

## 昆虫杆状病毒若干基因的研究进展\*

洪靖君<sup>1,2</sup>, 段家龙<sup>2</sup>, 彭辉银<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所病毒室, 湖北武汉 430071; 2. 安徽农业大学蚕业丝绸系, 安徽合肥 230036)

## Research Progress in Some Genes of Insect Baculovirus

HONG Jing-jun<sup>1,2</sup>, DUAN Jia-long<sup>2</sup>, PENG Hui-yin<sup>1\*\*</sup>

(1. Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2. Department of Sericulture and Silk-fasion, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

关键词: 昆虫杆状病毒; 基因; 进展

中图分类号: S43 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)03-0270-06

昆虫杆状病毒(*Insect baculovirus*)对鳞翅目、双翅目和膜翅目等昆虫具有病原性,是一种开发应用较广、高效的生物杀虫剂,具有杀虫专一、效果好、有流行传播作用等优点。为了更好地利用昆虫杆状病毒为防治农林害虫服务,加快昆虫杆状病毒杀虫剂研究的步伐,本文归纳了近几年来有关昆虫杆状病毒基因研究进展供从事研究的人员参考。

## 1 昆虫杆状病毒基因组研究

昆虫杆状病毒是一种单分子超螺旋闭合环状双链 DNA 病毒,其基因组大小为 100~180kb。目前至少已发表了 8 种核多角体病毒(Nuclear polyhedrosis virus, NPV)和 3 种颗粒体病毒(Granulosis virus, GV)的 DNA 全序列,其中 NPV 包括苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核多角体病毒(AcMNPV, GenBank L22858)、黄杉毒蛾多核衣壳核多角体病毒(OpMNPV, U75930)<sup>[1]</sup>、家蚕核多角体病毒(BmNPV, NC001962)<sup>[2]</sup>、舞毒蛾多核衣壳核多角体病毒(LdMNPV, AF081810)<sup>[3]</sup>、甜菜夜蛾多核衣壳核多角体病毒(SeMNPV, NC002169)<sup>[4]</sup>、棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 G4 株(HaSNPV G4, NC002654)<sup>[5]</sup>和 C1 株(HaSNPV C1, NC003094)<sup>[6]</sup>、斜纹夜蛾多核衣壳核多角体病毒(SpltMNPV, NC003102)<sup>[7-9]</sup>、EppoNPV(NC003083)<sup>[10]</sup>等。GV 包括八字地老虎颗粒体病毒(XcGV,

AF162221)<sup>[11]</sup>、小菜蛾颗粒体病毒(PxGV, NC002593)<sup>[12]</sup>和苹果囊蛾颗粒体病毒(CpGV, NC002816)<sup>[13]</sup>等。上述杆状病毒的部分基因组特性见表 1 和表 2。

## 2 昆虫杆状病毒若干基因的研究

## 2.1 解旋酶基因-p143 基因

已在 AcMNPV、OpMNPV<sup>[1]</sup>、BmNPV<sup>[2]</sup>、LdMNPV<sup>[3]</sup>、SeMNPV<sup>[4,14]</sup>、HaSNPV<sup>[15]</sup>和 XcGV<sup>[11]</sup>等昆虫杆状病毒的基因组中定位了解旋酶(Helicase)基因,因为最早从 AcMNPV 中鉴定的解旋酶基因编码分子量为 143kD 的蛋白质(P143),所以这类基因又被称为 p143 基因。解旋酶在杆状病毒中具有较高的保守性(见表 3)。杆状病毒的 *lef-3* 基因编码的 LEF-3 蛋白,为 DNA 单链结合蛋白(SSBP),能够与 P143 相互作用,从而加速 DNA 解旋<sup>[16]</sup>。进一步研究揭示 LEF-3 蛋白的第 1~165 位氨基酸之间为相互作用域。P143 不但具有解旋作用,还具有 ATPase 作用,在有 ATP 和 Mg<sup>2+</sup> 存在下, DNA-P143 复合体迅速解体,4 种 NTPs 中仅有 ATP 能与 P143 结合,并且在缺少 Mg<sup>2+</sup> 时两者也能结合<sup>[17]</sup>。Wu 和 Carstens<sup>[18]</sup>证明 LEF-3 蛋白具有介导 P143 定向迁移核内的功能,缺少 LEF-3 蛋白时, P143 蛋白则保留在细胞质中。

收稿日期:2001-10-08,修回日期:2002-01-23

\* 基金项目:科学技术部重点科技项目(K2000-03-35)

作者简介:洪靖君(1977-),男,安徽歙县籍,硕士研究生。

\*\* 通讯作者:彭辉银(1950-),男,湖北秭归籍,研究员,博士生导师,从事昆虫病毒资源开发及应用。Correspondence author.

表 1 11 种昆虫杆状病毒基因组的特性

Table 1 Characteristics of eleven insect baculovirus genomes

Characteristics	AcMNPV	OpMNPV	BmNPV	LdMNPV	SeMNPV	HaSNPV	SpltMNPV	EppoNPV	XcGV	PxGV	CpGV
Size(kb)	133.9	132.0	128.4	161.0	135.6	131.4	139.3	118.6	178.7	101.0	123.5
G + C content(mol%)	41	55	40	58	44	39	43	41	41	41	45
Total ORFs( $\geq 150$ nt)	154	152	136	163	139	135	136	135	181	120	143
Unique ORFs	11	16	1	29	17	20	26		82	18	25
Hrs	8	5	7	13	6	5	16		8	4	
Early Prmoters	65	61	12	12	34	33			13		
Late Prmoters	72	64	78	79	72	60			84		
Early + late	29	26	7	6	14	9			2		
Prmoters not identified	47	58	35	78	53	49			84		

表 2 7 种昆虫杆状病毒基因组同源 ORF 的数目及其氨基酸序列同源性(%)

Table 2 Numbers of ORFs with homologue in seven insect baculoviruses and their amino acid identities(%)

	AcMNPV	OpMNPV	BmNPV	LdMNPV	SeMNPV	HaSNPV	XcGV
XcGV	84	76	80	93	72	69	
HaSNPV	100	94	98	94	103		40
SeMNPV	103	102	99	104		47	ND
LdMNPV	94	95	91		45	46	ND
BmNPV	115	121		ND	41	41	ND
OpMNPV	126		55	ND	40	41	34
AcMNPV		56	93	41	41	41	33

注:表 2 中左上方数字表示同源 ORF 的数目,右下方数字为同源 ORF 的氨基酸序列同源性(%)。

Note: The numbers of ORFs with homologues in baculoviruses are shown above the diagonal and their amino acid identity (%) is shown below the diagonal. ND: Not determined.

表 3 7 种昆虫杆状病毒解旋酶的氨基酸序列同源性(%)比较

Table 3 Amino acid sequence identity(%) of seven insect baculovirus helicases

	BmNPV	OpMNPV	SeMNPV	LdMNPV	XcGV	HaSNPV
AcMNPV	98	76	59	59	41	60
BmNPV		76	59	59	41	60
OpMNPV			56	56	39	55
SeMNPV				67	41	66
LdMNPV					42	64
XcGV						43

## 2.2 DNA 聚合酶基因

从受 AcMNPV 感染的细胞中采用常规色谱方法分离纯化 AcMNPV DNA 聚合酶(DNAP),其 DNA 聚合酶活性为 5000U/mg,纯化的 DNAP 具有 3'→5'外切核酸酶活性,却没有 5'→3'外切核酸酶活性<sup>[19]</sup>。海灰翅夜蛾多核衣壳核多角体病毒(SpliMNPV)DNA 聚合酶基因(*dnapol*)编码 998aa 的多肽,其分子质量为 114.9kD<sup>[20]</sup>。SpliMNPV DNAP 与 AcMNPV 相比,具有 39%氨基酸序列同源

性。油桐尺蠖核多角体病毒(BusuNPV) *dnapol* 的 ORF 由 2379bp 组成,推测编码 793aa 多肽<sup>[21]</sup>,将推导出的氨基酸序列与 AcMNPV、云杉卷叶蛾多核衣壳核多角体病毒(CfMNPV)、LdMNPV、美洲棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(HzSNPV, V11242)、BmNPV 和 OpMNPV 的 DNAP 进行同源性比较,发现与 HzSNPV 的同源性最高,达 57%,与 OpMNPV 的同源性最低为 39.6%。

## 2.3 结构蛋白基因

昆虫杆状病毒在感染的细胞中能形成包涵体(Occlusion body),病毒粒子被包埋在这些包涵体的晶体蛋白中。这种包涵体形式的病毒在蛋白基质的保护下能长期存在,对昆虫幼虫的初始感染和虫体间的传播起关键的作用。昆虫杆状病毒 NPV 包涵体称为多角体,GV 包涵体称颗粒体,分别由病毒编码的多角体蛋白(Polyhedrin)与颗粒体蛋白(Granulin)构成结晶性基质。在被感染的细胞中,昆虫杆状病毒还会形成另一种形式的包涵体--纺锤形包涵体,这种纺锤形晶体蛋白被称为 GP37<sup>[22]</sup>。

2.3.1 *polh* 基因 CrNPV 多角体蛋白基因(*polh*)含有 964bp (U91940), G + C 为 40.7%, 编码 245aa 多肽。EppoNPV *polh* 基因的编码区长 738 bp (AF061578), 编码 245aa 的多肽、预计分子量为 28.8 kD, ATG 起始密码子上游具有 12 bp 的杆状病毒基因极晚期启动子序列 AATAAGTAATTT。SpltMNPV *polh* 基因 (AF068189) 编码区含有 569bp, G + C 为 49.4%, 编码 189 aa 的多肽。茶尺蠖单核衣壳核多角体病毒(EoSNPV) *polh* 基因编码区长 738bp, 可编码 246aa 的多肽, 起始密码子 ATG 上游 -52 核苷酸处有杆状病毒晚期启动子转录起始基序 ATAAG。EoSNPV 与已发表的 26 种杆状病毒包涵体蛋白及基因序列进行同源性比较<sup>[23]</sup>, 发现 EoSNPV 与 OpMNPV 的同源性最高, 核苷酸序列的

同源率为 83.0%、多角体蛋白同源率达 94.7%；锯角叶蜂单核衣壳核多角体病毒(NsSNPV)的同源性最低,核苷酸序列的同源性仅为 44.9%。

2.3.2 *gp37* 基因 在 AcMNPV、BmNPV、SeMNPV、OpMNPV、HaSNPV、甘蓝夜蛾多核衣壳核多角体病毒(MbMNPV, AF108960)、CfMNPV(U26734)、粘虫核多角体病毒(LsNPV, AB009614)、XcGV 等昆虫杆状病毒中均含有 *gp37* 基因。HaSNPV *gp37* 基因位于 HaSNPV 基因组的第 85.2~86.0kb 的位置,方向与 *polh* 基因相反。邓菲等测定了 HaSNPV *gp37* 基因的核苷酸全序列,该基因的编码区长 840bp,共编码 279aa,预计分子量为 31kD。在该基因起始密码子上游 -25~-21 位有一典型的杆状病毒基因晚期启动子 GTAAG<sup>[22]</sup>。应用 ScanProsite 软件对推测的氨基酸序列进行分析,发现在氨基酸第 174~176 位有一个蛋白激酶 C 磷酸化位点 TKR,第 195~197 位有 N-糖基化位点 NGS。HaSNPV 与 MbMNPV、SeMNPV 的 GP37 蛋白同源性最高为 56%,而与 XcGV 的蛋白同源性最低为 36%。

2.3.3 *p10* 基因 P10 蛋白是一个多功能蛋白<sup>[24]</sup>。(1)它与被感染昆虫细胞核和细胞质中形成的特征纤维结构有关,对其起聚集作用;(2)参与感染细胞溶解释放多角体;(3)对多角体膜的形成和多角体形态的稳定起重要作用。

SpltMNPV *p10* 基因编码区长 318bp,编码一个 105aa 的 P10 蛋白;基因的启动子含有两个 ATGTA 基元。SpltMNPV P10 蛋白含有 10 个七肽重复,可形成一个相对较长的卷曲螺旋。SpltMNPV *p10* 基因所在的 ORF552-*p10*-ORF945 基因簇与 SpliMNPV 的 ORF552-*p10*-ORF945 基因簇各基因位置、方向及对应的氨基酸序列十分相似,表明 SpltMNPV 与 SpliMNPV 有很近的亲缘关系<sup>[25]</sup>。HaSNPV *p10* 基因被定位于该基因组 DNA 的 115.4kb~115.6kb 处。HaSNPV *p10* 上游为 *p26*,下游为 *p74*,*p26* 与 *p10* 基因转录方向一致,而两者与 *p74* 基因转录方向相反。HaSNPV *p10* 是个极晚期基因,其转录从晚期启动子保守序列 GTAAG 的第二个 A 开始,转录产物大小为 430nt<sup>[26]</sup>。HaSNPV *p10* 基因编码区为 261bp,可编码分子量为 9.3kD、由 87 个氨基酸残基组成的多肽。对 HaSNPV P10 蛋白序列分析表明,该蛋白第 6~44 位及第 51~65 位氨基酸序列处含多个典型的卷曲螺旋

七聚体重复结构,并且第 20~34 位及第 51~65 位处存在 Leu-X<sub>2</sub>-Leu-X<sub>10</sub>-Leu 结构<sup>[6]</sup>。

## 2.4 抗细胞凋亡基因

杆状病毒抗细胞凋亡基因在提高病毒的感染力和决定病毒的宿主域中起重要作用,可用于工程改良病毒杀虫的潜力。至今已发现的杆状病毒抗细胞凋亡基因有两类,即 *iap* 基因和 *p35* 基因。AcMNPV 和 BmNPV 同时包含 *iap* 和 *p35* 两类抗细胞凋亡基因;SeMNPV、LdMNPV、OpMNPV、BusuNPV(AF045936)和 XcGV、CpGV 中只含有 *iap* 基因。

2.4.1 *iap* 基因 迄今为止,可根据 *iap* 同源性将其划分为 *iap* 1、*iap* 2、*iap* 3 和 *iap* 4 等四类。EppoNPV 基因组中有 4 个 ORF 分别与已鉴定的抗细胞凋亡基因 *iap* 1、2、3 和 4 具有同源性,但在瞬时表达试验中只有 *iap* 1 和 2 表现出抗细胞凋亡的功能。EppoNPV *iap* 1、2、3 和 4 基因编码区分别含有 855 bp(AF119227)、720bp(AF037358)、786bp(AF180757)和 426 bp(AF119228),各自编码 284aa、239aa、261aa、141aa 的多肽<sup>[27]</sup>。HaSNPV *iap* 3 含有 1301bp(AF266700),其中 G+C 占 34.8%,其 ORF 大小为 807bp,在起始密码子上游 -83~-79 位有一个晚期启动子 GTAAG。在 HaSNPV IAP3 蛋白氨基酸序列的第 18~80 位为 BIR 结构(杆状病毒 IAP 重复序列),ArgX<sub>7</sub>ProX<sub>14</sub>GlyX<sub>4</sub>(Asn)X<sub>2</sub>AspX<sub>3</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>6</sub>TrpX<sub>9</sub>HisX<sub>6</sub>Cys,该片段长度为 63 个氨基酸残基;而位于氨基酸序列的第 101~162 位是典型的 BIR 结构(ArgX<sub>7</sub>ProX<sub>13</sub>GlyX<sub>4</sub>GlyX<sub>2</sub>AspX<sub>3</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>6</sub>TrpX<sub>9</sub>HisX<sub>6</sub>Cys),该片段长度为 62 个氨基酸残基,BIR 结构内的保守氨序列可能对抗细胞凋亡起决定作用。C 端有一个典型的 RING 锌指结构(CysX<sub>2</sub>CysX<sub>11</sub>CysXHisX<sub>3</sub>CysX<sub>3</sub>CysX<sub>6</sub>CysX<sub>2</sub>Cys)<sup>[28]</sup>。HaSNPV *iap* 2 基因定位于该病毒基因组的 BamHI-F 片段,ORF 长 753 bp,编码 250aa,预计蛋白分子量 29.2kD。在 *iap* 2 基因上游 -50~-53 处有一个早期转录信号 CAAT。由该基因编码的 IAP2 蛋白 C 端也含有一个 RING 锌指结构,即 CysX<sub>2</sub>CysX<sub>7</sub>CysX<sub>3</sub>CysXHisX<sub>3</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>3</sub>CysX<sub>2</sub>CysCysXCys,形成 C<sub>4</sub>HC<sub>6</sub> 的特殊 Cys/His 基序,其 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 基序<sup>[29]</sup>完全保守;IAP2 蛋白还含有两个 BIR,其中 BIR1 位于氨基酸序列的第 13~78 位、共 66 个氨基酸残基,BIR2 位于第 87~156 位氨基酸残基处<sup>[30]</sup>。

2.4.2  $\rho 35$  基因 粉蚊夜蛾多核衣壳核多角体病毒(TnMNPV)与 AcMNPV  $\rho 35$  基因同源性高达 100%<sup>[31]</sup>。BmNPV 苏州株  $\rho 35$  基因与 BmNPV T3 株、AcMNPV 在核苷酸水平上同源性分别为 99.5% 和 95.1%, 在氨基酸同源性分别为 98.7% 和 89.4%<sup>[32]</sup>。BmNPV K1 株  $\rho 35$  基因的 ORF 含有 900 bp (AY048772), G + C 含量为 37.4%, 编码 299aa 的多肽。LsNPV  $\rho 35$  基因有 1242bp 组成 (AF068929), G + C 占 40%, 编码 302aa 的多肽。

$\rho 35$  基因的表达产物也能抑制因病毒感染而引起的细胞凋亡。不同杆状病毒的 P35 蛋白的抗细胞凋亡活性有所不同。如 AcMNPV 能有效阻止类白介素-1 $\beta$  转换酶的蛋白酶(Caspase)过量表达诱导的细胞凋亡, 而 BmNPV 则表现出很弱的功效。对嵌合型 P35 以及野生型 P35 蛋白的体外剪切分析表明, P35 中的剪切效率与其抗细胞凋亡活性有关, 环状区域是 P35 中最关键的结构决定簇。除抗细胞凋亡外,  $\rho 35$  基因对杆状病毒本身的复制也具备某些功能。如在 TnMNPV 基因组上另加入一个拷贝的  $\rho 35$  基因, 在 Sf-9 细胞中表达发现  $\rho 35$  基因的过量表达能促进病毒复制的进程<sup>[33]</sup>。

## 2.5 杆状病毒增效蛋白基因

杆状病毒增效蛋白(Enhancin)是某些杆状病毒编码的活性蛋白质, 在体外能促进 NPV 对昆虫离体细胞系的感染, 在体内能显著提高 NPV 对昆虫幼虫的感染效果, 并可增强 Bt 伴孢晶体对昆虫幼虫的毒力<sup>[34-36]</sup>。其作用机理主要是通过降解宿主中肠的肠粘蛋白和糖蛋白而破坏围食膜, 使病毒粒子更易进入中肠细胞; 另一方面与促进病毒核衣壳与细胞质膜的融合有关<sup>[37]</sup>。研究增效蛋白一方面有助于深入了解病毒的侵染和复制机制; 另一方面增效蛋白可以作为微生物杀虫剂的增效组分应用于防治害虫。

昆虫杆状病毒增效基因属晚期表达基因。已在美洲粘虫颗粒体病毒(PuGV)、粉蚊夜蛾颗粒体病毒(TnGV)、棉铃虫颗粒体病毒(HaGV)、PxGV、云杉卷叶蛾颗粒体病毒(CfGV)、XcGV 等 9 种 GV 和 LdMNPV 共计 10 种昆虫杆状病毒中发现有增效蛋白的存在<sup>[34]</sup>。TnGV 编码的病毒增强因子(Viral enhancing factor, VEF)基因是第一个被克隆、测序的昆虫病毒增效基因, 该基因含有 3556bp (D12617), G + C 为 46.5%, 编码的增效蛋白由 901aa 组成, 蛋白分子量为 104.3kD。刘平等对

TnGV 增效基因的 PCR 扩增及其克隆进行了研究<sup>[38]</sup>。1998 年 Rincon - Castro 等将该基因插入 AcMNPV  $\rho 10$  基因启动子下游构建的重组病毒毒力未见明显提高, 当与野生型病毒混合感染时才具有协同杀虫活性。随后, 袁哲明等将此基因 3' 端 2.5 kb 片段插入 pQE - 31 中构建了重组表达载体 pQE31/Enhancin, 转化大肠杆菌 M15 (pREP4), 在 IPTG 诱导下成功表达出含有 TnGV 增效蛋白 C 端 818aa、总分子量为 96kD 的融合蛋白 P96<sup>[34]</sup>, 纯化的 P96 显示明显的增效活性, 可提高 HaSNPV 对棉铃虫 3 龄幼虫感染死亡率 27.40% - 34.50%, 缩短 LT<sub>50</sub> 1.9d 以上<sup>[34,35]</sup>。继 TnGV 的增效基因被测序之后, 又测序分析了 PuGV - SF 和 HaGV 的增效基因, 分别含有 3572bp (D14871) 和 3213bp (D28558), G + C 分别为 45.8% 和 46.1%, 各自编码 901aa 和 902 aa 的增效蛋白。刘强等从 PuGV - Ps 的包涵体总蛋白中分离到增效因子(Synergistic factor, SF), 并分析了该增效因子的生化性质和测定了增效因子的增效活性<sup>[36]</sup>, 并将增效因子基因定位于 PuGV - Ps 病毒基因组 DNA 酶切片段 *Bam*H I - C、*Eco*R I - H、*Hind* III - J、*Kpn* I - K、*Pst* I - I、*Sma* I - J、*Xho* I - K 上<sup>[39]</sup>。胡蓉等从 HaGV 基因组中 PCR 扩增出 2.6kb 的病毒增效蛋白基因片段, 构建重组表达载体 pQE32/Enhancin, 转化大肠杆菌 M15 (pREP4), 在 IPTG 诱导下表达出分子量约 102 kD 的融合蛋白 P102, 纯化的 P102 也显示了明显的增效活性<sup>[40]</sup>。CfGV、XcGV 和 LdMNPV 各自编码的病毒增效蛋白分别含有 901aa、898aa 和 782aa, 对应 ORF 分别含有 2706bp (AF319939)、2697bp (AF162221) 和 2349bp (AF019970)<sup>[41]</sup>。TnGV 与 PuGV、CfGV 的核苷酸序列同源性最高均为 98%, 编码的病毒增效蛋白同源率分别为 97% 和 96%; TnGV 与 HaGV 的病毒增效基因的核苷酸序列同源性及其编码蛋白同源率分别为 81% 和 78%; TnGV 与 XcGV 的病毒增效蛋白同源率为 78%; 然而 LdMNPV 与 PuGV、TnGV、HaGV、CfGV 和 XcGV 的病毒增效蛋白同源率分别为 30%、31%、29%、31% 和 29%。说明在这 5 种 GV 的病毒增效基因之间有较高的同源性, 而与 LdMNPV 的病毒增效基因的同源性均较低。

## 2.6 组织蛋白酶 L 基因

在杆状病毒的病理发生过程, 组织蛋白酶 L 基因(Viral cathepsin L-like gene, *v-cath*) 又称半胱氨酸

蛋白酶基因(Cysteine protease gene, *cp*)与组织降解有关,并且其编码产物 V-CATH 的蛋白酶活性与芽生型病毒(BV)的侵染、肌动蛋白的重排与降解、病毒多角体的形成相互关联<sup>[42]</sup>。迄今,已报道 Cathepsin 的杆状病毒有 AcMNPV、BmNPV、CfMNPV(M97906)、OpMNPV、LdMNPV、SeMNPV、美国白蛾核多角体病毒(HycuNPV, AF120926)、BusuNPV<sup>[43]</sup>、HaSNPV<sup>[44]</sup>、CpGV、XcGV 等。比较已知的杆状病毒 V-CATH 氨基酸序列,有 73 个氨基酸非常保守,其中包括翻译后切割位点 Pro113(AcMNPV 的序列位点,下同)、催化位点 Cys136 和 His269,以及可能形成二硫键的 6 个半胱氨酸残基。

### 2.7 几丁质酶基因

几丁质酶的分类标准有多种,按反应初级产物类型、水解切口位置的不同分为内切几丁质酶和外切几丁质酶,前者的水解位点为同聚物内部  $\beta-1,4$  连接,后者为同聚物线性末端  $\beta-1,4$  连接<sup>[50]</sup>。目前研究最多、应用最广的是几丁质内切酶。按其蛋白氨基酸序列结构特征及同源性可分为六类,即 Class I-VI,其中 Class I 又分为 Class Ia 和 Class Ib<sup>[51]</sup>。昆虫也编码几丁质酶,在蜕皮液中的几丁质酶可在昆虫蜕皮时降解几丁质的旧表皮,但昆虫的几丁质酶基因只在特定组织或特定发育阶段才表达,昆虫在不适当时候接触几丁质酶则会影响发育或消化。

目前所鉴定的杆状病毒几丁质酶都属于 A 类几丁质酶(*chiA*),*chiA* 基因是参与杆状病毒宿主细胞降解的另一个基因。该基因缺失与否、表达水平的高低直接影响杀虫速度,Hawtin RE 等在进行病毒基因缺失研究中发现,AcMNPV 无论是缺失了几丁质酶基因,还是组织蛋白酶基因,所感染的粉蚊夜蛾幼虫死亡后尸体会保持数天完整无损<sup>[47]</sup>。杆状病毒在宿主幼虫体内增殖的晚期,病毒分泌的几丁质酶水解虫体的几丁质骨架,使虫体液化。这种液化过程不仅依靠病毒几丁质酶的准时分泌,而且需要另外一些病毒蛋白如组织蛋白酶<sup>[47]</sup>和 P10 蛋白<sup>[48]</sup>等的参与。BmNPV *chiA* 编码 552 aa 的多肽。柞蚕核多角体病毒(AnpeNPV)A 株 *chiA* 含有 3874bp (AB072731),也编码 552aa 的多肽。HzSNPV、CfMNPV 和 SpltMNPV *chiA* 基因分别含有 6517bp (U67265)、3540bp (U72030)和 7188bp,各自编码 573aa、553aa 和 564aa 的多肽。HycuNPV *chiA* 基因长 1929 bp(AF121457)、编码区为 1662 bp,5'和 3'

非编码区分别具有 TAAG 基元和 AATAAA poly (A)信号序列<sup>[49]</sup>。蜀柏毒蛾单核衣壳核多角体病毒(PaorSNPV) *chiA* 基因被定位于 *Bam*HI-D、*Eco*RI-A、*Hind*III-A、*Pst*I-D 和 *Xho*I-G/H 片段<sup>[54]</sup>。彭辉银等将 HaSNPV *chiA* 分别定位在 *Bam*HI-E、*Bgl*II-E、*Eco*RI-G、*Hind*III-F、*Xba*I-H、*Bam*HI+*Hind*III-M、*Bam*HI+*Xba*I-H,并以 pTZ19R 为载体获得了 *Xba*I-H 片段克隆<sup>[55]</sup>,该基因编码区含有 1713bp(AF114795),可编码 570aa 的多肽,预计分子量为 63.6kD<sup>[56]</sup>。HaSNPV 与 HzSNPV *chiA* 基因核苷酸序列一致性高达 98%,并且 G+C 含量都为 46.8%。HaSNPV 与 HzSNPV 的 Chitinase 同源率高达 90.7%,而与 AcMNPV、BmNPV、HycuNPV、LdMNPV、OpMNPV 和 CfMNPV 的同源率均在 64%左右,分别为 64.4%、64.9%、64.2%、62.9%、66.2%和 61.5%。

### 参考文献

- [1] Ahrens C H, Russell R L, Funk C J, *et al.* The sequence of *Orygia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus genome[J]. *Virology*, 1997, 229: 381-399.
- [2] Gomi S, Majima K, Maeda S, *et al.* Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1323-1337.
- [3] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al.* Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*[J]. *Virology*, 1999, 253: 17-34.
- [4] Ijkel W F, Van Strien E A, Heldens J G M, *et al.* Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 3289-3304.
- [5] Xin W C, Wilfred F J, Renato T, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 241-257.
- [6] 张传溪, 舞家才. 棉铃虫核型多角体病毒基因组结构及 p10 基因[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33: 179-184.
- [7] 王立华, 胡晓晖, 余健秀, 等. 斜纹夜蛾核多角体病毒基因组全序列分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(杀虫微生物专刊), 237.
- [8] Pang Y, Yu J, Wang L, *et al.* Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. *Virology*, 2001, 287: 391-404.
- [9] 胡晓晖, 王立华, 余健秀, 等. 斜纹夜蛾核多角体病毒基因组的 hr 序列分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(杀虫微生物专刊), 238.
- [10] Hyink O, Graves S, Fairbairn F M, *et al.* Mapping and polyhedrin gene analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus genome [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2853-2862.
- [11] Hayakawa T, Rinkei K, Kazuhiro O, *et al.* Sequence analysis of the *Xestia C-nigrum* Granulovirus Genome [J]. *Virology*, 1999, 262: 277-297.
- [12] Hashimoto Y, Hayakawa T, Ueno Y, *et al.* Sequence analysis

- of the *Plutella xylostella* Graulovirus Genome[J]. *Virology*, 2000, 275:358-372.
- [13] Luque T, Finch R, Crook N, *et al.* The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82:2531-2547.
- [14] Heldens J G M, Liu Y, Zuidema D, *et al.* Characterization of putative *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus helicase gene[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78:3101-3114.
- [15] 范凌云, 胡志红, Just M Vlák, 等. 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒解螺旋酶基因的序列分析[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:344-349.
- [16] Evans J T, Rosenblatt G S, Leisy D J, *et al.* Characterization of the interaction between the baculovirus ssDNA-binding protein (LEF-3) and putative helicase (P143)[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80:493-500.
- [17] Viven V M, Linda A G. DNA and ATP Binding Activities of the Baculovirus DNA Helicase P143[J]. *J Virol*, 2001, 75:7206-7209.
- [18] Wu Y, Carstens E B. A baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, mediates the nuclear localization of the putative helicase P143[J]. *Virology*, 1998, 247:32-40.
- [19] Hang X, Linda A G. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80:2519-2526.
- [20] Huang J, Levin D B. Identification, transcription and sequence analysis of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase gene[J]. *Arch Virol*, 2001, 146:303-326.
- [21] 龚 岷, 梁布锋, 李晔东, 等. 油桐尺蠖核型多角体病毒 DNA 聚合酶基因的克隆和序列分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15:59-65.
- [22] 邓 菲, 陈新文, Arif B M, 等. 中国棉铃虫单核包埋型核型多角体病毒 *gp37* 基因的序列分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(杀虫微生物专刊):35-41.
- [23] 张传溪, 胡 萃, 吴祥甫, 等. 茶尺蠖核型多角体病毒 *polh* 基因核苷酸序列及其在 Baculoviridae 中的地位[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15:365-371.
- [24] 曹 阳, 葛慈斌, 肖巧学, 等. 昆虫杆状病毒多角体形态异常的突变研究进展[J]. *蚕业科学*, 2000, 26(增刊):79-85.
- [25] 魏永杰, 龙繁新, 陈尚武, 等. Sl NPV *p10* 基因簇的序列及结构特征分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30:550-555.
- [26] 王华林, 陈新文, Vlák JM, 等. 棉铃虫核型多角体病毒 *p10* 基因的序列及转录分析[J]. *病毒学报*, 2001, 17:81-86.
- [27] Maguire T, Harrison P, Hyink O, *et al.* The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:2803-2811.
- [28] 王华林, 胡志红, 孙修炼, 等. 棉铃虫核多角体病毒细胞调亡抑制基因 *iap3* 的序列分析[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(杀虫微生物专刊):43-49.
- [29] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif[J]. *Cell*, 1991, 64:483-484.
- [30] 张小霞, 张忠信, 丁清泉. 棉铃虫核多角体病毒 *iap2* 基因的克隆和序列分析[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:338-343.
- [31] 施宪宗, 王珣章, 龙繁新, 等. 粉蚊夜蛾核型多角体病毒 *p35* 基因的克隆与序列分析[J]. *病毒学报*, 1997, 13:262-264.
- [32] 贡成良, 薛仁宇, 曹广力, 等. 家蚕核型多角体病毒 *p35* 基因的核苷酸序列分析[J]. *蚕业科学*, 2000, 26:219-223.
- [33] 施宪宗, 王珣章, 龙繁新, 等. 粉蚊夜蛾核型多角体病毒 *p35* 基因功能的研究[J]. *病毒学报*, 1999, 15:78-83.
- [34] 袁哲明, 孟小林, 刘树生. 粉蚊夜蛾核型多角体病毒增效基因 3'端 2.5 kb 片段在大肠杆菌中的表达[J]. *昆虫学报*, 2001, 44:155-159.
- [35] 袁哲明, 孟小林, 刘树生. 粉蚊夜蛾核型多角体病毒重组蛋白的增效作用[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(杀虫微生物专刊):55-59.
- [36] 刘 强, 丁 翠, 蔡秀玉. 粘虫核型多角体病毒增效因子的分离纯化及其生化性质[J]. *病毒学报*, 1998, 14:352-358.
- [37] Wang P, Granados R R. An insectal mucin is the target for a baculovirus enhancer[J]. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1997, 94:6977-6982.
- [38] 刘 平, 孟小林, 吕颂雅, 等. 粉蚊夜蛾核型多角体病毒增效蛋白基因的 PCR 扩增及其克隆[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1998, 44(杀虫微生物专刊):110-112.
- [39] 刘 强, 叶 寅, 白小东, 等. 粘虫核型多角体病毒增效因子的基因定位[J]. *昆虫学报*, 2001, 44:148-153.
- [40] 胡 蓉, 孟小林, 徐进平, 等. 棉铃虫核型多角体病毒增效基因 2.6kb 片段的表达[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:364-368.
- [41] Bischoff D S, Slavicek J M. Molecular analysis of an enhancer gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus[J]. *J Virol*, 1997, 71:8133-8140.
- [42] 刘 强, 丁 翠. 杆状病毒部分功能基因的研究进展[J]. *病毒学报*, 2001, 17:183-187.
- [43] 罗保君, 王华林, 陈新文, 等. 油桐尺蠖单核包埋型核型多角体病毒 *BamH I*-*H* 片段的序列分析[J]. *中国病毒学*, 1999, 14:333-342.
- [44] 刘 岚, 陈新文, 孙修炼, 等. 棉铃虫单核衣壳多角体病毒组织蛋白酶基因的序列分析和进化研究[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:229-235.
- [45] 韩 放, 李景鹏. 植物几丁质酶的研究进展[J]. *生物技术*, 2001, 11:25-28.
- [46] 欧阳石文, 冯兰香, 赵开军. 几丁质酶的三级结构和催化机制[J]. *生命的化学*, 2001, 21:25-27.
- [47] Hawtin R E, Zarkowska T, Arnold K, *et al.* Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes[J]. *Virology*, 1997, 238:243-253.
- [48] Thomas C J, Brown H L, Hawes C R, *et al.* Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum[J]. *J Virol*, 1998, 72:10207-10212.
- [49] 贡成良, 小林淳, 官岛成寿, 等. 美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列分析研究[J]. *病毒学报*, 1999, 15:260-269.
- [50] 赵小东, 周建华, 丁清泉. 蜀柏毒蛾核型多角体病毒基因文库的构建及几丁质酶基因的定位[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:286-288.
- [51] 彭辉银, 李 星, 张双民, 等. 中国棉铃虫核多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆[J]. *中国病毒学*, 1998, 13:139-143.
- [52] 张传溪, 林欣大, 吴 峻, 等. 棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因及杆状病毒几丁质酶基因的分子进化[J]. *昆虫学报*, 2000, 43:233-241.