

## 家蚕核型多角体病毒(BmNPV) *Bm56* 缺失对病毒复制和转录的影响

石扬辉<sup>a,b</sup>, 朱丽萍<sup>a,b</sup>, 张 臣<sup>a,b</sup>, 袁 佳<sup>a,b</sup>, 解纯刚<sup>a,b</sup>, 于 威<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学, a. 生物化学研究所; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 研究 *Bm56* 的生物学功能, 利用 Red 重组系统构建了 *Bm56* 基因缺失型病毒 v*Bm56*-KO-Bacmid, 并利用 Bac-to-Bac 系统构建了 *Bm56* 基因补回型病毒 v*Bm56*-Re-Bacmid。然后将构建好的上述病毒转染 BmN 细胞, qPCR 研究发现, *Bm56* 敲除型病毒与野生病毒相比, 在囊膜病毒(Budded virus, BV)的产量上并没有统计学差异, 表明 *Bm56* 基因不是病毒形成有感染活力病毒粒子的必需基因。同时 qRT-PCR 研究结果也显示, *Bm56* 缺失没有明显降低病毒基因组的复制水平, 进一步研究 *Bm56* 缺失对 BmNPV 基因转录的影响。qRT-PCR 结果显示, *Bm56* 对早晚期和极晚期基因的转录水平均没有明显的影响。说明 *Bm56* 不是 BmNPV 病毒复制的必需基因, 对病毒早期基因、晚期基因和极晚期基因的转录水平均无显著影响, 推测 *Bm56* 可能作为一种病毒结构蛋白, 在病毒装配等环节中起着重要作用。

**关键词:** BmNPV; *Bm56*; Red 重组; 病毒复制; 病毒转录

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A

### 0 引言

杆状病毒(baculovirus)是已知的昆虫病毒类中的最大类群, 可以编码 90—180 种蛋白质, 基因组大小在 80~180 kb 之间<sup>[1]</sup>。第一个基因组被完全测序的昆虫杆状病毒是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)<sup>[2]</sup>。该病毒基因组 DNA 由 133 894 个碱基对组成, 平均 A+T 含量为 59%, 编码 150 个核苷酸以上的开放式阅读框(open reading frame, ORF)有 154 个。家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)是杆状病毒的模型病毒之一<sup>[3]</sup>。由于 AcMNPV 被公认为模式杆状病毒, 因而 BmNPV 多数的信息可由它推测而来。BmNPV 大部分的 ORFs 与 AcMNPV 基因组 DNA 在类似位置上。目前, 作为感染鳞翅目昆虫的杆状病毒代表种 AcMNPV 是被研究最多的杆状病

毒, 其基因的表达具有高度时序性, 且主要是在转录水平上进行调控<sup>[4]</sup>。根据表达时序可将 AcMNPV 的基因分为早期基因、晚期基因和极晚期基因<sup>[4-5]</sup>。早期基因的表达由宿主 RNA 酶调控, 表达产物主要是调节蛋白, 这些蛋白是病毒 DNA 复制或晚期基因表达所必需的<sup>[4-5]</sup>。*lef-4*、*lef-8*、*lef-9* 和 *p47* 分别编码病毒 RNA 聚合酶的 4 个亚基<sup>[6]</sup>。*lef-5*、*lef-6*、*lef-10*、*lef-12* 以及 *pp31* 直接参与了病毒晚期基因的转录调控<sup>[7]</sup>。

杆状病毒生长周期具有两相性, ODV(occlusion derived virus)囊膜的主要组分是磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺, 而 BV(budded virus)的囊膜的主要组分是磷脂酰丝氨酸, 膜上有 BV 特有的蛋白 GP64<sup>[8-10]</sup>。这种糖蛋白使得两种病毒粒子表型在抗原性、感染组织特异性以及病毒入侵细胞方式都有差异。在病毒感染的早期, 病毒的核衣壳在细胞

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603)

作者简介: 石扬辉(1987—), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 研究方向为生物反应器与蛋白质组学。

通信作者: 于 威, E-mail: yuwei@zstu.edu.cn

内装配成熟,并可穿过质膜处出芽形成 BV, BV 负责细胞与细胞间的传播。在病毒感染晚期,部分核衣壳被包装成 ODV,细胞破裂释放,ODV 主要负责虫体间的传播,而且它在环境中具有较高的稳定性<sup>[11]</sup>。

*Bm56* 存在于所有已经测序的杆状病毒基因组中,是杆状病毒的核心基因之一,在 AcMNPV 中的同源基因是 AcMNPV ORF68。到目前为止,已经有报道 *Bm56* 可能是 ODV 的核衣壳蛋白,*Bm56* 的敲除与 BmNPV 相比在 BV 产量上并没有统计学上的区别<sup>[11]</sup>。本研究利用 Red 重组技术构建了 *Bm56* 基因缺失型病毒,研究该基因的缺失对于病毒 DNA 复制和病毒基因转录的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

*E. coli* TG1、DH10Bac(含辅助质粒和 Bacmid)和 BW25113 菌种(含质粒 pKD46,具有阿拉伯糖启动子控制的 phage  $\lambda$ Red 重组酶系统)、质粒 pFast-Bac1 和 pKD3(含有氯霉素抗性基因 *cat*)均由本实验室保存。

L-阿拉伯糖、SOC 液体培养基购自上海博彩生物有限公司;1Kb DNA ladder、DL2000 DNA ladder、T4 Ligation、PMD18-T vector、Taq 酶、限制性内切酶等为 TaKaRa 产品;基因组 DNA 小量抽提试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 *Bm56* 基因缺失型 Bacmid 和补回型 Bacmid 的构建

为了获得 *Bm56* 基因缺失型的 Bacmid,构建了一个用于 *Bm56* 基因打靶线性化片段(构建策略如图 1A)。以 pKD3 质粒为模板,*Bm56*-C Forward 5'-GAATTGATTATAAATGTGGCCAACAACACACCGCTTGACAACACGTTTGTAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'和 *Bm56*-C Reverse 5'-AA-CAATACAAATAAAGAACAACAAAATACATAGGCAATATTAACATTGGTTCGATGGGAATTAGCCATGGTCC-3'为引物,PCR 扩增获得 1 100 bp 左右的打靶片段,命名为 *Bm56*-C。然后,将 *Bm56*-C 转化含质粒 pKD46 的 DH10Bac 感受态细胞,*Bm56*-C 与病毒基因组中的 *Bm56* 基因发生同源重组。最后,利用含有氯霉素和卡那霉素的双抗板筛选。PCR 鉴定引物组合为 *Bm56*F 5'-GTATTCAT TATCGATACTCAGCGTC-3'和 *Bm56*R 5'-TTAT TTAATTTTGTGTTGCAACATTT-3'、*Bm56*F 和

*cat*R 5'-CAATATGGACAACCTTCTTCG-3'及 *cat*F 5'-CAATATGGACAACCTTCTTCG-3'和 *Bm56*R;为了获得 *Bm56* 基因补回型 Bacmid,构建了重组质粒 pFastBac1-*Bm56*,利用 Bac-to-Bac 系统将 *Bm56* 基因异位补回到多角体启动子下(构建策略如图 1B)。PCR 鉴定引物分别为 M13F 和 M13R、M13F 和 pFB-*Bm56*R 5'-CCGGAATTCTTATTTAATT TTTGTTGCAACATT-3'及 pFB-*Bm56*F 5'-CGCG GATCCAACAATTTTGTACAAATTGCTGTTG-3'和 M13R。

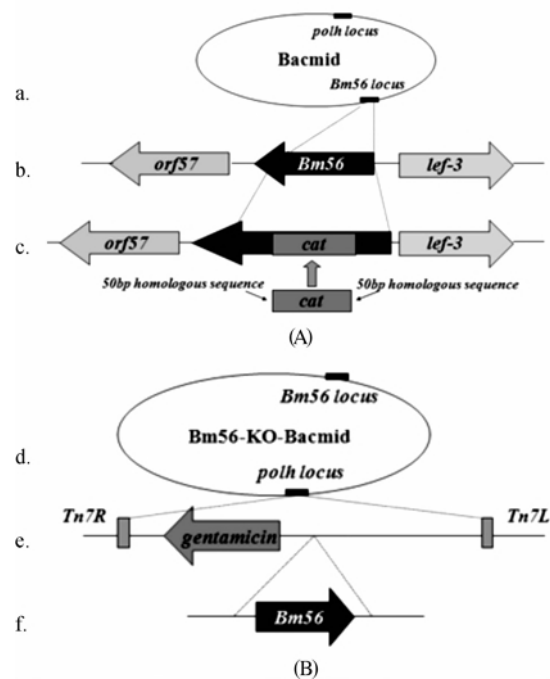


图 1 *Bm56* 基因敲除型(A)和补回型病毒(B)的构建  
注:a. *Bm56* 基因在 Bacmid 基因组中的位置;b. *cat* 基因替换 *Bm56* 基因的图谱;c. 以 pKD3 质粒为模板,PCR 扩增打靶片段;d. *Polh* 在 Bacmid 基因组中的位置;e. 含自身启动子的 *Bm56* 基因连到转座子上的图谱;f. 以野生型 Bacmid 为模板 PCR 扩增含自身启动子的 *Bm56* 基因。

### 1.3 定量 PCR 分析 *Bm56* 基因缺失对病毒基因组复制的影响

为了分析 *Bm56* 基因对病毒 DNA 复制的影响,通过实时定量 PCR (qPCR),对病毒基因组 DNA 在感染后不同时间的累积情况进行了分析。分别用 v*Bm56*-KO-Bacmid、wtBacmid 和 v*Bm56*-Re-Bacmid DNA 各 1  $\mu$ g 转染 BmN 细胞( $1 \times 10^6$  / dish),分别在转染后 6、12、24、36、48 h 收集细胞,提取胞内总 DNA,并用 *Dpn* I 酶消化<sup>[12]</sup>。所用引物为病毒基因 *gp41* 特异性引物(*gp41* 是 ODV 的囊膜蛋白,*gp41* 基因突变感染昆虫细胞后呈现单细胞感染表型,即不能产生二代病毒)<sup>[13]</sup>。为了消除

上样量的影响,引入内参  $\beta$ Actin。*Bm*gp41 扩增的引物为 gp41F 和 gp41R; *Bm* $\beta$ actin 扩增的引物为  $\beta$ -actinF 和  $\beta$ -actinR。

#### 1.4 qPCR 分析 *Bm*56 基因缺失对病毒基因转录的影响

通过 qPCR 对病毒早期和晚期基因在转染后不同时间的转录情况进行分析。分别用 vBm56-KO-Bacmid、wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid DNA 各 1  $\mu$ g 转染 BmN 细胞( $1 \times 10^6$ /dish),分别在转染后 6、12、24、48、72 h 收集细胞,Trizol 法提取胞内总 RNA,进行 qRT-PCR 分析。提取的总 RNA 经过 DNase I 的处理,以去除残留 BmNPV 基因组 DNA 的影响。以 oligodT 为引物,逆转录合成第一链 cDNA。分别以 BmNPV 基因组中的 *ie-1*、*lef-3*、*vp39*、*dnapol* 和 *p10* 基因特异性核酸序列为引物,同时引入内参 *Bm* $\beta$ Actin,以校正上样量的误差。

#### 1.5 病毒滴度测定

利用 TCID<sub>50</sub> 法测定 vBm56-KO-Bacmid、vBm56-Re-Bacmid 和 wtBacmid DNA 转染 BmN 细胞后 12、18、24、48、72 h 和 96 h 收集的细胞培养上清液的病毒滴度。取处于对数生长期 BmN 细胞铺孔板( $1 \times 10^3$  细胞/孔)。将各个时段收集到的病毒上清按 10 倍进行梯度稀释( $10^{-1} \sim 10^{-9}$ )。每孔接 10  $\mu$ L 病毒上清,每个稀释度接 8 孔。在细胞培养箱中培养 5 d,记录各稀释度的发病情况,用 Reed&Muench 法计算 50% 保护终点(TCID<sub>50</sub>)。

## 2 结果与分析

#### 2.1 *Bm*56 缺失型病毒 vBm56-KO-Bacmid 的鉴定

PCR 鉴定 *Bm*56 基因是否敲除。结果如图 2(a)。结果显示 Bm56F 和 catR 为引物的扩增产物大小约为 650 bp; Bm56R 和 catF 为引物的扩增产物大小约为 700 bp; Bm56F 和 Bm56R 为引物的扩增产物大小约为 1 700 bp;以上结果表明已成功将 *Bm*56 基因从 Bacmid 基因组中敲除,将该病毒命名为 vBm56-KO-Bacmid。

#### 2.2 *Bm*56 补回型病毒 vBm56-Re-Bacmid 的鉴定

PCR 鉴定 *Bm*56 基因是否正确补回。结果如图 2(b)。结果显示,以 M13F 和 M13R 为引物的扩增产物大小约为 3 300 bp;以 M13F 和 pFB-Bm56R 为引物的扩增产物大小约为 2 800 bp;以 pFB-Bm56F 和 M13R 为引物的扩增产物大小约 1 000 bp,均与理论值相符。表明 *Bm*56 基因已成功补回,将此病毒命名为 vBm56-Re-Bacmid。

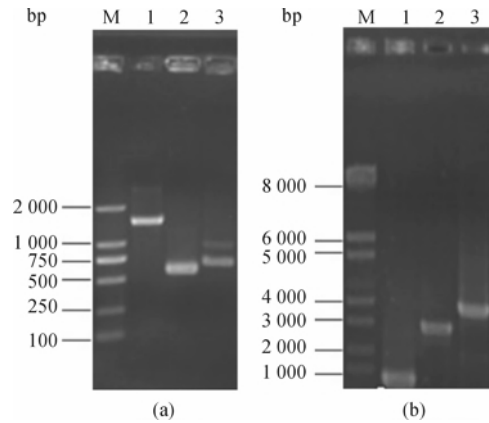


图2 *Bm*56 基因敲除型病毒(a)和补回型病毒(b)的 PCR 鉴定

注:(a) *Bm*56 基因敲除型病毒的鉴定; M: DNA Marker; 1: 以 Bm56F 和 Bm56R 为引物的 PCR 产物; 2: 以 Bm56F 和 catR 为引物的 PCR 产物; 3: 以 Bm56R 和 catF 为引物的 PCR 产物; (b) *Bm*56 基因补回型病毒的鉴定。M: DNA Marker; 1: 以 pFB-Bm56F 和 M13R 为引物的 PCR 产物; 2: 以 M13F 和 pFB-Bm56R 为引物的 PCR 产物; 3: 以 M13F 和 M13R 为引物的 PCR 产物

#### 2.3 *Bm*56 基因的缺失对 BmNPV 基因组复制的影响

为了分析 *Bm*56 基因缺失后对 BmNPV 基因组 DNA 复制的影响,分别将 *Bm*56 基因缺失型病毒(vBm56-KO-Bacmid)、野生型病毒(wtBacmid)和补回型病毒(vBm56-Re-Bacmid)的 DNA 分别转染家蚕 BmN 细胞,在转染后 6、12、18、24 h 和 48 h 收集细胞,进行荧光定量 PCR 分析,结果如图 3 所示。从图中可知,在所有时间点 vBm56-KO-Bacmid 转染后细胞中病毒 DNA 的拷贝数与 wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 均没有显著差异( $P > 0.05$ ),说明 *Bm*56 基因不是 BmNPV 基因组复制的必需基因。

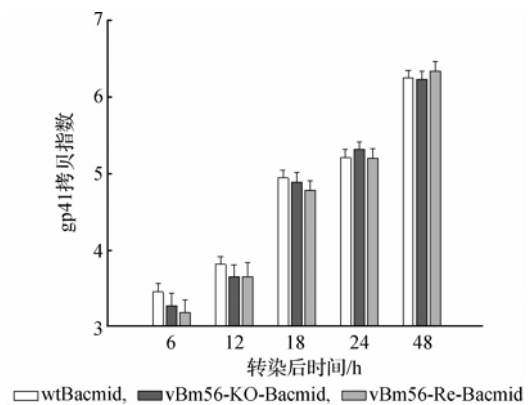


图3 wtBacmid、vBm56-KO-Bacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 转染 BmN 细胞病毒拷贝数随时间变化的 qPCR 分析

#### 2.4 wtBacmid、vBm56-KO-Bacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 转染 BmN 细胞病毒的增殖曲线分析

利用 TCID<sub>50</sub> 法测定 vBm56-KO-Bacmid、wt-

Bacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 转染 BmN 细胞后的病毒滴度(图 4)。从图中可以看出,vBm56-KO-Bacmid 感染的细胞的生长曲线与 wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 感染的细胞的曲线基本相似( $P > 0.05$ ),在 96h 都能达到  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL。说明 Bm56 是病毒增殖的非必需基因。

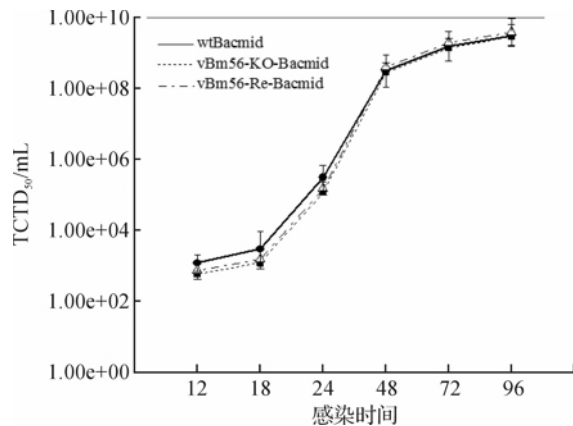


图 4 vBm56-KO-Bacmid、vBm56-Re-Bacmid 和 wtBacmid 转染 BmN 细胞的病毒增长曲线

## 2.5 Bm56 基因缺失对病毒早期基因转录的影响

利用荧光定量 PCR 分析 vBm56-KO-Bacmid、wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 对早期基因 *lef-3*、*ie-1* 和 *dnapol* 转录的影响。收集转染后 12、24、36 h 和 72 h 的细胞,进行 qPCR 分析。结果如图 5 所示。在 vBm56-KO-Bacmid 转染后的 12、24、36、72 h,病毒早期基因 *dnapol*、*ie-1*、*lef-3* 的转录水平与 wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 相比均没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 2.6 Bm56 基因缺失对 BmNPV 晚期和极晚期基因转录的影响

利用荧光定量 PCR 分析 vBm56-KO-Bacmid、vBm56-Re-Bacmid 和 wtBacmid 中晚期基因 *vp39* 和极晚期基因 *p10* 的转录,结果如图 6 所示。vBm56-KO-Bacmid 在转染 BmN 细胞后的各个时期,晚期基因 *vp39* 及极晚期基因 *p10* 的转录水平与 wtBacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 相比均无明显差异( $P > 0.05$ )。

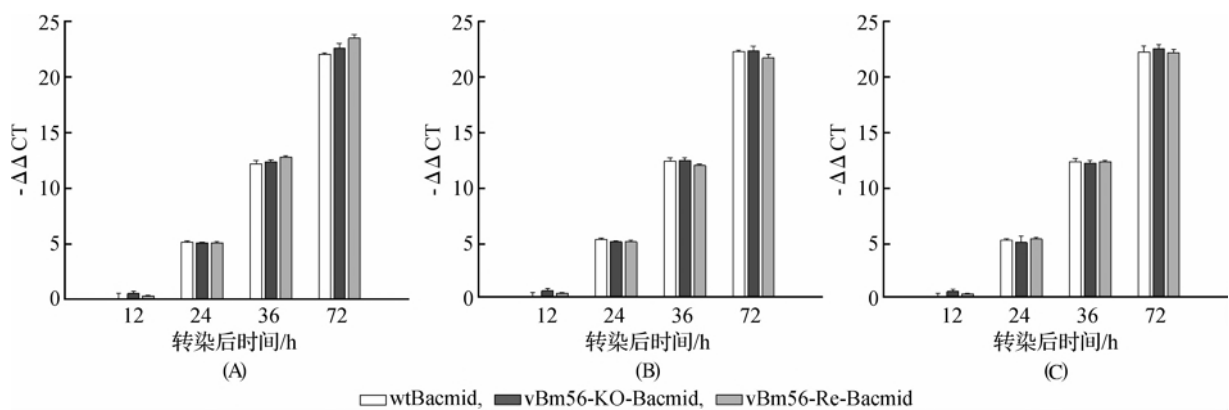


图 5 wtBacmid、vBm56-KO-Bacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 的早期基因 *dnapol* (A)、*ie-1* (B) 和 *lef-3* (C) 转录水平的 qRT-PCR 分析

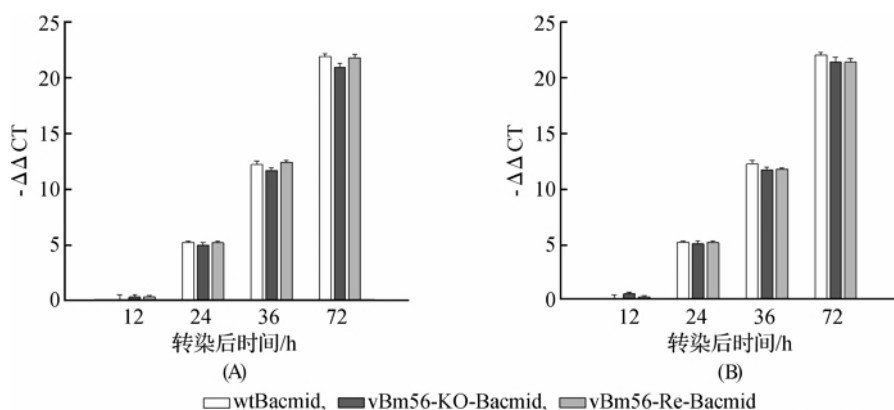


图 6 wtBacmid、vBm56-KO-Bacmid 和 vBm56-Re-Bacmid 的晚期基因 *vp39* (A) 和极晚期基因 *p10* (B) 转录水平的 qRT-PCR 分析

## 4 讨论

Red 重组技术<sup>[14]</sup>是近十年发展起来的新型遗传工程技术,其原理是利用与靶基因两侧具有 50bp 左右同源序列的外源基因片段,在 $\lambda$ 噬菌体 Red 重组酶的作用下,与靶基因发生同源重组,将外源基因插入到靶基因所在的基因组序列中,从而达到基因敲除的目的<sup>[15]</sup>。目前,Red 重组技术在 AcMNPV 及 BmNPV 的基因功能解析中已经应用得非常广泛,如通过 Red 重组技术敲除基因 *Ac146* 和 *lef-12* 等<sup>[16-17]</sup>。

本研究利用 Red 重组技术构建了 *Bm56* 缺失型病毒 vBm56-KO-Bacmid,并利用 Bac-to-Bac 系统将含自身启动子序列在内的 *Bm56* 基因异位补回到缺失型病毒的多角体启动子下。然后将缺失型病毒转入 BmN 细胞中,发现 *Bm56* 敲除的病毒与野生型病毒相比在 BV 产量上并无显著性差异,表明 *Bm56* 基因不是病毒形成有感染力的 BV (Budded virus) 所必需的,病毒增殖实验结果也表明 *Bm56* 缺失后不影响病毒 BV 的形成。这与前人的研究结果 *Bm56* 的敲除与 BmNPV 相比在 BV 产量上并没有统计学上的区别<sup>[11]</sup>相一致。

qRT-PCR 研究结果显示 *Bm56* 的缺失不会明显降低病毒基因组的复制水平。此外,qRT-PCR 结果表明,*Bm56* 对病毒基因的转录没有明显的影响。*Bm56* 是一个高度保守的基因,存在于目前所有已测序的杆状病毒中,说明 *Bm56* 在杆状病毒生活史中扮演着重要角色。其同源基因 CuniNPV ORF58,被认为是一个 ODV 的结构蛋白<sup>[18]</sup>。由此,推测 *Bm56* 可能也是家蚕杆状病毒的一个结构基因。

综上所述,*Bm56* 对于病毒 BV 的产生是非必需的,不是病毒复制的必需基因,qRT-PCR 显示 *Bm56* 可能是 ODV 的重要组成部分,其在 BmNPV 病毒装配过程中的生物学功能还有待于进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Bulach D M, Kumar C A, Zaia A, et al. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences[J]. J Invertebr Pathol, 1999, 73(1): 59-73.
- [2] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 202(2): 586-605.
- [3] Yu W, Du C Y, Quan Y P, et al. Characterization of late gene expression factor LEF-10 from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus[J]. Virus Res, 2013, 175(1): 45-51.
- [4] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus[J]. J Gen Virol, 1999, 80(5): 1323-1337.
- [5] Passarelli A L, Guarino L A. Baculovirus late and very late gene regulation[J]. Curr Drug Targets, 2007, 8(10): 1103-1115.
- [6] Guarino L A, Xu B, Jin J, et al. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells[J]. J Virol, 1998, 72(10): 7985-7991.
- [7] Lu A, Miller L K. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication[J]. J Virol, 1995, 69(2): 975-982.
- [8] Braunagel S C, Summers M D. Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles[J]. Virology, 1994, 202(1): 315-328.
- [9] Braunagel S C, Russell W K, Rosas-Acosta G, et al. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of Autographa californica nucleopolyhedrovirus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(17): 9797-9802.
- [10] Peng K, van Oers M M, Hu Z, et al. Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus[J]. J Virol, 2010, 84(18): 9497-9504.
- [11] Xu H J, Yang Z N, Zhao J F, et al. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production[J]. J Gen Virol, 2008, 89(5): 1212-1219.
- [12] Vanarsdall A L, Okano K, Rohrmann G F. Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene[J]. Virology, 2005, 331(1): 175-180.
- [13] Vanarsdall A L, Okano K, Rohrmann G F. Characterization of a baculovirus with a deletion of Vlf-1[J]. Virology, 2004, 326(1): 191-201.
- [14] Copeland N G, Jenkins N A, Court D L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 769-779.
- [15] Costantino N, Court D L. Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15748-15753.
- [16] Guarino L A, Mistretta T A, Dong W. Baculovirus *lef-12* is not required for viral replication[J]. J Virol, 2002, 76(23): 12032-12043.
- [17] Dickison V L, Willis L G, Sokal N R, et al. Deletion

of AcMNPV ac146 eliminates the production of budded virus[J]. Virology, 2012, 431(1-2): 29-39.  
[18] Perera O, Green T B, Stevens S M, et al. Proteins as-

sociated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions[J]. Journal of Virology, 2007, 81(9): 4585-4590.

## Influence of Deletion of *Bombyx Mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (*BmNPV*) on Viral Replication and Transcription

SHI Yang-hui<sup>a,b</sup>, ZHU Li-ping<sup>a,b</sup>, ZHANG Cheng<sup>a,b</sup>, YUAN Jia<sup>a,b</sup>, XIE Chun-gang<sup>a,b</sup>, YU Wei<sup>a,b,\*</sup>

(a. Institute of Biochemistry; b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This research intends to study the biological function of *Bm56*. It constructs *Bm56* gene deletion type virus v*Bm56*-KO-Bacmid through Red recombination system, establishes *Bm56* gene reimbursement type virus v*Bm56*-Re-Bacmid through Bac-to-Bac system and transfects BmN cell with viruses mentioned above. qPCR study finds that *Bm56* knockout type virus and wild virus do not have statistical difference in terms of the output of budded virus (BV), indicating that *Bm56* gene is not an essential gene for a virus to form infectious dynamic virion. Meanwhile, qRT-PCR research result shows that the deletion of *Bm56* does not greatly reduce the replication level of viral genome. The influence of *Bm56* deletion on BmNPV gene transcription is further studied. qRT-PCR result shows that *Bm56* does not have significant impact on transcriptional level of early, late and very late genes. Results above show that *Bm56* is not an essential gene for BmNPV virus replication and does not have significant impact on transcriptional level of early, late and very late virus genes. It is inferred that *Bm56* might be used as a structural protein of virus and play an important role in links such as virus assembly.

**Key words:** BmNPV; *Bm56*; Red-recombination; viral replication; viral transcription

(责任编辑: 许惠儿)