

利用奈米磁顆粒分離技術檢測六種感染蝴蝶蘭病毒之研究

撰文/ 王惠亮 · 黃詩婷 · 詹富智

前言

近二十年來我國蘭花產業蓬勃發展，已成為全世界蝴蝶蘭輸出量最高之國家，農委會更將其選為重點發展之作物。臺灣的蘭花產業與日本淵源甚深。臺灣的地理環境溫暖而潮濕，物種豐富多樣且可終年繁衍不斷，過去一再被公認是作物栽培的寶島。但對於影響植物生長的病蟲害而言，其實也是病原滋生的溫床，因此造成植物病害的多樣性及高發生率。

至今發現可感染蘭花之病毒有 30 種以上，其中以喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 及齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 之發生最為普遍，此兩種病毒的性質不僅相當穩定，其寄主範圍幾乎涵蓋臺灣常見之國蘭及洋蘭。在已被報導感染蘭花植物的病毒中，其中喜姆比蘭嵌紋病毒 (CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、蘭花斑點病毒 (Orchid fleck virus, OFV) 及石斛蘭葉脈壞疽病毒 (*Dendrobium vein necrosis virus*, DVNV)、辣椒黃化病毒蝴蝶蘭分離株 (*Capsicum chlorosis virus -Phalaenopsis*, CaCV-Ph)、蝴蝶蘭黃化斑點病毒 (*Phalaenopsis*

chlorotic spot virus, PhCSV) 及康乃馨斑駁病毒蝴蝶蘭分離株 (*Carnation mottle virus*, CarMV-Ph) 曾被報告可自然感染蝴蝶蘭，而臺灣地區的蝴蝶蘭則曾發現 CymMV、ORSV、CMV、CaCV-Ph、PhCSV 及 CarMV-Ph 的存在，皆會感染蝴蝶蘭而造成病變。

傳統之病毒病害檢測主要是藉由觀察蘭株上的病徵，但蘭株受到病毒感染後所產生的病徵會因蘭株的生長狀態及品種的不同而影響病徵的表現，包括嵌紋、黃化、輪斑、矮化、局部病斑、畸形和皺縮等不同之病徵。自從電子顯微鏡於 1939 年被發明後，即被用以直接觀察感病植物組織中的病毒顆粒，可作為鑑定病毒之依據。電子顯微鏡觀察法常用於顆粒大且型態容易辨識之病毒，直接觀察病毒的形狀、大小及表面的構造可做為診斷的依據，於 50 年代血清學技術開始發展後，抗血清檢定法開始普遍應用於植物病毒之診斷與鑑定是目前最重要的檢測法。1986 年核酸聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術發明後，在分子檢測技術有了重大且影響深遠的突破，它是為一種生體外 (*in vitro*) 複製 DNA 的技術，是目前為止偵測病毒最重要的工具之一。這項技術發明後大大提升了植物病毒檢測之靈敏度，尤其被證實過去許多經由酵素連

結免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測認定為無病毒感染之植株，若再以 PCR 檢測仍會被證實病毒之存在，可見 PCR 技術在病毒篩檢之靈敏度較高，它是屬於靈敏度較高、穩定，且快速的一種用於病毒的鑑定方法。

奈米磁顆粒近年來在基因科技與醫藥應用的研究已有許多進展，主要為核磁影像檢測、目標導向藥劑、基因篩選或細胞分離、腫瘤治療等生醫用途。目標導向藥劑，即是運用磁性微顆粒作為藥物載體 (drug carriers)，多使用磁性氧化物，如 Fe_3O_4 和 Fe_2O_3 ，作為藥物載體。免疫磁性分離法最初是應用於醫學領域，是使用一很小的超順磁粒子或磁顆粒，在上面結合可變辨識目標抗原的抗體，可用於分離真核細胞。本研究利用免疫磁性分離技術進行蝴蝶蘭病毒檢測技術開發，期望達到縮短檢測時間、早期發現病毒之成效。

在臺灣已發現會造成蝴蝶蘭病害之病毒有喜姆比蘭嵌紋病毒、齒舌蘭輪斑病毒、胡瓜嵌紋病毒、辣椒黃化病毒蝴蝶蘭分離株、蝴蝶蘭黃化斑點病毒及康乃馨斑駁病毒蝴蝶蘭分離株，皆會感染蝴蝶蘭而造成病變。此外植物病毒病害並無有效藥劑進行防治，蘭花遭受病毒感染，對蘭花之生長與品質構成威脅，尤其病毒可以隨無性繁殖方式傳播至後代種苗，若能及時發現病毒之存在，搭配隔離或銷毀之處理，在田間亦可減少病毒之散佈，病毒病害之管理上著重於病毒的偵測診斷，可以移除病株，或篩選無病毒健康苗。因此本研究目的為將利用奈米磁顆粒、RT-PCR 及 multiplex PCR 等之技術，開發磁顆粒分離鑑定蘭花病毒之技術，希望能達到快速、準確、敏感及低成本的目標；研究之成果將可用於無病毒健康苗之篩選工作之進行，減少病毒對蘭花產業的影響。

磁顆粒與專一性引子對核酸序列的設計

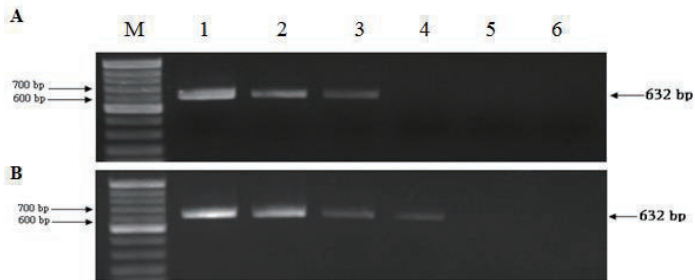
利用磁顆粒 (TANBead USPIO-101, 台灣圓點公司) 分離技術，針對感染病毒的蝴蝶蘭進行專一

性檢測。病毒檢測首先需開發 PCR 之病毒專一性的引子對，依據 CymMV、ORSV、CMV、PhCSV 和 CarMV-Ph 病毒的鞘蛋白 (coat protein) 與 CaCV-Ph 病毒的核鞘蛋白 (nucleocapsid protein) 之核酸多序列比對結果，顯示 6 種病毒的鞘蛋白與核鞘蛋白之核酸序列差異性相當大，因此選擇差異性較大的區域設計出專一性鑑定單一病毒的引子對。本研究所設計的 6 組 PCR 引子對都可針對專一病毒檢體複製出特定之條帶，對 CymMV 之純系病毒或病葉分析時可得到 632 bp 的專一性 RT-PCR 條帶，而在 CMV、ORSV、CarMV-Ph、PhCSV 及 CaCV-Ph 之分析時則可分別得到 426、300、601、500 及 403 bp 的專一性 RT-PCR 條帶，顯示所設計之引子對皆具有檢測之專一性。

有無磁顆粒進行分離純化病毒及組織液中病毒之靈敏度比較分析

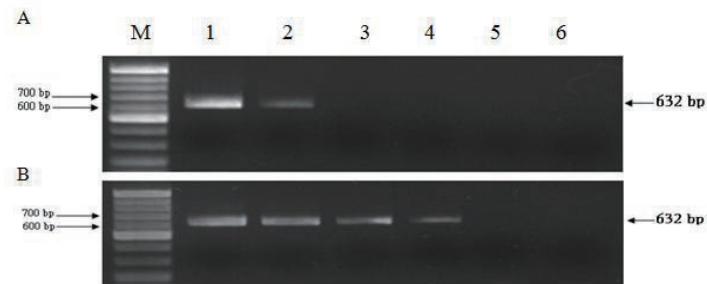
在靈敏度方面，本研究利用 CymMV 的純化病毒及病毒與組織液的混合液等 2 種材料進行測試，利用目前較常使用之 RT-PCR 技術及免疫磁顆粒分離技術，分別測試此 2 種方法的靈敏度。單純利用 RT-PCR 技術鑑別 CymMV，對純化病毒及病毒與組織液的混合液之靈敏度分別為 100 fg 及 1 pg (圖一、二)；利用磁顆粒分離鑑定技術鑑別 CymMV 時，其對純化病毒及病毒與組織液的混合液之靈敏度皆 1 fg (圖一、二)。結果顯示磁顆粒分離鑑定技術的靈敏度為 RT-PCR 的 100 倍以上，如此之結果利用在無病毒種苗的篩選應該更具可行性，可減少偽陰性 (false negative) 的結果發生。本研究中所發展出來的技術除其靈敏度都比以往的技術來理想之外，並顯示磁顆粒分離鑑定技術亦可用於病毒之分離接種上。

研究中進一步以磁顆粒結合多引子 RT-PCR (multiplex RT-PCR) 進行病毒檢測，測試時先將病毒分成二組進行 multiplex RT-PCR，第一組 multiplex RT-PCR 可用於偵測 CymMV、CMV 及 ORSV；而



註：(A)與磁顆粒分離之RT-PCR檢測，(B)靈敏度分析。Lane 1: 1 ng/ml, Lane 2: 1 pg/ml, Lane 3: 100 fg/ml in (A) and 10 fg/ml in (B), Lane 4: 10 fg/ml in (A) and 1 fg/ml in (B), Lane 5: 1 fg/ml in (A) and 100 ag/ml in (B), Lane 6: virus-free orchid.

圖一 喜姆比蘭嵌紋純化病毒之RT-PCR檢測

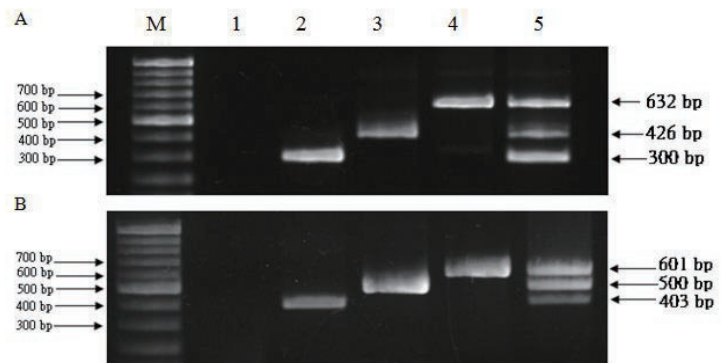


註：(A)與磁顆粒分離之RT-PCR檢測，(B)靈敏度分析。Lane 1: 1 ng/ml, Lane 2: 1 pg/ml, Lane 3: 100 fg/ml in (A) and 10 fg/ml in (B), Lane 4: 10 fg/ml in (A) and 1 fg/ml in (B), Lane 5: 1 fg/ml in (A) and 100 ag/ml in (B), Lane 6: virus-free orchid.

圖二 組織液中喜姆比蘭嵌紋純化病毒之RT-PCR檢測

第二組則可偵測到 CarMV-Ph、PhCSV 及 CaCV-Ph 之存在，分析時發現二組 multiplex RT-PCR 皆可產生相對應之專一性條帶，正確的鑑定出病毒種類(圖三)。

為了比較磁顆粒分離檢測技術及 ELISA 偵測技術於田間應用的實際效果，本研究分析蝴蝶蘭於接種病毒後的不同天數下，分別利用磁顆粒分離檢測技術及 ELISA 偵測技術之檢測結果。將蝴蝶蘭接種 CymMV 病毒後，於接種後第 4 至 11 天，每天分別利用 ELISA 與免疫磁顆粒分離檢測技術進行病毒測試。接種時是將 CymMV 接種於三珠蝴蝶蘭(三



註：ORSV、CMV及 CymMV(A)；CaCV-Ph、PhCSV及CarMV-Ph(B)

圖三 利用磁顆粒分離結合 Multiplex MS-RT-PCR 之分析

重複)，分析時各取三珠蘭花葉片組織 0.5 g 進行 ELISA 分析、0.5 g 進行免疫磁顆粒分離鑑定。分析結果(表一)顯示，於接種後第 1-6 天，此時蝴蝶蘭被病毒感染但還未產生病徵，磁顆粒分離鑑定與 ELISA 皆無法測得病毒之存在；但在第 7-8 天植株仍未出現病徵時，磁顆粒分離檢測技術已可測到病毒的存在；而 ELISA 偵測技術則至第 11 天才可測得病毒的存在，而此時蝴蝶蘭已開始出現輕微病徵。於對照組方面，此兩項檢測技術在未接種病毒之無病毒蘭花(negative control)皆無法偵測到病毒，在有病徵之蘭花(positive control)則都可偵測到病毒。實驗結果顯示，被病毒感染之蝴蝶蘭出現病徵前，ELISA 多無法測得病毒之存在，但免疫磁顆粒分離鑑定則可於病徵出現前測得病毒的存在，由此可見免疫磁顆粒的檢測靈敏度較 ELISA 佳。

結語

蘭花大量栽培主要是以組織培養技術進行種苗快速繁殖，帶病毒之種苗因而快速散佈至全世界，因此病毒病害已對蘭花產業造成極大之危害。在臺灣蘭花上已發現之病毒有喜姆比蘭嵌紋病毒(CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒(ORSV)、胡瓜嵌紋病毒(CMV)、辣椒黃化病毒蝴蝶蘭分離株(CaCV-Ph)、蝴蝶蘭黃化斑點病毒(PhCSV)及康乃馨斑駁病

表一 磁顆粒分離PCR鑑定技術與ELISA偵測法檢測蝴蝶蘭感染CymMV後之靈敏度比較

Day after inoculation	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
	Bead-PCR	ELISA	Bead-PCR	ELISA	Bead-PCR	ELISA
6	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-
10	+	-	+	-	+	-
11	+	+	+	-	+	+

毒蝴蝶蘭分離株 (CarMV-Ph) 等 6 種病毒。由於蘭花病毒之檢測技術對無病毒蘭花之生產扮演重大角色，因此本研究將磁顆粒分離結合反轉錄聚合連鎖反應 (RT-PCR) 檢測技術之開發，希望能改良目前之檢測效果。靈敏度方面，此技術的靈敏度無論在純系病毒或田間測試其靈敏度皆可達 1 fg ml^{-1} ；以蘭花病葉檢測試時發現，可在接種後 7 天（蝴蝶蘭尚未產生病徵）即可在葉片上測得病毒之存在，且單一病毒之檢測成本只需新臺幣 30 元。研究結果顯示此技術在檢測時間上，磁顆粒分離病毒需 30 分鐘，RT-PCR 需 2.5 小時，電泳分析 1.5 小時，可大幅縮

短病毒檢測之時間至 4.5 個小時。綜合上述之結果得知，本研究所開發出之磁顆粒分離檢測技術，具有快速、專一、敏感及低成本的特性，符合蘭花管理上之需求，預期未來應用於田間蝴蝶蘭病毒檢測，將有助於蘭花產業建立健康種苗體系。此外，利用免疫磁性分離技術可提高分離目標微生物之準確性，且仍可保持細菌為存活的状态，將有潛力應用於目前尚無法以人工接種的病毒的研究，以利植物病害防治之研究與推展。

AgBIO

王惠亮 國立高雄師範大學 生物科技系 副校長
 黃詩婷 國立高雄師範大學 生物科技系 碩士
 詹富智 國立中興大學 植物病理系 系主任

參考文獻

1. 王志農 (2003) 齒舌蘭輪斑病毒台灣系統基因序列譯讀與分析。國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文，103pp。
2. 王惠亮、林偉志 (2004) 喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統基因序列譯讀與分析。植物病理學會刊，13：61-68。
3. 王惠亮、王志農、張清安 (2004) 齒舌蘭輪斑病毒台灣系統基因序列譯讀與分析。植病會刊，13：97-106。
4. 王惠亮、方鄒誠 (2004) 黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統序列之定序與分析。植物病理學會刊，13：117-126。
5. 張清安、曾雅詩、陳金枝、鄧汀欽 (1999) 應用聚合酶連鎖反應及核酸探針雜配法偵測齒舌蘭輪斑病毒。植物病理學會刊，8：29-36。
6. 張清安、陳加忠 (2004) 蘭花母本保存園及附介質輪美蘭花溫室之設施與管理。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局出版，臺北，63pp。
7. 張清安 (2007) 植物種苗生技，第九期，42-48。
8. 葉瑩、林長平、劉秀玲、陳武揚、李永安、鐘文鑫、李敏郎、顏志恒、鄧汀欽、藍清隆、楊秀珠、張清安 (2006) 植物種要防疫檢疫病毒診斷鑑定技術研習會專刊(五)，103-117。
9. 鄭尤琇 (2007) 新蝴蝶蘭病毒之鑑定及其特性之研究暨以可產生短片段干擾RNA之人工合成核苷酸片段發展新式可廣泛性抗多種病毒之轉基因抗病策略。國立中興大學植物病理學研究所博士論文，p 6-9。
10. Christie, R. G., and Edwardson, J. R. (1977) *Light and Electron Microscopy of Plant Virus Inclusions*. Fla. Agric. Exp. Stn.

參考文獻

- Mongr. Ser. 9, 155pp.
11. Clark, M. F. (1981) *Immunosorbent assays in plant developments in plant virology*. Annu. Rev. Phytopathol 19: 83-106.
 12. Clark, W. R. (1983) *Experimental Foundations of Modern Immunology*. 2nd ed. John Wiley Sons, N. Y. 453pp.
 13. Frowd, J. A., and Tremaine, J. H. (1997) *Physical, chemical, and serological properties of Cymbidium mosaic virus*. Phytopathology 67: 43-49.
 14. Hu, J. S., Ferreira, D., Wang, M., and Xu, M. Q. (1993) *Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii*. Plant Dis. 77: 464-468.
 15. Inouye, N., and Gara, I. W. (1996) *Detection and identification of viruses of orchids in Indonesia*. Bull. Res. Inst. Bioresourc. Okayama University 4: 109-118.
 16. Kado, C. I., and Jensen, D.D. (1964) *Cymbidium mosaic virus in Phalaenopsis*. Phytopathology 54: 974.
 17. Ko, N. J. (1988) *Cytological identification of Cucumber mosaic virus infecting Phalaenopsis*. Proc. Nati. Sci. Council. Repub. China 12: 46-51.
 18. Lesemann, D. E. (1977) *Long, filamentous virus-like particles associated with vein necrosis of Dendrobium phalaenopsis*. Phytopathol. Z. 89: 330-339.
 19. Lesemann, D. E., and Begtrup, J. (1971) *Electron microscopic demonstration of a bacilliform virus in Phalaenopsis*. Phytopathol. Z. 71: 257-269.
 20. Nakajima, N., and Ikada, Y. (1995) *Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media*. Bioconjug Chem. 6: 123-130.
 21. Seoh, M. L., Wong, S. M., and Zhang, L. (1998) *Simultaneous TD/RT-PCR detection of Cymbidium mosaic potyvirus and Odontoglossum ringspot tobamovirus with a single pair of primers*. J. Virol. Methods 72: 197-204.
 22. Steinberg, G., Stromborg, K., Thomas, L., Barker, D., and Zhao, C. (2004) *Strategies for covalent attachment of DNA to beads*. Biopolymers 73: 597-605.
 23. Van Regenmortel, M. H. V. (1982) *Serology and immunochemistry of plant viruses*. Academic Press, N. Y. 302pp.
 24. Walsh, M. K., Wang, X., and Weimer, B. C. (2001) *Optimizing the immobilization of single-stranded DNA onto glass*. J. Biochem. Biophys. Methods 47: 221-231.
 25. Wey, G. C. (1988) *Occurrence and investigation of important disease on Phalaenopsis in Taiwan, Rep. Taiwan Sugar Res. Inst.* 122: 31-41.
 26. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. (1990) *Viruses of orchids and their control*. Plant Dis. 74: 621-626.
 27. Zheng, Y. X., Chen, C. C., Yang, C. J., Yeh, S. D., and Jan, F. J. (2008) *Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on Phalaenopsis orchids*. Eur. J. Plant Pathol. 120: 199-209.
 28. Zheng, Y. X., Chen, C. C., Chen, Y. K., and Jan, F. K. (2008) *Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on Phalaenopsis orchids*. Eur. J. Plant Pathol. 121: 87-95.