

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

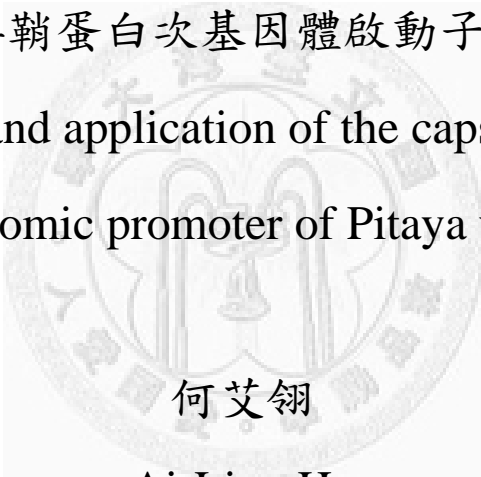
National Taiwan University

Master Thesis

紅龍果 X 病毒鞘蛋白次基因體啟動子之分析及應用

Analysis and application of the capsid protein

subgenomic promoter of Pitaya virus X



何艾翎

Ai-Ling He

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
英文摘要.....	iii
壹、前言.....	1
一、    次基因體之合成.....	1
二、    SGP 之特性及應用.....	3
三、 <i>Potexvirus</i> 之特性及 SGP 之相關研究.....	5
四、    紅龍果 X 病毒之介紹.....	7
五、    研究動機.....	8
貳、材料與方法.....	9
一、    病毒來源.....	9
二、    實驗植物與栽種方式.....	9
三、    質體之小量製備.....	10
四、    接種.....	11
五、    植物全 RNA 之抽取.....	11
六、    PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 5'端序列之擴增.....	12
七、    pGR-PiVX5 之構築.....	14
八、    質體之大量製備.....	17
九、    刪除突變株之構築.....	17
十、    以農桿菌注射法進行病毒選殖株接種.....	19
十一、   北方雜合分析.....	20
十二、   pGR-PiVX5-EGFP 之構築.....	21
十三、   pGR-PiVX5 <sup>C5843G</sup> 之構築.....	22
十四、   pGR-PiVX5-CP* 之構築.....	22
十五、   生體外轉錄.....	23
十六、   原生質體之製備與接種.....	23
十七、   間接式酵素連結免疫吸附法.....	25
十八、   免疫轉漬分析.....	26
參、結果.....	28
一、    PiVX 鞘蛋白基因轉錄起始點之定位.....	28
二、    pGR-PiVX5 之感染力測試.....	28
三、    鞘蛋白 SGP 分析方法之初步測試.....	29
四、    PiVX 鞘蛋白 SGP 之 3'端分析.....	30



五、	PiVX 鞘蛋白 SGP 之 5'端分析 .....	31
六、	PiVX 鞘蛋白 SGP 二級結構預測分析 .....	32
七、	利用 PiVX 鞘蛋白之 SGP 序列表現綠色螢光蛋白 .....	33
八、	PiVX5 <sup>C5843G</sup> 之病毒 RNA 及鞘蛋白累積分析 .....	35
九、	pGR-PiVX5 <sup>C5843G</sup> 之移動能力分析 .....	36
十、	pGR-PiVX5-CP*之複製及細胞間移動能力之分析 .....	37
肆、	討論 .....	39
伍、	參考文獻 .....	47
陸、	附表 .....	53
柒、	附圖 .....	54
捌、	附錄 .....	75



## 中文摘要

次基因體 RNA (subgenomic RNA, sgRNA) 的合成為單鏈正意股 RNA 病毒表現基因之常用策略之一，其啟動子(subgenomic promoter, SGP)在合成 sgRNA 的過程中扮演不可或缺的角色。紅龍果 X 病毒(Pitaya virus X, PiVX)為 *Potexvirus* 屬之新種病毒，本研究藉由 PiVX 鞘蛋白基因 SGP 之分析，以增加對該病毒的了解。為了確認 PiVX 鞘蛋白 SGP 的位置，我們先以 5'-RACE 配合選殖與定序，定位出鞘蛋白 sgRNA 之轉錄起始點，其位於病毒全長第 5865 個核苷酸。以此位置為基準，建構一系列 PiVX 刪除突變株(deletion mutants)，藉由農桿菌注射法在菸草(*Nicotiana benthamiana*)上進行分析，以找到鞘蛋白 SGP 的位置。結果顯示，若要維持 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 正常表現，以轉錄起始點作為+1，需保留-43 至+23 之序列，此即為 PiVX 的鞘蛋白 SGP。接著，我們以複製鞘蛋白 SGP 之方式建構 PiVX 病毒載體，並嘗試表現外源基因，經實驗證實 PiVX 病毒載體可於白藜及菸草上複製，並且成功表現綠色螢光蛋白。另外，在進行序列比對時發現，大部分 *Potexvirus* 屬之病毒在鞘蛋白基因轉譯起始點上游處，有一保守性序列 GUUAACUU，但在以仙人掌科為寄主之 potexviruses 中，此保守序列第一核苷酸皆為 C，為了要了解此核苷酸在 PiVX 感染過程中是否具有特殊意義，故建構了 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>。確定 PiVX5<sup>C5843G</sup> 在菸草原生質體中之複製及轉錄和野生型 PiVX5 沒有差別後，將質體 DNA 接種至三週大之白藜上，發現接種葉的病徵減弱、鞘蛋白累積量降低，且病毒無法移動至系統葉。初步推測可能是因為將 C 改變為 G，進而改變 RNA-鞘蛋白之間的交互作用，導致病毒之移動受到影響。而在確認上述推論前，我們想先確定鞘蛋白是否參與在 PiVX 之細胞間移動，故將鞘蛋白基因之轉譯起始碼突變為終止碼，建構了 pGR-PiVX5-CP\*，並接種在菸草原生質體及白藜植株上。結果顯示，當 PiVX 鞘蛋白不被轉譯時，PiVX 之

基因體 RNA 在菸草原生質體中之累積量皆明顯降低；而於白藜接種葉上此差異更加明顯，推測鞘蛋白位置之轉譯作用的進行或是鞘蛋白之存在，可能有助於病毒之累積，但此實驗無法確定 PiVX 鞘蛋白是否參與在病毒細胞間之移動。本研究不僅讓我們對 PiVX 有更多認識，也能以此為基礎，發展各式各樣的病毒載體以供利用。

關鍵詞：農桿菌注射法、紅龍果 X 病毒、馬鈴薯 X 病毒屬、次基因體啟動子、病毒載體



## Abstract

Transcription of subgenomic RNA (sgRNA) is one of the strategies used by eukaryotic positive sense RNA viruses for gene expression and its promoter plays an important role in sgRNA synthesis. Pitaya virus X (PiVX), a recently identified potexvirus, was investigated for its subgenomic promoter (SGP) in this study. In order to find out the SGP of PiVX capsid protein (CP) gene, the transcription start site of CP sgRNA was first studied and mapped to nucleotide (nt) 5865 by 5'-RACE analysis. Based on this result, a series of PiVX deletion mutants were constructed and used to define the functional promoter region of CP sgRNA by *Agrobacterium*-mediated inoculation on *Nicotiana benthamiana*. The results showed that the region between nt -43 and +23 relative to the CP transcription start site (+1) of PiVX supported the full promoter activity to generate CP sgRNA. Subsequently, we constructed a PiVX-based vector that contains duplicated full-length CP SGP, which could replicate and successfully express enhanced green fluorescent protein (EGFP) on *Chenopodium quinoa* and *N. benthamiana*. One interesting finding from the multiple sequence alignment indicated that sequences GUUAACUU upstream of CP gene translation start site are conserved in most members of the genus *Potexvirus*, but the first nt is C instead of G in potexviruses infecting *Cactaceae* plants. To study the significance of this nucleotide for PiVX, we performed the site-directed mutagenesis to create a mutant PiVX<sup>G5843C</sup>, its C<sup>5843</sup> replaced by G<sup>5843</sup>. The replication and transcription had no significant difference between PiVX<sup>G5843C</sup> and wild type PiVX in tobacco protoplasts. After inoculation of plasmid DNA on 3-week-old *C. quinoa* mechanically, the results revealed that the symptoms caused by PiVX<sup>G5843C</sup> were weaker, and the CP

levels were lower in the inoculated leaves compared to wild type. Moreover, the mutated virus PiVX<sup>G5843C</sup> could not be detected in the systemic leaves. Thus, these data suggested that G<sup>5843</sup> in PiVX may change the interaction of RNA and CP, and then affect the virus movement in *C. quinoa* plant. In order to confirm if PiVX CP participates in cell-to-cell movement, we constructed pGR-PiVX5-CP\* whose start codon of CP was mutated to stop codon and inoculated to *N. benthamiana* protoplasts and *C. quinoa* plants. The results showed that the accumulation of PiVX gRNA reduced in tobacco protoplasts and even became worse in the inoculated leaves of *C. quinoa*. It is suggested that translation of CP gene or CP protein itself may be important for the accumulation of PiVX gRNA. By this study, we can not only understand the characteristics of PiVX CP SGP but also obtain a benefit for further viral vector development.

Keywords: Agroinfiltration, Pitaya virus X, *Potexvirus*, subgenomic promoter, viral vector

## 壹、前言

### 一、次基因體之合成

大部分單鏈正意股 RNA 病毒會以合成次基因體 RNA (subgenomic RNA, sgRNA)之方式表現基因，利用此機制之病毒，在一條基因體 RNA (genomic RNA, gRNA)上會帶有兩個以上的基因，除了第一個基因可直接進行轉譯外，其他基因皆藉由產生 sgRNA 之方式來表現。由於合成 sgRNA 需仰賴病毒之複製，故通常 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)之蛋白會直接從 gRNA 進行轉譯而產生，再利用 RdRp 蛋白來合成 sgRNA，進而合成病毒在感染過程中所需之其他蛋白，如移動蛋白(movement protein, MP)或是鞘蛋白(capsid protein, CP)等。除了用以表現病毒基因，sgRNA 也參與在病毒之複製及重組(Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)，在病毒侵染過程扮演十分重要的角色。針對 sgRNA 之合成，目前可分為三種機制：internal initiation、premature termination 及 discontinuous transcription (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。

1、Internal initiation：此機制於病毒感染過程中會以(+)gRNA 為模版，做出相同長度之(-)gRNA，而於(-)gRNA 上會有兩個以上的啟動子，其中之一位於(-)gRNA 之 3'端，用於合成(+)gRNA，而其餘之啟動子稱為次基因體啟動子(subgenomic promoter, SGP)，用以合成 3'-coterminal sgRNA。在合成 sgRNA 時，病毒之 RdRp 會辨識並結合在 SGP 上，啟動 sgRNA 之轉錄(Miller & Koev, 2000; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。Internal initiation model 最早是於 *Brome mosaic virus* (BMV)中被發現，BMV 為 *Bromovirus* 屬之病毒，基因體由三條 RNA 組成，RNA1、RNA2 及 RNA3，在病毒複製過程中，RdRp 會結合至 RNA3 (-)上的 SGP，以 internal

initiation 轉錄出 RNA4，而 RNA4 經由轉譯會產生病毒移動及包被所需之鞘蛋白 (van der Kuyl *et al.*, 1990)。除此之外，利用 internal initiation 之機制來合成 sgRNA 尚有 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、*Barley yellow dwarf virus* (BYDV)、*Barley stripe mosaic virus* (BSMV)、*Alfalfa mosaic virus* (AMV)、*Sindbis virus* (SV) 及 *Caliciviridae* 等病毒(Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。

2、Premature termination：在此機制中 SGP 序列被認為帶有停止訊號。RdRp 利用(+)gRNA 為模版合成(-)gRNA 之過程中，會因為辨識到 SGP 而停止合成作用，接著再用已合成之較短片段的(-)gRNA 為模版，合成 3'-coterminal sgRNA。除此之外，此機制也可合成 5'-coterminal sgRNA，在以(-)gRNA 為模版，合成更多(+)gRNA 時，病毒之 RdRp 可能會因為 SGP 之停止訊號而停下，產生較短片段之(+)gRNA，此即為 5'-coterminal sgRNA。目前已知利用 premature termination 之機制來合成 sgRNAs 之病毒包括 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)、*Citrus leaf blotch virus* (CLBV)、*Grapevine vitivirus A* (GAV)、*Citrus tatter leaf virus* (CTLV)、*Citrus tristeza virus* (CTV)、*Toroviruses*、*Roniviruses*、*Betanodaviruses*、*Dianthoviruses*、*Closteroviruses* 及 *Nodaviruses* 等病毒(Pasternak *et al.*, 2006; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。

3、Discontinuous transcription：此機制和前兩者最大的不同在於其 sgRNA 不是單純來自於 gRNA 之 3'端或是 5'端，而是由 gRNA 之 3'端及 5'端部分序列所共同組成。利用此機制合成 sgRNA 之病毒，基因體之 5'端及 3'端會有重複出現的 transcription-regulatory sequences (TRS)，TRS 由三個部分組成：保守性較高之 core sequence (CS)及位於 CS 兩側之 5'-TRS 與 3'-TRS。TRS 至少攜帶兩種訊

息，其一為中止 RdRp 行使 RNA 之合成作用，使 RdRp 從模版股中脫離，其二，TRS 之序列保守性使其可和模版股下游位置相對應之 TRS 黏合，進而再度促使 RdRp 之作用，以合成具有不連續序列之 sgRNAs。此過程可能發生於合成 (-)gRNA 或 (+)gRNA 之過程中，但一般認為較有可能發生於 (-)gRNA 之合成時。利用此機制之病毒包括 Nidovirales 目中之 *Coronaviridae* 科及 *Arteriviridae* 科 (Pasternak *et al.*, 2006; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。

## 二、 SGP 之特性及應用

上述所提及之 internal initiation 及 premature termination 機制中，SGP 扮演不可或缺的角色。SGP 是一段可被 RdRp 所辨識之序列，用以合成特定 sgRNA，其位置主要是位於轉錄起始點上游 (French & Ahlquist, 1988; Koev *et al.*, 1999; Marsh *et al.*, 1988; Wang & Simon, 1997; van der Kuyl *et al.*, 1991)，極少數是位在轉錄起始點下游 (Balmori *et al.*, 1993; Miller & Koev, 2000)。目前已被研究之 SGP 長度大部分介於 20 至 200 個核苷酸之間，而同一病毒各 SGP 之長度及位置可能相當類似，但也可能截然不同 (Miller & Koev, 2000)。以 *Turnip crinkle virus* (TCV) 及 BYDV 作為例子：於 TCV 感染過程中會產生兩條 sgRNAs (sgRNA 1 及 sgRNA 2)，以兩基因之轉錄起始點作為 +1，SGP 之長度及位置分別為 -90 至 +6 及 -90 至 +4，兩條 sgRNA 之長度及位置皆十分相似；而於 BYDV 感染過程中則會產生三條 sgRNAs，sgRNA 1、sgRNA 2 及 sgRNA 3，其 SGPs 之長度及位置皆不盡相同，依序為 -76 至 +22、+1 至 +143 及 -6 至 +38 (Miller & Koev, 2000)。此外，SGP 常會形成 stem-loop 之二級結構，有助於 RdRp 或其他轉錄因子之結合，以促進 sgRNA 合成 (Li & Wong, 2006)。但同一病毒各 SGP 不一定具有保守性序列或是二級結構，Miller 等人 (2000) 認為不同之序列及結構，可能會和不同轉錄因子結合，而這或



許和基因表現的調節有關。除此之外，SGP 中部分序列可能和病毒其他部分序列進行鹼基配對，幫助 sgRNA 的合成。舉例來說，TBSV 的 sgRNA2 之轉錄起始點上游約 1000 個核苷酸處，有一長度為 12 個核苷酸之片段可以和其 SGP 中之序列進行鹼基配對，而且此遠距之交互作用(long-distance interaction)若是被破壞，將會影響 sgRNA2 之合成(Zhang *et al.*, 1999)。藉由 SGP 的研究，我們可以對病毒複製及 sgRNA 合成有更深入之了解，不僅能對病毒病害防治提供新的想法，也能利用 SGP 來構築病毒載體，協助我們在寄主中表現外源蛋白。

以 SGP 表現外源蛋白為構築植物載體的策略之一，由於在病毒複製過程中，鞘蛋白累積量較多，且於寄主植物中表現較為穩定，故鞘蛋白 SGP 成為被用於表現外源基因之常用工具。而 TMV 為目前使用最為廣泛之植物病毒載體之一，Dawson 等人於 1989 年嘗試以複製(duplicate) TMV 鞘蛋白 SGP 序列之方式來表現外源基因，發展初期他們保留 TMV 原有基因，於不同位置插入鞘蛋白 SGP，並於 SGP 下游加上 chloramphenicol acetyltransferase (CAT)基因，結果發現插入位置若在移動蛋白及鞘蛋白基因之間時，病毒可以有效複製且會多產生一條 sgRNA，進一步分析也發現 CAT 蛋白確實能被表現，且具有活性。但在系統性移動之分析結果顯示，當病毒移動至系統葉的過程中，CAT 基因會被剔除，推測可能為重複之鞘蛋白 SGP 序列導致重組機制發生(Dawson *et al.*, 1989)。為了減少重組機制發生，Donson 等人將表現外源蛋白之鞘蛋白 SGP 替換成同屬病毒 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)之鞘蛋白 SGP 序列，結果發現插入之外來基因可以穩定表現，除了可以移動至系統葉外，還可隨著病毒感染移至其他寄主植物上(Donson *et al.*, 1991)。而直到 2000 年，Chapman 等人研究顯示，以轉錄起始點(+1)為基準，TMV 鞘蛋白之完整 SGP 位於-157 至+54，使用完整 SGP 序列

進行外來基因之表現將可有效增加蛋白表現量(Grzelishvili *et al.*, 2000)。目前利用複製 SGP 之策略以漸趨發展成熟，此方法可在較不影響病毒特性下，於寄主中表現目標蛋白，現已依不同之目的被廣泛應用於各種研究上。

### 三、 *Potexvirus* 之特性及 SGP 之相關研究

*Potexvirus* 為 *Alphaflexiviridae* 科中之其中一屬，病毒外型為短絲狀，病毒顆粒長度為 470-580 nm (King *et al.*, 2012)。該屬病毒之基因體為單鏈正意股 RNA 分子，5'端具有 methylguanosine cap 構造，3'端帶有 poly(A) tail，而基因體結構包括 5'端非轉譯區(5'-untranslated region, 5'-UTR)、3'端非轉譯區(3'-untranslated region, 3'-UTR)及 5 個 open reading frames (ORFs)，依序為 ORF1 至 ORF5，ORF1 為 RdRp，可直接從 gRNA 轉譯出蛋白質，其功能主要是參與病毒之複製。ORF2-4 又稱為 triple gene block (TGB)，會藉由 sgRNA 之方式表現出三個蛋白，分別為 TGB1、TGB2 及 TGB3，主要功能與病毒在寄主細胞與細胞間之移動有關，TGB1 蛋白可增加原生質絲的大小，並且為一 silencing suppressor；TGB2 及 TGB3 皆含有一疏水性區域，可和寄主細胞中之膜系構造結合，並有調節 TGB1 蛋白之功能。而 ORF5 為 CP，經由 sgRNA 進行轉譯會產生大小約 18-27 kDa 之蛋白質，主要參與病毒之移動及病毒顆粒之包被(Batten *et al.*, 2003; Verchot-Lubicz & Ye, 2007)。

*Potexvirus* 屬之模式種(type species)為 *Potato virus X* (PVX)，PVX 於病毒感染期間會產生兩條主要 sgRNAs，分別用以表現 TGB1 及 CP 蛋白，在此兩條 sgRNAs 之 SGP 中皆有一保守性序列，GUUAAGUU，此序列於大部分 potexvirus 屬之病毒中也具有高度保守性；該段序列之突變，會在不影響(+)gRNA 及(-)gRNA

之累積量下，使 sgRNAs 之累積量下降(Kim & Hemenway, 1997)。另外，在 5'-UTR 存在著可與上述序列互補之 AACUAAAC 序列，該序列也普遍存在於 *Potexvirus* 屬之病毒中。Kim 與 Hemenway 於 1999 年分別針對 5'-UTR 及 SGP 中之保守性序列進行點突變，發現不管是對哪一序列做突變，只要鹼基配對被破壞，sgRNA 的累積量就會下降，進一步以非原本之序列回復遭到破壞之鹼基配對，也無法使 sgRNA 之累積量完全回復，證實兩段序列之鹼基配對對於 sgRNA 之合成是不可或缺的，同時也顯示遠距之 RNA-RNA 交互作用，及進行交互作用之序列皆為 sgRNA 之累積所必須的(Kim & Hemenway, 1999; Verchot-Lubicz & Ye, 2007)。另有研究指出，3'-UTR 也會和 SGP 中之保守性序列進行鹼基配對，並對(-)gRNA 之累積扮演重要角色(Hu, Pillai-nair, & Hemenway, 2007)。綜合目前研究可推知，病毒中不同位置的序列和 SGP 所進行之交互作用，在病毒複製過程中可能是維持一動態平衡的(Hu *et al.*, 2007)。

早在1992年即有利用PVX作為病毒載體，以複製鞘蛋白SGP的方式表現 $\beta$ -glucuronidase (GUS)之例子，在TGB3及鞘蛋白之間加入一鞘蛋白SGP，並於其後加上*gus*基因，此重組病毒載體可以在菸草(*Nicotiana clevelandii*)中進行系統性移動，且於接種葉及系統葉皆可偵測到GUS蛋白之活性(Chapman *et al.*, 1992)。而以綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因取代GUS基因，也可以得到相同結果，且GFP在UV照射下會發出綠色螢光，故可藉此來觀察病毒於植物中之移動情形(Baulcombe *et al.*, 1995)。另外，以複製鞘蛋白SGP之方式也可於植物中表現PVX鞘蛋白之單鏈抗體scFv40 (single-chain Fv 40)，將scFv40單鏈抗體自植物中純化出來後，發現其和原始之單鏈抗體具有相同之抗原專一性(Hendy *et al.*, 1999)。除了表現單鏈抗體，Fanconi等人也用相同策略於植物中表現抗human

papillomavirus (HPV)之E7蛋白，將植物表現之E7蛋白作為疫苗，施用於小鼠上，發現其具有抗腫瘤發生之作用(Franconi *et al.*, 2002)。PVX及鞘蛋白SGP之利用無論於基礎研究，抑或是抗體或疫苗之生產，現皆有廣泛之應用。

#### 四、 紅龍果 X 病毒之介紹

本實驗室於 2006 年自陽明山門卡紅龍果觀光果園採集樣品，以 I-ELISA 及 RT-PCR 針對紅龍果進行 *Cactus virus X* (CVX)之偵測，編號 37 號之樣品與 CVX 抗血清呈正反應，而在 RT-PCR 之檢測中發現，除了 CVX-Hu 及 CVX-NTU 此兩條預期之片段外，還出現一條大小為 300 bp 之條帶，將此條帶純化後進行定序，經序列比對分析，推測此片段應來自 *Potexvirus* 屬之病毒(呂, 2007)。之後，將 37 號紅龍果樣品接種於紅藜上，並進行三次單斑分離後，得到病毒分離株，暫時命名為 P37。以接種 P37 之白藜為材料，萃取植物全 RNA，利用先前已定序之 300 bp 片段設計專一性正向引子 37-F1，與反向引子 dT-Bam 進行 RT-PCR 反應，可以擴增出一條大小約 6.5 kb 之條帶，但經由解序後發現其不具有 *Potexvirus* 屬病毒之 5'-UTR 保守性序列，故進一步藉由 5' RACE 進行 P37 之 5'端選殖，以完成 P37 病毒株全長之選殖及解序。P37 不包含 poly(A)為 6677 個核苷酸，基因體組成與 *potexvirus* 相同，除了 5'-UTR 及 3'-UTR 外，至少包含 5 個 ORF，分別為 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 及 CP (毛, 2008)。經序列比對後證實 P37 之序列和 *Potexvirus* 屬之病毒特性相同。根據第八版 ICTV 中對 *Potexvirus* 屬之病毒種的相關規定，P37 確定為一可以感染火龍果之新種病毒，並將其命名為紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)。以感染 PiVX-P37 之紅藜為接種源，將其接種於紅藜及白藜上，可於接種後五天在接種葉上觀察到具有黃暈圈之褪色侷限性病斑(chlorotic local lesions)，在紅藜上會隨病勢之發展轉變為壞疽侷限性病斑(necrotic

local lesions)，而在白藜上病毒可進行系統性移動，可以觀察到系統葉出現褪色侷限性病斑。為了更加了解 PiVX 之特性，Li (2010) 將 PiVX-P37 病毒之全長 cDNA 選殖至具有 CaMV 35S 啟動子之載體上，並建構具有感染力之 p35S-PiVX 選殖株，而在感染力之測試時發現 p35S-PiVX-5 之感染力較佳，在紅藜及白藜上病毒的累積量都較其他選殖株高(Li, 2010)，故本實驗以 p35S-PiVX-5 為材料，進行 PiVX 鞘蛋白 SGP 之研究。

## 五、 研究動機

PiVX 之天然寄主主要侷限在仙人掌科(Cactaceae)的植物上，在 *Potexvirus* 屬病毒中，有同樣特性的病毒還有 *Cactus virus X* (CVX)、*Zygocactus virus X* (ZVX)、*Schlumbergera virus X* (SVX)及 *Opuntia virus X* (OVX)；這群病毒除了在寄主上和一般 potexviruses 有很大的差異外，在序列上也是自成一格(Li, 2010)。先前提到，於大部分 potexviruses 中用以表現 TGB1 及 CP 之 sgRNA 上游皆含有一保守性序列，GUUAAGUU，但在以仙人掌科植物為寄主之 potexviruses 中，TGB1 sgRNA 上游的保守性序列為 CAAUUAACCGUUCG，而 CP sgRNA 上游之保守性序列則為 CUUAAGUU，推測該群病毒可能在某些方面和一般所認知之 potexviruses 有所不同，故本實驗將以李勇賜學長建構之 PiVX 感染性選殖株(Li, 2010)為材料，針對 CP 之 SGP 進行分析，除了確認 SGP 之長度及位置外，也將探討 CUUAAGUU 中第一個核苷酸之不同是否具有特別意義。希望藉由本研究能夠讓我們更了解 PiVX，並為 *Potexvirus* 屬之病毒帶來更多資訊。

## 貳、材料與方法

### 一、 病毒來源

以 2006 年於陽明山紅龍果園中所採集之 37 號紅龍果樣品為材料，於指示植物白藜(*Chenopodium quinoa*)及紅藜(*C. amaranticolor*)上進行三次單斑分離，以得到病毒株 P37，將此保存於白藜或紅藜上，經選殖和定序後證實此為一 *Potexvirus* 屬新種，並將其命名為 Pitaya virus X (PiVX) (毛, 2008)。之後，以 P37 感染之紅藜為材料，萃取其 RNA，並以反轉錄聚合酶連鎖反應擴增出 PiVX 病毒全長 cDNA，並將之放置到帶有 CaMV 35S 啟動子之載體 p35S-GFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA)上，取代 GFP 基因，以構築全長度 cDNA 株，並已篩選出具有感染力之選殖株 p35S-PiVX5 (Li, 2010)。

### 二、 實驗植物與栽種方式

本實驗主要所使用的植物為白藜、菸草(*Nicotiana benthamiana*)及番茄(*Solanum lycopersicum* cv. Summer sweet)。白藜栽種方法如下：取適量白藜種子，置於裝有無菌水的錐形瓶中，於室溫下以轉速 50 rpm 震盪過夜。隔天可見白藜種子已發芽，取一花盆，將泥炭土與根基旺以 2:1 混合後填至花盆約八分滿，接著把已發芽之種子平均放於花盆中，待種子全都放置好後再輕覆上一層薄土。大約 2-3 日後即可將幼苗移至黑色軟盆內，每日光照約 16 小時，每週施用 1-2 次肥料。菸草種植方法如下：取適量種子均勻灑至裝滿泥炭土之穴盤中，不需覆土，每日光照 16 小時，一週後進行疏苗，使每個穴盤內僅剩 2 株幼苗，再過一週後即可將幼苗移植至填有泥炭土與根基旺(2:1 混合)之黑色軟盆內；每日光照 16 小時，每週施用 1-2 次肥料。番茄栽種方法如下：取適量番茄種子，置於裝有無菌水的錐形瓶中，於室溫下以轉速 50 rpm 震盪 2 天。將泥炭土與根基旺以 2:1 混

合後填至黑色軟盆內，並挖一個約一個指節深的洞，將已發芽之種子放入洞中並覆上一層土。每日光照約 16 小時，每週施用 1-2 次肥料。

### 三、 質體之小量製備

以 Mini *Plus*<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行質體之小量製備。從培養基上挑選單一菌落至含有 100 ppm ampicillin (p35S-PiVX5) 或 50 ppm kanamycin (pGR-PiVX5) 之 3 mL LB 培養液中，於 37°C 培養箱以轉速 225 rpm 震盪培養 12-16 小時。將菌液分兩次加入 1.5 mL 微量離心管中，以 13,800 xg (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 1 分鐘，去除上清液後加入 200  $\mu$ L MX1 Buffer，劇烈震盪使菌塊完全懸浮；再加入 250  $\mu$ L MX2 Buffer，上下翻轉十次，於室溫靜置 5 分鐘；接著加入 350  $\mu$ L MX3 Buffer，上下翻轉十次。以 16,200 xg 離心 10 分鐘後，將上清液移至下方套有 collection tube 的 Mini *Plus*<sup>TM</sup> column 中，並以 7,800 xg 離心 1 分鐘後，倒掉 collection tube 中之濾液。然後加入 0.5 mL WN Buffer，以 7,800 xg 離心 1 分鐘後，倒掉 collection tube 中之濾液；再加入 0.7 mL WS Buffer，以 7,800 xg 離心 1 分鐘，倒掉 collection tube 中之濾液後，以 16,200 xg 離心 5 分鐘，去除殘留酒精。接著將 Mini *Plus*<sup>TM</sup> column 移到 1.5 mL 微量離心管上，並將蓋子打開放置 5 分鐘，待酒精揮發完全，加入 50  $\mu$ L 無菌水靜置 3 分鐘後，以 16,200 xg 離心 2 分鐘，離心下來之液體即為純化之質體 DNA。純化後之質體 DNA 的品質及濃度使用 Nanodrop (NanoDrop® ND-1000, Thermo, Wilmington, USA) 進行分析，剩餘的 DNA 保存於 -20°C。

#### 四、 接種

以 4 週大之白藜進行病毒接種。首先，在欲接種的葉片均勻灑上適量矽藻土 (celite)，接著取 10  $\mu\text{g}$  溶於無菌水中之病毒質體 DNA 溶液滴於葉表上，戴上手套後以手指輕輕將滴上之液體均勻塗抹於整片葉片，待其乾燥後以無菌水將殘留的矽藻土沖洗掉。每棵植物共接種三片葉，接種完成後將植物移至 25°C 溫室培養。

#### 五、 植物全 RNA 之抽取

以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行植物全 RNA 的萃取。首先秤取植物樣本 0.1 g，置於以 180°C 處理過的研钵中，並加入適量液態氮，以杵將植物組織磨碎，倒入下方套有 collection tube 的 shearing tube 中，待液態氮揮發後加入 450  $\mu\text{L}$  RX 或 PRX Buffer，劇烈震盪混勻，以 16,200  $\times\text{g}$  (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 2 分鐘。將 collection tube 中所收集之濾液和 230  $\mu\text{L}$  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 9,600  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘後，倒掉 collection tube 中之濾液。加入 0.5 mL WF Buffer，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘後，倒掉 collection tube 中之濾液。加入 0.7 mL WS Buffer，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 1 分鐘後，倒掉 collection tube 中之濾液，此步驟重複兩次後，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 5 分鐘，去除殘留酒精。接著將 Plant Total RNA Mini Column 移到 1.5 mL 微量離心管上，並將蓋子打開放置 5 分鐘，待酒精揮發完全，加入 50  $\mu\text{L}$  無菌水靜置 3 分鐘後，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 2 分鐘，離心下來之液體即為植物全 RNA。植物全 RNA 的品質及濃度使用 Nanodrop (NanoDrop® ND-1000, Thermo, Wilmington, USA) 進行分析，剩餘的 RNA 保存於 -80°C。



## 六、 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 5'端序列之擴增

使用 GeneRacer™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 進行 PiVX 鞘蛋白次基因體 RNA 5'端序列之擴增，此方法是利用完整之 mRNA 具有 cap 之特性，將之和其他 RNA 做一區別。首先抽取接種 p35S-PiVX5 (接種後 10 天) 之白藜接種葉植物全 RNA 後，進行 RNA 的去磷酸作用，此步驟可以將不完整之 mRNA 或是非 mRNA 之 5'端磷酸根去除，完整之 mRNA 則因有 cap 構造保護而不受任何影響。作法如下：取一 1.5 mL 微量離心管，加入 7  $\mu$ L 植物全 RNA (631 ng/ $\mu$ L)、1  $\mu$ L 10X CIP Buffer、1  $\mu$ L RNaseOut™ (40 U/ $\mu$ L) 及 1  $\mu$ L CIP (10 U/ $\mu$ L)，輕拍混勻後置於 50°C 作用 1 小時。再加入 90  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 及 100  $\mu$ L phenol:chloroform，輕拍混勻後以 16,200 xg (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 5 分鐘。將水層(約 100  $\mu$ L)移至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 2  $\mu$ L mussel glycogen (10 mg/mL)、10  $\mu$ L sodium acetate (3 M, pH 5.2) 及 220  $\mu$ L 95% ethanol，輕拍混合均勻後於 -80°C 放置 2 小時。在 4°C 下，以 16,200 xg 離心 20 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液，加入 500  $\mu$ L 70% ethanol，在 4°C 下，以 16,200 xg 離心 10 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液，置於室溫風乾 10 分鐘後，最後加入 7  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O。

接著要進行 mRNA 之 cap 構造的去除，讓 5'端磷酸根顯露，以便之後 RNA oligo 之接合，而其他 RNA 則因缺乏磷酸根，故無法接合上 RNA oligo。此部份作法如下：取一 1.5 mL 微量離心管，加入 7  $\mu$ L 去磷酸之 RNA 溶液、1  $\mu$ L 10X TAP Buffer、1  $\mu$ L RNaseOut™ (40 U/ $\mu$ L) 及 1  $\mu$ L TAP (0.5 U/ $\mu$ L)，輕拍混勻後置於 37°C 作用 1 小時，再加入 90  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 及 100  $\mu$ L phenol:chloroform，輕拍混勻後以 16,200 xg 離心 5 分鐘。將水層(約 100  $\mu$ L)移至新的 1.5 mL 微量離心管，加

入 2  $\mu\text{L}$  mussel glycogen (10 mg/mL)、10  $\mu\text{L}$  sodium acetate (3 M, pH 5.2)及 220  $\mu\text{L}$  95% ethanol，輕拍混合均勻後放於  $-20^{\circ}\text{C}$  過夜。在  $4^{\circ}\text{C}$  下，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 20 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液，加入 500  $\mu\text{L}$  70% ethanol，在  $4^{\circ}\text{C}$  下，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 10 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液，置於室溫風乾 10 分鐘後，加入 7  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ ，如此即可完成 mRNA 的 cap 去除。

再來要將 GeneRacer<sup>TM</sup> RNA Oligo 和 mRNA 的 5'端接合：取 7  $\mu\text{L}$  含已去除 cap 之 mRNA 溶液，加至套組所附之含有 0.25  $\mu\text{g}$  GeneRacer<sup>TM</sup> RNA Oligo 的微量離心管中，混合均勻後置於  $65^{\circ}\text{C}$  作用 5 分鐘，讓 RNA 的二級結構解開，接著放於冰上 2 分鐘，再加入 1  $\mu\text{L}$  10X Ligase Buffer、1  $\mu\text{L}$  10 mM ATP、1  $\mu\text{L}$  RNaseOut<sup>TM</sup> (40 U/ $\mu\text{L}$ )及 1  $\mu\text{L}$  T4 RNA ligase (5 U/ $\mu\text{L}$ )，於  $37^{\circ}\text{C}$  培養箱放置 1 小時，再加入 90  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  及 100  $\mu\text{L}$  phenol : chloroform，輕拍混勻後以 16,200  $\times\text{g}$  離心 5 分鐘，將水層(約 100  $\mu\text{L}$ ) 移至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 2  $\mu\text{L}$  mussel glycogen (10 mg/mL)、10  $\mu\text{L}$  sodium acetate (3 M, pH 5.2)及 220  $\mu\text{L}$  95% ethanol，輕拍混合均勻後於  $-80^{\circ}\text{C}$  放置 2 小時。在  $4^{\circ}\text{C}$  下，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 10 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液；加入 500  $\mu\text{L}$  70% ethanol，在  $4^{\circ}\text{C}$  下，以 16,200  $\times\text{g}$  離心 10 分鐘，注意沉澱物的位置，小心去除上清液，置於室溫風乾 10 分鐘後，加入 10  $\mu\text{L}$  DEPC water，如此即完成 GeneRacer<sup>TM</sup> RNA Oligo 和 mRNA 的 5'端序列之接合。

接著要以此為模版進行反轉錄聚合酶連鎖反應：在含有 10  $\mu\text{L}$  接合反應產物之微量離心管中，加入 1  $\mu\text{L}$  PiVX-CPR1 (5 mM)及 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (25 mM)，混合均勻後置於  $65^{\circ}\text{C}$  作用 5 分鐘，接著放於冰上 2 分鐘，再加入 4  $\mu\text{L}$  5X AMV RT Buffer、

1  $\mu\text{L}$  DTT (0.1 M)、1  $\mu\text{L}$  RNaseOut<sup>TM</sup> (40 U/ $\mu\text{L}$ )及 1  $\mu\text{L}$  Cloned AMV RT (15 U/ $\mu\text{L}$ )，混合均勻後置於 45°C 作用 1 小時，接著移至 80°C 放置 15 分鐘，以終止反轉錄作用。取一 0.2 mL PCR tube，加入 1  $\mu\text{L}$  反轉錄作用之產物、18.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu\text{L}$  10X DyNAzyme<sup>TM</sup> Buffer (Finnzymes, Espoo, Finland)、0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM)、1.5  $\mu\text{L}$  GeneRacer<sup>TM</sup> 5' Primer (10  $\mu\text{M}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  PiVX-CPR1 引子(5 mM)及 0.5  $\mu\text{L}$  DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA Polymerase (1 U/ $\mu\text{L}$ , Finnzymes, Espoo, Finland)，混合均勻後用以下條件進行 PCR 反應：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、65°C/30 秒(每循環下降 0.7°C)、72°C/50 秒，進行 20 個循環；再以 96°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/50 秒，進行 20 個循環；最後以 72°C 進行 10 分鐘，反應完成後即可得到 PCR 產物。再來要進行 nested PCR 反應：將 PCR 產物稀釋 50 倍，取 1  $\mu\text{L}$  至新的 0.2 mL PCR tube，再加入 18.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O、2.5  $\mu\text{L}$  10X DyNAzyme<sup>TM</sup> Buffer、0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM)、1.5  $\mu\text{L}$  10 mM GeneRacer<sup>TM</sup> 5' Nested Primer、0.5  $\mu\text{L}$  5 mM PiVX-CPR2 引子及 0.5  $\mu\text{L}$  DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA Polymerase (1 U/ $\mu\text{L}$ )，混合均勻後用以下條件進行 PCR 反應：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、56°C/30 秒、72°C/50 秒，進行 30 個循環；再以 72°C 進行 10 分鐘，反應完成後即可得到 nested PCR 產物。所獲得的產物以 1% agarose gel 進行分析。

## 七、 pGR-PiVX5 之構築

### (一) 限制酶截切反應

以實驗室保存之 PiVX 感染性選殖株 p35S-PiVX5 (Li, 2010)及 pGR-106 (Baulcombe *et al.*, 1995)去除 PVX 全長序列之 pGR 載體作為材料，進行 pGR-PiVX 之構築。取一 1.5 mL 微量離心管，加入 3  $\mu\text{g}$  之 p35S-PiVX5、5  $\mu\text{L}$  10X NEB Buffer 4 (NEB, Ipswich, MA, USA)、5  $\mu\text{L}$  10X BSA (NEB, Ipswich, MA, USA)、1.5  $\mu\text{L}$  *Sbf*

I (10 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)及 1.5  $\mu$ L *Xma*I (10 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)，加 ddH<sub>2</sub>O 將總體積補到 50  $\mu$ L，於 37°C 處理 3 小時。pGR 載體也是以相同方式進行限制酶截切。

## (二) 回收截切後之 DNA 片段

以 QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany)進行截切後之 DNA 片段的回收。將 p35S-PiVX5 經限制酶截切之產物以 1% agarose gel 進行電泳，以 ethidium bromide (EtBr)染色後，於 UV 燈照射下切下目標 DNA 條帶，置於 1.5 mL 微量離心管中秤重，加入膠體三倍體積之 QX 1 及 7  $\mu$ L QIAEX II，以手指拍打離心管，使 QIAEX II 均勻懸浮後，置於 50°C 水浴槽 10 分鐘，每 2 分鐘取出拍打，使 QIAEX II 再次懸浮。以 16,200 xg 離心 30 秒，去除上清液，加入 500  $\mu$ L QX I，以手指拍打離心管，使 QIAEX II 均勻懸浮。以 16,200 xg 離心 30 秒，去除上清液，加入 500  $\mu$ L PE Buffer，以手指拍打離心管，使 QIAEX II 均勻懸浮，此步驟重複兩次後，以 16,200 xg 離心 30 秒，去除上清液，打開蓋子風乾 10 分鐘。加入 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，置於 50°C 水浴槽 10 分鐘，接著以 16,200 xg 離心 1 分鐘，離心後之上清液即為回收之 DNA 片段，此為接合反應中欲插入之 DNA 片段。pGR 載體經限制酶截切之產物也是以相同方式進行回收，回收片段大小約為 4 kb，此為接合反應中之載體 DNA。

## (三) DNA 接合反應

取一 1.5 mL 微量離心管，加入 9  $\mu$ L 欲嵌入之 DNA、3  $\mu$ L 載體 DNA、1.5  $\mu$ L 10X T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、0.5  $\mu$ L 10 mM ATP 及 1  $\mu$ L T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L, Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)，混

合均勻後置於 4°C 過夜。

#### (四) 轉型

利用 Heat-shock 法將質體 DNA 轉型至大腸桿菌 *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  中。自 -80°C 冰箱取出一支裝有 130  $\mu$ L 勝任細胞之 1.5 mL 微量離心管，置於冰上待其自然解凍。之後將接合反應之全部產物加至其中，輕拍混勻後置於冰上 30 分鐘。接著將其置於 42°C 加熱 90 秒，再放至冰上 5 分鐘，加入 1 mL 2X YT (1.6 g tryptone, 1 g yeast extract, 0.5 g NaCl, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 100 mL)，置於 37°C 培養箱，以轉速 225 rpm 培養 40 分鐘。以 6,200 xg (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA) 離心 5 分鐘，留下 50  $\mu$ L 上清液，回溶沉澱物後即可進行塗盤，約 16 小時後可以看到菌落於培養基上生長。

#### (五) 菌落聚合酶連鎖反應

以 colony PCR 進行轉型試驗後之初步篩選。取一 0.2 mL PCR tube 加入 0.5  $\mu$ L PiVX-CPF1 (5 mM) 引子、0.5  $\mu$ L NOS-3 (5 mM) 引子、5  $\mu$ L 2X Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon; Bie and Berntsen A/S, Rødovre, Denmark) 及 4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，接著以滅菌過之牙籤沾取單一菌落至混合液中，混合均勻後即可進行聚合酶連鎖反應，反應條件如下：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、56°C/30 秒、72°C/60 秒，進行 25 個循環；再以 72°C 進行 10 分鐘，反應完成後以 1% agarose gel 進行分析。挑選有擴增出大小約為 750 bp 之菌落進行質體小量製備，再以限制酶 *Sbf*I (NEB, Ipswich, MA, USA) 及 *Xma*I (NEB, Ipswich, MA, USA) 進行酶切，先確定產物大小正確，並經定序確認無誤後，即完成 pGR-PiVX5 之構築。

## 八、質體之大量製備

以 Geneaid Plasmid Midi Kit (Geneaid, Agoura Hills, CA, USA) 進行質體之大量製備。從培養基上挑選單一菌落至含有 50 ppm kanamycin 之 100 mL LB 培養液中，於 37°C 培養箱以轉速 225 rpm 震盪培養 12-16 小時。將菌液分兩次加入 50 mL 離心管中，以 6,000 xg (Centrifuge Z 383 K, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘，去除上清液後加入 4 mL PM1 Buffer，劇烈震盪使菌塊完全懸浮，再加入 4 mL PM2 Buffer，上下翻轉十次，於室溫靜置 2 分鐘，接著加入 4 mL PM3 Buffer，上下翻轉十次，以 6,000 xg 離心 20 分鐘。取出 Plasmid Midi Column，置於 50 mL 離心管上，加入 5 mL PEQ Buffer，待液體藉由重力流完後，將前述離心後之上清液移至 Plasmid Midi Column，待液體藉由重力流完，加入 12 mL PW Buffer，待液體藉由重力流完，將 Plasmid Midi Column 移至新的 50 mL 離心管上，加入 8 mL PEL Buffer，藉由重力將 DNA 流洗下來，之後即可將 Plasmid Midi Column 丟棄，於離心管中加入 6 mL isopropanol，充分混合均勻，移至 -20°C 放置過夜。在 4°C 下以 15,000 g 離心 30 分鐘，注意沉澱物位置，小心移除上清液，加入 5 mL 75% ethanol，在 4°C 下以 15,000 xg 離心 10 分鐘，移除上清液後風乾 10 分鐘，加入 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，於 50°C 水浴放置 10 分鐘，在 4°C 下以 15,000 xg 離心 5 分鐘，離心下來之液體即為純化之質體 DNA。純化後之質體 DNA 的品質及濃度使用 Nanodrop (NanoDrop® ND-1000, Thermo, Wilmington, USA) 進行分析。剩餘的 DNA 保存於 -20°C。

## 九、刪除突變株之構築

### (一) 轉錄起始點(+1)上游之刪除突變株之構築

根據欲缺失之序列位置設計三個正向引子 CP-sgF1、CP-sgF2 及 CP-sgF3，

分別和反向引子 NOS-3 進行聚合酶連鎖反應。取一 0.2 mL PCR tube 加入 5 ng pGR-PiVX5、2.5  $\mu$ L 5 mM 正向引子(CP-sgF1、CP-sgF2 或 CP-sgF3)、2.5  $\mu$ L 反向引子 NOS-3 (5 mM)、10  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、1  $\mu$ L dNTPs (10 mM)、0.5  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)，最後加 ddH<sub>2</sub>O 將總體積補至 50  $\mu$ L，混合均勻並短暫離心後即可進行聚合酶連鎖反應，反應條件如下：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、56°C/30 秒、72°C/70 秒，進行 30 個循環；再以 72°C 進行 10 分鐘。將反應產物進行純化，接著以 *Xma*I (NEB, Ipswich, MA, USA) 進行酶切，再次純化後將此產物和用 *Hpa*I (NEB, Ipswich, MA, USA) 及 *Xma*I 處理之 pGR-PiVX5 進行接合反應，以構築出 F1 ( $\Delta$ -61/-44)、F2 ( $\Delta$ -61/-24) 及 F3 ( $\Delta$ -61/-1)，所有突變株皆經由定序確認無誤。

## (二) 轉錄起始點(+1)下游之刪除突變株之構築

由於在轉錄起始點下游沒有適當的限制酶切位可供利用，故我們先以 pGR-PiVX5 為模版，設計正向引子 CP-*Cla*I-F 及反向引子 CP-*Cla*I-R，以聚合酶連鎖反應進行點突變，在不改變胺基酸序列的前提下，於轉錄起始點下游第 92 個核苷酸處創造一個 *Cla*I 的切位。取一 0.2 mL PCR tube 加入 5 ng pGR-PiVX5、1  $\mu$ L CP-*Cla*I-F (5 mM)、1  $\mu$ L CP-*Cla*I-R (5 mM)、3  $\mu$ L 5X Phusion HF buffer、1  $\mu$ L dNTPs (10 mM)、0.5  $\mu$ L Phusion DNA polymerase (2U/ $\mu$ L)，最後加 ddH<sub>2</sub>O 將總體積補至 15  $\mu$ L，混合均勻並短暫離心後即可進行聚合酶連鎖反應。反應條件如下：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、56°C/60 秒、72°C/13 分鐘，進行 17 個循環；再以 72°C 進行 10 分鐘。反應完成後加入 1  $\mu$ L *Dpn*I (20 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA) 於 37°C 作用 30 分鐘，接著進行大腸桿菌轉型，16 小時後挑選單一菌落進行質體小量製備，並以 *Cla*I (5 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA) 進行酶切作用，以

篩選點突變成功者，經由定序確認無誤即完成 pGR-PiVX5-ClaI 之構築。再來進行轉錄起始點下游之刪除突變株之構築。以 pGR-PiVX5-ClaI 為模版，根據欲刪除之序列位置設計四個反向引子 CP-sgR1、CP-sgR2、CP-sgR3 及 CP-sgR4，分別和正向引子 PiVX-NheI-F 進行聚合酶連鎖反應，反應條件和上述相同。將反應產物進行純化，接著以 *ClaI* 進行酶切，再次純化後將此產物和用 *NheI* (10 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)、*Klenow* (NEB, Ipswich, MA, USA) 及 *ClaI* 依序處理之 pGR-PiVX5-ClaI 進行接合反應，以構築出 R1 ( $\Delta$ +70/+92)、R2 ( $\Delta$ +47/+92)、R3 ( $\Delta$ +24/+92)及 R4 ( $\Delta$ +1/+92)，所有突變株皆經由定序確認無誤。

## 十、以農桿菌注射法進行病毒選殖株接種

### (一) 農桿菌轉型

利用液態氮冷凍法將 pGR-PiVX5 及刪除突變株轉型至農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 中。取 1  $\mu$ g 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 YT 培養液，置於 28°C 培養箱以轉速 225 rpm 震盪培養 2-4 小時。以 6,200  $\times$ g (SORVALL LEGEND MICRO 17 Centrifuge, Thermo, Wilmington, USA)離心 5 分鐘，留下 50  $\mu$ L 上清液，回溶沉澱物後即可進行塗盤，大約 2-4 天可以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 5 mL LB 培養液中，於 28°C 培養箱以轉速 225 rpm 震盪培養 12-16 小時。取 20  $\mu$ L 菌液至 20 mL Induction Medium (90 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 7 mM ammonium



sulfate, 1.5 mM sodium citrate, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% glucose, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 20 μM acetosyringone, 50 ppm kanamycin), 於 28°C 培養箱以轉速 225 rpm 震盪培養 24 小時。在 4°C 下, 以 5,500 xg (Centrifuge Z 383 K, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘, 去除上清液後, 以 MMA (10 mM MES, pH 5.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM acetosyringone) 回溶沉澱物, 並將菌液調至 OD600 等於 1, 即可用沒有針頭之 1 mL 針筒注射 5 週大之菸草, 所注射葉片為第 5 片本葉。

#### 十一、 北方雜合法分析

取 1.5 μg 植物全 RNA, 加入等體積之 2X RNA Loading Dye (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), 混合均勻後以 65°C 加熱 15 分鐘, 再放冰上 5 分鐘, 以解開 RNA 之二級結構。將處理完之樣本以 1% agarose gel 進行電泳分析。利用毛細現象將膠體中的 RNA 轉印至尼龍膜(Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)上: 將一塊玻璃板架在盆上, 並準備長方形之濾紙 (3MM, Whatman, England), 將濾紙置於玻璃板上, 並讓兩端垂入盆內, 接觸盆內之 20X SSC buffer (AMRESCO, Solon, OH, USA) 溶液中。將濾紙潤濕後把膠片放在濾紙上, 再將尼龍膜蓋在膠片上, 接著蓋上 2 張以 20X SSC buffer 浸溼之與膠片同大之濾紙, 然後用保鮮膜將膠片週圍密封。最後再覆蓋上一疊約 5 公分厚之擦手紙, 其上再以裝水之塑膠盒壓住, 在室溫下靜置 6 小時以上。

完成轉印後將尼龍膜進行 UV crosslink (UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA), 使 RNA 固定在膜上。再來要進行雜合作用: 將膜浸泡於 hybridization solution [50% (v/v) formamide, 5X SSC, 2% (w/v) blocking reagent, 0.1% (w/v) *N*-lauroylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS], 於 55°C 下以 8 rpm (YIHDER

HR-80, Taiwan)進行 pre-hybridization 至少 2 小時。取 0.25~0.4  $\mu\text{g}$  DIG 標定核酸探針，以 96°C 處理 10 分鐘後，迅速置於冰上 2 分鐘，短暫離心後加入 hybridization solution 中，進行雜合反應 12-16 小時。隔日將尼龍膜取出，以 100 mL 含 0.1% (w/v) SDS 的 2X SSC 溶液於室溫下清洗 2 次，每次 10 分鐘；再以 100 mL 含 0.1% (w/v) SDS 的 0.1X SSC 溶液於 68°C 下清洗 2 次，每次 15 分鐘。接著以 100 mL Buffer I (11.61 g maleic acid, 30 mL 5 M NaCl, 8 g NaOH, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 mL) 於室溫下短暫清洗 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 2  $\mu\text{L}$  alkaline phosphate-conjugated anti-DIG antibody (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 加入 20 mL Buffer II 後，於室溫下以 50 rpm 震盪 30 分鐘。再以 100 mL Buffer I 於室溫下清洗 3 次，每次 15 分鐘。清洗完畢後加入 600  $\mu\text{L}$  CDP-Star (NEB, Beverly, MA, USA) 溶液，於室溫下以 50 rpm 震盪 30 分鐘，然後取出尼龍膜，置入透明塑膠袋中並封口，以 Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (Amersham Biociences, Buckinghamshire, England) 底片進行曝光，沖洗底片後即可觀察結果。

## 十二、 pGR-PiVX5-EGFP 之構築

首先設計帶有 *Xho*I 及 *Not*I 切位之正向引子 duSGP-F，及帶有 *Sal*I 及 *Sac*II 之反向引子 duSGP-R，以聚合酶連鎖反應進行 SGP 之複製。取一 0.2 mL PCR tube 加入 5 ng pGR-PiVX5、2.5  $\mu\text{L}$  duSGP-F (5 mM)、2.5  $\mu\text{L}$  duSGP-R (5 mM)、10  $\mu\text{L}$  5X Phusion HF buffer (NEB, Ipswich, MA, USA)、2  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (10 mM)、0.5  $\mu\text{L}$  Phusion DNA polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ , NEB, Ipswich, MA, USA)，最後加 ddH<sub>2</sub>O 將總體積補至 50  $\mu\text{L}$ ，混合均勻並短暫離心後即可進行聚合酶連鎖反應，反應條件如下：96°C 進行 5 分鐘；以 96°C/30 秒、60°C/45 秒、72°C/13 分鐘，進行 25 個

循環；再以 72°C 進行 10 分鐘。將反應產物加入 1  $\mu$ L *DpnI* (20 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA)，於 37°C 放置 30 分鐘，接著進行純化，並以 30  $\mu$ L 回溶。取一 1.5 mL 微量離心管，加入 5  $\mu$ L 回溶產物、1  $\mu$ L 10X T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)、1  $\mu$ L ATP (10 mM)、0.5  $\mu$ L T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ $\mu$ L, NEB, Ipswich, MA, USA) 及 2.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，混合均勻後於 37°C 作用 1 小時。再加入 0.5  $\mu$ L 10X T4 DNA Ligase Buffer、0.5  $\mu$ L ATP (10 mM)、0.5  $\mu$ L T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L)、1.5  $\mu$ L 50% PEG 4000 (NEB, Ipswich, MA, USA) 及 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，於室溫放置 4 小時，即可進行大腸桿菌轉型。製備小量質體後，以 *SacII* 酶切作用進行確認和篩選，再經由定序確認無誤即完成 pGR-PiVX5-duSGP 之構築。再來以 pKGWFS7 (Ann *et al.*, 2002) 為模版，利用帶有 *Sac II* 之正向引子 *SacII*-EGFP-F 及帶有 *XhoI* 之反向引子 *XhoI*-EGFP-R 進行聚合酶連鎖反應，再以 *SacII* 及 *XhoI* 進行酶切，其產物經純化後和同樣以 *SacII* 及 *XhoI* 處理過之 pGR-PiVX5-duSGP 進行接合反應，經後續選殖步驟篩選出可能的目標，再經由定序確認無誤後即獲得 pGR-PiVX5-EGFP 重組載體。

### 十三、 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 之構築

以 pGR-PiVX5 為模版，利用正向引子 PiVX5-octa-F 及反向引子 PiVX5-octa-R，以聚合酶連鎖反應進行點突變。反應條件和前述點突變實驗相同。經定序確認無誤後即可得到 pGR-PiVX5<sup>G5843C</sup>。

### 十四、 pGR-PiVX5-CP\*之構築

以 pGR-PiVX5 為模版，利用正向引子 CP-stop-F 及反向引子 CP-stop-R，以聚合酶連鎖反應進行突變。反應條件和前述點突變實驗相同。經定序確認無誤後

即可得到 pGR-PiVX5-CP\*。

## 十五、 生體外轉錄

首先將質體 DNA 以 *Bam*HI (NEB, Ipswich, MA, USA) 進行酶切，讓質體 DNA 變成直線狀。取一 1.5 mL 微量離心管，加入 2-4  $\mu$ g 已直線化之質體 DNA 模板、10  $\mu$ L 5X T7 Buffer、10  $\mu$ L (ACU)TP (5 mM each)、1  $\mu$ L GTP (5 mM, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)、1.25  $\mu$ L Cap analog (10 mM, NEB, Ipswich, WA, USA) 及 1  $\mu$ L rRNasin (40 U/ $\mu$ L, Promega, Madison, WI, USA) 和 2  $\mu$ L T7 RNA polymerase (10 U/ $\mu$ L, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，最後加入 ddH<sub>2</sub>O 使體積為 41  $\mu$ L，混合均勻後置於 37°C 反應 15 分鐘，接著加入 9  $\mu$ L GTP (5 mM)，混合均勻後置於 37°C 反應 75 分鐘。反應完成後取 1  $\mu$ L 產物，以 1% agarose gel 進行電泳分析，並利用 UVP 拍照系統 (BioDoc-It™ Image system, Cambridge, UK) 確定生體外轉錄體之產量，其餘分裝保存於 -80°C 中備用。

## 十六、 原生質體之製備與接種

### (一) 原生質體之製備

取 6-9 週大之菸草葉片約 5-6 公克，以 1% 漂白水進行表面消毒 2 分鐘，再以一次蒸餾水進行 3 次漂洗後，用無菌濾紙吸乾葉片殘留之水分，將葉片置於無菌玻璃板上，先以刀片去除中肋，留下之葉片部分再切成約 2 mm  $\times$  4 mm 之長條狀，平均分置於兩個無菌玻璃培養皿中，以 0.2 mM minipore filter (Sartorius, Goettingen, Germany) 過濾 30 mL enzyme digestion buffer (30 mg BSA, 18 mg pectinase, 360 mg cellulose, 加 0.55M mannitol-0.1% MES 至 30 mL)，平均分配於兩個培養皿，置於 25°C 進行黑暗處理 16 小時。取出後輕輕搖動使培養皿中之菸

草組織懸浮，以 150 目尼龍網過濾植物之殘體，濾液平分於 4 支 15 mL 玻璃試管中，並以 300 rpm (KUBOTA 2010) 離心 7 分鐘。用無菌玻璃滴管去除上層液體，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES (50.105 g mannitol, 0.5 g MES, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL, pH 5.7) 後輕輕拍打試管底部，使沈澱物均勻懸浮。再以無菌玻璃滴管吸取 0.55 M sucrose 溶液，小心將滴管置於試管底部後，慢慢加入約 2 mL 溶液。以 300 rpm 離心 5 分鐘，以無菌之玻璃滴管小心吸取 mannitol-MES 與 sucrose 溶液之交界處所形成的深綠色原生質體，置於新的試管中，再加入 5 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕輕混合均勻。以 300 rpm 離心 5 分鐘，用無菌之玻璃滴管吸除上清液，再加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕輕拍打試管底部，使沈澱物均勻懸浮。再次以 300 rpm 離心 5 分鐘，用無菌之玻璃滴管去除上層液體，將此沈澱物懸浮於 1 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液中。將四支試管中的原生質體懸浮液集中於同一管中，均勻懸浮後，於光學顯微鏡(WILD HEERBRUGG M3Z, Switzerland)下以血球計數器計算細胞數目，平均產量約為  $6-8 \times 10^5$  cells/mL。

## (二) 原生質體之接種

將所獲得之菸草原生質體分裝於 12 × 75 mm 之小玻璃試管中，使每管約有  $4 \times 10^5$  cells，以進行後續之接種。首先將分裝好的原生質體以 300 rpm (KUBOTA 2010) 離心 5 分鐘，用無菌之玻璃滴管吸除上層液體，留下約 80 μL 之液體，輕輕拍打試管底部，使沈澱物均勻懸浮，將 15 μL 欲進行接種之生體外轉錄體加入其中，輕輕拍打試管底部，使其混合均勻，再全部取出輕輕加入含有 150 μL PEG inoculation buffer (40% PEG, 3 mM CaCl<sub>2</sub>) 的試管中，輕輕拍打試管底部 40 下，以混合均勻。再分 3 次加入 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，每次 500 μL，並

輕輕拍打混合，之後將此試管置於冰中 10 分鐘。最後以 300 rpm 離心 5 分鐘，用無菌之玻璃滴管吸除上層液體，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 溶液，輕輕拍打試管底部，使沈澱物均勻懸浮其中，以洗去殘留其中的 PEG。再以 300 rpm 離心 5 分鐘，用無菌之玻璃滴管吸除上層液體後，加入 750  $\mu$ L protoplast culture medium (Jones *et al.*, 1990) 中，輕輕拍打試管底部，使沈澱物均勻懸浮其中，以石臘膜將小玻璃管封口，並進行光照培養。24 或 48 小時後收取全 RNA，以北方雜合法進行分析。

#### 十七、 間接式酵素連結免疫吸附法

接種後十四天以間接 ELISA 進行 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 之感染力測試。摘取植物樣品，並以 10 倍 ISE Buffer (0.795 g NaCO<sub>3</sub>, 1.465 g NaHCO<sub>3</sub>, PVP 10 g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL, pH 9.6) 進行研磨，粗萃後之植物汁液取 100  $\mu$ L 加至 96 孔盤中，於 37°C 放置 1 小時。取出 96 孔盤後，以 PBST (25 mL 20X PBS, 200  $\mu$ L Tween 20, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL) 清洗各孔 10 次，加入 100  $\mu$ L 以 ECI buffer (1 g BSA, 10 g PVP, 加 PBST 至 500 mL) 稀釋 10,000 倍之 anti-PiVX 抗血清 (Li, 2010)，於 37°C 反應 1 小時，再以 PBST 清洗各孔 10 次，加入 100  $\mu$ L 以 ECI buffer 稀釋 10,000 倍之與鹼性磷酸酶連結的 anti-rabbit antibody，於 37°C 反應一個小時，再以 PBST 清洗各孔 10 次，最後各孔洞加入 100  $\mu$ L 以 PNP Buffer (0.1 g MgCl<sub>2</sub>, 97 mL diethanolamine, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 mL, pH 9.7) 新鮮配製之 PNP 基質進行作用，於 37°C 放置 30 分鐘後，以分光光度計測量各孔洞於波長 405 nm 下之吸光值，並以 Microsoft excel 軟體進行數據分析。

## 十八、 免疫轉漬分析

### (一) 蛋白質電泳凝膠製備

以 Hofel 蛋白質電泳系統 (Mighty Small II SE 250, Pharmacia Biotech) 進行蛋白質電泳凝膠之製備。首先製備 15% 之分離膠體(separating gel)：在 100 ml 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)，快速搖晃燒杯使溶液均勻混合後迅速鑄膠。加入約 3.2 mL 分離膠體後，立即加入 0.6 mL 95% 酒精，使膠面平整。靜置約 30 分鐘後，倒除酒精，並以濾紙徹底將殘留之酒精吸乾。再來配製 5% 之焦集膠體 (stacking gel)：取另一乾淨之 100 mL 燒杯，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，快速搖晃燒杯使溶液均勻混合後迅速注入約 1-2 mL 之集膠膠體，並小心插入齒梳(comb)，避免氣泡產生。待膠體凝固後，小心去除齒梳，並以清水清洗樣本槽中凝膠殘留物質，即可使用。

### (二) 樣品製備及 SDS-PAGE 分析

秤取植物樣本 0.1 g，置於以 180°C 處理過之研钵中，並加入適量液態氮，以杵將植物組織磨碎。待樣本稍稍回溫後加入 200  $\mu$ L GUS extraction buffer (5 mL 0.5 M EDTA, 250  $\mu$ L 100% Triton X-100, 175  $\mu$ L 14.3 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.25 g SDS, 0.83g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.93 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 250 mL)，混合均勻後倒入 1.5 mL 微量離心管，以 13,800 xg (Centrifuge Z216MK, HERMLE, Wehingen, Germany) 離心 15 分鐘。取 15  $\mu$ L 離心後之上清液和 5  $\mu$ L 4 X SDS sample buffer

(50 mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue)混合均勻，於 96°C 加熱 10 分鐘。將膠片置於電泳槽內，加入處理完畢之樣品，先以 120 伏特進行電泳約 20 分鐘，待樣本進入分離膠體後，將電壓調高至 180 伏特進行電泳約 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。

### (三) 免疫轉漬分析

免疫轉漬分析主要參考 Molecular Cloning 所描述之方法 (Sambrook and Russell, 2001)：將分離膠體浸泡在 CAPS (10 mM CAPS, 0.32 mM DDT, 15% methanol, pH 10.5) 中，於室溫下以 50 rpm 緩慢搖動 10 分鐘。接著裁剪一張與分離膠體(8.3×6.6 cm<sup>2</sup>)相同大小之 Amersham Hybond™-PVDF 膜(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 與 2 張濾紙。以 CAPS 浸濕濾紙，於正極之電極板上鋪上 1 張濾紙，接著將 PVDF 膜先以甲醇(methanol)浸溼，然後浸泡在 CAPS 中兩分鐘，再鋪在濾紙上。將浸泡在 CAPS 中之分離膠體小心鋪蓋在 PVDF 膜上，最後蓋上一張以 CAPS 浸溼之濾紙。蓋上負極之電極板，以 36 mA 之電流轉印。轉印 35 分鐘後取出 PVDF 膜，置於以 PBS 配置之 5%脫脂牛奶中，於 37°C 反應 30 分鐘。倒掉牛奶，加入以 1%脫脂牛奶稀釋 10,000 倍之 anti-PiVX 抗血清，於 37°C 下反應 1 小時後，以 PBST 清洗三次，每次五分鐘，再加入以 1%脫脂牛奶稀釋 10,000 倍之含鹼性磷酸酶連結體之 anti-rabbit antibody，於 37°C 下反應 1 個小時，完成後以 PBST 清洗三次，每次五分鐘。接著加入 10 mL Buffer III (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) 反應 2 分鐘，之後加入 200  $\mu$ l NBT/BCIP 溶液 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 進行呈色反應，待目標色帶出現即可將 PVDF 膜以二次水沖洗以終止呈色反應，風乾後護貝保存。



## 參、結果

### 一、PiVX 鞘蛋白基因轉錄起始點之定位

因為大部分病毒之 SGP 都座落在該 sgRNA 轉錄起始點附近，甚或包含轉錄起始點，故我們利用 GeneRacer™ Kit，針對病毒鞘蛋白 sgRNA 之 5' 端序列進行擴增，以找出 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 之轉錄起始點。第一階段的聚合酶連鎖反應是利用套組所附之 GeneRacer™ 5' Primer，以及位於 PiVX 鞘蛋白基因 3' 端之專一性引子 PiVX-CPR1，進行序列之擴增，取其產物 1 μL 進行電泳分析，可以看到藉由第一階段的聚合酶連鎖反應可以專一性地擴增出一條大小約為 700 bp 之條帶(圖一 A)。但為了確保我們擴增出的片段為 PiVX 之鞘蛋白基因，於是利用套組所附之 GeneRacer™ 5' Nested Primer 及 PiVX 鞘蛋白基因中間之專一性引子 PiVX-CPR2，進行第二階段聚合酶連鎖反應，以提高反應專一性。取其產物 1 μL 進行電泳分析，可以看到藉由第二階段的聚合酶連鎖反應可以專一性地擴增出一條大小約為 270 bp 之條帶(圖一 B)。將 700 bp 片段進行選殖，經篩選後挑選 3 個選殖株進行定序，結果顯示，PiVX 鞘蛋白基因之轉錄起始點位於該基因轉譯起始點之上游第 13 個核苷酸之位置，同時也是 TGB3 基因最後第 9 個核苷酸(圖二)，而在整個病毒 gRNA 中則是位於第 5,865 個核苷酸。確定鞘蛋白基因之轉錄起始點後，即可以此為一參考基準進行分析 SGP 所需之刪除突變株之設計。

### 二、pGR-PiVX5 之感染力測試

為了測試何種分析方法最適合用於 PiVX 鞘蛋白 SGP 之分析，我們構築了 pGR-PiVX5。利用在 p35S-PiVX5 及 pGR 載體上之 *Sbf*I 及 *Xma*I 限制酶切位，將具感染力之 PiVX 病毒全長 cDNA 從 p35S 載體置換到 pGR 載體上(圖三)。挑選

pGR-PiVX5-4、pGR-PiVX5-7 及 pGR-PiVX5-9，分別將其質體 DNA 接種在 4 週大之白藜上，另外也接種了 p35S-PiVX5 之質體 DNA 作為正對照組，比較感染力是否有差別。接種後 7 天，可以在接種葉觀察到黃色圓形病斑。14 天後可以在接種葉上看到病斑變多，且有些病斑中間呈現褐色壞疽；而且可於系統葉上觀察到褪綠病斑出現(圖四)，系統葉之病斑較小，隨時間之增長病斑數也會增加，但不會形成壞疽。經過 30 天的觀察，可以發現接種 pGR-PiVX5-4、pGR-PiVX5-7 及 pGR-PiVX5-9 的白藜和接種 p35S-PiVX5 之病斑型態及病徵發展都很相似。除此之外，於接種後 14 天也摘取各處理之接種葉及系統葉，抽取其全 RNA，進行反轉錄聚合酶反應，以檢測病毒之累積情形。結果顯示接種 pGR-PiVX5-4、pGR-PiVX5-7 及 pGR-PiVX5-9 之接種葉及系統葉皆會出現大小約為 650 bp 之專一性條帶(圖五)，此條帶為 PiVX 之鞘蛋白基因，這表示 PiVX 確實有在白藜上複製及移行。由於 pGR-PiVX5-7 在系統葉上之病毒累積量和 p35S-PiVX5 較為相似，故挑選 pGR-PiVX5-7 進行後續實驗，並將其正式命名為 pGR-PiVX5。

### 三、鞘蛋白 SGP 分析方法之初步測試

#### (一) 原生質體分析法

將 15  $\mu$ g 之 pGR-PiVX5 接種於菸草之原生質體，分別於接種後 24 小時、48 小時及 72 小時收取原生質體全 RNA，並以北方雜合法進行分析，由於欲觀察病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 之累積情形，故使用可和 PiVX 鞘蛋白基因 3'端專一性結合之 DNA 探針進行偵測。結果顯示，接種後 24 小時之樣品完全偵測不到任何訊號；接種後 48 小時之樣品可以看到鞘蛋白 sgRNA 之明顯累積，但病毒 gRNA 則只有微弱的訊號；而接種後 72 小時之樣品，則可看到病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 皆有較為明顯的累積(圖六)。

## (二) 農桿菌注射法

將 pGR-PiVX5 轉型至農桿菌，並利用農桿菌注射法於菸草上進行接種試驗。首先測試最佳收取樣本之時間：以農桿菌注射法接種於 5 週大之菸草，每棵植物接種 3 片葉片，接種後 24 小時及 48 小時隨機採取一片葉片，萃取其全 RNA，並以北方雜合法進行分析，使用之探針如同前述。實驗結果顯示在接種後 24 小時無法偵測到病毒之訊號；接種後 48 小時可以觀察到病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 之累積(圖七)。和上述原生質體分析法相比，農桿菌注射法可以在較短的時間內看到病毒的累積，且在操作上也較為方便，故選擇農桿菌注射法進行鞘蛋白 SGP 之分析。又根據以上結果，我們選用 5 週大之菸草作為材料，並於接種後 48 小時收取接種葉片，以北方雜合法進行鞘蛋白 SGP 之分析。

在多次重複實驗中發現，菸草個體間存在之差異可能會影響結果判讀。由於取樣方式為隨機取樣，推測可能不同位置之葉片其生理狀態可能不同，因此病毒複製情形也會有所差異。為了減少取樣間之差異，我們以 5 週大之菸草為材料，分別接種了第 4、第 5 及第 6 片本葉，並於接種後 48 小時抽取各接種葉片之全 RNA，以北方雜合法進行分析。結果顯示，不同位置之葉片，其病毒累積情形確實略有不同。接種於第 5 片本葉之病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 累積量較高(未出示資料)，且在注射過程中較易操作，故後續在進行鞘蛋白 SGP 分析實驗時，將利用 5 週大之菸草為材料，固定接種於第 5 片本葉上，並於接種後 48 小時抽取其全 RNA，以北方雜合法進行分析。

## 四、PiVX 鞘蛋白 SGP 之 3'端分析

為了要找尋 PiVX 鞘蛋白 SGP (位於 gRNA 的互補股)之 3'端邊界，我們根據

欲刪除之序列位置設計三個正向引子 CP-sgF1、CP-sgF2 及 CP-sgF3，分別和反向引子 NOS-3，以 pGR-PiVX5 為模版，進行聚合酶連鎖反應。再利用位於 TGB3 基因上之 *HpaI* 及 pGR-PiVX5 載體上之 *XmaI* 限制酶切位，建構了以轉錄起始點為基準(+1)之上游刪除突變株 F1 ( $\Delta$ -61/-44)、F2 ( $\Delta$ -61/-24)及 F3 ( $\Delta$ -61/-1) (圖八)。將 pGR-PiVX5、F1 ( $\Delta$ -61/-44)、F2 ( $\Delta$ -61/-24)及 F3 ( $\Delta$ -61/-1)分別轉型至農桿菌中，利用農桿菌注射法在 5 週大之菸草上進行接種，48 小時後再抽取植物全 RNA，以北方雜合法進行分析，所使用之探針如同前述。結果顯示除了以 MMA buffer 處理的負對照組外，各處理之樣本皆可看到病毒 gRNA 之累積(圖九 A)，表示 PiVX 於菸草細胞中確實有進行複製。同時觀察病毒鞘蛋白 sgRNA 之累積情形，可以發現 F2 ( $\Delta$ -61/-24)鞘蛋白 sgRNA 之累積量明顯比 pGR-PiVX5 少，而 F3 ( $\Delta$ -61/-1)則是完全沒有偵測到鞘蛋白 sgRNA 之表現(圖九 A)。由此可見，若要維持 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 之正常表現，至少需要保留轉錄起始點上游至-43 個核苷酸。另外，F1 ( $\Delta$ -61/-44)之鞘蛋白 sgRNA 累積量明顯多於 pGR-PiVX5 (圖九 A)，但由於 F1 ( $\Delta$ -61/-44)之病毒 gRNA 的累積也比較多，以定量軟體 ImageJ (Abramoff & Magalhaes, 2004)計算，結果顯示於相同單位之病毒 gRNA 下，F1 ( $\Delta$ -61/-44)之鞘蛋白 sgRNA 的累積量和 pGR-PiVX5 並無顯著差異(附錄一)。

## 五、PiVX 鞘蛋白 SGP 之 5'端分析

PiVX 鞘蛋白 SGP 之 5'端分析所使用之策略和 3'端分析一樣，但由於在轉錄起始點下游沒有適當的限制酶切位可供利用，故我們先在不改變胺基酸序列的前提下，於轉錄起始點下游創造一個 *ClaI* 的切位。完成 pGR-PiVX5-*ClaI* 之構築後將此質體 DNA 接種於白藜上，觀察病勢發展，確認其感染力與 pGR-PiVX5 相似(圖十)。之後即可利用 pGR-PiVX5-*ClaI* 為模版，進行以鞘蛋白 sgRNA 轉錄起

始點為基準之下游刪除突變株之構築。根據欲刪除之序列位置設計四個反向引子 CP-sgR1、CP-sgR2、CP-sgR3 及 CP-sgR4，分別和正向引子 PiVX-NheI-F 進行聚合酶連鎖反應。再利用位於 RdRp 基因上之 *NheI*，以及鞘蛋白基因上之 *ClaI* 限制酶切位，建構了以轉錄起始點為基準(+1)之下游刪除突變株 R1 ( $\Delta+70/+92$ )、R2 ( $\Delta+47/+92$ )、R3 ( $\Delta+24/+92$ )及 R4 ( $\Delta+1/+92$ )。將 pGR-PiVX5、R1 ( $\Delta+70/+92$ )、R2 ( $\Delta+47/+92$ )、R3 ( $\Delta+24/+92$ )及 R4 ( $\Delta+1/+92$ )分別轉型至農桿菌中，利用農桿菌注射法在 5 週大之菸草上進行接種，48 小時後再抽取接種葉植物全 RNA，以北方雜合法進行分析，此部份所使用之探針如同前述。結果顯示各接種 PiVX 之樣本皆可看到病毒 gRNA 之累積(圖九 B)，由於累積量相似，故可知在 48 小時內各刪除突變株之病毒複製情形和野生型 PiVX 沒有顯著差異。同時觀察病毒鞘蛋白 sgRNA 之累積狀況，可以發現 R4 ( $\Delta+1/+92$ )之累積量大約為 pGR-PiVX5 之 0.6 倍(圖九 B)。由此可見，若要維持 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 正常表現，至少需要保留轉錄起始點下游至+23 核苷酸。綜合以上結果，若要維持 PiVX 鞘蛋白 sgRNA 正常表現，至少需要保留-43 至+23 這段序列，此即為 PiVX 之鞘蛋白 SGP，共 66 個核苷酸。

## 六、PiVX 鞘蛋白 SGP 二級結構預測分析

由於 SGP 常會形成具有 stem-loop 之二級結構，此構造被認為可促進病毒 RdRp 的結合，以幫助病毒之感染(Grdzlishvili *et al.*, 2000; Li & Wong, 2006)。故我們利用 MFOLD 程式(Zuker, 1989)進行 PiVX 鞘蛋白 SGP 二級結構預測，分析結果顯示，SGP 及其附近序列確實如預期具有 stem-loop 之二級結構；經由和各刪除突變株之對照，推測此構造對於鞘蛋白 sgRNA 的累積可能是很重要的(附錄二)。上述 sgRNA 累積量明顯較正對照組少之刪除突變株 F2 ( $\Delta-61/-24$ )及 F3

( $\Delta$ -61/-1)在預測結果中皆可以觀察到此 stem-loop 結構受到改變(附錄二)，故推測此結構之破壞可能會影響鞘蛋白 sgRNA 之累積。除此之外，F2 ( $\Delta$ -61/-24)及 F3 ( $\Delta$ -61/-1)之 SGP 二級結構相同，但鞘蛋白 sgRNA 之累積量卻有差異，推測可能該二級結構之下游序列或結構可能也會影響 sgRNA 之生成。

## 七、利用 PiVX 鞘蛋白之 SGP 序列表現綠色螢光蛋白

### (一) PiVX 鞘蛋白 SGP 之複製

為了驗證我們找到之 PiVX 鞘蛋白 SGP 是具有功能性的，能夠在病毒複製的過程中正常轉錄其所負責的 sgRNA，故我們設計了分別帶有鞘蛋白 SGP 之 3' 端序列的正向引子 duSGP-F，及帶有鞘蛋白 SGP 之 5' 端序列的反向引子 duSGP-R，以聚合酶連鎖反應將鞘蛋白 SGP 進行複製，複製之位置位於 TGB3 及鞘蛋白基因之間，並在複製鞘蛋白 SGP 的過程中，同時在鞘蛋白 SGP 之 5' 端放入 *SacII*、*Sall*、*XhoI* 及 *NotI* 限制酶切位(圖十一)，以便日後用於置入其他外源基因。得到 pGR-PiVX5-duSGP 之重組載體後將其接種到 4 週大之白藜上，和接種 pGR-PiVX5 之白藜比較其病勢發展。結果顯示兩者皆於接種後七天出現病徵，且病徵型態一致，而於接種後 14 天則皆可於系統葉上觀察到病徵出現，觀察至 21 天，發現兩者之病勢發展相似(圖十二)。由此可確定，於 TGB3 基因之 3' 端外加一段鞘蛋白 SGP 序列並不會對病毒在白藜上之複製及移行有顯著影響。

### (二) 在白藜上以複製 PiVX 鞘蛋白 SGP 之方式表現綠色螢光蛋白

以 pGR-PiVX5-duSGP 為材料，並利用 *SacII* 及 *XhoI* 限制酶切位放入外源基因 EGFP，建構了 pGR-PiVX5-EGFP。此重組載體具有兩個鞘蛋白 SGP：第一個是自 TGB3 基因延伸至+23 (以鞘蛋白 sgRNA 之轉錄起始點為+1)，後面接有

EGFP 基因，第二個則是從-43 延伸至後面攜帶之鞘蛋白基因(圖十一)。以機械接種之方式將 pGR-PiVX5-EGFP 接種於白藜上，並同時接種 pGR-PiVX5 做為正對照組，接種後 7 天可以觀察到接種 pGR-PiVX5 之接種葉出現病斑，但接種 pGR-PiVX5-EGFP 之白藜則是在接種後 10 天才出現第一個病斑(圖十三 A)，且病勢發展明顯較正對照組緩慢，病徵也輕微許多。接種後 10 天，取下已出現病徵之接種葉，抽取其全 RNA，並以不同探針進行北方雜合法之分析。以 EGFP 基因專一性 DNA 探針偵測之結果顯示，接種 pGR-PiVX5-EGFP 之樣品可以看到病毒 gRNA 及 EGFP sgRNA 的累積(圖十三 B)；而利用 PiVX 鞘蛋白基因 3'端專一性 DNA 探針進行偵測，結果顯示接種 pGR-PiVX5-EGFP 之樣品和正對組皆可以看到病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 的累積，且兩樣品之累積量並無顯著差異(圖十三 C)。另外，可以看到接種 pGR-PiVX5-EGFP 之樣品，其病毒 gRNA 較正對照組略大(圖十三 C)，這是因為在病毒基因體中加入 EGFP 基因與複製的鞘蛋白 SGP 序列的關係，使病毒全長較原本多約 1 kb 左右之序列所致。

另外，也將接種 10 天後之 pGR-PiVX5-EGFP 接種葉以螢光顯微鏡進行觀察，可以看到明顯的綠色螢光表現(圖十四 A)，進一步以免疫轉漬法進行偵測，可以看到其病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白之累積(圖十四 B)。此結果顯示 pGR-PiVX5-EGFP 可以於白藜上表現病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白，表示我們複製之鞘蛋白 SGP 具有表現下游基因的能力。此外，觀察結果發現，接種 pGR-PiVX5-EGFP 之白藜其病勢發展較正對照組慢，鞘蛋白之累積量也明顯較少(圖十四 B)。

### (三) 在菸草上以複製 PiVX 鞘蛋白 SGP 之方式表現綠色螢光蛋白

由於 PiVX 只能在菸草之原生質體中進行複製，無法進行細胞間之移動(Li, 2010)，故我們將 pGR-PiVX5-EGFP5 轉型至農桿菌，藉由農桿菌注射法處理菸草，觀察 PiVX 所攜帶的 EGFP 於菸草上之表現情形。接種後 72 小時可於螢光顯微鏡下看到綠色螢光之表現(圖十五 A)，以免疫轉漬法也可偵測到病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白之累積(圖十五 B)。此結果顯示 pGR-PiVX5-EGFP 可以於菸草上表現病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白，再次證實我們複製之鞘蛋白 SGP 可以表現下游基因，且和上述觀察到相同情形：鞘蛋白之累積量明顯較正對照組少(圖十五 B)。

### 八、PiVX5<sup>C5843G</sup> 之病毒 RNA 及鞘蛋白累積分析

前人研究中顯示大部分 potexviruses 的鞘蛋白基因之轉譯起始點上游有一保守性相當高之序列 GUUAAGUU (Chen *et al.*, 2005; Côté *et al.*, 2008; Kim & Hemenway, 1997; Koenig *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2000)，此序列不僅在 gRNA 之累積上扮演重要角色 (Kim & Hemenway, 1999)，且對 sgRNA 的累積也是不可或缺 (Kim & Hemenway, 1997)。但在 potexviruses 中有一群病毒其保守性序列和上述略有不同，該群病毒之寄主範圍主要為仙人掌科植物，包括 SVX、OVX、CVX、ZVX 以及 PiVX，這群病毒在鞘蛋白基因轉譯起始點上游之保守性序列為 CUUAAGUU (Li, 2010)，第一個核苷酸為 C 而不是 G(附錄三)。為了解該核苷酸是否對於此類病毒具有特別的功能，我們以 PiVX 為材料，利用聚合酶連鎖反應製備點突變株 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>，並針對 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 於單細胞層次之病毒 RNA 及鞘蛋白累積進行分析。首先，製備生體外轉錄體(*in vitro* transcript)，並接種於菸草之原生質體，於接種後 24 及 48 小時抽取其全 RNA 及全蛋白質，分別



以北方雜合法及西方墨漬法進行分析。結果顯示在 48 小時內接種 PiVX5<sup>C5843G</sup> 之樣品，其病毒 gRNA、鞘蛋白 sgRNA (圖十六 A) 及鞘蛋白 (圖十六 B) 之累積量和正對照組並無顯著差異。由此部份實驗可得知，PiVX 第 5843 個核苷酸由 C 點突變為 G，並不會改變病毒於菸草原生質體中之複製及轉錄，且鞘蛋白之累積也不受影響。

### 九、pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 之移動能力分析

將 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 接種於 3 週大之白藜上，每片葉子接種 10 µg，每株植物共接種 3 片葉子，同時接種 pGR-PiVX5 作為正對照組。接種後 7 天可於正對照組之接種葉觀察到病徵出現，且於 14 天後其病斑呈現明顯黃斑 (圖十七 A)；而以 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 處理之接種葉則是在接種後 8 天出現病徵，病徵發展型態和正對照組相比較為輕微 (圖十七 A)。系統葉部分的觀察結果顯示，正對照組於接種後 14 天出現病徵；而以 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 處理之系統葉此時則未有病斑出現 (圖十七 A)。

為了比較植物中之病毒量是否有差異，故於接種後 14 天摘取各處理之接種葉及系統葉，以間接式 ELISA 進行分析。由分析結果中可以看到，接種 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 之接種葉其鞘蛋白累積量明顯少於正對照組；系統葉則是完全沒有偵測到病毒 (圖十七 B)。為了進一步確認 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 是否真的無法移動到白藜之系統葉上，接種後 20 天，以靈敏度較高之免疫轉漬法進行分析，結果和上述一樣，接種葉之鞘蛋白累積量較正對照組少 (圖十八 A)，系統葉則未偵測到病毒 (圖十八 B)。於接種後 30 天再次以免疫轉漬法進行測試，其結果相同 (圖十八 C)。由此可知，將 PiVX 第 5843 個核苷酸由 C 點突變為 G 後，會使病毒在

白藜接種葉之累積量下降，且無法移動至上位葉。綜合以上兩部分結果，初步推測 C<sup>5843</sup> 可能參與在 RNA-鞘蛋白之交互作用(interaction)，而將 C<sup>5843</sup> 改為 G<sup>5843</sup> 可能造成 RNA-鞘蛋白之間直接或間接之交互作用受到影響，導致 PiVX 細胞間之移動能力下降，進而影響到病毒系統性的移動。

#### 十、pGR-PiVX5-CP\*之複製及細胞間移動能力之分析

由於 *Potexvirus* 屬之病毒其細胞間的移動需要鞘蛋白之協助(Verchot-Lubicz & Ye, 2007)，故我們在進行更多實驗以釐清所看到的現象前，想先確定 PiVX 在進行細胞間之移動時是否和已研究之 potexviruses 一樣，需要鞘蛋白之參與。故我們將鞘蛋白之轉譯起始碼(start codon) AUG 突變為終止碼(stop codon) TAG，構築 pGR-PiVX5-CP\*，並將其接種於 4 週大之白藜上，同時接種 pGR-PiVX5 作為正對照組；10 天後可以看到接種 pGR-PiVX5 之接種葉已有明顯病徵，但接種 pGR-PiVX5-CP\*之接種葉則是沒有病徵(圖十九 A)。進一步抽取接種葉之蛋白質，以免疫轉漬法進行分析，確定 PiVX-CP\*無法表現鞘蛋白(圖十九 B)。接著製備其生體外轉錄體，並接種於菸草之原生質體，48 小時後抽取全 RNA，以北方雜合法進行分析，使用之探針如同前述，在曝光 5 分鐘後即可看到接種 PiVX 之樣品出現病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 的訊號，而在接種 PiVX-CP\*之樣品卻只有看到鞘蛋白 sgRNA 的累積(圖二十 A 上)；為了確定其 gRNA 是否有累積，把曝光時間增長至 18 個小時，則可偵測到病毒 gRNA 之訊號(圖二十 A 下)。此結果顯示，當 PiVX 不轉譯鞘蛋白時，病毒的複製會明顯受到影響。另外，欲確定鞘蛋白是否會影響接種葉中病毒 RNA 的累積，也將 pGR-PiVX5-CP\*機械接種於 4 週大之白藜，於接種後 10 天收取接種葉植物全 RNA，以北方雜合法進行偵測，結果顯示不僅未偵測到病毒 gRNA，也沒有看到鞘蛋白 sgRNA 之明顯累積(圖二

十 B)。此部份實驗顯示，當 PiVX 之鞘蛋白不被轉譯時，病毒在菸草原生質體中之複製會明顯受到影響，因此，本實驗無法證明 PiVX 之鞘蛋白是否參與病毒細胞間之移動。



## 肆、討論

在植物病毒中，用於分析 sgRNA 合成時之所需序列最常見的策略為：自感染性選殖株(infectious cDNA clone)製備生體外轉錄體，接著進行植物原生質體之接種，之後再萃取原生質體全 RNA，並以北方雜合法進行分析(Ayllón *et al.*, 2004; Grdzlishvili *et al.*, 2000; Li & Wong, 2006; Lin *et al.*, 2007; Renovell *et al.*, 2010)。由於此方法是在單細胞層次做分析，不僅可以避免在實驗過程中因病毒移動所造成之誤判，同時也能減少植物中其他因素之干擾，故原生質體成為研究 sgRNA 合成之相關機制最常用之系統。但並非每種病毒都適合上述方法，使用原生質體作為研究工具最大的限制在於原生質體的存活大約只能維持五天左右(Renovell *et al.*, 2010; Vives *et al.*, 2008)，若是病毒於原生質體中複製較慢，在五天以內病毒累積量太少，以致影響結果判讀時，可以利用農桿菌注射法進行分析(Renovell *et al.*, 2010)，此方法的優點在於操作方便且價格低廉，但若使用之植物為病毒之系統性寄主，則需把病毒之移動因素考慮進去，避免造成誤判。

為了測試在現有條件下何種方式最適合 PiVX 鞘蛋白 SGP 之分析，本研究製備 pGR-PiVX5。將 pGR-PiVX5 接種於菸草之原生質體，分別於接種後 24 小時、48 小時及 72 小時抽取原生質體全 RNA，並以北方雜合法進行分析。結果顯示至少要接種 48 小時後才能看到病毒 gRNA 及 sgRNA 之累積，而至 72 小時累積量更為明顯(圖六)。由於我們接種的是質體 DNA，不是 RNA 轉錄體，故病毒必須先進入細胞核中進行轉錄，待 RNA 移至細胞質，進行轉譯並產生 RdRp 之後，才能開始病毒之複製，可能因此造成病毒之累積較為緩慢。而我們選用之原生質體來自菸草，此非 PiVX 之實驗寄主，這對病毒之複製可能也會造成影響。為了能夠在短時間內觀察到病毒於原生質體中之複製，我們也嘗試利用 PiVX 系

統性感染之實驗寄主—白藜，進行原生質體之製備，期望能改善病毒之累積速度。但在嘗試了各種條件之後，始終無法製備足夠量之白藜原生質體，推測可能是培養白藜植株之條件，使葉片不適合用於原生質體之製備，故此部份實驗只有利用菸草之原生質體進行測試。

再來是農桿菌注射法之測試，將 pGR-PiVX5 轉型至農桿菌後，以注射方式接種在 5 週大之菸草上，除了在不同時間點抽取接種葉之植物全 RNA，以北方雜合法進行分析外，也測試了不同位葉之病毒累積情形。結果顯示，以 5 週大之菸草作為材料，接種於第 5 片及第 6 片本葉上，於接種後 48 小時可以看到病毒 gRNA 及 sgRNA 明顯之累積，但由於第 6 片本葉為較新生之葉片，其葉片較小，葉脈較密，在注射農桿菌時較難操作，故最後挑選第 5 片本葉進行後續實驗。和原生質體分析法比較，利用農桿菌注射法能在較短時間內偵測到病毒 gRNA 及 sgRNA 的累積，操作過程也較為簡便，並且由於不用製備植物原生質體及轉錄體，故所花費的價格也比較便宜。另外，本實驗所使用之植物為菸草，PiVX 只能於單細胞中進行複製，無法於菸草上進行細胞間之移動，所以不用將病毒移動造成之影響考慮進去。綜合上述理由，最後決定以 5 週大之菸草為材料，利用農桿菌注射法進行 PiVX 鞘蛋白 SGP 之分析。

本研究首次分析確定出 PiVX 鞘蛋白基因之轉錄起始點，將 potexviruses 中之鞘蛋白轉譯起始點上游的基因序列進行比對，可以發現具有一定的保守性(附錄三)，推測大部分 potexviruses 之轉錄起始點可能皆在此位置。轉錄起始點之定位通常是用於分析 SGP 位置及長度時之參考基準，本篇研究確切定位 PiVX 鞘蛋白基因之轉錄起始點，提供爾後該屬病毒進行鞘蛋白 SGP 及相關研究之參

考。

定位出鞘蛋白轉錄起始點之位置後，以此為基準進行 SGP 之 3'端及 5'端之分析。在分析鞘蛋白 SGP 之 3'端邊界時，發現 F1 ( $\Delta$ -61/-44)之病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 累積量皆比 pGR-PiVX5 多，經由定量軟體分析，顯示在相同單位之 gRNA 下，F1 ( $\Delta$ -61/-44)之 sgRNA 累積量和 pGR-PiVX5 並無顯著差異，也就是說 F1 ( $\Delta$ -61/-44)刪除突變株並不會影響鞘蛋白基因之轉錄。但在等量之 rRNA 下，其病毒 gRNA 累積量大約為 pGR-PiVX5 之 1.5 倍(未出示資料)，推測-61 至-44 此段序列可能具有抑制病毒 gRNA 累積之功能，故在我們將之移除後，病毒 gRNA 之累積量即顯著增加，由於此段序列除了可能作為鞘蛋白之 SGP 外，同時也是 TGB3 之基因，目前關於 *Potexvirus* 之研究並未顯示 TGB3 會參與在病毒複製之過程中(Batten *et al.*, 2003)，但在未經實驗加以證明前，我們無法確定 TGB3 之基因或是蛋白是否會參與 PiVX 之複製。F2 ( $\Delta$ -61/-24)之 gRNA 累積量和 pGR-PiVX5 相比並無顯著差異，但鞘蛋白 sgRNA 卻明顯較少，顯示-43 至-25 並非表現鞘蛋白 sgRNA 時之必要序列，但其可能具有加強 SGP 活性之功能，故若要應用於外來基因之表現，往轉錄起始點上游保留至-43 處會有較好之效果。經 3 次重複實驗確認 F3 ( $\Delta$ -61/-1)確實沒有鞘蛋白 sgRNA 之累積，推測在-23 至-2 之間即包含表現鞘蛋白 sgRNA 之必要序列。另外，除了鞘蛋白 sgRNA 累積量之變化，還可以觀察到 F3 ( $\Delta$ -61/-1)之 gRNA 的累積量明顯減少，此部份後續會加以討論。

而於鞘蛋白 SGP 之 5'端邊界之分析結果發現，刪除轉錄起始點的 R4 ( $\Delta$ +1/+92)仍舊可以看到少量鞘蛋白 sgRNA 之累積，因此無法確切定位出鞘蛋白

SGP 之 5'端邊界。推測可能要再往+1 之上游進行刪除，才會看到鞘蛋白 sgRNA 完全沒有累積之情形。若是如此，則表示 PiVX 鞘蛋白 SGP 不包含轉錄起始點，這在 *Potexvirus* 屬之病毒中是尚未被報導過的。此外，本實驗只有進行單方向之刪除突變株之構築，有可能需要在 3'端及 5'端同時刪除特定片段的情況下才能找出 SGP 之 5'端的邊界。

以農桿菌注射法進行鞘蛋白 SGP 分析時發現，在 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 之間出現 3 條條帶，推測此三條條帶可能為 sgRNAs，用以表現 TGB 1、TGB 2 及 TGB 3。為了證實以上假說，針對 TGB 1、TGB 2 及 TGB 3 分別設計專一性引子對以製備探針，考慮到此三個基因有部分重疊，故挑選之序列皆為各 ORF 之中間序列，避免造成誤判。此外，在不同刪除突變株可以看到 3 條條帶之累積量也略微不同(圖九)，這可能因為各 SGP 具有競爭關係，當有一 SGP 受到破壞，以致其 sgRNA 累積受到影響時，其他 sgRNA 之累積量也會因此而有所改變(Grdzlishvili *et al.*, 2000)。故挑選 pGR-PiVX5、R1 ( $\Delta+70/+92$ )及 R4 ( $\Delta+1/+92$ ) 進行接種，分別四種 DNA 探針進行北方雜合分析，結果以 TGB 1、TGB 2 及 TGB 3 之探針進行偵測時，皆會出現 3 條大小相似的條帶，而以鞘蛋白之探針偵測時，除了上述 3 條條帶，還可以測到鞘蛋白 sgRNA 之訊號(圖二十一)。因此推測，位於 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 之間的 3 條條帶並非可以表現 TGB 1、TGB 2 及 TGB 3 之 sgRNAs，由於以不同的專一性探針皆可偵測到相同片段，故猜測可能是病毒在複製過程中所產生之病毒重組產物。另外，在實驗過程中並未偵測到 TGB 1、TGB 2 及 TGB 3 之 sgRNAs，可能是在此處理方式下，其各 sgRNAs 之累積量不多，導致偵測上之困難，也可能是和上述 3 條條帶之大小太接近，即便有偵測到，也難以區分。

本研究一方面為了要驗證所找到之鞘蛋白 SGP 是否具有功能性，另一方面希望能利用複製鞘蛋白 SGP 的方式，將 PiVX 改造成具有應用性之病毒載體，故建構了 pGR-PiVX5-EGFP。將 pGR-PiVX5-EGFP 接種於白藜時，發現 pGR-PiVX5-EGFP 和 pGR-PiVX5 在接種後 10 天之接種葉上，其 gRNA 及 sgRNA 之累積量並無顯著差異，並且沒有看到帶有 EGFP 之病毒回復成野生病毒之情形，表示在 PiVX 的 TGB3 及鞘蛋白之間加入鞘蛋白 SGP 序列及綠色螢光蛋白基因，並不影響病毒之複製及鞘蛋白 sgRNA 之轉錄，且未觀察到 EGFP 基因被剔除之現象(圖十三)，故可推論此病毒載體之基因體組成穩定。而將 pGR-PiVX5-EGFP 接種於白藜及菸草上，皆可以看到綠色螢光蛋白之表現(圖十四和圖十五)，但在以鞘蛋白之抗體偵測時發現，接種 pGR-PiVX5-EGFP 之鞘蛋白累積量明顯少於正對照組，推測可能是 EGFP sgRNA 及鞘蛋白 sgRNA 會競爭相同之轉譯因子，導致在有 EGFP 存在的情況下，PiVX 鞘蛋白的累積會比野生型 PiVX 少。PiVX-EGFP 除了可以在接種葉累積外，以此接種葉作為材料，接種至健康之白藜時，可以看到病毒於接種葉及系統葉之累積，且在螢光顯微鏡下也可觀察到綠色螢光蛋白表現(未顯示之資料)，顯示此病毒載體確實很穩定，不會因為繼代接種而將外來基因 EGFP 剔除，並且具有系統性移行的能力。雖然在白藜上可以用螢光顯微鏡觀察到 PiVX-EGFP 之綠色螢光蛋白表現，但卻沒有辦法在直接以 UV 燈照射的情況下，看到綠色螢光累積，推測可能原因為白藜並非 PiVX 之天然寄主，病毒之複製及移行可能皆未達理想狀態，故目前也嘗試將此病毒載體接種至紅龍果上，期望能看到綠色螢光蛋白之大量累積。

植物病毒載體為目前被廣為使用之工具，其不僅在基礎研究上可用於探討基因的功能，也能應用於抗體或疫苗之製備(Gleba *et al.*, 2007)。而一好的病毒載體



必須能夠在寄主植物中大量複製，且在目標寄主上所造成之病徵輕微甚或沒有病徵。PiVX 為從紅龍果中分離出之病毒，在紅龍果中可以大量累積，其天然寄主主要為仙人掌科之植物(Li, 2010)，且目前未發現有媒介昆蟲傳播，而在寄主方面之專一性使該病毒載體於田間不易傳播至其他植物。感染 PiVX 之紅龍果病徵輕微，於先前實驗中也發現接種 PiVX-EGFP 之白藜病勢發展較野生型 PiVX 緩慢，且病徵之嚴重度也大幅下降，故推測在紅龍果上也可以看到相同現象。此外，實驗上常利用植物病毒載體進行大量表現(overexpression)及基因靜默(gene silencing)，來研究植物基因之功能(Lacomme & Chapman, 2008)。PiVX 之天然寄主主要為仙人掌科之植物，仙人掌科植物耐旱且為多年生，在目前全球暖化的環境下，其可能成為未來被廣泛應用之作物，目前關於此類植物之研究主要是針對生化特性進行分析(Stintzing & Carle, 2005)，而 PiVX 病毒載體可以作為研究仙人掌科植物基因之工具，幫助我們更了解此類作物，以便日後之應用。

由於想要探討以仙人掌科植物為寄主之 potexviruses 在鞘蛋白基因轉譯起始點上游之保守性序列 CUUAAGUU，其第一個核苷酸和其他 potexviruses 不同是否具有特殊意義，故將 C 點突變為 G，建構了 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>。將 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 接種至白藜，發現其接種葉之病勢發展較接種 pGR-PiVX5 之植株緩慢，且失去移動至系統葉的能力。由於在菸草原生質體中之分析發現 PiVX5<sup>C5843G</sup> 之病毒 RNA 的累積和野生型 PiVX 相似(圖十六 A)；此外，西方墨漬法之結果顯示，PiVX5<sup>C5843G</sup> 之鞘蛋白累積量不受影響(圖十六 B)，所以可推知此核苷酸之轉變並不會影響 PiVX 於菸草細胞中之複製、轉錄及鞘蛋白累積。而在以間接式 ELISA 偵測時，發現接種 pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> 之接種葉病毒鞘蛋白累積量較少，由於先前研究顯示 potexvirus 屬之病毒進行細胞間移動時需要其鞘蛋白

之參與(Wu *et al.*, 2011)，故初步推測可能是因為病毒突變後，其 RNA 和鞘蛋白之交互作用受到影響，進而影響病毒細胞間之移動能力。

而在加以證明此推論之前我們想先確定 PiVX 在進行細胞間之移動時是否和已研究之 potexviruses 一樣，需要鞘蛋白之參與，故建構了 pGR-PiVX5-CP\*。實驗結果顯示，當病毒之鞘蛋白不被轉譯時，於菸草原生質體中病毒之 gRNA 及 sgRNA 累積量明顯減少，而於白藜之接種葉甚至偵測不到 gRNA 之累積，推測 PiVX 在菸草之原生質體中之累積需要鞘蛋白的幫助。此現象曾在 PVX 中被發現，在 PVX 鞘蛋白基因之 5'端進行 frame-shift deletion 時，病毒無法於菸草(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)之接種葉上累積，而在菸草原生質體中，病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 累積量也有明顯下降，推測可能原因有二：其一，鞘蛋白參與在病毒的複製過程中，故當鞘蛋白不被表現時，病毒之複製受到影響，進而影響 sgRNA 之轉錄；其二，鞘蛋白藉由包被或是和 gRNA 之其他交互作用來穩定 gRNA，所以當鞘蛋白不被表現時，病毒 gRNA 較容易被降解(Chapman *et al.*, 1992)。除此之外，Sempere 等人也提出另一種看法，他們在同樣為 *Potexvirus* 屬之 *Pepino mosaic virus* (PepMV)上進行研究，發現若將鞘蛋白之轉譯起始碼突變為終止碼，病毒之 gRNA 及 sgRNA 於單細胞中之累積量會減少，但若保留鞘蛋白基因 5'端 36 個核苷酸序列，並將鞘蛋白基因其餘部分置換成綠色螢光蛋白基因，發現此重組病毒可以在單細胞中正常複製，但不能進行細胞間之移動。因此，作者認為鞘蛋白並非病毒複製所必須，但在鞘蛋白所在位置處之 ORF 在單細胞層次中具有促進病毒 RNA 累積的功能，且病毒細胞間之移動需要鞘蛋白參與(Sempere *et al.*, 2011)。另外，雖然在接種 pGR-PiVX5-CP\*之白藜接種葉上未偵測到病毒 gRNA 之累積，但卻不能因此斷定 PiVX 鞘蛋白參與在細胞間之移動，

因為在單細胞層次中即發現鞘蛋白會影響病毒 gRNA 及鞘蛋白 sgRNA 之累積，故我們無法確定所看到的現象為上述單一事件所造成的結果，抑或是和鞘蛋白影響病毒細胞間之移動所共同影響而造成的結果。由於本研究此部份實驗尚在進行，故在得到更多實驗結果前，無法確定 PiVX 之鞘蛋白在病毒複製及移動上扮演何種角色。前文提及，刪除突變株 F3 ( $\Delta$ -61/-1) 之 gRNA 的累積量於菸草原生質體中會明顯減少，可能是在鞘蛋白 sgRNA 完全不產生的情況下，其蛋白質也無法表現，此狀況和上述情形類似，可用上述推論加以解釋之。

本研究在操作過程中，分析病毒於單細胞中之 RNA 累積皆是使用菸草原生質體，但菸草並非 PiVX 之實驗寄主，以 PiVX 感染性選殖株接種在菸草上，無法於接種葉偵測到病毒之累積(Li, 2010)，故無法確定病毒在菸草原生質體中之累積狀況是否和白藜或是紅龍果上類似。理想狀況是能夠製備 PiVX 系統性寄主植物之原生質體，以此來進行單細胞層次之分析可能較無爭議。由於目前尚無法克服製備白藜原生質體之問題，期望未來可以針對此部份進行改善，以利更多 PiVX 相關之研究。

## 伍、參考文獻

- 毛青樺 (2008)。蟹爪蘭 X 病毒與紅龍果 X 病毒之分子特性與偵測。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 呂有其 (2007)。仙人掌 X 病毒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與微生物學研究所碩士論文。
- Abramoff, M. D., & Magalhaes, P. J. (2004).** Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Ayllón, M. a, Gowda, S., Satyanarayana, T., & Dawson, W. O. (2004).** cis-acting elements at opposite ends of the Citrus tristeza virus genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology* 322(1): 41-50.
- Balmori, E., Gilmer, D., Richards, K., Guilley, H., & Jonard, G. (1993).** Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* 75(7): 517-21.
- Bar-joseph, M., Yang, G., & Gafny, R. (1997).** Subgenomic RNAs : The Possible Building Blocks for Modular Recombination of Closteroviridae Genomes. *Seminars Virology* 8:113-119.
- Batten, S. J., Yoshinaris S., & Hemenway C. (2003).** MicroReview Potato virus X : a model system for virus replication , movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology* 4: 125-131.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., & Cruz, S. S. (1995).** Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant Journal* 7(6): 1045-53.
- Chapman, S., Hills, G., Watts, J., & Baulcombe, D. (1992).** Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191(1): 223-30.
- Chapman, S., Kavanagh, T., & Baulcombe, D. (1992).** Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* 2(4): 549-57.

- Chen, J., Shi, Y.-H., Adams, M. J., & Chen, J.-P. (2005).** The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of Lily virus X (genus Potexvirus). *Archives of Virology* 150(4): 825-32.
- Côté, F., Paré, C., Majeau, N., Bolduc, M., Leblanc, E., Bergeron, M. G., Bernardy, M. G., et al. (2008).** Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a new potexvirus: Malva mosaic virus. *Infection, Genetics and Evolution* 8(1): 83-93.
- Dawson, W. O., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., Bubrick, P., & Raffo, A. J. (1989).** A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses and added gene. *Virology* 172: 285-292.
- Donson, J., Kearney, C. M., Hilf, M. E., & Dawson W. O. (1991).** Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proceedings of the National Academy Sciences* 88: 7204-8.
- Eckerle, L. D., Albariño, C. G., & Ball, L. A. (2003).** Flock house virus subgenomic RNA3 is replicated and its replication correlates with transactivation of RNA2. *Virology* 317(1): 95-108.
- Eckerle, L. D., & Ball, L. A. (2002).** Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA. *Virology* 296(1): 165-76.
- Franconi, R., Di Bonito, P., Dibello, F., Accardi, L., Muller, A., Cirilli, A., Simeone, P., Donà M. G., Venuti A., & Giorgi C. (2002).** Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Research* 62(13): 3654-8.
- French, R., & Ahlquist, P. (1988).** Characterization and engineering of sequences controlling in vivo synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. *Journal of Virology* 62(7): 2411-20.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007).** Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 134-41.

- Grdzlishvili, V. Z., Chapman, S. N., Dawson, W. O., & Lewandowski, D. J. (2000).** Mapping of the Tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. *Virology* 275(1): 177-92.
- Hendy, S., Chen, Z. C., Barker, H., Santa Cruz, S., Chapman, S., Torrance, L., Cockburn, W., et al. (1999).** Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a potato virus X episomal vector. *Journal of Immunological Methods* 231(1-2): 137-46.
- Hu, B. I. N., Pillai-nair, N., & Hemenway, C. (2007).** Long-distance RNA – RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the potato virus X genome mediate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* 13(2): 267-80.
- Kim, K. H., & Hemenway, C. (1997).** Mutations that alter a conserved element upstream of the potato virus X triple block and coat protein genes affect subgenomic RNA accumulation. *Virology* 232(1): 187-97.
- Kim, K. H., & Hemenway, C. L. (1999).** Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *RNA* 5(5): 636-45.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B. (Eds.). (2012).** Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9th edn. Amsterdam: Elsevier. 1327 pp.
- Koenig, R., Lesemann, D.-E., Loss, S., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., et al. (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. *Journal of General Virology* 87(2): 439-43.
- Koey, G., Mohan, B. R., & Miller, W. a. (1999).** Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic RNA1. *Journal of Virology* 73(4): 2876-85.

- Lacomme, C., & Chapman, S. (2008).** Use of potato virus X (PVX)-based vectors for gene expression and virus-induced gene silencing (VIGS). *Current Protocols in Microbiology, Chapter 16*(February), Unit 16I.1.
- Lee, Y. S., Hsu, Y. H., & Lin, N. S. (2000).** Generation of subgenomic RNA directed by a satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus: analyses of potexvirus subgenomic RNA promoter. *Journal of Virology* 74(22): 10341-8.
- Li, W., & Wong, S. M. (2006).** Analyses of subgenomic promoters of Hibiscus chlorotic ringspot virus and demonstration of 5J untranslated region and 3J-terminal sequences functioning as subgenomic promoters. *Journal of Virology* 80(7): 3395-405.
- Li, Y. S. (2010).** Characterization, infectious clone construction and antiserum preparation of Pitaya virus X. Master Thesis, Department of Plant Pathology and Microbiology College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University.
- Lin, H.-X., Xu, W., & White, K. A. (2007).** A multicomponent RNA-based control system regulates subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *Journal of Virology* 81(5): 2429-39.
- Marsh, L. E., Dreher, T. W., & Hall, T. C. (1988).** promoter, *16*(3), 981-995.
- Miller, W. a, & Koev, G. (2000).** Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273(1): 1-8.
- Pasternak, A. O., Spaan, W. J. M., & Snijder, E. J. (2006).** Nidovirus transcription: how to make sense...? *The Journal of General Virology* 87(6): 1403-21.
- Renovell, A., Gago, S., Ruiz-Ruiz, S., Velázquez, K., Navarro, L., Moreno, P., Vives, M. C., & Guerri J. (2010).** Mapping the subgenomic RNA promoter of the Citrus leaf blotch virus coat protein gene by Agrobacterium-mediated inoculation. *Virology* 406(2): 360-9.

- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005).** Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* 49(2): 175-94.
- Sztuba-Solińska, J., Stollar, V., & Bujarski, J. J. (2011).** Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology* 412(2): 245-55.
- van der Kuyl A. C., Langereis, K., Houwing, C. J., Jaspars, E. M., & Bol, J. F. (1990).** cis-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNAs in vitro. *Virology* 176(2): 346-54.
- van der Kuyl A. C., Neeleman, L., & Bol, J. F. (1991).** Deletion analysis of cis- and trans-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNA 3 in vivo. *Virology* 183(2), 687-94.
- Verchot-Lubicz, J., & Ye, C. (2007).** Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology* 88(6): 1643-55.
- Vives, M. C., Martin, S., Ambros S., Renovell, A., Navarro, L., Pina, J. A., Moreno, P., & Guerri, J. (2008).** Development of a full-genome cDNA clone of Citrus leaf blotch virus. *Molecular Plant Pathology* 9(6): 787-97.
- Wang, J., & Simon, A. E. (1997).** Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus in vivo and in vitro. *Virology* 232(1): 174-86.
- Wu, C. H., Lee, S. C. & Wang, C. W. (2011).** Viral protein targeting to the cortical endoplasmic reticulum is required for cell-cell spreading in plants. *Journal of Cell Biology* 193(3): 521-35.
- Yang, G., Mawassi, M., Gofman, R., Gafny, R., & Bar-Joseph, M. (1997).** Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective citrus tristeza virus molecules. *Journal of Virology* 71(12): 9800-2.
- Zhang, G., Slowinski, V., & White, K. A. (1999).** Subgenomic mRNA regulation by a distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. *RNA* 5(4): 550-61.



**Zuker, M. (1989).** On finding all suboptimal folding of an RNA molecule. *Science* 244(4900): 48-52.

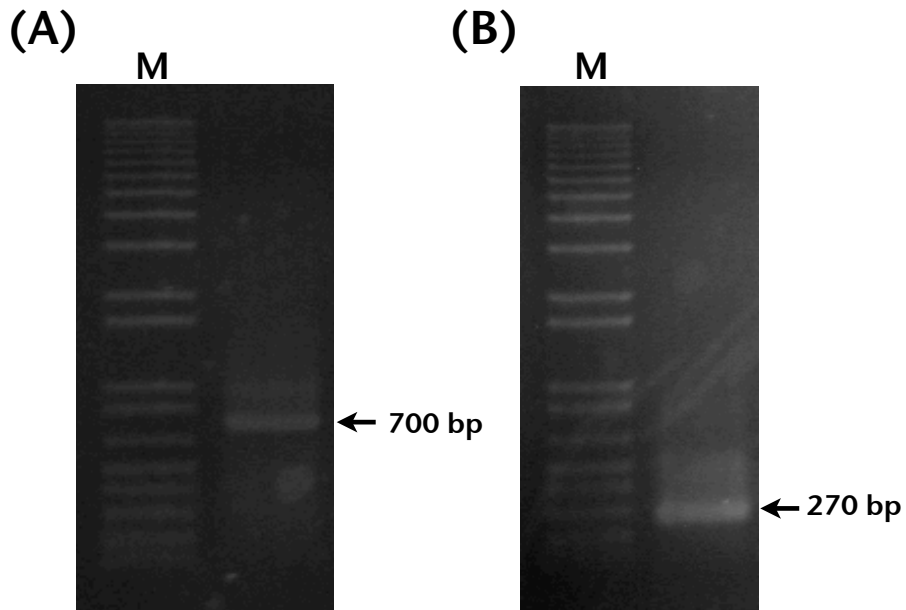


陸、附表

表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. The primers used in this study

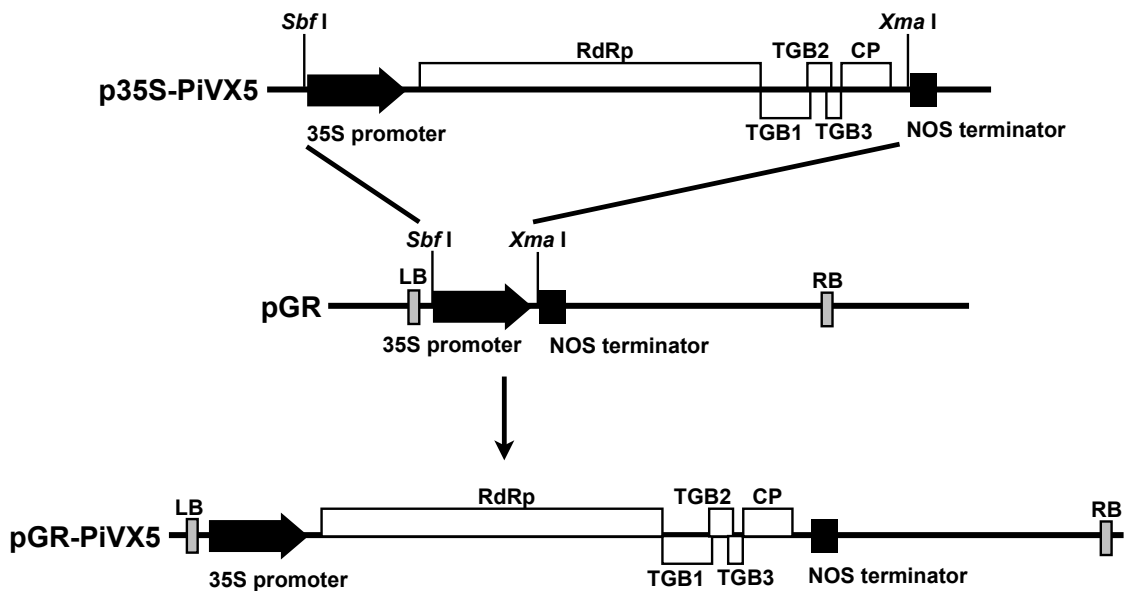
Primer name	Sequence (5'-3')
GeneRacer 5' primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
PiVX-CP-R1	TATAGCGGCCCTCTGGGGAGGGAAGAAGTTGGA
GeneRacer 5' Nested primer	GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA
PiVX-CP-R2	CCATTATCGAAGCAGTAGTTGACGAGC
PiVX-sgF1	CATAGCAGCGGTGAATAACCGC
PiVX-sgF2	GCTTAAGTTTTAGCTCTAGTTGTG
PiVX-sgF3	GAAAATAACTCCATGGCTACTC
NOS-3	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA
PiVX-CP-ClaI-F	CCGGCCCTTTCCAAACCCTATCGATGAGCCAACTCACTGCAC
PiVX-CP-ClaI-R	GTGCAGTGAGTTGGCTCATCGATAGGGTTTGGAAAGGGCCGG
PiVX-NheI-F	GTGTTTGCTAGCTACGACTGATGG
PiVX-sgR1	GTGGGGTTAGTTCTTGACCC
PiVX-sgR2	CGAGGATGAAGATTGTGCTGTTTG
PiVX-sgR3	GAGTAGCCATGGAGTTAGTTTTTC
PiVX-sgR4	ACAACTAGAGCTAAAACTTAAGCG
PiVX-octa-F	GCAGCGGTGAATAACCGTTAAGTTTTAGCTCTAGTTGTG
PiVX-octa-R	CACAACTAGAGCTAAAACTTAACCGTTATTCACCGCTGC
duSGP-F	CTCGAGGCGGCCCATAGCAGCGGTGAATAACC
duSGP-R	GTCGACCCGCGGTTGAGTAGCCATGGAGTTAG
SacII-EGFP-F	CCGCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
XhoI-EGFP-R	CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
CP-stop-F	CTAGTTGTAAAATAACTCCTAGGCTACTCAAACAGCAC
CP-stop-R	GTGCTGTTTGAGTAGCCTAGGAGTTAGTTTTCACAACTAG



圖一、以感染p35S-PiVX5之白藜全RNA進行5' RACE，以擴增病毒鞘蛋白次基因體RNA之5'端片段。(A)第一階段聚合酶連鎖反應之產物(700 bp)以1% agarose gel進行電泳分析之結果。(B)第二階段巢式聚合酶連鎖反應之產物(270 bp)以1% agarose gel進行電泳分析之結果。M為1 kb plus DNA ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)。

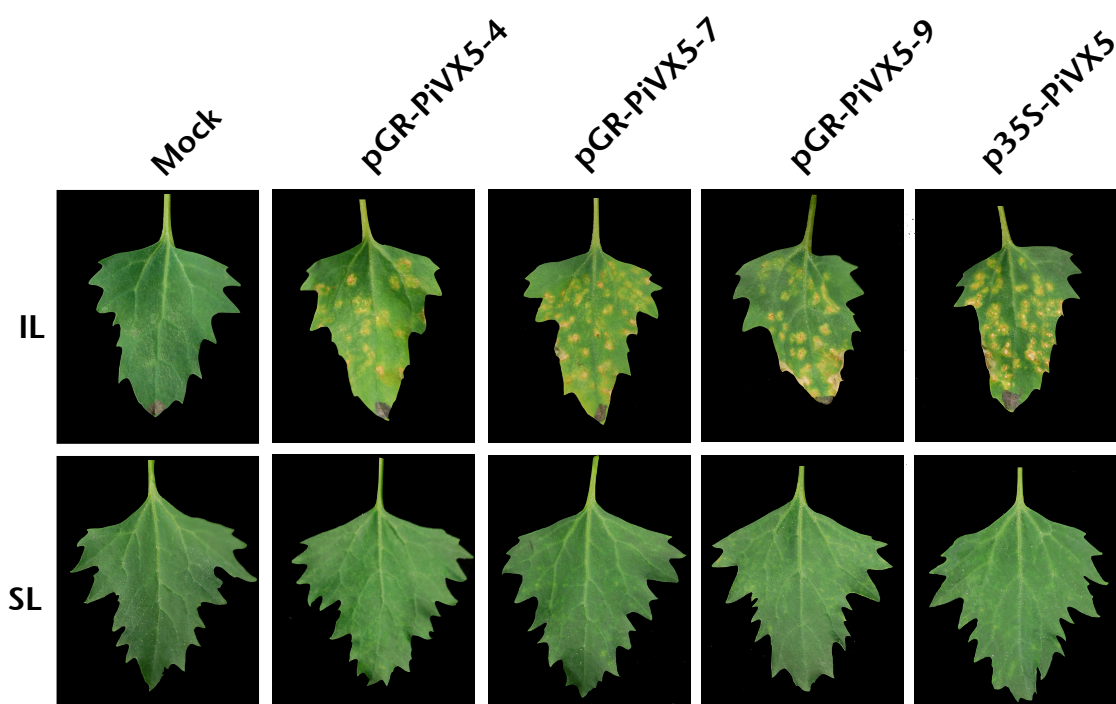
Fig. 1. The 5' terminal fragment of CP sgRNA amplified from p35S-PiVX-infected *C. quinoa* total RNA by 5' RACE method. (A) Analysis of PCR product (700 bp) by 1% agarose gel electrophoresis. (B) Analysis of nested PCR product (270 bp) by 1% agarose gel electrophoresis. Lane M: 1 kb plus DNA ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada).





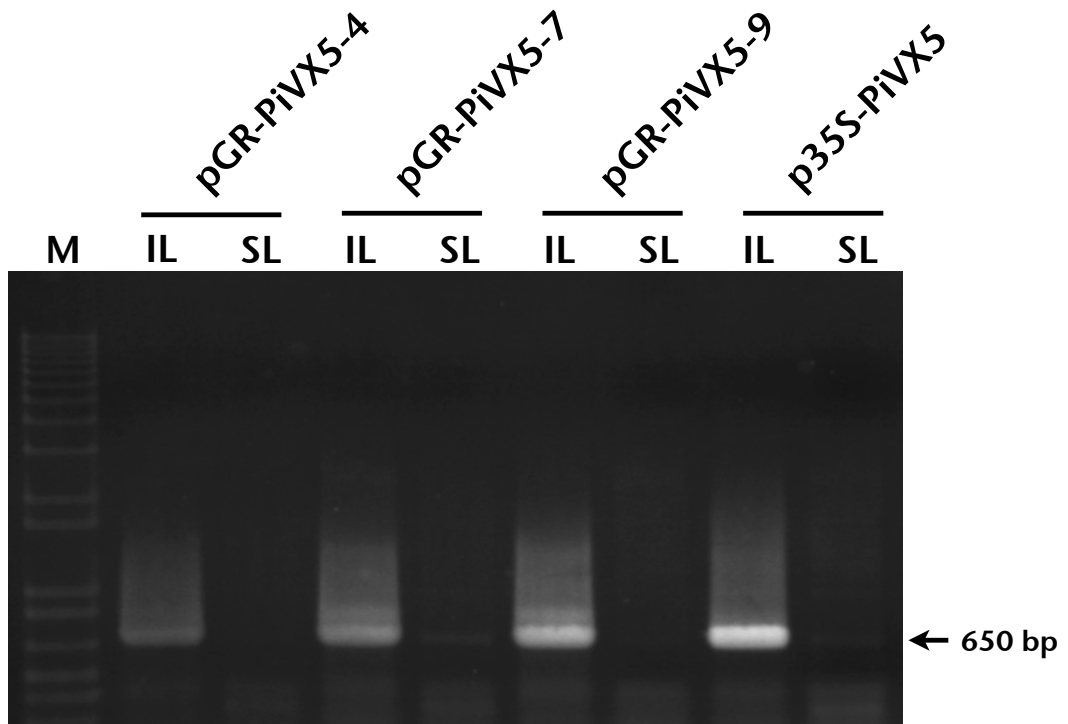
圖三、 pGR-PiVX5之構築策略示意圖。利用*Sbf*I和*Xma*I限制酶切位，將PiVX病毒全長cDNA連同35S啟動子，從p35S載體上置換到pGR載體上，以建構pGR-PiVX5。

Fig. 3. Schematic structure of pGR-PiVX5 construction. The *Sbf*I - *Xma*I fragment covering the PiVX full length cDNA clone together with 35S promoter was moved from p35S vector into pGR vector for pGR-PiVX5 construction.



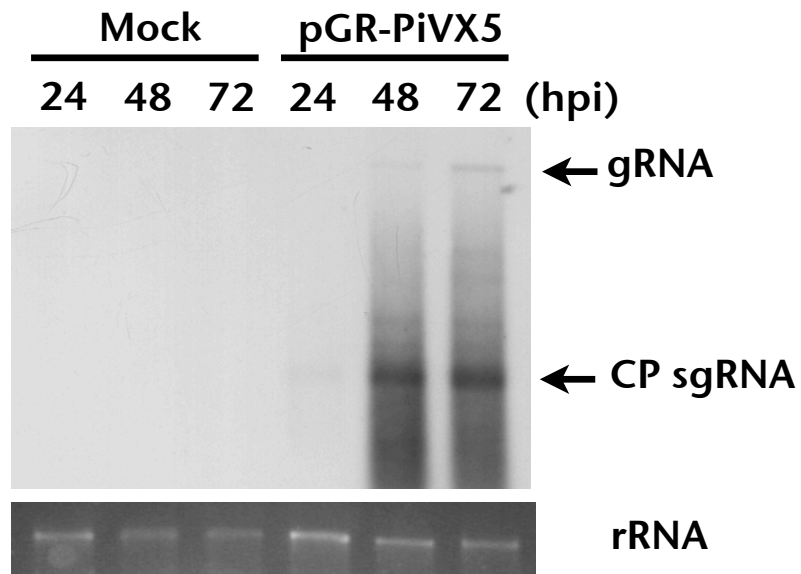
圖四、pGR-PiVX5-4、pGR-PiVX5-7、pGR-PiVX5-9及p35S-PiVX5於白藜上之感染力測試。接種後14天之病徵圖。Mock為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。IL為接種葉，SL為系統葉。

Fig. 4. Infectivity assay of pGR-PiVX5-4, pGR-PiVX5-7, pGR-PiVX5-9 and p35S-PiVX5 on *C. quinoa*. Symptoms caused by each clone at 14 days post inoculation. Mock: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. IL: inoculated leaf, SL: systemic leaf.



圖五、pGR-PiVX5-4、pGR-PiVX5-7、pGR-PiVX5-9及p35S-PiVX5接種於白藜之後，病毒RNA累積之情形。接種後14天，以反轉錄聚合酶連鎖反應分析各處理之接種葉及系統葉上病毒累積之情形。預期之650 bp條帶以箭頭標示。p35S-PiVX5為正對照組。M為1 kb plus DNA ladder。IL為接種葉，SL為系統葉。

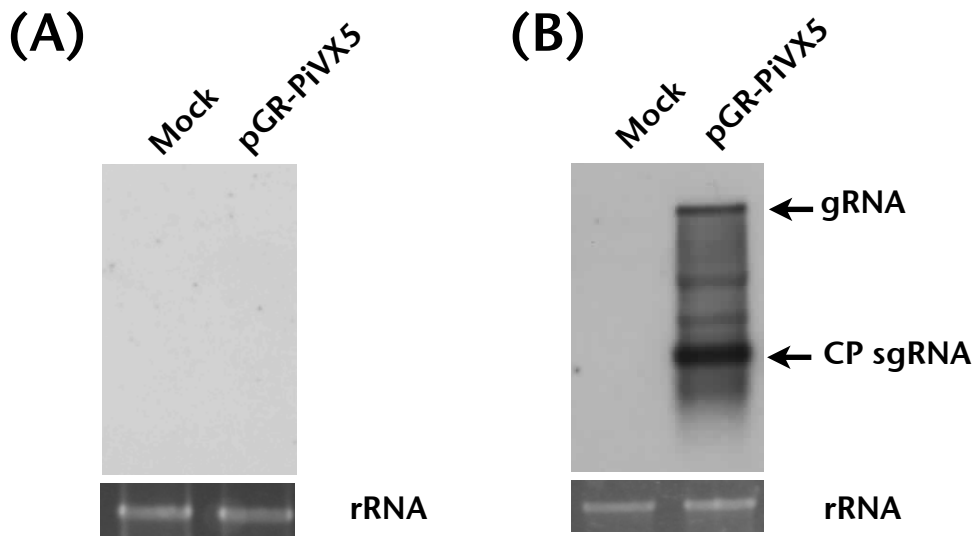
Fig. 5. Viral RNA accumulation of pGR-PiVX5-4, pGR-PiVX5-7, pGR-PiVX5-9 and p35S-PiVX5 on inoculated *C. quinoa*. Total RNA of inoculated and systemic leaves at 14 dpi of each treatment were analyzed by RT-PCR. The expected 650 bp fragment is indicated by arrow. Lane M: 1 kb plus DNA ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). IL: inoculated leaf, SL: systemic leaf.



圖六、PiVX鞘蛋白SGP分析方法之初步測試-原生質體分析法結果。將pGR-PiVX5質體DNA接種於菸草之原生質體，接種後24小時、48小時及72小時分別抽取原生質體全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析之結果。Mock為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。gRNA為病毒基因體RNA (gnomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA (subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。

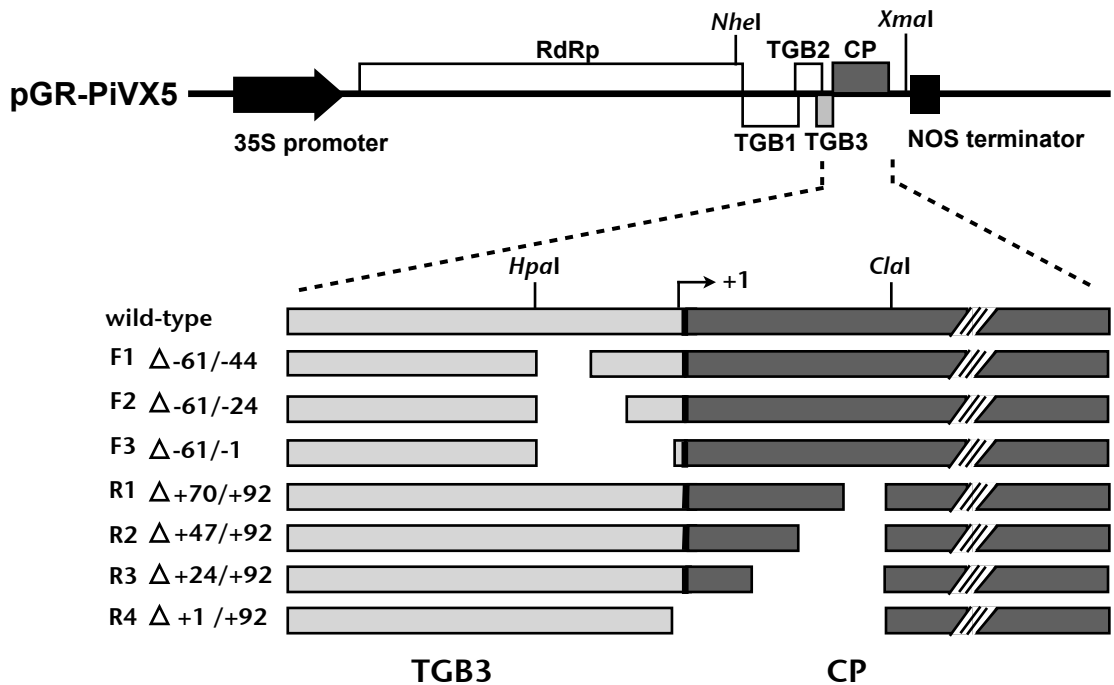
Fig. 6. Pretest of PiVX CP SGP analysis –protoplast assay. *N. benthamiana* protoplasts were inoculated by pGR-PiVX5 plasmid DNA. After 24, 48 and 72 hours of inoculation, total RNA were extracted from protoplasts, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to 3' terminus of PiVX CP gene. Mock: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs are served as loading control.





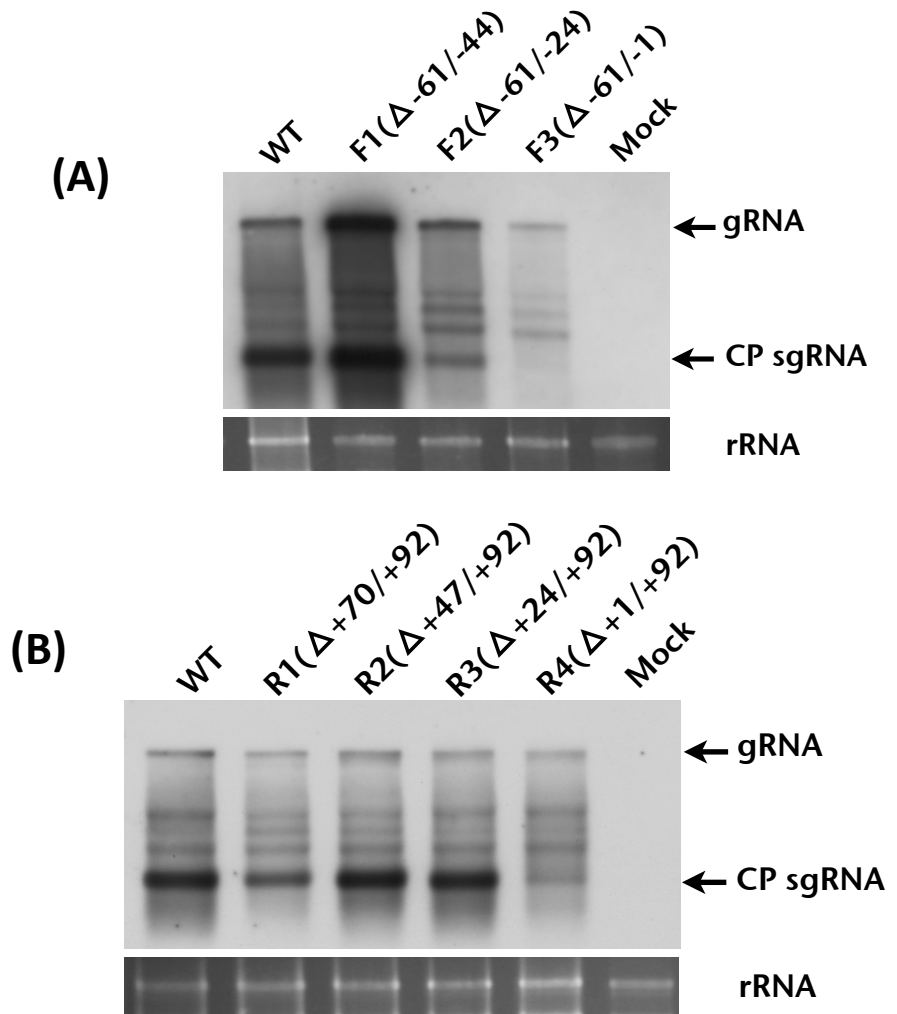
圖七、PiVX鞘蛋白SGP分析方法之初步測試-農桿菌注射法結果。將pGR-PiVX5質體DNA轉型至農桿菌，並利用農桿菌注射法於5週大之菸草進行接種試驗，每棵植物接種3片葉片，接種後24小時(A)及48小時(B)隨機採取一片接種夜，抽取其全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析之結果。Mock為接種MMA buffer之樣品。gRNA為病毒基因體RNA (genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA (subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。

Fig. 7. Pretest of PiVX CP SGP –agroinfiltration assay. *N. benthamiana* plants were inoculated by pGR-PiVX5 plasmid DNA with agroinfiltration (3 leaves/plant). After 24 (A) and 48 (B) hours of inoculation, total RNA were extracted from inoculated leaves, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to 3' terminus of PiVX CP gene. Mock: samples were inoculated by MMA buffer. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs were served as loading control.



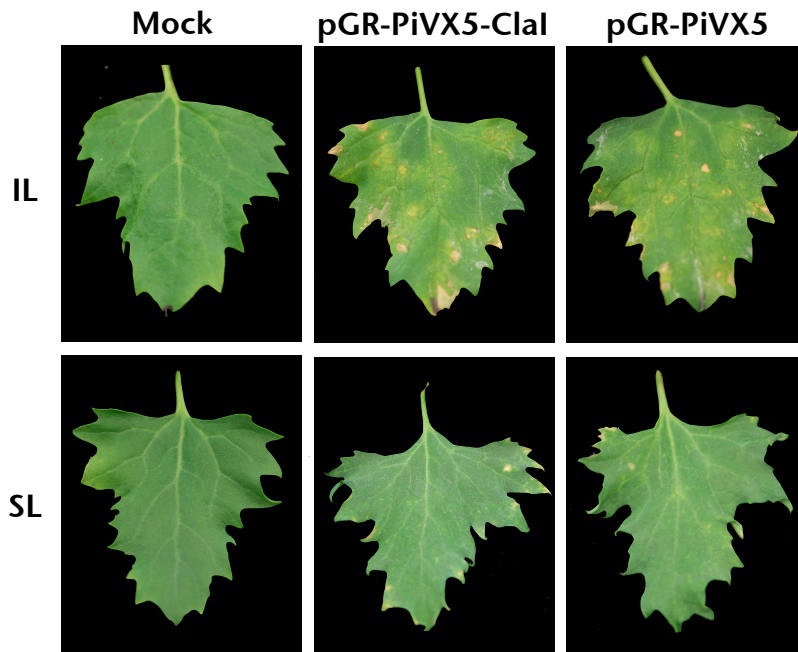
圖八、pGR-PiVX5刪除突變株之構築示意圖。以鞘蛋白基因之轉錄起始點為基準(+1)，分別建構了上游突變株F1 ( $\Delta$ -61/-44)、F2 ( $\Delta$ -61/-24)及F3 ( $\Delta$ -61/-1)和下游突變株R1 ( $\Delta$ +70/+92)、R2 ( $\Delta$ +47/+92)、R3 ( $\Delta$ +24/+92)及R4 ( $\Delta$ +1/+92)，空白之部分即為缺失之片段。

Fig. 8. Schematic structure of pGR-PiVX5 deletion mutants construction. Construction of upstream mutants F1 ( $\Delta$ -61/-44), F2 ( $\Delta$ -61/-24), F3 ( $\Delta$ -61/-1) and downstream mutants R1 ( $\Delta$ +70/+92), R2 ( $\Delta$ +47/+92), R3 ( $\Delta$ +24/+92), R4 ( $\Delta$ +1/+92) relative to the transcription start site of CP gene (+1). The gaps represent the deleted sequences.



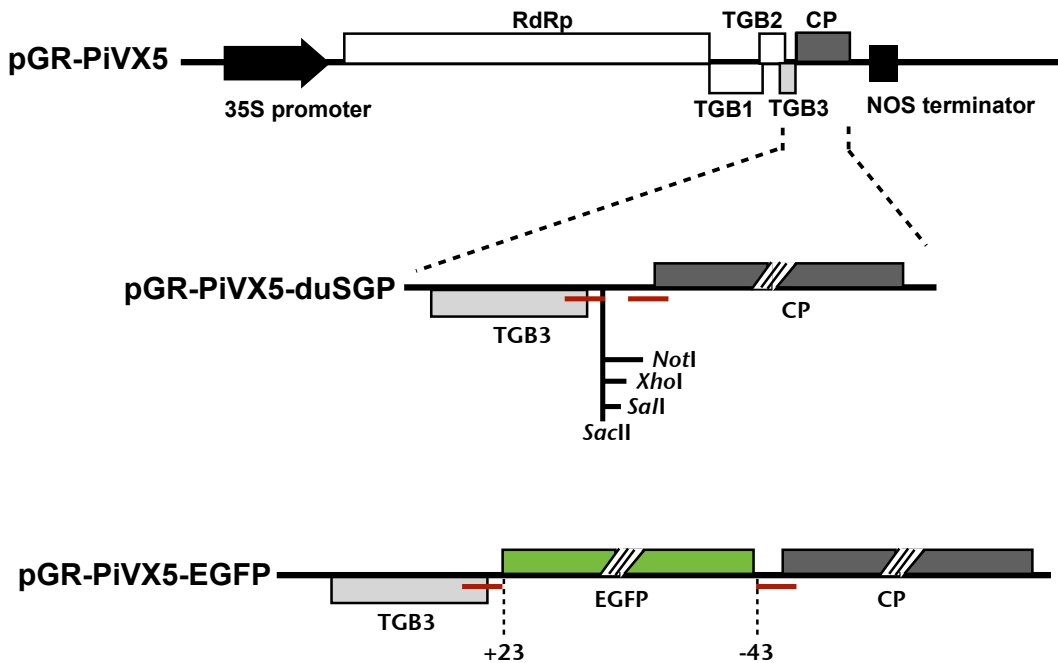
圖九、PiVX鞘蛋白SGP之3'端及5'端之分析結果。藉由農桿菌注射法於菸草上進行接種，48小時後抽取植物全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析之結果。(A)為鞘蛋白SGP 3'端之分析結果。(B)為鞘蛋白SGP 5'端之分析結果。WT為接種pGR-PiVX5之樣品。Mock為接種MMA Buffer之樣品。gRNA為病毒基因體RNA (genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA (subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。

Fig. 9. Mapping of the boundaries of PiVX CP SGP. *N. benthamiana* plants were inoculated by each plasmid clone with agroinfiltration (3 leaves per plant). After 48 hours of inoculation, total RNA were extracted from inoculated leaves, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to 3' terminus of PiVX CP gene. (A) Mapping of the 3' boundary of CP SGP. (B) Mapping of the 5' boundary of CP SGP. WT: samples were inoculated by pGR-PiVX5. Mock: samples were inoculated by MMA buffer. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs were served as loading control.



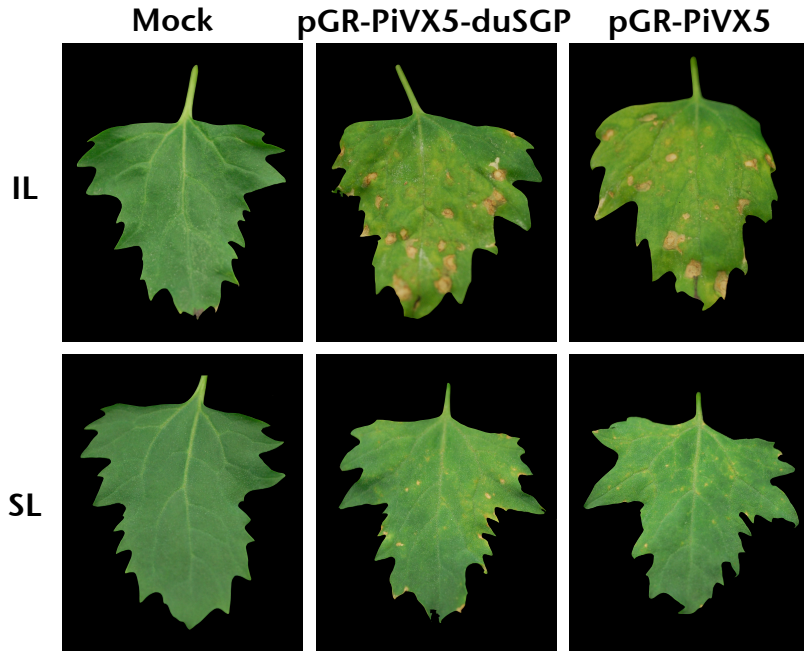
圖十、pGR-PiVX5-ClaI與pGR-PiVX5於白藜上之感染力測試。接種21天後之病徵圖。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。IL為接種葉，SL為系統葉。

Fig. 10. Infectivity assay of pGR-PiVX5-ClaI and pGR-PiVX5 on *C. quinoa*. Symptoms caused by pGR-PiVX5-ClaI and pGR-PiVX5 at 21 days post inoculation. M: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. IL: inoculated leaf, SL: systemic leaf.



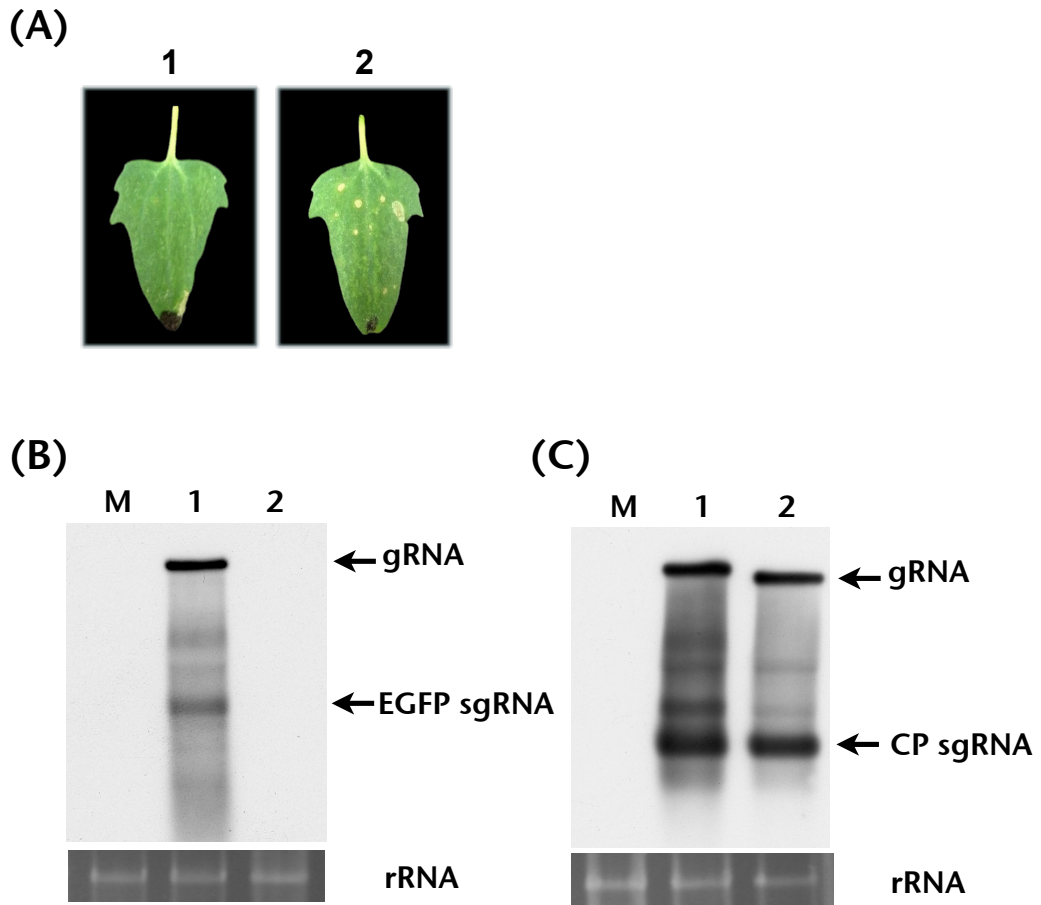
圖十一、 pGR-PiVX5-EGFP之構築策略示意圖。利用聚合酶連鎖反應將鞘蛋白SGP(紅色線條)進行複製，複製過程同時置入*SacII*、*SalI*、*XhoI*及*NotI*限制酶切位，以建構pGR-PiVX5-duSGP。再利用*SacII*及*XhoI*將外源基因EGFP插入TGB3及CP之間，以完成pGR-PiVX5-EGFP之構築。此重組載體具有兩個鞘蛋白SGP：第一個是自TGB3基因延伸至+23(以鞘蛋白sgRNA轉錄啟始點為+1)，後面接有EGFP基因，第二個則是從-43(以鞘蛋白sgRNA轉錄啟始點為+1)延伸至後面攜帶之鞘蛋白基因。

Fig. 11. Schematic structure of pGR-PiVX5-EGFP construction. PCR was used to duplicate SGP (red line) with *SacII*, *SalI*, *XhoI* and *NotI* cutting sites for pGR-PiVX5-EGFP construction. Following that, the EGFP gene was inserted between TGB3 and CP genes with the help of *SacII* and *XhoI* digestion and ligation for pGR-PiVX5-EGFP construction. There are two CP SGPs in pGR-PiVX5-EGFP: one at TGB3 gene extending to +23 (the transcription start site of CP sgRNA was +1), the other at -43 (the transcription start site of CP sgRNA was +1) extending to CP gene.



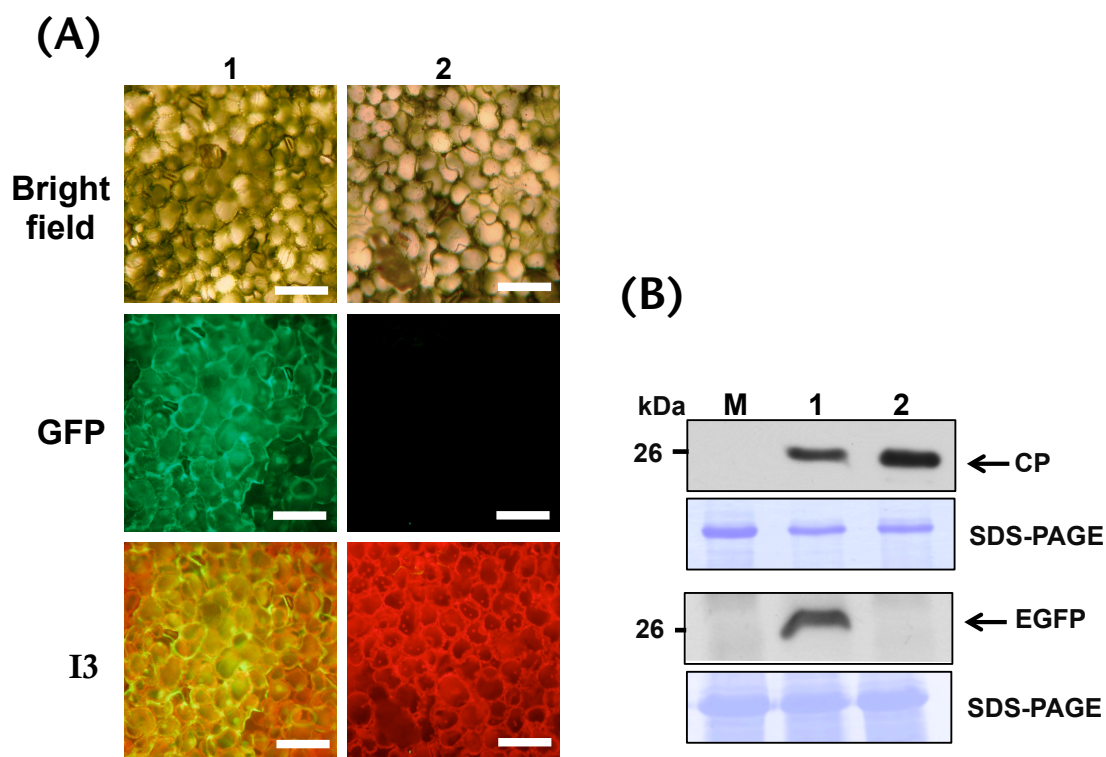
圖十二、 pGR-PiVX5-duSGP與pGR-PiVX5於白藜上之感染力測試。接種21天後之病徵圖。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品，作為負對照組。接種pGR-PiVX5之樣品為正對照組。IL為接種葉，SL為系統葉。

Fig. 12. Infectivity assay of pGR-PiVX5-duSGP and pGR-PiVX5 on *C. quinoa*. Symptoms caused by pGR-PiVX5-duSGP and pGR-PiVX5 at 21 days post inoculation. M: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. IL: inoculated leaf, SL: systemic leaf.



圖十三、 pGR-PiVX5-EGFP與pGR-PiVX5於白藜上之病徵及RNA累積之情形。(A)接種後10天之接種葉病徵圖。(B)接種後10天，抽取接種葉全RNA，使用EGFP基因專一性DNA探針進行北方雜合分析之結果。(C)接種後10天，抽取接種葉全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析之結果。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5-EGFP之白藜樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。gRNA為病毒基因體RNA (genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA (subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。

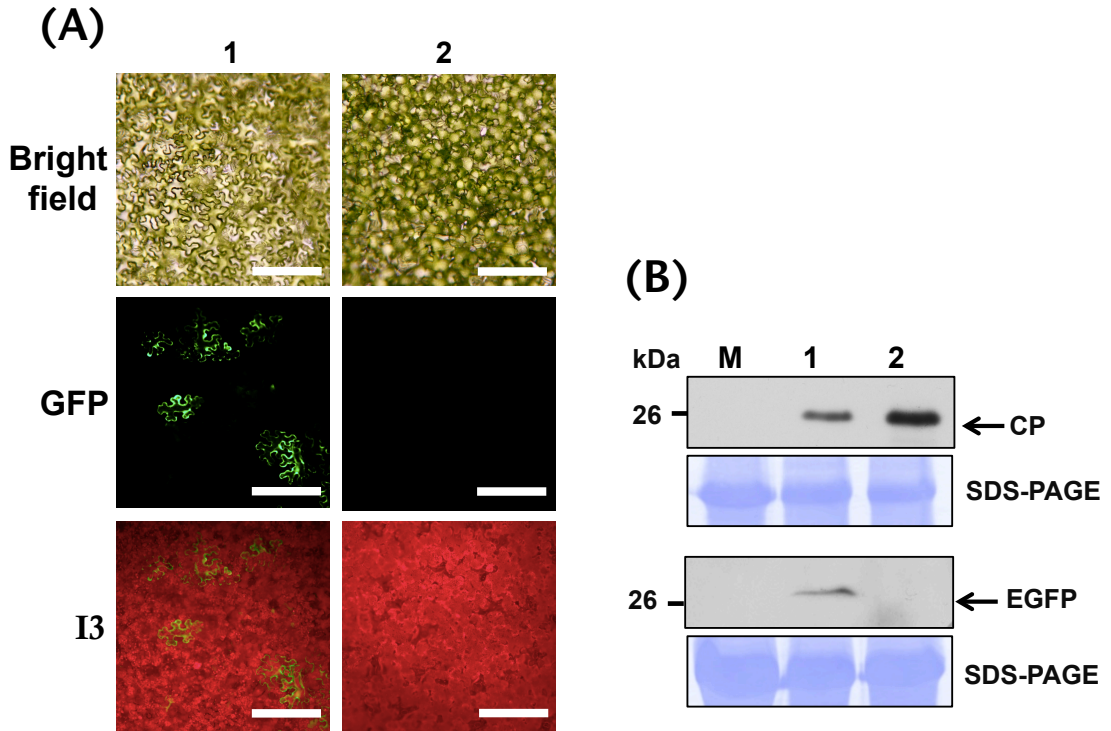
Fig. 13. Symptoms and RNA accumulation of pGR-PiVX5-EGFP and pGR-PiVX5 on inoculated *C. quinoa*. (A) Symptoms caused by pGR-PiVX5-EGFP and pGR-PiVX5 at 10 dpi. *C. quinoa* plants were inoculated by pGR-PiVX5-EGFP and pGR-PiVX5 plasmid DNA. After 10 days of inoculation, total RNA were extracted from inoculated leaves, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to EGFP gene (B) and PiVX CP gene (C). M: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: samples were inoculated by pGR-PiVX5-EGFP. 2: samples were inoculated by pGR-PiVX5. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs were served as loading control.



圖十四、pGR-PiVX5-EGFP於白藜上之EGFP表現情形。(A)接種後10天，以螢光顯微鏡觀察接種葉表現螢光情形，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  $\mu\text{m}$ 。(B)接種後10天，以免疫轉漬法分析接種葉中病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白之表現。鞘蛋白及綠色螢光蛋白以箭頭標示。SDS-PAGE為loading control。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5-EGFP之白藜樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。

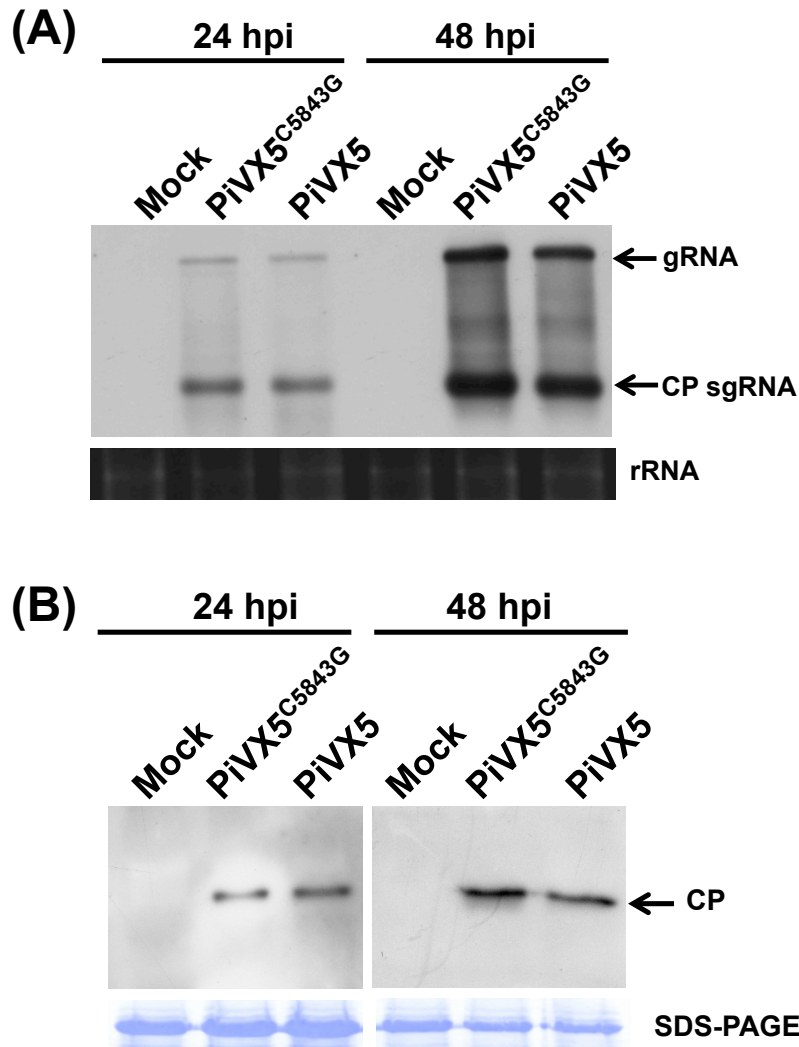
Fig. 14. The green fluorescence expression of pGR-PiVX5-EGFP on *C. quinoa* plants. After 10 days of inoculation, the leaves inoculated pGR-PiVX5-EGFP were observed using an epifluorescence microscope, and proteins were analyzed by western blot. (A) Microscopic images of inoculated leaves under visible light, and UV light using Chroma filter set 41020 (GFP) and I3 filter. White line: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Western blot analysis of inoculated leaves. CP and EGFP are indicated by arrows. SDS-PAGE as loading control. M: sample was inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: sample was inoculated by pGR-PiVX5-EGFP. 2: sample was inoculated by pGR-PiVX5.





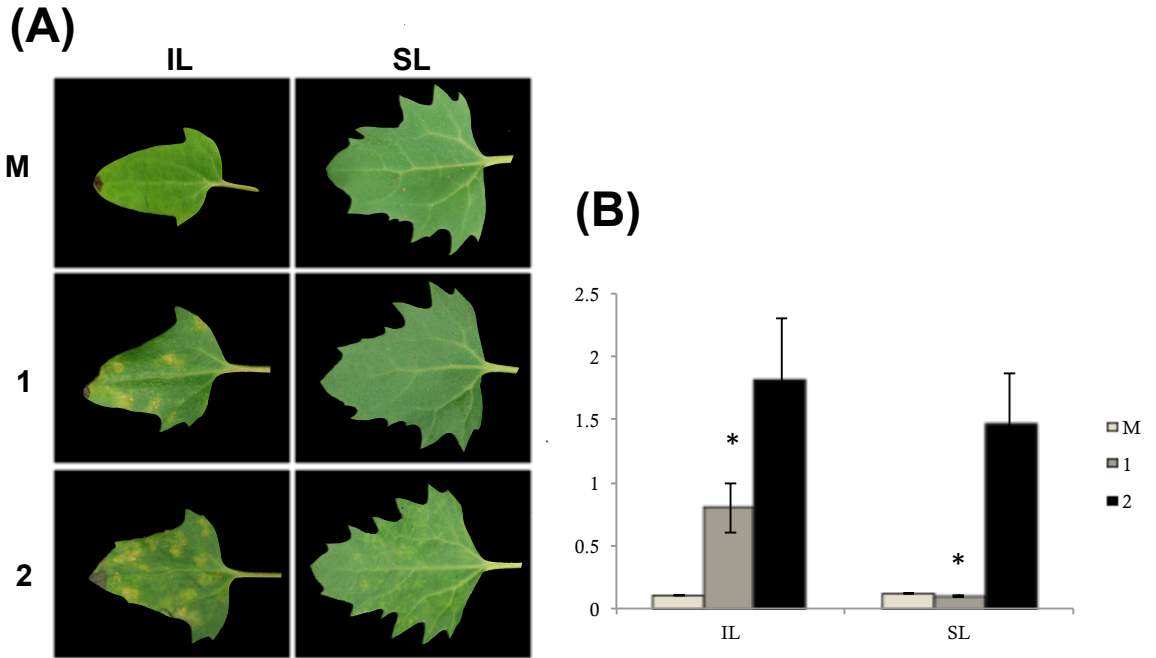
圖十五、pGR-PiVX5-EGFP於菸草上之EGFP表現情形。(A)接種後72小時，以螢光顯微鏡觀察接種葉螢光表現情形，分別以可見光(bright field)、Chroma 41020濾鏡(GFP)及I3濾鏡觀察。白色線條代表250  $\mu\text{m}$ 。(B)接種後72小時，接種葉以免疫轉漬法分析病毒鞘蛋白及綠色螢光蛋白之表現。鞘蛋白及綠色螢光蛋白以箭頭標示。SDS-PAGE為loading control。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5-EGFP之菸草樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。

Fig. 15. The green fluorescence expression of pGR-PiVX5-EGFP on *N. benthamiana* plants. After 72 hours of inoculation, the leaves inoculated pGR-PiVX5-EGFP were observed using an epifluorescence microscope, and proteins were analyzed by western blot. (A) Microscopic images of inoculated leaves under visible light, and UV light using Chroma filter set 41020 (GFP) and I3 filter. White line: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Western blot analysis of inoculated leaves. CP and EGFP are indicated by arrows. SDS-PAGE as loading control. M: sample was inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: sample was inoculated by pGR-PiVX5-EGFP. 2: sample was inoculated by pGR-PiVX5.



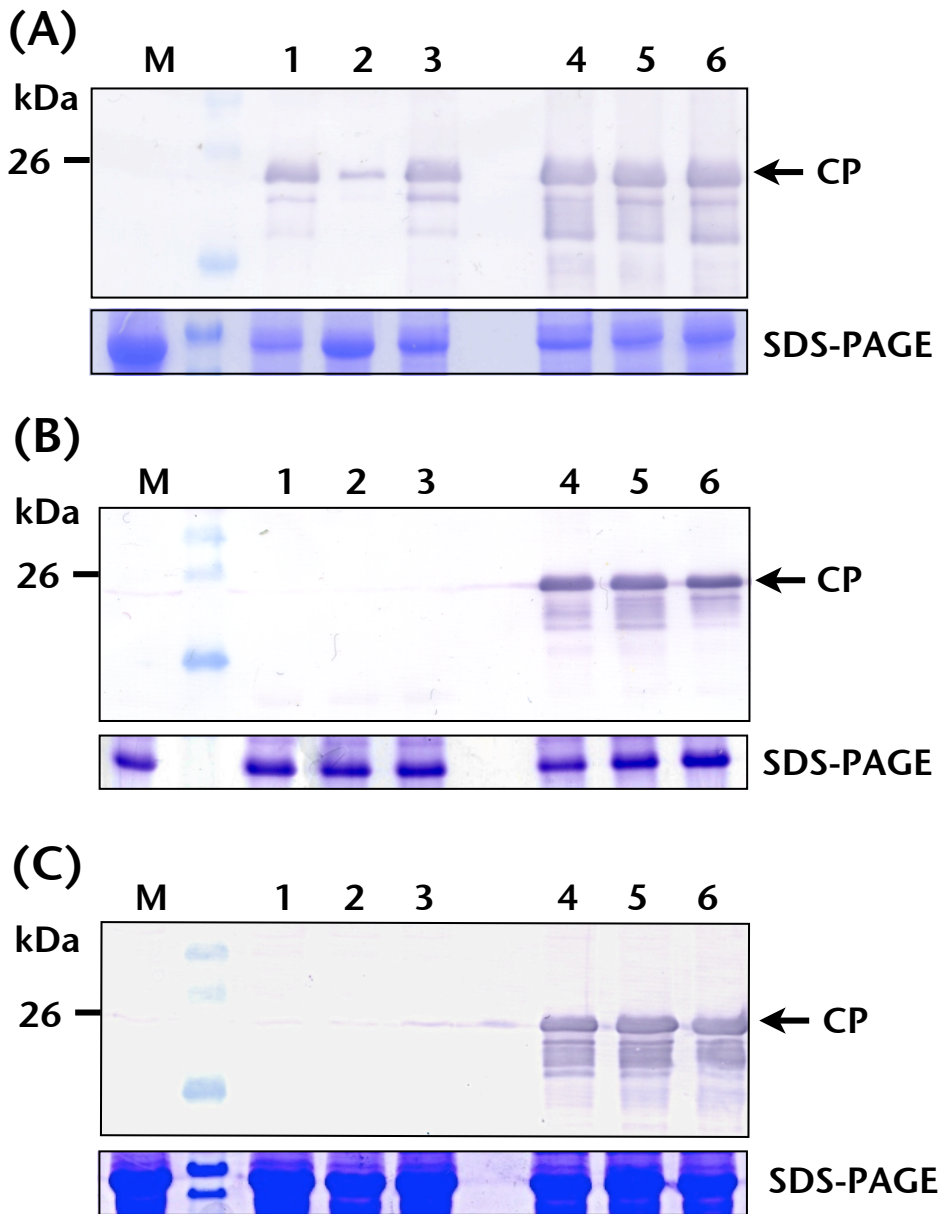
圖十六、以北方雜合法及西方墨漬法分析 PiVX5<sup>C5843G</sup>與PiVX5於菸草原生質體中之病毒RNA (A)及鞘蛋白(B)累積情形。(A)將生體外轉錄體接種至於草原生質體中，接種後24小時及48小時抽取原生質體全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析。(B)將生體外轉錄體接種至於草原生質體中，接種後24小時及48小時抽取原生質體全蛋白質，以西方墨漬法進行分析。Mock為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。gRNA為病毒基因體RNA(genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA(subgenomic RNA)，CP為PiVX鞘蛋白，以上三者皆以箭頭標示。rRNA及SDS-PAGE為loading control。

Fig. 16. Northern blot and western blot analysis of viral RNA and CP accumulation of PiVX5<sup>C5843G</sup> and PiVX5 in *N. benthamiana* protoplasts. (A) After 24 and 48 hours of RNA transcript inoculation, total RNA were extracted from protoplasts, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to 3' terminus of PiVX CP gene. (A) After 24 and 48 hours of RNA transcript inoculation, total protein were extracted from protoplasts, and analyzed by western hybridization Mock: samples was inoculated ddH<sub>2</sub>O. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs and SDS-PAGE are served as loading control.



圖十七、pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>與pGR-PiVX5於白藜上之感染性測試。(A)接種後14天之病徵觀察結果。(B)接種後14天，以PiVX鞘蛋白抗血清進行間接式ELISA分析之結果。以*t-test*進行統計分析，計算出兩者p值皆小於0.05，顯示接種pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>及接種pGR-PiVX5之樣品的接種葉及系統葉之鞘蛋白量有顯著差異。IL為接種葉，SL為系統葉。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>之樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。每種處理有6重複。\*表示有顯著差異。

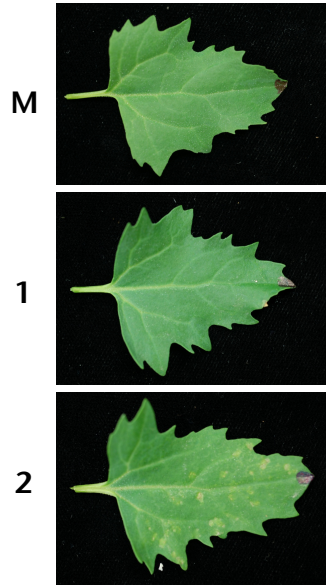
Fig. 10. Infectivity assay of pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> and pGR-PiVX5 on *C. quinoa*. After 14 days of inoculation, the plants inoculated pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> and pGR-PiVX5 were observed and analyzed by I-ELISA. (A) Symptoms caused by pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> and pGR-PiVX5 at 14 dpi. (B) I-ELISA analysis of inoculated and systemic leaves by PiVX CP antiserum. Statistical analysis by *t-test* at p value <0.05 indicated that there is significant difference of CP level on the inoculated and systemic leaves between pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup> and pGR-PiVX5-inoculate plants. IL: inoculated leaf, SL: systemic leaf. Mock: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: samples were inoculated by pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>. 2: samples were inoculated by pGR-PiVX5. Each treatment had six duplicates. \* means significant difference.



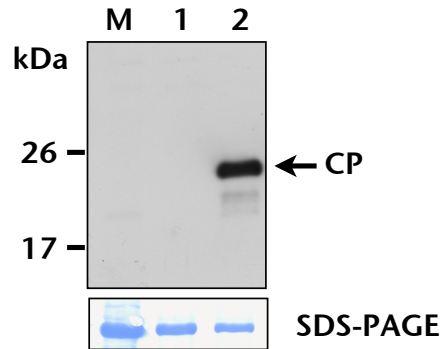
圖十八、以免疫轉漬法分析pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>與pGR-PiVX5接種白藜之結果。(A)接種後20天接種葉之分析結果。(B)接種後20天系統葉之分析結果。(C)接種後30天系統葉之分析結果。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1、2及3為接種pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>之三重複樣品。4、5及6為接種pGR-PiVX5之三重複樣品。

Fig. 18. Western blot analysis of CP accumulation of PiVX5<sup>C5843G</sup> and PiVX5 in *C. quinoa* plants. (A) Western blot analysis of inoculated leaves at 20 dpi. (B) Western blot analysis of systemic leaves at 20 dpi. (C) Western blot analysis of systemic leaves at 30 dpi. Mock: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1, 2 and 3: samples were inoculated by pGR-PiVX5<sup>C5843G</sup>. 4, 5 and 6: samples were inoculated by pGR-PiVX5.

(A)

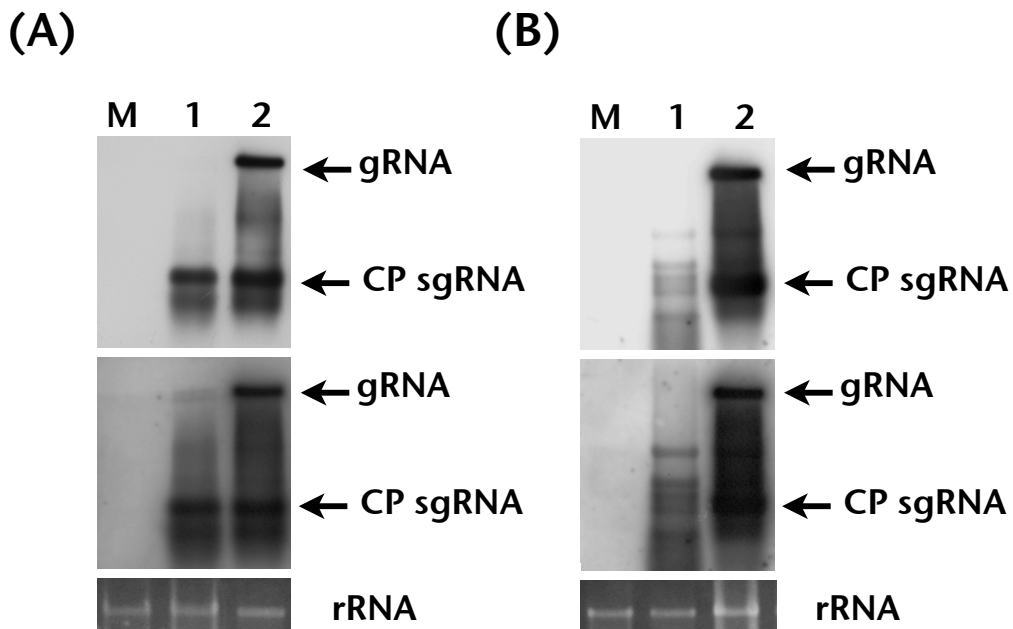


(B)



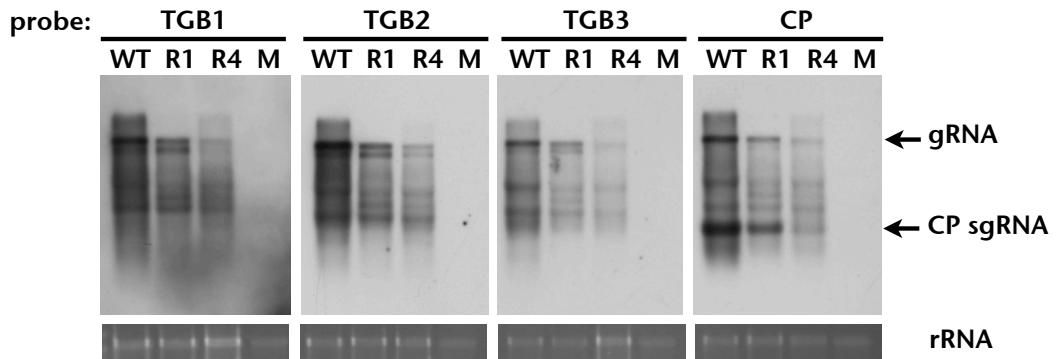
圖十九、pGR-PiVX5-CP\*與pGR-PiVX5於白藜上之病徵及鞘蛋白累積之情形。(A)接種後10天接種葉之病徵。(B)接種後10天，以免疫轉漬法分析接種葉之病毒鞘蛋白累積情形。鞘蛋白以箭頭標示。SDS-PAGE為loading control。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5\*之樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。

Fig. 19. Symptoms and CP accumulation of pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5 on inoculated *C. quinoa*. After 10 days of inoculation, the leaves inoculated with pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5 were observed and analyzed by western blot analysis. (A) Symptoms caused by pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5 at 10 dpi. (B) Western blot analysis of inoculated leaves at 10 dpi. CP is indicated by arrow. SDS-PAGE as loading control. M: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: samples were inoculated by pGR-PiVX5-CP\*. 2: samples were inoculated by pGR-PiVX5.



圖二十、以北方雜合法分析pGR-PiVX5-CP\*與PiVX5於菸草原生質體及白藜接種葉上之RNA累積情形。(A)以生體外轉錄體接種菸草原生質體，48小時後抽取全RNA，使用DIG標定之PiVX鞘蛋白基因3'端專一性DNA探針進行北方雜合分析所得之結果。(B)接種質體DNA於白藜上，10天後抽取接種葉全RNA，使用可和PiVX鞘蛋白基因3'端專一性DNA探針進行北方雜合分析之結果。M為接種ddH<sub>2</sub>O之樣品。1為接種pGR-PiVX5-CP\*之樣品。2為接種pGR-PiVX5之樣品。gRNA為病毒基因體RNA(genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA(subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。上圖為曝光時間5分鐘之結果，下圖為曝光時間18小時之結果。

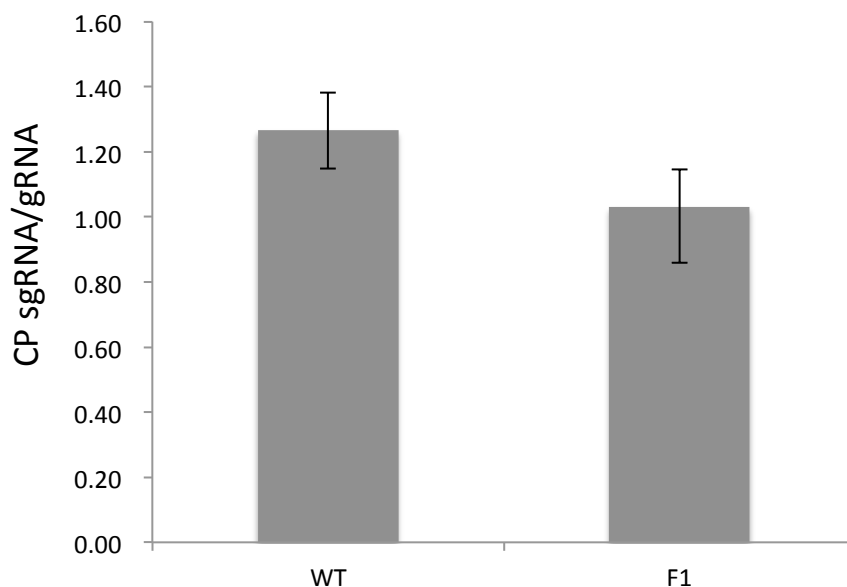
Fig. 20. Northern blot analysis of RNA accumulation of pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5 in *N. benthamiana* protoplasts and on *C. quinoa* plants. (A) *N. benthamiana* protoplasts were inoculated by *in vitro* transcripts of pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5. After 48 hours of inoculation, total RNA were extracted from protoplasts, and analyzed by Northern hybridization with DIG-labeled DNA probes targeting to 3' terminal of PiVX CP gene. (B) *C. quinoa* plants were inoculated pGR-PiVX5-CP\* and pGR-PiVX5 plasmid DNA. After 10 days of inoculation, total RNA were extracted from inoculated leaves, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to 3' terminus PiVX CP gene. M: samples were inoculated by ddH<sub>2</sub>O. 1: samples were inoculated by pGR-PiVX5-CP\*. 2: samples were inoculated by pGR-PiVX5. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs are served as loading control. Upper panels: 5-minute exposure. Lower panels: 18-hour exposure.



圖二十一、使用不同探針，配合北方雜合法分析pGR-PiVX5、R1 ( $\Delta+70/+92$ )及R4 ( $\Delta+1/+92$ )於菸草中之RNA累積情形。以農桿菌注射法將pGR-PiVX5、R1 ( $\Delta+70/+92$ )及R4 ( $\Delta+1/+92$ )接種於菸草上，48小時後抽取全RNA，分別使用可和TGB1基因、TGB2基因、TGB3基因及PiVX鞘蛋白基因3'端專一性結合之DNA探針進行北方雜合分析結果。WT為接種pGR-PiVX5之樣品。R1為接種R1 ( $\Delta+70/+92$ )之樣品。R4為接種R4 ( $\Delta+1/+92$ )之樣品。M為接種MMA Buffer之樣品。gRNA為病毒基因體RNA(genomic RNA)，sgRNA為病毒次基因體RNA(subgenomic RNA)，以上兩者皆以箭頭標示。rRNA為loading control。

Fig. 20. Northern blot using different probes of RNA accumulation of pGR-PiVX5, R1 ( $\Delta+70/+92$ ) and R4 ( $\Delta+1/+92$ ) in *N. benthamiana* protoplasts. Leaves of *N. benthamiana* were inoculated by pGR-PiVX5, R1 ( $\Delta+70/+92$ ) and R4 ( $\Delta+1/+92$ ). After 48 hours of inoculation, total RNA were extracted from inoculated leaves, and analyzed by Northern hybridization with DNA probes targeting to TGB1 gene, TGB2 gene, TGB3 gene and 3' terminus of PiVX CP gene. WT: samples were inoculated by pGR-PiVX5. R1: samples were inoculated by R1 ( $\Delta+70/+92$ ). R4: samples were inoculated by R4 ( $\Delta+1/+92$ ). Mock: samples were inoculated by MMA buffer. Arrows at right indicate the gRNA and CP sgRNA of PiVX. rRNAs are served as loading control.

## 捌、附錄

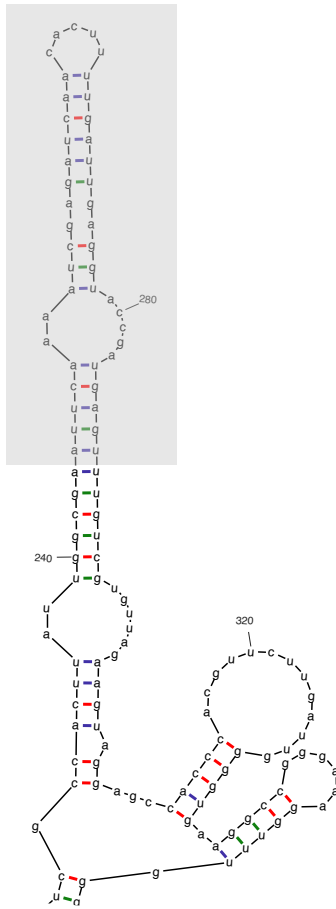


附錄一 於相同單位之病毒gRNA下，F1 ( $\Delta$ -61/-44)之鞘蛋白sgRNA的累積量和野生型PiVX之比較。使用ImageJ進行定量，並以*t-test*進行統計分析，計算出p值大於0.05，顯示在相同單位之病毒gRNA下，F1 ( $\Delta$ -61/-44)之鞘蛋白sgRNA的累積量和野生型PiVX無顯著差異。

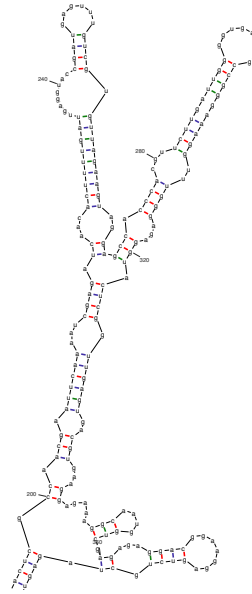
Appendix 1. The CP sgRNA/gRNA value of F1 ( $\Delta$ -61/-44) and wild type PiVX. ImageJ was used to quantify the level of gRNA and sgRNA. Statistical analysis by *t-test* at p value >0.05 indicated that there is no significant difference between CP sgRNA/gRNA value of F1 ( $\Delta$ -61/-44) and wild type PiVX.



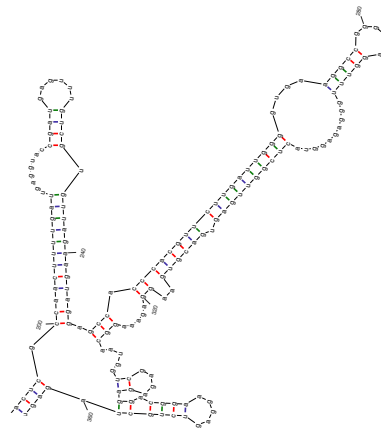
(A)



(B)



(C)



附錄二 野生型PiVX (A)、F2 ( $\Delta$ -61/-24) (B)及F3 ( $\Delta$ -61/-1) (C)之CP轉錄起始點附近序列以MFOLD程式進行二級結構之預測。經分析後認為灰底部分之結構對於鞘蛋白sgRNA之累積是很重要的。

Appendix 2. Secondary structures prediction of sequences around CP transcription start site of wild type PiVX (A), F2 ( $\Delta$ -61/-24) (B) and F3 ( $\Delta$ -61/-1) (C) by MFOLD program. We suggested that the secondary structure enclosed by gray background is important for CP sgRNA accumulation.

