

應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒

關政平^{1,*} 曾清山¹ 張文學² 石信德³ 鄭櫻慧³ 鄧汀欽⁴

摘要

關政平、曾清山、張文學、石信德、鄭櫻慧、鄧汀欽。2014。應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒。台灣農業研究 63(4):259–266。

本研究以微珠核酸探針系統應用於瓜類褪綠黃化病毒 (CCYV) 之檢測，並進行田間洋香瓜是否感染 CCYV 之測試。此微珠核酸探針系統之檢測包含可擴增 CCYV 病毒鞘蛋白 (CP) 基因及一組植物葉綠體來源基因 (ndhB)，分別設計一組引子對，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應及微珠核酸探針系統反應。微珠核酸探針系統設計上，尚包含專一性探針分別與基因擴增內部之序列核酸雜配結合之序列。利用核酸探針結合螢光染劑 (R-PE) 由冷光檢測分析系統 (LiquiChip) 分析螢光訊號作判讀，結果顯示具有高度專一性靈敏度，較使用傳統 RT-PCR 的靈敏度提高約 100 倍。此法預期將有助於檢測 CCYV 感染的洋香瓜種苗驗證。

關鍵詞：瓜類褪綠黃化病毒 (CCYV)、核酸探針、檢測。

前言

瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 為 *Closteroviridae* 科 *Crinivirus* 屬之長絲狀病毒，基因體由兩條正單股 RNA 所組成，分別命名為 RNA1 及 RNA2 (Karasev 2000)。2004 年首次在日本發現洋香瓜受到此病毒之感染，並由後續之研究鑑定被確認其分類地位 (Gyoutoku *et al.* 2009; Okuda *et al.* 2010)。台灣於 2009 年在雲林縣發現洋香瓜 (*Cucumis melo* L.) 受 CCYV 感染，並於 2010 年被證實 (Huang *et al.* 2010)。此病毒可藉煙草粉蝨以半永續性方式傳播，危害多種作物，寄主範圍包括甜瓜 (*Cucumis melo* L.)、胡瓜 (*Cucumis sativus* L.)、南瓜 (*Cucurbita moschata* Duchesne)、西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai.] 等葫蘆科作物 (Gyoutoku *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010)。而 2009 年 5 月中旬於台灣雲林縣

發現 CCYV 對洋香瓜的感染，繼於 2010 年重創中南部洋香瓜及甜瓜產業，導致瓜農損失慘重。其感染初期於植株葉片產生小型黃斑，病斑逐漸擴大形成綠色嵌紋病徵，影響果實產量與品質。

目前檢測 CCYV 病毒普遍使用的方法包括血清免疫學所發展之酶連抗體免疫標誌法 (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) (Kubota *et al.* 2011)、反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 法 (Gyoutoku *et al.* 2009) 等。微珠核酸探針系統係一新式檢測技術，結合多重聚合酵素進行連鎖反應，由 xMAP 技術之冷光檢測分析系統進行判讀。此檢測可在同一時間同一反應管檢定多重感染病原 (Tayor *et al.* 2001; Dunbar *et al.* 2003; Dunbar 2006)，本研究即在嘗試利用微珠結合專一性核酸探針與螢光染劑標誌鍵結的方式，藉由核酸雜配檢測經由核酸擴增量之 CCYV，未來將可運用此微珠

投稿日期：2013 年 8 月 20 日；接受日期：2014 年 2 月 21 日。

* 通訊作者：Pcr123@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

核酸探針系統技術於診斷田間瓜類中是否帶有 CCYV。

材料與方法

病毒來源與保存

ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*)、CMV (*Cucumber mosaic virus*)、PRSV (*Papaya ringspot virus*)、CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) 病毒株皆為農委會農業試驗所保存，本試驗以汁液摩擦分別接種於矮南瓜 (*Cucurbitapepo* L. var. *zucchini*) 及藜藜 (*Chenopodium quinoa*) 中，寄主接種試驗分別取呈現嵌紋黃化病斑之洋香瓜葉片組織，以 0.05 M 磷酸緩衝液研磨後接種，取葉片組織以 RT-PCR 檢測是否表現病徵。感染 CCYV 之西瓜及洋香瓜樣品採自台中地區，經由 RT-PCR 鑑定與核苷酸定序確定為 CCYV 病毒後，保存於 -70°C 中備用。

引子設計

利用 Primerplex 2.0 (USA) 軟體，對 CCYV 病毒基因及植物核酸序列進行引子設計。以所獲得之引子序列結果，設計出對應之專一性引子 (序列詳如表 1)，供檢測使用。

植物全 RNA 之純化

將植物組織以 TriSolution Reagent Plus (PROTECH, 台灣) 試劑組抽取其全量 RNA，步驟參照純化套組所附之使用說明。先秤取 0.1 g 植物組織，加入液態氮後以研鉢及鉢棒磨成粉末狀，將研磨好的組織粉末移入 1.5 mL

微量離心管中，取 1 mL TriSolution Reagent (Genemark, 台灣) 加入上述離心管中，均勻混合約 15–30 s，均質化的產物於室溫下放置 5 min。每 1 mL 的 TriSolution Reagent (Genemark, 台灣) 加入 0.2 mL 的 Chloroform-Isoamyl alcohol (24 : 1) (AMRESCO, USA)，劇烈震盪 15 s 並於室溫放置 2–3 min。進一步處理後於 4°C 下離心 (12,000× g) 15 min，吸取上層澄清液 (無色水層，大約 0.6 mL 的體積) 至新的離心管，每 1 mL 的 TriSolution Reagent (Genemark, 台灣) 加入 0.25 mL Isopropanol 及 0.25 mL PS & PG (Polysaccharides and Proteoglycan) Removal Solution (Genemark, 台灣)，混合均勻後置於室溫 10 min。將試驗樣品於 4°C 下離心 (12,000× g) 10 min (RNA 以白色沉澱物方式沉澱於試管底部)，小心移除上清液，加入 1 mL 75% 酒精以震盪器震盪混均 RNA 沉澱物，再於 4°C 下離心 (12,000× g) 離心 5 min。移除酒精並將沉澱物進行乾燥 5–10 min。加入 1 倍 RNase-free water 40 μL，用微量分注器反覆混勻，回溶沉澱物於 65°C 靜置 20 min。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

反轉錄反應以取得測植物全 RNA 2 μg，加入 0.5 μg oligo (dT)₁₈ 及 0.5 μg random hexamer primer，DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 處理水配置 25 μL。以 70°C 加熱 5 min 後，迅速置於冰中冷卻，再分別加入 5 μL 之 MMLV RT 5× reaction buffer (Promega, USA)、5 μL 之 10 mM dNTP (40 U μL⁻¹, Promega, USA) 及 1 μL 之 MMLV reverse transcriptase (200 U μL⁻¹, Promega, USA)，置於 42°C 水浴中作用 60 min，

表 1. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1. Primers and probes used in this study.

Primer/probe ^z	Sequence (5'–3')	Position (nt)
CCYV-368-0923-probe (5' modified NH2 C6)	GCCAGGAAACACGAGTCAGA	5432–5452
CCYV-368-0726-F1	CCATCACCAGACGAGTTCAT	5229–5248
CCYV-368-0726-R1 (5' modified Biotin)	GCCGCCAAATCACCATCT	5579–5596
ndHB-476-0726-probe (5' modified NH2 C6)	GAGAAGAACCTATGATTAGCTT	144268–144289
ndHB-476-0726-F1	GCCTTTCATTTGCTTCTCTTC	144090–144110
ndHB-476-0726-R1 (5' modified Biotin)	GCCTCATTAGACCGTACATCT	144545–144565

^z CCYV: GenBank Accession no. AB523789.1; ndHB: GenBank Accession no. AJ316582.1.

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 14 μL 之 ddH₂O、2 μL 反轉錄產物、2.5 μL 10 \times PCR buffer、2 μL 2.5 mM dNTP、1 μL 0.4 μM CCYV 正向引子 (CCYV-368-0726-F1)、1 μL 0.4 μM CCYV 反向引子 (CCYV-368-0726-R1)、1 μL 0.4 μM hdhb-476-0726F 正向引子、1 μL 0.4 μM hdhb-476-0726R 反向引子及 0.5 μL 2 U μL^{-1} Taq DNA polymerase (Protech, 台灣)。之後以 1,000 \times g 離心 10 s，接著進行 PCR 反應。其 program 如下：94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 再 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s (30 cycle) 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min。最後取 10 μL 之 PCR 產物進行 1.5% 膠體電泳分析。

CCYV 核酸片段選殖與序列分析

待測之植物葉片以 CCYV 分離株設計對應之 RNA2 cp 基因之專一性引子對 CCYV-368-0726-F1、CCYV-368-0726-R1 進行 RT-PCR 反應後。將增幅之產物使用回收套組

(IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare, UK) 回收純化之 DNA 利用 TA 轉殖載體構築於 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)，質體 DNA 以 NanoVue spectrophotometer 定量核酸濃度 (GE Healthcare, USA) 作為試驗正反應組用。

微珠核酸探針鍵結

本研究所使用之探針及引子對序列詳如表 1。將已設計之 CCYV 病毒序列之目標區域，反向引子 (CCYV-368-0726-R1) 之 5' 端標定 biotin；並從目標區域設計探針 (大小約 25–40 mers) 再將探針 5' 端經胺基 (Amine) 修飾 (基龍米克斯公司, 台灣)，以利與微珠上之胺基進行鍵結。微珠探針之作用流程詳如圖 1 所示，將微珠震盪均勻後並經超音波震盪各 30 s 後取 100 μL (1.25×10^6 微珠)，離心 (14,000 \times g) 2 min 去除上清液，加入 50 μL 之 0.1 μM MES [2 (N-Morpholino) ethanesulfonic acid] (pH 4.5)，震盪 20 s。加入 2 μL

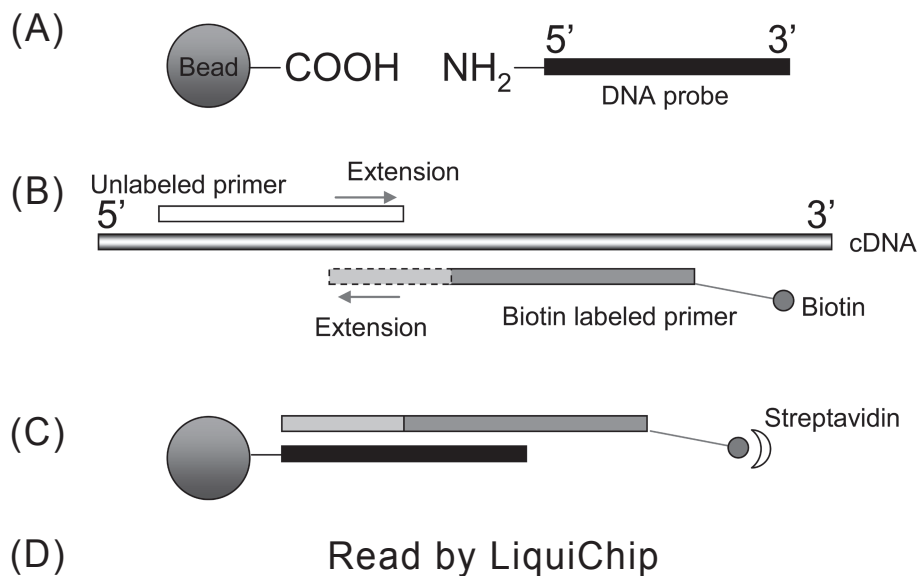


圖 1. 微珠核酸探針系統作用流程圖。(A) 微珠與專一性病毒互補之序列進行黏合；(B) 反轉錄反應及核酸擴增反應將 biotin 帶入擴增之產物中 (使用引子反向之引子帶有 biotin)；(C) 進行核酸雜配反應，並加入 streptavidin 作用；(D) 以冷光儀進行螢光偵測。

Fig. 1. Flow chart of bead-based DNA probing system. (A) The complementary anti-tag sequence coupled to a bead set; (B) Amplification products of biotin at 5' end side; (C) Hybridization process with streptavidin added; and (D) Read by the LiquiChip system.

混合液 [0.2 nanomole CCYV-368-0923-probe 與 66 號微珠 (直徑 5.3 nm 大小); ndHB-476-0726-probe 與 30 號微珠 Beads (直徑 5.3 nm 大小); biotinylated probe-CCYV; 5'-biotin-GCCGCCAAATCACCATCT-3'; biotinylated probe-ndHB; 5'-biotin-GCCTCATTAGAC-CGTACATCT-3'], 震盪混合, 配 10 mg mL⁻¹ EDC [1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride] (10 mg EDC dissolved in 1 mL ddH₂O), 加入 2.5 μL 10 mg mL⁻¹ EDC 震盪混合。在室溫下及避光條件下, 震盪 30 min。加入 1 mL 之 0.02% Tween-20 混合後, 離心 (14,000×g) 2 min, 去除上清液體後加入 1 mL 之 0.1% SDS, 震盪混合, 離心 (14,000×g) 2 min, 去除上清液後加入 100 μL TE buffer, 避光保存於 4°C。

核酸雜配反應與螢光偵測

PCR 產物取 5 μL, 加入 1.5× TMAC (Tetramethylammonium chloride solution) 33 μL, 各加入帶有微珠之探針 (濃度則達 2,500 beads 數量), 之後補 TE buffer 至 50 μL, 放於 PCR 儀, Verti thermal cycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, USA) 儀內加熱 95°C、5 min, 50°C、15–30 min (核酸雜配), (離心 10,000×g) 5 min。去除上清液, 加入 75 μL 2–4 μg mL⁻¹ streptavidin-R-phycoerythrin 已先溶於 1× TMAC, 於 50°C 下反應 15 min, 之後放入冷光儀 LiquiChip 200 (Qiagen, Germany), 觀察反應讀值並判讀結果。

專一性及靈敏度試驗

檢測 CCYV 專一性試驗, 待測之病毒包括 CCYV (3 個病毒分離株)、CMV、PRSV、CGMMV、ZYMV、健康洋香瓜、南瓜、西瓜與無菌水, 經由上述的 RT-PCR 反應後, 使用微珠探針系統與冷光儀進行分析進行 3 重複及 2 次反應。為了測試核酸雜配的靈敏度, 感染 CCYV 洋香瓜之全量 RNA 以無菌水進行 10 倍系列稀釋 (50 ng mL⁻¹ 至 5 μg mL⁻¹) 做為 RT-PCR (或 PCR) 模板。RT-PCR (或 PCR) 終產物再與微珠探針雜配, 並以冷光儀測試判讀以評估靈敏度, 且與 RT-PCR 的靈敏度做比較。

所有反應皆 3 重複, 並且進行 2 次反應, 結果經 Excel 統計圖表分析。

田間 CCYV 檢測

採集田間栽培之西瓜及洋香瓜材料, 取葉片組織約 0.1 g 進行全量 RNA 之萃取純化, 步驟依照前述材料與方法進行, RT-PCR 及反應結果置於冷光儀 LiquiChip 200 (Qiagen, Germany) 進行檢測。

結果

微珠核酸探針之專一性試驗

本試驗使用 RT-PCR 法增幅感染 CCYV 之植物組織之核酸抽出物, 產生 368 bp 之 CCYV 專一性核酸片段產物, 以及 476 bp 植物基因片段 (ndhB) 產物 (做為內控試驗用)。增幅之核酸產物與微珠核酸探針做雜配反應, 利用冷光檢測儀觀察微珠探針分佈位置, 經檢測顯示僅與瓜類 CCYV 反應, 而對 CMV、ZYMV、PRSV 及 CGMMV 等其他類病毒及健康南瓜、洋香瓜或西瓜植物與無菌水做負反應對照組皆不反應, 同時顯示有一植物基因片段 (ndhB) 形成, 健康南瓜、洋香瓜及南瓜皆對 ndhB 探針產生反應, 確認試驗的全 RNA 抽取無誤 (圖 2)。

靈敏度試驗

抽取感染 CCYV 之洋香瓜全 RNA 作為試驗用之核酸模板, 核酸濃度經系列 10 倍稀釋不同濃度進行 RT-PCR 及磁珠核酸探針系統搭配核酸雜配反應 (冷光儀分析), 並同時比較 RT-PCR 法及冷光儀 2 種檢測法。結果顯示, 以 RT-PCR 法經電泳分析, 出現 368 bp CCYV 專一性產物及 476 bp 之專一性 ndhB 產物, 並可測到稀釋倍數至 10⁻³, 相當可檢測至 50 pg RNA 量, 使用冷光儀可以測到稀釋倍數至 10⁻⁵, 相當於 0.5 pg CCYV 量。由此顯示, 靈敏度微珠核酸探針系統搭配冷光儀之靈敏度較 RT-PCR 法提高約 100 倍 (圖 3)。

田間病毒檢測試驗

利用 RT-PCR 法對田間疑似感染之洋香

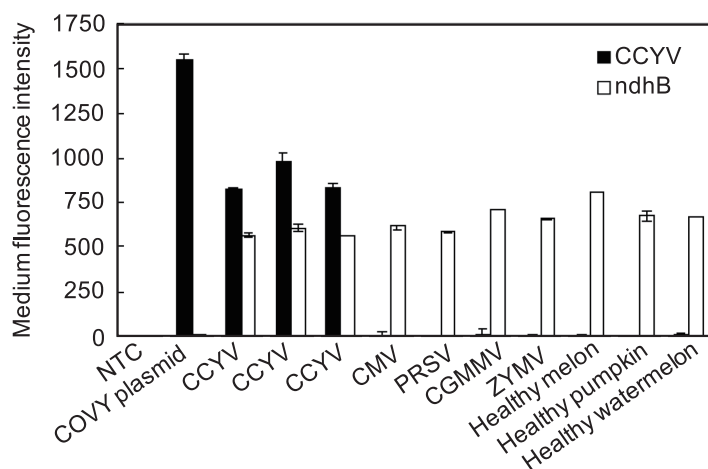


圖 2. *Cucurbit chlorotic yellows virus* 專一性試驗，核酸探針系統檢測病毒包括 *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV)、*Cucumber mosaic virus* (CMV)、*Papaya ringspot virus* (PRSV)、*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)、*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)、健康南瓜、洋香瓜及西瓜。所有的探針試驗皆含 2 種探針同時反應，反應背景值已扣除。

Fig. 2. Probe specificity tests with target and non-target DNA, including *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), as well as healthy squash, melon and watermelon. All probes were tested in a multiplex format (2 plex assay). The background signal was subtracted. NTC: no template control.

瓜樣品進行檢測，結果顯示 15 株洋香瓜葉片中以 RT-PCR 法可檢測到 4 株具有 CCYV，使用微珠核酸探針系統則顯示有 6 株可測到 CCYV (結果未顯示)。由結果可知，此方法可在洋香瓜中檢測出 CCYV。將擴增的 368 bp RT-PCR 產物經由瓊脂回收純化進行核苷酸定序，確屬於 CCYV 之鞘蛋白基因的部分片段，序列的相同度均與 CCYV (GeneBank acc no AB523789.1) 達 98% (結果未顯示)。因此，顯示本研究應用之磁珠核酸探針檢測系統對 CCYV 檢測結果的可靠性。

討論

目前使用微珠核酸探針系統應用常見於各種病原菌的檢測 (Taylor *et al.* 2001; Dunbar *et al.* 2003)，惟在 *Crinivirus* 的檢測上仍然缺乏。使用傳統 PCR 法僅增幅出特定片段，而使用微珠核酸探針系統，因經由專一性探針可與增幅之特定片段雜配反應，具有較佳之專一性確認。此外，使用微珠核酸探針系統具有可同時檢測 96 個樣品數之優點。然而，此法

的主要缺點是反應需要具有熟悉操作試驗的人員，且需要搭配特定儀器才能進行反應與分析。本研究結果顯示，當 CCYV 探針附加微珠再經雜配反應與目標 DNA 片段結合時，所產生之螢光訊號強度可進一步確認 PCR 擴增之產物。多重微珠核酸探針檢測病原特異性分析技術，有利於同時檢測多種病毒於同一反應管中 (Dunbar *et al.* 2003; Dunbar 2006)。此系統應用上另設計一內部植物控制引子對做為負對照組，可同時檢測多種植物病毒存在量，本研究所使用之冷光儀可以同時檢測瓜類 CCYV 病毒，並加入一植物基因做為反應之內控試驗 (internal control)。又此技術具有高通量快速檢測之優點 (Dunbar *et al.* 2003)，反應時間約 5–6 h。反應訊號強度與引子探針設計是否良好有關。此外，RT-PCR 是否最佳化與核酸雜配條件 (hybridization condition) 等，可能也會影響反應結果。本研究所使用之引子 CCYV368-0726F1/R1, ndHB 476-0726F1/R1 混合於檢測 CCYV 及檢測植物基因，均具有專一性並於磁珠核酸探針雜配法中優於 RT-PCR 之靈敏度。

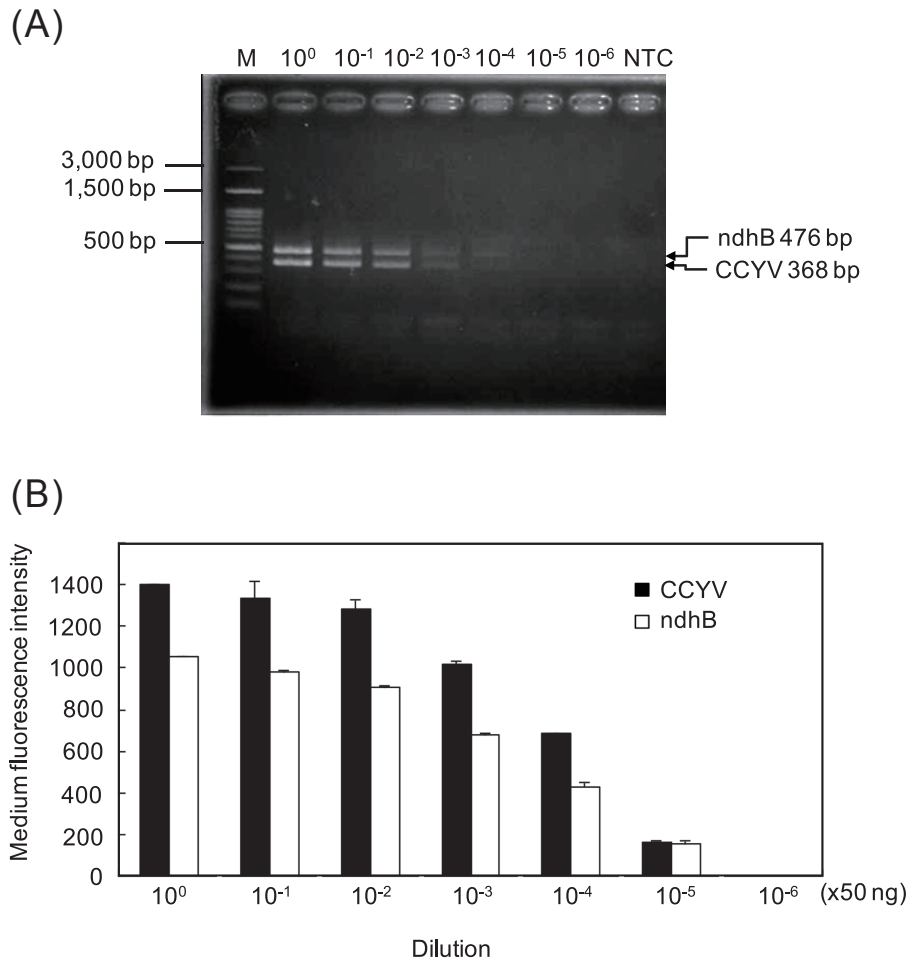


圖 3. 靈敏度試驗。(A) 感染 *Cucurbit chlorotic yellows virus* 之洋香瓜抽取 total RNA 經 10 倍系列稀釋後，以 RT-PCR 反應並經過電泳分析結果可檢測至 10⁻⁴ ng RNA 稀釋液；(B) 以微珠核酸探針系統法檢測，可檢測至 10⁻⁵ ng RNA 稀釋液。

Fig. 3. Minimal detection limit (sensitivity) of CCYV by RT-PCR (A) and LiquiChip detection system (B). Samples were run in 3 duplicates, and the experiment was run twice. NTC: no template control.

CCYV 已有利用血清學法使用 ELISA 鑑定病毒之方法 (Kubota *et al.* 2011)，但 Kubota *et al.* 認為 CCYV 病毒不易由感染植物中獲得足夠純化病毒蛋白做為動物免疫抗原以生產抗血清，主因是病毒在植物體中含量偏低 (Kubota *et al.* 2011)。本研究以傳統的 RT-PCR 法檢測 CCYV，再搭配微珠核酸探針技術後，可提高檢測靈敏度約達 100 倍。在 RNA 濃度非常低的情形下，仍可使用冷光儀提高偵測 CCYV 病毒之效益。

田間 CCYV 檢測，亦分別在疑似感染 CCYV 之洋香瓜樣本中；以 RT-PCR 法及微珠核酸探針系統技術皆可檢測出 CCYV 病毒，但試驗結果顯示 15 株洋香瓜中使用 RT-PCR 檢測出 4 株為陽性反應，使用微珠核酸探針技術則有 6 株被檢出。由此可知，有些葉片可能病毒量較低，使用 RT-PCR 法無法測出，但使用微珠核酸探針技術則有可能提高增幅病毒效果。因此，微珠核酸探針系統技術除具高度特异性外，亦有良好敏感性。隨著瓜類種植面積

不斷擴大，CCYV 所造成的危害也陸續出現，本研究結合微珠核酸探針系統的發展所建立之 CCYV 的檢測方法，高靈敏度檢測病毒之優點，對未來監測田間病害的發生，進而預防病害損失及在抗病篩選、病害流行預測等將有所助益。

引用文獻

- Dunbar, S. A. 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* 363:71–82.
- Dunbar, S. A., C. A. Vander Zee, K. G. Oliver, K. L. Karem, and J. W. Jacobson. 2003. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J. Microbiol. Methods* 53:245–252.
- Gyoutoku, Y., S. Okazaki, A. Furuta, T. Etoh, M. Mizobe, K. Kuno, S. Hayashida, and M. Okuda. 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new crinivirus. *Jpn. J. Phytopathol.* 75:109–111.
- Huang, L. H., H. H. Tseng, J. T. Li, and T. C. Chen. 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting Cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.* 94:1168.
- Karasev, A. V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:293–324.
- Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immunodetection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:116–120.
- Okuda, M., S. Okazaki, S. Yamasaki, S. Oluda, and M. Sugiyama. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus Crinivirus. *Phytopathology* 100:560–566.
- Taylor, J. D., D. Briley, Q. Nguyen, K. Long, M. A. Iannone, M. S. Li, F. Ye, A. Afshari, E. Lai, M. Wagner, J. Chen, and M. P. Weiner. 2001. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques* 30:661–666.

A DNA Probing System for the Detection of *Cucurbit Chlorotic Yellows Virus*

Cheng-Ping Kuan^{1,*}, Ching-Shan Tseng¹, Wen-Shiue Chang², Hsin-Der Shih³,
Ying-Huey Cheng³, and Ting-Ching Deng⁴

Abstract

Kuan, C. P., C. S. Tseng, W. S. Chang, H. D. Shih, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2014. A DNA Probing system for the detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):259–266.

In this paper, a PCR assay coupled with microspheres to rapidly screen field samples for *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) survey on melons was developed. The RT-PCR was designed to have the same binding sites for the forward and reverse primers of the CCYV viral coat protein (CP) gene as the target amplicon, but it had a unique internal sequence used for the probe site. The amplification of the CCYV viral RNA and the detection by LiquiChip were monitored with two different fluorescent probes in a multiplex format, one specific for the CCYV CP gene and the other for the plant chloroplast source gene, *ndhB*. The detection sensitivity of multiplex RT-PCR by LiquiChip was 100 times higher than only detection by RT-PCR for CCYV. The hybridized beads were processed and analyzed on LiquidChip instrument, which detected the presence of CCYV RNA and quantity of each PCR product from melon samples. Therefore, it may have great advantage to the certification program of melons.

Key words: *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), Nucleic acid probe, Detection.

Received: August 20, 2013; Accepted: February 21, 2014.

* Corresponding author, e-mail: Pcr123@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

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

³ Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.