

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

白點症病毒構造性蛋白 WSSV067 之定性與分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2311-B-040-001-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：陳歷歷

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 9 月 18 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

白點症病毒構造性蛋白 WSSV067 之定性與分析

Characterization of the structural protein encoded by *wssv067* of white spot syndrome virus (WSSV)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94 - 2311 - B - 040 - 001

執行期間： 94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳歷歷

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

中 華 民 國 95 年 9 月 7 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

白點症病毒構造性蛋白 WSSV067 之定性與分析

Characterization of the structural protein encoded by *wssv067* of white spot syndrome virus (WSSV)

計畫編號：NSC 94 - 2311 - B - 040 - 011

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：陳歷歷 中山醫學大學生物醫學科學學系

一、摘要

白點症病毒是造成台灣以及世界其他地區養殖蝦類嚴重死亡的病原體。分析白點症病毒的 ORFs，大部分皆無法在目前已知的資料庫比對中得到任何結果，至今只有少數基因有超越僅止於序列分析的研究，其它許多基因仍需鑑定或更進一步分析，才能瞭解它們在白點症病毒感染中所扮演的角色。

在著手進行任何一種病毒的研究時，由於病毒的結構性蛋白是第一個與寄主細胞產生交互作用的分子，益發凸顯其重要性。一般而言，病毒結構性蛋白在病毒感染寄主過程以及寄主免疫反應的誘發機制與疫苗的開發與設計上扮演重要角色。在本計畫中我們專注於白點症病毒膜蛋白 *wssv067* 基因產物，研究 *wssv067* 基因產物在蛋白質層次的定性與分析，以及利用蛋白質交互作用的技術尋找與 *wssv067* 基因產物相互作用的蛋白質。

在本計畫中利用西方點墨法我們發現在病毒結構中和感染組織中具有三種不同的蛋白質型式，利用酵母菌雙雜合實驗所得結果，發現 WSSV067 C 端部分蛋白會與一預測的草蝦幾丁質結合蛋白結合，將此部分蛋白序列經電腦比對分析，發現具有相當吻合的第二型幾丁質結合區域。

關鍵字：白點症病毒；結構性蛋白；幾丁質結合蛋白；第二型幾丁質結合區域；蛋白質交互作用。

Abstract:

White spot syndrome virus (WSSV) is the causative agent of a disease that has led to severe mortalities of cultured shrimps all over the world. However, most of the annotated WSSV ORFs encode proteins that have no homology to any known proteins or motifs. To date, only a few WSSV genes have been studied beyond this sequence analysis. Many genes that are important for the completion of WSSV's infection cycle remain either to be identified or studied further for interpreting their functional involvement during WSSV infection.

In characterizing any virus, its structural proteins are particularly important because these proteins are the first molecules to interact with the host and they therefore play critical roles in cell targeting as well as triggering host defenses. WSSV067 of Taiwan isolate is an envelop protein and it is also a best candidate for us to study the protein-protein interaction between viral protein and host receptor. Here we focus on WSSV067 to reveal its further characteristics on protein level. We also search for the molecules interacting with WSSV067 by using protein-protein interaction skills.

According to the result revealed by Western blotting, three protein forms were detected on viral structure and virus-infected tissues. Using yeast-two-hybrid analysis, WSSV067 C-terminal truncated protein binds to a putative shrimp chitin-binding protein. While aligning the protein with other known proteins, a consensus chitin-binding type-2 domain was discovered. In the researches on animal and baculovirus,

proteins with chitin-binding type-2 domain may participate in the defense or immune response of hosts.

Keywords : WSSV; structural proteins; chitin-binding protein; chitin-binding type-2 domain; protein-protein interaction.

二、前言

白點症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 在1990年代第一次在南亞被發現¹。WSSV的宿主範圍廣泛，可感染蝦、蟹、小龍蝦、龍蝦等甲殼類，對於對蝦 (penaeid shrimp) 更是具有高傷害力，在感染後三至七天內，死亡率可達90~100%，因此，對於全世界的養蝦產業都有極大影響²。WSSV具有封套，呈桿狀或紡錘狀，是一種雙股去氧核糖核酸病毒 (double-stranded DNA virus)^{3,4}，其明顯特徵是在病毒的其中一端會有類似尾狀的構造，屬於 *Nimaviridae* 病毒科，*Whispovirus* 病毒種⁵。

wssv067 基因產物為 WSSV 封套 (envelope) 上的結構性蛋白，可轉譯出1301個胺基酸，大小約為150kDa。根據過去的研究發現，wssv067基因產物具有類似豆科病毒外源凝集素 α 鏈區 (legume lectin alpha-chain prosite)。外源凝集素是一種位於細胞表面，具有紅血球凝集功能的醣蛋白，可以辨識醣類，並與其結合。通常，外源凝集素 α 鏈會與 β 鏈形成交互作用，以組裝成有功能的外源凝集素。根據先前對wssv067基因產物蛋白質的分析結果，發現wssv067基因產物可能具有3個穿膜區 (transmembrane domain)，以及數個氮連結 (N-linked) 醣化位置，與外源凝集素的特徵相似。

三、研究目的

隨著生物技術的迅速發展，利用蛋白質體學技術我們可以大範圍分析病毒的結構，目前已經發現WSSV至少有39個結構性蛋白⁶，WSSV067即為其中一種。由於WSSV067與外源凝集素之相似性，所以猜

想WSSV067可能也會與宿主的蛋白結合，以便進入宿主細胞，或是利用宿主的蛋白，將WSSV067運送到宿主細胞表面釋出，以利WSSV的感染及傳播。而酵母菌雙雜合系統 (yeast two-hybrid system)，可用於研究蛋白質與蛋白質之間的交互作用^{7,8}，因此，可利用此系統建立草蝦的cDNA資料庫，以篩選出與WSSV067有交互作用的蛋白質，用以分析WSSV067之功能。由實驗結果發現WSSV067會與一預測的草蝦幾丁質結合蛋白 (chitin-binding protein) 結合，這個發現亦值得我們進一步設計實驗深入探討。

四、文獻探討

幾丁質結合蛋白是一類能與幾丁質單體 N-acetylglucosamine (GlcNAc) 產生專一性結合的蛋白質，在立體結構上有一個由 30-43 個胺基酸殘基所組成的高保守區域，稱為幾丁質結合區域 (chitin binding domain)，能夠影響含有幾丁質成分的生物體之生長發育，包括真菌類及昆蟲類等⁹。在許多生物體內都可發現幾丁質結合蛋白，有關這一類的研究尤其以植物方面最為透徹，為明瞭何謂幾丁質結合蛋白、其功能為何，我們整理了許多相關資料報導，重點如下：

1. 植物體內有 Wheat germ agglutinin (WGA)、Lectin、Antimicrobial peptides (AMP)、Hevein、Wound-induced proteins (WIN)、Class I chitinases等⁹，這一類的幾丁質結合蛋白大多會利用雙硫鍵 (disulfide bond) 形成穩定的二聚合體 (dimer) 形式。在植物中的幾丁質結合蛋白有許多都具有殺死昆蟲的作用，這些蛋白質會與昆蟲中腸 (midgut) 的細胞或某些蛋白結合，破壞細胞或蛋白活性，以達到殺死昆蟲的目的⁹，而AMP在抵抗微生物方面的作用與殺死昆蟲的原理類似。
2. 在節肢動物方面，則有 Agglutinin/lectin¹⁰、Cuticular protein¹¹等分子，也發現有 Chitinase¹²。Lectin多屬於醣蛋白，是無脊椎動物免疫作用中重要的促進因子，其在非自我辨識 (non-self-recognition) 作用中扮演重要角色，在甲殼類的免疫研究中發現Lectin與寄

主被微生物感染後所形成的血淋巴巨噬作用 (hemolymph phagocytosis) 有關¹⁰；節肢動物的表皮是由幾丁質和蛋白質所組成的，同時具有皮膚和外骨骼的功能，而表皮的特性會受到幾丁質的比例、硬化的程度和蛋白質的序列而有所不同，目前 Cuticular protein 和幾丁質纖維交互作用在分子層次仍然不明，但已經在許多不同種生物的 Cuticular protein 上找到一些保守區域，其中最常見的為 R&R consensus 結合，然而此特殊的 R&R consensus 結構並不具備幾丁質結合區域，也沒有 Cysteine 聚集區^{13, 14}；有些昆蟲在褪皮時所分泌的消化液中含 Chitinase，這一類的 Chitinase 屬於分泌性的消化液，可以溶化舊的內表皮，使舊表皮被消化掉 80~90%¹²。

3 在細菌和病毒方面，則有 Lectin¹⁵、Chitinase¹⁶，Chitinase 的結合表面常帶有芳香族殘基 (aromatic residues)，通常是 tryptophan；在桿狀病毒 SpltMNPV 的研究中，亦發現其構造蛋白 GP37 具有幾丁質結合區域¹⁷。在大多數能分解幾丁質的微生物中都有同源蛋白，甚至在帶有 Chitinase 的昆蟲病毒中也有同源蛋白，那些病毒的感染力是依賴他們的 chitinase efficiency¹⁷。

五、研究方法

1. 勝任細胞 (competent cell) 之製備：

將單一菌落的大腸桿菌 (*Escherichia Coli*, DH5 α) 置於 5 ml LB 培養液 (1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5) 中，於 37°C 培養 12~16 小時。取此培養菌液 3 ml 移入 100 ml 的 LB 培養液中繼續培養 2~2.5 小時，之後以 1,000 x g 離心 10 分鐘回收細菌，將其懸浮於 50 ml 的 2 x TSS (LB broth 內含 5% PEG [分子量 6,000], 5% DMSO, 50 mM MgSO₄, 50 mM MgCl₂)，過程置於冰上操作，混合均勻後在 4°C 以 1,000 x g 離心 10 分鐘再將細菌沈澱下來。此沈澱塊再懸浮於 10 ml 內含 30% glycerol 的 1 x TSS 中，過程置於冰上操作，並將此處理過的菌液 (100 μ l/管) 分裝於微量離心管中，儲存於 -70°C 中備用。

2. 大腸桿菌之轉型作用 (transformation)：

將欲藉轉型作用送入大腸桿菌的重組質體 DNA 加入勝任細胞中，混合均勻後置於冰上 30 分鐘。之後經過 42°C 熱處理 90 秒，再置於冰上 5 分鐘，加入 200 μ l LB 培養液，於 37°C 旋轉培養 30 分鐘。取適量的菌液均勻塗佈在含特定抗生素的 LB 培養基上，於 37°C 培養 12~16 小時，即可進行菌落的篩選。

3. 大腸桿菌基因表現：

大腸桿菌基因表現系統係採用 pET28b 系列。將 wssv067 基因產物全長或部分片段序列 (核苷酸) 同向選殖至表現載體 pET28b。挑選出帶有表現載體的轉型細菌，置於含 ampicillin (50 μ g/ml) 的 LB 培養液中，於 37°C 旋轉培養 16~18 小時後，將培養的菌液稀釋 10 倍 (0.5 ml 菌液加至 4.5 ml 含 ampicillin 的 LB 培養液中)，於 37°C 重新培養 1 小時，然後加入 IPTG (最終濃度為 1 mM) 於 37°C 再培養 3 小時。以 10,000 x g 轉速離心 5 分鐘收集細菌，倒棄上清液後以 500 μ l 緩衝液 A (PBS [BDH Laboratory Supplies] 內含 10% glycerol) 懸浮沈澱菌塊，置於冰上，利用超音波震盪器 (Ultrasonic processor UP-50H, Dr. Hielscher GmbH) 以 80% 功率均勻震盪 20 秒，在冰上使其冷卻，如此反覆 3~4 次。以 10,000 x g 轉速離心 5 分鐘，倒棄上清液後以 400 μ l 緩衝液 B (PBS 內含 1.5% sarcosine, pH 8.0) 懸浮沈澱物，在室溫下低速震盪 1 小時至液體澄清，以 10,000 x g 轉速離心 5 分鐘，收取上清液，加入 1/10 體積帶有二價鎳離子 (Ni²⁺) 的 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 樹脂膠粒溶液，於 4°C 搖轉 16 小時。以 10,000 x g 轉速離心 5 分鐘倒棄上清液，沈澱塊加入 500 μ l 緩衝液 C (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 沖洗，10,000 x g 轉速離心 5 分鐘倒棄上清液，如此反覆重複 2~3 次，最後以 200 μ l 緩衝液 D (0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 在室溫下搖轉 2 小時或在 4°C 搖轉 16 小時將附著於 NTA 樹脂膠粒上的重組蛋白沖洗下來，純化後的重組蛋白保存於 -20°C。

4. 抗 *wssv067* 基因產物全長或部分片段重組蛋白抗體之製備：

將 150 μg 純化的 *wssv067* 基因產物全長或部分片段以二比一體積的方式與弗氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 均質乳化後，對紐西蘭雄白兔進行脾內注射 (intraspleen injection)，四週後追加第二劑，但所使用的免疫促進劑改為弗氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)。第二劑注射二週後採血，所獲得的血液先於室溫下靜置 1 小時凝集血塊，再置於 4°C 過夜使血塊萎縮凝集，然後將血液以 700 x g 離心 30 分鐘，取上清液保存於 -20°C 或冷凍乾燥後儲存。

5. SDS 聚丙烯醯胺膠電泳 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)：

反應產物加入等體積之 2 x SDS sample buffer (1 x SDS sample buffer: 0.1% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 12% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) 於沸水煮沸 5~10 分鐘，先以 10,000 x g 於室溫下離心 3 分鐘，取適量的上清液加到 SDS 聚丙烯醯胺膠，先以 80 伏特電壓進行 stacking running，再換至 120 伏特電壓直到染劑 (tracking dye) 到達凝膠底部。

6. 西方轉印法 (Western blot)：

經 SDS-PAGE 分析後的蛋白質樣本利用半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting) 轉印至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Micron Separations, Inc.)，置於 3% skim milk (Difco Laboratories; 以 w/v 溶於 TBS [0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4]) 中於室溫下進行 blocking 1 小時，然後轉換至以 3% skim milk 稀釋 2,000 倍的兔子抗 *wssv067* 基因產物之多元抗體血清中，於室溫下反應 1 小時。反應完畢後 PVDF 膜於室溫下以 washing buffer (TBS 內含 0.2% Tween-20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再將 PVDF 膜置於以 3% skim milk 稀釋 2,000 倍、鍵結 HRP (horseradish peroxidase) 的山羊抗兔子之單株抗體 (goat anti-rabbit IgG monoclonal antibody, Sigma) 中，於

室溫下反應 1 小時。反應完畢後 PVDF 膜於室溫下以 washing buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後 PVDF 膜以 Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Sciences) 處理，以 Fuji^{super} RX 底片於室溫下壓片，經顯影後即可知反應結果。

7. 病毒純化：

病毒純化方式參考 Tsai *et al.* 於 2004 年所發表的論文。剝取嚴重感染白點症病毒之病蝦的頭胸甲、鰓、泳足、步足及表皮，以液態氮磨碎後加入適量 Buffer C (20 mM HEPES, 0.4 N NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2.5 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bestatin)，置於冰上 10 分鐘並混勻蝦組織及 Buffer C 使病毒粒子釋出，於 4°C 以 1,000 x g 低速離轉 10 分鐘收取上清液。以 35% 及 56% 蔗糖溶液製造蔗糖梯度 (sucrose gradient)，將粗萃取液滴入蔗糖梯度中進行 74,700 x g 超高速離心 1 小時後可看見懸浮於蔗糖梯度中的病毒集中帶。收取病毒顆粒後以 TNE buffer (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4) 清洗並經 74,700 x g 超高速離心 30 分鐘沈澱病毒。

分離病毒封套及核蛋白鞘的方式參考 Nadala Jr *et al.* 於 1998 年所發表的論文。於前項步驟所沈澱下來的病毒顆粒中加入 1 ml 含 1% Triton X-100 的 TNE buffer，於 37°C 作用 1 小時後再經 140,000 x g 超高速離心 10 分鐘，沈澱物即病毒的核蛋白鞘，病毒封套則溶解於懸浮液中。沈澱物以適量的 TNE buffer 沖散並收取，懸浮液可以 Amicon 的 YM-10 column 離心予以濃縮。

8. 免疫沈澱法：

若欲分析之蛋白已有抗體，則取適量抗體加入 protein A beads 作用，若無抗體，則可以製作 GST 融合蛋白以 glutathione beads 作用。前述混合物於 4°C 反應並清洗後再加入欲分析之蛋白質樣品 (細胞萃取物或是感染 WSSV 之蝦體組織) 中，於 4°C 反應並清洗，

再以 elution buffer 將與抗體所結合之蛋白洗下並加以分析。

七、參考文獻

- [1] Ru Huang, Yunli Xie, Jianhong Zhang and Zhengli Shi. A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. *Journal of General Virology* (2005), 86, 1357–1361.
- [2] Jiann-Horng Leu, Jyh-Ming Tsai, Han-Ching Wang, Andrew H.-J. Wang, Chung-Hsiung Wang, Guang-Hsiung Kou, and Chu-Fang Lo. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. *Journal of Virology* (2005), 140–149.
- [3] Xixian Xie, Feng Yang. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology* (2005), 336, 93–99.
- [4] Marks H, Vorst O, van Houwelingen AM, van Hulten MC, Vlak JM. Gene-expression profiling of white spot syndrome virus in vivo. *Journal of General Virology* (2005), 86, 2081–2100.
- [5] Jyh-Ming Tsai, Han-Ching Wang, Jiann-Horng Leu, He-Hsuan Hsiao, Andrew H.-J. Wang, Guang-Hsiung Kou, and Chu-Fang Lo. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Virology* (2004), 11360–11370.
- [6] Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Hsiao, H. H., Wang, A. H. J., Kou, G. H. and Lo, C. F. (2004). Genomic and proteomic analysis of 39 structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J. Virol.* **78**, 11360–11370.
- [7] Colland F, Daviet L. Integrating a functional proteomic approach into the target discovery process. *Biochimie* (2004), 86(9-10):625–32.
- [8] Thaminy S, Miller J, Stagljar I. The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol.* (2004), 261:297–312.
- [9] Raikhel, N. V., and H. I. Lee. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 591–615.
- [10] Marques, M. R. F., and Barracco, M. A. (2000). Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 23–44.
- [11] Rebers, J. E., and Willis, J. H. (2001). A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 1083–1903.
- [12] Guo, W., Li, G., Pang, Y., and Wang, P. (2005). A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 1224–1234.
- [13] Willis, J. H. (1999). Cuticular proteins in insects and crustaceans. *Am. Zool.* **39**, 600–609.
- [14] Iconomidou, V. A., Willis, J. H., and Hamodrakas, S. J. (2005). Unique features of the structural model of ‘hard’ cuticle proteins: implications for chitin–protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **35**, 553–560.
- [15] Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., Rosas, C., Pascual, C., Alomianny, M., Vazquez, L., and Zenteno, E. (2005). Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**, 86–93.
- [16] Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M. F., Synstad, B., and Eijsink, V. G. H. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem.* **280**, 28492–28497.
- [17] Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y and Pang, Y. (2003). Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* **96**, 113–122.

八、計畫成果自評

本年度計畫執行獲得 WSSV067 N 端及 C 端不同抗體，N 端抗體並無偵測到截

斷型，然而 C 端抗體除了 WSSV067 全長外，尚偵測到另兩種截斷型，顯示 WSSV067 蛋白具有全長及 C 端截斷型至少二種型式；分析與 WSSV067 C 端截斷型蛋白產生交互作用之蛋白質，發現其為一草蝦幾丁質結合蛋白，顯示 WSSV067 與病毒引發寄主防禦能力方面有關。

本計畫順利完成，並達預期之結果。

