



烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株编码的 3H-117 蛋白能干扰 AcMNPV 的口服活性

李诗薇, 欧阳依依, 杨长锦, 童悦, 甘佳敏, 黄国华, 于欢*

湖南农业大学植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128

李诗薇, 欧阳依依, 杨长锦, 童悦, 甘佳敏, 黄国华, 于欢. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株编码的 3H-117 蛋白能干扰 AcMNPV 的口服活性. 微生物学报, 2022, 62(1): 131–144.

Li Shiwei, Ouyang Yiyi, Yang Changjin, Tong Yue, Gan Jiamin, Huang Guohua, Yu Huan. 3H-117 encoded by *Heliothis virescens ascovirus* 3h interferes the oral activity of AcMNPV. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 131–144.

摘要: 【目的】囊泡病毒是一类体液传播的昆虫病毒, 具有特殊的致病历程和良好的生防应用潜力。烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株(*Heliothis virescens ascovirus* 3h, HvAV-3h)是我国分离的第一株囊泡病毒, 其编码的 3H-117 蛋白被报道为 HvAV-3h 病毒粒子的结构蛋白。【方法】为了进一步探究 3h-117 基因的功能, 本研究以 Bac-to-Bac 昆虫表达系统为研究平台, 将 3h-117 插入到苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)的基因组中, 成功构建了具有口服活性的重组病毒 AcMNPV-117。【结果】通过与野生型病毒(AcMNPV-Egfp)的比较, 证实在感染 Sf9 细胞 72–96 h 后, AcMNPV-117 的出芽型病毒粒子产量以及病毒 DNA 的拷贝数显著降低, 且 AcMNPV-117 的多角体明显增大。进一步的生测结果表明, AcMNPV-117 对三龄甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的 90%致死浓度明显高于 AcMNPV-Egfp。此外, 被病毒感染的甜菜夜蛾幼虫生长相对健康幼虫明显减缓, 且试虫的日均取食量也因病毒的感染而被抑制。共聚焦结果表明, 3H-117 与 AcMNPV-117 感染后宿主细胞核骨架的聚集过程相关, 提示 3H-117 在囊泡病毒感染过程中可能具有瓦解宿主细胞核的功能。【结论】本研究的结果进一步验证了 3h-117 的功能, 为囊泡病毒的分子生物学研究奠定了基础。

关键词: 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株; 重组杆状病毒; 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒; Bac-to-Bac 昆虫表达系统; 生物活性测定

基金项目: 湖南省自然科学基金(2019JJ50234); 湖南省大学生创新训练项目(S201910537056)

Supported by the Hunan Natural Science Foundation (2019JJ50234) and by the Innovative Training Program for College Students in Hunan Province (S201910537056)

*Corresponding author. E-mail: huanyu@hunau.edu.cn

Received: 12 March 2021; Revised: 27 April 2021; Published online: 10 May 2021

3H-117 encoded by *Heliothis virescens ascovirus* 3h interferes the oral activity of AcMNPV

LI Shiwei, OUYANG Yiyi, YANG Changjin, TONG Yue, GAN Jiamin, HUANG Guohua, YU Huan*

Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Objective] Ascoviruses are humor transmitted insect viruses that have unique pathogenicity and are competent to develop into bioinsecticides. *Heliothis virescens ascovirus* 3h (HvAV-3h) is the first ascovirus strain that isolated in China, and the 3H-117 protein encoded by *HvAV-3h* are reported as a structural protein of HvAV-3h. [Methods] In order to further illustrate the function of *3h-117*, the Bac-to-Bac insect expression system was employed to construct a recombinant *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) by inserting *3h-117* into the genome of AcMNPV. [Results] Compared with the wild type control AcMNPV (AcMNPV-Egfp), the generated recombinant baculovirus (AcMNPV-117) had a significantly reduced budded virus production and viral DNA copies in the infected Sf9 cells during 72–96 hpi, and an enlarged occlusion bodies was found in AcMNPV-117. Further bioassays showed that the 90% lethal dosage of AcMNPV-117 against the third instar *Spodoptera exigua* are significantly higher than the 90% lethal dosage of AcMNPV-Egfp. Furthermore, the growth of the tested *S. exigua* larvae infected with AcMNPVs was slower than that of the healthy larval growth, and the average daily food intake of the tested larvae was also inhibited by the baculovirus infection. The confocal observation showed that 3H-117 is associated with the nuclear actin polymerization in AcMNPV-117 infected Sf9 cells, which indicated that the function of 3H-117 in the infectious procedures of ascovirus is associated to the disintegration of host cell nucleus. [Conclusion] The results obtained in this study confirmed the function of *3h-117*, which laid a foundation for the molecular biology research of ascovirus.

Keywords: *Heliothis virescens ascovirus* 3h (HvAV-3h); recombinant baculovirus; *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV); Bac-to-Bac insect expression system; biological assays

杆状病毒是一类 DNA 昆虫病毒, 基于其对害虫的专一性以及环境的友好性, 部分杆状病毒已被开发成为生物杀虫剂, 并成功用于控制农业和林业中的多种害虫^[1–3]。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)作为杆状病毒的模式物种, 对其的研究和应用非常广泛。该病毒能感染 30 多种鳞翅目昆虫的幼虫, 同时该病毒还被广泛用作外源基因表达的载体^[4–8]。但杆

状病毒作为生物杀虫剂在应用时都面临着杀虫周期较长(一般需要 7–15 d)以及生产成本高(相对化学农药而言)的问题^[9–14]。囊泡病毒作为昆虫病毒大家族中的“新成员”, 是一类相较杆状病毒具有更宽宿主范围且具有显著抑制宿主幼虫生长和取食能力的双链 DNA 病毒^[15–20]。由于囊泡病毒在野外主要依靠寄生蜂的产卵行为在不同宿主个体间进行传播, 口服感染活性极低, 这成为囊泡病毒在生物防治开发和应用上

的大难题^[21-23]。

烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 (*Heliothis virescens ascovirus* 3h, HvAV-3h) 是在中国长沙分离得到的 1 株囊泡病毒^[19]。相较 AcMNPV, HvAV-3h 具有更强的抑制宿主幼虫生长和取食能力, 且囊泡病毒对非靶标生物和环境同样安全^[24]。在野外和室内, HvAV-3h 能够通过斯氏侧沟茧蜂 (*Microplitis similis*) 携带, 并在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 个体之间进行传播^[23,25]。但囊泡病毒的这种寄生蜂携带的依赖性以及自然状况下极低的口服活性都将限制其作为生物杀虫剂的应用研发。近期的研究指出, 通过与苏云金芽孢杆菌的复配, 能够有效提高囊泡病毒在粘虫 (*Mythimna separata*) 和斜纹夜蛾幼虫中的口服活性^[26], 这些研究结果, 让我们相信囊泡病毒的应用瓶颈是可以被突破的, 同时也敦促着我们继续深入地进行囊泡病毒的基础研究。

HvAV-3h 的基因组序列于 2017 年被报道^[27], 其基因组大小为 190 519 bp, 共能编码 185 个开放阅读框 (open reading frame, *orf*)。3h-117 在 2019 年被报道为一个早期转录基因, 其编码的蛋白 (3H-117) 是 HvAV-3h 病毒粒子的结构蛋白, 但 3h-117 转录后并未马上被检测到翻译成蛋白^[28]; 3h-21 也是 HvAV-3h 病毒粒子结构蛋白的编码基因, 其转录始于 HvAV-3h 感染后的 24 h, 表达始于感染后 48 h^[29]。囊泡病毒功能基因的研究相对落后, 除了病毒粒子的结构蛋白编码基因外, 仅有数个囊泡病毒抗凋亡相关基因的功能在前期的研究中被报道^[30-32]。

囊泡病毒功能基因研究的相对匮乏是囊泡病毒致病历程尚未明晰的重要原因之一。为了进一步研究 3h-117 的功能, 本实验利用 Bac-to-Bac 昆虫表达系统将 3h-117 基因与杆状

病毒的多角体基因 (*polyhedrin*, *ph*) 一起插入至苜蓿银纹夜蛾多角体病毒 (AcMNPV) 中, 对重组病毒和野生型病毒的毒力进行了比较, 同时对 3H-117 进行了亚细胞定位分析。本研究的结果对 3h-117 的功能进一步的明确具有重要意义, 同时也为囊泡病毒的功能基因研究奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甜菜夜蛾虫卵购自河南科云生物有限公司, 并于本实验室饲养得到实验种群。Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞系 (由西北农林科技大学王敦教授课题组惠赠) 培养于含有 10% 胎牛血清 (GIBCO) 的 SFX II 昆虫细胞培养基 (Hyclone) 中, 于 27 °C 恒温培养。烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 (*Heliothis virescens ascovirus* 3h, HvAV-3h) 毒株发现并分离自湖南长沙, 由本实验室扩繁后保存于 -20 °C^[19,25]。大肠杆菌菌株 DH10Bac (*Escherichia coli* DH10Bac, 含有 bMON14272 及 pMON7124) 用于重组 AcMNPV 的构建; 大肠杆菌菌株 TG1 (*E. coli* TG1) 用于基因的克隆。

1.2 供体载体的构建

为了获得具有口服活性的 AcMNPV, 我们先将 3h-117 基因片段从 3h-117-T 载体^[28]上以 *Bam*H I 和 *Xho* I 消化切下, 并将其亚克隆至构建好的 pFB-ph-Pp10-egfp 载体^[33]中 *Bam*H I/*Xho* I 酶切位点处, 获得一个具有两个反向启动子的可以分别启动多角体基因 (*polyhedrin*) 以及外源基因的双向供体载体 pFB-ph-Pp10-117-egfp。

1.3 重组 bacmid 的构建

根据 Bac-to-Bac expression system (Thermo Fisher, Invitrogen) 的说明, 分别将构建好的 pFB-ph-Pp10-egfp 供体质粒以及

pFB-ph-Pp10-117-egfp 供体质粒转化入 DH10Bac 细胞中,并于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、7 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素、10 $\mu\text{g/mL}$ 四环素、100 $\mu\text{g/mL}$ X-gal、40 $\mu\text{g/mL}$ IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选。分别挑选 10 个白色菌落,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 24 h 后,参照 Yu 等所述的方法提取重组 bacmid 的 DNA^[33]。以 pUC/M13-F (5'-CCCAGTC ACGACGTTGTAAAACG-3') 和 pUC/M13-R (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') 为引物,对获取的转座子 bacmid 进行 PCR 鉴定,筛选 ph-Pp10-egfp 转座的重组病毒 AcMNPV-Egfp (在后续实验中用作野生型对照病毒)以及 ph-Pp10-117-egfp 转座的重组病毒 AcMNPV-117。

1.4 细胞转染与蛋白表达检测

分别取 2 μg AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 bacmid DNA 于 200 μL Grace's 昆虫细胞培养基中,随后加入 6 μL 转染试剂(X-treme GENE HP DNA transfection reagent, Roche),轻柔混匀后,于室温孵育 30 min。将孵育后的病毒 DNA/转染试剂复合物逐滴加入贴壁培养于 35 mm 培养皿的单层 Sf9 细胞中,并于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3–7 d,每天检测细胞绿色荧光的强度以及胞内病毒多角体的形成情况。

分别收集 AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 转染后 4 d 的细胞,以高效 RIPA 裂解液(北京索莱宝)以 1×10^6 细胞/200 μL 裂解液的用量,按照试剂盒的操作说明冰上裂解细胞,制备蛋白样品。向制备好的蛋白样品以 1/6 体积的比例加入 5 $\times$ Protein Loading Buffer (北京索莱宝),沸水浴 15 min 后,将制备好的蛋白样品上样于 12%的 SDS-PAGE 胶上,以 80 V 至 120 V 的电泳分离蛋白样品中的各蛋白条带;电泳结束后,根据预染 marker (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Thermo Scinetific, USA)的指示,

割取目的蛋白大小附近的胶块,转印于醋酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, Millipore, USA)上;经过封闭液(5%脱脂奶粉溶于 TBST buffer)室温孵育 1.5 h,分别以商业化的 His-Tag Monoclonal Antibody (Proteintech, Cat#66005-1-Ig, CHN, 1:5 000)和甜菜夜蛾甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的多克隆抗体(1:4 000)^[33]进行一抗孵育(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜);以 TBST 漂洗杂交膜 3 次,每次 5 min,随后分别以 Goat anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugated (Millipore, Cat#DC02L, 1:5 000)和 Goat anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugated (Millipore, Cat#AP132P, 1:5 000)作为 His-tag 鼠单抗和 GAPDH 兔多抗的二抗,进行二抗杂交(室温孵育 2 h);以 TBST 漂洗杂交膜 3 次,每次 5 min,利用 Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent (Millipore, Cat#WBKLS0500)对杂交膜进行显色反应,并在 ChemiDocTM XRS 和成像仪(BIO-RAD, USA)下拍摄免疫印迹反应条带的图像。

1.5 病毒生长曲线及病毒 DNA 复制曲线检测

分别取 2 μg AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 bacmid DNA 于 200 μL Grace's 昆虫细胞培养基中,随后加入 6 μL 转染试剂(X-treme GENE HP DNA transfection reagent, Roche),轻柔混匀后,于室温孵育 30 min;将孵育后的病毒 DNA/转染试剂复合物逐滴加入贴壁培养于 35 mm 培养皿的单层 Sf9 细胞中,并于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后更换培养基,并记为 0 h;于转染后 0、3、6、12、24、48、72、96 h 分别收集细胞和上清。每个孔为 1 个重复,每个处理的每个时间点均进行 3 个重复。收集的细胞,利用试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 [宝日医生物技术(北京)有限公司]提

取总 DNA, 并根据 Yu 等所述的方法^[33]对病毒基因组 DNA 的含量进行定量 PCR 分析。收集的细胞上清根据 Yu 等所述的方法^[33]进行病毒滴度分析, 并绘制 AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 的生长曲线。同一时间点上 2 种病毒间的 BV 含量以及 DNA 含量通过 Student's *t* test 比较差异(SPSS, v22.0, IBM 公司), 并以 Prism GraphPad 软件(v6.0, GraphPad Software 公司)绘制图表。

1.6 激光共聚焦观察

向 24 孔细胞培养板中放置细胞爬片(直径 14 mm, 北京索莱宝)并接种 1×10^5 个 Sf9 细胞至爬片上(500 μ L 每孔); 待细胞贴壁后, 将细胞培养基替换为含有 AcMNPV-117 BV 上清或含有 AcMNPV-Egfp BV 上清的培养基, 27 $^{\circ}$ C 培养 1 h; 更换新鲜细胞培养基, 并于 24、48 和 72 h 后分别取出细胞爬片; PBS 漂洗爬片 3 次后, 以 4%多聚甲醛室温固定爬片 20 min; PBS 漂洗爬片 3 次后, 以 0.5% Triton X-100 室温孵育爬片 15 min; PBS 漂洗爬片 3 次后, 根据试剂盒操作说明以 CoraLite[®]594 标记鬼笔环肽(Proteintech, Cat#PF00003)对细胞骨架进行染色; PBS 漂洗爬片 3 次后, 以 2 mg/mL DAPI (Roche, USA)的水溶液细胞核进行染色(室温避光孵育 5 min)。制备好的细胞爬片于激光共聚焦显微镜下(Olympus, FV3000)分别对激发波长为 594、488、600 nm 荧光图像进行观察和采集。

1.7 病毒多角体的扩繁与形态观察

为了大量扩繁 AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 病毒多角体, 病毒 DNA 转染 4 d 后的细胞培养上清液被收集, 并注射到 4 龄甜菜夜蛾幼虫体腔内(5 μ L/头)。注射后的幼虫放置在干净的养虫盒内, 单头培养, 直至幼虫发病死亡。收集虫尸于 5–10 mL 离心管中, 根据 Yu 等所

述的方法进行病毒粒子的分离与纯化^[34]。将获得的纯净重组病毒多角体涂布于盖玻片上, 自然风干后, 喷金处理, 并于扫描电镜(JSM-6380LV)下观察并拍摄病毒粒子的形态。随机选取 50 个以上 AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 病毒多角体, 利用 Image J 测量多角体的直径(单个多角体直径最大值和最小值的平均值记为该多角体的直径)。以 SPSS 软件(v22.0, IBM 公司)对 AcMNPV-Egfp 和 AcMNPV-117 的多角体直径进行 Student's *t* test, 以 Prism GraphPad 软件(v6.0, GraphPad Software 公司)绘制图表。

1.8 病毒毒力的测定

将 AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 的多角体配制成 5、10、50、100、500、1 000 和 5 000 OBs/ μ L (多角体病毒包涵体, occlusion bodies, OBs)的悬浮液, 各浓度取 1 μ L 添加于饲料小块表面, 并投喂饥饿处理 24 h 的 3 龄甜菜夜蛾幼虫。2 h 内取食完带毒饲料块的幼虫被取出, 并转移至含有新鲜饲料的养虫盒内, 单头饲养。30 头幼虫为 1 个重复, 每个处理 4 个重复。每天记录试虫的发病及死亡情况, 直至幼虫全部死亡或化蛹。饥饿处理后直接喂食新鲜饲料的健康幼虫为对照(check, CK)。

分别以 AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 的 LD_{20} 、 LD_{50} 、 LD_{90} 3 种计量饲喂饥饿处理后的 3 龄甜菜夜蛾幼虫(1 μ L/头), 将 2 h 内取食完带毒试虫转移至含有新鲜饲料的养虫盒内, 单头饲养。每日称取试虫的重量及投喂的新鲜饲料重量和剩余饲料的重量, 直至试虫全部死亡或化蛹。饥饿处理后直接喂食新鲜饲料的健康幼虫为对照(CK)。每个处理 30 头试虫, 分别计算试虫的日均虫重和日均取食量。

1.9 数据分析

以 SPSS 软件(v22.0, IBM 公司)中的 probit

方法计算 AcMNPV-117 以及 AcMNPV-Egfp 的 LD_{20} 、 LD_{50} 、 LD_{90} 值;以 SPSS 软件对健康甜菜夜蛾幼虫以及 AcMNPV-117 或 AcMNPV-Egfp 感染的幼虫日均虫重以及日均取食量进行统计,并进行方差分析和多重比较;以 Prism GraphPad 软件(v6.0, GraphPad Software 公司)绘制图表。

2 结果与分析

2.1 重组 bacmid 的构建

通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 对构建好的 ph-Pp10-117-egfp-HTb 载体进行酶切鉴定,获得了大小分别为 6 842 bp 以及 567 bp 的 2 个条带,表明 *3h-117* 已被成功连接至 ph-Pp10-117-egfp-HTb 载体,供体载体被成功构建(图 1A)。利用 pUC/M13-F 和 pUC/M13-R 引物对挑选获

得的转座子进行 PCR 鉴定,分别从 AcMNPV-117 阳性克隆的 bacmid DNA 中检测到了 4 678 bp 的单一一条带(图 1B),从 AcMNPV-Egfp 阳性克隆的 bacmid DNA 中检测到了 4 111 bp 的单一一条带(图 1C),表明两例重组 bacmid——AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 均构建成功。

2.2 重组 bacmid 转染 Sf9 细胞后病毒的生长曲线与病毒 DNA 复制曲线检测

将构建好的 AcMNPV-Egfp 以及 AcMNPV-117 重组 bacmid 分别转染贴壁生长的 Sf9 细胞系,在转染后 96 h (hpt, hours post transfection),被 AcMNPV-Egfp 以及 AcMNPV-117 转染的细胞明显检测到绿色荧光(图 2A)。收集细胞上清(含有出芽型病毒粒子),再将其添加至贴壁培养的 Sf9 细胞中,在感染

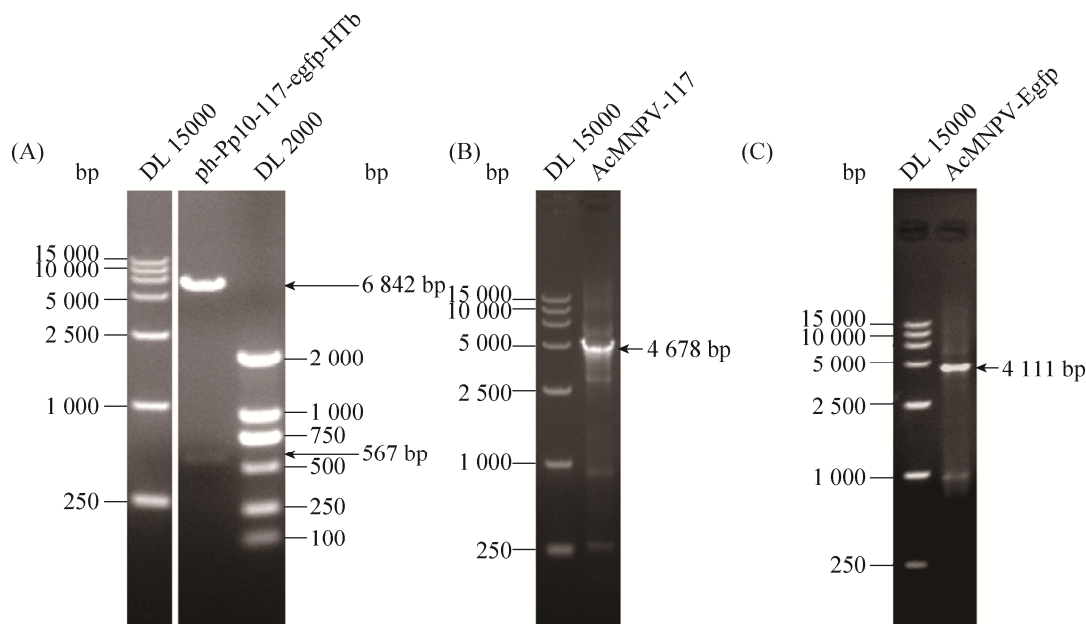


图 1 AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 重组 bacmid 的构建及鉴定

Figure 1 Construction and identification of the recombinant bacmid AcMNPV-117 and AcMNPV-Egfp. A: identification of ph-Pp10-117-egfp-HTb by digestion of *Bam*H I and *Xho* I; B: identification of AcMNPV-117 by PCR amplification; C: identification of AcMNPV-Egfp by PCR amplification.

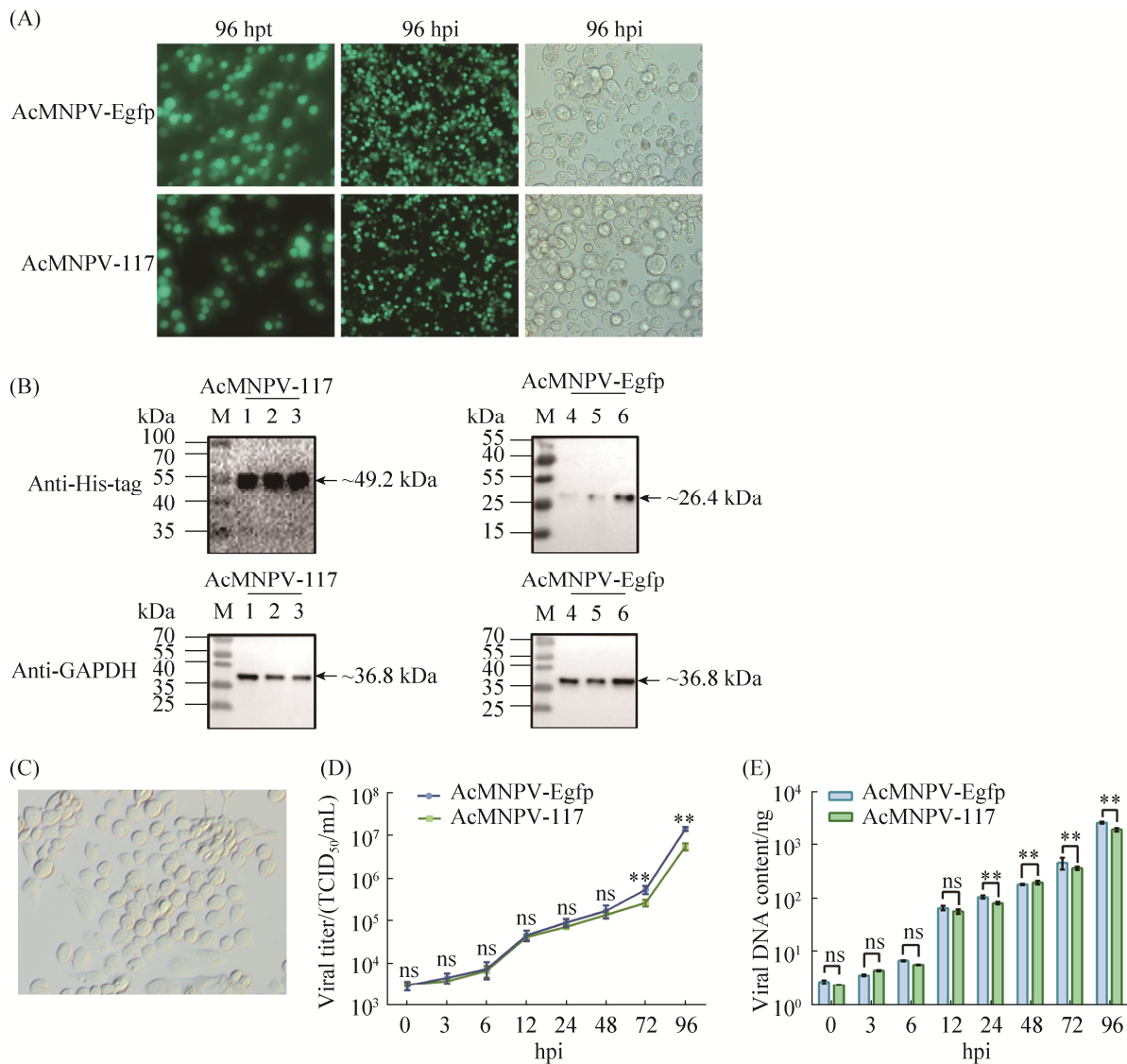


图2 AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 重组 bacmid 转染(感染) Sf9 细胞后的检测

Figure 2 Observation and protein expression detection of Sf9 cells (infected) with AcMNPV-117 or AcMNPV-Egfp. A: green fluorescence detection and viral occlusion bodies formation observation of Sf9 cells (infected) with AcMNPV-117 or AcMNPV-Egfp; B: Western blotting analysis of Sf9 cells with AcMNPV-117 or AcMNPV-Egfp (96). The His-tag mouse monoclonal antibody was used to detect the expression of EGFP fused 3H-117 in AcMNPV-117 Sf9 cells and the expression of EGFP in AcMNPV-Egfp Sf9 cells, respectively; the GAPDH rabbit antibody was used to detected the expression of reference protein GAPDH in AcMNPV-117 or AcMNPV-Egfp Sf9 cells. Lane M: prestained protein ladder; lane 1–3: protein samples prepared from the Sf9 cells with AcMNPV-117 at 96 (three repeats); lane 4–6: protein samples prepared from the Sf9 cells with AcMNPV-Egfp at 96 (three repeats). C: the healthy Sf9 cells observed by light microscopy; D: the viral growth curves of AcMNPV-117 and AcMNPV-Egfp in Sf9 cells; E: the viral DNA replication curves of AcMNPV-117 and AcMNPV-Egfp in Sf9 cells. Error bars represent the standard errors in the treatment; ns means no significant difference was found between two AcMNPVs (based on Students *t* test); asterisk means significant differences was found between two AcMNPVs (based on Students *t* test).

后 96 h (hpi, hours post infection)大量的细胞被检测到表达了绿色荧光蛋白。被病毒感染的细胞相较健康 Sf9 细胞(图 2C)明显变圆、上浮,且可观察到细胞内有大量的 OBs。这些结果表明, AcMNPV-Egfp 以及 AcMNPV-117 重组 bacmid 已成功转染到 Sf9 细胞,且二者均具备感染细胞的能力,并能正常合成和包装多角体。进一步对 AcMNPV-Egfp 或 AcMNPV-117 感染后的 Sf9 细胞蛋白样品进行 Western blotting 检测,结果如图 2B 所示。通过与 GAPDH 兔多抗的孵育,一条明显的约 36.8 kDa 的免疫印迹条带在 AcMNPV-Egfp 或 AcMNPV-117 感染后 Sf9 细胞的各种样品中被检出,说明细胞蛋白样品制备良好,可用于其他抗体的杂交检测;一条约 26.4 kDa 的免疫印迹条带和一条约 49.2 kDa 的免疫印迹条带分别在 3 个 AcMNPV-Egfp 感染的 Sf9 细胞蛋白样品中(泳道 4–6)和 3 个 AcMNPV-117 感染的 Sf9 细胞蛋白样品中(泳道 1–3)分别被检测到,与预期的 EGFP 蛋白大小(约 25 kDa)和 EGFP 融合的 3H-117 蛋白大小(约 48 kDa)相一致。这些结果表明,EGFP 融合的 3H-117 蛋白在 AcMNPV-117 感染的 Sf9 细胞中成功表达。进一步的病毒生长曲线和病毒 DNA 复制曲线检测结果表明,AcMNPV-117 在 Sf9 细胞中的 BV 产量以及 DNA 病毒的拷贝数含量在转染后 0–48 h 与 AcMNPV-Egfp 在 Sf9 细胞中的 BV 产量以及 DNA 病毒的拷贝数含量无显著差异;在转染的后期(72–96 hpi),AcMNPV-117 在 Sf9 细胞中的 BV 产量以及 DNA 病毒的拷贝数含量均显著低于 AcMNPV-Egfp 在 Sf9 细胞中的 BV 产量以及 DNA 病毒的拷贝数含量(图 2D、E)。

2.3 3H-117 的亚细胞定位观察

在 AcMNPV-Egfp 或 AcMNPV-117 感染 Sf9 细胞后的 48–96 h,分别观察绿色荧光在 Sf9 细

胞中的亚细胞定位。结果如图 3 所示,在 AcMNPV-Egfp 感染的 Sf9 细胞中绿色荧光在细胞核、细胞质中均有分布,且在感染后 48–96 h 均能检测到明显的绿色荧光;在 AcMNPV-117 感染的 Sf9 细胞中,EGFP 融合的 3H-117 于感染后 72–96 h 开始才能被检测到,细胞核与细胞质中均有绿色荧光的存在。值得注意的一点是在感染后 96 h,EGFP 融合的 3H-117 几乎与红色的鬼笔环肽完全重合(在重叠的图片中绿色与红色共定位成黄色),与 AcMNPV-Egfp 感染的 Sf9 细胞中红色荧光和绿色荧光的共定位有明显的差异。这些结果提示,3H-117 在 AcMNPV 的晚期启动子(P10 启动子)下,在 AcMNPV-117 感染 Sf9 细胞后 72 h 左右开始表达,可能参与了宿主细胞核骨架聚集的过程。

2.4 重组病毒的获取与纯化

取上述获得的病毒上清,注射入 4 龄甜菜夜蛾幼虫的体腔内,并于注射后 5 d 观察宿主幼虫的变化。结果如图 3 所示,部分幼虫体色发生明显的变化,呈典型的荧光绿色(如箭头所指),同时 AcMNPV-117 注射的幼虫个体略大于 AcMNPV-Egfp 注射的幼虫个体,这预示着 AcMNPV-117 的毒力相较 AcMNPV-Egfp 可能有所减弱。通过扫描电镜对 AcMNPV-117 以及 AcMNPV-Egfp 的多角体进行检测观察,我们发现两种病毒的 OBs 都呈显著多角体状(图 4);进一步的测量表明,AcMNPV-117 多角体(共测量了 112 个多角体)的大小较 AcMNPV-Egfp 的多角体(共测量了 73 个多角体)明显增大($t=3.641$, $df=38.094$, $p=0.001$)。这一结果表明,3h-117 能干扰 AcMNPV 多角体病毒粒子的组装。

2.5 病毒毒力的测定

将不同浓度的病毒 OBs 饲喂 3 龄甜菜夜蛾幼虫,对 AcMNPV-117 以及 AcMNPV-Egfp 的毒力进行测定,结果表明 AcMNPV-117 的 LD_{50}

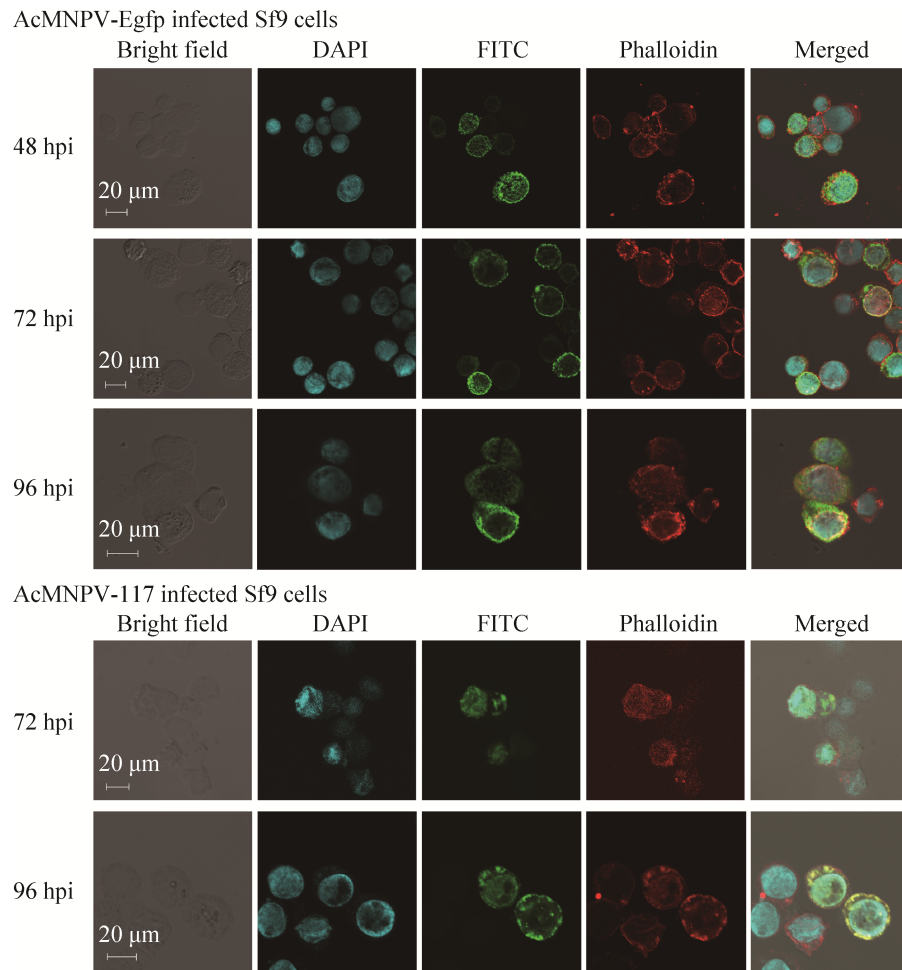


图3 3H-117 亚细胞定位的共聚焦观察

Figure 3 Confocal microscopic observation of subcellular location of 3H-117.

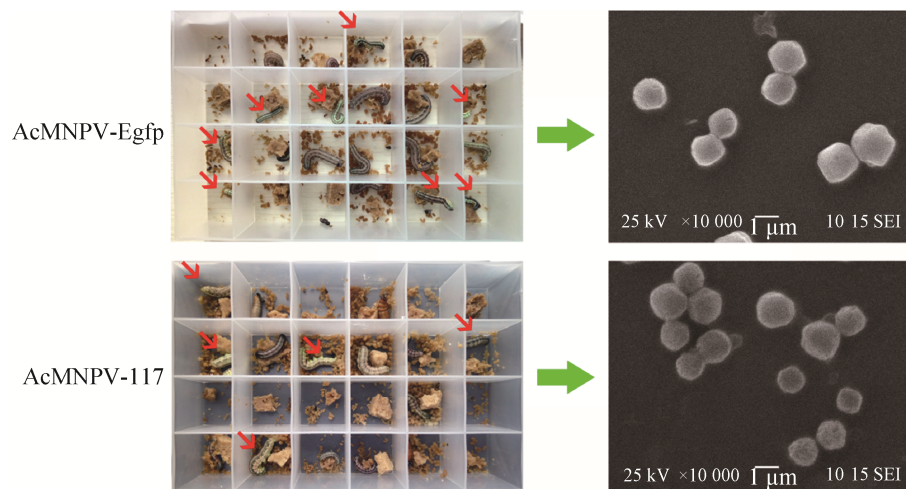


图4 AcMNPV-117 和 AcMNPV-Egfp 病毒粒子的扩繁及形态观察(SEM)

Figure 4 Propagation and morphological observation (SEM) of AcMNPV-117 and AcMNPV-Egfp. The BV supernatant injected larvae that obtained fluorescent green color were marked with red arrows.

值相较 AcMNPV-Egfp 的 LD_{50} 值有所升高, 但二者并无显著性差异; 但 AcMNPV-117 的 LD_{90} 值相较 AcMNPV-Egfp 的 LD_{90} 值明显升高(表 1)。此外, AcMNPV-117 的 LT_{50} 和 LT_{90} 值相较 AcMNPV-Egfp 的 LT_{50} 和 LT_{90} 值均有所升高, 但无显著性差异(表 2)。这些结果表明, 与野生型 AcMNPV 相比, 重组了 3h-117 的 AcMNPV 的杀虫功效有所降低, 这一结果与之前 BV 注射后的宿主幼虫呈现的结果相一致。

2.6 重组病毒对宿主幼虫取食和生长的影响

3 龄甜菜夜蛾幼虫感染不同浓度的 AcMNPV-Egfp 或 AcMNPV-117 后日均虫重变化如图 5 所示。两种病毒在感染后 2 d 内对宿主幼虫的体重影响较小。随着时间的推移, 病毒的剂量效果开始体现, 即随着病毒浓度的增加, 幼虫的体重减少越明显; 喂食低剂量病毒 (LD_{20}) AcMNPV-117 与 CK 组及野生型对照组相比从感染后第 3 天开始出现较大差异, AcMNPV-117 饲喂的幼虫体重增幅小且一直保持在较低水平。但以 AcMNPV-117 的 LD_{50} 、 LD_{90} 剂量喂食的甜菜夜蛾幼虫与 LD_{20} 剂量喂食的幼虫体重大小及其变化趋势相似(图 5A)。由此可见, 3h-117 重组的 AcMNPV 跟 AcMNPV-Egfp 毒株的作用效果相似, 均能抑制甜菜夜蛾幼虫的生长, 但 AcMNPV-117 高浓

度病毒条件下的作用效果与低浓度几乎无差, 而 AcMNPV-Egfp 高浓度条件下作用效果明显优于低浓度。进一步的幼虫取食量统计结果显示: 3 种不同浓度的 AcMNPV-117 感染幼虫后, 对比 CK 组均出现了取食量减少、取食量变化小的现象, 但相较 AcMNPV-Egfp, 这种对宿主幼虫取食的抑制效果在感染后第 5 天开始, 明显减弱。这些结果表明, AcMNPV-117 高剂量与低剂量的作用效果相似, 而 AcMNPV-Egfp 对宿主幼虫的抑制取食效果存在明显的剂量效应(图 5B)。

3 讨论

HvAV-3h 能够以斯氏侧沟茧蜂(*Microplitis similis*)为传播媒介, 在斜纹夜蛾(*S. litura*)、甜菜夜蛾(*S. exigua*)幼虫间广泛传播, 传播效率高达 80%以上^[26]; 人工接种条件下, HvAV-3h 对斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫(*H. armigera*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等重要夜蛾科害虫的感染性高达 95%以上, 且 HvAV-3h 的感染会明显抑制这些宿主幼虫的生长和取食^[23,26,35]。这些结果表明, 以 HvAV-3h 为例的囊泡病毒具有巨大的生物防治开发潜力。明确囊泡病毒病毒粒子的组成和结构, 以及开展针对囊泡病毒各功能基因的研究迫在眉睫。

表 1 两种病毒的 LD_{50} 、 LD_{90} 值及 95%置信区间统计

Table 1 Median lethal dose (LD_{50}) and 90% lethal dose (LD_{90}) with 95% confidence limits of two viruses

Treatment	LD_{50} (OBs/larva)	95% confidence limits	LD_{90} (OBs/larva)	95% confidence limits
AcMNPV-Egfp	16.7	(9.4–26.2)	500.7	(280.7–1 141.4)
AcMNPV-117	65.2	(12.6–213.8)	188 039.8	(13 308.2–447 475 583.2)

表 2 两种病毒的 LT_{50} 、 LT_{90} 值及 95%置信区间统计

Table 2 Median lethal time (LT_{50}) and 90% lethal time (LT_{90}) with 95% confidence limits of two viruses

Treatment	LT_{50} /d	95% confidence limits	LT_{90} /d	95% confidence limits
AcMNPV-Egfp	6.8	(6.5–7.2)	8.8	(8.3–9.4)
AcMNPV-117	7.5	(7.2–7.9)	9.3	(9.3–10.0)

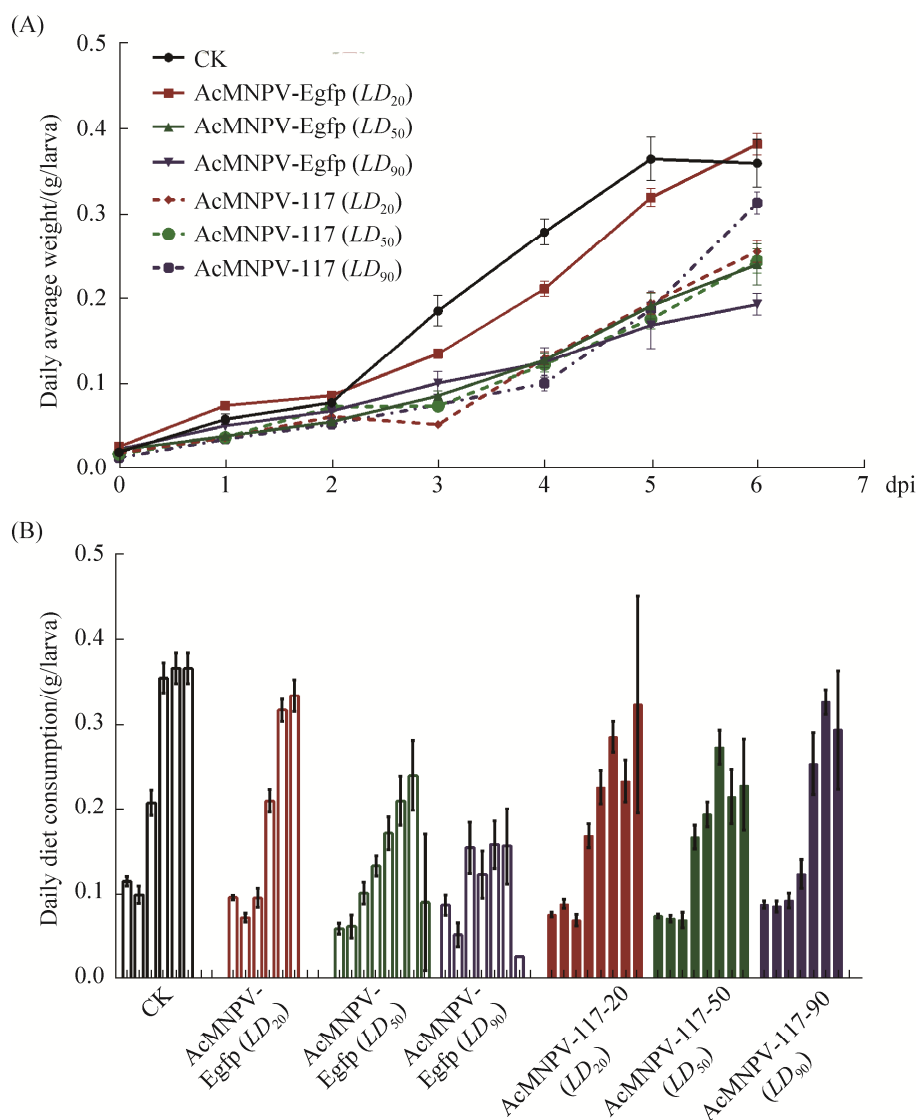


图 5 重组病毒感染甜菜夜蛾幼虫后日均体重分析及日均取食量分析

Figure 5 Daily average weight analysis and daily average diet consumption analysis on *Spodoptera exigua* larvae infected by recombinant AcMNPVs. A: daily average weight analysis of third instar *S. exigua* larvae treated with different dosages of AcMNPV-Egfp and AcMNPV-117; B: daily average diet consumption of third instar *S. exigua* larvae treated with different dosages of AcMNPV-Egfp and AcMNPV-117.

3h-117 是囊泡病毒的保守基因之一, 其编码的蛋白已被确认为是 H_vAV-3h 病毒粒子的结构蛋白之一^[28]。在缺乏囊泡病毒基因敲除平台的情况下, 为进一步明确 *3h-117* 基因的功能, 本研究利用 Bac-to-Bac 系统成功构建了重组杆状病毒 AcMNPV-117, 利用杆状病毒表达系统对

3h-117 的功能进行进一步阐释。通过毒力测定发现 AcMNPV-117 的致死中浓与致死中时都高于对照型病毒 AcMNPV-Egfp, 且重组病毒在宿主昆虫的生长和进食的抑制作用弱于对照型 (图 5)。这些结果表明重组病毒的杀虫活性较野生型病毒降低, 提示 *3h-117* 基因的表达能干扰

AcMNPV 的口服活性。这种干扰可能与 3H-117 是病毒粒子的结构蛋白相关, 即 3H-117 的存在可能会干扰 AcMNPV 病毒粒子的形成和组装。虽然扫描显微镜的观察结果表明, AcMNPV-117 的多角体相较 AcMNPV-Egfp 的多角体有明显的增大(图 4), 但 3H-117 对 AcMNPV 病毒粒子的具体影响以及对多角体形成的影响还需要进一步的探究。

本研究还发现了一个有意思的现象——3H-117 可能参与 AcMNPV 在感染过程中的细胞核骨架聚集过程(图 3)。细胞核骨架多聚化(nuclear actin polymerization)是 AcMNPV 感染过程中的一个独特的特征, 这个过程与 AcMNPV 感染后子代核衣壳的形态密切相关^[36-37], 且很多病毒基因都被报道参与宿主细胞核骨架多聚化现象^[38-42]。这一结果提示 3H-117 可能是通过降低 AcMNPV 对宿主细胞核骨架多聚化过程的利用来干扰 AcMNPV 子代病毒的产生、组装等过程。囊泡病毒是一类细胞质感染的病毒, 对其的研究多停留于感染性、组织特异性和毒力差异等报道, 鲜少有研究针对其单个基因的亚细胞定位的研究。

本研究对烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株的一个结构蛋白编码基因 *3h-117* 进行了进一步的功能分析, 获得的结果表明杆状病毒可用作囊泡病毒基因功能的展示平台, 为囊泡病毒功能基因的研究方法提供了新思路, 同时也丰富了囊泡病毒的分子生物学研究。

参考文献

- [1] Inceoglu AB, Kamita SG, Hammock BD. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in Virus Research*, 2006, 68: 323–360.
- [2] Fuxa JR. Insect control with baculoviruses. *Biotechnology Advances*, 1991, 9(3): 425–in2.
- [3] Bishop DHL. Control of insect pests by baculoviruses. *Concepts in Viral Pathogenesis III*. New York, NY: Springer New York, 1989: 368–382.
- [4] Luckow VA, Summers MD. High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 1989, 170(1): 31–39.
- [5] 陈琛, 吴航, 陈瑶. 昆虫幼虫生产重组蛋白研究进展. *生物技术*, 2020, 30(6): 604–608, 597.
Chen C, Wu H, Chen Y. Research progress on the production of recombinant protein by insect larva. *Biotechnology*, 2020, 30(6): 604–608, 597. (in Chinese)
- [6] 李双星, 刘业兵, 柳方远, 吉婧, 杜吉革, 李倩琳, 朱真, 李启红, 陈小云, 印春生. 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白在昆虫细胞-杆状病毒系统中的表达与鉴定. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(1): 273–279.
Li SX, Liu YB, Liu FY, Ji J, Du JG, Li QL, Zhu Z, Li QH, Chen XY, Yin CS. Expression and identification of feline infectious peritonitis virus N protein in insect cell-baculovirus expression system. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(1): 273–279. (in Chinese)
- [7] 刘高强, 章克昌, 王晓玲, 魏美才. 昆虫杆状病毒表达系统的应用进展. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(7): 40–44.
Liu GQ, Zhang KC, Wang XL, Wei MC. Advances in insect baculovirus expression system. *Progress in Biotechnology*, 2004, 24(7): 40–44. (in Chinese)
- [8] 韦永龙, 李轶女, 张志芳, 沈桂芳. 杆状病毒表达系统及其应用进展. *生物技术通报*, 2010(10): 1–7, 14.
Wei YL, Li YN, Zhang ZF, Shen GF. Advances in research and application of baculovirus expression system. *Biotechnology Bulletin*, 2010(10): 1–7, 14. (in Chinese)
- [9] Slavicek JM, Popham HJR, Riegel CI. Deletion of the *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene enhances viral killing speed in the last instar of the Gypsy moth. *Biological Control*, 1999, 16(1): 91–103.
- [10] Wilson KR, O'Reilly DR, Hails RS, Cory JS. Age-related effects of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus egt gene in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*). *Biological Control*, 2000, 19(1): 57–63.
- [11] Pinedo FJR, Moscardi F, Luque T, Olszewski JA, Ribeiro BM. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host.

- Biological Control*, 2003, 27(3): 336–344.
- [12] 沈兴家, 张志芳, 李奕仁. 昆虫杆状病毒 *egt* 基因研究进展. 中国蚕业, 2004, 25(2): 25(2): 4–7. (in Chinese)
- Shen XJ, Zhang ZF, Li YR. The research progress of baculovirus *egt* gene. *Sericulture in China*, 2004, 25(2): 4–7. (in Chinese)
- [13] Yu H, Meng J, Xu J, Liu TX, Wang D. A novel neurotoxin gene *ar1b* recombination enhances the efficiency of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus as a pesticide by inhibiting the host larvae ability to feed and grow. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0135279.
- [14] Yu H, Zhou B, Meng J, Xu J, Liu TX, Wang D. Recombinant *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus with arthropod-specific neurotoxin gene *RjAa17f* from *Rhopalurus junceus* enhances the virulence against the host larvae. *Insect Science*, 2017, 24(3): 397–408.
- [15] Cheng XW, Carner GR, Brown TM. Circular configuration of the genome of ascoviruses. *The Journal of General Virology*, 1999, 80(Pt 6): 1537–1540.
- [16] Federici BA. Enveloped double-stranded DNA insect virus with novel structure and cytopathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(24): 7664–7668.
- [17] Federici BA, Govindarajan R. Comparative histopathology of three Ascovirus isolates in larval noctuids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990, 56(3): 300–311.
- [18] Wang LH, Xue JL, Seaborn CP, Arif BM, Cheng XW. Sequence and organization of the *Trichoplusia ni* Ascovirus 2c (ascoviridae) genome. *Virology*, 2006, 354(1): 167–177.
- [19] Huang GH, Garretson TA, Cheng XH, Holztrager MS, Li SJ, Wang X, Cheng XW. Phylogenetic position and replication kinetics of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h (HvAV-3h) isolated from *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40225. DOI:10.1371/journal.pone.0040225.
- [20] Wei YL, Hu J, Li SJ, Chen ZS, Cheng XW, Huang GH. Genome sequence and organization analysis of *Heliothis virescens* Ascovirus 3f isolated from a *Helicoverpa Zea* larva. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2014, 122: 40–43.
- [21] Hamm JJ, Nordlung DA, Marti OG. Effects of a nonoccluded virus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on the development of a parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 1985, 14(3): 258–261.
- [22] Glynn Tillman P, Styer EL, Hamm JJ. Transmission of ascovirus from *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) by three parasitoids and effects of virus on survival of parasitoid *Cardiophiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 2004, 33(3): 633–643.
- [23] Li SJ, Hopkins RJ, Zhao YP, Zhang YX, Hu J, Chen XY, Xu Z, Huang GH. Imperfection works: survival, transmission and persistence in the system of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h (HvAV-3h), *Microplitis similis* and *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1–8.
- [24] Yu H, Ou-Yang YY, Li N, Nakai M, Huang GH. *In vitro* infectious risk assessment of *Heliothis virescens* Ascovirus 3j (HvAV-3j) toward non-target vertebrate cells. *Virologica Sinica*, 2019, 34(4): 423–433.
- [25] Li SJ, Wang X, Zhou ZS, Zhu J, Hu J, Zhao YP, Zhou GW, Huang GH. A comparison of growth and development of three major agricultural insect pests infected with *Heliothis virescens* Ascovirus 3h (HvAV-3h). *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e85704.
- [26] Yu H, Yang CJ, Li N, Zhao Y, Chen ZM, Yi SJ, Li ZQ, Adang MJ, Huang GH. Novel strategies for the biocontrol of noctuid pests (Lepidoptera) based on improving ascovirus infectivity using *Bacillus thuringiensis*. *Insect Science*, 2020: DOI 10.1111/1744-7917.12875.
- [27] Huang GH, Hou DH, Wang ML, Cheng XW, Hu ZH. Genome analysis of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h isolated from China. *Virologica Sinica*, 2017, 32(2): 147–154.
- [28] Zhao Y, Yu H, He L, Li N, Huang GH. 3H-117, a structural protein of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h (HvAV-3h). *Virus Genes*, 2019, 55(5): 688–695.
- [29] Zhao Y, Yu H, Li N, Huang GH. Characterization of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h *orf21* that encodes a virion protein. *Journal of Applied Virology*, 2020, 8(4): 59–70.
- [30] Bideshi DK. A viral caspase contributes to modified apoptosis for virus transmission. *Genes & Development*, 2005, 19(12): 1416–1421.
- [31] Asgari S. A caspase-like gene from *Heliothis virescens* Ascovirus (HvAV-3e) is not involved in apoptosis but is essential for virus replication. *Virus Research*, 2007,

- 128(1/2): 99–105.
- [32] Hussain M, Asgari S. Inhibition of apoptosis by *Heliothis virescens* Ascovirus (HvAV-3e): characterization of orf28 with structural similarity to inhibitor of apoptosis proteins. *Apoptosis*, 2008, 13(12): 1417–1426.
- [33] Yu H, Ou-Yang YY, Yang CJ, Li N, Nakai M, Huang GH. 3H-31, A non-structural protein of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h, inhibits the host larval cathepsin and chitinase activities. *Virologica Sinica*, 2021: 1–16.
- [34] Yu H, He L, Ou-Yang YY, Huang GH. Preparation and molecular characterization of a polyclonal antibody as an efficient cutworm reference protein. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2018, 21(3): 786–792.
- [35] Yu H, Xu J, Liu Q, Liu TX, Wang D. Ha83, a chitin binding domain encoding gene, is important to *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus budded virus production and occlusion body assembling. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11088.
- [36] 刘航, 廖用信, 陈壮美, 赵琳超, 黄国华. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株对草地贪夜蛾幼虫的感染特性及其生长发育的影响. *植物保护学报*, 2020, 47(4): 875–883.
- Liu H, Liao YX, Chen ZM, Zhao LC, Huang GH. Infection characteristics of *Heliothis virescens* Ascovirus 3h (HvAV-3h) in *Spodoptera frugiperda* larvae and its effects on host growth and development. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47(4): 875–883. (in Chinese)
- [37] Ohkawa T, Volkman LE. Nuclear F-actin is required for AcMNPV nucleocapsid morphogenesis. *Virology*, 1999, 264(1): 1–4.
- [38] Goley ED, Ohkawa T, Mancuso J, Woodruff JB, D'Alessio JA, Cande WZ, Volkman LE, Welch MD. Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 2006, 314(5798): 464–467.
- [39] Machesky LM, Insall RH, Volkman LE. WASP homology sequences in baculoviruses. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(7): 286–287.
- [40] Wang Y, Zhang YL, Han SL, Hu X, Zhou Y, Mu JF, Pei RJ, Wu CC, Chen XW. Identification of a novel regulatory sequence of actin nucleation promoting factor encoded by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(15): 9533–9541.
- [41] Wang Y, Wang Q, Liang CY, Song JH, Li N, Shi H, Chen XW. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid protein BV/ODV-C42 mediates the nuclear entry of P78/83. *Journal of Virology*, 2008, 82(9): 4554–4561.
- [42] Mu JF, Zhang YL, Hu YY, Hu X, Zhou Y, Zhao H, Pei RJ, Wu CC, Chen JZ, Zhao H, Yang K, Oers MMV, Chen XW, Wang Y. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac34 protein retains cellular actin-related protein 2/3 complex in the nucleus by subversion of CRM1-dependent nuclear export. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(11): e1005994.

(本文责编 张晓丽)