一種葡萄風信子病毒之鑑定及其血清與分子檢測工具之製備

江芬蘭　陳金枝*

台中縣霧峰鄉　行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

(接受日期：2010 年 12 月 6 日)

摘　要

江芬蘭、陳金枝*　2010　一種葡萄風信子病毒之鑑定及其血清與分子檢測工具之製備　植保會刊 52(3): 69-82

具輕微黃化嵌紋病徵之進口葡萄風信子罹病組織粗汁液可與*Potyvirus*屬病毒專一性單株抗體產生正反應。進一步萃取葡萄風信子罹病組織之全量核酸，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)，可增幅出一與預估相符合的核酸片段(約 1.2 kb)。此 RT-PCR 產物經選殖及定序後，獲得一核酸 Ma2 選殖株。Ma2 選殖株之核苷酸與胺基酸序列與*Potyvirus*屬的葡萄風信子嵌紋病毒(Muscari mosaic virus，簡稱 MMV，序號 EU042752)的鞘蛋白基之核苷酸和胺基酸序列皆有高於 98%之相同度，顯示此葡萄風信子病毒爲MMV之一分離株(isolate)。進一步將Ma2 選殖株之全長度鞘蛋白序列選殖於表現載體 pET28b(+)上，轉型於 *E. coli* Rosetta (DE3)宿主內並大量誘導其表現蛋白，分子量估計約 29.7 kDa。 經免疫分析證實此表現蛋白可與市售之*Potyvirus*專一性抗體反應，且將此表現蛋白經兔免疫注射後，得到對應Ma2 鞘蛋白抗原之抗血清(As-Ma2)。As-Ma2 抗血清可應用於酵素連結免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)、西方轉漬法(western blotting)，及 SDS 免疫擴散反應(sodium dodecyl sulfate immunodiffusion)與同源抗原產生反應，也於 ELISA 反應中與其他數種 potyviruses 之病葉組織有正反應之結果，進一步以西方轉漬法證明 As-Ma2 抗血清與四種豆類病毒(BCMV、BlCMV、BYMV 及 SMV)、兩種天鵝絨病毒(OrMV 及 PtVY)、兩種瓜類病毒(MVbMV 及

*通訊作者。E-mail: chinzue@tari.gov.tw

ZYMV) 以及一種茄科病毒 PVMV 等之鞘蛋白分子量相關位置有免疫反應，顯示 As-Ma2 於血清反應中可廣效應用於此等 potyviruses 的血清檢定。利用 Ma2 已知序列所設計之 Maup/Madw 引子對，於 RT-PCR 反應中可於葡萄風信子罹病組織中專一性地檢測出病毒反應，但不與其他種 potyviruses 罹病組織有反應，此引子對可應用於 MMV 之專一性檢測。國外已記錄之 MMV 首見於台灣，本研究針對 MMV 病毒之檢測試劑進行開發，對於進口葡萄風信子種球之病毒監測具有實質之助益。

(關鍵詞：葡萄風信子、*Potyvirus* 屬病毒、病毒檢測、RT-PCR、細菌表現鞘蛋白)

緒　　言

葡萄風信子(學名 *Muscari armeniacum*) 爲百合科 (*Liliaceae*) 葡萄風信子屬 (*Muscari* spp.) 的多年生單子葉球根花卉[11]，原生於歐亞大陸，別名藍壺花、串鈴花、葡萄百合、麝香蘭等，可當作地被花卉、花壇和盆栽等。

目前已知感染葡萄風信子之病毒種類有兩種 *Potyvirus* 屬病毒，包括風信子嵌紋病毒 (*Hyacinth mosaic virus*，HyaMV)[8, 11]，以及新近由國外學者於荷蘭葡萄風信子所發現之葡萄風信子嵌紋病毒 (Muscari mosaic virus，MMV)[12]。國內種植之葡萄風信子多由荷蘭進口，本研究由進口自荷蘭之葡萄風信子種球，採集具黃化嵌紋病徵之新抽生葉片組織進行血清及核酸檢測，證實該等植株確實爲 *Potyvirus* 屬病毒所感染。進一步由血清學之試驗以及核酸序列之選殖與定序分析確定其分類地位，並以細菌生合成方式誘導大量鞘蛋白之表現作爲多元抗體製備之抗原來源，成功地製備出對應此病毒之抗血清，並設計專一性引子對，可提供作爲葡萄風信子病毒檢測之應用。

材料與方法

病毒來源

進口葡萄風信子種球之新生葉片上出現黃化嵌紋病徵，選取此等葉片組織粗汁液與市售 *Potyvirus* 專一性單株抗體 (Agdia, Elkhart, IN)進行酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)，選取與 *Potyvirus* 抗體呈現正反應之葉片組織進行病毒之鑑定材料來源，植株並於隔離溫室中進行觀察。

寄主接種試驗

切取葡萄風信子之罹病葉片組織，與 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 以 1:10 (w/v) 比例研磨均質後，分別接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 等植物，於隔離溫室中觀察病徵表現，並摘取葉片組織進行 ELISA 檢測，反應方法如前人所述[3]。

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

取 0.1 公克之葡萄風信子罹病葉片，

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。以純化所得之 RNA 爲模板，利用可增幅 *Potyvirus* 全長度鞘蛋白 (coat protein，CP) 基因的簡併式引子對 HRP 5 (5'-ATGATHGARKCNTGGGG-3')[7] 及 Oligo-dT (5'-GCGGCCGCT$_{14}$-3') 進行單步驟 RT-PCR 反應。

根據單步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark, Taichung, Taiwan) 之配方，於每一 50 µl 反應液中分別加入 2 µl 全量 RNA、5 µl 5x PCR buffer、5 µl enhancer buffer、23 µl RNase free water、1 U reverse transcriptase、及各 2.5 µl 之 20 µM HRP5 和 Oligo-dT 引子，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) 中，設定反應程序爲 50℃下進行反轉錄 30 分鐘，94℃變性 1 分鐘半；之後進行 28 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 分鐘半，52℃下煉合 1 分鐘半，72℃下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72℃聚合反應延長爲 6 分鐘。此一反應預估可增幅出大小約 1.2 kb 之核酸產物，反應結果以 1.2%電泳瓊膠 (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) 進行分析。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析

將 RT-PCR 增幅實際所得之 1.2 kb DNA 片段選殖於 pCR II-TOPO 載體上 (Invitrogen, Carlsbad, CA)，再篩選出含有 1.2 kb DNA 之嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交明欣生物技術有限公司，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，所得之 Ma2 選殖株序列以 Vector NTI Suite (Invitrogen) 分析軟體 AlignX 程式進行分析，並與 GenBank 上已登錄之 *Potyvirus* 屬病毒之鞘蛋白基因序列進行比對。

受測病毒鞘蛋白基因之蛋白質表現及多元抗體製備

設計對應受測病毒全長度鞘蛋白核苷酸序列之專一性引子對 Ma-CPu (5'-ATGACTGCGAAGTTTCCATGGAGT-CGGGAGAA-3'，劃底線者爲 *Nco*I 切位) 及 Ma-CPd (5'-TTATCTGATAGTACTCGAGT-CACATTCGGACT-3'，劃雙底線者爲 *Xho*I 切位)，此引子設計將使得剪切構築於 pET28b(+) 載體 (Novagen, Madison, WI) 之病毒鞘蛋白分子將轉譯出全長度 268 個胺基酸的鞘蛋白而同時 N 端將多帶有 2 個載體上的胺基酸，但不含載體上的 histidine tag。以罹病之葡萄風信子全量 RNA 爲模板進行單步驟 RT-PCR 反應，於 50℃下煉合，30 個循環增幅鞘蛋白基因。

將增幅所得之受測病毒鞘蛋白核酸片段以 *Nco*I 和 *Xho*I 切割，剪接於同樣經 *Nco* I 和 *Xho*I 切割之 pET28b(+) 載體，並轉殖於細菌表現系統 *E. coli* Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基培養[9]，並以 1 mg/ml 之 IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現。菌液以 8000 rpm 轉速離心 10 分鐘後 (Spectrafuge, Labnet, Edison, NJ)，以 10 mM，pH 8.0 之 Tris-EDTA 緩衝液溶解沉澱物，直接進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析，並經西方轉漬法以市售之 *Potyvirus* 抗體確認受測病毒鞘蛋白之表現。進一步選用確定有鞘蛋白表現之選殖株，參照前人方法[3, 6, 10]進行表現蛋白之大量生產。

以純化所得之表現蛋白送交濁水溪生

物科技股份有限公司進行每週一次，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。

ELISA

本試驗參照以往之研究報告進行[3]，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 ELISA 反應盤內，100 µl /孔，每樣品二個重複，置於 37℃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；其次加入已稀釋 500 倍之 Ma2-CP 表現蛋白所製備之多元抗體 (As-Ma2)，100 µl/孔，放置在 25℃定溫箱反應 4 小時；反應完，以 1x PBST 緩衝液沖洗三次，再加入已稀釋 6000 倍之鹼性磷酸酶接合的山羊抗兔二次抗體 (alkaline phosphatase-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin; Jackson, West Grove, PA)，100 µl/孔，置於 25℃之定溫箱反應 4 小時；最後再以 1x PBST 緩衝液沖洗四次後，以 150 µl/孔之比例加入濃度爲 1 mg/ml 之鹼性磷酸酶基質(ρ-NPP, Amresco, Solon, OH)進行呈色反應。反應後 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，作爲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，視爲正反應。As-Ma2 抗體與抗原進行血清關係比對之病毒包括已知葡萄風信子罹病株，及研究室保存之不同 *Potyvirus* 屬病毒組織(見表二)。

SDS 免疫擴散反應(SDS-immunodiffusion)

將罹病組織研磨均勻，再分別與一次水及 3% SDS 溶液以等體積比例混合均勻，取其濾液於沸水中悶 3 分鐘，作爲 SDS 處理過之抗原，再與 As-Ma2 抗血清進行 SDS-免疫擴散反應。細菌大量表現之 Ma2 鞘蛋白，則將蛋白質回收沈澱懸浮液直接與 3% SDS 以等體積比例混合，並經相同的熱處理成爲 SDS 處理過之抗原。

西方轉漬法(western blotting)

取 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 µl 之樣品處理液 (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoethanol)，取 100 µl 研磨液加入等體積之 LDS 溶液[5]混勻。處理後之樣品經 12% SDS-PAGE 電泳後，取膠體將其轉漬於 PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA)，之後分別以自製之 As-Ma2 (稀釋 500 倍使用) 及購自 Agdia 公司之 *Potyvirus* 單株抗體 (稀釋 200 倍使用) 進行反應，以 Ma2 之表現蛋白作爲正反應對照。

Ma2 專一性引子對之設計與測試

針對 Ma2 之鞘蛋白核苷酸序列，設計可增幅出部份鞘蛋白片段之引子對，Maup (5'-CATGAACCTCGACCACTTAC-3')/ Madw (5'-TCGCCCTTTGTTGAGATA-3')，預估可增幅出分子量約 540 bp 之核酸產物。取經由 ELISA 初步檢測出與 As-Ma2 抗血清產生正反應之葡萄風信子罹病組織和其他與 As-Ma2 抗體在西方轉漬法中有正反應之 *Potyvirus* 屬病毒，包括 *Bean common mosaic virus* (BCMV)、*Black cowpea mosaic virus* (BlCMV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV)、*Soybean mosaic virus*

(SMV)、*Ornithogalum mosaic virus* (OrMV)、*Pterostylis virus* Y (PtVY)、*Melon vein-banding mosaic virus* (MVbMV)、*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)、*Pepper veinal mottle virus* (PVMV) 等之罹病葉組織進行RT-PCR，反應條件如上述，進一步測試此引子對之檢測專一性。

結　果

接種試驗結果

取葡萄風信子葉片出現黃化嵌紋病徵之罹病葉(圖一)，以組織汁液機械接種於奎藜後，並無單斑形成；接種於紅藜及菸草亦無病徵表現，也未檢測出有病毒反應。



圖一、葡萄風信子新生葉片上呈現黃化嵌紋之病徵。

Fig 1. The chlorosis and mosaic symptom observed on the young leaves emerging from a bulb of grape hyancith.

感染葡萄風信子Ma2病毒分離株鞘蛋白基因選殖及其核酸序列分析

取與 *Potyvirus* 專一性抗體產生正反應之葡萄風信子病葉組織，以其全量RNA核酸進行 RT-PCR 反應後，選殖到符合預估值大約 1.2 kb 之病毒核酸片段 (Ma2 選殖株)，經定序分析結果顯示，選殖到Ma2之3'端核酸片段實際有 1200 bp，只含有一個轉譯架構 (open reading frame)，爲一種具有 *Potyvirus* 基因體 3'端特質之核酸片段 (已登錄於 GenBank 取得序號爲 HQ400612)。對應Ma2 之鞘蛋白序列有 804 個核苷酸，轉譯出 268 個胺基酸，預估其分子量約爲 29.5 kDa；3'端非轉譯區含有 206 個核苷酸及 poly (A)，其餘 190 核苷酸乃屬於對應 NIb 蛋白 (Nucleous inclusion b) C 端的核苷酸序列。Ma2 對應 NIb 及 CP 之裂解位置乃位於胺基酸序列 VFH Q/S，由其 N 端起始第 5 個胺基酸位置上發現有對應 *Potyvirus* CP N 端胺基酸特質之 DAG triplet。Ma2 選殖株與 GenBank 上已登錄之葡萄風信子嵌紋病毒 (Muscari mosaic virus，MMV，序號 EU042752) 之鞘蛋白基因最爲相近，其核苷酸及胺基酸序列分別具有 98.9%及 99.3% 之相同度(表一)，依據此分子特性顯示本研究所發現感染葡萄風信子之病毒應爲 MMV 之不同分離株，將其命名爲 MMV-Ma2；而與其他種已登錄之 potyviruses 之鞘蛋白核酸分子序列之相同度均低於 65% 以下(表一)。

葡萄風信子病毒鞘蛋白之表現及其抗血清製備與測試

Ma2 鞘蛋白序列構築於 pET28b(+) 載體後，轉型於 *E. coli* Rosetta (DE3)宿主中，

表一、葡萄風信子嵌紋病毒 Ma-2 分離株與 *Potyvirus* 屬病毒鞘蛋白基因核苷酸(nt)和胺基酸(aa)序列比對之相同度 (%)

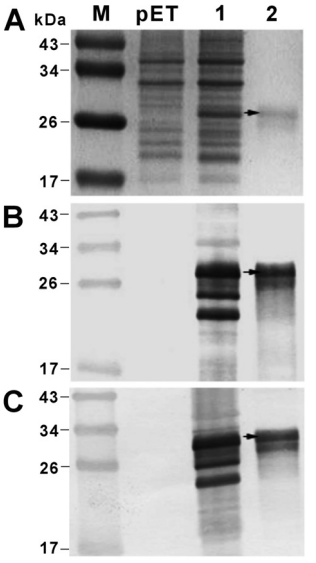
Table 1. Identities of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein of Muscari mosaic virus isolate Ma2 (MMV-Ma2) compared with those of other potyviruses

Potyvirus[1]	Identity (%)[2]		
	Acc. no.	nt	aa
MMV-Ma2	HQ400612	100.0	100.0
MMV	EU042752	98.9	99.3
BCMV	NC-003397	58.8	54.2
BlCMV	AY575773	57.6	54.2
BYMV	AB029439	61.4	56.8
CVMV	DQ854962	53.9	54.5
CypVY	AF185954	63.0	58.9
JYMV	AB027010	61.6	61.2
HyaMV	EF203679	59.4	54.5
OrMV	AB079656	64.9	63.6
PePMOV	AF440801	60.4	59.9
PRSV	AF344650	57.9	57.1
PtVY	AF185965	63.2	61.9
PVMV	AJ780970	62.2	63.7
PVY	S74813	63.3	63.9
SMV	AB100445	60.3	58.5
TuMV	AB189015	60.3	58.7
TVBMV	L28816	64.4	63.5
WMV	AY437609	60.6	57.4
ZYMV	AF127929	57.9	56.1
MVbMV	HQ423412	60.6	55.8

[1)] The abbreviations of potyviruses used for comparison are: MMV (Muscari mosaic virus), BCMV (*Bean common mosaic virus*), BlCMV (*Black cowpea mosaic virus*), BYMV (*Bean yellow mosaic virus*), CVMV (*Chilli veinal mottle virus*), CypVY (*Cypripedium virus* Y), HyaMV (*Hyacinth mosaic virus*), JYMV (*Japanese yam mosaic virus*), OrMV (*Ornithogalum mosaic virus*), PRSV (*Papaya ringspot virus*), PePMOV (*Pepper mottle virus*), PtVY (*Pterostylis virus* Y), PVMV (*Pepper veinal mottle virus*), PVY (*Potato virus* Y), SMV (*Soybean mosaic virus*), TuMV (*Turnip mosaic virus*), TVBMV (*Tobacco vein banding mosaic virus*), WMV (*Watermelon mosaic virus*), ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) and MVbMV (*Melon vein-banding mosaic virus*).

[2)] Identities of the respective nucleotide and amino acid sequences were analyzed by the AlignX program of Vector NTI Suite.

經 IPTG 誘導後表現之蛋白質大小約 29.7 kDa (病毒鞘蛋白N端多帶有 2 個表現載體之胺基酸) (圖二，A)。以西方轉漬法分析，此表現蛋白可與購自 Agdia 之 *Potyvirus* 單株抗體有專一性反應 (圖二，B)，且與 Ma2 之表現蛋白製備之抗血清 (As-Ma2) 也產生正反應 (圖二，C)；As-Ma2 抗體與葡萄風信子之罹病組織可於預估爲病毒鞘蛋白分子量大小的位置上產生正反應，但不與葡萄風信子之健康組織對照抗原產生反應 (圖三)。於 SDS 免疫擴散反應中，As-Ma2 與 Ma2 之細菌表現蛋白可產生免疫沈澱反應，但與罹病之葡萄風信子組織之反應沈澱帶不明顯或無法見到反應 (結果未出示)。



圖二、細菌表現之 MMV-Ma2 鞘蛋白 SDS-PAGE 電泳圖譜(A)及其與 *Potyvirus* 屬專一性單株抗體(Agdia) (B)和同源抗血清(As-Ma2) (C)進行西方轉漬反應後之圖譜。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28b (+)蛋白；行 1：細菌表現之 Ma2 鞘蛋白；行 2：純化後之 Ma2 表現蛋白。

Fig 2. The bacterial expressed coat protein (CP) of Muscari mosaic virus isolate Ma2 (MMV-Ma2) was examined by SDS-PAGE (A) and reacted with the commercial *Potyvirus*-specific monoclonal antibody (Agdia, 200-fold dilution) (B) and the homologous polyclonal antiserum (As-Ma2, 500-fold dilution) in western blotting. Lane M, protein markers; lane pET, IPTG-induced bacterial lysate expressed by pET28b(+) without Ma2 CP insert; lane 1, IPTG-induced bacterial lysate expressed by pET28b(+) with Ma2 CP insert; and lane 2, the purified bacterial expressed Ma2 CP. The predicted MMV CP is indicated by arrows.

應用Ma2 抗血清於檢測葡萄風信子樣品及不同 *Potyvirus* 病毒之測試

以 As-Ma2 抗血清對進口之葡萄風信子病株及不同來源 *Potyvirus* 屬病毒進行 ELISA 偵測之結果，As-Ma2 抗血清與 Ma2 同源病毒發生正反應，但也與 BCMV、BlCMV、BYMV、SMV、OrMV、PtVY、MVbMV、ZYMV 和 PVMV 等 potyviruses 產生正反應之 ELISA 讀值 (A_{405}) (表二)。進一步於西方轉漬法中，此等於 ELISA 中與 As-Ma2 產生正反應之 potyviruses，也會與 As-Ma2 產生病毒分子的正反應條帶 (圖三)。顯示此 Ma2 抗血清除了對同源病毒抗原外，對於其他種 potyviruses 也有血清特性的關連。然而進一步比對 BCMV、BlCMV、BYMV、SMV、OrMV、PtVY、MVbMV、ZYMV 及 PVMV 等 potyviruses 之鞘蛋白胺基酸序列結果顯示 (結果未出示)，此等病毒之 N 端乃爲高變異區，中央區爲高保留區，此乃不同 *Potyvirus* 鞘蛋

表二、應用葡萄風信子嵌紋病毒多元抗體檢測 potyviruses 之 ELISA 讀值

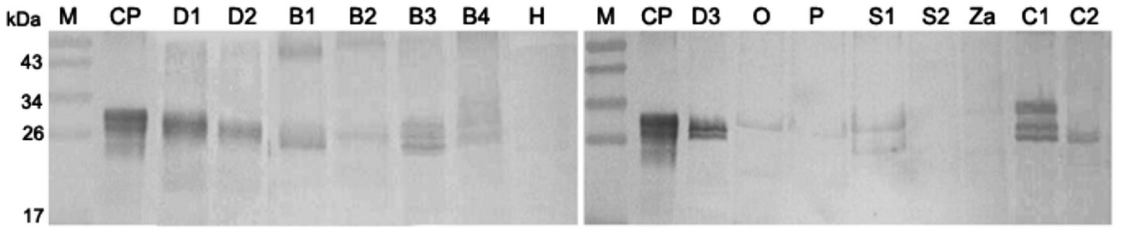
Table 2. ELISA readings of the antiserum against the coat protein of Muscari mosaic virus (MMV) reacted with various potyviruses

Potyvirus[1]	ELISA reading (A_{405})[2]	
	As-Ma2[3]	Agdia-potyvirus
Muscari spp.		
MMV-Ma1	1.85	2.58
MMV-Ma2	1.90	2.89
Zantedeschia spp.		
CLLV	0.19	1.28
DsMV	0.07	1.34
KoMV	0.12	0.91
TuMV	0.09	1.64
ZaMMV	0.13	2.52
Ornithagalum spp.		
OrMV	0.36	3.35
PtVY	0.32	2.70
Solanaceae		
PVMV	1.08	3.89
CVMV	0.10	3.27
Cucurbita spp.		
ZYMV	0.83	3.89
MVbMV	0.99	3.89
Leguminosae		
BCMV	0.71	3.89
BlCMV	0.94	3.89
BYMV	1.45	3.29
SMV	0.42	3.77
2x H-CK	0.22	0.21

[1)] The diseased plant samples used in this study including *Zantedeschia* spp. infected with Cally lily latent virus (CLLV), *Dasheen mosaic virus* (DsMV), *Konjac mosaic virus* (KoMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV) and Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV); *Ornithagalum* spp. infected with *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV) and *Pterostylis virus* Y (PtVY); Solanaceae plants infected with *Chilli veinal mottle virus* (CVMV) and *Pepper veinal mottle virus* (PVMV); *Cucurbita* spp. infected with *Melon vein-banding mosaic virus* (MVbMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); and Leguminosae plants infected with *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Black cowpea mosaic virus* (BlCMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Soybean mosaic virus* (SMV).

[2)] ELISA was conducted as previously described [(3)]. The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with ELISA readings lower than the healthy control (H-CK) threshold were considered undetectable by ELISA.

[3)] As-Ma2 is the antiserum against MMV while the Agdia-potyvirus is commercialized *Potyvirus*-specific monoclonal antibody (Agdia) and was used as the positive controls.



圖三、利用細菌表現之葡萄風信子嵌紋病毒 Ma2 抗血清於西方轉漬法檢測罹病葡萄風信子組織及其他種 potyviruses 罹病組織。行 M：蛋白質分子量標幟；行 CP：純化後之 Ma2 表現蛋白；行 D1、D2 和 D3：罹病之葡萄風信子葉組織；行 B1、B2、B3 和 B4：分別受 BCMV、BlCMV、BYMV 及 SMV 感染之罹病組織；行 O：OrMV 之罹病組織；行 P，PtVY 之罹病組織；行 S1 和 S2：分別爲 PVMV 及 CVMV 之罹病組織；行 Za：感染 ZaMMV 之罹病組織；行 C1 和 C2：分別爲 MVbMV 及 ZYMV 之罹病組織；行 H：健康葡萄風信子葉片。

Fig 3. Serological responses of the antiserum As-Ma2 against the bacterial expressed coat protein (CP) of Muscari mosaic virus (MMV) reacted with various potyviruses in western blotting. The tested samples were incubated with the antiserum As-Ma2 at a 1/500 dilution. Lane M, protein markers; lane CP, the purified lysate of bacterial expressed Ma2 CP; lanes D1, D2, and D3, MMV-infected tissues of different grape hyancith samples; lanes B1, B2, B3 and B4, diseased tissues infected with BCMV, BlCMV, BYMV and SMV, respectively; lane O, OrMV-infected tissue; lane P, PtVY-infected tissue; lanes S1 and S2, disease tissues infected with PVMV and CVMV, respectively; lane Za, ZaMMV-infected tissue; lanes C1 and C2, MVbMV and ZYMV-infected tissues, respectively; lane H, the healthy grape hyancith control.

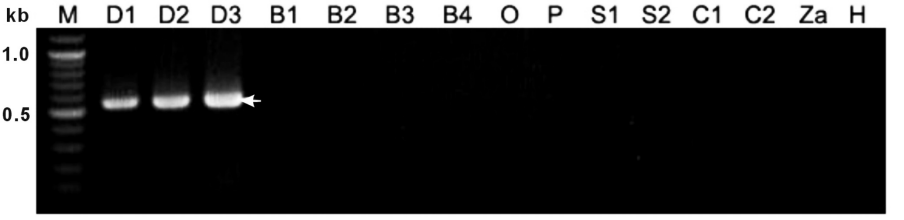
白基因之特性[5, 13]，且 Ma2 鞘蛋白胺基酸序列只與 MMV 病毒有高於 90%的相同度 (表一)。

應用 RT-PCR 專一性檢測葡萄風信子嵌紋病毒之發生

針對 Ma2 之 3'端核酸序列所設計之 Maup/Madw 引子對，於單步驟 RT-PCR 反應中，可成功由葡萄風信子罹病葉片組織增幅出預期 540 bp 之核酸片段 (圖四)，但不會自健康葡萄風信子組織及前述其他 potyviruses 病毒的全量 RNA 樣本中增幅出預期片段，顯示 Maup/Madw 引子對，可用於核酸分子檢測而針對葡萄風信子嵌紋病毒有專一性檢測之效果 (圖四)。

討　論

國內所栽植的葡萄風信子多由荷蘭進口。已知可感染葡萄風信子的病毒除了風信子嵌紋病毒 (HyaMV)外[8, 11]，於 2007 年由 Pham 等人於荷蘭的葡萄風信子發現一種具有獨特分子特性的新病毒，與已發生的風信子嵌紋病毒分屬不同種的 potyvirus，將其首次命名爲 Muscari mosaic virus (簡稱 MMV，GenBank 序號 EU042752) [12]。此病毒 (MMV) 鞘蛋白由 268 個胺基酸組成，對應 NIb (Nuclear inclusion body)及 CP 兩蛋白



圖四、利用 Maup/Madw 引子對進行葡萄風信子罹病葉片組織和不同 potyviruses 病葉組織之 RT-PCR 分析。行 M：核酸分子量標幟；行 D1、D2 和 D3：感染葡萄風信子嵌紋病毒之病葉組織；行 B1、B2、B3 和 B4：分別爲受 BCMV、BlCMV、BYMV 及 SMV 感染之罹病組織；行 O：OrMV 之罹病組織；行 P：PtVY 之罹病組織；行 S1 和 S2：分別爲 PVMV 及 CVMV 之罹病組織；行 Za：ZaMMV 之罹病組織；行 C1 和 C2：分別爲 MVbMV 及 ZYMV 之罹病組織；行 H：健康葡萄風信子葉片。

Fig 4. Detection of Muscari mosaic virus (MMV) using the primer pair Maup/Madw in reverse- transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Lane M, molecular marker; lanes D1, D2 and D3, MMV-infected tissues of different grape hyancith samples; lanes B1, B2, B3 and B4, disease tissues infected with BCMV, BlCMV, BYMV and SMV, respectively; lane O, OrMV-infected tissue; lane P, PtVY-infected tissue; lanes S1 and S2, disease tissues infected with PVMV and CVMV, respectively; lane Za, ZaMMV-infected tissue; lanes C1 and C2, MVbMV and ZYMV-infected tissues, respectively; lane H, the healthy control. Total RNAs extracted from virus-infected tissues were used for analysis. The size of 0.54 kb DNA fragments amplified from MMV-infected tissues are indicated by an arrow.

之裂解位置位於胺基酸序列 VFHQ/S，由其 N 端起始第 6 個胺基酸位置上發現有對應 *Potyvirus* CP N 端胺基酸特質之 DAG triplet， 此與本研究所選殖到之 Ma2 病毒核酸分子特性相同，而且兩者在鞘蛋白胺基酸的相同度高達 99.3%，由此等分子特性顯示 Ma2 與 MMV 爲相同病毒的不同分離株。

目前 MMV 病毒之相關資訊，僅有 Pham 等研究學者於 2007 年登錄於 GenBank 生物基因資料庫中，但只記載此病毒 3'端大約 1200 bp 之核酸序列分子訊息[12]。本研究針對 MMV-Ma2 病毒之研究，除了獲得其 3'端約 1200 bp 之核酸序列，由分子特性與證據印證此病毒在葡萄風信子上的發生外，也製備出其多元抗體並釐清其血清特性，對於此病毒的特性提供更完整之基礎資料。MMV 爲一種國外學者新鑑定與命名之病毒，目前對其生態與寄主範圍尚無明確之定論，但以 *Potyvirus* 屬病毒而言，透過罹病株汁液之機械傳播或是蚜蟲傳播，甚至隨帶病毒種球之繁殖而傳播等，均爲其可能之傳播途徑，尤其在鞘蛋白基因 N 端帶有 DAG triplet 之 *Potyvirus* 屬病毒，是具有藉蚜蟲傳播之能力的分子特性[4, 14]。本研究證實 MMV 隨進口種球帶毒而引入台灣之可能風險，對於此病毒的發生透過對種球的檢疫作病毒篩檢可預防病毒之發生於機先。

MMV-Ma2 於本研究中並無法透過機械接種繁殖於奎藜、紅藜及菸草植株葉片上，但直接由罹病株上經由血清檢測以及

核酸分子檢測之結果，確實證明葡萄風信子上含有與 MMV 相同病毒的存在，受檢測 12 株葡萄風信子中，5 個有黃化嵌紋病徵顯示的植株均檢測出有 MMV 病毒反應。MMV-Ma2 無法接種於奎藜，在花卉病毒中爲可見之例子[6]，無法成功接種之原因推測包含適當之接種緩衝液的使用、病毒系統(strains)、以及寄主作物來源等因素。進一步由 Ma2 鞘蛋白之表現蛋白所製備出的抗血清(As-Ma2)以及由 Ma2 核酸序列所設計的引子對，也成功地可以回測葡萄風信子上的相同病毒存在。然而在血清試驗方面，As-Ma2 抗血清除了與同源病毒 MMV 產生反應外，於 ELISA 試驗中可與 BCMV 等多種不同 potyviruses 有血清正反應結果(表二)，進一步於西方轉漬法分析結果顯示 As-Ma2 抗血清對於四種豆類病毒 (BCMV、BlCMV、BYMV 及 SMV)、兩種天鵝絨病毒 (OrMV 及 PtVY) [2]、兩種瓜類病毒 (MVbMV 及 ZYMV) 及感染茄科作物之 PVMV 等病毒之鞘蛋白分子量位置附近有免疫反應 (圖三)，顯示 MMV-Ma2 與此等 potyvuiruses 具有血清關聯性，此在 *Potyvirus* 的血清特性中爲常見之現象[13, 14]；*Potyvirus* 屬分類上鞘蛋白胺基酸序列之相同度高於 90%者，視爲同種病毒之不同分離株[4, 13]，本研究中根據鞘蛋白胺基酸序列比對結果 (表一)，與 MMV-Ma2 之鞘蛋白胺基酸相同度有高於 90%者，僅有 GenBank 上已登陸的 MMV 病毒[12]。因此，As-Ma2 多元抗血清雖不具有專一性檢測之特性，但對於其他種 potyviruses 可達到正反應檢出之效用，尤其對於四種豆類病毒 (BCMV、BlCMV、BYMV 及 SMV)、兩種天鵝絨病毒 (OrMV 及 PtVY) 以及兩種瓜類病毒 (MVbMV 及 ZYMV) 的檢測上，可以提供一種廣效性檢測病毒病發生的應用契機。

MMV 爲首見於台灣之病毒，本研究針對 MMV 所製備出之抗血清試劑，除了偵測葡萄風信子的病毒外，應用於其他種 potyviruses 的廣效性檢測，可待更多種類的 potyviruses 加入進行檢測試驗來進一步印證之。而透過核酸檢測，以 Maup/Madw 引子對可以專一性地檢出 MMV 病毒的存在，而能夠有標的地檢測此病毒在葡萄風信子上的發生，對於進口葡萄風信子的病毒監測可提供專一而準確的篩檢目標，防堵此新病毒透過種苗進口而傳播。

引用文獻

1. 張清安、陳金枝、劉逸琪、蔡惠婷、廖吉彥、鄧汀欽。1999。甜瓜脈綠嵌紋病毒爲具獨立分類地位之馬鈴薯 Y 屬病毒之分子生物學證據。植病會刊 8: 184-185。
2. 陳金枝、張幼莉、張清安、蔡惠婷。2000。於進口之天鵝絨發生嚴重嵌紋之病株中發現由天鵝絨嵌紋病毒及 *Pterostylis virus* Y 複合感染之分子生物學證據。植物病理學會刊 9: 184-185。
3. 陳金枝、鄭櫻慧、黃春惠、江芬蘭、陳麗雯、張清安。2009。利用細菌表現康乃馨斑駁病毒之鞘蛋白製備多元抗體及其檢測應用。植病會刊 18：35-44。
4. Adams, M. J., Antoniw, J. F., Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch Virol 150:459-479.

5. 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., 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.
6. 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.
7. Chen, C. C., Hsu, H. T., Cheng, Y. H., Huang, C. H., Liao, J. Y., Tsai, H. T., and Chang, C. A. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Botanical Studies 47:369-378.
8. Derk, A. F. L. M., and Vink-Van den Abeeld, J. L. 1980. Hyacinth mosaic virus: Symptoms in hyacinths, serological detection and relationships with other potyviruses. Acta. Horti. 109: 495-502.
9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227: 680-685.
10. 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.
11. Navalinskiene, M., and Samuitiene, M. 2001. Viruses affecting some bulb and corm flower crops. Biologija 4: 40-42.
12. Pham, K.T. K., van Kampen, D., Lemmers, M. E. C., and Derks, A. F. L. M. 2007. Molecular identification of potyviruses in Muscari (Accession EU042752). Direct submitted in GenBank. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/155970525.
13. 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.
14. Shukla, D. D., Frenkel, M. J., and Ward. C. W. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. Can. J. Plant Pathol. 13:178-191.

ABSTRACT

Chiang, F. L., and Chen, C. C.* 2010. Identification of a grape hyacinth-infecting virus and the production of its serological and molecular detection tools. Plant Prot. Bull. 52 (3) : 69-82 (Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung)

Grape hyacinth (*Muscari* spp.) is an imported bulb ornamental crop mostly from the Netherlands. Chlorosis and mosaic symptoms were observed on the newly emerging leaves of some bulbs. A potyvirus can be detected from the crude saps of infected leaves by the *Potyvirus*-specific monoclonal antibody in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A cDNA fragment with a predicted length of 1.2 kb can be amplified by using the degenerate primers (HRP5/Oligo-dT) specific for potyviruses in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified cDNA fragment (Ma2) has been cloned and sequenced, and compared to those of other potyviruses available in the GenBank. The percentage of the nucleotide and deduced amino acid sequence identities of the full-length coat protein (CP) of Ma2 are higher than 98% to that of Muscari mosaic virus (MMV, Acce. No. EU042752), indicating the virus associated with grape hyacinth chlorosis and mosaic is an isolate of MMV. The full-length CP gene was amplified by RT-PCR and constructed into the bacterial expression vector pET28b(+), and then transformed into *E. coli* Rosetta(DE3) cells for large scale protein expression. An expected 29.7-kDa over-expressed fusion protein (Ma2-CP) was purified and used as an immunogen to prepare polyclonal antiserum (As-Ma2). Antiserum against Ma2-CP was effective on detecting the homologous and heterologous potyviruses, including BCMV, BlCMV, BYMV, SMV, OrMV, PtVY, MVbMV, ZYMV and PVMV, in ELISA and western blotting. The designed Maup/Madw primer pair was specifically applied on the detection of MMV isolates in grape hyancith tissues by RT-PCR. MMV is first reported in Taiwan. Our results revealed that MMV-Ma2 antiserum can be applied to detect various potyviruses with its broad-spectrum serological properties, and the primer pair (Maup/Madw) can be applied to specifically detect MMV from the imported grape hyancith bulbs based on its specific molecular identities.

(Key words: Grape hyancith (*Muscari* spp.), Muscari mosaic virus (MMV), Bacteria expressed coat protein, RT-PCR, Polyclonal antibody)

*Corresponding author, E-mail: chinzue@tari.gov.tw