

## 三、結果與討論

### 3-1 電腦分析及模擬：

#### 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)

以結構模擬的方法，我們將白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶、白點症病毒胸腺嘧啶激酶及白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶三者序列送予模擬的工具—“GENO3D”以期得到蛋白質的三級結構，但由於其他物種之胸腺嘧啶激酶及胸腺嘧啶磷酸激酶為兩個各自獨立之蛋白質，故無法在 PDB 中得到類似白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶的序列做為模板；而白點症病毒胸腺嘧啶激酶與其它物種序列的比對中，雖然與某些物種的胸腺嘧啶激酶具有較高的相似性，但與已解出結構的胸腺嘧啶激酶序列相似度卻極低[圖 3-1]，故在 GENO3D 中無法實現三級結構的模擬；至於白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶則找到具有大於 40% [圖 3-2, 3-3] 序列相似性且已解出三級結構之蛋白質 [圖 3-4A]，查詢這些序列發現皆為人類胸腺嘧啶磷酸激酶，而這結果表示白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶與人類胸腺嘧啶磷酸激酶三級結構可能具有的高度相似性。利用不同的模板模擬出多個白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶的三級結構後，接下來要進行更進一步的篩選。

軟體 PROCHECK 可用來分析關於主鏈與側鏈的旋轉角度是否合理，這兩個分析分別利用胺基酸主鏈與側鏈旋轉角度上的空間障礙所得到的合理角度分布圖，主鏈的分布圖稱為 Ramachandran 圖表，而側鏈則依據其角度名稱而稱為 chi1-chi2 圖表。利用這個軟體來分析各個模擬出的結構，發現每個模擬結構的主鏈都大約有 60% ~ 80% 處於良好的角度，而側鏈更是極少角度狀態不佳。因此選出主鏈角度 70% 以上良好的結果，再由 Verify\_3D 以及 Errat 執行第二次的篩選。

Verify\_3D 是利用一個以胺基酸在不同環境下依據表格定義每個胺基酸分數，環境一共有六種：(1)深埋、疏水(buried; hydrophobic)；(2)深埋、普

通極性(buried; moderately polar); (3)深埋、極性(buried; polar); (4)部份埋入、普通極性(partially buried; moderately polar); (5)部份埋入、極性(partially buried; polar); (6)暴露於溶劑中(exposed to solvent)。而每一種又可分為螺旋、平板、以及其它。而在統計 100 個蛋白質三級結構後，定義出若是有 80%的胺基酸得到的分數在 0.2 以上，便是一個良好的結構。而 Errta 則是利用蛋白質中六種原子與原子(CC, CN, CO, NN, NO, OO)間非共價鍵鍵結不隨機分布的特性來確認蛋白質結構的可靠性，一般而言分數在 90 以上算是良好的結構，而若是解析度高的蛋白質結構，分數更在 95 以上。因此我們在利用 Verify\_3D 以及 Errat 分析後，選出了以 PDB 編號 1NMZ(人類胸腺嘧啶磷酸激酶)為模板所得的模擬結構，其模擬計算出的能量(Models energy)為-8867.61kcal/mol、二級結構以及三級結構與模板相似[圖 3-3, 3-4B]、Ramachandran polts 有 77.9%位於最佳區域[圖 3-5]、chi1-chi2 plots 僅有 3 個殘基位於不佳的位置、Verify\_3D 測試分數大於 0.2 的比例為 91.62%[圖 3-7]、Errat 得分為 99.451[圖 3-8]，並命名為 TMK\_M，同時也標示出本篇討論到的幾個胺基酸間 C $\alpha$ 的距離[圖 3-9]。



```

VaricellaZoster_Virus -----MSTDKTDVKMGVL 13
equine_herpesvirus_4 -----MAACVPTGEAPRSASGTPTRRQVTIV 26
HSV_TYPE_I MASYPCHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQEQATEVRLEQKMPTLL 50
WSSV_TK -----MAGRVELVT 9
:

VaricellaZoster_Virus RIYLDGAYGIGKTTAAEEFLHHFAITPNRIILLIGEPLSYWRNLAGEDAIC 63
equine_herpesvirus_4 RIYLDGVYGIGKSTTG-RVMASAAASGGSPPLYFPEPMAYWRTLFTDVIS 75
HSV_TYPE_I RVYIDGPRGMGKTTTTQQLLVALGS--RDDIVYVPEPMTYQWVLGASETIA 98
WSSV_TK GPMFAG-----KSTYLK 21
: * :

VaricellaZoster_Virus GIYGTQTRRLNGDVSPEDAQRLLTAHFQSLFCSPHAIMHAKISALMDTSTS 113
equine_herpesvirus_4 GIYDTQNRKQOQNLAVDDAALITAHYQSRFTTPYLILHDHTCTLFGGNS- 124
HSV_TYPE_I NIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVM TSAQITMGMPYAVTDAVLAPHIGGEAG 148
WSSV_TK NIYQQENGGNK-----HCLFVKHSLETRYGCGTGTIVTHAGEVIEGCTT 65
.** : : : : : : : : : : : :

VaricellaZoster_Virus DLVQVNKEPYKIMLSDRHPIASTICFPLSRYLVGDMSPAALPGLLFTLPA 163
equine_herpesvirus_4 --LQRTQPDLLVFDHRHPVASTVCFPAARYLLGDMSMCALMAMVATLPR 172
HSV_TYPE_I --SSHAPPPALTLIFDRHPIAALLCYPARYLMGSMTPQAVLAFVALIPP 196
WSSV_TK -----VSSIKELISVLPEVVDVILIDEGQFFTDLVLRNLAD 102
: : : : : : * : : : : :

VaricellaZoster_Virus EPPGTNLVVCVSLPSHLSRVSKRARPGETVNLPFVMLRNVIIMLINTI 213
equine_herpesvirus_4 EPQGGNIVVTTLNVEEHIRRLRTRARIGEQIDITLIATLRNVYFMLVNTC 222
HSV_TYPE_I TLPGTNIVL GALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYGLLANTV 246
WSSV_TK K--GKRIVIAALDG-----TSDQQMFSPHKLPLYTNSIV 135
* : * : : : : : : : : :

VaricellaZoster_Virus IFLKTN-NWHAGWNTLSFCNDVFKQKLOKSECIKLREVPGIEDTLFAVLK 262
equine_herpesvirus_4 HFLRSGRVWRDVGWELPTSCGAYKHRATQMDAFQERVSPELGDTLFAFK 272
HSV_TYPE_I RYLQGGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPR---PHIGDTLFTLFR 293
WSSV_TK KLASKCMICKIDTKEAPFTVR-----FGNDN 161
: : : : : * :

VaricellaZoster_Virus LPELCGEFGNIIPLWAWGMETLSNCLRSMSPFVLSLEQTPQHAAQELKTL 312
equine_herpesvirus_4 TQELLDDRGVILEVHAWALDALMLKLRNLNVFSADLSGTPRQCAAVVESL 322
HSV_TYPE_I APELLAPNGDLYNVFAWALDVLAKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRDALLQL 343
WSSV_TK DNNVICVGG--AEMYAAACRDCYKKINKKKN----- 190
: : * : * : : :

VaricellaZoster_Virus LP-QMTPANMSSGAWNILKELVNAVQDNTS--- 341
equine_herpesvirus_4 LP-LMSSTLSDFDSASALERAARTFNAEMGV-- 352
HSV_TYPE_I TSGMVQTHVTTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN 376
WSSV_TK -----

```

圖 3-1 白點症病毒胸腺嘧啶激酶與已有 X 光結晶構形之胸腺嘧啶激酶序列比對，可發現白點症病毒胸腺嘧啶激酶與其他的胸腺嘧啶激酶相似度極低(來源物種依序為帶狀疱疹病毒、第四型疱疹病毒、第一型疱疹病毒、白點症病毒)

EMPLATE	E	FIRST	LAST	ID	ALIGNEMENT	COMMENT
pdble9dA-0	4e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble9eA-0	4e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble9cA-0	4e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble2fA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	THYMIDYLATE KINASE
pdble1nmxA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble2dA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble2eA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	THYMIDYLATE KINASE
pdble2qA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	THYMIDYLATE KINASE
pdble99A-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble9aA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble9bA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble1nmyA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble1nmzA-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble1nn0A-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble1nn1A-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble1nn3A-0	6e-51	1	196	42	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE
pdble98A-0	5e-50	1	197	42	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble2gA-0	7e-50	1	196	41	<a href="#">see alignment</a>	THYMIDYLATE KINASE
pdble9fA-0	1e-49	1	196	40	<a href="#">see alignment</a>	PHOSPHOTRANSFERASE
pdble1nn5A-0	1e-49	1	196	41	<a href="#">see alignment</a>	TRANSFERASE

圖 3-2 白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶與已有 X 光結晶構形之胸腺嘧啶磷酸激酶序列比對，可發現比對得到的結果都是人類胸腺嘧啶磷酸激酶或是單點突變的人類胸腺嘧啶磷酸激酶。

```

1NMZ      LEGVDRAGKSTQSRKLVEALCAAGHRAELLRFPERSTEIGKLLSSYLQKKSDVEDHSVHL
TMP_M     LEGDRCGKSTQAKLLLTNKNSPLYGGEYMCFPDRSSHTGKLINDYLTKKIELDDHAAHL
          *** ** ***** *                *   ** **   ***   ** **   ** **
          *

1NMZ      LFSANRWEQVPLIKEKLSQGVTLVVDRYAFSGVAFTGAKENFSLDWCKQPDVGLPKPDLV
TMK_M     LFSANRWEVCSKIKQLDDGIHVMDRYYSGIVFSLARGVDTVEWCSASDEGLPQPDLV
          *****   ** * * * * ** * * * *   * * * *   * * * *   * * * *
          *

1NMZ      LFLQLQLADAAKRGAFGHERYENGAFQERALRCFHQLM-KDTTLNWKMVDASKSIEAVHE
TMK_M     LLMLLDVEKCSNRDTFGVERFETNSIQERARALFLDLANKDEKNVWIKVDARGTIEEVQT
          *   *           * * * * *   ****   * * * *   *   * * *   * * * *
          *

1NMZ      DIRVLSEDAI
TMK_M     KIINIVYNIV
          *

```



圖 3-3 人類 TMK 與蝦白點症病毒序列比對：相似度達 42%：紅色表示  $\alpha$ -helix，藍色表示  $\beta$ -sheet

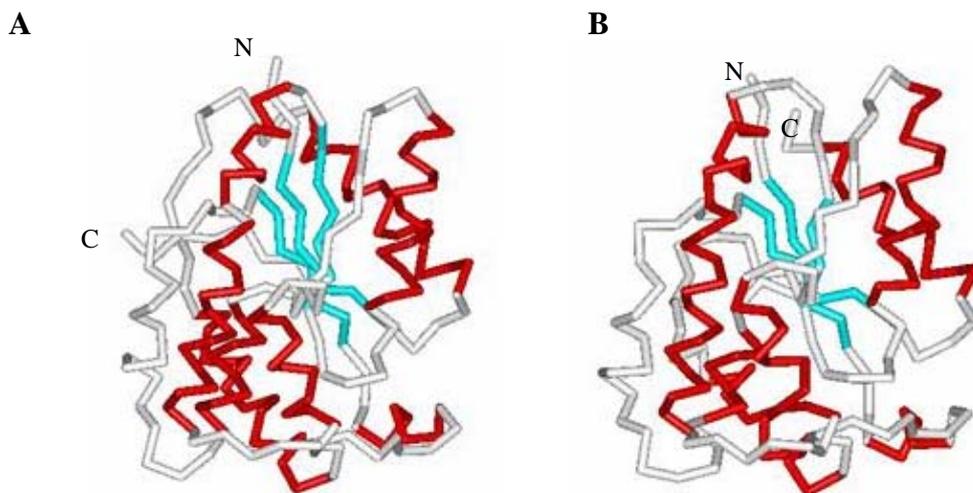
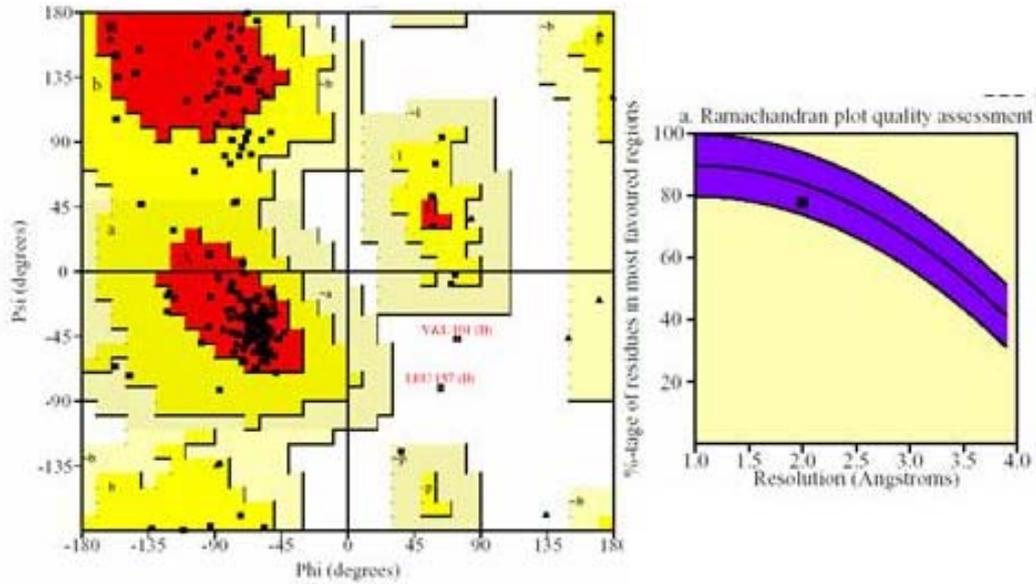


圖 3-4 左圖為 PDB 編號 1NMZ 人類胸腺嘧啶磷酸激酶立體結構；右圖為模擬出的白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶；其中紅色為  $\alpha$ -helix，藍色為  $\beta$ -sheet

A



B

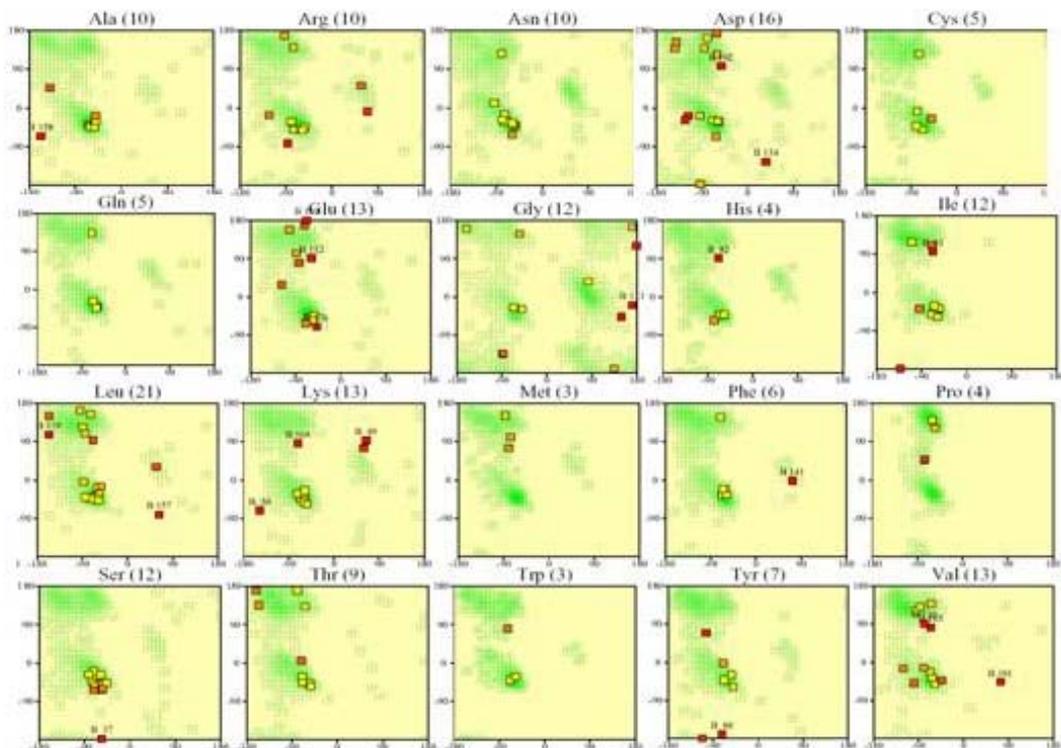


圖 3-5 A 左圖為 TMP\_M 所有胺基酸 ramachandran plots 圖，縱軸為 Psi，橫軸為 Phi；A 右圖為 ramachandran plots 一般比例範圍；B 為個別胺基酸的 ramachandran plots 圖。77.9%位於最佳的區域(紅色)；20.9%位於次要允許區域(黃色及淡褐黃色)；1.2%為不允許區域。

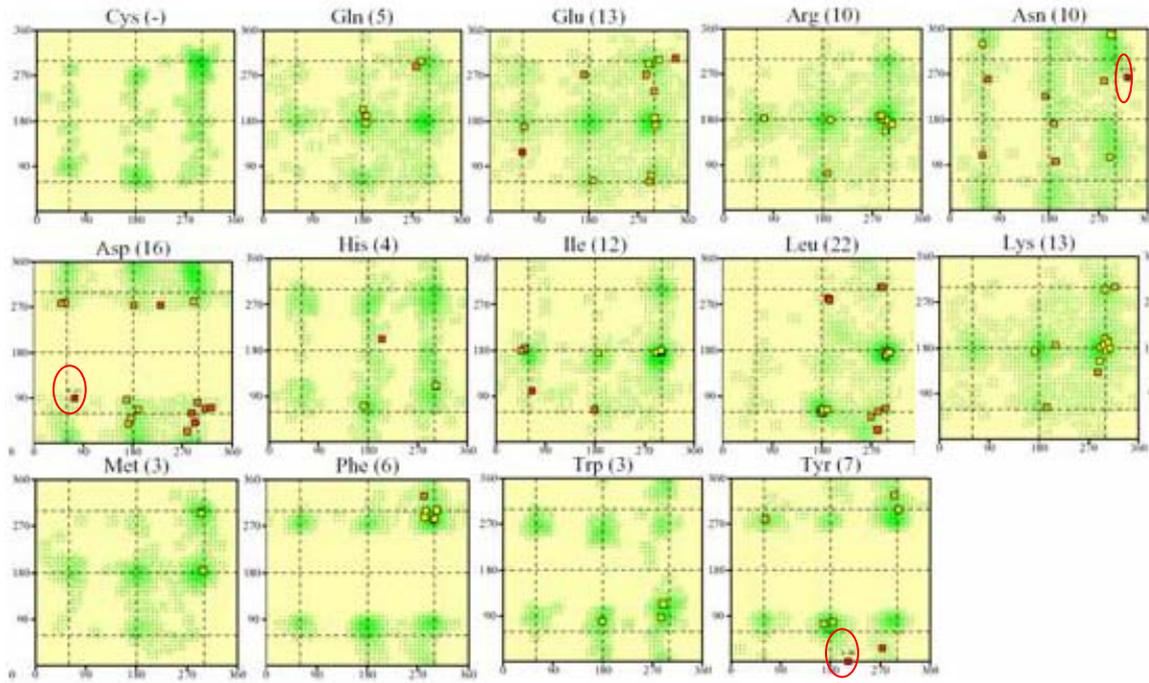


圖 3-6 TMP\_M 胺基酸 chi1-chi2 plots 圖，縱軸為 chi1，橫軸為 chi2。圖中有紅圈標記的點為不佳的組態

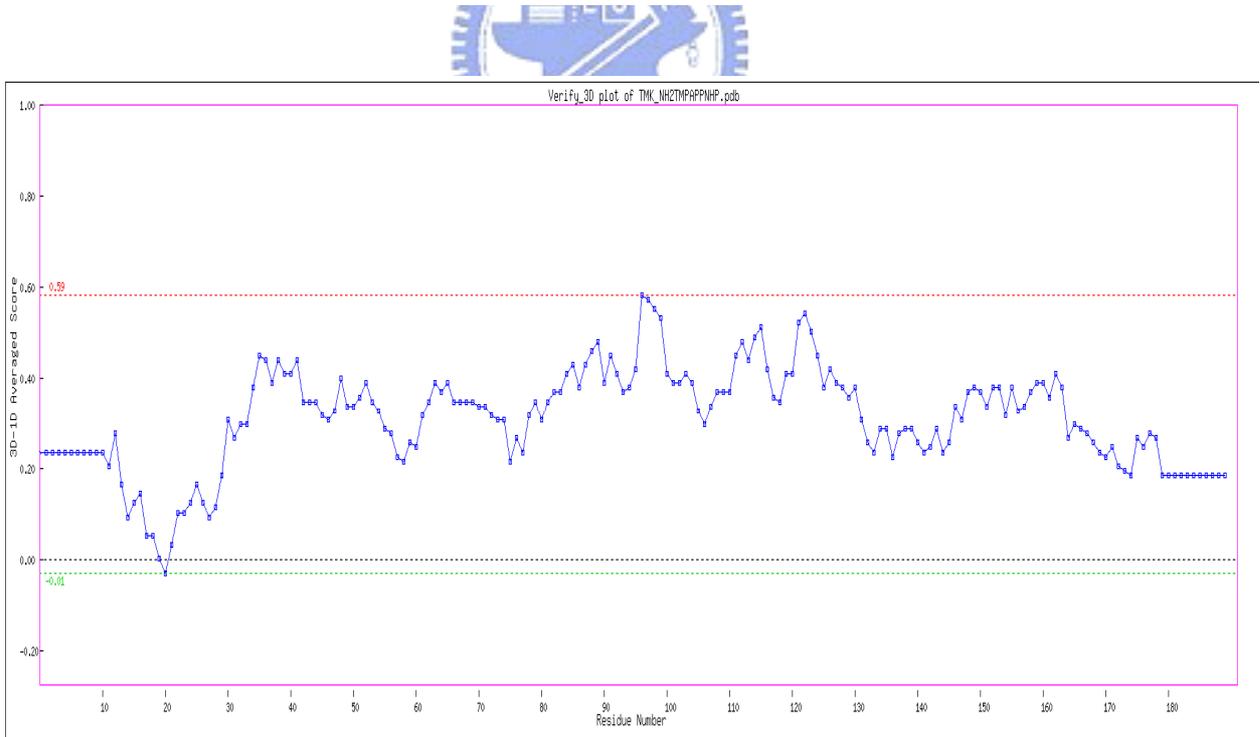


圖 3-7 Verify\_3D 軟體分析出 91.62% 的胺基酸具有大於經統計結果 0.2 的分數

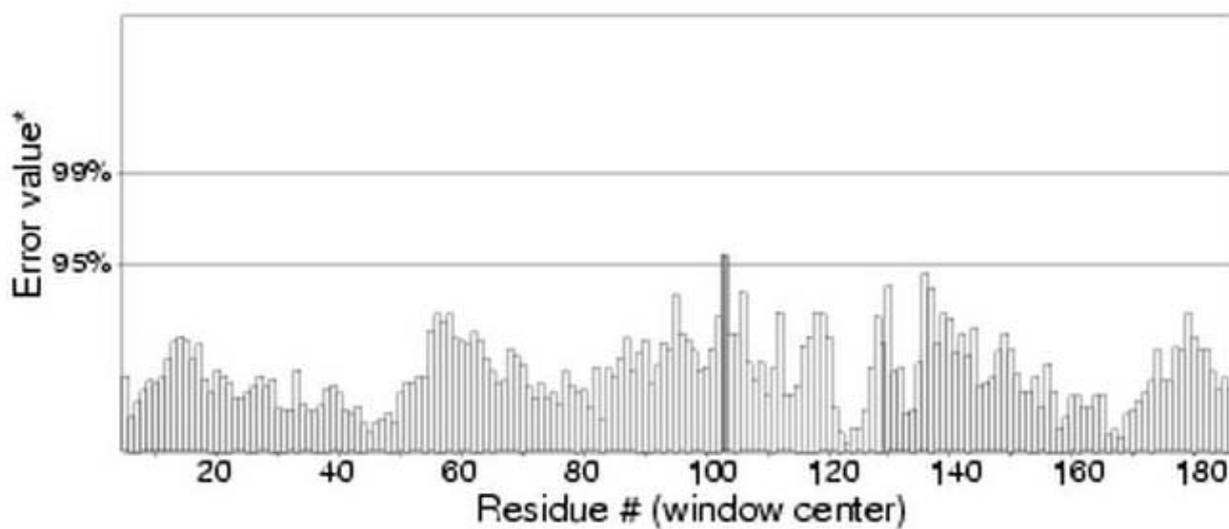


圖 3-8 Errat 分析出 TMK\_M 分數為 99.541；一般解析度高的結構分數在 95 以上

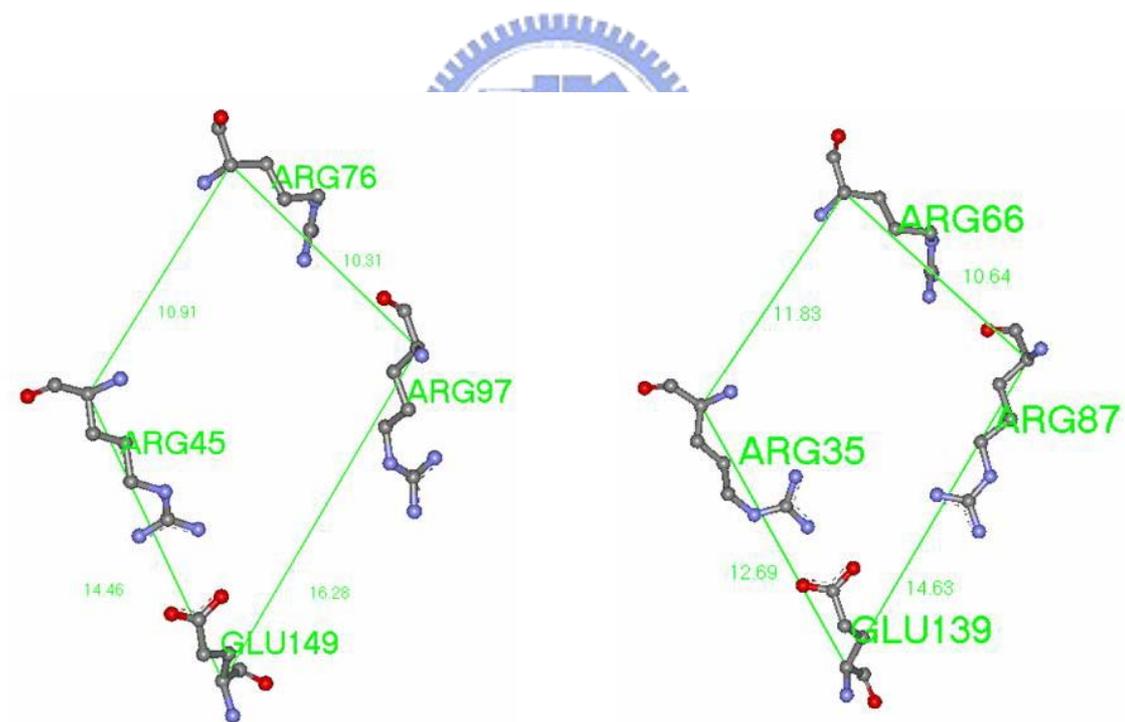


圖 3-9 上圖表示此篇討論到的幾個胺基酸 C $\alpha$ 間的距離。左圖為 PDB 編號 1NMZ 人類胸腺嘧啶磷酸激酶；右圖為模擬出的白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶

### 3-1-2 TMK\_M 入塢作用測試及設定

得到了模擬出的結構 TMK\_M 後，便要進行入塢作用測試，除了藉此設定出一組適合的參數外，也可證明用 TMK\_M 進行入塢作用是可行的。首先以同源模擬的模板 PDB 編號 1NMZ 人類胸腺嘧啶磷酸激酶以及其解結構的受質 NH<sub>2</sub>TMP 做入塢的測試，因為 Arg97 在 TMK 中扮演著與 TMP 與 ATP 產生作用力的角色，可以說是在整個活性區的中心，因此在設定上以 Arg97 為中心，半徑 18 Å 的範圍為入塢作用區域並將 GOLD 參數“作業次數 (number of operations)”調整至 150000。結果得到 0.9008 Å 如此極低的受質均方根差 (Root Mean Square Differences; RMSD) [圖 3-10]，代表作用區域以及參數設定的可靠性。因此我們除了將精胺酸 97 改成 TMK\_M 上相對應的胺基酸—精胺酸 87 之外，便利用同樣的參數進行 TMK\_M 對於 NH<sub>2</sub>TMP 的入塢作用測試，可發現所得到的結果都位於根據 1NMZ 所推想 TMK\_M 的活性區域，並且配位基幾乎坐落在同一個位置，近乎重疊[圖 3-11]，是一個極為收斂的結果。因此之後便利用這樣的參數設定進行資料庫二次篩選。而第一次的篩選便利用系統內定的參數。

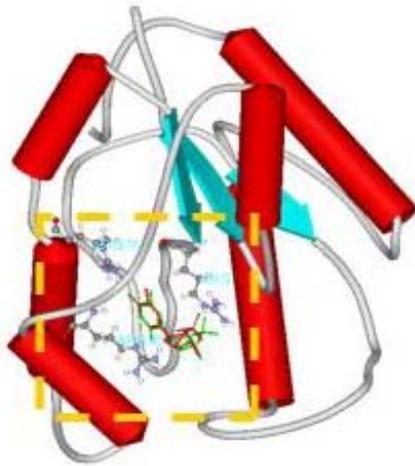
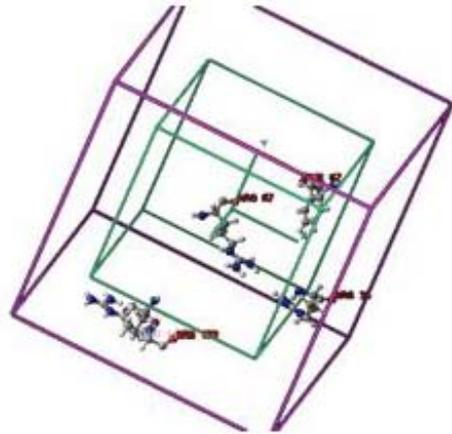
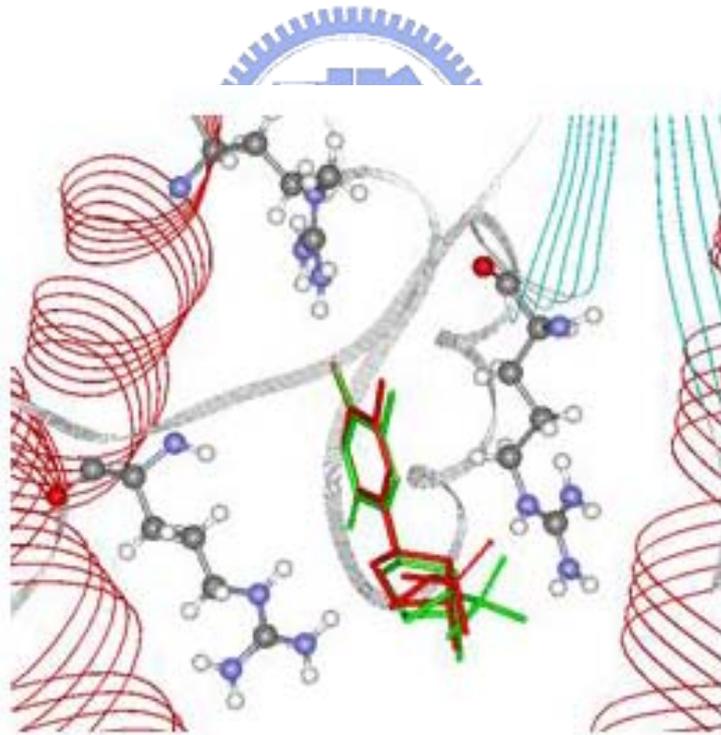
**A****B****C**

圖 3-10 1NMZ 入塢作用設定圖，受體為 NH<sub>2</sub>TMP。A 為活性區(進行入塢作用區域)在 1NMZ 中的位置；B 為入塢作用區域設定的放大圖(半徑 18 Å)；C 為入塢測試結果圖，均方根差為 0.9008Å。

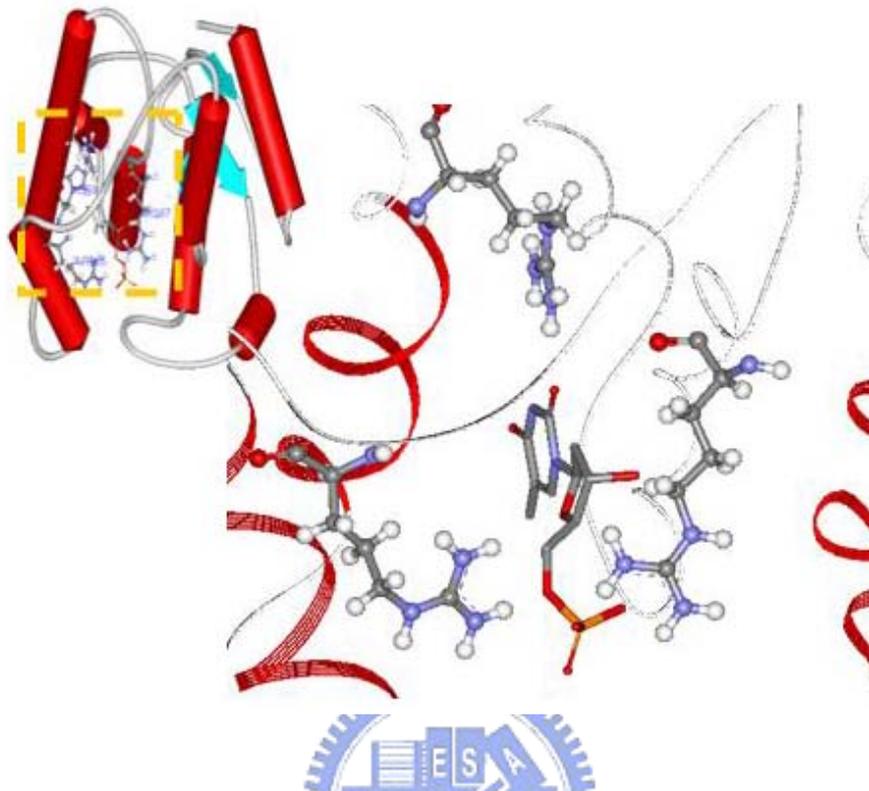


圖 3-11 TMK\_M 入塢作用測試圖，受質為 NH<sub>2</sub>TMP；這是一個收斂的結果

## 3-2 資料庫的搜尋及分析：

### 3-2-1 MDDR 與 CMC 的篩選

首先我們執行 GOLD，利用 TMK\_M 搜尋 MDDR 資料庫，第一次的篩選從十四萬個化合物中選出了 1000 個化合物，再將這 1000 個化合物進行第二次的篩選，選出前五十名最適合的化合物。觀察這些結果，發現這些化合物都具有環形結構，不論是五圓環或是六圓環，而將這五十個化合物放入與 TMK\_M 入塢作用後的空間位置，可以發現主要包含有下列一個或多個現象：(1)化合物的一部份以平面平行於 Phe62[圖 3-12A]；(2)繞過 Arg87 形成 U 形的形式[圖 3-12B]。

相對於 TMK\_M 上的 Phe62，在人類胸腺嘧啶磷酸激酶上為 Phe72，這個胺基酸在相關於胸腺嘧啶磷酸激酶的文獻中幾乎沒有被提到，但從我們得到的結果可發現這一個胺基酸限制了受質的構形，另一方面，觀察這一類具有結晶的蛋白質後可發現受質的六圓環結構都是平行於這一個胺基酸。也許因為如此，在設計胸腺核昔單磷酸的類似物(analog)都是以六圓環為基礎，而且除了主軸之外，只能在其上加入一些小的側基。此外在我們得到的結果中，平行於 Phe62 的化合物，或許有些許的錯開，但都以其中的五圓環或六圓環與 Phe62 平行，而有一些雖然也具有五圓環或六圓環，但不與 Phe62 平行，反而幾乎都於 Phe62 上方通過而且這部份也都互相平行，猜測可能是因為 TMK\_M 中這兩個位置都具有較狹窄的空間結構，使得化合物必須具圓環或是其他極平面的構形才能較易穩定於 TMK\_M 之中。根據每個化合物的結構資料來推想造成這兩者之間的差異性，推測是因為化合物結構角度上的自由度造成的，自由度高的在入塢作用進行時便易進入 Phe62 旁的孔洞，反之則會於 Phe62 上方通過[圖 3-13]。

人類胸腺嘧啶磷酸激酶中的 Arg97 扮演了藉著與受質磷酸根上的氧形成氫鍵固定住受質，而 TMK\_M 上相對於這個胺基酸的便是 Arg87。觀察我們得到的結果，因為 Arg87 在活性中心的突出，使得較長的化合物勢必要繞過，而下方為 LID 區域故又轉而向上，而形成了 U 形的結構，細看這些化合物，不一定會與 Arg87 產生氫鍵。推測是因為化合物與蛋白質間產生的凡得瓦爾力足以使其較為穩定。根據這樣的結果，推測一個適合於 TMK\_M 的化合物，除了要有近似於平面的結構，使得能夠深入活性區域外，化合物的另一部份也需要具備帶有負電的原子(氧、氮或硫)以便與 Arg87 或是 P-loop 產生氫鍵[圖 3-14A, B]。從前人的研究可知道 P-loop 以及相對於 TMK\_M Arg87 的胺基酸是 TMK 具有催化能力的重要關鍵之一，他們都容易與受質產生鍵結(ATP 或 TMP)，據此我們認為所篩出的化合物大多靠近 P-loop 而遠離 LID 是合理的。此外，若是化合物的長度足夠且具有上述特性，便會使得結果與 PDB 胸腺嘧啶磷酸激酶的結晶的結果完全相仿[圖 3-15]。在我們得到的結果中，通常化合物的分子量約在 300 到 800 之間，推測可能較大的化合物雖然與蛋白質核心會有更多接觸的可能性，但是產生不穩定的可能性也相對增加，而小的化合物則相反，因為太小而產生的

穩定力量太少。

綜合前面的敘述及觀察，我們認為一個可能適合與 TMK\_M 進行入塢作用的化合物需具備下述幾種特性：

1. 前端主構形為平面，不論六圓環或是五圓環可以包含小型的側基，如此會較易形成與 Phe62 平行的狀態。
2. 由前端圓環接出的主軸部分需有一定的角度變動性。
3. 末端帶有負電，以利產生氫鍵。
4. 若為較大型的化合物(如圖 3-15)，則為中間部分帶有負電。

有些作者會先加上一些限制以控制篩選出化合物的大小及其構形後，才進行入塢作用的試驗。下面的條件即以搜尋可與胸腺嘧啶激酶作用的化合物為例：

1. 定義一個類似胸腺嘧啶的六圓環為主結構
2. 定義一個化合物大小的範圍：定義上限，以確保所選出的化合物可以完全位於活性區；定義下限，以確保可在活性區占有一定的空間位置。

這樣的定義通常有助於更快速的篩選，因為和入塢作用相較下程式運行的時間少了很多，但這樣的方式也容易錯失掉一些有可能的化合物，所以這個方法也許比較適合進行相似物的篩選。

在作用於蛋白質的藥物設計上通常有兩種：一種是設計出相似物 (analog)，而另一種便是利用可能作用於蛋白質活性中心各個位置的化合物，其後再將之連結產生一新的、大型的化合物。如先前所述，本試驗並非在找尋相似物，而是著重在可能對 TMK\_M 有抑制作用的化合物，因此嘗試了在 TMK\_M 對三磷酸腺苷的入塢作用測試，希望能藉由兩個區域的結果，討論分析兩組結果是否有可能的相互連結以推測出一個較大型的可能抑制劑，但發現也許是因為三磷酸腺苷理論上的鍵結區域空間開放的關係，並不容易取得較好且穩定的結果，所以這一部份便沒有做資料庫的篩選。

在篩選完 MDDR 資料庫後，發現幾乎所有的化合物不是還處於實驗室階段，便是在醫療測試階段。因此另外選擇了都是已上市藥物的 CMC 資料庫來做篩選，最後結果與篩選 MDDR 的結果相仿[圖 3-12C, D]。

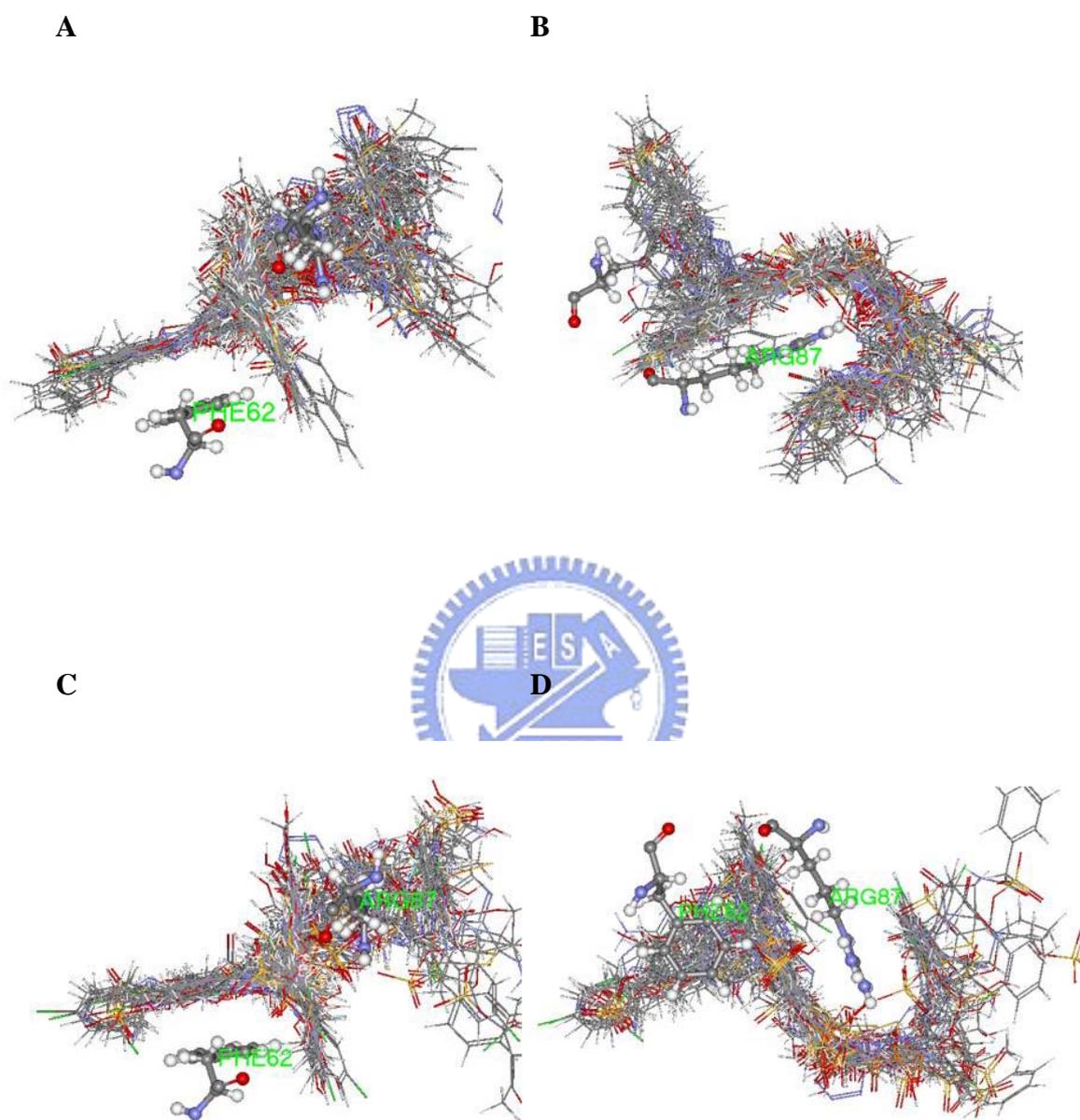


圖 3-12 TMK\_M 與 MDDR(A, B)以及 CMC(C, D)進行入塢作用得到的結果，  
A, C 為化合物與 Phe62 產生平行的關係圖；B, D 為化合物繞過 Arg87 的示意圖。

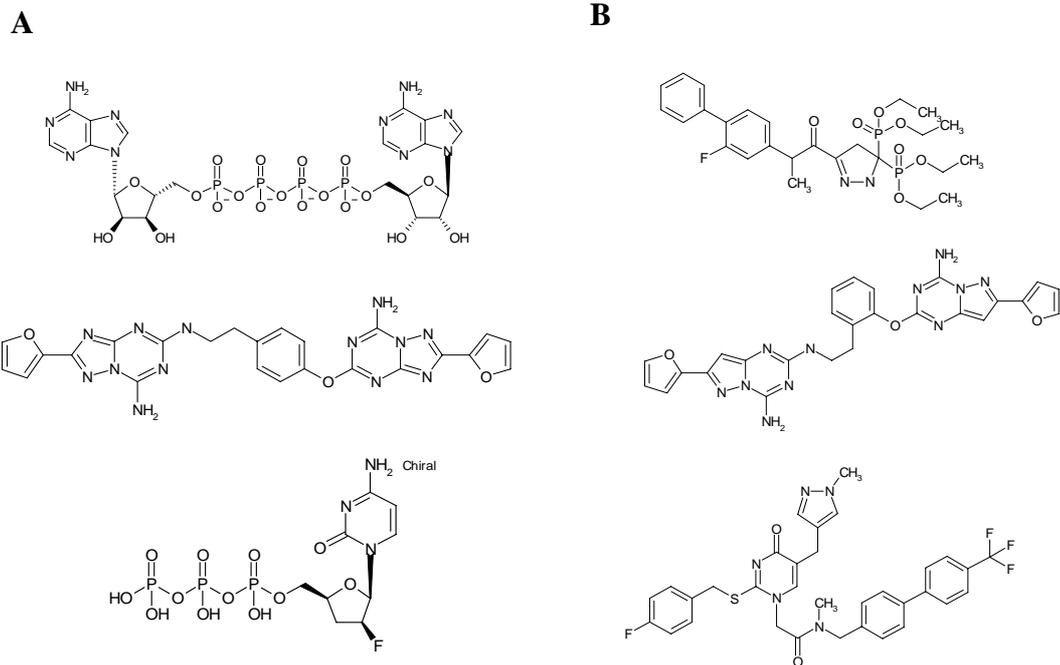


圖 3-13 MDDR 資料庫部分的篩選結果。A 表示可與 Phe62 形成部份平行的化合物；B 為無法與 Phe62 形成平行狀態。

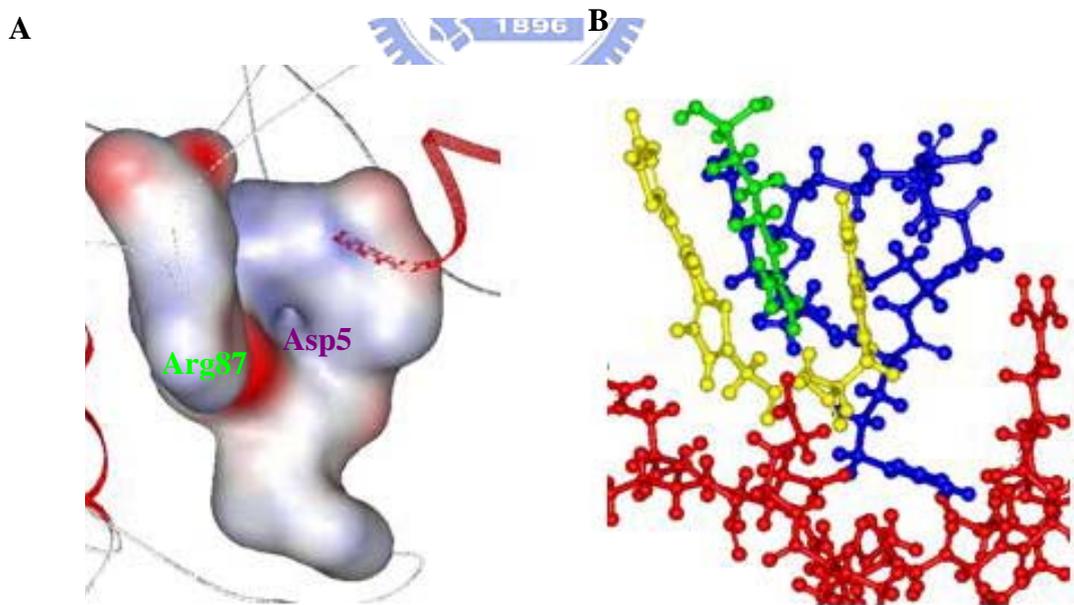
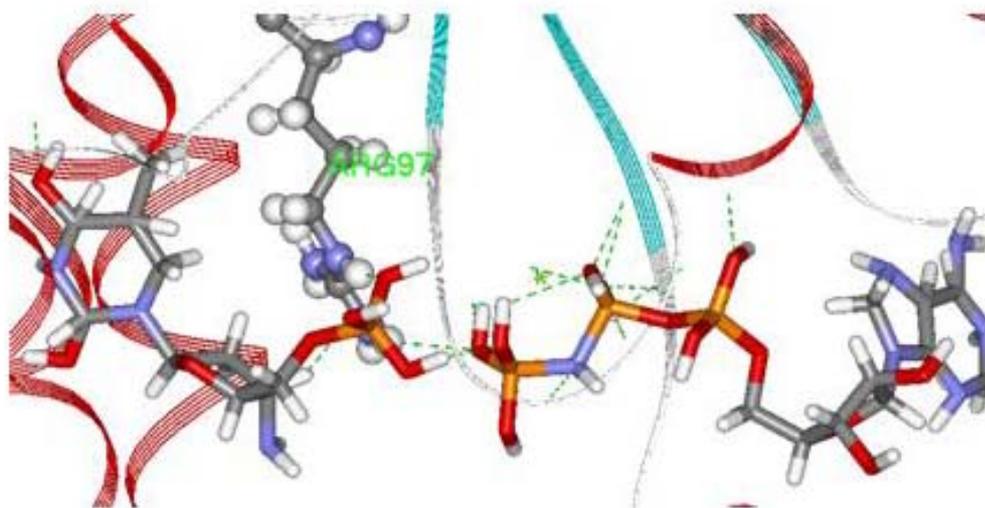


圖 3-14 圖 A 為 Arg87(前方)與 P-loop(後方)的表面圖。藍色為帶正電區，紅色為帶負電區。因為 Arg87 與 Asp5 的帶電性而容易與帶有負電性的原子產生氫鍵。圖 B 為 Arg98(綠色)、P-loop(藍色)、以及 LID(紅色)位置關係圖，黃色為 MDDR 篩選結果之一。

A



B

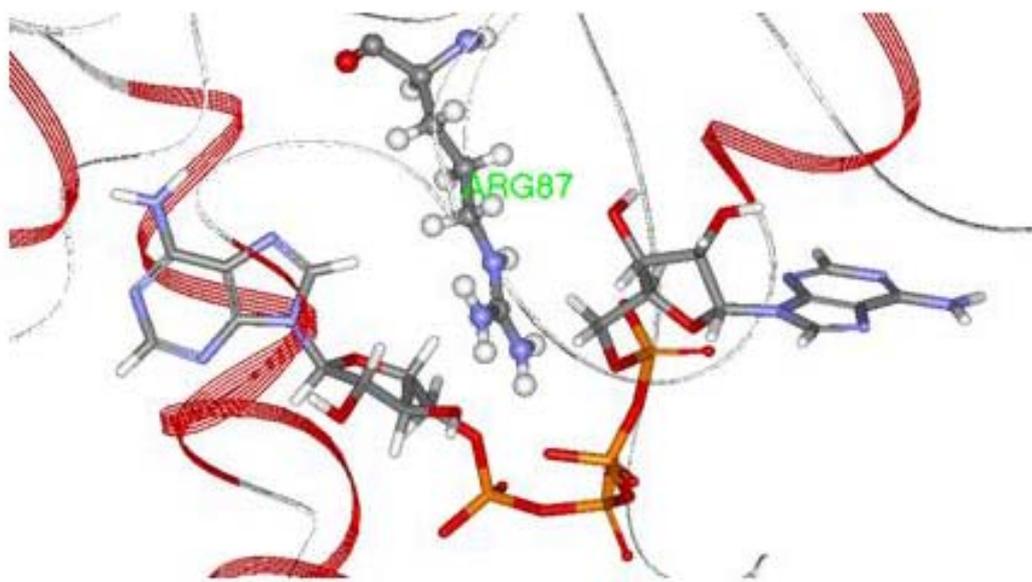


圖 3-15 A 為 PDB 1NMZ 受質與 Arg97 位置關係圖；B 為 TMK\_M 與化合物經 docking 後的示意圖。

### 3-3 蛋白質表現及純化

為了與模擬的結果做實質上的實驗測試，我們將整段白斑病毒 *tktmk* 基因的 5' 及 3' 端序列設計限制酵素 *EcoR* I 與 *Hind* III 可辨識之位置，以分生選殖方式用限制酵素切下整段基因轉殖入表現載體 pMAL-c2 中並放入大腸桿菌 BL21(DE3)RIL 菌株當作寄主，藉由其系統表現。

#### 3-3-1 聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)與基因轉殖

將白斑病毒基因組利用設計好的引子進行 PCR，得到了單一片段的 *tktmk* 後[圖 13-5A]，再將其利用設計好的限制酵素辨識位置進行基因轉殖，將 *tktmk* 轉殖入 pMAL-c2[圖 13-5B]，其後再經由 DNA 定序，確認得到正確的序列。

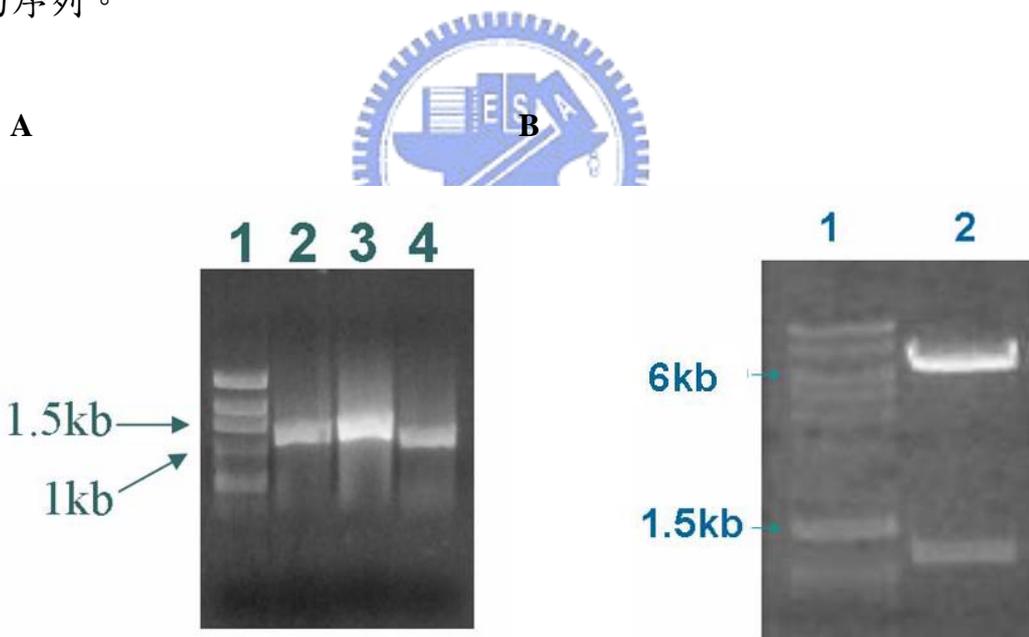


圖 3-16 A 為 *tktmk* 經 PCR 後的電泳圖，1 為 DNA 標誌物，2、3、4 皆為 *tktmk*，1167 bp；B 為 *tktmk* 轉殖入 pMAL-c2 後以 *EcoR*I 和 *Hind* III 將兩者分離後的電泳圖，pMAL-c2 約 6.7 kb。

### 3-3-2 蛋白質表現與活性測試

因為 *tktmk* 為病毒基因，所以具有許多少數密碼(rare codon)，因此利用 BL21(DE3)RIL 做為寄主。在進行表現的條件上，於 OD<sub>600</sub> 約 0.5 左右時加入 IPTG，於 37 °C 表現 4 小時後進行蛋白質的萃取及純化。因為表現載體 pMAL-c2 在轉殖入的 *tktmk* 前具有一段 *malE*，會表現出約 42 kDa 大小的麥芽糖結合蛋白(Maltose-Binding protein，簡稱 MBP)，而白點症病毒 TKTMK 大小約為 43 kDa，故表現出來的蛋白質大小約為 85 kDa。經親合性(Amylose Resin)與離子性(Q Sepharose)管柱層析後，可得較純的蛋白質[圖 3-16]。純化出的蛋白質經由 LC/MS/MS 分析，確認為白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶 [圖 3-17]。

其後利用高效能液相層析儀(HPLC)進行蛋白質活性測試，但並沒有得到可信的數據；也嘗試利用其他表現系統進行表現，但尚未表現出蛋白質。

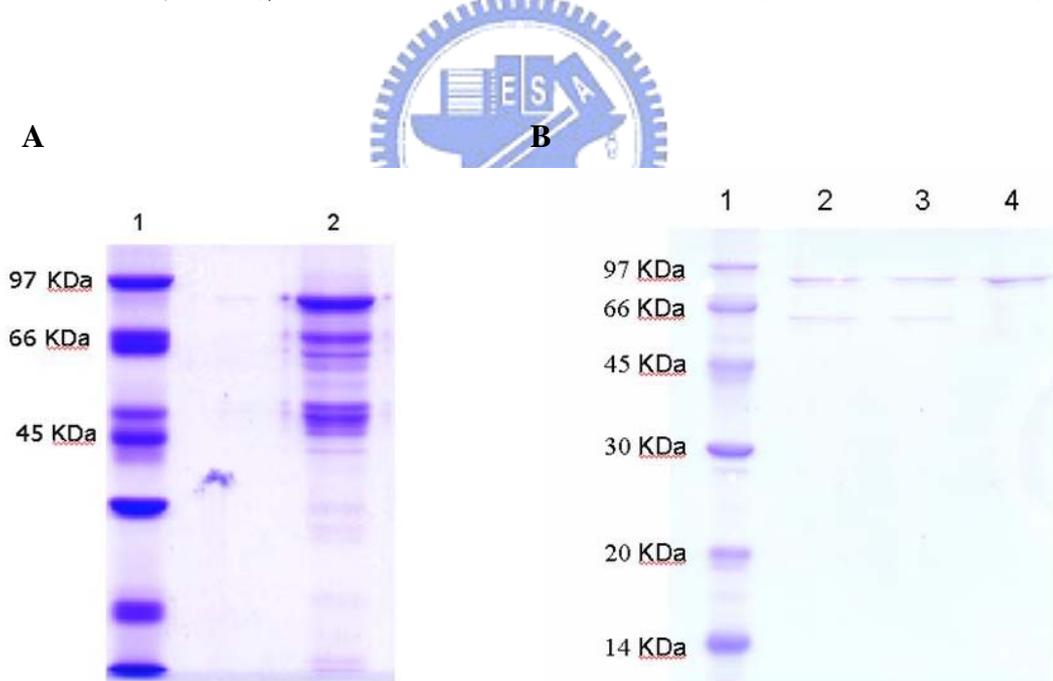


圖 3-17 A 為經 Amylose Resin 純化後的電泳圖，其中 1 為蛋白質標誌物，2 為純化後的蛋白質；B 為 A 之產物(Lane 2)再經 Q Sepharose 進行更進一步的純化，1 為蛋白質標誌物，2、3、4 皆為純化後的蛋白質，在 NaCl 0.4M (Lane 4)時可得較純蛋白質。

2.	<a href="#">gil11875610</a>	Mass: 43228	Score: 316	Peptides matched: 9						
thymidine kinase [Shrimp white spot syndrome virus]										
<input type="checkbox"/> Check to include this hit in error tolerant search										
	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">8</a>	490.25	978.48	978.54	-0.06	0	37	3.6	1	LINDYLK
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">9</a>	490.25	978.49	978.54	-0.05	0	(21)	1.6e+02	1	LINDYLK
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">15</a>	502.77	1003.52	1003.57	-0.05	0	50	0.23	1	ALFLDLANK
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">33</a>	624.81	1247.60	1247.66	-0.06	0	62	0.017	1	VELVIGPMFAGK
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">40</a>	459.57	1375.68	1375.73	-0.06	1	46	0.65	1	ALFLDLANKDEK
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">42</a>	719.85	1437.68	1437.73	-0.05	0	57	0.046	1	YYSGIWFSLAR
	<a href="#">47</a>	504.24	1509.70	1509.76	-0.06	0	27	50	3	QLLDGIHWMDR
	<a href="#">55</a>	488.25	1948.96	1949.01	-0.05	1	24	92	2	KIELDDHAHLFSANR
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">60</a>	724.36	2170.06	2170.11	-0.05	0	32	17	1	IVIAALDGTSDQMFSPHF

圖 3-18 LC/MS/MS 分析結果。結果顯示表現出的蛋白質序列與白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶的序列相同。