

## *Cymbidium ringspot virus* 核酸及血清檢測法之建立及其應用

陳金枝<sup>1,\*</sup> 江芬蘭<sup>2</sup>

### 摘要

陳金枝、江芬蘭。2017。 *Cymbidium ringspot virus* 核酸及血清檢測法之建立及其應用。台灣農業研究 66(3):202–218。

*Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) 為國外已有發生之病毒，目前國內尚未有此病毒之發生紀錄。本研究針對此病毒進行其核酸及血清檢測試劑製備，以應用於蘭花病毒監測。核酸檢測法方面，以對應 CymRSV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 之核苷酸序列設計 2 組引子對，應用於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)。CyRcpu/CyRcpd 引子對可增幅出涵蓋 CymRSV-CP 基因全長及其兩端序列共約 1370 bp 之片段，CyRu/CyRd 引子對可增幅出 CymRSV-CP 基因高保留區約 540 bp 之片段，於 RT-PCR 中均可成功檢測到市售之 CymRSV RNA 標準對照品 (DSMZ 出品)，獲得與預估分子量相符之核酸增幅產物。CyRu/CyRd 引子對於 60°C 煉合溫度下，於 RT-PCR 法中可專一性檢出 CymRSV。另外，針對 CymRSV-CP 基因序列設計 4 條引子 (CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3)，以反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP)，可於 65°C 恆溫條件下於 1 h 反應中成功擴增此病毒核酸分子，並直接以目視法判讀反應結果，可專一性檢出 CymRSV 之標準對照品，且有高於 RT-PCR 約 25 倍之靈敏度。在免疫檢測法方面，以人工基因合成 CymRSV 全長度鞘蛋白核酸片段，並構築於 pET28b 表現載體，於 *Escherichia coli* (Rosetta) 細菌宿主中進行蛋白表現，獲得分子量約 41.8 kDa 之融合性表現蛋白 (BEP189)，且可與 2 種國外市售之 CymRSV 多元抗體產生正反應；以 BEP189 做為抗原所製備出之多元抗體 (CymRSV#189) 於間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 及西方墨點法 (western blotting) 反應中，均可與其同源之表現蛋白及國外市售之 CymRSV 免疫檢測標準品產生正反應，但不與健康蘭花組織以及 9 種其他蘭花病毒產生正反應，自製之多元抗體可成功應用於 CymRSV 之專一性免疫檢測與鑑別。本研究首次開發 RT-LAMP 法於 CymRSV 之核酸快檢以輔助對此病毒之鑑定，並研發可實務應用於蘭花上對 CymRSV 監測之 RT-PCR 技術，且自製之多元抗體可有效地鑑別 CymRSV。

關鍵詞：CymRSV、血清檢測、RT-PCR 檢測、反轉錄-恆溫環形核酸增幅法。

### 前言

*Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) 屬於 *Tombusviridae* 科、番茄叢矮病毒屬 (*Tombusvirus*) 的球型病毒，為單股 RNA 核酸，鞘蛋白分子量約為 41 kDa，病毒顆粒大小約為直徑 30 nm (Fauquet *et al.* 2005)。此病毒首次於

1963 年在英國南部之蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 上被發現，罹病株之葉片產生黃色輪點 (chlorotic ring-mottle)，若與 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 複合感染則會加重病徵表現 (Hollings & Stone 1963)。此病毒特性穩定，主要藉由汁液傳播、器具污染、土壤或灌溉水傳播，尚無種子傳播或蟲媒記錄 (Hollings

投稿日期：2016 年 9 月 12 日；接受日期：2016 年 11 月 14 日。

\* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

*et al.* 1977)。CymRSV 普遍發生於草本植物上，實驗室可接種發病之寄主範圍廣泛，目前只在歐洲被發現，分佈仍不普遍，台灣尚無此病毒之發生報告。此病毒有兩個分離株系統 (strain)，包括豆科之白花苜蓿 (*white clover*, *Trifolium repens*) (Hollings *et al.* 1977) 及蕙蘭 (*Cymbidium spp.*) (Hollings & Stone 1963, 1977)，可經由寄主接種及血清反應加以判別。CymRSV 自從 1963 於蕙蘭上被發現後，2000 年代並未再在蘭花上被發現 (Elliott *et al.* 1996; Siegmann *et al.* 1998; Freitas-Astua *et al.* 1999)。但其兩種天然寄主包括蕙蘭及白色苜蓿在國內均有種植，加上可透過病毒汁液傳播快速之特性，一旦發生此病毒病害，對蘭花產業有潛在之威脅，因此有必要加強對 CymRSV 之監測，以防範病毒之發生。

國際上目前記錄可感染蘭花的病毒種類超過 30 種 (Zettler *et al.* 1990; Zheng *et al.* 2011b)，其中 CymMV 與 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 在蘭花上普遍發生，可感染蘭花的種類最多，對蘭花產業經濟面的影響最為深重 (Zettler *et al.* 1990; Wong *et al.* 1994; Khentry *et al.* 2006)。台灣已報告可感染蘭花之病毒包括 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) (Zheng *et al.* 2008b)、*Carnation mottle virus* (CarMV) (Zheng *et al.* 2011a, 2011b)、*Cucumber mosaic virus* (CMV)、CymMV、ORSV (Chang *et al.* 1999) 及 *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV) (Zheng *et al.* 2008a)，其中 PhCSV 與 *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV) 為同種異名 (Huang & Chang 2006; Zheng *et al.* 2011b)。國際上可感染蘭花之 *Potyvirus* 屬病毒約有 16 種 (Zheng *et al.* 2008a)，其中已見諸台灣之其他作物寄主者包括感染豆類之 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)、感染天南星科之 *Dasheen mosaic virus* (DsMV)、感染十字花科或花卉之 *Turnip mosaic virus* (TuMV)，及感染蘭花或洛葵之 *BarMV* (Huang & Chang 2006; Zheng *et al.* 2011b)。

由於國際間花卉種苗 (球) 的貿易活絡，病毒有可能隨種苗 (球) 行銷國際而傳播的風險，尤其蘭花種苗之進出口檢疫條件中，病毒檢測為決定貿易順暢之關鍵，近年來國際

間逐漸要求無特定病毒之檢疫 (Khentry *et al.* 2006)。

受病毒感染之蘭花大多有病徵之呈現 (Zettler *et al.* 1990)，但蘭花品系多樣，在特定品系上並不呈現病徵，故僅由病徵呈現容易發生誤判 (Tanaka *et al.* 1997; Koh *et al.* 2014)，需藉由檢測方法加以明確地判別才能發揮對控管病毒發生或傳播之效益。迄今，不同之免疫檢測法已開發於蘭花病毒之檢測 (Tanaka *et al.* 1997; Hu & Wong 1998; Eun *et al.* 1999; Chang *et al.* 2003; Lee & Chang 2008)，其中酵素連結免疫吸附反應法 (enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 具有特定敏感度，在操作及成本上適用於大量樣品之篩檢，已普遍被應用於植物病毒檢測或國際貿易之檢疫 (Lommel *et al.* 1982)，或應用於蘭花病毒發生調查以及健康種苗生產的品質控管需要 (Arunasalam & Pearson 1989; Hu *et al.* 1993; Vejaratpimol 1998; Grisoni *et al.* 2004; Khentry *et al.* 2006; Lee & Chang 2008; Liu *et al.* 2013)。

隨著核酸檢測技術之發展與應用，已大幅提升病毒檢出之敏感度與正確度，而對於蘭花病毒之檢測，反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 之應用已見諸許多報告 (Ryu *et al.* 1995; Chung *et al.* 1996; Chang *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2004; Lee & Chang 2006; Yamane *et al.* 2008)，可應用於組織培養之早期檢測確保無特定病毒之繁殖 (Choi *et al.* 2010)；而快速簡易之核酸檢測改進法亦陸續被開發，包括多重 (multiplex) RT-PCR (Lee & Chang 2006; Ali *et al.* 2014; Kim & Choi 2015)、反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP) (Lee *et al.* 2011; Tsai *et al.* 2016) 和定量 RT-PCR (Eun *et al.* 2000) 等。

國內學者 (Chang *et al.* 2005) 已成功開發 *Tombusvirus* 屬專一性引子對，可成功檢測同屬病毒之 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) 及 *Cucumber necrosis virus* (CNV)。CymRSV 為 *Tombusvirus* 屬成員，目前於國內未發生而被歸類為有害生物必需檢疫之病毒，為強化對此

病毒之專一性診斷鑑定與進出口檢疫之監測能力以預防機先，本研究針對 CymRSV 開發其診斷鑑定檢測試劑，包括核酸分子檢測用引子對及免疫檢測用之病毒多元抗體，以建立自主檢測技術，強化對此病毒之監測體系。

## 材料與方法

### CymRSV 正對照品材料來源

*Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) 為國外已發生之病毒，目前國內尚未有此病毒之發生紀錄。本研究之 CymRSV 核酸正對照品分別來自 (1) 購買市售 CymRSV RNA 商品 (德國 DSMZ 出品)；(2) 委託波仕特生物科技股份有限公司 (台北市，台灣) 進行基因合成於 pUC57 質體上 (pUC57-CyRCP)，包含有全長度鞘蛋白 (coat protein, CP) 之 1140 個核苷酸 (nucleotide, nt) 序列以及 2 種限制酶切位 (5' 端之 *Nco*I、3' 端之 *Sac*I 切位)。免疫檢測用之 CymRSV 正對照品乃購自市售之 CymRSV 蛋白 (德國 DSMZ 及美國 Agdia 公司出品)。

### 反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及核酸引子對

本試驗設計 RT-PCR 檢測用引子對，乃參考已發表於美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 所登錄之 CymRSV 序號 (AY500885、NC003532 及 X15511) 加以比對分析後，設計 2 組引子對，其一可增幅全長度 CP 基因及包含其兩端核酸序列之引子對 CyRcpu/CyRcpd (5'TCGTCTGGATAGATGGGAGAT 3'/5'AACATT CACTGTCAGCTTGTT 3')，增幅片段預估約 1370 bp；另一引子對 CyRu/CyRd (5' CGGTGGCRATMTCTAGRAT 3'/5' GAAGGTWACTGTGTAGTGGA 3') 為依據 CP 高保留區所設計之簡併式引子對，可增幅片段預估約 540 bp。

RT-PCR 進行步驟如下：(1) 受測樣品植物組織全量核酸之純化，本試驗依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini

Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行供試植物全量 RNA 之萃取；(2) RT-PCR 增幅核酸片段，以市售 DSMZ-CymRSV RNA 或植物全量 RNA 為模版，利用 CyRcpu/CyRcpd 或 CyRu/CyRd 引子對分別於反應管中進行反應。

RT-PCR 乃以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Co. Ltd., Taichung, Taiwan) 做為反應試劑，於總體積為 25  $\mu$ L 之反應管中，混合有下列成分包括 1  $\mu$ L RNA、5  $\mu$ L 之 5 $\times$  RT Reaction buffer、5  $\mu$ L 之 5 $\times$  Enhancer buffer、0.5  $\mu$ L 之 RT Enzyme mix、0.1  $\mu$ L RNase Block、11.4  $\mu$ L 之 Nuclease free water、10  $\mu$ M 之受測病毒引子各 1  $\mu$ L，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。反應條件為 50 $^{\circ}$ C 下進行反轉錄反應 30 min，再以 94 $^{\circ}$ C 下變性 50 s，所獲得之反轉錄核酸繼續進行 PCR 反應，條件如下：94 $^{\circ}$ C 下變性 50 s，60 $^{\circ}$ C 下煉合 50 s，72 $^{\circ}$ C 下聚合 2 min 為一循環，共進行 30 個循環，最後一個步驟以 72 $^{\circ}$ C 聚合 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

本試驗另以 CyRu/CyRd 引子對與其他已報導可感染蘭花之 9 種病毒種類，於 60 $^{\circ}$ C 煉合溫度下進行 RT-PCR 反應中，選用之病毒來源乃保存於本研究室之罹病組織，包括蘭花之 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 和 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)；彩色海芋之 *Cucurbit mosaic virus* (CMV)、*Dasheen mosaic virus* (DsMV) 和 *Turnip mosaic virus* (TuMV)、康乃馨之 *Carnation mottle virus* (CarMV)、落葵之 *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV)、豇豆之 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)。

### 反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (Reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 及引子組設計

以對應 CymRSV-CP 核苷酸序列為模板，依

據日本 EIKEN 公司之引子對設計軟體 (LAMP primer designing software PrimerExplorer, EIKEN Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japan) 進行可應用於 RT-LAMP 反應之引子對共 4 條，分別為 CyR-FIP (5' GCCCAGCGTTAGCTGA ACCAGTCCTTCTACGAACCGCAACCG 3')、CyR-BIP (5' TGTGGCTACCACAGC-CACGACGCCCTTTCACCATTGAGAC 3')、CyR-F3 (5' ACAAACGCAGTGGGTGACTT 3') 和 CyR-B3 (5' GCGTTACTCCCGTGAAG GTT 3')。取 DSMZ-CymRSV RNA 或受測樣品之全量核酸為模板，依據市售 RT-LAMP 試劑組條件 (RNA Amplification Kit, EIKEN Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japan) 進行反應，每一反應管 (總量 25  $\mu\text{L}$ ) 含有 1  $\mu\text{L}$  核酸模板、各 2  $\mu\text{L}$  之 40 pmol FIP 及 BIP 引子、各 0.25  $\mu\text{L}$  之 5 pmol F3 及 B3 引子、12.5  $\mu\text{L}$  之 2 $\times$  Reaction mix、1  $\mu\text{L}$  之 Enzyme mix、1  $\mu\text{L}$  之 Fluorescent dye 及 5  $\mu\text{L}$  之 Nuclease free water；反應條件於 65 $^{\circ}\text{C}$  下增幅 60 min 後，再經 95 $^{\circ}\text{C}$  終止反應 2 min。反應結果以 1.5% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA) 進行分析判讀結果，並以目視法觀察綠螢光之有無加以判讀，反應液有呈現螢光者為正反應，可進一步以離心法觀察正反應者有白色沉澱。

本試驗另以此 4 條引子組與上述已報導之其他 9 種蘭花病毒種類，於 65 $^{\circ}\text{C}$  黏合溫度下進行 RT-LAMP 反應。

### RT-PCR 與 RT-LAMP 之檢測敏感度比較

將市售之 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品以無菌水進行 5 $\times$  系列稀釋後，取各個稀釋倍數之核酸各 1  $\mu\text{L}$  做為模板，分別以 RT-PCR 及 RT-LAMP 之個別適合反應條件進行核酸增幅與判別反應結果。

### CymRSV 鞘蛋白選殖、融合性蛋白表現及多元抗體製備

以帶有全長度 CymRSV-CP 核酸序列之 pUC57-CyRCP 為模板，將其核酸以 *NcoI/SacI* 限制酶酵素切割後，將 CymRSV-CP 基因選殖於以同樣酵素切割並回收之表現載體 pET28b

(+) (Novagen, Inc. Madison, WI, USA) 上，獲得一選植株 pETCyRCP，並將其質體轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 宿主內進行 CymRSV-CP 之表現。轉型株以 M9 培養基中 (Li *et al.* 1998) 於 37 $^{\circ}\text{C}$  下培養約 2–3 h 後，加入 1 mg mL<sup>-1</sup> 之 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質表現 (Chen *et al.* 2002)。經 4 h 之 IPTG 誘導培養後，取菌液以 5.9 $\times$  g 轉速離心 10 min，取其沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 之緩衝液溶解均勻，並進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳，以分析表現蛋白之分子量。選用確定有預估大小約 41.8 kDa 表現蛋白之選植株進行大量培養以純化表現蛋白，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL<sup>-1</sup> 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (桃園市，台灣) 進行免疫注射以製備多元抗體。

### 自製 CymRSV-CP 多元抗體之免疫檢測效果評估

將兔免疫所得之 CymRSV 多元抗體 (#189) 純化其免疫球蛋白 (Immunoglobulin; IgG) 後，進行 indirect ELISA 及西方墨點法 (western blotting)，並與兩種市售 (Agdia 和 DSMZ) CymRSV 多元抗體比較對正對照品之檢測效果，以評估自製之 CymRSV#189 抗體之有效性。

本試驗另以 CymRSV#189 抗體與上述已報導之其他 9 種蘭花病毒種類，於上述兩種免疫檢測法中進行反應，以評估此抗體對於 CymRSV 之專一性檢測效果。相關免疫檢測法之步驟詳述如下：

**Indirect ELISA 法：**本方法乃參照以往研究報告進行 (Clark & Adams 1977; Chen *et al.* 2013)。反應步驟如下：(1) 病組織覆膜反應：取新鮮葉片 0.1 g 磨碎，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 混合，取組織液添加於 96 孔 ELISA 反應盤中 (100  $\mu\text{L}$  孔<sup>-1</sup>)，每樣品 2 個重複，置於 37 $^{\circ}\text{C}$  生長箱 4 h (或 4 $^{\circ}\text{C}$  隔夜)；然後以 1 $\times$  PBST (137 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>H-

PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：以自製之 CymRSV #189 免疫球蛋白 (IgG) 其 1,000× 稀釋反應液，添加於各反應孔中 (100 μL 孔<sup>-1</sup>)，於 25°C 定溫反應 3–4 h (或 4°C 隔夜)，之後以 1× PBST 沖洗 3 次；市售多元抗體則參照抗體使用濃度說明進行之；(3) 與二次抗體反應：加入已稀釋 6,000× 之鹼性磷酸酶酵素連結山羊抗兔 IgG (AP-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA)，100 μL 孔<sup>-1</sup>，置於 25°C 之定溫箱反應 3–4 h；再以 1× PBST 沖洗液沖洗 3 次；(4) 呈色反應：加入濃度為 1 mg mL<sup>-1</sup> 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-Nitrophenyl phosphate, p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Ohio, USA)，150 μL 孔<sup>-1</sup>，反應 40–50 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。樣品吸光值大於 2 倍健康葉片吸光值者，判讀為檢出病毒之正反應。

西方墨點法：取 0.1 g 待測樣品置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮磨碎，加入 200 μL dissociation buffer (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-Mercaptoethanol) 混勻。再加入 200 μL 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混合後，於熱水中悶熱 3–5 min，以 5.9× g 離心 5 min 後取適量上清液進行電泳分析。取電泳完之 SDS-PAGE 膠體，轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，並與自製 CymRSV#189 多元抗體或市售抗體進行免疫反應。

### 自製和市售 CymRSV 多元抗體檢測蘭花樣品之比較

對於蘭花樣品檢測效果之比較，取蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.)、文心蘭 (*Oncidium* spp.)、小花蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 及嘉德麗雅蘭 (*Cattleya* spp.) 等 4 種不同蘭花種類樣品，分別與自製抗體 CymRSV#189 和兩種市售抗體 (Agdia 和 DSMZ 出品) 反應，並將於 indirect ELISA 中與 Agdia 多元抗體有產生正反應之蘭花樣品，再以西方墨點法

測試其與 CymRSV#189、CymRSV-Agdia 和 CymRSV-DSMZ 抗體之反應；並以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 測試，由是否獲得預估 540 bp 之核酸產物片段，以佐證免疫檢測法之檢測結果。

## 結果

### RT-PCR 檢測

本研究於可涵蓋 CymRSV-CP 基因全長其及兩端部分核酸之區域所設計之引子對 (CyRcpu/CyRcpd)，以及針對 CP 核酸高保留區設計之引子對 (CyRu/CyRd)，於 RT-PCR 法中均可成功檢測到市售 DSMZ-CymRSV RNA 之標準對照品，增幅出之產物分子量分別為 1,370 bp (圖 1A) 與 540 bp (圖 1B) 之核酸片段，均與預期之大小相符；進一步選殖此等核酸片段並定序分析後，確屬 CymRSV 之核酸序列無誤 (結果未出示)。另以 CyRu/CyRd 引子對與其他已報導可以感染蘭花之其他 9 種病毒，於 60°C 煉合溫度下之 RT-PCR 反應中，均不與 CymMV、ÓRSV、CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 之核酸模板產生反應 (圖 2A)。

### RT-LAMP 及 RT-PCR 法之檢測敏感度比較

本研究以 RT-LAMP 檢測法，針對 CymRSV-CP 核酸區域所設計的 CyR-FIP、CyR-BIP、CyR-F3 及 CyR-B3 引子組，可於 65°C 恆溫條件下反應 1 h 後，成功進行此病毒核酸分子之擴增反應，電泳分析市售 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品可見其增幅產物 (圖 3A 上)，以目視法可觀察到 CymRSV 之正對照品有螢光表現以及白色沉澱，而健康對照品則無上述反應 (圖 3A 下)。對於以 5× 系列稀釋之 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品，以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 檢測，可檢出已稀釋 5<sup>-4</sup>× 之核酸 (圖 3B)，而以 RT-LAMP 可成功檢測已稀釋 5<sup>-6</sup>× 之核酸 (圖 3C)。此結果顯示對於 CymRSV 之核酸檢測，以 RT-LAMP 法有高於 RT-PCR 檢測的 25 倍靈敏度。本研究另以 RT-LAMP 引子組與國內已報告之 9 種蘭花

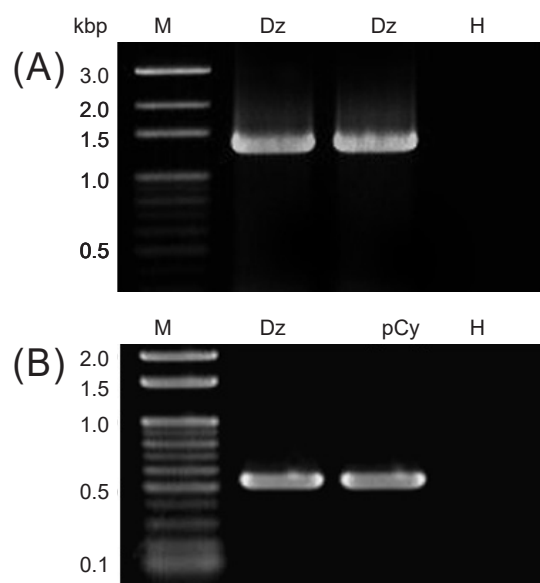


圖 1. CymRSV 引子對進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 之電泳分析結果。(A) 以 CyRcpu/CyRcpd 引子對進行 1,370 bp 全長度鞘蛋白核酸之增幅；(B) 以 CyRu/CyRd 引子對進行 CymRSV 鞘蛋白區域內之 540 bp 核酸片段之增幅。行 M：100 bp DNA 標準標識；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；行 pCy：pUC57-CyRCP 標準品；行 H：健康蝴蝶蘭組織。

**Fig. 1.** Amplification results of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV). (A) An expected 1,370-bp DNA fragment was amplified from the commercial DSMZ-CymRSV RNA by the CyRcpu/CyRcpd primer pair; (B) A 540-bp DNA fragment was amplified from the DSMZ-CymRSV RNA and artificial synthesized nucleotide fragment coding for viral coat protein (pUC57-CyRCP) by the CyRu/CyRd primer pair. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; lane pCy, the pUC57-CyRCP positive control; and lane H, the total RNA of the healthy orchid tissue.

病毒包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMV、BaRMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 罹病組織全量核酸進行反應，均無螢光正反應 (結果未出示)，顯示此引子組可用以鑑別蘭花上之 CymRSV 病毒。

### CymRSV 表現蛋白及其多元抗體檢測評估

本研究針對 CymRSV-CP 全長度核酸片段所選殖之 pETCyRCP 選植株，於 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內經由 IPTG 誘導大量之融合性表現蛋白 (BEP189)，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 BEP189 表現蛋白之分子量大約為 41.8 kDa，與預估值相符且為不帶有 CymRSV-CP 之 pET28b 表現載體所有 (圖 4A)。將 BEP189 表現蛋白為抗原所製備出之多元抗體 (#189) 於西方墨點法中，此抗體除

可同源之 41.8 kDa 表現蛋白產生正反應外，也與市售之 CymRSV-DSMZ 正對照品於預估之病毒分子量 41 kDa 產生正反應 (圖 4B)；且 Agdia (圖 4C) 及 DSMZ (圖 4D) 兩種市售之 CymRSV 多元抗體也均可與分子量約 41.8 kDa 之 BEP189 表現蛋白產生正反應，此等交叉反應結果顯示，本研究之 CymRSV-BEP189 表現蛋白可做為 CymRSV 免疫檢測之正對照品，且以其為抗原所製備出之多元抗體 (#189)，可成功應用於西方墨點法進行 CymRSV 之檢測。

而於 indirect ELISA 反應中，DSMZ 及 Agdia 兩種市售之 CymRSV 多元抗體對於表現蛋白 BEP189 之反應值分別為 0.49 及 0.50，均為正反應讀值；而 #189 抗體與同源之表現蛋白、DSMZ 及 Agdia 出品之兩種市售正反應對照品之 ELISA 讀值均為正反應值，平均值

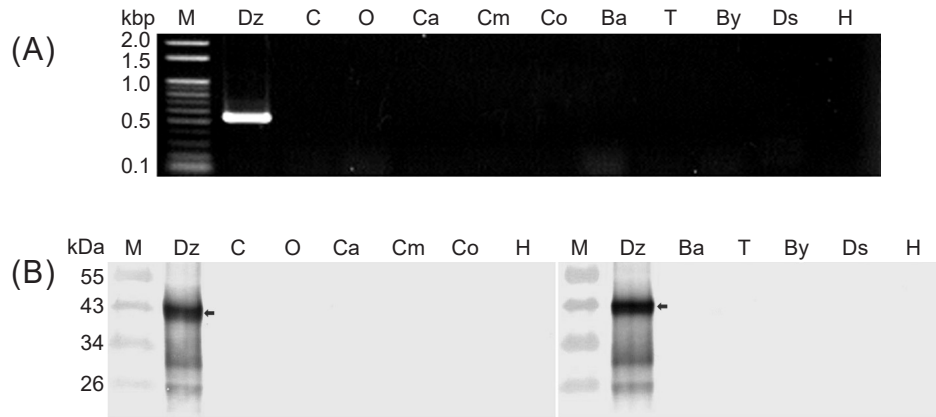


圖 2. 自製之引子對及多元抗體對 CymRSV 之專一性檢測效果。(A) 利用 CyRu/CyRd 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 中進行不同病毒之核酸分子檢測。行 M：100 bp DNA 標準標幟；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；(B) 西方墨點法分析，受測樣品與 CymRSV#189 抗體反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 Dz：市售 CymRSV-DSMZ 蛋白標準品；行 C：*Cymbidium mosaic virus* (CymMV)；行 O：*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)；行 Ca：*Capsicum chlorosis virus* (CaCV)；行 Cm：*Cucumber mosaic virus* (CMV)；行 Co：*Carnation mottle virus* (CarMV)；行 Ba：*Basella rugose mosaic virus* (BaRMV)；行 T：*Turnip mosaic virus* (TuMV)；行 By：*Bean yellow mosaic virus* (BYMV)；行 Ds：*Dasheen mosaic virus* (DsMV)；行 H：健康蝴蝶蘭組織。箭頭所指為 CymRSV-CP。

**Fig. 2.** The efficiencies of designed primers and prepared polyclonal antibody on detecting CymRSV specifically. (A) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the different viruses by the CymRSV primer pair-CyRu/CyRd. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; (B) Western blotting assay, the tested samples were reacted with the CymRSV#189 antibody. Lane M, protein markers; lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein; lane C, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV); lane O, *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV); lane Ca, *Capsicum chlorosis virus* (CaCV); lane Cm, *Cucumber mosaic virus* (CMV); lane Co, *Carnation mottle virus* (CarMV); lane Ba, *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV); lane T, *Turnip mosaic virus* (TuMV); lane By, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV); lane Ds, *Dasheen mosaic virus* (DsMV); and lane H, the healthy tissue of orchid. The CymRSV-CP is indicated by an arrow.

分別為 2.31、2.75 及 2.40。

上述結果顯示於兩種免疫檢測中，自製之 CymRSV#189 抗體可與其同源抗原 CymRSV-BEP189 表現蛋白以及市售之標準 CymRSV 病毒蛋白對照品產生正反應；此外，CymRSV#189 抗體與其他 9 種蘭花病毒包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMoV、BaRMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 等之寄主罹病組織抗原於 indirect ELISA 反應讀值均在 0.03–0.10 之間，均為負反應值；且於西方墨點法中也不與 CymMV 等其他 9 種受測病毒產生正反應 (圖 2B)。此等結果顯示在蘭花病毒檢測上，自製之 CymRSV#189 抗體於 indirect ELISA 和西方墨點法兩種免疫檢測反應中，具有對 CymRSV 檢測之專一性。

### 自製和市售 CymRSV 多元抗體檢測蘭花樣品之比較

本研究以 indirect ELISA 法針對不同來源之蘭花種類進行 CymRSV 之實際檢測效果，以自製之 CymRSV#189 抗體及 DSMZ 和 Agdia 兩種市售之多元抗體進行檢測比較。結果顯示，於 indirect ELISA 檢測中，Agdia 多元抗體可與正反應對照品及受測之蘭花樣品產生正反應讀值 (表 1)，其中包括 7 個蝴蝶蘭樣品之 ELISA 讀值介於 0.39–0.59 之間，12 個文心蘭樣品讀值介於 0.24–0.79 之間，9 個小花蕙蘭樣品讀值介於 0.24–0.83 之間，6 個嘉德麗雅蘭樣品讀值介於 0.94–1.31 之間；然而，#189 和 DSMZ 多元抗體僅與正對照標準品產生正反應讀值，與上述受測樣品均為負反應讀值。

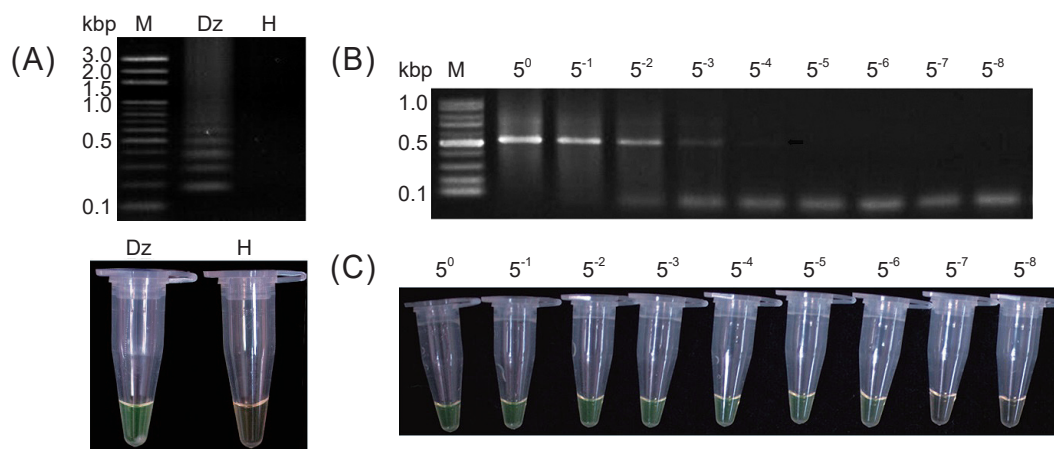


圖 3. 以反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 及反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 對檢測 CymRSV 之敏感度比較。(A) RT-LAMP 正反應者之電泳分析產物 (上) 及目視反應液有螢光及白色沉澱 (下)。行 M：100 bp DNA 標準標幟；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；行 H：健康蝴蝶蘭組織。(B) 以 CyRu/CyRd 引子對於 RT-PCR 檢測中，可檢測到稀釋  $5^{-4}$  倍之 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；箭頭所指為 540 bp 之核酸增幅產物。(C) 以 CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3 引子組於 RT-LAMP 檢測法中，可檢測到稀釋  $5^{-6}$  倍之 DSMZ-CymRSV RNA 標準品。行 M：100 bp DNA 標準標幟。

**Fig. 3.** Comparison of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on the sensitivity for detecting CymRSV. (A) The amplicon of RT-LAMP was analyzed by agarose gel electrophoresis (upper panel) and the amplification result of fluorescent with white precipitate was observed by naked eyes (lower panel). Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; and lane H, the healthy tissue of orchid. (B) The  $5^{-4}$  dilution of the commercial positive control of DSMZ-CymRSV RNA was detected by CyRu/CyRd primers in RT-PCR. The expected 540-bp amplicons are indicated by an arrow. (C) The  $5^{-6}$  dilution of the commercial positive control of DSMZ-CymRSV RNA was detected by CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3 primer set in RT-LAMP. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker.

上述以 Agdia 抗體檢出正反應者，進一步以西方墨點法檢測結果顯示，#189、DSMZ 和 Agdia 等多元抗體均無檢出受測蘭花樣品之 CymRSV 病毒蛋白分子條帶 (41 kDa)，但 Agdia 多元抗體則普遍與上述 4 種蘭花樣品於大約 24–25 kDa 處有非專一性條帶 (圖 5)，此等樣品進一步以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 檢測，並未出現 540 bp 之核酸片段條帶 (表 1)，顯示於 indirect ELISA 免疫檢測法中，由 Agdia 抗體所檢出之正反應者，乃屬偽陽性反應。

## 討論

本研究針對國內尚未發生之檢疫病毒 CymRSV 所研製之 RT-PCR 檢測用引子對，以及 RT-LAMP 引子組均可專一性檢出 CymRSV；此外，自製之多元抗體 CymRSV#189，其與市

售之標準正對照品和多元抗體比較後，顯示可成功應用於 indirect-ELISA 及西方墨點法兩種免疫檢測法中進行 CymRSV 之專一性檢測。於蘭花上對此病毒之監測，以 indirect-ELISA 再配合 RT-PCR 法或 RT-LAMP 之輔助鑑定，可確保對此病毒診斷鑑定的正確性。

本研究所設計之 CyRu/CyRd 引子對，於 60°C 煉合溫度下進行 RT-PCR，並未與蘭花常見病毒 CymMV 和 ORSV 產生反應，也與文獻上已知可感染蘭花之其他病毒包括 CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 病毒核酸不產生反應 (圖 2A)，顯示以 RT-PCR 法可有效檢出 CymRSV。本研究針對 CymRSV 所建立之 RT-PCR 法，可專一性檢測 CymRSV，為首度開發應用於蘭花樣品上對此病毒之監測用途者。

本研究應用 RT-LAMP 於 CymRSV 檢測，

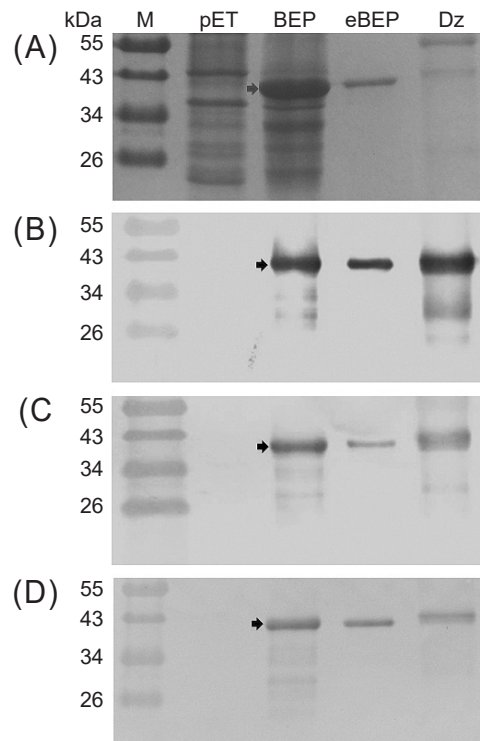


圖 4. 應用細菌大量表現之 CymRSV 融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) CymRSV 融合性表現蛋白 (41.8 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與自製之 CymRSV#189 多元抗體 (B)、Agdia 公司 (C) 及 DSMZ (D) 出品之 CymRSV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28b(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白；行 Dz：市售 CymRSV-DSMZ 蛋白標準品。箭頭所指為 CymRSV-CP 表現蛋白。

**Fig. 4.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of CymRSV. (A) A 41.8-kDa bacterial-expressed fusion protein of CymRSV-CP was observed in the SDS-PAGE assay. The polyclonal antibody #189 prepared in this study (B), and the purchased polyclonal antibodies from Agdia (C) and DSMZ (D) were used to react with the bacterial-expressed CymRSV-CP. Lane M, protein markers; lane pET, IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28b(+) without CymRSV-CP insert; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with CymRSV-CP insert; lane eBEP, the purified bacterial-expressed CymRSV-CP; and lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein. The target proteins are indicated by arrows.

可有高於 RT-PCR 法 25 倍之敏感度，可藉此提昇對 CymRSV 之檢出效率。LAMP 核酸檢測法於 2000 年由日本研發，乃利用 *Bst* DNA polymerase，在 65°C 左右的恆溫環境下進行核酸增幅，不需 95°C 的高溫處理以解開雙股 DNA 模板。針對 6 個區域以 4 條引子對進行核酸增幅，可讓 DNA 增幅成為長鍊狀並形成環型構造，並釋放出焦磷酸根 (pyrophosphate) 和反應溶液中的鎂離子形成不溶於水的焦磷酸鎂，而產生肉眼可見的白色混濁色，判斷反應結果 (Notomi *et al.* 2000)，或可搭配螢光

試劑染色加強判讀。針對 RNA 核酸，亦可於恆溫中一次進行單步驟 RT-LAMP 增幅反應。此技術可於單一恆溫條件下縮短核酸增幅反應時間，且專一性與靈敏度都比傳統 PCR 法為高，能直接以肉眼判斷反應結果，適合用於快篩檢測，為相當具有潛力的簡易核酸檢測技術，近年來已逐漸被學術界高度重視，並有許多用於動植物病原檢測的報告陸續產出 (Savan *et al.* 2005; Huang *et al.* 2010, 2014; Fukuta *et al.* 2013; Przewodowska *et al.* 2015; Tasi *et al.* 2016)。LAMP 或 RT-LAMP 應用於植物

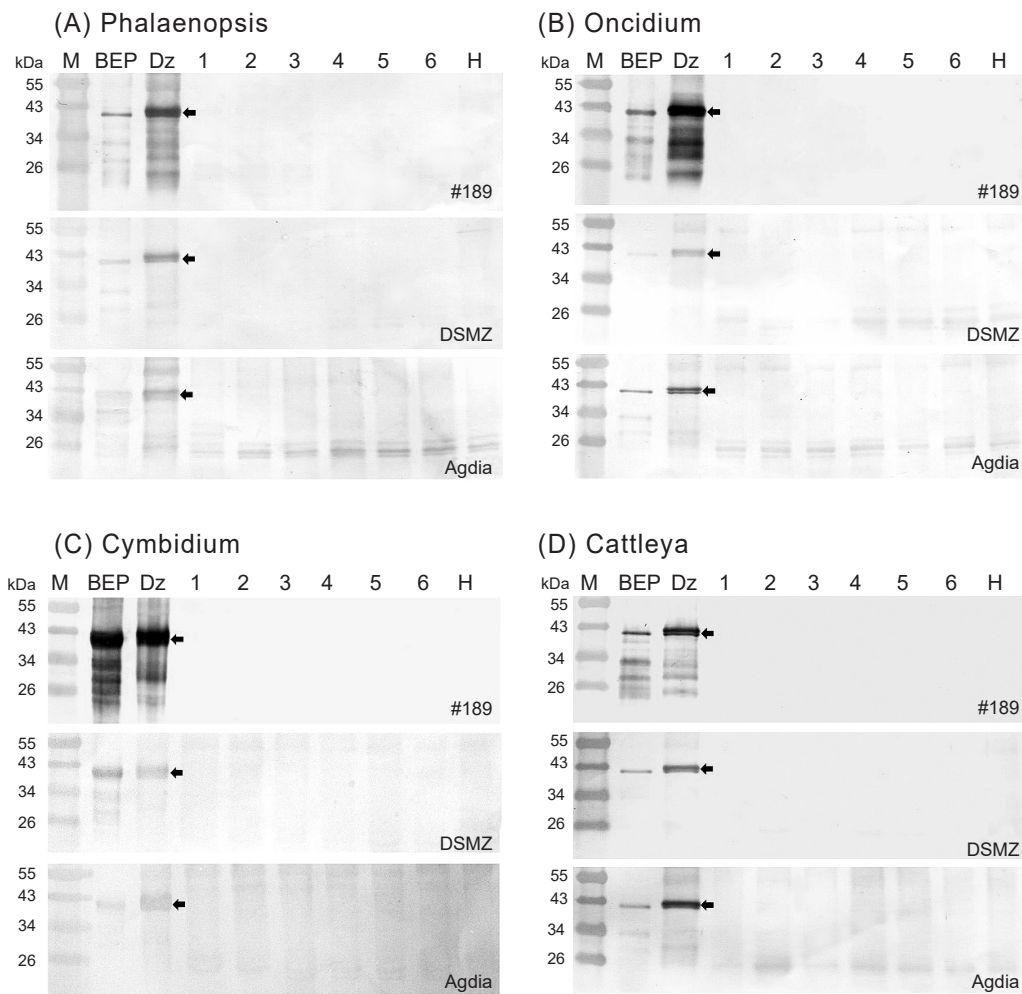


圖 5. 以西方墨點法分析不同蘭花樣品之 CymRSV。蝴蝶蘭 (A)、文心蘭 (B)、小花蕙蘭 (C) 和嘉德麗雅蘭 (D) 等受測樣品乃於 indirect ELISA 檢測中與 CymRSV-Agdia 抗體產生正反應者。分別與自製之 CymRSV#189 多元抗體、市售 CymRSV 多元抗體 (DSMZ 及 Agdia 公司出品) 進行反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 CymRSV-CP；行 Dz：市售 CymRSV-DSMZ 蛋白標準品；行 H：健康蘭花組織。箭頭所指為 CymRSV-CP。

**Fig. 5.** Western blotting assays for detection of CymRSV from different orchids. The samples of Phalaenopsis (A), Oncidium (B), Cymbidium (C) and Cattleya (D) positively reacted to CymRSV-Agdia antibody in indirect ELISA were further tested in western blotting assay using the polyclonal antibody #189 prepared in this study and two commercial antibodies purchased from the DSMZ and Agdia companies. Lane M, protein markers; lane BEP, the IPTG-induced bacterial cell lysates containing the expressed CymRSV CP; lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein; lane 1-6, the different tested samples; and lane H, the healthy tissue of orchid. The expected CymRSV-CP is indicated by arrows.

DNA 或 RNA 病毒以及類病毒方面已有許多成功之例，包括有 *Potato virus Y* (PVY) (Nie 2005; Zhao *et al.* 2012)、*Cucumber mosaic virus* (CMV) (Zhao *et al.* 2012)、*Tomato spotted wilt virus* (Fukuta *et al.* 2004)、*Banana*

*bunchy top virus* (BBTV) (Peng *et al.* 2012)、*Plum pox virus* (Varga & James 2006)、*Melon yellow spot virus* (Kuwabara & Sakai 2008)、*Chrysanthemum virus B* (Fukuta *et al.* 2005)、*Japanese yam mosaic virus* (Fukuta *et al.*

表 1. 以自製和市售 CymRSV 多元抗體於間接式 - 酵素連結免疫吸附反應法中檢測不同蘭花之比較。

**Table 1.** Comparison of the results for detecting CymRSV from different orchids in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) using the self-produced and commercial polyclonal antibodies.

Orchid sample	ELISA reading ( $A_{405nm}$ ) <sup>z</sup>			RT-PCR <sup>y</sup>
	#189	DSMZ	Agdia	
Phalaenopsis 1	0.03	0.01	0.45	-
Phalaenopsis 2	0.03	0.01	0.51	-
Phalaenopsis 3	0.02	0.01	0.42	-
Phalaenopsis 4	0.04	0.02	0.49	-
Phalaenopsis 5	0.02	0.01	0.49	-
Phalaenopsis 6	0.04	0.02	0.59	-
Phalaenopsis 7	0.03	0.01	0.39	-
D-CK <sup>x</sup>	2.76	2.92	2.73	+
2 H-CK	0.13	0.05	0.29	-
Oncidium 1	0.08	0.07	0.37	-
Oncidium 2	0.08	0.04	0.27	-
Oncidium 3	0.10	0.06	0.29	-
Oncidium 4	0.06	0.06	0.26	-
Oncidium 5	0.06	0.06	0.52	-
Oncidium 6	0.08	0.06	0.41	-
Oncidium 7	0.09	0.07	0.25	-
Oncidium 8	0.07	0.05	0.42	-
Oncidium 9	0.11	0.07	0.24	-
Oncidium 10	0.06	0.06	0.25	-
Oncidium 11	0.06	0.04	0.66	-
Oncidium 12	0.03	0.01	0.79	-
D-CK	3.81	3.92	2.52	+
2 H-CK	0.22	0.17	0.23	-
Cymbidium 1	0.05	0.02	0.34	-
Cymbidium 2	0.06	0.04	0.24	-
Cymbidium 3	0.05	0.03	0.24	-
Cymbidium 4	0.05	0.02	0.24	-
Cymbidium 5	0.06	0.03	0.39	-
Cymbidium 6	0.05	0.02	0.83	-
Cymbidium 7	0.05	0.02	0.51	-
Cymbidium 8	0.08	0.02	0.41	-
Cymbidium 9	0.05	0.03	0.36	-
D-CK	2.34	2.77	2.51	+
2 H-CK	0.10	0.08	0.20	-
Cattleya 1	0.09	0.03	0.94	-
Cattleya 2	0.08	0.03	1.15	-
Cattleya 3	0.08	0.02	1.23	-
Cattleya 4	0.07	0.03	1.27	-
Cattleya 5	0.10	0.03	1.31	-
Cattleya 6	0.08	0.02	1.11	-
D-CK	3.08	3.45	3.27	+
2 H-CK	0.14	0.06	0.79	-

<sup>z</sup> The polyclonal antisera to CymRSV prepared in this study (#189), and purchased from DSMZ and Agdia companies were used for comparison. The ELISA readings higher than two times of the healthy control's (2H-CK) were determined as positive results.

<sup>y</sup> RT-PCR was conducted by the CymRSV primer pair CyRu/CyRd. +, A 540-bp DNA fragment was amplified; -, no predicts were produced.

<sup>x</sup> D-CK: the ELISA-positive control of CymRSV purchased from DSMZ.

2003)、*Potato leafroll virus* (Ahmadi *et al.* 2013)、*Wheat yellow mosaic virus* (Zhang *et al.* 2011)、*Peach latent mosaic viroid* (Bourakos *et al.* 2009) 等數十種以上。蘭花常見病毒 CymMV 和 ORSV 於近期也已開發出 RT-LAMP 檢測技術 (Lee *et al.* 2011; Tsai *et al.* 2016)，本研究針對 CymRSV 所開發之 RT-LAMP 檢測法，為首度證實 RT-LAMP 可應用於此病毒之快速檢測，且其敏感度高於 RT-PCR，並具有對 CymRSV 檢測之專一性效果，未來可輔助對此病毒之監測或診斷鑑定之需。

RT-PCR 法具有高於 ELISA 檢測敏感度之優點，可更精準地檢出病毒，在蘭花病毒之檢測上已有許多開發與應用實例 (Wong *et al.* 1994; Jeong *et al.* 2001)；然而，ELISA 適用於大量樣品檢測或病毒發生調查之大量篩檢。而 CymRSV 多元抗體試劑在國際上目前至少有 Agdia (Agdia Inc., USA)、AC (AC Diagnostics Inc., USA) 及 DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Germany) 等品牌之市售試劑可購買使用，本研究選用 Agdia 及 DSMZ 之多元抗體做為對照，用以比較自製的 CymRSV#189 抗體之實際檢測效果。綜合 indirect ELISA、RT-PCR 及西方墨點法之檢測結果顯示，CymRSV-Agdia 與蝴蝶蘭、文心蘭、小花蕙蘭及嘉德麗雅蘭等蘭花組織會產生偽陽性結果 (表 1、圖 5)；而 CymRSV#189 與 CymRSV-DSMZ 對於正對照品以及不同蘭花種類之 indirect ELISA 檢測結果較相符，於西方墨點法中 CymRSV#189 無偽陽性現象。且 CymRSV#189 於此兩種免疫檢測法中並不與其他 9 種蘭花病毒 (包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV) 產生非專一性反應，預期在蘭花樣品上具有對 CymRSV 之檢測專一性；整體而言，於 indirect ELISA 和西方墨點法中，CymRSV#189 對 CymRSV 或蘭花健康組織之鑑別效果等同於市售 CymRSV-DSMZ 多元抗體者，顯示本研究自製之 CymRSV#189 多元抗體適用於 indirect ELISA 及西方墨點法中對 CymRSV 之免疫檢測。

市售 CymRSV-Agdia 以 DAS-ELISA kit 為主要檢測方式，本研究僅購買其 coating IgG 做為 indirect ELISA 之檢測，在本研究中會與蘭花組織呈現非專一性之偽陽性反應，可能是其對 CymRSV 之檢測不適用於 indirect ELISA 法所致。然而，indirect ELISA 具有可減少使用抗體而節省檢測成本之優點，本研究自製之 CymRSV#189 多元抗體以 indirect ELISA 法即可達到專一性檢出 CymRSV 的效果，可在節省抗體用量上達到對病毒之檢測效益。

Elliott *et al.* (1996) 以 ELISA 法及市售 CymRSV 多元抗體 (Agdia 出品提供) 針對不同蘭花病毒進行 ELISA 免疫檢測法之篩選時也曾發現，部分樣品之 ELISA 讀值有高於 2 倍健康對照者，理應為正反應讀值的判讀結果，但進一步以機械接種法確認其檢出有 CymRSV 之樣品並不會感染受測寄主，因此仍判定所檢出之正反應值非由 CymRSV 所致，並因此表示對於病毒之檢測必須至少有 2 種方法之輔助檢測結果較為具體。本研究所開發之不同檢測技術，也證實可強化對 CymRSV 之正確檢測。

以往為解決病毒特性不穩定或不易純化而造成檢測試劑不易製備之瓶頸，可直接從罹病組織中純化出含有病毒核酸之植物全量核酸，再以可包含全長度病毒鞘蛋白基因之核酸引子對配合 RT-PCR 增幅法直接增幅出病毒之鞘蛋白基因後，利用細菌表現蛋白系統，成功研製病毒抗原並製備抗體以因應病毒之免疫檢測，已見諸國內外許多研究成果 (Li *et al.* 1998; Lee & Chang 2008)。筆者等人以往應用此策略已完成夜來香微嵌紋病毒 (*Tuberosa mild mosaic virus*, TMMV) (Chen *et al.* 2002)、海芋潛隱病毒 (*Calla lily latent virus*; CLLV) (Chen *et al.* 2006)、及百合車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) (Chen *et al.* 2013) 等花卉病毒之檢測試劑而成功應用於進口種球 (苗) 之檢測。在本研究中，於未能取得 CymRSV 罹病植物組織檢體下，透過基因合成技術進行 CymRSV 已知核苷酸序列之人工合成，以及利用表現載體之細菌生

合成系統獲得多元抗體製備所需之病毒鞘蛋白抗原，突破無法取得病毒材料之瓶頸而成功製備出可有效檢測 CymRSV 之多元抗體，此抗原製備技術可解決對於國內尚未發生之檢疫病毒檢測之需要。尤其近年來國際貿易活動蓬勃發展，輸出入植物之檢疫問題為國際貿易之重要關鍵，對於國內尚未發生之檢疫病毒種類，可藉此建立可實用之檢測試劑，達到強化國內自主檢疫監測能力的目標。

本研究另以 CymRSV#189 和 CymRSV-DSMZ 兩種抗體，進行 indirect ELISA 檢測 268 個蝴蝶蘭、27 個文心蘭、14 個小花蕙蘭及 15 個嘉德麗雅蘭樣品，此 2 種抗體均未檢出 CymRSV。未來可持續以本研究所自製之抗體進行更多蘭花樣品對此病毒之監測，除可節省購買市售抗體之成本外，也同時可達到準確檢測之效果。

CymRSV 病毒自從 1963 於蕙蘭上被發現後，目前雖未再在蘭花種類上被發現 (Elliott *et al.* 1996; Siegmann *et al.* 1998; Freitas-As-tua *et al.* 1999)，僅侷限在歐洲地區，但其傳播途徑相當多元，對蘭花產業之影響存有潛在之風險；並且隨著國際貿易交流之活絡，透過種苗輸出入之途徑有可能引進境外發生之檢疫病毒風險，此發生風險見諸於百合 PIAMV 病毒之國際貿易傳播，已在美國、英國等地發現經由百合種球進口攜帶病毒之報告 (Anderson *et al.* 2013; Hammond *et al.* 2015)。因此，對於目前僅於國外發現偶發於蘭花上且被我國規範為檢疫有害生物之 CymRSV 而言，針對蘭花及其他可能寄主作物建立國內自主監測此病毒之能力相當重要，以能防範於未然。本研究研發之 CymRSV 核酸檢測及免疫檢測用多元抗體，可各就其檢測上之優點而相互輔助以鑑定 CymRSV，有效應用於此病毒之診斷鑑定與監測之需，進而強化對此病毒的自主監測管理能力。

## 誌謝

本研究部分經費由行政院農業委員會農業試驗所科技計畫 (重要檢疫病毒及花卉新發生病毒檢測試劑開發與應用；102 農科-10.2.1-

農-C5) 支助。本試驗承本組病毒研究室同仁劉星君小姐協助核酸檢測、黃美容小姐協助樣品採集及免疫檢測試驗、許家銘和王孝允先生協助病毒核酸檢測分析，謹此致謝。

## 引用文獻

- Ahmadi, S., M. A. Almasi, F. Fatehi, P. C. Struik, and A. Moradi. 2013. Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with hydroxynaphthol blue dye. *J. Phytopathol.* 161:120–124.
- Ali, R. N., A. L. Dann, P. A. Cross, and C. R. Wilson. 2014. Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids. *Arch. Virol.* 159:3095–3099.
- Anderson, H., A. Fox, S. Matthews-Berry, P. Reed, and A. Skelton. 2013. Rapid pest risk analysis for *Plantago asiatica mosaic virus*. <https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/downloadExternalPra.cfm?id=4074> (visit on 8/7/2017)
- Arunasalam, G. and M. N. Pearson. 1989. ELISA detection of *Odontoglossum ringspot virus* in mature plants and protocorms of *Cymbidium* orchids: Potential solutions to problems of sample preparation time and low virus concentration. *J. Phytopathol.* 126:160–166.
- Boubourakas, I. N., S. Fukuta, and P. E. Kyriakopoulou. 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 160:63–68.
- Chang, C. A., H. H. Lee, C. C. Chen, M. J. Lin, and C. P. Wang. 2003. Phytosanitary certification program of *Oncidium* seedlings and its future prospect to the development of ornamental industry in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 12:141–148. (in Chinese with English Abstract)
- Chang, C. A., Y. S. Tseng, C. C. Chen, and T. C. Deng. 1999. Detection of *odontoglossum ringspot tobamovirus* by DNA probe hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Pathol. Bull.* 8:29–36. (in Chinese with English Abstract)
- Chang, Y. C., S. C. Lee, and I. J. Lin. 2005. Development and application of a rapid detection method for the genus *Tombusvirus*. *Plant Pathol. Bull.* 14:41–50. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. *Bot. Stud.* 47:369–378.

- 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.
- Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method for the detection of *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:268–279. (in Chinese with English abstract)
- Choi, S. H., J. S. Hong, and K. H. Ryu. 2010. Early detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in tissue-cultured phalaenopsis plants. *Korean J. Hortic. Sci.* 28:103–107.
- Chung, S. Y., K. E. Yoon, K. H. Ryu, and W. M. Park. 1996. Detection of *Cymbidium mosaic virus* from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of the viral coat protein and 3'-non-coding region sequence. *Korean J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 37:158–165.
- 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.
- Elliott, M. S., F. W. Zettler, M. T. Zimmerman, O. W. Jr. Barnett, and M. D. LeGrande. 1996. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. *Plant Dis.* 80:1160–1164.
- Eun, A. J. C. and S. M. Wong. 1999. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* using immuno-capillary zone electrophoresis. *Phytopathology* 89:522–528.
- Eun, A. J., M. Seoh, and S. M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the Taqman real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 87:151–160.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. 2005. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, New York. 1162 pp.
- Freitas-Astua, J., J. A. M. Rezende, and E. W. Kitajima. 1999. Incidence of orchid viruses in the state of São Paulo, Brazil. *Fitopatol. Bras.* 24:125–130.
- Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, and M. Kanbe. 2004. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tomato spotted wilt virus* from chrysanthemum. *J. Virol. Methods* 121:49–55.
- Fukuta, S., M. Tamura, H. Maejima, R. Takahashi, S. Kuwayama, T. Tsuji, T. Yoshida, K. Itoh, H. Hashizume, Y. Nakajima, Y. Uehara, and Y. Shirako. 2013. Differential detection of *Wheat yellow mosaic virus*, *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* and *Chinese wheat mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods* 189:348–354.
- Fukuta, S., T. Iida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe, and Y. Ishimoto. 2003. Detection of *Japanese yam mosaic virus* by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 148:1713–1720.
- Fukuta, S., Y. Nimi, K. Ohishi, Y. Yoshimura, N. Anai, M. Hotta, M. Fukaya, T. Kato, T. Oya, and M. Kanbe. 2005. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of two viruses and chrysanthemum stunt viroid. *Ann. Rept. Kansai Pl. Prot.* 47:31–36. (in Japanese with English abstract)
- Grisoni, M., F. Davidson, C. Hyrondelle, K. Farreyrol, M. L. Caruana, and M. Pearson. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. *Plant Dis.* 88:119–124.
- Hammond, J., D. Bampi, and M. D. Reinsel. 2015. First report of *Plantago asiatica mosaic virus* in imported asiatic and oriental lilies (*Lilium* hybrids) in the United States. *Plant Dis.* 99:292.
- Hollings, M. and O. M. Stone. 1963. *Cymbidium ringspot* (a previously undescribed virus). p.90. *in: Glass House Crops Research Institute Annual Report.* Littlehampton, England. 146 pp.
- Hollings, M., and O. M. Stone. 1977. *Cymbidium ringspot virus.* CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 178. (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=178>) (visit on 9/6/2016)
- Hollings, M., O. M. Stone, and R. J. Barton. 1977. Pathology, soil transmission and characterization of *cymbidium ringspot*, a virus from *cymbidium* orchids and white clover (*Trifolium repens*). *Ann. Appl. Biol.* 85:233–248.
- Hu, J. S., S. Ferreira, M. Wang, and M. Q. Xu. 1993. Detection of *cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and *potyviruses* infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77:464–468.
- Hu, W. W. and S. M. Wong. 1998. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) in orchids. *J. Virol. Methods* 70:193–199.
- Huang, C. H. and Y. C. Chang. 2006. *Basella rugose mosaic virus*, a new potyvirus infecting *Basella rubra*. *Plant Pathol.* 55:819.
- Huang, C. H., G. H. Lai, M. S. Lee, W. H. Lin, Y. Y. Lien, S. C. Hsueh, J. Y. Kao, W. T. Chang, T. C. Lu, W. N. Lin, H. J. Chen., and M. S. Lee. 2010. Development

- and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anaemia virus. *J. Appl. Microbiol.* 108:917–924.
- Huang, Y. H., C. H. Chen, T. M. Hung, M. L. Wu, and T. T. Chang. 2014. Development of the detection method for tree brown root rot disease based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Plant Pathol. Bull.* 23:1–13. (in Chinese with English abstract)
- Jeong, J. H., D. C. Yan, and K. Y. Paek. 2001. Comparison of ELISA and RT-PCR for efficient diagnosis of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Cymbidium hoosai* Makino. *Korean J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42:336–340.
- Khentry, Y., A. Paradoruwat, S. Tantiwiwat, S. Phansiri, and N. Thaveechai. 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Prot.* 25:926–932.
- Kim, S. M. and S. H. Choi. 2015. Simultaneous detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in orchids using multiplex RT-PCR. *Virus Genes* 51:417–422.
- Koh, K. W., H. C. Lu, and M. T. Chan. 2014. Virus resistance in orchids. *Plant Sci.* 228:26–38.
- Kuwabara, K. and H. Sakai. 2008. Detection of *Melon yellow spot virus* (MYSV) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Ann. Rep. Kanto-Tosan Plant Prot. Soc.* 55:7–10.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lee, M. S., M. J. Yang, Y. C. Hseu, G. H. Lai, W. T. Chang, Y. H. Hsu, and M. K. Lin. 2011. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Cymbidium mosaic virus*. *J. Virol. Methods* 173:43–48.
- Lee, S. C. and Y. C. Chang. 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nad5* mRNA. *Plant Pathol. Bull.* 15:187–196. (in English with Chinese abstract)
- Lee, S. C. and Y. C. Chang. 2008. Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:297–306.
- 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.
- Liu, F. X., Y. C. Han, W. D. Li, X. Q. Shi, W. Xu, and M. G. Lin. 2013. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* affecting *Oncidium* orchids in Hainan Island, China. *Crop Prot.* 54:176–180.
- Lommel, S. A., A. H. McCain, and T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72:1018–1022.
- Nie, X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*. *Plant Dis.* 89:605–610.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:E63.
- Peng, J., J. Zhang, Z. Xia, Y. Li, J. Huang, and Z. Fan. 2012. Rapid and sensitive detection of banana bunchy top virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 185:254–258.
- Przewodowska, A., B. Zacharzewska, J. Chołuj, and K. Treder. 2015. A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Potato virus Y*. *Amer. J. Potato Res.* 92:303–311.
- Ryu, K. H., K. E. Yoon, and W. M. Park. 1995. Detection by RT-PCR of *Cymbidium mosaic virus* in orchids. *J. Phytopathol.* 143:643–646.
- Savan, R., T. Kono, T. Itami, and M. Sakai. 2005. Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens. *J. Fish Dis.* 28:573–581.
- Siegmann, B. J., M. S. Elliott, and F. W. Zettler. 1998. Relative incidences of CymMV, ORSV and CymRSV in commercial, private and public orchid collections. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 111:41–43.
- Tanaka, S., H. Nishii, S. Ito, M. Kameya-Iwaki, and P. Sommartya. 1997. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Dis.* 81:167–170.
- Tsai, C. C., C. Y. Huang, I. S. Weng, and W. L. Liu. 2016. One-step RT-LAMP analysis for efficient detection of *Odontoglossum ringspot virus* from *Oncidiinae* hybrids (Orchidaceae). *J. Gen. Plant Pathol.* 82:89–95.
- Varga, A. and D. James. 2006. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *J. Virol. Methods* 138:184–190.
- Vejaratpimol, R., C. Channuntapipat, P. Liewsaree, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka, and N. Minamiura. 1998. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of cymbidium mosaic virus in orchids. *J. Ferment. Bioeng.* 86:65–71.
- Wong, S. M., C. G. Chng, Y. H. Lee, K. Tan, and F. W. Zettler. 1994. Incidence of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Prot.* 13:235–239.

- Yamane, K., K. Oyama, E. Iuchi, H. Ogawa, T. Suzuki, and T. Natsuaki. 2008. RT-PCR detection of *Odonoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus* and *Tospoviruses* and association of infections with leaf-yellowing symptoms in *Phalaenopsis*. J. Phytopathol. 156:268–273.
- Zettler, F. W., N. J. Ko, G. C. Wisler, M. S. Elliot, and S. M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74:621–626.
- Zhang, Z. Y., X. J. Liu, D. W. Li, J. L. Yu, and C. G. Han. 2011. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Virol. J. 8:550.
- Zhao, L., J. Cheng, X. Hao, X. Tian, and Y. Wu. 2012. Rapid detection of tobacco viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Arch. Virol. 157:2291–2298.
- Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011a. First report of *Carnation mottle virus* in *Phalaenopsis* orchids. Plant Dis. 95:354.
- Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011b. Identification and characterization of three new *phalaenopsis* orchid-infecting viruses. Acta Hortic. 901:127–132.
- Zheng, Y. X., C. C. Chen, Y. K. Chen, and F. J. Jan. 2008a. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 121:87–95.
- Zheng, Y. X., C. C. Chen, C. J. Yang, S. D. Yeh, and F. J. Jan. 2008b. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 120:199–209.
- Zhou, G. H., X. Q. Chen, M. H. Li, J. L. Zhou, T. H. Tang, S. X. Feng, L. J. Guo, and W. Zhang. 2004. Identification and detection of two major viruses infecting orchids by molecular technique. Virol. Sin. 19:149–152.

## Development and Application of the Molecular and Serological Detection Methods for *Cymbidium ringspot virus*

Chin-Chih Chen<sup>1,\*</sup> and Fen-Lang Chiang<sup>2</sup>

### Abstract

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):202–218.

*Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) is recorded in foreign countries, but not found in Taiwan. The molecular and serological detection reagents for the inspection of CymRSV on orchids were developed in this study. In molecular detection, two primer pairs for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were designed based on the nucleotide sequences of CymRSV coat protein (CP). The primer pair CyRcpu/CyRcpd was designed for amplifying the full-length CP gene and its flanking borders. The primer pair CyRu/CyRd was used to amplify the conserved region of the CymRSV-CP gene. In RT-PCR, the expected 1370-bp and 540-bp DNA fragments were amplified by the primer pairs CyRcpu/CyRcpd and CyRu/CyRd, respectively, from the commercial DSMZ-CymRSV RNA. The annealing temperature under the 60°C, the primer pair CyRu/CyRd was used to specifically detect CymRSV in RT-PCR. A set of four primers (CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3) was successfully used to amplify CymRSV RNA under 65°C for 1 h in reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), and the results were able to be determined by naked eye observation. RT-LAMP with a specificity for CymRSV detection and has a 25-time higher sensitivity than RT-PCR assay. In serological detection, the predicted 41.8 kDa of the bacterial expressed fusion protein (BEP189) was positively reacted to two commercial CymRSV antibodies. The CymRSV antiserum (#189) was prepared from the rabbit immunized with the bacterial-expressed CymRSV-CP. In the detections of CymRSV by the ways of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) and western blotting, the prepared antibody #189 specifically reacted with its expressed CP as well as with the commercial controls of CymRSV, but not reacted to the healthy orchid tissues and other 9 viruses on orchids. This is the first report to develop the RT-LAMP method for detecting CymRSV and to apply the RT-PCR assay for inspecting CymRSV on orchids. Moreover, the prepared polyclonal antibody against CymRSV is efficient to differentiate CymRSV from other 9 tested orchid viruses.

**Key words:** *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), Serological detection, RT-PCR detection, RT-LAMP.

---

Received: September 12, 2016; Accepted: December 14, 2016.

\* Corresponding author, email: chinzue@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.