

รหัสโครงการ: PDF/52/2543

ชื่อโครงการ: การแยกและศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้าง 65 กิโลดาลตันของ
เชื้อไวรัสหัวเหลือง

Investigator: ดร.ศรวุฒิ จิตรภักดี
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Email Address: scsji@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2543 - 30 มิถุนายน 2545

เชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหัวเหลืองซึ่งพบในฟาร์มเพาะเลี้ยงกิ้งกูดดำ เชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างหลัก 3 ชนิด คือ gp116, gp64 และ p20 ซึ่งมีขนาด 116, 64 และ 20 กิโลดาลตันตามลำดับ โดยพบว่า gp116 และ gp64 เท่านั้นที่มีการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF3 ทำให้ทราบว่ายีนดังกล่าวสังเคราะห์โปรตีนสายยาวซึ่งมีกรดอะมิโน 1,664 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุล 185 กิโลดาลตันโดยประมาณ (มีค่า pI เท่ากับ 6.68) เมื่อทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติของกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนดังกล่าวประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น transmembrane 6 บริเวณ ส่วนที่เป็น ectodomain 3 บริเวณ รวมทั้งหลายบริเวณที่สามารถถูกเติมหมู่น้ำตาลได้ จากการหาลำดับที่ปลายด้าน N ของโปรตีน gp116 และ gp64 ที่สกัดจากเชื้อไวรัสมาเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF3 ทำให้ทราบว่าโปรตีน gp116 และ gp64 ถูกสังเคราะห์มาจาก precursor โปรตีนตัวเดียวกันซึ่งผ่านขบวนการตัดแปลงโดยการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรตีเอสซึ่งตัดพันธะเปปไทด์ระหว่าง Ala²²⁸ กับ Thr²²⁹ และระหว่าง Ala¹¹²⁷ กับ Leu¹¹²⁸ โดยบริเวณดังกล่าวอยู่ที่ปลายด้าน C ของ transmembrane เกลียวที่ 3 และเกลียวที่ 5 ตามลำดับ เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ gp116 และ gp64 ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ gp116 และ gp64 ของเชื้อ GAV ปรากฏว่ามีความคล้ายคลึงกัน 83% และ 71% โดยประมาณ ความแตกต่างที่เด่นชัดคือใน GAV นั้นมีการเกิด deletion ของลำดับกรดอะมิโนที่ด้าน N อยู่ 2 บริเวณ นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับโปรตีน gp 116 และ gp64 ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของเชื้อไวรัสตัวอื่น ๆ ในฐานข้อมูล

โปรตีน gp64 ที่ยังมี transmembrane และไม่มี transmembrane ถูกนำมาสังเคราะห์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นมาโดยวิธีดังกล่าวสามารถให้ปฏิกิริยาผลบวกกับ antibody ซึ่งเตรียมจากไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์

Project Code: PDF/52/2543

Project Title: Molecular cloning and expression of the 65 kDa Structural Protein of Yellow Head Virus

Investigator: Dr. Sarawut Jitrapakdee
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

Email Address: scsji@mahidol.ac.th

Project Period: July 1, 2000-June 30, 2002

Yellow head virus (YHV) is a major agent of disease in farmed penaeid shrimp. YHV virions purified from infected shrimp contain 3 major structural proteins of M_r 116 kDa (gp116), 64 kDa (gp64) and 20 kDa (p20). Two different staining methods indicated that the p116 and p65 proteins are glycosylated. Nucleotide sequence analysis of the ORF3 gene indicated that it encodes a polypeptide of 1,664 amino acids with calculated M_r of 185,713 kDa ($pI = 6.68$). Hydropathy analysis of the deduced ORF3 protein sequence identified 6 transmembrane helices and 3 ectodomains containing multiple sites for N-linked and O-linked glycosylation. N-terminal sequence analysis of mature gp116 and gp64 proteins indicated that each was derived from ORF3 by proteolytic cleavage of the polyprotein between residues Ala²²⁸ and Thr²²⁹, and Ala¹¹²⁷ and Leu¹¹²⁸ located at the C-terminal side of transmembrane helices 3 and 5, respectively. Comparison with the deduced ORF3 protein sequences of Australian gill-associated virus (GAV) indicated 83% identity in gp64 and 71% identity in gp116 which featured 2 significant sequence deletions near the N-terminus. Database searches revealed no significant homology with other proteins. Recombinant gp64 with and without C-terminal transmembrane region expressed in *E. coli* was shown to react with antibody raised against native gp64 purified from virions.