# 不同紫外线照射参数对家蚕核型多角体病毒的灭活效果研究*

邵榆岚** 张永红 李玲利 范仕弘 张一川 苏振国 白兴荣***

（云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所，蒙自 661101）

**摘 要** **【目的】** 旨在探索紫外线照射对家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus，BmNPV）的灭活方法及效果验证。**【方法】** 比较筛选不同功率、不同照射距离和时间的紫外线照射方法，以照射后病毒感染家蚕的存活率评估灭活效果；结合长链 PCR 技术对病毒结构糖蛋白 P40 基因的灭活效果进行分子检测，并通过扫描电镜观察灭活病毒粒子的结构形态；最后评价紫外线直接照射家蚕的安全性。**【结果】** 生物学实验结果初步表明，病毒在 60 W 紫外线距离 40 cm 处照射 60 min，感染家蚕 5 d 后的存活率为 63.33%，显著高于病毒对照组家蚕存活率 45%（$P$=0.014 2）。相同照射距离，15 和 30 W 紫外线照射时间大于 120 min 时，存活率高于 63.33%。照射距离大于 100 cm 时，家蚕存活率明显下降，180 min 照射组与病毒对照组差异不显著（$P$=0.058 8）。长链 PCR 检测显示，$5\times10^6$ 个/mL 低浓度病毒在 15 W 紫外线距离 40 cm 照射 60 min 后，无明显条带出现，而 $5\times10^8$ 个/mL 高浓度病毒在相同条件下照射 480 min 无明显条带出现，后者的病毒粒子形态与正常病毒无明显差别。紫外线直接照射家蚕的安全性实验表明，有薄膜覆盖的家蚕无明显影响，无薄膜覆盖的家蚕在距离 40 cm 照射 10 min 和距离 100 cm 照射 30 min，体色开始出现黑化，经过眠期蜕皮后，体色恢复正常并可正常结茧。**【结论】** 紫外线照射 BmNPV 的灭活效果与紫外灯功率、照射距离和时间以及病毒浓度有关，随着照射时间增加，灭活病毒感染家蚕的存活率增加，病毒核酸破坏程度越完全。在紫外线照射距离 40 cm 以上，至少需要照射 60 min 才能有效灭活低浓度 BmNPV，且对家蚕具有安全性保障。

**关键词** 家蚕核型多角体病毒；紫外线；灭活；防控

# Study on the inactivation effect of different utraviolet irradiation parameters on *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus

SHAO Yu-Lan** ZHANG Yong-Hong LI Ling-Li FAN Shi-Hong
ZHANG Yi-Chuan SU Zhen-Guo BAI Xing-Rong***

(Sericultural and Apicultural Reseach Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China)

**Abstract** **[Aim]** The aim of this study is to explore the inactivation method and verify the effectiveness of ultraviolet radiation on the *Bombyx mori* (silkworm) nuclear polyhedrosis virus. **[Methods]** We evaluated the effectiveness of different UV irradiation methods, differing in power and irradiation distance and time, on the inactivation effect of the nuclear polyhedrosis virus. This was determined based on the survival rate of silkworm fed with the virus post-irradiation. We analyzed the inactivation effect on the P40 gene, a structural glycoprotein of the virus, using long chain PCR technology. Scanning electron microscopy was used to observe the structural morphology of the inactivated virus particles. Finally, we evaluated the impact of direct ultraviolet radiation on silkworms. **[Results]** Silkworm exposed to 60 W of ultraviolet radiation at 40 cm for 60 min had a significantly higher survival rate compared to the virus control group, with survival rates

*资助项目 Supported projects：现代农业产业技术体系建设专项（CARS-18-SYZ21）；云南省重大科技专项（202102AE090010）；国家自然科学基金地区项目（32460864）

**第一作者 First author，E-mail：syl127@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：bxrong3@163.com

收稿日期 Received：2023-09-18；接受日期 Accepted：2023-11-30

of 63.33% and 45%, respectively ($P$=0.014 2). However, the survival rate of the 60 W exposure group was lower compared to the 15 and 30 W ultraviolet radiation exposure groups when the exposure distance remained at 40 cm, but the exposure time was extended to 120 min. At a radiation distance of 100 cm, the inactivation effect was poor, and there was no significant difference in the survival rate between the 180 min UV exposure groups and the virus control group($P$=0.058 8). Long PCR detection using low concentration virus suspensions showed no obvious bands after 60 min of exposure to 15 W UV radiation at 40 cm. Conversely, high concentration virus suspensions required 480 min of irradiation under the same conditions to show no obvious band. Additionally, there was no significant change in the morphology of the virus particles compared to control virus group. Exposure to direct UV radiation had no significant effect on silkworms that were covered with a protective film. In contrast, the bodies of unprotected silkworms began to darken after 10 min of exposure at 40 cm and 30 min of exposure at 100 cm. Interestingly, the silkworm's body color reverted and proceeded to cocoon normally after molting during the rest phase. **[Conclusion]** The inactivation effect of UV irradiation on BmNPV was influenced by several factors, including UV intensity, irradiation distance and time, and virus concentration. As the irradiation time increased, the survival rate of the silkworm fed with the virus post-irradiation increased, and the level of nucleic acid destruction of the virus became more absolute. A UV irradiation distance exceeding 40 cm for or a minimum duration of 60 min inactivates the low concentration BmNPV while protecting silkworms from the adverse effects of UV radiation.

**Key words**　*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus; ultraviolet radiation; inactivation; prevention and control

家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus，BmNPV）引起的家蚕血液型脓病是家蚕最严重的病害，传染性极强，死亡率最高，至今没有有效药物防治（唐芬芬等，2013）。目前，蚕作生产中仍然大量使用漂白粉、消特灵等含氯制剂进行环境消毒，是预防该病的主要措施。但是，氯制剂存在易挥发效果降低、对人体和环境有害等缺点，急需寻找一种适合家蚕的绿色友好型消毒方法。在许多理化消毒手段中，紫外线杀菌照射（Ultraviolet germicidal irradiation，UVGI）对空气、液体和物体表面等具有有效消毒的特性，在医院、学校和餐馆等广泛应用（Brickner *et al*., 2003）。紫外线杀菌作用主要是由于短波 UVC（250-270 nm）被微生物的核酸强烈吸收，形成嘧啶二聚体中断核酸复制以阻止微生物增殖（Reed, 2010）。许多流行病原对 UVC 敏感，如葡萄球菌、肠球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、流感病毒、SARS-CoV-2、登革热病毒等紫外线灭活效果好（Chang *et al*., 1985; Yin *et al*., 2013; Biasin *et al*., 2021; Nguyen *et al*., 2022），灭活性能与紫外线照射持续时间、距离和辐射照度有关（Palakornkitti *et al*., 2021）。适当的 UVC 不会对宿主细胞和组织造成显着损害，一定强度的 UVC 引起的宿主 DNA 非特异性损伤可通过宿主细胞 DNA 修复酶快速修复（Dai *et al*., 2012）。紫外线照射对 DNA 损伤的检测方法包括 Comet 彗星尾实验、损伤标志物检测、PCR 实验和 West Blotting 实验等（邓爽和徐克前，2013），本研究采用长链 PCR 方法是为了防止出现短片段的阳性扩增，提高检测准确性。由于紫外线照射后 DNA 损伤位置和大小随机，在相同起始位置的 PCR 扩增后，目的片段越长越无法检出，长链 PCR 更准确反映病毒核酸的破坏情况，避免短片段检出的假阳性干扰。

目前，昆虫病原作为杀虫剂及其抗紫外线机制是研究热点，紫外线灭活病毒的研究与应用主要集中在人类相关的公共卫生领域，而家蚕作为农业经济昆虫，紫外线灭活家蚕病毒的研究甚少，紫外线杀菌照射能否在养蚕生产中广泛应用需进一步验证。为了探明紫外线照射对家蚕核型多角体病毒的灭活方法和效果。本文首先比较筛选不同功率、不同照射距离和时间的紫外线照射方法，通过体内感染灭活病毒的家蚕存活率进行灭活效果初步评价。在此基础上，采用长链 PCR 技术对紫外线灭活病毒进行分子检测，扫描电镜比较灭活前后的病毒粒子形态。最后，评估紫外线照射在蚕作生产上的有效性和安全性。以期获得一种灭活 BmNPV 紫外线照射消毒方法，对降低家蚕核型多角体病毒病的发生具有

实效作用。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

家蚕核型多角体病毒 BmNPV 为云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所蚕桑与农业绿色防控创新团队实验室保存的 YN-BS 株；家蚕品种由云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所成果转化中心蚕种室提供的家蚕普种云 7×云 8 和菁松×皓月；紫外灯执行标准为 Q/320281 HJV 03 申星牌紫外线杀菌灯，紫外线波长为 253.7 nm。

## 1.2 试验设计与方法

**1.2.1 不同紫外线照射方法的灭活效果** 将 $5\times10^8$ 个/mL 的 BmNPV 病毒多角体液，移入 6 孔细胞培养板中，每孔移入 1 mL，并将培养板放在 200 r/min 的摇床上。采用 15、30 和 60 W 紫外灯于垂直距离 40 cm 处照射时间为 60、90、120、150 和 180 min，30、60、90 和 120 min，10、20、30 和 60 min；照射停止后，将病毒液经 4 000 r/min 离心 5 min，取沉淀，用 1 mL 灭菌水配置成灭活病毒液备用。试验时，采用 5 龄第 1 天的家蚕，按照病毒编号，每片大小一致的洁净桑叶上涂抹 10 μL 病毒液，晾干后饲喂 5 龄家蚕幼虫（普种云 7×云 8），采用制种圈隔离，每头蚕饲喂一片叶，每头蚕理论接种 $5\times10^6$ 个 BmNPV 多角体。设置空白对照，病毒对照。每组 3 个重复，每个重复 20 头蚕。于添食感染后每隔 24 h 记录家蚕存活数。

进一步选择常见的 30 W 紫外灯垂直距离 40、100、200 和 250 cm 分别照射病毒 90、120、150 和 180 min；处理病毒、感染家蚕及统计方法同上。

**1.2.2 长链 PCR 和扫描电镜检测病毒灭活效果** 制备 $5\times10^6$、$5\times10^8$ 个/mL 的 BmNPV 病毒多角体液，在 6 孔细胞培养板中，每孔放入 1 mL，培养板放在 200 r/min 的摇床上，采用 15 W 紫外线相同距离 40 cm 照射不同时间，照射停止后，用灭菌水收集对应孔灭活病毒液，使用试剂盒（Code No. 9765，TaKaRa）提取病毒 DNA。采用长链 PCR 方法检测目的条带，从分子水平检测紫外线照射对 BmNPV 分子结构是否具有破坏作用。以家蚕核型多角体病毒 BmNPV-ODV 特有结构糖蛋白 P40 为靶标，并延伸下游序列，设计具有同一个上游序列和不同下游序列的 5 对引物，如表 1 所示，扩增目的片段 P1、P2、P3、P4 和 P5 大小分别为 243、560、1 397、2 640 和 3 853 bp。P1 和 P2 的聚合酶采用 r Taq，P3 采用 Ex Taq，P4 和 P5 采用 LA Taq。r Taq/Ex Taq 的 PCR 反应体系：Buffer（含 $Mg^{2+}$）-2.5 μL、dNTP-2 μL、r Taq/Ex Taq-0.25 μL、FP-0.5 μL、RP-0.5 μL、ddH2O-19.25 μL、DNA-1 μL。LA Taq 的 PCR 反应体系：Buffer ($Mg^{2+}$ free)-2.5 μL、$Mg^{2+}$-2.5 μL、dNTP-4 μL、LA Taq-0.25 μL、FP-0.5 μL、RP-0.5 μL、$ddH_2O$-14.25 μL、DNA-1 μL。反应程序为：94 ℃预变性 4 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃复性 30 s，72 ℃延伸时间根据片段大小设定，变性-复性-延伸循环 30 次，保持 72 ℃ 10 min。

**表 1 引物序列**

**Table 1 Primer sequences**

| 引物 Primer | 序列（5′-3′） Sequences (5′-3′) | 片段大小（bp） Fragment size (bp) | 聚合酶 Polymerase | 延伸时间 Extension time |
|---|---|---|---|---|
| P40-FP | TATACAGTGCGTCCTTTCGT | | | |
| P40-RP1 | CAAGCAACCCAGCATGTTCC | 243 | r Taq | 30 s |
| P40-RP2 | ATTCCCATTCCGTTACCGTTC | 560 | | 1 min |
| P40-RP3 | CATCAGTTTTCAAACGGTGCT | 1 397 | Ex Taq | 1.5 min |
| P40-RP4 | CGCCGCTCAAAATAAACTCGT | 2 640 | LA Taq | 3 min |
| P40-RP5 | TCTTCATCTTTTCCGGTCAGC | 3 853 | | 4 min |

对 $5\times10^8$ 个/mL 的 BmNPV 病毒液 1 mL，15 W 紫外灯垂直照射距离 40 cm，照射 480 min，收集病毒。采用 PBS 缓冲液对照射病毒与正常病毒进行 2 次漂洗、离心，弃上清液后，取 1 mL 电镜固定液制备成病毒液，室温固定 2 h，4 ℃保存。样品送武汉赛维尔公司进行扫描电镜观察。

**1.2.3　紫外线照射对家蚕饲养的安全性**　对 4 龄后期家蚕（普种菁松×皓月），采用 30 W 紫外灯照射距离 40 和 100 cm 对家蚕进行直接照射和覆盖薄膜照射，实时观察家蚕体色变化并拍照记录。

### 1.3　数据处理

采用 WPS Office_Excel 最新版本进行数据整理分析和作图，GraphPad Prism 8.4.2 对家蚕 5 d 存活率进行组间差异分析和作图，组间差异分析采用非配对 *T* 检验。

## 2　结果与分析

### 2.1　不同紫外线照射方法的灭活效果

$5\times10^8$ 个/mL 的 BmNPV 病毒液采用 15、30 和 60 W 紫外线距离相同 40 cm 照射不同时间，结果如图 1（A-C）所示，同批次灭活病毒感染家蚕 5 d 后，空白对照组家蚕存活率为 93.33%，正常病毒对照组为 45.00%。15 W 紫外线照射病毒 60、90、120、150 和 180 min 的家蚕存活率分别为 45.00%、60.00%、70.00%、71.67%和 93.33%，30 W 紫外线照射病毒 30、60、90 和 120 min 的家蚕存活率分别为 35.00%、46.67%、58.33%和 70.00%，60 W 紫外线照射病毒 10、20、30 和 60 min 的家蚕存活率分别为 48.33%、48.33%、55.00%和 63.33%。该结果明显看出不同功率紫外灯灭活病毒效果均表现出随着照射时间延长家蚕存活率增加。其中相同照射时间 60 min 的灭活效果随着紫外灯功率加大而明显增加。60 W 紫外线照射 60 min 病毒感染家蚕 5 d 后的存活率（63.33%）与病毒对照（45.00%）呈差异显著（$P$=0.014 2），15 和 30 W 紫外线照射时间大于 120 min 时存活率高于 63.33%，15 W 紫外线照射病毒 180 min 时与空白对照组的家蚕存活率相同。结果表明家蚕核型多角体病毒的紫外线灭活效果与紫外灯功率和照射时间有关。

采用常见的 30 W 紫外灯进一步摸索不同照射距离、不同照射时间的关系，结果如图 2（A-D）所示，同批次灭活病毒感染家蚕 5 d 后，空白对照组家蚕存活率为 93.33%，正常病毒对照组为 42.81%。设置相同照射距离 40、100、200 和 250 cm，照射 90 min 的家蚕存活率分别为 55.00%、47.08%、43.33%和 42.55%，照射 120 min 的家蚕存活率分别为 62.02%、52.73%、55%和 38.29%，照射 150 min 的家蚕存活率分别为 74.47%、47.50%、52.5%和 55.00%，照射 180 min 的家蚕存活率分别为 73.21%、51.47%、51.17%和 55.73%。该结果明显看出紫外线照射距离越长，灭活病毒感染家蚕的存活率越低，当病毒照射距离 100 cm 时的家蚕存活率均明显降低，长时间 180 min 照射组家蚕存活率仍然与病毒组无显著差异（$P$=0.058 8）。其中病毒在 40 cm 短距离长时间照射 180 min，感染家蚕 5 d 后的存活率（73.21%）与病毒对照组（42.81%）差异极显著（$P$=0.006 3），照射 90 min 与病毒对照组无显著差异（$P$=0.052 9）。结果表明，常见 30 W 紫外灯短距离 40 cm 时需照射时间不低于 90 min 才具有明显灭活效果，照射时间越长，灭活效果越好。

### 2.2　长链 PCR 和扫描电镜检测病毒灭活效果

进一步研究不同病毒浓度的灭活效果，采用低浓度 $5\times10^6$ 个/mL 的 BmNPV 病毒液 1 mL，15 W 紫外线距离 40 cm 时，照射时间分别为 5、10、20、30、40 和 60 min，采用长链 PCR 检测不同长度的目的条带，结果如图 3 所示，目的片段越短，条带越清晰。其中最长照射时间 60 min 时，246 和 560 bp 均有目的条带，当目的产物延长到 1 397 bp 时无明显目的条带，而照射 40 min 时有 1 397 bp 目的条带。说明 15 W 的紫外线距离 40 cm 照射时间 60 min 时，对 BmNPV 核酸具有明显破坏作用。

高浓度 $5\times10^8$ 个/mL 的 BmNPV 病毒液 1 mL，15 W 紫外灯垂直照射距离 40 cm 时，照射时间分别为 90、120、150、180、210 和 240 min，

采用长链 PCR 检测目的条带。结果如图 4（泳道编号 1-6）所示，当照射 240 min 时，5 对目的产物均有条带，说明此时紫外线照射未能完全使病毒灭活。进一步增加照射时间 300、360、390、420、450 和 480 min，结果如图 4（泳道编号 7-12）所示，长片段目的产物为 3 853 bp 时，明显看出随着照射时间延长目的片段不明显，480 min 照射时间无明显目的片段。说明高浓度 BmNPV 病毒液在 15 W 紫外线距离 40 cm 照射时间 480 min 时，其核酸完全被破坏。

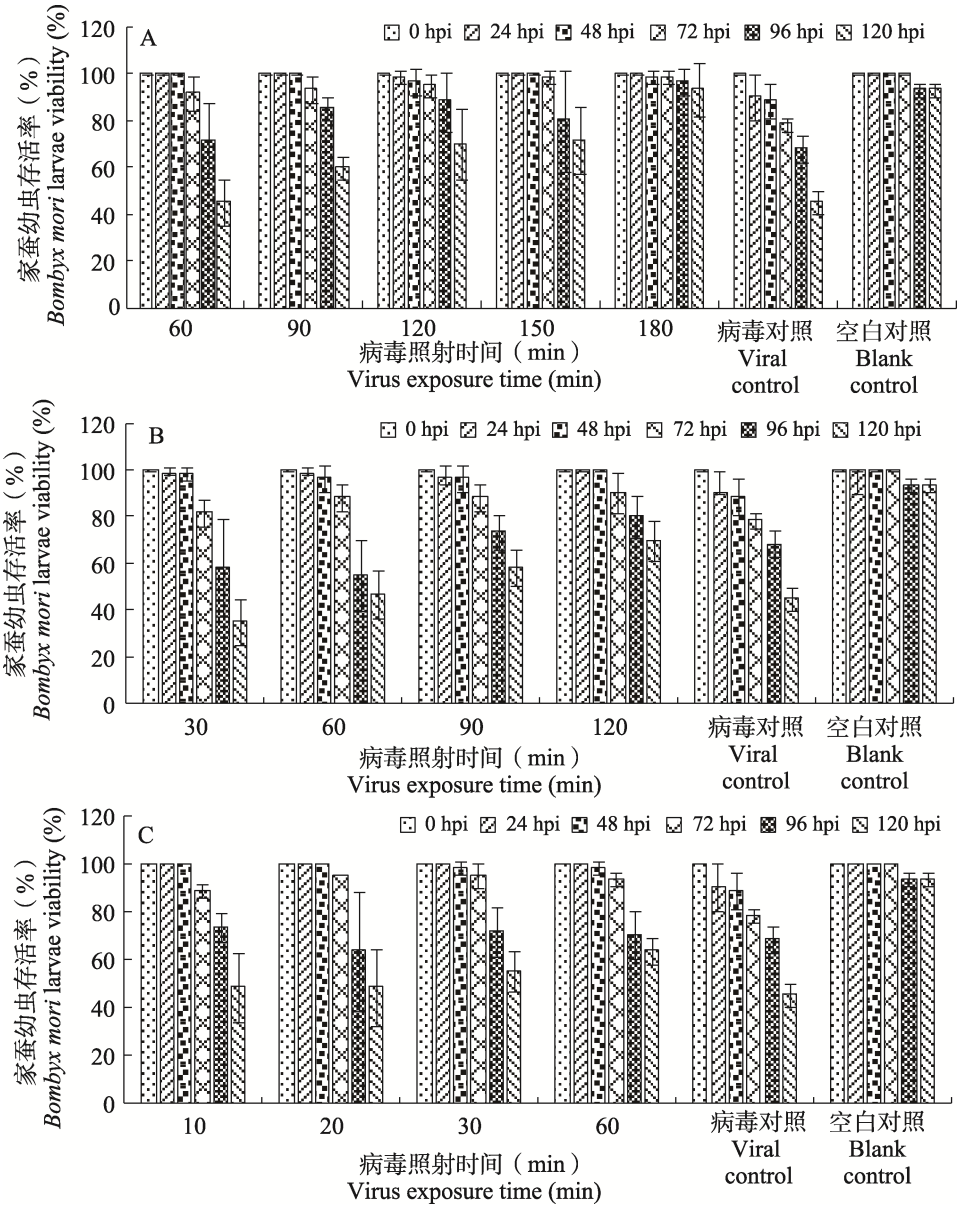


**图 1　不同紫外线强度与照射时间的灭活病毒感染家蚕后每隔 24 h 的存活率**

**Fig. 1　Survival rate of *Bombyx mori* larvae every 24 h infected with BmNPV inactivated different UV intensity and irradiation time**

BmNPV 处理：A. 15 W 紫外线距离 40 cm 照射病毒 60、90、120、150 和 180 min；B. 30 W 紫外线距离 40 cm 照射病毒 30、60、90 和 120 min；C. 60 W 紫外线距离 40 cm 照射病毒 10、20、30 和 60 min。hpi: 感染后小时数。下图同。

BmNPV exposure: A. 15 W ultraviolet irradiation at a distance of 40 cm for 60, 90, 120, 150 and 180 min; B. 30 W ultraviolet irradiation at a distance of 40 cm for 30, 60, 90 and 120 min; C. 60 W ultraviolet irradiation at a distance of 40 cm for 10, 20, 30 and 60 min. hpi: Hours post infection. The same below.

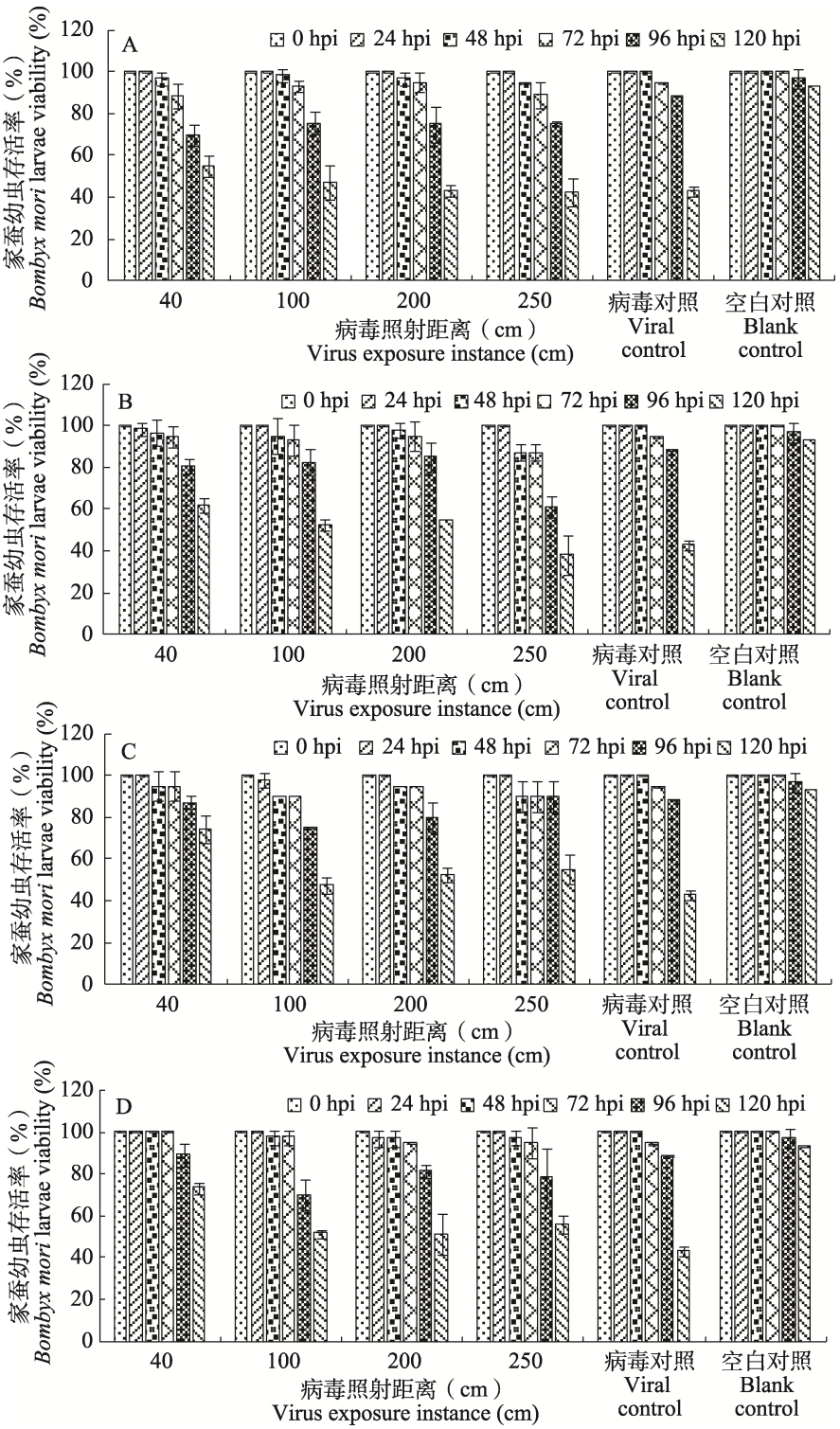


**图 2　30 W 紫外灯不同照射距离与照射时间的灭活病毒感染家蚕后每隔 24 h 的存活率**

**Fig. 2　Survival rate of *Bombyx mori* larvae every 24 h fed with BmNPV inactivated different irradiation distance and time of 30 W ultraviolet**

BmNPV 处理：A. 距离 40、100、200 和 250 cm 照射病毒 90 min；B. 距离 40、100、200 和 250 cm 照射病毒 120 min；C. 距离 40、100、200 和 250 cm 照射病毒 150 min；D. 距离 40、100、200 和 250 cm 照射病毒 180 min。

BmNPV exposure: A. 30 W ultraviolet irradiation at 40, 100, 200 and 250 cm distances for 90 min; B. 30 W ultraviolet irradiation at 40, 100, 200 and 250 cm distances for 120 min; C. 30 W ultraviolet irradiation at 40, 100, 200 and 250 cm distances for 150 min; D. 30 W ultraviolet irradiation at 40, 100, 200 and 250 cm distances for 180 min.

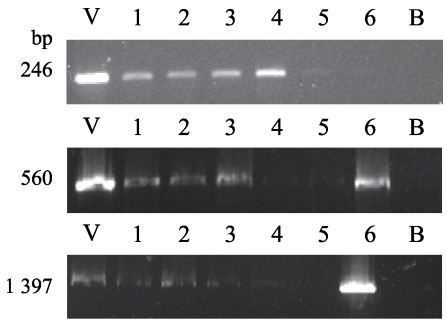


**图 3　低浓度 BmNPV 经 15 W 紫外灯照射不同时间的目的条带**

**Fig. 3　Target bands of low concentration BmNPV were irradiated with 15 W ultraviolet for different time**

泳道 V 表示病毒对照，泳道 B 表示空白对照，泳道 1-6 分别表示病毒照射时间为 5、10、20、30、40 和 60 min。
Lane V indicates viral control, lane B indicates blank control, and lane 1-6 indicates viral exposure time of 5, 10, 20, 30, 40 and 60 min, respectively.

为了获知紫外线对病毒粒子形态的影响，采用正常 BmNPV 和 15 W 紫外线距离 40 cm 照射 480 min 的 BmNPV 进行扫描电镜观察，结果如图 5（A，B）所示，照射前后病毒多角体的外观形态没有明显变化，说明紫外线对 BmNPV 病毒的灭活效果并未改变病毒多角体形态。

### 2.3　紫外线照射对家蚕饲养的安全性

为了获知紫外线照射对家蚕蚕体的影响，采用 30 W 紫外线照射距离 40 和 100 cm 对 4 龄家蚕进行无薄膜覆盖照射和有薄膜覆盖照射，实时观察家蚕变化。结果可知，无薄膜覆盖的距离 40 和 100 cm 的家蚕分别在紫外线照射 10 和 30 min 后，蚕体颜色开始显现黑色，随着照射时间延长，黑化现象愈发明显；有薄膜覆盖的家蚕体色无明显变化。根据图 6（A）显示，紫外线距离 40 cm 照射 30 min 后，无薄膜覆盖的家蚕

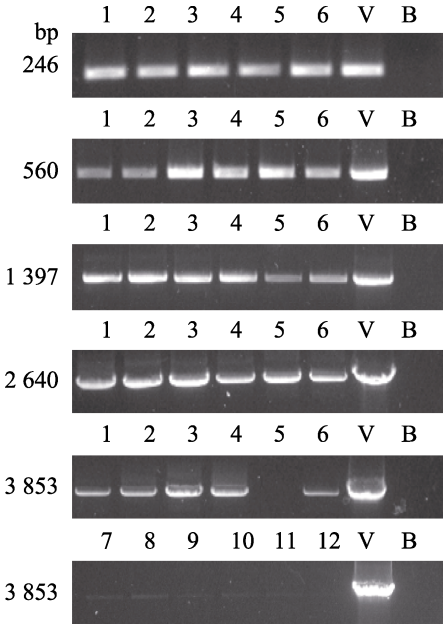


**图 4　高浓度 BmNPV 经 15 W 紫外灯照射不同时间的目的条带**

**Fig. 4　Target bands of low concentration BmNPV were irradiated with 15 W ultraviolet for different time**

泳道 V 表示病毒对照，泳道 B 表示空白对照，泳道 1-6 分别表示病毒照射时间为 90、120、150、180、210 和 240 min，泳道 7-12 分别表示病毒照射时间为 300、360、390、420、450 和 480 min。
Lane V indicates viral control, lane B indicates blank control, lane 1-6 indicates viral exposure time of 90, 120, 150, 180, 210 and 240 min, respectively, and lane 7-12 indicates viral exposure time of 300, 360, 390, 420, 450 and 480 min, respectively.

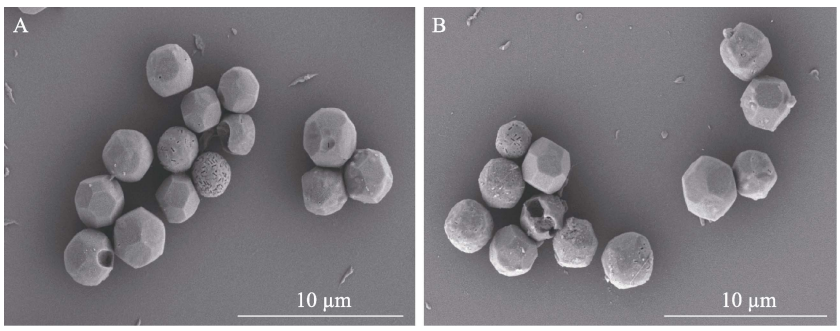


**图 5　BmNPV 病毒多角体经 15 W 紫外灯照射前后的扫描电镜图**

**Fig. 5　Scanning electron microscopy images of BmNPV virus before and after 15 W ultraviolet irradiation**

A. 正常 BmNPV；B. 15 W 紫外灯距离 40 cm 照射 480 min 的 BmNPV。
A. Normal BmNPV; B. BmNPV with 15 W ultraviolet radiation at a distance of 40 cm for 480 min.

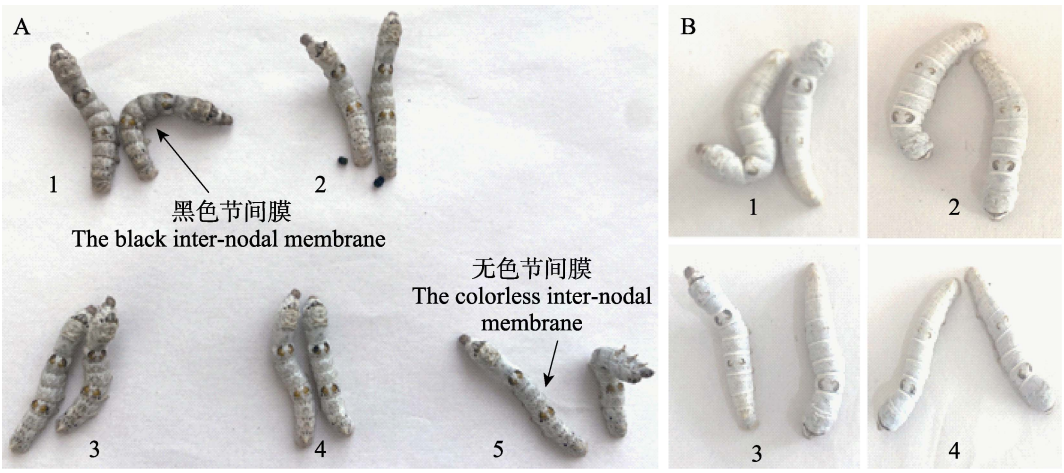


**图 6　30 W 紫外灯对家蚕进行无薄膜覆盖照射和有薄膜覆盖照射的家蚕体色变化**

**Fig. 6　Body color changes of *Bombyx mori* larvae under 30 W ultraviolet irradiation without film and with film irradiation**

A. 紫外线照射 4 龄家蚕；B. 眠期蜕皮后 5 龄家蚕。编号 1 和 3 表示无薄膜覆盖，分别距离 40 cm 照射 30 min 和距离 100 cm 照射 60 min。编号 2 和 4 表示有薄膜覆盖，分别距离 40 cm 照射 30 min 和距离 100 cm 照射 60 min。编号 5 表示正常无照射家蚕。

A. Ultraviolet irradiation of 4th instar *B. mori* larvae; B. 5th instar *B. mori* larvae after molting during sleep period. Numbers 1 and 3 indicate no film coverage and irradiated for 30 min at a distance of 40 cm and 60 min at a distance of 100 cm respectively. Numbers 2 and 4 indicate film coverage and irradiated for 30 min at a distance of 40 cm and 60 min at a distance of 100 cm, respectively. Number 5 indicates normal non-irradiated *B. mori* larvae.

节间膜颜色明显较黑，与有薄膜覆盖的家蚕和正常无照射的家蚕完全不同；紫外线距离 100 cm 照射 60 min 后，无薄膜覆盖的家蚕体色与有薄膜覆盖和正常无照射的家蚕体色明显不同。无薄膜覆盖的 2 种照射比较，明显看出，短距离短时间照射的节间膜颜色比长距离长时间照射的明显较黑。照射结束后，家蚕正常喂叶饲养，经过眠期蜕皮后，5 龄家蚕体色已无黑化现象，如图 6（B）。结果表明，家蚕直接受到紫外线照射会使体色发生黑化现象，照射距离影响较大，而有薄膜覆盖的家蚕体色受到紫外线影响不明显，这种黑化体色随着蜕皮后恢复正常体色，并且能正常结茧。

## 3　讨论

家蚕饲养历来有“万病一把灰”的防病策略，石灰粉、漂白粉的大量使用不仅对人体有害、污染环境、损耗资源等，并且随着钢架大棚等新型蚕室的推广，氯制剂不再适合大量使用。家蚕核型多角体病毒病是蚕作生产上最难防控的病害，病毒在宿主体内感染增殖过程中具有 2 种形态，出芽型病毒（Budded virus，BV）和包埋型病毒（Occlusion-derived virus，ODV），家蚕染病死亡或细胞裂解时 ODV 被释放到周围环境，又经口感染家蚕。ODV 能够减弱不良生态因子的影响，在环境中可以长期存在并保持活性（Blissard and Theilman, 2018）。本研究以有效灭活家蚕核型多角体病毒 BmNPV-ODV 为目标，验证紫外线照射家蚕核型多角体病毒的灭活效果。研究表明，紫外线照射家蚕核型多角体病毒的灭活效果与紫外线功率、照射距离和时间有关，紫外线照射对 BmNPV 核酸的破坏程度与病毒量、照射时间有关，病毒粒子形态照射前后无明显变化，家蚕受到紫外线照射的安全性与照射距离、时间和是否薄膜覆盖有关。紫外线照射距离大于 40 cm，照射时间至少 60 min 时对低浓度 BmNPV 具有破坏核酸作用，且对家蚕具有安全性保障。目前，紫外灯照射常采用固定位置模式，研究表明移动式 UVC 设备获得的辐照度、剂量和抗菌效果因房间中位置不同而有很大差异（Boyce *et al.*, 2016），本文研究结果与之一致，在蚕作生产中可根据病害严重程度改变紫外灯照射位置和

时间。

紫外线照射对不同病毒的灭活靶标不同，诺如病毒与其宿主受体的结合被阻止，并且自身基因组发生突变，而轮状病毒能够与宿主受体结合，但基因组停止复制（Araud *et al.*, 2020）。另一项研究报道 UVC 直接照射和间接太阳能消毒对腺病毒的灭活机制，表明 UVC 照射损伤基因组，而间接太阳能消毒表现出广泛的蛋白质降解，但基因组损伤和蛋白质降解的程度并不能完全评估病毒失活，关键在于表征蛋白质的受损区域及其在蛋白质中的位置，进而影响病毒功能，这是理解分子失活机制至关重要的原因（Bosshard *et al.*, 2013）。本研究靶标基因采用 BmNPV 的 *gp41* 基因（即 *P40* 基因），它是杆状病毒核心基因之一，编码迄今为止唯一公认的包埋型衍生病毒粒子 O-糖基化的包膜蛋白，AcMNPV 基因组中删除 *gp41* 导致 BVs 不再形成，ODV 不再组装，这主要是由于 gp41 蛋白质的三聚体形式和 2 个亮氨酸拉链样结构域等参与病毒粒子形态形成（Li *et al.*, 2018）。本研究中 BmNPV 受到距离 40 cm 的 15 W 紫外灯照射，随着照射时间的延长，目的条带从清晰到淡化，直到照射 480 min 完全无法检测到 *gp41* 基因及其下游共近 4 000 bp 的 DNA 序列，充分说明 *gp41* 基因序列被破坏，破坏程度与病毒量和照射时间相关，这与灭活病毒体内感染家蚕实验结果一致。同时说明了体内感染灭活病毒的家蚕存活率未达到正常家蚕存活率，是由于体内实验设置的紫外线照射时间不够，未能完全灭活病毒。紫外线照射前后对 BmNPV-*gp41* 基因表达量和蛋白质表达量的影响在本文中并未涉及，BmNPV 基因组损伤情况及其功能影响等有待进一步研究。

紫外线照射造成的基因组损伤包括形成环丁烷嘧啶二聚体（Cyclobutane pyrimidine dimers，CPDs）和光产物（Photoproducts，PPs），可通过基因组自身具有的重组修复、诱变修复、核苷酸切除修复和光解酶介导的修复等进行多方位修复。其中，光解酶能够催化 CPD 和吸收光产物，是最快和最简单的 DNA 修复机制，并且是唯一由光调节的机制（Elmenofy *et al.*, 2023）。家蚕核型多角体病毒的 *Bm65* 基因被鉴定为直接促进紫外线诱导的 DNA 损伤修复的核酸内切酶（Tang *et al.*, 2022），家蚕 BmRad23 作为一种光解酶，有助于修复紫外线损伤 BmNPV（Tang *et al.*, 2020）。紫外线照射对病毒基因组损伤并不能使其完全丧失感染能力，除了本研究中证明的与紫外线照射量、病毒量等极其相关以外，家蚕核型多角体病毒修复基因和家蚕修复基因如何为病毒复制提供支持等有待进一步研究。

## 参考文献 (References)


Araud E, Fuzawa M, Shisler JL, Li JR, Nguyen TH, 2020. Inactivation of rotavirus and tulane virus targets different components of the virions. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(4): e02436–e02419.

Biasin M, Bianco A, Pareschi G, Cavalleri A, Cavatorta C, Fenizia C, Galli P, Lessio L, Lualdi M, Tombetti E, Ambrosi A, Redaelli EMA, Saulle I, Trabattoni D, Zanutta A, Clerici M, 2021. UV-C irradiation is highly effective in inactivating SARS-CoV-2 replication. *Scientific Reports*, 11(1): 6260.

Blissard GW, Theilmann DA, 2018. Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annual Review of Virology*, 5(1): 113–139.

Bosshard F, Armand F, Hamelin R, Kohn T, 2013. Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4): 1325–1332.

Boyce JM, Farrel PA, Towle D, Fekieta R, Aniskiewicz M, 2016. Impact of room location on UV-C irradiance and UV-C dosage and antimicrobial effect delivered by a mobile UV-C light device. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 37(6): 667–672.

Brickner PW, Vincent RL, First M, Nardell E, Murray M, Kaufman W, 2003. The application of ultraviolet germicidal irradiation to control transmission of airborne disease: Bioterrorism countermeasure. *Public Health Reports*, 118(2): 99–114.

Chang JC, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD, 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6): 1361–13655.

Dai T, Vrahas MS, Murray CK, Hamblin MR, 2012. Ultraviolet C irradiation: An alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(2): 185–195.

Deng S, Xu KQ, 2013. Research progress of DNA damage detection technologies. *Chemistry of Life*, 33(6): 700–705. [邓爽, 徐克前, 2013. DNA 损伤检测技术. 生命的化学, 33(6): 700–705.]

Elmenofy W, El-Gaied L, Salem R, Gomaa L, Mahmoud A, Magdy A, Mohamed I, 2023. Regulatory mechanisms, protein expression and biological activity of photolyase gene from *Spodoptera littoralis* granulovirus genome. *Molecular Biotechnology*, 65(3): 433–440.

Li YM, Shen S, Hu LB, Deng F, Vlak JM, Hu ZH, Wang HL, Wang ML, 2018. The functional oligomeric state of tegument protein GP41 is essential for baculovirus budded virion and occlusion-derived virion assembly. *Journal of Virology*, 92(12): e02083–e02017.

Nguyen TT, He CR, Carter R, Ballard EL, Smith K, Groth R, Jaatinen E, Kidd TJ, Nguyen TK, Stockwell RE, Tay G, Johnson GR, Bell SC, Knibbs LD, 2022. The effectiveness of ultraviolet-C (UV-C) irradiation on the viability of airborne *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(20): 13706.

Palakornkitti P, Pinyowiwat P, Tanrattanakorn S, Rajatanavin N, Rattanakaemakorn P, 2021. The effectiveness of commercial household ultraviolet C germicidal devices in Thailand. *Scientific Reports*, 11(1): 23859.

Reed NG, 2010. The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public Health Reports*, 125(1): 15–27.

Tang FF, Yang WK, Shao YL, Xie DY, Liao PF, Yang H, Bai XR, 2013. Prompt diagnosis of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(4): 1013–1019. [唐芬芬, 杨伟克, 邵榆岚, 谢道燕, 廖鹏飞, 杨海, 白兴荣, 2013. 应用环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测家蚕核型多角体病毒的研究. 应用昆虫学报, 50(4): 1013–1019.]

Tang Q, Chen FY, Qi XY, Wu P, Chen HQ, Qiu LP, Hu ZY, Chen KP, Li GH, 2020. *Bombyx mori* Rad23 (BmRad23) contributes to the repair of UV-damaged BmNPV. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164: 91–99.

Tang Q, Liu YT, Tang JJ, Chen FY, Qi XY, Zhu FF, Yu Q, Chen HQ, Wu P, Chen L, Guo ZJ, Hu ZY, Ma SS, Chen KP, Li GH, 2022. BmNPV orf 65 (Bm65) is identified as an endonuclease directly facilitating UV-induced DNA damage repair. *Journal of Virology*, 96(14): e0055722.

Yin R, Dai TH, Avci P, Jorge AES, de Melo WCMA, Vecchio D, Huang YY, Gupta A, Hamblin MR, 2013. Light based anti-infectives: Ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5): 731–762.