

Bmp24 缺失对家蚕核型多角体病毒基因组的复制、转录及病毒组装的影响

陈琛^a, 于威^{a,b}, 史利利^{a,b}, 巩成见^{a,b}, 蒋磊^{a,b}, 童富淡^{a,b}

(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 *Bmp24* 基因的生物学功能, 利用 Red 重组技术和 Bac-to-Bac 系统构建 *Bmp24* 缺失型病毒 (*Bmp24*-ko-Bacmid) 和 *Bmp24* 修复型病毒 (*Bmp24*-re-Bacmid)。然后将 *Bmp24*-ko-Bacmid、*Bmp24*-re-Bacmid 以及野生型病毒 (wtBacmid) 分别转染 BmN 细胞, 病毒滴度测定发现 3 种病毒都能产生有活力的子代病毒并使细胞发病, 但 *Bmp24*-ko-Bacmid 在各个时相的滴度值显著低于其他两种病毒 ($P < 0.05$)。电镜观察结果发现 *Bmp24*-ko-Bacmid 感染的细胞中只有少量细长的杆状结构, 而其他两种病毒感染细胞后能够产生大量具有囊膜包裹的成熟病毒粒子。qPCR 实验结果显示, *Bmp24* 缺失不会影响病毒基因组的复制, 同时 qRT-PCR 结果显示 *Bmp24* 缺失使早期、晚期基因和极晚期基因的转录水平显著低于野生型病毒 ($P < 0.05$)。

关键词: 家蚕核型多角体病毒; *Bmp24* 基因; Red 重组系统; Bac-to-Bac 系统

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 01-0109-07 **引用页码:** 010704

0 引言

杆状病毒 (baculovirus) 是一类具有囊膜包裹的双链 DNA 大型病毒, 感染的宿主种类达到 600 多种, 是已知昆虫病毒中最大的类群。杆状病毒属于杆状病毒科, 这一病毒家族分为 4 大类^[1]: α 杆状病毒属 *Alphabaculovirus* (lepidopteran-specific nucleopolyhedrovirus NPV)、 β 杆状病毒属 *Betabaculovirus* (lepidopteran-specific granuloviruses)、 γ 杆状病毒属 *Gammabaculovirus* (hymenopteran-specific NPV)、 δ 杆状病毒属 *Deltabaculovirus* (dipteran-specific NPV)。

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) (T3 株) 是 *Alphabaculovirus* 的成员之一, 自从该病毒基因组测序完成之后^[2], 对其分子生物学上的研究非常多, 尤其是对基因组中保守基因的功能研究颇多。至今为止, 大约有 65% 的基因被报道, 例如调控基因 *lef3*^[3]、*lef1*^[4]、*lef11*^[5] 等; 结构基因 *Ac143*^[6]、*ODVE56*^[7]、

Bm60^[8]、*38K*^[9]、*Bm67*^[10] 和 *Bm91*^[11] 等。

p24 基因在苜蓿夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) 和黄衫毒蛾核型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus, OpMNPV)^[12] 中都是位于多角体膜蛋白基因区域连续表达的 5 个晚期开放阅读框 (open reading frame ORF) 中的第一个, 预期蛋白分子量大小为 21.2 kDa。在 OpMNPV 中 *p24* 基因编码了一种核衣壳相关蛋白^[13]; 在舞毒蛾核型多角体病毒 (*Lymantria dispar* multiple embedded nucleopolyhedrovirus, LdMNPV) 中 *p24* 的同源序列缺失 N-端, 编码蛋白预期分子量为 11 kDa^[14]。表达时相研究发现 *p24* 在 AcMNPV 和 OpMNPV 中为晚期表达基因, 而在 LdMNPV 中该基因为早期表达基因^[15], 即 *p24* 基因具有结构多样性和表达的多样性, 但该基因在病毒繁殖和感染过程中究竟具有何种影响以及在细胞感染中有何种调控功能, 研究甚少。

收稿日期: 2015-02-11

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

作者简介: 陈琛 (1988-), 女, 安徽淮南人, 硕士研究生, 主要从事生物反应器与蛋白质组学方面的研究。

通信作者: 童富淡, E-mail: fdtong@zstu.edu.cn

Bmp24 位于 BmNPV 基因组的 101,563-102,150 nt, 预测蛋白分子量为 21.8 KDa。本实验以 *Bmp24* 基因为研究对象, 探究该基因对 BmNPV 病毒复制、转录及组装的影响, 为优化家蚕杆状病毒表达系统提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

家蚕细胞 BmN, DH10Bac(含 Helper plasmid, 含 pKD46 质粒, 可表达 phage λ Red 重组酶系统); 大肠杆菌菌株 TG1; 质粒 pKD3(含氯霉素抗性基因 *cat*) 和质粒 pFastBacHTB 均由本实验室保存。

T4 连接酶(TaKaRa 公司)、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI(TaKaRa 公司); *Dpn*I(Promega 公司); PCR 反应有关的酶与试剂(TOYOBO 公司); 胎牛血清和 sf-900TMII SFM(1 \times)(Life technologies 公司); 脂质体转染试剂和 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒(Roche 公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *Bmp24* 缺失型和修复型病毒的构建及鉴定

以 pKD3 质粒为模板, Bmp24-C1/C2 为引物, PCR 扩增获得含有 *Bmp24* 同源臂和氯霉素(*cat*) 基因的线性片段, 为了避免模板自身对后续实验的污染、减少假阳性提高打靶效率, 本实验用 PCR 产物为模板进行了二次 PCR, 获得的片段命名为 Bmp24-C。将 Bmp24-C 利用 CaCl_2 热激法转化到制备好的 DH10Bac(含 pKD46 质粒)感受态细胞中, 在 Red 重组酶的作用下使得 Bmp24-C 与 *Bmp24* 发生同源重组, 最后经 LB 固体平板(含 Kan 和 Cm 抗性)筛选, 挑斑进行 PCR 鉴定。鉴定引物组合为 Bmp24-up 和 Bmp24-down、cat-F 和 Bmp24-down、Bmp24-up 和 cat-R(表 1)。获得的 *Bmp24* 缺失型病毒命名为 Bmp24-ko-Bacmid。

以 wtBacmid 基因组为模板, pFastBacHTB-p24 F/R 为引物, PCR 扩增含 *Bmp24* 基因及其上游 60 bp 左右(含启动子)序列的线性片段, 连接到转移载体 pFastBacHTB 上, 并命名为 pFastBacHTB-p24。然后将 pFastBacHTB-p24 转化到已制备的 Bmp24-ko-Bacmid 感受态细胞中, 通过含有 Kan、Gen、Tet 抗性及 IPTG、X-gal 的 LB 固体平板进行蓝白斑筛选培养, 挑取白斑进行 PCR 鉴定。鉴定引物组合为 M13F 和 M13R、M13F 和 pFastBacHTB-p24R、pFastBacHTB-p24F 和 M13R(表 1)。获得的 *Bmp24* 修复型病毒命名为 Bmp24-re-Bacmid。

表 1 *Bmp24* 缺失型和修复型病毒构建及鉴定过程中所用扩增引物

引物名称	引物序列
Bmp24-C1	5'-TCACGATGGCTATTTGGAACCTAAC- CGCCGCCGCCAAAATC GTGTAGGCT- GGAGCTGCTTC-3'下划线为同源臂
Bmp24-C2	5'-AGGACGTTTTTTTATTTATTCAAATTG- TAAITTTGACAGATAT ATGGGAATT- AGCCATGGTCC -3',下划线为同源臂
Bmp24-up	5'-ATGAAAACGGACGCCCAG-3'
Bmp24-down	5'-TTATTGTATTTCAGACTGC-3'
cat-F	5'-CACGTTTAAATCAAACTGGTG-3'
cat-R	5'-CAATATGGACAACCTTCTTCG-3'
pFastBacHTB-p24F	5'-CGGGATCCCTAATTCTATCTTTT- TATC-3'下划线为 <i>Bam</i> HI 酶切位点
pFastBacHTB-p24R	5'-CGGAATTCCAAACAAATGCTA- AACGA-3'下划线为 <i>Eco</i> RI 酶切位点
M13F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Bmp24 缺失型病毒构建策略(图 1-a)和修复型病毒(图 1-b)的构建策略。

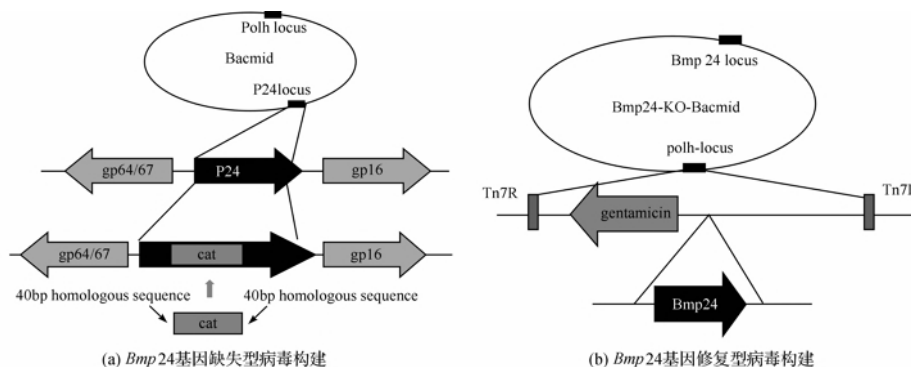


图 1 *Bmp24* 缺失型和修复型病毒的构建策略

注: (a) *Bmp24* 缺失型病毒的构建策略: 扩增带有 *Bmp24* 基因同源臂的 *cat* 片段, 同 wtBacmid 的病毒基因组中 *Bmp24* 基因发生同源重组, 替换 *p24* 基因; (b) 修复型病毒的构建策略: 扩增完整的 *Bmp24* 基因通过转移载体定点补回到 Bmp24-ko-Bacmid 的病毒基因组中 *polh* 基因上游位点。

1.2.2 TCID₅₀ 分析 *Bmp24* 缺失对子代病毒增殖的影响

分别将 1 μ g 的 wtBacmid、*Bmp24*-ko-Bacmid 和 *Bmp24*-re-Bacmid DNA 经脂质体法($V_{\text{转染试剂}} : V_{\text{DNA}} = 3 : 1$)转染到处于对数生长期的 BmN^[16-17], 收集转染后 12、24、48、72 h 和 96 h 的细胞上清。然后将状态良好的 BmN 均匀地铺于 96 孔板(1×10^4 个/孔), 27 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。当细胞密度达到 70%~80% 后, 将收集的病毒上清按梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-9}$)后接种到铺有细胞的 96 孔板中(100 μL /孔), 每个稀释度要设置 8 个重复, 并且将未接病毒液的细胞孔作为阴性对照组。27 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 5 d, 观察细胞状况, 记录各个稀释度阳性和阴性感染的孔数。3 次重复实验后用 TCID₅₀ 终端稀释法计算病毒滴度并制备曲线。

1.2.3 电镜分析 *Bmp24* 缺失对子代病毒组装的影响

以 3 种病毒上清(MOI=10)分别感染处于对数增长期的 BmN, 48 h 后离心(1000 r/min, 5 min)收集细胞。参照相关文献[18]的方法固定、包埋、切片和染色, 以 HitachiH-7650 型透射镜观察分析。

1.2.4 qPCR 分析 *Bmp24* 缺失对病毒基因组复制的影响

首先以未转染的 wtBacmid 为标准品, 按 $10^3 \sim 10^9$ 的梯度依次稀释, 各取 1 μL 为模板进行 qPCR, 绘制标准曲线。然后分别将 1 μg 的 wtBacmid、*Bmp24*-ko-Bacmid 和 *Bmp24*-re-Bacmid 的基因组 DNA 转染($V_{\text{转染试剂}} : V_{\text{DNA}} = 3 : 1$)BmN(1×10^6 /培养皿), 收集转染后 12、24、48 h 和 72 h 的细胞, 提取胞内总 DNA, 以 *Dpn* I 酶^[19] 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 12 h。将消化后的基因组 DNA 作为模板进行 qPCR^[20] 分析。以 *gp41*(*gp41* 是 BmNPV ODV 的囊膜蛋白基因, *gp41* 基因突变感染昆虫细胞后不能产生二代病毒)作为基因组复制水平的标记基因, 根据 *gp41* 基因序列设计引物 *gp41* F 和 *gp41* R(表 2)。为了确保上样量的统一, 实验中引入内参 βActin , βActin 的扩增引物为 $\beta\text{-actin}$ F/ $\beta\text{-actin}$ R(表 2)。

表 2 qPCR 反应中所用扩增引物

引物名称	引物序列
gp41F	5'-CGTAGTGGTAGTAATCGCCGC-3'
gp41R	5'-AGTCGAGTCGCGTCGCTTT-3'
$\beta\text{-actin}$ F	5'-GCGCGGCTACTCGTTCACT-3'
$\beta\text{-actin}$ R	5'-TGCCGCAAGCTTCCATACCC-3'

1.2.5 qRT-PCR 分析 *Bmp24* 缺失对病毒基因组转录的影响

收集 3 种病毒转染 12、24、48 h 和 72 h 后的细胞, 提取胞内总 RNA, 以不同时相的总 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA 的第一条链。再以 cDNA 为模板进行 qPCR, 每个样品设置 3 个实验重复, 研究 *Bmp24* 基因缺失对早期基因 *lef-3*、晚期基因 *vp39* 和极晚期基因 *p10* 转录的影响。同样, 为了消除上样量产生的误差, 引入内参 βActin 。根据 *lef-3*、*vp39*、*p10* 基因^[21] 序列分别设计引物 *lef-3* F 和 *lef-3* R、*vp39* F 和 *vp39* R、*p10* F 和 *p10* R(表 3)。

表 3 qRT-PCR 反应中所用扩增引物

引物名称	引物序列
lef-3 F	5'-TCGGATGACCGTTCTACCTCTT-3'
lef-3 R	5'-CTTCCAGCAGCATTGAGATTTG-3'
vp39 F	5'-AGACACCACAAACCCGAACAC-3'
vp39 R	5'-TTGATCGCCAACACC ACCT-3'
p10 F	5'-GACACGAATTTTACGACGCCATT-3'
p10 R	5'-CGATTCTTCCAGCCCCGTTT-3'

1.2.5 数据处理

利用 SPSS17.0 软件对实验数据进行统计学分析, 通过 T 检验比较各实验组之间是否存在显著差异, $P < 0.05$ 表示各组数据存在显著差异, $P < 0.01$ 表示存在极显著差异。

2 结果与分析

2.1 *Bmp24* 缺失型和修复型病毒的鉴定

缺失型病毒理论上 PCR 扩增条带大小为: 以 cat-F 和 *Bmp24*-down 为引物扩增条带为 1023 bp; 以 cat-R 和 *Bmp24*-up 为引物扩增条带为 399 bp; 以 *Bmp24*-up 和 *Bmp24*-down 为引物扩增条带为 1424 bp。PCR 结果显示扩增产物大小均与理论值相符(图 2-a), 表明 *Bmp24* 缺失型病毒构建成功, 将该病毒命名为 *Bmp24*-ko-Bacmid。

修复型病毒理论上 PCR 扩增产物大小: 以 M13F 和 M13R 为引物扩增条带为 3000 bp; 以 M13F 和 pFastBacHTB-p24R 为引物扩增条带为 2350 bp; 以 pFastBacHTB-p24F 和 M13R 为引物扩增条带为 1390 bp。PCR 结果表明扩增产物大小均与理论值相符(图 2-b), 表明 *Bmp24* 修复型病毒构建成功, 将该病毒命名为 *Bmp24*-re-Bacmid。

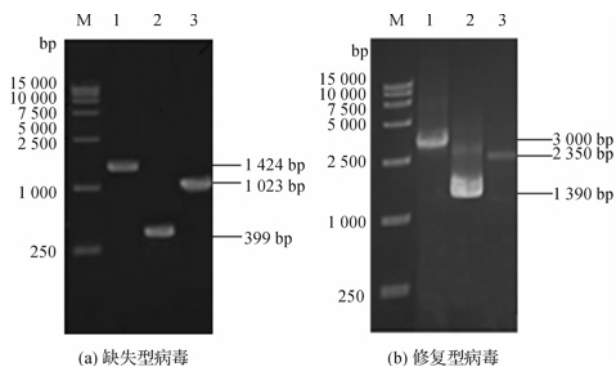


图2 *Bmp24* 基因缺失型和修复型病毒的PCR鉴定
注:(a)*Bmp24* 基因缺失型病毒的PCR鉴定;M:DL-15000;1:以 *Bmp24*-up& *Bmp24*-down 为引物的PCR产物;2:以 *Bmp24*-up& cat-R 为引物的PCR产物;3:以 cat-F & *Bmp24*-down 为引物的PCR产物;(b)*Bmp24* 基因修复型病毒的PCR鉴定;1:以 M13F 和 M13R 为引物的PCR产物;2:以 M13F 和 pFastBacHTB-p24R 为引物的PCR产物;3:以 pFastBacHTB-p24F 和 M13R 为引物的PCR产物。

2.2 *Bmp24* 缺失对病毒滴度的影响

收集3种病毒转染后特定时间点的病毒上清,感染 BmN 细胞,以 TCID₅₀ 法测定滴度。

结果显示3种病毒都可以产生有效的子代病毒并使细胞发病,且随着病毒转染时间的延长子代病毒滴度值增加;但 *Bmp24* 缺失型病毒的滴度显著低于野生型病毒($P < 0.05$),而修复型病毒与野生型病毒相比差异不显著($P > 0.05$)(图3)。

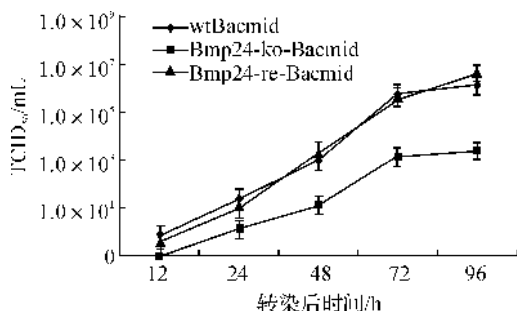


图3 3种病毒转染 BmN 细胞后的病毒滴度测定曲线

2.3 *Bmp24* 缺失对病毒粒子组装的影响

将 MOI 为 10 的 3 种病毒上清感染 BmN 细胞,48 h 后收集的细胞经固定、包埋、切片和染色,透射电镜观察。10000 \times 电镜结果显示: *Bmp24*-ko-Bacmid 病毒感染的细胞中(图 4-b1)病毒颗粒量与 wtBacmid(图 4-a1)及 *Bmp24*-re-Bacmid(图 4-c1)两种病毒相比明显降低;30000 \times 电镜结果显示: *Bmp24*-ko-Bacmid 病毒感染的细胞中只出现少量细小的杆状结构(图 4-b2),而 wtBacmid 病毒感染的细胞(图 4-a2)存在大量包装成熟的杆状病毒颗粒,而这种变化在 *Bmp24* 基因修复后得到弥补(图 4-c2)。

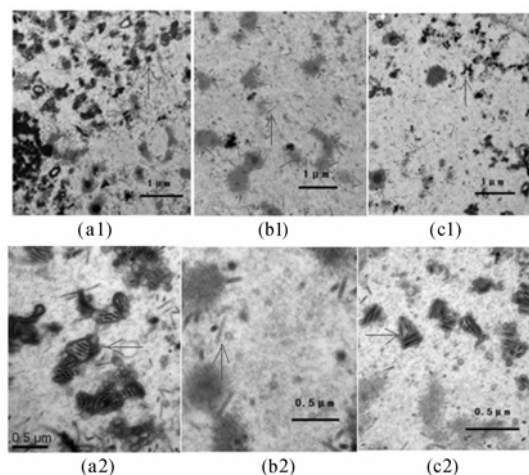


图4 电子显微镜观察3种病毒转染 BmN48h 后的增殖情况
注:a1. 野生型病毒感染的 BmN(10000 \times);b1. 缺失型病毒感染的 BmN(10000 \times);c1. 修复型病毒感染的 BmN(10000 \times);a2. 野生型病毒感染的 BmN(30000 \times);b2. 缺失型病毒感染的 BmN(30000 \times);c2. 修复型病毒感染的 BmN(30000 \times)。

2.4 *Bmp24* 缺失对 BmNPV 基因组复制的影响

收集3种病毒转染特定时间后的细胞,提取总 DNA 进行 qPCR 分析。结果表明随着转染时间的延长,3 种病毒的 *gp41* 的拷贝数都随之增高,但 *Bmp24*-ko-Bacmid 和 wtBacmid 相比无显著差异($P > 0.05$),证实 *Bmp24* 不是病毒基因组复制的必需基因(图5)。

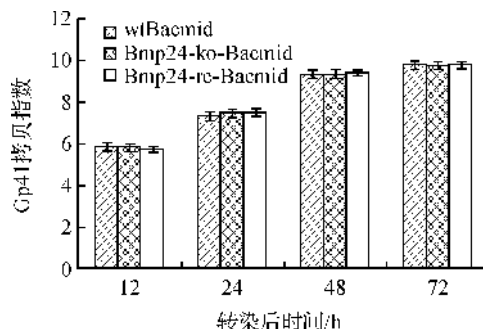


图5 3种病毒转染 BmN 后病毒拷贝数随时间变化的 qPCR 分析

2.5 *Bmp24* 缺失对早期、晚期基因和极晚期基因转录的影响

收集3种病毒转染特定时间后的细胞,提取总 RNA 进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 实验得出转染后不同时间点收集的细胞中 *lef-3*、*vp39* 和 *p10* 的 ct 值,按照 $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{目的基因}} - \Delta Ct_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{最大值}}$,计算出所有 $\Delta\Delta Ct$ 。然后以 $-\Delta\Delta Ct$ 为纵坐标,转染后时相为横坐标做柱状图,显示3种病毒在各个时间点上的转录水平(这里图表显示的不是绝对值差异,而是相对值差异)。结果表明缺失

型病毒转染细胞后产生的子代病毒的早期基因 *lef-3* (图 6-a)、晚期基因 *vp39* (图 6-b) 和极晚期基因 *p10* (图 6-c) 在各个时期的转录水平都低于野生型病毒, 差异显著 ($P < 0.05$), 而修复型与野生型无显著差异 ($P > 0.05$), *Bmp24* 基因的补回弥补了这一缺陷。

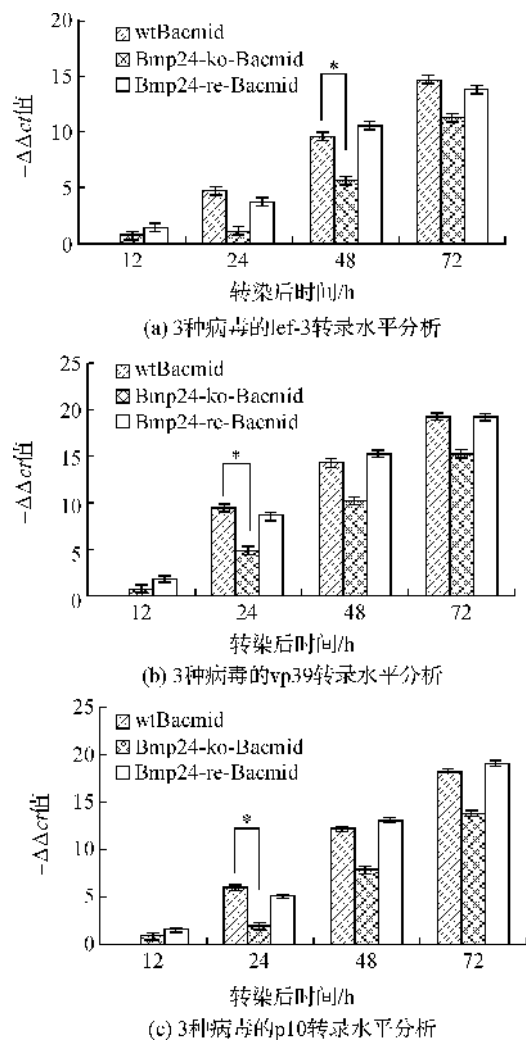


图6 3种病毒对病毒基因组转录水平的影响

3 讨论

前期实验研究发现 *p24* 基因表达的蛋白是重要的核衣壳相关蛋白, 但该基因在病毒繁殖和感染中具体的功能仍未知, 因此本实验利用 Red 重组的方法及 Bac-to-Bac 系统对其在细胞感染中的调控功能进行深入研究。

近年对 BmNPV 的保守基因研究颇多, 而基因敲除是研究基因功能的有效方法之一。Red 重组技术构建 *Bm61* 基因缺失型和修复型病毒^[22], 病毒滴度的测定发现转染后 12~96h, *Bm61* 的缺失并不会影响子代病毒的滴度, 而本研究发现 *Bmp24* 基因

缺失病毒的滴度值显著低于野生型 ($P < 0.05$); 同时电镜实验进一步发现 *Bmp24* 基因的缺失影响子代病毒粒子的包装, 而其对子代病毒的增殖和包装的影响机理有待深入研究。

在 AcMNPV 基因组中插入转座子使 *p24* 基因失活, 发现该基因的失活对基因组复制没有显著影响^[23]; 本实验发现 *Bmp24* 的缺失对 BmNPV 的 *gp41* 基因复制无显著影响, *p24* 对 BmNPV 和 AcMNPV 病毒基因复制具有相似的功能。qRT-PCR 实验结果显示 *Bmp24* 缺失虽然对基因复制没有显著影响, 但 *Bmp24* 的缺失会显著降低 BmNPV 的早期基因 *lef-3*、晚期基因 *vp39* 和极晚期基因 *p10* 的转录水平, 其作用机制有待深入研究。

另外, *Bm56* 同 *Bmp24* 一样, 也是家蚕核型多角体病毒中重要的结构基因^[24], 以往研究通过 qPCR 实验发现 *Bm56* 缺失对 BmNPV 病毒基因组复制和转录都没有显著影响, 而本研究发现 *Bmp24* 缺失对于 BmNPV 病毒基因组复制水平没有显著影响, 但它的缺失却显著降低病毒的转录水平。然而 *Bmp24* 和 *Bm56* 对 BmNPV 病毒基因组复制的作用机理是否相同, 有待进一步研究; 而两者对病毒基因组转录作用的差异及其机制, 也有待深入研究。

本实验研究发现 *Bmp24* 基因具有一定的调控功能, 影响子代病毒增殖和组装, 抑制 BmNPV 病毒基因组的转录。

参考文献:

- [1] JEHLE J, BLISSARD G, BONNING B, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision[J]. Arch Virol, 2006, 151: 1257-1266.
- [2] 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.
- [3] GOMI S, MAJIMA K, MAEDA S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80(5): 1323-1337.
- [4] YU M, CARSTENS E B. Identification of a domain of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus single-strand DNA-binding protein LEF-3 essential for viral DNA replication[J]. J Virol, 2010, 84(12): 6153-6162.
- [5] MIKHAILOV V, ROHRMANN G. The baculovirus

- replication factor LEF-1 is a DNA Primase[J]. J Virol, 2002, 76: 2287-2297.
- [6] ZHANG J, DONG Z Q, ZHANG C D, et al. Identification of a novel nuclear localization signal of baculovirus late expression factor 11[J]. Virus Res, 2014, 184: 111-119.
- [7] MCCARTHY C B, THEILMANN D A. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30 th baculovirus core gene[J]. Virology, 2008, 375 (1): 277-291.
- [8] SPARKS W O, HARRISON R L, BONNING B C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut[J]. Virology, 2011, 409(1): 69-76.
- [9] GUO Z J, QIU L H, AN S H, et al. Open reading frame 60 of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus plays a role in budded virus production [J]. Virus Research, 2010, 151: 185-191.
- [10] WU W, LIANG H, KAN J, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus 38K is a novel nucleocapsid protein that interacts with VP1054, VP39, VP80, and itself[J]. J Virol, 2008, 82(1): 12356-12364.
- [11] GE J Q, YANG Z N, TANG X D, et al. Characterization of a nucleopolyhedrovirus with a deletion of the baculovirus core gene Bm67[J]. J Gen Virol, 2008, 89: 766-774.
- [12] TANG Q, LI G H, YAO Q, et al. Bm91 is an envelope component of ODV but is dispensable for the propagation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 113(1): 70-77.
- [13] GOMBART A F, BLISSARD G W, ROHRMANN G F. Characterization of the genetic organization of the HindIII M region of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata perdotsugata* reveals major differences among baculoviruses[J]. Journal of General Virology, 1989, 70(a): 1815-1828.
- [14] WOLGAMOT G M, GROSS C H, RUSSELL R L Q, et al. Immunocytochemical characterization of p24, a baculovirus capsid-associated protein [J]. Journal of General Virology, 1993, 74: 103-107.
- [15] BJORNSEN R M, ROHRMANN G F. Nucleotide sequence of the polyhedron envelope protein gene region of the *Lyrnantria dispar* nuclear polyhedrosis virus[J]. Journal of General Virology, 1992, 73(a): 1499-1504.
- [16] LIN G, BLISSARD G W. Analysis of an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef-11* knockout: LEF-11 is essential for viral DNA replication[J]. J Virol, 2002a, 76 (6): 2770-2779.
- [17] LIN G, BLISSARD G W. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6* null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription[J]. J Virol, 2002b, 76 (11): 5503-5514.
- [18] LI Y, WANG J, DENG R, et al. Vlf-1 deletion brought AcMNPV to defect in nucleocapsid formation [J]. Virus Genes, 2005, 31: 275-284.
- [19] VANARSDALL A L, OKANO K, ROHRMANN G F. Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene [J]. Virology, 2005, Jan 5;331(1): 175-180.
- [20] VANARSDALL A L, OKANO K, ROHRMANN G F. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing[J] J Virol, 2006, 80(4): 1724-1733.
- [21] 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.
- [22] SHEN H X, CHEN K P. Bm61 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: Its involvement in the egress of nucleocapsids from the nucleus [J]. FEBS Letters, 2012, 586(1): 990-995.
- [23] GOMART A F, PEARSON M N, ROHRMANN G F, et al. A baculovirus polyhedral envelope-associated Protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization [J]. Virology, 1989, 169(1): 182-193.
- [24] 石扬辉, 朱丽萍, 张臣, 等. 家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) Bm56 缺失对病毒复制和转录的影响[J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2014, 31(6): 734-739.

Effect of *Bmp24* Deficiency on Replication, Transcription and Virus Assembly of BmNPV

CHEN Chen^a, YU Wei^{a,b}, SHI Lili^{a,b}, GONG Chengjian^{a,b}, JIANG Lei^{a,b}, TONG Fudan^{a,b}

(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 *Bmp24*. We constructed *Bmp24*-ko-Bacmid Red recombination technology and Bac-to-Bac system. Then, *Bmp24*-ko-Bacmid, *Bmp24*-re-Bacmid and wtBacmid transfected BmN cells. It was found through virus titer that the three viruses could generate viable progeny virus and induce cell pathogenesis, but the titerring values of *Bmp24*-ko-Bacmid was markedly lower than the other two types of viruses in various phases ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy result shows that among the cells infected by *Bmp24*-ko-Bacmid, there is only a small amount of long slender rod-shaped structures, while the other two virus-infected cells can produce large amounts of mature virus particles with capsule package. The qPCR result shows that lack of *Bmp24* will not affect the replication of the viral genome. And the qRT-PCR result shows that lack of *Bmp24* will reduce the transcription levels of early gene, late gene and very late gene which are significantly lower than that of the wild-type virus ($P < 0.05$).

Key words: bmnvp; *Bmp24* gene; Red recombination system; Bac-to-Bac system;

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 102 页)

Anti-tumor Activity Anaysis of Several Natural Pyrones Derivatives

ZHENG Xusheng¹, LI Huihui², LI Qi², TANG Yu², WANG Yigang¹, XU Chuanlian¹

(1. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. School of Pharmacy, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Natural pyrones derivatives with stronger anti-tumor activity were gained through antitumor activity analysis of several such compounds. MTT was used to detect the cytotoxicity of 6 natural pyrone compounds on tumor cells after structural modification and reconstruction. The results show that the antitumor activity of LiQ-1 and LiH-IV-80 is significantly strong. LiQ-1 was used to analyze its influnce on erythroleukemia K562 cell growth, and the result presented dose-dependent relaitonship. Through analysis and comparison of compound structure, it is proven that for LiH-IV-80, LiH-IV-50-2 and LiH-III-122-2, lactonic ring formed in 7-position plays an important role on tumor inhibition cell proliferation. For LiQ-1, LiQ-2 and LiQ-4, 4-position OH has a great affect on tumor activity.

Key words: natural pyrone; structural modification; MTT; anti-tumor activity

(责任编辑: 许惠儿)