

開發可區分辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒的 核酸和血清檢測方法

鄭櫻慧^{1,*} 陳金枝¹ 王昭月² 江佳典³ 張清安⁴

摘要

鄭櫻慧、陳金枝、王昭月、江佳典、張清安。2022。開發可區分辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒的核酸和血清檢測方法。台灣農業研究 71(3):231–241。

辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 和番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 都是茄科番椒屬作物的 *Potyvirus* 屬病毒，且在 potyviruses 中，二者的鞘蛋白相似度最高，因此有高强度抗血清相關性，即利用純化病毒或鞘蛋白製備的多元抗體無法區分此二病毒。比對 ChiVMV 與 PVMV 的鞘蛋白基因與 3' 非轉譯區，以鞘蛋白 N 端與 3' 非轉譯區差異最大。因 3' 非轉譯區長度差異大，以此區域設計專一性引子進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，利用增幅產物分子量大小不同，可以區分此二病毒。製備專一性抗血清則利用 ChiVMV 與 PVMV 之鞘蛋白 N 端差異大區域，以 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸 (4.3 kDa)，後接綠色螢光蛋白 (28.2 kDa)，使其成為複合蛋白加大分子量加強免疫反應，再以 pET-28b (+) 為表現載體，於 *Escherichia coli* Rosetta 產生一 32.5 kDa 之複合表現蛋白。大量表現此複合蛋白，加以純化後進行白兔免疫注射，獲得之多元抗體，進行 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 或西方漬染法，均可正確檢出感染 ChiVMV 之材料，而不與 PVMV 感染的煙草、甜椒和健康植株反應。用在檢測田間樣本時，與純化病毒製備之抗血清比較，可正確區分樣本是否為 ChiVMV 感染。比起製備單元抗體，利用細菌表現蛋白製備專一性多元抗血清，可不須經過繁複的步驟即可快速且簡便地得到 ChiVMV 專一性多元抗血清。

關鍵詞：辣椒葉脈斑駁病毒、表現蛋白、多元抗體。

前言

番椒 (*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L.) 屬於茄科 (Solanaceae) 番椒屬 (*Capsicum*) 為一年生或多年生作物，主要分為甜椒 (sweet pepper) 和辣椒 (chili pepper)，原產於南美洲的秘魯和中美洲的墨西哥一帶。番椒在台灣栽培歷史悠久，台灣甜椒栽培始於 1960 年之後由美國引進栽培，夏季種植於中海拔地區，秋冬季則以中、南部地區栽培較多。目前主要栽

培品種為一代交配種，品種依其果肉硬與柔軟分為『硬殼種』和『軟殼種』，若依其果肉顏色區分，綠色以外顏色歸為『彩色甜椒』。依據農委會統計年報 (<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>) 記載，台灣 2020 年番椒栽培面積約為 2,580 ha，產量達 30,072 Mg，主要產區依栽培面積由大至小排序為南投縣、嘉義縣、雲林縣、屏東縣、高雄市、台南市及台中市等地，週年均有生產。

番椒作物田間複合感染情形相當普遍 (Green

投稿日期：2021 年 11 月 16 日；接受日期：2022 年 3 月 14 日。

* 通訊作者：yhcheng@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

³ 朝陽科技大學生化科技研究所研究生。台灣 台中市。

⁴ 朝陽科技大學生化科技研究所教授。台灣 台中市。

& Kim 1991; Agranovsky 1993)，台灣已發生的病毒包括：辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV)、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV)、番椒黃斑病毒 (pepper chlorotic spot virus; PCSV)、番椒微斑駁病毒 (pepper mild mottle virus; PMMoV)、番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus; PepMoV)、番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV)、馬鈴薯病毒 X (potato virus X; PVX)、馬鈴薯病毒 Y (potato virus Y; PVY)、煙草微綠嵌紋病毒 (tobacco mild green mosaic virus; TMGMV)、番茄斑點萎凋病毒 (tomato spotted wilt virus; TSWV)、番茄黃化捲葉泰國病毒 (tomato yellow leaf curl Thailand virus; TYLCTHV) 及西瓜銀斑病毒 (watermelon silver mottle virus; WSMoV) (Li & Chang 2005; Tsai *et al.* 2005; Jan *et al.* 2007; Cheng *et al.* 2009a, 2009b; Huang *et al.* 2010; Shih *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2011; Cheng *et al.* 2013)。除了 PVX、PMMoV 和 TMGMV 只經由機械傳播無媒介昆蟲外，其餘病毒均可經由媒介昆蟲傳播，其中 CMV、ChiVMV、PepMoV、PVY 及 PVMV 可經由蚜蟲傳播，WSMoV、PCSV 和 TSWV 由薊馬傳播，TYLCTHV 只經由煙草粉蝨種群傳播。

ChiVMV、PepMoV、PVY 及 PVMV 同屬於 *Potyvirus* 病毒屬，田間藉由蚜蟲與農事操作傳播，病毒感染造成葉片斑駁、嵌紋、葉脈透化或壞疽圓斑等，也造成果實畸形與植株矮化等病徵，嚴重影響收成。這 4 種病毒之間有程度不一的血清學相關性，尤以 ChiVMV 與 PVMV 最為顯著，以純化病毒製備的抗血清常無法區分此 2 種病毒 (Moury *et al.* 2005)。ChiVMV 與 PVMV 雖然有高度的血清學相關性，但 2 病毒的寄主範圍與分布地區有很大差異，ChiVMV 寄主範圍限於藜科和茄科植物 (Shah *et al.* 2008)；PVMV 則寄主範圍較為廣泛，共可感染 14 科 47 種植物。ChiVMV 首先於 1947 年於西馬來西亞發現 (Ong *et al.* 1980)，主要分布於亞洲的中國、印度、印尼、日本、韓國、馬來西亞、巴基斯坦、菲律賓、斯里蘭卡、台灣、泰國和越南，後在非洲的坦桑尼亞、大洋洲的巴布亞新幾內亞和歐洲的義大利也發現 ChiVMV (Gao *et al.* 2016; Tiberi-

ni *et al.* 2017)。PVMV 則於 1971 年發現於迦納 (Brunt & Kenten 1971)，主要發生於非洲各國，後於亞洲與美國也有發現紀錄 (Cheng *et al.* 2009b; Matsumoto *et al.* 2016)。

ChiVM 與 PVMV 全基因體之核苷酸相同度低於 70%，其轉譯出的聚合蛋白胺基酸相同度高於 72%，比較各個裂解後之蛋白產物，差異集中於 P1 蛋白、P3 蛋白、鞘蛋白 N 端。ChiVMV 與 PVMV 的鞘蛋白有 70% 左右的胺基酸相同度，但鞘蛋白 N 端 (ChiVMV 有 50 個胺基酸；PVMV 有 31 個胺基酸)，除蚜蟲傳播必須的 DAG 外，幾乎都不相同；鞘蛋白除 N 端以外區域，胺基酸相同度則高於 88%。為了解決傳統純化病毒免疫白兔製備的多元抗血清無法區分 ChiVMV 與 PVMV 的問題，本研究擬利用 ChiVMV 與 PVMV 於鞘蛋白 N 端差異大的區域製備 ChiVMV 的專一性抗血清，與 ChiVMV 與 PVMV 的 3' 非轉譯區 (3'-nontranslated region; 3'-NTR) 長度差異大 (ChiVMV 約 284 nt; PVMV 約 376 nt) 設計簡併式引子，得以順利區分此 2 種病毒，專一性檢測對於田間調查病害發生或抗病育種有很大助益。

材料與方法

病毒來源、分離及保存

2006 年採集自水里的甜椒疑似病毒感染植株，呈現植株略微矮化及葉片出現嵌紋斑駁等病徵。甜椒葉片汁液以 10 倍量磷酸緩衝液研磨，進行接種試驗，在紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 接種葉出現黃色圓斑，在奎藜上進行 3 次單斑分離，之後接種於圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 繁殖。此分離之病毒接種於甜椒與煙草，確認其對甜椒病原性與作為本試驗病毒材料來源，並以煙草病葉組織置於 50% 甘油中於 -20°C 長期保存。

總量 RNA 之抽取、反轉錄聚合酶連鎖反應與鞘蛋白基因選殖與定序分析

取 100 mg 的煙草病葉，利用總量核酸純化試劑組 (Total RNA Extraction Miniprep System, Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 進行萃取。以

純化所得之 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (SolGent Co., Daejeon, Korea) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA、各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5 [5'-ATG(A/G)T(A/T/C)GA(A/R)(A/T/C)C(A/T/C/G)TGG-GG-3']/oligo d(T)。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中，設定反應程序為 50°C 下進行反轉錄 30 min，94°C 變性 1.5 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min，50°C 下煉合 1.5 min，72°C 下聚合 2 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應產物以 1.2% agarose (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。RT-PCR 增幅所得之 1.3 kb DNA 片段以 TOPO TA-PCR II Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 進行選殖。選殖株抽取質體再以限制酶 *EcoRI* 酶切確認插入 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司 (台灣台北市) 進行。定序之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Frederick, MD, USA) 分析軟體進行分析，並與 GenBank 上已登錄之核苷酸序列進行分析比對。

RT-PCR 鑑別辣椒葉脈斑駁病毒與番椒葉脈斑駁病毒

前述純化所得之總量核酸進行單一步驟 RT-PCR，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA，各 2.5 μL 之 20 μM 引子 CPVMV-F (5'-TATTC(T/C)TCAGTGTGG(A/T/C)T(T/C)CCAC-CAT-3'/CPVMV-R (5'-TC(A/T)C(T/C)(A/T/G)(T/C)AA(A/G)CCATAA(A/C)(A/C)ATA(A/G)T(T/C)T)，引子位於 ChiVMV 與 PVMV 的 3'-NTR。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀中，設定反應程序為 50°C 下進行反轉錄 30 min，94°C 變性 1 min 30 s；後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 1 min，52°C 下煉合 1 min 30 s，72°C 下聚合 1 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。反應產物以 1.2% agarose 電泳，分析增幅產物之分子量。

抗原蛋白之表現及製備

設計對應 ChiVMV 鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸的專一性引子 CVMCP-F：5'-ACCATGGGAA GCATGGAGAGAGTGCATT-3'/CVMCP-R：AACTAGTCATCAACACTCTCTCCCGAC-3'，以感染 ChiVMV 之煙草總量 RNA 為模板進行 RT-PCR 反應，於 50°C 下煉合 30 min，30 個循環反應：94°C 下變性 1 min，52°C 下煉合 1 min 30 s，72°C 下聚合 1 min，最後一個循環之 72°C 聚合反應延長為 6 min。增幅鞘蛋白 N 端基因之 117 bp，增幅 DNA 之 5' 端有 *NcoI* 切位，3' 端有 *SpeI* 切位。將增幅所得之 DNA 以 *NcoI* 和 *SpeI* 切割，剪接於同樣經 *NcoI* 和 *SpeI* 酶切之攜帶綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) 基因之 pET28b (+) 載體 (Novagen Inc., Madison, WI, USA)，此載體先以 *SpeI* 與 *XhoI* 將 GFP 基因選殖至 pET28b (+) 載體。選殖完成之載體轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基 (Laemmli 1970) 培養，並以 1 mg mL⁻¹ 之 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導複合蛋白 (鞘蛋白 N 端與 GFP 之複合蛋白) 之表現，菌液以 7,700 \times g 離心 10 min 沉降細菌後，以 pH 8.0 Tris-EDTA 緩衝液溶解沉澱物，收集蛋白質進行 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳分析 (Li *et al.* 1998)，並經西方漬染法以市售之 His 抗體與純化病毒製備之抗血清確定複合蛋白之表現。進一步選用確定有鞘蛋白表現之選殖株進行大量表現蛋白之生產，方法乃參照以往之研究報告 (Chen *et al.* 2002)。

抗血清之製備

以純化的複合表現蛋白為抗原，肌肉注射於紐西蘭白兔，每週注射 1 次，連續注射 4 wk。病毒懸浮液 (1 mg mL⁻¹) 與等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合乳化後進行第一次注射，之後 3 次則以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 進行乳化。第 5 週開始進行耳朵靜脈採血。採得血液於 37°C 中靜置 1 h，500 \times g 離心 10 min 使分層後取出上層之血清，保存於 -20°C 中備用。

西方漬染法

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 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β -mercaptoethanol, 0.015% bromophenol blue)，研磨後之萃取液以 85°C 加熱處理 5 min，經 SDS-PAGE 電泳後，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., Rockland, MA, USA)，之後以病毒抗血清進行漬染反應 (Chen *et al.* 2002)。

酵素連結免疫分析

試驗參照 Clark & Adams (1977) 報告進行，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，取 200 μL 加入酵素免疫分析反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 4°C 冰箱 16 h 進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以 1× PBST 緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次；其後加入 180 μL 供試抗體後，放置在 37°C 定溫箱反應 2 h；再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，每孔加入 150 μL 已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA)，置於 37°C 之定溫箱中反應 2 h；最後再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，再以 120 μL /孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p -NPP, Amresco, Solon Ind., Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應後 20–30 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，做為評估病毒濃度高低之依據。樣品的讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

結果

病毒分離與寄主植物測定

甜椒葉片汁液以 10 倍量磷酸緩衝液研磨，進行接種試驗，在紅藜 (*C. amaranticolor*) 及奎藜 (*C. quinoa*) 接種葉出現黃色圓斑，在奎

藜上進行 3 次單斑分離，之後接種於圓葉煙草 (*N. benthamiana*) 繁殖，得到仁愛分離株 (ChiVMV-RA)，做為試驗或接種來源，取病葉組織浸泡於 50% 甘油中置於 -20°C，進行長期保存。ChiVMV-RA 回接甜椒 (「翠綠星」，農友公司，台灣高雄市)，甜椒則出現葉片嵌紋及扭曲變形的明顯病徵；以台灣另一常見於番椒作物的 PVMV 相較，PVMV 接種「翠綠星」甜椒時，只造成葉面斑駁的輕微病徵 (圖 1)。

鞘蛋白基因之選殖、核苷酸序列分析及其與番椒嵌紋病毒鞘蛋白基因之比較

利用偵測 *Potyvirus* 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1，以接種 ChiVMV-RA 的 *N. benthamiana* 葉片總量 RNA 進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% agarose 膠體電泳分析，增幅之 DNA 片段為 0.5 kb 和 1.5 kb (圖 2)。且取 2 增幅 DNA 片段，經 TOPO TA 選殖套組選殖後，所得之選殖株經定序後，0.5 kb 大小之 DNA 增幅自煙草染色體之基因；1.5 kb 大小之 DNA 定序分析，共有 1,397 個核苷酸，包含病毒之部分 Nib 基因 (248 nt)、鞘蛋白基因 (861 nt) 和 3'-NTR (285 nt)。利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 之 BLAST 程式比對 GenBank 登錄之序列，其鞘蛋白基因與 ChiVMV isolate P3215 (DQ854945) 最相近，有 98.8% 的相同度，有 12 個核苷酸不同，鞘蛋白基因轉譯出 287 個胺基酸，與 isolate P3215 比較，有 4 個胺基酸不同，其胺基酸序列相同度為 98.4%。

相較於 ChiVMV，PVMV 的鞘蛋白基因有 810 個核苷酸，轉譯出 270 個胺基酸。其與 ChiVMV 的鞘蛋白基因僅有 66.5% 的核苷酸相同度與 75.6% 的胺基酸相似度，比對二者的胺基酸序列 (圖 3)，明顯差異集中在鞘蛋白 N 端約 50 個胺基酸，其後至 C 端的胺基酸序列相同度高於 88%，此結果與以 ChiVMV 純化病毒免疫白兔所製備的抗血清無法區分 2 病毒相符。

專一性核酸檢測技術建立

建立 RT-PCR 檢測技術時，選取 ChiVMV 與 PVMV 於 3'-NTR 長度差異大，ChiVMV 之

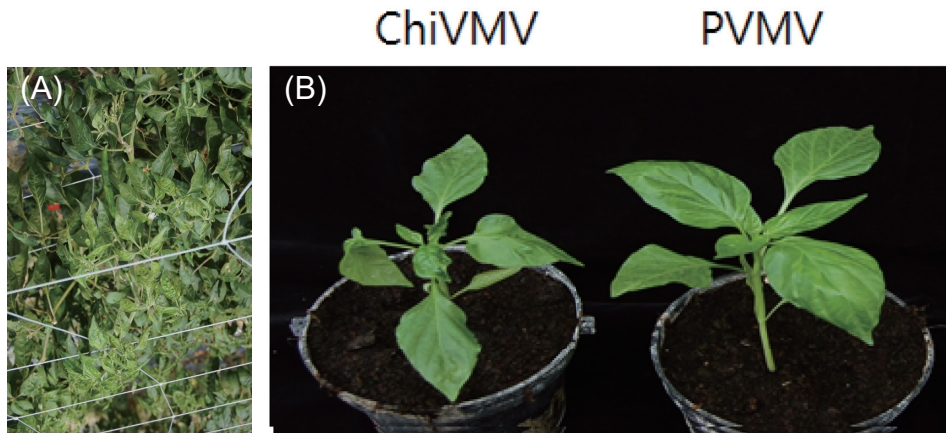


圖 1. 辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli vein mottle virus; ChiVMV) 感染甜椒之病徵。(A) 為田間栽培甜椒受到 ChiVMV 感染的病徵；(B) 為 ChiVMV 與番椒葉脈斑駁病毒 (pepper vein mottle virus; PVMV) 接種甜椒 (「翠綠星」HV-237, 農友公司, 台灣高雄市) 之病徵。

Fig. 1. Symptoms of pepper plants infected by chilli vein mottle virus (ChiVMV). (A) ChiVMV-infected green pepper plant showing mosaic and leaf deformation symptoms in the field; (B) symptoms of green pepper (HV-237, Known You Seed Co., Kaohsiung, Taiwan) plants inoculated with ChiVMV or pepper vein mottle virus (PVMV).

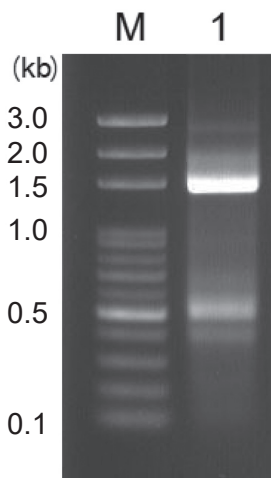


圖 2. 利用簡併式引子對 Hrp5/Pot1 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR), 增幅辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli vein mottle virus; ChiVMV) 基因體 3' 末端序列。Total RNA 純化自 ChiVMV 接種之圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) (行 1), 分別得到分子量約 1.4 kb 與 0.5 kb 之 RT-PCR 產物。行 M 為分子量標誌。

Fig. 2. Amplification of the 3'-end portion of chilli vein mottle virus (ChiVMV) genome by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Two main DNA fragments of 1.4 kb and 0.5 kb were amplified from the total RNA extracted from ChiVMV-infected *Nicotiana benthamiana* using the degenerate primers Hrp5/Pot1 (lane 1). Lane M: molecular size markers.

3'-NTR 有 284 核苷酸, PVMV 之 3'-NTR 有 376 核苷酸, 據此設計位於 3'-NTR 區域之引子對 CPVMV-F/CPVMV-R, ChiVMV 預期增幅 173 bp 產物, PVMV 則預期增幅 258 bp 產物, 以 1.2% agarose 電泳分析可依其分子量加以判別。以此引子對偵測田間甜椒樣本, 依產物分子量可區分受到 ChiVMV 或 PVMV 感染 (圖 4)。

複合表現蛋白與分子量測定

本試驗利用 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端與 PVMV 相異的 39 個胺基酸製備專一性抗體, 推估 39 個胺基酸分子量為 4.3 kDa, 恐引起的免疫反應不強, 因此以鞘蛋白 N 端的 4.3 kDa 後接 GFP (28.2 kDa), 使成一分子量約 32.5 kDa 的複合蛋白。構築複合蛋白時, GFP 基因先以 *SpeI* 與 *XhoI* 選殖至 pET28b (+) 載體, 設計對應 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸的引子對, 以 RT-PCR 增殖, 純化增殖 DNA 片段後, 以 *NcoI* 與 *SpeI* 選殖於 GFP 之前。構築完成之載體轉型於 *E. coli* strain Rosetta (DE3), 經 IPTG 誘導後表現之蛋白質大小約 32 kDa, 與預估值相符 (圖 5A)。以西方漬染法分析, 此表現蛋白可與市售之 His 抗血清有專一性反應

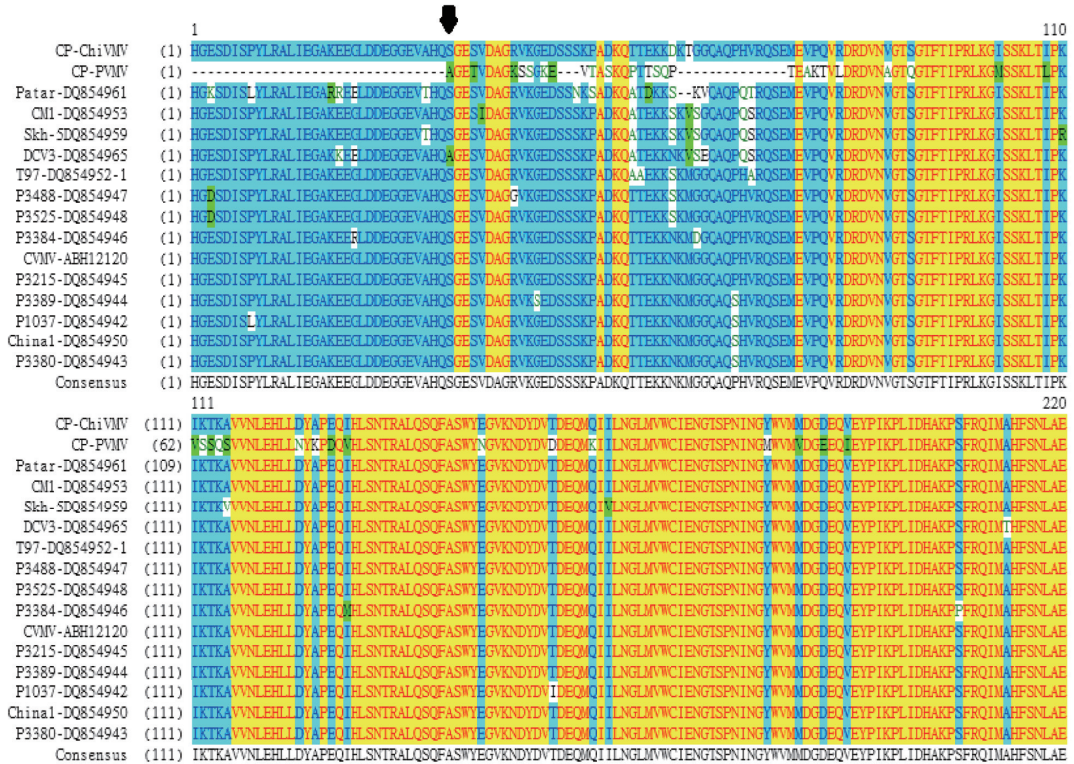


圖 3. 辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus; ChiVMV) 和番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus; PVMV) 部分鞘蛋白胺基酸序列比對。CP-ChiVMV 與 CP-PVMV 為 2 病毒台灣分離株，其餘序列為美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 登錄者，前為分離株名稱，後為登錄序號。鞘蛋白起始位置以箭頭標示。

Fig. 3. Comparison of deduced amino acid sequences of partial coat protein of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) and pepper veinal mottle virus (PVMV). The start amino acid of coat protein is indicated by an arrow.

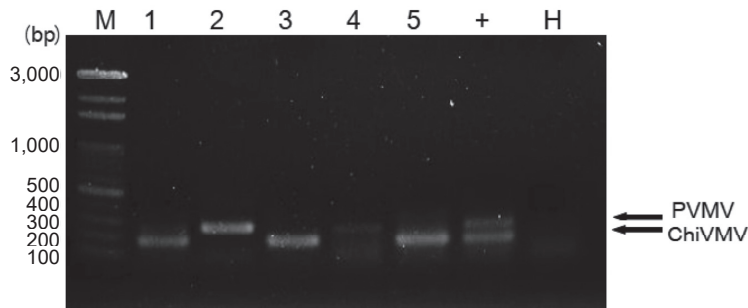


圖 4. 利用引子對 CPVMV-F/CPVMV-R 對田間採集疑似病毒感染甜椒樣本進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)，檢測感染 chilli veinal mottle virus (ChiVMV) 與 pepper veinal mottle virus (PVMV) 其產物以電泳分析結果。行 1-5：為不同田間採集甜椒樣本；行 +：混合 ChiVMV 與 PVMV 抽取自感染煙草之總量 RNA 作為正對照；行 H：未接種甜椒之總量 RNA 作為負對照；行 M：marker。

Fig. 4. Detection of in sweet peppers by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the primer pair CPVMV-F/CPVMV-R. Lanes 1-5: Sweet pepper samples collected from different fields; lane +: Mixed total RNA of *Nicotiana benthamiana* plants infected with ChiVMV and PVMV as a positive control; lane H: Total RNA of mock-inoculated *N. benthamiana* as a negative control; lane M: molecular size markers. The expected amplicons are indicated by arrows.

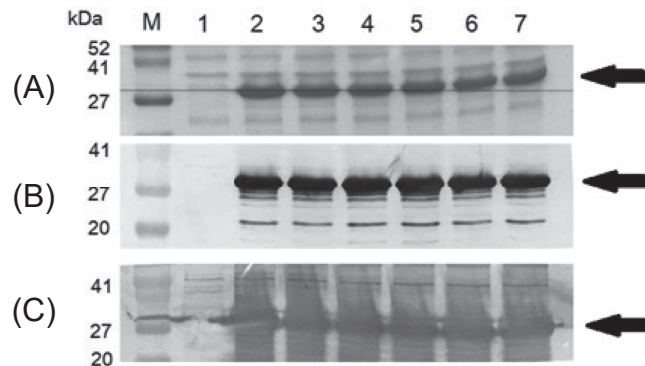


圖 5. 以膠體電泳與西方漬染法分析與篩選辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli vein mottle virus; ChiVMV) 部分鞘蛋白與綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) 複合表現蛋白的選植株。(A) 經 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導後表現之蛋白質；(B) 以市售之 His 抗血清進行西方漬染法分析及 (C) 以實驗室自製 ChiVMV 純化病毒免疫白兔所製備的抗血清進行西方漬染法分析。行 1：含有 pET28 之 *Escherichia coli* 對照株；行 2-7：誘導表現複合表現蛋白之 *E. coli* 選植株；行 M：蛋白分子量標誌。複合表現蛋白位置以箭頭標示。

Fig. 5. Analysis and screening of clones expressing fusion protein of the N-terminus of coat protein (CP) of chilli vein mottle virus (ChiVMV) and green fluorescent protein (GFP) by (A) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE) and (B) western blotting using the antisera against His tag or (C) ChiVMV CP. Lane 1: A *Escherichia coli* clone containing empty pET28 (+) vector as a negative control; lanes 2-7: *E. coli* clones containing recombinant vectors for expressing fusion protein; lane M: protein markers. The position of expected fusion protein is indicated by arrows.

(圖 5B)，也與實驗室自製 ChiVMV 純化病毒免疫白兔所製備的抗血清反應 (圖 5C)。

複合表現蛋白抗血清製備與應用

表現蛋白經 12% SDS-PAGE 分析，切取相對位置蛋白帶大量純化後，進行免疫注射白兔後，共採得約 100 mL 抗血清。抗血清稀釋 100-10,000 \times 進行 ELISA 時，與接種 ChiVMV 分離株的 *N. benthamiana* 呈正反應，選擇以稀釋 2,000 \times 進行以下實驗。

間接酵素聯結免疫分析與西方漬染法均以本實驗室製備之 ChiVMV 純化病毒與複合蛋白製備的抗血清為抗體進行測試對於 PVMV 與 ChiVMV 的專一性檢測能力。以西方漬染法進行分析，純化病毒抗血清 (以 AS-V 稱之) 與 PVMV 接種的番茄 (*Solanum lycopersicum*)、圓葉煙草 (*N. benthamiana*)、甜椒 (*C. annuum*) 及奎藜 (*C. quinoa*) 與 ChiVMV 接種的圓葉煙草 (*N. benthamiana*) 與甜椒 (*C. annuum*) 在高於 27 kDa 的位置都有明顯的反應條帶；複合蛋白抗血清 (以 AS-E 稱之) 只

與 ChiVMV 接種的圓葉煙草與甜椒在高於 27 kDa 的位置有明顯的反應條帶，與 PVMV 接種的番茄、圓葉煙草、甜椒及奎藜在鞘蛋白預期位置無反應條帶；未接種的煙草與甜椒與 2 種抗血清均無此反應條帶 (圖 6A)。以間接酵素聯結免疫呈色分析上述樣本，與西方漬染法結果相同，AS-V 與 PVMV 及 ChiVMV 接種的植物測得反應值都在 2.5 以上，AS-E 只與 ChiVMV 接種的植物測得反應值高於 2.5，與 PVMV 接種的植物測得反應值近似未接種對照植物 (圖 6B)。

討論

ChiVMV 和 PVMV 都危害感染茄科番椒屬作物的 *Potyvirus* 屬病毒，2 病毒的寄主範圍不同，發源地與分布地區也不同，但有高強度抗血清相關性，以傳統的純化病毒製備的抗血清常無法區分此 2 種病毒。本研究選取 ChiVMV 與 PVMV 於鞘蛋白 N 端差異大的 39 個胺基酸，製備 ChiVMV 的專一性多元抗血清

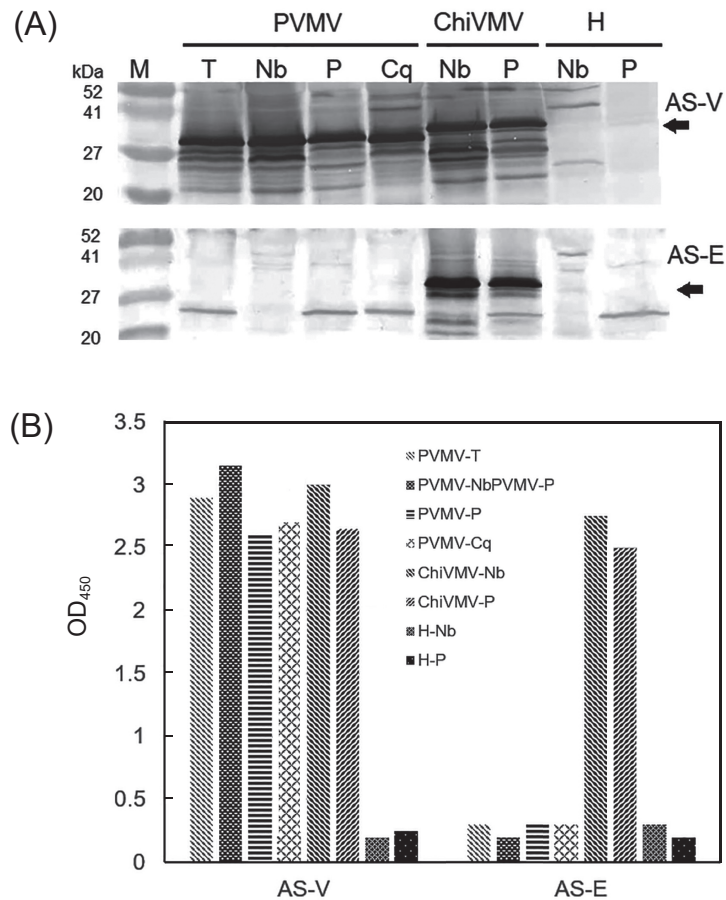


圖 6. (A) 以西方漬染法與 (B) 間接酵素聯結免疫呈色分析法分析純化病毒抗血清 (以 AS-V 稱之) 或複合表現蛋白 (以 AS-E 稱之) 檢測番椒葉脈斑駁病毒 (pepper vein mottle virus; PVMV) 與辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli vein mottle virus; ChiVMV) 接种植物, 包含 PVMV 接種的番茄 (*Solanum lycopersicum*) (T)、圓葉煙草 (*Nicotiana benthamiana*) (Nb)、甜椒 (*Capsicum annuum*) (P) 及奎藜 (*Chenopodium quinoa*) (Cq) 與 ChiVMV 接種的圓葉煙草 (Nb) 與甜椒 (P); 未接種的圓葉煙草 (Nb) 與甜椒 (P) 為負對照; M 為蛋白分子量標誌。

Fig. 6. Detection of pepper vein mottle virus (PVMV) and chilli vein mottle virus (ChiVMV) in plants by antisera against viral particles of ChiVMV (called AS-V) or expressed fusion protein (called AS-E) in (A) Western blotting and (B) indirect enzyme-linked immunosorbent assay. PVMV-infected *Solanum lycopersicum* (T), *Nicotiana benthamiana* (Nb), *Capsicum annuum* (P) and *Chenopodium quinoa* (Cq), and ChiVMV-infected *N. benthamiana* (Nb) and *C. annuum* (P) were used for assay. Mock-inoculated *N. benthamiana* (Nb) and *C. annuum* (P) were used as negative controls. M: protein markers. The expected coat protein (CP) position is indicated by arrows.

AS-E, 進行西方漬染法或 indirect ELISA, 都可以明確區分此 2 種病毒, 此抗血清適用於 ELISA 進行田間大量樣本檢測。利用 3'-NTR 核苷酸數目差異, 設計簡併式引子對進行 RT-PCR, 亦可依其產物分子量大小準確區分此 2 種病毒。RT-PCR 雖然靈敏度高, 但僅為定性反應, 而且能處理的樣本量少於 ELISA, 仍無法取代抗血清, 尤其是具有專一性的抗血清,

為釐清是否為 ChiVMV 感染不可或缺的工具。

Tsai *et al.* (2008) 收集南亞與東南亞的 ChiVMV 分離株, 加以定序分析, 根據其鞘蛋白基因分為 3 群, 根據圖 4 胺基酸序列比對分析, 以複合表現蛋白製備之抗血清與 3 群病毒反應, 亦即除了南亞與東南亞的 ChiVMV 分離株之外, 也可以偵測到日本與中國的 ChiVMV 分離株。中國近年報導新的重組分

離株 (Rao *et al.* 2020)，報告中比對重組分離株與中國及其他各國分離株，鞘蛋白基因歸納成 2 大群，比較這些分離株之鞘蛋白 N 端與 ChiVMV-RA，39 胺基酸中最多只有 6 個胺基酸不同 (數據未顯示)，據此推估試驗中製備的複合表現蛋白抗血清以西方漬染法或 ELISA 仍可以專一性地檢出 ChiVMV。

實驗中選取的 39 個胺基酸推估分子量約 4.3 kDa，這個勝肽因太短恐抗原性不佳。解決勝肽太短問題，實務上常見以勝肽直接鏈結一個大的蛋白以加強免疫反應。本實驗直接在 ChiVMV 之鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸，後接 GFP (28.2 kDa)，使成複合蛋白加大分子量加強免疫反應。再以 pET-28b (+) 為表現載體，大量表現此複合蛋白並純化後進行自兔免疫注射。GFP 為分離自水母的螢光蛋白，與植物蛋白相近的可能性極小，因此以複合表現蛋白免疫自兔製備的抗血清與感染其他病毒 (如 PVMV) 或未接種植物的反應極小，複合表現蛋白抗血清的高度專一性以西方漬染法或 ELISA 檢測時，很容易判別是否為 ChiVMV 感染。

本研究嘗試以 ChiVMV 之鞘蛋白專一性高的區域，複合水母之 GFP 蛋白，藉由病毒表現載體大量生產複合表現蛋白，以之免疫自兔獲得之專一性多元抗體，比單元抗體製備的時間短，過程簡單，耗用的費用也少，且深具實用價值。台灣早有 ChiVMV 感染辣椒的紀錄 (Green & Kim 1991)，而 PVMV 在台灣被發現後，已被記錄感染茄科的甜椒、辣椒、番茄和龍葵 (Cheng *et al.* 2009b) 與龍膽科的洋桔梗 (Cheng *et al.* 2009a)，應用此複合表現蛋白抗血清可以確實釐清田間番椒受到 PVMV 或 ChiVMV 危害，這些資料對病害管理與抗病育種等研究極具參考應用價值。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 98 農科-9.3.1-農-C1(2) 計畫經費支持，更依賴王昭萍、江芬蘭及林雅雯等多位研究同仁共同協助完成，謹此致謝。

引用文獻

- Agranovsky, A. A. 1993. Virus diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Ethiopia. *J. Phytopathol.* 138:89–97. doi:10.1111/j.1439-0434.1993.tb01364.x
- Brunt, A. A. and R. H. Kenten. 1971. Pepper veinal mottle virus-A new member of the potato virus Y group from peppers (*Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L.) in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* 69:235–243. doi:10.1111/j.1744-7348.1971.tb04676.x
- Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 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. doi:10.7016/BBAS.200201.0013
- Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Liao, D. T. Deng, and C. A. Chang. 2009a. Isolation and identification of *Pepper veinal mottle virus* on lisianthus. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:196–207. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2009.05803.05
- Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009b. First report of *Pepper veinal mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 93:107. doi:10.1094/PDIS-93-1-0107A
- Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, J. Y. Liao, C. A. Chang, and C. H. Chiang. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in bell pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 95:617. doi:10.1094/PDIS-10-10-0721
- Cheng, Y. H., Y. X. Zheng, C. H. Tai, J. H. Yen, Y. K. Chen, and F. J. Jan. 2013. Identification, characterisation and detection of a new tospovirus on sweet pepper. *Ann. Appl. Biol.* 164:107–115. doi:10.1111/aab.12084
- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475
- Gao, F., J. Jin, W. Zou, F. Liao, and J. Shen. 2016. Geographically driven adaptation of chilli veinal mottle virus revealed by genetic diversity analysis of the coat protein gene. *Arch. Virol.* 161:1329–1333. doi:10.1007/s00705-016-2761-7
- Green, S. K. and J. S. Kim. 1991. Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review. Technical Bulletin No. 18. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. 60 pp.
- Huang, C. H., Y. X. Zheng, Y. H. Cheng, W. S. Lee, and F. J. Jan. 2010. First report of *Capsicum chlorosis virus* infecting tomato in Taiwan. *Plant Dis.* 94:1263. doi:10.1094/PDIS-04-10-0275
- Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hosoi, and W. S. Tsai. 2007. First

- report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 91:1363. doi:10.1094/PDIS-91-10-1363A
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi:10.1038/227680a0
- Li, C. Y. and Y. C. Chang. 2005. First identification of *Tobacco mild green mosaic virus* on *Capsicum annuum* in Taiwan. *Plant Pathology* 54:258. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01171.x
- Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 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. doi:10.1007/s007050050476
- Matsumoto, K., R. Yasaka, T. Setoyama, S. Kawano, and K. Ohshima. 2016. Chilli pepper rugose mosaic disease caused by *Pepper veinal mottle virus* occurs on Ishigaki Island, Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 82:57–60. doi:10.1007/s10327-015-0634-7
- Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, and P. Gognalons. 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. *Phytopathology* 95:227–232. doi:10.1094/PHYTO-95-0227
- Ong, C. A., G. Varghese, and T. W. Poh. 1980. The effect of *Chili veinal mottle virus* on yield of chili (*Capsicum annuum* L.). *MARDI Res. Bull.* 8:74–78.
- Rao, S., X. Chen, S. Qiu, J. Peng, H. Zheng, Y. Lu, G. Wu, J. Chen, W. Jiang, Y. Zhang, and F. Yan. 2020. Identification of two new isolates of chilli veinal mottle virus from different regions in China: Molecular diversity, phylogenetic and recombination analysis. *Front. Microbiol.* 11:616171. doi:10.3389/fmicb.2020.616171
- Shah, H., T. Yasmin, M. Fahim, S. Hameed, and M. I. Ul-Haque. 2008. Transmission and host range studies of Pakistani isolate of *Chilli veinal mottle virus*. *Pak. J. Bot.* 40:2669–2681.
- Shih, S. L., W. S. Tsai, L. M. Lee, J. T. Wang, S. K. Green, and L. Kenyon. 2010. First report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* associated with pepper leaf curl disease in Taiwan. *Plant Dis.* 94:637. doi:10.1094/PDIS-94-5-0637B
- Tiberini, A., A. Manglli, A. Ahmad, U. Cassia, and L. Tomassoli. 2017. First report and molecular identification of chilli veinal mottle virus in Italy. *J. Plant Pathol.* 99:523–526. doi:10.4454/jpp.v99i2.3891
- Tsai, W. S., F. J. Jan, Y. C. Huang, and S. K. Green. 2005. Molecular characterization of five strains of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 47:429–430.
- Tsai, W. S., Y. C. Huang, D. Y. Zhang, K. Reddy, S. H. Hidayat, W. Srithongchai, S. K. Green, and F. J. Jan. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of chilli veinal mottle virus from South and Southeast Asia. *Plant Pathol.* 57:408–416. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01780.x
- Zheng, Y. X., C. H. Huang, Y. H. Cheng, F. Y. Kuo, and F. J. Jan. 2010. First report of *Tomato spotted wilt virus* in sweet pepper in Taiwan. *Plant Dis.* 94:920. doi:10.1094/PDIS-94-7-0920B

Development of Nucleic Acid and Serological Methods for Differentiation of Chilli Veinal Mottle Virus and Pepper Veinal Mottle Virus

Ying-Huey Cheng^{1*}, Chin-Chih Chen¹, Jau-Yeuh Wang², Chia-Dian Chiang³, and Chin-An Chang⁴

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Wang, C. D. Chiang, and C. A. Chang. 2022. Development of nucleic acid and serological methods for differentiation of chilli veinal mottle virus and pepper veinal mottle virus. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(3):231–241.

Pepper crops are commonly infected with two potyviruses, chilli veinal mottle virus (ChiVMV) and pepper veinal mottle virus (PVMV) in Taiwan. ChiVMV and PVMV share the highest sequence similarity of coat protein genes among potyviruses, preventing serological differentiation between the two viruses. However, the nucleotide sequences between the N-terminal region of the coat protein and the 3' non-coding region (3'-NTR) of two viruses are significantly different from each other. Based on 3'-NTR sequence divergence, ChiVMV and PVMV can be molecularly differentiated by designed primers in reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). For serological detection, the ChiVMV-specific antiserum was prepared using a fusion protein as an antigen. The antigen consisted of the divergent and most proximal N-terminal 39 amino acids (4.3 kDa) of ChiVMV coat protein as hapten and green fluorescent protein (28.2 kDa) as a carrier. Both heptan and carrier peptides were constructed into bacterial expression vector pET-28b (+) to produce an expressed fusion protein of 32.5 kDa in *Escherichia coli* Rosetta. The fusion protein was then immunized rabbits at regular intervals, and the harvested antiserum was used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or Western blotting to detect ChiVMV. The antiserum reacted positively and specifically to ChiVMV, but neither to PVMV nor non-inoculated plants. The ChiVMV-specific antiserum could specifically detect ChiVMV from field-collected samples, even in the presence of PVMV. When compared with the preparation of monoclonal antibodies, using the bacterial express fusion proteins containing ChiVMV partial coat protein to prepare polyclonal antisera is quicker, easier, and more economic.

Key words: Chilli veinal mottle virus (ChiVMV), Expression protein, Polyclonal antibody.

Received: November 16, 2021; Accepted: March 14, 2022.

* Corresponding author, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw

¹ Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Graduate Student, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung City, Taiwan, ROC.