

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/31/2542

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์จีโนมและการตรวจหาโปรตีนยับยั้งกระบวนการ Apoptosis

จากเฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัสในกึ่งกลาดำ

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110 โทร 02-2602122-4 ต่อ 4601

โทรสาร 02-2602122-4 ต่อ 4011 E-mail address: wasanas@swu.ac.th

เฮปาโตแพนครีเอติกพาร์โวไวรัส เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ทำให้เกิดโรคมะเร็งในกึ่งกลาดำ ในการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมไวรัสแล้วนำไปวิเคราะห์หายีนต่างๆ โดยเฉพาะยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งการเกิด apoptosis ในกึ่งกลาดำ การวิจัยได้ทำการแยกสกัดไวรัส HPV จากตับกึ่งที่ติดเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ ตรวจพิสูจน์การติดเชื้อโคลนนิ่งและหาลำดับเบส จากการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดจำนวน 6,089 เบส พบว่ามี open reading frame (ORF) 3 แห่งบนดีเอ็นเอที่เป็นบวกคือ ORF1, ORF2 และ ORF3 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนขนาด 428, 592 และ 818 กรดอะมิโน ซึ่งเทียบเท่า 50.37, 69.82 และ 92.17 กิโลดาร์ตัน ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ORF2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ Non-structural protein (NS1) ของพาร์โวไวรัสอื่นๆ โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไว้ 2 แห่ง คือ ส่วนของ Replication initiation motif และ NTP-binding and helicase domain motif ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 ไม่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนใดๆ ในฐานข้อมูล แต่คาดว่าเป็นส่วนของ Non-structural protein 2 (NS2) ซึ่งยังไม่รู้หน้าที่ สำหรับ ORF3 เป็นยีนของโปรตีนห่อหุ้ม (VP) ของไวรัส เนื่องจากมี PGY motif อยู่ปลายอะมิโนและมี phospholipase A2 motif ซึ่งพบในพาร์โวไวรัสสัตว์มีกระดูกสันหลังและในแมลง การจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนมเป็นแบบ monosense genomic organization ยีนของ NS1 และ NS2 ซ้อนทับกันอยู่ทางซ้าย ส่วนยีน VP อยู่ทางขวาของจีโนมและสร้างจาก ORF3 จากข้อมูล Phylogenetic tree พบว่าไวรัส HPV มีความใกล้ชิดกับพาร์โว-ไวรัสที่พบในกึ่งและแมลง คือ IHNV, AaeDNV และ Aa/DNV นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน NS1 มีความเหมือนเล็กน้อยกับ I-FLICE และ FLAME ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งเอนไซม์ caspase ใน *Homo sapiens* และจาก SDS-PAGE พบโปรตีนหลักขนาด 57 กิโลดาร์ตัน ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษา *in vivo* เพิ่มเติมว่าหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีนของไวรัส เช่น การใช้ SiRNA แล้วทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์กึ่งที่ติดเชื้อไวรัส HPV มากขึ้นหรือน้อยลง

คำหลัก : Hepatopancreatic parvovirus, จีโนมไวรัส HPV, Apoptosis inhibitor, HPV

Abstract

Project Code : PDF/31/2542

Project title : "Genome analysis and identification of apoptotic inhibitor from hepatopancreatic parvovirus in *Penaeus monodon* "

Investigator : Assist. Dr. Wasana Sukhumsirichart, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Tel. 02-2602122-4 ต่อ 4601 Fax. 02-2602122-4 ต่อ 4011 E-mail: wasanas@swu.ac.th

Project Period : 2 years

Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is a single-stranded DNA virus that infected and cause disease in *Penaeus monodon*. In this study, the nucleotide sequence of HPV genome was determined and analyzed for its genes especially anti-apoptosis. The virus particle was isolated from infected hepatopancreas, then the DNA was purified, cloning and sequencing. The analysis of 6,089 nucleotides of the viral genome, revealed three large open reading frames (ORFs) and parts of the non-coding termini. The ORF1, ORF2, and ORF3 on the complementary (plus) strand have potential coding of 428, 592 and 818 amino acids which equivalent to 50.37, 69.82 and 92.17 kDa, respectively. The ORF2 is most likely encodes the major non-structural protein (NS1) since it contains conserved replication initiation motif and NTP-binding and helicase domains similar to those in NS1 from all other parvoviruses. The ORF2 encodes for putative non-structural protein-2 (NS2), which unknown function. The right half (ORF3) of the genome encodes a capsid protein (VP) because of the PGY motif located at the N-terminal region of VP is conserved among most parvoviruses and also contained a phospholipase A2, a novel viral enzymes found in both vertebrate and insect parvoviruses. The HPV genome organizes as monosense, two overlapping genes encode for two NS proteins and the structural protein originates from ORF3. The phylogenetic tree construction revealed that it is closely related to shrimp parvoviruses and mosquito densovirus. Part of NS1 gene showed low similarity to I-FLICE and FLAME, an apoptosis inhibitors of *Homo sapiens*. By SDS-PAGE analysis, the major protein band of the virus was found at 57 kd. For further study, the *in vivo* experiment should be carried out to observe apoptosis response when the viral gene is inhibited by in infected cell treat with RNA interference specific to putative anti-apoptotic gene of HPV virus.

Key words: Hepatopancreatic parvovirus, HPV genome, Apoptosis inhibitor, HPV