

海芋嵌紋病毒重組鞘蛋白抗血清之製備 及其應用

胡文綺¹ 林為方¹ 黃偉洲¹ 黃金興¹ 張雅君^{1,2}

¹ 台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

² 聯絡作者，電子郵件：ycchang@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23620271

接受日期：中華民國 96 年 2 月 27 日

摘要

胡文綺、林為方、黃偉洲、黃金興、張雅君. 2007. 海芋嵌紋病毒重組鞘蛋白抗血清之製備及其應用. 植病會刊 16 : 31-40.

海芋為天南星科球根花卉，因廣受大眾歡迎，已成為國際間重要的花卉作物。田間栽種的海芋植株常遭受病毒為害，近幾年來國內外的研究顯示海芋嵌紋病毒 (*Zantedeschia mosaic virus*, ZaMV) 感染率遠高於芋頭嵌紋病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV)，且罹病植物病徵明顯，嚴重影響商品價值。本研究依據 ZaMV 彩色海芋分離株 (ZaMV-ZAN) 之序列設計專一性引子對，從其 cDNA 株中增幅出全長度鞘蛋白基因，選殖至表現載體後，再以大腸桿菌表現 ZaMV 重組鞘蛋白，並且製備出 ZaMV 抗血清。以間接式酵素連結抗體免疫吸附法 (indirect-ELISA, I-ELISA) 測試，結果顯示 ZaMV 抗血清具有極高的力價。而免疫轉漬分析證明 ZaMV 抗血清不會與健康海芋、DsMV 或海芋微嵌紋病毒 (*Zantedeschia mild mosaic virus*, ZaMMV) 反應，顯示其具高專一性。當以健康海芋粗萃取液對感染 ZaMV 的海芋粗萃取液進行 5 倍系列稀釋，藉此樣品測試免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應 (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR) 和 I-ELISA 的檢測靈敏度。實驗結果顯示當使用 ZF2 與 ZR0 引子對時，IC-RT-PCR 比 I-ELISA 靈敏度高 25 倍；若改用 ZF3 與 ZR0 引子對時，可再提高 IC-RT-PCR 約 125 至 625 倍的效果，意即檢測靈敏度較 I-ELISA 高 3125 至 15625 倍。本研究所研發的 ZaMV 檢測方法未來可應用於海芋種苗病毒驗證作業，以協助海芋健康種苗之生產。

關鍵詞：海芋、海芋嵌紋病毒、酵素連結抗體免疫吸附法、免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應

緒言

海芋 (*calla lily*) 原產於南非，為天南星科 (*Araceae*)、馬蹄蓮屬 (*Zantedeschia*) 多年生球根花卉⁽¹⁷⁾。馬蹄蓮屬包括七個種與兩個亞種⁽¹⁷⁾，依生長習性可分為兩類，其中常綠性的白花海芋 (*Z. aethiopica*)，生性喜歡潮濕多水的環境，其地下莖呈根莖狀 (rhizomatous)，對病毒性病害及細菌性軟腐病較具抗性；另一類為落葉性的彩色海芋 (*Zantedeschia* spp.)，不耐低溫，栽植時不宜太潮溼，其地下莖為盤狀塊莖 (tuber)，對病毒性病害及細菌性軟腐病較不具抗性。海芋由於花形典雅、苞片色彩豐富，觀賞壽命長，廣受大眾歡迎，近幾年已成為國際間重要的球根花卉。國

內白花海芋主要栽種在陽明山竹子湖；而彩色海芋則栽植於中部地區，面積約有二十公頃，目前種球大部分由國人自行生產⁽⁶⁾，栽種面積有持續增加之趨勢，是極具發展潛力之球根花卉。

病毒性病害為海芋栽培上重要限制因子，曾經報導過感染海芋的病毒種類有：芋頭嵌紋病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV)^(8, 25)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)⁽²⁰⁾、海芋嵌紋病毒 (*Zantedeschia mosaic virus*, ZaMV)^(1, 18)、菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)⁽²⁴⁾、蒟蒻嵌紋病毒 (*Konjac mosaic virus*, KoMV)⁽²⁴⁾、蕃茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)⁽²⁴⁾、鳳仙花壞疽斑點病毒

(*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)⁽²⁴⁾、苜蓿嵌紋病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)⁽²⁴⁾、馬鈴薯病毒X (*Potato virus X*, PVX)⁽²⁴⁾、山芥菜嵌紋病毒 (*Arabis mosaic virus*, ArMV)⁽²⁴⁾、煙草脆葉病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV)⁽²⁴⁾、蕪菁嵌紋病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV)⁽³⁾、康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV)⁽⁵⁾、海芋微嵌紋病毒 (*Zantedeschia mild mosaic virus*, ZaMMV)⁽¹³⁾、海芋黃斑病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)⁽⁴⁾ 以及海芋潛微病毒 (*Calla lily latent virus*, CLLV)⁽²⁾。在國內外 16 種被報導可感染海芋的病毒之中，ZaMV 雖然於 2005 年被國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 於第八版的 ICTV 報告正式發表為 *Potyvirus* 屬的一個獨立種⁽¹⁰⁾，但根據 Nishiguchi 等人 2006 年的報告，KoMV 與 ZaMV 以及鴨兒芹嵌紋病毒 (Japanese hornwort mosaic virus, JHMV) 應為同種異名的病毒，因為從鞘蛋白胺基酸序列的比對結果來看，感染蒟蒻的 KoMV F 分離株與感染海芋的 ZaMV 分離株的序列相同度為 88.7-96.8%，而與 JHMV 的相同度則介於 87.5-89.7%⁽²²⁾。但在 ICTV 尚未正式將 ZaMV 更名為 KoMV 之前，我們還是暫時將國內引起海芋嵌紋病的病毒稱為 ZaMV。

ZaMV 隸屬於 *Potyviridae* 科、*Potyvirus* 屬⁽¹⁰⁾，病毒顆粒形態呈略彎曲之長絲狀，長度介於 695-850 nm^(1, 18)。本實驗室於 1998 年在台中縣新社地區田間種植的彩色海芋植株中首先發現 ZaMV，可引起嵌紋、綠島、褪色條紋等病徵⁽¹⁾。當 ZaMV 接種彩色海芋組培苗時，新葉呈現嵌紋，之後出現沿著葉脈而產生的褪色條紋⁽⁹⁾。而彩色海芋種球所產生之葉片接種 ZaMV 後，出現與田間海芋相似的病徵，後期新葉扭曲變形，花苞著色不均、甚至畸形、花梗縮短，嚴重影響其商品價值⁽¹⁵⁾。ZaMV 寄主範圍局限在天南星科植物⁽¹⁸⁾，除了海芋之外，尚可感染乳斑黛粉葉 (*Dieffenbachia picta* cv. Rudolph Roehrs)⁽⁷⁾，若以人工接種方式感染小天使蔓綠絨 (*Philodendron selloum*)，則會產生斑駁和褪色條紋之病徵⁽⁹⁾；而中國大陸在水半夏或稱鞭膽犁頭尖 (*Typhonium flagelliforme*) 的天南星科中藥植物中也發現 ZaMV 的存在⁽²⁷⁾。目前除了台灣地區有報告證實 ZaMV 感染海芋⁽¹⁾ 之外，亦有報告指出韓國⁽¹⁸⁾、荷蘭⁽²⁴⁾、印度和德國⁽¹⁹⁾ 等地有 ZaMV 或 KoMV 為害海芋的情形。此外，台灣⁽¹⁴⁾ 與韓國⁽¹⁸⁾ 等地的報告也指出 ZaMV 感染海芋的比率遠高於 DsMV。ZaMV 可藉由汁液經傷口感染，亦可經罹病種球造成長距離傳播。有關 ZaMV 媒介昆蟲方面，目前無任何相關研究報告；只有日本曾報導 KoMV 可經由棉蚜 (*Aphis gossypii*) 以非永續方式傳播⁽²⁸⁾，而為害繖形科鴨兒芹 (*Cryptotaenia*

japonica) 的 JHMV 則可由桃蚜 (*Myzus persicae*) 傳播⁽²³⁾。

由於 ZaMV 在田間的發生率很高，因此希望針對威脅海芋產業的 ZaMV 研發合適的檢測方法，提供海芋種苗組織培養過程篩檢 ZaMV 使用，以協助國內海芋健康種苗的生產。因此本研究以 ZaMV 彩色海芋分離株 (ZaMV-ZAN) 為材料，表現其重組鞘蛋白，以此製備 ZaMV 抗血清；同時藉以研發相關的檢測方法，包括間接式酵素連結抗體免疫吸附法 (indirect-ELISA, I-ELISA) 以及免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應 (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR)，並且分析比較這些方法的靈敏度和優缺點。

材料與方法

病毒材料來源

採集自台中縣種苗改良繁殖場之海芋植株，先以 DsMV、ZaMV 和 ZaMMV 專一性引子對分別進行 RT-PCR 檢測^(9, 14, 16)，選取只感染 ZaMV 的樣品組織，以 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) 和適量的金鋼砂 (600 mesh) 於研鉢中研磨均勻，再將汁液接種至海芋組培苗和小天使蔓綠絨的健康幼苗，然後放置於 25 °C 恆溫室中，以此作為實驗的材料來源。至於感染海芋的 DsMV 和 ZaMMV 病毒株，則是本實驗室自行分離並保存的材料，同樣維持在海芋和小天使蔓綠絨的植株中^(13, 16)。

構築含全長度ZaMV鞘蛋白基因之表現載體

依據本實驗室所發表的 ZaMV 彩色海芋分離株 (ZaMV-ZAN) 之核酸序列 (AF332872)，設計出正向引子 (ZCPF2) 與反向引子 (ZCPR4)，其中 ZCPR4 含有一新增加的 *XhoI* 切位 (表一)；此對引子可由 cDNA 株 (pZaMV-ZAN) 增幅出全長度的 ZaMV 鞘蛋白基因，預期此片段大小為 855 bp。於 0.2 ml 之薄壁微量離心管中配製 100 μ l PCR 反應溶液，包括 1 μ l pZaMV-ZAN (0.2 ng/ μ l)，10 μ l 10X ThermoPol buffer (NEB, Beverly, MA, USA)、10 μ l dNTPs (2 mM)、10 μ l ZCPF2 (5 μ M)、10 μ l ZCPR4 (5 μ M)、1 μ l Vent DNA polymerase (2 U/ μ l, NEB, Beverly, MA, USA) 和 58 μ l H₂O；均勻混合並短暫離心後，以 GeneAmp® PCR system 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行 PCR 反應如下：先 94 °C 5 分鐘；再以 94 °C 30 秒，52 °C 45 秒，72 °C 75 秒，進行 35 個循環；最後以 72 °C 反應 7 分鐘。

表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study

Primer ¹	Sequence ²
ZCPF2	5' AGTGGAGAGGAAGAGAAGGA 3'
ZCPR4	5' <u>TGCCTCGAGA</u> AATAGCGCGCACACCCATCAGAG 3'
ZF2	5' CTATCTGTGCAGCTATGATTG 3'
ZF3	5' CCGCCCTGCAAAGCGCAAAC 3'
ZR0	5' CTCCTATTAAAAGACATGACTCG 3'

¹F and R indicate forward and reverse primers, respectively.

²A created *Xho*I site at ZCPR4 is underlined.

PCR 反應結束後取 5 μ l 產物進行 1% 凝膠電泳分析，之後將剩餘之 PCR 產物以 *Xho*I 內限制酶進行醇解以及電泳分析，並以 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 回收經 *Xho*I 處理過之 ZaMV 鞘蛋白基因 DNA。此外將 pET-29a (+) 質體 DNA (Novagen, Madison, WI, USA) 以 *Xho*I 與 *Eco*RV 內限制酶同時進行醇解，經電泳分析並以 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit 回收處理過之 DNA。然後將所回收之 ZaMV 與 pET-29a (+) DNA 依照廠商建議的方法進行接合反應，以構築表現載體 pET-ZCP。隔日將接合產物轉型至 *E. coli* DH5 α 勝任細胞中，經初步篩選並進一步核酸定序，以選擇構築正確的 pET-ZCP。

ZaMV 重組鞘蛋白之表現、純化與抗血清之製備

將正確的表現載體 pET-ZCP 轉型至 *E. coli* BL21 (DE3) 勝任細胞中，隔日挑取單菌落移至含 50 ppm kanamycin 的 3 ml LB 培養液 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 中，以 37 $^{\circ}$ C 震盪培養直到培養液呈雲霧狀或 OD₆₀₀ 值為 0.5-0.7。此時取出 500 μ l 菌液，移至 1.5 ml 微量離心管，放入冰中保存，其餘菌液加入 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 使最終濃度為 1 mM，以誘發 ZaMV 重組鞘蛋白產生；然後繼續於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養，每隔 1 小時取出 500 μ l 菌液，共取樣 5 次。所收集之菌液以 10,000 g 於室溫下離心 30 秒，去除上清液，留下沉澱物，再以 50 μ l 的 1X SDS gel-loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol)⁽²⁶⁾ 重新懸浮，接著以 12% SDS-PAGE 電泳分析，並推斷何時可獲得最多量之 ZaMV 重組鞘蛋白。

根據前述實驗結果訂出 ZaMV 重組鞘蛋白最佳誘發時間後，重新將 pET-ZCP 轉型至 BL21 (DE3) 中，隔日挑取單菌落移至含 50 ppm kanamycin 的 3 ml LB 培養液中，以 37 $^{\circ}$ C 震盪培養過夜。隔日將菌液移入含

kanamycin 的 100 ml LB 培養液，以相同方式培養至重組鞘蛋白最佳誘發時間；取出 10 ml 菌液置於冰中 5 分鐘，之後以 4,000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，將菌體沈澱。移除上清液，以 1 ml 含有 2 mM EDTA 之 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 重新懸浮菌體後，移至 1.5 ml 微量離心管中，加入 lysozyme 至最終濃度為 100 μ g/ml，以及 0.1 ml 1% Triton X-100，於 30 $^{\circ}$ C 下靜置 15 分鐘。然後將微量離心管置於冰中，以超音波打破菌體，再以 10,000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘，將上清液與沈澱物分離，分別加入 SDS gel-loading buffer，接著進行 SDS-PAGE 電泳分析，以瞭解 ZaMV 重組鞘蛋白的溶解性。

ZaMV 重組鞘蛋白的純化採用 Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Valencia, CA, USA)，將上述剩餘菌液以 4,000 g 離心 20 分鐘，以沈澱菌體，移除上清液後置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱過夜。隔天取出置於冰中解凍 15 分鐘，再以 5 倍體積的 buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0) 重新懸浮菌體，於室溫下溫和震盪 15-60 分鐘，直到液體呈現透明狀。接著以 10,000 g 於室溫下離心 20 分鐘，保留上清液，以 Ni-NTA Agarose 純化其中的 ZaMV 重組鞘蛋白，步驟則參照廠商之建議進行。以純化的 ZaMV 重組鞘蛋白作為免疫原，對兔子進行免疫注射，製備 ZaMV 的抗血清。抗血清的製備委請濁水溪生物科技公司進行。

間接式酵素連結抗體免疫吸附法 (indirect-ELISA, I-ELISA)

以 I-ELISA 分析 ZaMV 抗血清的力價 (titer)，使用的各種緩衝溶液和方法主要依據 Agdia 公司 (Elkhart, IN, USA) 的建議並修改如下：將待測之樣品秤重後裝入厚塑膠袋內，加入 10 倍體積的 indirect sample extraction buffer (ISE buffer : 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 2% polyvinylpyrrolidone (MW 40,000), pH 9.6)，研磨均勻後移至 1.5 ml 的微量離心管中，以 4,000 g 離心 5 分鐘，取其上清液，以作為抗原之來

源。取 100 μ l 抗原加入 96 穴微量盤中，每樣品做 3 重覆，以健康植株研磨液及 ISE buffer 作為負對照組。將微量盤以石蠟膜 (parafilm) 緊密覆蓋後，置於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時，之後以 1X PBST buffer (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) 清洗 6 次並甩乾，每穴再加入 100 μ l 以 coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) 新鮮配製的 5 % 脫脂奶粉溶液。將微量盤置於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時，之後以 PBST buffer 清洗並甩乾，加入以 ECI buffer (1X PBST buffer, 0.2% bovine serum albumin, 2% polyvinylpyrrolidone, pH 7.4) 稀釋之 ZaMV 抗血清 100 μ l，然後再置於 37 °C 恆溫箱中作用 2 小時。取出後以 PBST buffer 清洗並甩乾，再加入 100 μ l 以 ECI buffer 稀釋 1000 倍之連結鹼性磷酸酶的二次抗體 (alkaline phosphatase-conjugated goat anti rabbit IgG; Chemicon, Temecula, CA, USA)，於 37 °C 作用 1 小時後以 PBST buffer 清洗並甩乾，最後加入 100 μ l 以 PNP buffer (9.7% diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8) 新鮮配製的 PNP 基質溶液 (p-nitrophenyl phosphate, 1 mg/ml)。於 37 °C 下進行反應 40 分鐘，再以酵素免疫分析自動判讀儀 (Spectra MAX 340, Molecular Devices Co., Berkeley, CA, USA) 讀取 405 nm 波長下之吸光值。

免疫轉漬分析 (Immunoblot analysis)

本方法主要參考 Molecular Cloning⁽²⁶⁾ 並修改如下：先將蛋白質樣品以 12% SDS-PAGE 分析後，轉印至 PVDF 濾膜 (Osmonics, Westborough, MA, USA)。將 PVDF 濾膜置於含 3 % 脫脂奶粉的 PBS buffer 中，於 37 °C 下震盪作用 30 分鐘。取出以 PBST buffer 於室溫下清洗 10 分鐘，重覆 2 次。將 ZaMV 抗血清以 PBS buffer 所配製的 1% blocking reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 稀釋成 8000 倍，將 PVDF 濾膜置入後於 37 °C 下震盪作用 2 小時。然後以 PBST 溶液於室溫下清洗 10 分鐘，重覆 2 次。再加入以 3 % 脫脂奶粉溶液稀釋 1000 倍之連結鹼性磷酸酶的二次抗體，同樣於 37 °C 下震盪作用 2 小時。之後以 NBT/BCIP 溶液 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 進行呈色反應，最後以 TE buffer 終止作用。

免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應 (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR)

為了測試 IC-RT-PCR 的效果，我們設計了兩條正向引子 ZF2 與 ZF3，以及一條反向引子 ZR0 (表一)，實驗步驟則參照 Wetzel 等人的方法⁽²⁹⁾，並加以修改。

首先將 ZaMV 抗血清以 coating buffer 稀釋成 8000 倍，取 100 μ l 加至 0.5 ml 微量離心管中，置於 4 °C 冰箱中過夜。隔日取 ZaMV 之罹病組織，秤重後置於塑膠袋中，加入 10 倍體積的 general extraction buffer (GE buffer, Agdia, Elkhart, IN, USA)，以封口機將塑膠袋封好並加以研磨均勻，再將研磨液放入 1.5 ml 的微量離心管中，以 4,000 g 離心 5 分鐘，取上清液作為抗原。將已覆蓋抗血清之微量離心管取出，以 200 μ l 的 PBST buffer 清洗 3 次並甩乾。然後加入 100 μ l 抗原，置於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時，再以 200 μ l 的 PBST buffer 清洗 3 次並甩乾。隨後加入已預熱成 65 °C 的 1 % Triton X-100 (10 μ l)，並劇烈震盪，再分別加入 5 μ l DEPC-H₂O、5 μ l AMV RT 5X reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA)、1 μ l ZR0 引子 (5 μ M)、2.5 μ l dNTPs (10 mM)、0.5 μ l rRNasin (40 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA) 及 1 μ l AMV reverse transcriptase (10 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA)，置於 42 °C 水浴中作用 1 小時，以合成第一股 cDNA。接著於 0.2 ml 微量離心管中配製 20 μ l PCR 反應溶液，包括 2 μ l 反轉錄產物、2 μ l 10X PCR buffer、2 μ l dNTPs (2 mM)、1 μ l ZF2 或 ZF3 引子 (5 μ M)、1 μ l ZR0 引子 (5 μ M)、0.5 μ l DyNAzyme™ II DNA polymerase 和 11.5 μ l ddH₂O，混合均勻後進行 PCR 反應。當以 ZF2 和 ZR0 為 PCR 引子對時，反應條件如下：先 94 °C 5 分鐘；再以 94 °C 35 秒，53 °C 45 秒，72 °C 90 秒，進行 35 個循環；最後於 72 °C 反應 7 分鐘。反應完成後取 5 μ l 的 PCR 產物進行 1 % 凝膠電泳分析。若是以 ZF3 和 ZR0 引子對進行 PCR 反應時，則反應條件修改為 94 °C 5 分鐘；接著 94 °C 35 秒，53 °C 45 秒，72 °C 50 秒，共 35 個循環；最後再以 72 °C 反應 7 分鐘。且其 PCR 產物改以 2 % 凝膠進行電泳分析。

比較 I-ELISA 與 IC-RT-PCR 之檢測靈敏度

為了比較 I-ELISA 與 IC-RT-PCR 的檢測效果，我們將感染 ZaMV 的海芋組織切成小碎片，混合均勻後秤取兩份樣品，其中一份置加入 5 倍體積的 ISE buffer 並加以研磨，然後將研磨液放入 1.5 ml 的微量離心管中，以 4,000 g 離心 5 分鐘，取出上清液作為原始粗萃取液，再以健康海芋組織粗萃取液進行 5 倍系列稀釋；然後依照前述方法以稀釋 8000 倍的 ZaMV 抗血清作為一次抗體，進行 I-ELISA 的實驗。而另一份組織樣品則以 5 倍體積的 GE buffer 進行研磨，同樣以 4,000 g 離心 5 分鐘，取出上清液作為原始材料，以健康海芋粗萃取液進行 5 倍系列稀釋，之後依照前述方

法進行 IC-RT-PCR 實驗。當完成 RT 反應後，其產物分別以 ZF2/ZR0 與 ZF3/ZR0 兩組引子接著進行 PCR 反應，最後以凝膠電泳分析 IC-RT-PCR 產物，以比較這些檢測方法的靈敏度。

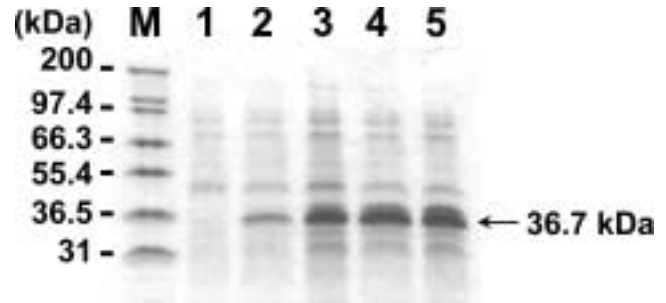
結果

ZaMV 重組鞘蛋白之表現與純化

根據我們實驗室之前已發表的 ZaMV-ZAN 核酸序列 (AF332872)⁽¹⁾，設計可增幅出 ZaMV 完整鞘蛋白基因之 ZCPF2 與 ZCPR4 引子對 (表一)。利用此對引子確實可經 PCR 反應由 pZaMV-ZAN 增幅出一條 855 bp，符合預期大小的 DNA 條帶 (未出示的資料)。將此 DNA 片段純化並選殖至 pET-29a (+) 載體，經篩選並定序後，已獲得正確的表現載體 pET-ZCP (未出示的資料)。將 pET-ZCP 轉型至可表現蛋白質的菌株 *E. coli* BL21 (DE3)，培養於含有抗生素之 LB 培養液中，至合適時間後以 1 mM IPTG 誘發蛋白質表現，並且於不同時間點採樣，之後進行 12% SDS-PAGE 電泳分析。由序列推估 ZaMV 重組鞘蛋白的分子量為 36.7 kDa，而 SDS-PAGE 電泳結果顯示於蛋白分子量標準 36.5 kDa 相同位置，可見因 IPTG 誘發而出現的明顯條帶，應為 ZaMV 重組鞘蛋白；經 IPTG 誘發後 1 小時即有少量表現，而誘發 2 小時後蛋白表現量即達高峰，且延長培養時間至 4 小時，蛋白表現量並未隨之增加 (圖一)。由此看來 ZaMV 重組鞘蛋白的最佳誘發時間為 2-4 小時。因此我們取 10 ml 誘發後 3 小時之菌液進行蛋白可溶性之測試，得知該重組鞘蛋白大部份為不可溶 (未出示的資料)。我們利用 ZaMV 重組鞘蛋白的 C 端帶有 6 個 histidine 的特性，依照廠商所建議的方法，以含有鎳離子的 Ni-NTA Agarose 純化出 ZaMV 重組鞘蛋白。然後將所純化之 ZaMV 重組鞘蛋白委託濁水溪生物科技公司對兔子進行免疫注射，製備 ZaMV 抗血清。

ZaMV 抗血清之力價與專一性

為分析 ZaMV 抗血清之力價，了解其最佳稀釋濃度，以建立 ZaMV 之檢測標準，遂以 I-ELISA 進行測試。我們將 ZaMV 抗血清以 ECI buffer 稀釋成 500、1000、2000、4000、8000、16000 及 32000 倍的系列稀釋濃度，然後以 I-ELISA 分別對健康和已接種 ZaMV 之海芋植株進行檢測。當檢測樣品的 ELISA 讀值高出健康植物平均讀值兩倍以上時，即認定為正反應。由實驗結果發現以大腸桿菌所表現的 ZaMV 重組鞘蛋白所製備的抗血清，即使稀釋高達 32000 倍仍能正確偵



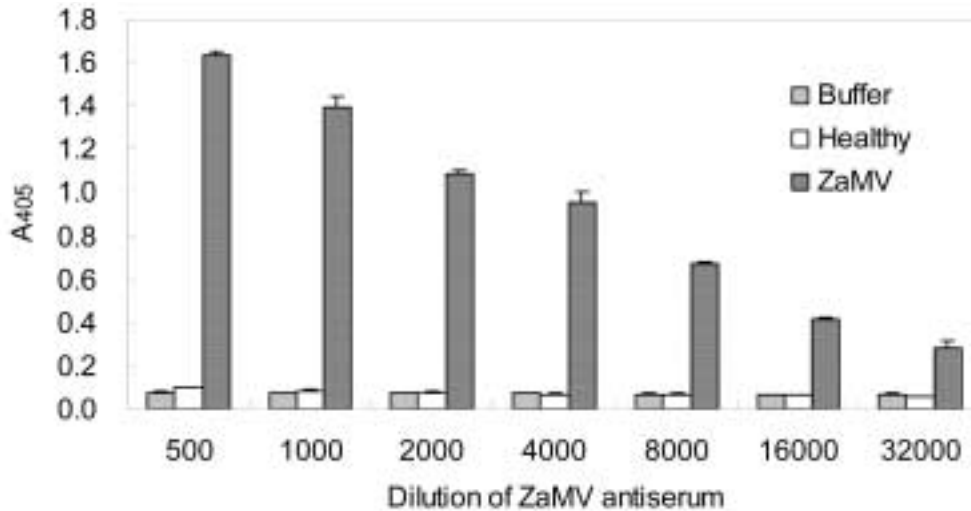
圖一、含有 pET-ZCP 之大腸桿菌 BL21 (DE3) 經 IPTG 誘發，不同時間採樣後，以 12% SDS-PAGE 分析之結果。M 行，Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)；1 行，未經 IPTG 誘發之樣品；2 至 5 行分別為經 IPTG 誘發後 1 至 4 小時之樣品。

Fig. 1. *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-ZCP was harvested at different IPTG induction time and analyzed by electrophoresis in a 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Lane M, Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); lane 1, without IPTG induction; lanes 2-5, one to four hours after IPTG induction. Molecular weights of the markers are indicated on the left. The position of the expressed protein is indicated by an arrow and the number is the deduced molecular weight.

測出 ZaMV，顯示此 ZaMV 抗血清力價很高，並且與健康植物反應的背景值低 (圖二)。當考慮抗血清的使用量，以及健康植物與 ZaMV 罹病樣品的 ELISA 比值時，則以稀釋 8000 倍之 ZaMV 抗血清進行 I-ELISA 檢測，可得最佳之效果。故往後 I-ELISA 和 IC-RT-PCR 實驗所使用的 ZaMV 抗血清，皆以稀釋 8000 倍為準。為測試 ZaMV 抗血清之專一性，以健康以及分別感染 ZaMV、DsMV 和 ZaMMV 之海芋植株的粗萃取液，加上純化的 ZaMV 重組鞘蛋白為樣品，先以 12% SDS-PAGE 電泳分離，轉印至 PVDF 濾膜，再以 ZaMV 抗血清進行免疫轉漬分析。結果顯示只有遭受 ZaMV 感染的海芋樣品會出現一條分子量約 32.4 kDa 的 ZaMV 鞘蛋白條帶，其分子量較 ZaMV 重組鞘蛋白 (36.7 kDa) 略小 (圖三)。由 pET-ZCP 所產生的 ZaMV 重組鞘蛋白，其 N 端包含來自 pET-29a (+) 載體的 30 個胺基酸，C 端也帶有 6 個 histidine，所以其分子量會大於 ZaMV 鞘蛋白。由免疫轉漬分析結果可知，ZaMV 抗血清不會與健康海芋、或 DsMV 和 ZaMMV 感染的海芋有反應，顯示其具有很好的專一性。

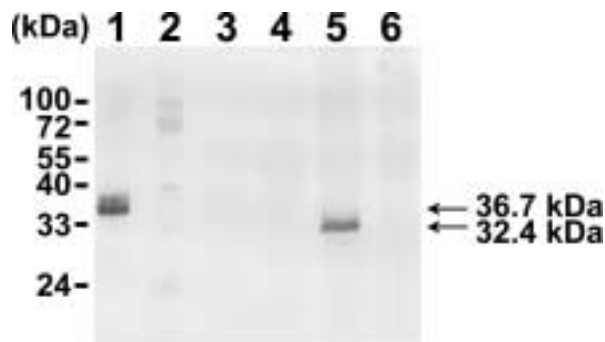
比較 I-ELISA 與 IC-RT-PCR 之檢測靈敏度

為了比較 I-ELISA 與 IC-RT-PCR 的檢測靈敏度，我們將感染 ZaMV 的海芋組織均分成兩份，分別以



圖二、以間接式酵素連結抗體免疫吸附法分析海芋嵌紋病毒抗血清之力價。健康和海芋嵌紋病毒感染之海芋作為檢測樣品。以不同稀釋倍率之海芋嵌紋病毒抗血清作為一次抗體，以連結鹼性磷酸酶的山羊抗體作為二次抗體，每一處理三重覆。

Fig. 2. Titer of ZaMV antiserum analyzed by I-ELISA. Healthy and ZaMV-infected calla lilies were used as test samples. Different dilutions of ZaMV antiserum were used as first antibody and alkaline phosphatase-conjugated goat anti rabbit IgG was used as secondary antibody. Each dilution had triplet wells. The absorbance was measured 40 min after the addition of PNP substrate.



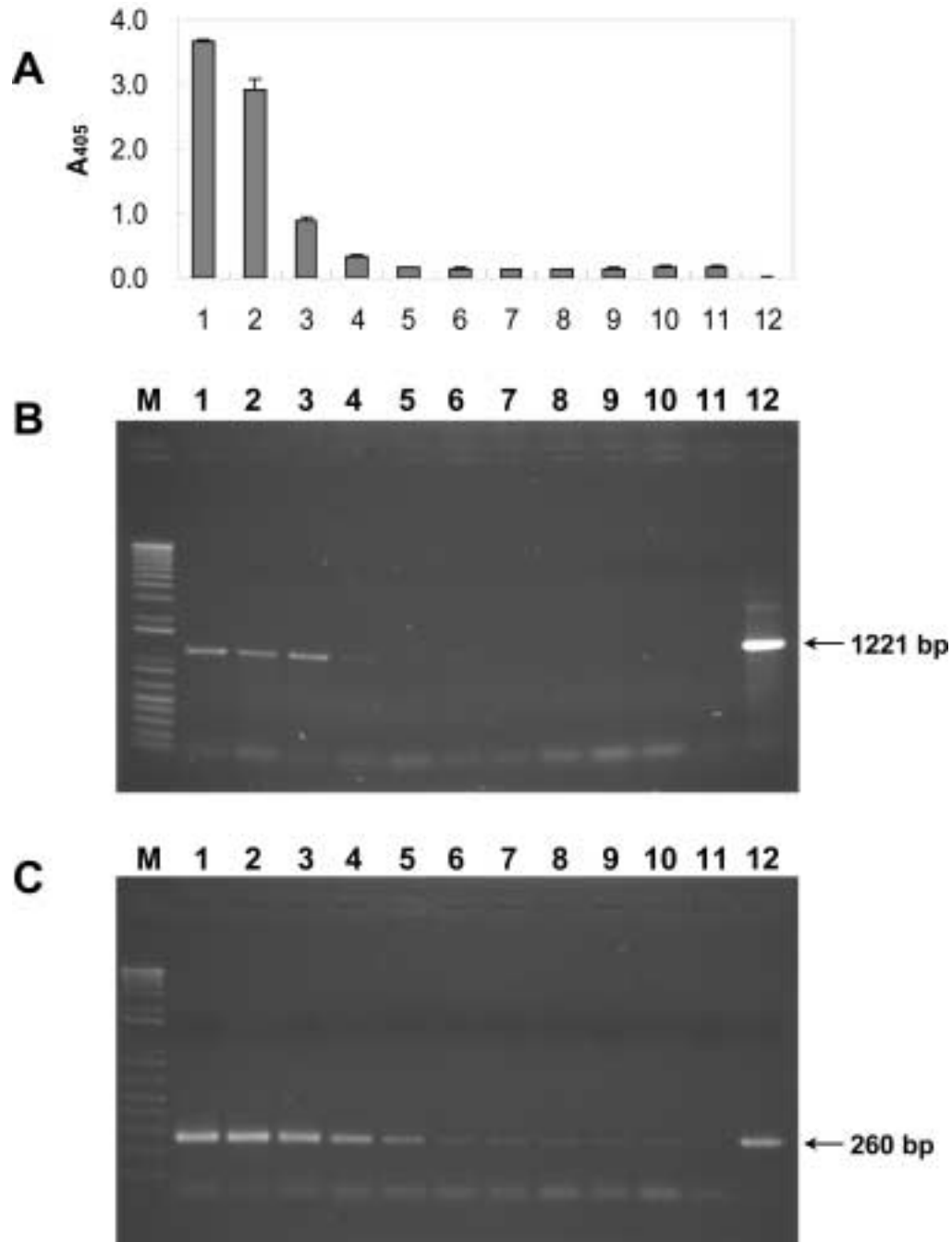
圖三、以免疫轉漬法分析海芋嵌紋病毒抗血清之專一性。重組鞘蛋白和海芋粗萃取液先以 12% SDS-PAGE 電泳分離，轉印至 PVDF 膜後，再與海芋嵌紋病毒抗血清反應。1 行，純化的海芋嵌紋病毒重組鞘蛋白；2 行，PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA)；3 至 6 行分別為健康、芋頭嵌紋病毒感染、海芋嵌紋病毒感染和海芋微嵌紋病毒感染之海芋粗萃取液。

Fig. 3. Specificity of ZaMV antiserum analyzed by immunoblot analysis. Recombinant coat protein and crude extracts of calla lilies were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane and reacted with ZaMV antiserum. Lane 1, purified recombinant coat protein of ZaMV; lane 2, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA); lanes 3-6, healthy, DsMV-infected, ZaMV-infected, and ZaMMV-infected calla lily extracts, respectively. The native (32.4 kDa) and recombinant (36.7 kDa) coat proteins of ZaMV are indicated by arrows.

ISE buffer 或 GE buffer 研磨，製備成原始粗萃取液，再以健康海芋粗萃取液分別系列稀釋成 5^{-1} 至 5^{-9} 倍，以模擬含不同病毒濃度的樣品，然後同時以 I-ELISA 與 IC-RT-PCR 進行檢測。結果顯示 I-ELISA 可偵測至稀釋 5^{-3} 倍之原始粗萃取液 (圖四-A)；而以 ZF2 和 ZR0 引子對進行 IC-RT-PCR 實驗時，從稀釋 5^{-5} 倍之罹病植物粗萃取液仍可增幅出預期 1221 bp 的產物，雖然稀釋 5^{-3} 至 5^{-5} 倍之粗萃取液所增幅的 IC-RT-PCR 產物量不高 (圖四-B)，但此結果已經重複實驗證實。此外，利用 buffer 代替健康植物粗萃取液進行系列稀釋，也獲得相同結論，即 IC-RT-PCR 比 I-ELISA 靈敏 25 倍 (未出示的資料)。為改善 IC-RT-PCR 的檢測效果，我們設計另一組專一性引子；當以 ZF3 和 ZR0 引子對檢測時，則稀釋 5^{-8} 至 5^{-9} 倍之粗萃取液可增幅出預期 260 bp 的 IC-RT-PCR 產物 (圖四-C)。檢測靈敏度的比較實驗至少重複兩次以上，結果皆相似。由上述結果可知，當使用 ZF2 與 ZR0 引子對時，IC-RT-PCR 比 I-ELISA 靈敏度高 25 倍；若改用 ZF2 與 ZR0 引子對時，可再提高 IC-RT-PCR 約 125 至 625 倍的效果，意即檢測靈敏度較 I-ELISA 高 3125 至 15625 倍。

討 論

ZaMV 所引起的海芋嵌紋病是國內外海芋栽種時常見的病害，且其發生率遠高於 DsMV^(14, 18)。受 ZaMV



圖四、I-ELISA 與 IC-RT-PCR 檢測海芋嵌紋病毒之靈敏度比較。以感染海芋嵌紋病毒之海芋組織製備原始粗萃取液，再以健康海芋粗萃取液進行 5 倍系列稀釋，製備測試用的樣品。(A) 以 I-ELISA 分析未稀釋、稀釋 5^{-1} 至 5^{-9} 倍的粗萃取液 (1 至 10 行)，健康對照組 (11 行)，buffer 對照組 (12 行)。(B) 以 ZF2/ZR0 引子對進行 IC-RT-PCR，分析未稀釋、稀釋 5^{-1} 至 5^{-9} 倍的粗萃取液 (1 至 10 行)，負對照組 (11 行)，正對照組 (12 行)。(C) 以 ZF3/ZR0 引子對進行 IC-RT-PCR，分析與 (B) 相同的樣品。

Fig. 4. Sensitivity comparison of I-ELISA and IC-RT-PCR for detecting ZaMV. ZaMV-infected calla lily tissues were used to prepare original crude extracts and then 5-fold serial diluted samples were prepared with healthy plant extracts. (A) I-ELISA analysis of different dilutions of original crude extract (1, 5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5} , 5^{-6} , 5^{-7} , 5^{-8} and 5^{-9} -fold, respectively) (columns 1-10), healthy control (column 11), and buffer control (column 12). The values indicate the absorbance at 405 nm after substrate incubation for 40 min. (B) IC-RT-PCR products amplified by ZF2/ZR0 primers and separated in 1% agarose gel electrophoresis. Five-fold serial dilutions of original crude extracts (lanes 1-10), negative control (lane 11), and positive control (lane 12). Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The expected 1221-bp amplification product is indicated by arrow. (C) IC-RT-PCR products amplified by ZF3/ZR0 primers and separated in 2% agarose gel electrophoresis. The same samples as (B) were tested. The expected 260-bp amplification product is indicated by arrow.

感染的海芋葉片會出現明顯的嵌紋、綠島及褪色條紋，新葉與花朵變形，花梗縮短且花苞著色不均，種球重量減輕等病徵^(1, 15)，對海芋產業有嚴重影響。同樣感染海芋和其他天南星科植物的 DsMV，國外研究證實可藉由組織培養去除病毒^(30, 31)，但需要有合適的檢測方法加以配合。國內生產海芋組培苗的研究單位也採用相同方法，經 DsMV 篩檢的組培苗確實能大幅降低田間海芋植株感染 DsMV 的情形⁽¹⁴⁾。由於目前並無市售的 ZaMV 抗體或相關產品可供使用，因此若想研發 ZaMV 的免疫檢測方法，必須自行製備 ZaMV 抗血清。以本實驗室研究感染海芋病毒的經驗，不容易從天南星科植物獲得高純度的病毒顆粒，因此也很難製備出高品質的病毒抗血清。不過本實驗室曾經利用大腸桿菌表現 DsMV 與 ZaMMV 的重組鞘蛋白，成功地獲得專一性和力價極佳的病毒抗血清^(14, 16)。因此我們也採用相同的策略製備 ZaMV 抗血清，而實驗證實所獲得的抗血清力價很高且背景值低(圖二)，可應用於 ELISA 等免疫檢測法，並且不會與健康植物的蛋白質反應(圖三)，這似乎是以重組鞘蛋白為抗原所生產的病毒抗血清的共同優點。

雖然 ELISA 具有準確、快速且能同時分析大量樣品的優點，是目前最簡便且使用最廣的植物病毒檢測法。但當病毒濃度低於某一限度時，靈敏且可靠的 RT-PCR 的檢出率便優於 ELISA，只可惜抽取植物全 RNA 之步驟較麻煩，是 RT-PCR 應用於大量樣品檢測的限制因子。因此結合免疫與 RT-PCR 的 IC-RT-PCR 是另一種選擇，其效果被證實較 ELISA 靈敏 1000-5000 倍^(21, 29)，而較傳統 RT-PCR 靈敏 250 倍⁽²⁹⁾。本研究利用 ZaMV 罹病植物粗萃取液為材料，以健康植物粗萃取液進行系列稀釋，模擬低病毒濃度之樣品，藉以比較 IC-RT-PCR 及 I-ELISA 檢測效果。結果顯示當以 ZF2/ZR0 引子對進行 IC-RT-PCR，其檢測靈敏度比 I-ELISA 高 25 倍(圖 -A 與 B)。推論我們的 IC-RT-PCR 檢測效果不如國外的報告^(21, 29)，可能是所使用的引子對所增幅的 PCR 產物較長的緣故(1221 bp 相較於 243-586 bp)。因此我們也使用另一組 ZF3/ZR0 引子對進行測試，所增幅的 IC-RT-PCR 產物大小為 260 bp；實驗結果證實 IC-RT-PCR 的靈敏度提高了 125-625 倍，換句話說，其檢測靈敏度較 I-ELISA 高 3125 至 15625 倍(圖四)。由此可知，引子對的選用對 IC-RT-PCR 的檢測結果具有重大的影響，所增幅的目標產物最好不要超過 600 bp，可能所增幅的片段越短，檢測效果越好。有研究指出使用 IC-RT-PCR 可避免植物汁液中的抑制物質影響 RT-PCR 的步驟⁽¹²⁾，因此提高偵測的靈敏度。除此之外，我們覺得 IC-RT-PCR 還具有下列優

點：因其結合免疫與核酸檢測，故專一性更好；又因其避免抽取植物全 RNA 之步驟，所以能縮短時間和減少成本，同時可避免 RNA 降解的問題，所以實驗結果比較不會有人為誤差，為一種方便又可靠的檢測方法。雖然 IC-RT-PCR 所須費用較 ELISA 為高，但對於病毒篩檢要求嚴格的種源庫、育種單位、組織培養中心和植物檢疫機構，是極為適用的檢測法^(11, 12)。

除了已發表的 DsMV 與 ZaMMV 檢測方法^(14, 16)，對於國內海芋常見之 ZaMV 我們也研發出相關的檢測法，但這些方法必須配合其他研究單位適時適地的加以應用，才能發揮其最大的功效。對於繁殖用的海芋親本或組培苗母瓶，我們建議採用高靈敏度的 IC-RT-PCR 來篩檢，以減低攜帶 ZaMV、DsMV 或 ZaMMV 的風險；雖然所需的花費較高，但可避免日後更大的損失，是值得採用的方法。而 I-ELISA 便於分析大量樣品且成本較低，適合使用於瓶苗或馴化組培苗的抽樣檢測。希望我們所研發的三種海芋病毒之檢測方法，未來可配合海芋種苗驗證的工作，協助國內業者生產健康種苗，以提高其海芋種苗的競爭力。

謝 辭

本研究承國科會農業生物技術國家型科技計畫(NSC94-2317-B-002-013)經費補助，特致謝忱。

引用文獻

1. Chang, Y.-C. Chen, Y.-L., and Chung, F.-C. 2001. Mosaic disease of calla lily caused by a new potyvirus in Taiwan. *Plant Dis.* 85: 1289.
2. Chen, C.-C., Chang, C.-A., Tsai, H.-T., and Hsu, H. T. 2004. Identification of a potyvirus causing latent infection in calla lilies. *Plant Dis.* 88: 1046.
3. Chen, C.-C., Chao, C.-H., Chen, C.-C., Yeh, S.-D., Tsai, H.-T., and Chang, C.-A. 2003. Identification of *Turnip mosaic virus* isolates causing yellow stripe and spot on calla lily. *Plant Dis.* 87: 901-905.
4. Chen, C.-C., Chen, T.-C., Lin, Y.-H., Yeh, S.-D., and Hsu, H. T. 2005. A chlorotic spot disease on calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a tospovirus serologically but distantly related to *Watermelon silver mottle virus*. *Plant Dis.* 89: 440-445.
5. Chen, C.-C., Ko, W.-F., Lin, C.-Y., Jan, F.-J., and Hsu, H. T. 2003. First report of *Carnation mottle virus* in calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Plant Dis.* 87: 1539.
6. Chen, J.-J., Yang, T.-C., Liao, Y.-J., Liu, M.-C., Shiau, F.-L., and Ho, Y.-H. 2001. Establishment of micropropagation and tuber production system for healthy calla lily in Taiwan. Pages 137-149 in:

- Proceedings of the Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. T.-F. Hsieh, P.-J. Ann, C.-A. Chang and C.-Y. Lin eds. Phytopathological Society of Republic of China, Taichung. 156 pp. (In Chinese)
7. Chen, Y.-L. 1998. Molecular cloning, characterization and detection of dasheen mosaic virus and a new potyvirus infecting aroids. Master Thesis, National Taiwan University. 130 pp. (In Chinese)
 8. Chen, Y.-L., Chung, F.-C., and Chang, Y.-C. 1998. Molecular cloning and characterization of dasheen mosaic potyvirus from aroid plants in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 7: 226-227.
 9. Chung, F.-C. 1999. Purification, molecular cloning and detection of dasheen mosaic potyvirus and *Zantedeschia* mosaic potyvirus infecting calla lilies. Master Thesis, National Taiwan University. 131 pp. (in Chinese)
 10. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A. 2005. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA. 1259 pp.
 11. Helguera, P. R., Taborda, R., Docampo, D. M., and Ducasse, D. A. 2001. Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *J. Virol. Methods* 95: 93-100.
 12. Hema, M., Kirthi, N., Sreenivasulu, P., and Savithri, H. S. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern India. *Arch. Virol.* 148: 1185-1193.
 13. Huang, C.-H., and Chang, Y.-C. 2005. Identification and molecular characterization of *Zantedeschia* mild mosaic virus, a new calla lily-infecting potyvirus. *Arch. Virol.* 150: 1221-1230.
 14. Huang, C.-H., Hu, W.-C., Yang, T.-C., and Chang, Y.-C. 2007. *Zantedeschia* mild mosaic virus, a new widespread virus in calla lily, detected by ELISA, dot-blot hybridization and IC-RT-PCR. *Plant Pathology* 56: 183-189.
 15. Huang, W.-Z. 2001. Effect of *Zantedeschia* mosaic virus on the production of calla lilies, and establishment of virus detection system for calla lilies. Master Thesis, National Taiwan University. 83 pp. (in Chinese)
 16. Huang, W.-Z., Chung, F.-C., Chen, Y.-L., Huang, C.-H., and Chang, Y.-C. 2005. Development and comparison of three detection methods for calla lily-infecting *Dasheen mosaic virus*. *Plant Pathology Bulletin* 14 (4): 239-250. (in Chinese)
 17. Kuehny, J. S. 2000. Crop reports: Calla history and culture. *HortTechnology* 10: 267-274.
 18. Kwon, S B., Ha, J. H., Yoon, J. Y., and Ryu, K. H. 2002. *Zantedeschia* mosaic virus causing leaf mosaic symptom in calla lily is a new potyvirus. *Arch. Virol.* 147: 2281-2289.
 19. Lesemann, D.-E., and Winter, S. 2002. Konjac mosaic virus, Dasheen mosaic and unknown potyviruses infecting *Zantedeschia* spp. and other cultivated *Araceae*. *Acta Hort.* 568: 135-141.
 20. Mokra, V., and Gotzova, B. 1994. Identification of virus infections in *Dieffenbachia* and *Zantedeschia* in Czechoslovakia. *Acta Hort.* 377: 361-362.
 21. Mumford, R. A., and Seal, S. E. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *J. Virol. Methods* 69:73-79.
 22. Nishiguchi, M., Yamasaki, S., Lu, X.-Z., Shimoyama, A., Hanada, K., Sonoda, S., Shimono, M., Sakai, J., Mikoshiba, Y., and Fujisawa, I. 2006. Konjak mosaic virus: the complete nucleotide sequence of the genomic RNA and its comparison with other potyviruses. *Arch. Virol.* 151: 1643-1650.
 23. Okuno, K., Hama, T., Takeshita, M., Furuya, N., and Takanami, Y. 2003. New potyvirus isolated from *Cryptotaenia japonica*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 138-142.
 24. Pham, K., Langeveld, S. A., Lemmers, M. E. C., and Derks, A. F. L. M. 2002. Detection and identification of potyviruses in *Zantedeschia*. *Acta Hort.* 568: 143-148.
 25. Rana, G. L., Vovlas, C., and Zettler, F. W. 1983. Manual transmission of dasheen mosaic virus from *Richardia* to nonaraceous hosts. *Plant Dis.* 67: 1121-1122.
 26. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 27. Shi, Y.-H., Hong, X.-Y., Chen, J., Adams, M. J., Zheng, H.-Y., Lin, L., Qin, B.-X., and Chen, J.-P. 2005. Further molecular characterization of potyviruses infecting aroid plants for medicinal use in China. *Arch. Virol.* 150: 125-135.
 28. Shimoyama, J., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., and Gunji, T. 1992. Konjak mosaic virus, a new potyvirus infecting konjak, *Amorphophallus konjac*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 706-712.
 29. Wetzels, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., and Dunez, J. 1992. A highly

- sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 39: 27-37.
30. Zettler, F. W., and Hartman, R. D. 1986. Dasheen mosaic virus and its control in cultivated aroids. Food and Fertilizer Technology Center for Asia and Pacific Region, Taipei, Taiwan, Republic of China. FFTC book No 33. 11 pp.
31. Zettler, F. W., and Hartman, R. D. 1987. Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture. *Plant Dis.* 71: 958-963.

ABSTRACT

Hu, W. C.¹, Lin, W. F.¹, Huang, W. Z.¹, Huang, C. H.¹, and Chang, Y. C.^{1,2} 2007. The production and application of the antiserum against *Zantedeschia mosaic virus* recombinant coat protein. *Plant Pathol. Bull.* 16: 31-40. (¹Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; ²Corresponding author, E-mail: ycchang@ntu.edu.tw. Fax: +886-2-23620271)

Calla lilies (*Zantedeschia* spp.), the bulbous flowers in the family *Araceae*, are very popular among consumers, hence they become the international important flower crops. The calla lily plants are frequently infected by viruses in the field. According to recent reports, *Zantedeschia mosaic virus* (ZaMV), which induces obvious symptoms and seriously affects the flower value, has much higher infection rate than *Dasheen mosaic virus* (DsMV). In this study, ZaMV specific primers were designed based on the sequence of ZaMV-ZAN isolate. The full-length coat protein gene of ZaMV was amplified from its cDNA clone, and then cloned into the expression vector. Recombinant ZaMV coat protein was expressed by *Escherichia coli* and used as antigen to prepare ZaMV antiserum. The result of indirect-ELISA (I-ELISA) demonstrated ZaMV antiserum had high titer. In addition, its specificity was confirmed by immunoblot analysis since it did not react with healthy, DsMV- or ZaMMV-infected calla lilies. To compare the detection sensitivities of immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) and I-ELISA, ZaMV-infected calla lily extracts were five times diluted serially with healthy plant extracts, and then treated as testing samples. The experimental results indicated that IC-RT-PCR with ZF2 and ZR0 primers was about 25 times more sensitive than I-ELISA. However, when ZF3 and ZR0 primers were used, the detection limit of IC-RT-PCR times could increase 125-625 fold. In other words, the detection of IC-RT-PCR could be 3125-15625 times more sensitive than I-ELISA. The ZaMV detection methods developed in this study can be applied to virus certification scheme of calla lily and help to produce healthy seedlings in Taiwan.

Key words: calla lily, *Zantedeschia mosaic virus*, I-ELISA, IC-RT-PCR