

利用双杂交系统对 SeNPV 泛素与抗细胞凋亡 蛋白相互作用的研究*

牛国栋, 张忠信**

(中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071)

Interaction between Ubiquitin and IAP2 or IAP3 of *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus

NIU Guo-dong, ZHANG Zhong-xin**

(Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: By using the yeast two hybrid system, *in vitro* assay for interaction between ubiquitin and IAP2 or IAP3 encoded by *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) has been done. The putative positive clones only existed on the plate of the SD/-Leu/-Trp/X- α -GAL, which suggested that ubiquitin interacted with IAP2 or IAP3 weakly, and ubiquitin was transferred to IAP2 or IAP3 through ubiquitin-activating enzyme (E1) and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) in yeast. IAPs encoded by SeNPV may be the ubiquitin ligase (E3).

Key words: SeNPV; Ubiquitin; IAPs; Yeast two-hybrid system; Ubiquitin ligase

摘要: 本文报道利用酵母双杂交系统研究甜菜夜蛾核多角体病毒 (SeNPV) 的泛素 (Ubiquitin) 与抗细胞凋亡蛋白 (IAP2, IAP3) 相互作用的结果。使用 Clontech 公司的 MACHMAKER GAL4 Two-hybrid system 3, 以病毒 ubiquitin 基因与酵母 GAL4 的 DNA 结合域重组表达“诱饵”蛋白, 以病毒 iap2 或 iap3 基因与 DNA 活化域重组表达“猎物”蛋白, 在低严谨型筛选培养基上均得到阳性克隆。这一结果表明, 甜菜夜蛾核多角体病毒泛素与 IAP2 或 IAP3 在体外能进行相互作用, 这种作用利用了酵母内源性 E1 和 E2。SeNPV 的抗细胞凋亡蛋白 (IAPs) 可能是泛素-蛋白酶水解途径 (UPP) 中的泛素连接酶 (E3), 或者是泛素依赖性蛋白水解酶的靶底物。

关键词: 甜菜夜蛾核多角体病毒; 泛素; 抗细胞凋亡蛋白; 酵母双杂交系统; 泛素连接酶

中图分类号: Q939.4

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0049-05

泛素为一种广泛存在于真核细胞中的小分子量蛋白质。泛素-蛋白酶复合体通路 (Ubiquitin proteasome pathway, UPP) 途径, 是细胞质和核内蛋白 ATP 依赖性的非溶酶体降解途径, 高效并高度选择性地对细胞内蛋白进行转换, 尤其是短命的功能蛋白, 癌基因产物和变性变构蛋白, 应急状态下也降解细胞内的其他的结构蛋白, 还参与某些重要蛋白质的编译后修饰和改造, 调节其功能, 在细胞内的信号传导中也起着重要作用^[1]。

近年来的研究发现, 多种真核生物病毒中含有编码泛素或与泛素作用蛋白的基因^[2-7]。已知的杆状病毒基因组中都含有编码泛素的基因。杆状病毒泛素与真核生物泛素的氨基酸序列有较大的不同: 其一, 在杆状病毒泛素的羧基端融合了不同长短的短肽, 这些融合的短肽与真核生物泛素延伸蛋白所融合的核糖体蛋白没有同源性; 其二, 杆状病毒泛素基因之间的同源性也较低, 只有 70%~80%, 在一些氨基酸位点的保守性也较低^[8]。杆状病毒泛素

收稿日期: 2003-08-11, 修回日期: 2003-10-28

* 基金项目: 国家 863 项目 (2001AA246014); 中国科学院农办重大项目 (NK 十五-B-07-04)

作者简介: 牛国栋 (1977-), 男, 山西长治籍, 硕士研究生, 主要研究方向为病毒分子生物学。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 027-87198301, E-mail: zhangzx@pentium.whiov.ac.cn

的结构及其在病毒中的定位已进行了研究,但其在 UPP 途径中的作用还未见报道。

杆状病毒基因组还编码一些含有 RING finger 结构的蛋白,如 IAPs、IE2 等。一些研究认为这类含 RING finger 结构的蛋白可能具有泛素连接酶功能。IAPs 蛋白存在两个主要的结构域:RING finger 结构和 BIR 结构。IAP RING finger 可能是泛素化位点,而 BIR 结构则被认为可以直接且专一性的抑制 caspases 活性,发挥其抗细胞凋亡的作用^[9]。在哺乳动物 IAPs 的研究中发现,含 RING finger 的细胞凋亡抑制蛋白(IAPs)可以在体外或体内通过对自身的泛素化被蛋白水解酶体降解,RING finger 缺失后稳定表达 IAPs 可以抑制细胞凋亡引起的蛋白降解,IAPs 蛋白可以通过自身的泛素化和降解来调控细胞凋亡^[10]。XIAP 还可以在体外以 caspase-3 作为底物使之泛素化,对 caspase-3 的泛素依赖性降解可以提高它的抗细胞凋亡活性^[11-12]。然而,杆状病毒泛素是否可以与 IAPs 蛋白相互作用? IAPs 是否可以利用病毒泛素对自身和底物泛素化而调控细胞凋亡?在杆状病毒基因的功能研究中,这些问题亟需回答。本文利用酵母双杂交系统对 SeNPV 的泛素与 IAP2 或 IAP3 在体外的相互作用进行了初步研究,为今后进行杆状病毒泛素及 IAPs 功能的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存,酵母菌株 AH109、质粒 pGAD-T7、pGBK-T7、pGAD-T7-53、pGAD-T7-LAM、pGBK-T7-T 和筛选培养基均由 CLONTECH 公司的 MACHMAKER GAL4 Two-hybrid system 3 试剂盒提供。筛选培养基包括,色氨酸缺陷培养基为 SD/-Trp/X- α -GAL,亮氨酸缺陷培养基 SD/-Trp/X- α -GAL,亮氨酸(Leu)和色氨酸(Trp)双缺陷的低严谨型筛选培养基缺乏 SD/-Leu/-Trp/X- α -GAL,色氨酸、亮氨酸、组氨酸(His)和腺嘌呤(Ade)都缺陷的高严谨型筛选培养基 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X- α -GAL。

1.2 含目的基因的诱饵质粒和猎物质粒的构建

根据已知的甜菜夜蛾核多角体病毒核苷酸序列^[13]设计 PCR 引物,引物分别为:

扩增 SeMNPV ubiquitin 基因的引物:

ubiP1: 5'-GAATTCATGCAGTTTTGTAAAAACTC-3'

ubiP2: 5'-GGCTGTTTGAGTAATCATG-3'

扩增 SeMNPV iap2 基因的引物:

iap2P1: 5'-GAATTCATGGCATCGTCGTCGAAAAGG-3'

iap2P2: 5'-GCGGCGAAAGTAGAGGGTTT-3'

扩增 SeMNPV iap3 基因的引物:

iap3P1: 5'-GAATTCATGCAGGTTGACAGCGAT-3'

iap3P2: 5'-CAGCGGAGACGAGTTTGA-3'

其中 GAATTC 为 EcoR I 限制酶酶切位点

分别用相应的 P1, P2 引物从 SeNPV 基因组上用 PCR 的方法扩增出 ubi、iap2 及 iap3 基因,构建原核表达质粒,PCR 扩增及质粒构建和鉴定参照文献进行^[8],原核表达质粒分别命名为 pGEM-SeNPV-ubi, pGEM-SeNPV-iap2, pGEMSeNPV-iap3。用 EcoR I 和 Sac I 对 pGEM-SeNPV-ubi 和 pGBK T7 双酶切,经凝胶电泳,用华舜胶回收试剂盒从凝胶上回收相应基因的 DNA 片段,连接 ubi DNA 与 pGBK T7,构建的双栖质粒转化 DH5 α ,培养后提取质粒 DNA 酶切鉴定。质粒命名为 pGBK-SeNPV-ubi,能在酵母 GAL4 的 DNA 结合域重组表达。利用相同方法分别将 SeNPV-iap2 或 SeNPV-iap3 与 pGAD T7 连接,构建能在酵母 GAL4 活化域表达,也能在原核中复制的双栖载体 pGAD-SeNPV-iap2 和 pGAD-SeNPV-iap3。

1.3 验证诱饵蛋白或猎物蛋白单独表达是否诱导报告基因表达

pGBK-SeNPV-ubi、pGAD-SeNPV-iap2 和 pGAD-SeNPV-iap3 分别转化酵母菌株 AH109,转化的菌液涂布在色氨酸缺陷培养基、亮氨酸缺陷培养基、低严谨型或高严谨型筛选培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 2d 至有菌斑长出,验证单独融合泛素的诱饵蛋白及单独融合 IAP2 或 IAP3 的猎物蛋白是否能诱导报告基因表达。酵母转化实验步骤根据 MACHMAKER GAL4 Two-hybrid system 3 试剂盒说明书中的少量转化酵母菌方法进行。

1.4 共转化 AH109

取 pGBK-SeNPV-ubi 0.1 μ g,与 pGAD-SeNPV-iap2 或 pGAD-SeNPV-iap3 分别同时转化酵母 AH109,同时加入鲱精 DNA 载体(Herring carrier DNA),转化菌液分别涂布在低严谨型或高严谨型选择培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d 至有菌斑长出。检测泛素与 IAP2 或 IAP3 的相互作用。试验同时设阴性对照和阳性对照,阴性对照为没有转化的空白 AH109 和 pGBK-T7-Lam 与 pGAD-T7-T 共转化的 AH109;阳性对照为 pGBK-T7-53 与 pGAD-T7-T 共转化的 AH109。共转化酵母菌实验参照 MACHMAKER GAL4 Two-hybrid system 3 试剂盒说明书的方法进行。

1.5 阳性克隆的 PCR 验证

pGBK-SeNPV-ubi 与 pGAD-SeNPV-iap2 或 pGAD-SeNPV-iap3 共转化 AH109, 30°C 在低严谨型筛选培养基上长出蓝白斑, 分别挑取几个白斑和几个蓝斑, 接种到 5mL 液体培养基中, 30°C 培养 24h。取 1.5 mL 菌液高速离心 30s, 用 200μL 的玻璃珠破菌缓冲液重悬细胞, 加入酸洗玻璃珠 (Sigma 公司) 约 200μL, 室温下剧烈震荡 10 min, 然后加入 25/24/1 的酚/氯仿/异戊醇, 室温下剧烈震荡 10min。高速离心 10min, 收集上清液, 取 1-2μL 用做 PCR 检测, PCR 产物通过凝胶电泳进行分析。

氨酸缺陷培养基、低严谨型筛选培养基和高严谨型筛选培养基上培养, 只有在色氨酸缺陷培养基 SD/-Trp/X-α-GAL 上长出白色菌斑, 这说明单独表达融合泛素的诱饵蛋白不能诱导报告基因表达。同样, pGAD-SeNPV-iap2 及 pGAD-SeNPV-iap3 分别转化酵母菌株 AH109, 在亮氨酸缺陷培养基、低严谨型或高严谨型筛选培养基上培养, 也只在亮氨酸缺陷培养基 SD/-Leu/X-α-GAL 上长出白色菌斑, 说明单独表达融合 IAP2 或 IAP3 的猎物蛋白也不能诱导报告基因表达。

2 结果分析

2.1 含目的基因的诱饵质粒及猎物质粒的构建及验证

目的基因与 pGBK-T7 或 pGAD-T7 连接, 转化 DH5α 细胞, 培养后得到分别含有 ubi、iap1 和 iap2 基因的阳性克隆子, 含有泛素基因的阳性克隆子 pGBK-SeNPV-ubi 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切, 凝胶电泳分析后得到一条 350bp 的片段, 与预期的片段大小相吻合。含有 iap2 或 iap3 的阳性克隆子 pGAD-SeNPV-iap2, pGAD-SeNPV-iap3 经 EcoR I 和 Sac I 双酶切, 电泳后分别得到一条 1kbp 左右的片段, 与预期的片段大小吻合 (图 1)。

对阳性克隆子中的插入片段进行测序, 序列分析结果表明, 插入片段分别与对应的 SeMNPV ubi, iap2 和 iap3 序列完全一致, 并且有正确的阅读框。pGBK-SeNPV-ubi 转化酵母菌株 AH109, 分别在色

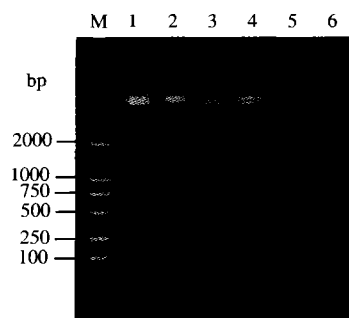


图 1 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of Reconstruction plasmids

M, DL 2000 marker; 1/2, pGBK-SeNPV-ubi with EcoR I/SalI; 3/4, pGAD-SeNPV-iap2 with EcoR I/SalI;

2.2 泛素与 IAP2 或 IAP3 在双杂交系统中的相互作用

含有泛素基因的质粒与含有 iap2 或 iap3 的质粒共转化酵母 AH109, 转化菌在不同培养基上诱导报告基因表达的结果见表 1。

表 1 泛素与 IAPs 在双杂交系统中的相互作用

Table 1 The interaction between Ubi and IAPs detected by two hybrid system

Media for stringency or lower stringency selecting	Plasmids for cotransforming				
	pGBK-SeNPV-ubi and pGAD-SeNPV-iap2	pGBK-SeNPV-ubi and pGAD-SeNPV-iap3	pGBKT7-53 and pGADT7-T (postive)	pGBKT7-Lam and pGADT7-T (negtive)	AH109 (control)
SD/-Leu/-Trp/ X-α-GAL (Lower stringency)	White (++)/Blue (++)	White (++)/Blue (++)	Blue (++)	White (++)	-
SD-Ade/-His/-Leu/ -Trp/X-α-gal (Stringency)	-	-	Blue (+)	White (+)	-

++hundreds plaques in a plate; + tens plaques in a plate; - no plaque in the plate.

试验结果显示, pGBK-SeNPV-ubi 和 pGAD-SeNPV-iap2 共转化酵母 AH109, 30°C 在低严谨型培养基上培养 2d 后, 长出 200 多个蓝色和白色的菌斑, 继续培养 1d 菌斑直径为 1~2mm 左右; 然而,

在高严谨型培养基上, 30°C 培养 3d 后无菌斑长出。pGBK-SeNPV-ubi 和 pGAD-SeNPV-iap3 共转化酵母 AH109, 30°C 在在低严谨型培养基上长出 300 多个蓝色和白色菌斑, 而在高严谨型培养基上, 30°C

培养 3d 后也无菌斑长出。同时, 作为阳性对照, pGBK-T7-53 和 pGAD-T7-T 共转化 AH109, 30°C 培养 2d 后, 在低严谨型培养基或高严谨型培养基上均长出蓝斑。作为阴性对照, pGBK-T7-Lam 和 pGAD-T7-T 共转化 AH109, 30°C 培养 2d 后, 在两种培养基上都仅长出白斑; 作为空白对照, AH109 在两种培养基上培养 2d 后都没有菌斑长出。阳性对照和阴性对照质粒共转化 AH109 的实验结果, 都与 MACHMAKER GAL4 Two-hybrid system 3 试剂盒说明书提供的结果相一致, 这说明共转化 AH109 成功。

上面的试验结果表明, 用 pGBK-ubi 分别与 pGAD-iap2 或 pGAD-SeNPV-iap3 共转化 AH109, 都得到同样的结果, 即在低严谨型筛选培养基 SD/-Leu/-Trp/X- α -GAL 上有蓝白斑长出, 而在高严谨型筛选培养基 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X- α -GAL 上没有蓝白斑长出。在低严谨型筛选培养基上有蓝色的菌斑长出, 这说明泛素和 IAPs 的相互作用可以使报告基因表达。低严谨型筛选培养基仅缺乏亮氨酸和色氨酸, 在这种培养基上, 允许双杂交系统中诱饵蛋白和猎物蛋白之间的连接作用, 而且也允许两个相互作用蛋白利用酵母细胞的某些酶共同完成连接作用。共转化 AH109 在低严谨型筛选培养基上能长出蓝白斑的结果说明, 泛素和 IAPs 有较弱的直接相互作用, 这种相互作用可能利用了酵母中的 E1 和 E2。而高严谨型筛选培养基同时缺乏色氨酸、亮氨酸、组氨酸和腺嘌呤, 它抑制酵母细胞中的一些酶参与蛋白质间的相互作用, 在这种培养基上筛选到的阳性克隆, 表明诱饵蛋白和猎物蛋白间有较强的直接相互作用, 而共转化 AH109 在这种培养基上筛选时, 酵母内源性 E1 或 E2 的表达量不能满足泛素与 IAPs 强相互作用的需要, 所以没有菌斑长出。泛素的直接作用底物为泛素连接酶(E1), IAPs 作为 E3 的直接作用底物为泛素结合酶(E2), 体外泛素化试验将进一步验证 SeNPV 的泛素与不同来源 E1s、E2s 及杆状病毒 IAPs 的相互作用能力。

2.3 阳性克隆的验证

用玻璃珠破碎法制备 pGBK-SeNPV-ubi 分别与 pGAD-SeNPV-iap2 或 pGAD-iap3 共转化酵母的质粒抽提液, 用相应的引物 P1 和 P2 对转入 AH109 中的 pGBK-SeNPV-ubi, pGAD-SeNPV-iap2 和 pGAD-SeNPV-iap3 进行 PCR 检测。PCR 检测结果如图 2 和图 3。pGBK-SeNPV-ubi 分别与 pGAD-SeNPV-iap2 或 pGAD-SeNPV-iap3 共转化酵母得到

的阳性克隆中, 各检测了 4 个蓝斑。实验结果证明, 转入的 pGBK-SeNPV-ubi、pGAD-SeNPV-iap2 和 pGAD-SeNPV-iap3 可以在阳性克隆内检测到, 但是得到 pGAD-SeNPV-iap2 和 pGAD-SeNPV-iap3 的 PCR 产物量要远远低于 pGBK-SeNPV-ubi 的 PCR 产物量。这可能是采用共转化方法时, pGBK 很容易大量复制, 而 pGAD 质粒复制量较少, 而且采用的玻璃珠破碎法提取质粒 DNA 量较少。

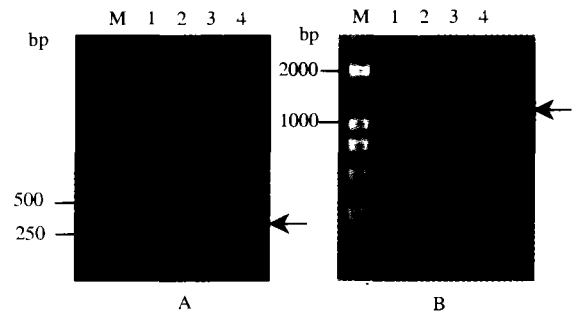


图 2 ubi 和 iap2 共转化 AH109 质粒抽提液的 PCR 检测
Fig.2 PCR detection of plasmid extract from AH109 which cotransformed with pGBK-SeNPV-ubi and pgad-SeNPV-iap2

A. Detection with ubi primers. B. Detection with iap2 primers. M. DL2000Marker; 1/2/3/4. Four blue plaques respectively.

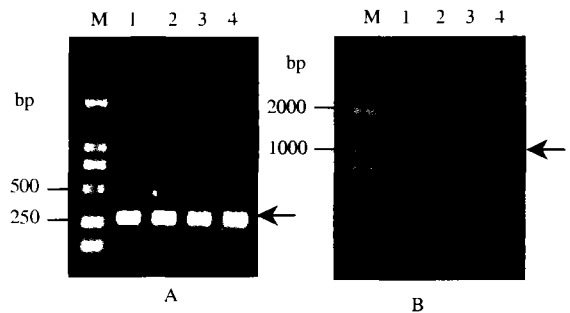


图 3 ubi 和 iap2 共转化 AH109 质粒抽提液的 PCR 检测
Fig.3 PCR detection of plasmid extract from AH109 which cotransformed with pGBK-SeNPV-ubi and pgad-SeNPV-iap3

A. Detection with ubi primers. B. Detection with iap3 primers. M. DL2000Marker; 1/2/3/4. Four blue plaques respectively.

3 讨论

杆状病毒泛素基因的功能研究已受到许多学者的关注。Elisabeth 等对甜菜夜蛾的泛素基因做了转录和翻译的研究, 证明其是一个晚期基因^[14]。在 AcMNPV 中, 泛素被通过一种新型的磷脂键被锚定

在病毒粒子的囊膜的内表面^[15]。缺失泛素基因的 AcMNPV 可以复制, 但感染细胞得到的病毒数量较野生型病毒低 5-10 倍, 病毒泛素可能参与了病毒的出芽或组装^[16]。Hass *et al* 对 AcMNPV 的泛素与 E1 的连接活性, 及参与 ATP 依赖的蛋白酶降解作了研究, 结果发现, 病毒泛素和真核生物泛素相比, 病毒泛素与 E1 的连接活性较低, 而且还可能降低 E3 催化的泛素多聚链延伸。AcMNPV 的泛素可能通过和宿主泛素竞争结合 E1, 从而降低泛素多聚链的延伸及 E3 的催化的底物连接, 在杆状病毒复制过程中阻止宿主的泛素蛋白酶系统对蛋白的降解^[17]。根据当前的研究结果认为, 杆状病毒泛素作为病毒粒子的一个组分, 可能参与病毒的复制和病毒粒子的形成。但病毒泛素是否都能阻止宿主蛋白酶的活性, 是否在 UPP 途径中对不同的 E2 和 E3 有不同的连接活性, 这些都还需要进一步的探讨。

在 UPP 途径中, 泛素连接酶 E3 是一个关键酶, 也是近年来研究的热点。由于在真核生物中发现众多 Ring finger 蛋白, 其中一些已经被证明具有 E3 的活性, 从而使人们推测所有 Ring finger 蛋白都可能是泛素连接酶 E3。最近, Noiko 等利用体外泛素化试验发现, BmMNPV 的 7 个 RING finger 蛋白中, IAP2、IE2、PE38 和 CG30 具有 E3 的功能, IAP1、ORF35、和 PE38 没有 E3 活性^[18], 而这些没有 E3 活性的 RING finger 蛋白可能需要其它专一性作用的 E2 才能发挥泛素连接酶作用。虽然 Noiko 等在试验中使用的不是杆状病毒泛素, 但由于杆状病毒泛素与真核生物泛素有较高的同源性^[8], 该试验可以是本文研究结果的一个佐证。在本研究中, 我们利用了酵母双杂交系统分别对 SeMNPV 的泛素和 IAP2, IAP3 在体外的相互作用作了初步的研究, 但杆状病毒泛素是否专一性的和病毒 IAPs 结合, 是否可以促进或抑制 IAPs 的 E3 的活性, 是否影响其抗细胞凋亡的功能, 都还有待于进一步的研究。目前, 我们已获得到含有 E1 和不同来源 E2 (Ubc5a, Ubc3, Ubc4, E2-25k, E2-20k, Ubc7, Ubc8, UbcH5B) 的质粒, 正在进行下一步的试验研究。

参考文献

- [1] 李存玺, 王永潮. 泛素-水解酶复合体通路[J]. 科学通报, 1997, 9: 1905-1910.
- [2] Hazelwood D, Zaitlin M. Ubiquitinated conjugates are found in preparations of several plant viruses [J]. Virology, 1990, 177: 352-356.
- [3] Karsies A, Hohnm T, Leclerc D. Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor [J]. Plant J, 2001, 27(4): 335-43.
- [4] Richard G, Evelyne G, Hugues L J, *et al*. Adenovirus protein involved in virus internalization recruits ubiquitin-protein ligases [J]. Biochemistry, 2002, 41:14299-14305.
- [5] Ronald N H, Mellissa E B, James P M, *et al*. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-protease system: a budding interaction [J]. J Virol, 2001, 75(22): 10623-10629.
- [6] Laurent C, Don G. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruse make the viruses make the connection [J]. Trends in Cell Biology, 2003, 13(1): 7-12.
- [7] Kuhne C, Banks L. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box [J]. J Biol Chem, 1998, 273(51): 34302-34309.
- [8] 牛国栋, 张小霞, 张忠信. 甜菜夜蛾核多角体病毒泛素基因的克隆和原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 44-48.
- [9] Stephen W F, Yigong S. Controlling the caspases [J]. Science, 2001, 294(16): 1477-1478.
- [10] Yili Y, Shengyun F, Jane P J, *et al*. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasome in response to apoptotic stimuli [J]. Science, 2000, 288: 874-877.
- [11] Yasuyuki S, Yui N, Ryosuke T. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8662-8667.
- [12] Marion M, Wendy M, Shawan B B, *et al*. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitin in Vitro [J]. J Biol Chem, 2002, 277(39): 36611-36616.
- [13] Ijkel W F J, van Strien E A, Heeldens J G M. *et al*. Sequence and organization of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J. Gen. Virol, 1999, 80: 3289-3304.
- [14] Elisabeth A S, Bastiaan J H. Sequence and transcriptional analysis of the ubiquitin gene cluster in the genome of Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol. 1996, 77: 2311-2319.
- [15] Guarino L A, Smith G, Dong W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor [J]. Cell, 1995, 80: 301-309.
- [16] Reilly L M, Guarino L A. The viral ubiquitin gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus is not essential to viral replication [J]. Virology. 1996, 218: 243-247.
- [17] Arthur L H, Dean J K, Patricia M R, *et al*. Functional character of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus Autographa californica [J]. Biochemistry, 1996, 35: 5385-5394.
- [18] Noriko I, Noriyuki M, Keiji T, *et al*. Ubiquitin ligase activity of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus RING Finger proteins [J]. J Virol. 2003, 77: 2929-293.