烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株 *3h-161* 的克隆和表达谱分析*

陈 斌** 徐存翊 黎 妮 谭 赟 于 欢 黄国华***

（湖南农业大学植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室，长沙 410128）

摘 要 【目的】本文旨在明确烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株（HvAV-3h）编码的第 161 号开放阅读框（*3h-161*）的序列特征及表达谱，为深入研究其功能奠定基础。**【方法】** 采用 PCR 技术克隆 *3h-161* 的 CDs 序列，构建原核表达载体，并制备高效的多克隆抗体；利用 RT-PCR 技术检测 *3h-161* 的转录情况，利用蛋白免疫印迹法检测 3H-161 的表达情况。**【结果】** *3h-161* 编码区长 516 bp，共编码 172 个氨基酸残基，感染甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 3 龄幼虫后 12 h 开始转录、48 h 开始表达；3H-161 在囊泡病毒属内的不同毒株（HvAV-3j、HvAV-3i、HvAV-3e、HvAV-3f 和 HvAV-3g）间高度保守，序列一致性为 100%。**【结论】** 本研究阐明了 *3h-161* 的序列特征、获得了 3H-161 的多克隆抗体，明确了其表达谱，为进一步研究该基因在 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾过程中发挥的作用奠定基础。

关键词 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株（HvAV-3h）；*3h-161*；原核表达；时相分析

Cloning and expression of *3h-161* gene encoded by Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h)

CHEN Bin** XU Cun-Yi LI Ni TAN Yun YU Huan HUANG Guo-Hua***

(Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract [Objectives] To clarify the sequence characteristics and expression profile of the *3h-161* (*open reading frame 161*) gene in Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h), thereby laying a foundation for further study of the function of this gene. **[Methods]** The CDs sequence of *3h-161* was cloned using PCR technology, a prokaryotic expression plasmid vector constructed and efficient polyclonal antibody prepared. RT-PCR and Western blotting technology was then used to detect the transcription and expression of 3H-161. **[Results]** The coding regions of *3h-161* are 516 bp in length, encoding 172 amino acids, respectively. Transcription began at 12 h and expression from 48 h in 3rd instar *S. exigua* larvae after infection with HvAV-3h. The putative protein sequences of *3h-161* are highly conservative in the *Ascovirus* and share 100% amino acid sequence identity with HvAV-3j, HvAV-3i, HvAV-3e, HvAV-3f and HvAV-3g. **[Conclusion]** The sequence characteristics of *3h-161* were determined, a polyclonal antibody of 3H-161 was obtained, and the expression profile of this gene was clarified, all of which lay a foundation for further study of the function of the *3h-161* gene during the infection of *S. exigua* by HvAV-3h.

Key words Heliothis virescens ascovirus 3h; *3h-161*; prokaryotic expression; phase analysis

囊泡病毒 Ascoviruses 隶属于囊泡病毒科 *Ascoviridae*，是一种环状双链 DNA 昆虫病毒，其基因组大小为 110-200 kb，是一类对鳞翅目、膜翅目和鞘翅目昆虫具有病原性的昆虫病原微生物（Asgari *et al*.，2017）。囊泡病毒于 1978 年首次在美国加利福利亚洲被发现，之后陆续在

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31872027）；国家现代农业产业技术体系（CARS-23-C08）

**第一作者 First author，E-mail：njchanbin@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：ghhuang@hunau.edu.cn

收稿日期 Received：2021-06-15；接受日期 Accepted：2022-01-19

法国、澳大利亚、印度尼西亚、中国和日本被报道（Adams *et al.*，1979；Bigot *et al.*，1997；Cheng *et al.*，2000；Newton，2004；Huang *et al.*，2012；Arai *et al.*，2018）。其病毒粒子呈杆状或卵状，长 200-400 nm，直径约 130 nm（Asgari *et al.*，2017）。感染囊泡病毒后的宿主幼虫取食量减少、发育缓慢、蜕皮困难、行动迟钝且血淋巴逐渐呈浑浊的乳白色（Federici，1983；Govindarajan and Federici，1990；Hu *et al.*，2016）。

烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株（Heliothis virescens ascovirus 3h，HvAV-3h）于 2011 年分离自长沙（Huang *et al.*，2012），对棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner，1808）、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner，1808）、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（Smith，1797）及斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Fabricius，1775）等具有强致病力和高致死率（Li *et al.*，2013；刘航等，2020）。其基因组全长为 190 519 bp，预测编码 185 个开放阅读框（Open reading frame，ORF）（Huang *et al.*，2017）。

关于 HvAV-3h 功能基因的研究正在逐步推进，除了病毒粒子的结构蛋白编码基因外（Zhao *et al.*，2019，2020；李诗薇等，2021），仅有部分基因的功能在前期的研究中被报道（曹生凯等，2021；Yu *et al.*，2021）。因此，展开对 HvAV-3h 功能基因的研究能够更好的帮助理解 HvAV-3h 的致病机制及分类进化。基于此，本研究对 HvAV-3h 的第 161 个 orf（*3h-161*）的功能进行了分析。通过序列分析、原核表达、抗体制备、逆转录聚合酶链式反应（Reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）以及蛋白免疫印迹检测法对 *3h-161* 的功能进行了初步的阐释，明确了 3H-161 在 HvAV-3h 感染过程中的表达谱，为进一步深入研究其功能及在病毒复制和/或转录过程中的具体功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

在实验室条件下，采用人工饲料饲喂甜菜夜蛾幼虫。人工饲料配方及配置方法参照陈壮美等（2019）报道的方法；成虫使用蜂蜜水（浓度为 20%）饲养。室内饲养温度为（27±1）℃，相对湿度为 75%，光周期设置为 16 L∶8 D。

1.2 供试病毒、菌株和试剂

HvAV-3h 由 Huang 等（2012）分离，并于 2017 年完成全基因组测序。

大肠杆菌 BL21（TG1 和 DE3）以及 pET-28a（+）均由本实验室长期保存。

T_4 DNA 连接酶、pGEM-T 载体试剂盒、Go Script 反转录试剂盒购自普洛麦格（北京）生物技术有限公司；V-ELUTE 微柱浓缩 DNA 凝胶回收试剂盒和快速质粒 DNA 小量提取试剂盒均购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司；蛋白免疫印迹显色液、TRI Reagent RNA/DNA/Protein 提取试剂盒、Ni^{2+}-NTA 琼脂糖试剂购自湖南晶科生物有限公司；限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ、*Taq* DNA 聚合酶、异丙基-β-D 硫代吡喃半乳糖苷（Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside，IPTG）购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；其他国产分析纯化学试剂购自湖南永翔生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 序列分析 在 NCBI 下载 HvAV-3h 基因组序列（GenBank 登录号：KU170628.1）及预测的 HvAV-3h 各 orf（Huang *et al.*，2017）。通过 DNAMAN 把 DNA 序列翻译成氨基酸序列；使用 NCBI BLAST 在线分析软件（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast）将 3H-161 的氨基酸序列与 GenBank 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）进行比较分析；应用在线分析工具 Signal P（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）、TMP-red（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）、Net-Phos（https://services.healthtech.dtu.dk/service/NetPhos/）和 Net-NGlyc（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）对 3H-161 的跨膜区、信号肽序列和磷酸化位点进行预测分析。

1.3.2 *3h-161* 的克隆 在甜菜夜蛾幼虫生长至

3 龄（蜕皮后 12-24 h），使用昆虫针接种 HvAV-3h，72 h 后，利用 TRI Reagent RNA/DNA/Protein 试剂盒提取虫体的总 RNA（Zhao *et al.*，2019），反转录合成 cDNA。设计 *3h-161* 的特异性引物：*3h-161*-F（5′-GGATCCATGGCTCTTCGCACA-ATAAC-3′，下划线处为 *Bam*HⅠ酶切位点）和 *3h-161*-R（5′-AAGCTTTTATTGTTGCTGCGGG-C′-3′，下划线出为 *Hin*dⅢ酶切位点）并由北京擎科生物技术有限公司代为合成。以制备的 cDNA 为模板，PCR 扩增获得 *3h-161*。

根据 pGEM-T 载体试剂盒的说明书，将 *3h-161* 与 T 载体连接，命名为 pGEM-T-161，将 pGEM-T-161 转化到大肠杆菌 BL21（TG1）感受态细胞中，蓝白斑筛选后挑选白色单菌落，然后送至湖南擎科生物技术有限公司进行测序分析。

1.3.3　*3h-161* 的原核表达、纯化及抗体制备　将 pGEM-T-161 与 pET-28a(+)同时使用 *Bam*HⅠ、*Hin*dⅢ酶切鉴定后胶回收目的条带。使用 T_4 DNA 连接酶将 pET-28a（+）与 *3h-161* 连接，构建原核表达载体：pET-28a-161。随后将 pET-28a-161 转化至大肠杆菌 BL21（TG1）感受态细胞中，蓝白斑筛选后挑取阳性克隆过夜培养，提取 pET-28a-161 并进行酶切鉴定。然后将 pET-28a-161 转化至大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，挑取阳性克隆过夜培养后提取 pET-28a-161 酶切鉴定。将验证正确的含 pET-28a-161 的大肠杆菌 BL21（DE3）菌液加入 IPTG（10 μg/mL）进行大量诱导。收集菌体沉淀用平衡缓冲液重悬，经超声破碎离心后，上清液与 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖室温孵育后，加入到层析柱中，分别用 pH 为 8.0、6.3、5.9 和 4.5 的洗脱缓冲液对 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖进行洗脱，收集流出液。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析纯化的融合蛋白。将纯化的融合蛋白送至武汉戴安生物有限公司制备多克隆抗体。

1.3.4　*3h-161* 在 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾后的转录时相检测　按照 1.3.2 的方法提取接种 HvAV-3h 后不同时间点的 3 龄甜菜夜蛾幼虫的 RNA，并合成 cDNA，使用特异性引物 *3h-161*-F/*3h-161*-R 以及甜菜夜蛾甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（*gapdh*）的特异性引物：*gapdh*-F（5′-GGAT-CCATGTCTAAAATCGGTA-3′）；*gapdh*-R（5′-CT-CGAGATCCTTGGTCTGGATG-3′）进行 RT-PCR（Yu *et al.*，2018），分析 *3h-161* 的转录时相。

1.3.5　*3H-161* 在 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾后的表达谱检测　在 1.3.4 的基础上，从提取总 RNA 的有机相中继续提取虫体的蛋白进行 SDS-PAGE 分析，并将含有目的蛋白的条带转印到醋酸纤维膜上，膜室温封闭后放入含 3H-161 兔多克隆抗体的 TBST 脱脂奶粉缓冲液中（1∶4 000），4 ℃过夜。用 TBST 缓冲液漂洗膜 5 次，随后放入含过氧化物酶标记山羊抗兔单克隆抗体（Millipore，Cat#AP132P，1∶5 000）的 TBST 缓冲液中室温孵育 2 h；漂洗后加入蛋白免疫印迹显色液进行显色反应。

1.4　数据分析与处理

利用 Primer Premier 5 软件设计 *3h-161* 扩增的特异性引物序列；同源序列分析使用 NCBI BLAST（https://blast.bcbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）和 DNAMAN 进行分析并作图。

2　结果与分析

2.1　3H-161 的序列分析

利用 NCBI ORF Finder 等软件对所获得的序列进行分析，结果显示，烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株 *3h-161* 位于基因组的 169 273-169 788 bp，编码区全长 516 bp。*3h-161* 编码 1 个由 172 个氨基酸残基组成的蛋白。其分子量大小为 19.83 ku，等电点（pI）为 10.49。从 NCBI 上筛选 3H-161 的同源蛋白进行一致性分析，结果表明 3H-161（HvAV-3h，登录号为 AYD68262.1）与 GenBank 数据库中 3J-164（HvAV-3j，登录号：BBB 16634.1）、3I-155（HvAV-3i，登录号：AXN77338.1）、3G-167（HvAV-3g，登录号：YP_009702160.1）、3E-152（HvAV-3e，登录号：YP_00111005.1）和 3F-164

（HvAV-3f，登录号：YP_009701630.1）具有 100% 的序列相似性；与 SfAV-1a-79（SfAV-1a，登录号：YP_762434.1）、TnAV-6a-149（TnAV-6b，登录号：AUS94248.1 和 TnAV-2a-137（TnAV-2c，登录号：YP_803360.1）分别具有 38.5%、37.5% 及 36.3%的序列相似性（图 1）。

应用 Signal P、TMP red 等在线工具分析推测，未发现信号肽和跨膜区序列；Net-Phos 预测出其 C 端 14-107 氨基酸位置有一个 *bro-n* 结构域（图 1 中红色方框标注）；根据 Net-NGlyc 的分析结果，3H-161 的氨基酸序列中含有 2 个 N 端糖基化位点（图 1 中黑色五角星号标注）和 7 个磷酸化位点：3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点（图 1 中蓝色星号标注）、2 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点（图 1 中黄色菱形标注）及 2 个蛋白激酶 G 磷酸化位点（图 1 中绿色圆形标注）。

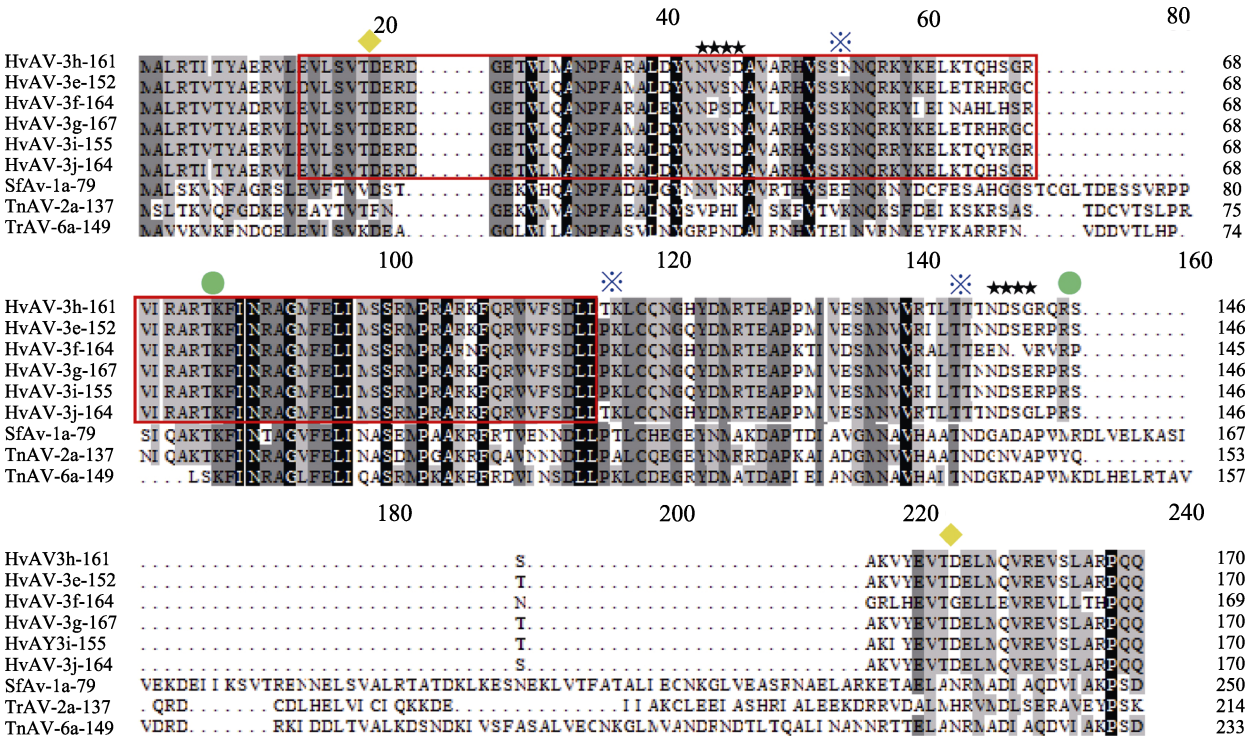

图 1　3H-161 蛋白多序列对比结果

Fig. 1　Multiple sequence alignment results of 3H-161

右边的数字表示不同序列的氨基酸位置。黑色底纹：100%序列相似性；深灰色底纹：90%序列相似性；浅灰色底纹：70%序列相似性。左侧缩写在 GenBank 中的登录号分别为：HvAV-3h-161：AYD68262.1；HvAV-3e-152：YP_001111005.1；HvAV-3f-164：YP_009701630.1；HvAV-3g-167：YP_009702160.1；HvAV-3i-155：AXN77338.1；HvAV-3j-164：BBB 16634.1；SfAv-1a-79：YP_762434.1；TnAv-2a-137：YP_803360.1；TnAV-6a-149：AUS94248.1；▭表示 *bro-n* 结构域；★★★★表示 N 端糖基化位点；※表法蛋白激酶 C；●表示蛋白激酶 G；◆表示酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点。

Numbers on the right show the amino acid position of different sequences. Black shading: 100% identity; Dark grey shading: 90% identity; Light grey shading: 70% identity. Abbreviations and data sources with GenBank accession numbers in parentheses: HvAV-3h-161: AYD68262.1; HvAV-3e-152: YP_001111005.1; HvAV-3f-164: YP_009701630.1; HvAV-3g-167: YP_009702160.1; HvAV-3i-155: AXN77338.1; HvAV-3j-164: BBB16634.1; SfAv-1a-79: YP_762434.1; TnAv-2a-137: YP_803360.1; TnAV-6a-149: AUS94248.1; *bro-n* domain marked by▭; N-terminal glycosylation marked by★★★★; Protein kinase C marked by※; Protein kinase G marked by●; Casein kinase II phosphorylation marked by◆.

2.2　*3h-161* 的克隆、原核表达及抗体制备

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳显示得到了一条大小为 528 bp 的特异性条带（含酶切位点）（图 2），说明 *3h-161* 扩增成功。

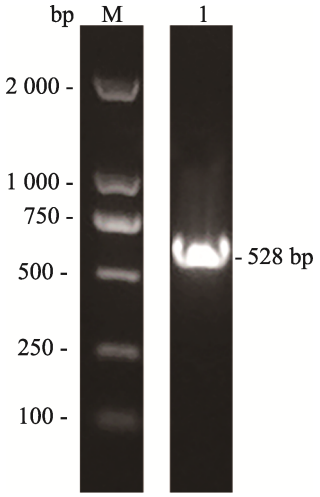

图 2　烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株 *3h-161* PCR 扩增

Fig. 2　PCR amplification of *3h-161* gene encoded by Heliothis virescens ascovirus 3h

M：2000 marker；1：*3h-161* 基因的 PCR 产物。

M: 2000 marker; 1: PCR product of gene *3h-161*.

将 *3h-161* 克隆至 pGEM-T 载体后，获得 pGEM- T-161（图 3：A）。酶切鉴定结果表明：

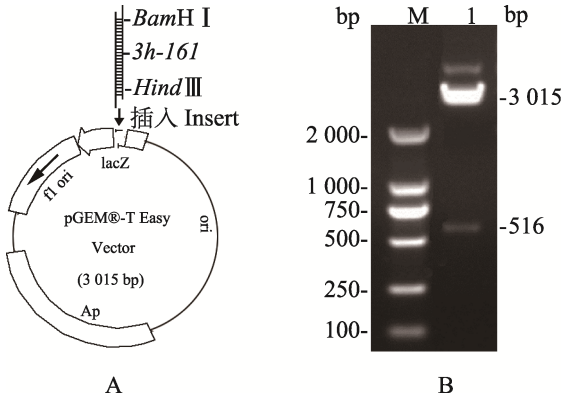

图 3　pGEM-T-161 连接模式图及 pGEM-T-161 酶切鉴定图

Fig. 3　The connection model diagram of pGEM-T-161 and double-enzyme digestion of pGEM-T-161

A. pGEM-T-161 连接模式图；B. *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定图。M：2 000 marker；1：基因 *3h-161*。

A. The connection model diagram of pGEM-T-161; B. Results of *Bam*H Ⅰ and *Hind* Ⅲ double-enzyme digestion of *3h-161*. M: 2 000 marker; 1: Gene *3h-161*.

泳道除了一条约 3 015 bp 的载体条带外，还有与目的基因大小一致的目的条带，大小约为 516 bp（图 3：B），表明 *3h-161* 成功克隆至 pGEM-T 载体上。

3h-161 与 pET-28a(+)连接构建 pET-28a-161（图 4：A）。酶切鉴定结果表明：泳道中出现一条大小约为 516 bp 的特异性条带，与一条为 5 369 bp 左右的 pET-28a（+）条带（图 4：B），这表明成功构建了 pET-28a-161。

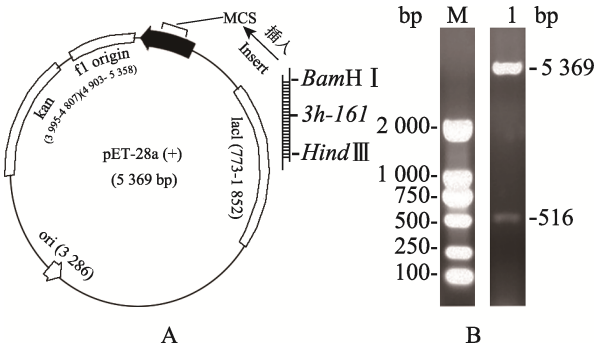

图 4　pET-28a-161 连接模式图及酶切鉴定图

Fig. 4　The connection model diagram of pET-28a-161 and double-enzyme digestion diagram of pET-28a-161

A. pET-28a-161 连接模式图；B. *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定图。M：2000 marker；1：pET-28a-161。

A. The connection model diagram of pET-28a-161; B. Results of *Bam*H Ⅰ and *Hind* Ⅲ double-enzyme digestion diagram of pET-28a-161; M: 2000 marker; 1: pET-28a-161.

将 pET-28a-161 转化到大肠杆菌 BL21（DE3）后加入 IPTG 进行大量诱导。结果表明：在 IPTG 诱导下，*3H-161* 自身大小为 19.83 ku，而 pET-28a（+）可以表达出大约 3.7 ku 的标签蛋白，所以预测 pET-28a-161 可以表达 23.53 ku 大小的融合蛋白。如图 5 所示，在 pET-28a-161（DE3）的超声破碎脲溶上清上样的泳道中有 1 条大小约为 23.53 ku 的蛋白；这和我们所预测的 3H-161 融合蛋白大小相一致。在超声破碎后的上清中几乎不存在 3H-161 的可溶性蛋白（泳道 pET-28a（+）-DE3-161 裂解物），其几乎变成包涵体溶解于 8 mol/L 的脲中（泳道超声破碎脲溶上清）。最终大量的 3H-161 蛋白从洗脱缓冲液（pH 5.9）和洗脱缓冲液（pH 4.5）中流出。取泳道 pH 5.9 的洗脱缓冲液中的流出液送至武汉戴安生物技

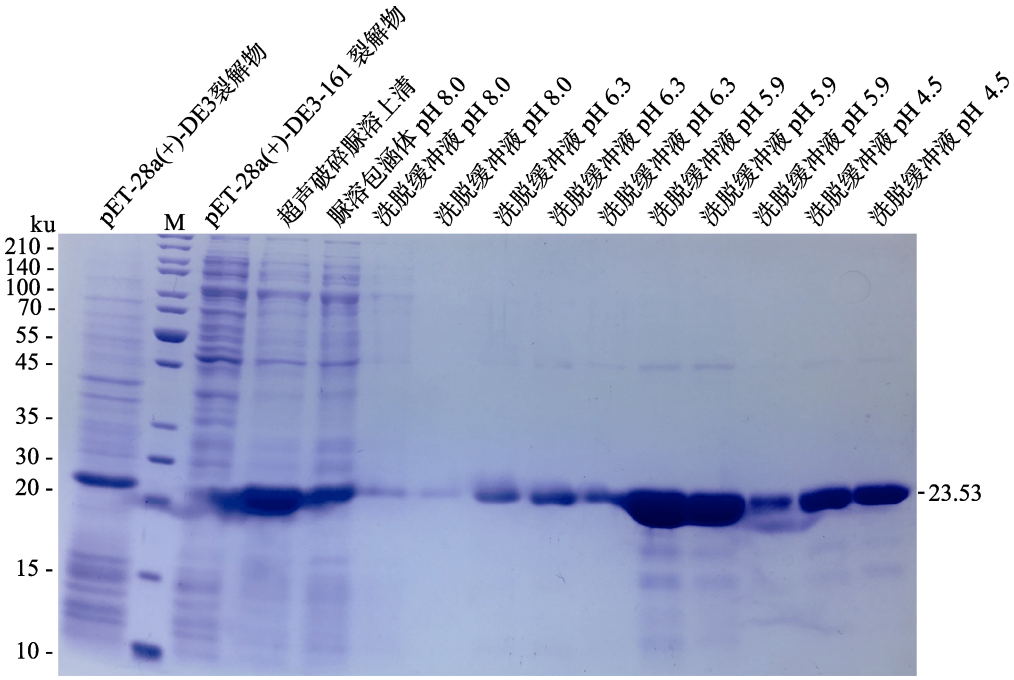

图 5 3H-161 的表达和纯化结果

Fig. 5 The expression and purification results of 3H-161

泳道 pET-28a（+）-DE3 裂解物：BL21（DE3）裂解产物；泳道 M：SDS-PAGE marker；泳道 pET-28a（+）-DE3-161 裂解物：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）超声破碎上清；泳道超声破碎脲溶上清：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）超声破碎后被 8 mol/L 脲溶解的包涵体上清；泳道脲溶包涵体 pH 8.0：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）被 8 mol/L 脲（pH 8.0）流出液；泳道洗脱缓冲液 pH 6.3：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）被 8 mol/L 脲（pH 6.3）流出液；泳道洗脱缓冲液 pH 5.9：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）被 8 mol/L 脲（pH 5.9）流出液；泳道洗脱缓冲液 pH 4.5：含有 pET-28a（+）-DE3-161 的 BL21（DE3）被 8 mol/L 脲（pH 4.5）流出液。

Lane pET-28a(+)-DE3: Soluble cell lysate of *Escherichia coli* BL21(DE3); Lane M: SDS-PAGE marker; Lane pET-28a(+)-DE3-161: Supernatant of scaled induced pET-28a-161 produced by ultrasonic destroyed; Lane urea supplement: Dissolved pET-28a-161 inclusion bodies with 8 mol/L urea; Lane flow through urea, pH 8.0: 8 mol/L urea, pH8.0 wash-out elution; Lane flow through urea, pH 6.3: 8 mol/L urea, pH 6.3wash-out elution; Lane flow through urea, pH 5.9: 8 mol/L urea, pH 5.9 wash-out elution; Lane flow through urea, pH 4.5: 8 mol/L urea, pH 4.5 wash-out elution.

术有限公司，免疫健康的新西兰大白兔，制备相应的兔多克隆抗体。

2.3 *3h-161* 的转录时相分析

收集 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾 3 龄幼虫后不同时间点的虫体，提取总 RNA 进行 RT-PCR 分析。结果如图 6 所示，*3h-161* 在病毒感染后 12 h 被检测到，持续至 168 h。作为对照的内参基因 *gapdh* 在所有时间点均可检测到，推测 *3h-161* 为病毒感染早期转录基因。

2.4 3H-161 的表达谱分析

收集 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾幼虫不同时间

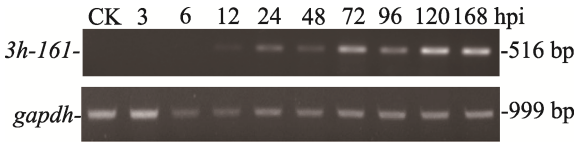

图 6 *3h-161* 基因在感染的甜菜夜蛾幼虫中的转录分析

Fig. 6 Transcription analysis of *3h-161* genes in infected *Spodoptera exigua* larvae

3、6、12、24、48、72、96、120 和 168 hpi 表示在 HvAV-3h 感染后不同时间点提取的甜菜夜蛾幼虫总 RNA，然后反转录成各时间点的 cDNA 样品。

Total RNA was extracted from HvAV-3h in fected *Spodoptera exigua* larvae at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 168 hpi. Then reverse transcripted to different time cDNA.

点的蛋白样品，进行蛋白免疫印迹分析，结果如图 7 所示。结果表明，3H-161 首先在 48 h 被检测到，直至 168 h 仍可检测到，显示 19.83 ku 的蛋白质大小与预测的大小相符。作为对照的内参蛋白 GAPDH 在所有时间点均可检测到表达。推测 3H-161 是一个在 HvAV-3h 感染晚期表达蛋白。

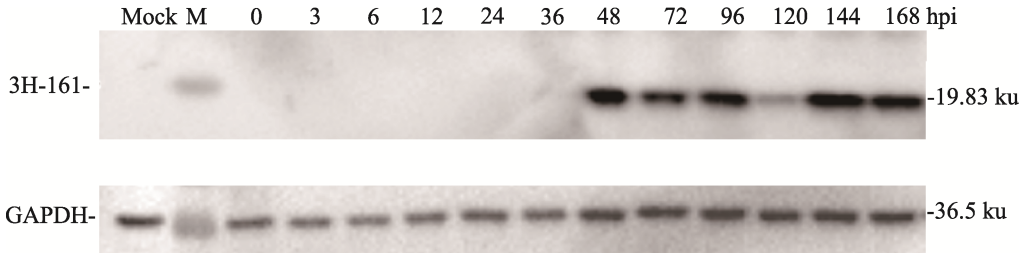

图 7　蛋白 3H-161 在 HvAV-3h 感染的甜菜夜蛾幼虫体内表达谱分析

Fig. 7　Expression analysis of protein 3H-161 in infected *Spodoptera exigua* larvae

M：SDS-PAGE marker，3、6、12、24、48、72、96、120 和 168 hpi 表示在 HvAV-3h 感染后不同时间点提取的甜菜夜蛾幼虫的全虫蛋白样品，MOCK：针刺模拟感染的甜菜夜蛾幼虫全虫蛋白。

M: SDS-PAGE marker, proteins samples was extracted from HvAV-3h in fected *Spodoptera exigua* larvae at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 168 hpi. MOCK: Proteins samples was extracted from mock-infected larvae

3　结论与讨论

烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株是一株对甜菜夜蛾和棉铃虫等多种夜蛾科害虫具有强致病力和高致死率的毒株（Li *et al.*, 2013；刘航等，2020）。本研究对 3H-161 的氨基酸序列进行了一致性分析，发现 3H-161 与 3I-155（HvAV-3i）、3J-164（HvAV-3j）、3E-152（HvAV-3e）、3F-164（HvAV-3f）和 3G-167（HvAV-3g）同源性高达 100%（图 3）。此外，进一步的蛋白结构分析表明，3H-161 存在 7 个磷酸化位点和 2 个糖基化位点（图 3），这种丰富的磷酸化和糖基化位点的存在预示着 3H-161 可能参与不同类型的翻译后修饰。作为常见的蛋白修饰手法，磷酸化和糖基化参与调节细胞多种生命活动，包括转录、细胞激活、细胞周期、磷酸化及多亚基蛋白复合体的正确组装等（Kearse and Hart，1991；Cohen，2002）。这也进一步提示，3H-161 在 HvAV-3h 感染过程中可能存在复杂且多变的调控功能。

本研究通过 RT-PCR 及蛋白免疫印迹检测技术分别检测了 *3h-161* 的转录与表达谱，结果显示 *3h-161* 在病毒感染 12 h 即可检测到转录；3H-161 在感染后 24 h 即可被检测到表达。由此推测，*3h-161* 可能在病毒感染和复制晚期开始发挥作用。根据前人（Huang *et al.*，2012，2017；Wei *et al.*，2014）的报道，已测序的囊泡病毒基因组中均包括 *3h-161* 的同源序列，并预测 *3h-161* 是 HvAV-3h 一个功能未知的 *bro* 基因。其包含一个 *bro-n* 基因家族的结构域（图 3）。在家蚕核型多角体病毒（BmNPV）中，其 *bro* 基因在病毒感染后 2 h 开始转录，且 Bro 蛋白在感染后 4 h 开始表达。Bro 蛋白具有核酸结合活性，并参与感染细胞核内的核蛋白复合物，调节宿主染色体的染色质结构来影响病毒 DNA 复制或转录（Zemskov *et al.*，2000；庞敏等，2007；Zhou *et al.*，2012；张媛媛等，2016）。在 HaSNPV 中，其 *bro* 基因在病毒感染后 4 h 开始转录。其编码的 Bro 蛋白具有阻碍宿主细胞 DNA 的复制或转录的作用，并且通过参与 mRNA 的出核运输过程，保护其编码的病毒蛋白免于宿主细胞的降解清除，以此来提高感染效率（陈明明等，2003）。在苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcMNPV）中，其 *bro* 基因在感染后 6 h 就开始转录，并在 8 h 时检测到 Bro 蛋白表达，该 Bro 蛋白可以与单链寡核苷酸非特异性结合，且敲除 *bro* 基因对病毒的 DNA 复制有明显影响（张楠等，2016）。上述研究结果表明在杆状病毒中的 Bro 蛋白多为早期表达蛋白，而在烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株（HvAV-3h）中 *3h-161* 在病毒感染 12 h 开始转录，并在 48 h 检测到表达，这种

转录和表达时相的差异提示囊泡病毒中的 *bro* 基因与杆状病毒中的 *bro* 基因功能并不相同。

本研究以烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 毒株基因组数据为基础，克隆获得 *3h-161*，其开放阅读框为 516 bp，编码一个由 172 个氨基酸残基组成的蛋白，属于 *bro* 基因家族，不存在跨膜结构域。此外，制备了 3H-161 蛋白的兔多克隆抗体，对 *3h-161* 基因在宿主幼虫体内的转录与表达谱进行了研究，其在 HvAV-3h 中参与感染后的 DNA 的复制或转录的分子机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

Adams JR, Stadelbacher EA, Tompkins GJ, 1979. A new virus-like particle isolated from the cotton bollworm, *Heliothis zea*. *Biological Control*, 37(5): 52–53.

Arai E, Ishii K, Ishii H, Sagawa S, Nakai M, 2018. An ascovirus isolated from *Spodoptera litura* (Noctuidae: Lepidoptera) transmitted by the generalist endoparasitoid *Meteorus pulchricornis* (Braconidae: Hymenoptera). *Journal of General Virology*, 99(4): 574–584.

Asgari S, Bideshi DK, Bigot Y, Federici BA, Cheng XW, 2017. ICTV virus taxonomy profile: Ascoviridae. *Journal of Generate Virology*, 98(1): 4–5.

Bigot Y, Rabouille A, Doury G, Sizaret PY, Delbost F, Hamelin MH, Periquet G, 1997. Biological and molecular features of the relationships between *Diadromus pulchellus* ascovirus, a parasitoid hymenopteran wasp (*Diadromus pulchellus*) and its Lepidopteran host, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of General Virology*, 78(5): 1149–1163.

Cao SK, He L, Li N, Wang X, Yu H, 2021. Prokaryotic expression and transcription of Heliothis virescens ascovirus 3h encoded *3h-38* gene. *Journal of Environmental Entomology*, 43(5): 1113–1121. [曹生凯, 何磊, 黎妮, 王星, 于欢，2021. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 *3h-38* 基因原核表达及转录、表达时相分析. 环境昆虫学报, 43(5): 1113–1121.]

Chen MM, Wu D, Yuan L, Chen XW, Hu ZH, 2003. Prokaryotic expression of three *bro* genes from *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus and generation of antibodies. *Virologica Sinica*, 18(6): 579–602. [陈明明, 吴东, 袁丽, 陈新文, 胡志红, 2003. 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 3 个 *bro* 基因的原核表达与抗体制备. 中国病毒学, 18(6): 579–602.]

Chen ZM, Zhao LC, Liu HL, 2019. Parasitic behavior and effect of *Microplitis similis* on *Spodoptera frugiperda* larvae. *Plant Protection*, 45(5): 71–74, 90. [陈壮美, 赵琳超, 刘航, 廖用信, 王星, 2019. 斯氏侧沟茧蜂对草地贪夜蛾幼虫的寄生行为及寄生效应. 植物保护, 45(5): 71–74, 90.]

Cheng XW, Carner GR, Arif BM, 2000. A new ascovirus from *Spodoptera exigua* and its relatedness to the isolate from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of General Virology*, 81(12): 3083–3092.

Cohen P, 2002. The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4(5): 127–130.

Federici BA, 1983. Enveloped double-stranded DNA insect virus with novel structure and cytopathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(24): 7664–7668.

Govindarajan R, Federici BA, 1990. Ascovirus infectivity and effects of infection on the growth and development of noctuid larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(3): 291–299.

Hu J, Wang X, Zhang Y, Zheng Y, Zhou S, Huang GH, 2016. Characterization and growing development of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h). *Journal of Economic Entomology*, 109(5): 2020–2026.

Huang GH, Garretsion TA, Cheng XH, Holztrager MS, Li SJ, Wang X, Cheng XW, 2012. Phylogenetic position and replication kinekics of Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h) isolated from *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 7(7): e40225.

Huang GH, Hou DH, Wang M, Cheng XW, Hu ZH, 2017. Genome analysis of Heliothis virescens ascovirus 3h isolated from China. *Virologica Sinica*, 32(2): 147–154.

Kearse KP, Hart GW, 1991. Topology of O-linked N -acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 290(2): 543–548.

Li SJ, Wang X, Zhou ZS, Jie Z, Hu J, Zhao YP, Zhou GW, Huang GH, Miguel LF, 2013. A comparison of growth and development of three major agricultural insect pests infected with Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h). *PLoS ONE*, 8(12): 1–12.

Li SW, Ouyang YY, Yang CJ, Tong Y, Gan JM, Huang GH, Yu H, 2021. 3H-117 encoded by Heliothis virescens ascovirus 3h interferes the oral activity of AcMNPV. *Acta Microbiologica Sinica*, 62(1): 131–144. [李诗薇, 欧阳依依, 杨长锦, 童悦, 甘佳敏, 黄国华, 于欢, 2021. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株编码的 3H-117 蛋白能干预 AcMNPV 的口服活性. 微生物学报, 62(1): 131–144.]

Liu H, Liao YX, Chen ZM, Zhao LC, Huang GH, 2020. Infection characteristics of Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h) in *Spodoptera frugiperda* larvae and its effects on host growth and development. *Journal of Plant Protection*, 47(4): 875–883. [刘航, 廖用信, 陈壮美, 赵琳超, 黄国华, 2020. 烟芽夜蛾囊泡病毒

3h 毒株对草地贪夜蛾幼虫的感染特性及对其生长发育的影响. 植物保护学报, 47(4): 875–883.]

Newton IR, 2004. The biology and characterisation of the ascoviruses (Ascoviridae: Ascovirus) of *Helicoverpa armigera* Hübner and *Helicoverpa punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. PhD dissertation. Queensland: Queensland University.

Pang M, Pang GQ, Li T, Wang X, Zhou ZY, 2007. Analysis of *bro* genes familys of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus of plaque-purified GD strain. *Chinese Journal of Virology*, 23(6): 486–489. [庞敏, 潘国庆, 李田, 王霞, 周泽扬, 2007. 家蚕核型多角体病毒广东株 *bro* 基因家族分析. 病毒学报, 23(6): 485–489.]

Wei YL, Hu J, Li SJ, Chen ZS, Huang GH, Cheng XW, 2014. Genome sequence and organization analysis of Heliothis virescens ascovirus 3f isolated from a Helicoverpa zea larva. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122 (2): 40-43.

Yu H, He L, Ouyang YY, Huang GH, 2018. Preparation and molecular characterization of a polyclonal antibody as an efficient cutworm reference protein. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(3): 786–792.

Yu H, Ouyang YY, Yang CJ, Li N, Nakai M, Huang GH, 2021. 3H-31, A non-structural protein of Heliothis virescens ascovirus 3h, inhibits the host larval cathepsin and chitinase activities. *Virologica Sinica*, 36(5): 1036–1051.

Zemskov EA, Kang W, Maeda S, 2000. Evidence for nucleic acid binding ability and nucleosome association of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus Bro proteins. *Journal of Virology*, 74(15): 6784–6789.

Zhao Y, Yu H, He L, Li N, Huang GH, 2019. 3H-117, a structural protein of Heliothis virescens ascovirus 3h (HvAV-3h). *Virus Genes*, 55(5): 688–695.

Zhao Y, Yu H, Li N, Huang GH, 2020. Characterization of Heliothis virescens ascovirus 3h *orf21* that encodes a virion protein. *Journal of Applied Virlology*, 8(4): 59–70.

Zhang N, Ge J, Zhou ZQ, Yin J, Zhong H, 2016. Expression and function of AcMNPV *bro* gene. *Journal of Fudan University* (*Natural Science*), 55(1): 128–132. [张楠, 葛晶, 周子谦, 尹隽, 钟红, 2016. AcMNPV *bro* 基因的表达和作用研究. 复旦学报(自然科学版), 55(1): 128–132.]

Zhang YY, Wei M, Li J, Zhang T, Shu TJ, Yu W, 2016. Effect of *bro-d* deletion on the viral transcription and cell apoptosis in silkworm (*Bombyx mori*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 24(7): 1073–1082. [张媛媛, 魏铭, 李俊, 张婷, 舒特俊, 于威, 2016. 家蚕杆状病毒 *bro-d* 基因缺失对病毒基因转录和细胞凋亡的影响. 农业生物技术学报, 24(7): 1073–1082.]

Zhou JB, Li XQ, De-Eknamkul W, Suraporn S, Xu JP, 2012. Identification of a new *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and analysis of its *bro* gene family. *Virus Genes*, 44(3): 539–547.