

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 ۷۱۴۵۴

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۳

تاریخ ورود: دی ۱۳۸۲

لغات کلیدی: بیو انفورماتیک، بیماری لکه سفید، اپی توپ

ویروس سندرم لکه سفید یک عامل مهم مرگ و میر میگو پرورشی در سراسر کشورهای جهان بشمار می رود (Witteveldt *et al.*, 2001). ویرونیهای غشاء دار این ویروس ذرات متقارن بیضوی تا میله ای 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 رشته ای 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 می کند. ویروس دارای حداقل پنج پروتئین ویریون اصلی است که سه تا از آنها یعنی VP26، VP24 و VP15 در نوکلئوکسپید 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 ویروس های جانوری غشاء دار است (Hulten *et al.*, 2000b).

اگر چه ویروس لکه سفید از نظر مورفولوژی شبیه باکولوویروسهای حشرات است ولی این دو از نظر توالی های انسیدهای آمینه به هم مرتبط نیستند. حتی برخی ژنهای این ویروس همولوژی بیشتری با ژنهای یوکاریوتیک دارند. در حقیقت توالی ویروس لکه سفید با همه ویروس ها متفاوت است (Yang *et al.*, 2001). مطالعات فیلوژنیک نیز نشان می دهند که پروتئین های این ویروس در ایزوله های مختلف آن بسیار نزدیک به هم هستند. درخت فیلوژنیک این پروتئین ها را از این نظریه حمایت می کند. که ویروس سندرم لکه سفید یک ویروس متمایز از سایر خانواده های ویروس می باشد و به هیچکدام از خانواده های 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 خانواده ای جدید به نام

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 (اپی توپها) مشخص گردند. سپس از این مطالعه ساختمانی در شناسایی ویروس استفاده شود.

اپی توپهای 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 اپی توپها استفاده شد:

- یک برنامه هیدروفیلیستی (Hopp & Woods, 1981)
- دو برنامه احتمال در سطح بودن (Janin & Wodak, 1978 ; Emini *et al.*, 1985)
- یک برنامه آنتی ژنیستی (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 نوکلئوکسپید 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 NP4۷۷۹۴۳،۱ (از چین)، AA ۷۱۹۹،۱ (از چین)، ۷۷۶۷۰،۱ AAK (از هلند) و AAK ۵۹۳۲۱،۱ (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 پیش‌گویی کردند. چهار اپی توپ پیش‌بینی شده طول ۶ اسید آمینه و توالی دیگر به طول ۸ اسید آمینه بود.

جدول ۱: قسمتهای پیش بینی شده بعنوان اپی توپهای مناسب

ردیف	تعداد اسیدهای آمینه	توالی
۱	۴۷-۵۲	NMDENL
۲	۹۰-۹۷	QMKEENAN
۳	۱۰۳-۱۰۸	VEGRAL
۴	۱۶۲-۱۶۷	SINENE
۵	۱۲۸-۱۳۳	TSRKIN

در هر پروتئین قسمتهایی به نام اپی توپ وجود دارند که نشان دهنده خصوصیات آنتی ژنیک آن پروتئین هستند. با انجام تستهای دقیق می توان این اپی توپ 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 وقت گیر است. راه دیگری که برای شناسایی این قسمتها وجود دارد استفاده از برنامه های کامپیوتری است. توسط این برنامه ها که خصوصیات گوناگون پروتئین ها را مورد آنالیز قرار می دهند می توان این اپی توپها را پیش گویی کرد. توالی های پروتئین وی پی ۲۸ در چند ایزوله ویروس سندرم لکه سفید میگو از بانک های 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 می تواند یک قسمت میان غشایی باشد. این پروتئین یک نقش بسیار مهم را در آغاز آلودگی سیستماتیک در میگو به وسیله ویروس لکه سفید ایفا می کند زیرا اساسا گیرنده های سلولی توسط این پروتئین تشخیص داده می شوند (Astrofsky *et al.*, 2001).

با توجه به این که این برنامه ها تنها ۵ قسمت را به گونه ای که در جدول مشخص شده بعنوان اپی توپ های خوب پیش بینی نمودند به جای ساختن پپتیدهای فراوان و آزمایش همه آنها و یا استفاده از کل پروتئین های ویروسی که باعث افزایش خطا می گردد، می توان تعداد معدودی پپتید را سنتز و از آنها برای شناسایی این ویروس استفاده نمود. شناسایی می تواند توسط تستهایی چون الایزا انجام گردد. برای این شناسایی، پپتیدهای مربوط به اپی توپ های پیش بینی شده پروتئین VP28 به یک جانور آزمایشگاهی مانند موش یا خرگوش تزریق می شود. این جانوران علیه این پپتیدها که بعنوان آنتی ژن عمل می کنند، تولید آنتی بادی های اختصاصی می نمایند. حال چنانچه میگوی مشکوک به بیماری به صورت هوموژنوس در بافر مناسب در چاهک های میکروپلیت الایزا قرار گیرد و آنتی بادی های فوق الذکر به این چاهکها اضافه گردند، در صورت آلوده بودن میگو واکنشهای بسیار اختصاصی بین پروتئین VP28 ویروسی موجود در میگو و آنتی بادی های مذکور انجام می شود، در غیر این صورت پاسخ تست الایزا منفی خواهد بود (Mohabatkar & Kar, 2004).

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.

- 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 hydrophatic 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.

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.