

# 家蚕杆状病毒(BmNPV) *Bm122* 基因的缺失 影响芽生型病毒粒子的形成

朱丽萍<sup>a</sup>, 于威<sup>a,b</sup>, 陈滨<sup>a,b</sup>, 何欢<sup>a,b</sup>, 解纯刚<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学, a. 生物化学研究所; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 为研究家蚕杆状病毒(BmNPV)编码的 *Bm122* 基因的生物学功能, 利用 Red 重组技术和 Bac-to-Bac 系统分别构建了 *Bm122*-ko-bacmid 和 *Bm122*-re-bacmid, 实现对 *Bm122* 基因的敲除和异位补回。进而将 *Bm122*-ko-bacmid、*Bm122*-re-bacmid、wtbacmid(野生型)分别转染 BmN 细胞, 病毒滴度测定结果显示: *Bm122* 缺失后, 病毒无法形成正常水平的芽生型病毒粒子(budded virus, BV), 表明该基因是病毒生成有感染力的 BV 所必需的基因; 透射电子显微镜观察发现, *Bm122* 敲除后细胞内未观察到杆状病毒粒子, 进一步证实 *Bm122* 的缺失影响了 BV 的生成。qPCR 结果显示, *Bm122* 缺失后病毒 DNA 复制水平降低。结果表明, *Bm122* 是病毒生成正常水平的 BV 所必需的基因。

**关键词:** 家蚕杆状病毒; *Bm122* 基因; Red 重组技术; Bac-to-Bac 系统; 病毒复制

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 02-0277-06 **引用页码:** 030702

## 0 引言

杆状病毒是一类在自然界中仅感染节肢动物的病毒。杆状病毒基因组为共价闭环环状 DNA, 基因组大小在 80~180 kb 之间。根据 ICTV 网站上发布的最新分类, 杆状病毒分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  杆状病毒属。病毒粒子分为包涵体来源型病毒粒子(occluded virions, ODV)和芽生型病毒粒子(budded virions, BV), 两种不同表型的病毒粒子产生于病毒感染周期的不同时期, 产生的细胞部位和形态结构也不同<sup>[1]</sup>。对家蚕杆状病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedro virus, BmNPV)的核酸序列分析表明, 它与苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)序列同源性高达 90%, 但它们的宿主截然不同。BmNPV 基因组全长 128413 bp, 其(G+C)%为 40%, 有 136 个开放阅读框编码的蛋白含有超过 60 个氨基酸<sup>[2]</sup>。杆状病

毒许多基因跟 BV 滴度下降有关但并不影响病毒 DNA 复制, 如 *pp31*、*gp64*、*Bm118*、*Bm117*、*Bm111* 等基因<sup>[3-7]</sup>; 有些基因敲除后会导致不能产生 BV, 但它们的缺失并不影响病毒 DNA 复制, 比如 *Bm92*、*Bm119*<sup>[8]</sup>、*lef-2*<sup>[9]</sup> 等基因; 有些基因缺失导致病毒不能产生 BV, 且影响病毒 DNA 复制, 如 *Bm101*<sup>[10]</sup>; 而有些基因的缺失导致病毒不能产生 BV, 且检测不到病毒相关蛋白的表达, 如 *Bm25*<sup>[11]</sup>。家蚕杆状病毒基因 *Bm122* 位于家蚕核型多角体病毒 T3 株基因组 116323-116928 nt, 读码框全长 606 bp, 编码的蛋白大小约 23 kD。 *Bm122* 存在于所有的鳞翅目基因组中。有研究表明, *Bm122* 转录起始于转染后 3 h, 由宿主的 RNA 聚合酶 II 转录, 由此推测它是一个早期基因<sup>[12]</sup>。 *Bm122* 基因编码的蛋白定于细胞核内, 推测它可能与病毒 DNA 复制及晚期基因表达有关。其同源基因 *Ac146* 与 *Bm122* 相似度达 97%, *Ac146* 是一个晚期基因, *Ac146* 的缺失导致病毒不能产生有感染性的 BV<sup>[13]</sup>。有研究

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603); 浙江省自然科学基金项目(Y207217)

作者简介: 朱丽萍(1988—), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事家蚕生物反应器与蛋白质组学方面的研究。

通信作者: 解纯刚, E-mail: chungxie@126.com

者通过将 *Bm122* 缺失后的 bacmid 连接 GFP 后证实该基因缺失后病毒无法进行细胞间的感染<sup>[14]</sup>。利用生物信息学的相关软件对 *Bm122* 进行了生物信息学分析,发现 *BM122* 蛋白不含跨膜结构域,但是在 N-端存在一个信号肽。本文利用分子生物学和细胞生物学等手段对 *Bm122* 的功能进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DH10Bac、大肠杆菌 TG1、BW25113 菌种、质粒 pFastBac1 和 pKD3 质粒均为本实验室保存。

L-阿拉伯糖购自 Promega 公司, pMD18-T vector、T4 Ligation、限制性内切酶及 PCR 试验所需试剂均购自 TaKaRa 公司, KOD plus 高保真酶购自 TOYOBO 公司。其余试剂均为国产分析纯。引物由上海桑尼公司合成。

Sf-900 II SFM(1×) 无血清培养基和胎牛血清(FBS) 购自美国 Gibco 公司, 脂质体转染试剂 SuperFectinTM II In Vitro DNA Transfection Reagent 购自普飞公司, 细胞培养瓶及培养皿购自康宁公司, 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司, *Dpn* I 和基因组 DNA 小量抽提试剂盒购自中国碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 *Bm122* 基因的缺失与补回

#### 1.2.1 *Bm122* 基因缺失型 bacmid 构建

设计一对引物, 扩增出氯霉素基因完整序列, 构建了一个用于 *Bm122* 基因敲除的线性化片段。这对引物分别由 50 bp 的 *Bm122* 基因同源区(下划线标注)和 20 bp 的氯霉素基因同源区组成。以 pKD3 (含有氯霉素抗性基因 *cat*) 质粒为模板, *Bm122*-cmF 和 *Bm122*-cmR 为引物扩增获得 1100 bp 左右的线性片段, 该线性片段转化 BW25113 (含质粒 pKD46 和 bacmid) 感受态细胞, 涂布含氯霉素和卡那霉素抗性的 LB 固体培养基进行筛选。在  $\lambda$ Red 重组酶的作用下, 含氯霉素基因的打靶片段和目的基因 *Bm122* 发生同源重组(如图 1a 所示)。PCR 扩增引物序列如下: *Bm122*-cmF: 5'-TGTGCGCTAGCATGCC CGTAACGGACCTTGTGCTTTTGGCTTCAAAGG TTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; *Bm122*-cmR: 5'-GACACGAGGAGCGTACGTGATCAGCTGCATT CGCGCGCCGCGCCTTTATC ATGGGAATTAGCCA TGGTCC-3'。将 *Bm122* 缺失型 bacmid 命名为 *Bm122*-ko-bacmid。

#### 1.2.2 *Bm122* 补回型 bacmid 构建

根据 *Bm122* 完整的基因序列进行引物设计, 引物序列为: *pFbBm122*-F: 5'-CGGGATCCCAGTCTCG CTGTCAGATACT-3' (下划线 *Bam*H I 酶切位点), *pFbBm122*-R: 5'-CGGAATTCGCGGCTCGCATGTATAGAAA-3' (下划线为 *Eco*R I 酶切位点)。以 wtbacmid (野生型) 为模板, 利用该对引物扩增出 *Bm122* 基因的完整编码框。PCR 扩增所得片段和转移载体 pFastBac1 分别经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后连接, 获得 pFastBac1-*Bm122* (如图 1)。将重组质粒 pFastBac1-*Bm122* 再转化 *Bm122* 缺失型的大肠杆菌 DH10Bac (内含辅助质粒和 bacmid), 通过转座作用将 *Bm122* 基因异位补回(如图 1b 所示)。用含卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG、X-gal 的多抗板筛选阳性重组质粒。将 *Bm122* 补回型 bacmid 命名为 *Bm122*-re-bacmid。

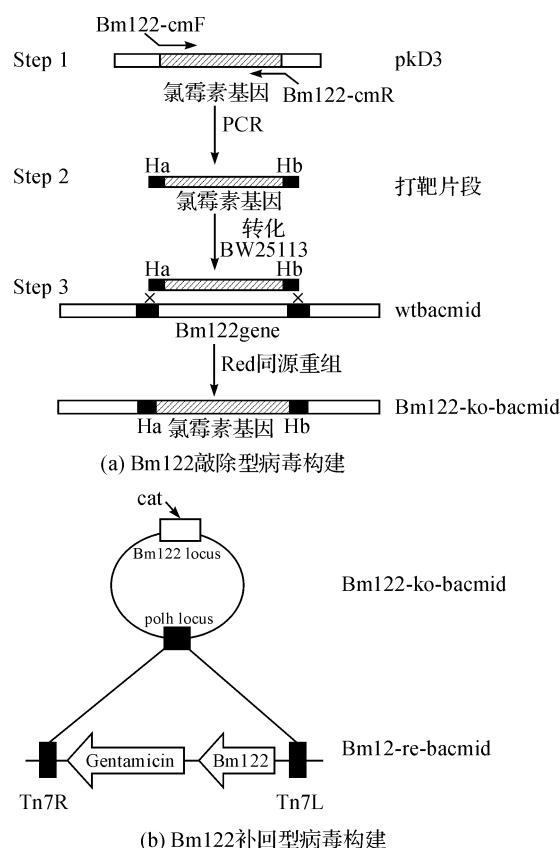


图1 *Bm122* 基因缺失型和补回型重组病毒的构建示意图: (a) 以 pKD3 质粒为模板, 扩增 *Bm122* 打靶片段, 打靶片段与 wtbacmid 上 *Bm122* 基因位点内相应片段同源重组, 构建 *Bm122* 基因缺失型重组病毒 *Bm122*-ko-bacmid; (b) *Bm122* 完整编码框连接到转移载体上, 将 *Bm122* 异位补回到 *Bm122*-ko-bacmid 上的 *polh* 启动子下游, 构建 *Bm122* 基因补回型重组病毒 *Bm122*-re-bacmid。

### 1.3 病毒滴度测定

为了研究 *Bm122* 的缺失对病毒增殖的影响,3种 bacmid 分别转染家蚕 BmN 细胞后,在不同时间点(24、48、72 h 和 96 h)收集细胞培养上清液,利用 TCID<sub>50</sub> 终点稀释法测定病毒滴度。取处于对数生长期的 BmN 细胞按每孔 10000 个细胞铺 96 孔板,病毒上清按 10 倍梯度稀释,各稀释度做 8 个重复。边缘两列不加病毒,以正常的 BmN 细胞作阴性对照。37℃ 培养箱中培养 7 d,每天观察并记录各稀释度的发病情况,TCID<sub>50</sub> 终端稀释法计算病毒滴度。

### 1.4 透射电镜观察病毒装配与增殖情况

为研究 *Bm122* 基因的缺失是否影响病毒核衣壳的结构<sup>[15]</sup>,收集 3 种 bacmid 转染 72 h 后的细胞,于透射电镜下观察。Bm122-ko-bacmid、wtbacmid 和 Bm122-re-bacmid 各 1 μg 转染家蚕 BmN 细胞,72 h 后轻轻吹下细胞,PBS 洗两次,加入 2.5% 戊二醛,4℃ 固定过夜;倒掉固定液,0.1 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min;1% 锇酸溶液固定样品 1~2 h;0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 15 min;再使用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 乙醇依次各洗 1 次,每次 15 min;用 100% 乙醇处理 20 min;纯丙酮处理 20 min;用包埋剂与丙酮的混合液(体积比 1:1)处理样品 1 h;用包埋剂与丙酮的混合液(体积比 3:1)处理样品 3 h;纯包埋剂处理样品过夜;70℃ 加热过夜,样品在 LEICA EM UC7 型超薄切片机中切片,切片厚度为 70~90 nm,再切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇的饱和溶液各染色 5 min 至 10 min,在 Hitachi H-7650 型透射电镜中观察。

### 1.5 qPCR 分析 *Bm122* 基因缺失对病毒复制的影响

设计一对引物 gp41-F:5'-CGTAGTGGTAGTAATCGCCGC-3', gp41-R: 5'-AGTCGAGTCGCGTCGCTTT-3',位于基因 *gp41* 的开放阅读框内<sup>[16]</sup>。该对引物与 BmNPV *gp41* 基因互补配对,扩增 100 bp 的病毒基因组 DNA 片段,该区域含有 4 个 *Dpn* I 限制性位点。为校正上样量的误差,引入内参照基因  $\beta$ Actin,其扩增引物为  $\beta$ Actin-F: 5'-GCGCGGCTACTCGTTCACT-3',  $\beta$ Actin-R: 5'-TGCCGCAAGCTTCCATACCC-3'。

分别取 Bm122-ko-bacmid、wtbacmid 和 Bm122-re-bacmid 各 1 μg 转染家蚕 BmN 细胞(5×10<sup>5</sup> 个细胞/孔),分别在转染后的 24、48、72、96 h 收集细胞,提取细胞内总 DNA,并用 *Dpn* I 酶消化掉转入的外源 bacmid,经处理的 DNA 进行 qPCR 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bm122* 基因的缺失和补回鉴定

#### 2.1.1 缺失型 bacmid 鉴定

以 pKD3(含有氯霉素抗性基因 *cat*)质粒为模板,Bm122-cmF 和 Bm122-cmR 为引物扩增获得 1100 bp 左右的线性片段,即 *Bm122* 基因打靶片段(如图 2b 所示)。该片段含 *cat* 基因的完整编码框,转化 BW25113 后与 wtbacmid 发生同源重组后,可在卡那霉素和氯霉素抗性平板上筛选阳性克隆,用碱裂解法提取 bacmid。PCR 鉴定引物为: Bm122-F: 5'-GAAGAGTGGCTTTCTAGTTG-3', Bm122-R: 5'-CTAATGGCGA ACACGATAATA A-3', cat-F: 5'-CACGTTTAAATCAAACTGGTG-3', cat-R: 5'-CAATATGGACAACCTTCTTCG-3'。引物 cat-F 和 cat-R 是氯霉素基因内部引物。鉴定引物组合分别为 Bm122-F 和 Bm122-R、Bm122-F 和 cat-R 及 cat-F 和 Bm122-R。各引物对应的位置如图 2(a)所示。电泳结果如图 2(c)所示。1-3 泳道以 wtbacmid 为模板,第 1 泳道产物预期大小为 580 bp,2、3 泳道无条带,因为 wtbacmid 中 *Bm122* 基因是完整的,无 *cat* 基因的插入,故无扩增产物;4-6 泳道以 *Bm122* 敲除后所提取的 bacmid 为模板,预期扩增产物大小依次为 1600 bp、450 bp、1150 bp。从图 2 中可看出,电泳产物大小分别与预期大小相符,表明 *Bm122* 敲除成功。

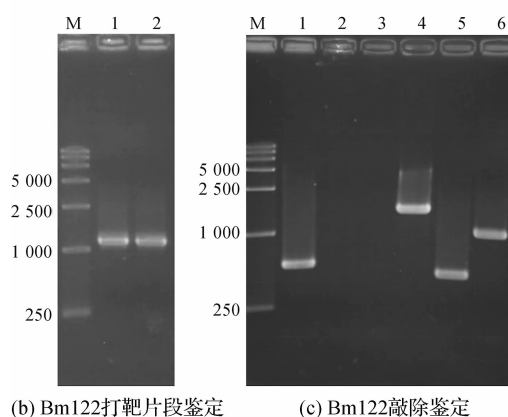
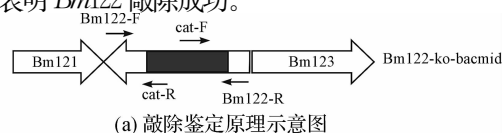


图2 *Bm122* 基因敲除型病毒的鉴定

注:(a)设计两对鉴定引物 Bm122-F/Bm122-R 和 cat-F/cat-R,利用这两对引物进行交叉 PCR,确保 *cat* 基因成功插入 *Bm122* 基因内部以实现 *Bm122* 基因的敲除;(b)以氯霉素抗性基因为模板 PCR 扩增的打靶片段大小为 1100 bp 左右;(c) *Bm122* 基因敲除鉴定;M:DL15000 DNA Marker;1-3 泳道为阴性对照,引物组合依次为 Bm122-F 和 Bm122-R、Bm122-F 和 cat-R、cat-F 和 Bm122-R;4-6 泳道为敲除鉴定结果,引物组合依次为 Bm122-F 和 Bm122-R、Bm122-F 和 cat-R、cat-F 和 Bm122-R。

### 2.1.2 补回型 bacmid 鉴定

在含卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 X-gal 的多抗平板上随机挑取白色单菌落,接种于含有卡那霉素、庆大霉素、四环素和氯霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 摇床培养过夜。提取病毒 bacmid 进行 PCR 鉴定。M13-F: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3', M13-R: 5'-CAGGAAA CAGCTATGAC-3', pFbBm122-F: 5'-CGGGATCCCAGTC

TCGCTGTCAGATACT-3', pFbBm122-R: 5'-CGGAATTCGCGGCTCGCATGTATAGAAA-3'。引物组合分别为 M13-F 和 M13-R、M13-F 和 pFbBm122-R 及 pFbBm122-F 和 M13-R。各引物对应位置见图 3(a)所示。鉴定结果如图 3(b)所示。1-3 泳道条带预期大小依次为 3163 bp、2513 bp、1553 bp,从图 3 中可看出电泳产物大小分别与预期相符,表明 *Bm122* 已成功补回。

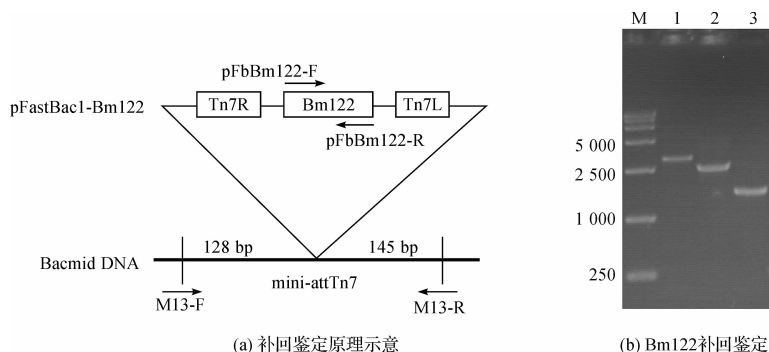


图3 *Bm122* 基因补回型病毒的鉴定

注:(a)通过转座作用将 pFastBac1-Bm122 重组到 *Bm122* 缺失型 bacmid 上游 M13 位点内的转座整合靶位点,利用 M13-F、M13-R 和 *Bm122* 自身引物 pFbBm122-F、pFbBm122-R 交叉 PCR 鉴定;(b)1-3 泳道依次是以 M13-F 和 M13-R、M13-F 和 pFbBm122-R、pFbBm122-F 和 M13-R 为引物对扩增的产物。

### 2.2 病毒滴度测定结果分析

碱裂法提取 wtbacmid、*Bm122*-ko-bacmid 和 *Bm122*-re-bacmid,各 1  $\mu$ g 分别转染 BmN 细胞,在特定时间点收集细胞培养上清液,测定上清液的病毒滴度,结果如图 4 所示。wtbacmid 型病毒的滴度随着时间的增加逐渐增加,*Bm122*-re-bacmid 型病毒的滴度也恢复到野生型水平,但是 *Bm122*-ko-bacmid 型病毒的滴度在各个时间点均为零,这说明 *Bm122*-ko-bacmid 转染的家蚕 BmN 细胞内不能产生有感染力的 BV。

### 2.3 透射电镜观察病毒增殖

为进一步研究 *Bm122* 缺失后细胞内是否能产生正常水平的 BV,将 *Bm122*-ko-bacmid、wtbacmid 和 *Bm122*-re-bacmid 各 1  $\mu$ g 转染家蚕 BmN 细胞后,72 h 收集细胞,制样,透射电镜观察。结果如图 5—图 7 所示:wtbacmid 和 *Bm122*-re-bacmid 转染的细胞内清楚可见许多正在装配或已成熟的病毒粒子。但是 *Bm122*-ko-bacmid 转染的细胞内并未观

察到 BV 结构。由电镜结果分析得出,*Bm122* 基因的缺失导致病毒不能产生正常水平 BV。

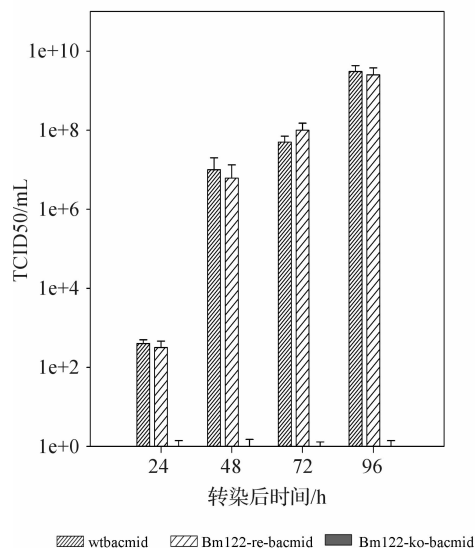


图4 wtbacmid、*Bm122*-re-bacmid 和 *Bm122*-ko-bacmid 转染细胞后病毒滴度分析

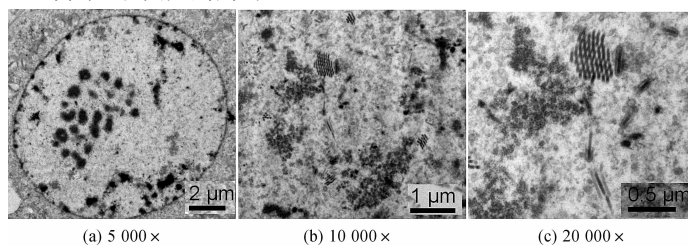


图5 wtbacmid 转染家蚕 BmN 细胞后超薄切片透射电镜照片

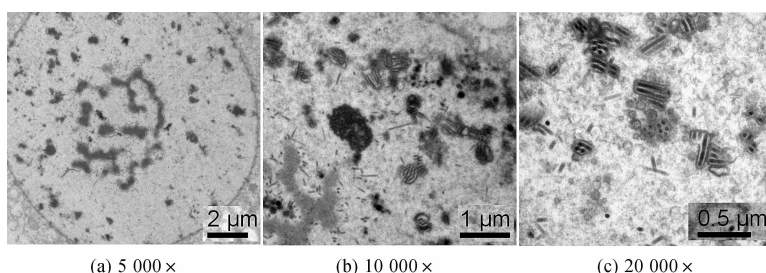


图 6 Bm122-re-bacmid 转染家蚕 BmN 细胞后超薄切片透射电镜照片

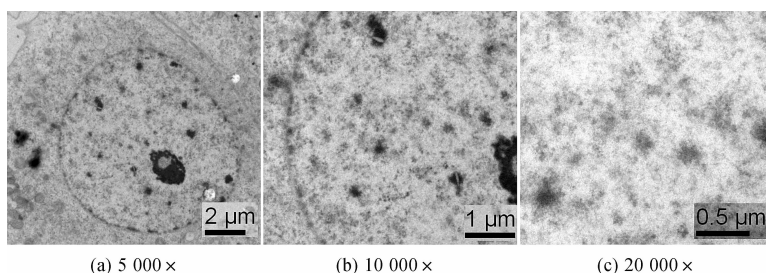


图 7 Bm122-ko-bacmid 转染家蚕 BmN 细胞后超薄切片透射电镜照片

#### 2.4 *Bm122* 基因缺失对病毒 DNA 复制影响

为研究 *Bm122* 敲除后病毒滴度为零是否因为 *Bm122* 的敲除影响了病毒基因组的正常复制,进行了 qPCR 验证。结果如图 8 所示,随着时间的增加,wtbacmid 型病毒 DNA 的复制水平逐渐增加,Bm122-re-bacmid 型病毒 DNA 的复制水平也几乎恢复到了 wtbacmid 型病毒 DNA 的复制水平。而 Bm122-ko-bacmid 型病毒 DNA 的复制水平明显低于前两者,且在转染后 48h 呈下降趋势,这可能是由于最初转染的细胞死亡导致病毒不能继续复制,也进一步说明 *Bm122* 缺失后,病毒无法产生 BV,不能进行细胞间感染。因此 Bm122-ko-bacmid 型病毒 DNA 的复制水平较 wtbacmid 型病毒和 Bm122-re-bacmid 型病毒低的原因可能是因为 *Bm122* 缺失导致病毒不能感染更多的细胞,所以只有在起始转染的细胞内有 DNA 的复制,或者是 *Bm122* 基因的缺失确实影响了病毒 DNA 的正常复制。

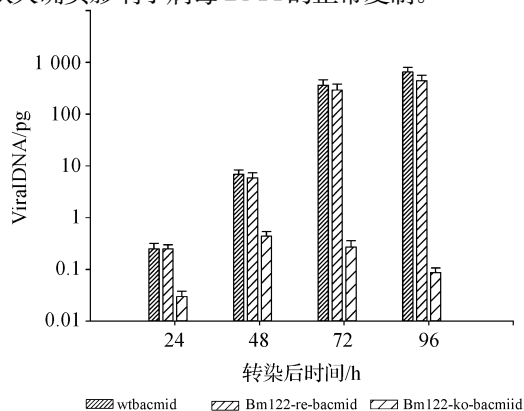


图 8 wtbacmid、Bm122-ko-bacmid 和 Bm122-re-bacmid 转染 BmN 细胞病毒拷贝数随转染后时间变化的 qPCR 分析

### 3 讨论

本研究通过 Red 重组技术和 Bac-to-Bac 系统分别实现对 *Bm122* 基因的敲除和异位补回。将 *Bm122* 缺失和补回型的 bacmid 与 wtbacmid 同时分别转染家蚕 BmN 细胞,病毒滴度分析表明 *Bm122* 的缺失导致病毒不能形成有感染力的 BV;透射电镜观察显示 *Bm122* 缺失后细胞内无 BV 生成。qPCR 结果表明 *Bm122* 基因缺失后,在转染的初期细胞内仍有病毒 DNA 复制,且在转染 48 h 后不再增加,但 *Bm122* 缺失型病毒 DNA 复制水平明显低于 wtbacmid 和 *Bm122* 补回型 bacmid,这可能是由于病毒无法进行细胞间感染造成的,或者 *Bm122* 的缺失影响了病毒 DNA 的复制。对 BM122 蛋白的信号肽分析表明,BM122 蛋白内有一个信号肽,剪切位点位于从 N 端开始的第 16 和 17 个氨基酸处。但是没有跨膜结构域,推测它可能在引导与病毒毒性相关的蛋白或者核衣壳蛋白参与病毒粒子的装配,或者调解相关蛋白功能方面有重要作用。综上所述,*Bm122* 基因是病毒 BVs 的形成所必需的基因,它可能在决定核衣壳最终能否装配成 BV 或 ODV 方面起重要作用。*Bm122* 基因是病毒生活周期中一个不可缺少的基因,*Bm122* 基因如何影响 BV 的生成以及对病毒 DNA 复制的影响还有待于进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] GEORGE F R. Baculovirus Molecular Biology [M]. United States: National Center for Biotechnology

- Information, 2001; 7-11.
- [2] GOMI S, MAJIMA K, MAEDA S. Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80(5): 1323-1337.
- [3] YAMAGISHI J, BURNETT E D, HARWOOD S H, et al. The AcMNPV pp31 gene is not essential for productive AcMNPV replication or late gene transcription but appears to increase levels of most viral transcripts[J]. Virology, 2007, 365(1): 34-47.
- [4] MONSMA S A, OOMENS A G, BLISSARD G W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection [J]. Journal of Virology, 1996, 70(7): 4607-4616.
- [5] MCCARTHY C B, DAI X, DONLY C, et al. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ac142, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment[J]. Virology, 2008, 372(2): 325-339.
- [6] DAI X, STEWART T M, PATHAKAMURI J A, et al. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus exon0 (orf141), which encodes a RING finger protein, is required for efficient production of budded virus [J]. Journal of Virology, 2004, 78(18): 9633-9644.
- [7] HAN Y Y, XIA H C, TANG Q, et al. The Bombyx mori nucleopolyhedrovirus Bm111 affects virulence but not virus replication[J]. Curr Microbiol, 2014, 69(1): 56-62.
- [8] MCCARTHY C B, THEILMANN D A. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene[J]. Virology, 2008, 375(1): 277-291.
- [9] CAROL P W, HUANG Y J, WANG J Y, et al. Capsid protein required for amplification but not initiation of viral DNA replication [J]. J Virol, 2010, 84(10): 5015-5024.
- [10] CHEN H Q, LI M, MAI W J, et al. Analysis of BmNPV orf101 disruption: orf101 is essential for mediating budded virus production [J]. Cytotechnology, 2014, 66(6): 1021-1029.
- [11] TAMER Z S, ZHANG F R, SUZANNE M T. Reduced expression of Autographa californica nucleopolyhedrovirus ORF34, an essential gene, enhances heterologous gene expression[J]. Virology, 2013, 435(2): 225-238.
- [12] GE J Q, ZHAO J F, SHAO Y M, et al. Characterization of an early gene orf122 from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(3): 543-548.
- [13] DICKISON V L, WILLIS L G, SOKAL N R, et al. Deletion of AcMNPV ac146 eliminates the production of budded virus[J]. Virology, 2012, 431(2): 29-39.
- [14] ONO C, KAMAGATA T, TAKA H, et al. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences[J]. Virus Res, 2012, 165(2): 197-206.
- [15] VANARSDALL A L, OKANO K, ROHRMANN G F. Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene [J]. Virology, 2005, 331(1): 175-180.
- [16] VANARSDALL A L, MIKHAILOV V S, Rohrmann G F. Characterization of a baculovirus lacking the DBP (DNA-binding protein) gene[J]. Virology, 2007, 364(2): 475-485.

## Influence of Deficiency in BombyxMori Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) Gene *Bm122* on the Production of Budded Virus

ZHU Liping<sup>a</sup>, YU Wei<sup>a,b</sup>, CHEN Bin<sup>a,b</sup>, HE Huan<sup>a,b</sup>, XIE Chungang<sup>a,b</sup>

(a. Institute of Biochemistry; b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** To study the biological function of BmNPV-encoded *Bm122* gene, we constructed a *Bm122* knockout bacmid (*Bm122*-ko-bacmid) and *Bm122* repair bacmid (*Bm122*-re-bacmid) to achieve knockout and repair of *Bm122* gene by using Red recombinant technology and Bac-to-Bac system respectively. Then, transfect BmN cells with *Bm122*-ko-bacmid, *Bm122*-re-bacmid and wt bacmid (wild type bacmid), and virus titer measuring results indicate that, with the *Bm122* deficiency, virus is unable to produce infectious BV (budded virus) of normal level. In addition, it also shows that the gene is the necessary gene required by virus to generate infectious BV. No baculovirus particles were found in cells through transmission electron microscopy after *Bm122* knockout, further proving that lack of *Bm122* affects the generation of BV. qPCR results show that the level of viral DNA replication in *Bm122*-ko-bacmid is evidently reduced. In conclusion, *Bm122* is essential to the production of BV of normal level.

**Key words:** BmNPV; *Bm122* gene; Red-recombination; Bac-to-Bac system; viral replication

(责任编辑: 许惠儿)