

白點症病毒結構蛋白質VP51A(ORF294)與其他結構蛋白質之交護作用研究 = Studying on the interaction of white spot syndrome ...

李媛婷、張雲祥

E-mail: 9708036@mail.dyu.edu.tw

摘要

在本研究中針對白點症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 外套膜(envelope)蛋白VP51A (WSSV-T1 ORF294)特性做分析。膜拓撲學分析證明VP51A蛋白質片段大小72 kDa是第二型穿膜蛋白在N端有高疏水性的穿膜區及C端完全暴露於病毒顆粒膜外；以Sf9昆蟲細胞表現重組VP51A並利用免疫螢光分析也證實了此一推測。免疫共沉澱分析與免疫螢光共表現分析及酵母菌雙雜交系統分析皆顯示VP51A會與白點症病毒中許多主要結構性蛋白直接結合，如VP19、VP24、VP26且也會與VP28產生間接交互作用，推測可能會在病毒外套膜上形成一個複合體，進而幫助病毒感染及病毒顆粒的生合成。

關鍵詞：白點症病毒；結構蛋白；外套膜蛋白；交互作用

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	ix 圖目錄
病毒結構蛋白 (structural protein) 之重要性	xii 表目錄
交互作用之結構蛋白	xv 1. 前言
研究目的	1.1 白點症病毒
2. 材料與方法	1.1.1 白點症病毒
2.1 實驗流程	1.1.2 病毒結構蛋白 (structural protein) 之重要性
2.2 材料與方法	1.3 蛋白質交互作用 (protein-protein interaction) 之意義
2.2.1 VP51A 膜拓撲學 (membrane topology) 分析	1.4 白點症病毒已知有交互作用之結構蛋白
2.2.1.1 VP51A 蛋白親水性、疏水性分析	1.5 研究目的
2.2.1.2 VP51A 穿膜區分析	2. 材料與方法
2.2.1.3 重組VP51A (recombinant VP51A, rVP51A) 於秋行軍蟲細胞 (Spodoptera frugiperda, Sf9) 之免疫螢光分析	2.1 實驗流程
2.2.1.3.1 質體DNA構築	2.2 材料與方法
2.2.1.3.2 免疫螢光分析	2.2.1 VP51A 膜拓撲學 (membrane topology) 分析
2.2.1.4 VP51A 在白點症病毒顆粒上之膜拓撲學	2.2.1.1 VP51A 蛋白親水性、疏水性分析
2.2.2 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白VP19、VP24、VP26、VP28 之交互作用	2.2.1.2 VP51A 穿膜區分析
11 2.2.2.1 免疫共沉澱分析 (Co-immunoprecipitation)	2.2.1.3 重組VP51A (recombinant VP51A, rVP51A) 於秋行軍蟲細胞 (Spodoptera frugiperda, Sf9) 之免疫螢光分析
11 2.2.2.1.1 質體DNA構築	2.2.1.3.1 質體DNA構築
11 2.2.2.1.2 免疫共沉澱分析	2.2.1.3.2 免疫螢光分析
12 2.2.2.2 酵母菌雙雜交系統 (yeast two-hybrid system) 分析	2.2.1.4 VP51A 在白點症病毒顆粒上之膜拓撲學
14 2.2.2.2.1 質體DNA構築	2.2.2 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白VP19、VP24、VP26、VP28 之交互作用
14 2.2.2.2.2 VP51A、VP28、VP26、VP24 及 VP19 基因在酵母菌雙雜交系統中之表現	11 2.2.2.1 免疫共沉澱分析 (Co-immunoprecipitation)
14 2.2.2.2.3 交互作用分析	11 2.2.2.1.1 質體DNA構築
15 2.2.2.3 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白VP19、VP24、VP26 在 Sf9 細胞中表現之定位分析	11 2.2.2.1.2 免疫共沉澱分析
16 2.2.2.3.1 免疫螢光分析 (co-localization)	12 2.2.2.2 酵母菌雙雜交系統 (yeast two-hybrid system) 分析
16 2.2.2.3.2 VP51A 與 VP26 在草蝦 (P. monodon) 血球細胞中表現之定位分析	14 2.2.2.2.1 質體DNA構築
17 3. 結果	14 2.2.2.2.2 VP51A、VP28、VP26、VP24 及 VP19 基因在酵母菌雙雜交系統中之表現
19 3.1 VP51A 拓撲學分析	14 2.2.2.2.3 交互作用分析
19 3.2 白點症病毒結構蛋白之交互作用分析	15 2.2.2.3 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白VP19、VP24、VP26 在 Sf9 細胞中表現之定位分析
20 3.2.1 VP51A 與 VP26、VP28 交互作用分析	16 2.2.2.3.1 免疫螢光分析 (co-localization)
20 3.2.2 VP51A 與 VP19、VP24 交互作用	16 2.2.2.3.2 VP51A 與 VP26 在草蝦 (P. monodon) 血球細胞中表現之定位分析
22 3.2.3 VP24 與 VP26、VP28 交互作用	17 3. 結果
23 3.2.4 VP19 與 VP24、VP26、VP28 交互作用	19 3.1 VP51A 拓撲學分析
24 3.2.5 VP51A、VP19、VP24 自身之交互作用	19 3.2 白點症病毒結構蛋白之交互作用分析
24 3.2.6 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖	20 3.2.1 VP51A 與 VP26、VP28 交互作用分析
25 4. 討論	20 3.2.2 VP51A 與 VP19、VP24 交互作用
26 5. 結論	22 3.2.3 VP24 與 VP26、VP28 交互作用
30 參考文獻	23 3.2.4 VP19 與 VP24、VP26、VP28 交互作用
64 圖目錄	24 3.2.5 VP51A、VP19、VP24 自身之交互作用
圖1 白點症病毒VP51A 蛋白親水性、疏水性預測.....31	24 3.2.6 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖
圖2 VP51A 穿膜位置分析 (TMHMM).....32	25 4. 討論
圖3 Sf9 分析重組VP51A 之膜拓撲學.....33	26 5. 結論
圖4 VP51A 膜拓撲學示意圖.....34	30 參考文獻
圖5 病毒拓撲學分析.....35	64 圖目錄
圖6 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP26 及 VP51A/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....36	圖1 白點症病毒VP51A 蛋白親水性、疏水性預測.....31
圖7 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26、VP28 在酵母菌雙雜交系統中交互作用..... 38	圖2 VP51A 穿膜位置分析 (TMHMM).....32
圖8 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26 於昆蟲細胞中共同表現分析.....40	圖3 Sf9 分析重組VP51A 之膜拓撲學.....33
圖9 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26 於草蝦血球細胞中共同表現分析.....41	圖4 VP51A 膜拓撲學示意圖.....34
圖10 白點症病毒結構蛋白VP26/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-FLAG) 與 V5 標示之 VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....42	圖5 病毒拓撲學分析.....35
圖11 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP26/VP28 之交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....43	圖6 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP26 及 VP51A/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....36
圖12 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP19 及 VP51A/VP24 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-V5)、VP24 重組蛋白 (VP24-V5) 之交互作用分析.....44	圖7 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26、VP28 在酵母菌雙雜交系統中交互作用..... 38
圖13 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP19 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-FLAG) 之交互作用分析.....46	圖8 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26 於昆蟲細胞中共同表現分析.....40
圖14 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP19 在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....47	圖9 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP26 於草蝦血球細胞中共同表現分析.....41
圖15 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP19 於昆蟲細胞中共同表現分析.....48	圖10 白點症病毒結構蛋白VP26/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-FLAG) 與 V5 標示之 VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....42
圖16 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP24 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP24 重組蛋白 (VP24-FLAG) 之交互作用分析.....49	圖11 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP26/VP28 之交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....43
圖17 白點症病毒結構蛋白VP51A 與 VP24 在酵母菌雙雜交系統中交互作用	圖12 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP19 及 VP51A/VP24 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-V5)、VP24 重組蛋白 (VP24-V5) 之交互作用分析.....44

交互作用.....	50	圖18 白點症病毒結構蛋白VP51A與VP24於昆蟲細胞中共同 表現分析.....
.....	51	圖19 白點症病毒結構蛋白VP24/VP26及VP24/VP28交互作用：FLAG標識之VP24重組蛋白 (VP24-FLAG)與V5標識之 VP26重組蛋白 (VP26-V5)、VP28重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....
.....	52	圖20 白點症病毒結構蛋白VP24/VP26交互作用之再確認：V5標示之VP24重組蛋白 (VP24-V5)與FLAG標示之 VP26重組蛋白 (VP26-FLAG)之交互作用分析.....
.....	54	圖21 白點症病毒結構蛋白VP24A與VP26在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....
.....	55	圖22 白點症病毒結構蛋白VP24與VP26於昆蟲細胞中共同表現分析.....
.....	56	圖23 白點症病毒結構蛋白VP19/VP24、VP19/VP26、VP19/VP28交互作用：FLAG標識之VP19重組蛋白 (VP19-FLAG)與V5標示之VP24重組蛋白 (VP24-V5)、VP26重組蛋白 (VP26-V5)、VP28重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....
.....	57	圖24 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP51A、VP19/VP19及 VP24/VP24交互作用：FLAG標識之VP51A重組蛋白 (VP51A-FLAG)、VP19重組蛋白 (VP19-FLAG)、VP24重組蛋白 (VP24-FLAG)與V5標示之VP51A重組蛋白 (VP51A-V5)、VP19重組蛋白 (VP19-V5)、VP24重組蛋白 (VP24-V5)之交互作用分析.....
.....	59	圖25 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖.....
.....	61	表目錄 表1 酵母菌雙雜交系統分析之特定核酸引子.....
.....	62	表2 結構蛋白交互作用分析表.....
.....	63	

參考文獻

- 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技學系碩士論文。 2. Bruchfeld, A., D. Saadoun, and P. Cacoub. 2006. Treatment for glomerulonephritis in hcv-associated mixed cryoglobulinaemia-anti-viral therapy vs rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 45, no. 6: 783-4; author reply 784-5. 3. Campadelli-Fiume, G., M. Amasio, E. Avitabile, A. Cerretani, C. Forghieri, T. Gianni, and L. Menotti. 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17, no. 5: 313-26. 4. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapajitkul, 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. 5. 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. 6. Dhar, A. K., A. Dettori, M. M. Roux, K. R. Klimpel, and B. Read. 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cdna microarrays. *Arch Virol* 148, no. 12: 2381-96. 7. Farid, A., M. Al-Sherbiny, A. Osman, N. Mohamed, A. Saad, M. T. Shata, D. H. Lee, A. M. Prince, and G. T. Strickland. 2005. Schistosoma infection inhibits cellular immune responses to core hcv peptides. *Parasite Immunol* 27, no. 5: 189-96. 8. Huang, J., X. L. Song, J. Yu, and C. H. Yang. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar Fish Res* 16: 1 ~ 10. 9. Huang, J., J. Yu, X. L. Song, J. Kong, and C. H. Yang. 1995. Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp. *Mar Fish Res* 16: 11 ~ 23. 10. Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Soderhall, and I. Soderhall. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *pacifastacus leniusculus*. *Dis Aquat Organ* 47, no. 2: 151-7. 11. Jiravanichpaisal, P., S. Sricharoen, I. Soderhall, and K. Soderhall. 2006. White spot syndrome virus (wssv) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20, no. 5: 718-27. 12. 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. 13. Kim, C. S., Z. Kosuke, Y. K. Nam, S. K. Kim, and K. H. Kim. 2007. Protection of shrimp (*penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (wssv) challenge by double-stranded rna. *Fish Shellfish Immunol* 23, no. 1: 242-6. 14. Li, L. J., J. F. Yuan, C. A. Cai, W. G. Gu, and Z. L. Shi. 2006. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (wssv) infection in crayfish. *Arch Virol* 151, no. 7: 1309-17. 15. 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. 16. Liu, W. J., Y. S. Chang, A. H. Wang, G. H. Kou, and C. F. Lo. 2007. White spot syndrome virus annexes a shrimp stat to enhance expression of the immediate-early gene ie1. *J Virol* 81, no. 3: 1461-71. 17. Lo, C. F., Leu, J. H., Ho, C. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, Y. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C. J., Chou, H. Y., Wang, C. H., and Kou, G. H. 1996b. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25:133-141. 18. Lotz, J. M., Browdy, C. L., Carr, W. H., Frelief, P. F., and Lightner, D. V. 1995. USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. In: Browdy CL, Hopkins JS (eds) *Swimming Through Troubled Water*, Proceedings the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66-75. 19. Lotz, J. M. and M. A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (wssv) epidemics in *litopenaeus vannamei*. *Dis Aquat Organ* 50, no. 3: 199-209. 20. Matsuda, K., M. Makise, Y. Sueyasu, M. Takehara, T. Asano, and T. Mizushima. 2007. Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *saccharomyces cerevisiae*: Interaction between subunits and identification of binding proteins. *FEMS Yeast Res* 7, no. 8: 1263-9. 21. Mokhtari-Azad, T., H. Mohammadi, I. A. Moosavi, Z. Saadatmand, and R. Nategh. 2004. Influenza surveillance in the islamic republic of iran from 1991 to 2001. *East Mediterr Health J* 10, no. 3: 315-21. 22. Nadala, E. C. B., Tappy, L. M., and Loh, P. C. 1997. Yellow-head virus: a

rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 31:141 – 146. 23. Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., and Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29:135-139. 24. Nykanen, M., R. Saarelainen, M. Raudaskoski, K. Nevalainen, and A. Mikkonen. 1997. Expression and secretion of barley cysteine endopeptidase b and cellobiohydrolase i in *trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63, no. 12: 4929-4937. 25. Papadopoulos, M., S. Saadoun, S. Krishna, B. Bell, and D. Davies. 2002. The aquaporin-1 water channel protein is abnormally expressed in oedematous human brain tumours. *J Anat* 200, no. 5: 531-532. 26. Saarelainen, R., A. Mantyla, H. Nevalainen, and P. Suominen. 1997. Expression of barley endopeptidase b in *trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63, no. 12: 4938-4940. 27. Tang, X. and C. L. Hew. 2007. Expression, purification and crystallization of two major envelope proteins from white spot syndrome virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, no. Pt 7: 624-6. 28. Tang, X., J. Wu, J. Sivaraman, and C. L. Hew. 2007. Crystal structures of major envelope proteins vp26 and vp28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *J Virol* 81, no. 12: 6709-17. 29. 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. 30. Tsai, J. M., H. C. Wang, J. H. Leu, A. H. Wang, Y. Zhuang, P. J. Walker, G. H. Kou, and C. F. Lo. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol* 80, no. 6: 3021-9. 31. van Hulten, M. C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst, and J. M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, no. 1: 7-22. 32. 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. 33. Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H.Y., E. T. M., Chang, C. F., Su, M. S., and Kou, G. H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239-242. 34. Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyanchumnarnkul, 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 black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77. 35. Wu, W., L. Wang, and X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (wssv) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* 332, no. 2: 578-83. 36. Xie, X., L. Xu, and F. Yang. 2006. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol* 80, no. 21: 10615-23. 37. Xie, X. and F. Yang. 2006. White spot syndrome virus vp24 interacts with vp28 and is involved in virus infection. *J Gen Virol* 87, no. Pt 7: 1903-8. 38. Zhang, X., C. Huang, and Q. Qin. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *penaeus monodon*. *Antiviral Res* 61, no. 2: 93-9.