

瓜類細菌性果斑病菌之分子檢測實務

曾國欽

國立中興大學植物病理學系

電子郵件：kctzeng@nchu.edu.tw；傳真：04-22854633

西瓜與洋香瓜為我國重要蔬果，栽培面積達 20,000 公頃以上，近年來西瓜與洋香瓜細菌性果斑病在田間經常發生，嚴重影響瓜果之商品價值，農民損失甚鉅。此病害係經由種子傳播，病原細菌在種子上之殘存可達數年之久，使用健康種子與種苗為本病害主要之防範策略，而如何偵測種子上之帶菌情形為重要之課題。目前長出試驗(grow-out test)為瓜類種子帶菌率檢測時常用之方法，但此法常需較長之栽種時間，且極耗人力與物力，又帶菌之種子亦不一定會發病，因此常無法快速準確的檢測瓜類種子之帶菌情形。本實驗係應用簡便，快速，專一性高且靈敏度高之聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction； PCR) 技術來檢測瓜類細菌性果斑病菌，其方法與步驟說明如下：

A. 植物組織

- 1.切取欲測之瓜類組織置於 1.5ml 微量離心管中。
- 2.加入 150 μ l 含 0.5% polyvinylpyrrolidone (PVP)之 0.5N NaOH，以滅菌過之牙籤將植物組織弄碎，離心(10,000 \times g, 10 min)。
- 3.取上層液 20 μ l 置於 200 μ l 微量離心管中，並加入 20 μ l 之 1M Tris-HCl (pH8.0) 混合均勻。
- 4.取原液、10 倍稀釋液及其 100 倍稀釋液各 2 μ l 作為模板，並加入瓜類細菌性果斑病菌之專一性引子對(SL1/SR1)，及其它之 PCR 反應混合液，再將此樣品置於 PCR 反應器中進行反應，並以電泳分析增幅後之 PCR 產物，觀察是否有瓜類細菌性果斑病菌專一性之條帶(194bp)呈現。

B. 種子偵測

- 1.將瓜類種子放入燒瓶中，加入適量之 0.85% NaCl (含 0.01% tween 80)直到完全浸泡種子，漂洗 15 分鐘後，取出漂洗液並以 10,000 \times g 離心 10min。
- 2.去除上層液，並加入 100 μ l 含 0.5% polyvinylpyrrolidone (PVP)之 0.5N NaOH, 混合均勻後吸取萃取液置於 1.5 ml 微量離心管中，並離心(10,000 \times g, 10 min)。
- 3.取出上層液 50 μ l 置於 200 μ l 微量離心管中，並加入 50 μ l 之 1M Tris-HCl

(pH8.0)混合均勻。

4. 取原液、10 倍稀釋液及其 100 倍稀釋液各 2 μ l 作為模板，並加入瓜類細菌性果斑病菌之專一性引子對(SL1/SR1)，及其它之 PCR 反應混合液，再將此樣品置於 PCR 反應器中進行反應，並以電泳分析增幅後之 PCR 產物，觀察是否有瓜類細菌性果斑病菌專一性之條帶(194bp)呈現。

附註：

1. PCR 反應混合液

- a. 10 \times Taq reaction buffer : 2 μ l
- b. dNTPs (2.5 m M) : 2 μ l
- c. 瓜類細菌性果斑病菌專一性引子對(SL1/SR1): 各 1 μ l (0.5 μ M)
- d. Taq DNA聚合酵素(0.2 u/ μ l) : 3 μ l
- e. PCR模版 : 2 μ l
- f. 添加滅菌過之去離子水使反應總體積達20 μ l

2. PCR 反應條件 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer)

	94	65	cycle
Program 1	2 min	0	1
Program 2	30 sec	1 min	30
Program 3	0	5 min	1

3. 電泳分析：

取 7 μ l 增幅後的 PCR 產物，加入 1 μ l 的追蹤液 (loading dye ; 0.25 % bromophenol blue, 30 % glycerol in H₂O)，經充分混合後，以微量吸管吸取 7 μ l，將其加入 0.5 \times TAE buffer 所製備之 agarose gel (1.5 %) 之 well 中，電泳槽內裝入適量的 0.5 \times TAE buffer，並以 Gen100 DNA Ladder 為其標幟 (marker)，以 100V 的電壓進行電泳分析，25~30 分鐘後取出膠體，經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後置於 UV box 上觀察，並照相記錄。

參考文獻

宋秉峰. 1999. 鑑定及偵測瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術. 國立中興大學碩士論文.