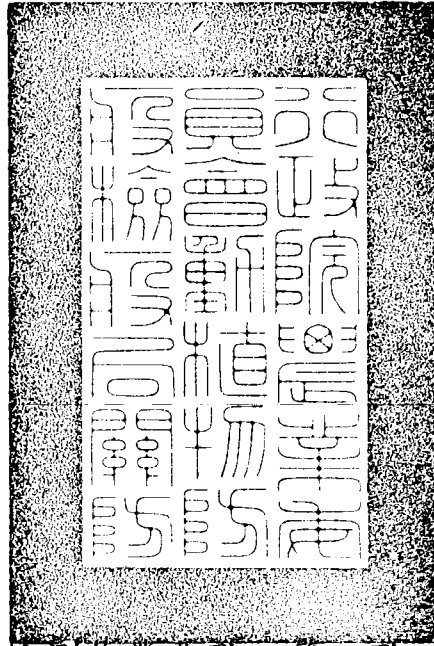


檔 號：
保存年限：

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 令

發文日期：中華民國105年01月11日
發文字號：防檢四字第1041494706A號



修正「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」第二點、第五點附件二，並自即日生效。

附修正「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」第二點、第五點附件二

局長 張淑賢

輸出植物種子特定病原檢測作業要點第二點修正規定

二、本要點適用之特定病原包括十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*)、番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*)、十字花科黑腳病菌 (*Phoma lingam*)、瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*)、菜豆炭疽病菌 (*Colletotricum lindemuthianum*)、豌豆葉斑病菌 (*Ascochyta pisi*)、菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*)、豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*)、南瓜嵌紋病毒 (*Squash mosaic virus*)、馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (*Potato spindle tuber viroid*)、番茄黃色矮化類病毒 (*Tomato chlorotic dwarf viroid*)、辣椒小果類病毒 (*Pepper chat fruit viroid*)、番茄頂矮化類病毒 (*Tomato apical stunt viroid*)、番茄類病毒 (*Tomato planta macho viroid*)、金魚藤潛伏類病毒 (*Columnea latent viroid*) 等。

本要點之輸出植物種子特定病害檢測作業，委由行政院農業委員會種苗改良繁殖場（以下簡稱種苗場）辦理之。

輸出植物種子特定病原檢測作業要點

第五點附件二特定病原之檢測方法修正規定

一、十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 檢測方法

檢測方法

聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

檢測方法簡介

針對十字花科植物種子中黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc) 之檢測。本檢測方法係利用一組引子對(含2條引子序列)進行聚合酶鏈鎖反應，以電泳分析核酸增幅產物所呈現之條帶位置為200bp以檢測病原菌。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品組織液萃取、PCR試劑配製及PCR等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。

1.2.設備

1.2.1.分光光度計：具波長260nm、280nm偵測功能之分光光度計，或可檢測核酸濃度與純度之相關儀器。

1.2.2.離心機：供各式微量離心管離心用。

1.2.3.聚合酶鏈鎖反應器：ABI Veriti™ Thermal cycler或同級品。

1.2.4.電泳裝置：供DNA電泳用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.5.膠片照相裝置：供電泳膠片照相用。

1.2.6.核酸自動萃取機：供檢測植物體的DNA萃取用，使用TAN; Smart LabAssiist-16或同級品。

1.2.7.恆溫箱：供育苗用，可維持25°C及28°C環境。

2.試材與試劑

2.1.植物總量DNA萃取套組

2.2.聚合酶鏈鎖反應(PCR)試劑

- 2.2.1. 檢測目標用引子：可偵測十字花科黑腐病菌之引子對
引子F：Xcc 2f，5'- TGGGTTTTTCGCCTATCAAAC -3'
引子R：Xcc 2r，5'- TGCAACTATTCCTAGCACCG -3'
PCR 增幅產物：DNA片段200bp (顯示該樣品含有十字花科黑腐病病原菌)
註1:合成之引子拆封後，以dH₂O稀釋成適當濃度，分裝後置於 -20°C貯存備用。
- 2.2.2. dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate)：含dATP(deoxyadenosine triphosphate)、dCTP(deoxycytidine triphosphate)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate)及dTTP(deoxythymidine triphosphate)
- 2.2.3. 聚合酶 (Taq DNA polymerase)：Taq DNA Pol.2x Master Mix RED，或同級品。
- 2.2.4. 電泳用試藥：Safe View DNA Stain、Agarose、DNA片段分子量標誌 (DNA molecular weight marker)：可區分100~1000bp 的 DNA 片段。
- 2.3. 正反應對照物質：為將標地基因序列接合於TOPO載體後，轉殖於大腸桿菌增量之質體，以確保檢測與定期監測用質體之處理作業的一致，以維持其檢驗結果之可靠性。
- 2.4. 其他耗材
- 2.4.1. 配合聚合酶連鎖反應器使用之反應容器：如PCR反應管，必須採用無DNase者。
- 2.4.2. 微量吸注器吸管(Pipette filter tips)：配合微量吸注器規格，必須採用無DNase者。
- 2.4.3. 育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。
- 2.4.4. 無菌水、濕紙巾、紙巾、培養皿、三十五格穴盤。
註2：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1 種子催芽及育苗

- 3.1.1. 以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設濕紙巾之培養皿內，並保持種子間互不接觸。
- 3.1.2. 於種子之上再鋪上一層紙巾，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於28°C之恆溫箱中黑暗三小時進行浸種。

- 3.1.3.以三十五格穴盤將種子分別種植於育苗期之介質以濕熱消毒法滅菌處理後，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，放置浸種完成之種子，並覆蓋已消毒之介質。放置於 12 小時光照 28°C，12 小時黑暗 25°C 之生長箱，待植株長出真葉後即可進行採樣。
- 3.2.植物DNA萃取
- 3.2.1.先將所有需要操作之器械及耗材放置於無菌操作台中(藥劑除外)，並開啟紫外線殺菌燈10分鐘以上，全程必須於無菌操作台內操作。開始操作時，務必關閉紫外線殺菌燈。
- 3.2.2.將待檢植物葉片置於2ml離心管中，1000µl Pipette及1000µl tip吸起Lysis Buffer (LB) 400µl，加到含有葉片之2ml離心管中，將離心管置於均質機以1000 rpm震盪30秒，樣品均勻攪拌後，於室溫中靜置約10min。
- 3.2.3.靜置樣品期間，TAN Bead combo kit 96孔盤置於無菌操作台上，並從塑膠包裝袋內取出，將各試劑添加至以下直行管柱內。(依樣品數量決定管柱使用量)
- 3.2.4.依照試劑套組指示於各個反應孔內加入藥劑。
- 3.2.4.1.第2直行/第8直行：用1000µl pipette及1000µl tip將Wash Buffer1(WB1)800µl加入其管柱中。
- 3.2.4.2.第2直行/第8直行：用100µl pipette及100µl tip將Magnetic Beads混合均勻後80µl加入其管柱中。
- 3.2.4.3.第3直行/第9直行：用1000µl pipette及1000µl tip將Wash Buffer2(WB2)800µl加入其管中。
- 3.2.4.4.第4直行/第10直行：用1000µl pipette及1000µl tip將Wash Buffer3 (WB3)800µl加入其管柱中。
- 3.2.4.5.第6直行/第12直行：用100µl pipette及100µl tip將Elution Buffer(EB)100µl加入其管柱中。
- 3.2.5.將已靜置10min之樣品溶液於試管震盪器震盪約10秒後，置於高速離心機中離心10,000 rpm、10min。將上清液倒入第1及第7直行管柱內。
- 3.2.6.用100µl pipette及100µl tip將70% EtOH 100µl加入第1及第7直行管柱中，並以tip混合均勻。
- 3.2.7.用1000µl pipette及1000µl tip將Binding Buffer 400µl加入第1及第7直行管柱中，並以tip混合均勻。
- 3.2.8.打開核酸自動萃取機(Smart LabAsist-16)電源開關(機器後方右下角)。
- 3.2.9.將96孔盤斜角朝左下方，順著軌道推到底置入機器中。

- 3.2.10. 將2條攪拌棒順著磁棒架軌道推到底，並關上門。
- 3.2.11. 選擇操作流程”DNA-BWE”，按”Start”開始運作。
- 3.2.12. 待流程結束(約45分鐘後)，打開門，取出96孔盤，置於無菌操作台上。
- 3.2.13. 用100µl pipette及100µl tip將第6直行及第12直行之Elution Buffer (EB)吸出並置入新的1.5ml離心管中。最後於-20°C冰箱中保存。

3.3. 目標病原菌PCR檢測

- 3.3.1. 植物總量萃取液取約3µl進行PCR反應。

十字花科黑腐病病原菌檢測：引子濃度為10µM，預期增幅出200 bp DNA 片段

Primer 名稱	序列
Xcc 2f	5'- TGGGTTTTTCGCCTATCAAAC -3'
Xcc 2r	5'- TGCAACTATTCCTAGCACCG -3'

- 3.3.2. PCR 試劑建議用量(以 Taq DNA Pol.2X master mix RED 為例)

Primer Xcc-2f, 10µM	2.0	µl
Primer Xcc-2r, 10µM	2.0	µl
water, nuclease-free	7.0	µl
2X PCR master mix	12.5	µl
Template	1.5	µl
<hr/> Total volume	25.0	µl

※PCR 相關試劑廠牌與使用量依各單位使用者自行決定

- 3.3.3. PCR 條件

A	95°C	5 min
B	95°C	30 sec
C	60°C	30 sec
D	72°C	30sec

重複步驟(B)到(D)35 個循環

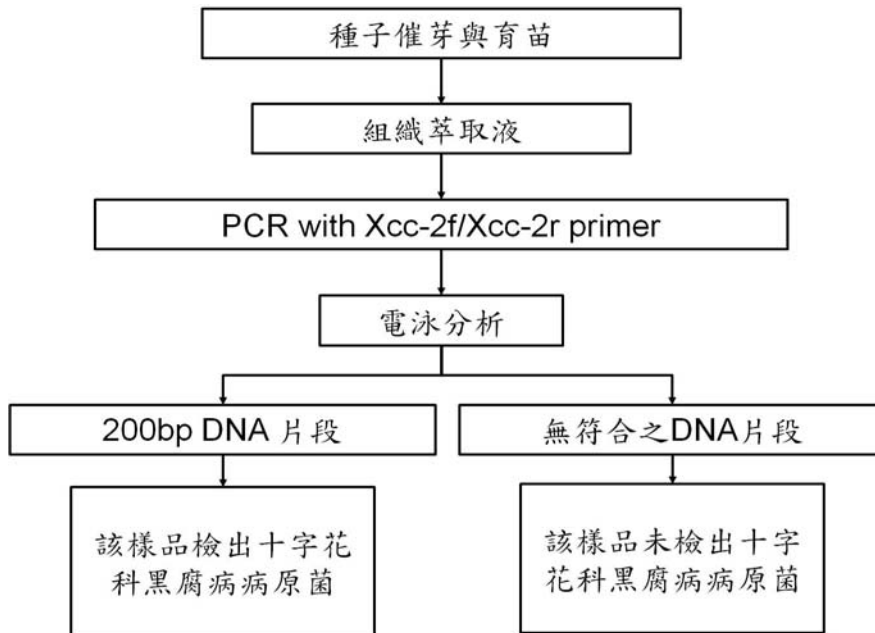
E	72°C	10 min
F	4°C	∞

- 3.4.4. PCR檢測電泳分析：每次製備正反應對照物質均需進行定序確認目標序列

無誤，並於每次實驗時同時測試正反應及負反應對照組樣品。檢體DNA之電泳結果，須與正反應對照組及DNA片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體DNA與正反應對照組DNA二者之PCR增幅產物大小相同，且經由DNA分子量標記物質估算PCR 增幅產物大小無誤，即判定該檢體含有Xcc。

3.4.5. 流程

十字花科黑腐病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

每次製備正反應對照物質均需進行定序確認目標序列無誤，並於每次實驗時同時測試正反應及負反應對照組樣品。檢體 DNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 DNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組 DNA 二者之 PCR 增幅產物大小相同，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅 DNA 產物大小為 200bp 片段，即判定該檢體含有該成分。

二、瓜類細菌性果斑病 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法 (Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對瓜類種子中細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行西瓜果斑病菌之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1. 環境與設備

1.1. 環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2. 設備

1.2.1. ELISA讀值分析儀：具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2. 恆溫培養箱：可維持37°C恆溫者。

1.2.3. 滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4. 八爪微量吸注器及微量吸管。

2 試材與試劑

2.1. 試劑

2.1.1. 洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g
先調pH值至7.4再加去離子水至總量1000ml	

2.1.2. 被覆緩衝液(coating buffer)

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
----------------------------------	--------

Na₂CO₃ 1.59 g

先調pH值至9.6再加PBST至總量1000ml

2.1.3. 樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Polyvinylpyrrolidone(PVP) 20 g

Ovalbumin 2 g

Na₂SO₃(anhydrous) 1.3 g

Tween 20 0.5 ml

NaCl 8 g

KH₂PO₄ 0.2 g

Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.15 g

KCl 0.2 g

先調pH值至7.4再加去離子水至總量1000ml

2.1.4. 結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA 2.0 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1 000ml

2.1.5. 基質緩衝液(Substrate buffer)

C₄H₁₁NO₂ 97.0 ml

NaN₃ 0.2 g

MgCl₂ · 6H₂O 0.1 g

先調pH值至9.8再加去離子水至總量1000ml

2.1.6. 抗血清：Anti-Aac IgG coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.2. 其他耗材

2.2.1. 反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2. 微量吸注器吸管(Pipette tips)：配合微量注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3. 育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4. 三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1. 種子催芽及育苗

3.1.1 種子播種於 3 寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子。

3.1.2 下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.3 種子發芽後每 1 植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，栽培到 3 片本葉長出後，每株採樣第 1 及第 2 片葉，置於具編號的採集袋中。

3.2. 細菌檢測

3.2.1. 將 Anti-Bacteria coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 96 格微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 4 小時。

3.2.2. 取出後以洗滌液清洗微量盤，重複清洗 3 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。將測試之樣品以消毒之刀片切取組織，稱重後加入 10 倍量之樣品萃取緩衝液(即植物組織：萃取緩衝液=1:10(W/V))，置於研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.3. 取組織研磨液分別注入 96 格微量盤中，每穴 100 μ l，每樣品 2 重複，並以健康西瓜組織液(負對照)及含西瓜果斑病菌組織液(正對照)當作對照組。

3.2.4. 將微量盤放入保濕盒於 4 $^{\circ}$ C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤，再重複清洗 3 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.5. 將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 1 小時。

3.2.6. 取出後以洗滌液清洗微量盤，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

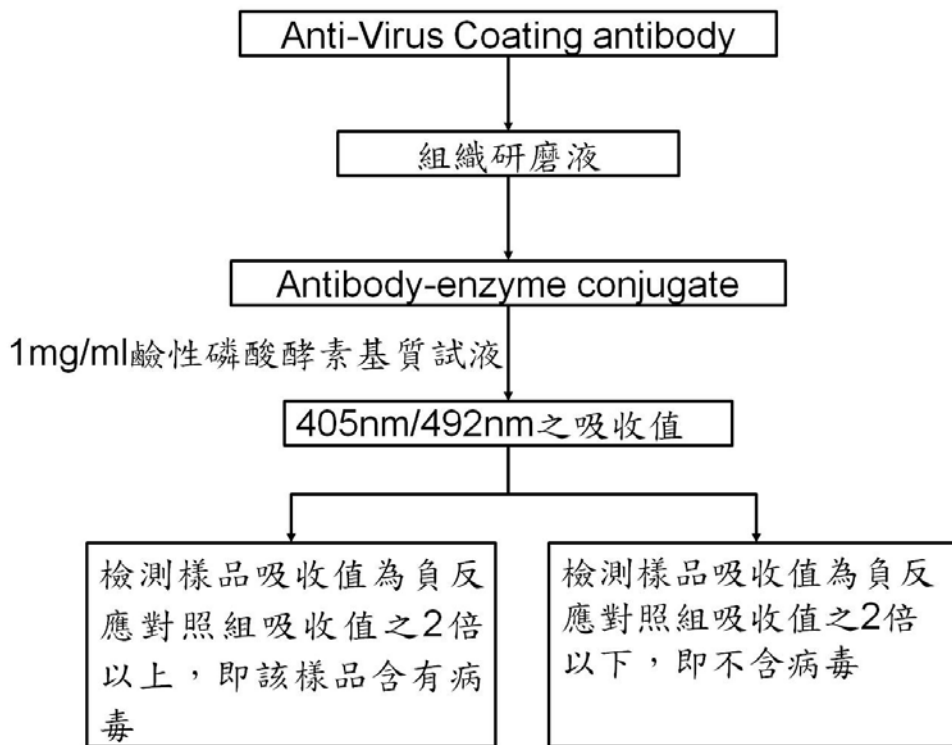
3.2.7. 將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於室溫暗室靜置 1 小時。

3.2.8. 取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3. 流程

瓜類細菌性果斑病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 *Acidovorax avenae subsp. citrulli* 組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 Aac。

三、胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

適用於瓜類種子中胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus* , CGMMV) 之定性檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行CGMMV之檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2. 設備

1.2.1.ELISA讀值分析儀：具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2.恆溫培養箱：可維持37°C恆溫者。

1.2.3.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4.八爪微量吸注器及微量吸管。

1.2.5.恆溫箱：供育苗用，可維持28°C環境。

2 試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g
先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml	

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g
先調 pH 值至 9.6 再加 PBST 至總量 1000ml	

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	10.0 ml
PVP	20.0 g
先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml	

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP-40	20 g
Na azide	0.2 g
先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml	

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamin	97.0 ml
Na azide	0.2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g
先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml	

2.1.6.抗血清：Anti- CGMMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.2.其他耗材

2.2.1.反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2.微量吸注器吸管(Pipette tips)：配合微量吸注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.無菌水、無菌濾紙、培養皿、三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放

置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28°C 之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2. 病毒檢測

3.2.1.將 Anti-Virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 96 格微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37°C 恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之瓜類病毒 CGMMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液=1:10(W/V))，置於研磨袋研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100 μ l，每樣品 2 重複，並以健康瓜類組織研磨液(負對照)及含 CGMMV 病毒瓜類組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4°C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37°C 恆溫箱反應 4 小時。

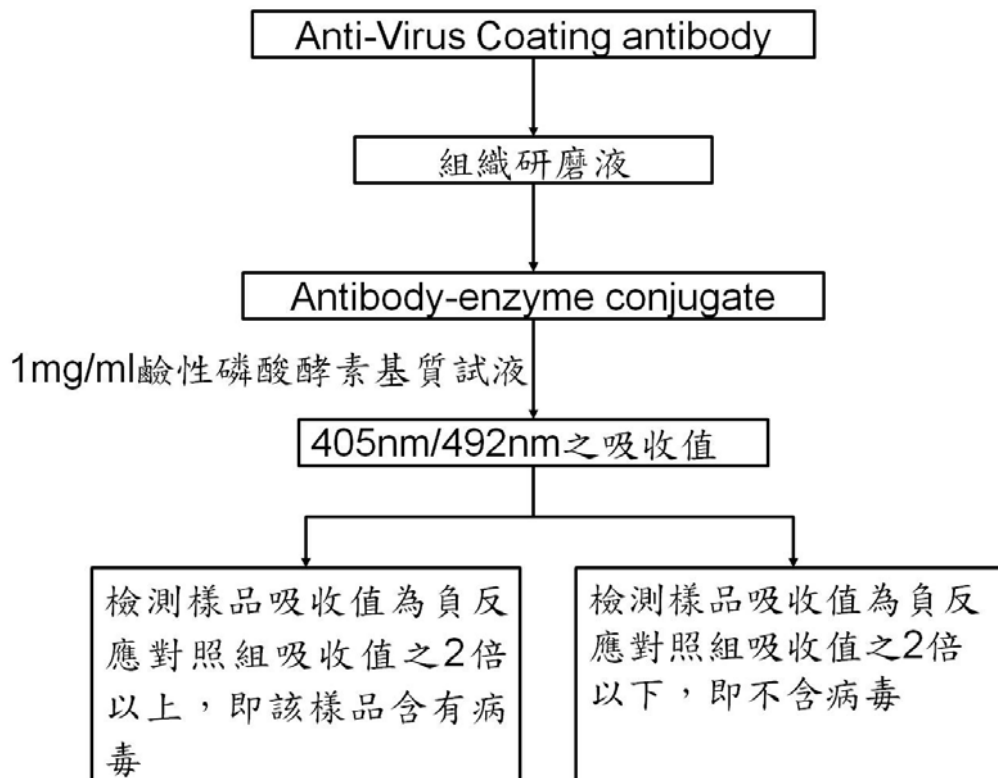
3.2.7.取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium (PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於 37°C 暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定

3.3. 流程

胡瓜綠斑嵌紋病毒檢測流程示意圖



4.結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 CGMMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 CGMMV。

四、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對瓜類種子中胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)之定性檢測。本檢測方法係以間接酵素聯結抗體免疫吸附法(indirect ELISA)進行CMV之檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2.設備

1.2.1.ELISA讀值分析儀：或同級品，具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2.恆溫培養箱：可維持37°C恆溫者。

1.2.3.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4.八爪微量吸注器及微量吸管。

2.試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g

先調pH值至7.4再加去離子水至總量
1000ml

2.1.2. 樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)：

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g

先調pH值至9.6再加PBST至總量1000ml

2.1.3. 結合緩衝液(Conjugate buffer)：

BSA	2.0 g
PVP-40	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.4. 基質緩衝液(Substrate buffer)：

Diethanolamine	97.0 ml
NaN ₃	0.2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.5. 抗血清：Anti- CMV IgG、Goat anti-rabbit AP conjugate

2.2. 其他耗材：

2.2.1. 反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2. 微量吸注器吸管 (Pipette tips)：配合微量吸注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3. 育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4. 三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1. 種子催芽及育苗

3.1.1 種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限1粒種子。

3.1.2 下壓穴盤中心之介質約0.5公分，覆蓋介質後，置於包覆32目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.3 種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，栽培到三片本葉長出後，每株採樣第1及第2之三出葉各一片小葉，置於具編號的採集

袋中。

3.2. 病毒檢測

3.2.1. 將測試樣品稱重，加 10 倍量之樣品萃取緩衝液(即植物組織：萃取緩衝液 = 1:10(W/V))，置於研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.2. 取組織研磨液分別注入 96 格微量盤中，每穴 100 μ l，每樣品 2 重複，並以健康植物組織液(負對照)及含病毒(CMV)組織液(正對照)當作對照組。

3.2.3. 將微量盤放入保濕盒於 4 $^{\circ}$ C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.4. 將病毒抗血清以結合緩衝液(conjugate buffer)依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 2 小時。

3.2.5. 取出後以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6. 將山羊抗兔血清連接酵素(Goat anti-rabbit AP conjugate)以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 2 小時。

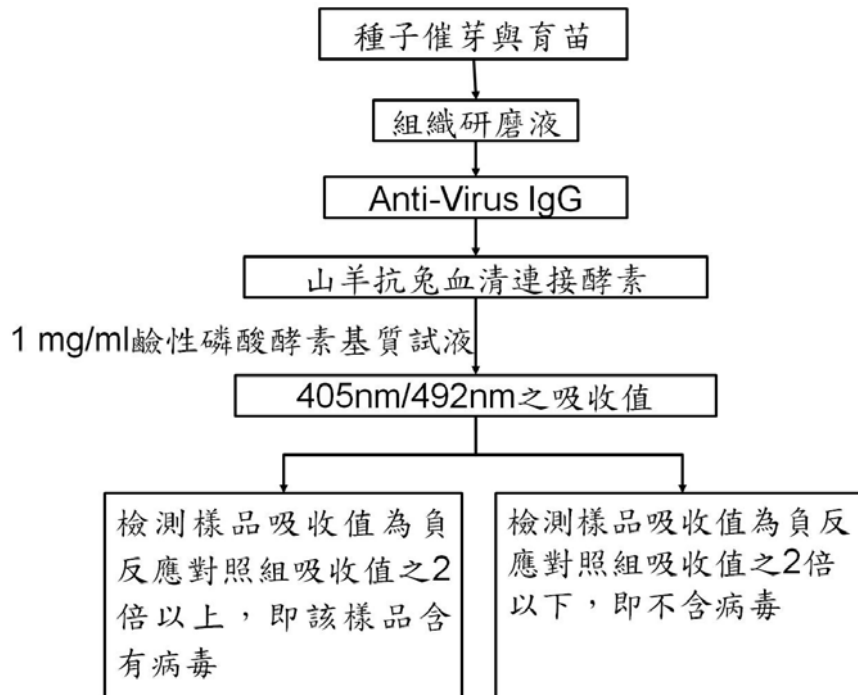
3.2.7. 取出後以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.8. 將 p-nitrophenyl phosphate disodium (PNP) 與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於 37 $^{\circ}$ C 暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9. 取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。註 2：相關試劑廠牌與使用量依各單位使用者自行決定

3.3 流程

胡瓜嵌紋病毒檢測流程示意圖



4. 結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 CMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 CMV。

五、番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

檢測方法簡介

針對茄科種子中番茄嵌紋病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)之檢測。本檢測方法係利用兩組引子對進行一步驟 RT-PCR反應，以偵測ToMV 之外鞘蛋白(coat protein, CP)轉錄體，並增加植物 β -actin轉錄體之專一性增幅條帶作為植物RNA樣品的正對照，進行電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置分別為550bp及121bp。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品RNA萃取、one-step RT-PCR試劑配製及one-step RT-PCR等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。one-step RT-PCR相關試劑之配製(如引子稀釋、酵素混合分裝等)應於無菌操作台內進行。

1.2.設備

1.2.1.核酸檢測：具波長260nm、280nm偵測功能之分光計，或可檢測核酸濃度與純度之相關儀器。

1.2.2.低溫離心機：可達 $20,000 \times g$ ，並具 4°C 溫控功能。

1.2.3.離心機：供各式微量離心管離心用。

1.2.4.聚合酶鏈鎖反應器：ABI Veriti™ Thermal cycler或同級品。

1.2.5.電泳裝置：供DNA電泳用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.6.膠片照相裝置：供電泳膠片照相用。

1.2.7.核酸自動萃取機：供檢測植物體的DNA萃取用，使用TAN; Smart LabAssiist-16或同級品。

1.2.8.恆溫箱：供育苗用，可維持 25°C 及 28°C 環境。

2.試材與試劑

2.1. 試劑

2.1.1. 反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)試劑

2.1.1.1 檢測目標用引子

2.1.1.1.1 可偵測ToMV病毒外鞘蛋白轉錄體之引子對

引子F：ToMV no.1，5'- Tgg gCC CCT ACC ggg ggT -3'

引子R：ToMV no.3，5'- TTC AAC AgC AgT TCA gCg Ag -3'

RT-PCR 增幅產物：DNA 片段大小 550 bp(顯示該樣品含有病毒 ToMV)

2.1.1.1.2 可偵測植物 β -actin轉錄體之引子對

引子F：ActinF，5'- CAT gTT CCC Tgg TAT TgC TgA -3'

引子R：ActinR，5'- gAT CCT CCA ATC CAg ACA CTg TA-3'

RT-PCR 增幅產物：DNA 片段121 bp (顯示該樣品含有植物RNA)

※合成之引子拆封後，以0.1X DEPC water稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C儲存備用。

2.1.2.dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate)：含dATP (deoxyadenosine triphosphate)、dCTP (deoxycytidine triphosphate)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate)及dTTP (deoxythymidine triphosphate)。

2.1.3.反轉錄酵素(Reverse Transcriptase)：AMV-RTase (5 U/ μ L)，或同級品。

2.1.4.聚合酶(*Taq* DNA polymerase)：AMV-Optimized *Taq* (5 U/ μ L)，或同級品。

2.1.5.電泳用試藥：Safe View DNA Stain、Agarose、Loading dye(含bromophenol blue、xylene cyanol FF或功用相同者)、DNA片段分子量標誌(DNA molecular weight marker)，可區分100-1000bp的DNA片段。

2.2. 其他耗材

2.2.1.配合聚合酶鏈鎖反應器使用之反應容器：如PCR反應管、96孔樣品盤等。

2.2.2.微量吸注器吸管(Pipette filter tips)：配合微量吸注器規格，如Aerosol barrier pipette tips或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.無菌水、滅菌濕紙巾、可密閉之小型培養容器、1.5吋栽培盆。

註1：所有耗材均必須採用無DNase、RNase者。

註2：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1 種子催芽與育苗

- 3.1.1. 以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，以滅菌過之鑷子夾取個別種子，擺放於鋪設濕紙巾(滅菌)之容器內，種子間互不接觸。
- 3.1.2. 於種子之上再鋪一層濕紙巾，加入無菌水保持濕潤。將容器密閉，擺置 25°C 定溫箱，進行催芽。每 24 小時觀察是否發芽，並持續加入無菌水，保持濕潤。使用於育苗期之介質以濕熱消毒法滅菌處理後，填充於 1.5 吋栽培盆。
- 3.1.3. 下壓盆面中心之介質約 0.5 公分，放置已催芽之種子後，覆蓋介質。放置於 12 小時光照 28°C，12 小時黑暗 25°C 之生長箱，待植株長出真葉後即可進行採樣。

3.2. RNA 萃取

- 3.2.1. 先將所有需要操作之器械及耗材放置於無菌操作台中(藥劑除外)，並開啟紫外線殺菌燈 10 分鐘以上，全程必須於無菌操作台內操作。開始操作時，務必關閉紫外線殺菌燈。
- 3.2.2. 將待檢植物葉片置於 2ml 離心管中，1000 μ l Pipette 及 1000 μ l tip 吸起 Lysis Buffer (LB) 400 μ l，加到含有葉片之 2ml 離心管中，將離心管置於均質機以 1000 rpm 震盪 30 秒，樣品均勻攪拌後，於室溫中靜置約 10min。
- 3.2.3. 靜置樣品期間，TAN Bead combo kit 96 孔盤置於無菌操作台上，並從塑膠包裝袋內取出，將各試劑添加至以下直行管柱內。(依樣品數量決定管柱使用量)
- 3.2.4. 依照試劑套組指示於各個反應孔內加入藥劑。
 - 3.2.4.1. 第 2 直行/第 8 直行：用 1000 μ l pipette 及 1000 μ l tip 將 Wash Buffer1(WB1)800 μ l 加入其管柱中。
 - 3.2.4.2. 第 2 直行/第 8 直行：用 100 μ l pipette 及 100 μ l tip 將 Magnetic Beads 混合均勻後 80 μ l 加入其管柱中。
 - 3.2.4.3 第 3 直行/第 9 直行：用 1000 μ l pipette 及 1000 μ l tip 將 Wash Buffer2(WB2)800 μ l 加入其管柱中。
 - 3.2.4.4. 第 4 直行/第 10 直行：用 1000 μ l pipette 及 1000 μ l tip 將 Wash Buffer3 (WB3)800 μ l 加入其管柱中。
 - 3.2.4.5. 第 6 直行/第 12 直行：用 100 μ l pipette 及 100 μ l tip 將 Elution Buffer(EB)100 μ l 加入其管柱中。
- 3.2.5. 將已靜置 10min 之樣品溶液於試管震盪器震盪約 10 秒後，置於高速離心機中離心 10,000 rpm、10min。將上清液倒入第 1 及第 7 直行管柱內。

- 3.2.6.用 100µl pipette 及 100µl tip 將 70% EtOH 100µl 加入第 1 及第 7 直行管柱中，並以 tip 混合均勻。
- 3.2.7.用 1000µl pipette 及 1000µl tip 將 Binding Buffer 400µl 加入第 1 及第 7 直行管柱中，並以 tip 混合均勻。
- 3.2.8.打開核酸自動萃取機(Smart LabAsist-16)電源開關(機器後方右下角)。
- 3.2.9.將 96 孔盤斜角朝左下方，順著軌道推到底置入機器中。
- 3.2.10.將 2 條攪拌棒順著磁棒架軌道推到底，並關上門。
- 3.2.11.選擇操作流程"RNA-BWE",按"Start"開始運作。
- 3.2.12.待流程結束(約 45 分鐘後)，打開門，取出 96 孔盤，置於無菌操作台上。
- 3.2.13.用 100µl pipette 及 100µl tip 將第 6 直行及第 12 直行之 Elution Buffer (EB) 吸出並置入新的 1.5ml 離心管中。最後於-20°C 冰箱中保存。

3.3.目標病毒 RT-PCR 檢測：

ToMV外鞘蛋白之轉錄體與植物β-actin基因之轉錄體均需檢測，植物總量 RNA取約1µl進行RT-PCR反應。

3.4.ToMV外鞘蛋白基因轉錄體檢測：10µM，預期DNA片段550bp片段

Primer 名稱	序列
ToMV no.1	5'- Tgg gCC CCT ACC ggg ggT -3'
ToMV no.3	5'- TTC AAC AgC AgT TCA gCg Ag -3'

3.5.植物β-actin基因轉錄體檢測：10 µM，預期DNA片段121 bp片段

Primer 名稱	序列
ActinF	5'- CAT gTT CCC Tgg TAT TgC TgA -3'
ActinR	5'- gAT CCT CCA ATC CAg ACA CTg TA -3'

3.6. RT-PCR 條件

A	50°C	30 min
B	92°C	2min
C	92°C	30 sec
D	55°C	30sec
E	72°C	7min
重複步驟(C)到(E)35 個循環		
F	4°C	∞

3.7.One-step RT-PCR 試劑建議用量(以 Takara 為例)

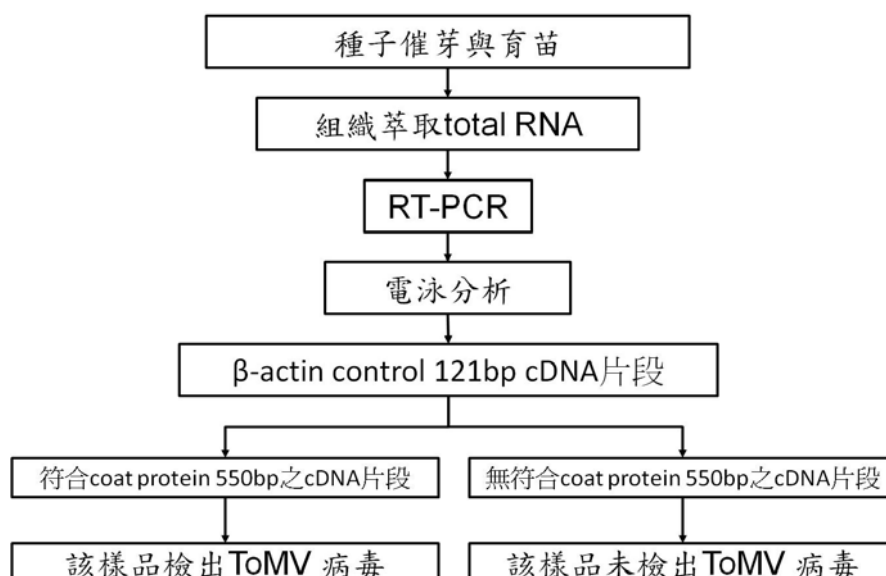
Rnase free distilled water	4.75	μl
10×buffer	1.25	μl
25mMMgCl ₂	2.50	μl
10mMdNTP	1.25	μl
Rnase inhibitor (40Units/μl)	0.25	μl
AMV RTase(5Units/μl)	0.25	μl
AMV Optimized Taq(5Units/μl)	0.25	μl
Primer ToMV no.1(10Mm)	0.25	μl
Primer ToMV no.3 (10μM)	0.25	μl
Primer ActinF (10μM)	0.25	μl
Primer ActinR (10μM)	0.25	μl
Template(總量 RNA)	1.00	μl
Total	12.50	μl

(※RT-PCR 相關試劑廠牌與使用量依各單位使用者自行決定)

3.8.PCR 檢測電泳分析:每次製備正反應對照物質均需進行定序確認目標序列無誤,並於每次實驗時同時測試正反應(罹染 ToMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。檢體 cDNA 之電泳結果,須與正反應對照組及 DNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對,當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 PCR 增幅產物大小相同,且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小無誤,即判定該檢體含有 ToMV。

3.9.流程

番茄嵌紋病毒檢測流程示意圖



4.結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 ToMV 組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。檢體 cDNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 cDNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 cDNA 與正負反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物，皆有出現 121bp 之植物 β -actin 基因 cDNA 產物，即判斷 RT-PCR 成功，當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物大小相同，且經由 cDNA 分子量標記物質估算 RT-PCR 增幅產物大小為 550bp，即判定該檢體含有 ToMV。

六、十字花科黑腳病菌 (*Phoma lingam*) 檢測方法

檢測方法

濾紙法(Standard blotter test, SBT)

檢測方法簡介

本方法適用於十字花科黑腳病菌(*Phoma lingam*)之檢測。利用濾紙法進行種子上之病原真菌培養，觀察病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀、鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.3.高溫高壓滅菌釜(Hirayama HVE-50或同級品以上)

1.2.4.培養箱：可維持20-24 °C (可調整光照週期與溫度，具近紫外光(波長300-400 nm)燈管) (名器F-360DN或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.直徑 9 cm 圓形濾紙(TOYO ADVANTEC® No. 1 或 Whatman® No. 1)

2.4.0.2% 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D)鈉鹽溶液(Sigma 或同級品以上)

2.5.無菌水

2.6.水瓊酯培養基(water agar medium, WA) (BD Bacto agar 或同級品以上)

2.7.正對照菌株：經鑑定具病原性之 *Phoma lingam* (有性時期: *Leptosphaeria maculans*) 菌株，以 WA 培養於 20-24°C 培養箱備用。

3.步驟與方法

3.1.將 3 張經滅菌過的直徑 9 cm 圓形濾紙添加 5 ml 的 0.2% 2,4-D 鈉鹽溶液後，

置入直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿中，以抑制種子發芽。

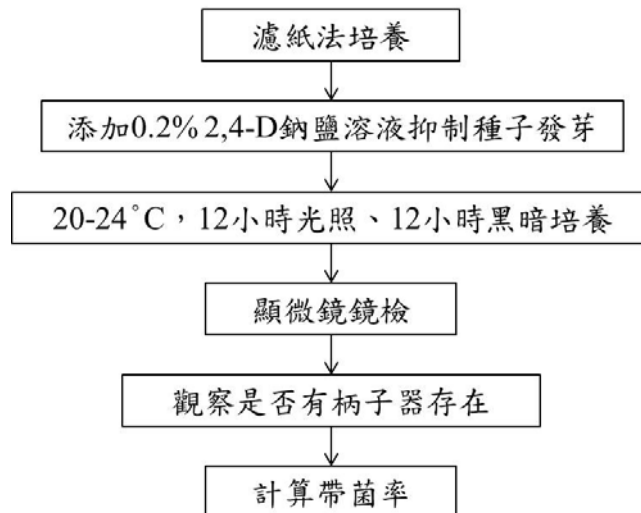
3.2.每個培養皿放入 50 顆種子，共 20 個培養皿。

3.3.將培養皿置於 20-24 °C 培養箱，在 12 小時光照、12 小時黑暗的環境下培養。

3.4.在一放有濕濾紙(添加 5 ml 的 0.2% 2,4-D 鈉鹽溶液)的培養皿中放入正對照菌株直徑 5 mm 新鮮菌絲塊，與待測樣品共同培養。

3.5.流程

十字花科黑腳病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 International Seed Testing association. 2008. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-004: Detection of *Phoma lingam* on *Brassica* spp.)，培養至第 6 天時，先以解剖顯微鏡 25 倍放大倍率觀察種子及周邊濾紙上是否已有 *P. lingam* 鬆散的銀白色菌絲(圖 1)產生。待培養至第 11 天，以解剖顯微鏡 25 倍放大倍率進行第二次檢查，受測種子及周邊濾紙是否有與 *Phoma lingam* 標準菌株相同之柄子器產生(圖 2-圖 4)，有觀察到柄子器的種子即為受感染種子。



圖 1. 種子及周邊濾紙上 *Phoma lingam* 鬆散的銀白色菌絲。



圖 2. *Phoma lingam* 的柄子器散生於甘藍種子及周邊濾紙上。



圖 3. 解剖顯微鏡下觀察之受感染種子及周邊濾紙上 *Phoma lingam* 鬆散的銀白色菌絲及其柄子器。

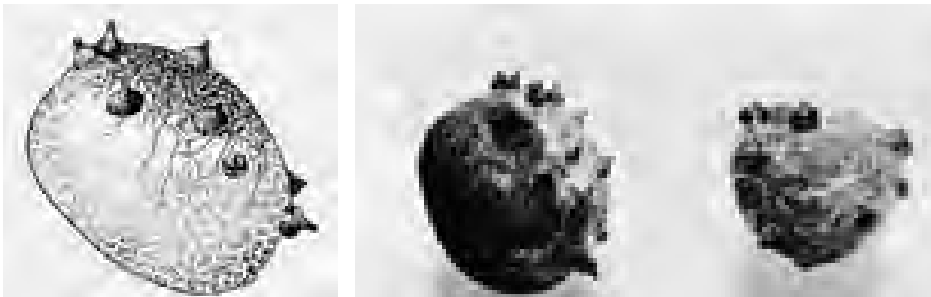


圖 4. 受感染種子表面可見 *Phoma lingam* 柄子器。

七、瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*) 檢測方法

檢測方法

冷凍濾紙法(Deep freezing blotter test, DFB)

檢測方法簡介

本方法適用於瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*) 之檢測。利用濾紙法配合低溫處理進行種子上的病原真菌培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀、鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.3.高溫高壓滅菌釜(Hirayama HVE-50或同級品以上)

1.2.4.培養箱：可維持20-24 °C (可調整光照週期與溫度，具近紫外光(波長300-400 nm)燈管)(名器F-360DN或同級品以上)。

1.2.5.冷凍櫃：可維持-20±2 °C(Ruey Shing LCF411-SL或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.直徑 9 cm 圓形濾紙(TOYO ADVANTEC® No. 1 或 Whatman® No. 1)

2.4.馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar, PDA) (BD Difco 或同級品以上)

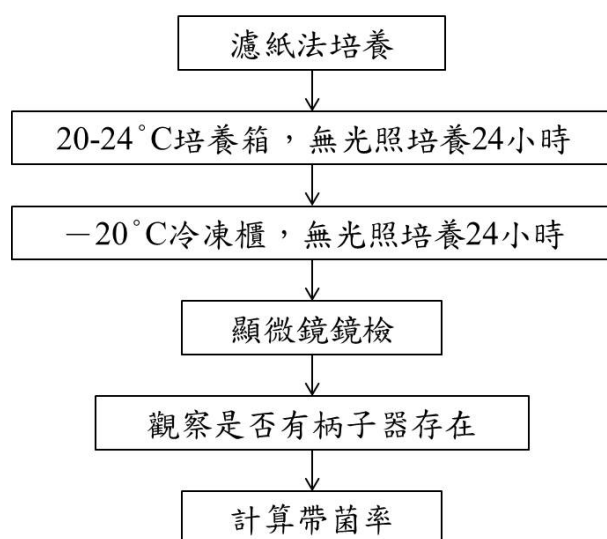
2.5.無菌水

2.6.正對照菌株：經鑑定具病原性之 *Didymella bryoniae* 菌株，以 PDA 培養於 20-24 °C 備用。

3.步驟與方法

- 3.1. 將 6 張經滅菌的直徑 9 cm 圓形濾紙以無菌水浸濕後置入直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿中。
- 3.2. 每個培養皿內置入 10 顆種子，共 40 個培養皿。
- 3.3. 將培養皿放到 20-24 °C 培養箱，無光照培養 24 小時。
- 3.4. 將培養皿移到 -20 °C 冷凍櫃，無光照培養 24 小時。
- 3.5. 在一放有濕濾紙的培養皿中放入正對照菌株直徑 5 mm 新鮮菌絲塊，於 20-24 °C 培養箱內，12 小時光照培養、12 小時無光照培養。
- 3.6. 將受測樣品與正對照菌株共同培養於 20-24 °C 培養箱，以 12 小時光照、12 小時無光照培養的循環條件，培養 5~8 天後取出觀察。
- 3.7. 流程

十字花科黑腳病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 Mathur, S. B. and Kongsdal, O. 2003. Chapter 5. Blotter method. p89-317. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. 1st ed. 425p. International Seed Testing Association (ISTA) published. Bassersdorf, CH-Switzerland)，以解剖顯微鏡放大 50 倍率，檢查受測種子及其周邊濾紙，是否有與 *Didymella bryoniae* 標準菌株相同之柄子器產生(圖 1、圖 2 與圖 3)。有觀察到柄子器的種子即為受感染種子。

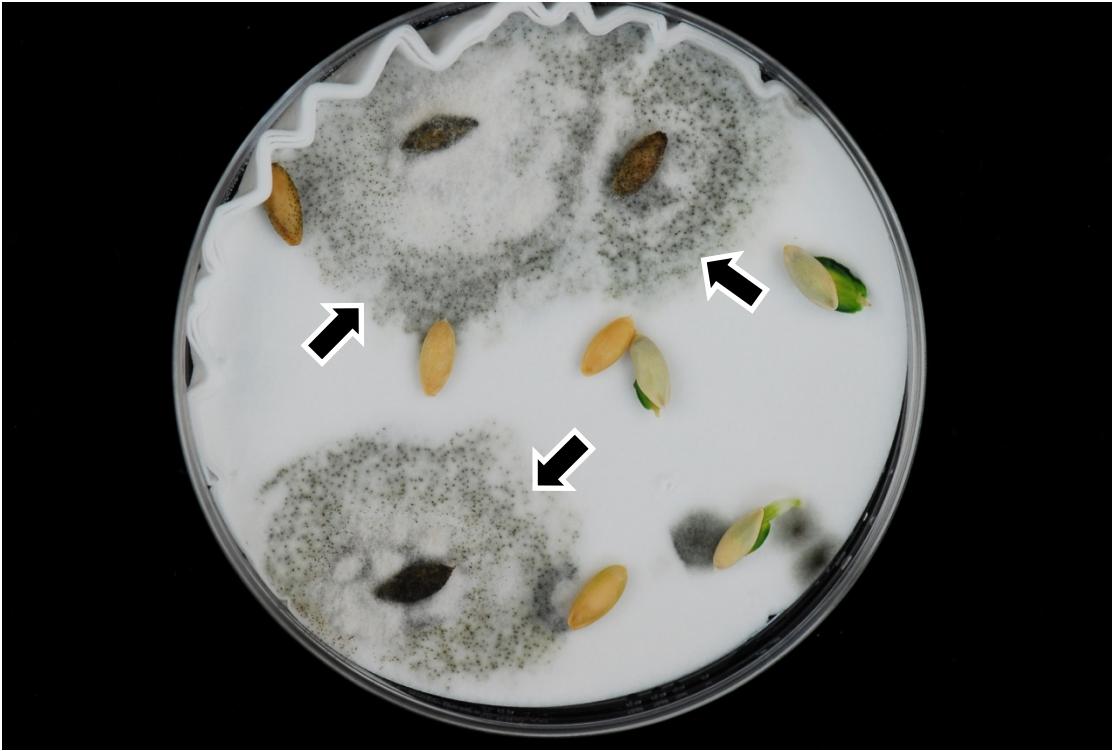


圖 1. 受感染之種子及其周邊濾紙，可觀察到黑褐色柄子器產生。



圖 2. 受感染的種子上有許多黑褐色柄子器產生。



圖 3. *Didymella bryoniae* 在胡瓜種子上的柄子器。

八、菜豆炭疽病菌 (*Colletotricum lindemuthianum*) 檢測方法

檢測方法

紙巾測試法(Paper toweling test)

檢測方法簡介

本方法適用於菜豆炭疽病菌(*Colletotricum lindemuthianum*)之檢測。利用紙巾測試法進行種子上的病原真菌培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀及鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.4.高溫高壓滅菌釜(HIRAYAMA HVE-50或同級品以上)

1.2.5.培養箱：可維持20-24 °C (名器F-360DN或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.紙巾 350 x 450 mm (Mayflower 或同級品以上)

2.3.馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar, PDA) (BD Difco 或同級品以上)

2.4.1%次氯酸鈉(Clorox[®] 或同級品以上)

2.5.無菌水

3.步驟與方法

3.1.菜豆種子浸泡於 1%次氯酸鈉進行表面消毒 10 分鐘，取出以無菌水漂洗 3 次後置於滅菌紙巾上陰乾。

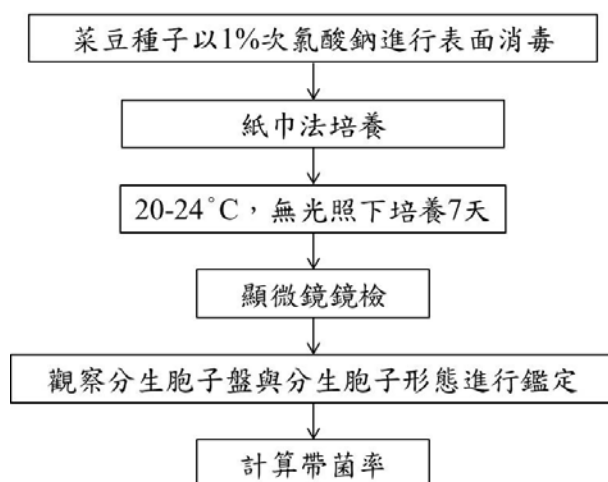
3.2.每個培養皿放置 1 張滅菌過、經無菌水浸濕的雙層 350 x 450 mm 紙巾

3.3.將已表面消毒之 50 顆種子個別放置於上述 3.2 培養皿，再用滅菌過、經無菌水浸濕的單層 350 x 450 mm 紙巾覆蓋於種子上，之後將紙巾縱向折兩次。

3.4.將培養皿置於 20-24 °C 培養箱無光照下培養。

3.5.流程

菜豆炭疽病菌檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 International Seed Testing association. 2008. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-006: Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* on *Phaseolus vulgaris* (Bean))，待測種子培養 7 天後，將單層紙巾移除，用肉眼觀察經去除種皮的子葉上有無明顯與健康組織區隔的黑色病斑，以 25 倍放大倍率之顯微鏡觀察每個病斑上有無帶有暗褐色剛毛(setae)的分生孢子盤(acervuli)。

4.2.*C. lindemuthianum* 分生孢子盤上的有隔剛毛長約 6 μm x 100μm，分生孢子盤呈灰橘色，內有 2.5-5.4 μm x 11-20 μm 大小、透明圓柱形分生孢子，其末端呈圓形，具有一至兩個油滴。小型的病斑常需要較長的培養時間來使分生孢子盤形成。

九、豌豆葉斑病菌 (*Ascochyta pisi*) 檢測方法

檢測方法

培養基檢測

檢測方法簡介

本方法適用於豌豆葉斑病菌(*Ascochyta pisi*)之檢測。利用培養基進行種子上的目標病原真菌檢測與培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀及鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.4.高溫高壓滅菌釜(HIRAYAMA HVE-50或同級品以上)

1.2.5.培養箱：可維持20-24 °C (名器F-360DN或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子；報驗樣品量為種子 400 顆。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.麥芽瓊脂培養基(malt agar, MA) (BD Bacto malt extract 與 BD Bacto agar 或同級品以上)或馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar, PDA) (BD Difco 或同級品以上)

2.4.0.2% 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D)鈉鹽溶液(Sigma 或同級品以上)

2.5.1%次氯酸鈉(Clorox[®]或同級品以上)

2.6.無菌水

2.7.滅菌紙巾

3.步驟與方法

3.1.豌豆種子浸泡於 1%次氯酸鈉進行表面消毒 10 分鐘後，以滅菌紙巾吸乾 1%

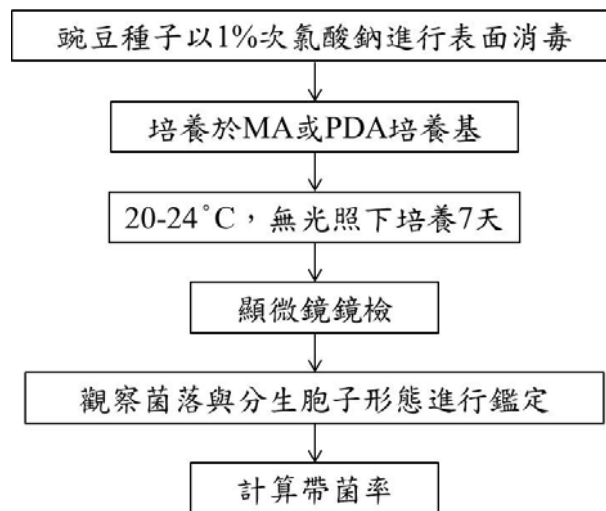
次氯酸鈉，再於 0.2% 2,4-D 鈉鹽溶液中浸泡 5 分鐘後取出以無菌水漂洗，置於滅菌紙巾上陰乾。

3.2. 每個培養皿(MA 或 PDA)中放置 10 顆豌豆種子。

3.3. 將培養皿置於 20-24°C 培養箱，無光照下培養 7 天。

3.4. 流程

豌豆葉斑病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 International Seed Testing association. 2008. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-005: Detection of *Ascochyta pisi* on *Pisum sativum* (Pea)，待測種子培養 7 天後，用肉眼觀察種子表面有無白色菌絲纏繞，疑似菌落以 25 倍放大倍率觀察菌落邊緣有無波浪狀菌絲。培養基背面可見菌落中央呈深橘褐色，至菌落外圍顏色漸淡。*A. pisi* 有時會在靠近培養基附近產生膠狀橘褐色分生孢子器，在解剖顯微鏡 20-25 倍率下並同時使用上下光源觀察，可以見到菌絲纏繞並呈現捲曲狀，上面會附著霧氣水珠。分生孢子器直徑可達 250 μm ，孢子呈透明圓柱狀，稍彎曲帶有圓形末端，在隔膜處稍縊縮，大小在 12 x 4.5 μm 。

十、菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對菸草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行菸草嵌紋病毒TMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介昆蟲入侵功能之設施。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20 μ l、20-200 μ l及200-1000 μ l)。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持37 $^{\circ}$ C恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000 μ l。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者。

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔(8孔)注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞(background)。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑：

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g

先調pH值至9.6再加1X PBST至總量1000ml，存放於4℃

2.1.3.品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4℃

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN ₃	0.2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6.抗血清：Anti- TMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96孔微量反應盤

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10 μ l、200 μ l、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

2.2.5.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6.三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28 $^{\circ}$ C 之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2.病毒檢測

3.2.1.將 Anti-Virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之菸草嵌紋病毒 TMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液=1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100 μ l，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含菸草嵌紋病毒 TMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4 $^{\circ}$ C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪

微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 4 小時。

3.2.7.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

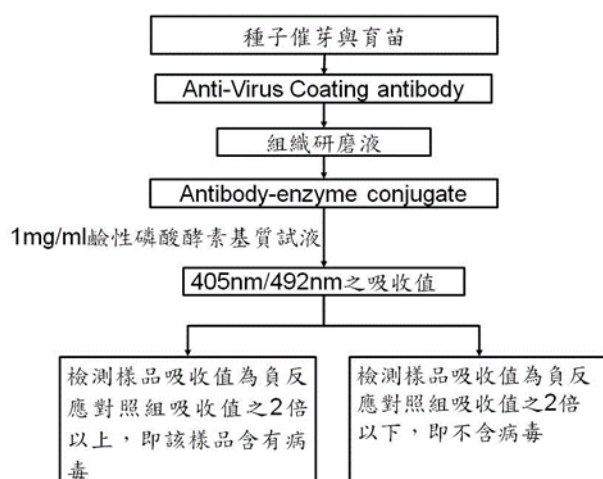
3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於 37 $^{\circ}$ C 暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3.流程

菸草嵌紋病毒 TMV 檢測流程示意圖



4. 結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染 TMV 病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值 (background reaction) 及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十一、南瓜嵌紋病毒 (*Squash mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對南瓜嵌紋病毒(Squash mosaic virus, SqMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行南瓜嵌紋病毒SqMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1. 設備與材料

1.1. 環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2. 設備

1.2.1. 天平

1.2.2. 微量吸管(Micropipette)：0.1-20 μ l、20-200 μ l及200-1000 μ l。

1.2.3. 恆溫培養箱：可維持37 $^{\circ}$ C恆溫者。

1.2.4. 八爪微量吸注器：200-1000 μ l。

1.2.5. 酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者。

1.2.6. 酸鹼值測量儀

1.2.7. 滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8. 洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔(8孔)注液器組。

1.2.9. 其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10. 陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11. 陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12. 空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞(background)。

1.2.13. 其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2. 試材與試劑

2.1. 試劑

2.1.1. 洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2. 被覆緩衝液(coating buffer)

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g

先調pH值至9.6再加1X PBST至總量1000ml，存放於4°C

2.1.3. 樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4°C

2.1.4. 結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5. 基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN ₃	0.2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6. 抗血清：Anti- SqMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate。

2.1.7. p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2. 其他耗材

2.2.1. 丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2. ELISA 96孔微量反應盤

2.2.3. 塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4. 微量吸管尖(Micropipette tips)：10µl、200µl、1.5 ml，或具同樣功能之同級

品。

2.2.5. 育苗介質：使用 Bas van Buuren (BVB) 介質 (No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6. 三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1. 種子催芽及育苗

3.1.1. 以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2. 於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28°C 之恆溫箱中黑暗三小時進行浸種。

3.1.3. 將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2. 南瓜嵌紋病毒 SqMV 檢測

3.2.1. 將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，於 37°C 恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2. 取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3. 將測試樣品稱重，加入 10 倍量之南瓜嵌紋病毒 SqMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液 = 1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.4. 取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含南瓜嵌紋病毒 SqMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5. 將微量盤放入保濕盒於 4°C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6. 將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，

於 37°C 恆溫箱反應 4 小時。

3.2.7.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

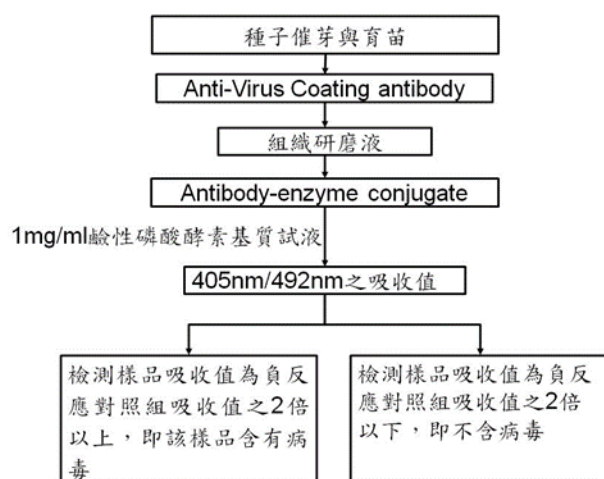
3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於 37°C 暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3. 流程

南瓜嵌紋病毒SqMV檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染南瓜嵌紋病毒(*Squash mosaic virus*，SqMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值 (background reaction) 及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十二、豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*) 檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) 之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介昆蟲入侵功能之設施。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20 μ l、20-200 μ l及200-1000 μ l。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持37 $^{\circ}$ C恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000 μ l。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔(8孔)注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞(background)。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1. 試劑：

2.1.1. 洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2. 被覆緩衝液(coating buffer)

Na ₂ HCO ₃	2.93 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g

先調 pH 值至 9.6 再加 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4°C

2.1.3. 樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4°C

2.1.4. 結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN ₃	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5. 基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN ₃	0.2 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6. 抗血清：Anti-PSbMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7. p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2. 其他耗材

2.2.1. 丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2. ELISA 96孔微量反應盤。

2.2.3. 塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4. 微量吸管尖(Micropipette tips)：10 μ l、200 μ l、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

2.2.5. 育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6. 三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1. 種子催芽及育苗

3.1.1. 以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2. 於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28 $^{\circ}$ C 之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3. 將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2. 豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 檢測

3.2.1. 將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2. 取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3. 將測試樣品稱重，加入 10 倍量之豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液 = 1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

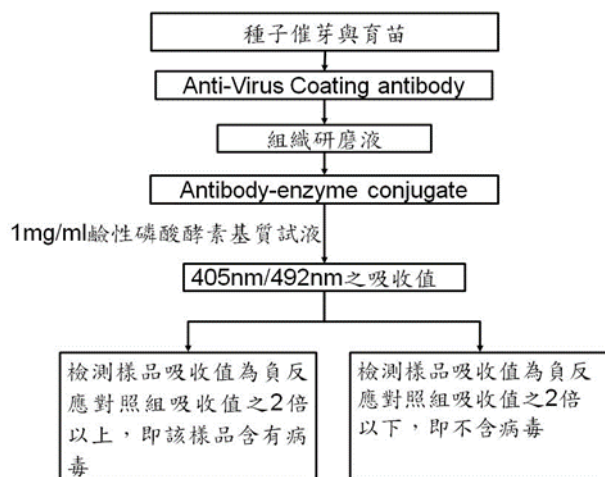
3.2.4. 取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100 μ l，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5. 將微量盤放入保濕盒於 4 $^{\circ}$ C 反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

- 3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤置入保濕盒中，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱反應 4 小時。
- 3.2.7.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。
- 3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100 μ l，將微量盤放入保濕盒，於 37 $^{\circ}$ C 暗室靜置 30 分鐘~1 小時。
- 3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。
- 註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3. 流程

豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 檢測流程示意圖



4. 結果判讀

- 4.1. 檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。
- 4.2. 吸收標準
- 4.2.1. 呈色狀況：陽性對照組(罹染豌豆種媒嵌紋病毒(*Pea Seed-borne Mosaic virus*, PSbMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值 (background reaction) 及陰性對照組則無色彩呈現。
- 4.2.2. 病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十三、馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒(*Potato spindle tuber viroid*)、番茄黃色矮化類病毒(*Tomato chlorotic dwarf viroid*)、辣椒小果類病毒(*Pepper chat fruit viroid*)、番茄頂矮化類病毒(*Tomato apical stunt viroid*)、番茄類病毒(*Tomato planta macho viroid*)、金魚藤潛伏類病毒(*Columnea latent viroid*)檢測方法

檢測方法

兩階段式反轉錄聚合酶鏈鎖反應(2 steps Reverse transcription polymerase chain reaction, 2 steps RT-PCR)檢測

檢測方法簡介

針對馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒(*Potato spindle tuber viroid*，PSTVd)、番茄黃色矮化類病毒(*Tomato chlorotic dwarf viroid*，TCDVd)、辣椒小果類病毒(*Pepper chat fruit viroid*，PCFVd)、番茄頂矮化類病毒(*Tomato apical stunt viroid*，TASVd)、番茄類病毒(*Tomato planta macho viroid*，TPMVd)及金魚藤潛伏類病毒(*Columnea latent viroid*，CLVd)之檢測。利用4組引子包括NADH-F、NADH-R、DHL-55F、DHL-56R、Pospi1F、Pospi1R、CLV4F、CLV4R等引子(其中NADH-F、NADH-R為植株常態表現之核糖核酸RNA偵測引子對，為比對RNA萃取效能之引子對)進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，以偵測類病毒馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒PSTVd、番茄黃色矮化類病毒TCDVd、辣椒小果類病毒PCFVd、番茄頂矮化類病毒TASVd、番茄類病毒TPMVd及金魚藤潛伏類病毒CLVd等檢疫類病毒，以電泳分析核酸增幅產物所呈現之條帶位置，進行結果判讀。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。為避免交叉污染。樣品前處理、樣品RNA萃取、2 steps RT-PCR試劑配製檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。2 steps RT-PCR相關試劑之配製(如引子稀釋、酵素混合分裝等)應於無菌操作台內進行。

1.2.設備

1.2.1.研磨機

1.2.2.水浴槽：可維持65°C。

1.2.3.烘箱：可維持70°C

- 1.2.4.核酸檢測：具波長260 nm、280 nm偵測功能之分光光度計，或可檢測核酸濃度與純度之相關儀器。
- 1.2.5.低溫離心機：可達 20,000 × g，並具 4°C 溫控功能。
- 1.2.6.離心機：供各式微量離心管離心用。
- 1.2.7.聚合酶鏈鎖反應器：ABI Veriti™ Thermal cycler 或同級品。
- 1.2.8.電泳裝置：供 DNA 電泳用，含電泳槽與電源供應器。
- 1.2.9.膠片照相裝置：供電泳膠片照相用。

2.試材與試劑

2.1.藥品、研磨液與萃取液配方

2.1.1.種子研磨液配方 1

藥劑	最終濃度	1L 配置量
1.0M Tris-HCl pH8.0	0.2M	200ml
NaCl	1.0M	58.4g

2.1.2.種子研磨液配方 2

藥劑	最終濃度	1L 配置量
0.5M EDTA pH8.0	0.1M	200ml
Sodium lauryl sulphate	2.5g/100ml	25g
PVP-40	6.6g/100ml	66g

2.1.3.萃取液：取等體積之種子研磨液配方 1 及種子研磨液配方 2 均勻混合

2.1.4.5M potassium acetate

2.1.5.isopropyl alcohol

2.1.6.70%酒精

2.1.7.2-mercaptoethanol

2.1.8.無菌水及 RNase-free 無菌水

2.2.兩階段式反轉錄聚合酶鏈鎖反應(2 steps RT-PCR) 試劑

2.2.1.檢測目標用引子：可偵測類病毒與植物 internal control RNA 之引子對

引子對名稱	序列(5'-3')
NADH-F	GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C
NADH-R	AGC AAT GAG ATT CCC CAA TAT CAT
DHL-55F	GGG GAA ACC TGG AGC GAA C
DHL-56R	CCT GAA GCG CTC CTC CGA GC
Pospi1F	GGG ATC CCC GGG GAA AC

Pospi1R	AGC TTC AGT TGT (T/A) TCC ACC GGG T
CLV4F	GGG GCT CCT GAG ACC GCT CTT G
CLV4R	GGG GCA ACT CAG ACC GAG C

※合成之引子拆封後，以 0.1X DEPC water 稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C 儲存備用。

2.2.2.反轉錄酶 Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl)

2.2.3.Deoxynucleotide Mix dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate)：含 dATP (deoxyadenosine triphosphate)、dCTP (deoxycytidine triphosphate)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate) 及 dTTP (deoxythymidine triphosphate)、10 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP。

2.2.4.Protector RNase Inhibitor(40 U/μl、Storage buffer: 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM dithiothreitol, 50% glycerol (v/v), pH approx. 7.6 (at 4°C))或同級品。

2.2.5.Random Hexamer Primer(600μM)或同級品。

2.2.6.Transcriptor RT Reaction Buffer(5X) (5X conc.: 250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl,40 mM MgCl₂, pH approx. 8.5 (25°C))或同級品。

2.2.7.2X PCR MIX

2.3.電泳用試藥

2.3.1.Safe View DNA Stain、Agarose

2.3.2.Loading dye (含 bromophenol blue、xylene cyanol FF 或功用相同者)

2.3.3.DNA 片段分子量標誌 (DNA molecular weight marker)：可區分 100-1000bp 的 DNA 片段

2.4.正反應對照物質：為將 PSTVd、CLVd 標的基因序列接合於 TOPO 載體後，轉殖於大腸桿菌增量之質體，以確保檢測與定期監測用質體之處理作業的一致，以維持其檢驗結果之可靠性。

2.5.其他耗材

2.5.1.塑膠研磨袋及冰塊。

2.5.2.離心管：1.5ml、2ml 及 50ml。

2.5.3.配合聚合酶鏈鎖反應器使用之反應容器：如 PCR 反應管、96 孔樣品盤等，必須採用無 DNase、RNase 者。

2.5.4.微量吸管尖(Pipette filter tips)：配合微量吸注器規格，如 Aerosol barrier pipette tips 或具同樣功能之同級品。

註 1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反

之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子分樣與研磨

3.1.1.將 400 顆種子放置塑膠研磨袋，以研磨機均勻研磨成粉狀(如果不易研磨，可先利用鐵槌等工具略敲碎)。

3.1.2.加入 5ml 的種子研磨液配方 1，均勻懸浮種子研磨液，再加入 10 μ l 2-mercaptoethanol。

3.1.3.加入 5ml 的種子研磨液配方 2，均勻懸浮種子研磨液，置於冰上保存，待其他樣品研磨完成。

3.1.4.加入 50ml 之萃取液，均勻懸浮後，取出 50ml 之種子萃取液至 50ml 離心管。

3.2.樣品 RNA 萃取

3.2.1.取出 1.5ml 之種子萃取液至 2ml 離心管進行 65 $^{\circ}$ C 水浴，10 分鐘。

3.2.2.加入 500 μ l 5M potassium acetate，混合均勻後，置於冰上 30 分鐘。

3.2.3.於 10 $^{\circ}$ C 離心 10,000rpm，10 分鐘。

3.2.4.取出 900 μ l 上清液置入 1.5ml 離心管，加入 540 μ l isopropyl alcohol，輕輕上下搖晃混合均勻後，置於冰上 30 分鐘。

3.2.5.於 10 $^{\circ}$ C 離心 10,000rpm，10 分鐘。

3.2.6.移除上清液，以 70%酒精清洗沉澱物後，移除酒精後於 70 $^{\circ}$ C 烘箱乾燥沉澱物。

3.2.5.以 50 μ l RNase-free 無菌水回溶沉澱物。

3.3.Reverse transcription

成份	體積
RNase-free 無菌水	9 μ l
Primer Random Hexamer Primer, 600 pmol/ μ l	2.0 μ l
Template (總量 RNA) (1 μ g)	2.0 μ l
置於冰上 10min	
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5 \times conc.	4.0 μ l

RNase inhibitor (40Units/ μ l)	0.5 μ l
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2.0 μ l
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/ μ l	0.5 μ l
Total	20.00 μ l

3.4.目標類病毒 PCR 檢測

3.4.1.植物 NADH 基因轉錄體檢測：10 μ M，預期 188 bp 片段

Primer 名稱	序列
NADH-F	GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C
NADH-R	AGC AAT GAG ATT CCC CAA TAT CAT

3.4.2.PSTVd、TCDVd 檢測：10 μ M，預期 354 bp 片段

Primer 名稱	序列
DHL-55F	GGG GAA ACC TGG AGC GAA C
DHL-56R	CCT GAA GCG CTC CTC CGA GC

3.4.3.Posipviroidae 檢測：10 μ M，預期 196-228 bp 片段

Primer 名稱	序列
Pospi1F	GGG ATC CCC GGG GAA AC
Pospi1R	AGC TTC AGT TGT (T/A) TCC ACC GGG T

3.4.4.CLVd 檢測：10 μ M，預期 373 bp 片段

Primer 名稱	序列
CLV4F	GGG GCT CCT GAG ACC GCT CTT G
CLV4R	GGG GCA ACT CAG ACC GAG C

3.4.PCR 條件

3.4.1.NADH 引子對 RT-PCR 條件

A. 94°C 2 min

B. 94°C 30 sec

C. 62°C 30 sec

D. 72°C 30 sec

重複步驟 (B) 到 (D) 40 個循環

E. 72°C 7 min

F. 15°C ∞

3.4.2.NADH 引子對 PCR 試劑建議用量 (以 Allbio 為例)

成份	體積
無菌水	6.5 μ l
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5 μ l
Primer F (10 μ M)	2.0 μ l
Primer R (10 μ M)	2.0 μ l
template (總量 cDNA)	2.0 μ l
Total	25.00 μ l

3.4.3.DHL55-DHR56 引子對 PCR 條件

A. 94°C 2 min

B. 94°C 30 sec

C. 58°C 30 sec

D. 72°C 30 sec

重複步驟 (B) 到 (D) 40 個循環

E. 72°C 7 min

F. 15°C ∞

3.4.4.DHL55-DHR56 引子對 PCR 試劑建議用量 (以 Allbio 為例)

成份	體積
無菌水	6.5 μ l
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5 μ l
Primer F (10 μ M)	2.0 μ l
Primer R (10 μ M)	2.0 μ l
template (總量 cDNA)	2.0 μ l
Total	25.00 μ l

3.4.5.pospiviroids 引子對 PCR 條件：

A. 94°C 2 min

- B. 94°C 30 sec
 C. 58°C 30 sec
 D. 72°C 30 sec
 重複步驟 (B) 到 (D) 40 個循環
 E. 72°C 7 min
 F. 15°C ∞

3.4.6. pospiviroids 引子對 PCR 試劑建議用量 (以 Allbio 為例)

成份	體積
無菌水	6.5µl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5µl
Primer F (10µM)	2.0µl
Primer R (10µM)	2.0µl
template (總量 cDNA)	2.0µl
Total	25.00µl

3.4.5. CLVd 引子對 PCR 條件：

- A. 94°C 2 min
 B. 94°C 30 sec
 C. 58°C 30 sec
 D. 72°C 30 sec
 重複步驟 (B) 到 (D) 40 個循環
 E. 72°C 7 min
 F. 15°C ∞

3.4.6. CLVd 引子對 PCR 試劑建議用量 (以 Allbio 為例)

成份	體積
無菌水	6.5µl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5µl
Primer F (10µM)	2.0µl
Primer R (10µM)	2.0µl

template (總量 cDNA)	2.0 μ l
Total	25.00 μ l

3.5.PCR 檢測電泳分析：依循膠體電泳操作方法，進行配置膠片、電泳操作、照相系統使用分析

註 2：PCR 相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

4.結果判讀

- 4.1 每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組（健康種子）樣品，且待測種子萃取檢體必須出現 NADH-F/NADH-R 引子對可增幅之 188bp 片段大小的產物。又 CLV4F/LV4R 引子對使用 CLVd plasmid 作為反應組之正對照，DHL-55F/DHL-56R 與 Posp1F/Posp1R 使用 PSTVd plasmid 作為反應組之正對照。
- 4.2 檢體 cDNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 cDNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物大小相同，且經由 cDNA 分子量標記物質估算 RT-PCR 增幅產物大小無誤，即判定該檢體含有該成分。