

朱姗颖,康启鑫,武亚楠,等. 杆状病毒 *ctl* 基因的进化分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):22-26.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.006

杆状病毒 *ctl* 基因的进化分析

朱姗颖¹, 康启鑫², 武亚楠², 陈奕蓄², 王文兵³, 何华纲²

(1. 江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212013; 2. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013;
3. 江苏大学医学院,江苏镇江 212013)

摘要:苜蓿尺蠖核型多角体病毒(AcMNPV)芋螺毒素类似多肽(CTL)具有酚氧化酶抑制剂活性,在农业害虫的生物防治领域具有潜在的应用价值。为了揭示杆状病毒 *ctl* 基因的进化特点,对杆状病毒 CTLs 进行多序列比对分析和分类研究。结果表明,杆状病毒 CTLs 可分为 I 型、II 型,2 种类型的 CTLs 都具有相同的二硫键骨架,但涉及昆虫酚氧化酶抑制剂活性的酪氨酸残基在 2 种类型 CTLs 中的数目、位置明显不同;另外, I 型 CTLs、II 型 CTLs 的理化性质也存在明显差异,疏水性氨基酸平均含量分别为 29.7%、21.3%,净电荷平均值分别为 -3.56、+0.507,等电点平均值分别为 3.86、7.32。由此推测, I 型 CTLs、II 型 CTLs 在功能上可能存在着重要分化。

关键词:杆状病毒; *ctl* 基因; 分类; 进化

中图分类号:Q753 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0022-05

芋螺毒素(conotoxin)是由海洋软体动物芋螺分泌的一类用于自卫和捕食的活性多肽,一般由 10~30 个氨基酸残基组成,富含半胱氨酸(C)。芋螺毒素能特异性地作用于钾、钠、钙等离子通道、细胞膜上的各种神经递质、激素的受体,从而干扰细胞或神经中的信号传递,在治疗慢性疼痛、急性疼痛、

神经保护等方面具有广泛的应用前景。根据保守的信号肽序列,芋螺毒素可分为 A、M、O、I、P、S、T 等超家族;进一步依据其半胱氨酸骨架及药理活性,又可分为 α 、 μ 、 ω 、 δ 、 Ψ 、 σ 、 λ 、 κ 、 γ 等家族^[1]。

1992 年, Eldridge 等从苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, 简称 AcMNPV)中鉴定了 1 个基因,该基因编码的蛋白质序列与 ω -芋螺毒素具有一定的相似性且具有相同的二硫键骨架($C_1-C_2-C_3-C_4-C_5-C_6$),因此将其命名为类芋螺毒素基因(conotoxin-like, 简称 *ctl*)^[2]。但 Eldridge 等通过体内、体外试验都未能证明杆状病毒 *ctl* 基因的任何功能^[2-3]。曹青等发现, AcMNPV CTL 不仅对金黄色葡萄球菌、微球菌等具有显著的抗菌活性,还可对酚氧化酶起到抑制作用,能阻止昆虫血液的黑化^[4-5]。本研究从 GenBank 数据库中收集已知的杆状病毒 *ctl* 基因,对

收稿日期:2016-11-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300138);江苏省自然科学基金(编号:BK2011491);江苏大学高级专业人才科研启动基金(编号:11JDG058)。

作者简介:朱姗颖(1978—),女,江苏常州人,博士,副教授,主要从事病毒分子生物学研究。Tel:(0511)88790931;E-mail:zhushanying@ujs.edu.cn。

通信作者:何华纲,博士,副教授,主要从事病毒分子生物学研究。Tel:(0511)88780201;E-mail:hghg@mail.ujs.edu.cn。

- [18] 蒋新龙. 绣球花花、叶总黄酮的提取工艺和含量测定[J]. 丽水学院学报,2007,29(5):37-41.
- [19] 冯卫生,张艳丽,郑晓珂,等. 绣球花的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(8):576-579.
- [20] 屈连伟. 绣球花新品种选育——种子收获和播种[J]. 中国花卉园艺,2013(8):30-32.
- [21] 海 风,屈连伟,赵兴华. 绣球花人工杂交技术研究[J]. 北方园艺,2014(12):72-74.
- [22] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [23] 董海燕,季孔庶,侯伯鑫,等. 基于 ISSR 标记的红花檵木品种亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2014,41(2):365-374.
- [24] 胡仲义,林 立,刘 夔,等. 26 个川茶花品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 植物研究,2013,33(5):629-634.
- [25] 严 华. 几种国兰形态学及 ISSR 分子鉴定[D]. 雅安:四川农业大学,2011.
- [26] 王湘莹,何 钢,王晓明,等. 金银花不同品种间遗传变异的

- ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(11):77-82.
- [27] 杨 梅,张 敏,师守国,等. 武当木兰种群遗传结构的 ISSR 分析[J]. 林业科学,2014,50(1):76-81.
- [28] 周永刚. 崇明水仙种质资源细胞学分析及 ISSR 分子鉴定[D]. 雅安:四川农业大学,2011.
- [29] 李延龙,张 明,曹秀敏,等. ISSR 分子标记技术在金叶女贞品种鉴定中的应用[J]. 安徽农学通报,2008,14(22):39,34.
- [30] 索志立. 利用 DNAISSR 分子标记技术对芍药属植物栽培品种的分类鉴定方法[J]. 生物技术通报,2008(增刊1):109-112.
- [31] 彭继庆,曹福祥,许若娴. 壳菜果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中国农学通报,2012,28(16):53-59.
- [32] 范海艳,曹福祥,彭继庆,等. 博白大果油茶 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(4):97-103.
- [33] 缪恒彬,陈发棣,赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(5):1243-1248.
- [34] 李艳香. 19 个绣球属种质资源的 SRAP 分析[D]. 长沙:湖南农业大学,2009.

其编码的 CTLs 进行较全面系统的进化分析,在此基础上对杆状病毒 *ctl* 基因进行分类,以期为该基因的功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因序列和蛋白质序列的获取

以 AcMNPV *ctl* 基因(GenBank 登录号: L22858)作为种子序列,在 GenBank 数据库中进行 BLAST,获取杆状病毒 *ctl* 基因序列,使用 DNASTar 软件进一步推导出对应的蛋白质序列。芋螺毒素 ω -M VII A、虎纹蜘蛛毒素 HWTX-X、家蝇酚氧化酶抑制剂 MdPOI 等抑制剂半胱氨酸结(inhibitor cystine knot, 简称 ICK)家族(也称 knottin 家族)成员的氨基酸序列从 KNOT-TIN 数据库(<http://knottin.cbs.cnrs.fr>)中获得。

1.2 多序列比对分析

使用 SignalP 3.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0>)预测杆状病毒 CTL 蛋白质的信号肽,进而根据信号肽的位置,推导 CTL 成熟肽。使用 ClustalW 软件(<http://www.genome.jp/tools/clustalw>)对杆状病毒 CTL 成熟肽进行多序列比对分析,并采用同样的方法对 ICK 家族进行多序列比对分析。

1.3 系统进化树的构建

应用 MEGA 4.0 软件通过邻接(N-J)法构建系统进化树。

1.4 蛋白质理化性质分析

用 DNASTar 软件统计杆状病毒 CTL 成熟肽、ICK 家族成员的疏水性氨基酸含量,并计算净电荷、等电点(pI)。

2 结果与分析

2.1 杆状病毒 *ctl* 基因的分布

以 AcMNPV *ctl* 基因为种子,在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析。结果显示,在全基因组已测序的 50 多个杆状病毒中,有 22 个杆状病毒含有 *ctl* 基因,约占 40%。在这些杆状病毒中,*ctl* 基因的数目一般为 1~2 个。例如,AcMNPV、豆天蛾核型多角体病毒(*Clanis bilineata* NPV,简称 ClbiNPV)等 16 种 NPVs 和棉铃虫颗粒体病毒(*Helicoverpa armigera* granulosis-virus,简称 HearGV)、八字地老虎颗粒体病毒(*Xestia c-nigrum* GV,简称 XecnGV)等 2 种 GVs 都只有 1 个 *ctl* 基因(表 1);蓖麻蚕核型多角体病毒(*Samia cynthia* NPV,简称 SacyNPV)、柞蚕核型多角体病毒(*Antheraea pernyi* NPV,简称 AnpeNPV)等 6 种 NPVs 均有 2 个 *ctl* 基因(表 2),而家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* NPV,简称 BmNPV)等杆状病毒中则没有该基因。在杆状病毒中,*ctl* 基因序列一致性在 74%~100%之间,推导的蛋白质 CTLs 的氨基酸序列一致性为 40%~78%。对不同杆状病毒 CTLs 进行信号肽的预测分析,发现所有 CTLs 的 N 端都有 1 段信号肽序列,其氨基酸组成的保守性较低,而成熟肽的氨基酸序列保守性较高。

表 1 含 1 个 *ctl* 基因的杆状病毒

基因	杆状病毒	前体肽氨基酸数(个)	成熟肽氨基酸数(个)	GenBank 登录号	分类
AcMNPV <i>ctl</i>	苜蓿尺蠖多角体病毒(<i>Autographa californica</i> NPV)	53	30	NP_054032	I 型
BusuNPV <i>ctl</i>	油桐尺蠖多角体病毒(<i>Buzura suppressaria</i> NPV)	53	30	AAC34372	I 型
CfMNPV <i>ctl</i>	云杉卷叶蛾核型多角体病毒(<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV)	53	30	NP_848442	I 型
LdMNPV <i>ctl</i>	舞毒蛾核型多角体病毒(<i>Lymantria dispar</i> MNPV)	53	30	NP_047786	I 型
PlxyMNPV <i>ctl</i>	小菜蛾核型多角体病毒(<i>Plutella xylostella</i> MNPV)	53	30	YP_758469	I 型
AdhoNPV <i>ctl</i>	茶小卷叶蛾核型多角体病毒(<i>Adoxophyes honmai</i> NPV)	51	29	NP_818733	II 型
AdorNPV <i>ctl</i>	苹果小卷叶蛾核型多角体病毒(<i>Adoxophyes orana</i> NPV)	51	29	YP_002300601	II 型
AgNPV <i>ctl</i>	黎豆夜蛾核型多角体病毒(<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV)	64	29	YP_803424	II 型
ApciNPV <i>ctl</i>	杨尺蠖核型多角体病毒(<i>Apocheima cinerarium</i> NPV)	52	29	ADB84397	II 型
ChchNPV <i>ctl</i>	戈尔登双生斑核型多角体病毒(<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV)	49	29	YP_249678	II 型
ClbiNPV <i>ctl</i>	豆天蛾核型多角体病毒(<i>Clanis bilineata</i> NPV)	52	29	YP_717591	II 型
EcobNPV <i>ctl</i>	热带尺蠖核型多角体病毒(<i>Ecotropis obliqua</i> NPV)	53	32	YP_874240	II 型
HearMNPV <i>ctl</i>	棉铃虫核型多角体病毒(<i>Helicoverpa armigera</i> MNPV)	50	29	YP_002332635	II 型
LyxyMNPV <i>ctl</i>	木毒蛾核型多角体病毒(<i>Lymantria xyliina</i> MNPV)	53	29	YP_003517803	II 型
MacoNPV-A <i>ctl</i>	蓓带夜蛾核型多角体病毒 A(<i>Mamestra configurata</i> NPV-A)	50	29	NP_613190	II 型
MacoNPV-B <i>ctl</i>	蓓带夜蛾核型多角体病毒 B(<i>Mamestra configurata</i> NPV-B)	50	29	NP_689280	II 型
HearGV <i>ctl</i>	棉铃虫颗粒体病毒(<i>Helicoverpa armigera</i> GV)	62	35	YP_001649112	II 型
XecnGV <i>ctl</i>	八字地老虎颗粒体病毒(<i>Xestia c-nigrum</i> GV)	52	29	NP_059275	II 型

2.2 杆状病毒 CTLs 的分类

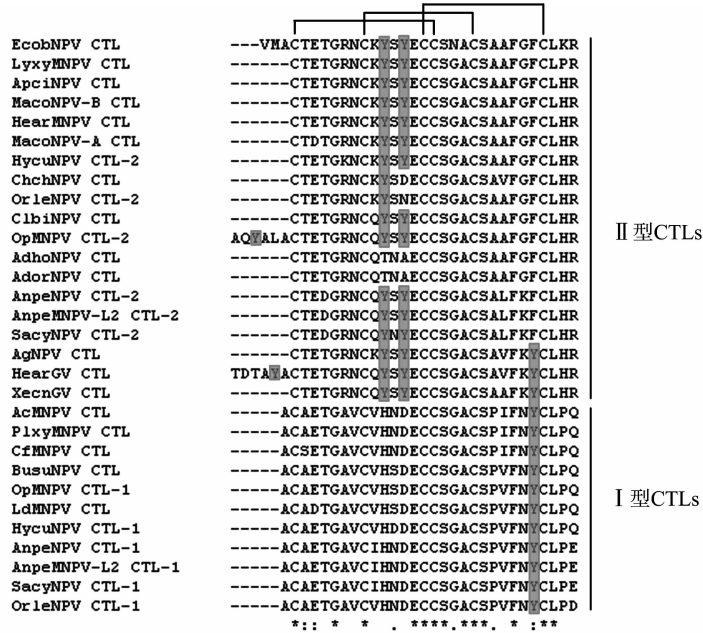
对预测的杆状病毒 CTLs 成熟肽序列进行多序列比对分析,可将杆状病毒 CTLs 分为 2 种类型,分别命名为 I 型 CTLs、II 型 CTLs(图 1)。I 型 CTLs 的前体肽都含有 53 个氨基酸残基(aa),预测的成熟肽均为 30 个氨基酸,成熟肽的氨基酸组成相当保守,为 ACA(/S)E(/D)TGAVCV(/I)HN(/S/D)DECCSGACSPV(/I)FNYCLPQ(/E/D),包括 AcMNPV 等 4 种 NPVs 编码的 CTLs,及 SacyNPV、AnpeNPV 等含有 2 个

ctl 基因的 NPVs 所编码的 CTL-1(表 1、表 2)。

II 型 CTLs 的前体肽含有 48~68 个氨基酸,长度变异主要位于信号肽部分,而成熟肽大部分为 29 个氨基酸,个别为 35、32 个氨基酸,成熟肽的氨基酸组成较为保守,为 CTE(/D)T(/D)GR(/K)NCK(/Q)Y(/T)S(/N)Y(/A/D/N)ECCSG(/N)ACSAA(/V/L)FG(/K)F(/Y)CLH(/K/P)R,包括 ClbiNPV 等 11 种 NPVs、HearGV 等 2 种 GVs 编码的 CTLs 及含有 2 个 *ctl* 基因的 NPVs 所编码的 CTL-2(表 1、表 2)。

表 2 含 2 个 *ctl* 基因的杆状病毒

杆状病毒	基因	前体肽氨基酸数(个)	成熟肽氨基酸数(个)	GenBank 登录号	分类
柞蚕核型多角体病毒(<i>Antheraea pernyi</i> NPV)	AnpeNPV <i>ctl</i> -1	53	30	YP_611105	I 型
	AnpeNPV <i>ctl</i> -2	48	29	YP_001419677	II 型
柞蚕核型多角体病毒 L2(<i>Antheraea pernyi</i> NPV-L2)	AnpeMNPV-L2 <i>ctl</i> -1	53	30	ABQ12369	I 型
	AnpeMNPV-L2 <i>ctl</i> -2	63	29	ABQ12349	II 型
美国白蛾核型多角体病毒(<i>Hyphantria cunea</i> NPV)	HycuNPV <i>ctl</i> -1	53	30	YP_473331	I 型
	HycuNPV <i>ctl</i> -2	53	29	YP_473311	II 型
白斑毒蛾核型多角体病毒(<i>Orgyia leucostigma</i> NPV)	OrleNPV <i>ctl</i> -1	53	30	YP_001650937	I 型
	OrleNPV <i>ctl</i> -2	53	29	YP_001651016	II 型
黄杉毒蛾核型多角体病毒(<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV)	OpMNPV <i>ctl</i> -1	53	30	NP_046292	I 型
	OpMNPV <i>ctl</i> -2	52	35	NP_046186	II 型
蓖麻蚕核型多角体病毒(<i>Samia cynthia</i> NPV)	SacyNPV <i>ctl</i> -1	53	30	ADC79662	I 型
	SacyNPV <i>ctl</i> -2	68	29	ADC79661	II 型



序列上方的星号所示为高度保守的氨基酸位点；序列上方的线条表示3对二硫键的位置；阴影所示为酪氨酸残基（Y），是潜在的酚氧化酶抑制剂的功能位点

图1 杆状病毒 CTL 多序列比对结果

采用 CTLs 成熟肽的氨基酸序列对杆状病毒进行系统发育分析,发现所有编码 I 型 CTLs 的杆状病毒聚于 1 支,而所有编码 II 型 CTLs 的杆状病毒聚于另 1 支(图 2)。

2.3 I 型、II 型 CTLs 成熟肽的保守位点

多序列比对分析表明,在 I 型 CTLs、II 型 CTLs 的成熟肽中均含有 6 个高度保守的半胱氨酸残基(C),二硫键骨架为 C₁-C₂-C₃C₄-C₅-C₆。酪氨酸(Y)是涉及昆虫酚氧化酶抑制剂活性的关键位点,因此本研究对 2 类 CTLs 中的酪氨酸的分布进行统计分析。结果显示,I 型 CTLs 都有 1 个保守的酪氨酸残基,位于 C₅~C₆ 之间;在 II 型 CTLs 中,除了茶小卷叶蛾核型多角体病毒(*Adoxophyes honmai* NPV,简称 AdhoNPV)、棉褐带卷蛾核型多角体病毒(*Adoxophyes orana* NPV,简称 AdorNPV)的 CTL 缺乏酪氨酸残基,ChchNPV CTL、OrleNPV CTL-2 只有 1 个酪氨酸残基之外,其余 CTLs 在 C₂~C₃ 之间都有 2 个保守的酪氨酸残基。除了这 2 个保守的酪氨酸残基,黎豆夜蛾核型多角体病毒(*Anticarsia gemmatilis* NPV,

简称 AgNPV)、HearGV、XecnGV 的 CTLs 还有 1 个酪氨酸残基,其位置与 I 型 CTLs 中的一致。此外,在 HearGV CTL、黄杉毒蛾核型多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* MNPV,简称 OpMNPV)CTL-2 的 C₁ 之前还有 1 个额外的酪氨酸残基(图 1)。

2.4 I 型、II 型 CTLs 成熟肽的理化性质

本研究对 I 型、II 型 CTLs 的净电荷、等电点、疏水性氨基酸含量等理化性质进行了比较分析,表 3 结果显示,I 型 CTL 在 pH 值 7.0 时净电荷范围为 -4.10~-3.10(平均值为 -3.56),等电点(pI)范围为 3.69~3.96(平均值为 3.86),疏水性氨基酸占 26.7%~30.0%(平均值为 29.7%);而 II 型 CTLs 在 pH 值 7.0 时净电荷为 -0.11~+1.89(平均值为 +0.507),pI 值为 6.88~8.01(平均值为 7.32),疏水性氨基酸占 17.2%~28.6%(平均值为 21.3%)。本结果表明,杆状病毒 I 型、II 型 CTLs 的理化性质存在明显差异,这暗示 2 类 CTLs 在功能上可能存在分化。

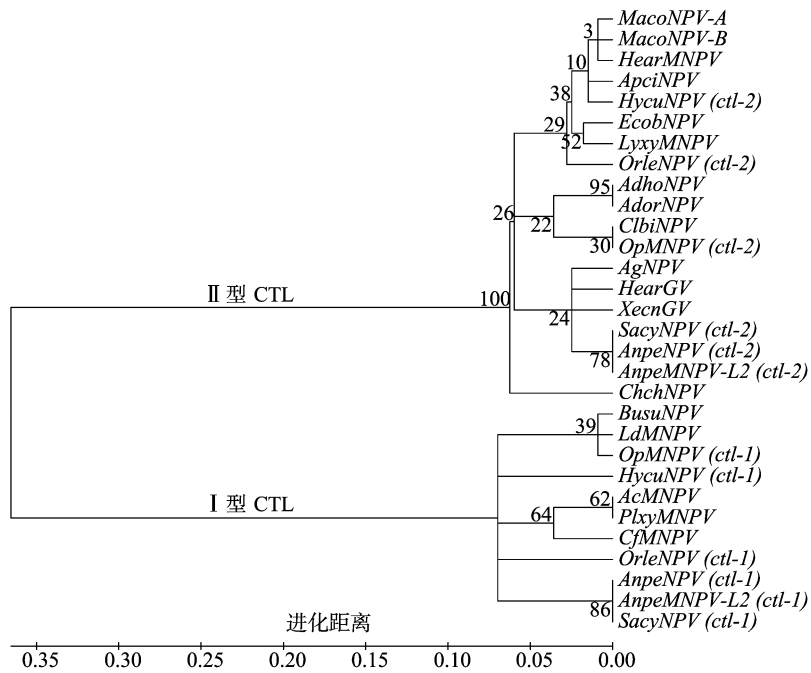


图2 基于 CTLs 的杆状病毒系统进化树

表 3 I 型 CTLs、II 型 CTLs 成熟肽理化性质的比较

名称	净电荷	pI 值	疏水性氨基酸含量 (%)
I 型 CTLs	-4.10 ~ -3.10 (-3.56)	3.69 ~ 3.96 (3.86)	26.7 ~ 30.0 (29.7)
AcCTL	-3.10	3.96	30.0
SacyCTL-1	-4.10	3.83	30.0
II 型 CTLs	-0.11 ~ +1.89 (+0.507)	6.88 ~ 8.01 (7.32)	17.2 ~ 28.6 (21.3)
ClbiCTL	-0.10	6.88	20.7
SacyCTL-2	-0.11	6.89	20.7
AhIAAI	-2.08	6.06	9.4
GsGUR	-2.10	4.97	25.7
MjTII	-2.10	4.81	24.3
AsAST-A	-5.27	3.04	44.4
MVIIA	+1.72	8.00	6.7
AlALO1	+1.89	8.01	11.8
MdPOI	+2.06	8.01	23.7
PaAMP1	+3.72	8.53	21.1
HWTX-X	+3.88	8.53	14.3

注:括号内数据为平均值。AcCTL 为首蓆尺蠖核型多角体病毒 CTL;ClbiCTL 为豆天蛾核型多角体病毒 CTL;SacyCTL-1、SacyCTL-2 为蓖麻蚕核型多角体病毒 CTL-1、CTL-2;AhIAAI 为千穗谷 (*Amaranthus hypochondriacus*) α -淀粉酶抑制剂;GsGUR 为匙羹藤 (*Gymnema sylvestre*) 甜味抑制蛋白 gurmarin;MjTII 为紫茉莉 (*Mirabilis jalapa*) 胰蛋白酶抑制剂;AsAST-A 为海洋生物 *Asteropus simplex* 抗菌肽;MVIIA 为芋螺毒素 ω -MVIIA;AlALO1 为长臂天牛 (*Acrocinus longimanus*) 抗菌肽;MdPOI 为家蝇 (*Musca domestica*) 酚氧化酶抑制剂;PaAMP1 为美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 抗菌肽;HWTX-X 为虎纹蜘蛛 (*Ornithoconus huweni*) 毒素 Huwentoxin-X。

2.5 杆状病毒 CTLs 与 ICK 家族的比较分析

杆状病毒 CTLs 属于抑制剂半胱氨酸结 (inhibitor cystine knot, 简称 ICK) 家族,多序列分析表明,杆状病毒 CTLs 与芋螺毒素 ω -MVIIA、虎纹蜘蛛毒素 HWTX-X、紫茉莉胰蛋白酶抑制剂 MjTII、匙羹藤甜味抑制蛋白 GsGUR、美洲商陆抗菌肽 PaAMP1、家蝇酚氧化酶抑制剂 MdPOI 等具有相同的二硫键骨架,但氨基酸序列一致性较低,仅为 16.7% ~ 33.3% (图 3)。

在理化性质方面,AhIAAI、GsGUR、MjTII、AsAST-A 等都带负电荷,等电点分别为 6.06、4.97、4.81、3.04,疏水性氨

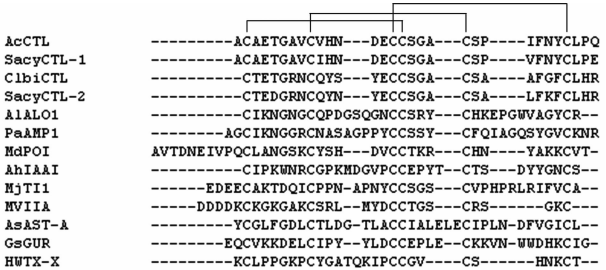


图3 抑制剂半胱氨酸结家族成员多序列比对结果

基酸含量分别为 9.4%、25.7%、24.3%、44.4%；而 ω -M VII A、AlAlOI、MdPOI、PaAMP1、HWTX-X 等都带正电荷，等电点为 8.00~8.53，疏水性氨基酸含量分别为 6.7%、11.8%、23.7%、21.1%、14.3%（表 3）。由此可见，不同的 ICK 家族成员在理化性质上存在较大差异，不过杆状病毒 I 型 CTLs 的净电荷（平均值为 -3.56）、等电点（平均值为 3.86）与 MjTII、AsAST-A、GsGUR 等比较接近。

3 讨论与结论

抑制剂半胱氨酸结家族，又称 knottin 家族，该家族是由富含半胱氨酸残基的小分子蛋白质组成，广泛存在于各种动物、植物和微生物中^[6]。研究发现，海洋生物芋螺中的芋螺毒素属于 ICK 家族。在 ICK 家族中，HWTX-X、Pa-AMP、MdPOI 等大量成员都与芋螺毒素 ω -M VII A 具有相同的二硫键骨架，即 $C_1-C_2-C_3C_4-C_5-C_6$ 。这些类 M VII A（M VII A-like）蛋白往往具有复杂的生物学功能，例如，HWTX-X 是虎纹蜘蛛产生的一种神经毒素，在捕食过程中发挥作用^[7]。PaAMP1 是从美洲商陆种子中分离的抗菌肽，对多种真菌和革兰氏阳性菌具有明显的抑制活性^[8]。MdPOI 是从家蝇蛹中发现的酚氧化酶抑制剂（phenoloxidase inhibitor，简称 POI），对家蝇幼虫的酚氧化酶具有显著的抑制作用^[9-10]。从二硫键骨架看，杆状病毒 CTLs 也属于 ICK 家族中类 M VII A 蛋白。杆状病毒 CTLs 很少带有正电荷，而带正电荷氨基酸对芋螺毒素的镇痛功能是必需的，因此，尽管最初杆状病毒 CTLs 因与芋螺毒素具一定的同源性而被命名，但是杆状病毒 CTLs 并不像芋螺毒素那样具有镇痛活性（笔者的相关研究数据未发表）。另外，曹青等已证实，AcMNPV CTL 对金黄色葡萄球菌、微球菌、短小芽孢杆菌等多种临床致病菌的生长有显著抑制功能，目前尚不明确抑菌活性对于杆状病毒的生物学意义^[4]。还有研究发现，AcMNPV CTL 具有酚氧化酶抑制活性，能阻止昆虫血液的黑化^[5]。

昆虫酚氧化酶不仅在昆虫发育过程中具有重要的生理功能，如参与表皮的鞣化、硬化、伤口愈合等，还在昆虫免疫防御反应中起着重要作用，它可使病原微生物表面产生黑色素沉淀，通过黑色素包裹反应来隔离和抵抗病原物，并在黑色素形成过程中产生醌及其衍生物，导致活性氧的积累，从而对病原物起到杀伤作用^[11]。已有研究表明，昆虫酚氧化酶与黑化幼虫表现出的较强的杆状病毒抗性有关^[12]。Trudeau 等用 AcMNPV 感染美洲棉铃虫时发现，气管上皮细胞的感染位点上出现了酚氧化酶介导的黑化及包裹反应^[13]。由此可见，昆虫酚氧化酶在宿主防御杆状病毒的过程中发挥着重要作用。昆虫体内存在内源性酚氧化酶抑制剂，能在纳摩尔（nmol）水平上高效地竞争性抑制酚氧化酶活性^[9]。Cao 等的研究表明，AcMNPV CTL 是病毒来源的酚氧化酶抑制剂，它可能在一定程度上能抑制昆虫宿主对杆状病毒的防御反应^[5]。

Daquinag 等对家蝇 MdPOI 的氨基酸序列及蛋白质结构进行解析发现，MdPOI 成熟肽由 38 个氨基酸残基组成，富含半胱氨酸、赖氨酸，其中 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键（ $C_1-C_2-C_3C_4-C_5-C_6$ ），且在 $C_5 \sim C_6$ 之间的酪氨酸残基（Y）经羟化修饰为多巴残基，该位点与酚氧化酶抑制剂的竞争性抑制活性有重要关系^[10]。本研究将杆状病毒 CTLs 分为 2 类，

即 I 型 CTLs、II 型 CTLs，其中 I 型 CTLs 在 $C_5 \sim C_6$ 之间也都有 1 个保守的酪氨酸残基，目前尚不清楚该位点是否存在羟化修饰，而大部分 II 型 CTLs 在 $C_2 \sim C_3$ 之间有 2 个保守的酪氨酸残基。另外，与 I 型 CTLs 类似，3 个 II 型 CTLs（AgNPV CTL、HearGV CTL 和 XecmrGV CTL）在 $C_5 \sim C_6$ 之间还有 1 个酪氨酸残基。目前尚不清楚 II 型 CTLs 是否也具有酚氧化酶抑制活性。此外，在蛋白质疏水性、电荷特性等方面，II 型 CTLs 与 I 型 CTLs 存在明显差异，由此推测，II 型 CTLs 的功能可能不同于 I 型 CTLs，这有待进一步研究。

参考文献：

- [1] Puillandre N, Watkins M, Olivera B M. Evolution of *Conus* peptide genes; duplication and positive selection in the A - superfamily [J]. Journal of Molecular Evolution, 2010, 70 (2): 190-202.
- [2] Eldridge R, Li Y, Miller L K. Characterization of a baculovirus gene encoding a small conotoxinlike polypeptide [J]. Journal of Virology, 1992, 66 (11): 6563-6571.
- [3] 卢玉蓉, 冯枫棣, 吴东, 等. 含外源类蜗牛毒素基因的 AcMNPV 的虫体感染性研究 [J]. 中国病毒学, 2004, 19 (3): 276-280.
- [4] 曹青, 吴岩, 刘永, 等. AcMNPV 类芋螺毒素多肽的抗菌活性分析 [J]. 生物学杂志, 2012, 29 (6): 29-31.
- [5] Cao Q, Zhu S Y, Wu Y, et al. The effect of a small conotoxin-like *ctx* gene from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) on insect hemolymph melanization [J]. Polish Journal of Microbiology, 2012, 61 (3): 183-189.
- [6] Gracy J, Le-Nguyen D, Gelly J C, et al. KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007 [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36 (SI): D314-D319.
- [7] Liu Z, Dai J, Dai L, et al. Function and solution structure of Huwentoxin-X, a specific blocker of N-type calcium channels, from the Chinese bird spider *Ornithoconus huweni* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281 (13): 8628-8635.
- [8] Liu Y, Luo J, Xu C, et al. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed [J]. Plant Physiology, 2000, 122 (4): 1015-1024.
- [9] Tsukamoto T, Ichimaru Y, Kanegae N, et al. Identification and isolation of endogenous insect phenoloxidase inhibitors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992, 184 (1): 86-92.
- [10] Daquinag A C, Nakamura S, Takao T, et al. Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92 (7): 2964-2968.
- [11] Nappi A J, Christensen B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions; applications to insect innate immunity [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2005, 35 (5): 443-459.
- [12] Reeson A F, Wilson K, Gunn A, et al. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* phenotypically plastic and responds to population density [J]. Proceedings of the Royal Society B, 1998, 265: 1787-1791.
- [13] Trudeau D, Washburn J O, Volkman L E. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* [J]. Journal of Virology, 2001, 75 (2): 996-1003.