

Importin α/β 与 importin β 双重途径介导鹿眼蛱蝶浓核病毒结构蛋白 VP1 入核转运

彭倩^{1,2}, 谢田¹, 邱欣妍¹, 陈振中^{1,2}, 傅悦^{1,2}, 谌祖文^{1,2*}

1 黄冈师范学院 生物与农业资源学院, 湖北 黄冈

2 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈

彭倩, 谢田, 邱欣妍, 陈振中, 傅悦, 谌祖文. Importin α/β 与 importin β 双重途径介导鹿眼蛱蝶浓核病毒结构蛋白 VP1 入核转运[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 352-363.

PENG Qian, XIE Tian, QIU Xinyan, CHEN Zhenzhong, FU Yue, CHEN Zuwen. Dual pathways of importin α/β and importin β mediate the nuclear translocation of the structural protein VP1 of *Junonia coenia* densovirus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(1): 352-363.

摘要: 【目的】分析鹿眼蛱蝶浓核病毒(*Junonia coenia* densovirus, JcDV)结构蛋白 VP1 在棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)表皮细胞系 HaEpi 内的入核转运动态及转运途径, 为明确 JcDV 的装配与增殖过程提供理论依据。【方法】构建与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合表达的 VP1 野生型、突变体质粒, 转染至 HaEpi 细胞内, 分析 VP1 的亚细胞定位动态特征, 鉴定核定位信号(nuclear localization signal, NLS)及关键氨基酸残基; 克隆 HaEpi 细胞表达的入核转运受体基因, 构建与红色荧光蛋白 DsRed2 融合表达的质粒, 分析其亚细胞定位; 采用共定位、免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)技术分析 VP1 与入核转运受体的相互作用。【结果】转染后 6 h, VP1 定位于细胞质内, 之后直至 48 h 逐渐转运至细胞核内; VP1 的 NLS 位于 325-EGTKRKADTPVEEGPSKKGAAH-345, 其中 K328、R329、K341 是影响核定位的关键氨基酸残基。入核转运受体 Haimp α 1、Haimp α 4、Haimp α 7 定位于细胞核内, 而 Haimp β 1 主要位于细胞核膜周围。共定位与 Co-IP 结果表明, VP1 与 Haimp α 1、Haimp α 4、Haimp β 1 存在相互作用, 但与 Haimp α 7 无相互作用。【结论】JcDV 结构蛋白 VP1 可通过 importin α/β 和 importin β 双重途径转运入核。

关键词: 浓核病毒; 结构蛋白; 核定位信号; 入核转运受体; 入核转运途径

资助项目: 国家自然科学基金(32070483); 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心开放基金(202141404); 麻城市农业外来入侵物种普查项目(20120220267)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070483), the Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains (202141404), and the Census Project of Agricultural Alien Invasive Species in Macheng (20120220267).

*Corresponding author. E-mail: zuwenchen@hgnu.edu.cn

Received: 2025-07-13; Accepted: 2025-08-20; Published online: 2025-09-12

Dual pathways of importin α/β and importin β mediate the nuclear translocation of the structural protein VP1 of *Junonia coenia* densovirus

PENG Qian^{1,2}, XIE Tian¹, QIU Xinyan¹, CHEN Zhenzhong^{1,2}, FU Yue^{1,2}, CHEN Zuwen^{1,2*}

1 College of Biology and Agricultural Resources, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei, China

2 Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Huanggang, Hubei, China

Abstract: [Objective] We explored the nuclear translocation dynamics and pathways of the structural protein VP1 of *Junonia coenia* densovirus (JcDV) in the epidermal cell line HaEpi derived from the larvae of *Helicoverpa armigera*, aiming to provide theoretical support for clarifying the assembly and proliferation processes of JcDV. [Methods] The wild-type and mutant plasmids of VP1 protein fused with green fluorescent protein (GFP) were constructed and transfected into HaEpi cells. Subsequently, the subcellular localization dynamics of the VP1 protein were analyzed, and the nuclear localization signal (NLS) and key amino acid residues of the protein were identified. The importin genes expressed by HaEpi cells were cloned. Subsequently, the plasmids of importins fused with DsRed2 were constructed to analyze their subcellular localization. The co-localization and co-immunoprecipitation (Co-IP) assays were employed to analyze the interactions between VP1 protein and importins. [Results] The VP1 protein was located in the cytoplasm at 6 h post transfection, and then gradually translocated to the nucleus until 48 h. The NLS of VP1 protein was located at 325-EGTKRKADTPVEEGPSKKGAAH-345, among which K328, R329, K341 were the key amino acid residues affecting the nuclear localization. The importins Haimp α 1, Haimp α 4, and Haimp α 7 were located in the nucleus, while Haimp β 1 was mainly located around the nuclear membrane. The co-localization and Co-IP results indicated that the VP1 protein interacted with Haimp α 1, Haimp α 4, and Haimp β 1 but not with Haimp α 7. [Conclusion] The structural protein VP1 of JcDV can be translocated into the nucleus through the dual pathways of importin α/β and importin β .

Keywords: densovirus; structural protein; nuclear localization signal; importin; nuclear translocation pathway

鹿眼蛱蝶浓核病毒 (*Junonia coenia* densovirus, JcDV) 是一种无囊膜、呈正二十面体对称的单链 DNA 病毒, 隶细小病毒科浓核病毒亚科原双义浓核病毒属 (Protoambidensovirus)^[1-3]。JcDV 可侵染鳞翅目夜蛾科的多种害虫, 如棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 等^[4-6], 致使害

虫的脂肪体、气管、表皮等组织发生感染, 最终虫体因缺氧等生理因素而死亡^[7]。JcDV 的基因组全长为 6 032 个脱氧核糖核苷酸, 包含 4 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)。ORF1 通过漏扫描 (leaky scanning) 方式编码 4 个结构蛋白 (viral structural protein, VP), 即 VP1、VP2、VP3 和 VP4, 它们具有相同的羧基末端, 仅在

氨基末端序列上存在差异^[8], 并且按照 1:9:9:41 的比例组装成含有 60 个亚基的衣壳^[1]; ORF2、ORF3、ORF4 分别编码 3 个非结构蛋白(non-structural protein, NS), 即 NS1、NS2 和 NS3^[8]。

浓核病毒通过调控宿主细胞 S 期复制机器在细胞核内完成基因组的复制与增殖^[9-10]。浓核病毒的结构蛋白在宿主细胞表面受体识别、致病力决定、晚期胞内体(endosome)逃逸、病毒基因组递送以及衣壳装配等方面发挥着重要功能^[11-14]。谌祖文报道棉铃虫表皮细胞系(epidermis of *H. armigera*, HaEpi)^[15]是一株适合 JcDV 增殖的受纳细胞系, 并证实 VP1-VP4 均定位于细胞核内^[6]。在 JcDV 的复制周期中, 新合成的结构蛋白必须从细胞质转运至细胞核内进行装配。然而, 作为 JcDV 最大的结构蛋白, VP1 如何转运至细胞核内目前尚不清楚。

蛋白入核转运依赖于细胞核膜上的核孔复合体(nuclear pore complexes, NPCs), 小蛋白可通过被动扩散穿过 NPCs 进入细胞核, 而大蛋白(>50 kDa)则通过主动运输方式入核, 且需要自身携带的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的协助^[16-17]。NLS 通常由一段或多段富含碱性氨基酸残基(K、R)的短序列构成, 可分为经典 NLS 和非经典 NLS。经典 NLS 又进一步分为单分型(monopartite) NLS 和双分型(bipartite) NLS, 前者的序列模式为 K(K/R)X(K/R), 其中 X 代表任意氨基酸残基, 如猿猴空泡病毒 40(simian vacuolating virus 40, SV40)大 T 抗原的 NLS, 其序列为 PKKKRKV^[18]; 后者的序列模式为 (K/R) (K/R)X₁₀₋₁₂(K/R)₃₋₅, 如非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)核质蛋白的 NLS, 其序列为 KRPAATKKAGQAKKKK^[19]。目前, 已在细小病毒科细小病毒亚科的多个属病毒的结构蛋白中发现功能性 NLS^[20-22], 但在浓核病毒亚科中仅报道 Blattambidensovirus 属的德国小蠊浓核病毒(Blattella germanica densovirus 1, BgDV1) VP1 含有 1 个双分型 NLS^[13]。

含有经典 NLS 的货物蛋白的入核转运通常由

importin $\alpha\beta$ 途径介导, 首先入核转运受体 importin α 识别并结合货物蛋白的 NLS, 然后与 importin β 形成三元复合物转运入核^[23-24]。目前, 在哺乳动物细胞中已鉴定出 importin $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 和 $\alpha 8$ ^[17,25], 在昆虫如果蝇、草地贪夜蛾 Sf9 细胞系中各鉴定出 4 种同源蛋白^[26]。研究表明不同 importin α 结合的货物蛋白种类及其亲和力存在差异^[24,27]。此外, 还有一些货物蛋白的 NLS 可直接被入核转运受体 importin β 识别并结合, 通过 importin β 途径转运入核^[28]。目前, 关于细小病毒亚科病毒的结构蛋白利用上述途径入核的报道较多^[29], 而针对浓核病毒亚科病毒的结构蛋白入核转运途径的研究较少, JcDV 的 VP1 通过何种途径转运入核仍不得而知。本研究分析了 JcDV VP1 的入核转运动态特征、NLS 及关键氨基酸残基, 还分析了 VP1 与入核转运受体的相互作用, 明确其入核转运途径, 为阐明 JcDV 的装配与增殖过程提供实验依据, 以期揭示 JcDV 的发病机制(pathogenesis)和害虫防治研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒与质粒

棉铃虫表皮细胞系 HaEpi 由山东大学生命科学学院赵小凡教授惠赠。彭倩等^[30]构建的 JcDV 感染性克隆质粒 pJcDV 由本实验室保存。参考 Gai 等^[31]方法构建的 pie2-EGFP-N1、pie2-DsRed2-N1 空载质粒由本实验室构建并保存。

1.2 主要试剂和仪器

Grace's 昆虫细胞培养基、预染蛋白 marker、TRIzol, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 英克(Invigentech)公司; RNA 提取试剂盒、PrimeScript FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切核酸酶 *BamH* I、*EcoR* I、*Kpn* I, 宝生物工程(大连)有限公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、产物纯化试剂盒, Omega Bio-Tek 有限公司; I-5TM 2×High-

Fidelity Master Mix、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 北京擎科生物科技股份有限公司; FuGENE HD Transfection 试剂, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; Anti-Flag 鼠抗、Anti-GFP 鼠抗, 艾比玛特医药科技(上海)有限公司; Hoechst 33258 染色液、免疫沉淀试剂盒(Protein A+G 磁珠法)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 磷酸盐缓冲液、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 底物试剂盒(特超敏), 安徽白鲨生物科技有限公司。

细胞培养箱, 益世科(上海)企业发展有限公司; PCR 仪, 拓赫机电科技(上海)有限公司; 激光共聚焦显微镜, 仪景通光学科技(上海)有限公司; 蛋白电泳仪与转膜仪, 北京伯兰特仪器设备有限公司; 接触式化学发光成像仪, 易亨特生命科学(上海)有限公司。

1.3 细胞转染与显微观察

将 HaEpi 细胞按每孔 2×10^5 个接种至放有无菌小圆玻片的 48 孔板中, 次日将 0.5 μg 质粒与 1 μL FuGENE HD Transfection 试剂加到 25 μL 无血清 Grace's 培养基中混匀, 静置 30 min, 再补加 100 μL 无血清 Grace's 培养基混匀; 吸弃培养板孔内原培养液, 用无菌 PBS 小心清洗 3 遍, 然后加入混合液孵育 4 h; 换成含 10% FBS 的 Grace's 培养基培养 48 h, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 加入 150 μL Hoechst 33258 染色液染色 10 min; 用 PBS 清洗 3 次, 制片, 使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.4 VP1 NLS 的预测

参考 Yu 等^[14]方法, 采用 NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) 网站预测细小病毒科浓核病毒亚科 Protoambidensovirus 属所有成员, 包括蔗螟浓核病毒(*Diatraea saccharalis* densovirus, DsDV)、大蜡螟浓核病毒(*Galleria mellonella* densovirus, GmDV)、棉铃虫浓核病毒(*Helicoverpa armigera*

densovirus, HaDV)、鹿眼蛱蝶浓核病毒(*Junonia coenia* densovirus, JcDV)、劳氏黏虫浓核病毒(*Mythimna loreyi* densovirus, MIDV)、大豆尺夜蛾浓核病毒(*Pseudoplusia includens* densovirus, PiDV) VP1 的 NLS。同时, 根据 Pan 等^[32]的方法, 使用 DNAMAN 9.0 (Lynnon 公司) 软件对 VP1 的氨基酸序列进行多序列比对, 分析 VP1 NLS 中保守的氨基酸残基。

1.5 重组质粒的构建

根据 JcDV *vp1* 基因序列(GenBank 登录号为 KC883978)分别构建与 GFP、Flag 同框阅读的融合表达质粒 VP1-GFP、Flag-VP1; 再结合 1.4 节的预测结果, 通过反向 PCR、点突变等技术构建 NLS 缺失或其内部单个氨基酸的丙氨酸替换突变体, 方法参考 Liu 等^[33]。从 NCBI BioProject database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>) 获得 HaEpi 细胞系转录组数据(登录号为 PRJNA1242702), 筛选鉴定细胞内表达的所有入核转运受体基因。参照 RNA 提取和反转录试剂盒说明书提取 HaEpi 细胞 RNA 并合成 cDNA, PCR 扩增入核转运受体基因 *importin $\alpha 1$* 、 *$\alpha 4$* 、 *$\alpha 7$* 、 *$\beta 1$* (GenBank 登录号分别为 XM_064042603.1、XM_021341117.3、XM_064037122.1、XM_021328329.3)全长, 分别构建与 DsRed2、GFP 融合表达的重组质粒, 经测序[奥科(武汉)生物科技有限公司]验证构建是否正确。本研究使用的引物如表 1 所示。

1.6 免疫共沉淀与 Western blotting 检测

将 HaEpi 细胞以 8×10^5 个/孔接种至 6 孔板中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 次日将 Flag-VP1 分别与 Haimp $\alpha 1$ -GFP、Haimp $\alpha 4$ -GFP、Haimp $\alpha 7$ -GFP、Haimp $\beta 1$ -GFP 质粒共转染; 48 h 后用预冷的 PBS 清洗 3 遍, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)裂解液裂解 30 min, 12 000 $\times g$ 离心 15 min; 将上清液与 0.3 μg 的 Anti-Flag 鼠抗或对照鼠 IgG 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,

表1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Constructs	Primer sequences (5'→3')
VP1-GFP	Forward: <u>CGGAATTC</u> GCCACCATGTCTTTCTACACGGCCGGGTTAATAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCAAAGTTACCAAGAGTAGCTCCATTAC
Flag-VP1	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCTTTCTACACGG CCGGGTTAATAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> TAAACGTTACCAAGAGTAGCTCCATTAC
VP1 ^{ΔNLS} -GFP	Forward: GATTCACCGATGTCAAACGCTCCACATAACTCGCAAGGTAC Reverse: TGACATCGGTGAATCTGAAAGAGTTTGTCTTC
VP1 ^{K328A} -GFP	Forward: CACCGATGTCAGAGGGAACAGCACGTAAAGCTG Reverse: GCTGTTCCCTCTGACATCGGTGAATCTGAAA
VP1 ^{R329A} -GFP	Forward: CGATGTCAGAGGGAACAAAAGCTAAAGCTGATAC Reverse: GCTTTTGTCCCTCTGACATCGGTGAATCTG
VP1 ^{K330A} -GFP	Forward: TGTCAGAGGGAACAAAACGTGCAGCTGATACTC Reverse: GCACGTTTTGTCCCTCTGACATCGGTGAATC
VP1 ^{K341A} -GFP	Forward: CTGTTGAAGAAGGTCTTCTGAAAAGGTGCTC Reverse: GCAGAAGGACCTTCTCAACAGGAGTATCAGC
VP1 ^{K342A} -GFP	Forward: AAGCAGGTGCTCATAACGCTCCACATAAC Reverse: CCTGCTTTAGAAGGACCTTCTTCAACAGGAG
Haimpα1-DsRed2	Forward: <u>CGGAATTC</u> GCCACCATGTCTGAAAAAATCATTCTTCACG Reverse: <u>GGGGTACCG</u> TTCACCTCCACCTCCAAAGTTAATATTTTGATTGCCTGTAGTTC
Haimpα4-DsRed2	Forward: <u>CGGAATTC</u> GCCACCATGGCGACTGATCAAGTGAAGAACCGC Reverse: <u>GGGGTACCG</u> TTCACCTCCACCTCCGAAGCGGAAGCCCTCGTGCGGGCCGGCGG
Haimpα7-DsRed2	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGTCTGGTGGACACAAACATCGTTAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCGAATTGGAAGCCACCCATTGGAACAGATTG
Haimpβ1-DsRed2	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGCATACGGAAACGACATTAACAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCGCTAGTGAGAGGCGTCTGATGCTTGAGC
Haimpα1-GFP	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGTCTGAAAAAATCATTCTTCACG Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCAAAGTTAATATTTTGATTGCCTGTAGTTC
Haimpα4-GFP	Forward: <u>CGGAATTC</u> GCCACCATGGCGACTGATCAAGTGAAGAACCGC Reverse: <u>GGGGTACCG</u> TTCACCTCCACCTCCGAAGCGGAAGCCCTCGTGCGGGCCGGCGG
Haimpα7-GFP	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGTCTGGTGGACACAAACATCGTTAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCGAATTGGAAGCCACCCATTGGAACAGATTG
Haimpβ1-GFP	Forward: <u>GGGGTACCG</u> CACCATGCATACGGAAACGACATTAACACTTATAC Reverse: <u>CGGGATCCC</u> GTCACCTCCACCTCCGCTAGTGAGAGGCGTCTGATGCTTGAGCTTG

加下划线的字母表示限制性内切酶的酶切位点。

The underlined letters indicate the restriction endonuclease sites.

再与 Protein A+G 磁珠室温孵育 2 h; 用 IP 裂解液清洗磁珠 5 次, 加入洗脱液, 沸水煮 10 min; 12% SDS-PAGE, 在冰水浴、135 mA 下转 PVDF 膜 1.5 h, 5% 脱脂奶粉封闭过夜; 按 1:4 000 稀释比用 Anti-Flag、Anti-GFP 鼠抗 4 °C 孵育过夜, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 以 1:5 000 稀释, 室温孵育 1 h; 加入适量 ECL 化学发光液显色 1 min, 使用接触式化学发光成像仪扫描成像。

2 结果与分析

2.1 VP1 的亚细胞定位动态与超表达分析

将 *vp1* 基因连接到 *pie2*-EGFP-N1 空载体上, 提取质粒后测序, 测序结果显示重组质粒构建成功, 命名为 VP1-GFP。将其转染 HaEpi 细胞, 于不同时间点制片观察。结果显示 VP1 于转染后 6 h 位于细胞质内; 18 h 后主要位于细

胞核内, 且形成点状化的聚集; 24-48 h 细胞核内表达量逐渐增加(图 1A), 表明 VP1 发生由细胞质到细胞核的入核转运。构建与 Flag 标签融合表达的质粒 Flag-VP1, 将其转染 HaEpi 细胞 48 h 后制样, Western blotting 结果显示除检测到预期大小 89.9 kDa 条带外, 还检测到分子量略偏大的另一条带(图 1B)。

2.2 VP1 NLS 的鉴定与关键氨基酸残基分析

通过 NLS Mapper 分析 Protoambidensovirus 属所有成员 VP1 的 NLS, 结果显示均含有一个双分型 NLS 基序 $\text{EXTKRKA(D/G)(S/T)(S/P)(A/V)XE(T/G)P(A/S)KKG(A/T)(T/H)}$, 其中 X 代表

任意氨基酸残基, 下划线表示碱性氨基酸残基(表 2), 表明该属 VP1 NLS 的序列与位置非常保守。进一步构建 JcDV VP1 NLS 缺失、丙氨酸替换碱性氨基酸残基的突变体质粒, 转染 HaEpi 细胞后 48 h 制片观察, 结果显示 $\text{VP1}^{\Delta\text{NLS}}$ 在核质中均匀分布; $\text{VP1}^{\text{K328A}}$ 、 $\text{VP1}^{\text{R329A}}$ 、 $\text{VP1}^{\text{K341A}}$ 在核质均有分布, 但主要位于细胞核内; $\text{VP1}^{\text{K330A}}$ 、 $\text{VP1}^{\text{K342A}}$ 完全定位于细胞核内, 表明 325-EGTKRKADTPVEEGPSKKGAAH-345 是 JcDV VP1 的 NLS, 其中 K328、R329、K341 是影响核定位的关键氨基酸残基(图 2)。

2.3 入核转运受体的亚细胞定位分析

将 HaEpi 细胞内表达的入核转运受体基因

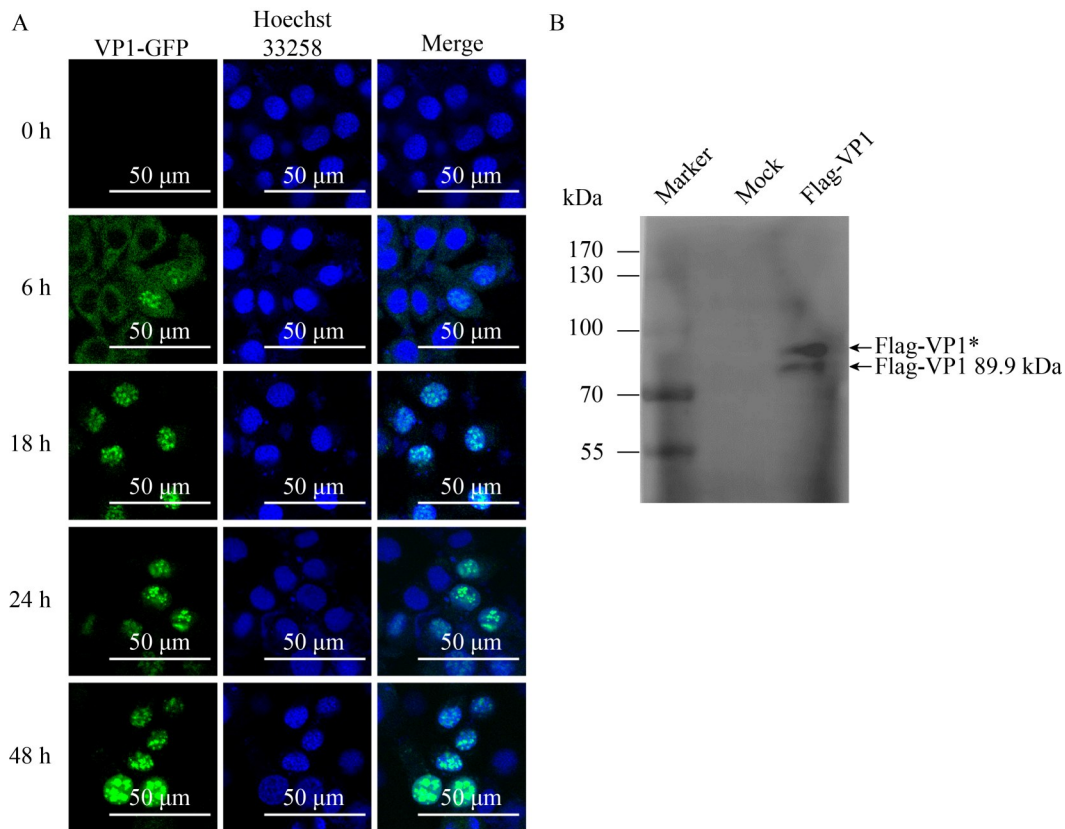


图1 VP1的亚细胞定位观察与超表达检测。*: 发生修饰的Flag-VP1。

Figure 1 Observation of subcellular localization of VP1 and detection of overexpressed VP1. A: The subcellular localization of VP1 in HaEpi cells at 0-48 h. B: The detection of overexpressed VP1 in HaEpi cells (Lane Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder; Lane Mock: The blank control; Lane Flag-VP1: Transfected with Flag-VP1 plasmid). * Modified Flag-VP1.

表2 Protoambidensovirus属所有成员VP1的NLS预测

Table 2 NLS prediction of VP1 proteins for all members of Protoambidensovirus

Species	Virus	NLS sequence of VP1	Position (AA)
<i>Diatraea saccharalis</i> densovirus	DsDV (NC_001899)	EST <u>K</u> R <u>K</u> ADTPAEETPS <u>K</u> <u>K</u> GAH	325–345
<i>Galleria mellonella</i> densovirus	GmDV (NC_004286)	EAT <u>K</u> R <u>K</u> ADSPA <u>V</u> ETPA <u>K</u> <u>K</u> GTT	326–346
<i>Helicoverpa armigera</i> densovirus	HaDV (JQ894784)	EAT <u>K</u> R <u>K</u> ADTPAEEG <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>K</u> GAH	325–345
<i>Junonia coenia</i> densovirus	JcDV (KC883978)	EGT <u>K</u> R <u>K</u> ADTPVEEG <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>K</u> GAH	325–345
<i>Mythimna loreyi</i> densovirus	MIDV (NC_005341)	EPT <u>K</u> R <u>K</u> AGSSAAETPA <u>K</u> <u>K</u> GAT	326–346
<i>Pseudoplusia includens</i> densovirus	PiDV (NC_019492)	EGT <u>K</u> R <u>K</u> ADSPVEEG <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>K</u> GAH	325–345

DsDV、GmDV、HaDV、JcDV、MIDV 与 PiDV 的 VP1 登录号分别为 NP_046815.1、NP_694830.1、AFK91983.1、AGO32183.1、NP_958101.1、YP_007003825.1；下划线表示NLS中碱性氨基酸残基；AA (amino acid)表示肽段位置。

The VP1 protein accession numbers of DsDV, GmDV, HaDV, JcDV, MIDV, and PiDV are NP_046815.1, NP_694830.1, AFK91983.1, AGO32183.1, NP_958101.1, and YP_007003825.1, respectively. The basic amino acid residues within NLS are underlined. AA (amino acid) indicates the peptide position.

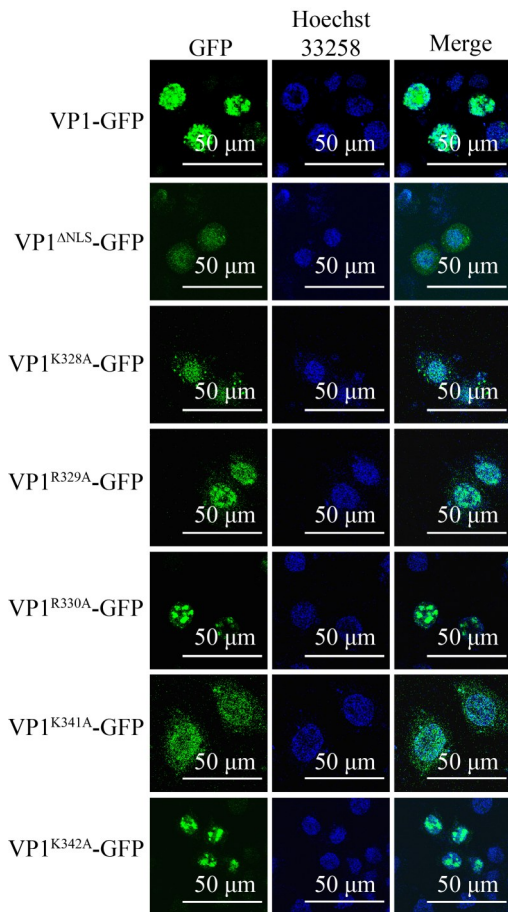


图2 NLS缺失与丙氨酸替换VP1突变体的亚细胞定位
Figure 2 Subcellular localization of VP1 mutants with NLS deletion and alanine replacement.

importin a1、*a4*、*a7*、*β1* 分别连接到 *pie2*-DsRed2-N1 空载体中，提取质粒并测序。测序

结果显示重组质粒构建成功，分别命名为 Haimpα1-DsRed2、Haimpα4-DsRed2、Haimpα7-DsRed2、Haimpβ1-DsRed2，再分别将上述重组质粒转染 HaEpi 细胞，48 h 后制片观察。结果显示 Haimpα1、Haimpα4、Haimpα7 定位于细胞核内；Haimpβ1 主要位于细胞核膜周围，且在细胞质与细胞核中均有少量点状化聚集体(图 3)。



图3 入核转运受体的亚细胞定位观察
Figure 3 Observation of subcellular localization of the importins.

2.4 VP1 与入核转运受体的共定位分析

将 VP1-GFP 分别与 Haimp α 1-DsRed2、Haimp α 4-DsRed2、Haimp α 7-DsRed2、Haimp β 1-DsRed2 质粒共转染 HaEpi 细胞, 48 h 后制片观察。结果显示 VP1 与 Haimp α 1、Haimp α 4、Haimp β 1 存在点状化共定位, 但与 Haimp α 7 无明显共定位(图 4)。

2.5 VP1 与入核转运受体的 Co-IP 分析

将 Flag-VP1 与 Haimp α 1-GFP、Haimp α 4-GFP、Haimp α 7-GFP、Haimp β 1-GFP 质粒分别共转染 HaEpi 细胞, 48 h 后进行 Co-IP。Western blotting 结果显示: VP1 可拉下 Haimp α 1、Haimp α 4、Haimp β 1 蛋白, 但不能拉下 Haimp α 7 蛋白, 表明除 Haimp α 7 外, VP1 可与其余 3 种入核转运受体相互作用(图 5)。

3 讨论与结论

单链 DNA 病毒通常在宿主细胞核内完成基

因组复制和衣壳装配, 而病毒蛋白的核定位是病毒增殖、病原发生的重要环节^[14]。Vendeville 等^[34]报道 JcDV 病毒粒子通过网格蛋白(clathrin)介导的内吞途径进入舞毒蛾(*Lymantria dispar*)卵巢细胞系 Ld652 内。Zádori 等^[12]证实 VP1 氨基末端特有的磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 基序对于病毒粒子从晚期胞内体逃逸至关重要。随后 JcDV 如何转运至细胞核内尚不清楚, 推测 JcDV 入核转运过程与其衣壳蛋白表面暴露的 NLS 有关。此外, 宿主细胞质中新合成的 VP1-VP4 需要转运至细胞核内^[6], 然后与病毒基因组装配, 推测这一过程也与其携带的 NLS 密切相关。本研究发现 VP1 发生明显的入核转运, 证实其含有 1 个双分型 NLS, 其中 K328、R329、K341 突变导致 VP1 亚细胞定位明显改变, 推测这 3 个残基可能是 NLS 与入核转运受体互作的关键残基。VP1 超表达结果显示产生 1 条比预期大小偏大的条带, 这与 BgDV1 结构蛋白的超表达结果类似^[13], 推测与蛋白修饰有关。本研

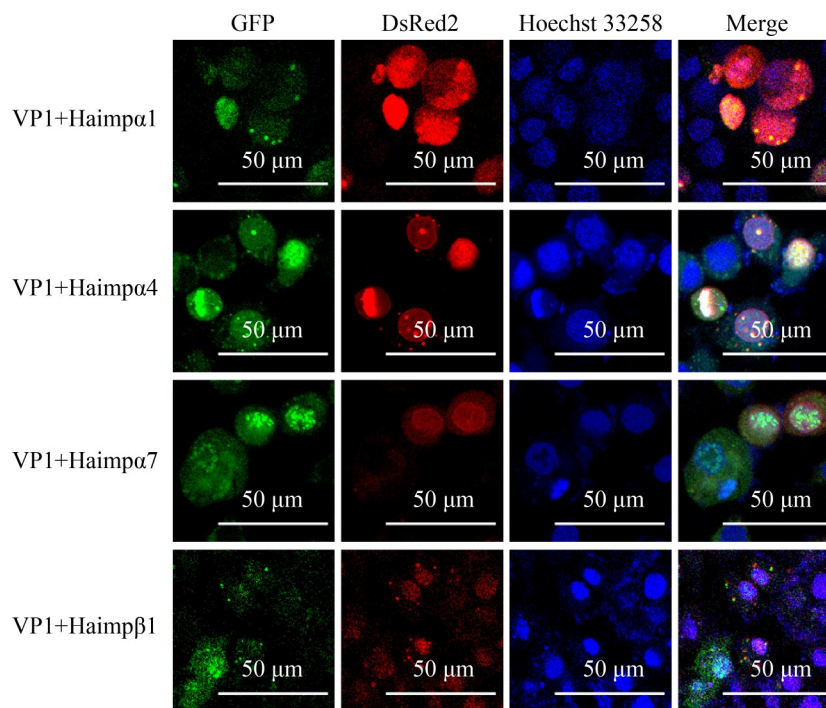


图4 VP1与入核转运受体的共定位

Figure 4 Colocalization of VP1 protein and the importins.

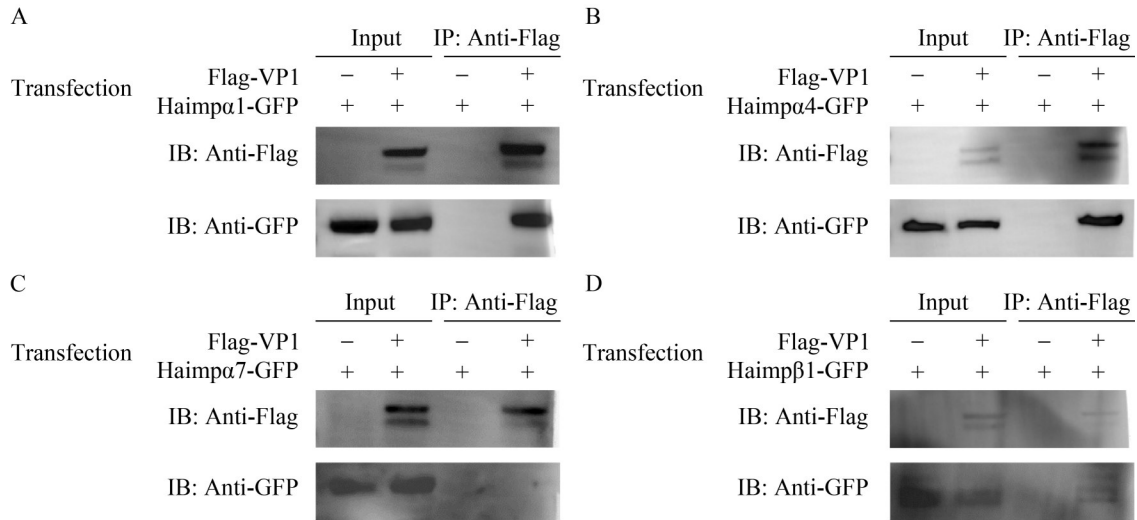


图5 VP1与入核转运受体的Co-IP检测

Figure 5 Co-IP detection of VP1 protein and the importins. HaEpi cells were co-transfected with Flag-VP1 plasmid and a plasmid expressing GFP-tagged importin Haimpα1 (A), Haimpα4 (B), Haimpα7 (C), or Haimpβ1 (D). After transfection for 48 h, the cell lysates were subjected to immunoprecipitation with Anti-Flag antibody, followed by Western blotting with Anti-Flag antibody and Anti-GFP antibody, respectively.

究还发现 Protoambidensovirus 属所有成员的 VP1 NLS 序列与位置非常保守, 提示可能具有相同的人核转运途径。目前, 浓核病毒亚科中仅从 BgDV1 VP1 氨基端鉴定出 1 个 NLS^[13], 不同浓核病毒属间 VP1 NLS 是否保守还需深入研究。Croizier 等^[35]报道 JcDV 的 VP1-VP4 均可单独装配成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs), 且 VLPs 的装配与这 4 种蛋白的比例无关。本研究中鉴定的 NLS 仅存在于 VP1-VP3 的氨基端, 无 NLS 的 VP4 如何入核参与衣壳装配仍不清楚。Valle 等^[36]推测无 NLS 的浓核病毒结构蛋白通过与含有功能性 NLS 的其他结构蛋白形成复合体, 由后者介导入核转运。VP4 蛋白是否采取这种方式入核还需进一步证实。

携带经典 NLS 的货物蛋白可被入核转运受体 importins 识别结合, 且主要通过 importin α/β 途径转运入核^[24,37]。目前, 许多真核生物体内 importin α 家族成员已经被鉴定, 如人类拥有 7 个 importin α 成员, 并且基于序列同源性, 它们被分成 3 个亚家族; 酵母仅编码 1 个 importin α;

果蝇含有 4 个 importin α^[17,38-40]。鳞翅目昆虫中仅报道草地贪夜蛾含有 4 个 importin α1、α2、α4、α7^[26]。本研究从 HaEpi 细胞系转录组中鉴定出 3 个 importin α1、α4、α7, 1 个与人类高度同源的 importin β1。亚细胞定位结果显示仅 importin β1 位于核膜周围, 其余 3 个均位于细胞核内, 提示它们可能在蛋白入核转运方面具有重要功能。Cao 等^[23]报道猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 的 NS1 可与猪肾 PK-15 细胞系内 importin α5、α7 结合; Chen 等^[26]报道苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 编码的 DNA 聚合酶可与草地贪夜蛾 Sf9 细胞系内 importin α1、α4、α7 结合, 表明多种入核转运受体可与同一个货物蛋白相互作用。本研究中共定位结果显示 VP1 与 Haimpα1、Haimpα4、Haimpβ1 存在明显共定位, 暗示后者可能是 VP1 的入核转运受体。

目前, 有关细小病毒蛋白的入核转运途径在细小病毒亚科中已有较深入研究^[41], 如 PPV

的 NS1 通过 importin α/β 途径入核^[23]; 犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 结构蛋白可直接由 importin β 途径介导入核^[29]; 人类博卡病毒 (human bocavirus) 非结构蛋白 NP1 (non-structural protein 1) 可通过 importin α/β 与 importin β 双途径入核^[42]。浓核病毒亚科中病毒蛋白的入核转运途径研究尚未见报道, 本研究中 Co-IP 结果显示 VP1 分别与 importin α 1、 α 4、 β 1 互作, 表明其也可通过 importin α/β 与 importin β 双途径入核。上述何种途径为介导 VP1 入核转运的主要途径, 下一步还需从 VP1 与入核转运受体的亲和力强弱、入核转运受体的表达量等方面深入研究。此外, Labadie 等^[43]报道 VP1-VP4 通过复制-装配偶联方式直接参与 JcDV 增殖过程, VP1 入核转运对 JcDV 增殖的影响也值得深入研究。

综上所述, 本研究分析鉴定了 JcDV VP1 入核转运的 NLS 与关键氨基酸残基, 并证实其利用 importin α/β 与 importin β 双途径入核转运, 这为阐明 JcDV 的装配与增殖过程提供了重要实验支撑, 为研究 JcDV 的复制周期、发病机制和害虫治理奠定了基础。

致谢

感谢山东大学赵小凡教授提供的 HaEpi 细胞系和实验建议。

作者贡献声明

彭倩: 实验操作、数据处理与分析、论文撰写与修改; 谢田: 实验操作、数据分析; 邱欣妍: 实验操作、数据收集; 陈振中: 协助实验操作、监督管理; 傅悦: 协助实验操作、论文讨论; 谌祖文: 提供资源、研究构思与设计、论文撰写与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] BRUEMMER A, SCHOLARI F, LOPEZ-FERBER M, CONWAY JF, HEWAT EA. Structure of an insect parvovirus (*Junonia coenia* densovirus) determined by cryo-electron microscopy[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 347(4): 791-801.
- [2] PHAM HT, HUYNH OTH, JOUSSET FX, BERGOIN M, TIJSEN P. *Junonia coenia* densovirus (JcDNV) genome structure[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(4): e00591-13.
- [3] MIETZSCH M, PÉNZES JJ, AGBANDJE-MCKENNA M. Twenty-five years of structural parvovirology[J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 362.
- [4] CHEN ZW, YANG YC, ZHANG JF, JIN MH, XIAO YT, XIA ZC, LIU YY, YU SZ, YANG YB, WANG Y, LI Y, LIU KY. Susceptibility and tissue specificity of *Spodoptera frugiperda* to *Junonia coenia* densovirus[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(3): 840-849.
- [5] PIGEYRE L, SCHATZ M, RAVALLEC M, GASMI L, NÈGRE N, CLOUET C, SEVENO M, EL KOULALI K, DECOURCELLE M, GUERARDEL Y, COT D, DUPRESSOIR T, GOSELIN-GRENET AS, OGLIASTRO M. Interaction of a densovirus with glycans of the peritrophic matrix mediates oral infection of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*[J]. *Viruses*, 2019, 11(9): 870.
- [6] 谌祖文. 鹿眼蛱蝶浓核病毒 JcDV 的杀虫毒力及其在昆虫细胞系中的复制研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2021.
- [7] CHEN ZW. Virulence of *Junonia coenia* densovirus to insects and its replication in insect cell lines[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2021 (in Chinese).
- [8] MUTUEL D, RAVALLEC M, CHABI B, MULTEAU C, SALMON JM, FOURNIER P, OGLIASTRO M. Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of infection that leads to hypoxia[J]. *Virology*, 2010, 403(2): 137-144.
- [9] WANG Y, ABD-ALLA AMM, BOSSIN H, LI Y, BERGOIN M. Analysis of the transcription strategy of the *Junonia coenia* densovirus (JcDNV) genome[J]. *Virus Research*, 2013, 174(1/2): 101-107.
- [10] SALASC F, MUTUEL D, DEBAISIEUX S, PERRIN A, DUPRESSOIR T, GRENET AG, OGLIASTRO M. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/target of rapamycin pathway during ambidensovirus infection of insect cells[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(1): 233-245.
- [11] TIJSEN P, PÉNZES JJ, YU Q, PHAM HT, BERGOIN M. Diversity of small, single-stranded DNA viruses of invertebrates and their chaotic evolutionary past[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 140: 83-96.
- [12] MULTEAU C, FROISSART R, PERRIN A, CASTELLI I, CASARTELLI M, OGLIASTRO M. Four amino acids of an insect densovirus capsid determine midgut tropism and virulence[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5937-5941.
- [13] ZÁDORI Z, SZELEI J, LACOSTE MC, LI Y, GARIÉPY S, RAYMOND P, ALLAIRE M, NABI IR, TIJSEN P. A

- viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity[J]. *Developmental Cell*, 2001, 1(2): 291-302.
- [13] KOZLOV EN, MARTYNOVA EU, POPENKO VI, SCHAL C, MUKHA DV. Intracellular localization of *Blattella germanica* densovirus (BgDV1) capsid proteins[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 370.
- [14] YU Q, YAN JX, CHEN Y, ZHANG JF, TANG Q, ZHU FF, SUN LD, MA SS, LIU XY, CHEN KP, YAO Q. Conserved nuclear localization signal in NS2 protein of *Bombyx mori* bidensovirus: a potential invertebrate ssDNA virus trait[J]. *Viruses*, 2025, 17(1): 71.
- [15] SHAO HL, ZHENG WW, LIU PC, WANG Q, WANG JX, ZHAO XF. Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3127.
- [16] LIU P, CHEN S, WANG MS, CHENG AC. The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 80.
- [17] 夏阳, 武斌, 张毅, 李吉达. 核定位信号及其在病毒感染机制中的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 896-905.
- XIA Y, WU B, ZHANG Y, LI JD. Research progress of nuclear localization signal in virus infection mechanism[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 896-905 (in Chinese).
- [18] KALDERON D, ROBERTS BL, RICHARDSON WD, SMITH AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location[J]. *Cell*, 1984, 39(3 Pt 2): 499-509.
- [19] ROBBINS J, DILWORTH SM, LASKEY RA, DINGWALL C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence[J]. *Cell*, 1991, 64(3): 615-623.
- [20] BOISVERT M, BOUCHARD-LÉVESQUE V, FERNANDES S, TIJSSEN P. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(20): 11748-11759.
- [21] CHEN S, LIU P, HE Y, YANG C, WANG MS, JIA RY, ZHU DK, LIU MF, YANG Q, WU Y, CHENG AC. The 164 K, 165 K and 167 K residues in 160 YPVVKKPKLTEE171 are required for the nuclear import of goose parvovirus VP1[J]. *Virology*, 2018, 519: 17-22.
- [22] LOMBARDO E, RAMÍREZ JC, GARCIA J, ALMENDRAL JM. Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(14): 7049-7059.
- [23] CAO LY, FU F, CHEN JF, SHI HY, ZHANG X, LIU JB, SHI D, HUANG Y, TONG DW, FENG L. Nucleocytoplasmic shuttling of porcine parvovirus NS1 protein mediated by the CRM1 nuclear export pathway and the importin α/β nuclear import pathway[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(1): e0148121.
- [24] CHRISTIE M, CHANG CW, RÓNA G, SMITH KM, STEWART AG, TAKEDA AAS, FONTES MRM, STEWART M, VÉRTÉSSY BG, FORWOOD JK, KOBE B. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(10): 2060-2090.
- [25] TEJOMURTULA J, LEE KB, TRIPURANI SK, SMITH GW, YAO JB. Role of importin alpha8, a new member of the importin alpha family of nuclear transport proteins, in early embryonic development in cattle[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(2): 333-342.
- [26] CHEN GQ, LI P, YAN Q, WU YH, WANG HR, CHAO SF, WU LJ, CHEN L, FENG GZ. Identification of *Spodoptera frugiperda* importin alphas that facilitate the nuclear import of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus DNA polymerase[J]. *Insect Molecular Biology*, 2021, 30(4): 400-409.
- [27] KÖHLER M, SPECK C, CHRISTIANSEN M, BISCHOFF FR, PREHN S, HALLER H, GÖRLICH D, HARTMANN E. Evidence for distinct substrate specificities of importin α family members in nuclear protein import[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(11): 7782-7791.
- [28] PEMBERTON LF, PASCHAL BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export[J]. *Traffic*, 2005, 6(3): 187-198.
- [29] MÄNTYLÄ E, AHO V, KANN M, VIHINEN-RANTA M. Cytoplasmic parvovirus capsids recruit importin beta for nuclear delivery[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(4): e01532-19.
- [30] 彭倩, 陈彦宁, 李如玉, 傅悦, 湛祖文. 鹿眼蛱蝶浓核病毒结构蛋白基因 vp1-4 在草地贪夜蛾幼虫体内的表达动态分析[J]. *昆虫学报*, 2025, 68(8): 1050-1056.
- PENG Q, CHEN YN, LI RY, FU Y, CHEN ZW. Dynamic analysis of expression of *Junonia coenia* densovirus structural genes vp1-4 in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2025, 68(8): 1050-1056 (in Chinese).
- [31] GAI ZC, ZHANG XJ, ISLAM M, WANG X, LI AY, YANG YB, LI Y, PENG JX, HONG HZ, LIU KY. Characterization of Atg8 in lepidopteran insect cells[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2013, 84(2): 57-77.
- [32] PAN X, XIE Y, YAN SW, ZHANG XT, LIU XX, JIAO YZ, GAO F. Characterization of two novel mitoviruses co infecting a single strain of *Fusarium pseudograminearum* causing wheat crown rot[J]. *Archives of Virology*, 2025, 170(4): 83.
- [33] LIU LL, CHEN ZW, YANG YC, XIAO YT, LIU CX, MA YM, SOBERÓN M, BRAVO A, YANG YB, LIU KY. A single amino acid polymorphism in ABCC2 loop 1 is responsible for differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in different *Spodoptera* (Noctuidae) species[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 100: 59-65.
- [34] VENDEVILLE A, RAVALLEC M, JOUSSET FX, DEVISE M, MUTUEL D, LÓPEZ-FERBER M, FOURNIER P, DUPRESSOIR T, OGLIASTRO M. Densovirus infectious pathway requires clathrin-mediated

- endocytosis followed by trafficking to the nucleus[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(9): 4678-4689.
- [35] CROIZIER L, JOUSSET FX, VEYRUNES JC, LÓPEZ-FERBER M, BERGOIN M, CROIZIER G. Protein requirements for assembly of virus-like particles of *Junonia coenia* densovirus in insect cells[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(Pt 6): 1605-1613.
- [36] VALLE N, RIOLOBOS L, ALMENDRAL JM. Synthesis, Post-translational Modification and Trafficking of the Parvovirus Structural Polypeptides[M]. UK, London: Edward Arnold, 2006: 291-304.
- [37] COOK A, BONO F, JINEK M, CONTI E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76: 647-671.
- [38] MIYAMOTO Y, YAMADA K, YONEDA Y. Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions[J]. *Journal of Biochemistry*, 2016, 160(2): 69-75.
- [39] GOLDFARB DS, CORBETT AH, MASON DA, HARREMAN MT, ADAM SA. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor[J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(9): 505-514.
- [40] KELLEY JB, TALLEY AM, SPENCER A, GIOELI D, PASCHAL BM. Karyopherin α 7 (KPNA7), a divergent member of the importin α family of nuclear import receptors[J]. *BMC Cell Biology*, 2010, 11: 63.
- [41] SHI JM, PEI YF, YU Q, DONG H. Progress in the study of parvovirus entry pathway[J]. *Virology Journal*, 2023, 20(1): 61.
- [42] LI Q, ZHANG ZF, ZHENG ZH, KE XL, LUO HL, HU QX, WANG HZ. Identification and characterization of complex dual nuclear localization signals in human bocavirus NP1: identification and characterization of complex dual nuclear localization signals in human bocavirus NP1[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 6): 1335-1342.
- [43] LABADIE T, GARCIA D, MUTUEL D, OGLIASTRO M, CAMBRAY G. Capsid proteins are necessary for replication of a parvovirus[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(17): e0052321.