

研究报告

Research Report

水稻南方黑条矮缩病毒湖南鼎城株系 S10 片段的基因组序列分析

崔亚² 朱俊子² 周倩^{1,2} 蒋坚² 高必达^{1,2*}

1 湖南农业大学植物疾病控制与利用湖南省高校重点实验室,长沙,410128; 2 湖南农业大学生物信息系,长沙,410128

* 通讯作者, bdgao@yahoo.com.cn

摘要 运用 RT-PCR 技术克隆了水稻南方黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)湖南鼎城株系的基因组 S10 片段(SRBSDV-HuNDC S10),并对其全序列进行了测定和生物信息学分析。结果显示,SRBSDV-HuNDC S10 片段全长为 1 797 bp (登录号: JQ337964),含有 1 个 ORF,编码 557 个氨基酸残基的衣壳蛋白,推测分子量约 62.6 kD,推测等电点为 7.62,与已报道的广东、海南和云南分离物病毒的 S10 作比较,它们的核苷酸相似性分别为 99.7%、99.0%和 98.4%,氨基酸相似性分别为 100.0%、99.5%和 99.3%。对 SRBSDV-HuNDC S10 及部分 *Fijiviruses* 病毒对应片段在 5' URT 与 3' URT 存在的保守序列和互补序列进行了归纳,对其 ORF 编码的氨基酸序列进行了 motif 查找,得到该属(*Fijiviruses*)氨基酸序列的 10 个保守区段。此外,进行了糖基化位点、磷酸化位点及 B 细胞抗原表位预测,发现了 3 个可能的 N 端豆蔻酰基化位点,可能与病毒的侵染机制有关。

关键词 南方水稻黑条矮缩病毒, S10 片段, 基因组序列分析

Sequence Analysis of Genome Segment S10 of Hunan Dingcheng Isolate of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus

Cui Ya² Zhu Junzi² Zhou Qian^{1,2} Jiang Jian² Gao Bida^{1,2*}

1 Hunan Provincial University Key Lab for Plant Disease Control and Utilization, Changsha, 410128; 2 Hunan Agricultural University, Changsha, 410128

* Corresponding author, bdgao@yahoo.com.cn

DOI: 10.3969/gab.031.000160

Abstract The full-length cDNA of the genome segment S10 of Dingcheng isolate of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus was cloned and the complete nucleotide sequence was determined, as well as its bioinformatics analysis. Results show that the S10 is 1 797 bp (JQ337964), has an open reading frame (ORF), encodes a capsid protein containing 557 amino acid residues. Its molecular weight is about 62.6 kD and its isoelectric point is 7.62. Compared with other known viruses such as Guangdong isolates, Hainan isolates and Yunnan isolates, the nucleotide identities of S10 segment are 99.7%, 99.0% and 98.4%, respectively, and their amino acid identities are 100.0%, 99.5% and 99.3% respectively. Conservative sequence and complementary sequence in the 5' URT and 3' URT of SRBSDV-HuNDC S10 and corresponding segments of the *Fijiviruses* viruses were analyzed, and 10 conservative segment of *Fijiviruses* viruses were founded by searching the motif of amino acid sequence encoded by ORF. Moreover, the glycosylation sites, phosphorylation sites and B cell epitope were predicted. Three possible N-myristoylation sites were found, which may be involved in virus infection.

Keywords Southern rice black-streaked dwarf virus, S10 fragment, Genome sequence analysis

南方水稻黑条矮缩病的大面积流行给我国南部和越南北部水稻生产造成极大的危害。自 2001 年在我国广东省阳西县晚稻上首次发现以来(周国辉等, 2010), 扩散十分迅速, 给我国南方各省中、晚稻生产造成严重损失。2009 年, 该病在广东、海南、江西和湖南等省的部分稻区爆发, 据不完全统计, 造成约

基金项目 本研究由公益性行业(农业)科研专项(201003031)和湖南省科技厅项目(2010NK3021)共同资助

6 500 hm² 水稻失收, 受害面积至少达 3×10⁵ hm² (周国辉等, 2010)。

南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV)是呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(*Fijivirus*)成员之一, 为该属的一个建议新种(Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2008)。与 RBSDV (rice black-streaked dwarf virus)、MRDV (maize rough dwarf virus)、MRCV (Mal de Rio Cuarto virus)、OSDV (oat sterile dwarf virus)、FDV (Fiji disease virus)、NLRV (*Nilaparvata lugens reovirus*)同属(Milne et al., 2005) 具有较近的亲缘关系。SRBSDV 基因组由 10 条 dsRNA 片段组成, 按在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率由大到小分别命名为 S1 到 S10 (Zhou et al., 2008)。最外层外壳蛋白由 S10 编码(Wang et al., 2010) 其序列具有保守性, 是分类和鉴定病毒属种的重要依据。

迄今为止, NCBI 数据库中有 5 条 S10 全序列, 广东(EU784840) (Wang et al., 2010)、海南(EU523360 和 NC_014713) (Wang et al., 2010)、云南(HQ394212) 和山东(GQ472845) (Yin et al., 2011), 广东和海南更是完成了全基因组测序(Wang et al., 2010)。然而, 对 S10 序列的基因结构并没有详细的报道。S10 编码的最外层衣壳蛋白是否与病毒致病性、病毒的寄主选择或致使寄主产生某些病症有关, 尚不清楚。

本研究是在完成 SRBSDV S10 湖南分离物的测定的基础上, 利用生物信息学方法对其进行序列结构特征和同源性分析。

1 结果与分析

1.1 SRBSDV 检测

利用本实验室已获专利的 SRBSDV 检测引物(周倩等, 2010), 对湖南省常德植保站送检水稻进行了检测, 出现约 500 bp 条带, 为阳性。

1.2 全序列分析

测定的 SRBSDV 中国湖南常德鼎城分离物 S10 片段全长为 1 797 bp (GenBank 登录号为 JQ337964), GC 含量为 35.56%, 其唯一的 ORF 编码的蛋白推测分子量为 62.6 kD (表 1)。与已报道的广东、海南和云南分离物病毒的 S10 全序列相比, 它们的核苷酸相似性分别为 99.7%、99.0%和 98.4%, 氨基酸相似性分别为 100.0%、99.5%和 99.3% (表 2)。与海南分离物相比, 在 20 处碱基突变中 C/T 间 12 次, A/G 间的转变 5 次, A/T 间 1 次, G/T 间 1 次, 1 788 位空 1 次, 编码区突变 12 次, 3' URT 突变 8 次, 5' URT 突变 0 次。

同类碱基之间的转换(即 C/T, A/G)共 17 次, 占总突变的 85%。

S10 两端存在保守序列(方框内)和紧接保守序列的不完全反向互补序列(下划线) 5'-AAGTTTTTTTTC CTCATCCATA ... GGGGAAAGCAGCTGATGTC-3' (Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010)。其它亲缘关系相近的病毒相应片段也有类似结构, 但 OSDV 和 NLRV 除外(表 1)。SRBSDV 病毒 S1~S9 也存在相似结构(Wang et al., 2010)。这些结构可能在病毒的复制和翻译相关蛋白的调节过程中发挥功能。

1.3 S10 编码蛋白的 motif 分析

S10 仅编码一个长为 557 个氨基酸残基的 ORF, 推测分子量约 62.6 kD, 推测等电点为 7.62, 编码病毒的最外层衣壳蛋白。对该属相关病毒的 10 条外层衣壳蛋白氨基酸序列进行 MEME 软件在线分析, 找到 10 个保守区域。10 个保守区域在 10 条序列上均存在, 而且覆盖序列的很大部分(图 1), 进一步证明该病毒属衣壳蛋白序列高度保守。就保守区域的位置而言, OSDV、FDV、NLRV 与其它有所不同, 而其它 7 条则基本一致。将 10 个 motif 的匹配模式整理为表 3。

1.4 系统发育树分析

两个发育树都显示湖南病毒分离物与广东、海南、云南 SRBSDV 病毒分离物在同一分支上, 进一步证明了湖南鼎城病毒分离物为 SRBSDV 的一个地理小种(图 2)。

1.5 糖基化位点、磷酸化位点及 B 细胞抗原表位预测

湖南鼎城 SRBSDV 分离物 S10 编码的蛋白含有 8 个糖基化位点: 87-NITQ、114-NLSD、152-NVTL、253-NISL、364-NTSG、370-NITK、454-NLTI 和 536-NSST, 其中, 第 364 位和第 536 位可能性相对较小。磷酸化位点: 丝氨酸(Ser)有 22 个位点(37, 51, 97, 116, 128, 133, 159, 227, 275, 282, 328, 331, 354, 366, 389, 406, 409, 537, 538, 540, 542, 544), 苏氨酸(Thr)含有 8 个位点(79, 132, 154, 228, 297, 302, 358, 440), 酪氨酸(Tyr)有 6 个位点(171, 220, 312, 333, 410, 434)。其中, 537~544 aa 为丝氨酸位点富集区。B 细胞抗原表位分析结果: 含有 7 个主要抗原表位(219~240, 300~314, 322~336, 352~372, 386~394, 500~508 和 533~547)。经 PROSITE 在线分析发现, 在 323~328、326~331 和 438~443 存在 3 个可能的 N 端豆蔻酰基化位点(图 3)。

表 1 SRBSDV-S10 的湖南, 广东, 海南, 云南株系和部分 *Fijivirus* 病毒对应片段比较

Table 1 Comparison of SRBSDV-S10 and SRBSDV of HuNDC, GD, HaN, YN isolates and other related *Fijiviruses*

病毒及基因片段 Virus (isolate) and its genome segment	GenBank Accession No. in GenBank	全长(bp) Complete length (bp)	GC 含量(%) (G+C) (%)	氨基酸长(aa) Length of coded product (aa)	5' 端保守序列和互补序列 5' URT	3' 端保守序列和互补序列 3' URT
SRBSDV-r-HuNDC	JQ337964	1 797	35.56	557	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCATCCATA	<u>GGGGAAA</u> GCAGCTGATGTC
SRBSDV-r-GD	EU784840.1	1 797	35.61	557	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCATCCATA	<u>GGGGAAA</u> GCAGCTGATGTC
SRBSDV-r-HaN	EU523360.1	1 798	35.60	557	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCATCCATA	<u>GGGGAAA</u> TTTCAGCTATTGTC
SRBSDV-m-YN	HQ394212.1	1 798	35.26	557	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCATCCATA	<u>GGGGAAA</u> TTTCAGCTATTGTC
RBSDV S10	NC_003733.1	1 801	36.59	558	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCACCATA	<u>GGGGAAA</u> TTTCAGCTATTGTC
MRDV S10	L76560.1	1 802	36.63	558	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCACCATA	<u>GGGGAAA</u> TTTCAGCTATTGTC
MRCV S10	AY607586.1	1 798	34.71	557	<u>AAAGTTT</u> TTTCCCTCACCATA	<u>GGGGAAA</u> GCAGCTATTGTC
OSDV S8	AB011025.1	1 874	33.88	588	AACGAAAAAAAAGGACAACA	CCTTTTTTTTAGTC
FDV S10	NC_007162.1	1 819	34.14	555	<u>AAAGTTT</u> AACCCTATATCACC	<u>GGGTTAACA</u> GCAGATGTC
NLRV S8	NC_003653.1	1 802	35.29	562	<u>AGTTTG</u>	<u>CAACATGGT</u> ACTAGTTGTC

表 2 湖南, 广东, 海南, 云南 SRBSDV S10 和部分 *Fijivirus* 病毒对应片段核苷酸和氨基酸序列的相似性比较

Table 2 Nucleotide and putative amino acid identity among SRBSDV S10 of HuNDC, GD, HaN and YN isolates and corresponding segments of the related *Fijiviruses*

对比毒株 Compared strains	SRBSDV-r-HuNDC	SRBSDV-r-GD	SRBSDV-r-HaN	SRBSDV-m-YN	RBSDV S10	MRDV S10	MRCV S10	OSDV S8	FDV S10	NLRV S8
SRBSDV-r-HuNDC	100.0									
SRBSDV-r-GD	99.7	100.0								
SRBSDV-r-HaN	99.0	98.8	100.0							
SRBSDV-m-YN	98.4	98.3	98.1	100.0						
RBSDV S10	78.4	78.3	78.7	78.5	100.0					
MRDV S10	78.8	78.8	79.1	79.1	78.7	100.0				
MRCV S10	72.4	72.3	72.3	71.9	71.8	71.1	100.0			
OSDV S8	49.2	49.1	49.1	49.2	48.3	48.3	47.5	100.0		
FDV S10	56.4	56.3	56.1	56.2	56.9	56.9	56.9	56.9	100.0	
NLRV S8	38.9	38.8	38.7	38.9	39.1	39.8	39.8	39.8	42.6	100.0

注: 左下角显示核酸相似性; 右上角显示氨基酸相似性

Note: Down-left shows nucleotide identity; Upper-right shows putative amino acid identity

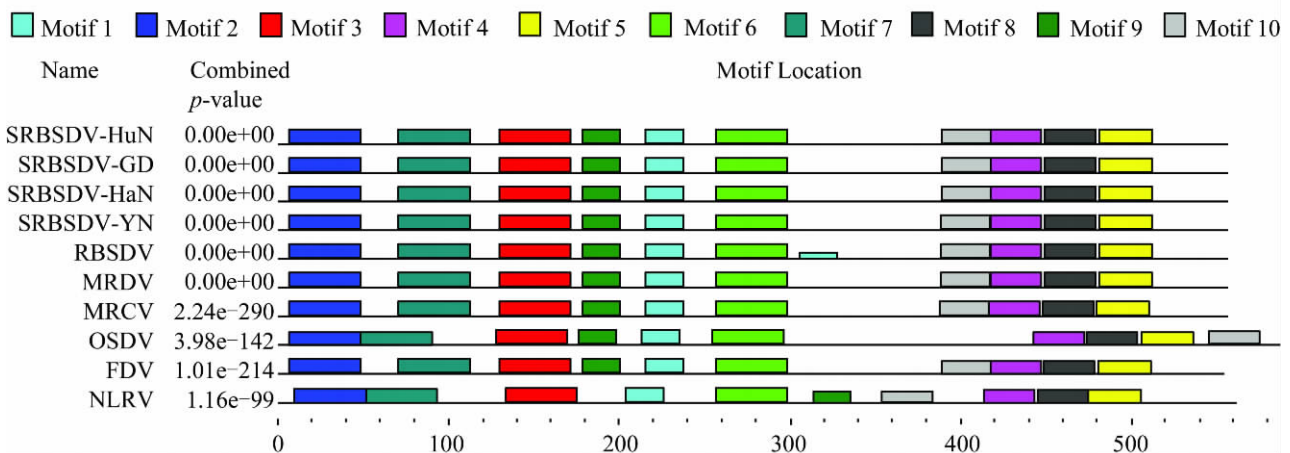


图 1 全部保守区域
Figure 1 Combined block diagrams

表 3 10 个保守区域的匹配模式
Table 3 Regular expression of the ten motifs

保守区名称	匹配模式
Motif name	Regular expression
Motif1	DGGYD[FY]NCP[AS]STTDVTHYGGY
Motif2	[IV]APDLIH[NC]GVPQRLSDTIILN[ND][RK]P[TK]ITLLSHF[NE][SN]LFHE[SL]NI
Motif3	AT[SA]KLD[AV]EQIERVQIETLTEGN[VIL]TLKP[FI]SADGLEVILDDSY
Motif4	[AKS]IWKRKG[ADS]L[AV][AV][PK][CY][FI]DYIKLGV[ES]KA[YF]HL[AS]P
Motif5	LI[AS]KLIITS[VI]LPNIIQAVYKTDPS[NS][NV][VI][MS]NS
Motif6	I[IV]PVS[AK]LKT[IV]H[VIL][FL]EKEL[SE][AV]LDADKSL[LI][ED]QTWS[GAV][SAT]SF[IV]E[TS][WT]
Motif7	RL[HP]DRLQ[TD]V[EN]T[SV]T[LI]PN[IK]TQ[LI]K[ED]H[IL][QR][SN][FY][FL][RQS]NE[HQ][QL]PI[FY]QTLTN
Motif8	MKKYN[LI]T[IL]DD[IV]I[HNS]FI[ED][IKE]GPSYLA[KG]LDK[IW][DP]
Motif9	GL[ED]VHKL[LI]DKCC[RK]EVPA[QH][ML]GI
Motif10	N[GAV]H[ED]KS[VI][TV]V[IQ][TK]NKGE[ML][STR]L[ED][SY]YR[KA]I[GAV][ED][IV]L[SN]

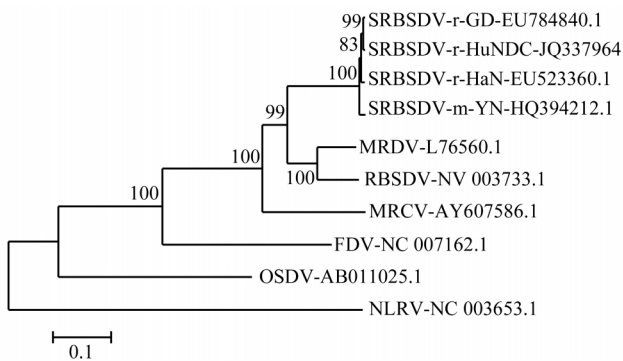


图 2 SRBSDV S10 全序列系统发育树
Figure 2 Phylogenetic tree of complete segment of SRBSDV S10

2 讨论

SRBSDV 是近年来发现的一种新病毒，目前的研究十分有限。因此，对各地该病毒衣壳蛋白编码基因的测定及其生物信息学分析很有必要，可为今后进一步阐释 SRBSDV 侵染细胞机制提供理论依据，

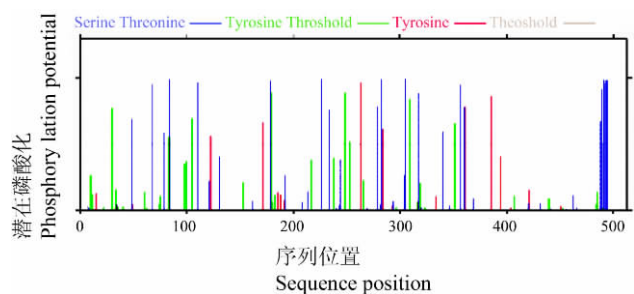


图 3 SRBSDV-HuNDC S10 氨基酸序列磷酸化位点预测
Figure 3 Predicted phosphorylation sites in amino acid sequence of SRBSDV-HuNDC S10

为防治南方水稻黑条矮缩病提供有益借鉴。

本研究成功测定了湖南鼎城病毒分离物 SRBSDV S10 片段的完整序列，并对其进行了生物信息学分析。结果发现 SRBSDV-HuNDC S10 两端存在保守序列和紧接保守序列的完全或不完整的反向互补序列，与前人报道的一致(Zhang et al., 2008; Wang et

al., 2010)。更加特殊的是,这种结构不仅在该属其它病毒(除 OSDV)衣壳蛋白序列上存在(表 1)(McMahon et al., 1999),而且在 SRBSDV 的 S1~S9 片段上也均存在(Wang et al., 2010)。Kudo 等(1991)曾推测,与 SRBSDV 同科的植物呼肠孤病毒属(*Phytoreovirus*)正链的 3' 端在负链 RNA 合成的起始过程中起了重要作用。考虑到该结构分布的特殊性和广泛性,笔者推测 SRBSDV 的末端序列也可能与负链 RNA 合成起始,进而与病毒的复制机制有关。有意思的是,在分析过程中发现唯独 OSDV 的保守区域与 SRBSDV 的保守区域“**AAGTTTT**”、“**GCAGCTGATGTC**”有很大不同,然而更有趣的是,若将 SRBSDV S10 两端互补区周围序列互换一段,将变为接近 OSDV S8 的两端序列(图 4)。

这说明,两者保守区虽然不同,但还是具有一定的联系。由上分析可知,末端保守结构很可能与病毒复制有关,OSDV 是否为该属某种病毒复制过程出现差错而导致的产物,值得深究。

对 SRBSDV S10 的 aa 序列进行了糖基化位点、磷酸化位点及 B 细胞抗原表位的预测,对研究该蛋白的表达后蛋白修饰有重要的参考价值。据报道,正呼肠孤病毒(*Orthoreovirus*)外层衣壳 $\mu 1$ 蛋白裂解释放出的 N 端豆蔻酰基化位点是该病毒穿过细胞膜屏障的必需部分(Liemann et al., 2002)。而 SRBSDV 衣壳蛋白发现的 3 个可能的 N 端豆蔻酰基化位点的生物学意义还不清楚,也可能与 SRBSDV 穿过细胞膜有关。本研究还对其编码的 aa 序列与部分 *Fijiviruses* 病毒对应片段 aa 序列进行了 motif 查找,分析了查找到的 10 个保守区域在各病毒 aa 序列上的位置差异,为进一步研究蛋白质结构提供理论依据。

S10 编码病毒的最外层衣壳蛋白,对其进行测定和生物信息学分析,丰富其分子水平资料,有助于对

```

SRBSDV 5'URT      AAGTTTTTTCCTCATCCATA...
          3'URT      CTGTAGTCGACGAAAGGGG...

交换
Exchange      AAG TTTTTTTCCTCATCCATA...
               ↙                ↑
               CTGT AGTCGACGAAAGGGG...

结果
Result        AAGAAAGGTCATCCATA...
               CTGTTTTTTTTCCAGTCGACGGG...

OSDV 5'URT      AACGAAAAAAAGGACACA...
          3'URT      CTGATTTTTTTTCC...
    
```

图 4 SRBSDV-HuNDC S10 两端序列变换后与 OSDV S8 两端序列的比较

Figure 4 Comparison of the transformed SRBSDV-HuNDC S10 ends sequence and OSDV S8 ends sequence

该病毒复制机制、侵染方式和致病性的深入研究,为防治 SRBSDV 提供理论依据。

3 材料与方法

3.1 植物材料

疑似感染 SRBSDV 水稻于 2010 年 6 月采自湖南省常德市鼎城区,保存于 -20°C 冰箱中。

3.2 总 RNA 提取

所用的玻璃、瓷器均采用干热(180°C)灭菌 4 h 以上,配试剂等均用 0.1% DEPC 处理水。取 50~100 mg 病茎叶组织加入液氮充分研磨,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中。加入 1 mL 的 Trizol 试剂;加入 500 μL 氯仿-异戊醇(24:1)剧烈震荡摇匀 15 s;冰浴 10 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)轻微混匀,取上清,加入 500 μL 的异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加 80% 的乙醇洗涤沉淀,7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加无水乙醇洗涤沉淀,7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,室温下沉淀并充分干燥后,溶于 20 μL DEPC 水中, -20°C 保存备用。

3.3 SRBSDV 的 RT-PCR 检测

用提取到的植株总 RNA 用特异性引物做 RT-PCR(周倩等, 2010)。

RT 反应体系: $5\times$ first stand Buffer 4 μL , dNTPs (10 mmol/L) 2 μL , F 端引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , R 端引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , M-MLV 反转录酶(200 U/ μL) 1 μL , 总 RNA 3 μL , DEPC 处理水补足总体积 20 μL 。RT 反应程序: 65°C 5 min, 冰上孵育 5 min, 30°C 10 min; 42°C 温浴 20 min, 99°C 酶灭活 5 min, 立即至于冰上, 4°C 保存备用。

PCR 反应体系: $10\times$ PCR Buffer 2.5 μL , F 端引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , R 端引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.5 μL , 模板 cDNA 2 μL , 超纯水补足总体积 25 μL 。PCR 扩增程序为: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s, 35 个循环后 72°C 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

3.4 双链 RNA 提取

参考 Zhang 等(2008)改良的硝酸纤维素 CF-11 亲和层析法从水稻病株叶组织中抽提病毒 dsRNA (Dodds et al., 1984),经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后于

-20℃保存备用。

3.5 SRBSDV S10 全序列测序

为确保 SRBSDV S10 两端序列的准确性,用 T4 RNA ligase (宝生物)在双链 RNA 的 3' 端加上接头引物 zhm-1 (表 4) (Zhang et al., 2008)。

RT 反应体系 5×first stand Buffer 4 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2 μL, zhm-2 (表 4) (Zhang et al., 2008) (10 μmol/L) 2 μL, M-MLV 反转录酶(200 U/μL) 1 μL, 双链 RNA 3 μL, 超纯水补足总体积 20 μL。RT 反应程序:42℃温浴 1 h。

PCR 反应体系 2.5 μL 10×PCR Buffer, 引物 0.3 μmol/L (表 4) dNTPs (2.5 mmol/L) 0.2 mmol/L, MgSO₄ 1.5 mmol/L, 模板 cDNA 0.5 μL, KOD DNA 聚合酶 0.5 μL, 超纯水补足总体积 25 μL。PCR 扩增程序为 98℃ 2 min, 94℃ 10 s, 55℃ 30 s, 68℃ 1 min, 35 个循环后 68℃延伸 10 min。

表 4 扩增 SRBSDV-HuNDC S10 的引物

Table 4 Primers used for amplifying SRBSDV-HuNDC S10 引物

名称	位置	序列 (5'-3')
Name	Position	Sequences (5'-3')
S10-F	1 285~1 396	AAACGTGGTAAGGCATTAGCTG
S10-R	868~846	GTGATTTGTCAGCATCTAAAGCG
S10(1)-F	697~714	CGCTATGGCGGTTACGAC
S10(1)-R	1 494~1 376	CGCTGAATGATGTTTGCC
zhm-1	-	PO4-CTCTCCCTCCCTCCTC-NH2
zhm-2	-	GAGGAGGGAGGGGAAGAG

对 PCR 产物回收、连接、转化到 pGM-T 载体上,再经过蓝白斑筛选,挑取白色菌落,测定了两端序列。同法,再用 S10(1)-F、S10(1)-R 对其中间片段进行测序,得到 SRBSDV-HuNDC S10全序列。

3.6 S10 同源性分析

应用 DNASTAR Lasergene 软件中的 Megalign 程序的 Clustal W Method 将湖南株 S10 与 GenBank 数据库上发布的 9 个相关毒株相应的核酸、氨基酸序列进行相似性比对。

同源性比对的相关毒株为:SRBSDV-r-GD 株 (EU784840);SRBSDV-r-HaN 株 (EU523360);SRBSDV-m-YN 株 (HQ394212);RBSDV S10 株 (NC_0037-33);MRDV S10 株 (L76560);MRCV S10 株 (AY6075-86);OSDV S8 株 (AB011025);FDV S10 (NC_007162);NLRV S8 株 (NC_003653)。海南两个毒株 S10 全序列一致,仅选一个进行分析,山东玉米上 SRBSDV 分离

物的 S10 全序列 (GQ472845)NCBI 数据库已收录,但未公布,未作分析。

3.7 S10 编码蛋白的 motif 分析

应用 MEME 软件 (Bailey and Elkan, 1994) (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>)在线分析湖南株 S10 编码的氨基酸序列。参数设置为 Distribution of motif occurrences:One per sequence;Number of different motifs:10;Minimum motif width:6;Maximum motif width:50。

3.8 序列比对和系统发育树的建立

应用 Clustal X (version 1.83)的 Alignment 程序分别对 10 条序列进行多重对位排列 (multiple alignments),使用 MEGA4.1 软件进行系统发育分析和遗传进化树的构建。遗传距离计算采用 Kimura2-parameter 模式,并将对位排列中的缺失数据 (missing data)或空位 (gaps)完全删除 (complete deletion),用邻位相连法 (NJ, neighbor-joining)分析进化距离,并进行自展 (bootstrap)检验,重复 1 000 次。

3.9 糖基化位点、磷酸化位点及 B 细胞抗原表位预测

应用软件 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)在线预测糖基化位点;应用软件 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线预测磷酸化位点;应用软件 BepiPred 1.0b (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>)在线预测 B 细胞抗原表位;使用 PROSITE 数据库 (<http://www.expasy.org/prosite>)在线搜索可能的 N 端豆蔻酰基化位点。

作者贡献

该研究的实验和文章的写作部分由崔亚和朱俊子共同完成,高必达老师负责文章研究的组织、构思和技术指导,周倩老师负责论文修改工作,并对本实验工作的顺利进行给予了大力支持和协调。

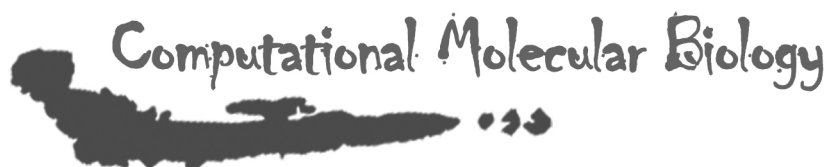
致谢

诚挚感谢湖南省常德市鼎城区植保站送检的疑似感染 SRBSDV 的水稻材料。

参考文献

Bailey T.L., and Elkan C., 1994, Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers, Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol., 2: 28-36

- Dodds J.A., Morris T.J., and Jordan R.L., 1984, Plant viral double-stranded RNA, *Annual Review of Phytopathology*, 22: 151-168
- Kudo H., Uyeda I., and Shikata E., 1991, Viruses in the *Phytoreovirus* genus of the *Reoviridae* family have the same conserved terminal sequences, *Journal of General Virology*, 72: 2857-2866
- Liemann S., Chandran K., Baker T.S., Nibert M.L., and Harrison S.C., 2002, Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3, *Cell*, 108(2): 283-295
- McMahon J.A., and Dale J.L., and Harding R.M., 1999, Taxonomic implications for Fijiviruses based on the terminal sequences of Fiji disease fijivirus, *Arch. Virol.*, 144(11): 2259-2263
- Milne R.G., del Vas M., Harding R.M., Marzachi R., and Mertens P.P.C., 2005, Genus fijivirus, In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., and Ball L.A. (eds.), *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, San Diego, pp.534-542
- Wang Q., Yang J., Zhou G.H., Zhang H.M., Chen J.P., and Adams M.J., 2010, The complete genome sequence of two isolates of southern rice black-streaked dwarf virus, a new member of the genus Fijivirus, *Journal of Phytopathology*, 158(11-12): 733-737
- Yin X., Xu F.F., Zheng F.Q., Li X.D., Liu B.S., and Zhang C.Q., 2011, Molecular characterization of segments S7 to S10 of a southern rice black-streaked dwarf virus isolate from maize in northern China, *Virologica Sinica*, 26(1): 47-53
- Zhang H.M., Yang J., Chen J.P., and Adams M.J., 2008, A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel Fijivirus, *Archives of Virology*, 153(10): 1893-1898
- Zhou G.H., Wen J.J., Cai D.J., Li P., Xu D.L., and Zhang S.G., 2008, Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed *Fijivirus* species in the family *Reoviridae*, *Chinese Science Bulletin*, 53(23): 3677-3685
- Zhou G.H., Zhang S.G., Zou S.F., Xu Z.W., and Zhou Z.Q., 2010, Occurrence and damage analysis of a new rice dwarf disease caused by southern rice black-streaked dwarf virus, *Zhiwu Baohu (Plant Protection)*, 36(2): 144-146 (周国辉, 张曙光, 邹寿发, 许兆伟, 周志强, 2010, 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, *植物保护*, 36(2): 144-146)
- Zhou Q., Zhu J.Z., Liang J.G., Chen X.Y. and Gao B.D., 2010, Rapid detection of southern rice black-streaked dwarf virus, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(5): 1009-1012 (周倩, 朱俊子, 梁晋刚, 陈欣怡, 高必达, 2010, 南方水稻黑条矮缩病毒快速检测, *基因组学与应用生物学*, 29(5): 1009-1012)



<http://cmb.sophiapublisher.com>



Reasons to publish in BioPublisher
A BioScience Publishing Platform

- ★ Peer review quickly and professionally
- ☆ Publish online immediately upon acceptance
- ★ Deposit permanently and track easily
- ☆ Access free and open around the world
- ★ Disseminate multilingual available

Submit your manuscript at: <http://bio.sophiapublisher.com>