

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 病毒之 *cis-acting* elements 與缺失性 RNA 之

分析與應用

Analysis and application of *cis-acting* elements and
defective RNA of Pitaya virus X

李芷菁

Chih-Ching Lee

指導教授：張雅君 博士

Advisor: Ya-Chun Chang, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

紅龍果 X 病毒之 *cis-acting* elements 與缺失性 RNA 之分析
及應用

Analysis and application of *cis-acting* elements and
defective RNA of Pitaya virus X

本論文係李芷菁君（學號 R01633014）在國立臺灣大學植物病理與微生物學所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 7 月 29 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張雅君

（簽名）

（指導教授）

張雅君


陳穎練

系主任、所長

張雅君

（簽名）

中文摘要



紅龍果為仙人掌科三角柱屬(*Hylocereus* spp.)之多年生攀附性植物，亦為近年台灣大力推廣之熱帶水果，其田間栽種植株常遭受病毒為害。目前國內已發現紅龍果被仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX)、蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZyVX)及紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)所感染，且這三種 potexvirus 病毒普遍存在全台各地紅龍果果園中。PiVX 為本實驗室所發現鑑定之 *Potexvirus* 屬新病毒，我們從感染 PiVX 的紅龍果植株萃取總量 RNA，以北方雜合分析發現一些小片段 RNA 與 PiVX 探針有反應；進一步選殖與序列分析，確認其為源自 PiVX 的缺失性 RNA (defective RNA, dRNA)。dRNA 為病毒基因體 RNA 經過缺失與重組後產生的次病毒分子，需輔助病毒(helper virus)提供複製酵素、鞘蛋白與移動蛋白等，才能在寄主體內複製、包被與移行。從紅龍果所選殖到不同長度之 PiVX dRNA 選殖株，先製備成 RNA 轉錄體，再與 PiVX 共同接種菸草原生質體，以篩選在輔助病毒存在下，複製效率最佳的 dRNA。經過數次的原生質體接種試驗，篩選出增殖能力最佳的 P1 dRNA，其保留了 5'端 645 nt 與 3'端 196 nt，總長度為 841 nt。為了將 PiVX dRNA 改造為可應用在植物上的病毒載體，我們以 P1 dRNA 為基礎，構築兩種以不同方法表現綠色螢光基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的載體，分別為 P1-EF 與 P1-E。P1-EF 以複製酶的轉譯架構與外源基因結合，以形成融合蛋白；P1-E 為將 PiVX 鞘蛋白基因之次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP)加入 PiVX dRNA 中，以 SGP 表現外源基因。其中，P1-E 已成功在菸草原生質體及白藜植株中表現 EGFP，但表現效率並不高。故嘗試短暫表現基因靜默抑制子 p19 於菸草與白藜植株，以期加強 P1-E 表現 EGFP 之能力；結果在白藜植株上，p19 對 EGFP 之表現沒有顯著影響。而在非繁殖寄主菸草上，先短暫表現 p19 後再接種 P1-E，可以抗體偵測到 PiVX 鞘蛋白在菸草中累積，但以 GFP 抗體仍然無法偵測到訊號。此外，欲研究 P1 dRNA 可被 PiVX 辨識並增殖的 *cis-acting elements* 序列，我們構築數個序列刪除株，同樣以菸草原生質體分析其活性。目前研究結

果顯示 PiVX dRNA 的 5'端只需保留 435 nt,即可被 PiVX 輔助病毒所辨識並增殖。另外,我們也由紅龍果中分離出 CVX 的缺失性 RNA,其保留 5'端 677 nt 及 3'端 591 nt,總長度為 1268 nt。進一步將其 RNA 轉錄體與 PiVX 以菸草原生質體測試活性,結果發現 CVX dRNA 可被 PiVX 複製,顯示 CVX dRNA 所保留的序列具有被 PiVX 複製酶辨識的 *cis-acting elements*。

關鍵字：紅龍果 X 病毒、仙人掌 X 病毒、*cis-acting elements*、缺失性 RNA、病毒載體、次基因啟動子

Abstract



Pitaya, a climbing succulent plant in the family *Cactaceae*, has gradually become an important economic fruit in Taiwan. However, its cultivation is restricted by viral diseases. *Cactus virus X* (CVX), *Zygocactus virus X* (ZyVX) and Pitaya virus X (PiVX) have been reported to infect pitaya in Taiwan. These viruses are commonly found in the field. PiVX is a new member of the *Potexvirus* genus identified in our lab. We extracted total RNA from infected pitaya and discovered some small RNAs reacting to PiVX probe by Northern blot. After cloning and sequence analysis, we confirmed that these small RNAs are defective RNAs (dRNAs) of PiVX. dRNAs are subviral RNAs produced from RNA virus via deletion and recombination. dRNAs depend on their parental virus (helper virus) to replicate, encapsidate and move in host plant. To select the PiVX dRNAs with best infectivity, transcripts of different dRNA clones from pitaya were analyzed with the help of PiVX transcripts in *Nicotiana benthamiana* protoplasts by Northern blot. After several independent inoculation assays, we found P1 dRNA, which contains 5' 645 nt region and 3' 196 nt region with its total length of 841 nucleotides had the best replication ability. In order to develop PiVX dRNA as a virus expression vector, we used P1-based vector to express enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene by two different ways and thus constructed P1-EF and P1-E. P1-EF combined the open reading frame of RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) with foreign gene to form a fusion protein. P1-E recruited the subgenomic promoter (SGP) of PiVX into P1 dRNA to express foreign gene through sgRNA expression. According to experimental results, P1-E could successfully express EGFP in *N. benthamiana* protoplasts and *Chenopodium quinoa* plants, but the expression efficiency was low. To improve the expression efficacy of P1-E, we tried to express p19, a gene silencing suppressor, in *N. benthamiana* and *C. quinoa* plants. The results indicated p19 had no significant effect on the expression of EGFP in *C. quinoa* plants. However, when P1-E was inoculated to *N. benthamiana* plant after transient expression of p19, PiVX CP accumulation increased but EGFP expression could not be detected by GFP antibody. In addition, in order to study the *cis-acting* elements that can be recognized and replicated by PiVX, we constructed and analyzed some deletion mutants of P1 dRNA in *N. benthamiana*

protoplasts. The current result indicated that the dRNA containing only 5' 435 nt region and 3' 196 nt region could still be replicated by helper virus. Furthermore, we also cloned CVX dRNAs from pitaya plant, which contain CVX 5' 677 nt region and 3' 591 nt region with its total length of 1268 nucleotides. For testing the biological activity, transcripts of CVX dRNAs together with PiVX were inoculated to *N. benthamiana* protoplasts, and Northern blot demonstrated CVX dRNAs could be replicated by PiVX. Accordingly, the result suggested that PiVX RdRP can recognize the *cis-acting* elements of CVX dRNAs.

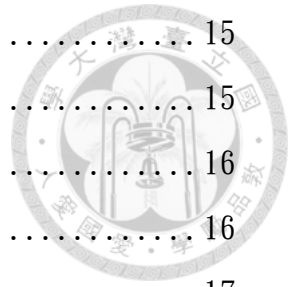
Keywords: Pitaya virus X, *Cactus virus X*, *cis-acting* elements, detective RNA, viral vector, subgenomic promoter

目錄



中文摘要	I
Abstract	III
壹、前言	1
一、缺失性 RNA 研究歷史.....	1
二、缺失性 RNA 之形成與特性.....	2
三、 缺失性 RNA 之應用	3
四、 病毒載體之研究	4
五、 基因靜默抑制子之應用	5
六、 紅龍果病毒 X 及仙人掌病毒 X 之介紹	6
七、 PiVX 缺失性 RNA 及鞘蛋白次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP) 之研究 6	
八、 研究動機	7
貳、材料與方法	9
二、 實驗植物與栽種	9
三、 缺失性 RNA 之選殖	10
(一)小量植物全 RNA 之萃取	10
(二)反轉錄聚合酶連鎖反應	10
(三)從膠體回收核酸	11
(四)限制酶截切反應與去磷酸化反應	12
(六)轉型作用	12
(七)正確選植株之篩選	13
1. 菌落聚合酶連鎖反應	13
2. 小量質體 DNA 製備與篩選	13
3. pUC-P1 dRNA 之構築	14
4. 序列比對與分析	14
四、生體外轉錄體之製備	14
(一) 限制酶直線化質體	14
(二) 生體外轉錄反應	15

五、原生質體之製備、接種與分析.....	15
(一) 原生質體之製備.....	15
(二) 原生質體之接種.....	16
(三) 原生質體之全 RNA 之萃取與分析.....	16
六、缺失性 RNA 在白藜上之接種.....	17
七、 北方轉漬與雜合法分析.....	17
(一) PiVX 5' 端、CVX 3' 端與 EGFP 專一性 DNA 探針之製備.....	17
(二) 北方轉漬法.....	18
(三) 北方雜合反應.....	18
八、pUC-P1-EF 及 pUC-P1-E 之構築.....	19
九、p35S-P1-E 與 pGR-P1-E 之構築.....	20
十、影響 PiVX 複製之 <i>cis-acting</i> elements 分析.....	20
(一) 構築 5' 端不同長度之缺失性 RNA.....	20
(二) 菸草原生質體接種與分析.....	21
十一、接種紅龍果實生苗.....	21
十二、以農桿菌注射法進行病毒選殖株之接種.....	22
(一) 農桿菌轉型.....	22
(二) 農桿菌注射法.....	22
十三、以農桿菌注射表現 <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV) P19 蛋白於菸草及白藜 22	
(一) 以農桿菌表現 P19 蛋白後再表現 EGFP.....	22
(二) 以農桿菌表現 P19 與 EGFP.....	23
十四、西方轉漬分析法.....	23
(一) 聚丙烯醯氨膠體電泳.....	23
(二) 樣品製備及聚丙烯醯氨膠體電泳分析.....	24
(三) 免疫轉漬分析.....	24
參、結果.....	26
一、 PiVX 缺失性 RNA 之選殖與分析.....	26



二、測試 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體中之複製能力.....	27
三、測試 PiVX 缺失性 RNA 於白藜植株系統葉之累積能力.....	27
四、以 PiVX 缺失性 RNA 為載體表現外源蛋白.....	28
(一)以菸草原生質體分析 P1 載體利用鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子或表現融合蛋白之方法表現綠色螢光蛋白之效果.....	28
(二)以白藜植株分析 P1 載體利用鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子表現綠色螢光蛋白之效果.....	29
五、PiVX 複製相關 <i>cis-acting</i> elements 之分析.....	31
六、測試 CVX 缺失性 RNA 在 PiVX 幫助下於菸草原生質體之複製能力 ...	31
(一)CVX 缺失性 RNA 之選殖與分析.....	31
(二)CVX 缺失性 RNA 在 PiVX 協助下於菸草原生質體中之複製能力	32
肆、討論	33
一、PiVX 與 CVX 缺失性 RNA 之選殖.....	33
二、以 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體表現外源基因.....	34
三、iVX 缺失性 RNA 於白藜植株表現外源基因	36
四、表現 p19 對缺失性 RNA 載體之影響.....	37
五、桿菌注射法同時表現 p19 與 PiVX 缺失性 RNA 載體.....	38
六、PiVX 製相關之 <i>cis-acting</i> elements 區域.....	39
七、CVX 缺失性 RNA 之分析	39
八、結語	40
伍、參考文獻	42
陸、表	50
柒、圖	51
捌、附錄	65

壹、前言



一、缺失性 RNA 研究歷史

缺失性病毒最早於動物病毒中發現，1944 年 Friedewald 純化流行性感冒病毒 (influenza virus) 時發現有一些不完全病毒顆粒 (incomplete virus particles)，且不具有感染能力 (Friedewald & Pickels, 1944)。之後，Von Magnus 發現不完全病毒顆粒可以干擾野生型流行性感冒病毒之增殖，但尚不了解其缺失之處 (Von Magnus, 1954)。直到 1956 年，Henle 與 Lief 發現不完全病毒顆粒的核蛋白 (nucleoprotein) 與表面抗原 (surface antigen) 比例較野生型病毒低，推測不完全病毒顆粒缺失的部分為基因體核酸 (Henle & Lief, 1956)。之後，這些不完全病毒顆粒被稱為 defective interfering (DI) particle (Huang & Baltimore, 1970)。目前已經發現 DI particle 普遍出現於動物病毒中，但仍與病毒種類、寄主細胞種類與偵測方式有密切關聯 (Roux *et al.*, 1991)。

而植物病毒直到 1987 年 Hillman 等人以 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) 接種至菸草 (*Nicotiana clevelandii*) 時，發現菸草病徵有減緩的現象，抽取菸草 RNA 並以北方雜合反應分析，此情況伴隨約 0.4 kb 的小分子 RNA 出現 (Hillman *et al.*, 1987)。將 TBSV 與小分子 RNA 共同接種後發現，小分子 RNA 濃度越高，在菸草上的發病程度越緩和，葉片中之病毒量亦相對減少。進一步純化這些小分子 RNA 並進行定序，發現其與 TBSV 具有序列上的同源性 (Hillman *et al.*, 1987)。因這些小分子 RNA 與動物病毒的 DI particle 性質相當接近，故 Hillman 等人認為這群小分子 RNA 應為植物病毒之缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA, DI RNA)。因此，TBSV 為第一個被報導具有缺失干擾性 RNA 之植物病毒 (Hillman *et al.*, 1987)。

目前已發現有一些植物病毒可產生缺失性 RNA 或缺失干擾性 RNA，包含 tombusviruses (Burgyan *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 1987; Rochon *et al.*, 1991; Rubino *et al.*, 1995)、carmoviruses (Li *et al.*, 1989)、potexviruses (Calvert *et al.*, 1996; White


et al., 1991 ; Yeh *et al.*, 1999) 、 furovirus (Bouzoubaa *et al.*, 1991 ; Chen *et al.*, 1994) 、 bromovirus (Damayanti *et al.*, 1999 ; Pogany *et al.*, 1995 ; Romero *et al.*, 1993) 、 closterovirus (Mawassi *et al.*, 1995) 及 cucumovirus (Graves *et al.*, 1995) 等。



二、缺失性 RNA 之形成與特性

多年來在不同的植物病毒中陸續發現，在病毒增殖的過程中，會伴隨一些小分子 RNA 出現，且有些具有干擾病毒增殖與病徵表現的能力。目前已知這些小分子 RNA 包含衛星核酸(satellite RNA)、衛星病毒(satellite virus)(Francki, 1985 ; Prody *et al.*, 1985)及缺失干擾性 RNA(Hillman *et al.*, 1987)。這些小分子 RNA 皆不具有自行增殖之能力，必須依賴輔助病毒(helper virus)協助才能正常增殖，但卻常擁有調節輔助病毒複製或病徵之能力。而缺失干擾性 RNA 來自於其親緣病毒基因體經缺失與重組後產生，故與親緣病毒或親緣關係相近之輔助病毒具序列上之同源性；衛星核酸與衛星病毒則不具此同源性，來源並不清楚(Francki, 1985 ; Simon *et al.*, 2004)。植物病毒缺失干擾性 RNA 的輔助病毒通常為其親緣病毒，但亦有缺失干擾性 RNA 可被與親緣病毒序列相似之病毒協助複製之例子 (Takeshita *et al.*, 2009)。不具有干擾病徵表現能力的病毒缺失株則稱為缺失性 RNA (defective RNA) (Chen *et al.*, 1994 ; White *et al.*, 1991)。而也有少部分植物病毒缺失干擾性會使病徵加重(Li *et al.*, 1989 ; Romero *et al.*, 1993)。

缺失性 RNA 源自於其輔助病毒序列片段組成(White & Morris, 1999)，其與輔助病毒的複製相同，需藉由輔助病毒的複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)合成，故目前對於缺失性 RNA 的形成機制有兩種假說(Pathak & Nagy, 2009)。第一種機制為 replicase driven template-switching mechanism：當病毒基因體 RNA 進行複製時，複製酶攜帶尚未複製完成之新股 RNA 自原本的模板股脫落，移至下游或另一模板股上重啟複製，而合成重組突變株(Nagy & Simon, 1997)。第二種機制為 forced template-switching mechanism:在複製酶已經完成新生 RNA 合成



或未完成時，複製酶自模板股脫落並移至另一模板股重啟複製，但新生的 RNA 會受到寄主細胞之內切酶(endoribonuclease)或外切酶(exoribonuclease)作用而斷裂，再重新接合產生缺失性 RNA (Zhang & Nuss, 2008)。其中，第一種機制被認為是缺失性 RNA 最有可能形成的機制(Pathak & Nagy, 2009)，許多研究顯示進行生體外 RNA 複製時，當捐贈股(donor template)上具有斷裂、髮夾狀構造(hairpin structures)及富含 AU 片段時，複製酶較有機會脫落(Cheng *et al.*, 2002; Cheng & Nagy, 2003; Pogany & Nagy, 2008; Wierzchoslowski & Bujarski, 2006)；而當複製酶脫落時攜帶之新生 RNA，與獲贈股(acceptor template)有 2-5 個核苷酸具互補性，即可使複製酶重啟複製(Nagy & Simon, 1997)。而缺失干擾性 RNA 及缺失性 RNA 依其基因體的組成型態可區分成兩型：嵌紋型(mosaic type)及單一片段移除型(single internal deletion type)。嵌紋型為由親緣病毒基因體數個不連續的區域片段直接或是部分重組後接合而成(Hillman *et al.*, 1987)；單一片段移除型為親緣病毒基因體中間序列發生大片段的移除，只保留親緣病毒的 5' 及 3' 端不等長的序列重新組合而成(Li *et al.*, 1989; White *et al.*, 1991)。因缺失干擾性或缺失性 RNA 的基因體比輔助病毒短，且必須仰賴輔助病毒方能增殖，故其保留的序列必定具有可被輔助病毒之複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)辨識的 *cis-acting* elements (Li & Simon, 1991; White *et al.*, 1991)。

三、缺失性 RNA 之應用

缺失性 RNA 為由親緣病毒基因體經缺失及重組而形成，其基因體序列較一般病毒短非常多，以此進行分生研究較為容易，故為病毒學常用的工具。而因缺失性 RNA 普遍擁有較高的演化速度，故常以缺失性 RNA 進行病毒演化及 RNA 重組的研究(Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。缺失性 RNA 需輔助病毒之協助，才能進行正常的複製、包被或移行，其所保留的序列必定有可被輔助病毒之蛋白辨識的 *cis-acting* elements，故可以缺失性 RNA 進行輔助病毒序列特性之研究

(Lewandowski & Dawson, 1998 ; Lough *et al.*, 2006)。此外，大多數的缺失干擾性 RNA 具有減緩親緣病毒造成的病徵表現，使其具有於植物保護上應用的潛力，如將蕙蘭輪點病毒(*Cymbidium ring spot virus*, CymRSV)的缺失干擾性 RNA 以轉基因之方式，使菸草自行轉錄出缺失干擾性 RNA，成功使 CymMV 造成的病徵大幅減輕(Kollàr *et al.*, 1993)。另外，許多缺失性 RNA 具有轉譯架構，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，表現外源蛋白之潛力(Sandoval *et al.*, 2008)；且因缺失性 RNA 序列長度較短，複製能力較輔助病毒佳，表現外源蛋白量較一般的病毒載體高，為其極大的優勢(Lico *et al.*, 2008 ; Qiu & Scholthof, 2007)。

四、病毒載體之研究

病毒載體為常用表現外源蛋白的方式，利用病毒接種之方便性，且感染寄主植物後大多會快速大量複製，因此外源基因伴隨著大量表現；且若病毒本身寄主範圍廣泛，則可以在許多不同的寄主上表現外源基因(Scholthof *et al.*, 1996)。而由於病毒複製過程中，鞘蛋白的累積量較多，且於寄主植物中表現較為穩定，故以病毒之鞘蛋白次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP)表現外源蛋白，成為構築植物載體常用之工具(Dawaon *et al.*, 1989 ; Chapman *et al.*, 1992)；且使用完整的 SGP 序列表現外源基因，可有效增加外源蛋白的表現量(Grzelishvili *et al.*, 2000)。1992 年 Chapman 等人嘗試以 *Potato virus X* (PVX) 當作載體，以 PVX 之鞘蛋白的啟動子在菸草(*N. clevelandii*)上表現外源基因 β -glucuronidase (GUS)，結果發現 GUS 蛋白確實可以大量表現，且可隨著病毒移動至系統葉(Chapman *et al.*, 1992)。同樣使用 PVX 載體，以綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因取代 GUS 基因，也可得到相同的結果，且 GFP 在 UV 光下會有綠色螢光出現，可藉此來觀察病毒於植物中之移動情形(Baulcombe *et al.*, 1995)。而與 PVX 同屬於 *Potexvirus* 屬可感染紅龍果的蟹爪蘭病毒 X (*Zygocactus virus X*, ZyVX)，也有利用其鞘蛋白基因啟動子

在白藜表現外源基因的例子(Koenig *et al.*, 2006)。但是由於病毒序列很長，其複製時較常出現錯誤，且病毒移動時可能會剔除外源基因(Dawson *et al.*, 1989)；而缺失性 RNA 的序列較短，實驗較容易操作，且其被輔助病毒複製的效率很高；故 Burgyán 等人於 1994 年以 CymRSV 的缺失干擾性 RNA 當作病毒載體，結果發現確實可以表現外源蛋白，但其表現效率與蛋白的插入位置相關(Burgyán *et al.*, 1994)。此後陸續有許多利用缺失干擾性或缺失性 RNA 作為載體之報導，且都可穩定大量表現外源蛋白(Komarova *et al.*, 2006；Qiu & Scholthof, 2007；Sandoval *et al.*, 2008)。另外，以缺失性 RNA 表現外源蛋白時，可同時研究病毒的分子特性；Lough 等人構築 PVX 5'端不同長度的人工刪除突變株，並以這些突變株表現 GFP，藉由綠色螢光的表現來尋找與 PVX 細胞移動相關的 *cis-acting elements* (Lough *et al.*, 2006)。

五、基因靜默抑制子之應用

植物因應病毒的攻擊，演化出病毒誘導基因靜默(virus-induced gene silencing, VIGS)與轉錄後基因靜默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)抵禦病毒(Vance, & Vaucheret, 2001)。而目前已經發現有些病毒存在 VIGS 與 PTGS 的抑制子，包括 potyviruses 之 helper component-proteinase (HC-Pro) (Anandalakshmi *et al.*, 1998)與 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)之 p19 蛋白(Voinnet *et al.*, 1999)。其中，Qiu 等人於 2002 年發現將 TBSV 以及欠缺 p19 的缺失干擾性 RNA 共同接種在菸草(*N. benthamiana*)，會誘發 PTGS；但若再表現 p19 蛋白，則會使 PTGS 延遲發生；此結果顯示 p19 是個很有效的 PTGS 抑制子(Qiu *et al.*, 2002)。此外，p19 也會加強病毒的系統性感染(Qu & Morris, 2002)。另外，Komarova 等人於 2006 年嘗試將 PVX 的 TGB1、TGB2、TGB3 及 CP 基因以報導基因 GFP 取代，並保留 SGP1，以此來表現 GFP；而因缺乏 CP 會影響 PVX 的移動性，故以農桿菌注射法在菸草(*N. benthamiana*)上表現 GFP。結果顯示 PVX 缺失株比全長病毒表現更多 GFP；且共同表現 HC-Pro 與 GFP 之菸草葉片，所測到的 GFP 表現量較多(Komarova *et al.*,

2006)。故以植物病毒表現外源蛋白時，共同表現基因靜默抑制子是不錯的方法。



六、紅龍果病毒 X 及仙人掌病毒 X 之介紹

紅龍果病毒 X (Pitaya virus X)及仙人掌病毒 X (*Cactus virus X*)，同屬於 *Potexvirus* 屬之病毒，且皆可感染紅龍果，為少數發現之紅龍果病毒(毛, 2008；劉, 2000)。PiVX 為本實驗室於陽明山紅龍果園分離並鑑定之一種新病毒，其為絲狀、單鏈正意股 RNA 病毒，長約 450-500 nm，寬約 12-13 nm，基因體不包含 polyA 為 6677 個核苷酸(毛, 2008)。PiVX 可系統性感染紅龍果及白藜，在紅龍果上引起嵌紋病徵，而於白藜上產生褪綠和壞疽病斑；另外，在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、番杏 (*Tetragonia expansa*)及羽狀雞冠花 (*Celosia argentea*)只能感染接種葉(李, 2010)。經由全台各地紅龍果園之樣本採集與檢測，發現台北、宜蘭、彰化及台東之紅龍果園皆已受到 PiVX 感染，PiVX 似乎已成為台灣紅龍果栽培的威脅因子(毛, 2008)。故本實驗室已於 2010 年構築 PiVX 具感染力的選殖株，供 PiVX 之相關研究使用。

而 CVX 在美國及歐洲都曾被報導，可能存在世界各地的仙人掌植物(Berck, 1971)；其病毒顆粒為絲狀，長度約 520 nm，寬度約 13 nm，基因體大小約 6.5 kb (Attathom *et al.*, 1978)。劉瑞芬老師實驗室於 2000 年首先由台灣新竹地區分離出 CVX-Hu 病毒株，為第一個發現的紅龍果病毒病原(劉, 2000)。本實驗室也於 2006 年間分離出 CVX-NTU 病毒株，CVX-NTU 在白藜上造成的病徵 CVX-Hu 略有不同，前者為產生退綠斑點，後者為退綠壞疽之侷限性病斑(呂, 2007)。

七、PiVX 缺失性 RNA 及鞘蛋白次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP)之研究

陳君弢學長發現重複繼代接種 PiVX 的白藜會有小分子 RNA 出現，經過選殖後發現這群小分子訊號為 PiVX 的缺失性 RNA，之後更發現長期感染 PiVX 的紅龍果植株亦有缺失性 RNA，與於白藜中發現的缺失性 RNA 共同選殖出 9 種類型的

PiVX 缺失性 RNA (陳, 2012)。將 9 種缺失性 RNA 與 PiVX 共同接種至白藜，有 5 種類型可在白藜上被 PiVX 增殖，包括由白藜選殖出的 PiVX-N1、PiVX-N2、PiVX-N4、PiVX-N5，以及由紅龍果選殖出的 PiVX-P1。這些缺失性 RNA 皆為單一片段移除型(Li *et al.*, 1989)，保留 5' 645 nt-859 nt 及 3' 196 nt-768 nt 的序列。進一步構築 5'端不同長度刪除株並在白藜上測試，推測 5'端序列範圍 356-562 nt 間，為 PiVX 缺失性 RNA 在白藜上增殖所必須之序列(陳, 2012)。

次基因體 RNA (subgenomic RNA, sgRNA)之轉錄為單鏈正意股 RNA 病毒表現基因常用的策略，而合成 sgRNA 需藉由次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP)協助。何艾翎學姊以 5' RACE 配合選殖與定序，定位出 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 之轉錄起始點，其位於 PiVX 病毒全長的 5865 個核苷酸。藉由農桿菌注射法於菸草上分析，以轉錄起始點為+1，需保留-43 至+23 之序列，PiVX 鞘蛋白 sgRNA 才能正常表現，故此段序列應為 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 的 SGP(何, 2012)。

八、研究動機

由於 PiVX 的寄主範圍狹窄，主要侷限在仙人掌科(*Cactaceae*)植物與少數指示植物上，且 PiVX 在紅龍果不會造成嚴重的病徵，已成為一個優良且安全的病毒載體須具備的條件。而陳君弢學長已發現在感染 PiVX 的紅龍果植株上，可分離出 PiVX 的缺失性 RNA(陳, 2012)；加上缺失性 RNA 作為載體，較一般病毒載體容易操作，故本研究欲以缺失性 RNA 作為載體表現外源蛋白。因 PiVX 缺失性 RNA 通常會維持一個轉譯架構，試圖利用此特性以融合蛋白方式表現外源蛋白。另外，何艾翎學姊已分析出 PiVX 鞘蛋白基因啟動子的位置，一般病毒的鞘蛋白 sgRNA 的表現量比全長基因體 RNA 高(何, 2012)。所以利用 PiVX 缺失性 RNA 表現外源蛋白之方式將分為兩種：以融合蛋白形式與利用鞘蛋白次基因啟動子表現。此外，陳君弢學長發現 PiVX 5'端的 356 nt-562 nt 之間應具有 PiVX 缺失性 RNA 於植物組織中累積必須之序列，故我藉由進一步構築 PiVX 5'端突變株，以分析 PiVX

複製相關的 *cis-acting* elements 區域，期望讓我們更加了解 PiVX 的序列特性，並提供相關資訊供 *Potexvirus* 屬植物病毒之研究。



貳、材料與方法



一、實驗材料

p35S-PiVX5 來自陽明山紅龍果(*Hylocereus undatus*)之紅龍果病毒 X (Pitaya virus X, PiVX)分離株 PiVX-P37，將全長 cDNA 嵌入帶有 CaMV 35S 啟動子的載體 p35S-GFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA)上，取代 GFP 基因，所構築之全長 cDNA 選殖株(李, 2010)。p35S-PiVX5 可以機械接種方式系統性感染紅龍果及白藜(*Chenopodium quinoa*)，並在前者產生嵌紋病徵，在後者上形成褪綠斑點病徵(李, 2010)。陳君弢學長將 p35S-PiVX5 置換至 pUC119 載體，同時在 PiVX 基因體前方加上噬菌體 T7 啟動子，構築出 pUC-PiVX 選殖株，可用於合成生體外轉錄體，以接種菸草(*Nicotiana benthamiana*)原生質體。此外，從已知感染 PiVX 之紅龍果植株中萃取其全 RNA，發現有天然產生的缺失性 RNA；將 PiVX 缺失性 RNA 選殖至 p35S 載體上，並篩選出具感染力的選殖株(陳, 2012)。本研究利用 PiVX 缺失性 RNA 選殖株 p35S-P1-4 為材料，構築出 pUC-P1，供菸草原生質體接種實驗使用。


pBIN61-GFP 由沈湯龍老師提供，pBIN61-P19-myc-ko 則是由實驗室黃裕雯同學所構築，以此進行農桿菌注射法於白藜及菸草短暫表現 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)之 P19 蛋白。

二、實驗植物與栽種

本研究主要使用的植物為菸草(*N. benthamiana*)及白藜(*C. quinoa*)。栽種方式為將適當數量種子放在填滿泥炭土的穴盤上，保持泥炭土濕潤，每日光照 16 小時。待植物發芽約一週後，將幼苗移至裝有泥炭土與根基旺(3:1)混合介質的黑色軟盆內，一樣維持每日光照 16 小時，每週施用 2 次肥料。待白藜與菸草生長 4-5 週後，即可進行實驗。

三、缺失性 RNA 之選殖

(一)小量植物全 RNA 之萃取



取已知感染 PiVX 與 CVX 的田間紅龍果植株，以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行植物全 RNA 萃取。首先秤取植物樣本 0.1 g，置於以 180°C 處理過的研鉢中，並加入適量液態氮，以杵將植物組織磨碎，快速將粉末倒入 1.5 mL 微量離心管中，再加入 450 μ L RX 或 PRX buffer，以震盪器劇烈震盪 10 秒鐘，接著將震盪後的混合液倒入已和 collection tube 組裝好的 shearing tube 中，以 13,000 rpm (Sorvall Legend Micro 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 2 分鐘，以除去植物殘體。將 collection tube 中所收集之濾液與 230 μ L 100% 酒精均勻混合，並將混合液移至下方套有 collection tube 的 Plant Total RNA Mini Column 中，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去 collection tube 中的濾液，再加入 500 μ L WF buffer，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去 collection tube 中的濾液。接著，吸取 700 μ L WS buffer 加入 Plant Total RNA Mini Column 中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，除去 collection tube 中的濾液，重複以 WS buffer 清洗之步驟 1 次。之後將 Plant Total RNA Mini Column 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，以除去殘留之 WS buffer。再將 Plant Total RNA Mini Column 移到 1.5 mL 離心管上，並將蓋子打開，靜置於室溫 5 分鐘，使酒精揮發完全。再加入 40 μ L 無菌水，靜置 2 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將植物全 RNA 流洗至微量離心管。植物全 RNA 的品質及濃度以 Nanodrop (Nanodrop[®]ND-1000, Thermo, Wilmington, USA) 確認，取其中 5 μ L 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳，以 UVP 拍照系統分析 (BioDoc-It[™] Image system, Cambridge, UK)，剩餘的 RNA 保存於 -80°C。

(二)反轉錄聚合酶鏈鎖反應

將 11 μ L 之植物全 RNA (約 400 ng) 置於 1.5 mL 微量離心管中，加入 1 μ L 之 5 μ M 反向引子 (PiVX-dT-Bam 或 NTU-dT-R) 與 1 μ L 之 10 mM dNTP mix，混合均勻

後，置於 65°C 水浴槽 15 分鐘，隨後置於冰上 5 分鐘。之後加入 4 μL 之 5X first-strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)、1 μL 0.1 M DTT (Invitrogen)、1 μL 之 rRNAsin (40 U/ μL , Promega, Madison, CA, USA) 和 1 μL 之 SuperscriptTM III Reverse transcriptase (200 U/ μL , Invitrogen)，混合均勻。置於 55°C 反應 1 小時，以合成 cDNA 產物，置於 -20°C 備用。

在 0.2 mL PCR tube 中加入 10 μL 之 5X fusion DNA Polymerase buffer、1 μL 之 10 mM dNTP mix、1 μL 之 5 μM 正向引子(T7-sal-F 或 T7-farm-F)、1 μL 之 5 μM 反向引子(PiVX-dT-Bam 或 NTU-dT-R)，與作為模板之 4 μL 之 cDNA 產物，隨後加入 0.6 μL 之 Phusion DNA Polymerase (2 U/ μL , NEB)，最後補水至 50 μL 。並以以下條件進行 PCR 反應：94°C 反應 5 分鐘，接著進行 94°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/1 分鐘，30 個循環反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。取 5 μL 之 PCR 產物，以 1.2% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，確定有預期片段後，再將剩下的 45 μL 之 PCR 產物以相同方式進行電泳，從中切取預期片段，並進行核酸回收。

(三)從膠體回收核酸

核酸回收使用 QIAGEN[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany)，將含有預期 DNA 片段之膠體切下，放入 1.5 mL 離心管中，以電子微量天秤秤取膠體重量，再加入 3 倍膠體體積之 QX1 (QIAGEN) 與 10 μL QIAGEN II (QIAGEN)，置於 50°C 水浴槽 10 分鐘，並每隔 2 分鐘上下搖晃，使膠體均勻溶解。接著以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去上清液。再加入 500 μL QX1，輕拍使其中的 QIAGEN II 均勻懸浮，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去上清液。之後加入 500 μL PE buffer，輕拍使 QIAGEN II 懸浮均勻後，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘，重複此步驟 1 次。移除上清液，打開蓋子置於室溫風乾 10 分鐘，以除去殘存酒精。最後加入 20 μL 無菌水，輕拍混勻後，置於 50°C 水浴槽 5 分鐘，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，吸取上清液至新的微量離心管，此即為回收之核酸片段，置於 -20°C 保存備用。



(四)限制酶截切反應與去磷酸化反應

將 20 μL 之 PiVX 缺失性 RNA 回收產物置於 1.5 mL 微量離心管中，加入 5 μL 之 10X BSA、5 μL 之 10X buffer 3、1 μL 之 *Bam*HI (20 U/ μL , NEB)、1 μL 之 *Sal*I (20 U/ μL , NEB)，以無菌水補至總體積為 50 μL ，於 37°C 處理 6 個小時後進行核酸回收。同時也將 2 μL pUC119 載體置入 1.5 mL 微量離心管中，加入 2.5 μL 之 10X BSA、2.5 μL 之 10X buffer 3、0.5 μL 之 *Bam*HI、0.5 μL 之 *Sal*I，最後以無菌水補至總體積為 25 μL ，於 37°C 反應 4 個小時後進行核酸回收。隨後各取 1 μL 產物以 1.2% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析並定量。

將 20 μL 之 CVX 缺失性 RNA 核酸回收產物以 *Bam*HI-HF (20U/ μL , NEB) 進行酶切，再進行核酸回收。而經 *Bam*HI 處理的 pUC119 載體則需進行去磷酸化反應：加入 5 μL 10X Antarctic phosphatase buffer (NEB) 及 1.5 μL 之 Antarctic phosphatase (5 U/ μL , NEB)，並以水補至總體積為 50 μL ，於 37°C 反應 30 分鐘，再於 65°C 反應 10 分鐘，去除酵素活性。隨後以 1.2% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，並進行核酸回收。

(五)接合反應

取 1 μL 純化後的 pUC119 置於 1.5 mL 微量離心管中，加入 1.5 μL 之 10X Ligation buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、1 μL 10 mM ATP、1 μL 之 T4 DNA Ligase (5 U/ μL , Thermo, Wilmington, USA)，並加入純化之缺失性 RNA 的 cDNA 片段，使總體積為 15 μL 。混合均勻後在室溫下反應 3 小時，再進行轉型作用。

(六)轉型作用

由 -80°C 冰箱取出裝有 130 μL *Eschericia coli* DH5 α 菌株之勝任細胞的 1.5 mL 微量離心管，置於冰上使其自然解凍，再將接合反應之全部產物加入其中，輕拍

混勻後置於冰上 30 分鐘，以 42°C 熱休克處理 90 秒，再移至冰上 5 分鐘，即可將菌液均勻塗抹於含有 100 ppm ampicillin 之 LA 平板培養基上，於 37°C 培養箱培養 12-16 小時。



(七)正確選殖株之篩選

1. 菌落聚合酶連鎖反應

隨機挑選上述 LA 平板培養基上之單一菌落進行菌落 PCR，以進行初步篩選。取 0.2 mL PCR tube 加入 4.5 μ L 無菌水、0.25 μ L 之 5 μ M 正向及反向引子 (PiVX-F/M13-F) 及 5 μ L 2X Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampiqon; Tris-HCl pH 8.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 mM MgCl_2 , 0.2% Tween 20[®], 0.4 mM dNTPs, 0.2 U/ μ l Ampiqon Taq DNA polymerase, Inert red dye and stabilizer)；接著沾取少量單一菌落置入混合液中，混合均勻後即可進行聚合酶連鎖反應。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 /1 分鐘，30 個循環反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。反應完成後以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，挑選符合預期之菌落進行小量質體 DNA 製備。

2. 小量質體 DNA 製備與篩選

挑取單一菌落至含 100 ppm ampicillin 的 5 mL LB 中，於 37°C 培養箱中以 250 rpm 震盪培養 12-16 小時；然後依據 FavorPrep[™] Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen, Ping Tung, Taiwan) 建議之方法進行小量質體 DNA 之製備。將所純化的質體 DNA 以構築時所使用的限制酶，或其他適宜之限制酶進行酶切反應，並以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，挑選其中正確的選殖株，進行大量質體製備。



3. pUC-P1 dRNA 之構築

將 PiVX 天然缺失性 RNA 選殖株 p35S-P1-4 (陳, 2012), 以限制酶 *StuI* 與 *BamHI* 進行酶切反應後, 將 P1 dRNA 置換至帶有 T7 啟動子的載體上, 構築 pUC-P1 dRNA。首先將 p35S-P1-39 與 pUC-PiVX 分別以限制酶 *StuI* (10 U/ μ L, NEB) 與 *BamHI* (20 U/ μ L, NEB) 進行酶切反應後, 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析, 分別挑選 707 bp 與 3242 bp 之片段, 進行核酸回收; 前者為欠缺 5' 端之缺失性 RNA 的 cDNA 片段, 後者為帶有缺失性 RNA 之 5' 端片段的 pUC119 載體。將兩者進行接合反應後, 與 *E. coli* DH5 α 菌株之勝任細胞進行轉型作用。並以 PiVX-F 與 M13-F 引子對進行菌落 RCR, 初步篩選符合預期之菌落, 然後進行小量質體 DNA 製備, 將質體以 *StuI* 與 *BamHI* 進行酶切, 以確定正確之選殖株並定序, 完成 pUC-P1 dRNA 之構築。

4. 序列比對與分析

以 GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, Version 2.5.000) 觀看定序完成之缺失性 RNA, 並以 Clustal X (Thompson *et al.*, 1994) 進行序列比對, 再以 Vector-NTI (NTI AdvanceTM 11.0, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 進行序列分析。並輔以 MFOLD 進行 RNA 二級結構預測。

四、生體外轉錄體之製備

(一) 限制酶直線化質體

取小量製備之質體 DNA: pUC-PiVX、pUC-P1 dRNA、pUC-1P dRNA、pUC-2P dRNA、pUC-5P dRNA, 以限制酵素 *BamHI* 進行酶切反應後, 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析, 確認其反應完全後, 進行核酸回收, 回收之直線化質體置於 -20°C 冰箱備用。



(二) 生體外轉錄反應

在 1.5 mL 之微量離心管中，加入 1 μg 上述已直線化之質體 DNA 作為模板，與 5 μL 5X T7 transcription buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、5 μL (ACU)TP (5 mM each)、0.5 μL GTP (5 mM, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)、0.625 μL cap analog (10 mM NEB, Ipswich, MA, USA)、0.5 μL rRNasin (40 U/ μL , Promega, Madison, WI, USA) 及 1 μL T7 RNA polymerase (50 U/ μL , Invitrogen)，於 37°C 反應 15 分鐘後，加入 4.5 μL GTP (5 mM)，總反應體積為 50 μL ，隨後繼續於 37°C 反應 75 分鐘。取稀釋 50 倍之 1 μL 生體外轉錄體，以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，並利用 UVP 系統拍照，以 ImageJ 估算生體外轉錄體之產量，剩餘分裝保存於 -80°C 備用。

五、原生質體之製備、接種與分析

(一) 原生質體之製備

使用的所有器具皆以鋁箔紙包覆，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 4-6 週大之菸草，秤取葉片約 5 g，以 700 mL 1% 次氯酸鈉表面消毒 2 分鐘後，以二次蒸餾水漂洗 3 次，以除去殘留之次氯酸鈉，接著以濾紙吸去葉片殘留之水分。將葉片置於玻璃板上，先以刀片去除中肋，剩餘之葉片再切成約 2 mm x 4 mm 之長條狀，平鋪於兩個玻璃皿中，以 0.2 mM minipore filter (Sartorius, Goettingen, Germany) 過濾 25 mL enzyme digestion buffer [25 mg BSA, 15 mg pectinase, 300 mg cellulose, 25 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES (pH5.7)]，平均分配至兩個培養皿，避光於 25°C 反應 16 小時。反應完成後，輕輕搖晃培養皿使其內的菸草組織懸浮，再以 150 目尼龍網過濾植物殘體，將濾液平分至 4 支 15 mL 玻璃試管中，以 300 rpm (KUBOTA 2010, Tokyo, Japan) 離心 5 分鐘。隨後以玻璃滴管除去上層液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES，輕拍打

試管底部，使沉澱物均勻懸浮。再以玻璃滴管吸取 2 mL 0.55 M sucrose 溶液，伸至試管底部緩慢加入，形成 sucrose cushion。再以 300 rpm 離心 5 分鐘，比重適當的菸草原生質體會累積在 sucrose cushion 與 mannitol-MES 的交界處，形成深綠色層帶。吸取該處之原生質體置於新試管中，再加入 5 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕拍混合均勻。以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液，再加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕拍使沉澱物懸浮。隨後以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液，將沉澱物重新懸浮於 1 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液中，並集中於一管，均勻懸浮後，於光學顯微鏡下以血球計數器計算細胞數目，平均產量約為 $8-11 \times 10^4$ cells/mL。

(二) 原生質體之接種

將 4×10^5 個菸草原生質體置於 12 X 75 mm 玻璃之指形管中，以 300 rpm (KUBOTA 2010)離心 5 分鐘，除去上清液，留下 100 μ L 液體，輕晃使原生質體均勻懸浮，再將適量之生體外轉錄體加入原生質體懸浮液中，輕晃混合均勻，吸出所有原生質體懸浮液至裝有 150 μ L PEG inoculation buffer (Jones *et al.*, 1990)之指形管中，20 秒內輕拍指形管底部 40 下，並以穩定的速率加入 500 μ L 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液 3 次，並輕拍使混合均勻。置於冰上 10 分鐘後，以 300 rpm 離心 5 分鐘。接著吸去上層液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，並輕拍指形管底部，使沉澱物重新懸浮以洗去殘留之 PEG inoculation buffer。以 300 rpm 離心 5 分鐘，除去上層液，加入 750 μ L protoplast culture medium (Jones *et al.*, 1990)，並輕拍指形管底部，均勻懸浮沉澱物，以石臘膜封口，於 25°C 光照下培養 48 小時。

(三) 原生質體之全 RNA 之萃取與分析

取培養完成之原生質體輕拍懸浮後，以 300 rpm 離心 5 分鐘，除去上層液後，將沉澱之原生質體以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System 進行小量全 RNA

之萃取。萃取出之原生質體全 RNA，取 5 μ L 以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，剩餘之 RNA 置於 -20°C 冰箱備用，或直接進行北方雜合分析。



六、缺失性 RNA 在白藜上之接種

首先將缺失性 RNA 置換至帶有 CaMV 35S 啟動子的載體上，利用已構築之 p35S-P1dRNA 在 155 nt 處有單一 *StuI* 切位，以及 pUC119 載體上具有之 *BamHI* 切位，將其他的缺失性 RNA 由 pUC 置換到 p35S 載體上，所用之方法與 5.7.3 相同。本試驗使用 4-5 週之白藜植株，首先配置接種源，在 1.5 mL 微量離心管中加入 20 μ g p35S-PiVX 或 p35S-PiVX-dRNAs，或同時加入 20 μ g p35S-PiVX 與 p35S-PiVX-dRNAs，並以 ddH₂O 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，撒上適量之金鋼砂後，將接種源均勻塗抹全葉，每株白藜接種 3 片葉子，於 10 與 20 天後分別收取接種葉與系統葉，進行植物全 RNA 之萃取與分析。

七、北方轉漬與雜合法分析

(一) PiVX 5'端、CVX 3'端與 EGFP 專一性 DNA 探針之製備

以 p35S-PiVX、pUC-CVX3 與 pGR-PiVX-EGFP 為模板，利用 PCR 反應分別製備 PiVX 5'端、CVX 3'端與 EGFP 專一性 DNA 探針，使用之引子對如下：PiVX 使用 PiVX-F 與 37-R6 引子，CVX 使用 Farm-F 與 Farm-R1 引子，EGFP 則使用 SacII-EGFP-F 與 XhoI-EGFP-R 引子。取 5 ng 之模板 DNA 加入 0.2 mL PCR tube 中，接著加入 5 μ L 10X DyNAzymeTM buffer (Finnzyme, Espoo, Finland)、2 μ L 10X Digoxigenin (DIG)-11-dUTP labeling mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)、2.5 μ L 5 μ M 正向引子與 2.5 μ L 5 μ M 反向引子，再加入 0.5 μ L DyNAzymeTM II DNA Polymerase (2 U/ μ L, Finnzyme)，最後補水至 50 μ L。並以下列條件進行 PCR: 94°C 反應 5 分鐘，接著進行 94°C /30 秒、55°C /30 秒、72°C /30 秒，

30 個循環反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。取 2 μ L 之 PCR 產物以 1.2% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，確認條帶正確後，稀釋 10 倍，分裝至 0.2 mL PCR tube 中，置於 -80°C 冰箱備用。



(二) 北方轉漬法

取適量植物全 RNA，加入等體積之 2X RNA loading Dye (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)，混合均勻後以 70°C 加熱 10 分鐘，再放置冰上 5 分鐘，以解開 RNA 的二級結構。接著將處理完之樣品以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，再利用毛細現象使膠體中的 RNA 轉印至尼龍膜 (Hybond-N⁺, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 上，步驟為：將寬度略大於膠體的濾紙 (3MM, Whatman, England) 放在已架於長方盒的玻璃板上，並使濾紙兩端垂入盒內，以接觸盒內之 20X SSC buffer (AMRESCO, Solon, OH, USA)。濾紙完全潤濕後，將膠片背面朝上放在濾紙上，再蓋上已經以 20X SSC buffer 潤濕的尼龍膜與 2 張濾紙，上述步驟皆須避免氣泡存在間隙。接著以石臘膜將膠體周圍密封避免 20X SSC buffer 逸散，並覆蓋適量之擦手紙或吸水海綿，其上以重物壓住，於室溫下靜置 12-16 小時。

(三) 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 crosslinking (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。以鑷子將尼龍膜放入內有 20 mL hybridization solution 之雜合管中，於 50°C 之雜合箱 (YIH DER HR-80, Taiwan) 中，以 10 rpm 進行 pre-hybridization 反應 1 小時。DNA 核酸探針在使用前須進行變性反應，將已分裝之 20 μ L DNA 探針於 96°C 作用 10 分鐘，再移至冰上冷卻 5 分鐘，短暫離心後加入 hybridization solution，於 50°C 下轉速 10 rpm 進行雜合反應 12-16 小時。

反應完成後，取出尼龍膜，加入適量高鹽溶液(2X SSC, 0.1% SDS)於室溫震盪漂洗 2 次，每次 10 分鐘。再加入適量預熱至 65°C 之低鹽溶液(0.1X SSC, 0.1% SDS)於 65°C 震盪漂洗 2 次，每次 15 分鐘。接著以適量之 Buffer I (11.61 g maleic acid, 30 mL 5 M NaCl, 8 g NaOH, 加 ddH₂O 至 1 L)於室溫浸洗尼龍膜 1 分鐘，再以 100 mL Buffer II (10 mL 10% Blocking reagent, 90 mL Buffer I)於室溫下以 50 rpm 震盪 30 分鐘。接著取 1 μL alkaline phosphate-conjugated anti-DIG antibody (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)加入 20 mL 之 Buffer II，於室溫下以 50 rpm 震盪 45 分鐘。然後以適量 Buffer I 於室溫下清洗 2 次，每次 15 分鐘。清洗完畢後取出尼龍膜至透明塑膠袋中，加入 600 μL CDP-Star (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)，於黑暗中作用 15 分鐘後，除去多餘溶液後封口，以 X 光底片進行曝光，沖洗底片後即可觀察結果。

八、pUC-P1-EF 及 pUC-P1-E 之構築

欲以 P1 dRNA 作為表現載體以表現外源蛋白，我選擇以產生融合蛋白與利用 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子，兩種不同策略表現綠色螢光蛋白，因此構築 pUC-P1-EF 及 pUC-P1-E。首先設計帶有 *Sac*II 切位之反向引子 P1-*Sac*II-R，以及帶有 *Hpa*I 及 *Xho*I 切位之反向引子 P1-*Hpa*I-*Xho*I-R，配合正向引子 PiVX-map-F1，利用反向聚合酶鏈鎖反應(inverse PCR)在 pUC-P1 的 RdRP 與 CP 之間新增加 *Sac*II 切位，以構築 pUC-P1S；或是創造出 *Hpa*I 與 *Xho*I 切位，以構築 pUC-P1HX。方法如下：取一 0.2 mL PCR tube 加入 3 ng pUC-P1 dRNA、4 μL 之 5X fusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1 μL 之 10 mM dNTP mix、1 μL 之 5 μM 正向引子、1 μL 之 5 μM 反向引子，隨後加入 0.6 μL 之 Phusion DNA Polymerase (2U/μL, NEB)，最後補水至 20 μL，混合均勻後進行 inverse PCR。反應條件如下：96°C 反應 5 分鐘，接著進行 96°C /30 秒、60°C /1 分鐘、72°C /5 分鐘，25 個循環反應，最後以 72°C 反應 10 分鐘，並降溫至 4°C。

將核酸純化後，接著進行磷酸化反應：取一 1.5 mL 離心管加入 1.5 μ L 10X T4 DNA ligase buffer (Fermentas, ulington, Ontario, Canada)、1 μ L 10 mM ATP 與 1 μ L T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ L, NEB)，並加入純化後的 PCR 產物至總體積為 15 μ L，置於 37°C 作用 1 小時。再加入 0.5 μ L 10X T4 DNA ligase buffer、1 μ L 10 mM ATP、0.5 μ L T4 DNA ligase (5 U/ μ L, Thermo, Wilmington, USA) 及 3 μ L ddH₂O，於室溫下作用 4 小時，即可進行大腸桿菌轉型。經過菌落 PCR 與酶切反應篩選正確菌落，並製備小量質體 DNA。

將 pGR-PiVX-EGFP (何, 2012) 與帶有 *Sac*II 切位的 pUC-P1S，分別以 *Sac*II 及 *Xma*I 酶切後，以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析，從中挑選預期片段，並進行核酸回收，接著進行接合反應，以大腸桿菌進行轉型作用後，再進行菌落 PCR 篩選，經過小量質體製備並經酶切確認後，再由定序確定無誤，即完成 pUC-P1-EF 之構築(圖四)。以相同方式利用 *Hpa*I 及 *Xho*I 對 pGR-PiVX-EGFP 和帶有 *Hpa*I-*Xho*I 切位的 pUC-P1HX 進行酶切，電泳分析，核酸片段純化與接合反應，以構築 pUC-P1-E (圖四)。

九、p35S-P1-E 與 pGR-P1-E 之構築

已構築完成之 p35S-PiVX-P1 (陳, 2012) 與 pGR-PiVX (何, 2012)，以及 pUC-P1-E 皆帶有 *Stu*I 及 *Bam*HI 之切位，因此使用這兩種酵素對三種質體 DNA 進行酶切，以及後續之接合反應，而完成 p35S-P1-E 與 pGR-P1-E 之構築，所使用之方法與 5.7.3 相同。

十、影響 PiVX 複製之 *cis-acting elements* 分析

(一) 構築 5'端不同長度之缺失性 RNA

利用可和 pUC-PiVX-P1 dRNA 之 CP 保留區域起始位置專一結合之正向引子 PiVX-map-F1，及設計與 RdRP 保留區域不同位置專一性結合之反向引子 PiVX-map-R3 與 PiVX-map-R4，以下列配方配置 PCR 反應溶液：3 ng 之

pUC-PiVX-P1 dRNA、3 μL 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1 μL 10 mM dNTP mix、1 μL 之 5 μM 正向引子 PiVX-map-F1、1 μL 之 5 μM 反向引子 (PiVX-map-R3 與 PiVX-map-R4)、1 μL Phusion DNA polymerase (2 U/ μL , NEB), 補水至 20 μL , 反應條件為: 96°C 反應 5 分鐘, 接著進行 96°C/30 秒、55°C/1 分鐘、72°C/3 分鐘, 25 個循環反應, 最後以 72°C 反應 10 分鐘, 並降溫至 4°C。取 1 μL 產物以 1% agarose gel/1X TAE 進行電泳分析, 確定為預期片段大小後, 將剩餘產物進行核酸回收。

隨後進行磷酸化反應, 於 1.5 mL 微量離心管中加入 11.5 μL 核酸回收產物, 接著加入 1.5 μL 之 10X T4 ligase buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、1 μL 之 10 mM ATP 與 1 μL 之 T4 Polynucleotide kinase (NEB), 總體積為 15 μL , 於 37°C 反應 1 小時。接著進行接合反應, 將 0.5 μL 之 10X ligase buffer (Fermentas)、1 μL 之 10 mM ATP、與 0.5 μL 之 T4 DNA Ligase (5 U/ μL , Thermo, Wilmington, USA) 加入至上述產物中, 並補水至 20 μL , 於 4°C 反應隔夜後, 進行轉型作用。以 PiVX-F 與 M13-F 作為引子對進行菌落 PCR, 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 *PvuII* 進行酶切, 以確定取得正確之刪除突變株, 稱之為 pUC-P1-R3 與 pUC-P1-R4。

(二) 菸草原生質體接種與分析

使用 4-5 週之菸草植株, 並將菸草原生質體分離後, 以 PiVX 之生體外轉錄體與 P1-R3/P1-R4 之生體外轉錄體, 共同或單獨接種(莫耳數比 1:10), 經過 48 小時後抽取原生質體全 RNA, 並以北方雜合反應進行分析。

十一、接種紅龍果實生苗

單獨或共同接種 p35S-PiVX 與 p35S-P1-EGFP 各 20 μg 至白藜葉片, 接種後 20 天採收白藜系統葉約 1g, 加入 500 μL 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 在

經 180°C 烘箱滅菌之研鉢內以杵磨碎。接著以數支蟲針沾取汁液，再戳於紅龍果實生苗之三角莖，可連戳多次。經過一個月再萃取紅龍果全 RNA，同時可取一部份組織進行鏡檢，以觀察是否有綠色螢光蛋白表現。



十二、以農桿菌注射法進行病毒選植株之接種

(一) 農桿菌轉型

利用液態氮冷凍法將 pGR-PiVX、pGR-P1-EGFP、pBIN61、pBIN61-P19 及 pBIN61-GFP 轉型至農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 C58C1 中。取 1 µg 欲轉入之質體 DNA 加至勝任細胞中，輕拍後丟入液態氮 1 分鐘，再移至 37°C 水浴 5 分鐘，接著加入 1 mL 2X DYT 培養液，置於 28°C 培養箱以轉速 250 rpm 震盪培養 2 小時。以 13,000 rpm (Sorvall Legend Micro 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 1 分鐘，留下 100 µL 上清液，回溶沉澱物後即可進行塗盤，約 2-4 天可看到單一菌落於培養基上生長。

(二) 農桿菌注射法

從培養基上挑選單一菌落至含有 50 ppm kanamycin 之 LB 培養液中，於 28°C 培養箱以轉速 250 rpm 震盪培養 12-16 小時。以 MMA [10 mM MES (pH 5.6), 10 mM MgCl₂, 200 µM acetosyringone] 對半稀釋，並以 5500 rpm (Centrifuge Z 383 K, Hermle, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘，去除上清液後，加入 1 mL MMA 回溶沉澱物，並將菌液濃度調至 OD₆₀₀ 等於 0.5，即可用無針頭之 1 mL 針筒注射 4 週大的菸草與白藜，所注射的葉片為第 3、4 與 5 片本葉。

十三、以農桿菌注射表現 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) P19 蛋白於菸草及白藜

(一) 以農桿菌表現 P19 蛋白後再表現 EGFP

取 4-5 週大的菸草及白藜植株，以農桿菌注射法表現 pBin61-P19-myc-ko 及

pBin61，一天後再共同接種 p35S-PiVX 及 p35S-P1-E 至有注射農桿菌的菸草與白藜，接種方法與方法六相同；經過 5 天後收取接種葉，以 anti-GFP 及 anti-PiVX 鞘蛋白之一次抗體進行西方轉漬分析，並偵測綠色螢光蛋白表現情形。



(二) 以農桿菌表現 P19 與 EGFP

取 4-5 週大的菸草及白藜植株，將 pGR-PiVX 及 pGR-P1-E 與 pBin61-P19-myc-ko 或 pBin61 共同以農桿菌注射法處理葉片，5 天後收取接種葉片，進行西方轉漬分析。

十四、西方轉漬分析法

(一) 聚丙烯醯氨膠體電泳

以 Hofel 蛋白質電泳系統 (Mighty Small II E 250, Pharmacia Biotech) 進行聚丙烯醯氨膠體電泳。首先製備 12.5% 之分離膠體 (separating gel)：在燒杯中依序加入 12.6 mL ddH₂O、9.375 mL 40% acrylamide/bisacrylamide、7.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.3 mL 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.03 mL N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED) 及 0.15 mL 20% ammonium persulfate (APS)；快速搖晃燒杯使溶液均勻混合後，迅速倒入鑄膠器中，並立即加入 1 mL 95% 酒精，使膠面平整。靜置約 30 分鐘後，倒除酒精。接著配置 5% 焦集膠體 (stacking gel)：在燒杯中依序加入 9 mL ddH₂O、1.875 mL 40% acrylamide/bisacrylamide、3.75 mL 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.15 mL 10% SDS、0.015 mL TEMED 及 0.12 mL 20% APS，快速搖晃燒杯使溶液混合均勻後，迅速注入約 1-2 mL 之焦集膠體至分離膠體上方，並迅速插入齒梳 (comb)。待膠體凝固後，小心移去齒梳，並以清水清洗樣本槽中殘留之凝膠，即可使用。

(二) 樣品製備及聚丙烯醯氨膠體電泳分析

秤取適量植物樣本，置於以 180°C 處理之研鉢中，並加入適量液態氮，以杵將植物組織磨碎。接著加入植物樣品兩倍量的 GUS extraction buffer (5 mL 0.5 M EDTA, 250 µL 100% Triton X-100, 175 µL 14.3 M β-mercaptoethanol, 0.25 g SDS, 0.83 g NaH₂PO₄, 1.93 g Na₂HPO₄, pH 8.0, 補 ddH₂O 至 250 mL)，以杵混合均勻後，倒入 1.5 mL 微量離心管，以 13,000 rpm (Centrifuge Z216MK, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 10 分鐘。取 15 µL 之上清液和 5 µL 4X SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue) 混合均勻，於 96°C 加熱 10 分鐘，使蛋白質變性。接著將膠片置於電泳槽內，加入處理完畢之樣品後，即可進行電泳。電泳結束後去除焦集膠體，以 Coomassie brilliant R-250 (CBR) 染色觀察，之後即可進行西方轉漬免疫反應。

(三) 免疫轉漬分析

主要參考 Molecular Cloning 所描述之方法 (Sambrook and Russell, 2001)：將電泳結束分離的膠體浸泡在 CAPS (10 mM CAPS, 0.32 mM DTT, 15% methanol, pH 10.5) 中，於室溫下以 50 rpm 搖晃 10 分鐘。接著裁剪一張與分離膠體 (8.3 X 6.6 cm²) 相同大小之 HybondTM - PVDF 膜 (Millipore, Darmstadt, Germany)，與兩張相同大小的濾紙。以甲醇 (methanol) 浸濕 PVDF 膜，再浸泡於 CAPS 中，並將濾紙也浸泡於 CAPS 內。接著依序在正極之電極板上鋪上一張濾紙、PVDF 膜、分離膠體及濾紙，並蓋上負極之電極板。以 100 mA 之電流轉印，轉印 30 分鐘後取出 PVDF 膜，置於以 PBS 配置之 5% 脫脂奶粉中，於 37°C 震盪反應 1 小時。倒掉牛奶，加入以 1% 脫脂奶粉稀釋 10,000 倍之 anti-PiVX 一次抗體，或稀釋 2000 倍之 anti-GFP 一次抗體，於 37°C 震盪反應 1 小時後；以 PBST 清洗三次，每次 15 分鐘，再加入以 1% 脫脂奶粉稀釋 20,000 倍之含鹼性磷酸酶連結體之 anti-rabbit 二次抗體，於 37°C 震

盪反應 1 個小時後；以 PBST 清洗三次，每次 15 分鐘。最後加入 1 mL chemiluminescent HRP substrate (Millipore)，反應 5 分鐘內，迅速進行壓片，沖洗底片並觀察結果。



參、結果



一、PiVX 缺失性 RNA 之選殖與分析

本實驗室發現從 2010 年接種 PiVX-P37 分離株之紅龍果植株中，可天然產生 PiVX 缺失性 RNA，並從中選殖出具生物活性的 P1 缺失性 RNA (陳, 2012)。而本研究欲得到更多類型的天然產生之 PiVX 缺失性 RNA，以篩選出在 PiVX 輔助病毒的複製之下，累積量最佳的缺失性 RNA。利用田間採集且確認感染 PiVX 的紅龍果植株(F1 及 F5 植株)，萃取其全 RNA，再利用針對 PiVX 基因體 5'端 1-29 核苷酸的 PiVX-F 為正向引子，而反向引子 PiVX-dT-Bam 可針對 3'端-包括 poly A 在內的 46 個核苷酸進行專一性黏合，並在 poly A 末端帶有一個 *Bam*HI 切位，經由反轉錄作用與聚合酶鏈鎖反應後，以電泳進行分析。由結果可看到在 1 kb、0.85 kb 及約 0.6 kb 處有明顯的 DNA 條帶 (附錄一)。將這些 DNA 片段分別切下純化後，與之前已得到的 pUC-P1 選殖株，與 pUC119 載體以 *Sal*I 及 *Bam*HI 酶切，再進行黏合反應；接著轉型至 *Eschericia coli* DH5 α 菌株中，並培養於含有 ampicillin 的 LA 平板培養基上。隨機挑取 72 個菌落以 PCR 進行篩選，由 PCR 產物大小正確的菌株中挑取 10 個選殖株，抽取質體 DNA，再經酵素酶切，以確定是否為預期大小。從中選取 6 個選殖株進行定序，結果發現其中 2 個為非 PiVX 序列，而其他 4 個 PiVX 缺失性 RNA 可分成 3 種類型，分別稱之為 1P、2P 與 5P，其中 2P 有 2 個選殖株，1P 及 5P 各 1 個；加上之前已獲得的 P1 (陳, 2012)，因此目前 PiVX 缺失性 RNA 共有 4 種類型。其中 1P 與 P1 類似，5'端保留 PiVX 完整的 5' UTR 與部分 RdRP 基因之序列，3'端則由 CP 基因部分序列與完整的 3'UTR 所組成(圖一 A)。2P 與 5P 的 5'端所保留的部分與前兩者相似，但 3'端部分卻不含 CP 序列，只有不完整的 3'UTR (圖一 A)。若仔細分析其序列，1P 與 P1 不同處在於 1P 保留較長的 5'端及 3'端序列，分別是 5'端 747 個核苷酸與 3'端 262 個核苷酸，總長度(不含 polyA)

為 1009 個核苷酸；而 P1 的 5'端與 3'端則各有 645 個與 196 個核苷酸，全長為 841 個核苷酸。2P 保留了 5'端 521 個核苷酸，加上 3'端 43 個核苷酸，總長度為 564 個核苷酸。5P 總長度為 610 個核苷酸，由 5'端 578 個核苷酸與 3'端 32 個核苷酸所組成(圖一 A)。其中，因 1P 由田間紅龍果篩選而來，經由 geneDoc 分析，1P 與 P1 之序列有 9 個核苷酸的差異(附錄二)，而以程式預測將兩者轉譯成胺基酸之結果，兩者皆未維持鞘蛋白部分之轉譯架構，只保留複製酶之轉譯架構(圖一 B)。而兩者轉譯後有 1 個胺基酸不同，1P 可表現一個 225 個胺基酸之重組蛋白，P1 則具有一個由 193 個胺基酸構成之重組蛋白；而 2P 與 5P 則分別表現一個 145 個與 169 個胺基酸的重組蛋白(圖一 B)。

二、測試 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體中之複製能力

將製備完成之缺失 RNA 的生體外轉錄體以電泳分析，並以 EtBr 染色且拍攝影像後，利用 ImageJ 進行定量分析，再進行菸草原生質體接種試驗。將 PiVX 缺失性 RNA 包含 P1、1P、2P-1、2P-2、5P 之生體外轉錄體，各約 7 μ g 單獨接種，或是和莫耳數比 10:1 之 PiVX 生體外轉錄體混合，共同接種至菸草原生質體中；48 小時後抽取原生質體全 RNA，以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。實驗結果顯示有接種 PiVX 生體外轉錄體者，皆有 PiVX 基因體 RNA 的訊號。單獨接種 PiVX 缺失性 RNA 者，未偵測到任何訊號。而所有 PiVX 缺失性 RNA 與 PiVX 共同接種的處理中，只有 P1 出現明顯的缺失性 RNA 條帶，1P 則呈現較弱的雜合訊號，至於 2P 與 5P 沒有偵測到反應(圖二)。由多次實驗結果可知，只有 PiVX 輔助病毒存在時，缺失性 RNA P1 及 1P 才可以在菸草原生質體中複製累積，而其中又以 P1 的複製能力最佳，2P 與 5P 則不具複製能力。

三、測試 PiVX 缺失性 RNA 於白藜植株系統葉之累積能力

依據菸草原生質體接種實驗結果，P1 缺失性 RNA 之複製能力較其他缺失性

RNA 為佳，但 1P 缺失性 RNA 有時也會有明顯的複製現象(未出示資料)。為進一步確認 PiVX 缺失性 RNA 在植物上的複製與移動能力，遂將 1P 缺失性 RNA 由 pUC 載體置換至由 CaMV 35S promoter 驅動之載體，以構築出 p35S-1P。加上實驗室原先構築的 p35S-P1 (陳, 2012)與 p35S-PiVX (李, 2010)，共同或單獨接種至 4-5 週大的白藜植株，每棵白藜接種 3 片葉。經過 10 與 20 天，分別觀察接種葉與系統葉之病徵，並萃取接種葉與系統葉之全 RNA，以 PiVX 之 5'端探針進行北方雜合反應分析。結果顯示在 PiVX 的協助下，於未接種之白藜系統葉可偵測到 P1 缺失性 RNA 之累積(圖三 A)。但 1P 在 PiVX 的協助下，雖可於白藜接種葉累積 1P 的 RNA (未出示資料)，但卻無法在系統葉測得 1P 的 RNA 訊號(圖三 A)。單獨接種兩種 PiVX 缺失性 RNA 的處理，皆無法在系統葉偵測到缺失性 RNA 之累積(圖三 A)。由此可知，P1 缺失性 RNA 可與 PiVX 一起進行系統性移動，但 1P 可能只能在接種葉上進行複製與細胞間移動。比較接種後 20 天白藜系統葉的病徵，1P 缺失性 RNA 與 PiVX 共同接種時，與單獨接種 PiVX 的病徵並無顯著差異；但 P1 缺失性與 PiVX 共同接種的病徵較 PiVX 單獨接種的病徵略為嚴重(圖三 B)。

四、以 PiVX 缺失性 RNA 為載體表現外源蛋白

(一)以菸草原生質體分析 P1 載體利用鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子或表現融合蛋白之方法表現綠色螢光蛋白之效果

前述研究結果為 P1 缺失性 RNA 在菸草原生質體的複製能力最佳，又可在白藜植株行系統性移動，故選擇以 P1 缺失性 RNA 作為表現載體，用來表現外源蛋白。以綠色螢光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)作為外源蛋白，使用兩種不同的方式表現 EGFP；其中 pUC-P1-EF 是將 P1 缺失性 RNA 的 RdRp N 端與 EGFP 形成融合蛋白，同時保留完整的 PiVX 鞘蛋白(圖四)；而 pUC-P1-E 則是利用 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子(何, 2012)，先轉錄出帶有 EGFP 序列的次基因體 RNA，再轉譯出 EGFP(圖四)。

將 P1-E 與 P1-EF 的生體外轉錄體單獨接種，或與 PiVX 的生體外轉錄體共同接種至菸草原生質體，接種後 48 小時，以螢光顯微鏡進行觀察，並且萃取原生質體全 RNA，再以北方雜合反應分析 RNA 累積情形。共同接種 PiVX 與 P1-E 的菸草原生質體，經過 48 小時後可看到有綠色螢光表現(圖五 A)；而共同接種 PiVX 與 P1-EF 的處理，則無法觀察到螢光表現(圖五 A)。使用 PiVX 5'端專一性探針及 EGFP 共同偵測，結果發現與 PiVX 共同接種之處理，P1-E 有複製的現象，但相較於 P1 缺失性 RNA，P1-E 的累積量較少(圖五 B)；而 P1-EF 則沒有被 PiVX 複製的情形(圖五 C)。當再以 EGFP 探針偵測時，可看到 P1-E 與 PiVX 共同接種的處理，呈現 P1-E 清楚的雜合訊號(圖五 B)，可是卻未偵測到預期產生之次基因體 RNA。

(二) 以白藜植株分析 P1 載體利用鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子表現綠色螢光蛋白之效果

因 P1-E 在菸草原生質體內可被 PiVX 複製，遂將 P1-E 置換到至由 CaMV 35S promoter 驅動之載體上，構築 p35S-P1-E。再將 p35S-P1-E 與 P35S-PiVX 共同或單獨接種至 4-5 週大小的白藜植株，經過 20 天後，抽取植物全 RNA，以 EGFP 專一性探針進行北方雜合反應，並以螢光顯微鏡觀察白藜系統葉的螢光蛋白表現情形，以分析 p35S-P1-E 在 PiVX 協助下之系統性移動情形。以螢光顯微鏡觀察接種後的白藜系統葉，可看到只有 p35S-PiVX 與 p35S-P1-E 共同接種的白藜系統葉才有綠色螢光蛋白表現(圖六 A)，其餘則沒有綠色螢光蛋白表現。北方雜合反應結果顯示與 p35S-PiVX 共同接種時，在白藜系統葉可偵測到 P1-E RNA 訊號，可是卻未偵測到預期產生之次基因體 RNA(圖六 B)，而其他處理則沒有訊號出現。

五、短暫表現基因靜默抑制子 P19 對 PiVX 缺失性 RNA 載體表現 EGFP 之影響

根據上述研究結果，P1 載體表現 EGFP 的效率並不高(圖五及圖六)，雖然將 P1-E 接種於菸草原生質體與白藜植株，皆可以北方雜合反應偵測到 EGFP RNA 的

表現，但以西方轉漬法無法偵測菸草原生質體的 EGFP 表現(未出示資料)，而在白藜上的螢光蛋白訊號則不穩定(未出示資料)，推測可能是 EGFP 表現效率較差而以西方轉漬法無法穩定偵測。為改善表現效率低的情況，希冀利用基因靜默抑制子 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) 之 P19 來加強 P1-E 表現。首先將 pBIN61-P19 或 pBIN61 以農桿菌注射至 4 週大的菸草及白藜，經過一天後再機械接種 p35S-PiVX 與 p35S-P1-E 至有處理的菸草與白藜，再經過 5 天收取接種葉，以 PiVX-CP 抗體與 GFP 抗體進行西方轉漬分析。由結果顯示，在白藜上表現 P19 並不會增加 P1-E 的 EGFP 表現，只要 PiVX 在白藜內的複製達到某種量，即可測到 EGFP 表現(圖七 A)。因菸草不是 PiVX 的寄主，可見到在有表現 P19 的菸草，才能偵測到 PiVX 的鞘蛋白(圖七 B)，表示在菸草上表現 P19 蛋白確實有助於 PiVX 的感染，但卻無法使 P1-E 表現 EGFP(圖七 B)。

由於上述在菸草上先表現 P19 再接種 p35S-PiVX 與 p35S-P1-E 可以成功偵測到 PiVX 的累積，卻無法表現 EGFP，推測有可能以機械接種的方法表現 EGFP 所需的時間較久，故將 p35S-P1-E 置換至可以農桿菌注射法的載體：pGR-P1-E，與 pGR-PiVX (何, 2012) 及 pBin-P19 共同以農桿菌注射法接種菸草與白藜，菸草收取 5 天的接種葉進行西方轉漬分析。本實驗所做的處理有單獨以農桿菌注射 pGR-PiVX、pGR-P1-E 或 pBin-GFP，共同注射 pGR-PiVX 與 pGR-P1-E，共同注射 pGR-PiVX、pGR-P1-E 與 pBin-P19/pBin61。由結果顯示只要有注射 pGR-PiVX 的菸草，即能以 PiVX-CP 抗體偵測到訊號，但以 GFP 抗體卻依然無法偵測到以 P1 載體表現之 EGFP (圖八 B)。而以農桿菌注射法表現於白藜，收取接種後 3、5 及 8 天的接種葉，皆無法偵測 PiVX 鞘蛋白之表現，也無法偵測到 GFP 的表現(圖八 A)，表示以農桿菌注射白藜的方法似乎有些條件不適當，因而在本研究中未有結果。



五、PiVX 複製相關 *cis-acting elements* 之分析

欲了解 PiVX 複製相關的 *cis-acting elements*，我選擇複製能力最佳的 P1 缺失性 RNA 為材料，分析 PiVX 5' 的長度對缺失性 RNA 在菸草原生質體之累積能力之影響，藉此研究 PiVX 複製相關之保守序列。利用可與 P1 鞘蛋白保留序列起始位置專一性結合之正向引子 PiVX-map-F1，以及可和 PiVX 之 RdRP 不同位置專一性結合之反向引子，進行聚合酶連鎖反應，以構築帶有不同長度的 RdRP 片段之 P1 刪除突變株；得到 4 種不同長度的突變株，分別為 R3、R4。經定序後確定 R3 保留 1-515 nt 之片段，R4 保留 1-435 nt 之片段(圖九 A)。

將 pUC-R3 及 pUC-R4 以 *Bam*HI 截切進行直線化，純化並製備生體外轉錄體，再單獨或與 pUC-PiVX 之生體外轉錄體共同接種至菸草原生質體中，經 48 小時後抽取原生質體全 RNA，隨之以北方雜合反應觀察。由實驗結果顯示，R3 及 R4 與 PiVX 共同接種原生質體，除了 PiVX 基因體 RNA 外，亦可偵測到 R3 及 R4 缺失性 RNA 之累積，且被 PiVX 複製的能力似乎只比 P1 略低一些(圖九 B)。由此結果可知 PiVX 之缺失性 RNA 只要保留 1-435 nt 與 6482-6677 nt，即可在菸草原生質體中被 PiVX 複製，故此區域內應有 PiVX 複製相關之 *cis-acting elements*。

六、測試 CVX 缺失性 RNA 在 PiVX 幫助下於菸草原生質體之複製能力

(一) CVX 缺失性 RNA 之選殖與分析

萃取田間已知感染 CVX 之紅龍果植株全 RNA，以 CVX 5' 端專一性探針進行北方雜合反應，可發現除了 CVX 基因體 RNA 訊號之外，尚有許多小分子 RNA 訊號(未出示資料)，推測 CVX 也與 PiVX 一樣會產生缺失性 RNA。因此，本研究利用田間已知感染 CVX 與 PiVX 的紅龍果植株(F1 及 F5 植株)，萃取其全 RNA，再利用針對 CVX 基因體 5' 端 1-24 核苷酸，並可在 5' 端前增加 T7 啟動子與 *Bam*HI 切位的 T7-farm-F 做為正向引子，而反向引子為 NTU-dT-R，其帶有一個 *Bam*HI

切位，並可針對 3'端-包括 poly A 在內的 44 個核苷酸進行專一性黏合，經由反轉錄作用與聚合酶鏈鎖反應後，以電泳進行分析。由結果可看到在 1 kb 及 0.85 kb 處有明顯的 DNA 條帶 (附錄一)。將這些 DNA 片段切下純化，與 pUC119 載體以 *Bam*HI 酶切後，進行黏合反應，接著轉型至 *Eschericia coli* DH5 α 菌株中，並於含有 ampicillin 的 LA 平板培養基上進行選殖。隨機挑取 48 個菌落進行篩選，由菌落 PCR 結果大小正確的菌株中，挑取 6 個選殖株抽取質體 DNA，再經酵素酶切確定是否為預期大小，由中選取 3 個選殖株進行定序，結果篩到二種 CVX 的缺失性 RNA，稱為 C3 與 C6(圖十 A)，剩餘一個選殖株經序列比對後，非 CVX 缺失性 RNA。C3 與 C6 皆由 5'端 677 核苷酸及 3'端 591 個核苷酸組成，總長為 1268 個核苷酸，保留完整的 5'UTR 及 3'UTR，以及部分 RdRp 與 CP 基因。C3 與 CVX-NTU 的序列有 16 個鹼基差異，C6 有 17 個鹼基差異；而兩者唯一不同處在 RdRP 基因第 188 個核苷酸為 C3 為 C，而 C6 則是 T，胺基酸則有 alanine 與 valine 之別。

(二) CVX 缺失性 RNA 在 PiVX 協助下於菸草原生質體中之複製能力

為了解 PiVX 能否辨識 CVX 缺失性 RNA，並幫助其複製，同樣以菸草原生質體進行測試。將製備完成之 CVX 缺失 RNA 的生體外轉錄體以電泳分析，並以 EtBr 染色且拍攝影像後，利用 ImageJ 進行定量分析，再進行接種試驗。將 CVX 缺失性 RNA C3 及 C6 之生體外轉錄體，各約 10 μ g 單獨接種，或是和 PiVX 生體外轉錄體混合，以莫耳數比 10:1 共同接種至菸草原生質體中，48 小時後抽取原生質體之全 RNA，以 PiVX 5'端及 CVX 5'專一性探針進行雜合反應。結果顯示 C3 或 C6 與 PiVX 共同接種時，除了 PiVX 基因體 RNA 的訊號外，亦有缺失性 RNA 累積 (圖十 B)，代表 C3 及 C6 可被 PiVX 複製，且兩者沒有明顯差異。單獨接種 C3 及 C6 也可發現有一些訊號出現，因訊號明顯低於共同接種的處理，故推論應為接種源的殘留。



肆、討論

一、PiVX 與 CVX 缺失性 RNA 之選殖

我們所分離出的 PiVX 缺失性 RNA 及 CVX 缺失性 RNA 皆屬於單一片段移除型，為親緣病毒保留 5'端及 3'端不等長的序列，但移除一大段中間序列再重新接合而成(圖一及圖十)，與許多報導所分離出的缺失性 RNA 相同(Li *et al.*, 1989 ; White *et al.*, 1991 ; Calvert *et al.*, 1996)。我們由紅龍果中分離的 PiVX 缺失性 RNA，由 5'端 521-747 nt 與 3'端 32-262 nt 重新組合而成。將這些缺失性 RNA 與輔助病毒 PiVX 共同接種菸草原生質體，只有 P1 與 1P 可以在菸草原生質體上被複製(圖二)，可推知 PiVX 5'端 645 nt 及 3'端 196 nt 區域序列內應具有可以被 PiVX 複製酶辨識的 *cis-acting* elements。而 2P 及 5P 不能被複製可能是因其缺乏完整的 3'端非轉譯區(untranslated regions, UTR)，有許多文獻指出病毒的 3'端 UTR 與其本身的複製、造成的病徵、轉譯效率與系統性移動有關(Olsthoorn *et al.*, 1999 ; Gallie & Kobayashi, 1994 ; Dreher, 1999 ; Roy *et al.*, 2013)。此外，因 2P 及 5P 完全缺失鞘蛋白序列，也有可能 1P 及 P1 所保留的鞘蛋白區域有保守性的二級結構，可讓 RNA 複製酶辨識而啟始複製反應(Kovalev & Nagy, 2014)，但這尚待實驗證明。由目前結果可推論缺少完整的 PiVX 3'端 UTR，無法在菸草原生質體中被複製，而 5'端只要保留 645 nt 即可被複製。經過多次菸草原生質體接種實驗，有時 P1 被複製的效率較佳，但有時為 1P 複製量較高。報導指出將 TBSV 與其缺失干擾性 RNA 共同接種於菸草原生質體，會因溫度不同而使缺失干擾性 RNA 的被複製率明顯不同(Jones *et al.*, 1990)。故有可能是菸草原生質體接種後的培養環境溫度不同，導致 P1 與 1P 的複製效率有時會不同；因此之後的研究都仔細控制菸草原生質體的環境溫度。另外，比較 1P 與 P1 之序列，除了長度不同外，還有 9 個核苷酸有差異(附

錄二)，但經程式預測轉譯後的胺基酸只有 1 個不同。1P 與 P1 經 Mfold 預測的二級結構也非常類似(附錄三)，可能因而使得兩者皆可以在菸草原生質體中被 PiVX 辨識而複製，但精確的辨識位置尚待進一步研究證實。

從 PiVX 缺失性 RNA 與 PiVX 接種白藜植株之結果顯示，P1 保留 PiVX 5'端 645 nt 及 3'端 196 nt 即可在白藜上系統性移動並累積，而 1P 的 5'端及 3'端保留序列皆較 P1 長，卻只能在接種葉上進行複製與細胞間移動，而喪失了系統性移動的能力，推測可能較長之序列使 1P 易受到 PTGS 的影響(Szitty, 2002)，或是缺失性 RNA 的增殖能力會直接受到其本身基因體長度之影響(Makino *et al.*, 1990)。而也無法排除 1P 比 P1 多出的序列長度會受到寄主因子的影響，而使其無法進行系統性移動(Llamas *et al.*, 2004；Zhang & Nuss, 2008)。

綜合 P1 及 1P 接種於菸草原生質體及白藜植株的結果(圖二及圖三)，這些 PiVX 缺失性 RNA 不具有干擾輔助病毒複製之能力，故其不屬於缺失干擾性 RNA (Chen *et al.*, 1994)。甚至在研究過程中常會發現，所分離出的 PiVX 缺失性 RNA 似乎會使輔助病毒複製變多的現象(未出示資料)，但這狀況並不穩定，且缺失性 RNA 與 PiVX 共同接種白藜的病徵也與單獨接種 PiVX 的病徵相差不大(圖三 B)。而根據報導，目前只有兩個例子是缺失性 RNA 會使輔助病毒造成的病徵有加重的現象(Li *et al.*, 1989；Romero *et al.*, 1993)，其他的缺失性 RNA 皆不會影響輔助病毒複製，至於缺失干擾性 RNA 則是有使輔助病毒有複製下降的狀況。而有些學者認為缺失性 RNA 是利用輔助病毒多餘的 RdRP 來進行複製，或許我分離到的缺失性 RNA 也是如此，因此在某部分狀況並不會影響輔助病毒複製(Lewandowski & Dawson, 1998)。而目前我們並不知道我們分離出的缺失性 RNA 有何特殊功能，使其在演化過程中被保留下來。

二、以 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體表現外源基因

由於 PiVX 寄主範圍狹窄，目前只知道可以在紅龍果及白藜植株上系統性移

動(李, 2010), 此為以 PiVX 當作載體的一大優點, 因其在寄主方面之專一性使該病毒載體不易傳播至其他植物。且目前發現的紅龍果病毒種類不多, 若要在紅龍果上表現外源蛋白, PiVX 應是個不錯的選擇, 因其在紅龍果上不會產生嚴重的病徵, 但是否影響紅龍果產量尚需進一步研究。因缺失性 RNA 是已經過自然選汰後在寄主上出現, 且其基因體較短, 插入外源基因較能穩定表現(Chapman *et al.*, 2002); 故我們欲以分離出來的缺失性 RNA 作為載體表現外源基因。我們首先嘗試只要以螢光顯微鏡即可觀測其表現效率的綠色螢光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)作為外源基因, 以分析我們所構築的 PiVX 缺失性 RNA 載體表現情形。因 PiVX 缺失性 RNA 之中, P1 在菸草原生質體及白藜植株的系統葉上都可測到其累積(圖二及圖三), 顯示 P1 可能在不同植物中較能穩定地被 PiVX 複製, 因此, 我們選擇以 P1 做為表現外源基因的載體。而因為缺失性 RNA 的特殊性質, 其通常會維持一個複製酶 N 端的轉譯架構而與外源基因形成融合蛋白(圖一)(Sandoval *et al.*, 2008), 故我們試圖以此方法表現 EGFP 而構築了 P1-EF(圖四)。另外, 許多文獻指出以病毒鞘蛋白次基因啟動子(subgenomic promoter, SGP)表現外源蛋白的表現效率高又穩定(Dawaon *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 1992), 故我們也嘗試利用 PiVX 之鞘蛋白 SGP 表現綠色螢光基因(何, 2012), 因而構築了 P1-E(圖四)。由兩者與 PiVX 共同接種於菸草原生質體之北方雜合結果顯示, 以 SGP 表現 EGFP 之效果較以融合蛋白的形式佳(圖五)。學者利用 *Broad bean mottle bromovirus* (BBMV) 缺失干擾性 RNA 的 RdRP 轉譯架構來表現 GFP 的融合蛋白, 成功以機械方式接種於 BBMV 的寄主豆科植物上, 可系統性移動並大量表現 GFP, 且 GFP 的表現量非常穩定, 可以持續 3 個月以上 (Sandoval *et al.*, 2008)。同理可見, 我們以 PiVX 的 RdRP 轉譯架構表現 EGFP 應是可行的方法, 可能是 P1-EF 帶有完整的 PiVX 鞘蛋白, 致使序列太長而無法被複製; 因為 BBMV 之表現載體包含 GFP 總長度為 1.7 kb (Sandoval *et al.*, 2008), 而 P1-EF 的長度為 2.2 kb。另一可能原因為此實驗的原生質體狀態不佳, 因圖五 C 之 P1 與 PiVX 共同接種的複製率也較圖五

B 相同處理組低。而雖然將 P1-E 與 PiVX 共同接種原生質體之結果有測到 EGFP RNA，但其訊號相較於同時接種的 P1 低很多(圖五 B)，且以螢光顯微鏡觀測時表現效率並不高，或許因此西方轉漬法無法測到 EGFP 蛋白表現(未出示資料)。此外，因我們來表現 EGFP 的 SGP 之 5'端多了 18 個核苷酸(鞘蛋白轉錄起始點-61/-44)，而這一段序列被認為可能具有抑制 PiVX gRNA 累積的功能，因將其移除後，病毒 gRNA 與 sgRNA 之累積量隨即上升(何, 2012)。因此，有可能因為此段序列的存在，使得 P1-E 的 gRNA 表現效率不高。因菸草不是 PiVX 的繁殖寄主，且 P1 又攜帶外源基因而增加序列長度，使其被 PiVX 複製的效率下降，而使得 EGFP 表現率並不高。

三、iVX 缺失性 RNA 於白藜植株表現外源基因

PiVX 可在白藜上形成褪綠和壞疽病斑，並且造成系統性感染，故欲在白藜測試我們所構築的缺失性 RNA 載體。因在菸草原生質體上確定了 P1-E 可以表現 EGFP，故進一步將 P1-E 構築於以 CaMV 35S 啟動的載體上，與 p35S-PiVX 共同接種於白藜後，當病斑出現時以螢光顯微鏡觀察白藜接種葉及系統葉的 EGFP 表現情形，發現 EGFP 表現效率並不高，只有在葉子上病斑周圍零星表現(圖六 A)，故無法以 UV 燈照射下直接觀察到 EGFP 表現。而白藜系統葉以北方雜合反應可以測到 EGFP 的累積，但在西方轉漬反應以 GFP 抗體偵測的結果並不穩定，有時可以明顯看到 GFP 訊號，有時則沒有訊號(未出示資料)。推測可能 P1-E 在接種後的序列有些點突變，造成雖然可以北方雜合反應偵測到 EGFP RNA 訊號，但因蛋白質的抗原決定基構型改變，使 GFP 抗體無法偵測到訊號；或是 P1-E 與 PiVX 一起進行系統性移動時，有一部分缺失性 RNA 將外源基因 EGFP 剔除(Dawson *et al.*, 1989; Scholthof, 1999)，造成西方轉漬法結果不太穩定。其他可能原因是未找到適當採收葉片抽蛋白的時間點，或許病斑已佈滿整面葉片時，EGFP 的表現已降低，

因此應採收病斑較新鮮的葉片，因圖七 A 之研究收取白藜葉片時並無病徵表現，但以 GFP 抗體進行西方轉漬法卻可偵測到訊號。



四、表現 p19 對缺失性 RNA 載體之影響

由於以缺失性 RNA 表現外源基因植物上的表現效率不高，而近年來常用基因靜默抑制子 p19 來增強病毒的複製量，進而使缺失性 RNA 被複製的量也增加 (Qiu & Scholthof, 2007)。因此，我們嘗試先以農桿菌注射法表現 p19 於白藜及菸草，再接種 PiVX 與 P1 載體來表現外源基因。由結果顯示 p19 的表現似乎並不會使 PiVX 在白藜上的複製增加，也沒有增加 EGFP 表現的情況(圖七 A)，因以農桿菌注射 pBin-p19 及 pBin61 之處理所偵測到的 PiVX 鞘蛋白訊號差不多；而沒有先以農桿菌處理的葉片則 PiVX 複製量較少，推測因農桿菌的注射造成植物組織有一些損傷，而使病毒較易入侵及複製；而可以看到有 PiVX 複製的葉片，則有測到 EGFP 的表現，代表我們所使用的 P1 載體確實能在 PiVX 存在下表現外源蛋白。由於菸草不是 PiVX 的繁殖寄主，有文獻指出基因靜默抑制子會增加病毒在非寄主上的感染力 (Ambrós *et al.*, 2011)，因此我們嘗試利用 p19，來觀測是否 p19 會使 PiVX 變成可以感染菸草，而讓 P1 載體可以表現 EGFP。由結果顯示有處理 p19 菸草葉片可以西方轉漬法測到 PiVX 鞘蛋白累積(圖七 B)，代表可能只要抑制了菸草啟動的基因靜默反應，PiVX 即可在菸草葉片上累積，但我們依然無法在有 PiVX 存在的菸草葉片，以 GFP 抗體偵測到 EGFP 訊號(圖七 B)。此結果顯示雖然 p19 的表現使 PiVX 可以感染菸草，但 PiVX 複製 P1 的能力似乎受到限制，可能植物上尚有一些抑制因子，使 P1 載體無法表現。另外，有可能以機械接種之方法缺失性 RNA 載體被 PiVX 複製需要一些時間，因目前觀察白藜接種葉需要 7 天以上才會出現病徵，而菸草既不是寄主，且因受限於以注射農桿菌後的葉片會逐漸透化，所以我們是收接種後 5 天的接種葉之原因，使得 P1 載體尚未被表現。



五、桿菌注射法同時表現 p19 與 PiVX 缺失性 RNA 載體

Citrus tristeza virus (CTV)以農桿菌注射法在其非寄主菸草(*N. benthamiana*)上成功感染，並可進行系統性移動與造成病徵，且若同時注射基因靜默抑制子可以加強其感染(Ambrós *et al.*, 2011)。上述 P19 與 P1 載體不同時間點的表現方法使我們無法掌握 P19 與 EGFP 共同大量表現的時間點，而利用農桿菌注射法可同時快速強迫細胞被感染(Voinnet & Baulcombe, 1997)，因此我們將 PiVX 與 P1-E 以農桿菌注射法接種菸草，並同時加入 p19，試圖加強 PiVX 感染力。由圖八 B 之結果顯示，農桿菌注射法確實有助於 PiVX 感染菸草，但我們的結果與 CTV 感染菸草不同(Ambrós *et al.*, 2011)，因同時注射 p19 時，PiVX 並沒有增加的現象(圖八 B)，且注射後觀察菸草系統葉也沒有病徵出現，推測 PiVX 並不會在菸草內系統性移動。另外，我們將相同處理的菸草以 GFP 抗體進行偵測，遺憾的是 P1 載體沒有被 PiVX 複製而表現 EGFP(圖八 B)。推測可能是接種 PiVX 與 P1 載體的菌量條件不佳，因我們接種菸草原生質體所使用的 PiVX 與 P1 載體轉錄體之莫耳數比為 1 : 10，而我們以農桿菌注射的菌量比為 1 : 1。而也可能以缺失性 RNA 載體在非寄主表現外源蛋白要突破許多難處，例如其輔助病毒需在非寄主上大量複製，接著辨識到缺失性 RNA 進而協助其複製，而缺失性 RNA 攜帶著外源基因，又增添了更多困難。另外，我們以相同的方法表現於 PiVX 的寄主白藜，卻無法以西方轉漬法偵測到 PiVX 與 GFP 的累積，而且連注射 pBin-GFP 的處理也無法測到，表示白藜可能不是農桿菌良好的感染對象，所以直至目前並無將白藜以農桿菌處理的文獻，或是有文獻指出，農桿菌菌株的不同會對感染植物有不同的結果(Zhao Zhang *et al.*, 2013)，推測我們所使用的農桿菌菌株也許不具有感染白藜細胞的能力，未來可以嘗試其他的農桿菌菌株。



六、PiVX 製相關之 *cis-acting elements* 區域

缺失性 RNA 為常用來研究輔助病毒的 *cis acting elements* 之材料(Simon *et al.*, 2004; Pathak & Nagy, 2009)，而我們欲了解 PiVX 的序列特性，因此也利用目前在菸草原生質體及白藜上皆可穩定被 PiVX 複製的 P1 缺失性 RNA 構築人為突變株，再以菸草原生質體測試其活性。目前已知道在 PiVX 序列 356-562nt 區域似乎具有 PiVX 缺失性 RNA 於植物累積必須之序列(陳, 2012)，以此為基準，我們繼續構築了在此範圍內的突變株，以更精準地確定 PiVX 複製相關的 *cis-acting elements*。結果發現 PiVX 只要保留 5' 端 435 nt 與 3' 端 196' nt 即可在菸草原生質體被 PiVX 複製，代表此區域應具有 PiVX 複製相關之 *cis-acting elements*。而再綜合陳君弢學長的研究，可能 PiVX 序列 356 nt-435 nt 區域內可能具有與 PiVX 複製息息相關的序列。而目前已知許多 *Potexvirus* 屬的 5' 端及 3' 端非轉譯區與其複製、移動相關，且會形成穩定的 stem loop (Kim & Hemenway, 1996; Pillai-Nair *et al.*, 2003)，例如 *Potato virus X* (PVX) 的研究，其與細胞移動相關的 *cis-acting elements* 位於 PVX 序列 1-107 nt 區段上，且此段序列存在一保守性的 stem loop (Lough *et al.*, 2006)。因此我們以 Mfold 分析此段區域的二級結構(附錄四)，結果可以看到 354-394 nt 有一個 stem loop 結構，但並不知道是否此結構與 PiVX 的辨識相關，需更進一步的研究以證實。

七、CVX 缺失性 RNA 之分析

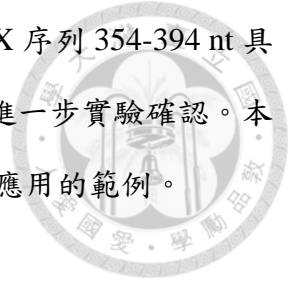
在 *Potexvirus* 屬植物病毒缺失性 RNA 的研究中，須以高濃度的病毒接種，並經過連續繼代多次才會形成缺失性 RNA (Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1999)。然而以高濃度之 PiVX 連續繼代接種至白藜上，竟然從第二代就有缺失性 RNA 的出現(陳, 2012)。而 PiVX 與 CVX 在 *Potexvirus* 屬中的序列與寄主自

成一群(李, 2010), 故我們推測 CVX 應該也會形成缺失性 RNA。因而取感染 CVX 之紅龍果植株之全 RNA, 以 CVX 的 5'端專一性探針進行北方雜合反應, 果然除了 CVX 基因體 RNA 之外, 亦有一些小分子 RNA 訊號(未出示資料); 且以 CVX 之 5'端及 3'端之專一性引子可擴增出 DNA 條帶, 與 PiVX 存在的缺失性 RNA 長度差異不大(附錄一)。因 PiVX 與 CVX 皆可在紅龍果上生存, 且其序列相似度高(李, 2010), 故我們嘗試以 PiVX 作為輔助病毒, 與 CVX 缺失性 RNA 共同接種於菸草原生質體, 由結果顯示 CVX 缺失性 RNA 可以被 PiVX 複製(圖十)。這與 Takeshita 等人所觀察到的缺失性 RNA 可被不同的輔助病毒複製的現象相同(Takeshita *et al.*, 2009)。此外, 我們試著分析 CVX 缺失性 RNA 之二級結構, 以了解被 PiVX 辨識之區域, 結果發現 CVX 在 354-394 nt 也有一個 stem loop 結構(附錄四), 顯示有可能此段為 PiVX 辨識的必要區域。因此, 之後可以構築此段區域的刪除株, 以測試此段區域對於被 PiVX 辨識的重要性。以 Mfold 預測缺失性 RNA 二級結構時, 只有當序列為 1-394 nt 時, CVX 與 PiVX 會形成類似的二級結構(附錄五); 而以其他的長度預測時, 則無法看到與 PiVX 類似之二級結構。且在 P1 及 C3 不同長度的二級結構預測圖內, 皆可看到在 354-394 nt 處維持著 stem loop(未出示資料), 代表此二級結構應該很穩定存在。

八、 結語

綜觀本研究我們成功在菸草原生質體及白藜植株上, 以 PiVX 缺失性 RNA 表現外源基因, 且發現結合 p19 之表現, PiVX 可以成功感染菸草葉片, 但卻無法協助缺失性 RNA 載體表現外源基因; 而 p19 並無法增加 PiVX 感染白藜之能力, 因此無法協助缺失性 RNA 載體表現外源蛋白。我們發現並選殖 CVX 缺失性 RNA, 這是 *Potexvirus* 屬第五個被發現具有缺失性 RNA 的例子。此外, 我們確認 PiVX 缺失性 RNA 保留序列 1-435 nt 即可被 PiVX 複製, 顯示其內應具有可被 RdRP 辨識的複製

相關的 *cis-acting* elements。另外，進一步分析發現 PiVX 與 CVX 序列 354-394 nt 具有一保守性二級結構，似乎與兩者被 PiVX 辨識相關，但需要進一步實驗確認。本研究使我們更加了解 PiVX 的分子特性，及提供其缺失性 RNA 應用的範例。



伍、參考文獻



- 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微生物學研究所碩士論文。
- 呂有其。2007。仙人掌病毒 X 新分離株之特性分析與感染性選殖株之構築。國立台灣大學植物病理微生物學研究所碩士論文。
- 李勇賜。2010。紅龍果 X 病毒之特性分析、感染力選殖株構築與抗血清製備。國立台灣大學植物病理微生物學研究所碩士論文。
- 何艾翎。2012。紅龍果 X 病毒鞘蛋白次基因體啟動子之分析及應用。國立台灣大學植物病理微生物學研究所碩士論文。
- 陳君弢。2012。紅龍果 X 病毒缺失性 RNA 之選殖與特性分析。國立台灣大學植物病理微生物學研究所碩士論文。
- 劉命如。2000。紅龍果嵌紋病毒生物特性及全長核酸序列之研究。國立台灣大學植物病理微生物學研究所碩士論文。
- Ambrós, S., El-mohtar, C., Ruiz-ruiz, S., Peña, L., Guerri, J., Dawson, W. O., Moreno, P., and Protección, C. De. 2011. Agroinoculation of Citrus tristeza virus Causes Systemic Infection and Symptoms in the Presumed Nonhost *Nicotiana benthamiana*. 24:1119–1131.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, a C., Smith, T. H., and Vance, V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 13079–84.
- Attathom, S., Weathers, L. G., and Gumpf, D. J. 1978. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus. Phytopathology 68: 1401-6.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., and Santa Cruz, S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J. 7:1045–53.
- Bercks, R. 1971. Cactus virus X. CMI/AAB Descriptions of plant viruses NO. 58.

- Bouzoubaa, S., Niesbach-Klösger, 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. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 2):259–66
- Burgyan, J.M and Grieco, F. 1989.** A defective interfering RNA molecule in *Cymbidium ringspot virus* infections. *Journal of General Virology* 70: 235-239.
- Burgyán, J., Salánki, K., Dalmay, T., and Russo, M. 1994.** Expression of homologous and heterologous viral coat protein-encoding genes using recombinant DI RNA from cymbidium ringspot tomosvirus. *Gene* 138:159–63.
- 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.
- Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. 1992.** Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 2: 4, 549–57.
- 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.
- Cheng, C.-P., Pogany, J., and Nagy, P. D. 2002.** Mechanism of DI RNA Formation in Tombusviruses: Dissecting the Requirement for Primer Extension by the Tombusvirus RNA-Dependent RNA Polymerase in Vitro. *Virology* 304:460–473 7.
- Cheng, C., Nagy, P. D., Cheng, C., 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 Mechanism of RNA Recombination in Carmo- and Tombusviruses. *J. of Virology* 77: 12033-47.
- Damayanti, T. a, Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. 1999.** Brome mosaic virus defective RNAs generated during infection of barley plants. *J. Gen. Virol.* 80: 2511–8.
- Dawson, W. O., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., Bubrick, P., Raffo, a J., Shaw, J. J., Grantham, G. L., and Desjardins, P. R. 1989.** A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virol.* 172: 285–92.

Francki, R. I. 1985. Plant virus satellites. Annual Review of Microbiology 39: 151–74.

Friedewald, W. F., and Pickels, E. G. 1944. Centrifugation and ultrafiltration studies on allantoic fluid preparations of influenza virus. Journal of Experimental Medicine. 79: 301-317.

Gallie, D. R., and Kobayashi, M. 1994. The role of the 3'-untranslated region of non-polyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency. Gene 142: 159–65.

Graves, M., and Roossinck, M, 1995, Characterization of defective RNAs derived from RNA3 of the Fny strain of Cucumber mosaic virus. Journal of Virology 69: 4746-51.

Grdzlishvili, V. Z., Chapman, S. N., Dawson, W. O., and Lewandowski, D. J. 2000. Mapping of the Tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. Virology 275: 177–92.

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.

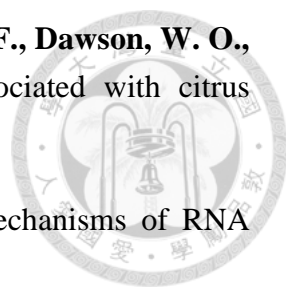
Huang, A. S., and Baltimore, D. 1970. Defective Viral Particles and Viral Disease Processes. Nature 226: 325-327.

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.

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 176:539–45.

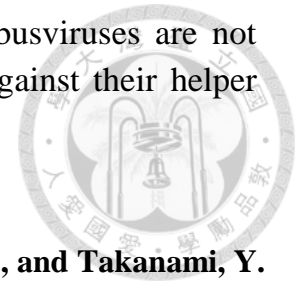
Kim, K. H., Hemenway, C., Kim, K., and Hemenway, C. 1996. The 5' nontranslated region of potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. Journal of Virology 70: 8, 5533 – 40.

- Koenig, R., Lesemann, D.-E., Loss, S., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., Aust, H., and Burgermeister, W. 2006.** Zygocactus virus X-based expression vectors and formation of rod-shaped virus-like particles in plants by the expressed coat proteins of Beet necrotic yellow vein virus and Soil-borne cereal mosaic virus. *The Journal of General Virology* 87: 439–43.
- Kollàr, a, Dalmay, T., and Burgyàn, J. 1993.** Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tomosvirus in transgenic plants. *Virology* 193:313–8.
- Komarova, T. V, Skulachev, M. V, Zvereva, a S., Schwartz, a M., Dorokhov, Y. L., and Atabekov, J. G. 2006.** New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochem. Biokhimiia* 71: 846–50.
- Kovalev, N., and Nagy, P. D. 2014.** The expanding functions of cellular helicases: the tomosvirus RNA replication enhancer co-opts the plant eIF4AIII-like AtRH2 and the DDX5-like AtRH5 DEAD-box RNA helicases to promote viral asymmetric RNA replication. *PLoS Pathogens* 10: e1004051.
- Lewandowski, D. J., and Dawson, W. O. 1998.** Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology* 251:427–37.
- 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. *PNAS* 86:9173–9177.
- Li, X. H., and Simon, A. E. 1991.** In vivo accumulation of a turnip crinkle virus defective interfering RNA is affected by alterations in size and sequence. *Journal of Virology* 65: 4582–4590.
- Lico, C., Chen, Q., and Santi, L. 2008.** Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of cellular physiology* 216: 366–77.
- 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.

- 
- Mawassi, M., Karasev, a V, Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R. F., Dawson, W. O., and Bar-Joseph, M. 1995.** Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. *Virology* 208: 383–7.
- Nagy, P. D., and Simon, A. E. 1997.** New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination. *Virology* 9: 235, 1–9.
- Olsthoorn, R. C., Mertens, S., Brederode, F. T., and Bol, J. F. 1999.** A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication. *The EMBO Journal* 18: 17, 4856–64.
- Pathak, K. B., and Nagy, P. D. 2009.** Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists. *Viruses* 1:895–919.
- Pillai-Nair, N., Kim, K.-H., and Hemenway, C. 2003.** *Cis-acting* Regulatory Elements in the Potato Virus X 3'Non-translated Region Differentially Affect Minus-strand and Plus-strand RNA Accumulation. *J. Mol. Biol.* 326:701–720.
- Pogany, J., and Nagy, P. D. 2008.** Authentic replication and recombination of *Tomato bushy stunt virus* RNA in a cell-free extract from yeast. *J. Virol.* 82: 5967–80.
- 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.
- 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.
- Qiu, W., Park, J., and Scholthof, H. B. 2002.** Tombusvirus P19-Mediated Suppression of Virus-Induced Gene Silencing Is Controlled by Genetic and Dosage Features That Influence Pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15: 3, 269–280.
- Qiu, W., and Scholthof, H. B. 2007.** Using vectors derived from tomato bushy stunt virus (TBSV) and TBSV defective interfering RNAs (DIs). *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 16:Unit 16I.4.
- Qu, F., and Morris, T. J. 2002.** Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15:3, 193–202.

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11153–11157.
- 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.
- Roy, G., Fedorkin, O., Fujiki, M., Skarjinskaia, M., Knapp, E., Rabindran, S., and Yusibov, V. 2013.** Deletions within the 3' non-translated region of *Alfalfa mosaic virus* RNA4 do not affect replication but significantly reduce long-distance movement of chimeric *Tobacco mosaic virus*. *Viruses* 5:1802–14.
- Roux, L., Simon, A. E., and Holland, J. J. 1991.** Effect of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis. *Advance in Virus Research* 40: 181-211.
- Rubino, L., Burgyan, J., and Russo, M. 1995.** Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tombusvirus genomic and defective interfering RNAs. *Arch Virol.* 140: 2027-39.
- 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. *Arch. Virol.* 153:1755–8.
- Scholthof, H. B. 1999.** Rapid Delivery of Foreign Genes into Plants by Direct Rub-Inoculation with Intact Plasmid DNA of a *Tomato Bushy Stunt Virus* Gene Vector. *J. Virol* 73: 7823-29.
- Scholthof, H. B., Scholthof, K. B., and Jackson, a O. 1996.** Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:299–323.
- Simon, A. E., Roossinck, M. J., and Havelda, Z. 2004.** Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:415–37
- Sztuba-solińska, J., Urbanowicz, A., Figlerowicz, M., and Bujarski, J. J. 2011.** RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 415–43.

Szitty, 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



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

Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 14147-52.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949–56.

Vance, V., and Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* 292: 2277–80.

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.

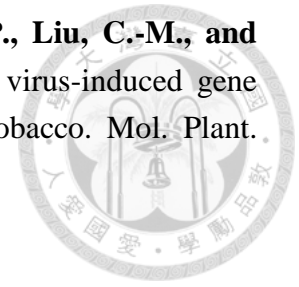
White, K. A., and Morris, T. J. 1999. Defective and defective interfering RNAs of monopartite plus-strand RNA plant viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 239: 1-17.

Wierchoslawski, R., and Bujarski, J. J. 2006. Efficient in vitro system of homologous recombination in brome mosaic bromovirus. *J. Virol.* 80:6182–7.

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.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:16749-54

Zhang, Z., Fradin, E., de Jonge, R., van Esse, H. P., Smit, P., Liu, C.-M., and Thomma, B. P. H. J. 2013. Optimized agroinfiltration and virus-induced gene silencing to study Ve1-mediated *Verticillium* resistance in tobacco. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26:182–90.



陸、表

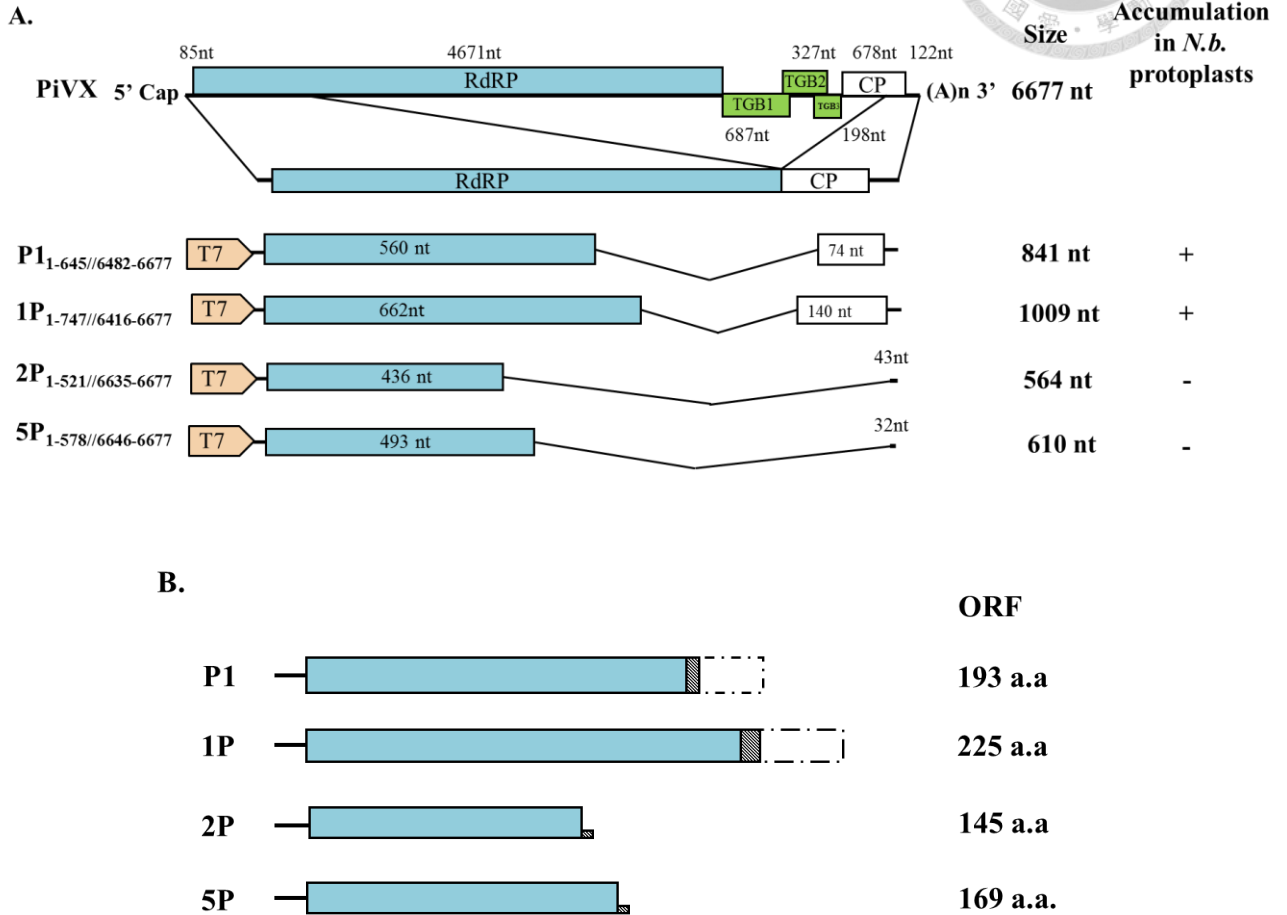
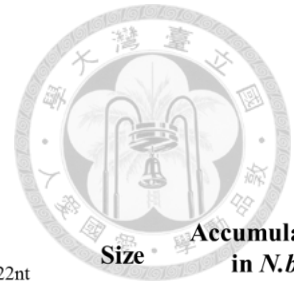


表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. The primers used in this study.

Primer name	Sequence (5'-3')
PiVX-F	GGAAAACCAACCCAAACCAAACCTACCTC
PiVX-dTBam	AGCTGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGAACTTG CATTAAAACAGAAGGC
PiVX-F-T7-Sal	ATCGGTCGACTAATACGACTCACTATAGGAAAACCAACC CAAACCAAACCTACCTC
PiVX-map-F1	AACCACCTCCACTCTGGTGACTAAAGG
PiVX-map-R3	TGGTGCATGGAGTTTTCTCCAGAT
PiVX-map-R4	TTGATGAACTTGTCGTTCTGGTGTG
T7-Farm-F	CGATGGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAAACCAAC CCCAACCCAAACC
NTU-dT-R	CGTAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAACT TGCATTAAAAC
P1-HpaI-XhoI-R	CTCGAGATCGTTAACAATGGCCTCAACTGGAAGT
P1-SacII-R	CCGCGGAATGGCCTCAACTGGAAGTACAAT
M13-F	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
EGFP-R1	TTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
SacII-EGFP-F	CCGCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
XhoI-EGFP-R	CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

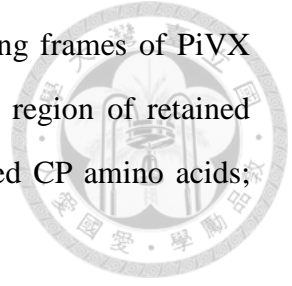
柒、圖

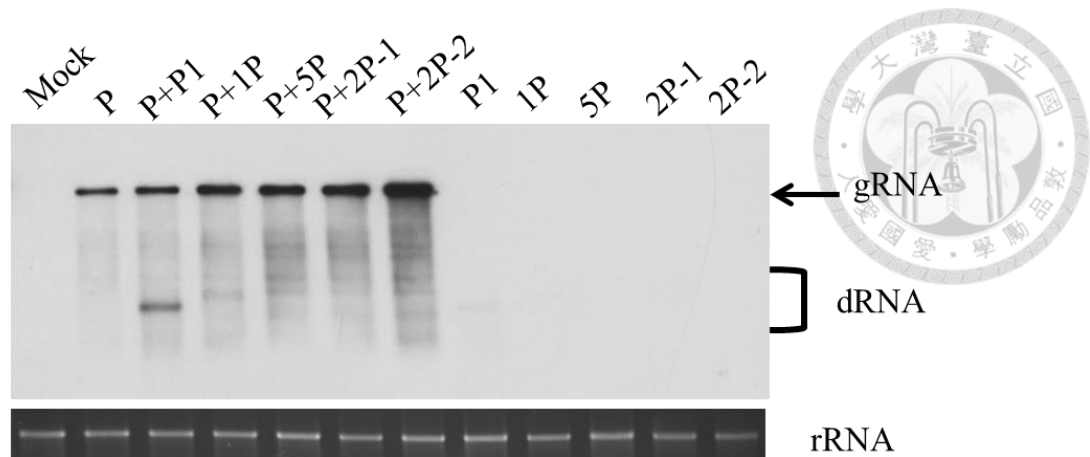


圖一、Pitaya virus X (PiVX) 缺失性 RNA 及預測轉譯架構之圖譜。本研究從田間採集確認之複合感染 PiVX 與 CVX 之紅龍果植株為材料，選殖出 3 類 PiVX (1P、2P 與 5P) 缺失性 RNA。(A) 定序分析後繪製缺失性 RNA 與 PiVX 基因體之比較示意圖。P1 為接種 PiVX-37 病毒株之紅龍果植株所選殖出之缺失性 RNA (陳, 2012)。(B) 以 GeneDoc 進行缺失性 RNA 轉譯架構之預測。藍色為保留之 PiVX RdRP 胺基酸序列；虛線為消失之鞘蛋白胺基酸序列；斜線表示改變後之胺基酸序列。

Fig. 1. The maps of Pitaya virus X (PiVX) defective RNAs and their predicted ORF. There were three types (1P, 2P and 5P) of PiVX defective RNAs cloned from both PiVX and CVX mixedly infected pitaya plants in this study. (A) The maps of PiVX and its defective RNAs. P1 defective RNA was previously cloned from pitaya plant that was

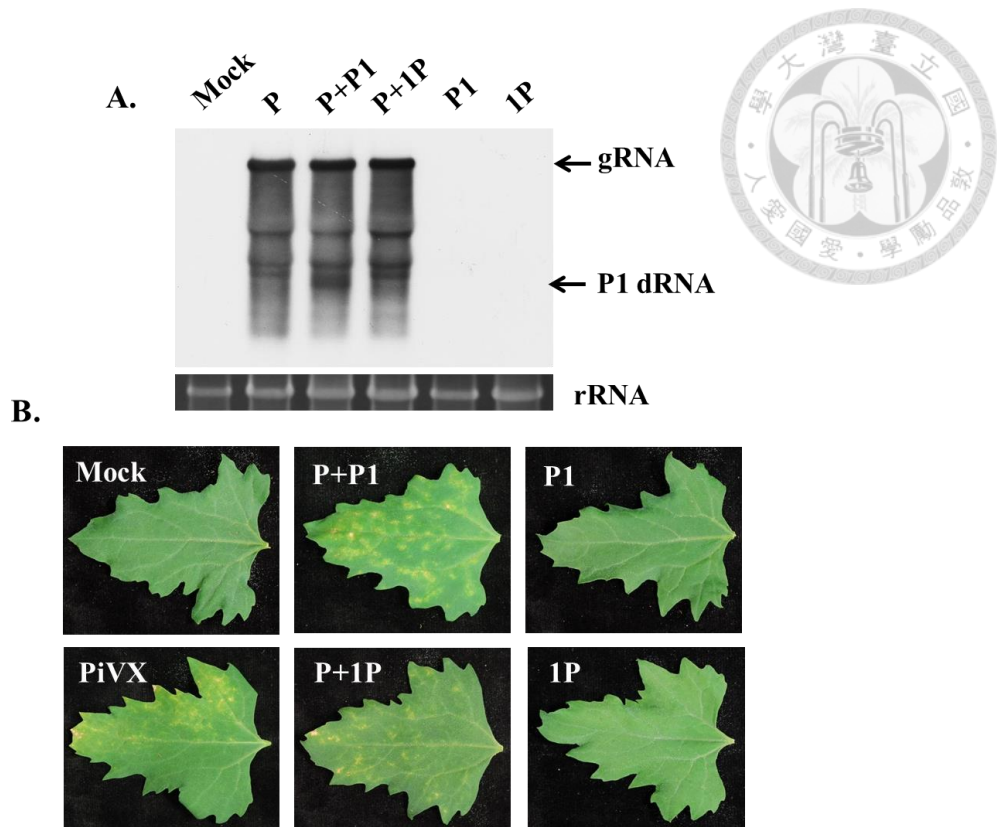
inoculated with PiVX-37 isolate (Chen, 2012). (B) The open reading frames of PiVX defective RNAs predicted by GeneDoc. Blue block represents the region of retained RdRP amino acids; dashed line represents the region of disappeared CP amino acids; dashed line block represents the region of changed amino acids.





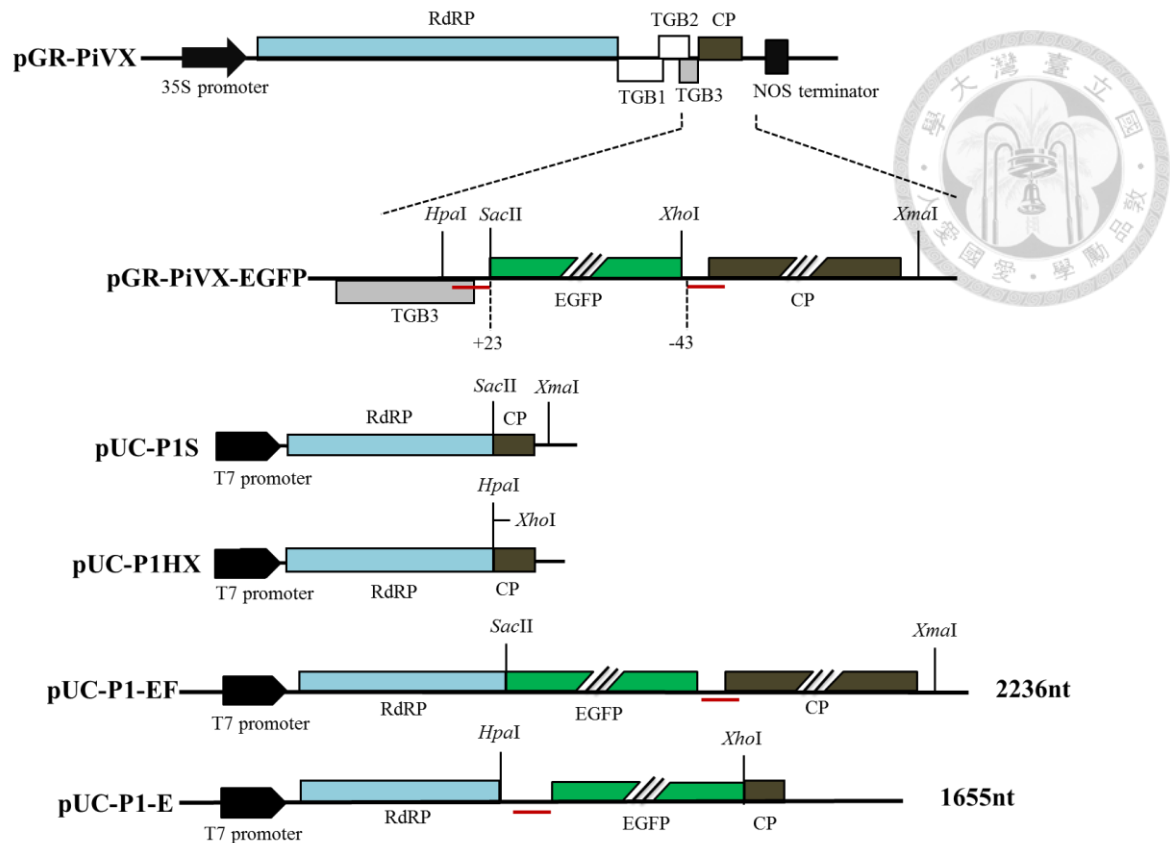
圖二、以北方雜合反應分析 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體中之複製能力。為測試 PiVX 缺失性 RNA 在單細胞中之複製能力，將 PiVX 與其缺失性 RNA 之生體外轉錄體，以莫耳數 1:10 共同接種或單獨接種至菸草原生質體。經過 48 小時，抽取原生質體全 RNA，並以 PiVX 之 5'端專一性探針進行北方雜合分析。Mock 為接種 T7 transcription buffer；P 為單獨接種 PiVX 生體外轉錄體之處理；P+P1、P+1P、P+5P、P+2P-1 及 P+2P-2 為共同接種 PiVX 與缺失性 RNA 生體外轉錄體之處理；P1、1P、5P、2P-1 及 2P-2 為單獨接種 PiVX 與缺失性 RNA 生體外轉錄體之處理。gRNA 為 PiVX 基因體 RNA；dRNA 代表缺失性 RNA 之大小範圍；rRNA 為 loading control。

Fig. 2. The biological activity analysis of PiVX defective RNAs in *Nicotiana benthamiana* protoplasts by northern hybridization. For analyzing biological activity of PiVX defective RNAs, *N. benthamiana* protoplasts were inoculated with PiVX defective RNA transcripts alone, or mixture of PiVX and PiVX defective RNA transcripts (molar ratio 1:10). After 48 hour of protoplast inoculation, northern blot assay was conducted with PiVX 5' probe. Mock: sample inoculated with T7 transcription buffer; P: sample inoculated with PiVX transcripts alone; P+P1, P+1P, P+5P, P+2P-1 and P+2P-2: samples inoculated with mixture of PiVX and PiVX defective RNA transcripts; P1, 1P, 5P, 2P-1 and 2P-2: samples inoculated with PiVX defective RNA transcripts. gRNA: size of PiVX genomic RNA; dRNA: sizes of PiVX defective RNAs; rRNA: loading control.



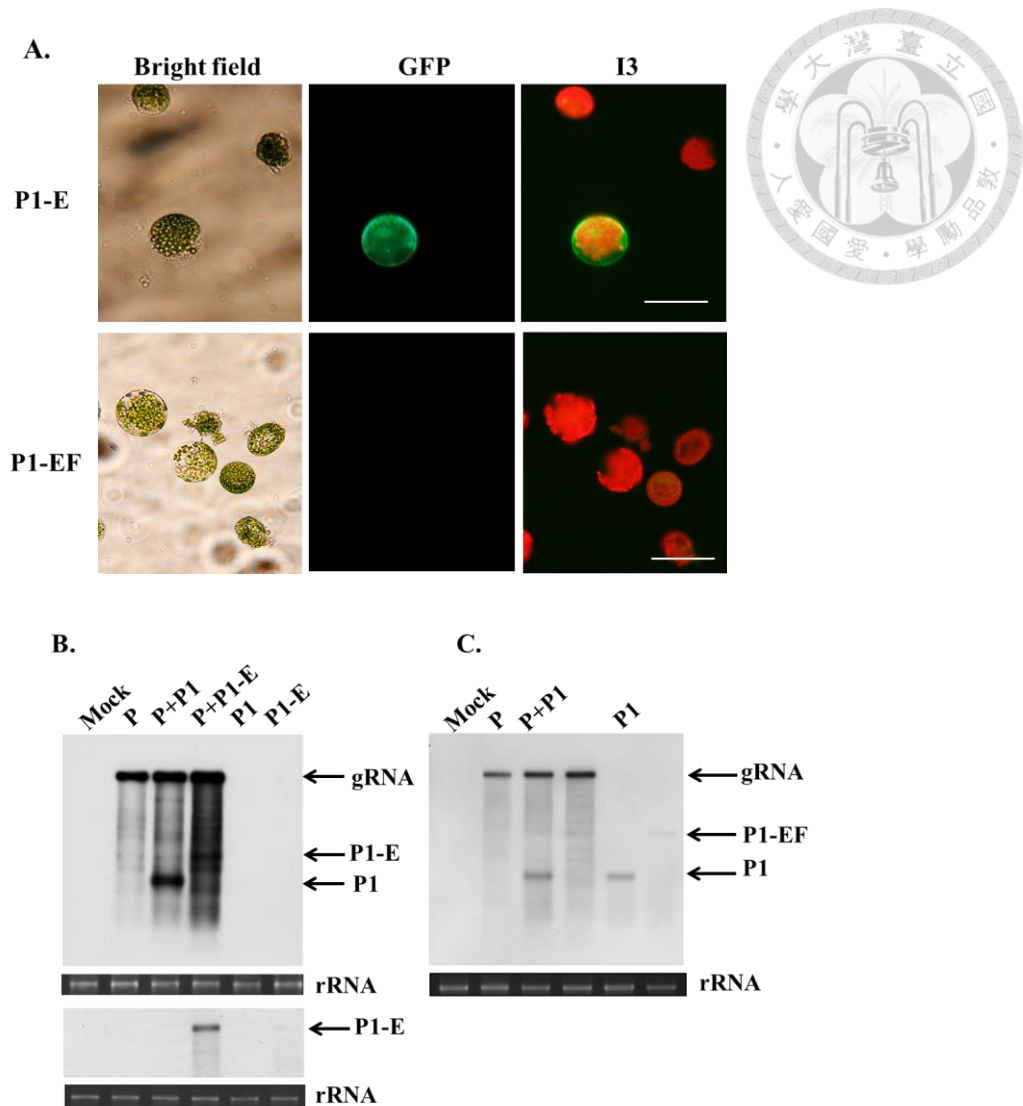
圖三、分析缺失性 RNA 在 PiVX 協助下於白藜系統葉之累積與引起之病徵。將 p35S promoter 驅動的 PiVX 及其缺失性 RNA 之選殖株，各取 20 μg 質體 DNA 接種至白藜葉片，20 天後收取未接種之系統葉進行觀察與分析。(A)以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合分析。(B) 白藜系統葉之病徵。Mock 為接種無菌水之處理；P 為單獨接種 p35S-PiVX；P+P1 與 P+1P 為共同接種 p35S-PiVX 與缺失性 RNA；P1 與 1P 為單獨接種缺失性 RNA 之處理。gRNA 為 PiVX 基因體 RNA；rRNA 為 loading control。

Fig. 3. Symptom and RNA accumulation of *Chenopodium quinoa* systemic leaves caused by PiVX and PiVX defective RNA. Plasmid DNAs of PiVX and PiVX defective RNAs driven by p35S promoter were inoculated to *C. quinoa* plants. After 20 days, the systemic leaves were observed and analyzed. (A) Northern hybridization with PiVX 5' probe. (B) Symptoms of *C. quinoa* systemic leaves. Mock: inoculated with ddH₂O; P: inoculated p35S-PiVX alone; P+P1 and P+1P: inoculated with mixture of p35S-PiVX and p35S-P1/p35S-1P; P1 and 1P: inoculated defective RNA alones. gRNA: size of PiVX genomic RNA; rRNA used as loading control.



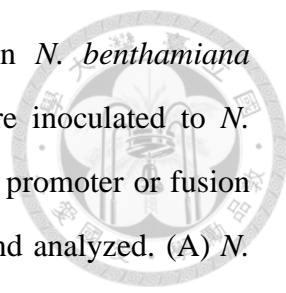
圖四、pUC-P1-EF 及 pUC-P1-E 之構築示意圖。首先利用聚合酶鏈鎖反應在 pUC-P1 之 RdRP 與 CP 序列間分別創造 *Sac*II (pUC-P1S) 以及 *Hpa*I-*Xho*I (pUC-P1HX) 之切位。利用 *Sac*II 及 *Xma*I 酵素將 pGR-PiVX-EGFP 上的外源基因 EGFP 與 PiVX 鞘蛋白全長序列切下，選殖至以相同酵素處理的 pUC-P1S，以構築 pUC-P1-EF。另外，利用 *Hpa*I-*Xho*I 切位，將帶有 PiVX 之鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子的 EGFP 基因，插入 pUC-P1HX 之 RdRP 與鞘蛋白序列之間，以完成 pUC-P1-E 之構築。紅色線段代表 PiVX 之鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子。

Fig. 4. Schematic structure of pUC-P1-EF and pUC-P1-E construction. At first, *Sac*II (pUC-P1S) and *Hpa*I-*Xho*I (pUC-P1HX) sites between RdRP and CP sequences of pUC-P1 were created by PCR mutagenesis. Fragment of EGFP and PiVX CP genes of pGR-PiVX-EGFP was cloned into pUC-P1S through the help of *Sac*II and *Xma*I digestion and thus constructed pUC-P1-EF. In addition, EGFP with PiVX CP subgenomic promoter was inserted between RdRP and CP sequences of pUC-P1HX with the help of *Hpa*I and *Xho*I digestion and ligation for pUC-P1-E construction. Red line represents PiVX CP subgenomic promoter.

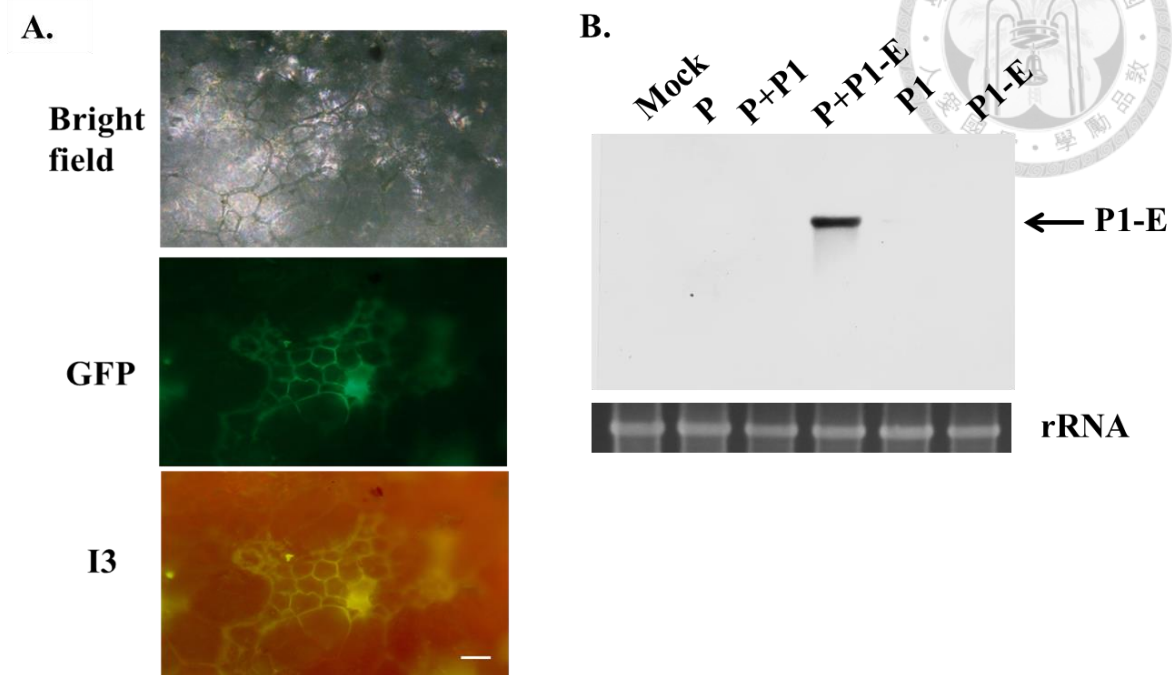


圖五、利用 PiVX 缺失性 RNA 為載體，於菸草原生質體中分別以 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子或融合蛋白方式表現外源基因 *egfp* 之結果。將 PiVX 與 P1-E 或 P1-EF 之生體外轉錄體共同接種至菸草原生質體，利用 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子或融合蛋白的方式表現 EGFP，接種後 48 小時進行觀察與分析。(A) 以螢光顯微鏡觀察菸草原生質體螢光表現。分別以可見光(bright field)、Chroma 41020 濾鏡(GFP)及 I3 濾鏡觀察。白色線條代表 100 μm。(B) 以 PiVX 5'端探針與 EGFP 專一性探針共同(上圖)或單獨以 EGFP 專一性探針(下圖)進行北方雜合分析之結果。(C) 以 PiVX 5'端探針進行北方雜合分析之結果。gRNA 為 PiVX 基因體 RNA；P1、P1-E 與 P1-EF 為 PiVX 缺失性 RNA；rRNA 為 loading control。

Fig. 5. The results of PiVX defective RNA-based vectors expressing foreign gene *egfp*



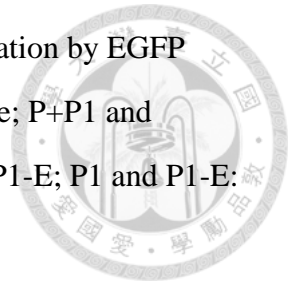
by the ways of CP subgenomic promoter and fusion protein in *N. benthamiana* protoplasts. Mixture of PiVX and P1-E or P1-EF transcripts were inoculated to *N. benthamiana* protoplasts to express EGFP by PiVX CP subgenomic promoter or fusion protein. After 48 hours of inoculation, protoplasts were observed and analyzed. (A) *N. benthamiana* protoplasts were observed using an epifluorescence microscope. Microscopic images of protoplast under visible light (bright light), and UV light using Chroma filter set 41020 (GFP) and I3 filter. White line: 100 μm . (B) Northern blot assays were conducted with PiVX 5'probe and EGFP probe, (upper panel) and EGFP probe alone (lower panel). (C) Northern blot assay was conducted with PiVX 5'probe after 48 hours of inoculation. gRNA: size of PiVX genomic RNA; P1, P1-E and P1-EF: sizes of PiVX defective RNAs; rRNA used as loading control.

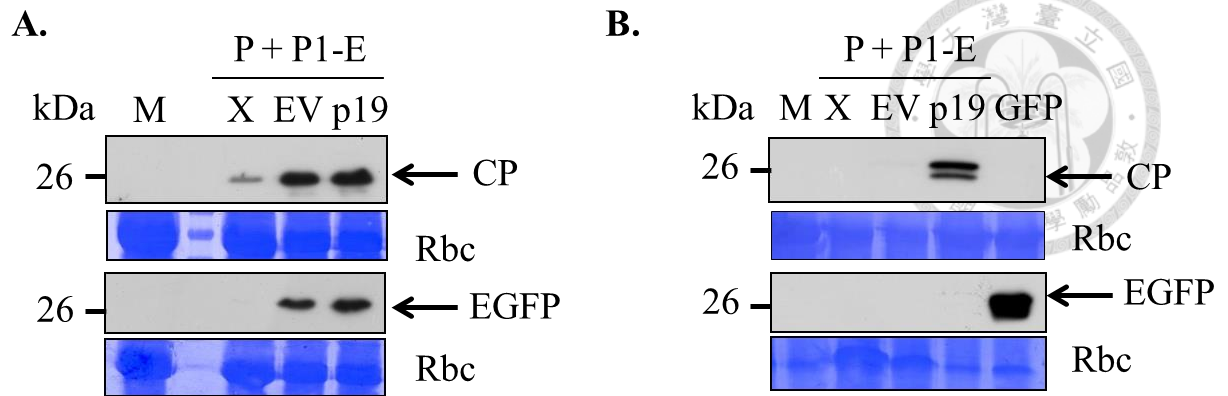


圖六、利用 PiVX 缺失性 RNA 為載體，於白藜植株中以 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 啟動子(P1-E)表現綠色螢光蛋白之結果。將 PiVX 與其缺失性 RNA 之質體 DNA 接種至白藜植株，每種 DNA 接 20 μg 至每片葉子；20 天後以螢光顯微鏡觀察系統葉之綠色螢光蛋白表現情形，同時抽取植物全 RNA 及蛋白，分別進行北方雜合與西方轉漬分析。(A) 以螢光顯微鏡觀察白藜系統葉之綠色螢光表現，分別以可見光 (bright field)、Chroma 41020 濾鏡(GFP)及 I3 濾鏡觀察。白色線條代表 100 μm 。(B) 以 EGFP 專一性探針進行北方雜合反應之結果。Mock 為接種無菌水之處理；P 為單獨接種 p35S-PiVX；P+P1 與 P+P1-E 為共同接種 p35S-PiVX 與缺失性 RNA；P1 與 P1-E 為單獨接種缺失性 RNA 之處理。rRNA 為 loading control。

Fig. 6. The results of PiVX defective RNA-based vector expressing EGFP by the ways of CP subgenomic promoter (P1-E) in *C. quinoa*. Plasmid DNA of PiVX and PiVX defective RNAs driven by p35S promoter were inoculated to *C. quinoa* plants. After 20 days, the systemic leaves were observed by an epifluorescence microscope. Analysis by northern hybridization and western blot simultaneously. (A) Microscopic images of systemic leaf under visible light (bright field) and UV light using Chroma filter set

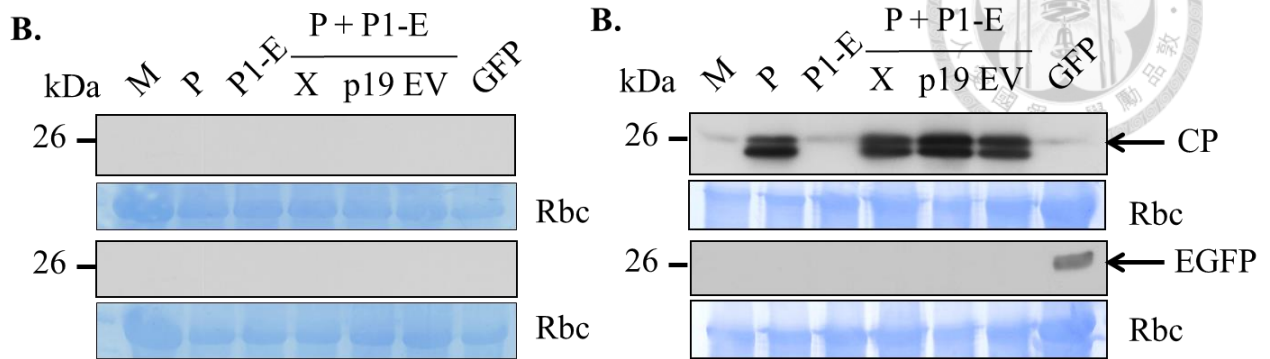
41020 (GFP) and I3 filter. White line: 100 μ m. (B) Northern hybridization by EGFP probe. Mock: inoculated with ddH₂O; P: inoculated p35S-PiVX alone; P+P1 and P+P1-E: inoculated with mixture of p35S-PiVX and p35S-P1/p35S-P1-E; P1 and P1-E: inoculated defective RNA alone. rRNA used as loading control.





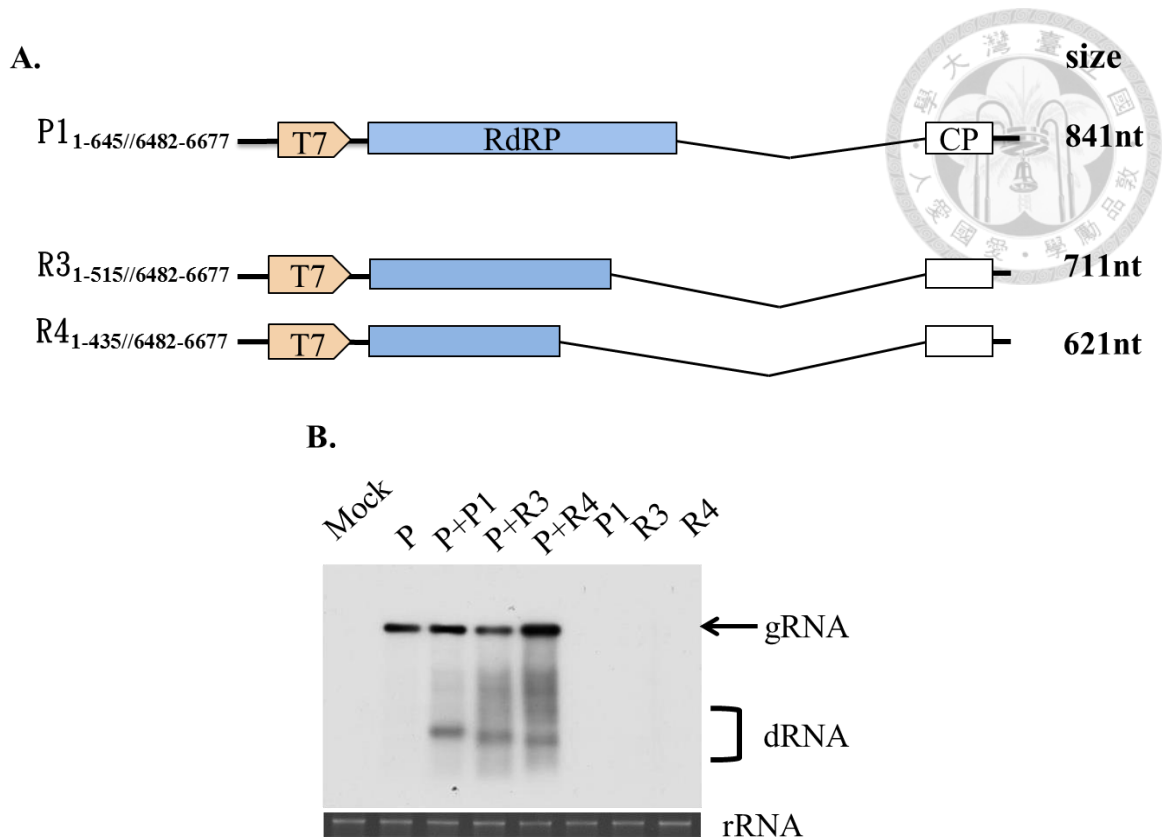
圖七、先短暫表現之基因靜默抑制子 p19 對 PiVX 缺失性 RNA 載體表現 EGFP 之影響。將 pBin-p19 或 pBin61 以農桿菌注射至 4 週大的菸草及白藜，經過一天後再機械接種 p35S-PiVX 與 p35S-P1-E 至有處理的菸草與白藜，再經過 5 天收取接種葉，以 PiVX-CP 抗體與 GFP 抗體進行西方轉漬分析。(A) 在白藜上的實驗結果。(B) 在菸草上的實驗結果。PiVX 鞘蛋白及 GFP 以箭頭標示。M：接種 ddH₂O 之處理；X：未注射農桿菌之處理；EV：注射 pBin61 之處理；p19：注射 pBin-p19 之處理；GFP：注射 pBin-GFP 之處理；P + P1-E：機械接種 p35S-PiVX 及 p35S-P1-E。Rubisco (Rbc) 為 loading control。

Fig. 7. The influence of already transiently expressed p19 (gene silencing suppressor) on the EGFP expression of PiVX defective RNA-based vector. *N. benthamiana* and *C. quinoa* plants were agroinfiltrated with pBin-p19 or pBin61 and then mechanically inoculated with p35S-PiVX and p35S-P1-E after 1 day. The inoculated leaves were harvested at 5 days of inoculation and analyzed by western blots with PiVX-CP and GFP antibodies. (A) The result on *C. quinoa*. (B) The result on *N. benthamiana*. CP and EGFP are indicated by arrows. M: inoculated with ddH₂O; X: without agroinfiltration; EV: agroinfiltrated with pBin61; p19: agroinfiltrated with pBin-p19; GFP: agroinfiltrated with pBin-GFP; P + P1-E: mechanically inoculated with p35S-PiVX and p35S-P1-E. Rubisco (Rbc) used as loading control.



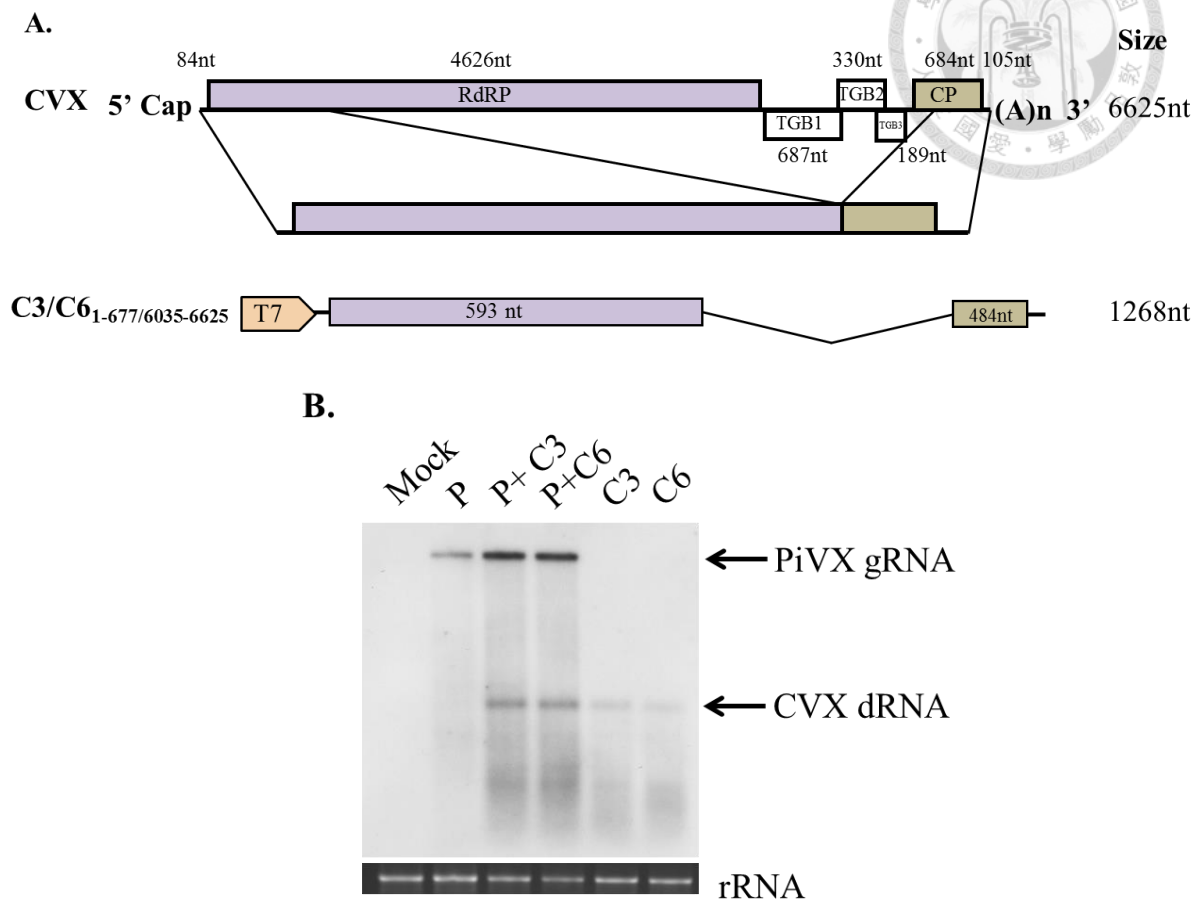
圖八、以農桿菌注射法同時表現基因靜默抑制子 p19 對 PiVX 缺失性 RNA 載體表現 EGFP 之影響。將 pBin-p19/pBin61、pGR-PiVX 及 pGR-P1-E 混合後，以農桿菌注射法共同處理 4 週大的菸草及白藜，經過 5 天收取接種葉，以 PiVX-CP 抗體與 GFP 抗體進行西方轉漬分析。(A) 在白藜上的實驗結果。(B) 在菸草上的實驗結果。PiVX 鞘蛋白及 GFP 以箭頭標示。M：注射 MMA 之處理；P：注射 pGR-PiVX；P1-E：注射 pGR-P1-E 之處理；P + P1-E：共同注射 pGR-PiVX 及 pGR-P1-E；X：未注射 pBin61 載體之處理；p19：注射 pBin-p19 之處理；EV：注射 pBin61 之處理；GFP：注射 pBin-GFP 之處理。Rubisco (Rbc) 為 loading control。

Fig. 7. The influence of coexpressed p19 on the EGFP expression of PiVX defective RNA-based vector. *N. benthamiana* and *C. quinoa* plants were co-agroinfiltrated with pBin-p19/pBin61, pGR-PiVX and pGR-P1-E, and the inoculated leaves were harvested after 5 days of injection. The western blots were detected by PiVX-CP and GFP antibodies. (A) The result on *C. quinoa*. (B) The result on *N. benthamiana*. CP and EGFP are indicated by arrows. M: injected with MMA; P: injected with pGR-PiVX; P1-E: injected with pGR-P1-E; P + P1-E: injected with pGR-PiVX and pGR-P1-E; X: injection without pBin61; p19: injected with pBin-p19; EV: injected with pBin61; GFP: injected with pBin-GFP. Rubisco (Rbc) used as loading control.



圖九、以北方雜合反應分析 5'端序列長度對 PiVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體中累積能力之影響。(A) 保留 PiVX 5'端不同長度之缺失性 RNA 之圖譜。(B) 萃取接種後之菸草原生質體全 RNA，並以 PiVX 5'端專一性探針進行北方雜合反應之結果。Mock 為接種 T7 transcription buffer 之處理，P 為單獨接種 PiVX 生體外轉錄體；P+P1、P+R3 及 P+R4 為共同接種 PiVX 與缺失性 RNA 之生體外轉錄體；P1、R3 及 R4 為單獨接種缺失性 RNA 生體外轉錄體。gRNA 為 PiVX 基因體 RNA；dRNA 代表缺失性 RNA 之大小範圍；rRNA 為 loading control。

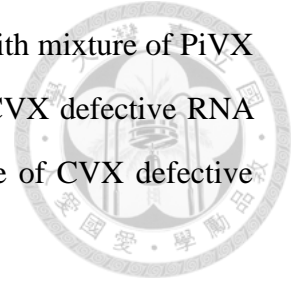
Fig 9. The influences of 5' terminal length on the accumulation of PiVX defective RNA in *N. benthamiana* protoplasts was analyzed by northern hybridization. (A) The maps of PiVX defective RNAs with different lengths of 5' terminus. (B) An RNA blot of total RNA extracted from *N. benthamiana* protoplasts inoculated with PiVX or mixture with PiVX defective RNA. Mock: sample inoculated with T7 transcription buffer; P: PiVX transcripts inoculated alone; P+R3 and P+R4: samples inoculated with mixture of PiVX and PiVX defective RNA transcripts. gRNA: size of PiVX genomic RNA; dRNA: size of PiVX defective RNAs; rRNA used as loading control.



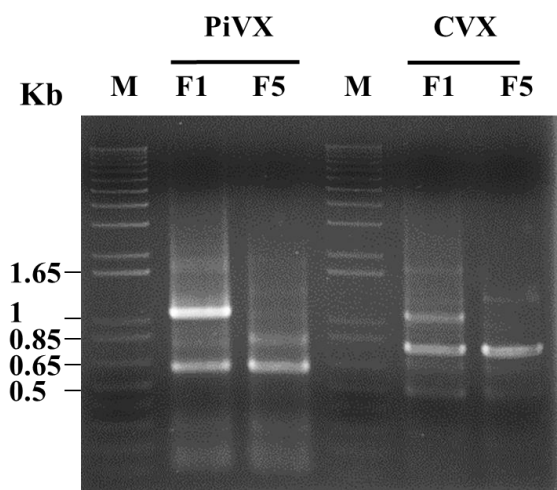
圖十、CVX 缺失性 RNA 於菸草原生質體中被 PiVX 複製情形。(A) CVX 缺失性 RNA 之圖譜。(B) 接種後 48 小時，萃取菸草原生質體全 RNA，並同時以 PiVX 5' 端及 CVX 5' 端專一性探針進行北方雜合反應之結果。Mock 為接種 T7 transcription buffer 之處理，P 為單獨接種 PiVX 生體外轉錄體；P+C3 及 P+C6 為共同接種 PiVX 與缺失性 RNA 之生體外轉錄體；C3 及 C6 為單獨接種缺失性 RNA 生體外轉錄體。gRNA 為 PiVX 基因體 RNA；dRNA 代表 CVX 缺失性 RNA；rRNA 為 loading control。

Fig 10. The accumulation of *Cactus virus X* (CVX) defective RNAs replicated by PiVX in *N. benthamiana* protoplasts. (A) The maps of defective RNA of CVX. (B) An RNA blot of total RNA extracted from *N. benthamiana* protoplasts inoculated with PiVX or mixture with CVX defective RNA, detecting by PiVX 5' probe and CVX 5' probe simultaneously. Mock: sample inoculated with T7 transcription buffer; P: inoculated

with PiVX transcripts alone; P+C3 and P+C6: samples inoculated with mixture of PiVX and CVX defective RNA transcripts. C3 and C6: inoculated with CVX defective RNA transcripts alone. gRNA: size of PiVX genomic RNA; dRNA: size of CVX defective RNAs; rRNA used as loading control.

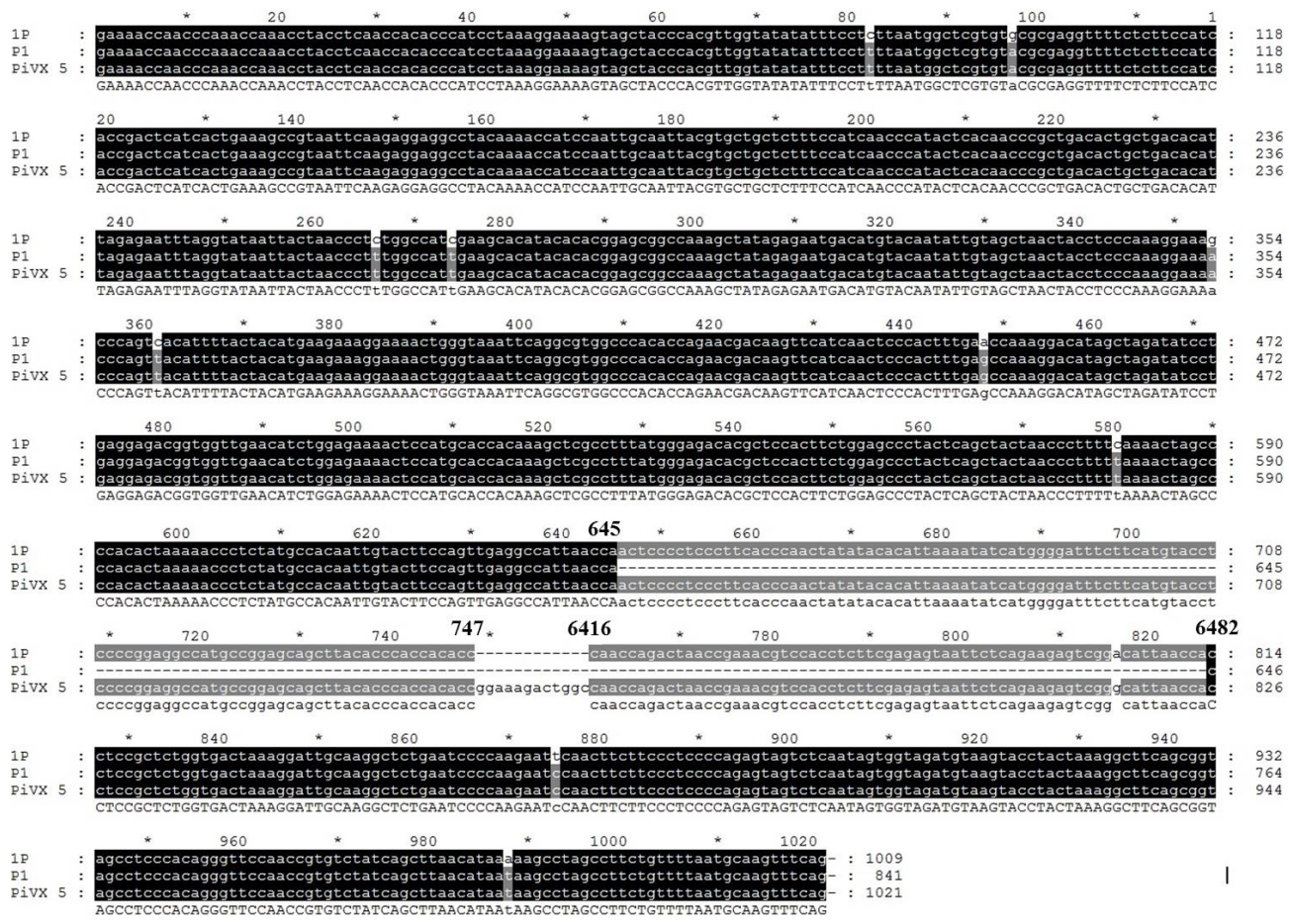


捌、附錄

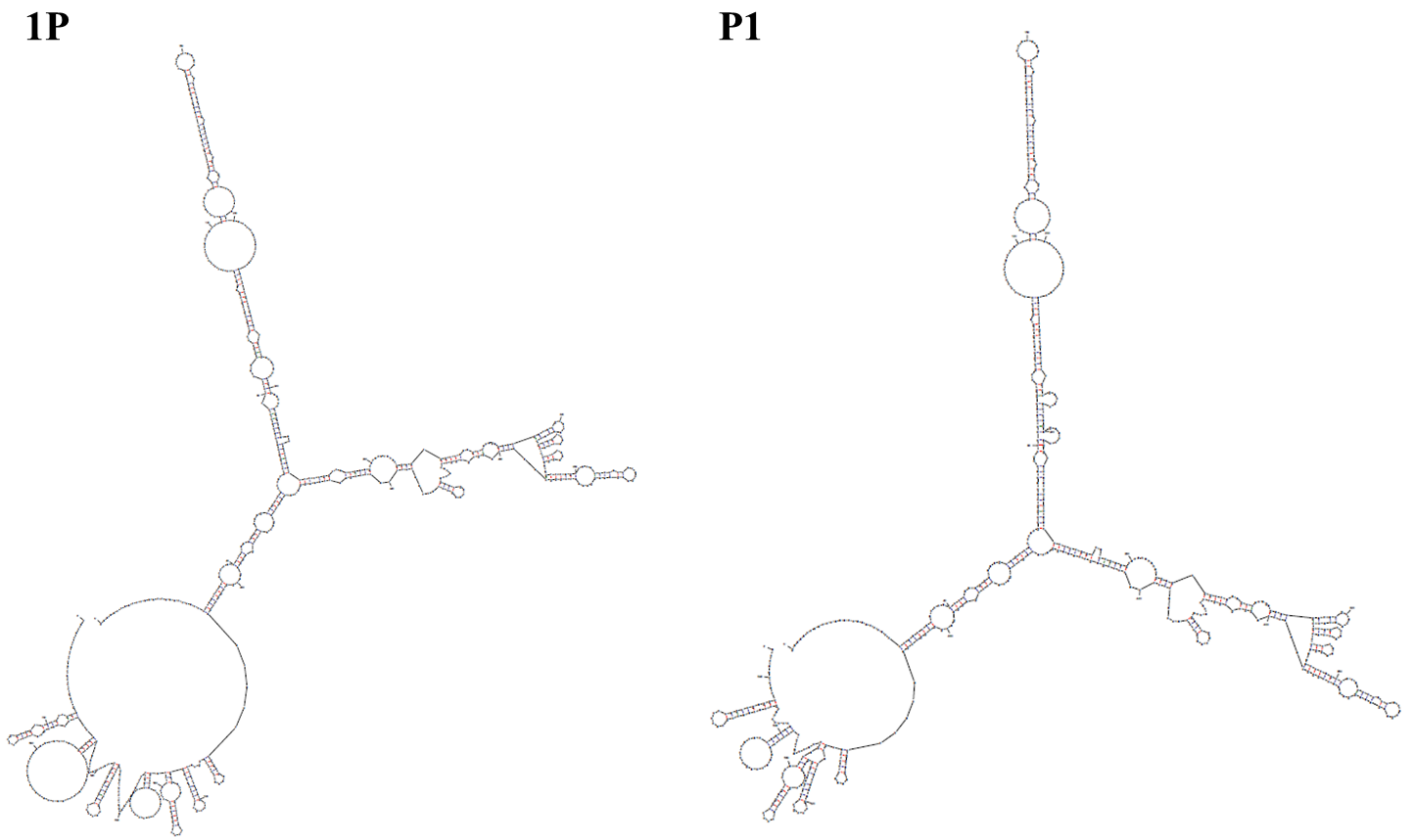


附錄一、分別以 PiVX 或 CVX 之 5'端與 3'端引子對田間紅龍果植株內的小分子 RNA 擴增之結果。以 PiVX 引子對擴增可看到 1 kb、0.85 kb 及約 0.6 kb 處有明顯的 DNA 條帶；以 CVX 引子對擴增則於 1 kb 及 0.85 kb 處可見到 DNA 條帶。F1 及 F5 為兩棵紅龍果植株之編號。

Fig. S1. The result of amplified small fragments from pitaya plant by PiVX or CVX specific primers, respectively. There are 1 kb, 0.85 kb and 0.6 kb DNA fragments amplified by PiVX primers. There are 1 kb and 0.85 kb DNA fragments amplified by CVX primers. F1 and F5 are the labels of two pitaya plants.



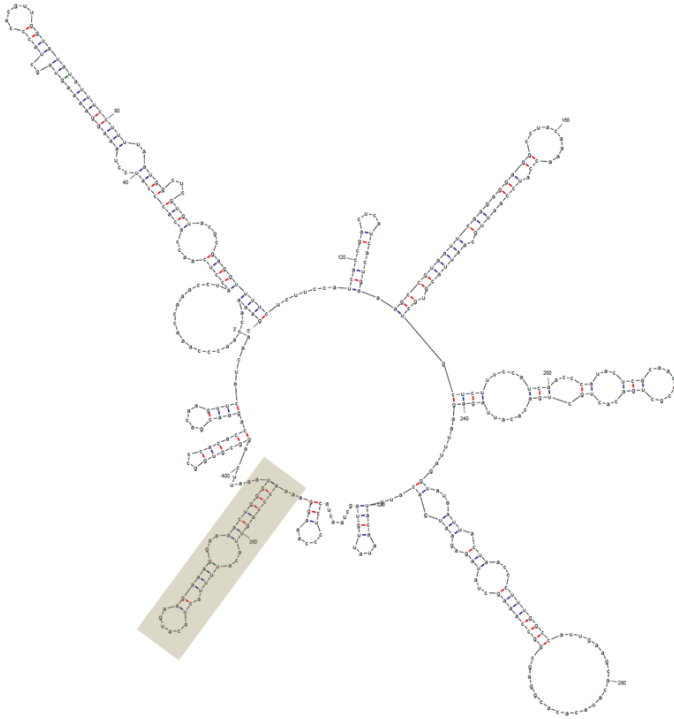
附錄二、PiVX 缺失性 RNA 1P 和 P1 以及 PiVX 病毒基因體序列之比較。
 Fig. S2. Sequence alignment of PiVX defective RNA 1P and P1 with the same regions of PiVX genomic sequences.



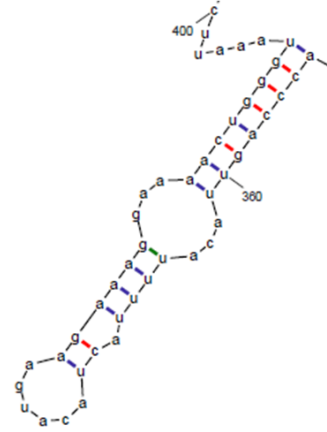
附錄三、1P 及 P1 缺失性 RNA 之二級結構預測圖。以 Mfold 進行 1P 及 P1 在 25°C 時的二級結構預測結果，1P 及 P1 雖然同樣長度內有 9 個核苷酸差異，但二級及結構預測結果極為相似。

Fig. S3. Secondary structure predictions of 1P and P1 defective RNAs. We used Mfold program to predict 1P and P1 secondary structures at 25°C. Although 1P has 9 nucleotide differences from P1, their predicted secondary structures are similar.

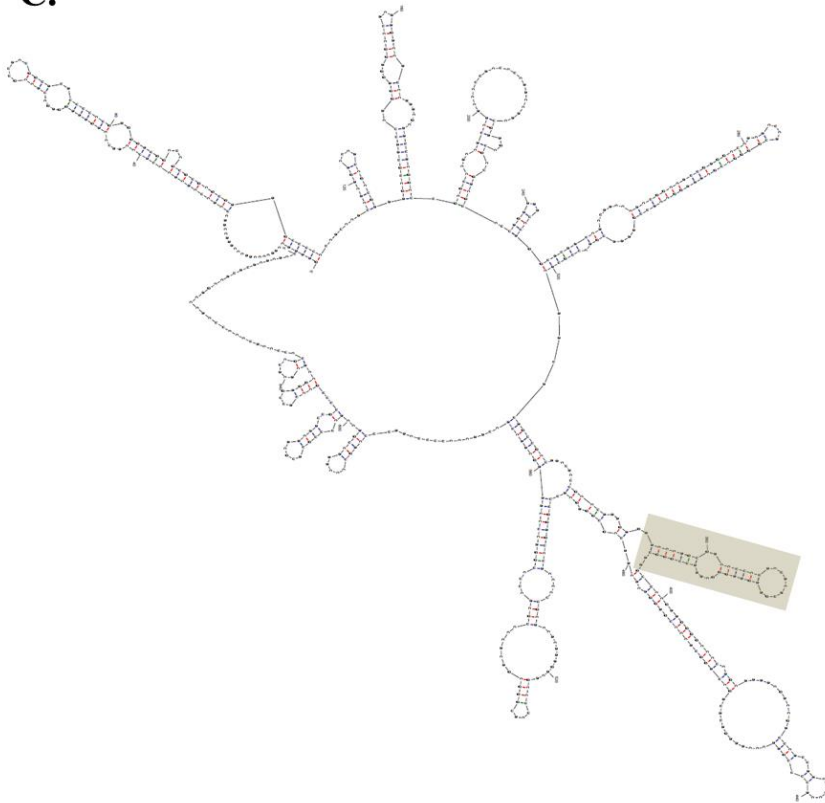
A.




B.



C.



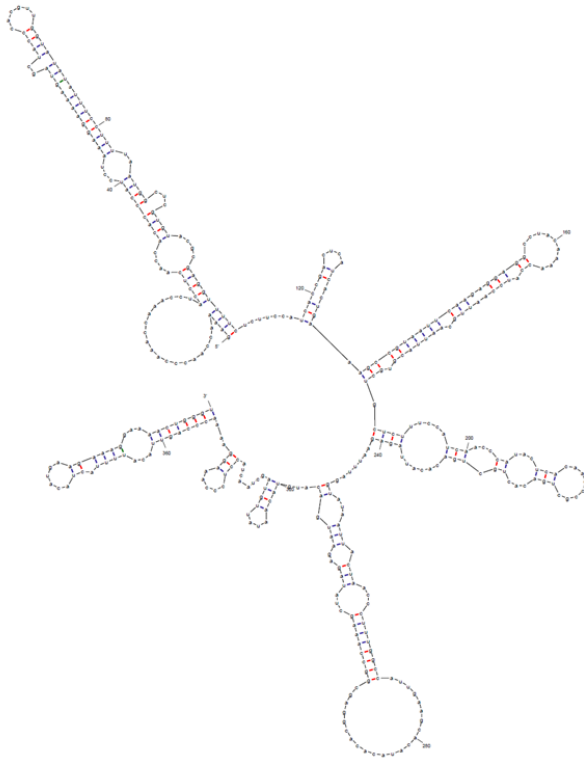


附錄四、PiVX 與 CVX 缺失性 RNA 之複製相關 *cis-acting* elements 預測區域。(A) PiVX 缺失性 RNA R4 之二級結構預測圖，灰底部分為預測之 PiVX 複製相關 *cis-acting* elements 序列。(B) 為 A 圖之灰底部分放大圖。(C) CVX 缺失性 RNA C3 之二級結構預測圖。其在相同序列處(灰底)也具有一樣的 stem loop。

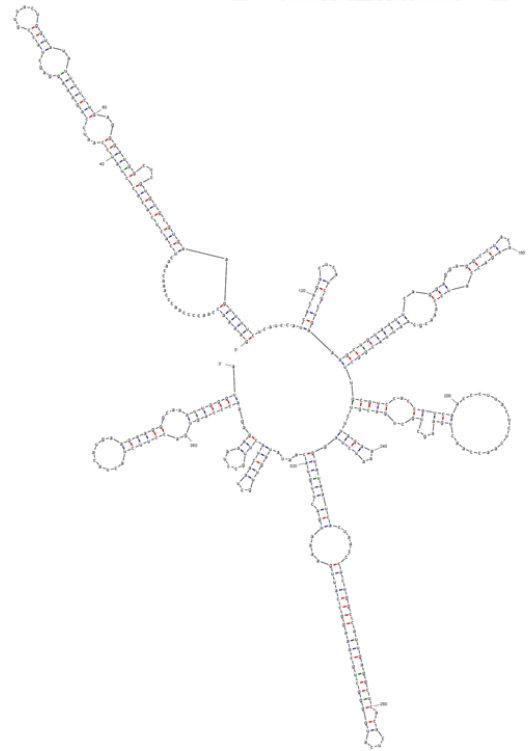
Fig. S4. The predicted *cis-acting* elements important for replication of defective RNAs of PiVX and CVX. (A) The predicted secondary structure of PiVX dRNA R4. We suggested the region in gray is the *cis-acting* elements of PiVX dRNA R4. (B) The magnified sequences in gray block in (A). (C) The predicted secondary structure of CVX dRNA C3. It has similar stem loop as the gray region in (A).



P1



C3



附錄五、缺失性 RNA P1 及 C3 在 1-394 nt 序列經預測具有相似的二級結構。

Fig. S5. The 1-394 nt sequences of dRNAs P1 and C3 have similar predicted secondary structure.