

## 錦鯉疱疹病毒結構蛋白之表現

報告人：邱芮瑜 約聘研究助理（生物研究組）

### 壹、緒言

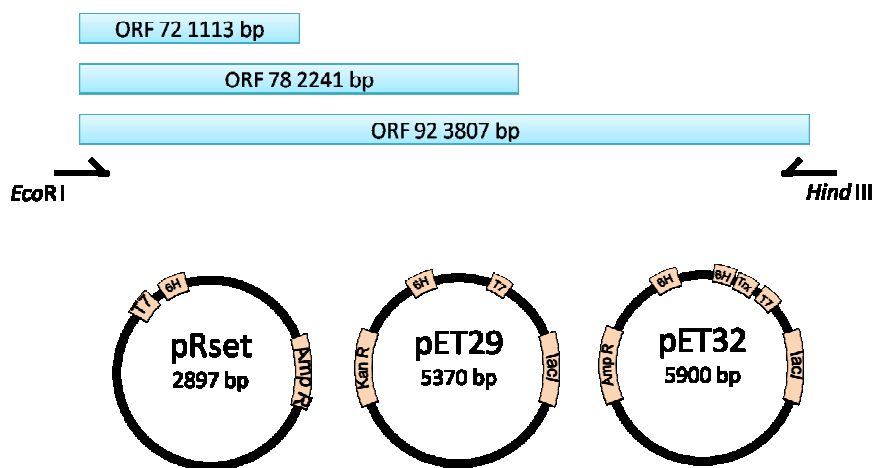
錦鯉疱疹病毒(koi herpes virus, KHV)，為直徑約為 180-230 nm 之球形病毒，其直線、雙股的 DNA 被封套及正二十面體之外鞘蛋白所包裹。目前 KHV 被分類為第三類鯉科疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)，會引起錦鯉(*Cyprinus carpio koi*)及鯉魚(*Cyprinus carpio carpio*)急性死亡。此病發生時可能會造成魚隻精神沈鬱、游泳不定向的臨床症狀；肉眼病變方面可能可以見到眼球凹陷、皮膚及鰭基部的出血、鰓出現白色壞死斑。自 1998 年起世界各國陸續爆發 KHV，造成各國嚴重經濟損失，因此 KHV 也列入本國防疫檢疫的重要項目之一。在病毒尚無法藉由細胞培養大量生產的情況下，將病毒可能具有抗原性之結構蛋白，利用分子生物學的技術選殖、表現出重組蛋白，為發展快速檢驗方法的重要工具。

### 貳、材料方法

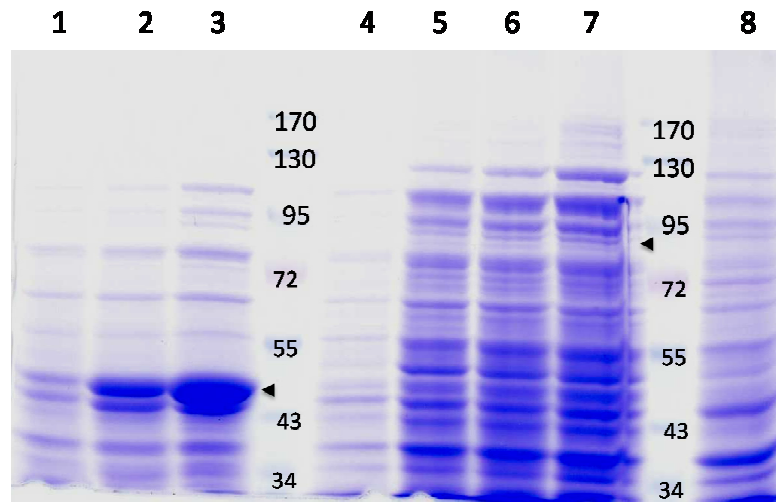
本實驗根據 Aoki 等人所預測 KHV 之結構蛋白 ORF72、ORF78、ORF92 序列，設計含限制酶切位 EcoR I 及 Hind III 之引子對，將三段基因構築入 pRset 或 pET29 或 pET32 表現載體中(圖一)，經定序確認後，將質體轉型至 BL21(DE3)pLysS 勝任細胞中，塗抹在含 kanamycin 30  $\mu$ g/ml (pRset 與 pET32 為 Ampicillin 50  $\mu$ g/ml)的 LB agar 上培養 37 $^{\circ}$ C 16 小時。所長出的菌落，再接種於 4ml 含 kanamycin 30  $\mu$ g/ml (pRset 與 pET32 為 Ampicillin 50  $\mu$ g/ml)與 Chloramphenicol 34  $\mu$ g/ml 的 LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中，以 220 rpm 轉速培養 16 小時。之後將 1 ml 菌液接種至 100 ml 含相同篩選抗生素的 LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中，以 220 rpm 轉速培養 2-3 小時，當 OD<sub>600nm</sub> 達到 0.6-0.8 時，加入最終濃度 0.5 mM IPTG 誘導重組蛋白之表現。4-6 小時後將菌液以 6000 g 離心 15 分鐘，留下菌塊，以每 50 ml 之表現以 8ml lysis buffer，將細菌均勻懸浮後加入適量 lysozyme 於 4 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘以裂解細菌。繼以超音波震盪機均質後將菌液以 16000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘，收集上清液及沈澱物，以 SDS-PAGE 分析其重組蛋白之表現狀況。根據序列 ORF72、78、92 重組蛋白分別表現出約 47-159 kDa 的蛋白，故選用 8-10% acrylamide 的分離凝膠，欲分析的樣品以等體積加入 SDS gel-loading buffer，沸水煮 10 分鐘後，注入堆積凝膠的孔中進行電泳。開始以 40 V 電泳，待染劑全部進入 16 分離凝膠後增加電壓至 80-100 V，當染劑跑出分離凝膠後停止電泳。將膠片以 coomassie blue 溶液進行染色 30-60 分鐘，接著以退染液(45% methanol, 10% acetic acid)退染，每次 10 分鐘，退染 3-4 次，當背景退掉時，以年糕紙封緊乾燥保存判讀。

## 參、結果與討論

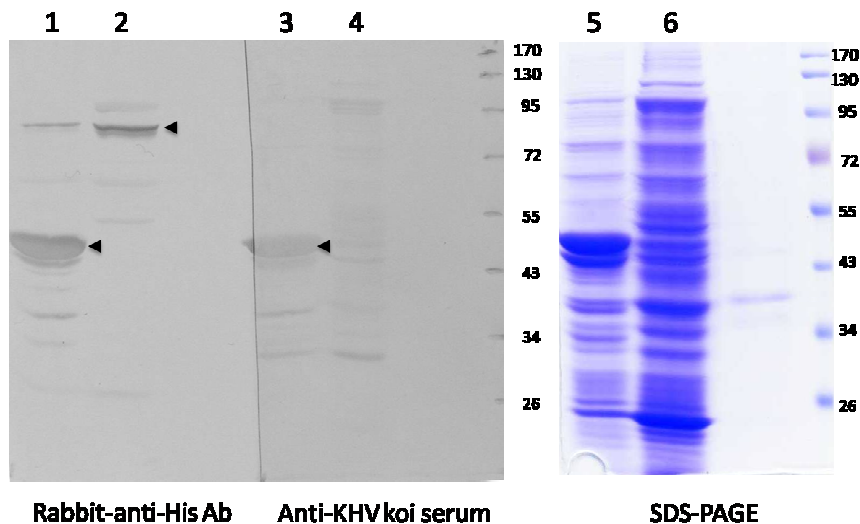
pRset-ORF72 與 pRset-ORF78 首先構築完成，經 IPTG 誘導表現後，pRset-ORF72 可表現出預期中 47.6 kDa 重組蛋白的大量表現，而 pRset-ORF78 在相同條件下在預期 86.8 kDa 的位置並未看到重組蛋白的大量表現(圖二)。以西方墨點法確認：His-tag Ab 可辨識 pRset-ORF72 預期中 47.6 kDa 及 pRset-ORF78 86.8 kDa 的位置；另以感染 KHV 陽性場之錦鯉血清確認，僅 pRset-ORF72 可被辨識(圖三)。pET29-ORF92 與 pET32-ORF92 之構築，經 IPTG 誘導表現後，僅 pET29-ORF92 可在 37°C 的條件下可順利表現出預期中 145 kDa 重組蛋白(圖四)，pET32-ORF92 在 37°C 的條件下則否(結果未顯示)。而 pET29-ORF92 所表現出的重組蛋白以西方墨點法確認，可被 His-tag Ab 與感染 KHV 陽性場之錦鯉血清辨識(圖五)。三種 KHV 結構蛋白中只有 ORF72 能被大量表現，打破細菌後，可發現重組蛋白為不可溶性蛋白，可被含 3M urea 之溶液溶解，進一步被純化成較單純的重組蛋白質(結果未顯示)。ORF78 則在 PAGE 染色下看不出大量表現，僅能以西方墨點法偵測到重組蛋白；ORF92 之表現量雖在 SDS-PAGE 染色可見，但表現量還尚待改進。表現量相對較多的 ORF72 與 ORF92 均可被 KHV 陽性錦鯉血清以西方墨點法辨識，具有發展成 KHV 快速檢驗工具之潛力。



圖一、KHV 結構蛋白表現質體。設計含有限制酶切位 EcoR I 及 Hind III 之引子對，以感染 KHV 病魚組織萃取出的 genomic DNA 為模板，經 PCR 增幅 ORF72、ORF78、ORF92 基因片段後，先以 TA cloning 方法確認序列，再以限制酶切割後，構築入 pRset 或 pET29 或 pET32 表現載體中。



圖二、 ORF72 與 ORF78 重組蛋白之表現。以 0.5 mM IPTG 誘導重組蛋白表現，Lane 1-3 分別為 pRset-ORF72 誘導後 0、2、4 小時；Lane 4-7 分別為 pRset-ORF78 誘導後 0、2、4、6 小時；Lane 8 為表現質體 pRset 誘導表現 4 小時。ORF72 可表現出預期中 47.6 kDa 重組蛋白(如箭頭所示)；ORF78 在預期中 86.8 kDa 的位置(如箭頭所示)並無大量重組蛋白之表現。

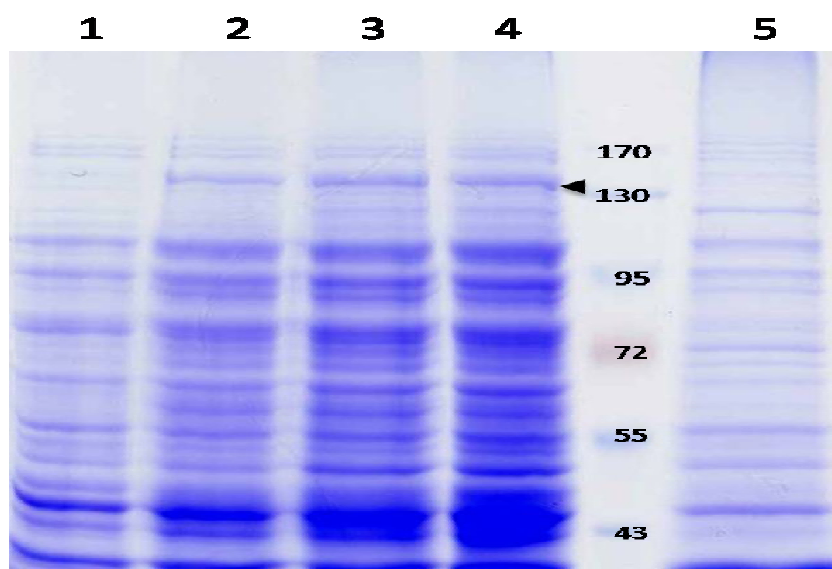


Rabbit-anti-His Ab

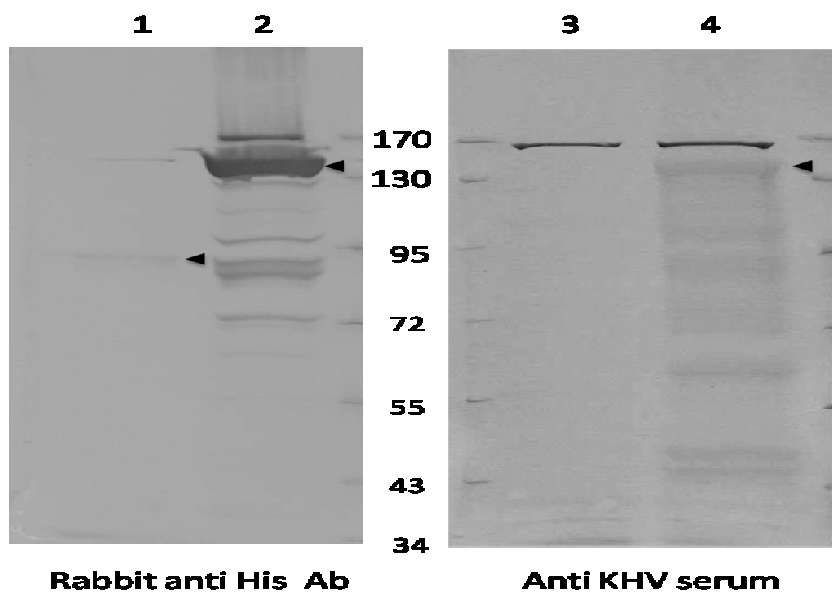
Anti-KHV koi serum

SDS-PAGE

圖三、 ORF72 與 ORF78 重組蛋白之抗原性。Lane 1、3、5 為 pRset-ORF72 誘導後 4 小時之全菌；Lane 2、4、6 pRset-ORF78 誘導後 6 小時之全菌。以西方墨點法確認：His-tag Ab (Lane 1、2)可辨識 pRset-ORF72 預期中 47.6 kDa 及 pRset-ORF78 86.8 kDa 的位置(如箭頭所示)；KHV 陽性錦鯉血清(Lane 3、4)，僅可辨識 pRset-ORF72 (如箭頭所示)。



圖四、ORF92 重組蛋白之抗原性。Lane 1-4 分別為 0.5 mM IPTG 誘導 pET29-ORF92 表現後 0、2、4、6 小時，Lane 5 為表現質體 pET29 誘導後 5 小時。ORF92 可表現出預期中 145 kDa 重組蛋白(如箭頭所示)。



圖五、ORF92 重組蛋白之表現。Lane 1-4 分別為 0.5 mM IPTG 誘導 pET29-ORF92 表現後 0、2、4、6 小時，Lane 5 為表現質體 pET29 誘導後 5 小時。ORF92 可表現出預期中 145 kDa 重組蛋白(如箭頭所示)。