

家蚕浓核病毒中国株非结构蛋白 1(NS1)的表达

余蔚, 姚勤*, 郭忠建, 包方, 尹慧娟, 陈克平

(江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

摘要: 利用 PCR 技术扩增出 BmDENV-3 NS1 基因, 将目的基因与原核表达载体 pET-30a 进行连接, 转化 BL21 star 菌并在该菌中表达, 经 Western blot 鉴定表达的产物为 BmDENV-3 NS1 蛋白, 纯化 NS1 蛋白并制备兔多克隆抗体。同时 BmDENV-3 NS1 基因亚克隆到杆状病毒转移载体 pFastBac-HTb-eGFP 中, 转化 *BmDH10BAC* 感受态细胞, 提取的重组 Bacmid 通过脂质体包埋转染家蚕 BmN 细胞, 再以收获的重组病毒感染家蚕幼虫。家蚕 BmN 细胞和幼虫感染重组病毒 2d 后均观察到绿色荧光, 经 SDS-PAGE 分析真核表达的产物与预测的 NS1-eGFP 融合蛋白大小不一致, 说明 NS1-eGFP 融合蛋白被昆虫内源性的蛋白酶降解。降解的产物用 NS1 蛋白抗体进行 Western blot 鉴定为 BmDENV-3 NS1 蛋白。

关键词: 家蚕浓核病毒; 非结构蛋白 1; 表达; 杆状病毒表达系统; Western blot

中图分类号: Q93, Q51 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0191-06

家蚕浓核病毒中国株 (*Bombyx mori* densovirus, BmDENV-3) 具有两条 DNA 分子 (VD1 和 VD2), 分别包埋于不同的病毒粒子中。VD1 大小为 6453bp, 在 VD1 正链上有 3 个开放阅读框 (ORF1-ORF3), 在 VD1 负链上有 1 个开放阅读框 ORF4。ORF1 和 ORF2 共用一个启动子, 分别编码 2 种非结构蛋白, ORF3 编码结构蛋白, ORF4 编码病毒自身的 DNA 聚合酶^[1]。一般认为, 细小病毒 DNA 合成靠自我引发机制 (self-priming mechanism) 而起始, 这个引发机制是由于两端回文序列的存在而衍生的^[2]。BmDENV-3 基因组末端有反向重复序列, 但是不形成回文序列, 这一末端结构暗示其复制机制不同于其他细小病毒。非结构蛋白是具有多种功能的核磷酸化蛋白, 与细小病毒复制相关。鼠细小病毒 (MVM) 的 NS1 蛋白含有 ATP 或 GTP 结合位点, 具有解旋酶活性、DNA 结合和切割活性, 在 MVM DNA 复制中担任病毒复制起始因子和病毒基因表达的调控因子^[3], 它还是基因组本身编码的反式

激活蛋白, 对病毒的早期和晚期转录都发挥着重要作用。有报道认为, NS1 蛋白可以抑制细胞的 DNA 复制, 抑制多种异源性启动子, 从而发挥细胞毒性作用^[4,5]。

虽然国内外已经报道了不同 BmDENV 毒株的基因组全序列, 但是对 NS1 的研究还很少。本实验室已经完成了 BmDENV-3 的基因组全序列测定和基因组结构分析^[1], 并与 BmDENV-1 基因组的结构和转录^[6]进行了比较, 我们发现虽然 BmDENV-3 与 BmDENV-1 基因组都有末端反向重复序列, 但是其末端反向重复序列不形成回文结构, 不能折叠成细小病毒共有的发夹结构。通过对 BmDENV-3 NS1 蛋白的氨基酸序列分析, 发现其含有解旋酶超家族 3(SF3) 的保守结构域, 而没有 RCR 复制起始蛋白保守序列。这些差异使得 BmDENV-3 NS1 在 BmDENV-3 病毒的增殖中的功能研究很必要。本实验通过基因重组技术, 克隆 NS1 基因到原核表达载体 pET-30a 和家蚕杆状病毒转移载体 pFastBacHTb-eGFP 上, 在 BL21 star 菌和家蚕 BmN

基金项目: 国家“973项目”(2005CB121000); 江苏省自然科学基金项目(BK2006074)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-511-8791923; E-mail: yaoqin@uj.s.edu.cn

作者简介: 余蔚(1980-), 女, 江西弋阳人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: weiweiyu1022@hotmail.com

收稿日期: 2007-06-14; 修回日期: 2007-11-15

细胞以及幼虫中分别表达 NS1 蛋白, 为 BmDENV-3 NS1 在病毒基因组复制中的作用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒、菌株和细胞: 家蚕浓核病毒中国株为本实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*)TG1、原核表达载体 pET30a 和 BL21 star 菌均由本实验室保存。含 BmNPV bacmid 的大肠杆菌 BmDH10Bac 由日本 Shizuoka 大学 Park 教授惠赠。pFasBacHTb-eGFP、家蚕 BmN 细胞由浙江大学张传溪教授赠送。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 脂质体、胎牛血清为 Invitrogen 公司产品; 昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清为 Sigma 公司产品; 鼠抗 his 单抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的二抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗为 Tiangen 公司产品; 用于 NS1 扩增的 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增仪为 eppendorf 公司产品; 荧光倒置显微镜为德国 Leica 公司产品; 荧光体视显微镜为 OLYMPUS 公司产品; Fluorescent Image Scanning Unit and Analytical Software 为 HITACHI 公司产品。

1.2 NS1 蛋白的原核表达和抗体制备

根据编码 BmDENV-3 非结构蛋白 1(NS1)的核苷酸序列设计引物。上游引物序列为: 5'-GCGAATTCA TGGAATCGAAGTCAA-3', 下游引物序列为: 5'-CAAGCTTCTACCCATAATATTTATT-3'。该引物对分别含有 *EcoR* 和 *Hind* 酶切位点(下划线标注)。从 10% 琼脂糖凝胶中回收 PCR 扩增产物, 克隆到 pET-30a 载体中, 鉴定后, 转化大肠杆菌 BL21 star 菌。

挑取经鉴定含有重组表达质粒的单个菌落, 接种于 3mL 含卡那霉素(30 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期后加入不同浓度的 IPTG 进行诱导, 28 $^{\circ}$ C 继续培养 10h。收集重组菌细胞, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

在含 150mL 液体 LB 的锥形瓶中, 接种重组菌培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期后加入 IPTG 诱导, 28 $^{\circ}$ C 继续培养 10 h。收集重组菌培养物, 用 5mL 含 1mg/mL 的 lysis buffer 裂解菌体细胞, 8000 \times g 离心, 弃沉淀, 上清液用 Ni-NFA 亲和层析柱(Qiagen 公司) 纯化, 获得的纯化后 NS1 蛋白用于免疫健康新西兰

大白兔, 获得 NS1 的兔多克隆抗体。

1.3 重组家蚕杆状病毒表达载体的构建

根据 BmDENV3 NS1 的序列设计引物。上游引物序列为: 5'-GCGAATTCTGGAATCGAAGTCAA-3', 下游引物序列为: 5'-GCTCGAGCCCATAATATT TATTAT-3'。该引物对分别含有 *EcoR* 和 *Xho* 酶切位点(下划线标注)。

PCR 扩增得到的产物连接到 pMD18-T 载体上, 再经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切克隆到 pFastBacHTb-eGFP 转移载体上, 转化带有 BmNPV bacmid 和辅助质粒 helper 的 BmDH10Bac 感受态细胞, 利用卡那霉素、庆大霉素和四环霉素抗性在固体平板上进行筛选, 挑取单个白色菌落, 用碱裂解法抽提重组 Bacmid 基因组 DNA, 用 pUC/M13 引物对进行 PCR 鉴定。

用同样的方法获得对照含 eGFP 基因的重组 Bacmid 基因组 DNA。

1.4 重组 Bacmid 转染家蚕 BmN 细胞及幼虫

提取重组 Bacmid HTb-NS1-eGFP 和重组 Bacmid HTb-eGFP DNA, 按照 Invitrogen 公司脂质体转染说明书转染家蚕对数生长期 BmN 细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养 3~4d, 在荧光倒置显微镜下观察荧光。4d 后分别收集病毒感染的细胞上清于 4 $^{\circ}$ C 保存, 得到含 NS1 基因的重组病毒 vBm-NS1-eGFP 和不含 NS1 基因的重组病毒 vBm-eGFP。

收集家蚕对数生长期 BmN 细胞, 用血细胞计数板计数, 以 2×10^6 /mL 的细胞过夜培养, 用重组病毒 vBm-NS1-eGFP 和 vBm-eGFP 感染 BmN 细胞, 培养 72h 后, 观察细胞变化, 分别收集细胞上清和贴壁细胞, 进行计数。

用家蚕对数生长期 BmN 细胞用含有卡那霉素(50 μ g/mL)、庆大霉素(7 μ g/mL)的重组病毒 vBm-NS1-eGFP 和 vBm-eGFP 悬浮液, 在家蚕 5 龄幼虫期穿刺家蚕节间膜, 病毒滴度为 10^6 pfu。接种后 2~4d, 在荧光体视显微镜下观察荧光。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

分别解剖接种重组病毒 BmNPV-HTb-NS1-eGFP 2d 和 4d 的家蚕脂肪体组织, 加液氮研磨, 加入 250 μ L 蛋白提取溶液(40mmol/L Tris-aminoethane, 35mg/mL PMSF)提取组织中总蛋白, 加 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE 分析, 同时以重组病毒 BmNPV-HTb-eGFP 接种的家蚕幼虫脂肪体蛋白

作为阴性对照。

接种重组病毒的家蚕组织蛋白进行 SDS-PAGE 后, 电转印至硝酸纤维膜(NC 膜)上, 按常规的方法进行 Western blot。一抗为 NS1 蛋白的兔多克隆抗体, 二抗为羊抗兔 IgG-HRP, 用二氨基联苯氨(Diaminobenzidin, DAB)显色, 水中终止显色反应。

2 结果

2.1 NS1 原核表达

PCR 扩增的 NS1 基因克隆到 pET-30a 上后, 经 IPTG 诱导在 BL21 star 菌中表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析和用鼠源抗 His 单抗进行 Western blot 分析, 在 34kDa 左右有特异条带(图 1), 与预测的家蚕浓核病毒 NS1 大小一致, 说明在 pET-30a 载体中 NS1 基因得到正确表达。

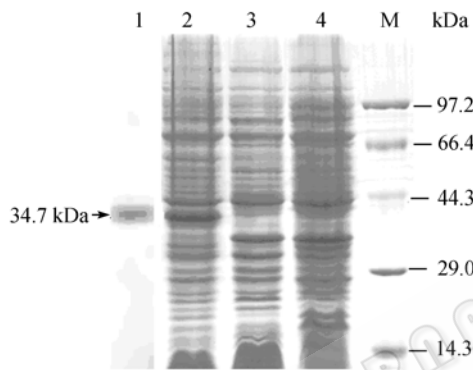


图 1 BmDENV-3 NS1 原核表达 SDS-PAGE 和 Western blot
Fig. 3 The SDS-PAGE analysis and Western blot identification of expression in *E.coli* of BmDENV-3 non-structural protein NS1. 1. Western blot analysis of BmDENV-3 NS1; 2. The protein of BL21 star containing pET-30a-NS1; 3. The protein of BL21 star, as negative control; 4. The protein of BL21 star containing pET-30a, as negative control; M. Protein molecular weight marker (MW marker).

2.2 重组家蚕杆状病毒 Bacmid-NS1-eGFP 的检测

BmDENV-3 NS1 基因长 950bp, 而 eGFP 基因长 720bp。将 PCR 扩增的 NS1 基因克隆到 pMD18-T 载体和转移载体 pFasBacHTb-eGFP 上, 酶切和 PCR 鉴定表明 NS1 基因成功的克隆到 pFasBacHTb-eGFP 载体上。目的基因 NS1 定向克隆到多角体强启动子下游, eGFP 位于 NS1 基因的 C 端(图 2-A)。

分别将重组转移载体 pFasBacHTb-NS1-eGFP 和对照 pFasBacHTb-eGFP 转化感受态细菌 BmDH10Bac, 用 pUC/M13 引物进行 PCR 鉴定。发生重组的 Bacmid 的 PCR 产物的大小应该为 2430bp 加上 NS1 插入片段和 eGFP 片段的大小(图 2-B 中的 2、3 泳道)。电泳检

测可以得到大小约为 4.1kb 的目的带, 而对照 Bacmid-eGFP 的 PCR 产物的大小约为 3.1kb 左右(图 2-B 中的 4 泳道), 获得了含 NS1 基因的重组病毒基因组并命名为 bacmid-NS1-eGFP。对照 eGFP 的重组病毒基因组命名为 bacmid-eGFP。

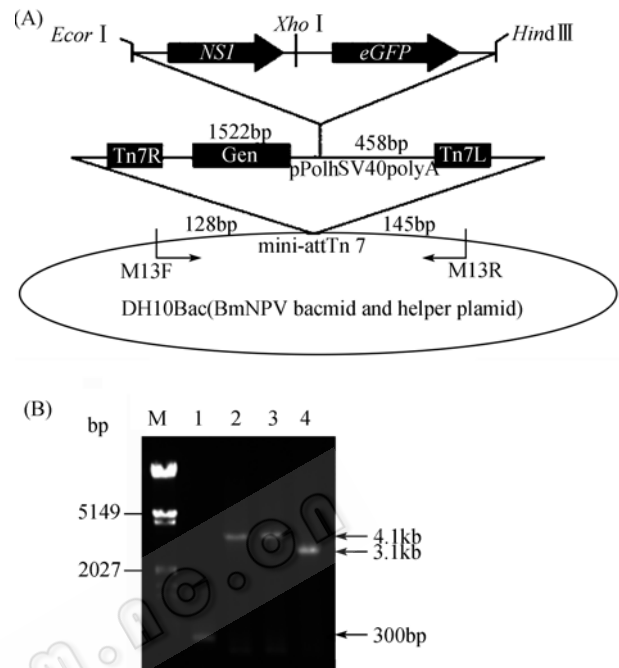


图 2 重组 bacmid-NS1-eGFP、bacmid-eGFP 的构建(A) 和 PCR 鉴定(B)

Fig. 2 Construction of recombinant baculovirus and PCR analysis. A: Construction of recombinant baculovirus; B: PCR analysis. M: DNA maker. 1. Negative control; 2, 3. PCR of bacmid-NS1-eGFP using pUC/M13 primers; 4: PCR of bacmid-eGFP using pUC/M13 primers.

2.3 重组病毒感染家蚕 BmN 细胞和幼虫的病变分析

分别将重组 bacmid-NS1-eGFP 和 bacmid-eGFP 基因组 DNA 转染家蚕 BmN 细胞。转染 72h 后, 细胞均出现病毒感染症状, 由梭形变成圆形, 核仁增大, 细胞离壁悬浮。转染 96h 后收获重组病毒 vBm-NS1-eGFP 和 vBm-eGFP, 测定病毒滴度, 以 106pfu 的病毒滴度, 重新感染家蚕 BmN 细胞。

两组细胞感染后 72h, 在荧光显微镜下均可以观察到绿色荧光(图 3)。同时, 用血细胞计数板分析得到, 感染重组病毒 vBm-NS1-eGFP 细胞的死亡率为 31.3%, 而感染重组病毒 vBm-eGFP 细胞的死亡率为 9.81%。从这两组数据可以看出 NS1 蛋白对细胞具有一定的毒性作用。

重组病毒 vBm-NS1-egfp 和 vBm-eGFP 接种家蚕

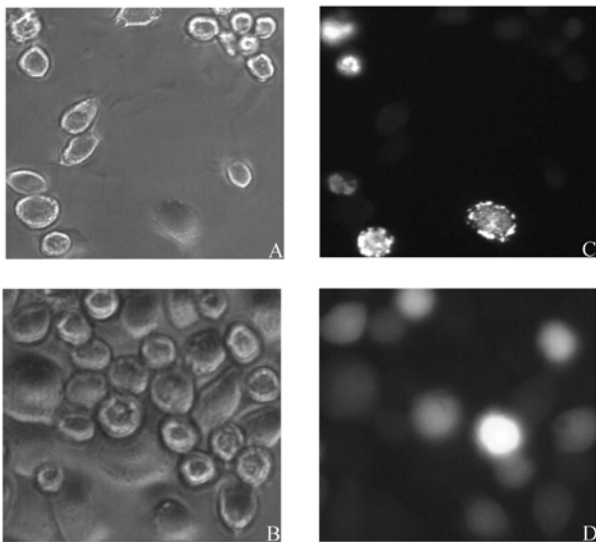


图 3 家蚕 vBm-NS1-eGFP(A、B)、vBm-eGFP(C、D)重组病毒感染 BmN 细胞中荧光的观察(200×)

Fig. 3 BmN-4 cells at 3 days post-infection with vBm-NS1-EGFP and vBm-eGFP(200×). Recombinant baculovirus vBm-NS1-eGFP was used to infect BmN-4 cells. At 3 days post-infection cells were observed using a fluorescence microscope (B) and a light microscope (A) respectively. Recombinant baculovirus vBm-eGFP was used as control(C,D). All images were magnified at 200×.

幼虫 2 天后, 在荧光体视显微镜下即能观测到体表有微弱的荧光。解剖家蚕幼虫后, 在气管周围的脂肪体

组织中可见部分荧光(图略)。接种家蚕幼虫 4d 后, 出现 BmNPV 感染蚕体的典型症状, 即病体松软, 体壁易破。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

重组病毒 vBm-NS1-egfp 和 vBm-eGFP 接种家蚕幼虫 2d 和 4d 后, 分别提取脂肪体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 并在荧光扫描分析系统下显示蛋白荧光, 数据显示, vBm-NS1-egfp 接种 2d 后在 44kDa 左右出现表达条带, 接种 4d 后在 28-40kDa 左右均有模糊条带(图 4-A)。为了进一步验证真核表达产物, 用 NS1 蛋白抗体进行 Western blot 分析, 结果表明 2d 提取的组织总蛋白在分子量约为 44kDa 的位置出现一条杂交带, 而 4d 提取的组织总蛋白中没有检测到杂交带(图 4-B)。NS1 蛋白的预测分子量为 34.7kDa, EGFP 蛋白的预测分子量为 26.9kDa, 正确的融合蛋白大小应该是 60kDa 左右, 而实际表达的 NS1-egfp 融合蛋白比预测的要小, 推测 NS1-egfp 融合蛋白被蛋白酶降解, 而在接种 4d 后蛋白的 Western blot 分析没有杂交条带推测是因为 NS1-eGFP 蛋白被降解而失去了抗原性。

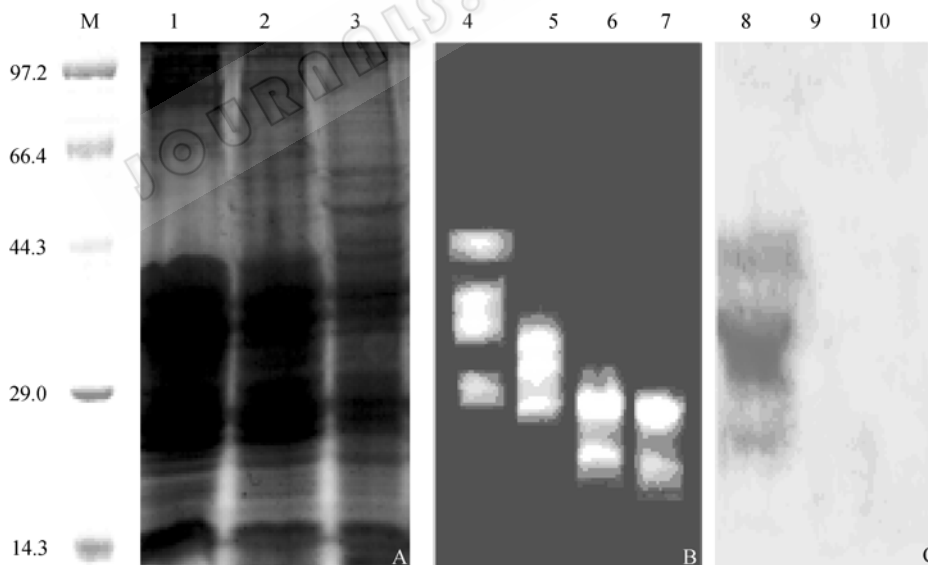


图 4 vBm-NS1-eGFP 和 vBm-eGFP 重组病毒接种家蚕幼虫的组织蛋白的 SDS-PAGE 电泳(A), 荧光扫描分析(B)和 Western blot 分析(C)

Fig. 4 A: SDS-PAGE analysis of NS1-eGFP fusion protein in fat body from silkworm larvae. B: Fluorescence image analysis of NS1-eGFP fusion protein in fat body of silkworm larvae. C: Detection of NS1 fusion protein by Western blot. Extracted proteins were separated by SDS-PAGE (10% gel) and detected by fluorescence image analyzer. M: Protein molecular weight marker (MW marker), 1,4 and 8: protein from fat body of 2 d.p.i. infected larvae with recombinant virus vBm-NS1-eGFP, 2,5 and 9: protein from fat body of 4 d.p.i. infected larvae with recombinant virus vBm-NS1-eGFP, 3,6 and 10: protein from fat body of 2 d.p.i. infected larvae with recombinant virus vBm-eGFP, 7: protein from fat body of 4 d.p.i. infected larvae with recombinant virus vBm-eGFP. Protein from fat body of infected larvae with recombinant virus vBm-eGFP was used as control.

3 讨论

本实验中, 我们用原核表达系统和家蚕杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统表达 BmDENV-3 NS1 蛋白。在原核表达系统中, BmDENV-3 NS1 得到了正确的表达, 其蛋白大小为 34kDa 左右, 与预测的 NS1 大小一致。纯化该蛋白免疫新西兰大白兔, 获得了 NS1 蛋白的多克隆抗体, 该抗体的制备为以后分析 BmDENV-3 NS1 蛋白的功能和该蛋白在发挥病毒复制因子作用时与其它蛋白的相互作用打下了基础。

我们用家蚕杆状病毒表达系统表达 BmDENV-3 NS1 蛋白时却得到了让我们感兴趣的数据。用含 BmDENV3 NS1 蛋白的重组家蚕杆状病毒 vBm-NS1-eGFP 感染 BmN 细胞时引起了细胞的大量死亡(数据未显示)。P.Cailliet-Fauquet¹ 和 M.Perros¹ 等人曾通过糖皮质激素启动子在人肿瘤细胞过量表达 MVM NS1 蛋白, 结果显示 NS1 蛋白的表达对人肿瘤细胞有毒性作用, 并诱导细胞程序性死亡^[9]。推测 BmDENV3 NS1 蛋白在家蚕细胞中的表达对细胞有毒性。

家蚕杆状病毒表达系统是能在家蚕幼虫中大量表达外源基因的真核表达系统。已经有不少关于用传统的家蚕杆状病毒表达系统表达外源基因的报道。干扰素^[10]、绿色荧光蛋白^[11]和 HBeAg 蛋白^[12]分别在家蚕幼虫中获得了表达。用家蚕杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统中, 我们获得了含有 BmDENV-3 NS1 基因的重组家蚕杆状病毒。用重组病毒 vBm- NS1-eGFP 注射家蚕 5 龄幼虫, 在提取的家蚕脂肪体组织蛋白中, 我们只检测到 44kDa 左右的融合蛋白, 实际表达的融合蛋白分子量与预测的融合蛋白之间存在的差异证实了蛋白酶的存在, 在昆虫细胞中一些内源性的蛋白酶可以识别并降解融合蛋白, 感染 BmNPV 的 BmN-4 细胞系中检测到一个 36kDa 的半胱氨酸蛋白酶^[13]。另一种可能是家蚕和 BmDENV 在长期的进化过程中, 双方已经形成了侵染和抵抗的关系, 家蚕宿主有自身的防卫系统, 这个系统有破坏 BmDENV 的作用。在家蚕品种资源库中就有很多品种品系对 BmDENV 完全免疫, 属单个隐性基因控制的。也许正是上述原因, 我们没有得到完整 BmDENV-3 NS1 基因表达产物。

参 考 文 献

- [1] 王永杰, 姚勤, 陈克平. 家蚕浓核病毒 BmDENV-3(中国株)VD1 基因组结构与转录分析. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2006, 22(5): 707-712.
- [2] Bando H, Choi H, Ito Y, et al. Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. *Virology*, 1990, 179(1): 57-63.
- [3] Cotmore SF, Tattersall P. The NS1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res*, 1986, 4: 243-250.
- [4] Nu'esch JPF, Dettwiler S, Corbau R, et al. Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J Virol*, 1998, 72: 9966-9977.
- [5] Cotmore SF, Christensen J, Nu'esch JPF, et al. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]2-3. *J Virol*, 1995, 69 (3): 1652-1660.
- [6] Matthew M, David JP. Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)2-3 containing DNA. *Virology*, 1998, 251: 123-131.
- [7] Daniel L, Jean R. Terminal regions of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J Virol*, 1992, 66: 5705-5713.
- [8] Li Y, Zádori Z, Bando H, et al. Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDENV-1) and enzyme activity of its capsid. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 2821-2825.
- [9] Cailliet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, et al. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *The EMBO Journal*, 1990, 9(9): 2989-2995.
- [10] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 1985, 315: 592-594.
- [11] Sehgal D, Gopinathan FP. Recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedro-virus harboring green fluorescent protein. *BioTechniques*, 1998, 25: 997-1006.
- [12] Deng XZ, Diao ZY, Liang HE. HbeAg gene expression with baculovirus vector in silkworm cells. *World J Gastroenterol*, 1999, 5: 167-171.
- [13] Ohkawa T, Majima D, Maeda SA, et al. Cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1994, 68: 6619-6625.

Expression of non-structural protein 1 of Bombyx mori densovirus-3

Wei Yu, Qin Yao*, Zhongjian Guo, Fang Bao, Huijuan Yin, Keping Chen

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: We cloned the NS1 gene of BmDENV-3 into the prokaryotic expression vector pET-30a after we amplified the NS1 gene by PCR, and then we transformed the pET-30a-NS1 plasmid into BL21 star to express BmDENV-3 NS1. After we induced NS1 expression by IPTG, we used Western blot analysis to identify the recombinant protein, the result indicated that the recombinant protein was BmDENV-3 NS1. After purification, we used NS1 to immunize New Zealand white rabbits following standard protocol to harvest anti-NS1 anti serum. On the other hand, we cloned the BmDENV-3 NS1 into pFastBacHTb-eGFP vector, and then transformed the pFastBacHTb-NS1-eGfp into *BmDH10BAC* to harvest recombinant bacmid genome. We obtained the recombinant virus from the cells, which was transfected by the recombinant bacmid genome using liposomes. We used the virus genome to infect *Bombyx mori* larvae. We observed the fluorescence in the cells and silkworm larvae at 2 days post infection, and then we used SDS-PAGE and fluorescence image analysis to identify the fusion protein. The result showed that the size of the fusion protein was not consistent with the expected size of NS1-eGFP, indicating the fusion protein was degraded randomly by the intrinsic digestive protease. To further confirm the fusion protein, we used Western blot with an anti-NS1 antibody.

Keywords: *Bombyx mori* densovirus-3; non-structural protein 1; expression; baculovirus expression system; Western blot

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB121000) and the China Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2006074)

*Corresponding Author: Tel: +86-511-8791923; Fax: +86-511-8791923; Email: yaoqin@ujs.edu.cn

Received: 14 June 2007/ Revised: 15 November 2007

答 读 者 问

问: 我想发表一篇关于生物降解的文章, 菌株是自己筛选的, 现在只做了 16S rDNA 的鉴定(自己实验室), 请问必须要到相关部门(如北微所)做生理生化鉴定并具备有效国家证明才能在贵刊发表该菌株的相关文章吗?

答: 对于您提出的问题, 编辑部分 3 点回答您, 请您作参考。

- (1) 关于菌种鉴定的文章必须两个要点, 要么是新种, 要么是已知菌但是要有新的特殊的应用价值。
- (2) 如果您实验室筛选到了一株菌, 并发表文章, 不必到权威部门再做测试, 只是你们实验室的结果就行, 但是如果是新种必须满足以下两条: 一是作一下 16S rDNA 的鉴定, 二是要在两个国家以上的菌种保藏中心进行保藏。
- (3) 2004 年 11 月, 本刊主编建议: 为了使我国的研究成果得到国际公认, 建议作者将发现新种的研究报告尽快改投国外期刊 "IJSEM", 以取得公认。待发表后, 再告知本刊, 由《微生物学报》将此消息公布。

问: 如何构建系统发育树?

答: 构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位, 应使用正确的方法重新构树, 制作方法如下:

- (1) 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank, 用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA, 然后一起构树。
- (2) 构建树时采用能反应分支长度的软件 (如 NJ 法), 并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
- (3) 系统发育分析应该用国际上较为通用的一些建树方法, 如 Neighbour-Joining 等, 这样结果就更为可靠, 更直观。
- (4) 请严格按照下列具体要求写作[参见: 微生物学报, 2004, 44(2): 143.]
 - ①系统树中: 菌名应列出全称, 且属和种名应斜体; 名称后再加括号, 其内含序列号。
 - ②图注(本刊的图注全部采用英文写作): 应表明“树”上所有的内容, 包括: 括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。
 - ③作图要求: 文件格式为*.Tif; 分辨率为 600 线; 字体为“Time New Roman”, 字号为 7 磅。