

# 製備西瓜銀斑病毒複製酶之單株抗體偵測 複製酶在植物上之表現

張賀雄<sup>1</sup> 曾獻嫻<sup>1</sup> 葉錫東<sup>1</sup> 古新梅<sup>2,3</sup> 詹富智<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>台中市 國立中興大學 植物病理學系

<sup>2</sup>台中市 國立中興大學 農藝學系

<sup>3</sup>聯絡作者，電子郵件：fjjan@nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2285-4145, hmku@nchu.edu.tw；  
傳真：+886-4-22877054

接受日期：中華民國 99 年 2 月 10 日

## 摘要

張賀雄、曾獻嫻、葉錫東、古新梅、詹富智. 2009. 製備西瓜銀斑病毒複製酶之單株抗體偵測複製酶在植物上之表現. 植病會刊 18: 237-246.

西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) 屬於 *Bunyaviridae* 科 *Tospovirus* 屬植物負極性 RNA 病毒 (negative-strand RNA virus)，具有三條基因體 RNA，其中最大的 L RNA 以病毒反義股 (anti-genomic sense) 的方向編譯著 WSMoV 最大的病毒蛋白，L 蛋白；目前已知 L 蛋白是 WSMoV 的複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase, replicase)，且 L 蛋白、核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, N protein) 與病毒基因體 RNA 纏繞成核酸蛋白複合體 (ribonucleoprotein complex, RNP)；根據動物 bunyaviruses 的研究指出，鑑定出具感染力 RNP 的所有組成成分，是建立逆向遺傳系統 (reverse genetics system) 不可或缺的門檻。本研究的目的為產生 WSMoV L 蛋白的單株抗體 (monoclonal antibody)，並應用於感病植株上 L 蛋白表現的偵測。利用細菌表現系統表現 L 蛋白 C 端部分 (L-c)，經過實驗鼠免疫注射、細胞融合及篩選培養，獲得表現所需抗體之融合瘤細胞株，並注射實驗鼠使產生含有高濃度單株抗體之腹水 (ascites fluid)。此單株抗體對於 WSMoV 的 L 蛋白具有專一性，不與其他三個 tospoviruses 血清群—番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*)、鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*)、花生輪點病毒 (*Groundnut ringspot virus*) 發生反應，且可以西方轉漬法偵測到感病圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 上 L 蛋白的表現依接種後經過天數不同而有消長現象；將此單株抗體結合蛋白 A 膠金標記 (protein A-gold labeling) 電子顯微鏡技術，可以觀察到纏繞著 N 蛋白、L 蛋白的 RNP 結構。本研究所產生的 L 蛋白單株抗體，未來搭配 WSMoV 逆向遺傳系統的建立將可進行更深入地研究應用。

關鍵詞：西瓜銀斑病毒、核酸蛋白複合體、細菌表現系統、融合瘤細胞、蛋白 A 膠金標定電子顯微鏡

## 緒言

*Bunyaviridae* 科為負極性 RNA 病毒 (negative-strand RNA virus) 中的一個病毒科，大部分為節肢動物 (arthropods) 所傳播，*Bunyaviridae* 科之下分為五個病毒屬，分別為 *Orthobunyavirus*、*Hantavirus*、*Nairovirus*、*Phlebovirus* 以及 *Tospovirus* 屬<sup>(9)</sup>。

*Bunyamweravirus* (*Orthobunyavirus* 屬) 是 *Bunyaviridae* 科病毒第一個被建立起逆向遺傳研究系統 (reverse genetics system) 的病毒<sup>(2)</sup>，同時也是多條基因體 (segmented genome) 負極性 RNA 病毒中的第一例<sup>(2)</sup>。逆向遺傳系統的建立對於病毒學家來說，大幅度擴展了對 RNA 病毒的研究空間，使得病毒學家得以利用修飾或重組病毒基因體，針對病毒感染寄主細胞後各個

病毒基因所扮演的角色及功能、或病毒蛋白與寄主之間的交互作用等，進一步深入研究<sup>(13)</sup>。

依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses) 網頁 (<http://www.ictvonline.org>) 公告，植物負極性 RNA 病毒主要含有 *Rhabdoviridae* 病毒科的 *Cytorhabdovirus* 和 *Nucleorhabdovirus* 病毒屬、*Bunyaviridae* 病毒科的 *Tospovirus* 病毒屬、*Ophioviridae* 病毒科的 *Ophiovirus* 病毒屬及尚未被分類為任何病毒科的 *Tenuivirus* 病毒屬之病毒，然而自 1994 年第一個動物負極性 RNA 病毒—*Rabies virus* (*Rhabdoviridae* 科) 的逆向遺傳系統被建立以來<sup>(25)</sup>，至今仍然尚未有植物負極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統被建立。目前在植物負極性 RNA 病毒的領域中，僅有 *Rhabdoviridae* 病毒科的苦苣菜黃網病毒 (*Sonchus yellow net virus*, SYNV) 有被發表過關於建立微基因體構築 (mini-genome) 的研究摘要<sup>(11, 12)</sup>，然而其所建立微基因體構築的表現，仍有許多問題需要解決，遑論真正建立一個有效率的逆向遺傳系統，依然有很大的困難要突破。

*Tospovirus* 屬病毒為可被薊馬類昆蟲以永續性方式傳播之植物病毒，亦是 *Bunyaviridae* 科中唯一可感染植物之病毒屬<sup>(24)</sup>。*Tospovirus* 屬病毒與其它植物負極性 RNA 病毒一樣，由於未有逆向遺傳系統的建立，在分子生物學的研究上目前仍停留在序列分析、以轉基因植物表現病毒蛋白探討其可能功能或對寄主之影響，然而這些研究方式並不能直接地證明病毒感染時這些病毒蛋白所扮演的完整功能，且利用自然突變或誘導突變病毒株進行病毒功能性基因體研究的難度亦相對較高；要解決這些困難，並讓 *Tospovirus* 屬病毒和其它植物負極性 RNA 病毒在分子生物學研究上有長足的突破，建立病毒的逆向遺傳系統是一個重要的研究方向。

西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) 為 *Tospovirus* 屬病毒，是台灣瓜類作物栽培的主要限制因子之一<sup>(14, 31)</sup>。WSMoV 具有三條基因體 RNA，分別依大小命名為 S RNA、M RNA 及 L RNA<sup>(9)</sup>；S RNA 在病毒股及病毒反義股上各編譯一個基因，分別為非結構性蛋白 S (nonstructural protein S, NSs) 及核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, N)，N 蛋白具有核酸結合功能，與病毒基因體 RNA 纏繞成複合體<sup>(18, 19)</sup>，NSs 目前已知為基因沉寂作用的抑制子 (gene-silencing suppressor)<sup>(26)</sup>；M RNA 在病毒股及病毒反義股上各編譯一個基因，分別為非結構蛋白 M (nonstructural protein M, NSm) 及醣蛋白 (glycoprotein precursor, Gn/Gc protein)，Gn/Gc 蛋白為病毒顆粒脂質外套膜上鑲嵌之蛋白，與媒介昆蟲之辨識傳播有關<sup>(29)</sup>，

NSm 則為病毒進行細胞間移動時的相關蛋白<sup>(15, 16)</sup>；L RNA 在病毒反義股上編譯一個病毒基因，表現為 WSMoV 最大的 L 蛋白 (RNA-dependent RNA polymerase, L protein)，又稱為複製酶 (replicase)，為病毒進行複製、轉錄所需之蛋白<sup>(4, 27)</sup>。WSMoV 病毒基因的功能藉由轉基因植物、農桿菌短暫表現或參考其它 bunyaviruses 的研究成果，有一些粗略的概念與了解，但是這些成果對於研究 WSMoV 生活史或病毒寄主交互作用並不屬於直接的證據。Okuda 等人以重分配策略證明不同 WSMoV 分離株在番杏 (*Tetragonia expansa*) 上造成病徵差異的關鍵位於 S RNA 上<sup>(21)</sup>，然而由於 WSMoV 被未建立逆向遺傳系統，無法針對 S RNA 進行修飾或突變，以至於無法準確地了解 S RNA 上的什麼基因或什麼序列造成病徵的差異；Adkins 的研究團隊以菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 作為載體表現番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) NSm 蛋白探討 NSm 蛋白的基因功能<sup>(16)</sup>，然而此種研究平台只能看到 NSm 對 TMV 發生了何種幫助或作用，無法直接了解 NSm 蛋白可以在 TSWV 感染時發生何種作用。諸如此類無法針對病毒基因或序列的功能進行直接探討的困難，不僅是 WSMoV、同樣也是 *Tospovirus* 病毒屬與其它植物負極性 RNA 病毒的研究瓶頸。

根據 *Bunyaviridae* 科動物病毒的研究指出，*Bunyaviridae* 科病毒感染後基因體 RNA 進行複製及基因轉錄表現時需要有 L 蛋白及 N 蛋白的直接作用<sup>(8, 10, 17)</sup>；雖然 tospoviruses 病毒感染後進行複製表現所需要的最基本病毒組成並未被直接確認，但是要建立 WSMoV 的逆向遺傳系統，必須先建立能表現 WSMoV 不同病毒蛋白，包括 L 蛋白及 N 蛋白的接種平台，因此，能夠偵測病毒蛋白表現的抗體則為研究中不可或缺的工具；此外，病毒蛋白抗體的產生，可以在逆向遺傳系統建立之前用來偵測寄主細胞內病毒蛋白表現情形，亦可進一步利用抗體觀察、探討病毒蛋白與寄主細胞蛋白可能的交互作用。

本研究的目的即在於產生能夠偵測 WSMoV L 蛋白的單株抗體 (monoclonal antibody)，並將其運用於偵測 L 蛋白在受 WSMoV 感染之圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domain.) 上的表現情形。

## 材料與方法

### 病毒來源及繁殖

本研究所使用 WSMoV 為中興大學植物病理學系葉

錫東教授實驗室分離自冬瓜的病毒分離株<sup>(5)</sup>，病毒在溫室中以機械接種方式繁殖於系統性寄主圓葉菸草上。以產生病徵之系統葉組織為接種源，1:10 比例加入接種緩衝液 (inoculation buffer: 10 mM potassium phosphate buffer contains 10 mM sodium sulfite) 研磨後，接種於健康植株上。WSMoV 接種於圓葉菸草約 5-8 天系統性發病。

### 部分長度L基因的選殖及蛋白的製備

使用反轉錄聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 進行 L 蛋白 C 端基因序列的增幅及選殖 (圖一)。利用已知 WSMoV 序列 (GenBank accession No.: NC\_003832) 針對 L 基因下游 798 個核苷酸序列 (即 L RNA 病毒段 nt 252-1049) 設計引子對 FJJ2004-62 (5'-CCTTGCTAGCTTCTATGAATATAAAACAATC-3')-FJJ2004-63 (5'-CAACTCGAGTTCTTGGTCTGAGGAA GTAG-3')，引子對分別包含限制酵素 *NheI* 和 *XhoI* 切位 (引子對序列中底線所示)。RT-PCR 產物以 pGEM-T 選殖載體 (Promega Co., Madison, WI) 進行選殖，經過解序確認其正確性後，將欲表現的 L-c 片段以限制酵素 *NheI* 及 *XhoI* 切下並構築於細菌表現載體 pET28b (+) (Novagen Co., Madison, WI) 上，命名 pET28bL-c，在構築 L-c 片段下游保留原載體上表現組胺酸標示片段 (His-tag) 的序列，供抗體產生前方便以 anti-His 抗體偵測之用；構築完成後之蛋白表現載體送入大腸桿菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株進行蛋白表現。將細菌於 37°C 下震盪培養，取適量過夜培養之菌液加入新的培養液中 100 倍稀釋放大，於 37°C 中震盪預培養 2 小時，加入最終濃度為 1 mM 的 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) 誘導蛋白質表現，分別於 IPTG 誘導 6、8、10、16 個小時之後離心破細胞，並將總體蛋白依可溶解性與不可溶解性分離，以 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 及西方轉漬法 (western blotting) 測定其大小及位置，最後再以 SDS-PAGE 針對表現的 L-c 蛋白進行膠體分離回收，根據測定之蛋白大小，將 SDS-PAGE 上相對位置的膠體切下，在研磨袋中磨碎後加入與膠體重量相等之 PBS 緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4)，室溫靜置 3 分鐘使緩衝液從膠體中析出蛋白，將膠體與緩衝液混和物置入微量離心管以 10,000 xg 離心並收集上清液，取少量上清液進行 SDS-PAGE 及西方轉漬法確認蛋白存在，並測定其濃度後準備進行抗體製備。

### 單元抗體的製備

經純化的 L-c 蛋白 50  $\mu$ g (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 混合等體積之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant, DIFCO Laboratories, Detroit, MI)，進行實驗鼠 (BALB/c) 第一次腹腔注射誘導免疫反應。之後每隔七天施打一針 50  $\mu$ g (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) L-c 蛋白混合等體積不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant, DIFCO Laboratories) 共四次，細胞融合前三天最後一次施打不混和佐劑的 L-c 蛋白 50  $\mu$ g (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)。取出老鼠脾臟細胞 (spleen cell) 與老鼠骨髓瘤細胞 (myeloma cell FOX-NY) 細胞株混合，以 50% PEG 4000 (polyethylene glycol 4000, Sigma Chemical Inc., St. Louis, MO) 進行細胞融合；融合瘤細胞 (hybridoma cell) 分裝於 96 孔微量培養皿內以 HAT 選擇性培養基 [RPMI-1640 medium (Sigma), 1 mM sodium pyruvate, 0.2% (w/v) sodium bicarbonate (Sigma), 0.1% gentamycin, 1 mM L-glutamic acid, 5.7% Nuserum (Collaborative Research, Inc., Bedford, MA), CRSR-3 (Sigma), FBS (Hyclone Laboratory, Inc., Logan, UT), 1X HAT (Sigma)] 於 CO<sub>2</sub> (6%) 培養箱中篩選培養。細胞融合 10 天後，部份培養孔中有少量細胞團長出，取上層培養液作為一次抗體，以表現 L-c 蛋白大腸桿菌的菌體破碎粗萃液作為抗原，用 ELISA 方式來篩選能表現抗 L-c 蛋白抗體之；三次 ELISA 確認為正反應之融合瘤細胞株以限數稀釋法 (limiting dilution) 進行單株化，單株化獲得穩定表現單株抗體的細胞株後，以此細胞株對已注射過 pristane (Sigma) 一週之實驗鼠腹腔注射，腹水 (ascites fluids) 於注射細胞株約 10-15 天後於老鼠腹部內累積，以針頭刺穿老鼠腹腔收集之。

### 酵素連結免疫吸附反應 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

間接酵素連結免疫吸附反應參考 Yeh 和 Gonsalves 所發表的方法操作<sup>(30)</sup>。以表現 L-c 蛋白細菌的破碎菌體粗萃液為抗原，以覆蓋緩衝液 (coating buffer) (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 9.6) 處裡後加入至聚苯乙烯材質的微量盤 (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) 進行覆蓋反應；將來自融合瘤細胞的培養液作為一次抗體，以結合緩衝液 (conjugate buffer) [PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% Tween 20, 2.7 mM KCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4) 含有 2% PVP-40, 0.2% ovalbumin] 以 1:1 的比例 (100  $\mu$ l:100  $\mu$ l) 稀釋後加入 96 孔微量盤中進行抗原抗體反應；加入以結合緩衝液稀釋 5,000 倍的鹼性磷酸酵素標示之山羊抗鼠免疫球蛋白 (goat anti-mouse IgG

alkaline phosphatase conjugated, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., PA. USA) 進行二次抗體反應。ELISA 實驗的對照組則使用帶有 pET28b (+) 空載體、且經相同環境培養誘導之細菌菌體破碎粗萃取液。ELISA 的結果是利用 ELISA 讀值機 (ELISA reader, multiskan Ex, Labsystems) 測量在波長 405 nm 下的吸光值。

### 西方轉漬法 (western blotting)

本研究所用的樣品以三倍體積 (v/w) 樣品緩衝液 (sample buffer) [50mM Tris-HCl (pH 7.2), 2% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 10% sucrose and 0.005% bromophenol blue and 0.01 M EDTA] 混合後煮沸 3 分鐘。以 9,300 g 離心 5 分鐘後取其上清液並以 6% 分離膠體 (separating gel) SDS-PAGE 在 150V 下電泳分離 1.5 小時；電泳分離後再將蛋白質轉印至 PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride membrane) 上，接著將轉印有蛋白質的膜以 TSW 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.9% NaCl, 0.25% gelatin, 0.1% Triton X-100, and 0.2% SDS] 浸泡 30 分鐘，取來自實驗鼠的腹水做為一次抗體，以 TSW 緩衝液稀釋 8,000 倍，將膜浸泡其中 30-40 分鐘後，以 TSW 緩衝液洗三次每次 3 分鐘，之後加入以 TSW 緩衝液稀釋 5,000 倍之山羊抗鼠二次抗體反應 30-40 分鐘後，經 TSW 緩衝液沖洗後以鹼性磷酸酵素緩衝液 (alkaline phosphatase buffer, AP buffer) [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>] 清洗一次，接著加入含有 NBT (para-nitro blue tetrazolium chloride) 及 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate paratoluidine salt) 的呈色劑，呈色約 3-10 分鐘後以去離子水終止反應。

### 蛋白 A 膠金抗體標記免疫電子顯微鏡

依據趙的 tospoviruses 核鞘蛋白純化方法<sup>(3)</sup>，將純化步驟中斷在蔗糖溶液墊層 (sucrose cushion) 離心後，以 TBG 緩衝液 [0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.01 M glycine, 0.01 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0.1% cystein] 回溶的步驟，進行 WSMoV 病毒的部份純化 (partial purification)。部份純化後含有病毒的萃取液以銅網進行捕捉 (trapping)，將銅網正面向下覆蓋於萃取液上，室溫下靜置 5 分鐘，再以清洗用磷酸緩衝液 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) 清洗 20 滴，以濾紙吸去多餘水滴；滴上 1% 牛血清蛋白 [BSA 溶於 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.2)] 反應 10 分鐘，同樣再以清洗用磷酸緩衝液清洗 20 滴並以濾紙吸去多餘水滴；滴上 500 倍稀釋之抗體或抗血清，反應 30 分鐘後，以清洗用磷酸緩衝液清洗 60 滴，再以蒸餾

水清洗 30 滴；滴上 20 倍稀釋蛋白 A 膠金抗體複合物 (protein-A gold, Aurion, Wageningen, Netherlands) 反應 30 分鐘，以清洗用磷酸緩衝液清洗 60 滴，再以蒸餾水清洗 30 滴；以 2% 醋酸鈷 (uranium acetate) 染色 15 分鐘，蒸餾水清洗 30 滴，檸檬酸鉛 (lead citrate) 染色 1.5 分鐘，蒸餾水清洗 30 滴；濾紙吸乾後以電子顯微鏡 (JEOL 200CX transmission electron microscope, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 以六萬倍以上倍數觀察。N 蛋白抗血清為本實驗室製備之兔子多株抗血清，L 蛋白抗體則為前述之單株抗體。

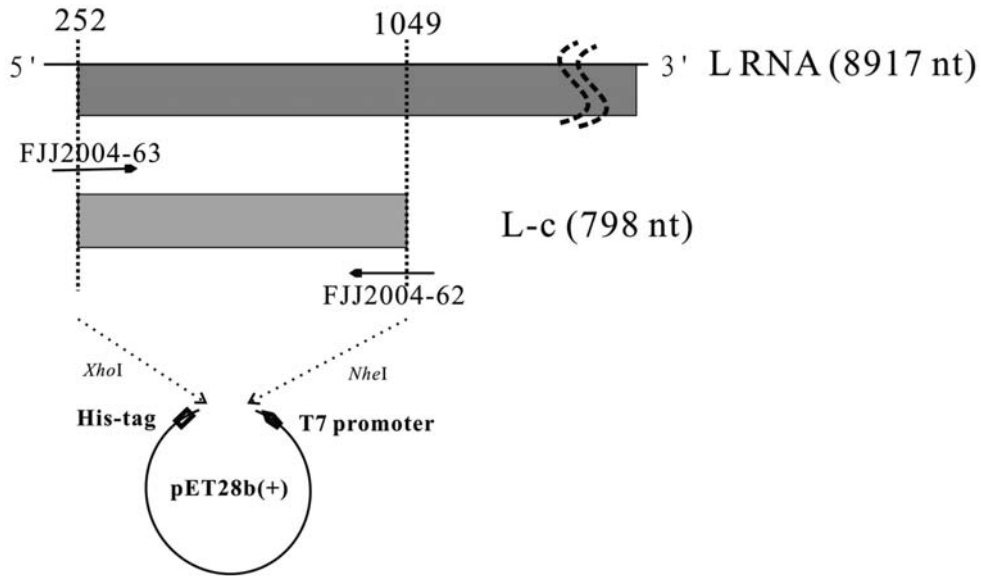
## 結 果

### L-c 蛋白細菌表現載體之構築及蛋白表現

以根據已知 WSMoV 序列針對 L 基因 C 端設計的引子對進行增幅選殖，L-c 片段 DNA 長度為 798 bp (圖一)，預期表現出蛋白質約為 33 kDa。將帶有蛋白表現載體 pET28bL-c 的大腸桿菌菌株於 37°C 培養箱中震盪培養，並以 IPTG 進行不同時間長度 (6、8、10、16 小時) 的蛋白表現誘導，實驗對照組為帶有不含基因片段空載體 pET28b (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株。誘導表現結果顯示，帶有 pET28bL-c 表現載體的菌株總量蛋白與對照組比較，在 SDS-PAGE 電泳大約 33 kDa 位置有預期的大量蛋白累積 (圖二A)，以 anti-His 專一性抗體檢測，該處確實有目標蛋白累積 (圖二B)；此外，不同誘導時間的結果也指出，L-c 蛋白在 IPTG 誘導 8 和 10 小時環境下表現量高於 6 及 16 小時，且大部份的 L-c 蛋白則都以不可溶的型態聚集於破細胞後離心的沉澱物中 (圖二 pellet)。大量培養帶有 pET28bL-c 表現載體的大腸桿菌菌株，並以 37°C、8 小時 IPTG 誘導大量表現 L-c 蛋白，再以膠體切離的方式回收 L-c 蛋白，用以進行實驗鼠免疫注射。

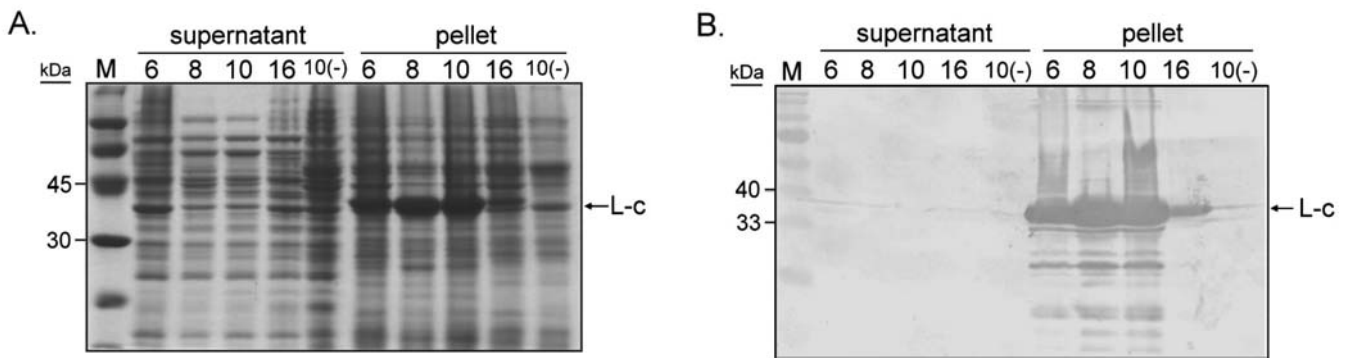
### 單元抗體之製備及 WSMoV 感染植物上 L 蛋白之偵測

細胞融合後經過 ELISA 篩選及限數稀釋單株化，總共獲得三個可表現 L-c 蛋白單株抗體之融合瘤細胞株 9F2A8、9F2D11 及 9F2G7，分別以此三個細胞株對實驗鼠進行腹腔注射以產生腹水，三個細胞株所產生的腹水經過西方轉漬法測試，對於偵測 WSMoV 感染菸草葉片中的 L 蛋白具有相同的專一性及靈敏度 (data not shown)，其中 9F2A8 細胞株所產生的腹水量較多，後續實驗均以此細胞株所產腹水進行。為了解此單株抗體對於 WSMoV 以外的 tospoviruses 是否有廣泛適用



圖一、西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*) 之 L-c 抗原蛋白於 pET-28b 表現載體之構築。

Fig. 1. The construction of the partial L sequence (L-c) of *Watermelon silver mottle virus* in the protein expression vector pET-28b (+). The RT-PCR product corresponding to the 5' end of L complete reading frame (252-1049 nts) was cloned in pET28b (+) with restriction endonucleases *NheI* and *XhoI*. The WSMoV L-c was expressed as a 33-kDa fusion protein containing a His-tag.

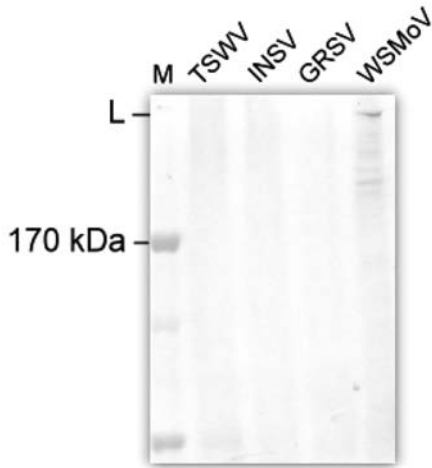


圖二、以 SDA-PAGE 及西方轉漬法分析 L-c 蛋白之表現。

Fig. 2. Analysis of the L-c of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The IPTG-induced bacterial lysate of clone pET28bL-c, containing the WSMoV L-c sequence, expressed at 37°C for 6 to 16 hr were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by staining with Coomassie blue (A), and western blotting with the antibody against the His-tag (B). The position of the target protein, L-c, was arrowed. The IPTG-induced bacterial lysate containing the expression vector without WSMoV L-c sequence insert at 37°C for 10 hr is used as a negative control [10(-)].

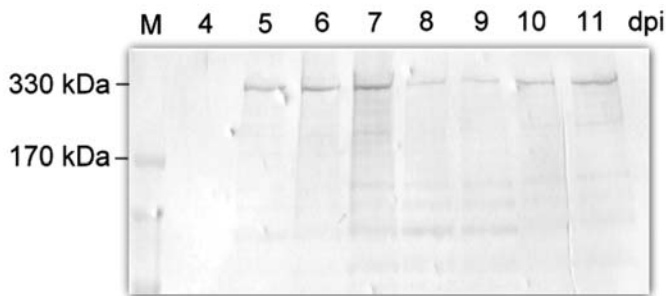
性，我們分別選取 *Tospovirus* 屬中四種不同血清群的病毒，包括番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)、花生輪點病毒 (*Groundnut ringspot virus*, GRSV) 及 WSMoV 進行西方轉漬法的分析，結果發現此一 L 蛋白單株抗體對於 WSMoV 之 L 蛋白具有專一性，對其他三種不同血清群的病毒 TSWV、INSV 及 GRSV 之 L 蛋白不具有辨識的能力 (圖三)。進一步要

了解在 WSMoV 感染之圓葉菸草上 L 蛋白表現情形，分別於收集接種 4-11 天後的系統性葉片組織，並以西方轉漬法分析 L 蛋白表現情形；結果顯示，接種後第 5 天系統性葉片開始有 L 蛋白被偵測到，葉片組織中 L 蛋白的表現量逐日增加，到第 7 天可偵測到的表現量達到高峰，第 8 及第 9 天表現量稍減，但又於第 10 及第 11 天有表現量的增加 (圖四)。



圖三、以西方轉漬法分析 L 蛋白單株抗體對不同血清群 tospoviruses 的反應。

Fig. 3. Western blot analysis of four tospoviruses from different serogroups using L-c monoclonal antibody against the L protein of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV). TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; INSV, *Impatiens necrotic spot virus*; GRSV, *Groundnut ringspot virus*. The position of L protein is indicated by "L".

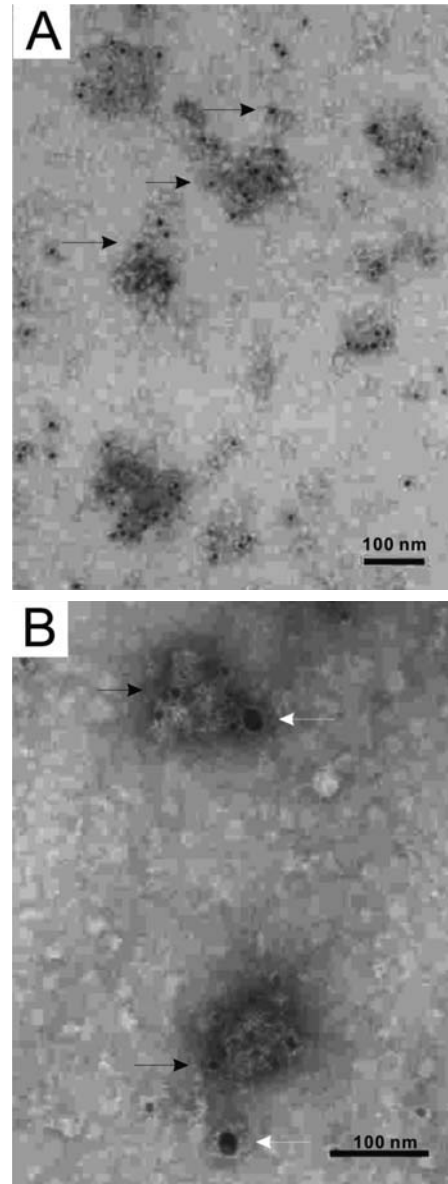


圖四、以西方轉漬法分析L蛋白於接種西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*) 之圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 上的表現情形。

Fig. 4. Time course detection of *Watermelon silver mottle virus* L protein expression in infected *Nicotiana benthamiana* by western blot. *N. benthamiana* plants diluted with sample buffer 1:10 were assayed by western blot 4-11 days post-inoculation with WSMoV. The L protein is observed at the position of 330 kDa.

### 蛋白A膠金抗體標記免疫電子顯微鏡

從接種 WSMoV 的菸草經過部分純化後，獲得含有病毒的萃取液進行蛋白 A 膠金免疫電子顯微鏡觀察。單獨以 N 蛋白抗體吸附，再以蛋白 A 膠金抗體複合物反應後，可以在電子顯微鏡下觀察到有線狀纏繞的陰影，線狀陰影上附著有金屬顆粒黑影 (圖五A)；抗體吸附過程中，同時加入 N 蛋白兔子多株抗體及L蛋白老鼠單株抗體進行免疫吸附，再以抗兔及抗鼠兩種蛋



圖五、部分純化西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*) 以核鞘蛋白 (nucleoprotein) 多株抗血清或複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase) 蛋白單株抗體，進行蛋白 A 膠金抗體標記免疫電子顯微鏡。

Fig. 5. Protein A-gold labeling electron microscopy for partial purified *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) with polyclonal antiserum against the nucleocapsid protein (N) and/or monoclonal antibody against RNA-dependent RNA polymerase (L). (A) Partial purified WSMoV reacted with polyclonal antiserum against N, and then with the protein A-gold (10 nm) labeled goat-anti-rabbit antibody. (B) Partial purified WSMoV was first reacted with the polyclonal antiserum against N and monoclonal antibody against L, and then with the protein A-gold (10 nm) labeled goat-anti-rabbit antibody and protein A-gold (25 nm) labeled goat-anti-mouse antibody. The positions of N and L are marked by black and white arrows respectively. The scale bar (100 nm) is indicated at the lower right.

白 A 膠金抗體複合物進行反應，兩種複合物金粒子大小分別為 10 nm 及 25 nm，則可以在電子顯微鏡下觀察到線狀纏繞的陰影上，附著有較多的小金屬粒子和較少的大金屬粒子(圖五 B)，而在非線狀纏繞陰影的空白區域，則沒有觀察到大金屬粒子單獨存在。

## 討 論

逆向遺傳系統的建立是研究病毒基因體功能及病毒寄主交互作用等機制的門檻。正極性 RNA 病毒(positive-strand RNA virus)的病毒基因體 RNA，本身即具有 mRNA 的功能<sup>(7)</sup>，病毒基因體 RNA 存在寄主細胞體內，可直接借用寄主細胞的轉譯(translation)系統表現病毒蛋白，進而啟動病毒的增殖機制，因此其逆向遺傳系統的建立僅需將完整長度病毒基因體 RNA 表現於寄主細胞體內即可完成；負極性 RNA 病毒的基因體 RNA 不能當作 mRNA 使用，它的複製表現系統需要同時有數種病毒蛋白的存在方能啟動<sup>(20, 22)</sup>，因此其逆向遺傳系統的建立相對較為複雜。同屬於 *Bunyaviridae* 科動物病毒的研究已經指出，bunyaviruses 啟動病毒複製表現系統，除了需要病毒基因體 RNA，同時需要病毒蛋白 L 及 N 的存在<sup>(8, 10, 17)</sup>。而病毒蛋白的抗體或抗血清的製備，除了用來偵測能表現病毒蛋白的寄主細胞平台是否穩定表現病毒蛋白、在逆向遺傳系統建立後的功能性基因研究偵測病毒蛋白表現情形之外，在研究病毒生活史、病毒在寄主細胞內蛋白表現量與表現位置，或研究病毒外型結構時，都能夠有很大的應用空間及價值。

本研究中所設計 L 蛋白表現區段係參考 van Poelwijk 等人<sup>(28)</sup>所發表 TSWV L 蛋白抗血清製備而設計。實驗最初設計表現 L 蛋白上的三個區段，L 蛋白 N 端(L-n, 30 kDa) (data not shown)、L 蛋白 C 端，及利用軟體分析選取 L 蛋白上親水性、抗原性較佳的區域(Lhphi, 16 kDa) (data not shown)；表現結果發現，表現量以 L-n 表現量最低，而 Lhphi 表現量最高，因此選擇純化 L-c 及 Lhphi 蛋白進行實驗鼠免疫注射；免疫注射的結果，注射 Lhphi 蛋白實驗鼠的多株抗血清無法用在 ELISA 或西方轉漬法偵測接種 WSMoV 後圓葉菸草上 L 蛋白的表現，因此只有 L-c 蛋白繼續完成單株抗體的製備；推測其原因，可能是 Lhphi 蛋白分子量較小，在實驗鼠體內引起免疫的效果較差，而未表現出足夠抗體可以偵測感病植物細胞中的 L 蛋白。

L-c 蛋白單株抗體篩選過程中，均以有表現蛋白與未表現蛋白之菌體破碎粗萃液作為抗原進行 ELISA 篩選；單株抗體產生後用於偵測感病植物 WSMoV L 蛋白的表現時，在西方轉漬法上可以清楚地偵測到病

毒表現 330 kDa 的 L 蛋白，但無法以 ELISA 方式準確反應出 L 蛋白的存在。造成這個使用上便利性下降的原因，可能是因為 L-c 蛋白製備是細菌表現的部分長度蛋白，且經過 SDS-PAGE 純化的變性形式(denature from)，因此可用於西方轉漬法辨認經變性的 L 蛋白，但使用 ELISA 偵測的 L 蛋白則較偏向不完全變性或自然形式(nature from)，未變性形式下的 L 蛋白其 C 端可能因折疊關係隱藏於內側或折疊形狀與變性形式不同，造成偵測可行性下降；此外，更有可能是因為 L 蛋白在病毒複製表現過程中的表現量較低，在感病細胞中累積量較少，因此無法以 ELISA 的方法靈敏地偵測到其存在。然而，相較於 TSWV 之 L 蛋白抗體之製備的研究，其產生之抗體以西方轉漬法或 ELISA 於感病葉片萃取液均無法偵測 L 蛋白存在，僅能在純化的病毒體中以西方轉漬法偵測到 L 蛋白的存在<sup>(28)</sup>，雖然同樣面臨感病葉片萃取液所含有 L 蛋白濃度太低的困難度，但本實驗中所製備的 L 蛋白單株抗體，確實有較高的靈敏度。由西方轉漬法以 WSMoV 之 L 蛋白分析四種不同血清型之 tospoviruses 其 L 蛋白之血清學上的關係，結果發現本實驗針對 WSMoV 之 L 蛋白 C 端所製備的單株抗體只能辨認 WSMoV 之 L 蛋白，而不會與其他病毒之 L 蛋白發生反應。在 tospoviruses 中 L 蛋白是病毒六種蛋白中最具保留性的，其 L 蛋白上具有 RNA 聚合酶之五個保留性區域<sup>(6)</sup>，若以此保留性區域的蛋白進行抗體的製備，則有可能會獲得與其他不同血清型病毒均有反應之抗體。然而本實驗中製備之 L 抗體是選取 L 蛋白 C 端進行表現並免疫實驗鼠所產生，根據 NCBI 基因庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上搜尋的序列(目前並無 GRSV L RNA 序列被發表)進行比對，在 L 蛋白 C 端部分 WSMoV 與 TSWV、INSV 之間，分別僅有 47.4%、47.6% 的核苷酸相同度及 28.1%、28.5% 的胺基酸相同度，推測由於 L-c 蛋白在此四種不同血清群間不具有序列保留特性，相似度較低，故本研究中製備之 L 抗體對 WSMoV 具有較高的專一性。綜合上述結果，本研究中所產生 L 蛋白之單株抗體，同時具有良好的靈敏度及專一性，在應用於檢測並診斷田間感病植物上亦有其實用性。

以西方轉漬法分析 WSMoV 在感病植物上 L 蛋白的表現，發現 L 蛋白的累積隨著時間推移有消長情形，這情形與病毒在寄主細胞內表現策略或其他病毒蛋白表現狀況應有所關聯，病毒於系統性寄主內慢慢移動至新葉時，必須進行大量模板 RNA 複製，以便之後大量轉錄表現其他病毒蛋白，此時需要高量之 L 蛋白發揮作用，於是 L 蛋白累積量大幅提升，並於接種後第 7 天時 L 蛋白表現達最高量；模板 RNA 大量產生

並進行轉錄作用，其他病毒蛋白被大量表現，而L蛋白持續平穩地作用，自身的合成趨於減緩，因此有L蛋白含量於接種後第 7 天開始降低的情形，各種病毒蛋白穩定執行功能，核酸蛋白複合體 (ribonucleoprotein complex, RNP) 開始累積並營造出病毒大量增殖之有利環境，外在表徵則顯示為病徵產生並趨於嚴重；然而，L 蛋白在第 9、10 天累積量又再上升，要深究其原因則須將採樣時間拉長，觀察其消長是否有規律性，並搭配感病細胞內各種病毒蛋白累積情形，再做出整合性的推斷，不排除其中一種可能性為，當 RNPs 濃度提升到某一程度後，形成要大量複製病毒基因體的訊息，於是在接種後第 9 天，L 蛋白累積量又開始增加，進入複製及包裹成病毒顆粒的階段。這一結果指出，如果實驗需要大量從感病植株純化分離 L 蛋白，於接種後到病徵產生前第 5-7 天是較適當的時機；而在病徵產生後，則可以較有效率地分離具感染力的 RNPs 或病毒顆粒。

將 WSMoV L 蛋白單株抗體，搭配蛋白 A 膠金抗體複合物進行免疫電子顯微鏡應用，觀察到針對 N 蛋白偵測的金粒子累積於線狀纏繞陰影部位，除了 N 蛋白之外，在這線狀纏繞陰影上亦偵測到 L 蛋白的存在，合理的推測此一線狀纏繞複合物即為 RNP 結構纏繞物，與目前的研究結果指出不同屬 bunyaviruses 間具有的共同特性相似：病毒顆粒內基因體 RNA 與病毒 L 蛋白連結<sup>(1, 23)</sup>，而N蛋白則緊密包裹著單股病毒基因體 RNA<sup>(18, 19)</sup>，整體纏繞成一個假環狀構造 (pseudo-circular structure)；換句話說，RNP 的組成明顯包括病毒 RNA、N 蛋白及 L 蛋白，是一個具有複製及表現功能的最小組成複合體。而本研究中 RNP 結構之所以直接裸露而被觀察到，則是因為此一純化方法並非針對完整病毒顆粒，而是針對 N 蛋白做純化，因此寄主細胞中未被包裹的 RNPs 會被分離出來，而分離過程中 Triton X-100 的處理，同時也會讓完整包裹於 RNP 外層的脂質套膜破壞，致使 RNP 裸露而被偵測觀察到。

在 tospoviruses 的研究中，利用植物基因轉殖的方式，對於多種病毒蛋白的基本功能已有初步的了解，然而在缺乏逆向遺傳系統的情形下，仍無法直接對病毒基因進行修飾做詳細的研究；在動物 bunyaviruses 的研究中，由於逆向遺傳系統的建立，在各種病毒蛋白與寄主間交互作用已有深入地研究。目前已知L蛋白至少牽涉轉錄及複製的活性，且以身為一個具功能性轉錄複合物所必需的蛋白而被包裹在病毒顆粒中；一個具高度專一性及靈敏度的 L 蛋白單株抗體的產生，將可以在逆向遺傳系統建立之前，被應用於偵測 L 蛋白在寄主細胞中的累積和運輸情形，以及觀察其與寄主

蛋白間的交互作用。本研究中所製備 L 蛋白單株抗體，不僅在田間病害診斷上具有鑑定 WSMoV 病毒種的能力，在分子生物學研究領域上更有其深入應用的潛力。

## 謝 辭

本研究承蒙行政院國科會計畫 (NSC94-2313-B-005-003; NSC98-2313-B-005-026-MY3) 經費補助，特此致謝。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Bouloy, M., Colbere, F., Krams-Ozden, S., Vialat, P., Garpin, A. C., Hannoun, C., and Lepine, P. 1975. Activate-RNA polymerase associated with bunyavirus (Lumbo). C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D. 280:213.
2. Bridgen, A., and Elliott, R. 1996. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404.
3. Chao, C.-H. 1995. Purification and serology of the nucleocapsid proteins of four distinct tospoviruses. National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.
4. Chapman, E. J., Hilson, P., and German, T. L. 2003. Association of L protein and *in vitro* Tomato spotted wilted virus RNA-dependent RNA polymerase activity. Intervirology 46: 177-181.
5. Chen, C. C., Ho, H. M., Chang, T. F., Chao, C. H., and Yeh, S. D. 1995. Characterization of a tospovirus-like virus isolated from wax gourd. Plant Prot. Bull. 37: 117-131.
6. Chu, F.-H., Chao, C.-H., Chung, M.-H., Chen, C.-C., and Yeh, S.-D. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91: 361-368.
7. Conzelmann, K.-K., and Meyer, G. 1996. Genetic engineering of animal RNA viruses. Trends Microbiol. 4:386-393.
8. Dunn, E. F., Pritlove, D. C., Jin, H., and Elliott, R. M. 1995. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. Virology 211: 133-143.
9. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A., eds. 2005. Virus Taxonomy: classification and nomenclature. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego,



California.

10. Flick, R., and Pettersson, R. F. 2001. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (*Bunyaviridae*): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J. Virol.* 75: 1643-1655.
11. Ganesan, U., Bragg, J. N., Deng, M., Marr, S. K., and Jackson, A. O. 2007. GFP expression from a *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* replicon. *Phytopathology* 97: S38.
12. Ganesan, U., Bragg, J. N., Deng, M., Marr, S. K., and Jackson, A. O. 2009. GFP expression from a biologically active minireplicon of *Sonchus yellow net virus*. *Phytopathology* 99: S39.
13. García-Sastre, A. 1998. Negative-strand RNA viruses: applications to biotechnology. *Trends Biotech.* 16: 230-235.
14. Huang, C. H., Chang, L., and Tsai, J. H. 1993. The partial characterization of melon vein-banding mosaic virus, a newly recognized virus infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Pathol.* 42: 100-107.
15. Kormelink, R., Storm, M., van Lent, J., Peters, D., and Goldbach, R. 1994. Expression and subcellular location of the NSm protein of *Tomato spotted wilted virus* (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* 200: 56-65.
16. Lewandowski, 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* 342: 26-37.
17. Lopez, N., Muller, R., Prehaud, C., and Bouloy, M. 1995. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J. Virol.* 69: 3972-3979.
18. Mir, M. A., and Panganiban, A. T. 2004. Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle. *J. Virol.* 78: 8281-8288.
19. Mohamed, N. A. 1981. Isolation and characterization of subviral structures from *Tomato spotted wilted virus*. *J. Gen. Virol.* 53: 197-206.
20. Neumann, G., Whitt, M. A., and Kawaoka, Y. 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J. Gen. Virol.* 83: 2635-2662.
21. Okuda, M., Taba, S., and Hanada, K. 2003. The S RNA segment determines symptom differences on *Tetragonia expansa* between two *Watermelon silver mottle virus* isolates. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 327-332.
22. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O. G., Pleschka, S., and García-Sastre, A. 1996. Negative-strand RNA viruses: Genetic engineering and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11354-11358.
23. Ranki, M., and Petterson, R. F. 1975. Uukuniemi virus contains an RNA polymerase. *J. Virol.* 16: 1420-1425.
24. Sakimura, K. 1963. *Frankliniella fusca*, an additional vector for the *Tomato spotted wilted virus*, with notes on *Thrips tabacii*, another vector. *Phytopathology* 53: 412-415.
25. Schnell, M. J., Mebatsion, T., and Conzelmann, K.-K. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13: 4195-5784.
26. Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., 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.
27. van Knippenberg, I., Goldbach, R., and Kormelink, R. 2002. Purified *Tomato spotted wilted virus* particles support both genome replication and transcription *in vitro*. *Virology* 303: 278-286.
28. van Poelwijk, F., Boye, K., Oosterling, R., Peters, D., and Goldbach, R. 1993. Detection of L protein of *Tomato spotted wilted virus*. *Virology* 197: 468-470.
29. Wijkamp, I. 1995. Virus-vector relationships in the transmission of tospoviruses. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
30. Yeh, S.-D., and Gonsalves, D. 1984. Purification and immunological analysis of cylindrical-inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. *Phytopathology* 74: 1273-1278.
31. Yeh, S.-D., Lin, Y.-C., Cheng, Y.-H., Jih, C.-L., Chen, M.-J., and Chen, C.-C. 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus on watermelon in Taiwan. *Plant Dis.* 76: 835-840.

## ABSTRACT

Chang, H.-H.<sup>1</sup>, Tseng, H.-H.<sup>1</sup>, Yeh, S.-D.<sup>1</sup>, Ku, H.-M.<sup>2,3</sup>, and Jan, F.-J.<sup>1,3</sup> 2009. Generation of monoclonal antibody against the replicase of *Watermelon silver mottle virus* and its application on the detection of L protein expression in planta. *Plant Pathol. Bull.* 18: 237-246. (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; <sup>2</sup>Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; <sup>3</sup>Corresponding author, E-mail: fjjan@nchu.edu.tw or hmku@nchu.edu.tw, Fax: +886-4-2285-4145 or +886-4-2287-7054)

*Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), belonging to the *Tospovirus* genus of the *Bunyaviridae*, has a segmented-genome designed as S (small), M (medium) and L (large) RNA. L RNA, a negative-sense RNA, encodes the largest protein (L protein) of WSMoV. The L protein is a RNA-dependent RNA polymerase of WSMoV, and forms the ribonucleoprotein complex (RNP) with the nucleocapsid protein and the genomic RNA. According to the studies of animal bunyaviruses, identifying the components of RNP is the key step for developing a reverse genetics system. The purpose of this study is to generate the monoclonal antibody against L protein, and utilize it for the detection of L protein in virus-infected plants. The C terminus of WSMoV L protein (L-c) was purified from a bacterial expression system and used to immunize BALB/c mice. Ascites fluid containing the monoclonal antibody against the L protein was collected from the mice intraperitoneally injected with hybridoma cells. This monoclonal antibody specifically reacts with the L protein of WSMoV, but not with those of the other three serogroups of tospoviruses including *Tomato spotted wilt virus*, *Impatiens necrotic spot virus*, or *Groundnut ringspot virus*. While detecting WSMoV-infected *Nicotiana benthamiana* plants with the monoclonal antibody, a growth and decline profile in the L protein expression level was observed. The RNPs were observed in electron microscope with the monoclonal antibody and protein A-gold labeled 2<sup>nd</sup> antibody. The L protein monoclonal antibody developed in this study has high specificity and sensitivity, and will be a powerful tool for virus functional genomic study in reverse genetics system.

Key words: *Watermelon silver mottle virus*, ribonucleoprotein complex, bacterial expression system, hybridoma, protein A-gold labeling electron microscopy