

白點症病毒結構性蛋白質VP38A(ORF314)之特性分析

趙梓霖、張雲祥

E-mail: 322099@mail.dyu.edu.tw

摘要

白點症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是一個大型的DNA病毒，其病毒顆粒由三個結構層環狀圍繞核心DNA所組成，此三個結構層分別為外套膜、中間層及核鞘蛋白。本實驗針對白點症病毒結構性蛋白質VP38A (WSSV-T1 ORF314, GenBank accession no. AF440570) 從事其特性分析。以不同鹽濃度之Triton X-100溶液處理病毒顆粒，將其結構剝離後以西方墨點法 (Western blot) 及免疫電顯分析，證實VP38A為外套膜蛋白質；膜拓璞學分析顯示VP38A不具穿膜區且暴露在病毒顆粒外；免疫共沉澱分析顯示VP38A會與 VP28及VP51A交互作用，但不會與VP19、VP24、VP26、VP32、VP37及其自身有交互作用。在先前以酵母菌雙雜交篩選白點症病毒基因庫的實驗中發現，VP38A具有自體激活之特性，在本研究中此現象也再度被確認，表示VP38A可能為一轉錄因子。以上結果顯示VP38A在白點症病毒感染與複製是重要甚至不可或缺。

關鍵詞：白點症病毒、VP38A、結構性蛋白質、交互作用、自體激活

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要v 誌謝 vi 目錄 viii 圖目錄 xii 表目錄 xiv 1. 前言 1 1.1. 白點症病毒 1 1.2. 白點症病毒結構性蛋白質之重要性 3 1.3. 蛋白質交互作用 4 1.4. 研究目的 6 2. 材料方法 7 2.1. 實驗流程 7 2.2. 基因表現時序分析 8 2.2.1. RNA 萃取 8 2.2.2. DNase I 處理 8 2.2.3. 反轉錄聚合反應 (Reverse transcription , RT) 9 2.2.4. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction , PCR) 9 2.3. 蛋白質定位分析 10 2.3.1. VP38A於白點症病毒顆粒上之位 10 2.3.1.1. 白點症病毒顆粒純化 10 2.3.2. 西方墨點分析 11 2.3.3. 免疫電顯分析 11 2.3.4. VP38A於白點症病毒顆粒上之定位分析 12 2.4. VP38A 膜拓璞學分析 13 2.4.1. VP38A蛋白親水性、疏水性分析 13 2.4.2. VP38A穿膜區分析 13 2.4.3. VP38A於秋行軍蟲細胞株之免疫螢光分析 14 2.4.3.1. 感染白點症病毒之螯蝦DNA萃取 14 2.4.3.2. 質體DNA構築 14 2.4.3.3. 免疫螢光分析 15 2.4.4. VP38A病毒顆粒膜拓璞學分析 16 2.5. 蛋白質交互作用分析 17 2.5.1. VP38A蛋白與其他結構性蛋白質交互作用分析 17 2.5.1.1. 質體DNA構築 17 2.5.1.2. 細胞內現 18 2.5.1.3. 免疫共沉澱分析 (Co-immunoprecipitation) 19 2.5.1.4. VP38A與VP28、VP51A共轉染Sf9細胞表現定位分析 20 2.5.2. 遠西方墨點法 (Far Western blotting) 分析 22 2.5.2.1. 質體DNA構築 22 2.5.2.2. 蛋白質表現 22 2.5.2.3. 蛋白質誘導表現 22 2.5.2.4. 重組蛋白之水溶性測試 23 2.5.2.5. 重組蛋白純化 23 2.5.2.6. VP38A基因進行遠西方墨點法分析 24 2.6. 轉錄活化因子特性分析 24 2.6.1. 酵母菌雙雜交系統 24 2.6.1.1. 質體DNA構築 25 2.6.1.2. 酵母菌轉染 25 2.6.1.3. VP38A自體激活測試 25 2.6.2. 雙螢光報導基因分析 26 2.6.2.1. 載體構築 26 2.6.2.2. 細胞表現 26 3. 結果 28 3.1. 基因時序表現分析 28 3.2. VP38A病毒顆粒定位分析 28 3.3. VP38A膜拓璞學分析 29 3.4. 蛋白質交互作用 30 3.4.1. VP38A與其他結構性蛋白交互作用 30 3.4.1.1. VP38A與VP28、VP51A交互作用分析 30 3.4.1.2. VP38A與VP19、VP24交互作用分析 31 3.4.1.3. VP38A與VP26、VP32交互作用分析 31 3.4.1.4. VP38A與VP37、VP38A交互作用分析 31 3.4.2. 遠西方墨點法分析 32 3.5. 轉錄活化因子分析 32 3.5.1. 酵母菌雙雜交系統 32 3.5.2. 雙螢光報導基因分析 33 4. 結論 34 參考文獻 64 圖目錄 圖1、白點症病毒相關基因轉錄表現之時序分析 35 圖2、白點症病毒顆粒純化 36 圖3、西方墨點法分析 37 圖4、白點症病毒免疫電顯分析 38 圖5、白點症病毒VP38A蛋白質親水性、疏水性預測 39 圖6、VP38A穿膜位置分析 40 圖7、Sf9分析重組VP38A之膜拓璞學 41 圖8、VP38A蛋白質之病毒膜拓璞學分析 42 圖9、重組表現載體 V5-VP38A 和 FLAG-VP38A 於昆蟲細胞 Sf9 表現 43 圖10、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP28 交互作用 44 圖11、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP51A 交互作用 45 圖12、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP19 交互作用 46 圖13、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP24 交互作用 47 圖14、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP26 交互作用 48 圖15、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP32 交互作用 49 圖16、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP37 交互作用 50 圖17、白點症病毒結構性蛋白質 VP38A/VP38A 交互作用 51 圖18、白點症病毒 VP38A 蛋白質表現時序分析 52 圖19、重組 VP38A 蛋白質水溶性測試 53 圖20、重組 VP38A 蛋白質純化測試 54 圖21、重組 VP38A 蛋白質定量 55 圖22、白點症病毒結構蛋白 VP38A 在酵母菌雙雜交系統 56 圖23、西方墨點法確認融合 GAL4 VP38A、DBD GAL4 和 VP38A 蛋白質的表現 57 表目錄 表1、白點症病毒基因時序表現分析核酸引子 58 表2、細胞表現蛋白質核酸引子 59 表3、酵母菌雙雜交系統分析核酸引子 60 表4、雙螢光報導基因分析核酸引子 61 表5、蛋白質表現核酸引子 62 表6、結構蛋白交互作用分析表 63

參考文獻

- 1.周宗錄，2007。蝦白點症病毒結構性蛋白VP51A (ORF294)特性分析。私立大葉大學分子生物科學系碩士論文。2.李媛婷，2008。白點症病毒結構蛋白質VP51A (ORF294)與其他結構蛋白質之交互作用研究。私立大葉大學分子生物科學系碩士論文。
- 3.Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapaijittkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul, and P. 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, no. 2: 180-4.
- 4.Chang, Y.S., W. J. Liu, C. C. Lee, T. L. Chou, Y.T. Lee, T. S. Wu, J. Y. Huang, W. T. Huang, T. L. Lee, G. H. Kou, A. H. Wang , C. F. Lo. (2010). A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins. *PLoS One*. 5(5): e10718.
- 5.Chang, Y.S., W. J. Liu, T. L. Chou, Y.T. Lee, T. L. Lee, W. T. Huang, G. H. Kou, C. F. Lo. (2008). Characterization of White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP51A and Its Interaction with Viral Tegument Protein VP26. *J. Virol.* 82(24): 12555-64.
- 6.Chen, L. L., J. H. Leu, C. J. Huang, C. M. Chou, S. M. Chen, C. H. Wang, C. F. Lo, and G. H. Kou. (2002). Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting vp35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* 293, 44-53.
- 7.Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, G. H. Kou 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.
- 8.Couch, J. A. (1974). Free and occluded virus, similar to Baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247, 229-231.
- 9.Edmondson D. G, S. Y. Roth. (2001). Identification of Protein Interactions by Far Western Analysis. *Curr Protoc Mol Biol* 20: 19.7.1-19.7.10.
- 10.Flegel, T. W. (1997). Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotech.* 13, 422-433.
- 11.Hasson, K.W., D. V. Lightner, L. L. Mohney, R. M. Redman, B. T. Poulos, and B. M. White. (1999). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 36: 81-93.
- 12.Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, A. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L.Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willem, H. Sassi, P.A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. V. Hogue, D. Figeys, M. Tyers. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-183.
- 13.Huang, C. (2001). Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: Crayfish, *Cambarus clarkii*. *Virus Res.* 76:115-25.
- 14.Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori, Y. Sakaki. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS* 98: 4569-4574.
- 15.Kiatpathomchai, W., A. Taweetungtragoon, K. Jittivadhana, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, and T. W. Flegel. (2005). Target for standard thai pcr assay identical in 12 white spot syndrome virus (wssv) types that differ in DNA multiple repeat length. *J Virol Methods* 130, no. 1-2: 79-82.
- 16.Kumar, A., M. Snyder. (2002). Protein complexes take the bait. *Nature* 415: 123-124.
- 17.Li, Z., Q. Lin, J. Chen, J. L. Wu, T. K. Lim, S. S. Loh, X. Tang, and C. L. Hew. (2007). Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics* 6, no. 9: 1609-20.
- 18.Lightner, D.V. (1992). Shrimp viruses: diagnosis, distribution and management. In: J. Wyban (ed.). *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA. pp. 238-253.
- 19.Lightner, D.V. (1996) *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304.
- 20.Liu, W. J., Y. S. Chang, H. C. Wang, J. H. Leu, G. H. Kou, C. F. Lo. (2008). Transactivation, dimerization, and DNA-binding activity of white spot syndrome virus immediate-early protein IE1. *J. Virol.* 82(22):11362-73.
- 21.Lo, C. F., G. H. Kou. (1998). Virus associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan : A review. *Fish Pathology* 33: 365-371.
- 22.Lo, C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, Y. T. Chen, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C. H. Wang, and G. H. Kou. (1996a). Infection of white spot syndrome associated virus (WSBV) in cultured and wild-caught shrimps, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27, 215-225.
- 23.Nadala, E. C. B., L. M. Tappy, and P. C. Loh. (1997). Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 31:141 – 146.
- 24.Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye, N. Oseko. (1994). Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29: 135-139.
- 25.Ren, L., D. Emery, B. Kaboord, E. Chang, M. W. Qoronfleh. (2003) Improved immunomatrix methods to detect protein:protein interactions. *J Biochem Biophys Methods* 50:143-157.
- 26.Sisson, T. H., C.W. Castor. (1990). An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarose. *J Immunol Methods* 127:215-220.
- 27.Tsai, J. M., H. C. Wang, J. H. Leu, H. H. Hsiao, A. H. Wang, G. H. Kou, and C. F. Lo. (2004). Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol* 78, no. 20: 11360-70.
- 28.Van Etten, J. L., M. V. Graves, D. G. Muller, W. Boland, and N. Delaroque. (2002). Phycodnaviridae--large DNA algal viruses. *Arch Virol* 147:1479-1516.
- 29.van Hulten, M. C., J. Witteveldt, M. Snippe, and J. M. Vlak. (2001). White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285, no.2: 228-33.
- 30.Van Hulten, M. C., M. Reijns, A. M. Vermeesch, F. Zandbergen, 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.
- 31.Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassankajon, 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 black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77.
- 32.Yang, F., (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Viro1.* 75(23) : 11811-11820.