

家蚕浓核病毒 DNV-3(中国株)的 VD₂ 基因组序列分析

王永杰^{1,2} 陈克平^{1*} 姚勤¹ 高贵田¹ 韩序¹

(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)

摘 要 浓核病毒 *BmDNV-3* (中国株) 基因组中含有两种不同的单链线形 DNA 分子 (VD₁, VD₂)。该病毒的 VD₂ 被分离、纯化、克隆到 pUC119 载体上, 并完成了 VD₂ 全基因组序列的测定。序列分析显示: VD₂ 全基因组长为 6022 个核苷酸, 末端拥有 524 个核苷酸反向重复序列 (ITRs)。VD₂ 基因组正链含有 2 个大的开放阅读框, 负链含有 1 个小的开放阅读框。计算机分析推测该基因组正链上开放阅读框 (ORF1) 及负链上开放阅读框 (ORF3) 主要编码病毒的非结构蛋白, 而正链上开放阅读框 (ORF2) 主要编码病毒的结构蛋白。比较 *BmDNV-3* VD₂ 和 *BmDNV-2* (Yamanashi isolate) VD₂ 基因组全序列, 两者同源性达 97.7%, 并且有 132 个碱基的替代、11 个碱基的删除和 2 个碱基插入。研究结果显示 *BmDNV-3* VD₂ 和 *BmDNV-2* VD₂ 有很近的亲缘关系, 但也发生一定的变异, 这为更好地理解浓核病毒种类的多样性, 也为研究家蚕浓核病毒进化提供了有益的线索。

关键词: 家蚕浓核病毒; 序列分析; 基因组结构

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0363-05

浓核病毒 (*Densonucleosis virus*, DNV) 和其它细小病毒一样, 无囊膜, 正 20 面体对称, 直径 19 ~ 24 nm, 含有 4 ~ 6 种多肽, 基因组大小约为 4.0 ~ 6.5 kb。该病毒内含有正负链单分子 ssDNA, 或为正链, 或为互补的负链, 分别包裹在不同的衣壳蛋白中。在适当盐浓度抽提时, 正负链在体外可形成双链 dsDNA。浓核病毒通常感染无脊椎动物, 并引起浓核病症^[1]。与细小病毒不同的是浓核病毒对宿主的感染往往是致死的。在基因组结构上浓核病毒与细小病毒存在极大的差别, 并且不同的浓核病毒之间也存在基因组结构的多样性^[2]。到目前为止, 大约有 30 种 DNVs 从不同的寄主中分离出来, 正式被分类鉴定的约 20 种, 仍然还有很多种未被精确分类鉴定。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 网上最新的公布, 可将浓核病毒亚科分为 3 个属。(1) 浓核病毒属 (*Densovirus*), 代表种有鹿眼蝶浓核病毒 (*JcDNV*)^[3]、大蜡螟浓核病毒 (*GmDNV*)^[4]、玉米夜蛾浓核病毒 (*MIDNV*)^[5] 等。(2) *Iteva* 病毒属 (*Itevirus*), 代表的种类有家蚕 *BmDNV-1*^[6,7]、蟑螂 *PIDNV*^[8] 等。(3) 短浓核病毒属 (*Brevidensovirus*), 代表种有蚊、伊蚊、虾和蟹等浓核病毒^[9,10]。随着家蚕浓核病毒 *BmDNV-2* (Yamanashi isolate) 的序列被解析, 有学者建议将其

分类为双分子浓核病毒属 (*Bidensoviruses*)^[11], 该病毒基因组含有两种不同的单链线形 DNA 分子 (VD₁ 6542 bp, VD₂ 6031 bp), VD₁ 与 VD₂ 大小不等, 并且两者之间没有同源性。VD₁ 与 VD₂ 可能位于两个不同的衣壳蛋白中^[11], 现在还不清楚 VD₁ 与 VD₂ 是如何相互作用的。

家蚕作为经济昆虫的重要性, 自上世纪 80 年代就先后从日本 (*BmDNV-1*、*BmDNV-2*)、中国镇江 (*BmDNV-3*) 和印度 (*BmDNV-4*) 的家蚕中分离到了不同株系 DNVs^[11]。家蚕对这些不同株系的 DNVs 的感受性、血清学上有差异^[12], 在宿主感染部位上也存在不同。*BmDNV-1*、*BmDNV-2* (Yamanashi isolate) 只感染家蚕中肠柱状细胞, *BmDNV-3* (中国株) 在发病的早期感染家蚕中肠柱状细胞, 在发病的后期也能感染杯状细胞。另外, *BmDNV-3* 与 *BmDNV-2* 基因组限制性内切酶酶切位点的差异性方面也有报道^[13]。*BmDNV-3* 已给中国家蚕产业造成较大损失, 但在基因组水平上对 *BmDNV-3* 的认识还很有限。本研究首次克隆、测定了 *BmDNV-3* VD₂ 基因组全序列, 并应用生物信息学软件对其基因组结构和功能进行了分析。

基金项目: 江苏大学高级人才基金项目 (1291180009); 江苏省教育厅高校自然科学基金项目 (03KJD180065)

* 通讯作者。Tel: 86-511-8791923; E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

作者简介: 王永杰 (1966 -) 男, 安徽人, 副研究员, 在读博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: hfwangyongjie@163.com

收稿日期: 2005-08-24; 接受日期: 2005-10-25; 修回日期: 2005-11-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 :*BmDENV-3* 病毒株由中国农业科学院蚕业研究所提供, 试验所需的病毒由本实验室繁殖。

1.1.2 酶和反应试剂 :限制性内切酶、Klenow、T4 DNA 连接酶及相应反应缓冲液为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和质粒载体 pUC119 购自上海 Sangon 公司。

1.2 病毒 DNA 分离

病毒分离与纯化参照文献[3]的方法, 略有改进。取 5 龄发病症状明显的蚕中肠在 TEN buffer (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 0.1mol/L NaCl, pH 7.5) 中匀浆, 40% (W/W) 蔗糖梯度离心 45000r/min 16h, 纯化的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°C 水浴 4h, 然后用酚氯仿抽提, 乙醇沉淀。

1.3 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 VD₂-DNA 并用 Klenow 酶补平 (300ng DNA/10U), 然后用 *Hind* III 酶切。酶切后的 VD₂-DNA 片段克隆到经过 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切的 pUC119 载体上。再转化到 *E. coli* DH5 α 中进行扩增。另外, 在测序结果重复一致性不理想的区域和 *Hind* III 酶切位点两端附近还设计了特异引物进行 PCR, 并克隆 PCR 产物, 对其序列加以进一步验证。

1.4 病毒 DNA 序列测定

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。用末端终止法, 在 CEQ™ 8000 遗传分析仪上进行序列测定。为了保证序列测定结果的可靠性, 对整个基因组进行 5~7 倍的覆盖率测定。

1.5 DNA 序列分析

序列测定所获得各个片段的连接、开放阅读框和特征序列的查找由 DNASIS、DNAstar 软件完成, 不同浓核病毒核苷酸序列和氨基酸序列同源性的比较在 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 网站上进行。

2 结果和分析

2.1 *BmDENV-3* VD₂ 基因组克隆

在适度盐浓度条件下, *BmDENV-3* VD₂ 正负链在

体外可形成双链 dsDNA, 1.2% 琼脂糖电泳结果显示 VD₂ 分子量大小约 6.0kb。分离纯化 VD₂ 并对其行全长克隆未能获得成功。于是将 VD₂ 经 *Hind* III 酶切成大小约 2.4kb、2.0kb 和 1.6kb 的 3 个片段后, 连接到经过 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切的 pUC119 载体上, 成功地获得了一些目的重组子。

2.2 *BmDENV-3* VD₂ 基因组的核苷酸序列

利用 DNAstar 软件, 将测序各片段序列除去载体序列后连接装配, 获得了一个连续序列 VD₂, 全长共计 6022 个核苷酸。整个基因组的大小与预测的约 6.0kb 基本一致。其中 38.2% A, 13.1% C, 14.8% G, 33.9% T (A+T)% 含量为 72.1% (G+C)% 含量为 27.9%, 具有浓核病毒较低 (G+C)% 含量的典型特征。该序列已登录 GenBank, 登录号: DQ017269。*BmDENV-3* VD₂ 与 *BmDENV-2* VD₂ (GenBank 登录号: S78547) 核苷酸序列同源性比较, 二者的同源性为 97.7%, 并且 *BmDENV-3* VD₂ 内有 132 个碱基的替代、11 个碱基的删除和 2 个碱基插入。

2.3 病毒 VD₂ 基因组的末端结构分析

对 *BmDENV-3* VD₂ 的末端结构分析, 发现两端含有 524bp 反向重复序列 (ITRs), 但未发现浓核病毒常见的回文结构 (palindrome)。浓核病毒这种回文结构对末端发夹结构形成以及 DNA 的复制极为重要^[6]。*BmDENV-3* VD₂ 两端没有这种回文结构, 因此推断不能形成发夹结构。但是, 其两末端又拥有可以形成与 DNA 复制有关的“锅柄形”结构的反向重复序列, 这种特殊的末端结构说明 *BmDENV-3* VD₂ 在复制机制上与拥有回文结构末端的浓核病毒存在着不同之处。在对 *BmDENV-3* VD₂ 和 *BmDENV-2* VD₂ 末端反向重复序列相比较时发现: 两者末端核苷酸序列存在较大差异, 并且拥有的末端反向重复序列 (ITRs) 长度也不相等, *BmDENV-2* VD₂ 拥有 537bp 反向重复序列^[14], 比 *BmDENV-3* VD₂ 多 13bp。浓核病毒的末端序列通常作为浓核病毒自我引发机制 (Self-priming mechanism) 和分类的重要标志, 从这一个角度也说明该类病毒的特异性, 以及这两种病毒之间存在着一定的差异性。

2.4 VD₂ 基因组的开放阅读框 (ORFs) 及其编码蛋白同源性比较

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, 在正负链上进行可读阅读框查找, VD₂ 正链有 2 个开放阅读框 (VD₂ORF1, VD₂ORF2), 负链有 1 个开放阅读框

(VD₂ORF3),分别编码 305aa、856aa 和 222aa 的蛋白。正链上 VD₂ORF1 和 VD₂ORF2 有少量碱基的重叠。*Bm*DNV-3 VD₂ 与 *Bm*DNV-2 VD₂ 基因组结构相比较:*Bm*DNV-2 VD₂ 基因组拥有 2 个开放阅读框^[15],而 *Bm*DNV-3 VD₂ 多了 1 个开放阅读框(图 1),这是由于 VD₂ 在 nt 1589 处 A 的插入引起的,使 *Bm*DNV-2 VD₂ 的 ORF1 在 *Bm*DNV-3 VD₂ 中被分为 2 个开放阅读框(ORF1、ORF2)。为了避免这种改变是因测序而造成的错误,在 nt 1589 处附近我们进行了多次重复的测定,皆证明了我们的结果是可靠的。

对 *Bm*DNV-3 VD₂ 基因组编码的蛋白与 NCBI 蛋白质数据库进行同源性搜索,发现正链开放阅读框(ORF1)编码蛋白 1~305aa 与日本 *Bm*DNV-2 VD₂ 的 ORF1 编码蛋白有 99% 的同源性;88~305aa 与印度 *Bm*DNV-4 编码蛋白(片段)存在 98% 的同源性;82~293aa 与具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* FUSNN)DNA 解旋酶存在 23% 的同源性。正链的大开放阅读框(ORF2)编码蛋白 4~858aa 与日本 *Bm*DNV-2 VD₂ 的 ORF1 编码蛋白存在 98% 的同源性;604~754aa 与家蚕质型多角体(*Bombyx mori* cytopovirus)病毒结构蛋白 VP1、VP3 和 VP4 存在 24% 的同源性。负链上的开放阅读框(ORF3)编码蛋白 1~222aa 与日本 *Bm*DNV-2 VD₂ 的 ORF2 编码蛋白有 98% 的同源性;71~158aa 与鹿眼蝶浓核病毒(*Jc*DNV)非结构蛋白(NS3)存在 31% 的同源性;73~158aa 与玉米夜蛾浓核病毒(MIDNV)非结构蛋白(NS3)存在 28% 的同源性;91~192aa 与转染伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei* PLABE)DNA 复制因子相关蛋白存在 24% 的同源性。由此可以推测该基因组正链的开放阅读框(ORF1)及负链上开放阅读框(ORF3)可能主要编码病毒非结构蛋白,而正链的大开放阅读框(ORF2)可能主要编码病毒的结构蛋白。

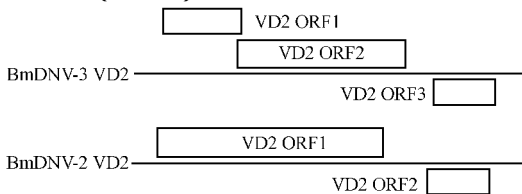


图 1 *Bm*DNV-3 VD₂ 和 *Bm*DNV-2 (Yamanashi isolate) VD₂ 基因组结构比较示意图

Fig. 1 Comparison of genome organization of *Bm*DNV-3 VD₂ and *Bm*DNV-2 (Yamanashi isolate) VD₂. The horizontal bar represents the genomic DNA molecules VD₂, open boxes above the horizontal bars show the ORFs in the genome sequence and the complementary sequence is shown below.

2.5 可能的启动子区和 Poly(A)位点

脊椎动物细小病毒基因组的转录、表达和调控存在多种机制,包括启动子、反式激活和选择性剪切等。目前对浓核病毒基因转录、表达和调控的研究比较少,已报道的与脊椎动物细小病毒有较大的差异。根据真核启动子区的特点^[16],查找 *Bm*DNV-3 VD₂ 可能的启动子区和 Poly(A)位点的分布(图 2)。第 1 个可能 TATA 盒(TATATAA)位于 nt 626~632,在左边阅读框起始密码子上游 32bp,由于位于图距单位 10 处,称之为 P₁₀,其上游有激活区(ATCATAT nt 617~623)。第 2 个可能 TATA 盒(TATATAA)位于 nt 1546~1552,在 ORF2 阅读框起始密码子上游 19bp,位于图距单位 26 处,称之为 P₂₆,其上游有激活区(AGAATGT nt 1535~1541)。P₁₀、P₂₆ 上游存在促使 RNA 聚合酶 II 与其结合基序的核心片段(A/C/G)CA(G/T)T 的 enabler 区,分别位于(nt 602;nt 1507)。以 AATAAA 作为一致序列,在正链上发现了一个可能的 Poly(A)位点位于 nt 4214~4219,负链上发现了两个可能的 Poly(A)位点分别位于 nt 4725~4730;nt 4760~4765。但由于缺少 *Bm*DNV-3 VD₂ 基因转录的精确数据,所以还不能断定这些可能的启动子和 Poly(A)加尾信号是否具有功能。

3 讨论

VD₂ 呈单链线状,两末端可形成锅柄结构,另外,VD₂ 具有浓核病毒较低(G+C)%含量的典型特征,在适当盐浓度抽提时,VD₂ 正负链在体外才可形成双链 dsDNA,因此进行完整 DNA 克隆非常困难。国内自上世纪 80 年代就有报道对其克隆^[13],但未获成功。我们试用了几种常用的限制性内切酶对 VD₂ 进行酶切,发现 *Hind*III 酶较为理想。经 *Hind*III 酶切后的 VD₂ 产生大小为 1567bp、2030bp 和 2425bp 的 3 个片段。然后再将这 3 个片段克隆到经过 *Hind*III 和 *Sma*I 酶切的 pUC119 载体上,并且获得成功,实验证明这种方法很有效。为了确保这些重组子的稳定性,我们将 DH5 α 在 30℃ 的条件下生长扩增,取得了很好效果。*Bm*DNV-3 与 *Bm*DNV-2 (Yamanashi isolate)由于长期地理环境等不同,使得这两种病毒发生了变异。例如:VD₂ 在 nt 1589 处 A 的插入使得 *Bm*DNV-3 VD₂ 基因组多了一个开放阅读框,两末端序列的长度不等,分别为 524bp 和 537bp,末端核苷酸序列也存在较大差异等。该序列测定从分子水平上为其分类鉴定提供了依据。这使

我们更好地理解浓核病毒种类的多样性,为研究浓

核病毒进化提供了有益的线索。



图2 *BmDENV-3* VD₂ 简易序列显示可能启动子区和 Poly(A) 位点特征

Fig.2 Abbreviated sequence of the *BmDENV-3* VD₂ genome illustrating its promoters and Poly(A) characteristic properties.

The most likely functional promoters are indicated with TATA boxes, the regions marked by over line are activator (A) and enabler (E) sequences.

浓核病毒线性单链 DNA 末端反向重复结构是标志性的结构。大多数浓核病毒和腺联病毒都有末端反向重复序列。已报道的其它浓核病毒的发夹结构一般由 120~160bp 构成,但整个发夹结构又被两个短的回文结构中断,因此末端序列可折成“Y”或“T”型结构。浓核病毒基因组这种发夹结构在浓核病毒基因组 DNA 的复制过程中起着重要作用。一般认为,该 DNA 的合成靠这种“自我引发”机制而开始的^[18]。*BmDENV-3* VD₂ 的末端反向重复结构没有发现回文结构,由此我们推断该病毒的复制不能采取“自身引物,发夹转移”的方式。关于 *BmDENV-3* VD₂ 复制机制现在还不清楚,但从两端可形成与 DNV 复制有关的“锅柄形”结构上看,是否类似自主性的细小病毒一样的复制机制有待于验证。

浓核病毒的非结构蛋白在病毒基因组复制中起着重要作用,非结构蛋白中有 3 个保守序列与病毒 DNA 复制的起始和终止相关。保守序列 motif I 为金属离子结合区(metal-binding domain),motif II 中的保守酪氨酸位点在病毒 DNA 复制过程中可能参与 DNA 复制中间体特异性位点的切割反应,motif I 和 motif II 都是复制起始蛋白的保守区,motif III 在浓核病毒与脊椎动物细小病毒间有很高同源性,这一段

氨基酸表现出较高的疏水性,一般认为是 NTP-binding 和 DNA 解旋酶结合域^[11]。从目前已经完全清楚的浓核病毒编码蛋白中得知浓核病毒的结构蛋白都是由 4 种多肽 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成的,其分子量大小约 45~100kDa,是由 1 个编码结构蛋白的基因(VP)通过核糖体扫描机制而形成的,结构蛋白基因(VP)内未发现剪切^[4,5]。在 *BmDENV-3* VD₂ 中仅 ORF2 具有编码结构蛋白的能力。因此,从开放阅读框编码蛋白与其它细小病毒的同源性以及编码能力上来看,*BmDENV-3* VD₂ 基因组的 ORF1、ORF3 可能主要编码病毒的非结构蛋白,ORF2 可能编码病毒的结构蛋白。另外,据报道 *BmDENV-1* 也有 3 个开放阅读框,ORF1、ORF3 编码的非结构蛋白,ORF2 编码结构蛋白^[7,17]。*BmDENV-1* 和 *BmDENV-3* VD₂ 在基因组织结构上,以及在开放阅读框编码的结构蛋白与非结构蛋白上存在着相似性,这也为我们对 *BmDENV-3* VD₂ 编码结构蛋白和非结构蛋白的预测结果提供了佐证。

参 考 文 献

- [1] Vago C, Luciani J. Development du virus de la maladie desnoyaux denses de *Galleria mellonella* eu cultures de tissus de lépidoptères. *Experientia*, 1965, 21: 393-394.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [2] Chapman MS, Rossmann MG. Structure, sequence and function relationship correlations among parvoviruses. *Virology*, 1993, **194**: 491 – 508.
- [3] 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.
- [4] Tijssen P, Li Y, El-Far M, et al. Organization and expression strategy of the ambisense genome of denonucleosis virus of *Galleria mellonella* (GmDNV). *J Virol*, 2003, **77**: 10357 – 10365.
- [5] Fédère G, El-Far M, Li Y, et al. Expression strategy of denonucleosis virus from *Mythimna loreyi*. *Virology*, 2004, **320**: 181 – 189.
- [6] Bando H, Choi H, Ito Y, et al. Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. *Virology*, 1990, **179**: 57 – 63.
- [7] Li Y, Zádori Z, Bando H, et al. Genome organization of the densovirus from *Bombey mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid. *J Gen Virol*, 2001, **82**: 2821 – 2825.
- [8] 郭海涛, 张珈敏, 胡志远. 蟑螂浓核病毒全核苷酸序列与基因组结构. *科学通报*, 2000, **45**(10): 1076 – 1080.
- [9] Boublik Y, Jousset FX, Borgoin M. Complete nucleotide sequence and genomic organization of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV) pathogenic for *Aedes albopictus* larvae. *Virology*, 1994, **200**: 752 – 763.
- [10] Songsak R, Linda N, Leigh O. Comparison of Penaeid shrimp and insect Parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. *Virus Research*, 2002, **87**: 79 – 87.
- [11] Tijssen P, Bergoin M. Denonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Virology*, 1995, **6**: 347 – 355.
- [12] 川瀬茂実. カイコの浓核病ウイルス. *日蚕雑*, 1989, **58**(4): 295 – 301.
- [13] 高 谦, 蔡幼民, 朱 群, 等. 家蚕浓核病毒“镇江株”基因文库的构建. *蚕业科学*, 1987, **13**(4): 227 – 229.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Bensimhon MJ, Gabaeo-Arpa J, Ehrlich R, et al. Physical characteristics in eukaryotic promoters. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 4521 – 4540.
- [17] Bando H, Kusuda J, Gojobori T, et al. Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of parvoviruses. *J Virol*, 1987, **61**: 553 – 570.

Complete nucleotide sequence analysis of *Bombyx mori* denonucleosis virus type 3 VD₂(China isolate)

WANG Yong-jie^{1, 2}, CHEN Ke-ping¹, YAO Qin¹, GAO Gui-tian¹, HAN Xu¹

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

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

Abstract: The genome of *Bombyx mori* denonucleosis virus type 3 (China isolate) contains two kinds different single-stranded linear DNA molecules (VD₁, VD₂). The VD₂ was purified and cloned into the pUC119 vector, and the complete nucleotide sequence of VD₂ was determined. Sequence analysis showed that the VD₂ genome sequence consisted of 6022 nts, including inverted terminal repeats (ITRs) of 524 nts. In the viral genome, two major open reading frames (ORF1 and ORF2) in the plus strand and one minor ORF (ORF3) in the complementary strand were identified. Computer analysis suggested the plus stand ORF1 and the minus strand ORF3 most likely encode the major nonstructural protein, while the plus stand ORF2 most likely encodes the major structural protein. Comparing the complete genome sequence of BmDNV-3 VD₂ with that of BmDNV-2 VD₂ (Yamanashi isolate) demonstrated that they shared 97.7% genome sequence in the VD₂ region, with substitutions of 132 nucleotides, deletions of 11 nucleotides and insertions of 2 nucleotides in the VD₂ region of BmDNV-3. The results suggested that BmDNV-3 is closely related to BmDNV-2, but with some differences, giving a better understanding about the variation of the viruses and providing clues to their evolution.

Keywords: *Bombyx mori* denonucleosis; Sequence analysis; Genomic organization

Foundation item: Advanced Talent Person Foundation of Jiangsu University (1291180009); Jiangsu Academy Nature Science Foundation (03KJD180065)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-511-8791923; E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

Received: 24 August 2005/Accepted 25 October 2005/Revised 28 November 2005