13 JAN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF 65 KDa STRUCTURAL PROTEIN OF YELLOW HEAD VIRUS

SASIMANAS UNAJAK

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-2422-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S252M
2002
C.2

Copyright by Mahidol University

4236793 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc.(BIOCHEMISTRY)

KEY WORDS : PENAEUS MONODON/YELLOW HEAD VIRUS

SASIMANAS UNAJAK : MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF 65 KDa STRUCTURAL PROTEIN OF YELLOW HEAD VIRUS. THESIS ADVISORS : SARAWUT JITRAPAKDEE, Ph.D, VICHAI BOONSEANG, PhD., SAKOL PANYIM, Ph.D., 107 P. ISBN 974-04-2422-8

Yellow head virus (YHV) is a causative agent of the yellow head disease in penaeid shrimps. The purified viruses were prepared from haemolymph of YHV-infected *Penaeus monodon* followed by gradient ultracentrifugation. The ultrastructure of YHV virion viewed under transmission electron microscopy showed the bacilli-form virion with 146-200 x 53 nm in size surrounded by a layer of an envelope with spike like protruding and helical nucleocapsids 33-36 nm. The analysis of structural proteins revealed that virus contains 3 structural proteins with size of 116, 65 and 20 kDa. Glycoprotein analyses using ECL glycoprotein detection kit (Pharmacia Amersham) and Thymol staining also showed that the 116 and 65 kDa were glycosylated and designated as gp116, gp65 and vp20, respectively. The N-terminal of gp116 and gp65 were determined to be T-I-L-S-G-I-P-E-K-D- and L-A-P-R-Q-A-R-V-X-G- (X, uncertain residue). The polyclonal antibodies were raised against gp116 or gp65 purified from SDS-PAGE. Because the nucleotide sequence of YHV ORF3 had not been completely sequenced, partial sequence of ORF3 from residues 504-1201 was obtained making the sequence complete. The N-terminal sequences of gp116 and gp65 matched residues Thr^{229} - Asp^{239} and Leu^{1128}- Val^{1136} that were inferred from cDNA sequence. The coding region of gp65 gene was 1,619 bp long. The protein is composed of 539 amino acid residues, with 20 amino acid transmembrane domains at the C-terminus. Gp65 with and without C-terminal transmembrane was expressed in *Escherichia coli*. The materials produced from *E. coli* were readily detectable by antibody against gp65. However expression level of gp65 without transmembrane domain was significantly higher than that of gp65 with transmembrane domain.

Copyright by Mahidol University

4236793 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

ศศิมนัส อุณจักร์ : การแยกและการศึกษาการแสดงออกของยีนสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้าง 65 กิโลดาลตันจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF 65 KDa STRUCTURAL PROTEIN OF YELLOW HEAD VIRUS). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ศราวุฒิ จิตรภักดี, Ph.D, วิชัย บุญแสง, PhD., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., 107 P. ISBN 974-0.4-2422-8

ไวรัสหัวเหลือง (YHV) เป็นสาเหตุหลักในการก่อความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไวรัสที่ใช้เตรียมได้จากเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ที่นำไปปั่นแยกใน gradient ultracentrifugation โครงสร้างของเชื้อไวรัสที่แยกได้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบ โครงสร้างแบบแท่ง ขนาดประมาณ 146-200 x 53 nm ภายนอกล้อมรอบด้วยชั้นของเปลือกหุ้มประกอบไปด้วยโครงสร้างคล้ายหนาม และภายในยังมีโครงสร้างของ nucleocapsids ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายแท่งเกลียว ขนาดประมาณ 33-36 nm องค์ประกอบทางโปรตีนโครงสร้างของไวรัส ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ 116, 65 และ 20 กิโลดาลตัน นอกจากนี้การศึกษาการเติมหมู่น้ำตาลของโปรตีนด้วยชุดทดสอบ ECL glycoprotein detection module (Pharmacia Amersham) และการย้อมสีบน SDS-PAGE ด้วย Thymol พบว่า โปรตีนโครงสร้างขนาด 116 และ 65 กิโลดาลตันมีการเติมหมู่น้ำตาล และเรียกชื่อว่า gp116, gp65 และ vp20 ตามลำดับ ต่อมาจึงหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N ของ gp116 และ gp65 ซึ่งได้แก่ T-I-L-S-G-I-P-E-K-D- และ L-A-P-R-Q-A-R-V-X-G- (X, ลำดับกรดอะมิโนที่ไม่แม่นยำ). การผลิตโพลีโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างทั้งสอง คือ gp116 และ gp65 นั้น เตรียมจากไวรัสบริสุทธิ์ที่นำมาแยกโปรตีนโครงสร้างแต่ละชนิดด้วย SDS-PAGE. เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหัวเหลืองในส่วน ORF3 ยังไม่สมบูรณ์ จึงได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลือ คือจากลำดับอะมิโนที่ 504-1201 จากนั้น จึงเปรียบเทียบระหว่างลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N ของ gp116 และ gp65 และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก ORF3 พบตำแหน่งที่ตรงกันที่ลำดับอะมิโน 229 และ 1128 ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์โปรตีน gp65 ยาว 1,619 เบส ซึ่งจะแปลรหัสให้โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน 539 ตัว โดยกรดอะมิโนที่ปลายด้าน C ประมาณ 20 ตัวจะแทรกเข้าไปในส่วนเมมเบรน ยีนที่สร้างโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตันนี้จะนำไปศึกษาการแสดงออกใน *Escherichia coli* การแสดงออกของโปรตีนที่สร้างจากยีนที่แปลรหัสให้ gp65 ที่มีการเติมหมู่ฮิสทิดีนนั้นมีการแสดงออกต่ำมาก แต่เมื่อตัดส่วนปลายของยีนที่สังเคราะห์ให้ส่วนที่แทรกเข้าไปในเมมเบรนทิ้งและนำไปศึกษาการแสดงออกอีกครั้ง พบว่ามีการแสดงออกอย่างดี โปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 56 กิโลดาลตัน ซึ่งความแตกต่างของขนาดโปรตีนที่แสดงออกและโปรตีนในไวรัสนั้นเกิดจากกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นหลังจากการแปลรหัสโปรตีน เช่น การเติมหมู่น้ำตาล เป็นต้น

Copyright by Mahidol University