

中华蜜蜂囊状幼虫病毒在 Sf9 和 S2 细胞系中的感染性研究*

刘永梅, 史红霞, 黄钰彬, 党晓群

(重庆师范大学 动物生物学重点实验室, 重庆 401131)

摘要:【目的】调查研究中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)卵巢细胞系 Sf9 和果蝇 S2 胚胎细胞(Schneider's *Drosophila* Line 2)中的感染性。【方法】以 Sf9 和 S2 作为 CSBV 体外感染的细胞系, 通过 RT-PCR 检测 CSBV 的 *Vp1* 基因表达情况从而判断 CSBV 是否能在两种细胞中感染并增殖。【结果】在 S2 细胞中并未检测到 CSBV, 说明 CSBV 不能感染该细胞; 接种了 CSBV 的 Sf9 细胞中并未表现出明显的致细胞病变效应(CPE), 但在该细胞总 RNA 中可检测到 *Vp1* 基因的转录。通过克隆测序发现, 从接种 CSBV 的 Sf9 细胞中克隆得到的 *Vp1* 基因序列与 CSBV 重庆分离株 *Vp1* 基因(NCBI 登录号: KJ716806)同源性高达 99%。系统进化分析显示, 该序列与囊状幼虫病毒(Sacbrood virus, SBV)中国分离株聚为一簇。但是, 当感染 CSBV 的细胞传至第 3 代时检测不到 CSBV。【结论】CSBV 不能感染 S2 细胞而能感染 Sf9 细胞, 且不能在后者中进行增殖, 暗示后者可能含有某类可清除 CSBV 的因子, 从而为寻找 CSBV 寄生增殖所必需的细胞因子提供了线索。

关键词:中华蜜蜂囊状幼虫病毒; Sf9 细胞; S2 细胞; RT-PCR; 细胞培养

中图分类号:S895.1

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0118-06

中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)是一种在中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)中比较流行的蜜蜂病毒。自 1972 年首次在中国广东省的中华蜜蜂种群中发现 CSBV 后, 该病毒迅速在全国蔓延, 甚至传播到了东南亚, 给养蜂业造成极大困扰。CSBV 和西方蜜蜂(*Apis mellifera*)囊状幼虫病毒(Sacbrood virus, SBV)类似, 主要感染 2~3 日龄蜜蜂幼虫。患病幼虫表现为体色由乳白色逐渐变成橘黄色, 封盖期最后 1 次蜕皮被抑制, 无法正常化蛹, 蜕皮液沉积于老旧表皮内, 表皮变硬成囊袋状。蜜蜂成蜂一旦染病, 就会出现行为异常, 寿命缩短, 最终导致整个蜂群毁灭性死亡^[1]。CSBV 和 SBV 基因同源性很高, 属于两种不同的病毒株, 几乎不产生交叉感染。但在 2016 年, 有研究者对感染 SBV 的东方蜜蜂(*Apis cerana*)种群和西方蜜蜂种群进行研究后发现, 感染东方蜜蜂的 SBV 出现了交叉感染, 即它也可以感染西方蜜蜂幼虫和成蜂, 但不引起明显的患病症状^[2]。

CSBV 属于仿小核糖核酸病毒目(Picorna-like virus)传染性软腐病毒科(Iflaviridae)正义单链无囊膜的 RNA 病毒。CSBV 病毒粒子为球状结构, 直径大小约为 20~30 nm, 基因组大小约为 8 800 个核苷酸, 具有 1 个开放阅读框, 编码 4 个结构蛋白(VP1, VP2, VP3 和 VP4)和非结构蛋白^[1]。目前, 研究者还没有找到适合蜜蜂病毒体外培养的成熟昆虫细胞系, 这严重影响了蜜蜂病毒的深入研究, 也给蜜蜂病毒的防治工作造成极大困扰。

近些年来, 随着昆虫细胞培养技术的成熟, 国内外学者利用体外培养的蜜蜂细胞对病毒进行了研究。2010 年, Hunter 等人^[3]使用 8~11 d 健康西方蜜蜂幼虫, 首次成功培养了蜜蜂幼虫原代细胞, 并在细胞内接种以色列麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus, IAPV), 发现 IAPV 可在细胞中进行复制, 这为蜜蜂病毒的体外培养以及更深入的研究开创先河。2015 年, 李慧等人^[4]以 3 日龄的中华蜜蜂幼虫为材料, 分离并培养幼虫原代细胞; 他们在接种 CSBV 后发现该病毒可在细胞中进行复制, 但培养的幼虫细胞在 85 d 后出现凋亡现象。这为蜜蜂病毒的

* 收稿日期:2018-08-11 修回日期:2019-04-15 网络出版时间:2019-05-09 19:29

资助项目:国家自然科学基金(No. 31770160); 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助(No. CARS-44-KXJ21); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ20160559765); 重庆师范大学校级项目(No. 16xzb07)

第一作者简介:刘永梅,女,研究方向为资源昆虫及其病原微生物学, E-mail: 664508721@qq.com; 通信作者:党晓群,女,副教授,博士, E-mail: dangxiaoqun@126.com

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1929.014.html>

深入研究提供了理论依据。本研究就CSBV在成熟昆虫细胞系草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)卵巢细胞Sf9以及果蝇S2胚胎细胞(Schneider's *Drosophila* Line 2)中感染情况进行了调查性研究,以便为蜜蜂病毒体外培养以及深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂以及仪器

供试细胞Sf9和S2来自西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室。Sf9细胞培养液sf-900III和S2细胞培养液Schneider's *Drosophila* Medium(1×)购自Gibco公司,均加入体积分数为10%的FBS作为完全培养液;Trizol试剂购自ambio® by life technologies公司;胶回收试剂盒购自AxyPrep公司;反转录试剂盒、pMD19-T质粒、Solution I及DH5α购自Takara公司;细胞观察使用倒置显微镜为Nikon ECLIPSE Ti-S。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Sf9和S2细胞培养于Corning® 25 cm²矩形斜颈细胞培养瓶中,每个培养瓶加3 mL完全培养液,每隔2 d换1次液,3~4 d传1次代,并用倒置显微镜观察细胞形态及生长状况,以便进行细胞添毒。

1.2.2 病毒液的制备 CSBV病毒采集自重庆市沙坪坝区中梁山的患病中华蜜蜂幼虫。取5只患病蜜蜂幼虫,在溶质体积分数为75%的乙醇溶液中漂洗5 min,转移至4℃预冷的DEPC水中漂洗3次,每次1 min。将冲洗干净的幼虫放入灭过菌的干净研钵中磨碎,加入0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液1 mL混匀,转移至2 mL离心管,涡旋混匀。采用差速离心法获得纯化的病毒液^[5],−80℃保存备用。

1.2.3 病毒接种 当Sf9和S2细胞长势良好,密度达到 1.8×10^5 个·mL⁻¹时,开始添毒。向Sf9细胞培养瓶中加入3 mL完全培养液,并同时加入10 μL已纯化的CSBV病毒液,轻轻左右晃动混匀,使细胞与病毒充分接触,静置2 h。弃去上清培养液,向培养瓶中加入2 mL新的培养液清洗2次,然后加入3 mL新鲜培养液,轻轻吹起细胞,吸取500 μL细胞液至健康的Sf9细胞培养瓶中,轻轻左右晃动混匀,静置2 h。弃去上清培养液,向培养瓶中加入3 mL新的培养液,28℃培养箱培养,并命名为种毒第1代。3 d后,以第1代的Sf9细胞感染正常Sf9细胞,命名为种毒第2代。再用上述方法再于3 d后用第2代Sf9细胞感染正常Sf9细胞,命名为种毒第3代。取每代的细胞各2瓶,−80℃保存备用。同样地,在对S2细胞进行添毒时,首先向S2细胞培养瓶中加入10 μL纯化的CSBV液,混匀后静置2 h。将混合培养液转移至5 mL离心管,1 000 r·min⁻¹离心3 min后,弃上清液;向离心管中加入2 mL新鲜培养液,1 000 r·min⁻¹离心3 min,弃上清液。同样的方法清洗2次。最后向离心管中加入2 mL新鲜细胞培养液,轻轻吹起细胞,吸取其中500 μL细胞液至未加CSBV病毒液的S2细胞培养瓶中,轻轻左右晃动摇匀,28℃培养箱培养,并命名为种毒第1代。3 d后以上述方法传代并命名为种毒第2代,再过3 d,又用相同的方法传代得到种毒第3代,收集各代S2细胞各2瓶,−80℃保存备用。对Sf9和S2细胞进行CSBV接种的实验各重复3次。

1.2.4 病毒接种后的细胞总RNA提取以及RT-PCR检测 取出收集到的各代Sf9和S2细胞,在冰上融化后,于4℃以5 000 r·min⁻¹离心5 min。弃上清,向离心管中加入1 mL Trizol,冰上涡旋5 min,室温静置5 min,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清至新的离心管,按照Trizol试剂盒说明书进行操作提取接种病毒后的细胞总RNA。将提取的RNA按照反转录试剂盒说明书进行反转录。以cDNA为模板,以CSBV结构蛋白Vp1基因序列设计检测引物(Vp1-F:5'-AGATGTGAACGCTTACCCCTGAT-3';Vp1-R:5'-CTCCTCGCATATACAC-CAAAACTT-3'),进行PCR扩增。扩增的目的片段大小为596 bp。反应体系25 μL,其中包括各0.5 μL的上下游引物、0.5 μL模板、12.5 μL Premix r-Taq预混液以及11 μL ddH₂O。反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性40 s,63℃退火1 min,72℃延伸1 min,此过程共35个循环;72℃延伸10 min。反应产物于12℃保存。

1.2.5 VP1基因片段回收与序列分析 将以上PCR扩增得到目的产物在质量分数为1%的琼脂糖核酸凝胶上进行电泳后切胶,使用DNA胶回收试剂盒回收。将回收得到的目的片段与pMD19-T载体连接。连接体系为包括5 μL的Solution I、4 μL回收目的片段和1 μL的pMD19-T质粒,16℃下进行连接并过夜。转化至E. coli DH5α感受态细胞中,用含有氨苄青霉素的LB固体培养基37℃培养过夜。挑取单菌落提取质粒后进行PCR检测,将扩增出目的片段的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果登录NCBI(<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov)进行序列同源性比对分析,并采用 MEGA6 软件进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 感染 CSBV 后的 Sf9 和 S2 细胞生长状态

图 1a 显示,正常的 Sf9 细胞多为圆形,整体透明,细胞边缘比较光滑,胞内有少量的颗粒。正常的 S2 细胞则为圆形半贴壁半悬浮细胞(图 1b)。分别向 Sf9 和 S2 细胞培养瓶中添加纯化后的 CSBV 液(图 1c)后,Sf9 和 S2 细胞均没有出现明显的致细胞病变效应(CPE)(图 1d~g)。

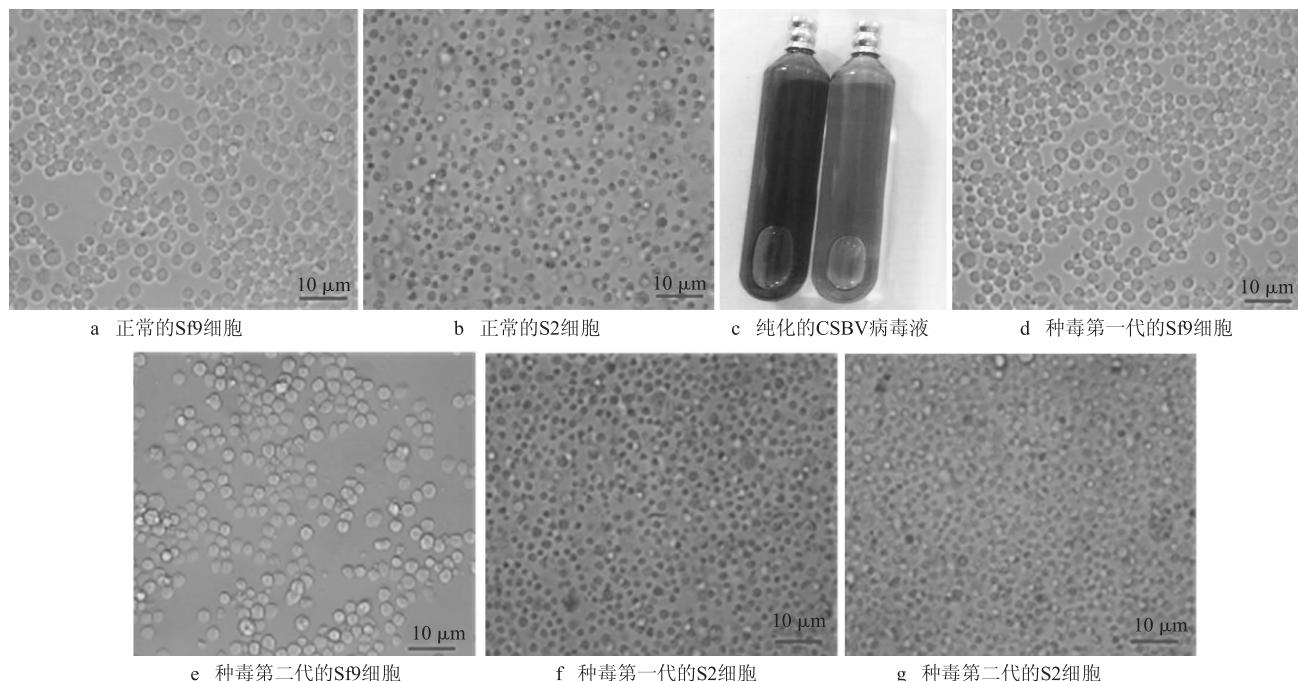


图 1 接种 CSBV 的 Sf9 细胞和 S2 细胞生长状况

Fig. 1 The growth status of Sf9 cells and S2 cells inoculated with CSBV

2.2 CSBV 在 Sf9 和 S2 细胞中的感染情况

图 2 显示,从 Sf9 和 S2 细胞中提取到的总 RNA 完整性良好,可用于反转录。通过反转录获得 cDNA,并以 cDNA 为模板,对 CSBV 结构蛋白 Vp1 的部分序列设计引物进行 PCR 扩增。结果发现:在接种 CSBV 后的 Sf9 细胞种毒第 1 代和种毒第 2 代中均有目的片段被检测到,但在种毒第 3 代 Sf9 细胞中没有检测到 CSBV 的 Vp1 基因的扩增条带(图 3)。而在 S2 细胞种毒第 1 代、种毒第 2 代以及种毒第 3 代中,均未检测到扩增出 CSBV 的 Vp1 基因。上述结果说明 CSBV 可以感染 Sf9 细胞,且在 Sf9 细胞最初两代细胞中均能被检测到,但当感染了 CSBV 的 Sf9 细胞传代至第 3 代时,该病毒基因组丢失。对于 S2 细胞而言,研究结果则暗示了 CSBV 不能感染它。

2.3 CSBV 的 Vp1 基因克隆与序列分析

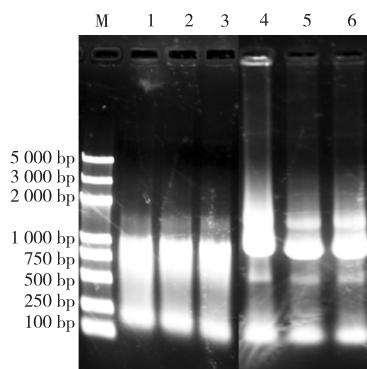
PCR 检测结果表明,本研究成功构建了 CSBV 的 Vp1 基因重组质粒(图 4)。将该基因的测序结果与 NCBI 上已报道的 SBV 的 Vp1 基因进行序列同源性分析,结果显示该基因与 SBV 重庆分离株的 Vp1 基因(NCBI 登录号:KJ716806)序列同源性为 99%,这也表明了 CSBV 可感染 Sf9 细胞(封二彩图 5)。

为了检测 Sf9 细胞中 CSBV 与已报道的 SBV 之间的亲缘关系,从 NCBI 上下载不同地理来源 SBV 分离株的 Vp1 基因序列,采用 MEGA6 构建邻接树,bootstrap 值设为 1 000,树图中数值表示遗传距离 p-distance。如图 6 所示,在两代 Sf9 细胞中的 CSBV 仍与中国重庆、福州、西安和吉林分离株聚为一支,暗示 CSBV 在两代受感染 Sf9 细胞中均能检测到,且与已分离株系的数据进行比对后仍存在不同程度的分化。

3 讨论

CSBV 作为在中华蜜蜂中最流行的一种蜜蜂病毒,严重影响蜜蜂产业的发展。然而,没有合适的 CSBV 体

外培养细胞系严重制约了CSBV致病机理的研究。本研究以Sf9和S2细胞作为CSBV体外培养的细胞系,均未在接种了CSBV的S2细胞中检测到病毒,因此推测CSBV不能感染S2细胞。同时,CSBV在Sf9前两代细胞中均能被检测到,当细胞传代至第3代时,在细胞中检测不到CSBV,表明Sf9细胞可作为CSBV短期内的宿主,但后者不能在Sf9细胞中复制增殖。此结果与Kweon等人^[6]对SBV的研究结果一致。

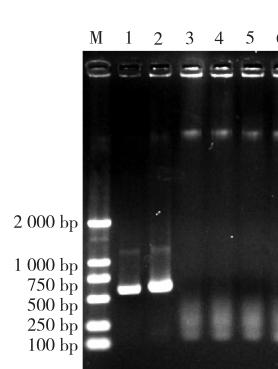


注:M为marker;1~3分别为Sf9细胞种毒第1~3代总RNA;4~6分别为S2细胞种毒第1~3代总RNA

图2 接种CSBV的Sf9和S2细胞总RNA

Fig. 2 Total RNA of Sf9 and S2 cells inoculated with CSBV

CSBV只在Sf9前两代细胞中被检测到的结果可能与以下3个原因有关:第一,细胞种属差异太大。本研究使用的Sf9和S2细胞分别来自鳞翅目(Lepidoptera)和双翅目(Diptera)昆虫,而CSBV主要感染的是膜翅目(Hymenoptera)昆虫,不同目之间细胞的差异太大,这成为影响CSBV感染力的主要决定性因素^[7]。第二,病毒对细胞的嗜性不同。决定病毒嗜性的因素一个是病毒的基因和蛋白与宿主的若干因素之间的一系列复杂的相互作用,另一个是靶细胞上受体的效力和病毒的细胞吸附性蛋白^[8]。有研究发现病毒的内部核糖体进入位点(IRES)翻译起始效率与寄主细胞的类型密切相关^[9],2016年,Sun等人^[10]将口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)的IRES进行嵌合克隆,构建了一系列IRES-嵌合病毒,观察这些病毒在猪肾上皮细胞(PK-15)、猪源细胞(IBRS2)细胞系中的复制动力学,结果也发现这些IRES-嵌合病毒对细胞的感染率不同。IRES介导的翻译决定了体内FMDV感染的特异性,这表明IRES可能是决定病毒细胞嗜性的重要元件^[11-12]。本研究使用的CSBV的基因组5'末端



注:M为marker;1~3分别为Sf9细胞种毒1~3代cDNA的PCR扩增产物;4~6分别为S2细胞种毒第1~3代cDNA的PCR扩增产物

图3 CSBV的Vp1基因PCR扩增产物

Fig. 3 PCR production of CSBV Vp1 gene

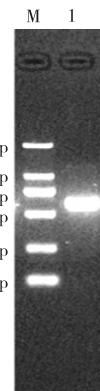
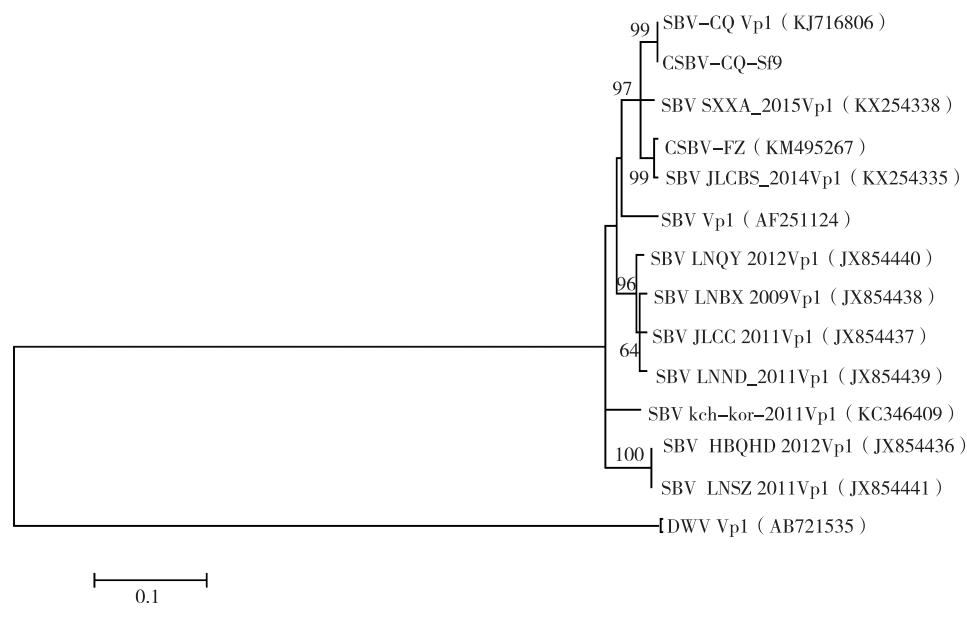


图4 CSBV的Vp1基因重组质粒pMD19-T-Vp1的PCR扩增产物

Fig. 4 PCR production of CSBV Vp1 gene amplified from the recombinant plasmid pMD19-T-Vp1



注:SBV后的大写字母表示分离株来源,其中:CQ代表重庆,SXXA代表陕西西安,LNND代表辽宁宽甸,LNQY代表辽宁清源,JLCC代表吉林长春,LNBX代表辽宁本溪,JLCBS代表吉林长白山,HBQHD代表河北秦皇岛,LNSZ代表辽宁绥中,kch-kor代表韩国;括号中为NCBI登录号

图6 分离自不同地区SBV的Vp1基因系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic tree showing SBV Vp1 gene from Sf9 cell with other different districts

缺乏帽子结构,调控翻译起始因子的是5'非翻译区(Untranslated regions,UTRs)的IRES,因此IRES可能是调控CSBV对Sf9和S2细胞嗜性的重要原件。也有学者提出病毒的细胞嗜性是靶细胞上受体的效力和病毒的细胞吸附性蛋白相互作用的结果。McKenna等人^[13]研究发现猪的FMDV结构蛋白VP1上的RGD(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸)序列以及非结构蛋白3A是病毒入侵宿主细胞的主要决定因素,VP1上的RGD可以同靶细胞膜表面特定蛋白(受体)特异性结合,从而使病毒进入细胞。第三,与宿主细胞的自噬有关。许多学者通过对哺乳动物和果蝇细胞自噬机制进行研究发现,细胞自噬是宿主细胞识别并抑制微生物入侵的一种方式^[14-16]。例如,病毒在入侵的过程中,宿主通过细胞自噬蛋白识别病毒的信号通路,并将信号传至免疫系统,引发细胞自噬,从而抑制病毒的复制增殖^[17-19]。CSBV为蜜蜂病毒,在感染Sf9和S2细胞时引起细胞的自噬,因此抑制了CSBV复制增殖。

目前,SBV可在蜜蜂幼虫原代细胞、PK-15、IBRS2以及非洲绿猴肾细胞(Vero)中感染并复制增殖^[4,6]。而本研究中的CSBV可以感染Sf9但不能增殖,说明Sf9细胞中可能存在某种限制性因子,当细胞监测到病毒感染时,立即启动限制性因子对病毒进行清除。因此,本研究对CSBV的致病机制研究具有较为重要的意义,也为有关病症的防治提供了新的线索。

参考文献:

- [1] 樊琼,费东亮,马鸣潇. 中蜂囊状幼虫病毒多克隆抗体的制备[J]. 现代畜牧兽医, 2014(1):34-37.
- FAN Q, FEI D L, MA M X. Preparation of the specific polyclonal antibody against Chinese sacbrood bee virus[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014(1):34-37.
- [2] GONG H R, CHEN X X, CHEN Y P, et al. Evidence of *Apis cerana* sacbrood virus infection in *Apis mellifera* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2016, 82(8):2256-2262.
- [3] HUNTER W B. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae) [J]. Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2010, 46(2):83-86.
- [4] 李慧,费东亮,胡影,等. 中华蜜蜂幼虫原代细胞培养及中华蜜蜂囊状幼虫病毒在培养的细胞中的复制[J]. 昆虫学报, 2015, 58(12):1362-1367.
- LI H, FEI D L, HU Y, et al. Culture of the primary cells of *Apis cerana* larva and the replacation of Chinese sacbrood virus in the cultured cells [J]. Acta Entomologica Sinica, 2015, 58(12):1362-1367.
- [5] 冯建勋,卢忻英,张勤奋,等. 中蜂囊状幼虫病毒的纯化,结晶与结构研究[J]. 电子显微学报, 1998, 17(4):387-388.
- FENG J X, LU X Y, ZHANG Q F, et al. Purification, crystallization and structure of Chinese sacbrood virus[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 1998, 17(4):387-388.
- [6] KWEON C H, YOO M S, NOH J H, et al. Derivation of cell-adapted sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee [J]. Virus Research, 2015, 198:15-21.
- [7] GOBLIRSCH M J, SPIVAK M S, KURTTI T J. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryo-
- onic tissues[J]. Plos One, 2013, 8(7):e69831.
- [8] 巫学兰,崔天盆,吴健民. 病毒细胞受体作用机制研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2003, 10(5):155-158.
- WU X L, CUI T P, WU J M. Study on cellular receptors of measles virus[J]. International Journal of Virology, 2003, 10(5):155-158.
- [9] 黄小晔. HCV IRES 翻译启动活性的细胞特异性及其机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2011.
- HUANG X H. Cell specific translation activity of HCV IRES and its mechanism[D]. Changsha:Central South University, 2011.
- [10] SUN C, YANG D, GAO R, et al. Modification of the internal ribosome entry site element impairs the growth of foot-and-mouth disease virus in porcine-derived cells[J]. Journal of General Virology, 2016, 97(4):901-911.
- [11] SALEH L, RUST R C, FÜLLKRUG R, et al. Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site [J]. Journal of General Virology, 2001, 82(Pt 4):757-763.
- [12] GALL O L, CHRISTIAN P, FAUQUET C M, et al. *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T=3 virion architecture[J]. Archives of Virology, 2008, 153(4):715-727.
- [13] Mc KENNA T S, LUBROTH J, RIEDER E, et al. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD[J]. Journal of Virology, 1995, 69(9):5787-5790.
- [14] ZHAO Z, FU X B, GOODWIN M, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens[J]. Cell Host & Microbe, 2008, 4(5):458-469.

- [15] LEVINE B, MIZUSHIMA N, VIRGIN H W. Autophagy in immunity and inflammation [J]. Nature, 2011, 469 (7330): 323-325.
- [16] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: Renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4):728-741.
- [17] MOY R H, CHERRY S. Antimicrobial autophagy: a conserved innate immune response in *drosophila* [J]. Journal of Innate Immunity, 2013, 5(5):444-455.
- [18] JACKSON W T. Viruses and the autophagy pathway [J]. Virology, 2015, 479/480:450-456.
- [19] ORVEDAHL A, MACPHERSON S, SUMPTER R, et al. Autophagy protects against sindbis virus infection of the central nervous system [J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7 (2):115-127.

Investigation of the Infectivity of Chinese Sacbrood Virus in both Sf9 and S2 Cell Lines

LIU Yongmei, SHI Hongxia, HUANG Yubin, DANG Xiaoqun

(Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401131, China)

Abstract: [Purposes] The investigation of the infectivity of Chinese sacbrood virus (CSBV) in *Spodoptera frugiperda* ovary cell line Sf9 and *Drosophila* S2 embryonic cells (Schneider's *Drosophila* Line 2). [Methods] Sf9 and S2 cells were used to culture CSBV in vitro, and the Vp1 gene was detected by RT-PCR in order to test the infection and reproduction of CSBV. [Findings] CSBV was not detected in S2 cells, indicating that CSBV could not infect *Drosophila* S2 cells. Although there were no signs of cytopathic effect (CPE) in Sf9 cells inoculated with CSBV, the Vp1 gene of CSBV was amplified in the total RNA of the infected Sf9 cells suggesting CSBV could infect Sf9 cells. The Vp1 sequence from Sf9 cells has 99% homologous to the Vp1 (NCBI accession number: KJ716806) of the CSBV Chongqing isolate. The results of phylogenetic analysis clearly indicated that there was differentiation between the field strains and CSBV after cell culture, although it clustered with CSBV Chinese isolate. However, the infected Sf9 cells were not detected CSBV after 3 passages. It is presumed that CSBV can only infect Sf9 cells but not proliferate in the cells. [Conclusions] The bee virus CSBV could not infect S2 cells and infect Sf9 cells but proliferation in Sf9 cells, suggests that Sf9 cells may contain certain factors that can eliminate CSBV, which provides clues for finding the cytokines necessary for CSBV parasitic proliferation.

Keywords: Chinese sacbrood virus; Sf9 cell; S2 cell; RT-PCR; cell culture

(责任编辑 方 兴)

