

感染海芋之芋頭嵌紋病毒檢測方法之研發與比較

黃偉洲¹ 鍾芳珠¹ 陳穎練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 94 年 11 月 14 日

摘要

黃偉洲、鍾芳珠、陳穎練、黃金興、張雅君. 2005. 感染海芋之芋頭嵌紋病毒檢測方法之研發與比較. 植病會刊 14: 239-250.

海芋為天南星科、馬蹄蓮屬多年生球根花卉，近年來深受消費者喜愛，栽培面積持續增加，已成為國際間重要的花卉作物。病毒性病害為目前海芋栽培上的主要限制因子之一，國內外曾有 16 種病毒被報導可感染海芋，其中芋頭嵌紋病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV) 可危害 16 屬以上的天南星科植物，其分佈遍及世界各地，具有經濟重要性。本研究針對感染海芋的 DsMV 研發出三種檢測方法。其一是檢測 DsMV 鞘蛋白的方法，先依據 DsMV 彩色海芋分離株 (DsMV-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，再以大腸桿菌系統表現 DsMV 重組鞘蛋白，並且製備出 DsMV 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 DsMV 抗血清具有極高的力價；而以免疫轉漬分析證明 DsMV 抗血清不會與其他感染海芋的同屬病毒反應，顯示其具高專一性。其次為檢測 DsMV 核酸的方法，於 DsMV 基因體的 3' 端非轉譯區及鞘蛋白區域，共設計三組引子對，以製備三種長短不同的 DNA 探針，並以墨點雜合法 (dot-blot hybridization, DBH) 對罹病植物粗萃取液及植物全 RNA 進行檢測；結果顯示此三種 DNA 探針皆具有高專一性，且靈敏度相似；但以純化的全 RNA 為檢測樣品時，效果較植物粗萃取液為佳。第三種方法則是結合免疫與核酸檢測原理的免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應 (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR)。當以感染 DsMV 的罹病植物粗萃取液作為檢測材料，比較 I-ELISA、DBH 及 IC-RT-PCR 三者之靈敏度時，結果以 IC-RT-PCR 靈敏度最佳，比 I-ELISA 靈敏度高 125 倍以上，而 DBH 次之，比 I-ELISA 靈敏度高 4 倍。之前未曾有以 DBH 或 IC-RT-PCR 檢測 DsMV 之報告，或這些方法與 ELISA 比較的相關報導，因此希望本研究研發的 DsMV 檢測方法未來可應用於海芋種苗病毒驗證作業，以協助國內業者生產健康海芋種苗。

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

緒言

海芋又名馬蹄蓮，英名為 calla lily，原產於南非，在分類學上屬於天南星科 (*Araceae*)、馬蹄蓮屬 (*Zantedeschia*) 多年生草本球根花卉⁽⁷⁾。馬蹄蓮屬分成七個種與兩個亞種⁽⁸⁾，依生長習性可分為兩類，一類為常綠性的種類，冬季常綠而不落葉，晚冬至早春開花，以白花海芋 (*Z. aethiopica*) 為代表，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；另一類為落葉性的種類，冬季落葉而夏季開花，栽植時不宜太潮溼，其地下莖為盤狀塊莖 (tuber)，因其苞片之顏色有黃、橙、粉、紅色及紫紅等，所以國人俗稱為彩色海芋 (*Zantedeschia spp.*)，此類不耐低溫，較適合種植在排水性佳的砂質壤土，對病毒性病害及細菌性軟腐病較不具抗性。彩色海芋由於花形特殊典雅，苞片色彩豐

富，可做為切花、盆花及花壇植物，觀賞壽命長，深受消費者喜愛，近幾年已成為重要的世界性新興球根花卉。台灣栽種白花海芋已超過 20 年⁽⁷⁾，主要是在陽明山竹子湖。十幾年前台灣陸續由紐西蘭、荷蘭等國進口彩色海芋，由於氣候適合，再加上近年來繁殖種球的技術逐漸成熟，所以目前大部分已由國人自行生產彩色海芋種球⁽⁶⁾。據估計彩色海芋栽植面積約有二十公頃，且每年栽培面積有持續增加之趨勢^(1,7)，是國內極具發展潛力之球根花卉。

海芋在栽培上有兩個限制因子，其一為細菌性軟腐病，其二為病毒性病害。國外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)⁽²⁶⁾、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)⁽²³⁾、海芋嵌紋病毒 (*Zantedeschia mosaic virus*, ZaMV)⁽²⁰⁾、菜豆黃化嵌紋病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)⁽²⁵⁾、蒟蒻嵌紋病毒 (*Konjak mosaic virus*, KoMV)⁽²⁵⁾、蕃茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)⁽²⁵⁾、鳳仙花壞疽斑點病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV)⁽²⁵⁾、苜蓿嵌紋病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)⁽²⁵⁾、馬鈴薯病毒 X (*Potato virus X*, PVX)⁽²⁵⁾、山芥菜嵌紋病毒 (*Arabis mosaic virus*, ArMV)⁽²⁵⁾ 及煙草脆葉病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV)⁽²⁵⁾。國內相關的研究在學者們的努力之下，最近幾年陸續有感染海芋的病毒被報導，除了 DsMV⁽¹⁶⁾、ZaMV⁽⁹⁾、蕪菁嵌紋病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV)⁽¹³⁾ 和康乃馨斑駁病毒 (*Carnation mottle virus*, CarMV)⁽¹⁵⁾ 之外，尚有多種新發現的海芋病毒：海芋微嵌紋病毒 (*Zantedeschia mild mosaic virus*, ZaMMV)⁽¹⁸⁾、海芋黃斑病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)⁽¹⁴⁾ 以及海芋潛微病毒 (*Calla lily latent virus*, CLLV)⁽¹²⁾。在國內外 16 種被報導可感染海芋的病毒之中，DsMV 除了海芋之外，尚可危害其他天南星科植物，寄主多達 16 屬以上⁽³⁴⁾，具有經濟重要性，本省亦有 DsMV 感染其他天南星科植物的報導^(2,16,22)。

DsMV 為 *Potyviridae* 科、*Potyvirus* 屬之長絲狀病毒，最早是在 1970 年由 Zettler 等學者於芋頭 (*Colocasia esculenta*) 上所發現，其病毒顆粒平均長度為 700-800 nm，可藉由罹病植物汁液進行機械傳播⁽³⁵⁾，在田間主要經由黑豆蚜 (*Aphis craccivora*)、棉蚜 (*A. gossypii*) 及桃蚜 (*Myzus persicae*) 行非永續性的傳播，亦可由罹病營養繁殖體行長距離傳播⁽³⁴⁾。DsMV 在天南星科植物上所造成之病徵，會因寄主植物的不同及季節環境的變化而有所差異，且病徵會呈現間歇性的變化⁽³³⁾。被 DsMV 感染的海芋通常會出現明顯的系統性病徵，包括嵌紋、斑駁、黃化、葉片皺縮、葉片畸

形等^(4,5,8,26,35)。DsMV 在黛粉葉 (*Dieffenbachia* spp.) 引起的病徵包括嵌紋、輪斑、葉片畸形、植株嚴重矮化等^(10,11,32)，其表現會受到季節的影響，又以春秋兩季較常出現明顯病徵⁽³⁴⁾。而粗肋草 (*Aglaonema* spp.) 和白鶴芋 (*Spathiphyllum* spp.) 一般產生輕微的嵌紋病徵，較不易被察覺^(10,34)。芋頭、彩葉芋 (*Caladium* spp.) 及牙芋 (*Xanthosoma* spp.) 則會出現典型的羽毛形 (feathering) 病徵，但病株的多數葉片可能無明顯病徵^(34,35,36)。此外，小天使蔓綠絨 (*Philodendron selloum*) 對 DsMV 非常感病，接種後會造成葉脈透化、嵌紋、葉脈黃化、葉片畸形、植株嚴重矮化等病徵^(5,8,32,33,35)。

DsMV 為天南星科植物中分佈最廣泛之病毒，常見於芋頭、彩葉芋、黛粉葉、海芋和牙芋的栽植地⁽³³⁾，尤其是熱帶及亞熱帶地區⁽³²⁾。目前澳洲、加勒比海地區、大洋洲、北美洲、南美洲、歐洲、亞洲、南非及西非等地皆有 DsMV 之報導^(32,33,34)。DsMV 之所以遍及全球，學者推論最主要的原因是 DsMV 很容易藉由蚜蟲於田間快速地進行傳播，加上目前天南星科植物幾乎已全面採用無性繁殖，因此 DsMV 便藉由無性繁殖體而傳播至世界各地^(33,34)。由於 DsMV 曾使得天南星科觀賞植物包括海芋、彩葉芋、黛粉葉和蔓綠絨損失達 60% 以上^(33,34)，栽種健康種苗成為防治 DsMV 的首要工作，而準確、方便又可靠的 DsMV 檢測方法成為生產無病毒健康種苗的必要條件。

為協助國內海芋健康種苗的生產，因此希望針對感染海芋的 DsMV 研發多種檢測方法，提供海芋種苗組織培養過程篩檢 DsMV 使用。因本實驗室已分別選殖出 DsMV 芋頭分離株 (DsMV-TW)、彩色海芋分離株 (DsMV-ZAN) 與白色海芋分離株 (DsMV-ZAE) 約 1.8 kb 的基因體片段，並且完成核酸定序的工作^(5,8)。由序列比對結果發現 DsMV-ZAN 與 DsMV-ZAE、DsMV-TW，還有國外所發表的 DsMV-LA、DsMV-TEN、DsMV-Ch，鞘蛋白基因胺基酸序列主要的差異在 N 端⁽⁸⁾，而此區是 potyvirus 病毒顆粒的表面抗原決定基坐落的位置之一⁽³⁰⁾，對抗原特性應有決定性的影響。由此推論，從不同種類天南星科植物所分離之 DsMV，其鞘蛋白序列的 N 端差異性大，可能造成抗原性不完全相同。因此若想研發偵測感染海芋的 DsMV 抗血清，利用 DsMV 海芋分離株為材料，效果會比其他分離株為佳。因此本研究以 DsMV-ZAN 為材料進行 DsMV 抗血清之製備，同時研發檢測 DsMV 的方法，包括間接式酵素連結抗體免疫吸附法 (indirect-ELISA, I-ELISA)、墨點雜合法 (dot-blot hybridization, DBH) 以及免疫吸附反轉錄聚合酶連鎖反應 (immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR)，並且分析比較各種方法的專一性和靈敏度。

材料與方法

材料來源

本實驗所使用之材料為海芋 (*Zantedeschia* spp.) 罹病株，由台中種苗改良繁殖場採集而得。先以 Agdia 公司的 DsMV 抗體 (Agdia, Elkhart, IN, USA) 檢測，確定遭受 DsMV 感染後，將罹病組織以 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和小天使蔓綠絨的無病毒幼苗，然後將植株放置於 25 °C 之恆溫室中觀察病徵的表現，並以此作為實驗的材料來源⁽⁸⁾。至於感染海芋的 ZaMV, ZaMMV 和 TuMV 病毒株，則是本實驗室自行分離並保存的材料。

構築含有完整的DsMV鞘蛋白基因之表達載體

根據鍾所獲得的 DsMV cDNA 株 (pDsMV-ZAN8) 之核酸序列⁽⁸⁾，設計出正向引子 (DCPF1) 與反向引子 (DCPR2)，其中 DCPR2 含有一新增加的 *XhoI* 切位 (表一)；此對引子可由 pDsMV-ZAN8 增幅出完整的 DsMV 鞘蛋白基因，預期此片段長度為 952 bp。於 0.2 ml 之薄壁微量離心管中，加入 1 μ l pDsMV-ZAN8 (0.2 ng/ μ l)，10 μ l 10X ThermoPol buffer (NEB, Beverly, MA, USA)、10 μ l dNTPs (2 mM)、10 μ l DCPF1 (5 μ M)、10 μ l DCPR2 (5 μ M)、1 μ l Vent DNA polymerase (2 U/ μ l, NEB, Beverly, MA, USA) 和 58 μ l H₂O，使總反應體積為 100 μ l；均勻混合，以 GeneAmp[®] PCR system 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行 PCR 反應如下：先 94 °C 2 分鐘；再以 94 °C 30 秒，52 °C 45 秒，72 °C 60 秒，進行 35 個循環；最後以 72 °C 反應 7 分鐘。PCR 反應完畢後取 5 μ l 產物進行 1% 凝膠電泳分析。

將剩餘之 PCR 產物以 *XhoI* 內限制酶進行酵解，

然後將產物進行電泳分析，並以 GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 回收經 *XhoI* 處理過之 DsMV 鞘蛋白基因 DNA。將 pET-29a(+) 質體 DNA (Novagen, Madison, WI, USA) 以 *XhoI* 與 *EcoRV* 內限制酶同時進行酵解，經電泳分析並以 GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit 回收處理過之 DNA 片段。將所獲得之 DsMV 鞘蛋白基因與 pET-29a(+) DNA 進行接合反應 (ligation)，以構築表達載體 pET-DCP。隔日將接合產物分別轉型至勝任細胞 *E. coli* DH5 α 及 HB 101 中，經初步篩選並進一步核酸定序，以選擇構築正確的表達載體。

以大腸桿菌系統表現 DsMV 重組鞘蛋白

將正確的表達載體 pET-DCP 轉型至 *E. coli* BL21(DE3) 中，隔日挑選單一菌落移入含 50 ppm kanamycin 的 100 ml LB 培養液 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 中，以 37 °C 震盪培養 4-5 小時，直到瓶中可見雲霧狀菌液或 OD₆₀₀ 值為 0.4-1，表示菌已達所需濃度，此時取出 500 μ l 菌液，以 12,000 rpm 於室溫下離心 30 秒，去除上清液，留下沉澱物，並以 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)⁽²³⁾ 重新懸浮，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 DsMV 鞘蛋白產生；然後繼續於 37 °C 震盪培養，每隔 1 小時後取出 500 μ l 菌液，以 12,000 rpm 於室溫下離心 30 秒，去除上清液，留下沉澱物，並以 50 μ l 的 SDS gel-loading buffer 重新懸浮；如此重複進行 4 次。從未加入 IPTG 開始，每隔 1 小時取樣 1 次，共取樣 5 次，以 12% SDS-PAGE 電泳分析是否有隨時間漸增的蛋白質產物，同時推斷何時可獲得最多量之 DsMV 重組鞘蛋白。

表一、本研究所使用之引子序列

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used in this study

| Primer ¹ | Sequence ² |
|---------------------|--|
| DCPF1 | 5' GCGGATGATACAGTTGATGC 3' |
| DCPR2 | 5' ATGCCTCGAGCTGCGGAGGTGCCATACCTAGC 3' |
| DF0 | 5' AGGCTTGGTAAACAGRCCACAG 3' |
| DF2 | 5' GACTTCTATGAGGTCAATTC 3' |
| DF3 | 5' GCCATGATAGAAGCATGGGG 3' |
| DR0 | 5' TTGAACACCGTGCACGAAGCATC 3' |
| PCPF1 | 5'GGCCCCGTACGCCTTYGAYTTYTA3' |

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

² Nucleotide Y at degenerate position represents C and T. Nucleotide R at degenerate position represents A and G. A created *XhoI* site at DCPR2 is underlined.

DsMV 重組鞘蛋白之純化與抗血清之製備

由前述實驗訂出 DsMV 重組鞘蛋白最佳誘發時間後，重新將 pET-DCP 轉型至 BL21(DE3) 中，同樣挑選單一菌落至含 kanamycin 的 LB 培養液中，再加入 1 mM IPTG，繼續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 5,000 rpm 於 4 °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 °C 下靜置 15 分鐘，以弱化菌體細胞壁。將微量離心管置於冰中，以超音波打破菌體，再以 12,000 rpm 於 4 °C 離心 15 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，以瞭解大腸桿菌所表現的 DsMV 重組鞘蛋白的溶解性。DsMV 重組鞘蛋白的純化採用 HiTrap™ Chelating HP Columns (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)，步驟則參照廠商之建議進行。

以純化的 DsMV 重組鞘蛋白作為免疫原，對兔子進行免疫注射，製備 DsMV 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 測試所獲得的 DsMV 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)，以封口機封好並加以研磨均勻，再將研磨萃取液置於 1.5 ml 的微量離心管中，以 5,000 rpm 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，而以感染 DsMV 之植株作為待測樣品。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 1% 脫脂奶粉溶液。將微量盤以石蠟膜緊密覆蓋後，置於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時，之後以 PBST buffer 清洗 6 次，甩乾後加入以 ECI buffer (1X PBST buffer，0.2% bovine serum albumin，2% polyvinylpyrrolidone，pH 7.4)

稀釋之 DsMV 抗血清 100 μ l，置於塑膠保溼盒內，再放入 4 °C 冰箱中過夜。隔日取出後以 PBST buffer 清洗 6 次並甩乾，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)，以石蠟膜緊密覆蓋後，置於 37 °C 恆溫箱中作用 1 小時，之後以 PBST buffer 清洗 6 次並甩乾，最後每穴加入 100 μ l 以 PNP buffer (9.7% diethanolamine，0.5 mM MgCl₂，pH 9.8) 新鮮配製的 p-nitrophenyl phosphate (PNP) 基質溶液 (1 mg/ml) 進行反應，再將微量盤以石蠟膜緊密覆蓋後，置於 37 °C 恆溫箱中作用 40 分鐘，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)

免疫轉漬分析主要參考 Molecular Cloning 所描述之方法⁽²⁸⁾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)。取出濾膜，置入含 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 於室溫下洗 10 分鐘，重覆 2 次，再以 1X gelatin-NET (0.25% gelatin，0.15 M NaCl，5 mM EDTA，0.05% Tween-20，50 mM Tris-HCl，pH 8.0) 稀釋 8000 倍之 DsMV 抗血清於 37 °C 下震盪作用 2 小時。然後以 PBST 溶液於室溫下洗 10 分鐘，重覆 2 次。再加入以 1X gelatin-NET 稀釋 1000 倍之連結鹼性磷酸酶的二次抗體，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。

DsMV 專一性核酸探針之製備

依據定序完成的 DsMV 序列設計三條正向引子 (DF0、DF2 和 PCPF1) 和一條反向引子 (DR0) (表一)，然後以 pDsMV-ZAN8 為模板，利用此三組專一性引子對進行 PCR 反應，以增幅出不同大小之 DsMV 基因體片段。PCR 反應所需成分包括 2 μ l pDsMV-ZAN8 (0.2 ng/ μ l)、2 μ l 10X PCR buffer、2 μ l dNTPs (2 mM)、1 μ M 正向引子 (5 μ M)、1 μ M 反向引子 (5 μ M)、11.5 μ l H₂O 及 0.5 μ l DyNAzyme™ II DNA polymerase (2 U/ μ l, Finnzymes Inc., Espoo, Finland)，總反應體積為 20 μ l，PCR 反應條件如下：先 94 °C 2 分鐘；再以 94 °C 30 秒，52 °C 30 秒，72 °C 30 秒，進行 35 個循環；最後以 72 °C 反應 7 分鐘。反應完成後取 3 μ l 的 PCR 產物進行 1.5% 凝膠電泳分析，以確定所增幅片段

大小。之後將所得到之 PCR 產物稀釋 100 倍，再進行一次 PCR 反應，以製備不同長度的探針，除了以 1X PCR DIG labeling mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 取代 dNTPs 外，其餘反應條件與前述 PCR 反應相同。最後取 2 μ l PCR 產物進行 1.5% 凝膠電泳分析，其餘產物保存於 -80 °C 冰箱中備用。

墨點雜合法 (dot-blot hybridization, DBH)

將前述 pDsMV-ZAN8 以 DF0/DR0 引子對增幅的 PCR 產物，以 GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ, USA) 定量後，以 1 ng/ μ l 為原始溶液，再以 H₂O 進行 5 倍系列稀釋，置於冰中備用。將 DsMV 感染的植物樣品分為兩部分，一部分利用 ammonium carbonate buffer (200 mM ammonium carbonate, 2% SDS, 2 mM disodium EDTA, 0.02% bentonite, pH 9.0)⁽⁴⁷⁾ 抽取植物的全 RNA，步驟參照張等人之方法⁽³⁾，將 RNA 溶於 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 處理過之水中 (DEPC-H₂O)，取 4 μ l 全 RNA 進行 1% 凝膠電泳分析，並將其餘部分定量後，以 200 ng/ μ l 為原始溶液，再以 DEPC-H₂O 進行 5 倍系列稀釋。另一部分樣品以 10 倍體積的 ISE buffer 研磨，短暫離心後取上清液作為 1 倍粗萃取液，再以 ISE buffer 進行 5 倍系列稀釋。先以 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) 浸泡尼龍膜 (Millipore, Bedford, MA, USA)，風乾後將上述不同稀釋濃度之 PCR 產物 (1 μ l)、植物全 RNA (2 μ l) 或植物粗萃取液 (5 μ l) 分別點漬在尼龍膜上，然後於室溫下風乾，再以 UV 光進行照射，使核酸固著於尼龍膜表面。

將處理完成的尼龍膜置於雜合玻璃管中，加入雜合溶液 (50% formamide, 5X SSC (v/v), 2% blocking reagent (w/v), 0.1% N-lauroylsarcosine (w/v), 0.02% SDS (w/v); Roche Applied Science, Mannheim, Germany)，於 68 °C 恆溫箱中作用 1 小時，之後加入約 500 ng 的 DIG 標定的核酸探針於雜合溶液中，均勻混合，於 55 °C 進行 12 小時以上的雜合反應。後續尼龍膜的洗滌與雜合訊號的偵測，依照廠商的建議進行 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)。

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

除了以 DR0 作為反向引子外，另外設計一正向引子 DF3 (表一)，以供 IC-RT-PCR 使用。實驗步驟主要參照 Wetzel 等人的方法⁽³¹⁾，並修改如下：首先將 DsMV 抗血清以 coating buffer 稀釋成 8,000 倍，並取 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 DsMV 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)，之後用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 5,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液以作為抗原來源。將已覆蓋抗血清之 0.5 ml 微量離心管取出，並以 200 μ l 的 PBST buffer 清洗 3 次，之後並加以甩乾。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 DR0 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。之後取反轉錄產物進行 PCR 反應，於 0.2 ml 微量離心管中分別加入 11.5 μ l ddH₂O、2 μ l 反轉錄產物、2 μ l 10X PCR buffer、2 μ l dNTPs (2 mM)、1 μ l DR0 引子 (5 μ M)、1 μ l DF3 引子 (5 μ M) 及 0.5 μ l DyNAzyme™ II DNA polymerase，總反應體積為 20 μ l，混合均勻後以 1,000 rpm 離心 10 秒，接著進行 PCR 反應條件如下：先 94 °C 2 分鐘；再以 94 °C 1 分鐘，52 °C 1 分鐘，72 °C 1 分鐘，進行 35 個循環；最後以 72 °C 反應 10 分鐘。反應完成後取 10 μ l 的 PCR 產物進行 1% 凝膠電泳分析。

比較 I-ELISA、DBH 與 IC-RT-PCR 之檢測靈敏度

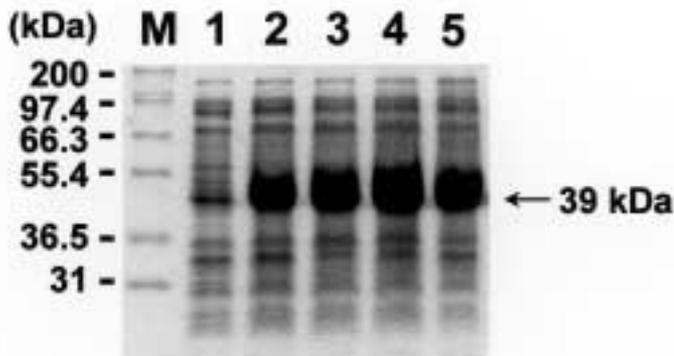
首先將感染 DsMV 的小天使蔓綠絨組織秤重後置於塑膠袋中，加入 5 倍體積的 GE buffer，之後用封口機將塑膠袋封好並加以研磨均勻，再將研磨液放入 1.5 ml 的微量離心管中，以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，再取出上清液作為實驗原始材料。在 I-ELISA 和 DBH 的檢測中，是以 ISE buffer 進行 5 倍系列稀釋；而在 IC-RT-PCR 的方法中則是以 GE buffer 進行 5 倍系列稀釋。I-ELISA 是以稀釋 8000 倍的 DsMV 抗血清作為一次抗體，DBH 則選用 DN457 作為檢測探針，而 IC-RT-PCR 則是依照前述方法，然後同時進行檢測，以比較三種方法的靈敏度。

結 果

DsMV 重組鞘蛋白的表現與純化

根據之前已獲得的 DsMV-ZAN 核酸序列⁽⁸⁾，設計

可增幅出完整鞘蛋白基因之正向引子 (DCPF1) 與反向引子 (DCPR2) (表一), 此對引子確實可增幅出一條 952 bp 符合預期大小的 DNA 條帶。將此 DNA 片段選殖至 pET-29a(+), 經篩選並定序後, 已獲得正確的表達載體 pET-DCP (未出示的資料)。將正確之 pET-DCP 轉型至可表現蛋白質的菌株 *E. coli* BL21(DE3) 中, 於含有 kanamycin 之 LB 中培養, 以 1 mM IPTG 誘發蛋白質表現, 經不同時間後採樣進行電泳分析。由序列推估 DsMV 重組鞘蛋白的分子量約為 39 kDa, 而 SDS-PAGE 電泳結果顯示位於蛋白分子量標準 36.5 kDa 和 55.4 kDa 之間, 隨時間漸增的條帶應為 DsMV 重組鞘蛋白, 且經 IPTG 誘發後 1 小時即可大量表現, 而以誘發 3 小時後達最高峰 (圖一)。此外, 取 10 ml 誘發後 3 小時之菌液進行蛋白可溶性之測試, 得知該蛋白質大部份為不可溶 (未出示的資料)。我們利用含有鎳離子的 HiTrap™ Chelating HP Columns 依照廠商所建議的方法, 純化出 DsMV 重組鞘蛋白, 並且將所純化之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 DsMV 抗血清。

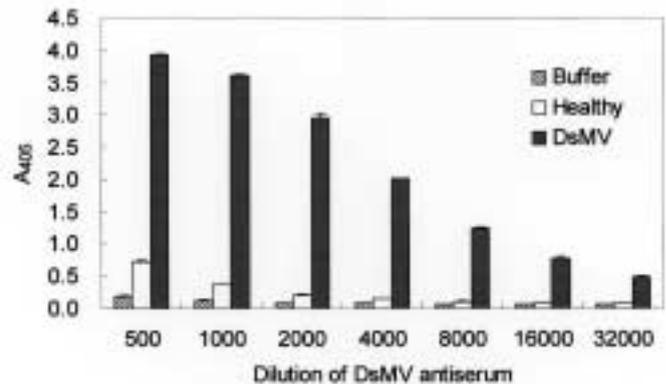


圖一、含有 pET-DCP 之大腸桿菌 BL21 (DE3) 經 IPTG 誘發, 不同時間採樣後, 以 12% SDS-PAGE 分析之結果。M 行, Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1 行, 未經 IPTG 誘發之樣品; 2 至 5 行分別為經 IPTG 誘發後 1 至 4 小時之樣品。

Fig. 1. *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET-DCP 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, no IPTG induction; lanes 2-5, one to four hours after IPTG induction. Molecular weights of the markers are indicated on the left. The predicted position of the expressed protein is indicated by an arrow and the number is the deduced molecular weight.

DsMV 抗血清之力價與專一性

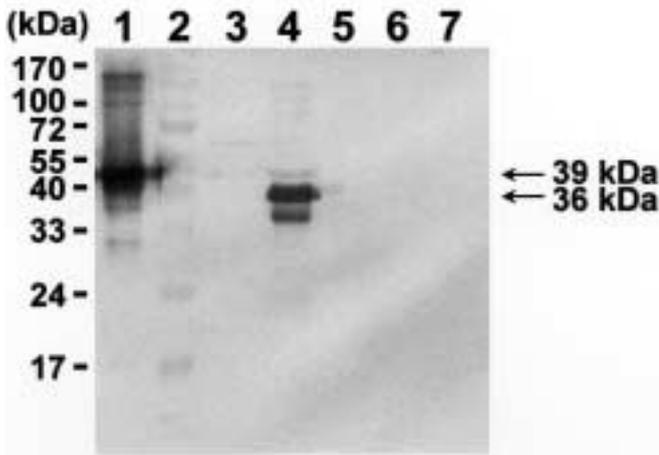
為建立 DsMV 之檢測標準, 遂以 I-ELISA 測試 DsMV 抗血清之力價及最佳稀釋濃度。將 DsMV 抗血清以 ECI buffer 稀釋成 500、1000、2000、4000、8000、16000 及 32000 等稀釋濃度, 然後以 I-ELISA 分別對健康和已接種 DsMV 之小天使蔓綠絨植株進行檢測。當檢測樣品的 ELISA 讀值高出健康植物平均讀值兩倍以上時, 即認定為正反應。結果發現此抗血清稀釋 32000 倍後仍能有效偵測 DsMV (圖二), 顯示由大腸桿菌所表現的 DsMV 鞘蛋白製備之 DsMV 抗血清力價很高, 並且與健康植物反應的背景值很低。當考慮健康植物與 DsMV 罹病樣品的比值時, 則以稀釋 8000 倍之 DsMV 抗血清進行 I-ELISA 檢測, 可得最佳之效果。故往後 I-ELISA 實驗皆以稀釋 8000 倍之 DsMV 抗血清作為一次抗體。



圖二、以間接式酵素連結抗體免疫吸附法分析芋頭嵌紋病毒抗血清之力價。健康和芋頭嵌紋病毒感染之海芋作為檢測樣品。以不同稀釋倍率之芋頭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 DsMV antiserum analyzed by I-ELISA. DsMV-infected and healthy calla lilies were used as test samples. Different dilutions of DsMV 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.

為測試 DsMV 抗血清之專一性, 以健康以及分別感染 DsMV、ZaMV、TuMV 和 ZaMMV 之海芋植株的粗萃取液, 加上純化的 DsMV 重組鞘蛋白, 先以 SDS-PAGE 電泳分離, 再進行免疫轉漬分析。結果顯示只有遭受 DsMV 感染的樣品會出現一條分子量約 36 kDa 的 DsMV 鞘蛋白條帶, 其分子量較 DsMV 重組鞘蛋白 (39 kDa) 略小 (圖三), 乃因後者 N 端還包含由表達載體所



圖三、以免疫轉漬法分析芋頭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，再與芋頭嵌紋病毒抗血清反應。1 行，純化的芋頭嵌紋病毒重組鞘蛋白；2 行，PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA)；3 至 7 行分別為健康、芋頭嵌紋病毒感染、蕪菁嵌紋病毒感染、海芋嵌紋病毒感染和芋頭微嵌紋病毒感染之海芋粗萃取液。

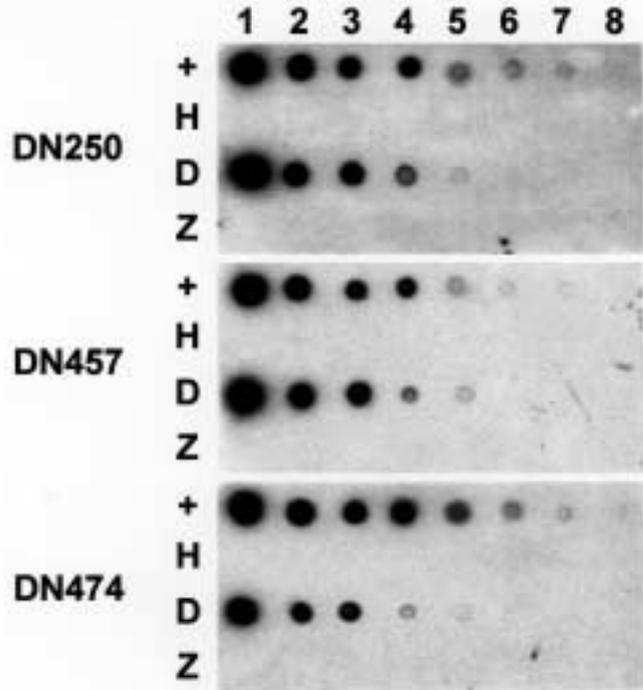
Fig. 3. Specificity of DsMV antiserum analyzed by Immunoblot analysis. Expressed coat protein and crude sap extracts of calla lilies were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane and reacted with DsMV antiserum. Lane 1, purified recombinant coat protein of DsMV; lane 2, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA); lanes 3-7, healthy, DsMV-infected, TuMV-infected, ZaMV-infected, and ZaMMV-infected calla lily extract, respectively. The native (36 kDa) and recombinant (39 kDa) coat proteins of DsMV are indicated by arrows.

產生的 30 個胺基酸，C 端也帶有 6 個 histidine 之故。此外，被 DsMV 感染的植物除了預期的鞘蛋白，尚有一分子量較小且會與 DsMV 抗血清反應的條帶，推論應該是鞘蛋白被分解的產物(圖三)。由免疫轉漬分析結果可知，DsMV 抗血清不會與健康海芋、或 ZaMV、TuMV 和 ZaMMV 感染的海芋有反應，證實其具有很好的專一性。

以 DBH 檢測 DsMV 之結果

以 pDsMV-ZAN8 質體 DNA 作為模板，再分別利用 DR0/DF0、DR0/DF2 及 DR0/PCPF1 三組引子對，以 PCR 反應製備出 250、457 及 474 bp 的 DNA 核酸探針。所獲得的三種 DsMV DNA 探針以其長度命名為 DN250、DN457 和 DN474。以三種 DsMV 探針分別對純化之植物全 RNA 進行 DBH 檢測的結果顯示，三種探針皆只會與感染 DsMV 的植物全 RNA 反應，而不與

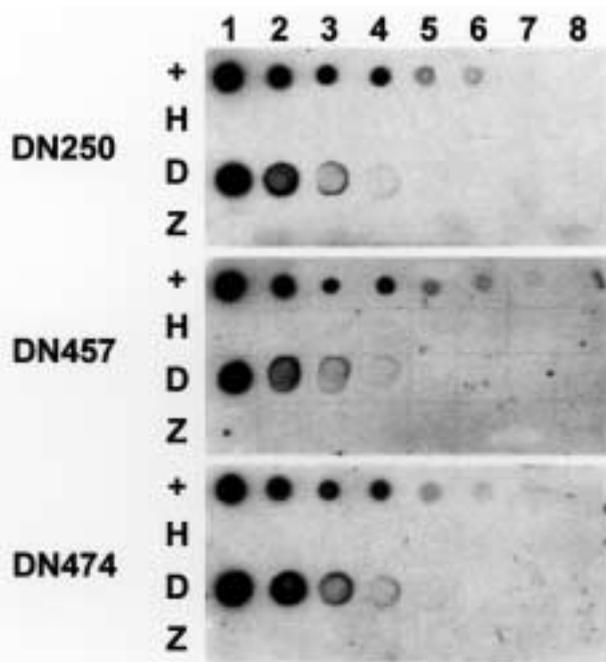
健康植株及含 ZaMV 之植物全 RNA 產生雜合訊號，顯示具有專一性(圖四)。在靈敏度方面，三種 DsMV DNA 探針皆能偵測到 64 fg 的 DsMV PCR 產物，同時可檢測到 640 pg 感染 DsMV 的植物全 RNA(圖四)。由此可知，這三種 DsMV DNA 探針並不會因片段大小的不同，而在靈敏度上有所差異。



圖四、以墨點雜合法分析三種芋頭嵌紋病毒核酸探針之專一性和靈敏度。正對照為 pDsMV-ZAN8 的 PCR 產物。健康、芋頭嵌紋病毒感染和海芋嵌紋病毒感染之小天使蔓綠絨的全 RNA 作為檢測樣品。分別以 H₂O 進行 5 倍系列稀釋，點漬在尼龍膜上，再分別以 DN250、DN457 與 DN474 探針進行墨點雜合分析。

Fig. 4. The specificity and sensitivity of three DsMV DNA probes analyzed by dot-blot hybridization (DBH). PCR product of pDsMV-ZAN8 amplified by DF0/DR0 primers was used as positive control (+). Total RNAs purified from healthy (H), DsMV-infected (D) and ZaMV-infected (Z) *Philodendron selloum* were used as test samples. Positive control and three types of total RNA were 5-fold serially diluted with H₂O. And then 1 μ l of positive control and 2 μ l of total RNA were separately dotted on nylon membranes. The membranes were hybridized with DsMV DNA probes, DN250, DN457, and DN474, respectively. The original concentration (dot 1) of positive control was 1 ng/ μ l and that of total RNA was 200 ng/ μ l. Amount of positive control applied (dots 1 to 8) was 1 ng, 200 pg, 40 pg, 8 pg, 1.6 pg, 320 fg, 64 fg and 12.8 fg, respectively. Amount of total RNA applied (dots 1 to 8) was 400 ng, 80 ng, 16 ng, 3.2 ng, 640 pg, 128 pg, 25.6 pg and 5.12 pg, respectively.

將製備好的植物粗萃取液以 ISE buffer 系列稀釋成 5^{-1} 至 5^{-7} 倍，取 $5 \mu\text{l}$ 點漬在尼龍膜上，再分別以 DN250、DN457 和 DN474 探針進行檢測。結果顯示三種 DsMV DNA 探針皆只會與感染 DsMV 的植物粗萃取液反應，而不與含 ZaMV 及健康植株之粗萃取液產生反應，顯示具有專一性 (圖五)；在靈敏度方面，三種 DsMV DNA 探針皆能偵測到稀釋 5^{-3} 至 5^{-4} 倍含 DsMV 的植物粗萃取液 (圖五)，顯示三種 DsMV DNA 探針對植物粗萃取液的檢測靈敏度差異不大。若以 DsMV PCR 產物為比較基準，則會發現以純化的全 RNA 為樣品時，檢測效果較植物粗萃取液為佳 (圖四與圖五)。



圖五、以墨點雜合法於植物粗萃取液檢測芋頭嵌紋病毒之專一性和靈敏度。正對照為 pDsMV-ZAN8 的 PCR 產物。健康、芋頭嵌紋病毒感染和海芋嵌紋病毒感染之小天使蔓綠絨的粗萃取液作為檢測樣品。分別以 ISE buffer 進行 5 倍系列稀釋，點漬在尼龍膜上，再分別以 DN250、DN457 與 DN474 探針進行墨點雜合分析。

Fig. 5. Evaluation of the specificity and sensitivity of DBH for detection of DsMV in crude sap extracts. PCR product of pDsMV-ZAN8 amplified by DF0/DR0 primers was used as positive control (+) as described in fig. 4. Healthy (H), DsMV-infected (D) and ZaMV-infected (Z) *P. selloum* were separately ground in 10 volumes of ISE buffer and the clarified supernatants were used as the original crude sap extracts (dot 1). Crude sap extracts were 5-fold serially diluted with ISE buffer and $5 \mu\text{l}$ was dotted on nylon membranes. The membranes were hybridized with DsMV DNA probes, DN250, DN457, and DN474, respectively.

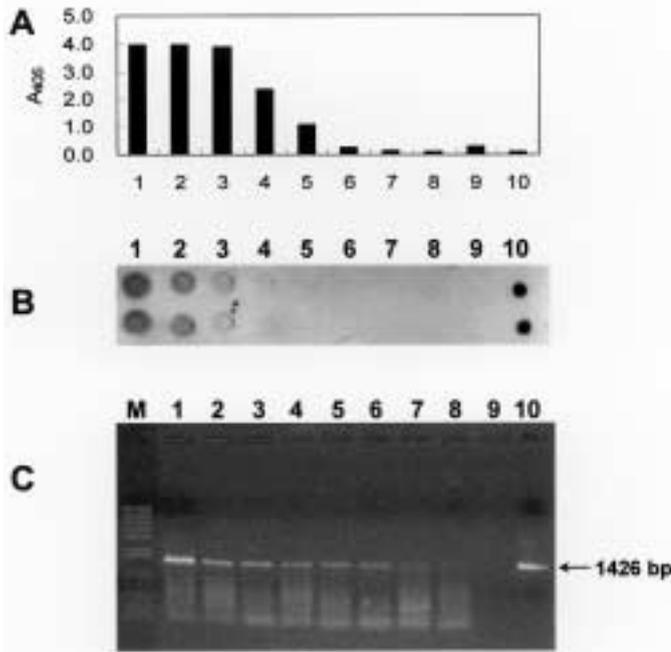
比較 I-ELISA、DBH 與 IC-RT-PCR 之檢測靈敏度

將感染 DsMV 的植物組織先以 GE buffer 研磨，製備成原始粗萃取液，再以 ISE buffer 或 GE buffer 分別系列稀釋成 5^{-1} 至 5^{-8} 倍，然後同時以 I-ELISA、DBH 與 IC-RT-PCR 進行檢測，以比較三者之間的靈敏度。結果顯示以 IC-RT-PCR 最為靈敏，可從稀釋 5^{-8} 倍之罹病植物粗萃取液增幅出預期 1426 bp 的產物 (圖六-C)。而 ELISA 可偵測至 5^{-5} 倍之粗萃取液 (圖六-A)，DBH 則可偵測至 5^{-4} 倍之粗萃取液 (圖六-B)。但由於三種方法所檢測的樣品體積量並不完全相同 (ELISA 為 $100 \mu\text{l}$ ，DBH 為 $5 \mu\text{l}$ ，IC-RT-PCR 為 $100 \mu\text{l}$)，所以換算成所能檢測之最低病毒量時，仍以 IC-RT-PCR 最為靈敏，比 ELISA 靈敏 125 倍以上，而以 DBH 次之，比 ELISA 靈敏 4 倍。

討論

DsMV 是國內海芋栽種時常見的病毒之一，受其感染的海芋葉片會出現明顯的嵌紋、斑駁、黃化、甚至畸形 (4, 5, 8, 26, 35)，嚴重影響其商品價值。針對 DsMV 引起的病害問題，國外研究證實可藉由組織培養去除病毒 (33, 34)，但需要有合適的檢測法進行 DsMV 的篩檢，才能獲得健康種苗。有關 DsMV 的分子檢測法，目前除了 ELISA 有正式的報告 (21, 27) 外，並無其他相關的研究報告。因此本研究主要目的是以感染海芋的 DsMV 為對象，研發出三種檢測法，包括 I-ELISA、DBH 及 IC-RT-PCR。其中 I-ELISA 所需的 DsMV 抗血清，因為純化 DsMV 時常有寄主植物所產生的黏性物質干擾，所以病毒顆粒的純化不易，抗血清的製備較為困難 (5, 8, 21)。有鑒於已有學者將感染彩葉芋的 DsMV 分離株 (DsMV-Ch) 之鞘蛋白基因選殖至表達載體，再利用大腸桿菌表現重組鞘蛋白，藉此生產具專一性的 DsMV 抗血清 (21)，因此我們採用相似的策略以製備 DsMV 抗血清，目前已獲得專一性和力價極佳的 DsMV 抗血清，可應用於 I-ELISA 檢測和免疫轉漬分析。利用自製的 DsMV 抗血清，以 I-ELISA 對海芋樣品進行檢測，由於其具有準確、快速且能同時分析大量樣品的優點，為目前最簡便且便宜的檢測方法。

本研究亦利用專一性核酸探針配合 DBH 以檢測 DsMV，所製備的三種 DNA 探針皆具有專一性，且對感染 DsMV 植物的全 RNA 皆可檢測至 640 pg，顯示具有極高之靈敏度，且並不會因探針長度的差異，而影響探針的靈敏度。此外，直接利用 DsMV 罹病植物粗萃取液作為 DBH 測試的材料，結果發現三種 DNA 探針的靈敏度相似。雖然以植物粗萃取液為檢測樣品，



圖六、比較 I-ELISA、墨點雜合法與 IC-RT-PCR 檢測芋頭嵌紋病毒植物粗萃取液之靈敏度。以芋頭嵌紋病毒感染之小天使蔓綠絨組織製備檢測用的原始粗萃取液。(A) I-ELISA 分析稀釋 5^{-1} 至 5^{-8} 倍的粗萃取液 (1 至 8 行)，健康對照組 (9 行)，buffer 對照組 (10 行)。(B) 墨點雜合法分析同一組粗萃取液 (1 至 8 點)，健康對照組 (9 點)，正對照組 (10 點)。(C) IC-RT-PCR 分析同一組粗萃取液 (1 至 8 行)，健康對照組 (9 行)，正對照組 (10 行)。

Fig. 6. Comparison of the sensitivities of I-ELISA, DBH and IC-RT-PCR for detection of DsMV in crude sap extracts. Infected *P. selloum* tissues were used to prepare original crude sap extract for DsMV detection. (A) I-ELISA analysis of different dilutions of original crude sap extract (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5} , 5^{-6} , 5^{-7} and 5^{-8} -fold, respectively) (lanes 1-8), healthy control (lane 9), and buffer control (lane 10). The values indicate the absorbance at 405 nm after substrate incubation for 40 min. (B) DBH analysis of the same set of crude sap extracts (dots 1-8), healthy control (dot 9), and positive control (dot 10) with DN457 probe. (C) IC-RT-PCR analysis of the same set of crude sap extracts (lanes 1-8), healthy control (lane 9), and positive control (lane 10). Lane M, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The expected 1426-bp amplification product is indicated by arrow.

效果較純化的全 RNA 稍差，但前者有其優點，譬如能省去抽取植物全 RNA 的步驟，減少檢測時間與成本。雖然我們曾嘗試模仿 Wetzel 等學者的方法⁽³¹⁾，利用 12X SSC 與 6% formaldehyde 製備 DsMV 罹病植物粗萃取液，但其檢測效果與目前使用之 ISE buffer 相同 (未出示的資料)。若能針對 DsMV 萃取液加以改善，

例如採用 cold extraction buffer (50 mM sodium citrate, 5 mM EDTA, pH 8.5)⁽²⁹⁾，或許可如該報告所描述能檢測至稀釋 5^{-7} 倍之粗萃取液。

雖然 ELISA 是目前最方便且使用最廣的植物病毒檢測法，但當病毒濃度太低時，ELISA 可能無法偵測出來。而 RT-PCR 是目前最靈敏的檢測法，並且已有許多改良方法被報導，例如 IC-RT-PCR 被證實較 ELISA 靈敏 1000-5000 倍^(24, 31)，比核酸探針靈敏 625 倍，而較傳統 RT-PCR 靈敏 250 倍⁽³¹⁾。本研究利用 DsMV 罹病植物粗萃取液為材料，同時比較 IC-RT-PCR、DBH 及 I-ELISA 三種檢測法，結果 IC-RT-PCR 靈敏度最佳，比 I-ELISA 靈敏 125 倍，推論提高的倍率不如前述報告^(24, 31)，可能是所使用的引子對所增幅的 PCR 產物較長的緣故 (1426 bp 相較於 243-586 bp)，若能改善引子對，應可提高 IC-RT-PCR 的靈敏度。至於 DBH 只比 I-ELISA 靈敏 4 倍，此結果較 Sanchez-Navarro 等人所報告的 5-25 倍為差⁽²⁹⁾，可能是所使用的植物材料和萃取液不同所致。目前實驗結果顯示 IC-RT-PCR 具有下列優點：除了可提高偵測的靈敏度之外，因其避免抽取植物全 RNA 之步驟，所以能縮短檢測時間和減少成本，同時可避免 RNA 降解的問題，為一種方便又可靠的方法。雖然所須費用較 ELISA 為高，但對於病毒篩檢要求嚴格的組織培養系統之親本，是極為適用的檢測法。

本研究針對 DsMV 所研發之三種檢測法皆有優缺點，如何適時適地的應用各種檢測法，以發揮其最大的檢測效果，為另一重要課題。例如在海芋組培苗的生產過程中，當進行母球或組培苗出瓶前的篩檢，建議可以靈敏度最高的 IC-RT-PCR 來進行檢測，以減低生產過程中及出瓶後可能帶有 DsMV 的風險；雖然花費的成本較高，但可避免日後更大的損失，仍值得採用。由於 I-ELISA 操作方便且成本較低，可於生產過程中利用 I-ELISA 對瓶苗或馴化中的小苗進行抽樣檢測。必要時亦可利用 DBH 作為輔助的工具，對重要樣本進行檢測。目前行政院農委會正研擬「海芋種苗病毒驗證作業須知」，積極推動海芋種苗驗證的工作，藉此提高國內海芋種苗的競爭力。因此本研究所研發之 DsMV 檢測方法，未來可應用於海芋種苗病毒驗證作業，以協助國內業者生產健康海芋種苗。

謝辭

本研究承行政院農委會種苗改良繁殖場計劃 (91農科-1.1.2-種-X2) 經費補助，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. 何陽修. 1999. 彩色海芋：一種美麗且有潛力的球根花卉. 台灣花卉園藝 139: 40-41.
2. 柯南靖、梁耀光、楊佐琦. 1988. 利用免疫標示法鑑定芋頭嵌紋病毒. 植保會刊 30: 422.
3. 張雅君、李淑娟、林怡仍. 2005. 番茄叢矮病毒屬快速檢測方法之研發與應用. 植病會刊 14: 41-50.
4. 陳金枝、張清安. 2003. 芋頭嵌紋病毒. p.55-62. 植物保護圖鑑系列 12—海芋保護. 行政院農委會動植物防疫檢疫局出版.
5. 陳穎練. 1998. 天南星科植物芋頭嵌紋病毒與新 potyvirus 之分子選殖、特性分析及檢測系統之研發. 國立臺灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文. 130 pp.
6. 陳駿季、楊佐琦、廖玉珠、劉明宗、蕭芳蘭、何陽修. 2001. 彩色海芋健康種球之微體繁殖與養球技術之建立. p.137-149. 健康種苗在植物病害防治上之應用研討會專刊.
7. 劉明宗、楊佐琦、廖玉珠、蕭芳蘭、何陽修、陳駿季. 2003. 作物簡介及種苗繁殖與種球生產. p.2-7. 植物保護圖鑑系列12—海芋保護. 行政院農委會動植物防疫檢疫局出版.
8. 鍾芳珠. 1999. 感染彩色海芋之芋頭嵌紋病毒與彩色海芋嵌紋病毒之純化、分子選殖與檢測. 國立臺灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文. 131 pp.
9. 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.
10. Chase, A. R. 1987. Dasheen mosaic virus of aroids. Pages 64-65 in: *Compendium of Ornamental Foliage Plant Diseases*. A. R. Chase ed. APS Press. St. Paul, MN, USA. 92 pp.
11. Chase, A. R., and Zettler, F. W. 1982. Dasheen mosaic virus infection of dieffenbachia cultivars. *Plant Dis.* 66: 891-893.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Donald, R. G. K., and Jackson, A. O. 1994. The barley stripe mosaic virus γ b gene encodes a multifunctional protein that affects pathogenesis. *Plant Cell* 6: 1593-1606.
18. 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.
19. Kuehny, J. S. 2000. Crop reports: Calla history and culture. *HortTechnology* 10: 267-274.
20. 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.
21. 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.
22. Liang, Y. G., Yang, T. C., and Chen C. T. 1994. Identification of dasheen mosaic virus in Taiwan by immunolabellings. *Rept. Taiwan Sugar Res. Inst.* 143: 41-50.
23. Mokra, V., and Gotzova, B. 1994. Identification of virus infections in *Dieffenbachia* and *Zantedeschia* in Czechoslovakia. *Acta Hort.* 377: 361-362.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Rodoni, B. C., and Moran, J. R. 1988. The detection of dasheen mosaic virus using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Hort.* 234: 281-288.
28. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
29. Sánchez-Navarro, J. A., Cañizares, M. C., Cano, E. A., and Pallás, V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J. Virol. Methods* 82: 167-175.
30. Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1989. Structure of

- potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* 36: 273-314.
31. Wetzel, 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.
 32. Zettler, F. W., Abo El-Nil, M. M., and Hartman, R. D. 1978. Dasheen mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 191. 4 pp.
 33. 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 No33.* 11 pp.
 34. 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.
 35. Zettler, F. W., Foxe, M. J., Hartman, R. D., Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1970. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants. *Phytopathology* 60: 983-987.
 36. Zettler, F. W., Tsai, J. H., Faan, H. C., Ke, C., and Lu, K. C. 1987. Dasheen mosaic virus infecting taro in People's Republic of China. *Plant Dis.* 71: 837-839.

ABSTRACT

Huang, W.-Z.¹, Chung, F.-C.¹, Chen, Y.-L.¹, Huang, C.-H.¹, and Chang, Y.-C.^{1,2} 2005. Development and comparison of three detection methods for calla lily-infecting *Dasheen mosaic virus*. *Plant Pathol. Bull.* 14: 239-250. (¹ Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; ² Corresponding author, E-mail: ycchang@ntu.edu.tw. Fax: +886-2-23620271)

Calla lilies (*Zantedeschia* spp.), belonging to the family *Araceae*, are perennial bulbous flowers. Because calla lilies are very popular among consumers and the cultivation areas continuously increase, they become important flower crops worldwide. The viral disease is one of the limiting factors for growing calla lilies and 16 viruses have been reported. Among these viruses, *Dasheen mosaic virus* (DsMV), a member of the genus *Potyvirus*, is an important and widely spread virus which can infect at least 16 genera of aroid plants. In this study, three detection methods were developed for calla lily-infecting DsMV (DsMV-ZAN). The first method was to detect the coat protein of DsMV. Based on the sequence of DsMV-ZAN isolate, specific primers were designed to amplify the full-length of coat protein gene, and then cloned into the expression vector. Recombinant DsMV coat protein was expressed by *Escherichia coli* and used as antigen to prepare DsMV antiserum. The result of indirect-ELISA (I-ELISA) indicated DsMV antiserum possessed good titer. Moreover, its specificity was proved by immunoblot analysis since it did not react with other calla-infecting potyviruses. The second method was to detect DsMV RNA. Three primer pairs located in 3'UTR and the coat protein region of DsMV were designed and used to prepare three DNA probes with different length. The results of dot-blot hybridization (DBH) demonstrated that all probes were highly specific and had similar sensitivities in detecting DsMV in crude sap extracts and purified total RNAs although the latter showed better result than the former. The third method, immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR), was developed by combining the immunological and nucleic acid detection methods. When the sensitivity of I-ELISA, DBH and IC-RT-PCR was compared by detecting DsMV in crude sap extracts, the results indicated that IC-RT-PCR was about 125 times more sensitive than I-ELISA, and DBH was about 4 times more sensitive than I-ELISA. There is neither paper about detecting DsMV by DBH or IC-RT-PCR nor report about comparing ELISA with these methods published before. Therefore, the DsMV 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, *Dasheen mosaic virus*, I-ELISA, dot-blot hybridization, IC-RT-PCR