

蘭花病毒鞘蛋白基因選殖 與生產

袁雅芬¹ 高佩如² 王慧如² 王賢燕² 簡怡文¹ 鍾文全³ 邱燕欣¹

一、前言

蘭花姿態優雅，廣受消費者喜愛，可做盆花、切花之應用，為日、美歐各國花卉市場主流。台灣為蘭花主要生產國之一，據台灣經濟研究院整理統計，2007 年及 2008 年，台灣蘭花出口總值均突破 25 億元新台幣。以蝴蝶蘭產值最高，獲選為台灣四大旗艦農產之一，2008 年台灣蝴蝶蘭出口總值則約 16 億元，為第三大外銷農產品，主要以盆花及蘭苗銷往日本及美國；其次為國蘭，每年外銷金額為 2-3 億元，9 成銷往韓國，近年來，隨著中國經濟發展，國蘭業者亦積極開拓中國市場。

台灣氣候十分適合蘭花生長，且具有多樣品種及栽培技術之優勢，然而，各種病蟲害的發生亦頗頻繁，以蝴蝶蘭為例，主要有薊馬、介殼蟲、黃葉病、細菌性軟腐病、褐斑病及各種病毒病害，而以病毒為蘭花品質之主要限制因子，因為消費者對蘭花品質無法容許絲毫遭受病蟲危害所致之瑕疵，且病毒為系統性潛伏感染，感染初期無明顯病徵，而後會使蘭株生長緩

慢，葉片上出現嵌紋、條斑、壞疽等病徵，使花色不均、花朵畸形或致提早凋萎，嚴重影響蘭花商品價值，對於全球蘭花產業影響也最鉅。

據文獻記載計有 50 種以上的病毒可感染蘭花，其中以蕙蘭嵌紋病毒（簡稱 Cym-MV）與齒舌蘭輪斑病毒（簡稱 ORSV）最為普遍，亦最受國際關注，各國均對此 2 種病毒設有規範。在我國，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局公告實施之文心蘭及蝴蝶蘭種苗病毒驗證規範，主要亦針對此 2 種病毒，規範了母本檢查與保存、各級繁殖圃（組織培養場、定植苗培養場）設置標準與操作管理，以防範蘭花病毒藉由種苗傳播，維持台灣蘭花品質，並提昇業者競爭能力。

本場為協助蘭花業者自我品質提升，每年均成立計畫輔導業者栽培與經營管理，並接受業者之蘭花樣品病毒(CymMV 及 ORSV)檢測業務，平均樣品數量每年達 11,099 件。每 1 樣品平均檢測主要藥劑成本佔約 27.2 元，其中購自廠商的抗血清佔約每 1 樣品平均成本為 14.4 元。為公務預算考量，本場自 2010 年起，進行蘭花病毒鞘蛋白的量產與純化試驗，以分子生物學技術，將病毒鞘蛋白基因進行

1 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

2 種苗改良繁殖場繁殖技術課 聘用助理

3 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員兼課長

選殖，構築表現質體後，轉入大腸桿菌細胞中，進行誘導表現，期以現代生物技術量產病毒鞘蛋白，送交廠商施打紐西蘭兔，經動物免疫反應後，可獲得抗血清應用於蘭花病毒檢測，以達到撙節經費之目標。

二、研究過程

首先，自NCBI資料庫中搜尋CymMV與ORSV鞘蛋白基因序列，以此2病毒鞘蛋白全長基因序列與預定使用之表現載體-pET28a(+)的多種限制酵素切位序列比對，發現CymMV與ORSV鞘蛋白全長基因序列中並無BamHI亦無HindIII限制酵素切位，於是取鞘蛋白全長基因之5'端及3'端序列與前述2種限制酵素切位序列設計引子對進行RT-PCR，引子序列如(表一)所示。

表一.蘭花病毒鞘蛋白基因選殖用引子序列

引子編號	引子DNA序列
CB5	GCG GGATCC ATGGGAGAGCCCACT
CH3	GCG AAGCTT TTATTCAGTAGGGGG
OB5	GCG GGATCC ATGTCTTACAATATT
OH3	GCG AAGCTT TTAGGAAGAGGTCCA

列。其中，CB5與CH3可自CymMV基因組中複製出708bp鞘蛋白基因全長片段；而OB5與OH3可自ORSV基因組中複製出513bp鞘蛋白基因全長片段。

將RT-PCR反應所得之基因片段以接合酵素構築於pET28a(+)上，為利於進行所構築表現質體之複製，先轉入大腸桿菌DH5α細胞中，將DH5α細胞以選擇性培養基(LA/Kan⁵⁰)培養，所得菌落先後以PCR

及限制酶切反應確認，再將符合的菌落質體解序，進行比對。上述獲得的轉殖株質體抽出後，再轉入可表現蛋白的大腸桿菌BL21細胞中，以1mM IPTG誘導表現，取全蛋白質進行SDS-PAGE電泳分析。

將前述SDS-PAGE電泳膠體轉漬於PVDF膜上，以購自Agdia公司的CymMV與ORSV抗血清進行反應。

三、研究結果

起初，為確認蛋白表現的誘導條件，先以廠商提供的大腸桿菌對照菌株E進行誘導表現試驗：先以1mM IPTG進行不同反應時間表現試驗，確認反應時間僅需3小時即可；再比較各廠牌的IPTG藥劑及不同溫度處理，結果發現各廠牌藥劑並無顯著差異，且於37℃誘導處理3小時表現蛋白較多；以37℃處理24小時表現蛋白量略有下降。

將構築CymMV與ORSV病毒鞘蛋白基因的表現質體，轉入大腸桿菌DH5α細胞中，以PCR、限制酶切反應及解序比對，確認所構築的表現質體中確實插入了病毒鞘蛋白全長基因質體。

後續試驗中，將表現質體轉入大腸桿菌BL21細胞中，將菌落以CB5/CH3和

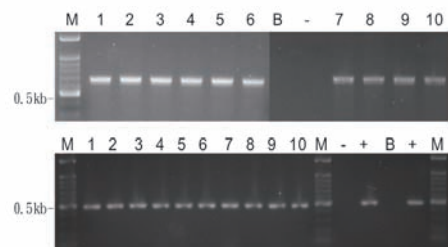


圖1 蘭花病毒鞘蛋白基因轉殖株確認結果：上圖為CymMV，下圖為ORSV鞘蛋白轉殖株菌落分別以引子對CB5/CH3與OB5/OH3進行PCR產物電泳圖。

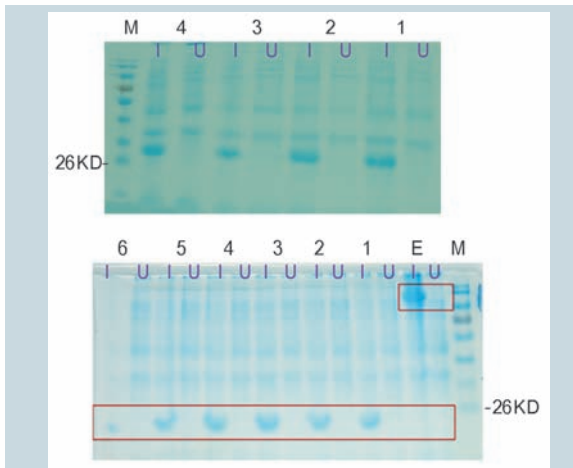


圖 2 CymMV(上)及 ORSV(下)鞘蛋白誘導表現，行 E: 正對照, 1-6: 轉殖株編號，M: 蛋白質分子量標誌(Prestained Protein Ladder, Fermentas Co.)，I: 以 1mM IPTG 於 37°C 處理 3 小時，U: 處理 0 小時

OB5/OH3 引子對經 PCR，確實可增幅出 708bp CymMV 鞘蛋白基因片段，以及 513bp ORSV 鞘蛋白基因片段(如圖 1)。

篩選出轉殖株以 1mM IPTG 於 37°C 誘導處理 3 小時，誘導表現病毒鞘蛋白，結果(如圖 2)所示，同 1 轉殖株經 IPTG 誘導處理後可產生符合預期大小的鞘蛋白：在 CymMV 鞘蛋白基因轉殖株可誘導表現 1 個 28KD 的蛋白，而於 ORSV 鞘蛋白基因轉殖株可誘導表現 1 個 21KD 的蛋白。

為確認前述轉殖株所表現的蛋白是否為 CymMV 及 ORSV 的鞘蛋白，將大腸桿菌全蛋白自 SDS-PAGE 電泳膠體轉漬到 PVDF 膜上，結果當 CymMV 鞘蛋白基因轉殖株全蛋白以 CymMV 抗血清雜合時，除可於 IPTG 處理組中與預期的 28KD 的蛋白結合，另一 72KD 蛋白條帶亦會有結合，在對照組上則無任何蛋白可與此抗血清結合(圖 3 上)，；而相同的處理下所獲

得的大腸桿菌全蛋白以 ORSV 抗血清雜合時，於 IPTG 處理組與對照組中，預期的 28KD 蛋白質條帶則無法與 ORSV 抗血清結合(圖 3 下)。

而 ORSV 鞘蛋白基因轉殖株全蛋白以 ORSV 抗血清雜合時，除可於 IPTG 處理組中與預期的 21KD 的蛋白結合，另一 50KD 蛋白條帶亦會有結合，在對照組上則僅有一 34KD 蛋白可與此抗血清結合，但是其量極少(圖 4 上)；將相同的處理下所獲得的大腸桿菌全蛋白以 CymMV 抗血清雜合時，於 IPTG 處理組與對照組中，則無蛋白質條帶與抗血清結合(圖 4 下)。

由此，可知處理組中 28KD 的蛋白確實是 CymMV 鞘蛋白，21KD 的蛋白確實是 ORSV 鞘蛋白；至於 72KD 與 50KD 蛋白原本在 SDS-PAGE 電泳圖中並不明顯，在雜合反應中卻出現了，推測有可能是轉殖株發生少量的蛋白接續表現(Read-through)；或者可能是所使用的抗血清非單株抗體，故而對其他蛋白條帶有反應。

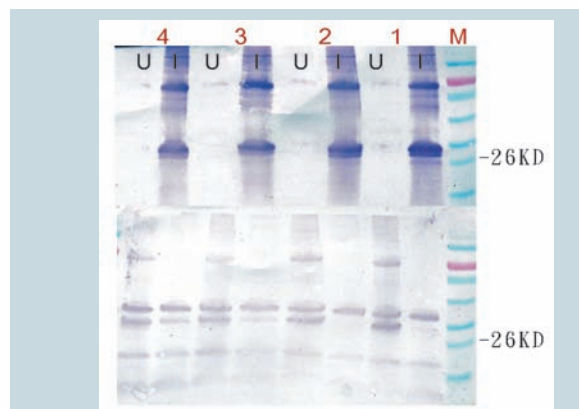


圖 3 CymMV 鞘蛋白基因轉殖株誘導表現之全蛋白以 CymMV(上)及 ORSV(下)抗血清行西方墨點法結果，行 1-4: 轉殖株編號，M: 蛋白質分子量標誌(Prestained Protein Ladder, Fermentas Co.)，I: 以 1mM IPTG 於 37°C 處理 3 小時，U: 處理 0 小時。

研究成果

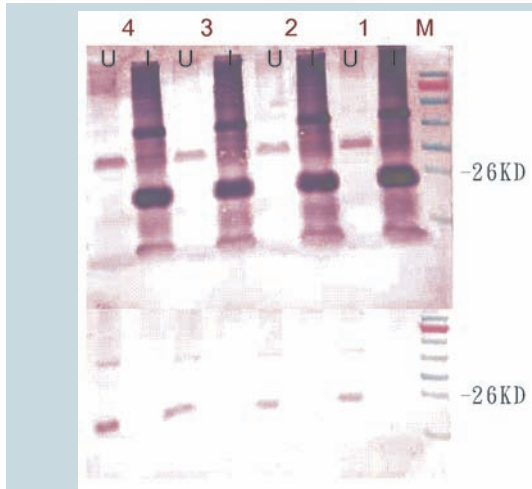


圖 4 ORSV 鞘蛋白轉殖株以 ORSV (上) 及 CymMV (下) 抗血清行西方墨點法結果，行 1-4: 轉殖株編號，M: 蛋白質分子量標誌 (Prestained Protein Ladder, Fermentas Co.)，I: 以 1mM IPTG 於 37°C 處理 3 小時，U: 處理 0 小時誘導鞘蛋白表現。

將有表現病毒鞘蛋白且分子量符合預期的轉殖株選出，以甘油保存於 -80°C 中，準備進行病毒鞘蛋白大量製備工作。

四、結語與未來展望

台灣蝴蝶蘭種苗多經無性組織培養繁殖，極易感染親本所帶有的病毒，因此種苗病毒檢測即於蘭花品質管制上佔有重要一席。目前，蘭花病毒檢測技術仍以酵素連結免疫吸附反應（簡稱 ELISA）與反轉錄-核酸聚合酶連鎖反應（簡稱 RT-PCR）為主，前者針對病毒鞘蛋白進行檢測；後者則針對病毒核酸分子。ELISA 技術適用於大量樣品之病毒檢測操作，加上結果之再現性與穩定性均深獲各界肯定，因此，本場蘭花病毒檢測仍以 ELISA 技術為主，為提升檢測能力與服務品質，本場於 2010 年 1 月 22 日獲 TAF 認證，可出具國際認證之檢測結果報告，對蘭花業者之助益不可謂不大。

雖然，為生產抗血清，以應用於病毒檢測、病毒株鑑定、定量等後續試驗，而進行病毒鞘蛋白量產之分子生物技術於國內發展已多年，但於本場仍屬初次試驗，經不斷檢討修正，本場初步建立蘭花病毒鞘蛋白轉殖株的篩選流程(如圖 5)將病毒鞘蛋白基因片段黏合於表現質體，先轉入大腸桿菌 DH5α，經選擇性培養基與限制酶切反應確認轉殖株，再經基因解序作 2 次確認，將確定有插入病毒鞘蛋白基因的質體，轉入大腸桿菌 BL21 中，以選擇性培養基及菌落 PCR 篩選，將選出的轉殖株以 1mM IPTG 於 37°C 誘導處理 3 小時，取全蛋白行電泳檢視，最後以西方轉漬法確定。

隨著外銷市場的競爭壓力上升，消費國對花卉品質的要求愈趨嚴苛的趨勢，未來蘭花病毒檢測工作的重要性不言可喻，現行的檢測方法中，大量樣品檢測仍以 ELISA 為主，RT-PCR 為輔，因此，本場所選殖之蘭花病毒鞘蛋白基因，日後經大量製備後，可獲得抗血清進行病毒檢測，除有助於本場蘭花病毒檢測成本的減輕，相關技術亦可應用於其他新興蘭花病毒檢測用抗血清生產，將有助於生產較高品質蘭花，提高產業競爭力，開拓台灣蘭花市場。

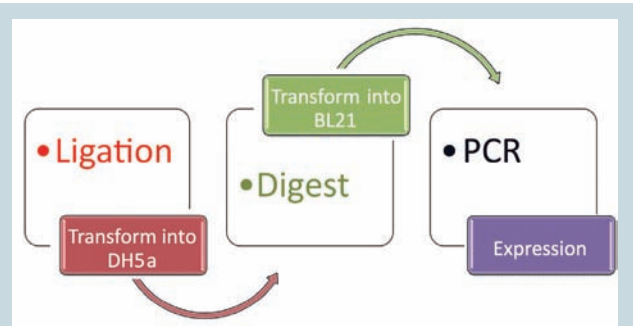


圖 5、蘭花病毒鞘蛋白選殖流程。