

感染鳶尾花引起嵌紋病徵之 *Potyvirus* 病毒鑑定及利用細菌表現病毒 鞘蛋白製備病毒多元抗體

江芬蘭¹ 陳金枝^{1,3} 張清安² 鄭櫻慧¹

¹ 台中縣行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

² 台中縣霧峰鄉朝陽科技大學生化科技研究所

³ 聯絡作者，電子郵件：chinzue@tari.gov.tw；傳真：+886-4-2330-2803

接受日期：中華民國 98 年 12 月 16 日

摘要

江芬蘭、陳金枝、張清安、鄭櫻慧. 2009. 感染鳶尾花引起嵌紋病徵之 *Potyvirus* 病毒鑑定及利用細菌表現病毒鞘蛋白製備病毒多元抗體. 植病會刊 18: 217-224.

本研究於日本進口之鳶尾花植株發現黃化嵌紋病徵之葉片組織，以 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 檢測出與 *Potyvirus* 屬病毒專一性抗血清產生正反應，進一步純化罹病葉片之全量核酸，利用 *Potyvirus* 屬之廣效性引子對 HRP 5/Oligo dT 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，將預期 1.3-kb 核酸產物進行選殖及定序後，獲得一核酸選殖分離株 JI 2。JI 2 分離株與 GenBank 上已登錄之鳶尾花嵌紋病毒 (Butterfly flower mosaic virus, 簡稱 BFMV, 序號 AM774001) 之鞘蛋白核苷酸與氨基酸序列相同度 (identities) 均大於 99.6%，推測屬於相同病毒之不同系統。設計可增幅 JI2 全長度鞘蛋白基因之專一性引子對，經 RT-PCR 增幅後，將其選殖於表現載體 pET28b (+) 上，再轉型於 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內誘導大量表現蛋白之生成，將分子量約 29.5 kDa 之表現蛋白經兔免疫注射後，得到對應 JI2 之多元抗體 (#162)。此多元抗體可應用於 ELISA、西方轉漬法 (Western blotting)，及 SDS 免疫擴散反應 (Sodium dodecyl sulfate immunodiffusion) 與同源抗原產生專一性反應。針對 JI2 之已知核酸序列所設計之 JI-up/JI-dw 引子對，利用 RT-PCR 可專一性地檢測出感染 BFMV 之鳶尾罹病組織，此等自製以 JI2 分離株為來源所製備對應鳶尾花嵌紋病毒引子對及抗體，可實際應用於進口鳶尾花種球之病毒監測，提供了我國對此病毒之自主檢測能力之實質助益。

關鍵詞：鳶尾花嵌紋病毒、細菌表現蛋白、多元抗體

緒言

鳶尾花，屬於鳶尾科 (Iridaceae)、鳶尾屬 (*Iris*) 的多年生單子葉草本植物，有藍蝴蝶花、扁竹花、愛麗絲等別稱，常見的鳶尾科的球根花卉包括鳶尾花、唐菖蒲和小蒼蘭。日本及中國大陸地區為鳶尾花的原生地⁽⁸⁾，目前世界各地均有栽植，常可在公園和庭院中見其蹤影。

目前已知感染鳶尾花之病毒種類，包括長絲狀的

Iris mild mosaic virus (IMMV)⁽⁴⁾、*Iris severe mosaic virus* (ISMV)⁽⁵⁾、*Ornithogalum mosaic virus* (OrMV)⁽¹³⁾、*Ornithogalum virus 2* (OV-2)⁽¹³⁾、及 *Narcissus latent virus* (NLV)⁽³⁾ 等 *Potyvirus* 屬病毒；球型病毒的 *Tospovirus*，如 *Iris yellow spot virus* (IYSV)⁽⁹⁾。

本研究由日本進口的鳶尾花 (學名 *Iris japonica*，別名蝴蝶花和白花射干) 之種球，種植後在植株抽生之葉片上出現嵌紋病徵，罹病組織與 *Potyvirus* 屬單元抗體產生正反應，進一步經由 RT-PCR 增幅選殖後，證實

該等植株確實含有 *Potyvirus* 之鞘蛋白基因分子訊號，所獲得的核酸選殖分離株 JI2 再應用細菌誘導大量表現病毒鞘蛋白之技術，獲得純化的 JI2 表現蛋白作為免疫原，經免疫注射製備出對應 JI2 之抗血清，證明此抗血清除可應用於進口之日本鳶尾花之檢測外，也具有應用於進口花卉種苗病毒監測之效果。

材料與方法

一、病毒來源與保存

本研究由進口自日本之鳶尾花種球所抽生之葉片上，發現植株葉片出現黃化嵌紋病徵 (圖一)，選取此等出現病徵之葉片組織與市售 *Potyvirus* 抗體 (Agdia Inc. Elkhart, Indiana, USA.)，進行 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 反應，取呈現正反應之葉片組織進行試驗，並將罹病葉片浸漬於 50% (v/v) 甘油中，保存於 -20°C 下供後續實驗所需。



圖一、鳶尾花新生葉片上呈現黃化嵌紋之病徵。
Fig. 1. The yellowing and mosaic symptom occurred in the young leaves of iris.

二、寄主接種試驗

分別切取呈現病徵之鳶尾花葉片組織以 0.05 M 磷酸緩衝溶液研磨後接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 等寄主植物，7 至 10 天後觀察病徵表現，並摘取葉片組織進行 ELISA 檢測。

三、反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

取 0.1 公克之鳶尾花葉片，加入液態氮研磨均勻後，利用植物全量核酸純化試劑組 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行全量 RNA 之純化。利用可增幅 *Potyvirus* 3' 端約 1.3 kb 核酸片段之簡併式引子對 HRP5/Oligo dT⁽⁷⁾，以純化所得之 RNA 為模板，進行單步驟 RT-PCR 反應。

依據單步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 之建議配方，每一 50 μ l 反應液中分別加入全量 RNA/2 μ l、5x PCR buffer/5 μ l、enhancer buffer/5 μ l、RNase/23 μ l、Reverse transcription polymerase/1U、及 20 μ M HRP5 和 Oligo dT 引子/各 2.5 μ l。於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序為 50°C 下進行反轉錄 30 分鐘，94°C 變性 1 分鐘半；之後進行 28 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 分鐘半，52°C 下煉合 1 分鐘半，72°C 下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 分鐘。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

四、核酸片段選殖和核苷酸序列分析

將 RT-PCR 增幅後，預估 1.3 kbp 的 DNA 片段選殖於 TOPO-PCR II 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)，並進行嵌入序列之核苷酸定序⁽⁷⁾，所得之序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 GenBank 上已登錄之 *Potyvirus* 屬病毒之鞘蛋白基因序列進行比對。

五、JI2 分離株鞘蛋白基因之蛋白質表現及多元抗體製備

依據定序結果，針對可增幅 JI2 分離株之全長度鞘蛋白 (coat protein, 簡稱 CP) 核苷酸序列，設計專一性引子對 JI2CP-u/JI2CP-d [5'-AAGCACTGTACTCCATGGGAACGCAAGTTGACG (劃底線者為 *Nco*I 切位)/5'-AAAGATAGACCTCGAGTTACTGCGAA CACC-3', (劃雙底線者為 *Xho*I 切位)]。以罹病之鳶尾花葉片組織全量 RNA 為模板，參照上述 RT-PCR 反應條件，以 JI2CP-u/JI2CP-d 引子對，於 50°C 下煉合，25 個 PCR 循環增幅，預估可獲得 828 bp 之鞘蛋白核酸片段。

將增幅所得之 JI2 鞘蛋白核酸片段以 *Nco*I 和 *Xho*I 切割，剪接於同樣經 *Nco*I 和 *Xho*I 切割之 pET28b (+)

載體 (Novagen, Inc. Madison, WI, USA) , 並轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3) 。轉型株以 M9 培養基培養⁽¹¹⁾ , 並以 1 mg/ml 之 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現。培養之菌液以 8000 rpm 轉速離心 10 分鐘後, 沉澱物以 pH 8.0 之 Tris-EDTA 緩衝液溶解均勻, 並進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析, 再經西方轉漬法以 *Potyvirus* 專一性抗體確認 JI2 鞘蛋白之表現。

進一步選用確定有表現鞘蛋白之選殖株進行大量表現蛋白之生產, 參照以往之研究報告進行^(7,11)。將純化所得之表現蛋白進行每週一次, 連續四週之兔免疫注射, 每次注射 1 mg 之表現蛋白, 第五週起由兔耳朵進行靜脈採血, 每次採約 30-40 ml 以製備多元抗體。

六、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 及 SDS-免疫擴散反應 (Sodium dodecyl sulfate immunodiffusion)

1. ELISA

本試驗參照以往之研究報告進行⁽⁶⁾, 取 0.1 g 之罹病葉組織, 以 3 ml 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後, 加入 96 孔 EIA 反應盤內, 每樣品二個重複, 置於 37°C 生長箱 4 小時進行覆膜反應 (coating reaction) ; 然後以 1x PBST 緩衝液沖洗三次; 其次分別加入由表現蛋白製備對應 JI2 之抗體 (#162), 放置在 25°C 定溫箱反應 4 小時; 爾後以 1x PBST 緩衝液沖洗三次, 再加入已稀釋 6000 倍的山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA) , 100 μ l/孔, 置於 25°C 之定溫箱反應 4 小時; 最後再以 1x PBST 緩衝液沖洗四次後, 再以 150 μ l/孔之比例加入濃度為 1mg/ml 之鹼性磷酸酶基質 (p-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應 30 分鐘, 以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值, 作為評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片讀值 2 倍者, 視為正反應。#162 抗體與不同鳶尾花罹病株和研究室保存之不同 *Potyvirus* 病毒來源罹病組織進行血清檢測 (表二)。

2. SDS-免疫擴散反應

將鳶尾花罹病組織研磨均勻, 分別與一次水及 3% SDS 以等體積比例混合 (1:1:1) 後, 取其濾液於沸水中悶 3 分鐘, 作為 SDS 處理過之抗原, 再與自製之 #162 抗血清進行 SDS-免疫擴散反應⁽¹²⁾; 細菌大量表現之 JI2

分離株鞘蛋白, 則將蛋白質回收液直接與 3% SDS 以等體積比例混合 (1:1) 並經相同的熱處理。

七、西方轉漬法 (Western blotting)

將 0.1 g 之罹病葉組織, 以液態氮磨碎, 加入 200 μ l 之樣品處理液 (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 20% glycerol, 2% SDS, 3% β -Mercaptoethanol) 。再取 100 μ l 研磨液加入等體積之 LDS 溶液⁽¹⁰⁾ 混勻後進行電泳。SDS-PAGE 電泳後, 將膠體轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA) , 分別以購自 Agdia 公司之 *Potyvirus* 及自製 #162 之抗血清進行反應。

八、JI2 (#162) 抗體應用於鳶尾花罹病株之檢測

針對日本進口之鳶尾花, 採取其葉片以自製 JI2 (#162) 抗體分別以 ELISA、SDS-免疫擴散反應及西方轉漬法進行檢測, 流程詳如前述。與 #162 抗體產生正反應值之樣品, 進一步以植物全量 RNA 純化試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany) 萃取其全量 RNA, 以前述之 *Potyvirus* 鞘蛋白簡併式引子對 HRP5/Oligo dT 進行鞘蛋白核酸片段之選殖及定序, 所得之不同來源分離株之核酸序列與不同 *Potyvirus* 屬病毒 (如表一所示) 進行核酸序列之分析。

九、JI2 分離株 專一性引子對之設計與測試

依據 JI2 分離株之鞘蛋白核苷酸序列設計可增幅出全長度鞘蛋白 (分子量預估 820 bp) 之引子對 JI-up, 5'-TGA AGC ACT GTA CTT CCA 3' /JI-dw, 5'-GGT TCT TAC TGG CGA ACA -3'。取經由 ELISA 初步檢測出與 JI2 抗血清產生正反應之鳶尾花罹病組織進行 RT-PCR 反應, 反應條件如前述。另取感染有 OrMV (*Ornithogalum mosaic virus*) 之白藜單斑作為對照, 測試此引子對之檢測專一性。

結 果

一、罹病植株病徵與血清檢測鑑定

本研究由進口自日本之鳶尾花種球種植, 於新生的葉片上, 發現植株葉片出現黃化嵌紋病徵 (圖一), 選取此等出現病徵之葉片組織, 初步以 ELISA 血清法進行檢測, 發現與市售 *Potyvirus* 專一性抗體產生正反應, 顯示罹病組織內存在與 *Potyvirus* 有血清親緣之病毒。

二、接種試驗

將呈現黃化嵌紋之鳶尾花組織粗汁液接種於奎藜，並無單斑形成，且接種於紅藜及菸草等作物亦無病徵表現及未檢測出有病毒反應。

三、感染鳶尾花之病毒鞘蛋白基因選殖及核酸序列分析

本研究以 HRP 5/Oligo dT 簡併式引子對，直接由鳶尾花罹病葉片純化之全量核酸進行 RT-PCR，選殖到與預估值相符合之 1.3 kb 左右之病毒核酸片段，經定序後確定只含有一個轉譯架構 (open reading frame)，為一種具有 *Potyvirus* 基因體 3' 端特質之核酸片段，代號 JI2 (已登錄於 GenBank 取得序號為 GQ240300)。對應 JI2 分離株之鞘蛋白 (coat protein, CP) 基因有 792 個核苷酸，可轉譯出 264 氨基酸，預估分子量約為 29.0 kDa。JI2 對應 NIb (Nucleous inclusion b) 及 CP 之裂解位置乃位於氨基酸序列 LYFQ/G，由其 N 端起始第 5 個氨基酸位置上發現有對應 *Potyvirus* CP N 端氨基酸特質之 DAG triplet，推測 JI2 應具有藉蚜蟲傳播之能力。利用 JI2 分離株與 GenBank 上已登錄可感染鳶尾花，屬於 *Potyvirus* 病毒之 Butterfly flower mosaic virus (AM774001)⁽⁸⁾，在病毒鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之相同度均高於 99.6% 以上 (表一)，推測二者應為相同病毒的不同系統^(1,2)。

四、鳶尾花 JI2 病毒分離株鞘蛋白之表現及其抗血清製備

以專一性引子對 JI2CP-u/JI2CP-d 進行 JI2 全長度鞘蛋白基因之增幅，將 JI2 鞘蛋白 (JI-CP) 序列構築於 pET28b (+) 表現載體後，轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3) 宿主中，經 IPTG 誘導後表現之融合性蛋白質大小約 29.5 kDa，與預估值相符 (圖二，A)。此表現蛋白以西方轉漬法分析時，可與購自 Agdia 公司之 *Potyvirus* 抗血清產生正反應 (圖二，B)。JI2-CP 表現蛋白經兔免疫注射後所製備之抗血清 (#162)，於 SDS-免疫擴散反應可與正對照之 JI-CP 表現蛋白及經 IPTG 誘導之 pET28b (不含 JI-CP) 蛋白質反應；與鳶尾花罹病組織產生沉澱反應，此沈澱反應與 JI2-CP 表現蛋白所產生之沉澱帶呈現同源性之融合反應 (圖三)。

五、應用 JI2 抗血清 (#162) 於檢測鳶尾花樣品及不同 *potyviruses* 病毒之測試

將 #162 抗體進行 ELISA 及西方轉漬法等血清檢測反應。以 #162 抗體對日本進口之鳶尾花病株及不同

Potyvirus 屬病毒來源進行 ELISA 檢測，#162 抗體只與感染鳶尾花之同源病毒發生反應而不與其他種 *Potyvirus* 屬病毒發生反應，顯示此抗體具專一性反應，(表二)。在西方轉漬法中，#162 抗體對不同鳶尾花病株進行時，與同源病毒及 JI2 分離株之細菌表現鞘蛋白發生反應，而不與健康對照抗原產生反應 (圖四)。

六、應用 RT-PCR 專一性檢測 BFMV 分離株之發生

針對 JI2 之核苷酸序列所設計之 JI-up/JI-dw 引子對，可成功地自與 JI2 抗血清有正反應之罹病鳶尾葉片組織增幅出大小約 820 bp 之核酸片段產物，且並不與記錄上可感染鳶尾花之 *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV) 罹病組織產生反應 (圖五)，顯示此引子對可用於鳶尾花作 BFMV 之專一性檢測。

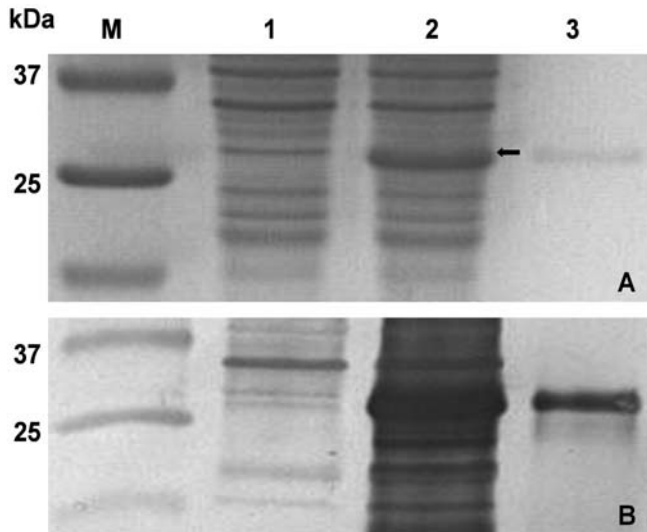
表一、鳶尾花嵌紋病毒 JI-2 分離株與已登錄於 GenBank 之其他 *Potyvirus* 病毒鞘蛋白基因序列分析比對

Table 1. Percent identities of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein region of Butterfly flower mosaic virus JI-2 isolate to other potyviruses available in GenBank

Virus isolates ¹	Percent identity of CP region ²		
	Acc. No	nt	aa
JI-2	GQ240300	100.0	100.0
BFMV	AM774001	99.6	99.6
BCMV	Z17203	63.8	61.7
IMMV	DQ436918	57.9	59.7
ISMV	AF034839	56.9	54.3
OrMV	AU994106	60.0	60.2
PVY	AF525081	62.3	62.9
SMV	AJ628754	58.3	58.3
SPFMV	EF015398	51.5	50.5
SuMV	AF465545	71.0	74.1
TEV	DQ871309	70.6	76.1
TuMV	AB076526	58.5	55.2
ZYMV	AB127936	62.0	60.7

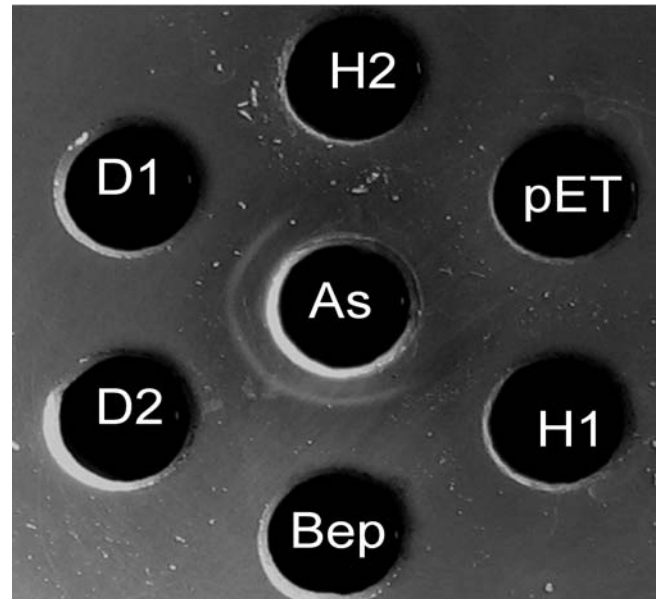
¹ The sequences in the regions of coat proteins of different potyvirus isolates used in this study were obtained from GenBank including Butterfly flower mosaic virus (BFMV), *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Iris mild mosaic virus* (IMMV), *Iris severe mosaic virus* (ISMV), *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV), *Potato virus Y* (PVY), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Sunflower mosaic virus* (SuMV), *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Tobacco etch virus* (TEV), and *Turnip mosaic virus* (TuMV), and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV).

² Sequences analysis was conducted by use of the program of Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wisconsin).



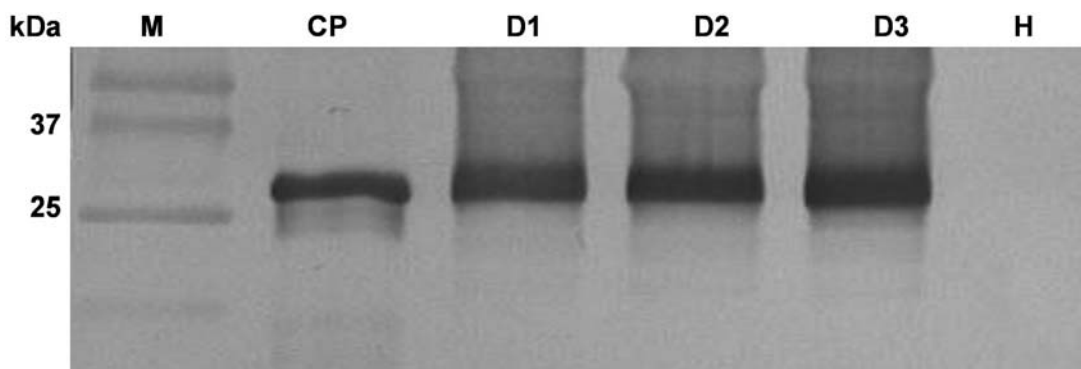
圖二、經由細菌大量表現之鳶尾花嵌紋病毒 JI2 分離株之鞘蛋白電泳及西方轉漬法分析圖。(A) SDS-PAGE 蛋白質電泳圖；(B) 西方轉漬法分析。行 M, 蛋白質分子量標幟；行 1, 細菌表現之 pET28b (b) 蛋白(未帶有 JI2 鞘蛋白)；行 2, 細菌表現之 JI2 鞘蛋白；行 3, 純化後之細菌表現的 JI2 鞘蛋白。

Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assay of the bacterial expressed coat protein (CP) of JI2 isolate. (A) SDS-PAGE of the 29.5 kDa bacterial expressed JI CP (arrowed) ; (B) The bacterial expressed JI2 CP was reacted with the 200x-diluted antiserum against *Potyvirus*-specific monoclonal antibody purchased from Agdia Co. Lane M, protein markers; lane 1, IPTG-induced bacteria lysate containing expression vector pET28b (+) without JI2 CP insert; lane 2, IPTG-induced bacteria lysate containing pET28b (+) with JI2 CP insert; lane 3, purified bacterial expressed JI2 CP.



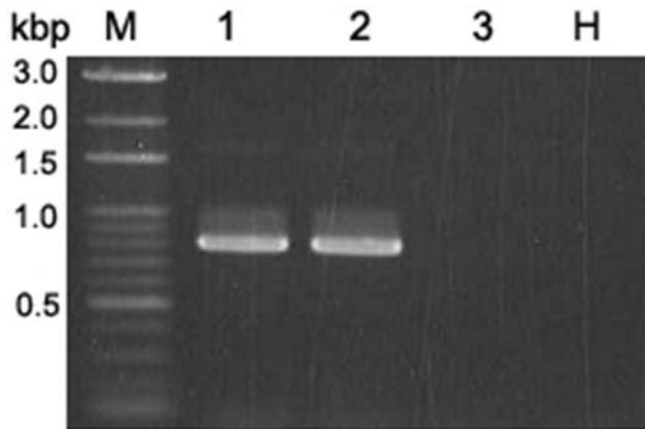
圖三、利用細菌表現之鳶尾花嵌紋病毒 (Butterfly flower mosaic virus) JI-2 抗血清於 SDS 免疫擴散法與罹病鳶尾花之反應。Bep, 細菌表現之 JI2 鞘蛋白；pET, 細菌表現之 pET28b (b) 蛋白 (未帶有 JI2 鞘蛋白)；D1 及 D2, 病毒感染之罹病鳶尾花葉組織；H1 及 H2, 健康鳶尾花葉組織。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum against bacterial expressed coat protein of Butterfly flower mosaic virus JI2 CP. The central well was filled with antiserum against antiserum #162 (As). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including Bep, the IPTG-induced bacterial lysate containing pET28b (+) with JI2 CP insert; pET, the IPTG-induced bacteria lysate containing pET28b (+) without JI2 CP insert; D1 and D2, virus-infected iris tissues; H1, the healthy tissues of iris.



圖四、利用細菌表現之鳶尾花嵌紋病毒 JI-2 抗血清於西方轉漬法檢測罹病鳶尾花組織。行 M, 蛋白質分子量標幟；行 CP, 純化後之細菌表現 JI2 鞘蛋白；行 D1、D2、及 D3, 病毒感染之鳶尾花葉組織；行 H, 健康鳶尾花葉組織。

Fig. 4. Western blotting test of antiserum against bacterial expressed coat protein of the bacterial expressed JI2 CP and the virus-infected iris tissues imported from Japanese. Samples were reacted to the 1000x-diluted antiserum against JI2 CP (#162). Lane M, protein marker; lane CP, the purified lysate of bacteria expressed JI2 CP; lane D1, D2, D3, virus-infected iris tissues; lane H, healthy tissue of iris.



圖五、利用 JI-up/JI-dw 引子對進行鳶尾花罹病組織之反轉錄-聚合酶鏈鎖反應之電泳圖。行 M，核酸分子量標幟；行 1, 2，BFMV 感染之鳶尾花罹病葉組織；行 3，OrMV 感染之病組織；行 H，健康鳶尾花葉組織。
Fig.5. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of the Butterfly flower mosaic virus JI2 isolate by the JI-up/JI-dw primer pair. Lane M, molecular marker; lane 1, 2, BFMV-infected irises JI2 and JI3 isolates; lane 3, OrMV-infected tissues; lane H, the healthy control. The RNA templates of iris JI2 and JI3 purified from the total RNA of diseased tissues, were all reacted to the primer pair JI2-up/JI2-dw and generated 820 bp DNA products, respectively.

討 論

近幾年來，花卉產業蓬勃發展，多種球根花卉進口國內種植，相對地也容易引進國外發生的病毒。本研究從日本進口的鳶尾花種球新生的葉片上，直接檢測與分離出病毒核酸即是一例。本研究之 JI2 分離株與近來 GenBank 上已登錄之 Butterfly flower mosaic virus (AM774001)⁽⁸⁾，在病毒鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列之相同度均高於 99.6% 以上，由本研究血清學與分子生物學的證據顯示 JI2 分離株確實屬於新近發表的 *Potyvirus* 屬病毒 Butterfly flower mosaic virus (BFMV)。

BFMV 屬於一種新的 *Potyvirus* 屬病毒，乃於 2008 年由中國大陸學者於呈現嵌紋病徵的日本鳶尾花上分離、定序以及暫命名者，本病毒顆粒長度約 720-770nm，鞘蛋白分子量約 29 kDa⁽⁸⁾。目前已普遍發生於中國大陸之北京、南京、昆明及上海等地。根據 Chen *et al.* 報告，實驗室的機械接種結果僅感染鳶尾花，並無法感染白藜、或紅藜、煙草等十多種作物，本研究雖僅將罹病組織接種了白藜、或紅藜、煙草三種作物，然而結果也顯示並無病毒的感染，血清的檢測也並未檢測出病毒。而 *Potyvirus* 屬病毒在自然界的傳播，主要透過蚜蟲以非永續性方式傳播，自然界是否

表二、利用細菌表現之鳶尾花嵌紋病毒 JI-2 多元抗體以 ELISA 檢測不同 *Potyvirus* 屬病毒之效益

Table 2. Efficiency of the virus reaction by the polyclonal antibody against Butterfly flower mosaic virus JI-2 to different potyviruses in enzyme-linked immunosorbent assay

Antigens ¹	ELISA reading ²
	30x
Iris 1	1.096
Iris 2	1.046
Iris 3	0.908
Iris 4	0.706
Iris 5	1.326
BCMV	0.017
BICMV	0.097
BYMV	0.012
CVMV	0.123
DsMV	0.013
LiMV	0.024
LPV	0.011
LyMMV	0.058
MVbMV	0.072
OrMV	0.027
PaMV	0.035
PCV	0.011
PRSV	0.070
PSbMV	0.071
PStV	0.021
PtVY	0.029
PVY	0.066
SMV	0.073
TMMV	0.071
TuMV	0.040
ZaMV	0.053
JI2-CP	2.359
Diseased control	1.012
Healthy control threshold	0.222

¹ Different BFMV-infected iris tissues (iris 1-5) and several potyviruses stored in laboratory were used in test.

² The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than the healthy control threshold were considered undetectable by ELISA.

有其他作物可被 BFMV 感染，還有待更多的檢測發現。

本研究之 JI2 分離株，對應於 NIb 及 CP NIa protease 裂解序列均為 LYFQ/G，對應鞘蛋白有 264 個氨基酸，鞘蛋白分子量預估約為 29 kDa，與已發表者相同。本研究所設計之 JI-up/JI-dw 引子對，目前可應用於鳶尾花作病毒之專一性檢測；此外，根據 JI2 鞘蛋白序列利用細菌生合成系統所生產之融合性蛋白所製備之抗血清，除可應用於 SDS-免疫擴散法檢測到同源

病毒外，應用於 ELISA 可專一性地檢出 BFMV 病毒 (表二)，於西方轉漬法中更能清晰地檢出罹病病葉中的病毒 (圖三)。本研究針對鳶尾花 BFMV-JI2 製備之核酸檢測用引子對以及其抗血清，能專一性地檢出 BFMV 病毒，對於進口鳶尾花種球之病毒篩檢，可以有效發揮檢疫的功能，對於國內栽種之鳶尾花，可提供明確的病毒發生資訊，應用於追蹤此病毒可能產生的風險之病毒檢測所需。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adams M. J., Antoniw, J. F., and Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch Virol* 150: 459-479.
2. Berger, P. H., Adams, M. J., Barnett, O. W., Brunt, A. A., Hammond, J., Hill, J. H., Jordan, R. L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E., Spence, N., Stenger, D. C., Ohki, S. T., Uyeda, I., van Zaayen, A., Valkonen, J., and Vetten, H. J. 2005. *Potyviridae*. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. eds. *Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp 819-841.
3. Brunt, A. A. 1976. Narcissus latent virus. AAB descriptions of plant viruses no. 170. AAB, Wellesbourne, UK
4. Brunt, A. A. 1986. Iris mild mosaic virus. AAB descriptions of plant viruses no. 324. AAB, Wellesbourne, UK
5. Brunt, A. A., Derks, A. F. L. M., and Barnett, O. W. 1988. Iris severe mosaic virus. AAB descriptions of plant viruses no. 338. AAB, Wellesbourne, UK
6. Chen, C. C., Chang, C. A., and Dai, T. 1999. Variable distribution patterns of bean yellow mosaic potyvirus and cucumber mosaic cucumoviruses in gladiolus plant and their influence on virus detection. *Plant Pathol. Bull.* 8: 117-120. (in Chinese with English abstract)
7. Chen, C. C., Hsiang, T., Chiang, F. L., and Chang, C. A. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 13-20.
8. Chen, J., Shi, Y. H., Li, M. Y., Adams, M. J., and Chen, J. P. 2008. A new potyvirus from butterfly flower (*Iris japonica* Thunb.) in Zhejiang, China. *Arch. Virol.* 153 (3): 567-569.
9. Cortês, I., Livieratos, I. C., Derks, A., Peters, D., and Kormelink, R. 1998. Molecular and serological characterization of Iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology.* 88: 1276-1282.
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-685.
11. Li, R. H., Zettler, F. W., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (*Caladium* isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. *Arch. Virol.* 143: 2461-2469.
12. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) -treated plant viruses and plant viral inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 788. 39 pp.
13. Wei, T., Pearson, M. N., and Cohen, D. 2006. First report of ornithogalum mosaic virus and ornithogalum virus 2 in New Zealand. *Plant Pathol.* 55: 820.

ABSTRACT

Chiang, F. L.¹, Chen, C. C.^{1,3}, Chang, C. A.², and Cheng, Y. H.¹ 2009. Identification of the potyvirus causing mosaic symptom on iris and the preparation of the virus polyclonal antiserum by immunizing bacterial expressed viral coat protein. *Plant Pathol. Bull.* 18: 217-224. (¹Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung; ²Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung; ³Corresponding author, E-mail: chinzue@tari.gov.tw; Fax: +886-4-2330-2803)

Iris (Iris japonica), native in Japan and Mainland China, is a bulb floral crop imported to Taiwan. Several iris plants exhibited yellowing mosaic symptoms on the leaves emerging from the bulbs were recently observed. The infected leaves exhibiting symptom was positively reacted to the *Potyvirus*-specific monoclonal antibody (Agdia Inc.) in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A predicted 1.3 kb DNA fragment was amplified from the symptomatic leaf tissues by use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), with the use of potyvirus-degenerate primers. An isolate (JI2) was cloned and sequenced from the RT-PCR amplicons and compared to those of other plant viruses available in the GenBank. The percentage identities of the nucleotide and amino acid sequences of the full-length coat protein (CP) gene of JI2 were both higher than 99.6% comparing to the Butterfly flower mosaic virus (BFMV, GenBank Acc. AM774001). It indicated that JI2 isolate is probably a strain of BFMV. The full-length of JI2-CP gene was subsequently amplified and constructed into the expression vector pET28b (+), then transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) cells. An expected 29.5-kDa overexpressed fusion protein was purified and used as an immunogen to prepare polyclonal antiserum. The designed JI-up/JI-dw primer pair was applied in the detection of BFMV in iris tissues by RT-PCR. The prepared antiserum (As-JI2) was proved to be useful in ELISA, western blotting and SDS-immunodiffusion tests for the detection of BFMV in virus-infected iris samples. The As-JI2 was suitable to be applied on the BFMV detection for the imported iris bulbs.

Key words: *Iris japonica*, Butterfly flower mosaic potyvirus, bacteria expressed coat protein, RT-PCR, polyclonal antibody