2022, 59(3): 599-607.

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190519 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16L:8D。

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。

T₄ 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、Ni²⁺-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*H I、*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/)、TMPred (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'-<u>GGATCC</u>ATGGCTCTTCGCACA-ATAAC-3',下划线处为 *Bam*H I 酶切位点)和 *3h-161*-R(5'-<u>AAGCTT</u>TTATTGTTGCTGCGGGG-C'-3',下划线出为 *Hind* III 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 BamH I、 Hind Ⅲ酶切鉴定后胶回收目的条带。使用 T₄ 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 Ni²⁺-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 Ni²⁺-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(1:4000), 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, 1:5000)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;

 $HvAV-3g-167; YP_009702160.1; HvAV-3i-155; AXN77338.1; HvAV-3j-164; BBB16634.1; SfAv-1a-79; YP_762434.1; SfAv-1a-79; YP_7624334.1; SfAv-1a-79; YP$

TnAv-2a-137: YP_803360.1; TnAV-6a-149: AUS94248.1; *bro-n* domain marked by

N-terminal glycosylation marked by $\star \star \star \star$; Protein kinase C marked by \aleph ;

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:





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. BamH 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 BamH 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. BamH I和 HindⅢ酶切 鉴定图。M: 2000 marker; 1: pET-28a-161。
A. The connection model diagram of pET-28a-161;
B. Results of BamH I and HindⅢ 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





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8mol/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



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 蛋白质大小与预测的大小相符。作为对照的内参 图 7 所示。结果表明, 3H-161 首先在 48 h 被检 蛋白 GAPDH 在所有时间点均可检测到表达。推 测到, 直至 168 h 仍可检测到, 显示 19.83 ku 的 测 3H-161 是一个在 HvAV-3h 感染晚期表达蛋白。 Mock M 72 96 120 144 168 hpi 0 3 6 12 24 36 48 3H-161--19.83 ku -36.5 ku GAPDH-图 7

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12h开始转录,并在48h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* singlenucleocapsid 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 plaquepurified 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.