

木瓜輪點病毒鞘蛋白雙重切位突變病毒株系之感染力分析 = The infectivity assays of Papaya Ringspot Virus contained the ...

林碧雲、江主惠

E-mail: 9901152@mail.dyu.edu.tw

摘要

木瓜輪點病毒(Papaya ringspot virus; PRSV)基因體含有10,326個核糖核酸，對應產生一條381 kDa複合大蛋白，再由三個蛋白裂解酵素P1，helper component-proteinase (HC-Pro)及nuclear inclusion protein a (N1a)裂解成許多小蛋白，其中N1a作用在複合蛋白的C端至少6個位置。由N1a蛋白的切位規則可發現在PRSV中N1b與鞘蛋白(coat protein; CP)之間存在有兩個N1a可認知的切位，分別為CP1及CP2切位，此現象相當特殊，只有在PRSV才有，因此本實驗即來探討此CP雙重切位對病毒活性的影響。首先利用PCR方式針對CP1及CP2進行突變後，再將此含突變序列的DNA片段置換到35SPRSV-HAGFP質體中，總共獲得9種突變病毒，其中8種構築為胺基酸的置換，突變病毒株包括HA-GFP-CP1QS、HA-GFP-CP1GS、HA-GFP-CP1MS、HA-GFP-CP2ES、HA-GFP-CP2GS、HAGFP-CP2MS、HA-GFP-CP12MS/GS及HA-GFP-CP12QS/ES，另一種突變HA-GFP-CPdel為將CP1及CP2間20個胺基酸去除。所有構築完成的突變病毒質體皆先經由限制酵素Hind III及EcoRI初步確認，再進行核糖核酸解序，以確認構築之正確性。由於突變病毒攜帶有螢光蛋白(Green fluorescent protein; GFP)，因此有助於觀察病毒在寄主植物中的複製及移動情形。為了測試鞘蛋白突變病毒在寄主植物中之感染情形，首先將9種突變病毒接種到木瓜及白藜植株上。在木瓜植株中，突變病毒HA-GFP-CP1QS與HA-GFP-CP1GS分別於接種後第20天及23天的接種葉上出現病徵，與接種野生型35S-PRSV-HA及35S-PRSV-HAGFP的木瓜植株相比，病徵出現約慢了一星期，而其他突變病毒株則無法造成系統性病徵。為了觀察木瓜接種葉是否有病毒存在，進一步摘取木瓜植株的接種葉進行西方墨點法分析，結果發現只有HA-GFP-CP1QS、HAGFP-CP1GS及HA-GFP-CPdel接種的葉片可偵測到病毒。另外，此九種鞘蛋白突變病毒株接種在單斑寄主白藜植物時，皆可感染而形成單斑，但單斑出現時間比野生型病毒慢約2-6天。由以上結果得知當CP1及CP2的切位突變時，確實會影響病毒感染植物的能力，而且PRSV中具有較長N端的鞘蛋白對病毒本身複製的影響並不大，但會影響病毒在植物上的移動效率。

關鍵詞：木瓜輪點病毒，N1a蛋白裂解，鞘蛋白，突變，西方墨點法

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘
要.....	iv	英文摘
要.....	vi	誌
謝.....	viii	目
錄.....	ix	圖目
錄.....	xii	表目
錄.....	xiii	1. 前
言.....	1	1.1 馬鈴薯Y群病毒介
紹.....	1	1.2 病毒感染植物之過
程.....	2	1.3 N1a蛋白裂解之介
紹.....	3	1.4 Potyvirus 病毒鞘蛋白基因所擔任的角
色.....	5	1.5 木瓜輪點病毒可產生兩條大小不同之鞘蛋
白.....	6	1.6 實驗目
的.....	7	2. 材料與方
法.....	8	2.1 以PCR進行鞘蛋白切位定點突
變.....	8	2.2 突變後的DNA構築至TA載
體.....	10	2.3 勝任細胞的製備及質體之轉型作
用.....	10	2.4 質體DNA之快速篩選(Quick
screening).....	11	2.5 質體DNA之抽
取.....	12	2.6 限制酵素初步確認質體DNA之正確
性.....	13	2.7 鞘蛋白突變株之核糖核酸解
序.....	14	2.8 含鞘蛋白突變的DNA片段送入PRSV全長度質

體.....	14	2.9 PRSV鞘蛋白基因突變病毒在系統性寄主與單斑寄主植物感染力測
試.....	15	2.10 植物病徵觀察及反轉錄-聚合?連鎖反應RT-PCR ; Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)確認植物中之病毒....15 2.10.1 植物總核醣核酸萃
取.....	16	2.10.2 針對PRSV HA 鞘蛋白突變位置之引子設
計.....	16	2.10.3 反轉錄-聚合?連鎖反
應.....	17	2.11 西方墨點法(Western blotting)對植物中病毒之偵
測.....	18	2.11.1 植物蛋白質之粗萃 (Protein extraction).....18 2.11.2 SDS-PAGE之配
置.....	18	2.11.3 蛋白質電泳之進行及電轉印(Electrophoresis and electroblotting).....19 2.11.4 血清雜合與呈色(Serum hybridization and color developement).....20
3. 結果.....	20	3. 結果.....22
3.1 PRSV HA 鞘蛋白突變株之構築.....	22	3.2 突變病毒感染力之測
試.....	23	3.3 突變病毒感染之確
認.....	24	3.4 西方墨點
法.....	24	4. 討
論.....	26	5. 結
論.....	30	參考文
獻.....	48	附
錄.....	51	圖目錄 圖1 PRSV HAGFP CP突變病毒之構
築.....	31	圖2 利用NCBI軟體比對11種Potyvirus 屬病毒鞘蛋白胺基酸序
列.....	32	圖3 利用聚合?連鎖反應進行定點突
變.....	34	圖4 35S PRSV HAGFP突變病毒株的核?酸序列確認, 圖所呈現為包
含突變點CP1及CP2附近的位置.....	35	圖5 木瓜輪點病突變病毒接種至發芽後種植20天之木瓜植株於接種
後不同天數之病徵表現.....	37	?6 木瓜輪點病毒鞘蛋白突變株接種至白藜後, 於不同天數於不同天數所
呈現之病徵.....	38	?7 木瓜輪點病毒鞘蛋白突變株接種到木瓜植株後, 以反轉轉聚合?連鎖反應偵測病
毒之感染.....	41	圖8 木瓜輪點病毒鞘蛋白突變株接種木瓜後於不同天數收集接數收集接種葉進行西方墨點
法分析.....	42	表目錄 表1 PCR定點突變所使用之引
子.....	44	表2 病毒鞘蛋白CP1或CP2切位上所進行之核?酸與其對應與其對
應的胺基酸之突變.....	45	表3 木瓜輪點病毒鞘蛋白突變株在木瓜上之感染力分
析.....	46	表4 木瓜輪點病毒鞘蛋白突變株在白藜上之感染力分
析.....	47	

參考文獻

- Adams, M.J., Antoniw, J.F. and Beaudoin, F. (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Mol. Plant Pathol.*, 471-487.
- Boevink P. and Oparka, K.J. (2005) Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol.* 138, 1815-1821
- Carrington, J.C. and Dougherty, W.G. (1988) A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3391-5.
- Carrington JC, H.R., Dolja VV, Restrepo-Hartwig MA. (1993) Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. *J Virol.* 67, 1-6.
- Chiang, C.H. and Yeh, S.D. (1997) Infectivity assays of in vitro and in vivo transcripts of papaya ringspot potyvirus. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38, 153-163.
- Christie, R.G., and Edwardson, J. R. (1977) Light and electron microscopy of plant virus inclusionS. Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. and Carrington, J.C.(1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* 13(6), 1482-91.
- Dougherty, W.G., Cary, S.M. and Parks, T.D. (1989) Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* 171(2), 356-64.
- Edwardson, J.R. (1974) some properties of the potato virus y group. *F1. Agric. Exp. St. Monogr* 4, 225.
- Ghabrial, S.A., Smith, H.A., Parks, T.D. and Dougherty, W.G. (1990) Molecular genetic analyses of the soybean mosaic virus NIa proteinase. *The Journal of general virology* 71(9), 1921-1927.
- Hamilton, R.I., Edwardson, J. R. I. B., (1981) Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *J Gen Virol* 54, 223-241.
- Johansen, E., Edwards, M. C., and Hampton, R. O. (1994) Seed transmission of viruses : current perspectives. *Annu Rev Phytopathol* 32, 363-386.
- Lin S.S., H., R. F., Yeh S.D., (2001) Complete genome sequence and genetic organization of a Taiwan isolate of Zucchini yellow mosaic virus. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42, 243-250.
- Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S. (2009) The N-terminal region of the *Plantago asiatica* mosaic virus coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly. *Mol Plant Microbe Interact* 22(6), 677-85.
- Rao, A.L. and Grantham, G.L. (1996) Molecular studies on bromovirus capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology* 226(2), 294-305.
- Riechmann, J.L., Lain, S. and Garcia, J.A. (1990) Infectious in vitro transcripts

from a plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology* 177(2), 710-6. Riechmann, J.L., Lain, S. and Garcia, J.A. (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73 (Pt 1), 1-16. Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Brief review. *Arch Virol* 106(3-4), 171-200. Siaw, M.F., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J.G. and Rhoads, R.E. (1985) Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142(1), 134-43. Torrance L, Lukhovitskaya NI, Schepetilnikov MV, Cowan GH, Ziegler A and El., S.(2009) Unusual long-distance movement strategies of Potato mop-top virus RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *MPMI*. 22, 1-9. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L. and Bernardi, F. (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74(1-2), 157-75. Varrelmann, M. and Maiss, E. (2000) Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 81(Pt 3), 567-76. Verchot-Lubicz, J. (2005) A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol Plant Microbe Interact* 18(4), 283-90. Yeh, S.D., Jan, F.J., Chiang, C.H., Doong, T.J., Chen, M.C., Chung, P.H. and Bau, H.J.(1992) Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *J Gen Virol* 73 (Pt 10), 2531-41. Zakir Ullah, a., b., Benli Chai , b., Sue Hammar a, Benny Raccah b, b, A.G.-O. and a,R.G. (2003) Effect of substitution of the amino termini of coat proteins of distinct potyvirus species on viral infectivity and host specificity *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63, 129-139.