

95, 13(3) 19 1003 85-280
杆状病毒 p10 基因及蛋白结构与功能的研究进展 * 213244

陈尚武** 魏永杰 龙繁新 王珣章

(中山大学昆虫学研究所, 生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

Research Advances on Structures and Functions
of Baculovirus p10 Genes and Proteins

Chen Shangwu Wei Yongjie Ling Qingxin Wang Xunzhang

(Institute of Entomology and State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 杆状病毒, p10 基因, 功能, 启动子

Key words Baculovirus, p10 gene, Function, Promoter

p10 蛋白是杆状病毒复制晚期大量表达的一种蛋白质, 因其分子量约为 10 kDa 而得名。大量表达的 p10 蛋白在杆状病毒感染的细胞核和细胞浆中形成纤维状结构。研究表明, p10 蛋白与杆状病毒感染细胞的裂解及多角体释放有关, 同时参与多角体囊膜的形成, 维持多角体的稳定。p10 基因的强启动子在构建杆状病毒表达载体及杆状病毒杀虫剂的改造等方面得到了广泛应用, 日益受到人们的重视。

1 p10 基因结构与蛋白质结构

由于 p10 不是病毒主要结构蛋白质, AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nuclaer polyhedrosis virus) p10 又不含蛋氨酸, 它的发现要比多角体蛋白晚 (因早期标记感染的细胞蛋白质通常用 ³⁵S-蛋氨酸, 且多研究 AcMNPV)。直到 1984 年, Kuzio^[1] 等完成了第一个杆状病毒 p10 基因 AcMNPV p10 基因的核酸序列测定。目前, AcMNPV^[1]、*Orgyia pseudotsugata* multicapsid NPV (OpMNPV)^[2]、*Bombyx mori* NPV (BmNPV)^[3]、*Spodoptera exigua* multicapsid NPV (SeMNPV)^[4]、*Perina nuda* multicapsid NPV (PnMNPV)^[5]、*Choristoneura fumifera* multicapsid NPV (CfMNPV)^[6] 等 6 种杆状病毒 p10 基因序列已测定, 不同 NPV 之间 p10 的同源性相差较大, 其中 OpMNPV 与 PnMNPV 之间的氨基酸同源性最高, 达 94.6%, AcMNPV 与 SeMNPV 氨基酸同源性仅 21.6% (表 1)。p10 基因编码的多肽链大多在 91~94 个氨基酸残基之间, 其中 CfMNPV p10 基因编码 81 个氨基酸的多肽链, 与其他 p10 相比, 其靠近 C 端的一段非保守氨基酸缺插失。最近从 GenBank 中也可查到 *Spodoptera litura* NPV (SINPV) 印度株的 p10 基因序列, 仅编码 70 个氨基酸, 而且其核酸序列及蛋白质氨基酸序列与上述 6 种 p10 的同源性非常低。

收稿日期: 1997-07-10, 修回日期: 1997-09-05

* 本文受国家自然科学基金及香港中山大学高等学术研究中心基金会为坚博士后基金资助

** 现在地址: 中山大学生物化学系, 广州 510275

	1	50
AcMNPV	MSKPNVLTQILDAVTETNTKVDSVQTQLNGLEESFQLLDGLPAQLTDLNT	
BmNPV	MSKPTVLTPIILDAIAETNTKVDSVQTQLNGLEESFQPLDGLPAQLTDFNT	
CfMNPV	MSKPSILQQILTAVQDVDTKVDAALQAQLTELDGKVQPLDGLSEQLTALDT	
OpMNPV	MSKPSILTQILDAVRAVDSKVTAALQTQVDQLVEDSKTLEALTDQLGELDN	
PnMNPV	MSKPSILTQILDAVRAVDSKVTAALQTQVDQLGEDSKTLEALTDQLGDVDN	
SeMNPV	MSQ-NILLIRADIKAVDEKVDALQQA VNDV SANLPDTSELSAKLDAQAT	
	51	94
AcMNPV	KISEIQSILTGDI V PDL PDSLKPKLKSQAFELDS DARRGKRSSK	
BmNPV	KISEIQSILTGDTAPDLPESLKPNLKSQAFEFDS DARLGKRSSK	
CfMNPV	KVTTIQDILGGA E V P D V P L P D N P L N K T R S R K	
OpMNPV	KVSDIQSMLSVEBELPEPPAPAPEPELPEIPDVPGLRRSRKQ	
PnMNPV	KVSDIQSMLSIBBELPEPPAPAPEPELPEIPDVPGLRRSRKQ	
SeMNPV	TLDTIVTQVNNINDV L N P D L P D V P G N L Q K Q Q Q K K S N K K	

图1 6种杆状病毒p10蛋白氨基酸序列比较^[3,7]Fig 1 Alignment of amino acid sequence of baculovirus p10 proteins^[3,7]表1 杆状病毒p10蛋白氨基酸的相似性(%)和同源性(%)^[7]

	BmNPV	CfMNPV	OpMNPV	PnMNPV	SeMNPV
AcMNPV	91.5(87.2)	66.6(51.9)	61.5(41.8)	62.6(42.9)	44.3(21.6)
BmNPV	---	60.5(48.8)	61.5(39.6)	61.5(40.7)	51.2(28.8)
CfMNPV	---	---	60.3(50.6)	60.3(45.7)	55.0(37.5)
OpMNPV	---	---	---	98.9(94.6)	55.4(39.2)
PnMNPV	---	---	---	---	58.1(39.2)

比较 AcMNPV 和 BmNPV p10 基因 5' 侧翼序列发现^[1,3], -4 至 -10 和 -19 至 -25 为 7 bp 的反向重复序列,可能形成一个茎环结构。-61 至 -72 位为一个 12 nt 的保守序列(A/T)TAAGNANT(A/T)TT,这是迄今为止已知的所有杆状病毒高效表达晚期基因 5' 侧翼序列中都存在的,杆状病毒晚期基因启动子 5 nt 的核心序列(A/G)TAAG 位于其中。此外,在 AcMNPV 和 BmNPV p10 基因 5' 侧翼序列中存在可能的真核启动子序列 TATAAT box 和 CAATAT box。对 AcMNPV p10 启动子 5' 端进行的缺失突变分析表明,缺失至 -77 位对启动子活性没有影响,如再缺失 12 bp 则完全无 p10 启动子活性,因而认为 -77 至 -65 含有一个对启动子活性至关重要的元件^[8]。对 BmNPV p10 启动子 5' 端进行节律缺失删节,分别缺失至 -135、-111 和 -38 位,检测启动子控制下报道基因 Luc(luciferase, 昆虫荧光素酶)的表达水平。结果证明 -111 至 -38 位结构序列是 BmNPV p10 启动子功能所必须的^[9]。转移质粒转染 AcMNPV 感染的 BmNPV 非敏感细胞 Sf-9 也得到相同的结果,说明 BmNPV 和 AcMNPV p10 启动子的调节因子可能相似。

杆状病毒晚期和最晚期基因的转录从 TAAG 启动子序列开始,p10 基因的转录也是如此。

研究发现, CfMNPV p10 转录从两个晚期转录起始位点开始^[6], 分别在翻译起始密码子上游 24 和 54 bp 处, 且受到不同调节。感染 48 h 转录起始从两个启动子均可见到, 但 96~156 h, 从较近的启动子的转录活性逐渐降低, 从较远启动子的转录逐渐增强。从较远启动子启动的转录方式与最晚期高表达基因的转录是一致的, 因为整个感染周期保持着高水平。在其他杆状病毒基因尚未见到, 一个晚期杆状病毒基因从两个分别调节的串联晚期启动子进行转录。

Kuzio^[1]等注意到, AcMNPV p10 基因序列的一个显著特征是 p10 读框邻接一个 AT 富含区, 起始密码子上游 100 bp 含 83% AT, -100 至 -200 区含 62% AT, 而编码区前 200 bp 仅含 58% AT, 终止密码子下游前 100 bp 含 79% AT, 接下去的另 100 bp 是 72% AT。张耀洲等发现在 BmNPV 也是如此, 其 p10 基因编码区序列中 AT 仅占 53.5%, 而在编码区两端则被富有 AT 的序列所包围, 其中起始密码子上游及终止密码子下游 100 bp 内的 AT 比例分别是 82% 和 79%^[3]。AT 富集位点在 AcMNPV 多角体基因前导序列内可以看到, 同样的 AT 富集区在一些低等真核生物如酵母等基因组也可见到。

由于大多数杆状病毒的基因座位存在共线性关系, p10 基因侧翼的基因排列在 AcMNPV、OpMNPV、SeMNPV、CfMNPV^[2, 4, 6, 10]基因组是相似的, p10 上游邻接 p26 基因, 转录方向相同, 下游以相反的方向邻接 p74 基因^[11]。在 AcMNPV p10 与 p74 读框相距 11 nt^[10], CfMNPV p10 终止密码子与 p74 终止密码子是紧接在一起的^[6]。

对 p10 蛋白结构分析发现, p10 蛋白序列中有 3 个保守序列的结构域^[6], 即 N-端卷曲螺旋、p10 纤维体形成所需的碱性的 C-端结构域以及一个 Pro 丰富区。每个 p10 保守的 N-端结构域预计形成一个卷曲螺旋结构, 卷曲螺旋是平行对齐排列的 α -螺旋的寡聚体。形成卷曲螺旋的蛋白质有一个疏水性和亲水性氨基酸残基组成的 7 肽重复单元(a-g), 在 a、d 位的残基通常是疏水性的。在每种 p10 蛋白序列中预计的卷曲螺旋结构域含有 7 组 7 肽重复单元, 形成一个两性分子的螺旋。卷曲螺旋蛋白形成二聚体、四聚体和可能的十聚体。p10 卷曲螺旋寡聚体的形成与这一结构域的聚集功能是一致的^[12, 13], 可能是 p10 纤维结构的前体。

2 p10 蛋白的结构和功能

2.1 p10 的聚集作用与纤维结构的形成 昆虫细胞被 NPVs 感染的特征就是合成大量的多角体和形成许多通常称之为纤维结构的绳索样(rop-like)结构^[14, 15]。p10 是 NPVs 感染细胞中的一种丰富的病毒蛋白质, 与这些感染细胞核和细胞浆中的纤维结构有关。Van Der Wilk 应用抗 p10 蛋白抗血清进行免疫金标记试验, 在 AcMNPV 感染的细胞核和细胞浆观察到金标记的纤维状结构^[15]。有趣的是当 lacZ 基因插入 p10 编码序列的读框中, 则纤维状结构代之以颗粒状结构^[12, 13]。

缺失突变分析发现, 去掉 AcMNPV p10 C-端 8 个氨基酸残基的 p10 分子, 不能组装成纤维结构, 表明正电荷的 C-端可能参与 p10 蛋白之间、p10 与宿主细胞成分如微管蛋白质分子间的相互作用^[16]。抗 OpMNPV p10 蛋白的单抗与非感染细胞中微管之间存在交叉反应, 抗原决定簇位于 p10 中的 LPEIPPVP 序列^[14], 这一序列在微管蛋白中不存在, 表明这一 p10 与微管中的一个非微管蛋白组分的序列同源。另外, 这一序列的部分与所有杆状病毒 p10 蛋白中发现的一个同源盒(A/V/L/I)P(D/E)(V/L/I/P)P 匹配^[4, 7], 这可能表明, 除 C-端外另一结构域参与了与微管蛋白的结合。最近, Cheley 的研究表明, 表达一个非杆状病毒丝氨酸激酶, 磷酸化 p10 的 C-端 Ser 残基, 诱导 p10 与微管的结合^[17]。已知所有的 p10 蛋白都有一个

亲水的碱性 C-端,这一区域至少含有一个 Ser^[7]。C-端缺失分析结果支持 C-端参与与微管的相互作用^[16]。通过定点诱变可以表明 C-端氨基酸残基中的哪些氨基酸参与这一过程。

由于 N-端与 β -半乳糖苷酶融合的 p10 可以在重组 AcMNPV 感染的细胞核中聚集^[12,13] 形成颗粒状的 p10 结构,而 C-端缺失 8 个或 15 个氨基酸的 truncated p10 蛋白仍局限于细胞核和细胞浆中的一些区域,提示 p10 N-端参与 p10 分子间的聚集作用^[16]。

Van Oers^[7]等研究发现,构建一个重组 AcMNPV(AcCR1),其中的 p10 编码序列被其远缘的 SeMNPV p10 序列替代,在 AcCR1 感染的细胞中 SeMNPV p10 蛋白的表达水平与野生型(wild type, wt)AcMNPV 感染细胞中的 AcMNPV p10 水平相当,SeMNPV 和 AcCR1 感染细胞中纤维结构形成方式相似,因此,SeMNPV p10 在 AcMNPV 基因组中表达时仍具有装配成纤维结构的能力。然而,wt AcMNPV 和重组 AcCR1 混合感染表达,仅仅同种 p10 蛋白间才发生聚集作用,这些聚集体聚合成纤维结构,这表明 p10 蛋白具有自身优先聚集趋势。聚集功能预计由 AcMNPV p10 N-端决定^[12],除同源盒 KV(D/T)(A/S)(V/L)Q 外^[7],AcMNPV 和 SeMNPV p10 N-端氨基酸序列相差很大。这样的重复序列见于所有的 p10 分子,其功能尚不清楚,可能参与 p10 分子的聚集作用。同种 p10 聚集体组合成纤维结构可能是基于 p10 同宿主蛋白中微管蛋白的共同作用,后者既识别 SeMNPV 聚集体,也识别 AcMNPV 聚集体^[7]。

由此可见,p10 聚集成纤维结构是一个复杂的分子识别与装配过程,首先是 p10 分子之间的识别聚集,进而与宿主蛋白相互作用形成纤维结构,但形成的 p10 纤维结构对病毒的生物学性质及其与寄主的相互关系有何影响,有待深入研究。

2.2 核裂解与多角体的释放 AcMNPV p10 基因的缺失突变表明它在培养细胞或虫体对病毒的复制并非必须,p10 缺失病毒仍象 wt AcMNPV 一样具有感染性^[18],但这些重组病毒不能从感染细胞释放多角体,提示 p10 在细胞溶解中的作用^[13]。

缺失分析表明,缺失 p10 C-端 8 和 15 个氨基酸,感染细胞缺乏纤维结构,但仍见多角体释放,缺失 C-端 42 个氨基酸或 p10 完全缺失,细胞虽然解体,但多角体仍包含在感染的细胞核中,表明多角体释放和纤维结构的形成存在独立的 p10 结构域^[16]。乳酸脱氢酶测定表明,导致多角体释放的核崩溃是一个有别于病毒诱导的细胞裂解过程^[16]。AcMNPV p10(含 N-端 51 个氨基酸)- β -半乳糖苷酶融合的重组病毒感染的细胞不释放多角体^[13],而缺失 p10 C-端 15 个氨基酸的突变体感染的细胞释放多角体,提示参与核裂解的功能序列在 AcMNPV p10 的 52~79 氨基酸,在 AcMNPV p10 蛋白这一区域的 64~68 位是 VPDL,在 OpMNPV p10 其同源序列分别是 77~81 位的 LPEIP 和 80~84 位的 IPDVP。蛋白的这一部分有待进一步引入点突变分析。与 AcMNPV 或 SeMNPV 感染 *S. exigua* 细胞相反,重组病毒 AcCR1^[7]感染的 *S. exigua* 细胞不能释放多角体,这一结果表明,核裂解至少需要一个病毒特异的因子与 p10 的相互作用。

2.3 参与多角体囊膜的形成及多角体的稳定 多角体被一个称为多角体囊膜(polyhedron envelope, PE)的电子致密层结构所包围,PE 蛋白(PEP)显然是多角体囊膜的组成成分。Williams 等^[13]研究表明,缺失 p10 基因导致 p10 相关的纤维结构缺失,产生囊膜缺失或缺损的多角体。同时发现,缺失 p10 重组病毒感染产生的多角体脆弱易碎^[13],提示 p10 参与多角体囊膜的形成,对维持多角体的稳定性可能起到一定的作用。而 Van Oers^[16]等则发现,p10 编码序列较大(C-端 42 个氨基酸的密码子)或完全缺失突变仍能产生多角体囊膜,而且,p10

编码序列被 lac Z 基因置换的 AcMNPV 重组毒株仍保留形成 PE 的能力,似乎 p10 对 PE 的形成并非必不可少。

上述基于透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)的研究,对 AcMNPV p10 基因的缺失与 PE 的存在与否结果不一致。与 AcMNPV 感染培养细胞不同, Gross^[19]等研究在昆虫虫体产生 OpMNPV 多角体,发现 p10 或 PE 蛋白基因缺失的重组病毒,一些多角体至少有部分 PE 样结构。然而扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)研究表明,重组病毒感染产生的多角体表面粗糙、布满洞穴,与野生型多角体表面不同,表明它们缺乏 PE。这提示 TEM 观察到的 PE 样结构可能是样品固定过程中人为造成的,也可能是一个不完全或不适当装配的 PE,在多角体从感染细胞纯化过程中被丢失。另外, Gross^[19]还发现,缺失 p10 和 PE 蛋白基因的重组 OpMNPV 多角体,显然比 Williams^[13]所述的 AcMNPV p10⁻重组多角体更稳定,这可能是由于两个病毒的 p10 和 PE 蛋白的作用不同。然而, AcMNPV 在培养细胞中生长,而 OpMNPV 是在昆虫体内生长,可能昆虫提供了使多角体稳定的因子。Gross^[19]认为, p10 和 PE 蛋白可能在多角体的形态发生中起着重要作用, p10 和 PE 蛋白显然参与了多角体外周的包被,进而保证核衣壳不被丢失。PE 可能稳定多角体,保护它们免受机械损伤和阻止其聚集作用。这些特征使病毒有能力以单个稳定的多角体方式传播大量完整的病毒粒子。

AcMNPV p10 对病毒感染性及病毒表型均非必须^[1,12,13],但 p10 基因在病毒进化过程中保存下来且大量表达,表明它起着极其重要的功能,这种功能在实验室生长条件下可能不明显,但或许是野生环境中生存所必需。尽管 p10 保存下来了,但每个 p10 蛋白的氨基酸序列变化较大。不同 p10 肽链间同源性不高表明,它们的功能不是依赖于初级的序列特征,而可能是基于蛋白质的高级结构^[6]。

3 基于 p10 启动子的表达载体及其应用

杆状病毒复制晚期,多角体和 p10 得到大量表达,它们的启动子常被用来构建杆状病毒表达载体^[20]。1983 年, Smith 等首先以杆状病毒载体表达人 β -干扰素,但早期的表达载体主要采用多角体启动子,重组病毒不产生多角体。近年,基于 p10 启动子的表达载体不断发展,得到了广泛的应用,概括起来有下列几种方式。

3.1 由 p10 启动子启动外源基因的表达,如将 Lelystad 病毒(LV)的核衣壳蛋白 N 的编码基因插入 AcMNPV p10 启动子的下游,表达的重组蛋白 N 用来检测血清中 LV 不同株系的抗体^[21]。表达加有信号肽的猪 LH 受体(pLHR),重组病毒感染的细胞分泌产生有生物学活性的产物,与激素高亲和结合^[22]。

3.2 由 p10 启动子启动报道基因,多角体启动子启动待表达基因,如由 p10 启动子控制 lac Z 报道基因,多角体启动子启动荧光素酶^[23]、IL-4^[24]等外源基因的表达。这类载体去掉了多角体基因,不能形成多角体,代之以另一报道基因作筛选标志。

3.3 由 p10 启动子启动待表达基因,其他非杆状病毒启动子控制报道基因,如在 p10 转移载体的克隆位点插入果蝇 *melanogaster* 热激启动子控制下的 lac Z 基因,于 p10 编码序列中插入花椰菜花叶病病毒(Cauliflower Mosaic Virus, CaMV)基因 I 的 cDNA,结果这一 p10 重组体表达 CaMV 基因 I 的水平与 p10 蛋白和多角体蛋白的表达水平相当,表明产生这种蛋白像利用多角体启动子的重组体一样有效。此种载体具有多角体和报道基因两个选择标志,由于多角体基因完整,重组病毒可通过口服感染昆虫表达外源基因,或借此增加杆状病毒的致病力,用

于昆虫的生物防治^[18]。

3.4 构建多重表达载体。Belyaev 等^[25]构建的杆状病毒多重基因转移载体 pAcAB3 和 pAcAB4, 通过一次共感染实验可分别插入 3 个或 4 个外源基因到 AcMNPV 基因组。pAcAB3 含一个多角体启动子, 两个 p10 启动子位于多角体启动子的两侧, 方向相反。在 pAcAB4 于第一个 p10 启动子前再并排放置一个多角体启动子, 与 pAcAB3 中多角体启动子方向相反。用这两个载体同时独立表达 3 或 4 个蓝舌病毒(bluetongue virus, BTV)基因已获成功, 当表达 4 个 BTV 主要结构基因的重组病毒感染 Sf 细胞后, 可装配成含有 BTV VP1、VP3、VP5 和 VP7 蛋白的病毒样粒子。这一载体系统在表达多亚基蛋白质方面具有很大的应用潜力。

早期的研究多以 AcMNPV 为模型, 近年 BmNPV p10 启动子的表达载体亦得到了成功的应用^[26]。由于 BmNPV p10 基因与 AcMNPV p10 具有相当高的同源性^[3], 根据这一特点, 张耀洲等^[27]将 BmNPV p10 启动子(点突变起始密码子 ATG 区)及其 5' 端作为 5' 端交换臂, AcMNPV p10 基因 3' 端作为 3' 端交换臂, 构成一个非融合通用转移载体, 该载体可以在 Sf 细胞和 wt AcMNPV DNA 共转染重组表达外源基因, 也可以在 Bm 细胞中和 wt BmNPV DNA 重组表达外源基因。

重组 BmNPV 表达荧光素酶基因比较 p10 和多角体启动子的活性, 结果 p10 启动子启动表达的荧光素酶活性大约是多角体启动子控制表达产物活性的 50%, 表明 p10 和多角体启动子都能高效表达外源基因^[28]。但使用 p10 启动子, 保留原多角体基因, 使重组病毒仍保留多角体这一识别标志。

表达昆虫特异的毒素、激素或酶基因的重组 NPV 可增强它们的杀虫效能。如果外源基因取代多角体基因, 虽可获得高水平表达, 但重组病毒不产生多角体, 不能口服感染, 限制了它的使用, 因而一般都保留多角体基因, 而将外源基因置于另一拷贝多角体启动子、人工合成启动子^[29]或其他 NPV 晚期基因启动子控制之下。目前较常用的就是将外源毒素基因置于 p10 启动子下游, 在 AcMNPV p10 启动子控制下表达 Bt δ -内毒素基因^[30]、杀虫晶体蛋白基因^[31]以及蝎神经毒素 AaIT 基因等的重组杆状病毒杀虫效果可获显著提高。

参 考 文 献

- 1 Kuzio J, Rohel DZ, Curry CJ *et al.* Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1984, 139:414-418
- 2 Leisy DJ, Rohrmann GF, Nesson M *et al.* Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *Virology*, 1986, 153:157-167
- 3 张耀洲, 张颖, 吴祥甫等. 家蚕核型多角体病毒 p10 基因的克隆及核苷酸序列分析. *病毒学报*, 1992, 8(3):280-282
- 4 Zuidema D, Van Ders MM, Van Strien EA *et al.* Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of *Spodoptera erisqua* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1993, 74:1017-1024
- 5 Chou JM, Lo CF, Huang CJ *et al.* Isolation and nucleotide sequence of *Perina nuda* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (PnMNPV) two late genes: polyhedrin and p10 gene. *Proceedings of the XIX International Congress of Entomology*, Beijing, China, VIII-P #21, 1992. 280
- 6 Wilson JA, Hill JE, Kuzio J *et al.* Characterization of the baculovirus *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene indicate that the polypeptide contains a coiled-coil domain. *J Gen Virol*, 1995, 76:2923-2932
- 7 Van Oers MM, Flipsen JTM, Reusken CBE *et al.* Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, 1994, 200:513-523
- 8 Qin JC, Lin AF, Weaver RF. Studies on the control region of the p10 gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis

- virus. *J Gen Virol*, 1989, 70(5):1273-1279
- 9 张燕,张颖,张志芳等.家蚕核多角体病毒 p10 基因启动子结构与功能分析.病毒学报,1995,11(3):255-261
 - 10 Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 1989, 173:759-763
 - 11 Hill JE, Kuzio J, Wilson JA *et al.* Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1172:187-189
 - 12 Vlak JM, Klinkenberg FA, Zaai KJM *et al.* Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene. *J Gen Virol*, 1988, 69:765-776
 - 13 Williams GV, Rohel DZ, Kuzio J *et al.* A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J Gen Virol*, 1989, 70:187-202
 - 14 Quant-Russell RL, Pearson MN, Rohrmann GF *et al.* Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology*, 1987, 160:9-19
 - 15 Van Der Wilk F, Van Lent JWM, Vlak JM. Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Gen Virol*, 1987, 68:2615-2623
 - 16 Van Der MM, Flipsen JTM, Reusken CBEM *et al.* Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1993, 74:563-574
 - 17 Cheley S, Kosik KS, Paskevich P *et al.* Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *Journal of Cell Science*, 1992, 102:739-752
 - 18 Vlak JM, Schouten A, Usmany M *et al.* Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology*, 1990, 179:213-320
 - 19 Gross CH, Russell RLQ, Rohrmann GF. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis and their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol*, 1994, 75:1115-1123
 - 20 Kidd IM, Emery VC. The use of baculoviruses as expression vectors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, 42:137-159
 - 21 Meulenbergh JJ, Bende RJ, Pol JM *et al.* Nucleocapsid protein N of Ielystad virus: expression by recombinant baculovirus; immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995, 2:652-656
 - 22 Bozon V, Romy JJ, Pajot-Augg E. Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in baculovirus/lepidopteran cells or the caterpillar system. *J Mol Endocrinol*, 1995, 14:277-284
 - 23 Richardson CD, Banville M, Lalumiere M. Bacterial luciferase produced with rapid-screening baculovirus vectors is a sensitive reporter for infection of insect cells and larvae. *Intervirology*, 1992, 34:213-227
 - 24 Cottrez F, Aurialt C, Capron A *et al.* Murine interleukin-4 production with baculovirus: an easy and rapid method for a small scale production of functional interleukins. *Eur Cytokine Netw*, 1994, 5:481-487
 - 25 Belyaev AS, Roy P. Development of baculovirus triple and quadruple expression vector: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21:1219-1223
 - 26 张耀洲,吴祥甫,李载平.氟孢素乙酰基转移酶基因在家蚕核型多角体病毒 p10 基因启动子控制下的表达.病毒学报,1993,9(4):361-366
 - 27 Zhang Yaozhou, Wu Xiangfu, Li Zaiping. p10 genes of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Science in China (Series B)*, 1995, 38(1):50-59
 - 28 Tomita S, Kanaya T, Kobayashi J *et al.* Isolation of p10 gene from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and study of its promoter activity in recombinant baculovirus vector system. *Cytotechnology*, 1995, 17:65-70
 - 29 王珣章,谢伟东,龙繁新等.人工合成杆状病毒后期启动子探讨.中国科学(B辑),1992,1:34-46
 - 30 Merry Weather AT, Weger U, Harris MP *et al.* Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *J Gen Virol*, 1990, 71(7):1535-1544
 - 31 Martens JW, Knoester M, Weijts F *et al.* Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 1995, 66:249-257