

杆状病毒 ac30 基因的序列分析及其功能

余 倩

仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广州 510225

摘要 通过生物信息学初步分析苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)基因组第 30 开放阅读框(*ac30*)及其同源基因的特征,并在此基础上利用 ET-重组技术构建 *ac30* 缺失突变体,探讨其在 AcMNPV 感染 Sf-9 细胞时的功能。结果表明:*ac30* 的开放阅读框(ORF)全长为 1 392 bp,GC 含量为 43%,编码氨基酸 463 个,预计分子质量为 54.7 ku。从转染或感染的病毒生长曲线变化趋势来看, *ac30* 的缺失对病毒产生有感染力的 BV 粒子没有影响,说明 *ac30* 基因是 AcMNPV 病毒在 Sf-9 细胞复制中的非必需基因。

关键词 *ac30*; 序列分析; 缺失突变体; 基因功能

中图分类号 S 476⁺.13 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)04-0013-07

杆状病毒(Baculovirus)是寄生于节肢动物的专一性病原微生物,属于有囊膜包被和具杆状形态的双链闭环超螺旋 DNA 病毒,不同病毒的基因组大小为 80~180 kb。杆状病毒广泛存在于自然环境中,到目前为止已在超过 600 种昆虫中分离到杆状病毒,其宿主主要为鳞翅目、双翅目和膜翅目的昆虫^[1-3]。杆状病毒在害虫的生物防治中具有化学杀虫剂无法比拟的优点^[4],但杆状病毒同时也存在杀虫谱窄、即效性差、不能同时防治多种害虫等缺点,通过基因工程的手段可以有效地提高杆状病毒杀虫剂的效率^[5]。近年来,杆状病毒还被用作高等生物基因治疗的表面展示系统^[6]。提高杆状病毒杀虫剂的效率,发展杆状病毒基因表达系统和基因治疗的基因传递系统,深入研究病毒-宿主细胞相互作用,对杆状病毒基因功能的全面研究能极大拓展杆状病毒在各个方面的应用,具有重要意义。

苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)是第一个完成全基因组测序的杆状病毒,也是研究最多的一个杆状病毒,其基因组大小为 133 894 bp,全长大于 50 个氨基酸的开放阅读框(open reading frame, ORF)有 156 个^[7]。到目前为止,在已测序的所有杆状病毒中有 31 个高度保守的核心基

因^[8-10],这些基因涉及到病毒 DNA 的复制、基因的转录、核衣壳的装配和病毒粒子的形成,还与病毒和宿主的相互作用有关。除了这 31 个核心基因,在已测序的鳞翅目杆状病毒中还有 31 个保守的基因^[11],*ac30* 就是其中一个,其同源基因分别存在所有已测序鳞翅目昆虫杆状病毒基因组中,其编码的氨基酸序列保守,且该基因的功能未知。*ac30* 的核苷酸序列与部分鳞翅目昆虫杆状病毒的同源序列有很高的相似性,其中与小菜蛾核多角体病毒(*Plutella xylostella* nucleopolyhedrovirus, PlxyNPV) ORF29、斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) ORF30、家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* NPV, BmNPV) ORF30、薄荷灰夜蛾核多角体病毒(*Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus, RoMNPV) ORF30 的核苷酸序列一致性在 96%以上,故对其进行功能研究有重要的意义。本试验选择 AcMNPV 的 *ac30* 为研究对象,运用生物信息学的方法对其序列进行分析,并在此基础上利用 ET-重组技术和 Bac-to-Bac 系统,首次在 AcMNPV Bacmid 的基础上构建 *ac30* 缺失的重组病毒,将其感染宿主细胞,旨在探讨缺失 *ac30* 对 AcMNPV 病毒在 Sf-9 细胞中增殖的影响。

收稿日期: 2014-08-22
基金项目: 国家自然科学基金项目(31201575); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(Yq2013096); 广东省教育厅特色创新项目(2012KJCX0067)
余 倩, 博士, 副教授. 研究方向: 应用微生物. E-mail: yuqianchina@126.com

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试 *ac30* 基因序列来源于 AcMNPV 的全基因组序列,基因组序列的序列号为 NC_001623.1, *ac30* 基因的 GeneID 为 1403862; 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 幼虫由中山大学生科院养虫室提供,为人工饲料饲养的健康幼虫,人工饲料配方见参考资料^[12]; 野生型 AcMNPV 引自美国加州大学 Riverside 分校 B.A.Federici 教授实验室; 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf-9 引自英国自然环境研究委员会病毒研究所,用 10% 胎牛血清的 Grace's 培养基 (Invitrogen) 27 ℃ 培养待用。

1.2 应用软件及分析方法

应用 DNASTAR^[13] 和 Vector NTI^[14] 软件包对 DNA 序列进行阅读框和核苷酸序列特征分析; 亚细胞定位预测使用 PSORT II prediction (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) 和 WoLF PSORT Prediction (<http://wolfsort.org/>)^[15]; 同源性搜索使用 ExPASy BLAST (SIB BLAST Network Service, <http://www.expasy.org/tools/blast/>)^[16]。

1.3 AcMNPV 病毒感染 Sf-9 细胞

在直径 35 mm 培养皿中以每孔 1×10^6 个细胞密度接种对数生长期的 Sf-9 细胞; 待细胞贴壁 1 h 后移出培养基,AcMNPV 病毒血淋巴以 MOI 为 5 感染细胞,27 ℃ 培养 1 h 并间隔摇动培养板; 1 h 后

弃感染液,以无抗生素无血清 Grace's 培养基洗 2 次,然后加入 Grace's 培养基继续培养,加入病毒即开始计时,于感染后不同时间收集取样,3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,细胞沉淀先放入液氮速冻 30 min,再在 -70 ℃ 下保存备用。

1.4 PCR 引物

供试引物序列见表 1,引物由上海英骏生物工程公司合成。反应结束后,取反应液 5 μL 进行凝胶电泳,确认反应产物。

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 PCR primers used for application	
引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
30 u-u	atggcgtaattaattaagaa
30d-d	ttcttaattaattacgccat
del-r	cgattatgtgtccaatacaaacacttgaacacggcgc taataaacaatgtaaccagcaatagacataagcgg
del-f	aatcgacgcgatttttgaattttgaaacagcatcaggttga acgcgcgcgccctttcgtcttcgaataaatacct
CmR	ggatcccttcgaataaatacctgtga
CmF	ctgcagaaccagcaatagacataagc

1.5 缺失型和补回型重组病毒的构建

通过引物对 del-r/del-f(表 1)PCR 扩增出两端带有 *ac30* 同源序列的长片段,将其电转入含有 AcMNPV 基因组的 bMON14272 中,通过诱导发生同源重组,利用氯霉素抗性基因将 *ac30* 中的部分序列替换,从而构建了缺失 *ac30* 的重组病毒,进一步与含有 *polh* 和 *egfp* 序列的 pFB1-PH-GFP 转座,构建 vAc^{30KO-PH-GFP}、vAc^{30REP-PH-GFP}、vAc^{PH-GFP} (野生型)。构建策略如图 1 所示。

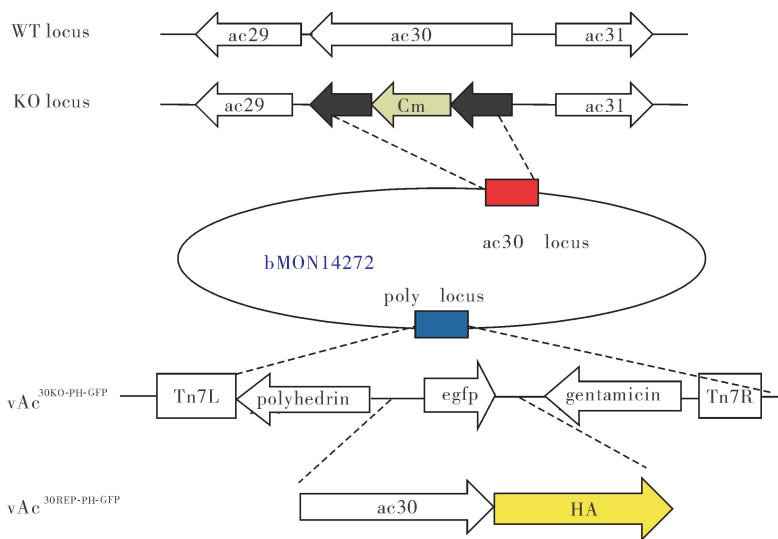


图 1 vAc^{30KO-PH-GFP} (缺失型)和 vAc^{30REP-PH-GFP} (补回型)重组病毒的构建
Fig.1 The constructions of *ac30* knock-out bacmid and repair bacmid

1.6 重组 vAc^{30KO-PH-GFP} Bacmid 的 PCR 鉴定

运用 PCR 检测 *ac30* 基因片段是否已经被正确敲除。分别利用引物对 30u-u/30d-d、CmF/CmR 和 CmF/30d-d、30u-u/CmR 进行 PCR 反应,同时分别以 vAc^{PH-GFP} Bacmid DNA 和 vAc^{30KO-PH-GFP} Bacmid DNA 为模板进行反应以鉴定 *ac30* 基因是否正确缺失,以及 Cm 是否在预定位置插入。

1.7 病毒样品制备

以 vAc^{30KO-PH-GFP}、vAc^{30REP-PH-GFP}、vAc^{PH-GFP} bacmid DNA 1 μg 定量转染 1×10⁶ 个处于生长期的 Sf-9 细胞,分别在 12、24、48、72、96 h(时间点)吸取细胞上清,6 000 r/min 离心 5 min,转移上清至无菌 EP 管中,4℃避光保存待用。每个处理重复 3 次。

1.8 病毒滴度测定

吸取 10 μL 不同时间点收取的病毒上清,用细胞培养基对其进行 10 倍梯度稀释,稀释范围为 10⁻¹~10⁻⁸,每个稀释度体积为 90 μL,充分混匀;在每个病毒稀释液中加入 90 μL 细胞悬液,细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL,轻柔混匀;将混合液加到细胞滴度测定板中,每孔加 10 μL,每个稀释度接 6 孔,并以无病毒感染的细胞悬液作为对照;将滴度板放在 27℃温箱中保湿培养 5 d,在荧光显微镜下观察每个梯度中细胞感染病毒的孔数并记录。按以下公式计算出病毒的 TCID₅₀: TCID₅₀/mL=10^{(a+x)×200/mL},式中 $a=\lg(n)$, n 为感染率高于 50% 的最接近稀释度, b 为 n 稀释度的感染率; c = 低于 n 的最接近稀释度的感染率; $x=(b-50\%)/(b-c)$ 。

2 结果与分析

2.1 AcMNPV_{ac30} 阅读框分析

1)*ac30* 在基因组中的位置。AcMNPV_{ac30} 基因位于 AcMNPV 基因组 24 315~25 706 nt 之间(图 2),与 AcMNPV ORF29 (*ac 29*) 和 *Ac-fgf* (ORF 32) 转录方向相同且无重叠,与 *Ac-lef6* (ORF28) 和 *Ac-sod* (ORF31) 转录方向相反;与上游 *Ac-sod* 相隔 114 bp,与 *ac29* 相隔 54 bp。

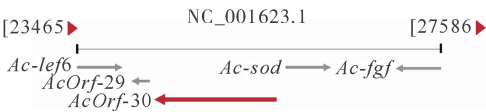


图 2 *ac30* 在 AcMNPV 基因组中的位置

Fig.2 *ac30* region in AcMNPV genome

2)*ac30* 编码框分析。*ac30* 的 ORF 全长 1 392 bp,GC 含量 43%,编码 463 个氨基酸,预计分子质

量为 54.7 ku。

3) 核苷酸序列的 BLAST 搜索。ExPASy BLAST 搜索结果结果表明 AcMNPV *ac30* 基因核苷酸序列与部分鳞翅目昆虫杆状病毒的同源序列有很高的相似性,其中与小菜蛾核多角体病毒 PlxyNPV ORF29、斜纹夜蛾核多角体病毒 SpltMNPV ORF30、家蚕核多角体病毒 BmNPV ORF30、薄荷灰夜蛾核多角体病毒 RoMNPV ORF30 的核苷酸序列一致性在 96% 以上。

2.2 Ac30 蛋白质特征分析

1) 氨基酸序列特征分析。*ac30* 编码 463 个氨基酸,其中含有 9 个强碱性氨基酸,9 个强酸性氨基酸,AC30 理论分子质量为 9.440 1 ku,等电点为 6.56。

2) AC30 蛋白的亚细胞定位。利用在线软件 PSORT II prediction 对 AC30 蛋白进行亚细胞定位预测分析,分析结果表明 AC30 蛋白 56.5% 在细胞质内,30.4% 在细胞核内,8.7% 在线粒体内 mitochondrial,4.3% 在细胞骨架上。

3) 蛋白同源序列比对分析。利用 Blastp (SIB BLAST Network Service) 搜索引擎在 Swiss-Prot+TrEMBL 蛋白质数据库中进行比对,结果表明 AC30 蛋白序列在鳞翅目昆虫杆状病毒中相当保守,其中 AC30 蛋白序列与 PlxyNPV gp030, BmNPV gp022, RoMNPV hypothetical protein 编码的蛋白序列一致性达 95% 以上。

2.3 重组病毒的构建和 PCR 检测

为进一步探讨 *ac30* 的功能,利用 ET-同源重组技术构建缺失 *ac30* 的重组 AcMNPV 病毒,以观察 *ac30* 缺失对病毒在细胞中复制的影响。同时构建 *ac30* 基因补回型重组病毒,分析缺失表型与基因缺失的对应关系。分别提取 3 种重组病毒的 Bacmid DNA 进行 PCR 分析,结果显示:引物对 30u-u/30d-d 能在重组病毒 vAc^{30KO-PH-GFP} 中扩增出约 2.0 kb 的特异带,在 vAc^{PH-GFP} 病毒中扩增出约 1.0 kb 的特异带;引物对 Cm F/Cm R 在重组病毒 vAc^{30KO-PH-GFP} 中均能扩增出约 1.2 kb 特异带,在 vAc^{PH-GFP} 病毒中未能扩增出特异带;引物对 30u-u/Cm F 在重组病毒 vAc^{30KO-PH-GFP} 中扩增出约 1.5 kb 的特异带,在 vAc^{PH-GFP} 病毒中未扩增出特异带;引物对 Cm R/30d-d 在重组病毒 vAc^{30KO-PH-GFP} 中扩增出约 1.5 kb 的特异带,在 vAc^{PH-GFP} 病毒中未扩增出特异带(图 3)。

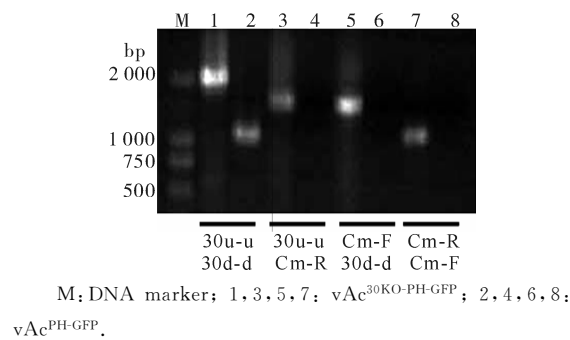


图 3 vAc^{PH-GFP} 和 vAc^{30KO-PH-GFP} 的 PCR 分析
Fig.3 Analysis of vAc^{PH-GFP} and vAc^{30KO-PH-GFP} by PCR

2.4 重组病毒转染细胞的观察

取 3 种重组病毒 vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和

vAc^{30REP-PH-GFP} 各 1 μg，分别转染细胞培养皿中的 1×10⁶ Sf-9 细胞，在转染 12、24、48、72、96、120 h 后分别进行荧光显微镜观察和普通显微镜观察，并拍照记录结果。转染 24 h 后观察时，视野下可见分散的绿色荧光，3 种重组病毒感染的 Sf-9 细胞中的荧光的分布及数量无明显差异；转染 48 h 后观察时，感染的 Sf-9 细胞中可观察到成团成簇的绿色荧光，出现绿色荧光的细胞数量与 24 h 相比有指数级的增加；转染 72 h 后观察时几乎所有病毒感染的细胞中都有荧光出现(图 4)。观察结果表明 *ac30* 基因的缺失并没有影响 BV 的形成，缺失型重组病毒仍可产生具有感染力的 BV。

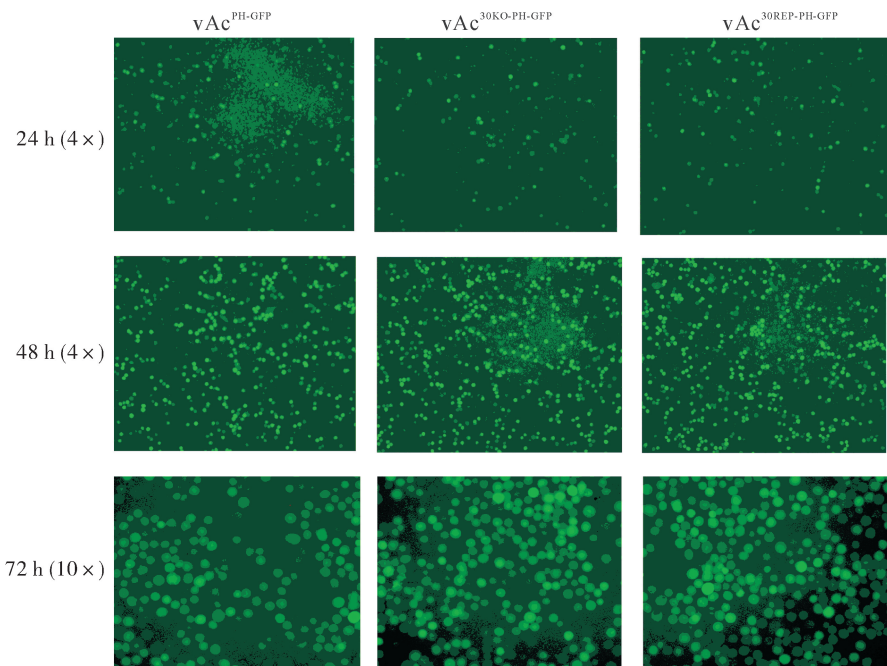


图 4 vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和 vAc^{30REP-PH-GFP} 转染 Sf-9 细胞后不同时间点荧光显微镜照片
Fig.4 Observations of Sf-9 cells transfected with vAc^{PH-GFP} , vAc^{30KO-PH-GFP} and vAc^{30REP-PH-GFP} under fluorensce microscope at different time point

2.5 重组病毒转染 Sf-9 细胞的病毒生长

将 vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和 vAc^{30REP-PH-GFP} 3 种重组病毒转染 Sf-9 细胞后，分别于不同时间点收取病毒上清液，利用终点稀释法测定上清液中的病毒滴度，以所测得上清病毒滴度绘制 3 种重组病毒转染细胞的 BV 生长曲线。

由测定结果可知，vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和 vAc^{30REP-PH-GFP} 3 种重组病毒的 BV 生长曲线显示出较为一致的上升趋势，表明 *ac30* 的缺失对病毒产生有感染力的 BV 粒子数没有影响。

2.6 重组病毒感染 Sf-9 细胞的病毒生长

将 vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和 vAc^{30REP-PH-GFP} 3 种重组病毒以 MOI=5 感染 Sf-9 细胞后于不同时间点收取病毒上清，利用终点稀释法测定上清中病毒滴度，以所测得上清病毒滴度绘制重组病毒感染细胞的 BV 生长曲线。

由测定结果可知：在感染 Sf-9 细胞后 24 h，vAc^{PH-GFP}、vAc^{30KO-PH-GFP} 和 vAc^{30REP-PH-GFP} 3 种重组病毒的滴度基本一致；在感染后 96 h 和 120 h，3 种重组病毒的滴度也基本一致，其 BV 生长曲线显示出

较为一致的上升趋势。

感染试验结果和前面的转染试验结果相似,都说明 *ac30* 缺失后对病毒产生有感染力的 BV 粒子没有影响。*vAc^{PH-GFP}*、*vAc^{30KO-PH-GFP}* 和 *vAc^{30REP-PH-GFP}* 3 种重组病毒转染或感染 Sf-9 细胞后的病毒生长状况都显示 *ac30* 缺失后对病毒产生有感染力的 BV 粒子没有影响,说明该基因不是 AcMNPV 病毒在 Sf-9 细胞复制中的非必需基因。

3 讨论

ac30 基因在鳞翅目昆虫为宿主的杆状病毒中比较保守,但基因功能未知。Ac30 同源蛋白相似性在 BmNPV、PlxyMNPV、RoMNPV 中高度保守,相似性达 95%~99%。Ac30 所有同源蛋白只存在于以鳞翅目昆虫为宿主的病毒中,而在感染双翅目、膜翅目昆虫的杆状病毒以及颗粒体病毒中均无同源序列,表明该类基因具有一定的宿主特异性,在病毒特异性识别鳞翅目宿主昆虫过程中可能起着重要作用。AcMNPV 感染 Tn 细胞的转录组学研究结果表明 *ac30* 基因有两个转录起始位点,分别是起始密码子的上游 191 nt 处和 491 nt 处^[17],*ac30* 基因缺少典型的早期启动子元件,对 *ac30* 的转录时相研究结果(本文未显示)推测 *ac30* 基因可能是一个非典型的早期基因。

在 ET-重组技术应用于杆状病毒改造之前,杆状病毒基因的缺失大多利用同源重组的方法进行,通过传统的构建转移载体,再与基因组 DNA 共转染的方法来构建重组病毒,但利用此方法研究杆状病毒必需基因时,会因为必需基因缺失而使得重组病毒不能复制,无法得到重组病毒使研究无法继续进行。

相对于用同源重组的方法在昆虫细胞中构建重组病毒而言,将外源基因插入到能在细菌中复制的杆状病毒穿梭载体上的位点特异性重组具有很大优势。自 Luckow 等^[18] 成功构建 AcMNPV Bacmid 以来,逐步发展起来的 ET-重组技术已经实现了众多基因的敲除。通过 ET-重组,Wang 等^[19] 构建了 *ac18* 缺失的重组病毒,发现 *ac18* 缺失型重组病毒在细胞和虫体中都能复制,但在感染粉纹夜蛾幼虫试验中半数致死时间相对野生病毒延迟了 24 h。在对 *HearNPV* 81 基因的缺失研究中,发现此基因是一个晚期基因,它的缺失阻断了病毒 BV 的产生^[20]。通过 ET-重组,分别敲除 AcMNPV 的

ac101、*ac142* 和 *ac144*,发现分别缺失这 3 个基因不影响 DNA 的复制,但缺失型病毒不能在细胞中复制,电镜观察和 Western blot 分析进一步显示这 3 个基因与核衣壳形成有关,编码核衣壳相关蛋白^[21]。

本试验利用 ET-重组方法,在原核系统 *E.coli* DH10B 细胞中成功从 AcMNPV Bacmid 基因组敲除了 *ac30* 基因片段,并在该位点插入了氯霉素基因 *Cm*,通过氯霉素抗性筛选和 PCR 检测等手段鉴定分析表明基因敲除完全正确。这些结果可为研究该基因在病毒生活周期中的作用提供科学依据。

本试验最后对 *ac30* 基因缺失型重组病毒在细胞中的增殖进行了观察与分析,结果表明 *ac30* 基因缺失型病毒转染 Sf-9 细胞可以产生有感染力的子代病毒,同野生型病毒相比,缺失型病毒和补回型病毒的一步生长曲线没有显著差异。研究结果表明,*ac30* 的缺失并不影响病毒在细胞中的增殖以及多角体的形成;*ac30* 是病毒在细胞中增殖的非必需基因。对 *ac30* 的同源基因 *Bm21* 的功能研究结果显示其也是一个复制非必需基因^[22],这两个结果是一致的。杆状病毒除了编码必需基因外,还编码一系列具有其他功能的基因,使其与宿主的相互关系能达到最佳适应状态。这些基因非病毒复制所必需,但是可能为病毒提供一种选择性的生长优势以利于病毒的增殖,称为辅助基因^[23]。

近来,Detvisitsakun 等^[24] 对杆状病毒的一个辅助基因 *vfgf* 进行了较深入研究,结果表明缺失 *vfgf* 基因的重组病毒感染 Sf-21 细胞仍可产生有感染力的 BV,病毒或宿主蛋白的表达以及病毒基因组的复制也并没有因为 *vfgf* 基因的缺失而关闭。缺失 *vfgf* 基因的重组病毒和对照野生型病毒共感染 Sf-21 细胞并在细胞中传代,通过杂交检测各代中缺失型病毒和野生型病毒的复制,结果表明无论是野生型病毒还是 *vfgf* 基因的缺失型病毒都没有表现出稳定的生长优势,所以 *vfgf* 基因是病毒复制的非必需基因,作为辅助基因 *vfgf* 可能与病毒在虫体内的复制过程中执行特定的功能。对杆状病毒中其他辅助基因,如 *alk-exo*、*chitinase* 及 *gp37* 等^[25-27] 基因研究也表明,辅助基因对病毒复制是非必需的,但有利于病毒充分增殖,这类基因的功能体现了杆状病毒的复制策略、病毒与细胞的相互作用关系,与杆状病毒宿主特异性的决定有关。

参 考 文 献

- [1] ROHRMANN G F, ERLANDSON M A, THEILMANN D A. Genome sequence of an alphabaculovirus isolated from *Choristoneura murinana* [J]. *Genome Announc*, 2014, 30: 1135-1143.
- [2] SLACK J, ARIF B M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function [J]. *Adv Virus Res*, 2007, 69: 99-165.
- [3] VAN OERS M M, VLAK J M. Baculovirus genomics [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8: 1051-1068.
- [4] LU A, MILLER L K. Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning [J]. *Biotechniques*, 1996, 21(1): 63-68.
- [5] CHEN X, SUN X, HU Z, et al. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide [J]. *J Invertebr Pathol*, 2000, 76(2): 140-146.
- [6] PIERONI L, LA MONICA N. Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3(5): 464-467.
- [7] AYRES M D, HOWARD S C, KUZIO J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Virology*, 1994, 202: 586-605.
- [8] ROSE J, KLEESPIES R G, WANG Y, et al. On the susceptibility of the box tree moth *Cydalima perspectalis* to *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AnfaNPV) [J]. *J Invertebr Pathol*, 2013, 113(3): 191-197.
- [9] HERNIOU E A, JEHL E J A. Baculovirus phylogeny and evolution [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(10): 1043-1050.
- [10] HERNIOU E A, LUQUE T, CHEN X, et al. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny [J]. *J Virol*, 2001, 75: 8117-8126.
- [11] BIERNAT M A, EKER A P, VAN OERS M M, et al. A baculovirus photolyase with DNA repair activity and circadian clock regulatory function [J]. *J Biol Rhythms*, 2012, 27(1): 3-11.
- [12] 庞义. 杆状病毒的重组及其寄主与载体系统研究 [D]. 广州: 中山大学图书馆, 1988.
- [13] BURLAND T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software [J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 132: 71-91.
- [14] LU G, MORIYAMA E N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 378-388.
- [15] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT [C]. [s.l.]: The 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference, 2006: 39-48.
- [16] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3402.
- [17] YUN R U C, SILIN Z, ZHANG J F, et al. The transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells [J]. *J Virol*, 2013, 87(11): 6391-6405.
- [18] LUCKOW V A, LEE S C, BARRY G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* [J]. *J Virol*, 1993, 67: 4566-4579.
- [19] WANG Y, WU W, LI Z, et al. *ac18* is not essential for the propagation of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus [J]. *Virology*, 2007, 367: 71-81.
- [20] LI X F, YU H, ZHANG C X, et al. *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus *orf81* is a late gene involved in budded virus production [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(8): 2011-2022.
- [21] VAN ARSDALL A L, PEARSON M N, ROHRMANN G F. Characterization of baculovirus constructs lacking either the *Ac101*, *Ac142*, or the *Ac144* open reading frame [J]. *Virology*, 2007, 367: 187-195.
- [22] HUANG J. Open reading frame Bm21 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus is not essential for virus replication *in vitro*, but its deletion extends the median survival time of infected larvae [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(4): 922-930.
- [23] O'REILLY D R. Auxiliary genes of baculoviruses [M]. New York: Plenum Press, 1997: 267-295.
- [24] DETVISITSAKUN C, CAIN E L, PASSARELLI A L. The *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality [J]. *Virology*, 2007, 365: 70-78.
- [25] SALVADOR R, FERRELLI M L, SCIOCCO-CAP A, et al. Analysis of a chitinase from EpapGV, a fast killing betabaculovirus [J]. *Virus Genes*, 2014, 48(2): 406-409.
- [26] SALVADOR R, FERRELLI M L, BERRETTA M F, et al. Analysis of EpapGV gp37 gene reveals a close relationship between granulovirus and entomopoxvirus [J]. *Virus Genes*, 2012, 45(3): 610-613.
- [27] WANG Q, QU L, ZHANG Z, et al. Characterization of a novel chitinase, DkChi, from *Dendrolimus kikuchii* nucleopolyhedrovirus [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(12): 2523-2530.

Sequence analysis and functional study on baculovirus *ac30* gene

YU Qian

Zhongkai University of Agriculture and Engineering, College of Food Science and Technology,
Guangzhou 510225, China

Abstract *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) *ac30* (*orf30*) is a highly conserved gene in lepidopteran baculovirus whose function is unknown. *ac30* is located between nt 24 315 to nt 25 706 in AcMNPV genome, and encodes a putative protein of 463 amino acids with a predicted molecular mass of 54.7 ku. To determine the role of *ac30* in the baculovirus life cycle, an *ac30* knockout virus containing the AcMNPV genome was generated by using AcMNPV bacmid bMON14272 via ET-recombination in *Escherichia coli*. To rescue the phenotype of the *ac30* knockout, an *ac30*-repaired virus was constructed in which an *ac30* gene copy with its native promoter and terminator element was inserted into the *polyhedron* (*polh*) locus of the *ac30* knockout bacmid by transposition. Sf-9 cells were transfected with wt bacmid, *ac30* knockout bacmid or the repair bacmid, respectively. All of the three virus bacmids could generate infectious virus. After infection of Sf-9 cells with wt virus, *ac30* knockout virus or *ac30* repair virus, all of the three viruses showed similar infection pattern. All these results indicated that *ac30* gene was not essential for virus propagation in AcMNPV life cycle.

Key words *ac30*; sequence analysis; knockout bacmid; gene function

(责任编辑:陈红叶)