

动物及兽医生物技术

家蚕二分浓核病毒在家蚕细胞中的体外拯救

张苗苗, 马瑛, 潘晓利, 胡朝阳, 李国辉, 司亚运, 邢亚丽, 陈克平, 姚勤

江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013

张苗苗, 马瑛, 潘晓利, 等. 家蚕二分浓核病毒在家蚕细胞中的体外拯救. 生物工程学报, 2015, 31(1): 86-95.

Zhang MM, Ma Y, Pan XL, et al. Rescuing *Bombyx mori* bidensovirus in BmN cells *in vitro*. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 86-95.

摘要: 家蚕二分浓核病毒 (*Bombyx mori* bidensovirus, BmBDV) 是特异性感染家蚕中肠引起慢性浓核病症的致病原, 基因组含有 2 套单链 DNA 分子 (VD1 和 VD2), 复制机制尚不清楚。为了能够在体外拯救出有感染性的病毒粒子, 构建了 BmBDV 的基因组全长的克隆质粒 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2, 并通过酶切构建的克隆质粒来获得双链的基因组片段 VD1 和 VD2, 利用脂质体包埋的方法, 线性化共转染 BmN 细胞。提取转染后的 BmN 细胞总 DNA, 经去甲基化处理后, 通过 PCR 检测到病毒基因的复制; 提取转染后的 BmN 细胞和添食回感的家蚕中肠的总蛋白, 分别进行蛋白质印记杂交检测, 检测到病毒基因的表达。由此首次表明, 该病毒线性化的基因组片段通过共转染 BmN 细胞的方法, 可以在体外条件下拯救出具有感染性的病毒粒子。

关键词: BmBDV, 病毒基因组片段, 线性化共转染, BmN 细胞, 病毒拯救

Rescuing *Bombyx mori* bidensovirus in BmN cells *in vitro*

Miaomiao Zhang, Ying Ma, Xiaoli Pan, Zhaoyang Hu, Guohui Li, Yayun Si, Yali Xing, Keping Chen, and Qin Yao

Life Science Research College, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: *Bombyx mori* bidensovirus (BmBDV) has been identified as causing chronic denosucleosis in *Bombyx mori* specifically. The replication mechanism of BmBDV remains unknown. Its genome comprises two single stands DNA (VD1 and VD2). In order to rescue infectious virions *in vitro*, we obtained the total viral DNA extracted from the

Received: March 6, 2014; **Accepted:** April 23, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 3127250, 31270192), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114604).

Corresponding author: Qin Yao. Tel/Fax: +86-511-88791923; E-mail: yaoqin@ujs.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 3127250, 31270192), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114604) 资助。

网络出版时间: 2014-05-28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140139.html>

BmBDV-infected larvae midguts, subsequently cloned the full-length sequence of BmBDV genome fragments by PCR and constructed recombinant plasmids pMD18T-VD1 and pUC-VD2. The linear genome fragments were obtained by digesting recombinant plasmids with corresponding restriction enzymes, and then collectively transfected BmN cells by the method of liposome-embedding. We determined the replication of the virus gene by PCR with the template of demethylated total DNA extracted from the post-transfect BmN cells. Meanwhile, we collected the total proteins from the post-transfect BmN cells and the larvae midgut of feeding the post-transfect BmN cells to perform Western blotting analysis, and detected the expression of viral genes. Here we firstly confirm that infectious virions can be rescued in BmN cells by linear co-transfect method.

Keywords: BmBDV, viral genome fragments, linear co-transfect, BmN cells, virus rescue

家蚕二分浓核病毒 (*Bombyx mori* bidensovirus, BmBDV), 旧称家蚕浓核病毒 II 型 (*Bombyx mori* Densovirus type II, BmDENV-II)^[1], 含有两个不同的基因组 (VD1, VD2), 并分别独立包装于不同的衣壳中^[2]; VD1 和 VD2 的末端分别含有 224 bp 和 524 bp 的互补序列, 以及 53 nt 的末端共有序列 (Common terminal sequence, CTS)^[1], 但未发现细小病毒常见的回文结构^[3], 不能形成发夹结构, 但末端可形成“锅柄结构”^[4-5]。VD1 上具有 DNA 聚合酶编码区^[6], 所编码的蛋白与 DNA 聚合酶 B 家族的蛋白 (polB2) 高度同源^[7], 是目前已知唯一能够编码 DNA 聚合酶的 ssDNA 病毒。2012 年国际病毒分类学委员会依据以上的特殊性, 专门为 BmBDV 设立了二分 DNA 病毒科 (Family Bidnavridae), 下设二分浓核病毒属 (Genus Bidensovirus), 并将其确定为该属唯一的代表种, 命名为家蚕二分浓核病毒 (*Bombyx mori* bidensovirus, BmBDV)^[8]。

本实验室 2005 年测定了 BmBDV 基因组的全长序列 (GenBank Accession No. DQ017268^[9], DQ017269^[10]), 大小分别为 6 543 nt (VD1) 和 6 022 nt (VD2)。通过对这两种病毒基因组的研究得知, VD1 有 4 个 ORFs, 分别编码非结构蛋白 NS2^[11]、非结构蛋白 NS1^[10], 结构蛋白 VP^[13],

以及 DNA 聚合酶 (DNApol)^[6]; VD2 有 2 个 ORFs 分别编码非结构蛋白 NS3^[3]和结构蛋白 P133^[13]。其中, VD1-ORF3 编码的蛋白为主要结构蛋白 VP, VD2-ORF2 编码的蛋白则为次要结构蛋白 P133^[13]。

结构蛋白是病毒粒子核衣壳的主要构成成分, 在病毒整个生命周期中起到框架结构和生物学活性的重要功能作用, 包括病毒与宿主细胞表面受体的识别, 决定病毒粒子的致病性、病毒基因组在衣壳中的包装、宿主免疫应答机制的防御和入侵等^[14]。病毒 DNA 复制过程中所涉及的蛋白, 病毒的非结构蛋白也发挥着不可小觑的作用, 但是相比之下, 聚合酶的作用则更是无可替代的^[15]。只有充分了解 DNA 聚合酶的生物学作用, 才能更好地研究在病毒 DNA 复制过程中, 其对宿主基因组的作用机制^[16]。所以, 在本实验中, 对 VD1-ORF3 编码的结构蛋白 VP 和 VD1-ORF4 编码的 DNA 聚合酶的检测是非常必要的。

关于 BmBDV 复制方式的研究, 1997 年 Hayakawa 等依据细小病毒 DNA 复制的自我引发“滚发夹”的模式, 设计引物, 试图通过 PCR 方式找出 BmDENV-II (BmBDV) 可能的 DNA 复制中间体, 结果没有检测到复制中间体, 由此

否定了 BmDENV- II (BmBDV) 自我引发“滚发夹”的模式^[17]。序列分析表明 VD1-ORF4 编码的多肽拥有 DNA-pol-B-2 保守结构域, 而 DNA-pol-B-2 是一类以蛋白为引物的 DNA 聚合酶^[18]。2001 年 Kojima 等证明了 BmDENV- II (BmBDV) 具有 DNA 聚合酶, 研究也表明在 BmDENV- II (BmBDV) 至少有一种结构蛋白可以与 53 nt 的末端重复序列结合, 表明基因组末端存在类似腺病毒的末端结合蛋白^[19]。

以上的研究与 1995 年 Tijssen 等提出的假说, 即该病毒可能采取类似腺病毒的以蛋白为起始的复制方式^[4]相一致。腺病毒利用 Adeasy 体系构建重组病毒质粒, 通过酶切的方法得到末端带有特异性酶切位点腺病毒线性化基因组, 并利用脂质体包埋的方法将其转染 HEK293 细胞, 持续培养 20 d, 将 HEK293 细胞中拯救出的腺病毒病毒粒子纯化出来, 二次感染 HEK293 细胞, 从而达到腺病毒快速增殖的目的^[20]。

BmBDV 具有高度宿主特异性和组织特异性, 即特异性地侵染家蚕幼虫中肠上皮细胞中的柱状细胞^[21], 目前还没有合适的研究平台用来研究该病毒, 其复制机理尚未阐明。因此, BmBDV 病毒拯救可借鉴腺病毒快速扩增的方法。本研究通过酶切构建的病毒基因组全长克隆质粒, 获得病毒基因组片段, 首次进行线性化共转染 BmN 细胞的方法, 检测能否从 BmN 细胞中释放出具有感染性的病毒粒子。这将为深入研究该病毒的复制机制和病毒基因的功能, 以及病毒侵染机制的研究提供了一个新的平台。

1 材料与方法

1.1 材料

BmN 细胞、BmBDV、易感品系的家蚕菁松、

瞬时表达质粒 pFastHTb-*ie1-egfp-sv40*、大肠杆菌 DH10B、VD1-ORF3 兔血清抗体和 VD1-ORF4 鼠血清抗体均由本实验室保存和制备。

1.2 主要试剂

TC100 培养基、胎牛血清 FBS 购自美国 Gibco 公司。Cellfectin Regent 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司。苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 蛋白酶抑制、蛋白酶 K、放射免疫沉淀法 (Radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液和异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔二抗试剂盒购自碧云天科技有限公司。pMD18-T 和 pUC-119 载体、碱性磷酸酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶、山羊抗兔二抗辣根过氧化物酶标记物、二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色液均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 BmBDV 线性化基因组片段的收集

按照文献^[9]中的方法提取纯化 BmBDV 病毒粒子, 以及蛋白酶 K 的说明书中的方法提取 BmBDV 的 DNA, 以此为模板, 在基因组的末端引入 *EcoR* I 的酶切位点, 利用引物 *EcoR* I-CTS (表 1), PCR 扩增 VD1 全长, 克隆至 pMD18-T, 构建克隆质粒 pMD18T-VD1。

VD1 和 VD2 末端含有共有的 53 nt 序列, 但以相同引物 *EcoR* I-CTS (表 1) 扩增后, 测序发现仅有 VD1 被扩增出来, VD2 并未被扩增出来。VD2 选用分段扩增方法, 在两个末端分别引入 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点, 选用 VD2 上第 4 007 nt 处, 唯一的 *Sac* I 酶切位点, 对 VD2

进行分段扩增。利用引物 *EcoR* I-CTS 和 VD2-*Sac* I-up (表 1), 扩增出约 4 kb 的长片段, 亚克隆到 pMD18-T 载体; 利用引物 VD2-*Sac* I-down (表 1) 和 *BamH* I-CTS (表 1), 扩增出约 2 kb 的短片段, 亚克隆至 pUC119 载体; 以上两种克隆质粒分别用 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶切后, 用碱性磷酸酶处理 (处理方法按照试剂盒操作步骤进行), 再将其拼接克隆最终形成质粒 pUC-VD2。

按照 OMEGA 质粒抽提试剂盒中说明操作, 抽提 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2 前者进行 *EcoR* I 单酶切, 后者进行 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切, 参照文献[20]中的方法, 对酶切后的混合液采用酒精沉淀法回收基因组的 DNA 片段, 进而得到末端带有特异酶切位点的双链线性化的病毒基因组 DNA 片段 VD1 和 VD2。

1.3.2 线性化共转染 BmN 细胞

按照 Cellinfect Regent 转染试剂盒的说明书进行操作, 对 25 cm² 组织培养瓶中的 BmN 细胞进行如下操作: 将 1.3.1 中收集的病毒基因组片段 VD1 和 VD2 各 3 μg, 转染 BmN 细胞, 作为实验组; 3 μg 瞬时表达质粒 pFastBac-*ie1-egfp-sv40* 作为转染效率的阳性对照; 未经处理的 BmN 细

胞作为阴性对照。分别于 27 °C 恒温条件下, 正常传代培养 20 d。

1.3.3 BmN 细胞的免疫组化检测

收集转染 20 d 后的 BmN 细胞, 约 1×10⁶ 个细胞接种于培养皿中的载玻片上。按照 FITC 标记的山羊抗兔二抗试剂盒中的说明书操作, 于激光双聚焦显微镜下观察。一抗为按 1 : 1 000 稀释的 VD1-ORF3 兔血清抗体。正常传代培养的 BmN 细胞, 与上述操作相同, 作为阴性对照。

1.3.4 添食回感实验

用细胞刮刀将 1.3.2 中细胞全部刮下, 4 °C 下 180 000 r/min 离心 1 h, 弃上清, 沉淀于 -70 °C 贮存备用。用适量无菌的 pH 7.4 PBS (0.20 g 氯化钾, 0.24 g 磷酸二氢钾, 3.58 g 十二水合磷酸氢二钠, 8.00 g 氯化钠, 加入蒸馏水定容至 1 L) 悬浮, 将悬浮液均匀涂抹于桑叶背面, 晾干后添食家蚕二龄起蚕的幼虫, 待桑叶食净后, 正常饲养, 作为实验组; 按照文献[22]中的方法, 制备感染 BmBDV 的家蚕中肠干的研磨液, 浓度约为 2 mg/mL, 同上操作, 作为阳性对照; 添食正常传代的 BmN 细胞作为阴性对照组; 正常饲养桑叶的作为空白对照组。每 30 头家蚕

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequence of PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>EcoR</i> I-CTS	CGAATTCGTGTGTGTATACTGGGGCGG	6 543
VD2- <i>Sac</i> I-up	ATTCTAGAGCTCTTACAACAAA TGATG	4 007
VD2- <i>Sac</i> I-down	CATTTGTTGTAAGAGCTCTAGAATATTC	2 015
<i>BamH</i> I-CTS	CGGGATCCGTGTGTGTATACTGGGGCGG	
VD1- <i>Dpn</i> I	CAGCCTTGATTAACGGATCTAGC GATATATCAAACCTTCACCACC	981
VD2- <i>Dpn</i> I	GAGGTTATACGTATTTTGCCTG GATCTTTGTTGCGTAGACCATTG	633

作为一组样本, 每组重复 3 次。将上述家蚕幼虫饲养至 5 龄第 4 天, 解剖取其中肠组织, 于 -70°C 贮存备用。

1.3.5 PCR 检测

大肠杆菌 DH10B 具有甲基化修饰作用, 在 GATC 的序列处具有甲基化修饰位点, 在真核生物 BmN 细胞中无此修饰作用^[23]。利用 *Dpn* I 将转染到 BmN 细胞中具有甲基化修饰的 DNA 消解完全, 进而得到在 BmN 细胞中无甲基化修饰的子代 DNA。在 VD1 和 VD2 分别选取含有 5 个 GATC 的序列, 设计引物 VD1-*Dpn* I 和 VD2-*Dpn* I (表 1)。按照碧云天公司 RIPA 裂解液和蛋白酶 K 说明书上的步骤操作, 提取 1.3.2 中的 BmN 细胞和 1.3.4 中的中肠组织的总 DNA, 并分别用 *Dpn* I 进行消解, 参照文献[20]中的方法, 对 *Dpn* I 消解后的混合液采用酒精沉淀法回收 DNA, 以回收后的 DNA 作为模板, 对病毒 DNA 进行 PCR 检测。

1.3.6 Western blotting 检测

按照碧云天公司附带的说明书进行操作, 在 1.3.4 收集的细胞沉淀中, 加入 500 μL RIPA, 5 μL 100 mmol/L PMSF, 4°C 下充分裂解 3 min; 4°C 下 780 000 r/min 离心 15 min, 取上清于 -70°C 贮存备用。1.3.4 中收集的中肠组织, 每 3 头为一个样本, 于液氮中充分研磨; 加入 1 mL RIPA, 10 μL 100 mmol/L PMSF, 4°C 下充分裂解 10 min; 在冰上超声破碎 30 s, 每隔 2 s 间歇一次; 4°C 下 780 000 r/min 离心 15 min; 取上清于 -70°C 贮存备用。

制备 12% 的 SDS-PAGE, 5% 脱脂奶粉封闭过夜; 利用 VD1-ORF3 兔血清抗体和 VD1-ORF4 鼠血清抗体, 分别稀释成 1:2 000, 孵育 3 h; pH 7.4 PBS 洗涤 5 次, 6 min/次; 二抗为稀释 1:3 000 的

山羊抗兔二抗辣根过氧化物酶标记物, 孵育 2 h; pH 7.4 PBS 洗涤 5 次, 6 min/次; DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 BmBDV 基因组全长的扩增和克隆质粒的酶切验证

根据 1.3.1 中的方法, 构建 BmBDV 基因组全长克隆质粒 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2, 测序后发现与 GenBank 上的登录号 DQ017268 和 DQ017269 对应的序列相一致, 对质粒的酶切鉴定结果与理论值也相符 (图 1)。

2.2 线性化共转染对 BmN 细胞的感染性

2.2.1 BmN 细胞中病毒 DNA 的检测

提取的转染后 BmN 细胞的总 DNA, 进行 *Dpn* I 消化, 以此为模板。利用表 1 中引物 VD1-*Dpn* I 和 VD2-*Dpn* I, 进行 PCR 检测。结果如图 2 所示, 所扩增出来的条带大小分别为 981 bp 和 633 bp, 与表 1 中理论值相一致, 说明在线性化共转染的 BmN 细胞中有 BmBDV 病毒基因的复制。

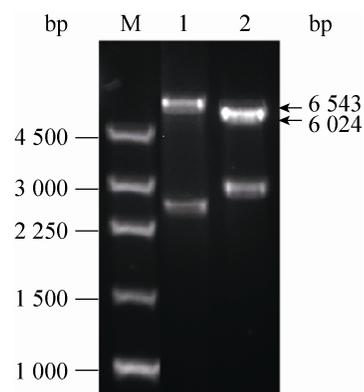


图 1 质粒 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2 的酶切鉴定
Fig. 1 Identification of plasmids pMD18T-VD1 and pUC-VD2. M: DL250 bp DNA marker; 1: pMD18T-VD1; 2: pUC-VD2.

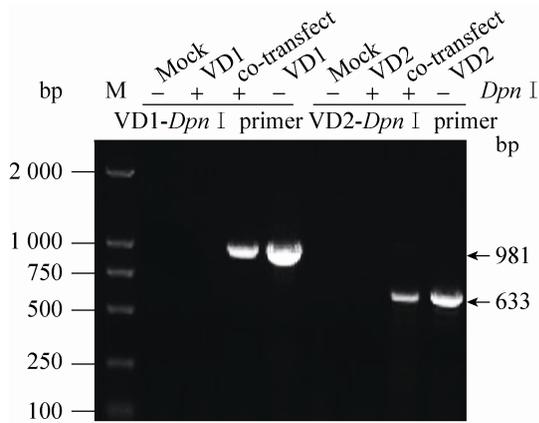


图2 BmN 细胞中病毒 DNA 的 PCR 检测

Fig. 2 Detection of viral DNA in BmN cells by PCR. Mock: the total DNA of BmN cells; VD1 and VD2: genomic fragments VD1 and VD2; co-transfect: the total DNA of linear co-transfect BmN cells. "+" and "-" denote by *Dpn* I treated and untreated.

2.2.2 BmN 细胞中病毒基因的表达

提取 BmN 细胞的总蛋白，分别利用 VD1-ORF3 兔血清抗体和 VD1-ORF4 鼠血清抗体进行 Western blotting 检测，结果分别如图 3A 和图 3B 所示。利用 VD1-ORF3 抗体可杂交到 2 条大小为 55 kDa 和 51 kDa 的条带，与阳性对照组中 BmBDV 所杂交到的条带大小相一致，说明在线性化共转染的 BmN 细胞可检测到病毒结构蛋白 VP 的表达。利用 VD1-ORF4 抗体杂交到条带大小约为 53 kDa，与 BmBDV 病毒粒子的阳性对照中杂交到的条带大小一致，说明在线性化共转染的 BmN 细胞中可检测到病毒 DNApol 的表达。阴性对照组则均未杂交到对应的目的条带。

2.2.3 线性化共转染的 BmN 细胞中 VP 蛋白的免疫荧光检测

利用 VD1-ORF3 的兔血清抗体，取线性化共转染 20 d 后的 BmN 细胞，进行间接免疫荧光

检测，结果如图 4 所示，病毒的结构蛋白 VP，主要定位于细胞核内，同时也表明在线性化共转染的 BmN 细胞中，可检测到病毒结构蛋白 VP 的表达。

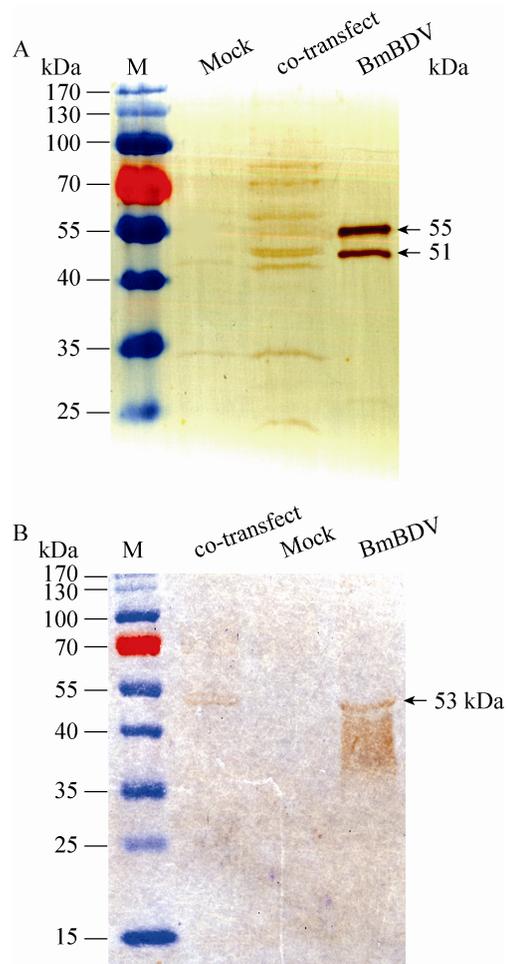


图3 BmN 细胞总蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 3 Western blotting analysis of total protein of BmN. (A) Western blotting analysis using raised VD1-ORF3 antiserum in rabbits. (B) Western blotting analysis using raised VD1-ORF4 antiserum in rats. Mock: total protein from normal BmN cells. co-transfect: total protein from linear co-transfect BmN cells. BmBDV: total protein from the purified BmBDV virions.

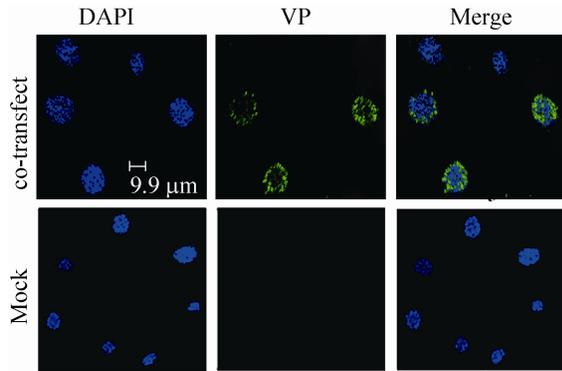


图4 线性化共转染的 BmN 细胞的免疫荧光检测
Fig. 4 Immunofluorescence analysis of linear co-transfect BmN cells. Mock: normal BmN cells; co-transfect: linear co-transfect BmN cells.

2.3 拯救病毒的回感检测

2.3.1 添食回感的家蚕组织中病毒基因的检测

提取添食回感的家蚕中肠组织总 DNA，利用表 1 中引物 VD1-*Dpn* I 和 VD2-*Dpn* I，分别对病毒基因组 VD1 和 VD2 进行 PCR 检测。结果如图 5A 和图 5B 所示，添食共转染的 BmN 细胞沉淀的家蚕中肠组织总 DNA 中扩增到的条带，与添食感染 BmBDV 的中肠干研磨液的阳性对照组中的条带相一致，大小分别为 981 bp 和 633 bp，与表 1 中理论值也相符。结果表明，添食线性化共转染的 BmN 细胞的家蚕组织总 DNA 中有病毒基因的复制。

2.3.2 添食回感的家蚕中肠中病毒基因的表达

利用 VD1-ORF3 兔血清抗体，对添食的家蚕幼虫中肠全蛋白，进行 Western blotting 检测，结果如图 6 所示。添食线性化共转染的 BmN 细胞组可杂交到的条带，与添食感染 BmBDV 的家蚕中肠干研磨液的阳性对照组所杂交到的条带相一致，大小分别为 55 kDa、53 kDa 和 51 kDa。结果表明添食回感的家蚕组织总蛋白中，可检测到病毒结构蛋白 VP 的表达。

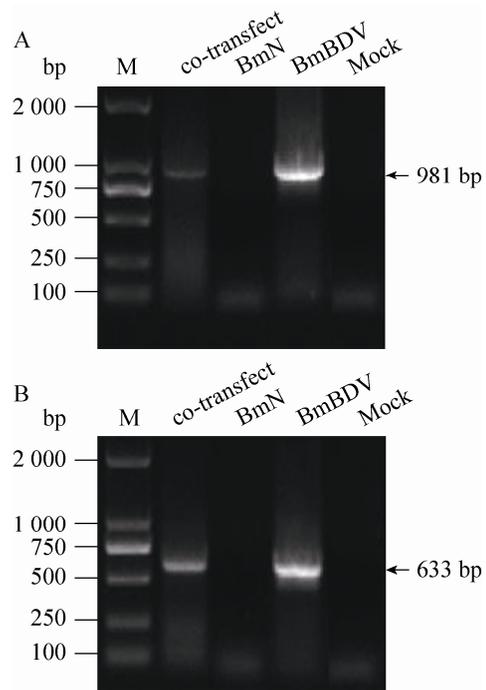


图5 添食回感的家蚕中肠组织总 DNA 中病毒基因的 PCR 检测

Fig. 5 PCR analysis of viral gene from total DNA of fed midgut tissue. (A) Primer VD1-*Dpn* I was used. (B) Primer VD2-*Dpn* I was used. co-transfect: fed linear co-transfect BmN cells; BmN: fed normal BmN; BmBDV: fed slurry of midgut dry infected with BmBDV; Mock: fed nothing.

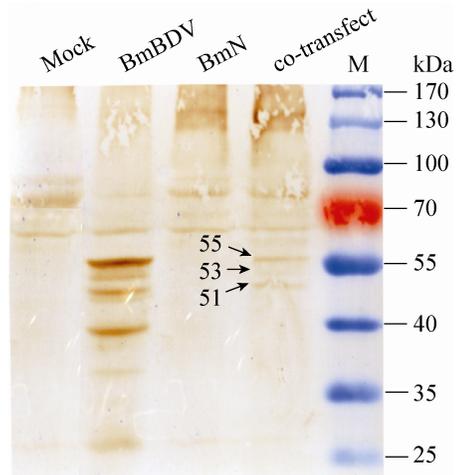


图6 添食回感的家蚕组织中肠总蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 6 Detection of total protein from inoculated silkworm midgut tissue by Western blotting analysis.

3 讨论

根据已有的实验数据表明 BmDENV-II (BmBDV) 可能采取类似腺病毒的蛋白起始的复制方式^[4,7,18]。腺病毒的快速扩增是通过构建末端具有酶切位点的重组腺病毒质粒, 酶切产生带有单一酶切位点 *Pac* I 的双链线性化腺病毒基因组片段, 利用脂质体包埋线性化转染至 HEK293 细胞中从而产生大量腺病毒病毒粒子^[20]。所以, 构建一个双链 DNA 复制源, 获得线性化的基因组片段对于蛋白起始复制方式是必需的。本研究中, 构建了带有特异性酶切位点的 BmBDV 基因组全长的克隆质粒, 并命名为 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2, 通过酶切可产生大量的双链线性化的基因组片段。

通过线性化片段共转染的方式, 在转染后的 BmN 细胞中, 利用 VD1-ORF3 兔血清抗体杂交到的条带大小在 55 kDa 和 51 kDa 左右, 与本实验室吕盟等制备 VD1-ORF3 的原核表达多克隆抗血清, 对该病毒的全蛋白进行的 Western blotting 分析和质谱鉴定的结果^[13]相一致。由于病毒基因在 BmN 细胞中的表达量过低, 为了杂交到目的条带, 提高了上样量, 以至于结果中出现很多非特异性条带。利用 VD1-ORF4 鼠血清抗体进行的 Western blotting 分析, 杂交到的条带大小在 53 kDa 左右, 与本实验室李国辉等制备 VD1-ORF4 的原核表达多克隆抗血清, 对该病毒的全蛋白进行的 Western blotting 分析和质谱鉴定的结果^[24]相一致。VD1-ORF3 所编码的 VP 蛋白的表达与病毒粒子的组装相关, 而 VD1-ORF4 编码的 DNA 聚合酶的表达与病毒基因组的复制相关。综上所述, 在线性化共转染的 BmN 细胞中有 BmBDV 病毒基因组的复制和

表达。

在添食回感实验中, 利用 VD1-ORF3 兔血清抗体, 对添食线性化共转染的 BmN 细胞的实验组进行 Western blotting 分析, 可检测到结构蛋白 VP 的表达。杂交到大小分别为 55 kDa 和 51 kDa 的条带, 与线性化共转染后的 BmN 细胞中检测到的条带大小相符; 其中, 53 kDa 的条带可能与家蚕中肠组织和 BmN 细胞的组织特异性相关, 也有可能是由于多克隆抗体的缘故, 所杂交到的非特异性条带。结果表明, 转染后的 BmN 细胞沉淀中产生了具有感染性的 BmBDV 病毒粒子, 使得添食的家蚕幼虫染病。通过病毒基因组线性化共转染的方式可在 BmN 细胞中拯救出具有感染性的 BmBDV 病毒粒子。另外, 本实验室在对环质粒 pMD18T-VD1 和 pUC-VD2 共转染 BmN 细胞的实验中, 以及将转染后细胞回感家蚕幼虫的实验中发现, 从 DNA 和蛋白质表达水平上检测的结果表明均无该病毒基因组的复制和表达 (结果未显示)。这一结果就进一步证实了 BmBDV 的复制方式与腺病毒相似, 需要双链线性化的 DNA, 并需要暴露基因组的末端。

本研究采取细胞系拯救的途径, 利用脂质体包埋的方法, 将病毒线性化的基因组片段导入细胞内, 这就打破了该病毒组织细胞特异性识别的界限, 为拥有自编码 DNA 聚合酶的 BmBDV 的复制机制、病毒各编码框内基因的功能和该病毒侵染机制的深入研究提供了一个平台。

由于 BmBDV 是慢性病毒, 其发病病程为 7-12 d, 病蚕在 10-20 d 后死亡^[25]; 从理论上讲, BmN 细胞并不是它的宿主细胞^[21]; BmN 细胞生长缓慢且转染效率低, 一般不超过 20%; 因

此,在 BmN 细胞内病毒粒子的组装和增殖是很有局限性的。我们实验室也曾在转染效率较高的 Sf9 细胞中,以同样的线性化共转染的方式进行该病毒的体外拯救,但是无论从 DNA 或是蛋白表达水平上,均未检测到有该病毒基因的复制与表达(结果未显示)。说明该病毒对于细胞系也具有较强的感染特异性,这有待于下一步去探索或是构建转化效率较高的家蚕细胞系,来深入研究该病毒体外拯救。另外,本实验仅是定性地检测到有感染性病毒粒子的产生,并没有定量去检测,所以,我们将会在今后的实验中,在检测方法上采取一些改进的措施。

REFERENCES

- [1] 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(1/2): 187–193.
- [2] Abd-Alla A, Jousset FX, Li Y, et al. NS-3 protein of the *Junonia coenia* densovirus is essential for viral DNA replication in an Ld 652 cell line and *Spodoptera littoralis* larvae. *J Virol*, 2004, 78(2): 790–797.
- [3] Yin HJ, Yao Q, Guo ZJ, et al. Expression of non-structural protein NS3 gene of *Bombyx mori* densovirus (China isolate). *J Genet Genomics*, 2008, 35(4): 239–244.
- [4] Tijssen P, Bergoin M. Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Semin Virol*, 1995, 6(5): 347–355.
- [5] Wang YJ, Yao Q, Chen KP, et al. Organization and transcription strategy of genome of *Bombyx mori* bidensovirus (China isolate) VD1. *Chin J Biotech*, 2006, 22(5): 707–712 (in Chinese).
王永杰, 姚勤, 陈克平, 等. 家蚕浓核病毒(中国株)的 VD1 基因组结构与转录分析. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 707–712.
- [6] Zhang JH, Li GH, Chen HQ, et al. Molecular cloning and expression of key gene encoding hypothetical DNA polymerase from *B. mori* parvo-like virus. *Genet Mol Biol*, 2010, 33(4): 739–744.
- [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 Res*, 2000, 66(1): 101–108.
- [8] Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol*, 2012, 157(7): 1411–1421.
- [9] Wang YJ, Yao Q, Chen KP, et al. Characterization of the genome structure of *Bombyx mori* densovirus (China isolate). *Virus Genes*, 2007, 35(1): 103–108.
- [10] Li GH, Sun C, Zhang JH, et al. Characterization of *Bombyx mori* parvo-like virus non-structural protein NS1. *Virus Genes*, 2009, 39(3): 396–402.
- [11] Wang F, Hu Z, He Y, et al. The non-structural protein NS-2 of *Bombyx mori* parvo-like virus is localized to the nuclear membrane. *Curr Microbiol*, 2011, 63(1): 8–15.
- [12] Kong J, Hu ZY, He YQ, et al. Expression analysis of *Bombyx mori* parvo-like virus VD2-ORF1 gene encoding a minor structural protein. *Biologia*, 2011, 66(4): 684–689.
- [13] Lv M, Yao Q, Wang Y, et al. Identification of structural proteins of *Bombyx mori* parvo-like virus (China Zhenjiang isolate). *Intervirology*, 2010, 54(1): 37–43.
- [14] Agbandje-Mckenna M, Chapman MS. Correlating structure with function in the viral capsid/Kerr JR, Cotmore SF, Bloom ME, et al. *Parvoviruses*. London: Hodder Arnold, 2006: 125–139.
- [15] Kornberg A, Baker TA. *DNA replication*. San Francisco: WH Freeman, 1980: 324–327.
- [16] Wang Y, Chen K, Yao Q, et al. Transcriptional

- analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* parvo-like virus (China isolate). *J Microbiol*, 2007, 45(2): 139.
- [17] Hayakawa T, Asano S, Sahara K, et al. Detection of replicative intermediate with closed terminus of *Bombyx* densovirus. *Arch Virol*, 1997, 142(2): 393–399.
- [18] Stoll A, Redenbach M, and Cullum J. Identification of essential genes for linear replication of an SCP1 composite plasmid. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 270(1): 146–154.
- [19] Kojima K, Hirano A, Asano S, et al. Analysis of the BmDENV-2 specific DNA polymerase and the common terminal sequence binding proteins. *J Seric Sci Jpn*, 2001, 70(2): 103–108.
- [20] Luo JY, Deng ZL, Luo XJ, et al. A protocol for RIPA generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236–1247.
- [21] Hu ZY, Li GH, Li GT, et al. *Bombyx mori* bidensovirus: The type species of the new genus *Bidensovirus* in the new family *Bidnaviridae*. *Chin Sci Bull*, 2013, 58(36): 4528–4532.
- [22] Hu YY, Seki H, Kawase S. Electron microscopic studies on DNA from a densovirus (Yamanashi isolate) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl Ent Zool*, 1986, 21(4): 613–619.
- [23] Wobbe CR, Dean F, Weissbach L, et al. *In vitro* replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(17): 5710–5714.
- [24] Li GH, Hu ZY, Guo XL, et al. Identification of *Bombyx mori* bidensovirus VD1-ORF4 reveals a novel protein associated with viral structural component. *Curr Microbiol*, 2013, 66(6): 527–534.
- [25] Iwasita Y, Chao CY. The development of a densovirus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori*, of China. *Ultrastructure and Functioning of Insect Cells*. Tokyo: Soc. Insect Cells, 1982: 161–164.

(本文责编 陈宏宇)