

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 以酵母菌雙雜合系統篩選白點症病毒膜蛋白 WSSV067 之受器

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2311-B-040-011-

執行期間：93年11月01日至94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

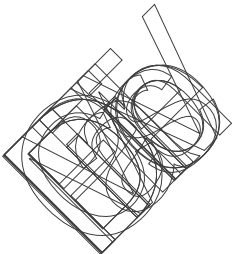
計畫參與人員：吳宛蓉、黃博鈺、孫豪廷、劉昱德

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢



中 華 民 國 94 年 9 月 16 日



# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 以酵母菌雙雜合系統篩選白點症病毒膜蛋白 WSSV067 之 受器

Screening the receptor of white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein WSSV067 using the yeast two-hybrid system

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 93 - 2311 - B - 040 - 011

執行期間： 93 年 11 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳歷歷

共同主持人：

計畫參與人員：吳宛蓉、黃博鈺、孫豪廷、劉昱德

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 94 年 9 月 16 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 以酵母菌雙雜合系統篩選白點症病毒膜蛋白 WSSV067 之受器

### Screening the receptor of white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein WSSV067 using the yeast two-hybrid system

計畫編號：NSC 93 - 2311 - B - 040 - 011

執行期限：93 年 11 月 1 日至 94 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。有關白點症病毒的基因體序列已經定序完畢，目前已公開的白點症病毒基因體序分屬於三種不同來源：中國病毒株 (305107 bp)、泰國病毒株 (292967 bp) 以及台灣病毒株 (307287 bp)。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。

不同的病毒都各自演化出不同的感染及生存策略，以更有效地感染寄主，並且有助於以後的傳播。根據前人的研究，我們發現台灣病毒株 *wssv067* 基因產物具有一個類似於豆科病毒外源凝集素  $\alpha$  鏈區，在流行性感冒病毒的研究中，發現病毒可藉著外源凝集素與寄主細胞的唾液酸交互作用而進入寄主細胞，開始其感染週期。由蛋白質分析及比對結果顯示 *wssv067* 基因產物為研究 WSSV 構造蛋白與寄主受器之結合關係最佳候選，由於酵母菌雙雜合系統為分析蛋白質-蛋白質交互作用的利器之一，因此本計畫擬建立酵母菌雙雜合系統操作平台，利用 *wssv067* 基因產物進行白點症病毒寄主受器的篩選及分析，並進一步明瞭病毒蛋白與寄主受器之結合關係。

關鍵字：白點症病毒；外源凝集素；酵母菌雙雜合系統；受器。

#### 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. The size of the WSSV genome has been differently reported for different isolates: 305107 bp, 292967 bp and 307287 bp for viruses isolated from China, Thailand and Taiwan, respectively. 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.

Different viral families have developed widely varying strategies that allow infection of host cells and that optimize the survival of that viral family by facilitating further infection. In the previous studies, a region of WSSV067 of Taiwan isolate was investigated to have the similarity to legume lectin  $\alpha$ -chain prosite. Researches on influenza virus were shown that viruses appear to enter host cells by using the protein-protein interaction between viral lectin and sialic acid (SA) of host cells. Thus, WSSV067 is a best candidate for us to study the protein-protein interaction between viral protein and host receptor. Because the most valuable use of the yeast two-hybrid system has been to identify protein partners for a

protein of interest. In this research, we will focus on establishing yeast two-hybrid system and using WSSV067 to screen host receptor.

Keywords : WSSV; lectin; yeast two-hybrid system; receptor.

## 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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。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)<sup>3,4</sup>，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<sup>5</sup>。

*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  $\alpha$  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  $\alpha$  鏈會與  $\beta$  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

病毒感染宿主細胞後，通常會以結構性蛋白與宿主細胞膜上的接受器 (receptor) 結合，進而進入寄主細胞；而病毒在宿主體內大量複製並組裝完成後，也需要藉由結構性蛋白與宿主的蛋白結合，有效率地將病毒運送到細胞表面，讓病毒在宿主細胞表面釋出，以達到更有效的感染與傳

播。由於 WSSV067 亦為結構性蛋白，以及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<sup>6,7</sup>，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。

## 四、文獻探討

根據過去的研究，越來越多證據顯示細胞骨架 (cytoskeleton) 的組成物，特別是肌動蛋白束 (actin filament)，對於許多不同病毒科的成員在細胞內的運輸都佔有重要的地位<sup>8</sup>。在侵入宿主細胞後，大部分病毒的基因體 (genome) 必須被送到細胞核或是一些特殊的 cytosolic membrane 上。但是，由於細胞質的緊密性以及高度結構性，擴散的方式效率太低，病毒並不會採用這樣的方式運送核蛋白鞘 (nucleocapsid)<sup>9</sup>；因此，病毒通常會利用細胞骨架或是細胞運動蛋白 (cellular motor protein)，例如：桿狀病毒 (baculovirus) 會在核蛋白鞘的一端誘導肌動蛋白的聚合作用 (polymerization)，以利用肌動蛋白束將核蛋白鞘從病毒進入的地方送到細胞核<sup>10</sup>；在人類免疫缺乏病毒第一型 (HIV-1) 中，亦發現使用著相同的運輸策略<sup>8</sup>。肌動蛋白在病毒進入細胞上，也扮演了重要的角色。因為肌動蛋白束中含有豐富的肌動蛋白，會使得細胞骨架產生屏障，以阻隔病毒直接通過細胞膜進入細胞，為了克服這樣的屏障，有些病毒亦會產生應變措施，例如：猿猴空泡病毒 (simian virus 40, SV40)，此病毒會活化酪胺酸激酶 (tyrosine kinase)，誘導一連串訊號傳遞的發生，使局部肌動蛋白束分離，進而穿過細胞膜，進入宿主細胞。除此之外，肌動蛋白亦被發現可以促進病毒在細胞表面的釋出<sup>10</sup>。

## 五、研究方法

## 1. 質體之構築

以 pmh15 作為模板，將分別外掛 *SmaI* site 和 *BamHI* site 的 WSSV067-CF(5'-ATTGAGCGCCCCGGG GACGA-3') 和 WSSV067-CR(5'-ATGTGGATCCTTACCT ATCCATTTTATGA-3')，作為引子 (primer)，進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)。反應完成後，將 PCR 產物與 pGBKT7 進行接合作用 (ligation)，並轉型 (transform) 到 DH5  $\alpha$  中，挑選正確的菌落，並送定序。

## 2. 酵母菌雙雜合基因庫之建構與篩選

### <RNA 萃取>

將人工感染試驗所收集的檢體 (約 0.5g) 置入研鉢中，用液態氮冷凍並磨碎，加入 6ml 的 TRIzol<sup>®</sup> (Gibco BRL)，均勻混合之後，放置室溫 5 分鐘，再加入 1.2ml 的氯仿 (chloroform)，用力震盪 15 秒，放置室溫 3 分鐘，在低溫下以 10000xg 離心 15 分鐘，收集上清液，加入 3ml 的異丙醇 (2-propanol)，於室溫下以 10000xg 離心 10 分鐘，其沉澱物即為 RNA。

### <單股 cDNA 的合成>

取 2  $\mu$ l RNA sample、1  $\mu$ l CDS III Primer 和 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，混合均勻，置於 72 °C 2 分鐘後，冰上冷卻 2 分鐘，分別加入 2  $\mu$ l 5X First-Strand Buffer、1  $\mu$ l DTT、1  $\mu$ l dNTP Mix 和 1  $\mu$ l MMLV Reverse Transcriptase，混合均勻，置於 42 °C 10 分鐘，加入 1  $\mu$ l BD SMART III Oligonucleotide，置於 42 °C 1 小時，再放到 75 °C 10 分鐘以終止反應，室溫冷卻後，加入 1  $\mu$ l RNase H，置於 37 °C 20 分鐘，即完成單股 cDNA 的合成。

### <雙股 cDNA 的合成與純化>

取 2  $\mu$ l First-Strand cDNA 作為模板進行 LD PCR (Long Distance PCR)，並加入下列試劑：70  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、10  $\mu$ l 10X BD Advantage 2 PCR Buffer、2  $\mu$ l 50X dNTP Mix、2  $\mu$ l 5' PCR Primer、2  $\mu$ l 3' PCR Primer、10  $\mu$ l 10X GC-Melt Solution、2  $\mu$ l 50X BD Advantage 2 Polymerase Mix。LD PCR 反應溫度和時間設定如下：(1) 95 °C，30 秒；(2) 95 °C，10 秒；(3) 68 °C，6 分

鐘；(4) 將步驟 (2) 和 (3) 重複 30 次；(5) 68 °C，5 分鐘。LD PCR 反應完成後，以 BD CHROMA SPIN<sup>™</sup> TE-400 Column 將其產物純化，即為純化完成的雙股 cDNA。

### <酵母菌勝任細胞的製備>

取 AH109 的單一菌落加入 3ml YPDA，置於 30 °C 200-250rpm 培養 8 小時後，取出 5  $\mu$ l 加入 50ml YPDA，置於 30 °C 200-250rpm 培養 16-20 小時，在室溫下以 700xg 離心 5 分鐘，再以 100ml YPDA 將沉澱物再懸浮，置於 30 °C 200-250rpm 培養 3-5 小時，在室溫下以 700xg 離心 5 分鐘，以 60ml 滅菌水將沉澱物再懸浮，在室溫下以 700xg 離心 5 分鐘，以 3ml 1.1X TE/LiAc (10X TE、1M LiAc、ddH<sub>2</sub>O) 將沉澱物再懸浮，高速離心 15 秒，最後在沉澱物中加入 600  $\mu$ l 1.1X TE/LiAc，混合均勻後即為 AH109 酵母菌勝任細胞。

### <共同轉型 (Cotransformation)>

分別取 20  $\mu$ l ds cDNA、6  $\mu$ l pGADT7-Rec、5  $\mu$ l pGBKT7/wssv067c、20  $\mu$ l Herring Testes Carrier DNA、600  $\mu$ l competent yeast cell、2.5ml PEG/LiAc (5% PEG、10X TE、1M LiAc)，混合均勻後置於 30 °C 培養 45 分鐘，加入 160  $\mu$ l DMSO，42 °C 水浴 20 分鐘，以 700xg 離心 5 分鐘，以 3ml YPD Plus Liquid Medium 將沉澱物再懸浮，置於 30 °C、200-250rpm 培養 90 分鐘，以 700xg 離心 5 分鐘，以 6ml NaCl Solution (0.9%) 將沉澱物再懸浮，最後分別塗在 TDO (SD/-His/-Leu/-Trp) 和 QDO (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp) plate 上，置於 30 °C 培養 3-5 天後，出現的菌落即為候選酵母菌。

## 3. 候選酵母菌質體之分離

取出已篩選的菌落，以 YPDA 培養 24 小時，以室溫 13000rpm 離心，在收集下來的酵母菌中加入 20  $\mu$ l lyticase，作用 1 小時，再加入 20% SDS，置於 -70 °C，作用 30 分鐘後，以 Column-Pure<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit (LAMDA BIOTECH) 將質體抽取出來。以 5'ADLD (5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCAC CAAAC-3') 和 3'ADLD

(5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTACTACG-3') 作為引子 (primer)，進行 PCR，反應時間和溫度設定如下：(1) 94°C，3 分鐘 (2) 94°C，1 分鐘 (3) 58°C，1 分鐘 (4) 72°C，3 分鐘 (5) 重複步驟 (2) (3) (4) 30 次 (6) 72°C，5 分鐘 (7) 4°C，15 分鐘。反應完成，跑膠確認片段大小後，與 pGEM-T easy vector 進行接合作用 (ligation)，並轉型 (transform) 到 DH5  $\alpha$  中，利用藍白菌挑選正確的菌落，並送定序。

#### 4. 序列分析

利用 NCBI 的 blastn 比對定序結果，再利用程式 CLUSTAL X 與 GeneDoc 進行編輯，進一步看出其彼此之間序列的相似性。

### 六、結果與討論 (含結論與建議)

在各個候選酵母菌定序完成後，利用 NCBI 進行序列分析，其中 Y367-1 在 blastn 比對後發現，與草蝦 (*Penaeus monodon*) 的 actin2 (act2) 非常相似。其 Score 值為 1199，E value 值為 0.0，Identity 亦高達 92% (849/917)。再進一步使用程式 CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) 與 GeneDoc (Nicholas et al., 1997) 對草蝦的 actin 2 與 Y367-1 的序列進行編輯，亦發現兩者的相似度仍然非常地高。除了 Y367-1 外，其他已定序完成的候選酵母菌仍在繼續分析中，目前還有另外 20 個候選菌落也正在定序。

利用酵母菌雙雜合系統所篩選出來與 WSSV067 有交互作用的 Y367-1，與草蝦的一種肌動蛋白 (actin 2) 非常相似。根據過去研究肌動蛋白與病毒的關係，推測 WSSV 會與肌動蛋白產生結合可能有兩種原因。

(1) 因為目前尚未知道 WSSV 進入宿主細胞後的型態，亦不知 WSSV 是否為包裹著封套進入宿主細胞；假設 WSSV 是包裹著封套進入宿主細胞，則封套上的 WSSV067 與肌動蛋白結合，其作用可能就是為了要在 WSSV 進入宿主細胞後，促使 WSSV 的遺傳物質在細胞內的運送

效率，使其可以藉由肌動蛋白的幫助，將遺傳物質送入細胞核，讓病毒的 DNA 能夠大量複製，進而使 WSSV 能夠更有效感染及傳播。

(2) 另一種可能是，當 WSSV 在宿主細胞內大量複製，並完成組裝，整個病毒由封套所包裹住，此時，便可利用封套上 WSSV067 與肌動蛋白的結合，促進 WSSV 由宿主細胞表面釋出。

### 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] Colland F, Daviet L. Integrating a functional proteomic approach into the target discovery process. *Biochimie* (2004), 86(9-10):625-32.
- [7] Thaminy S, Miller J, Stagljar I. The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol.*

- (2004), 261:297-312.
- [8] Xixian Xie, Feng Yang. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology* (2005), 336, 93 – 99.
  - [9] Beate Sodeik. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in Microbiology* (2000), 8, 10, 465-472.
  - [10] Alicia E. Smith, Ari Helenius. How Viruses Enter Animal Cells. *Science* (2004), 304, 9, 237-242.

#### 八、計畫成果自評

本計畫順利完成，並達到預期的成果。

