

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180604001

http://www.yykxjz.cn/

王中一, 刘庆慧, 卢翠玉, 黄捷. 利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 156–162
Wang ZY, Liu QH, Lu CY, Huang J. Identification of the host interactors of wsv112 of WSSV by yeast two-hybrid. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 156–162

利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白*

王中一^{1,2} 刘庆慧^{1①} 卢翠玉^{1,2} 黄捷¹

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾白斑综合征病毒(WSSV)开放阅读框 wsv112 编码脱氧尿苷焦磷酸酶(dUTP pyrophosphatase, dUTPase)。为研究 wsv112 与宿主的互作关系,本研究采用酵母双杂交 Gal4 系统从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道 cDNA 文库中筛选与 wsv112 互作的候选蛋白。以 WSSV 为模板,构建 pGBKT7-112 诱饵载体,转化到 Y2H Gold 酵母菌感受态细胞中,转化菌液涂布到不同缺陷型培养基上,检测诱饵载体的自激性和毒性。将凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库与诱饵菌株 pGBKT7-112 接合,通过筛选力度不同的缺陷型培养基、颜色反应、PCR、测序鉴定等步骤筛选阳性克隆,将阳性菌株提取质粒,再经过回复杂交实验验证筛选出的阳性质粒与诱饵载体的作用。研究表明,诱饵载体 pGBKT7-112 无自激性和毒性,可用于酵母双杂交实验;经初筛和回复杂交实验最终得到 2 个阳性质粒,经过 NCBI 数据库对比,其编码的蛋白分别与日本囊对虾(*Penaeus japonicus*) C 型凝集素(AGW27416.1)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 40S 核糖体蛋白 S20 小亚基蛋白(ALE99171.1)具有 37%和 98%同源性。本研究为 wsv112 的调控机制提供新的线索。

关键词 对虾白斑综合征病毒; wsv112; dUTPase; 酵母双杂交

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0156-07

酵母双杂交技术最初是由 Fields 等(1989)在进行真核基因转录调控研究中用来检测酵母体内蛋白与蛋白相互作用的系统,目前,主要用于研究蛋白与蛋白之间的相互作用。酵母双杂交系统包括 2 个相互独立的功能结构——DNA 结合域(DNA-BD)和转录激活域(AD),这 2 个结构在细胞内相距较远时不能激活转录,当二者通过某种作用在空间上相互接近时,才

能激活报告基因的转录(Ozenberger *et al.*, 1995)。由于酵母双杂交技术具有高灵敏度、简便操作等优点,所以,该技术越来越广泛地应用于蛋白质相互作用的研究(Yu *et al.*, 2012)。

对虾白斑综合征病毒(WSSV)是水产养殖中主要的病原,给水产养殖行业造成了巨大的经济损失。研究表明,其开放阅读框 wsv112 编码脱氧尿苷焦磷酸

* 国家自然科学基金(31672679)、国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助[This work was supported by National Science Foundation of China (31672679), National Key Basic Research Development Plan(2012CB114401), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 王中一, E-mail: liangwang06@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-06-04, 收修改稿日期: 2018-07-11

酶(dUTP pyrophosphatase, dUTPase)(Liu *et al*, 2005)。自 20 世纪 90 年代在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现 dUTPase 以来,一直为学术界研究的热点,其广泛存在于真核生物(植物、动物)、原核生物(细菌)和病毒中。dUTPase 是一种水解酶,能够水解脱氧尿苷三磷酸(dUTP),形成脱氧尿苷单磷酸(dUMP)和无机焦磷酸(PPI)。甲基化的 dUMP 可形成胸腺嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸(dTTP),dTTP 是 DNA 合成的主要成分,因此,dUTPase 对 WSSV 的生存具有重要的作用,维持低水平的 dUTP/ dTTP 比例,可降低 dUTP 在 DNA 合成中的插入和错配,减少突变频率(Payne *et al*, 2001;Chen *et al*, 2002; Liu *et al*, 2005)。McGeoch(1990)研究发现,不同生物中 dUTPase 分子量差别很大,但在 N 末端含有 5 个高度保守的序列,分别为 motif 1(A GFDL)、motif 2 (GKSS)、motif 3(GIIDFGYTG)、motif 4 (GQKFAQL)和 motif 5(RGDKGFGS)(招丽婵等, 2008)。一些病毒尤其是逆转录病毒编码的 dUTPase 协助病毒完成侵染的过程,并且与毒力有关,可作为病毒治疗的靶位点(陈巧林等, 2002; Cottone *et al*, 2002)。dUTPase 在病毒的生命周期中发挥独特的作用,但关于 dUTPase 在 WSSV 与宿主细胞的相互作用以及表达调控机制仍不清楚。

本研究利用酵母双杂交技术初步筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白,为深入研究 wsv112 的功能,揭示 WSSV 侵染宿主细胞的途径提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与主要材料

酵母菌株 Y2HGold 和 Y187、YPDA 培养基、营养缺陷型培养基 [SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu (DDO)、SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA(DDO/X/A)]、X- α -Gal 和 YeastmakerTM Yeast Transformation System 购自 Clontech 公司; pGADT7、pGADT7-T、pGBKT7、pGBKT-53、pGBKT7-lam 质粒甘油菌由本实验室保存; *E.coli* Top10、酵母菌质粒小提试剂盒购自天根科技生物公司; 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)和质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 诱饵载体的构建 根据 wsv112 基因的 ORF 设计带有 *Nde* I 和 *Pst* I 酶切位点的引物 w112s (5'-GAC ATATGATGGACTCATCTGCATC-3')和 w112a (5'-ATC

TGCAGTGTATACTCCTCCACGC-3'),以 WSSV 提取的 DNA 为模板,PCR 扩增目的序列。PCR 产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳后回收,将胶回收的产物和酵母表达载体 pGBKT7 分别经过 *Nde* I 和 *Pst* I 双酶切后,用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组表达载体 pGBKT7-112,将其转化到 *E. coli* Top10 感受态细胞中。挑单克隆,进行菌液 PCR,筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序验证。

1.2.2 酵母菌阴性及阳性接合对照 感受态 Y2H Gold、Y187 的制备及相关转化步骤参照 Clontech 公司 YeastmakerTM Yeast Transformation System 转化手册进行。按照表 1 所列进行阳性和阴性质粒转化,转化菌液分别稀释 10、100 和 1000 倍后,涂布于对应的单缺培养基上,37℃ 培养 5 d,观察菌落生长情况。

表 1 阴性和阳性对照质粒转化
Tab.1 Transformation of negative and positive plasmid

菌株 Strain	质粒 Plasmid	培养基 Medium
Y2H Gold	pGBKT7-53	SD/-Trp
Y2H Gold	pGBKT7-lam	SD/-Trp
Y187	pGADT7-T	SD/-Leu

分别挑取单克隆 Y2H Gold(pGBKT7-53)和 Y187 (pGADT7-T)加入同一个含有 500 μ l 2×YPDA 的 1.5 ml 离心管中,涡旋混匀,30℃,250 r/min 过夜培养,作为酵母双杂交的阳性对照(P);以 Y2H Gold(pGBKT7-Lam)和 Y187(pGADT7-T)作为阴性对照(N)。将菌液稀释 10、100、1000 倍后涂布于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu(DDO)、SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal(40 μ g/ml)/AbA(200 ng/ml)(DDO/X/A)培养基上,30℃ 倒置培养 5 d,观察菌落生长情况。从 DDO 平板挑取含有 2 种质粒的菌株保种作为后续实验阴、阳性对照。

1.2.3 诱饵载体 pGBKT7-112 毒性和自激性的检测

感受态酵母菌 Y2H Gold 制备及相关转化步骤按照 Clontech 公司 YeastmakerTM Yeast Transformation System 转化手册。将重组质粒 pGBKT7-112 和空质粒 pGBKT7 分别转入 Y2H Gold 感受态细胞。转化菌液分别稀释 10、100 和 1000 倍后涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基上,30℃ 倒置培养 3~4 d,观察各平板酵母菌菌落的数量、大小、颜色,进行诱饵质粒 pGBKT7-112 的毒性和自激性检测。

1.2.4 酵母双杂交筛选与 wsv112 互作的基因

挑取含有 pGBKT7-112 质粒的 Y2HGold 单克隆于 50 ml SD/-Trp 液体培养基中 30℃,250 r/min 培养

至 OD_{600 nm} 达到 0.8, 1000×g 离心 5 min, 用 4 ml SD/-Trp 重悬沉淀, 加入 1 ml 构建好的文库和 45 ml 2×YPDA/Kan(50 μg/ml), 30℃ 30 r/min 振荡培养 20 h, 显微镜观察结合情况, 当视野中出现“米老鼠头”或“三叶草”形状时, 结束接合。1000×g 离心 10 min 后用 0.5×YPDA/Kan 重悬沉淀, 共收集到 10 ml 悬浮细胞。100 μl 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 倍的稀释液铺在 100 mm SD/-Trp、SD/-Leu、DDO 固体培养基上, 30℃, 培养 3~5 d; 剩余所有菌液涂布于 DDO/X 平板上, 30℃ 倒置培养 5~7 d, 直至长出克隆。用灭菌的牙签将 DDO/X 培养基上生长的蓝色克隆转移至筛选力度更强的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA(QDO/X/A) 培养基上, 30℃ 培养 3 d。为排除假阳性和多种质粒融合现象, 将蓝色克隆在 QDO/X/A 上反复筛选至少 3 次。

将筛选出的蓝色克隆编号, 并接种于 1 ml QDO/A 液体培养基中, 30℃ 250 r/min 培养, 用 PGADT7 通用引物进行菌液 PCR, 检测蓝色克隆中插入 cDNA 片段的大小。PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司测序, 分析测序结果。

1.2.5 获得与 wsv112 互作基因的质粒 按照酵母质粒小提试剂盒提取筛选的酵母质粒, 并转化到 *E.coli* Top10 感受态细胞中, 经 Amp⁺ 和菌液 PCR 筛选出阳性克隆测序。选取含有正确序列的质粒, 扩大培养后抽提质粒, 得到插入片段的质粒。

1.2.6 回复杂交验证互作蛋白 为进一步排除实验的假阳性, 将上述得到的质粒 pGADT7-X 转化到含有 pGBKT7-112 诱饵载体的 Y2H Gold 菌株中(各质粒转化情况如表 2 所示), 以 pGADT7-T+pGBKT7-lam 作为阴性对照, 以 pGADT7-T+pGBKT7-53 为阳性对照。以 pGADT7-X+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-112、pGADT7+pGBKT7 为空质粒对照, pGADT7-X 与 pGBKT7-112 共转化组在 QDO/A/X 培养基上如果不生长或菌落为白色, 则 pGADT7-X 判断为假阳性; 如果生长且菌落为蓝色, 各阴性对照培养板无菌落生长则为阳性。

表 2 回复杂交转化
Tab.2 The grouping of reply hybrid

Y2H Gold	PGADT7-X	PGADT7	PGADT7-T
pGBKT7-112	√	√	—
pGBKT7-lam	—	—	√
pGBKT7-53	—	—	√
pGBKT7	√	√	—

注: √代表有; —代表无

Note: √ denoted positive; — denoted negative

2 结果

2.1 诱饵载体的构建

表达载体 pGBKT7 和 wsv112 双酶切连接后构建重组质粒, 菌落 PCR 检测结果如图 1 所示, 条带在 1500~2000 bp 之间与理论值相符, 与 wsv112 标准序列对比后无碱基突变和移码现象。

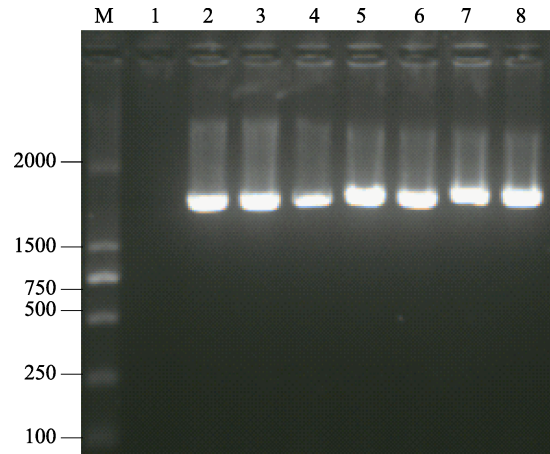


图 1 重组载体 pGBKT7-112 菌液 PCR 检测
Fig.1 PCR identification of recombinant plasmids

M: DNA 标准分子量 2000; 1: 阴性对照; 2~8: 重组质粒;
M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control
2~8: Recombinant plasmids

2.2 酵母菌阴性及阳性接合对照

将 pGBKT7-53、pGBKT7-lam、pGADT7-T 转化到相应的酵母菌株后, 将菌液稀释 10、100 和 1000 倍涂布到对应的缺陷型培养基上, 30℃ 培养 5 d, 观察菌落生长情况, 结果如图 2A~图 2C 所示, 每一种菌株生长状态完好, 可用于后续实验。挑取单克隆菌株 Y2H Gold(pGBKT7-53) 和 Y187(pGADT7-T) 进行接合, 作为阳性对照; Y2H Gold(pGBKT7-Lam) 和 Y187(pGADT7-T) 接合为阴性对照, 涂布到相应的缺陷型培养基上, 30℃ 培养 5 d, 观察菌落生长情况, 结果如图 2D~图 2F 所示。阳性对照菌株在 DDO/X/A 培养基上生长且为蓝色, 说明该菌株可以激活 AbA 和 X-α-Gal 报告基因, 可作为阳性对照; 阴性对照菌株在 DDO 培养基上生长良好, 在 DDO/X/A 培养基上无法生长, 说明阴性菌株不能激活 AbA 和 X-α-Gal 报告基因, 可作为阴性对照。

2.3 诱饵蛋白毒性和自激性的检测

将构建成功的诱饵载体 pGBKT7-112 和空质粒 pGBKT7 分别转入 Y2H Gold 感受态细胞中, 30℃ 倒

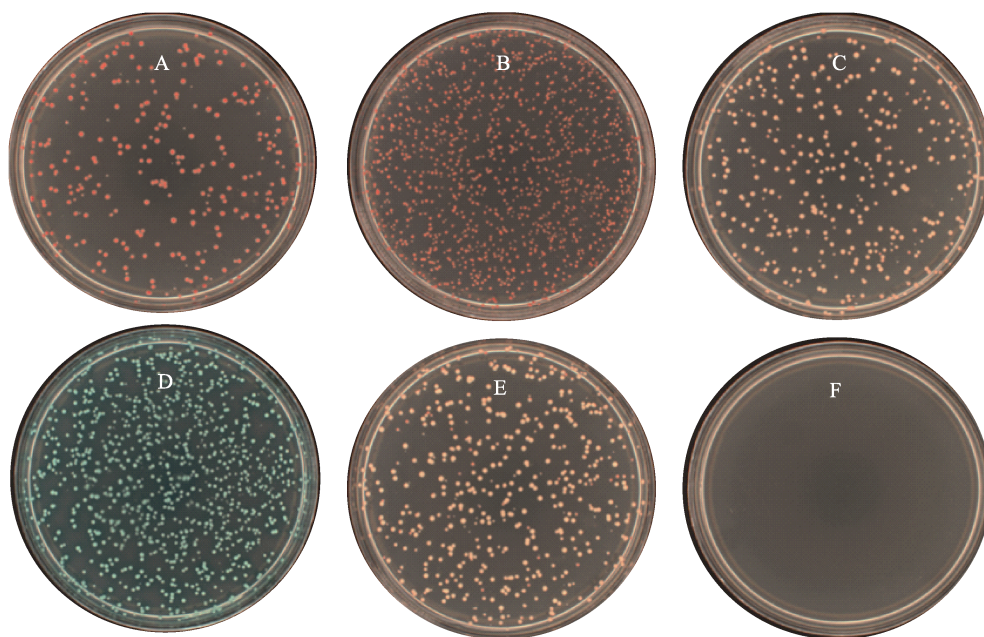


图2 对照菌株在不同缺陷型培养基上的生长情况
Fig.2 The growth of control groups on different culture medium

A: pGBKT7-53 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上; B: pGBKT7-lam 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上;
C: pGADT7-T 转化到 Y187 在 SD/-Leu 培养基上; D: 阳性对照在 DDO/X/A 培养基上;
E: 阴性对照在 DDO 培养基上; F: 阴性对照在 DDO/X/A 培养基上

A: Y2H Gold transformants with pGBKT7-53 grow on SD/-Trp plates; B: Y2H Gold transformants with pGBKT7-lam grow on SD/-Trp plates; C: Y187 transformants with pGADT7-T grow on SD/-Leu plates; D: The positive control grow on DDO/X/A plates; E: The negative control grow on DDO plates; F: The negative control grow on DDO/X/A plates

置培养于SD/-Trp、SD/-Trp/X、SD/-Trp/X/A固体培养基上5 d后,观察培养基克隆生长状况(图3A~图3C)。结果发现,菌落只有在SD/-Trp、SD/-Trp/X培养基上生长,在SD/-Trp-Ade-X培养基上没有菌落生长,说明诱饵质粒不能激活Aba报告基因,没有自激性;含有pGBKT7质粒的菌落和含有pGBKT7-112的菌落大小和数目差别不大(图3A和图3D),说明诱饵菌株也没有毒性,可用于酵母双杂交实验。

2.4 酵母双杂交筛选与 wsv112 互作的基因

将剩余的杂交菌液全部涂布在 DDO/X 固体培养基上,30℃培养5 d后。将长出的蓝色克隆全部划线到筛选力更强的 QDO/X/A 固体培养基上,反复筛选3次后,共得到526株蓝色克隆。利用pGADT7通用引物扩增PCR检测蓝色克隆中插入的片段,将PCR产物测序,经分析共筛选出6株具有意义的序列,其编号分别是1-5、4-7、6-35、8-23、8-39、8-45。

2.5 回复杂交验证互作基因

将筛选得到的6个质粒pGADT7-X与pGBKT7-112共同转化到Y2H Gold酵母菌中进行回复杂交实验,同时,设置阴、阳对照组和空质粒对照组,回复

杂交的实验结果如图4所示,阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T)能够激活报告基因的表达,在QDO/X/A培养基上长出蓝色克隆;阴性对照(pGBKT7-lam+pGADT7-T)、空白质粒对照(pGADT7+pGBKT7)不能激活报告基因的表达,在QDO/X/A培养基上不生长;证明实验体系完好。pGADT7-1-5+pGBKT7、pGADT7-4-7+pGBKT7、pGADT7-6-35+pGBKT7、pGADT7-8-23+pGBKT7、pGADT7-8-39+pGBKT7、pGADT7-8-45+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7112 酵母菌株在QDO/X/A培养基上不生长,说明编号1-5、4-7、6-35、8-23、8-39、8-45及wsv12基因无自激性。pGBKT7-112+pGADT7-4-7、pGBKT7-112+pGADT7-8-23菌株能够在QDO/X/A培养基上生长出蓝色克隆,说明wsv112与编号4-7和8-23基因能够相互作用。pGBKT7-112+pGADT7-1-5、pGBKT7-112+pGADT7-6-35、pGBKT7-112+pGADT7-8-39、pGBKT7-112+pGADT7-8-45菌株不能在QDO/X/A培养基上生长,说明wsv112不与编号1-5、6-35、8-39和8-45的基因相互作用。综上所述,本研究共筛选出2个阳性质粒,编号分别为4-7和8-23,测序分析其基因编码蛋白分别与日本囊对虾(*Penaeus japonicus*) C型凝集素

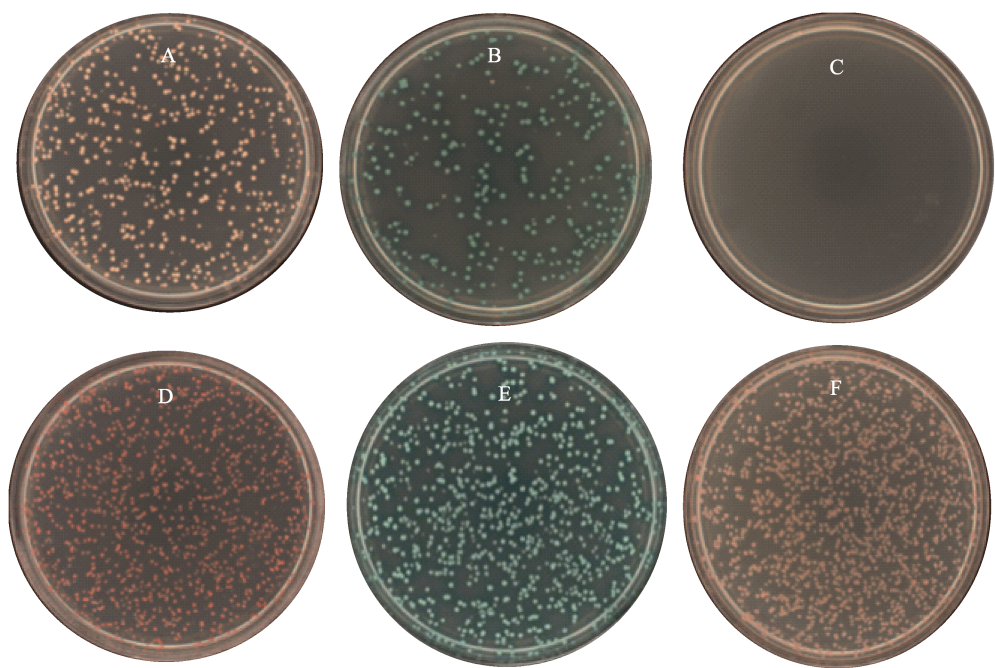


图 3 诱饵载体 pGBKT7-112 转录自激性的检测
Fig.3 Assay of self-transcriptional activation and toxicity of pGBKT7-112

A: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上; B: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp/X 培养基上;
C: pGBKT7-112 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp/X/A 培养基上; D: pGBKT7 转化到 Y2H Gold 在 SD/-Trp 培养基上;
E: 阳性对照在 SD/-Trp/X/A 培养基上; F: 阴性对照在 SD/-Trp 培养基上
A: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp plates; B: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp/X plates; C: Y2H Gold transformants with pGBKT7-112 grow on SD/-Trp/X/A plates; D: Y2H Gold transformants with pGBKT7 grow on SD/-Trp plates; E: The positive control grow on SD/-Trp/X/A plates; F: The negative control grow on SD/-Trp plates

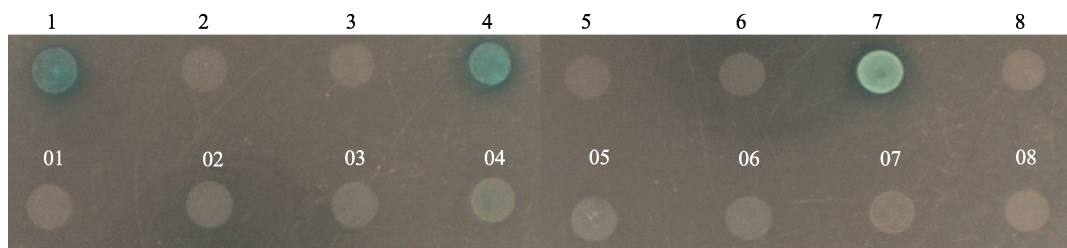


图 4 回复杂交的 16 个转化组在 QDO/X/A 平板上生长的情况
Fig.4 The growth of 16 transformants on highly selective medium in retest

1~8: Y2H Gold (pGBKT7-112+pGADT7-4-7, pGBKT7-112+pGADT7-1-5, pGBKT7-112+pGADT7-6-35, pGBKT7-112+pGADT7-8-23, pGBKT7-112+pGADT7-8-39, pGBKT7-112+pGADT7-8-45, pGBKT7-53+ pGADT7-T(P), pGBKT7-lam+pGADT7-T(N)
01~08: Y2H Gold(pGADT7-4-7+pGBKT7, pGADT7-1-5+pGBKT7, pGADT7-6-35+pGBKT7, pGADT7-8-23+pGBKT7, pGADT7-8-39+pGBKT7, pGADT7-8-45+pGBKT7, pGADT7+pGBKT7112, pGADT7+pGBKT7)

(AGW27416.1)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 40S 核糖体蛋白 S20 小亚基蛋白(ALE99171.1)具有 37%和 98%的同源性。

3 讨论

为进一步探讨 wsv112 在 WSSV 侵染过程中的作

用机制,本研究以 wsv112 为诱饵利用酵母双杂交技术从凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库中筛选出与 wsv112 互作的蛋白。根据 wsv112 的序列设计特异性引物构建诱饵表达载体并转入到 Y2H Gold 酵母菌中,观察菌株在不同缺陷型培养基上的生长情况,证明诱饵载体没有自激性和毒性,可利用酵母双杂交技术筛选与

之互作的蛋白。将含有诱饵质粒 pGBKT7-112 的 Y2HGold 菌株与凡纳滨对虾肠道 cDNA 文库融合, 利用缺陷型培养基、颜色反应、PCR 检测、回复杂交等实验环节逐步筛选阳性克隆, 最终得到 2 个与 wsv112 互作的蛋白, 分别与日本囊对虾的 C 型凝集素和克氏原螯虾 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白具有同源性。

肝胰腺和血组织是甲壳动物表达 C 型凝集素最丰富的部位, 因其含有能识别入侵病原表面糖类的 C 型凝集素样结构域(CTLD), 因此, 被认为是一类模式识别受体, 在先天免疫识别中发挥重要作用(Weis *et al*, 1998; Dodd *et al*, 2011), 如细胞粘附、酚氧化酶的激活、结节形成、吞噬和包被作用等(Lis *et al*, 1998; Koizumi *et al*, 1999; Yu *et al*, 1999、2004)。有些 C 型凝集素还具有抑菌或抗病毒的作用(Luo *et al*, 2003; Sun *et al*, 2008; 高焕等, 2012; 于金红等, 2013)。对鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)敏感的 C 型凝集素在感染的前期发挥作用, 针对 WSSV 敏感的 C 型凝集素在感染后期起作用(王显伟, 2012)。由此推测, wsv112 可能在感染的后期发挥作用。

核糖体是所有生物进行蛋白质合成的场所, 是具有复杂结构的蛋白核酸复合物。哺乳动物的核糖体由 79 个核糖体蛋白(RP)和 4 种 RNA 组成; 其中, 40S 核糖体包含 32 种 RPs, 60S 核糖体含有 47 种 RPs (Wool, 1979; Wool *et al*, 1995)。由于从细菌到高等生物的广泛物种中都存在, 核糖体已经成为研究分子进化的重要大分子。关于人类所有的 79 个 RPs 的结构域功能都已基本清楚, 关于甲壳动物的 RPs, 虽然已有一些研究, 但是针对 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白的结构和功能还未被了解透彻。本研究初步确定 40S 核糖体蛋白 S20 亚基蛋白及 C 型凝集素与 wsv112 的作用, 为进一步揭示 WSSV 的侵染机制提供了一个新线索, 其相互作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- Chen QL, Ren HW, Ru BG. Progresses on the study of dUTP pyrophosphatase. *Chemistry of Life*, 2002, 22(4): 356–359 [陈巧林, 任宏伟, 茹炳根. dUTP 焦磷酸酶研究进展. *生命的化学*, 2002, 22(4): 356–359]
- Chen RX, Wang HT, Mansky LM. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *Journal of General Virology*, 2002, 83(10): 2339–2345
- Cottone R, Büttner M, McInnes CJ, *et al*. Orf virus encodes a functional dUTPases gene. *Journal of General Virology*, 2002, 83(5): 1043–1048
- Dodd RB, Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 2011, 11(5): 71–79
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246
- Gao H, Lai XF, Wang WJ, *et al*. Expression of seven kinds of lectins after WSSV challenge in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(5): 53–58 [高焕, 赖晓芳, 王伟继, 等. 中国对虾不同凝集素基因应答 WSSV 侵染的表达差异. *渔业科学进展*, 2012, 33(5): 53–58]
- Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, *et al*. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Letters*, 1999, 443(2): 139–143
- Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 1998, 98(2): 637–674
- Liu XQ, Yang F. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase. *Virus Research*, 2005, 110(1–2): 21–30
- Luo T, Zhang X, Shao Z, *et al*. *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*, 2003, 551(1–3): 53–57
- McGeoch DJ. Protein sequence comparisons show that the ‘pseudoproteases’ encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(14): 4105–4110
- Ozenberger BA, Young KH. Functional interaction of ligands and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast. *Molecular Endocrinology*, 1995, 9(10): 1321–1329
- Payne SL, Elder JH. The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Current Protein & Peptide Science*, 2001, 2(4): 381–388
- Sun YD, Fu LD, Jia YP, *et al*. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, 2008, 45(2): 348–361
- Yu JH, Pan LQ. Prokaryotic expression of C-type lectin like-domain protein gene of *Portunus trituberculatus* and activity analysis of recombinant protein. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 58–63 [于金红, 潘鲁青. 三疣梭子蟹 C-型凝集素的原核表达和活性检测. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 58–63]
- Yu X, Liu X, Liu T, *et al*. Identification of a novel binding protein of FAT₁₀: Eukaryotic translation elongation factor _{1A1}. *Digestive Diseases and Sciences*, 2012, 57(9): 2347–2354
- Yu XQ, Gan H, Kanost MR, *et al*. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(7): 585–597

- Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(9): 891–900
- Wang XW. Functional study of C-type lectins from decapoda crustaceans. Doctoral Dissertation of Shandong University, 2012 [王显伟. 十足目甲壳动物 C 型凝集素功能研究. 山东大学博士研究生学位论文, 2012]
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectins superfamily in the immune system. *Immunological Reviews*, 1998, 163: 19–34
- Wool IG. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, 48: 719–754
- Wool IG, Chan YL, Glück A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 1995, 73(11–12): 933–947
- Zhao LC, Chen AC, Wang MS, *et al.* Progress on the viral dUTPase. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2008, 20(2): 304–304 [招丽婵, 程安春, 汪铭书, 等. 病毒 dUTPase 研究进展. *生命科学*, 2008, 20(2): 304–304]

(编辑 马瑾艳)

Identification of the Host Interactors of wsv112 of WSSV by Yeast Two-Hybrid

WANG Zhongyi^{1,2}, LIU Qinghui^{1①}, LU Cuiyu^{1,2}, HUANG Jie¹

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The ORF wsv112 of white spot syndrome virus (WSSV) encodes a dUTPases. It plays an essential role in nucleotide biosynthesis. Hydrolysis of dUTP by UTPase produces dUMP, required for the de novo synthesis of dTTP, and maintains low cellular ratios of dUTP/dTTP, thus preventing the mis-incorporation of uracil into chromosomal DNA. In order to identify the host interactors of wsv112, wsv112 was cloned into the bait vector pGBKT7 and used to screen an intestine cDNA library of *Litopenaeus vannamei*, which had previously been constructed by yeast two-hybrid sequencing transformation. The positive clone was identified through different culture media, color change, polymerase chain reaction (PCR), and sequencing. The result showed that the bait plasmid pGBKT7-112 showed no virulence or self-activating effect on yeast strain Y2H Gold. A total of 526 blue clones were screened, which were analyzed by PCR and homology analysis using the BLAST in NCBI, and 6 possible interaction proteins of *Litopenaeus vannamei* were obtained. Then through the Yeast two-hybrid reply hybridization experiment, only two gene interactions were confirmed with the wsv112. They were identified as lectin C gene of *Marsupenaeus japonicas* (AGW27416.1) and 40S ribosomal protein S20 gene of *Procambarus clarkia* (ALE99171.1) with 37% and 98% identity. This study may provide a theoretical basis for further study of the wsv112 interaction mechanisms.

Key words WSSV; wsv112; dUTPase; Yeast two-hybrid

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn