

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學系

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

紅龍果 X 病毒缺失性 RNA 之選殖與特性分析

Cloning and characterization of defective RNAs

of Pitaya virus X

陳君弢

Chun-Tao Chen

指導教授：張雅君 博士

Advisor: Ya-Chun Chang, Ph.D.

中華民國 101 年 07 月

July, 2012

## 目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	iii
壹、 前言.....	1
貳、 前人研究.....	3
一、 動物與植物病毒缺失性 RNA 研究歷史與進程.....	3
二、 缺失性 RNA 之特性.....	5
三、 缺失性 RNA 之形成與演化.....	7
四、 缺失干擾性 RNA 干擾能力之來源研究.....	8
五、 <i>Potexvirus</i> 屬植物病毒缺失性 RNA 之研究.....	9
六、 缺失性 RNA 之應用.....	10
七、 紅龍果與紅龍果 X 病毒之簡介.....	11
八、 研究目的.....	12
參、 材料與方法.....	13
一、 病毒材料.....	13
二、 實驗植物與栽種.....	13
三、 PiVX 人為缺失性 RNA 之構築.....	13
四、 PiVX 天然缺失性 RNA 之選殖.....	18
五、 缺失性 RNA 在白藜上之接種、全 RNA 萃取及電泳分析.....	22
六、 北方轉漬法及雜合反應.....	23
七、 生體外轉錄體之製備.....	25
八、 原生質體之製備、接種與分析.....	27
九、 影響 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上累積之 5' 序列之分析.....	29
十、 轉譯架構對缺失性 RNA 之重要性測試.....	30

十一、	缺失性 RNA 轉譯架構在白藜上表現情形之分析 .....	31
十二、	西方轉漬分析法.....	31
肆、	結果.....	34
一、	構築五種 PiVX 人為缺失性 RNA .....	34
二、	以菸草原生質體測試 PiVX 人為缺失性 RNA 之複製能力 .....	34
三、	測試 PiVX 人為缺失性 RNA 於白藜上之累積能力 .....	35
四、	PiVX 天然缺失性 RNA 之選殖與分析 .....	36
五、	測試 PiVX 天然缺失性 RNA 於白藜上之累積能力 .....	38
六、	PiVX 天然缺失性 RNA 序列與轉譯架構分析 .....	39
七、	5'端序列長度對 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上累積能力之影響.....	40
八、	轉譯架構對 PiVX 缺失性 RNA 之重要性測試.....	41
九、	PiVX 缺失性 RNA 之預測轉譯架構在白藜上表現情形之分析 .....	41
伍、	討論.....	43
陸、	參考資料.....	50
柒、	圖表.....	57
捌、	附錄.....	77

## 中文摘要

紅龍果為仙人掌科(Cactaceae)作物，原產於中美洲地區，為本島近幾年新興之經濟水果作物。在國內，紅龍果可被仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX)、蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZVX)和本實驗室於 2008 年發現之紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)所感染。PiVX 為 *Potexvirus* 屬病毒，病毒顆粒成短絲狀，基因體為正意單股 RNA，全長不包含 polyA 為 6677 個核苷酸。缺失性 RNA (defective RNA, D RNA)是一種 RNA 病毒基因體經過缺失與重組後所形成的次病毒分子，需輔助病毒(helper virus)協助，才能正常進行複製、包被和移行，因這些獨特的性質，缺失性 RNA 成為病毒學研究上常用之工具。本研究嘗試以人為及天然篩選的方式選殖 PiVX 之缺失性 RNA，以協助我們進一步探討 PiVX 之特性。首先利用實驗室先前已建立之 p35S-PiVX5 之感染性選殖株 (infectious clone)作為構築材料，利用限制酶進行截切，以構築五個人為缺失性 RNA (artificial defective RNA, aD RNA)。將五個人為缺失性 RNA 與輔助病毒共同接種至菸草原生質體中，以北方雜合反應進行分析，可發現五個人為缺失性 RNA 皆可在輔助病毒的協助下進行增殖。顯示當 PiVX 人為缺失性 RNA 保留 5'端 269 與 3'端 262 個核苷酸即具有被輔助病毒複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)辨識並複製之能力。進一步將五個人為缺失性 RNA 與輔助病毒共同接種至白藜植株上，則只有 PiVX-AB 與 EB 可觀察到增殖累積之情形。顯示 PiVX 缺失性 RNA 生物活性不僅受到保留區域，也受到長度及其它因素之影響。另一方面，從重複繼代接種 PiVX 的白藜植株與長期感染 PiVX 的紅龍果植株中，選殖出 9 種類型天然產生的 D RNA (naturally occurring D RNA, nD RNA)。將 9 種 PiVX 天然缺失性 RNA 與輔助病毒共同接種至白藜植株上，發現除從白藜選殖出之 PiVX-N3 與從紅龍果選殖出之 PiVX-P2、P3、P4 外，其餘皆可在白藜上被輔助病毒所增殖。在比對 PiVX 天然缺失性 RNA 所攜帶的轉譯架構與在白藜上增殖能力的測試結果後，可知是否維持原鞘蛋白之轉譯架構對 PiVX 缺失性 RNA 增殖能力並無影響。在比較不同缺失性 RNA 在白藜上增殖能力之差異後，我們推測 270-755 nt 間存在決定 PiVX 缺失性 RNA 是否具有在白藜上增殖能力之序列；經構築不同 5'端長度刪除株並測試後，已將此序列範圍縮小至 356-562 nt 之間。

進一步以點突變方式將所攜帶轉譯架構之啟始碼除去並接種測試，發現 PiVX 缺失性 RNA 在植物中累積量下降，但仍可進行增殖。顯示轉譯架構的維持對 PiVX 缺失性 RNA 增殖能力而言，並非必須。此外我們也嘗試在 PiVX 缺失性 RNA 重組蛋白上加上 myc 及 C4 蛋白標籤並接種測試，但在西方墨漬法的測試結果中，我們無法偵測到此重組蛋白之累積，顯示 PiVX 缺失性 RNA 轉譯架構在寄主細胞中的表現量不高或此重組蛋白較不穩定，可能也暗示了轉譯作用對 PiVX 缺失性 RNA 增殖能力影響大於其重組蛋白。而在本研究中，我們不僅成功以人為及天然選殖的方式取得 PiVX 之缺失性 RNA，並且也對其基本特性進行基礎分析，為研究 PiVX 提供了良好的資訊及材料。

關鍵詞：順勢作用子、缺失性 RNA、馬鈴薯 X 病毒屬、紅龍果、紅龍果 X 病毒



## Abstract

Pitaya (*Hylocereus* spp.), a climbing succulent plant in the family *Cactaceae* originating in Central and South America, is cultivated in Taiwan as a new tropical fruit. *Cactus virus X* (CVX), *Zygocactus virus X* (ZVX), and Pitaya virus X (PiVX) have been reported to infect pitaya in Taiwan. PiVX, a new *Potexvirus* identified in 2008, is a virus with short filamentous particles containing a single-stranded, positive-sense RNA genome. Genomic RNA of PiVX consists of 6677 nucleotides excluding polyA tail and five open reading frames (ORFs). Defective RNAs (D RNAs) are subviral RNAs produced from RNA virus genome by deletion and recombination. D RNA is dependent on its parental virus (helper virus) for normal replication, encapsidation and movement. Because of this unique character, D RNAs become useful tool in viral research. In this study, we created artificial D RNAs (aD RNAs) from the PiVX infectious clone (p35S-PiVX5) and clone naturally occurring PiVX D RNAs (nD RNAs). All five PiVX aD RNAs could be replicated in *Nicotiana benthamiana* protoplasts under the help of PiVX transcripts. This result suggested that 5' 269-nt region and 3' 262-nt region within PiVX aD RNA possibly contain the replication signal recognized by PiVX RNA-dependent RNA polymerase. When plasmid DNAs of PiVX and its aD RNAs were applied together onto *Chenopodium quinoa*, only the RNAs of PiVX-AB and EB were detected in the inoculated leaves. The data indicated that not only the domain of PiVX aD RNA but also the length of the domain could affect its biological activity. In addition, we have obtained nine groups of PiVX nD RNA clones from the inoculated leaves of *C. quinoa* by serial passages of inoculation and also from PiVX-infected pitaya. All nD RNAs could replicate in the presence of its helper virus in the inoculated leaves of *C. quinoa*

except PiVX-N3 from *C. quinoa* as well as PiVX-P2, P3 and P4 from pitaya. After comparing the predicted ORFs and the infectivity of PiVX nD RNAs, it demonstrated that the presence or absence of CP ORF did not affect the accumulation of PiVX D RNAs *in planta*. According to the results of inoculation and sequence analyses, we speculated the region from nt 270 to 755 may contain the sequence essential for the accumulation of PiVX D RNAs in *C. quinoa*. By testing PiVX-N1 deletion mutants, the indispensable sequence for PiVX D RNA accumulation was mapped to the region of nt 356 to 562. On the other hand, we constructed PiVX-N1D, an ORF-dysfunctional mutant of PiVX-N1, and inoculated it to *C. quinoa* to test the necessity of the PiVX D RNA ORF. Although the RNA accumulation decreased, PiVX-N1D is still detectable *in planta*. The results indicated that the existence of ORF is not crucial for PiVX D RNA accumulation in *C. quinoa*. Then, we added myc and C4 protein tags to the putative recombinant protein encoded by the PiVX D RNA ORF. Because this recombinant protein could not be detected by anti-myc and anti-C4 antibodies, suggesting that the expression of PiVX D RNA ORF was too low to be detected, or the recombination protein was very unstable in host cell. It also implied the translation itself is more important than the expressed recombination protein for PiVX D RNA accumulation in *C. quinoa*. In this study, we have constructed the aD RNA and cloned the nD RNA of PiVX successfully, and have studied their basic properties. These results may provide useful information and tools for future research of PiVX.

Key words: *cis*-acting element, defective RNA, *Potexvirus*, Pitaya, Pitaya virus X

## 壹、前言

由病毒所引起之病害廣泛分布於動物界與植物界中，並造成十分嚴重之損失。20 世紀以來，陸續於動植物中，發現一些次病毒級病原(subviral pathogen)，其主要分為衛星核酸(satellite RNA)、衛星病毒(satellite virus)與缺失干擾性病毒(defective interfering particle, DI particle)。其中，在動物病毒中普遍存在的為缺失干擾性病毒(Huang and Baltimore, 1970)，而衛星核酸與衛星病毒則主要於植物病毒中被報導(King *et al.*, 2011)。上述三個次病毒病原之共同點在於它們皆須輔助病毒(helper virus)協助進行正常之複製(replication)、包被(packaging)或移行(movement)，並皆具有調節輔助病毒表現之能力(Collmer & Howell, 1992; White & Morris, 1999)。而衛星核酸、衛星病毒與缺失干擾性病毒之間主要的差異為缺失干擾性病毒與其親緣病毒(parental virus)或親緣關係相近的輔助病毒具有基因體序列上的同源性，其原因為缺失干擾性病毒來自於親緣病毒基因體經缺失(deletion)與重組(recombination)後而產生，並因缺失部分基因體序列而失去自行增殖之能力；而衛星核酸與其輔助病毒基因體之序列同源性很低，其來源至今仍不清楚(Simon *et al.*, 2004; White & Morris, 1999)。

植物病毒中，最早被報導具有缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA, DI RNA)的為番茄矮化叢生病毒(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)(Hillman *et al.*, 1987)。之後，陸續有報導指出在不同之植物病毒中具有缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA (defective RNA, D RNA)(Graves *et al.*, 1996)，其中缺失干擾性 RNA 可視為具有干擾能力之缺失性 RNA。而自此之後，缺失性 RNA 便被大量應用在植物病毒學的研究與應用上。由於缺失性 RNA 源自其親緣病毒基因體之缺失與重組，故其可作為研究病毒 RNA 重組模式之研究材料；且缺失性 RNA 需依賴其輔助



病毒始能正常複製、包被及移行，故其序列上必定保留了可被輔助病毒蛋白所辨識之特定序列或結構(*cis-acting elements*)，故可藉由研究缺失性 RNA 了解病毒如何進行複製、包被及移行(Pathak & Nagy, 2009)。

本研究以紅龍果 X 病毒(Pitaya virus X, PiVX)作為研究對象。PiVX 屬於 *Potexvirus* 屬病毒，主要感染仙人掌科(Cactaceae)之植物，病毒顆粒成短絲狀，基因體為正意單股 RNA，全長不含 polyA 共有為 6677 個核苷酸(李, 2010)。本研究欲以人為構築以及天然選殖兩種方式，嘗試選殖出 PiVX 之缺失性 RNA，以協助進一步了解 PiVX 之分子生物學特性，並評估 PiVX 缺失性 RNA 之應用潛力，以期提供 *Potexvirus* 屬病毒研究更多資料。



## 貳、 前人研究

### 一、 動物與植物病毒缺失性 RNA 研究歷史與進程

最早關於不完全病毒顆粒(incomplete virus particles)之描述出現在 1944 年，Friedewald 在進行流行性感冒病毒(influenza virus)的純化實驗時，發現高濃度的流行性感冒病毒顆粒在進行高速梯度離心後，病毒顆粒被分成 700 S 與 460 S 兩群，其中 460 S 的病毒顆粒被重新純化後進行分析，發現其不具有感染能力，當時認為這些 460 S 的病毒顆粒可能為病毒解體過程中的中間產物(Friedewald, 1944)。其後，von Magnus 於 1954 年，第一次對 DI particle 進行了較詳盡的報導，von Magnus 將高濃度之流行性感冒病毒以連續繼代接種的方式感染雞胚細胞(embryonated chicken eggs)後，出現了一些不完全的病毒顆粒，進一步研究後，發現這些不完全病毒顆粒可以干擾野生型病毒的增殖，但並不清楚這些不完全病毒顆粒缺失部分為何(Von Magnus, 1954)。直到 1956 年，Lief 與 Henle 發現不完全病毒顆粒具有比野生型病毒較低比率的核蛋白與表面抗原(nucleoprotein/surface antigen)，至此方認為不完全病毒顆粒缺失之部分為基因體核酸(Henle and Lief, 1956)。這些不完全病毒顆粒因缺失了親緣病毒之部分基因體，故不完全病毒顆粒比正常之親緣病毒顆粒來得小，並且可以電子顯微鏡觀察到此以一現象(Hackett, 1964)。1970 年 Huang 與 Baltimore 將此種來自動物病毒之不完全病毒顆粒正式稱之為 DI particle，並作了以下之定義描述：DI particle 基因體由具感染力之親緣病毒基因體的部分序列所組成，其具有與野生型病毒相同之構造蛋白及抗原性，但需要親緣關係相近之輔助病毒協助其增殖，且其增殖潛力可能較其輔助病毒來得更高，並因此干擾輔助病毒之增殖(Huang and Baltimore, 1970)。之後，陸續有以高濃度動物病毒連續繼代接種至培養的細胞後產生 DI particle 之報導(Cole *et al.*, 1971)，並且發現此一現象在動物病毒中普遍出現，但仍與病毒種類、寄主細胞種類與偵測方式有密切之關聯(Roux *et al.*, 1991)。

雖然 DI particle 在動物病毒中相當常見，但在植物病毒中卻是一直沒有相關之報導，反而是很早就有植物病毒與衛星病毒或衛星核酸共存之報導與研究 (Francki, 1985; Prody *et al.*, 1985)。直到 1987 年，Hillman 等人以 TBSV 接種至菸草 (*Nicotiana clevelandii*) 時，發現菸草病徵有緩和的情況，抽取 RNA 以北方雜合反應分析後，發現此現象伴隨著 0.4 kb 左右的小分子 RNA 的出現；進一步以不同濃度之小分子 RNA 與 TBSV 共同接種至菸草上，並觀測植物病徵之表現與 TBSV 病毒之含量，結果顯示當小分子 RNA 的濃度越高時，在菸草上之病徵程度越緩和，葉片中之病毒量亦相對減少 (Hillman *et al.*, 1987)。純化這些小分子 RNA 並進行定序，發現這些小分子 RNA 由 4 段保守性序列所組成，分別來自 TBSV 基因體之 5' 端、中間部位及 3' 端，亦表示這些小分子 RNA 與 TBSV 具有序列上之同源性。因這些小分子 RNA 之特性與動物病毒 DI particle 性質相當接近 (Huang and Baltimore, 1970)，故 Hillman 等人認為此小分子 RNA 應為植物病毒之缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA, DI RNA)，因此 TBSV 成為第一個被報導具有缺失干擾性 RNA 之植物病毒 (Hillman *et al.*, 1987)。

其後，Knorr 等人為了探討 TBSV 缺失干擾性 RNA 之來源，將不含缺失干擾性 RNA 之 TBSV 分離株分別以高濃度與低濃度連續繼代接種至兩種菸草 (*N. clevelandii* and *N. benthamiana*) 上，並觀察接種之菸草上是否出現缺失干擾性 RNA，結果顯示，當以高濃度之 TBSV 繼代接種時，於數代後可於菸草上偵測到缺失干擾性 RNA，反之以低濃度 TBSV 繼代接種則無法觀察到此一現象 (Knorr *et al.*, 1991)。由此可知 TBSV 缺失干擾性 RNA 來自新產生之親緣病毒缺失體，而非由已存在之野生型病毒與缺失干擾性 RNA 混合物中所得，且 TBSV 缺失干擾性 RNA 可以人工方式於實驗室中誘導產生 (Knorr *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1989)。接下來的數十年中，陸續有植物病毒被報導具有缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA，

包括有：tombusviruses (Burgyan & Grieco, 1989; Hillman *et al.*, 1987; Rochon, 1991)、carmoviruses (Li *et al.*, 1989)、potexviruses (Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)、furoviruses (Bouzoubaa *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994)、bromoviruses (Damayanti *et al.*, 1999; Pogany *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1993)、closteroviruses (Mawassi *et al.*, 1995)及 cucumoviruses (Graves & Roossinck, 1995)等。由於缺失性 RNA 獨特的性質與應用性，除了病毒本身自然產生之天然缺失性 RNA(naturally occurring D RNAs, nD RNAs)外，亦有以人工方式構築人為缺失性 RNA(artificial defective RNAs, aD RNAs)之例子(Hehn *et al.*, 1994; Marsh *et al.*, 1991)。

## 二、 缺失性 RNA 之特性

植物病毒中存在著許多次病毒級之小分子核酸，包括：衛星核酸、衛星病毒及缺失性核酸或是前述之混合體(Li *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1991)。這些小分子核酸皆沒有自行增殖之能力，需要其輔助病毒的協助方能正常增殖，但卻常擁有調節輔助病毒複製或病徵之能力。其中，衛星核酸/衛星病毒與缺失性 RNA 最大的不同點為缺失性 RNA 來自於其親緣病毒基因體經缺失與重組後產生，故和親緣病毒或親緣關係相近之輔助病毒具有序列上之同源性，而衛星核酸/衛星病毒則不具此種同源性，其來源至今仍不清楚(Simon *et al.*, 2004; White & Morris, 1999)。在植物病毒缺失性 RNA 中，輔助病毒一般即為其親緣病毒，但亦有缺失性 RNA 可被不同之輔助病毒協助複製累積之例子，且若為缺失干擾性 RNA，其對病徵表現之干擾情形亦有可能因不同之輔助病毒而有所不同(Takeshita *et al.*, 2009)。植物病毒缺失干擾性 RNA 大多具有減輕病徵之能力，但也有使病徵加重之例子(Li *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1993)。而在 *Furovirus* 與 *Potexvirus* 中發現之缺失性 RNA 並不具有干擾病徵表現之能力，因而稱之為缺失性 RNA(defective RNA, D RNA)(Chen *et al.*, 1994; White *et al.*, 1991)。

分析植物缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 可以發現，可依其基因體之不同組成型態分為兩型，其一為鑲嵌型(mosaic type)，此類型缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 為由其親緣病毒基因體數個不連續之區域片段直接或是部分重組後接合而成；其二為單一片段移除型(single internal deletion type)，此型為其親緣病毒基因體中段發生大片段缺失，而剩餘不等長之 5'端與 3'端重新組合而成(李, 2000)。在動物病毒缺失干擾性 RNA 大多被其鞘蛋白包被為 DI particle 形式，以維持病毒顆粒與寄主細胞之受體相互辨識之過程(Roux *et al.*, 1991)。但有些植物病毒之系統性移行並非必須以完整病毒顆粒之形式進行，故植物病毒缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA 可以是裸露之核酸，鞘蛋白之包被並非必須(Rochon *et al.*, 1994)。因此可知，植物病毒缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA 序列上必定帶有複製相關之序列，但卻未必具有與鞘蛋白包被相關之序列(van der Most *et al.*, 1991; White *et al.*, 1991)。

缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 大多維持一個轉譯架構，預期此轉譯架構可產生一重組蛋白，許多病毒之缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA 已可在寄主細胞中被偵測到有此重組蛋白累積(Makino *et al.*, 1988; Sandoval *et al.*, 2008)。而此一轉譯架構被認為對缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 之增殖能力具有相當之影響，事實上，轉譯架構存在與否對不同的缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 具有不同之重要性，舉例而言：在竹嵌紋病毒(*Bamboo mosaic virus*, BaMV)的研究中，將 BaMV 缺失性 RNA D20 之轉譯架構以單點突變的方式移除後，D20 即失去了被 BaMV 增殖之能力(李, 2000)；但在雞傳染性支氣管炎病(*Infectious bronchitis virus*, IBV)缺失干擾性 RNA CD-91 的研究中，轉譯架構之存在並不影響其被輔助病毒增殖的能力(Pénzes *et al.*, 1996)。

### 三、 缺失性 RNA 之形成與演化

目前針對缺失性 RNA 之形成機制主要有二種假說(Pathak & Nagy, 2009)。第一種稱之為 replicase driven template-switching mechanism，其主要假設為當病毒基因體 RNA 進行複製時，複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)因模板股序列特性或是其他原因自原本之模板脫落，並攜帶尚未複製完成之新股 RNA 移至下游或另一個模板股上重新啟始複製，以此種方式形成重組突變株或缺失性 RNA (Nagy & Simon, 1997)。在包括 TBSV 在內的一系列病毒 RNA 重組的研究中，發現在進行生體外 RNA 複製作用時，當捐贈股(donor template)上具有斷裂(breaks)、髮夾狀結構(hairpin structures)及富含 AU 片段(AU-rich stretches)時，複製酶有較大的機會脫落(Cheng & Nagy, 2003; Pogany & Nagy, 2008; Wierzoslawski & Bujarski, 2006)；另外，獲贈股(acceptor template)上，與複製酶脫落後攜帶之新生 RNA 與具有互補性(complementarity)之區域，可能為複製酶重新起始複製的熱點(hot point)(Nagy & Simon, 1997)，此種互補之片段最短只需 2-5 核苷酸之互補，即能明顯促進複製酶重新起始複製作用。此一機制被認為是缺失性 RNA 最有可能之形成機制(Pathak & Nagy, 2009)。第二種機制為 forced template-switching mechanism，此機制可能發生於複製酶未完成或已完成新生 RNA 之合成時，和前述機制相同，複製酶可能會脫落並移至另一模板股，重新起始複製作用並完成複製作用，但新生 RNA 會受到寄主細胞之內切或外切核酸酶(endo- and exoribonuclease)之作用而斷裂，並重新接合產生缺失性 RNA (Pathak & Nagy, 2009; Zhang & Nuss, 2008)。

缺失性 RNA 形成後並非一成不變，而是如同病毒般不斷以核苷酸突變或 RNA 重組之方式進行演化。一般而言，因缺失性 RNA 具有較高之基因可塑性(genetic plasticity)，缺失性 RNA 演化之速度遠快於其親緣病毒(Pathak & Nagy, 2009)。許多因子皆有可能影響缺失性 RNA 之演化，其中最重要之因子為競爭複

製酶(Pathak & Nagy, 2009)。在實際的演化表現上，移除不必要之序列片段(deletion)為常見的方向，以 TBSV 缺失干擾性 RNA 為例，DI-73 在菸草內會逐漸缺失一段序列而演化為 DI-72，這段被移除之序列上帶有一個類似轉譯作用增強子(enhancer)之結構，而轉譯作用因子和 RNA 的結合會影響複製酶和 RNA 之結合，進而影響缺失干擾性 RNA 之複製，因此移除這段序列對於 TBSV 缺失干擾性 RNA 複製而言，是相對有利的(White & Morris, 1994a)。同樣在 TBSV 缺失干擾性 RNA 中，DI-73 亦有演化為 DI-R1 之現象，DI-R1 相較於 DI-73 多具有一段重複的 130 個核苷酸片段，而 DI-R1、DI-73 及 DI-72 分別接種比較後，發現 DI-R1 具有最佳的複製能力(White & Morris, 1994b; Wu & White, 1998)。而此重複出現的序列片段具有被 TBSV 複製蛋白 p33 所辨識之能力，故可提供 DI-R1 更多 *cis-acting elements*，以競爭複製酶之結合(Pogany *et al.*, 2005)。因缺失性 RNA 演化之特性，相同之親緣病毒在不同寄主、環境和時間點，所攜帶之缺失性 RNA 亦有可能不同(Llamas *et al.*, 2004; Zhang & Nuss, 2008)。

#### 四、 缺失干擾性 RNA 干擾能力之來源研究

目前對於缺失干擾性 RNA 干擾能力由來之來源研究主要可分為三個方向。其一為研究缺失干擾性 RNA 和其輔助病毒之競爭關係，缺失干擾性 RNA 序列上帶有和複製、包被及移行等病毒生理功能相關之 *cis-acting elements*，因此具有和輔助病毒競爭相關的病毒與寄主蛋白之能力，這些蛋白可能為複製酶、鞘蛋白、移動蛋白、轉譯相關蛋白及寄主輔助蛋白等，進而影響輔助病毒在寄主細胞之增殖與累積；而缺失干擾性 RNA 具有較輔助病毒高之增殖潛力，故此競爭作用對輔助病毒影響較大，於表型即出現病徵之干擾現象(Jones *et al.*, 1990)。其二為研究缺失干擾性 RNA 針對病毒因子(viral factors)之調節能力，在 TBSV 與其缺失干擾性 RNA 相關研究中，發現 TBSV 移動蛋白 p22 下降程度遠大於 TBSV 複製酶下降程度，並且移動蛋白 p22 在時間與空間上之分布皆出現明顯改變，代表缺

失干擾性 RNA 必定對某些病毒因子有特定之影響，但詳細之機制仍須進一步研究(Scholthof *et al.*, 1995)。其三則是針對缺失干擾性 RNA 啟動或增強轉錄後基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)之研究，在 tombusvirus 缺失干擾性 RNA 的研究中，缺失干擾性 RNA 不僅會減少基因沉默抑制蛋白 p19 的累積，也會增加 siRNA 的產生(Havelda *et al.*, 2005)，且誘導 PTGS 發生後，PTGS 對輔助病毒 RNA 之影響也大於對缺失干擾性 RNA 之影響(Szittyta, 2002)，但其中詳細之機制至今仍不清楚。由前述可知，缺失干擾性 RNA 對輔助病毒干擾能力的形成並無法以單一因素概括，而是由多個因素參與並產生交互作用之複雜過程。

## 五、 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 之研究

關於 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 最早之報導為 1991 年，學者 White 等人於感染系統性寄主蠶豆的首蓿黃化嵌紋病毒(*Clover yellow mosaic virus*, CIYMV)分離出約 1.2 kb 之小分子 RNA，經序列分析後，發現其為 CIYMV 基因體 RNA 缺失體，並且也需其親緣病毒作為輔助病毒協助其進行增殖，但與先前發現之缺失干擾性 RNA 不同處為其不具有明顯干擾輔助病毒之能力，因而稱之為缺失性 RNA。其序列為由 CIYMV 基因體 5'端 757 個核苷酸與 3'端 415 個核苷酸所組成，並維持一個包含 5'端複製酶部分之 221 個胺基酸與 3'端鞘蛋白部分之 91 胺基酸所組成之融合蛋白轉譯架構(White *et al.*, 1991)。為了解此融合蛋白轉譯架構對 CIYMV 缺失性 RNA 增殖之影響，以人為方式插入或移除 6 個核苷酸並不影響 CIYMV 缺失性 RNA 之增殖，但當插入或移除 4 個核苷酸時，則 CIYMV 缺失性 RNA 失去增殖之能力，因此可知，此融合蛋白轉譯架構之維持對 CIYMV 缺失性 RNA 增殖能力而言是重要的(White *et al.*, 1992)。其後，於 1996 年，亦有報導指出樹薯嵌紋病毒(*Cassava common mosaic virus*, CsCMV)中具有約 1.1 kb 的缺失性 RNA 之存在，其由 CsCMV 基因體 5'端 876 個核苷酸與 3'端 216 個核苷酸所組成，和 CIYMV 缺失性 RNA 相同，其序列維持了一個包含 5'端複



製酶部分 263 個胺基酸與 3'端鞘蛋白部分 33 胺基酸所組成之融合蛋白轉譯架構 (Calvert *et al.*, 1996)，但其生物特性尚待進一步研究。

在 1999 年，Yeh 等人於將 BaMV 連續接種於菸草(*N. benthamiana*)後，發現有缺失性 RNA 之產生(Yeh *et al.*, 1999)。本實驗室將疑似帶有缺失性 RNA 之病毒顆粒抽取 RNA 並進行選殖，從中得到數個缺失性 RNA 選殖株，其中最具增殖能力者為 D20，經定序分析後，發現其 D20 由 BaMV 基因體 5'端 868 個核苷酸與 3'端 252 個核苷酸所組成，但其和 CIYMV 與 CsCMV 缺失性 RNA 不同的是，D20 並未維持一由複製酶與鞘蛋白胺基酸所組成之融合蛋白轉譯架構，但仍具有一個由 5'端複製酶部分 258 個胺基酸與改變轉譯架構後的 4 個非鞘蛋白胺基酸組成之轉譯架構(李, 1997)。而將此轉譯架構以單點突變的方式移除後，D20 即失去了被 BaMV 增殖之能力，顯示此轉譯架構之維持對 BaMV 缺失性 RNA 之增殖仍有相當大之影響(李, 2000)。由前述研究可知，*Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 皆為親緣病毒基因體中間序列發生大片段移除後重組而成，但是否須維持複製酶與鞘蛋白融合蛋白轉譯架構則並不一定，但 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 上所攜帶之轉譯架構存在與否對其增殖能力仍有相當程度之影響。

## 六、 缺失性 RNA 之應用

缺失性 RNA 具有獨特生物之活性與性質，而其較小之基因體序列長度，使其較易進行分生技術上之操作，成為病毒學研究上常用之工具。缺失性 RNA 需依賴輔助病毒始能正常被複製、包被與移行，故其所保留之序列上必定帶有可被輔助病毒蛋白所辨識並行使功能之 *cis-acting element*，因而利用缺失性 RNA 進行病毒序列特性之研究。除本身即天然具有缺失性 RNA 之病毒外，亦有以人為方式構築缺失性 RNA 以協助研究進行，其中馬鈴薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)細胞間移動相關序列即為一例(Lough *et al.*, 2006)。而缺失性 RNA 普遍具有較高

演化速度，且其本身即是由親緣病毒基因體經缺失與重組而成，因此，在病毒演化及 RNA 重組研究上，缺失性 RNA 亦是常使用之研究材料(Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。另一方面，缺失干擾性 RNA 重要特性之一為其大多具有減輕病徵表現之能力，使其具有在植物保護上應用之潛力；實際上，已有將蕙蘭輪點病毒 (*Cymbidium ring spot virus*, CymRSV) 的缺失干擾性 RNA 以轉基因方式，使菸草自行轉錄出缺失干擾性 RNA，並成功使病徵大減輕之例子(Burgyan & Grieco, 1989; Kollár *et al.*, 1993)。另外，許多缺失性 RNA 具有轉譯架構，並可在寄主細胞中轉譯出重組蛋白，此種特性使缺失性 RNA 具有成為病毒載體，以表現外源蛋白之潛力(Sandoval *et al.*, 2008)，且因其擁有較輔助病毒佳之複製能力，其表現外源蛋白量較一般病毒載體高為極大之優勢(Lico *et al.*, 2008; Qiu & Scholthof, 2007)。

## 七、 紅龍果與紅龍果 X 病毒之簡介

紅龍果(pitaya)為仙人掌科(Cactaceae)三角柱屬(*Hylocereus* spp.)之多年生攀緣性肉質植物。其原產於墨西哥、加勒比海域及中南美洲熱帶雨林，故喜高溫多雨之環境，具肉質狀三角莖，全株皆可食用，其中果實碩大且深具營養價值(劉等, 2004)。台灣栽種最早之紀錄為 1645 年由荷蘭人所引進栽種，其後，於 1953 年再由波多黎各引入，於全台各地普遍栽種，並於最近十多年開始大規模進行經濟栽培(徐, 2004; 楊, 1984)。根據行政院農委會之統計，2011 年全國紅龍果栽種面積達 827 公頃，主要集中於中部地區，其中又以彰化二林最具規模，年總產量為 1 萬 9341 公噸，年產值可達 4 億 4 千萬元，為近幾年發展迅速之新興果樹。在相關病害方面，紅龍果栽培主要受到真菌性及病毒病害之限制，真菌性病害以果莖潰傷病(*Neoscytalidium dimidiatum*) (Chuang *et al.*, 2012)、莖腐病(*Fusarium* spp.)、褐斑病(*Botryodiplodia dothidea*)以及炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)較為嚴重(王等, 2005; 林等, 2006)；病毒病害目前則有三種，除最早被報導具有

感染紅龍果能力之仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX)外，本實驗室於 2006 年至 2008 年間，於陽明山紅龍果園分離出台灣首次報導之蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZVX)以及一種新發現之病毒，我們將它命名為紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)。PiVX 病毒顆粒為絲狀，長約 450-500 nm，寬約 12-13nm。其經選殖與定序後，發現 PiVX 基因體不含 polyA 具有 6677 個核苷酸，並具有和 potexvirus 相同基因體組成，故其應為 *Potexvirus* 屬之成員(毛, 2008)。經寄主範圍測試後，PiVX 雖然只能感染紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)、番杏(*Tetragonia expansa*)及羽狀雞冠花(*Celosia argentea*)之接種葉，但卻可系統性感染白藜及紅龍果，並可在白藜上產生黃化及壞疽病斑，在紅龍果上形成黃化嵌紋病徵(李, 2010)。進一步採集全台各地火龍果園之樣本進行檢測後，發現台北、宜蘭、彰化及台東知紅龍果園皆已受到 PiVX 之感染，其中彰化地區感染比例高達 93.4%，由此可知 PiVX 已成為台灣紅龍果栽培重要的威脅因子(毛, 2008)。故本實驗室於 2010 年構築了 PiVX 具感染力之選殖株，提供了對 PiVX 進行研究之良好材料(李, 2010)。雖然如此，但我們對 PiVX 仍有許多不清楚的地方。

#### 八、 研究目的

本研究嘗試以 PiVX 作為材料，以人工構築或天然選殖方式嘗試選殖 PiVX 之缺失性 RNA，並對其基礎分子生物特性與生物活性進行測試，期望能協助進一步了解 PiVX 與仙人掌科植物病毒之生物特性，並提供 *Potexvirus* 屬植物病毒研究，除 PVX 與 BaMV 外更多之研究資料，同時評估 PiVX 缺失性 RNA 之應用潛力。

## 參、 材料與方法

### 一、 病毒材料

p35S-PiVX5 為來自陽明山紅龍果園的紅龍果病毒 X 分離株 PiVX-P37 之全長 cDNA，嵌入具有 CaMV 35S 啟動子的 p35S-GFP 載體 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) 中(李, 2010)。其可以機械接種方式系統感染紅龍果(*Hylocereus undatus*)與白藜(*Chenopodium quinoa*)，並在紅龍果上產生嵌紋病徵，在白藜上產生黃化病徵此外，p35S-PiVX5 亦可以感染單細胞的方式感染菸草(*Nicotiana benthamiana*)細胞(李, 2010)。

### 二、 實驗植物與栽種

本研究使用的植物主要為白藜(*C. quinoa*)與菸草(*N. benthamiana*)。栽種方式為將乾燥的種子，以適當數量播種在以泥炭土填滿之穴盤中，不進行覆土，並維持泥炭土保持潮濕，光照維持每日約 16 小時。待植物發芽約二週後，將植物幼苗移置裝有泥炭土與根基旺(2:1)的黑色軟盆內，並開始每週施用肥料，待白藜生長約 4-5 週與菸草 6-9 週後，即可進行相關實驗。

### 三、 PiVX 人為缺失性 RNA 之構築

#### A. 人為缺失性 RNA 之構築

以 p35S-PiVX5 為材料，參考已發表之 *Potexvirus* 屬植物病毒之缺失性 RNA 序列保留重組區域(Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)，在其上選擇適合之限制酶酵素切位：*Age*I (nt 1621, nt 5767)、*Bst*XI (nt 2074, nt 6285)、*Eag* I (nt 1437)與 *Msc*I (nt 269, nt 6316)，並以這些切位做為端點，構築一系列 PiVX 人為缺失性 RNA。其方法如下所述：PiVX-MM 來自 p35S-PiVX5 與 *Msc*I (10 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)反應後，以 1% agarose gel/1X TAE (附錄)進行電

泳分析，並對目標片段進行核酸回收後，直接進行接合反應，此人為缺失性 RNA 缺少 PiVX 基因體 nt 270-6415 之核酸片段，保留了 5'端 269 與 3'端 262 個核苷酸。PiVX-AA 則為將 p35S-PiVX5 以 *AgeI* (10 U/ $\mu$ L, NEB)反應後，進行電泳分析，並對目標片段進行核酸回收後，進行接合反應，預期此人為缺失性 RNA 缺少 PiVX 基因體 nt 1622-5809 之核酸片段，保留了 5'端 1621 與 3'端包括大部分鞘蛋白基因在內的 868 個核苷酸。PiVX-BB 來自將 p35S-PiVX5 以 *BstXI* (5 U/ $\mu$ L, NEB)進行酶切後，以 Mung bean nucleae (10 U/ $\mu$ L, NEB)移去切位凸出的部分，接著進行電泳分析，並對目標片段進行核酸回收後，再進行接合反應，預期此人為缺失性 RNA 缺少 PiVX 基因體 nt 2075-6284 之核酸片段，保留了 5'端 2074 與 3'端 393 個核苷酸。PiVX-AB 則是將 p35S-PiVX5 以 *AgeI* 和 *BstXI* 反應後，以 Mung bean nucleae 除去切位凸出的部分後，進行電泳分析，並對目標片段進行核酸回收，再進行接合反應，預期其缺失了 PiVX 基因體 nt 1620-6284 之片段，保留了 5'端 1619 與 3'端 393 個核苷酸。PiVX-EB 為將 p35S-PiVX5 以 *EagI* 和 *BstXI* 進行酶切反應後，以 Mung bean nucleae 移去切位突出部分，隨後進行電泳分析，並對目標片段進行核酸回收，並進行接合反應，預期此人為缺失性 RNA 缺失了 PiVX 基因體 nt 1438-6284 之片段，保留了 5'端 1437 與 3'端 393 個核苷酸。以上一系列人為缺失性 RNA 進行接合反應後，再以勝任細胞進行轉型試驗，篩選正確選殖株後皆進行定序，以確定其基因組成。

## B. 核酸回收

使用 QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany)回收 DNA。將酶切產物以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，以 EtBr 染色後，在 UV 燈箱上，將含有預選殖片段之膠體切下，放入 1.5 mL 微量離心管中，並以電子微量天平秤取膠體重量。加入 3 倍膠體體積之 QX1 (QIAGEN)與 10  $\mu$ L 之 QIAEX II (QIAGEN)後，置於 50°C 水浴槽 10 分鐘，期間每隔 2 分鐘取出上下搖

晃，使膠體均勻溶解。取出微量離心管，以 13,000 rpm (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA)離心 1 分鐘後，移去上清液。再加入 500  $\mu$ L QX1，輕拍使其中 QIAEX II 均勻懸浮後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，移除上清液，再加入 500  $\mu$ L PE buffer，並輕拍使其中之 QIAEX II 均勻懸浮，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，此步驟重複兩次。最後移去上清液，並靜置於室溫 10 分鐘風乾，以除去殘留之酒精。最後，加入 30  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，輕拍使 QIAEX II 均勻懸浮後，置於 50°C 水浴槽 5 分鐘。接著以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，吸取上清液至新的微量離心管中，此即為回收之核酸片段，可置於置於-20°C 冰箱中備用。

### C. 接合反應

取 1.5 mL 微量離心管，在其中加入核酸回收純化產物 7.5  $\mu$ L、1  $\mu$ L 10X Ligation buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、0.5  $\mu$ L 10 mM ATP 和 1  $\mu$ L 之 T4 DNA ligase (5 U/ $\mu$ L, Fermentas)使總體積為 10  $\mu$ L。震盪均勻混合後，於 4 °C 冰箱中作用一個晚上，接著進行轉型作用。

### D. 轉型試驗

#### 1. 勝任細胞(competent cell)之製備

自-80°C 冰箱取出保存之 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*E. coli* DH5 $\alpha$ )菌株，畫線培養於 Luria agar (LA) (附錄)平板培養基上，置於 37°C 培養箱培養 14 小時，待長出單一菌落後，挑選任意單一菌落接種至 5 mL Luria-Bertani broth (LB) (附錄)液態培養基中，置於 37°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養。14 小時後取 10  $\mu$ L 之菌液接種至 200 mL SOB (附錄)液態培養基中，置於 26°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養 16 小時(OD 600 = 0.5-0.6)，取出培養瓶並置於冰上 10 分鐘，接著將菌液移至已預冷之 50 mL 離心管中，以 1,250 rpm (Centrifuge Z383 K, HERMLE, Wehingen,

Germany)於 4°C 離心 10 分鐘。之後移去上清液，加入 20 mL TB buffer (附錄)，並小心將沉澱菌塊重新懸浮，接著置於冰上 10 分鐘後，以 1,250 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘。移去上清液後，再加入 1.5-2 mL TB buffer 重新懸浮菌塊，接著加入 DMSO 至終濃度為 7%，即可以每管 130  $\mu$ L 分裝並置於 -80°C 冰箱備用(Inoue *et al.*, 1990)。

## 2. 轉型試驗

從 -80°C 冰箱取出 *E. coli* DH5 $\alpha$  勝任細胞，置於冰中待其回溫解凍。取 10  $\mu$ L 接合反應產物，加入 130  $\mu$ L 勝任細胞中，輕輕搖晃並置於冰上 30 分鐘後，以 42°C 熱休克處理 90 秒，在移至冰上 5 分鐘，接著加入 1 mL 2X YT (附錄)液體培養基，置於 37°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養 40 分鐘後，以 8,000 rpm (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA)離心 5 分鐘。保留 100  $\mu$ L 上清液和菌塊混合後，將菌液均勻塗佈於含有 100 ppm ampicillin 之 LA 平板培養基上，於 37°C 培養箱培養 12-16 小時(Sambrook *et al.*, 1989)。

### E. 正確選殖株之篩選

#### 1. 菌落聚合酶連鎖反應

隨機挑選前述 LA 平板培養基上之單一菌落進行 colony PCR。首先配製 PCR 反應溶液，在 0.2 mL PCR tube 中，加入 4.6  $\mu$ L 之 ddH<sub>2</sub>O，並各加入 0.2  $\mu$ L 之 5  $\mu$ M 正向及反向引子對(PiVX-F 與 PiVX-dT Bam)，接著再補入 5  $\mu$ L 之 2X Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon; Bie and Berntsen A/S, Rødovre, Denmark)混合均勻後，沾取少量單一菌落至反應溶液內，並混合均勻。接著以 TPersonal Thermocycler (Whatman Biometra GmbH, Gottingen, Germany)以下列條件進行反應：94°C 反應 5 分鐘，接著進行 94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/30-150 秒的 25 個循環之反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。取 5  $\mu$ L 之 colony

PCR 產物以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析。從中挑選具預期片段大小之菌株進行質體小量製備。

## 2. 質體 DNA 之小量製備

使用 Mini-Plus™ Plasmid DNA Extraction System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA)進行質體 DNA 之小量製備。挑選單一菌落接種至 5 mL 含有 100 ppm ampicillin 之 LB 液態培養基中，於 37°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養 12-16 小時。接著利用 Mini-Plus™ Plasmid DNA Extraction System 進行質體 DNA 製備。首先將 1.5 mL 菌液裝入 1.5 mL 微量離心管中，並以 12,000 rpm (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA)離心 1 分鐘後，除去上清液，留下下方沉澱的菌體，重複前述步驟二次。接著在微量離心管中加入 200  $\mu$ L 之 MX 1 buffer (含 RNase，存放於 4°C)，以震盪器將菌體重新均勻懸浮，再加入 250  $\mu$ L 之 MX 2 buffer，輕輕上下翻轉，使其均勻混合並轉為澄清，於室溫靜置 5 分鐘以使其破菌完全。最後，加入 350  $\mu$ L 之 MX 3 buffer，輕輕上下翻轉使其混合均勻後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘。組合 Mini-Plus™ column 和 Collection tube，將離心過後之上清液倒入 Mini-Plus™ column 中，以 9,000 rpm 離心 1 分鐘後，除去 Collection tube 中的濾出液。接著在 Mini-Plus™ column 中加入 500  $\mu$ L 之 WN buffer，以 9,000 rpm 離心 1 分鐘後，除去 Collection tube 中的濾出液。再加入 700  $\mu$ L 之 WS buffer，以 9,000 rpm 離心 1 分鐘後，除去濾出液。並再以 13,000 rpm 離心 5 分鐘後，至於室溫風乾 5 分鐘，以除去 Mini-Plus™ column 中的殘存酒精。最後將 Mini-Plus™ column 組合至新的微量離心管中，並在 Mini-Plus™ column 中心加入 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，於室溫靜置 2 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘將質體 DNA 重新流洗至微量離心管中。再以分光光度計(NanoDrop® ND-1000, Thermo, Wilmington, USA)測量其濃度，置於-20°C 冰箱備用。



### 3. 篩選

選擇構築時所使用的限制酶，搭配其它適合之限制酶，對少量製備之質體 DNA 進行酶切反應，並以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，挑選其中正確之選殖株，進行大量質體製備，以進行後續之試驗。

## 四、 PiVX 天然缺失性 RNA 之選殖

### A. PiVX 天然缺失性 RNA 之誘導

將 p35S-PiVX5 以每葉 10  $\mu$ g 接種至 4 週大之白藜，7 天後摘取接種葉，取其中之 0.1 g，置於研鉢中，加入 1 mL 之 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 與適量的矽藻土(celite)，以研鉢磨碎後，接種至健康的 4 週大白藜。另再取 0.1 g 之接種葉，進行北方雜合分析，以偵測其 PiVX 是否可經由連續繼代接種產生天然缺失性 RNA。另一組於接種 p35S-PiVX5 3 天後，於接種葉再接入 10  $\mu$ g 人為缺失性 RNA 選殖株，以觀察是否能加快天然缺失性 RNA 的誘導產生。另一方面，我們也嘗試由 2010 年接種 PiVX-P37 至今之紅龍果植株中篩選天然缺失性 RNA。

### B. 小量植物全 RNA 之萃取

使用 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA)，為避免 RNase 之污染，全程保持低溫並使用手套，且所有操作皆使用 RNA 操作專用器具，研鉢與杵則事先以鋁箔紙包覆，於 180°C 處理 4 小時，除去 RNase 後，冷卻備用。秤取 0.1 g 之植物接種葉，置於研鉢中，加入適量液態氮，待葉片組織完全冷凍後，以杵研磨葉片組織至粉末狀，再重複倒入液態氮並研磨，盡量打破植物細胞後，快速將粉末倒入 1.5 mL 微量離心管中。趁組織粉末尚未完全解凍，在微量離心管中加入 450  $\mu$ L RX 或 PRX buffer(含  $\beta$ -mercaptoethanol)，以震盪器劇烈震盪 15 秒鐘。接著將 Shearing tube 和 Collection tube 組合，將震

盪過後之混合液倒入 Shearing tube 中，以 13,000 rpm (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 2 分鐘，以除去植物殘存組織。取出 Collection tube 中的濾液，移入裝有 230  $\mu$ L 100% 酒精之微量離心管中混合均勻。組裝 Plant Total RNA Mini Column 至 Collection tube 上，將前述混合液吸取至 Plant Total RNA Mini Column，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，除去 Collection tube 中的濾液，並在 Plant Total RNA Mini Column 加入 500  $\mu$ L 之 WF buffer，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，接著，將 Collection tube 中的濾液除去。吸取 700  $\mu$ L WS buffer 加入 Plant Total RNA Mini Column 中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，除去 Collection tube 中的濾液，重複以 WS buffer 清洗之步驟 1 次。接著將 Plant Total RNA Mini Column 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，除去殘留之 WS buffer。再靜置於室溫 5 分鐘以除去 Plant Total RNA Mini Column 中殘留之酒精。最後，在 Plant Total RNA Mini Column 中心加入 40  $\mu$ L 之 RNase-free ddH<sub>2</sub>O，於室溫靜置 2 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘將植物全 RNA 流洗至微量離心管中。以分光光度計(NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000, Thermo, Wilmington, USA) 測量其濃度，並取其中 3  $\mu$ L 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，剩餘植物全 RNA 則置於 -80°C 冰箱備用。

### C. 反轉錄反應

反轉錄反應操作過程須保持 RNase-free 之操作環境。將 11  $\mu$ L 之植物全 RNA (5  $\mu$ g) 置於 1.5 mL 微量離心管中，接著加入 1  $\mu$ L 作為反向引子之 5  $\mu$ M PiVX-dT-Bam 與 1  $\mu$ L 之 10 mM dNTP mix，混合均勻後，放置於 65°C 水浴槽 15 分鐘。取出微量離心管置於冰上 5 分鐘後，加入 4  $\mu$ L 之 5X First-strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、1  $\mu$ L 之 0.1 M DTT (Invitrogen)、1  $\mu$ L 之 rRNasin (40 U/ $\mu$ L, Promega, Madison, WI, USA) 和 1  $\mu$ L 之 SuperScript<sup>™</sup> III Reverse

Transcriptase (200 U/ $\mu$ L, Invitrogen), 混合均勻, 置於 55°C 反應 1 小時。cDNA 產物可置於 -20°C 冰箱中備用。

#### D. 聚合酶連鎖反應

在 0.2 mL PCR tube 中加入 2.5  $\mu$ L 之 10X DyNAzyme™ II DNA polymerase buffer (Finnzyme, Espoo, Finland)、0.5  $\mu$ L 之 10 mM dNTP mix、1.5  $\mu$ L 之 5  $\mu$ M PiVX-F、1.5  $\mu$ L 之 5  $\mu$ M PiVX-dT-Bam 與作為模板之 2  $\mu$ L 之 cDNA 產物, 然後加入 0.3  $\mu$ L DyNAzyme™ II polymerase (1 U/ $\mu$ L, Finnzyme), 最後補水至 25  $\mu$ L。並以如下條件進行 PCR 反應: 94°C 反應 5 分鐘, 接著進行 94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/3 分鐘, 30 個循環之反應, 最後以 72°C 反應 10 分鐘, 並降溫至 4°C。取 2  $\mu$ L 之 PCR 產物, 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析。從中挑選具有預期片段大小之樣品進行核酸回收。

#### E. TA 選殖

##### 1. 接合反應與轉型作用

使用的為 pGEM®-T Easy vector System (Promega, Madison, Wisconsin, USA)。取純化之 PCR 產物 7  $\mu$ L 置於 1.5 mL 微量離心管, 接著加入 1  $\mu$ L 10X Ligation buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、0.5  $\mu$ L pGEM-T Easy vector (50 ng/ $\mu$ L, Promega)、0.5  $\mu$ L 10 mM ATP 和 1  $\mu$ L 之 T4 DNA ligase (5 U/ $\mu$ L, Fermentas), 補水使總體積為 10  $\mu$ L。均勻混合後, 置於 4°C 冰箱中作用, 隔夜後取出進行轉型作用。轉型作用方法如前述, 最後將菌液均勻塗佈於含有 100 ppm ampicillin 與 20 mg/mL X-gal 之 LA 平板培養基上, 於 37°C 培養箱培養 12-16 小時。

## 2. 篩選

隨機挑選一定數量之白色單一菌落，以 M13-F 與 M13-R 作為引子對進行 colony PCR，以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析後，挑選出現預期片段之菌株進行小量質體 DNA 製備，並以合適之限制酶進行酶切，以確定選殖株之正確性，最後再經核酸定序並進行序列比對分析。

### F. 序列比對與分析

定序完成之天然缺失性 RNA 選殖株序列以 GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, Version 2.5.000) 觀看定序結果，並以 CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) 進行序列比對，再以 Vector-NTI (NTI Advance™ 11.0, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 進行序列分析。以 MFOLD (The mfold Web Server, <http://mfold.rna.albany.edu/>) 進行 RNA 二級結構預測分析。

### G. P35S-PiVX-ND RNA 之構築

欲構築具有感染能力之天然缺失性 RNA 選殖株。將前述之天然缺失性 RNA 選殖株置換至帶有 CaMV 35S 啟動子的載體上。將前述之天然缺失性 RNA 選殖株以限制酶 *StuI* (10 U/μL, NEB, Ipswich, MA, USA) 與 *XcmI* (5 U/μL, NEB) 進行酶切反應後，以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析後，挑選預期核酸片段進行核酸回收。另外，將具感染力選殖株 p35S-PiVX5 相同以 *StuI* (10U/μL, NEB) 與 *XcmI* (5U/μL, NEB) 進行酶切反應後，挑選大小為 4142 nt 之片段進行核酸回收做為載體。將缺失性 RNA 之 cDNA 片段與載體進行接合反應後，進行轉型作用。並以 37-F1 與 PiVX-CP-R1 作為引子對進行 colony PCR，做初步之篩選，挑選符合預期之菌落進行小量質體 DNA 製備。將製備完成之質體 DNA 以 *MscI* (10 U/μL, NEB) 進行酶切，以確定正確之選殖株。

## 五、 缺失性 RNA 在白藜上之接種、全 RNA 萃取及電泳分析

### A. 植物接種

本試驗所使用之植物為 4-5 週之白藜植株。首先配製接種源，在 1.5 mL 微量離心管中加入 10  $\mu$ g p35S-PiVX-D RNA，或同時加入 10  $\mu$ g p35S-PiVX5 與 10  $\mu$ g p35S-PiVX-D RNA，並以 ddH<sub>2</sub>O 將體積調整至相同。接著輕輕將欲接種之白藜葉片上之白粉抹去，撒上適量之矽藻土後，將接種源均勻塗抹於全葉，每株白藜接種 3 片葉子，於 7 與 14 天後收取葉片進行大量植物全 RNA 之萃取。

### B. 大量植物全 RNA 萃取

使用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 進行大量植物全 RNA 之萃取。本試驗全程需保持 RNase-free 之操作環境。秤取 0.1 g 之植物葉片組織，置於研鉢中，再加入 1 mL 之 TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)，以杵研磨葉片至漿水狀，並將其吸取至 1.5 mL 微量離心管中，以震盪器劇烈震盪 30 秒鐘後，置於室溫 5 分鐘。接著加入 200  $\mu$ L chloroform，以震盪器劇烈震盪 10 秒鐘後，置於室溫 5 分鐘。再以 4<sup>°</sup>C 低溫，轉速 13,000 rpm (Centrifuge Z216MK, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘，將 600  $\mu$ L 上層液移至新的微量離心管中，加入 150  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 與 750  $\mu$ L PCI (附錄)，劇烈震盪 10 秒鐘，以 4<sup>°</sup>C 低溫，轉速 13,000 rpm 離心 15 分鐘，此 PCI 作用步驟重複 3 次。接著將 600  $\mu$ L 上層液移至新的微量離心管中，加入 150  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 與 750  $\mu$ L CI (附錄)，劇烈震盪後，以 4<sup>°</sup>C 低溫，轉速 13,000 rpm 離心 15 分鐘，以除去殘留之 phenol。最後，吸取 600  $\mu$ L 上層液移至新的微量離心管中，加入 600  $\mu$ L isopropanol，置於 -20<sup>°</sup>C 冰箱中 14-16 小時，使 RNA 沉降。14-16 小時後，以 4<sup>°</sup>C 低溫，轉速 13,000 rpm 離心 30 分鐘後，除去上層液，再加入 500  $\mu$ L 75% 酒精，以震盪器劇烈震盪後，以 4<sup>°</sup>C 低溫，轉速 13,000 rpm 離心 20 分鐘，此步驟重複 2 次，以除去多餘鹽類和 isopropanol。最

後，靜置於室溫 20 分鐘風乾後，加入 50  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 回溶，並以分光光度計(NanoDrop® ND-1000, Thermo, Wilmington, USA)測量其濃度，其餘部分置於-80°C 冰箱備用。

### C. 電泳分析

使用 2X RNA Loading Dye Solution (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) 進行 RNA 之變性作用。首先，在 1.5 mL 微量離心管中加入植物全 RNA 與同體積之 2X RNA Loading Dye Solution (Fermentas)，充分混合，以 70°C 加熱作用 15 分鐘後，迅速取出置於冰上 5 分鐘，接著以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，之後進行北方轉漬法及北方雜合反應。

## 六、 北方轉漬法及雜合反應

### A. PiVX 5'端專一性 DNA 探針之製備

以 p35S-PiVX5 作為模板，製備偵測 PiVX 及缺失性 RNA 之專一性 DNA 探針。首先，取 3-5 ng 之 p35S-PiVX5 加至 0.2 mL PCR tube 中，然後加入 10  $\mu\text{L}$  5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、5  $\mu\text{L}$  10X Digoxigenin (DIG)-11-dUTP labeling mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)、2.5  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{M}$  PiVX-F 引子與 2.5  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{M}$  37-R6 引子，然後加入 0.5  $\mu\text{L}$  Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ , NEB)，最後補水至 50  $\mu\text{L}$ 。並以如下條件進行 PCR 反應：94°C 反應 5 分鐘，接著以 94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/1 分鐘之條件，進行 30 個循環之反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。取 2  $\mu\text{L}$  之 PCR 產物以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析。確定為單一條帶後，分裝至 0.5 mL PCR tube 中，置於-20°C 冰箱備用。

## B. 北方轉漬法

將一塊玻璃板架於一長形盒上，並準備寬度略大於膠體之長方形濾紙(3MM, Whatman, England)，將濾紙置於玻璃板上，使兩端垂入盒內，接觸已先裝入盒內之 20X SSC buffer (AMRESCO, Solon, OH, USA) 中。以微量吸管吸取 20X SSC buffer 至濾紙上，使其溼透以作為鹽橋，並避免濾紙與玻璃板間存在氣泡。接著將膠體小心置於濾紙上，再將事先以 20X SSC buffer 潤濕之尼龍膜(Hybond-N+, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)覆蓋在膠片上，上述步驟皆須避免氣泡存在於間隙。接著先蓋上兩張以 20X SSC buffer 浸溼之濾紙，用保鮮膜將膠片週圍密封避免 20X SSC buffer 之蒸散。最後再覆蓋上適量之吸水紙及吸水海綿，其上再以約 500 g 之重物壓覆，在室溫下進行核酸轉漬 12-16 小時。

## C. 北方雜合反應

轉漬完成後，將尼龍膜小心取出，略為風乾後進行 UV crosslink (UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA)，使 RNA 固定於尼龍膜上。接著以廠商(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)建議之方法略加修改後進行北方雜合反應。以鏢子將尼龍膜小心放入內有 20 mL hybridization solution (附錄)之雜合管中，於定溫 55°C 之雜合箱(YIH DER HR-80, Taiwan)中，以 5 rpm 轉速進行 pre-hybridization 反應 2 小時。DNA 核酸探針在使用前須進行變性反應，把已分裝之 2  $\mu$ L DNA 探針置於 96°C 作用 15 分鐘後，快速移至冰上冷卻 5 分鐘，短暫離心後加入 hybridization solution，於定溫 55°C 下，5 rpm 轉速進行雜合反應 12-16 小時。雜合反應完成後，進行清洗及螢光偵測反應，取出尼龍膜，加入 100 mL 高鹽溶液(2X SSC, 0.1% (w/v) SDS)於室溫震盪(25 rpm)漂洗 2 次，每次 15 分鐘。再加入 100 mL 預熱至 68°C 之低鹽溶液(0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS)於 68°C 震盪(25 rpm)漂洗 2 次，每次 15 分鐘。接著以 100 mL Buffer I (附錄)於室溫浸洗尼龍膜 5 分鐘。再將 Buffer I 置換成 25 mL Buffer II，於室溫震盪(25 rpm)反應 30

分鐘，以補滿膜上可能被抗體非專一性結合部位。倒去 Buffer II，接著取 2.5  $\mu$ L 之 alkaline phosphate-conjugated anti-DIG antibody (Roche Applied Science) 加至 25 mL Buffer II 中，並與尼龍膜於室溫震盪(25 rpm)進行反應 30 分鐘。最後以 Buffer I 於室溫震盪(25 rpm)清洗尼龍膜 3 次，每次 15 分鐘。接著加入 600  $\mu$ L CDP-Star (NEB, Ipswich, MA, USA) 溶液(附錄)，於室溫震盪(25 rpm)反應 15 分鐘，取出尼龍膜，置於透明塑膠袋中，即可以 Hyperfilm™ MP (Amersham Biociences, Buckinghamshire, England) 進行壓片，沖洗底片並觀察結果。

## 七、 生體外轉錄體之製備

### A. T7 啟動子引導之病毒及缺失性 RNA 選殖株之構築

設計帶有 T7 啟動子及 *SalI* 限制酶切位之引子 PiVX-F-T7-sal。以 p35S-PiVX5 作為模板，以下列配方進行 PCR 反應：3-5 ng 之 p35S-PiVX5、10  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1  $\mu$ L 10 mM dNTP mix、2.5  $\mu$ L 5  $\mu$ M PiVX-F-T7-sal 與 2.5  $\mu$ L 5  $\mu$ M PiVX-dT-Bam 引子，0.5  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L, NEB)，補水至 50  $\mu$ L，反應條件為：94°C 反應 5 分鐘，接著以 94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/8 分鐘之循環條件，進行 30 個循環之反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。擴增出目標片段後進行電泳分析，並將核酸回收純化。純化後之目標片段以 *SalI* (10 U/ $\mu$ L, NEB) 及 *BamHI*-HF (20 U/ $\mu$ L, NEB) 進行酶切反應，進行電泳分析後回收。而另將 pUC 119 載體以 *SalI* 及 *BamHI*-HF 進行酶切反應後，進行電泳分析與核酸回收作為載體。將兩者進行接合反應，並轉型至 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，獲得之選殖株經篩選與定序，正確選殖株命名為 pUC-PiVX5。

將 p35S-PiVX-D RNA 與 pUC-PiVX5 之選殖株以限制酶酵素 *StuI* (10 U/ $\mu$ L, NEB) 與 *BamHI*-HF 進行酶切反應，之後進行電泳分析，再將目標片段進行核酸



回收。將兩者進行接合反應，並進行轉型作用，獲得之選殖株經篩選後確定為正確選殖株，稱之為 pUC-PiVX-D RNA 系列。

### B. 質體 DNA 之中量製備

挑選單一菌落接種至 100 mL 含有 100 ppm ampicillin 之 LB 液態培養基中，於 37°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養 12-16 小時後，使用 Geneaid Plasmid Midi Kit (Geneaid, Taiwan) 進行質體 DNA 之中量製備。將 Plasmid Midi Column 以 5 mL 之 PEQ buffer 以重力進行流洗，並除去濾出液。菌液則分成兩份倒入 50 mL 離心管中，以 3,500 rpm (Centrifuge Z383 K, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘，倒去上清液後，加入 4 mL PM1 buffer (含 RNase A)，劇烈震盪以重新懸浮菌塊。接著加入 4 mL PM2 buffer，小心上下翻轉至溶液呈透明澄清狀，於室溫靜置 5 分鐘，使破菌完全。再加入 4 mL PM3 buffer，輕輕上下翻轉使其混合均勻後，以 3,500 rpm 離心 20 分鐘。離心完成後，將上層液倒入已流洗完成之 Plasmid Midi Column 中，以重力流洗並除去濾出液。接著加入 12 mL PW buffer，同樣以重力流洗並除去濾出液後，將 Plasmid Midi Column 移至新的 50 mL 離心管上，加入 8 mL PEL buffer，以重力流洗，收集濾出液，並加入 6 mL isopropanol，均勻混合後置於 -20°C 冰箱 14-16 小時，使 DNA 沉降。取出離心管，以 4°C，轉速 8,500 rpm 離心 30 分鐘後，小心倒去上層液，加入 5 mL 75% 酒精，洗去殘留之 isopropanol，再以 4°C，轉速 8,500 rpm 離心 20 分鐘。小心倒去上清液，置於室溫風乾 20 分鐘後，以 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 回溶，置於 -20°C 冰箱備用。

### C. 限制酶直線化質體

取中量製備之質體 DNA，以限制酶酵素 *Bam*HI-HF (20 U/ $\mu$ L) 進行酶切反應，以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，確定其反應完全後，進行核酸回收，回收之直線化質體置於 -20°C 冰箱備用。

#### D. 生體外轉錄反應(*In vitro* transcription)

生體外轉錄反應過程須保持 RNase-free 之操作環境。在 1.5 mL 微量離心管中加入 2-4  $\mu\text{g}$  先前已直線化之質體 DNA 作為模板，與 1X transcription buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、1 mM ATP、1 mM CTP、1 mM UTP、0.1 mM GTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)、0.25 mM cap analog (NEB, Ipswich, MA, USA)、40 U rRNasin (40 U/ $\mu\text{L}$ , Promega, Madison, WI, USA) 與 100 U T7 RNA polymerase (Invitrogen)，於 37°C 反應 15 分鐘後，加入 GTP，使其終濃度為 1 mM，總反應體積為 50  $\mu\text{L}$ ，隨後繼續於 37°C 反應 75 分鐘。取 0.5  $\mu\text{L}$  以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，以 EtBr 染色後，使用 UVP 拍照系統(BioDoc-It™ Image system, Cambridge, UK)拍照，再以 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, UM, USA)進行定量分析。

### 八、原生質體之製備、接種與分析

#### A. 原生質體之製備

本試驗使用之器具皆以鋁箔紙包覆後，於 180°C 處理 4 小時，以保持無菌及 RNase-free 之狀態。使用的植物為 6-9 週大之菸草，秤取葉片約 6 g，以 500 mL 1% Chlorox 表面消毒 2 分鐘後，以無菌水漂洗 3 次，以除去殘留之 Chlorox，接著以濾紙吸去葉片殘留之水分。將葉片成推於玻璃板上進行切割，首先切除中肋部分，剩餘之葉片部分則切割為約 2 mm  $\times$  4 mm 大小，平鋪置於 2 個玻璃培養皿中。接著分別將 15 mL enzyme digestion buffer (附錄)以 0.2 mM minipore filter (Sartorius, Goettingen, Germany) 過濾至培養皿中，輕壓葉片使浸入 enzyme digestion buffer 中後，避光於 25°C 反應 16 小時。反應完成後，取出培養皿並輕搖使其中之菸草組織懸浮，再以滅過菌之 150 目尼龍網濾去植物殘體，將濾液平分至 4 支 15 mL 玻璃試管中，以 300 rpm (KUBOTA 2010) 離心 7 分鐘。使用玻

璃滴管吸去上層液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES (附錄)，輕搖使沈澱物重新懸浮。再以玻璃滴管吸取 2 mL 0.55 M sucrose 溶液，伸至試管底部慢慢加入，做成 sucrose cushion。再以 300 rpm 離心 5 分鐘，比重適當之菸草原生質體會累積在 sucrose cushion 與 mannitol-MES 交界處，形成深綠色層帶。吸取該處之原生質體置於新管中，再加入 5 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕晃使其混合均勻。以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，以滴管加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕搖使沈澱物重新懸浮。接著以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液，將沈澱物重新懸浮於 1 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液中，並集中於一管中，均勻懸浮後，以光學顯微鏡 (WILD HEERBRUGG M3Z, Switzerland) 與血球計數器計算產量，平均產量約為  $6-8 \times 10^5$  cells/mL。

#### **B. 原生質體之接種(Protoplast inoculation)**

本試驗須保持保持無菌及 RNase-free 之狀態。取  $4 \times 10^5$  個菸草原生質體置於 12 X 75 mm 玻璃指形管中進行接種試驗。將分裝之原生質體以 300 rpm (KUBOTA 2010)離心 5 分鐘，吸去上層液，留下 80  $\mu$ L 液體，輕晃使沈澱物重新均勻懸浮。將適量之生體外轉錄體加入原生質體懸浮液中，輕晃使其混合均勻，吸出所有原生質體懸浮液加入含有 150  $\mu$ L PEG inoculation buffer (Jones *et al.*, 1990) (附錄)之指形管中，輕拍指形管底部 40 下，使均勻混合。以 3 次逐次加入 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，直至 1500  $\mu$ L，並輕拍使其均勻混合。置於冰中 10 分鐘後，以 300 rpm 離心 5 分鐘。吸去上層液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕拍指形管底部，使沈澱物重新均勻懸浮，以洗去殘留之 PEG inoculation buffer。以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液，加入 750  $\mu$ L protoplast culture medium (Jones *et al.*, 1990) (附錄)，輕拍指形管底部，使沈澱物重新均勻懸浮，以石臘膜封口後，置於 25°C 光照下培養 24 小時。

### C. 原生質體之全 RNA 萃取與分析

將光照培養 24 小時之原生質體懸浮液於指形管中以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液後，將沉澱下來之原生質體以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行小量全 RNA 萃取。萃取出之原生質體全 RNA，取 3  $\mu$ L 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，剩餘部分置於 -20°C 冰箱備用或進行北方雜合反應分析。

## 九、 影響 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上累積之 5' 序列之分析

### A. 5' 端不同長度之缺失性 RNA 之構築

設計可和 PiVX 缺失性 RNA 選植株 p35S-PiVX-N1 之 CP 保留區域起始位置專一性結合之正向引子 PiVX-map-F1，以及可和 RdRp 保留區域不同位置專一性結合之反向引子 PiVX-map-R1 及 PiVX-map-R2，以下列配方配製 PCR 反應溶液：1-3 ng 之 p35S-N1、3  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1  $\mu$ L 10 mM dNTP mix、1  $\mu$ L 5  $\mu$ M PiVX-map-F1 與 1  $\mu$ L 5  $\mu$ M PiVX-map-R1 或 PiVX-map-R2，1  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L, NEB)，補水至 15  $\mu$ L，反應條件為：96°C 反應 5 分鐘，接著以 96°C/30 秒、55°C/1 分鐘、68°C/5 分鐘之循環條件，進行 18 個循環之反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。PCR 反應完成後，直接於反應溶液加入 1  $\mu$ L *DpnI* (2 U/ $\mu$ L, NEB)，於 37°C 反應 1 小時後，以 85°C 處理 20 分鐘，除去 *DpnI* 活性。接著進行轉型作用，並篩選定序，以確定取得正確之刪除突變株，稱之為 p35S-PiVX-R1 及 p35S-PiVX-R2。

### B. 植物接種與分析

使用之植物為 4-5 週之白藜植株。將 p35S-PiVX5 單獨接種或與 p35S-PiVX-N1、p35S-PiVX-R1、p35S-PiVX-R2、p35S-PiVX-MM 共同接種至白

藜上，每株白藜接種 3 片葉子，接種方式如前述，於 7 與 14 天後收取葉片進行大量植物全 RNA 之萃取，並以北方雜合反應觀察實驗結果。

## 十、轉譯架構對缺失性 RNA 之重要性測試

### A. p35S-PiVX-N1D 選殖株之構築

使用可和 PiVX-N1 轉譯架構啟動子前後序列進行黏合之 PiVX-dorf-F 與 PiVX-dorf-R 引子對，PiVX-dorf-F 與 PiVX-dorf-R 除可將擴增產物上之啟動子由 AUG 轉為 GUG 外，另可使啟動子下游第 9 個核苷酸由 T 轉為 G，產生一個 *XhoI* 限制酶切位。以下列配方進行聚合酶連鎖反應：1-3 ng 之 p35S-N1、3  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1  $\mu$ L 10 mM dNTP mix、1  $\mu$ L 5  $\mu$ M PiVX-dorf-F 與 PiVX-dorf-R、1  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L, NEB)，補水至 15  $\mu$ L，反應條件為：96 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，接著以 96 $^{\circ}$ C/30 秒、55 $^{\circ}$ C/1 分鐘、68 $^{\circ}$ C/5 分鐘之循環條件，進行 18 個循環之反應，最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，並降溫至 4 $^{\circ}$ C。PCR 反應完成後，直接於反應溶液加入 1  $\mu$ L *DpnI* (2 U/ $\mu$ L, NEB)，於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時後，以 85 $^{\circ}$ C 處理 20 分鐘，除去 *DpnI* 活性。接著進行轉型作用，並篩選定序，以確定取得正確之刪除突變株，稱之為 p35S-PiVX-N1D。

### B. 植物接種與分析

使用 4-5 週大小之白藜植株。將 p35S-PiVX5 單獨接種或與 p35S-PiVX-N1D 共同接種至白藜上，每株白藜接種 3 片葉子，於 7 與 14 天後收取葉片進行大量植物全 RNA 之萃取，並以北方雜合反應觀察實驗結果。

## 十一、 缺失性 RNA 轉譯架構在白藜上表現情形之分析

### A. p35S-PiVX-N1-tag 選殖株之構築

利用帶有 *XcmI* 限制酶切位之引子對 X2-4-tag-F 與 X2-4-tag-R，將帶有 C4 與 myc 蛋白質標籤之 DNA 序列片段由 pBI-100-myc-ko 質體中擴增出來。以下列配方進行 PCR 反應：3-5 ng 之 pBI-100-myc-ko、10  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1  $\mu$ L 10 mM dNTP mix、2.5  $\mu$ L 5  $\mu$ M X2-4-tag-F 與 2.5  $\mu$ L 5  $\mu$ M X2-4-tag-R，0.5  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L, NEB)，補水至 50  $\mu$ L，反應條件為：94 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，接著以 94 $^{\circ}$ C/30 秒、55 $^{\circ}$ C/30 秒、72 $^{\circ}$ C/1 分鐘之循環條件，進行 30 個循環之反應，最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，並降溫至 4  $^{\circ}$ C。擴增出帶有 *XcmI* 切位之目標片段，電泳分析後，進行核酸回收。將回收之核酸片段以 *XcmI* (5 U/ $\mu$ L, NEB) 進行酶切反應後，進行核酸回收作為嵌入片段。而另將 p35S-PiVX-N1 以 *XcmI* 處理，將核酸片段回收作為載體。將兩者進行接合反應，並進行轉型作用，獲得之選殖株經篩選定序後確定為正確選殖株，稱之為 p35S-PiVX-N1-tag。

### B. 植物接種與分析

使用之植物為 4-5 週之白藜植株。將 p35S-PiVX5 單獨接種或與 p35S-PiVX-N1、p35S-PiVX-N1-tag 共同接種至白藜上，每株白藜接種 3 片葉子，於 7 與 14 天後收取葉片進行植物全蛋白質之粗萃取。並以西方墨漬法試驗觀察實驗結果。

## 十二、 西方轉漬分析法

### A. 植物全蛋白質之粗萃取

研鉢及杵先以於 180 $^{\circ}$ C 處理 4 小時候備用。秤取植物全葉重量，置於研鉢後，加入適量液態氮，以杵將植物組織磨碎至呈粉末狀。待樣本稍稍回溫後，以重量

體積比 1 : 5 之比例加入 10 mM phosphate buffer (附錄)，以杵磨成漿水狀後，吸取至 1.5 mL 微量離心管中。以 10,000 rpm (Centrifuge Z216MK, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 3 分鐘，上清液即為粗萃取之植物全蛋白質。取 15  $\mu$ L 上清液至微量離心管中，加入 15  $\mu$ L 2X MURB buffer (附錄)與 0.3  $\mu$ L 100X PMSF，均勻混合後，於 65°C 加熱 10 分鐘。樣本製備完成後，即可進行蛋白質電泳。

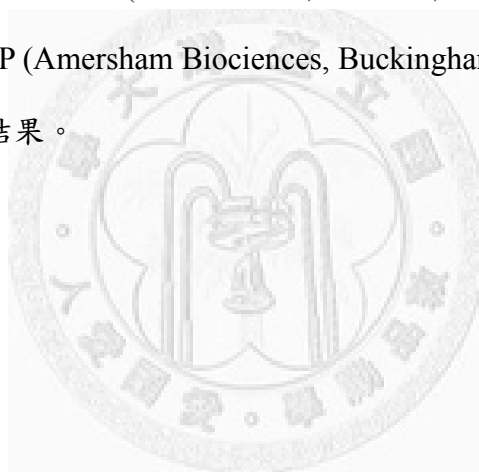
## B. 聚丙烯醯胺膠體電泳

以 Hofel 蛋白質電泳系統(Mighty Small II SE 250, Pharmacia Biotech) 進行聚丙烯醯胺膠體電泳凝膠之製備。首先架設鑄膠器，接著在燒杯中依序加入 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O、3.75 mL 40% acrylamide/bisacrylamide、2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.1 mL 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.05 mL 20% ammonium persulfate (AP) 以及 0.01 mL N', N', N', N'-tetramethylethylene diamine (TEMED)，快速搖晃後迅速倒入鑄膠器中，以製作 15% 分離膠體(separating gel)，並迅速加入 0.6 mL 95% 酒精，使膠面平整。靜置約 30 分鐘後，倒去酒精。接著配製 5% 之焦集膠體(stack gel)，在燒杯中依序加入 3.03 mL ddH<sub>2</sub>O、0.625 mL 40% acrylamide/bisacrylamide、1.25 mL 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.05 mL 10% SDS、0.04 mL 20% AP 以及 0.005 mL TEMED，快速搖晃後迅速注入分離膠體上方，並迅速插入齒梳 (comb)，其間小心避免氣泡產生。待膠體凝固後，移去齒梳，並以清水清洗樣本槽中殘留之凝膠，即可使用。將膠片架設於電泳槽內，加入先前製備之樣品，以 120 V 進行電泳約 20 分鐘，使樣本進入分離膠體，再以 180 V 進行電泳約 1 小時。電泳結束後，去除焦集膠體，即可進行西方轉漬免疫反應。

## C. 西方轉漬分析法

將 Amersham Hybond™-P PVDF 膜 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 切割成和分離膠體等大(6 X 8 cm<sup>2</sup>)之大小，先以 methanol 浸潤後，再以 CAPS (附

錄)浸泡備用。將 1 張與膠體等大之濾紙以 CAPS 浸濕，鋪於正極電極版(TE70X semi-dry transfer unit, Hoefer Inc., San Francisco, CA, USA)上，接著將 PVDF 膜平鋪於濾紙之上，再鋪上分離膠體，並接避免在間隙產生氣泡，其上再鋪上 1 張以 CAPS 浸濕之濾紙，蓋上負極電極版。以 36 mA 進行半乾式轉漬 40 分鐘。轉漬完成後，取出 PVDF 膜，以 PBS (附錄)配製之 5%脫脂奶粉溶液，於 37°C 震盪反應 1 小時。接著以 PBS 配製之 1%脫脂奶粉溶液稀釋一次抗體，加入盒中與 PVDF 膜於 37°C 震盪反應 1 小時後，以 PBST 於室溫下震盪清洗 3 次，每次 15 分鐘。然後加入以 PBS 配製之 1%脫脂奶粉溶液稀釋之二次抗體，於 37°C 震盪反應 1 小時後，以 PBST 於室溫下震盪清洗 3 次，每次 15 分鐘。最後加入 1 mL chemiluminescent HRP substrate (MILLIPORE, Billerica, MA, USA)，反應 5 分鐘後，即可以 Hyperfilm™ MP (Amersham Biociences, Buckinghamshire, England)進行壓片，沖洗底片並觀察結果。





## 肆、 結果

### 一、 構築五種 PiVX 人為缺失性 RNA

依據關於 BaMV 與 CsCMV 所報導之缺失性 RNA 序列保留重組區域(Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)，以 p35S-PiVX5 為材料，分別以 AgeI、BstXI、EagI 與 MscI 進行酶切，並依據切點情形進行修飾作用後，構築一系列 PiVX 人為缺失性 RNA，並進行定序以確定其序列組成。其中 PiVX-MM 全長為 531 個核苷酸，保留了 5'端 269 個與 3'端 262 個核苷酸。PiVX-AA 則是保留了 5'端 1621 個與 3'端 911 個核苷酸，全長為 2532 個核苷酸。PiVX-AB 保留了 2011 個核苷酸，包括 5'端 1618 個與 3'端 393 個核苷酸。PiVX-BB 全長為 2464 個核苷酸，包括 5'端 2071 個與 3'端 393 個核苷酸。而 PiVX-EB 預期應具有 5'端 1437 個與 3'端 393 個核苷酸，但經定序後 3'端端點部分缺失了 1 個核苷酸，故最終 PiVX-EB 保留了 3'端 392 個核苷酸，全長為 1865 個核苷酸(圖一)。根據序列預測，PiVX-AA 可表現一個 774 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-AB 可產生一個 544 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-BB 則有一個 687 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-EB 可表現一個 483 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-MM 則可產生一個 107 個胺基酸之重組蛋白(圖一)。

### 二、 以菸草原生質體測試 PiVX 人為缺失性 RNA 之複製能力

將製備完成之生體外轉錄體以電泳分析，並以 EtBr 進行染色且拍攝影像後，以 ImageJ 進行定量分析，再進行接種試驗。將 PiVX 人為缺失性 RNA:PiVX-AA、AB、BB、EB 和 MM 之生體外轉錄體 500 ng 單獨接種，或是和 PiVX 生體外轉錄體以莫耳數 6:1 共同接種至菸草原生質體中，24 小時後抽取原生質體全 RNA 進行北方雜合分析。在北方雜合分析中，為避免使用 PiVX 3'端探針時，因 PiVX 人為缺失性 RNA 與 PiVX 次基因體 RNA (subgenomic RNA)訊號因兩者分子大小

相近，而產生對結果判別的混淆，故選用 PiVX 5'端專一性探針進行雜合反應。在底片經 30 分鐘壓片後之結果可以發現：在所有 PiVX 人為缺失性 RNA 與 PiVX 共同接種的結果上，除 PiVX 基因體 RNA 之訊號外，皆有出現 PiVX 人為缺失性 RNA 之訊號；而在單獨接種 PiVX 人為缺失 RNA 的結果上，仍可以在 PiVX 人為缺失性 RNA 之分子大小的位置上觀察到訊號，但訊號強度明顯弱於和 PiVX 共同接種之處理，故推論為接種源之殘留(圖二)。雖有作為接種源之 PiVX 人為缺失性 RNA 殘留之訊號，但仍可發現在菸草原生質體中所有之 PiVX 人為缺失性 RNA 可被 PiVX 複製。比較訊號強度後，可觀察到 PiVX-MM 複製之效率最佳，而 PiVX-AA 與 BB 較差(圖二)。由本試驗結果可知，PiVX 可經由人為方式構築缺失性 RNA，且此 PiVX 人為缺失性 RNA 並無明顯干擾 PiVX 之能力，故稱之為人為缺失性 RNA (artificial defective RNAs, aD RNAs)(Hehn *et al.*, 1994; Marsh *et al.*, 1991)。

### 三、 測試 PiVX 人為缺失性 RNA 於白藜上之累積能力

為了瞭解一系列 PiVX 人為缺失性 RNA 在植物上累積之能力。使用 4 週大之白藜，將 10  $\mu$ g PiVX 人為缺失性 RNA 的質體 DNA 單獨接種或混合 10  $\mu$ g p35S-PiVX5 共同接種至 1 片葉子上，每株接種 3 片。於接種後 7 天收取接種葉，萃取植物全 RNA，並以 PiVX 之 5'端專一性探針進行北方雜合分析。從結果可發現，雖然 5 種 PiVX 人為缺失性 RNA 皆可在 PiVX 協助下於菸草原生質體中進行複製，但只有 PiVX-AB 與 EB 可在白藜上偵測到 RNA 累積(圖三)。由此結果可推知，PiVX 人為缺失性 RNA 於白藜上之累積能力除受到保留區域影響外，亦有可能受到 PiVX 人為缺失性 RNA 總長度的影響。在試驗中，有 PiVX-AB 與 EB RNA 累積的接種葉上，並沒有觀察到 PiVX 基因體 RNA 累積量顯著下降，故 PiVX-AB 與 EB 似乎對輔助病毒(PiVX)的複製能力不具明顯之干擾。而在病

徵的表現上，共同接種 PiVX-AB 與 EB 與單獨 PiVX 之處裡，病徵亦無顯著差異 (圖四-B、C、D)，顯示 PiVX 人為缺失性 RNA 為不具干擾性之缺失性 RNA。

#### 四、 PiVX 天然缺失性 RNA 之選殖與分析

##### A. 接種 PiVX 之白藜與紅龍果之全 RNA 萃取與分析

將 10 µg p35S-PiVX5 接種至 4 週大之白藜葉片，7 天後取 0.5 g 接種葉，以 1 mL 之 sodium phosphate buffer 研磨後，作為繼代接種源，加入矽藻土接種至健康的 4 週大白藜，每株接種 3 片葉子。另一組接種 PiVX 三天後，於接種葉再次接種 PiVX 人為缺失性 RNA 選殖株之處理，期望能加速 PiVX 天然缺失性 RNA 的誘導發生。而在每次繼代接種時，亦取部分接種葉，抽取植物全 RNA，以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。在本試驗的結果中，可以發現在第二代時，除可偵測到 PiVX 基因體 RNA 訊號外，無論是否有接種 PiVX 人為缺失性 RNA 選殖株，各處理亦皆可偵測到疑似 PiVX 天然缺失性 RNA 之訊號(圖五)。其中較為明顯的為一條大小約 3 kb 與數條出現在約 1 kb 附近之訊號。另一方面，我們也從 2010 年接種 PiVX-P37 分離株之紅龍果植株中採取樣本，抽取表皮部分之全 RNA，以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析，也可觀察到相似之情形(未出示資料)。於是針對這些疑似為 PiVX 天然缺失性 RNA 分子進行 RT-PCR 與 TA 選殖。

##### B. 以 RT-PCR 進行 PiVX 天然缺失性 RNA 之選殖

使用針對 PiVX 基因體 5'端 1-29 核苷酸的 PiVX-F 作為正向引子，而反向引子則是使用可針對 3'端-包括 poly A 在內的 46 個核苷酸專一性黏合，並在 poly A 末端帶有一個 *Bam*HI 切位之 PiVX-dT-Bam，經由反轉錄作用與聚合酶連鎖反應後，以電泳進行分析。在白藜植株的結果可發現無論 PiVX 單獨接種或是與人為缺失性 RNA 選殖株 PiVX-BB 共同接種，皆擴增出約 1 kb 大小之 DNA 片段(圖

六-A)，但在 PiVX 與 PiVX-EB 共同接種的狀況下並沒有出先大小類似之片段。而在共同接種 PiVX-BB 與 EB 的情形中，亦分別出現符合 PiVX-BB 與 EB 大小之 DNA 片段，此情形無法判斷為質體 DNA 接種源殘留，或是 PiVX-BB 與 EB 被複製之結果。將 1 kb 大小之 DNA 片段切下純化後，嵌入 pGEM-T Easy vector 中，並進行 TA 選殖。在含有 X-gal 與 ampicilin 的 LA 平板培養基上隨機挑選 16 個菌落進行篩選，從出現正反應的菌株中挑選 5 個選殖株(PiVX-N1、N2、N3、N4、N5)進行定序分析。經定序後可以發現五個選殖株皆是由 PiVX 5'端至 RdRp 之部分序列，以及 3'端至 CP 之部分序列組合而成(圖七)。經比較後，可以發現 PiVX-N1、N2、N4 與 N5 彼此間較為相似，保留了較長的 5'端與較短的 3'端，其中 PiVX-N1 保留了 5'端 755 個核苷酸序列與 3'端 198 個核苷酸；PiVX-N2 保留了 5'端 783 個核苷酸序列與 3'端 309 個核苷酸；PiVX-N4 保留了 5'端 859 個核苷酸序列與 3'端 248 個核苷酸；PiVX-N5 保留了 5'端 752 個核苷酸序列與 3'端 278 個核苷酸。而 PiVX-N3 則是保留了較長的 3'端與較短的 5'端，其保留了 5'端 228 個核苷酸序列與 3'端 768 個核苷酸(圖七)。另外，經序列分析後，預期 PiVX-N1 可產生一個 228 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-N2 則有一個 294 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-N3 可表現一個 262 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-N4 可產生一個 299 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-N5 則有一個 231 個胺基酸之重組蛋白(圖八)。由以上實驗結果可知，利用連續繼代高濃度病毒之方式，可誘導 PiVX 快速產生天然缺失性 RNA。

另一方面，將接種 PiVX 的紅龍果植株全 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應後，也可擴增出約 900 bp 及 550 bp 大小的 DNA (圖六-B)。利用和前述相同的方法，針對這些小片段 DNA 進行 TA 選殖，從含有 X-gal 與 ampicilin 的 LA 平板培養基上隨機挑選 100 個菌落進行初步篩選，再從正反應的菌株中挑選 20 個進行定序。定序結果發現，可將其分成四個類型，分別稱之為 PiVX-P1、PiVX-P2、

PiVX-P3 及 PiVX-P4。這四群選殖株也皆是由 PiVX 5'端部分序列與 3'端部分序列組合而成(圖七)。其中 PiVX-P1 保留了 5'端 645 個核苷酸序列與 3'端 196 個核苷酸；PiVX-P2 保留了 5'端 204 個核苷酸序列與 3'端 306 個核苷酸；PiVX-P3 保留了 5'端 210 個核苷酸序列與 3'端 313 個核苷酸；PiVX-P4 保留了 5'端 590 個核苷酸序列與 3'端 73 個核苷酸 (圖七)。進行序列分析後，預期 PiVX-P1 具有一個由 192 個胺基酸構成之重組蛋白，PiVX-P2 可表現一個 100 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-P3 則有一個 45 個胺基酸之重組蛋白，PiVX-P4 具有一個至少 201 個胺基酸之重組蛋白 (圖八)。從前述結果可知，PiVX 在天然寄主紅龍果中，亦可自行產生缺失性 RNA。

##### 五、 測試 PiVX 天然缺失性 RNA 於白藜上之累積能力

將 PiVX 天然缺失性 RNA 選殖株以限制酶 *StuI* 與 *XcmI* 進行酶切反應後，將 PiVX 天然缺失性 RNA 選殖株置換至帶有 CaMV 35S 啟動子的載體上，構築一系列 p35S-PiVX-nD RNA 選殖株，以進行植物之接種。將 10  $\mu$ g p35S-PiVX-nD RNA 選殖株單獨接種或與 10  $\mu$ g p35S-PiVX5 共同接種至 4 週大之白藜，每株白藜接種 3 片葉子。於接種後 7 天收取葉片進行植物全 RNA 之萃取，並以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。從結果可以發現，篩選到之 PiVX 天然缺失性 RNA-N1、N2、N4 與 N5 皆可以在 PiVX 的協助下於白藜上進行複製累積，而單獨接種 PiVX 天然缺失性 RNA 則無法自行複製累積(圖九)。此外，PiVX-N3 則即使以底片曝光至 24 小時，仍無法觀察到明顯的累積情形(未出示資料)，故認為其應不具有累積之能力(圖九)。而在由紅龍果中選殖的四個類型中，只有 PiVX-P1 類型可在白藜接種葉中被偵測到累積，而 PiVX-P2、P3 與 P4 則皆無法在白藜接種葉中被偵測到明顯累積(圖十)。目前只對 PiVX 天然缺失性 RNA 進行初步的複製能力分析，因此對於不同之 PiVX 天然缺失性 RNA 選殖株在白藜上的增殖能力是否具有顯著差異，目前尚無法定論。而在數次的白藜接種試驗中，

在 PiVX 與 PiVX 天然缺失性 RNA 共同接種的處理中，並沒有觀察到 PiVX 複製能力的下降，故 PiVX 天然缺失性 RNA 似乎不具有明顯干擾輔助病毒(PiVX)複製之能力(圖九和圖十)。而在病徵的表現觀察中，亦未發現共同接種 PiVX 天然缺失性 RNA 之處理與單獨接種 PiVX 之處理，在病徵上有顯著差異(圖四-B、E、F、G、H、I)，故推測 PiVX 天然缺失性 RNA 並非缺失干擾性 RNA。

## 六、 PiVX 天然缺失性 RNA 序列與轉譯架構分析

比較前述五個由白藜中篩選之 PiVX 天然缺失性 RNA 之差異，發現無論是在 RdRp 保留區的接合位置(junction site)或是鞘蛋白(CP)保留區域之接合位置，皆不相同；但 PiVX-N1、N2、N4 與 N5 接合位置上之差異，皆在 110 個核苷酸內，差異沒有非常大，而 N3 則是相對差異較大(圖十一)。依據核酸序列預測其可能的轉譯架構時，發現 PiVX-N2、N3 與 N4 為維持原本鞘蛋白轉譯架構(in frame)的選殖株(圖八和圖十一)，其中，PiVX-N2 包含 RdRp 之 N 端 233 個胺基酸及原本鞘蛋白 C 端完整的 61 個胺基酸；PiVX-N3 則是帶有 RdRp 之 N 端 48 個胺基酸及原本鞘蛋白 C 端完整的 214 個胺基酸；PiVX-N4 則保留了 RdRp 之 N 端 258 個胺基酸及原本鞘蛋白 C 端完整的 41 個胺基酸(圖八)。而 PiVX-N1 與 N5 則為無法維持原本鞘蛋白轉譯架構(out of frame)的選殖株，皆有胺基酸序列改變，並提早出現終止密碼的情形(圖十一)，其中，PiVX-N1 包含 RdRp 之 N 端 223 個胺基酸及改變後的 5 個胺基酸；PiVX-N5 則保留 RdRp 之 N 端 222 個胺基酸及改變後的 33 個胺基酸(圖八)。除此之外，PiVX 天然缺失性 RNA 在序列上的歧異度不高，PiVX-N1、N4 和 N5 皆只有零星的數個核苷酸位置出現變異，其中 PiVX-N1 在 PiVX5 序列上第 712 個核苷酸；PiVX-N2 在第 6404 個核苷酸；PiVX-N5 在第 460、487 與 6649 個核苷酸上出現改變。其中，PiVX-N1 與 N5 在 RdRp 序列上之改變皆不影響其胺基酸序列，而 PiVX-N2 在鞘蛋白序列上的改變則是會使其攜帶的胺基酸序列由 Ala 轉為 Glu (未出示資料)。

而由紅龍果中選殖出來的四種類型 PiVX 天然缺失性 RNA 中，只有 PiVX-P2 為 in frame 之選殖株；而 PiVX-P1、P3 及 P4 皆為 out of frame 選殖株。其中，PiVX-P1 包含 RdRp 之 N 端 186 個胺基酸及改變後的 6 個胺基酸；PiVX-P3 則保留 RdRp 之 N 端 42 個胺基酸及改變後的 3 個胺基酸；PiVX-P4 包含 RdRp 之 N 端 168 個胺基酸及改變後的至少 33 個胺基酸；而 in frame 選殖株 PiVX-P2 則保留了 RdRp 之 N 端 40 個胺基酸及原本鞘蛋白 C 端完整的 60 個胺基酸(圖八)。另外，在 PiVX-P1 類型中，PiVX-P1-4 在 PiVX5 序列上第 531 個核苷酸；PiVX-P1-19 在第 390、432 個核苷酸；PiVX-P1-38 在第 598 個核苷酸上出現改變，與 PiVX5 序列不同。其中，PiVX-P1-39 序列上之改變不影響其胺基酸序列，而 PiVX-P1-4 及 PiVX-P1-19 在序列上的改變則是會使其攜帶的胺基酸序列分別由 Met 轉為 Thr (PiVX-P1-4)及 Leu 轉為 Pro、Ile 轉為 Thr (PiVX-P1-19) (未出示資料)。

而在比較 PiVX 天然缺失性 RNA 所保留的序列區域及在白藜接種葉上的累積能力後，可發現當 5'保留區域長度為 204、206 及 228 個核苷酸時(圖七)，便無法在白藜接種葉偵測到缺失性 RNA 的累積(圖九和圖十)。

## 七、 5'端序列長度對 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上累積能力之影響

因先前數次接種試驗後，認為 PiVX-N1 在白藜上複製能力較為穩定，故使用 PiVX-N1 進行日後之試驗。為了解 5'保留序列對 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上累積能力的影響，利用可和 PiVX-N1 鞘蛋白保留序列起始位置專一性結合之正向引子 PiVX-map-F1 與可和 RdRp 保留序列不同位置專一性結合之反向引子 PiVX-map-R1 及 PiVX-map-R2，進行聚合酶連鎖反應，以建構帶有不同長度 RdRp 片段之 PiVX-N1 刪除突變株，稱之為 PiVX-R1 及 PiVX-R2。經定序後確定 PiVX-R1 缺失 562-755 nt 之片段；PiVX-R2 缺失 356-755 nt 之片段(圖十二-A)。

將 p35S-PiVX5 單獨或與 PiVX-N1、PiVX-R1、PiVX-R2、PiVX-MM 共同接種至 4 週大之白藜上，每株白藜接種 3 片葉子，於接種後第 7 天採集接種葉，以抽取植物全 RNA，並進行北方雜合反應。從實驗結果可以發現，在 PiVX 與 PiVX-N1 或與 R1 共同接種時，除 PiVX 基因體 RNA 外，亦可偵測到 PiVX-N1 及 R1 的累積；但 PiVX 與 PiVX-R2 或 MM 共同接種時，則只能偵測到 PiVX 基因體 RNA 累積，但卻偵測不到 PiVX-R2 或 MM 的累積(圖十二-B)。由此實驗結果可知，PiVX 缺失性 RNA 需保留 5'端至少 562 nt 之區域，以維持在白藜上正常之累積。

#### 八、 轉譯架構對 PiVX 缺失性 RNA 之重要性測試

為了解 PiVX 缺失性 RNA 之預測轉譯架構存在與否對其複製累積能力之影響，我們設計一對可和 PiVX-N1 轉譯架構啟動子前後序列進行黏合之 PiVX-dorf-F 與 PiVX-dorf-R，進行聚合酶連鎖反應，以將 PiVX-N1 上轉譯架構之起始密碼進行點突變，使其由 ATG 轉為 GUG，使 PiVX-N1 轉譯架構失去功能，稱此突變株為 PiVX-N1D。並將 p35S-PIVX5 單獨或分別與 PiVX-N1、PiVX-N1D 共同接種至白藜上，每株白藜接種 3 片葉子，於 7 天後收取全 RNA 進行北方雜合反應。由實驗結果可發現，PiVX-N1 與 PiVX-N1D 皆可偵測到在白藜接種葉上的累積，但 PiVX-N1D 累積之量較 PiVX-N1 來得低(圖十三)。

#### 九、 PiVX 缺失性 RNA 之預測轉譯架構在白藜上表現情形之分析

為進一步了解 PiVX 缺失性 RNA 的預測轉譯架構在植物上表現累積之情形，利用帶有 *XcmI* 限制酶切位之引子對 X2-4-tag-F 與 X2-4-tag-R，進行聚合酶連鎖反應，將帶有 C4 與 myc 蛋白標籤之 DNA 序列片段擴增出來，並以 *XcmI* 限制酶切位將此片段以維持轉譯架構的方式插入 PiVX-N1 中，經定序後預期將使 PiVX-N1 轉譯出之蛋白 C 端攜帶一段 C4 與 myc 蛋白標籤，可供偵測使用，稱此選殖株為 PiVX-N1-tag。將 p35S-PIVX5 單獨或分別與 PiVX-N1、PiVX-N1-tag



共同接種至白藜上，每株白藜接種 3 片葉子，於 7 天後收取接種葉萃取植物全蛋白質。並以北方雜合反應與西方墨漬法試驗觀察實驗結果。從結果上可以發現，在接種葉上，PiVX-N1-tag 與 PiVX-N1 之 RNA 累積並無顯著之差異(圖十四-A)，但卻在西方墨漬法中，無論使用 C4 抗體或 myc 抗體，皆無法偵測到 PiVX-N1 重組蛋白之累積。但若以 CP 抗體進行偵測，則可偵測到 35S-PiVX5 鞘蛋白之累積(圖十四-B)。由本實驗結果可知，缺失性 RNA 重組蛋白無法在白藜上明顯累積，顯示 PiVX 缺失性 RNA 攜帶的轉譯架構在白藜中可能不表現或累積量較低。



## 伍、 討論

PiVX 基因體組成與其他 potexvirus 相似(李, 2010), 因此在尚未選殖出天然產生之 PiVX 缺失性 RNA 前, 先嘗試依曾報導過之 potexvirus 缺失性 RNA 特性(White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999), 以人為方式構築一系列包含 PiVX 基因體 5' 端及 3' 端部分序列之 PiVX 人為缺失性 RNA(圖一)。將這些 PiVX 人為缺失性 RNA 單獨或與輔助病毒共同接種於菸草原生質體中, 結果顯示在輔助病毒 PiVX 存在下, PiVX 人為缺失性 RNA 皆具有被複製之能力。其中, PiVX-MM 僅具有 531 個核苷酸即具有被複製之能力, 故可推知在 5' 端 269 與 3' 端 362 個核苷酸區域序列應具有可被 PiVX 複製酶所辨識之 *cis-acting element*。而 PiVX-MM 於菸草原生質體中累積之量明顯高於其他人為缺失性 RNA(圖二), 推測其複製潛力應較其它人為缺失性 RNA 為佳, 其原因可能為 PiVX-MM 擁有最短之全長序列, 故在單位時間內具有最多之複製機會(Pathak & Nagy, 2009); 而觀察全長最長的 PiVX-AA, 也可發現累積量較其他人為缺失性 RNA 少(圖二), 但仍需進一步定量才能肯定。除受到本身長度之影響外, PiVX-MM 較短之基因體可能降低 PTGS 對其之影響, 進而提高 PiVX-MM 在細胞中的累積量(Szittyta, 2002); 但我們也發現 PiVX-MM 所殘留接種源量亦較高(圖二), 故不能排除 PiVX-MM 之 RNA 二級結構可能也較為穩定之因素。

進一步將此一系列入為缺失性 RNA 單獨或與 PiVX 共同接種至白藜植株, 從北方雜合反應的結果, 可以發現在輔助病毒 PiVX 存在的狀況下, PiVX-AB 及 EB 可在接種葉上複製累積, 但 PiVX-AA、BB 及 MM 則皆無法在白藜接種葉累積其 RNA(圖三)。推論最短的 PiVX-MM 可能已經缺失了與細胞間移動 (cell-to-cell movement) 相關之序列, 因而無法在植物組織中大量累積。而將無法累積的 PiVX-AA、BB 與可於葉片上累積之 PiVX-AB 進行比較, 可發現三者之

間主要差異為 PiVX-AA 於 3'端之保留區域較 PiVX-AB 長，而 PiVX-BB 則是於 5'端之保留區域較 PiVX-AB 長，PiVX-AA 與 BB 已包含 PiVX-AB 之序列(圖一)，故理論上，PiVX-AA 與 BB 皆應具有與於葉片上累積相關之序列，但卻仍然無法在接種葉上偵測到其累積，表示缺失性 RNA 除須保留必須之 *cis-acting element* 序列外，保留之區域長度亦為影響其累積能力之重要因子，這可能和較長之序列長度造成 PiVX-AA 與 BB 複製潛力較低、較易受到 PTGS 之影響(Szitty, 2002)，且較難以進行細胞間移動有關(Pathak & Nagy, 2009)。而在一些研究中，亦指出缺失干擾性 RNA 之增殖能力會直接受到其本身基因體長度之影響(Makino *et al.*, 1990)。但因本研究所使用之原生質體來自菸草，與植物接種試驗使用之白藜不同，故也不能排除有寄主因子的影響(Llamas *et al.*, 2004; Zhang & Nuss, 2008)。由此部分之實驗可知，利用人為方式將 PiVX 基因體進行改造，是可以模擬創造出人為缺失性 RNA，但如同其它病毒天然缺失干擾性或缺失性 RNA 一般，其生物活性仍受到許多因子之影響，包括：序列保留區域、序列長度、二級結構與寄主種類等，皆有可能影響到 PiVX 人為缺失性 RNA 之生物活性。

為了誘導 PiVX 天然缺失性 RNA 之產生，將高濃度 PiVX 連續繼代接種至白藜上，期間以北方雜合反應進行分析。從結果可以發現從接種第二代開始，除可偵測到 PiVX 基因體 RNA 訊號外，無論是否有接種 PiVX 人為缺失性 RNA 選植株，各處理皆可偵測到疑似 PiVX 天然缺失性 RNA 之訊號。健康植物樣本並未偵測到這些疑似 PiVX 天然缺失性 RNA 之訊號，因此可知它們必定是病毒基因體 RNA 之衍生物(圖五-A)。一方面為了觀察這些疑似 PVX 缺失性 RNA 之訊號是否穩定出現，一方面則是因在前人關於 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 的研究中，並沒有如此快速產生缺失性 RNA 的報導(Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)，所以繼續繼代接種試驗並持續以北方雜合反應進行分析。在接下來的兩次繼代中，這些疑似天然缺失性 RNA 的訊號仍持續出現(圖五

-B, C), 其中, 較為明顯的為一條大小約 3 kb 與數條約 1 kb 附近之訊號, 因此便針對這些核酸進行 TA 選殖。然而, 在進行 RT-PCR 後, 發現可擴增出大小約 1 kb 之產物, 但並未擴增出約 3 kb 大小之產物(圖六-A), 因此推測此約 3 kb 大小之片段可能具有病毒基因體 5'端之序列, 但卻缺乏 3'端之序列, 有可能為類似缺失性 RNA 之病毒基因體衍生物, 但尚待研究證明。在近幾年的報告中, 開始認為缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA 並非只是單純地對輔助病毒造成不利之影響, 而是有其它相對的有利功能, 使缺失性干擾性 RNA 或缺失性 RNA 可在演化的過程中被保留下來(Pathak & Nagy, 2009; Simon *et al.*, 2004)。而在本研究中, 我們發現 PiVX 產生缺失性 RNA 的速度相當快, 且此一現象在我們的試驗過程中相當穩定的出現; 因此, 我們推測 PiVX 以如此快速的方式產生缺失性 RNA, 應有兩者在共演化上之意義, 但仍需進一步的研究以了解其關係為何。

從連續繼代接種 PiVX 之白藜接種葉, 以及長時間感染 PiVX 之紅龍果植株上, 我們一共選殖出 9 種不同類型之缺失性 RNA, 這 9 種缺失性 RNA 皆為 PiVX 基因體缺失中間大片段序列後, 由 5'端 214-859 個核苷酸與 3'端 73-768 個核苷酸重新組合而成(圖七)。將這 9 種缺失性 RNA 混合輔助病毒 PiVX 共同接種至白藜上, 發現由白藜選殖出來的天然缺失性 RNA 中, 除了 PiVX-N3 之外, PiVX-N1、N2、N4 及 N5 皆能在白藜接種葉上累積(圖九)。而由紅龍果中選殖出來的天然缺失性 RNA 中, 只有 PiVX-P1 類型可以在白藜接種葉中偵測到累積(圖十)。在比較 PiVX-N3 與人為缺失性 RNA 之序列後, 我們認為其無法在植物組織中累積可能與其較 PiVX-MM 短的 5'端保留區域, 以及較 PiVX-BB 長的 3'端保留區域有關。而 PiVX-N1、N2、N4、N5 及 P1 等可在植物組織中累積的天然缺失性 RNA 所保留區域與長度之類型則和其它 *Potexvirus* 病毒缺失性 RNA 相似, 因 PiVX 基因體組成与其它 *Potexvirus* 相同, 故其 *cis-acting element* 所在區域可能也較為相似的緣故(李, 2010)。

在同屬 *Potexvirus* 的 CIYMV 缺失性 RNA 研究上發現，CIYMV 缺失性 RNA 攜帶了一個由其複製酶與鞘蛋白以相同轉譯架(in frame)方式組成的融合蛋白轉譯架構(White *et al.*, 1991)。而對 CIYMV 缺失性 RNA 而言，保有鞘蛋白基因原本之轉譯架構是相當重要的，當破壞兩基因之間的轉譯架構使其不再保有原鞘蛋白基因之轉譯架構，則 CIYMV 缺失性 RNA 會失去複製之能力(White *et al.*, 1992)。在 poliovirus 與 coronavirus 上發現之缺失干擾性 RNA 亦有類似的情況(Hagino-Yamagishi & Nomoto, 1989; van der Most *et al.*, 1991)。在以程式預測 PiVX 天然缺失性 RNA 後發現，PiVX-N2、N3、N4 與 P2 維持了一個由複製酶與鞘蛋白序列 in frame 組合之融合蛋白轉譯架構，但 PiVX-N1、N5、P1、P3 及 P4 則出現了兩基因間轉譯架轉換，未維持原本鞘蛋白部分之轉譯架構(圖八和圖十一)。但比對在植物上生物活性測試之結果，PiVX- N1、N2、N4、N5 及 P1 皆可在植物組織中複製累積(圖九和圖十)，代表了在 PiVX 天然缺失性 RNA 中，複製酶與鞘蛋白 in frame 之轉譯架構的維持，對缺失性 RNA 在植物組織中複製累積之能力並不具決定性的影響。此特性與 CIYMV 缺失性 RNA 明顯不同，但與由菸草中選殖出之 BaMV 缺失性 RNA 相同(李, 2000)。

前人研究顯示轉譯架構的維持與否對 BaMV 缺失性 RNA 的增殖有決定性的影響，利用點突變使 BaMV 缺失性 RNA 喪失攜帶之 RdRp 轉譯架構後，BaMV 缺失性 RNA 亦失去其增殖能力(李, 2000)。但在本研究中，我們發現即使將 PiVX-N1 之 RdRp 轉譯架構以點突變方式除去，其仍可在輔助病毒的協助下於植物上進行複製與累積，但其 RNA 累積量下降(圖十三)，表示轉譯架構的維持與否對 PiVX 缺失性 RNA 的增殖可能有影響，但並非必要性。在 *Potexvirus* 屬病毒的 5' 非轉譯區域(untranslation region, UTR)的研究中，發現其在轉譯起始密碼附近具有四大類保守性的二級結構(Chen *et al.*, 2010)，並在之後的研究中發現

BaMV 衛星核酸(satBaMV)也具有相似之結構，且此結構應和複製酶進行 RNA 合成作用有關，而 satBaMV 可能是以此二級結構和 BaMV 競爭複製酶(Chen *et al.*, 2012)。當我們以 MFOLD 程式分析 PiVX 5'UTR 之序列，可以預測出 PiVX 轉譯起始密碼附近也具有保守的二級結構，而我們將起始碼由 AUG 突變成 GUG，預期並不會改變此保守的二級結構(圖十五)，這或許是 PiVX-N1D 能維持一定之累積量的原因，但仍需更多實驗以證明此一假設。

我們推測 PiVX-MM 已經缺失了在植物組織中累積必須之序列，在與可在葉片上累積的 PiVX-N1 進行比較後，我們推測這段序列應存在於 270-755 nt 之間。為更仔細的將此段序列找尋出來，我們構築了缺失 270-755 nt 間不同長度之 PiVX-N1 突變株進行試驗。結果顯示當我們將 356-562 nt 區域移除後，PiVX-R2 便失去了在葉片上累積之能力(圖十二)，由此得知此區域序列應具有 PiVX 缺失性 RNA 於植物組織中累積必須之序列。但在 PVX 的研究中，PVX 進行細胞間移動之相關 *cis-acting element* 被認為存在於 PVX 序列 1-107 nt 區段上，而此段序列也存在一個保守的二級結構(Lough *et al.*, 2006)，這與我們在 PiVX 缺失性 RNA 上所得到的結果有相當的差異。因此我們雖知道 PiVX 缺失性 RNA 至少需保留 356-562 nt 區域，方能在植物組織中累積，但我們無法肯定此段區域是否具有決定細胞間移動之 *cis-acting element*，但本試驗之結果，仍可成為日後將 PiVX 缺失性 RNA 應用於病毒研究上的參考。

在植物病毒中，許多缺失干擾性 RNA 攜帶之轉譯架構已被證實具有功能性，並可在寄主細胞中偵測到其攜帶之蛋白質，並且被認為這些蛋白質有可能參與缺失性 RNA 之增殖過程(White *et al.*, 1991)。此種特性亦使缺失性 RNA 具有作為病毒載體表現外源蛋白之潛力，事實上，也已有許多成功利用的例子(Naumer, 2005; Sandoval *et al.*, 2008)。而在 *Potexvirus* 缺失性 RNA 中，CIYMV 與 BaMV 缺失性

RNA 皆已被證實可以生體外轉譯的方式產生所攜帶的重組蛋白(White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)，但並無直接在寄主中偵測到重組蛋白累積的紀錄。為了進一步了解 PiVX 缺失性 RNA 攜帶之轉譯架構特性，我們在 PiVX-N1 蛋白質 C 端接上了兩個蛋白標籤(epitope tag)，以測試其重組蛋白在白藜接種葉上表現累積之情形。結果我們並未在植物中偵測到 PiVX-N1 蛋白質的累積(圖十四-B)。雖然如此，但在我們針對轉譯架構的試驗中，轉譯作用的存在與否似仍會對 PiVX 缺失性 RNA 之累積產生影響(圖十三)，因此，我們仍認為 PiVX 缺失性 RNA 重組蛋白的轉譯作用在寄主細胞中仍會進行，並且對 PiVX 缺失性 RNA 增殖具有一定之協助作用。而我們無法在寄主細胞中偵測到轉譯出之重組蛋白，則推測可能因為在病毒的增殖過程中，複製酶之轉譯量需求並不似鞘蛋白那麼高；或是其蛋白表現具有特定高峰期，並非持續穩定表現；也可能為轉譯出之蛋白質並非十分穩定，以致我們無法在寄主細胞中偵測到明顯累積；這可能也暗示了轉譯作用本身對 PiVX 缺失性 RNA 增殖能力影響大於其轉譯出之重組蛋白。在我們的試驗中，PiVX 缺失性 RNA 在植物中之累積量仍然高且穩定(圖十四-A)，因而若是以 PiVX 缺失性 RNA 為基礎進行外源蛋白表現，可嘗試以導入鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子(subgenomic RNA promoter)，以增加外源蛋白表現量(Lico *et al.*, 2008)。

在缺失干擾性 RNA 形成機制中，無論是 replicase driven template-switching mechanism 或 forced template-switching mechanism 皆須經過 template-switching 的 RNA 重組過程(Pathak & Nagy, 2009)。而在 1999 年 Yeh 等人的研究中，認為 *Potexvirus* 缺失性 RNA 形成的 RNA 重組機制很有可能為 similarity-assisted recombination (Yeh *et al.*, 1999)。此機制序列上的特性有二，其一為 acceptor template 與 donor template 在接合點區域的序列上具有一定之相似性，換言之，即是新生 RNA 片段與 acceptor template 接合區域有互補性；其二為在 acceptor

template 接合區域具有特定之二級結構存在，作為複製酶轉移之訊號(Nagy & Simon, 1997)。在其它 *Potexvirus* 缺失性 RNA 中，此種序列相似程度約為 65-84% (Yeh *et al.*, 1999)，而將由紅龍果中選殖出之 PiVX 缺失性 RNA 進行序列分析後，發現 PiVX 缺失性 RNA 也有類似的序列相似性，其相似程度約在 66-95% (圖十六)，但以程式預測 PiVX 缺失性 RNA 接合區域之序列二級結構，我們可以發現在 acceptor template 接合點位置附近皆有出現莖環結構(stem-loop structure)，但並沒有發現一個保守的結構存在(未出示資料)，因此，我們無法判斷 PiVX 缺失性 RNA 形成時，RNA 重組之模式為 similarity-assisted recombination 或是 similarity-essential recombination。

綜觀本研究，我們發現了 PiVX 具有缺失性 RNA，這是第四種被報導具有缺失性 RNA 之 *Potexvirus* 屬植物病毒，也是仙人掌科植物病毒第一次被發現具有缺失性 RNA，而 PiVX 雖屬於 *Potexvirus* 屬植物病毒，但其在寄主及序列特性上與其它 *Potexvirus* 屬植物病毒有相當大的差異。如同其親緣病毒，PiVX 缺失性 RNA 與其它 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 亦是同中存異，雖具有相似的組成區域及長度，但在生物特性上卻存在許多差異。值得一提的是，PiVX 除了能以高濃度病毒接種的方式，以遠較其它植物病毒快速地產生缺失性 RNA 外，在天然寄主上也能自然地產生缺失性 RNA，這與大部分植物病毒缺失性 RNA 需在實驗環境中誘導產生有極大的不同。事實上，這暗示了 PiVX 及其缺失性 RNA 之間具有更緊密的關聯性，若我們能更進一步了解此一現象，也許能為我們揭露缺失干擾性 RNA 或缺失性 RNA 在病毒演化上佔據之角色。PiVX 作為本實驗室新報導之病毒，我們對 PiVX 許多特性仍然不甚了解。而在本研究中，我們已經成功以人為及天然選殖的方式取得 PiVX 之缺失性 RNA，並進一步分析其基本特性。本研究成果為進一步研究 PiVX 與其它仙人掌科植物病毒提供了一個相當良好的材料。



## 陸、 參考資料

1. 王智立、林正忠。2005。紅龍果果腐病及仙人掌莖腐病。植物病理學會會刊。14:269–274。
2. 毛青樺。2008。蟹爪蘭 X 病毒與紅龍果 X 病毒之分子特性與檢測。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
3. 李慧君。1997。竹嵌紋病毒缺失性 RNA 的選殖與分析。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
4. 李淑娟。2000。影響竹嵌紋病毒缺失性 RNA 增殖之因子。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
5. 李勇賜。2010。紅龍果 X 病毒之特性分析、感染力選植株構築與抗血清製備。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
6. 林正忠、郭韋柏、蔡淑芬。2006。台灣紅龍果病害。豐年。56:38–41。
7. 徐萬德。2004。仙人掌紅龍果之栽培、生育習性及物候調查。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
8. 劉命如、洪建龍、劉瑞芬。2004。引起紅龍果斑駁病徵之 *Cactus virus X* 的鑑定與免疫檢測。植物病理學會會刊。13:27–34。
9. 楊恭毅。1984。陽氏園藝植物大名典。中國花卉雜誌社。7184 頁。
10. Bouzoubaa, S., Niesbach-Klösgen, U., Jupin, I., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1991. Shortened forms of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 and -4: internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology*. 72 ( Pt 2):259–66.
11. Burgyan, J., and Grieco, F. 1989. A defective interfering RNA molecule in *Cymbidium ringspot virus* infections. *Journal of General Virology*. 70:235–239.
12. Calvert, L. A., Cuervo, M. I., Ospina, M. D., Fauquet, C. M., and Ramirez, B.-C. 1996. Characterization of *Cassava common mosaic virus* and a defective RNA species. *Journal of General Virology*. 77:525–530.
13. Chen, H.-C., Kong, L.-R., Yeh, T.-Y., Cheng, C.-P., Hsu, Y.-H., and Lin, N.-S. 2012. The conserved 5' apical hairpin stem loops of *Bamboo mosaic virus* and its satellite RNA contribute to replication competence. *Nucleic Acids Research*. 40:4641–52.

14. Chen, J., MacFarlane, S. A., and Wilson, T. M. 1994. Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of *Soil-borne wheat mosaic virus* RNA2 associated with increased symptom severity. *Virology*. 202:921–9.
15. Chen, S.-C., Desprez, A., and Olsthoorn, R. C. L. 2010. Structural homology between *Bamboo mosaic virus* and its satellite RNAs in the 5'untranslated region. *Journal of General Virology*. 91:782–7.
16. Cheng, C.-P., and Nagy, P. D. 2003. Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *Journal of Virology*. 77:12033–47.
17. Chuang, M. F., Ni, H. F., Yang, H. R., Shu, S. L., Lai, S. Y., and Jiang, Y. L. 2012. First report of stem canker disease of pitaya ( *Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus* ) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*. 96:906–906.
18. Cole, C. N., Smoler, D., Wimmer, E., and Baltimore, D. 1971. Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties. *Journal of Virology*. 7:478–85.
19. Collmer, C. W., and Howell, S. H. 1992. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 30:419–42.
20. Damayanti, T. a, Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. 1999. *Brome mosaic virus* defective RNAs generated during infection of barley plants. *Journal of General Virology*. 80 ( Pt 9):2511–8.
21. Francki, R. I. 1985. Plant virus satellites. *Annual Review of Microbiology*. 39:151–74.
22. Friedewald, W. F. 1944. Centrifugation and ultrafiltration studies on allantoic fluid preparations of influenza virus. *Journal of Experimental Medicine*. 79:301–317.
23. Graves, M., and Roossinck, M. 1995. Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of *Cucumber mosaic cucumovirus*. *Journal of Virology*. 69:4746–4751.
24. Graves, M. V., Pogany, J., and Romero, J. 1996. Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Seminars in Virology*. 7:399–408.

25. Henle, W., and Lief, F. S. 1956. Studies on the soluble antigen of influenza virus. III. The decreased incorporation of S antigen into elementary bodies of increasing incompleteness. *Virology*. 2:782–97.
26. Huang, A. S., and Baltimore, D. 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature*. 226:325–327.
27. Hackett, A. J. 1964. A possible morphologic basis for the autointerference phenomenon in *Vesicular stomatitis virus*. *Virology*. 24:51–59
28. Hagino-Yamagishi, K., and Nomoto, A. 1989. In vitro construction of poliovirus defective interfering particles. *Journal of Virology*. 63:5386–92.
29. Havelda, Z., Hornyik, C., Válóczy, A., and Burgyán, J. 2005. Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *Journal of Virology*. 79:450–7.
30. Hehn, A., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Guilley, H., and Richards, K. E. 1994. Artificial defective interfering RNAs derived from RNA 2 of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Archives of Virology*. 135:143–151.
31. Hillman, B. I., Carrington, J. C., and Morris, T. J. 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell*. 51:427–33.
32. Jones, R. W., Jackson, A. O., and Morris, T. J. 1990. Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of *Tomato bushy stunt virus* in inoculated protoplasts. *Virology*.
33. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., and Carstens, E. B., eds. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 9th ed. Amsterdam: Elsevier.
34. Knorr, D. A., Mullin, R. H., Hearne, P. Q., and Morris, T. J. 1991. De novo generation of defective interfering RNAs of *Tomato bushy stunt virus* by high multiplicity passage. *Virology*. 181:193–202.
35. Kollár, A., Dalmay, T., and Burgyán, J. 1993. Defective interfering RNA-mediated resistance against *Cymbidium ringspot tombusvirus* in transgenic plants. *Virology*. 193:313–8.
36. Li, X. H., Heaton, L. a, Morris, T. J., and Simon, a E. 1989. *Turnip crinkle virus* defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated de novo.

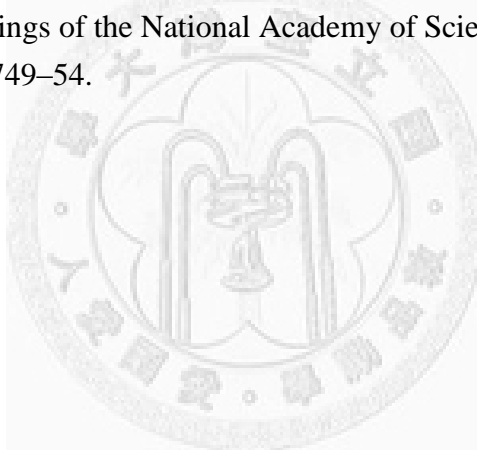
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86:9173–7.

37. Lico, C., Chen, Q., and Santi, L. 2008. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology*. 216:366–77.
38. Llamas, S., Sandoval, C., Babin, M., Pogany, J., Bujarski, J. J., and Romero, J. 2004. Effect of the host and temperature on the formation of defective RNAs associated with *Broad bean mottle virus* infection. *Phytopathology*. 94:69–75.
39. Lough, T. J., Lee, R. H., Emerson, S. J., Forster, R. L. S., and Lucas, W. J. 2006. Functional analysis of the 5' untranslated region of potexvirus RNA reveals a role in viral replication and cell-to-cell movement. *Virology*. 351:455–65.
40. Von Magnus, P. 1954. Incomplete forms of influenza virus. *Advances in Virus Research*. 2:59–79.
41. Makino, S., Shieh, C. K., Soe, L. H., Baker, S. C., and Lai, M. M. 1988. Primary structure and translation of a defective interfering RNA of murine coronavirus. *Virology*. 166:550–60.
42. Makino, S., Yokomori, K., and Lai, M. M. 1990. Analysis of efficiently packaged defective interfering RNAs of murine coronavirus: localization of a possible RNA-packaging signal. *Journal of Virology*. 64:6045–53.
43. Marsh, L. E., Pogue, G. P., Connell, J. P., and Hall, T. C. 1991. Artificial defective interfering RNAs derived from *Brome mosaic virus*. *Journal of General Virology*. 72 ( Pt 8):1787–92.
44. Mawassi, M., Karasev, A. V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R. F., Dawson, W. O., et al. 1995. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology*. 208:383–7.
45. van der Most, R. G., Bredenbeek, P. J., and Spaan, W. J. 1991. A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs. *Journal of Virology*. 65:3219–26.
46. Nagy, P. D., and Simon, A. E. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology*. 235:1–9.
47. Pathak, K. B., and Nagy, P. D. 2009. Defective interfering RNAs: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses*. 1:895–919.

48. Pogany, J., and Nagy, P. D. 2008. Authentic replication and recombination of *Tomato bushy stunt virus* RNA in a cell-free extract from yeast. *Journal of Virology*. 82:5967–80.
49. Pogany, J., Romero, J., Huang, Q., Sgro, J. Y., Shang, H., and Bujarski, J. J. 1995. De novo generation of defective interfering-like RNAs in *Broad bean mottle bromovirus*. *Virology*. 212:574–86.
50. Pogany, J., White, K. A., and Nagy, P. D. 2005. Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *Journal of Virology*. 79:4859–69.
51. Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, J. M., Schneider, I. R., and Bruening, G. 1985. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*. 737:24–27.
52. Péntzes, Z., Wroe, C., Brown, T. D., Britton, P., and Cavanagh, D. 1996. Replication and packaging of coronavirus infectious bronchitis virus defective RNAs lacking a long open reading frame. *Journal of Virology*. 70:8660–8.
53. Qiu, W., and Scholthof, H. B. 2007. Using vectors derived from *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) and TBSV defective interfering RNAs (DIs). *Current Protocols in Microbiology*. Chapter 16:Unit 16I.4.
54. Rochon, D. M. 1991. Rapid de novo generation of defective interfering RNA by *Cucumber necrosis virus* mutants that do not express the 20-kDa nonstructural protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:11153–7.
55. Rochon, D. M., Finnen, R. L., and Sit, T. L. 1994. Coat protein of *Cucumber necrosis virus* is not required for efficient generation or accumulation of defective interfering RNAs. *Journal of General Virology*. 75 ( Pt 9):2505–8.
56. Romero, J., Huang, Q., Pogany, J., and Bujarski, J. J. 1993. Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of *Broad bean mottle virus* infections. *Virology*. 194:576–84.
57. Roux, L., Simon, A. E., and Holland, J. J. 1991. Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis. *Advances in Virus Research*. 40:181–211.

58. Sandoval, C., Pogany, J., Bujarski, J., and Romero, J. 2008. Use of a defective RNA of *Broad bean mottle bromovirus* for stable gene expression in legumes. *Archives of Virology*. 153:1755–8.
59. Scholthof, K. B., Scholthof, H. B., and Jackson, a O. 1995. The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of *Tomato bushy stunt virus* proteins and implications for disease attenuation. *Virology*. 211:324–8.
60. Simon, A. E., Roossinck, M. J., and Havelda, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology*. 42:415–37.
61. Szittyá, G. 2002. Short Defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell Online*. 14:359–372.
62. Sztuba-Solińska, J., Urbanowicz, A., Figlerowicz, M., and Bujarski, J. J. 2011. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annual Review of Phytopathology*. 49:415–43.
63. Takeshita, M., Matsuo, Y., Suzuki, M., Furuya, N., Tsuchiya, K., and Takanami, Y. 2009. Impact of a defective RNA 3 from *Cucumber mosaic virus* on helper virus infection dynamics. *Virology*. 389:59–65.
64. White, K. A., and Morris, T. J. 1999. Defective and defective interfering RNAs of monopartite plus-strand RNA plant viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 239:1–17.
65. White, K. a, Bancroft, J. B., and Mackie, G. a. 1991. Defective RNAs of *Clover yellow mosaic virus* encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology*. 183:479–86.
66. White, K. a, Bancroft, J. B., and Mackie, G. a. 1992. Coding capacity determines in vivo accumulation of a defective RNA of *Clover yellow mosaic virus*. *Journal of Virology*. 66:3069–76.
67. White, K. a, and Morris, T. J. 1994. Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *Journal of Virology*. 68:14–24.
68. White, K. a, and Morris, T. J. 1994. Enhanced competitiveness of *Tomato bushy stunt virus* defective interfering RNAs by segment duplication or nucleotide insertion. *Journal of Virology*. 68:6092–6.

69. Wierchoslawski, R., and Bujarski, J. J. 2006. Efficient in vitro system of homologous recombination in *Brome mosaic bromovirus*. *Journal of Virology*. 80:6182–7.
70. Wu, B., and White, K. a. 1998. Formation and amplification of a novel tombusvirus defective RNA which lacks the 5' nontranslated region of the viral genome. *Journal of Virology*. 72:9897–905.
71. Yeh, T. Y., Lin, B. Y., Chang, Y. C., Hsu, Y. H., and Lin, N. S. 1999. A defective RNA associated with *Bamboo mosaic virus* and the possible common mechanisms for RNA recombination in *Potexviruses*. *Virus Genes*. 18:121–8.
72. Zhang, C. X., Cascone, P. J., and Simon, a E. 1991. Recombination between satellite and genomic RNAs of *Turnip crinkle virus*. *Virology*. 184:791–4.
73. Zhang, X., and Nuss, D. L. 2008. A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:16749–54.



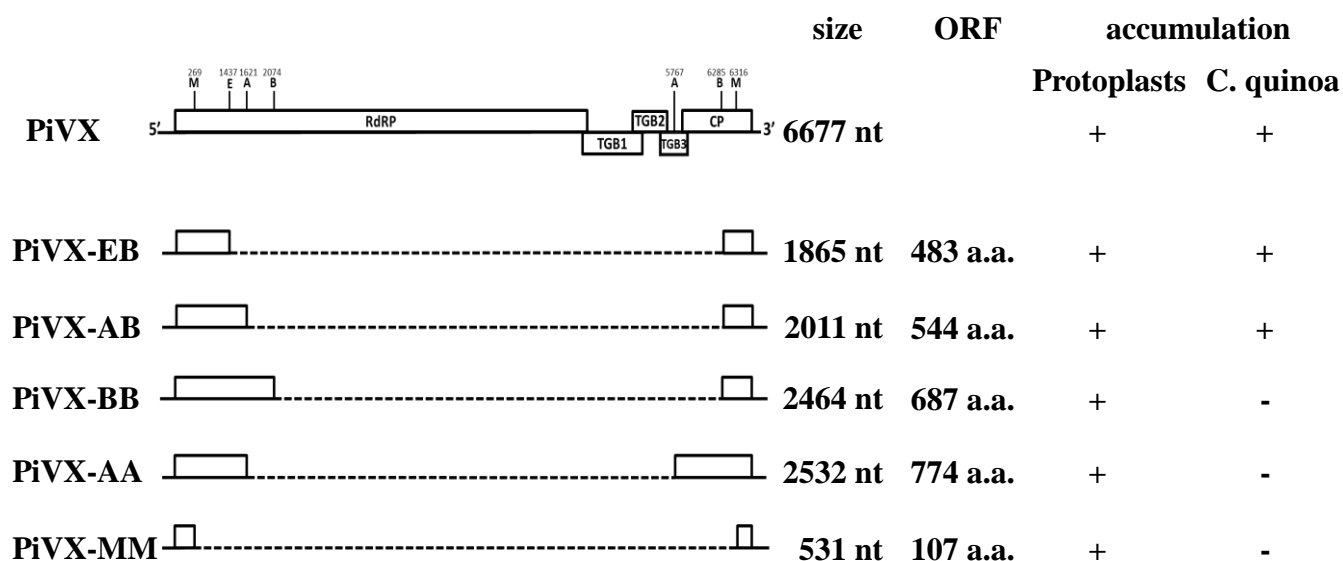




表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. The primers used in this study.

Primer name	Sequence (5'-3')
PiVX-F	GGAAAACCAACCCAAACCAAACCTACCTC
PiVX-dTBam	AGCTGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGAAACT TGCATTAAAACAGAAGGC
PiVX-R6	CTCTATAGCTTTGGCCGCTCCG
PiVX-F-T7-sal	ATCGGTCGACTAATACGACTCACTATAGGAAAACCA ACCCAAACCAAACCTACCTC
PiVX-map-F1	AACCACCTCCGCTCTGGTGAATAAAGG
PiVX-map-R1	GAGTAGGGCTCCAGAAGTGGAGCG
PiVX-map-R2	CTGGGTTTTCCTTTGGGAGGTAGTTAGC
PiVX-dorf-F	GTATATATTTTCCTTTTAGTGGCTCGAGTACGCGAGGT TTTC
PiVX-dorf-R	GAAAACCTCGCGTACTCGAGCCACTAAAAGGAAATA TATAC
X2-4-tag-F	ATCGCCACCTCCGCTCTGGGAACAGAACTGATCTC TGAAGAA
X2-4-tag-R	ATCGCCAGAGCGGAGGTGGATATTCAATTTGCTCCTC ACCATCC

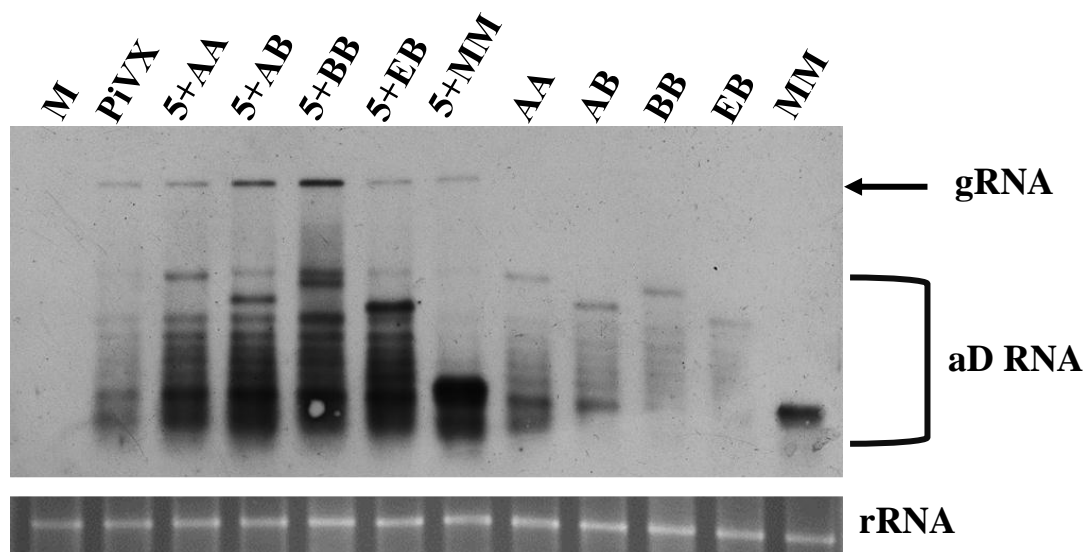


圖一、PiVX人為缺失性RNA之圖譜。

以p35S-PiVX5為材料，在其序列上選擇合適之切位，移除PiVX基因體部分序列，以構築PiVX人為缺失性RNA。PiVX-EB長度為1865個核苷酸，PiVX-AB長度為2011個核苷酸，PiVX-BB長度為2464個核苷酸，PiVX-AA長度為2532個核苷酸，PiVX-MM長度為531個核苷酸。限制酶切位縮寫如下：A：*AgeI*；B：*BstXI*；E：*EagI*；M：*MscI*。

Fig 1. The maps of PiVX artificial defective RNAs.

PiVX artificial defective RNAs were constructed by removing part of p35S-PiVX5 sequences with the help of restriction enzyme digestion. The length of PiVX-EB is 1865 nt; the length of PiVX-AB is 2011 nt; the length of PiVX-BB is 2464 nt; the length of PiVX-AA is 2532 nt; the length of PiVX-MM is 531 nt. Restriction enzyme sites: A: *AgeI*; B: *BstXI*; E: *EagI*; M: *MscI*.

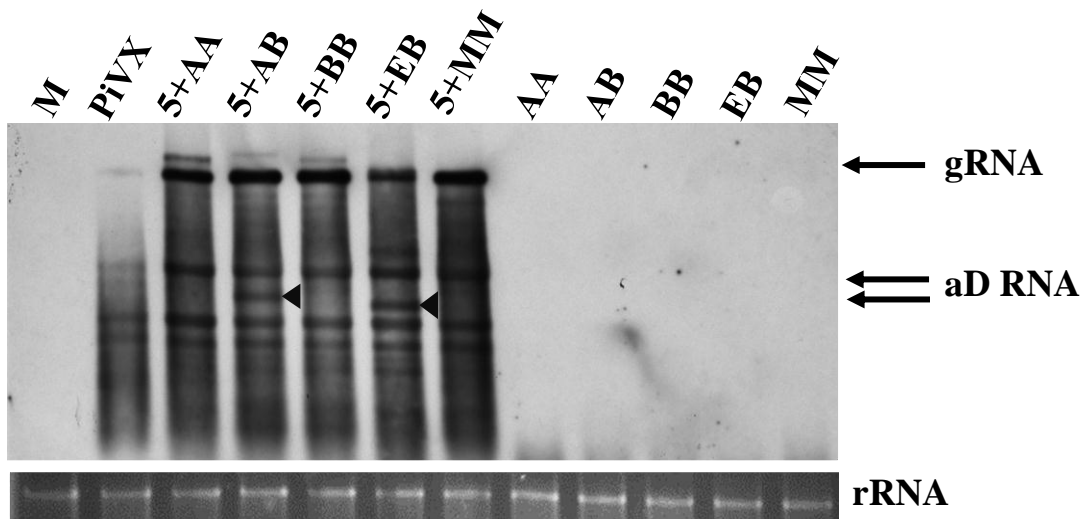


圖二、以北方雜合反應分析PiVX人為缺失性RNA於菸草原生質體中之複製能力。

為測試PiVX人為缺失性RNA在單細胞中之複製能力，將PiVX人為缺失性RNA：PiVX-AA、AB、BB、EB和MM之生體外轉錄體單獨接種，或是混合PiVX生體外轉錄體，以莫耳數6：1共同接種至菸草原生質體中。24小時後，抽取原生質體全RNA，並以PiVX之5'端專一性探針進行北方雜合分析。其中M為接種transcription buffer之處理；PiVX為單獨接種PiVX生體外轉錄體之處理；5 + AA、5 + AB、5 + BB、5 + EB與5 + MM為PiVX生體外轉錄體與人為缺失性RNA生體外轉錄體共同接種之處理；AA、AB、BB、EB與MM為單獨接種人為缺失性RNA生體外轉錄體之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；aD RNA代表人為缺失性RNA之大小範圍。

Fig 2. The biological activity analysis of PiVX artificial defective RNAs in *N. benthamiana* protoplasts by Northern hybridization.

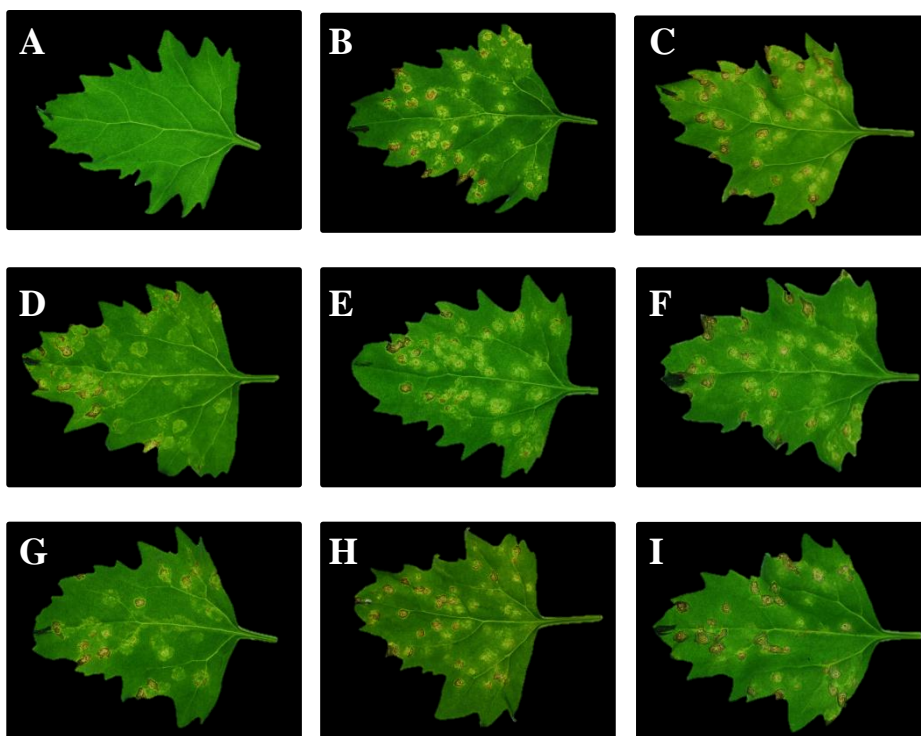
For analyzing biological activity of PiVX artificial defective RNAs, *N. benthamiana* protoplasts were inoculated with PiVX artificial defective RNA transcripts alone or mixture of PiVX artificial defective RNA and PiVX transcripts (molar ratio 6:1). An RNA blot assay of total RNA from *N. benthamiana* protoplasts was conducted with PiVX 5' probe. M: Sample inoculated with transcription buffer; PiVX: sample inoculated with PiVX transcripts alone; 5 + AA, 5 + AB, 5 + BB, 5 + EB and 5 + MM: samples inoculated with mixture of PiVX artificial defective RNA and PiVX transcripts; AA, AB, BB, EB and MM: samples inoculated with PiVX artificial defective RNA transcripts alone. gRNA: size of PiVX genomic RNA; aD RNA: sizes of PiVX artificial defective RNAs.



圖三、以北方雜合反應分析PiVX人為缺失性RNA於白藜上之累積能力。為了解PiVX人為缺失性RNA在植物上累積之能力。使用4週大之白藜，將PiVX人為缺失性RNA質體DNA單獨接種，或與 p35S-PiVX5 共同接種至白藜葉片上，總共接種3片。於接種後7天收取接種葉，萃取植物全RNA，並以PiVX之5'端專一性探針進行北方雜合分析。其中M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種 p35S-PiVX5 之處理；5 + AA、5 + AB、5 + BB、5 + EB與5 + MM為p35S-PiVX5 與人為缺失性RNA共同接種之處理；AA、AB、BB、EB與MM為單獨接種人為缺失性RNA之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；aD RNA代表人為缺失性RNA之大小。

Fig 3. The biological activity analysis of PiVX artificial defective RNAs in *C. quinoa* plants by Northern hybridization.

For analyzing biological activity of PiVX artificial defective RNAs in plants, *C. quinoa* plants were inoculated with plasmid clones of PiVX artificial defective RNAs alone or mixture of PiVX artificial defective RNAs and PiVX plasmid clones. An RNA blot assay of total RNA from *C. quinoa* inoculated leaf was conducted with PiVX 5' probe. M: sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + AA, 5 + AB, 5 + BB, 5 + EB and 5 + MM: samples inoculated with mixture of PiVX artificial defective RNA and PiVX; AA, AB, BB, EB and MM: samples inoculated with PiVX artificial defective RNA alone. gRNA: Size of PiVX genomic RNA; aD RNA: Sizes of PiVX artificial defective RNAs.

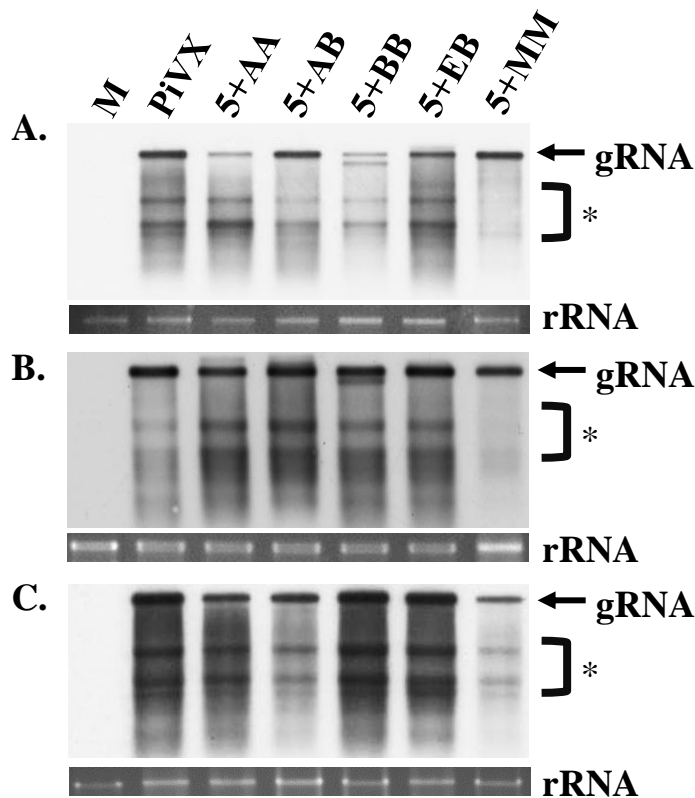


圖四、接種PiVX及PiVX缺失性RNA之白藜接種葉病徵。

取p35S-PiVX5及PiVX缺失性RNA質體DNA接種至白藜，每株接種3片葉子。14天後接種葉病徵。(A)接種無菌水之處理。(B)單獨接種p35S-PiVX5之處理。(C)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-AB之處理。(D)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-EB之處理。(E)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-N1之處理。(F)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-N2之處理。(G)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-N4之處理。(H)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-N5之處理。(I)共同接種p35S-PiVX5與PiVX-P1-39之處理。

Fig 4. The symptoms caused by PiVX and PiVX defective RNAs.

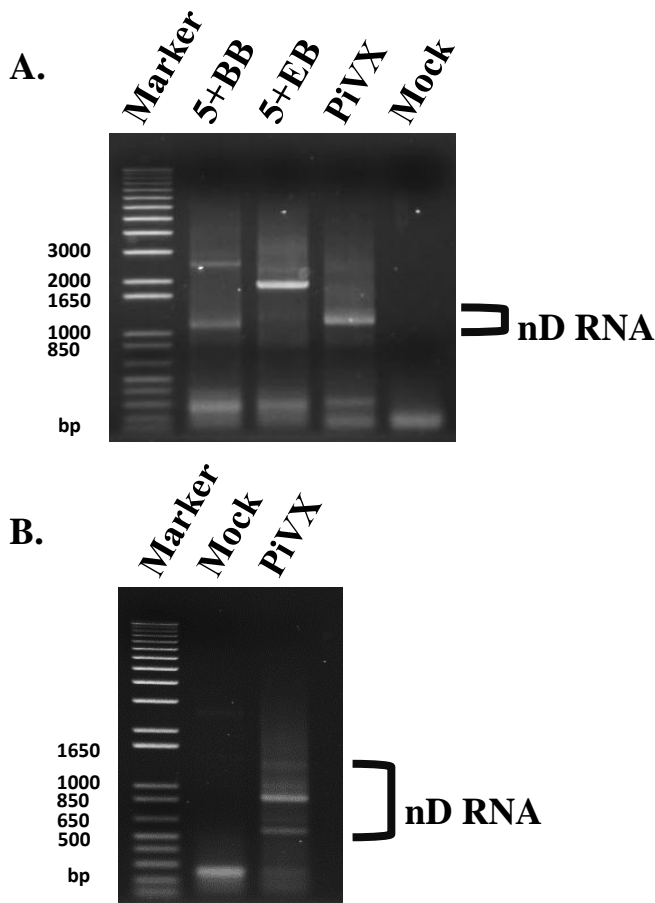
Plasmid DNAs of PiVX and PiVX defective RNAs were inoculated to *C. quinoa* plants. After 14 days, the inoculated leaves were harvested and photographed. (A) Sample inoculated with water; (B) sample inoculated with PiVX alone; (C) sample inoculated with PiVX-AB and PiVX; (D) sample inoculated with PiVX-EB and PiVX; (E) sample inoculated with PiVX-N1 and PiVX; (F) sample inoculated with PiVX-N2 and PiVX; (G) sample inoculated with PiVX-N4 and PiVX; (H) sample inoculated with PiVX-N5 and PiVX; (I) sample inoculated with PiVX-P1-39 and PiVX.



圖五、以北方雜合反應分析在白藜上誘導產生PiVX天然缺失性RNA之情形。為瞭解PiVX天然缺失性RNA在植物上產生之情形，將p35S-PiVX5接種至4週大之白藜，7天後摘取接種葉，以緩衝液研磨後，作為繼代接種源接種至健康的4週大白藜。另一組於接種p35S-PiVX5後3天，於接種葉再接種PiVX人為缺失性RNA質體DNA。並於每次繼代時，取部分葉片萃取植物全RNA，以北方雜合法應進行分析。圖A、圖B與圖C分別為接種第二代(一次繼代)、第三代與第四代之情形。其中，M為繼代接種無菌水之處理；PiVX為單獨繼代接種p35S-PiVX5之處理；5 + AA、5 + AB、5 + BB、5 + EB與5 + MM為p35S-PiVX5 與人為缺失性RNA共同繼代接種之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；\*代表疑似PiVX天然缺失性RNA之訊號。

Fig 5. De novo generation of PiVX defective RNAs on *C. quinoa* plants analyzed by Northern hybridization.

PiVX or mixture of PiVX artificial defective RNAs and PiVX were inoculated to *C. quinoa* plants to reveal the situation of *de novo* generation of PiVX defective RNAs in plants. After 7 days, inoculated leaves were used to inoculate healthy *C. quinoa* plants. An RNA blot assay of total RNA from inoculated leaves of *C. quinoa* at every passage was assayed by PiVX 5' probe. (A) Samples of secondary passage; (B) samples of third passage; (C) samples of fourth passage; M: sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + AA, 5 + AB, 5 + BB, 5 + EB and 5 + MM: samples inoculated with mixture of PiVX artificial defective RNA and PiVX. gRNA: size of PiVX genomic RNA; \*: Suspected sizes of PiVX naturally occurring defective RNAs.

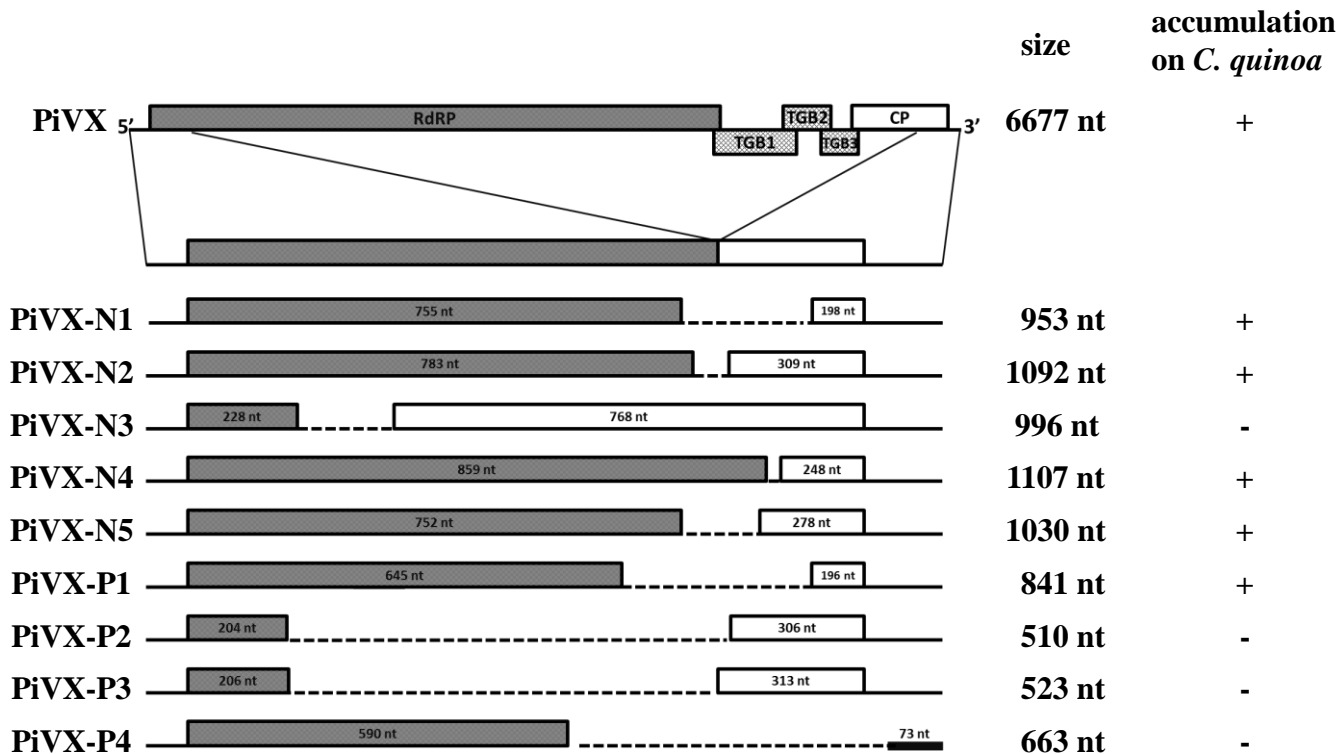


圖六、以RT-PCR進行PiVX天然缺失性RNA之選殖。

萃取第四代繼代接種之白藜接種葉與接種PiVX-P37病毒株之紅龍果全RNA，使用針對PiVX基因體5'端專一性之PiVX-F作為正向引子，而反向引子則是使用3'端專一性之PiVX-dT-Bam，經由反轉錄聚合酶連鎖反應後，以電泳進行分析。(A)白藜繼代接種樣本：5 + BB與5 + EB為p35S-PiVX5 與人為缺失性RNA質體DNA共同繼代接種之處理；PiVX為單獨繼代接種p35S-PiVX5 之處理；M為繼代接種無菌水之處理。(B)接種PiVX-P37病毒株之紅龍果樣本：PiVX為接種PiVX-P37之紅龍果植株；M為健康紅龍果植株。Marker為1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。nD RNA代表PiVX天然缺失性RNA。

Fig 6. Cloning of PiVX naturally occurring defective RNAs by RT-PCR.

Total RNA extracted from PiVX-infected *C. quinoa* plants and pitaya were RT-PCR amplified by PiVX-F and PiVX-dT-Bam primers. (A) Samples from PiVX-infected *C. quinoa* plants: M: sample from healthy *C. quinoa* plants; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; ; 5 + BB and 5 + EB: samples inoculated with mixture of PiVX artificial defective RNA and PiVX. (B) Samples from PiVX-P37-infected pitaya: M: sample from healthy pitaya; PiVX: sample inoculated with PiVX alone. nD RNA: sizes of PiVX naturally occurring defective RNAs. Marker: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).



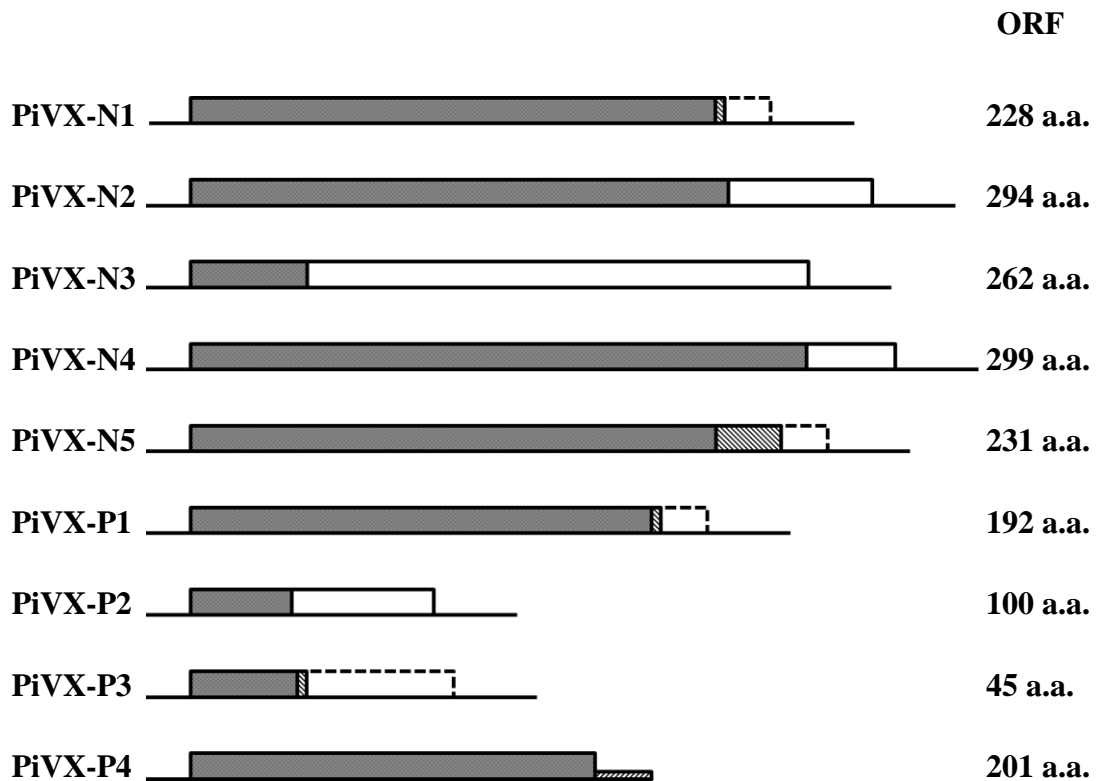
圖七、PiVX天然缺失性RNA之圖譜。

由繼代接種PiVX之白藜與接種PiVX-P37病毒株之紅龍果植株選殖出9類天然缺失性RNA，經定序後繪製天然缺失性RNA與PiVX基因體之比較圖。PiVX為病毒全基因體；PiVX-N1、N2、N3、N4與N5為自白藜中選殖之天然缺失性RNA保留之區域示意圖；PiVX-P1、P2、P3與P4為自紅龍果中選殖之天然缺失性RNA保留之區域示意圖。

Fig 7. Maps of PiVX naturally occurring defective RNAs.

There were nine types of PiVX naturally occurring defective RNAs cloned from PiVX-infected *C. quinoa* and pitaya plants. PiVX: full genome map of PiVX; PiVX-N1, N2, N3, N4 and N5: maps of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-infected *C. quinoa*; PiVX-P1, P2, P3 and P4: maps of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-P37-infected pitaya.



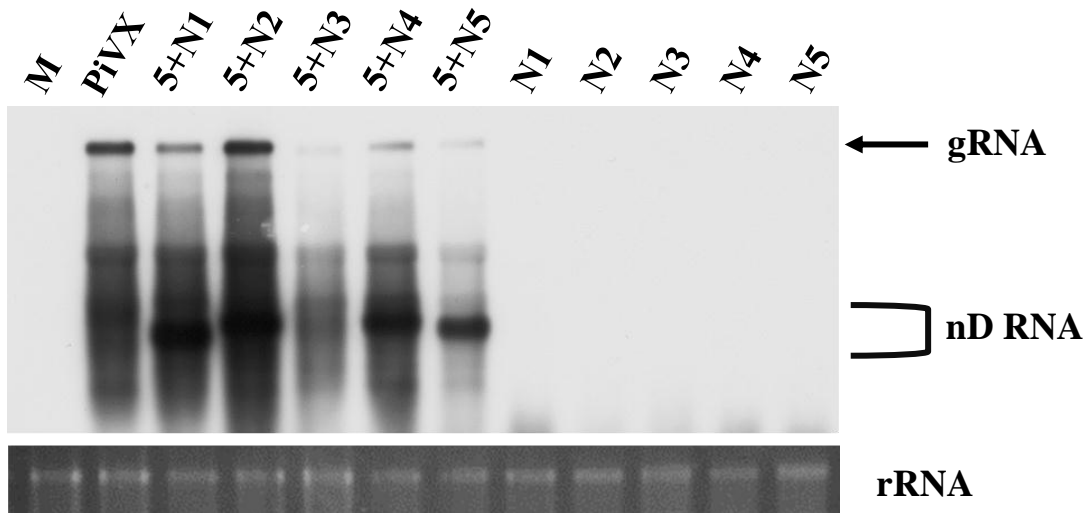


圖八、PiVX天然缺失性RNA之預測轉譯架構圖譜。

由繼代接種PiVX之白藜與接種PiVX-P37選殖株之紅龍果植株選殖出之天然缺失性RNA，以Vector-NTI進行天然缺失性RNA轉譯架構之預測。其中灰色為保留之PiVX RdRp胺基酸序列，白色代表保留之PiVX CP胺基酸序列；斜線表示改變後之胺基酸序列。PiVX-N1、N2、N3、N4與N5為自白藜中選殖之天然缺失性RNA；PiVX-P1、P2、P3與P4為自紅龍果中選殖之天然缺失性RNA。

Fig 8. Predicted ORFs of PiVX naturally occurring defective RNAs.

There were nine types of PiVX naturally occurring defective RNAs were cloned from PiVX-infected *C. quinoa* and pitaya plants. ORFs of these PiVX naturally occurring defective RNAs were predicted by Vector-NTI. Gray block is the region retaining RdRp amino acids; white block is the region maintaining CP amino acids; slash line block is the region containing changed amino acids. PiVX-N1, N2, N3, N4 and N5: PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-infected *C. quinoa*; PiVX-P1, P2, P3 and P4: PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-P37-infected pitaya.

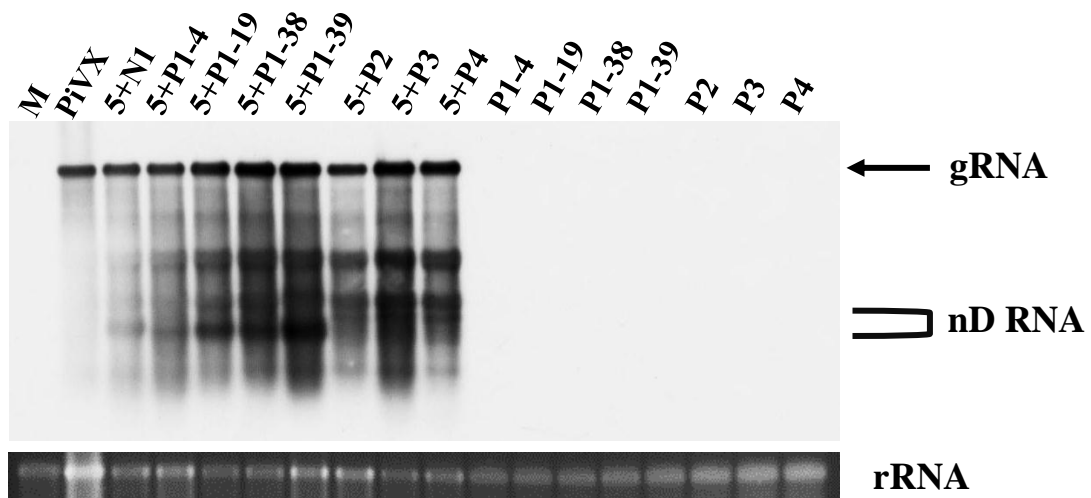


圖九、以北方雜合反應分析來自白藜植株之PiVX天然缺失性RNA於白藜上之累積能力。

為了解由白藜中選殖出來之PiVX天然缺失性RNA於植物上的複製累積能力，將PiVX-nD RNA質體DNA單獨接種或混合p35S-PiVX5共同接種至4週大之白藜，共接種3片葉子。7天後收取葉片進行植物全RNA之萃取，並以PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種p35S-PiVX5之處理；5 + N1、5 + N2、5 + N3、5 + N4與5 + N5為p35S-PiVX5 與天然缺失性RNA共同接種之處理；N1、N2、N3、N4與N5為單獨接種天然缺失性RNA之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；nD RNA代表天然缺失性RNA之大小。

Fig 9. The biological activity analysis of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-infected *C. quinoa* plants by Northern hybridization.

For the biological activity analysis of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-infected *C. quinoa* plants, heath *C. quinoa* plants were inoculated with plasmid clones of PiVX alone or mixture of PiVX naturally occurring defective RNA and PiVX. An RNA blot assay of total RNA from *C. quinoa* inoculated leaf was conducted with PiVX 5' probe. M: Sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + N1, 5 + N2, 5 + N3, 5 + N4 and 5 + N5: samples inoculated with mixture of PiVX naturally occurring defective RNAs and PiVX; N1, N2, N3, N4 and N5: samples inoculated with PiVX naturally occurring defective RNAs alone. gRNA: size of PiVX genomic RNA; nD RNA: sizes of PiVX naturally occurring defective RNAs.



圖十、以北方雜合反應分析來自紅龍果植株之PiVX天然缺失性RNA於白藜上之累積能力。

為了解由紅龍果中選殖出之PiVX天然缺失性RNA於白藜上的複製累積能力，將PiVX天然缺失性RNA質體DNA單獨接種或混合p35S-PiVX5共同接種至4週大之白藜，共接種3片葉子。7天後收取葉片進行植物全RNA之萃取，並以PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種p35S-PiVX5之處理；5 + N1、5 + P1-4、5 + P1-19、5 + P1-38、5 + P1-39、5 + P2、5 + P3與5 + P4為p35S-PiVX5 與天然缺失性RNA共同接種之處理；N1、P1-4、P1-19、P1-38、P1-39、P2、P3與P4為單獨接種天然缺失性RNA之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；nD RNA代表天然缺失性RNA之大小。

Fig 10. The biological activity analysis of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-P37-infected pitaya by Northern hybridization.

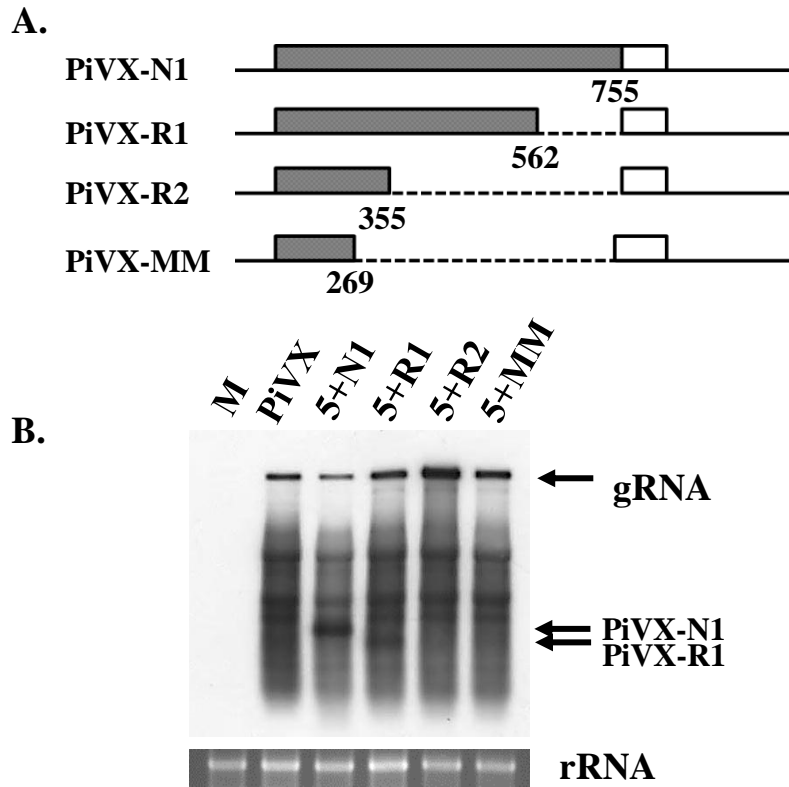
For the biological activity analysis of PiVX naturally occurring defective RNAs from PiVX-infected pitaya, heath *C. quinoa* plants were inoculated with plasmid clones of PiVX alone or mixture of PiVX naturally occurring defective RNAs and PiVX. An RNA blot assay of total RNA from *C. quinoa* inoculated leaf was conducted with PiVX 5' probe. M: sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + N1, 5 + P1-4, 5 + P1-19, 5 + P1-38, 5 + P1-39, 5 + P2, 5 + P3 and 5 + P4: samples inoculated with mixture of PiVX naturally occurring defective RNAs and PiVX; N1, P1-4, P1-19, P1-38, P1-39, P2, P3 and P4: samples inoculated with PiVX naturally occurring defective RNAs alone. gRNA: size of PiVX genomic RNA; nD RNA: sizes of PiVX naturally occurring defective RNAs.

	755	6480	
PiVX-N1	...CGAAACAAC	CACCTCCGCTCTGGTGA...	953 nt
Frame shift	K Q P	P P L W .	228 a.a.
	783	6369	
PiVX-N2	...CAGACTCAA	CCCCACTGATGGTCTA...	1092 nt
Frame shift	R L N	P T D G L	294 a.a.
	228	5910	
PiVX-N3	...TGACACTGC	GGTGGGTGCAAGAACT...	996nt
In frame	D T A	V G A R T	262 a.a.
	859	6430	
PiVX-N4	...CAGAGAGGC	CGAAACGTCCACCTCT...	1107 nt
In frame	Q R G	R N V H L	299 a.a.
	752	6400	
PiVX-N5	...ACACGAAAC	GAGGCGGAAAGACTGG...	1030 nt
Frame shift	T K R	G G K T	231 a.a.
	645	6482	
PiVX-P1	...CATTAACCA	CCTCCGCTCTGGTGAC...	841 nt
Frame shift	I N H	L R S G D	192 a.a.

圖十一、PiVX天然缺失性RNA 5'端與3'端接合區域序列之比較。  
由接種PiVX之白藜與紅龍果中所選殖出五種天然缺失性RNA，比較其接合區域之cDNA序列與胺基酸序列。

Fig 11. Comparison of the partial cDNA sequences corresponding to the junction sites of PiVX naturally occurring defective RNAs.

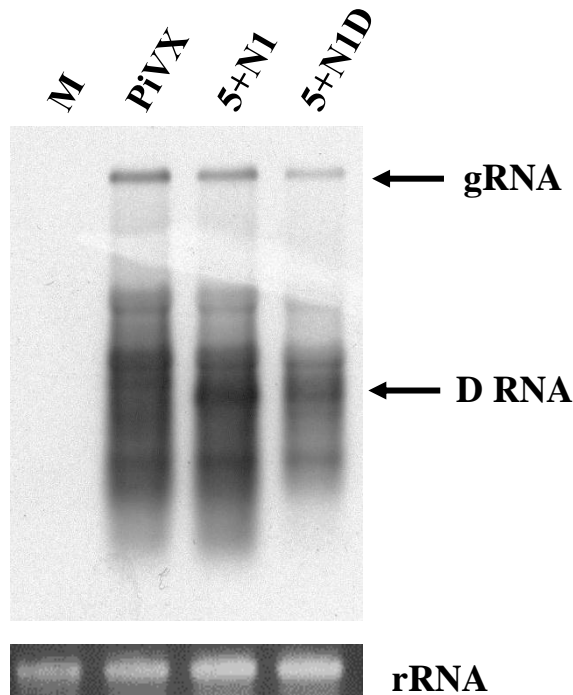
There were five types of PiVX naturally occurring defective RNAs were cloned from PiVX-infected *C. quinoa* and pitaya plants. The partial cDNA sequence and aminod acid corresponding to the junction sites were compared.



圖十二、5'端序列長度對PiVX缺失性RNA在白藜上累積能力之影響。為了解影響PiVX缺失性RNA在白藜上累積所需具備之5'端序列，將PiVX-N1、PiVX-R1、PiVX-R2、PiVX-MM選植株與p35S-PiVX5共同接種至4週大之白藜，共接種3片葉子。7天後收取接種葉抽取植物全RNA，以北方雜合反應進行分析。(A) 保留5'端不同長度之缺失性RNA選植株圖譜。(B) 萃取植物全RNA，並以PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析之結果。M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種p35S-PiVX5之處理；5 + N1為共同接種PiVX-N1與p35S-PiVX5之處理；5 + R1為共同接種之PiVXR1與p35S-PiVX5之處理；5 + R2為共同接種之PiVX-R2與p35S-PiVX5之處理；5 + MM為共同接種之PiVX-MM與p35S-PiVX5之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；PiVX-N1代表PiVX-N1 缺失性RNA之大小；PiVX-R1代表PiVX-R1 缺失性RNA之大小。

Fig 12. The influence of 5' terminal length on the accumulation of PiVX defective RNA on *C. quinoa* plants was identified.

PiVX-R1 and R2 were constructed to be the PiVX-N1 mutants with different length of 5' terminus. Then the influence of the length of 5' terminus on the accumulation of PiVX D RNA on *C. quinoa* was assayed by Northern hybridization. (A) The maps of PiVX defective RNAs with different length of 5' terminus. (B) An RNA blot of total RNA extracted from *C. quinoa* plants inoculated with PiVX or mixture of PiVX defective RNA and PiVX. M: sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + N1: sample inoculated with mixture of PiVX-N1 and PiVX; 5 + R1: sample inoculated with mixture of PiVX-R1 and PiVX; 5 + R2: sample inoculated with mixture of PiVX-R2 and PiVX; 5 + MM: sample inoculated with mixture of PiVX-MM and PiVX. gRNA: size of PiVX genomic RNA; PiVX-N1: size of PiVX-N1 defective RNA; PiVX-R1: size of PiVX-R1 defective RNA.

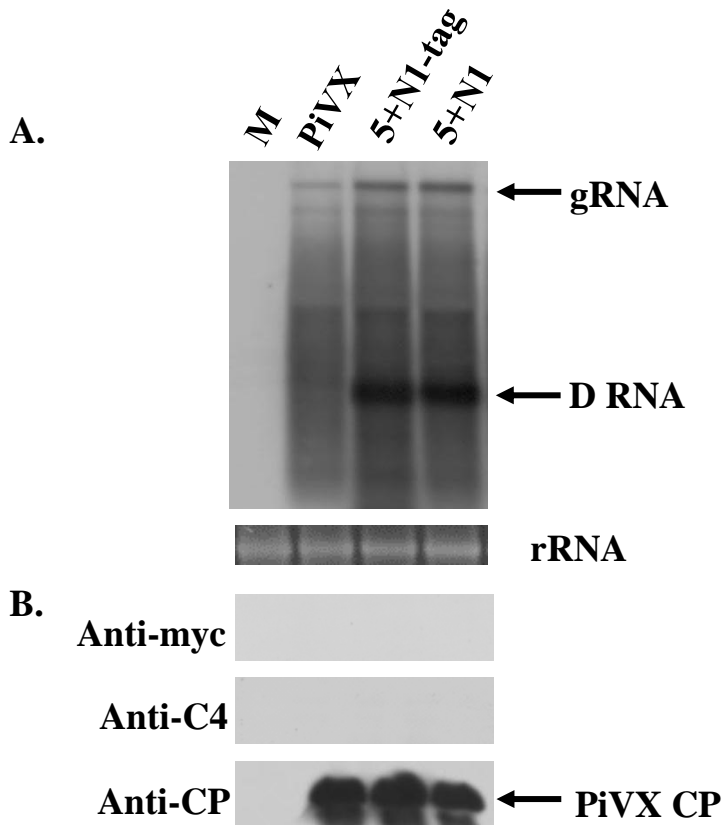


圖十三、測試轉譯架構存在與否對PiVX缺失性RNA之影響。

為研究PiVX缺失性RNA攜帶之轉譯架構對PiVX缺失性RNA的影響，構築除去轉譯架構起始碼之PiVX缺失性RNA選植株PiVX-N1D。將PiVX-N1及PiVX-N1D選植株與p35S-PiVX5共同接種至4週大之白藜，共接種3片葉子。7天後收取接種葉進行植物全RNA，以北方雜合反應進行分析。M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種p35S-PiVX5之處理；5 + N1為共同接種p35S-N1與p35S-PiVX5之處理；5 + N1D為共同接種之PiVX-N1D與p35S-PiVX5之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；D RNA代表PiVX-N1及PiVX-N1D之大小。

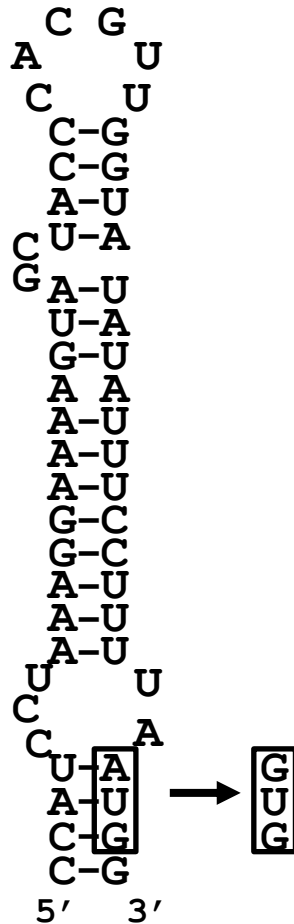
Fig 13 The influence of ORF existence on the accumulation of PiVX defective RNAs on *C. quinoa* plants.

To study the importance of PiVX defective RNA ORF, the translation start site deletion mutant, PiVX-N1D was constructed and inoculated to *C. quinoa* plants. An RNA blot assay of total RNA from *C. quinoa* inoculated leaf was conducted with PiVX 5' probe. M: sample inoculated with water; PiVX: sample inoculated with PiVX alone; 5 + N1: sample inoculated with mixture of PiVX-N1 and PiVX; 5 + N1D: sample inoculated with mixture of PiVX-N1D and PiVX. gRNA: size of PiVX genomic RNA; D RNA: sizes of PiVX-N1 and PiVX-N1D defective RNAs.



圖十四、PiVX缺失性RNA轉譯架構在白藜上表現情形之分析  
 為確認PiVX缺失性RNA轉譯架構在白藜上的表現情形，將PiVX-N1-tag選殖株與p35S-PiVX5共同接種至4週大之白藜，共接種3片葉子。7天後收取接種葉進行植物全RNA與全蛋白質之萃取，再分別以北方雜合反應與西方墨漬法進行分析。(A)萃取植物全RNA，並以PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。(B)萃取植物全蛋白質，以anti-myc抗體、anti-C4抗體與anti-PiVX CP抗體進行西方墨漬法分析。M為接種無菌水之處理；PiVX為單獨接種p35S-PiVX5之處理；5 + N1-tag為共同接種p35S-N1-Myc-C4 與p35S-PiVX5 之處理；5 + N1為共同接種之p35S-N1與p35S-PiVX5之處理。gRNA代表PiVX基因體RNA之大小；D RNA代表PiVX-N1及PiVX-N1-tag之大小。

Fig 14. Analysis of PiVX defective RNA ORFs expression on *C. quinoa* plants. To confirm the expression of PiVX defective RNA ORFs, PiVX-N1-tag was constructed and inoculated to *C. quinoa* plants. (A) An RNA blot of total RNA extracted from *C. quinoa* by anti-myc antibody, anti-C4 antibody and anti-PiVX CP antibody. (B) Western analysis of total protein extracted from the same inoculated *C. quinoa* plants inoculated with PiVX or mixture of PiVX defective RNA and PiVX. M: sample that inoculated with water; PiVX: sample that inoculated with PiVX alone; 5 + N1: sample that inoculated with mixture of PiVX-N1 and PiVX; 5 + N1-tag: sample that inoculated with mixture of PiVX-N1-tag and PiVX. gRNA: size of PiVX genomic RNA; D RNA: sizes of PiVX-N1 and PiVX-N1-tag defective RNAs.



圖十五、以MFOLD程式預測PiVX複製酶起始碼上游序列之二級結構。  
以MFOLD程式預測在25°C下，PiVX複製酶起始碼上游核苷酸序列之保守性二級結構示意圖。複製酶基因起始碼和點突變序列以方框標示。

Fig 15. Secondary structure of the RNA sequence upstream of the translation start site of PiVX RdRp gene.

Secondary structure of the RNA sequence upstream of PiVX RdRp gene was predicted by MFOLD program (in 25°C). The translation start codon of RdRp gene and the mutated sequence are indicated.





PiVX-N1 : **GAAAACCAACCCAAACCAAACCTACCTCAACCACACCCATCCTAAAGGAA** : 50  
 PiVX-P1-39 : **GAAAACCAACCCAAACCAAACCTACCTCAACCACACCCATCCTAAAGGAA** : 50  
 PIVX5 : **GAAAACCAACCCAAACCAAACCTACCTCAACCACACCCATCCTAAAGGAA** : 50

PiVX-N1 : **AAGTAGCTACCCACGTTGGTATATATTTTCCTTTTAAATGGCTCGTGACGC** : 100  
 PiVX-P1-39 : **AAGTAGCTACCCACGTTGGTATATATTTTCCTTTTAAATGGCTCGTGACGC** : 100  
 PIVX5 : **AAGTAGCTACCCACGTTGGTATATATTTTCCTTTTAAATGGCTCGTGACGC** : 100

PiVX-N1 : **GAGGTTTTCTCTTCCATCACCGACTCATCACTGAAAGCCGTAATTCAAGA** : 150  
 PiVX-P1-39 : **GAGGTTTTCTCTTCCATCACCGACTCATCACTGAAAGCCGTAATTCAAGA** : 150  
 PIVX5 : **GAGGTTTTCTCTTCCATCACCGACTCATCACTGAAAGCCGTAATTCAAGA** : 150

PiVX-N1 : **GGAGGCCTACAAAACCATCCAATTGCAATTACGTGCTGCTCTTTCCATCA** : 200  
 PiVX-P1-39 : **GGAGGCCTACAAAACCATCCAATTGCAATTACGTGCTGCTCTTTCCATCA** : 200  
 PIVX5 : **GGAGGCCTACAAAACCATCCAATTGCAATTACGTGCTGCTCTTTCCATCA** : 200

PiVX-N1 : **ACCCATACTCACAACCCGCTGACACTGCTGACACATTAGAGAATTTAGGT** : 250  
 PiVX-P1-39 : **ACCCATACTCACAACCCGCTGACACTGCTGACACATTAGAGAATTTAGGT** : 250  
 PIVX5 : **ACCCATACTCACAACCCGCTGACACTGCTGACACATTAGAGAATTTAGGT** : 250

PiVX-N1 : **ATAATTACTAACCCTTTGGCCATTGAAGCACATACACACGGAGCGGCCAA** : 300  
 PiVX-P1-39 : **ATAATTACTAACCCTTTGGCCATTGAAGCACATACACACGGAGCGGCCAA** : 300  
 PIVX5 : **ATAATTACTAACCCTTTGGCCATTGAAGCACATACACACGGAGCGGCCAA** : 300

PiVX-N1 : **AGCTATAGAGAATGACATGTACAATATTGTAGCTAACTACCTCCCAAAGG** : 350  
 PiVX-P1-39 : **AGCTATAGAGAATGACATGTACAATATTGTAGCTAACTACCTCCCAAAGG** : 350  
 PIVX5 : **AGCTATAGAGAATGACATGTACAATATTGTAGCTAACTACCTCCCAAAGG** : 350

PiVX-N1 : **AAAACCCAGTTACATTTTACTACATGAAGAAAGGAAAACCTGGGTAAATTC** : 400  
 PiVX-P1-39 : **AAAACCCAGTTACATTTTACTACATGAAGAAAGGAAAACCTGGGTAAATTC** : 400  
 PIVX5 : **AAAACCCAGTTACATTTTACTACATGAAGAAAGGAAAACCTGGGTAAATTC** : 400

PiVX-N1 : **AGGCGTGGCCACACCAGAACGACAAGTTCATCAACTCCCACCTTTGAGCC** : 450  
 PiVX-P1-39 : **AGGCGTGGCCACACCAGAACGACAAGTTCATCAACTCCCACCTTTGAGCC** : 450  
 PIVX5 : **AGGCGTGGCCACACCAGAACGACAAGTTCATCAACTCCCACCTTTGAGCC** : 450

PiVX-N1 : **AAAGGACATAGCTAGATATCCTGAGGAGACGGTGGTTGAACATCTGGAGA** : 500  
 PiVX-P1-39 : **AAAGGACATAGCTAGATATCCTGAGGAGACGGTGGTTGAACATCTGGAGA** : 500  
 PIVX5 : **AAAGGACATAGCTAGATATCCTGAGGAGACGGTGGTTGAACATCTGGAGA** : 500

PiVX-N1 : **AAACTCCATGCACCACAAAAGCTCGCCTTTATGGGAGACACGCTCCACTTC** : 550  
 PiVX-P1-39 : **AAACTCCATGCACCACAAAAGCTCGCCTTTATGGGAGACACGCTCCACTTC** : 550  
 PIVX5 : **AAACTCCATGCACCACAAAAGCTCGCCTTTATGGGAGACACGCTCCACTTC** : 550

PiVX-N1 : **TGGAGCCCTACTCAGCTACTAACCCTTTTTTAAAACCTAGCCCCACACTAAA** : 600  
 PiVX-P1-39 : **TGGAGCCCTACTCAGCTACTAACCCTTTTTTAAAACCTAGCCCCACACTAAA** : 600  
 PIVX5 : **TGGAGCCCTACTCAGCTACTAACCCTTTTTTAAAACCTAGCCCCACACTAAA** : 600

```

                                                    645
PiVX-N1      : AACCCCTCTATGCCACAATTGTA  

PiVX-P1-39  : AACCCCTCTATGCCACAATTGTA  

PIVX5       : AACCCCTCTATGCCACAATTGTA  

                                                    : 650
                                                    : 645
                                                    : 650

PiVX-N1      : CCTCCCTTCACCCA  

PiVX-P1-39  : -----  

PIVX5       : CCTCCCTTCACCCA  

                                                    : 700
                                                    : -
                                                    : 700

PiVX-N1      : ATGTACCTCCCGGGAGGCCATGCCGGAGCAGCTTACACCCACCACACGAA : 750
PiVX-P1-39  : ----- : -
PIVX5       : ATGTACCTCCCGGGAGGCCATGCCGGAGCAGCTTACACCCACCACACGAA : 750

                755   6480  6482
PiVX-N1      : ACAAC-----CACTCCGCTCTGGTGACTAAAGGATTGCAAGGCTCTGAA : 795
PiVX-P1-39  : -----CCTCCGCTCTGGTGACTAAAGGATTGCAAGGCTCTGAA : 683
PIVX5       : ACAAC-----CACTCCGCTCTGGTGACTAAAGGATTGCAAGGCTCTGAA : 795

PiVX-N1      : TCCCCAAGAATCCA  

PiVX-P1-39  : TCCCCAAGAATCCA  

PIVX5       : TCCCCAAGAATCCA  

                                                    : 845
                                                    : 733
                                                    : 845

PiVX-N1      : GATGTAAGTACCTACTAAAGGCTTCAGCGGTAGCCTCCACAGGGTTCCA : 895
PiVX-P1-39  : GATGTAAGTACCTACTAAAGGCTTCAGCGGTAGCCTCCACAGGGTTCCA : 783
PIVX5       : GATGTAAGTACCTACTAAAGGCTTCAGCGGTAGCCTCCACAGGGTTCCA : 895

PiVX-N1      : ACCGTGTCTATCAGCTTAACATAATAAGCCTAGCCTTCTGTTTTAATGCA : 945
PiVX-P1-39  : ACCGTGTCTATCAGCTTAACATAATAAGCCTAGCCTTCTGTTTTAATGCA : 833
PIVX5       : ACCGTGTCTATCAGCTTAACATAATAAGCCTAGCCTTCTGTTTTAATGCA : 945

PiVX-N1      : AGTTTCAG : 953 nt
PiVX-P1-39  : AGTTTCAG : 841 nt
PIVX5       : AGTTTCAG : 6677 nt

```

圖十七、PiVX天然缺失性RNA與p35S-PiVX5 全長序列比較。

Fig 17. Sequence alignment of PiVX naturally occurring defective RNA sequences with the same regions of the PiVX5 genomic sequence.



## 常用試劑配方

### 1. Luria agar (LA)平面培養基

保存於 4°C

---

LB	1000 mL
Agar	1001 mL

---

### 2. Luria-Bertani broth (LB)液體培養基 (modified)

---

typtone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g
glucose	1 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---

滅菌後使用

### 3. 2X YT 液體培養基

保存於室溫

For 100 mL

---

typtone	1.6 g
yeast extract	1 g
NaCl	0.5 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

滅菌後使用

### 4. PCI (25:24:1)

保存於 4°C，避光

---

phenol	50 mL
chloroform	48 mL
isoamylalcohol	2 mL

---

混合均勻，置於 4°C 隔夜後使用

### 5. CI (24:1)

---

chloroform	96 mL
isoamylalcohol	4 mL

---

混合均勻，置於 4°C 隔夜後使用

### 6. 6X dye

保存於 4°C

For 10 mL

---

bromophenol blue	0.025 g
xylene cyanol FF	0.025 g
glycerol	3 mL
ddH <sub>2</sub> O	7 mL

---

### 7. 50X TAE

保存於室溫

For 1000 mL

---

Tris base	242 g
glacial acetic acid	57.1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---

滅菌後使用

### 8. SOB 液態培養基

For 100 mL

---

typtone	2 g
yeast extract	1 g
NaCl	0.05 g
KCl	0.02 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

以 NaOH 調整 pH 至 7.0

滅菌後，使用前加入 1 mL 1M MgCl<sub>2</sub>

### 9. TB buffer

保存於 4°C

For 100 mL

---

pipes	0.3 g
CaCL <sub>2</sub>	0.22 g
KCl	1.86 g
以 KOH 調整 pH 至 6.7	
MnCl <sub>2</sub>	1.09 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

過濾消毒後使用

### 10. 0.55 M mannitol-0.1% MES (pH 5.7)

保存於 4°C

For 1000 mL

---

D-mannitol	100.21 g
MES	1 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---

以 KOH 調整 pH 至 5.7 ，滅菌後使用

### 11. enzyme digestion buffer

新鮮配製

For 25 mL

---

BSA	0.025 g
pectinase (macerozyme)	0.015 g
cellulase	0.3 g
0.55 M mannitol-0.1% MES (pH 5.7)	加至 25 mL

---

### 12. 20% sucrose

For 100 mL

---

sucrose	20g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

### 13. 40% PEG (w/v) inoculation buffer

保存於 4°C

For 100 mL

---

PEG (MW 1450)	40 g
CaCl <sub>2</sub>	0.333 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

滅菌後使用

### 14. protoplast culture medium

For 1 tube

---

0.55 M mannitol-0.1% MES (pH 5.7)	1 mL
1 M CaCl <sub>2</sub>	10 μL
0.2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M KNO <sub>3</sub> (pH 6.5)	1 μL
1 M MgSO <sub>4</sub> , 1 mM KI, 1 mM CuSO <sub>4</sub>	1 μL
10 mg/mL gentamycin sulfate	1 μL

---

### 15. 10% blocking reagent

For 100 mL

---

blocking reagent	10 g
buffer I	加至 100 mL

---

滅菌後使用

### 16. hybridization solution

新鮮配製

---

formamide	10 mL
20X SSC	5 mL
10% blocking reagent	4 mL
1% N-lauroylsarcosine	2 mL
10% SDS	40 μL

---



**17. buffer I**

保存於室溫

For 1000 mL

maleic acid	11.61 g
5 M NaCl	30 mL
NaOH	8 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

滅菌後使用

**18. buffer II**

新鮮配製

For 100 mL

10% blocking reagent	10 mL
buffer I	90 mL

**19. CDP-Star**

保存於 4°C

For 40 mL

25 mM CDP-Star substrate (NEB)	80 μL
25X Assay buffer (NEB)	1.6 mL
ddH <sub>2</sub> O	38 mL

**20. phosphate buffer (0.01 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)**

保存於室溫

For 100 mL

NaPO <sub>4</sub>	0.38 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

調整 pH 至 7.4，滅菌後使用

### 21. 2X MURB buffer

保存於室溫

For 100 mL

---

NaPO <sub>4</sub>	0.59 g
MES	0.488 g
SDS	1 g
urea	18 g
NaN <sub>3</sub>	6.5 mg
ddH <sub>2</sub> O	加至 100 mL

---

使用前加入 10 μL β-ME

### 22. 4X sample buffer

保存於室溫

For 10 mL

---

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 mL
SDS	0.8 g
glycerol	4 mL
14.7 M β-mercaptoethanol	0.4 mL
0.5 M EDTA	1 mL
bromophenol blue	8 mg
ddH <sub>2</sub> O	加至 10 mL

---

### 23. 10X SDS-PAGE running buffer

For 100 mL

---

Tris	30 g
glycine	144 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---

調整 pH 至 8.3

#### 24. 1X CAPS transfer buffer

保存於 4°C

For 1000 mL

---

cycohexylaminopropane	2.21 g
DTT	0.5 g
methanol	150 mL
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---

以 NaOH 調整 pH 至 10.5，滅菌後使用

#### 25. 10X PBS

保存於室溫

For 500 mL

---

NaCl	40 g
KCl	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 500 mL

---

調整 pH 至 7.4，滅菌後使用

#### 26. 1X PBST

For 1000 mL

---

10X PBS	100 mL
Tween-20	500 μL
ddH <sub>2</sub> O	加至 1000 mL

---