

# Studying on the Interaction of White Spot Syndrome Virus (WSSV) Structural Protein VP51A (ORF294) with Other Structural

李媛婷、張雲祥

E-mail: 9708036@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

In this study, we characterized a novel white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein, VP51A (WSSV-T1 ORF294), identified from a previous study. Membrane topology assay demonstrated that the VP51A 72 kDa protein is a type II transmembrane protein with a highly hydrophobic transmembrane domain on its N-terminal and a C-terminal that is exposed on the surface of virion. Co-immunoprecipitation, co-localization and yeast two-hybrid assays revealed that VP51A associated directly with some WSSV major structural protein, such as VP19, VP24 and VP26 and indirectly with VP28. Thus, these proteins may form a complex in the virion which may contribute to virus infection and to viral morphogenesis.

Keywords : WSSV ; Structural protein ; Envelope protein ; Interaction

## Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書	iii 中文摘要
iv 英文摘要	v 誌謝
vi 目錄	ix 圖目錄
病毒結構蛋白 (structural protein) 之重要性	xii 表目錄
2 1.3 蛋白質交互作用 (protein-protein interaction) 之意義	xv 1. 前言
3 1.4 白點症病毒已知有交互作用之結構蛋白	1.1 白點症病毒
4 1.5 研究目的	2 1.2 白點症病毒已知有交互作用之結構蛋白
5 2. 材料與方法	2.1 實驗流程
6 2.1 實驗流程	6 2.2 材料與方法
6 2.2 材料與方法	7 2.2.1 VP51A 膜拓撲學 (membrane topology)分析
7 2.2.1 VP51A 膜拓撲學 (membrane topology)分析	7 2.2.1.1 VP51A 蛋白親水性、疏水性分析
7 2.2.1.1 VP51A 蛋白親水性、疏水性分析	7 2.2.1.2 VP51A 穿膜區分析
7 2.2.1.2 VP51A 穿膜區分析	7 2.2.1.3 重組 VP51A (recombinant VP51A, rVP51A) 於秋行軍蟲細胞 (Spodoptera frugiperda, Sf9) 之免疫螢光分析
7 2.2.1.3 重組 VP51A (recombinant VP51A, rVP51A) 於秋行軍蟲細胞 (Spodoptera frugiperda, Sf9) 之免疫螢光分析	7 2.2.1.3.1 質體 DNA 構築
7 2.2.1.3.1 質體 DNA 構築	7 2.2.1.3.2 免疫螢光分析
7 2.2.1.3.2 免疫螢光分析	8 2.2.1.4 VP51A 在白點症病毒顆粒上之膜拓撲學
8 2.2.1.4 VP51A 在白點症病毒顆粒上之膜拓撲學	9 2.2.2 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白 VP19、VP24、VP26、VP28 之交互作用
9 2.2.2 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白 VP19、VP24、VP26、VP28 之交互作用	11 2.2.2.1 免疫共沉澱分析 (Co-immunoprecipitation)
11 2.2.2.1 免疫共沉澱分析 (Co-immunoprecipitation)	11 2.2.2.1.1 質體 DNA 構築
11 2.2.2.1.1 質體 DNA 構築	11 2.2.2.1.2 免疫共沉澱分析
11 2.2.2.1.2 免疫共沉澱分析	12 2.2.2.2 酵母菌雙雜交系統 (yeast two-hybrid system) 分析
12 2.2.2.2 酵母菌雙雜交系統 (yeast two-hybrid system) 分析	14 2.2.2.2.1 質體 DNA 構築
14 2.2.2.2.1 質體 DNA 構築	14 2.2.2.2.2 VP51A、VP28、VP26、VP24 及 VP19 基因在酵母菌雙雜交系統中之表現
14 2.2.2.2.2 VP51A、VP28、VP26、VP24 及 VP19 基因在酵母菌雙雜交系統中之表現	14 2.2.2.2.3 交互作用分析
14 2.2.2.2.3 交互作用分析	15 2.2.2.3 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白 VP19、VP24、VP26 在 Sf9 細胞中表現之定位分析
15 2.2.2.3 VP51A 與數個白點症病毒主要結構蛋白 VP19、VP24、VP26 在 Sf9 細胞中表現之定位分析	16 2.2.2.3.1 免疫螢光分析 (co-localization)
16 2.2.2.3.1 免疫螢光分析 (co-localization)	16 2.2.2.3.2 VP51A 與 VP26 在草蝦 (P. monodon) 血球細胞中表現之定位分析
16 2.2.2.3.2 VP51A 與 VP26 在草蝦 (P. monodon) 血球細胞中表現之定位分析	17 3. 結果
17 3. 結果	19 3.1 VP51A 拓撲學分析
19 3.1 VP51A 拓撲學分析	19 3.2 白點症病毒結構蛋白之交互作用分析
19 3.2 白點症病毒結構蛋白之交互作用分析	20 3.2.1 VP51A 與 VP26、VP28 交互作用分析
20 3.2.1 VP51A 與 VP26、VP28 交互作用分析	20 3.2.2 VP51A 與 VP19、VP24 交互作用
20 3.2.2 VP51A 與 VP19、VP24 交互作用	22 3.2.3 VP24 與 VP26、VP28 交互作用
22 3.2.3 VP24 與 VP26、VP28 交互作用	23 3.2.4 VP19 與 VP24、VP26、VP28 交互作用
23 3.2.4 VP19 與 VP24、VP26、VP28 交互作用	24 3.2.5 VP51A、VP19、VP24 自身之交互作用
24 3.2.5 VP51A、VP19、VP24 自身之交互作用	24 3.2.6 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖
24 3.2.6 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖	25 4. 討論
25 4. 討論	26 5. 結論
26 5. 結論	30 參考文獻
30 參考文獻	64 圖目錄
64 圖目錄	圖1 白點症病毒 VP51A 蛋白親水性、疏水性預測.....31
圖1 白點症病毒 VP51A 蛋白親水性、疏水性預測.....31	圖2 VP51A 穿膜位置分析 (TMHMM).....32
圖2 VP51A 穿膜位置分析 (TMHMM).....32	圖3 Sf9 分析重組 VP51A 之膜拓撲學.....33
圖3 Sf9 分析重組 VP51A 之膜拓撲學.....33	圖4 VP51A 膜拓撲學示意圖.....34
圖4 VP51A 膜拓撲學示意圖.....34	圖5 病毒拓撲學分析.....35
圖5 病毒拓撲學分析.....35	圖6 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP26 及 VP51A/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....36
圖6 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP26 及 VP51A/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....36	圖7 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26、VP28 在酵母菌雙雜交系統中交互作用..... 38
圖7 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26、VP28 在酵母菌雙雜交系統中交互作用..... 38	圖8 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26 於昆蟲細胞中共同表現分析.....40
圖8 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26 於昆蟲細胞中共同表現分析.....40	圖9 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26 於草蝦血球細胞中共同表現分析.....41
圖9 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP26 於草蝦血球細胞中共同表現分析.....41	圖10 白點症病毒結構蛋白 VP26/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-FLAG) 與 V5 標示之 VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....42
圖10 白點症病毒結構蛋白 VP26/VP28 交互作用：FLAG 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-FLAG) 與 V5 標示之 VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....42	圖11 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP26/VP28 之交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....43
圖11 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP26/VP28 之交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP26 重組蛋白 (VP26-V5)、VP28 重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....43	圖12 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP19 及 VP51A/VP24 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-V5)、VP24 重組蛋白 (VP24-V5) 之交互作用分析.....44
圖12 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP19 及 VP51A/VP24 交互作用：FLAG 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-FLAG) 與 V5 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-V5)、VP24 重組蛋白 (VP24-V5) 之交互作用分析.....44	圖13 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP19 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-FLAG) 之交互作用分析.....46
圖13 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP19 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP19 重組蛋白 (VP19-FLAG) 之交互作用分析.....46	圖14 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP19 在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....47
圖14 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP19 在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....47	圖15 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP19 於昆蟲細胞中共同表現分析.....48
圖15 白點症病毒結構蛋白 VP51A 與 VP19 於昆蟲細胞中共同表現分析.....48	圖16 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP24 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP24 重組蛋白 (VP24-FLAG) 之交互作用分析.....49
圖16 白點症病毒結構蛋白 VP51A/VP24 交互作用之再確認：V5 標示之 VP51A 重組蛋白 (VP51A-V5) 與 FLAG 標示之 VP24 重組蛋白 (VP24-FLAG) 之交互作用分析.....49	圖17 白點

症病毒結構蛋白VP51A與VP24在酵母菌雙雜交系統中交互作用白點症病毒結構蛋白VP51A與VP24在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....50 圖18 白點症病毒結構蛋白VP51A與VP24於昆蟲細胞中共同表現分析.....51

.....51 圖19 白點症病毒結構蛋白VP24/VP26及VP24/VP28交互作用：FLAG標識之VP24重組蛋白 (VP24-FLAG)與V5標識之VP26重組蛋白 (VP26-V5)、VP28重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....52

.....52 圖20 白點症病毒結構蛋白VP24/VP26交互作用之再確認：V5標示之VP24重組蛋白 (VP24-V5)與FLAG標識之VP26重組蛋白 (VP26-FLAG)之交互作用分析.....54

.....54 圖21 白點症病毒結構蛋白VP24A與VP26在酵母菌雙雜交系統中交互作用.....55

.....55 圖22 白點症病毒結構蛋白VP24與VP26於昆蟲細胞中共同表現分析.....56

.....56 圖23 白點症病毒結構蛋白VP19/VP24、VP19/VP26、VP19/VP28交互作用：FLAG標識之VP19重組蛋白 (VP19-FLAG)與V5標示之VP24重組蛋白 (VP24-V5)、VP26重組蛋白 (VP26-V5)、VP28重組蛋白 (VP28-V5) 之交互作用分析.....57

.....57 圖24 白點症病毒結構蛋白VP51A/VP51A、VP19/VP19及VP24/VP24交互作用：FLAG標識之VP51A重組蛋白 (VP51A-FLAG)、VP19重組蛋白 (VP19-FLAG)、VP24重組蛋白 (VP24-FLAG)與V5標示之VP51A重組蛋白 (VP51A-V5)、VP19重組蛋白 (VP19-V5)、VP24重組蛋白 (VP24-V5)之交互作用分析.....59

.....59 圖25 白點症病毒結構蛋白交互作用示意圖.....61

.....61 表目錄 表1 酵母菌雙雜交系統分析之特定核酸引子.....62

.....62 表2 結構蛋白交互作用分析表.....63

## REFERENCES

- 參考文獻 1. 周宗錄, 2007。蝦白點症病毒結構性蛋白VP51A (ORF294)特性分析。私立大葉大學分子生物科技學系碩士論文。 2. Bruchfeld, A., D. Saadoun, and P. Cacoub. 2006. Treatment for glomerulonephritis in hcv-associated mixed cryoglobulinaemia-anti-viral therapy vs rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 45, no. 6: 783-4; author reply 784-5. 3. Campadelli-Fiume, G., M. Amasio, E. Avitabile, A. Cerretani, C. Forghieri, T. Gianni, and L. Menotti. 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17, no. 5: 313-26. 4. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapajitkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul, and P. Sithigorngul. 2006. Development of a polyclonal antibody specific to vp19 envelope protein of white spot syndrome virus (wssv) using a recombinant protein preparation. *J Virol Methods* 133, no. 2: 180-4. 5. Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, G. H. Kou, and C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in taiwan. *Dis Aquat Org* 23: 165-173. 6. Dhar, A. K., A. Dettori, M. M. Roux, K. R. Klimpel, and B. Read. 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cdna microarrays. *Arch Virol* 148, no. 12: 2381-96. 7. Farid, A., M. Al-Sherbiny, A. Osman, N. Mohamed, A. Saad, M. T. Shata, D. H. Lee, A. M. Prince, and G. T. Strickland. 2005. Schistosoma infection inhibits cellular immune responses to core hcv peptides. *Parasite Immunol* 27, no. 5: 189-96. 8. Huang, J., X. L. Song, J. Yu, and C. H. Yang. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar Fish Res* 16: 1 ~ 10. 9. Huang, J., J. Yu, X. L. Song, J. Kong, and C. H. Yang. 1995. Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp. *Mar Fish Res* 16: 11 ~ 23. 10. Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Soderhall, and I. Soderhall. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *pacifastacus leniusculus*. *Dis Aquat Organ* 47, no. 2: 151-7. 11. Jiravanichpaisal, P., S. Sricharoen, I. Soderhall, and K. Soderhall. 2006. White spot syndrome virus (wssv) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20, no. 5: 718-27. 12. Kiatpathomchai, W., A. Taweetungtragoon, K. Jittivadhana, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, and T. W. Flegel. 2005. Target for standard thai pcr assay identical in 12 white spot syndrome virus (wssv) types that differ in DNA multiple repeat length. *J Virol Methods* 130, no. 1-2: 79-82. 13. Kim, C. S., Z. Kosuke, Y. K. Nam, S. K. Kim, and K. H. Kim. 2007. Protection of shrimp (*penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (wssv) challenge by double-stranded rna. *Fish Shellfish Immunol* 23, no. 1: 242-6. 14. Li, L. J., J. F. Yuan, C. A. Cai, W. G. Gu, and Z. L. Shi. 2006. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (wssv) infection in crayfish. *Arch Virol* 151, no. 7: 1309-17. 15. Li, Z., Q. Lin, J. Chen, J. L. Wu, T. K. Lim, S. S. Loh, X. Tang, and C. L. Hew. 2007. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and itraq differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics* 6, no. 9: 1609-20. 16. Liu, W. J., Y. S. Chang, A. H. Wang, G. H. Kou, and C. F. Lo. 2007. White spot syndrome virus annexes a shrimp stat to enhance expression of the immediate-early gene ie1. *J Virol* 81, no. 3: 1461-71. 17. Lo, C. F., Leu, J. H., Ho, C. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, Y. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C. J., Chou, H. Y., Wang, C. H., and Kou, G. H. 1996b. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25:133-141. 18. Lotz, J. M., Browdy, C. L., Carr, W. H., Frelief, P. F., and Lightner, D. V. 1995. USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. In: Browdy CL, Hopkins JS (eds) *Swimming Through Troubled Water*, Proceedings the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66-75. 19. Lotz, J. M. and M. A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (wssv) epidemics in *litopenaeus vannamei*. *Dis Aquat Organ* 50, no. 3: 199-209. 20. Matsuda, K., M. Makise, Y. Sueyasu, M. Takehara, T. Asano, and T. Mizushima. 2007. Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *saccharomyces cerevisiae*: Interaction between subunits and identification of binding proteins. *FEMS Yeast Res* 7, no. 8: 1263-9. 21. Mokhtari-Azad, T., H. Mohammadi, I. A. Moosavi, Z. Saadatmand, and R. Nategh. 2004. Influenza surveillance in the islamic republic of iran

from 1991 to 2001. *East Mediterr Health J* 10, no. 3: 315-21. 22. Nadala, E. C. B., Tappy, L. M., and Loh, P. C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 31:141 – 146. 23. Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., and Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29:135-139. 24. Nykanen, M., R. Saarelainen, M. Raudaskoski, K. Nevalainen, and A. Mikkonen. 1997. Expression and secretion of barley cysteine endopeptidase b and cellobiohydrolase i in *trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63, no. 12: 4929-4937. 25. Papadopoulos, M., S. Saadoun, S. Krishna, B. Bell, and D. Davies. 2002. The aquaporin-1 water channel protein is abnormally expressed in oedematous human brain tumours. *J Anat* 200, no. 5: 531-532. 26. Saarelainen, R., A. Mantyla, H. Nevalainen, and P. Suominen. 1997. Expression of barley endopeptidase b in *trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63, no. 12: 4938-4940. 27. Tang, X. and C. L. Hew. 2007. Expression, purification and crystallization of two major envelope proteins from white spot syndrome virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, no. Pt 7: 624-6. 28. Tang, X., J. Wu, J. Sivaraman, and C. L. Hew. 2007. Crystal structures of major envelope proteins vp26 and vp28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *J Virol* 81, no. 12: 6709-17. 29. Tsai, J. M., H. C. Wang, J. H. Leu, H. H. Hsiao, A. H. Wang, G. H. Kou, and C. F. Lo. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol* 78, no. 20: 11360-70. 30. Tsai, J. M., H. C. Wang, J. H. Leu, A. H. Wang, Y. Zhuang, P. J. Walker, G. H. Kou, and C. F. Lo. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol* 80, no. 6: 3021-9. 31. van Hulten, M. C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R. K. Lankhorst, and J. M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, no. 1: 7-22. 32. van Hulten, M. C., J. Witteveldt, M. Snippe, and J. M. Vlak. 2001. White spot syndrome virus envelope protein vp28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285, no. 2: 228-33. 33. Wang, C. H., Lo, C. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Chou, H.Y., E. T. M., Chang, C. F., Su, M. S., and Kou, G. H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239-242. 34. Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassankajon, A., Withyanchumnarnkul, B., and Flegel, T. W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77. 35. Wu, W., L. Wang, and X. Zhang. 2005. Identification of white spot syndrome virus (wssv) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* 332, no. 2: 578-83. 36. Xie, X., L. Xu, and F. Yang. 2006. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol* 80, no. 21: 10615-23. 37. Xie, X. and F. Yang. 2006. White spot syndrome virus vp24 interacts with vp28 and is involved in virus infection. *J Gen Virol* 87, no. Pt 7: 1903-8. 38. Zhang, X., C. Huang, and Q. Qin. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *penaeus monodon*. *Antiviral Res* 61, no. 2: 93-9.