

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

針對番茄斑萎病毒屬病毒之非結構性 NSs 蛋白的高保留性  
抗原決定基產生廣效型抗體之製備及其於本屬病毒檢測上  
之應用

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 96-2313-B-468-004-

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

執行單位：亞洲大學生物科技學系

計畫主持人：陳宗祺

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：康雅琪、葉怡均

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月31日

## (一) 中文摘要

非結構性NSs蛋白為番茄斑萎病毒屬 (*Tospovirus*) 病毒克服植物防禦基因沉寂機制之重要因子，先前的研究發現，西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) NSs蛋白的單株抗體不僅能與WSMoV血清群的成員產生血清反應，更可偵測到鳶尾花黃斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV) 和番茄黃輪病毒 (*Tomato yellow ring virus*, TYRV) 等非WSMoV血清群成員的NSs蛋白。經epitope mapping分析得知，WSMoV NSs蛋白第98到120個胺基酸序列「VRKPGVKNTGCKFTMHNQIFNPN」，命名為WNSscon，為單株抗體結合的位置，序列分析亦了解此區域為高保留性序列，存在於這些病毒的NSs蛋白，使得WSMoV NSs蛋白的單株抗體成為非常有用的檢測工具。此外，另一高保留性序列「ISVCSNTVNTNGVKHQHGLKVLS」，命名為TNSscon，亦被發現存在於番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、花生輪斑病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV) 和鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) NSs蛋白的第98到120個胺基酸位置，這些結果暗示了NSs蛋白的同源性與tospoviruses的演化有關，而NSs蛋白的高保留性序列將成為檢測tospoviruses的重要標的。本計畫利用矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 植物病毒載體與細菌表現載體生產TSWV和INSV之NSs蛋白，並已完成INSV NSs蛋白及TNSscon抗血清之製備，可成功用以檢測TSWV、INSV、GRSV和TCSV等歐美型病毒，未來將與WSMoV NSs蛋白的抗體配合使用，建立完善的tospoviruses檢測平台。

關鍵詞：番茄斑萎病毒屬、基因沉寂抑制子、血清學。

## (二) 英文摘要

Nonstructural (NSs) protein of tospoviruses plays the role as a gene-silencing suppressor that overcomes natural defense mechanisms of plants. In the previously study, the produced monoclonal antibodies against the NSs protein (MAb-WNSs) of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) serologically reacted not only with all members of WSMoV serogroup but also with those of non-WSMoV serological related tospoviruses, such as *Iris yellow spot virus* (IYSV) and *Tomato yellow ring virus* (TYRV). Epitope mapping showed that MAb-WNSs recognized the amino acid (aa) 98 to 120 region of the NSs protein of WSMoV, the sequence is “VRKPGVKNTGCKFTMHNQIFNPN”, denoted WNSscon. Sequence alignment of the reported NSs proteins revealed that the WSMoV NSs MAb-recognized region is consensus at the same position of those of the aforementioned tospoviruses. In addition, another consensus sequence “ISVCSNTVNTNGVKHQHGLKVLS”, denoted TNSscon, was found at the same position, the aa 98 to 120, among the NSs proteins of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) and *Impatiens necrotic spot virus* (INSV). These results imply that the homology of NSs

proteins is related to the evolution of tospoviruses and these conserved regions of NSs proteins are able to be the important target for detection of tospoviruses. In this project, we applied the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) vector and bacterial expression vector to produce the NSs proteins of TSWV and INSV. The antisera against the NSs protein of INSV or the TNSscon peptide have been produced. They were successfully used to detect the Euro-American tospoviruses, including TSWV, INSV, GRSV and TCSV. These antisera will be used with MAb-WNSs to establish a complete detection system for worldwide tospoviruses.

**Keywords:** *Tospovirus*, gene-silencing suppressor, and serology.

### (三) 報告內容

#### I、前言

近年來，由於植物對抗病毒的RNA干擾機制之研究日趨明朗，相對地，病毒克服植物防禦機制的重要武器，即基因沉寂抑制因子 (gene silencing suppressors)，亦成為最近相當熱門的研究課題，而非結構性NSs蛋白即為tospoviruses對抗植物防禦反應之gene silencing suppressor。NSs蛋白在tospoviruses所感染的植物細胞內形成內含體 (inclusion body)，表現量不亞於形成核酸結合構造之結構性核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, NP)，然而，由於病毒體極不穩定，使得病毒蛋白難以傳統方式純化，目前除了NP有較為有效的傳統純化方式之外，其餘蛋白僅能以細菌表現方式獲得。但是細菌為原核細胞生物，其表現的蛋白結構可能異於真核細胞所表現的蛋白。有鑑於此，中興大學葉錫東副校長研究室成功地利用ZYMV載體表現大量的WSMoV NSs蛋白，並制訂標準的純化流程，可於矮南瓜植株中獲得高純度之NSs蛋白，用以製備抗血清及單株抗體 (Chen *et al.*, 2006)。出乎意料地，該研究室所製備的WSMoV NSs蛋白單株抗體除了可偵測到WSMoV本身之外，更可與同屬於WSMoV血清群之所有其他成員，包括CaCV、CCSV、PBNV、WBNV、MYSV，及IYSV血清群之病毒，包括IYSV和TYRV，有很強的血清反應，該研究室進一步分析WSMoV NSs蛋白上與單株抗體結合的位置，發現此位置為一連續性的胺基酸序列，且高保留性地存在於上述8種病毒的NSs蛋白上第98-120個胺基酸的位置，此高保留性序列為「VRKPGVKNTGCKFTMHNQIFNPN」，命名為WNSscon。

此外，分析目前已知的其他種tospoviruses，結果發現屬於TSWV血清群的TSWV和GRSV與獨立血清型的INSV之NSs蛋白上相同的位置 (第98-120個胺基酸) 互相存在另一段高保留性序列「ISVCSNTVNTNGVKHQHGLKVL S」，命名為TNSscon，而另二獨立血清型PCFV和PYSV則不具有與其他病毒相似的序列。綜合以上分析結果，依NSs蛋白上的高保留性序列可推測目前已知的17種tospoviruses大致可分為二大群，此結果恰巧與先前國外學者所主張之地理分類為歐美和亞洲二型相契合，亦與NP之親緣關係有關。經軟體進行NSs蛋白的結構分析，發現此高保留性區域可能與蛋白質或核酸的結合能力有關，推測可能為NSs蛋白的功能性區域。

## II、研究目的

根據先前的研究發現，可以得知NSs蛋白上的高保留性區域可能與病毒的演化有關，其血清學上的關係，非常適合應用於建立該類病毒之檢測系統。WSMoV NSs蛋白的單株抗體已成功地成為國內tospoviruses檢測的有力工具，其對於亞洲型病毒的廣泛性，亦獲得國內外抗體生產的生技公司注意。為了建立更完整的tospoviruses檢測系統，本研究計畫利用葉錫東副校長研究室所開發之ZYMV植物病毒載體系統，與細菌表現系統來表現TSWV和INSV之NSs蛋白做為抗原，在缺乏所有TSWV血清群病毒成員的情況下，製備歐美型病毒NSs蛋白高保留性區域之廣效性抗體。這些抗體將與WSMoV NSs蛋白單株抗體共同使用，開發成快速且簡易的tospoviruses檢測系統，用於檢測Tospovirus屬之所有病毒，以建立全球性tospoviruses病害防檢疫系統為目的。這些抗體亦為日後研究NSs蛋白與植物防禦機制相互作用關係時的有利工具。

## III、文獻探討

### 1. Tospoviruses之分類地位與特性

*Bunyaviridae* 科之病毒乃藉由節肢動物傳播，其下分為五個屬，分別為 *Orthobunyavirus*、*Hantavirus*、*Nairovirus*、*Phlebovirus* 以及 *Tospovirus* (Fauquet *et al.*, 2005)，而 *Tospovirus* 為該科中唯一可感染植物之一屬，可被薊馬類昆蟲以永續性方式傳播，寄主範圍超過82科900多種單子葉及雙子葉植物 (Prins and Goldbach, 1998)，分布遍及熱帶、亞熱帶及溫帶地區，為全球性危害之病毒。此類病毒型態為具有脂質蛋白套膜 (lipoprotein envelope) 之球型顆粒，直徑約在80-110nm之間。在病毒顆粒內有三條線狀單股基因體RNA分子，依其分子量大小分別命名為L RNA、M RNA及S RNA，此三條基因體RNA之兩端序列為互補且相互配對，並分別與NP緊密包裹形成一假環狀構造 (pseudo-circular structure) (Fauquet *et al.*, 2005)。

病毒顆粒內的三條基因體RNA可分別轉譯出六種蛋白質產物。L RNA為負極性 (negative polarity)，具有一個大轉譯架構 (open reading frame, ORF)，可對應產生一個大蛋白，為病毒之複製酶 (de Haan *et al.*, 1991)。M RNA為雙極性 (ambisense) 表現策略，具有兩個轉譯架構，病毒股RNA對應產生一個非結構性NSm蛋白，為病毒的移動性蛋白，與病毒RNA在植物細胞與細胞間的移動有關，可在受病毒感染的植物及昆蟲細胞形成管狀結構 (Kormelink *et al.*, 1994; Lewandowski and Adkins, 2005)；而病毒互補股則產生一個醣蛋白的前驅物，經裂解後產生Gn及Gc蛋白，在病毒的外套膜上形成突起 (spikes) 的構造，且Gn和Gc蛋白對於病毒能在薊馬體內複製及傳播扮演關鍵的角色 (Kikkert *et al.*, 2001)。S RNA亦為雙極性，可對應產生兩種蛋白質，一為由病毒股RNA對應產生之非結構性NSs蛋白，可在感病細胞內形成絲狀體結構 (Kormelink *et al.*, 1991)，其功能則與病毒的致病性

(pathogenicity) 有關，為病毒抵禦植物基因沉寂作用 (gene silencing) 之抑制因子 (suppressor) (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003)；另一個則由互補股RNA所對應產生的NP，為核酸結合性蛋白 (de Haan *et al.*, 1990)，其血清學及序列親緣關係為tospoviruses分類之重要依據 (Goldbach and Kuo, 1996)。

## 2. Tospoviruses之血清學分類系統

根據NP的血清學及序列親緣關係，現今已發表之17種tospoviruses可分類為三個主要血清群，分別為：TSWV血清群，包括番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、花生輪斑病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV)、番茄黃化斑點病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV)、菊花莖部壞疽病毒 (*Chrysanthemum stem necrosis virus*, CSNV)、和矮南瓜致死黃化病毒 (*Zucchini lethal chlorosis virus*, ZLCV)；WSMoV血清群，包含西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV)、花生頂芽壞疽病毒 (*Peanut bud necrosis virus*, PBNV)、西瓜頂芽壞疽病毒 (*Watermelon bud necrosis virus*, WBNV)、番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*, CaCV)、彩色海芋黃化斑點病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)、和甜瓜黃斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV)、及於今年所發表的番茄輪斑病毒 (*Tomato zonate spot virus*, TZSV) (Dong *et al.*, 2008)；IYSV血清群，包括鳶尾花黃斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV) 和番茄黃輪病毒 (*Tomato yellow ring virus*, TYRV)；以及鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)、花生黃斑病毒 (*Peanut yellow spot virus*, PYSV)、和花生黃化扇斑病毒 (*Peanut chlorotic fan-spot virus*, PCFV) 等三個獨立的血清型。獨立血清型的病毒，其NP與其他病毒不具任何血清學關係；而屬同一血清群之病毒的NP則互有血清學反應。此一血清學分類系統目前已成為tospoviruses分類之主要依據 (Lin *et al.*, 2005)。

## 3. 國內tospoviruses之血清學研究現況

Tospoviruses在生體外極不穩定而使純化不易。近年來由於蛋白質表現技術及純化方法的進步，且中興大學植物病理學系葉錫東教授研究室為了收集齊備的NP抗體，該研究室與印度學者合作，以自行研發成功之矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 載體使得NP取得更為容易，為國內tospoviruses收集種類最多且NP抗血清製備最完善之處。以NP做為抗原免疫紐西蘭白兔，可獲得高專一性且高力價的抗血清，加上酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 與西方轉漬法 (western blotting) 等血清學技術的應用，NP之抗血清已廣為使用於tospoviruses之快速診斷與檢測。然而，同一血清群病毒NP相互之間會有血清學反應，故以NP抗血清鑑定病毒種類易造成混淆，必須配合生物分析 (bioassay) 及專一性引子對進行核酸檢測，才能確認病毒身分，過程較為耗時。拜賜於單株抗體 (monoclonal antibody) 生產技術的開發與進步 (Hsu *et al.*, 1984)，生產高專一性的NP單株抗體，得以針對單一病毒種 (species) 進行快速且有效率的

診斷，也使得tospoviruses分離株間的血清學關係更趨明朗。

NP之抗血清與單株抗體雖然專一性高，但僅侷限於特定病毒種之偵測，面對田間複雜的病毒相，生產更廣效性的抗體將有助於tospoviruses檢疫工作之進行。葉錫東教授研究室嘗試以ZYMV病毒載體大量表現WSMoV的NSs蛋白，並制訂標準純化流程，於瓜類植株中獲得高純度之NSs蛋白，以製備抗血清及單株抗體 (Chen *et al.*, 2006)。出乎意料地，WSMoV NSs蛋白單株抗體除了可偵測到WSMoV血清群之所有成員，更可與IYSV血清群之IYSV和TYRV有很強的血清學反應，為一相當有效率的田間檢測工具。

#### IV、研究方法

##### 1. 病毒之繁殖

TSWV、INSV、TCSV、GRSV、WSMoV、MYSV、IYSV及PCFV以機械接種方式繁殖於單斑寄主奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 與系統性寄主菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domin.) 上，生長於恆溫隔離溫室中 (25-28°C)，以供實驗之用。

##### 2. TSWV和INSV的NSs轉譯架構 (open reading frames, ORFs) 之增幅與選殖

萃取感染TSWV及INSV之菸草的總量RNA做為模板，分別設計專一性引子對以對其NSs ORF進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，預期分別增幅出全長度約1.4 kb之DNA片段。針對不同ZYMV載體與pET載體系統，引子對分別設計如Table 1和2所示。增幅後所得之全長度NSs ORFs，以TA cloning vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) 粘合并轉殖於勝任細胞*E. coli* DH5 $\alpha$ 。經kanamycin與X-Gal/IPTG藍白篩選後，繁殖所篩選之轉殖細胞並以驗處理方式純化其質體DNA。DNA序列以ABI377-19 automatic DNA sequencing system (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) 定序後，經GCG BESTFIT program (Wisconsin Package version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI) 比對確認無誤，以便進行下一步實驗。

Table 1. Primers were designed for amplification of the individual NSs open reading frames (ORFs) of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) for constructing in the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) vector

Virus	Primer name	Primer sequence	Restriction site (underlined)
TSWV	TNSs-pSph	5'- <u>GGCATGCATGTCTTCAAGTGT</u> TTATGAGTCG-3'	<i>Sph</i> I
	TNSs-rKpn	5'-GGGTACCTTTTGATCCTGAAGCATGTGTTTC-3'	<i>Kpn</i> I
INSV	INSs-pSph	5'- <u>GGCATGCATGTATGAAACAATTATCAAATCG</u> -3'	<i>Sph</i> I
	INSs-rKpn	5'-GGGTACCATTAAATCTAATTTAGAAATAGC-3'	<i>Kpn</i> I

Table 2. Primers were designed for amplification of the individual NSs ORFs of TSWV and INSV for constructing in the pET-28b(+) vector

Virus	Primer name	Primer sequence	Restriction site (underlined)
TSWV	TNSs47Nco	5'- <u>GCCATGGCTTCAAGT</u> GTTTATGAG-3'	<i>NcoI</i>
	TNSs1447cXho	5'-GCT <u>CGAGTTTTGATCCTGAAGCATGTGT</u> -3'	<i>XhoI</i>
INSV	INSs63Nde	5'-GCATATG <u>TCTAGTGCAATGTATGAA</u> -3'	<i>NdeI</i>
	INSs1409cXho	5'-GCT <u>CGAGATTTAAATCTAATTTAGAAAT</u> -3'	<i>XhoI</i>

### 3. NSs ORFs之構築於不同的表現載體

#### (1) 於ZYMV病毒載體之構築

所選殖之NSs ORFs分別經*SphI*和*KpnI*限制酶剪切後，以1.2% agarose gel電泳進一步分離純化。ZYMV載體 (p35SZYMV-GFPhis) 亦同時以*SphI*和*KpnI*限制酶剪切移出GFP基因，並於0.8% agarose gel電泳分離純化之。將剪切後的NSs ORFs片段與ZYMV載體以T4 DNA ligase (Epicentre, Madison, WI) 於16°C黏合後，轉殖入*E. coli* DH5 $\alpha$ 勝任細胞內，再以ampicillin篩選之。抗ampicillin的菌落利用PCR技術，分別以專一性引子對TNSs-pSph/TNSs-rKpn及INSs-pSph/INSs-rKpn放大出所構築之TSWV與INSV之NSs ORFs，以選殖出所要的clones。

#### (2) 於pET-28b(+)細菌表現載體之構築

TSWV NSs ORF經*NcoI*和*XhoI*限制酶剪切及INSV NSs ORF經*NdeI*和*XhoI*限制酶剪切後，以1.2% agarose gel電泳進一步分離純化。pET-28b(+)載體亦同時分別以*NcoI*和*XhoI*或*NdeI*和*XhoI*限制酶剪切，並於1.0% agarose gel電泳分離純化之。將剪切後的NSs ORFs片段與pET-28b(+)載體以T4 DNA ligase於16°C黏合後，轉殖入*E. coli* strain Rosetta (DE3) (Novagen) 勝任細胞內，再以kanamycin篩選之。抗kanamycin的菌落利用colony PCR技術，分別以專一性引子對TNSs47Nco/TNSs1447cXho及INSs63Nde/INSs1409cXho放大出所構築之TSWV與INSV之NSs ORFs，以選殖所要的clones。

### 4. ZYMV重組病毒之感染力分析與NSs蛋白表現之偵測

選殖得到之含TSWV或INSV NSs ORF的ZYMV重組clones以鹼處理方式純化其質體DNA後，溶解於TE buffer (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA, pH 8.0) 中，以玻璃棒機械接種於單斑寄主奎藜葉片上，置於隔離的溫控溫室 (25-28°C) 觀察其發病情形。待單斑形成後，單斑分離並機械接種於矮南瓜上，以評估其於單斑寄主與系統性寄主上之感染力。罹病植

物組織以ZYMV CP抗血清及histidine單株抗體進行western blotting偵測之，以證明ZYMV重組病毒之存活與NSs蛋白之表現情形。此外，萃取感染ZYMV重組病毒感染之植物材料的總量RNA，分別以專一性引子對TNSs-pSph/TNSs-rKpn及INSs-pSph/INSs-rKpn增幅出所構築之TSWV和INSV NSs ORFs，以進一步確認ZYMV重組病毒之感染。

## 5. ZYMV表現NSs蛋白之純化

根據先前所發表之方法進行ZYMV表現NSs蛋白之純化 (Chen *et al.*, 2006)。收集之罹病接種ZYMV重組病毒植物材料，加入兩倍體積的buffer A [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、15 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、20% glycerol、0.05% 2-mercaptoethanol (2-Me)、及0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)] 研磨，以3000 rpm低速離心10分鐘後經紗布過濾去除植物殘渣，上澄液以1% Triton X-100於4 °C處理30分鐘後以30000 rpm超高速離心30分鐘並收集上澄液。因為ZYMV病毒載體所表現的NSs蛋白之C端含有histidine tag，利用1 ml的Ni<sup>2+</sup>-NTA親和性樹脂以buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 8.2)、15 mM MgCl<sub>2</sub>、20% glycerol、0.05% 2-Me、及0.1 mM PMSF] 平衡後加入前述上澄液，於4°C混合1小時後倒入管柱，令其自然流下，收集未結合之流出液。待其平衡後，以等量之buffer B洗滌，並以2 ml的含250 mM imidazole之buffer B純化出已結合於樹脂上之NSs蛋白。所有流出液皆收集之，並以SDS-PAGE蛋白電泳及利用histidine tag單株抗體以western blotting分析所純化之蛋白濃度。以Ni<sup>2+</sup>-NTA親和性管柱純化之NSs蛋白因植物組織內含有histidine-rich的蛋白而影響純度，故以SDS-PAGE電泳進一步分離後，以低溫之0.25% KCl溶液處理並切下預期分子量大小之蛋白沉澱帶，再以Bio-Rad Model 422 Electro-Eluter收集之，以供抗體製備之用。

## 6. 細菌表現NSs蛋白之純化

以5 ml LB培養基加入50 ppm kanamycin、34 ppm chloramphenicol、與選殖到的菌株，放入37°C生長箱振盪培養over night。再用300 ml LB培養基加入相同抗生素與2 ml的隔夜培養Rosetta菌液，於37°C培養4小時後，加入1 mM IPTG繼續培養4小時。菌液以8000 rpm離心10分鐘，去除上清液，沉澱物放入-20°C冰箱冷凍1小時後加入lysozyme把菌打破，再以超音波震盪器將核酸震碎，後用binding buffer [500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)] 以8000、10000、8000 rpm各10分鐘層差離心，倒掉上清液，最後用denature buffer [500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、6 M Urea] 溶解沉澱物。因為pET-28b(+)載體所表現的NSs蛋白之C端含有histidine tag，如前述ZYMV表現NSs蛋白之純化，利用Ni<sup>2+</sup>-NTA親和性管柱純化並收集NSs蛋白，並以SDS-PAGE電泳進一步分離後，以低溫之0.25% KCl溶液處理並切下預期分子量大小之蛋白沉澱帶，再以Bio-Rad Model 422 Electro-Eluter收集之。

## 7. 人工合成歐美型tosopoviruses之NSs蛋白上的高保留性胜肽鏈

經序列分析得知，TSWV、GRSV與INSV之NSs蛋白的第98到120個胺基酸具有高保留



性序列「ISVCSNTVNTNGVKHQHGLKVLS」，命名為TNSscon。人工合成TNSscon做為抗原，用以製備廣泛性抗血清。

## 8. 兔子與老鼠抗血清之製備

取0.1-0.5 mg之純化後的NSs蛋白或50 µg之TNSscon與Freund's complete adjuvant混合乳化後，分別以皮下注射方式注射於紐西蘭白兔或腹腔注射方式注射於小白鼠體內，一週後，再以同量的純化蛋白混合Freund's incomplete adjuvant注射之，連續注射三週後開始自兔子耳靜脈或小白鼠尾部採血，兔子則每週採血一次。採血後將血液於37°C靜置1小時，之後置放於4°C靜置30分鐘，以4000 rpm離心5分鐘，收集上層血清部份。

## 9. Indirect ELISA

取感染病毒之罹病菸草組織，加入coating buffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、34 mM NaHCO<sub>3</sub>、3 mM NaN<sub>3</sub>) 稀釋50倍並磨碎之，另取健康菸草葉片組織做為對照，以相同倍數稀釋研磨。加入200 µl研磨粗萃液於96孔ELISA盤中，於37°C靜置反應30分鐘。倒掉96孔盤中的研磨粗萃液，每一孔穴以PBST buffer (136 mM NaCl、1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O、2 mM KCl、3 mM NaN<sub>3</sub>、0.05% Tween 20) 沖洗，靜置3分鐘後倒掉，重覆此步驟三次。將兔子或老鼠的抗血清與enzyme-conjugate buffer (2% PVP-40、0.2% ovalbumin溶於1x PBST) 以1000、2000、3000、4000、5000、6000的稀釋倍數充分混合。取上述抗血清稀釋液200 µl加至每一孔穴，於37°C靜置反應30分鐘。倒掉血清稀釋液，以PBST buffer重覆沖洗步驟。分別以磷酸酶連結之goat anti-rabbit IgG或goat anti-mouse IgG做為二次抗體，以enzyme-conjugate buffer稀釋5000倍後，取200 µl加至每一孔穴內，於37°C靜置反應30分鐘。倒掉二抗稀釋液，以PBST buffer重覆沖洗步驟。以P-nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate (p-NPP) 做為呈色基質，以substrate buffer (9.7% Diethanolamine、3 mM NaN<sub>3</sub>) 完全溶解後 (1 mg/ml)，取180 µl混合液加入每一孔穴，於室溫下進行呈色反應。開始呈色後，以ELISA讀值儀偵測波長405 nm之吸收值，每隔10~15分鐘測讀一次，連續測讀1小時。

## 10. Western blotting

取感染病毒之罹病菸草，加入protein sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% sodium dodecyl sulfate (SDS)、12% glycerol、0.1% bromophenol blue、2% 2-Me) 稀釋磨碎，經12% SDS-PAGE分離後轉漬於nitrocellulose (NC) membrane上，以TSW buffer (10 mM Tris、154 mM NaCl、4% Gelatin、0.1% Triton X-100、2% SDS) 沖洗，搖3分鐘後倒掉，重覆此步驟三次。用上述NSs的抗血清以TSW buffer稀釋，做為一抗，反應50分鐘，再以TSW buffer沖洗。用磷酸酶連結之goat anti-rabbit IgG或goat anti-mouse IgG做為兔子或老鼠二次抗體，TSW稀釋5000倍後，反應50分鐘，再以TSW buffer洗淨。以NBT/BCIP做為呈色基質，

用substrate buffer (100 mM Tris、100 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>) 稀釋，加於NC membrane上，於室溫下進行呈色反應，開始呈色後以清水沖洗乾淨終止反應。

## V、結果與討論

### 1. TSWV和INSV NSs蛋白於ZYMV病毒載體之表現

將選殖到的重組病毒之clones，利用機械接種於矮南瓜上，其所造成的病徵比野生型ZYMV所造成的病徵更為嚴重。利用RT-PCR檢測所接種之矮南瓜，可測得NSs基因；且利用western blotting也可偵測到NSs蛋白的表現。進一步純化ZYMV表現之TSWV NSs蛋白，發現NSs蛋白產量低，且有許多植物蛋白也被純化出來 (Fig. 1)。此現象可能是因矮南瓜植株中能產生含有histidine的蛋白，所以也能被Ni<sup>2+</sup>-NTA親和性管柱純化出來，可以藉由提高imidazole的濃度來將其他植物成分沖洗掉，改善純化結果。而將重組病毒繼代接種後，則無法再測得NSs蛋白表現，且進行RT-PCR的分析，也無法測得NSs基因，由此可知，NSs基因可能已遭剔除。

### 2. TSWV和INSV NSs蛋白於pET-28b(+)細菌載體之表現

為使NSs蛋白順利表現，改以細菌載體表現之。分別將TSWV與INSV NSs ORF片段接入pET-28b(+)載體中，轉型於*E. coli*的Rosetta表現菌株中，用PCR確認NSs片段有接入載體中。大量INSV NSs蛋白於pET載體中表現並純化之，產量較ZYMV載體表現高 (Fig. 2)，純化步驟亦較ZYMV載體簡易，且外源基因不會因繼代培養而遭剔除，但利用細菌表現NSs蛋白，因其蛋白在細菌體內表現量大，容易形成inclusion body，所以純化蛋白時，可以利用層差離心，來去除多餘的蛋白，最後再將NSs蛋白變性，以Ni<sup>2+</sup>-NTA親和性管柱純化NSs蛋白，可得高純度的蛋白，所以本研究改用細菌載體系統來純化NSs蛋白。

### 3. INSV NSs兔子抗血清之血清學分析

所生產的INSV NSs兔子抗血清 (RAs-INSV NSs) 不僅可與INSV反應，亦可與TSWV血清群病毒，包括TSWV、GRSV、和TCSV產生血清反應 (Fig. 3和4)。ELISA結果可得知，RAs-INSV NSs與TSWV、TCSV、和INSV有強烈的血清反應，而對GRSV則僅是微弱的血清反應，可能是因為GRSV的材料是來自於奎藜之故，而奎藜的病毒量本來就不如菸草來的多，所以才導致反應微弱。此實驗結果將再進一步確認。而從western blotting的結果來看，此抗血清是可以對TSWV血清群的病毒與INSV本身產生血清反應，而不與WSMoV和IYSV血清群的病毒及PCFV血清型反應。ELISA與western blotting反應結果的不同，可能在於western blotting中的蛋白是屬於變性的形態去做檢測，而ELISA則否，但由ELISA與western blotting的結果仍可得知，RAs-INSV NSs是可以用於偵測歐美型的tospoviruses。

#### 4. TNSscon老鼠抗血清之血清反應

以人工合成的TNSscon為抗原所生產的老鼠抗血清 (MAs-TNSscon)，以ELISA進行序列稀釋的檢測結果，可得知此抗血清可對TSWV與GRSV產生血清反應 (Fig. 5)，但是否能與INSV反應，尚須再確認。但依TNSscon的高保留序列來看，此抗血清應可與TSWV血清群的病毒及INSV血清型有血清反應，此結果稍後已由western blotting得到證實 (Fig. 6)。因此，MAs-TNSscon也可以用來進行歐美型tospoviruses之檢測。

#### (四) 參考文獻

1. Bucher, E., Sijen, T., de Haan, P., Goldbach, R., and Prins, M. 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* 77:1329-1336.
2. Chen, T. C., Huang, C. W., Kuo, Y.-W., Liu, F. L., Hsuan Yuan, C.-H., Hsu, H. T., and Yeh, S. D. 2006. Identification of common epitopes on a conserved region of NSs proteins among tospoviruses of *Watermelon silver mottle virus* serogroup. *Phytopathology* 96:1296-1304.
3. de Haan, P., Wagemaker, L., Peters, D., and Goldbach, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* 71:1001-1007.
4. de Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 71:2207-2216
5. Dong, J.H., Cheng, X. F., Yin, Y. Y., Fang, Q., Ding, M., Li, T. T., Zhang, L. Z., Su, X. X., McBeath, J. H., and Zhang, Z. K. 2008. Characterization of tomato zonate virus, a new tospovirus in China. *Arch. Virol.* 135: 855-864.
6. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A. 2005. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, New York.
7. Goldbach, R., and Kuo, G. 1996. *International. Acta Hort.* 431: 21-26.
8. Hsu, H. T., Aebig, J., and Rochow, W. F. 1984. Differences among monoclonal antibodies to barley yellow dwarf viruses. *Phytopathology* 74: 600-605.
9. Kikkert, M., Verschoor, A. D., Kormelink, R., Peters, D., and Goldbach, R. 2001. Tomato spotted wilt virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *J. Virol.* 75:1004-1012.
10. Kormelink, R., Kitajima, E. W., de Haan, P., Zuidema, D., Peters, D., and Goldbach, R. 1991. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* 181:459-468.

11. Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D., and Goldbach, R. 1994. Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200:56-65.
12. Lewandowaki, D. J., and Adkins, S. 2005. The tubule forming NSm protein from *Tomato spotted wilt virus* complements cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. *Virology* 200:50-65
13. Lin, Y. H., Chen, T. C., Hsu, H. T., Liu, F. L., Chu, F. H., Chen, C. C., Lin, Y. Z., and Yeh, S. D. 2005. Serological comparison and molecular characterization for verification of Calla lily chlorotic spot virus as a new tospovirus species belonging to *Watermelon silver mottle virus* serogroup. *Phytopathology* 95: 1482-1488.
14. Prins, M., and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends. Microbiol.* 6:31-35.
15. Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* 532:75-79.

#### (五) 計畫成果自評

1. 本計畫所生產之針對歐美型 tospoviruses 廣效性抗血清可成功用以檢測 TSWV、GRSV、TCSV 及 INSV，將成為植物防檢疫之重要工具。未來將繼續測試是否與 CSNV 和 ZLCV 反應，並與生技廠商合作開發為試劑組，銷售歐美國際市場。
2. 本研究計畫特別感謝中興大學葉錫東副校長研究室提供溫室與病毒株的協助，使得計畫能順利進行，建立良好的學術交流，不但能資源共享，藉由研究團隊的互助合作，將有助於未來研究計畫的順利執行，提升我國學術研發的能量。

(六) 附圖

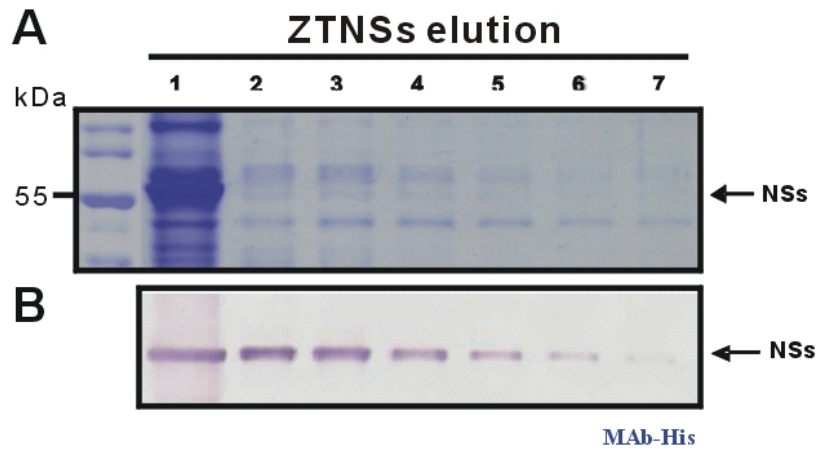


Fig. 1. Purification of TSWV NSs protein expressed by the ZYMV vector system. A, Elution fractions of the ZYMV-expressed TSWV NSs protein were observed by SDS-PAGE. B, The purified NSs protein of TSWV was detected using the monoclonal antibody against the histidine tag (MAb-His) in western blotting. The ZYMV-expressed NSs protein is indicated by arrowheads.

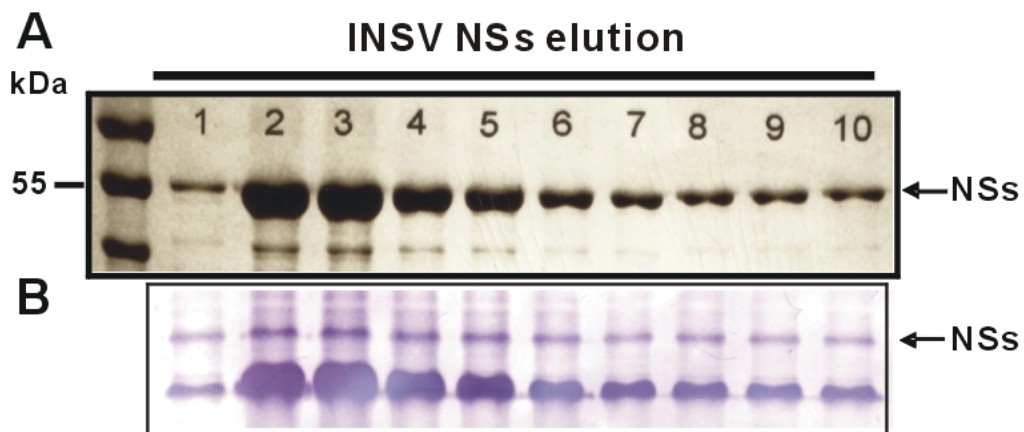


Fig. 2. Purification of INSV NSs protein expressed by the pET-28b(+) vector. A, Elution fractions of the expressed INSV NSs protein were observed by SDS-PAGE. B, The purified INSV NSs protein was detected using MAb-His in western blotting. The expressed NSs protein of INSV is indicated by arrowheads.

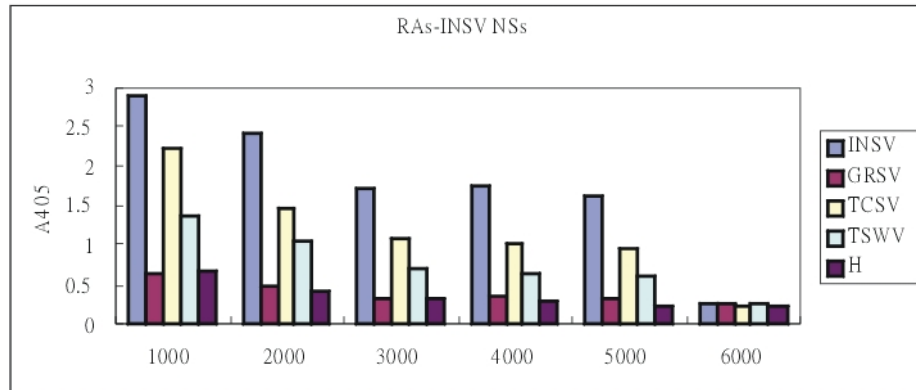


Fig. 3. Serological responses of the produced rabbit antiserum against the NSs protein of INSV (denoted RAs-INSV NSs) reacted with INSV, GRSV, TCSV and TSWV in indirect ELISA. RAs-INSV NSs was used in 1000-, 2000-, 3000-, 4000-, 5000- or 6000-fold dilution for virus detection. Virus-infected or healthy (H) tissues of *Nicotiana benthamiana* were used to react with RAs-INSV NSs.

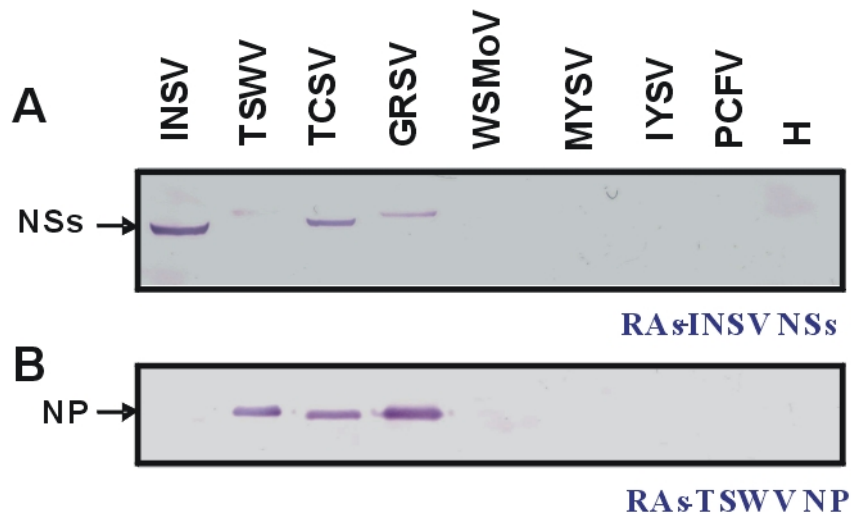


Fig. 4. Serological responses of RAs-INSV NSs reacted with different tospoviruses in western blotting. A, Leaves of *Nicotiana benthamiana* infected with INSV, TSWV, TCSV, GRSV, WSMoV, MYSV, IYSV and PCFV were used to react with RAs-INSV NSs. Healthy samples (H) of *N. benthamiana* were used as the negative control. B, The antiserum against the NP of TSWV (RAs-TSWV NP) was used to clarify TSWV-related tospoviruses. The NSs protein and NP are indicated by arrowheads.

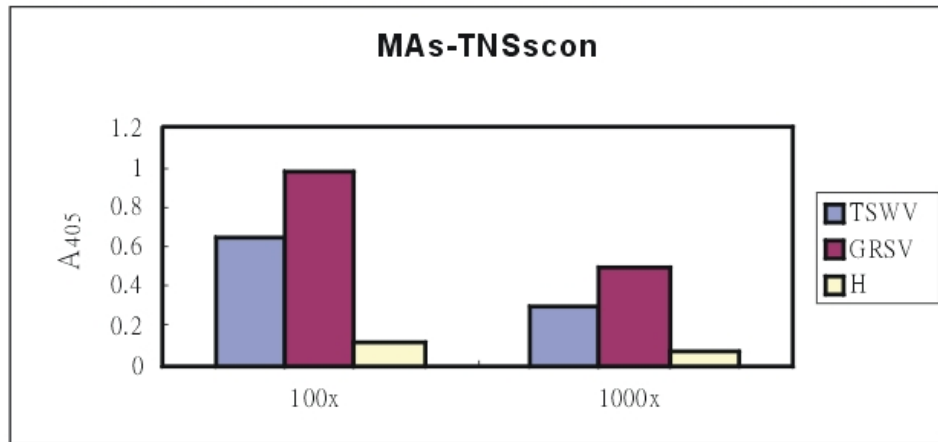


Fig. 5. Serological responses of mouse antiserum against TNSscon (MAs-TNSscon) reacted with TSWV and GRSV in indirect ELISA. MAs-TNSscon was used in 100- or 1000-fold dilution for virus detection. Virus-infected or healthy (H) tissues of *N. benthamiana* were used to react with MAs-TNSscon.

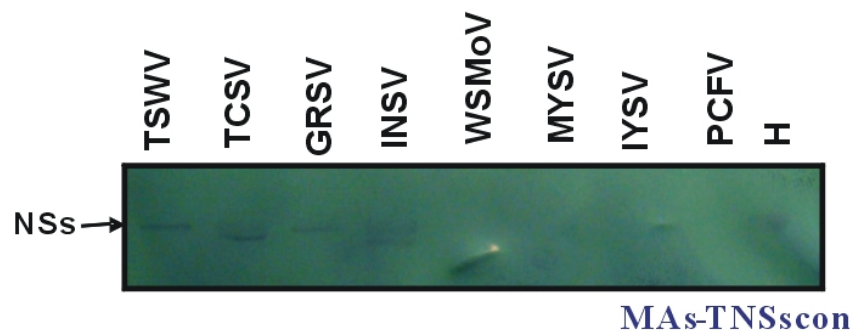


Fig. 6. Serological responses of MAs-TNSscon reacted with different tospoviruses in western blotting. A, Leaves of *N. benthamiana* infected with INSV, TSWV, TCSV, GRSV, WSMoV, MYSV, IYSV and PCFV were used to react with MAs-TNSscon. Healthy samples (H) of *N. benthamiana* were used as the negative control. The NSs protein is indicated by arrowheads.