

华 / 中 / 师 / 范 / 大 / 学 / 出 / 版 / 基 / 金 / 丛 / 书

杆状病毒 分子生物学

GANZHUANG BINGDU FENZI
SHENGWUXUE

彭建新 编著

华中师范大学出版社



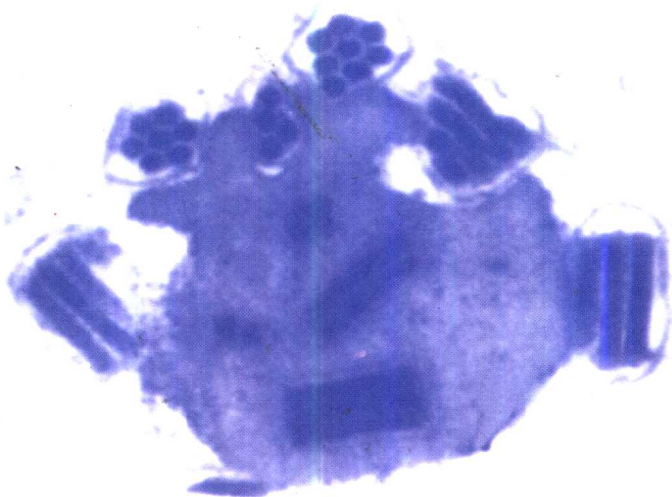
华 / 中 / 师 / 范 / 大 / 学 / 出 / 版 / 基 / 金 / 丛 / 书

杆状病毒 分子生物学

GANZHUANG BINGDU FENZI
SHENGWUXUE

彭建新 编著

华中师范大学出版社



(鄂)新登字 11 号

图书在版编目(CIP)数据

杆状病毒分子生物学/彭建新编著.

—武汉:华中师范大学出版社,2000.10

ISBN 7-5622-2281-9/Q·29

I. 杆... II. 彭... III. 杆状病毒—分子生物学
IV. Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 48234 号

杆状病毒分子生物学

© 彭建新 编著

华中师范大学出版社出版发行

(武昌桂子山 邮编:430079)

武汉正佳彩色输出中心激光照排

新华书店湖北发行所经销

武汉工业大学印刷厂印刷

责任编辑:严定友

封面设计:甘 英

责任校对:张 钟

督 印:朱 虹

开本:850 mm×1 168 mm 1/32

印张:13.5 字数:336 千字

版次:2000 年 10 月第 1 版

2000 年 10 月第 1 次印刷

印数:1-1000

定价:24.00 元

本书如有印装质量问题,可向承印厂调换。

前 言

杆状病毒是节肢动物的病源病毒,是所有已知病毒种类中对人类最为有益的病毒,其不仅对人的健康无害,而且在控制农林害虫的种群密度方面起着重要的作用。所以,在研究杆状病毒的漫长历史中,人类不断探索,希望破译其生命之谜,扬其长避其短,以造福于人类。由于现代生物学技术,特别是分子生物学技术的发展,使解读杆状病毒生命之谜在分子水平这一层次展开。近10多年来,杆状病毒分子生物学研究进入极其活跃、繁荣时期:几种杆状病毒基因组DNA全序列的测定;几十个病毒编码基因的鉴定;病毒基因表达调控机制的阐述;病毒DNA复制顺式作用元件的鉴别等取得了巨大成果,极大地丰富了分子生物学的理论宝库。特别是杆状病毒已发展成为高效外源基因表达载体系统,此系统已成为表达各种类型基因的最普遍的工具,它已广泛应用于农业、医学和生物学各个领域。杆状病毒宿主域的分子机制研究伴同病毒基因操作技术的发展,构建广谱性工程杆状病毒杀虫剂问鼎有望,杆状病毒生命之谜底略见端倪。

在我国,杆状病毒研究与应用也历时数十载,研究在不同层次、不同方向展开,杆状病毒分子生物学研究也取得了一定成就,不少杆状病毒分子生物学文献见诸各类学术刊物。但系统地介绍杆状病毒分子生物学的著作却极为鲜见。作者萌发撰写系统的且较为通俗的杆状病毒分子生物学读本意念,虽几经周折,终完成此稿,并有幸在人类步入新世纪时付印。

此书较系统介绍了杆状病毒分子生物学各个方面,全书分为九章,分别是杆状病毒及其生活周期;杆状病毒基因组结构;杆状

病毒基因组的基因组织;杆状病毒基因表达与调控;杆状病毒DNA复制;杆状病毒结构蛋白;杆状病毒宿主域的分子基础;杆状病毒表达载体和杆状病毒杀虫剂的遗传改造等。本书具有基础性、系统性、先进性和通俗性特点。作者力图融入最新研究资料,追踪前沿,勾勒杆状病毒分子生物学完整轮廓。希望此书于专家是有价值参考资料,对初学者则是学习杆状病毒分子生物学的向导。

作者虽多年从事杆状病毒研究工作,然而由于才疏学浅,涉足这一精深领域颇感力不从心,书中谬误之处在所难免,望同行及读者不吝斧正。

本书在撰写过程中,受到洪华殊教授热情关心、帮助和督促,谨表示由衷的谢忱。施先宗博士为本书提供了大量有价值资料并参与个别章节的撰写,余泽华教授审阅了书稿并提出宝贵意见,谨致以诚挚的谢意。作者感谢陈曲侯教授多年来的培养教育与学术指导。

同时,还谨以此书献给尊敬的李宗池先生,感谢他给予作者以“杆状病毒是什么”的启蒙,并引导作者进入杆状病毒研究的殿堂。

编著者

1999年12月

目 录

1 杆状病毒及其生活周期	(1)
1.1 杆状病毒的分类	(1)
1.2 杆状病毒的结构	(3)
1.3 杆状病毒的感染周期	(6)
2 杆状病毒基因组结构	(32)
2.1 杆状病毒基因组 DNA 的理化性质	(32)
2.2 杆状病毒基因组的物理图谱	(35)
2.3 杆状病毒 DNA 的同源区	(39)
2.4 杆状病毒基因组间的同源性	(45)
2.5 杆状病毒基因组的异质性	(48)
2.6 杆状病毒基因组中的宿主 DNA 成分	(49)
3 杆状病毒基因组的基因组织	(61)
3.1 基因组织的测定	(62)
3.2 杆状病毒基因组基因组织的比较	(67)
3.3 杆状病毒基因及性质	(82)
3.4 杆状病毒中已鉴定的基因	(84)
4 杆状病毒基因的表达与调控	(158)
4.1 杆状病毒基因的时序性表达	(159)
4.2 杆状病毒的转录单位	(162)
4.3 杆状病毒基因的表达调节	(173)
4.4 杆状病毒基因表达的级联调节模型	(213)
5 杆状病毒 DNA 的复制	(223)
5.1 DNA 复制原点	(223)
5.2 与病毒 DNA 复制有关的基因	(233)

5.3	宿主因子	(243)
5.4	杆状病毒 DNA 的复制方式	(243)
5.5	杆状病毒 DNA 复制起始模型	(245)
6	杆状病毒结构蛋白	(254)
6.1	病毒结构蛋白的定位	(254)
6.2	多角体结构蛋白	(255)
6.3	核衣壳结构蛋白	(274)
6.4	病毒囊膜结构蛋白	(280)
6.5	PDV 其他结构蛋白	(290)
7	杆状病毒宿主域的分子基础	(301)
7.1	病毒进入细胞的限制	(302)
7.2	杆状病毒在半受纳与非受纳细胞中的复制	(303)
7.3	涉及杆状病毒宿主域的病毒基因	(311)
7.4	杆状病毒在脊椎动物细胞中的行为	(315)
8	杆状病毒表达载体	(324)
8.1	杆状病毒表达载体系统的特征	(324)
8.2	受体系统——昆虫细胞、虫体和蛹	(327)
8.3	BEV 构建原理及实验方法	(330)
8.4	BEV 表达外源基因	(348)
8.5	影响外源基因在 BEV 系统表达的因素	(388)
8.6	BEV 发展方向与发展前景	(391)
9	杆状病毒杀虫剂的遗传改造	(399)
9.1	杆状病毒杀虫剂	(399)
9.2	工程杆状病毒杀虫剂研究战略与设计原理	(401)
9.3	插入外源基因的工程杆状病毒的构建	(402)
9.4	基因缺失的重组杆状病毒	(410)
9.5	杆状病毒宿主域的遗传改造	(411)
9.6	重组杆状病毒的安全性	(416)
9.7	重组杆状病毒的田间试验	(420)

1 杆状病毒及其生活周期

杆状病毒 (baculovirus) 是一类在自然界中仅感染节肢动物的病毒。目前已记述的杆状病毒除少量从蛛形纲和甲壳纲分离外, 绝大多数都来自于昆虫纲, 而且主要集中在鳞翅目昆虫。由于各种分子生物学技术和方法的应用, 杆状病毒在分子水平的研究取得了迅猛发展, 其研究成果令人瞩目。本章将主要介绍杆状病毒的分类、病毒的结构及杆状病毒的生活周期并力图从分子水平讨论相关问题。

1.1 杆状病毒的分类

杆状病毒是节肢动物特异的 DNA 病毒 (arthropoda-specific DNA virus)。杆状病毒隶属于杆状病毒科 (Baculoviridae), 根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 1995 年第 6 次报告, 杆状病毒科包括两个属, 即核型多角体病毒属 (Nucleopolyhedrovirus, NPV) 和颗粒体病毒属 (Granulovirus, GV)。过去划归杆状病毒科的非包埋型杆状病毒 (nonoccluded virus) 已从杆状病毒科中剔出, 这类非包埋型杆状病毒的分类地位有待更多研究资料积累后才能确定 (Volkman et al, 1995)。

杆状病毒具有共同的特征, 病毒基因组为双链环状 DNA 分子, DNA 以超螺旋形式压缩包装在杆状衣壳内, 这种杆状粒子称之为核衣壳 (nucleocapsid), 核衣壳外被脂类囊膜, 被有囊膜的核衣壳即为病毒粒子, 病毒粒子封闭在由蛋白质形成的包涵体晶体之中。

杆状病毒的宿主范围仅限于节肢动物，主要集中在昆虫纲鳞翅目，在双翅目、膜翅目昆虫中也有报道。目前已记录的杆状病毒已达 600 余种 (Martignoni and Iwai, 1986)。

杆状病毒在宿主细胞核中复制增殖。

杆状病毒科由核多角体病毒属和颗粒体病毒属组成，两者的差异主要在于前者 (NPV) 产生大的多角形的称之为多角体 (polyhedra) 结构；后者产生圆形或卵圆形叫作颗粒体 (granules) 结构。NPV 的多角体包埋多个病毒粒子，而 GV 颗粒体中仅含单个病毒粒子，偶而含有两个病毒粒子。NPV 多角体直径在 $0.5\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 之间，而颗粒体则大小约为 $(0.16\mu\text{m}\sim 0.30\mu\text{m}) \times (0.30\mu\text{m}\sim 0.50\mu\text{m})$ 。核型多角体病毒属的代表种为苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* NPV, AcNPV)；颗粒体病毒属的代表种为苹果小蠹蛾颗粒体病毒 (*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV)。历史上，核型多角体病毒分为二个亚属，多衣壳型核型多角体病毒 (multicapsid nuclear polyhedrosis virus, MNPV) 或多粒包埋型核型多角体病毒，代表种为苜蓿银纹夜蛾多衣壳型核型多角体病毒 (AcMNPV)，另一亚属为单衣壳型核型多角体病毒 (single-capsid nuclear polyhedrosis virus, SNPV)，或单粒包埋型核型多角体病毒，代表种为家蚕 (*Bombyx mori*) 单衣壳型核型多角体病毒 (BmSNPV)。多衣壳型核型多角体病毒指每个病毒粒子由多个核衣壳组成，即多个核衣壳共一个囊膜，单衣壳型核型多角体病毒一个病毒粒子由一个核衣壳构成。颗粒体病毒的病毒粒子无多寡核衣壳的形式，病毒粒子均由单个核衣壳构成。

杆状病毒的命名以分离毒株的宿主种名定名，如棉铃虫 NPV、斜纹夜蛾 NPV、菜青虫 GV，这些病毒分别从棉铃虫、斜纹夜蛾、菜青虫中分离。由于存在交叉感染等现象，这种命名方法并不严谨，但目前无新的更科学的命名规则，这种命名方法

仍在沿用。

1.2 杆状病毒的结构

杆状病毒的病毒粒子呈杆状，病毒粒子被包涵体封闭。对于 NPV，多个病毒粒子包埋于多角体蛋白（polyhedrin）形成的晶体之中；而 GV 病毒粒子则包埋在由蒴状体蛋白（granulin）构成的晶体之中，颗粒体中仅包埋单个病毒粒子。多年来由于 GV 离体增殖缺乏适宜的离体细胞支持系统，所以 GV 的分子生物学知识甚少。有关杆状病毒的分子的、生物化学及遗传学的研究主要集中在 NPVs。

杆状病毒的一个最显著的特征是其具有双向复制周期，产生两种具有不同形态、不同功能的表型病毒，即出芽型（budded virus, BV）和包涵体来源型病毒粒子（occlusion derived virus, ODV）或多角体来源型病毒粒子（polyhedra derived virus, PDV）。两种表型病毒产生于病毒感染周期中不同时期，在细胞中的不同部位，它们的形态结构也存在差异。图 1-1 示杆状病毒粒子结构。下面分叙两种病毒粒子的结构及化学组成。

包涵体来源型病毒粒子 图 1-1 右侧示包涵体来源型病毒粒子构造。病毒粒子具囊膜（envelope），囊膜呈典型脂质双层膜结构。囊膜包被一个或多个核衣壳（图中包被多个核衣壳），核衣壳（nucleocapsid）由衣壳（capsid）和髓核（core）组成，衣壳紧贴在髓核表面，其端部有环状乳头状结构，底部有爪样结构，衣壳极性结构是不相同的。

根据囊膜包被核衣壳数目的多寡可将 NPV 分为两种类型：单粒包埋型和多粒包埋型 NPV，单粒包埋型每一个病毒粒子含有一个核衣壳，即囊膜包被一个核衣壳；多粒包埋型每个病毒粒子含有多个核衣壳，即多个核衣壳共享一个囊膜。GV 的每个病毒

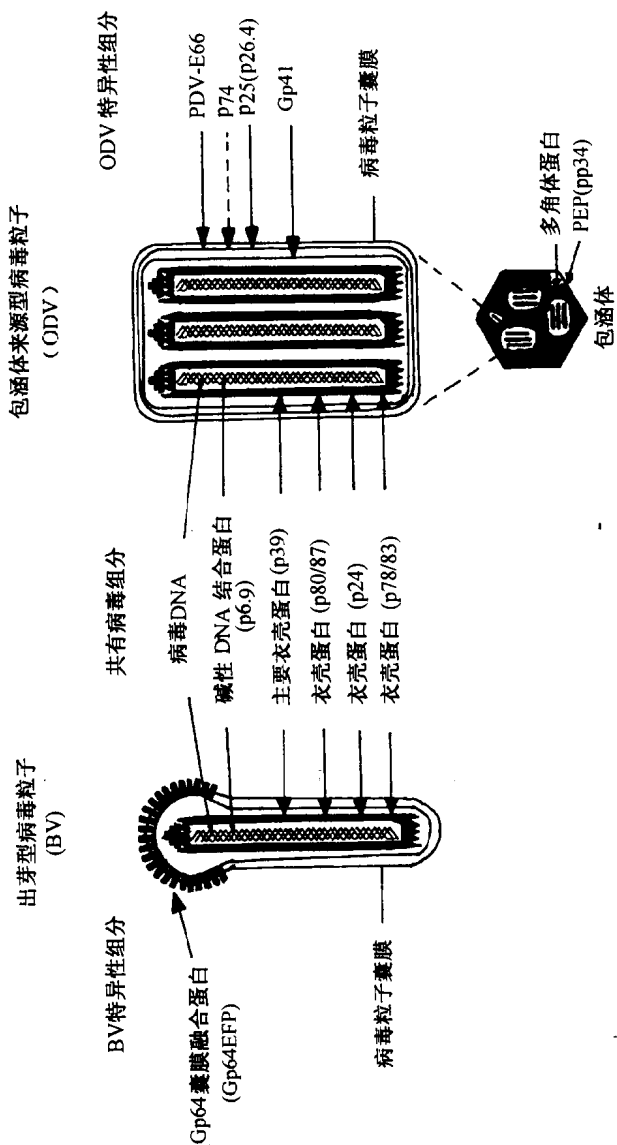


图 1-1 两种表型杆状病毒粒子的结构与组成
(自 Blissard, 1996)

粒子只含一个核衣壳。囊膜具有典型脂质双层膜结构,目前已经鉴别了几种由病毒编码的结构蛋白,它们是 p25, PDV-E66, ODV-E56(ODV-6E),可能还包括 p74,上述几种蛋白是 ODV 病毒囊膜特异性结构蛋白(Braunagel and Summers, 1994; Braunagel et al, 1996; Hong et al, 1994; Kuzio et al, 1989; Roberts, 1989; Russell and Rohrmann, 1993a; Theilmann et al, 1996)。

衣壳位于髓核外周,其两端极性结构不同,这些结构的化学组成和功能目前均不明确,已鉴定的衣壳结构蛋白主要是衣壳结构蛋白 p39,衣壳蛋白 p80/87,衣壳蛋白 p24 和衣壳蛋白 p78/83 四种(Blissard et al, 1989; Pearson et al, 1988; Russell et al, 1991; Lu and Carstens, 1992; Müller et al, 1990; Russell et al, 1997)。这几种衣壳蛋白是 ODV 和 BV 两种表型病毒粒子衣壳的共有结构蛋白。

髓核位于衣壳之中,由 DNA 和结合蛋白构成。DNA 呈超螺旋构型,与 DNA 结合的蛋白已鉴定的是碱性 DNA 结合蛋白 p6.9 (Wilson et al, 1987)。

此外,与 ODV 病毒粒子有关的是另一蛋白 Gp41。电镜观察显示在 ODV 囊膜与核衣壳之间存在外被(tegument)区域, Gp41 蛋白定位于外被(Kawamanto et al, 1977)。在病毒感染后期 ODV 病毒粒子被多角体蛋白包埋形成多角体(Hooft van Iddekinge et al, 1983),多角体主要由多角体蛋白形成。在多角体外周有一多角体膜结构, pp34 蛋白定位于此结构(Gombart et al, 1989b; Russell and Rohrmann, 1990b)。

电镜研究出芽型病毒粒子的结构,显示 BV 含单个核衣壳,核衣壳外被囊膜。BV 病毒粒子的衣壳与髓核化学组成和结构与 ODV 是一致的。BV 病毒粒子与 ODV 病毒粒子最显著的差别在于囊膜。在成熟的 BV 病毒粒子的一端有多个钉状结构或称之为膜粒(peplomer,见图 1-1 左侧 BV 结构示意图)。BV 囊膜的主

要蛋白是 Gp64 囊膜融合蛋白 (Gp64 EFP)。ODV 病毒粒子囊膜无此蛋白。通过对正在出芽和成熟的 BV 病毒粒子免疫电镜研究证明膜粒由 Gp64 EFP 构成 (Blissard and Rohrmann, 1989; Whitford et al, 1989; Volkman, 1986; Volkman et al, 1984)。最近, 在黄杉毒蛾 (*Orgyia pseudotsugata*) 核型多角体病毒 (OpMNPV) 的出芽型病毒粒子中鉴别了杆状病毒转录活化物 IE-1, 此蛋白并不存在于 OpMNPV 的 ODV 病毒粒子之中 (Theilmann and Stewart, 1993)。然而, IE-1 在 BV 中的定位尚未确定, 另外也不能确定是否在所有杆状病毒 BV 中都存在 IE1 蛋白。最近, Guarino 等 (1995) 在 BV 囊膜内表面鉴定了修饰的泛素 (ubiquitin), 这种泛素含有不常见的磷脂锚联成分, 它能与膜连接。由于这种修饰的泛素由病毒和宿主编码的泛素构成, 需进一步研究它对病毒粒子的产生和病毒的感染性起什么作用 (Guarino, 1990; Guarino et al, 1995)。BV 囊膜脂类的组成与 ODV 之间存在较大差异。

脂类的组成能够影响膜的流动性和蛋白质的运动。两种病毒粒子囊膜脂质组成的差异可能对其功能有某种影响和作用, 这种作用可能主要发生在病毒入侵过程中与宿主细胞膜之间的相互作用。脂质分析显示 BV 病毒粒子囊膜比 ODV 病毒粒子囊膜具有更大的流动性, ODV 病毒粒子囊膜较之 BV 病毒囊膜含有更高浓度的蛋白质含量。

总之, BV 和 ODV 两种病毒粒子核衣壳的形态结构和化学组成是一致的, 两者囊膜结构和化学组成的差异, 是它们功能不同所决定的。

1.3 杆状病毒的感染周期

杆状病毒感染周期分为二个阶段 (或二个时相), 第一阶段

ODV 感染中肠上皮细胞，病毒复制增殖后产生出芽型子代病毒粒子 (BV)。大多数鳞翅目昆虫中肠上皮细胞仅产生出芽型病毒粒子，虽然有中肠上皮细胞产生多角体的报道，但多角体晶体中没有包埋或者包埋很少病毒粒子。杆状病毒感染周期的第二阶段是 BV 侵染昆虫其他组织（第二次感染或继发感染），此阶段产生两种类型的病毒粒子，早期产生出芽型病毒粒子，感染晚期产生 ODV 及多角体。ODV 不能侵染其他组织，它只能在虫体之间传播感染；BV 可在组织细胞之间传递感染。

杆状病毒的侵染方式尽管有报道经气门感染，但主要感染途径是口服感染。

幼虫自然状态的感染，一般由于幼虫食下污染包涵体的饲料而引起，进入中肠的包涵体受肠道消化液作用而被溶解，包埋其中的病毒粒子释放到肠管内，病毒粒子附着在柱状上皮细胞的微绒毛突起上，病毒粒子囊膜与细胞融合，核衣壳进入细胞质内，核衣壳迁移到细胞核，脱壳后释放 DNA。在细胞核内，病毒基因表达，DNA 复制，病毒粒子装配，新装配的核衣壳在细胞表面出芽获得囊膜（或在核膜处得到囊膜，在质膜处更换）。BV 病毒粒子穿过基底膜后进入血体腔，在敏感组织中重复这一复制增殖过程并产生 ODV 及包涵体。下面以 NPV 为例，分别叙述病毒感染周期中主要事件及相关问题。

1.3.1 ODV 病毒粒子在肠道中的释放

昆虫幼虫吞食附有多角体的食物后，多角体随食物进入中肠，绝大多数鳞翅目昆虫肠道消化液呈碱性 ($\text{pH}8 \sim 11$)，多角体在此碱性条件下溶解，病毒粒子被释放游离出来。多角体在中肠的碱溶解除了肠道消化液 pH 碱性因素外，宿主幼虫肠道中的酶可能参与此过程，报道较多的是碱性蛋白酶。许多 NPV 在多角体蛋白的纯化过程中，多角体蛋白常被降解，PAGE 电泳图谱

显示多条带出现。如果在多角体碱解之前热处理,则多角体蛋白不被降解。从培养细胞中增殖的多角体则勿须热灭活,且无多角体蛋白降解现象,这说明碱性蛋白酶可能是宿主成分或是肠道中细菌产物,多角体中的碱性蛋白酶是多角体装配过程中包埋进去的。目前对杆状病毒基因组基因的鉴定工作尚未发现编码此酶的基因。

病毒粒子呈游离状态后,在达到中肠上皮细胞之前需穿越昆虫幼虫肠道保护性屏障——围食膜(peritrophic membrane)。围食膜是层非细胞半透性结构,其化学组成主要是几丁质、蛋白质、糖蛋白等。由于这些成分的装配和特殊取向,围食膜是不连续的,其上有“孔洞”。孔隙的直径因不同虫种存在差异,同时由于测定方法不同,文献报道的围食膜孔洞直径大小变化较大。Barbehenn和Martin(1995)测定了四种鳞翅目昆虫,三种直翅目昆虫围食膜孔洞直径,估计鳞翅目昆虫围食膜孔洞大小在21 nm~29 nm之间,直翅目昆虫围食膜孔洞直径在24 nm~36 nm之间。从病毒粒子大小看,似乎难以穿越昆虫围食膜。但是人们研究发现,如果将诸如几丁质酶等破坏围食膜结构的生物的化学物质连同病毒喂食昆虫,病毒感染性将大大提高;如果人为破坏围食膜(如喂食纤维刺伤围食膜)病毒感染性亦会提高和增强。显然,病毒有某种扩大围食膜孔,穿越围食膜达到中肠上皮细胞的机制。Granados实验室对粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)颗粒体病毒(TnGV)增强蛋白(enhancin)一系列研究显示,此蛋白能提高和增强ODV的感染性(Derksen and Granados, 1988; Gallo et al, 1991)。增强蛋白存在于颗粒体病毒蒴状体之中,对该蛋白的结构和功能特征研究表明它是金属蛋白酶(Lepore et al, 1996)。离体与活体研究揭示增强蛋白能降解围食膜结构糖蛋白,围食膜的结构糖蛋白是增强蛋白的靶底物。最近Wang等(1997a, 1997b)已将此靶底物——IIM(invertebrate

intestinal mucin) cDNA 克隆并测序。作者的研究证明增强蛋白能够提高离体条件下围食膜的渗透性 (Peng et al, 1999)。可见, 就 GV 而言, ODV 穿过围食膜可通过病毒编码的增强蛋白消化围食膜主要结构蛋白 mucin, 破坏围食膜结构的完整性, 突破昆虫这道防御性屏蔽, 达到中肠上皮细胞。当然, 这一推测尚需要更多的实验来证实, 比如通过 GV 增强蛋白基因缺失突变体的构建等。对于核型多角体病毒, Derksen 和 Granados (1988) 通过围食膜离体测定 (in vitro PM assay) 发现 AcNPV 多角体蛋白上清液 (除去病毒粒子) 能降解粉纹夜蛾 5 龄幼虫围食膜 68k 结构蛋白, 这说明多角体蛋白中存在某种消化围食膜结构蛋白的因子, 这种因子的性质尚未鉴别。Possee 实验室鉴定了 AcNPV 基因组中几丁质酶基因, 并构建了几丁质酶缺失的突变体 AcchA⁻。同时, 在纯化的 AcNPV 多角体中检测到几丁质酶活性。比较野生型 AcNPV 和 AcchA⁻ 的感染性, AcchA⁻ 感染 2 龄粉纹夜蛾幼虫的 LD₅₀ 显著提高 (Ayres et al, 1994; Hawtin et al, 1995; 1997)。由于几丁质酶能够消化围食膜的几丁质, 这一实验的可能解释是在几丁质酶的作用下, 提高了病毒粒子穿过围食膜到达中肠柱状上皮细胞的能力。

尽管病毒粒子怎样穿过中肠围食膜仍需研究, 但从多角体中释放的病毒粒子需迅速穿过围食膜, 否则有被肠液消化降解的危险。事实上经电镜研究表明, 在 AcNPV 感染粉纹夜蛾幼虫 0.25 h~2 h, 就很难观察到幼虫肠道中存在病毒粒子。利用无多角体的病毒粒子口服感染试验也说明在肠道中的病毒粒子需快速穿越围食膜, 经口服感染的裸露病毒粒子往往缺乏感染性, 或者感染性极低, 这种现象可以部分解释为裸露的病毒粒子易受肠道因素的影响, 部分原因可解释为病毒粒子因缺乏诸如增强蛋白、几丁质酶等, 丧失破坏围食膜结构能力, 不能达到中肠上皮细胞发动感染。

显然, 杆状病毒粒子穿越昆虫幼虫围食膜是一种主动行为, 病毒自身的成分参与并加速了这一过程。当然, 在详细阐明病毒粒子穿过围食膜过程细节之前, 并不排除存在多种穿越方式的可能性。总而言之, 病毒粒子穿越围食膜并不是件困难的事。

1.3.2 病毒粒子进入宿主细胞

ODV 和 BV 病毒粒子进入宿主细胞的方式是不同的, 下面分别叙之。

(一) ODV 病毒粒子 ODV 病毒粒子进入中肠上皮细胞是通过与细胞膜间的融合。一旦 ODV 病毒粒子穿越围食膜到达中肠上皮细胞, 病毒粒子对中肠上皮细胞比其他组织似乎具有更大的“亲和力”。病毒粒子附着在柱状上皮细胞微绒毛表面, 病毒囊膜和细胞膜发生融合并向细胞内释放核衣壳 (图 1-2)。这一过程主要是经电镜研究观察到 (Granados, 1978; Summers, 1971)。没有证据显示 ODV 是通过细胞内吞作用进入中肠上皮细胞, 因为 ODV 进入中肠上皮细胞不被氯奎 (chloroquine) 处理所抑制, 氯奎能缓冲内吞体 pH 值, 抑制病毒经内吞途径进入细胞。

Horton 等 (1993) 利用荧光染料标记舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) NPV 的 ODV 粒子研究 ODV 进入中肠上皮细胞和离体细胞方式, 他们认为 ODV 进入中肠上皮细胞和离体培养细胞是非细胞内吞方式, 荧光标记的 ODV 是以饱和方式连接到舞毒蛾中肠上皮 BBMV 和离体细胞, 在 BBMV 和培养细胞表面存在病毒特异结合位点。每个细胞大约存在 10^6 个 ODV 特异受体位点。病毒在 27°C 直接与靶膜融合, 而在 4°C 的融合只有 27°C 时融合水平的 55%。ODV 与宿主 BBMV 的融合可发生在较宽的 pH 范围内 (pH4~pH11), 而在碱性条件下融合水平明显升高。同时他们的研究亦指出细胞膜受体是蛋白质性质的, 因为细胞用蛋