

江 彤, 单文书, 夏伟伟, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒安徽分离物 S5 片段的克隆及 S5-2 基因的原核表达[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(1):58-62.

南方水稻黑条矮缩病毒安徽分离物 S5 片段的克隆及 S5-2 基因的原核表达

江 彤, 单文书, 夏伟伟, 张享享, 蒋西子
(安徽农业大学 植物保护学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】探讨南方水稻黑条矮缩病毒(Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)安徽分离物(SRBSDV-AnHui-HN2)的遗传特性,并获得原核表达的 P5-2 蛋白。【方法】RT-PCR 扩增 SRBSDV S5 片段,克隆、测序并进行序列分析。将 S5-2 基因插入原核表达载体,重组载体转化大肠埃希菌并用 IPTG 诱导, Ni²⁺-NTA 亲和柱纯化融合蛋白, SDS-PAGE 分析 P5-2 蛋白的表达情况。【结果】SRBSDV-AnHui-HN2 S5 片段全长 3 167 bp, 包含 S5-2 基因全长 612 bp, 编码 204 个氨基酸。序列比对结果显示, SRBSDV-AnHui-HN2 S5 片段与其他 SRBSDV 分离物 S5 片段的序列相似性极高, 达 99.0% ~ 99.7%, 而与斐济病毒属(*Fijivirus*)其他成员 S5 片段的序列相似性较低, 仅为 38.0% ~ 71.3%; 构建的 S5 片段系统发育树表明 SRBSDV 和 RBSDV 聚成 1 个分支, 其中 6 个 SRBSDV 分离物聚成 1 个亚分支。原核表达获得相对分子质量约为 47 000 的重组蛋白, Western blot 分析显示, GST 单抗能够与重组融合蛋白发生特异性反应。【结论】SRBSDV 各分离物之间亲缘关系非常近, 而与 *Fijivirus* 其他成员亲缘关系较远, 原核表达获得的融合蛋白为靶标蛋白。

关键词:南方水稻黑条矮缩病毒; S5 片段; S5-2 基因; 原核表达
中图分类号:S435.111.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)01-0058-05

Prokaryotic expression of S5-2 gene and cloning of S5 segment from Anhui isolate of Southern rice black-streaked dwarf virus

JIANG Tong, SHAN Wenshu, XIA Weiwei, ZHANG Xiangxiang, JIANG Xizi
(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract:【Objective】To study genetic characteristics of the isolates of Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) from Anhui province, and to obtain P5-2 protein by prokaryotic expression. 【Method】The S5 segment of SRBSDV was amplified by RT-PCR, and it was cloned, sequenced and analyzed. Gene S5-2 was inserted into prokaryotic expression vector. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* and was induced by IPTG. The fusion protein was purified by Ni²⁺-NTA affinity column. The expression of P5-2 protein was analyzed by SDS-PAGE. 【Result】The S5 segment from Anhui isolate of SRBSDV (SRBSDV-AnHui-HN2) was 3 167 bp in full length and contained a 612 bp S5-2 gene encoding 204 amino acids. Sequence comparison showed that the S5 segment of SRBSDV-AnHui-HN2 shared high sequence similarity (99.0% – 99.7%) with other SRBSDV isolates, while had relatively low sequence similarity (38.0% – 71.3%) to other *Fijivirus* members. The phylogenetic tree based on S5 segment sequences showed that SRBSDV and RBSDV clustered into a branch, and six isolates of SRBSDV clustered into a sub-branch. The recombinant protein with approximately 47 000 relative molecular mass was obtained by prokaryotic expression. Western blot analysis revealed that GST

monoclonal antibody could specifically bind to the fusion protein. 【Conclusion】All isolates of SRBSDV are closely related, and they have relatively far relationship to other *Fijivirus* members. The fusion protein obtained by prokaryotic expression is the target protein.

Key words: Southern rice black-streaked dwarf virus; S5 segment; S5-2 gene; prokaryotic expression

南方水稻黑条矮缩病毒 (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 为呼肠孤病毒科 Reovirides 斐济病毒属 *Fijivirus*^[1]。该病毒由迁飞性昆虫介体白背飞虱 *Sogatella furcifera* 传播^[2], 病毒可在虫体内增殖, 虫体一旦获毒, 可终身带毒^[3]。研究^[4]表明 SRBSDV 可侵染水稻 *Oryza sativa*、玉米 *Zea mays*、稗草 *Echinochloa crusgalli* 和白草 *Pennisetum flaccidum* 等多种禾本科植物。感染 SRBSDV 的水稻表现出植株矮缩、叶色深绿、节部气生须根倒生等典型症状^[5]。近年来, 由于耕作制度的改变、气候变暖和白背飞虱暴发等多种因素的影响, SRBSDV 在我国多个省市流行成灾。2009 年, SRBSDV 在江西、湖南和广东等部分地区严重发生, 受害面积超过 30 万 hm^2 , 约 6 500 hm^2 水稻绝收^[6-7]。2010 年, SRBSDV 在安徽省 6 市 26 县水稻种植区大发生, 受灾面积约 3.3 万 hm^2 ^[8]。

SRBSDV 病毒粒体为正二十面体等轴状粒子, 直径 70~75 nm, 其基因组由 10 条 dsRNA 组成, 分别命名为 *S1*~*S10*, 共编码 13 个蛋白^[1,9]。根据水稻黑条矮缩病毒 (Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 基因组结构推测 SRBSDV 共编码 6 个结构蛋白 (*S1*、*S2*、*S3*、*S4*、*S8*、*S10*) 和 7 个非结构蛋白 (*S5-1*、*S5-2*、*S6*、*S7-1*、*S7-2*、*S9-1*、*S9-2*)^[10-12]。目前, 仅有部分片段编码的蛋白功能得到注释, *S1* 编码 Rep 蛋白, 指导基因组 RNA 的复制; *S4* 编码外壳蛋白的 B 型突起^[13]; *S5-2* 编码的蛋白主要定位于细胞质, 且能在细胞质中形成较大的颗粒状聚集体^[14]; *S6* 编码 1 个 RNA 沉默抑制子, 协助病毒克服寄主的防御体系, 利于病毒的侵染^[15]; *S7-1* 编码一种小管蛋白, 与病毒的胞间移动有关^[10]; *S8* 编码核心内衣壳蛋白, 参与形态构建^[16]; *S9-1* 编码蛋白与病毒基质的形成密切相关, 是 dsRNA 合成及病毒组装的重要场所^[10]; *S10* 编码外壳蛋白, 决定了该病毒的表面抗原特性^[17]。

水稻叶片胶体金定位和本氏烟叶片亚细胞定位研究^[18]发现, RBSDV 编码的 13 个蛋白中, 仅 *S5-2* 编码的 P5-2 蛋白定位在叶绿体上, RBSDV 侵染水稻表现的叶色深绿症状可能与 P5-2 蛋白有关, 推测 P5-2 蛋白可能是 RBSDV 的症状决定子。SRBSDV *S5-2* 基因编码的 P5-2 蛋白可能具有相似的功能, 因此, 本研究克隆 SRBSDV 安徽分离物 S5 片段序列, 探究来源于安徽的 SRBSDV S5 片段与 *Fijivirus* 其他

成员 S5 片段之间的序列差异; 再进行原核表达获得 P5-2 融合蛋白, 以期为进一步深入研究 P5-2 蛋白的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

感染 SRBSDV 的水稻样本于 2012 年 8 月采自安徽怀宁, 样本保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱; 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 和 BL21 及原核表达载体 pET-GST 保存于安徽农业大学植物保护学院植物病理研究室; 克隆载体 pMD19-T、T4-DNA 连接酶及 DNA 内切酶购自 TaKaRa 公司, 硝酸纤维素膜购自北京索莱宝公司, Ni^{2+} 柱购自 QiaGen 公司; GST-Taq · Antibody 单抗、AP · 羊抗小鼠 IgG 二抗及异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自美国 Amersham Pharmacia 公司; DNA marker、蛋白 marker、PCR 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技公司; Trizol® Plus RNA Purification Kit 购自北京全氏金生物科技有限公司; Taq DNA 聚合酶、HiFi-MMV 反转录试剂盒购自 Promega 公司; 其余试验药品均购自国药生物公司。引物合成及测序为上海 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 SRBSDV S5 片段的克隆与序列分析 称取 0.1 g 水稻感病样本, 加液氮研磨, 再用 RNA 抽提试剂盒提取水稻叶片总 RNA, 详细方法参照 Trizol® Plus RNA Purification Kit 说明书。反转录水稻总 RNA, 得到 cDNA。以 cDNA 为模板扩增 S5 片段, 引物 S5-F: 5'-AAGTTTTTTTCACTCATGACATATTCGA-3'/S5-R: 5'-GACATCAGCTGTATTCCTCC-3', 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s, 循环 30 次。用纯化的目的片段连接载体 pMD19-T, 热击转化 DH5 α , 挑取单菌落为模板, PCR 扩增筛选阳性转化子。根据测序结果获得 SRBSDV S5 片段核苷酸序列。运用软件 DNAMAN Version 5.22 和 DNASTar 进行序列分析。采用邻近相连法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树。

1.2.2 SRBSDV S5-2 基因的克隆及原核表达载体的构建 根据 SRBSDV 片段 S5 的核苷酸序列设计扩增引物, 正向引物添加酶切位点 *Bam*H I, S5-2-F: 5'-ACGGATCCATGTCTATGACACGTT-3', 反向引物添加酶切位点 *Sal* I 位点, S5-2-R: 5'-CCGTCGACTCA-

AACATGAAGTATA-3’。以含有 S5 片段的质粒 DNA 为模板,PCR 扩增 S5-2 基因,反应条件为 94 ℃ 45 s, 56 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,循环 30 次。琼脂糖电泳纯化扩增的 DNA 目的片段,连接载体 pMD19-T,热击转化 DH5 α ,挑取单菌落 PCR 筛选阳性转化子 pMD-S5-2。重组载体 pMD-S5-2 和表达载体 pET-GST 均用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切,再将 S5-2 基因插入表达载体 pET-GST,热击转化 DH5 α ,挑取单菌落 PCR 筛选阳性转化子 pET-S5-2。

1.2.3 融合蛋白的表达、纯化与检测 将获得的质粒 pET-S5-2 转化 BL21,挑取阳性转化子接种于 LB 培养基,37 ℃ 条件下振荡培养 12 h,再扩大培养至菌液 $D_{600\text{ nm}} = 0.6$ 。诱导条件为 28 ℃、10 h、0.2 mmol · L⁻¹ IPTG。将培养好的菌液离心,收集菌体,在超声破碎仪内处理 15 min,12 000 r · min⁻¹ 条件下,将破碎的菌液离心 30 min;上清液转移至新的离心管,加入 1 mL 的镍胶亲和纯化琼脂糖 (Ni²⁺-NTA),过柱纯化获得融合蛋白。

共设 4 个处理的菌液,空载体 pET-GST 未诱导、空载体 pET-GST 诱导、重组载体 pET-S5-2 未诱导和重组载体 pET-S5-2 诱导。各处理菌液用 PBS 缓冲液重新悬浮,混入 5 × Buffer,在沸水中处理 5 min,再冰浴 10 min;离心后,上清液转移到新的离心管,即为制备的上样样品。相同方法处理过柱纯化获得的融合蛋白制备上样样品。制备 2 块聚丙烯酰胺凝胶,同时电泳,第 1 块凝胶用考马斯亮蓝染色后观察蛋白条带,第 2 块凝胶用作 Western blot 分析,先覆盖 NC 膜进行转印,再将 NC 膜转移至 50 g · L⁻¹ 奶粉溶液中,25 ℃ 轻微振荡处理 2 h,加入稀释 2 000 倍的 GST-Taq · Antibody 单抗(一抗),25 ℃ 条件下振荡处理 1 h,PBST 溶液冲洗 3 次,再用稀释 2 000 倍的 AP · 羊抗小鼠 IgG(二抗)振荡处理 2 h,PBST 溶液冲洗 5 次,最后加入 NBT/BCIP 显色。

2 结果与分析

2.1 SRBSDV S5 片段的克隆与序列分析

将 PCR 扩增的 SRBSDV 安徽分离物(SRBSDV-AnHui-HN2)S5 片段克隆并测序,序列长度为 3 167 bp,序列的 GenBank 登录号为:HF954999。比对 SRBSDV-AnHui-HN2 S5 片段和 NCBI 下载的斐济病毒属(*Fijivirus*)其他分离物 S5 片段的序列相似性,发现 SRBSDV-AnHui-HN2 S5 片段与其他 SRBSDV S5 片段的序列相似性极高,达 99.0% ~ 99.7%,而与其他 *Fijivirus* 成员 S5 片段的序列相似性较低,仅为 38.0% ~ 71.3%(表 1)。

表 1 SRBSDV-Anhui-HN2 S5 片段与 16 个斐济病毒属其他分离物 S5 片段核苷酸序列的相似性

Tab.1 Nucleotide sequence similarity between S5 segment of SRBSDV-Anhui-HN2 and S5 segments of 16 other isolates of *Fijivirus*

分离物	GenBank 登录号	来源地	相似性/%
SRBSDV-Anhui-HN2	HF954999	中国安徽	100.0
SRBSDV-VNM	JQ692576	越南	99.7
SRBSDV-HuNyy	JQ034352	中国湖南	99.5
SRBSDV-Hubei	HM585275	中国湖北	99.4
SRBSDV-YN-MShi	JQ773424	中国云南	99.2
SRBSDV-HN	FN563993	中国海南	99.0
RBSDV-HB	KC134293	中国河北	71.3
RBSDV-JS	KM921677	中国江苏	71.1
RBSDV-SDZZ10	JX421768	中国山东	70.2
RBSDV-MX8	HF954989	中国安徽	70.2
RBSDV-Anhui-LJ	HF955009	中国安徽	70.2
RBSDV-WZ	KC801047	中国浙江	70.1
RBSDV-LH	KC801046	中国浙江	70.0
RBSDV-Korean	HQ670667	韩国	69.9
FDV-AUS	NC_007160	澳大利亚	49.9
MRCV-Arg	AY607587	阿根廷	64.1
NLRV-TSU	D49697	古巴	38.0

构建 SRBSDV 安徽分离物与 *Fijivirus* 其他成员 S5 核苷酸序列系统关系树(图 1),结果发现,SRBSDV 和 RBSDV 聚成一个分支,其中 6 个 SRBSDV 分离物聚成一个亚分支,8 个 RBSDV 分离物聚成另一个亚分支。而里奥夸尔托病毒(Mal de Rio Cuarto virus, MRCV)、稻飞虱呼肠孤病毒(*Nilaparvata lugens reovirus*, NLRV)和斐济病病毒(*Fiji disease virus*, FDV)分别单独聚成一个分支。

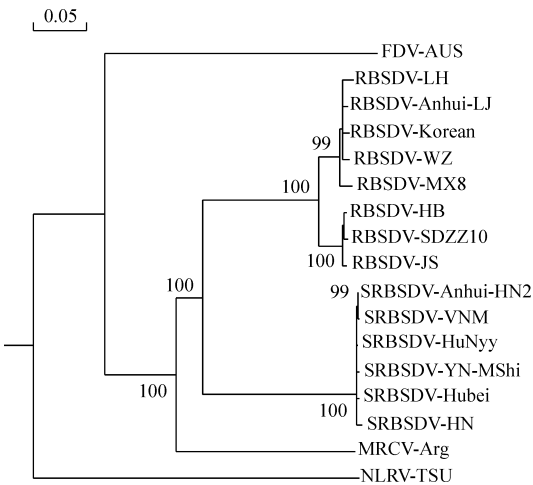


图 1 基于 S5 片段核苷酸序列构建的系统关系树
Fig. 1 Relationship dendrogram of SRBSDV-Anhui-HN2 and other isolates of *Fijivirus* based on S5 segment sequences

2.2 SRBSDV S5-2 重组表达载体的构建

PCR 扩增的模板为含有 S5 片段的质粒 DNA,引物为 S5-2-F 和 S5-2-R,只能扩增出 1 条约 600 bp 的

条带, 将此特异性条带克隆并测序, 证明插入 pMD19-T simple 的 S5-2 基因没有发生变异。再将 S5-2 基因亚克隆到原核表达载体 pET-GST 上, *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切验证, 片段大小和理论值完全相符 (图 2), 测序验证 S5-2 基因序列未发生突变, 说明插入的 S5-2 基因读码框正确。

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

从图 3a 可以看出, pET-S5-2 诱导表达的 P5-2 蛋白条带相对分子质量大约为 47 000, 与理论预测完全符合。从图 3b 可以看出, GST-Taq · Antibody 单抗可以和 pET-S5-2 诱导表达的 P5-2 融合蛋白以及纯化的 P5-2 融合蛋白特异性结合, 在蛋白相对分子质量 47 000 的 P5-2 融合蛋白位置均出现一条明显的条带; 而 pET-GST 空载体未诱导、pET-GST 空载体诱导和 pET-S5-2 未诱导 3 个处理, 各个泳道蛋白相对分子质量 47 000 位置均未出现条带。

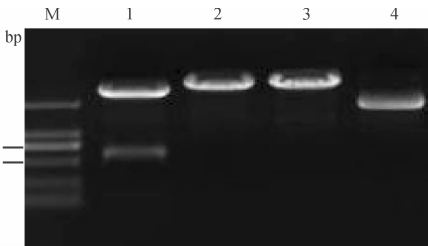


图 2 重组质粒 pET-S5-2 的酶切电泳图谱
Fig. 2 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid pET-S5-2 digested with restriction enzyme

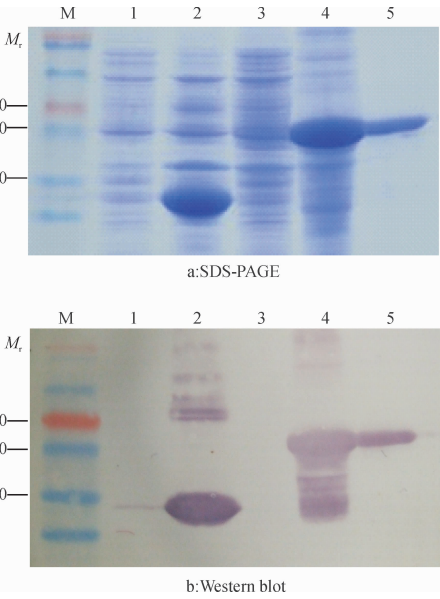


图 3 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析
Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of fusion protein

3 讨论与结论

序列比对发现 SRBSDV-AnHui-HN2 与其他 SRBSDV 各分离物 S5 片段的序列相似性极高, 说明 SRBSDV S5 片段核苷酸序列在序列进化过程中非常保守。系统关系树表明 SRBSDV 和 RBSDV 聚成一个分支, 而 NLRV、FDV 和 MRCV 分别单独聚成一个分支。研究发现, SRBSDV 和 RBSDV 同属于 *Fijivirus* 属亚组 II, SRBSDV 和 RBSDV 的血清学关系较强^[19], 均为害水稻和玉米, 主要发病地区是东亚和东南亚, 但 SRBSDV 的传播介体是白背飞虱, RBSDV 的传播介体是灰飞虱 *Laodelphax striatellus*^[22]。NLRV 属于 *Fijivirus* 属亚组 V, 只能侵染褐飞虱 *Nilaparavata lugens*, 与 *Fijivirus* 属其他成员没有任何血清学关系^[20]。FDV 属于 *Fijivirus* 属亚组 I, 传播介体是甘蔗扁角飞虱 *Perkinsiella* spp., 自然寄主为甘蔗 *Saccharum officinarum*, 主要发病地区是澳大利亚, 与 *Fijivirus* 属其他成员也没有任何血清学关系^[21]。MRCV 虽属于 *Fijivirus* 属亚组 II, 但其传播介体是明飞虱 *Delphacodes kuscheli*, 主要寄主是玉米, 也能侵染高粱 *Sorghum bicolor* L.、小麦 *Triticum aestivum* Linn. 和燕麦 *Avena sativa* L. 等禾本科作物, 一般发生于南美洲的阿根廷和巴西南部, 与 SRBSDV 和 RBSDV 血清学关系均较弱^[22]。

张蔚明等^[17]制备的 SRBSDV P10 蛋白特异性抗血清, 可用于带毒白背飞虱和感病水稻寄主的快速检测。羊健等^[16]原核表达了 RBSDV P8 蛋白并制备了 P8 蛋白的多抗血清, 可用于 RBSDV 田间病株的快速诊断。张上林等^[23]原核表达了 RBSDV P7-2 蛋白, 与水稻总蛋白进行了 Pull-Down 试验, 鉴定出与 P7-2 互作的 4 个水稻蛋白。本研究利用载体 pET-GST 获得了带有 6 × His 和 GST 双标签的 P5-2 融合蛋白, 28 ℃、10 h 和 0.2 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下诱导, P5-2 蛋白能够快速、大量地表达, 但表达的 P5-2 蛋白为沉淀蛋白, 缺乏生物活性, 可用于抗血清制备, 但不能进行蛋白互作试验^[24]。为了获得具有生物活性的可溶性蛋白, 需降低诱导温度, 延长诱导时间, 调整 IPTG 诱导浓度等优化诱导条件, 提高可溶性蛋白的表达量, 为开展 Pull-down 和 Co-IP 等蛋白互作试验奠定基础。

参考文献:

[1] ZHOU G H, WEN J J, CAI D J, et al. Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed *Fijivirus* species in the family Reoviridae[J]. Chinese Sci Bull, 2008, 53(23): 3677-3685.

- [2] 季英华, 高瑞珍, 张野, 等. 一种快速同步检测水稻黑条矮缩病毒和南方水稻黑条矮缩病毒的方法[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 91-94.
- [3] 王强, 周国辉, 张曙光. 南方水稻黑条矮缩病毒一步双重 RT-PCR 检测技术及其应用[J]. 植物病理学报, 2012, 42(1): 84-87.
- [4] 周国辉, 张曙光, 邹寿发, 等. 水稻新病害南方水稻黑条矮缩病发生特点及危害趋势分析[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 144-146.
- [5] ZHOU G H, XU D L, XU D G, et al. Southern rice black-streaked dwarf virus: A white-backed planthopper-transmitted *fijivirus* threatening rice production in Asia [J]. Front Microbiol, 2013, 4: 270.
- [6] 刘欢, 倪跃群, 饶黎霞, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒和水稻条矮缩病毒的单抗制备及其检测应用[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 27-34.
- [7] 杨迎青, 兰波, 孟凡, 等. 江西省白背飞虱消长动态及南方水稻黑条矮缩病带毒率的测定[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 60-64.
- [8] 郑兆阳, 张启勇, 沈光斌. 安徽省南方水稻黑条矮缩病发生现状和综防对策[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(7): 132-188.
- [9] 丁铭, 尹跃艳, 方琦, 等. 云南水稻上检测到南方水稻黑条矮缩病毒[J]. 植物病理学报, 2011, 41(6): 640-644.
- [10] LIU Y, JIA D S, CHEN H Y, et al. The P7-1 protein of Southern rice black-streaked dwarf virus, a *fijivirus*, induces the formation of tubular structures in insect cells [J]. Arch Virol, 2011, 156(10): 1729-1736.
- [11] 羊健. 水稻黑条矮缩病毒 S5 基因组功能的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007: 1-57.
- [12] ZHANG P, MAR T T, LIU W W, et al. Simultaneous detection and differentiation of Rice black streaked dwarf virus (RBSDV) and Southern rice black streaked dwarf virus (SRBSDV) by duplex real time RT-PCR[J]. Virol J, 2013(10): 24-35.
- [13] 张恒木, 雷娟利, 陈剑平, 等. 浙江和河北发生的一种水稻, 小麦, 玉米矮缩病是水稻黑条矮缩病毒引起的[J]. 中国病毒学, 2001, 16(3): 246-251.
- [14] 章松柏, 王开放, 刘小娟, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒非结构蛋白的亚细胞定位研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2102-2107.
- [15] 卢嫣红, 张金凤, 熊如意, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒 S6 编码一个沉默抑制子[J]. 中国农业科学, 2011, 44(14): 2909-2917.
- [16] 羊健, 张恒木, 陈剑平, 等. 水稻黑条矮缩病毒 p8 蛋白的原核表达、抗血清制备及其特性[J]. 植物保护学报, 2007, 34(3): 252-258.
- [17] 张蔚明, 刘燕娟, 周倩, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒外壳蛋白 P10 的原核表达和抗血清制备及应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(4): 400-402.
- [18] LIU X Y, YANG J, XIE L, et al. P5-2 of Rice black-streaked dwarf virus is a non-structural protein targeted to chloroplasts[J]. Arch Virol, 2015, 160(5): 1211-1217.
- [19] 洪健, 李德葆, 周雪平, 等. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 64-67.
- [20] NAKASHIMA N, KOIZUMI M, WATANABE H, et al. Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: A putative member of the genus *Fijivirus* [J]. J Gen Virol, 1996, 77(1): 139-146.
- [21] HARDING R M, BURNS P, GEIJSKES R J, et al. Molecular analysis of Fiji disease virus segments 2, 4 and 7 completes the genome sequence [J]. Virus Genes, 2006, 32(1): 43-47.
- [22] DISTEFANO A J, CONCI L R, HIDALGO M M, et al. Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV): Evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species [J]. Arch Virol, 2002, 147(9): 1699-1709.
- [23] 张上林, 孙丽英, 陈剑平. 四种水稻蛋白与水稻黑条矮缩病毒编码非结构蛋白 P7-2 的互作分析[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(6): 1298-1303.
- [24] 陈秀, 饶雪琴, 阮小蕾, 等. 香蕉线条病毒 MP 功能域基因的克隆、原核表达及抗血清制备[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 47-52.

【责任编辑 霍 欢】