

## 含外源类蜗牛毒素基因的 AcMNPV 的虫体感染性研究\*

卢玉蓉<sup>1</sup>, 冯枞棣<sup>1</sup>, 吴东<sup>1</sup>, 孙修炼<sup>1</sup>, 邓菲<sup>1</sup>, 袁丽<sup>1</sup>, J.M.Vlak<sup>2</sup>, 胡志红<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 分子病毒学重点实验室和无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉 430071; 2. Department of Virology, Wageningen University, Binnenhaven 11, 6709 PD Wageningen, the Netherlands)

Study of Foreign Baculoviral *ctl* Gene by Overexpression Using AcMNPVBacmid System *in vivo*LU Yu-rong<sup>1</sup>, FENG Zong-di<sup>1</sup>, WU Dong<sup>1</sup>, SUN Xiu-lian<sup>1</sup>, DENG Fei<sup>1</sup>, YUAN Li<sup>1</sup>,  
J.M.Vlak<sup>2</sup>, HU Zhi-hong<sup>1\*\*</sup>

(1. The key laboratory of Molecular Virology and Joint-lab of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071 China; 2. Department of Virology, Wageningen University, Binnenhaven 11, 6709 PD Wageningen, the Netherlands)

**Abstract:** The conotoxinlike (*ctl*) gene is a small gene in the genomes of several baculoviruses. The biological function of baculoviral *ctl* gene remains unknown. In this report, we generated a recombinant AcMNPV(AcBac-*ph-ctl*) which contains the *ctl* gene from BusuNPV using AcMNPV bacmid system. The transcription of *ctl* gene by AcBac-*ph-ctl* was confirmed by RT-PCR in infected Sf21 cells. To study the CTL function *in vivo*, the recombinant viruses were used to infect *Spodoptera exigua peros*, and the infectivity and action speed were determined. No significant difference between the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and the median survival time (ST<sub>50</sub>) of the wild type virus AcMNPV and the recombinant virus was found.

**Key words:** Conotoxinlike (*ctl*); AcMNPV Bacmid; LC<sub>50</sub>; ST<sub>50</sub>; Transcription; Bioassay

**摘要:** 类蜗牛毒素基因 (conotoxinlike, *ctl*) 是在一些杆状病毒基因组中存在的与蜗牛毒素类似的一类基因, 其功能尚不清楚。本文利用苜蓿银纹夜蛾核多角病毒 (AcMNPV) bacmid 表达系统构建了含油桐尺蠖核多角体病毒 (BusuNPV)*ctl* 基因的重组病毒 AcBac-*ph-ctl*。在细胞水平上对 *ctl* 基因的 RT-PCR 分析表明, 该基因转录出 mRNA。在甜菜夜蛾体内进行了生物活性测定, 结果表明 AcBac-*ph-ctl* 与对照野生型 AcMNPV 的 LC<sub>50</sub>, ST<sub>50</sub> 无显著性差异, 表明在此系统中, 外源的 CTL 无杀虫增效性能。

**关键词:** 类蜗牛毒素基因 (*ctl*); AcMNPV Bacmid; LC<sub>50</sub>; ST<sub>50</sub>; 转录; 生物测定

**中图分类号:** S432.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5152 (2004) 03-0276-05

蜗牛毒素 (Conotoxin) 是一种在海洋腹足纲动物中发现的神经毒素, 包括 N 端的保守信号肽和 C 端富含半胱氨酸的金属蛋白酶结构。蜗牛毒素家族中半胱氨酸的排列以 4 环的 ω-蜗牛毒素 (ω-conotoxin) 居多, 保守的结构花式 (元) 为 CX<sub>3</sub>GX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CCX<sub>2-3</sub>CX<sub>4-6</sub>C。这类毒素能够阻断许多脊椎动物细

胞的钙离子通道, 从而对动物造成毒害作用。1992 年, Eldrige 等人在杆状病毒 (LdMNPV) 中发现一种与蜗牛毒素结构非常类似的小分子肽, 因而根据其保守的结构特点将其命名为类蜗牛毒素 (conotoxinlike, *ctl*), 但基因缺失实验并没有揭示其在体内和体外的任何功能<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2003-12-9, 修回日期: 2003-12-22

\* 基金项目: 国家杰出青年基金 (3002503), 中国科学院创新工程重要方向性项目 (KSCX2-1-02, KSCX-SW-301-09); 863 项目 (2001AA214031), 973 项目 (2003CB114202)

作者简介: 卢玉蓉 (1975-), 女, 硕士生, 研究方向为分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 胡志红 (1966-), 女, 研究员, 研究方向为分子病毒学。Corresponding author: Tel: 027-87197180, E-mail: huzh@pentium.whiov.ac.cn

本研究在 AcMNPV 中克隆一个外源的 *ctl* 基因,拟通过比较该病毒与野生型病毒宿主甜菜夜蛾的生物活性差异,研究 *ctl* 基因的功能。本研究所选用的 *ctl* 基因来自于油桐尺蠖核多角体病毒<sup>[2, 3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

全长 *ctl* 基因来自本室保存的质粒 pFBD-*ctl*(由冯枫棣构建,该质粒中的全长 *ctl* 基因由本室保存的油桐尺蠖多角体基因组文库质粒 pSH9<sup>[2]</sup>中扩增得到),质粒 pFastBac-AcPH-GFP 和 AcMNPV 的 Bac-to-Bac 表达系统 (Invitrogen-GIBCO 公司产品)由荷兰 Dr. Vlask 惠赠。野生型 AcMNPV 病毒由本室邓菲博士提供。昆虫细胞 Sf21 为本室保存,按常规方法传代培养,用于病毒的转染,增殖和滴度测定。2 龄甜菜夜蛾 (*Spodotera exigua*) 由本所实验动物室提供,用于虫体感染和生物测定。

### 1.2 质粒(转移载体)的构建

1.2.1 构建含 *ctl* 完整基因的转移载体 pLYR1: 用引物 *ctl*-F1:5' GCGGTCGACTTATCGTGCAATTAATATG-3' 下划线为 *Sal* I 酶切位点和 *ctl*-R1: 5'GGG CTG CAG TTAGTGAGGCAAGCAATAGT T-3 下划线为 *Pst* I 酶切位点,以 pFBD-*ctl* 为模板,PCR 扩增 *ctl* 的完整阅读框。扩增产物用质粒回收试剂盒回收,克隆至 pGEM<sup>®</sup>-T Easy 载体,质粒命名为 pLYR1,测序验证序列正确。

1.2.2 构建含 *ctl* 完整基因和 AcMNPV 多角体基因(*ph*)的转移载体 pLYR3: 用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切从质粒 pFast Bac-AcPh-GFP 上将 AcMNPV 多角体基因(*ph*)克隆至转移载体 pFastBacDual(Promega),得到的质粒命名为 pLYR2。用 *Eco*R I 酶切 pLYR1 得到全长的 *ctl* 片段,Klenow 酶补平,同时用 *Sma* I 单酶切 pLYR2,将得到的片段与 *ctl* 片段连接得到同时含有 AcMNPV 多角体基因和 *ctl* 基因的转移载体质粒,命名为 pLYR3。图 1 显示了构建含目的基因 *ctl* 和 AcMNPV 多角体基因(*ph*)转移载体的流程。

### 1.3 重组病毒的构建

1.3.1 转座及重组 Bacmid 的筛选:通过 CaCl<sub>2</sub> 转化方法<sup>[4]</sup>,将纯化的 pLYR3 转座到纯化的含有 AcBacmid 和 Helper 质粒的大肠杆菌 DH10 $\beta$  感受态中,将得到的产物于 LB 培养基平板(含 50 $\mu$ g/mL 卡那霉素,7 $\mu$ g/mL 四环霉素庆大霉素,X-Gal,IPTG)上,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h。挑取白色菌落,PCR 鉴定阳性转座子。通过电转化,将上述转座得到的重组

Bacmid 转化到不含 Helper 质粒的大肠杆菌 DH10 $\beta$  中,以消去 Helper 质粒,得到 AcBac-*ph-ctl*。将 pLYR2 以同样的方法转座得到重组 Bacmid AcBac-*ph*。

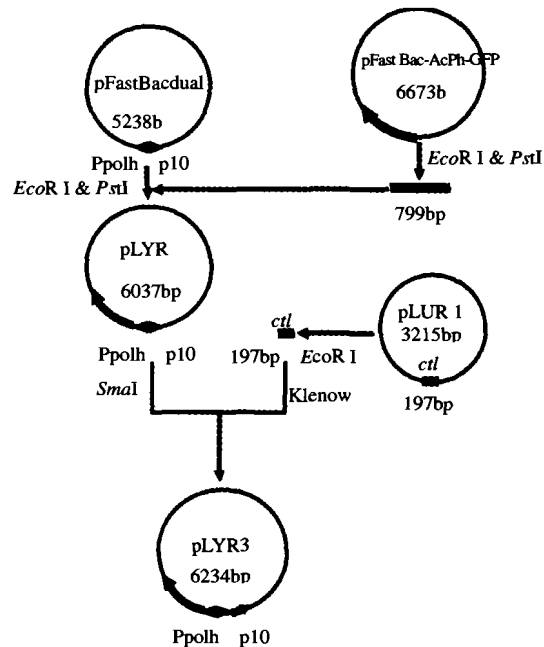


图 1 转移载体构建图谱

Fig.1 Construction of the transfer vectors

1.3.2 重组 Bacmid 的 DNA 提取及酶切鉴定:按照 Bac-to-Bac 表达载体说明书上的方法 (Gibco/BRL Co.) 分别提取 AcBac-*ph-ctl* 和 AcBac-*ph* 的 Bacmid DNA,用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度。取约 1 $\mu$ g 的 DNA 与 4.5 $\mu$ L 的 *Hind* III 于 37 $^{\circ}$ C 反应 22h,于 0.8% 琼脂糖凝胶、电压 30V 电泳 24 h,用凝胶成像仪成像。

### 1.4 重组病毒的转染、扩增和滴度测定

1.4.1 重组病毒的转染:转染前一天将约  $1 \times 10^6$  的 Sf21 细胞用无血清的 Grace's 培养基于 35mm 细胞培养皿中培养过夜。转染时,在 1.5mL Eppendorf 管中用无血清的 Grace's 培养基将约 1 $\mu$ g 的病毒 DNA 稀释至 100 $\mu$ L,各加入 15 $\mu$ L 的 cellfectin 及 85 $\mu$ L 无血清的 Grace's 培养基,轻轻颠倒约 6~7 次,充分混匀,静置约 45min 后,用无血清的 Grace's 培养基将 DNA 和 cellfectin 的混合物稀释至 1mL,吸去细胞培养上清,用无血清的 Grace's 培养基洗细胞一次,再将上述混合液加入到细胞中。27 $^{\circ}$ C 培养 5h 后,弃上清,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 Grace's 培养基,另加青霉素 (100 $\mu$ g/mL) 与链霉素 (10mg/mL) 各 10 $\mu$ l 于

27℃继续培养 4~7d。

1.4.2 重组病毒的扩增和滴度测定：将转染得到的重组病毒AcBac-ph-ctl和AcBac-ph用Sf21细胞增殖，用60孔板按梯度稀释法进行滴度测定<sup>[5]</sup>。

1.5 重组病毒的转录分析

用 MOI 为 5 的重组病毒感染 Sf21 细胞，感染后 96 h 收集被感染的细胞，用 Omega Bio-tek RNA 试剂盒提取 RNA，用 TaKaRa 公司出品的 3'-Full RACE Core Set 进行 RT-PCR 分析。

引物 *ctl*-F1 和 *ctl*-F2:5'-GCGGAATTCTTG GTA TTGCGATGTTTGTGCGC3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)分别作为 *ctl* 基因上游和内部特异性 PCR 引物，与 3'锚定引物用于 RT-PCR 反应。

1.6 重组病毒多角体的电镜观察

用浓度为 1×10<sup>7</sup> PIBs/mL 的重组病毒 AcBac-ph-ctl 和野生型病毒 AcMNPV 喂食二龄末甜菜夜蛾幼虫，收集虫尸，提纯多角体，进行电镜切片观察。

1.7 重组病毒的生物测定<sup>[6]</sup>

将经鉴定的重组病毒在虫体中扩增一次后，收集多角体，经初步纯化<sup>[7]</sup>后计数，以野生型 AcMNPV 及双蒸水为对照，进行生物测定。挑选大小均一的二龄末甜菜夜蛾幼虫，置于无菌的 24 孔板，28℃恒温光照培养箱内饥饿培养 16h，分别以浓度为 1×10<sup>4</sup> PIBs/mL、3×10<sup>4</sup> PIBs/mL、1×10<sup>5</sup> PIBs/mL、3×10<sup>5</sup> PIBs/mL、1×10<sup>6</sup> PIBs/mL、1×10<sup>7</sup> PIBs/mL 的病毒悬液喂食饥饿后的甜菜夜蛾<sup>[6]</sup>，同时设健康对照。1×10<sup>4</sup> PIBs/mL~1×10<sup>6</sup> PIBs/mL 等 5 个浓度每个浓度的病毒悬液各喂食 36 头幼虫，每天观察死亡率，用概率分析的方法计算病毒的半致死浓度 (LC<sub>50</sub>)<sup>[8]</sup>。以 1×10<sup>7</sup> PIBs/mL 浓度的病毒以及健康对照各喂食 48 头幼虫，每天观察 3 次，并记载幼虫存活情况，进行生存分析并计算半数存活时间 ST<sub>50</sub><sup>[9]</sup>。LC<sub>50</sub> 及 ST<sub>50</sub> 均进行 t 测验，实验重复 2 次。

2 结果和分析

2.1 类蜗牛毒素的结构分析

蜗牛毒素是在捕食性节肢动物的毒液中发现的生物活性肽，长度一般为 10~30 个氨基酸残基，大多数已鉴定的蜗牛毒素都能形成多个二硫键，可作用于各种受体和离子通道<sup>[10,11]</sup>。ω-蜗牛毒素是蜗牛毒素当中的一类，其保守的结构花式为 CX<sub>3</sub>GX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CCX<sub>2-3</sub>CX<sub>4-6</sub>C (X 可以是任意残基)，通常可以阻断某些脊椎动物的 Ca<sup>2+</sup>离子通道<sup>[11]</sup>。

到目前为止，在杆状病毒基因组中发现的类蜗

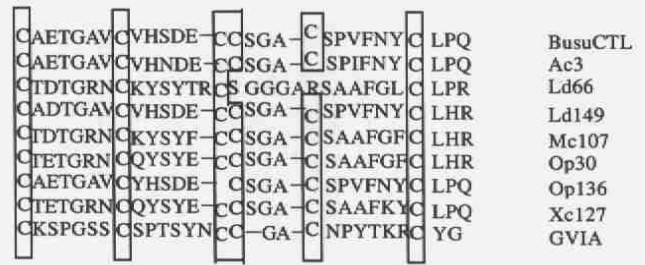


图 2 类蜗牛毒素与蜗牛毒素 GVIA 的结构比较  
Fig.2 Structural similarity between known baculoviral conotoxinlike genes and GVIA.

The derivations of all the conotoxinlike genes are showed in the text.

牛毒素基因包括：BusuNPV (*Burura suppressaria* nucleopolyhedrovirus)的 Busu-*ctl*<sup>[3]</sup>，AcMNPV (*AutographacaliFornicamultinucleocapsi-dnucleopolyhedrovirus*)的 Ac3<sup>[12]</sup>，LdMNPV (*Lymantriadisparmultinucleocapsidnucleopolyhedrovirus*)的 Ld66<sup>[13]</sup>和 Ld149<sup>[13]</sup>，MacoNPV (*Mamestra configuratanucleopolYhedrovirus*)的 Maco107<sup>[14]</sup>，OpMNPV (*Orgyiapseudotsugat multinucleocapsidnucleopolyhedrovirus*)的 Op30<sup>[15]</sup>和 Op136<sup>[15]</sup>，XcGV (*Xestia c-nigram granulosisvirus*)的 Xc127<sup>[16]</sup>等。比较已知杆状病毒的 CTL 的序列发现，除 Ld66 以外，其它几种毒素多肽在 C 端都具有 ω-蜗牛毒素家族特有的结构特征 CX<sub>3</sub>GX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CCX<sub>2-3</sub>CX<sub>4-6</sub>C。6 个半胱氨酸形成 3 个二硫键，维系着毒素的三维构象。Ld66 尽管在氨基酸一级序列上与其它杆状病毒的类蜗牛毒素有相似性，但并不具有上述保守的结构花式，所以不属于 ω-蜗牛毒素家族。

2.2 转移载体及重组病毒的酶切鉴定

2.2.1 转移载体的酶切鉴定：转移载体 pLYR1, pLYR2, pLYR3 的阳性克隆用酶切和 PCR 方法鉴

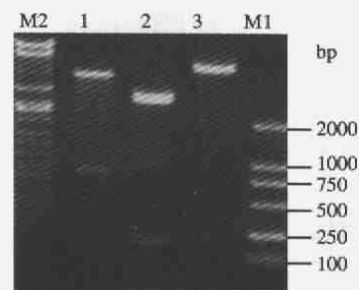


图 3 转移载体 pLYR1, pLYR2, pLYR3 的酶切鉴定图谱  
Fig.3 Restriction enzyme digestion of transfer vectors pLYR1, LYR2 and LYR3.

1; pLYR2 digested with *Eco*R I & *Pst* I; 2, pLYR1 digested with *Pst* I & *Sal* I; 3, pLYR3 digested with *Sal* I; & *Xho* I; M1, DL2,000 marker; M2, λ*Hind* III+*Bam*H I+*Eco*R I marker.

定。图3显示了各种转移载体的酶切及PCR鉴定结果, 与预期值相符。

2.2.2 重组病毒的酶切鉴定: 得到的重组 Bacmid DNA 用 *Hind* III 进行酶切鉴定。由于新引入的酶切位点, *AcBac-ph-ctl* 经 *Hind* III 进行酶切后, 原 *AcBacmid* 上的 8.05kb 的带将变成 9.21kb, 1.47bp 和 500bp 三条带; 而 *AcBac-ph* 经 *Hind* III 酶切后, 原 *AcBacmid* 上的 8.05kb 的带将变成 8.98kb, 1.47bp 和 500bp 三条带。图4显示了重组 bacmid DNA 及对照 *AcBacmid* 的酶切鉴定结果, 结果与预期值相符 (500bp 带未显示), 说明所构建的 *AcBac-ph* 和 *AcBac-ph-ctl* 是正确的。

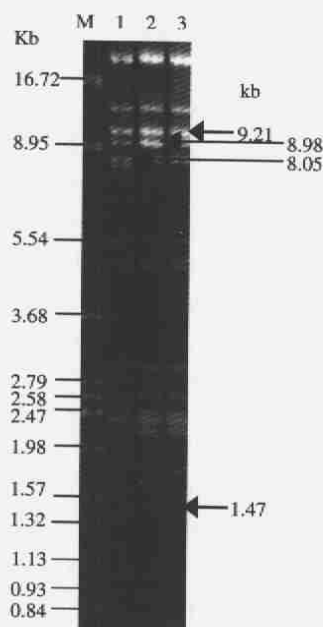


图4 重组病毒的酶切鉴定

Fig.4 *Hind* III digestion of the recombinant viruses.

1, *AcBacmid*; 2, *AcBac-ph*; 3, *AcBac-ph-ctl*; M,  $\lambda$ *Hind* III+*Bam*H I+*Eco*R I marker.

### 2.3 重组病毒的电镜切片观察

将含有目的基因 *ctl* 的重组病毒 *AcBac-ph-ctl* 多角体及野生型 *AcMNPV* 多角体纯化后进行电镜切片观察, 结果表明, 该重组病毒在甜菜夜蛾虫体内能形成完整的病毒粒子, 并被包装成完整的多角体。如图5。

### 2.4 重组病毒的转录分析

由于我们在构建 *ctl* 基因重组病毒时, 采用的是 p10 启动子, 属于晚期和极晚期启动子, 因此我们收集被重组病毒感染 96h 的 Sf21 细胞样品, 进行转录分析。在最初用特异性引物 *ctl*-F1 与 3' 锚定引物进行 PCR 反应后, 发现被 *AcBac-ph-ctl* 感染的

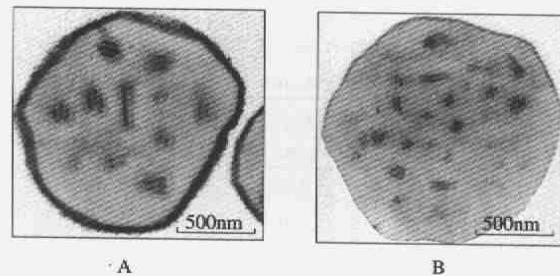


图5 重组病毒多角体的电镜切片观察

Fig.5 The electroscope image of polyhedron of *AcBac-ph-ctl* and *AcMNPV*.

A, Polyhedron of *AcBac-ph-ctl*; B, Polyhedron of *AcMNPV*.

Sf21 细胞的 RNA 样品的 RT-PCR 产物有约 300bp 大小的特异性带出现, 而被 *AcBac-ph* 感染的 Sf21 细胞 RNA 样品的 RT-PCR 产物则没有这样的特异性带。用另一条 *ctl* 基因内部引物 *ctl*-F2, 以第一次 PCR 的产物做模板, 与 3' 锚定引物进行 PCR 之后, 上述特异性带变得清晰明显 (图6), 而 *AcBac-ph* 感染的 Sf21 细胞中没有该产物, 因而可以推断, *ctl* 基因 mRNA 在 *AcBac-ph-ctl* 感染的细胞内进行了转录。

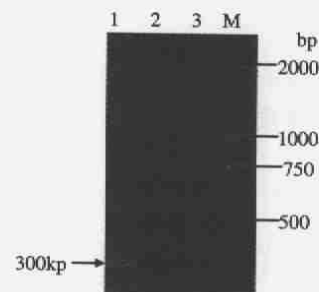


图6 *ctl* 基因的 RT-PCR 转录分析

Fig.6 Detection of the transcription of *ctl* by RT-PCR.

Samples were extracted from Sf21 cells which were infected with 1. *AcBac-ph-ctl*; 2, *AcBac-ph*. and 3, Healthy cells; M, DL2, 000 marker.

### 2.5 重组病毒的生物测定

两次实验结果均表明, 重组病毒的与野生型病毒对 2 龄棉铃虫半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 和半数致死时间 ( $ST_{50}$ ) 均没有显著性差异 ( $p > 0.05$ ) (表 1, 2)。

## 3 讨论

热带海洋地区盛产 500 多种锥形蜗牛, 每种锥形蜗牛都产生一种独特的毒液, 其中含有 50~200 种被称作是蜗牛毒素的具活性的短肽, 锥形蜗牛靠这些带有麻痹性毒素的“鱼叉”捕获猎物。Omega 族蜗牛毒素通常为钙离子通道的抑制剂, 可以引起节肢动物的迅速麻痹<sup>[17]</sup>。尽管在一级序列上的差异很

表1 重组病毒 AcBac-ph-ctl 与野生型病毒 LC<sub>50</sub> 值的比较Table 1 The comparison of the LC<sub>50</sub> values between AcBac-ph-ctl and AcMNPV

Tests	Viruses	LC <sub>50</sub> (PIBs/mL)	95% fiducial limits (PIBs/mL)	t
1	AcBac-ph-ctl	222986	(140342, 356578)	1.837
	AcMNPV	472546	(294401, 780970)	
2	AcBac-ph-ctl	226976	(136144, 407645)	1.658
	AcMNPV	760164	(423712, 1654984)	

表2 重组病毒与野生型病毒 ST<sub>50</sub> 值的比较Table 2 The comparison of the ST<sub>50</sub> values between AcBac-ph-ctl and AcMNPV

Tests	Viruses	ST <sub>50</sub> (h)	SE	t
1	AcBac-ph-ctl	76.2	2.1	0.440
	AcMNPV	75.0	1.9	
2	AcBac-ph-ctl	92.3	3.5	0.800
	AcMNPV	87.8	4.4	

大,这一类毒素具有极为保守的结构特征。迄今为止,许多杆状病毒基因组中也发现了具有这一类特征的基因,但其具体功能尚不清楚。唯一有文献报道的是 AcMNPV 中的类蜗牛毒素,它在感染的昆虫体液中低量存在,缺失这个基因与野生型病毒相比,对昆虫的行为并没有造成明显的变化<sup>[1]</sup>。可能这个基因的具体作用是与其特定的宿主或宿主特定的发育阶段有关。

在本实验设计中,我们选择了油桐尺蠖病毒的 *ctl* 基因,将其与 AcMNPV 多角体基因一起引入 AcMNPV Bacmid 中,构建重组病毒 AcBac-ph-ctl,并用该重组病毒感染宿主甜菜夜蛾,目的在于比较 CTL 这一毒素蛋白对甜菜夜蛾的杀虫毒力是否有增强作用。

实验结果显示,虽然 *ctl* 基因可以在重组病毒感染的细胞中转录,并且含有 *ctl* 基因的重组病毒具有明显的杀虫毒性,但是其杀虫毒力与野生型 AcMNPV 并没有明显的差异。导致这种结果的可能原因有:(1) *ctl* 基因在甜菜夜蛾虫体内并没有表达加工为有活性的蛋白。由于缺少 CTL 的抗体,目前我们尚不能证实重组病毒是否产生了 CTL 多肽。

(2) 甜菜夜蛾也可能并不是 *Busu-ctl* 基因的特异性靶宿主。(3) 由于野生型 AcMNPV 中有一个自身的 *ctl* 基因,新增外源 CTL 的毒性作用可能不足以与野生型 CTL 区别开等等。

我们的实验表明,在目前的系统中, *Busu-ctl* 的加入并不能增加 AcMNPV 的杀虫性能,下一步,我们拟在缺少天然 *ctl* 基因的棉铃虫病毒中开展类

似的研究,并制备 CTL 的抗体,以进一步揭示 CTL 的功能。

## 参考文献

- [1] Eldridge R, Li Y, Miller L K. Characterization of a Baculovirus Gene Encoding a Small Conotoxinlike Polypeptide[J]. J Virol, 1992, 66: 6563-71.
- [2] Hu Z H, Arif B M, Sun J S, et al. Genetic organization of the HindIII-I region of the single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*[J]. Virus Research, 1998, 55: 71-82.
- [3] 冯枞棣. 棉铃虫核多角体病毒特有基因 Ha34, Ha99 的鉴定和杆状病毒类蜗牛毒素的初步功能研究[D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒所, 2002.
- [4] 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 侯云德, 等校. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] David R O, Lois K M, Verne A L. Baculovirus expression vector: a laboratory manual[M]. New York: W. H. Freeman and Company, 1992.
- [6] Bianchi F J J A, Snoeiijing I, Van der werf W, et al. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. J Invert Pathol, 2000, 75: 28-35.
- [7] 孙修炼, 张光裕. 棉铃虫 (*Heliothis* spp) 核型多角体病毒四个分离株的比较研究[J]. 中国病毒学, 1994, 9: 309-318.
- [8] Finney D J. Probit Analysis (3<sup>rd</sup> ed.) [M]. London: Combridge University Press, 1973.
- [9] Collett D. Modelling Survival Data in Medical Research[M]. London: Chapman & Hall, 1994.
- [10] Olivera B M, Rivier J, Clark C, et al. Diversity of *Conus* neuropeptides[J]. Sciences, 1990, 249: 257-263.
- [11] Olivera B M, Rivier J, Scott J K, et al. Conotoxin[J]. J Biol and Chem, 1991, 266:22067-22070.
- [12] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 202: 586-605.
- [13] 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.
- [14] Li Q, Donly C, Li L, et al. Sequence and Organization of the *Mamestra configurata* Nucleopolyhedrovirus Genome[J]. Virology, 2002, 294: 106-121.
- [15] Ahrens C H, Russell R L, Rohrmann G F, et al. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome[J]. Virol. 1997, 229:381-399.
- [16] Hayakawa T, Ko R, Okano K, et al. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome[J]. Virol. 1999, 262: 277-297.
- [17] Hillyard D R, Baldomero M, Olivera B M, et al. A molluscivorous *Conus* Toxin: conserved frameworks in conotoxins[J]. Biochemistry, 1989, 28: 358-361.