

马尾松毛虫 CPV 基因组 S7 的序列分析及部分序列的原核表达

洪靖君^{1,2}, 张海元¹, 赵淑玲¹, 段家龙², 彭辉银^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 分子病毒学重点实验室, 湖北武汉, 430071; 2. 安徽农业大学蚕业丝绸系, 安徽合肥, 230036)

Nucleotide Sequence Analysis and Prokaryotic Expression of S7 cDNA from
Dendrolimus punctatus CPV Hunan StrainHONG Jing-jun^{1,2}, ZHANG Hai-yuan¹, ZHAO Shu-ling¹, DUAN Jia-long², PENG Hui-yin^{1**}

(1. The Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Department of Sericulture and Silk-fashion, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The nucleotide sequence of genome S7 cDNA (AY180908) from *Dendrolimus punctatus* cypovirus 1 Hunan strain (DpCPV-HN) was determined. S7 cDNA consists of 1501 nucleotides and encodes a protein of 448 amino acids with a molecular mass of 49.8 kDa. The 5'- and 3'- terminus conserved sequences are 5'-AGTAA-3' and 5'-GTTAGCC-3', respectively. When compared with S7 and its putative protein of *Lymantria dispar* cypovirus 1 and *Bombyx mori* cypovirus 1, 97.2% and 87.0% identities in the nucleotide level, and 98.7% and 92.8% identities in the amino acid level were found, respectively. BLAST search program revealed some similarity between DpCPV-HN P50 and DnaK-like protein of *Mycoplasma hominis*. The cDNA fragment encoding DpCPV-HN P50 C259 was also cloned and inserted into pET-28a expressive vector after being digested with *Bam*H I and *Hind* III to construct pET-28a/S7(591-1 371) recombinant expression vector. Expression of the fusion protein was induced by IPTG in *E. coli* BL21. The results indicated that the fusion protein with a molecular mass of 37.3 kDa containing P50C259 was expressed abundantly, and the fusion protein had an optional level when induced by 1.0mmol/L IPTG over about 2 hours.

Key words: *Dendrolimus punctatus* cypovirus 1 Hunan strain (DpCPV-HN); dsRNA virus; Nucleotide sequence analysis; Prokaryotic expression.

摘要: 马尾松毛虫质多角体病毒(湖南株)基因组 S7 节段 (AY180908) cDNA 克隆及序列分析结果表明:S7 由 1501 个碱基组成, 编码由 448 个氨基酸组成的分子量为 49.8 kDa 的多肽 P50。5' 末端和 3' 末端具有 5'-AGTAA-3' 和 5'-GTTAGCC-3' 末端保守序列。该基因组与舞毒蛾质多角体病毒 1 型和家蚕质多角体病毒 1 型 S7 节段有很高的同源性, 核苷酸序列同源性分别为 97.2% 和 87.0%, 氨基酸序列同源性分别为 98.7% 和 92.8%。P50 多肽与人型支原体的 DnaK 样蛋白在 C-末端有相似性。本文报道了编码 P50 C259 的 cDNA 序列的克隆并作了原核表达, 当用 1.0 mmol/L IPTG 诱导 2h, 分子量约为 37.3 kDa 的融合蛋白在大肠杆菌 BL21 中得到大量表达。

关键词: 马尾松毛虫质多角体病毒 (DpCPV); 双链 RNA 病毒; 序列分析; 原核表达

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0581-06

质多角体病毒 (Cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) 属呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 质多角体病毒

属 (*Cypovirus*)^[1-3]。病毒粒子含有由 10 或 11 节段 dsRNA 构成的基因组^[4-6] 和 5 种病毒结构蛋白

收稿日期: 2003-05-12, 修回日期: 2003-07-22

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270057) 和中科院知识创新工程重要方向项目。

作者简介: 洪靖君 (1977-), 男, 安徽歙县籍, 硕士研究生, 研究方向为病毒生物学及分子生物学, E-mail: jing junhong@163.cn.

** 通讯作者: 彭辉银 (1950-) 男, 研究员, 研究方向为病毒生物学, Corresponding author, E-mail: Penghy@Pentium.whiov.ac.cn.

(Viral structural protein) (V1-V5)^[4]。采用冰冻电镜和计算机三维重构技术研究 CPV 病毒颗粒表明, CPV 为单层衣壳结构, 衣壳外表面有 2 种不同大小的突起, V3 和 V5 为这些突起的蛋白组成成分^[7], 这些突起结构可能是病毒感染细胞时的吸附部位。CPV 的病毒形态与正呼肠孤病毒的形态极为相似^[8]。根据病毒基因组 dsRNA 片段在聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶中电泳图谱的差异, 将昆虫 CPV 分为 15 个电泳型 (Electrophoretotype)^[9~11]。病毒基因组 dsRNA 片段杂交分析与病毒结构蛋白血清学比较, 都证实这一分类系统是可行的。

马尾松毛虫质多角体病毒 (Dendrolimus punctatus cypovirus, DpCPV) 是我国 1973 年首次分离得到的一种质多角体病毒^[12], 其基因组由 10 个 dsRNA 节段组成^[13]。马尾松毛虫质多角体病毒江西株 (DpCPV-JX) 多角体蛋白基因 (AF318306) 和 NS5-蛋白基因 (AY173076) 的核苷酸序列以及 S8 (AF513912) 全基因序列先后被测定^[14~16]。Hagiwara 和 Matsumoto 等研究发现, 家蚕质多角体病毒 (BmCPV-1) S7 (NC-004133) 由 1501 bp 组成, 编码含有 448 aa 的多肽^[17]。本文对马尾松毛虫质多角体病毒湖南株 (DpCPV-HN) S7 全基因序列 (AY180906) 进行了 cDNA 克隆和序列测定, 并在大肠杆菌 BL21 中表达了编码 P50 C259 的 cDNA 序列, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒株

虫体克隆纯化后的马尾松毛虫 1 型质多角体病毒湖南株 (DpCPV-HN) 由本实验室保存^[18]。pGEM-T Easy 克隆载体为美国 Promega 公司产品, 质粒 pET-28a 由张忠信副研究员馈赠, 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 由本实验室保存。在马尾松毛虫体内增殖经虫体克隆纯化后的 DpCPV-HN 增殖参照洪靖君等方法^[18], 多角体纯化参照刘润忠等方法^[21]。

1.2 试剂

RNA 胶回收试剂盒 (RNaid kit) 购自 Q•BIO 基因公司; DNA 胶回收试剂盒 (Gel extraction mini kit) 购自上海华舜生物工程公司; RNA 酶抑制剂 (RNase inhibitor) 为加拿大 Biostar 公司产品; M-MLV 逆转录酶 (Reverse Transcriptase) 为美国 Promega 公司产品。

1.3 引物设计

根据 CPV 同一电泳型之间具有较高同源性的原理^[19, 20], 以 BmCPV-1 S7 正链的 3' 末端序列

(1477-1501 bp) 为依据, 设计 S7-PB 引物 (5'-GGCTAACGTTTGGTCACTCCGAAGT-3'), 通用引物 PA (5'-GGCGAAGCTTGTGCGACGAA TTC(T)₁₇-3')。利用这两个引物获得 DpCPV-HN S7 的全基因序列。用于 DpCPV S7 部分 cDNA 序列克隆及原核表达的引物为: P1: 5'-GAGGATC CTCTCGCGACGTCGTTAACTG-3', GGATCC 为 BamHI 酶切位点。P2: 5'-AAGCTTGTTCATAGGAT GTCATCTGAG-3', AAGCTT 为 Hind III 酶切位点。

1.4 基因组 dsRNA 的提取及电泳

采用 SDS-热酚法 (pH8.0) 从病毒粒子中纯化基因组 dsRNA, 乙醇沉淀核酸, 溶解于 DEPC 处理的双蒸水中, 然后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.5 S7 片段的分离纯化与 RT-PCR

用 RNA 试剂盒进行回收并纯化 S7 dsRNA。取约 200 ng S7 dsRNA 在 100°C 沸水中变性 5 min, 迅速在冰上冷却, 依次加入 40U 的 RNA 酶抑制剂, 4 μ L M-MLV RT 5 \times buffer, 20 pmol 引物 S7-PB, 2 μ L dNTPs (各 2.5 mM) 和 100U 的 M-MLV 逆转录酶, 用 DEPC 处理的双蒸水将 RT 反应总体系补齐到 20 μ L, 在 37°C 水浴 60 min, 在 95°C 处理 10 min 使逆转录酶失活。RNA-cDNA 用 2U 大肠杆菌 RNA 酶 H 在 37°C 水浴中消化 20 min。在底物 dATP 存在下, 用 TdT 将约 20 个脱氧腺苷酰残基 d(A) 加到被除去 RNA 的 cDNA 链 3' 末端, 反应产物用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提, 无水乙醇沉淀后溶于 20 μ L 灭菌的双蒸水中。取上述加尾的 cDNA 溶液 10 μ L, 然后依次加入 5 μ L 10 \times Pyrobest buffer, 各 40 pmol 引物 S7-PB 和 PA, 8 μ L dNTPs (各 2.5 mM) 和 2.5U Pyrobest DNA 聚合酶使总反应体系为 50 μ L。置 94°C 变性 40 s, 55°C 退火 40 s, 72°C 延伸 90 s, 35 个循环后, 于 72°C 放置 10 min。

1.6 S7 cDNA 的克隆

琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物, 用 DNA 试剂盒回收目的 DNA。按照 pGEM-T Easy 克隆载体的操作手册将目的 DNA 片段与载体连接。将所得到的产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后, 制备含 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板, 于 37°C 恒温培养 16~18 h。

1.7 重组质粒的筛选与鉴定

挑取白斑于 5 mL LB 选择培养基的试管中, 在 37°C 恒温振荡培养 16h, 碱裂解法快速制备质粒 DNA^[22], 酶切及琼脂糖凝胶电泳鉴定重组子。

1.8 S7 基因序列测定与分析

选择 3 个 cDNA 阳性克隆子作模板, 采用质粒

载体上的通用引物和根据已测定的序列合成引物, 正、反向进行双链测序, 测序由上海中科开瑞基因技术有限公司完成。

运用 EditSeq 软件进行氨基酸序列的分析, 保守的氨基酸结构被 ScanProsite 软件识别, 蛋白二级结构由 PredictProtein 服务器进行预测, DNA 序列及其编码的氨基酸序列用 FASTA^[23]和 BLAST^[24]软件数据库进行分析。

1.9 编码 p50C259 的 cDNA 序列的 PCR 扩增及产物的克隆与鉴定

以 DpCPV-HN S7 cDNA 的重组质粒为模板, 利用引物 P1 和 P2, 在 *Pyrobest* DNA 聚合酶作用下进行 PCR 反应, 即 94℃ 预变性 5 min 进入 PCR 反应循环: 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环后, 于 72℃ 放置 7 min。PCR 产物经纯化, 在目的 DNA 3' 末端加 d (A) 后, 再克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 此重组质粒命名为 pGEM-S7(591-1371)。

1.10 重组基因表达载体的构建与表达

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pGEM-S7(591-1371), 切下编码 P50 C259 的 DNA 片段, 与同样双酶切的 pET-28a 相连, 重组表达质粒命名为 pET-28a/S7(591-1371)。上海中科开瑞基因技术有限公司对 pET-28a/S7(591-1371) 中插入的 DNA 片段进行测序。

重组基因在大肠杆菌中进行表达: 将 pET-28a/S7(591-1371) 转化大肠杆菌 BL21, 按文献^[22]用 IPTG 进行诱导表达目的蛋白, 15% 的 SDS-PAGE 分离胶进行电泳, 然后被考马斯亮蓝 R250 染色, 凝胶成像分析系统 GeneGenius 处理电泳结果。

2 结果与分析

2.1 S7 RT-PCR 产物及其重组质粒的电泳分析

S7 RT-PCR 产物及其重组质粒用 *Eco*R I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 分析结果见图 1。

2.2 序列分析及同源序列比较

DpCPV S7 全长 CDNA 的核苷酸序列已经登录 GenBank (AY180908)。S7 cDNA 全序列长 1501 bp, 开放阅读框起始密码子 ATG 位于第 24-26 碱基, 终止密码子 TGA 位于第 1368-1370 碱基, 由 448 aa 组成的编码 49.8 kDa 多肽 P50, pI 为 6.127。BmCPV-1 10 节段末端保守序列即 5' 末端的 5'-AGUAA-3' 和 3' 末端的 5'-GUUAGCC-3' 在 DpCPV-HN S7 中同样存在。P50 氨基酸序列中含一

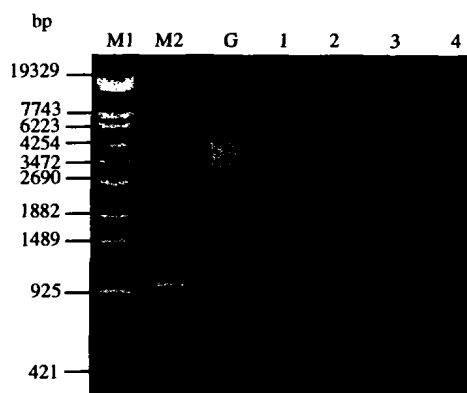


图 1 S7 RT-PCR 产物及其重组质粒的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR products and recombinant vectors

M1/M2. DNA Ladder; G, DpCPV-HN genome; 1, RT-PCR product of S7; 2, *Eco*RI digestion of recombinant vector containing S7 cDNA; 3, RT-PCR product of 3'-terminal sequence of segment S7; 4, *Eco*RI digestion of recombinant vector containing the cDNA of 3'-terminal sequence of segment S7

个核定位信号 (位于第 173-179 残基) 和 5 个 N-糖基化位点, 蛋白二级结构含有 43.5% α -helix, 14.7% β -sheet 和 41.7% loop。

DpCPV-HN S7 核苷酸序列与舞毒蛾质多角体病毒 (LdCPV-1) S7 和 BmCPV-1 S7 相比, 同源性分别为 97.2% 和 87.0%, 氨基酸序列同源性分别为 98.7% 和 92.8%; 序列同源性比较分析显示, DpCPV-HN P50 第 302-428 位氨基酸序列与人型支原体的 DnaK 样蛋白第 404-521 位氨基酸序列有 25.8% 同源性和 43.8% 相似性 (见图 2)。

2.3 编码 P50 C259 的 cDNA 序列的克隆与鉴定

以 DpCPV-HN S7 cDNA 的重组质粒为模板, 利用引物 P1 和 P2, 扩增出一条约 800 bp 的片段, 将这条片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 经 *Eco*R I 酶切、电泳鉴定其分子量大小正确 (见图 3)。

2.4 重组基因表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pGEM-S7(591-1371), 将编码 P50 C259 的 DNA 片段与 pET-28a 连接, 得到重组质粒 pET-28a/S7(591-1371), 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切、电泳鉴定其分子量大小正确。pET-28a/S7(591-1371) 中插入的 DNA 片段经测序检验证实与先前测定的结果相一致。

2.5 重组基因在大肠杆菌中的诱导表达

选用不同的 IPTG 浓度如 0.8mmol/L、1.0mmol/L 和

DpCPV-HN p50	302	DMRTPRTSVTSAGESALVRHRYMTE-SFKGLSPIALAQKKHEMMLHTHEIHSMDIDGSI	360
Mh DnaK	404	D +T T V + GE L R N+ + + +G+ P + E+ S+D++G	457
DpCPV-HN p50	361	KNMVERETVNMNEIDAMNTMSWKEEIHVEVQTTVHGTHQMSADPEQTQLISQETAVITH	420
Mh DnaK	458	K ++ NK I NT S +E EVE+ AD ++ I E V	513
DpCPV-HN p50	421	RASSDADE	428
Mh DnaK	514	+ S+D ++	521

图 2 DpCPV-HN P50 与人型支原体的 DnaK 样蛋白序列同源性比较

Fig. 2 Results of a search for identity and similarity to DpCPV-HN p50.

Mh, *Mycoplasma hominis*; Similar amino acid is indicated by “+”

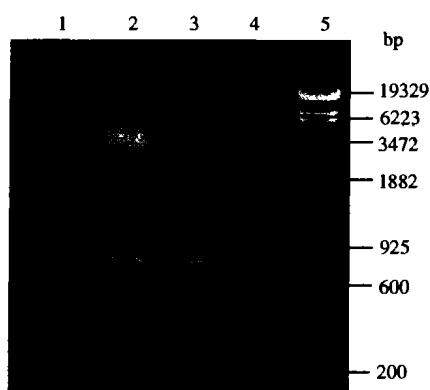


图 3 DpCPV-HN p50 C259 的 cDNA 片段的电泳鉴定

Fig. 3 Identification of PCR product, pGEM-S7(591-1371) and pET-28a/S7 (591-1371).

1, pET-28a/S7(591-1371) digested with *BamH* I and *Hind* III; 2, pGEM-S7(591-1371) digested with *EcoR* I; 3, PCR product; 4/5, 200 bp DNA Ladder and *EcoT14* I digest Lambda DNA, respectively.

1.2mmol/L, 2h 进行诱导表达, 利用凝胶成像分析系统 GeneTools 软件对融合蛋白的分子量及表达量进行分析, 结果表明: 融合蛋白的分子量约为 37.3 kDa, 大于该融合蛋白的理论值 32.9 kDa (图 4)。

3 讨论

国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)第七次报告^[3]将呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 分为 9 个属包括正呼肠孤病毒属 (*Orthoreovirus*)、轮状病毒属 (*Rotavirus*)、环状病毒属 (*Orbivirus*)、胞浆质多角体病毒属 (*Cypovirus*)、植物呼肠孤病毒属 (*Phytoreovirus*)、斐济病毒属 (*Fijivirus*)、水稻病毒属 (*Oryzavirus*)、科罗拉多婢传热症病毒属 (*Coltivirus*) 及水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*)，同时新增了 2 个拟定属 (*Seadonavirus*) 和 (*Entomoreovirus*)。在呼肠

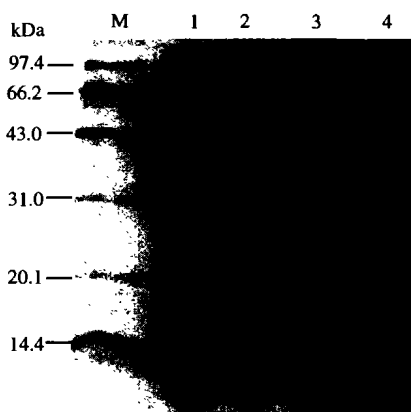


图 4 不同 IPTG 浓度对融合蛋白表达的影响

Fig.4 Fusion protein expression induced by different concentration of IPTG

M, marker; 1/2/3, pET-28a/S7(591-1371) induced by 0.8, 1.0, and 1.2 mmol/L IPTG over 2 hrs, respectively. 4, pET-28a induced by 1.0 mmol/L IPTG over 2 h.

孤病毒成员的分子生物学研究中, 以正呼肠孤病毒、轮状病毒、环状病毒和植物呼肠孤病毒的研究较为详尽^[25-27]。比较而言, 质多角体病毒的研究还较少, GenBank 核苷酸序列数据库中已经公布了 BmCPV-1 两个株系 (H 株和 I 株), LdCPV-1, LdCPV-14 和粉纹夜蛾 15 型质多角体病毒 (*Trichoplusia ni cypovirus 15*, TnCPV-15)全基因组序列, 目前仅 BmCPV-1 有较多地报道^[5,17,28-33]。从已有的文献资料及 GenBank 中能检索到的基因序列进行的比较分析表明, 同类型质多角体病毒间的同源性较高; 不同类型质多角体病毒间同源性较低^[19, 20]。属于 1 型质多角体病毒的病毒成员有 BmCPV-1、LdCPV-1 和 DpCPV-1。通过对 DpCPV-HN S7 cDNA 全序列分析, 其 5' 末端与 3' 末端序列与 BmCPV-1 的 10 个 dsRNA 片段的末端序列基本相

同, 5' 末端具有 AGTAA 保守序列, 3' 末端有 GTTAGCC 保守序列, 这是 1 型质多角体病毒病毒的一个重要特征。其它电泳型质多角体病毒也具有各自保守的末端序列^[20]。这些末端序列可能为 RNA 转录酶或复制酶提供识别信号, 与核糖体、病毒的结构组装相关^[34]。

DnaK 与大肠杆菌热激蛋白 Hsp70 同源, 是一个依赖 ATP 的分子伴侣, 与 DnaJ 和 GrpE 一起执行蛋白折迭, 重新缔造, 多亚基复合物的组装等功能。对 DnaK 结构的研究表明, 该蛋白含有 N-末端的 ATP 结合域 (第 1-384 氨基酸残基) 和 C-末端的底物结合域 (第 385-638 氨基酸残基)。分子伴侣活性受 ATP 控制^[35], 而 DnaK 的 ATP 酶的活性又受到 GrpE 的严密控制^[36]。同源序列分析显示, DpCPV-HN p50 与 *Mycoplasma hominis* 的 DnaK 样蛋白在 C-末端有一同源区, 但两者在同源区的 α -helix 和 β -sheet 相对分布有区别, 因此 DpCPV-HN p50 是否具有分子伴侣功能有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L, *et al.* Classification and nomenclature of viruse. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Arch Virol, 1991, Suppl 2.
- [2] Holmes I H, Boccardo G, Esters M K, *et al.* Family Reoviridae [M]. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, New York: Springer, Wien, 1995. 208-237.
- [3] Mertens P P C, Arella M, Attoui H. Reoviridae [M]. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, 2000.
- [4] Payne C C, Mertens P P C. Cytoplasmic polyhedrosis virus [M]. The Reoviridae, New York: Academic Press, 1983. 425-504.
- [5] Arella M, Lavallee C, Belloncik S, *et al.* Molecular cloning and characterization of cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin and a viable deletion mutant gene[J]. J Virol, 1988, 62: 211-217.
- [6] Qanungo K R, Kundu S C, Mullins J I, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Antheraea mylitta* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 9[J]. J Gen Virol, 2002, 83:1483-1491.
- [7] Zhang H, Zhang J, Yu X, *et al.* Visualization of protein-RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. J Virol, 1999,73: 1624-1629.
- [8] Hill C L, Booth T F, Prasad B V V, *et al.* The structure of a cypovirus and the functional organization of dsRNA viruses [J]. Nat Struct Biol, 1999, 6: 565-568.
- [9] Payne C C, Rivers C F. A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segments [J]. J Gen Virol, 1976, 33: 71-85.
- [10] Belloncik S, Liu J, Su D. Identification and characterization of a new cypovirus type 14, isolate from *Heliothis armigera* [J]. J Invert Pathol, 1996, 67: 41-47.
- [11] Rao S, Carner G, Scott S, *et al.* Trichoplusia ni cytoplasmic polyhedrosis virus 15 segment 11, complete sequence. GenBank accession number NC_002566. 2000.
- [12] 广东省林业科学研究所. 马尾松毛虫多角体病毒研究初报 [J]. 林业科技通讯, 1974, (10): 13.
- [13] 陶 粮, 陈昌洁, 王志贤, 等. 七株松毛虫质型多角体病毒 RNA 基因图谱比较研究[J]. 林业科学, 1988, 24: 28-33.
- [14] 杜建宇, 张珈敏, 郭海涛, 等. 马尾松毛虫质多角体病毒多角体蛋白基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 中国病毒学, 2001, 16: 350-354.
- [15] 文 力, 张珈敏, 王 琼, 等. 马尾松毛虫质多角体病毒 NSS 蛋白基因的 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 中国病毒学, 2003, 18: 49-53.
- [16] 胡建芳, 张珈敏, 杨 娟, 等. 单引物法扩增马尾松毛虫质多角体病毒基因组第 8 片段及其序列分析 [J]. 中国病毒学, 2003, 18: 39-43.
- [17] Hagiwara K, Matsumoto T. Nucleotide sequence of the genome segments 6 and 7 of *Bombyx mori* cypovirus1, encoding the viral structural protein V4 and V5, respectively[J]. J Gen Virol, 2000, 81:1143-1147.
- [18] 洪靖君, 段家龙, 赵淑玲, 等. 家蚕对马尾松毛虫质多角体病毒的敏感性[J]. 昆虫学报, 2003, 46. (4): 409-416.
- [19] Galinski M S, Stanik V H, Rohmann F, *et al.* Comparison of sequence diversity in several CPVs [J]. Virology, 1983, 130: 372-380.
- [20] 洪靖君, 彭辉银, 段家龙. 昆虫质多角体病毒研究的若干新进展 [J]. 昆虫学报, 2002, 45: 815-821.
- [21] 刘润忠, 谢天恩, 彭辉银, 等. 文山松毛虫质多角体病毒形态结构及理化性质的研究[J]. 中国病毒学, 1992, 7: 69-79.
- [22] 金冬雁. 分子克隆实验指南 [M], 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [23] Pearson W R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA [J]. Methods Enzymol, 1990, 183: 63-68.
- [24] Altschul S F, Madden T L, Schiffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389-3340.
- [25] Estes M K, Cohen J. Rotavirus gene structure and fuction [J]. Microbiol Rev, 1989, 53: 410-449.
- [26] Koonin E V. Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-stranded RNA viruses [J]. Semin Virol, 1992, 3: 327-339.
- [27] Suzuki N. Molecular analysis of the rice dwarf virus genome [J]. Semin Virol, 1995, 6: 89-95.
- [28] Nakazawa H, Kendirgi F, Belloncik S, *et al.* Effect of mutations on the intracellular localization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin[J]. J Gen Virol, 1996, 77:147-153.
- [29] Hagiwara K, Tomita M, Nakai K, *et al.* Determination of the

- nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 9 and its expression in BmN4 cells[J]. *J Virol*, 1998a, 72: 5762-5768.
- [30] Hagiwara K, Tomita M, Kobayashi J, *et al.* Nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 8[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998b, 247:549-553.
- [31] Hagiwara K, Kobayashi J, Tomita M, *et al.* Nucleotide sequence of the genome segment 5 from *Bombyx mori* cypovirus 1[J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 181-187.
- [32] Ikeda K, Nagaoka S, Winkler S, *et al.* Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4 [J]. *J Virol*, 2001, 75: 988-995.
- [33] 钟伯雄. 家蚕质型多角体病毒的三磷酸核苷酸结合蛋白 [J]. *蚕业科学*, 2001, 27: 38-41.
- [34] Nibert M L, Schiff L A. *Reoviruses and their replication* [M]. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 1679-1728.
- [35] Szabo A, Langer T, Schroder H, *et al.* The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:10345-10349.
- [36] Buchberger A, Schroder H, Buttner M, *et al.* A conserved loop in the ATPase domain of the DnaK chaperone is essential for stable binding of GrpE [J]. *Nat Struct Biol*, 1994, 1: 95-101.