magiran.com

استفاده از علم بیو انفورماتیک برای تشخیص آلودگی میگو به ویروس بیماری لکه سفید

حسن محبت کار

h_mohabatkar@yahoo.com

بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، چهار راه ادبیات، کد پستی ۷۱٤٥٤

تاریخ ورود: دی ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۳

لغات کلیدی: بیو انفورماتیک، بیماری لکه سفید، اپی‌توپ

ویروس سندرم لکه سفید یک عامل مهم مرگ و میر میگو پرورشی در سراسر کشورهای جهان بشمار می‌رود (Witteveldt *et al.*, 2001). ویریونهای غشاء دار این ویروس ذرات متقارن بیضوی تا میله‌ای شکل با قطری بین ۱۲۰ تا ۱۵۰ نانومتر و طولی در حدود ۲۷۰ تا ۲۹۰ نانومتر هستند. انتهای دم مانندی در یک انتهای ویریون وجود دارد (Hulten *et al.*, 2002). این ویروس دارای ژنوم DNA حلقوی دو رشته‌ای با طولی در حدود ۳۰۵ هزار جفت باز است که در آن ۱۸۱ ORF وجود دارد. ویروس سندرم لکه سفید، میگو و سایر سخت پوستان را آلوده می‌کند. ویروس دارای حداقل پنج پروتئین ویریون اصلی است که سه تا از آنها یعنی VP26، VP24 و VP15 در نوکلئوکپسید میله ای شکل و دو تای دیگر یعنی VP28 و VP19 در غشا ویروس وجود دارد (Mohan *et al.*, 2002). هیچکدام از ۵ پروتئین اصلی ساختمانی این ویروس گلیکوزیله نیستند. که این یک خصوصیت غیرمعمول در بین ویروس‌های جانوری غشاء دار است (Hulten *et al.*, 2000_b).

اگر چه ویروس لکه سفید از نظر مورفولوژی شبیه باکولوویروسهای حشرات است ولی این دو از نظر توالی‌های اسیدهای آمینه به هم مرتبط نیستند. حتی برخی ژنهای این ویروس همولوژی بیشتری با ژنهای یوکاریوتیک دارند. در حقیقت توالی ویروس لکه سفید با همه ویروس‌ها متفاوت است (Yang *et al.*, 2001). مطالعات فیلوژنیک نیز نشان می‌دهند که پروتئین‌های این ویروس در ایزوله‌های مختلف آن بسیار نزدیک به هم هستند. درخت فیلوژنیک این پروتئین‌ها را از این نظریه حمایت می‌کند که ویروس سندرم لکه سفید یک ویروس متمایز از سایر خانواده‌های ویروس می‌باشد و به هیچکدام از خانواده‌های شناخته شده فعلی تعلق ندارد (Chen *et al.*, 2002). این ویروس یا عضوی از یک جنس جدید به نام *Whispovirus* در خانواده باکولوویریده و یا عضوی از خانواده‌ای جدید به نام

magtran.com

Whispoviridae است (Hulten *et al.*, 2000a). مطالعات نشان داده است که پروتئین غشایی اصلی یعنی وی پی ۲۸ یک نقش کلیدی در آلودگی سیستماتیک میگو به وسیله این ویروس دارد (Hulten *et al.*, 2002). .هدف از تحقیق حاضر این بود که با به کارگیری علم بیوانفورماتیک که به معنی علم کاربرد رایانه در بیولوژی است، روی این پروتئین مهم ویروسی یک آنالیز دقیق ساختمانی انجام شود و با استفاده از آن قسمتهای آنتی ژنی (اپی‌توپها) مشخص گردند. سپس از این مطالعه ساختمانی در شناسایی ویروس استفاده شود.

اپی‌توپهای یک پروتئین اغلب بخشهای آب دوستی هستند که در سطح پروتئین قرار گرفته‌اند. این بخشها قابلیت انعطاف زیاد داشته و در حد فاصل ساختمانهای ثانویه (مانند آلفا هلیکس‌ها و بتا شیت‌ها) قرار گرفته‌اند. بعلاوه، این قسمتها اکثرا گلیکوزیله نیستند. بنابر این در تحقیق حاضر از مقیاس‌های زیر برای پیش‌گویی اپی‌توپها استفاده شد:

- یک برنامه هیدروفیلیستی (Hopp & Woods, 1981)
- دو برنامه احتمال در سطح بودن (Janin & Wodak, 1978 ; Emini *et al.*, 1985)
- یک برنامه آنتی ژنیسیتی(Welling *et al.*, 1985)
- یک برنامه هیدروپاتی(Kyte & Doolittle, 1982)
- یک برنامه انعطاف پذیری زنجیره (Karplus & Schulz, 1985)
- یک برنامه ساختمان ثانویه (Garnier *et al.*, 1978).

مکان های N- گلیکوزیله نیز مورد بررسی قرار گرفتند(Hubbard & Ivatt, 1981). توالی اسیدهای آمینه به صورت یک پنجره در حال حرکت هفت واحدی مطالعه شد.

برای توالی‌یابی پروتئین‌های ویروس لکه سفید، ابتدا ویروس را از میگوی آلوده جدا و آن را در خرچنگ آب شیرین تکثیر و سپس توسط تکنیک سانتریفوژ گرادیان نوکلئوکپسید را جدا می‌نمایند. پروتئین‌های ویروسی سپس توسط SDS-PAGE جدا و توالی‌یابی می‌گردند. توالی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای ژنهای مربوطه به بانکهای اطلاعاتی مربوطه گزارش می‌شود. هر توالی در این بانکها دارای یک شماره خاص به نام شماره دسترسی می‌باشد (Yang *et al.*, 2001). توالی‌های اسیدهای آمینه پروتئین VP28 ویروس سندرم لکه سفید میگو از بانک ژنی SWISSPROT استخراج گردید. شماره دسترسی به این توالی‌ها به صورت NP۴۷۷۹۴۳.۱ (از چین)، AA ۷۱۹۹.۱ (از چین)، ۷۷۶۷۰.۱ AAK (از هلند) و ۵۹۳۲۱.۱ AAK (از کره جنوبی) می‌باشند. تعداد اسیدهای آمینه در هر چهار توالی مورد مطالعه ۲۰۴ است.

نتیجه آنالیز رایانه‌ای پیش‌گویی قسمتهای آنتی ژنتیک پروتئین در جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که در این جدول مشخص شده است این برنامه‌ها ۵ قسمت را به عنوان بخش‌های آنتی ژنی پیش‌گوئی کردند. چهار اپی‌توپ پیش‌بینی شده طول ۶ اسید آمینه و توالی دیگر به طول ۸ اسید آمینه بود.

magiran.com

جدول ۱: قسمتهای پیش بینی شده بعنوان اپی‌توپهای مناسب

ردیف	تعداد اسیدهای آمینه	توالی
۱	٤٧-٥٢	NMDENL
۲	۹۰-۹۷	QMKEENAN
۳	۱۰۳-۱۰۸	VEGRAL
۴	۱۶۲-۱۶۷	SINENE
۵	۱۲۸-۱۳۳	TSRKIN

در هر پروتئین قسمتهایی به نام اپی‌توپ وجود دارند که نشان‌دهنده خصوصیات آنتی ژنیک آن پروتئین هستند. با انجام تستهای دقیق می‌توان این اپی‌توپ را مشخص و از آنها برای شناسایی یک ویروس در میزبان استفاده نمود. ولی سنتز همه پپتیدهای مربوط به یک پروتئین کامل و آزمایش همه آنان کاری گران قیمت و وقت‌گیر است. راه دیگری که برای شناسایی این قسمتها وجود دارد استفاده از برنامه‌های کامپیوتری است. توسط این برنامه‌ها که خصوصیات گوناگون پروتئین‌ها را مورد آنالیز قرار می‌دهند می‌توان این اپی‌توپها را پیش‌گویی کرد. توالی‌های پروتئین وی پی ۲۸ در چند ایزوله ویروس سندرم لکه سفید میگو از بانک‌های اطلاعاتی استخراج و پس از مرتب کردن آنها، توالی مورد توافق آنها تعیین گردید. پروتئین VP28 در سطح ویروس قرار گرفته و دارای بخشی در انتهای آمینو است که می‌تواند یک قسمت میان غشایی باشد. این پروتئین یک نقش بسیار مهم را در آغاز آلودگی سیستماتیک در میگو به وسیله ویروس لکه سفید ایفا می‌کند زیرا اساسا گیرنده‌های سلولی توسط این پروتئین تشخیص داده می‌شوند (Astrofsky *et al.*, 2001).

با توجه به این که این برنامه‌ها تنها ۵ قسمت را به گونه‌ای که در جدول مشخص شده بعنوان اپی توپ‌های خوب پیش‌بینی نمودند به جای ساختن پپتیدهای فراوان و آزمایش همه آنها و یا استفاده از کل پروتئین‌های ویروسی که باعث افزایش خطا می‌گردد، می‌توان تعداد معدودی پپتید را سنتز و از آنها برای شناسائی این ویروس استفاده نمود. شناسائی می‌تواند توسط تستهایی چون الایزا انجام گردد. برای این شناسایی، پپتیدهای مربوط به اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده پروتئین VP28 به یک جانور آزمایشگاهی مانند موش یا خرگوش تزریق می‌شود. این جانوران علیه این پپتیدها که بعنوان آنتی ژن عمل می‌کنند، تولید آنتی بادی‌های اختصاصی می‌نمایند. حال چنانچه میگوی مشکوک به بیماری به صورت هوموژنوس در بافر مناسب در چاهکهای میکروپلیت الایزا قرار گیرد و آنتی بادی‌های فوق‌الذکر به این چاهکها اضافه گردند، در صورت آلوده بودن میگو واکنشهای بسیار اختصاصی بین پروتئین VP28 ویروسی موجود در میگو و آنتی‌بادی‌های مذبور انجام می‌شود، در غیر این صورت پاسخ تست الایزا منفی خواهد بود (Mohabatkar & Kar, 2004).

magiran.com

تشکر و قدردانی

از دانشگاه شیراز جهت حمایت مالی برای انجام این تحقیق تشکر می‌نمایم.

منابع

Astrofsky, K.M. ; Roux, M.M. ; Klimpel, K.R. ; Fox, J.G. and Dhar, A.K. , 2001. Isolation of differentially expressed genes from White Spot Virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). Virology. Vol. 285, pp.228-233.

Chen, L. ; Wang, H. ; Huang, C. ; Peng, S. ; Chen, Y. ; Lin, S. and Chen, W. , 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. Virology. Vol. 15, pp.136-140.

Emini, E.A. ; Hughes, J.V. ; Perlow, D.S. and Boger, J. , 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. Journal of Virol. Vol. 55, pp.836-9.

Garnier, J. ; Osguthorpe, D.J. and Robson, B. , 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. Journal of Mol. Biol. Vol. 120, pp.97-120.

Hopp, T.P. and Woods, K.R. , 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 8, pp.3824-3828.

Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. , 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem. Vol. 50, pp.555-583.

Hulten, M.C. ; Westenberg, M. ; Goodall, S.D. and Vlak, J.M. , 2000a. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology. Vol. 266, pp.227-236.

Hulten, M.C. ; Tsai, M.F. ; Schipper, C.A. ; Lo, C.F. ; Kou, G.H. and Vlak, J.M. , 2000b. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. Journal of Gen. Virol. Vol. 81, pp.307-316.

Hulten, M.C. ; Reijns, M. ; Vermeesch, A.M. ; Zandbergen, F. and Vlak, J.M. , 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. Journal of Gen. Virol. Vol. 83, pp.257-265.

magiran.com

Janin, J. and Wodak, S. , 1978. Conformation of amino acid side- chains in proteins. Journal of Mol. Biol. Vol. 125, pp.357-386.

Karplus, P.A. and Schulz, G.E. , 1985. Prediction of site flexibility in proteins. Naturwissenschaften. Vol. 72, pp.212-213.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. , 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Mol. Biol. Vol. 5, pp.105-132.

Mohabatkar, H. and Kar, S.K. , 2004. Prediction of exposed domains of exposed enveloped glycoprotein in Indian HIV-1 isolates and experimental confirmation of their immunogenicity in humans. Braz. Journal of . Med. Biol. Res. Vol. 37, pp.675-681.

Mohan, C.V. ; Corsin, F. ; Thakur, P.C. ; Padiyar, P.A. and Madhusudan, ? , 2002. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus and chronic bacterial infection. Dis. Aquat. Organ. Vol. 50. pp.1-8.

Welling, G.W. ; Weijer, W.J. ; van der Zee, R. and Welling-Wester, S. , 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. FEBS Lett. Vol. 2, pp.215-218.

Witteveldt, J. ; Van Hulten, M.C. and Vlak, J.M. , 2001. Identification and phylogeny of a non-specific endonuclease gene of white spot syndrome virus of shrimp. Virus Genes. Vol. 23, pp.331-337.

Yang, F. ; He, J. ; Lin, X. ; Li, Q. ; Pan, D. ; Zhang, X. and Xu, X. , 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virol. Vol. 75, pp.11811-11820.

magiran.com

Application of bioinformatics in diagnosis of White Spot Syndrome Virus

Mohabatkar H.

h_mohabatkar@yahoo.com

Biology Department, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz

Received: January 2003 Accepted: February 2004

Keywords: Bioinformatics, White Spot Syndrome, Epitope

Abstract

White spot syndrome is one of the major problems in shrimp culture worldwide. There are different techniques like Dot blotting, PCR and using monoclonal antibodies for diagnosis of White Spot Syndrome Virus (WSSV). In the latter method, by using laboratory animals, monoclonal antibodies against different antigenic domains of proteins of the virus are developed. Then the reactivity of these antibodies with all proteins of shrimp can be tested by ELISA. As it is not known at the start of the test which parts of a protein are strong epitopes and so there is a need to test many peptides, this method is expensive and time consuming. One of the solutions for this problem is prediction of epitopes, synthesis of few peptides, and testing these peptides. Since VP28 is the most important protein of WSSV capsid, the sequences of amino acids of VP28 of four isolates of WSSV from different parts of the world were collected for this study. By using bioinformatic methods, after aligning of sequences the consensus sequence was identified. For prediction of antigenic domains of V28, seven different programs were used. The analysis through the computer programme resulted in prediction of five epitopes in V28. These parts of the protein can now be synthesized and tested for identification of the virus.