

# 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)呼肠孤病毒 5 个 结构蛋白互作分析\*

熊尚凌 邢峻梁 范东洋 袁洋洋 朱四东 林旦璆 杨季芳 陈吉刚

(浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100)

**摘要** 采用酵母双杂交系统,对青蟹呼肠孤病毒(*Scylla serrata* reovirus) 5 个结构蛋白(VP3, VP6, VP9, VP11, VP12)间的双向互作进行了分析。将 5 个结构蛋白对应的 ORF 分别亚克隆至诱饵载体 pGBKT7 和猎物载体 pGADT7, 成功构建了 10 个酵母双杂交重组载体。将重组诱饵载体或重组捕获载体转化至酵母菌 Y2H Gold 中进行自激活检测, 结果显示 5 个结构蛋白均不能激活酵母菌报告基因 HIS3 的表达, 表明 5 个病毒蛋白均不具有自激活活性。通过酵母双杂交实验, 从 5 个结构蛋白 25 个可能性互作对中, 共筛选出 2 个双向互作对(VP11&VP6, VP11&VP12)和 3 个自身互作对(VP3&VP3, VP11&VP11, VP12&VP12)。本研究是有关 SsRV 结构蛋白互作的首次报道。

**关键词** 锯缘青蟹; 呼肠孤病毒; 酵母双杂交; 互作

中图分类号 S945.4 doi: 10.11693/hyhz20170300070

青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)首次报道于广东青蟹养殖区(Weng *et al.*, 2007), 其后在浙江青蟹养殖区发现类似病毒, 并将其命名为锯缘青蟹呼肠孤病毒(*Scylla serrata* reovirus, SsRV)(陈吉刚等, 2008; Chen *et al.*, 2011)。根据病毒粒子形态和基因组序列同源性, 判定 MCRV 和 SsRV 为不同地区分离株(Chen *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2012)。SsRV 基因组为 12 节段双链(ds)RNA(S1—S12), 可能编码 13 种病毒蛋白(p160, p100, p96, p50, p25, p61, p67, p46, p32, p40, p35, p23 和 p29) (Chen *et al.*, 2012)。SDS-PAGE 结合 Modi TOF/TOF 质谱分析表明, p160, p96, p67, p40, p29 和 p23 六个蛋白为 SsRV 病毒粒子的结构蛋白(Yuan *et al.*, 2016)。在上述 13 种病毒蛋白中, 只有 p160 和 p40 的功能较为清楚。p160 蛋白为病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp), p35 蛋白具有病毒孔蛋白样功能, 在病毒复制的后期发挥重要作用(Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2017)。

MCRV 的三维结构已被初步解析(Huang *et al.*, 2012)。该病毒衣壳由 T=13 外层衣壳和 T=2 内层衣壳两层衣壳组成, 其结构特征与 RDV、SA1114F 和 BTV 相似。在 MCRV 完整病毒颗粒的三维结构中, 外衣壳蛋白包含表面小突起的同源三聚体蛋白 260 个、衣壳表面六邻体中央蛋白 120 个; 内层衣壳具有一种蛋白的两种构象体 A 和 B 各 60 个, 以及 5 次轴顶点下方的可能由 RNA 聚合酶和其它蛋白形成的转录复合物。然而目前仅根据上述研究结果还无法确定青蟹呼肠孤病毒衣壳蛋白的具体组成, 更不清楚这些病毒蛋白间的相互作用关系及其对病毒结构和生物学发生功能的影响。呼肠孤病毒衣壳蛋白之间通常存在某种相互作用, 以维系病毒蛋白的层次结构并维持病毒形态的稳定性(Miyazaki *et al.*, 2005)。基于此, 本研究通过酵母双杂交技术对 SsRV 5 个结构蛋白间的相互作用进行分析, 研究结果为进一步揭示 SsRV 病毒结构和形态发生提供理论依据。

\* 国家自然科学基金项目, 30800856 号; 宁波市自然科学基金项目, 2016A610229 号; 宁波市科技创新团队, 2015C110018 号。熊尚凌, 讲师, E-mail: hustxiong@163.com

通讯作者: 陈吉刚, 教授, 硕士生导师, E-mail: genomic@163.com

收稿日期: 2017-03-24, 收修改稿日期: 2017-06-03

## 1 材料与方方法

### 1.1 菌株、载体及主要试剂

大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自北京全式金生物有限公司; 酵母双杂交试剂盒购自 Clontech 公司; 携带 SsRV S3, S6, S9, S11 或 S12 的重组质粒 PMD-S3、PMD-S6、PMD-S9、PMD-S11 和 PMD-S12 由本实验室构建并保存; 鲑鱼精 DNA 购自索莱宝生物科技有限公司; Minimal SD Base、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Leu-Trp、SD/-Leu-Trp-Ade-His、Aureobasidin A、X- $\alpha$ -gal、PCR 相关试剂、*Eco*R I、*Xho*I、*Sal*I、*Bam*H I 均购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒 SanPrep 购自上海生物工程有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 猎物载体及诱饵载体的构建及鉴定

由于

SsRV 和 MCRV 为同一病毒不同地区分离株, 为了达到 SsRV 和 MCRV 病毒蛋白描述上的统一, 本文采用 MCRV 病毒蛋白命名方式(VPx, x 对应基因组中节段序号)对 SsRV 蛋白进行命名。根据 SsRV 的 VP3(p96), VP6(p67), VP9(p40), VP11(p23), VP12(p29)蛋白对应的基因序列并结合猎物载体 pGADT7 和诱饵载体 pGBKT7 多克隆位点设计 6 对特异引物(表 1), 分别以重组载体 PMD-S3、PMD-S6、PMD-S9、PMD-S11 和 PMD-S12 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳回收纯化后, 经双酶切后, 分别克隆于猎物载体 pGADT7 和诱饵载体 pGBDT7, 转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 并利用氨苄青霉素或卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 挑选阳性克隆小量抽提质粒, 利用 PCR 和双酶切进行鉴定后, 送上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

表 1 扩增 SsRV 5 个结构蛋白各节段引物序列

Tab.1 Oligonucleotides used for PCR amplification of SsRV five structural proteins

引物名称	载体名称	引物序列(5'—3')*	酶切位点
VP3-AD-F	AD-VP3	CGGAATTCATGGCTAGTACAACACTAGACTTG	<i>Eco</i> R I
VP3-AD-R		CCGCTCGAGTTTATCTCACATATTCGACCACAC	<i>Xho</i> I
VP3-BD-F	BD-VP3	CGGAATTCATGGCTAGTACAACACTAGACTTG	<i>Eco</i> R I
VP3-BD-R		ACGCGTTCGACGTTATCTCACATATTCGACCACAC	<i>Sal</i> I
VP6-F	BD-VP6/AD-VP6	CGGAATTCATGGCTTCGAATTCGTCTATC	<i>Eco</i> R I
VP6-R		CGGGATCCTATCTTGAAAGTTTCCAAATATGTACC	<i>Bam</i> H I
VP9-F	BD-VP6/AD-VP6	CGGAATTCATGGCAGACAGTATCACTG	<i>Eco</i> R I
VP9-R		CGGGATCCCTCAGTAATAAACATCAGCCTTAGT	<i>Bam</i> H I
VP11-F	BD-VP11/AD-VP11	CGGAATTCATGAATTGGTCAAAAAGCAATAAAC	<i>Eco</i> R I
VP11-R		CGGGATCCCTTAACTTTGGTTTTTCCAAGAGAG	<i>Bam</i> H I
VP12-F	BD-VP12/AD-VP12	CGGAATTCATGAACCTGGAAATTAACAACCTTG	<i>Eco</i> R I
VP12-R		CGGGATCCCTCAGTAATCGAGAACCCAC	<i>Bam</i> H I

注: \*加粗字体代表内切酶识别位点

1.2.2 猎物蛋白及诱饵蛋白自激活检测 将含有目的基因的重组载体 pGBKT7-VPx, 简称 BD-VPx (x 代表 3, 6, 9, 11, 12)分别与 pGADT7 共转感受态细胞 Y2H Gold, 以及将 pGADT7-VPx, 简称 AD-VPx (3, 6, 9, 11, 12)分别与 pGBKT7 共转 Y2H Gold 感受态细胞, 进行目的蛋白的自激活检测。实验设 pGBKT7-53& pGADT7-T 共转感受态细胞为阳性对照组, 设 pGBKT7-lam& pGADT7-T 共转感受态细胞, 以及 pGBKT7& pGADT7 共转感受态细胞为阴性对照组。吸取适量的共转化酵母涂布于 SD/-Trp-Leu (DDO)平板, 30 恒温倒置培养 3—5d, 待菌落长出后, 挑取单菌落同时接种到二缺板(SD/-Trp-Leu + X- $\alpha$ -Gal +

Aureobasidin A, DDO/X/A)和四缺板(SD/-Trp-Leu-Ade-His + X- $\alpha$ -Gal + Aureobasidin A, QDO/X/A), 30 培养 3—5d, 观菌落生长及菌落颜色变化情况。若转化酵母菌在 DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上均能生长, 且菌落颜色为蓝色, 则说明目的蛋白具有自激活活性; 若转化酵母菌在 DDO/X/A 板上生长且菌落不变蓝, 而在 QDO/X/A 板上不能生长, 则说明该蛋白不具有自激活能力, 可用于后续蛋白互作实验。

1.2.3 SsRV 5 个结构蛋白之间的互作 对 5 个结构蛋白 25 种互作对(双向蛋白间互作对 20 个, 自身互作对 5 个)两两共转酵母感受态细胞, 通过观察转化酵母菌在 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上的生

长及菌落颜色变化情况,分析5个结构蛋白之间以及蛋白自身的互作情况。每组互动对均设 pGBKT7-53 & pGADT7-T 共转感受态细胞为阳性对照组,设 pGBKT7-lam & pGADT7-T 共转感受态细胞,以及 pGBKT7 & pGADT7 共转感受态细胞为阴性对照组。

## 2 实验结果

### 2.1 阳性克隆菌株 PCR 检测结果

重组载体目的基因 VP<sub>x</sub> 的 PCR 及双酶切鉴定如图 1 所示。从图中可以看出,扩增产物及酶切产物中均出现与 5 个目的片段预期分子量相符的条带,说明目的基因被成功引入猎物载体 pGADT7 和诱饵载体 pGBDT7。

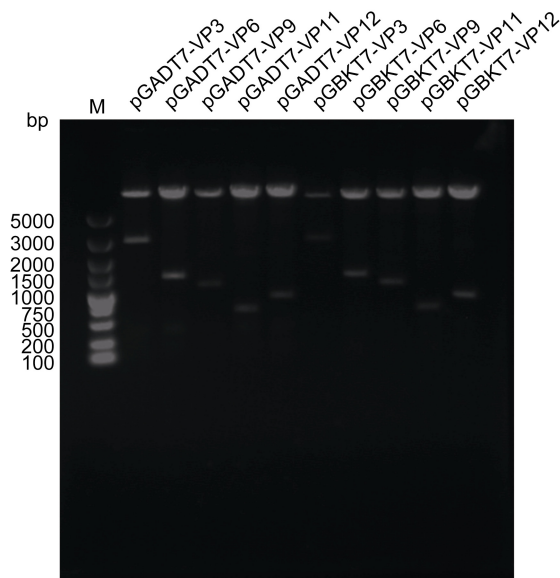


图 1 重组猎物载体及诱饵载体双酶切及 PCR 鉴定  
Fig.1 Digestion and PCR identification of recombined prey vectors and bait vectors  
注: M 为 DNA 分子量标准

### 2.2 猎物蛋白及诱饵蛋白毒性检测

含重组载体 AD-VP<sub>3</sub>、AD-VP<sub>6</sub>、AD-VP<sub>9</sub>、AD-VP<sub>11</sub> 或 AD-VP<sub>12</sub> 的阳性克隆,以及含 BD-VP<sub>3</sub>、BD-VP<sub>6</sub>、BD-VP<sub>9</sub>、BD-VP<sub>11</sub> 或 BD-VP<sub>12</sub> 的阳性克隆在培养基中,经 30 振荡培养 24 h 后,测得菌液 OD<sub>600</sub> 均大于 0.8,表明猎物蛋白及诱饵蛋白对酵母细胞均无毒性作用,可用于后续实验。

### 2.3 结构蛋白自激活检测

将重组载体 BD-VP<sub>x</sub> 和载体 pGADT7,以及将载体 pGBKT7 和重组载体 AD-VP<sub>x</sub> 两两共转酵母菌,通过判断 His<sub>3</sub>、Ade<sub>2</sub>、MEL1 报告基因是否表达来判断目的蛋白是否具有自激活活性。如果目的蛋白具有自

激活活性,将会导致转化酵母菌中报告基因 His<sub>3</sub> 和 Ade<sub>2</sub> 的表达,酵母菌因此能够在缺失 His 和 Ade 的 QDO/X/A 培养基上生长,同时由于蛋白自激活导致 MEL1 基因的表达会促使菌落表面的 X- $\alpha$ -Gal 变为蓝色。反之,如果目的蛋白不具备自激活活性,DDO/X/A 平板上的菌落不会变蓝,亦不能在 QDO/X/A 培养基上生长。实验结果显示(图 3, 图 3),所有的实验组酵母菌均能在 DDO 和 DDO/X/A 平板上生长,且在 DDO/X/A 平板上菌落颜色不变蓝,说明重组捕获载体和重组诱饵载体均成功转入酵母菌,同时也初步表明 5 个结构蛋白无论在诱饵载体,还是在猎物载体中均无自激活活性。更加严格的 QDO/X/A 平板筛选结果表明,酵母菌均不能在 QDO/X/A 板上生长,进一步说明目的蛋白没有自激活活性。阳性对照组和阴性对照组与预期结果相符,即阳性组均能够在 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上生长,且菌落在 DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上均呈现蓝色,而阴性对照组能够在 DDO 和 DDO/X/A 平板上生长,但不能在 QDO/X/A 板上生长,且菌落在 DDO/X/A 平板上不变蓝。

### 2.4 结构蛋白自身及之间互作分析

将 5 种蛋白 25 对互动对分别两两转化感受态酵母 Y2H Gold,并分别涂布于 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板,在 30 恒温培养箱中培养 3—5d,观察记录转化酵母菌生长及颜色变化。如果转化酵母菌能在 DDO 和 DDO/X/A 平板上生长,而不能在 QDO/X/A 板上生长,且菌落在 DDO/X/A 平板上不变蓝,则说明目的蛋白之间或自身不存在相互作用。反之,如果转化菌能在 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上生长,且菌落在 DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上均呈现蓝色,则说明蛋白存在相互作用。如图 2 所示,AD-VP<sub>3</sub>&BD-VP<sub>3</sub>、AD-VP<sub>11</sub>&BD-VP<sub>11</sub> 或 AD-VP<sub>12</sub>&BD-VP<sub>12</sub> 两两共转的酵母菌均能在 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上生长,且菌落在 DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上均呈现蓝色,说明 VP<sub>3</sub>、VP<sub>11</sub> 和 VP<sub>12</sub> 存在自身互作。AD-VP<sub>11</sub>&BD-VP<sub>6</sub>、AD-VP<sub>11</sub>&BD-VP<sub>12</sub>、BD-VP<sub>11</sub>&AD-VP<sub>6</sub> 或 BD-VP<sub>11</sub>&AD-VP<sub>12</sub> 两两共转的酵母菌均能在 DDO、DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上生长,且菌落在 DDO/X/A 和 QDO/X/A 平板上均呈现蓝色,说明 VP<sub>11</sub>&VP<sub>6</sub>、VP<sub>11</sub>&VP<sub>12</sub> 存在双向互作(图 3)。此外,阳性对照组和阴性对照组与预期结果相符(图 2, 图 3),说明本实验结果可靠。

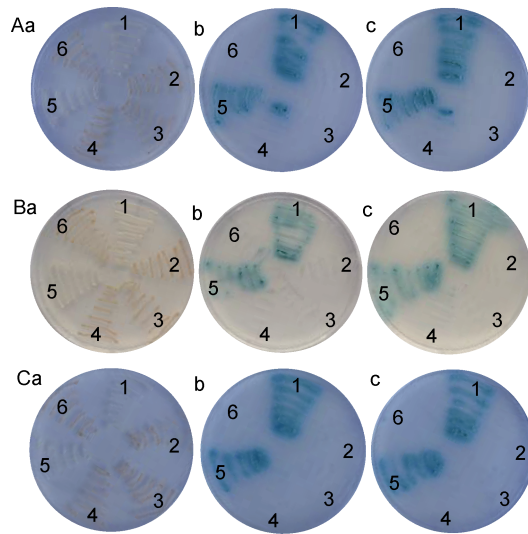


图 2 酵母双杂交分析结构蛋白自身互作

Fig.2 Y2H screening of self-association interaction in SsRV structural proteins

注: A. VP3&VP3; B. VP11&VP11; C. VP12&VP12. a. DDO 培养基; b. DDO/X/A 培养基; c. QDO/X/A 培养基. 1. 阳性对照 pGBKT7-53&pGADT7-T; 2. 阴性对照 pGBKT7-Lam&pGADT7-T; 3. 自激活检测 pGBKT7-VPx&pGADT7; 4. 自激活检测 pGBKT7&pGADT7-VPx; 5. pGBKT7-VPx&pGADT7-VPx; 6. 阴性对照 pGBKT7&pGADT7. x 代表 3, 11 或 12

### 3 讨论

SsRV 全病毒 SDS-PAGE 图谱显示, VP3、VP6、VP12 蛋白条带最浓, 其次为 VP9 和 VP11 蛋白, 而 VP1 条带最弱(Chen *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2016)。同源分析表明, 优势蛋白 VP6 与 LNV 病毒外衣壳蛋白 VP4 蛋白的同源性为 25%, 与 MRV-2 病毒吸附蛋白 sigma1 的同源性为 25%。糖基化位点预测显示, VP6 蛋白含有呼肠孤病毒外衣壳蛋白普遍所具有的糖基化位点。有文献报道, 外衣壳蛋白上的糖基化位点有助于病毒与细胞表面的吸附与侵入(Shaw *et al*, 1996)。基于上述分析, 推断该蛋白为病毒的外衣壳蛋白(Chen *et al*, 2012)。酵母双杂交结果显示 VP6 蛋白能够与 VP11 蛋白互作。VP11 蛋白除了能与 VP6 蛋白互作外, 还能与 VP12 蛋白互作。免疫电镜结果表明, VP12 蛋白定位于病毒粒子表面, 是病毒的外衣壳蛋白(Xu *et al*, 2015)。对于 SsRV 结构蛋白 VP9, SVMProt 蛋白功能预测将该蛋白归类于分子内转移酶家族, 该家族成员具有激酶活性, 也具有二磷酸和核苷酸的转移活性。此外, VP9 蛋白部分序列 RNA 结合蛋白及甲基化转移酶存在同源性, 以此推断该蛋白可能为病毒的甲基转移酶, 参与了 SsRV mRNA 的 5' 端加帽(Chen *et al*, 2012; 张昭等, 2014)。然而, MCRV

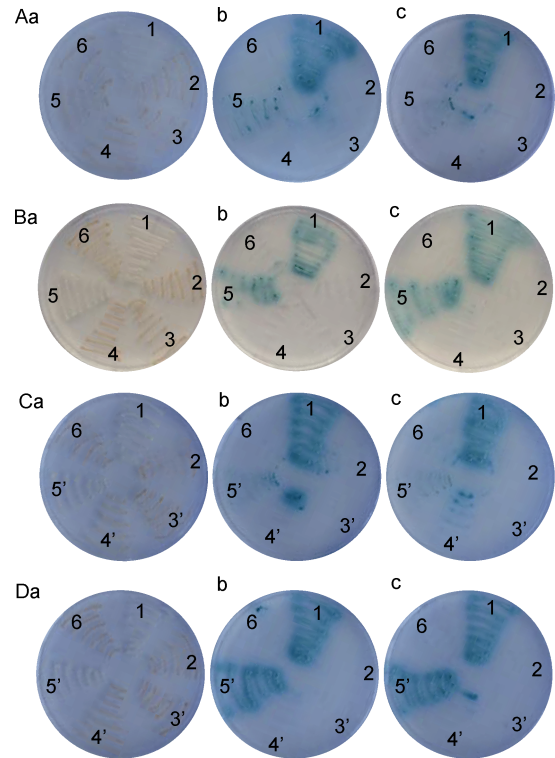


图 3 酵母双杂交分析结构蛋白两两互作

Fig.3 Y2H screening of binary interaction in SsRV structural proteins

注: A. AD-VP11&BD-VP6; B. AD-VP11&BD-VP12; C. BD-VP11&AD-VP6; D. BD-VP11&AD-VP12. a. DDO 培养基; b. DDO/X/A 培养基; c. QDO/X/A 培养基. 1. 阳性对照 pGBKT7-53&pGADT7-T; 2. 阴性对照 pGBKT7-Lam&pGADT7-T; 3. 自激活验证 pGADT7-VP11&pGBKT7; 4. 自激活验证 pGBDT7-VPx&pGAKT7; 5. pGAKT7-VP11&pGBDT7-VPx; 6. 阴性对照 pGBKT7&pGADT7; 3'. 自激活验证 pGBDT7-VP11&pGAKT7; 4'. 自激活验证 pGADT7-VPx&pGBKT7; 5'. pGBKT7-VP11&pGADT7-VPx. x 代表 6 或 12

全病毒的 SDS-PAGE 电泳图谱中未发现 VP9 蛋白(Deng *et al*, 2012), 究其原因可能是 VP9 作为病毒转录复合体的组成成分, 由于其在 MCRV 病毒粒子中的含量较低而被遗漏。酵母双杂交未发现 VP9 存在自身互作, 也未发现该蛋白与其它结构蛋白存在相互作用。对于 SsRV VP3 蛋白, SVMProt 蛋白功能预测将该蛋白归类于催化形成碳-碳键的酶家族。当对其它呼肠孤病毒蛋白进行 SVMProt 预测时, 发现唯有 BTV 内衣壳蛋白 VP3 属于催化形成碳-碳键的酶家族, 因此我们推测 VP3 蛋白可能是 SsRV 内衣壳蛋白组成成分(Chen *et al*, 2012)。酵母双杂交结果显示, VP3 蛋白存在自身互作, 这为内衣壳蛋白的多聚体的形成提供了可能。综合上述分析, 笔者推测: VP6、VP11 和 VP12 均为 SsRV 的外衣壳组成成分, 而 VP3

和 VP9 分别为 SsRV 内衣壳和病毒转录复合体的组成成分。

呼肠孤病毒衣壳蛋白通过自身互作形成多聚体 (Liu *et al*, 2007)。然而, 酵母双杂交结果表明, 作为潜在外衣壳蛋白的 VP6 并不存在自身互作。病毒外衣壳蛋白与内衣壳蛋白间往往通过相互作用来维持结构的稳定性, 然而酵母双杂交并未检测到潜在内衣壳蛋白 VP3 与外衣壳蛋白之间的互作。笔者认为导致上述结果的可能原因是由于酵母双杂交系统的局限性。在酵母细胞中, 通过验证报告基因的表达情况能够精确验证蛋白之间微弱的相互作用关系, 且其互作是在活细胞中进行能够在一定程度上代表细胞内的真实情况, 此外目的基因在酵母细胞中的产物积累效应, 能够显著提高检测的灵敏性, 对于微弱的或暂时性的相互作用也能够呈现出表观的效果 (Rajagopala, 2015)。虽然该技术在蛋白互作研究方面具有上述诸多优点, 但其仍具有一定的局限性, 首先是诱饵蛋白与猎物蛋白的相互作用发生在细胞核内, 对于一些不能入核的蛋白无法检测, 其次是酵母中表达的蛋白质只能进行有限的翻译后修饰, 对于一些需要多种翻译后修饰的蛋白质作用有限 (Rajagopala, 2015)。因此, 后续实验还需要通过 GST-pull down, Far-western 和双分子荧光互补等其他蛋白互作技术, 对 SsRV 结构蛋白互作进一步分析。

#### 4 结论

本研究采用 Clontech 公司的 Matchmaker 系统对 SsRV 5 个结构蛋白的互作进行了分析。利用 Matchmaker 系统携带的三个启动子, 四个报告基因 (His3, Ade2, MEL1 和 AUR1-C2), 以及显色反应的筛选, 有效地减少了假阳性的发生。另外, 通过两个方向的酵母双杂交实验, 验证了蛋白之间的相互作用, 结果真实可靠。VP3, VP6, VP9, VP11 和 VP12 五个结构蛋白自身及之间的相互作用, 与维系 SsRV 病毒形态发生、结构稳定性有密切关系。研究结果为进一步探讨该病毒对宿主的感染和致病机制奠定了坚实的基础。

#### 参 考 文 献

陈吉刚, 杨季芳, 王海丽等, 2008. 养殖锯缘青蟹呼肠孤样病毒粒子的电镜观察. 海洋学研究, 26(4): 93—96

- 张 昭, 朱四东, 井晓欢等, 2014. 锯缘青蟹呼肠孤病毒 p40 蛋白的体外表达与单克隆抗体制备. 上海海洋大学学报, 23(4): 487—491
- Chen J G, Xiong J, Cui B J *et al*, 2012. Molecular characterization of eight segments of *Scylla serrata* reovirus (SsRV) provides the complete genome sequence. Archives of Virology, 157(8): 1551—1557
- Chen J G, Xiong J, Yang J F *et al*, 2011. Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family *Reoviridae*. Archives of Virology, 156(3): 523—528
- Deng X X, Lü L, Ou Y J *et al*, 2012. Sequence analysis of 12 genome segments of mud crab reovirus (MCRV). Virology, 422(2): 185—194
- Huang Z W, Deng X X, Li Y Y *et al*, 2012. Structural insights into the classification of Mud Crab Reovirus. Virus Research, 166(1—2): 116—120
- Liu H J, Wei C H, Zhong Y W *et al*, 2007. Rice black-streaked dwarf virus outer capsid protein P10 has self-interactions and forms oligomeric complexes in solution. Virus Research, 127(1): 34—42
- Miyazaki N, Hagiwara K, Naitow H *et al*, 2005. Transcapsidation and the conserved interactions of two major structural proteins of a pair of phytoreoviruses confirm the mechanism of assembly of the outer capsid layer. Journal of Molecular Biology, 345(2): 229—237
- Rajagopala S V, 2015. Mapping the protein-protein interactome networks using yeast two-hybrid screens. Advances in Experimental Medicine and Biology, 883: 187—214
- Shaw A L, Samal S K, Subramanian K *et al*, 1996. The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. Structure, 4(8): 957—967
- Weng S P, Guo Z X, Sun J J *et al*, 2007. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China. Journal of Fish Diseases, 30(3): 133—139
- Xu H D, Su H J, Zou W B *et al*, 2015. Identification of mud crab reovirus VP12 and its interaction with the voltage-dependent anion-selective channel protein of mud crab *Scylla paramamosain*. Fish & Shellfish Immunology, 44(1): 224—231
- Yuan Y Y, Fan D Y, Zhang Z *et al*, 2016. Identification and RNA segment assignment of six structural proteins of *Scylla serrata* reovirus. Virus Genes, 52(4): 556—560
- Yuan Y Y, Fan D Y, Zhu S D *et al*, 2017. Identification and characterization of host cell proteins interacting with *Scylla serrata* reovirus non-structural protein p35. Virus Genes, 53(2): 317—322
- Zhang Z, Yuan Y Y, Fan D Y *et al*, 2015. *Scylla serrata* reovirus p35 protein expressed in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. Virus Genes, 51(1): 69—76

## MAPPING INTERACTIONS OF *SCYLLA SERRATA* REOVIRUS IN FIVE STRUCTURAL PROTEINS

XIONG Shang-Ling, XING Jun-Liang, FAN Dong-Yang, YUAN Yang-Yang, ZHU Si-Dong,  
LIN Dan-Qiu, YANG Ji-Fang, CHEN Ji-Gang

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract** Each pair-wise combination among five structural proteins of *Scylla serrata* reovirus (SsRV) was analyzed systematically for possible interactions. Potential binary protein interactions among individual structural proteins of SsRV were screened by yeast two-hybrid (Y2H). All the five structural genes (VP3, VP6, VP9, VP11 and VP12) were tested pair-wise against each other in duplicate. None of the proteins was found to autoactivate the HIS3 reporter gene when expressed in the yeast. Of 25 combinations among the five VPs that accounted for two binary and three self associations were identified to be stable and functional within the yeast. The two binary interactions comprised VP11&VP6 and VP11&VP12, while the self association comprised VP3&VP3, VP11&VP11, and VP12&VP12. None of these interactions have been documented previously for SsRV.

**Key words** *Scylla serrata*; reovirus; yeast two-hybrid; interaction