

# 柞蚕核型多角体病毒 *p11* 基因克隆及序列分析

石生林<sup>1,2</sup>, 刘彦群<sup>1</sup>, 潘敏慧<sup>2</sup>, 鲁成<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 西南大学 农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400716)

**摘要:**为丰富柞蚕核型多角体病毒分子生物学基础,通过 PCR 扩增克隆了 ApNPV *p11* 基因并进行了序列的生物信息学分析。ApNPV *p11* 基因编码 102 个氨基酸,预测分子量 11.2 kDa;氨基酸序列 N 端 1~33 位是信号肽序列,中部 50~72 位是跨膜区。PSI-BLAST 搜索表明有 20 种核型多角体病毒编码蛋白与 ApNPV P11 蛋白有显著性匹配;比对分析发现 P11 蛋白氨基酸序列中部相对保守,两端变异较大。进化分析表明 ApNPV 属于 NPV 类群 I 且与 EppoNPV、AgMNPV、CfDefNPV 亲缘关系较近。

**关键词:**杆状病毒; *p11* 基因; 序列分析

中图分类号: Q783 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)02-0042-05

## Cloning and Sequence Analysis of *Antheraea pernyi* Nucleopolyhedrovirus(*ApNPV*)*p11* Gene

SHI Sheng-lin<sup>1,2</sup>, LIU Yan-qun<sup>1</sup>, PAN Min-hui<sup>2</sup>, LU Cheng<sup>2</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** To enrich the molecular biology information of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus (ApNPV), the *p11* gene was PCR amplified and cloned. Moreover, the sequence was subjected to bioinformatics analysis. ApNPV *p11* gene encoded a 102 amino acid sequence with a predicted molecular weight of 11.2 kDa. The position 1-33 of the N terminal was the signal peptide sequence and the middle position (50-72) was the transmembrane domain. PSI-BLAST search revealed that total 20 nucleopolyhedrovirus proteins significantly match with ApNPV P11 protein. Align analysis indicated that the middle parts was relatively conserved and the two ends were less conserved. Phylogenetic analysis classified ApNPV as one group I NPV and closely related to EppoNPV, AgMNPV and CfDefNPV.

**Key words:** Baculoviruses; *p11* gene; Sequence analysis

杆状病毒是有囊膜的双链 DNA 病毒,宿主域仅限于无脊椎动物,迄今已报道包括鳞翅目在内,共 7 个目有 600 种以上昆虫能被杆状病毒感染<sup>[1]</sup>。根据国际病毒分类委员会(ICTV)第八次报告,杆状病毒科(Baculoviridae)分核型多角体病毒(NPV)与颗粒体病毒(GV)两个属<sup>[2]</sup>。柞蚕(*Lepidoptera: Saturniidae*)是我国北方山区重要的特种经济昆虫,柞蚕核型多角体病毒(*Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus, ApNPV)是柞蚕核型多角体病(又称柞蚕脓病)的病原,严重制约柞蚕生产发展。通过克隆测序分析 ApNPV *Pst* iv-B 片段发现,ApNPV 开放阅读框 B-ORF6L 具有晚期基因特性,与苜蓿尺蠖核型多角体

病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) ORF108、黄杉毒蛾核型多角体病毒(*Oryia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus, OpMNPV) ORF108 有同源性<sup>[3]</sup>。因杆状病毒中该同源区均编码 11 kDa 蛋白,故将该 ORF 命名为 *p11* 基因。已有研究及本试验后续研究均表明杆状病毒 *p11* 基因编码晚期表达的杆状病毒膜相关蛋白<sup>[4,5]</sup>,本研究报告 ApNPV *p11* 基因克隆及序列分析结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、载体及菌株

质粒 pUC19-B 克隆有 ApNPV *Pst* iv-B 片段,

收稿日期: 2008-12-09

基金项目: 沈阳农业大学中青年研究生导师基金资助(2006); 国家自然科学基金资助(30800803, 30771630)

作者简介: 石生林(1972-),男,辽宁岫岩人,副教授,理学博士,主要从事昆虫病原分子生物学相关研究。

通讯作者: 鲁成(1957-),男,重庆长寿人,教授,博士,主要从事蚕桑分子生物学及细胞生物学研究。

由农业部蚕桑学重点开放实验室克隆并保存; pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司; 大肠杆菌 DH5a 由农业部蚕桑学重点开放实验室保存。

## 1.2 酶与试剂

限制性内切酶 (*Bam*H I、*Hind* III)、*Taq* 聚合酶等 PCR 试剂、DNA Ladder Marker 均为 TaKaRa 公司产品; RNase A 为 Sigma 公司产品; 凝胶电泳片断回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.3 核酸序列

ApNPV *p11* 基因序列收录号为: AY619724, P11 蛋白氨基酸序列由核酸序列推导获得, 收录号为: AAU89271; 其他 P11 蛋白序列均来自 GenBank, 收录号分别为: AcMNPV (NP-054138.1)、AdhoNPV (NP-818730.1)、AgMNPV (YP-803500.1)、AgseNPV (YP-529735.1)、BnNPV (NP-047508.1)、CfDefNPV (NP-932711.1)、CfMNPV (NP-848410.1)、ChchNPV (YP-249704.1)、EppoNPV (NP-203263.1)、HcNPV (YP-473235.1)、HearNPV-G4 (NP-075164.1)、HzNPV (NP-542721.1)、LeseNPV (YP-758409.1)、MaviMNPV (YP-950814.1)、OpMNPV (NP-046264.1)、OrleSNPV (YP-001651004.1)、RoMNPV (NP-703097.1)、SfMNPV (YP-001036350.1)、SplhMNPV (NP-258365.1)、TnSNPV (YP-308984.1)。

## 1.4 引物设计及 PCR 扩增

上游引物 (5'-GGATCCATGGTCACGCCGTCCC-3') 起始密码子 (ATG) 前加 *Bam*H I 酶切位点 (GGATCC), 下游引物 (5'-AAGCTTTAGGGGACGTTCCGTT-3') 终止密码子 (TAA) 后加 *Hind* III 酶切位点 (AAGCTT)。PCR 扩增以质粒 pUC19-B 为模板, 扩增体系为: pUC19-B 质粒 DNA (2 μg/μL), 0.30 μL; 10× Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2.50 μL; Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 2.00 μL; dNTP (各 2.5 mmol/L) 2.00 μL; 引物 (10 μmol/L) 各 0.80 μL; *Taq* 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL; ddH<sub>2</sub>O 补足体积 25.00 μL; 扩增条件为: 94℃预变性 2 min, 94℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 循环 30 次, 72℃延伸 10 min。

## 1.5 PCR 产物克隆

PCR 扩增产物切胶回收后克隆至 pGEM-T easy 载体, 转化宿主菌 DH5a, 构建重组质粒; 扩增产物回收及克隆方法均按公司产品说明进行。获得的重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切并测序鉴定。

## 1.6 核酸及氨基酸序列分析

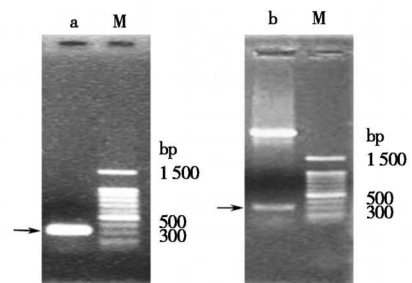
核酸、氨基酸基本特性采用软件 DNAMAN 进行; ApNPV P11 蛋白结构域分析采用在线服务器

<http://smart.embl-heidelberg.de> 进行; 抗原决定簇预测采用在线服务 <http://immunax.dfci.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl> 进行<sup>[6]</sup>; 信号肽分析采用在线服务 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行<sup>[7]</sup>; ApNPV P11 蛋白 GenBank 数据库同源区搜索采用 PSI-BLAST 程序在线服务进行<sup>[8]</sup>; 多序列比对分析采用软件 ClustalX 进行<sup>[9]</sup>; 比对结果编辑及序列一致性计算采用 GeneDoc 软件进行; 系统进化树构建采用 MEGA 4.0 软件进行<sup>[10]</sup>。除特殊说明外, 各分析参数均采用默认设置。

## 2 结果与分析

### 2.1 ApNPV *p11* 基因扩增及克隆

*p11* 基因 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1-a, 扩增产物大小约 300 bp, 与 *p11* 基因长度 (309 bp) 相符。将此 PCR 产物切胶回收并克隆到 pGEM-T easy 载体, 获得的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 能够得到与 *p11* 基因大小相同的酶切片段 (图 1-b)。获得的重组质粒经测序证明, 插入片段序列与 *p11* 基因序列完全相同, 说明 *p11* 基因克隆正确, 可用于构建原核表达质粒进行原核表达。



a. PCR 产物; b. 重组质粒; M. DNA 标准分子量。

a. PCR product; b. Recombinant plasmid; M. DNA ladder marker (1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp)。

图 1 *p11* 基因 PCR 扩增及克隆鉴定 (1.0% 琼脂糖)

Fig. 1 PCR amplification and clone identification of *p11* gene (1.0% agarose)

### 3.2 *p11* 基因序列分析

ApNPV *p11* 基因 G+C 含量为 56.3%, 编码 102 个氨基酸 (图 2), 预期分子量 11.2 kDa, 等电点 pI=10.35。核酸序列中有一段直接重复 (N78 与 N225 位, CAACGCGT) 和三段镜像重复 (N70 与 N78 位, CFCGCGCAA; N71 与 N225 位, TCGCGCAAC; N123 与 N224 位, GCGCAACC)。P11 蛋白翻译起始位点 ATG 上游 -2 至 -6 位有一个杆状病毒晚期基因共有基序 (GTAAG)<sup>[11]</sup>, 此共有基序与 *αv-ec43* 基因终止密码子重叠; 翻译终止密码子 (TAA) 下游没有典型的 poly(A) 信号 (AATAAA); 氨基酸序列分析表明 N 端 1~33 位是信号肽序列, 50~72 位是跨膜区, 跨膜区

```
CGCGGAGCCGATTGGGCACGAACGCGTGCCTTTTCTGCAAAAATGACAGCGTGGCCAT -181
CACAATGCGCGGCAGCGTGCCCGTTAACATGCCGATATCAACCCCTTTGAACGTGTTTGA -121
CAATTCCGATTTTGACGAGGTCACGGCTTTAAAGCGGGTAGCCAACCGCGTGCCGTGCA -61
CGGGCTTTTTCGAAGCGCGTGACCGTGACGCGGTGCGCTACAATTACTTTTGTAAAGC -1
                                odv-ec43 → |
ATGGTACAGCCGTCCCACGTGGTGTGCGCGCTGACCGGCGCGCGCGGCAATCCCATC 60
M V T P S H V V S R L T C G R A C N P I
GTCGACGTCTCTGCGCAACAACGCGTGCGCCACGGACGGTGATCAGTTAAGCCAGTTTGTG 120
V D V L R N N A S P T D G D Q L S Q F V
GCGCGCAACCGGTCTTTAATTAAGAATTTGTCTGTACTCTGCGGGTTTTTGTGGTGA 180
A R N R S L I K E F V L V L C G F L V V
GTAATGATTCTGTGTGTTCTTTACGTTGTCTGATGTCATCATGACCAACGCGTACGCGGAG 240
V M I L L F F T L L I V I M T N A Y A E
CAGACCGCGCGGGTTTCAGTATAAACAGCGCGTGGTGAAAAATTACGCGCGCAACCGCAAC 300
Q T A R V Q Y K Q A L V K N Y G A K P N
GTCGCTAACAGGCAACTATCTTGCTTTTGGCTACGACCGTCCGCGAAAAACGCGTGCT 360
V A *
ATTGTAAACAATGCGTCATTGGGGCATTGACCGCGCAATCTTGCTTTTCGAAAACGGGTG 420
TTCTTGAAAAAGCACGTTCTATTTTAAAGTGGTGCGCCAGCGCTATGCCGGATCTAACACAA 480
TTGTATAAAGCAGAGTGCGTTTAAAGCTGATCGGCAATGACATTAATGCGCAGTCTTGTT 540
TTTCAAGCA 549
灰色阴影表示晚期转录共有基序和转膜区域结构, 删除线表示信号肽序列。
```

The late consensus transcription motif and transmembrane domain was grey shadowed; the signal peptide sequence was delete-lined.

图2 ApNPV *p11* 基因编码区序列

Fig. 2 The sequence of ApNPV *p11* gene coding region

```
OpMNPV : -----MATPSHVVSRTGGRAGNPIVEVIRSNATPTDGDQLESFVARNRSLIKEFVLVLCGFLV : 59
HcNPV : -----MTTPSQVVSRTGGRAGNPIVEVIRNNPTPTDGDQLESFVKRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 59
CfMNPV : -----MATPSHVVSRTGGRAGNPIVEVIRNNATPTDGDQLESFVTRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 59
ApNPV : -----MVTPSHVVSRTGGRAGNPIDVLRNNASPTDGDQLESFVARNRSLIKEFVLVLCGFLV : 59
CfDefNPV : MPCTTTTFCKNMATPSHVVARGGGRAGNPITIEAIRNHASPTDGDQLESFVTRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 70
AgMNPV : MLCNTTTFCKNMATPSHVVARGGGRAGNPITIEIRNHASPTDGDQLESFVTHNRSLIKEFVLVLCGFLV : 70
MaviMNPV : -----MKPTPADIISRATGGRAGNPIDVLIQANNSPTDGDQLESFVNRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 60
RoMNPV : -----MKPTAADIISRATGGRAGNPIDVLIQANNSPTDGDQLESFVNRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 60
AcMNPV : -----MKPTAADIISRATGGRAGNPIDVLIQANNSPTDGDQLESFVNRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 60
BmNPV : -----MKPTAADIISRATGGRAGNPIDVLIQANNSPTDGDQLESFVNRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 60
EppoNPV : -----MATPSVVARGGGRAGNPIDVIRNHTSPTDGDQLESFVTRNRSLIKEFVLVLCGFLV : 59
SpltMNPV : -----N-----TLNEDVTQPSVLDYDQLGGLVSRNRIFLRDFVLVLCGLTV : 43
SfMNPV : -----RRNA---REFET-NTASSVLNQDQLESFVSRNQSFRLDFLLVICIIV : 45
OrleSNPV : -----RR---TANVLGAVPDSVLDYDQLGGLVSRNRVFLRDFIMVLVLCIIV : 44
HearNPV-G4 : -----RHRNGTVAVFADNTVPASILDYDQINQVVTNRNTRFLRDFVLVLIASLVI : 49
HzNPV : -----RHRNGTVAVFADNTVPASILDYDQVNVVVTNRNTRFLRDFVLVLIASLVI : 49
LeseNPV : -----N-----ALYENATRQPSVLDYDQLGGLVSRNRFLRDFMLVLVLCALFV : 43
ChchMNPV : -----RRMA---RTLGG-SDTNSILNQDQLESFVNRNQSFRLDFLLVICGVV : 45
TnSNPV : -----RRMA---RTIGGDSNTNSILNQDQLESFVNRNQSFRLDFLLVICGVV : 46
AgseNPV : -----RQNN---RYPET-GSASSVLNQDQLESFVSRNQSFRLDFLLVICSVIV : 45
AdhoNPV : -----NYTA---AQYTN---NSILYADQLTDLISNRSEFKDYLLVLCALFV : 42

OpMNPV : VMIIILFFTLVLAHLTNAYAVQVGQAQFERALQRYAPPTDASARASTA----- : 108
HcNPV : EIMIIILFFTLVVVMNNAHAVRIQAQFERALKNYAPPNA----- : 100
CfMNPV : IIMIIILFFTLVLVLLTNAYAVQSEQAQFERALKNYAPPGV----- : 100
ApNPV : VVMIIILFFTLIVIMTNAYAEQTAQVQYQALKNYGAKPNVA----- : 102
CfDefNPV : VVMIVLFFMLVVMITNAQAVETEVOFEKALKNYGVALNQMHKKIME----- : 119
AgMNPV : VVMIVLFFTLVLVIMTNEQTVKTEVOFEQALKNYGVAPKEDA----- : 114
MaviMNPV : EIMIVLFFMLVLVILLNQETITEQKQYETTLKNYDIRNRNI----- : 103
RoMNPV : EVMIVLFFMLVLVILLNQETITVQKQYETTLKNYDIRNRNATK----- : 105
AcMNPV : EVMIVLFFMLVLVILLNQETITVQKQYETTLKNYDIRNRNATI----- : 105
BmNPV : EVMIVLFFMLVLVILLNQETITVQKQYETTLKNYDIRNRNATT----- : 105
EppoNPV : VIMIVLFFTLVLVILLINAQNTQTEHLHFEQALKNYGKPKQV----- : 101
SpltMNPV : EIVIVFEMLVVYNINETVRLEEYESTRQRYKNYDFTRTVPATETSAERAARLLETSPSRRLNT : 112
SfMNPV : EVILLLEFLLVSVSNKSMEISTAQLERQRTFANLRLRARTAPAVIDLNRPQKTAQIPTSVLAPPAPT : 114
OrleSNPV : EVIIVAFILFVLVPMATNKEQHDKFTQEQQRLANIDYRNA----- : 85
HearNPV-G4 : EVMIVTEIARIYSIQKSLELQVARQKLNETLKNYDYRTNRNIR----- : 94
HzNPV : EVMIVTEIARIYSIQKSLELQVARQKLNETLKNYDYRTNRNIR----- : 94
LeseNPV : EVMIVFELIFNHSRTVEMNRLEE---MRYKNYDYTGRTVPPPTNPANIDTLPFPVRATTIPLGS : 108
ChchMNPV : EIVCLLEFIVLIFNHSSEARERQQRQKQTEANLDYRYRQPNSSFNK----- : 94
TnSNPV : EIVCLLEFIVLIFNHSSEIETRERQILQRQTEANLDYRYRQPER-QNQ----- : 94
AgseNPV : EVMIVLEIVINNHNKSVELANYIIDRQRAYANLRLRARTPTKMIDLRNP---AAATIDVAAKPA-- : 109
AdhoNPV : LVMITLVLLLTTFK-----QSERIETYASMLDYRMROQ----- : 78
```

图3 21种杆状病毒P11蛋白氨基酸序列比对分析

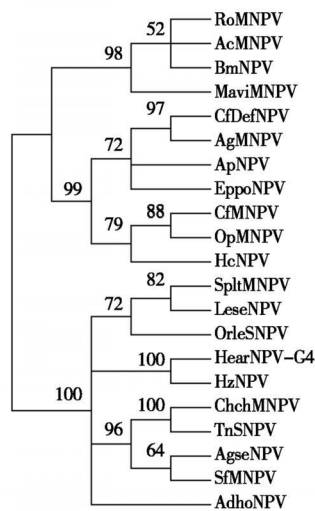
Fig. 3 Alignment of 21 baculovirus P11 protein sequences

恰好与疏水性区域相一致; 序列的 1~ 100 位为杆状病毒 11 kDa 蛋白结构域。P11 蛋白氨基酸组成中含量较多的为: Val( 15/ 102)、Leu( 12/ 102) 和 Ala( 9/ 102); 含量较少的氨基酸为: Cys( 1/ 102)、His( 1/ 102) 和 Glu( 2/ 102); 不含有 Trp。抗原决定簇分析表明, 有 5 段氨基酸序列具有抗原性分别为 4- ISHVSR- 10, 17- GNHVDV- 23, 35- QLSQFVARN- 43, 46- LIKEFVLM- CGFLVVMILLFFILLNIM- 74, 81- QTA RVQYKQALVKN- 94, 说明该蛋白具有免疫原性, 可用于制作多克隆抗体。

### 2.3 P11 蛋白同源性及进化分析

PSI- BLAST 搜索表明有 20 种核型多角体病毒蛋白在默认 E- value 阈值条件下与 ApNPV P11 蛋白有显著性匹配, GV 类、双翅目来源的 CuniNPV、膜翅目来源的 NeseNPV、NeleNPV 及 NeabNPV 没有 ApNPV P11 蛋白同源区。比对分析发现 P11 蛋白氨基酸序列中部相对保守, 两端变异较大, 保守性区域与跨膜区、疏水性区域相一致( 图 3)。

系统进化树将核型多角体病毒划分为两大群: 类群 I NPV( 包括 AcMNPV、AgMNPV、ApNPV、BmNPV、CfDefNPV、GMNPV、EppoNPV、HcNPV、MaviMNPV、OpMNPV 和 RoMNPV) 和类群 II NPV( 包括 AdhoNPV、AgseNPV、ChchMNPV、HearNPV- G4、HzNPV、LeseNPV、OrleSNPV、SfMNPV、SpltMNPV 和 TrSNPV)( 图 4)。ApNPV 属于 NPV 类群 I, 且与 EppoNPV、AgMNPV、CfDefNPV 亲缘关系相对较近, 与 AcMNPV、BmNPV、MaviMNPV、RoMNPV 亲缘关系相对较远。通



用 N- J 法构建无根树, 数字表示 1 000 次重复的支持百分率, 支持率低于 50% 已被删除。  
Unrooted trees were generated using neighbor joining method.  
Numbers indicate percentage support, per 1 000 bootstrap replications.  
Percentage lower than 50 percent were cut off.

图 4 21 种杆状病毒 P11 蛋白进化分析  
Fig. 4 Phylogenetic analysis of baculovirus P11 proteins

过氨基酸序列两两比对并计算序列一致性和相似性发现, ApNPV 同类群 I NPV 的一致性为 52%~ 74%, 相似性为 69%~ 90%; 同类群 II NPV 的一致性为 18%~ 27%, 相似性为 35%~ 52%; 与 ApNPV 一致性最高的是 GMNPV, 最低的是 LeseNPV。

### 3 讨论

柞蚕核型多角体病危害柞蚕历史悠久, 在我国最早的柞蚕专著《养蚕成法》中即有记载, 目前除卵面消毒外尚无有效控制措施。有关 ApNPV 的研究虽有一些进展<sup>[11, 12]</sup>, 但与其他杆状病毒相比仍相对落后。阐明 ApNPV 分子遗传机理是有效控制脓病爆发及优化 ApNPV 宿主载体表达系统的关键, 而生物信息学分析则是分子生物学、分子遗传学及基因功能研究的一部分, 是前提和基础。本研究主要报告了 ApNPV *p11* 基因的克隆及生物信息学分析结果, 从理论上确定了 P11 蛋白是一个晚期表达的膜相关蛋白, 其预期分子量为 11. 2 kDa, 可用作抗原制作抗体, 这一结果与本研究组后续研究结果相一致<sup>[4]</sup>。跨膜区与疏水性区域及氨基酸序列的保守性相一致说明该区域可能是该蛋白的功能决定性区域。研究中核型多角体病毒被划分两大类群与已有报道相符<sup>[13]</sup>, ApNPV 与 EppoNPV、AgMNPV、CfDefNPV 等亲缘关系较近并被划分为类群 I NPV 也与已有研究相符<sup>[14, 15]</sup>, 但与 ApNPV 亲缘关系最近的 NPV 并非是其氨基酸序列一致性最高的 GMNPV, 这是因为序列同源性和序列一致性、序列相似性是完全不同的概念, 也与构树方法及所采用构树模型和参数有关。

### 参考文献:

[1] Blissard G W, Rohmann G F. Baculovirus diversity and molecular biology[ J]. Annu Rev Entomol, 1990, 35: 127- 155.  
[2] Theilmann, D A, Blissard G W, Bonning B, et al. Baculoviridae[ C]// Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier: New York, N Y, 2005: 177- 185.  
[3] 石生林, 潘敏慧, 鲁成. 柞蚕核型多角体病毒 *Pst* I- B、C 片段克隆及序列分析[ J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27( 1): 81- 85.  
[4] Shi S L, Pan M H, Lu C. Characterization of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus *p11* gene, a homologue of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus orf108 [ J]. Virus Genes, 2007, 35( 1): 97- 101.  
[5] Chen W, Li Z, Li S, et al. Identification of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus ORF97, a novel protein as-

- sociated with envelope of occlusion- derived vius[J]. *Virus Genes*, 2006, 32( 1) : 79- 84.
- [ 6] Kolaskar A S, Tongaonkar P C. A semi- empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens[ J]. *FEBS Lett*, 1990, 276( 1- 2) : 172- 174.
- [ 7] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, *et al*. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools[ J]. *Nat Protoc*, 2007, 2( 4) : 953- 971.
- [ 8] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al*. Gapped BLAST and PSI - BLAST: a new generation of protein database search programs[ J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 ( 17) : 3389- 3402.
- [ 9] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2. 0[ J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 ( 21) : 2947- 2948.
- [ 10] Tamura, K, Dudley J, Nei M, *et al*. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis ( MEGA ) software version 4. 0 [ J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24( 8) : 1596- 1599.
- [ 11] 石生林, 王学英, 刘 限, 等. 柞蚕核型多角体病毒研究进展[ J]. *沈阳农业大学学报*, 2003, 34( 1) : 72- 74.
- [ 12] 王学英, 石生林, 李 群. 柞蚕核型多角体病毒宿主载体表达系统的研究现状及展望[ J]. *沈阳农业大学学报*, 2007, 38( 3) : 259- 264.
- [ 13] Hemiou E A, Olszewski J A, Cory J S, *et al*. The genome sequence and evolution of baculoviruses[ J]. *Annu Rev Entomol*, 2003, 48: 211- 234.
- [ 14] Fan Q, Li S, Wang L, *et al*. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*[ J]. *Virology*, 2007, 366( 2) : 304 - 315.
- [ 15] Wang W, Zhu S, Wang L, *et al*. Cloning and sequence analysis of the *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus *gp64* gene [ J]. *J Biosci*, 2005, 30( 5) : 605- 610.