

## 一种新颖的棉铃虫单粒包埋核多角体病毒表达系统\*

王汉中<sup>1</sup>, 黄 弋<sup>1</sup>, 司艳红<sup>1</sup>, 方明刚<sup>1</sup>, 陈新文<sup>1</sup>, Just M. Vlak<sup>2</sup>, 胡志红<sup>1</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒所无脊椎动物病毒联合实验室, 湖北武汉 430071; 2. Laboratory of Virology, Wageningen University 6709 PD Wageningen, The Netherlands)

A Novel Expression System of *Helicoverpa armigera*  
*single-nucleocapsid nucleopolydrovirus*WANG Han-zhong<sup>1</sup>, HUANG Yi<sup>1</sup>, SI Yan-hong<sup>1</sup>, FANG Ming-gang<sup>1</sup>,  
CHEN Xin-wen<sup>1</sup>, Just M. Vlak<sup>2</sup>, HU Zhi-hong<sup>1</sup>(1. Joint-lab of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China;  
2. Laboratory of Virology, Wageningen University, 6709 PD Wageningen, The Netherlands)

**Abstract:** A 8.5kb fragment containing an *E. coli* low-copy number mini F replicon, a selectable kanamycin resistance marker and *lacZ* gene with attTn7 (the target site for bacterial transposon Tn7) replaced polyhedrin gene in HaSNPV genome using homologous recombination. HaSNPV genome was cloned and maintained as 132 kb bacterial artificial chromosome (Bacmid) in *E. coli*, transfection of the Bacmid(HaBacmid-HZ8) into HzAm1 cells led to a productive virus infection. In this paper, the donor plasmid HapFastPhP10 was constructed using the Ha-polh gene and the Ha-P10 promoter to replace the original Ac P10 promoter and Ac-Polh promoter of the pFastBacDual donor plasmid respectively. The eGFP gene was inserted into multiple cloning site(MCS) downstream of the P10 promoter in the pFastBacHaPhP10 donor plasmid. Recombinant HaBacmid-HZ8 was constructed by transposing a mini-Tn7 element from a HapFastPhP10 donor plasmid to the mini-attTn7 attachment site on the HaBacmid-HZ8 when the Tn7 transposition functions are provided in trans by a helper plasmid. Recombinant HaBacmid-HZ8 DNA was transfected HzAm1 cells, occlusion bodies and green fluorescent were found within HzAm1 cells 5 days after transfection. The results indicated the Habac to Bac expression system based on HaSNPV can effectively express foreign gene.

**Key words:** HaSNPV, Expression, Transposition, Bacterial artificial chromosome

**摘要:** 将含有低拷贝数的 mini-F replicon、一个卡那霉素抗性基因和一个 *lacZ $\alpha$*  基因 8.6kb 的 DNA 片段经同源重组置换到棉铃虫核型多角体病毒基因组中的多角体蛋白基因内, 构建了既能在 *E. coli* 内复制又可在昆虫细胞内复制形成完整的病毒粒子棉铃虫核型多角体病毒 Bacmid(HaBacmid-HZ8)。另外将 HaSNPV 的多角体蛋白基因和 P10 启动子序列取代 pFastBacDual 质粒上的 AcMNPV 的多角体启动子序列和 P10 启动子序列, 构建插入 HaSNPV 多角体蛋白基因和 P10 启动子序列的 HapFastBacPhP10 供体质粒。利用 HapFastBacPhP10 供体质粒将 eGFP 基因转位至 HZ8 的 Tn7 附着位点上, 随后将含有 eGFP 基因的重组 HaBacmid DNA 转染至 HZAm1 细胞内。转染 5d 后, 细胞核内能形成典型的多角体, 在荧光显微镜下观察到细胞内显示出强烈的绿色荧光。结果证明我们构建的 Habac to Bac 表达系统能有效的表达外源基因。

**关键词:** HaSNPV; 表达; 转位; 细菌人造染色体

收稿日期: 2002-02-05, 修回日期: 2002-04-10

\* 基金项目: 中科院中荷院级合作项目(97CDP010)、百人计划、创新工程重要方向性项目(kscx2-1-02, kscx2-301-09)、青年科学家小组项目; 国家杰出青年基金(3002503)、国家自然科学基金(30070034); 转基因植物专项基金(J00-A-003), 863 项目(101-06-10-01; 2001AA14031)。

作者简介: 王汉中(1956-), 男, 湖北省籍, 副研究员, 从事分子病毒学研究。

中图分类号: S433 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0319-07

自1983年Smith和Summers<sup>[1]</sup>首次报道利用AcMNPV在Sf9细胞中表达人-β干扰素基因,杆状病毒表达载体因其能在昆虫细胞和昆虫幼虫中高效表达外源基因,且在大多数情况下杆状病毒表达系统具有加工和修饰表达产物的能力,如信号肽的切割、糖基化和磷酸化作用以及大多数表达产物具有很高的生物活性等优点,使其成为十分重要的真核表达系统。目前应用杆状病毒表达系统已表达了几百种不同来源的外源基因。

传统的重组杆状病毒构建需要按以下两步进行:首先必须将外源基因克隆到转移载体质粒的多克隆位点上,通常多克隆位点位于杆状病毒的P10和多角体启动子等强启动子控制下。将转移载体同杆状病毒DNA共转染到昆虫细胞内,经同源重组产生重组病毒,重组率通常在0.1%~1%之间。其次需用空斑法鉴定和纯化重组病毒。由于重组病毒的产生率低以及空斑纯化法操作复杂、耗时,往往需数月甚至更长的时间构建一个完整的重组病毒。鉴于杆状病毒表达系统存在上述两个缺陷,Kuckow<sup>[2]</sup>发明了一种快速、有效产生重组杆状病毒的方法,即Bac-to-Bac系统,能在7d内完成重组病毒的构建和外源基因的高效表达。该系统由Bacmid和pFastBac<sup>TM</sup>供体质粒两部分组成。Bacmid含有一个低拷贝数的mini-F replicon、一个卡那霉素抗性基因和一个lacZα基因的8.6kb的DNA片段,同时一个作为细菌转位子插入位点(mini-att Tn7)的短片段插入到lacZα基因N-末端,该片段的插入并不改变lacZα基因的阅读框。该Bacmid既能在*E. coli*内复制又可在昆虫细胞内复制形成完整的病毒粒子。pFastBac<sup>TM</sup>供体质粒则是由一个mini-Tn7转位因子组成,在mini-Tn7左右臂之间插入有一个庆大霉素抗性基因、一个杆状病毒特异强启动子、一个多克隆位点和SV40(A)poly信号序列组成的表达框。在辅助质粒提供的转位酶的作用下,克隆于pFastBac<sup>TM</sup>供体质粒多克隆位点的外源基因能转位至Bacmid的mini-att Tn7位点上,通过抗生素抗性筛选和蓝白斑筛选鉴定重组Bacmid,随后从*E. coli*内提取BacmidDNA转染到昆虫细胞内进行外源基因的表达。该方法具有重组率高、重组病毒筛选方便等优点。

我们已成功地将含有低拷贝数的mini F repli-

con、一个卡那霉素抗性基因和一个lacZα基因8.6kb的DNA片段插入到棉铃虫核型多角体病毒基因组中的多角体基因内,构建了既能在*E. coli*内复制又可在昆虫细胞内复制形成完整的病毒粒子棉铃虫核型多角体病毒Bacmid(HaBacmid-HZ8)<sup>[3]</sup>最近我们在pFastBacDual质粒的基础上成功构建了pFastBacHaPhp P10质粒,并将eGFP基因插入到p10启动子控制下的多克隆位点,经在DH10B受体菌中转位后,将重组HaBacmid-HZ8Ph<sup>+</sup>eGFP重组病毒DNA转染到HzAm1细胞内进行表达,在HzAm1细胞内eGFP能得到高效表达,至此我们已成功构建一套完善的HaBac to Bac表达系统。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和质粒

WtHaSNPV G4株由本室分离保存,HaBacmid-HZ8由本实验室构建,见文献<sup>[3]</sup>。pFastBacDual质粒购于生命公司。pGEM<sup>RT</sup>-Easy载体购于Promega公司。

### 1.2 PCR扩增和克隆

选择位于多角体基因起始位点上游150bp的一段序列作上游引物和多角体蛋白基因终止密码下游序列作下游引物,利用wtHaSNPV DNA作模板进行PCR扩增,筛选带有启动子的多角体基因。同时选择HaP10启动子上下游一对引物扩增P10启动子序列。引物序列如下:

Ph-1: 5'-C GGATCCCTTATACTTCTAAAC  
Bam H I  
 TGTTTCGTCGTG-3'

Ph-2: 5'-C GTATACTTAAATATGCAGGACC  
Bst 1107 I  
 AGTGTATAG-3'

P10-1: 5'-A GATCTCGAAACCTGACACGAA  
Bgl II  
 ACG-3'

P10-2: 5'-G GATCCCGTGATTATTTTCGTC  
Bam H I  
 GTACAGTTGG-3'

HaSNPV多角体基因的PCR扩增反应体系为: 5μL 10×TaqDNA聚合酶缓冲液, Ph-1引物和Ph-2引物各2.5μL (25pmol), 1μL WtHaSNPV DNA, 1μL dNTPs (10mmol/L), 1μL TaqDNA聚合酶, 37μL ddH<sub>2</sub>O, 总体积为501μL。

PCR 扩增的循环参数为:94℃ 变性 45s, 58℃ 退火 48s, 72℃ 延长 1min 共 5 次循环,再经 94℃ 变性 45s, 48℃ 退火 48s, 72℃ 延长 1min, 共 25 个循环,经 30 个循环后,72℃ 延长 5min。HaSNPV P10 启动子序列的 PCR 扩增:除以 P10-1 和 P10-2 引物取代 Ph-1 和 Ph-2 引物外,其他条件和上述反应条件一致。

按照 Promega 公司提供的 pGEM<sup>R</sup>-T Easy 载体产品说明介绍的方法将多角体蛋白基因或 HaP10 启动子序列克隆到 pGEM<sup>R</sup>-Easy 载体上。

### 1.3 pFastBacHaPhpP10 载体的构建

按图 1 方案构建 pFastBacHaPhp10 载体。

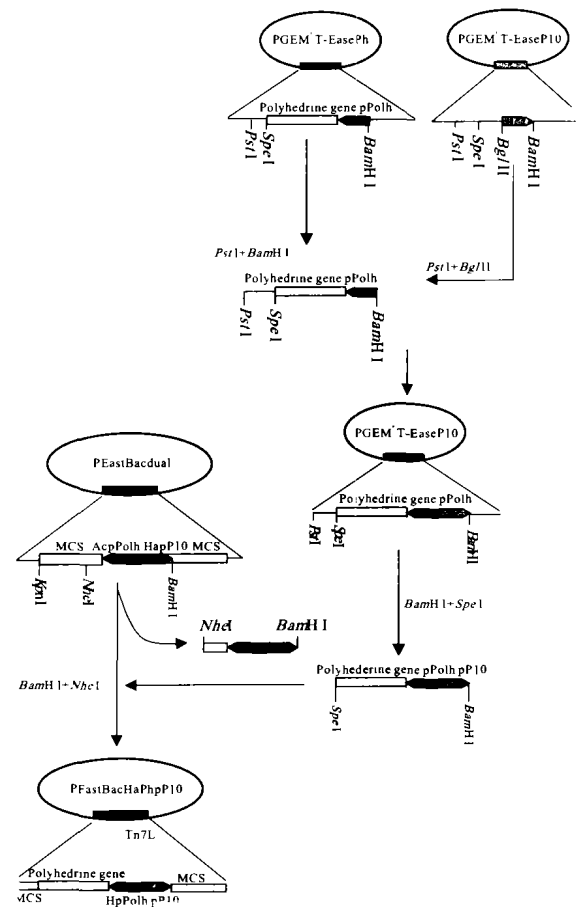


图 1 pFastBacHaPhp10 供体质粒构建流程图

Fig. 1 Flow chart for construction of the pFastBacHaPhp10 donor plasmid

### 1.4 转位和转染

pFastBacHaPhpP10DNA 被转化到含有 HaBacmidHZ8 和辅助质粒的 *E. Coli* 中,在辅助质粒转位酶的作用下,插入在 pFastBacPhpP10 上 miniTn7 左右臂之间的 HaSNPV 多角体基因,

HapP10 启动子,庆大霉素抗性基因被转位到 HaBacmid-HZ8 的 miniattTn7 位点上。在含有庆大霉素,卡那霉素和四环素的 LB 平板上挑选白色菌落,既为阳性克隆子。将阳性克隆转移至 3mL 含有上述三种抗生素的 LB 液体培养基内,37℃ 摇床内培养 24h,收集菌体,按照修改的碱裂解法提取重组 HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup> 的 DNA (注:溶液 III 的 pH 值为 5.2 ~ 5.6,用异丙醇沉淀 HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup> 的 DNA)。图 2 描述了转位发生的模式图。

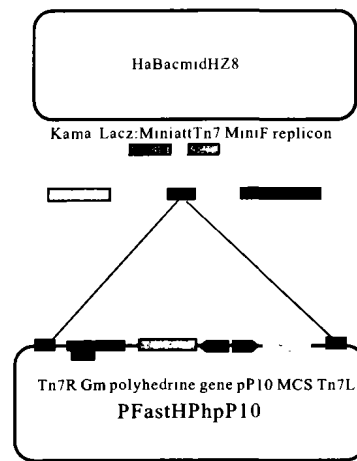


图 2 HaSNPV Bac to Bac 表达系统转位模式图

Fig. 2 Transposition model of the HaBac to Bac expression system

### 1.5 细胞转染

按 O'Reilly<sup>[4]</sup>描述的方法将 HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup> 重组病毒转染到 HzAm1 细胞内。转染 5-7d 后,在光学显微镜下观察细胞病变和细胞核内包涵体形成。收集细胞上清,用于下一步感染。

### 1.6 感染细胞的超薄切片观察

分别用 WtHaSNPV、HaBacmid-HZ8 和 HaBacmid-Hz8ph<sup>+</sup> 的病毒粒子感染 HzAm1 细胞,感染 72h 后,收集被感染的细胞,用于细胞的超薄切片和电镜观察。

### 1.7 感染细胞的病毒多角体蛋白检测

分别用 WtHaSNPV、HaBacmid-HZ8 和 HaBacmidHZ8ph<sup>+</sup> 的病毒粒子感染 HzAm1 细胞,感染 96h 后,收集被感染的细胞,用于聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.8 HaSNPV Bac-to-Bac 系统表达功能测试

为了 HaSNPV Bac-to-Bac 系统的表达功能,绿色荧光蛋白基因 (eGFP) 被克隆到 HapFast-BacPHP10 载体中 P10 启动子控制下的多克隆位点,随后该质粒 DNA 被转化到含有 HZ8 和辅助质

粒的 *E. Coli* 中进行转位。转位方法和阳性克隆的筛选同方法 1.4 一样。按照方法 1.5 描述的那样完成重组 DNA 对 HzAm1 细胞的转染。

### 1.9 绿色荧光蛋白基因(eGFP)表达

插入有 eGFP 基因的 HaBacmidHZ8ph<sup>+</sup> DNA 转染 HzAm1 细胞 72h 后,在荧光显微镜下观察细胞内的荧光强度。

## 2 结果和讨论

### 2.1 HasNPV 多角体基因 P10 启动子序列 PCR 扩增及其扩增产物的克隆

利用两对引物分别从 WtHaSNPV 基因组中扩增出多角体蛋白基因和 P10 启动子序列,见图 3。

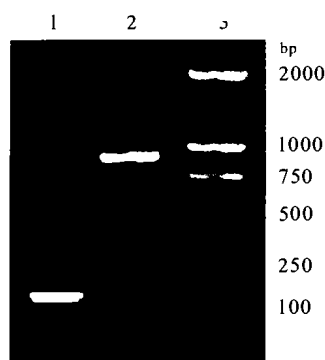


图3 P10 启动子序列和多角体基因序列的 PCR 扩增  
M, 标准 DNA 分子量;1, P10 启动子序列;2, 带启动子多角体基因。

Fig. 3 PCR amplification of P10 promoter and polyhedrine gene  
M, DL200 DNA motecu weight mark; 1, P10 promoter; 2, Polyhedrine gene.

PCR 扩增的产物大小和预期的相符,多角体蛋白基因为 900bp, P10 启动子序列为 160bp。分别将这两个片段克隆到 pGEM<sup>RT</sup>-Easy 载体上。利用 *Bgl*II 和 *Pst*I 限制性内切酶鉴定 p10 启动子序列在 pGEM<sup>RT</sup>-Easy 中的插入方向,选择 *Bgl*II 和 *Pst*I 酶切位点在同一末端的克隆,命名为 pGEM<sup>RT</sup>-Easy p10。用 *Bam*HI 和 *Pst*I 限制性内切酶鉴定多角体基因的插入方向,选择 *Bam*HI 和 *Pst*I 酶切位点分别位于多角体基因片段不同末端的克隆,命名为 pGEM<sup>RT</sup>-Easy Ph。将 pGEM<sup>RT</sup>-Easy p10 DNA 用 *Bgl*II 和 *Pst*I 进行双酶解,用 *Bam*HI 和 *Pst*I 限制性内切酶双酶解 pGEM<sup>RT</sup>-Easyph 质粒 DNA,然后将切下的多角体基因片段与 pGEM<sup>RT</sup>-Easy p10 质粒 DNA 的线性化片段进行连接,由于 *Bgl*II 和 *Bam*HI 酶切片段具有的粘性末端,两者连接后,转

化到 DH5 $\alpha$  受体菌,在含有氨苄青霉素的 LB 平板中筛选插入有 p10 启动子序列和多角体基因序列的阳性克隆,即得到 pGEM<sup>RT</sup>-EasyPhP10 质粒。

### 2.2 pFastBacHaPhpP10 供体质粒的构建

以 pFastBacDual 质粒作为起始质粒,分别用 *Bam*HI 和 *Nhe*I 限制性内切酶双酶切 pFasBactDual 质粒和用 *Bam*HI 和 *Spe*I 双酶切 pGER<sup>M</sup>T-EasyPhP10 质粒。pFastBacDual 经双酶切后可将 Acp10 启动子序列和 AcpPohl 启动子序列去除,而在 pGER<sup>M</sup>T-EasyPhP10 质粒经双酶切后可得到含有多角体蛋白基因和 Hap10 启动子序列的片段。将两种片断连接后逐构建供体质粒 pFast-BacHaPhpP10。

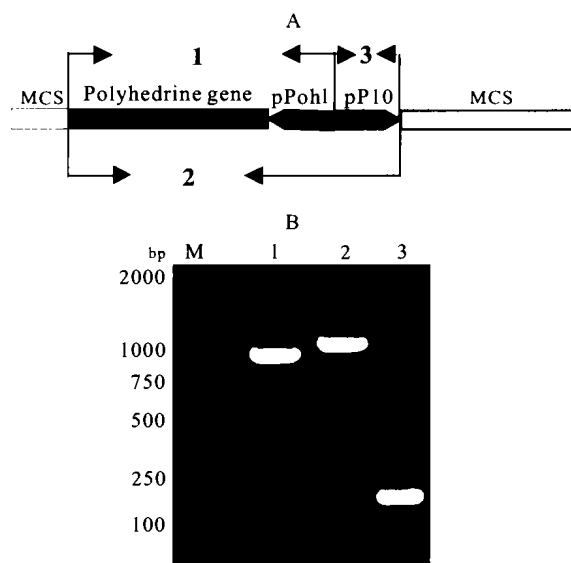


图4 多角体基因和 P10 启动子在 pFastBacHaPhpP10 供体质粒中的插入方向的鉴定

A, 多角体基因和 P10 启动子插入方向的物理图谱;B, 利用不同的引物组合 PCR 检测多角体基因和 P10 启动子插入方向的电泳图谱;1, Ph-1 和 Ph-2;2, Ph-2 和 P10-2;3, P10-1 和 P10-2。

Fig. 4 Location of polyhedrine gene and P10 promoter on the pFast-BacHaPhpP10 donor plasmid

A, Physical map of location of the polyhedrine gene and P10 promoter on the pFastBacHaPhpP10 donor plasmid; B, Identification of Location of the polyhedrine gene and P10 promoter by PCR with different primers combination; 1, Ph-1 and Ph-2; 2, Ph-2 and P10-2; 3, P10-1 and P10-2.

### 2.3 pFast Bac HaPhpP10 供体质粒的鉴定

为了证实多角体基因和 p10 启动子在 pFast-BacHaPhpP10 供体质粒中的插入位点和插入方向,分别将扩增多角体蛋白基因和 p10 启动子序列的两对引物进行不同组合的 PCR 检测。结果证明该片段的插入位点和方向是正确的。图 4 显示 PCR 检

测结果。图 5 为 pFastBacHaPhpP10 供体质粒的物理图谱。

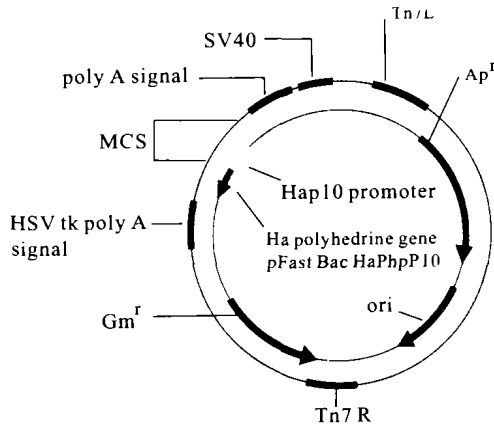


图 5 pFastBacHaPhpP10 供体质粒的物理图谱

Fig. 5 Physical map of the pFastBacHaPhpP10

pFastBacHaPhpP10 供体质粒转化到含有 HaBacmidHZ8 和辅助质粒的 DH10B 受体菌后,经转位作用,可得到重组 HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup>。提取重组 HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup> DNA,按方法<sup>[4]</sup>描述的方法将其转染到 HzAm1 细胞,7d 后细胞内出现大量的多角体,而 HaBacmidHZ8 DNA 转染的细胞仅产生细胞病变,而没有多角体形成。将三种感染细胞样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,HaBacmidHZ8pH<sup>+</sup> 和 Wt HaSNPV 感染的 HzAm1 细胞一样,出现一条 30KD 的多角体蛋白带的表达,见图 6。

将 eGFP 基因插入到 pFastBacPhpP10 质粒中 p10 启动子控制下的多克隆位点。同样按照文献<sup>[4]</sup>的方法进行转化和按照方法进行转染。转染 HzAm1 细胞 6-7d 后,细胞内出现明显的多角体,在荧光显微镜下可观察到很多细胞内充满绿色荧光。图 8(见封 3 彩版)为绿色荧光蛋白基因在 HzAm1 细胞内的表达。结果证明 HaP10 启动子能有效启动外源基因的表达。

Bac to bac 系统作为一种操作方便、快速和高效新颖杆状病毒表达载体已得到广泛的利用。目前已有商品化的 AcBac to Bac 表达系统。和 AcBacmid 一样,我们构建的 HZ8Bac(HaBacmid)是利用同源重组的方法将一个含有低拷贝数的 mini-F replicon、一个卡那霉素抗性基因和一个 lacZα 基因、同时一个作为细菌转位子插入位点(mini-attTn7)的短片段插入到 lacZα 基因 N-末端的 8.6kb 的 DNA 片段置换到病毒基因组的多角体蛋白基因位点上,因此,

所构建的 HzBacmidHZ8 是缺少多角体蛋白基因的重组病毒,用这种重组病毒感染 HzAm1 细胞仅能产生细胞病变,但不能在细胞核内形成包涵体,见图 7。在利用 pFastBac 供体质粒将外源基因转位到

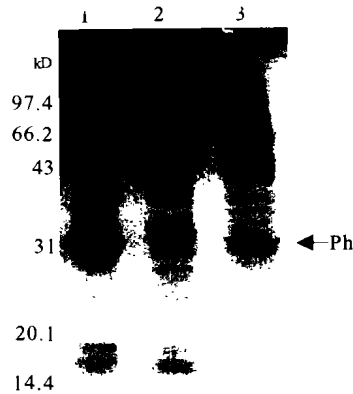


图 6 感染细胞 72h 后收集细胞的 SDS-PAGE 分析

1, WtHaSNPV; 2, HaBacmidHZ8; 3, HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup>。

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of total cellular proteins of HzAm1 cells 72h postinfection

1, HzAm1 cells infected with WtHaSNPV; 2, HzAm1 cells infected with HaBacmidHZ8; 3, HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup>。

Bacmid 的转位子插入位点(mini-attTn7)后,其 DNA 转染 HzAm1 细胞后,能形成具有感染性的重组病毒粒子,并能在 Pphol 和 P10 启动子控制下表达外源基因。和 AcBacmid 表达系统不同的是我们所构建的 pFastPhP10 供体质粒即有 P10 启动子控制下的多克隆位点又插入有带有多角体启动子序列的完整的多角体蛋白基因,见图 5。当外源基因插入到 P10 控制下的多克隆位点后,经转位将外源基因和多角体蛋白基因同时插入到 HaBacmid 中的转位子插入位点,转染到 HzAm1 细胞后,能在光学显微镜下观察是否在细胞内形成包涵体,如细胞内形成包涵体,证明转染获得成功,随后可收集重组病毒粒子再感染细胞并可进行外源基因表达水平的检测。因此多角体蛋白基因的表达和包涵体的形成可作为转染成功的重要识别标记。另外,由于重新将多角体蛋白基因插入到病毒基因组,所产生的重组病毒是一个不缺失任何基因的重组病毒,因而该重组病毒不仅能在昆虫细胞内也可在昆虫幼虫内表达外源基因。另一个重要优点是便于插入对昆虫有特异性毒杀作用的毒素基因,构建高效、快速的重组病毒杀虫剂。

棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒作为生物杀虫

剂在我国已商品化,在我国该产品大面积应用于防治棉铃虫和烟青虫,取得良好的防治效果。鉴于野生型 HaSNPV 生物杀虫剂有杀虫时间长,杀虫谱窄等缺点,还需利用分子生物学方法对病毒基因组进行遗传改造,以增加 HaSNPV 生物杀虫剂的速效性和广谱性。我们实验室已成功构建 etg 基因缺失、插入蝎毒基因、利用 Hap6.9 和 pPh 双启动子控制下的蝎毒基因表达的三种重组病毒杀虫剂<sup>[6]</sup>,大大增加了杀虫速度。同时我们在 HaSNPV 的分子生

物学方面以及基因结构和功能也取得重大进展,特别是完成了 HaSNPV 全基因组序列分析<sup>[5]</sup>,把 HaNPV 的分子生物学研究提高到一个新的水平。HaBac to Bac 系统的建立不仅能作为一个完善的真核细胞表达系统,同时由于能将病毒基因组转化到大肠杆菌中进行遗传操作,从而大大缩短了重组病毒的构建过程。例如我们在 HaBacmid 系统基础上构建的大肠杆菌重组系统为 HaSNPV 的分子生物学研究提供技术支撑。



图7 感染 HzAm1 细胞 72 h 后的细胞超薄切片的电镜观察

A, WtHaSNPV; B, HaBacmidHZ8; C, HaBacmidHZ8Ph.

Fig. 7 Electron micrographs of thin sections of HzAm1 cells infected with A, wild-type HaSNPV; B, HaBacmidHZ8; C, HaBacmidHZ8Ph<sup>+</sup>.

国外学者也利用类似的技术研究其它病毒,例如 Mark S.<sup>[7]</sup>利用温度敏感型供体质粒将外源基因导入插入有特异转位位点的 AcMNPV 基因组内,在 *E. Coli* 中直接构建重组病毒。最近不少研究者将一个全长的 F 质粒,又称细菌人造染色体分别插入到鼠巨细胞病毒基因组<sup>[9]</sup>、EB 病毒基因组<sup>[8]</sup>、猪伪狂犬病毒<sup>[11]</sup>和 HSV-1<sup>[10]</sup>基因组内构建全长病毒基因组 F 质粒克隆,并在此基础上进行遗传操作,构建重组病毒。这些研究结果证明(1)插入 F 复制子的病毒全基因组能向质粒一样在细菌内稳定复制,重组 DNA 能有效转染真核细胞,产生具有感染性的病毒粒子。(2)能在大肠杆菌中对动物病毒和杆状病毒进行遗传改良,构建重组病毒。(3)由于 F-质粒克隆技术能使病毒基因组在大肠杆菌中稳定复制,有助于建立某种病毒不同基因型的病毒基因文库。

#### 参考文献

[1] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. Production of human  $\beta$

- interferon in insect cell infected with a baculovirus expression vector[J]. *Mol Cell Biol*, 1983b, 3:2156 - 2165.

[2] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site - specific transposon - mediated insertion of foreign gene into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* [J]. *J virol*, 1993, Vol. 67, No. 8, 4566 - 4579.

[3] Hanzhong Wang, Fei Deng, Gorben P, *et al.* Construction of a *Helicoverpa armigera* SNPV Bac to Bac system[A]. Society for Invertebrate Pathology 34<sup>th</sup> Annual meeting. 2001, p35. Noordwijkerhout - The Netherland.

[4] O'Reilly D R, Miller L k, Luckow V A. Baculovirus expression vectors, A laboratory manual[M]. W H. Freeman and company New York;1992, 148 - 149.

[5] Chen X, Ijkel W F J, Tarchini R, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. *J Gen Virol* 2001, 82:241 - 257.

[6] Chen X, Sun X, Hu zhi, *et al.* Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single - nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as a improved pesticide [J]. *J Inverte Patheol.* 2000. 76: 140 - 1466.

[7] Mark S L, Stephen C L, peter O olins. A novel host - vector

- system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1995 .
- [ 8 ] Delecluse H J, T Hisendegen D, Pich R, *et al.* Propagation and recovery of intact, infectious Epstein - Barr virus from prokaryotic to human cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 90:8245 - 8250.
- [ 9 ] Messerle M, I Crnkovic W, Hammerschmid H, *et al.* Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94: 14759 - 14763.
- [10] Saeki Y, T Ichikawa, A Saeki, *et al.* Herpes simplex virus type I DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia Coli*: rescue of replication - competent virus progeny and packaging of amplicon vector[J]. *Hum. gene Ther.* 1998, 9:2787 - 2794.
- [11] Gregory A Smith, Lynn W Enquist. Construction and transposon mutagenesis in *E. coli* of a full - length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus[J]. *J. Virology*, 1999, 73: 6405 - 6414.

## 《分子病毒学》简介

由中山大学黄文林教授主编、海内外病毒领域著名学者参与编写的全国统编研究生教材《分子病毒学》不仅详尽的阐述了病毒学基础知识的最新理论,同时对免疫病毒学、肿瘤病毒学、病毒载体基因治疗等领域进行了深入探讨,内容精深详实而新颖,集中体现了近年来国际上分子病毒学研究的最新成果,突出地反映了目前分子病毒学的研究热点和争论焦点,指出了病毒学研究的发展方向,具有很强的启发性。全书大量引用了最新图表,引人入胜。附录中收录了与病毒学研究相关的主要网站和国内外主要的病毒学期刊,为信息时代的病毒学教学研究和学术交流提供了便捷渠道。本书不仅是优秀的病毒学研究生教材,对于病毒学教研人员和临床医生也是一本不可多得的参考书。

联系地址:人民卫生出版社(北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼,邮政编码:100078,联系电话:010-67616688)。