



杆状病毒凋亡抑制基因 *IAP1* 促进家蚕 CyclinB 的核内积累

肖苗¹, 董战旗^{1,2}, 肖琴¹, 胡志刚¹, 王杰¹, 陈鹏^{1,2}, 潘敏慧^{1,2*}

1 西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

肖苗, 董战旗, 肖琴, 胡志刚, 王杰, 陈鹏, 潘敏慧. 杆状病毒凋亡抑制基因 *IAP1* 促进家蚕 CyclinB 的核内积累. 微生物学报, 2022, 62(9): 3478–3488.

Xiao Miao, Dong Zhanqi, Xiao Qin, Hu Zhigang, Wang Jie, Chen Peng, Pan Minhui. Baculovirus apoptosis suppressor gene *IAP1* promotes nuclear accumulation of CyclinB in *Bombyx mori*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3478–3488.

摘要:【目的】家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)是生产上危害最严重的病原之一。BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞将细胞周期阻滞于 G2/M 期。CyclinB 是调控细胞周期 G2 期向 M 期转换的重要细胞周期蛋白。因此, 研究 BmNPV 感染后 CyclinB 变化对解析病毒调控细胞周期的机制具有重要意义, 同时探究这个过程中与 CyclinB 互作的病毒蛋白, 可为构建家蚕转基因品系提供分子靶标。【方法】qRT-PCR 检测 BmNPV 感染后 BmCyclinB 的表达变化; 免疫荧光观察病毒感染前后 BmCyclinB 的定位变化, 通过细胞质细胞核蛋白分离实验验证。免疫共沉淀钓取与 BmCyclinB 互作的病毒蛋白。BmNPV 感染期间敲除 BmNPV *IAP1* 观察 BmCyclinB 的入核比例。【结果】BmNPV 感染后 *BmCyclinB* 转录水平下调。BmNPV 感染前 BmCyclinB 主要定位于细胞质, 而感染后主要定位于细胞核。BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞后促进 BmCyclinB 在核内积累。共钓取了 7 个与 BmCyclinB 互作的病毒蛋白, 免疫共沉淀和细胞共定位证明 BmNPV *IAP1* 与 BmCyclinB 之间存在相互作用。敲除 BmNPV *IAP1* 后 BmCyclinB 进入细胞核的数量显著减少。【结论】BmNPV *IAP1* 可通过与 BmCyclinB 互作, 促进 BmCyclinB 在核内积累。

关键词: 家蚕; 家蚕核型多角体病毒; 细胞周期; 细胞周期蛋白 B; 凋亡抑制蛋白 1

基金项目: 国家自然科学基金(31872427, 31902214); 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0096, cstc2020jscx-msxmX0045); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872427, 31902214), by the Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2019jcyj-msxmX0096, cstc2020jscx-msxmX0045) and by the China Agriculture Research System of Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Areas

*Corresponding author. Tel: +86-23-68250076; Fax: +86-23-68251128; E-mail: pmh047@126.com

Received: 15 January 2022; Revised: 8 March 2022; Published online: 27 May 2022

Baculovirus apoptosis suppressor gene *IAP1* promotes nuclear accumulation of CyclinB in *Bombyx mori*

XIAO Miao¹, DONG Zhanqi^{1,2}, XIAO Qin¹, HU Zhigang¹, WANG Jie¹, CHEN Peng^{1,2}, PAN Minhui^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) is one of the most serious pathogens in sericulture. BmNPV infection blocked the cell cycle at G2/M phase in BmN-SWU1 cells. CyclinB is an important cyclin that regulates the transition from G2 phase to M phase of cell cycle. Therefore, studying the changes of CyclinB after BmNPV infection is of great significance to elucidate the mechanism of viral regulation of cell cycle and meanwhile, exploring the viral proteins interacting with CyclinB during this process can provide molecular targets for the construction of transgenic strains of *Bombyx mori*. [Methods] Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of BmCyclinB after BmNPV infection. The localization change of BmCyclinB after viral infection was observed by immunofluorescence and verified by cytoplasmic and nuclear protein separation experiment. Co-immunoprecipitation was employed to catch the viral proteins that interacted with BmCyclinB. The proportion of BmCyclinB into the nucleus was observed by knocking down BmNPV *IAP1* after BmNPV infection. [Results] The transcription level of *BmCyclinB* was down-regulated after BmNPV infection and BmCyclinB was mainly located in cytoplasm before BmNPV infection and in nucleus after infection. BmNPV infection of BmN-SWU1 cells promoted the nuclear accumulation of BmCyclinB. A total of 7 viral proteins interacting with BmCyclinB were identified. The interaction between BmNPV *IAP1* and BmCyclinB was confirmed by co-immunoprecipitation and cell co-localization. The amount of BmCyclinB entering the nucleus was significantly reduced after BmNPV *IAP1* was knocked out during BmNPV infection. [Conclusion] BmNPV *IAP1* can promote the accumulation of BmCyclinB in the nucleus by interacting with BmCyclinB.

Keywords: *Bombyx mori*; *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; cell cycle; CyclinB; cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1)

杆状病毒是一类专性寄生于无脊椎动物的病毒, 解析其与宿主之间的相互作用一直是研究热点^[1]。世界上近 70 个国家均有蚕业生产^[2], 其中属于杆状病毒的家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV), 是蚕业生产上危害最严重的病原之一^[3-5], 每年给蚕业生产造成巨大的经济损失^[6-7]。前期研究发现, BmNPV 感染 BmN-SWU1^[8]细胞将细胞

周期阻滞于 G2/M 期, 以利于自身增殖。细胞周期蛋白 CyclinB 是细胞周期 G2 期向 M 期转换的重要调控因子, 其与细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 组成复合物调控细胞周期由 G2 期进入 M 期^[9-12]。研究 BmNPV 感染过程中 CyclinB 表达水平及定位变化对解析病毒调控细胞周期的机制具有重要意义, 同时探究这一过程中参与调控的宿

主基因和病毒基因, 可为培育抗 BmNPV 的家蚕转基因品系提供理论支撑。杆状病毒是一类环状、双链、基因组为超螺旋的 DNA 病毒^[13], 其基因组大小为 80–180 kb^[14–15]。杆状病毒生活周期中可以产生 2 种不同的病毒粒子^[16–17]: 包埋型病毒(occlusion-derived virus, ODV)和芽生型病毒(budded virus, BV)。ODV 介导个体间的传播, BV 介导细胞间的传播。杆状病毒感染宿主, 将宿主细胞周期阻滞于 G2/M 期, 形成一个有利于病毒自身增殖复制的环境^[18]。CyclinB 从 G1 晚期开始表达并逐渐积累, 在 G2 晚期达到最大值, 一直维持到分裂中期, 随后立即降解。CyclinB 的积累和降解在维持正常的细胞周期中起着重要的作用, 外部因素或内部因素引起 CyclinB 的不正常表达都会导致细胞周期的紊乱。在家蚕卵巢细胞中干涉 CyclinB 会抑制细胞增殖, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期^[19]。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 感染 Sf9 细胞, 编码 ODV-EC27 蛋白与 CyclinB 竞争性结合 CDK1, 使 G2 期向 M 期转换的重要调控复合物 CyclinB-CDK1 不能发挥作用, G2 期不能进入 M 期, 最终将细胞周期阻滞在 G2/M 期^[20–22], 以利于病毒增殖^[23]。棉铃虫单核衣壳核型多角体病毒(*Helioverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)感染 Hz-AM1 细胞诱导细胞周期阻滞在 G2/M 期, 并提高 CyclinB1 表达量^[24]。已有研究发现 BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞通过 BmNPV IAP1 下调 BmCDK1 蛋白水平的表达将细胞周期阻滞于 G2/M 期^[25], 与报道的 AcMNPV 和 HaSNPV 阻滞细胞周期方式存在差异。BmNPV 侵染 BmN-SWU1 细胞阻滞细胞周期于 G2/M 期, 解析这一过程有利于对 BmNPV 的防控。在 BmNPV 侵染 BmN-SWU1 细胞过程

中, 探究 BmCyclinB 表达量及定位变化, 鉴定与 BmCyclinB 发生相互作用的病毒蛋白, 为培育抗 BmNPV 家蚕品系提供分子靶标, 同时为解析 BmNPV 调控宿主细胞周期阻滞周期于 G2/M 期提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 由西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室建立^[8]并保存, BmNPV(CQ 株)由实验室保存。

1.2 试剂和仪器

试剂: 各种限制性内切酶、连接酶、DNA Marker、逆转录试剂盒等分子生物学操作试剂购于 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒和 RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司; 抗体和细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒购于 Beyotime 公司; ECL 显色液和定量试剂购于 Yeasen 公司; 各种化学试剂购于成都科隆有限公司。

仪器: 超高分辨激光共聚焦显微镜(Olympus); 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad); 分光光度计(ThermoFisher); 转膜仪(Bio-Rad); 扫描仪(Bio-Rad); 化学发光成像仪(Bio-Rad); 16 °C 连接仪(Eppendorf)。

1.3 BmCyclinB 真核表达载体、BmNPV iap1 敲除载体和重组病毒构建

利用 Primer 5.0 进行 BmCyclinB 的引物设计, 其中 BmCyclinB^{HA}-BamH I-F 的序列为(CGCggatccATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGAAATTCAACTAAGGCGGCAT), BmCyclinB-Not I-R 的序列为(ATTTgcgccgcTTAAGGGCTTGGGCTTGATATCT)。用 Ex-Taq 酶进行扩增, 扩增片段和 pIZ-V5/His 载体用 BamH I 和 Not I 内切酶进行酶切, 利用 Solution I 连接, 选择阳性克隆进行测序。根据文献[25]进行

psl1180-sgBmNPV *iap1*-Cas9-Flag 载体构建。

将 *BmCyclinB*^{Flag} 克隆到 pFastBac1 载体上, 随后通过 Bac to Bac 转座到 vBm 基因组上^[26], 构建重组病毒 vBm-*BmCyclinB*^{Flag}。

1.4 RNA 提取和逆转录实验

细胞转染 48 h 后以感染复数 MOI=5 添加病毒, 将细胞轻轻吹下, 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 1 遍, 加入 TRK 裂解液, 按试剂盒说明书提取 RNA, 分光光度计测量 RNA 浓度后, 立即使用逆转录试剂进行逆转录实验。10 μL 反应体系包括 gDNA Eraser 1 μL, 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, RNA 1 μg, RNase Free ddH₂O 补足到 10 μL; 42 °C 保温 2 min 后加 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL, 5×PrimeScript Buffer 24 μL, RT Primer Mix 4 μL, RNase Free ddH₂O 1 μL, 37 °C 反应 30 min; 85 °C 保温 5 s 以终止反应, 最后利用家蚕肌动蛋白基因 *Actin3* 的扩增引物 A3-F (5'-CATGAAGATCCTCACCGAGCG-3') 和 A3-R (5'-CGTAGCACAGCTTCTCCTTGATA-3')^[27] 检测逆转录反应是否成功。

1.5 荧光定量 PCR

以逆转录获得的 cDNA 为模板, 进行定量 PCR 检测, 10 μL 的体系包括: SYBR®Green Supermix 5 μL、DEPC 水 5 μL、引物(10 μmol/L) 各 0.3 μL、模板(反转 1 μg RNA) 0.8 μL。反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次; 最后 95 °C 变性 10 s。选用翻译起始因子 4A^[28](*sw22934*) 作为内参基因, 引物为 qsw22934-F (5'-TTCGTAAGTGGCTCTTCTCGT-3') 和 qsw22934-R (5'-CAAAGTTGATAGCAATTC CCT-3')。用于 *BmCyclinB* 检测的引物为 qBmCyclinB-F (5'-TGTCAAAAATGTTATTCCAG CC-3') 和 qBmCyclinB-R (5'-TTTCCGTAAAGA GTCAGTTCC-3')。

1.6 免疫荧光

根据 TransIT[®]-Insect Transfection Reagent

说明书将 pIZ-*BmCyclinB*-HA 载体进行转染, 无菌培养 48 h 后添毒。PBST (PBS 加 Tween-20) 清洗, 加入 200 μL 4% 多聚甲醛溶液, 室温固定 15 min, PBST 清洗, 加入 200 μL 1% Triton X-100, 室温下通透 15 min, PBST 清洗。加 250 μL 封闭液(3% BSA, 10% 羊血清, 90% PBS) 37 °C 封闭 1 h。加入一抗, 37 °C 孵育 2 h, PBST 清洗 30 min, 加入二抗, 37 °C 避光孵育 1 h, PBST 清洗。取干净载玻片, 做好标记, 将爬片小心取出固定在载玻片上, 在荧光共聚焦显微镜下观察。

1.7 细胞核蛋白及细胞浆蛋白分离

利用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒进行细胞浆蛋白和细胞核蛋白的分离。将细胞样品吹下, 吸出一部分作为总蛋白, 其余进行细胞浆蛋白和细胞核蛋白的分离, 具体步骤见试剂盒说明书。最后在所得到的总蛋白、细胞核蛋白和细胞浆蛋白中加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水煮 10 min, -80 °C 保存备用。

1.8 Western blotting

将 BmN-SWU1 细胞样品吹下离心, 沉淀加入 IP 裂解液(IP 裂解液:PMSF=100:1)冰上裂解 30 min, 然后加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴中煮 10 min 备用。利用 SDS-PAGE (12% 分离胶, 5% 浓缩胶) 凝胶进行电泳, 结束后通过转膜仪将蛋白质电转至 PVDF 膜上, 将膜置于封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液) 中室温封闭 2 h, 然后以一抗和封闭液比为 1:2 000 加入 HA/Flag 抗体(兔/鼠), 室温孵育 2 h, TBST 缓冲液清洗 5 次, 每次 6 min, 再以二抗和封闭液比为 1:5 000 加入 HRP 标记的山羊抗兔/鼠 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, 重复上步清洗步骤。最后加 ECL 显色液进行曝光。

1.9 免疫共沉淀

向细胞中添加重组病毒 vBm-*BmCyclinB*^{Flag},

48 h 后, 将细胞吹下离心, 沉淀中加入 1 mL IP 裂解液, 冰上摇动裂解 30 min 后吸出 100 μ L 样品作为总蛋白样品。另准备 2 个新的离心管, 做好标记, 分别加入 50 μ L Protein A 磁珠, 磁力架上用 PBST 洗涤 3 次。加入 300 μ L PBST, 2 个离心管分别加入 3 μ L 鼠/兔 IgG 和 3 μ L Flag(HA)鼠/兔抗体, 翻转仪上孵育 2 h。磁力架上去除上清, 2 个离心管中各加入 450 μ L 蛋白样品, 翻转仪上孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次, 随后 2 个离心管中分别加入 100 μ L IP 裂解液和 25 μ L 5 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水中煮 10 min。磁力架上将煮好的蛋白转移至新的做好标记的离心管中, -80°C 保存备用。

1.10 银染和质谱鉴定

将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后进行以下处理: 固定液(甲醇 50 mL、冰乙酸 12 mL、甲醛 50 μ L、纯水 38 mL)固定 1 h; 洗涤液(甲醇 125 mL、纯水 125 mL)清洗 2 h; 增感液(无水硫代硫酸钠 0.01 g、纯水 250 mL)增感 90 s; 超纯水洗涤 3 次, 每次 20 s; 染色液(硝酸银 0.2 g、甲醛 75 μ L、纯水 100 mL)染色, 避光孵育 30 min; 超纯水洗涤 3 次, 每次 20 s; 显影液(无水硫代硫酸钠 6 g、增感液 8 mL、甲醛 50 μ L、纯水 92 mL)显色, 直到蛋白条带清晰可见后加入终止液(甲醇 50 mL、冰乙酸 12 mL、纯水 38 mL)终止显影, 蛋白胶于扫描仪上成像和分析。将差异条带切下送北京华大基因进行质谱鉴定, 质谱条带以家蚕数据库和 BmNPV 基因组信息为参照。

2 结果与分析

2.1 BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞影响 BmCyclinB 表达

探究 BmNPV 感染对宿主细胞周期 G2 期向 M 期转换的关键调控基因 *BmCyclinB* 的影

响, 利用实时荧光定量 PCR 检测病毒感染 0、12、24、36、48 h 后 *BmCyclinB* 的表达。以未感染病毒的细胞做对照, 结果显示, BmNPV 感染后, *BmCyclinB* 转录水平发生显著下调(图 1)。

2.2 BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞促进 BmCyclinB 在核内积累

为了探究 BmNPV 对 *BmCyclinB* 定位的影响, 构建了 *BmCyclinB* 过表达载体 pIZ-*BmCyclinB*-HA, 并通过定量水平验证, 构建成功(图 2A 和 2B), 将其转染细胞, 48 h 后添毒进行免疫荧光观察。结果显示, 在未感染病毒的对照组中, *BmCyclinB* 定位于细胞质, 感染病毒后 *BmCyclinB* 定位发生改变, 细胞质和细胞核都有, 但主要定位于细胞核(图 2C)。进一步将表达 *BmCyclinB* 的细胞按处于细胞质或细胞核进行统计分析, 结果显示, 在未感染时, *BmCyclinB* 定位于细胞核占比 34.96%, 感染 12 h 占比 41.70%, 感染 24 h 占比 50.76%, 感染 48 h 占比 88.92%, 感染病毒后 *BmCyclinB* 定位于细胞核内的比例显著增加(图 2D)。

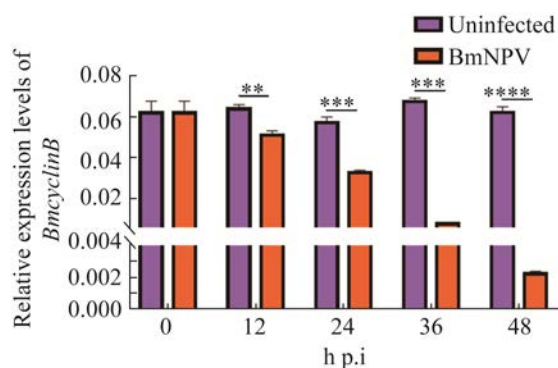


图 1 BmNPV 感染后对 *BmCyclinB* 表达的影响
Figure 1 Effect of BmNPV infection on expression of *BmCyclinB*. A: qRT-PCR analysis of the transcriptional level change of *BmCyclinB* during BmNPV infection. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

为了进一步验证 BmNPV 感染后是否促进 BmCyclinB 在核内积累, 以正常培养的未感染病毒作为对照, 进行细胞质蛋白/细胞核蛋白分离实验, 以微管蛋白 tubulin^[29] 和增殖细胞核抗原^[30] (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 分别代表细胞质蛋白和细胞核蛋白。Western blotting 结果显示, 实验组与对照组的细胞质蛋白中未检测到

PCNA, 细胞核蛋白中未检测到 tubulin, 说明所收样品符合实验要求, 可用于后续实验。对照组中, 在总蛋白及细胞质蛋白中均检测到 BmCyclinB 的表达, 但在细胞核蛋白中未检测到 BmCyclinB 蛋白(图 2E); 实验组中, 在三者中均检测到了 BmCyclinB 的表达(图 2F)。以上结果说明 BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞促进 BmCyclinB 于核内积累。

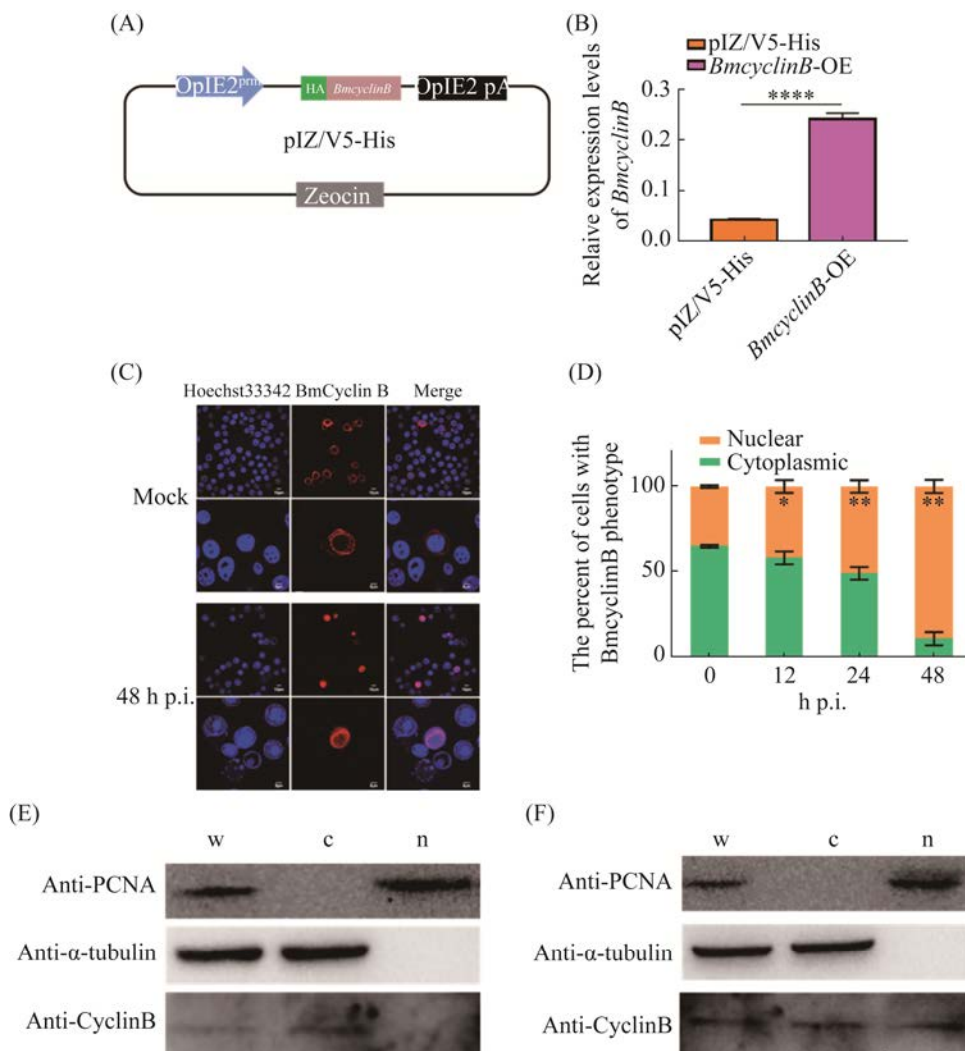


图 2 BmNPV 感染后对 BmCyclinB 蛋白定位的影响

Figure 2 Effect of BmNPV infection on localization of BmCyclinB. A: schematic diagram of vector construction for overexpression of BmCyclinB; B: detection of expression efficiency after overexpression of BmCyclinB; C: immunofluorescence analysis of the distribution of BmCyclinB during BmNPV infection; D: statistical analysis of nucleoplasmic ratio of BmCyclinB during BmNPV infection; E: Western blotting analysis of the distribution of BmCyclinB before BmNPV infection; F: Western blotting analysis of the distribution of BmCyclinB after BmNPV infection 48 h. w represents whole cell lysates; c indicates the cytoplasmic proteins; n shows the nuclear proteins. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.3 BmCyclinB 互作蛋白分析

为了探究 BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞促进 BmCyclinB 核内积累的机制, 利用重组病毒 vBm-BmCyclinB^{Flag} 感染细胞, 收集蛋白进行免疫共沉淀实验, 银染后切取 IgG 条带和 IP 条带进行质谱鉴定。结果显示, 与对照 IgG 相比, vBm-BmCyclinB^{Flag} 有 5 条差异带(图 3A)。质谱结果结合差异条带的大小和蛋白丰度, 筛选到与 BmCyclinB 蛋白互作的病毒蛋白有 7 个, 分别是病毒衣壳蛋白(BV/ODV-C42)、第 67 个开

放阅读框 (Bm67)、碱性核酸酶 (alkaline nuclease, AN)、凋亡抑制基因(BmNPV IAP1)、通用反式转录因子(global transactivator, Gta)、第 128 个开放阅读框(Pe38)和第 89 个开放阅读框(He65)(表 1)。进一步对 BmCyclinB 与 BmNPV IAP1 进行了共定位观察, 结果显示, BmCyclinB 与 BmNPV IAP1 共定位于细胞核和细胞质, 并主要定位于细胞核(图 3B)。免疫共沉淀和免疫印迹分析结果显示, BmCyclinB 与 BmNPV IAP1 蛋白之间存在一定相互作用(图 3C)。

表 1 Co-IP 筛选 BmCyclinB 互作候选病毒蛋白

Table 1 The candidate viral proteins interacting with BmCyclinB by Co-IP

Protein ID	Size/kDa	Protein name	Matches	Score	Protein functions
NP_047502.1	41.6	BV/ODV-C42	9(8)	231	Encoding BV and ODV capsid proteins
NP_047484.1	27.0	Bm67	5(3)	84	Nonstructural protein gene
NP_054163.1	48.5	AN	4(3)	73	5' to 3' exonuclease and endonuclease activities
NP_047432.1	34.0	BmNPV IAP1	1(1)	48	Inhibition of apoptosis
NP_047448.1	59.2	Gta	3(2)	33	A kind of READ helicase superfamily
NP_047549.1	36.1	Pe38[Bm128]	2(1)	32	Activating DNA replication
NP_047506.1	34.3	He65[Bm89]	1(1)	14	Early transcriptional genes

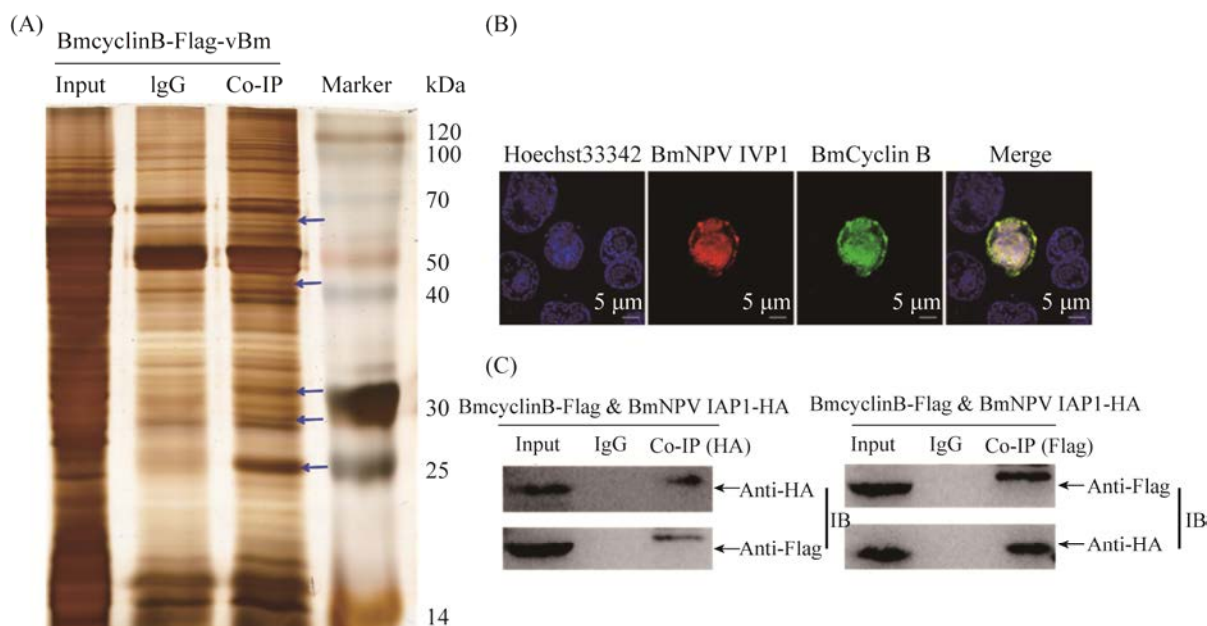


图 3 BmCyclinB 互作病毒蛋白分析

Figure 3 Analysis of BmCyclinB interaction with virus proteins. A: Co-IP silver staining results of BmCyclinB: the different bands were pointed out by the blue arrows; Marker (protein molecular weight marker), Input (cell lysates), IgG (control), Co-IP (IP with anti-Flag antibody); B: Co-location analysis of BmCyclinB and BmNPV IAP1 by immunofluorescence; C: Co-IP assays verifying the interaction of BmCyclinB and BmNPV IAP1.

2.4 敲除 BmNPV *IAP1* 对 BmCyclinB 定位的影响

将 psl1180-sgBmNPV *iap1*-Cas9-Flag 载体转染进 BmN-SWU1 细胞, 48 h 后添毒, 以空载为对照, 添毒 24 h 后进行免疫荧光实验, 随后用荧光共聚焦显微镜观察 BmCyclinB 细胞质细胞核分布情况(图 4A)。对表达 BmCyclinB 的细胞中 BmCyclinB 处于细胞核的细胞进行统计, 结果显示, 对照组中接近 50% 的 BmCyclinB 进入细胞核, 而敲除 BmNPV *iap1* 后 BmCyclinB 进入细胞核的数量显著减少(图 4B)。

3 讨论

本文首次探讨了 BmNPV 与 BmCyclinB 之间的关系。已有研究表明, BmNPV 侵染家蚕细胞将细胞周期阻滞在 G2/M 期^[31]。CyclinB 是细胞 G2 期向 M 期转换的重要细胞周期蛋白, 与 CDK1 形成 CyclinB-CDK1 复合物^[32], 调控 G2 期向 M 期的转换^[33]。在 G2 早期, CyclinB-CDK1 复合物出核速度快于入核速度; 在 G2 晚期, CyclinB-CDK1 复合物出核速度慢于入核速度,

在细胞核累积, 调控 G2 期进入 M 期^[34]。本研究结果显示, BmNPV 感染导致 BmCyclinB 转录水平下调; BmCyclinB 蛋白定位发生变化, 感染前主要定位于细胞质, 感染后主要定位于细胞核。进一步通过细胞质细胞核蛋白分离实验证明, BmNPV 感染后 BmCyclinB 蛋白有部分进入细胞核内, 而对照组的细胞核蛋白组中未检测到 BmCyclinB 蛋白。细胞周期分为间期和分裂期两个阶段, 其中间期占据整个过程的大部分时间, 分裂期只占据小部分, 如 HeLa 细胞周期约为 22 h, 其中细胞间期为 21 h, 分裂期为 1 h^[35], 因此本研究在对照组中未检测到 BmCyclinB 蛋白。

AcMNPV 编码的 ODV-EC27 蛋白能够和 CyclinB 竞争性结合 CDC2 和 CDC6, 调控宿主细胞周期进程, 将细胞周期阻断于 G2/M 期^[20]。而 BmNPV 编码 BmNPV IAP1 下调 BmCDK1 的表达, 阻滞细胞周期于 G2/M 期^[25]。为了探讨 BmNPV 侵染 BmN-SWU1 细胞将细胞周期阻滞在 G2/M 期的阻滞机制, 本研究以 BmCyclinB 为诱饵钓取了与其相互作用的病毒蛋白。结果

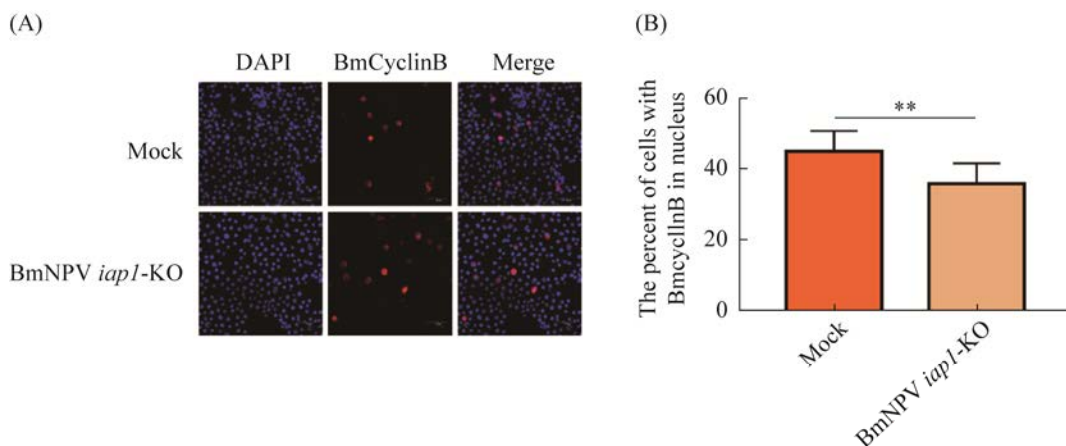


图 4 敲除 BmNPV *iap1* 对 BmCyclinB 入核的影响

Figure 4 Effect of BmCyclinB into the nucleus after knocking out BmNPV *iap1* during BmNPV infection. A: immunofluorescence observed of the distribution of BmCyclinB after knocking down BmNPV *iap1*; B: analysis of nuclear proportion of BmCyclinB after knocking down BmNPV *iap1*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

发现了 7 个与 BmCyclinB 互作的病毒蛋白, 分别是 BV/ODV-C42、Bm67、AN、BmNPV IAP1、Gta、Pe38 和 He65。已有研究发现一种鼠凋亡抑制基因 TIAP 在同步化的 NIH 3T3 细胞重新进入细胞周期的 S 期向 G2/M 期转换过程中高表达^[36], 暗示其在调节细胞周期转换中发挥重要功能。因此, 本文选取了 BmNPV IAP1 作进一步研究。通过免疫荧光和免疫共沉淀证明 BmCyclinB 与 BmNPV IAP1 之间存在一定相互作用, 敲除 BmNPV IAP1 后 BmCyclinB 定位于细胞核的数量显著减少, BmNPV 通过 BmNPV IAP1 促进 BmCyclinB 在核内积累, 使其不能与 CDK1 形成复合物行使功能, 或者在 CyclinB-CDK1 复合物未被激活的情况下促进入核, 复合物不能正常发挥功能, 从而导致细胞周期不能从 G2 期顺利进入 M 期, 最终将细胞周期阻滞于 G2/M 期。HaSNPV 感染 Hz-AM1 细胞, 阻滞 CyclinB1 进核, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期^[24], BmNPV 促进 CyclinB 在核内积累以调控宿主细胞周期, 与 HaSNPV 调控方式存在差异, 但可为解析杆状病毒调控宿主细胞周期方式提供参考。

本研究发现 BmNPV IAP1 与 BmCyclinB 存在一定相互作用, 参与 BmNPV 调控宿主细胞周期。IAP 是凋亡抑制基因, 在细胞中起调控细胞凋亡的作用^[37-38], 本文发现与研究报道的 IAP 功能不一样, 一方面丰富了 IAP 基因功能研究, 另一方面为解析病毒与宿主之间的调控方式提供新思路。最后, 细胞周期是一个复杂的调控网络, 参与其中的基因涉及很多, 通过 BmCyclinB 钓取的其他病毒蛋白是否也参与 BmNPV 调控细胞周期的过程, 有待进一步研究。

4 结论

BmNPV 感染 BmN-SWU1 细胞, 通过降低

BmCyclinB 表达量以及通过 BmNPV IAP1 促进 BmCyclinB 在核内积累, 以调控宿主细胞周期阻滞在 G2/M 期。

参考文献

- [1] Van Oers MM, Vlak JM. Baculovirus genomics. *Current Drug Targets*, 2007, 8(10): 1051-1068.
- [2] 顾国达. 世界蚕丝业经济与丝绸贸易. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
- [3] Cheng Y, Wang XY, Du C, Gao J, Xu JP. Expression analysis of several antiviral related genes to BmNPV in different resistant strains of silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*, 2014, 14(76): 76.
- [4] Li G, Qian HY, Luo XF, Xu PZ, Yang JH, Liu MZ, Xu AY. Transcriptomic analysis of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains following BmNPV infection provides insights into the antiviral mechanisms. *International Journal of Genomics*, 2016, 2016: 2086346.
- [5] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *The Journal of General Virology*, 1999, 80 (Pt 5): 1323-1337.
- [6] Liu TH, Dong XL, Pan CX, Du GY, Wu YF, Yang JG, Chen P, Lu C, Pan MH. A newly discovered member of the Atlantin family, BmAtlantin-n, has an antiviral effect against BmNPV in *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28946.
- [7] Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Cheng DJ, Dai FY, Li B, Zhao P, Zha XF, Cheng TC, Chai CL, Pan GQ, Xu JS, Liu C, Lin Y, Qian JF, Hou Y, Wu ZL, Li GR, Pan MH, Li CF, Shen YH, Lan XQ, Yuan LW, Li T, Xu HF, Yang GW, Wan YJ, Zhu Y, Yu MD, Shen WD, Wu DY, Xiang ZH, Yu J, Wang J, Li RQ, Shi JP, Li H, Li GY, Su JN, Wang XL, Li GQ, Zhang ZJ, Wu QF, Li J, Zhang QP, Wei N, Xu JZ, Sun HB, Dong L, Liu DY, Zhao SL, Zhao XL, Meng QS, Lan FD, Huang XG, Li YZ, Fang L, Li CF, Li DW, Sun YQ, Zhang ZP, Yang Z, Huang YQ, Xi Y, Qi QH, He DD, Huang HY, Zhang XW, Wang ZQ, Li WJ, Cao YZ, Yu YP, Yu H, Li JH, Ye JH, Chen H, Zhou Y, Liu B, Wang J, Ye J, Ji H, Li ST, Ni PX, Zhang JG, Zhang Y, Zheng HK, Mao BY, Wang W, Ye C, Li SG, Wang J, Wong GKS, Yang HM, Group BA. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306(5703): 1937-1940.
- [8] Pan MH, Cai XJ, Liu M, Lv J, Tang H, Tan J, Lu C.

- Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell*, 2010, 42(1): 42–46.
- [9] Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *The Biochemical Journal*, 1995, 308 (Pt 3): 697–711.
- [10] Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(5): 280–292.
- [11] Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development: Cambridge, England*, 2013, 140(15): 3079–3093.
- [12] Gavet O, Pines J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental Cell*, 2010, 18(4): 533–543.
- [13] Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*, 1990, 35: 127–155.
- [14] Ihalainen TO, Laakkonen JP, Paloheimo O, Ylä-Herttua S, Airene KJ, Vihinen-Ranta M. Morphological characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, 2010, 148(1/2): 71–74.
- [15] Ma XC, Xu HJ, Tang MJ, Xiao Q, Hong J, Zhang CX. Morphological, phylogenetic and biological characteristics of *Ectropis obliqua* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2006, 44(1): 77–82.
- [16] Braunagel SC, Summers MD. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Current Drug Targets*, 2007, 8(10): 1084–1095.
- [17] Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*. 4th ed. Bethesda (MD), *National Center for Biotechnology Information (US)*, 2019.
- [18] Monteiro F, Carinhas N, Carrondo MJT, Bernal V, Alves PM. Toward system-level understanding of baculovirus-host cell interactions: from molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 391.
- [19] Pan MH, Hong KL, Chen XY, Pan C, Chen XM, Kuang XX, Lu C. BmCyclin B and BmCyclin B3 are required for cell cycle progression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(4): 360–365.
- [20] Braunagel SC, Parr R, Belyavskiy M, Summers MD. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology*, 1998, 244(1): 195–211.
- [21] Belyavskiy M, Braunagel SC, Summers MD. The structural protein ODV-EC27 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a multifunctional viral cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(19): 11205–11210.
- [22] Ikeda M, Kobayashi M. Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 1999, 258(1): 176–188.
- [23] Zhang YH, Wei W, Xu P, Qin Q, Chen J, Chen XZ, Chen XP, Zhao XH. The cell cycle phase affects the potential of cells to replicate *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Acta Virologica*, 2012, 56(2): 133–137.
- [24] Zhou R, Yu ZH, Li XQ, Jia F, Wu JH, Chen XW. *Heliocoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus induces Hz-AM1 cell cycle arrest at the G2 phase with accumulation of cyclin B1. *Virus Research*, 2004, 105(2): 113–120.
- [25] Xiao Q, Dong ZQ, Zhu Y, Zhang Q, Yang X, Xiao M, Chen P, Lu C, Pan MH. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) induces G2/M arrest to promote viral multiplication by depleting BmCDK1. *Insects*, 2021, 12(12): 1098.
- [26] Chen TT, Tan LR, Hu N, Dong ZQ, Hu ZG, Jiang YM, Chen P, Pan MH, Lu C. C-lysozyme contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 108: 54–60.
- [27] 陈向云. BmGem1 和 BmGem2 在家蚕细胞中的功能鉴定. 西南大学博士学位论文, 2015.
- [28] Wang GH, Xia QY, Cheng DJ, Duan J, Zhao P, Chen J, Zhu L. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphosis based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR. *Insect Science*, 2008, 15(005): 405–413.
- [29] Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International Review of Cytology*, 1998, 178: 207–275.
- [30] González-Magaña A, Blanco FJ. Human PCNA Structure, function, and interactions. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 570.
- [31] Baluchamy S, Gopinathan KP. Characterization of a cyclin homolog from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, 2005, 108(1/2): 69–81.
- [32] Ji JY, Crest J, Schubiger G. Genetic interactions

- between Cdk1-CyclinB and the separase complex in *Drosophila*. *Development: Cambridge, England*, 2005, 132(8): 1875–1884.
- [33] Terzoudi GI, Jung T, Hain J, Vrouvas J, Margaritis K, Donta-Bakoyianni C, Makropoulos V, Angelakis P, Pantelias GE. Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. *International Journal of Radiation Biology*, 2000, 76(5): 607–615.
- [34] Davy C, Doorbar J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, 2007, 368(2): 219–226.
- [35] Deplanche M, Filho RA, Alekseeva L, Ladier E, Jardin J, Henry G, Azevedo V, Miyoshi A, Beraud L, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Steghens JP, Le Loir Y, Otto M, Götz F, Berkova N. Phenol-soluble modulín α induce G2/M phase transition delay in eukaryotic HeLa cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2015, 29(5): 1950–1959.
- [36] Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1457–1462.
- [37] Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: What's in a name? *Molecular Cell*, 2008, 30(2): 123–135.
- [38] Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*, 1998, 17(8): 2215–2223.