

家蚕浓核病毒 *Bm*DNV- χ (中国株)VD₁ 基因组结构与转录分析

Organization and Transcription Strategy of Genome of *Bombyx mori* Bidsenovirus (China isolate) VD₁

王永杰^{1,2} 姚 勤^{1*} 陈克平¹ 韩 序¹

WANG Yong-Jie^{1,2}, YAO Qin^{1*}, CHEN Ke-Ping¹ and HAN Xu¹

1 江苏大学生命科学研究院,镇江 212013

2 安徽省农业科学院水产研究所,合肥 230031

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

2 Institute of Fisheries, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China

摘 要 为了进一步认识家蚕浓核病毒 *Bm*DNV- χ (中国株)VD₁ 基因组的结构和功能,VD₁ 被分离、纯化、克隆到 pUC119 载体上,完成了基因组全序列的测定。序列分析显示 VD₁ 基因组全长为 6543 个核苷酸,末端拥有 224 个核苷酸反向重复序列(ITRs)。VD₁ 基因组正链含有 3 个大的开放阅读框(ORF1-3),负链含有 1 个大的开放阅读框(ORF4)。比较 *Bm*DNV-3 的 VD₁ 和 *Bm*DNV-2 (Yamanashi isolate) 的 VD₁ 基因组全序列,两者同源性为 98.4%,并且有 107 个碱基的替代和 1 个碱基插入。氨基酸突变集中在 VD₁ ORF3 和 VD₁ ORF4。Northern 杂交结果显示:VD₁ 的左边正链上有 1.1kb 和 1.5kb 两个转录本,右边的负链上有一个 3.3kb 转录本。3' 和 5'-RACE 结果显示:1.1kb 转录本开始于 nt 290 结束于 nt 1437;1.5kb 转录本开始于 nt 1423 结束于 nt 2931;3.3kb 转录本开始于 nt 6287 结束于 nt 2922。正链上 1.5kb 转录本和负链上 3.3kb 转录本拥有 10 个核苷酸的 3' 端的共同序列。研究结果显示该病毒基因转录与已报道的其它浓核病毒存在较大的差异性。

关键词 家蚕浓核病毒,序列分析,转录分析

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0707-06

Abstract To better understand the genomic structure and function of *Bombyx mori* bidsenovirus (China isolate) VD₁, the VD₁ was purified and cloned into the pUC119 vector, and the complete nucleotide sequence of VD₁ was determined. Sequence analysis showed that VD₁ genome consisted of 6543 nts including inverted terminal repeats (ITRs) of 224 nts. In the viral genome, three major open reading frames (ORF1, ORF2 and ORF3) in the plus strand and one major ORF (ORF4) in the complementary strand were identified. Comparison of the complete genome sequence between *Bombyx mori* bidsenovirus (China isolate) and *Bm*DNV-2 (Yamanashi isolate) showed an identity of 98.4% in VD₁, with a total number of 104 bp substitutions and 1 bp insertions found in *Bombyx mori* bidsenovirus (China isolate), the highly variable regions were mainly located in VD₁ ORF3 and VD₁ ORF4. Northern blotting revealed that VD₁ contained 1.1 kb and 1.5 kb transcript in the left-half 'plus' strand, and one transcript about 3.3 kb of 'minus' strand in the right-half. Sequencing of 3' and 5' ends of transcript products showed

Received: June 7, 2006; Accepted: June 20, 2006.

This work was supported by the grants from a grant from Jiangsu Academy Natural Science Foundation (No. BK2006074); National Basic Research Program of China (No. 2005CB121000).

* Corresponding author. Tel: 86-511-8791923, Fax: 86-511-8791923, 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 (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>

the 1.1 kb transcript started at nt 290 and ended at nt 1437, the 1.5 kb transcript was found to start nt 1423 and ended at 2931, and the 3.3 kb transcript was found to start nt 6287 and ended at nt 2922. Therefore, the 1.5 kb transcript in the left-half plus' strand and 3.3 kb transcripts of minus' strand in the right-half overlapped for 10 nts at the 3' ends. These results indicate that this virus employs a transcription strategy that is radically different from that of the other reported DNVs.

Key words *Bombyx mori* bidensovirus VD₁, Sequence analysis, Northern blotting analysis

细小病毒分为两个亚科:细小病毒(*Parvovirinae*)和浓核病毒(*Densovirinae*),分别主要感染脊椎动物和无脊椎动物^[1]。浓核病毒与细小病毒一样,无囊膜,直径 18~26nm,基因组大小约为 4.0~6.5kb,有正负单链 DNA,或为正链,或为互补的负链。在体外高盐浓度下抽提时,正负单链 DNA 可互补成双链。浓核病毒(*Densonucleosis virus* or DNVs)一词来源于该病毒感染细胞后,核膨大,核内含有大量稠密的 Feulgen 浓染的病毒物质。浓核病毒具有宿主特异性,并且在通常情况下能引起宿主的死亡。浓核病毒能感染昆虫的很多组织,但并不能感染脊椎动物的组织,因此浓核病毒作为生物杀虫剂控制农业主要害虫具有很好的应用前景^[2]。

家蚕作为经济昆虫的重要性,自上世纪 70 年代人们先后从中国镇江、日本山梨县、长野县伊那、长野县佐久、以及印度等分离到了家蚕 DNV 的不同株系,命名为伊那株(DNV-1)、山梨株和佐久株(*BmDNV-2*)、中国株(*BmDNV-3*)、印度株(*BmDNV-4*)、信大株(*BmDNV-5*)。这 5 种不同株系浓核病毒可划分为两个属^[3]:(1) *Iteravirus* 属(*BmDNV-1*, *BmDNV-5*)^[4];(2) *Bidensovirus* 属(*BmDNV-2*, *BmDNV-3*, *BmDNV-4*)^[5,6],该属病毒拥有两套大小不等,且无同源性的单链线形 DNA 分子(VD₁、VD₂),VD₁ 和 VD₂ 可能分别存在于不同的衣壳蛋白中^[7]。这些不同株系家蚕浓核病毒在感染家蚕中肠组织的不同细胞上有区别,*BmDNV-1* 和 *BmDNV-2* 只感染家蚕中肠圆筒状细胞,而 *BmDNV-3* 在发病的早期感染家蚕中肠圆筒状细胞,在发病的后期也能感染杯状细胞;在病毒的血清学方面,*Iteravirus* 属和 *Bidensovirus* 属的病毒之间存在明显差异,而同属之间的伊那株(*BmDNV-1*)和信大株(*BmDNV-5*)血清学相似,中国株(*BmDNV-3*)、印度株(*BmDNV-4*)和 *BmDNV-2*(*Yamanashi isolate*)基本上相似,但中国株(*BmDNV-3*)血清学上略有区别^[8,9]。本文研究是对 *BmDNV-3* VD₁ 的全基因组序列进行测定、分析,并与 *BmDNV-2* VD₁ 进行比较,另外,首次用 Northern blots 以及 3'和 5'-RACE 对其基因组织结构和转录

进行研究。

1 材料和方法

1.1 病毒和病毒 DNA 分离

BmDNV-3 病毒株由中国农业科学院蚕业研究所提供。病毒粒子在对 *BmDNV-3* 感性的 5 龄家蚕华八品系中繁殖。病毒粒子的纯化方法参照文献 [10] 方法如下:取发病症状明显的家蚕中肠,在 TEN buffer (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 0.1mol/L NaCl, pH 7.5)中匀浆(2000r/min, 2min),采用 40% (W/W)蔗糖梯度离心(20℃ 45000r/min, 16h)。病毒粒子在高盐浓度下(10mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100mmol/L NaCl, 15mmol/L MgCl₂, 0.2% SDS, 0.5mg/mL protein K),放入 37℃ 水浴 4h,再用酚/氯仿多次抽提,然后乙醇沉淀。

1.2 病毒 DNA 克隆

病毒 DNA 琼脂糖电泳后,出现两条大小不同的条带(VD₁, VD₂),分离纯化 VD₁-DNA,并用 Klenow 酶(300ng DNA/10U)补平末端,70℃ 水浴 15min,乙醇沉淀,然后经 *Hind*III 酶切成片段,克隆到 *Hind*III/*Sma*I 双酶切的 pUC119 载体上。VD₁ 的末端是通过克隆到 *Sma*I 平端酶切的 pUC119 载体上获得的。另外,在酶切位点两侧还依据获得的序列设计特异引物,进行 PCR 加以验证。重组子转化到 *E. coli* DH5 α 中进行扩增。

1.3 病毒 DNA 序列测定和序列分析

克隆片段测序采用引物步行法,从克隆片段的两个方向进行。为了保证序列测定结果的可靠性,我们对整个基因组进行 5~7 倍的覆盖率测定。序列测定所获得各个片段的连接、开放阅读框查找和氨基酸序列翻译用 DNASTAR 软件完成;核苷酸和氨基酸序列同源性的比较在 NCBI 网站上进行;转录起始信号查找由 NNPP 软件完成。

1.4 Northern blots 分析

病毒总 RNA 是从感染后 72h 的 5 龄家蚕华八品系的中肠组织获得。在抽提总 RNA 前,先将新鲜的家蚕中肠放入 0.05% DEPC 水中处理,去除中肠

内膜和杂质,再用液氮研碎。用 Rneasy Mini Kit 试剂盒(QIAGEN 公司)提取总 RNA。总 RNA 在 1.2% 的琼脂糖甲醛变性胶中电泳分离后,再转移到带正电荷的尼龙膜上(Roche 公司, USA)。探针的模板通过 PCR 获得,一个长度为 1458bp(*BmDENV-3* VD_1 nt 1116~2573),另一个长度为 964bp(*BmDENV-3* VD_1 nt 4451~5414)。利用随机引物标记试剂盒(TaKaRa 公司)制备探针。Northern 杂交在 42℃ 杂交液中与 ^{32}P 标记的两个随机引物探针进行杂交过夜。

1.5 病毒转录的 3'和 5'端分析

病毒转录本 3'和 5'端的序列是使用 BD SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒(BD Biosciences Clontech 公司, USA)来确定的。简单地说,首先对 *BmDENV-3* VD_1 开放阅读框分析,预测最有可能的转录位置,从多个位置设计不同的特异引物,然后用设计的特异引物与 3'和 5'端的通用引物进行 PCR 扩增,扩增方法按照 RACE 试剂盒的要求进行,然后再对扩增的条带进行克隆和序列测定。

2 结果和分析

2.1 病毒 VD_1 基因组的分析

病毒 VD_1 测序各片段连接装配后,获得一个全长 6543 个核苷酸的 VD_1 序列。该序列的 GenBank 登录号:JQ017268。病毒基因组的大小与琼脂糖电泳分析的 6.6kb 结果基本一致。 VD_1 基因组有 68.2% A+T 和 31.8% G+C。*BmDENV-3* VD_1 具有很高 A+T 含量,在这一点与报道的蟑螂浓核病毒类似^[12]。以 ATG 为起始密码, TAA, TAG, TGA 为终止密码,大于 100 氨基酸为限制条件查找开放阅读框,*BmDENV-3* VD_1 有 4 个开放阅读框。正链含有 3 个大的开放阅读框(ORF1-3),右半负链含有 1 个大的开放阅读框(ORF4)。开放阅读框的位置、方向、大小如图 2B 所示。

对 VD_1 的末端结构进行分析,发现两末端分别含有 224 个核苷酸反向重复序列(ITRs),但未发现浓核病毒常见的回文结构(palindrome)。从 VD_1 的 ITRs 结构分析得出两末端互补可以形成“锅柄结构”,并且 ITRs 的 G+C 含量(42.4%)比整个基因组 G+C 含量(31.8%)要高,这有利于稳定这种二级结构。该类病毒的复制机制到目前为止还不清楚,但依据 ITRs 可以形成“锅柄结构”的信息,推测该病毒的复制可能类似腺病毒的复制机制。DNA 合成可能起始于蛋白共价结合在“锅柄结构”的 5'末端。

在复制过程中,互补的末端可作为病毒子代 DNA 链合成的模板。

2.2 氨基酸同源性比较

BLAST 同源性搜索发现 ORF1 和 ORF2 分别与一些复制起始蛋白和细小病毒的非结构蛋白存在一定的同源性。ORF1 的 60aa(52-121)与疟原虫 *Plasmodium falciparum* (登录号 34495238)真核结合蛋白存在 27% 的同源性,87aa(25-111)与疟原虫 *Pseudomonas putida* 染色体复制起始蛋白有 25% 的同源性;ORF2 的 226aa(89-314)与虾浓核病毒 *PstDENV* (登录号 AF273215)的非结构蛋白有 21% 同源性,123aa(144-266)与 *Porcine* 细小病毒(登录号 M37899)的非结构蛋白有 27% 同源性,241aa(58-298)与 AAV(登录号 AF043303)的 NTP-binding 和 helicase 区域有 22% 的同源性。

ORF1 和 ORF2 编码的氨基酸与其它浓核病毒编码的氨基酸相比存在两个保守区域。一个是位于 ORF1(8-69 aa)含有细小病毒常见复制起始蛋白保守序列(图 1A 所示),该蛋白与 DNA 复制起始和终止有关。另一个是 ORF2(178-296 aa)含有细小病毒共同拥有的非结构蛋白(NS-1)的 NTP-binding 和解旋酶保守序列的特征(图 1B 所示)。在脊椎动物的细小病毒中,NS-1 被发现共价结合在病毒 DNA 的 5'端,并且影响着病毒 DNA 的包装,NTP-binding 和解旋酶占据着中心位置。依据这些序列的同源性,推测 ORF1 和 ORF2 编码病毒的非结构蛋白。ORF4 与多种 DNA 聚合酶有一定的同源性,因此预测 ORF4 可能编码与病毒 DNA 复制有关的非结构蛋白。尽管 ORF3 在氨基酸上与浓核病毒结构蛋白未发现同源性,但根据组成 *BmDENV-2* 衣壳蛋白多肽氨基酸序列的测定结果^[9],ORF3 编码病毒结构蛋白。

2.3 *BmDENV-3* VD_1 和 *BmDENV-2* VD_1 全序列的比较

BmDENV-3 VD_1 和 *BmDENV-2* VD_1 相比较,两病毒有完全一致的开放阅读框。在基因组核苷酸全序列上,两病毒同源性为 98.4%,并且有 107 个碱基的替代和 1 个碱基插入。*BmDENV-3* VD_1 比 *BmDENV-2* VD_1 多了 1 个碱基,这个碱基 A 插入在非编码区域 nt 230 处,未能导致开放阅读框的改变。替代的碱基中有 95 个碱基发生在开放阅读框的编码区域,10 个碱基的替代发生在 ITRs 序列上,2 个碱基的替代发生在非编码区域。在开放阅读框替代的碱基中有 76 个碱基未能使氨基酸发生改变,19 个发生突变的氨基酸都发生在 2 个开放阅读框里(ORF3 和 ORF4)。

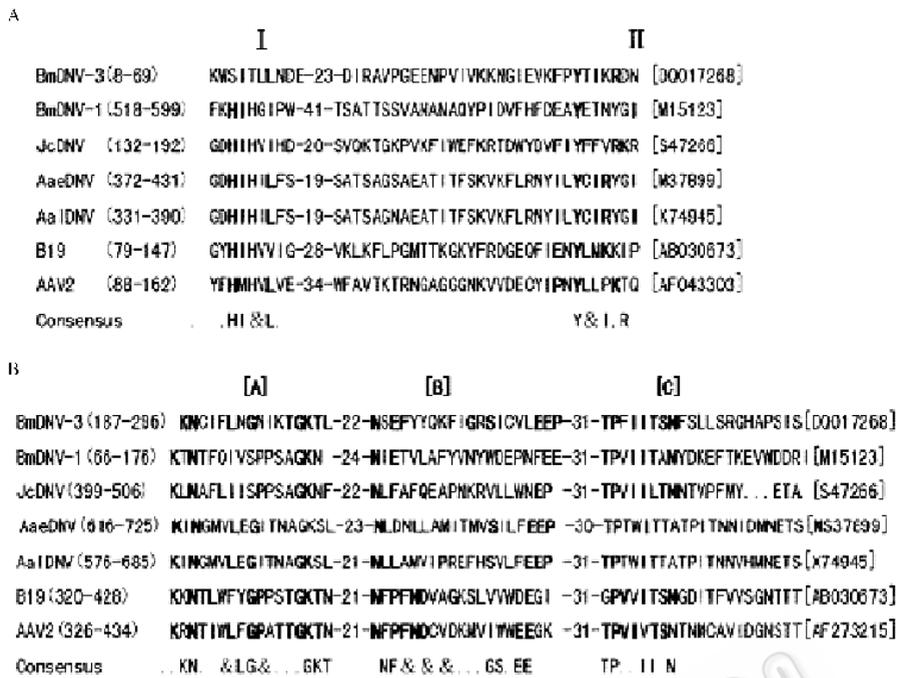


图 1 (A)家蚕 *BmDENV-3* VD_1 和其它细小病毒 motif I 和 motif II 复制起始蛋白的保守区域。(B)家蚕 *BmDENV-3* VD_1 和其它细小病毒非结构蛋白(NS-1)的 NTP-binding 和解旋酶保守的 119 氨基酸序列比对

Fig. 1 (A) Replication initiator motifs I and motifs II in *BmDENV-3* VD_1 and other parvoviruses. (B) *BmDENV-3* VD_1 and other parvoviruses region of NS-1 was aligned with highly conserved 119-aa sequence, NTP-binding and helicase domains A, B, and C are also present. Number in parentheses indicated the position of sequence for each viral protein shown in the figure. GenBank accession numbers are shown in brackets

VD_1 ORF4)中,而在2个编码病毒非结构蛋白的阅读框(VD_1 ORF1, VD_1 ORF2)中的氨基酸同源性高达100%。总之序列分析显示 *BmDENV-3* VD_1 和 *BmDENV-2* VD_1 二者亲源关系很近,但长期处于不同环境中的这两种病毒确实存在一定的差异,氨基酸突变集中在 ORF3 和 ORF4,而推测编码非结构蛋白的 ORF1 和 ORF2 高度保守。

2.4 病毒 VD_1 转录分析

目前为止,有 30 多种浓核病毒的序列被解析^[3],但对其基因转录的研究报道甚少。而病毒基因转录可以反映该病毒的基因结构和表达基本情况。Northern 杂交结果显示 VD_1 的左边正链上有 1.1kb 和 1.5kb 两个转录本,右边的负链上有一个 3.3kb 转录本(图 2A 所示)。1.1kb 和 1.5kb 两个转录本的杂交信号很强。转录本 3' 和 5'-RACE 序列测定结果显示:1.1kb 转录本开始于 nt 290,结束于 nt 1437,该转录本中含有两个开放阅读框 VD_1 ORF1 (nt 331~691)和 VD_1 ORF2 (nt 474~1424)并且未发现剪切存在;1.5kb 转录本开始于 nt 1423,结束于 nt 2931,负链上有一个 3.3kb 转录本开始于 nt 6287,结束于 nt 2923(图 2B 所示)。1.5kb 转录本和 3.3kb 转

录本有 10 个核苷酸 3' 端的共同序列。在基因组织结构上,*BmDENV-3* VD_1 像浓核病毒属(*Densovirus*)病毒一样拥有正链和负链都编码蛋白的双义基因组,并且正负链的转录本分别在左右边各约占整个基因组长度 50%。

2.5 病毒 VD_1 转录启动子和 Poly(A)位点分析

为了进一步阐明 VD_1 基因组的结构,我们还对 VD_1 启动子和 Poly(A)位点位置进行分析(图 2B 所示)。应用生物信息学软件(NNPP)运算法则对转录调控序列进行预测,结果显示 VD_1 第 1 个可能 TATA 盒(TATATAA)位于 nt 260-266,其上游含有 GC 含量丰富的激活区(AGCCTAG nt 253-259),与蛋白翻译的起始通用序列(A/GCCAUGG)^[11],7 个碱基有 4 个相匹配,这个启动子控制着 VD_1 ORF1 和 VD_1 ORF2。另一个启动子 TATA 盒(TATATAA)位于 nt 1402-1408,控制着 VD_1 ORF3。第三个负链上的启动子 TATA 盒(TATATAA)位于 nt 6301-6307,上游含有激活区(AACATGC nt 6309-6045),7 个碱基有 5 个与蛋白翻译的起始通用序列相匹配,该启动子控制着 VD_1 ORF4。以 AATAAA 作为 Poly(A)信号,在正链上发现了两个 Poly(A)位点(图 2B)。第一个位点位于 nt 1406,第二个位点位于 nt 2914。

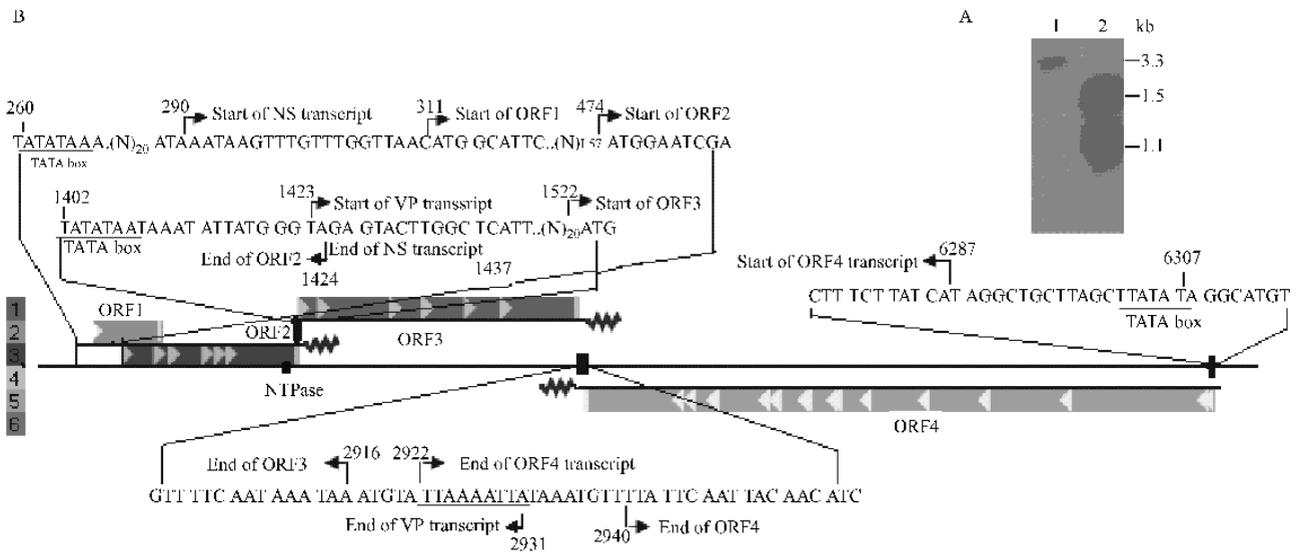


图2 (A) *BmDENV-3* VD_1 基因组织结构与转录分析。(B) *BmDENV-3* VD_1 的 Northern 杂交分析。

Fig.2 (A) Organization and transcription strategy of *BmDENV-3* VD_1 , the horizontal bar represents the genomic DNA molecules VD_1 , open boxes above the horizontal bars show the ORFs in the genome sequence and the complementary sequence is shown below.

Abbreviated sequence of the *BmDENV-3* VD_1 genome illustrated its characteristic properties. The functional promoters are

indicated by TATA boxes. (B) Northern blot was hybridized against the single-stranded probes,

Lanes 1 - 2 : Northern blots with 1458bp and 964bp probes respectively.

-2916), 负链上发现了一个 Poly(A) 位点 (nt 2943 - 2938)。

3 讨论

已报道的浓核病毒基因转录与脊椎动物细小病毒有较大的差异。细小病毒基因组均有两个主要的开放的阅读框, 位于同一条 DNA 链上, 每一个 ORF 大约占基因组长度的 50%, 3' 端 ORF 编码结构蛋白, 5' 端 ORF 编码非结构蛋白, 结构蛋白和非结构蛋白有各自独立的启动子区域。无脊椎动物浓核病毒属的病毒的正链和负链都含有开放阅读框, 左边的开放阅读框编码非结构蛋白, 右边的开放阅读框编码结构蛋白^[12, 13]。我们采用 Northern blot 分析以及 3' 和 5'-RACE 对 *BmDENV-3* VD_1 进行了研究, 结果显示其正链上有两个转录本并且有两个不同 pol(A) 位点和各自独立的启动子区域; 负链上有一个转录本。生物信息学分析负链上 VD_1 ORF4 以及正链上 VD_1 ORF1 和 VD_1 ORF2 编码非结构蛋白, 而正链上 VD_1 ORF3 编码结构蛋白。这种基因组织结构与已报道的细小病毒和浓核病毒都存在较大的差异性。

TATA-box 位于转录起始上游的 25 ~ 30 nts 以及上游含有 GC 含量丰富的激活区是病毒基因转录启动子一种典型特征^[13, 14]。应用生物信息学软件并结

合 RACE 和 Northern blot 研究结果对病毒 VD_1 转录起始信号进行分析, VD_1 具有典型的浓核病毒基因转录启动子特征。另据报道 mRNA 的扫描机制是浓核病毒基因转录表达调控的另一种重要方式^[15]。 VD_1 正链上的 1.1kb 转录本含有 ORF1 和 ORF2 开放阅读框, 因此具备从不同的起始密码子在不同读码框翻译两种蛋白的可能。这种可能是否确实存在还需要今后在体内外表达中进一步的验证。

总之, VD_1 与浓核病毒属的其它病毒相比, VD_1 含有双义的基因组并含有细小病毒共同拥有的复制起始蛋白保守序列、NTP-binding 和解旋酶保守序列以及具有典型的浓核病毒属病毒启动子特征等。然而, VD_1 也拥有一些与其不同的特征, 尤其是 VD_1 ORF3 编码的结构蛋白。据报道^[13, 15]浓核病毒属 *GmDENV* 和 *MmDENV* 的结构蛋白是由一个开放阅读框编码的 4 种多肽, 分子量在 50 ~ 100kD, 它们通过核糖体扫描机制从 4 个不同的起始密码子开始翻译 4 种拥有相同 C 端的多肽, 并且含有磷酸酯酶 A_2 的保守域。但 *BmDENV-3* VD_1 ORF3 编码结构蛋白最大分子量仅为 55kD, 且未能发现磷酸酯酶 A_2 的保守域。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Berns KI. Parvoviridae and their replication. *Virology*, 1990, 2 :
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [2] El-Far M, Li Y, F di re G, Abol-Ela S *et al.* Lack of vertebrate cells by the densovirus from the maize worm *Mythimna loreyi* (*MDNV*). *Virus Research* , 2004 , **99** : 17 - 24
- [3] Tijssen P, Bergoin M. Denonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Semin Virology* , 1995 , **6** : 347 - 355
- [4] Li Y, Z dori Z, Bando H *et al.* Genome organization of the densovirus from *Bombey mori*(*BmDENV-1*) and enzyme activity of its capsid. *J Gen Virol* , 2001 , **82** : 2821 - 2825
- [5] Bando H, Choi H, Ito Y *et al.* Structural analysis on the single-stranded genomic DNAs of the virus newly insolated from silkworm : the DNA molecules share a common terminal sequence. *Arch Virol* , 1992 , **124** : 187 - 193
- [6] Bando H, Hayakawa T, Asano S *et al.* Analysis of the genetic information of a DNA Segment of a now virus from silkworm. *Arch Virol* , 1995 , **140** : 1147 - 1155
- [7] Hayakawa T, Kojima K, Nonaka K *et al.* Analysis of proteins encoded in the bipartite genome of a new type of parvo-like virus isolated from silkworm structural protein with DNA polymerase motif. *Virus Research* , 2000 , **66** : 101 - 108
- [8] Lü HS(吕鸿声). *Molecule Biology of Insect Virus*. China Agriculture Science and Technology Publishing Company Press , 1998
- [9] Wang Y(王永杰), Chen K(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
- [10] Dumas B, Jourdan M, Pascaud AM *et al.* Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. *Virology* , 1992 , **191** : 202 - 222
- [11] Guo HT(郭海涛), Zhang JM(张珈敏), Hu YY(胡远扬). Complete sequence and genome organization of the densovirus from *Periplaneta fuliginosa*. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2000 , **45**(10) : 1076 - 1080
- [12] Chen S, Cheng L, Zhang Q *et al.* Genetic , biochemical , and structural characterization of a new densovirus isolated from a chronically infected *Aedes albopictus* C6/36 cell line. *Virology* , 2004 , **318** : 123 - 133
- [13] Tijssen P, Li Y, El-Far M *et al.* Organization and expression strategy of the ambisense genome of desonucleosis virus of *Galleria mellonella* (*GmDENV*). *J Virol* , 2003 , **77** : 10357 - 10365
- [14] Zhao XH(赵兴卉), Zhu XD(朱旭东), Liu J(刘娟) *et al.* Construction of a SV40 Promoter Specific Artificial Tran scription Factor. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003 , **19**(5) : 608 - 612
- [15] Fédère G, Ei-Far M, Li Y *et al.* Expression strategy of denonucleosis virus from *mythimna loreyi*. *Virology* , 2004 , **320** : 181 - 189