

香蕉束顶病毒 Rep 蛋白特性分析及纯化体系的建立

余乃通^{1,2}, 张雨良¹, 王健华¹, 刘志昕¹

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101; 2. 海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228)

摘要:以香蕉束顶病毒海口分离物 DNA1 (Accession NO. FJ463042) 的 Rep 蛋白为研究对象, 利用生物信息学软件对该蛋白的理化性质、结构组成、信号肽、磷酸化、二级结构、三级结构与功能结构域等作了较为详细的分析与预测, 并配置了相关纯化试剂。将含重组质粒 pET32b-Rep 的 *E. coli* BL21 (DE3), 接种到 LB 液体培养基, 在 20℃、0.1 mmol/L IPTG 条件诱导 4 h, 产生大量的可溶性重组蛋白, 经 AKTA Explorer 100 系统亲和层析柱后, 用不同梯度的 Washing buffer 洗脱杂蛋白并对各阶段产物进行 12% SDS-PAGE 分析, 确定了 100 mmol/L 咪唑的 Washing buffer 洗脱浓度, 最终获得大量高纯度的重组蛋白。以 His * Tag Monoclonal Antibody 为一抗, Western blot 鉴定结果表明纯化重组蛋白即为 His-Rep 融合蛋白。该纯化体系的建立为研究 BBTV Rep 蛋白的结晶奠定了基础, 也为今后 ABTV、FBNYV、MVDV、PNYDV 等病毒的相关复制蛋白纯化提供了重要数据。

关键词:香蕉束顶病毒; Rep 蛋白; 特性分析; 纯化体系; 建立

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.02.05

中图分类号:S432.41 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2011)02-0031-07

Characteristics Analysis of Banana Bunchy Top Virus Rep Protein and Establishment of its Purification System

YU Nai-tong^{1,2}, ZHANG Yu-liang¹, WANG Jian-hua¹, LIU Zhi-xin¹

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural sciences, Haikou 571101; 2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: With Rep protein from *Banana bunchy top virus* Haikou isolates DNA1 (Accession NO. FJ463042) as the research object, physical and chemical properties, composition, signal peptide, phosphorylation, secondary structure, tertiary structure and functional domains of the protein, etc. were analyzed and forecasted using bioinformatics software, and associated protein purification reagents were configured according to these features. The recombinant plasmid pET32b-Rep of *E. coli* BL21 (DE3) was inoculated into LB liquid medium and was induced at 20℃, 0.1 mmol/L IPTG for 4 h. A lot of soluble recombinant protein was generated and the supernatant was added to the AKTA Explorer 100 system by affinity chromatography. A different gradient of Washing buffer eluted impurity proteins and products of various stages via 12% SDS-PAGE electrophoresis to determine 100 mmol/L imidazole as washing buffer concentration, and a large number of high-purity recombinant proteins were obtained ultimately. His * Tag Monoclonal Antibody as the first antibody, Western blot showed that the purified recombinant protein was the His-Rep fusion protein. The establishment of this purification system could not only provide basis for studying the crystallization of BBTV Rep, but also provide important data for purification of ABTV, FBNYV, MVDV, PNYDV, etc.

Key words: BBTV (*Banana bunchy top virus*); Rep protein; characteristics analysis; purification system; establishment

香蕉束顶病毒 (Banana bunchy top virus, BBTV) 属于矮缩病毒科 (Nanaviridae) 香蕉束顶病毒属 (*Babwivirus*)^[1]。在 20 世纪, 该病毒引起的香蕉束顶病 (banana bunchy top disease, BBTB) 是香

收稿日期: 2010-12-27; 接受日期: 2011-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070131); 海南大学“211 工程大学建设”专项资金资助。

作者简介: 余乃通, 硕士研究生, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: yunaitong@163.com。通讯作者: 刘志昕, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事植物病毒分子生物学研究。E-mail: ittblzx@yahoo.com.cn

蕉毁灭性的病害之一,造成重大的经济损失,严重影响了当时世界香蕉产业的发展^[2,3]。

BBTV 的病毒颗粒为 18 ~ 20 nm 的等径颗粒,基因组至少由 6 个大小约 1.0 ~ 1.1 kb 的环状 ssDNA 组分所组成,分别命名为 1、2、3、4、5、6 组分^[4-7]。BBTV DNA1 是最早被克隆和测序的一个组分,首先发现其编码一个分子量约 33.6 kDa 的复制起始蛋白(replication initiation protein, Rep),在病毒的复制过程中起重要作用^[4];随后, Northern 杂交和 3'-RACE 分析证明其内部还有一个小 ORF,但其编码框相位与 Rep ORF 不同,是以 a + 2 编码框存在于 Rep ORF 内部,编码分子量约为 5 kDa 的功能未知蛋白^[8]。由于香蕉转基因技术体系尚不成熟,国内外对 BBTV *rep* 基因的功能研究少有报道,如 DNA1 小 ORF 的功能、病毒 *rep* 基因转录和翻译的调控、寄主中与病毒 Rep 蛋白互作的蛋白、BBTV 的复制和侵染机理等问题还不清楚。为此,本实验以含重组质粒 pET32b-Rep 的 *E. coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达获得了可溶性蛋白,经 AKTA Explorer 100 系统确定了 BBTV Rep 蛋白纯化的最佳条件。该纯化体系的建立为 BBTV 解决上述问题提供了一定的途径,对进入下一步的 Rep 蛋白结构、功能研究奠定了良好的基础,该实验也为 ABTV、FBNYV、MVDV、PNYDV 等相关复制蛋白纯化提供了重要数据。

1 材料与方法

1.1 材料

表达菌 *E. coli* BL21 (DE3) 购自德国默克公司。克隆载体 pET-32b(+)、氨苄青霉素(ampicillin)、IPTG 均购自大连宝生物公司;蛋白低分子量 Marker 购自 Promega 公司;BCIP/NBT 底物显色试剂盒、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自 Solarbio 公司;AKTA Explorer 100 系统、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、考马斯亮蓝 R-250 均购自 Amresco 公司;His * Tag Monoclonal Antibody、Goat Anti-Mouse IgG-AP 购自 Novagen 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 Rep 蛋白的结构与功能分析

Rep 蛋白氨基酸序列组成和理化性质通过

ExPASy 在线 ProtParam 完成(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>);病毒蛋白在感染寄主的细胞内定位由 Virus-mPLoc 完成(<http://www.psорт.org/>);信号肽分析通过 ExPASy 在线 SignalP 完成(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);蛋白质翻译后修饰的糖基化位点和磷酸化位点分析分别采用 DictyOGlyc 在线软件和 NetPhos2.0 Server 完成(<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>); <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>);功能预测由 NCBI 和 Pfam HMM 完成(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome); <http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequence-Block>);利用 SOPMA 在线工具完成 Rep 蛋白的二级结构预测(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html);通过蛋白分析专家系统 ExPASy 提供的在线分析工具 ProtScale 分析蛋白的疏水性(<http://us.expasy.org/tools/protscale.html>);蛋白质立体结构预测和观看采用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1)和 Raswin(<http://www.bbioo.com/Soft/2007/710.htm>)软件。

1.3 Rep 蛋白系统进化树的构建

利用 NCBI 的 protein blast 比对 BBTV Rep 蛋白氨基酸序列的同源性,从 GenBank 蛋白质数据库中收集来自 15 个植物病毒的相关复制蛋白的氨基酸序列。利用 DNAMAN6.0 软件构建相关复制蛋白的分子进化树:先用 ClustalX 2.0 的 Do Complete Alignment 命令做序列比对,格式文件转化为 FASTA 格式,再用 DNAMAN 6.0 泊布矫正距离模式构建系统发育树。

1.4 重组蛋白表达及纯化

根据上述分析的 Rep 蛋白特性(pI、半衰期、不稳定系数等)配置一系列纯化试剂,使 Rep 蛋白溶于其中并尽量保持生理活性,且易于后续纯化。

含重组质粒 pET32b-Rep 的 *E. coli* BL21 (DE3) 活化后,接种到 1.4 L 培养基,在 20℃、0.1 mmol/L IPTG 条件下诱导 4 h,4℃ 10 000 r/min

离心 30 min, 收集菌体, 沉淀用 50 mL Binding buffer (pH 8.0) 溶液重悬, 超声波破碎仪破碎 (冰浴), 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清过 0.45 μm 滤膜以除去大颗粒物质。利用 AKTA Explorer 100 系统亲和层析柱进行纯化, 经不同梯度的 Washing buffer (含 50 ~ 500 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl) 溶液洗去杂蛋白, 确定洗脱杂蛋白的最低咪唑浓度, 最后用 Elution buffer 洗脱可获得纯化的重组蛋白。

1.5 重组蛋白 Western blot 检测

取未诱导重组表达菌、诱导重组表达菌和纯化蛋白溶液分别与 2 × SDS 变性缓冲液按 1:1 混合, 经 12% SDS-PAGE, 电转移到 NC 膜, 以 His * Tag Monoclonal Antibody 为一抗, 碱性磷酸酯酶 (AP) 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 化学底物发光法显色, 检测纯化的重组蛋白是否为目的蛋白。

2 结果与分析

2.1 Rep 蛋白氨基酸序列组成和理化性质

Rep 蛋白以甲硫氨酸为起始氨基酸, 长度为 286 个氨基酸。利用 ProtParam 在线工具计算 Rep 蛋白化学分子式为 C₁₅₀₂H₂₃₁₅N₃₉₉O₄₃₂S₂₀, 理论分子量约为 33.52 kDa, 估测等电点 pI 为 8.29, 半衰期为 30 h, 不稳定系数为 47.72, 预测认为 Rep 蛋白是一类不稳定蛋白家族一员, 这些为 Rep 蛋白的分离纯化研究提供了基础数据。

2.2 Rep 蛋白细胞内定位、信号肽分析

根据 PSORT 的 Virus-mPLoc 预测分析, BBTV Rep 在寄主香蕉植物亚细胞中定位于细胞质和细胞核中。根据 SignalP 分析 (图 1), 以 0.5 分为阈值, Rep 蛋白的 C 分值、Y 分值和 S 分值分别在 20、20 和 13 位点, 分别为 0.069、0.150 和 0.606, 预测 Rep 蛋白无信号肽序列。DietyOGlyc 预测表明 (图 2) BBTV Rep 无糖基化位点, 不形成糖蛋白。这些结果说明 BBTV Rep 蛋白在染病寄主细胞的细胞核中表达后, 可能与病毒自身或寄主蛋白相互作用, 通过核孔转移蛋白运送到细胞质中。然而这一结果还需要细胞生物学实验数据进一步证明。

2.3 Rep 蛋白的功能预测及结构分析

NetPhos2.0 Server 磷酸化位点分析结果表明

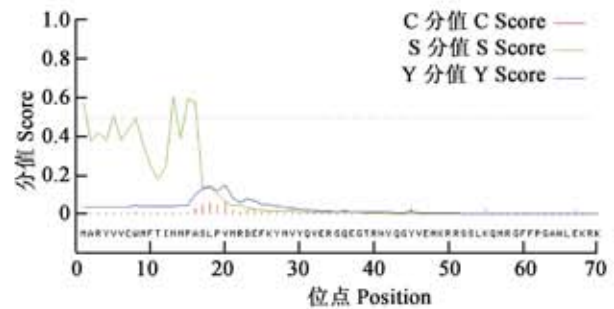


图 1 Rep 蛋白氨基酸序列的信号肽预测

Fig. 1 Prediction of signal peptide of Rep protein amino acid sequence.

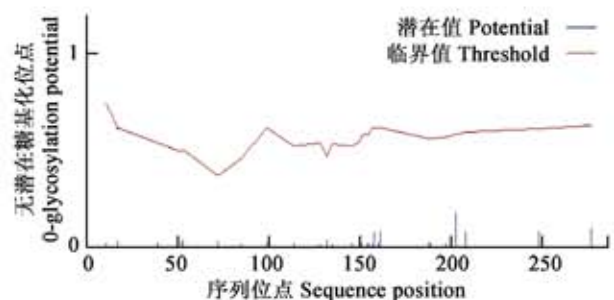


图 2 Rep 蛋白氨基酸序列的糖基化位点分析

Fig. 2 Analysis of glycosylation sites of Rep protein amino acid sequence.

(图 3), BBTV Rep 分值 > 0.5 的磷酸化位点有 21 个; 其中丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点 11 个, 苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点 3 个, 酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点 7 个, 这些位点在整个多肽链中均有分布。蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation) 是生物界最普遍, 也是最重要的一种蛋白质翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs), 20 世纪 50 年代以来一直被生物学家看作是一种动态的生物调节过程。在细胞中, 大约有 1/3 的蛋白质被认为是经过磷酸化修饰的^[9]。蛋白质的磷酸化是植物细胞表达调控的关键环节, 在病毒侵染的寄主细胞中, 病毒蛋白质磷酸化可能作为病毒在其体内的增殖起开关调控作用的调控因子。

利用 NCBI 和 Pfam HMM 分析 (图 4), 功能预测都显示为复制蛋白: C 端属于 P-loop NTPase superfamily 或 RNA helicase, 具有使环状 DNA 开环的功能; N 端属于 Viral-Rep superfamily, 与寄主细胞内蛋白因子结合成复制起始复合物, 再与开环后的 DNA 起始位点序列相结合起始复制, 香蕉束顶病毒的 DNA 复制需要两者协同作用共同完成。

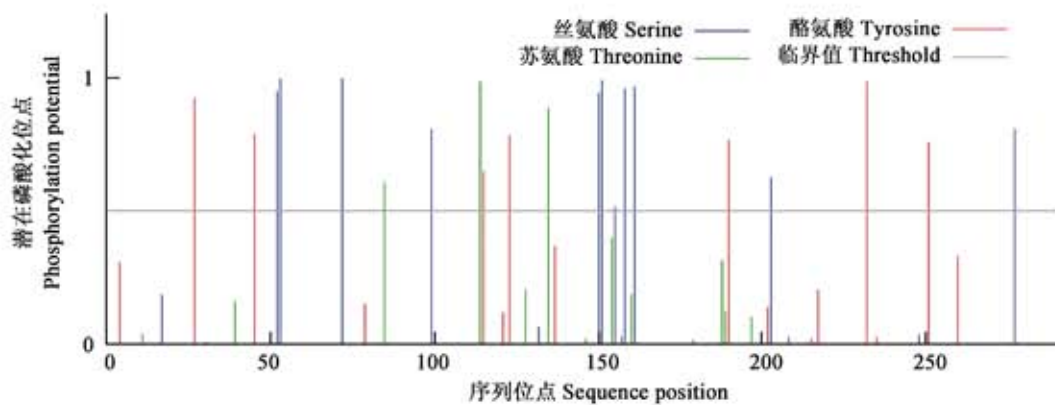


图3 Rep 蛋白氨基酸序列的磷酸化位点分析

Fig. 3 Analysis of phosphorylation sites of Rep protein amino acid sequences.

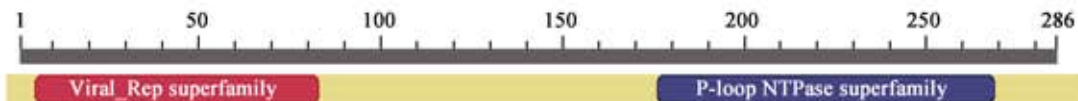


图4 Rep 蛋白氨基酸序列的功能预测

Fig. 4 Prediction of function of Rep protein amino acid sequence.

氨基酸的多肽链通过折叠和卷曲形成稳定的二级结构,进一步形成特有的生物学活性及理化性质的高级结构。应用 SOPMA 预测 Rep 蛋白的

二级结构,结果表明(图5): α -螺旋占 40.91%,不规则卷曲占 34.27%,而延伸链占 19.23%,散布在整个蛋白质中,只有很少的 β 转角存在,占 5.59%。

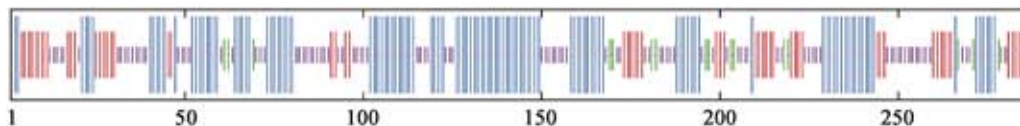


图5 Rep 蛋白氨基酸序列的二级结构分析

Fig. 5 Analysis of the secondary structure of Rep protein amino acid sequence.

注:蓝色代表 α -螺旋,红色代表延伸链,绿色代表 β 转角,紫色代表不规则卷曲。

Note: Blue represents α -helix, Red represents extended strand, Green represents β -turn, Purple represents random coil.

疏水性是氨基酸的一种重要性质,疏水性氨基酸倾向于远离周围亲水性物质,将自己包埋进蛋白质的内部,这一趋势与空间立体条件及其他一些因素共同决定了一个蛋白质折叠形成的三维空间构象^[10]。ProtScale 预测结果表明:Rep 蛋白疏水性最大值为 2.011,最小值为 -3.056,整个多肽链中大多数氨基酸的分值较低,表明亲水性氨基酸远多于疏水性氨基酸(图6)。结合图5,亲水性较强的氨基酸区域预测为 α -螺旋区,而疏水性较强的氨基酸区域预测为延伸链区。通过分析所得的 BBTV Rep 的亲疏水区域,这一结果一方面为二级结构预测结果提供参考,另一方面还可以为结构域及功能域的划分提供依据。

要充分研究蛋白质的功能,就必须清楚蛋白

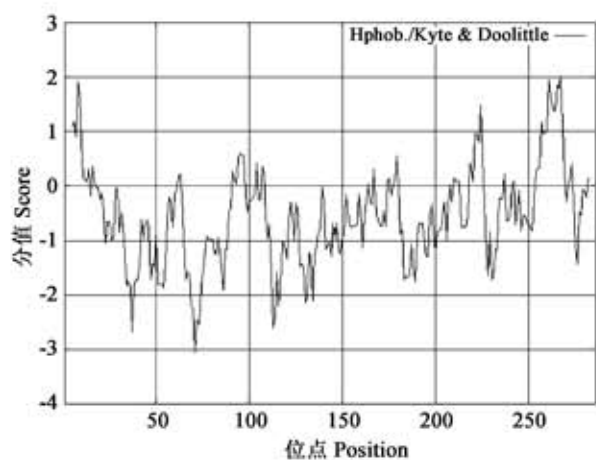


图6 Rep 蛋白氨基酸序列的疏水性分析

Fig. 6 Analysis of the hydrophobic of Rep protein amino acid sequence.

质的高级结构。从氨基酸序列预测三级结构的技术很多,方法也很多,其中之一是同源建模,它主要通过比较已知结构的蛋白质序列来预测未知结构蛋白质序列的三级结构。首先在蛋白数据库中找到与预测蛋白相近的已知蛋白结构作为模板,对目标蛋白进行精确的结构模型构建。利用 ExPasy 的 SWISS-MODEL 对 Rep 蛋白的立体结构进行在线预测,发现与蚕豆坏死黄化病毒的 M-Rep protein (56.64%) 同源性最高,以 M-Rep protein (PDB code: 2hwt) 蛋白质晶体结构为模板进行同源建模,获得了 Rep 蛋白的高级结构(图 7),用 SwissPDBviewer 和 RasMol 软件查看和编辑。



图 7 Rep 蛋白三级结构的同源建模

Fig. 7 Homology modeling of Rep protein tertiary structure.

2.4 BBTV Rep 蛋白与其他病毒相关复制蛋白的系统进化树分析

将同源性较高的植物病毒相关复制蛋白与 BBTV Rep 的氨基酸序列构建进化树进行同源性分析(图 8),发现 BBTV Rep 与 ABTV Rep 同源性最高,达 85.66%,与 FBNYV、MVDV、PNYDV 的相关复制蛋白也有较高的同源性。而 BBTV Rep 与 SCSV、CLCBV、GDSV、AEV-DNA1、CYVMV、BYVMV、MVMV-DNA1、TYLCCNV-DNA1、MYLCV-DNA1、CLCMV 等相关复制蛋白的遗传距离较远,同源性较低。

在功能域上它们都有相同的特点(图 4),C 端属于 P-loop NTPase superfamily,使环状 DNA 开环;N 端属于 Viral-Rep superfamily,参与环状 DNA 的复制,在这些植物病毒的 DNA 复制中具有相同作用机制。

2.5 重组蛋白表达及纯化

对重组蛋白进行 AKTA Explorer 100 亲和层析纯化,12% SDS-PAGE 分析重组蛋白分布情况表明,杂蛋白经 100 mmol/L(图 9)咪唑浓度的

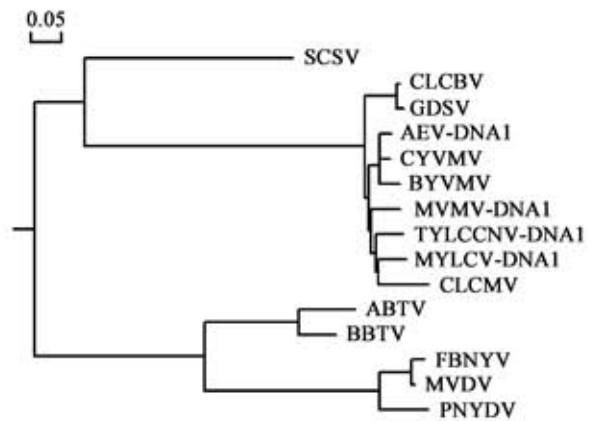


图 8 相关复制蛋白的系统发育树构建

Fig. 8 Phylogenetic tree construction of replication associated protein.

BBTV; Banana bunchy top virus, ACK43789.1; ABTV; Abaca bunchy top virus, ABP96960.1; AEV-DNA1; Ageratum enation virus associated DNA 1, CBA18493.1; BYVMV; Bendhi Yellow Vein Mosaic alphasatellite, CBJ19305.1; CLCBV; Cotton leaf curl Burewala alphasatellite, CBJ19311.1; CLCMV; Chilli leaf curl Multan alphasatellite, YP_003104752.1; CYVMV; Croton yellow vein mosaic alphasatellite, CBJ19303.1; FBNYV; Faba bean necrotic yellows virus, ACX50503.1; GDSV; Gossypium darwinii symptomless alphasatellite, ACC78675.1; MVDV; Milk vetch dwarf virus, NP_619769.1; MYLCV-DNA1; Mimosa yellow leaf curl virus-associated DNA 1, YP_001285943.1; MYMV-DNA1; Malvastrum yellow mosaic virus-associated DNA 1, CAJ85971.1; PNYDV; Pea necrotic yellow dwarf virus, ADE87486.1; SCSV; Subterranean clover stunt virus, NP_620700.1; TYLCCV-DNA 1; Tomato yellow leaf curl China virus associated DNA 1, CAE18134.1.

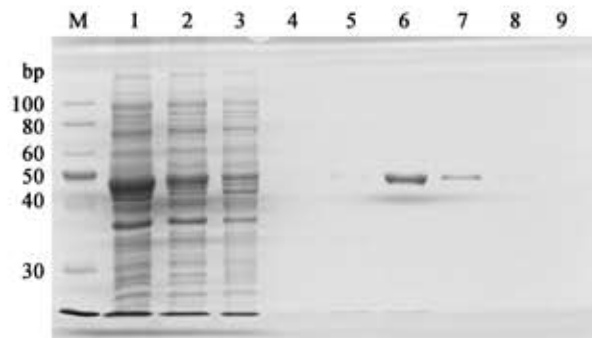


图 9 Rep 重组蛋白纯化分析

Fig. 9 Analysis of purification of Rep recombinant protein. M; ProteinRuler II; 1; 细胞破碎上清液; 2; 穿透液; 3-9; 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mmol/L 咪唑 washing buffer
M; ProteinRuler II; 1; Supernatant of cell disruption; 2; Transmission fluid; 3-9; 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mmol/L imidazole washing buffer

Washing buffer 洗脱后,与亲和层析柱 Ni^{2+} 螯合的重组蛋白纯度已达要求,最终将重组蛋白溶于

500 mmol/L 咪唑浓度的 Elution buffer 中,并确定杂蛋白最佳洗脱条件为 200 mmol/L 咪唑。Band-Scan 软件初步分析纯度达到 98.27%,可用于后续高质量的蛋白相关实验。

2.6 目的蛋白的 Western blot 检测

以 His * Tag Monoclonal Antibody 为一抗(稀释 10 000 倍),AP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(稀释 30 000 倍),Western-blot 分析,未诱导重组表达菌无目的条带出现,诱导重组表达菌和纯化重组蛋白均有目的条带出现,且条带大小与理论值一致(图 10),表明最后纯化的重组蛋白为目的蛋白,即 His-Rep 融合蛋白。

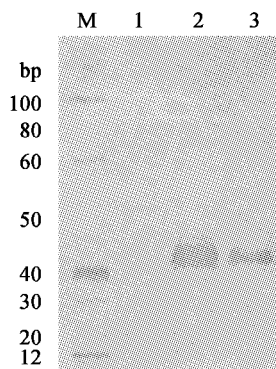


图 10 Western blot 检测

Fig. 10 Detection of Western blot.

M: ProteinRuler II; 1: pET32-Rep/DE3 诱导 0 h; 2: pET32-Rep/DE3 诱导 4 h; 3: 纯化 Rep 重组蛋白

M: ProteinRuler II; 1: pET32-Rep/DE3 inducing 0h; 2: pET32-Rep/DE3 inducing 4 h; 3: Purification of recombinant protein

3 讨论

随着基因组和功能基因组研究的快速发展,生物信息学的理论研究方法也取得较大的进步,基于生物学实验数据和现代计算技术相结合的生物信息学分析方法在分子病毒学研究领域也得到了广泛应用。利用生物信息学技术对目标靶基因、靶蛋白进行结构和功能预测是一项重要的科研技术策略^[11]。本文利用该方法,对 BBTV Rep 蛋白的生理生化性质进行较为全面的预测,为 Rep 蛋白的纯化提供了基础。

BBTV Rep 蛋白在染病寄主细胞的细胞核中复制后,可能与病毒自身或寄主细胞的蛋白相互

作用,通过核孔转移蛋白运送到细胞质中。研究认为,起转运作用的蛋白更有可能是 BBTV DNA 4 编码的运动蛋白(movement protein, MP)^[4],原因是其产物 N-末端的 29 个疏水残基的缺失试验结果说明 N-末端 29 个疏水残基区域对细胞周边的定位是必须的^[12],表明 DNA 4 编码蛋白对胞间运输及长距离运输是不可缺少的^[13,14]。还发现 MP 能与 NSP 进行协同表达,且 NSP-DNA 复合物能被 MP 运输到细胞外围^[12,13,15,16],孙德俊等^[17]也证明 DNA 4 具有编码运动蛋白的功能。从以上研究推测,转运 Rep 蛋白到细胞质的极有可能是 MP 蛋白。

与双生病毒编码的 Rep 一样,在体外表达的麦芽糖结合蛋白与 Rep 的重组蛋白具有特异的切割和连接活性,这是滚环复制起始蛋白的共性^[18]。重组蛋白能够在 ssDNA 茎环结构中环上保守的 9 核苷酸序列中的第 7 和第 8 个核苷酸之间(¹TAnTATT ↓ ⁸AC)进行切割。反应过程中,需要 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 存在,但不需要 ATP,3'切割产物的 5'末端与 Rep 共价连接,而产生的切口链的 3'末端在 TYLCV 中被证明能够被宿主 DNA 聚合酶用来延伸病毒 DNA 的合成^[19]。研究证明,这种共价连接的蛋白-DNA 复合物是切割-连接酶的典型代表,如 TYLCV 和 RC-plasmid pT181 的 Rep, *uX174* 的 A 基因产物,RP4 的 Tra 蛋白以及 RSF1010 的 Mob 蛋白^[19]。在体外,重组蛋白还能够催化两个切口 ssDNA 片段的位点特异的连接,推测其很可能在体内连接新生的病毒 ssDNA 成为病毒基因组单位^[19]。这些结果还说明,环以外的序列和结构对于体外切割是非必须的,从某种意义上说,茎环的形成不是切割活性的先决条件^[20]。这些研究的证明及后续工作都需要高纯度的 Rep 蛋白,而 Rep 蛋白体系的建立,正是为此提供了宝贵的数据。

参 考 文 献

- [1] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, *et al.* Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam, Boston, Heidelberg: Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] Dale J L. Banana bunchy top: an economically important

- tropical plant virus disease[J]. *Adv. Virus Res.*, 1987, 33: 301-325.
- [3] 周仲驹,林奇英,谢联辉,等. 香蕉束顶病的研究 I. 病害的发生、流行与分布[J]. *福建农学院学报(自然科学版)*, 1993, 22(3): 305-310.
- [4] Burns T M, Harding R M, Dale J L. The genome organization of Banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components[J]. *J. Gen. Virol.*, 1995, 76: 1471-1482.
- [5] Harding R M, Burns T M, Dale J L. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA[J]. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72: 225-230.
- [6] Harding R M, Burns T M, Hafner G J, *et al.*. Nucleotide-sequence of one-component of the Banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene[J]. *J. Gen. Virol.*, 1993, 74: 323-328.
- [7] Karan M, Harding R M, Dale J L. Association of banana bunchy top virus DNA components 2 to 6 with banana bunchy disease[J]. *Mol. Plant Pathol.*, 1997, On-line: 1-16.
- [8] Gregory J H, Robert M H, James L D A. DNA primer associated with *banana bunchy top virus*[J]. *J. Gen. Virol.*, 1997, 78: 479-486.
- [9] Zolnierowicz S, Bollen M. Protein phosphorylation and protein phosphatases[J]. *J. EMBO*, 2000, 19: 483-488.
- [10] 杨琦. 黏着斑激酶生物信息学分析[J]. *西安工业大学学报*, 2008, 28(4): 367-371.
- [11] 冯从经,陆剑锋,黄建华,等. 亚洲玉米螟幼虫酚氧化酶原基因序列的生物信息学分析[J]. *昆虫学报*, 2009, 52(10): 1068-1077.
- [12] Wanitchakorn R, Hafner G J, Harding R M, *et al.*. Function analysis of proteins encoded banana bunchy top virus DNA-4 to-6[J]. *J. Gen. Virol.*, 2000, 81: 299-306.
- [13] Noueiry A O, Lucas W J, Gilbertson R L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport[J]. *Cell*, 1994, 76: 925-932.
- [14] Sudarshana M R, Wang H L, Lucas W J, *et al.*. Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein[J]. *Mol. Plant Microb. Inter.*, 1998, 11: 277-291.
- [15] Sanderfoot A A, Lazarowitz S G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1185-1194.
- [16] Lazarowitz S G, Beachy R N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 535-548.
- [17] Dugdale D, Beetham P R, Becker D K, *et al.*. Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA-1 to DNA-6 in transgenic tobacco and banana cells[J]. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79(10): 2301-2311.
- [18] Baas P D, Jansz H S. Single-stranded DNA phage origins[J]. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1988, 136: 31-70.
- [19] Laufs J, Traut W, Heyraud F, *et al.*. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 3879-3883.
- [20] Hafner G J, Harding R M, Dale J L. A DNA primer associated with banana bunchy top virus[J]. *J. Gen. Virol.*, 1997, 78: 479-486.