



## 家蚕 ADP/ATP 转运酶(BmANT)抑制 BmNPV 增殖作用机制研究

董战旗<sup>1,2</sup>, 蒋亚明<sup>1,2</sup>, 陈鹏<sup>1,2</sup>, 潘敏慧<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

<sup>2</sup>西南大学农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400716

**摘要:**【目的】家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)隶属于杆状病毒, 需要借助宿主细胞能量代谢进行自身增殖复制。家蚕 ADP/ATP 转运酶(*Bombyx mori* ADP/ATP translocase, BmANT)是线粒体转运蛋白, 在 BmNPV 感染条件下和家蚕热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, BmHSP60)具有直接的相互作用。因此, 鉴定 *Bmant* 基因在 BmNPV 感染过程中的功能特征, 有助于解析杆状病毒劫持宿主细胞因子促进自身增殖复制机制, 完善杆状病毒和宿主相互作用网络。【方法】通过结构域预测 BmANT 蛋白的结构特征, 荧光定量 PCR 分析 *Bmant* 基因在 BmNPV 感染后的变化特征; 并过表达 BmANT 检测其对病毒 DNA 复制和病毒蛋白表达变化影响; 进一步在转录水平分析 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因的调控关系; 最后通过流式细胞术等技术鉴定 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因共同调控 BmNPV 增殖复制的机制。【结果】SMART 软件预测显示 BmANT 包含 3 个线粒体载体结构域, BmNPV 感染 24 h 后 *Bmant* 基因持续下调表达。过表达 *Bmant* 基因能够显著抑制 BmNPV DNA 的复制和 VP39 蛋白表达。荧光定量 PCR 分析显示 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因具有相互拮抗作用, 能够相互抑制转录。*Bmant* 和 *Bmhsp60* 共同过表达分析显示, BmANT 和 BmHSP60 共同作用 BmNPV 能够抑制病毒的增殖复制。【结论】结果表明, BmANT 是一个线粒体载体蛋白, 具有显著的抗病毒作用, 能够下调 *Bmhsp60* 基因表达, 并抑制 BmNPV 增殖复制。

**关键词:** 家蚕, 家蚕核型多角体病毒, BmANT, BmHSP60, 抗病毒

家蚕(*Bombyx mori*)是一种具有重要经济价值的鳞翅目模式昆虫<sup>[1]</sup>, 而家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)作为家蚕重大病害血液型脓病的病原每年给我国养蚕

基金项目: 国家自然科学基金(31872427); 国家蚕桑产业技术体系(CARS-18); 中国博士后基金面上项目(2018M633309); 重庆市博士后特别资助项目(XmT2018020)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-23-68250076; E-mail: pmh047@126.com

收稿日期: 2018-09-20; 修回日期: 2019-01-12; 网络出版日期: 2019-03-13

业造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。因此,解析杆状病毒和宿主相互作用机制,和鉴定新的家蚕抗病毒因子,对家蚕抗病毒育种具有重要的意义。

杆状病毒是双链 DNA 病毒,编码 90–180 个基因,具有双向生活史<sup>[3]</sup>。杆状病毒依赖宿主细胞功能进行增殖感染<sup>[4]</sup>。研究表明 BmNPV 能够劫持宿主细胞家蚕热休克蛋白 60 (*Bombyx mori* heat shock protein 60, BmHSP60)促进 BmNPV 的增殖复制<sup>[5–6]</sup>。同时,本研究小组确定了 BmHSP60 在 BmNPV 感染过程能够和家蚕 ADP/ATP 转运酶 (*Bombyx mori* ADP/ATP translocase, BmANT)相互作用。BmANT 转运蛋白能够跨越线粒体内膜交换细胞溶质二磷酸腺苷(ADP)和 ATP,为细胞提供主要的能量<sup>[7]</sup>。先前研究报道,包括家蚕在内的很多昆虫都具有 2 个 *ant* 同源基因,分别命名为 *ant1* 和 *ant2*, *ant1* 在全身组织中均有高量表达,而 *ant2* 只特异地在精巢中表达,和生殖细胞的形成有关<sup>[8]</sup>。宿主的 ANT1 能够和多个病原的相关蛋白发生相互作用,进而调控病毒增殖复制。比如猪繁殖与综合呼吸征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)包膜蛋白 E、对虾白斑综合症病毒(white spot syndromic virus, WSSV) VP12、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV) Vpr 均能与 ANT1 相互作用,控制线粒体膜通透性;人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) miR-UL36-5P 能够干涉的 *ant* 基因,下调宿主 *ant3* 的表达,从而抑制凋亡<sup>[9–12]</sup>。不同昆虫的 ANT1 都存在相似的结构,即含有 3 个线粒体跨膜结构域,锚定在线粒体内膜中,和电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)共同构成线粒体膜孔复合物,参与调节线粒体内膜通透

性、电化学平衡和氧化磷酸化链,甚至参与细胞凋亡途径<sup>[7]</sup>。但是, *Bmant* 在家蚕中的功能以及 *Bmant* 对 BmNPV 增殖复制的调控作用未见报道。本文系统分析了 *Bmant* 在 BmNPV 感染过程中的功能特征以及和 *Bmhsp60* 共同调控 BmNPV 增殖的作用机制,为深入解析杆状病毒和宿主相互作用提供了一定的基础数据,同时也为家蚕抗病毒研究提供了新的抗病毒靶标基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和病毒:**家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 和 BmNPV (vA4<sup>P<sup>mtm</sup></sup>-EGFP)病毒由家蚕基因组生物学国家重点实验室保存<sup>[13–14]</sup>。

**1.1.2 试剂和仪器:**TC100 昆虫细胞培养基(US Biological);澳洲胎牛血清(Gibco);各种限制性内切酶、连接酶、DNA Marker、Protein Marker 等分子生物学操作试剂购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购于 Omega 公司;质粒提取试剂盒(全式金);16 °C 连接仪(Eppendorf);流式细胞仪(BACMAN);倒置显微镜(Olympus)。

### 1.2 载体构建

本实验以 pIZ/V5-His 为空载,构建 pIZ-ANT<sup>HA</sup> 和 pIZ-HSP60<sup>Flag</sup> 载体。首先通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索目标基因序列,设计相应的引物,以家蚕 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因全长开放阅读框(open reading frame, ORF),并通过相应的酶切连接到 pIZ/V5-His 空载,测序正确后,进行转染。本研究所用的引物如表 1 所示。

表 1. PCR 引物信息  
Table 1. PCR primer information

Primer	Sequence (5'→3')
BmHSP60 <sup>Flag</sup> - <i>Bam</i> H I/F	CGCGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTTGCGTCTACCTCGTGTT
BmHSP60 <sup>Flag</sup> - <i>Not</i> I/R	ATAAGAATGCGGCCGCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCATCATGCCTCCCAT ACCA
BmANT <sup>HA</sup> - <i>Kpn</i> I/F	GGGGTACCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTCGAACCTC GCCGA
BmANT <sup>HA</sup> - <i>Spe</i> I/R:	GGACTAGTGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTACAGGACCTTCTT GATTCAT
RT-BmANT/F	CGGCGGTGTTGACAAGAAGA
RT-BmANT/R	CGAAGTATGAGGCACGGTAGAT
RT-BmHSP60/F	ACAATGGGTCCAAAAGGTAGAA
RT-BmHSP60/R	CGTGTCCCCGTTAGCAGAT
sw22934/F:	TTCGTAAGTCTCTTCTCGT
sw22934/R:	CAAAGTTGATAGCAATTCCT
gp41/F	CCTATTCTGTGCTGGTGGTGG
gp41/R	ATGTTGATGTGCGGAAAGC

The restriction enzyme sites are marked in bold, the underline represents the fusion tag.

### 1.3 细胞培养和转染

在生长贴壁的 BmN-SWU1 细胞培养瓶中加入 3 mL 含有 10%胎牛血清的 TC100 培养基, 放置于 27 °C 智能人工气候箱中培养, 72 h 更换 1 次培养基。当细胞铺满 80%左右时, 吸取原有培养基, 加入少量无抗培养基将残留的培养基完全清除, 倒掉后再用无抗培养基替换。

24 孔细胞培养板中, 按照 0.8 µg 质粒 : 2 µL 转染试剂 : 100 µL 无抗培养基混合, 在高压灭菌的离心管中轻柔逐滴混匀 50 次左右, 静置 30 min, 然后滴加到细胞孔中; 共转时, 24 孔板每孔加入质粒各 0.5 µg。转染后, 细胞放置在 27 °C 恒温培养。培养 8–12 h 后, 再将无抗培养基替换成含有 10%胎牛血清的完全培养基, 继续培养 48 h 后即可进行下一步处理。

### 1.4 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

家蚕组织和 BmN-SWU1 细胞总 RNA 使用

TRIzol Reagent (Invitrogen)提取, 使用反转录试剂盒(Promega)合成 cDNA, 操作按说明书进行, 保存于-20 °C 备用。本研究按照以下体系混合: 5 µL iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) 定量试剂, 5 µL dH<sub>2</sub>O, 0.2 µL Primer F/R, 1 µL cDNA 模板, 混匀后加入孔中, 即每个反应重复 3 次。将分装好的反应产物连同定量 PCR 板 4 °C、3000×g 离心 3 min 后, 放置在定量 PCR 仪中, 反应程序为: 95 °C 10 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次, 65 °C 以 0.5 °C 每 5 s 梯度增长至 95 °C。以家蚕真核翻译起始因子 4A (探针号: sw22934)为内参基因, 相对定量 PCR 的数据处理用 2<sup>-ΔCT</sup>法。本研究所用引物见表 1。

病毒 DNA 拷贝数分析采用绝对定量方法, 病毒感染细胞样品利用 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)试剂盒提取细胞总 DNA, 具体方法参照试剂盒说明书。以病毒基因 GP41 作为定量引物, 提取的病毒基因组 DNA 作

为模板, 采用上述定量 PCR 体系和条件进行绝对定量检测, 根据本研究建立的标准曲线计算病毒基因组拷贝数<sup>[5]</sup>。

### 1.5 Western blotting

转染相应的过表达载体到 BmN-SWU1 细胞 48 h 后, 分别感染 BmNPV 不同时间后收集细胞。加入 100  $\mu$ L 的 IP 裂解液(含蛋白酶抑制剂 PMSF), 冰上或 4  $^{\circ}$ C 裂解 30 min, 14000 $\times$ g 离心 10 min 后去上清, 加入 20  $\mu$ L 的 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水煮沸 10 min, 室温 14000 $\times$ g 离心 10 min 后 Western blotting 分析。转移样品到 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗分别用  $\alpha$ -VP39 和  $\alpha$ -Tubulin 孵育 1 h, 用 TBST 洗脱 5 min $\times$ 6 次; 二抗用相应来源的抗体孵育 1 h, 用 TBST 洗脱 5 min $\times$ 6 次; 将配好的 ECL 显色液均匀滴在 PVDF 膜上, 避光显色约 5 min; 在 Bio-Rad 化学发光成像仪上成像分析。

### 1.6 流式细胞分析

将感染 BmNPV 后不同时间的细胞用移液器轻轻吹下, 静置在冰上待用; 先用流式细胞清洗液清洗仪器管道 2 min, 然后排尽清洗液, 用流式细胞鞘液润洗管道 5 min; 设置流式细胞仪程序按相同设置程序进样并分析, 清洗仪器, 并排尽洗液。

## 2 结果和分析

### 2.1 *Bmant* 基因表达特征鉴定

为了鉴定家蚕 *Bmant* 基因的功能特征, 本研究首先通过 SMART 软件([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/save\\_user\\_preferences.pl](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/save_user_preferences.pl))预测了该蛋白的结构域特征, 分析结果显示 BmANT 蛋白包含 3 个线粒体载体结构域, 定位在线粒体内(图 1-A)。

这一结果和先前线粒体共定位结果一致, 表明 BmANT 是一个线粒体蛋白。先前已经证明 BmANT 能够在 BmNPV 感染过程和 BmHSP60 相互作用, 本研究为了确定 *Bmant* 基因调控 *Bmhsp60* 基因的具体作用机制, 我们首先分析了 *Bmant* 基因在 BmN-SWU1 细胞感染 BmNPV 后的转录水平变化。结果显示 *Bmant* 基因在 BmNPV 感染后 6 h 开始下调表达, 一致持续到 72 h 都维持在一个较低的表达水平, 说明 BmNPV 侵染后能够显著抑制 *Bmant* 基因的转录(图 1-B)。

### 2.2 BmANT 抑制病毒增殖复制

为了进一步分析 *Bmant* 基因对 BmNPV 增殖复制的影响, 本研究首先在家蚕 BmN-SWU1 细胞中过表达 *Bmant* 基因, 定量 PCR 结果显示过表达 *Bmant* 基因的细胞, *Bmant* 基因显著上调表达(图 2-A)。感染 BmNPV 0、12、24、48 h 后, 提取不同处理样品的 DNA 绝对定量, BmNPV DNA 拷贝

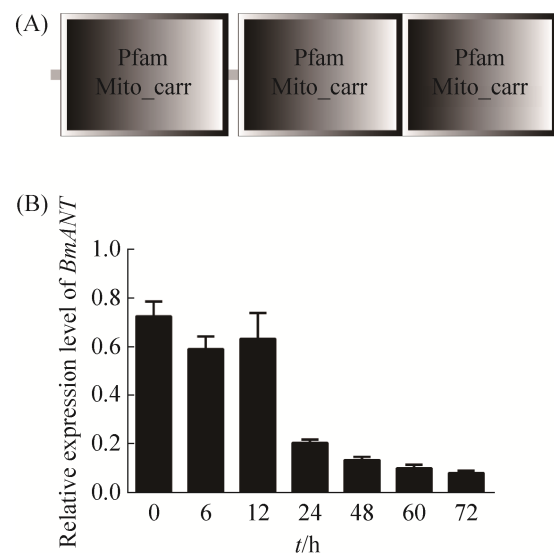


图 1. *Bmant* 基因表达特征鉴定

Figure 1. The expression characterization of *Bmant* gene. A: Illustrative diagram of BmANT structure prediction; B: Analysis of *Bmant* gene expression characteristics after BmNPV infection.

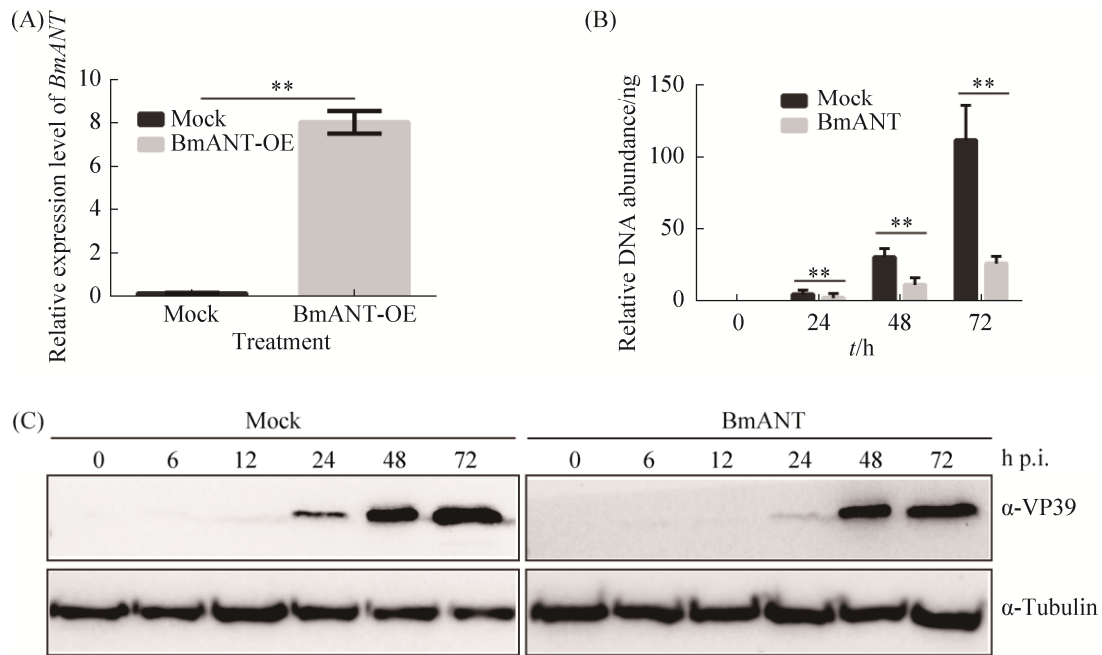


图 2. *Bmant* 基因抑制病毒增殖复制

Figure 2. *Bmant* gene inhibits viral proliferation replication. A: Overexpression analysis of *Bmant* gene; B: Antiviral analysis of BmANT by BmNPV DNA replication abundance. Statistically significant differences: \*\*:  $P < 0.01$ ; C: Antiviral analysis of BmANT by Western blotting.

数分析显示过表达 *Bmant* 基因的细胞, 在不同的感染时间点均具有明显的抑制作用(图 2-B)。为了进一步分析说明 BmANT 蛋白对 BmNPV 的抑制作用, 我们提取了不同时间点的蛋白样品, Western blotting 分析结果显示, 过表达 *Bmant* 基因后 BmNPV 蛋白表达明显受到抑制, 在感染 48 hours post-infection (h p.i.) 才能检测到大量 VP39 蛋白表达, 而对照组在 24 h p.i. 就能检测到大量 VP39 蛋白表达(图 2-C)。以上结果表明 *Bmant* 基因是一个抗病毒因子, 能够显著抑制病毒的增殖。

### 2.3 BmANT 和 BmHSP60 互为拮抗作用

先前本研究小组已经证明杆状病毒 LEF-11 能够挟持宿主细胞 ATPase 家族 BmATAD3A 和 BmHSP60 促进自身增殖复制; 同时, 我们进一步通过免疫共沉淀和质谱数据分析鉴定了 BmHSP60 能够在 BmNPV 感染过程中和 BmANT

相互作用<sup>[5]</sup>。为了鉴定 BmANT 和 BmHSP60 相互作用调控 BmNPV 作用的机制, 本研究进一步分析了 *Bmant* 和 *BmhsP60* 基因相互调控关系, 过表达 *Bmant* 基因后检测 *BmhsP60* 基因的转录水平变化, 结果显示过表达 *Bmant* 基因后能够显著抑制 *BmhsP60* 基因的表达(图 3-A)。同时我们分析了过表达 *BmhsP60* 基因对 *Bmant* 基因转录水平的影响, 结果显示过表达 *BmhsP60* 基因也能够显著抑制 *Bmant* 基因的表达(图 3-B)。以上结果表明 *Bmant* 和 *BmhsP60* 基因能够相互抑制对方基因表达, 具有相互拮抗的关系。

### 2.4 BmANT 抑制 BmHSP60 对 BmNPV 增殖复制的促进作用

先前研究表明 BmHSP60 能够促进病毒增殖复制<sup>[5]</sup>, BmANT 抑制病毒增殖复制, 既然 *Bmant* 和 *BmhsP60* 基因具有相互拮抗的关系, 那么该基

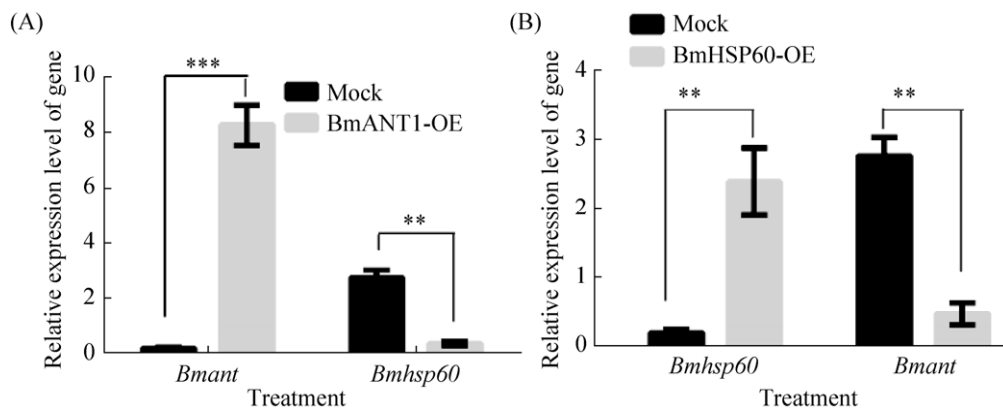


图 3. *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因转录调控分析

Figure 3. Transcriptional regulation analysis of *Bmant* and *Bmhsp60* gene. A: The transcriptional regulation analysis of *Bmhsp60* by *Bmant* gene; B: The transcriptional regulation analysis of *Bmhsp60* by *Bmant* gene. Statistically significant differences: \*\*:  $P < 0.01$ .

因相互拮抗调控 BmNPV 作用又是如何呢? 为了验证 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因共同对 BmNPV 的作用, 本研究进一步分析了共同转染后对 BmNPV 增殖复制的影响。流式细胞术分析显示, 单独过表达 *Bmant* 基因能够抑制 BmNPV 的增殖, 感染 48 h 后, BmNPV 感染率从 24.68% 降低到 19.09%; 而单独过表达 *Bmhsp60* 基因能够促进病毒增殖, 感染 48 h 后, BmNPV 感染率从 24.68% 提高到 27.07%; 共同转染后, BmNPV 感染率从 24.68% 降低到 20.57%, 整体水平抑制了 BmNPV 增殖复制(图 4-A)。EGFP 阳性细胞数统计结果显示在不同的感染时间点均具有显著性差异(图 4-B)。

进一步我们通过 BmNPV DNA 拷贝数和 Western blotting 分析 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因同时过表达对 BmNPV 增殖复制的作用。病毒 DNA 分析结果显示 BmANT 抑制 BmHSP60 对 BmNPV 的促进作用, 在 *Bmant* 基因过表达的细胞中 *Bmhsp60* 基因基本不能影响病毒增殖复制(图 4-C)。Western blotting 分析显示 BmANT 抑制 BmHSP60 对病毒的促进作用, 共同过表达后 VP39 蛋白表达量相比对照明显受到抑制(图 4-D)。结合上述结果, 表明

*Bmant* 基因能够抑制 *Bmhsp60* 基因转录, 进而抑制 BmNPV 增殖复制; 而 *Bmhsp60* 基因能够负反馈抑制 *Bmant* 基因转录, 但是通过负反馈调控对病毒增殖影响较小。

### 3 讨论

BmNPV 是对家蚕危害最为严重的病原之一, 而杆状病毒和宿主细胞相互作用机制的解析, 为家蚕抗病毒基础研究提供了重要的理论支撑<sup>[15-16]</sup>。目前, 杆状病毒和宿主相互作用研究主要包括杆状病毒诱导宿主细胞 DNA 损伤应答、宿主细胞周期阻滞、关闭宿主蛋白合成、调控宿主细胞信号通路以及诱导宿主细胞细胞凋亡等方式, 利用宿主细胞器官和组织为自身增殖复制服务<sup>[15,17-20]</sup>。杆状病毒劫持宿主细胞能量代谢促进自身增殖研究还相对较少, 本研究通过鉴定宿主能量代谢因子 BmHSP60 和其相互作用蛋白 BmANT 调控 BmNPV 增殖作用机制, 鉴定了能够抑制 BmNPV 增殖复制的蛋白, 为进一步解析杆状病毒劫持能量代谢提供了支撑。

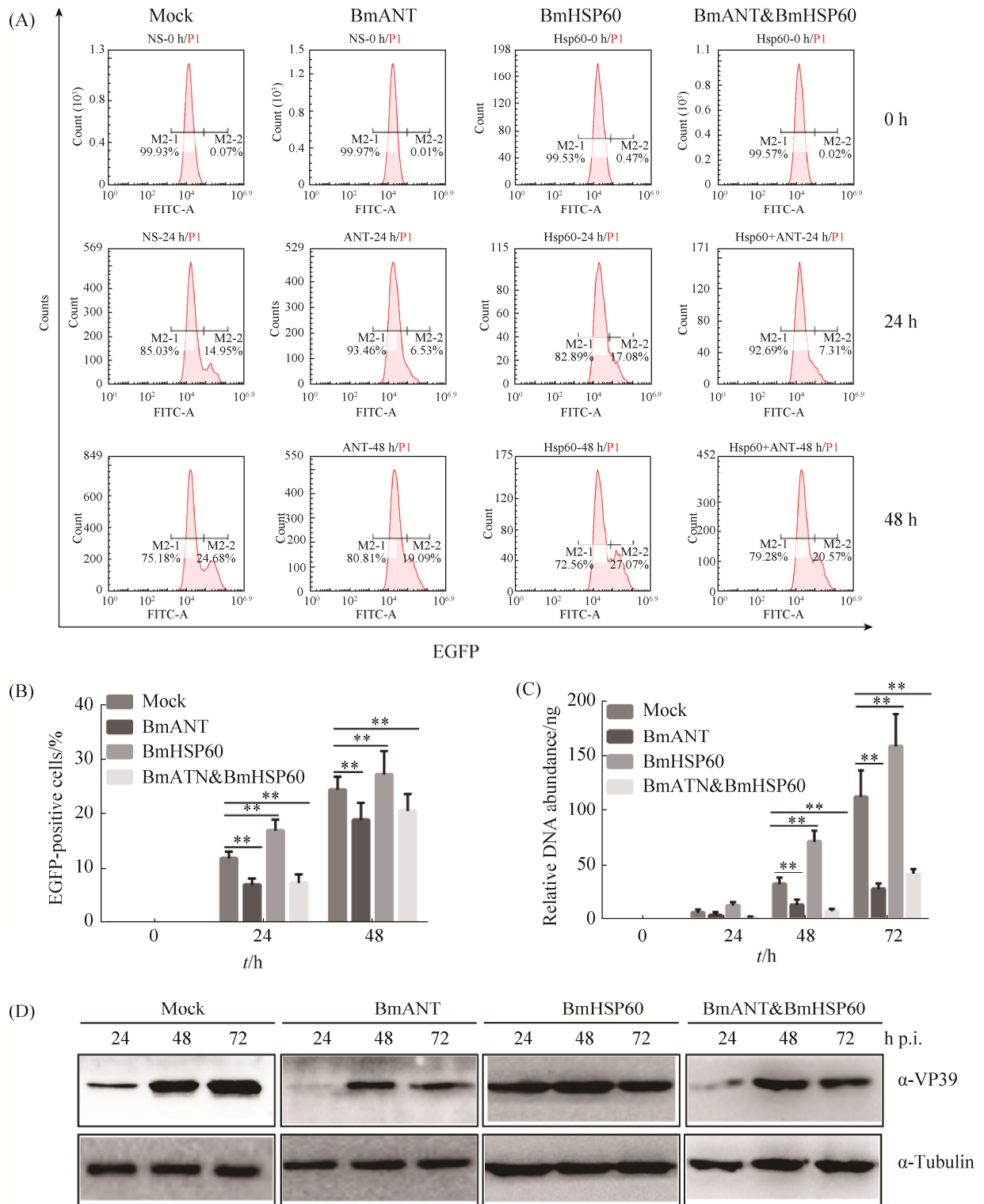


图 4. BmANT 抑制 BmHSP60 的功能

Figure 4. BmANT inhibits the function of BmHSP60. A: Flow cytometry analysis of *Bmant*, *Bmhsp60* gene and co-overexpression on viral replication; B: Statistical analysis of flow cytometry analysis; C: DNA replication analysis of *Bmant*, *Bmhsp60* gene and co-overexpression on viral replication; D: Western blotting analysis of *Bmant*, *Bmhsp60* gene and co-overexpression on viral replication. Statistically significant differences. \*\*:  $P < 0.01$ .

ANT 是氧化磷酸化途径的一个组成部分, 它催化线粒体 ATP 在线粒体内膜上的细胞质 ADP 交换<sup>[7]</sup>。参与通透性转换孔复合物(permeability transition pore complex, PTPC)的形成, 释放线粒体产物, 从而触发细胞凋亡<sup>[21]</sup>。先前研究表明, 杆状病毒 IE-2 蛋白能够和 BmANT 相互作用, 结合本研究证明 BmANT 能够抑制 BmNPV 增殖复制(图 2), 我们推测 BmANT 在 BmNPV 感染过程和宿主发生了相互博弈<sup>[22]</sup>。研究表明 PRRSV E 蛋白与 ANT 相互作用能够激活 caspase-3 诱导细胞凋亡, 从而导致 PARP 分裂, 从而导致 ATP 的产生显著减少<sup>[22]</sup>。结合 BmANT 和 BmHSP60 均为线粒体蛋白, 我们推测 BmNPV 引起宿主 *Bmant* 表达下调(图 1-B), 可能是防止细胞过早凋亡, 因为细胞凋亡是机体应对外界刺激、阻止病原入侵的常用手段之一, 在很多物种尤其是昆虫等缺乏获得性免疫的生物中, 凋亡被认为是先天免疫机制的重要组成部分<sup>[23-24]</sup>。先前已经证明杆状病毒 LEF-11 能够劫持宿主细胞 BmATAD3A 和 BmHSP60 促进病毒增殖复制, 而 BmHSP60 进一步能够和 BmANT 相互作用并调控其表达, 因此杆状病毒 LEF-11 和 BmANT 蛋白是否具有直接的相互作用关系将是进一步解析杆状病毒调控 ATP 转运机制的关键<sup>[5]</sup>。

HSP60 作为宿主相应机制的重要分子, 在病原微生物如埃博拉病毒、登革热病毒、沙雷氏菌等感染宿主后, 参与了对病原的应答反应<sup>[25]</sup>。先前研究表明 *Bmhsp60* 在 BmNPV 感染后迅速上调表达, 并证明了 BmHSP60 能够促进 BmNPV 的增殖, 结合本研究发现 *Bmhsp60* 和 *Bmant* 基因在宿主应对 BmNPV 感染时具有相反的表达模式, 并且该蛋白 BmHSP60 对病毒增殖的影响也是相反的(图 3 和 4), BmHSP60 和 BmANT 可能共同调

控病毒增殖复制<sup>[5]</sup>。先前研究表明 HIV RP 蛋白能够诱导线粒体凋亡, 介导线粒体蛋白 ANT 剪切, 释放 HSP60 蛋白, 进而抑制病毒增殖<sup>[26]</sup>。结合本研究同时过表达 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因能够减弱 *Bmhsp60* 基因促进病毒增殖的能力, 我们推测 *Bmhsp60* 基因可能受 *Bmant* 基因调控(图 4)<sup>[25]</sup>。BmANT 能够和 VDAC 等线粒体内膜蛋白一起, 构成线粒体内膜膜孔复合物的主体结构, 调控宿主细胞 ADP/ATP 转运的功能, 进而调控线粒体呼吸作用中电子链的传递和氧化磷酸化, 而本研究表达 BmANT, 导致细胞内 ANT 过量积累, 导致 ATP/ADP 转运紊乱, 进而能够抑制 BmNPV 增殖复制<sup>[27-28]</sup>。

本研究结果表明, BmANT 是一个线粒体载体蛋白, 具有抗病毒作用, 可应用于后期家蚕转基因抗病毒研究; 家蚕 *Bmant* 和 *Bmhsp60* 基因具有相互拮抗调控作用, BmHSP60 和 BmANT 共同作用能够抑制 BmNPV 的增殖复制。

## 参考文献

- [1] The International Silkworm Genome Consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(12): 1036–1045.
- [2] Dong Z, Hu Z, Qin Q, Dong F, Huang L, Long J, Chen P, Lu C, Pan M. CRISPR/Cas9-mediated disruption of the *Immediate early-0* and *2* as a therapeutic approach to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in transgenic silkworm. *Insect Molecular Biology*, 2019, 28(1): 112–122.
- [3] Mikhailov VS. Replication of the baculovirus genome. *Molecular Biology(Mosk)*, 2003, 37(2): 250–259.
- [4] Nguyen Q, Nielsen LK, Reid S. Genome scale transcriptomics of baculovirus-insect interactions. *Viruses*, 2013, 5(11): 2721–2747.
- [5] 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.
- [6] Dong ZQ, Hu N, Zhang J, Chen TT, Cao MY, Li HQ, Lei XJ, Chen P, Lu C, Pan MH. Oligomerization of baculovirus LEF-11 is involved in viral DNA replication. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144930.
- [7] Louvi A, Tsitilou SG. A cDNA clone encoding the ADP/ATP translocase of *Drosophila melanogaster* shows a high degree of similarity with the mammalian ADP/ATP translocases. *Journal of Molecular Evolution*, 1992, 35(1): 44–50.
- [8] Sugahara R, Jouraku A, Nakakura T, Kusakabe T, Yamamoto T, Shinohara Y, Miyoshi H, Shiotsuki T. Two adenine nucleotide translocase paralogues involved in cell proliferation and spermatogenesis in the silkworm *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119429.
- [9] Pujhari S, Zakhartchouk AN. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope (E) protein interacts with mitochondrial proteins and induces apoptosis. *Archives of Virology*, 2016, 161(7): 1821–1830.
- [10] Sabbah EN, Druillennec S, Morellet N, Bouaziz S, Kroemer G, Roques BP. Interaction between the HIV-1 protein Vpr and the adenine nucleotide translocator. *Chemical Biology & Drug Design*, 2006, 67(2): 145–154.
- [11] Dampier W, Nonnemacher MR, Sullivan NT, Jacobson JM, Wigdahl B. HIV excision utilizing CRISPR/Cas9 technology: attacking the proviral quasispecies in reservoirs to achieve a cure. *MOJ Immunology*, 2014, 1(4): 00022.
- [12] Guo X, Huang YJ, Qi Y, Liu ZY, Ma YP, Shao YZ, Jiang SJ, Sun ZR, Ruan Q. Human cytomegalovirus miR-UL36-5p inhibits apoptosis via downregulation of adenine nucleotide translocator 3 in cultured cells. *Archives of Virology*, 2015, 160(10): 2483–2490.
- [13] 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.
- [14] Zhang J, He Q, Zhang CD, Chen XY, Chen XM, Dong ZQ, Li N, Kuang XX, Cao MY, Lu C, Pan MH. Inhibition of BmNPV replication in silkworm cells using inducible and regulated artificial microRNA precursors targeting the essential viral gene *lef-11*. *Antiviral Research*, 2014, 104: 143–152.
- [15] 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.
- [16] Wang F, Zhang CX, Shyam Kumar V, Wu XF. Influences of chitinase gene deletion from BmNPV on the cell lysis and host liquefaction. *Archives of Virology*, 2005, 150(5): 981–990.
- [17] Deng ZH, Huang ZH, Yuan MJ, Yang K, Pang Y. Baculovirus induces host cell aggregation via a Rho/Rok-dependent mechanism. *Journal of General Virology*, 2014, 95(10): 2310–2320.
- [18] Byers NM, Vandergaast RL, Friesen PD. Baculovirus inhibitor-of-apoptosis Op-IAP3 blocks apoptosis by interaction with and stabilization of a host insect cellular IAP. *Journal of Virology*, 2015, 90(1): 533–544.
- [19] Mitchell JK, Byers NM, Friesen PD. Baculovirus F-box protein LEF-7 modifies the host DNA damage response to enhance virus multiplication. *Journal of Virology*, 2013, 87(23): 12592–12599.
- [20] Wang L, Xiao Q, Zhou XL, Zhu Y, Dong ZQ, Chen P, Pan MH, Lu C. *Bombyx mori* Nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) induces host cell autophagy to benefit infection. *Viruses*, 2018, 10(1): 14.
- [21] Andersen JL, DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, Jacquot G, Benichou S, Planelles V. HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(12): e127.
- [22] Wu YJ, Wu Y, Wu Y, Tang H, Wu HL, Zhang GZ, Wang WB. Screening of candidate proteins interacting with IE-2 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(10): 5797–5804.
- [23] Ikeda M, Yamada H, Ito H, Kobayashi M. Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells. *Journal of General Virology*, 2011, 92(11): 2654–2663.
- [24] Clarke TE, Clem RJ. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. *International Reviews of Immunology*, 2003, 22(5/6): 401–424.
- [25] Song EB, Tang S, Xu J, Yin B, Bao ED, Hartung J. Lenti-siRNA Hsp60 promote bax in mitochondria and induces apoptosis during heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 481(1/2): 125–131.
- [26] Rumlová M, Křížová I, Keprová A, Hadravová R, Doležal M, Strohalmová K, Pichová I, Hájek M, Ruml T. HIV-1 protease-induced apoptosis. *Retrovirology*, 2014, 11: 37.
- [27] Brenner C, Lemoine A. Mitochondrial proteins (e.g., VDAC, Bcl-2, HK, ANT) as major control points in oncology.

*Frontiers in Oncology*, 2014, 4: 365.

[28] Kumarswamy R, Chandna S. Putative partners in Bax

mediated cytochrome-*c* release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion*, 2009, 9(1): 1–8.

## Inhibition of BmNPV proliferation by *Bombyx mori* ADP/ATP transportase (BmANT)

Zhanqi Dong<sup>1,2</sup>, Yaming Jiang<sup>1,2</sup>, Peng Chen<sup>1,2</sup>, Minhui Pan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Southwest University, Chongqing 400716, China

**Abstract:** [Objective] *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) belongs to the family *Baculoviridae*. It replicates and proliferates using its host cell's energy metabolism. *Bombyx mori* ADP/ATP translocase (BmANT) is a transporter that interacts with the host energy metabolism factor, heat shock protein 60 (BmHSP60), during BmNPV infection. To determine which of the functional characteristics of the *Bmant* gene affect the process of BmNPV infection, we here analyze the mechanism by which the baculovirus hijacks host cytokines to promote viral proliferation and replication. [Methods] The structural characteristics of the *Bmant* gene were predicted, and qRT-PCR was performed to analyze the changes in the *Bmant* gene after BmNPV infection. The effect of this gene on viral DNA replication and viral protein expression was analyzed using overexpression of the *Bmant* gene. We further analyzed the relationship between the *Bmant* and *Bmhsp60* genes in transcriptional regulation. The mechanism by which *Bmant* and *Bmhsp60* regulates the proliferation and replication of BmNPV was identified using flow cytometry and Western blotting analysis. [Results] SMART software predicted that BmANT protein contained three mitochondrial vector domains, and the *Bmant* gene down-regulated expression 24 h after BmNPV infection. Overexpression of the *Bmant* gene significantly inhibited BmNPV DNA replication and VP39 protein expression. QRT-PCR analysis showed the *Bmant* and *Bmhsp60* genes to have mutual antagonism and to be capable of inhibiting each other's transcription. Co-transfection analysis of the *Bmant* and *Bmhsp60* genes showed that the *Bmant* gene can significantly inhibit the action of the *Bmhsp60* gene and ultimately inhibit the proliferation and replication of BmNPV. [Conclusion] The results indicated that the *Bmant* gene is a mitochondrial carrier protein with significant antiviral activity that is capable of down-regulating the expression of *Bmhsp60* and inhibiting BmNPV proliferation and replication.

**Keywords:** *Bombyx mori*, BmNPV, BmANT, BmHSP60, antiviral

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872427), by the State of Sericulture Industry Technology System (CARS-18), by the China Postdoctoral Science Foundation (2018M633309) and by the Chongqing Special Postdoctoral Science Foundation (XmT2018020).

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

Received: 20 September 2018; Revised: 12 January 2019; Published online: 13 March 2019