

蔬菜病毒病害接種技術

鄭櫻慧

台灣省農業試驗所

一、材料：

1. 病毒：蕪菁嵌紋病毒 (Turnip mosaic *Potyvirus* ; TuMV) 之感病材料
2. 供試植物：芥菜 (*Brassica juncea*)
蘿蔔 (*Raphanus sativus*)
紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)
3. 磷酸緩衝液 (0.01M) : 0.01M K_2HPO_4 以 0.01M KH_2PO_4 調至 pH 7.0
4. 金剛砂 (600 mesh)
5. 研鉢及鉢棒

二、接種方法：

1. TuMV 可保存於芥菜 (*B. juncea*) 。
2. 接種前以金剛砂灑一薄層於供試植株。
3. 取 1 克葉片研磨於 10 ml 0.01 M 磷酸緩衝液，以人工擦拭法接種於開展之葉片或子葉 2-3 個葉片。
4. 以水洗去葉上殘留汁液。
5. 置於溫室中觀察發病病徵，並以 ELISA 偵測病毒感染情形。

Indirect ELISA for Turnip Mosaic Virus (TuMV) (from Clark M. F. and A. M. Adams. 1977. J. G. Virol. 34: 475-483)

1. 檢體葉片研磨於 20 倍之 coating buffer 。每一微量穴加入 200 ul 之葉片汁液。
2. 37°C 靜置 2-2.5 小時或 4°C 冰箱靜置至第二天。
3. 甩掉汁液，注入 PBST 後靜置 3 分鐘，如此重複洗 3 次，最後於吸水紙上拍乾微量盤。
4. 一級抗血清 (rabbit anti-TuMV serum) 以 1000-3000 倍稀釋於 enzyme buffer ，每一微量穴加入 190 ul 。
5. 37°C 靜置 2-2.5 小時。
6. 清洗步驟同“3”。
7. 二級酵素連結抗血清 (Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) 以 5000 倍稀釋於 enzyme buffer ，每一微量穴加入 180 ul 。
8. 37°C 靜置 2-2.5 小時。
9. 清洗步驟同“3”。

10. 每一微量穴加入現配之酵素基質溶液 150 ul，室溫下靜置至呈色對比明顯。
酵素基質溶液為酵素基質 (p-nitrophenyl phosphat ; p-NPP) 以 1 mg/ml 之濃度溶於 substrate buffer 。
11. 加入 30 ul 之 3M NaOH 停止反應。
12. 目測或以波長 405 nm 之吸光質測定呈色結果並記錄之。

Direct ELISA for Turnip Mosaic Virus (TuMV)

1. 抗 TuMV 血清 (rabbit anti-TuMV serum) 以 1000-3000 倍稀釋於 coating buffer，每一微量穴加入 200 ul 之抗血清溶液。
2. 4°C 冰箱靜置至第二天或 37°C 靜置 2-2.5 小時。
3. 甩掉抗血清溶液，注入 PBST 後靜置 3 分鐘，如此重複洗 3 次，最後於吸水紙上拍乾微量盤。
4. 檢體葉片研磨於 20 倍之 extraction buffer。每一微量穴加入 190 ul 之葉片汁液。37°C 靜置 2-2.5 小時。
5. 清洗步驟同“3”。
6. 酵素鏈結抗體 (Alkaline phosphatase labeled anti-TuMV γ -globulin) 以 1000-3000 倍稀釋於 enzyme buffer，每一微量穴加入 180 ul。37°C 靜置 2-2.5 小時。
7. 清洗步驟同“3”。
8. 每一微量穴加入現配之酵素基質溶液 150 ul，室溫下靜置至呈色對比明顯。酵素基質溶液為酵素基質 (p-nitrophenyl phosphat ; p-NPP) 以 1 mg/ml 之濃度溶於 substrate buffer 。
9. 加入 30 ul 之 3M NaOH 停止反應。
10. 目測或以波長 405 nm 之吸光質測定呈色結果並記錄之。

Buffers

PBS (pH 7.4)(1 liter)

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KH₂PO₄
- 2.9 g Na₂HPO₄.12 H₂O
- 0.2 g KCl
- 0.2 g NaN₃

PBST = 1 liter PBS + 0.5 ml Tween 20

Coating Buffer (pH 9.6) (1 liter)

1.59 g Na_2CO_3
2.93 g NaHCO_3
0.2 g NaN_3

Sample Extraction buffer (pH7.5)

0.25 M phosphate buffer
0.01 M EDTA

Enzyme Buffer

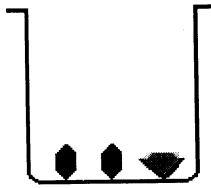
PBST
2% PVP-40 (Polyvinyl - Pyrrolidone)
0.2% ovalbumin

Substrate Buffer (1 liter)

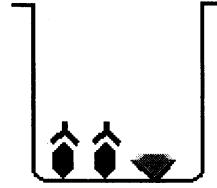
97 ml Diethanolamine
800 ml H_2O
0.2 g NaN_3
以 HCl 調 pH 至 9.8

以上 Buffers 均保存於 4-6°C

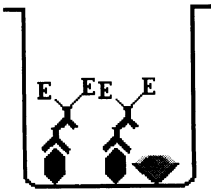
Principle of the indirect ELISE Technique



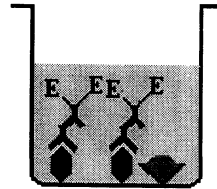
1. 檢體吸附於微量盤



2. 加入專一性之一級抗血清

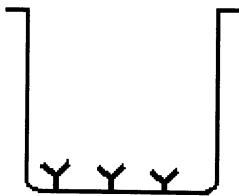


3. 加入與酵素連結的二級抗血清
此二級抗血清可辨認一級抗血清

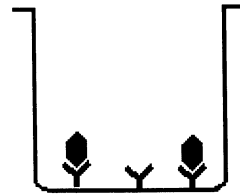


4. 加入酵素質
呈色深淺與病毒濃度正相關

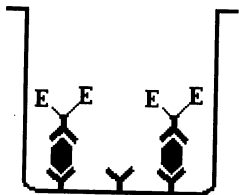
Principle of the direct ELISE Technique



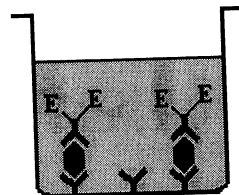
1. 檢體吸附於微量盤



2. 加入檢體
檢體中之病毒與其抗體聯結



3. 加入具專一性之酵素連結抗體
其可與病毒連接



4. 加入酵素基質溶液
若有反應溶液由無色變成黃色
呈色深淺與病毒濃度成正相關