

重要檢疫病毒檢測方法之開發與應用實例

張雅君 副教授

國立臺灣大學植物病理與微生物學系

電子郵件：ycchang@ntu.edu.tw；傳真：02-2362-0271

摘要

李痘瘡病毒(*Plum pox virus*, PPV)是核果類作物最具毀滅性的病原。臺灣並無 PPV 危害之記錄，但由於國內有 PPV 的重要媒介昆蟲，以及桃、李、梅等李屬寄主植物，使得 PPV 在國內立足和擴散的可能性提高。為避免 PPV 傳入臺灣，我們嘗試開發多種 PPV 檢測方法，以協助植物檢疫工作。首先由 GenBank 搜集 PPV 之序列，經分析整理後找出數個保守性較高之區域，依此設計出五組對應之引子對。之後利用 PPV cDNA 株為模板，以生體外轉錄反應產生 PPV 之 RNA 轉錄體，再以所設計之 PPV 專一性引子進行 RT-PCR，以比較不同引子組合其 RT-PCR 的檢測效果。結果發現 PPV-F0/PPV-R0 引子對的專一性和靈敏度最好，在含有植物全 RNA 溶液中可偵測出至少 1 fg 的 PPV RNA 轉錄體。此外，將 PPV 鞘蛋白基因選殖至適當的表達載體，再利用大腸桿菌系統產生 PPV 的重組鞘蛋白，藉此生產 PPV 專一性抗血清。當以含有 PPV 的植物組織為材料，比較 ELISA 和 RT-PCR 的檢測效果時，ELISA 的靈敏度依植物萃取液使用的稀釋方式不同可達原始萃取液濃度的 5^{-3} - 5^{-5} 倍，兩者相差 25 倍；而以 RT-PCR 檢測的靈敏度則可以達到 5^9 ，較 ELISA 灵敏 625-15625 倍。除了 ELISA 外，PPV 抗血清也成功應用於免疫轉漬分析法與組織轉印免疫分析法上，使檢測方式具有多種不同的選擇，方便不同的情況選用，有利於 PPV 檢疫工作之進行。

關鍵詞：李痘瘡病毒、檢測、反轉錄聚合酶連鎖反應、抗血清、酵素連結抗體免疫吸附法、免疫轉漬分析法、組織轉印免疫分析法

Development and application of detection methods for important quarantine virus

Ya-Chun Chang, PhD, Associate professor

Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

E-Mail: ycchang@ntu.edu.tw; Fax: 02-2362-0271

Abstract

Plum pox virus (PPV) is the most destructive pathogen of stone fruits. Although PPV has not been reported in Taiwan, this virus has the potential to establish in our country because its insect vectors and *Prunus* host plants are all over the island. To prevent PPV-infected plant materials from being imported into Taiwan, several detection methods for PPV were developed to be used for plant quarantine. The PPV sequences collected from GenBank were used for specific primer designed. According to the results of multiple sequence alignment, several conserved regions were selected, and then five PPV-specific primer pairs were designed from these regions. When the primer pairs of PPV were evaluated by RT-PCR assay, the results indicated that PPV-F0/PPV-R0 showed the best specificity and sensitivity. This primer pair could detect at least 1 fg of PPV RNA transcripts in plant total RNA solution. In order to obtain antiserum for subsequent studies, a recombinant PPV coat protein expressed in *Escherichia coli* was used as an antigen. When the detection sensitivity of ELISA for PPV was determined by a 5-fold serial dilutions of diseased plant extracts mixed with healthy plant extracts or extraction buffer, the detection limit of ELISA was 5^{-3} or 5^{-5} , respectively. The sensitivity of RT-PCR is 5^{-9} of original sample and is 625-15625 times more sensitive than that of ELISA. Besides, the PPV antiserum was successfully used for immunoblot analysis and tissue blot immunoassay. Therefore, this antiserum can be used in different detection methods in addition to RT-PCR to help the plant quarantine tasks against PPV.

Key words: *Plum pox virus, detection, RT-PCR, antiserum, ELISA, immunoblot analysis, tissue blot immunoassay*

緒 言

李痘瘡病毒(*Plum pox virus*, PPV)屬於*Potyviridae*科、*Potyvirus*屬的長絲狀病毒，顆粒大小為11-13 x 680-900 nm，鞘蛋白分子量約36 kDa，內含一條長度約9.7 kb之單鏈正股RNA (Fauquet *et al.*, 2005)。PPV自從1910年在馬其頓地區首次被發現(Kegler and Hartmann, 1998)，保加利亞也於1917年報導李樹遭受李痘瘡病(Sharka disease 或 plum pox disease)危害。目前PPV已漫延至全歐洲與地中海地區(Nemeth, 1994)，埃及、敘利亞、印度和智利也相繼發現，而1999年美國賓州地區也發現果樹被PPV所危害(Lopez-Moya *et al.*, 2000)。2003年加拿大報導有一新的PPV分離株，據推論可能來自東歐的李樹種子(James *et al.*, 2003)。2005年Plant Disease期刊報導中國湖南省杏樹(*Prunus armeniaca* cvs. Hong Mei and Bai Mei)發現由PPV所引起的黃色輪斑和褪綠斑點病徵，並以ELISA、RT-PCR和序列證實為D strain (Navratil *et al.*, 2005)。PPV可感染各種李屬植物，罹病果樹提前落果，或是果實變小，果實風味喪失、甜度下降、以及酸度上升(Nemeth, 1994)，果實畸形而失去商品價值。病害的嚴重程度與PPV的strain以及植物的品種有關。目前PPV共有D、M、EA和C四種strain，其中PPV-M蚜傳能力最強，在桃樹引起嚴重病徵(Lopez-Moya *et al.*, 2000)，並曾被報導可經由種子傳播(Nemeth and Kolber, 1983)。在田間至少有14種蚜蟲可以非永續方式傳播PPV，包括*Myzus persicae*、*Aphis spiraecola*、*A. gossypii*、*A. fabae*等，國內也有PPV的媒介蚜蟲。

為避免 PPV 經由進口的種苗或果實傳入臺灣，我們嘗試開發多種 PPV 檢測方法，以協助植物檢疫工作，確保 PPV 不會進入國內並造成重大損失。目前應用於植物病毒的檢測方法，以反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)及酵素連結抗體免疫吸附法(ELISA)應用最廣，其中以 RT-PCR 的靈敏度較高，而 ELISA 則是以可以同時檢測大量樣品見長。本實驗室利用由 GenBank 所之搜集 PPV 序列，經分析整理後所設計的 PPV-F0/PPV-R0 引子對，在經過測試後，具有良好的專一性和靈敏度，在含有健康葉片組織的全 RNA 溶液中可偵測出至少 1 fg 的 PPV RNA 轉錄體。雖然利用 RT-PCR 可靈敏的偵測出 PPV，但是在面對大量的樣品時，有其限制存在。為顧及使用的方便性及同時處理大數量樣品，利用 ELISA 檢測 PPV 是另一種選擇。但目前因須從國外廠商處購買 PPV 抗體，尤其是單元抗體，花費相當可觀，因此我們同時也開發可

供 ELISA 檢測使用的抗體，以期能提供國內防疫與檢疫人員使用，並能有效的防止 PPV 侵入。

李痘瘡病毒之分子檢測

PPV 序列之分析比對

由 GenBank 搜尋 PPV 各種 strain 的序列資料，經分析整理後，採用 GCG 程式(Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA)所提供之 PileUp 功能，對全長序列進行核酸序列之多序列並列比對，以了解不同 PPV strain 其核酸序列的異同。根據所獲得之序列比對結果，找出數個保守性較高之區域，設計出對應之專一性引子，供檢測使用。

植物全 RNA 之純化

以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, CA, USA) 從植物組織抽取其全RNA，步驟參照純化套組所附之使用說明。先稱取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450 μ l RX buffer加入上述離心管中，劇烈震盪混合均勻。組合shearing tube於collection tube上，將上述混合液加入shearing tube中，蓋上管蓋後，以13,000 rpm離心2分鐘。將collection tube中的濾出液移到新的1.5 ml 微量離心管中，避免取到最下層的沉澱物。取230 μ l 100% 酒精加入濾出液中，以微量吸量器上下吸放混合均勻。組合plant total RNA mini column於collection tube上，將上述混合液加入plant total RNA mini column中，蓋上管蓋後，以10,000 rpm離心1分鐘，將濾出液丟棄。取0.5 ml WF buffer加入plant total RNA mini column，以13,000 rpm離心30-60秒，將濾出液丟棄。再取0.7 ml WS buffer加入plant total RNA mini column，以13,000 rpm離心30-60秒，將濾出液丟棄。重複以WS buffer清洗的步驟。將plant total RNA mini column再以13,000 rpm離心3分鐘，以完全去除殘留的WS buffer。將plant total RNA mini column組合至新的1.5 ml微量離心管上，在column中加入50 μ l DEPC-H₂O，以13,000 rpm離心1-2分鐘，將RNA流洗出來。所獲得的RNA溶液，以分光光度計分析RNA品質並測量其濃度，然後保存於-70°C中備用。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)

取待測植物全RNA 4 μ l，加入1 μ l PPV反向引子，以65°C加熱15分鐘後，迅速置於冰中冷卻，經短暫離心後，再分別加入3.25 μ l ddH₂O、2.5 μ l AMV RT 5X reaction buffer (Promega, WI, USA) 、1.25 μ l 10 mM dNTPs、0.25 μ l rRNasin (40 U/ μ l, Promega, WI, USA)及0.25 μ l AMV reverse transcriptase (10 U/ μ l, Promega, WI, USA)，置於42°C水浴中作用30分鐘，以合成第一股cDNA。之後取反轉錄產物進行PCR反應，於0.2 ml離心管中分別加入9.6 μ l ddH₂O、2 μ l 反轉錄產物、2 μ l 10X PCR buffer、2 μ l 2 mM dNTPs、2 μ l 5 μ M PPV正向引子、2 μ l 5 μ M PPV反向引子及0.4 μ l DyNAzyme II DNA polymerase (2 U/ μ l, Finnzymes Inc., Finland)，之後以1,000 rpm離心10秒，接著進行PCR反應。其program如下：94°C/5min → 94°C/30 sec, 53°C/30 sec, 72°C/30 sec (30 cycle) → 72°C/7 min。最後取10 μ l之PCR產物進行1.5% 膠體電泳分析。

PPV 抗血清之製備與 ELISA 檢測

PPV 重組鞘蛋白的製備與純化，以及後續 PPV 抗血清的製備，參照前人的報告(Huang *et al.*, 2007)進行。以 indirect-ELISA 測試所獲得的 PPV 抗血清，方法如下：將含有 PPV 的植物組織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)，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 5000 rpm 離心 5 分鐘，取其上清液，以作為抗原之來源：以健康植株研磨液及 ISE buffer 作為負對照組，同時將含有 PPV 之組織研磨液以健康植株研磨液或是 ISE buffer 進行 5 倍序列稀釋。將上述研磨液各取 100 μ l 抗原加入 96 穴微量盤中，每樣品做 3 重覆，將微量盤以保鮮膜緊密覆蓋後，置於 37°C 恒溫箱中作用 1 小時，之後以 1 X 之 PBST buffer 清洗 8 次並甩乾，每穴再加入 100 μ l 以 coating buffer 新鮮配製的 1% 脫脂奶粉溶液，其目的是要將未完全被抗原覆蓋之穴盤底部填滿，以避免背景值提高。之後以 1 X 之 PBST buffer 清洗 8 次，甩乾後加入 100 μ l PPV 抗血清(以 ECI buffer 稀釋 10000 倍)，將微量盤置於 37°C 恒溫箱中作用 1 小時，之後以 1X 之 PBST buffer 清洗 8 次並甩乾，加入 100 μ l 以 ECI buffer 稀釋 1000 倍之鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)連結的二次抗體，置於 37°C 恒溫箱中作用 1 小時，之後以 1 X 之 PBST buffer 清洗 8 次並甩乾，最後每穴加入 100 μ l 以 PNP buffer 新鮮配製的 PNP 基質進行作用，再將微量盤置於 37°C 恒溫箱中作用 40 分鐘，以酵素免疫分析自動判讀儀讀取 405 nm 波長下之吸光值。

免疫轉漬分析法與組織轉印免疫分析法(Immunoblot analysis and tissue print immunoassay)

免疫轉漬分析法是取約 0.1 g 受檢植株樣品，以液態氮研磨成粉末後，放入 0.5 ml 微量離心管，加入 50 μ l SDS sample buffer 後，混合均勻，以 96°C 加熱 10 分鐘後，迅速置於冰中 5 分鐘，使蛋白質變性後，利用 12% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析。經蛋白質電泳後，將蛋白質轉印到 PVDF 濾膜(Osmonics, Westborough, MA, USA)上，以進行後續分析。在組織轉印免疫分析法方面，以無菌或消毒過的刀片，將受檢植株之組織橫切後，壓印在 PVDF 濾膜上，將濾膜略為風乾後，進行後續分析。將已轉印蛋白質的濾膜浸泡於 10 ml 含有 1% 脫脂奶粉的 PBST 溶液中，於 37°C 下輕微振盪約 30 分鐘。濾膜以 PBS 漂洗 2 次，每次 5 分鐘。將 PPV 抗血清以 ECI buffer 稀釋 10000 倍，每一濾膜約以 10 ml 稀釋的抗體溶液，於 37°C 下作用 1 小時。濾膜以 PBS 漂洗 2 次，每次 5 分鐘。以 ECI buffer 將二次抗體稀釋 1000 倍，每一濾膜加入 10 ml 的二次抗體稀釋液於 37°C 下作用 1 小時。濾膜重覆以 PBS 漂洗 2 次，每次 5 分鐘。將 200 μ l NBT/BCIP 濃縮液加入 10 ml substrate buffer 中，混合均勻。將濾膜浸泡於基質反應液中，於室溫黑暗下作用數分鐘，直至濾膜上有藍紫色的呈色反應產生。呈色的濾膜以 2 次蒸餾水漂液中止反應，風乾後以膠膜護貝保存。

結 果

根據序列比對結果，選擇了 PPV 的 3' 端三處設計正向引子，PPV-F0、PPV-F1 和 PPV-F2，兩處設計反向引子，PPV-R0 和 PPV-R1(表一)。其中 PPV-F0 和 PPV-R0 位於 3' 端非轉譯區，PPV-F2 和 PPV-R1 位於鞘蛋白基因，PPV-F1 位於 NIb 基因 3' 端。為了解這些 PPV 專一性引子應用在 RT-PCR 檢測時的專一性和靈敏度，我們以 PPV 的 RNA 轉錄體模擬病毒 RNA 進行全面性的測試。因此先大量製備 PPV 質體 DNA 後，利用 SpeI 內限制酶將質體 DNA 直線化作為 DNA 模板，再以 T7 RNA polymerase 進行生體外轉錄反應，反應結束後以 DNase I 去除 DNA 模板，所獲得之 PPV RNA 轉錄體溶於 DEPC-H₂O，並調整其濃度。當只有 PPV RNA 轉錄體存在的情況下，由實驗結果發現以 PPV-F2/PPV-R0 和 PPV-F0/PPV-R0 的專一性最好(圖一)，其餘引子組合都會增幅出非專一性的片段，其中又以 PPV-F2/PPV-R1 的專一性最差(圖一)。當比較檢測的靈敏度時，

PPV-F2/PPV-R0只能檢測到 4×10^{-2} ng，而PPV-F0/PPV-R0則可測到 4×10^{-7} ng，比前者高出 10^5 倍。為模擬從植物樣品中檢測PPV之情形，我們先抽取健康桃樹葉片的全RNA，於十倍系列稀釋的PPV RNA轉錄體中，分別加入純化之 $0.5 \mu\text{g}$ 全RNA；再以檢測效果最佳的PPV-F0/PPV-R0專一性引子對，對進行RT-PCR測試。結果發現當RNA轉錄體的量在1 fg以上時，PPV-F0/PPV-R0即可增幅出218 bp的PPV RT-PCR產物。

以免疫轉漬分析法測試所製備的 PPV 抗血清的專一性，結果發現在含有 PPV 的植物組織中可以很明顯的在接近 36 kDa 附近獲得強烈的訊號，而在健康的植物組織中則沒有任何反應。結果顯示我們所研發出的 PPV 抗血清可以成功的辨識植物組織中是否含有 PPV。此外將進口果實樣品進行組織轉印免疫分析，在感染病毒的果實上，不論是果皮或是果肉，都可以經由 PPV 抗血清和二次抗體辨識後產生明顯的反應，而健康的果實則無任何訊號。這些結果顯示，此一 PPV 抗血清可配合免疫轉漬分析法或是轉印免疫分析法來檢測 PPV。

將含有PPV的植物組織切成小碎片後，混合均勻並分成兩份，一份用以抽取其全RNA，以進行RT-PCR檢測；另一份則以ISE buffer進行研磨後，進行ELISA檢測。將自製的PPV抗血清稀釋10000倍後，以I-ELISA進行測試，以找出檢測時抗血清的靈敏度。將含有PPV的植物組織以10倍體積的ISE buffer進行研磨後，所得的萃取液作為原始溶液，再分別以健康植物萃取液或是ISE buffer進行5倍的序列稀釋，然後進行檢測；當檢測樣品的ELISA讀值如高出健康植物的負對照組三倍以上時，即認為正反應(Clark and Adams, 1977)。結果發現將萃取液以健康植物組織萃取液稀釋時，ELISA的靈敏度只有到達 5^{-3} (125倍稀釋)，然而若是由ISE buffer進行稀釋，則靈敏度可以增加到 5^{-5} (3125倍稀釋)。在RT-PCR檢測方面，將含有PPV的全RNA以健康植物組織的全RNA進行5倍稀釋後，其檢測的靈敏度可以達到 5^{-9} ，相較於ELISA，其靈敏度提高了625-15625倍。不論將含有PPV的全RNA以健康植物組織的全RNA或是ddH₂O進行稀釋，其檢測的靈敏度皆相同；而在進行ELISA檢測時，其檢測的靈敏度會因為以健康植物萃取液或是ISE buffer進行稀釋而有所不同，且差異達25倍。

討 論

利用由國外學者所提供的PPV材料自行選殖PPV之cDNA株，以此測試自行設計的PPV引子對，結果發現以位在3'非轉譯區的PPV-F0/PP-R0引子對之專一性和靈敏度最佳，其餘的引子組合雖然能增幅出預期大小的DNA片段，但有些引子組合會有非專一性的DNA片段出現，或者是靈敏度較差。為了解我們所設計的PPV專一性引子應用在RT-PCR檢測時的效果，因此進一步以PPV的RNA轉錄體模擬病毒RNA，以RT-PCR對各種引子組合進行測試。由實驗結果發現，以PPV-F0/PPV-R0的專一性和靈敏度最好，其檢測靈敏度可以達到1 fg PPV RNA。

除了利用專一且靈敏的 RT-PCR 方式進行 PPV 檢測之外，針對未來要面對檢測方法使用的方便性與處理大量的樣品，我們也開發了檢測 PPV 的抗血清，將 PPV 的鞘蛋白序列選殖至適當的表達載體，再利用大腸桿菌系統產生 PPV 的鞘蛋白，藉此生產具專一性的 PPV 抗血清。目前已獲得專一性和力價極佳的 PPV 抗血清，此一抗血清在 ELISA、免疫轉漬分析與植物組織轉印免疫分析上，皆能成功的偵測到 PPV，可作為病毒篩檢使用。雖然 RT-PCR 較 ELISA 灵敏 625-15625 倍，但是在面對大量的樣品時，有其限制存在。為協助植物檢疫工作之執行，我們開發了多種 PPV 檢測方法，各具有不同的優缺點，方便不同的情況選用，有利於建立 PPV 檢疫工作之標準作業流程。

引用文獻

- Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.
- 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.
- 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.
- James, D., Varga, A., Thompson, D., and Hayes, S. 2003. Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease* 87: 1119-1124.
- Kegler, H., and Hartmann, W. 1998. Present Status of Controlling Conventional Strains of Plum Pox Virus. In: Hadidi, A., Khetarpal, R.K. and Koganezawa, H., (eds). *Plant Virus Disease Control*, pp. 616-628. APS Press, St. Paul, MN, USA. 684 pp.
- Lopez-Moya, J. J., Fernandez-Fernandez, M. R., Cambra, M., and Garcia, J. A. 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76:121-136.
- Navratil, M., Safarova, D., Karesova, R., and Petrzik, K. 2005. First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease* 83: 338.
- Nemeth, M. 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. *EPPO Bulletin* 24: 525-536.
- Nemeth, M. and Kolber, M. 1983. Additional evidence on seed transmission of plum pox virus in apricot, peach and plum, proved by ELISA. *Acta Horticulturae* 130: 293-300.

表一、本研究所設計之 PPV 專一性引子的寡核酸序列

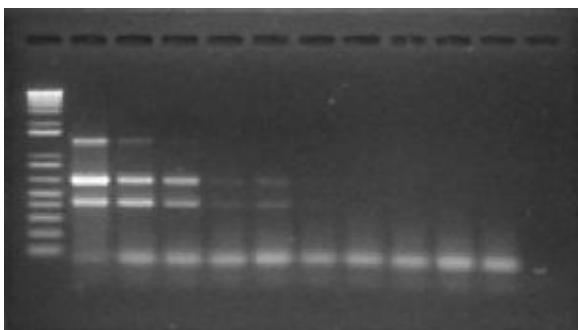
Primer ^a	Sequence ^b
PPV-F primer	
PPV-F0	5' GTGGTCTCGGTATCTATCATAAACT3'
PPV-F1	5' GAGTCCAACRTTGTTRRCACCA3'
PPV-F2	5' GGAATGTGGGTGATGATGGATG3'
PPV-R primer	
PPV-R0	5' GTCTCTTGCACAAGAACATATAACCC3'
PPV-R1	5' CTACACTCCCCTCAYACCGAGG3'

^aF0, F1 and F2 indicate forward primers, whereas R0 and R1 indicate reverse primer.

^bNucleotide at degenerate positions are represented by a single letter code; R = A and G; Y = C and T.

PPV-F2/R1

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



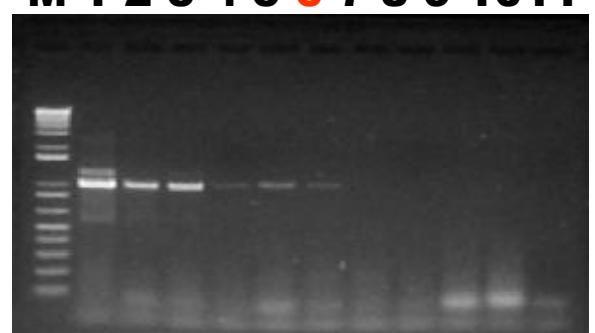
PPV-F2/R0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



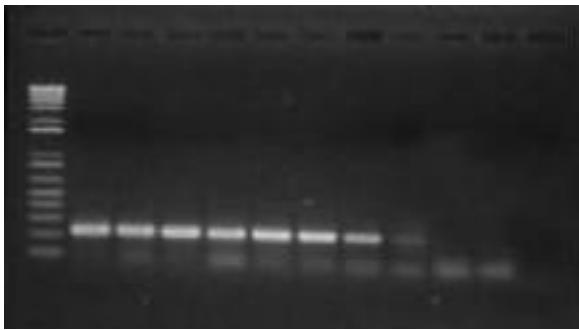
PPV-F1/R1

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



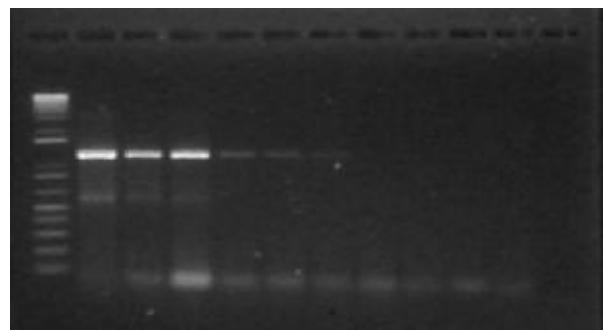
PPV-F0/R0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



PPV-F1/R0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



圖一、以RT-PCR測試不同的PPV引子對之專一性與靈敏度。(1)至(10)以10倍系列稀釋的PPV之RNA轉錄體為模板，進行RT-PCR之結果。由左至右：(M) 1 kb plus DNA ladder，(1) 4 ng ，(2) $4 \times 10^{-1}\text{ ng}$ ，(3) $4 \times 10^{-2}\text{ ng}$ ，(4) $4 \times 10^{-3}\text{ ng}$ ，(5) $4 \times 10^{-4}\text{ ng}$ ，(6) $4 \times 10^{-5}\text{ ng}$ ，(7) $4 \times 10^{-6}\text{ ng}$ ，(8) $4 \times 10^{-7}\text{ ng}$ ，(9) $4 \times 10^{-8}\text{ ng}$ ，(10) $4 \times 10^{-9}\text{ ng}$ PPV之RNA轉錄體，(11) 負對照。