维普资讯 http://www.cqvip

第 19 卷 5 期
2004 年 10 月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

19 (5): 498-503
October 2004

苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核型多角体病毒 AcMNPV P78/83 蛋白初步研究*

聂英超[1,2]，方明刚[1]，王 倩[1]，余泽华[2**]，陈新文[1**]

（1.中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学实验室，湖北武汉 430071；2.华中师范大学生命科学学院昆虫所，湖北武汉 430079）

Functional Analysis of AcMNPV P78/83 Protein

NIE Ying-chao[1,2]，FANG Ming-gang[2]，WANG Qian[2]，YU Ze-hua[2]，CHEN Xin-wen[**]

(1. Molecular Virology Lab, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Entomology Institute, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) is the typical member of nucleopolyhedrovirus of *Baculoviradae*, a circled and double stranded large DNA virus. It's also one of the most widely studied baculoviruses that turns out to be environment sound pesticide and a powerful vector of foreign protein expression as well as a promising vector of gene therapy. Revealing the molecular mechanism of the interaction plays a key role in the better understanding of viral replication, package, transportation and application of baculovirus as a gene therapy vector. Sequence analysis found that the P78/83 product of AcMNPV ORF9 shares the common motifs with WASP proteins indicating that P78/83 might involve in baculovirus transportation. Trying to understand P78/83 function, we constructed a recombinant virus vAc-orf9-gfp with the Bac-to-Bac system, within which AcMNPV ORF9 was fused with enhanced green fluorescence protein (EGFP). Sf21 cells were infected with the recombinant virus and Laser Confocal Microscopy was used to determine the subcellular location of P78/83. Green fluorescences showed major distribution in cell plasm a after 12h infection, and transfered into nucleus at 24 hpi. This means that P78/83 is located in the nucleus. Infection assay *in vitro* showed that overexpression of P78/83 had no effect on virus growth and viral assembly.

Key word: AcMNPV; Enhanced green fluorescence protein (EGFP); P78/83

摘要：AcMNPV ORF9 编码病毒核衣壳蛋白 P78/83，该蛋白在宿主细胞内以磷酸化和去磷酸化两种形式存在，能够与细胞骨架成分肌动蛋白相互作用，序列分析表明其具有与 WASP 蛋白类似的结构，推测可能在病毒粒子的包装、运输等过程中起重要作用。本文利用 Bac-to-Bac 系统构建了 P78/83 与绿色荧光蛋白融合表达的重组 AcMNPV，激光共聚焦显微镜观察表明，重组病毒感染 Sf21 细胞 12h 后绿色荧光主要集中分布于细胞质中，24h 及以后绿色荧光主要集中分布于细胞核中。感染试验表明，超表达 P78/83 对病毒的生长无明显的影响。

关键词：苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核多角体病毒；绿色荧光蛋白；P78/83 蛋白；

中图分类号：S432.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0498-06

苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核多角体病毒(*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNV)是杆状病毒科核型多角体病毒属的代表成员，作为一种生物农药和高效表达载体已获得广泛的应用并得到深入研究[1]。近年来，病毒与宿主细胞相互作用的研究愈来愈受到广大研究者的关注，充分全面

收稿日期：2004-03-24，修回日期：2004-05-09
* 基金项目：国家 973 项目(2002CCCA02800, 2003CB 114202)；国家自然科学基金杰出青年基金（30325002）
作者简介：聂英超(1979-),女,硕士研究生,从事杆状病毒分子生物学研究
** 通讯作者：陈新文(1964-)，男，博士，研究员. Corresponding author. Tel: 027-87199106, Email: chenxw@pentium.whiov.ac.cn
余泽华(1945-)，男，教授, Corresponding author. Tel: 027-67867226, Email: yuzehua@hotmail.com

维普资讯 http://www.cqvip.c

的了解杆状病毒与宿主细胞的相互关系，也成为杆状病毒研究的热点。

已有许多报道指出病毒与宿主细胞肌动蛋白骨架存在密切的相互作用,它们的侵染、转录、复制以及包装运输过程都需要肌动蛋白的参与，如腺病毒、HIV、痘苗病毒、人呼吸道合胞病毒 RSV(*Human respiration syncytial virus*)、人类副流感病毒 3 型(*Human parainfluenza virus 3*, HPV 3)等 [2~4]。早期关于 AcMNPV 的研究证实杆状病毒的复制也需要宿主细胞肌动蛋白的参与[5 6]。另外研究表明肌动蛋白本身是多角体形成的一种抑制因子[7]。近期 Taro Ohkawa 等在 AcMNPV 中发现 6 个介导 G-actin 向细胞核中定位的早期基因 [8]。诸多的研究结果表明，肌动蛋白参与杆状病毒的入侵、复制、包装以及运输等过程。

AcMNPV ORF9 编码核衣壳蛋白 P78/83，该蛋白在细胞内存在的方式包括磷酸化和去磷酸化的形式[9]。蛋白质氨基酸序列分析表明，P78/83 具有与 WASP 家族蛋白及细菌表面蛋白（如李斯特单胞菌 ActA）高度相似的蛋白结构域 [10]，推测该基因可能参与宿主细胞肌动蛋白的相互作用，在病毒的包装运输中发挥作用。病原微生物包括病毒可以直接与肌动蛋白或调控微丝形成的因子相互作用，实现在胞内胞间的运输。如志贺氏菌（*Shigella*）和沙门氏菌（*Salmonella*），他们能够利用自身的表面结构蛋白直接激活或模仿 WASP（Wiskott-Alfrich syndrom protein）家族蛋白，通过 Arp2/3 复合体调控途径，引起细胞肌动蛋白聚合形成肌动蛋白尾或其他与微生物运动性相关的特殊结构，实现他们在细胞内的运动或细胞之间的传播[11 12]。李斯特单胞菌表面蛋白 ActA、志贺氏菌表面蛋白 IscA 以及痘苗病毒 A36R，它们都具有与 WASP 家族蛋白高度相似的蛋白基序：WH2 区、cofilin 同源区与 acidic 区，通过这三个基序与肌动蛋白单体及肌动蛋白聚合调控因子相互作用，快速组装肌动蛋白实现它们在细胞内和细胞间运输与传播[13~15] 。

本文构建了 EGFP-P78/83 融合表达的重组 AcMNPV 病毒，对该基因的基本特性进行了分析研究，为开展进一步的结构与功能的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫病毒、细胞系及菌株

野生型 AcMNPV、重组 AcMNPV-gfp 及 Sf21 细胞均由中科院武汉病毒所分子病毒室保存。细胞于 28℃培养，培养基为 Grace，含 10%胎牛血清。

大肠杆菌 DH10B 为武汉病毒所分子病毒学实验室保存。

1.2 试剂

Grace 培养基、胎牛血清为 GIBCO/BRL 公司产品。凝胶回收试剂盒为 Omega 产品。所用 DNA 限制性内切酶、Rnase、DNA marker 等均为 Tarkara 公司产品，人工合成引物为上海博亚公司合成。

1.3 Bacmid DNA 提取方法

在 Eppendorf 管中加入 1.5mL 过夜培养的含 vAc-orf9-gfp bacmid 的 DH10B 大肠杆菌培养物，14,000r/m 离心 30s 后去掉上清，重复一次；加入 300μL 溶液 I，在震荡器上打散菌体沉淀；加入溶液 300μL 溶液 II，混匀后在冰上静置 5min；加入 300μL 溶液 III 混匀后，在冰上静置 5min, 14,000r/m 离心 15min，小心将上清转移至另一个 Eppendorf 管中，加入一倍体积的异丙醇，混匀后-20℃放置 15min，14,000r/m 离心 15min，弃去上清，用 70%乙醇洗沉淀一次，室温干燥，立即加入 30μL 无菌水，-4℃贮存。

1.4 重组病毒的构建

1.4.1 p78/83 克隆：以 AcMNPV 基因文库含 *Bgl*II C 片段质粒为模板，利用人工合成引物 Primer1（*GAATTC*ATGACGAATCGTAGATATGAATC）和 Primer2（*GGTACC*GCAGCGCTAGA TTCTGTGCG TT）PCR 扩增 P78/83。引物 Primer1、Primer2 分别为 P78/83 基因上游引物和不包括基因终止密码子的下游引物，其中黑体所示为基因起始密码子，引入的酶切位点 *Eco*RI 和 *Kpn* I 为斜体所示。PCR 反应条件为：94℃预变性 5min，按照 94℃45s，57℃40s，72℃1.5min 设定 25 个循环，最后 72℃终延伸 10min。PCR 所得产物回收后插入 pGEM-Teasy（Promega），酶切鉴定并测序。测序正确的基因以 *Eco*R I 和 *Kpn* I 酶切回收后插入 pEGFP-N1(Clontech)，得到含 p78/83 与 EGFP 基因融合的质粒 pEGFP-P78/83。然后以 *Eco*R I 和 *Kpn* I 酶切下 p78/83-EGFP 融合基因插入到 pFastbac I 质粒上的相应位点，得到用于重组病毒构建的供体质粒 pFast-EP78/83。

1.4.2 重组 Bacmid 的构建：利用 AcMNPV Bac-to-Bac 系统，根据产品说明书构建重组 Bacmid（Invitrigen）。具体过程简述如下：利用 pFast-EP78/ 83 转座含 helper 质粒与 AcMNPV bacmid 的大肠杆菌感受态细胞，转座产物通过卡那霉素、庆大霉素与四环霉素三种抗生素筛选，同时辅以蓝白斑筛选，挑选三抗平板上长出的白色菌落，得到含 p78/83-EGFP 融合蛋白的重组 AcMNPV bacmid DNA。提取重组

维普资讯 http://www.cqvip.com

bacmid DNA PCR 与限制性内切酶分析鉴定。PCR 鉴定所用引物为 Primer3（CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG）和 Primer4（CTCAAGTATGGGCATCATTC）。

1.4.3 重组病毒的获得：利用脂质体转染 Sf21 细胞得到重组病毒，操作过程根据产品操作说明书进行（Invitrigen）。10μL 脂质体用基础培养基 Grace 稀释至 50μL，静置 5min 后，将 50μL 稀释的重组 bacmid DNA 约 1μg 加入脂质体中，充分混合，然后每隔 5min 轻轻弹动，45min 以后，轻轻加入 900μL Grace，再将其转到接种细胞的小皿中。培养 6h 后，吸弃含脂质体的基础培养液，以 Grace 加 10%胎牛血清的正常培养液培养，28℃培养约一星期后，荧光显微镜下用 488nm 激发波长观察，有绿色荧光出现，表明 EGFP-P78/83 融合蛋白表达，超表达该融合蛋白的重组 AcMNPV 病毒产生。

1.5 病毒制备与滴度测定

转染所得重组病毒 vAc-orf9-gfp 感染 Sf21 细胞以大量增殖病毒，收集病毒，通过终点稀释法测定病毒滴度[16]，-80℃保存备用。

1.6 P78/83 亚细胞定位

接种 Sf21 细胞 2×10^6 到置有盖玻片的培养小皿中爬片，细胞贴壁 2h 后，重组病毒以 10 个感染复数（MOI）感染，分别在感染后 12h、16h、24h、48h 及 72h 取出盖玻片置于载玻片上，以甘油/PBS（9/1）封片，然后用 Leica 共聚焦激光显微镜观察绿色荧光在细胞中的分布。

1.7 重组病毒生长特性比较

分别用 vAc-orf9-gfp 与 AcMNPV-gfp 以 MOI10 感染接种于六孔板的 Sf21 细胞，在感染后 24h、48h、72h、96h、以及 120h 取感染上清，测定各次取样上清的滴度，绘制病毒生长曲线进行比较[17]。

1.8 重组病毒病毒粒子形态发生

分别用 vAc-orf9-gfp 与 AcMNPV-gfp 以 MOI10 感染接种于小皿的 Sf21 细胞，在感染后 24h、36h、48h 取感染的细胞，固定切片，以电子显微镜观察细胞超薄切片[17]。

2 结果

2.1 EGFP-P78/83 超表达重组病毒的构建

以 AcMNPV 基因文库含 *Bgl*II C 片段质粒为模板，PCR 扩增 AcMNPV P78/83 克隆到 pGEM-T 载体获得克隆 pT-P78/83，通过酶切和测序确定获得的基因序列完全正确。用 *Eco*RI 和 *Kpn*I 双酶切 pT-P78/83 回收 1.6kb 的片段，连接到以相同酶切开的 pEGFP-N1 质粒得到 pEGFP-P78/83，pEGFP-P78/83 含有 p78/83 融合到 EGFP C 端的 EGFP-P78/83 的融合基因（图 1）。以 *Eco*RI 与 *Not*I 酶切 pEGFP-P78/83 及 pFastbacI，回收大小分别约为 2.3kb 融合基因与 4.7kb 载体并连接，获得供体质粒 pFast-EP78/83（图 2）。融合基因位于多角体基因启动子下，采用 EGFP 基因终止密码子与 pFastbacI 质粒上的 PolyA 终止信号终止融合基因表达。

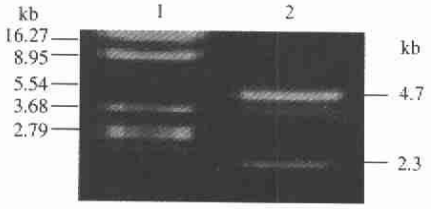

图 1 pEGFP-P78/83 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pEGFP-P78/83

1, λ DNA digested with *Bam*H I+*Hin*d III+*Eco*R I; 2, EGFP-P78/83 digested with *Kpn* I+*Eco*R I.

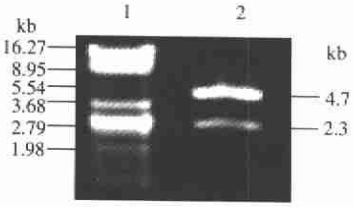

图2 pFast-EP78/83的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pFast-EP78/83

1, λ DNA digested with *Bam*H I+*Hin*dIII+*Eco*R I; 2, pFast-EP78/83 digested with *Eco*R I+*Not* I.

重组 pFast-EP78/83 质粒转座含 AcMNPV bacmid 的大肠杆菌，蓝白筛选得到重组 AcMNPV bacmid：vAc-orf9-gfp。

2.2 重组 AcMNPV bacmid 的鉴定

提取重组 AcMNPV bacmid 基因组，利用 M13F 与庆大霉素抗性基因下游引物 Pgm 进行 PCR 鉴定，获得大小约 1kb 的产物，与预计的结果吻合。根据序列分析结果，我们选择了 *Hin*dIII 分析比较重组 vAc-orf9-gfp 和 AcMNPV Bacmid 基因组。结果显示，所构建的 vAc-orf9-gfp 与野生型 AcMNPV Bacmid 相比，多出 8.7kb, 1.5kb 左右和 1kb 左右的条带，而 AcMNPV Bacmid 中原有的 8kb 带消失，表明片段插入位置正确（图 3）。

2.3 重组 bacmid 转染 Sf21 细胞

提取的重组 bacmid DNA 转染对数生长期的 Sf21 细胞。转染后第 7 天用荧光显微镜观察，细胞出现绿色荧光。取转染上清感染 Sf21 细胞以大量增殖病毒，且进行滴度测定以获得病毒的滴度。

维普资讯 http://www.cqvip.com

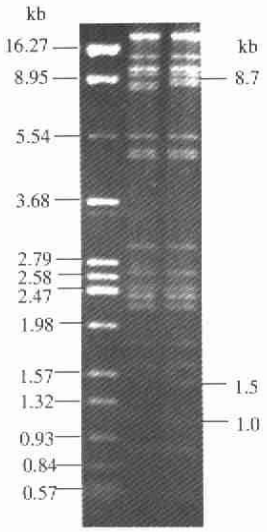

图 3 vAc-orf9-gfp 基因组 *Hin*dIII 酶切

Fig. 3 Genome digestion of bacmid with *Hin*d III

1, λ DNA digested with *Bam*H I+*Hin*d III+*Eco*RI; 2, wt. AcMNPV bacmid; 3, vAc-orf9-gfp.

2.4 AcMNPV P78/83 在 Sf21 细胞内的定位

重组病毒 vAc-orf9-gfp 和仅表达绿色荧光蛋白的重组病毒 AcMNPV-gfp 以 10 MOI 感染接种于盖玻片上的 Sf21 细胞，在感染后 12h、16h、24h、48h 及 72h 观察细胞内绿色荧光的分布情况。结果显示，vAc-orf9-gfp 在感染后 12h 绿色荧光主要分布在细胞质中，有聚集成团的现象；感染后 16h，绿色荧光向细胞核转移，但只有少量细胞中绿色荧光主要分布在细胞核中，大部分仍然主要分布在细胞质中（图 4B）；到感染后 24h 绝大部分细胞的细胞核中表现较强的绿色荧光而细胞质中无明显的荧光（图 4C）；随着感染时间延长到 48h 及 72h，绿色荧光也基本分布于细胞核中（图 4D），即在感染的晚期，P78/83 定位于细胞核中。而 AcMNPV-gfp 感染的细胞，虽然感染后 12h 绿色荧光分布基本与 vAc-orf9-gfp 相同，但在感染后 16h、24h、48h 及 72h 观察，绿色荧光一直都基本均匀地分布在整个细胞中（图 4A），不同于相同感染时间 vAc-orf9-gfp 感染细胞中绿色荧光的分布。

2.5 vAc-orf9-gfp 与 AcMNPV-gfp 病毒生长特性的比较

测定感染 Sf21 细胞不同时间上清中病毒滴度可见，重组病毒与野生型病毒的感染性不存在明显差异。如感染后 24h，vAc-orf9-gfp 感染上清滴度约为 1.3×10^6，AcMNPV-gfp 感染上清滴度为 1.1×10^6；感染后 48h，重组病毒感染上清滴度为 3.3×10^7，对照为 2.9×10^7。感染 72h，96h，120h 后两者上清中病毒滴度也基本相同。由此可见，P78/83 在 Sf21 细胞中的超表达，并没有引起病毒对细胞感染能力的增强或减弱。

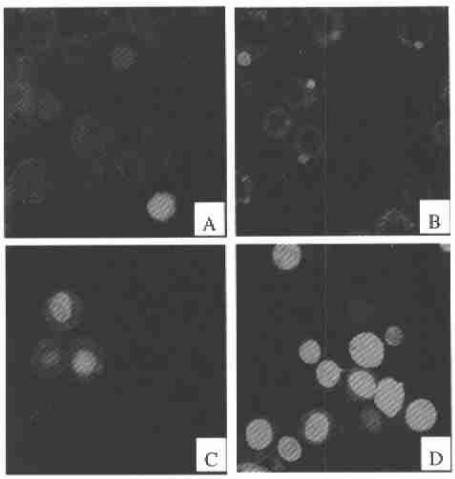

图 4 P78/83 在 Sf21 细胞中的定位

Fig. 4 Sub-celluar location of P78/83

A, AcMNPV-gfp 16 hpi; B,vAc-orf9-gfp 16 hpi; C, vAc-orf9-gfp 24 hpi; D, vAc-orf9-gfp 48 hpi.

2.6 vAc-orf9-gfp 与 AcMNPV-gfp 的病毒粒子形态发生的比较

感染不同时间 Sf21 细胞超薄切片电镜观察结果显示，重组病毒与 AcMNPV-gfp 在病毒粒子的形态发生上没有明显区别，即 P78/83 的超表达并不影响病毒粒子的形态发生。以感染 24h 后 Sf21 细胞为例，重组病毒 vAc-orf9-gfp 感染的细胞，在细胞核中可见大量多粒包埋的病毒粒子，也有部分正在成熟的病毒粒子，有的细胞中可见电子致密的病毒发生基质；以 AcMNPV-gfp 感染同样时间的 Sf21 对照细胞切片，观察到的情况基本与重组病毒相同，核中也有大量多粒包埋的病毒粒子，部分病毒粒子正在包装成熟，还可见高电子密度的病毒发生基质。（图 5）

3 讨论

杆状病毒的感染与复制、包装等过程与宿主细胞肌动蛋白密切相关。杆状病毒进入宿主细胞后，细胞肌动蛋白依次发生三次重大重排。出芽病毒 BV 通过内吞作用进入细胞，病毒囊膜融合蛋白与内吞体膜融合，病毒核衣壳从内吞体中释放并穿过细胞质进入细胞核。此时，细胞质中出现肌动蛋白缆索结构，它常常与核衣壳联系在一起，介导了核衣壳从细胞质到细胞核的运输[18]。随后肌动蛋白在早期基因 arif-1 的作用下发生第二次构象变化[19]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

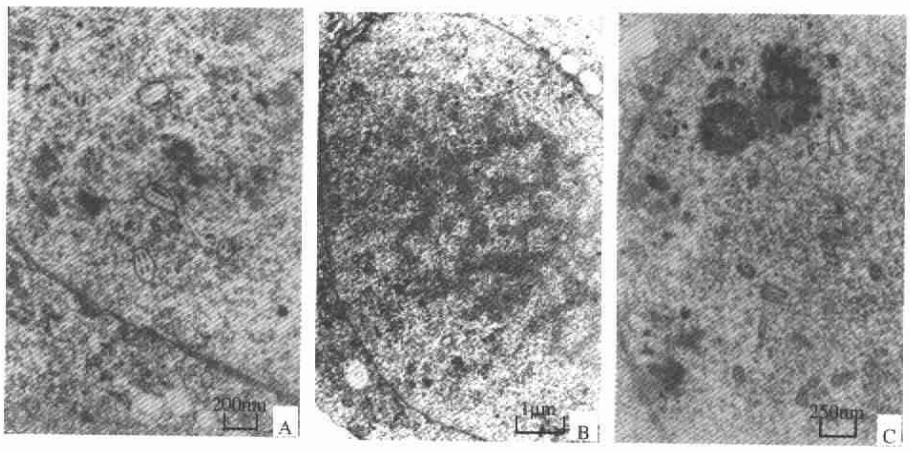

图5 病毒感染的Sf21细胞超薄切片电镜观察

Fig. 5 Electron picture of infected Sf21 cell

A, vAc-orf9-gfp 24 hpi; B, vAc-orf9-gfp 24 hpi; C, AcMNPV-gpf 24 hpi.

F-actin在细胞膜附近聚集，这种变化的具体功能人们并不了解。在感染的后期细胞骨架肌动蛋白发生第三次重大变化，F-actin从细胞质转移到细胞核成为病毒发生基质的一部分，从而参与病毒的复制与装配。

序列分析表明P78/83与WASP家族蛋白结构域组织的高度相似性：具有与WASP-Arp2/3调控肌动蛋白聚合途径的必需结构区VCA区，即结合肌动蛋白单体的WH2区、参与蛋白N端调控分子相互作用的cofilin同源区，和结合Arp2/3复合体的酸性结构域。我们推测P78/83与细胞肌动蛋白之间相互作用，可能在病毒表面组装成纤维状结构，推动病毒在细胞内部或细胞间的移动运输。

为了研究P78/83的结构与功能，我们构建了超表达P78/83与EGFP的融合蛋白的重组病毒，研究了该蛋白在细胞中的定位及对病毒生长的影响。通过观察绿色荧光在细胞内分布，发现在感染后12h和16h P78/83主要分布于细胞质中，随后向细胞核转移，到感染后24h以后则定位于细胞核中。这与已报道的AcMNPV复制过程相吻合，在感染后期，P78/83作为病毒粒子的组分进入细胞核并包装入子代病毒粒子，并随着时间的推移细胞核内的绿色荧光强度明显增强。我们以10 MOI的vAc-orf9-gfp感染Sf21细胞以追踪病毒颗粒的运输过程，但在感染的早期，在激光共聚焦显微镜下未能观察到GFP荧光，可能是单个的病毒粒子所含的P78-EGFP量太低， 已有报道表明P78为杆状病毒的微量结构蛋白[20]。另外所用的启动子为多角体蛋白的晚期启动子，在感染的早期不表达。

野生型病毒与重组病毒vAc-orf9-gfp生长曲线的比较结果表明，两者之间并无明显可见差异，即P78/83的超量表达并没有改变病毒的生长特性。可能的原因是所构建的重组病毒仍然保留了其自身的P78/83基因，而且所用的启动子为多角体蛋白晚期启动子，在感染的早期不表达，融合蛋白没有参与到感染的早期病毒粒子从细胞质向细胞核中的运输过程。

另外可能是该蛋白超量表达并不能改变病毒的感染能力。我们将进一步研究P78/83与actin的相互关系以揭示病毒与宿主细胞肌动蛋白骨架相互作用的分子机制，阐明细胞内相关的信号传导过程。本文的工作为深入的研究奠定了良好的基础。

参考文献

[1] Miller L K. The Baculoviruses [M]. New York: Plenum, 1997.

[2] Ploubidou A, Way M. Viral transport and the cytoskeleton [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(1): 97-105.

[3] Burke E, Dupuy L, Wall C, *et al.* Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus [J]. Virology, 1998, 252: 137-148.

[4] Gupta S, Bishnu P De, Drazba J A, *et al.* Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza Virus type 3[J]. J. Virol, 1998, 72(4): 2655-2662.

[5] Volkman L E, Goldsmith P A, Hess R T. Evidence for microfilament in budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus production [J]. Virology, 1987, 156:32-39.

[6] Volkman L E. *Autographa californica* MNPV nucleocapsid assembly: inhabition by cytochalasin D [J]. Virology, 1988, 163: 547-553.

[7] Volkman L E, Storm K, Aivazachvili V, *et al.* Overexpression of actin in AcMNPV infected cells interferes with polyhedrin synthesis and

维普资讯 http://www.cqvip.c

polyhedra formation [J]. Virology, 1996, 225: 369-376.

[8] Taro Ohkawa, Annette R R, Volkman L E. Identification of Six Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Early Genes That Mediate Nuclear Localization of G-actin [J]. J Virol, 2002, 76: 12281-12289.

[9] Machesky L M, Insall R H, Volkman L E. WASP homology sequences in baculoviruses. Trends Cell Biol [J]. Trends Cell Biology, 2001, 11(7): 286-287.

[10] Vialard J E, Richardson C D. The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein [J]. J Virol, 1993, 67(10): 5859-5866.

[11] Fu Y, Galan J E. The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton [J]. Mol Microbiol, 1998, 27(2): 359-368.

[12] Fu Y, Galan J E. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion [J]. Nature, 1999, 401: 293-297.

[13] Cameron L A, Footer M J, Oudenaarden V A, *et al*. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 4908-4913.

[14] Frischknecht F, Way M. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11: 30-38.

[15] Moreau V, Frischnecht F, Reckmann I, *et al*. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 441-448.

[16] O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manul [M]. New York City: W. H. Freeman and company, 1992. 132-135.

[17] King L A, Possee R D. The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide [M]. London: Chapman & Hall, 1992.

[18] Charlton C A, Volkman L E. Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected Spodopotera frugiperda cells [J]. J Virol, 1991, 65(3): 1219-1227.

[19] Dreschers S, Roncarati R, Knebel-Morsdorf D. Actin rearrangement-inducing factor of baculoviruses is tryrosine phorsphorylated and colocalizes to F-actin at the plasma membrane [J]. J Virol, 2001, 75 (8): 3771-3778.

[20] Lanier L M, Volkman L E. Actin binding and nucleation by Autographa californica M Nucleopolyhedrovirus [J]. Virology, 1998, 243(1): 167-77.