 in 1xPBS for 1 hour at 4°C)於 4°C 共同反應 30 分鐘，最後以 1 倍 PBS (containing 2% BSA and 0.1% Tween-20) 清洗四次 (每次清洗後將微量試管放置磁座上進行磁珠與上清液之分離，隨後移除上清液)，最後分別於待測樣品加入 2 倍 SDS sample buffer 20  $\mu$ l，以 95°C 加熱 5 分鐘後，再放置於磁座上使磁珠與液態之待測樣品分離，最後利用 SDS PAGE 及 western blot 技術進行分析。

## 2.24 西方點墨法(Western Blotting)

將完成 SDS-PAGE 電泳分離之膠片利用三明治法轉移至 PVDF membranes，再於室溫將 membranes 以 PBST (內含 5% skim milk) blocking overnight，利用 skim milk 可結合 membranes 上之剩餘黏性處，降低非專一性的結合。隔日，加入溶於 PBST (內含 0.1% Tween 20 以及 5% skim milk)的一級抗體 mouse anti-FLAG (Sigma cat.no. F3165)、mouse anti-HA (Sigma cat.no. H9658)、rabbit anti-MyD88、rabbit anti-IRAK4 (LifeSpan, cat.no. LS-C164429)、rabbit anti-TRAF6 (Novus, cat. no. NB600-976) 與 mouse anti-beta actin (Novus, cat. no NB600-501)，於室溫反應 2 小時後用 PBST (內含 0.1% Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，以降低背景值，再加入二級抗體 goat anti mouse IgG (horseradish peroxidase)或 goat anti rabbit IgG (horseradish peroxidase)並於室溫下反應 1 小時後，以 PBST (內含 0.1% Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，隨後立即加入受質 (Luminata™ Western HRP Substrates, Millipore, USA) 進行呈色反應，再利用影像系統 (BioSpectrum®UVP, USA) 進行偵測與顯影。

## 2.25 疫苗實驗設計 (Experimental Design of Vaccine)

實驗用點帶石斑魚 (Orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*) 購自國立成功大學石斑魚育苗場，平均體長約 4.60 $\pm$ 0.2 公分，平均體重約 1.60 $\pm$ 0.1 克，平日蓄養於 0.5 噸 FRP 桶內，水溫 24.5 $\pm$ 1°C，鹽度 30 $\pm$ 1 ppt，每日定時定點投餵飼料，並換水總水體二分之一，實驗用魚經過 5 天蓄養後，篩選平均體長約 4.75 $\pm$ 0.2 公分，平均體重 1.70 $\pm$ 0.1 克之魚苗進行實驗。

實驗進行前以 MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma, USA)將魚隻麻醉以降低其緊迫，實驗設計共 6 組，每組 60 尾魚，分別以腹腔注射



方式注射 1 倍 PBS、iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/fish)、iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 20 nM、iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 200 nM、iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 2  $\mu$ M，控制組未進行注射動作，完成注射後將魚隻繼續蓄養於 80L 水缸中，並於注射後第 0、7 和 14 天採集血液(每組隨機採集 6 尾)後，以 3,000 x g 於 4°C 離心 30 分鐘後分離血清，保存於 -80°C 待用，同時隨機採集各組 3 尾魚的頭腎、脾臟和胸腺組織，再利用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA) 萃取 total RNA。

## 2.26 Total RNA 萃取 (Extraction of Total RNA)

本研究係利用 TRIzol 試劑 (Invitrogen, USA) 進行樣品的 total RNA 萃取。首先加入適量 TRIzol 於細胞或組織，利用研磨方式將樣品均質(細胞樣品除外)，隨後靜置冰上 5 分鐘，再加入適量三氯甲烷 (chloroform)後，上下搖晃約 15 秒，靜置冰上 3 分鐘即進行離心 (以 13,000 x g 於 4°C 離心 15 分鐘)後，取上清液至另一新的 1.75 ml 微量試管，並添加適量異丙醇 (isopropanol)，充分混合後靜置冰上 10 分鐘即以轉速 13,000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，捨棄上清液，可發現白色沉澱物 RNA，最後加入適量 75% 酒精進行清洗；於加入後以轉速 10,000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，將 RNA 沉澱洗出，此步驟重複兩次，最後將含有 RNA 沉澱物的微量試管置於抽氣櫃風乾，再加入適量 DEPC (Diethylpyrocarbonate) 水 (RNase free) 並置於乾式加熱器以 65°C，10 分鐘回溶 RNA。

為避免 DNA 殘留，再將已回溶的 RNA 產物以 DNase (RQ1 RNase Free Dnase kit, Promega, USA)於 37°C 處理 30 分鐘後，重複操作一次 RNA 萃取流程，再利用分光光度計 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo, USA) 測量與檢測 RNA 的濃度與品質。

## 2.27 互補DNA之合成 (Synthesis of Complementary DNA)

利用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) 套組進行反轉錄互補股去氧核糖核酸之合成；依據其操作步驟首先定量 2  $\mu$ g RNA 為反應模板，取適量體積 total RNA、1  $\mu$ l 寡聚核苷酸 T (oligo dT)或 random primer 與適量體積的 DEPC 水添加至微量試管內，於乾式加熱器以 65°C 加熱 10 分鐘，放置冰上 5 分鐘，隨後加入反轉錄預混液 (每反應含有 4  $\mu$ l 5 倍 Transcriptor Reverse

Transcriptase Reaction Buffer、0.5  $\mu$ l Protector RNase Inhibitor、2  $\mu$ l 10 mM Deoxynucleotide Mix、0.5  $\mu$ l Transcriptor Reverse Transcriptase)，混合均勻後將其置於乾式加熱器以 50°C 加熱 60 分鐘，最後以 85°C 加熱 5 分鐘終止酵素反應即完成反轉錄互補股去氧核糖核酸合成步驟，將 cDNA 樣品儲存於 -20°C 備用。

## 2.28 基因體 DNA 萃取 (Extraction of Genomic DNA)

利用 TRIzol (Invitrogen, USA) 試劑進行基因體 DNA 之萃取；首先加入適量 TRIzol 於細胞或組織，並利用研磨方式使樣品均質後 (細胞樣品除外)，於 4°C 靜置 5 分鐘，隨即加入適量三氯甲烷 (chloroform)，並將樣品均勻混合使其作用約 15 秒後，以轉速 13000 x g 於 4°C 離心 15 分鐘，離心後將中間相 (interphase) 吸取至另一 1.75 ml 微量試管，再加入適量 100% 酒精 (若使用 1 ml TRIzol 進行 DNA 萃取，則加入 300  $\mu$ l 100% 酒精)，均勻混合後靜置室溫 3 分鐘後，以 2000 x g 於 4°C 離心 5 分鐘，取上清液至另一 1.75 ml 微量試管內，再加入適當比例之檸檬酸鈉/酒精溶液 (0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, pH 8.5) 後，靜置室溫 30 分鐘，每 10 分鐘將試管輕輕翻轉使其均勻混合，再以 2000 x g 於 4°C 離心 5 分鐘，移除上層液，並重覆此步驟兩次，隨後加入適量 75% 酒精 (若使用 1 ml TRIzol 進行 DNA 萃取，則加入 1.5~2 ml 的 75% 酒精)，靜置室溫 20 分鐘，每 10 分鐘將微量試管輕輕翻轉使其均勻混合後，以 2000 x g 於 4°C 離心 5 分鐘，移除上層液，將微量試管置於抽氣櫃內風乾殘存酒精後，加入 0.3~0.6 mL 的 8 mM NaOH，以 12,000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘移除不溶物質，將上層液轉移至新的微量試管內並儲存於 4°C 待用 (若需長期保存可加入 HEPES 緩衝溶液將 pH 值調整至 7~8，並在溶液中加入 EDTA 至最終濃度為 1 mM)。利用分光光度計 NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo, USA) 測量與檢測所萃取的 DNA 濃度與品質。

## 2.29 即時定量 PCR 分析 (Real-time Quantitative PCR)

本研究利用即時定量聚合酶連鎖反應技術分析點帶石斑魚注射疫苗後，其免疫組織內相關免疫基因的表現模式；首先配製反應所需預混液，包含 10  $\mu$ l SYBR green、6.8  $\mu$ l DEPC 水以及各 0.6  $\mu$ l (5  $\mu$ M) real-time PCR 專一性 primers，於 96 well plate 中，每 well 加入 18  $\mu$ l 預混液，再分別取 2  $\mu$ l (200 ng) 的 cDNA 作為 QPCR

反應模板以及標準曲線樣本 ( $10^{-3}$ ~ $10^{-9}$ )，總反應體積為 20  $\mu$ l，每樣品三重覆，上機前將 96 well plate 置於盤式離心機，利用 500 x g 離心 5 分鐘使管壁上之殘留液體集中，再將其置於 real-time PCR 反應器 (CFX Connect™ Real-Time system, BIO-RAD, USA)，設定反應條件為熱啟動反應 95°C 反應 3 分鐘、擴增反應重覆 40 個循環，每循環為 95°C 反應 10 秒、55°C 反應 30 秒、解離曲線先冷卻至 65°C 反應 5 秒再緩慢升溫至 95°C 後連續偵測螢光值，判斷擴增的產物是否皆為相同之解離溫度。完成反應後於 CFX Connect™ Real-Time system software 進行數據分析並製作標準曲線，即可得知各反應  $C_T$  值，再以  $2^{-(\text{target gene 之 } C_T \text{ 減 beta-actin } C_T \text{ 值})}$  計算，所得數值利用 *t*-test 檢測實驗組與對照組是否有顯著差異，當 *p* 小於 0.05 時視為有顯著差異。

### 2.30 病毒增殖 (Multiplication of Virus)

將 GK 細胞培養於 T175 培養皿中，控制細胞數使其於 24 小時內能生長至 95% 左右，隔日進行病毒感染前，先以不含血清的 L-15 培養液清洗細胞面 3 次後，再依序加入於實驗前已配製完成之病毒液 (最終 MOI 設定為 0.001，每 flask 加入的病毒液體積為 2.5 ml)，於 28°C 細胞培養箱進行同步感染 1 小時後，隨即抽出病毒液並於每一培養皿加入含有 2% FBS 的 L-15 培養液 30 ml，再放置回 28°C 培養箱，並開始觀察細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE)，當細胞 CPE 現象已達 90% 以上，即利用細胞刮勺將殘存之細胞刮下，隨後抽出並集中各 flask 內的病毒液，以低速離心 2,500 x g 於 4°C 離心 5 分鐘去除細胞碎片後，取上清液並以 0.45  $\mu$ m 過濾，再取適量病毒液進行 TCID<sub>50</sub> 測試，其餘分裝並儲存於 -80°C 備用。

### 2.31 病毒力價測定 (Virus Titration)

將 GK 細胞等量分養至 96 well (Corning, USA) 中，每 well 約接種  $2 \times 10^4$  顆細胞，隔日待細胞生長至九分滿即進行病毒力價測定。首先將待測的 GIV 病毒液以含有 2% FBS 的 L-15 培養液作十倍連續稀釋，稀釋倍數由  $10^1$ ~ $10^{11}$ ，實驗進行前以不含血清的 L-15 培養液清洗細胞面 3 次後，再將每一稀釋倍率的病毒液依序加入 96 well 中 (控制組為含有 2% FBS 的 L-15 培養液)，每一稀釋倍率 8 重複，加完病毒液後，為避免細胞培養液 pH 值大幅變動而影響實驗效果，以封口膜將培

養盤封緊後，放置於 28°C 細胞培養箱，並開始觀察細胞病變效應，病毒力價以 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) (REED and MUENCH, 1938) 方法計算。



### 2.32 石斑魚虹彩病毒分離與純化 (Isolation and Purification of Grouper

#### Iridovirus)

以「GIV 增殖」方式大量培養病毒液，待細胞病變效應 (Cytopathic effect, CPE) 達 90% 以上，即以細胞刮勺將殘存細胞刮下，抽出各培養皿內的病毒液並集中，作為病毒分離及純化使用。

進行 GIV 純化時，首先以 5,800 x g 於 4°C 離心 30 分鐘後，沉澱物以 1 倍 TNE buffer (50 mM Tris, pH7.3; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) 回溶備用，上清液收集後依序緩慢加入 2.2% NaCl 及 5% PEG (polyethylene glycol) 8000，置於 4°C 冰箱緩慢均勻混合 16 小時後，隔天取出以 7,500 x g 於 4°C (JA-10, Beckman) 離心 65 分鐘後移除上清液，沉澱物以 1 倍 TNE buffer 回溶。

加入等量(1:1) freon 於含有沉澱物的 TNE buffer 中，強力震盪 5 分鐘後以 5,500 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，收集上清液至新試管中，沉澱物則再次加入等量(1:1) freon，強力震盪 5 分鐘後，以 5,500 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，取上清液至試管並集中。

隨後以 CsCl 梯度離心方式分離 GIV (由下至上分別為 40% CsCl 4 ml、30% CsCl 3 ml、20% CsCl 2 ml，最後加入懸浮於 TNE buffer 中的 GIV 病毒液)，以 30k rpm 於 4°C (SW41, Beckman) 離心 16 小時，再抽取於界面層中清楚可見的白色條帶至新試管內，加入適量 1 倍 TNE buffer，以 35k rpm 於 4°C (SW41, Beckman) 離心 1.5 小時，捨棄上清液，將純化 GIV 回溶於 1 倍 TNE buffer，取適量進行 TCID<sub>50</sub> 測試，其餘分裝並儲存於 -80°C 備用。

### 2.33 不活化石斑魚虹彩病毒製備 (Preparation of Inactive GIV)

以最終處理濃度為 0.1% 的福馬林溶液進行純化石斑魚虹彩病毒的不活化；將福馬林液與病毒液的混合後置於 4°C 冰箱進行病毒去活化 12 天，再以透析膜收集去活化石斑魚虹彩病毒液後，置於 4°C 以 1 倍 PBS 透析 3 天後收集備用，同時取適量的去活化病毒液進行 TCID<sub>50</sub> 測試，確認病毒已完全去活化，再將其分裝並儲

存於-80°C作為實驗使用。



### 2.34 病毒攻讀實驗設計 (Experimental Design of Virus Challenge)

實驗用點帶石斑魚 (Orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*) 購自於國立成功大學石斑魚育苗場，平均體長約 4.60±0.2 公分，平均體重 1.60±0.1 克，蓄養於 0.5 噸 FRP 桶內，水溫 24.5±1°C，鹽度 30±1 ppt，每日定時定點投餵飼料蓄養，並換水總水體的二分之一，實驗用魚經過 5 天蓄養後，篩選平均體長約 4.75±0.2 公分，平均體重 1.70±0.1 克的魚苗進行實驗。

實驗進行前以 MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma, USA) 將魚隻麻醉以降低其緊迫，實驗設計共 6 個組別，每組共 60 尾魚，分別以腹腔注射方式注射 1 倍 PBS、iGIV (1x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/fish)、iGIV (1x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 20 nM、iGIV (1x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 200 nM、iGIV (1x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/fish)+ODN 1966 2 μM，控制組未進行注射，完成注射後將魚隻分別蓄養於 80L 水缸中，每日定時定點投餵飼料，14 天之後 (魚體平均體長約 5.07±0.2 公分，平均體重約 1.90±0.1 克)每一免疫組分別選用二種劑量的石斑魚虹彩病毒液 (1x10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/fish、1x10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/fish) 以腹腔注射方式，每劑量注射 10 尾魚，並採三重複實驗，感染完成魚隻蓄養於 12 L 水族箱，每天觀察並記錄死亡情形，再以相對存活百分比 (relative percent of survival, RPS) 呈現實驗結果，另一方面，於感染後第 28 天，將各組仍存活魚隻採其免疫組織包括頭腎、脾臟與胸腺，每組採集 3 尾魚，再利用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA) 萃取 total RNA 與 DNA。

### 2.35 統計分析 (Statistical Analysis)

試驗所得數據以 Student's *t*-test 或 ANOVA-Duncan's multiple range test 進行統計分析，數值:平均值±標準差 \**p*<0.05, \*\**p*<0.005, \*\*\**p*<0.0005。

### 第三章、結果



#### 第一節、探討 CpG ODN 誘發點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑

##### 1.1 分析點帶石斑魚 TLR9 RNA 選擇性剪接結果與組織表現情況

點帶石斑魚之 TLR9 genomic DNA 序列經由分析後發現具有三個外顯子(exon)和兩個插入子(intron)，再經由 RNA 選擇性剪接(alternative splicing) 後，會產生 gTLR9A 及 gTLR9B 兩種模式(圖一、a)，其分別能轉譯出 1,061 及 1,008 個氨基酸。經由分析其二級結構發現 gTLR9 具有三個主要的功能性區域，包含與 PAMP 結合的 leucine-rich repeat (LRR) 區域、於胞內部份 (intracellular domain) 一段具有調控下游訊息傳遞功能的 Toll/interleukin-1 receptor domain (TIR) 以及 transmembrane domain(TM)，而 gTLR9B 與 gTLR9A 之差異主要是在其 TIR domain 缺少了 box 3 的部分。

分析 gTLR9A (product size: 274 bp) 和 gTLR9B (product size: 381 bp)於點帶石斑魚的不同組織表現之差異後發現，其表現量在脾臟 (Spleen)、頭腎 (Head kidney)、肝臟 (Liver)、後腎 (Posterior kidney) 及鰓部 (Gills) 較為顯著，且脾臟的表現量最高、頭腎則次之 (圖一、b)，進一步分析 gTLR9 下游之轉接子 gMyD88 於點帶石斑魚不同組織之表現後發現，gMyD88 於各組織均有表現 (圖一、b)。

##### 1.2 設計並篩選出能透過點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑並誘導下游基因表現的 ODN

首先於 NCBI 資料庫搜尋病毒基因體相關資訊，主要針對病原體 WSSV (White Spot Syndrome Virus)、NNV(Nervous Necrosis Virus)與 GIV (Grouper Iridovirus)之基因組設計及參考已發表之相關文獻(Jorgensen *et al.*, 2003; Krug *et al.*, 2001a; Strandskog *et al.*, 2007a)，ODNs 序列相關資訊列述於(表一、a)說明，並進行實驗檢測其誘導點帶石斑魚先天性免疫反應之影響效果。

以 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞後，經由即時定量 PCR (Real-time PCR) 的分析結果，發現與其它 ODNs 相較之下，ODN 1214 在以濃度為 100 nM 的反應條件下，對於誘發 IL-1 $\beta$  的表現有最佳效果(圖二、a)，且相同條件下，也會同時誘發 Mx gene 的表現(圖二、b)，此結果證明經由 ODN 1214 的刺激能夠誘導點帶石斑魚的 TLR9

訊息傳遞途徑，且對於誘發下游基因表現有最佳效果。



### 1.3 不同型態 ODNs 於不同濃度處理對於誘導 IL-1 $\beta$ 啟動子表現之差異

經由 Real-time PCR 分析結果得知 ODN 1214 能夠誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑及下游相關基因之表現，為進一步了解不同型態 ODN，包含 ODN 1214(CpG)、ODN 1215(GpC)和 ODN 1216(GpG)進行處理後，是否同樣能夠誘導 IL-1 $\beta$  promoter 之反應，因此利用本實驗室經由 G418 篩選後所得的 Permanent GK cells (含 rainbow trout IL-1 $\beta$  promoter)，以不同濃度之 ODN 1214、ODN 1215 和 ODN 1216 處理 6 小時後，再利用 Dual-Luciferase Assay 系統分析 IL-1 $\beta$  promoter 表現量。

由實驗結果發現以 10 nM 處理的組別 ODN 1215 (GpC)及 ODN 1216 (GpG) 所誘導 IL-1 $\beta$  promoter 的表現量與未處理組相比均有顯著上升的現象 ( $p<0.05$ )。而以 20 nM 處理的組別，無論是 ODN 1214 (CpG)、ODN 1215 (GpC) 或 ODN 1216 (GpG)，所誘導 IL-1 $\beta$  promoter 的表現量與未處理組相比均有顯著上升的現象 ( $p<0.05$ )，但不同的是 ODN 1214 所誘導之 IL-1 $\beta$  promoter 的表現量與其它組別相比顯著較高 ( $p<0.005$ )。若以 50 nM 及 100 nM 處理，無論是 ODN 1214 (CpG)、ODN 1215 (GpC)或 ODN 1216 (GpG)，所誘導 IL-1 $\beta$  promoter 的表現量與未處理組相比均有顯著上升的現象 ( $p<0.05$ )。

綜合以上結果發現以濃度 20 nM 之 ODN1214 處理能有最佳誘導 IL-1 $\beta$  promoter 的效果，然而 ODN 1215 (GpC) 及 ODN 1216 (GpG) 對於誘導 IL-1 $\beta$  promoter 的表現也有某程度上的效果 (圖三)。

### 1.4 探討於不同處理時間以不同濃度的 ODN 1214 處理石斑魚腎臟細胞後，細胞激素 IL-1 $\beta$ 表現之差異

先前實驗證明 ODN 1214 能夠誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑以及下游 IL-1 $\beta$  promoter 之表現，故進一步探討石斑魚腎臟細胞以 ODN 1214 處理後，是否於蛋白質層面也能誘發 IL-1 $\beta$  之表現，故於 GK cell 以不同濃度 ODN 1214 處理 1 小時後，再分別於第 6、12 及 24 小時收集細胞培養液，以 ELISA 技術分析 IL-1 $\beta$  含量。

實驗結果發現：分別以不同濃度 ODN 1214 包括 20 nM、50 nM、100 nM 及

200 nM 處理後，在第 6 及第 12 小時 IL-1 $\beta$  含量都顯著高於控制組(未處理)( $p < 0.005$ )，而在第 24 小時，則是以 ODN 1214 20 nM 及 50 nM 的處理濃度，IL-1 $\beta$  含量顯著高於控制組(未處理) ( $p < 0.005$ )，綜合本次實驗結果可知以 ODN 1214 50 nM 處理後第 12 小時，IL-1 $\beta$  有最高表現量 (圖四)，證實 CpG ODN 1214 除能誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑之下游基因以及 IL-1 $\beta$  promoter 之表現，並且也能誘發 IL-1 $\beta$  的分泌。

### 1.5 點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 辨識 CpG ODN 1214 之分析

先前相關實驗證實 ODN 1214 除能誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑下游基因以及 IL-1 $\beta$  promoter 之表現，並且也能誘發 IL-1 $\beta$  的分泌，然而關於哺乳動物的相關研究中發現 TLR9 的配體 (ligand) 為 CpG ODN，而為了驗證 ODN 1214 是否確實是經由點帶石斑魚 TLR9 之訊息傳遞途徑誘導下游 IL-1 $\beta$  之表現，所以進一步利用 DNA receptor binding assay 技術分析 ODN 1214 與點帶石斑魚 TLR9 是否會有結合反應。

圖五之實驗結果顯示 ODN 1214 確實分別會與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR9B 結合，且以 Poly (I:C)作為對照組一同進行實驗，亦可發現 gTLR9A 和 gTLR9B 並無法與其結合，因此可證明點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR9B 之配體與哺乳動物所發現之結果相同均為 CpG ODN。

### 1.6 點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 共免疫沉澱分析

雖然已證明 ODN 1214 能誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑下游基因以及 IL-1 $\beta$  promoter 之表現，並且也能誘發 IL-1 $\beta$  之分泌，也證明 ODN 1214 分別會與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR9B 結合再經由點帶石斑魚 TLR9 之訊息傳遞途徑。然而為了進一步研究 gTLR9A 及 gTLR9B 兩者於結構上之差異是否會使其下游訊息傳遞機制也受到影響，因此利用 Co-immunoprecipitation (CO-IP) 共免疫沉澱技術驗證 gTLR9A、gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 之間是否具有相互作用 (interaction)。

首先將 gTLR9A 和 gTLR9B 次選殖 (subclone) 到 pcDNA-3flag 載體上，gMyD88 則次選殖到 pcDNA3.0-HA-NF2 載體上，待重組質體之序列經定序確認後，接著進行共免疫沉澱實驗，由結果可知點帶石斑魚 gTLR9 及 gTLR9B 與其轉





接子 gMyD88 確實會有相互作用(interaction) (圖六)。

### 1.7 分析點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 分別與其轉接子 gMyD88 結合後，與下游蛋白間相互關係之差異分析

ODN 1214 分別會與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR9B 結合且經由點帶石斑魚 TLR9 之訊息傳遞途徑，由共免疫沉澱技術證實點帶石斑魚 gTLR9 及 gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 確實會有相互作用，本研究再次利用 CO-IP 技術檢測 gTLR9A、gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 產生交互作用後，對於下游相關蛋白之招募是否會有所差異，如: IRAK4 以及 TRAF6。

如圖七之分析結果可證明 gTLR9A 與 gMyD88 結合後會招募下游的 IRAK4 和 TRAF6，而 gTLR9B 與 gMyD88 結合後卻無法招募下游的 IRAK4 和 TRAF6，推測可能與 gTLR9B 在 TIR domain 缺少了 box 3 有關。

### 1.8 ODN 1214 以包埋方式處理後，藉由胞噬作用使其作用於石斑魚腎臟細胞後，比較於不同處理時間，gTLR9A 及 gTLR9B 表現量之差異以及與 IL-1 $\beta$ 之相關性

先前實驗已證實 ODN 1214 能夠有效誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑之下游基因 IL-1 $\beta$  以及 IL-1 $\beta$  promoter 表現，也會誘導 IL-1 $\beta$  之分泌，且 ODN 1214 均會與 gTLR9A 及 gTLR9B 結合，而 gTLR9A 與其轉接子 gMyD88 結合後，會繼續招募下游 IRAK4 及 TRAF6 之表現，但 gTLR9B 與 gMyD88 結合後，卻無法招募下游 IRAK4 及 TRAF6，因此推測 gTLR9B 於點帶石斑魚 TLR9 之訊息傳遞途徑可能扮演負調控之角色。

因此進行實驗探討於石斑魚腎臟細胞，以 polyJet 包埋 ODN 1214 後，藉由胞噬作用送到細胞作用 1 小時，並分別於處理前取樣，及處理後第 0、30 min、1 小時、2 小時、3 小時、6 小時、9 小時、12 小時、24 小時以及 48 小時取樣，樣品包括「細胞」與其「培養液」，再分別以 Real-time PCR 及 ELISA 技術分析 gTLR9A 和 gTLR9B 表現量以及 IL-1 $\beta$  含量。

在 Real-time PCR 分析結果發現 gTLR9A 在 1+2 小時表現量開始增加，於 1+6 小時後其表現量開始下降，而 gTLR9B 則是在 1+0 小時後有顯著表現，且隨著反

應時間點越長，其表現量有逐漸下降的趨勢，但於 1+9 小時後其表現量又開始有增加現象，至 1+48 小時 gTLR9A 和 gTLR9B 的表現比率已回復到與控制組相當，實驗結果發現 gTLR9A 和 gTLR9B 表現情形呈現相反現象(圖八)，另外在 ELISA 的分析結果中也發現，在 1+0 小時和 1+30 分鐘時，IL-1 $\beta$  含量均較控制組低 ( $p < 0.05$ )，而在 1+3 小時之後，IL-1 $\beta$  含量即開始隨著反應時間增加而增加，直到 1+48 小時，IL-1 $\beta$  表現量已經趨緩(圖九)。

綜合上述結果得知，當 gTLR9B 表現量開始增加時，IL-1 $\beta$  的表現會受到抑制，而當 gTLR9A 之表現量開始增加時，IL-1 $\beta$  的表現則是隨之增加，不過當 gTLR9B 表現量又再增加時，IL-1 $\beta$  之表現似乎又會受到抑制，可知 gTLR9B 在點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑中是扮演負調控之角色，並能夠調控下游 IL-1 $\beta$  之表現。

## 1.9 點帶石斑魚 TLR9 訊息調控機制

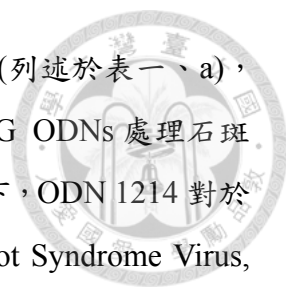
圖十繪述點帶石斑魚 TLR9 之訊息調控機制；左圖為 gTLR9A 與 CpG ODN 結合後，會再與其轉接子 gMyD88 結合，接著招募下游的 IRAK4 與 TRAF6，並活化 IL-1 $\beta$  promoter 誘導 IL-1 $\beta$  的產生，右圖為 gTLR9B 與 CpG ODN 結合後，雖會與其轉接子 gMyD88 結合，但無法招募下游 IRAK4 與 TRAF6 的反應，但可能影響並調控下游 IL-1 $\beta$  之表現

## 第二節、探討 class A CpG 寡核糖核酸之作用與如何調節點帶石斑魚免疫反應

### 2.1 以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞，探討對於誘導 IL-1 $\beta$ 表現之差異

前述實驗發現 ODN 1214 能夠有效誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑與下游基因 IL-1 $\beta$  以及 IL-1 $\beta$  promoter 之表現，也會誘導 IL-1 $\beta$  之分泌，並且 ODN 1214 能夠與 gTLR9A、gTLR9B 結合，而 gTLR9A 與其轉接子 gMyD88 結合後，會繼續招募下游 IRAK4 及 TRAF6 之表現，但 gTLR9B 與 gMyD88 結合後，卻無法招募下游 IRAK4 及 TRAF6，gTLR9B 在訊息傳遞途徑中可能扮演著負調控角色，調控下游 IL-1 $\beta$  之表現。

由於原先是藉由搜尋 NCBI 資料庫之病毒基因體相關資訊，再針對不同病原 (WSSV、NNV 與 GIV) 基因體並參考已發表之相關文獻 (Jorgensen *et al.*, 2003;



Krug *et al.*, 2001a; Strandskog *et al.*, 2007a) 設計不同 CpG ODNs (列述於表一、a)，並檢測其對點帶石斑魚先天性免疫反應之影響後發現以不同 CpG ODNs 處理石斑魚腎臟細胞後，以 Real-time PCR 分析發現與其它 ODN 相較之下，ODN 1214 對於誘發 IL-1 $\beta$  之表現有最佳效果，然而依據白點症病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 基因體序列所設計的 ODN 1214 並非典型 class A ODN，因此更進一步以其序列 (ODN 1214 為截短的 class A ODN) 為模板，設計了不同組成結構的 CpG ODNs，包含將 ODN 1214 之 3 端 poly G 序列去除後成為 ODN 2065 (缺少 5 端和 3 端的 poly G 序列)，於 3 端加上 poly G 序列後的 ODN 2061、於 5 端加上 poly G 序列的 ODN 2062、於兩端均加上 poly G 序列的典型 class A ODN 1966，為能同時探討不同組成結構之 CpG ODN 是否會影響其作用效果，故再針對典型 class A ODN 1966 之組成結構進行修改，並設計了 ODN 2063 (破壞其迴文結構，palindrome)、ODN 2064 (將 CpG motif 改變為 GpG motif) 及 ODN 1942 (減少 phosphorothioate 的修飾數目)，上述 ODNs 之結構特性統一系列述於表一、b 說明。

為瞭解 class A ODN 結構特性的改變是否會影響點帶石斑魚之免疫反應，參考本實驗室所建立之最適 ODN 處理條件，於石斑魚腎臟細胞以不同組成結構之 ODNs 500 nM 分別處理 1 小時後，在第 12 小時收集細胞培養液並以 ELISA 技術分析 IL-1 $\beta$  含量。實驗結果發現以 ODN 1966、2061、2062 及 2064 處理的組別，IL-1 $\beta$  之含量都顯著高於控制組(未處理) ( $p < 0.05$ )，尤其以 ODN 1966 處理，IL-1 $\beta$  有最佳表現 ( $p < 0.0005$ )，而 ODN 2061 (於 3 端加上 poly G 序列且缺少 5 端 poly G 序列) 及 ODN 2062 (於 5 端加上 poly G 序列且缺少 3 端 poly G 序列) 均因結構上的改變，而影響了 IL-1 $\beta$  的表現效果，另一方面於結果中發現 ODN 2064 (將 CpG motif 改為 GpG) 也能誘發 IL-1 $\beta$  之表現 (圖十一)。

由上述結果可知，於石斑於腎臟細胞所進行的體外細胞實驗中發現典型的 class A ODN 1966 會因結構上的改變而影響其誘發 IL-1 $\beta$  表現之效果，另外也發現 ODN 2064 (將 CpG motif 改為 GpG) 同樣能夠誘導 IL-1 $\beta$  之表現。

## 2.2 以不同濃度 ODN1966 處理石斑魚腎臟細胞，並於不同時間點檢測 IL-1 $\beta$ 之表現

雖於先前實驗結果證實以 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞後，能夠有效誘導 IL-1 $\beta$

之表現，尤其以 ODN1966 最為顯著，但為能夠找到最適處理條件（如處理濃度或時間等），因此以 ODN1966 為主，將濃度調整至 100 nM~2  $\mu$ M 之間處理石斑魚腎臟細胞，同樣處理 1 小時，並於第 12 小時收集細胞培養液，以 ELISA 分析後發現隨著 ODN 1966 濃度增加，IL-1 $\beta$  的含量也隨之增加（圖十二），以濃度 2  $\mu$ M 的處理條件，所測得 IL-1 $\beta$  的含量最高( $p<0.0005$ )。接著以 ODN1966 500 nM 處理 GK cell，並於不同時間點收集細胞培養液，以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量，發現在處理後的第 30 分鐘，IL-1 $\beta$  含量與控制組（未處理）相較之下有非常顯著的增加( $p<0.0005$ )，而在處理後的 1 小時有最高含量，1+2 小時開始 IL-1 $\beta$  的含量就開始有緩慢增加的現象( $p<0.0005$ )，直到 1+12 小時，而以 ODN 1966 500 nM 處理 30 分鐘後，IL-1 $\beta$  的含量就很顯著的增加，直到處理 1 小時( $p<0.0005$ )，因此推測 ODN 誘導 IL-1 $\beta$  的表現是非常快速的(圖十三)，故往後 ODN 的處理方式均採用處理濃度 500 nM 與處理時間 1 小時。

### 2.3 於石斑魚腎臟細胞及從點帶石斑魚頭腎組織分離出之巨噬細胞，利用不同組成結構之 ODNs 處理後，比較所誘導之 IL-1 $\beta$ 含量之差異

於石斑魚腎臟細胞以不同組成結構之 ODNs 以濃度 500 nM 處理 1 小時後，收集細胞培養液，以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量並比較其差異，可發現以 ODN 1966、2061、2062、2064 及 1942 處理後，IL-1 $\beta$  的含量都顯著高於控制組(未處理組)( $p<0.0005$ )，特別是 ODN 1966 處理的組別 IL-1 $\beta$  含量最高( $p<0.0005$ )，而 ODN 2062 (於 5 端加上 poly G 序列且缺少 3 端 poly G 序列) 及 ODN 1942 (減少 phosphorothioate 修飾數目)的組別，可能是因為結構的改變而影響了誘發 IL-1 $\beta$  的效果，同時發現 GpG motif 的 ODN 2064 也能誘發 IL-1 $\beta$  的表現（圖十四）。

由於巨噬細胞為 TLR9 主要表現的細胞之一，IL-1 $\beta$  主要由巨噬細胞分泌，為一種促發炎性細胞激素(pro-inflammatory cytokines)，除了誘發發炎反應外，亦能刺激 T 細胞來調控免疫反應，因此以分離自點帶石斑魚頭腎組織的巨噬細胞進行實驗，以不同組成結構之 ODNs 500 nM 分別處理 1 小時，收集細胞培養液並以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量後，亦發現以 ODN 1966、2061、2062、2064 及 1942 處理的組別，IL-1 $\beta$  含量均顯著高於控制組(未處理組) ( $p<0.0005$ )，尤其是 ODN 1966 處理的組別，IL-1 $\beta$  有最高表現( $p<0.0005$ )，而以 ODN 2062 (於 5 端加上 poly G 序列且缺少

3 端 poly G 序列)及 ODN 1942 (減少 phosphorothioate 修飾數目) 處理的組別，可能是因為結構上改變而影響了誘發 IL-1 $\beta$  的效果，同時發現 GpG motif 的 ODN 2064 也能誘發 IL-1 $\beta$  的表現(圖十五)。

綜合兩次實驗結果發現無論是於石斑魚腎臟細胞或是以分離自點帶石斑魚的頭腎組織之巨噬細胞進行實驗，兩者誘發 IL-1 $\beta$  的表現趨勢相同。

#### 2.4 分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，吞噬活性之差異

自點帶石斑魚頭腎組織所分離出的巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 500 nM 處理 1 小時後，加入帶有螢光標記的大腸桿菌，與其反應 2 小時後移除，再加入 trypan blue 於室溫反應 1 分鐘後移除，以螢光分析儀檢測吞噬活性之差異。

由實驗結果發現以 ODN 1966、2061 及 2064 處理之組別，吞噬活性分析結果均顯著高於控制組(未處理組) ( $p < 0.005$ ) (圖十六)。

#### 2.5 分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，超氧陰離子表現之差異

自點帶石斑魚頭腎組織分離出巨噬細胞後，以不同組成結構之 ODNs 濃度 500 nM 處理 1 小時後，移除細胞培養液，隨即加入 100  $\mu$ l NBT 及 100  $\mu$ l Zymosan，置於室溫反應 30 分鐘後移除，再加入 100  $\mu$ l 的 100% 甲醇，放置室溫反應 1 分鐘後移除，再以 100  $\mu$ l 的 70% 甲醇清洗，重複此步驟三次後置於抽氣櫃風乾，最後加入 140  $\mu$ l 的 DMSO 及 120  $\mu$ l 的 2N KOH，以 ELISA 偵測 OD 630 nm 之吸光值。由實驗結果發現以 ODN 1966、2061 及 2064 處理的組別，超氧陰離子的表現都顯著高於控制組(未處理組別) ( $p < 0.005$ )，若以 ODN 2063、2065 及 1214 處理的組別，超氧陰離子的表現反而都顯著低於控制組 (未處理組別) ( $p < 0.05$ ) (圖十七)。

#### 2.6 探討 CpG 和 GpG ODN 與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR21 接合反應

之前研究發現除了以 ODN 1966 處理後 IL-1 $\beta$  有最高表現外，同時也發現 GpG motif 的 ODN 2064 也同樣能誘發 IL-1 $\beta$  的表現，為了進一步探討 ODN 1966 及 ODN 2064 是否都是經由與受體結合後再誘導下游細胞激素的產生，故將 gTLR9A-3flag 和 gTLR21-3flag 質體分別轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，再

將其與分別帶有 biotin 標誌的 ODN 1966 或 Poly (I:C)進行反應，利用 streptavidin 磁珠將與 ODN 1966 或是 Poly (I:C)有產生接合反應者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析。由實驗結果發現 CpG ODN 1966 無論是與點帶石斑魚的 gTLR9A 或 gTLR21 都會結合，與 Poly (I:C)都不會結合 (圖十八、a)。

另外，將 gTLR9A-3flag 和 gTLR21-3flag 質體分別轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，再將其分別與帶有 biotin 標誌之 ODN 2064 或 Poly (I:C)進行反應，利用 streptavidin 磁珠將與 ODN 2064 或是 Poly (I:C)有產生接合反應者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析，由實驗結果發現 GpG ODN 2064 無論是與點帶石斑魚的 gTLR9A 或 gTLR21 都會結合，與 Poly (I:C)都不會結合 (圖十八、b)。

最後將 gTLR3-3flag 質體轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，再將其與帶有 biotin 標誌的 Poly (I:C)進行反應，利用 streptavidin 磁珠將與 Poly (I:C)有接合者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析，由實驗結果發現 Poly (I:C)會與點帶石斑魚的 TLR3 產生結合 (圖十九)。

綜合上述結果可證明點帶石斑魚的 gTLR9A、gTLR21 都會與 ODN 1966 (CpG) 或 ODN 2064 (GpG)結合，都不會與 Poly (I:C)結合，且點帶石斑魚 gTLR3 確實會與 Poly (I:C)產生專一性結合，所以點帶石斑魚 gTLR9A 和 gTLR21 都會透過與 CpG ODN 以及 GpG ODN 產生專一性結合。

## 2.7 於點帶石斑魚注射不同組成結構之 ODNs 後，檢測並比較 IL-1 $\beta$ 之誘導效果

於點帶石斑魚注射不同組成結構之 ODNs 2  $\mu$ M/fish，並於注射後第 6 及 24 小時抽血後分離血清，以 1 倍 PBS 將血清稀釋 250 倍後，利用 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  的含量，由實驗結果發現注射 ODN 1966 的組別在第 6 及 24 小時，與其它組別相較之下，誘導 IL-1 $\beta$  的效果顯著高於控制組( $P < 0.0005$ ) (圖二十)。

## 第三節、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑對於點帶石斑魚抗病毒保護效果之探討

### 3.1 測試以石斑魚虹彩病毒進行感染實驗之最適劑量

實驗用點帶石斑魚 (Orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*) 購自國立成

功大學石斑魚育苗場，平均體長約  $4.60 \pm 0.2$  公分，平均體重約  $1.60 \pm 0.1$  克，平日蓄養於 0.5 噸 FRP 桶內，水溫  $24.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ，鹽度  $30 \pm 1$  ppt，每日定時定點投餵飼料並換水總水體的二分之一，實驗用魚經過 5 天蓄養後，篩選平均體長約  $4.75 \pm 0.2$  公分，平均體重約  $1.70 \pm 0.1$  克的魚苗進行實驗。

以腹腔注射方式進行點帶石斑魚人工感染石斑魚虹彩病毒實驗，並於攻毒後每日觀察記錄死亡數量；感染劑量包括  $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$ 、 $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$ 、 $1 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  及  $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  四種，控制組僅注射等量之 1 倍 PBS，由實驗結果發現隨著病毒攻毒劑量增加，點帶石斑魚死亡時間會有提前趨勢，控制組魚隻則無死亡情況發生（圖二十一），可知該批石斑魚虹彩病毒液（原始病毒液為  $1 \times 10^{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ）確實能夠造成魚隻感染並死亡，因此本研究後續相關病毒感染實驗均以本批石斑魚虹彩病毒作為材料。

### 3.2 檢測不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後的抗病毒保護效果

首先以不活化石斑魚虹彩病毒(iGIV)疫苗或將其搭配不同濃度之 ODN 佐劑，利用腹腔注射方式免疫點帶石斑魚，於免疫後第十四天進行 GIV 感染；GIV 劑量分別為  $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  及  $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$ ，每組十尾魚，以三重複進行。

由實驗結果發現，以  $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  進行攻毒，Mock 組與僅注射 PBS 組於攻毒後第六天就開始有死亡現象發生，至攻毒後第 15 天，該兩組魚隻均已全數死亡，死亡率為 100%，僅注射 iGIV 疫苗的組別在攻毒後第 28 天累積死亡率達 47%（圖二十二、a），相對存活百分比為 53%（表三），而搭配 CpG 佐劑進行免疫的組別累積死亡率介於 20~37%之間（圖二十二、a），相對存活百分比介於 63~80%之間（表三）。以  $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  進行攻毒，Mock 組與僅注射 PBS 組於攻毒後第六天就開始有死亡現象發生，至攻毒後第 14 天，該兩組魚隻均已全數死亡，死亡率為 100%，而僅注射 iGIV 疫苗的組別在攻毒後第 28 天累積死亡率達 53%（圖二十二、b），相對存活百分比為 47%（表三），而搭配 CpG 佐劑進行免疫的組別累積死亡率介於 30~47%之間（圖二十二、b），相對存活百分比介於 53~70%之間（表三）。

由上述實驗結果得知，無論是以病毒劑量  $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  或  $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{fish}$  攻毒，僅注射 iGIV 疫苗的組別或將其搭配不同劑量佐劑使用的組別與僅注射 PBS

組相較之下，均可顯著降低感染後的死亡率( $p < 0.05$ ) (圖二十二)，因此推測可能是藉由誘導早期非特異性免疫及適應性免疫來達到保護作用。

為進一步探討疫苗的抗病毒保護效果，在感染後第二十八天，於每組採集三尾攻毒後仍存活魚隻的頭腎 (head kidney)、脾臟 (spleen) 與胸腺 (thymus) 組織，並利用即時定量聚合酶連鎖反應技術 (Real-time PCR) 分析 MCP 基因及 MCP genomic DNA 之表現情況。實驗結果發現在頭腎及脾臟組織，iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑進行免疫的組別與僅注射 iGIV 疫苗的組別相較之下，無論攻毒劑量是  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish 或  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish，MCP 基因(圖二十三)與 MCP genomic DNA (圖二十四) 之表現量均有顯著下降的情況 ( $p < 0.0005$ )，而在胸腺組織則無顯著差異，顯示添加佐劑不僅能夠提升 iGIV 疫苗在免疫早期的抗病毒保護效果，亦能降低魚體內的病毒量。

### 3.3 探討不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑後免疫魚隻，對於抗體生成力價之差異

由之前實驗結果顯示添加佐劑不僅能夠提升不活化石斑魚虹彩病毒(iGIV)疫苗在免疫早期的抗病毒保護效果，亦能降低魚體內的病毒量，因此進一步分析血清中專一性抗體力價。利用腹腔注射方式以 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑 CpG ODN 免疫點帶石斑魚，並分別於免疫前(pre immune)及免疫後第 7、第 14 天採集血液並分離出樣本血清後，以 ELISA 分析特異性抗體力價，實驗共分為 6 組，包括 Mock 組:未進行免疫、僅注射 PBS 組：注射 1 倍 PBS、僅注射 iGIV 組:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。

由實驗結果發現在免疫後第七天(圖二十五、a) 及第十四天 (圖二十五、b)，僅注射 iGIV 疫苗組別或是注射 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別，其抗體力價與控制組相較後，均有提高的現象，顯示兩者均可提高抗體力價，而在搭配不同劑量佐劑的組別中，iGIV+ODN 1966 20 nM 的組別在注射後第七天和第十四天與僅注射 iGIV 疫苗組相較後，均有提高的現象，然而在 iGIV+ODN 1966 200 nM 和 iGIV+ODN 2  $\mu$ M 的組別在免疫後第七天和第十四天與僅注射 iGIV 疫苗組相比反



而呈現降低的情況，因而得知 iGIV 疫苗本身即能提高免疫後之抗體力價，而添加適量 ODN 佐劑後，亦能提升 iGIV 疫苗的抗體力價，但過量則反之，推測可能在 iGIV 疫苗中添加較高劑量的 ODN 佐劑後，會誘發細胞性免疫反應的產生。



### 3.4 探討不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，相關免疫基因之表現情況

為探討不活化石斑魚虹彩病毒(iGIV)疫苗及將其搭配 ODN 佐劑後，對於點帶石斑魚先天性(innate) 及適應性 (adaptive) 免疫反應之影響，因此進一步分析數個代表性基因在魚體經過免疫後的表現情形。經疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎 (head kidney)、脾臟 (spleen) 及胸腺 (thymus) 組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析先天性免疫相關基因包括 gTLR9A、gIL-1 $\beta$ 、gMx、gTNF- $\alpha$  及適應性免疫相關基因包括 gT-bet、gGATA-3、gCD4、gCD8 之表現情況。

#### 3.4.1 免疫後點帶石斑魚 gTLR9A 基因之表現情況

TLR9 主要功能為辨識帶有 CpG motif 的 DNA 並誘導下游基因的表現，且 TLR9 被活化後能夠誘導巨噬細胞、樹突細胞、B 淋巴細胞活化及促發炎細胞激素分泌，故檢測點帶石斑魚免疫後 TLR9 之表現情形 (圖二十六)。

頭腎(head kidney)於免疫後第一天，注射 PBS、iGIV 疫苗和 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象 ( $p < 0.0005$ )，於免疫後第七天，注射 PBS、iGIV 疫苗和搭配 ODN 1966 200 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象 ( $p < 0.005$ )，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 200 nM 和 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。脾臟 (spleen) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗和搭配 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，而僅注射 PBS 的組別與 Mock 組相較有顯著下降的現象( $p < 0.0005$ )。胸腺 (thymus) 於免疫後第一天，僅注射 PBS 的組別和 Mock 組相較有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，注射 iGIV 疫苗和 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別和 Mock 組相較均有顯著下降的現象

( $p < 0.05$ )，於免疫後第七天，注射 iGIV 疫苗的組別與 Mock 組相較有顯著下降的現象( $p < 0.005$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗或搭配 ODN 1966 20 nM、ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。由分析結果發現 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gTLR9A 表現量在不同組織，不同時間會有不同的表現。

### 3.4.2 免疫後點帶石斑魚 gIL-1 $\beta$ 基因之表現情況

IL-1 $\beta$  主要由巨噬細胞分泌，為一種促發炎性細胞激素(pro-inflammatory cytokines)，除了誘發發炎反應外，亦能刺激 T 細胞調控免疫反應，故檢測點帶石斑魚免疫後 gIL-1 $\beta$  之表現情形 (圖二十七)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗和搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較，均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )，而與僅注射 PBS 與 Mock 組相較有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第七天及第十四天，搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )。脾臟(spleen) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗組、搭配 ODN 1966 200 nM 和 ODN 1966 2  $\mu$ M 組與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的各組與 Mock 組相較，均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。胸腺 (thymus) 於免疫後第七天，注射 iGIV 疫苗的組別和搭配 ODN 1966 20 nM 組與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗組與 Mock 組相較下有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。由分析結果發現 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gIL-1 $\beta$  表現量在不同組織，不同時間會有不同的表現。

### 3.4.3 免疫後點帶石斑魚 gTNF- $\alpha$ 基因之表現情況

TNF- $\alpha$  主要由巨噬細胞分泌，為一種促發炎性細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)，除了誘發發炎反應外，亦能刺激 T 細胞調控免疫反應，故檢測點帶石斑魚免疫後 gTNF- $\alpha$  之表現情形 (圖二十八)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第一天，僅注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，於脾臟 (spleen)

所發現的趨勢與頭腎相同；免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，胸腺 (thymus) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均無顯著差異。由實驗結果發現 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gTNF- $\alpha$  表現量在頭腎和脾臟會有顯著上升的現象。

#### 3.4.4 免疫後點帶石斑魚 gMx 基因之表現情況

Mx 基因由第一型干擾素 (type I IFN) 所誘發，是一種抗病毒蛋白；在魚類的研究發現 Mx 可作為干擾素產生或病毒感染的指標性基因 (Bergan and Robertsen, 2004)，故檢測點帶石斑魚免疫後 gMx 之表現情形(圖二十九)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，僅注射 PBS 組與 Mock 組相較則為顯著下降( $p < 0.005$ )，於免疫後第七天，僅注射 PBS 及搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。脾臟 (spleen) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，於免疫後第七天，無論是注射 PBS、iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均呈現顯著下降的現象( $p < 0.0005$ )，於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗或搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。胸腺 (thymus) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )，於免疫後第七天，搭配 ODN 1966 20 nM 及 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，僅注射 PBS 或 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )。由實驗結果發現注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gMx 表現量在不同組織，不同時間會有不同的表現。

#### 3.4.5 免疫後點帶石斑魚 gCD4 基因之表現情況

CD4 是一種作為第二類 MHC 限制性 T 細胞共同受體的糖蛋白，而大多數輔助 T 細胞 (helper T cell, T<sub>H</sub>) 是 CD4<sup>+</sup> T 細胞，T<sub>H</sub> 細胞經抗原刺激後可提供促進免疫反應的訊號，故檢測點帶石斑魚免疫後 gCD4 之表現情形 (圖三十)。

頭腎(head kidney)於免疫後第十四天，僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 及 ODN 1966 2 μM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。脾臟 (spleen) 的表現趨勢與頭腎相同；僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 及 ODN 1966 2 μM 組與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。胸線 (thymus) 於免疫後第十四天，無論僅注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。由實驗結果發現注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gCD4 表現量在不同組織會有不同的表現。

#### 3.4.6 免疫後點帶石斑魚 gCD8 基因之表現情況

CD8 為一種作為第一類 MHC 限制性 T 細胞提供共同受體的雙聚體蛋白，大多數的毒殺 T 細胞 (T<sub>C</sub>) 是 CD8<sup>+</sup> T 細胞，T<sub>C</sub> 細胞能以抗原專一性方式殺死標的細胞，故檢測點帶石斑魚免疫後 gCD8 之表現情形 (圖三十一)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第十四天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )。脾臟 (spleen) 的表現趨勢與頭腎相同；注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。胸線 (thymus) 於免疫後第十四天，僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 200 nM 或 ODN 1966 2 μM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。由實驗結果發現注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gCD8 表現量在不同組織會有不同的表現。

#### 3.4.7 免疫後點帶石斑魚 gT-bet 基因之表現情況

T-bet (Tbx21)是由 530 個氨基酸所組成的轉錄因子，具有 T-box DNA 結合區 (T-box DNA binding domain)，可與基因啟動子上的 T-box 序列結合，T-bet 已被證實可調控 IFN- $\gamma$  的啟動子，促進 T 細胞從 T<sub>H0</sub> 細胞分化成 T<sub>H1</sub> 細胞，並分泌細胞激素刺激 CD8<sup>+</sup> T 細胞分化成細胞毒殺性 T 細胞 (Lazarevic *et al.*, 2013)，故檢測點


帶石斑魚免疫後 gT-bet 之表現情形 (圖三十二)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第一天，搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )，於免疫後第七天，僅注射 PBS、僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 或 ODN 1966 200 nM 組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 或 ODN 1966 2  $\mu$ M 組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。脾臟 (spleen) 於免疫後第七天，注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 或 ODN 1966 200 nM 組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，搭配 ODN 1966 2  $\mu$ M 組別與 Mock 組相較則有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 200 nM 或 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )，搭配 ODN 1966 20 nM 組別與 Mock 組相較有顯著下降的現象( $p < 0.0005$ )。胸腺 (thymus) 於免疫後第一天，僅注射 PBS 及注射 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第七天，搭配 ODN 1966 200 nM 組與 Mock 組相較有顯著上升的現象( $p < 0.0005$ )，而僅注射 iGIV 疫苗組與 Mock 組相較則有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第十四天，各實驗組與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。由實驗結果發現注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gT-bet 表現量在不同組織，不同時間會有不同的表現。

### 3.4.8 免疫後點帶石斑魚 gGATA-3 基因之表現情況

GATA-3 屬於 GATA 家族成員之一，為 zinc-finger 的轉錄因子，是最早被發現能結合到 TCR 的  $\alpha$  和  $\delta$  鏈的基因其增強子 (enhancer) 上 (Ho *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 1991)，目前也有研究證實 naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞經由 GATA-3 的調控能分化成 T<sub>H</sub>2 細胞，協助 B 細胞產生抗體，故檢測點帶石斑魚免疫後 gGATA-3 之表現情形 (圖三十三)。

頭腎 (head kidney) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 或 ODN 1966 2  $\mu$ M 組別與 Mock 組相較均呈現顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第七天，僅注射 PBS 組與 Mock 組相較有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 200 nM 的組別與 Mock 組相較有顯著上升的現象( $p < 0.05$ )。脾臟 (spleen) 於免疫後第一天，注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑



量佐劑組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.05$ )，於免疫後第七天，僅注射 PBS、僅注射 iGIV 疫苗或搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.0005$ )，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 20 nM 及 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象( $p < 0.0005$ )。胸線 (thymus) 於免疫後第七天，僅注射 PBS、僅注射 iGIV 疫苗、搭配 ODN 1966 200 nM 或 ODN 1966 2  $\mu$ M 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象( $p < 0.005$ )。由實驗結果發現注射 iGIV 疫苗或 iGIV 疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，gGATA-3 表現量在不同組織，不同時間會有不同的表現。

## 第四章、討論



### 第一節、探討 CpG ODN 誘發點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑

由之前本實驗室的研究發現點帶石斑魚的 TLR9 具有兩種模式，分別為 gTLR9A 及經由 RNA 選擇性剪切後所形成的 gTLR9B (alternative splicing from)，後者主要是在 intracellular 的 TIR domain 缺少了 box3，由組織表現分析結果得知，點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 在不同組織均會表現，其中又以脾臟 (spleen)、頭腎 (head kidney)、肝臟 (liver)、後腎 (posterior kidney) 及鰓部 (gills) 最為顯著，於脾臟的表現量最高，而且可發現 gTLR9A 在一些免疫相關的組織中表現量明顯比 gTLR9B 高，而下游的轉接子 gMyD88，同樣是在不同組織中均會表現，且廣泛分布於每個組織，這些結果暗示 gTLR9A 及 gTLR9B 有不同的調節功能(Lee *et al.*, 2015)。

本研究探討 CpG ODN 是否會經由點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑誘導下游相關基因之表現，首先藉由參考 NCBI 資料庫之相關病原菌(WSSV、NNV 和 GIV) 基因體序列及參考已發表的相關文獻(Jorgensen *et al.*, 2003; Krug *et al.*, 2001a; Strandskog *et al.*, 2007a)設計了 ODNs，並檢測其對點帶石斑魚先天性免疫反應之影響，實驗結果證實 CpG ODN 1214 對於誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑的下游基因表現有最佳效果，例如 IL1- $\beta$  與 Mx，而以誘導 IL1- $\beta$  的表現較為顯著。接著若以本實驗室已建立好的 Permanent GK cell (含有 Rainbow trout IL-1 $\beta$  promoter) 利用不同濃度的 CpG ODN 1214、GpC ODN 1215 和 GpG ODN 1216 處理細胞後，發現 ODN 1214 會誘發 IL-1 $\beta$  promoter 的表現，在蛋白質層面的研究也證明以 ODN 1214 處理石斑魚腎臟細胞後，確實能夠誘發 IL-1 $\beta$  的分泌。

CpG ODN 能夠刺激虹鱒 (rainbow trout)IL1- $\beta$  的產生(Jørgensen *et al.*, 2001a; Jørgensen *et al.*, 2001b)，而在鯉魚(common carp)除了能夠刺激 IL1- $\beta$  的產生外，也會誘發 CXC 和 CC chemokines 的表現(Tassakka and Sakai, 2004)，這點與本研究結果相類似。人類的 plasmacytoid dendritic cell (pDC)以 ODN 2216 刺激後會誘發 IFN- $\alpha/\beta$ ，並活化 NK cell 促進 IFN- $\gamma$  的產生，進而引起 naive CD4 T cells 走向 TH1 反應，而若以 ODN 2006 刺激後則會誘發 B 細胞的相關基因表現(CD86)，ODN 2216 為 class A CpG ODN，ODN 2006 為 class B CpG ODN，可知 class A CpG ODN 會

偏向誘導 T 細胞反應，而 class B CpG ODN 則偏向誘導 B 細胞反應(Krug *et al.*, 2001a)。從大西洋鮭魚的頭腎與脾臟組織中分離出 leukocytes 後，以不同類型的 ODNs 刺激後發現以 ODN 2216 (class A)和 ODN 2395 (class C)誘導 IFN- $\alpha/\beta$  的效果較佳，ODN 2006 (class B)則是刺激 leukocytes 的分化較 ODN 2216 (class A)效果佳，且 ODN 2395 (class C)也會刺激 leukocytes 的分化(Strandskog *et al.*, 2007a)。

由上述相關研究可知 ODN 2216 (class A) 能夠刺激 pDCs 誘發 IFN- $\alpha/\beta$  的分泌，而在大西洋鮭魚也被證明 ODN 2216 (class A) 能夠刺激 leukocytes 誘發 IFN- $\alpha/\beta$ 。在本研究一開始除了藉由參考 NCBI 資料庫之相關病原菌(WSSV、NNV 和 GIV)基因體序列設計了幾對 ODNs 外，並參考相關報告(Krug *et al.*, 2001a; Strandskog *et al.*, 2007a)嘗試以 ODN 2216 進行實驗，然而實驗結果發現 ODN 2216 在石斑魚腎臟細胞對於誘導 IL1- $\beta$  和 Mx 基因的表現並不顯著，而在大西洋鮭魚的相關研究已證實 ODN1681(Class B)會促進 B 細胞的分化、IgM、IL-6 和 TNF 的產生，而且也會誘導 IFN-like cytokine activity (Jorgensen *et al.*, 2003)，另外再嘗試以 ODN 1681 (class B) (Jorgensen *et al.*, 2003)進行實驗，然而經由實驗結果也發現 ODN 1681 應用於石斑魚腎臟細胞並無法誘導 IL1- $\beta$  基因的表現，但能夠誘導 Mx 基因的表現，ODN 1681 應用於石斑魚腎臟細胞與大西洋鮭魚(Jorgensen *et al.*, 2003)均被證明能夠誘導病毒相關激素與基因的表現。因為 ODN 可能具有物種專一性 (Carrington and Secombes, 2006)所以本論文的研究期望能找尋對於石斑魚免疫反應具有較佳誘導效果的 class A ODN，故由相關實驗結果發現 ODN 1214 對於誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑的下游基因表現有最佳效果。

先前的相關研究已證實哺乳動物其 TLR9 的配體 (ligand) 為 CpG ODN，為了想進一步了解 ODN 1214 誘導 IL1- $\beta$  和 Mx 的表現是否透過點帶石斑魚 TLR9 的訊息傳遞途徑，故藉由 DNA receptor binding assay 的實驗探討點帶石斑魚 TLR9 與 ODN 1214 是否會有結合反應，結果發現 CpG ODN 1214 確實會與點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 產生專一性結合，且都不會與 TLR3 的配體 Poly (I:C)結合，證明了 gTLR9A 及 gTLR9B 確實會與 ODN 1214 結合，然後藉由 Co-IP 實驗來探討 gTLR9A、gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 是否會有相互作用(interaction)，實驗結果也顯示 gTLR9A、gTLR9B 與 gMyD88 之間確實會有 interaction。

以上相關實驗結果雖已證實點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 都會與 ODN 1214



產生專一性結合，且與下游的 gMyD88 會有 interaction，為想更進一步瞭解下游相關蛋白於訊息傳遞過程所受到的調控情況，故藉由 Co-IP 實驗探討檢測後，發現 gTLR9A 與 gMyD88 結合後能夠招募下游的 IRAK4 及 TRAF6，這樣的結果與哺乳動物中 TLR9 訊息傳遞機制相同(Akira *et al.*, 2006)，而 gTLR9B 則無法再招募下游的 IRAK4 及 TRAF6，推測可能與 gTLR9B 的 TIR domain 缺少了 box 3 有關。

為了檢視 gTLR9B 在點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑所扮演的角色，將 ODN 1214 包埋後於點帶石斑魚腎臟細胞處理 1 小時，再分別於處理前、處理後第 0、30 min、1 小時、2 小時、3 小時、6 小時、9 小時、12 小時、24 小時以及 48 小時收集細胞與培養液進行 Real-time PCR 和 ELISA 分析 gTLR9A 與 gTLR9B 表現量之差異，以及 IL-1 $\beta$  的含量，結果發現 gTLR9A 與 gTLR9B 表現量所呈現的比率在 1+0 小時，可見 gTLR9B 有顯著表現，而隨著時間的延長 gTLR9B 表現量逐漸下降，於不過在 1+9 小時後其表現量又開始有增加現象，gTLR9A 則是在 1+2 小時表現量開始增加，於 1+9 小時後其表現量便開始下降，至 1+48 小時 gTLR9A 與 gTLR9B 表現量之比率已回復到和控制組相當，實驗結果發現 gTLR9A 與 gTLR9B 之表現情形呈現相反現象。而在 ELISA 分析結果中發現，在 1+0 小時和 1+30 分鐘時，IL-1 $\beta$  含量較控制組低( $p < 0.05$ )，而在 1+3 小時後 IL-1 $\beta$  之含量隨時間延長而逐漸增加，至 1+48 小時 IL-1 $\beta$  的累積含量已經趨緩，由實驗結果發現當 gTLR9B 的表現量開始增加時，IL-1 $\beta$  的分泌即會受到抑制，而 gTLR9A 之表現量開始增加時，IL-1 $\beta$  含量也會隨之增加，而當 gTLR9B 表現量又開始增加時，IL-1 $\beta$  的分泌會再受到抑制，故推測 gTLR9B 在點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑中應是扮演負調控的角色，可調控下游 IL-1 $\beta$  的分泌。

經由分析 gTLR9B (Alternative splicing form) 的胺基酸序列並與 gTLR9A 相較後發現缺少  $\alpha$ D、 $\beta$ E、 $\alpha$ E 和部分的 DD loop，而且  $\beta$ D 胺基酸序列也不同，而 TLR9 於胞內部份 (intracellular domain) 則是一段具有調控下游訊息傳遞功能的 Toll/interleukin-1 receptor domain (TIR)，TIR domain 有三個區域具有高度保守性被命名為 box1~3，分別坐落於  $\beta$ A strand, BB loop, and  $\alpha$ E helix，gTLR9B 胺基酸序列所缺少的部分參照 (Bovijn *et al.*, 2012) TLR4 TIR model，絕大部分是 Binding site III 的區域，box3 位於  $\alpha$ E，於 (Celia *et al.*, 2012) 的報告中指出：Binding site I 包含  $\alpha$ A 和  $\alpha$ B helix 以及 BB 和 BC loop，Binding site II 包含 BB loop、DD loop 和  $\alpha$ C

helix，Binding site III 包含 DD loop、DE loop、 $\beta$ E、EE loop 和  $\alpha$ E，而由 MAPPIT 和 AlphaScreen 的試驗結果也發現，binding site I 和 II 的突變會影響 TLR4-TLR4 和 TLR4-adaptor interaction，binding site III 的突變會影響 TLR4 TIR-TLR4 TIR 的 interaction，binding site III 的突變則不會強烈影響 TLR4 誘導 NF $\kappa$ B 的訊息傳遞或是 MAL 與 TRAM 的招募，然而 gTLR9B TIR domain 所缺少  $\alpha$ D 和部分的 DD loop 以及 EE loops 卻會影響下游的訊息傳遞以及細胞激素的分泌 (Gautam *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2013)，MyD88 TIR 之  $\alpha$ E helix 和 box 3 區域的突變則會調控其 self-association、負調控影響 IL1 $\beta$  的產生、影響 NF $\kappa$ B-dependent reporter gene 的活性以及 IL6 的分泌 (Jiang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Toshchakov *et al.*, 2011)。

圖十描繪點帶石斑魚 TLR9 的訊息調控機制；gTLR9A 與 CpG ODN 結合後，會再與其轉接子 gMyD88 結合，然後招募下游的 IRAK4 與 TRAF6，活化 IL-1 $\beta$  promoter 並誘導 IL-1 $\beta$  的產生，而 gTLR9B (alternative splicing form) 與 CpG ODN 結合後，雖會與其轉接子 gMyD88 結合，但無法招募下游的 IRAK4 與 TRAF6，這可能影響並調控下游 IL-1 $\beta$  之表現。本研究的相關實驗結果證明經由 CpG ODN 處理後，除了能夠有效誘導 IL-1 $\beta$  之表現外，gTLR9A 與 gTLR9B 也會有不同的表現模式，而由本實驗室的其它實驗亦證實了造成 TLR9A 與 gTLR9B 有不同表現模式並非 mRNA 的穩定性所造成，經由 overexpression 的實驗分析結果，證實 gTLR9B 能夠抑制 IL1 $\beta$  的表現，綜合以上相關實驗結果及本實驗室已發表的報告(Lee *et al.*, 2015)推斷 gTLR9B 在點帶石斑魚的 TLR9 訊息傳遞路徑是扮演負調控的功能。

## 第二節、探討 class A CpG 寡核糖核酸之作用與如何調節點帶石斑魚免疫反應

本研究發現 ODN 1214 (依據白點症病毒 White Spot Syndrome Virus, WSSV 基因體序列所設計的非典型 class A ODN) 確實能夠有效誘導點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑之下游基因表現及相關免疫反應，然而因 ODN 1214 (截短的 class A ODN) 並非典型的 class A ODN，且欲進一步探討 ODN 結構改變是否會影響其誘發先天性免疫反應之效果，故以 ODN 1214 序列為模板，設計了不同 CpG ODNs，包含將 ODN 1214 的 3 端 poly G 序列去除後，成為 ODN 2065 (缺少 5 端和 3 端的 poly G 序列)，於 3 端加上 poly G 序列的 ODN 2061、於 5 端加上 poly G 序列的 ODN 2062、於兩端均加上 poly G 序列的典型 class A ODN 1966，為能同時探討不同組成結構

之 CpG ODN 是否會影響其作用效果，故再針對典型的 class A ODN 1966 結構進行修改，並設計了 ODN 2063 (破壞其迴文結構)、ODN 2064 (將 CpG motif 改變為 GpG motif) 及 ODN 1942 (減少 phosphorothioate 的修飾數目)。

IL-1 $\beta$  主要由巨噬細胞所分泌，為一種促發炎性細胞激素，除了誘發發炎反應外，亦能刺激 T 細胞來調控免疫反應，而 class A (又可稱為 class D) CpG ODN，具有自然存在的 phosphodiester 骨架以及 palindromic CpG motifs 座落於序列之中，及具有 phosphorothioate 骨架的 Poly (G) 序列位在序列的 3' 和 5' 端，這一類型的 CpG ODN 在 pDCs 能夠誘導啟動 TLR9 的訊息傳遞途徑，誘導 IFN- $\alpha$  的產生，並且偏向刺激 T 細胞及自然殺手細胞的活化，不過 class A CpG ODN 幾乎無法誘導 B cells 的增殖(Gursel *et al.*, 2002; Krieg, 2002; Krug *et al.*, 2001a)。因前人研究發現自虹鱒(rainbow trout)頭腎組織所分離出的巨噬細胞以 CpG ODN 處理後，能夠刺激 IL1- $\beta$  和 interferon-like cytokines 的產生(Jørgensen *et al.*, 2001a; Jørgensen *et al.*, 2001b)，在鯉魚(common carp)的研究則發現除了會刺激 IL1- $\beta$  的產生，也會誘發 CXC 和 CC chemokines 的表現(Tassakka and Sakai, 2004)，然而針對硬骨魚類探討 class A ODN 結構特性改變後，對其誘導免疫反應之影響的參考資料較少，故以表一、b 所列之 ODNs 於點帶石斑魚腎臟細胞進行相關實驗，比較不同組成結構對於 IL-1 $\beta$  表現之影響。結果發現以 ODN 1966、2061、2062 和 2064 處理石斑魚腎臟細胞株 GK cell 後，IL-1 $\beta$  的含量都顯著高於控制組，且以 ODN 1966 處理的組別表現量最高，ODN 2061 和 ODN 2062 可能因為組成結構上的改變而影響了誘發 IL-1 $\beta$  表現的效果，而有趣的是 GpG ODN 2064 也能誘發 IL-1 $\beta$  的表現，體外細胞實驗結果發現典型 class A CpG ODN 1966 會因組成結構的改變而影響誘發 IL-1 $\beta$  表現的效果，儘管如此但差異並未非常顯著，因此修正 ODN 處理條件，期能有更顯著證據支持 ODN 組成結構的改變確實能夠影響誘導 IL-1 $\beta$  分泌的效果之推論。

首先於石斑魚腎臟細胞以不同濃度 ODN 1966 (100 nM~2  $\mu$ M) 處理 1 小時後，在第 12 小時收集培養液並以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量，發現 ODN 1966 確實對於誘發 IL-1 $\beta$  具有最佳效果，且隨著 ODN 1966 濃度的增加，所誘發 IL-1 $\beta$  的含量也隨之增加，以 2  $\mu$ M 的濃度處理，IL-1 $\beta$  有最高之表現量。若再進一步探討以濃度 500 nM 的 ODN 1966 處理細胞後，於不同時間點收集細胞培養液，並以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量，發現以 ODN 處理後 30 分鐘，IL-1 $\beta$  的含量與控制組相較有非常

顯著的增加，至 1 小時有最高表現量，而在處理 1 小時後的時間點發現從 1+2 小時開始，IL-1 $\beta$  的含量會緩慢增加直到 1+12 小時，推測 ODN 1966 誘導 IL-1 $\beta$  的表現應是非常快速，因此後續實驗均依循濃度 500 nM，反應 1 小時的處理條件。

確立 ODNs 之最適處理條件後，隨即於石斑魚腎臟細胞以及自點帶石斑魚頭腎組織所分離出的巨噬細胞，以表一、b 所列經改變組成結構之 ODNs 處理細胞，並利用 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量發現以 ODN 1966、2061、2062、2064 及 1942 處理後，IL-1 $\beta$  含量均顯著高於控制組，且以 ODN 1966 處理的組別最為顯著，而 ODN 2062 (於 5 端加上 poly G 序列且缺少 3 端 poly G 序列) 及 ODN 1942 (減少 phosphorothioate 修飾數目) 可能因組成結構上的改變而影響了誘發 IL-1 $\beta$  的效果，GpG ODN 2064 於本次實驗也發現同樣能夠誘發 IL-1 $\beta$  的表現，該兩次實驗結果呈現相同趨勢，因此推斷 3 端 poly G tail 的結構應是非常重要的，5 端 poly G tail 結構則是必須存在的，且 palindrome 結構和 phosphorothioate 修飾數目的改變也會影響最終誘發 IL-1 $\beta$  表現的效果。class A ODN 在 pDCs 能夠顯著誘導 type I IFN 大量的產生，而在其序列中需具有迴文序列和 poly G tail (Krug *et al.*, 2001a)，class A ODN 會自發性的產生 higher-order structure 也是因為具有迴文序列和 poly G tail (Klein *et al.*, 2010)，class B ODN 則不會形成此結構而為線性結構，class A ODN 其迴文序列和 poly G tail 會影響 type I IFN 的產生與是否會形成 higher-order structure。本研究發現不管是石斑魚腎臟細胞或自點帶石斑魚頭腎組織所分離出的巨噬細胞，都會因 class A ODN 結構上迴文序列和 poly G tail 的改變而影響誘發 IL-1 $\beta$  的效果，雖然 phosphorothioate 骨架的 poly G 序列位在序列的 3' 和 5' 末端能增加抵抗 DNase 的降解(Zhao *et al.*, 1993)，但是 class A ODN 其 3 端 Poly G motifs 的存在能使其保有最佳活性(Carrington and Secombes, 2006)，由 (Kobayashi *et al.*, 2013) 的研究也指出 class A ODN 如果缺少 3 端 Poly G 會失去其功效，而 polyguanosine (poly-G) oligonucleotides (ODN) 能夠抑制腫瘤(tumor)，而 antitumor 的活性則是經由調控 CD8 T cells (TLR9-independent manner)，(Kobayashi *et al.*, 2013) 研究也指出 3 端 poly G tail 比 5 端及序列中間的 poly G tail 來的重要，且長度至少要具有 6 個 Gs。本實驗室先前研究證實 CpG ODN 會經由點帶石斑魚 TLR9 訊息傳遞途徑誘導下游 IL-1 $\beta$  的產生 (Lee *et al.*, 2015)，也有相關研究指出 phosphorothioate 的修飾數目改變同樣會有影響，且 ODN 序列包含完整或部分的

phosphorothioate backbone 可抵抗 DNase 的降解 (Hanagata, 2012), 除此之外, 若 ODN 序列只是 phosphodiester backbone, 但其形狀為類似啞鈴狀結構(dumbbell-like structure)也能抵抗 DNase (Chu and Orgel, 1992; Clusel *et al.*, 1993; Erie *et al.*, 1987), 可知 phosphorothioate 修飾數目減少後會影響其抵抗 DNase 降解的能力, 再進一步影響誘發 IL-1 $\beta$  的效果。本研究結果感到有趣的發現是將 class A ODN 序列上的 CpG motif 改變成 GpG motif 後, 仍會顯著誘發 IL-1 $\beta$  的產生, 這點與先前的相關研究有所不同, 在 Human PBMC (peripheral blood mononuclear cells)將 CG motif 置換成 GC motif 或 cytosine methylation 以及 control ODN (GG motif)都會顯著降低 IFN- $\alpha$  的產生(Vollmer *et al.*, 2004b)。

由於 class A ODN 的迴文序列和 poly G tail 會自發性的產生 higher-order structure, 但 class B ODN 因只是線性結構, 因此不會有前述現象 (Klein *et al.*, 2010), 再者 poly G tail 能與巨噬細胞表面之 scavenger receptor 結合 (Lee *et al.*, 2000), 也有相關研究報告指出 ODN 的 poly G tail 序列能夠增加細胞攝入的效率 (Dalpke *et al.*, 2002; Gursel *et al.*, 2002), 因此本研究利用分離自點帶石斑魚頭腎組織的巨噬細胞進行吞噬活性及超氧陰離子表現量之分析, 並作為探討 ODN 功能性的參考指標。實驗結果發現以 ODN 1966、2061 和 2064 處理的組別, 吞噬活性和超氧陰離子之表現量均顯著提高; 前述兩實驗結果證明 class A ODN 1966 確實能夠顯著提高吞噬活性與超氧陰離子之表現, 也驗證了 3 端 poly G tail 的組成結構是非常重要的, 且 5 端 poly G 的組成結構、迴文序列結構和 phosphorothioate 修飾數目的不同均會影響其表現量, 也證實 ODN 除了會誘導 IL-1 $\beta$  之表現外, 也會影響吞噬活性與超氧陰離子之表現。

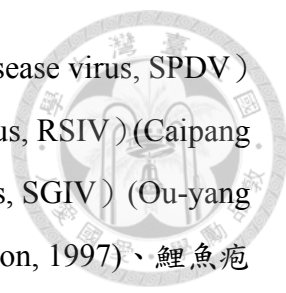
在牙鮭 (*Paralichthys olivaceus*) 的研究結果中提到 *in vitro* 及 *in vivo* 實驗均證實人工合成的 CpG ODN 能夠有效提升吞噬後呼吸爆 (respiratory burst) 的活性以及抗 *Edwardsiella tarda* 的能力 (Lee *et al.*, 2003), 而在虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 的研究則發現吞噬細胞與人工合成的 CpG ODN 預培養後能夠明顯提升其吞噬活性抵抗 *Vibrio ordalii* (Nakatani *et al.*, 2007), 自大西洋鮭魚 (Atlantic salmon, *Salmo salar* L.) 脾臟和頭腎中分離的白血球以 class A CpG ODN 與 class C CpG ODN 共同處理後發現 IFN 會被大量誘導出來, 而自脾臟、血液和頭腎中所分離的白血球以 class B CpG ODN 與 class C CpG ODN 共同處理後, 發現能夠刺激細胞的分化

(Strandskog *et al.*, 2007b)，鯉魚 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的吞噬細胞以 CpG ODN 處理後，能增強超氧陰離子 (superoxide anion,  $O_2^-$ )、過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 以及殺菌活性 (bactericidal activity) (Meng *et al.*, 2003)。前述文獻證實人工合成之 ODNs 能夠有效提升細胞或魚體之相關免疫參數並且增強對病原菌之抵抗力，此與本研究結果相類似，但令人感到驚訝的是 GpG ODN 同樣也能誘導相關免疫反應，此點顯示出魚類與哺乳動物在免疫表現上之差異。

哺乳動物 TLR9 能夠辨識 CpG ODN，而雞雖然缺乏了 TLR9 但具有 TLR21，已有研究證明 CpG ODN 能夠被 chTLR21 辨識 (Keestra *et al.*, 2010)，於點帶石斑魚則發現同時具有 gTLR9 與 gTLR21，因此進行實驗了解兩者是否都能經由辨識 CpG ODN 或 GpG ODN 後，再誘發下游 IL-1 $\beta$  的表現，結果證實點帶石斑魚 gTLR9A 與 gTLR21 均會與 CpG ODN 1966 或 GpG ODN 2064 產生專一性結合，進而活化下游 IL-1 $\beta$  的表現，但兩者都不會與 gTLR3 的 ligand Poly (I:C) 結合，同時也證實點帶石斑魚 gTLR3 會與 Poly (I:C) 產生專一性結合。與斑馬魚不同的是 zebTLR9 和 zebTLR21 雖然都能辨識 CpG ODN，但具有不同的辨識特性區別 (Yeh *et al.*, 2013)，另外也有文獻指出 CpG ODN 及 GpG ODN 不只會與 mTLR-9 結合也會與 mTLR-3 及 mTLR-7 結合 (Graham *et al.*, 2010)。與哺乳動物相較之下，點帶石斑魚 gTLR9 和 gTLR21 對於辨識不同 motifs 的 ODNs 管控上或許並不嚴謹，然而在 *in vitro* 和 *in vivo* 的實驗均證實 ODN 1966 對於誘導 IL-1 $\beta$  表現有最佳效果，因此期望能以人工合成之 CpG ODN 作為佐劑，並探討其在點帶石斑魚抗病毒保護效果之效應。

### 第三節、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑對於點帶石斑魚抗病毒保護效果之探討

不活化疫苗已廣泛被研究並應用於抗魚類病毒性疾病，例如病毒性出血敗血症 (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) (de Kinkelin *et al.*, 1995)、傳染性造血組織壞死症 (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) (Anderson *et al.*, 2008)、鯉魚春季病毒血症 (Spring viremia of carp virus, SVCV) (Tesarcik *et al.*, 1977)、傳染性胰臟壞死症 (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) (Munang'andu *et al.*, 2012;



Munang'andu *et al.*, 2013)、鮭魚胰腺病病毒 (Salmon pancreas disease virus, SPDV) (Lopez-Doriga *et al.*, 2001)、嘉臘虹彩病毒 (Red seabream iridovirus, RSIV) (Caipang *et al.*, 2006a)、新加坡石斑虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) (Ou-yang *et al.*, 2012b)、鮫魚病毒感染症 (Channel catfish virus, CCV) (Dixon, 1997)、鯉魚疱疹病毒第三型 (Cyprinid herpesvirus subtype-3, CyHV-3) (Yasumoto *et al.*, 2006)、病毒性神經壞死症 (Nervous necrosis virus, NNV) (Pakingking *et al.*, 2010; Pakingking *et al.*, 2009)、鮭貧血病毒 (salmon anemia virus, SAV) (Lauscher *et al.*, 2011)，也有相關研究證實不活化疫苗能夠誘導體液性免疫反應的產生，但為了提升其功效，適量添加佐劑也是近年來許多研究著重的課題，佐劑的輔助效果包括(1)可延長抗原作用時間，(2)增強刺激訊號，(3)刺激淋巴球的增生等，CpG ODN 能誘發 TLR9 訊息傳遞途徑，並產生先天性免疫反應(如活化巨噬細胞、樹突細胞、B 淋巴細胞及促發炎細胞激素分泌)，其作為佐劑時能夠呈現出獨特的免疫增強作用 (Bode *et al.*, 2011)。

本實驗室先前研究發現以 DNA 疫苗搭配 ODN 1214 佐劑於點帶石斑魚利用肌肉注射方式進行免疫後，除了可顯著降低感染神經壞死病毒後的致死率，並可提高魚體的專一性抗體力價，而雖然在免疫基因的分析結果發現點帶石斑魚於免疫後兩星期 T-bet 基因 (Th1 特異性轉錄因子)有顯著提高的趨勢，但 GATA-3 基因 (Th2 特異性轉錄因子)的表現卻呈現降低的現象，可知 DNA 疫苗搭配 ODN 1214 佐劑雖可顯著提高 Th1 的反應，卻不會因為 Th1 反應提高而提升 pcMGNNV2 DNA 疫苗的保護效果 (Chen *et al.*, 2015)，因此希望開發不活化石斑魚虹彩病毒疫苗之免疫佐劑，並進一步探討以不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑 (CpG ODN) 免疫點帶石斑魚後的抗病毒保護功效。

利用點帶石斑魚作為研究對象，以不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑 CpG ODN 1966 免疫 14 天後，再以病毒感染免疫後魚隻，並觀察其保護效果。結果發現無論病毒感染劑量為  $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/fish 或  $1 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/fish，以不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑 (CpG ODN) 或僅注射不活化石斑魚虹彩病毒疫苗與控制組相較下，確實能夠顯著降低其致死率，推測可能是藉由誘發早期的非特異性免疫與適應性免疫來達到保護作用，此與本實驗室先前研究 DNA 疫苗搭配 ODN 1214 佐劑免疫點帶石斑魚，可降低感染神經壞死病毒後的致死率有相同


趨勢 (Chen *et al.*, 2015)，即 DNA 疫苗或 DNA 疫苗搭配 CpG ODN 佐劑使用，再免疫點帶石斑魚後，可顯著降低病毒感染後所造成的致死率，而(Ou-yang *et al.*, 2012a)的研究也指出僅施打 iSGIV 疫苗能夠降低點帶石斑魚攻毒後的致死率。

於大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) 的研究文獻中描述 ISAV (infectious salmon anemia virus) 感染後第 21 天，於鰓，頭腎和心臟組織的病毒 RNA 量，不活化疫苗組別明顯較控制組低 (Lauscher *et al.*, 2011)。本論文研究於免疫點帶石斑魚後第十四天進行 GIV 攻毒實驗，並於病毒感染後第二十八天採集各組仍存活魚隻的免疫相關組織，再分析石斑魚虹彩病毒 MCP 基因與 MCP genomic DNA 之表現情況，實驗結果發現在頭腎和脾臟組織，不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與僅注射不活化石斑魚虹彩病毒疫苗組別相較後，無論是以病毒劑量  $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/fish 或  $1 \times 10^4$ TCID<sub>50</sub>/fish 的攻毒條件，MCP 基因與 MCP genomic DNA 表現量均有顯著降低的現象，而在胸腺組織則無顯著差異，推測可能是石斑魚虹彩病毒所感染的組織是以頭腎與脾臟為主，而非胸腺組織，故未見病毒基因有明顯變化，實驗結果可知添加佐劑不僅能夠有效提高不活化石斑魚虹彩病毒疫苗在免疫早期的抗病毒保護功效，還能降低魚體內的病毒含量。

目前也有許多相關研究證實注射 IWV 疫苗 (Inactivated Whole Viral Vaccines) 後能夠誘發 IgM 的產生並降低攻毒後的致死率 (Munang *et al.*, 2015); IWV 疫苗是一外生性 (exogenous) 的抗原，能夠誘發體液性免疫 (humoral immune) 反應，而注射 IWV 疫苗後所產生的 IgM 含量高低亦會影響其保護效果，在本論文的研究也發現了相同結果，即注射不活化石斑魚虹彩病毒疫苗後，血清中特異性 IgM 含量會顯著增加，而若搭配低劑量 (20 nM) 的 CpG ODN 佐劑，確實更能提升特異性 IgM 的含量，但隨著佐劑濃度增加，其含量會隨之降低，另一方面，雖然免疫魚隻 14 天後進行 GIV 攻毒實驗的累積死亡率結果發現隨著佐劑濃度增加，累積死亡率呈現下降的情況，但是佐劑濃度 200 nM 與 2  $\mu$ M 的組別，血清中特異性 IgM 含量與不活化疫苗組別相較並無顯著增加的情況，與本實驗室先前研究 DNA 疫苗搭配 ODN 1214 佐劑使用，再注射點帶石斑魚進行免疫後，可提高魚隻免疫後之專一性抗體力價 (Chen *et al.*, 2015) 的實驗結果相似，同樣發現疫苗中搭配適量 ODN 佐劑使用，能夠提高魚體內專一性抗體力價。

雖然不活化病毒疫苗本身即能提高魚隻免疫後之抗體力價，搭配適量佐劑使






用後更能提升其抗體力價，但於本論文的實驗結果發現若過量添加則會造成相反效果，在本研究是使用 class A ODN 作為佐劑，這一類型的 CpG ODN 在 pDCs 能夠活化 TLR9 誘導 IFN- $\alpha$  的產生，並且偏向刺激 T 細胞及自然殺手細胞的活化，不過 class A CpG ODN 幾乎不會誘導 B cells 的增殖(Gursel *et al.*, 2002; Krieg, 2002; Krug *et al.*, 2001a)，這可能是於較高濃度 CpG ODN 作用的同時，也會誘發其他免疫反應有關。為能夠更進一步探討不活化石斑魚虹彩病毒疫苗及添加適量 ODN 佐劑後對於先天性(innate) 及適應性 (adaptive) 免疫反應之影響，故分析數個代表性基因於免疫後的表現情況，包含先天性免疫相關基因 (gTLR9A、gIL-1 $\beta$ 、gMx、gTNF- $\alpha$ ) 及適應性免疫相關基因(gCD4、gCD8、gT-bet、gGATA-3)。經分析先天性免疫相關基因後發現，ODN 佐劑會透過 TLR9 訊息傳遞途徑活化下游相關免疫基因的表現，這結果也與本實驗室先前的研究相同；搭配適量佐劑 ODN 1214 的 DNA 疫苗免疫點帶石斑魚，能夠啟動 TLR9 訊息傳遞途徑，並誘發下游 Mx 與 IL1- $\beta$  基因之表現 (Chen *et al.*, 2015)，而由於是以 DNA 疫苗搭配 ODN 佐劑，所以也可能是 DNA 疫苗本身誘發 TLR9 訊息傳遞途徑，並活化下游相關免疫基因的表現。本研究以不活化病毒做為抗原，藉由 ODN 佐劑誘導 TLR9 訊息傳遞途徑並活化下游相關免疫基因的表現，因此可知不活化疫苗中添加適量 ODN 當成佐劑確實能夠顯著提高早期的非特異性免疫保護效果。而人工合成的 CpG ODNs 可被位於核內體(endosome)上的 TLR9 辨識，然後直接活化 B 淋巴細胞、巨噬細胞和樹突細胞，但由於 T 細胞表面缺乏 TLR9 受體，因此不能直接被活化 (Hunter, 2002)，故以 iGIV 疫苗搭配三種不同劑量佐劑 CpG ODN 免疫點帶石斑魚後，CpG ODN 會誘發點帶石斑魚 TLR9 的訊息傳遞途徑，進而產生先天性免疫反應，活化下游促發炎細胞激素分泌，並且提高 iGIV 疫苗之 RPS 值，證實 CpG ODN 作為佐劑並搭配 iGIV 疫苗共同免疫點帶石斑魚後，能夠提高早期的非特異性免疫保護效果。

於適應性免疫相關基因之分析結果發現，免疫後第十四天，不活化石斑魚虹彩病毒(iGIV)疫苗組和不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 的組別於胸腺組織均會誘導 gCD4 基因的表現，而在頭腎和脾臟的分析結果發現除了不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配 ODN 1966 200 nM 的組別無差異外，其餘的免疫組別皆有顯著差異。gCD8 基因於 iGIV 疫苗組和 iGIV 疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 組別在頭腎與脾臟組織發現均會誘導 gCD8 基因的表現，而在胸腺組織除了不活化石

斑魚虹彩病毒疫苗搭配 ODN 1966 20 nM 的組別無差異外，其餘的免疫組別皆有顯著差異。硬骨魚類頭腎和脾臟內有巨噬細胞、淋巴細胞和 B 細胞的存在 (Petrie-Hanson and Ainsworth, 2000; Press *et al.*, 1994)，且硬骨魚類頭腎組織的功能相似於哺乳類的骨髓 (bone marrow) (Zapata *et al.*, 2006)，因此具有初級及次級免疫組織之特性，而 T 細胞則來自於胸腺組織，實驗結果發現在頭腎與脾臟組織的 gCD4 和 gCD8 T 細胞在免疫第十四天後有顯著上升的現象，推測免疫後純真 T 細胞可能須要經過十四天的成熟階段，再由胸腺遷移至頭腎或脾臟組織才開始參與免疫反應，且於實驗結果也發現，胸腺、頭腎與脾臟內之效應物 T 細胞 (effector T cell) 其表面標記 gCD4 及 gCD8 於不活化石斑魚虹彩病毒疫苗免疫後十四天也有大量表現的情況，可知 CD4<sup>+</sup> 輔助性 T 細胞及 CD8<sup>+</sup> 毒殺性 T 細胞於不活化石斑魚虹彩病毒疫苗免疫後十四天開始參與免疫反應。CD4<sup>+</sup> T 細胞是透過其分泌的細胞激素來執行輔助功能，藉其所分泌的細胞激素可區分為 T<sub>H1</sub> 和 T<sub>H2</sub> 兩種亞群，主要透過 TCR 和細胞激素受體訊號決定細胞是否產生 T<sub>H1</sub> 特異性轉錄因子 T-bet，或是產生 T<sub>H2</sub> 特異性轉錄因子 GATA-3，gT-bet 能夠促進 CD4<sup>+</sup> T 細胞分化成 T<sub>H1</sub> 細胞並分泌細胞激素，促進毒殺性 T 細胞活化，由實驗結果發現脾臟於免疫後第七天，注射不活化石斑魚虹彩病毒疫苗、搭配 ODN 1966 20 nM 或 ODN 1966 200 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 200 nM 或 ODN 1966 2 μM 的組別與 Mock 組相較均有顯著上升的現象。而 gGATA-3 基因在脾臟於免疫後第一天，注射不活化石斑魚虹彩病毒疫苗或不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象，於免疫後第七天，僅注射 PBS、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗或搭配 ODN 1966 20 nM 的組別與 Mock 組相較均有顯著下降的現象，於免疫後第十四天，搭配 ODN 1966 20 nM 及 ODN 1966 2 μM 的組別與 Mock 組較下均有顯著下降的現象。經分析適應性免疫相關基因的表現結果發現，ODN 佐劑會透過 TLR9 訊息傳遞途徑活化 gCD4、gCD8 基因的表現。這一類的 CpG ODN 在先前研究發現是偏向刺激 T 細胞及自然殺手細胞的活化，class A CpG ODN 較無法誘導 B 細胞的增殖 (Gursel *et al.*, 2002; Krieg, 2002; Krug *et al.*, 2001a)，但本研究結果發現不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配 ODN 1966 使用後對於誘發 CD4<sup>+</sup> 輔助性 T 細胞及 CD8<sup>+</sup> 毒殺性 T 細胞有顯著的影響效果。在脾臟於免疫後第七天及第十四天，搭配 ODN 1966 使用後能顯著誘發 gT-bet



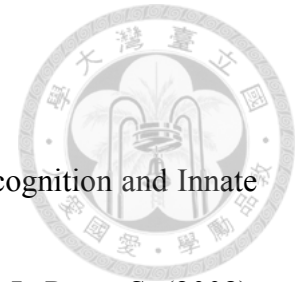
基因的表現，而 gGATA-3 基因在脾臟於免疫後第七天及第十四天，搭配 ODN 1966 使用後表現量則呈現顯著降低的現象，gT-bet、gGATA-3 基因在脾臟於免疫後第七天及第十四天均呈現相反結果，此趨勢與本實驗室先前所發表的報告相似(Chen *et al.*, 2015)，即 class A ODN 1966 傾向誘發 Th1 反應，但在本研究的結果較不明顯，主要可能是使用不同抗原，(Chen *et al.*, 2015)的報告是以 DNA 當作抗原，因 DNA 抗原也會誘導 TLR9 訊息傳遞途徑並進一步活化 Th1 反應，所以其誘發 Th1 反應效果較為顯著。pcMGNNV2 DNA 疫苗單獨使用時能夠增強石斑魚免疫後專一性抗體的平均力價，且在免疫後第 7 天於脾臟組織也顯著誘導了 TLR9、Mx 和 IL-1 $\beta$  基因的表現，顯示 pcMGNNV2 DNA 疫苗免疫後能夠誘發 TLR9 訊息傳遞機制，因此，於幼魚階段使用 pcMGNNV2 DNA 疫苗，能夠誘導石斑魚先天性與適應性免疫反應 (Chen *et al.*, 2015)。

本研究使用不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配適量 CpG ODN1966 佐劑免疫點帶石斑魚後，相較於(Chen *et al.*, 2015)的研究結果，以 CpG ODN1966 作為佐劑使用後其抗病毒保護功效較為顯著，這可能與 CpG ODN 1214 為非典型 class A ODN 有關，因 CpG ODN 1214 的序列 5 端缺少了 poly G tail，序列 3 端則是截短了的 G tail，然而 CpG ODN 1966 為典型的 class A ODN，於其序列兩端均具有完整的 poly G tail，參閱相關研究報告亦曾指出 class A ODN 其 3 端 Poly G motifs 的存在能使其保有最佳活性(Carrington and Secombes, 2006)，(Kobayashi *et al.*, 2013) 的研究也指出 class A ODN 如果缺少 3 端 Poly G 會失去活性，3 端 poly G tail 比 5 端及在序列中間的 poly G tail 重要，且長度至少要具有 6 個 Gs，也有研究曾指出 ODN 的 poly G tail 序列能夠增加細胞攝入效率 (Dalpke *et al.*, 2002; Gursel *et al.*, 2002)，經由本研究相關結果也發現 CpG ODN 1966 誘發 IL1- $\beta$  的效果明顯較 CpG ODN 1214 來的高，經由吞噬活性與細胞內超氧陰離子活性實驗也發現 CpG ODN1966 有最佳效果，且發現若改以包埋的方式將 CpG ODN 1214 利用胞噬作用送入細胞內，會有相當好的效果，因此推測 CpG ODN1966 較 CpG ODN 1214 有更顯著誘發免疫相關反應的效果可能是因為後者於 5 端與 3 端均缺少完整的 poly G tail 有關，因而影響細胞將其涉入的效果，導致兩者誘發相關免疫反應有非常顯著的差異。

實驗結果發現不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配適量的 CpG ODN 佐劑確實能顯著降低病毒感染後所造成的致死率，也能有效提高不活化病毒疫苗在免疫早期

的抗病毒保護功效，同時也可有效降低魚體內的病毒含量，且更能提升其專一性抗體力價，再者不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配適量的 CpG ODN 佐劑後，除了能夠誘發先天性免疫基因之表現，也可能在免疫後誘發毒殺性細胞和抗體參與抗病毒作用，證實了不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配適量的 CpG ODN 佐劑的抗病毒效果，也進一步證實不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配適量的 CpG ODN 佐劑免疫點帶石斑魚之可行性。

## 第五章、參考文獻



Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783-801.

Anderson, E., Clouthier, S., Shewmaker, W., Weighall, A., and LaPatra, S. (2008). Inactivated infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines. *J Fish Dis* 31, 729-745.

Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.

Andrade, Warrison A., Souza, Maria do C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, Miriam S., Melo, Mariane B., Bartholomeu, Daniella C., Ghosh, S., Golenbock, Douglas T., and Gazzinelli, Ricardo T. (2013). Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice. *Cell Host & Microbe* 13, 42-53.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 201, 1157-1167.

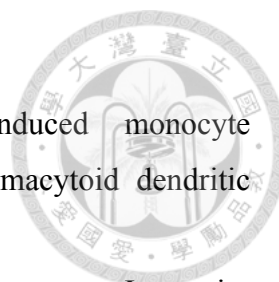
Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L., and Krieg, A.M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *Journal of immunology* 157, 1840-1845.

Bergan, V., and Robertsen, B. (2004). Characterization of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Mx protein expression. *Developmental and comparative immunology* 28, 1037-1047.

Bernard, J.J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., Muehleisen, B., Muto, J., Borkowski, A.W., Martinez, L., Greidinger, E.L., Yu, B.D., and Gallo, R.L. (2012). Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* 18, 1286-1290.

Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. *Science* 298, 2199-2202.

Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the



story of endotoxin. *Nature reviews* 3, 169-176.

Blackwell, S.E., and Krieg, A.M. (2003). CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha. *Journal of immunology* 170, 4061-4068.

Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 32, 305-315.

Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., and Klinman, D.M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 10, 499-511.

Boggs, R.T., McGraw, K., Condon, T., Flournoy, S., Villiet, P., Bennett, C.F., and Monia, B.P. (1997). Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense & nucleic acid drug development* 7, 461-471.

Botos, I., Segal, David M., and Davies, David R. (2011). The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure* 19, 447-459.

Bovijn, C., Ulrichs, P., De Smet, A.S., Cateeuw, D., Beyaert, R., Tavernier, J., and Peelman, F. (2012). Identification of interaction sites for dimerization and adapter recruitment in Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 287, 4088-4098.

Broz, P., and Monack, D.M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 13, 551-565.

Cai, X., Chiu, Y.-H., and Chen, Zhijian J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Molecular Cell* 54, 289-296.

Caipang, C.M., Hirono, I., and Aoki, T. (2006a). Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish & shellfish immunology* 20, 597-609.

Caipang, C.M.A., Hirono, I., and Aoki, T. (2006b). Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish & shellfish immunology* 20, 597-609.

Carrington, A.C., and Secombes, C.J. (2006). A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Veterinary immunology and immunopathology* 112, 87-101.

Carrington, A.C., and Secombes, C.J. (2007). CpG oligodeoxynucleotides

up-regulate antibacterial systems and induce protection against bacterial challenge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 23, 781-792.

Celhar, T., Magalhaes, R., and Fairhurst, A.M. (2012). TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunologic research* 53, 58-77.

Chao, C.B., Chen, C.Y., Lai, Y.Y., Lin, C.S., and Huang, H.T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Dis Aquat Organ* 58, 127-142.

Chen, S.P., Peng, R.H., and Chiou, P.P. (2015). Modulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide on a DNA vaccine against nervous necrosis virus in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & shellfish immunology* 45, 919-926.

Chen, Y., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. (2007). Construction of a recombinant plasmid containing multi-copy CpG motifs and its effects on the innate immune responses of aquatic animals. *Fish & shellfish immunology* 23, 589-600.

Chi, S.-C., Lin, S.-C., Su, H.-M., and Hu, W.-W. (1999). Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Research* 63, 107-114.

Chi, S., Lo, C., Kou, G., Chang, P., Peng, S., and Chen, S. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 20, 185-193.

Chi, S., Shieh, J., and Lin, S. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms* 55, 221-228.

Chou, H.-Y., Hsu, C.-C., and Peng, T.-Y. (1998a). Isolation and Characterization of a Pathogenic Iridovirus from Cultured Grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan. *Fish Pathology* 33, 201-206.

Chou, H.-Y., Hsu, C.-C., and Peng, T.-Y. (1998b). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan. *魚病研究* 33, 201-206.

Chu, B.C., and Orgel, L.E. (1992). The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts. *Nucleic acids research* 20,

5857-5858.

Clusel, C., Ugarte, E., Enjolras, N., Vasseur, M., and Blumenfeld, M. (1993). *Ex vivo* regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides. *Nucleic acids research* 21, 3405-3411.

Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K., Tsukui, T., Takeshita, F., Sakurai, K., *et al.* (2010). Immunogenicity of Whole-Parasite Vaccines against *Plasmodium falciparum* Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9. *Cell Host & Microbe* 7, 50-61.

Dalpke, A.H., Zimmermann, S., Albrecht, I., and Heeg, K. (2002). Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Immunology* 106, 102-112.

de Kinkelin, P., Bearzotti, M., Castric, J., Nougayrede, P., Lecocq-Xhonneux, F., and Thiry, M. (1995). Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France. *Veterinary research* 26, 379-387.

Dixon, P. (1997). Immunization with viral antigens: viral diseases of carp and catfish. *Dev Biol Stand* 90, 221-232.

Eaton, H.E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., and Brunetti, C.R. (2007). Comparative genomic analysis of the family *Iridoviridae*: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology journal* 4, 11.

Eaton, H.E., Ring, B.A., and Brunetti, C.R. (2010). The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family *iridoviridae*. *Viruses* 2, 1458-1475.

Erie, D., Sinha, N., Olson, W., Jones, R., and Breslauer, K. (1987). A dumbbell-shaped, double-hairpin structure of DNA: a thermodynamic investigation. *Biochemistry* 26, 7150-7159.

Gautam, J.K., Ashish, Comeau, L.D., Krueger, J.K., and Smith, M.F., Jr. (2006). Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *The Journal of biological chemistry* 281, 30132-30142.

Gerttula, S., Jin, Y.S., and Anderson, K.V. (1988). Zygotic expression and activity of the *Drosophila* Toll gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. *Genetics* 119, 123-133.



Graham, K.L., Lee, L.Y., Higgins, J.P., Steinman, L., Utz, P.J., and Ho, P.P. (2010). Treatment with a Toll-like receptor inhibitory GpG oligonucleotide delays and attenuates lupus nephritis in NZB/W mice. *Autoimmunity* 43, 140-155.

Guiducci, C., Gong, M., Cepika, A.M., Xu, Z., Tripodo, C., Bennett, L., Crain, C., Quartier, P., Cush, J.J., Pascual, V., *et al.* (2013). RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 210, 2903-2919.

Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K.J., and Klinman, D.M. (2002). Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *Journal of leukocyte biology* 71, 813-820.

Hanagata, N. (2012). Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International journal of nanomedicine* 7, 2181-2195.

Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S., and Endres, S. (2003). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 33, 1633-1641.

Hartmann, G., Weiner, G.J., and Krieg, A.M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9305-9310.

Heit, A., Maurer, T., Hochrein, H., Bauer, S., Huster, K.M., Busch, D.H., and Wagner, H. (2003). Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *Journal of immunology* 170, 2802-2805.

Ho, I.C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B.K., Tsai, S.F., Orkin, S.H., and Leiden, J.M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *The EMBO journal* 10, 1187-1192.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology* 168, 4531-4537.

Huang, Y., Huang, X., Yan, Y., Cai, J., Ouyang, Z., Cui, H., Wang, P., and Qin, Q.

(2011). Transcriptome analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) spleen in response to Singapore grouper iridovirus. *BMC genomics* 12, 556.

Hunter, R.L. (2002). Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 20 Suppl 3, S7-12.

Jørgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., and Sommer, A.-I. (2001a). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 313-321.

Jørgensen, J.B., Johansen, L.H., Steiro, K., and Johansen, A. (2003). CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virology* 77, 11471-11479.

Jørgensen, J.B., Zou, J., Johansen, A., and Secombes, C.J. (2001b). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 $\beta$  and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish & shellfish immunology* 11, 673-682.

Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W., and Jacobs, B.L. (2010). Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family *Iridoviridae*). *J Virol* 84, 2636-2647.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Jault, C., Pichon, L., and Chluba, J. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular immunology* 40, 759-771.

Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., Wilson, I. A., Olson, A., Beutler, B. (2006). Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10961-10966.

Jorgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., and Sommer, A.I. (2001). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and comparative immunology* 25, 313-321.

Jorgensen, J.B., Johansen, L.H., Steiro, K., and Johansen, A. (2003). CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J*

Viol 77, 11471-11479.

Jung, J., Yi, A.K., Zhang, X., Choe, J., Li, L., and Choi, Y.S. (2002). Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *Journal of immunology* 169, 2368-2373.

Kato, A., Ogasawara, T., Homma, T., Batchelor, J., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H., and Matsumoto, K. (2004). CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. *Biochemical and biophysical research communications* 320, 1139-1147.

Kawai, T., and Akira, S. (2010a). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373-384.

Kawai, T., and Akira, S. (2010b). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373-384.

Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* 5, 461.

Keestra, A.M., de Zoete, M.R., Bouwman, L.I., and van Putten, J.P. (2010). Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of immunology* 185, 460-467.

Klein, D.C., Latz, E., Espevik, T., and Stokke, B.T. (2010). Higher order structure of short immunostimulatory oligonucleotides studied by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 110, 689-693.

Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., and Krieg, A.M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2879-2883.

Ko, L.J., Yamamoto, M., Leonard, M.W., George, K.M., Ting, P., and Engel, J.D. (1991). Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. *Molecular and cellular biology* 11, 2778-2784.

Kobayashi, N., Hong, C., Klinman, D.M., and Shirota, H. (2013). Oligodeoxynucleotides expressing polyguanosine motifs promote antitumor activity through the upregulation of IL-2. *Journal of immunology* 190, 1882-1889.

Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R.,

Hayden, Matthew S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119-130.

Krieg, A.M. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 128, 128-133.

Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology* 20, 709-760.

Krieg, A.M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995a). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.

Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995b). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 2154-2163.

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European journal of immunology* 31, 3026-3037.

Lauscher, A., Krossoy, B., Frost, P., Grove, S., Konig, M., Bohlin, J., Falk, K., Austbo, L., and Rimstad, E. (2011). Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection. *Vaccine* 29, 6392-6401.

Lazarevic, V., Glimcher, L.H., and Lord, G.M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 777-789.

Lee, C.H., Jeong, H.D., Chung, J.K., Lee, H.H., and Kim, K.H. (2003). CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*. *Dis Aquat Organ* 56,



43-48.

Lee, F.F., Chuang, H.C., Chen, N.Y., Nagarajan, G., and Chiou, P.P. (2015). Toll-Like Receptor 9 Alternatively Spliced Isoform Negatively Regulates TLR9 Signaling in Teleost Fish. *PloS one* *10*, e0126388.

Lee, S.M., Kok, K.H., Jaume, M., Cheung, T.K., Yip, T.F., Lai, J.C., Guan, Y., Webster, R.G., Jin, D.Y., and Peiris, J.S. (2014). Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 3793-3798.

Lee, S.W., Song, M.K., Baek, K.H., Park, Y., Kim, J.K., Lee, C.H., Cheong, H.K., Cheong, C., and Sung, Y.C. (2000). Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *Journal of immunology* *165*, 3631-3639.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology* *25*, 697-743.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.

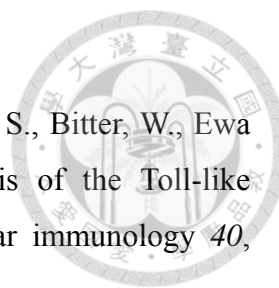
Li, C., Zienkiewicz, J., and Hawiger, J. (2005). Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* *280*, 26152-26159.

Lopez-Doriga, M.V., Smail, D.A., Smith, R.J., Domenech, A., Castric, J., Smith, P.D., and Ellis, A.E. (2001). Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) in cell culture and its ability to protect against infection by the 'wild-type' agent. *Fish & shellfish immunology* *11*, 505-522.

Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G., and Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature immunology* *10*, 587-594.

Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S.-G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, Matthew S., and Ghosh, S. (2012). A Mouse Model of *Salmonella Typhi* Infection. *Cell* *151*, 590-602.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.



Nature 388, 394-397.

Meijer, A.H., Gabby Krens, S.F., Medina Rodriguez, I.A., He, S., Bitter, W., Ewa Snaar-Jagalska, B., and Spaink, H.P. (2004). Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular immunology* 40, 773-783.

Meng, Z., Shao, J., and Xiang, L. (2003). CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages. *Developmental and comparative immunology* 27, 313-321.

Munang'andu, H.M., and Evensen, O. (2015). A Review of Intra- and Extracellular Antigen Delivery Systems for Virus Vaccines of Finfish. *J Immunol Res* 2015, 960859.

Munang'andu, H.M., Fredriksen, B.N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T.Y., Marjara, I.S., Dalmo, R.A., and Evensen, O. (2012). Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine* 30, 4007-4016.

Munang'andu, H.M., Fredriksen, B.N., Mutoloki, S., Dalmo, R.A., and Evensen, O. (2013). Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary research* 44, 7.

Munang'andu, H. M., Evensen, O. (2015). A Review of Intra- and Extracellular Antigen Delivery Systems for Virus Vaccines of Finfish. *Journal of Immunology Research* 2015, 19.

Murali, S., Wu, M.F., Guo, I.C., Chen, S.C., Yang, H.W., and Chang, C.Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 25, 91-100.

Nakajima, K., Maeno, Y., Honda, A., Yokoyama, K., Tooriyama, T., and Manabe, S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis Aquat Organ* 36, 73-75.

Nakajima, K., Maeno, Y., Kurita, J., and Inui, Y. (1997). Vaccination Against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream. *Fish Pathology* 32, 205-209.

Nakatani, M., Iwasaki, T., Watarai, S., and Kodama, H. (2007). In vitro

enhancement by CpG ODN of phagocytic activity of rainbow trout head kidney phagocytes against fish pathogen *Vibrio ordalii*, but not against polystyrene particles. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 69, 1287-1290.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. Nature immunology 6, 769-776.

Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., *et al.* (2012). TLR13 Recognizes Bacterial 23S rRNA Devoid of Erythromycin Resistance—Forming Modification. Science 337, 1111-1115.

Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K., and Seya, T. (2003). Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. Immunogenetics 54, 791-800.

Ou-yang, Z., Wang, P., Huang, X., Cai, J., Huang, Y., Wei, S., Ji, H., Wei, J., Zhou, Y., and Qin, Q. (2012a). Immunogenicity and protective effects of inactivated Singapore grouper iridovirus (SGIV) vaccines in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Developmental & Comparative Immunology 38, 254-261.

Ou-yang, Z., Wang, P., Huang, X., Cai, J., Huang, Y., Wei, S., Ji, H., Wei, J., Zhou, Y., and Qin, Q. (2012b). Immunogenicity and protective effects of inactivated Singapore grouper iridovirus (SGIV) vaccines in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Developmental and comparative immunology 38, 254-261.

Pakingking, R., Jr., Bautista, N.B., de Jesus-Ayson, E.G., and Reyes, O. (2010). Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. Fish & shellfish immunology 28, 525-533.

Pakingking, R., Jr., Seron, R., dela Pena, L., Mori, K., Yamashita, H., and Nakai, T. (2009). Immune responses of Asian sea bass, *Lateolabrax japonicus* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine. J Fish Dis 32, 457-463.

Petrie-Hanson, L., and Ainsworth, A.J. (2000). Differential cytochemical staining characteristics of channel catfish leukocytes identify cell populations in lymphoid organs. Veterinary immunology and immunopathology 73, 129-144.

Press, C.M., Dannevig, B.H., and Landsverk, T. (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & shellfish immunology* 4, 79-93.

Qian, C., and Cao, X. (2013). Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1283, 67-74.

Rebl, A., Goldammer, T., and Seyfert, H.-M. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary immunology and immunopathology* 134, 139-150.

REED, L.J., and MUENCH, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology* 27, 493-497.

Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J., and Brint, E. (2013). Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *Journal of immunology* 191, 6084-6092.

Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9577-9582.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 588-593.

Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A., and Raz, E. (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 3, 849-854.

Samulowitz, U., Weber, M., Weeratna, R., Uhlmann, E., Noll, B., Krieg, A.M., and Vollmer, J. (2010). A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* 20, 93-101.

Sangrador-Vegas, A., Martin, S.A.M., O'Dea, P.G., and Smith, T.J. (2000). Cloning and characterization of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *European Journal of Biochemistry* 267, 7031-7037.



Scapigliati, G., Costantini, S., Colonna, G., Facchiano, A., Buonocore, F., Bossù, P., Cunningham, C., Holland, J.W., and Secombes, C.J. (2004). Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Developmental & Comparative Immunology* 28, 429-441.

Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J.C., Rothlisberger, P., and Bachmann, M.F. (2003). Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *European journal of immunology* 33, 1465-1470.

Snyder, G.A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Rommler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Durr, S., *et al.* (2013). Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6985-6990.

Strandskog, G., Ellingsen, T., and Jørgensen, J.B. (2007a). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN  $\alpha/\beta$  activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 39-51.

Strandskog, G., Ellingsen, T., and Jorgensen, J.B. (2007b). Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN alpha/beta activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes. *Developmental and comparative immunology* 31, 39-51.

Subramaniam, S., Stansberg, C., Olsen, L., Zou, J., Secombes, C.J., and Cunningham, C. (2002). Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Developmental & Comparative Immunology* 26, 415-431.

Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Lamichhane, A., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., *et al.* (2014). Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nature communications* 5.

Tassakka, A.C.M.A.R., and Sakai, M. (2004). Expression of immune-related genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after stimulation by CpG oligodeoxynucleotides. *Aquaculture* 242, 1-12.

Tesarcik, J., Macura, B., Dedek, L., Valicek, L., and Smid, B. (1977). Isolation and electron microscopy of a rhabdovirus from the acute form of infectious dropsy of carp (spring viraemia of carp). *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of*

veterinary medicine. Series B 24, 340-343.

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., and Sudo, T. (1984). Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *Journal of the National Cancer Institute* 72, 955-962.

Toshchakov, V.Y., Szmazinski, H., Couture, L.A., Lakowicz, J.R., and Vogel, S.N. (2011). Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface. *Journal of immunology* 186, 4819-4827.

Tsai, C.T., Ting, J.W., Wu, M.H., Wu, M.F., Guo, I.C., and Chang, C.Y. (2005). Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *J Virol* 79, 2010-2023.

Vollmer, J., Jurk, M., Samulowitz, U., Lipford, G., Forsbach, A., Wullner, M., Tluk, S., Hartmann, H., Kritzler, A., Muller, C., *et al.* (2004a). CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN-gamma-inducible protein-10 production in human B cells. *Journal of endotoxin research* 10, 431-438.

Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., and Krieg, A.M. (2004b). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European journal of immunology* 34, 251-262.

Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T., and Tokunaga, T. (1992). DNA from Bacteria, but Not from Vertebrates, Induces Interferons, Activates Natural Killer Cells and Inhibits Tumor Growth. *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY* 36, 983-997.

Yasumoto, S., Kuzuya, Y., Yasuda, M., Yoshimura, T., and Miyazaki, T. (2006). Oral Immunization of Common Carp with a Liposome Vaccine Fusing Koi Herpesvirus Antigen. *Fish Pathology* 41, 141-145.

Yeh, D.W., Liu, Y.L., Lo, Y.C., Yuh, C.H., Yu, G.Y., Lo, J.F., Luo, Y., Xiang, R., and Chuang, T.H. (2013). Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110,

20711-20716.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., and Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology* 20, 126-136.

Zhang, S.-Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., Segal, D., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A., *et al.* (2007). TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science* 317, 1522-1527.

Zhao, Q., Matson, S., Herrera, C.J., Fisher, E., Yu, H., and Krieg, A.M. (1993). Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense research and development* 3, 53-66.

Zhao, Q., Temsamani, J., Iadarola, P.L., Jiang, Z., and Agrawal, S. (1996). Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochemical Pharmacology* 51, 173-182.

Zhou, Z.X., Zhang, J., and Sun, L. (2014). C7: A CpG oligodeoxynucleotide that induces protective immune response against megalocytivirus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) via toll-like receptor 9-mediated signaling pathway. *Developmental and comparative immunology* 44, 124-132.

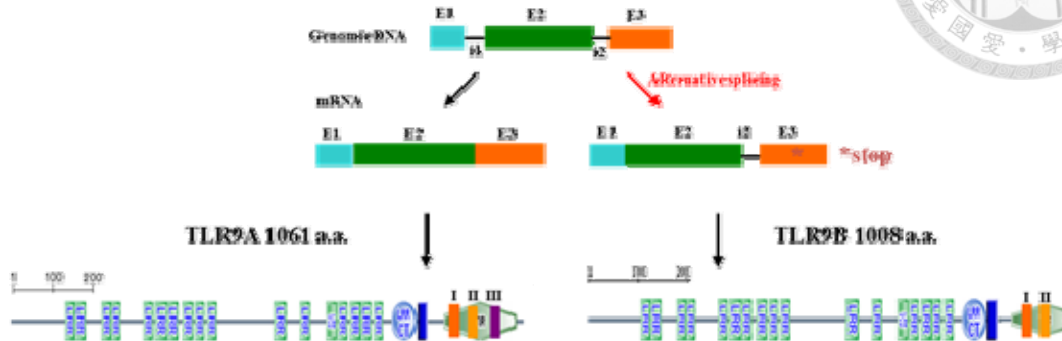
黃淑敏 (2012). 石斑魚虹彩病毒不活化疫苗之開發歷程. *農業生技產業季刊* 31, 26-31.

鄭安倉 (2012). 石斑魚養殖管理技術手冊. 財團法人台灣養殖漁業發展基金會 67-70.

## Alternative RNA Splicing of Grouper TLR9



(a)



(b)

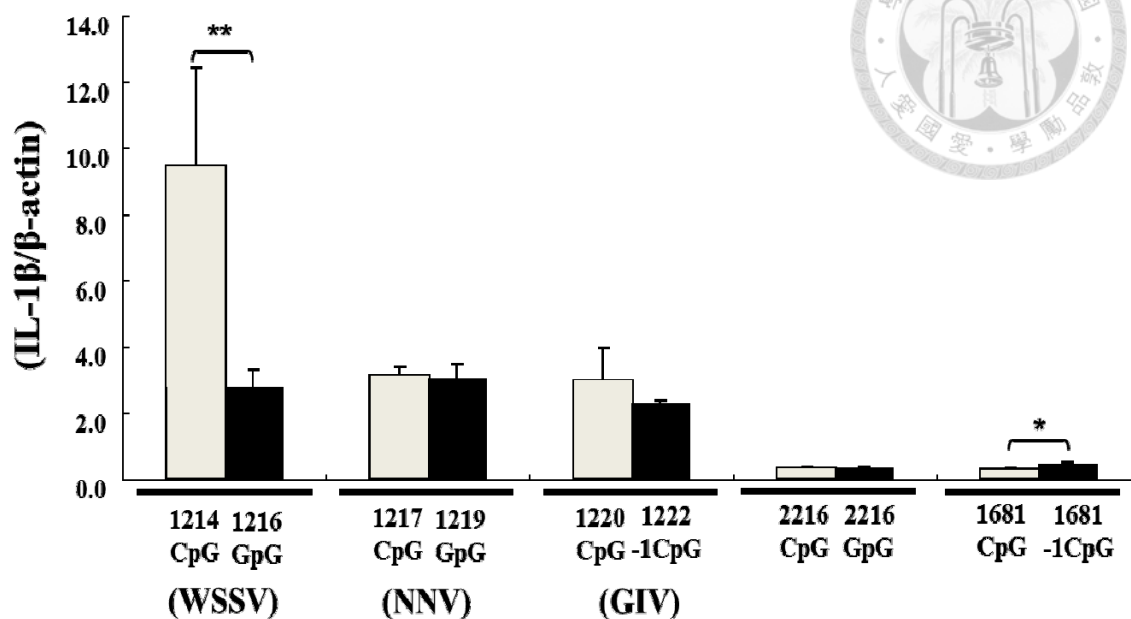


圖一、點帶石斑魚 TLR9 RNA 選擇性剪接與組織表現之分析

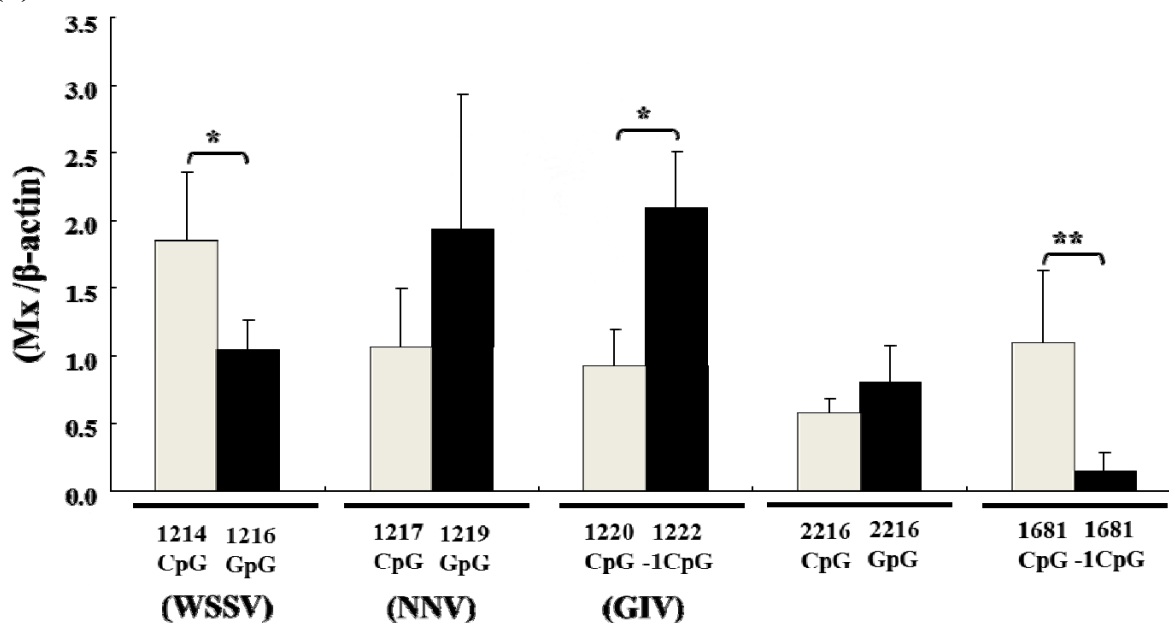
- (a) 點帶石斑魚的 TLR9 包含 gTLR9A 與經由選擇性剪接後產生的 gTLR9B 兩種模式。
- (b) 以 PCR 方式分析 gTLR9A、gTLR9B 及 gMyD88 於不同組織間的表現情況。



(a)

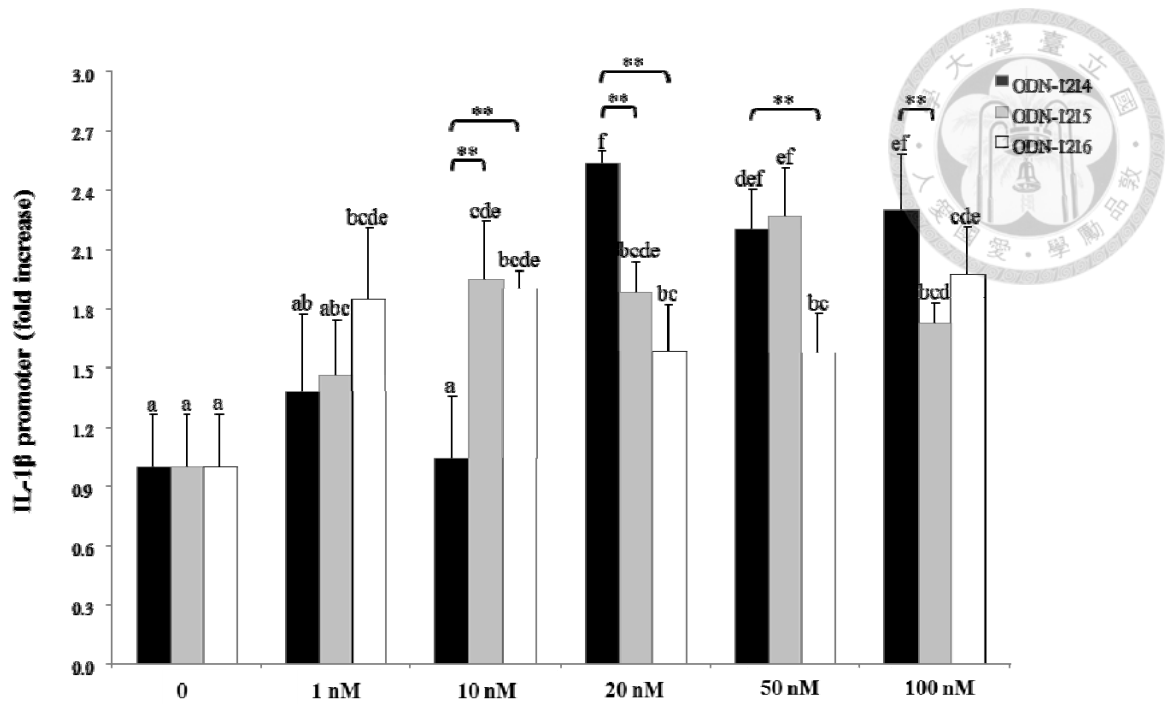


(b)



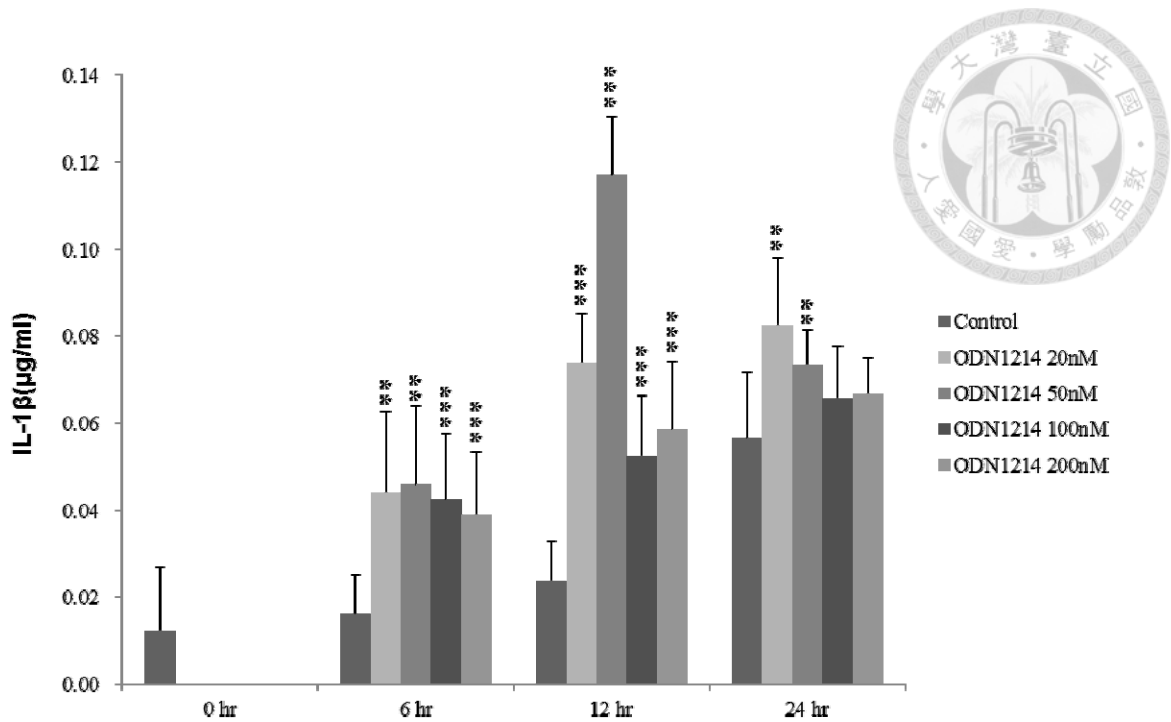
圖二、不同型態之 ODNs 作用於石斑魚腎臟細胞後，誘導 IL-1 $\beta$  及 Mx 基因表現量之差異

- (a) 以不同型態之 ODNs，濃度 100 nM 處理石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 12 小時後，利用 Real-time PCR 分析 IL-1 $\beta$  基因表現量之差異。
- (b) 以不同型態之 ODNs，濃度 100 nM 處理石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 12 小時後，利用 Real-time PCR 分析 Mx 基因表現量之差異。數值：平均值 $\pm$ 標準差 (\*0.05< $p$ <0.1, \*\* $p$ <0.05, Student's  $t$ -test ; n=3)。



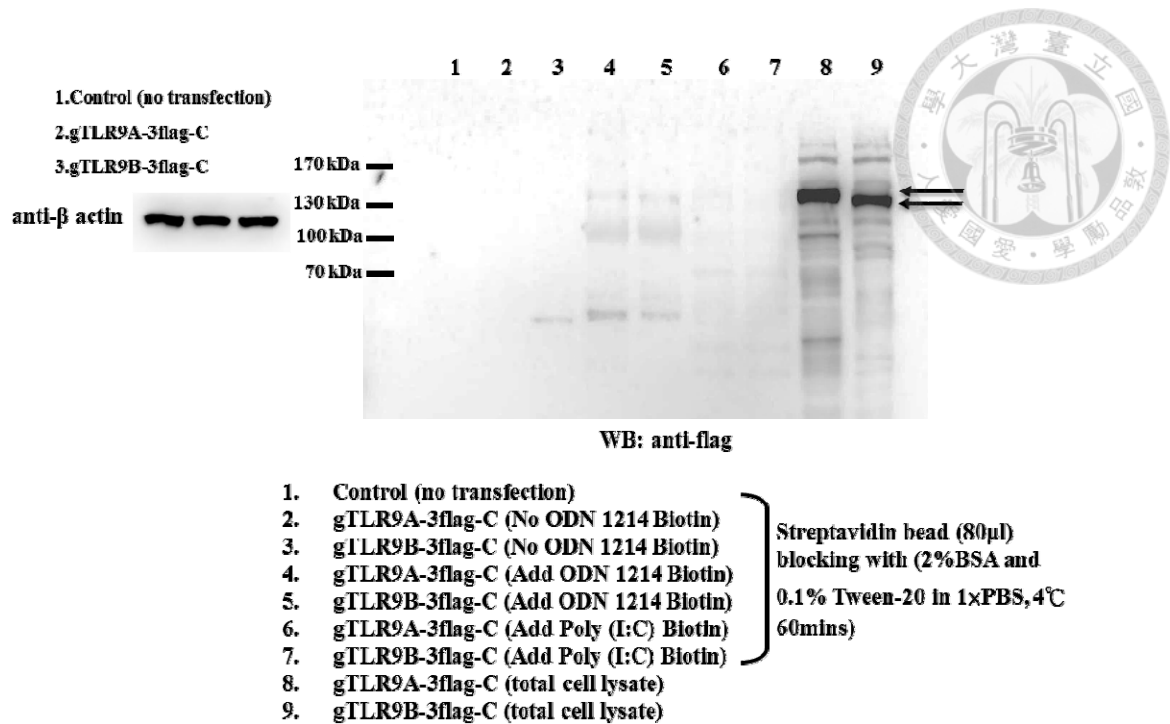
圖三、不同型態 ODNs 於不同濃度處理對於誘導 IL-1 $\beta$  啟動子表現之差異

以不同濃度之 ODN 1214 (CpG ODN)、ODN 1215 (GpC ODN) 及 ODN 1216 (GpG ODN) 處理 Permanent GK cells (具有 rainbow trout IL-1 $\beta$  promoter) 6 小時，再利用 Dual-Luciferase Assay 系統分析 IL-1 $\beta$  promoter 表現量之差異。“0”代表未處理。數值：平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test;  $n$ =3)。



圖四、探討於不同處理時間以不同濃度的 ODN 1214 處理石斑魚腎臟細胞，細胞激素 IL-1 $\beta$  表現之差異

於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 以不同濃度 ODN 1214 處理 1 小時後，再分別於第 6、12 及 24 小時分別收集細胞培養液後，以 ELISA 技術分析 IL-1 $\beta$  含量，Control: 表示未處理。數值：平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ; n=3)。



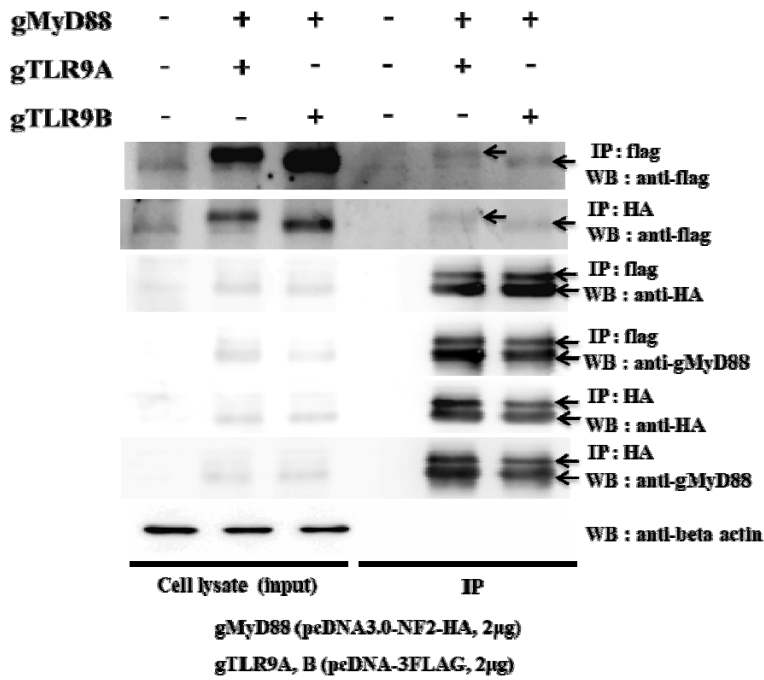
圖五、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 辨識 CpG ODN 1214 之分析

將 gTLR9A 及 gTLR9B 分別轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，接著將 cell lysates 先與 biotin 標誌的 ODN 1214、Poly (I:C) 反應後，利用 streptavidin 磁珠將已與 ODN 1214 或 Poly (I:C) 有接合反應者沉澱下來，再進行蛋白質電泳分析。箭頭分別標示 gTLR9A 及 gTLR9B 之分子大小所在位置。





**(BS3 Crosslinking)**

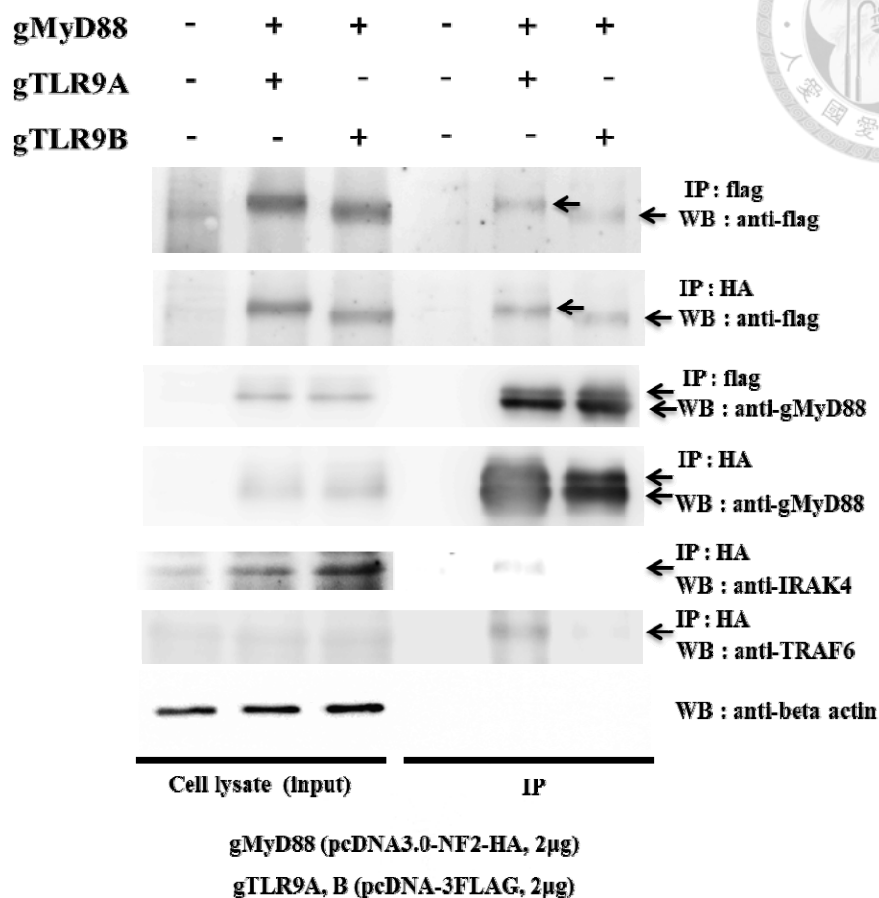


圖六、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 與其轉接子 gMyD88 共免疫沉澱分析

將 TLR9A-3flag、TLR9B-3flag 以及 gMyD88-HA 分別共同轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，再利用共免疫沉澱技術來分析 gTLR9A 及 gTLR9B 與轉接子 gMyD88 之間的相互關係。箭頭所標示位置分別是利用不同抗體染色後之色帶，左方橫線以上所呈現之結果為 total input protein 電泳結果，右方橫線以上所呈現之結果為樣品經由免疫沉澱後所得之電泳結果。

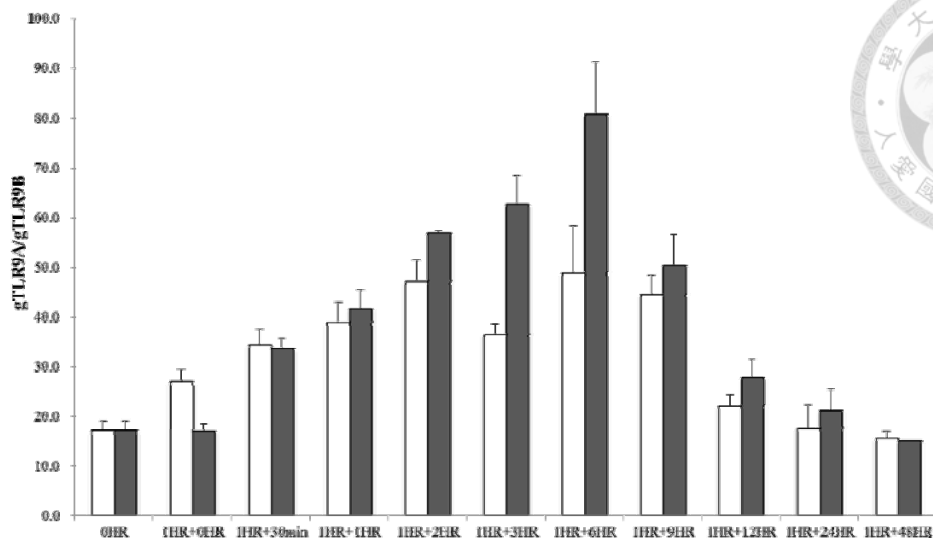
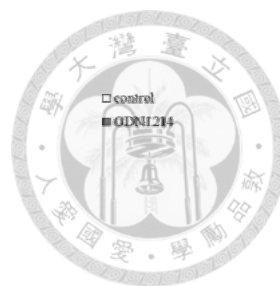


**(BS3 Crosslinking)**



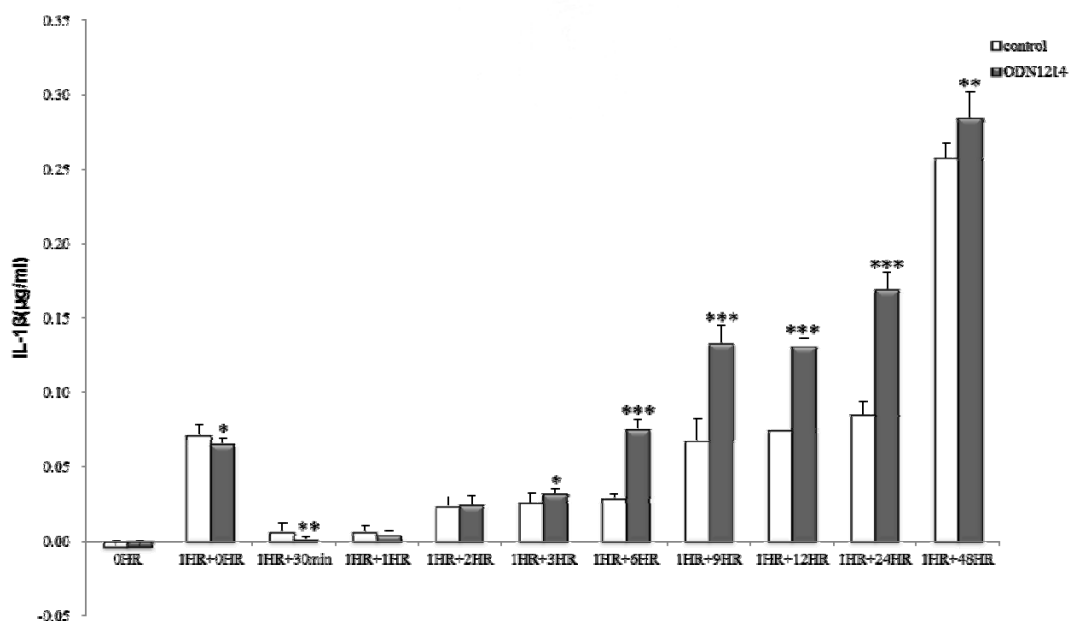
圖七、點帶石斑魚 gTLR9A 及 gTLR9B 分別與其轉接子 gMyD88 結合後，與下游蛋白相互關係之差異分析

將 TLR9A-3flag、gMyD88-HA 以及 TLR9B-3flag、gMyD88-HA 分別共同轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates，再利用共免疫沉澱技術來分析 gTLR9A 及 gTLR9B 與轉接子 gMyD88 之間的相互關係。箭頭所標示位置分別是不同抗體染色後之色帶，左方橫線以上所呈現之結果為 total input protein 電泳結果，右方橫線以上所呈現之結果為樣品經由免疫沉澱後所得之電泳結果。



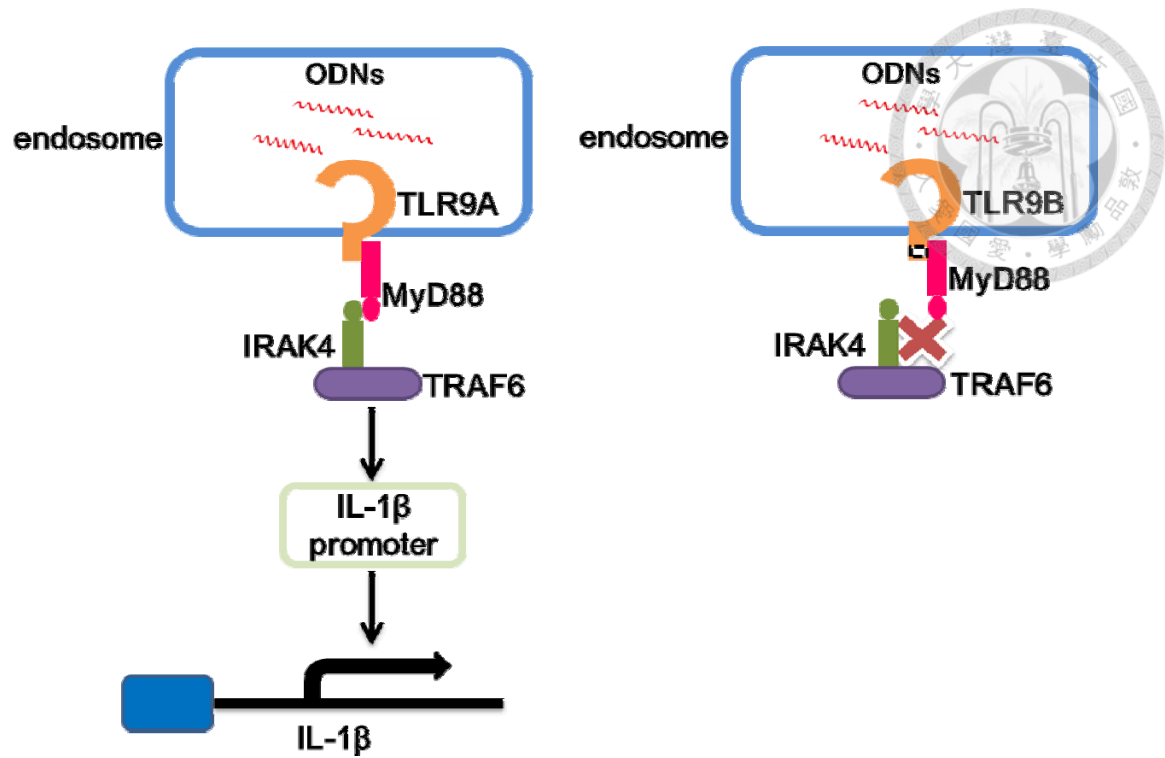
圖八、ODN 1214 以包埋方式處理，再藉由胞噬作用使其作用於石斑魚腎臟細胞後，比較於不同處理時間，gTLR9A 及 gTLR9B 表現量之差異

於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 將不同濃度之 ODN 1214 (0.6  $\mu$ g) 以 polyJet 包埋方式處理後，藉由胞噬作用 1 小時後，於不同時間點收集細胞，並以 Real-time PCR 分析 gTLR9A 和 gTLR9B 之表現量差異，0 hr control: 表示未處理。數值: 平均值 $\pm$ 標準差，計算 gTLR9A/gTLR9B 之比率，n=3。



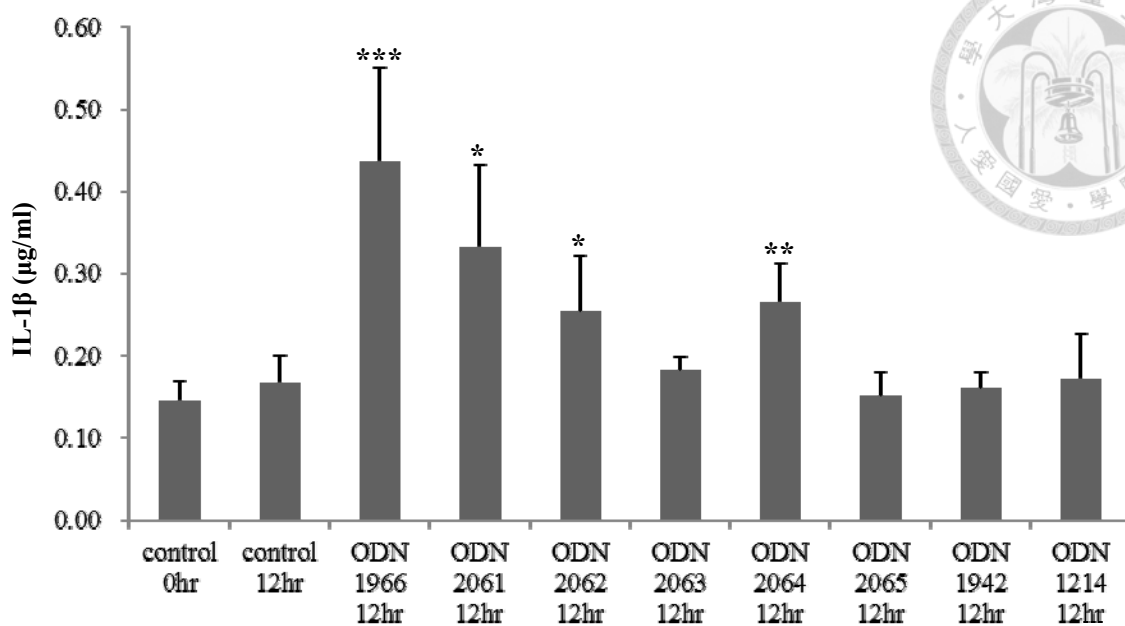
圖九、ODN 1214 以包埋方式處理，再藉由胞噬作用使其作用於石斑魚腎臟細胞後，於不同處理時間分析 IL-1 $\beta$  之含量

於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 將不同濃度之 ODN 1214 (0.6  $\mu$ g) 以 polyJet 包埋方式處理後，藉由胞噬作用 1 小時後，於不同時間點收集細胞培養液，以 ELISA 技術分析 IL-1 $\beta$  之含量。0 hr control: 表示未處理。數值: 平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test; n=3)。



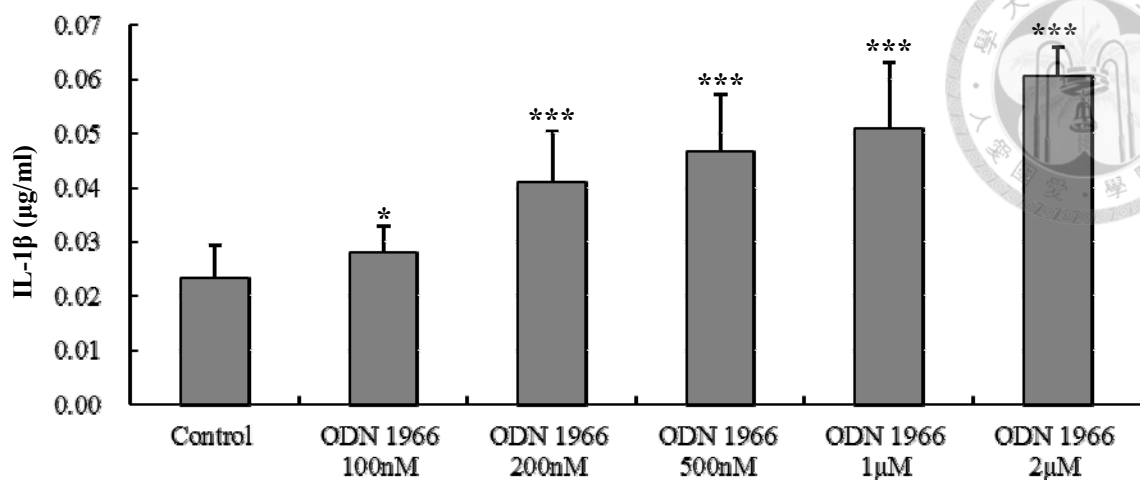
圖十、繪述點帶石斑魚 TLR9 之訊息傳遞機制

左圖為 gTLR9A 與 CpG ODN 結合後，會再與其轉接子 gMyD88 結合，然後招募下游之 IRAK4 與 TRAF6，活化 IL-1 $\beta$  promoter 並誘導 IL-1 $\beta$  的產生，右圖為 gTLR9B 與 CpG ODN 結合後，雖會與其轉接子 gMyD88 結合，但無法招募下游 IRAK4 與 TRAF6 之反應，而可能影響並調控下游 IL-1 $\beta$  之表現。



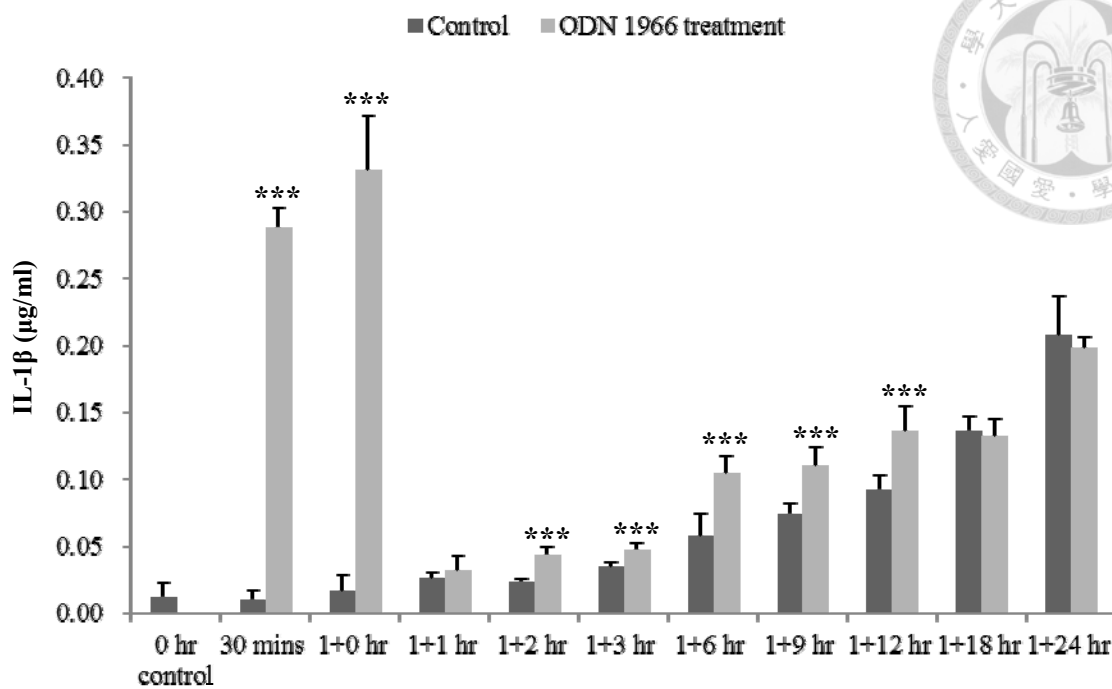
圖十一、分別以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞並探討其對於誘導 IL-1 $\beta$  表現之差異

於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 以不同組成結構之 ODNs 500 nM 分別處理 1 小時後，在第 12 小時收集細胞培養液並以 ELISA 技術分析 IL-1 $\beta$  之含量。0 hr control、12 hr control:均表示未處理。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ;  $n$ =3)。



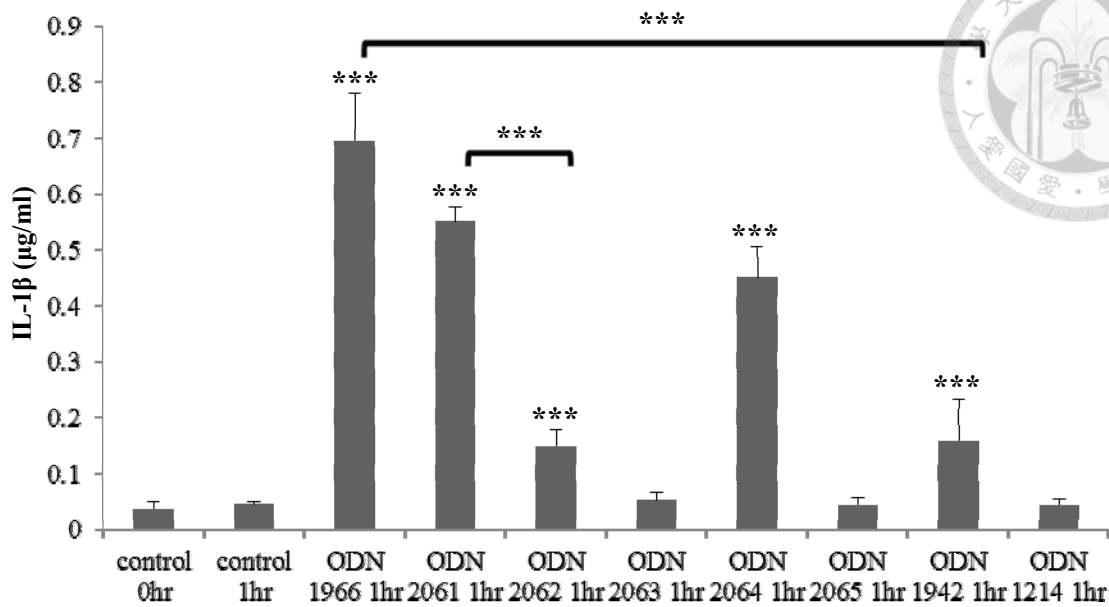
圖十二、以不同濃度 ODN1966 處理石斑魚腎臟細胞後，檢測 IL-1 $\beta$  之表現

於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 以不同濃度 ODN 1966 分別處理 1 小時後，在第 12 小時收集細胞培養液並以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  之含量。control: 表示未處理。數值: 平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ;  $n$ =3)。



圖十三、於石斑魚腎臟細胞以 ODN 1966 處理後，於不同時間點檢測 IL-1 $\beta$  之表現

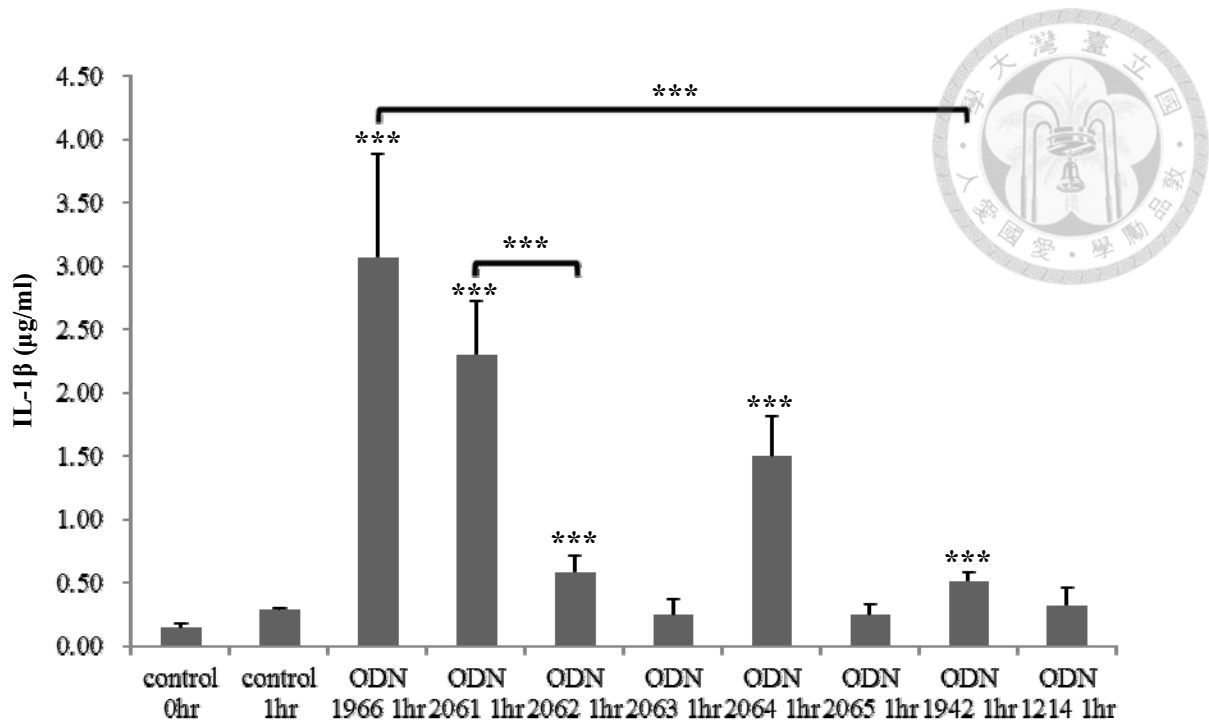
以 500 nM ODN 1966 處理石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 後，於不同時間收集細胞培養液，再以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  之含量。0 hr control:代表未處理。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ;  $n$ =3)。



圖十四、以不同組成結構之 ODNs 處理石斑魚腎臟細胞，並探討其對於誘導 IL-1 $\beta$  表現之差異

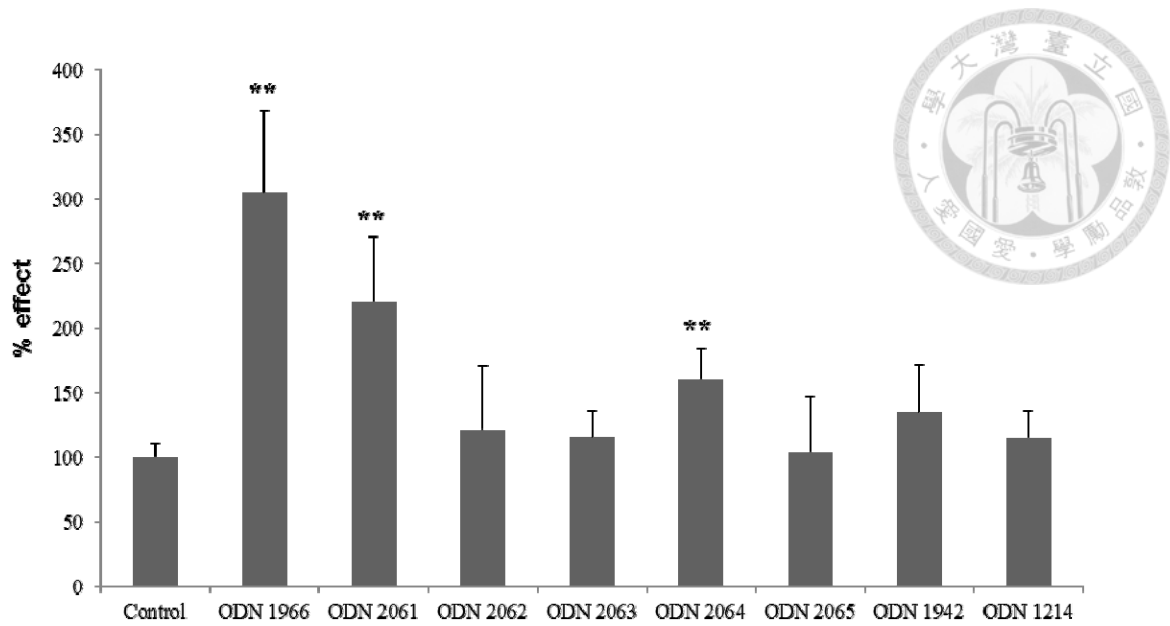
於石斑魚腎臟細胞 (GK cell) 以不同組成結構之 ODNs 500 nM 分別處理 1 小時後收集細胞培養液，再以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  之含量。0 hr control、1hr control:均表示未處理。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ; n=3)。





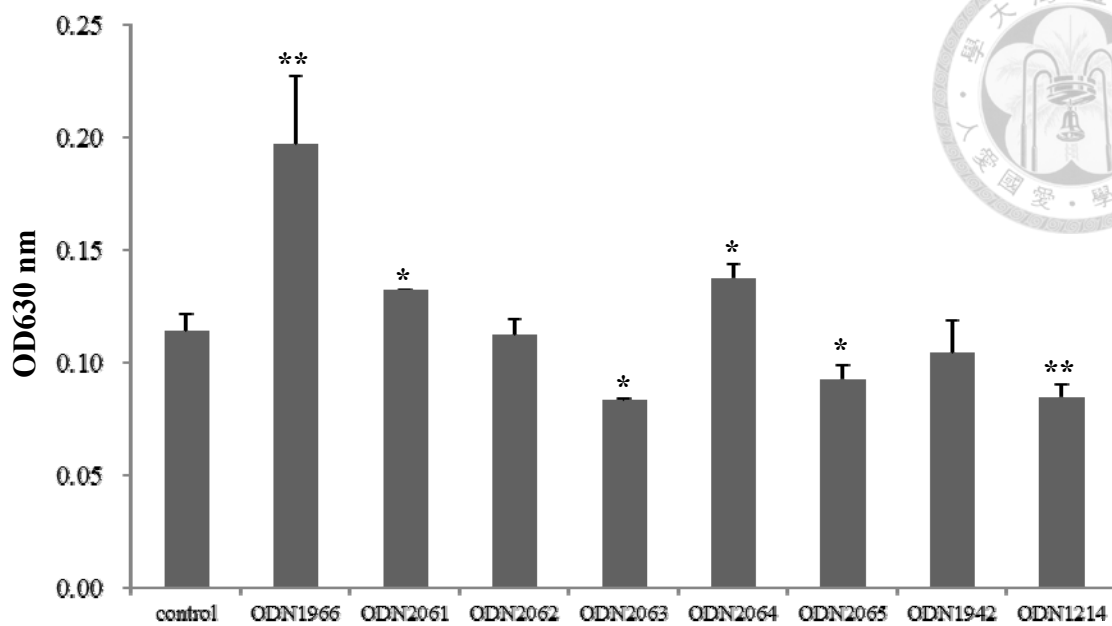
圖十五、分別以不同組成結構之 ODNs 處理自點帶石斑魚腎臟所分離出的巨噬細胞，並探討其對於誘導 IL-1 $\beta$  表現之差異

於點帶石斑魚的頭腎組織所分離出之巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 500 nM 分別處理 1 小時後，收集細胞培養液，並以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  之含量。0 hr control、1 hr control:均表示未處理。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ;  $n$ =3)。



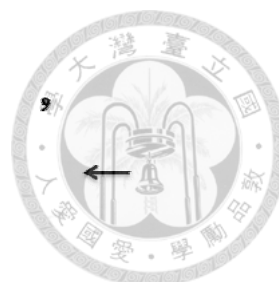
圖十六、分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，吞噬活性之差異

自點帶石斑魚頭腎組織分離出巨噬細胞後，以不同組成結構之 ODNs 500 nM 處理 1 小時後，加入帶有螢光標記的大腸桿菌，與其反應 2 小時後移除，再加入 trypan blue 於室溫下反應 1 分鐘後移除，最後以螢光分析儀檢測吞噬活性差異。數值：平均值±標準差 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , Student's  $t$ -test ;  $n=5$ )。

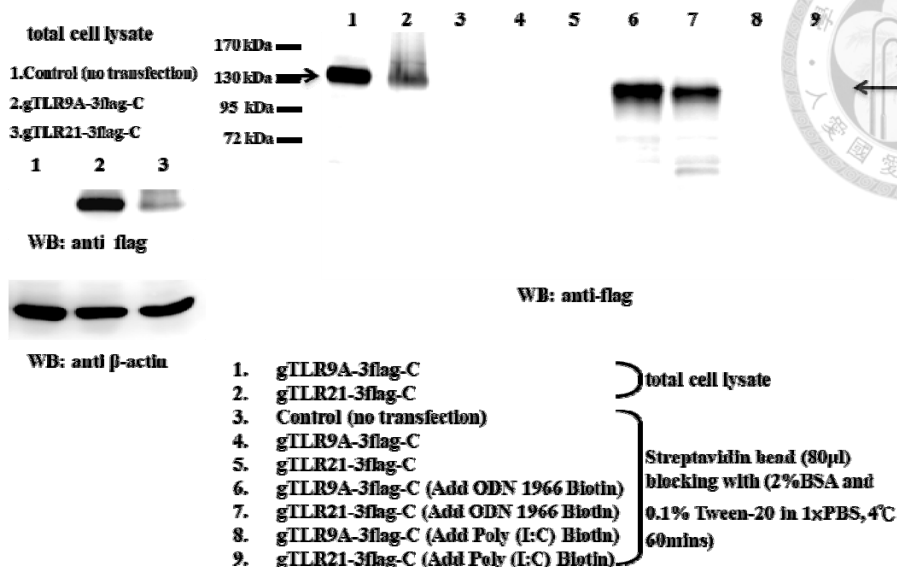


圖十七、分析點帶石斑魚巨噬細胞以不同組成結構之 ODNs 處理後，超氧陰離子表現之差異

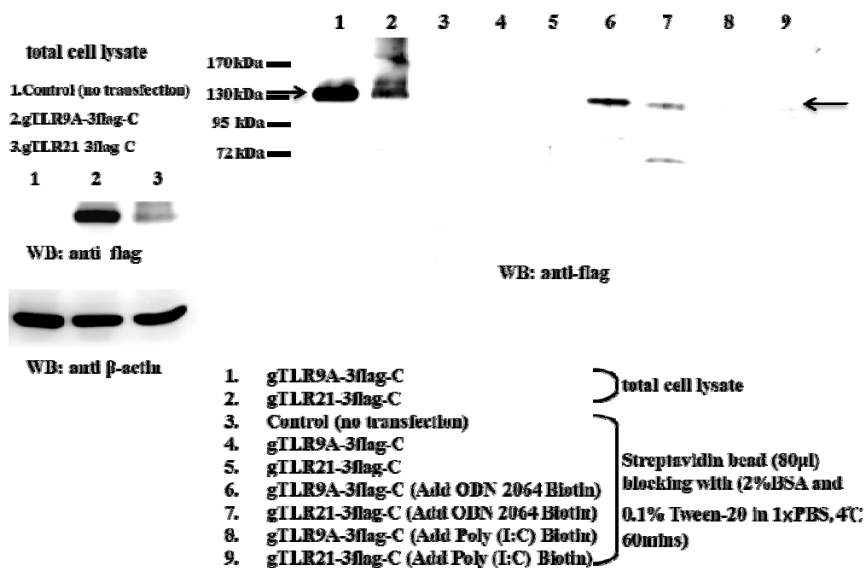
自點帶石斑魚頭腎組織分離出巨噬細胞後，以不同組成結構之 ODNs 濃度 500 nM 處理 1 小時後，移除細胞培養液，隨即加入 100  $\mu$ l NBT 及 100  $\mu$ l Zymosan，置於室溫反應 30 分鐘後移除，然後加入 100  $\mu$ l 之 100% 甲醇，置於室溫反應 1 分鐘後移除，以 100  $\mu$ l 的 70% 甲醇清洗，且重複此步驟三次後，再於抽氣櫃中風乾，最後加入 140  $\mu$ l 的 DMSO 及 120  $\mu$ l 的 2N KOH，並隨即以 ELISA 偵測 OD 630 nm 之吸光值。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test; n=5)。



(a)



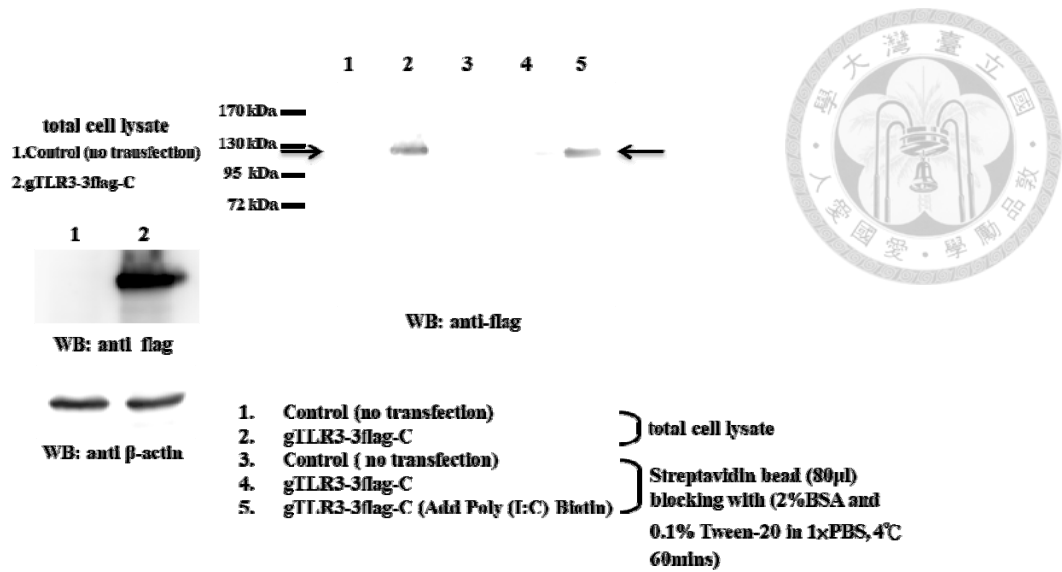
(b)



圖十八、探討 CpG 和 GpG ODN 與點帶石斑魚 TLR9A 和 TLR21 接合反應

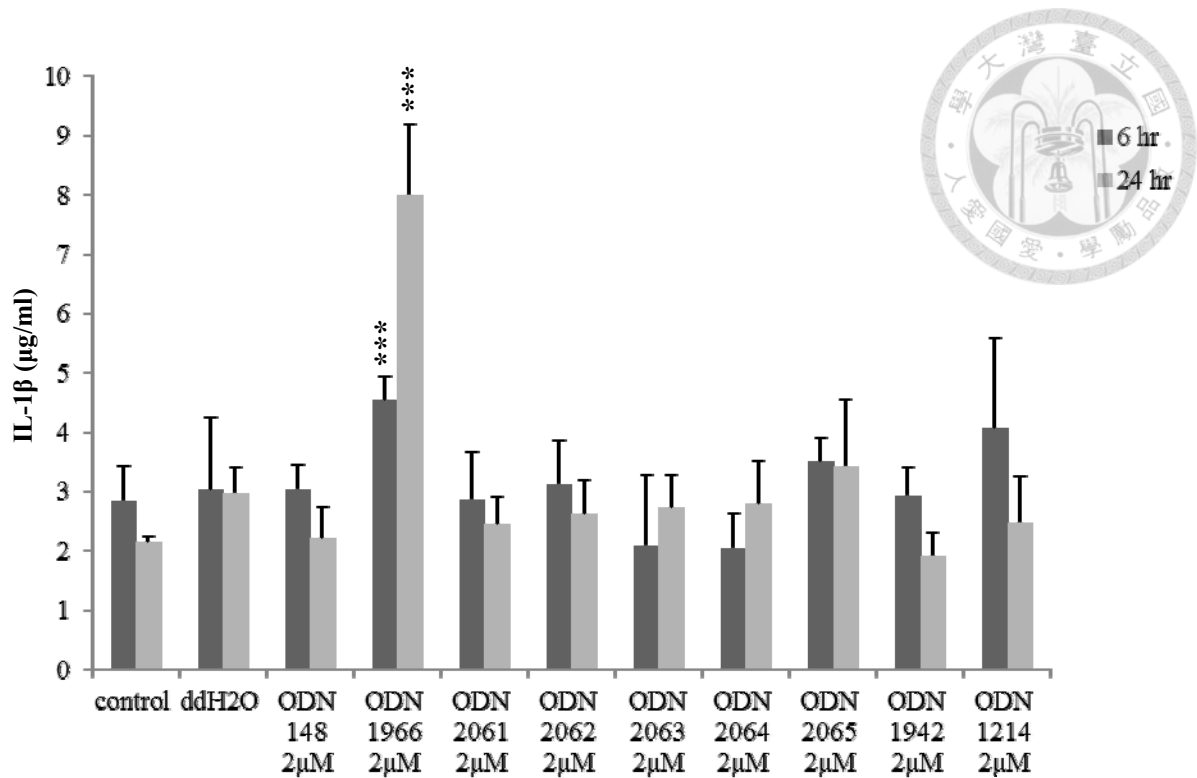
(a)將 gTLR9A-3flag 和 gTLR21-3flag 質體分別轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates 備用，然後將 cell lysates 先分別與帶有 biotin 標誌的 ODN 1966 或 Poly (I:C)一同反應，再利用 streptavidin 磁珠將與 ODN 1966 或是 Poly (I:C)有產生接合反應者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析。箭頭所標示分別為 gTLR9A 及 gTLR21 大小之相對位置。

(b) 將 gTLR9A-3flag 和 gTLR21-3flag 質體分別轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates 備用。然後將 cell lysates 先分別與帶有 biotin 標誌之 ODN 2064 或 Poly (I:C)反應，再利用 streptavidin 磁珠將與 ODN 2064 或是 Poly (I:C)有產生接合反應者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析。箭頭所標示位置分別為 gTLR9A 及 gTLR21 大小之相對位置。



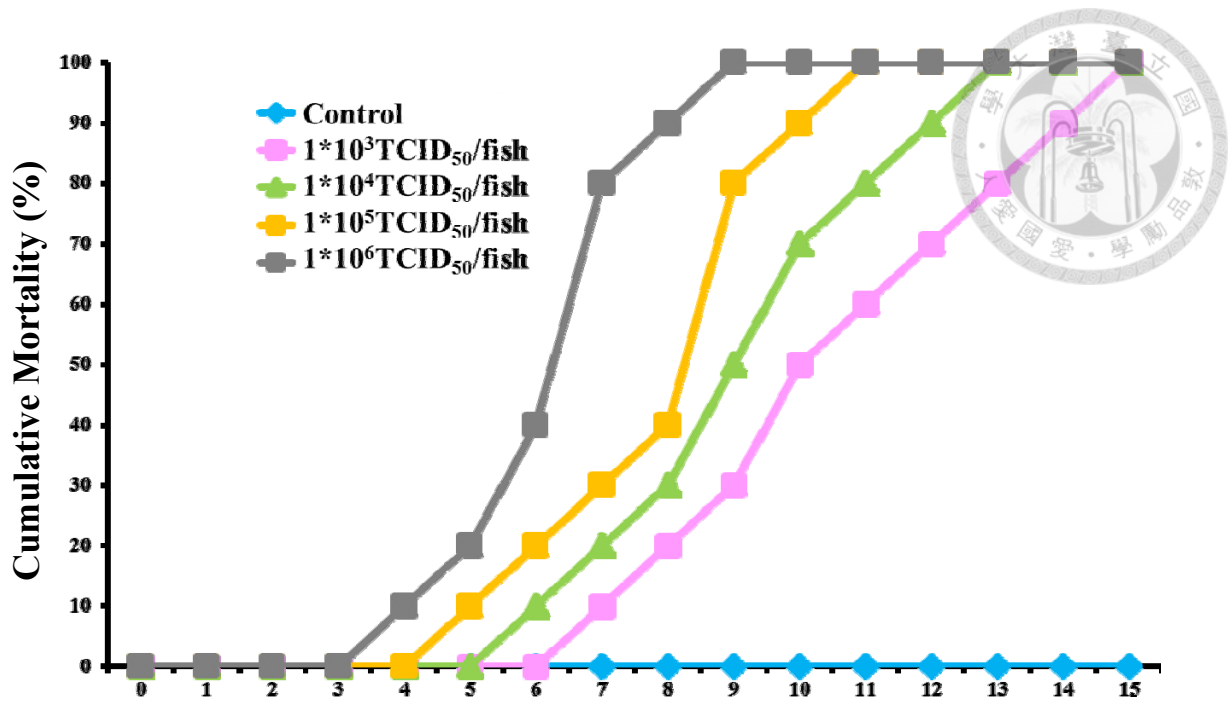
圖十九、探討點帶石斑魚 TLR3 與 Poly (I:C)之接合反應

將 gTLR3-3flag 質體轉染至 HEK 293T 細胞 24 小時後，收集 cell lysates 備用，然後將 cell lysates 先與帶有 biotin 標誌的 Poly (I:C)反應，再利用 streptavidin 磁珠將與 Poly (I:C)有產生接合反應者沉澱下來，隨後進行蛋白質電泳分析。箭頭所標示位置為 gTLR3 大小之相對位置。



圖二十、於點帶石斑魚注射不同組成結構之 ODNs 後，檢測並比較 IL-1 $\beta$  之誘導效果

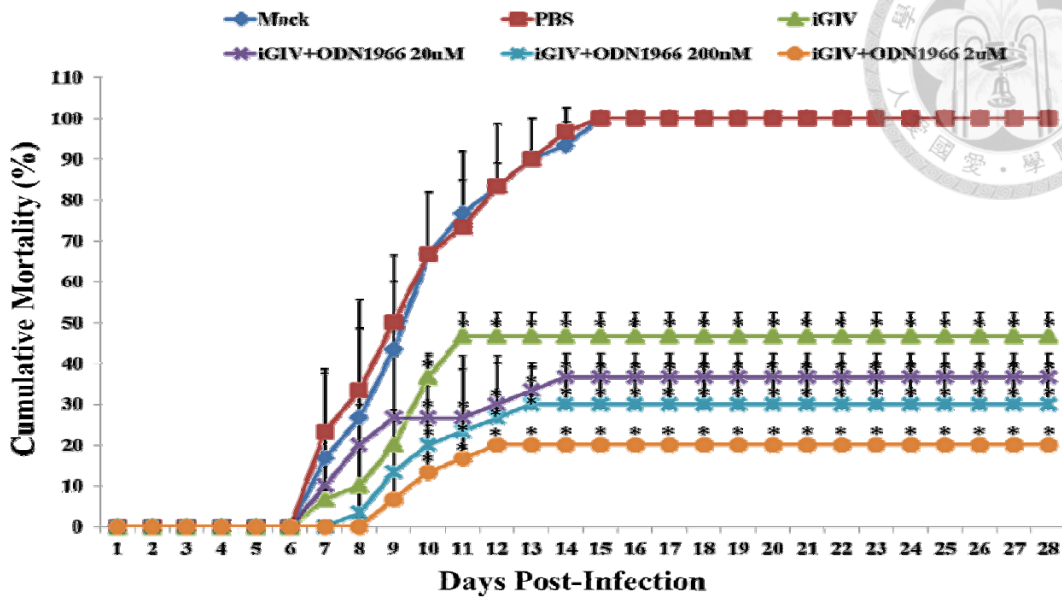
於點帶石斑魚注射(腹腔注射)不同組成結構之 ODNs 2  $\mu$ M/fish，並於注射後第 6 及第 24 小時抽血，分離血清並以 1 倍 PBS 稀釋 250 倍後，以 ELISA 分析 IL-1 $\beta$  含量。control:表示未注射、ddH<sub>2</sub>O:表示注射二次水。數值:平均值 $\pm$ 標準差 (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.0005, Student's  $t$ -test ; n=3)。



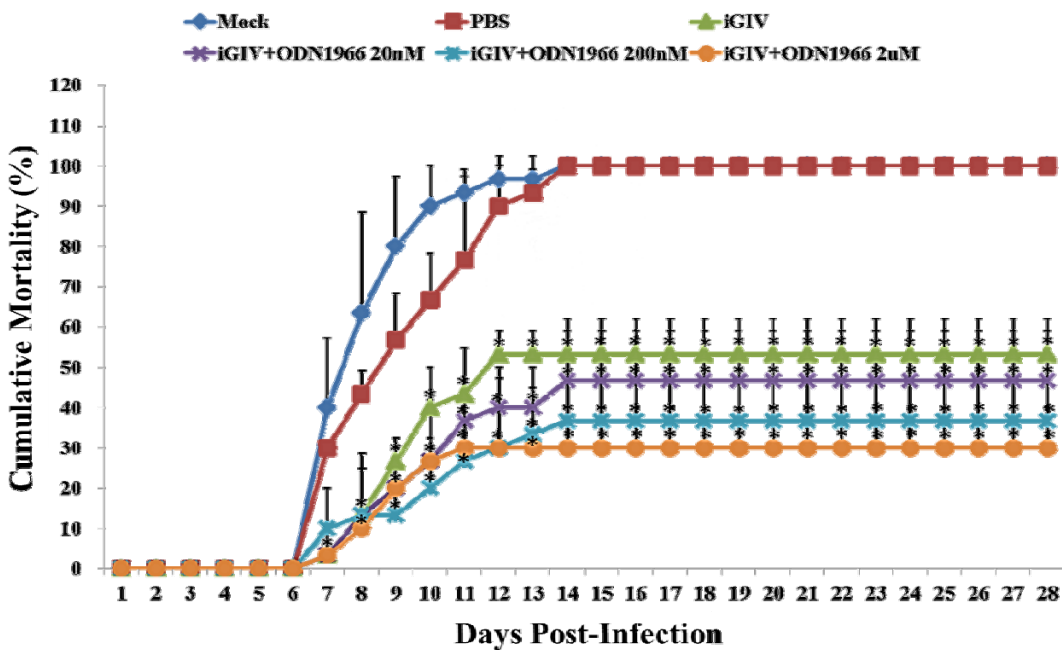
圖二十一、點帶石斑魚以不同劑量石斑魚虹彩病毒進行感染後之每日累積死亡率

以腹腔注射方式進行點帶石斑魚人工感染石斑魚虹彩病毒實驗，攻毒後每日觀察記錄死亡數量，感染劑量包括  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish、 $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish、 $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/fish 及  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/fish 共 4 種，控制組僅注射等量之 1 倍 PBS，實驗設計每組十尾魚 control:代表未感染病毒，僅注射 1 倍 PBS。

(a)



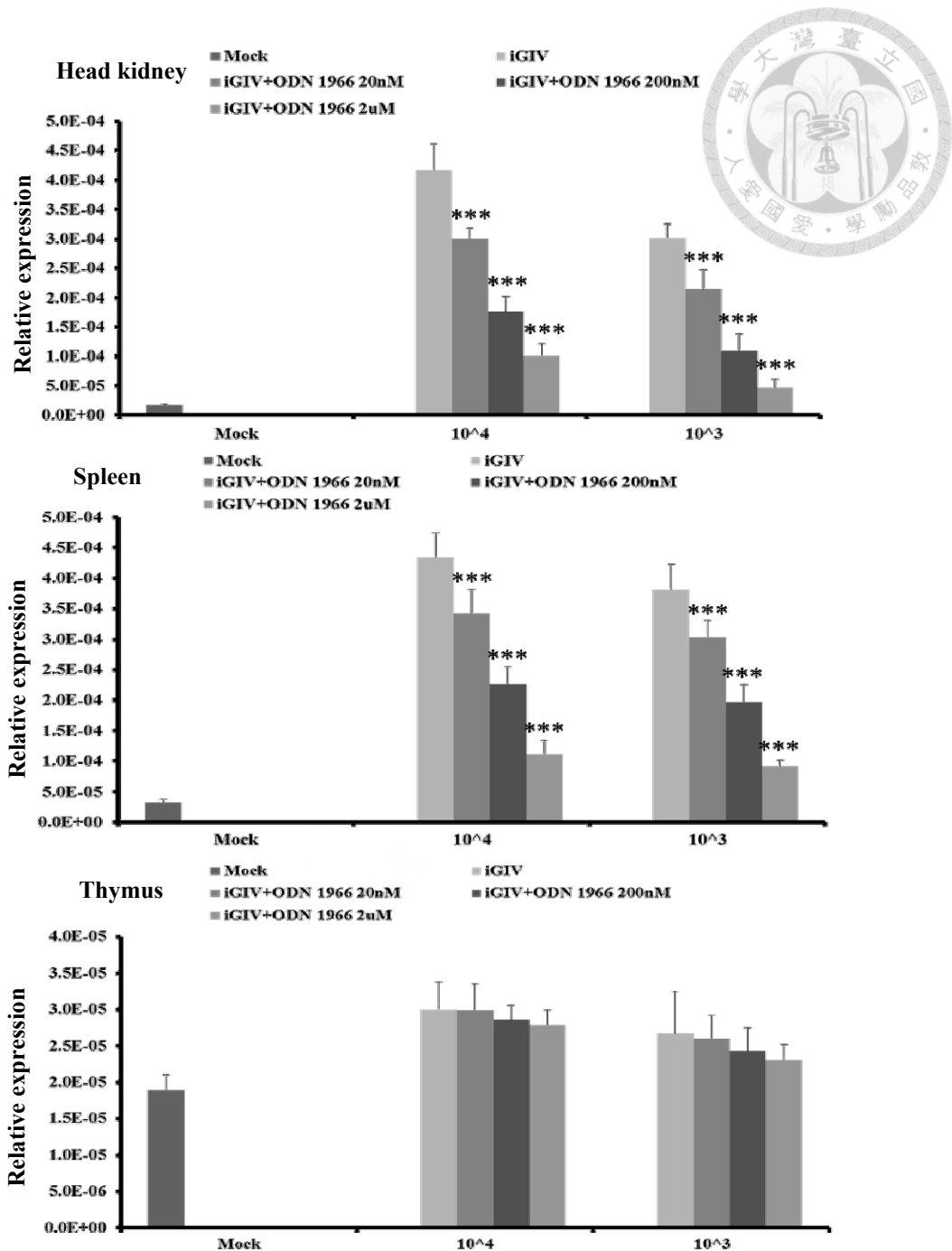
(b)



圖二十二、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後的抗病毒保護效果

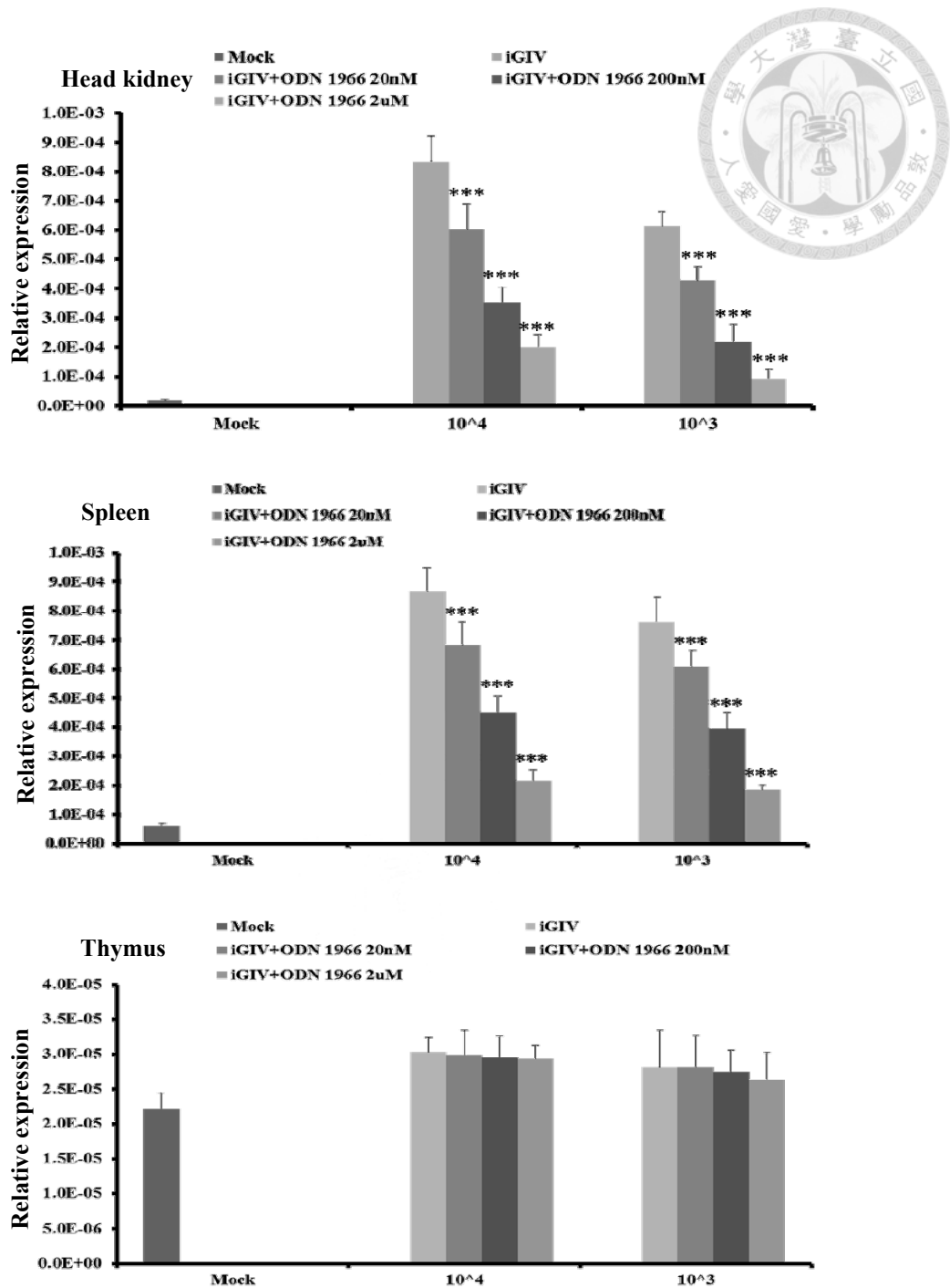
以腹腔注射方式免疫點帶石斑魚，並於免疫後十四天進行 GIV 病毒感染；以腹腔注射人工感染 GIV 之病毒劑量分為(a)  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish 及(b)  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish 兩種，每組十尾魚，以三重複進行。Mock 組:未進行免疫、僅注射 PBS 組:注射 1 倍 PBS、僅注射 iGIV 組:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ )。





圖二十三、病毒感染後二十八天仍存活魚隻 MCP 基因表現情形

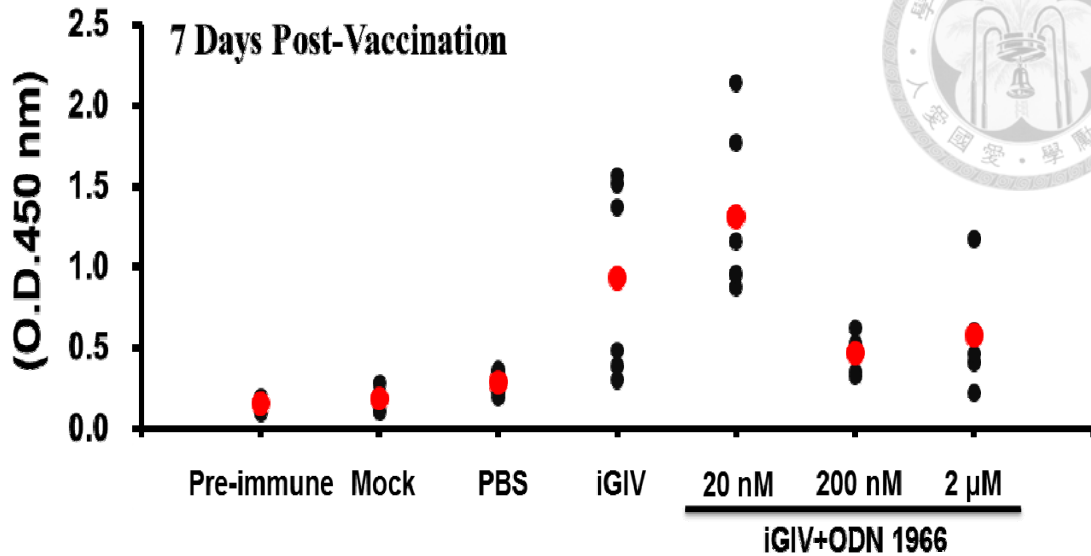
在感染後第二十八天，於每組採集三尾攻毒後仍存活魚隻的頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)與胸腺(thymus)組織，並利用即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 MCP 基因之表現情況。GIV 之病毒劑量分為  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish 及  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish 兩種。Mock 組:未進行疫苗免疫、病毒攻毒；僅注射 iGIV 組:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2 μM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2 μM。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。



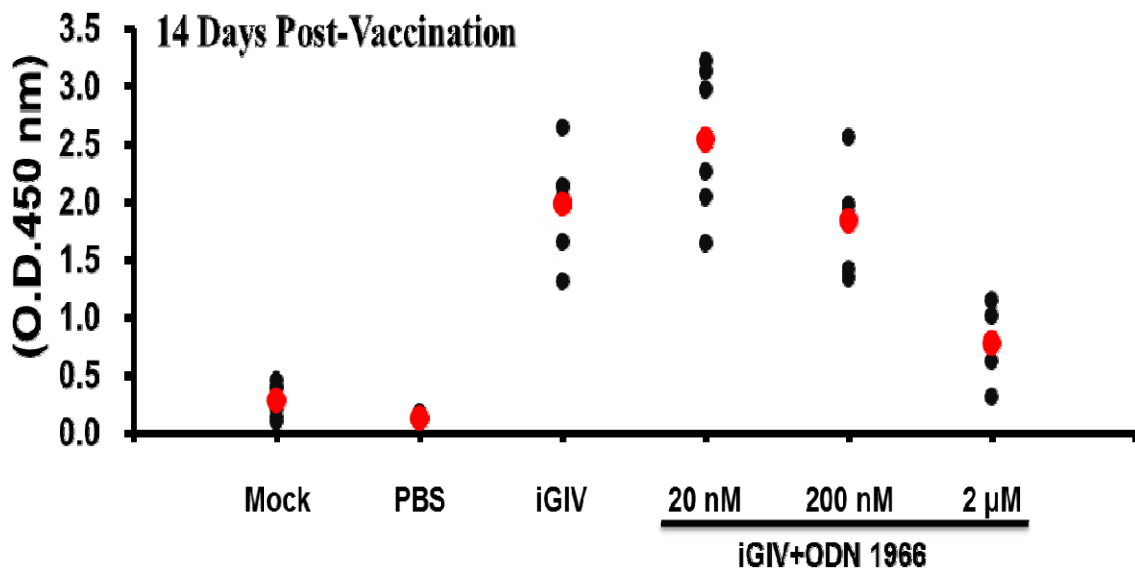
圖二十四、病毒感染後二十八天仍存活魚隻 MCP genomic DNA 基因表現情形

在感染後第二十八天，於每組採集三尾攻毒後仍存活魚隻的頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)與胸腺(thymus)組織，並利用即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 MCP genomic DNA 基因之表現情況。GIV 之病毒劑量分為  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish 及  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/fish 兩種。Mock 組:未進行疫苗免疫、病毒攻毒；僅注射 iGIV 組:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。

(a)

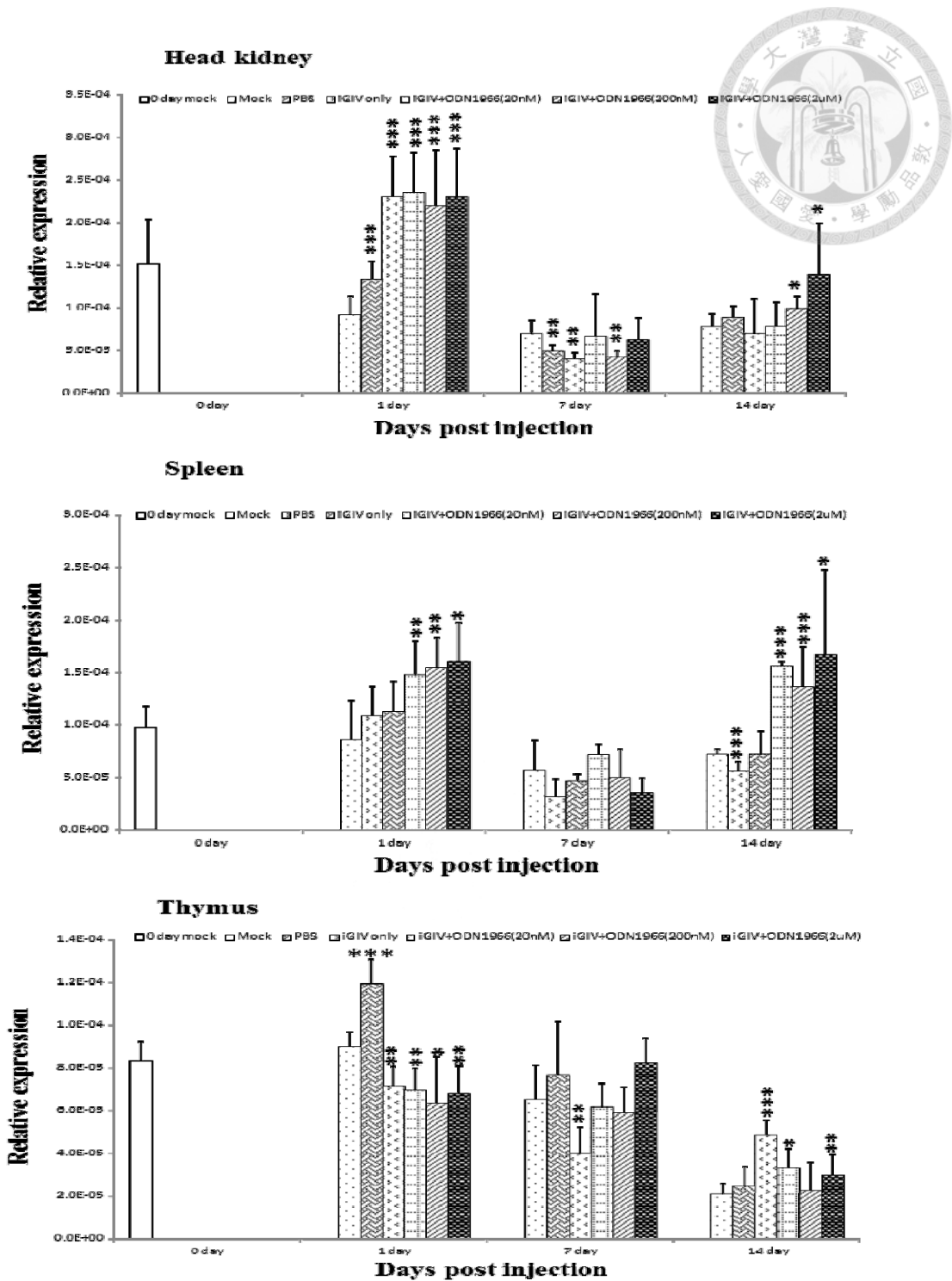


(b)



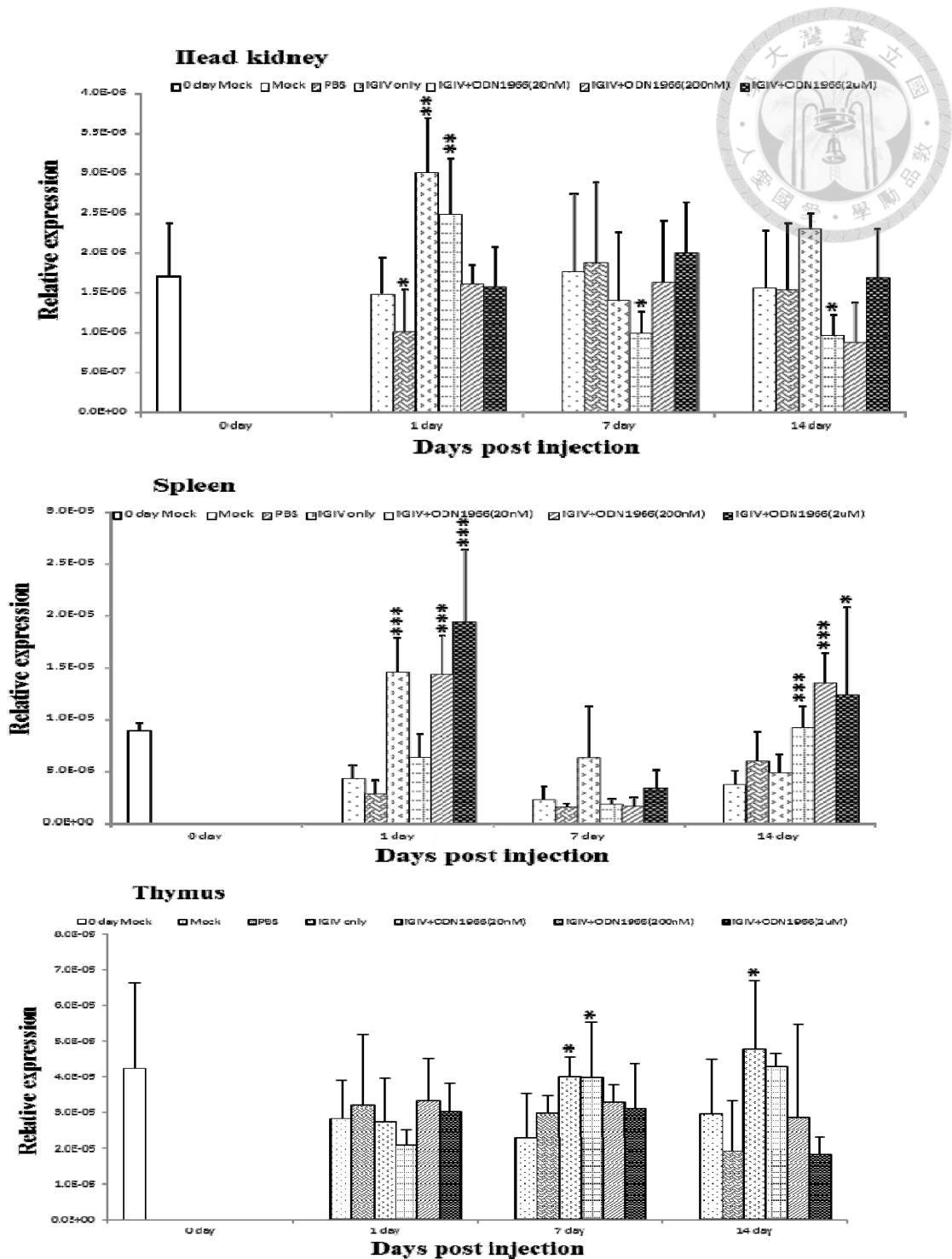
圖二十五、以不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量 CpG ODN 佐劑後免疫魚隻對於抗體生成力價之影響

利用腹腔注射方式以不活化虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑(CpG ODN)免疫點帶石斑魚，並在免疫前、免疫後第 7 天及第 14 天集血液並分離血清後，以 ELISA 分析特異性抗體力價之差異，第 7 天(a)與第 14 天(b)之分析結果如上圖。實驗共分為 6 組，包括 Mock 組:未進行免疫、僅注射 PBS 組: 注射 1 倍 PBS、僅注射 iGIV 組:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2 μM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2 μM。黑色圓點表示每尾魚特異性抗體力價，紅色圓點為: 平均值。



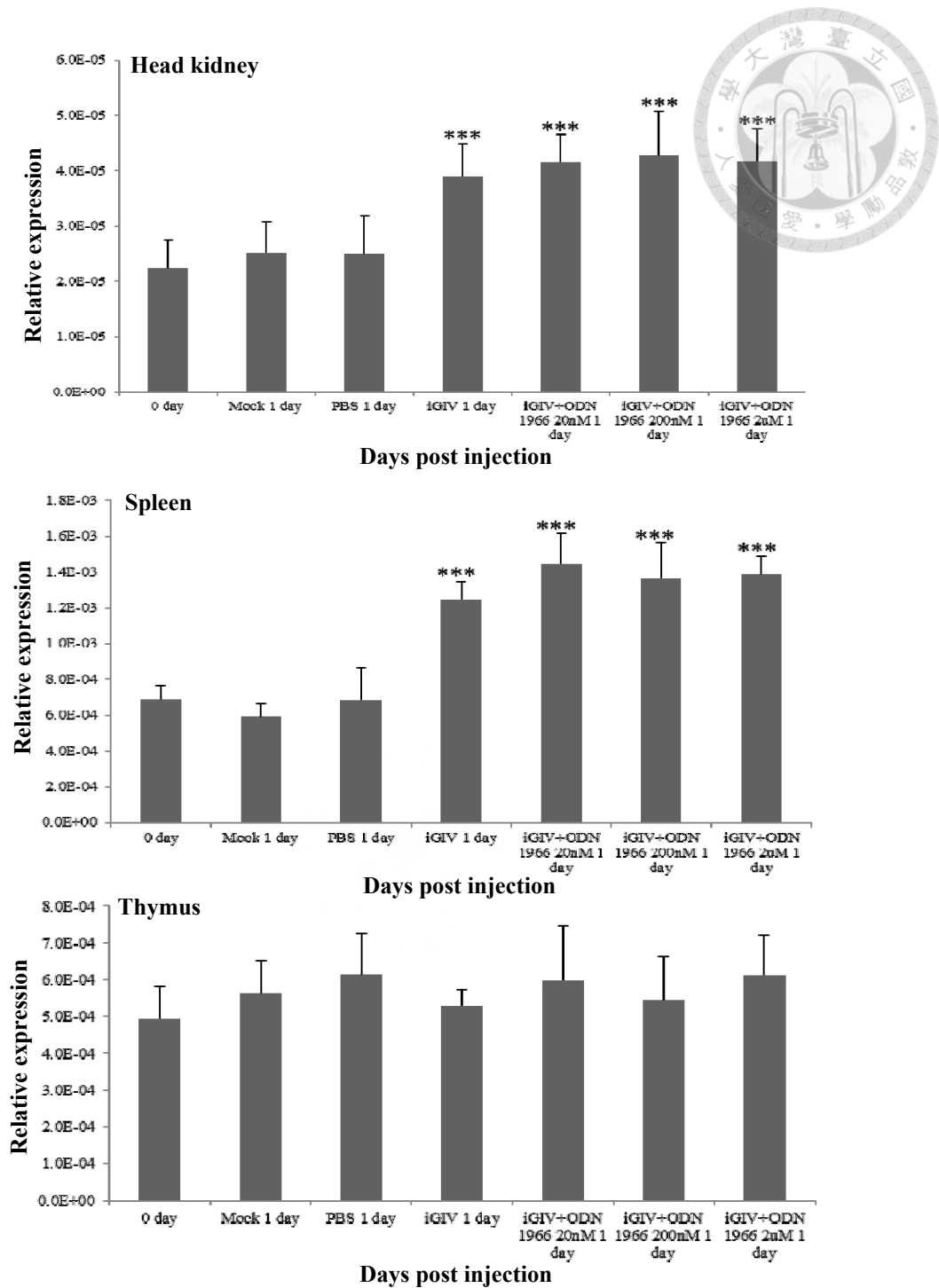
圖二十六、免疫後點帶石斑魚 gTLR9A 基因之表現情形

疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gTLR9A 基因表現情形。0 day Mock 和 Mock :未免疫組、PBS 組 :僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。



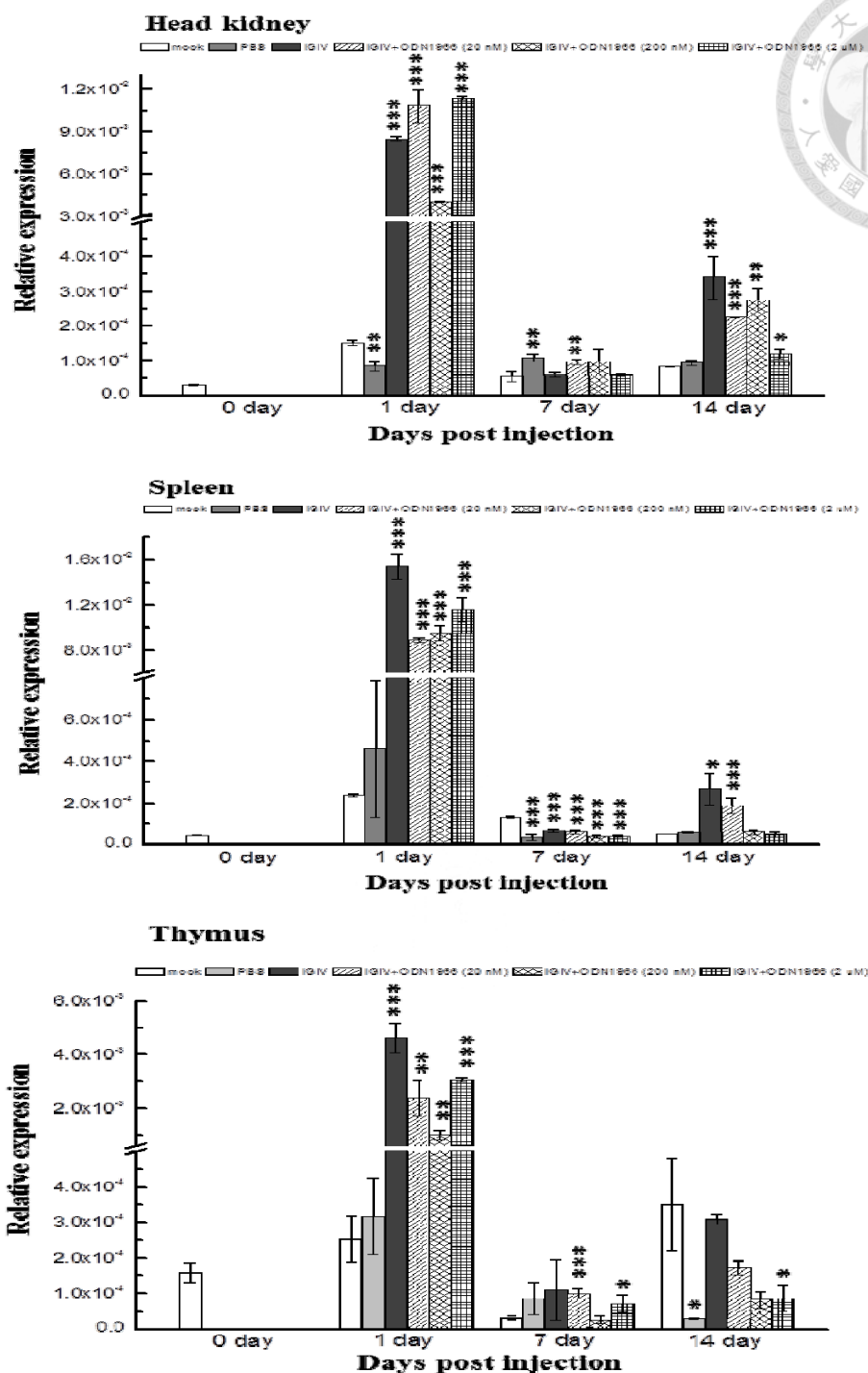
圖二十七、免疫後點帶石斑魚 gIL-1 $\beta$  基因之表現情形

疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gIL-1 $\beta$  基因表現情形。0 day Mock 和 Mock :未免疫組、PBS 組 :僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。



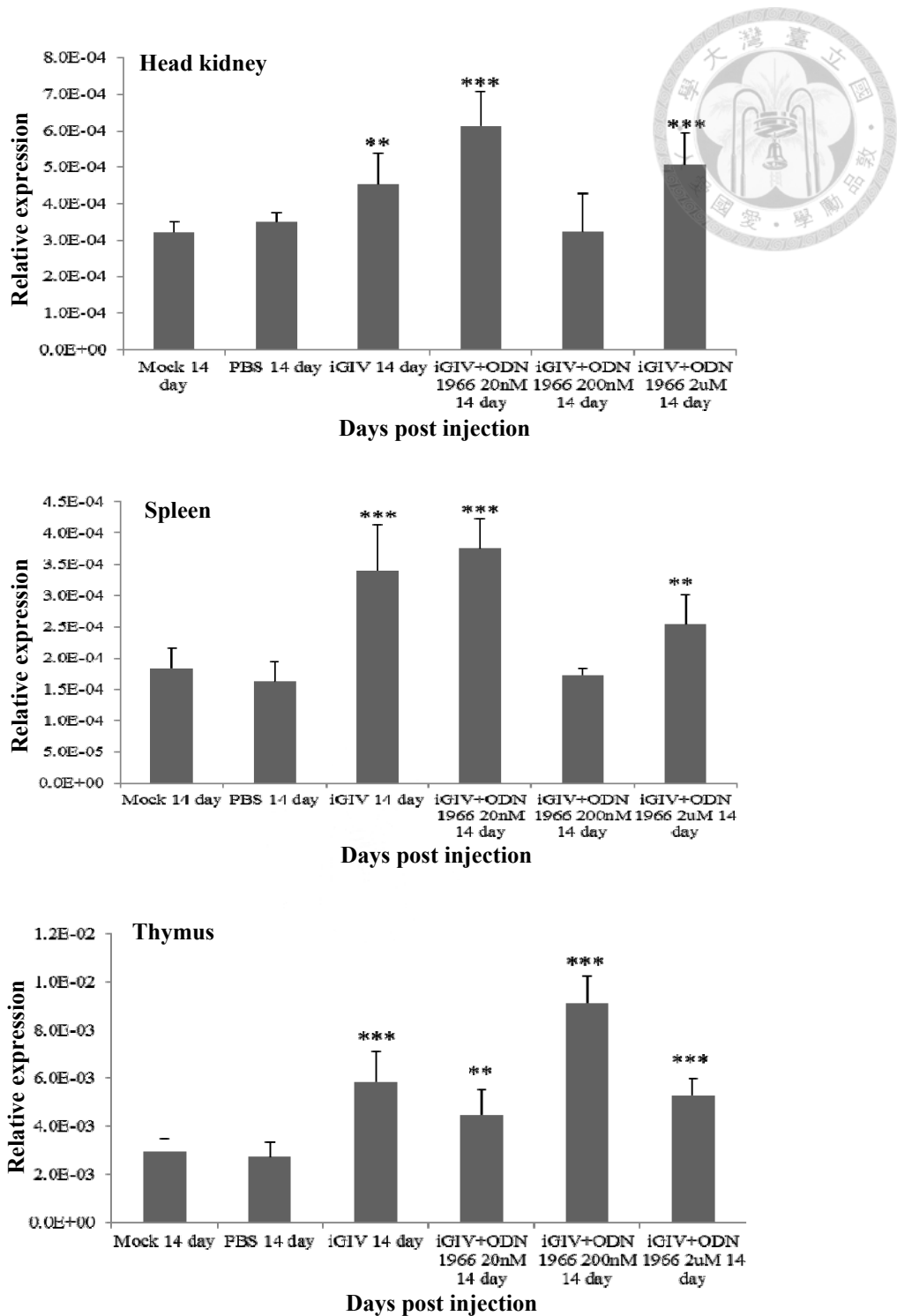
圖二十八、免疫後點帶石斑魚 gTNF- $\alpha$  基因之表現情形

疫苗處理後第 0 天及第 1 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gTNF- $\alpha$  基因表現情形。0 day Mock 和 1 day Mock :未免疫組、PBS 組 : 僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。



圖二十九、免疫後點帶石斑魚 gMx 基因之表現情形

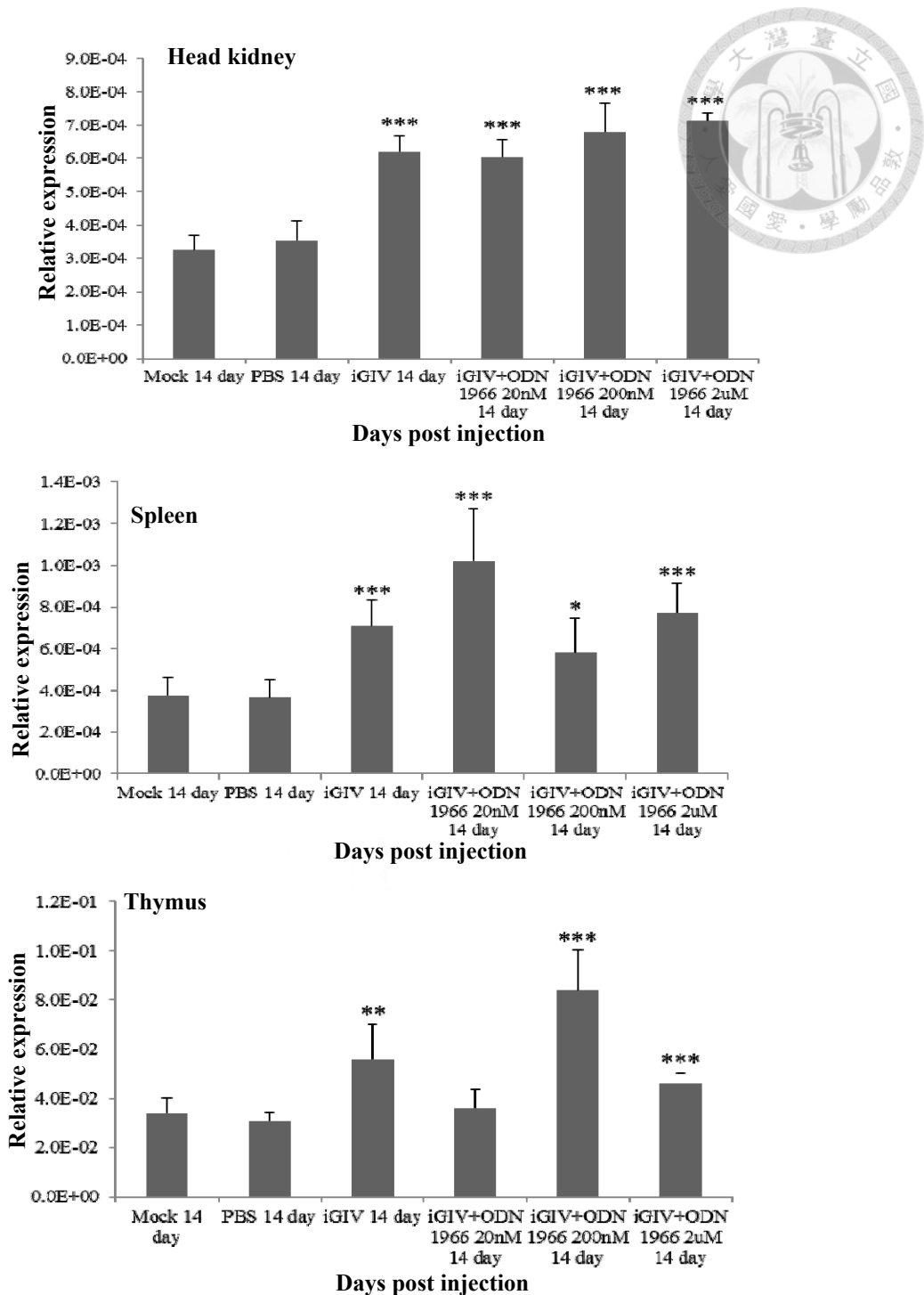
疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gMx 基因表現情形。0 day Mock 和 Mock : 未免疫組、PBS 組 : 僅注射 1 倍 PBS、iGIV only: 注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2 μM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2 μM。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ )。



圖三十、免疫後點帶石斑魚 gCD4 基因之表現情形

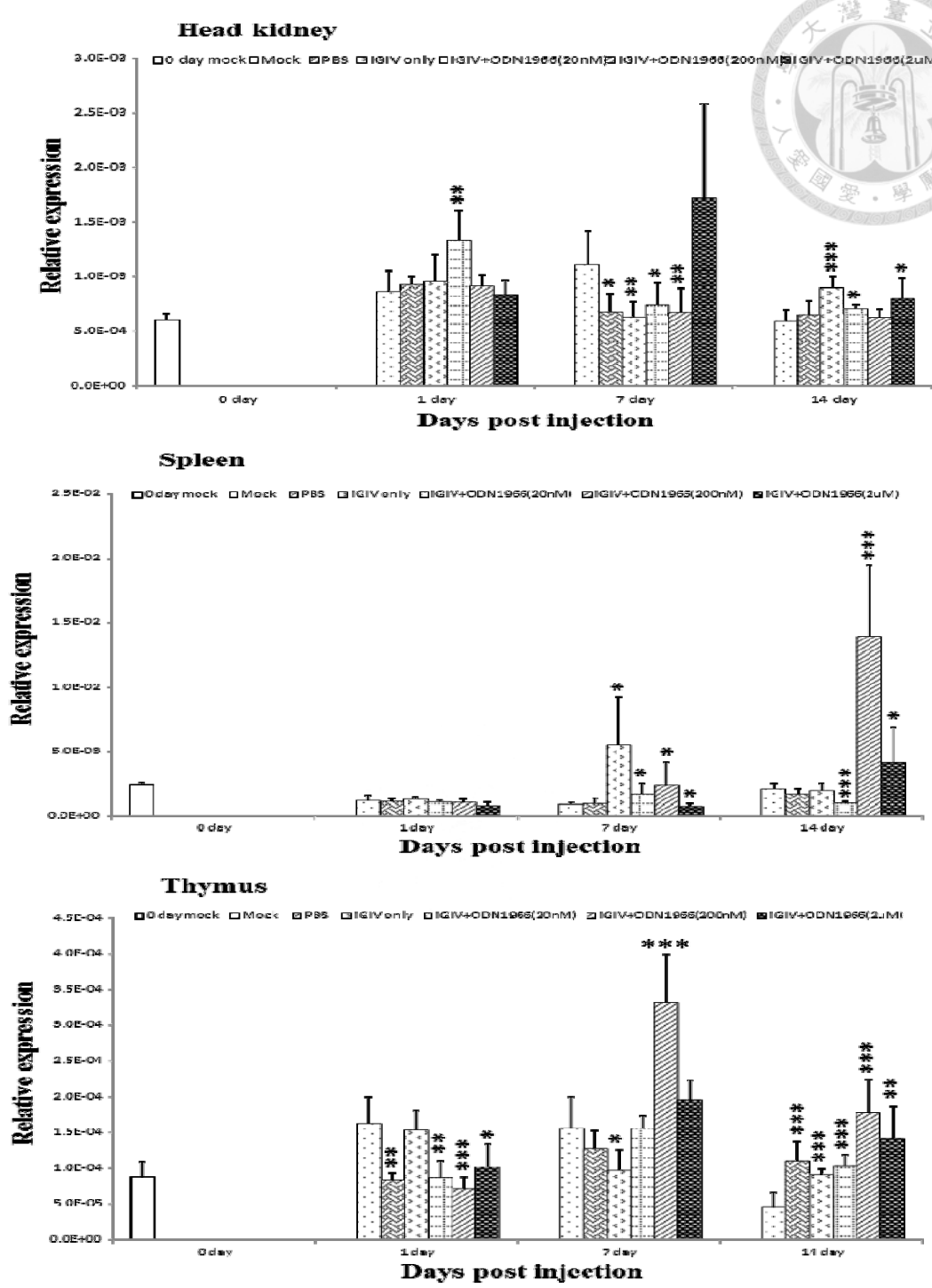
疫苗處理後第 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gCD4 基因表現情形。Mock:未免疫組、PBS 組:僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2 μM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2 μM。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ )。





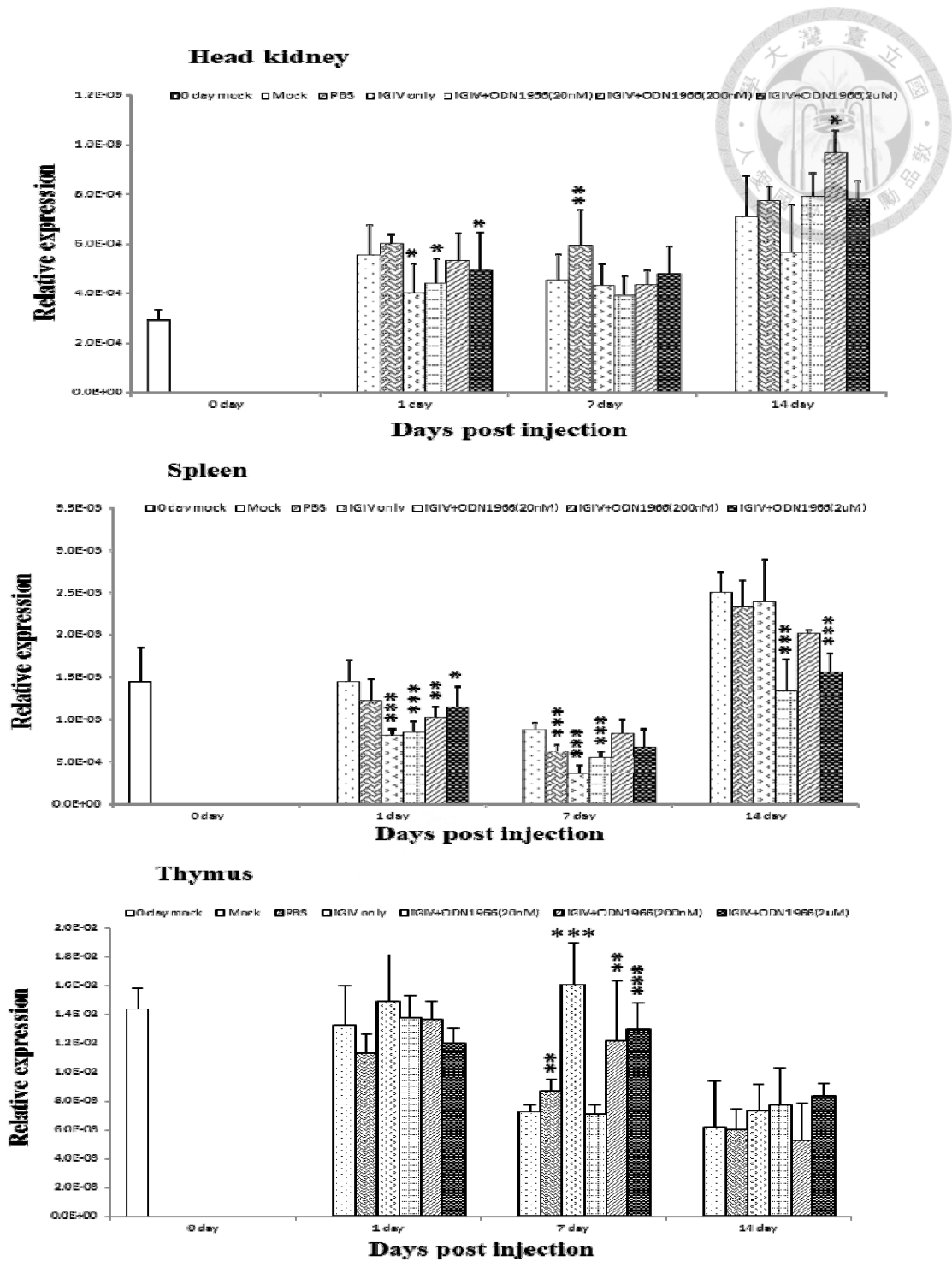
圖三十一、免疫後點帶石斑魚 gCD8 基因之表現情形

疫苗處理後第 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gCD8 基因表現情形。Mock :未免疫組、PBS 組 :僅注射 1 倍 PBS、iGIV only: 注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.005$ ，\*\*\* $p < 0.0005$ )。



圖三十二、免疫後點帶石斑魚 gT-bet 基因之表現情形

疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gT-bet 基因表現情形。0 day Mock 和 Mock :未免疫組、PBS 組 :僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2  $\mu$ M 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2  $\mu$ M。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ )。



圖三十三、免疫後點帶石斑魚 gGATA-3 基因之表現情形

疫苗處理後第 0、1、7 及 14 天採集點帶石斑魚頭腎(head kidney)、脾臟(spleen)及胸腺(thymus)組織，每組採集三尾，並以即時定量聚合酶連鎖反應技術(Real-time PCR)分析 gGATA-3 基因表現情形。0 day Mock 和 Mock :未免疫組、PBS 組 :僅注射 1 倍 PBS、iGIV only:注射 iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)、iGIV-ODN 1966 20 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 20 nM、iGIV-ODN 1966 200 nM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 200 nM、iGIV-ODN 1966 2 μM 組: iGIV ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>)+ODN 1966 2 μM。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ )。

表一、本研究所使用之 ODNs 序列相關資訊



(a)

ODN	Origin	Type	Motif	Length	Modification
PC1214 (CpG)	WSSV	A	CpG: 1	20	Partial PS
PC1215 (GpC)			GpC: 1	20	
PC1216 (GpG)			GpG: 1	20	
PC1217 (CpG)	NNV	A	CpG: 1	20	Partial PS
PC1219 (GpG)			GpG: 1	20	
PC1220 (CpG)	GIV	A	CpG: 1	24	Partial PS
PC1222 (-1CpG)			GpG: 1	24	
2216 (CpG)	Krug et al., 2001	A	CpG: 3	20	Partial PS
2216-GG(GpG)	Strandskog et al., 2007		GpG: 3	20	
1681(CpG)	Jorgensen et al., 2003	B	CpG: 4	22	PS
1681-GG(-1CpG)			GpG: 4	22	

(b)

ODNs	Motif	Length	Modification
PC1966	CpG:1	29	Typical A type
PC2061	CpG:1	24	5' polyG deleted
PC2062	CpG:1	23	3' polyG deleted
PC2063	CpG:1	29	Palindrome disrupt
PC2064	CpG:1	29	CpG motif
PC2065	CpG:1	18	5' and 3' polyG deleted
PC1942	CpG:1	29	Decrease PS number
PC1214	CpG:1	20	Truncated from
PC0148	CpG:3	19	B type ODN

備註：WSSV: White Spot Syndrome Virus 。  
 NNV: Nervous Necrosis Virus 。  
 GIV: Grouper Iridovirus 。  
 PS：表示 phosphorothioate linkages 。

表二、本研究所使用之引子與其序列相關資訊

目標基因	序列	附註
gTLR9A	F: 5'-GAGAGAGGATCCATGGCTATGCTGAAAAGTAT-3' R: 5'-GAGAGAGGATCCAAGATGAAACTTTCCTCATGT-3'	subclone
gTLR9B	F: 5'-GAGAGAGGATCCATGGCTATGCTGAAAAGTAT-3' R: 5'-AGAGAGGATCCAACACCCACAAAATACATGTGA-3'	subclone
gMyD88	F: 5'-GAGAGAGGATCCATGGCGTGTAAGGACCCAGA-3' R: 5'-GAGAGACTCGAGTTACGGCAGCGAGAGCGCCT-3'	subclone
gTLR21	F: 5'-GAGAGAGGATCCAAATGGCGAGTCTAACTTATCA-3' R: 5'-GAGAGAGAATTCTGGAAGCAAGTAATAGTTTTC-3'	subclone
gTLR3	F: 5'-GAGAGAGGTACCAAATGCAAAGGCCAAATCTGGT-3' R: 5'-GAGAGAGAATTCCTCCTTTAAATGATTAGTCA-3'	subclone
gTLR9	F: 5'-GAAGACAGTGTGTTGTGCTGTCCAGCGGT-3' R: 5'-AGACTTTTTGCACAGCCGTTTC-3'	RT-PCR
gMyD88	F: 5'-AGGCTGAAGCTGTGTGTGTTTCG-3' R: 5'-TACCCAGAACCAGCTCTGTGTC-3'	RT-PCR
gβ-actin	F: 5'-CCTGACAGAGCGTGGCTACTC-3' R: 5'-CCTTGATGTCACGCACGATT-3'	QPCR
gMX	F: 5'-CATTGCCAGGGTGGCTGTA-3' R: 5'-TGAACCTCTGGATCAGTCCCTT-3'	QPCR
gIL1β	F: 5'-GTGTTCCGGTTGTGAGGCAACT-3' R: 5'-GCGCGTCTGGTGATCA-3'	QPCR
gTLR9A	F: 5'-GTTTGTGCTGTCCAGCGGT-3' R: 5'-GCATAGCTGCATCCACCTTCTC-3'	QPCR
gT-bet	F: 5'-TGCTACCCCAAGGCTACCT-3' R: 5'-TGATAGGCTCGCGGCTGTA-3'	QPCR
gGATA-3	F: 5'-TTCCAAAACAAGACCAAAATCAAG-3' R: 5'-GGCCCCGCAGTTCACA-3'	QPCR
gCD4	F: 5'-CGTTTGCTGAGATAACGCTGAA-3' R: 5'-CGATGACTGTGACACTGCATATGA-3'	QPCR
gCD8	F: 5'-TGTGCTGGTGATTCTGCTGATT-3' R: 5'-ATCCGCTGCCCTTCCTTTAC-3'	QPCR
MCP	F: 5'-CTGCGGATTGGCTCTGCCACCGT-3' R: 5'-AGCCCGCCGGCTATGTCCGGTAGCA-3'	QPCR

表三、不活化石斑魚虹彩病毒疫苗搭配不同劑量佐劑免疫點帶石斑魚後，抗病毒保護效果

Treatment	Cumulative mortality (RPS)	
	10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /fish	10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /fish
Mock	100%	100%
PBS	100% (0)	100% (0)
iGIV	47% (53)	53% (47)
iGIV+ODN 1966 20 nM	37% (63)	47% (53)
iGIV+ODN 1966 200 nM	30% (70)	37% (63)
iGIV+ODN1966 2 μM	20% (80)	30% (70)

將各組三重複之累積死亡率求其平均值後，以公式算出各組之相對存活百分比。未免疫組 Mock 以及僅注射 PBS 的組別，無論以 1x10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/fish 或 1x10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/fish 攻毒，其相對存活百分比均為 0，iGIV 組別相對存活百分比分別為 53(1x10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/fish)及 47(1x10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/fish)，而搭配佐劑 (ODN 1966) 的組別其相對存活百分比介於 63~80 (1x10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/fish)及 53~70 (1x10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/fish)。相對存活百分比(RPS)=(1-免疫組死亡百分率/控制組死亡百分率) x 100。