

# 家蚕浓核病毒(中国镇江株)在不同感受性宿主体内的复制 Replication of *Bombyx mori* Densonucleosis Virus (Zhenjiang isolate) in Different Silkworm Strains

韩 序 姚 勤\* 高 路 王永杰 包 方 陈克平

HAN Xu, YAO Qin\*, GAO Lu, WANG Yong-Jie, BAO Fang and CHEN Ke-Ping

江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

**摘 要** 家蚕浓核病毒中国镇江株是一株双生浓核病毒(bidensovirus)。其宿主感染后的病症与典型的家蚕浓核病毒(BmDENV-1 伊那株)表现相似,病蚕软化,中肠的圆筒型细胞呈浓核症。该病毒的最大特点是基因组中含有二套 DNA 分子(VD1, VD2),这两种核酸分子以单链(+VD1, -VD1, +VD2, -VD2)链型方式被分开包装在各自的衣壳蛋白中,成为四种病毒体,而且它自身编码 DNA 聚合酶。有部分蚕品种对该病毒表现完全抗性,即不发病。分别对敏感性家蚕品种(华八 35)和抗性家蚕品种(秋丰 d)的幼虫进行经口接种病毒。在接种后,从 2h 到 96h 分 9 个时间点,对中肠组织进行取样。以家蚕细胞质肌动蛋白 A3(actin A3)基因作为参比基因,用来标定取样组织细胞数。针对 VD1 和 VD2 分别设计特异引物,用荧光定量 PCR 的方法分别检测各个时间点的样品中的病毒基因组 VD1 和 VD2 拷贝数。结果表明:无论是在感性还是在抗性宿主体内,家蚕浓核病毒中国株的基因组 VD1 和 VD2 在各时间点拷贝数相近,表现出 VD1 和 VD2 是同步复制的,病毒侵入两种宿主中肠的初始量(接种后 2h)基本相等,每个细胞约为 6~10 拷贝数。在敏感性宿主体内病毒感染过程表现为潜伏期、指数增长期、平台期。从接种后 2h 到 12h 为病毒潜伏期;12h 到 36h 为指数增长期,倍增时间为 1.71h,大约扩增 15 次;36h 到 96h 为平台期,进入平台期病毒的拷贝数达到 20 万个。在抗性宿主体内病毒处于一种极低水平的增殖,从添毒后 2h 的 6~10 拷贝数到 96h 的 150~200 拷贝数,病毒复制倍增时间分别为 3h 和 12h,大约扩增 5 次。推测家蚕对浓核病毒中国株的抗病性,只是一种慢性的带毒不发病的表现。

**关键词** 家蚕, 双生浓核病毒, 体内增殖, 荧光定量 PCR

中图分类号 Q939.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0145-07

**Abstract** The invertebrate parvovirus *Bombyx mori* Densonucleosis Virus type 3 (Zhenjiang isolate), named BmDENV-3, is a kind of bidensovirus. The most obvious characteristic in the genome of BmDENV-3 is that it has 2 sets of DNA molecular (VD1, VD2) and each of them is encapsidated respectively in the form of single-stranded linear DNA (+VD1, -VD1, +VD2, -VD2) in equal percentage. So the BmDENV-3 has 4 kinds of virions. Furthermore the sequence of BmDENV-3 is able to encode DNA polymerase itself. Some strains of silkworm revealed complete resistance to BmDENV-3, so they didn't fall sick. To investigate the difference in the process of infection and replication between the 2 virions (VD1, VD2) of this bidensovirus, and the difference of the increment in the resistant or susceptible host, the 5th instar larvae of the susceptible silkworm strain (HUABA 35) and the resistant silkworm strain (QIUFENG d) were inoculated determinate dose of BmDENV-3 by oral ingestion. Then the

Received: July 31, 2006; Accepted: September 4, 2006.

This work was supported by the grants from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (No. BK2006074) and the National Basic Research Program of China (973) (No. 2005CB121000).

\* Corresponding author. E-mail: yaoqin@ujs.edu.cn

江苏省自然科学基金项目 (No. BK2006074), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2005CB121000).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

midgut were collected at 9 timepoints. The silkworm cytoplasm *actin A3* was used to be normalized gene, so the number of cells in collected tissue could be determined. The result shows that whatever in the susceptible silkworm strain or in the resistant one, the copies of VD1 and VD2 in the genome of BmDENV-3 collected at the different timepoint were almost at the equal level respectively, so that the VD1 and VD2 were replicated with synchronization. The process of infection in the susceptible silkworm strain was divided into 3 partitions, latent period (2 ~ 12 hours post inoculation), exponential phase (12 ~ 36 hours post inoculation) and stationary phase (36 ~ 96 hours post inoculation and there are about  $2 \times 10^5$  copies per cell). In the resistant silkworm strain, the virus were replicated at a very low level, that was from 6 ~ 10 copies 2 hours post inoculation to 150 ~ 200 copies 96 hours post inoculation (about 20 times). So we predict that the resistance in some of the silkworm strains from BmDENV-3 was a kind of chronic representation that the host carried virus without being caused flacherie.

**Key words** *Bombyx mori*, bidensovirus, proliferation *in vivo*, fluorescence quantitative PCR

家蚕浓核病毒中国镇江株 (*Bombyx mori* densonucleosis virus, BmDENV-Z 或 BmDENV-3) 是一种特异的、在我国发生的致使家蚕罹患类似浓核症的病原<sup>[1,2]</sup>。浓核病毒是一类直径为 22 ~ 24nm, 二十面体, 单链、线型 DNA 病毒, 其宿主都是无脊椎动物, 病毒的结构特征与感染脊椎动物的细小病毒相似。至今发现的家蚕浓核病毒有 6 株。根据血清学和基因组类型的区别分为两类, 一类是家蚕浓核病毒 I 型 (如日本的伊那株 BmDENV-1), 基因组与其它浓核病毒一样是单个 ssDNA 分子<sup>[3]</sup>; 另一类是家蚕浓核病毒 II 型 (如日本的山梨株 BmDENV-2 和中国镇江株), 基因组中含有二个 ssDNA 分子 (VD1, VD2), 这两种核酸分子以单链 (+ VD1, - VD1, + VD2, - VD2) 线型方式被分开包在衣壳蛋白中, 成为两种病毒体<sup>[4-7]</sup>, 而且该病毒自身编码 DNA 聚合酶<sup>[8]</sup>。由于家蚕浓核病毒 II 型的病毒体结构和基因组形式与通常的浓核病毒有很大的区别, 加拿大大学者 Tijssen P 将该病毒命名为 bidensovirus<sup>[9,10]</sup>, 作者译为双生浓核病毒。

浓核病毒通常能侵染宿主的大部分组织。但是家蚕浓核病毒 BmDENV-1、BmDENV-2 只侵染家蚕中肠圆筒形细胞, 而中肠杯状细胞保持完整。BmDENV-3 在发病的早期感染家蚕中肠圆筒形细胞, 在发病的后期也能感染杯状细胞<sup>[2,11]</sup>。家蚕对 BmDENV 感染有两种表现, 一种是敏感型, 另一种是抵抗型。遗传学分析表明: 家蚕对 BmDENV-1 有隐性不感染 (*nsd-1*) 和显性不感染 (*Nin-1*), *nsd-1* 基因在第 21 染色体 8.3cM, *Nin-1* 在第 17 染色体 31.1 cM; 家蚕对 BmDENV-2 的抵抗力仅发现隐性不感染 (*nsd-2*), 在第 17 染色体 24.5 cM; 家蚕对 BmDENV-3 的抗性基因 *nsd-z* 位于第 15 染色体与眼纹全黑 (*bl*) 基因连锁<sup>[12-15]</sup>。推测家蚕对 BmDENV-3 抵抗力机制不同于前二者。目前, 对浓核病毒侵染宿主的过程、病毒

基因组在宿主体内的复制动态以及家蚕抵抗浓核病毒感染机制尚不清楚。

本研究小组 2005 年完成了家蚕浓核病毒中国株 BmDENV-3 病毒基因组的测序 (GenBank Accession Number: DQ017268, DQ017269), 基因组序列与 BmDENV-2 (日本山梨株) 有较大的同源性, 但基因结构有一定的差异。VD1 全长 6543bp, 有 4 个开放阅读框 (ORF1-ORF4), VD2 全长 6022bp, 有 3 个开放阅读框 (ORF1-ORF3)<sup>[16,17]</sup>。病毒基因组全序列的解析为研究病毒基因组在宿主体内的复制奠定了基础。为了查明该病毒在其天然宿主体内真实和准确的增殖过程, 了解两种病毒粒子 VD1 和 VD2 在同一宿主细胞内是否存在增殖差异; 为了查清病毒究竟是否可以侵入抗性宿主体内, 病毒核酸到底能否在其中复制, 在本研究中, 我们选用对 BmDENV-3 敏感性蚕品种华八 35 和抗性蚕品种秋丰 d 作为试验材料, 采用经口定量滴注病毒的接种方法, 应用荧光定量 PCR 的技术对 BmDENV-3 病毒基因组 (VD1 和 VD2) 在敏感性和抗性宿主中肠组织中的复制拷贝数进行全程定量检测, 以阐明家蚕浓核病毒中国株在不同感受型宿主细胞的复制差异性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试病毒: 所用病毒为 BmDENV-3, 由本实验室保存。

1.1.2 家蚕品种: 敏感的品种华八 35; 抗性品种秋丰 d。这两个品种为本实验室长期蛾区内交配, 添食病毒筛选, 完全纯化的蚕品种。

1.1.3 主要试剂和仪器: 荧光定量 PCR 试剂 TaKaRa SYBR (r) Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time), 病毒基因组提取试剂 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 2.0, 克隆载体 pMD-18T vector

(TAKARA)均购自大连宝生物工程有限公司。核酸蛋白分析仪, Gene spec III( HITACHI Genetic systems ); 荧光定量 PCR 仪, Mx3000P™ 型 PCR 仪( Stratagene USA )。荧光定量 PCR 反应专用管和八联盖购自英国 ABgene 公司。

## 1.2 样本制备方法

**1.2.1 病毒接种液制备** :0.5g BmDENV 病蚕肠干, 5mL 灭菌水研磨、匀浆。10000g 离心 30min, 取上清液。用等体积 0.2mol/L 冰醋酸处理 40min, 用 1% NaCO<sub>3</sub> 将病毒液 pH 调至 7.2 后, 稀释为浓度 20 mg/mL 的病毒液。

**1.2.2 病毒接种方法** :在五龄起蚕 2h, 用微量移液器吸取病毒液 5 $\mu$ L, 滴注于幼虫的口器处, 由其自行全部摄入。添食病毒 1h 后, 全部给予新鲜桑叶常规饲养。经过预试验比较, 该添食方法与常规添食方法将浓度 1mg/mL 病毒涂抹在桑叶上, 给蚕取食 24h, 然后换新鲜桑叶常规饲养, 致病性完全一致。

**1.2.3 取样方法** :分别于添食病毒后 2、12、24、36、48、60、72、84 和 96h 取样。对照区( 添食缓冲液 )在 24h 取样。剖取中肠, 去除内容物和围食膜, 在 4 $^{\circ}$ C 预冷的 0.05mol/L 磷酸缓冲液中洗涤数次, 去除中肠组织表面吸附的桑叶和病毒。每个时间点各取 5 头蚕的中肠组织混合为一个样本。取 25 $\mu$ L 病毒接种液为阳性对照样本。

**1.2.4 样本 DNA 提取** :采用酚-氯仿法抽提, 具体操作参照《分子克隆实验指南》。阳性对照样本( 病毒接种液 )DNA 采用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 2.0 抽提, 按说明书进行。

## 1.3 荧光定量 PCR 检测

试验设置了病毒接种后 9 个时间点取样的处理区: 阳性对照区( 病毒接种液 ); 阴性对照( 添食缓冲液 ); 无模板对照区( NTC )。用荧光染料 SYBR Green I 的定量检测方法, 采用红色 ROX 荧光作为阳性参比信号, 以家蚕细胞质肌动蛋白 A3( Bmactin A3 ) ( Genbank Accession Number : X04507 ) 基因作为参比基因。

**1.3.1 PCR 扩增的靶标和引物** :以 BmDENV-3 VD1 的 ORF4、BmDENV-3 VD2 的 ORF2 和 Bmactin A3 基因序列为靶标, 采用 Primer5.0 软件设计特异性引物。序列如表 1。

引物由上海生物工程技术有限公司合成。BmDENV 的引物序列在 NCBI GenBank 上与家蚕基因组序列进行比对, 未发现有相似区域。

**1.3.2 荧光定量 PCR 反应** :PCR 反应参照 SYBR<sup>®</sup>

Premix Ex Taq™ ( Perfect Real Time ) 试剂盒说明书进行, 反应体系均为 25 $\mu$ L。反应条件 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 扩增 40 个循环( 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s )。在每个循环退火时, 设置仪器自动收集 1 次荧光信号。熔解曲线分析, 设定温度持续上升( 0.1 $^{\circ}$ C/s )至 95 $^{\circ}$ C。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 The special primers in fluorescence quantitative PCR

Target	Sequence of prime	Length of amplification
BmDENV-3 VD1 ORF4	5'-GTTGACCCAGTAGGATAGGATGAC-3' 5'-CTATTACTCCACCAGCAAAGACGA-3'	298bp
BmDENV-3 VD2 ORF2	5'-AGAATATGATCTTAAAGCAGG-3' 5'-GATTAGCAATAGGTTGTGTTT-3'	254bp
Bmactin A3	5'-GGATGTCACGTCGCACCTCA-3' 5'-GCGCGGCTACTCGTTCACCTACC-3'	284bp

**1.3.3 标准曲线** :构建靶标基因的克隆, 将靶标基因的目的片段克隆到 pMD-18T 载体上, 作为标准质粒 pBmDENV-VD1、pBmDENV-VD2、pBmactinA3。经 Gene spec III 测定质粒浓度, 计算出它们的拷贝数。分别 1.0  $\times$  10<sup>1</sup> ~ 1.0  $\times$  10<sup>8</sup> copies/ $\mu$ L 的 8 个梯度浓度稀释质粒。以这 8 个梯度浓度质粒为模板进行荧光定量 PCR 检测, 由定量 PCR 仪自动生成质粒拷贝数 Log 与 Ct 值的标准曲线。每个样本重复 3 次。

## 1.4 数据分析方法

实时定量 PCR 最常用的两种实验数据的分析方法是绝对定量和相对定量。绝对定量通过标准曲线计算起始模板的拷贝数, 相对定量方法则是比较样本之间的 Ct 值差异, 病毒的相对定量采用模板量 = 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 的公式计算<sup>[18, 19]</sup>。以家蚕细胞质肌动蛋白 A3( Bmactin A3 ) 基因作为参比基因来确定各样本组织中的细胞数量, 校正方法为 [ DNA ] 样本拷贝数 / [ DNA ] actin 拷贝数( actin A3 基因在家蚕基因组中的拷贝数是 3 个, 在 2 倍体细胞中的拷贝数为 6, 即可以按 actin A3 基因的每 6 个拷贝数设定为 1 个中肠组织细胞 )。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光定量 PCR 结果的评估

无模板对照( NTC ) Ct 值高于添毒样本最低可信浓度 Ct 值 5 个循环, 阴性对照( 添食缓冲液 )的 Ct 值与无模板对照( NTC ) Ct 值接近, 见表 2。扩增产物的熔解曲线( 图 1 ), 图中 BmDENV VD1、BmDENV VD2 和 actin A3 基因的扩增片段熔解主峰分别在 81 $^{\circ}$ C、78 $^{\circ}$ C 和 89 $^{\circ}$ C, 无其它杂峰。样本 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳显示无非特异性扩增条带和引物二

聚体。证实了所进行的扩增是特异性扩增,所设计引物特异性高。

表 2 各对照区的荧光定量 PCR 结果

Table 2 Result of controls in fluorescence quantitative PCR

Template	Positive control		No template control		Negative control	
	Liquid virus vaccination (Ct)	NTC (Ct)	HUABA35 (Ct)	QIUFENG α (Ct)		
BmDENV-VD1	9.38	34.49	34.43	30.85		
BmDENV-VD2	9.67	37.54	34.33	31.79		
Bmactin A3	—	31.26	25.37	26.57		

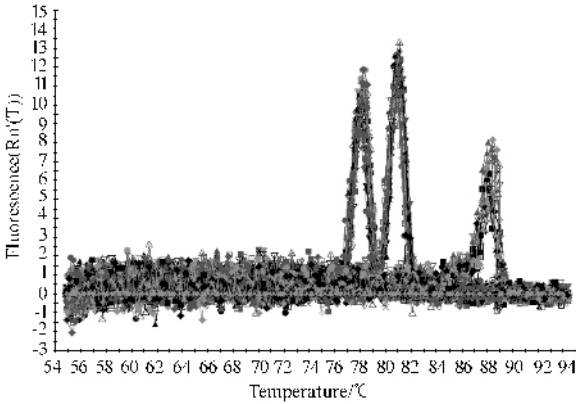


图 1 荧光定量 PCR 的熔解曲线

Fig. 1 The melting curve of fluorescence quantitative PCR

2.2 定量的标准曲线

结果显示在  $10^1 \sim 10^8$  copies 范围内,这三个质粒的扩增效率在 90% ~ 110% 范围之间;Log 浓度/Ct 的斜率在 -3.1 ~ -3.6 有效范围之间,表明这三个基因片段具有较高和相一致的扩增效率,可以进行相互比较;Log 浓度/Ct 的相关系数(Rsq) > 0.985,表明这个标准曲线可以在较宽的范围内用于 BmDENV 拷贝数的绝对定量(图 2 和表 3)。

2.3 BmDENV-3 病毒基因组 VD1、VD2 在两种宿主主体内的增殖

从图 3 和表 4 中可以看到,无论是在感性还是在抗性宿主主体内,家蚕浓核病毒中国株的基因组 VD1 和 VD2 各时间点拷贝数相近,表现出 VD1 和 VD2 是同步复制的。在两种宿主的中肠中病毒初始感染量(接种后 2h)基本相等,每个细胞约为 6 ~ 10 个拷贝数。BmDENV 在敏感型宿主体内的感染过程表现为潜伏期,指数增长期,平台期。从接种后 2h 到 12h 为潜伏期;12h 到 36h 为指数增长期,在这期间病毒的复制最为活跃,其复制速度也是最快的,病毒拷贝数呈指数增长,通过计算,在感染后 12 ~ 36h 这个时间段内,大约复制 15 次,病毒 DNA 平均每 1.71h 复制一代;36h 到 96h 为平台期。在 36h 病毒的拷贝数达到 VD1  $4.21 \times 10^4$  个,VD2  $6.45 \times 10^4$  个,在感染 36h 后,病毒总的复制速度下降,并且病毒的复制主要在感染 72h 之前完成。BmDENV 在抗性宿主主体内维持一种极低水平的增殖,从添毒后 2h 的 6 ~ 10 拷贝数到 96h 的 150 ~ 200 拷贝数,大约仅增长 20 倍。

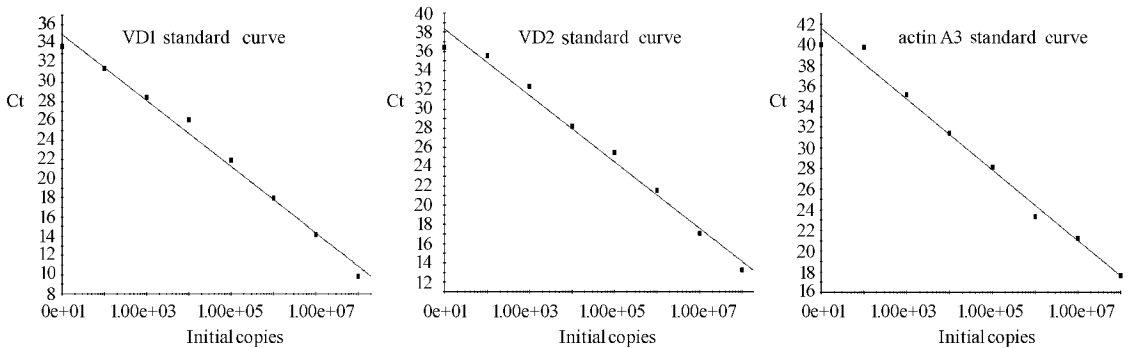


图 2 BmDENV-3 VD1、VD2 和 actin A3 的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of BmDENV-3 VD1、VD2 and actin A3

表 3 标准曲线中的数据

Table 3 Date of the standard curve

	Efficiency of amplification%	Log concentration/Ct slope	Log concentration/Ct Rsq
BmDENV-VD1	92.2	-3.529	0.991
BmDENV-VD2	95.0	-3.448	0.985
Bmactin A3	95.9	-3.425	0.987
Effective range	90 ~ 110	-3.1 ~ -3.6	> 0.985

### 2.4 体外的病毒粒子群体内 VD1 和 VD2 的比例

通过荧光定量 PCR 检测,病毒接种液中 VD1、VD2 的 Ct 值分别为 9.38、9.67,见表 1。经过标准曲线和稀释比例计算得病毒接种液中的病毒拷贝数分别为 VD1  $5.04 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,VD2  $6.43 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。由此算得,在成熟离体的病毒粒子群体内 VD1 : VD2 = 1 : 1.28。

## 3 讨论

家蚕浓核病毒 II 型的基因组有两套 ssDNA (VD1,VD2),并独立包装成两种病毒粒子。病毒基

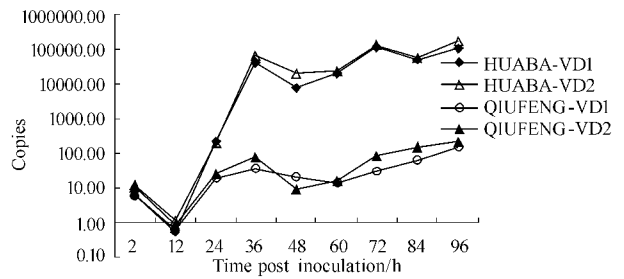


图 3 BmDENV-3 VD1 和 VD2 在感(华八 35)抗(秋丰 d)不同品系中的扩增曲线

Fig. 3 Multiplication curves of BmDENV-3 (VD1,VD2) in the susceptible silkworm strain (HUABA 35) and the resistant silkworm strain (QIUFENG d)

表 4 荧光定量 PCR 结果

Table 4 Result of fluorescence quantitative PCR

Hours post inoculation	Susceptible silkworm strain (HUABA 35)					Resistant silkworm strain (QIUFENG d)				
	VD1 (Ct)	VD2 (Ct)	Actin (Ct)	VD1 copy/cell	VD2 copy/cell	VD1 (Ct)	VD2 (Ct)	Actin (Ct)	VD1 copy/cell	VD2 copy/cell
2	24.96	24.35	25.37	6.47	11.86	26.28	25.68	26.57	6.09	10.87
12	25.06	24.15	21.72	0.53	1.18	23.33	23.2	20.33	0.65	0.88
24	17.53	18.08	23.35	213.97	202.57	24.06	24.04	26.13	19.33	24.23
36	10.98	10.96	24.86	42106.22	64487.23	24.85	24.04	27.81	35.45	74.39
48	11.15	10.4	22.53	7950.97	19775.74	21.06	22.73	23.28	20.41	8.66
60	9.01	9.42	21.81	19861.28	23525.49	26.31	26.43	27.83	13.86	15.28
72	9.72	10.25	25.2	120225.28	130016.39	21.76	20.66	24.58	30.79	82.23
84	11.77	12.2	25.89	50027.72	56049.13	17.64	16.91	21.67	64.86	144.1
96	9.76	9.73	25.09	108832.5	170965.17	19.05	19.01	24.33	152.71	209.45

因组 VD1,VD2 的末端有 53nt 的共有序列,在 VD1 上有一最大的读码框,编码 DNA 聚合酶。这种病毒体和基因组类型与通常的浓核病毒迥然不同。有人建议将其单独列出来,设立为双生浓核病毒科 (Bidensovirane)。在植物病毒中有一组双生病毒 (Geminivirus),它是具有双生颗粒形态的单链环状 DNA 病毒,其亚组 3 的基因组为双组份单链环形的 DNA 分子,构成两种病毒粒子。目前,双生病毒研究已成为植物病毒学最活跃的领域之一<sup>[20]</sup>。家蚕浓核病毒 II 型是首例动物双生病毒,这两种病毒粒子之间的相互关系以及它们与宿主之间的关系倍受人们关注。本研究结果揭示了这两种病毒粒子在宿主体内基因组的复制是同步的,这种同步复制可能与它们共有的末端序列以及自身编码 DNA 聚合酶有关。

家蚕对 BmDENV 的抗性是侵染抵抗性,还是发病抵抗性?即添食病毒后,病毒核酸能否进入中肠细胞?若能进入中肠细胞,是否能在其中复制转录,病毒基因能否表达,能否装配成病毒粒子?总之,其中任一环节发生障碍,蚕都会表现抗性。胡雪芳、钱元骏等(1981)利用对流免疫电泳和添食用同位素标

记的病毒的方法,在抗性品种中肠细胞中没有检测到病毒,认为添食一段时间后,病毒会被排出体外<sup>[21]</sup>。高谦等(1989)利用核酸分子杂交的方法,检测抗性品种蚕在添食病毒后 72h 后中肠内是否有 BmDENV 核酸<sup>[22]</sup>。杂交结果表明,在蚕体组织中未检出病毒核酸,认为病毒不能在其中复制增殖。我们认为血清学和同位素标记都是检测病毒蛋白存在与否,血清学反应为阴性,说明抗性品种蚕中肠组织中未检出病毒蛋白;添食标记的病毒,经一段时间后,中肠组织的固闪记数率与本底相似,说明标记的病毒蛋白被排出体外,但是不能说明病毒核酸是否进入中肠细胞,更无法说明核酸进入细胞后是否复制增殖。那么,病毒核酸究竟能否经脱蛋白外壳后进入中肠细胞呢?我们利用荧光定量 PCR 的方法,检测到在抗性品种中初始感染的样本中 VD1 浓度  $2.52 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (6 拷贝/细胞),VD2  $4.58 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (10 拷贝/细胞)。接种后 96h 样本 VD1 浓度  $2.87 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (153 拷贝/细胞),VD2  $3.94 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (209 拷贝/细胞)。荧光定量 PCR 的方法是一种比核酸分子杂交灵敏度更高的检测方法,根据

王虹玲等(2005)在对虾白斑病毒检测比较实验<sup>[23]</sup>, 实时荧光定量 PCR 比核酸点杂交技术的灵敏度要高出三个数量级。当病毒浓度低于荧光定量 PCR 测定的 Ct 值 23.2 的病毒量时, 核酸点杂交技术就无法检测出来。我们的检测结果说明病毒核酸确实能够进入中肠细胞, 并且能够以一种极低的水平增殖。因此, 我们认为抗性是由于病毒或病毒核酸只能在抗性品种中肠细胞中低水平缓慢复制, 其产生的效应不足以影响细胞的正常生理活动。蚕对 BmDNV 的抗性是一种感染抵抗性。这种感染抵抗性或许因为宿主的某种因素使得病毒编码的与 DNA 合成有关的基因不能活化。本实验室用 mRNA 差异显示技术已经筛选到宿主的影响病毒基因表达的基因(数据待发表)。另外, 在宿主细胞中环境不利的情况下, 病毒以一种潜伏性感染方式存在。在潜伏性感染中, 病毒能下调基因表达而成为无活性状态, 如基因表达严格受限和没有进行性复制。典型的潜伏感染病毒伴随宿主终生。这种感染在人类的一个例子是单纯疱疹病毒。

本试验改进了以往浓核病毒的个体接种方法, 新方法使蚕体在 1min 内摄取入足够量的病毒, 常规接种方法要取食 24h。新方法缩短了接种时间, 使得全部病毒粒子在同一时间进入蚕体, 同一时间抵达中肠细胞, 病毒在细胞内的基因表达和复制也是在同一起始时间。这样的接种方法为精确分析浓核病毒在细胞中的复制奠定了基础。

本研究中, 我们选用家蚕细胞质 Actin 基因作为标准化基因, 由于它在家蚕的基因组中有 3 个拷贝, 拓宽了病毒与宿主基因组浓度(拷贝数/ $\mu\text{L}$ )的参比范围。由于在本试验中病毒基因组在感性宿主体内倍增次数多, 到平台期宿主的单个细胞中病毒达到大约 20 万拷贝数, 我们将 36h 后的感性宿主样本再稀释 10 倍, 使得病毒扩增的 Ct 值和 Action 基因扩增的 Ct 值都在标准曲线定量的范围内。我们利用荧光定量 PCR 技术灵敏而准确地检测了病毒粒子 DNA 的拷贝数, 为精确分析浓核病毒在细胞中的复制过程提供了基础数据, 也为深入研究病毒与宿主的相互作用提供了可行的技术平台。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Qian Y(钱元骏), Hu X(胡雪芳), Sun YK(孙玉昆), et al. Studies on the denonucleosis virus of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学), 1986, **12**(2): 89-94.
- [ 2 ] Lü HX(吕鸿声). *Molecular Biology of Insect Viruses*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1998, pp. 1381-4001.
- [ 3 ] Li Y, Zadori Z, Bando H, et al. Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid. *Journal of General Virology* 2001, **82**: 2821-2825.
- [ 4 ] Bando H, Kusuda J, Kawase S. Molecular cloning and characterization of *Bombyx* densovirus genome DNA. *Arch Virol*, 1987, **93**: 139-146.
- [ 5 ] Bando H, Kusuda J, Gojobori T, et al. Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of the parvovirus. *J Virol*, 1987, **61**(2): 553-560.
- [ 6 ] Bando H, Choi H, Ito Y, et al. Structural analysis on the single-stranded genomic DNAs of the virus newly isolated from silkworm: the DNA molecules share a common terminal sequence. *Arch Virol*, 1992, **124**: 187-193.
- [ 7 ] Bando H, Hayakawa T, Asano S, et al. Analysis of the genetic information of a DNA segment of a new virus from silkworm. *Arch Virol*, 1995, **140**: 1147-1155.
- [ 8 ] Hayakawa T, Kojima K, Nonaka K, et al. Analysis of proteins encoded in the bipartite genome of a new type of parvo-likevirus isolated from silkworm-structural protein with DNA polymerase motif. *Virus Res Jan*, 2000, **66**(1): 101-8.
- [ 9 ] Peter Tijssen, Max Bergoin. Denonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars in Virology*, 1995, **6**: 347-355.
- [ 10 ] Bergoin M, Tijssen P. Molecular Biology of Densovirinae. In Faisst S and Rommelaere J (ed.), *Parvoviruses. From Molecular Biology to Pathology and Therapeutic Uses*. Karger, Basel, Switzerland, 1995, pp. 12-32.
- [ 11 ] Guo X(郭锡杰), Qian Y(钱元骏), Hu X(胡雪芳), et al. The research of parasitized location of BmDNV in silkworm. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学), 1985, **11**(2): 93-98.
- [ 12 ] Abe H, Harada T, Kanehara M, et al. Genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene nsd-1 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet Syst*, 1998, **73**: 237-242.
- [ 13 ] Ogoyi DO, Kadono-Okuda K, Eguchi R, et al. Linkage and mapping analysis of a non-susceptibility gene to densovirus (nsd-2) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 2003, **12**(2): 117-124.
- [ 14 ] Qin J(秦俭), Yi WZ(易文仲). The linkage analysis of non-infected genes to BmDNV-Z in silkworm. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学), 1988, **14**(3): 129-132.
- [ 15 ] Li MW, Guo QH, Hou CX, et al. Linkage and mapping analyses of the denonucleosis non-susceptible gene nsd-Z in the silkworm *Bombyx mori* using SSR markers. *Genome*, 2006, **49**(4): 397-402.
- [ 16 ] Wang Y(王永杰), Chen KP(陈克平), Yao Q(姚勤), et al. Complete nucleotide sequence analysis of *Bombyx mori* denonucleosis virus type 3 VD2 (China isolate). *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2006, **46**(3): 363-367.
- [ 17 ] Wang Y(王永杰), Yao Q(姚勤), Chen KP(陈克平), et al. Organization and transcription strategy of genome of *Bombyx mori* bidonovirus (China isolate) VD<sub>1</sub>. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22**(5): 707-712.

- [ 18 ] Winer J , Jung CK , Shackel I , *et al.* Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* , 1999 **270**( 1 ) : 41 - 49.
- [ 19 ] Schmittgen TD , Zakrajsek BA , Mills AG , *et al.* Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay : comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* , 2000 **285**( 2 ) : 194 - 204.
- [ 20 ] Liu YI( 刘玉乐 ) , Tian B( 田波 ). Advance in plant geminivirus research. *Virologica Sinica*( 中国病毒学 ) , 1998 **13**( 1 ) : 6 - 15.
- [ 21 ] Hu XF( 胡雪芳 ) Qian YJ( 钱元俊 ). The study of the offspring of Dong 34 × Su 12 which shows resistance to infectious flacherie virus. *Acta Sericologica Sinica*( 蚕业科学 ) , 1981 **7**( 1 ) : 51 - 54.
- [ 22 ] Gao Q( 高谦 ) , Cai YM( 蔡幼民 ) , Yu CX( 余承鑫 ) , *et al.* The resistant mechanism of BmDENV to the silkworm and the BmDENV embryos transmission possibility. *Science of Sericulture*( 蚕业科学 ) , 1989 **15**( 1 ) : 41 - 44.
- [ 23 ] Wang HJ( 王虹玲 ) , Wang ZF( 王忠发 ) , Jiang WY( 蒋文雅 ). The comparison between real-time PCR and DNA dots hybridization applied in detecting WSS. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*( 中国卫生检验杂志 ) , 2005 **15**( 5 ) : 596.