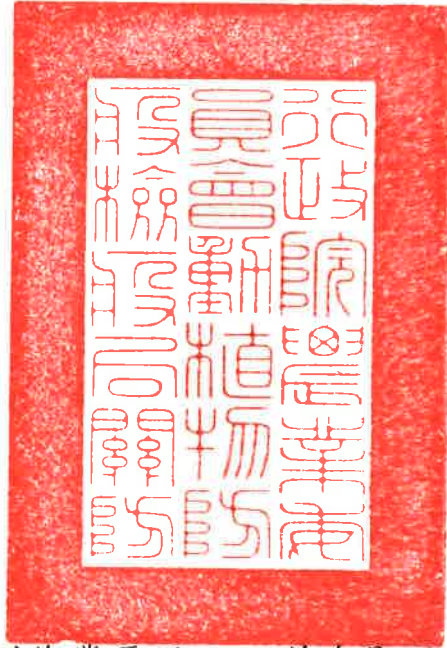


檔 號：
保存年限：

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102年09月18日
發文字號：防檢四字第1021493589A號



訂定「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」，並自即日生效。
附「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」

局長 張淑賢

輸出植物種子特定病原檢測作業要點

- 一、行政院農業委員會動植物防疫檢疫局（以下簡稱防檢局）為辦理輸出植物種子特定病害檢測作業，特訂定本要點。
- 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*）及番茄嵌紋病毒（*Tomato mosaic virus*）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。

- 三、輸出植物種子特定病原之檢測作業流程如附件一。
- 四、輸出人為符合輸入國（地區）檢疫規定，而須於輸出植物檢疫證明書加註植物種子經檢測未罹染特定病原者，應向防檢局轄區分局提出檢測申請。

前項申請應載明輸出植物種子之學名、數量、重量、輸銷國家（地區）及申請檢測之病原名稱（學名）。

- 五、特定病原之檢測方法如附件二。

六、取樣

- （一）由防檢局轄區分局派員至植物種子存放處進行取樣。
- （二）各類種子之取樣數量如附件三。

七、送檢

樣品由防檢局轄區分局檢疫人員封識，並填寫「送請鑑定植物病蟲害報告表」（附件四），一併交由輸出人送至種苗場進行檢測，檢測費用由輸出人依「行政院農業委員會種苗改良繁殖場受託辦理基因轉殖植物及植物病原檢測收費標準」支付予種苗場。

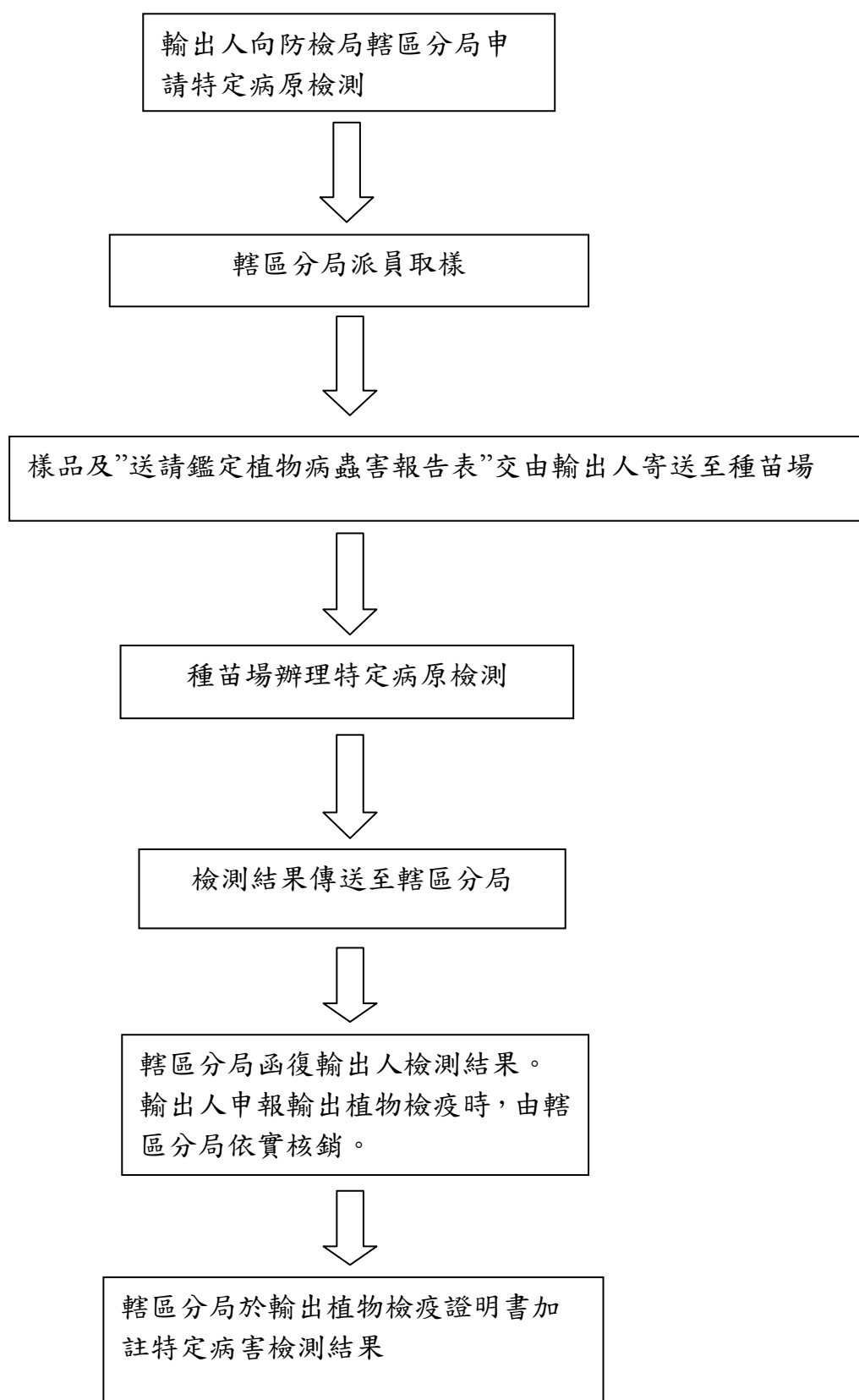
八、檢測結果

- (一) 種苗場依附件二檢測方法完成檢測後，應將檢測結果登載於「送請鑑定植物病蟲害報告表」後傳送至防檢局轄區分局。
- (二) 防檢局轄區分局於接獲種苗場檢測結果後，應函知輸出人檢測結果。檢測合格之種子得分批輸出，惟應於二年內辦理輸出完畢，並依實核銷數量，逾期則應重新申請檢測。

九、輸出植物檢疫證明書核發及加註

輸出人輸出種子時，應檢附前點第二款函向防檢局轄區分局申報輸出檢疫，經防檢局轄區分局確認該批種子係經種苗場檢測合格後，始於輸出植物檢疫證明書加註檢測結果，並依實核銷數量。

附件一 輸出植物種子特定病原檢測作業流程



附件二 特定病原之檢測方法

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
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

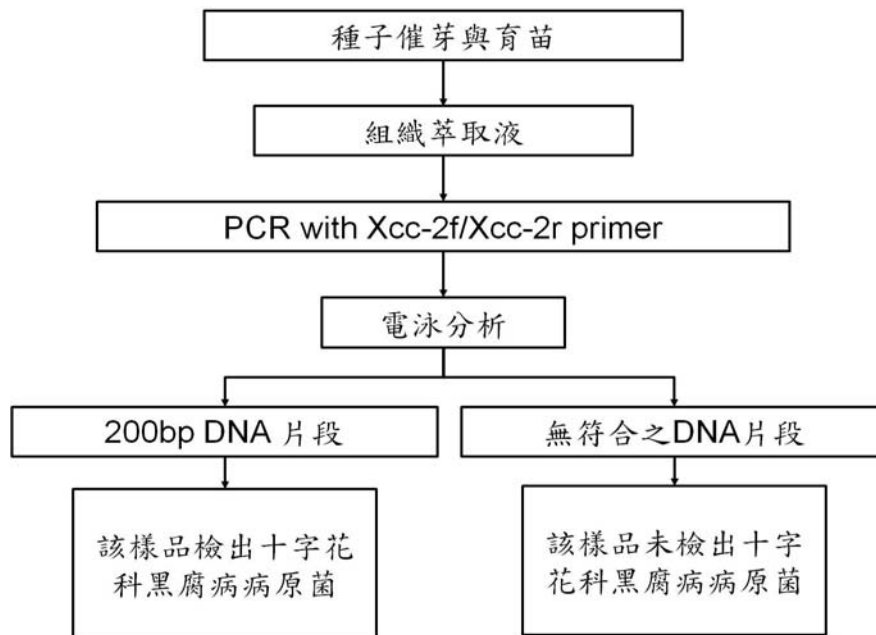
F 4°C ∞

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

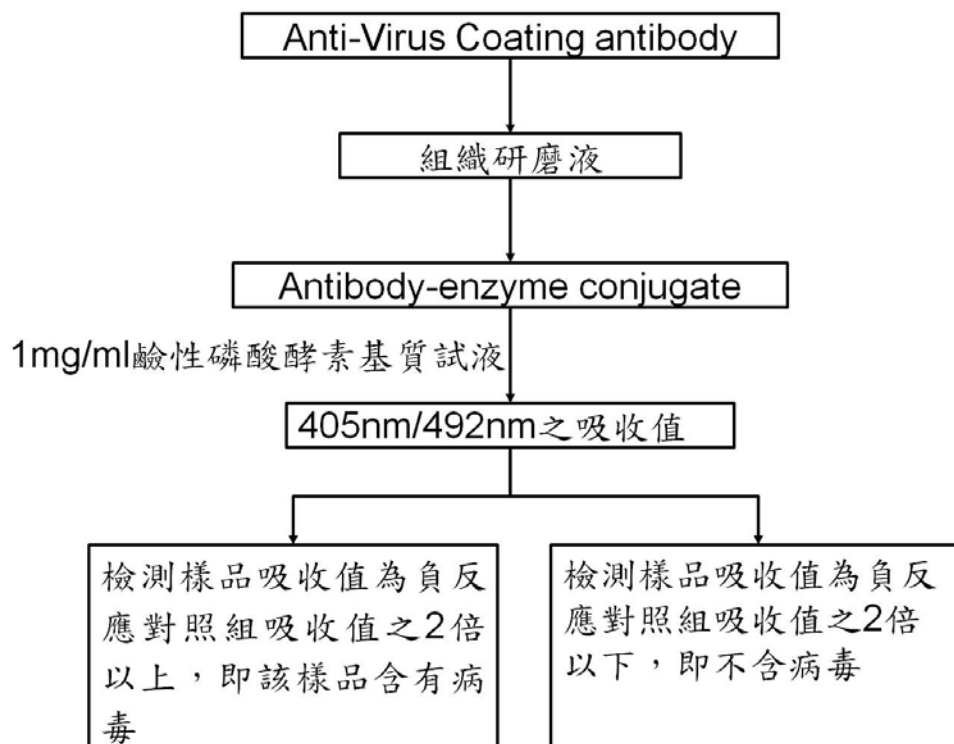
3.1. 種子催芽及育苗

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

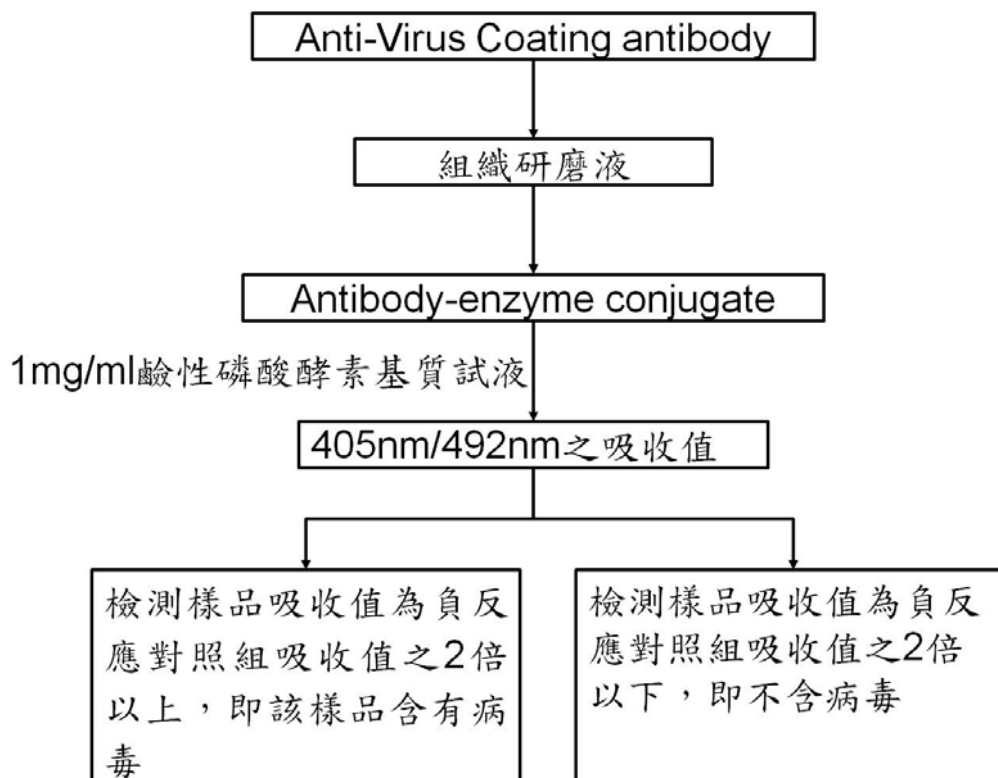
3.1. 種子催芽及育苗

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 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)：

Na₂HCO₃ 2.93 g

Na₂CO₃ 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

NaN₃ 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

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

2.1.5. 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。

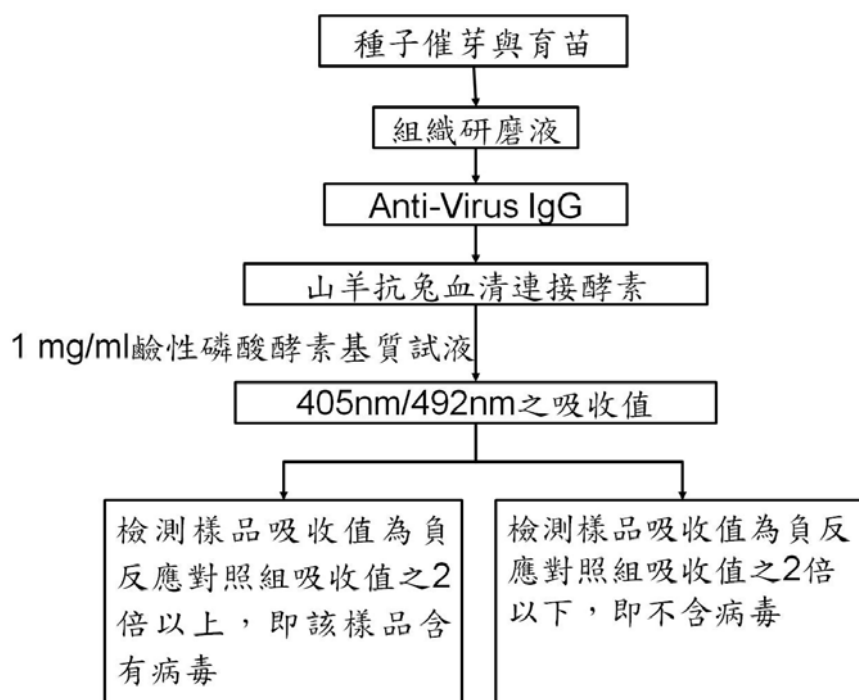
3.1.3 種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，栽培到三片本葉長出後，每株採樣第1及第2之三出葉各一片小葉，置於具編號的採集袋中。

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 × 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 LabAssist-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)

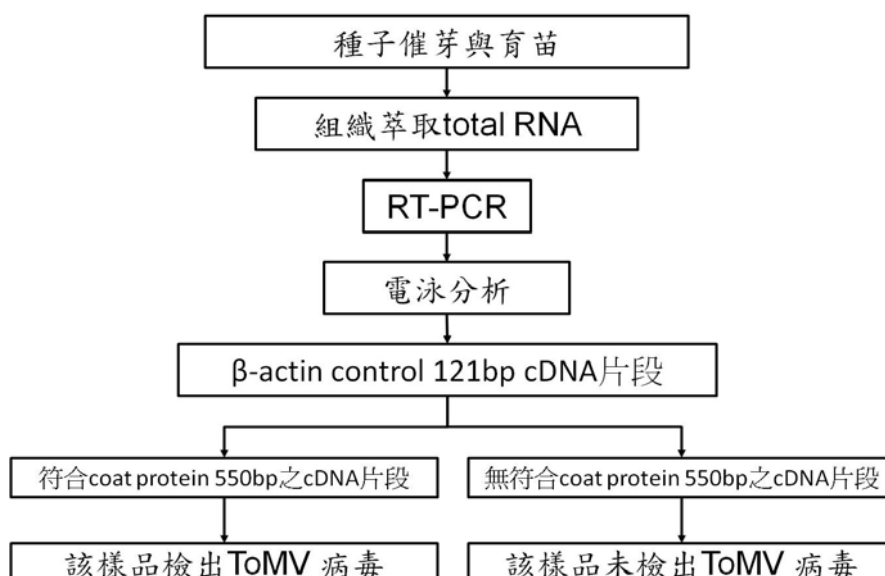
Rnase free distilled water	4.75	μl
10×buffer	1.25	μl
25mMMgCl ₂	2.50	μl
10mMdNTP	1.25	μl
Rnase inhibitor (40Units/μl)	0.25	μl
AMV RTase(5Units/μl)	0.25	μl
AMV Optimized Taq(5Units/μl)	0.25	μl
Primer ToMV no.1(10Mm)	0.25	μl
Primer ToMV no.3 (10μM)	0.25	μl
Primer ActinF (10μM)	0.25	μl
Primer ActinR (10μM)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

附件三 種子取樣數量

種子種類		取樣數量
茄科	番茄	50 公克
	辣椒	50 公克
	甜椒	50 公克
十字花科	花椰菜	50 公克
	青花菜	50 公克
	甘藍	50 公克
	芥藍	50 公克
	不結球白菜	50 公克
	青江白菜	50 公克
葫蘆科	西瓜	1,000 粒
	南瓜	1,000 粒
	洋香瓜	1,000 粒
	胡瓜	1,000 粒
菊科	萵苣	50 公克
	萬壽菊	50 公克
番木瓜科	木瓜	1,000 粒
豆科	豇豆	1,000 粒
	鵲豆	1,000 粒
其他種類		大型者 1,000 粒、 小型者 50 公克

附件四 送請鑑定植物病蟲害報告表

鑑定單位：			聯絡者：			電子郵件：			
			聯絡電話：			傳真：			
申請鑑定單位：○○分局（植物檢疫課）			聯絡者：			電子郵件：			
			聯絡電話：			傳真：			
送請鑑定日期：			鑑定項目：			鑑定完成日期：			
						鑑定者：			
編號	採樣日期	公文文號	寄主植物或介質種類 (部位)	輸出國	鑑定 項目	鑑定結果		臺灣是否 有紀錄	備註
						種類名稱(中名)	學名		
例：高 -7-001	1020901								廠商名稱

檢疫員：_____ 課長(主任)：_____ 分局長：_____