

DOI: 10.13376/j.cblls/2015053

文章编号: 1004-0374(2015)03-0406-11



胡志红, 中国科学院武汉病毒研究所研究员、病毒学国家重点实验室副主任、中国普通病毒保藏中心主任、系统病毒学学科组长。中国科学院“百人计划”入选者, 国家杰出青年基金获得者, 百千万工程领军人才入选者, 国家自然科学基金委“病毒与宿主相互作用的分子机理”创新研究群体带头人。兼任中国微生物学会理事、中国微生物学会病毒学专业委员会副主任委员, *Journal of Invertebrate Pathology* 副编辑等。长期从事病毒学研究, 通过研究病毒与宿主的相互作用, 发现生命科学的自然规律, 并发展病毒应用技术。近年来的研究方向包括: (1) 自然界中病毒的多样性及其作用; (2) 病毒与宿主相互作用的分子机理; (3) 出血热病毒的致病机理; (4) 杆状病毒在生物防治及表达载体等方面的应用研究等。

## 杆状病毒病毒粒子结构与口服感染和系统感染的关系

侯典海, 王曼丽, 邓菲, 王华林, 胡志红\*

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

**摘要:** 杆状病毒在其生命周期中形成了两种不同的病毒类型: 出芽型病毒粒子 (budded virus, BV) 和包埋型病毒粒子 (occlusion derived virus, ODV), 其中 ODV 负责口服感染, 而 BV 负责系统感染。它们又分别应用于不同的生物技术领域, 如 BV 可用于杆状病毒表达载体, 而富含 ODV 的多角体主要用于生物防治。近年来蛋白质组学的研究进展对 BV 和 ODV 的产生机理有了新的认识, 现主要总结这方面的研究结果。

**关键词:** 杆状病毒; 出芽型病毒粒子; 包埋型病毒粒子; 口服感染; 系统感染

**中图分类号:** Q939.4; R373      **文献标志码:** A

### The structure differences of BV and ODV reflect their function for systematic and oral infection

HOU Dian-Hai, WANG Man-Li, DENG Fei, WANG Hua-Lin, HU Zhi-Hong\*

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** Baculovirus produces two phenotypes of progeny virions during its life cycle: budded virus (BV) and occlusion derived virus (ODV). BV is responsible for systematic infection in the host and has been used widely as foreign gene expression vector, while ODV is responsible for initiating oral infection and has been used for biological control. Recently, the proteomics researches on BV and ODV have revealed the structural similarity and differences between the two phenotypes. In this review, we summarize the relationship between the structure of BV and ODV and their functions of oral and systematic infection, as well as the impacts on future research and development.

**Key words:** baculovirus; budded virus (BV); occlusion derived virus (ODV); oral infection; systematic infection

收稿日期: 2014-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30630002, 31321001, 31400142); 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB11030400); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(30060002)

\*通信作者: E-mail: huzh@wh.iov.cn

杆状病毒是昆虫特异性病毒, 为了适应宿主昆虫间断性暴发的生态学特性, 杆状病毒在与宿主昆虫的长期共进化过程中, 形成了两种不同类型的病毒粒子: 一种为包埋型的病毒粒子 (occlusion derived virus, ODV), 另一种为出芽型的病毒粒子 (budded virus, BV)。这两种病毒都由同一个基因组所编码, 出现在病毒感染周期的不同阶段, 分别负责杆状病毒的口服感染和系统感染。在自然界中, ODV 被包埋在由多角体蛋白或颗粒体蛋白所形成的包涵体 (occlusion body, OB) 中, 这种包涵体能够抵御较强的外界环境变化, 在土壤中存活数十年。当宿主昆虫取食到包涵体时, 在昆虫中肠的碱性环境下, 包涵体蛋白会特异性地降解, 从而释放出 ODV。ODV 通过膜融合进入中肠上皮细胞, 启动初始感染 (也称口服感染)。进入中肠上皮细胞的病毒经过繁殖, 产生出新的病毒粒子 BV, BV 从中肠的基底层出芽, 进入气管及血管, 从而启动昆虫体内其他组织的系统感染。因此, ODV 特异性地负责口服感染 (也称初始感染), 而 BV 负责系统感染 (也称二次感染)。ODV 仅能特异性地感染昆虫的中肠, 而 BV 可以感染除中肠以外的昆虫其他组织。

杆状病毒的应用主要表现在两个方面。一方面, 从 20 世纪 30 年代起, 人们就注意到杆状病毒可以防治农林害虫。随着 1975 年第一个商品化生产的棉铃虫病毒杀虫剂的问世, 杆状病毒作为生物杀虫剂的研究迎来了高潮<sup>[1]</sup>, 世界卫生组织和国际粮农组织都推荐用杆状病毒进行害虫防治。另一方面, 杆状病毒在感染的极晚期, 具有超高表达的两个基因, 多角体蛋白基因和 P10 蛋白基因。人们利用极晚期启动子, 成功地构建了杆状病毒表达系统, 在昆虫细胞中利用杆状病毒表达系统进行了多种外源基因的表达, 使得杆状病毒表达系统成为当今最好的真核表达载体之一, 在蛋白质表达、疫苗生产等领域得到了广泛的应用, 还有望发展成为有效的基因治疗载体<sup>[2]</sup>。这两方面的应用, 实际上利用了杆状病毒的不同特性, 如在生物防治领域, ODV 的口服感染特性尤为重要, 而在载体表达方面, 则主要依赖 BV 的细胞水平感染和传播特性。因此, 对 ODV 和 BV 生物学特性的深入研究, 不仅有助于理解为什么 ODV 能特异性感染昆虫中肠上皮细胞, 介导口服感染, 而 BV 可以感染不同的组织导致系统感染, 还将有助于发展具有更好特性的生物杀虫剂和表达载体。本文将总结近年来蛋白质组学研究对 ODV 和 BV 组成成分的解析结果, 并结合杆状

病毒分子生物学研究进展, 阐述 BV 与 ODV 的共性及特性, 进而为今后的杆状病毒基础研究及其应用改良提供基础。

## 1 BV和ODV在细胞中的生活周期

在体外培养的细胞水平上, BV 和 ODV 是在杆状病毒感染细胞后的不同阶段分别形成的。目前研究最为清楚的是杆状病毒的模式种苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica multiple nucleocapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)。AcMNPV 感染宿主细胞, 首先是 BV 通过受体介导的内吞进入细胞, 在内吞体酸性环境下, BV 的囊膜与内吞体囊膜融合, 释放出核衣壳。核衣壳可以诱导胞内肌动蛋白 (actin) 聚合形成 F-actin, 核衣壳沿着 F-actin 抵达细胞核周边, 然后通过核孔入核。在细胞核内, 核衣壳解聚, 释放出基因组核酸, 病毒基因组在核内的病毒发生基质 (virogenic stroma, VS 区) 开始核酸的复制和子代核衣壳的组装。组装好的核衣壳, 将会被运转到核内膜的周边地带, 称环带区 (ring zone region, RZ 区), 在感染的早期, 核衣壳穿过核膜, 进入细胞质, 通过进一步运输抵达细胞质膜, 在细胞质膜的特定区域, 包裹上病毒编码的囊膜蛋白 GP64, 出芽产生成熟的 BV。细胞在感染的早期阶段 (24~48 h) 主要生产 BV, 而在感染的晚期 (约感染后 72 h), 在目前尚不清楚的作用机制下, 核衣壳不再 (或仅少量) 出核, 而是在环带区由微囊泡包裹形成 ODV, 最终被包埋的多角体蛋白形成的包涵体 (多角体) 中。在杆状病毒的生活周期中, 大约只有 16% 的病毒 DNA 会用于产生 BV, 而余下的主要用于产生 ODV<sup>[3]</sup>。因此, BV 是在病毒感染细胞的早期通过质膜出芽形成的, 而 ODV 是在感染的晚期在细胞核内获得囊膜而形成, 两者核衣壳成分相同, 而囊膜的形成地点和组分都不相同。

## 2 BV和ODV的共同之处

为了深入研究 BV 和 ODV 的异同, 本实验室将 BV 和 ODV 分别纯化, 然后将其囊膜和核衣壳组分分离, 再利用一系列蛋白质组学的方法鉴定其囊膜和核衣壳组分, 包括用相对定量标记质谱技术 iTRAQ 等方法定位蛋白质的位置, 并用大量的 Western Blot 验证蛋白质的定位, 获得了棉铃虫单核衣壳多角体病毒 (*Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus*, HearNPV) BV 和 ODV 的蛋白

质组分<sup>[4]</sup>。

表1显示了BV和ODV的组分分析结果,从中可以看出,BV和ODV有21个共有蛋白,其中3个为囊膜蛋白(E18、E25和vUbi),其余的为核衣壳或间质(位于囊膜和核衣壳之间)蛋白。对这些共有蛋白的深入分析发现,其中多数为杆状病毒的核心保守基因所编码(在所有杆状病毒中都存在)或为鳞翅目杆状病毒所共有。BV/ODV共有蛋白从功能上可以分为以下几种类型。(1)参与核衣壳的形成。如:VP39是主要的核衣壳蛋白,构成杆状病毒的杆状核衣壳骨架<sup>[54]</sup>;P6.9是DNA结合蛋白,通过与杆状病毒的双链环状DNA基因组结合,浓缩DNA并将其装配到杆状的核衣壳中<sup>[54]</sup>;38K是一个与多种核衣壳蛋白发生相互作用的蛋白,推测其参与核衣壳的装配中<sup>[8]</sup>;AC142、EC27和C42的缺失都会导致产生装配不完整的核衣壳<sup>[9]</sup>,且由于杆状病毒核衣壳的装配主要发生在VS区,因此推测这些蛋白应该主要集中在VS区(图1)。(2)参与核衣壳的运输。在杆状病毒生活周期中,新形成的核衣壳需要被运输到RZ区,然后通过出核形成BV,或在感染晚期被微囊泡包裹形成ODV。目前已有研究表明,6个BV和ODV共有的蛋白可能参与了这一运输过程:P12参与actin的入核<sup>[12]</sup>;P78/83和C42参与actin的聚合及核衣壳的运输<sup>[13,55-56]</sup>;VP80能与F-actin相互作用,并运输核衣壳从VS区到RZ区<sup>[14]</sup>;AC66具有actin结合结构域,并参与核衣壳的出核及ODV的包装<sup>[15]</sup>;AC75可能也参与了核衣壳的出核和ODV的包装<sup>[21]</sup>。(3)参与决定BV或ODV的形成。FP25K是一个晚期表达的蛋白,当FP25K缺失时,BV的产量增高,而ODV的形成减少,推测FP25K在从形成BV到形成ODV的转换中发挥关键作用<sup>[16]</sup>。FP25K参与许多ODV囊膜蛋白的核运输<sup>[57]</sup>,这是否是其调配BV/ODV形成转换的原因尚有待进一步研究。GP41是一个高度O-糖基化的间质蛋白<sup>[58]</sup>,研究表明GP41变异可导致BV出核受阻,BV无法产生<sup>[17]</sup>。E18和E25都是BV和ODV共有的囊膜蛋白,它们都是病毒诱导的微囊泡的组份<sup>[59-60]</sup>。E18是BV形成的必需基因<sup>[18]</sup>,E25的缺失则导致BV产量的下降和无法产生ODV<sup>[19]</sup>。(4)其他及功能未知蛋白:PEP蛋白是多角体囊膜蛋白<sup>[20]</sup>,它在BV/ODV核衣壳中的出现不知是否因为它还具有其他功能;vUbi是病毒编码的与泛素ubiquitin高度同源的蛋白,但其功能目前还未知<sup>[22]</sup>;HA44和HA100是

group II杆状病毒特有的蛋白<sup>[61]</sup>,HA100的缺失会导致口服感染能力的下降<sup>[62]</sup>;AC58/59的同源物Bm47缺失并未显著影响BV的感染,该蛋白可能是非必需蛋白<sup>[5]</sup>,但其具体功能仍不清楚。

### 3 BV和ODV的不同之处

BV与ODV最显著的不同在其囊膜上,表1中可以看出,BV和ODV的囊膜成分有显著不同。BV具有3个特有的囊膜蛋白:膜融合蛋白F、几丁质蛋白酶ChiA,以及一个功能尚不清楚的囊膜蛋白HA68(AC74)。ODV囊膜上则有11个特有蛋白,这11个蛋白中有9个蛋白已报道与口服感染相关。这些囊膜蛋白,一方面反映出BV和ODV获得囊膜的方式不同,另一方面也决定了其组织感染的特性。

糖基化质谱分析发现的所有N-糖基化蛋白,都只存在于BV相关的蛋白中(主要是囊膜蛋白),而不存在于ODV的蛋白中<sup>[4]</sup>。N-糖基化在蛋白的折叠与运输中发挥着重要的功能,推测这些BV相关蛋白可能在翻译后会通过正常的内质网及高尔基体进行N-糖基化;而ODV表面的囊膜蛋白则需要在核糖体翻译之后,通过内质网,进入核外膜及核内膜,最终通过微囊泡的形式,在环带区包裹在ODV的表面<sup>[63]</sup>。因此,推测ODV囊膜蛋白的产生形式使得它们缺少N-糖基化修饰。

### 4 BV与系统感染

BV在虫体水平上能进行系统感染,而ODV则不具备系统感染的能力。在实验室培养的细胞中,也只有BV能够有效地感染,而ODV的感染效率是BV感染效率的0.1%<sup>[64]</sup>。这其中的主要原因是BV上具有ODV上所没有的膜融合蛋白。杆状病毒BV的膜融合蛋白有两类,F蛋白和GP64。F蛋白被认为在杆状病毒的祖先中就存在,目前在杆状病毒的除 $\delta$ 杆状病毒属中都存在;GP64则仅在 $\alpha$ 杆状病毒属的group I病毒中存在,被认为是在杆状病毒进化的晚期新获得的膜融合蛋白<sup>[65-66]</sup>。相对于F蛋白,GP64具有更强大的膜融合功能,因此,推测这也是group I的 $\alpha$ 杆状病毒相对来讲具有更广的宿主特性,甚至能转染哺乳动物细胞的原因<sup>[67]</sup>。在group I病毒中,除了有GP64存在外,还存在一个退化的F like蛋白,这些F like蛋白丧失了被细胞Furin酶剪切的位点,从而不能暴露融合肽,失去了膜融合的功能。以往的研究认为,F like蛋白

表1 棉铃虫单核衣壳多角体病毒的BV和ODV的蛋白组分及其定位和功能的总结

类别	蛋白名称	保守性	功能	定位
BV及ODV共有蛋白	VP39 (AC89)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[5-6]</sup>	BV/ODV核衣壳
	P6.9(AC100)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[7]</sup>	BV/ODV核衣壳
	38K(AC98)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[8]</sup>	BV/ODV核衣壳
	HA9(AC142)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[9-10]</sup>	BV核衣壳,ODV间质
	EC27(AC144)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[9]</sup>	BV/ODV核衣壳
	C42(AC101)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[9]</sup> 及核衣壳运输 <sup>[11]</sup>	BV/ODV核衣壳
	P12(AC102)	鳞翅目保守基因	参与核衣壳运输 <sup>[12]</sup>	BV/ODV核衣壳
	P78/83(AC9)	鳞翅目保守基因	参与核衣壳运输 <sup>[13]</sup>	BV核衣壳,ODV间质
	VP80(AC104)	鳞翅目保守基因	参与核衣壳运输 <sup>[14]</sup>	BV核衣壳,ODV间质
	HA66(AC66)	核心基因	参与核衣壳运输 <sup>[15]</sup>	BV核衣壳,ODV间质
	FP25K(AC61)	鳞翅目保守基因	参与BV/ODV形成 <sup>[16]</sup>	BV核衣壳,ODV间质
	GP41(AC80)	核心基因	参与BV/ODV形成 <sup>[17]</sup>	BV/ODV间质
	E18(AC143)	核心基因	参与BV/ODV形成 <sup>[18]</sup>	BV/ODV囊膜
	E25(AC94)	鳞翅目保守基因	参与BV/ODV形成 <sup>[19]</sup>	BV/ODV囊膜
	HA44	group II保守基因	未知	BV/ODV核衣壳
	HA100	group II保守基因	未知	BV核衣壳, ODV间质
	HA51(AC58/59)	group I及大多数group II保守基因	未知	BV/ODV核衣壳
	PEP(AC131)	核心基因	多角体囊膜蛋白 <sup>[20]</sup>	BV/ODV核衣壳
	HA69(AC75)	鳞翅目保守基因	参与核衣壳运输 <sup>[21]</sup>	BV间质, ODV囊膜
	vUbi(AC35)	group I、GV、及大多数group II保守基因	类泛素蛋白, 未知 <sup>[22]</sup>	BV/ODV囊膜
	F(AC23)	鳞翅目及双翅目保守基因	参与系统感染 <sup>[23]</sup>	BV囊膜
	ChiA(AC126)	存在于大多数group I及少量GV	参与系统感染 <sup>[24]</sup>	BV囊膜
	HA68(AC74)	存在于所有group I及部分group II	参与BV的形成 <sup>[25]</sup>	BV囊膜
	FGF(AC32)	鳞翅目保守基因	参与系统感染 <sup>[26]</sup>	BV间质
	HA128(AC17)	group I及大多数group II保守基因	参与BV形成 <sup>[27]</sup>	BV间质
	P48(AC103)	核心基因	参与BV/ODV的形成 <sup>[28]</sup>	BV间质
PKIP(AC24)	group I及group II保守基因	参与BV/ODV形成 <sup>[29]</sup>	BV间质	
ME53(AC139)	鳞翅目保守基因	参与BV的形成及出芽 <sup>[30-31]</sup>	BV核衣壳	
P26(AC136)	group I及大多数group II保守基因	未知	BV核衣壳	
HA57	非保守基因	未知	BV核衣壳	
LEF6(AC28)	鳞翅目保守基因	参与晚期转录 <sup>[32]</sup>	未知	
GP37(AC64)	group I及group II及少量GV保守基因	未知	未知	
P74(AC138)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[33]</sup>	ODV囊膜	
PIF1(AC119)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[34]</sup>	ODV囊膜	
ODV特有蛋白				

表1 棉铃虫单核衣壳多角体病毒的BV和ODV的蛋白组分及其定位和功能的总结(续)

类别	蛋白名称	保守性	功能	定位
	PIF2(AC22)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[34]</sup>	ODV 囊膜
	PIF3(AC115)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[34]</sup>	ODV 囊膜
	PIF4(AC96)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[35-36]</sup>	ODV 囊膜
	PIF5(AC148)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[37-38]</sup>	ODV 囊膜
	PIF6(AC68)	核心基因	口服感染必需基因 <sup>[39]</sup>	ODV 囊膜
	ODV-E66(AC46)	group I、及大多数group II和GV保守基因	参与口服感染 <sup>[40]</sup>	ODV 囊膜
	VP91(AC83)	核心基因	参与核衣壳形成及口服感染 <sup>[41]</sup>	ODV 囊膜
	HA72(AC78)	核心基因	参与BV/ODV形成 <sup>[42-43]</sup> 及口服感染 <sup>[44]</sup>	ODV 囊膜
	SOD(AC31)	大多数鳞翅目保守基因	超氧化物歧化酶,未知	ODV 囊膜
	VP1054(AC54)	核心基因	参与核衣壳形成 <sup>[45]</sup>	ODV 核衣壳
	EC43(AC109)	核心基因	参与BV/ODV形成 <sup>[46-48]</sup>	ODV 间质
	VLF-1(AC77)	核心基因	参与晚期转录及DNA包装 <sup>[49-50]</sup>	ODV 间质
	P33(AC92)	核心基因	参与ODV的包装和BV的出核 <sup>[51-52]</sup>	ODV 间质
	HA74(AC81)	核心基因	参与ODV的包装和BV的出核 <sup>[53]</sup>	ODV 间质
	AC51	group I及group II保守基因	未知	ODV 间质
	AC26	group I及大多数group II保守基因	未知	未知
	HA52(AC60)	group I、group II及大多数GV保守基因	未知	ODV 核衣壳
	HA45	非保守基因	未知	ODV 核衣壳
	HOAR	非保守基因	未知	未知

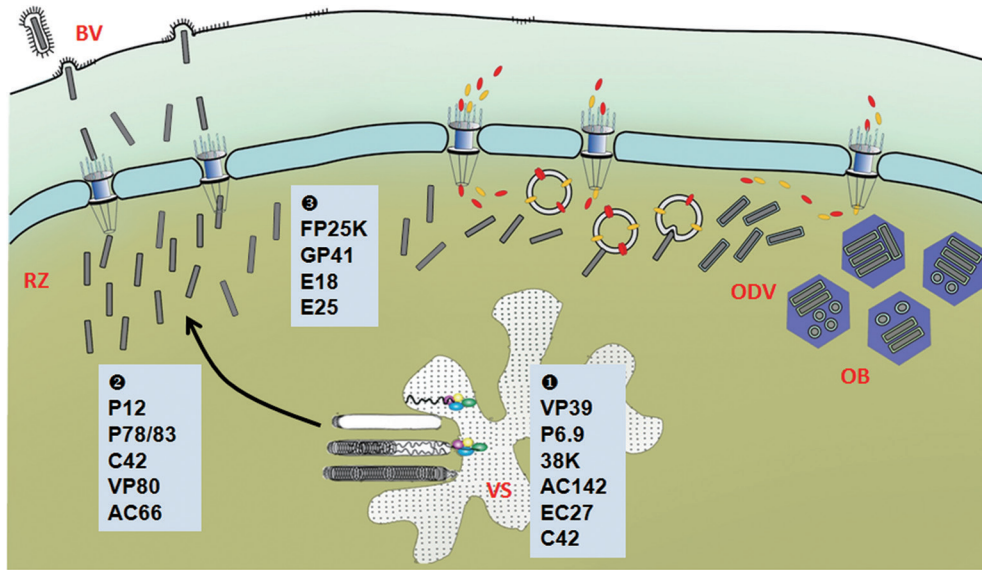


图1 BV和ODV的共有蛋白在其形成过程中的可能作用模式图

可能是进化上的一个遗留物,不具有任何功能,而本实验室新近的研究表明, F like 蛋白虽然丧失了膜融合的功能,但仍在病毒入侵过程中发挥重要作用,也许还起着结合蛋白的功能<sup>[68]</sup>。无论是 GP64 还是 F 蛋白,它们单独表达都能介导细胞的融合<sup>[65, 69-70]</sup>。融合后的构像分析显示 GP64 是属于 Glass III 的膜融合蛋白<sup>[71]</sup>, F 蛋白和 GP64 似乎利用了不同的细胞受体<sup>[72]</sup>,但这些受体目前还没有被发现。

除了膜融合蛋白外,病毒编码的成纤维生长因子(viral fibroblast growth factor, vFGF)在系统感染中也发挥着重要作用。在感染中肠上皮细胞之后,病毒需要穿透昆虫中肠的基底层(basal lamina)屏障,vFGF在这一过程中发挥了重要作用:杆状病毒感染中肠后,表达出的vFGF通过与FGFs受体结合,激活宿主的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases)和凋亡蛋白酶(caspases),进而启动细胞凋亡,从而导致中肠基底层的降解和重排。基底层的降解会导致气管细胞被出芽型的病毒感染,病毒通过气管系统,在虫体中迅速扩散<sup>[26]</sup>。

目前对 BV 形成的分子机制了解得还不充分,有 4 个基因被报道与 BV 的产量相关:ME53 缺失会导致 BV 产量下降 99.99%<sup>[30]</sup>; Exon 0 或 AC66 的缺失均能造成 BV 产量下降 99%<sup>[15, 73]</sup>,其中 Exon 0 可以与  $\beta$ -tubulin 相互作用,而后者在 BV 的出芽中发挥着作用<sup>[74]</sup>; GP64 的缺失会导致 BV 产量下降 98%<sup>[75]</sup>。

#### 4 ODV与口服感染

与 BV 介导系统感染不同,ODV 特异性地感染中肠的上皮细胞,而无法感染昆虫的其他组织,这是由 ODV 的囊膜组成所决定的。前面提到,HearNPV 的蛋白质组学研究表明,在 ODV 的表面具有 11 个 ODV 的特有蛋白,这些蛋白中有 9 个蛋白是与口服感染相关的,其中 7 个被称为口服感染因子(*per os infectivity factors*, PIFs)。PIF 的定义为,这些蛋白是口服感染的必需蛋白,但对 BV 的感染不需要,当基因组中缺失单个 *pif* 的时候, BV 的生长和对虫体的系统感染不受影响,但口服感染的功能完全丧失。P74 是最早发现的 PIF,被称为 PIF0<sup>[33, 76]</sup>,随后发现了 PIF1~PIF6<sup>[34-35, 37, 39, 77-78]</sup>。这些蛋白在杆状病毒中完全保守,同时还存在于裸病毒(nudivirus)、唾液腺肥大病毒(hytrosavirus)、多分 DNA 病毒(polydnavirus),甚至在感染对虾的对虾白斑病综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)中发现,这些病毒都是感染无脊椎动物的大的 DNA 病毒,提示 PIF 介导的口服感染机制是一个古老的机制<sup>[79]</sup>。

目前已知的病毒,一般都在中性或酸性的条件下发生膜融合和入侵,而鳞翅目昆虫的中肠是充满消化酶的碱性环境,因此,杆状病毒中肠感染的机制应该比较特殊的。PIFs 的作用机制尚不清楚,但有研究表明,PIFs 中的 PIF1、PIF2、PIF3 会形成一个核心蛋白质复合体, P74、PIF4 以及 VP91 等会

与该蛋白质复合物有一定的结合<sup>[79-80]</sup>。荧光追踪显示 PIF1、PIF2 以及 P74 参与了病毒与中肠微绒毛的最初结合及融合, 而 PIF3 则没有在这一步发挥作用<sup>[81]</sup>。目前, 尚没有 PIF 复合体的具体结构及在中肠环境下如何激活的研究报道, AcMNPV 的 P74 在中肠中经历了两次剪切过程<sup>[82-83]</sup>, 推测整个 PIF 复合体的剪切激活将是一个复杂而精细的调控过程。

PIFs 与中肠受体的相互作用在很大程度上决定了杆状病毒感染昆虫的宿主范围。目前尚没有任何关于中肠受体的报道, 本实验室尝试利用不同种杆状病毒的 PIFs 来分别替代 HearNPV 的 P74、PIF1、PIF2、PIF3 的研究显示, 杆状病毒的 PIFs 有很强的宿主特异性, 单独替换 PIF 都会使重组病毒丧失口服感染能力(待发表资料)。如果今后希望通过替换 PIFs 来获得具有新的宿主范围的病毒, 需要考虑将全套的 PIFs 整体替换。

ODV 的形成过程中, 一个关键步骤是核衣壳在 RZ 区被微囊泡包裹, 形成有囊膜的 ODV。ODV 的囊膜蛋白一般具有核内膜定位信号(inner nucleus membrane sorting motif, INM-SM), 这个信号一般由蛋白质 N-端长约 18 个氨基酸的疏水区和紧接其后的富含带正电氨基酸(4~8 个)的肽段所组成, 能将表达出的蛋白定位到核内膜, 并在病毒感染的情况下定位到环带区及最终 ODV 的囊膜表面<sup>[63]</sup>。在这一过程中, FP25K、E26 以及宿主的 importin- $\alpha$ -16 发挥了重要作用<sup>[57, 84]</sup>。2014 年, Wei 等<sup>[85]</sup>研究发现, 杆状病毒中还有一些蛋白在其 C-端具有非典型的 INM-SM, 它们也可以定位到核内膜上。目前知道病毒编码的 AC93<sup>[86]</sup>、AC76<sup>[87]</sup> 和 P48<sup>[28]</sup> 在核内微囊泡的形成过程中发挥了重要作用。如果编码这些蛋白的基因缺失, 核内微囊泡将不能形成, 核衣壳将不能包装成 ODV, 有时也会影响核衣壳出核形成 BV<sup>[28, 86-87]</sup>。

## 6 BV与ODV的进化

在同一个病毒的生活周期中产生两种不同类型的病毒粒子是杆状病毒在进化上所特有的(不排除其他的昆虫病毒也有类似途径), 那么这种二项性究竟是如何形成的? 最早的祖先病毒是否只有一种形式, 如果只有一种形式, 究竟是 BV 还是 ODV?

有两方面的数据偏向 ODV 是祖先病毒: 首先, PIFs 的同源蛋白在许多非杆状病毒的无脊椎动物病毒中发现, 因此, 它们可能存在于杆状病毒的祖先

病毒<sup>[88]</sup>; 其次, 在现有的杆状病毒中, 感染双翅目的  $\delta$  杆状病毒和感染膜翅目的  $\gamma$  杆状病毒在进化上要早于感染鳞翅目的  $\alpha$  和  $\beta$  杆状病毒<sup>[89-91]</sup>, 而目前的数据显示  $\delta$  和  $\gamma$  杆状病毒仅能感染昆虫的中肠, 不能形成系统感染<sup>[54]</sup>。因此可以推测, 最早的杆状病毒是一种仅能感染中肠的病毒, 后来才进化出了可以系统感染的 BV。

如果从 ODV 到 BV 的进化假说成立, 从细胞水平的感染周期可以推测, 最早的杆状病毒主要是在核内形成和包埋的, 后来由于某些分子机理的改变, 例如增加了 F 蛋白, 使得核衣壳有了出芽的特性, 而一些与 BV 出芽相关的蛋白的基因, 如 F 蛋白、FGF 蛋白、FP25K 蛋白等, 都应该是在进化稍晚的阶段所获得的, 这些推测尚有待证明。

## 7 总结和展望

BV 和 ODV 的结构解析, 对深入研究杆状病毒感染分子机理和发展杆状病毒应用技术具有重要的科学意义及指导价值。

在分子机理方面, 首先, 所发现的 BV 和 ODV 共性蛋白为进一步剖析杆状病毒的包装及运输机理奠定了基础。如前所述, 可以初步将这些共性蛋白定位在杆状病毒复制的不同阶段, 随着其结构与功能研究的深入, 以及它们之间及其与宿主蛋白相互作用研究的深入, 将揭示杆状病毒包装与运输的分子机理, 其中杆状病毒核衣壳的形成机制、DNA 的包装机制, 以及杆状病毒在核内与细胞骨架系统的相互作用的运输机制等都可能带来全新的认识。

其次, BV 和 ODV 形成的调控机制一直是杆状病毒研究的未解之谜, FP25K 蛋白对 BV/ODV 形成的调控, 以及它在 ODV 囊膜蛋白核运输过程中的作用, 对下一步研究具有重要的参考价值; 杆状病毒的前期研究为发现蛋白在核内膜上的定位的普遍机制发挥了重要作用, 预期今后核内微囊泡的形成机制及核衣壳出核机制的解析将成为研究的重点, 而这些研究有可能揭示病毒对真核细胞核膜的调控机制。

ODV 口服感染的分子机制是最近杆状病毒的研究热点, PIFs 及 PIF 复合体的发现为口服感染机制的研究奠定了基础, 今后的研究重点将是受体的发现以及 PIF 复合物作用机制的研究。同样, 杆状病毒 BV 受体的发现也是今后的研究重点。

在应用研究方面, 口服感染和系统感染的关键蛋白的揭示为今后杆状病毒的改良奠定了基础。杆

状病毒表达载体具有容量大和可塑性强等优点。前期的研究发现, 对于 BV 在细胞水平上的感染, 很多 ODV 相关蛋白是不需要的, 因此, 人们可以通过去除基因组上与细胞水平感染无关的基因 (如 PIFs), 给外源基因腾出更多的空间, 也可以使基因组更小, 复制和表达效率更高, 这为杆状病毒载体系统的改良提供了新的研究方向。在生物防治方面, 口服感染的复杂性使我们意识到要想人为地改变杆状病毒的宿主范围, 仅替换单个的 PIF 将很难成功, 而需要发展一种技术, 使多个 PIF 的替换成为可能; 以前曾经有人提出用大量体外培养的方法生产病毒杀虫剂, 现在的知识使我们意识到, 如果在细胞上长期传代, 有可能丢失 ODV 中肠感染的特异因子, 因此, 虫体大规模生产仍将是病毒杀虫剂今后生产的主流方式。

#### [参 考 文 献]

- [1] Inceoglu AB, Kamita SG, Hammock BD. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv Virus Res*, 2006, 68: 323-60
- [2] Condreay JP, Kost TA. Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(10): 1126-31
- [3] Rosinski M, Reid S, Nielsen LK. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(4): 476-80
- [4] Hou D, Zhang L, Deng F, et al. Comparative proteomics reveal fundamental structural and functional differences between the two progeny phenotypes of a baculovirus. *J Virol*, 2013, 87(2): 829-39
- [5] Ono C, Kamagata T, Taka H, et al. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Res*, 2012, 165(2): 197-206
- [6] Pearson MN, Russell RL, Rohrmann GF, et al. p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology*, 1988, 167(2): 407-13
- [7] Wang M, Tuladhar E, Shen S, et al. Specificity of baculovirus P6.9 basic DNA-binding proteins and critical role of the C terminus in virion formation. *J Virol*, 2010, 84(17): 8821-8
- [8] Wu W, Lin T, Pan L, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid assembly is interrupted upon deletion of the 38K gene. *J Virol*, 2006, 80(23): 11475-85
- [9] Vanarsdall AL, Pearson MN, Rohrmann GF. Characterization of baculovirus constructs lacking either the Ac 101, Ac 142, or the Ac 144 open reading frame. *Virology*, 2007, 367(1): 187-95
- [10] Yang ZN, Xu HJ, Park EY, et al. Characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus with a deletion of bm118. *Virus Res*, 2008, 135(2): 220-9
- [11] Wang Y, Wang Q, Liang C, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid protein BV/ODV-C42 mediates the nuclear entry of P78/83. *J Virol*, 2008, 82(9): 4554-61
- [12] Gandhi KM, Ohkawa T, Welch MD, et al. Nuclear localization of actin requires AC102 in *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus-infected cells. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 8): 1795-803
- [13] Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol*, 2010, 190(2): 187-95
- [14] Marek M, Merten OW, Galibert L, et al. Baculovirus VP80 protein and the F-actin cytoskeleton interact and connect the viral replication factory with the nuclear periphery. *J Virol*, 2011, 85(11): 5350-62
- [15] Ke J, Wang J, Deng R, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac66 is required for the efficient egress of nucleocapsids from the nucleus, general synthesis of preoccluded virions and occlusion body formation. *Virology*, 2008, 374(2): 421-31
- [16] Wu D, Deng F, Sun X, et al. Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 9): 2439-44
- [17] Olszewski J, Miller LK. A role for baculovirus GP41 in budded virus production. *Virology*, 1997, 233(2): 292-301
- [18] McCarthy CB, Theilmann DA. AcMNPV *ac143* (*odv-e18*) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology*, 2008, 375(1): 277-91
- [19] Chen L, Hu X, Xiang X, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *odv-e25* (Ac94) is required for budded virus infectivity and occlusion-derived virus formation. *Arch Virol*, 2012, 157(4): 617-25
- [20] Gombart AF, Pearson MN, Rohrmann GF, et al. A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology*, 1989, 169(1): 182-93
- [21] Shen H, Chen K. BM61 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: its involvement in the egress of nucleocapsids from the nucleus. *FEBS Lett*, 2012, 586(7): 990-5
- [22] Reilly LM, Guarino LA. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication. *Virology*, 1996, 218(1): 243-7
- [23] Pearson MN, Russell RL, Rohrmann GF. Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology*, 2001, 291(1): 22-31
- [24] Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, et al. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 1997, 238(2): 243-53
- [25] Guo ZJ, Qiu LH, An SH, et al. Open reading frame 60 of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus plays a role in budded virus production. *Virus Res*, 2010, 151(2): 185-91
- [26] Means JC, Passarelli AL. Viral fibroblast growth factor,



- matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21): 9825-30
- [27] Nie Y, Theilmann DA. Deletion of AcMNPV AC16 and AC17 results in delayed viral gene expression in budded virus infected cells but not transfected cells. *Virology*, 2010, 404(2): 168-79
- [28] Yuan M, Wu W, Liu C, et al. A highly conserved baculovirus gene *p48 (ac103)* is essential for BV production and ODV envelopment. *Virology*, 2008, 379(1): 87-96
- [29] McLachlin JR, Yang S, Miller LK. A baculovirus mutant defective in PKIP, a protein which interacts with a virus-encoded protein kinase. *Virology*, 1998, 246(2): 379-91
- [30] de Jong J, Arif BM, Theilmann DA, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *me53 (ac140)* is a nonessential gene required for efficient budded-virus production. *J Virol*, 2009, 83(15): 7440-8
- [31] de Jong J, Theilmann DA, Arif BM, et al. Immediate-early protein ME53 forms foci and colocalizes with GP64 and the major capsid protein VP39 at the cell membranes of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus-infected cells. *J Virol*, 2011, 85(19): 9696-707
- [32] Lin G, Blissard GW. 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 Virol*, 2002, 76(11): 5503-14
- [33] Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *J Virol*, 2004, 78(13): 6786-91
- [34] Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R, et al. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *J Virol*, 2005, 79(24): 15258-64
- [35] Fang M, Nie Y, Harris S, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a per os infectivity factor (PIF-4). *J Virol*, 2009, 83(23): 12569-78
- [36] Huang H, Wang M, Deng F, et al. ORF85 of HearNPV encodes the per os infectivity factor 4 (PIF4) and is essential for the formation of the PIF complex. *Virology*, 2012, 427(2): 217-23
- [37] Harrison RL, Sparks WO, Bonning BC. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 5): 1173-82
- [38] Sparks WO, Harrison RL, Bonning BC. *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. *Virology*, 2011, 409(1): 69-76
- [39] Nie Y, Fang M, Erlandson MA, et al. Analysis of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair *lef3* and *ac68* reveals that AC68 is a per os infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication. *J Virol*, 2012, 86(7): 3985-94
- [40] Xiang X, Chen L, Hu X, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *odv-e66* is an essential gene required for oral infectivity. *Virus Res*, 2011, 158(1-2): 72-8
- [41] Zhu S, Wang W, Wang Y, et al. The baculovirus core gene *ac83* is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2013, 87(19): 10573-86
- [42] Tao XY, Choi JY, Kim WJ, et al. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF78 is essential for budded virus production and general occlusion body formation. *J Virol*, 2013, 87(15): 8441-50
- [43] Huang H, Wang M, Deng F, et al. The *ha72* core gene of baculovirus is essential for budded virus production and occlusion-derived virus embedding, and amino acid K22 plays an important role in its function. *J Virol*, 2014, 88(1): 705-9
- [44] Li SN, Wang JY, Yuan MJ, et al. Disruption of the baculovirus core gene *ac78* results in decreased production of multiple nucleocapsid-enveloped occlusion-derived virions and the failure of primary infection *in vivo*. *Virus Res*, 2014, 191: 70-82
- [45] Olszewski J, Miller LK. Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. *J Virol*, 1997, 71(7): 5040-50
- [46] Alfonso V, Maroniche GA, Reza SR, et al. AcMNPV core gene *ac109* is required for budded virion transport to the nucleus and for occlusion of viral progeny. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46146
- [47] Fang M, Nie Y, Theilmann DA. Deletion of the AcMNPV core gene *ac109* results in budded virions that are non-infectious. *Virology*, 2009, 389(1-2): 66-74
- [48] Lehiy CJ, Wu W, Berretta MF, et al. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus open reading frame 109 affects infectious budded virus production and nucleocapsid envelopment in the nucleus of cells. *Virology*, 2013, 435(2): 442-52
- [49] Vanarsdall AL, Okano K, Rohrmann GF. Characterization of a baculovirus with a deletion of *vlf-1*. *Virology*, 2004, 326(1): 191-201
- [50] Vanarsdall AL, Okano K, Rohrmann GF. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *J Virol*, 2006, 80(4): 1724-33
- [51] Wu W, Passarelli AL. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac92 (ORF92, P33) is required for budded virus production and multiply enveloped occlusion-derived virus formation. *J Virol*, 2010, 84(23): 12351-61
- [52] Nie Y, Fang M, Theilmann DA. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac92 (p33)* is

- required for efficient budded virus production. *Virology*, 2011, 409(1): 38-45
- [53] Ge JQ, Yang ZN, Tang XD, et al. Characterization of a nucleopolyhedrovirus with a deletion of the baculovirus core gene *Bm67*. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 3): 766-74
- [54] Williams GV, Faulkner P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection [M]//Miller, LK. *The Baculoviruses*. New York: Plenum, 1997: 61-107
- [55] Goley ED, Ohkawa T, Mancuso J, et al. Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science*, 2006, 314(5798): 464-7
- [56] Li K, Wang Y, Bai H, et al. The putative pocket protein binding site of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus BV/ODV-C42 is required for virus-induced nuclear actin polymerization. *J Virol*, 2010, 84(15): 7857-68
- [57] Braunagel SC, Cox V, Summers MD. Baculovirus data suggest a common but multifaceted pathway for sorting proteins to the inner nuclear membrane. *J Virol*, 2009, 83(3): 1280-8
- [58] Whitford M, Faulkner P. A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Virol*, 1992, 66(6): 3324-9
- [59] Braunagel SC, He H, Ramamurthy P, et al. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology*, 1996, 222(1): 100-14
- [60] Russell RL, Rohrmann GF. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology*, 1993, 195(2): 532-40
- [61] Deng F, Wang R, Fang M, et al. Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. *J Virol*, 2007, 81(17): 9377-85
- [62] Luo S, Zhang Y, Xu X, et al. *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus-associated protein, HA100, affects oral infectivity *in vivo* but not virus replication *in vitro*. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 6): 1324-31
- [63] Braunagel SC, Summers MD. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(10): 1084-95
- [64] Volkman LE, Summers MD, Hsieh CH. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization comparative infectivity, and *in vitro* growth studies. *J Virol*, 1976, 19(3): 820-32
- [65] Pearson MN, Groten C, Rohrmann GF. Identification of the *lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *J Virol*, 2000, 74(13): 6126-31
- [66] Jiang Y, Deng F, Rayner S, et al. Evidence of a major role of GP64 in group I  $\alpha$  baculovirus evolution. *Virus Res*, 2009, 142(1-2): 85-91
- [67] Liang C, Song J, Chen X. The GP64 protein of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus rescues *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus transduction in mammalian cells. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 6): 1629-35
- [68] Wang M, Wang J, Yin F, et al. Unraveling the entry mechanism of baculoviruses and its evolutionary implications. *J Virol*, 2014, 88(4): 2301-11
- [69] Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol*, 1992, 66(11): 6829-35
- [70] WF IJ, Westenberg M, Goldbach RW, et al. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. *Virology*, 2000, 275(1): 30-41
- [71] Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that baculovirus GP64 superfamily proteins are class III penetrenes. *Virol J*, 2008, 5: 28
- [72] Westenberg M, Uijtdewilligen P, Vlak JM. Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 12): 3302-6
- [73] Dai X, Stewart TM, Pathakamuri JA, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *exon0* (*orf141*), which encodes a RING finger protein, is required for efficient production of budded virus. *J Virol*, 2004, 78(18): 9633-44
- [74] Fang M, Nie Y, Theilmann DA. AcMNPV EXON0 (AC141) which is required for the efficient egress of budded virus nucleocapsids interacts with  $\beta$ -tubulin. *Virology*, 2009, 385(2): 496-504
- [75] Oomens AG, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 1999, 254(2): 297-314
- [76] Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 1989, 173(2): 759-63
- [77] Kikhno I, Gutierrez S, Croizier L, et al. Characterization of *pif*, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 12): 3013-22
- [78] Pijlman GP, Pruijssers AJ, Vlak JM. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 8): 2041-9
- [79] Peng K, van Oers MM, Hu Z, et al. Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *J Virol*, 2010, 84(18): 9497-504
- [80] Peng K, van Lent JW, Boeren S, et al. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. *J Virol*, 2012, 86(9): 4981-8
- [81] Mu J, van Lent JW, Smagge G, et al. Live imaging of baculovirus infection of midgut epithelium cells: a functional assay of per os infectivity factors. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 11): 2531-9
- [82] Peng K, van Lent JW, Vlak JM, et al. In situ cleavage of baculovirus occlusion-derived virus receptor binding protein P74 in the peroral infectivity complex. *J Virol*, 2011, 85(20): 10710-8
- [83] Slack JM, Lawrence SD. Evidence for proteolytic

- cleavage of the baculovirus occlusion-derived virion envelope protein P74. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 6): 1637-43
- [84] Saksena S, Summers MD, Burks JK, et al. Importin- $\alpha$ -16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(6): 500-8
- [85] Wei D, Wang Y, Zhang X, et al. *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus *Ac76*: a dimeric type II integral membrane protein that contains an inner nuclear membrane-sorting motif. *J Virol*, 2014, 88(2): 1090-103
- [86] Yuan M, Huang Z, Wei D, et al. Identification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *ac93* as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids. *J Virol*, 2011, 85(22): 11664-74
- [87] Hu Z, Yuan M, Wu W, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac76* is involved in intranuclear microvesicle formation. *J Virol*, 2010, 84(15): 7437-47
- [88] Burke GR, Thomas SA, Eum JH, et al. Mutualistic polydnviruses share essential replication gene functions with pathogenic ancestors. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5): e1003348
- [89] Moser B, Becnel J, White S, et al. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 2): 283-97
- [90] Lauzon HA, Lucarotti CJ, Krell PJ, et al. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. *J Virol*, 2004, 78(13): 7023-35
- [91] Theze J, Bezier A, Periquet G, et al. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(38): 15931-5