

水稻条纹病毒编码蛋白在灰飞虱体内的检测 及其与 CP 体外结合研究

张开玉¹, 熊如意^{1,2}, 吴建祥², 周雪平², 周益军¹

(¹江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; ²浙江大学生物技术研究所, 杭州 350002)

摘要: 【目的】检测灰飞虱体内由水稻条纹病毒 (RSV) 编码的外壳蛋白 (CP)、病害特异性蛋白 (SP), 以及非结构蛋白 NS2、NS3 和 NSvc4 等 5 种蛋白以及病毒粒子 CP 与 SP、NS2、NS3、NSvc4 的体外结合, 为进一步研究水稻条纹病毒与其介体昆虫互作提供有用信息。【方法】提取高带毒灰飞虱 (Q 家系) 总蛋白, 用免疫方法检测昆虫体内 CP、SP、NS2、NS3 和 NSvc4 等 5 种重要蛋白的表达以及病毒粒子 CP 与 SP、NS2、NS3、NSvc4 的体外结合情况。【结果】结果表明在带毒灰飞虱体内以上 5 种蛋白都能检测到, 而且 CP 含量最高, NSvc4、SP、NS3、NS2 含量依次降低; 用体外原核表达后纯化的蛋白进行了 RSV 粒子 CP 与 SP、NS2、NS3、NSvc4 的体外结合实验, 实验结果表明病毒粒子 CP 与 SP、NSvc4 之间存在体外结合关系。【结论】检测结果为灰飞虱作为 RSV 的昆虫寄主并且可以在其体内增殖的结论提供了支持, 表达差异表明病毒编码蛋白在介体灰飞虱体内可能存在着一定的协调关系; 病毒粒子与 SP 的结合为前人关于 CP 与 SP 可能共同作用于叶绿体进而影响症状的严重度的报道又提供了一个新的证据, 病毒粒子与 NSvc4 之间存在体外结合关系, 也为 NSvc4 可能作为运动蛋白通过与 CP 的互作以及诱导病毒在胞间运动需要 CP 的辅助提供了佐证。

关键词: 灰飞虱; 水稻条纹病毒; 表达; 体外结合

Detection of the Proteins Encoded by Rice Stripe Virus in *Laodelphax striatellus* Fallén and Interactions *in vitro* Between CP and the Four Proteins

ZHANG Kai-yu¹, XIONG Ru-yi^{1,2}, WU Jian-xiang², ZHOU Xue-ping², ZHOU Yi-jun¹

(¹Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014;

²Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: 【Objective】 Detecting the five proteins encoded by RSV (CP, SP, NS2, NS3 and NSvc4) in the small brown plant hopper (*Laodelphax striatellus* Fallén, SBPH), investigating the interactions between CP and the other four proteins of RSV *in vitro*, and providing available data for further studying the relationship between RSV and its insect vector. 【Method】 The total protein of virus infected SBPH was extracted, and hybridized with specific antibodies of the five RSV proteins. The gel overlay assay was performed. 【Result】 All the five proteins encoded by RSV presented in the SBPH. Further more, CP has a higher density among the five proteins. Besides, results indicated that there are interactions with CP and SP or CP and NSvc4 *in vitro*. 【Conclusion】 The study confirmed that RSV replicates in SBPH, and different concentrations of the five proteins presented in SBPH body indicated the different roles in its replication. The interaction *in vitro* between CP and NSvc4 (the potential movement protein) indicates that the cell-to-cell movement of RSV may depend on this relationship between CP and NSvc4. The results also showed the interaction between CP and SP, which has been reported previously on chloroplast of rice and influence on the severity of symptoms.

收稿日期: 2007-12-26; 接受日期: 2008-03-03

基金项目: 国家支撑计划 (2006BAD02A16、2006BAD08A04), 江苏省重大科技攻关 (BE2005301), 江苏省自然科学基金 (BK2005BK2006164), 农业部行业专项 (nyhyzx07-01), 江苏省 333 工程资助项目

作者简介: 张开玉、熊如意为同等贡献者。张开玉 (1981—), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒学。熊如意 (1973—), 女, 江西高安人, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为植物病毒学。通讯作者周益军 (1957—), 男, 江苏涟水人, 研究员, 研究方向为植物病理学。Tel/Fax: 025-84390391; E-mail: yjzhou@jaas.ac.cn

Key words: *Laodelphax striatellus* Fallen; *Rice stripe virus*; Expression; Interaction *in vitro*

0 引言

【研究意义】水稻条纹病毒 (*Rice stripe virus*, RSV) 是纤细病毒属 (*Tenuivirus*) 的典型成员, 分布于中国 16 个省市, 给中国水稻生产造成严重损失^[1]。

【前人研究进展】RSV 通过灰飞虱以持久方式传播^[2], 并且它在植物及昆虫寄主中都能复制, 病毒可以通过昆虫经卵传递给下一代^[3-4]。RSV 由 4 条 RNA 链组成, 分别为 RNA1、RNA2、RNA3 和 RNA4^[5-6]。随着 RSV 分子生物学研究的深入, 人们对 RSV 编码的几个蛋白功能的了解也日趋完善。研究结果表明, vcRNA3 编码相对分子质量 35 kD 的外壳蛋白 (CP), vRNA4 编码病害特异性蛋白 SP, CP 和 SP 在病叶中的积累与褪绿花叶症状的严重度密切相关, 推测这两种蛋白都是致病相关蛋白^[7]。Takahashi 等^[8]与 Liang 等^[9]对由 vRNA2 编码的 NS2 蛋白有不同的看法, 前者推测其与病毒的胞间运动 (cell to cell movement) 有关, 而 Liang 等在进行 NS2 与 RNA 结合实验后认为 NS2 不可能是运动蛋白。NS3 由 vRNA3 编码, 推测其与病毒的复制有关^[10], 但其确切功能还未知。vcRNA4 编码的 NSvc4 蛋白与植物病毒 30 kD 移动蛋白 (movement protein, MP) 大家族的结构有相似性, 推测其可能与病毒的胞间运动有关。【本研究切入点】以上的推测多数缺乏直接的实验依据, 研究 RSV 编码的 5 种主要蛋白在灰飞虱体内的表达以及病毒粒子与 SP、NS2、NS3 和 NSvc4 的体外结合情况, 可以更加清晰说明 RSV 在灰飞虱体内的增殖与传播。【拟解决的关键问题】本文采用 ELISA 和 Western blotting 方法检测到 5 个蛋白在灰飞虱体内的表达, 并初步推测 5 种蛋白量的多少; 同时采用 ELISA 和凝胶覆盖验证病毒粒子 CP 与其它 4 种蛋白之间的体外结合关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

提纯的 RSV、TMV, 高带毒灰飞虱 (Q 家系) 及 CP 单克隆抗体 (对应二抗 Sigma Product No.: A4416) 均由江苏省农科院植物保护研究所病害室保存并提供, SP、NS2、NS3、NSvc4 原核表达后的纯化蛋白以及相应多克隆抗体 (SP、NS2、NS3、NSvc4 效价分别为 1 : 102 400、1 : 51 200、1 : 51 200、1 : 25 600, 经试验验证几种抗血清在 ELISA 和 Western 试验中对

其它几种非对应抗原之间无交叉反应; 对应二抗 Sigma Product No.: A0545) 由浙江大学制备和提供。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自 Sigma 公司 (Product No.: A4416 和 A0545), NC 膜购自 Amersco 公司。饲虫水稻品种为高感 RSV 的武育粳 3 号。

1.2 试验方法

1.2.1 高带毒灰飞虱筛选 灰飞虱饲养至成虫, 单头雌虫产卵 3~4 d, 取出雌虫经 Dot-ELISA 检测, 阳性虫后代饲养 2~4 代后再同上法纯化一次, 所得纯系 (Q 家系) 进行扩繁。实验过程中定期进行纯化, 使供试虫的带毒率维持在 90% 以上。同样方法筛选出不带毒灰飞虱群体。

1.2.2 ELISA 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 参照王贵珍的方法^[11], 略做修改。(1) 取高带毒灰飞虱 10 头, 加入 2.5 ml pH 9.6 的 0.05 mol·L⁻¹ Na₂CO₃-NaHCO₃ 包被缓冲液, 在玻璃匀浆器内彻底研磨后于 4℃、4 000 r/min 离心 5 min。取上清按照 1、10、50、100、500、1 000、5 000 和 10 000 倍做梯度稀释后加到酶联板上, 每孔 100 μl, 置 4℃温育过夜。实验中以纯化 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 稀释 10 倍后作为阳性对照, 不带毒灰飞虱同样处理的上清为阴性对照。(2) 用 0.01 mol·L⁻¹ PBST 洗 3 次, 每次 3 min。(3) 每孔加 1% 脱脂奶粉封闭液 (0.01 mol·L⁻¹ PBST 中加入脱脂奶粉至终浓度 1%) 125 μl, 37℃封闭 30 min。同 (2) 洗涤。(4) 每孔加入 100 μl 用封闭液稀释 (一抗浓度均为 1 : 10 000) 的一抗, 37℃温育 1.5 h。同 (2) 洗涤。(5) 每孔加入 100 μl 用封闭液稀释 HRP 标记二抗, 37℃温育 1.5 h。同 (2) 洗涤。(6) 每孔加入 100 μl 新配制的底物溶液, 37℃显色 30 min。(7) 每孔加入 50 μl 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄, 终止反应。随后在 Bio-Rad 550 型酶标仪上测 450nm 处的 OD 值, 求出阴性对照的 OD 值的平均值 N, 若样品 OD 值 P ≥ 2N, 则视为阳性, 否则为阴性 (重复 3 次, 取平均值)。

1.2.3 Western 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 按 Sambrook 等的方法^[12]。取高带毒灰飞虱 200 头采用 Mg-EGTA 沉降法^[13]提取虫体总蛋白。提取的蛋白样品与 2×SDS 上样缓冲液中 (2 : 1) 煮沸 5 min 后冰水浴中静置 3 min 稍离心加样, 经过 12.5% SDS-PAGE 电泳 (每泳道 40 μl) 将蛋白分开,

电泳结束后将蛋白用 Bio-Rad 半干转移仪转移到 NC 膜上, NC 膜干燥后用 5% 脱脂奶粉封闭 24 h。封闭后的 NC 膜浸于 5% 脱脂奶粉稀释的一抗(一抗浓度均为 1:100)中, 室温下在水平摇床上轻轻振荡反应 1.5 h, 用 PBST 淋洗 3~5 次, 每次约 5 min。淋洗后将膜转移至用 5% 脱脂奶粉以 1:10 000 稀释的 HRP 标记的二抗中, 室温下轻轻振荡反应 1.5 h。膜用 PBST 洗 8~10 次, 以去除多余的二抗。再将膜浸入显色液中避光反应, 至特异性条带明晰, 而背景较低为止。将显色反应完全后的膜迅速移至去离子水中, 以终止颜色反应(重复 3 次)。

1.2.4 ELISA 验证 RSV 粒子 CP 与纯化的蛋白体外结合 将提纯的 RSV 按照 1、10、100、1 000 和 10 000 倍做梯度稀释后加到酶联板上, 每孔 100 μl , 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜, 试验中以提纯 TMV 为阴性对照。用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBST 洗 3 次, 每次 3 min。每孔加 1% 脱脂奶粉封闭液(0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBST 中加入脱脂奶粉至终浓度 5%) 125 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min, 同上洗涤。再加入用 5% 脱脂奶粉以 1:50 稀释的纯化蛋白, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5 h^[14-16]。以下操作与 1.2.2 (4) 以后步骤相同(重复 3 次, 取平均值)。

1.2.5 凝胶覆盖验证 (gel overlay assay) RSV 粒子与纯化蛋白体外结合 如 1.2.3 将 SP、NS2、NS3、NSvc4 4 个纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜。转膜后将 NC 膜浸入变性缓冲液(6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.3) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。再让蛋白先后在复性缓冲液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.4, 150

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 和 0.1% NP-40, 其中包含盐酸胍依次为 4、3、2、1 和 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 复性 10 min。复性后的膜用包含 10% 脱脂奶粉和 5% 甘油的复性缓冲液^[17-20], 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下, 封闭 1.5 h。将膜转移至用 5% 脱脂奶粉作 1:100 稀释的 RSV 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜^[21-23]。过夜的膜浸于 5% 脱脂奶粉稀释(1:250)的 CP 一抗中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5 h, 用 PBST 淋洗 3~5 次, 每次约 5 min。淋洗后将膜转移至用 5% 脱脂奶粉作 1:10000 稀释的 HRP 标记的二抗中, 室温下轻轻振荡反应 1.5 h。膜用 PBST 短暂淋洗, 以去除膜表面的 Tween-20。再将膜浸入显色液中避光反应, 至特异性条带明晰, 而背景较低为止, 约需 5~10 min。将显色反应完全后的膜迅速移至去离子水中, 以终止颜色反应(重复 3 次)。

2 结果与分析

2.1 ELISA 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4

提取高带毒灰飞虱(Q 家系)总蛋白, 进行一系列的稀释后进行 ELISA 反应, 结果表明, 稀释 100 倍后, 检测不到 NS2 蛋白; 稀释 500 倍后, 检测不到 SP 和 NS3 蛋白; 稀释 1 000 倍后, 检测不到 CP 和 NSvc4 蛋白。数据说明了这 5 种蛋白在带毒灰飞虱体内都被表达, 但存在量上的差异, 即 $\text{CP} > \text{NSvc4} > \text{SP} > \text{NS3} > \text{NS2}$ (图 1)。

2.2 Western 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4

提取的高带毒灰飞虱总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电

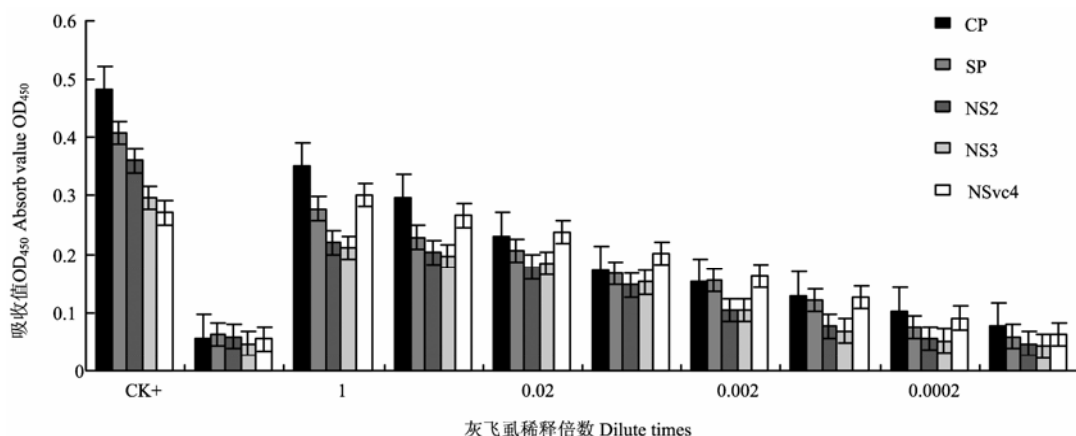
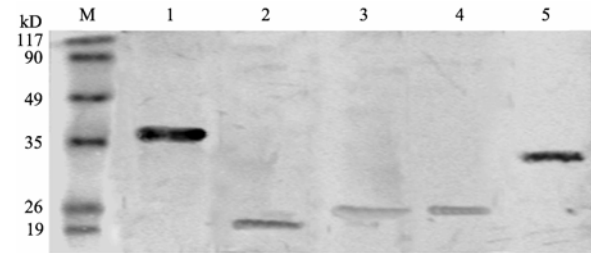


图 1 ELISA 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 蛋白

Fig. 1 Detection of CP, SP, NS, NS3, NSvc4 in SBPH by ELISA

泳后转膜, 进行 Western 印迹反应, 结果表明在带毒灰飞虱体内 CP (35.1 kD)、SP (20.5 kD)、NS2 (22.8 kD)、NS3 (23.9 kD)、NSvc4 (32.4 kD) 5 个蛋白在 Western 检测中都有杂交信号, 而且大小与理论值相符。从条带显色的深浅可以推测带毒灰飞虱体内蛋白含量为 CP>NSvc4>SP>NS3>NS2 (图 2), 这个结果与 2.1 的结果是一致的。



M: 蛋白分子量标准; 1~5: 分别为 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4
M: Protein marker; 1-5: CP, SP, NS2, NS3 and NSvc4

图 2 Western 检测带毒灰飞虱体内的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 蛋白

Fig. 2 Western-blot of the CP, SP, NS, NS3 and NSvc4

2.3 ELISA 验证 RSV 粒子 CP 与纯化蛋白的体外结合

图 3 的检测结果显示病毒粒子 CP 可以与纯化蛋白中的 SP、NSvc4 结合, 并且分别在病毒粒子稀释到 1 000 倍和 100 倍时仍可以被检测到。而 NS2、NS3 的 OD 值都是 P<2N, 因此判定 NS2、NS3 与病毒粒

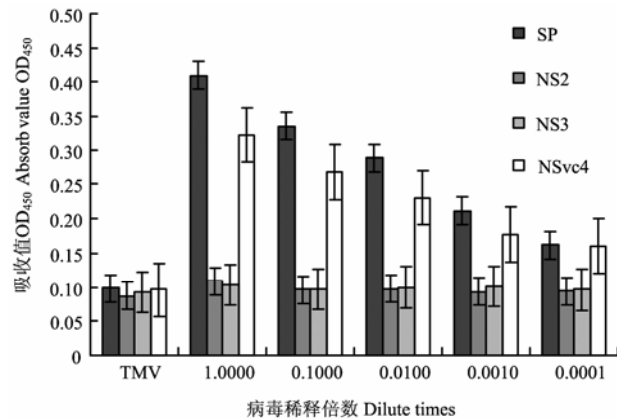


图 3 ELISA 检测病毒粒子与 SP、NS2、NS3、NSvc4 蛋白的体外结合

Fig. 3 Detection of the interaction in vitro between CP and SP, NS, NS3, NSvc4 by ELISA

子 CP 没有发生结合。

2.4 Western 验证 RSV 病毒粒子与纯化的蛋白体外结合

纯化的 4 个蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转膜, 以 RSV 单抗作为一抗, 碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 结果表明, 纯化的 4 个蛋白中只有 SP、NSvc4 与病毒粒子 CP 发生了体外结合, 从而被 CP 的单抗检测到, 纯化的 SP、NSvc4 带有 His-Tag 标签蛋白为 19 kD 左右, 因此出现的特异条带与理论大小 39.5、51.4 kD 相符 (SP、NSvc4 大小分别为 20.5、32.4 kD), 0.2%BSA 的对照没有明显条带出现。NS3 和 NS2 与对照相同也没有出现互作条带 (结果未显示)。

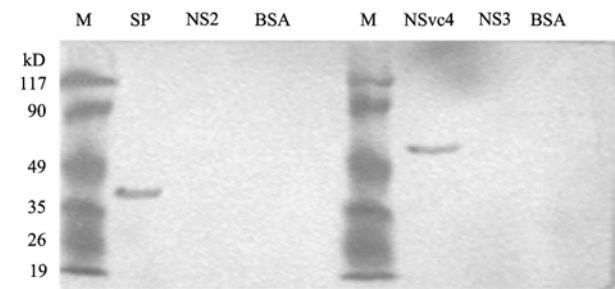


图 4 凝胶覆盖检测验证病毒粒子蛋白与 SP、NS2、NS3、NSvc4 蛋白的体外结合

Fig. 4 Detection of the interactions in vitro between CP and SP, NS, NS3, NSvc4 by gel overlay assay

3 讨论

利用已经得到的 5 个多克隆抗体在带毒灰飞虱体内均能检测到相应的 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 5 个蛋白, 而且大小与理论相符。曲志才等^[10]在带毒灰飞虱体内也检测到了 CP、SP、NS3、NSvc4 这 4 个蛋白, 但是大小与理论值有差异。出现这种差异很可能与灰飞虱的带毒率、灰飞虱蛋白的提取方法以及抗体的差异相关。另外根据 ELISA 和 Western blot 的结果可以推测出这 5 种蛋白在表达量上为 CP 含量最高, NSvc4、SP、NS3、NS2 含量依次降低。在带毒灰飞虱体内可以检测出 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 5 个蛋白支持了灰飞虱作为 RSV 的昆虫寄主并且可以在其体内增殖的结论, 同时这 5 个蛋白存在量上的差异也暗示了 RSV 编码的这 5 个蛋白的功能差异并且在昆虫介体体内可能存在相互调控关系^[24]。

Takahashi 等^[8]认为, 在 RSV 侵染的灰飞虱单层

细胞培养体系中, vRNA2 编码的 NS2 蛋白可诱导形成胞间连丝状的管状结构, 结合其瞬时表达等特征, 推测其与病毒的胞间运动 (cell to cell movement) 有关, 而 Liang 等^[9]在进行 NS2 与 RNA 结合实验后推翻了这个推测。因此到目前为止, NS2 的具体功能是未知的。本文结果表明 NS2 能在带毒灰飞虱体内检测到, 但含量较低, 体外结合实验中 CP 不能与 NS2 互作, 这为进一步证实 NS2 的功能提供初步的基础。vRNA3 编码的 NS3, Western blot 分析可以在病毒颗粒体、病叶和带毒虫体内检测到这个蛋白, 估计其与病毒的复制有关^[7]。这意味着 NS3 蛋白可能直接参与病毒颗粒体的形成, 但其确切功能还未知。Bucher 等^[25]发现与 RSV 同属的水稻白叶病毒 (RHBV) 编码的 NS3 是基因沉默抑制子, 因此推断 RSV 编码的 NS3 也可能是基因沉默抑制子。本研究结果发现病毒粒子不能与 NS3 结合, 因此也未能在病毒颗粒体中检测到 NS3 的存在, 这可能与病毒颗粒体的结构相关。刘利华等^[26]认为 CP 和 SP 两种蛋白都可以进入叶绿体, 且其含量与病叶症状严重度呈正相关, 但现在还不清楚 RSV 侵染后在水稻上表现的症状是由 CP 或 SP 单独作用所致, 还是由两者共同作用的结果。本文中病毒粒子与 SP 的互作实验为 CP 与 SP 可能共同作用于叶绿体进而影响症状的严重度提供了一个有力证据。另外 Melcher 等^[27]推测 vRNA4 编码的 NSvc4 蛋白与植物病毒 30 kD 移动蛋白大家族的结构有相似性, Western blot 分析也可以在病叶和带毒虫体内检测到这个蛋白^[10]。此外, 免疫胶体金标记显示, 在病叶叶肉组织细胞壁的胞间连丝中存在 CP, 这个结果暗示 NSvc4 作为运动蛋白极有可能是和 CP 协同起作用的^[26,28]。而病毒粒子与 NSvc4 的互作结果也为 NSvc4 可能作为运动蛋白诱导病毒在胞间运动提供了佐证。

4 结论

利用 ELISA、Western blotting 和凝胶覆盖检测方法表明在带毒灰飞虱体内可以检测出 CP、SP、NS2、NS3、NSvc4 等 5 个蛋白, 并且根据结果推测出这 5 种蛋白在表达量上为 CP 含量最高, NSvc4、SP、NS3、NS2 含量依次降低; 试验结果还表明病毒粒子 CP 与 SP、NSvc4 之间存在体外结合关系。

References

- [1] 任春梅, 程兆榜, 魏邦庆, 周益军, 范永坚. 江苏水稻条纹病毒致病型及其应用评价. *江苏农业科学*, 2007, (3): 58-60.

- Ren C M, Cheng Z B, Wei B Q, Zhou Y J, Fan Y J. Pathogenicity of rice stripe virus. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2007, (3): 58-60. (in Chinese)
- [2] Ramirez H C, Haenni A L. Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses in Jiangsu. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 467-475
- [3] Toriyama S. Rice stripe virus; prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects. *Microbiological Sciences*, 1986, 3: 347-351.
- [4] Johannes F J M, van den Heuvel, Saskia A, Hogenhout, Frank van der Wilk. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(2): 71-76.
- [5] Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, Minobe Y. Ambisense segment 3 of rice stripe virus: the first instance of a virus containing two ambisense segments. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 465-468.
- [6] Zhu Y, Hayajawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA4 of rice stripe virus isolate T and comparison with another isolate and with maize stripe virus. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 1309-1312.
- [7] 林奇田, 林含新, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 水稻条纹病毒外壳蛋白和病害特异性蛋白在寄主体内的积累. *福建农业大学学报*, 1998, 27(3): 322-326.
- Lin Q T, Lin H X, Wu H Z, Lin Q Y, Xie L H. Accumulations of protein and disease-specific protein of rice stripe virus in its host. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1998, 27(3): 322-326. (in Chinese)
- [8] Takahashi M, Goto C, Matsuda I, Toriyama S. Expression of rice stripe virus 22.8k protein in insect cells. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1999, 65(3): 337.
- [9] Liang D L, Ma X Q, Qu Z C, Roger H. Nucleic acid binding property of the gene products of rice stripe virus. *Virus Genes*, 2005, 31(2): 203-209.
- [10] 曲志才, 沈大棱, 徐亚南, 谈家桢, Roger H. 水稻条纹叶枯病毒基因产物在水稻和昆虫体内的 Western 印迹分析. *遗传学报*, 1999, 26(5): 512-517.
- Qu Z C, Shen D L, Xu Y N, Roger H. Western blotting of RStV gene products in rice and insects. *Acta Genetica Sinica*, 1999, 26(5): 512-517. (in Chinese)
- [11] 王贵珍, 周益军, 陈正贤, 周雪平. 水稻条纹病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *植物病理学报*, 2004, 34(4): 302-306.
- Wang G Z, Zhou Y J, Chen Z X, Zhou X P. Production of monoclonal antibodies to rice stripe virus and application in vln18 detection. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(4): 302-306. (in Chinese)

- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ed)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1993: 889-897.
- [13] Harvey W R, Cioffi M, Wolfersberger M G. Transport physiology of lepidopteran midgut in relation to the action of Bt delta-endotoxin. In: Samson R A, Vlak J M, Peters D. *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Wageningen: Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, 1986: 11-14.
- [14] Isogai M, Watanabe K, Uchidate Y, Yoshikawa N. Protein-protein and protein-RNA-binding properties of the movement protein and VP25 coat protein of Apple latent spherical virus. *Virology*, 2006, 352: 178-187.
- [15] Sasaya T, Torrance L, Cowan G, Ziegler A. Aphid transmission studies using helper component proteins of potato virus Y expressed from a vector derived from potato virus X. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 1115-1119.
- [16] 李向东, 李怀方, 范在丰, 裘维蕃. 玉米矮花叶病毒 HC-Pro 在蚜虫传毒过程中的作用机制. *植物病理报*, 2000, 30(3): 217-221.
Li X D, Li H F, Fan Z F, Qiu W F. Mechanism of HC-Pro in MDMV transmission by aphids. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30(3): 217-221. (in Chinese)
- [17] Chaouch-Hamada R, Redinbaugh M G, Gingery R E, Willie K, Hogenhout S A. Accumulation of maize chlorotic dwarf virus proteins in its plant host and leafhopper vector. *Virology*, 2004, 325: 379-388.
- [18] Kikkert M, Meurs C, van der Wetering F. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94 kDa thrips. *Phytopathology*, 1998, 88: 63-69.
- [19] Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung H Y, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M, Namaba S. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 4252-4257.
- [20] Salas-Benito J S, Del-Angel R M. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind Dengue type 4 virus. *Virology*, 1997, 71(10): 7246-7252.
- [21] Yu L, Makinen Dorokhov K, Yu O, Frolova A, Merits J, Saarinen N, Kalkkinen J G, Atabekov M, Saarma. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters*, 1999, 461: 223-228.
- [22] 郭爱珍, 陆承平. 犬瘟热病毒细胞膜受体的鉴定. *病毒学报*, 2000, 16(2): 155-157.
Guo A Z, Lu C P. Identification of canine distemper virus receptor in cell lines. *Chinese Journal of Virology*, 2000, 16(2): 155-157. (in Chinese)
- [23] Karger A, Mettenleiter T C. Identification of cell surface molecules that interact with pseudorabies virus. *Journal of Virology*, 1996, 70 (4): 2138-2145.
- [24] 谢联辉, 魏太云, 林含新, 吴祖建, 林奇英. 水稻条纹病毒的分子生物学. *福建农业大学学报*, 2001, 30(3): 269-279.
Xie L H, Wei T Y, Lin H X, Wu Z J, Lin Q Y. Advances in molecular biology of rice stripe virus. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2001, 30(3): 269-279. (in Chinese)
- [25] Bucher E, Sijen T, De Haa P, Goldbach P, Prins M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*, 2003, 77(2): 1329-1336.
- [26] 刘利华, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 水稻条纹叶枯病细胞病理变化的观察. *植物病理学报*, 2000, 30(4): 306-311.
Liu L H, Wu Z J, Lin Q Y, Xie L H. Cytopathological observation of rice stripe. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30(4): 306-311. (in Chinese)
- [27] Melcher U. The '30k' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology*, 2000, 81(1): 257-266.
- [28] Chomchan P, Li S F, Miranda G J, Shirako Y. Interactions among proteins coded on rice grassy stunt genome. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 2000, 66(2): 164.

(责任编辑 毕京翠)