



家蚕核型多角体病毒 BmNPV 泛素基因缺失显著降低病毒增殖效率

许慧鑫, 刘芸芸, 祁馨宇, 唐琦, 李国辉*

江苏大学生命科学学院, 江苏 镇江 212013

许慧鑫, 刘芸芸, 祁馨宇, 唐琦, 李国辉. 家蚕核型多角体病毒 BmNPV 泛素基因缺失显著降低病毒增殖效率[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2909-2920.

XU Huixin, LIU Yunyun, QI Xinyu, TANG Qi, LI Guohui. The absence of ubiquitin gene reduces the proliferation efficiency of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2909-2920.

摘要: 【目的】泛素是一类进化上高度保守的、由 76 个氨基酸组成的多肽, 是蛋白质泛素化修饰过程中所必需的底物分子, 蛋白质泛素化修饰异常会影响宿主的生长和发育。家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)基因 orf26 是一个编码病毒泛素的基因, 其在病毒增殖中的具体功能尚不清楚。【方法】本研究利用同源重组的方法将氯霉素(chloramphenicol)基因(*Cm*)表达盒替换家蚕杆状病毒泛素基因序列 3'端的 50 个碱基对序列, 构建携带 *Cm* 表达盒的重组 BmNPV 病毒基因组(Bm-Bacmid^{Ub-KO}), 利用转座原理将绿色荧光蛋白基因(*green fluorescent protein, gfp*)表达盒插入 Bm-Bacmid^{Ub-KO} 和野生型 Bm-Bacmid^{WT} 转座位点, 构建重组质粒 Bm-Bacmid^{Ub-KO-GFP} 和 Bm-Bacmid^{WT-GFP}, 以及异位互补型的质粒 Bm-Bacmid^{GFP-UbRep}。这些重组病毒分别转染家蚕卵巢细胞(*Bombyx mori* ovarian cell, BmN)后, 对转染后的细胞进行绿色荧光观察。【结果】泛素基因缺失后不影响感染性病毒粒子的产生, 但与野生型相比, 泛素缺失型重组病毒明显降低了感染的细胞中产生的绿色荧光数量。免疫印迹分析表明, 泛素缺失后降低重组病毒结构蛋白 GP64 和 VP39 在细胞中的表达水平, 显著降低病毒增殖效率。生物分析表明, 泛素缺失的重组病毒能延缓家蚕半致死时间 15 h。【结论】BmNPV 泛素基因缺失不影响感染性病毒粒子的产生, 但显著降低病毒增殖效率。本研究为阐明泛素在 BmNPV 增殖中的具体作用提供了实验依据。

关键词: 家蚕; 家蚕核型多角体病毒(BmNPV); 泛素; 病毒

资助项目: 国家自然科学基金(32072794)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072794).

*Corresponding author. Tel: +86-511-88788933, E-mail: ghli@ujls.edu.cn

Received: 2022-12-07; Accepted: 2023-02-22; Published online: 2023-02-26

The absence of ubiquitin gene reduces the proliferation efficiency of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)

XU Huixin, LIU Yunyun, QI Xinyu, TANG Qi, LI Guohui*

School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Ubiquitins, a class of highly conserved 76-amino acid peptides, are essential substrate molecules in the ubiquitination of proteins. The abnormal ubiquitination of proteins is directly associated with the individual growth and development. The role of orf26, a gene encoding ubiquitin of silkworm baculovirus, in virus proliferation remains unclear. [Methods] The chloramphenicol gene (*Cm*) expression cassette was used to replace a 50 bp fragment at the 3' end of the ubiquitin gene sequence by homologous recombination, and the recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) carrying *Cm* expression cassette (Bm-Bacmid^{Ub-KO}) was constructed. A green fluorescent protein expression cassette was inserted into Bm-Bacmid^{Ub-KO} and Bm-Bacmid^{WT} via transposition for the construction of recombinant Bm-Bacmid^{Ub-KO-GFP} and Bm-Bacmid^{WT-GFP}, respectively. Meanwhile, the repair type of Bm-Bacmid^{GFP-UbRep} was constructed in the study. [Results] The deletion of ubiquitin gene did not affect the generation of infectious virions in BmN cells, while it decreased the production of progeny virions. Western blotting showcased that the deletion of ubiquitin gene down-regulated the expression levels of viral structural proteins GP64 and VP39, which were directly involved in the production of progeny virions. Furthermore, the bioassay results showed that the deletion of ubiquitin gene caused a 15-h delay in the median lethal time of silkworm. [Conclusion] The deletion of ubiquitin gene in BmNPV did not affect the production of infectious virions while significantly reducing the efficiency of viral proliferation. This study lays a foundation for clarifying the specific role of ubiquitin in BmNPV proliferation.

Keywords: silkworm; *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV); ubiquitin; virus

细胞内主要有 2 条蛋白质降解途径，一条是通过细胞自噬对包裹在膜泡里的蛋白质进行降解；另一条是泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)降解途径，在泛素酶 1 (E1)、泛素转移酶 2 (E2)和泛素连接酶 3 (E3)的级联催化作用下，泛素分子可以偶联到靶蛋白赖氨酸残基位点上，形成单泛素化和多聚泛素化的蛋白质翻译后修饰方式，泛素化的靶蛋白随后能被 26S 蛋白酶体识别并发生降解^[1-2]。

泛素的功能在哺乳动物中已经得到广泛的

解析，胞内众多的蛋白质以动态性的方式发生单泛素化或者多泛素化，泛素化发生位点也各有不同，从而调控蛋白质的稳定性、亚细胞定位及其生物功能。现有的证据表明，泛素与细胞周期控制、细胞凋亡、蛋白质转运、信号途径、DNA 损伤修复、疾病发生和发展都密切相关^[3-4]。泛素化修饰在调控蛋白质的稳定性和半衰期、及时清理胞内一些无功能的蛋白质过程中起重要的作用，由此可见，维持胞内蛋白质合成和降解之间的动态平衡与个体正常生长、发育直接相关。

泛素化在病毒增殖过程中是一把双刃剑, 宿主细胞利用泛素化对病毒靶蛋白进行降解, 限制病毒增殖; 另一方面, 病毒能操纵泛素-蛋白酶系统来降解胞内的限制因子, 从而促进病毒增殖^[5]。一些病毒蛋白发生泛素化修饰后被降解, 包括甲型流感病毒编码的 NP 蛋白、M2 蛋白和 PB1 蛋白, 登革热病毒编码的 NP 蛋白和疱疹病毒等病毒编码的一些蛋白通过泛素化修饰发生降解^[5]。已有文献报道, 蛋白质泛素化修饰在病毒去衣壳、病毒 DNA 复制、基因转录、子代病毒粒子组装、囊膜包裹及子代病毒粒子释放等多个阶段中都具有重要作用, 蛋白质泛素化也能调控宿主抗病毒免疫反应^[5-7]。然而, 不管是宿主蛋白质还是病毒蛋白质, 它们都是利用宿主编码的泛素作为蛋白质翻译后修饰的底物。病毒编码的泛素是否具有相似的功能仍不清楚, 病毒编码的泛素被用作蛋白质翻译后修饰的底物来源也鲜有报道。

几乎所有的鳞翅目昆虫病毒都编码泛素分子, 杆状病毒泛素与真核生物泛素序列有 75% 的一致性, 1995 年, Guarino 等^[8]首次发现病毒泛素分子定位于苜蓿银纹夜蛾核多角病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 出芽型病毒(budded virus, BV)颗粒上, 泛素与 BV 囊膜内部的糖基磷脂酰肌醇发生共价偶联, 表明病毒编码的泛素与病毒粒子的结构组装相关。AcMNPV 编码的泛素基因缺失后, BV 芽生型子代病毒粒子的产量会降低到原来的 1/5-1/10, 推测病毒编码的泛素可能参与病毒颗粒的形成。此外, AcMNPV 编码的泛素基因的生化实验结果表明, 杆状病毒编码的泛素可能在病毒复制中起作用, 以阻止宿主降解途径对短寿命蛋白质的破坏^[9]。家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)编码的泛素蛋白的氨基酸序列与 AcMNPV 编码的几乎完全相

同, Katsuma 等^[10]对 BmNPV 泛素蛋白进行研究时发现, BmNPV 基因组中缺失泛素基因后, 未观察到任何表型缺陷, 与 AcMNPV 编码的泛素基因功能不同。

BmNPV 是一种囊膜包裹的 DNA 双链病毒, 该病毒对家蚕的传染性很强, 感染该病毒的家蚕会罹患血液型脓病。1999 年, Gomi 等^[11]完成了 BmNPV 的基因组序列测序和分析, 其基因组大小为 80-180 kb, 编码大约 100-200 个基因, 其基因功能已经得到广泛注释, 这些功能解析为深入了解病毒侵染、DNA 复制、核衣壳组装、病毒粒子释放及与宿主之间的博弈提供科学依据^[12]。BmNPV orf26 基因编码一个理论序列长度为 77 个氨基酸的泛素, 其在病毒增殖过程中的具体功能仍不清楚, 为此, 本研究构建泛素基因缺失的重组病毒以及融合有 flag 标签的泛素补回型重组病毒, 检测了这些重组型病毒对家蚕卵巢细胞(BmN)增殖的影响, 研究结果为阐明泛素在 BmNPV 增殖中的具体作用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、病毒

HTB-P_{te1}-EGFP 和 pUC118-Cm 质粒由本实验室构建并保存。BmNPV Bacmid 由日本静冈大学 Enoc Y. Park 博士惠赠, BmNPV Ub 缺失的 Bacmid (Bm-bacmid^{UbKO})由本实验室构建并保存。pMON14272 大质粒(即 BmNPV Bacmid)、pMON7124 (提供转座酶的辅助质粒)和 pBAD-gbaA (提供同源重组酶的质粒)均保存于本实验室大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH10Bac 中。

1.1.2 试剂和抗体

VP39 抗体来源于中科院武汉病毒所胡志红教授惠赠、GP64 单克隆抗体购自 Abcam 公

司; 卡那霉素、氨卞青霉素购自 Sigma 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、*rTaq* 酶和 pMD19-T 载体、5000 bp DNA Ladder Marker 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取和胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 蛋白质预染 Marker 购自南京斯博慕生物科技有限公司; 兔源的 Mcherry 抗体购自 Proteintech 公司; 偶联有 HRP 的羊抗兔二抗购自北京全式金生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂购自 Thermo Fisher 公司。

1.2 引物设计与合成

设计引物, 如表 1 中所示。以 Ub-US-F 和 Ub-US-R 为引物对, 以 BmNPV bacmid 为模板扩增, PCR 产物理论序列长度为 565 bp 的 DNA 片段, 作为同源重组的上游片段。以 Ub-DS-F 和 Ub-DS-R 为引物对, 以 BmNPV bacmid 为模板扩增, PCR 产物理论序列长度为 524 bp 的 DNA 片段, 作为同源重组的下游片段。以 Ub-Flag-F 和 Ub-Flag-R 为引物对, 以 BmNPV bacmid 为

模板进行 PCR 扩增, 获得的 DNA 片段含有泛素自身启动子控制的泛素表达盒, 且泛素 C 端融合有 flag 标签。引物合成和序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 重组质粒 pUC118-US-Cm-DS、HTB-P_{ie1}-EGFP-P_{Ub}-Ub-flag 的构建和 BmNPV 泛素基因的敲除

分别以 Ub-US-F 和 Ub-US-R、Ub-DS-F 和 Ub-DS-R 为引物对, 从 bacmid 中扩增用于同源重组的上游片段 US 和下游片段 DS, 依次通过酶切连接的方法与经过同样双酶切的 pUC118-Cm 进行连接, 产生重组质粒 pUC118-US-Cm-DS。对 pUC118-US-Cm-DS 进行 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切, 回收得到三联体片段 US-Cm-DS。将 1 μg 回收的 US-Cm-DS 片段电击转化 DH10B 感受态细胞, 进行多轮 PCR 鉴定。将 Ub-Flag-F 和 Ub-Flag-R 从 Bm-bacmid 扩增的产物进行 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切, 将回收的酶切产物与经同样双

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primers	Primer sequence (5'→3')	Enzyme digestion site	Targeted site
Ub-US-F	<u>CCAAGCTT</u> CAATCGGCGTGCCTGTAAC	<i>Hind</i> III	To amplify the 565 bp upstream fragment as a homologous recombination
Ub-US-R	AACTGCAGCTTCCAATTGTTGCCCGC	<i>Pst</i> I	
Ub-DS-F	CGGGATCCATGGTGTTACGATTACGAGGAGG	<i>Bam</i> H I	To amplify the downstream fragment of 524 bp as a homologous recombination
Ub-DS-R	AGGGTACCTCAAGCGACAACGCAGCA	<i>Kpn</i> I	
Ub-Flag-F	GGACTAGTTCACCTTAAAATCGTCGTCAGCTTC	<i>Spe</i> I	To obtain the DNA fragment containing the ubiquitin expression cassette controlled by its own promoter
Ub-Flag-R	TACTCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCATACCCTCCTCGTAATCGTAACACC	<i>Xho</i> I	
Cm-F	<u>GGATCC</u> CCTTCGAATAAATACCTGTGA	<i>Bam</i> H I	To amplify <i>Cm</i> fragments for homologous recombination
Cm-R	<u>CTGCAG</u> AACCAGCAATAGACATAAGC	<i>Pst</i> I	
M13-F	GTTTTCCAGTCACGAC		In order to verify the fragments of homologous recombination
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC		
GP64-F	AT <u>CTGCAG</u> ATGCTACTAGTAAATCAGT	<i>Pst</i> I	To amplify 1 700 bp of GP64 DNA fragment for qPCR
GP64-R	TACTCGAGTTAATATTGTCTACTATTACG	<i>Xho</i> I	
qGP64-F	CGATGCGGCGTTTCTAC		For qPCR
qGP64-R	GTTGCCCTCAGCGTCCA		

Underlined letters indicate restriction enzyme digestion sites.

酶切的载体 HTB-P_{ie1}-EGFP 进行连接, 转化后进行鉴定, 将鉴定正确的重组质粒命名为 HTB-P_{ie1}-EGFP-P_{Ub}-Ub-flag。

1.4 三种重组质粒 Bm^{WT-GFP}、Bm^{UbKO-GFP} 和 Bm^{UbRep-GFP} 的构建

为便于观察泛素基因缺失对病毒增殖的影响, 参照 Li 等^[13]的方法构建 3 种重组质粒 Bm^{WT-GFP}、Bm^{UbKO-GFP} 和 Bm^{UbRep-GFP}。在转座酶的作用下, 将质粒 HTB-P_{ie1}-EGFP 分别对 Bm^{WT} 和 Bm^{UbKO} 进行转座, 将绿色荧光蛋白表达盒定点引入到 Bm-bacmid 转座位点构建 Bm^{WT-GFP} 和 Bm^{UbKO-GFP}。另外, 将 HTB-P_{ie1}-EGFP-P_{Ub}-Ub-flag 转座 Bm-bacmid^{UbKO}, 获得重组质粒 Bm-bacmid^{UbRep-GFP}。为获取成功转座的重组 bacmid, 通过蓝白斑筛选, 对平板上的白斑进行 PCR 鉴定。以 Bm^{WT-GFP}、Bm^{UbKO-GFP} 和 Bm^{UbRep-GFP} 为模板, 利用 M13-F/M13-R 引物对其进行 PCR 扩增, 理论上以 Bm^{WT} 为模板的 PCR 扩增产物为 283 bp, 电泳结果与理论预期相符。分别以 M13-F/M13-R 和 ie1-F/EGFP-R 为引物对, 以 Bm^{WT-GFP} 和 Bm^{UbKO-GFP} 为模板, 扩增产物长度大约为 3 600 bp 和 1 200 bp, 电泳结果与预期相符。以 Bm^{UbRep-GFP} 为模板, 引物对 M13-F/M13-R、ie1-F/EGFP-R、M13-F/Ub-flag-R 和 Ub-flag-F/M13-R 扩增产物长度与理论序列均完全一致。

1.5 Western blotting 分析

分别收集重组病毒 BmNPV-P_{ie1}-Mcherry、BmNPV-P_{ie1}-Mcherry-Ub 和 BmNPV-P_{ie1}-Ub-Mcherry 感染后的 BmN 细胞总蛋白, 蛋白浓度测定按照 BCA Protein Assay Kit (Pierce) 使用说明进行, 每个泳道蛋白上样量为 30 μg, 对转膜后的蛋白进行 Western blotting 分析, 由于 BmNPV 编码的泛素 N 端或者 C 端都融合有 Mcherry, 利用兔源的 Mcherry 抗体(Proteintech, 26765-1-AP)

进行孵育, 偶联有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的羊抗兔为二抗(北京全式金生物技术股份有限公司), 利用 ECL 化学发光试剂(Thermo Fisher)对其进行显色。

1.6 qPCR 标准曲线的建立

由于 Bm^{WT-GFP} 和 Bm^{UbKO-GFP} 中含有 GP64 基因, 为揭示泛素缺失对病毒 DNA 增殖的影响, 利用 GP64 设计特异性引物对其进行 qPCR 验证。以 Bm-bacmid 为模板, 利用 GP64-F/GP64-R 引物对进行 PCR 扩增, 获得一条大小约 1 700 bp 的 GP64 靶 DNA 条带。对该条带进行切胶回收纯化, 切胶回收后的扩增片段与 pMD19-T 载体进行连接, 得到标准质粒 pMD19T-GP64。根据标准质粒浓度, 代入公式: copies/μL=(质粒浓度 ng/μL×10⁻⁹)×(6.02×10²³)/(650×质粒 bp), 计算出标准质粒的拷贝数。根据拷贝数稀释标准质粒, 获得 100 μL 分子量为 1×10⁹ 的稀释后质粒, 并由此进行梯度得到 1×10⁸、1×10⁷……1×10² 分子量的稀释质粒, 利用基于 SYBR Green 的 qPCR 来分析得到标准曲线。

1.7 病毒毒力分析

参照 Li 等^[14]方法对重组病毒 Bm^{WT-GFP}、Bm^{UbKO-GFP} 和 Bm^{UbRep-GFP} 对家蚕半致死时间进行测定, 以病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1 注射 306 品系五龄家蚕起蚕, 利用微量注射器从家蚕第三腹足皮下分别注射 3 种病毒, 每种病毒注射 30 头, 统计每天家蚕死亡头数, 实验重复 3 次。利用 SPSS 16.0 软件计算各病毒的半数致死时间(median lethal time, LT₅₀)。

2 结果与分析

2.1 BmNPV 编码的泛素序列同源比对分析

BmNPV 编码的泛素只有 77 个氨基酸, 理论分子量为 8.6 kDa, 为阐明家蚕杆状病毒编码泛素的具体功能, 对家蚕杆状病毒编码的泛素序列之

间的同源性进行分析。在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 搜寻其同源蛋白, 分别为 BmNPV (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus) NP_047441.1、AcMNPV (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) AAA46751.1、AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus) YP_009316153.1、HcNPV (*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus) UIX56252.1、ApNPV (*Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus) YP_611089.1、DapuNPV (*Dasychira pudibunda* nucleopolyhedrovirus) AKR14208.1、CfMNPV (*Choristoneura fumiferana* multiple nucleopolyhedrovirus) NP_848337.1、ChocNPV (*Choristoneura occidentalis* alphabaculovirus) AGR57014.1、ChmuNPV (*Choristoneura murinana* nucleopolyhedrovirus) YP_008992217.1、EppoMNPV (*Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus) NP_203192.1、DkNPV (*Dendrolimus kikuchii* nucleopolyhedrovirus) AFS51993.1、CyunNPV (*Cyclophragma undans* nucleopolyhedrovirus) YP_010086717.1、LoobMNPV (*Lonomia obliqua* multiple nucleopolyhedrovirus) YP_009666471.1、OxocNPV (*Oxyplax ochracea* nucleopolyhedrovirus) YP_009666646.1、ThorNPV (*Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus) YP_007250445.1、PaviNPV (*Palpita vitrealis* nucleopolyhedrovirus) USC25887.1、TraeNPV (*Troides aeacus* nucleopolyhedrovirus) QCF61045.1、MaviNPV (*Maruca vitrata* nucleopolyhedrovirus) YP_950754.1、PlxyGV (*Plutella xylostella* granulovirus) NP_068261.1、HearGV (*Helicoverpa armigera* granulovirus) YP_001649029.1、SfMNPV (*Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus) YP_001036416.1 和 *Homo sapiens* 4JIO_U。参照 Li 等^[13]的方法, 利用 Clustal 软件和 Genedoc 软件, 对 BmNPV 编码的泛素(NP_047441.1)与其他昆虫病毒同源蛋白进行多序列比对并对比

对结果进行编辑。多序列比对分析结果发现, BmNPV 泛素(NP_001153667.1)与 AcMNPV 泛素(AAA46751.1)完全一致, 与其他杆状病毒编码的泛素一致性为 78%–99%, 表明家蚕杆状病毒编码的泛素蛋白序列高度保守, 推测其在病毒增殖过程中起着相同的作用。

2.2 重组病毒的构建

为获得泛素基因缺失的 Bm-bacmid (图 1A), 通过构建三联体同源片段, 在同源重组酶的作用下, 利用同源重组的方法将 *Cm* 表达盒取代杆状病毒泛素基因中的 50 bp, 结果如图 1B 所示。以 Cm-F/Cm-R 引物对, 分别对缺失型和野生型的 Bm-bacmid 进行 PCR 扩增, 从缺失型 Bm-bacmid^{UbKO} 中能扩增到氯霉素表达盒, 其长度为 1 039 bp 的 DNA 片段; 而野生型扩增不到任何片段, 扩增结果表明与理论预期一致, 表明 *Cm* 表达盒已成功替换 Bm-bacmid^{UbKO} 中的 Ub 基因特定区域。

为进一步确定 *Cm* 表达盒成功取代杆状病毒泛素基因中的特定区域, 分别以引物对 Ub-US-F/Cm-R 和 Cm-F/Ub-DS-R 对野生型和缺失型 Bm-bacmid 进行 PCR 扩增, 理论上, 野生型中无任何 DNA 扩增产物, 缺失型中 Ub-US-F/Cm-R 扩增产物片段长度为 1 604 bp、Cm-F/Ub-DS-R 扩增产物长度为 1 563 bp, 电泳结果与理论预期一致。以 Ub-US-F/Ub-DS-R 为引物对, 分别在缺失型中扩增 2 124 bp 和野生型中扩增 1 139 bp, 电泳结果(图 1B)与理论相一致。

为便于观察泛素基因缺失对病毒增殖的影响, 在转座酶的作用下, 将构建的转座质粒 HTB-P_{ie1}-EGFP 分别对 Bm^{WT} 和 Bm^{UbKO} 进行转座, 将绿色荧光蛋白表达盒定点引入到杆状病毒 Bm-bacmid 转座位点构建 Bm^{WT-GFP} 和 Bm^{UbKO-GFP}。另外, 将 HTB-P_{ie1}-EGFP-P_{Ub}-Ub-flag 转座 Bm^{UbKO}, 获得重组 Bm^{UbRep-GFP}。为获得发生成功转座的

重组 bacmid, 通过蓝白斑筛选, 对平板上的白斑进行 PCR 鉴定。以 Bm^{WT-GFP} 、 $Bm^{UbKO-GFP}$ 和 $Bm^{UbRep-GFP}$ 为模板, 利用 M13-F/M13-R 引物对其进行 PCR 扩增, 理论上以 Bm^{WT} 为模板的 PCR 扩增产物为 283 bp, 电泳结果与理论预期相符。分别以 M13-F/M13-R 和 ie1-F/EGFP-R 为引物对, 以 Bm^{WT-GFP} 和 $Bm^{UbKO-GFP}$ 为模板, 扩增产物长度大约为 3 600 bp 和 1 200 bp, 电

泳结果与预期相符。以 $Bm^{UbRep-GFP}$ 为模板, 引物对 M13-F/M13-R、ie1-F/EGFP-R、M13-F/Ub-flag-R 和 Ub-flag-F/M13-R 扩增的 DNA 产物长度与理论序列都完全一致(图 1C)。

2.3 杆状病毒泛素基因缺失不影响感染性子代病毒粒子的产生

通过脂质体转染的方法, 分别将构建的 3 种重组质粒 Bm^{WT-GFP} 、 $Bm^{UbKO-GFP}$ 和 $Bm^{UbRep-GFP}$

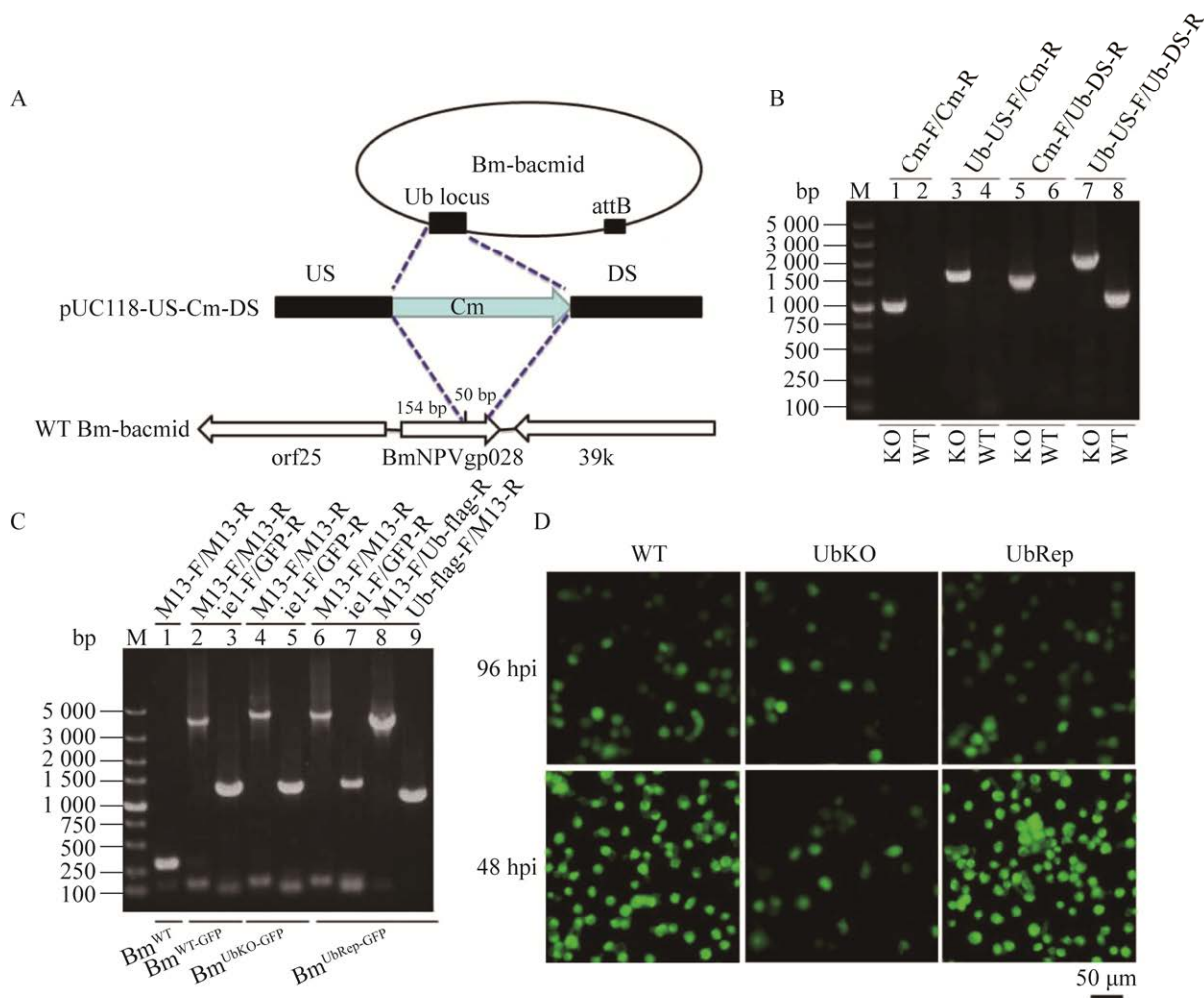


图 1 杆状病毒泛素基因缺失对病毒增殖的影响

Figure 1 Effect of the deletion of BmNPV ubiquitin gene on viral propagation. A: Strategy for the deletion of BmNPV ubiquitin gene by homologous recombination. B: PCR confirmation of ubiquitin-deleted Bm-bacmid by different primer pairs. C: PCR analysis of three recombinant plasmids Bm-bacmids of Bm^{WT-GFP} , $Bm^{UbKO-GFP}$ and $Bm^{UbRep-GFP}$ with different primer pairs. D: Fluorescence micrographs of BmN cells transfected with the three bacmids after transfection 96 hpi, and infected with viruses after infection 48 hpi.

转染 BmN 细胞, 转染 96 h 后进行绿色荧光显微观察, 结果如图 1D 所示。泛素缺失型病毒感染的 BmN 细胞中, 绿色荧光信号数量明显少于野生型和补回型病毒感染细胞中的荧光强度, 收集转染上清并感染 BmN 细胞, 发现感染后的细胞中也有绿色荧光, 荧光信号随着感染时间的延长, 荧光信号越来越强。与野生型和补回型病毒相比, 泛素缺失型病毒感染的细胞中荧光强度较弱, 说明杆状病毒泛素基因缺失抑制病毒的增殖, 其与病毒增殖效率相关。

2.4 杆状病毒泛素基因缺失下调病毒结构蛋白的表达

为深入研究杆状病毒泛素基因缺失对病毒结构蛋白表达的影响, 将相同病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 5 的野生型病毒和泛素缺失型病毒感染 BmN 细胞, 分别收集病毒感染细胞 24、48、72、96 h 后的细胞样品, 每个泳道上样 30 μg , 对这些样品总蛋白进行 Western blotting 分析(图 2)。与野生型病毒相比, 泛素缺失型的杆状病毒感染后的 BmN 细胞中, 结构蛋白 VP39 和 GP64 的表达水平发生显著下调, 表明泛素基因缺失抑制病毒结构蛋白的表

达水平, 影响子代病毒粒子增殖效率, 与子代病毒粒子的产量直接相关。

2.5 qPCR 分析泛素缺失对病毒 DNA 复制的影响

为了确保 qPCR 的准确性, 选取 1×10^9 – 1×10^3 copies/ μL 对应的 7 个点构建标准曲线, 通过 GraphPad 软件分析得到标准方程的方程式为: $y = -1.192 \ln(x) + 36.615$, $R^2 = 0.9979$ (图 3B)。并得到标准质粒实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 溶解曲线(图 3A)和扩增曲线(图 3C)。为深入研究泛素缺失型病毒对病毒 DNA 复制的影响, 将 MOI 为 5 的野生型病毒和泛素缺失型病毒分别感染 BmN 细胞, 分别收集病毒感染 BmN 细胞后 24、48、72、96 h 不同时间点的细胞样品, 抽提病毒感染后的细胞总基因组, 以引物对 qGP64-F/qGP64-R 对其进行 qPCR 分析。如图 3D 所示, 在感染后 24 h, 野生型病毒和泛素缺失型病毒的基因组拷贝数差异不显著, 而在感染后 48、72、96 h, 野生型病毒的基因组拷贝数明显高于泛素缺失型病毒的基因组拷贝数 ($P < 0.001$)。

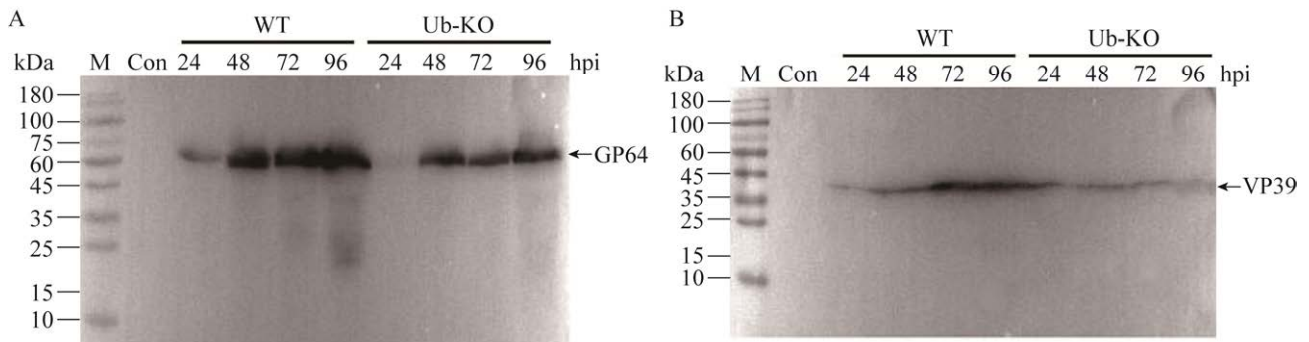


图 2 杆状病毒泛素基因缺失下调 GP64 和 VP39 的表达

Figure 2 Downregulation of the expression of GP64 and VP39 in BmN cells infected with ubiquitin-deleted virus. A: Western blotting analysis of GP64 from the extract of BmN cells infected with wild type BmNPV and ubiquitin-deleted BmNPV. B: Western blotting analysis of VP39 from the extract of BmN cells infected with wild BmNPV and ubiquitin-deleted BmNPV.

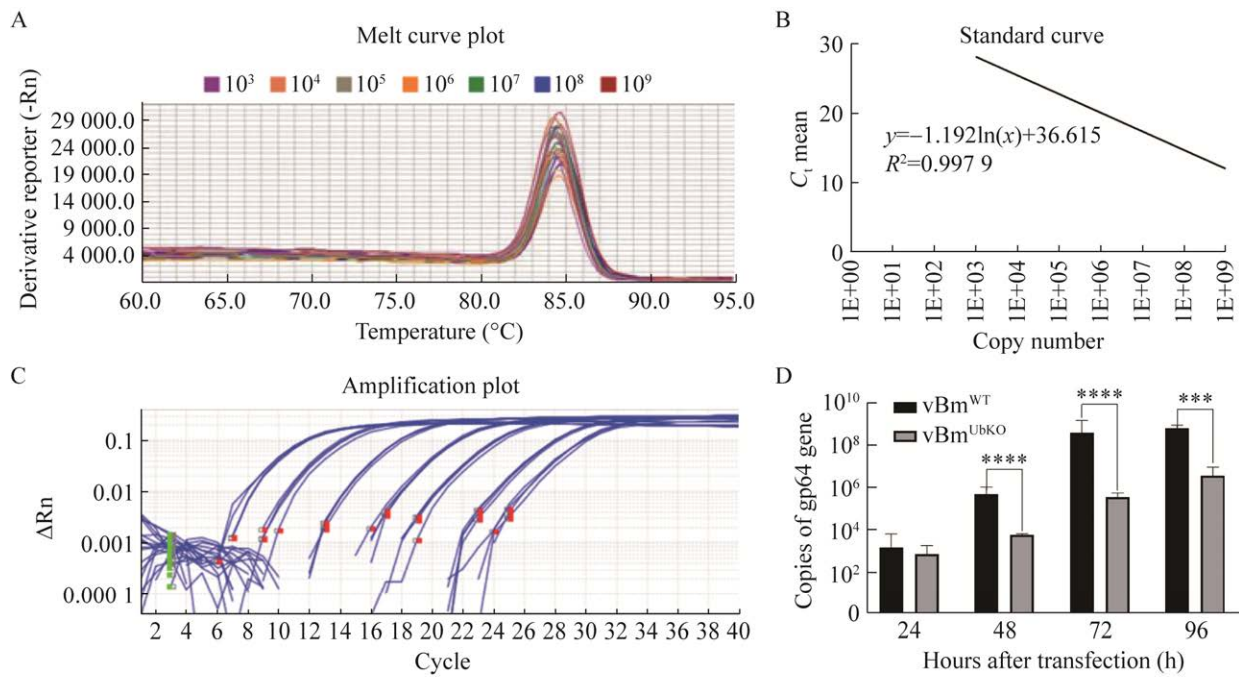


图3 qPCR 分析泛素缺失对病毒 DNA 复制的影响

Figure 3 qPCR analysis of ubiquitin deletion on the replication of viral DNA. A: Melt curve plot of PCR. B: Drawing of standard curve of different concentration of GP64. C: Amplification plot of GP64. D: GP64 gene copies in BmN cells infected with Bm^{WT-GFP} and Bm^{UbKO-GFP} after 24, 48, 72 and 96 hpi, respectively.

2.6 BmNPV 编码的泛素在 BmN 细胞中的定位分析

在本研究中, 用构建的 2 种重组病毒 BmNPV-P_{ie1}-Mcherry-Ub 和 BmNPV-P_{ie1}-Ub-Mcherry 分别感染 BmN 细胞, 对泛素 N 端和 C 端分别融合有 Mcherry 的融合蛋白 Mcherry-Ub 和 Ub-Mcherry 进行 Western blotting 分析, 同时对胞内的红色荧光进行荧光显微观察, 结果发现: 将 Mcherry 融合在 BmNPV 泛素 N 端或 C 端, 对胞内红色荧光信号观察时出现 2 种完全不同的结果, Mcherry 融合在泛素 N 端, 红色荧光主要分布在细胞核中(图 4A), Western blotting 分析表明 Mcherry 融合在泛素 N 端时主要以融合表达的形式存在(图 4B 泳道 3、4); 而将 Mcherry 融合在泛素 C 端时, 红色荧光均匀分布在细胞中, Western blotting 分析表明

Mcherry 融合在泛素 C 端时, 通过 Mcherry 抗体检测到的蛋白条带主要是 Mcherry 自身序列长度, 在其上方也显示出一条淡淡的融合有 Ub 分子的 Mcherry 融合条带(图 4B 泳道 5、6), 其丰度明显低于融合蛋白 Mcherry-Ub 的丰度, 以 BmNPV-P_{ie1}-Mcherry 病毒感染的 BmN 细胞中表达的 Mcherry 蛋白为对照(图 4B 泳道 2), 说明 Ub 分子 C 端融合 Mcherry 时, 会影响 Ub-Mcherry 融合蛋白的稳定性, Mcherry 会从 Ub 分子 C 端发生断裂或者酶切, 而 Ub 分子 N 端融合有 Mcherry 时, Mcherry-Ub 在胞内能够稳定存在。

2.7 重组病毒毒力生物分析

将重组病毒 Bm^{WT-GFP}、Bm^{UbKO-GFP} 和 Bm^{UbRep-GFP}, MOI 为 1 注射 306 品种五龄家蚕起蚕, 每种病毒注射 30 头, 统计每天家蚕死亡头数, 实验重复

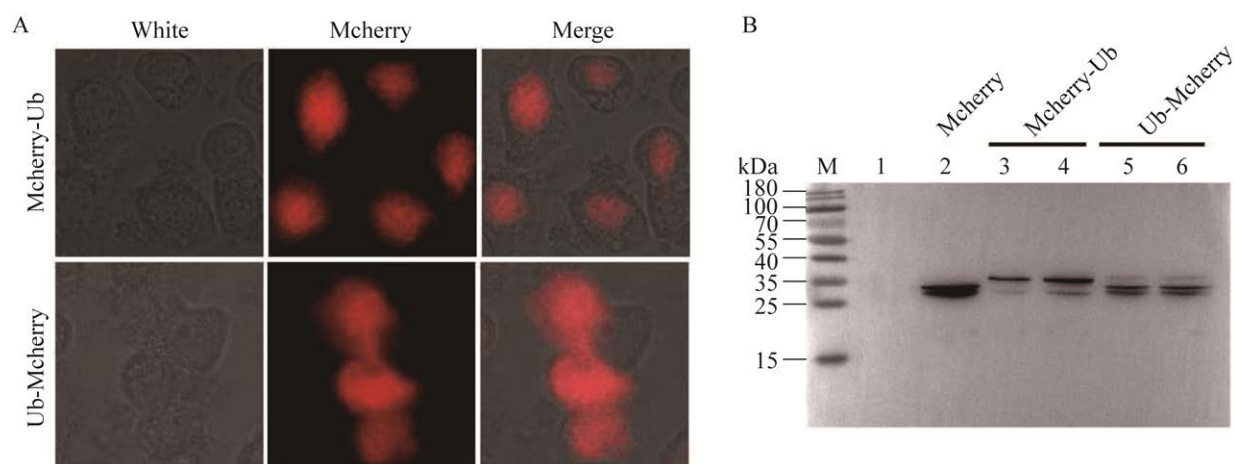


图 4 BmNPV 编码的泛素亚细胞定位分析

Figure 4 Subcellular analysis of BmNPV ubiquitin in virus-infected BmN cells. A: Fluorescence microscopy observation of ubiquitin fusion with Mcherry. B: Western blotting analysis of BmN cells infected with viruses using antibodies against Mcherry.

3 次，利用 SPSS 16.0 软件计算各病毒的半数致死时间(median lethal time, LT_{50})，统计结果如表 2 所示，泛素缺失型的重组病毒 $Bm^{UbKO-GFP}$ 较野生型 Bm^{WT-GFP} 相比，延缓家蚕半数致死时间 15 h。

3 讨论与结论

杆状病毒科是目前唯一已知能够编码泛素同源蛋白的一类病毒，杆状病毒 BmNPV 编码的泛素由 77 个氨基酸组成，哺乳动物编码的泛素由 76 个氨基酸组成，它们仅存在 1 个氨基酸长度的差异，且同源序列比对显示其与哺乳动物编码的泛素分子之间存在 76.32% 的序列一致性。因此，尽管病毒与哺乳动物之间差异很大，

但它们编码的泛素分子之间具有高度同源性，推测 NPV 泛素分子可能参与蛋白降解和病毒感染扩增过程。

本研究通过同源重组对 BmNPV 泛素基因中间序列 50 bp 进行敲除(图 1A)，该基因敲除位点上游保留 154 bp、下游位点保留 30 bp，缺失序列被 *Cm* 表达盒所取代，利用 *Cm* 抗性筛选出泛素基因缺失的重组 $Bm-Bacmid^{Ub-KO}$ ，由于泛素基因中间序列被外源 DNA 所替换，基因中间插入一段外源表达盒，尽管从理论上来说插入位点上游还可能发生转录并翻译出一段截短蛋白，但是由于 ORF 完整性发生破坏，会影响转录因子对其进行识别，从而导致转录破坏。另外，泛素是一个高度保守的小肽，主要对靶蛋白进行翻译后修饰，调控它们的生物活性，而截短后的泛素不能作为泛素修饰底物分子，因此，发生截短的泛素肽链一般不认为具有类似的泛素修饰功能。

在本研究中，为了实验的严谨性，抽提缺失 50 bp 的泛素缺失型重组病毒 vBm^{Ub-KO} 和野生型病毒 BmNPV 感染的细胞总 RNA，利用

表 2 各病毒对家蚕的半数致死时间

Table 2 Median lethal time of silkworm treated with three viruses

Virus	LT_{50}	95% fiducial limit (h)	
		Lower	Upper
$Bm^{UbKO-GFP}$	135	114.48	144.72
$Bm^{UbRep-GFP}$	118	112.16	128.24
Bm^{WT-GFP}	120	113.28	127.20

RT-PCR对泛素缺失位点上游154 bp进行扩增,结果未扩增到目的条带(结果未显示),而野生型中能扩增到目的条带,表明该50 bp序列缺失后,影响了泛素基因表达盒的完整性,从而导致其不被转录或者转录出来的截短转录本半衰期很短,容易发生降解。

另外,本研究发现泛素缺失后显著降低病毒晚期蛋白GP64和VP39的表达,并减低了子代病毒粒子的增殖效率,也从正面验证了泛素缺失后对病毒增殖的影响。通过转座的方法,构建携带绿色荧光标记的重组病毒,结果发现泛素基因缺失后,在转染和感染的细胞中,都能产生具有感染性的BV病毒粒子,是病毒增殖的非必需基因,但与野生型相比,细胞中的荧光信号明显减少,表明泛素缺失后,子代病毒粒子BV的产量发生显著下降。为深入探究泛素降低子代病毒粒子产量的分子机制,本研究对其在细胞中的定位进行分析,结果发现泛素N端融合有Mcherry的融合蛋白,其主要定位在BmN细胞核中,推测BmNPV编码的泛素能调控病毒基因的转录水平,从而影响病毒蛋白表达和子代病毒粒子的产量。Western blotting结果证实在泛素缺失型病毒感染的细胞中,病毒囊膜蛋白GP64和衣壳蛋白VP39表达水平明显低于野生型。Guarino等^[8]发现AcMNPV病毒泛素基因缺失后,并不影响病毒DNA复制和感染性病毒粒子的产生,但会影响病毒粒子结构蛋白上偶联的泛素分子丰度,从而影响病毒粒子结构蛋白的表达水平,进而影响子代病毒粒子的产量。因此,泛素对BmNPV子代病毒粒子产量的影响在某种程度上与Guarino等^[8]报道的病毒泛素对AcMNPV子代病毒粒子的影响类似。

2011年,Guo等^[15]报道BmNPV和阿米格拉螺旋体核多角体病毒(*Helicoverpa armigera*

nucleopolyhedrovirus, HaNPV)编码的泛素细胞定位模式不同,BmNPV编码的泛素在细胞质和细胞核中都有分布,而HaNPV编码的泛素主要分布在病毒感染的宿主细胞核膜上,表明它们编码的泛素在病毒增殖中具有不同的作用。本研究通过构建融合表达BmNPV泛素和红色荧光蛋白的重组病毒,对BmNPV编码的泛素亚细胞定位进行分析,结果表明Mcherry融合在泛素N端和C端,红色荧光在细胞中的分布情况完全不同(图4A),Mcherry融合在泛素C端时,Western blotting结果(图4B泳道5、6)显示泛素会与Mcherry之间发生断裂,因此,该红色荧光只代表Mcherry在细胞中的分布,不能代表泛素分子的亚细胞定位;而Mcherry融合表达在N端时,融合蛋白Mcherry-Ub能稳定地表达在细胞中,荧光显微观察发现红色荧光信号主要定位在细胞核中,与病毒基因的表达调控具有一定的相关性,Western blotting结果(图2)验证了泛素缺失能下调病毒GP64和VP39基因的表达水平,从而影响子代病毒粒子的产量。泛素定位在细胞核中,对病毒基因的转录和表达起调控作用,影响病毒基因的蛋白水平,尤其是对病毒晚期基因表达调控起重要作用,从而影响子代病毒粒子的产量。另外,为研究泛素缺失的病毒对家蚕的毒力,对野生型病毒和泛素缺失型重组病毒感染后的家蚕半致死时间进行生物统计分析,结果发现泛素基因缺失后延长家蚕半致死时间15 h,表明泛素基因缺失后抑制病毒增殖效率,延缓了家蚕的半致死时间,为深入研究泛素在病毒增殖中的作用提供了实验依据。

参考文献

- [1] WANG Y, LE WD. Autophagy and ubiquitin-proteasome system[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 527-550.
- [2] GRUMATI P, DIKIC I. Ubiquitin signaling and

- autophagy[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(15): 5404-5413.
- [3] van WIJK SJ, FULDA S, DIKIC I, HEILEMANN M. Visualizing ubiquitination in mammalian cells[J]. *EMBO Reports*, 2019, 20(2): e46520.
- [4] SHARMA A, KHAN H, SINGH TG, GREWAL AK, NAJDA A, KAWECKA-RADOMSKA M, KAMEL M, ALTYAR AE, ABDEL-DAIM MM. Pharmacological modulation of ubiquitin-proteasome pathways in oncogenic signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11971.
- [5] TANG Q. Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral propagation[J]. *Life Sciences*, 2018, 207: 350-354.
- [6] LANGER S, YIN X, DIAZ A, PORTILLO AJ, GORDON DE, ROGERS UH, MARLETT JM, KROGAN NJ, YOUNG JAT, PACHE L, CHANDA SK. The E3 ubiquitin-protein ligase cullin 3 regulates HIV-1 transcription[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2010.
- [7] PROULX J, BORGMANN K, PARK IW. Role of virally-encoded deubiquitinating enzymes in regulation of the virus life cycle[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4438.
- [8] GUARINO LA, SMITH G, DONG W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor[J]. *Cell*, 1995, 80(2): 301-309.
- [9] REILLY LM, GUARINO LA. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication[J]. *Virology*, 1996, 218(1): 243-247.
- [10] KATSUMA S, TSUCHIDA A, MATSUDA-IMAI N, KANG W, SHIMADA T. Role of the ubiquitin-proteasome system in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection[J]. *The Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt 3): 699-705.
- [11] GOMI S, MAJIMA K, MAEDA S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus[J]. *The Journal of General Virology*, 1999, 80(Pt 5): 1323-1337.
- [12] ONO C, KAMAGATA T, TAKA H, SAHARA K, ASANO SI, BANDO H. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences[J]. *Virus Research*, 2012, 165(2): 197-206.
- [13] LI GH, QI XY, CHEN HQ, HU ZY, CHEN FY, DENG L, GUO ZJ, CHEN KP, TANG Q. The motif of ⁷⁶KRKCSK in Bm65 is an efficient nuclear localization signal involved in production of infectious virions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2739.
- [14] LI GH, LI MM, XU W, ZHOU Q, HU ZY, TANG Q, CHEN KP, YAO Q. Regulation of BmBDV NS1 by phosphorylation: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on ATPase activity and cytopathic effects[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 66-72.
- [15] GUO ZJ, ZHU YM, LI GH, CHEN KP, ZHANG CX. Ubiquitins of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus show distinct subcellular localization in infected cells[J]. *Acta Virologica*, 2011, 55(2): 101-106.