



NDV磷蛋白潜在功能性磷酸化位点定位及其功能研究

汇报人：汪军卿

小组成员：汪军卿 曲昱蓉
曹晓丹 韩月

上海兽医研究所 2012.06.10



汪军卿：总体设计，结果分析，
PPT制作，汇报



曲昱蓉：资料整理，基因序列分析等



曹晓丹：氨基酸序列磷酸化位点测定，
PPT修改等



韩月：La Sota株P蛋白潜在磷酸化位点
分析及结果分析

汇报内容

研究背景

研究目的及意义

技术路线

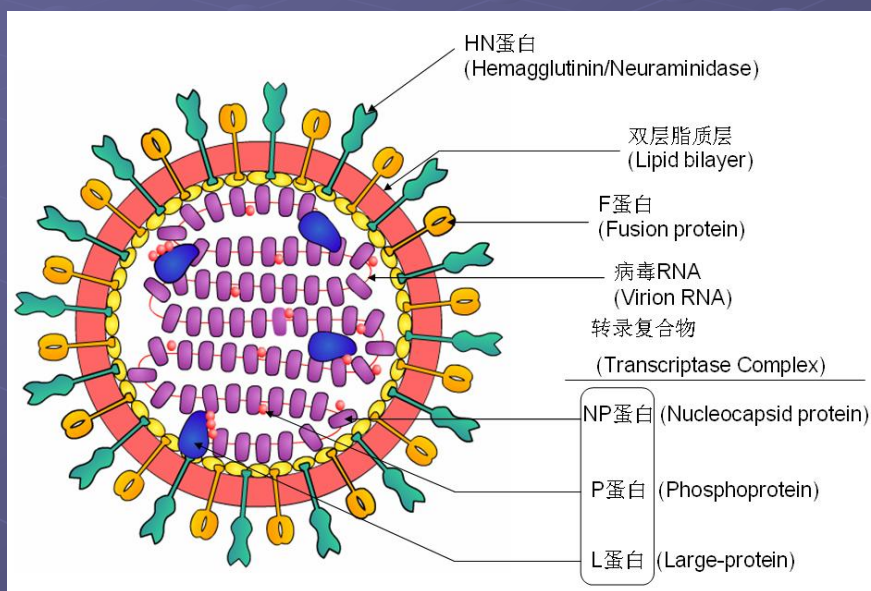
实验进展及结果

参考文献

致谢

研究背景

新城疫（Newcastle Disease, ND）是由新城疫病毒（Newcastle disease virus, NDV）引起的对世界养禽业危害极为严重的一种传染病。新城疫病毒是副黏病毒科（Paramyxoviridae）、禽腮腺炎病毒属（Avulavirus）的唯一成员。



P蛋白是P基因编码的三种蛋白产物中唯一参与病毒复制的病毒蛋白，也是RNA聚合酶的成份之一

图1、NDV病毒粒子及基因组形态结构示意图
(引自Alexander et al., 1999)

研究背景

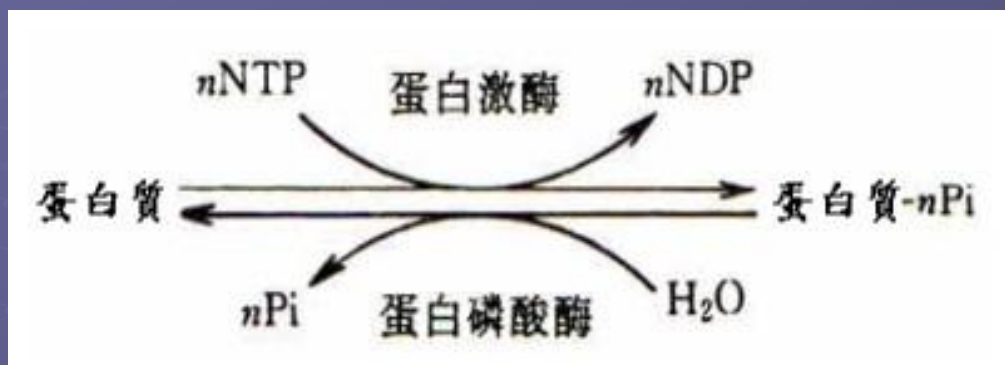


图3 可逆磷酸化过程

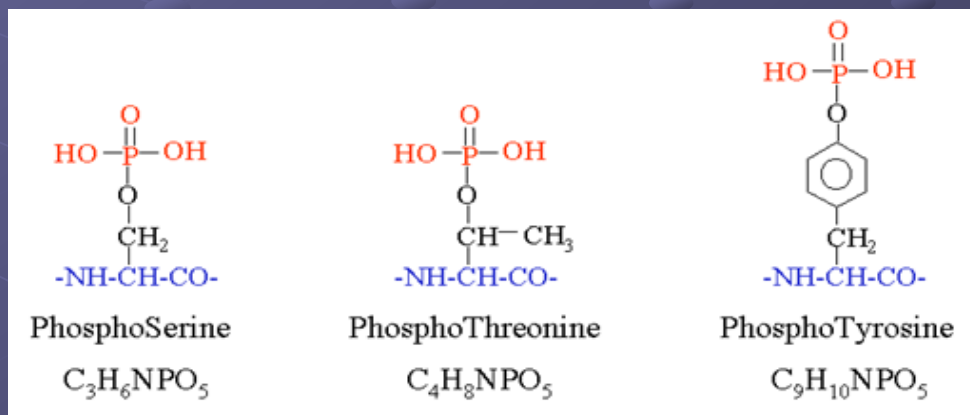


图4 丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸的磷酸化形式

研究背景

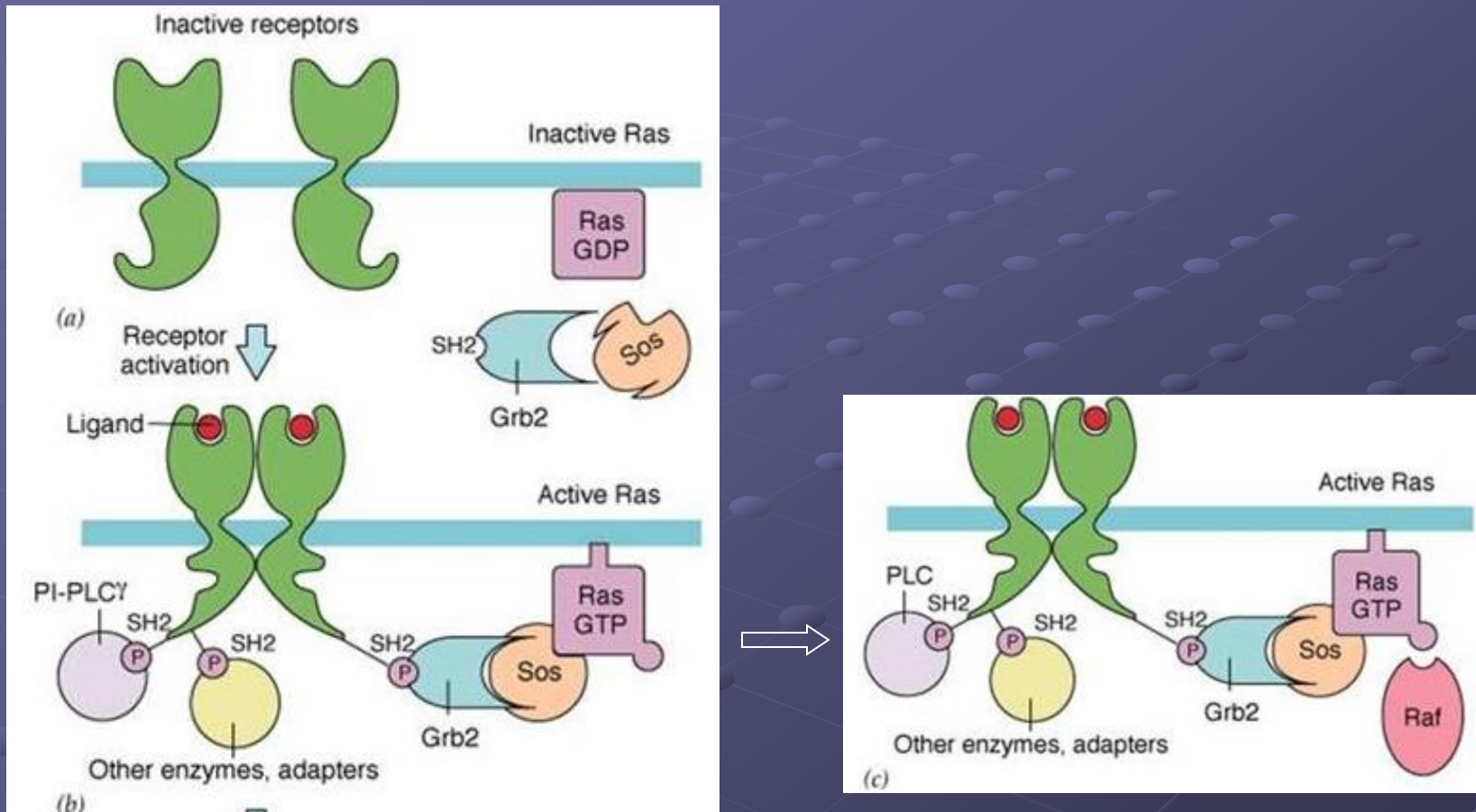


图5 Ras蛋白磷酸化引起的信号转导（引自John Wiley et al., 1999）

研究目的及意义

通过生物信息分析结合特异蛋白激酶抑制剂等实验，来筛选出其中重要的功能性位点，并综合分析磷酸化对病毒复制和转录过程的影响。

研究NDV在宿主细胞内的增殖调控和致病机理有重要的理论意义。

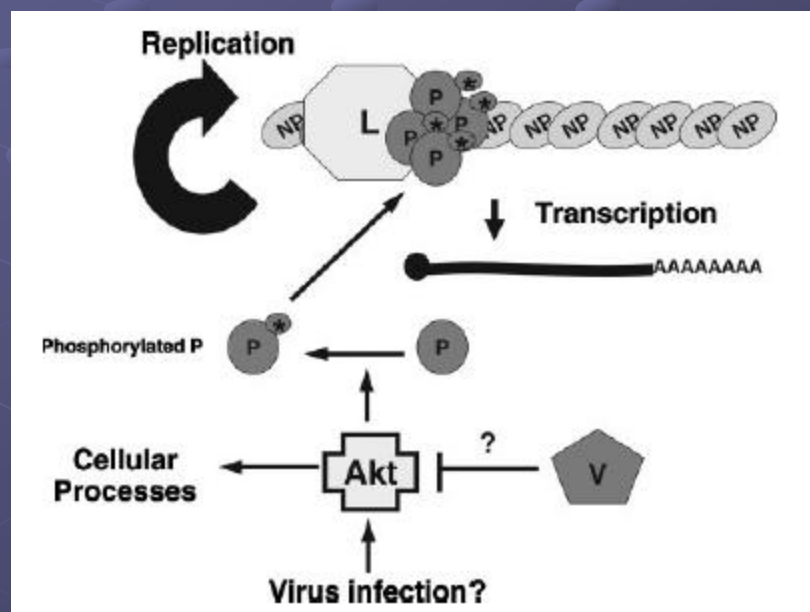


图6 副黏病毒P蛋白磷酸化水平对病毒基因组RNA合成的影响（引自 Sun M et al., 2008）

技术路线

获取28株NDV毒株的P基因序列



翻译成蛋白氨基酸序列



依据蛋白氨基酸序列寻找磷酸化位点



蛋白序列比对
获得保守位点



以La Sota毒株蛋白序列寻找潜在的磷酸化位点



获得潜在的功能性磷酸位点

注：仅包括生物信息学部分。

实验进展及结果

1、NDV不同毒株序列分析

表1 文章中采用的基因组全长序列的EMBL/GenBank登录号

基因型 Genotype	毒株名称 Virus Strain	全基因组序列登录号 Accession number
II-I	NDV isolate 01-1108	AY935489
II-I	NDV isolate 99-0655	AY935494
II-I	NDV strain PHY-LMV42	DQ097394
II-II	NDV AQI-ND026	DQ060053
II-II	NDV isolate I-2	AY935499
II-I	NDV isolate chicken/N. Ireland/Ulster/67	AY562991
II-II	NDV strain HB92 isolate V4	AY225110
II-II	NDV strain B1 isolate Takaaki	AF375823
II-II	NDV strain LaSota	AF077761
II-II	NDV cDNA to complete genomic RNA, clone 30	Y18898
II-II	NDV strain mallard/US(MN)/99-376/1999	GQ288389
II-III	NDV strain Mukteswar	EF201805
II-III	NDV HM	HM063425
II-IV	NDV strain Herts/33	AY741404
II-V	NDV isolate anhinga/U.S.(Fl)/44083/93	AY562986
II-V	NDV isolate mixed species/U.S./Largo/71	AY562990
II-VI	Pigeon paramyxovirus-1 strain AV324/96	GQ429292
II-VI	NDV isolate chicken/U.S.(CA)/1083(Fontana)/72	AY562988
II-VI	NDV isolate dove/Italy/2736/00	AY562989
II-VIII	NDV strain AF2240	AF284647

实验进展及结果

2、新城疫病毒P蛋白中保守性氨基酸位点分析 (DNASar 7.0 版软件包, MEGA version 5)

MATFTDAEIDDLFETSGTVIDSIIITAQGKPAETVGRSAIPQGKTKALSAAWEKHGSIQPPASQDTPDRQDRSDKQPSTPEQATPHNSPPATSTDQPPTQA	Majorit
.....E.....V.....S.....L.....S.ND.....	01-1108
.....E.....V.....S.....L.....S.ND.....	99-0655
.....E.....N.....V.....V.S.....N.E.....L.....V.S..D.....	PHY-LMV42
.....E.....N.....H.....D.....A.....	AQI-ND026
.....E.....V.....T.....R.....S.....S.....P.PL.....S.ND.L.....N	I-2
.....E.....V.....V.S.....L.....V.....D.....	CN/Ulster/67
.....E.....N.....V.....N.....T.....D.....A.....	HB92 /V4
.....E.....N.....V.....N.....T.....D.....A.....	B1 /Takaaki
.....E.....N.....V.....N.....T.....D.....A.....	LaSota
.....E.....GN.....V.....N.....T.....D.....A.....	clone 30
.....E.....V.....N.S.....N.Q.....HVI..DGQ.T.A.S.....	US(MN)/99-376/1999
.....N.V.....T.....G.....M.....P.....T.....	Mukteswar
.....N.V.....T.....G.....M.....P.....T.....	HM
.....I.....S.....NL.Q.....	Herts/33
.....IL.I.....V.....S.....L.K.A.....P.TT.....DT.S.R.....Q.GP.....K.I.....P.EPLLS.....	U.S.(F)/44083/93
.....IL.....S.....S.....T.....S.....Q.G.....K.S.....V.P.EP.....	U.S./Largo/71
.....E.I.....A.....S.....K.....T.R.....E.....S.G.S.Q.....P.L.....G.TA.KEPL.....	AV324/96
.....IL.....S.....T.R.....S.G.S.Q.....NS.....IEPL.....	U.S.(CA)/1083(Fontana)/72
.....E.I.....A.RS.....G.....M.....S.G.SSQ.KP.....S.....D.LTAPKEPL.....	dove/Italy/2736/00
.....I.....S.....I.....ST.N.Q.....P.L.....S.....AEPL.....	AF2240
.....I.....A.....T.....V.H.A.....KTE.....S.....N.T.....EP.....	NA-1
.....I.....D.S.....E.....T.....V.H.A.Q.....TE.....V.L.N.I.....GP.....	ZJ1
.....I.....S.....T.....V.HTN.A.Q.....TE.....N.I.....EP.....	CN/Guangxi7/2002
.....H.....I.....S.....T.....V.HTN.A.Q.....TE.....N.I.....EP.....	CN/Guangxi9/2003
.....N.G.....S.....P.....F.R.....NS.....	F48E8
.....E.....V.....L.....NANAQ.V.ESAGE..QPGQNQASNSNRA.PEEG.HP.QA..AA.P	DE-R49/99
.....L.....EE.....R.V.....L.....NTNT.A.ESAGE..QPGQNQVSNNSNQE.PEEG.RP.QA.AAA.P	08-004
.....E.....V.....L.....NVNA.A.ESAGE..QPGQNQASSNRA.PEEGLHP.QA.AAA.P	9a5b

图7 NDV毒株的P蛋白序列分析和比对结果 (部分)

实验进展及结果

表2 新城疫病毒P蛋白中保守性丝/苏/酪氨酸位点

类型 Type of residues	保守性位点 The conservative sites
Ser	16, 37, 48, 114, 125, 190, 193, 253, 254, 290, 291, 313, 328, 335, 354, 361, 367, 368, 369, 374, 381
Thr	5, 18, 44, 111, 210, 251, 267
Tyr	315

实验进展及结果

3 新城疫病毒La Sota毒株P蛋白潜在磷酸化位点的筛选

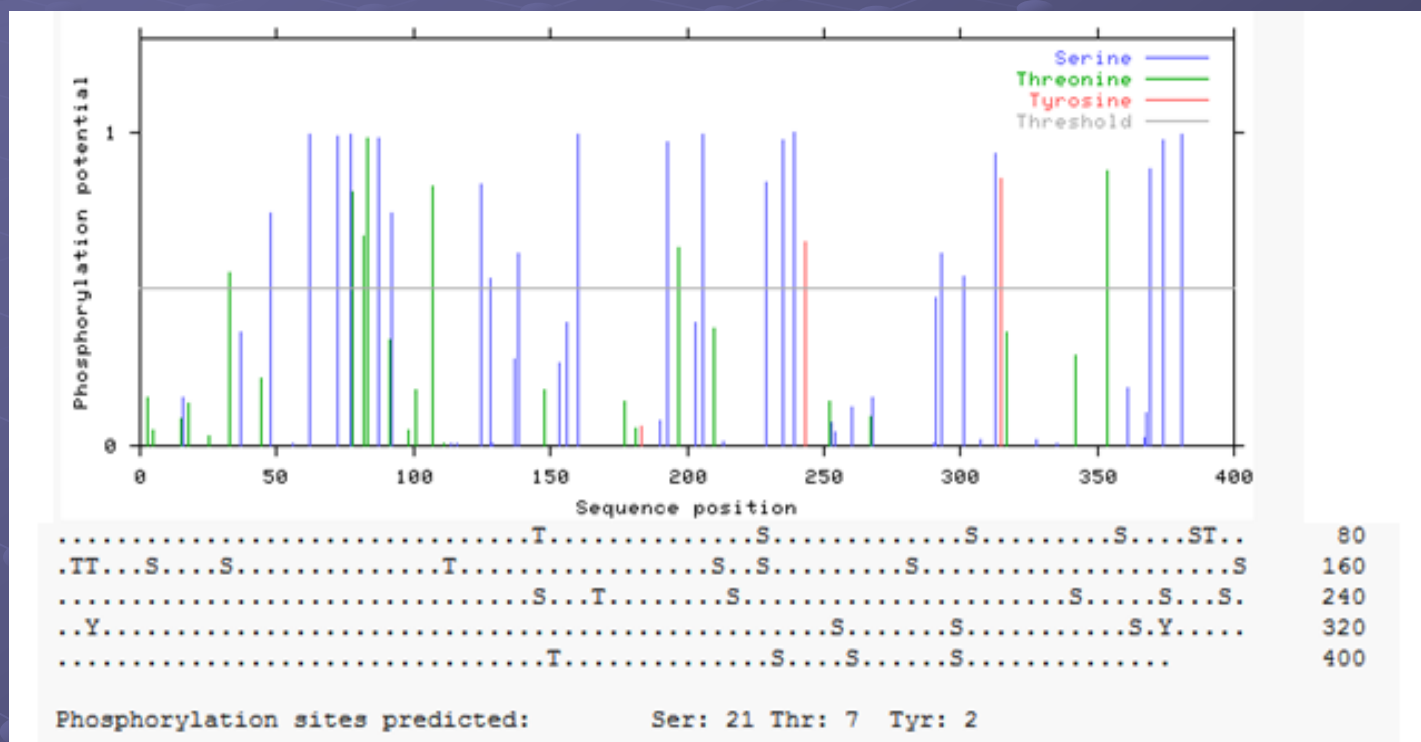


图8 Netphos 2.0 Server 分析La Sota毒株P蛋白中可被磷酸化的氨基酸位点

注: Netphos 2.0 Server磷酸化位点在线分析软件
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)

实验进展及结果

NetPhosK 1.0 Server - prediction results		
Technical University of Denmark		
Method: NetPhosK without ESS filtering: Query: LaSota		
Site	Kinase	Score
T-5	CKII	0.66
S-16	CKI	0.51
T-18	PKC	0.63
S-37	PKG	0.58
T-44	cdc2	0.52
S-62	DNAPK	0.62
S-62	ATM	0.55
S-72	PKC	0.79
T-78	p38MAPK	0.53
T-83	cdk5	0.63
S-87	GSK3	0.51
S-87	cdk5	0.60
T-98	DNAPK	0.58
T-111	PKC	0.58
S-114	PKA	0.69
S-116	PKA	0.55
S-116	cdc2	0.54
S-125	PKC	0.81
S-128	PKC	0.70
S-129	PKC	0.80
T-148	DNAPK	0.58
T-148	ATM	0.52
T-148	PKC	0.65
S-153	DNAPK	0.64
S-153	ATM	0.57
S-153	PKC	0.62
S-153	cdc2	0.52
S-160	DNAPK	0.62
S-160	ATM	0.64
Y-183	EGFR	0.61
S-190	DNAPK	0.57
S-190	cdc2	0.59
S-193	CKI	0.53
T-197	p38MAPK	0.53
T-197	cdk5	0.61
S-203	PKG	0.55
S-206	DNAPK	0.64
S-206	ATM	0.52
S-206	PKA	0.73
T-210	cdc2	0.58
S-229	CKII	0.54
S-235	PKC	0.71
Y-243	INSR	0.51
T-267	PKC	0.60
T-267	cdc2	0.51
S-268	cdc2	0.56
S-291	DNAPK	0.60
S-291	PKA	0.58
S-293	cdc2	0.58
S-301	GSK3	0.50
S-313	cdk5	0.54
S-328	DNAPK	0.57
S-328	ATM	0.63
S-328	cdc2	0.58
S-361	GSK3	0.50
S-367	PKC	0.52
S-369	PKC	0.69
S-374	cdc2	0.51
S-381	CKII	0.54
S-381	CKI	0.51

Highest Score: 0.81 PKC at position 125

图8 NetPhosK 1.0 Server分析La Sota毒株P蛋白中可被磷酸化的氨基酸位点

注: NetPhosK 1.0 Server特异性磷酸激酶作用位点在线分析软件

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)

实验进展及结果

4 P蛋白磷酸化位点与结构功能的对应关系分析

表4 新城疫病毒P蛋白中保守的特异性蛋白激酶作用位点

Serine/ Threonine / Tyrosine Kinase					
PKA	PKC	cdc2	PKG	CKI/CKII	Other
291	18, 44, 48, 111, 125, 267, 369	190, 210, 267, 328, 367	37	5, 16, 381	190, 313, 315, 328, 361, 374

实验进展及结果

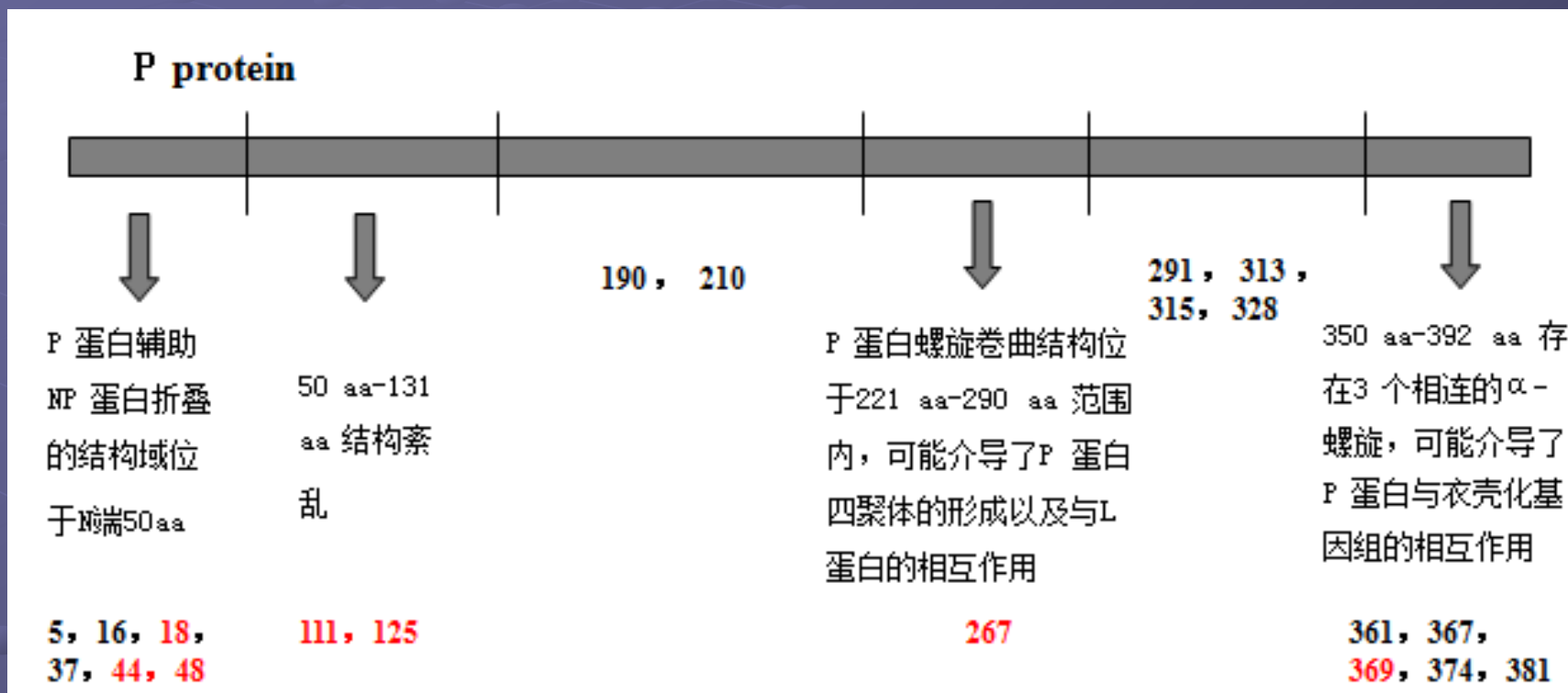


图9 P蛋白磷酸化位点与结构功能的对应关系

实验进展及结果

如上图将我们所得到的**20**个潜在的磷酸化位点与**P**蛋白的这四个功能结构域一一对应，结果发现唯一一个贯穿于所有结构功能域的磷酸化位点是**PKC**激酶作用位点。特别是在参与**P**蛋白自身四聚体形成和与**L**蛋白互作的区域和结构紊乱区内，预测出的磷酸化位点有且仅有**PKC**激酶的作用位点。

后续实验

后续我们讲通过实验手段来筛选功能性磷酸化位点！

参考文献

- [1] 孙英杰, 陈鸿军, 宋翠萍, 等. Class I NDV强毒株主要结构蛋白特异性抗体的研制[J]. 中国兽医科学, 2010, 40 (01): 34-40
- [2] 陈宏, 李荣清, 丁云霞, 等. PKC激活剂佛波酯PMA和抑制剂Staurosporine对大肠癌HT229细胞黏附作用的影响[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20 (1): 39-43
- [3] 仇旭升. 反向遗传技术研究新城疫病毒P基因功能及其对病毒毒力的影响[D]. 扬州大学, 2009.
- [4] Rahaman A, Srinivasan N, Shamala N, et al. Phosphoprotein of the Rinderpest virus forms a tetramer through a coiled coil region important for biological function[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (22): 23606-23614.
- [5] Tanner S, Shu H, Frank A, et al. InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77 (14): 4626-4639.
- [6] Tarbouriech NJ, Ebel CC, Ruigrok KW, et al. On the domain structure and the polymerization state of the Sendai virus P protein[J]. Virology, 2000, 266 (1): 99-109.
- [7] Wang Y, Klemke RL. PhosphoBlast, a computational tool for comparing phosphoprotein signatures among large datasets[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7 (1): 145-162.
- [8] Xue Y, Li A, Wang L, et al. PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7:163.
- [9] Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication[J]. In Fields Virology (Fields B N, Knipe D M, Howley P M et al), 2001, 1305-1340.
- [10] James B. Bliska, Stanley, et al. The role of host tyrosine phosphorylation in bacterial pathogenesis[J]. Trends in Genetics, 1993, 9 (3): 85-89
- [11] Hamaguchi M, Yoshida T, Nishikawa K, et al. Transcriptional complex of Newcastle disease virus. Both L and P proteins are required to constitute an active complex[J]. Virology, 1983, 128 (1): 105-117.

注：部分显示

致谢

首先感谢罗老师，在罗老师的指导下，一学期的生物信息学学习使我们初步掌握了相关软件的使用方法、技巧以及如何结合自己的课题进行分析，这将对我们的以后的科研提供很大便利。

其次感谢小组各位成员，在每周一次的讨论中，我们共同学习，一起商量和解决问题，各方面都有很大的提高。在这次汇报的完成过程中，大家集思广益，齐心协力，大量搜索和收集资料，在小组成员的共同努力下，此次汇报顺利完成。

谢谢！

谢谢大家

Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
LaSota	16	LFETSGTVI	0.155	.
LaSota	37	TVGRSAIPQ	0.361	.
LaSota	48	TKVLSAAWE	0.745	*S*
LaSota	56	EKHGSIOPP	0.007	.
LaSota	62	QPPASQDNP	0.991	*S*
LaSota	72	RQDRSDKQP	0.987	*S*
LaSota	77	DKQPSTPEQ	0.994	*S*
LaSota	87	TPHDSPPAT	0.983	*S*
LaSota	92	PPATSADQP	0.743	*S*
LaSota	114	RTGASNLL	0.014	.
LaSota	116	GASNLLLM	0.006	.
LaSota	125	LDKLSNKSS	0.832	*S*
LaSota	128	LSNKSSNAK	0.531	*S*
LaSota	129	SNKSSNAKK	0.006	.
LaSota	137	KGPWSSPQE	0.274	.
LaSota	138	GPWSSPOEG	0.615	*S*
LaSota	153	QQQGSQPSR	0.262	.
LaSota	156	GSQPSRGNS	0.395	.
LaSota	160	SRGNSQERP	0.996	*S*
LaSota	190	QWEESQLSA	0.079	.
LaSota	193	ESQLSAGAT	0.971	*S*
LaSota	203	HALRSRQSQ	0.394	.
LaSota	206	RSRQSQDNT	0.991	*S*
LaSota	213	NTLVSADHV	0.012	.
LaSota	229	QAMMSMEA	0.839	*S*
LaSota	235	MEAISQSVS	0.972	*S*
LaSota	239	SQRVSKVDY	0.997	*S*
LaSota	253	LKQTSSIPM	0.076	.
LaSota	254	KQTSSIPMM	0.045	.
LaSota	260	PMMRSEIQQ	0.121	.
LaSota	268	QLKTSVAVM	0.154	.
LaSota	290	CANISSLSLSD	0.009	.
LaSota	291	ANISSLSLSDL	0.475	.
LaSota	293	ISSLSLSDLRA	0.612	*S*
LaSota	301	AVARSHFVL	0.537	*S*
LaSota	307	FVLVSGPGD	0.017	.
LaSota	313	PGDPSPYVT	0.935	*S*

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
LaSota	3	--MATFTDA	0.152	.
LaSota	5	MATFTDAEI	0.047	.
LaSota	15	ELFETSGTV	0.083	.
LaSota	18	ETSGTVIDN	0.136	.
LaSota	25	DNIITAQGK	0.028	.
LaSota	33	KPAETVGRS	0.551	*T*
LaSota	44	POGKTKVLS	0.213	.
LaSota	78	KQPSTPEQT	0.810	*T*
LaSota	82	TPEQTPHD	0.667	*T*
LaSota	83	PEQTPHDS	0.980	*T*
LaSota	91	SPPATSADQ	0.340	.
LaSota	98	DQPPTQATD	0.048	.
LaSota	101	PTQATDEAV	0.176	.
LaSota	107	EAVDTOFRT	0.942	*T*
LaSota	111	TQFRTGASN	0.008	.
LaSota	148	HQRPTQOQG	0.179	.
LaSota	177	GNOGTDVNT	0.138	.
LaSota	181	TDVNTAYHG	0.055	.
LaSota	197	SAGATPHAL	0.632	*T*
LaSota	210	SQDNTLVSA	0.371	.
LaSota	252	VLKQTSSIP	0.142	.
LaSota	267	QQLKTSVAV	0.091	.
LaSota	317	SPYVTQGGE	0.362	.
LaSota	342	IKPATACGP	0.287	.
LaSota	354	VEKDIVRAL	0.875	*T*

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
LaSota	183	VNTAYHGQW	0.062	.
LaSota	243	SKVDYQLDL	0.649	*Y*
LaSota	315	DPSPYVTQG	0.851	*Y*
		^		

注：NetPhosK 1.0 Server特异性磷酸激酶作用位点在线分析软件
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)

 [返回](#)