

家蚕二分浓核病毒感染家蚕后的释放动态研究

胡朝阳* 张晓龙 张清 刘伟 李国辉 姚勤

(江苏大学生命科学研究院 江苏 镇江 212013)

摘要:【目的】研究家蚕二分浓核病毒(BmBDV)感染家蚕后不同时间段内释放到环境中的病毒量,为通过蚕沙快速检测病毒提供方法和依据。【方法】选取家蚕二分浓核病毒基因组节段 VD1 上的 *ns1* 基因和 VD2 上的 *ns3* 基因中的一小部分片段,分别克隆到 pMD18-T 载体上,制备标准品质粒,并用实时荧光定量 PCR 的方法绘制 *ns1* 和 *ns3* 的标准曲线。通过检测 BmBDV 感染 5 龄家蚕后不同时间蚕沙中的病毒量来衡量释放到环境中的病毒的变化动态。【结果】在病毒感染家蚕第 3 天,大量的病毒随蚕沙释放到环境中,每微克蚕沙中约含 1.38×10^6 个 VD1, 6.54×10^5 个 VD2;从感染后第 5 天开始,释放到环境中的病毒量呈指数型增加;第 7–8 天病毒的释放量到达一个平台期,此时每微克蚕沙中约有 2.12×10^7 个 VD1, 1.34×10^7 个 VD2。普通 PCR 结果也反应出了类似的病毒释放动态。【结论】根据 BmBDV 感染家蚕后的释放动态,推测病毒的复制周期约 60 h。利用实时荧光定量 PCR 检测蚕沙中的 BmBDV,能简单、快速、准确地诊断病毒的感染。

关键词: 家蚕二分浓核病毒, 蚕沙, 实时荧光定量 PCR, 病毒释放动态, 复制周期

Release dynamics of *Bombyx mori* bidensovirus from virus-infected silkworm

HU Zhao-Yang* ZHANG Xiao-Long ZHANG Qing LIU Wei LI Guo-Hui YAO Qin

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

Abstract: [Objective] In order to investigate the amount of virus released from silkworm infected by *Bombyx mori* bidensovirus (BmBDV) at the different periods and to develop a method for rapid and accurate detection whether silkworm were infected by BmBDV or not. [Methods] A small fragment of *ns1* gene of genomic segment VD1 and *ns3* gene of VD2 were cloned to pMD18-T vector respectively, and then the standard curve of *ns1* and *ns3* was obtained. The release dynamics of BmBDV were investigated by detecting the amount of BmBDV in the faeces of 5th instar silkworm at different infection stage. [Results] The results shown that a lot of virus were detected in silkworm faeces at the 3 days post-infected about 1.38×10^6 copies/ μg VD1, 6.54×10^5 copies/ μg VD2. The amount of virus increased exponentially from 5 days post-infected. The amount of BmBDV reached

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270192, 31272507, 31570150); Startup Scientific Research Fund from Jiangsu University for Advanced Professionals (No. 11JDG048)

*Corresponding author: Tel: 86-511-88791702; E-mail: sunnyhu163@163.com

Received: January 28, 2016; Accepted: April 18, 2016; Published online (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270192, 31272507, 31570150); 江苏大学高级人才启动基金(No. 11JDG048)

*通讯作者: Tel: 86-511-88791702; E-mail: sunnyhu163@163.com

收稿日期: 2016-01-28; 接受日期: 2016-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

a plateau at 7 to 8 days post-infected about 2.12×10^7 copies/ μg VD1, 1.34×10^7 copies/ μg VD2. The PCR results also indicated a similar dynamics. **[Conclusion]** The release dynamics of virus suggests that the replication cycle of BmBDV is about 60 h. The infection of BmBDV in silkworm can rapidly, simply and accurately be determined by detecting the virus in silkworm faeces using real-time quantitative PCR.

Keywords: *Bombyx mori* bidensovirus, Silkworm faeces, Real-time fluorescent quantitative PCR, Release dynamics, Replication cycle

家蚕二分浓核病毒(*Bombyx mori* bidensovirus, BmBDV)旧称家蚕浓核病毒 II 型(BmDENV-2 或 3), 曾归属于细小病毒科浓核病毒亚科, 是家蚕致死性软化病的一种病原体, 是导致蚕丝减产的主要病原之一^[1]。BmBDV 为二分体单链线性 DNA 病毒, 病毒粒子呈二十面体结构, 无囊膜包被, 直径约为 20–24 nm, 基因组含有两个单链线性的 DNA 片段 VD1 (6.6 kb) 和 VD2 (6.0 kb), 在壳体化的过程中 VD1 和 VD2 独立包装^[2-4]。VD1 编码一个以蛋白为起始引物的 DNA 聚合酶^[5]。基于这些独特的性状, 国际病毒分类委员会于 2012 年将该病毒重新命名, 并将其归类到一新设定的二分 DNA 病毒科(Bidnaviridae)二分浓核病毒属(Bidensovirus)^[6]。该病毒主要感染家蚕中肠柱状上皮细胞^[7]。家蚕幼虫摄食 BmBDV 污染的食物后, 病毒进入家蚕中肠柱状上皮细胞, 在其核内增殖, 被感染的细胞表现为核异常膨大。被病毒感染的细胞退化, 成熟的病毒粒子随退化的细胞释放到肠腔内, 随蚕沙一起被排出体外。被感染的家蚕幼虫表现为空头、软化、发育迟缓等症状, 在病毒感染的晚期, 幼虫后部中肠变为黄白色^[4,8], 观察这些典型病症, 是判断 BmBDV 感染的手段之一。

到目前为止, 对家蚕病毒病的防治主要以预防为主。加强病原的检测是防止病害发生和暴发的基础, 建立准确、快速、简易的 BmBDV 检测方法对该病毒感染家蚕的诊断和防治具有重要的意义。目前, 对 BmBDV 的诊断主要依据对染病幼虫典型症状的观察, 更简便的方法是利用抗原抗体免疫反应, 如荧光抗体法、酶联免疫法等^[9], 这些方法或者不够准确、不能定量, 或者操作繁琐,

难以在生产实践中推广应用。随着分子生物学实验技术的发展, 实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 因其灵敏性高、重复性好、特异性强、操作简单快速、能准确定量等优点^[10], 已被广泛应用于病原体检测^[11]、环境微生物检测^[12]、基因突变检测^[13]、基因表达检测^[14]、肿瘤早期诊断^[15]等研究中。

韩序等曾研究过 BmBDV 基因在家蚕体内的复制情况, 病毒在家蚕体内的复制经历潜伏期、指数增长期和平台期几个阶段, 病毒 DNA 在感染后 12 h 开始复制, 36 h 后达到平台期^[16]。然而, 成熟病毒粒子的释放动态及病毒完成一个复制周期所需要的时间还未见有文献报道。本研究分别以 BmBDV VD1 编码的非结构蛋白基因 *ns1* 和 VD2 编码的非结构蛋白基因 *ns3* 为检测对象, 设计特异的引物, 建立了 BmBDV 的实时荧光定量 PCR 检测体系, 我们利用该检测体系分析了病毒感染家蚕幼虫后病毒随蚕粪释放的动态, 结果表明病毒感染后 72 h 能明显检测到病毒的释放, 从感染后 120 h 开始, 病毒的释放量呈指数提高, 说明在感染后 120 h 内, 病毒已完成了第二次感染, 推测病毒的复制周期约 60 h。通过检测蚕沙中病毒, 能快速准确地诊断 BmBDV 感染家蚕幼虫。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit、E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek; Trans StartTM Green qPCR Super Mix, 北京全式金生物技术有限公司; *rTaq* DNA polymerase、dNTP Mixture、10 \times PCR buffer、pMD18-T、*EcoR* I 和 *Hind* III, 大连 TaKaRa

公司。Mx3000P™ Real-Time PCR System, Stratagene 公司; MJ Mini™ Personal Thermal Cycler, Bio-Rad 公司; One Drop 分光光度计, 南京五义科技有限公司; GenoSens1800 系列凝胶成像系统, Clinx science instruments 有限公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

1.2 家蚕与病毒

所用的家蚕品种为菁松; 病毒为家蚕二分浓核病毒, 由本实验室保藏。

1.3 荧光定量 PCR 引物设计与合成

以 BmBDV VD1 编码的非结构蛋白基因 *ns1* 和 VD2 编码的非结构蛋白基因 *ns3* 为检测对象, 设计特异的引物。引物 5'-GTTGGTGGTGAAGGGTTTG-3' 和 5'-GGGAGATAGTTTACTTTGGAG-3' 用来扩增 VD1-*ns1* 片段, 扩增子大小为 198 bp。引物

$$\text{质粒拷贝数} = \frac{\text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})}{\text{质粒长度}(\text{bp}) \times 660 \times 10^9} \times 6.02 \times 10^{23} (\text{copies}/\mu\text{L})。$$

1.5 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将上述定量的标准品质粒稀释至 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 和 1.0×10^1 copies/ μL , 以梯度稀释的标准品为模板进行实时荧光定量 PCR 反应, 实时荧光定量 PCR 最佳的反应体系为: SYBR green 5 μL , Rox II 0.2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.2 μL , 模板 1 μL , ddH₂O 3.4 μL , 总体积为 10 μL 。实时荧光定量 PCR 的反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 20 s, 53 °C 20 s, 72 °C 20 s, 重复 45 个循环; 最后进行一轮溶解曲线分析, 95 °C 1 min, 53 °C 30 s, 95 °C 30 min。每组实验进行 3 次重复。

1.6 qPCR 检测 5 龄感病家蚕不同感染天数蚕沙中病毒的量

按文献[16]的方法制备病毒粗提液, 并将病毒液稀释至 1 g 肠干/L 后浸泡桑叶, 沥干, 喂食 30 头 5 龄初家蚕幼虫, 喂食 8 h 后换新鲜桑叶。家蚕饲养温度为 24–27 °C, 并保持环境湿润。从添食病毒开始, 每隔 1 d (Days post infection, d p.i.) 取一次蚕沙直到蚕吐丝结茧, 0 d p.i. 指健康 5 龄初蚕蚕沙, 蚕沙样品于 -70 °C 保存待用。

取 1 g 蚕沙, 用灭菌的双蒸水研磨蚕沙, 离心

5'-CAAGGATTGTCATTTTACGCT-3' 和 5'-GAATCAAACACAGAATCCCAC-3' 用来扩增 VD2-*ns3* 片段, 扩增子大小为 173 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4 标准品质粒的制备

以病毒 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 扩增 *ns1* 和 *ns3* 片段, 电泳后用 E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit 回收目的片段。将目的片段克隆到 pMD18-T 中并转化入 DH5 α 感受态菌中, 然后将菌涂抹到含有 Amp 的 LB 固体培养皿中, 37 °C 培养 14 h, 挑选单菌落进行 PCR 验证。验证正确的菌于 LB 液体培养基^[17]中培养 12 h, 用 E.Z.N.A.™ Plasmid Mini Kit 试剂盒提取质粒。质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切验证正确后送样测序。测序正确的质粒进行浓度测定并按下面的公式换算成质粒拷贝数:

取上清, 将沉淀多次研磨后合并上清液。将上清液稀释到 0.1 g 蚕沙/L, 取 1 μL 作为模板进行 qPCR, 反应体系和条件同 1.5, 每组实验重复 3 次。通过每个样本的 C_t 值和已建立的标准曲线计算出蚕沙中病毒 VD1 和 VD2 的量。

1.7 普通 PCR 检测 5 龄感病家蚕不同感染天数蚕沙中的病毒

将 0.1 g/L 的蚕沙研磨液取 1 μL 作为模板进行普通 PCR 反应, 反应体系为 ddH₂O 15 μL , *rTaq* 0.2 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , 10 \times PCR buffer 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.4 μL , 模板 1 μL , 总体积为 20 μL 。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 20 s, 53 °C 20 s, 72 °C 20 s, 23 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 标准品质粒的构建和验证

将酶切验证正确的重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果在 GenBank 网站上进行在线 BLAST 比对, 比对结果如图 1 所示。说明构建的标准品质粒是正确的。

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线

将标准品质粒 10 倍系列稀释,用 Stratagene 公司的 Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪绘制 *ns1* 和 *ns3* 的标准曲线与溶解曲线。如图 2 所示, *ns1* 的标准曲线为 $Y=-3.186\log(X)+36.16$, 直线相关系数 $R^2=0.997$, 扩增效率 $\text{Eff.}=106.0\%$; *ns3* 的标准曲线为 $Y=-3.186\log(X)+34.96$, 直线相关系数 $R^2=0.998$, 扩增效率 $\text{Eff.}=106.0\%$, 两者的扩增范围为 10^1-10^8 copies/ μL , 符合荧光定量的要求。溶解曲线分析表明, *ns1* 和 *ns3* 扩增产物的溶解峰单一, 说明扩增特性强。

2.3 病毒随蚕沙释放的动态

用病毒感染家蚕 5 龄幼虫, 在不同时间点收集幼虫蚕沙, 通过荧光定量 PCR 检测蚕沙中的病毒。结果表明, 在病毒感染 1-2 d 中, 病毒量维持在很低的水平, 在第 3 天的蚕沙中检测到大量的病毒, 每微克蚕沙中约含 1.38×10^6 个 VD1, 6.54×10^5 个 VD2, 相当于每微克蚕沙中约含有 9.956×10^{-3} ng 的 VD1, 4.695×10^{-3} ng 的 VD2; 从感染后 5 d 开始, 释放到环境中的病毒量呈指数型增加; 第 7-8 天病毒的释放量到达一个平台期, 此时每微克蚕沙中约有 2.12×10^7 个 VD1, 1.34×10^7 个 VD2, 相当于每微

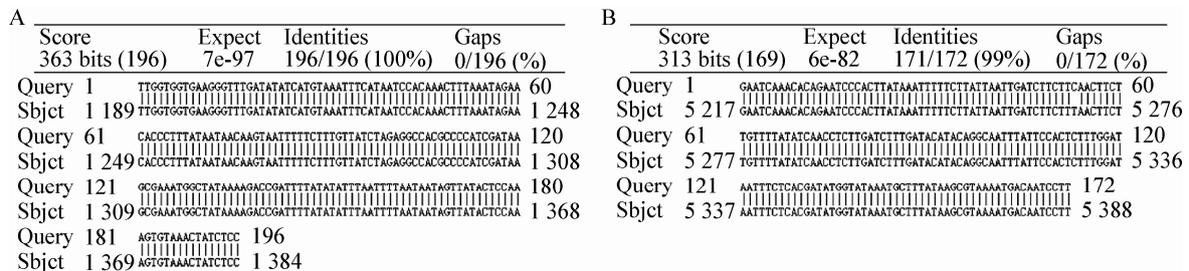


图 1 克隆片段测序比对结果

Figure 1 BLAST results of sequencing clone fragment

注: A: *ns1* 克隆片段测序 BLAST 结果; B: *ns3* 克隆片段测序 BLAST 结果。

Note: A: BLAST results of sequencing *ns1* fragment; B: BLAST results of sequencing *ns3* fragment.

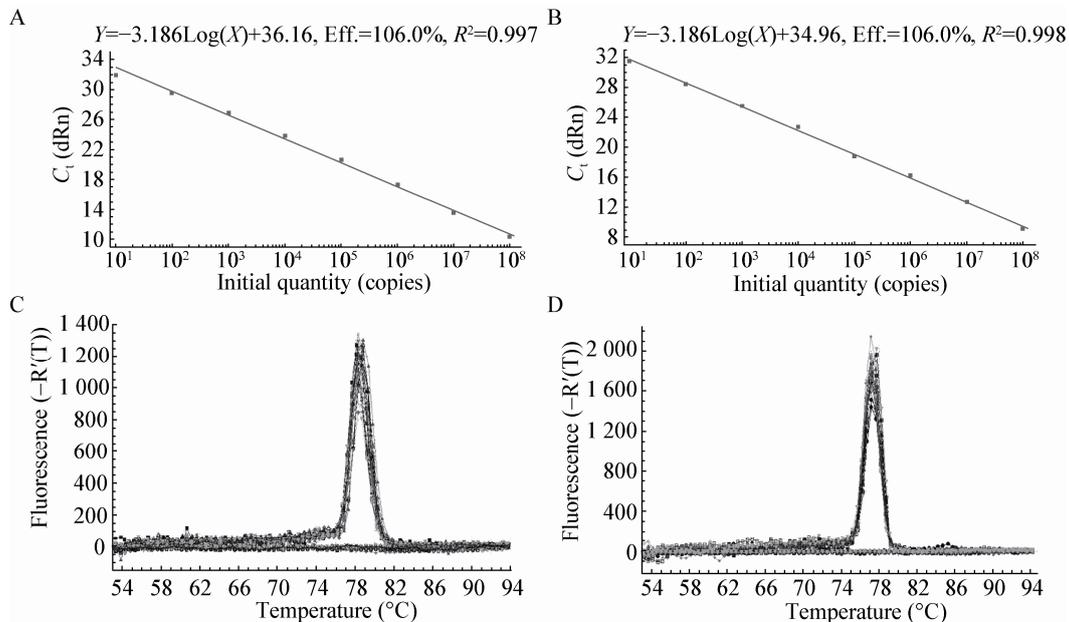


图 2 实时荧光定量 PCR 标准曲线和溶解曲线

Figure 2 The standard curve and dissociation curve of qPCR

注: A: *ns1* 的标准曲线; B: *ns3* 的标准曲线; C: *ns1* 的溶解曲线; D: *ns3* 的溶解曲线。

Note: A: *ns1* standard curve; B: *ns3* standard curve; C: *ns1* dissociation curve; D: *ns3* dissociation curve.

克蚕沙中约含有 0.152 ng 的 VD1, 0.096 ng 的 VD2 (图 3)。

2.4 普通 PCR 检测蚕沙中病毒

以蚕沙匀浆液为模板, PCR 分析蚕沙中的病毒。23 个循环数下的 PCR 结果如图 4、5 所示。BmBDV-VD1-*ns1* 基因在病毒感染 1 d 的幼虫蚕沙中开始被检测到, BmBDV-VD2-*ns3* 基因在病毒感染第 3 天的蚕沙中开始被检测到, 扩增产物特异。从感染后 5 d 开始, 扩增产物显著地增加。

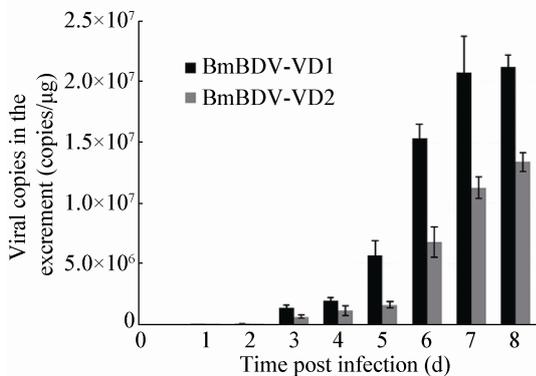


图 3 5 龄感病家蚕不同感染天数的蚕沙中 BmBDV 的量
Figure 3 The amount of BmBDV in excrement of 5th silkworm infected by virus at different time points

注: 纵坐标为病毒的拷贝数, 横坐标为病毒感染 5 龄家蚕后不同时间点的家蚕蚕沙。黑色柱状图表示 BmBDV-VD1 的量, 灰色柱状图表示 BmBDV-VD2 的量, 3 次重复计算标准差。

Note: X axis shows the excrement of silkworm infected by BmBDV at different days. Y axis is the viral copies. Black column indicate the quantities of BmBDV-VD1. Gray column indicate the quantities of BmBDV-VD2. Standard deviations come from the three times repeated test.

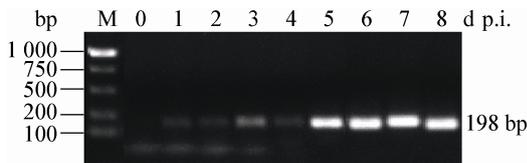


图 4 PCR 检测蚕沙中 BmBDV-*ns1*
Figure 4 Detection of BmBDV-*ns1* in the faeces of silkworm by PCR



图 5 PCR 检测蚕沙中 BmBDV-*ns3*
Figure 5 Detection of BmBDV-*ns3* in the faeces of silkworm by PCR

3 结论与讨论

家蚕二分浓核病毒致使家蚕幼虫罹患类似昆虫浓核症, 是危害蚕业生产的主要病原之一, 与家蚕浓核病毒相比, 其致病的病程较长^[4], 5 龄后幼虫感染病毒后, 症状不明显。在 BmBDV 感染的晚期, 大量的成熟的病毒粒子随蚕沙排泄到环境, 因此, 可通过检测蚕沙中的 BmBDV 来诊断家蚕是否被病毒感染。贾鹏等就曾用实时荧光定量手段通过检测猪粪便中的基因 4 型戊型肝炎病毒来判断猪是否患有此病^[18]。

为了对 BmBDV 进行定量研究, 我们选取了 VD1 上 *ns1* 基因和 VD2 上 *ns3* 基因上的部分片段, 克隆到 pMD18-T 载体上, 并通过测序验证克隆成功。随后得到了 *ns1* 和 *ns3* 基因的标准曲线, 两者在 10^1 – 10^8 copies/μL 范围内线性关系良好, 溶解曲线单一, 可以用于 BmBDV 的诊断和定量研究。根据建立的标准曲线, 我们研究了 BmBDV 感染家蚕后释放到环境中的病毒量的变化动态, 结果表明, 在病毒感染家蚕后第 3 天有大量的病毒随蚕沙释放到环境中, 说明此时病毒完成了初始感染。从感染后第 5 天起, 释放到环境中的病毒量呈指数增加, 说明此时病毒完成了第二次感染, 感染后第 7–8 天病毒的释放量到达一个平台期。根据病毒的释放动态, 可以推断 BmBDV 的复制周期约 2.5 d (60 h)。病毒复制周期的准确时长还需要通过对不同感染时间点中肠的超薄切片的电镜观察来进一步验证。普通的 PCR 分析结果反映出相同的病毒释放动态, 且 PCR 扩增产物特异, 进一步说明我们检测方法特异、准确。韩序等通过 qPCR 研究了 BmBDV 基因组在家蚕体内的复制情况, 发现病毒基因组在感染 12 h 开始复制, 36 h 后达到平台期^[16]。先前的研究表明, BmBDV 感染家蚕 36 h 后, 在病毒感染的幼虫中肠中开始检测到病毒衣壳蛋白的表达^[19]。综合我们的研究, BmBDV 感染宿主后 12 h, 病毒基因组开始复制, 到感染后 36 h, 基因组大量复制并表达结构蛋白, 然后开始子代病毒的装配, 到感染后约 60 h, 成熟的子代病毒粒子释放到肠腔, 完成

一个完整的复制周期。对于第 1 天和第 2 天的蚕沙中也检测到少量的病毒，可能是添毒时的病毒残留。我们也用 qPCR 和普通 PCR 对不添毒家蚕的蚕沙进行了研究，并未检测到病毒(图未展示)。

我们的研究显示，蚕沙中的病毒群体中 VD1 和 VD2 的拷贝数不同。蚕豆坏死矮化病毒(Faba bean necrotic stunt virus, FBNSV)具有 8 个独立包装的基因组节段，研究显示，FBNSV 的不同基因组节段在病毒复制过程中及病毒粒子群体中差异积累，这种不同基因组节段拷贝数的差异调控在植物多分体病毒中普遍存在，这种差异调控的机制和意义仍未明了^[20]。需要指出的是，在我们的实验中，两个不同的标准品质粒的纯度差异会导致质粒浓度之间的比较误差，影响 VD1 和 VD2 的相对比例。

本研究以 BmBDV *ns1* 和 *ns3* 基因为目的基因，建立了实时荧光定量 PCR 检测方法，并以此分析了不同感染时间点家蚕蚕沙中的病毒量。根据病毒的释放动态，BmBDV 的复制周期约 60 h。我们的研究与前人的相比，无需繁琐的提取 DNA 的步骤，更不需解剖家蚕幼虫，直接以蚕沙匀浆液为模板检测病原，能对 BmBDV 的感染进行快速、简便、准确的诊断。我们的研究能为 BmBDV 的流行病学研究、疫情的早期诊断和防治以及抗病毒家蚕的筛选提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] Hu XF, Wang HL, Qian YJ, et al. Identification of *Bombyx mori* infectious flacherie virus in some Chinese areas[J]. *Canye Kexue*, 1983, 9(3): 156-159 (in Chinese)
胡雪芳, 王红林, 钱元骏, 等. 我国部分地区家蚕软化病病毒性状鉴定[J]. *蚕业科学*, 1983, 9(3): 156-159
- [2] Wang YJ, Yao Q, Chen KP, et al. Characterization of the genome structure of *Bombyx mori* densovirus (China isolate)[J]. *Virus Genes*, 2007, 35(1): 103-108
- [3] Krupovic M, Koonin EV. Evolution of eukaryotic single-stranded DNA viruses of the Bidnaviridae family from genes of four other groups of widely different viruses[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5347
- [4] Hu ZY, Li GH, Li GT, et al. *Bombyx mori* bidensovirus: the type species of the new genus Bidensovirus in the new family Bidnaviridae[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(36): 4528-4532
- [5] Kapitonov VV, Jurka J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(12): 4540-4545
- [6] Adams MJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(7): 1411-1422
- [7] Ito K, Kidokoro K, Sezutsu H, et al. Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx parvo*-like virus[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(21): 7523-7527
- [8] Iwashita Y, Cao YS. The development of a densovirus isolated from silkworm larvae, *Bombyx mori*, of China[J]. *Canye Kexue*, 1983, 9(4): 219-222 (in Chinese)
岩下嘉光, 曹谄孙. 中国株家蚕浓核症病毒的发育[J]. *蚕业科学*, 1983, 9(4): 219-222
- [9] Lü HS. *Molecular Biology of Insect Viruses*[M]. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1998: 396 (in Chinese)
吕鸿声. *昆虫病毒分子生物学*[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 396
- [10] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(3): 597-601
- [11] Heine HG, Foord AJ, Wang JN, et al. Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 18
- [12] Chen PS, Li CS. Real-time quantitative PCR with gene probe, fluorochrome and flow cytometry for microorganism analysis[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2005, 7(3): 257-262
- [13] Gentilini F, Turba ME. Optimization of the Divergent method for genotyping single nucleotide variations using SYBR Green-based single-tube real-time PCR[J]. *Mutation Research*, 2014, 766/767: 14-18
- [14] Zhang YP, Liu YM, Zhang JZ, et al. Molecular cloning and mRNA expression of heat shock protein genes and their response to cadmium stress in the grasshopper *Oxya chinensis*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131244
- [15] Pu TJ, Guo P, Qiu Y, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction is an alternative method for the detection of HER-2 amplification in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(9): 10565-10574
- [16] Han X, Yao Q, Gao L, et al. Replication of *Bombyx mori* densovirus (Zhenjiang isolate) in different silkworm strains[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(1): 145-150 (in Chinese)
韩序, 姚勤, 高路, 等. 家蚕浓核病毒(中国镇江株)在不同感受性宿主体内的复制[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 145-150
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3rd Edition. Translated by Huang PT. Beijing: Science Press, 2002: 1595 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*[M]. 第三版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595
- [18] Jia P, Jin NY, Li X, et al. Establishment of a fluorescent real-time quantitative RT-PCR assay for detection of genotype 4 Hepatitis E virus in swine stools[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2010, 26(1): 33-38 (in Chinese)
贾鹏, 金宁一, 李霄, 等. 检测猪粪便中基因 4 型戊型肝炎病毒的实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. *病毒学报*, 2010, 26(1): 33-38
- [19] Pan XL, Lü P, Zhang MM, et al. Expression analysis of *Bombyx mori* bidensovirus structural proteins and assembly of virus-like particles in insect cells[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(4): 567-573
- [20] Sicard A, Yvon M, Timchenko T, et al. Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2248