

专论与综述

杆状病毒侵染的分子基础\*

李充璧 庞义\*\*

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘要: 杆状病毒是昆虫的专一性寄生病毒, 可作为一种有效的生物杀虫剂。杆状病毒侵染寄主表现在其基因的功能上。侵染是一个复杂的过程, 包括许多不同基因的表达、调控等。以苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 为例, 从分子水平上概述了与杆状病毒侵染有关的基因及蛋白质的结构特性与功能, 为进一步了解杆状病毒侵染寄主的机制, 从而有效的改良杆状病毒, 扩大杀虫谱, 提高其杀虫效果提供参考。

关键词: 杆状病毒, 侵染

中图分类号: Q939.4 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 04-0080-05

杆状病毒是一组主要感染昆虫, 也感染其他无脊椎动物, 如虾等甲壳动物的双链DNA病毒。目前所知, 杆状病毒可感染600种以上的昆虫。它不感染人类等哺乳动物及其它脊椎动物和植物。由于其安全性好, 是控制虫口密度增长的重要生物因子, 作为生物杀虫剂替代化学农药具有巨大潜力, 因此在研究和应用中受到了人们广泛的重视。但是目前在生物防治上的一个重要问题是如何从分子水平上改良杆状病毒, 扩大杀虫谱, 提高其杀虫效果。要解决这个问题, 首先需了解杆状病毒与侵染宿主有关的基因结构与功能。本文以杆状病毒代表种-苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 为例, 从分子水平上概述了与杆状病毒侵染宿主有关的基因及蛋白质的结构与功能, 为有效地改良杆状病毒, 扩大杀虫谱, 提高其杀虫效果提供参考。

1 杆状病毒侵染的机制

目前所知杆状病毒存在两种形态。一种为形成包涵体的病毒 (Occluded virus, OV), 即在感染后期 (24h) 寄主细胞核内形成的, 可见的核衣壳被晶体蛋白所包埋, 当昆虫食入OV后, 病毒颗粒从包涵体中释放出来, 执行着初级感染功能。另一种为非包涵体病毒 (Nonoccluded Virus, NOV), 是感染早期从感染细胞质膜芽生出的一种病毒颗粒, 又称芽生病毒 (Budded Virus, BV)。在组织培养中, NOV的感染性是OV的1500倍<sup>[1]</sup>。

杆状病毒可广泛存在于土壤中和植物表面。当被昆虫食入后, 杆状病毒的包涵体

\* 国家自然科学基金重点资助项目 (No. 39730030)  
Key Project of Chinese National Science Fund. (No. 39730030)  
“九五”国家重点科技攻关项目 (No. 96-01-04)

\*\* 通讯作者

收稿日期: 2000-02-29, 修回日期: 2000-06-02

在昆虫肠道的碱性环境下溶解,病毒被释放出来。然后通过融合方式进入寄主细胞核进行复制。一部分新复制的病毒以芽生的方式穿出细胞膜,这些芽生病毒以吞噬的方式进入其他细胞,开始新一轮复制。

## 2 与病毒侵染有关的蛋白质性质与功能

就基因和蛋白质结构及功能而言,目前研究得比较深入的杆状病毒为苜蓿丫蚊夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV),该病毒为环状、双链DNA病毒。总基因组为128kb,大约有150个基因<sup>[2]</sup>。病毒粒子的结构蛋白包括一种39kD的外壳蛋白<sup>[3]</sup>和一种6.9kD的碱性多肽<sup>[4]</sup>。另外又发现一种24kD的蛋白分布在核衣壳内<sup>[5]</sup>和一种与病毒增殖有关的78kD的磷蛋白定位在核壳粒的端部<sup>[6]</sup>。gp64(67kD)是芽生病毒外膜上的特异蛋白,在芽生病毒经吞噬方式进入细胞的过程中起重要作用。对NOV形式的病毒,吸附、胞饮进入寄主细胞是必要的<sup>[7]</sup>。相比之下,多角体衍生病毒(Polyhedra-derived virus, PDV)进入昆虫细胞是在肠细胞表面以融合方式进入的<sup>[8]</sup>。已知PDV外膜上含有多种蛋白成分,例如:P25, P74, P10, EGT, PDV-E66, ODV-E56, ODV-E18等。但这些蛋白质在病毒吸附、融合和渗入昆虫细胞中的作用还不清楚。此外还有阻碍寄主细胞分裂的调节蛋白IE2<sup>[9]</sup>。

## 3 与病毒入侵有关的基因结构特征

**3.1 gp37 基因的结构特征** 在AcMNPV中, gp37基因定位在DNA聚合酶下游。开放阅读框为908个核苷酸(nt199 to 1107)。编码302个氨基酸,分子量为34.8kD。是杆状病毒的晚期表达基因。目前发现, gp37基因是在杆状病毒和昆虫痘病毒中共同存在的基因, gp37蛋白质含有N连接糖基化位点(Asn-X-Ser)。实验表明, AcMNPV gp37基因含有两个晚期基因启动子A/GTAAG,是杆状病毒复制的必需基因<sup>[10]</sup>。

**3.2 p74 基因的结构特征** p74基因在完整的AcMNPV-HindIII-P片段上,与相邻的p10基因转录方向相反,物理图谱单位为88.9~90.5。转录本为1935个碱基,编码645个氨基酸的蛋白,分子量为73819D。Northern杂交表明,主要的转录本为2700个碱基。p74基因的起始位点为TATTG,不同于其它晚期、高表达的杆状病毒基因的起始序列(ATAAG)。通过分析可知p74基因碱基的保守程度及功能,推论可能对病毒蛋白的加工、修饰乃至对昆虫细胞的病理发生均有关<sup>[11]</sup>。

**3.3 gp64 基因的结构特征** 在感染AcMNPV的细胞中,用含有gp64的重组噬菌体作为探针与经限制性内切酶消化后的AcMNPV杂交发现, gp64基因位于EcoRI-H片段。感染后24h,可检测到3.5和7.2kb的两个转录本。若将AcMNPV的EcoRI的H片段亚克隆,可产生系列重叠克隆。亚克隆片段的左端测序可知,含有2684个bp。计算机分析显示出10个阅读框。最大的为1590bp,编码529氨基酸。方向是从右到左,终止密码子在1588bp处,在其阅读框内有6个N端连接的糖基化位点,在54bp位点处有第二个ATG起始密码子,编码511个氨基酸。在其阅读框内有5个糖基化位点。基因两侧富含AT。gp64基因的特点是含有一个早期启动子(-43bp)和4个晚期启动子(-153, -167, -174, -175bp)。转录起始区是一个四核苷酸保守序列(CAGT),启动子上游含有4个ATAAG结构。若将位于-77~-62bp间的TATA盒缺失掉,则会导致转录活性丧失<sup>[12]</sup>。

**3.4 *ie2* 基因的结构特征** 极早期调控基因 *ie2* 位于 AcMNPV 基因组的物理图谱 (96.9 ~ 0.0mu) 上, 该基因编码 49kD 的蛋白质 IE2。阅读框长 1.3kb。感染后半小时即可检测到蛋白质 IE2, 6h 达到最高水平, 到 48h 稍有下降。转录活性决定于转录起点上游 275bp 的启动子顺序。它能在另一个反式调节基因 *ie1* 的存在下, 反式激活 39K 基因启动子的早期表达。已证明 *ie2* 基因是 AcMNPV 复制中的必需基因<sup>[9]</sup>。

**3.5 *p10* 基因的结构特征** *p10* 基因位于 AcMNPV 基因组的 *EcoRI*-P 区, 物理图谱单位为 88.1 ~ 89.6mu。大小为 0.63 ~ 0.76kb, 编码 93 个氨基酸, 分子量为 10, 132D 的糖蛋白, 故命名为 P10。它的起始密码子为 AUG (+1), 终止密码子为 UAA (+285)。-64 位点是真核细胞启动子的 TATAAT 盒。现认为 P10 是一种非结构蛋白。当体外感染时, 它是非必需基因。但 OB 的形成需要 *p10* 基因的表达, P10 蛋白的存在是病毒形成包涵体的必要前提。有文献报道, P10 在转运包涵体外膜并使之附着于包涵体上起作用<sup>[13]</sup>。用 AcMNPV-*p10* 缺失的突变体感染 SF 细胞, 相差显微镜检测表明, 不同种的 *p10* 突变体显示不同的细胞病变结果。感染 4d 后, 细胞核肿胀, 核内含包涵体较少。另一个明显的特点是感染 *p10* 突变体病毒的细胞缺乏象野生型病毒感染而出现的纤维状核质, 也不出现溶解现象。而感染野生型病毒的细胞 2d 后开始溶解, 到 2 周后仍能观察到这种现象<sup>[13]</sup>。

**3.6 *egt* 基因的结构特征** AcMNPV 基因组的物理图谱 8.4 ~ 9.6mu 区域有两个阅读框, 大阅读框含 506 个密码子, 编码蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖转移酶 (Ecdycterioid UDP-glucosyl transferase, *egt*), 分子量为 57, 010D, 等电点为 9.83 的碱性蛋白。*egt* 在 AcMNPV 基因组中按顺时针方向转录。另一个小阅读框位于 *egt* 之内, 编码 116 个氨基酸, 等电点为 13.12 的碱性蛋白。该阅读框的转录方向与 *egt* 相反, 但还未检测到该阅读框转录的 mRNA。*egt* 基因的起始密码子上游第 43 个核苷酸为转录起始位点。转录起点上游 29-25 位核苷酸为真核基因调控区普遍存在的保守序列 TATA 盒<sup>[14]</sup>。*egt* 基因表达可阻断幼虫蜕变, 有利于病毒繁殖<sup>[13]</sup>。

**3.7 *p25* 基因的结构特征** AcMNPV 基因组的物理图谱 33.8 ~ 37.7mu 区域, *HindIII*-I 片段上定位有编码 25kD 蛋白的基因, 故称 *p25* 基因。Beames & Summers (1988)<sup>[25]</sup> 提出, 在 *HindIII*-I 片段的 *EcoRI*-*HindIII* 片段 (35.0 ~ 37.7) 存在两个重叠的晚期转录本。一个为 0.8kb, 另一个为 1.6kb。而 *p25* 基因在 0.8kb 的阅读框内, 在读码框下游 862 ~ 867bp 处有 AATAAA 的 poly (A) 信号, 而 1.6kb 的阅读框不编码任何信息。研究发现杆状病毒感染的细胞在传代过程中常常发现有少多角体的病毒突变体出现, 而该突变体正好缺乏 *p25* 基因 1.6kb 的序列。但是在感染的昆虫细胞核内却检测到 1.6kb 的转录本。后来证实是一种细胞 DNA 的转座插入。插入 *AluI* 片段到病毒基因组, 导致少多角体 (FP) 表型出现<sup>[15]</sup>。

**3.8 *ubiquitin* 基因的结构特征** AcMNPV DNA 的物理图谱 (17.7-20.5mu) 的位置上的 3kb 的 *HindIII*/*BgII* 片段, 经测序分析证明, 该片段共有 5 个 ORF。其中之一为 Ubiquitin-39K 基因组。它的启动子元件为 ATAAG。*ubiquitin* 基因位于 39K 基因的下流, 属于晚期表达基因<sup>[3,6]</sup>。另有报道, *Ubiquitin* 基因可连接到另一个基因的框内, 这种含有 *Ubiquitin* 的融合蛋白在裂解后可释放出游离的 *Ubiquitin*。认为这种方式是产生 *Ubiquitin* 和调节非 *Ubiquitin* 组分的方式 (Finley *et al.* 1991)。*Ubiquitin* 基因高度保守, 与动物

的氨基酸序列同源性达70%，而AcMNPV和OpMNPV的*Ubiquitin*的氨基酸同源性达84%。特别是在氨基酸的15~31和51~59位之间同源性高。但是杆状病毒的*Ubiquitin*不如多角体基因那样保守<sup>[16]</sup>。

#### 4 与病毒侵染有关的蛋白的产生及作用特点

Western杂交表明，在野生型PDV中P74蛋白是一种结构蛋白。蛋白酶水解分析可知，P74蛋白附着于PDV包膜上。在感染后16~24h，P74蛋白最多。而芽生病毒外膜上未检测到该蛋白<sup>[17]</sup>。推测该蛋白在病毒进入昆虫细胞时起重要作用，也可能在病毒粒子成熟时影响其精确的三级或四级结构。P74含有一个膜锚定部位，是PDV膜的蛋白成分。杆状病毒增殖产生的两种表型，一种是BV，另一种则是PDV。由于两种病毒表型是在感染细胞内的不同部位获得各自的膜，故膜中含不同的蛋白。研究表明，P74缺失不影响BV的产生和它的感染性。P74蛋白可能在病毒成熟期影响膜结构的三级或四级结构。并在PDV吸附和融合过程中起作用。因P74存在3个可能的螺旋和双极性区域，H<sub>1</sub> (aa, 191-20)，H<sub>2</sub> (aa, 466-478)和H<sub>3</sub> (aa, 491-502)。这些区是膜融合的起始区，对病毒进入寄主细胞执行初级感染很重要。说明P74对该过程的完成是必需的蛋白<sup>[17]</sup>。

IE2蛋白是杆状病毒*ie2*基因表达的中心含有环指的核心蛋白。环指为C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>的锌指结构域，与多功能的蛋白结构域相似。AcMNPV基因组中具有这种环指结构的蛋白有5种。分别为IE2，CG30，PE-38，IAP1和CIAP2。研究发现，用表达*ie2*基因质粒转染昆虫细胞，导致细胞的胀大，妨碍了细胞分裂，阻断了细胞周期的进程。这种阻碍表现在S期的抑制，但是DNA复制仍在继续。若将IE2蛋白的环指区域缺失，则IE2抑制细胞周期的功能消失。进一步研究证实，是因缺失该区域94-173位的氨基酸所致。关于IE2抑制细胞分裂的原因还不清楚<sup>[3]</sup>。*gp64*编码的GP64蛋白质的N端为信号肽，C端为跨膜肽。该蛋白是芽生病毒特有的成分。OpMNPV同AcMNPV相比，GP64蛋白的N端和C端的氨基酸同源性很低，与病毒专一性有关。GP64是芽生病毒膜糖蛋白，对芽生病毒吸附，胞饮进入寄主细胞是必需的蛋白质<sup>[18]</sup>。感染后2h，便可检测到编码67kD糖蛋白的2.1kb的转录本。感染后12h检测，表达量很大。它的氨基酸序列与多数膜蛋白的特点一致，显示两个疏水区。一个靠近N端，起信号肽作用；另一个靠近C端，起锚定作用。可使GP64蛋白固定在质膜上<sup>[18]</sup>。GP64蛋白的另一个特点是它的整个分子结构与木瓜蛋白酶相似，二级结构分析也显示含有木瓜蛋白酶类似的 $\alpha$ 和 $\beta$ 区域，其中一个包括由第25位的半胱氨酸残基开始的长 $\alpha$ -螺旋特征结构。另据报道，病毒粒子的25kD蛋白的N端疏水区与PDV膜连接，相互作用，又作为膜的成分。在病毒感染周期中与多角体作用形成包涵体。在感染初期病毒与细胞接触、相互作用的过程中，P25蛋白起一定作用<sup>[3,7]</sup>。GP37蛋白是杆状病毒科和昆虫痘病毒科的一个由晚期基因编码的结构蛋白。在病毒感染宿主24h后开始表达，36h达到高峰。在研究CfMNPV *gp37*基因时发现，GP37蛋白不但在复制过程中起重要作用，还参与调节病毒粒子间的转运，是病毒粒子组装或包涵体加工的必需成分。不同病毒的GP37蛋白具有较高的保守性，尤其是在形成二级结构中有重要意义的氨基酸极其保守，并且在昆虫痘病毒中能形成纺锤体结构。推测GP37蛋白是和多角体蛋白有类似特点的蛋白，在病毒感染周期中具有重要作用<sup>[10]</sup>。

病毒基因组编码一种与真核生物高度同源的蛋白——Ubiquitin 蛋白，附着于杆状病毒内表，是芽生病毒特有的一种结构蛋白。它的作用关系到细胞内包括蛋白质降解的多种活动过程。在 AcMNPV 和 *Orgyia pseudotsugata* MNPV 两种病毒的 Ubiquitin 蛋白 C 端有 6 个氨基酸对其功能是必需的基因。包括 His-68, Lys-48。由于发现编码 Ubiquitin 的寄主基因插入病毒基因组，使牛非病理性的病毒性腹泻转变为病毒性腹泻；还有牛乳头瘤病毒 E6 蛋白可与寄主 P53 蛋白联结，从而改变了 Ubiquitin 依赖蛋白酶的靶特异性，促进了 p53 蛋白的降解；疱疹病毒感染 Hela 细胞是通过病毒转录因子 ICP4 诱导、激活寄主 *polyubiquitin* 基因的转录活性。因而提出病毒具有操纵 Ubiquitin 途径的特异性功能。根据蛋白质的磷酸化和乙酰化对碱处理的敏感性实验可知，Ubiquitin 蛋白是附着于杆状病毒内膜上的典型的磷脂化蛋白<sup>[19]</sup>。由于 Ubiquitin 是一种病毒膜结合蛋白，故推测 Ubiquitin 蛋白可起一种分子伴侣 (chaperone) 作用。

### 参 考 文 献

- [1] Volkman L E, Summers M D, Hsieh C H. *J Virol*, 1976, 19: 820 ~ 832.
- [2] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, *et al.* *Virology*, 1994, 202: 586 ~ 605.
- [3] Thiem S M, Miller L K. *J Virol*, 1989, 63: 4489 ~ 4497.
- [4] Tweeten K A, Bulla L A, Consigli R A. *J Virol*, 1980, 33: 866 ~ 876.
- [5] Wolgamot G M, Gross C H, Russeil R L Q, *et al.* *J Gen Virol*, 1993, 74: 103 ~ 107.
- [6] Vialard J, Lalumiere M, Vernet T, *et al.* *J Virol*, 1990, 64: 37 ~ 50.
- [7] Volkman L E. *Virology*, 1986, 185: 185 ~ 195.
- [8] Granados R R, Lawier K M. *Virology*, 1981, 108: 297 ~ 308.
- [9] Elena A, Prikhod K, Miller L K. *J Virol*, 1998, 72: 684 ~ 692.
- [10] Liu J J, Caarstens E B. *Virology*, 1996, 223: 396 ~ 400.
- [11] Hill J E, Kuzio J, Wilson J A, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1172: 187 ~ 189.
- [12] Whitford M, Stewart S, Kuzio J, *et al.* *J Virol*, 1989, 63: 1393 ~ 1399.
- [13] O' Relly D R, Miller L K. *J Virol*, 1990, 64: 1321 ~ 1328.
- [14] Beames B, Summers M D. *Virology*, 1989, 168: 344 ~ 353.
- [15] Williams G V, Rohel D Z, Kuzio J, *et al.* *J Gen. Virol.*, 1989, 70: 187 ~ 202.
- [16] Perlman D, Halvorson H O. *J Mol Biol*, 1983, 167: 391 ~ 409.
- [17] Kuzzio J, Jaques R, Faulkner P. *Virology*, 1989, 173: 759 ~ 763.
- [18] Volkman L E. *Virology*, 1986, 185: 185 ~ 195.
- [19] Linda A G, Smith G, Dong W. *Cell*, 1995, 80: 301 ~ 309