



hsc70-4 基因促进家蚕核型多角体病毒复制增殖

陈鹏^{1,2}, 包希艳¹, 董战旗¹, 康涛涛¹, 朱艳¹, 潘敏慧^{1,2}, 鲁成^{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

摘要:【目的】热休克应答(heat shock response, HSR)是机体细胞应对环境压力的一种重要防御策略, 鉴定热休克蛋白在杆状病毒侵染宿主过程中的功能, 并揭示其作用的分子机制, 为探明宿主与病毒相互作用的分子基础提供理论依据。【方法】通过分子克隆技术对 *Bmhsc70-4* 基因进行克隆, 并利用 BioEdit 及 GeneDoc 对其进行多序列比对分析; 分别通过真核表达和基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑系统对 *Bmhsc70-4* 基因进行过表达和敲除; 利用荧光定量 PCR 技术检测相应基因的表达量; 通过对 Caspase-9 和 Caspase-3/7 活性的检测确定 *Bmhsc70-4* 基因对细胞凋亡的影响; 通过免疫荧光验证 BmHSC70-4 和 BmIAP 的共定位情况, 并进一步通过免疫共沉淀验证它们的相互作用。【结果】*Bmhsc70-4* 基因开放阅读框为 1950 bp, 编码 649 个氨基酸, 在昆虫间具有较高的保守性; BmNPV 能够诱导 *Bmhsc70-4* 基因上调表达, 过表达 *Bmhsc70-4* 基因能够促进 BmNPV 的增殖, 敲除 *Bmhsc70-4* 基因能够抑制 BmNPV 的增殖, 表明 *Bmhsc70-4* 基因的表达利于 BmNPV 的增殖; *Bmhsc70-4* 基因具有抑制家蚕细胞凋亡的功能; 荧光共定位显示 BmHSC70-4 和 BmIAP 共定位于细胞质中, 免疫共沉淀结果表明两者可以相互作用; BmNPV 侵染过程中 *Bmhsc70-4* 基因能够促进 *Bmiap* 基因的表达。【结论】*Bmhsc70-4* 基因具有抑制家蚕细胞凋亡的功能, 在 BmNPV 侵染家蚕细胞过程中, 能够与 BmIAP 相互作用, 并促进 BmNPV 复制增殖。

关键词: 家蚕, BmNPV, 热休克应答, 细胞凋亡, *Bmhsc70-4*, *Bmiap*

杆状病毒(baculovirus)是一类双链环状 DNA (80–180 kb)病毒, 专门寄生于无脊椎动物, 其宿主主要是鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)和膜翅目(Hymenoptera)昆虫^[1–2]。对于一

个有效的感染过程而言, 杆状病毒需要挟持并利用宿主细胞的多种结构及分子通路, 如细胞凋亡、DNA 损伤应答等^[3–4]。研究表明, 在宿主与病毒的长期“斗争”中, 宿主同样能够通过一系列的免疫

基金项目: 国家自然科学基金(31602009, 31572466); 中央高校基本科研业务费(SWU116066); 现代农业产业技术体系(CARS-18)

*通信作者。Tel: +86-23-68251812; E-mail: lucheng@swu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-29; 修回日期: 2018-11-29; 网络出版日期: 2019-02-18

反应来阻滞病毒的复制增殖, 如热休克应答、细胞凋亡等^[5-6]。尽管目前对病毒与宿主的相互作用研究已经取得了丰硕的成果^[7-8], 然而相对于对病毒的了解来说, 对宿主在感染病毒后的应答机制的理解仍很匮乏。

家蚕(*Bombyx mori*)是重要的经济昆虫, 而蚕病的危害一直是制约蚕业发展的重要因素, 其中尤以家蚕血液型脓病为主。作为家蚕重大病害脓病的病原, 家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)属于杆状病毒的一种, 长期受到研究者们的关注, 且对杆状病毒的研究亦发端于家蚕脓病。随着研究的逐渐深入, 已经获得了一些与 BmNPV 侵染相关的宿主基因, 如脂肪酶(*Bmlipase-1*)、丝氨酸蛋白酶(*serine protease*)、*caspase-1*、*BmREEPa*、*BmAtlastin-n* 等^[9-12]。近期我们还发现, 杆状病毒可以通过 LEF-11 劫持宿主的 ATP 酶 ATAD3A 以促进自身的复制增殖^[13]。尽管作为参与免疫应答过程的热休克蛋白(heat shock protein, HSP)被报道参与了 BmNPV 侵染家蚕细胞的过程^[14], 然而对于功能强大的热休克蛋白来说, 对其具体作用机制的解析是很必要的。先前的研究表明草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的热休克蛋白 *hsc70* 基因(*Heat shock cognate 70*) 在苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)感染后表达量会上调^[15-16], 家蚕 *hsc70* 基因的表达在感染 BmNPV 后也会增强^[14], 说明 *hsc70* 基因可能参与了 NPV 感染宿主的过程。同时, 最近有研究表明家蚕 *hsc70-4* 基因(*Heat shock cognate 70-4*)也参与了 BmNPV 的侵染过程^[17], 但其作用机制并不清楚。

本研究以家蚕热休克蛋白 HSC70-4 为研究对

象, 探究其在 BmNPV 侵染家蚕细胞过程中的功能及调控机制, 可望为探明宿主与病毒相互作用的分子基础提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕卵巢细胞系(BmN-SWU1)和重组 BmNPV 病毒(v39K^{pm}-EGFP)均由本实验室构建和保存。

1.2 基因序列分析

使用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)在线 BLAST 程序比对, 并从数据库中下载相应的蛋白质序列。利用 BioEdit 软件进行多序列比对, 并将结果通过 GeneDoc 软件输出。

1.3 细胞培养和转染

在 27 °C 条件下, 用含 10% (V/V)胎牛血清的 TC-100 昆虫培养基恒温培养家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1。细胞转染试剂为 tremeGENE HP DNA Transfection Reagent(Roche), 细胞转染操作按说明书进行。

1.4 载体构建

依据已知的序列信息设计目的基因的相应引物, 其中用于构建过表达载体的引物添加相应标签序列(表 1)。pIZ/V5-His 载体用于构建基因过表达质粒, 本小组前期构建的 CRISPR/Cas9 转基因敲除载体^[18]用于构建基因敲除质粒。

1.5 紫外诱导细胞凋亡

将转染目的质粒的细胞培养 48 h 后, 吸除培养基, 在紫外灯(8 W)下 15 cm 处照射 4 min, 添加培养基, 继续培养 24 h, 用于后续分析。

表 1. 本试验所用引物
Table 1. Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
pIZ/V5-HA- <i>Bmhsc70-4</i> -F	CCGCTCGAGATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGCAAAAGCACCCGC
pIZ/V5-HA- <i>Bmhsc70-4</i> -R	CTAGTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAATCGACCTCCTCGATGGT
pIZ/V5-Flag- <i>Bmiap</i> -F	CGCGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGAGTTGACGAAAAGTTGCTA
pIZ/V5-Flag- <i>Bmiap</i> -R	CCGCTCGAGTCACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCCGAGAAGTAGAGCCGCACCGCA
Knockdown- <i>Bmhsc70-4</i> -F	AAGTGAAACTGCCGAAGCTTATCT
Knockdown- <i>Bmhsc70-4</i> -R	AAACAGATAAGCTTCGGCAGTTTC
<i>Bmiap</i> -qRT-PCR-F	CCTTAGTGACTCCTGCTTTACGAA
<i>Bmiap</i> -qRT-PCR-R	TAGAACTTGCAAATGGCTTGTG
<i>Bmhsc70-4</i> -qRT-PCR-F	GGCTTACGAAAATGAAGGAAACT
<i>Bmhsc70-4</i> -qRT-PCR-R	GCATCTTTTGTGGCTTGTCTTT
<i>vp39</i> -qRT-PCR-F	CTAATGCCCGTGGGTATGG
<i>vp39</i> -qRT-PCR-R	TTGATGAGGTGGCTGTTGC
sw22934-qRT-PCR-F	TTCGTAAGGCTCTTCTCGT
sw22934-qRT-PCR-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCT

1.6 Caspase 活性检测

Caspase 活性检测利用 Caspase-Glo9 和 Caspase-Glo3/7 试剂盒(Promega)进行,每孔加 100 μ L Caspase-Glo9 或 3/7 工作液,每个样品重复 3 次,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,然后使用多荧光酶标仪检测 Caspase-9 和 3/7 的活性。

1.7 免疫荧光检测

在室温条件下用 PBS 轻洗目标细胞 2 次(5 min/次),然后添加 4%多聚甲醛静置固定 15 min;用 PBST 同上轻洗 5 次(6 min/次);用 0.1% TritonX-100 孵育 10 min;用 PBST 轻洗(同上)后,加入封闭液(10%羊血清加 3% BSA)于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;加入 1:500 稀释的一抗(HA 抗体或 FLAG 抗体, Sigma)于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h;用 PBST 轻摇清洗 5 次(6 min/次);加入 1:1000 稀释的二抗(碧云天)于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h;加入 DAPI 染色液(碧云天)于室温染色 10 min;用 PBST 轻洗 5 次(6 min/次);将细胞爬片挑起,把细胞面铺在载玻片的甘油上并封片,在共聚焦显微镜(Olympus)下观察。

1.8 免疫共沉淀及 Western blotting

取共转目的质粒 48 h 后的细胞,将培养基倒掉,用 PBS 清洗 2 遍;加入 1 mL IP 裂解液置于冰上裂解 3–5 min;将裂解中的细胞转移至 1.5 mL 的离心管(预冷)中裂解 30 min;4 $^{\circ}$ C 冷冻离心 15 min,14000 \times g;将上清分为 3 份:(1)取 80 μ L 作为总蛋白样品,加入 20 μ L 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液沸水浴 10 min,(2)取 400 μ L,加入 3 μ L 小鼠 IgG 作为对照,(3)剩余上清加入 3 μ L FLAG 鼠抗作为实验组,冰浴孵育过夜;取 70 μ L protein (A+G)用 1 mL IP 裂解液洗 1 次,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,3000 \times g;将对照组及实验组样品分别加到对应的 protein (A+G)中,冰浴孵育 3–5 h;用 IP 裂解液清洗 3 次(500 μ L/次),于 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,3000 \times g,弃废液;在样品中加入 40 μ L 的 IP 裂解液和 10 μ L 的蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min,用于下一步分析。

将蛋白样品加到样品孔中并进行 SDS-PAGE,浓缩胶和分离胶的浓度分别为 5%和 12%;电泳

结束后进行转膜, 恒流 200 mA, 根据蛋白分子量确定转膜时间; 然后, 将 PVDF 膜放到蛋白封闭液中, 室温孵育 3 h; 把 PVDF 膜放到相应比例的一抗稀释液中, 4 °C 孵育过夜; 室温, 用 1×TBST 缓冲液轻洗 4–5 次(8–10 min/次), 把 PVDF 膜放入相应比例的二抗稀释液中, 孵育 1 h; 重复上步清洗步骤, 加入 ECL 显色液进行显色成像。

1.9 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

本研究所用试剂为 iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad), 按说明书进行操作。qRT-PCR 反应程序如下: 95 °C 4 min; 95 °C 15 s, 60 °C 31 s, 40 个循环; 溶解曲线反应条件为 95 °C 15 s; 60 °C 20 s; 95 °C 15 s。将家蚕真核

翻译起始因子 4A (家蚕芯片探针号: sw22934) 作为内参基因, 引物信息见表 1。

2 结果和分析

2.1 *Bmhc70-4* 基因序列分析

通过基因克隆获得了 *Bmhc70-4* 基因的 cDNA 序列, 其开放阅读框(open reading frame, ORF)为 1950 bp, 共编码 649 个氨基酸, 预测其蛋白分子量约为 71 kDa。分别利用家蚕、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)和蜜蜂(*Apis mellifera*)的 HSC70-4 同源蛋白序列进行比对分析, 结果显示 *Bmhc70-4* 基因在昆虫中具有较高的保守性(图 1)。

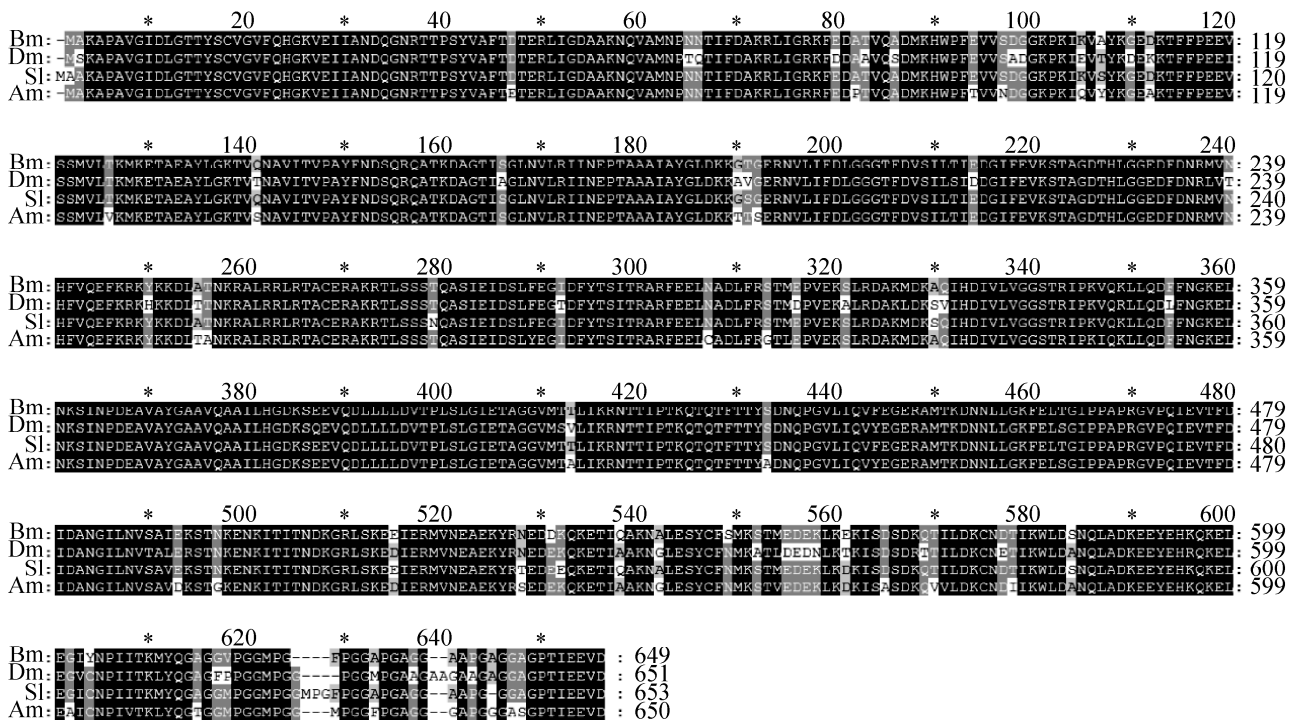


图 1. 不同昆虫间 HSC70-4 蛋白序列的比对

Figure 1. Multiple sequence alignment of HSC70-4 proteins among different insects. Bm: *Bombyx mori* (NP_001036892.1); Dm: *Drosophila melanogaster* (AGB95967.1); Sl: *Spodoptera litura* (ADK55518.1); Am: *Apis mellifera* (XP_001650298.2).

2.2 *Bmhsc70-4* 基因对 BmNPV 增殖的影响

为了探究 *Bmhsc70-4* 基因与 BmNPV 增殖之间的关系, 我们首先对 BmNPV 侵染家蚕 BmN-SWU1 细胞后 *Bmhsc70-4* 基因的表达特征进行分析。结果显示, 随着 BmNPV 的增殖, *Bmhsc70-4* 基因的表达量逐渐升高(图 2-A)。为进一步探究 *Bmhsc70-4* 基因在 BmNPV 增殖过程中的功能, 我们利用 BmNPV 侵染分别过表达或敲除 *Bmhsc70-4* 基因(图 2-B)后的 BmN-SWU1 细胞, 并对杆状病毒 *Vp39* 基因的表达情况进行检测。结果显示过表达 *Bmhsc70-4* 基因能够导致 *Vp39* 基因上调表达, 敲除 *Bmhsc70-4* 基因后, 能够使 *Vp39* 基因下调表达(图 2-C、2-D), 表明 *Bmhsc70-4* 基因能够促进 BmNPV 的增殖。

2.3 *Bmhsc70-4* 基因对家蚕细胞凋亡的影响

细胞凋亡是昆虫重要的先天免疫应答反应,

研究表明热休克蛋白参与了细胞凋亡的调控^[19-20]。

为了验证 *Bmhsc70-4* 基因在家蚕细胞中的凋亡功能, 分别在 BmN-SWU1 细胞中过表达或敲除 *Bmhsc70-4* 基因后, 对 Caspase-9 和 Caspase-3/7 的活性进行了检测。结果表明, 过表达 *Bmhsc70-4* 基因后, 经紫外线诱导 BmN-SWU1 细胞, 发现 Caspase-9 和 Caspase-3/7 的活性与对照相比均显著降低; 敲除 *Bmhsc70-4* 基因后 Caspase-9 和 Caspase-3/7 的活性均显著升高(图 3), 说明 *Bmhsc70-4* 基因在家蚕细胞中具有抗凋亡功能。

2.4 BmHSC70-4 和 BmIAP 蛋白的相互作用鉴定

研究表明家蚕凋亡抑制基因(*Bombyx mori inhibitor apoptosis, Bmiap*)在家蚕细胞中具有明确的抗凋亡作用^[21], 为了验证其与 BmHSC70-4 抗凋亡作用之间的关系, 成功构建并获得了 *Bmhsc70-4* 基因(融合 HA 标签)和 *Bmiap* 基因(融合 FLAG 标

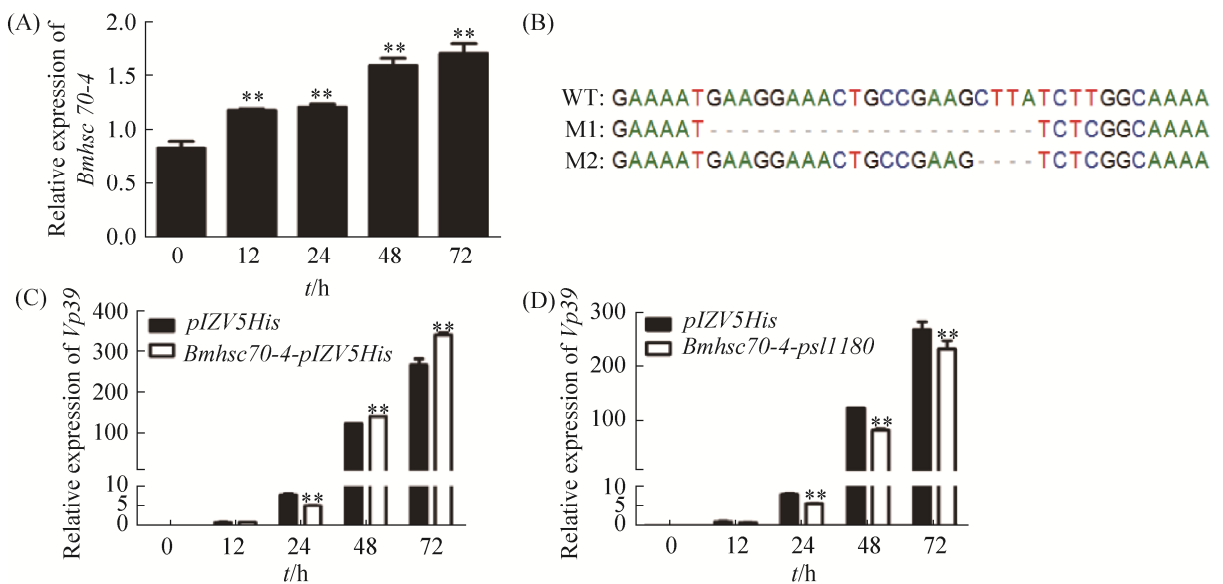


图 2. *Bmhsc70-4* 基因对 BmNPV 增殖的影响

Figure 2. Effect of *Bmhsc70-4* gene on BmNPV proliferation. Statistically significant differences: ** $P < 0.01$. A: Expression analysis of *Bmhsc70-4* gene during BmNPV infection. B: DNA sequencing analysis of the CRISPR/Cas9 target sites. WT: wild-type; M: mutation. C: Effect of overexpression of *Bmhsc70-4* gene on BmNPV proliferation. D: Effect of knockdown of *Bmhsc70-4* gene on BmNPV proliferation.

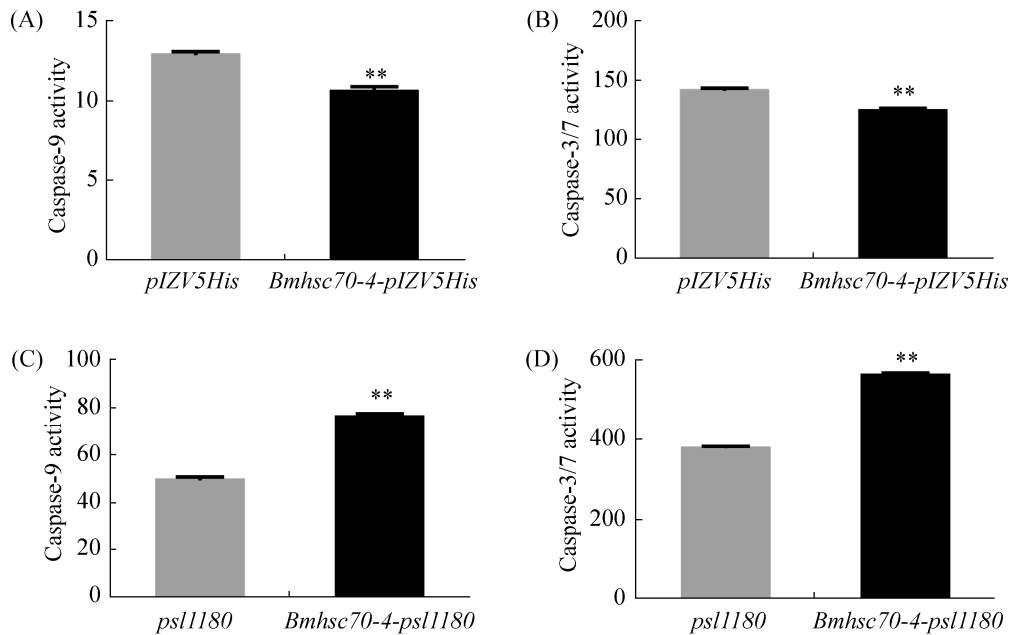


图 3. 过表达和敲除 *BmHSC70-4* 基因对 Caspase 活性的影响

Figure 3. Effects of overexpression and knockdown of *BmHSC70-4* gene on caspase activity. Statistically significant differences: ** $P < 0.01$. A: Effect of overexpression of *BmHSC70-4* gene on caspase-9 activity. B: Effect of overexpression of *BmHSC70-4* gene on caspase-3/7 activity. C: Effect of knockdown of *BmHSC70-4* gene on caspase-9 activity. D: Effect of knockdown of *BmHSC70-4* gene on caspase-3/7 activity.

签) 的过表达质粒, 进而转染家蚕细胞 BmN-SWU1, 感染 BmNPV 48 h 后进行免疫荧光分析。荧光共定位结果显示 BmHSC70-4 蛋白能够与 BmIAP 蛋白共定位于细胞质中(图4-A)。为了进一步明确 BmHSC70-4 蛋白和 BmIAP 蛋白之间的

关系, 我们将以上两个过表达质粒共转 BmN-SWU1 细胞, 并于感染 BmNPV 48 h 后进行免疫共沉淀实验。结果显示用 HA 和 FLAG 抗体都能够检测到相应蛋白条带(图 4-B), 表明 BmHSC70-4 和 BmIAP 之间存在相互作用。

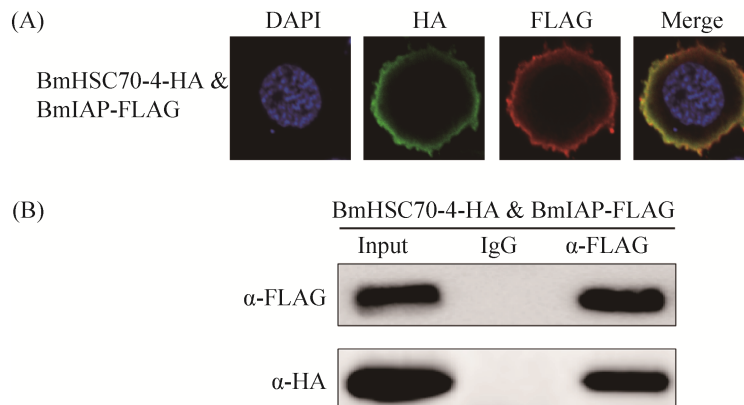


图 4. 免疫荧光和免疫共沉淀分析 *BmHSC70-4* 和 *BmIAP* 的相互作用

Figure 4. Immunofluorescence (A) and co-immunoprecipitation (B) analysis of the interaction between *BmHSC70-4* and *BmIAP*.

2.5 *Bmhsc70-4* 基因对 *Bmiap* 基因的调控分析

为了进一步分析在 BmNPV 侵染家蚕细胞的过程中 *Bmhsc70-4* 基因对 *Bmiap* 基因的调控作用, 分别在 BmN-SWU1 细胞中过表达或敲除 *Bmhsc70-4* 基因, 然后检测 *Bmiap* 基因的表达情况。结果显示, 在没有 BmNPV 侵染的情况下, 无论是过表达还是敲除 *Bmhsc70-4* 基因, 对 *Bmiap*

基因的表达均没有显著影响(图 5-A、5-B); 而在 BmNPV 侵染的条件下, 过表达 *Bmhsc70-4* 基因后, *Bmiap* 基因显著上调表达(图 5-A), 而敲除 *Bmhsc70-4* 基因后, *Bmiap* 基因的表达显著下调(图 5-B), 表明在 BmNPV 侵染过程中 *Bmhsc70-4* 基因能够促进 *Bmiap* 基因的表达。

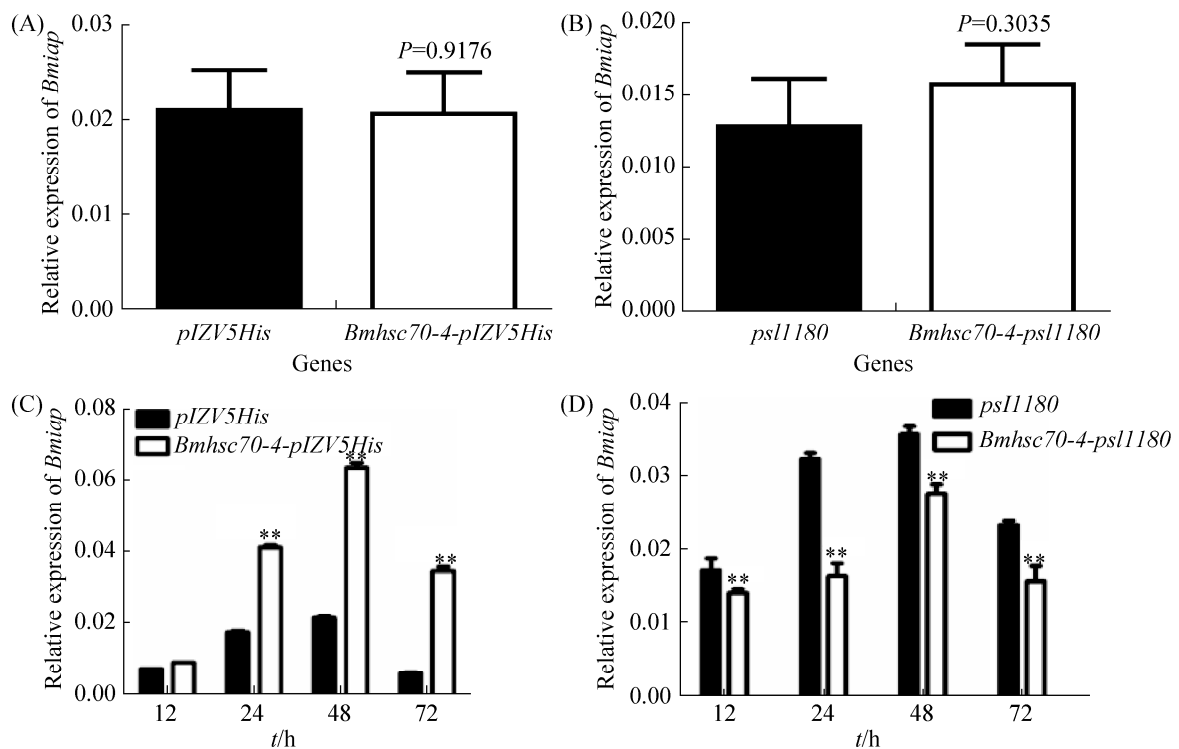


图 5. *Bmiap* 基因的相对表达量分析

Figure 5. Analysis of the relative expression profiles of *Bmiap* gene. Statistically significant differences: ** $P < 0.01$. A: Effect of overexpression of *Bmhsc70-4* on *Bmiap* gene expression without BmNPV infection. B: Effect of knockdown of *Bmhsc70-4* on *Bmiap* gene expression without BmNPV infection. C: Effect of overexpression of *Bmhsc70-4* on *Bmiap* gene expression with BmNPV infection. D: Effect of knockdown of *Bmhsc70-4* on *Bmiap* gene expression with BmNPV infection.

3 讨论

杆状病毒与宿主相互作用的分子机制研究具有重要的科学意义和应用价值, 尤其是对害虫的防

治及经济昆虫抗病毒品种的培育。热休克应答(heat shock response, HSR)作为一种标志性的机体细胞应对环境压力的防御策略, 可以有效维持蛋白质稳态^[22]。在杆状病毒侵染宿主细胞时, 会诱导热休克

蛋白的高量表达,然而这种来自于宿主的应激反应是利于宿主细胞对病毒入侵的抑制,还是利于病毒本身的增殖,仍需要深入的研究。

本研究中我们以家蚕的热休克蛋白 HSC70-4 为研究对象,发现家蚕 BmN-SWU1 细胞感染 BmNPV 后,表达量显著升高,表明 BmNPV 能够诱导 *Bmhsc70-4* 基因的表达。同时,当我们过表达 *Bmhsc70-4* 基因后,能够促进 BmNPV 的增殖,而敲除 *Bmhsc70-4* 基因则会抑制 BmNPV 的增殖,表明 *Bmhsc70-4* 基因的表达利于 BmNPV 增殖,*Bmhsc70-4* 参与的应激反应可能已被病毒利用。我们的结果进一步证实了病毒可能把热休克应答作为一种感染宿主细胞的重要策略^[23]。

同热休克应答一样,细胞凋亡也可以被认为是宿主细胞受到病毒侵染后的一种应激反应,而研究表明热休克蛋白参与了细胞凋亡过程^[20]。本研究中我们的结果显示敲除 *Bmhsc70-4* 能够诱导家蚕细胞发生凋亡,而过表达 *Bmhsc70-4* 基因能够抑制紫外诱导的细胞凋亡,表明 *Bmhsc70-4* 基因具有抑制细胞凋亡的作用。该结果与 Kong 等发现的热应激蛋白家族成员 Hsp70 能够抑制 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡一致^[24]。Didelot 等发现 HSP90 β 能够与 c-IAP1 结合以防止 c-IAP1 的自身泛素化和降解^[25], Zhang 等发现 HSP72 能够通过与 XIAP 的结合抑制细胞凋亡^[26]。为探究 *Bmhsc70-4* 基因抑制细胞凋亡的机制,我们检测了其于凋亡抑制基因 *Bmiap* 之间的关系。结果显示 BmHSC70-4 能够与 BmIAP 结合,且 *Bmhsc70-4* 基因对 *Bmiap* 基因的表达具有促进作用。我们推测在 BmNPV 增殖复制过程中, BmHSC70-4 蛋白可以通过与 BmIAP 蛋白结合使其不被泛素化降解,进而抑制宿主细胞发生凋亡,为 BmNPV 的复制增殖提供

条件。同时,我们还发现 BmHSC70-4 和 BmIAP 能够共定位于细胞质中,我们推测 BmHSC70-4 在细胞质中翻译为蛋白,进而调控宿主细胞线粒体凋亡通路或者和杆状病毒表达蛋白直接相互作用,从而促进病毒增殖复制,但 BmHSC70-4 是如何被 BmNPV 利用的仍需进一步研究。

参考文献

- [1] van Oers MM, Vlak JM. Baculovirus genomics. *Current Drug Targets*, 2007, 8(10): 1051–1068.
- [2] Rohrmann GF. Baculovirus Molecular Biology. 3rd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2013.
- [3] Clem RJ. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. *Current Drug Targets*, 2007, 8(10): 1069–1074.
- [4] Huang N, Wu W, Yang K, Passarelli AL, Rohrmann GF, Clem RJ. Baculovirus infection induces a DNA damage response that is required for efficient viral replication. *Journal of Virology*, 2011, 85(23): 12547–12556.
- [5] Salem TZ, Zhang FR, Xie Y, Thiem SM. Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, 2011, 412(1): 167–178.
- [6] Xue J, Qiao N, Zhang W, Cheng RL, Zhang XQ, Bao YY, Xu YP, Gu LZ, Han JD, Zhang CX. Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis. *Journal of Virology*, 2012, 86(13): 7345–7359.
- [7] Ramage H, Cherry S. Virus-host interactions: From unbiased genetic screens to function. *Annual Review of Virology*, 2015, 2(1): 497–524.
- [8] Nguyen Q, Nielsen LK, Reid S. Genome scale transcriptomics of baculovirus-insect interactions. *Viruses*, 2013, 5(11): 2721–2747.
- [9] Ponnuel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2003, 77(19): 10725–10729.

- [10] Qin L, Xia H, Shi H, Zhou Y, Chen L, Yao Q, Liu X, Feng F, Yuan Y, Chen K. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(12): 3630–3638.
- [11] Dong XL, Liu TH, Wang W, Pan CX, Wu YF, Du GY, Chen P, Lu C, Pan MH. *BmREEPa* is a novel gene that facilitates BmNPV entry into silkworm cells. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144575.
- [12] Liu TH, Dong XL, Pan CX, Du GY, Wu YF, Yang JG, Chen P, Lu C, Pan MH. A newly discovered member of the Atlastin family, *BmAtlastin-n*, has an antiviral effect against BmNPV in *Bombyx mori*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28946.
- [13] Dong ZQ, Hu N, Dong FF, Chen TT, Jiang YM, Chen P, Lu C, Pan MH. Baculovirus LEF-11 hijack host ATPase ATAD3A to promote virus multiplication in *Bombyx mori* cells. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46187.
- [14] Sagisaka A, Fujita K, Nakamura Y, Ishibashi J, Noda H, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M, Tanaka H. Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, 2010, 147(2): 166–175.
- [15] Nobiron I, O'Reilly DR, Olszewski JA. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach. *The Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 11): 3029–3039.
- [16] Lyupina YV, Zatsepina OG, Timokhova AV, Orlova OV, Kostyuchenko MV, Beljelarskaya SN, Evgen'ev MB, Mikhailov VS. New insights into the induction of the heat shock proteins in baculovirus infected insect cells. *Virology*, 2011, 421(1): 34–41.
- [17] Iwanaga M, Shibano Y, Ohsawa T, Fujita T, Katsuma S, Kawasaki H. Involvement of HSC70-4 and other inducible HSPs in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Virus Research*, 2014, 179:113–118.
- [18] Dong ZQ, Chen TT, Zhang J, Hu N, Cao MY, Dong FF, Jiang YM, Chen P, Lu C, Pan MH. Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells. *Antiviral Research*, 2016, 130: 50–57.
- [19] Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiology*, 1999, 7(4): 160–165.
- [20] Kennedy D, Jäger R, Mosser DD, Samali A. Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB Life*, 2014, 66(5): 327–338.
- [21] Hamajima R, Iwamoto A, Tomizaki M, Suganuma I, Kitaguchi K, Kobayashi M, Yamada H, Ikeda M. Functional analysis of inhibitor of apoptosis 1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 79: 97–107.
- [22] Fujimoto M, Nakai A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *The FEBS Journal*, 2010, 277(20): 4112–4125.
- [23] Monteiro F, Carinhas N, Carrondo MJ, 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.
- [24] Kong F, Wang H, Guo J, Peng M, Ji H, Yang H, Liu B, Wang J, Zhang X, Li S. Hsp70 suppresses apoptosis of BRL cells by regulating the expression of Bcl-2, cytochrome C, and caspase 8/3. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 2016, 52(5): 568–575.
- [25] Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquelin A, Ducoroy P, Cathelin S, Decolgne N, Chiosis G, Dubrez-Daloz L, Solary E, Garrido C. Interaction of heat-shock protein 90 β isoform (HSP90 β) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15(5): 859–866.
- [26] Zhang B, Rong R, Li H, Peng X, Xiong L, Wang Y, Yu X, Mao H. Heat shock protein 72 suppresses apoptosis by increasing the stability of X-linked inhibitor of apoptosis protein in renal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(3): 1793–1799.

Gene *Hsc70-4* promotes the replication and proliferation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus

Peng Chen^{1,2}, Xiyan Bao¹, Zhanqi Dong¹, Taotao Kang¹, Yan Zhu¹, Minhui Pan^{1,2}, Cheng Lu^{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, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Heat shock response is an important cellular defense strategy to environmental stresses. Identification of the function of heat shock protein in the process of baculovirus infection and revealing the molecular mechanism of its role will provide a theoretical basis for understanding the molecular basis of host-virus interaction. [Methods] *Bmhsc70-4* gene was cloned by molecular cloning, and multiple sequence alignment was performed with BioEdit and GeneDoc. The *Bmhsc70-4* gene was overexpressed by eukaryotic expression and knocked out by CRISPR/Cas9 gene editing system. The expression of the corresponding genes was detected by quantitative real-time PCR. The effect of *Bmhsc70-4* gene on apoptosis was determined by detecting the activity of Caspase-9 and Caspase-3/7. The co-localization of BmHSC70-4 and BmIAP was verified by immunofluorescence, and their interaction was further verified by immunoprecipitation. [Results] The open reading frame of *Bmhsc70-4* gene was 1950 bp, encoding 649 amino acids and it was highly conserved among insects. *Bmhsc70-4* gene was up-regulated during BmNPV infection. Overexpression of *Bmhsc70-4* gene could promote the proliferation of BmNPV, and knockout of *Bmhsc70-4* gene inhibited the proliferation of BmNPV, indicating that the expression of *Bmhsc70-4* gene was conducive to the proliferation of BmNPV. We confirmed that *Bmhsc70-4* gene can inhibit the apoptosis of silkworm cells. Immunofluorescence assay showed that BmHSC70-4 and BmIAP were co-localized in the cytoplasm and immunoprecipitation showed that they could interact with each other. *Bmhsc70-4* gene could promote the expression of *Bmiap* gene during BmNPV infection. [Conclusion] *Bmhsc70-4* gene had the function of inhibiting apoptosis of silkworm cells, and it could interact with BmIAP and promote BmNPV replication and proliferation during the process of BmNPV infecting silkworm cells.

Keywords: *Bombyx mori*, BmNPV, heat shock response, apoptosis, *Bmhsc70-4*, *Bmiap*

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31602009, 31572466), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (SWU116066) and by the China Agriculture Research System (CARS-18)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251812; E-mail: lucheng@swu.edu.cn

Received: 29 August 2018; Revised: 29 November 2018; Published online: 18 February 2019