



曹生凯, 何磊, 黎妮, 王星, 于欢. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 3h-38 基因原核表达及转录、表达时相分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1113–1121.

烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 3h-38 基因原核表达及转录、表达时相分析

曹生凯^{1,2}, 何磊^{1,2}, 黎妮^{1,2}, 王星^{1,2*}, 于欢^{1,2*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学植物病虫害生物学与防治湖南省重点实验室, 长沙 410128)

摘要: 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 (*Heliothis virescens ascovirus 3h*, HvAV-3h) 作为一种极具生防潜力的环状双链 DNA 昆虫病毒, 自被分离后, 对其基因的特性和相关蛋白功能研究从未间断。本研究通过生物信息学预测 3H-38 蛋白序列发现其 131~150 氨基酸位置有一段由胞外向胞内的跨膜区序列, N 端 23~121 氨基酸位置有一个 BRO 家族结构域, 和其同源蛋白的序列对比发现 3H-38 与烟芽夜蛾囊泡病毒 3i 株 (*Heliothis virescens ascovirus 3i*, HvAV-3i) 和烟芽夜蛾囊泡病毒 3j 株 (*Heliothis virescens ascovirus 3j*, HvAV-3j) 编码的同源蛋白 3I-40 和 3J-43 相似性高达 85% 以上。进一步通过 RT-PCR 克隆、构建 pET-28a-38 原核表达载体、IPTG 诱导表达、Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化蛋白等方法获得了 His-tag 融合的 3H-38 重组蛋白, 并制备了该蛋白的兔多克隆抗体。通过检测 3h-38 基因在 HvAV-3h 感染的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 幼虫中的转录和表达时相, 本研究发现 3h-38 从感染后 3 h 开始转录, 从感染后 36 h 开始表达, 即 3h-38 是一个早期转录、晚期表达的基因。3h-38 基因的生物学信息分析和转录表达时相检测为进一步研究该蛋白的功能和特性奠定了基础。

关键词: HvAV-3h; 原核表达; 多克隆抗体; 转录时相; 表达时相

中图分类号: Q963; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1113-09

Prokaryotic expression and transcription analysis of *Heliothis virescens ascovirus 3h* encoded 3h-38 gene

CAO Sheng-Kai^{1,2}, HE Lei^{1,2}, LI Ni^{1,2}, WANG Xing^{1,2*}, YU Huan^{1,2*} (1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: As a large double stranded DNA insect virus, *Heliothis virescens ascovirus 3h* (HvAV-3h) has high potential to develop into biological control agent, and the studies on the gene characteristics and related protein functions of HvAV-3h has been carried on since it was isolated. In this study, the putative protein sequence of 3H-38 was predicted to contain a transmembrane region and a bro family domain (23~121 amino acid in the N-terminal). Compared with the homologous proteins in other ascovirus isolates, a high identity above 85% was found between 3H-38 and 3I-40 (encoded by HvAV-3i) and 3J-43 (encoded by HvAV-3j). Besides, RT-PCR, construction of pET-28a-38 vector, induction by IPTG, and purification of Ni²⁺-NTA affinity chromatography column was employed to obtain the His-tag

基金项目: 国家自然科学基金 (32070168)

作者简介: 曹生凯, 1998 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病毒分子生物学, E-mail: caoshengk@163.com

* 共同通讯作者 Author for correspondence: 王星, 博士, 教授, 研究方向为重要害虫生物防治, E-mail: wangxing@hunau.edu.cn;

于欢, 博士, 研究方向为昆虫病毒分子生物学, E-mail: huanyu@hunau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-06-20; 接受日期 Accepted: 2021-08-06

fused 3H-38, followed by rabbit polyclonal antibody preparation. The transcription and expression phase detection of 3h-38 gene in *Spodoptera exigua* (Hübner) larvae infected by HvAV-3h were analyzed, and the results showed that 3h-38 was started to transcribe from 3 hpi (hours post infection), but started to express from 36 hpi. The results indicated that 3h-38 was an early transcriptional gene but a late expressional protein. The analysis of the biological information and the detection of transcription and expression phase of 3h-38 gene laid a foundation for further study on the function and characteristics of the protein.

Key words: HvAV-3h; prokaryotic expression; polyclonal antibody; transcription analysis; expression analysis

囊泡病毒是一种环状双链 DNA 昆虫病毒, 因其在感毒感染的昆虫血淋巴内形成包裹着许多病毒粒子的大型囊泡而得名 (Federici & Govindarajan, 1990; Asgari *et al.*, 2007)。囊泡病毒的病毒粒子呈棒状、囊状或卵圆形, 长度约为 200 ~ 400 nm, 直径约为 130 nm (Federici *et al.*, 1990; Asgari *et al.*, 2017)。它们在鳞翅目宿主之间传播的方式主要通过膜翅目寄生蜂的产卵行为机械传播 (Govindarajan *et al.*, 1990)。宿主感病之后表现出明显的急致病性、慢致死性的症状, 被感染后的幼虫食量急剧减少, 生长发育缓慢, 且无明显的暴食期 (Carner *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016; 刘航等, 2020)。囊泡病毒感染所致最为典型的症状为宿主幼虫的血淋巴颜色会由澄清变为浑浊的奶白色 (Govindarajan *et al.*, 1990; Bideshi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012a)。根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 的报道, 囊泡病毒包含两个属: 分别是囊泡病毒属 *Ascovirus* 和图尔病毒属 *Toursvirus*; 其中囊泡病毒属包括草地贪夜蛾囊泡病毒 1 (*Spodoptera frugiperda ascovirus* 1, SfAV-1)、粉纹夜蛾囊泡病毒 6 (*Trichoplusia ni ascovirus* 6, TnAV-6) 和烟芽夜蛾囊泡病毒 3 (*Heliothis virescens ascovirus* 3, HvAV-3); 图尔病毒属主要包括双美缘姬蜂图尔病毒 1 (*Diadromus puchellus toursvirus* 1, DpTV-1) 和枣瘿蚊图尔病毒 2 (*Dasineura jujubifolia toursvirus* 2, DjTV-2) (Asgari *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020)。

烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 (*Heliothis virescens ascovirus* 3h, HvAV-3h) 于 2012 年由本实验室分离获得, 并在 2017 年完成了全基因组测序, 基因组全长 190 519 bp, G + C 含量为 45.5%, 预测编码

185 个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 主要对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 等具有高致病性 (Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017)。在细胞水平上, 囊泡病毒的感染过程是类似细胞凋亡 (Apoptosis-like) 的病理反应, 即宿主细胞会随着囊泡病毒的感染和复制, 出现类似细胞凋亡的形态特征, 当细胞进入感染后期, 大量含有病毒粒子的囊泡会随着类凋亡小体的形成被释放到血淋巴中 (Bideshi *et al.*, 2005; Bideshi *et al.*, 2006)。这种在细胞水平上囊泡病毒所展现出来的特殊的致病现象提示囊泡病毒具有特殊的致病机制, 同时也敦促着我们对囊泡病毒基因功能进行更深入的研究, 从而为囊泡病毒特殊致病性和致病历程的探明奠定基础。

本研究针对 HvAV-3h 的一个基因 (3h-38) 进行了初步的功能分析, 通过制备的特异性多克隆抗体对其在 HvAV-3h 感染甜菜夜蛾后的转录和表达时相进行了检测。获得的结果为进一步深入研究 3H-38 在病毒侵染中的具体功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 昆虫饲养和 HvAV-3h 扩繁

甜菜夜蛾幼虫由本实验室采用人工饲料饲喂, 人工饲料具体配置方法及饲养条件参考 Li 等 (2013) 和 Hu 等 (2016) 报道的方法 (Li *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016)。

HvAV-3h 株按照本实验室 Li 等 (2013) 报道的方法扩繁和保存。幼虫生长至 3 龄时 (蜕皮 12 ~ 24 h 内), 用微型针平行针刺健康的 3 龄甜菜

夜蛾幼虫的腹足, 收集感染幼虫的血淋巴作为含毒血淋巴, 同时收集未被病毒感染的幼虫血淋巴即无毒血淋巴作对照, 于 $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存备用 (Li *et al.*, 2013)。

1.2 3h-38 的序列分析

通过 NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 把 DNA 序列翻译成氨基酸序列, 使用 Expert Protein Analysis System 工具 (<http://expasy.org/tools/>) 推导 3h-38 基因编码蛋白质的相对分子量等理化性质。根据 Zhao 等 (2019) 报道的方法使用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 将 3H-38 序列与 GenBank 数据库中蛋白序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比较分析; Geneious 4.8.4 版本 (Biomatters Ltd)、DNAMAN (Lynnon corporation) 软件进行序列比对, 应用在线分析工具 Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白信号肽序列、TMP-red 在线分析软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对跨膜区、使用 Pfam 在线工具 (<http://pfam.xfam.org/search>) 对蛋白保守结构域进行预测分析 (Zhao *et al.*, 2019)。

1.3 3h-38 基因的克隆

取感染 HvAV-3h 后 72 h 的幼虫, 以 TRI Reagent[®] RNA/DNA/Protein Isolation Reagent (Molecular Research Center, USA) 提取虫体的总 RNA, 再根据 GoScript[™] Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) 反转录试剂盒 (Promega, USA) 的使用说明进行反转录 PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 将制备好的 cDNA 样品储存于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。根据 Huang 等报道的 HvAV-3h 基因组序列 (GenBank 登录号: KU170628.1) 及其对 HvAV-3h 各开放阅读框的预测, 设计 3h-38 的基因的编码区特异性引物 3h-38-F (5'-GAATTCATGCAGTCGACTGATTTATTT-3', 下划线部分为 EcoRI 酶切位点) 和 3h-38-R (5'-CTCGAGTTATGAGTGATTTATTGCATTAT-3', 下划线部分为 XhoI 酶切位点)。以制备的 cDNA 为模板, 使用 3h-38-F/3h-38-R 进行 PCR 扩增, 反应程序为 94°C 初始变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 进行 40 个扩增循环。扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳检测后利用 V-ELUTE Gel

Mini purification Kit (北京庄盟国际生物基因科技有限公司) 回收目的基因的 DNA 片段。回收后根据 pGEM-T Easy Vector System I 试剂盒使用说明 (普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司) 和克隆载体相连, 并将连接产物转化入 *Escherichia coli* TG1 感受态细胞中, 通过蓝白斑筛选和氨苄青霉素抗性筛选获得含重组质粒 (pGEM-T-38) 的阳性克隆菌株。克隆片段序列的准确性进一步通过测序确认 (擎科生物技术有限公司)。

1.4 原核表达载体的构建

采用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* (TaKaRa) 对构建好的 pGEM-T-38 和 pET-28a (+) 载体分别进行双酶切, 用凝胶回收试剂盒分别回收目的基因片段和载体片段; 回收产物采用 *T₄* DNA 连接酶 (目的基因片段和载体片段体积比为 5:3) 在 4°C 反应过夜; 通过热激转化法将连接产物转入 *E. coli* TG1 感受态细胞中, 向菌液中加入 1 mL 的 S. O. C. 培养基于 37°C , 200 rpm 震荡培养 45 min ~ 1 h; LB 固体培养基平板上经卡那霉素抗性筛选后挑取阳性克隆于 3 mL LB 液体培养基 (含卡那霉素 $50 \mu\text{g/mL}$) 中, 在 37°C , 200 rpm 震荡培养 10 ~ 12 h 后收集菌液, 利用 Fast Plasmid Minprep Kit (北京庄盟国际生物基因科技有限公司) 提取质粒; 再以 *EcoRI* 和 *XhoI* 对筛选获得的重载体质粒进行双酶切鉴定, 获得 3h-38 的原核表达载体 (pET-28a-38)。

1.5 重组质粒的表达及蛋白纯化

将 pET-28a-38 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经卡那霉素抗性筛选, 在 LB 固体培养基挑取阳性单菌落, 37°C , 200 rpm 培养过夜后提取质粒 DNA, 进行双酶切鉴定, 检测表达载体是否构建成功。取 $100 \mu\text{L}$ 培养物接种到具有相同组成的 3 mL LB 液体培养基中, 并在 37°C , 200 rpm 下生长约 2 ~ 3 h (直到 OD_{600} 达到 0.6 ~ 0.8)。通过加入 $3 \mu\text{L}$ 1 mM 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导目的基因的表达, 然后在 37°C , 200 rpm 条件下培养 12 h。取 1.5 mL 菌液, 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色检测菌体中目的蛋白的表达情况。当目的蛋白表达成功后, 利用超声波破碎细胞, 最后利用镍螯合亲和层析柱 (Ni^{2+} -NTA

Sefinose™ Resin Settled Resin) 纯化回收目的蛋白, 最后将纯化的目的蛋白送至中国武汉病毒研究所, 制备多克隆抗体。

1.6 转录分析

根据 1.1 所述的方法, 分别将含有 HvAV-3h 的血淋巴 (处理组) 和健康幼虫的血淋巴 (对照组) 接种至甜菜夜蛾 3 龄幼虫 (蜕皮后 12~24 h) 血腔内; 在 HvAV-3h 接种后的 3、6、12、24、48、72、96、120 和 168 h 收取试虫; 对照组仅收取健康血淋巴接种后 24 h 的虫体 (模拟接种, mock); 根据 TRI Reagent® RNA/DNA/Protein Isolation Reagent International Patents 试剂盒 (molecular research center, USA) 说明, 提取各处理幼虫的总 RNA, 根据 GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) 反转录试剂盒 (Promega, USA) 的使用说明制备各样品的 cDNA, 使用 3h-38-F/3h-38-R 特异性引物以及本实验保存的甘油醛-3-磷酸脱氢酶编码基因 (GAPDH) 特异性引物进行 40 个循环 (95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min) 的 PCR, 然后在 1% 琼脂糖凝胶上分析聚合酶链反应产物。

1.7 表达分析

在 1.5 的基础之上, 继续用提取总 RNA 的有机相按照操作说明书, 提取各样品的总蛋白; 向制备好的蛋白样品以 1/6 体积的比例加入 5 × Protein Loading Buffer (北京索莱宝), 沸水浴 13 min 后, 将制备好的蛋白样品上样于 12% 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 maker (PageRuler™ 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 His-Tag 3H-38 兔多抗 (Proteintech, CHN, 1:4 000) 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) 进行一抗孵育 (4℃ 过夜); 以 TBST 漂洗杂交膜 3 次, 每次 5 min, 随后以辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 (horseradish peroxidase (HRP) conjunct goat-anti-rabbit IgG) (购自陕西先锋生物技术有限公司) 作为二抗 (1:5 000), 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 ChemiDoc™ XRS + 成像仪 (BIO-RAD, USA) 下拍摄免疫印迹反应条带的图像。针刺模拟感染的幼虫用作对照, GAPDH 用作内参蛋白 (Yu *et al.*, 2018)。

2 结果与分析

2.1 3h-38 的序列分析

3h-38 由 1 080 个碱基对 (base pair, bp) 组成, 预测其编码一条由 360 个氨基酸残基组成的蛋白 (3H-38), 相对分子量约为 40.357 kDa, 等电点 (protein isoelectric point, pI) 为 7.63。根据 Net-Phos 预测出 N 端 23~121 氨基酸位置有一个 BRO 家族结构域, 应用 Signal P、TMP red 等工具分析推测的氨基酸序列未发现信号肽, 从 131~150 氨基酸位置有一段由胞外向胞内的跨膜区序列 (score: 568), 在 228~316 位置有一个未知功能的保守结构域 (DUF3627) (图 1)。同源蛋白氨基酸序列比对结果表明: 3H-38 与 HvAV-3j-43 (ORF43)、HvAV-3i-40 (ORF40) 相似性达到了 85% 以上, 和 HvAV-3e-39 (ORF39)、TnAV-6b-149 (ORF149) 的相似性达到了 75% 以上, 和 HvAV-3g-45 (ORF45)、SfAv-4a-79 (ORF79) 的相似性达到了 60% 以上, 此外和 TnAv-6a-137 (ORF137) 的相似性为 29.53%, 和 DpAv-4a-110 (ORF110) 的相似性最低, 为 19.09% (图 1)。

2.2 3h-38 的克隆和重组表达载体的鉴定

通过特异性引物扩增后, 得到了 1 080 bp 的目的片段 (图 2-A)。将重组的 pGEM-T-38 质粒通过对应的限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho*I 进行双酶切检测后, 泳道 2 除了一条约 3 015 bp 的载体片段外, 还有与目的基因大小一致的条带, 其大小为 1 080 bp (图 2-B)。将目的条带回收纯化后用于后续实验。

2.3 3H-38 原核表达和蛋白纯化

对获得的原核表达载体 pET-28a-38 双酶切检测后, 3 泳道除了 5 369 bp 的载体片段外, 还有和目的基因大小一致的条带 (图 3), 这表明重组表达载体构建成功, 可以进行后续的诱导纯化。

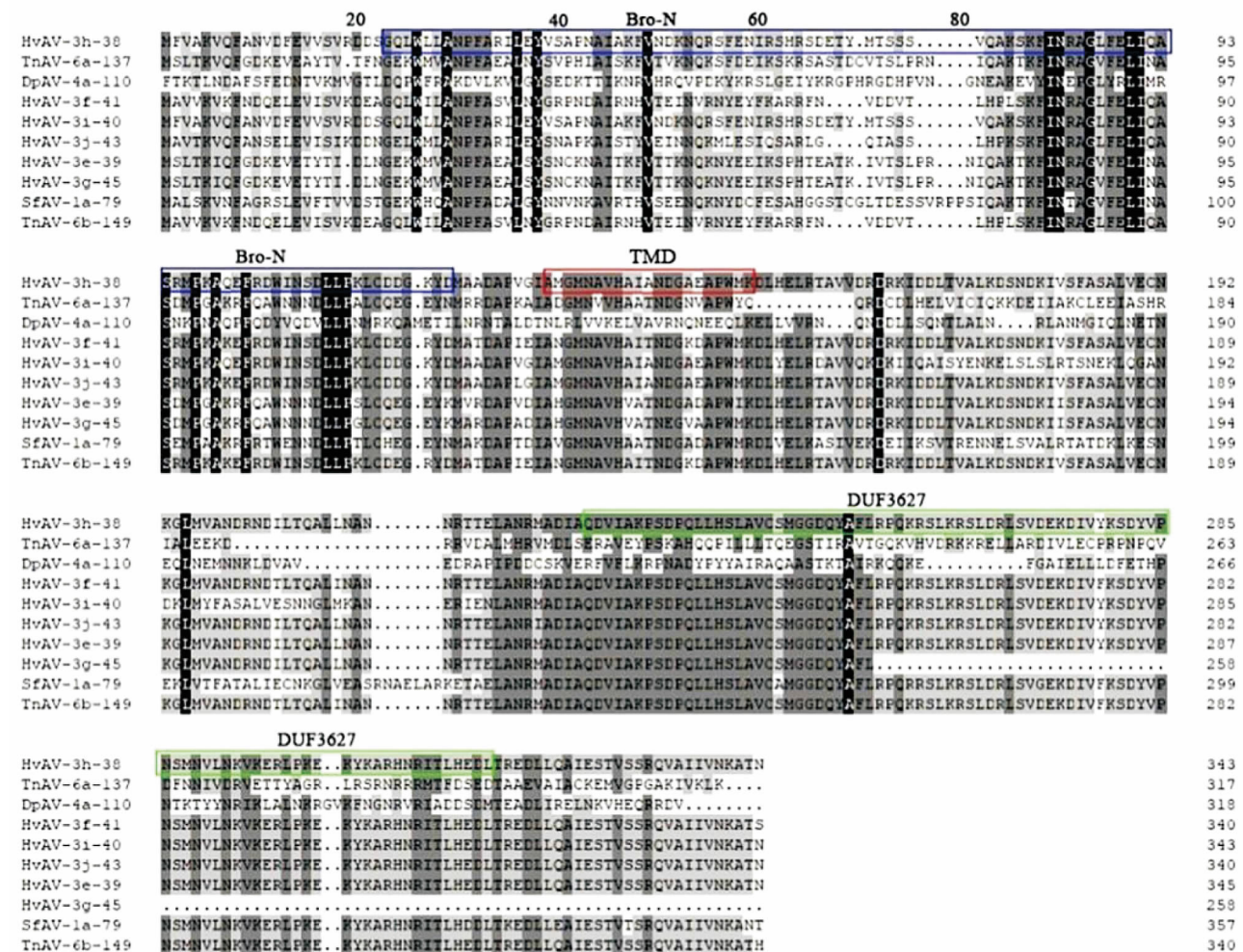


图 1 3H-38 与其同源蛋白的多重序列对比

Fig. 1 Multiple sequence alignment of 3H-38 and its homologues

注: 右边的数字表示不同序列的氨基酸位置; 黑色, 100% 相似性; 深灰色, 75% 相似性; 浅灰色, 50% 相似性; 蓝色方框标注 BRO 家族结构域; 红色方框标注跨膜区 (TMD); 绿色方框标注未知功能的结构域 (DUF3627); 在 GenBank 中的登录号为 HvAV-3h-38: AYD68167.1; TnAv-6a-137: YP_803360.1; DpAv-4a-110: YP_009640098.1; HvAV-3f-41: YP_009701507.1; HvAV-3i-40: AXN77223.1; HvAV-3j-43: BBB16513.1; HvAV-3e-39: YP_001110892.1; HvAV-3g-45: YP_009702038.1; SfAV-1a-79: YP_762434.1; TnAV-6b-149: AUS94248.1. Note: Numbers on the right showed the amino acid position of different sequences; Black shading: 100% identity; Dark grey shading: 75% identity; Light grey shading: 50% identity; Blue box: BRO N-terminal domain; Red box: transmembrane domain (TMD); Green box: domain of unknown function (DUF3627); GenBank accession numbers: HvAV-3h-38: AYD68167.1; TnAv-6a-137: YP_803360.1; DpAv-4a-110: YP_009640098.1; HvAV-3f-41: YP_009701507.1; HvAV-3i-40: AXN77223.1; HvAV-3j-43: BBB16513.1; HvAV-3e-39: YP_001110892.1; HvAV-3g-45: YP_009702038.1; SfAV-1a-79: YP_762434.1; TnAV-6b-149: AUS94248.1.

通过 IPTG 诱导后, 3h-38 自身可以表达 40.35 kDa 的蛋白, 而由于 pET-28a 载体自身可以表达出大约 3.7 kDa 的标签蛋白, 故预测 3h-38 可表达 44 kDa 的蛋白。结果表明含有 pET-28a-38 的 BL21 (DE3) 全菌裂解产物有可溶性的蛋白 (泳道 2), 超声破碎后的上清中不存在 3H-38 的可溶性蛋白 (泳道 3), 超声破碎后被 8 M 胍溶液溶解的包涵体中存在可溶性的蛋白 (泳道 4), 这说明

重组蛋白都变成包涵体溶解于 8 M 的胍溶液中。用不同 pH 的 8 M 胍溶液对目的蛋白进行洗脱 (泳道 5~14), 3H-38 蛋白首先从 pH 5.9 的胍溶液被洗脱出来 (泳道 9), 在 10~14 泳道都检测到被洗脱的可溶性蛋白。最终选取从 Buffer D (pH 5.9) (泳道 10, 黑色箭头标注) 洗脱出的蛋白, 将其浓度调到 1 $\mu\text{g/mL}$ 用于制备多克隆抗体 (图 4)。

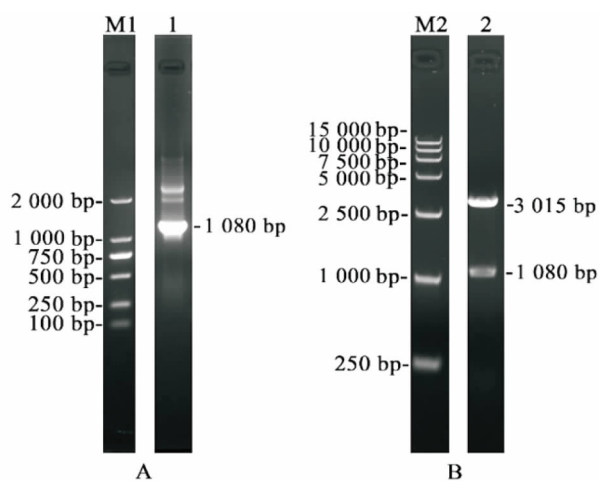


图2 目的基因的PCR扩增及pGEM-T-38酶切鉴定

Fig. 2 PCR amplification of 3h-38 and enzyme digestion identification of pGEM-T-38

注: A, 3h-38 的PCR扩增; B, pGEM-T-38 载体的双酶切鉴定 (*EcoRI* 和 *XhoI*)。泳道 M1, DNA ladder 2 000 (TaKaRa); 泳道 1, 3h-38 的PCR扩增产物; 泳道 M2, DNA ladder 15 000 (TaKaRa); 泳道 2, pGEM-T-38 质粒由 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后的产物。Note: A, PCR amplification of 3h-38; B, Confirmation of pGEM-T-38 by double restriction endonuclease digestion (*EcoRI* and *XhoI*). Lane M1, DNA ladder 2 000 (TaKaRa); Lane 1, PCR products of 3h-38; Lane M2, DNA ladder 15 000 (TaKaRa); Lane 2, *EcoRI* and *XhoI* digestion diagram products of pGEM-T-38 vectors.

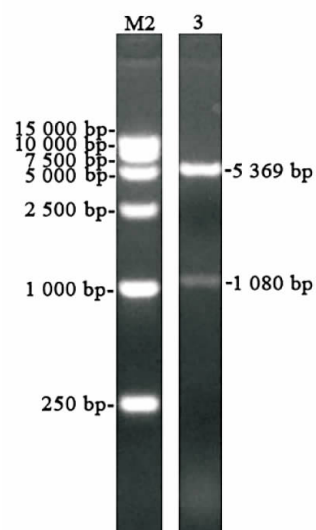


图3 pET-28a-38 双酶切鉴定

Fig. 3 Confirmation of pET-28a-38 by double restriction endonuclease digestion

注: 泳道 M2, DNA ladder 15 000 (TaKaRa); 泳道 3, pET-28a-38 质粒由 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后的产物。Note: Lane M2, DNA ladder 15 000 (TaKaRa); Lane 3, *EcoRI* and *XhoI* digestion diagram products of pET-28a-38 vectors.

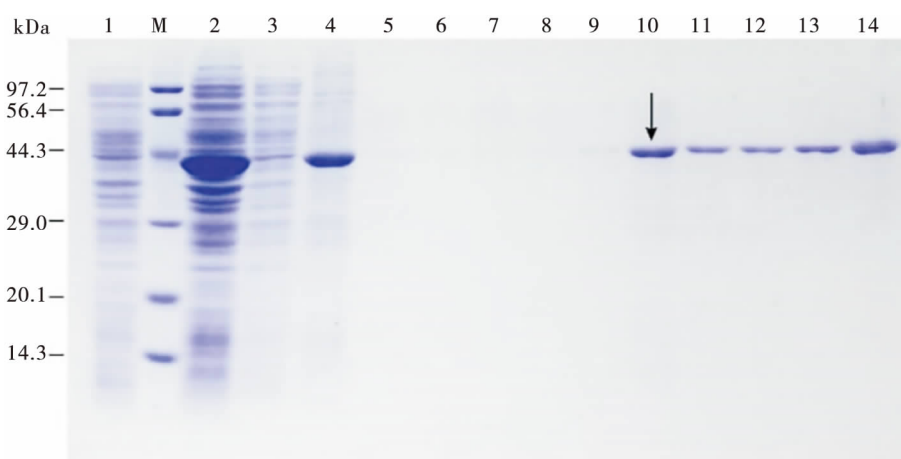


图4 3H-38 的表达纯化

Fig. 4 Expression and purification of 3H-38

注: 泳道 M, Premixed protein Marker (Low) (TaKaRa); 泳道 1, BL21 (DE3) 裂解产物; 泳道 2, 含有 pET-28a-38 的 BL21 (DE3) 裂解产物; 泳道 3, 含有 pET-28a-38 的 BL21 (DE3) 破碎后的上清; 泳道 4, 含有 pET-28a-38 的 BL21 (DE3) 超声破碎后被 8 M 脲溶解的包涵体; 泳道 5, Buffer B (8 M 脲, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 8.0) 洗脱液; 泳道 6~8, Buffer C (8 M 脲, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 6.3) 洗脱液; 泳道 9~11, Buffer D (8 M 脲, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 5.9) 洗脱液; 泳道 12~13, Buffer E (8 M 脲, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 4.5) 洗脱液; 泳道 14, BL21 (DE3) Buffer F (8 M 脲, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 3.9) 洗脱液。Note: Lane M, Premixed protein Marker (Low) (TaKaRa); Lane 1, Soluble cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3); Lane 2, Soluble cell lysate of pET-28a-38 transformed BL21 (DE3); Lane 3, Supernatant of scaled induced pET-28a-38 produced by ultrasonic destroyed; Lane 4, Dissolved pET-28a-38 inclusion bodies with 8 M urea; Lane 5, Buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 Cl, 0.01 M Tris-Cl, pH 8.0) wash-out elution; Lane 6~8, Buffer C (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 Cl, 0.01 M Tris-Cl, pH 6.3) wash-out elution; Lane 9~11, Buffer D (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 Cl, 0.01 M Tris-Cl, pH 5.9) wash-out elution; Lane 12~13, Buffer E (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 Cl, 0.01 M Tris-Cl, pH 4.5) wash-out elution; Lane 14, Buffer F (8 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 Cl, 0.01 M Tris-Cl, pH 3.9) wash-out elution.

2.4 3h-38 在甜菜夜蛾体内的转录、表达分析

为了确定 3h-38 是否在甜菜夜蛾体内被转录, 从模拟感染和 HvAV-3h 感染后不同时间点的甜菜夜蛾幼虫体内提取总 RNA 进行 RT-PCR 分析, RT-PCR 结果显示对照组未检测到明显的单一条带, 3h-38 在模拟感染的甜菜夜蛾幼虫体内无转录, 处理组在感染 3 h (hour post infection, hpi) 时检测到单一的条带 (大小约为 0.6 kb), 该条带到 168 hpi 仍可检测到, 这些结果表明 3h-38 基因是一个在甜菜夜蛾体内早期转录的基因 (图 5)。

使用抗 3H-38 特异性兔抗血清进行 Western blotting 检测, 结果显示 3H-38 蛋白首先在 36 hpi 检测到, 到 168 hpi 仍然可检测到, 其大小约 40 kDa, 和预期大小相符, 表明 3H-38 蛋白质在转录翻译后没有发生重大的修饰, 在模拟感染的幼虫体内未检测到 3H-38 的表达。GAPDH 作为内参抗体在每个时间段都能够检测到 (图 6)。

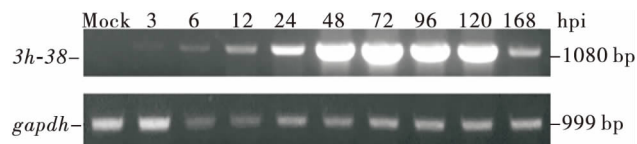


图 5 HvAV-3h 感染的甜菜夜蛾幼虫中 3h-38 转录分析

Fig. 5 Transcription analysis of 3h-38 in HvAV-3h infected *Spodoptera exigua* (Hübner) larvae

注: 在感染 HvAV-3h 3、6、12、24、48、72、96、120 和 168 hpi 的甜菜夜蛾幼虫以及针刺模拟感染的健康幼虫中提取总 RNA, 进行 PCR 后在 1% 琼脂糖凝胶中通过电泳分析扩增产物; *gapdh* 为内参对照。Note: Total RNA was extracted from HvAV-3h infected *S. exigua* larvae at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 168 hpi and in mock-infected larvae; PCR was performed, and the amplification products were subsequently analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel; *gapdh* was an internal loading control.

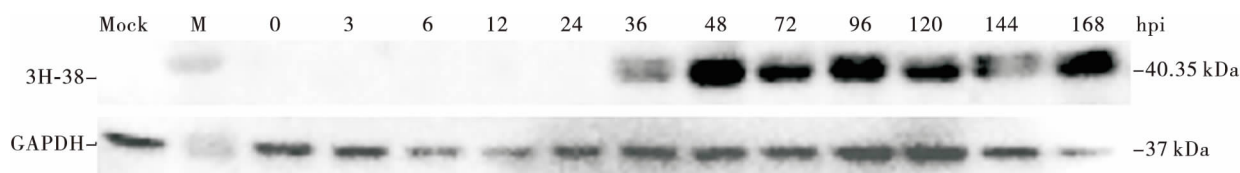


图 6 HvAV-3h 感染的甜菜夜蛾幼虫中 3H-38 表达分析

Fig. 6 Expression analysis of 3H-38 in HvAV-3h infected *Spodoptera exigua* (Hübner) larvae

注: 泳道 M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA); 收取感染 HvAV-3h 0 ~ 168 hpi 的甜菜夜蛾幼虫以及针刺模拟感染的健康幼虫全蛋白质样品, 通过 12% SDS-PAGE 分离, 转移至 NC 膜上, 并与抗结构蛋白多克隆抗血清反应; 针刺模拟感染的幼虫全蛋白和 GAPDH 作对照。Note: Lane M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA); Protein samples were harvested from 0 to 168 hpi, separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and reacted with anti-structural proteins polyclonal antiserum; Mock-infected larvae and GAPDH were used as controls.

3 结论与讨论

本研究对 3H-38 蛋白序列进行了分析, 发现 3H-38 与 HvAV-3j-43 (ORF43)、HvAV-3i-40 (ORF40) 相似性达到了 85% 以上。在线分析显示 3H-38 蛋白 N 端有一个未知功能的序列 (DUF3627), N 端 23 ~ 121 氨基酸位置有一个 BRO 家族结构域。虽然 3H-38 的 N 端被预测到含有一个 *bro* 基因家族结构域, 但是其作用和功能还是未知的。在杆状病毒中, 家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV) 可以编码 5 个 *bro* 基因, 而其指导编码的 BRO 蛋白在病毒感染抑制宿主 mRNA 翻译方面有一定的作用,

其 N 端氨基酸序列还有核输出信号的作用 (Kang *et al.*, 2006; Kotani *et al.*, 2015)。此外, 蛋白结构分析还表明 3H-38 在 131 ~ 150 氨基酸位置有一段由胞外向胞内的跨膜区序列, 在鼠肝炎病毒 (*Murine hepatitis virus*, MHV) S 蛋白中也存在一段由胞外向胞内的跨膜区, 进一步研究发现这段跨膜区和病毒颗粒的装配有关, 也具有病毒膜融合的功能 (Ye *et al.*, 2004)。这也提示着 3H-38 蛋白在病毒感染宿主过程也具有类似复杂功能。

本研究还检测了 3h-38 基因在感染 HvAV-3h 甜菜夜蛾体内的转录本, 结果显示 3h-38 基因 3 hpi 开始在甜菜夜蛾体内转录, 而其编码的蛋白在 36 hpi 开始表达。Kang 等人表征了 BmNPV 的 5 个 *bro* 基因 (*bro-a*、*bro-b*、*bro-c*、*bro-d*、*bro-e*)

转录发生在感染后 2 ~ 4 h (Kang *et al.*, 1999), 略早于 3H-38 基因的转录起始时间。3H-38 的表达始于感染后 36 h, 较 3h-38 转录的起始时间相比, 有 30 h 以上的延后 (图 5-6)。虽然病毒基因的表达较转录有所推迟在其他报道中也有出现, 如董战旗等分析 *lef-11* 基因及其编码蛋白质在 BmNPV 侵染的家蚕卵巢培养细胞 BmN 中的转录与表达时相, 发现 *lef-11* 从侵染后 6 h 开始转录, 蛋白质从侵染后 12 h 开始持续表达 (董战旗等, 2016); 张楠等分析苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) *bro* 基因的转录和表达时相中也有表明 AcMNPV 的 *ac-bro* 基因在感染后 6 h 开始转录, 在 8 h 检测到表达 (张楠等, 2016), 但这些延迟远没有 3h-38 明显。在已报道的 HvAV-3h 的结构蛋白 3H-117 和 3H-21 的表达相对转录的起始分别延迟了 16 h 和 24 h, 虽比本研究中 3H-38 的延迟短, 但也明显比杆状病毒功能基因中的延迟更明显, 这可能与囊泡病毒自身的特殊性相关 (Zhao *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020)

本研究利用生物信息学技术分析了 3H-38 蛋白的结构, 检测了 3h-38 基因在感染 HvAV-3h 甜菜夜蛾幼虫体内的转录水平和其编码蛋白的表达时相, 展示了 HvAV-3h 的 3H-38 蛋白的转录和表达特性, 为后续阐述 3H-38 功能、解明 HvAV-3h 的致病机制提供基础数据。

参考文献 (References)

- Asgari S, Davis J, Wood D, *et al.* Sequence and organization of the *Heliothis virescens ascovirus* genome [J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88 (4): 1120 – 1132.
- Asgrain S, Bideshi D, Bigot Y, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Ascoviridae* [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98 (1): 4 – 5.
- Arai E, Ishii K, Ishii H, *et al.* An ascovirus isolated from *Spodoptera litura* (Noctuidae: Lepidoptera) transmitted by the generalist endoparasitoid *Meteorus pulchricornis* (Braconidae: Hymenoptera) [J]. *Journal of General Virology*, 2018, 99 (4): 574 – 584.
- Bideshi DK, Tan YP, Bigot Y, *et al.* A viral caspase contributes to modified apoptosis for virus transmission [J]. *Genes & Development*, 2005, 19 (12): 1416 – 1421.
- Bideshi DK, Demattei MV, Rouleux – Bonnin F, *et al.* Genomic sequence of *Spodoptera frugiperda ascovirus 1a*, an enveloped, double – stranded DNA insect virus that manipulates apoptosis for viral reproduction [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80 (23): 11791 – 11805.
- Boenisch T. Pretreatment for immunohistochemical staining simplified [J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2007, 15 (2): 208 – 212.
- Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, *et al.* Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (17): 9797 – 9802.
- Carner GR, Hudson JS. Histopathology of virus-like particles in *Heliothis* spp. [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1983, 41 (2): 238 – 249.
- Dong ZQ, Hu N, Chen TT, *et al.* Expression characterization of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus lef-11* gene in the virus-infected host cells [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 (2): 274 – 280. [董战旗, 胡楠, 陈婷婷, 等. 家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) *lef-11* 基因在病毒感染宿主细胞中的表达特征 [J]. 蚕业科学, 2016, 42 (2): 274 – 280]
- Federici BA, Vlak JM, Hamm JJ. Comparative study of virion structure, protein composition and genomic DNA of three ascovirus isolates [J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71 (8): 1661 – 1668.
- Federici BA, Govindarajan R. Comparative histopathology of three ascovirus isolates in larval noctuids [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990, 56 (3): 300 – 311.
- Govindarajan R, Federici BA. *Ascovirus* infectivity and effects of infection on the growth and development of noctuid larvae [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990, 56 (3): 291 – 299.
- Huang GH, Garretson TA, Cheng XH, *et al.* Phylogenetic position and replication kinetics of *Heliothis virescens ascovirus 3h* (HvAV-3h) isolated from *Spodoptera exigua* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (7): e40225.
- Huang GH, Hou DH, Wang ML, *et al.* Genome analysis of *Heliothis virescens ascovirus 3h* isolated from China [J]. *Virologica Sinica*, 2017, 32 (2): 147 – 154.
- Hu J, Wang X, Zhang Y, *et al.* Characterization and growing development of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by *Heliothis virescens ascovirus 3h* (HvAV-3h) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 109 (5): 2020 – 2026.
- Kang WK, Kurihara M, Matsumoto S. The BRO proteins of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* are nucleocytoplasmic shuttling proteins that utilize the CRM1 – mediated nuclear export pathway [J]. *Virology*, 2006, 350 (1): 184 – 191.
- Kotani E, Muto S, Ijiri H, *et al.* *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* nucleic acid binding proteins BRO – B and BRO – E associate with host T – cell intracellular antigen 1 homologue BmTRN – 1 to influence protein synthesis during infection [J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96 (7): 1947 – 1956.
- Li SJ, Wang X, Zhou ZS, *et al.* A comparison of growth and development of three major agricultural insect pests infected with *Heliothis virescens ascovirus 3h* (HvAV – 3h) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (12): e85704.
- Liu H, Liao YX, Chen ZM, *et al.* Infection characteristics of *Heliothis virescens ascovirus 3h* (HvAV – 3h) in *Spodoptera frugiperda* larvae and its effects on host growth and development [J]. *Journal of*

- Plant Protection*, 2020, 47 (4): 875–883. [刘航, 廖用信, 陈壮美, 等. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株对草地贪夜蛾幼虫的感染特性及对其生长发育的影响 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (4): 875–883]
- Stasiak K, Renault S, Federici B A, *et al.* Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51 (2): 103–115.
- Wang LH, Xue JL, Seaborn CP, *et al.* Sequence and organization of the *Trichoplusia ni* ascovirus 2c (*Ascoviridae*) genome [J]. *Virology*, 2006, 354 (1): 167–177.
- Wang J, Yang ML, Xiao HB *et al.* Genome analysis of *Dasineura jujubifolia* toursvirus 2, a novel ascovirus [J]. *Virologica Sinica*, 2020, 35 (2): 134–142.
- Yu H, He L, Ou-Yang YY, *et al.* Preparation and molecular characterization of a polyclonal antibody as an efficient cutworm reference protein [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2018, 21 (3): 786–792.
- Ye R, Montalto – Morrison C, Masters PS. Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: Distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (18): 9904–9917.
- Zhao Y, Yu H, He L, *et al.* 3H-117, a structural protein of *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h) [J]. *Virus Genes*, 2019, 55 (5): 688–695.
- Zhang N, Ge J, Zhou ZQ, *et al.* Expression of function of AcMNPV bro gene [J]. *Journal of Fudan University (Nature Science)*, 2016, 55 (1): 128–132. [张楠, 葛晶, 周子谦, 等. AcMNPV bro 基因的表达和作用研究 [J]. 复旦学报 (自然科学版), 2016, 55 (1): 128–132]
- Zou JC, Yang Y, Yang YZ *et al.* Research progresses on *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2016, 32 (6): 800–806. [邹金城, 杨勇, 杨益众, 等. 斜纹夜蛾核型多角体病毒研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32 (6): 800–806]
- Zhao Y, Yu H, Li N, *et al.* Characterization of *Heliothis virescens* ascovirus 3h *orf21* that encodes a virion protein [J]. *Journal of Applied Virology*, 2020, 8 (4): 59–70.