

目錄

| | |
|-----------|-----|
| 中文摘要..... | i |
| 英文摘要..... | ii |
| 謝誌..... | iii |
| 目錄..... | iv |
| 圖目錄..... | vii |
| 表目錄..... | ix |

一、緒論

| | |
|--|----|
| 1-1 蝦白點症..... | 1 |
| 1-1-1 傳播途徑..... | 1 |
| 1-1-2 蝦白點症的症狀及危害..... | 1 |
| 1-1-3 蝦白點症的病理..... | 2 |
| 1-1-4 病原特徵及分類..... | 2 |
| 1-1-5 目前蝦白點症病毒的防治對策..... | 3 |
| 1-2 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶..... | 7 |
| 1-2-1 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶的功能與其重要性..... | 7 |
| 1-2-2 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶的分類..... | 8 |
| 1-2-3 蝦白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶(WSSV—TK-TMK) | 13 |
| 1-3 電腦模擬..... | 18 |
| 1-3-1 蛋白質結構模擬..... | 18 |
| 1-3-2 入塢交互作用..... | 19 |
| 1-4 實驗目的..... | 21 |

二、實驗材料與方法

| | |
|------------------------|----|
| 2-1 實驗材料..... | 22 |
| 2-1-1 菌種與載體及培養基成分..... | 22 |
| 2-1-2 化學藥品與酵素來源..... | 22 |
| 2-1-3 使用儀器..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 2-1-4 溶液與緩衝液..... | 23 |
| 2-1-4-1 分生選殖技術所用溶液..... | 23 |
| 2-1-4-2 蛋白質表現及純化所用緩衝液..... | 23 |
| 2-1-5 電腦軟體與資料庫..... | 24 |
| 2-2 實驗方法..... | 25 |
| 2-2-1 聚合酶連鎖反應與質體的建構(the construction of plasmid) | 26 |
| 2-2-2 大腸桿菌轉殖勝任細胞 (competent cell)之備製..... | 27 |
| 2-2-3 DNA 定序..... | 28 |
| 2-2-4 基因序列錯誤修正..... | 28 |
| 2-2-5 質體之轉化作用..... | 31 |
| 2-2-6 蛋白質的表現..... | 31 |
| 2-2-7 粗萃液 (Crude Extract)之製備..... | 31 |
| 2-2-8 蛋白質之純化 (Protein Purification) | 31 |
| 2-2-9 蛋白質濃度判..... | 32 |
| 2-2-10 蛋白質結構之模擬..... | 33 |
| 2-2-11 Docking..... | 34 |
| 2-2-12 資料庫準備..... | 35 |
| 2-2-13 GOLD 參數設定..... | 36 |
| | |
| 三、結果與討論 | |
| 3-1 電腦分析及模擬..... | 38 |
| 3-1-1 白點症病毒胸腺嘧啶激酶－胸腺嘧啶磷酸激酶之蛋白質結構模擬(Homology modeling) | 38 |
| 3-1-2 TMK_M 入塢作用測試及設定..... | 46 |
| 3-2 資料庫的搜尋及分析..... | 48 |
| 3-2-1 MDDR 與 CMC 的篩選..... | 48 |
| 3-3 蛋白質表現及純化..... | 54 |
| 3-3-1 聚合酶鏈索反應(polymerase chain reaction; PCR)與基因轉殖..... | 54 |
| 3-3-2 蛋白質表現與活性測試..... | 55 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 四、結論與未來展望..... | 57 |
| 五、參考文獻..... | 59 |
| 六、附錄..... | 63 |
| 附錄一:MDDR 資料庫篩選結果與 Phe62 平行的化合物..... | 63 |
| 附錄二:MDDR 資料庫篩選結果不與 Phe62 平行的化合物..... | 65 |
| 附錄三:CMC 資料庫篩選結果與 Phe62 平行的化合物..... | 67 |
| 附錄四:CMC 資料庫篩選結果不與 Phe62 平行的化合..... | 69 |



圖目錄

| | | |
|--------|---|----|
| 圖 1-1 | dTTP 合成途徑中 TK 與 TMK 所扮演的角色..... | 8 |
| 圖 1-2 | 人類 TMK 的蛋白質立體結構..... | 10 |
| 圖 1-3 | P-loop 與 LID 序列比較..... | 12 |
| 圖 1-4 | TK 及 TMK 之分類..... | 12 |
| 圖 1-5 | 胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶 DNA 以及蛋白質序列..... | 15 |
| 圖 1-6 | TK 家族序列比較..... | 16 |
| 圖 1-7 | TMK 家族序列比較圖..... | 17 |
| 圖 2-1 | 實驗流程圖..... | 25 |
| 圖 2-2 | WSSV- <i>tktmk</i> PCR program..... | 26 |
| 圖 2-3 | WSSV- <i>tktmk</i> 接入表現載體 pMAL-c2 位置示意圖..... | 27 |
| 圖 2-4 | DNA sequence program..... | 28 |
| 圖 2-5 | Quick change 原理示意圖..... | 29 |
| 圖 2-6 | 蛋白質結構合理性確認工具網頁..... | 33 |
| 圖 2-7 | 電腦模擬流程圖..... | 34 |
| 圖 2-8 | 化合物資料庫下載示意圖..... | 35 |
| 圖 3-1 | WSSV-TK 與已有 X 光結晶構形之 TK 序列比對..... | 40 |
| 圖 3-2 | WSSV-TMK 與已有 X 光結晶構形之 TMK 序列比對..... | 41 |
| 圖 3-3 | 人類 TMK 與與蝦白點症病毒序列比對..... | 42 |
| 圖 3-4 | 人類 TMK(PDB 1NMZ) 3D 結構圖與 WSSV-TMK 模擬結構..... | 42 |
| 圖 3-5 | TMP_M Ramachandran plots..... | 43 |
| 圖 3-6 | TMP_M chi1-chi2 plots..... | 44 |
| 圖 3-7 | Verify_3D 分析結果..... | 44 |
| 圖 3-8 | Errat 分析結果..... | 45 |
| 圖 3-9 | 人類 TMK(PDB 1NMZ)與 TMK_M 部分重要胺基酸 C α 間距圖..... | 45 |
| 圖 3-10 | 1NMZ 入塢作用設定..... | 47 |
| 圖 3-11 | TMK_M 入塢作用測試..... | 48 |
| 圖 3-12 | TMK_M 篩選 MDDR 及 CMC 結果示意圖..... | 51 |
| 圖 3-13 | MDDR 資料庫部分篩選結果..... | 52 |

| | | |
|--------|--|----|
| 圖 3-14 | Arg87、P-loop、及 LID 關係圖..... | 52 |
| 圖 3-15 | 1NMZ 受質與 Arg97 相對關係以及 TMK_M docking 結果比較圖..... | 53 |
| 圖 3-16 | WSSV- <i>tktmk</i> PCR 以及轉殖入 pMAL-c2 電泳圖..... | 54 |
| 圖 3-17 | WSSV-TKTMK SDS-PAGE..... | 55 |
| 圖 3-18 | LC/MS/MS 分析結果..... | 56 |



表目錄

| | | |
|-------|--|----|
| 表 1-1 | 白斑病毒之部分開放解碼區列表..... | 6 |
| 表 2-1 | WSSV- <i>tkmk</i> PCR condition..... | 26 |
| 表 2-2 | Quick change PCR condition..... | 30 |
| 表 2-3 | Quick change PCR program..... | 30 |
| 表 2-4 | Quick change remover template condition..... | 30 |
| 表 2-5 | SDS-PAGE 下層膠配方..... | 32 |
| 表 2-6 | SDS-PAGE 上層膠配方..... | |

