

國立交通大學

生物科技學院
生物科技研究所

碩士論文

使用重組蛋白發展對 HPV、IHHNV 和 TSV
殼蛋白有專一性之單株抗體



**Using Recombinant Protein to Develop Monoclonal
Antibody Specific to Coat Proteins of
Hepatopancreatic Parvovirus (HPV)、
Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis
Virus (IHHNV) and Taura Syndrome Virus (TSV)**

研究生：陳文鴻
指導教授：吳東昆博士

中華民國九十五年六月

使用重組蛋白製造對 HPV、IHHNV 和 TSV 殼蛋白
有專一性之單株抗體

Using Recombinant Protein to Develop Monoclonal Antibody
Specific to Coat Proteins of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV)、
Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)
and Taura Syndrome Virus (TSV)

研究生：陳文鴻

Student：Wen-Hung Chen

指導教授：吳東昆 博士

Advisor：Dr. Tung-Kung Wu



A Thesis

Submitted to Department of Biological Science and Technology

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biological Science and Technology

June 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年六月

使用重組蛋白製造對 HPV、IHHNV 和 TSV 殼蛋白有專一性之單株抗體

學生:陳文鴻

指導教授:吳東昆博士

國立交通大學生物科技學系碩士班

摘 要

根據聯合國糧食及農業組織 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO) 的數據指出，蝦養殖產業為一個能夠提供高營養價值的食物來源，也能為發展中國家提供經濟收入的一重要之產業。但近年來，因為病毒問題，使其遭受巨大之損失。因此若是能有效且儘早偵測到病毒，可以針對所面臨之狀況，提早作出對應，以降低損失。

本研究從 NCBI database 資料中，分別在肝胰小病毒 (hepatopancreatic parvovirus, HPV)、傳染性皮下及造血組織壞死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV) 和桃拉病毒 (taura syndrome virus, TSV) 等三種常見之蝦病毒中，各選出一段殼蛋白基因，利用重組蛋白的方式，在大腸桿菌中大量表現。並利用親和性管柱純化，將純化所得之蛋白質當作抗原注射至老鼠體內誘導，以期發展出針對這些蛋白質具有專一性的單或多株抗體。

目前實驗已可以成功地利用大腸桿菌，大量表現 HPV、TSV 及 IHHNV 的重組蛋白，並利用重組蛋白上所帶的親和性標記進行純化，再以這個純化的重組蛋白，在 BALB/c 老鼠體內引發免疫反應，經由 ELISA 及西方點墨實驗證實，可以免疫出對重組蛋白具有反應的單株抗體。之後結合融合瘤技術發展單株抗體，在 HPV 方面，總共得到 2 株細胞株。在西方點墨實驗中，均可以辨別到 HPV 重組蛋白。在蝦體的檢驗中，使用 3-24 這株單株抗體進行西方點墨實驗，其初步結果與病毒檢測試劑 (PCR

diagnosis) 所得結果相符。在 IHHNV 目前篩選到 3-62 這株細胞株，可辨認到 IHHNV 重組蛋白。經由初步結果顯示，証實所發展的單株抗體，具有發展成檢驗試劑的可能性。



Using Recombinant Protein to Develop Monoclonal Antibody Specific to Coat Proteins of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) 、 Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus (IHHNV) and Taura Syndrome Virus (TSV)

Student: Wen-Hung Chen

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Institute of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract

As the FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) reported, the aquaculture of shrimp is a very important industry. It can support high nutritional food and provide the income for the developing nation. Because of the viral disease, this industry suffers huge loss recently. Therefore, if the detection of virus can be effective as soon as possible, we may prevent the diseases from the shrimp.

In this study, we refer to the NCBI database to design primers which are used for amplification of the gene fragment of hepatopancreatic parvovirus (HPV) 、 infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and taura syndrome virus (TSV). These gene-encoding structural coat proteins were cloned into expression vector and transformed into *E. coli*. The objective was to produce recombinant coat protein with a 6-histidine tag. After induction, the recombinant proteins were produced, purified by Nickel column and used for immunization of BABL/c mice for polyclonal antibody production. The mouse antiserum showed specific immunoreactivity to the recombinant protein as verified by ELISA and Western blot. In HPV, the western blot data indicated that two monoclonal antibodies against the HPV recombinant protein were constructed. The detection of shrimps with monoclonal antibody 3-24 strain exhibited parallel result as compared with that of PCR diagnosis. In IHHNV, 3-62 strain showed immunoreactivity against the IHHNV recombinant protein or coat protein purified from the IHHNV infected shrimp.

謝 誌

首先，感謝我的指導教授，吳東昆 老師，在學生學涯遭受難關時，願意幫助學生，這些日子以來，在生活上、實驗上給予甚多的指導與建議，讓學生得以有機會完成這個學位。另外，很感謝 淡江化學的鄭建中 老師、系上 袁俊傑 老師，百忙之中給予學生，在論文與實驗方面的建議與指正，讓學生的論文更加完整。

感謝 林苔吟 老師，於前段求學日子中，在生活上的體諒與幫助，僅獻上學生的祝福。

另外，感謝 毛仁淡 院長、邱顯泰 老師、賴美玲 師母及系辦 郭淑卿、郭珍佑、呂聖鈴 小姐，在那段失意的日子裡，所給予的幫助與鼓勵。

完成我的碩士了，這段日子以來，感謝大家的幫忙與鼓勵，終於克服了。實驗室的程翔、裕國學長、媛婷學姐、小芭、希希、阿美、晉豪、大鳥、令宗、宏明、晉源、小妹、文萱、大景、皓宇以及志豪、昶文、秉博、惠敏、勝致學長、文亮學長，還有智媛、惠娟、婉如等，很感謝大家，這些日子以來的陪伴與幫助。

最後，謝謝兩個弟弟，俊豪、春元，在家裡經濟狀況不好的情況下，能夠體諒我這個已居立業之年的哥哥，繼續就學。父親、母親，很感謝有您們的支持，讓我可以一路求學過來，親愛的家人們，謝謝你們的支持，謝謝。

文鴻

06年6月21日于交大

目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	iv
目錄.....	v
圖目錄.....	viii
表目錄.....	x
附錄.....	xi
	頁次
第一章 前言.....	1
1.1 水產養殖及養蝦產業概論.....	1
1.2 蝦病對養殖產業的影響.....	4
1.2.1 蝦病之簡介.....	4
1.2.2 主要蝦病毒之介紹.....	6
1.2.2.1 White spot syndrome virus (WSSV)	6
1.2.2.2 Hepatopancreatic parvovirus (HPV)	7
1.2.2.3 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)	8
1.2.2.4 Taura syndrome virus (TSV)	8
1.2.2.5 其它病毒.....	9
1.3 蝦病毒之檢測.....	10
1.4 對抗蝦病毒之策略.....	11
1.5 本研究之目的.....	12
第二章 材料與方法.....	15
2.1 抗源的製備.....	15
2.1.1 病毒殼蛋白 (coat protein) 基因的選取.....	15

	頁次
2.1.2 引子的設計.....	15
2.1.3 表現載體.....	16
2.1.4 表現菌株.....	18
2.1.5 病毒基因體的抽取與確認.....	18
2.1.6 蛋白質重組.....	20
2.1.7 表現與純化.....	24
2.2 單株抗體之製作.....	26
2.2.1 材料.....	29
2.2.2 免疫反應.....	30
2.2.3 骨髓瘤細胞.....	30
2.2.4 細胞融合.....	31
2.2.5 細胞增殖與取樣篩檢.....	32
2.2.6 抗體之生產.....	32
2.2.7 腹水抗體製備.....	33
2.3 抗體的測定.....	33
2.3.1 材料.....	33
2.3.2 ELISA.....	35
2.3.3 SDS-PAGE.....	35
2.3.4 Western blot.....	36
2.4 儀器設備.....	37
第三章 結果與討論.....	37
3.1 病毒基因片段取得.....	37
3.2 重組蛋白的表現與純化.....	40
3.3 抗體的製作.....	43
3.3.1 單株抗體力價的測試.....	43



	頁次
3.3.2 單株抗體對抗原反應篩選.....	44
3.3.3 單株抗體特異性之測試.....	47
3.3.4 重組蛋白 Alignment 結果 (使用 Clustal W).....	50
第四章 結論與展望.....	51
第五節 參考文獻.....	53



圖目錄

	頁次
圖 1-1：水產品佔動物性蛋白攝取之比例.....	1
圖 1-2：蝦養殖產量.....	2
圖 1-3：蝦養殖產值.....	3
圖 1-4 WSSV virions (a)及 WSSV nucleocapsid(b)之電顯圖.....	7
圖 1-5 HPV virions 電顯圖.....	8
圖 1-6 TSV virions 電顯圖.....	9
圖 1-7 YHV virions 電顯圖.....	10
圖 2-1 細胞內核酸的合成路徑.....	31
圖 3-1-1 IHHNV PCR 產物.....	37
圖 3-1-2 HPV 的確認.....	38
圖 3-1-3 HPV PCR 產物.....	38
圖 3-1-4 TSV RT-PCR 產物.....	39
圖 3-1-5 TSV Nest-PCR 產物.....	39
圖 3-2-1 IHHNV 重組蛋白的表現與純化.....	40
圖 3-2-2 IHHNV 重組蛋白與 anti-his taq 抗體西方點墨實驗.....	40
圖 3-2-3 HPV 重組蛋白的表現與純化.....	41
圖 3-2-4 HPV 重組蛋白與 anti-his taq 抗體西方點墨實驗.....	41
圖 3-2-5 TSV 重組蛋白的表現與純化.....	42
圖 3-2-6 TSV 重組蛋白在桿狀病毒系統中的表現.....	42
圖 3-3-1 實驗接種小鼠血清力價測試，HPV 重組蛋白.....	43
圖 3-3-2 實驗接種小鼠血清力價測試，IHHNV 重組蛋白.....	43
圖 3-3-3 融合成功細胞產生的抗體對 HPV 重組蛋白抗原反應篩選.....	45
圖 3-3-4 HPV 重組蛋白與抗體西方點墨結果.....	45

圖 3-3-5 HPV 3-24 抗體與蝦檢體之西方點墨實驗結果.....46

圖 3-3-6 融合成功細胞產生的抗體對 IHHNV 重組蛋白抗原反應篩選.....46

圖 3-3-7 IHHNV 3-62 抗體與蝦體之西方點墨實驗結果.....47

圖 3-3-8 HPV 3-24 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果.....48

圖 3-3-9 HPV 3-7 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果.....48

圖 3-3-10 IHHNV 3-62 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果.....49

圖 3-3-11 HPV 3-24 抗體與重組蛋白西方點墨實驗結果.....49

圖 3-3-12 HPV 3-7 抗體與重組蛋白西方點墨實驗結果.....49

圖 3-3-13 IHHVN 3-62 抗體與重組蛋西方點墨實驗結果.....50



表 目 錄

	頁次
表 1.1 蝦養殖產量.....	2
表 1.2 蝦養殖產值.....	3
表 3.1 HPV 重組蛋白 polyclonal antibodies.....	45



附 錄

	頁次
附錄一、實驗設計流程圖.....	14
附錄二、單株抗體製作流程圖.....	28
附錄三、IHHNV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列.....	61
附錄四、HPV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列.....	62
附錄五、TSV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列.....	63
附錄六、桿狀病毒表現系統.....	64
附錄七、immuno-strips.....	65
附錄八、抗原與免疫金膠抗體結合示意圖.....	65
附錄九、immuno-PCR.....	66
附錄十、抗體親和性管柱純化病毒示意圖.....	66



第一章 前言

1.1 水產養殖及養蝦產業概論

根據聯合國糧食及農業組織 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO) 的報告 (The state of world Fisheries and Aquaculture, 2004) 指出，2002 年全球捕撈和水產養殖生產工業總共提供了 1.01 億噸的食用水產品。其中至少提供了 20% 的動物性蛋白來源 (圖 1-1)。但隨著長久對自然界水資源的開發，漁業的捕獲量已呈停頓。因此水產養殖的角色在水產品供應上，日益重要。

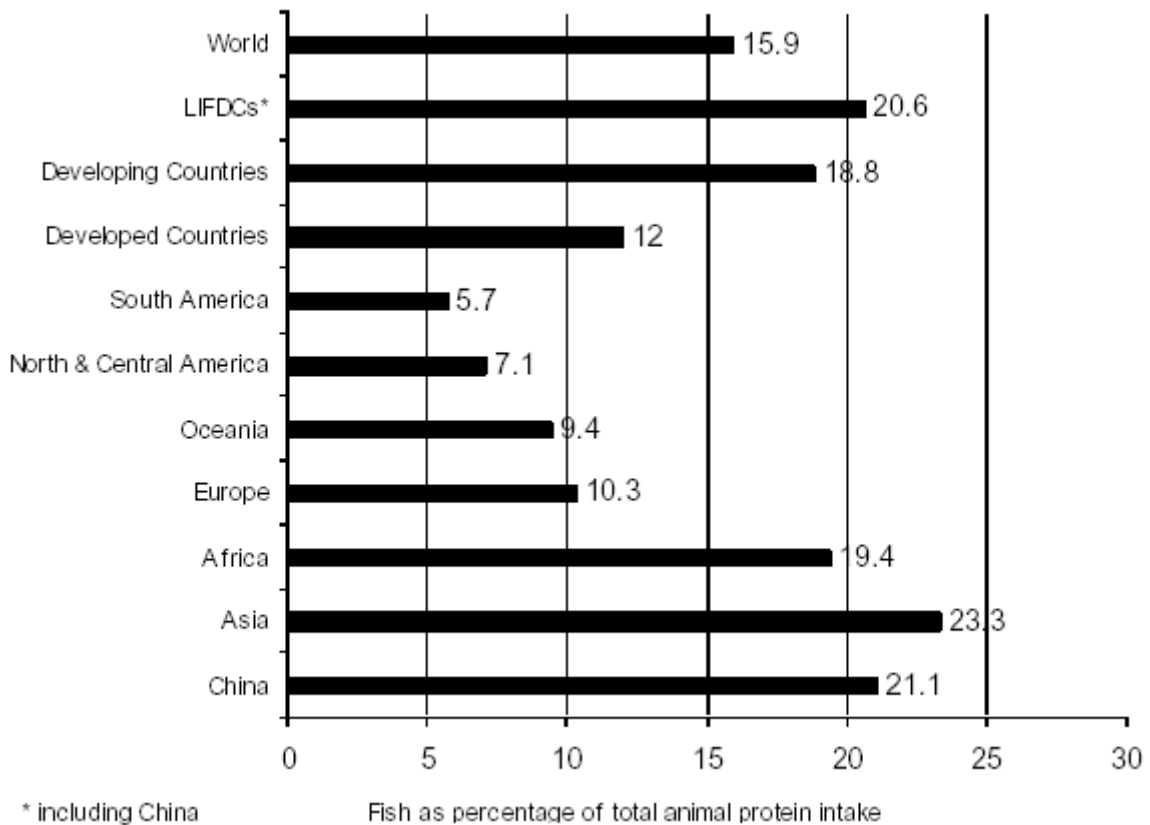


圖 1-1 水產品佔動物性蛋白攝取之比例

資料來源: FAO Fisheries Circular No.886, Rev.2,
Review of the state of world aquaculture

而在水產養殖中，養蝦產業又具有較高的經濟價值，根據 FAO 的資料顯示，從 1990 至 2003 年，年產量及產值明顯呈正向成長 (圖 1-2、圖 1-

3)。2003年時，年產量為一百八十萬噸（表 1.1），產值為近十兆美元（參考表 1.2）。總而言之，此一產業能提供食物來源，以及增加經濟收入。

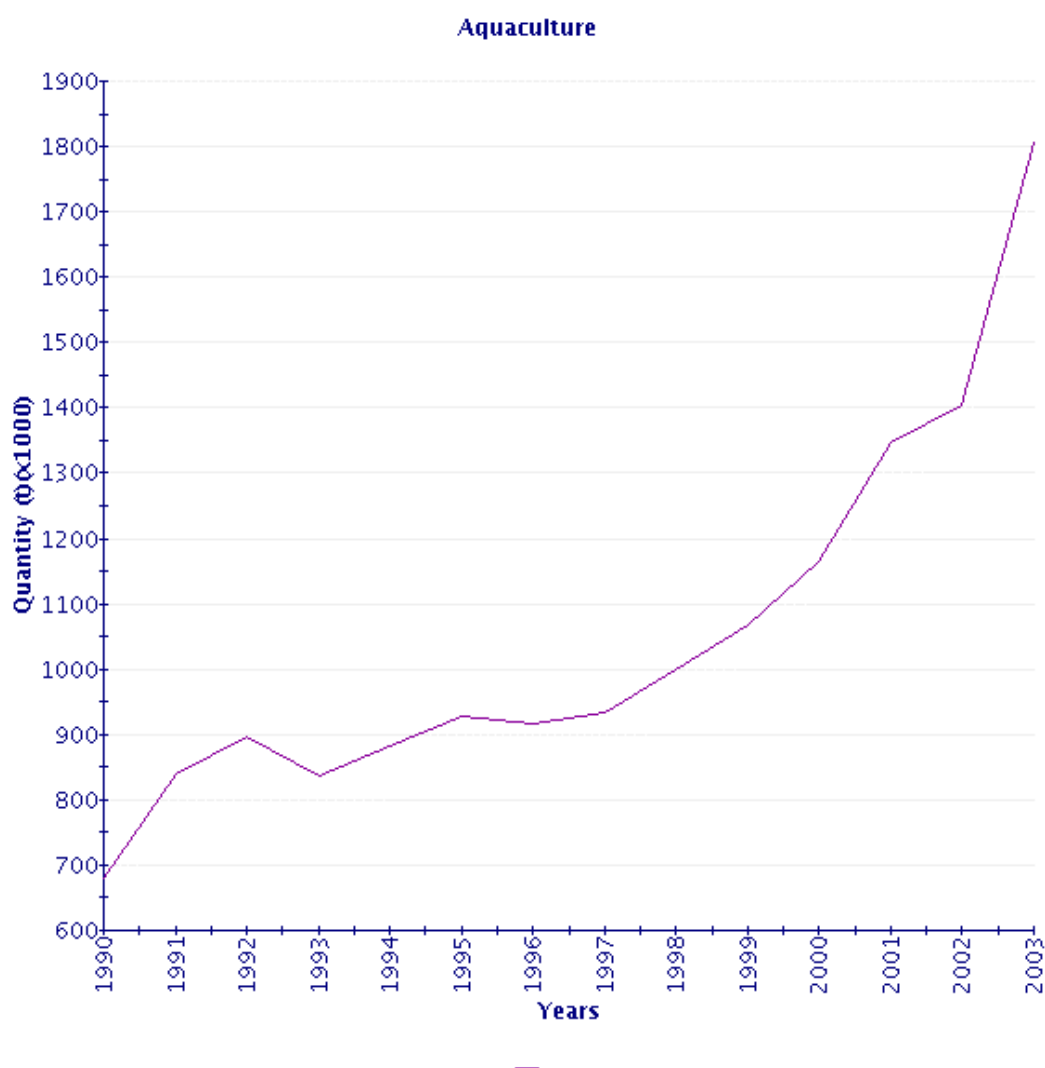


圖 1-2 蝦養殖產量

資料來源: FAO

表 1.1 蝦養殖產量

年	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
年產值(噸)	679976	838229	897042	835203	881959	928238	917315
年	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
年產值(噸)	932832	999370	1068297	1164408	1348275	1405367	1804932

資料來源: FAO

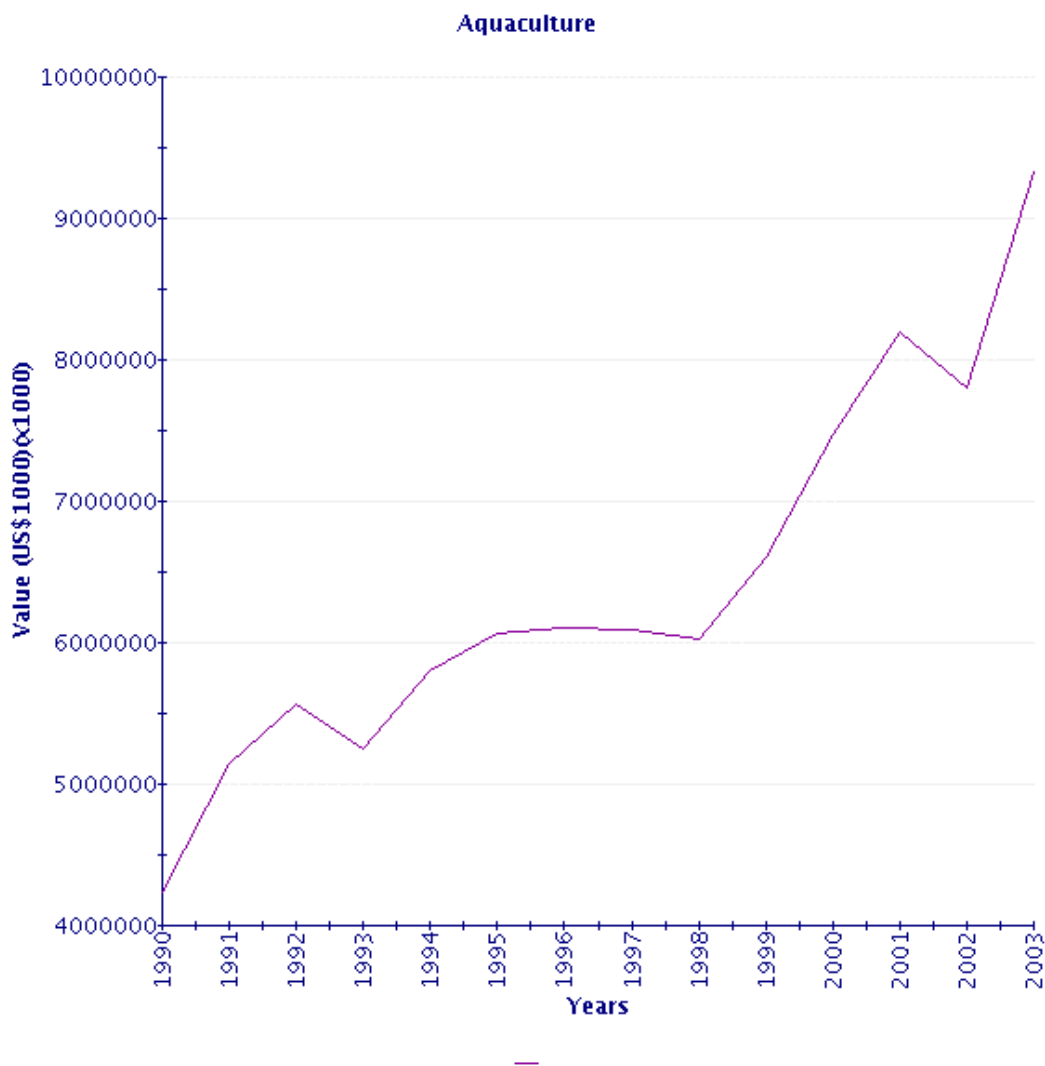


圖 1-3 蝦養殖產值

資料來源: FAO

表 1.2 蝦養殖產值

年	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
年產值 (US\$1000)	4232126932	5147831774	5564748338	5243870896	5808843324	6062515828	6101260906
年	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
年產值 (US\$1000)	6088002339	6029950994	6601383965	7467516197	8194251165	7804330709	9322858775

資料來源: FAO

1.2 蝦病對養殖產業的影響

一般魚類養殖往往因疾病造成嚴重之損失，蝦之養殖亦不例外，蝦之存活率通常只有 50%，可見由疾病所造成之損失有多大。一般說來，蝦病病因主要有兩類：

(1)非傳染性病因：營養不平衡，如缺乏膽固醇或維他命 C、水溫太高或太低、鹽度驟變、中毒、藥毒等物理化學之傷害。

(2)傳染性病因，如細菌、黴菌、病毒、寄生蟲等等。

目前全球養蝦產業所面臨到的問題，其中又以傳染性病因中之病毒感染所造成之損失最大。主要是因其具有傳染性，且又有極高之致死率。

1.2.1 蝦病之簡介

蝦病主要有病毒、細菌、黴菌性疾病、原生動物感染、外共生性微生物引起之疾病、寄生蟲病。而其中病毒，對於在亞洲、美洲等地，快速發展中的養蝦產業，有很高的致死率，造成產能的大量損失。[1]

一、病毒性疾病 (Viral Disease)

對養殖產業來說，病毒性疾病是最大的病因，目前至少有二十二種病毒被報導出來，[2] 以下六種病毒為目前影響較嚴重且常被研究者，(1)白斑病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)，(2)肝胰小病毒 (Hepatopancreatic parvovirus, HPV)，(3)桃拉病毒 (Taura syndrome virus, TSV)，(4)傳染性皮下及造血組織壞死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)，(5)草蝦桿狀病毒 (Monodon Baculovirus, MBV) 及(6)黃頭病毒 (Yellow head virus, YHV)。

二、細菌性疾病 (Bacterial Diseases)

許多種類細菌可引起養殖蝦的疾病，尤其在蝦苗、幼蝦及中蝦期為主，通常受感染後可引起以下三類型之疾病感染：

(1)軀殼、附肢及鰓等體表之潰爛(又稱爛殼病及細菌性壞死病)，通常由產生溶解幾丁質酵素(Chitinase)細菌感染而形成外殼之局部穿孔，然後再侵入體內，引起體內局部炎症反應，如感染未能被有效遏止則可演變成全身性敗血症死。(2)體內局部感染症，細菌可在內臟、鰓、肌肉等造成局部性感染病灶而形成膿瘍。(3)全身性敗血症，病原菌侵入體內淋巴血液及各臟器組織。一般感染細菌的症狀有：蝦體變色、鰓變色、壞死、爛鰓、爛尾等，例如細菌性黑鰓病(Bacterial black gill disease)。絕大多數蝦病細菌均屬二次感染性細菌(Secondary pathogens)，通常必須先有各種緊迫誘因(Predisposing factors)，如其他病原(病毒或其他細菌)之感染、寄生蟲寄生、外共生性微生物附生、外傷、營養缺失、化學或物理性緊迫作用等之影響下，才能使這些原來在水中或蝦體外附著之細菌有機可乘而引發細菌感染造成病害。迄今自病蝦所分離到之細菌大約可分為兩大類，即一種為自病蝦體內或局部病灶所分離到之病原細菌：蝦病原細菌，通常本屬細菌可引起病變，另一種為附生在蝦體表面之共生細菌：蝦外部共生細菌，一般不引起病變。

三、黴菌性疾病 (Fungal Diseases)

黴菌性蝦病可分為兩種：(1)全身性黴菌感染症 (2)局部性黴菌感染症

四、原生動物感染 (Protozoan Infections)

寄生性原蟲有兩種(1)微孢子蟲類(Microsporidia) (2)簇蟲類(Gregarines)。

五、外共生性微生物引起之疾病 (Diseases caused by Epicommensals)

蝦體表外殼、附肢及鰓常被外共生菌、原蟲或藻類附著增生，此類微生物之附著並不侵入體內亦不造成病變，但大量增生附著蝦體之結果可引起蝦呼吸、運動、攝食、脫殼之障礙而往往導致蝦呼吸困難窒息而死亡。

六、寄生蟲疾病 (Parasitic Diseases)

包括吸蟲 (Flukes, Trematodes), 條蟲 (Tapeworms, Cestodes) 及線蟲或圓蟲 (Roundworms, Nematodes)。一般吸蟲類寄生在蝦頭胸部各器官、腹側肌肉或外骨骼下休眠；條蟲則在消化腺組織中；線蟲則在頭胸部各器官及消化道內外寄生。養殖蝦類之寄生蟲病發生率小亦鮮有大量死亡情形發生，主要原因是一般養殖蝦池內，極少寄生蟲傳染所需之中間寄主棲息，因此寄生蟲之生活史無法完成。

1.2.2 主要蝦病毒之介紹

病毒因具有傳染性，以及高的致死性，所以較受大家之注意。以下將就目前在全球引發較大影響之病毒，作一簡單之介紹。

1.2.2.1 White spot syndrome virus (WSSV)

白斑病毒, White spot syndrome virus, 簡稱 WSSV, 即白點病, 會在病蝦蝦殼上產生白點。是目前對蝦子影響甚鉅的病原體之一, 並且對全球之養蝦產業造成嚴重的傷害。雖然此一病毒可以感染幾種甲殼類, 例如蝦子、螃蟹和龍蝦, [3, 4, 5, 6, 7] 但其對對蝦類 (penaeid shrimp) 特別具有高的毒性, 在感染三到七天內, 死亡率高達 90~100%。[3, 8] WSSV 病毒顆粒呈桿狀, 包覆膜蛋白, 大小約 275×120 nm。為雙股 DNA 病毒, 基因體大小為 290 kb, [8] 被外殼蛋白 capsid protein 所包覆, 核蛋白衣 nucleocapsid 大小約 300×70 nm。[9] 其有一顯眼之特徵, 就是該病毒體有著如尾巴的一端 (圖 1-4)。[11, 12] 這個病毒被歸類在尼瑪病毒科 (Nimaviridae) 這個家族 (“nima”在拉丁文中為“線”的意思)。[13]

目前已經定出三個完整的 WSSV 序列, 共有 532 個開放閱讀區 (open reading frames, ORFs)。包含非結構蛋白 (醣核苷酸還原酶 ribonucleotide reductase, 蛋白激酶 protein kinase, the chimeric thymidine kinase/thymidylate

kinase, and DNA 聚合酶 DNA polymerase [14, 15, 16, 17]) 或是結構蛋白 (VP28, VP26, VP24, VP19, and VP15) 等等。[18~23]

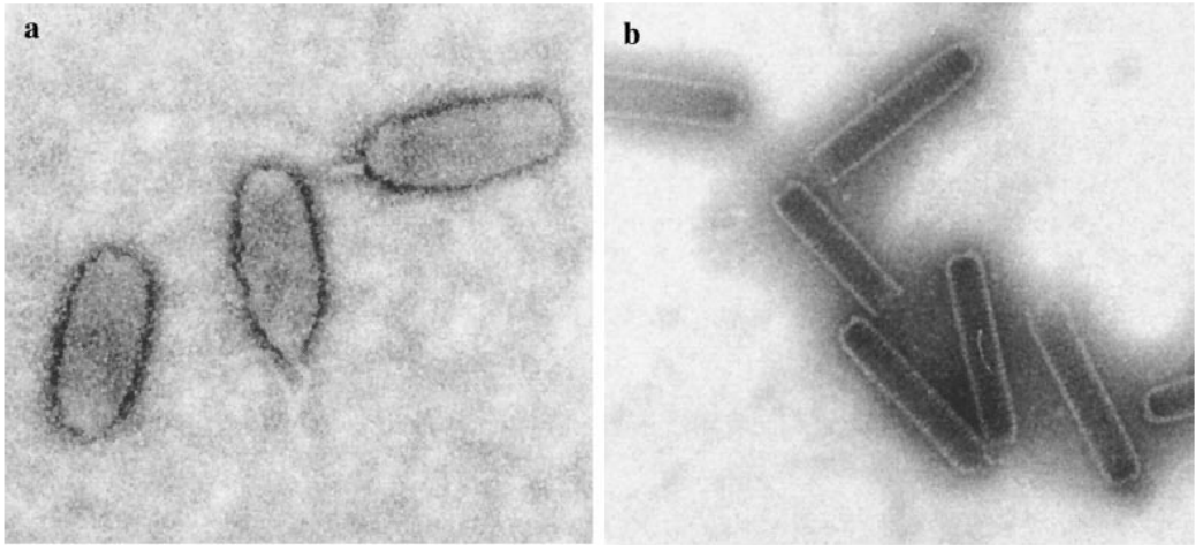


圖 1-4 WSSV virions (a)及 WSSV nucleocapsid(b)之電顯圖

資料來源: *Virology*. 266:227-236, 2000.

1.2.2.2 Hepatopancreatic parvovirus (HPV)

肝胰小病毒, Hepatopancreatic parvovirus, 簡稱 HPV。在 1984 年, 第一次在 *Penaeus mergiensis* 和 *Penaeus indicus* 這兩種蝦子中發現。[24] 這種病毒為單股 DNA 病毒, 基因體長度約 6321 bp。[25] 廣泛地分佈在養殖及野生蝦子中, 其中包括 *Penaeus monodon* 和 *Penaeus chinensis*。[26] 死亡率約在 50~100% 之間, 病程約為 4-8 週, 通常主要病變在肝胰臟, 使該器官萎縮壞死。嚴重感染時, 會造成生長減緩, 進而造成產量下降。其外形為多面病毒體 (icosahedral), 沒有膜蛋白包覆, 直徑約 22 nm (圖 1-5), 基因體大小約 6 kb, 有三個大的 ORFs, 基於這些特徵, 將其歸類在 Parvoviridae 家族。[27, 28, 29]

1.2.2.3 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

傳染性皮下及造血組織壞死病毒，Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus，簡稱 IHHNV。1981 年在 Hawaii 發現。[30] 致死率達 90%，病毒感染蝦體時，通常破壞其皮下組織，前腸、後腸皮下組織以及造血組織上皮及肌肉。此病毒為小、多面體，沒有膜蛋白包覆，單股 DNA，基因體大小約 4.1 kb。[31, 32] 包含三個大的 ORFs。[33] 依外形特徵，被歸類為小 DNA 病毒科 Parvoviridae 家族。[31]

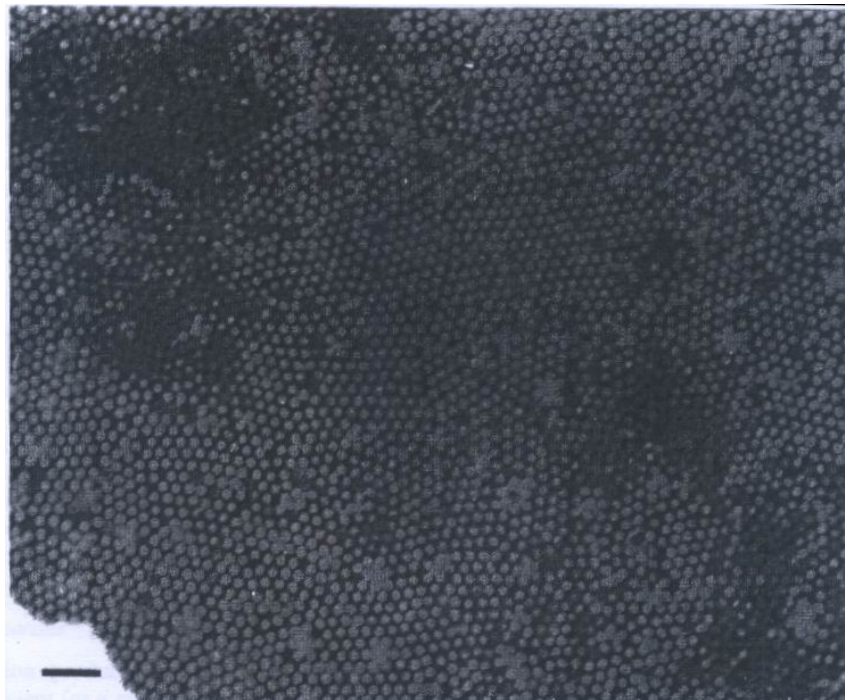


圖 1-5 HPV virions 電顯圖，Bar 代表 100nm.

資料來源: *Journal of General Virology*. 76:813-817, 1995.

1.2.2.4 Taura syndrome virus (TSV)

桃拉病毒，Taura syndrome virus，簡稱 TSV。1992 年時，在靠近 Taura 河 (厄瓜多, Ecuador) 出口的養蝦場中所養之 *Penaeus vannamei* 發現，因此命名為 Taura，死亡率 50-90%。此病毒為多面體，大小約 31 至 32 nm (圖 1-6)，單股 RNA，基因體大小約 9 kb，依外形被歸類為 Parvoviridae 家族。[34] 受感染蝦群在急性期症狀為倦怠、軟殼、腸內無內容物，

身體紅色素增加而變淡紅，尤其尾扇邊緣呈紅色，故又稱紅尾病，常可見脫殼期之死亡蝦。而在慢性期症狀為在急性期耐過後出現，病蝦可能仍有食慾，但體表甲殼有多發性黑色斑點。

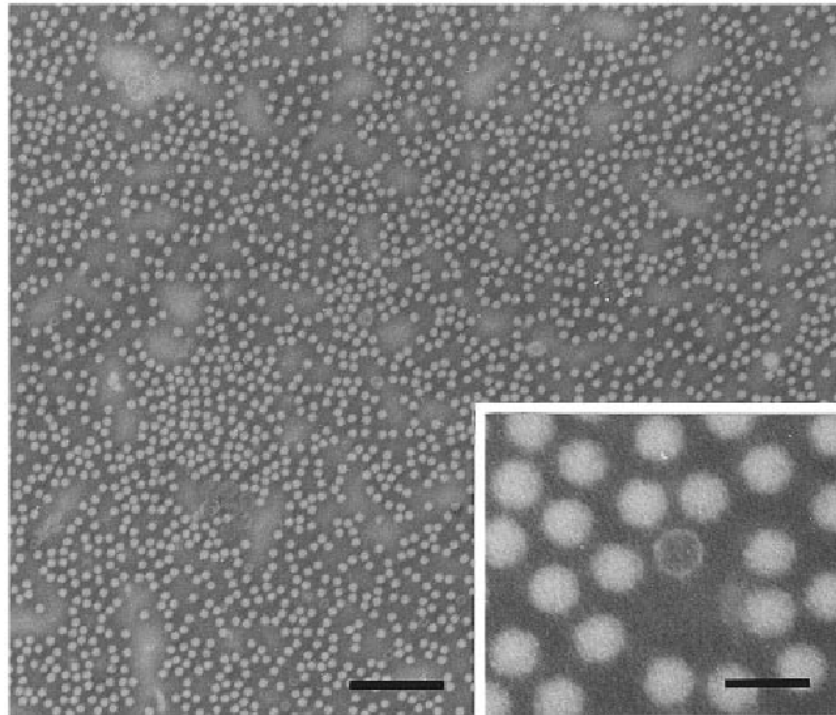


圖 1-6 TSV virions 電顯圖，左邊的 Bar 代表 300nm。

資料來源: *Journal of General Virology*. 78:313-319, 1997.

1.2.2.5 其它病毒

其它對養蝦產業造成較大影響的還有黃頭病毒，Yellow head virus (YHV)、草蝦桿狀病毒 monodon baculovirus (MBV)等。

YHV, 黃頭症。1990 年時，在泰國發現。[35] 患病時會中斷進食，在頭胸部 (cephalothoraxes) 和鰓 (gill) 會變成黃色。[36] 病徵出現 2-3 天就會開始死亡。此病毒外表包覆膜蛋白，呈桿狀，大小約 40×170 nm (圖 1-7)，有突起的外表，內部有螺旋狀的核蛋白。[37] 單股 RNA。[38]

MBV, 草蝦桿狀病毒。1981 年時，第一次在台灣養殖的 *Penaeus monodon* 中發現。[39] 對草蝦來說，是個重要的病原體，患病時會造成高致死率或生長遲緩。[40]

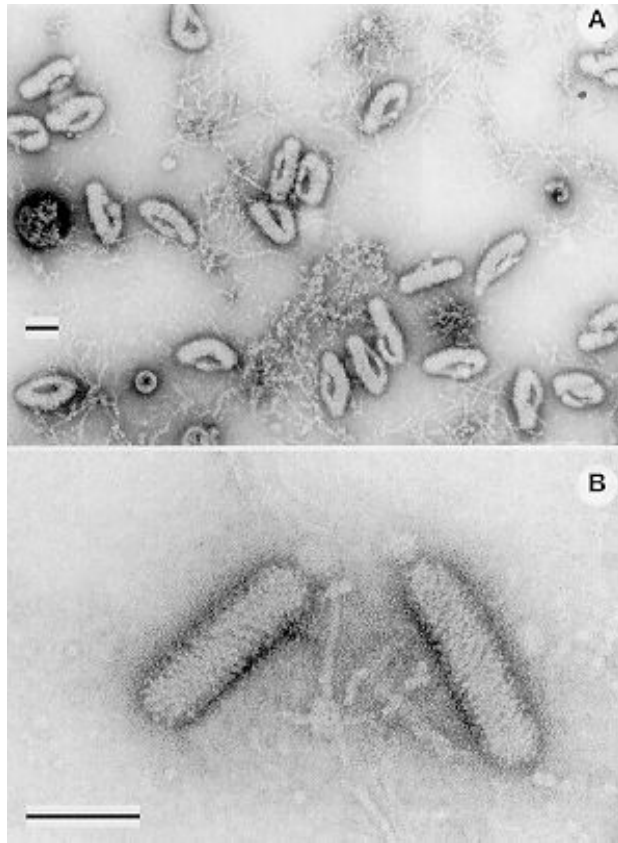


圖 1-7 YHV virions 電顯圖，Bars 代表 100nm.

資料來源: Department of Microbiology University of Hawaii at Manoa ,
virus laboratory (www2.hawaii.edu/~pilip/yhv1.htm)

1.3 蝦病毒之檢測

因為蝦病毒對於養蝦產業影響之大，若是能有效且儘早偵測到病毒，可以針對所面臨之狀況，提早作出對應，以降低損失。所以蝦病毒之檢測發展就相形重要了。一個良好的檢測方法，必需考慮到快速、便宜、靈敏及專一性。

目前所使用的方法主要有(1)組織病理學 (histopathology) 。[41, 42] 經由病體組織上的特徵，判斷感染原及患病狀況。(2)免疫學方法 (immunological method) 。[43, 44, 45] 使用抗體對病原體的蛋白質作專一性的辨認。(3)聚合酶鏈鎖反應方法 (polymerase chain reaction, PCR) 。[46, 47, 48] 設計引子，放大病原體某個核苷酸序列。(4) DNA 探針方法 (in situ

hybridization methods using DNA probe)。[49, 50] 使用 DNA 探針辨認病原體上特殊的核苷酸序列。除此之外，尚有一些其它改良的方法，例如 Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays (DB-NC-EIA)、[51] miniarray system、[52] PCR-ELLISA。[53] 但其中，由於病理學檢測需長期的訓練，且較費時。而使用聚合酶鏈鎖反應及 DNA 探針方法，操作人員需經過一定的訓練，且需要聚合反應的機器。因此，免疫學方法，較有潛力發展成兼具方便、專一性、便宜、靈敏之檢測工具。讓第一線的養殖漁民，可方便地利用這項工具，快速、正確地檢測，讓其損失降至最低。

1.4 對抗蝦病毒之策略

欲降低蝦病毒對養蝦產業所造成之衝擊，除了良好檢測工具的開發外，對抗蝦病毒方法的研究也極具重要性。目前主要的作法有：免疫能力的增加、疫苗的開發、病原體的隔離及環境的控制，[54] 另外還有無特定病原 SPF (Specific Pathogen-Free)、對特有病原體有忍受性之種蝦的開發 SPR(Specific Pathogen Resistant)、及對病原的中和 (neutralization)。以下對這一些方法作簡略介紹：

(1) 免疫能力的增加，在飼料中加入一些免疫促進劑（例如 β -1,3 glucan、lipopolysaccharide, LPS），藉以提升蝦子的免疫能力。[55, 56]

(2) 口服疫苗的應用：雖然蝦子不具有 adaptive immune response，但在最近的研究中，發現一現象，quasi-immune response，可以對抗 WSSV。[57] 因此可以利用失活的病原體，或是病原體的重組蛋白，來誘發蝦子對病原體的抵抗能力。[58, 59]

(3) 病原體的隔離與環境的控制：病原體可隨著宿者 [活體 (蝦子本身或是昆蟲等) 或是冷凍食品] 四處散播，所以對於運送的方法就要有所注意。而養殖所用的水，因為裡面也可能含有病原體，所以在使用前需要經過處理。

(4)抗病種蝦及無特定病原種蝦的篩選:可分析比對較高存活率與較低者,其各基因之表現量。最終可以經由這些基因的表現量,來判斷該品系是否能對抗病體。[60, 61, 62, 63]

(5)病原體的中和反應:利用抗體技術尋找病原體感染蝦子時所需要的結合位置,藉由抗體來中和病原體與蝦子的結合位,達到保護蝦子的目的。例如黃頭病毒 (Yellow head virus, YHV),其表面蛋白 gp116 就是 YHV 與蝦子感染時的表面結合位,利用抗體中和這個蛋白,可降低 YHV 對蝦子的感染。[64]

1.5 本研究之目的

目前所發展之檢測方法,主要是以聚合酶鏈鎖反應方法、DNA 探針和免疫學方法為主。但前兩者在操作上,需要有經訓練之人員、及昂貴的機器。而使用免疫學方法則可發展成容易操作且不需機器,即可對檢體作檢測。在免疫學方面,主要是取病原體之表面蛋白,或是以全病原體當作抗原,用以在小鼠上引發免疫反應,再利用細胞瘤融合技術,作成單株抗體。利用這些抗體,可辨認病原體之某些蛋白的性質,可發展成檢測試劑、或是作為發展抗病藥物之研究基礎。

現今全球的蝦養殖產業,正因病毒的影響,造成產能嚴重損失。為了解決病毒問題,我們的目標是發展出方便、快速、便宜之檢測工具,作為評估現場狀況,讓養殖漁夫可在第一時間,作出最為符合經濟效益的判斷。也可作為無特定病原蝦 (SPF) 的篩選工具。另外,也可透過抗體與病毒表面蛋白間的結合關係,探討病毒感染宿主的機制。最終,對此發展可有效對抗病毒之藥物。

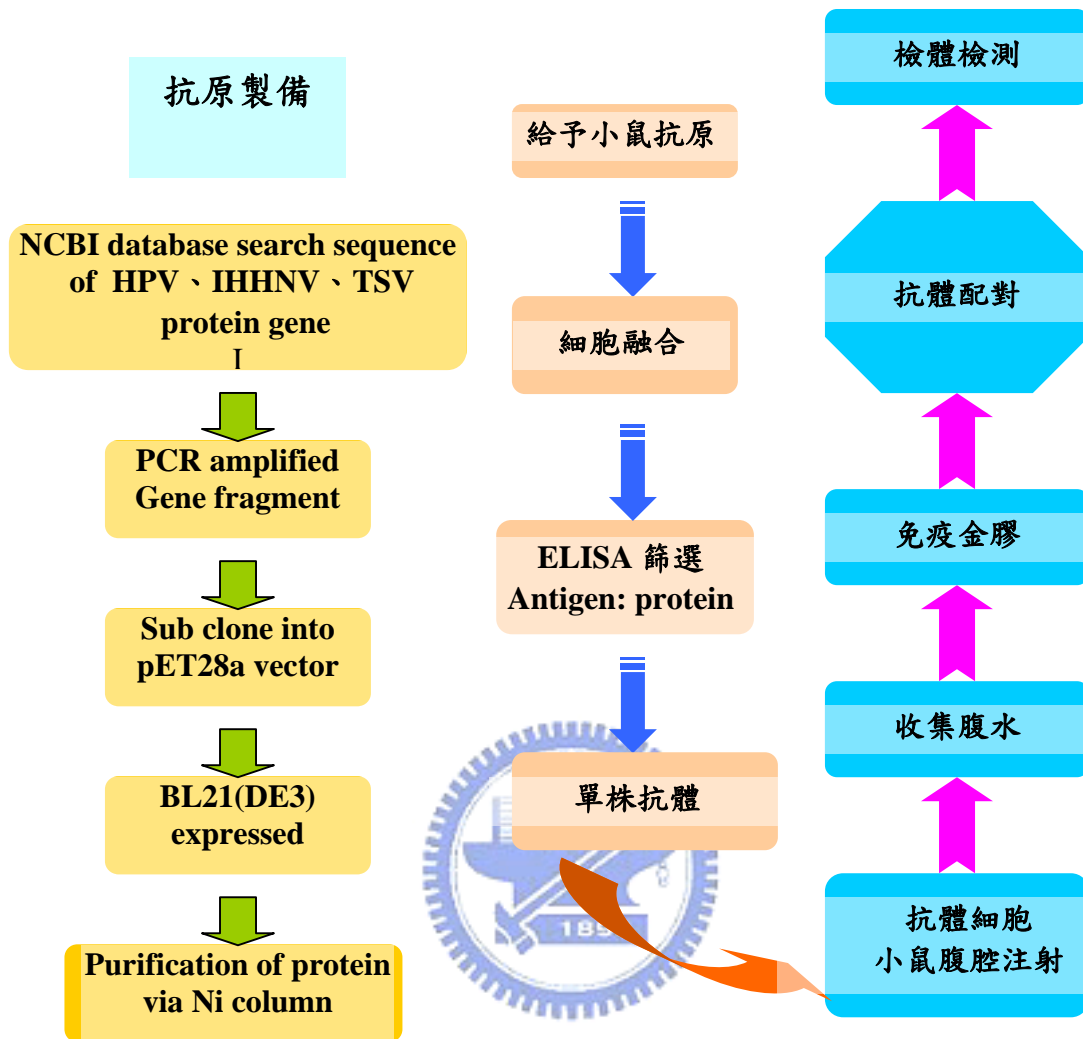
因為病原體之純化不易,所以利用基因重組技術,表現蝦病毒 HPV、IHHNV、TSV 之蛋白,當作抗原。再利用融合瘤技術(hybridoma

technique)，生產針對這些蛋白具有專一性之抗體。再利用這些抗體開發出一快速、便宜、簡單、靈敏之檢測工具。

作為抗原的病毒蛋白，主要以殼蛋白為主。(1)TSV 方面，目前已有五十一筆核苷酸資料，我們從中選取 AY826054，為一殼蛋白。(2)IHHNV 方面，目前已有十七筆核苷酸資料，從 NC002190 取一段 Gene ID: 1457864 之基因片段，為殼蛋白。(3)HPV 方面，有十一筆核苷酸資料，從 NC007218 選取一段 GENE ID: 3562190 之基因片段。



附錄一、實驗設計流程圖



第二章 材料與方法

2.1 抗原的製備

2.1.1 病毒殼蛋白 (coat protein) 基因的選取

由 NCBI database，分別選取 IHNV (附錄三)、HPV (附錄四)、TSV (附錄五) 三種病毒，所欲表現之基因片段。

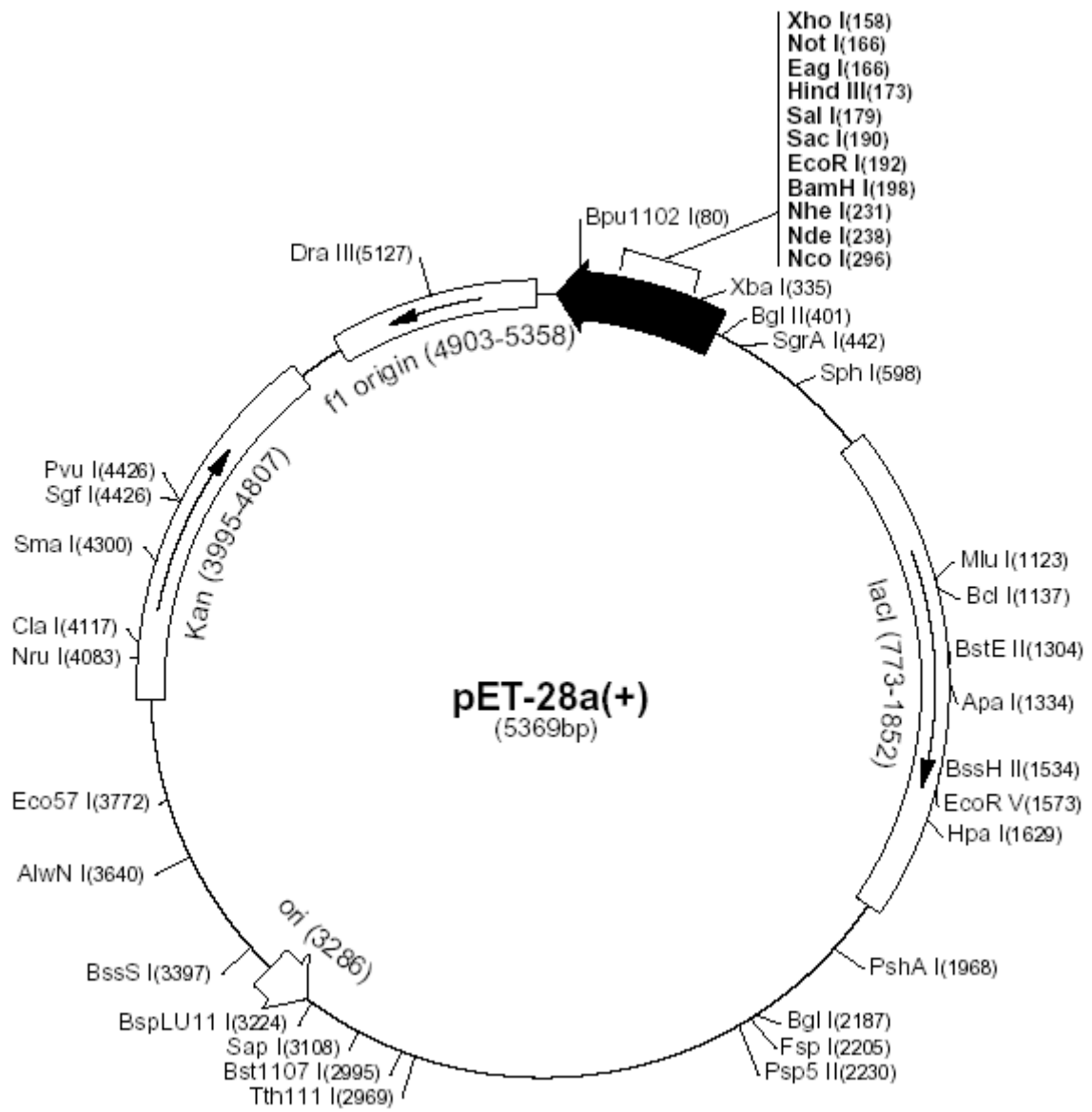
2.1.2 引子的設計

IHNV		
		切位
Forward primer	5-ggAATTC- <u>CATATg</u> -ATgTgCgCCgATTCAAC-3'	NdeI
Reverse primer	5-CCg- <u>CTCgAg</u> -TTagTTagTATgCATAA-3'	XhoI

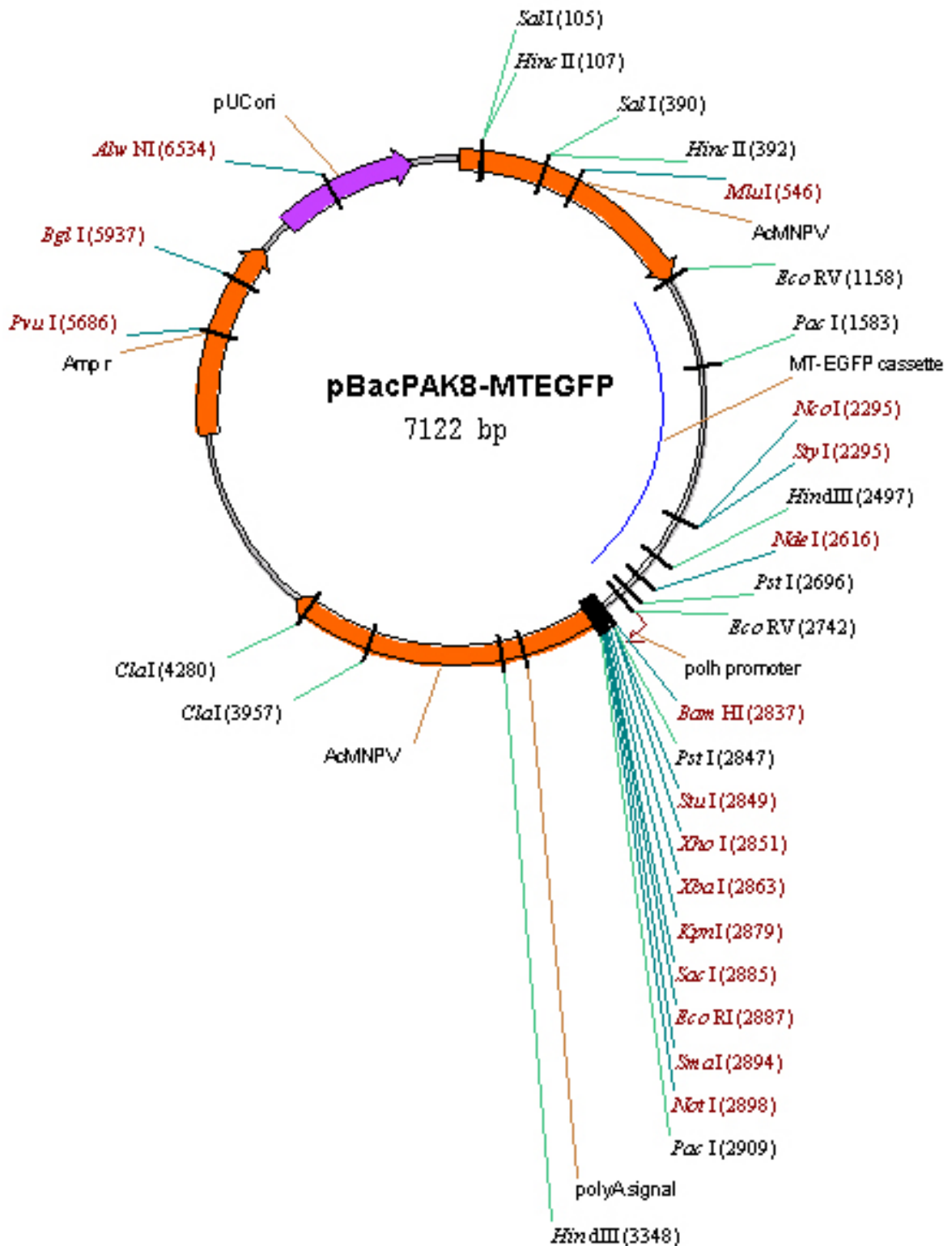
HPV		
		切位
Forward primer	5-ggAATTC- <u>CATATg</u> -ATggCgAgCAAaggTgA-3'	NdeI
Reverse primer	5-CCg- <u>CTCgAg</u> -TTACCTggCgAAACATT-3'	XhoI

TSV		
		切位
Forward primer 1	5-CCCCAAAACACgTgTgAggAgAAAgTCCC-3'	
Forward primer 2	5-AAgTAgACAgCCgCgCT-3'	
Forward primer 3	5-ggAATTC-CATATg-ATggCTAACCCAgTTgAAAT-3'	NdeI
Reverse primer	5-Cg-ggATCC-TTagACAATCCCCTgTTTAg-3'	BamHI

2.1.3 表現載體：
pET28a, Novagen



pBacPAK8-MTEGFP, 國衛院, 用於桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)



2.1.4 表現菌株: BL21(DE3), Novagen

可表現出帶有 His-tag 的融合蛋白 (fusion protein)。

2.1.5 病毒基因體的抽取及確認

使用病毒檢測試劑組 (Pathotech, Magellan Biotechnology Co., Ltd.) 抽取，由病蝦體上取下約 25-50 mg 組織，放到 1.5 ml 微量離心管，加入 500 μ l Tissue Lysis buffer，用玻棒攪碎。使用桌上離心機離心 15 分鐘，轉速 10,000 rpm。取上清液 200 μ l，加入 200 μ l viral DNA binding buffer 及 50 μ l Protease K (20 mg/ml)，放到一新的微量離心管中，並反覆倒置混合。72°C 靜置 10 分鐘。再加入 100 μ l isopropanol，並再反覆倒置混合。將混合液置入含有樹脂的 Filter tube 中，離心 1 分鐘，轉速 10,000 rpm。倒去過濾液，再加入 500 μ l Wash buffer I，到 Filter tube 中，離心 1 分鐘，轉速 10,000 rpm。倒去過濾液，再加入 450 μ l Wash buffer II 到 Filter tube 中，離心 1 分鐘，轉速 10,000 rpm，倒去過濾液，再離心 30 秒，轉速 13,000 rpm。最後將 Filter tube 置於新的微量離心管中，加入 50 μ l Elution buffer，並靜置 5 分鐘，離心 1 分鐘，轉速 10,000 rpm，即可收到病毒 DNA，存放於-20°C 備用。

使用試劑組中所附之六種病毒 (WSSV、HPV、IHHNV、TSV、YHV、MBV) 引子，確認含有那些病毒。

PCR, 聚合鏈反應條件

WSSV、HPV、IHHNV、MBV (DNA virus)

引子	2 μ l
病毒 DNA	2 μ l
滅菌二次水	16 μ l
	<hr/>
	20 μ l

*試劑組中所附藍色小管，內含 DNA polymerase, dNTP (粉狀)

94°C	2 分鐘	} 35 cycles
94°C	30 秒	
55°C	1 分鐘	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	
4°C	∞	

YHV、TSV (RNA viral)

RT-PCR (反轉錄聚合鏈反應)

引子	2 μ l
病毒 RNA	2 μ l
滅菌二次水	16 μ l
<hr/>	
	20 μ l

*試劑組中所附紅色小管，內含反轉錄酶, dNTP (粉狀)

60°C	5 分鐘	} 35 cycles
42°C	30 分鐘	
94°C	30 秒	
57°C	30 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	
4°C	∞	



Nest-PCR (巢式聚合鏈反應)

引子	2 μ l
RT-PCR 產物 10 倍稀釋	2 μ l
滅菌二次水	16 μ l
<hr/>	
	20 μ l

*試劑組中所附紅色小管，內含反轉錄酶 (粉狀)

94°C	2 分鐘	} 35 cycles
94°C	30 秒	
56°C	30 秒	
72°C	30 秒	
72°C	7 分鐘	
4°C	∞	

2.1.6 蛋白質重組

2.1.6.1 材料

限制酵素 *NdeI*、*XhoI*、*BamHI*、*SacI*、*NotI* (購自 NEB)

100bp、1kb DNA marker, dNTP、10X PCR buffer、Taq DNA polymerase (5U/ul)、Loading buffer 和 Plasmid Prep Kit (購自禾鑫公司)

SYBR Green I (10X)(購自 Life)，使用 DMSO 將 10000X 稀釋成 10X 備用

T4 DNA ligase (購自進階公司)

Agrose gel (USB, 購自季勗公司)

Gel Band Purification Kit (購自 amersham 公司)

50X TAE buffer

Tris base 242 g, Glacial Acetic Acid 57.1 ml, 0.5 M EDTA, pH8.0 溶於 1 L 二次水中，使用時稀釋成 1X

LB 培養液

10 g Bacto-Tryptone、5 g yeast extract 以及 5 g NaCl 溶在 1 L 二次水中，滅菌備用

LB 培養基

每升 LB 培養液加入 15 g Agar 經過高溫滅菌後等冷卻至 70 °C 以下再倒盤 (~15 ml/ 每盤) 備用

Kanamycine 配製: 取 250 mg kanamycine 溶於 10 ml 二次水中, 使用 0.45 μ m filter 過濾, 分裝備用

LB (kan)培養液 (基), kanamycine 最終濃度為 25 μ g/ ml

2.1.6.2 基因片段放大

2.1.6.2.1 IHHNV、HPV

引子 (Forward, 10 μ M)	2 μ l
引子 (Reversed, 10 μ M)	2 μ l
viral DNA	2 μ l
dNTP (2 mM)	2 μ l
10X PCR buffer	2 μ l
Taq polymerase (5U/ μ l)	0.5 μ l
滅菌二次水	9.5 μ l
	<hr/>
	20 μ l



94°C	2 分鐘	} 40 cycles
94°C	30 秒	
54°C	30 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	
4°C	∞	

2.1.6.2.2 TSV

RT-PCR

引子 (Forward 1or2,10 μ M)	2 μ l
引子 (Reversed,10 μ M)	2 μ l
viral DNA	2 μ l
滅菌二次水	14 μ l
<hr/>	
	20 μ l

*使用病毒檢測試劑組中之紅色小管，內含反轉錄酶, dNTP

60°C	5 分鐘	
42°C	30 分鐘	
94°C	5 分鐘	
94°C	30 秒] 40 cycles
54°C	45 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	
4°C	∞	



NEST-PCR

引子 (Forward3,10 μ M)	2 μ l
引子 (Reversed,10 μ M)	2 μ l
RT-PCR 產物 10 倍稀釋	2 μ l
dNTP(2 mM)	2 μ l
10X PCR buffer	2 μ l
Taq polymerase(5U/ μ l)	0.5 μ l
滅菌二次水	9.5 μ l
<hr/>	
	20 μ l

94°C	2 分鐘	
94°C	30 秒] 40 cycles
56°C	30 秒	
72°C	30 秒	
72°C	7 分鐘	
4°C	∞	

2.1.6.3 表現質體的建構

將載體 (Vector, pET28a) 和欲殖入的 DNA 序列 (Insert) , IHNV 和 HPV 利用 *Nde I*、*Xho I* 兩個限制酵素；TSV 利用 *Nde I*、*BamHI* 兩個限制酵素 (pBacPAK8-MTEGFP-TSV, 則是利用 *SacI*、*NotI* 將 TSV 基因片段由 pCR-TOPO vector 上切下, 接入 pBacPAK8-MTEGFP vector 中), 於 37 °C 之恆溫水槽作用 (Digestion) 16 小時。再將 DNA 取出, 加入 1 μ l Loading buffer 及 1 μ l SYBR Green I, 利用 1% 洋菜膠 (Agrose gel), 電壓 100 伏特進行電泳分析, 把正確大小的 DNA 及載體片段切下, 使用 Gel Band Purification Kit (Amersham), 將膠體中之 DNA 純化出來。純化出來之基因片段及載體, 以 6:1 (體積) 混合後, 抽乾, 用 10 μ l 二次水回溶, 再加入接合酵素 (T4 DNA ligase, progema), 在 4°C 下作用約 16 小時。再進行轉形作用, 將建構好之表現質體, 送入 BL21(DE3) 菌株中。

2.1.6.4 轉形作用

取 5 μ l 接合產物, 加到 100 μ l BL21(DE3) 的勝任細胞 (competent cell) 中, 在冰上靜置 30 分鐘。Heat shock, 置於 42°C 熱水中 1 分鐘, 馬上置於冰中 2 分鐘。加入 900 μ l LB 培養液, 於 37°C 振盪培養 (200 rpm) 1 小時。取 200 μ l 塗於 LB/kna 培養基上, 在 37°C 隔夜培養。挑單一菌落至 3 ml LB/kna 培養液中, 37°C, 振盪培養 (200 rpm) 16 小時, 利用 Plasmid Prep Kit (GeneMark), 將建構好之質體抽出, 並用原先作接合之限制酵素, 來確認插入之 DNA 片段是否有接入載體之中。

2.1.7 表現與純化

IHHNV、HPV、TSV 三個基因均接在 pET28a，利用 IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 誘發載體，使其表現所接入之基因片段。而純化方面，均利用載體上所共同表現出來之 his-taq，使用 Nickel column 作純化。

2.1.7.1 材料

IPTG (sigma, 購自季勗公司)

Nickel resin (購自 Novagen)

PBS buffer

37g Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 0.35g, NaCl 8.77g 溶於 1 L 一次水中

Lysis buffer

NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM, Imidazole 50 mM, pH 7.9

Guanidine-Lysis buffer

6 M Guanidine Hydrochloride, NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM, Imidazole 50 mM, pH 7.9

Wash buffer

NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM, Imidazole 80 mM, pH 7.9

Elution buffer

NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM, Imidazole 0.5 M, pH 7.9

透析液 I

0.25 M Guanidine Hydrochloride, NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM,
Imidazole 50 mM, pH 7.9

透析液 II

NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM, Imidazole 50 mM, pH 7.9

2.1.7.2 表現

取菌養於 5 ml LB (kna) 培養液中，37°C 振盪培養 (200 rpm) 16 小時後。以 1:100 體積比，轉養至 300 ml LB (kna) 培養液中，37°C 振盪培養 (200 rpm) 2~3 小時，直到 OD₆₀₀=0.4~0.6 後。加入 IPTG (final concentration 1mM) 誘導。IHHNV 在 25°C 振盪培養 (200 rpm) 10 小時、TSV 在 37°C 振盪培養 (200 rpm) 10 小時、HPV 在 37°C 振盪培養 (200 rpm) 6 小時後。以 4°C，轉速 9000g，離心 15 分鐘，倒掉上清液，菌體保存在 -20°C 中備用。

2.1.7.3 純化

2.1.7.3.1 IHHNV、TSV

取 100 ml 培養液所離心下來之菌體，加入 15 ml Lysis buffer 回溶菌體。使用超音波震碎方式破細胞 (震幅 30%，打 1 秒停 2 秒，共打 10 分鐘)。以 4°C，轉速 10,000 g，離心 15 分鐘，取上清液進行純化工作。

將約 2 ml Nickel resin 裝填到管柱 (直徑 1.5 公分) 中，取 20 ml Lysis buffer 平衡管柱。之後將上個步驟中，含有蛋白質的上清液，慢慢加到管柱之中，待流完時，再用 15 ml Lysis buffer 沖洗管柱一次。取 12 ml Wash

buffer，沖洗管柱一次。再取 12 ml Elution buffer 沖洗管柱，每 1.5 ml 收一管。

2.1.7.3.2 HPV

取 100 ml 培養液所離心下來之菌體，加入 5 ml PBS buffer 回溶菌體，使用超音波震碎方式破細胞 (震幅 30%，打 1 秒停 2 秒，共打 10 分鐘)。以 4°C，轉速 6000 g，離心 15 分鐘。倒去上清液，加入 5 ml PBS buffer 回溶沈澱物，再使用超音波震碎，條件同上。離心 15 分鐘，4°C，轉速 6000 g，到去上清液，加入 5 ml Guanidine-Lysis buffer，使用超音波震碎回溶沈澱物，靜置冰上 1 小時。以 4°C，轉速 16,000 g，離心 30 分鐘。取上清液，使用針頭，利用重力，慢慢加入 15 ml Lysis buffer，並將之裝入透析膜 (MW 25,000) 中，在 250 ml 透析液 I 中，4°C 透析 4~6 小時後。再將之換到 1 升透析液 II 中，4°C 透析約 16 小時後。再以 4°C，轉速 16000g，離心 30 分鐘，取上清液作純化。

將約 2 ml Nickel resin 裝填到管柱 (直徑 1.5 公分) 中，取 20 ml Lysis buffer 平衡管柱。將上個步驟中，含有蛋白質的上清液，慢慢加到管柱之中，待流完時，再用 15 ml Lysis buffer 沖洗管柱一次。取 12 ml Wash buffer，沖洗管柱一次。再取 12 ml Elution buffer 沖洗管柱，每 1.5 ml 收一管。

2.2 單株抗體之製作

抗體是由 B 細胞所分泌的蛋白質，目前廣為應用的抗體分為兩種，多株抗體 (polyclonal antibody) 和單株抗體 (monoclonal antibody)。多株抗體是將抗原打入老鼠體內，經過數次免疫，採集血液，收血清，此為多株抗體。操作過程雖然簡單，但其專一性低，對於相似的抗原結構都會有所反應，稱為交叉反應 (cross reaction)。1973 年，Milstein 等人，提出骨髓瘤細

胞(myeloma cell)之融合實驗，製造出單株抗體。因為血清中的每一種抗體，是由單一種 B 細胞所製造，所以將 B 細胞由脾臟中取出，與骨髓瘤細胞融合，成為可持續分泌抗體，又可在培養基中永久生長的細胞株，即為融合瘤細胞株(hybridoma cell)。

其過程為，給予小鼠外來抗原，並同時以免疫佐劑加強小鼠免疫反應，使脾臟內的 B 細胞產生特定抗體，將其與癌化細胞株融合形成可體外培養且生產特定抗體之細胞株(附錄二)。



附錄二、單株抗體製作流程圖

第 0 天-將佐劑 (complete adjuvant) 和抗原等體積混和注射入老鼠體內



第 10 天-第二次注射



第 20 天-第三次注射，解凍 FO 細胞，且大量繁殖



第 27 天-第四次注射



第 28 天- FO 細胞 1：2 繼代培養



第 30 天-採血測 titer，取小鼠脾臟與 FO 細胞做細胞融合



第 37 天-加 50 μ L 之 HY-HAT 培養液



細胞數佔孔洞約 50 - 90 %，培養液轉黃取 50 μ L，做 ELISA 篩選



陽性細胞群落單株化



以 ELISA 篩選陽性單株細胞群落



大量繁殖陽性單株細胞，收集培養液，做後續實驗用



2.2.1 材料

Name	Component	Trademark
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Contains 4500 mg / L D-glucose, L-glutamine, and 110 mg / L sodium pyruvate but no sodium bicarbonate.	GIBCO BRL® 12800-017
Fetal Bovine Serum (FBS)	< 10 EU / mL endotoxin, < 10 mg / dL hemoglobin, 40 nm filtered.	HYCLONE® Defined Grade
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Contains 10,000 units of penicillin (base) and 10,000 µg of streptomycin (base) / mL utilizing penicillin G (sodium salt) and streptomycin sulfate in 0.85% saline.	GIBCO BRL® 15140-122
H-Y Medium (HY)	Contains L-glutamine, bovine insulin, oxaloacetate, and sodium pyruvate but no sodium bicarbonate.	SIGMA H-9014 HYBRI-MAX®
HAT Media Supplement (50 X) (HAT)	Reconstitute contents of vial with 10 mL sterile cell culture medium. When reconstituted to 10 mL, each vial contains 5×10^{-3} M hypoxanthine, 2×10^{-5} M aminopterin, 8×10^{-4} M thymidine.	SIGMA H-0262 HYBRI-MAX®
PEG / DMSO Solution (PEG / DMSO)	Contains 50% (w/v) PEG (Av. Mol. Wt. 1450) and 10% DMSO (v/v) in DPBS without calcium.	SIGMA P-7306 HYBRI-MAX®

碳酸氫鈉 (NaHCO_3) (購自 sigma)

DEAE resin (購自 amersham)

PB buffer

1 M Na_2HPO_4 68.4 ml, 1 M NaH_2PO_4 31.6 ml補一次水至 5 L, 調pH至 7.2

2.2.2 免疫反應

以純化所得之病毒蛋白為抗原。利用 4-8 週的 BALB/c 小鼠為免疫動物，以抗原(100 μg / mouse) 加等體積之佐劑 (Freund's complete adjuvant) (Sigma) 混合成乳劑，於 0 天做小白鼠腹腔注射(IP)。之後再以抗原(100 μg / mouse) 加等體積之佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) (Sigma) 混合成乳劑，於 10、20 及 27 天再進行小白鼠腹腔注射 (IP)，誘發免疫反應，使 B 細胞成熟增生並產生抗體。第 30 天時要採血測價數，確認小白鼠已被引發免疫反應，確認後再進行細胞融合。

2.2.3 骨髓瘤細胞 (myeloma cell)

所用之骨髓瘤細胞株極易增生，且與脾臟細胞融合後，可迅速發育且分泌高濃度免疫球蛋白。目前最常使用為HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) 缺乏性骨髓瘤細胞，如P3、P3 / 653、NS1、SP2、及 FO等細胞，當細胞培養於HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) 培養液中，其中aminopterin可阻止骨髓瘤細胞核酸之正常代謝途徑 (*de novo synthesis*) 之進行，使細胞僅能以 HGPRT或TK酵素，依救急代謝途徑 (salvage pathway) 利用hypoxanthine及thymidine合成核酸，若骨髓瘤細胞缺乏HGPRT，將無法合成核酸而死亡，而融合細胞因為自脾臟細胞取得HGPRT之基因而得以存活增生 (參考圖 2-1)。實驗室採用FO細胞株，

採購於食品工業研究所，使用DMEM培養液，添加 0.018 M碳酸氫鈉、10 % FBS及 1 % penicillin / streptomycin，培養於 37 °C，5 % CO₂。

細胞內核酸的合成路徑

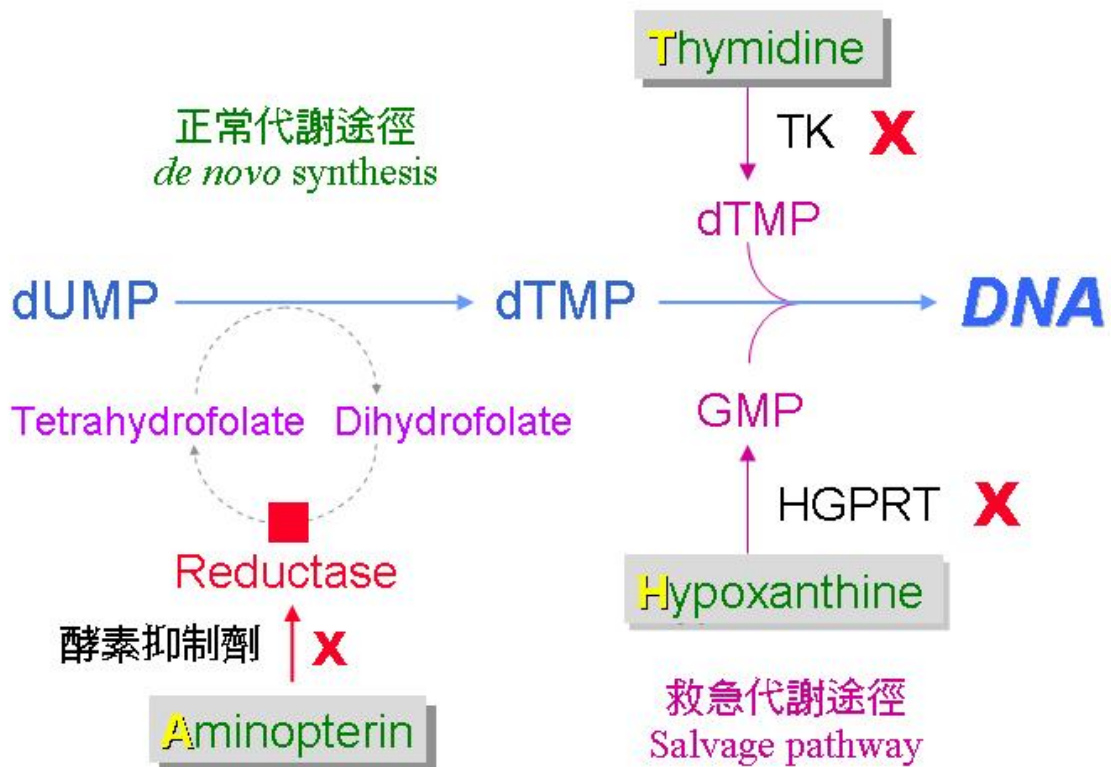


圖 2-1 細胞內核酸的合成路徑 核酸的正常代謝途徑若被 aminopterin 阻礙，可由救急途徑 (salvage pathway) 取用 thymidine (T) 及 hypoxanthine (H) 來合成 DNA。但 FO cell 缺乏 TK 及 HGPRT 兩種酵素，因此在 aminopterin (A) 存在下 FO cell 無法生長；正常細胞 (如 B 細胞) 則可經救急途徑繼續生長。HAT 培養基含 aminopterin, thymidine 及 hypoxanthine，FO cell 在 HAT 中無法生長，除非經由細胞融合導入 TK 或 HGPRT 兩酵素的基因 (可由正常脾臟細胞得來)。

2.2.4 細胞融合 (Fusion)

小鼠以乙醚將其迷昏後，採眼窩血，無菌操作解剖取出脾臟，以 DMEM 於培養皿中清洗兩次。將脾臟至於培養皿中以 5 mL 針筒末端平坦處將脾臟壓碎，用 21G 針頭抽吸使細胞分散，經由無菌紗布過濾至 50 mL 離心管，離心 5 分鐘，轉速 260 g，去除上清，再加入 10 mL DMEM 沖

洗，重複兩次。同時取FO細胞，以DMEM沖洗細胞兩次，離心 5 分鐘，轉速 260 g，回溶於 10 mL DMEM中。取部分細胞做細胞計數，用trypan blue液計算活細胞率，以脾細胞：FO細胞=4：1 之比例將細胞混合，離心 5 分鐘，轉速 260 g，去上清液。離心管輕擊桌面震散細胞，於 1 分鐘內緩慢滴入 1 mL已加溫到 37 °C之PEG / DMSO，同時輕輕搖晃細胞使其均勻混合，於 37 °C水浴 1 分鐘後取出，在 2 分鐘內緩慢滴入 10 mL已加溫到 37 °C之DMEM，離心管輕擊桌面邊敲邊加，離心 5 分鐘，轉速 180 g，去上清液，再以 20 mL DMEM沖洗細胞兩次。以HY培養液(已添加HAT、0.018 M 碳酸氫鈉、20 % FBS及 1 % P / S) 懸浮細胞，並於 96 孔細胞培養盤 (96 well culture plate)培養細胞，在 37 °C，5 % CO₂之條件進行融合後細胞培養。

2.2.5 細胞增殖與取樣篩檢

融合後培養之細胞定期觀察其生長狀況，融合後第 7 天，需再補充 HY-HAT 培養液。14 天後檢查培養液之顏色，若有融合成功有融合瘤細胞 (hybridoma cell) 產生，則培養液顏色變黃，取其培養液做 ELISA 篩檢。太早做篩檢易漏失陽性細胞，因其分泌出的抗體濃度尚低，但若太遲篩檢，融合細胞會因過度增生而死亡。因此最好在細胞未長滿前篩檢一次，其陰性者在培養液變黃時再篩檢一次。培養液經 ELISA 篩檢出含有抗體時，每一次 ELISA 需作一個負向對照組實驗，將該細胞繼續培養。

2.2.6 抗體之生產

單株抗體之生產是使用組織培養法，組織培養法是以 175 cm²塑膠培養盤 (T75) 大量培養，直到細胞過飽和開始死亡時，離心除去細胞，收集上清液，保存在 -20 °C 冰箱中備用。

2.2.7 腹水抗體製備 (Ascetic fluid)

6~11 週大的BALB/C小鼠為實驗動物，第 0 天小鼠腹腔注射給予 0.5 ml Pristane (Sigma)。第 7 天收集單株抗體細胞以PBS清洗兩次後，小鼠腹腔注射單株抗體細胞， 3×10^6 cell/mouse。第 21 天觀察小鼠，腹部腫脹且行動不便者，以 18 號針頭配 5ml 針筒腹腔收集腹水，可收 2~3 次。將收集的腹水離心去除組織碎片，最上層白色懸浮物為脂質先去除，收上清液。加入 50% 的硫酸銨 (ammonia sulfate)，分三次加入，每次間隔 30 分鐘，最後在 4°C 中攪拌反應 2 小時，離心 30 分鐘，4°C，轉速 1620 g，倒掉上清液，沈澱物以適量PB buffer回溶，再用PB buffer透析 16 小時。離心 30 分鐘，4°C，轉速 1620 g，上清液用 0.45 μ m filter過濾備用。

使用 DEAE 管柱 (管徑 2.5 公分)進行純化，裝填 20 ml DEAE 樹脂，加入 80 ml PB buffer 平衡管柱。將硫酸銨沈澱所得之過濾液倒入，將流過管柱之液收起，大部份抗體因為不與 DEAE 樹脂結合，而分佈在這個部份。再分別用含有 40mM、60m NaCl之 PB buffer，各 40 ml 沖洗管柱，每 1.5 ml 收集一管。最後再用含有 1M NaCl 之 PB buffer 50 ml 沖洗管柱。

2.3 抗體的測定

2.3.1 材料

PBS: 1.37 g Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 0.35 g, NaCl 8.77 g 溶於 1 L 一次水中

goat anti-mouse conjugated HRP antibodies (KPL)

TMB (KPL)

Blocking buffer

5%(w/v)脫脂奶粉溶於 PBS 中

ABTS (2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

取 22 mg ABTS 溶於 100 ml 的 50 mM sodium citrate (pH 4.0) 中，過 0.22 μ m 的 filter 中，置於 4°C 備用。每次反應取 21 ml 加入 36 μ l 30% H₂O₂.

DAB (3,3-Diaminobenzidine)

20 mM 3,3-Diaminobenzidine 及 0.15% H₂O₂ 溶於 PBS 中

SDS running buffer

3.03 g Tris, 144 g glycine, 10 g SDS 溶於 1 L 一次水中

5× SDS loading buffer

二次水 4 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 1.7 ml, Glycerol 5 ml, 20% (w/v) SDS 0.5ml, 2-mercaptoethanol 2 ml, 0.05% (w/v) bromophenol blue 4~8 mg.

Coomassie Blue staining solution

400 ml methanol, 100 ml acetic acid, 0.1 g Coomassie Brilliant Blue R250 溶在 1 L 一次水中

退染溶液 I

400 ml methanol, 100 ml acetic acid, 補一次水至 1 L

退染溶液 II

50 ml methanol, 70 ml acetic acid, 補一次水至 1 L

西方點墨轉漬緩衝液 transfer buffer

3.03 g Tris, 14.4 g glycine, 200 ml methanol, 補一次水至 1 L

2.3.2 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

先以老鼠原倍血清 (IgG) 當作正向控制 (positive control)，blocking buffer作負向控制 (negative control)。實驗進行時，以純化所得之病毒蛋白為抗原，於 96 孔盤中每個孔洞加入 100 μL ，室溫下靜置 1.5 小時，以洗滌液 (PBS) 洗去抗原溶液，重複洗三次後，加入 blocking buffer 400 μL /well，室溫下靜置一個小時後，以洗滌液洗去 blocking buffer，重複洗三次，再加入以洗滌液稀釋的待測抗體即細胞培養液或腹水 100 μL /well，室溫下靜置一個小時後，以洗滌液洗去待測抗體，重複洗三次，加入以洗滌液稀釋的二級抗體(如 goat anti-mouse conjugated HRP antibodies 100 μL /well)，室溫下靜置一個小時後，以洗滌液洗去二級抗體，重複洗三次，再以 PBS 洗一次，最後加入呈色劑(TMB 或是 ABTS) 50 μL /well，室溫下避光反應 20 分鐘，使用 2 M H_2SO_4 ，50 μL /well 終止反應，以 ELISA reader (Fusion Universal Microplate Analyzer, Packard) 波長 450 nm (ABTS 用 405 nm) 讀取數值，即可知待測抗體是否能辨識抗原。

2.3.3 SDS-PAGE

在製膠器具中，加入約 3-4 mL resolving gel 於兩片玻璃間的溝槽中，再以 70 % 酒精覆蓋其表面，靜置約 25-30 分鐘後待其凝結完全。去除酒精，注入適當體積的 stacking gel，comb 立即緊貼玻璃面置入 stacking gel，靜置 25-30 分鐘。待其凝結後移去 comb。將凝結完成的膠片，架設於電泳槽中，倒入 SDS running buffer，將樣品蛋白質與 5 \times SDS loading buffer 混合後，95 $^{\circ}\text{C}$ 熱浴 5 分鐘，注入孔中，以 100 伏特進行電泳，至電泳結束。膠片浸泡於 Coomassie Blue staining solution 中 30-60 分鐘，換至退染溶液 I 中約 1 小時，去除多餘背景染料之後，再換浸泡於退染溶液 II 以去除多餘背景染料。

12% SDS-PAGE, Separating gel

ddH ₂ O	1.6 ml
30 % acrylamide mix	2 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3 ml
10 % SDS	0.05 ml
10 % ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
total volume	5 ml

5% SDS-PAGE, Stacking gel

ddH ₂ O	0.68 ml
30 % acrylamide mix	0.17 ml
1.0 M Tris (pH6.8)	0.13 ml
10 % SDS	0.01 ml
10 % ammonium persulfate	0.01 ml
TEMED	0.002 ml
total volume	1 ml

2.3.4 Western blot (西方點墨)

硝化纖維膜與紙張先浸泡於轉漬緩衝液 transfer buffer 中，將完成的 SDS-PAGE 膠片置於硝化纖維膜上，上下再夾以三張紙張，置入溼式電傳器中 (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad)，90V，60 分鐘。完成後置入 blocking buffer 中，室溫下搖晃一個小時後，以 PBS 洗去 blocking buffer，重複洗三次，再置入以 PBS 稀釋的一級抗體(待測抗體)，室溫下搖晃一個小時後，以 PBS 洗去一級抗體，重複洗三次，置入以 PBS 稀釋的二級抗體 (如 goat anti-mouse conjugated HRP antibodies)，室溫下搖晃一個小時後，以洗滌液洗去二級抗體，重複洗三次，後加入 DAB 呈色劑呈色。

2.4 儀器與設備

UVS400, Thermo Savant SPD SpeedVac

BECKMAN COULTER Allegra 21R Centrifuge

ORBITOR SHAKER

Centrifuge 5415R, eppendorf

Orbital shaking incubator Model S300R, FIRSTEK SCIENTIFIC

550 sonic dismembrator, FIRSTEK SCIENTIFIC

Mini Trans-Blot Cell, Bio-Red

Fusion Universal Microplate Analyzer, Packard

第三章 結果與討論

3.1 病毒基因片段取得

所得到之病毒基因片段均進行定序實驗，且證實所得之 DNA 片段序列無誤。



3.1.1 IHHNV

使用商業用檢測試劑組所抽得之基因體當作模板，再用所設計之引子進行 PCR 反應，即可得到一長度為 990bp 之基因產物 (圖 3-1-1)。

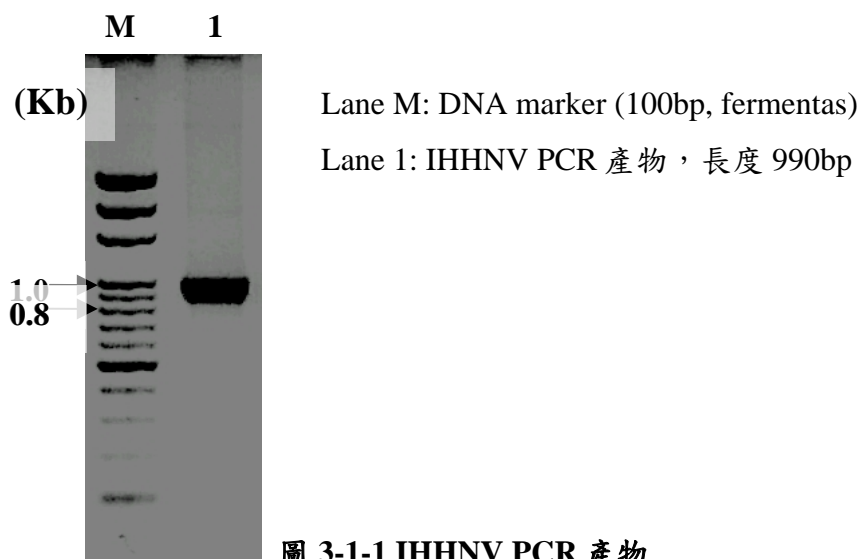
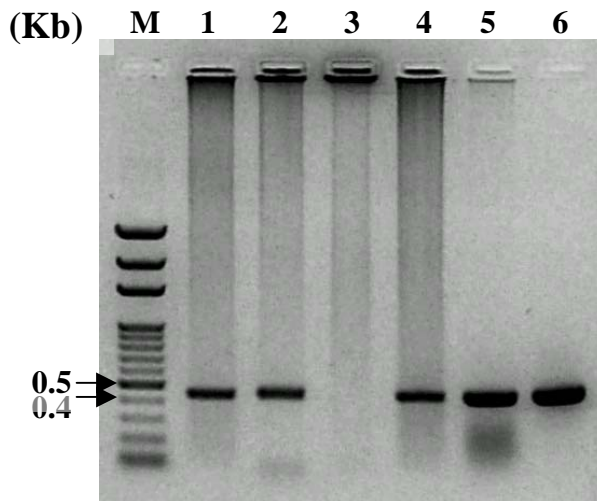


圖 3-1-1 IHHNV PCR 產物

3.1.2 HPV

使用檢測試劑得知，有四隻檢體體內具 HPV (檢體編號#1、2、4、5)，因此將這四隻檢體所抽得之基因體，使用所設計之引子，進行 PCR 反應，其中，有三組可以得到預期之基因片段長度 (檢體編號#1、2、5)，但其中一組所得之量甚少 (圖 3-1-3，Lane 1)。此外，另有一組，在檢測後得知有 HPV 存在，但在使用實驗室所設計之引子進行 PCR 反應後，卻無法得到預期之基因片段 (檢體編號#4)，因為其它兩組檢體 (檢體編號#2、5)，提供可放大出基因片段之模板，因此選定編號#5 之檢體，進行後續之實驗。



Lane M: DNA marker (100bp, fermentas)

Lane 1~5: 五隻不同蝦子檢體，編號

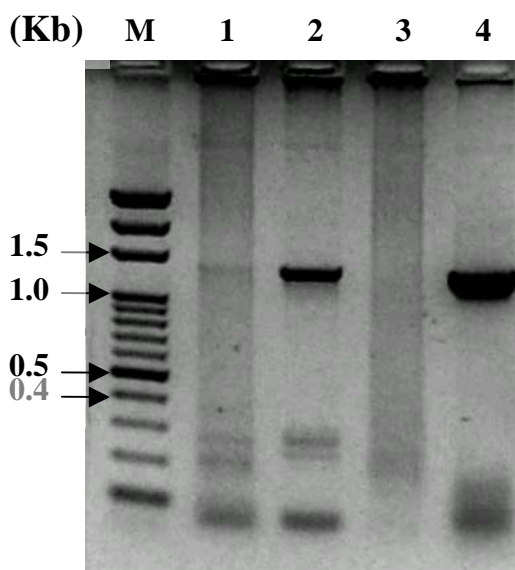
#1~5，Lane 6: positive control，若檢體中

具有 HPV，即可放大出一相同大小的片

段，該片段長 441bp。結果看來，五隻

檢體中，有四隻具有 HPV

圖 3-1-2 HPV 的確認



Lane M: DNA marker (100bp, fermentas)

Lane 1~4: 四個不來源，檢體編號為#1、

2、4、5(參考圖 3-2)的 HPV，進行 PCR，

得到基因片段 1039bp，其中 Lane 4 所得

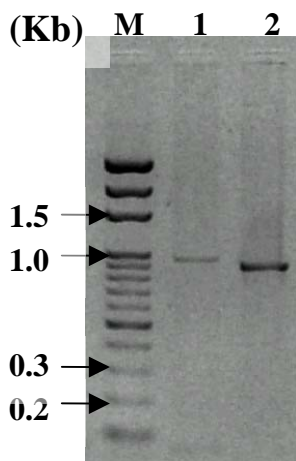
量大，以此檢體(編號#5)為來源進行後續

實驗。

圖 3-1-3 HPV PCR 產物

3.1.3 TSV

TSV 屬於 RNA 病毒，因此需經由反轉錄之過程，以取得 cDNA，再
由其為模板，放大出所選取之基因片段。亦因如此，需在所選取之基因片
段前後，設計新的引子 (TSV Forward primer 1 and Forward primer 2)，利用
反轉錄酵素，以放大出長度大於目標基因片段之 DNA 片段。再利用這個
片段，進行 Nest-PCR，以增加放大量。在圖 3-1-4 中，Lane 1 為使用 TSV
Forward primer 1 和 TSV Reversed primer 所放大，其長度為 947bp。而在
Lane 2 則是利用 TSV Forward primer 2 和 TSV Reversed primer 所大出，其長
度為 903bp。再利用這兩段 RT-PCR 產物當作模板，進行 Nest-PCR，不論
使用何者當模板，均可得到一長度為 876bp 的 DNA 片段 (圖 3-1-5)。

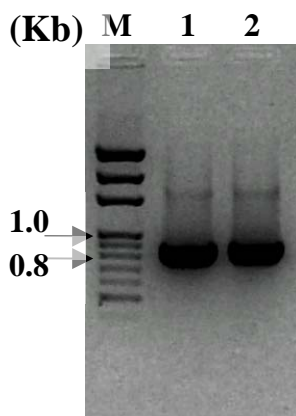


Lane M: DNA marker (100bp, fermentas)

Lane 1: 使用 TSV foreard 1 及 TSV reversed primer 所作之
PCR 結果，可放大出一長 947bp 的片段

Lane 2: 使用 TSV foreard 2 及 TSV reversed primer 所作之
PCR 結果，可放大出一長 903bp 的片段

圖 3-1-4 TSV RT-PCR 產物



Lane M: DNA marker (100bp, fermentas)

Lane 1: 使用 947bp RT-PCR 產物當模板

Lane 2: 使用 903bp RT-PCR 產物當模板

結果指出，不論用何種模板，均能放大出一長度 876bp 的
基因片段

圖 3-1-5 TSV Nest-PCR 產物

3.2 重組蛋白的表現與純化

3.2.1 IHHNV

此一重組蛋白，在 37°C 表現時，雖然有大量表現，但會形成 inclusion body。因此改在 25°C 表現，雖然表現量降低，但較易於純化 (圖 3-2-1)。此外，此一重組蛋白易被分解，純化出來後，置於 4°C 中保存，約七天再拿出來進行蛋白質電泳時，原本單一蛋白質帶會變成兩條。純化出來的蛋白質，亦有以 anti-his tag 抗體進行西方墨點實驗時，可以為其所辨認 (圖 3-2-2)，所以初步判定，已能純化出此一重組蛋白，蛋白質分子量大小，由表現載體與目標基因切接後，估計為 37 Kda。

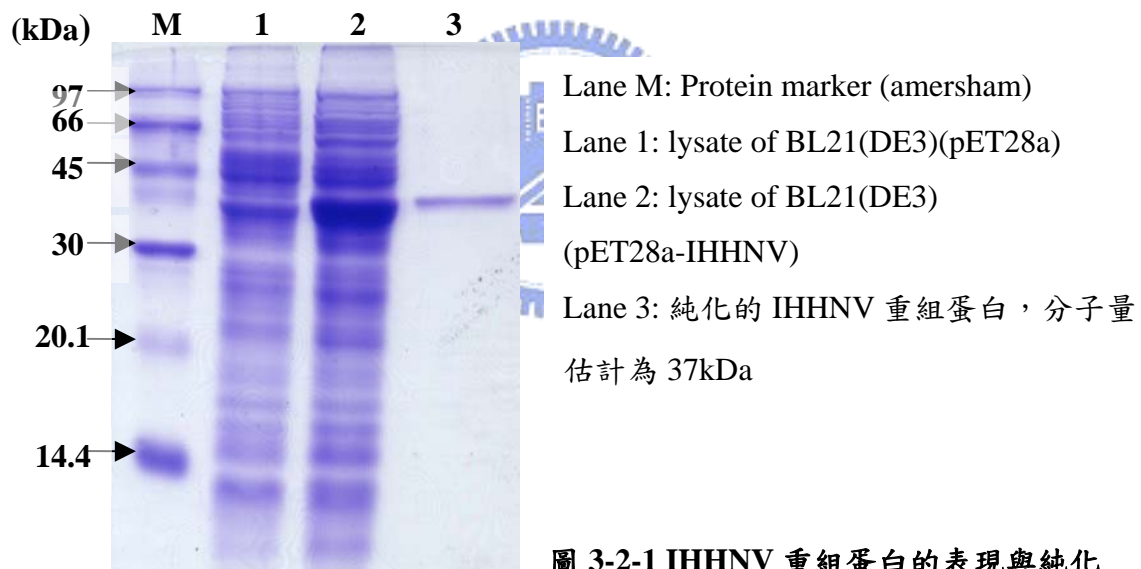


圖 3-2-1 IHHNV 重組蛋白的表現與純化

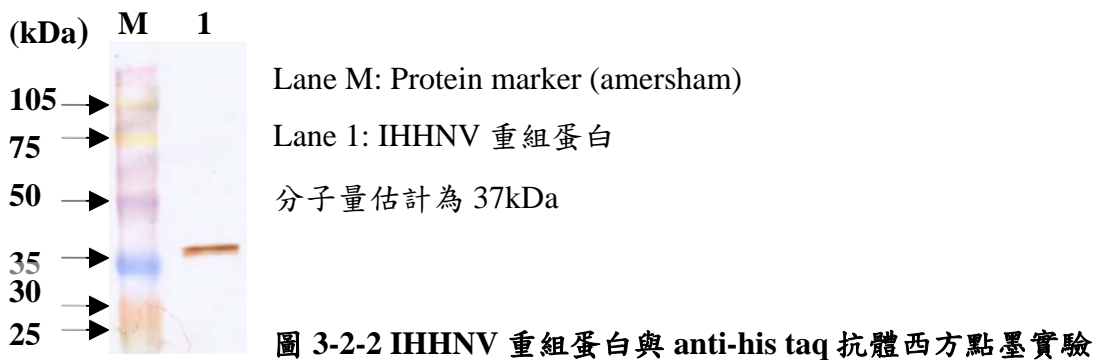


圖 3-2-2 IHHNV 重組蛋白與 anti-his tag 抗體西方點墨實驗

3.2.2 HPV

HPV 重組蛋白，在 37°C 表現時，會形成 inclusion body。改為 25°C 表現時，表現量降低甚多，與對照組相比，無法看出差異，僅能使用 anti-his tag 進行西方墨點實驗時，才能看出此重組蛋白分佈在上清液中。在 25°C 表現雖然不會現在 inclusion body，但表現量太低。因此仍在 37°C 表現，使用 Guanidine HCl 將其失活 (denature) 之後，再利用透析方式使其再重疊 (refolding)。在再重疊的過程中，Guanidine HCl 濃度的改變必需要很緩慢，若改變太快，容易產生沈澱。透析完後，仍有部份沈澱，離心完後，此時上清液中，HPV 重組蛋白在全體蛋白質中已佔有很高的比例 (圖 3-2-3)。使用 anti-his tag 抗體進行西方墨點實驗時，可以為其所辨認 (圖 3-2-4)，所以初步判定，已能純化出此一重組蛋白，蛋白質分子量大小，由表現載體與目標基因切接後，估計為 50 Kda。

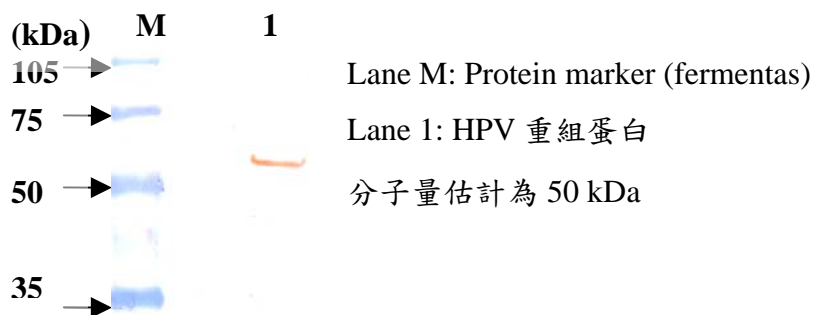
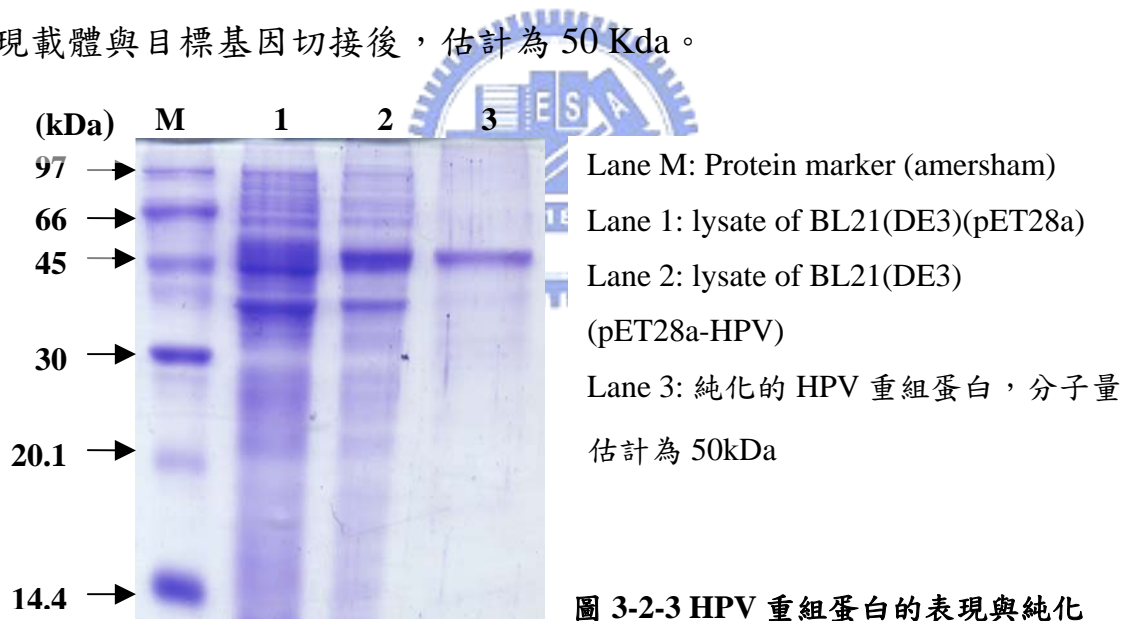
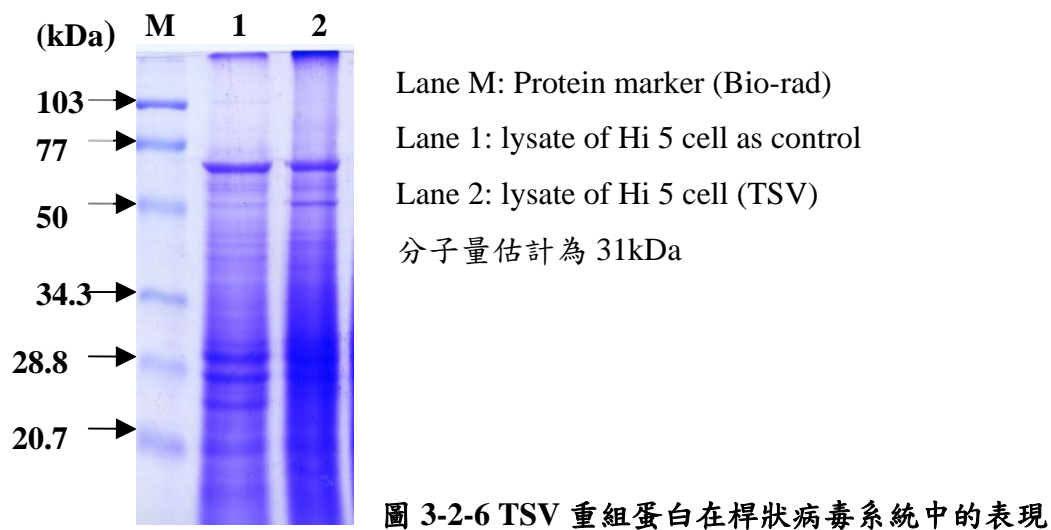
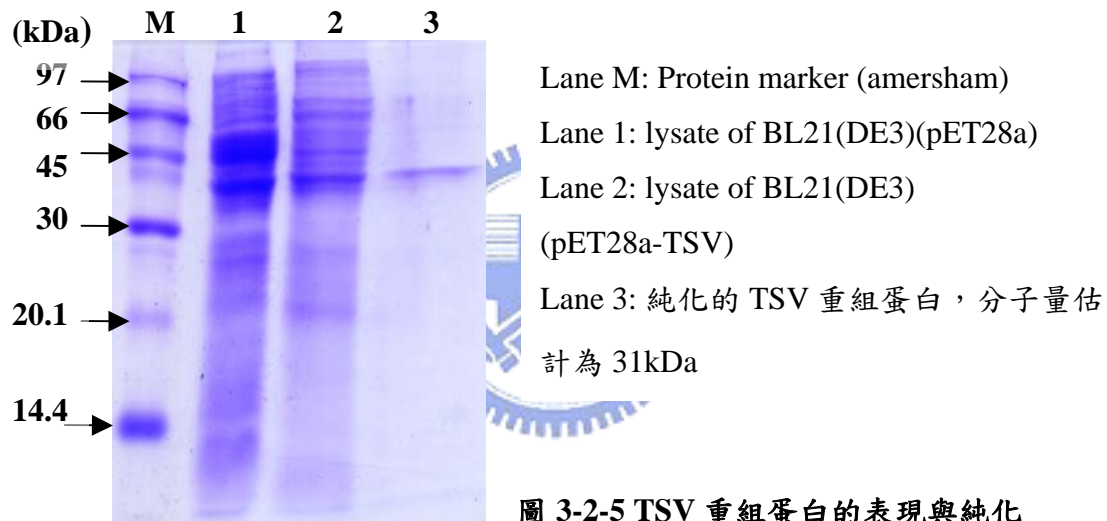


圖 3-2-4 HPV 重組蛋白與 anti-his tag 抗體西方點墨實驗

3.2.3 TSV

TSV 重組蛋白，在 37°C 表現時，與對照組相比，無法看出差異，僅能使用 anti-his tag 在西方墨點實驗中，證實該重組蛋白可能有表現。但表現量很低，圖 3-2-4 中所純化之重組蛋白，經濃縮約六倍體積後才有如此結果，蛋白質分子量大小，由表現載體與目標基因切接後，估計為 31 Kda。也嘗試將此基因片段接入 PBACPAK8-MTEGFP 載體中，使用 baculovirus expression system 作表現 (附錄六)，但初步實驗結果看來，與對照組相比，似乎也是沒有表現 (圖 3-2-5)。



3.3 抗體的製作

3.3.1 單株抗體力價的測試

當小鼠給予抗原後產生免疫反應，可測其血液中抗體力價(titer)高低，決定是否適合進行融合實驗，通常給予抗原三次後，血液中抗體力價可達高峰，因此在第 30 天給予抗原後，第 34 天眼窩採血，血液離心取血清連續稀釋作 ELISA 實驗，值趨平緩者為其價數，由結果得知四次給予抗原小鼠的血中力價，使用 HPV 重組蛋白者，可達 1：20000 (圖 3-3-1)；使用 IHHNV 重組蛋白者，可達 1：50000 (圖 3-3-2)。

3.3.1.1 HPV 重組蛋白單株抗體力價之測試

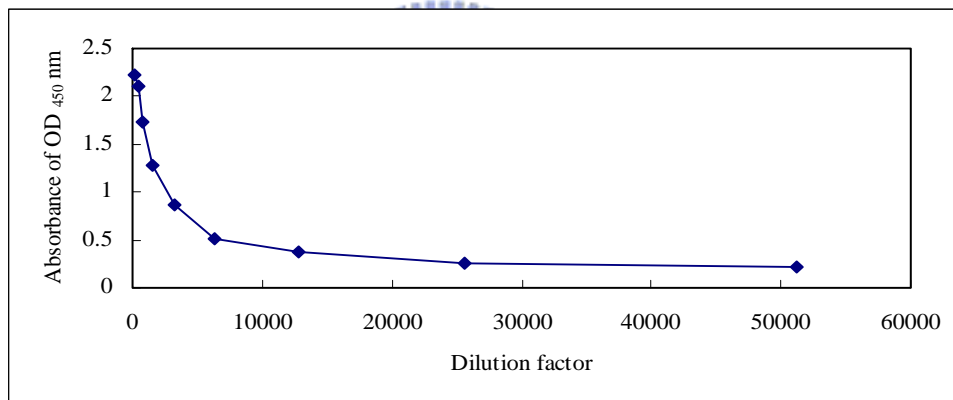


圖 3-3-1 實驗接種小鼠血清力價之測試，HPV 重組蛋白

3.3.1.2 IHHNV 重組蛋白單株抗體力價之測試

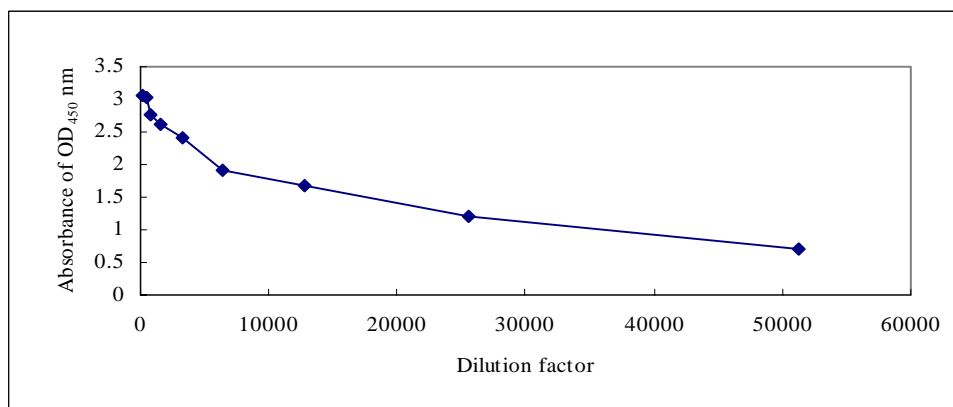


圖 3-3-2 實驗接種小鼠血清力價之測試，IHHNV 重組蛋白

3.3.2 單株抗體對抗原反應篩選

3.3.2.1 HPV

在 HPV 方面，因為表現量很高，所以抗原的製備，是將蛋白質粗抽液跑完 SDS-PAGE 後，經染色，將預期位置的帶切下，使用液態氮讓其結凍，再將其磨碎。如此反覆數次，直至膠體顆粒大小可流過 23G 針頭，以便於打到老鼠中。但免疫三次後，測血清價數，未達可作抗體之數，所以再以粗抽蛋白免疫一次。因為粗抽蛋白中，尚有其它雜蛋白，所以會有認其它蛋白的抗體。因此在篩選時，會使用 E. coli BL21(DE3)(pET28a)表現後的粗抽蛋白當作負向選取 (negative selection)，因為這兩組所表現之蛋白質，理論上只差重組蛋白，所以可以利用這樣的方式，保留只會認重組蛋白質的細胞株。所得到的十六株抗體 (表 3.1)，由 ELISA 數據看來 (圖 3-3-3)，均會認到其它雜蛋白，但其中，3-24、3-7 這兩株價數高且負向選取的值也較低，代表這兩株細胞所生產之抗體，較不會認到雜蛋白，有較高的專一性。雖然這兩株細胞，其負向選取的值與負向控制比起來，相對高，但在西方點墨實驗中 (圖 3-3-4)，卻僅認到 HPV 重組蛋白，這可能跟 DAB 呈色靈敏度較差，導致所認到的雜蛋白無法呈現出來。這樣的推論在 ECL (enhanced chemiluminescent) 呈色結果可得到證實 (data 未呈現)，所得之單株抗體均會認到重組蛋白以外的雜蛋白。出現這樣的結果，與未作單株化有關，僅靠負向篩選，又在不使用純的蛋白當抗原時，無法得到僅認重組蛋白之單株抗體。在蝦體檢測方面，初步選了 13 隻未含 HPV 的蝦子，取其組織粗抽液當抗原，與 3-24 單株抗體進行西方墨點實驗 (圖 3-3-5)，初步結果指出，此株僅認到 HPV 重組蛋白。雖然此一結果並不能證明該抗體可與天然的 HPV 殼蛋白作辨識，但也可證明，不會非特異性地辨認到蝦體中其它的蛋白。

表 3.1 HPV 重組蛋白 monoclonal antibodies

3-3	1-13	2-14	2-12	3-10	3-24	3-7	3-12
1-2	1-13	3-13	2-1	2-6	1-8	2-5	3-2

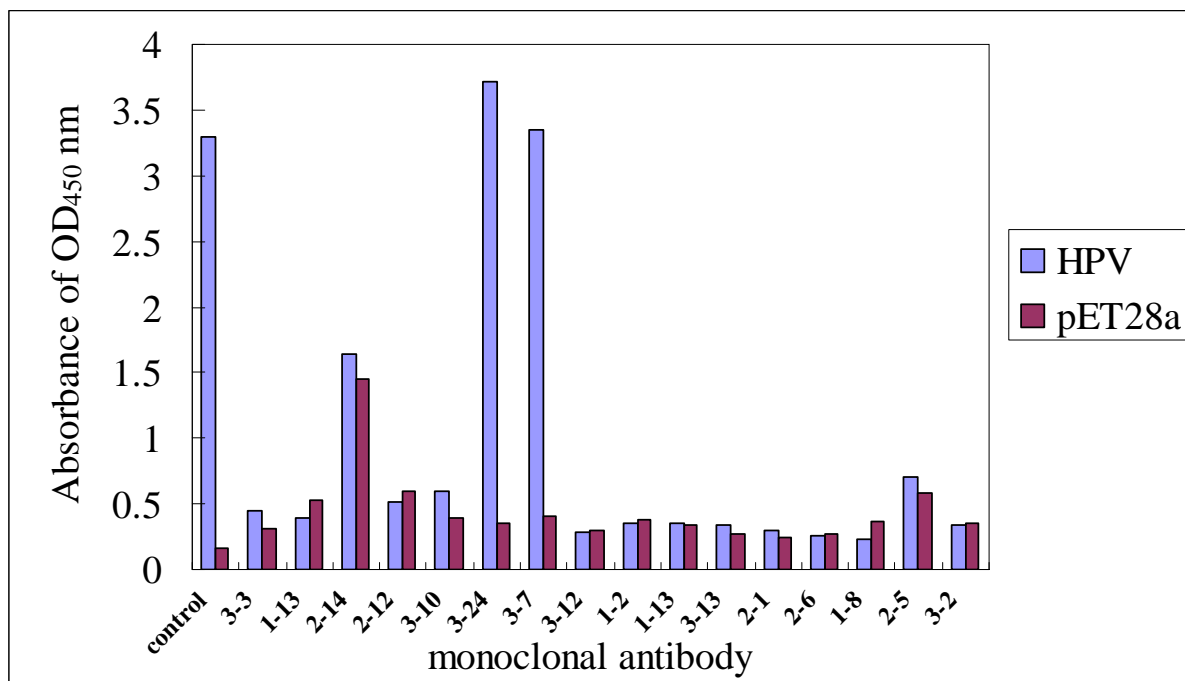


圖 3-3-3 融合成功細胞產生的抗體對 HPV 重組蛋白抗原反應篩選

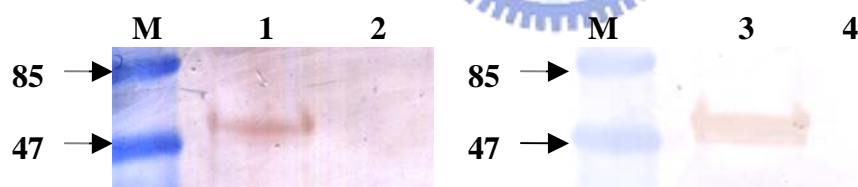


圖 3-3-4 HPV 重組蛋白與抗體西方點墨結果。Lane 1、3, HPV 重組蛋白；Lane 2、4: BL21(DE3)(pET28a)表現後之粗抽蛋白，當作負向選取 (negative selection)，左圖用 3-7 單株抗體，右圖用 3-24 單株抗體。

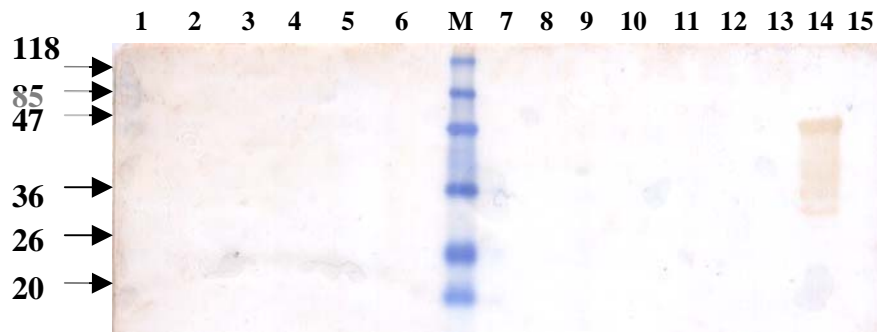


圖 3-3-5 HPV 3-24 抗體與蝦檢體之西方點墨實驗結果。Lane 1~13, 蝦子檢體粗抽液; Lane 14, HPV 重組蛋白; Lane 15, BL21(DE3)(pET28a)表現後粗抽蛋白，當作負向控制 (negative control)。

3.3.2.2 IHHNV

在 IHHNVN 方面，目前已得到一株細胞株，3-62。在 ELISA 實驗中 (圖 3-3-6)，其價數與老鼠原倍血清同高。而在西方點墨實驗中也證實，此一單株抗體辨認到 IHHNV 重組蛋白，在病原蝦粗抽液中也可以辨認到 IHHNV 天然之殼蛋白 (圖 3-3-7)。

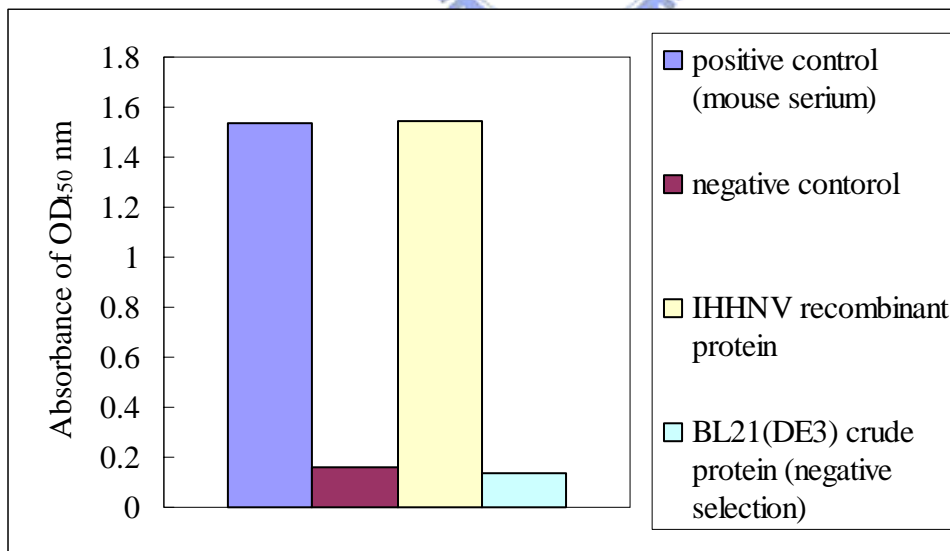


圖 3-3-6 融合成功細胞產生的抗體對 IHHNV 重組蛋白抗原反應篩選

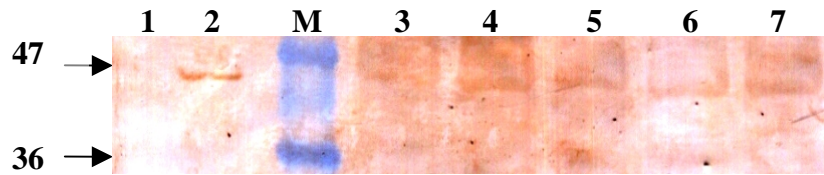


圖 3-3-7 IHHNV 3-62 抗體與蝦檢體之西方點墨實驗結果。Lane1, BL21(DE3)(pET28a) 表現後粗抽蛋白，當作負向控制 (negative control)；Lane2, IHHNV 重組蛋白; Lane3~7: IHHNV 病蝦檢體粗抽液。

3.3.3 單株抗體特異性之測試

抗體與抗原之辨認途徑有二個，一個是蛋白質序列、一個是蛋白質結構。為避免所發展之抗體，會非特異性地辨認到其它蝦病毒，因此將所得之兩株 HPV 抗體與一株 IHHNV 抗體，交叉與 TSV、HPV、IHHNV 三種重組蛋白質進行 ELISA (圖 3-3-8~10) 及西方點墨實驗 (圖 3-3-11~13) 實驗。在 (圖 3-3-8) 中，使用 HPV 3-24 這株 HPV 抗體，只會專一性辨認到 HPV 重組蛋白。在 (圖 3-3-9) 中，使用 HPV 3-7 這株 HPV 抗體，只會專一性辨認到 HPV 重組蛋白，雖然對 IHHNV 重組蛋白有一點反應，這可能與單株化不佳有關。在 (圖 3-3-10) 中，使用 IHHNV 3-62 這株 IHHNV 抗體，只會專一性辨認到 IHHNV 重組蛋白，雖對 HPV 重組蛋白也是有一點反應，這可能也是與單株化不佳有關。而在西方點墨實驗中，也是有類似的結果。因此初步看來，所得到這三株抗體，在不同的重組蛋白中，不會出現非特異性的辨認。

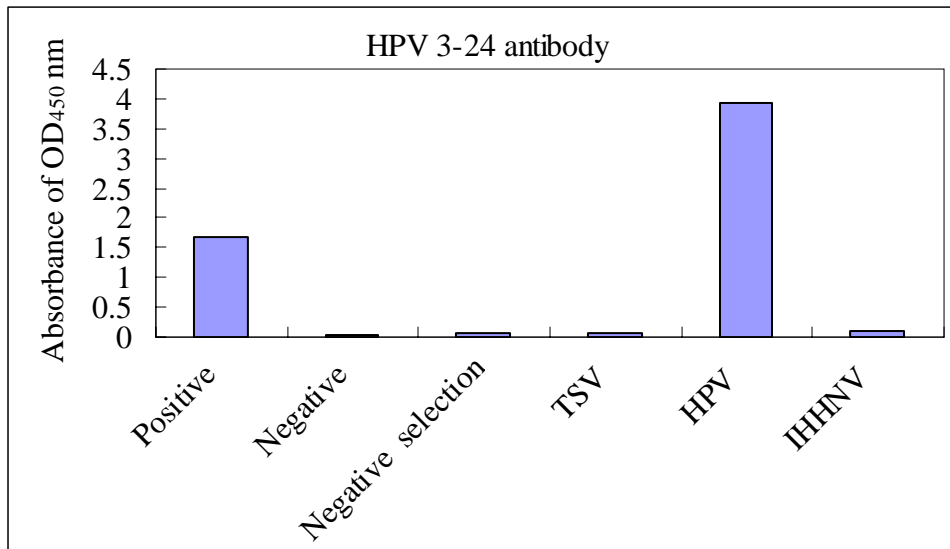


圖 3-3-8 HPV 3-24 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果。Positive, 使用老鼠原倍血清；negative, 使用 5% 脫脂奶粉；TSV, TSV 重組蛋白；HPV, HPV 重組蛋白；IHHNV, IHHNV 重組蛋白。

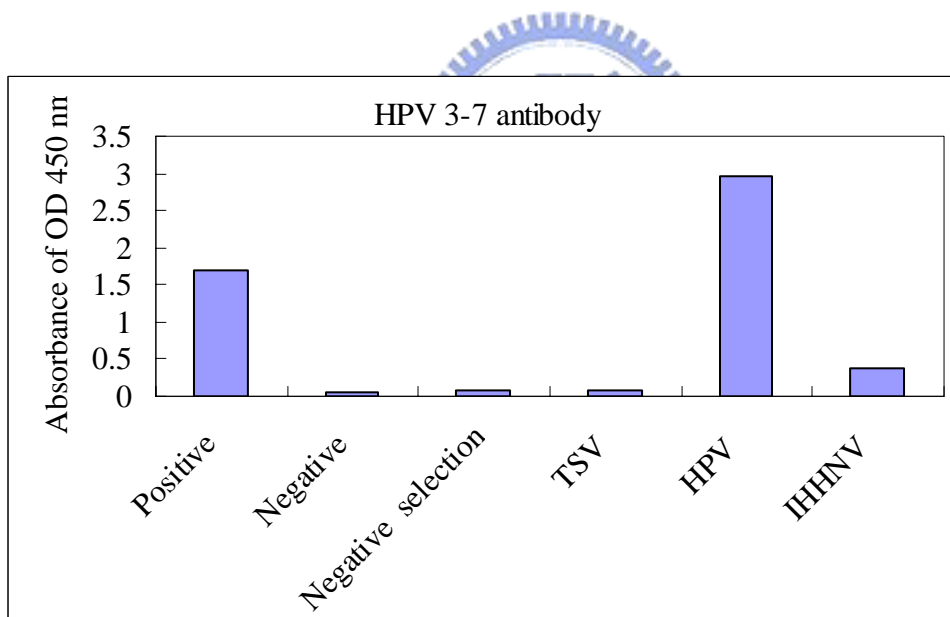


圖 3-3-9 HPV 3-7 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果。Positive, 使用老鼠原倍血清；negative, 使用 5% 脫脂奶粉；TSV, TSV 重組蛋白；HPV, HPV 重組蛋白；IHHNV, IHHNV 重組蛋白。

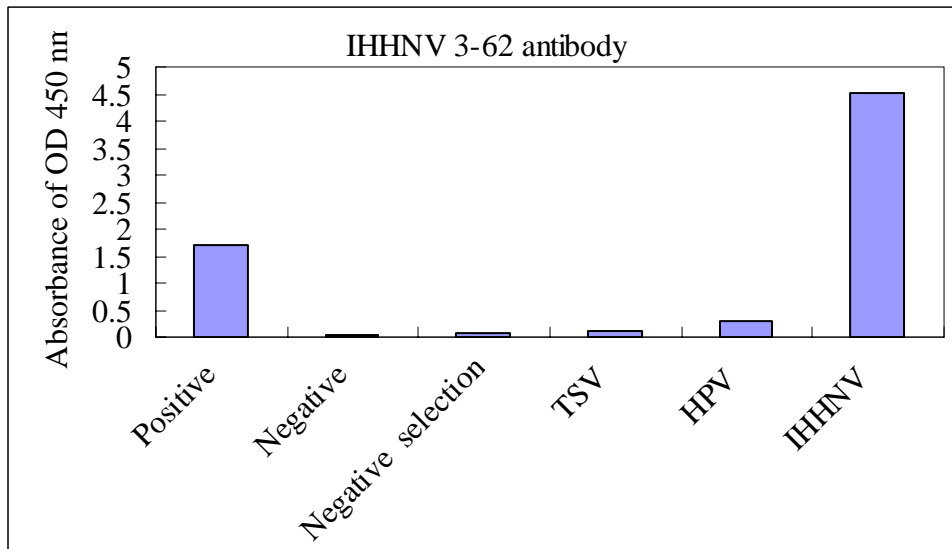


圖 3-3-10 IHHNV 3-62 抗體與重組蛋白 ELISA 實驗結果。Positive, 使用老鼠原倍血清；negative, 使用 5%脫脂奶粉；TSV, TSV 重組蛋白；HPV, HPV 重組蛋白；IHHNV, IHHNV 重組蛋白。

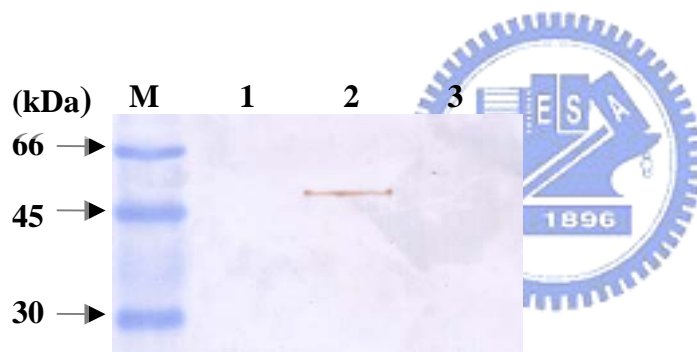


圖 3-3-11 HPV 3-24 抗體與重組蛋白西方點墨實驗結果。Lane 1, IHHNV 重組蛋白；Lane 2, HPV 重組蛋白；Lane 3, TSV 重組蛋白。

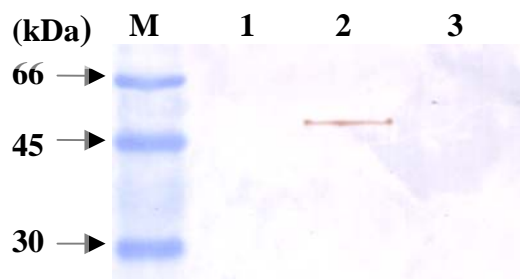


圖 3-3-12 HPV 3-7 抗體與重組蛋白西方點墨實驗結果。Lane 1, IHHNV 重組蛋白；Lane 2, HPV 重組蛋白；Lane 3, TSV 重組蛋白。

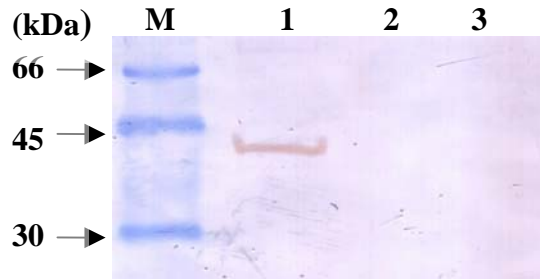


圖 3-3-13 IHHNV 3-62 抗體與重組蛋白西方點墨實驗結果。Lane 1, IHHNV 重組蛋白；Lane 2, HPV 重組蛋白；Lane 3, TSV 重組蛋白。

3.3.4 重組蛋白 Alignment 結果(使用 Clustal W)

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	VP2.TSV	283	2	NS2.HPV	428	6
1	VP2.TSV	283	3	37Kda.IHHNV	329	2
2	NS2.HPV	428	3	37Kda.IHHNV	329	4

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

VP2.TSV          -----ANPVEIDNFDTTTTSGGLIPGGSVTNSEG-----STILMNDIPITNQNVVL 45
NS2.HPV          MASKGDYYYFTPRDLVNFVNTLLCHKINAIKMLTMKEEDFLSQVWLPYIQGFQTAHDL 60
37Kda.IHHNV     --MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGDPHRCLQFNTGDSIHITFQTRRYFEF 58
                  . * . : . : . :

VP2.TSV          SKNVTDN-----LFEVQDQALIESLSRDVLLHN-----DSWTSSD 80
NS2.HPV          GRDSKCGAAGDEFQEVFLDERKFIDFMTSFRRSVFI SYGDEWRHRSSHFMADVFWSDNL 120
37Kda.IHHNV     DAANDGN-----FDGKNLYCLPLHWMNLYLYG-----LKSSDSSATETQRYKM 101
                  . : : . :

VP2.TSV          DEIGTTMTQEQLATEFN-QPHLYEISLPDDIVRKSLFMSNKLANIAYMR----- 128
NS2.HPV          RQFWMMI FGECFHVNMSPCCKRLYVDMLPYYLAKMTTENRHLEIWEYMNPCPATHVRRNK 180
37Kda.IHHNV     VKSMMKTYGKVKVHKAGVVMHSMVPLMKDLKVS GGT SFETLTFDTTPYLE----- 150
                  : . : : * :

VP2.TSV          -----CDYEVTVR-----VQATPFLOQALWLWNKMN---AKQTSIIRRTL 166
NS2.HPV          MTGMNFCSQGVVIDNEYPDNQMGCYNIDEHPLPGGIRWSGNTYRRTGYVHVNVKVKWLGVT 240
37Kda.IHHNV     -----IFKDTTGLHN-----QLSTKEADVTLAKWIQNPQLVT--VQSTAANYEDPI 194
                  . . : . * * . : .

VP2.TSV          EHLRSITSFPGIEMNLQSEARAITLS----IPYTSELQVFNPRNVN----- 208
NS2.HPV          DKVSDMEETSSDEEVPSSQEKYMKSKKKEQPKTSEKKDDEPANKKRKFCLTSAALEKQK 300
37Kda.IHHNV     QQFGFMEQMRGTGDRKAYTIHGDRNWNWYGEIPTTGPTTFIPKWGG----- 238
                  : . : : * * . :

VP2.TSV          -----NLNSIRLSVLSQLQGPEDVESASYSIYGR LKNIK----- 242
NS2.HPV          LELGKFFRMEEEP INIKLYDLEEGKEHHVHEAIRIDGTNSKFAKKKDEHGVIDDFKVIV 360
37Kda.IHHNV     -----QLKWDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIK----- 272
                  : : . : . : * . :

VP2.TSV          -----LYGHAP-----SVTSSVYPSTQSGYDDDCPIVHAGTDEDEDSSKQGIV----- 283
NS2.HPV          CDGENNLYGFFANTQLNKL FNKWHSTKKYSMKPEHNI SLKVSQIQEVRNGKMCIVKMAIN 420
37Kda.IHHNV     -----GPNGDELKLG-CRVQADFFLHLEVRLPPQGCVASL GMLQYLHAPCTGQLNKCYIM 326
                  * : . . : :

VP2.TSV          -----
NS2.HPV          DDVKCFAR 428
37Kda.IHHNV     HTN----- 329
  
```

第四章 結論與展望

目前可利用所設計之引子，放大出所選之目標基因，並可利用基因重組方式，大量表現這些蛋白質並純化之。也可以使用這些純化的蛋白質，在 BALB/c 老鼠體內，誘導出對重組蛋白具有免疫反應的多株抗體。所發展的單株抗體中，選擇 3-24 這株單株抗體，與未含 HPV 的蝦子檢體（由 PCR 方式證實未含 HPV），進行西方墨點實驗，結果指出，3-24 這株單株抗體，並不會與蝦子檢體產生非特異性反應，僅會針對 HPV 重組蛋白產生反應，3-7 進行相同實驗，也有相似的結果。在 IHHNV 方面，目前已篩到 3-62 細胞株，可單一辨認出 IHHNV 重組蛋白，並且可在 IHHNV 病蝦中，辨認出此一殼蛋白。但也非特異性地辨認到蝦體粗抽液中其它蛋白質，因此該細胞株可能無法單一用於發展檢測試劑，仍需配合其它細胞株以增加專一性。另外，使用所得到之三株不同的抗體，針對不同之重組蛋白進行 ELISA 及西方點墨實驗也初步證實，這些抗體對不同的重組蛋白並不會有非特異性的辨認產生。

目前的結果中，僅使用未含 HPV 的蝦體，之後仍需使用含有 HPV 的蝦體，看能否使用單株抗體，認到 HPV 上的這個抗原。另外，TSV 尚有其它兩個殼蛋白、HPV 仍有一個殼蛋白，後續實驗中，可先利用同樣的方式，發展成單株抗體。再整合這些對蝦病毒殼蛋白具有專一性的抗體，作下列四種應用：(1) 發展出檢測工具；(2) 純化病毒，用以探討致病機制；(3) 進行中和反應 (neutralization)，以探討殼蛋白在病毒入侵宿主時，是否具有細胞吸附 (cell attachment) 的功能；(4) 發展口服疫苗。以下將就各應用作一簡略之介紹。

(1) 發展檢測工具，取得對病毒表面殼蛋白具有專一性之單株抗體後，將應用於 immuno-strips 及 immuno-PCR 等檢測工具的開發。Immuno-strips (附錄七) 利用單株抗體，吸附在膜上當作捕捉抗體 (capture antibody)，辨

認到病毒表面殼蛋白時，再利用結合金粒子之單株抗體當作二級抗體 (secondary antibody)，因為金粒子聚集時，會呈現紫紅色 (附錄八)，以此作為判斷之用。Immuno-PCR (附錄九)，則是利用 PCR 的方式放大訊號，藉此增加靈敏度。原理為，對殼蛋白 (抗原) 具有專一性的抗體作為捕抓抗體，再以 biotinylated anti-IgG antibody 當作二級抗體，透過 streptavidin 這個蛋白質，連結 biotinylated signaling DNA，如此，將抗原上連結上一段 DNA，之後可利用 PCR 將訊號放大。放大的 DNA 可用電泳分析，或是作比色分析。因為透過 PCR 放大訊號的關係，一般只要幾百個分子就可被偵測到。

(2) 純化病毒，病毒顆粒可用以探討致病機制。一般傳統的純化方法，是利用不同的蔗糖梯度 (sucrose gradient) 或是氯化鋇梯度 (CsCl gradient)，在超高速離心下，將病毒純化出來。我們利用抗體與抗原高度的專一性，將抗體與 sepharose 這類載體結合，發展成親和性管柱。(附錄十)

(3) 中和反應實驗，探討病毒殼蛋白在病毒入侵宿主時，是否具有細胞吸附的功能。病毒在入侵宿主時，會先利用表面蛋白與宿主的細胞表面作結合，之後再入侵到細胞內，因此將利用抗體與殼蛋白具有專一性的特性作結合，若影響了病毒的感染能力，可推論該殼蛋白可能扮演了細胞吸附的功能。

(4) 發展口服疫苗。得到重組蛋白的過程中，建構了許多可以表現病毒殼蛋白的大腸桿菌。將這些大腸桿菌在大量表現後，將其吸附在飼料上。因為這些飼料上含有細菌菌體及病毒殼蛋白，期待這些因子可以在蝦體引發類似 adaptive 的免疫反應，可對細菌或是病毒產生防禦能力。

第五章 參考文獻

- [1] **Flegel, T. W.** 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microbiol biotechnol.* 13:433-422.
- [2] **Lightner, D. V. & Redman, R. M.** 1998. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.* 33:165–180.
- [3] **Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang, and C. F. Lo.** 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23:165-173.
- [4] **Flegel, T. W.** 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13:433-442.
- [5] **Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama, and M. Hiraoka.** 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.* 29:149-158
- [6] **Lo, C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C. H. Wang, and G. H. Kou.** 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27:215-225.
- [7] **Wang, C. H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, M. C. Tung, C. F. Chang, M. S. Su, and G. H. Kou.** 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 23:239-242.
- [8] **Zhan, W. B., Y. H. Wang, J. L. Fryer, K. K. Yu, H. Fukuda, and Q. X. Meng.** 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health* 10:405-410.
- [9] **Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z. and Xu, X.** 1997. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J. Virol. Methods* 67:1-4.
- [10] **Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Paryim, S., Tassanakajon, A.,**

Withyachumnarnkul, B., and Flegel, T. W. 1995. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21: 69-77

[11] **Durand, S., D. V. Lightner, R. M. Redman, and J. R. Bonami.** 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 29:205-211

[12] **Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B.**

Withyachumnarnkul, and T. W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21:69-77.

[13] **Mayo, M. A.** 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147:1655-1656.

[14] **Chen, L. L., H. C. Wang, C. J. Huang, S. E. Peng, Y. G. Chen, S. J. Lin, W. Y. Chen, C. F. Dai, H. T. Yu, C. H. Wang, C. F. Lo, and G. H. Kou.** 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301:136-147.

[15] **Liu, W. J., H. T. Yu, S. E. Peng, Y. S. Chang, H. W. Pien, C. J. Lin, C. J. Huang, M. F. Tsai, C. H. Wang, J. Y. Lin, C. F. Lo, and G. H. Kou.** 2001. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. *Virology* 289:362-377.

[16] **Tsai, M. F., C. F. Lo, M. C. van Hulten, H. F. Tzeng, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, J. M. Vlak, and G. H. Kou.** 2000. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92-99.

[17] **Tsai, M. F., H. T. Yu, H. F. Tzeng, J. H. Leu, C. M. Chou, C. J. Huang, C. H. Wang, J. Y. Lin, G. H. Kou, and C. F. Lo.** 2000. Identification and

characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology* 277:100-110.

[18] **van Hulten, M. C., R. W. Goldbach, and J. M. Vlak.** 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J. Gen. Virol.* 81:2525-2529.

[19] **van Hulten, M. C., M. Westenberg, S. D. Goodall, and J. M. Vlak.** 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266:227-236.

[20] **van Hulten, M. C., M. Reijns, A. M. Vermeesch, F. Zandbergen, and J. M. Vlak.** 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 83:257-265.

[21] **Zhang, X., C. Huang, X. Xu, and C. L. Hew.** 2002. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 83:471-477.

[22] **Zhang, X., C. Huang, X. Xu, and C. L. Hew.** 2002. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J. Gen. Virol.* 83:1069-1074.

[23] **Zhang, X., X. Xu, and C. L. Hew.** 2001. The structure and function of a gene encoding a basic peptide from prawn white spot syndrome virus. *Virus Res.* 79:137-144.

[24] **C. R. Pantoja, D. V. Lightner.** 2001. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp by in situ hybridization at the electron microscope level. *Dis. Aqua. Org.* 44:87-96.

[25] **Wasana Sukhumsirichart, Pongsoppee Attasart, Vichai Boonsaeng and Sakol Panyim.** 2003. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus mondon*. *Virology* 346:266-277.

- [26] **D.V. Lightner, R.M. Redman, D.W. Moore and M.A. Park.** 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp, *Aquaculture* 116:15–23.
- [27] **Bonami JR, Mari J, Poulos BT, Lightner DV.** 1995. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 76:813-817.
- [28] **Spann KM, Adlard RD, Hudson DA, Pyecroft SB, Jones TC, Voigt MOC.** 1997. Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *penaeus japonicus* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 31:239-241.
- [29] **Sukhumsitrichart W, Wongteerasupaya C, Boonsaeng V, Panyim S, Sriurairatana S, Withyachumnarnkul B, Flegel TW.** 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 38:1-10.
- [30] **Lightner, D. V., Redman, R. M., Bell, T. A.** 1983a. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 42:62-70.
- [31] **Bonami JR, trumper B, Mari J, Brehelin M, Lightner DV.** 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 71:2657-2664.
- [32] **Mari J, Bonami JR, Lightner DV.** 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.* 74:2637-2643.
- [33] **Shike H, Dhar AK, Burns JC, Shimizu C, Jousset FX, Klimple KR, Bergoin M.** 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology* 277:167-177.
- [34] **Bonam JR, Kenneth W. Hasson, Mari J, Poulos BT, Lightner DV.** 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.* 78:313-319.

- [35] **Sarawut Jitrapakdee, Sasimanas Unajak, Nusra Sittidilokratna, Richard A. J. Hodgson, Jeff A. Cowley, Peter J. Walker, Sakol Panyim, Vichai Boonsaeng.** 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *J. Gen. Virol.* 84:863-873.
- [36] **Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Sataporn, D., Aekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S., Flegel, T. W.** 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.* 17:145-157.
- [37] **Wang, Y. C., Chang, P. S.** 2000. Yellow head virus infection in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.* 35:1-10
- [38] **Wongteerasupaya, V., Sriurairatana, S., Vicker, J. E., Akrajamorn, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T. W.** 1995. Yellow head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22:45-50.
- [39] **Lightner, D.V., Redman, R.M.** 1981. A baculovirus caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 299-302.
- [40] **Chen, S. N., Chang, P.S., Kou, G. H.** 1989. Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in Taiwan. *Fish Pathol.* 24:189-195.
- [41] **Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Fujii, R. Tomonaga, S., Supamattaya, K., Boonyaratpalin, S.** 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp. *Fish Pathol.* 29:121– 125.
- [42] **Wang, C.S, Tang, K.F.J., Kou, G.H., Chen, S.N.** 1997. Light and electron microscopic evidence of white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *J. Fish Dis.* 20:323–331.
- [43] **Nadala Jr., E.C.B., Loh, P.C.** 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassay for the detection of white-spot virus and yellow head virus of

penaeid shrimp. *J. Virol. Methods* 84:175– 179.

[44] **Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S., Loh, P.C.** 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. *J. Virol. Methods* 69:39–44.

[45] **Sahul Hameed, A.S., Anil Kumar, M., Stephen Raj, M.L., Kunthala, J.** 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 160:31– 45.

[46] **Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusda, R., Hirona, I., Aoki, T.** 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish Dis.* 19:399– 403.

[47] **Tapay, L.M., Cesar, E., Nadala Jr., E.C.B., Loh, P.C.** 1999. A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus (WSV). *J. Virol. Methods* 82:39– 43.

[48] **Nunan, L.M., Poulos, B.T., Lightner, D.V.** 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture* 160:19– 30.

[49] **Durand, S., Lightner, D.V., Nunan, L.M., Redman, R.M. Mari, J., Bonami, J.R.** 1996. Application of gene probes as a diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 27:59–66.

[50] **Chang, P.S., Chen, H.C., Wand, Y.C.** 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus WSBV in experimentally infected wild shrimps, crabs and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164:232–242.

[51] **E. Cesar B. B. Nadala Jr., Philop C. Loh.** 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *J. Virol. Methods* 84:175-179.

- [52] **Ronan Quere, Therese Commes, Jacques Marti, Bonami JR., David Piquemal.** 2002. White spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus simultaneous diagnosis by miniarray system with colorimetry detection. *J. Virol. Methods* 105:189-196.
- [53] **W. Sukhumsirichart, W. Kiatpathomchai, C. Wongteerasupaya, B. Withyachumnarnkul, T. W. Flegel, V. Boonseang, S. Panyim.** 2002. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *penaeus monodon* using PCR-ELLISA. *Molecular and Cellular Probes* 16:409-413.
- [54] **Xiang, J.** 2001. Recent advance of research and development on marine biotechnology in China. In: Postgraduate conference on marine biology and biotechnology, June 6–8, Hong Kong, China, p. 12.
- [55] **Chang C. F., Su M. S., Chen H. Y., Liao I.C.** 2003. Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 15:297-310.
- [56] **Itami T., Asano M., Tokishige K. Kubono K. nakagawa A., Takeno N. Nishimura H., Maeda M.,Kondo M., Takahashi Y.** 1998. Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japoicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 16:277-288.
- [57] **Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T., Muroga, K.** 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* against penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.* 42:83– 89.
- [58] **Atsushi Namikoshi, Wu J. L., Takayoshi Yamashita, Toyohiko Nishizawa, Toyohiro Nishioka, Misao Arimoto, Kiyokuni Muroga.** 2004, Vaccination trials with *penaeus Japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229:25-35.
- [59] **Jeroen Witteveldt, Carolina C. Cifuentes, Just M. Vlak, Marielle C. W. van Hulten.** 2004. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. *J. Virol.* 78:2057-2061.

- [60] **Jiraporn Rojtinnakorn, Ikuo Hirono, Toshiaki Itami, Yukinori Takahashi, Takashi Aoki.** 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn *penaeus japoicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish & Shellfish Immunology* 13:69-83.
- [61] **Thomas Gitterle, Ragnar Salte, Bjarne Gjerde, James Cock, Harry Johansen, Marcela Salazar, Carlos Lozano, Morten Rye.** 2005. Genetic (co)variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. *Aquaculture* 246:139-149.
- [62] **Nanghai He, Qiwei Qin, Xun Xu.** 2005. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus Japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research* 66:39-45.
- [63] **Tian Luo, Xiaobo Zhang, Zongze Shao, Xun Xu.** 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 551:53-57.
- [64] **Wanchai Assavalapsakul, Witoon Tirasophon, Sakol Panyim.** 2005. Antiserum to the gp116 glycoprotein of yellow head virus neutralizes infectivity in primary lymphoid organ cells of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 63:85-88.
- [65] **Parin Chaivisuthangkura, Phiromsak Phattanapaijitkul, Nitaya Thammapalerd, Sombat Rukpratanporn, Siwaporn Longyant, Weerawan Sithigorngul, Paisarn Sithigorngul.** 2006. Development of a polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using a recombinant protein preparation. *J. Virol. Methods* 133:180-184.

附錄三、IHHNV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列

NC002190, Gene ID: 1457864

2701 acttcctagg actcttccaa gaatacgaag aggaaatcga cgacatcata gacaaccatg
2761 tgcgccgatt caacaagagc aagcccaagg aaaagatcca ggagggatgc acataatgaa
2821 gacgaagaac acgccgaagg atcaagtgga ccagaccac acagatgtct acaattcaat
2881 actggagact caatacatat tactttccaa acaagaagat acttcgaatt cgacgctgcc
2941 aatgatggaa acttcgacgg aaaaaatfta tactgcctcc cactacattg gatgaactta
3001 tatctctatg gtctaaagag cagcgacagt tcagcaacag aacacaacg atataagatg
3061 gtaaaatcaa tgatgaagac ctacggatgg aaagtacata aagcaggcgt agtgatgcac
3121 tcgatggtag cccttatgaa agacttaaaa gtatcaggag gcacatcatt tgagactctc
3181 acatftacag acaccccata tttagaata ttttaaggata ctactggact acataatcaa
3241 ctatcaacta aggaagccga cgtaacattg gcaaaatgga taaaaatcc ccaacttgtg
3301 accgtacaat caacagcagc aaactatgaa gaccaatcc aacaatttgg attcatggaa
3361 caaatgcaa cgggtgacag aaaagcctat acaatccatg gtgacactag aaatttggat
3421 ggcggagaaa taccaacaac cggaccacc ttcattccaa aatggggtgg tcaattaaaa
3481 tgggacaaac catcccttgg aaacctagtc taccagcag accaccatac aaacgactgg
3541 caacagatct tcatgagaat gtcaccaatc aaaggacaa atggagacga acttaactt
3601 ggctgcagag tacaagccga cttcttcta cacctagaag tacgactccc accacaagga
3661 tgtgtcga gtttgggat gttacaatat cttcacgcac catgtactgg acaacttaac
3721 aatgttata ttatgcatac taactaaata tattcgatgt gcaatatata cccgattata

Product: 37 kDa coat protein, protein id: NP_039239.1

MCADSTRASPRKRSRRDAHNEDEEHAEGSSGPDPHRCLQFNTGDSIHITF
QTRRYFEFDAANDGNFDGKNLYCLPLHWMNLYLYGLKSSDSSATETQR
YKMKVSMKTYGWKVKAGVVMHSMVPLMKDLKVS GGTSFETLTFT
DTPYLEIFKDTTGLHNQLSTKEADVTLAKWIQNPQLVTVQSTAANYEDP
IQQFGFMEQMRTGDRKAYTIHGDTRN WYGGEIPTTGPTFIPKWGGQLK
WDKPSLGNLVYPADHHTNDWQQIFMRMSPIKGPNGDELKLGCRVQAD
FFLHLEVRLPPQGCVASLGMLQYLHAPCTGQLNKCYIMHTN

附錄四、HPV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列

NC007218, GENE ID: 3562190

181 tctccgattg gtctagcagt gaagtctca gcacgatggc gagcaaaggt gactattatt
241 attttactcc tagagatcta gtgaactttg taaatacctt gctctgtcat aagattaatg
301 ctatagctgt gaaaatgcta accatgaagg aggaggattt cttgagccaa gtctggttgc
361 catacataca aggctttcag acagctcatg acttgggtag agacagtgat aagtgcggtg
421 cggcggggga tgaatttcaa gaggtttttc tggatgaacg taaattcata gatttcatga
481 catctttccg ccgcagtga tttatcagct atggtgacga gtggagacat agatcatctc
541 actttatggc agatgtatit tggagtgata atctaaggca attttggatg atgatatttg
601 gagagtgttt tcacgtaaat atgtcaccaat gtaagagatt gtatgtagac atgttaccat
661 actattatit agcaaagatg actacggaaa acagacatct tatagaatgg gaatacatga
721 atccatgtcc tgccacacat gtgcggcgga ataagatgac tggatgaac tttttagtgc
781 agggagtagt tatagacaac gaatatccag acaatcagat gggttgttac aacatagacg
841 aacatccatt accaggaggt attagatgga gtggtaacac agaatatcgt acaggttatg
901 tacacgttaa taaggtaaaa tggttgggag ttacagataa agtcagtgc atggaggaga
961 cttccagtga tgaggaggtg cctagcagtc aggagaagta tatgaagagt aaggagaaga
1021 aggaacagcc aaagacatcg gagaagaaag acgatgagcc agcaaacaag aagaggaagt
1081 tctgcctcac aagcgcagct ctggagaagc agaagttaga actgggaaaa ttttccgga
1141 tggaaagagga gccgatcaac atcaattat acgacttaga ggaaggggaag gaacaccacg
1201 tacatgaagc tatacgtatc gatggtacta actctaagtt tgctaagaag aaagacgaac
1261 atggtaacgt tatcgtatg tcaaggtaa ttgtttgtga tggagagaac aacttgtatg
1321 gtttttttgc taacacacag ttgaacaaat tgtttaaca atggcacagt acaagaat
1381 atagtatgaa gccagaacac aacataagct taaaggttc acagattcag gaggttagga
1441 atggaaagat gtgtattgta aagatggcca ttaacgatga tgtaaaatgt ttcgccaggt
1501 aatgaagctc aagagagaag ggatactgga tcataaccct cttgttcat tttactctgg

product: non-structural protein 2 , protein id="YP 271914.1

MASKGDYYYFTPRDLVNFVNTLLCHKINAIIVKMLTMKEEDFLSQVWL
PVIQGFQTAHDLGRSDKCGAAGDEFQEVFLDERKFIDFMTSFRRSVFIS
YGDEWRHRSSHFMADVFWSDNLRQFWMIFGECFHVNMSPCKRLYV
DMLPYYYLAKMTTENRHLIEWEYMNPCPATHVRRNKMTGMNFCSQGV
VIDNEYPDNQMGCYNIDEHPLPGGIRWSGNTEYRTGYVHVNKVKWLG
VTDKVSDMEETSSDEEVPSSQEKYMKSKEKKEQPKTSEKKDDEPANKK
RKFLTSAALEKQKLELGKFFRMEEEPINIKLYDLEEGKEHHVHEAIRID
GTNSKFAKKKDEHGNVIDDFKIVICDGENNLYGFFANTQLNKLFNKWH
STKKYSMKPEHNISLKVSQIQEVRNGKMCIVKMAINDDVKCFAR"

附錄五、 TSV 選取之基因片段序列，及其蛋白質序列

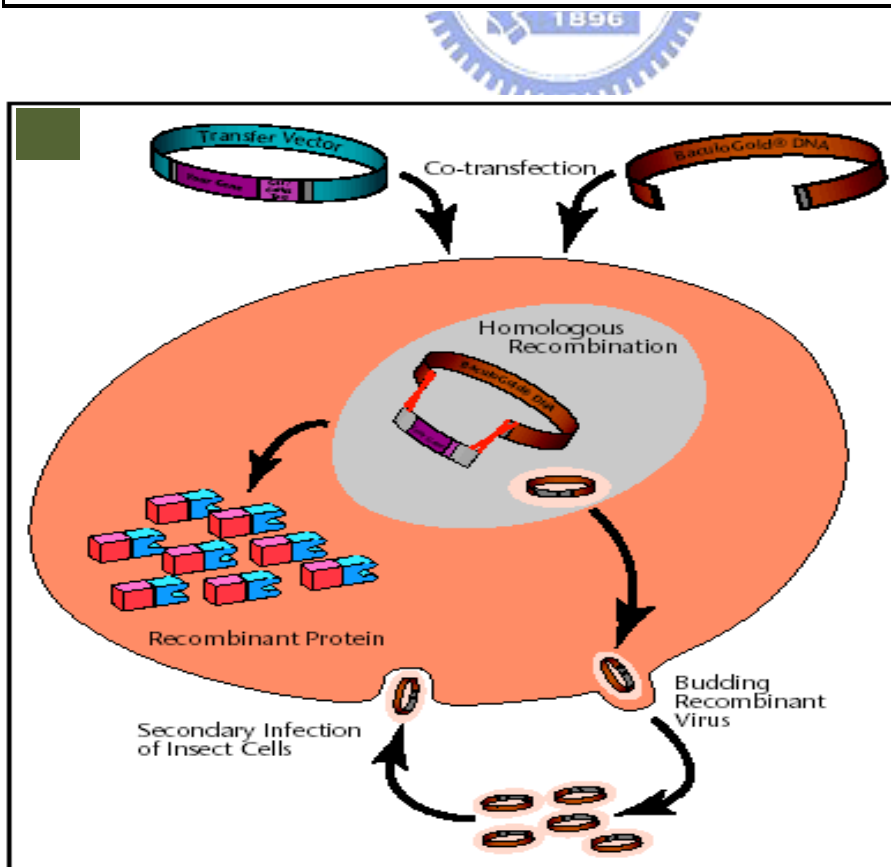
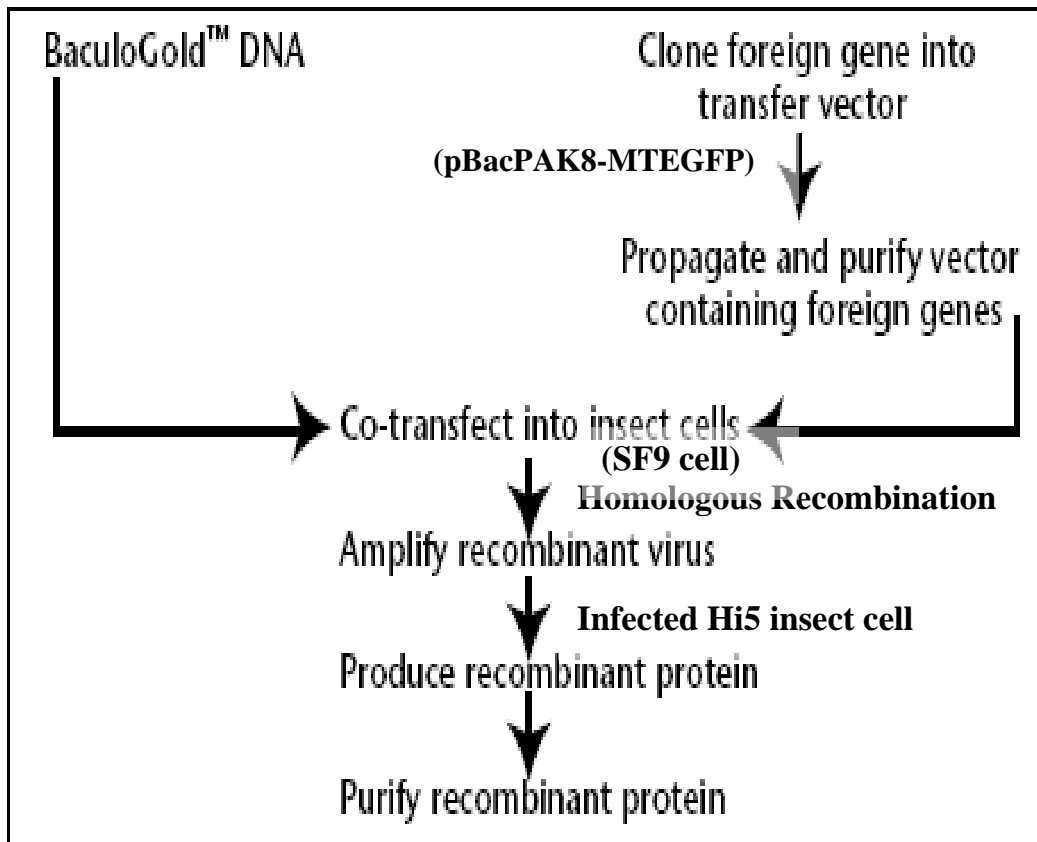
AY826054

6901 ctttgggcaa agtagacagc cgcgcttgcg tggtaggact taattaatgc ctgctaacc
6961 agttgaaatt gataattttg atacaacaac cagtggagga ctaattccag gaggtagtgt
7021 tacaacacagt gaaggttcta caatcttgat gaatgatatc ccaatcacta atcagaatgt
7081 agtgctgtct aagaatgtaa cagataacct gtttgaagtc caggaccaag ctctcattga
7141 atctctctct cgcgacgttt tacttcataa cgacagttgg acatctagtg atgatgaat
7201 tggcacaact atgacgcagg aacagcttgc aacagaattc aatcagccac acttatatga
7261 aatttcacct cctgatgaca ttgtacgtaa atcgcgtgtt atgtctaata aattagcgaa
7321 tattgcatat atgcgatgag attacgaggt tactgtacga gtacaagcca cgcccttttt
7381 acaaggagca ttgtggctgt ggaataagat gaatgctaag cagacatcaa ttattcgacg
7441 cactcttaca gaacacctac gctctattac atcatttctt ggcattgaga tgaacttgca
7501 gtctgaagct cgagctatta ctctttcgat tccttatact agtgagttgc aggtttttaa
7561 cccagaaat gtgaataacc taaattctat tcggctttcc gttctgagtc aattgcaagg
7621 ccctgaagat gtagaatccg catcttattc tatttatggc aggttgaaaa acatcaagct
7681 atatgggcat gcgccatctg tgacatctt agtatatccg tctactcagt ccggatatga
7741 tgatgattgt cccattgtgc atgeggaac tgatgaggat tcttctaac aggggattgt
7801 ctcaagggtt gcagacaccg ttggtgcggt ggcaaatgta gtagatgggg taggagtacc

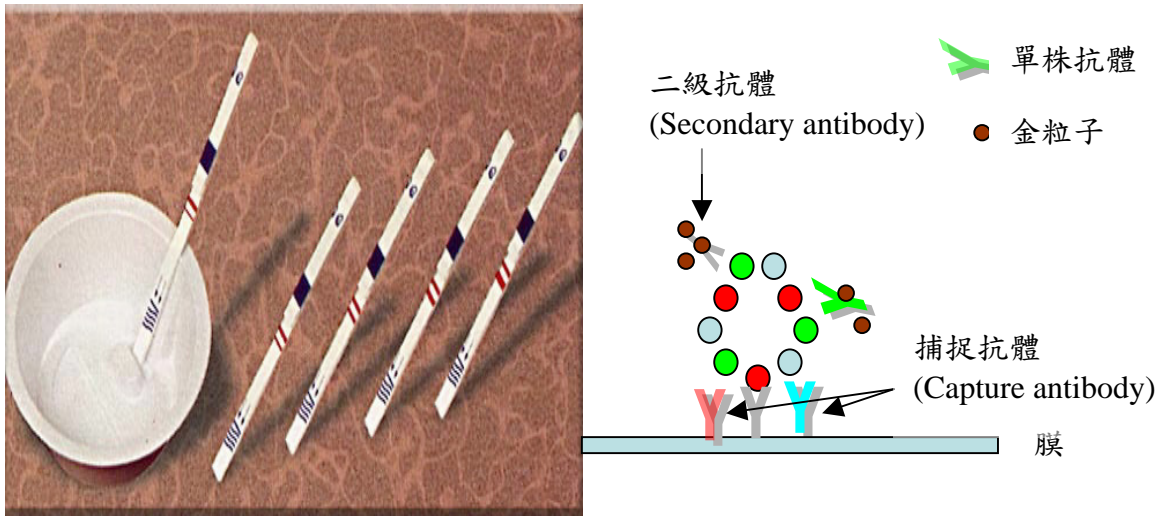
Product: Viral coat protein 2, protein id: AAX35818.1"

ANPVEIDNFDTTTTSGGLIPGGSVTNSEGSTILMNDIPITNQNVVLSKNVTD
NLFEVQDQALIESLSRDVLLHNDSWTSSDDEIGTTMTQEQLATEFNQPH
LYEISLPDDIVRKSLFMSNKLANIAYMRCDYEVTVRVQATPFLQGALWL
WNKMNAKQTSIIRRTLTEHLRSITSFPGIEMNLQSEARAITLSIPYTSELQV
FNPRNVNNLNSIRLSVLSQLQGPEDVESASYSIYGRLKNIKLYGHAPSVT
SSVYPSTQSGYDDDCPIVHAGTDEDSSKQGIV"

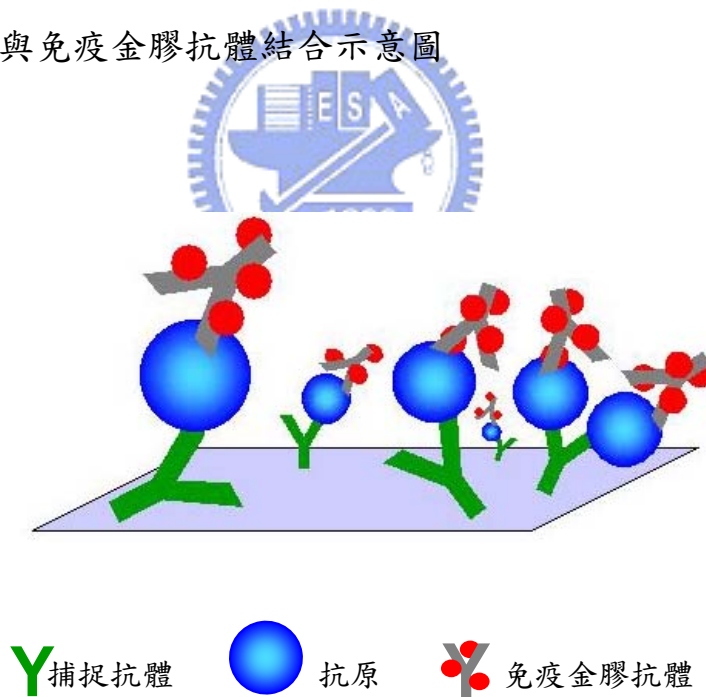
附錄六、桿狀病毒表現系統



附錄七、immunostrips

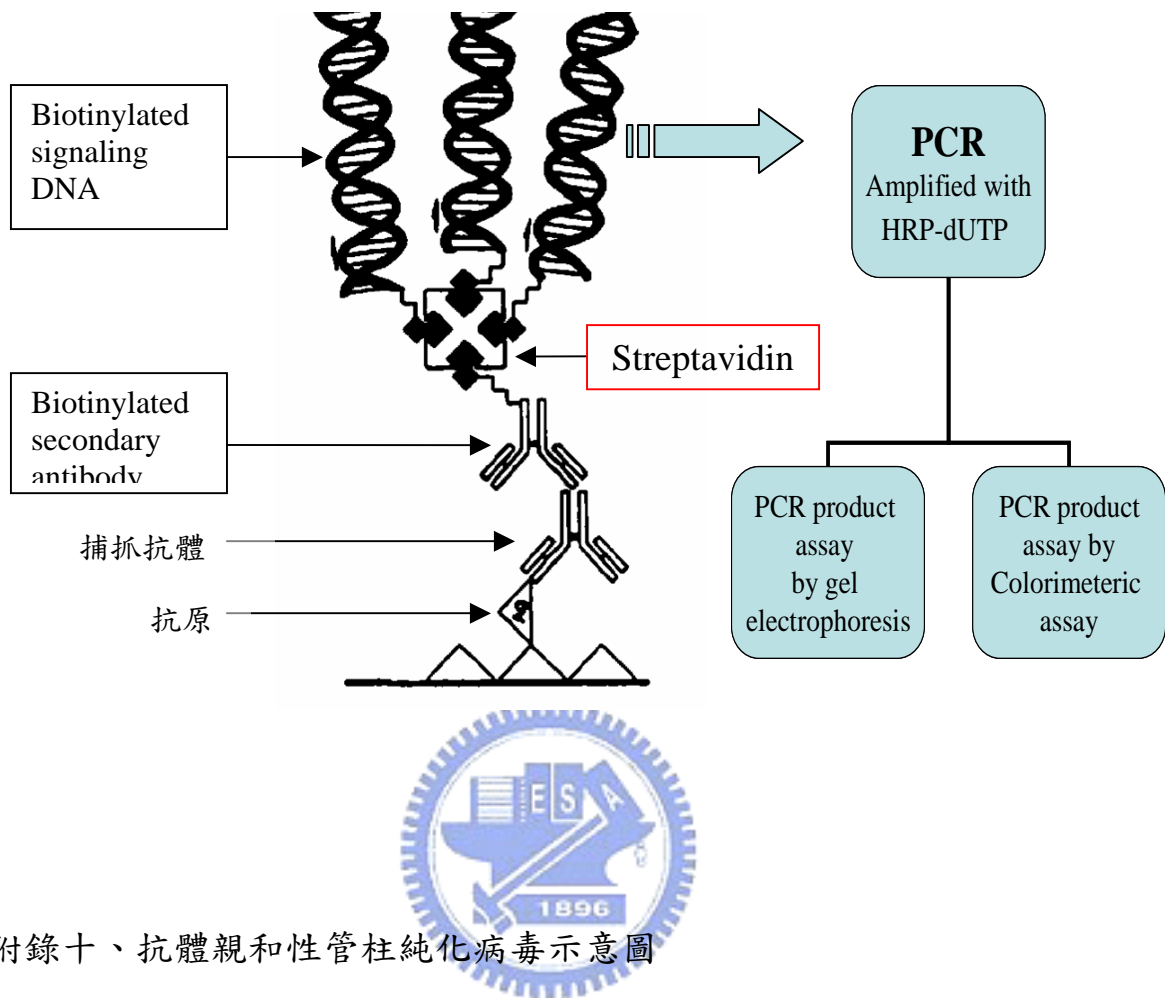


附錄八、抗原與免疫金膠抗體結合示意圖



抗原與免疫金膠抗體結合示意圖。捕捉抗體正免疫金膠抗體均為對抗原有專一性的抗體，但認的 epitope 不同，以增加對抗原的專一性(可由排列組合找到最佳化)，因為免疫金膠抗體上帶有金顆粒，當其聚集在一起時，即可呈現出紫紅色，可明顯觀察之。

附錄九、immuno-PCR



附錄十、抗體親和性管柱純化病毒示意圖

