

# 瓜類細菌性果斑病菌血清偵測技術之研發

王惠亮<sup>1,3</sup> 鄭安秀<sup>2</sup>

1. 高雄市 國立高雄師範大學生物科學研究所
  2. 台南市 行政院農業委員會台南區農業改良場
  3. 聯絡作者：電子郵件：hlwang@nknuc.nknu.edu.tw，傳真：07-7169030
- 接受日期：中華民國 90 年 8 月 18 日

## 摘要

王惠亮、鄭安秀. 2001. 瓜類細菌性果斑病菌血清偵測技術之研發. 植病會刊 10:129-138.

瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 供試菌株分別分離自台中、台南、高雄及宜蘭地區洋香瓜、西瓜、甜瓜、苦瓜罹病葉片或果實。由甜瓜分離菌株 Aa 31 細菌全細胞製備抗血清。利用 SDS 免疫擴散反應進行抗血清力價測定，結果顯示未稀釋和稀釋二倍後的抗血清均能與細菌性果斑病原細菌 (*A. avenae* subsp. *citrulli*) 形成 2 條明顯弧形反應帶。所有由洋香瓜、西瓜、甜瓜、苦瓜分離之細菌性果斑病菌株均與所獲得之抗血清反應，且形成兩條明顯弧形反應帶，而此抗血清並不與其他五種不同病原細菌菌株形成任何反應帶；在間接和雙層夾心式酵素連結抗體檢測法【double antibody sandwich (DAS) ELISA】試驗中，亦可順利偵測到分離之所有細菌性果斑病菌株，而在兩種 ELISA 試驗中，其他五種細菌均無反應。所製備免疫球蛋白 (immunoglobulin G, IgG) 和酵素結合免疫球蛋白 (conjugate IgG)，在 DAS-ELISA 檢定法中，以 IgG 濃度 1 µg/ml 和 conjugate IgG 稀釋 1200 倍之組合為最佳。在間接 ELISA 檢測法中，以 IgG 濃度 1 µg/ml 為最適宜。ELISA 檢測法對細菌性果斑病原細菌之靈敏度測定結果顯示，在間接 ELISA 和 DAS-ELISA 試驗中，分別可以偵測到 10<sup>4</sup> 和 10<sup>5</sup> cfu/ml 濃度之細菌性果斑病原細菌。A. *avenae* subsp. *citrulli* Aa 31 萃取之全量蛋白質，分子大小由 15 kDa 至大於 221 kDa。西方墨點分析結果，有二種蛋白質可和製備的免疫球蛋白反應，其分子量均大於 221 kDa，顯示本試驗所製備之抗血清，是由此兩種蛋白質反應製備而得。

關鍵詞：瓜類作物，細菌性果斑病菌，血清學

## 前言

瓜類細菌性果斑病自 1992 年起於雲林縣沿海及台南縣善化地區零星發現大西瓜果表呈現不規則水浸狀稍龜裂病斑，主要發生在雨季，病斑於果皮上蔓延，初期並不危害果肉<sup>(1)</sup>。1997 年相繼在西洋甜瓜 (洋香瓜類) 及東方甜瓜 (脆瓜類) 上發現，病原細菌感染甜瓜果實後，果皮上出現似瓜實蠅危害之水浸狀的病斑，病斑不會擴大，但果肉往內逐漸褐腐；感染本葉後會出現深褐色水浸狀病斑，病斑易受葉脈限制，但會沿葉脈蔓延，在高濕度的環境下，病斑上可見乳白色菌泥泌出的痕跡；感染幼葉而病勢未繼續蔓延時，會造成病斑處破裂、葉片變形<sup>(2)</sup>。病原細菌菌株經 Biolog 鑑定系統 (GN Microplate TM; Release 3.50) 測定，被鑑定為 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*<sup>(1,3)</sup>。由 *A. avenae* subsp. *citrulli* 所引起之西瓜細菌性果斑病，1989 年於美國佛羅里達州西瓜田發現，果實受害程度 5-50%<sup>(19)</sup>，高溫、下雨的環境適合病害的發生與蔓延，田間果實受害

程度與環境有關<sup>(7,8,15)</sup>。1996 年美國德州首次報導 *A. avenae* subsp. *citrulli* 危害田間甜瓜 (honeydew) 果實，果實表面出現 3-10 mm 直徑大小、水浸狀斑點，但不擴展到果肉<sup>(11)</sup>。1999 年美國喬治亞州報導 *A. avenae* subsp. *citrulli* 危害南瓜<sup>(13)</sup>。1997 年台灣宜蘭地區洋香瓜果實表面出現小型水浸狀、深褐色或橄欖色斑點，不會擴大，但果肉組織成水浸狀、褐腐或木栓化病徵，接著台南、台中、嘉義及高雄地區之洋香瓜及甜瓜產區陸續發生，罹病果率由 5-80%，雨季更加速病害的蔓延，農民損失慘重<sup>(1)</sup>。不同西瓜品種對本病原細菌具有不同程度的感病性，但目前尚未發現具有強抗病性栽培品種<sup>(1,5)</sup>。本病目前防治方法以銅劑，鏈四環黴素或稀鹽酸處理種子，可以降低苗期感病株率<sup>(3,6,9)</sup>。而本病原細菌不僅僅害植株葉片、果實，最嚴重的是種子亦會受污染而帶病原細菌<sup>(4,10,12,18,21)</sup>，如果是採種田受感染，種子會受污染而成為初次感染源，國外報告如果 10,000 個種子有一個種子帶有病原細菌，本病即有大發生的可能<sup>(12)</sup>。我國為瓜類種子出口國，未來本病如果

被列為檢驗病害，或是為了防止本病在我國大發生，種子檢驗勢在必行，目前偵測細菌常用的方法包括生物檢驗法<sup>(14)</sup>、血清學檢驗法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)<sup>(16,20)</sup> 等方法，而這些方法中以血清學檢驗法和聚合酵素連鎖反應在各種病原細菌的檢測上最為快速靈敏，而目前檢驗方法均以生物法，將種子播種，再觀察其發病情形，此方法極費時和不準確，而本試驗之目的，即在研發利用血清檢驗方法，以期能快速準確檢驗本病原細菌。

## 材料與方法

### 供試菌株收集與保存

細菌性果斑病原細菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) 供試菌株分別分離自台中、台南、高雄及宜蘭地區西洋甜瓜、東方甜瓜、苦瓜及扁蒲罹病葉片或果實 (表一)。所有菌株皆懸浮於裝有無菌蒸餾水之螺旋試管中，並於室溫下保存。

### 抗血清之製備

以甜瓜分離菌株 Aa 31 作為製備抗血清之菌株。取 1 ml *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Aa 31 細菌懸浮液 ( $10^8$  cfu/ml) 加等量之 Freund's 完全佐劑 (Life Technologies, U.S.A.) 充分乳化後，注射於紐西蘭雌白兔之頸後皮下，第二、三週分別再取 1 ml 之 Aa 31 細菌懸浮液 ( $10^8$  cfu/ml) 加等量之 Freund's 不完全佐劑充分乳化後追加注射，共注射 3 次，最後一次注射後二週，自兔子耳朵連續採血 4 週。收集之血液於 37 °C 靜置 1 小時，待凝塊後，再移置於 4 °C 冰箱中過夜，次日取泌出於上層之抗血清，所得之抗血清以 8,000 rpm 離心 10 分鐘，去除混入抗血清之血球，取上層液分裝於微量試管中，置於 -20 °C 冰箱中保存備用。

### 抗血清力價測定

抗血清力價測定參照 Purcifull *et al.*<sup>(17)</sup> 的 SDS 免疫擴散反應測定法，在 9 cm 之塑膠培養皿中倒入 12 ml 內含 0.8% 瓊脂 (Difco noble agar)、0.5% SDS、1%  $\text{NaN}_3$ ，待凝固後以挖孔器在中央挖一穴，周圍等距離挖六穴，每穴直徑 7 mm，穴間距離 5 mm。抗原係以新鮮病原細菌 *A. avenae* subsp. *citrulli* 用蒸餾水稀釋成  $10^8$  cfu/ml，以 8,000 rpm 離心 10 分鐘，再以 200  $\mu$ l 2% SDS 回溶沉澱物作為抗原。中間穴加入抗原細菌，周圍穴則加入未稀釋之抗血清及以蒸餾水加倍稀釋之抗血清；將培養皿置於室溫下，16-24 小時後觀察結果，並拍照記錄。

### 不同寄主分離之病原細菌菌株與不同種類細菌菌株之 SDS 免疫擴散反應

依上述的方法，將 9 cm 之塑膠培養皿之中間穴加入 200  $\mu$ l 之 *A. avenae* subsp. *citrulli* A31 之抗血清原液，周圍穴則分別加入由各種瓜類 (西洋甜瓜、東方甜瓜、西瓜、苦瓜和扁蒲) 分離到之細菌性果斑病原細菌菌株、柑桔潰瘍病菌株 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、甘藍黑腐病菌株 (*X. campestris* pv. *campestris*)、青蔥軟腐病菌株 (*Erwinia chrysanthemi*)、洋蔥軟腐病菌株 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 和芒果黑斑病菌株 (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*) 之細菌懸浮液 ( $10^8$  cfu/ml) 200  $\mu$ l，置於室溫下，16-24 小時後觀察結果，並拍照記錄。

### 酵素連結抗體檢定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

免疫球蛋白 (immunoglobulin G) 製備：抗血清 1 ml，加蒸餾水至 10 ml，再分別慢慢加入 10 ml 飽和之硫酸銨 (ammonium sulfate)，攪拌均勻後於室溫下靜置 30-60 分鐘，再以 9,000 rpm 離心 10 分鐘，沈澱物以 2 ml 一半強度 (1/2-strength) 之磷酸鹽緩衝液 (PBS) 溶解，而後以 500 ml 一半強度之 PBS 透析三次，每次於 4 °C 下透析 4 小時；之後將試料分別慢慢加入填有預先平衡二乙基胺基乙基纖維素 (diethylaminoethyl cellulose; DEAE-cellulose) 之 10 ml 的塑膠管柱，製備免疫球蛋白 (IgG)。待試料慢慢流入預先平衡管柱，全部進入 cellulose 後，以適量之 1/2-strength 之 PBS 加在管柱上端，流出物 (effluent) 以離心管 (ependorf) 收集，每管 1 ml，收集 16 管，以光電比色計 (Pharmacia ultrospec-2000 spectrophotometer) 波長 280 nm 測每一管之吸收值 (OD)，之後合併 OD 值大於 0.8 之流出物，再有一半強度之 PBS 調整免疫球蛋白之 OD 值至 1.4 即為 1 mg/ml，保存於 -20 °C 下備用。

酵素免疫球蛋白結合體 (conjugate IgG) 之製備：將 5 ml (= 5 mg) 之鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase; Sigma Type VII)，以 9,000 rpm 離心 10 分鐘，將得沉澱物用 2 ml (= 2 mg) 之免疫球蛋白懸浮；懸浮液經過三次透析，每次 500 ml PBS，於 4 °C 下 6 小時，去除殘存之硫酸銨。透析後之液體，滴入 25% 戊二醛 (glutaraldehyde) 溶液，使其最後濃度含有 0.06% 之戊二醛，充分攪拌後，置室溫四小時，再以 PBS 透析三次，去除戊二醛。而後加入 5 mg/ml 之小牛血清蛋白 (bovine serum albumin)，保存於 4 °C 冰箱中。

不同濃度的免疫球蛋白及酵素連結免疫球蛋白之 ELISA 反應試驗：以  $10^8$  cfu/ml 之 *A. avenae* subsp. *citrulli*，用覆披緩衝液 (coating buffer) 稀釋成 1:20 的濃度，加入微量盤 (Nunc. Co.) 中；另將柑桔潰瘍病菌株 (*X. axonopodis* pv. *citri* XW-47) 用相同的方法處理作為對照。

表一、利用 SDS 免疫擴散反應和酵素結合抗體檢定法偵測不同瓜類品種感染細菌性果斑病菌之情形

Table 1. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in various cucurbit crops using SDS double diffusion and ELISA

Strain <sup>1</sup>	Source	SDS-double <sup>2</sup> diffusion test	ELISA OD value <sup>3</sup>	
			DAS	Indirect
Aa 1	Muskmelon (autumn sweet), 洋香瓜 (秋蜜)	+	2.13	2.78
Aa 2	Muskmelon (autumn waltz), 洋香瓜 (秋華)	+	2.21	1.77
Aa 3	Muskmelon (autumn waltz)	+	2.14	1.75
Aa 10	Muskmelon (autumn waltz)	+	1.88	1.55
Aa 11	Muskmelon (autumn waltz)	+	2.31	1.49
Aa 12	Muskmelon (autumn waltz)	+	2.06	1.65
Aa 13	Muskmelon (autumn waltz)	+	1.58	1.33
Aa 46	Muskmelon (autumn waltz)	+	1.48	1.57
Aa 47	Muskmelon (autumn waltz)	+	1.99	1.60
Aa 14	Muskmelon (golden prize), 洋香瓜 (狀元)	+	2.08	1.50
Aa 15	Muskmelon (new century), 洋香瓜 (新世紀)	+	1.99	1.34
Aa 16	Muskmelon (red sweet), 洋香瓜 (紅蜜)	+	1.44	0.61
Aa 35	Muskmelon (red sweet)	+	1.33	0.63
Aa 42	Muskmelon (red sweet)	+	1.97	1.28
Aa 45	Muskmelon (red sweet)	+	1.58	1.73
Aa 39	Muskmelon (autumn favor), 洋香瓜 (秋香)	+	1.90	1.01
Aa 40	Muskmelon (autumn favor)	+	1.04	1.42
Aa 48	Muskmelon (new chuanshiang), 洋香瓜 (新春香)	+	1.57	1.61
Aa 51	Muskmelon (honey world), 洋香瓜 (蜜世界)	+	2.52	1.70
Aa 7	Watermelon (supreme baby), 西瓜 (特小鳳)	+	2.36	1.94
Aa 8	Watermelon (supreme baby)	+	2.74	2.20
Aa 9	Watermelon (supreme baby)	+	2.71	1.80
Aa 24	Watermelon (paolan) 西瓜 (寶蘭)	+	2.13	1.61
Aa 50-1	Watermelon (paolan)	+	2.50	1.29
Aa 50-2	Watermelon (paolan)	+	2.61	1.96
Aa 52	Watermelon (china baby), 西瓜 (華寶)	+	>2.61	1.66
Aa 59	Watermelon 西瓜	?	>3.00	2.33
Aa 60	Watermelon	?	>3.00	2.69
Aa 61	Watermelon	?	>3.00	2.70
Aa 62	Watermelon	?	>2.87	2.20
Aa 63	Watermelon	?	>2.73	2.68
Aa 64	Watermelon	?	>3.00	2.75
Aa 65	Watermelon	?	>3.00	2.65
Aa 66	Watermelon	?	>3.00	2.63
Aa 67	Watermelon	?	>3.00	2.29
Aa 68	Watermelon	?	>3.00	2.33
Aa 23	Melon (silver light), 東方甜瓜 (銀輝)	+	1.92	1.48
Aa 25	Melon (silver light)	+	1.68	1.83
Aa 31	Melon (silver light)	+	2.25	1.64
Aa 32	Melon (silver light)	+	1.52	1.43
Aa 33	Melon (silver light)	+	2.03	1.08
Aa 34	Melon (silver light)	+	1.38	1.63
Aa 43	Melon (silver light)	+	2.30	1.06
Aa 44	Melon (silver light)	+	2.23	1.84
Aa 26	Balsam pear (high moon), 苦瓜 (高月)	+	1.73	1.19
Aa 27	Balsam pear (high moon)	+	1.97	1.18
Aa 28	Balsam pear (high moon)	+	2.21	1.75

<sup>1</sup>. Aa : *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; Xac : *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xcc : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Ec : *Erwinia chrysanthemi*; Eca : *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*; Xcm : *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

<sup>2</sup>. + : positive with 2 bands ; - : negative ; ? : not test.

<sup>3</sup>. OD values were read at 405 nm 30min after substrate added.

續表一、利用 SDS 免疫擴散反應和酵素結合抗體檢定法偵測不同瓜類品種感染細菌性果斑病菌之情形 (續前頁)

Table 1. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in various cucurbit crops using SDS double diffusion and ELISA (continued)

Strain <sup>1</sup>	Source	SDS-double <sup>2</sup> diffusion test	ELISA OD value <sup>3</sup>	
			DAS	Indirect
Aa 54	Balsam pear 苦瓜	?	>3.00	1.49
Aa 55	Balsam pear	?	>2.87	1.53
Aa 56	Balsam pear	?	>3.00	2.01
Aa 57	Balsam pear	?	>3.00	1.80
Aa 58	Balsam pear	?	3.00	2.06
Aa 30	Bottle gourd 扁蒲	+	1.99	1.55
Xac	Buntan shaddock 白柚 (1)	-	0.02	0.01
Xac	Buntan shaddock 白柚 (7)	-	0.01	0.01
Xcc	Cabbage 甘藍 (XCH14)	-	0.01	0.00
Xcc	Cauliflower 花椰菜 (XCH1)	-	0.01	0.00
Ec	Green onion 青蔥 (Brs4)	-	0.01	0.13
Eca	Onion 洋蔥 (Bsr9)	-	0.00	0.09
Xac	Sweet orange 柑桔 (XW47)	-	0.00	0.00
Xcm	Mango 芒果 (XCM25-1)	-	0.00	0.01

<sup>1</sup>. Aa : *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; Xac : *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xcc : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Ec : *Erwinia chrysanthemi*; Eca : *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*; Xcm : *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

<sup>2</sup>. + : positive with 2 bands ; - : negative ; ? : not test.

<sup>3</sup>. OD values were read at 405 nm 30min after substrate added.

再將自抗血清製備的 IgG 以酵素連結緩衝液 (conjugate buffer) 作系列稀釋成 2 µg/ml、1.25 µg/ml、1 µg/ml、0.83 µg/ml 等濃度，配合羊抗兔子酵素連結 IgG (goat anti-rabbit conjugate IgG) 1:1000 作間接 ELISA 反應試驗。另外將血清製備的 IgG 以 coating buffer 作系列稀釋成 2 µg/ml、1.25 µg/ml、1 µg/ml、0.83 µg/ml 等濃度，加入微量盤中，37 °C 培養 2 hr，再以 10<sup>8</sup> cfu/ml 之 *A. avenae* subsp. *citrulli* 及對照菌株 *X. axonopodis* pv. *citri* (XW 47) 用無菌水稀釋成 1 : 20 的濃度處理，最後將前述製備之 conjugate IgG 以 conjugate buffer 作系列稀釋成 1 : 500、1 : 800、1 : 1000 和 1 : 1200 等濃度作雙層夾心式連結抗體檢測 (DAS-ELISA) 反應試驗。

#### 不同寄主分離之病原細菌菌株與不同種類細菌菌株之 ELISA 試驗

將各種瓜類 (西洋甜瓜、東方甜瓜、西瓜、苦瓜和扁蒲) 分離到之細菌性果斑病病原細菌菌株、柑桔潰瘍病原菌株 (*X. axonopodis* pv. *citri*)、甘藍黑腐病病原菌株 (*X. campestris* pv. *campestris*)、青蔥軟腐病病原菌株 (*E. chrysanthemi*)、洋蔥軟腐病病原菌株 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 和芒果黑斑病病原菌株 (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*) 進行間接 ELISA 和 DAS-ELISA 測定。DAS-ELISA 中使用之免疫球蛋白和酵素連結免疫球蛋白分別為 1 µg/ml 和 1:1000；而間接 ELISA 中使用之免疫球蛋白和 goat anti-rabbit conjugate IgG 分別為 1 µg/ml 和 1:1000。

#### 酵素連結抗體檢定法對細菌性果斑病病原細菌之靈敏度測定

將 *A. avenae* subsp. *citrulli* 用 coating buffer (間接 ELISA) 或用無菌水 (DAS-ELISA) 稀釋成 10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup> cfu/ml 的濃度，進行靈敏度測定；另將 *X. axonopodis* pv. *citri* XW47 用相同的方法處理作為對照。在 DAS-ELISA 中使用之 IgG 和 conjugate IgG 濃度分別為 1 µg/ml 和 1 : 1000。在間接 ELISA 中使用之 IgG 濃度為 1 µg/ml，配合 goat anti-rabbit conjugate IgG 濃度為 1:1000。

#### 以 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 分析蛋白質

萃取細菌蛋白質時，將細菌 *A. avenae* subsp. *citrulli* Aa31 自培養基挑選單一菌落移至無菌水，其菌濃度以 OD 620 nm 調至 0.5 後，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，將菌體沉澱後，再使菌體懸浮於 100 µl 1X 解離緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8 ; 100 mM DDT ; 2% SDS ; 0.1% bromophenol blue ; 10% glycol) 中，接著在沸水中煮沸 5 分鐘後，震盪 30 秒，置於冰上 5 分鐘冷卻，接著以 12,000 rpm，離心 5 分鐘，取含蛋白樣品 10-20 µl 之上層液注入 SDS-PAGE 電泳膠體中進行分析。電泳膠體為 12.5% 之分離凝膠 (separation gel ; 3 ml d.d.H<sub>2</sub>O、4.35 ml 30% acrylamide solution、2.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8、100 µl 10% SDS、50 µl 10% ammonium persulfate solution 及 5 µl TEMED) 和 3% 之集聚凝膠 (stacking gel ; 3.05 ml d.d.H<sub>2</sub>O、0.67 ml 30% acrylamide solution、1.25 ml 0.5 M

Tris-HCl, pH 6.8、50  $\mu$ l 10% SDS、50  $\mu$ l 10% ammonium persulfate solution 及 5  $\mu$ l TEMED) 進行電泳分析。電泳膠體之分析，將凝膠玻璃片裝置放置電泳槽內，於槽內注入 1 X 泳動緩衝液 (running buffer)。將蛋白質樣品與分子量標誌吸取適當量體積緩緩注入集聚凝膠之齒溝槽內，於電壓為 150 V 下先進行電泳 30 分鐘。再於電壓為 200 V 下進行電泳分離，分離至染劑下移到分離凝膠之底部，取出膠體進行染色與脫色。膠體內蛋白之染色與去染，將電泳後之膠體取下，切去集聚凝膠部分後浸於孔雀藍染劑 (50% methanol ; 7% acetic acid ; 0.25% coomassie blue) 中染色 3 分鐘，取出改置於去染液 I (40% methanol ; 7% acetic acid) 5 分鐘，再更換於去染液 II (5% methanol ; 7% acetic acid) 中待背景顏色退去，最後膠體兩面以玻璃紙覆蓋，經風乾後拍照後保存之。試驗中所用的標記蛋白為 GIBCO BRL 之 Prestained Protein Molecular Weight Standards，分別含 Lysozyme (14.5 kDa)、 $\alpha$ -Lactoglobulin (19.7 kDa)、Carbonic anhydrase (28.6 kDa)、Ovalbumin (45.4 kDa)、Bovine serum albumin (71.7 kDa)、Phosphorylase B (96.7 kDa)、Myosin H-chain (220.9 kDa)。

### 西方墨點分析法 (western blot analysis)

病原細菌蛋白經 SDS-PAGE 電泳分離後，取下膠體，浸泡於轉漬緩衝液 (transfer buffer) (25 mM Tris-HCl ; 190 mM glycine ; 20% methanol)，並準備聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride ; PVDF ; Micron separation, U.S.A.) 膜，先以甲醇浸泡，蒸餾水漂洗，再浸泡於轉漬緩衝液。使用迷你垂直電泳系統 (miniVE Vertical Electrophoresis System ; Hoefer Amersham Pharmacia Biotech)，於 4 下以 25V 通電二小時，使膠體上的蛋白轉漬於 PVDF 膜上，以 TSW buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 ; 0.9% NaCl ; 0.25% gelatin, 單獨加熱溶解後再加入 ; 0.1% Triton X-100 ; 0.02% SDS) 水洗三次，每次十分鐘，再以 TSW buffer 進行浸置一小時，經 TSW buffer 水洗後，以 conjugate buffer 稀釋 1,000 倍的鹼性磷酸酵素結合之 IgG 進行免疫反應，37 作用二小時，經 TSW buffer 水洗後在以顯色緩衝液 (colorization buffer ; 100 mM Tris-HCl, pH 9.5 ; 100 mM NaCl ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 潤洗一下，以 NBT (nitroblue tetrazolium) 30  $\mu$ l 及 BCIP (bromochloroindoyl phosphate) 15  $\mu$ l 溶解於 5 ml colorization buffer 內做為呈色基質進行呈色，此時須避免照光，待呈色後即以蒸餾水漂洗，停止反應後拍照保存判讀。

## 結 果

### 抗血清之力價測定

將連續採血五次之抗血清進行力價測定，抗血清力價乃以 SDS 免疫擴散反應進行。結果顯示稀釋 1/4 倍後的抗

血清未能與抗原形成反應帶；但是未稀釋和稀釋 1/2 倍後的抗血清均能與細菌性果斑病原細菌 (*A. avenae* subsp. *citrulli*) 形成 2 條明顯弧形反應帶，與對照菌株 *X. axonopodis* pv. *citri* 則不形成任何反應帶。

### 抗血清與不同種類細菌之 SDS 免疫擴散反應試驗

以第二次之抗血清與西洋甜瓜、東方甜瓜、西瓜、苦瓜之細菌性果斑病菌株、*X. axonopodis* pv. *citri* XW47、*X. campestris* pv. *campestris* XCH14、*E. chrysanthemi* Brs4、*E. carotovora* subsp. *carotovora* Bsr9、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* XCM25-1 作雙重擴散反應試驗，以探討不同種類之病原細菌與抗血清之反應。結果顯示所有由西洋甜瓜、東方甜瓜、西瓜、苦瓜分離之細菌性果斑病菌株均與所獲得之抗血清反應 (表一)，且形成兩條明顯弧形反應帶 (圖一和表一)。而此抗血清並不與其他五種不同病原細菌菌株，形成任何反應帶 (圖一)。

### 不同濃度之免疫球蛋白和酵素連結免疫球蛋白對 DAS-ELISA 吸收值之影響

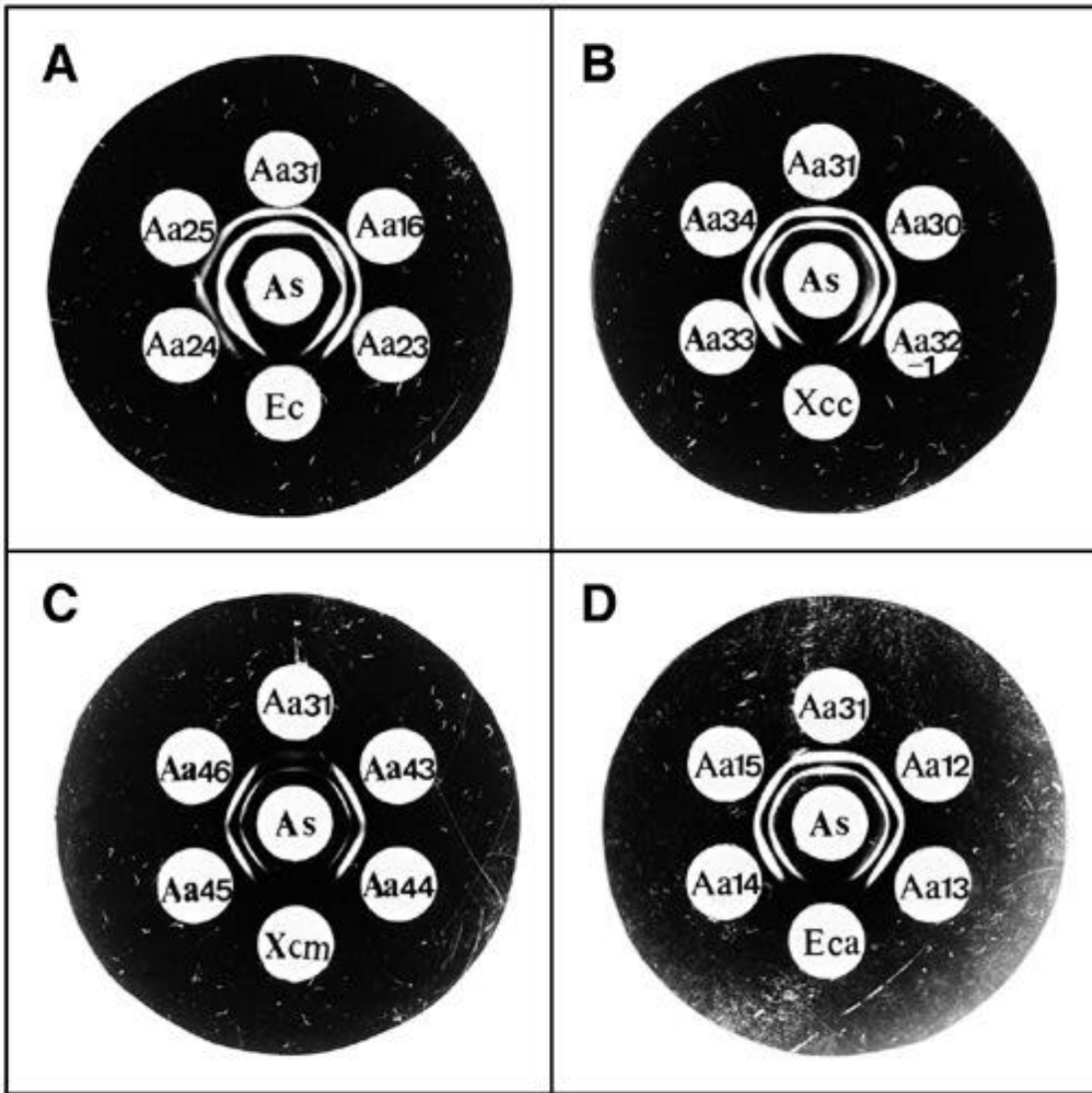
如表二結果所示，在 DAS-ELISA 測定中，加入基質後 30 分鐘反應最靈敏者為 IgG 濃度 2 或 1  $\mu$ g/ml 配合 conjugate IgG 稀釋 500 倍之組合，OD 值 > 3.0 ; IgG 濃度 1.25  $\mu$ g/ml 和 conjugate IgG 稀釋 500 倍其次 ; OD 值為 2.76 ; IgG 濃度 1  $\mu$ g/ml 和 conjugated IgG 稀釋 800 倍，OD 值為 2.38 ; IgG 濃度 1  $\mu$ g/ml 和 conjugate IgG 稀釋 1000 倍和 1200 倍，OD 值分別為 1.6 和 1.76，因此由經濟效益及靈敏度來評估，以 IgG 濃度 1  $\mu$ g/ml 和 conjugate IgG 稀釋 1200 倍之組合為最適宜。

### 不同濃度之免疫球蛋白對間接 ELISA 吸收值之影響

如表三結果所示，在非直接 ELISA 測定中加入基質後 30 分鐘，OD 值最靈敏者為 IgG 濃度 2  $\mu$ g/ml 處理，OD 值 > 3.0，其次為濃度 1.25  $\mu$ g/ml 者，OD 值為 2.98，而濃度 1  $\mu$ g/ml 和 0.83  $\mu$ g/ml，OD 值分別為 2.78 和 2.66。而其背景值均低於 0.04，因此由經濟效益及靈敏度來評估，以 IgG 濃度 1  $\mu$ g/ml 為最適宜。

### 不同寄主分離之病原細菌菌株與不同種類細菌菌株之 ELISA 試驗

將各種瓜類 (西洋甜瓜、東方甜瓜、西瓜、苦瓜和扁蒲) 分離到之細菌性果斑病原細菌菌株進行間接 ELISA 和 DAS-ELISA 測定。結果如表一所示，非直接 ELISA 和直接 DAS-ELISA 試驗中均可順利偵測到病原細菌。而直接 DAS-ELISA 之反應吸光值較非直接 ELISA 高。同時在兩種 ELISA 試驗中，其他五種病原細菌菌株均無反應。



圖一、細菌性果斑病菌抗血清對細菌性果斑病菌與不同種類細菌之 SDS 免疫擴散反應。

**Fig. 1.** SDS immuno-double diffusion tests between *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* antiserium (As) and various bacteria. Aa 12, 13, 14, 15, 16, 23, 24, 25, 30, 31, 32-1, 33, 34, 43, 44, 45 represent different strains of Aac isolated from cucurbit crops as shown in Table 1. Xcc, Ec, Eca and Xcm represent *X. campestris* pv. *campestris*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* and *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, respectively.

**酵素連結抗體檢定法對細菌性果斑病原細菌之靈敏度測定**

ELISA 檢定法對細菌性果斑病原細菌之靈敏度測定結果如表四所示，在 DAS-ELISA 試驗中，在加入基質後 30 分鐘，可以偵測到  $10^5$  cfu/ml 濃度之細菌性果斑病原細菌，其 OD 值為 0.2，而  $10^7$  和  $10^8$  cfu/ml 濃度之細菌性果斑病原細菌，其 OD 值均大於 3。而在非直接 ELISA 試驗中，在加入基質後 30 分鐘，可以偵測到  $10^4$  cfu/ml 濃度之細菌性果斑病原細菌，其 OD 值為 0.17，而  $10^6$  和  $10^7$  cfu/ml 濃度之細菌性果斑病原細菌，其 OD 值均大於 3 (表五)。

**SDS-PAGE 蛋白質與西方墨點分析**

以 SDS-PAGE 電泳膠體進行 *A. avenae* subsp. *citrulli* Aa 31 萃取之全量蛋白質分析，結果如圖二、A 所示，依據標記蛋白質之分子量，可以估算細菌全量蛋白質大小，由 15 kDa 至大於 221 kDa。西方墨點分析結果如圖二、B 所示，由圖可見，有二種蛋白質可以和果斑病菌的免疫球蛋白反應，其分子量均大於 221 kDa，此結果顯示本試驗所製備之抗血清，是由此兩種蛋白質反應製備而得；這個結果也可以說明為何在 SDS 免疫擴散反應試驗中，抗血清均與所有由洋香瓜、西瓜、甜瓜、苦瓜分離之細菌性果斑病菌株形成兩條明顯弧形反應帶 (圖一)。

表二、不同濃度 IgG 和酵素連結 IgG 對細菌性果斑病菌在雙層夾心式酵素連結抗體檢測法中對吸光值之影響

Table 2. Effect of concentrations of IgG and conjugate IgG of *A. avenae* subsp. *citrulli* on optical density (OD) value in DAS-ELISA

Concentrations of conjugate IgG	Concentrations of IgG in coating buffer			
	2 µg/ml	1.25 µg/ml	1 µg/ml	0.83 µg/ml
1 : 500	>3.00/0.02 <sup>1</sup>	2.76/0.02	>3.00/0.02	2.14/0.01
1 : 800	2.59/0.01	2.17/0.01	2.38/0.01	1.69/0.01
1 : 1000	1.81/0.01	1.54/0.01	1.60/0.01	1.23/0.01
1 : 1200	1.81/0.01	1.66/0.02	1.76/0.01	1.22/0.01

<sup>1</sup> "/" indicates the resultant OD values when 10<sup>8</sup> cfu/ml of *A. avenae* subsp. *citrulli* and *X. axonopodis* pv. *citri* were used as samples, respectively. OD values were read at 405 nm 30 min after substrate added.

表三、不同濃度 IgG 對細菌性果斑病菌在間接酵素連結抗體檢測法中對吸光值之影響

Table 3. Effect of concentrations of IgG of *A. avenae* subsp. *citrulli* on optical density (OD) value in indirect ELISA<sup>1</sup>

Bacterium <sup>2</sup>	Concentrations of IgG			
	2 µg/ml	1.25 µg/ml	1 µg/ml	0.83 µg/ml
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	>3.0	2.98	2.78	2.66
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	0.04	0.03	0.02	0.02

<sup>1</sup> Concentration of goat anti-rabbit conjugate IgG was 1 : 1000.

<sup>2</sup> The concentrations of *A. avenae* subsp. *citrulli* and *X. axonopodis* pv. *citri*, were 10<sup>8</sup> cfu/ml, respectively.

表四、不同濃度之細菌性果斑病菌在雙層夾心式酵素連結抗體檢測法中對吸光值之影響

Table 4. Effect of concentrations of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on optical density (OD) value in DAS-ELISA<sup>1</sup>

Incubation time after substrate was added	OD value at various concentrations ( cfu/ml ) of <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>							
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
15 min	2.65	1.09	0.20	0	0	0	0	0
30 min	>3	2.06	0.58	0.57	0	0	0	0
45 min	>3	2.92	0.98	0.18	0	0	0	0
60 min	>3	>3	1.19	0.20	0	0	0	0

<sup>1</sup> Concentrations of IgG and conjugate IgG used were 1 µg/ml and 1:1200, respectively.

表五、不同濃度之細菌性果斑病菌在間接酵素連結抗體檢測法中對吸光值之影響

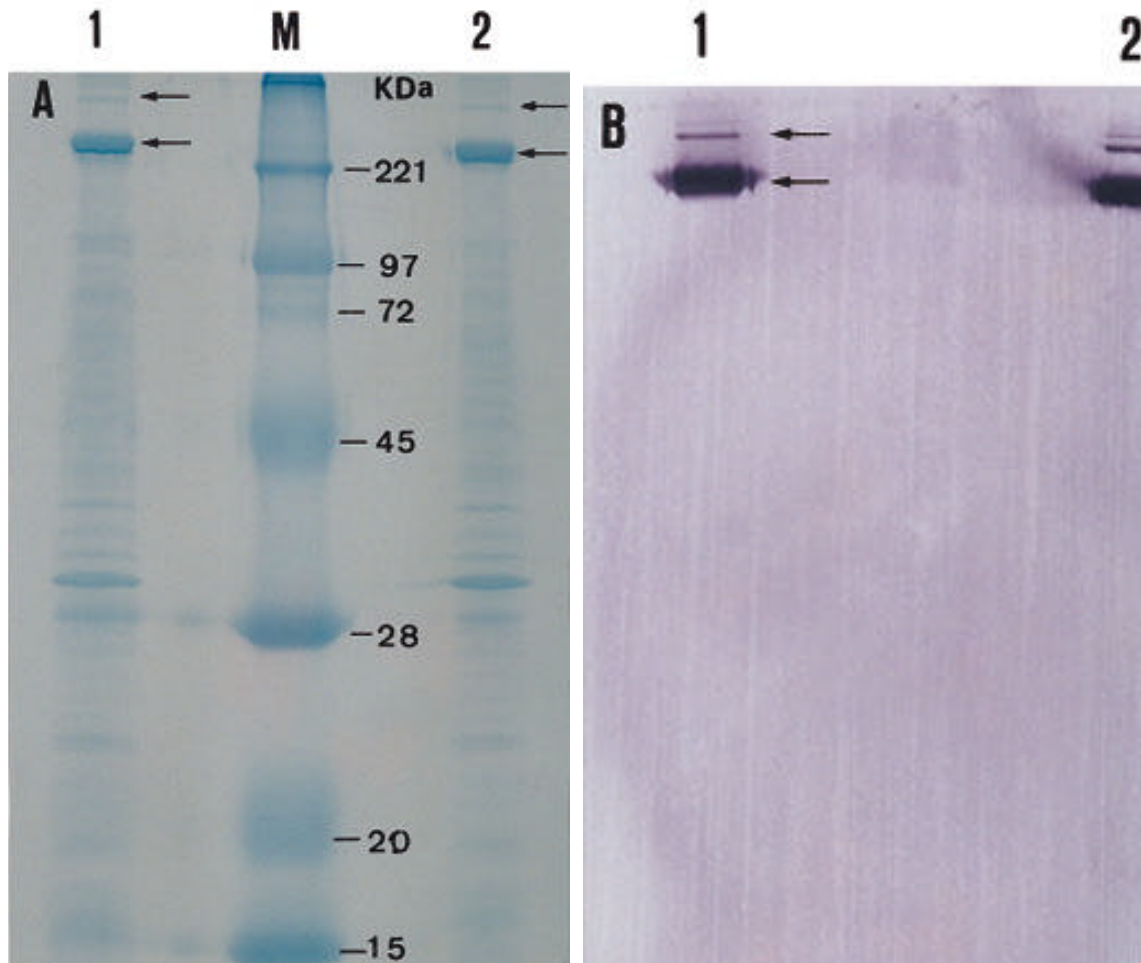
Table 5. Effect of concentrations of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on optical density (OD) value in indirect ELISA<sup>1</sup>

Incubation time after substrate was added	OD value at various concentrations ( cfu/ml ) of <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>							
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
15 min	0.65	1.50	1.08	0.35	0.04	0.02	0	0
30 min	1.03	2.38	1.66	0.54	0.07	0.03	0	0
45 min	1.69	>3	2.61	0.91	0.13	0.04	0.01	0
60 min	2.18	>3	>3	1.21	0.17	0.05	0.01	0

<sup>1</sup> Concentrations of IgG and goat-anti-rabbit conjugated IgG used were 1 µg/ml and 1:1,000, respectively.

## 討論

瓜類細菌性果斑病近年來在瓜類上造成農民嚴重經濟損失，同時因為病果表皮只有 3-10 mm 水浸狀不明顯斑點，但是果肉組織或是種子腔往往已填滿了病原細菌，如果農民不查而採收上市，往往造成消費者損失及困擾。因此如何防治本病為當前主要研究方向，而如何研發本病原細菌之快速準確之血清檢驗方法，亦至為重要。本試驗所獲得之抗血清具有高專一性，在 SDS 免疫擴散反應試驗中，可以與西瓜、東方甜瓜、西洋甜瓜、苦瓜或扁蒲分離之病原細菌菌株反應 (表一)，而且形成二條明顯反應沈澱帶 (圖一)，但此抗血清並不與其他五種不同病原細菌菌株形成任何反應帶 (圖一)。此結果顯示抗血清是由兩種不同抗原蛋白，免疫反應而製成，此推論亦由西方墨點反應分析結果得到佐證 (圖二)，其分子量均大於 221 kDa，由於無法取得大於 221 kDa 之標記蛋白質，因此無法準確估算出此兩種抗原蛋白質之分子量。由於所得之免疫球蛋白可在 DAS-ELISA 或間接 ELISA 與病原細菌反應 (表二和三)，顯示抗原蛋白質是存在病原細菌之外部，因此這兩種抗原蛋白質是否屬於細胞壁外膜 (outer membrane) 之結構蛋白質，尚待進一步利用抗血清電子顯微鏡法 (immunosorbent electron microscopy) 加以觀察證實。除了 SDS 免疫擴散反應法外，不論直接或間接 ELISA，均可快速準確來偵測本病原細菌，在 DAS-ELISA 試驗，可以偵測到 10<sup>5</sup> cfu/ml 濃度之病原細菌，而在間接 ELISA 試驗只要 10<sup>4</sup> cfu/ml 即可偵測到 (表二和三)，以上兩種方法均可在一天內完成偵測步驟，尤其是在檢驗種子帶菌上，比較



圖二、瓜類細菌性果斑病菌全量蛋白質分析 (A)，與西方轉漬反應結果 (B)。

**Fig. 2.** The analysis of total proteins of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A, lanes 1 and 2) by a 12.5% slab SDS-PAGE. M:14.3-200 kDa protein markers (GIBCO BRL Protein Molecular Weight Standards, U.S.A.). (B) the western blot analysis of total proteins of *A. avenae* subsp. *citrulli*. Two bands in lanes 1 and 2 in B show the proteins which reacted with IgG against Aac in western blot. Arrows in A and B indicate two proteins which induced immunization.

目前常用的生物檢驗方法如利用半選擇性培養基的稀釋平板法，或經由種子播種再觀察其發病情形的植株長出法，其敏感度較高，且省時間、省空間、不易受環境溫度、溼度影響，因此利用血清偵測法來偵測本病原細菌，有其可取之處，唯一需要注意之處，為血清檢驗方法，無法分辨檢驗之病原細菌是活性具有感染力，或是已死亡而不具感染力，因此當利用血清檢驗法而得到正反應結果時，亦應將病原細菌加以培養觀察其活性。由本試驗結果顯示，血清偵測法不僅可以作為田間本病害之檢驗用，在檢疫上亦可提供快速準確之檢驗方法不過其靈敏度仍有待配合其他技術加以提升。分子生物技術已被廣泛應用於植物病原菌的診斷或鑑定，國外報導指出利用聚合酵素連鎖反應技術可用來偵測西瓜種子上的 *A. avenae* subsp. *citrulli*<sup>(16)</sup>；如果將免疫血清結合聚合酵素連鎖反應更可將偵測敏感度提高到 10 cfu/ml<sup>(20)</sup>。本研究已獲得具高專一性之抗血清，

將進一步評估與聚合酵素連鎖反應技術結合之可行性，提高種子帶菌偵測之靈敏度與準確性。

## 誌 謝

本研究承行政院農業委員會科技計畫 89 科技-6.3-檢 70 經費補助，研究期間承黃柄龍先生、陳貴英、許瑛玲小姐協助，特誌謝忱。

## 引用文獻

1. 唐致仁. 1997. 西瓜細菌性果斑病之研究. 國立中興大學植物病理學研究所第二十七屆畢業碩士論文.
2. 鄭安秀、黃欒昌. 1998. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 引起的甜瓜及苦瓜細菌性果斑病. 植病會刊 7:216.



3. 鄭安秀、許瑛玲、黃欒昌、王惠亮. 2000. 甜瓜對細菌性果斑病之感受性及果斑病之防治. 植病會刊 9:151-156.
4. Frankle, W. G., Hopkins, D. L., and Stall, R. E. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. *Plant Dis.* 77:1090-1092.
5. Hopkins, D. L. 1990. Differences in cultivar resistance to bacterial fruit blotch of watermelon. *Phytopathology* 80:435 (Abstr.).
6. Hopkins, D. L. 1993. Epidemiology and control of bacterial fruit blotch of watermelon. Annual Project Report to American Seed Research Foundation.
7. Hopkins, D. L. 1993. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. *Phytopathology* 83:466(Abstr.).
8. Hopkins, D. L. 1994. Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. *Phytopathology* 84:795(Abstr.).
9. Hopkins, D. L. 1995. Copper-containing fungicides reduce the spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. *Phytopathology* 85:510(Abstr.).
10. Hopkins, D. L., Cucuzza, J. D., and Watterson. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis.* 80:529-532.
11. Isakeit, T. 1997. Report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 81:694 (Abstr.).
12. Kucharek, T., Perez, Y., and Hodge, C. 1993. Transmission of the watermelon blotch bacterium from infested seed to seedling. *Phytopathology* 83:467 (Abstr.).
13. Langston, D. B., JR., Walcott, R. D., Gitaitis, R. D., and Sanders, F. H., JR. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83:199(Abstr.).
14. Latin, R. X., and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon : The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79:761-765.
15. Latin, R., Tikhonova, I., and Rane, K. 1995. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. *Phytopathology* 85:1413-1417.
16. Minsavage, G. V., Hoover, R. J., Kucharek, T. A., and Stall, R. E. 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85:1162. (Abstr.)
17. Purcifull, D. E., and D. L. Bstchelor. 1977. Immuno-diffusion Test with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Florida Agric. Expt. Sta. Bull. No. 78, 39 pp.
18. Rane, K. K., and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch for watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76:509-512.
19. Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kucharek, T. A., Hodge, N. C., and Watterson, J. C. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Dis.* 75:1053-1056.
20. Walcott, R. R., and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84:470-474.
21. Wall, G. C. 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat-treatment. *Phytopathology* 79:1911 (Abstr.).

## ABSTRACT

Wang, H. L.<sup>1,3</sup> and Cheng, A. H.<sup>2</sup> 2001. Development of serological detection technique for bacterial fruit blotch *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbit crops. Plant Pathol. Bull. 10:129-138. (<sup>1</sup> Institute of Biology Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 800, Taiwan, R.O.C. ; <sup>2</sup> Tainan District Agricultural Improvement Station, Council of Agriculture, Tainan, 701, Taiwan, R.O.C. ; <sup>3</sup> Corresponding author: E-mail: hlwang@nknucc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030 )

*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* which infected fruits and leaves of cucurbit crops including muskmelon, watermelon, melon and bitter gourd were collected from Taichung, Tainan, Kaohsiung and Ilan in Taiwan. The strain designated as Aa 31 of *A. avenae* subsp. *citrulli* isolated from melon was used for producing antiserum. The titer of antiserum was 1/2 dilution of crude antiserum in SDS-double diffusion test with two visible reaction bands. The optimum concentrations of immunoglobulin G (IgG) and enzyme conjugate immunoglobulin G (conjugate IgG) were 1 µg/ml and 1/1200 dilution in double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), respectively. The optimum concentration of IgG was 1 µg/ml in indirect ELISA. The minimum concentrations that resulted in positive reaction in DAS-ELISA and indirect ELISA were 10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cfu/ml of Aa 31, respectively. All strains of *A. avenae* subsp. *citrulli* from different cucurbit crops also reacted with antiserum resulting in two precipitation bands in SDS-double diffusion test, and reacted with IgG in indirect ELISA and DAS-ELISA. However the antiserum did not react with other five species of bacteria including *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* and *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* in SDS double diffusion test, indirect ELISA and DAS-ELISA. The result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting showed that two reacting bands with protein molecular weight over 221 kDa were observed.

Keywords : cucurbit crops, bacterial fruit blotch, serology