

# 台灣十字花科黑腐病菌之酵素連結抗體檢測法<sup>1</sup>

黃德昌<sup>2</sup>

關鍵字：十字花科黑腐病菌、酵素連結抗體檢測法

## 摘 要

以黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)XC38菌株之抗血清為材料，比較雙層夾心式及間接式酵素連結抗體檢測法檢測黑腐病菌之專一性與靈敏度，顯示二者靈敏度相近，但以雙層夾心式酵連抗體法之專一性較高，供試之31株其他病原細菌及腐生菌中，僅*X. campestris* pv. *vesicatoria*出現強干擾反應，但供試之62個黑腐病菌株中，有3個呈現負反應。抗原細菌以添加0.1% Tween 80及0.125% glutaraldehyde之磷酸緩衝生理食鹽水當作萃取液萃取後，在雙層夾心式酵連抗體法中反應最強，而背景呈色亦低，偵測同源抗原細菌之靈敏度可達 $3.3 \times 10^4$  CFU/ml，肉眼可判別之反應則約在 $1.3 \times 10^5 \sim 2.6 \times 10^5$ 之間，此一方法同時亦適用於病組織中細菌之檢測。以雙層夾心式酵連抗體法偵測種帶或土帶黑腐病菌，一般而言，靈敏度不及以選擇性培養基SMA之直接分離法，但其反應不受雜菌多寡之影響，對大量或污染嚴重之種子樣品，仍不失為可行之病菌偵測法，同時亦可輔助培養基直接分離法確認可疑之菌落，也可應用於田間作物或雜草可疑病徵之快速鑑定。

## 前 言

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 引起之十字花科黑腐病是重要之種子傳播病害(24)。而在某些地區，土壤也被懷疑是本病重要之感染源(5, 20)，因此，長久以來偵測種子及土壤中之病菌，被認為是研究本病生態、流行學及檢疫、防病之重要課題(5, 17, 20, 24)。

本病病菌之偵測方法頗多，但仍以使用選擇性培養基直接分離偵測優點最多(17)，利用直接分離偵測法在樣品含雜菌或拮抗菌之種類或數量少時，靈敏度(sensitivity)高，可顯示相對之活菌數，而且長出之菌落尚可用其他

1. 本文為作者碩士論文之一部份，承中興大學徐世典教授指導。

2. 台灣省台東區農業改良場助理研究員。

方法如血清、噬菌體或接種做最後之確認，誤判之可能性低（15. 16. 17. 18. 19.），但如樣品所受污染嚴重時，該方法之效果即不理想（17.）。因此，近年來，血清偵測及鑑定技術逐漸受到重視（16.），Domen 與 Alveraz（12.）以直接免疫螢光技術（*direct immunofluorescent technique*）偵測土壤中之病菌，可偵測出其於土中數量之變化，靈敏度達  $10^2$  CFU/克土壤。Schaad 與 Donaldson（18.）以間接免疫螢光技術（*indirect immunofluorescent technique*）配合直接分離法偵測種帶病菌，認為迅速而有用。酵連抗體法（ELISA）已被應用於本菌之快速鑑定（4. 6.），但其應用於種子或土壤偵測之效果如何，則迄今未見報告。

本研究以本省黑腐病病菌為材料，比較酵素連結抗體法之專一性與靈敏度，並就操作方法加以改良，進而評估其應用於偵測或鑑定之可行性。

## 材料與方法

### (一) 細菌菌株：

黑腐病菌菌株由台灣各地十字花科蔬菜罹病葉片或種子分離而得，其他細菌菌株取自中興大學植病系細菌實驗室，或由中興大學吳文川教授、謝式坤鈺教授提供。這些細菌均在 523 培養基上，於  $30^{\circ}\text{C}$  培養三天後當菌源。

### (二) 抗血清（*anti serum*）之製備：

1. 抗原（*antigen*）之製備：將 *X. campestris pv. campestris* XC 38 移入裝有 30 毫升之 523 *broth*（同 523 *agar*，但不加 *agar*）之三角瓶中，在  $30^{\circ}\text{C}$  之水浴中振盪培養 18 小時，將菌液經  $12,000\times g$  離心 10 分鐘，倒去上澄液，沉降物以  $0.01M$  之 *PBS* 懸浮，如此重覆三次，以洗去胞外多醣體（*extracellular polysaccharide*），最後之沉降物以 *PBS* 懸浮成約含  $10^9$  CFU/ml 之懸浮液，將此懸浮液裝入透析膜（*cellulose tubing*）中，於含 2% *glutaraldehyde* 之 *PBS* 中，在室溫下透析 3 小時以固定菌體，而後移入 *PBS* 中透析過夜（換 3 次 *PBS*）以去除游離之 *glutaraldehyde*，即得抗原製備液，用於免疫注射用（3. 21.）。
2. 抗血清之產生：取上述之抗原製備液加等量之 *Difco bacto freud's incomplete adjuvant* 混合，乳化（*emulsified*）均勻後注射於日本種白兔（*Japanese White*，體重 1.5—2.0 公斤）後肢內側之肌肉，共注射 4 次，各注射量為 0.5、1.0、1.5 及 2.0 毫升，每次間隔 10 天，第 4 次注射前由耳側靜脈取少量之血清以凝聚法（*agglutination test*）測定力價（*titer*），第四次注射後 7 天則自耳側靜脈大量採血，所採得之血液靜置於

室溫下使其凝塊後，放入  $37^{\circ}\text{C}$  中 1 小時，再移入  $4^{\circ}\text{C}$  下 1 小時，此時血清即會上浮，用吸管吸出上浮血清，血塊再重覆放於  $37^{\circ}\text{C}$  及  $4^{\circ}\text{C}$  中二次，即可收集到大部份之抗血清，再經過  $900\times g$  離心 5 分鐘去除血球後，吸取上澄液，即為抗血清製備液，加入 0.1% 之 *sodium azide* 後小管分裝，保存於  $4^{\circ}\text{C}$  備用。採得之血清並以凝聚法測定力價，測定時將  $10^8\text{CFU/ml}$  之 *XC38* 菌液滴於載玻片 (*slide glass*) 上，而後滴入等量之抗血清 2 倍系列稀釋液，輕搖使其混合後，放入保濕盒中，置於  $37^{\circ}\text{C}$  下 2 小時，觀察記錄能引起凝聚反應之最低濃度，該一稀釋倍數即為其力價 (3)。本試驗中所使用之抗血清力價為 2,048。

#### ㊦ 免疫球蛋白 (*r-globulin*) 之純化與標誌 (*label*):

1. 免疫球蛋白之純化：取 1 毫升之抗血清加入 9 毫升之蒸餾水中，而後緩緩加入 10 毫升之飽和硫酸 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 溶液，在室溫下靜置 30 至 60 分鐘，然後以  $10000\times g$  離心 10 分鐘，保留沉澱物以如上述所用之 *PBS* 2 倍稀釋液 ( $1/2\text{ PBS}$ ) 溶解之，而後裝入透析膜中在  $1/2\text{ PBS}$  中，於  $4^{\circ}\text{C}$  透析過夜，每 4 小時換液 1 次，共換 3 次，以去除硫酸，而後使其通過裝有 8 毫升 *DEAE cellulose* (*Pharmarcia Chemicals*) 之管柱，以  $1/2\text{ PBS}$  洗出，以去除卵蛋白 (*albumin*)，洗出液每 1 毫升收集 1 管，共 12 管，每管均於 *spectrophotometer* 280nm 波長下判讀，收集吸收值較高之 3—4 管混合後將其吸收值調至 1.4，即免疫球蛋白之濃度為 1 毫克/毫升，置於  $4^{\circ}\text{C}$  下保存 (3. 8. 11.)。
2. 酵素免疫球蛋白結合體 (*enzyme-labelled conjugate*) 之製備：將 0.72 毫升 (等於 6.0 毫克) 之 *alkaline phosphatase* (*Sigma type VII-S*) 於  $10000\times g$  下離心 10 分鐘，倒棄上澄液後，以上項純化過之免疫球蛋白 2 毫升溶解沉澱物，隨後裝入透析膜，在如上述之 *PBS* 中於  $4^{\circ}\text{C}$  下透析過夜，共換液 3 次，以去除硫酸，取出後加入新鮮之 *glutaraldehyde*，使 *glutaraldehyde* 最終濃度為 0.05%，混合均勻後，在室溫下放置 4 小時，使酵素與免疫球蛋白充分結合，再以 *PBS* 透析去除 *glutaraldehyde*，透析後加入 5 毫克/毫升之 *bovine albumin*，並保存於  $4^{\circ}\text{C}$  下備用 (3. 8. 11.)。

#### ㊦ 免疫反應 (*immuno-assay*) 之操作步驟：

1. 雙層夾心式酵素連結抗體反應 (*double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay*，簡稱 *DAS-ELISA*) 之操作：依 *Garnsey* 改良 *Clark* 與 *Adams* 之方法 (8. 11.) 進行操作，所採用之緩衝液 (*buffer*) 亦均相同，其步驟為：1) 將溶於 *coating buffer* 之免疫球蛋白加 200ml 於微量盤 (*microtiter plate*)，本研究主要選用 *Falcon 3911*

*micro-test III<sup>TM</sup> flexible assay plate*，少部份用 *Linbro E.I.A. micro-titration plate*) 之洞中，於 37°C 下放置 2.5 小時或 4°C 下過夜；2) 用洗滌瓶以 *PBST* 清洗，每次停留 3 分鐘，重覆 3 次後甩清洗滌液，並在衛生紙上拍乾每洞之殘留液體；3) 每洞隨即加入稀釋劑 (*diluent*) 中之抗原懸浮液或萃取液 (*Garnsey* 所採用之稀釋劑即所謂之 *extraction buffer*，該緩衝劑在本研究中簡稱之為 *PBSPT*，而本研究所採用之抗原稀釋劑則隨試驗目的之不同而改變) 200ml，於 37°C 下放置 2.5 小時或 4°C 下過夜，後如 2)，以 *PBST* 洗 3 次，拍乾；4) 每洞加入適當濃度溶於 *conjugate buffer* 中之 *enzyme labelled conjugate* 200ml，放置於 37°C 下 2.5 小時，後如 2)，以 *PBST* 洗 3 次，拍乾；5) 每洞加入溶於 *substrate buffer* 中之酵素基質 (*P-nitrophenyl phosphate*，濃度為 1.0 毫克/毫升)，放置於室溫中，觀察呈色反應之進行，大約 10.~30. 分鐘，或至呈色差異明顯時，每洞加入 50ml 之 3 *N NaOH* 以停止反應；6) 以 *Bio-Tek EIA reader (model EC 307)* 判讀各洞在波長 405nm 之吸收值，當樣品反應之吸收值為對照反應之 2 倍以上時，視為正反應。

2. 間接式酵素連結抗體法 (*indirect enzyme linked immunosorbent*，本研究簡稱為 *ID-ELISA*)：參考 *Alveraz* 與 *Lommel* 等人 (14.) 之方法，首先將抗原製備液加入洞中，每洞 250ml，放入 37°C 之循環式培養箱 (*circulatory incubator*) 吹乾，經 *PBST* 如上法洗滌後加入稀釋於 *conjugate buffer* 中之免疫球蛋白 200ml，置於 37°C 2.5 小時後，洗滌 3 次，再加入稀釋於 *conjugate buffer* 之 *antirabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma No. A-8025)* 200ml，置於 37°C 下 2.5 小時後，洗滌 3 次，而後如上法呈色判讀。

(五) 不同濃度之免疫球蛋白與酵素結合體在酵連抗體法中與 *X. campestris pv. campestris* 之反應：

將培養於 523 *agar* 3 天之 *XC38* 懸浮於 *PBS* 中 (0.01M, *pH* 7.2)，並調成 10 倍系列之稀釋液 (原液  $A_{620nm} = 0.1$ )，免疫球蛋白調成 4 微毫克/毫升、2 微毫克/毫升及 1 微毫克/毫升，酵素結合體則調成 1/250，1/500 及 1/1000 之稀釋液，三者分別在雙層夾心式及間接式酵連抗體法中依前述方法交互作用，比較各不同組合之吸收值，並以 *PBS* 當對照。

(六) 不同細菌菌株在酵連抗體法中與抗 *X. campestris pv. campestris* 免疫球蛋白 (*anti-XC38 r-globulin*) 之反應：

供試之細菌，除 *X. campestris pv. campestris* 62 個菌株，*X. cam-*

pestris不同病原型 (*pathovar*) 及其他植物病原菌外, 另外選 *Anp1*, *Anp2*、*Anp3*、*FP43*、*FP45*及在 *NGA* 平板上自種子及土壤分出之未鑑定腐生細菌, 分別以 *PBS*( $0.01 M$ ,  $pH7.2$ )調成  $A_{620nm} = 0.1$ , 以雙層夾心式及間接式酵連抗體法測試, 並以 *PBS* 當對照, 重覆 3 次, 平均吸收值 ( $A_{450nm}$ ) 爲對照組之 2 倍以上 (含 2 倍), 5 倍以下時視爲弱反應 (十); 5 倍以上 (含 5 倍), 10. 倍以下時爲中反應 (十十); 10. 倍以上 (含 10. 倍) 時爲強反應 (十十十); 2 倍以下則爲負反應 (一)。

(iv) 不同抗原稀釋劑 (*diluent*) 在酵連抗體法中對檢測 *X. campestris pv. campestris* 之影響:

分別以生理食鹽水、蒸餾水、*PBS*( $0.01M$ ,  $pH7.2$ )、*PBST*(*PBS*  $\pm$   $0.1\%$  *Tween 80*)、*PBSP*(*PBS* +  $2\%$  *FVP*) 及 *PBSPT* (*PBSP* +  $0.05\%$  *Tween 20*) 當稀釋液, 各調成  $A_{620nm} = 0.1$  之 *XC38* 懸浮液, 均經 10. 倍系列稀釋, 測驗在 *DAS-ELISA* 之反應, *anti-XC38 r-globulin* 濃度爲 1 微毫克/毫升, *conjugate* 濃度爲  $1/1000$ , 每樣品均重覆測試 3 次。

(v) 不同抗原處理在雙層夾心式酵連抗體法中對檢測 *X. campestris pv. campestris* 之影響:

將於 *523 agar* 上生長 3 天之 *XC38* 稀釋於 *PBST* 及 *PBSPT* 中使原液成爲  $A_{620nm} = 0.1$  後做 10. 倍之系列稀釋, 而後將在 *PBST* 及 *PBSPT* 中不同濃度之 *XC38* 懸浮液 (不含菌體之純 *PBST* 及 *PBSPT* 爲對照) 行以下之處理: 1)  $100^{\circ}C$  水中熱殺 30. 分鐘; 2) 加入  $0.5\%$  之 *formalin* 固定 30. 分鐘; 3) 加入  $0.125\%$  之 *glutaraldehyde* 固定 30. 分鐘; 4) 不處理對照, 而後將處理過後之各樣品以雙層夾心式酵連抗體法測試反應, *r-globulin* 及 *conjugate* 之濃度分別爲 1 微毫克/毫升及  $1/1000$ 。

(vi) *PBST* 及 *PBSPT* 添加戊二醛 (*glutaraldehyde*) 當作黑腐病花椰菜病葉組織之抗原萃取液在雙層夾心式酵連抗體法測試中對吸收值 ( $A_{405nm}$ ) 之影響: 調配成含  $0.5\%$ ,  $0.125\%$  及不含 *glutaraldehyde* 之 *PBST* 及 *PBSPT*, 自田間採健康之花椰菜葉, 以  $1:10(w/v)$  之比例分別在上述各液體中磨碎, 分別取上澄液裝管, 另外採同一菜園中罹病之花椰菜葉組織, 切取新鮮部份, 以  $1:10(w/v)$  之比例, 分別在以上各不同之液體中磨碎, 而後均在原來之健葉萃取液中做 10. 倍系列稀釋, 以模擬含不同菌量之病葉萃取液, 各處理均放置澄清, 而後做雙層夾心式酵連抗體法測試, 並以健葉萃取液當對照, 以比較添加不同濃度 *glutaraldehyde* 之 *PBST* 及 *PBSPT* 當病葉萃取液之優劣。每處理 2 個洞, 重覆 3 次。

(vii) 雙層夾心式酵連抗體法中 *X. campestris pv. campestris* 菌量與吸收值 ( $A_{405nm}$ ) 之關係:

將生長於 523 agar 上 3 天之 XC38 移入 PBSTG (PBS + 0.1% Tween 80 + 0.125% glutaraldehyde) 中，使  $A_{620nm} = 0.1$ ，後作 2 倍之系列稀釋至  $2^{-18}$  倍止，將各稀釋液於 Linbro E. I. A. microtitration plate 上測試 DAS-ELISA 之反應，並以 PBSTG 為對照，anti-XC38 r-globulin 及 conjugate 之濃度為 1 毫克/毫升及 1/1000，同時並以 PBST 中相同濃度之菌液，經適當稀釋後，在 NGA 平板決定實際之菌量，比較菌量與吸收值之關係，每處理 3 洞，重覆三次。

## 結 果

(一) 不同濃度免疫球蛋白及酵素結合體在酵連抗體法中與 X. campestris pv. campestris 之反應：

結果顯示在雙層夾心式酵連抗體中，免疫球蛋白濃度為 4 微毫克/毫升，而 conjugate 稀釋成 1/250 時與各不同濃度之 XC38 懸浮液之反應最為強烈，但同時以緩衝液 (PBS) 為對照之背景呈色 (background color) 也最深，經呈色 (color development) 20 分鐘後  $A_{405nm}$  達 0.38，免疫球蛋白為 1 微毫克/毫升，而 conjugate 為 1/1000 時反應較弱，但背景呈色最淡，僅為 0.15，反而有利於肉眼觀察結果，因此爾後即選定此一濃度繼續以下之測試。而在間接式酵連抗體法中，結果同雙層夾心式酵連抗體法，免疫球蛋白 1 微毫克/毫升，而 anti-rabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate 為 1/500 與 1/1000 之背景呈色最淡，無害結果之判讀且更有利於肉眼觀察，因此爾後之試驗亦採 1 微毫克/毫升及 1/1000 之濃度。

(二) 不同細菌菌株在雙層夾心式及間接式酵連抗體法中與抗 X. campestris pv. campestris xc38 免疫球蛋白之反應：

結果顯示，在雙層夾心式酵連抗體法中，供試之 X. campestris pv. campestris 62 個菌株中除 XC23、XC59 及 XC60 之  $A_{405nm}$  低於對照 (PBS) 之  $A_{405nm}$  (0.12) 之二倍值而判為負 (—) 反應外，其餘菌株中，XC26、XC35、XC37、XC38、XC39、XC41、XC43、XC44、XC46、XC47、XC48、XC49、XC50、XC51 均為強正反應 (++++)，5 個菌株為中的正反應 (++)、40 個為弱的正反應 (+)。其他供試菌株，則僅 X. campestris pv. vesicatoria XV1 為強的正反應，其餘均屬負反應 (表一)；在間接法中，X. campestris pv. campestris 菌株之反應結果與雙層夾心式相近，但 XC61 在此法與對照 (PBS) 之  $A_{405nm} = 0.077$  比較判讀為負反應，

在雙層夾心法則為弱的正反應，XC 60 在本法中為弱的正反應，但在雙層夾心法為負反應，其餘結果則相同，但不同之細菌菌株方面，除 X. campestris pv. vesicatoria X<sub>V1</sub> 亦為強的正反應外，X. campestris pv. oryzae X<sub>O1</sub> 為中的正反應，另分自土壤之一腐生菌亦呈弱的正反應（表一），顯示在本試驗中雙層夾心式酵連抗體法較間接式酵連抗體法之專一性為高。

(三) 不同抗原稀釋劑在酵連抗體法測試中對偵測 X. campestris pv. campestris 之影響：

比較結果顯示，在雙層夾心法中，以植物病毒 (*plantvirus*) 之標準抗原萃取緩衝液 (*standard extraction buffer*，本試驗簡稱為 *PBSPT*) 當純菌之稀釋劑時反應較弱，但背景呈色亦較淡，以 *PBST* 當稀釋劑之反應最強，但背景呈色亦最深，但各處理結果，正負反應之判定並無差異（表二）；在間接法中，凡含有 *Tween 80* 或 *Tween 20* 之稀釋液 *PBST* 或 *PBSPT* 均會大幅降低各不同濃度菌液反應之吸收值，在 *PBST* 中  $5.4 \times 10^6$  *CFU/ml* 之菌量尚測不出，而 *PBSPT* 亦只能測出  $5.4 \times 10^6$  *CFU/ml* 之菌量，蒸餾水、生理食鹽水及 *PBS* 之結果則甚為接近，不含 *Tween 20* 之 *PBSPT* 反應強度亦明顯減弱（表三），顯示含 *Tween* 或 *IVP* 之液體不適合菌體附著於微量操作盤之洞壁。

(四) 不同抗原處理在雙層夾心式酵連抗體法反應中對檢測 X. campestris pv. campestris 之影響：

比較各處理之反應結果顯示，不行任何處理之 *PBST* 菌體懸浮液反應最強，但背景呈色也最深 ( $A_{405nm} = 0.25$ )，而不行任何處理之 *PBSPT*，菌體懸浮液反應較其為弱，背景呈色亦較淡 ( $A_{405nm} = 0.14$ )，此結果與(三)相似，但兩相比較，以 *PBST* 當稀釋劑，反應靈敏度高於 *PBSPT*；*PBST* 或 *PBSPT* 之菌體懸浮液經 *formalin* 或 *glutaraldehyde* 處理後，各濃度之反應均略有減弱，但以不含菌體之相同液體當對照所呈現之背景顏色則顯著降低，當純的 *PBST* 引起之背景呈色吸收值為  $A_{405nm} = 0.5$  時，含有 *formalin* 及 *glutaraldehyde* 之 *PBST* 引起之背景呈色吸收值分別降為 0.17 及 0.08，而在 *PBSPT* 則分別從 0.14 降為 0.07 及 0.06，對於靈敏度之提高雖無明顯之幫助，但却大大有利於結果之肉眼觀察；以熱處理 *PBST* 及 *PBSPT* 之懸浮液，顯示在 *PBST* 中不但高濃度菌液之吸收值明顯降低，而且只以加熱過之 *PBST* 當對照時即造成  $A_{405nm} = 0.30$  之背景呈色，較之不加熱 *PBST* 當對照之吸收值  $A_{405nm} = 0.25$  還高，因此反應之靈敏度反而較不加熱處理者降低 100 倍以上；在 *PBSPT* 中之情形亦同，但所受之不良影響較在 *PBST* 者為低，然而其背景呈色吸收值亦由 0.14 提高為 0.18（表四）

。綜上結果顯示，以雙層夾心式酵連抗體法測試培養之黑腐病菌時，以PBST (0.01 M PBS + 0.1% Tween 80) 添加 0.125% glutaraldehyde 之效果最理想。

(五) PBST 及 PBSPT 中添加 glutaraldehyde 當作黑腐病罹病花椰菜葉組織之抗原萃取液在雙層夾心式酵連抗體法中對吸收值之影響：

PBST 中添加 0.125% 或 0.5% 之 glutaraldehyde 當抗原萃取液，在呈色反應強度及背景呈色上均與不添加者相近，而 PBSPT 之各處理之呈色反應均較 PBST 中之各相對處理弱，背景呈色則差異不大 (表五)，此結果顯示，PBST 中添加 glutaraldehyde 當 X. campestris pv. campestris 病葉抗原萃取液之效果較在植物病毒上所用之標準抗原萃取液為佳。

(六) 雙層夾心式酵連抗體法中 X. campestris pv. campestris 菌量與吸收值 (A 405nm) 之關係：

將不同菌量稀釋於添加 0.125% glutaraldehyde 之 PBST 中，經測試三次，每次每濃度 3 洞之平均吸收值 (A 405nm) 顯示，吸收值隨菌量之增加而遞增，當菌量為  $5.4 \times 10^8$  CFU/ml 時吸收值平均為 1.46，而至  $3.3 \times 10^4$  CFU/ml，即每洞加入  $6.6 \times 10^3$  個菌體時吸收值為 0.068，與 PBSPT (PBST 添加 0.125% glutaraldehyde) 當對照之吸收值 (A 405nm = 0.03) 比較，均屬於正反應，但肉眼可辨試之正反應則在  $1.3 \times 10^5$  —  $2.6 \times 10^6$  之間 (圖一)。

## 結 論 與 討 論

酵連抗體法近幾年來廣泛被應用於植物病毒之研究 (10.)，但在植物病原細菌上應用較少，在 X. campestris pv. campestris 方面，則僅被應用於病菌之快速鑑定 (6) 及單株抗體之篩選與定性 (4)，至於用於偵測種子或土壤時效果如何，迄今未見報告。本研究中除探討抗 XC38 免疫球蛋白在雙層夾心式及間接式酵連抗體法中之專一性外，並就酵連抗體法反應中之某些變數 (parameters) 對敏感度之影響作詳細研究，結果顯示，在雙層夾心式酵連抗體法中 anti-XC38 r-globulin 之專一性頗高，在供試 32 個非本菌之菌株中，只有 X. campestris pv. vesicatoria 會發生強的正反應，顯示二菌間密切之血清關係，此結果亦與以往國外之報告脗合 (6. 15. 22. 23.)，其他之植物病原細菌或腐生細菌則均無反應；間接式酵連體法中專一性則較差，除 X. campestris pv. vesicatoria 仍為強正反應外，X. campestris pv. oryzae 及 1 株腐生菌亦會發生中及弱之正反應，而不論在雙層夾心式或間接式酵連抗體法

中，*X. campestris pv. campestris* 各菌株之反應結果並不全然相同，依其與 *anti-XC38 r-globulin* 反應之強弱共可分為 4 級，其中各有 3 個菌株為負反應，*Alvarez, Schaad* 及 *Thaveechai* 等人 ( 6. 7. 21. )，曾分別以單株抗體 (*monoclonal antibody*) 或多株抗體 (*polyclonal antibody*) 在酵連抗體法或免疫螢光法中測試，結果亦顯示 *X. campestris pv. campestris* 不同血清型之存在，而此種血清型之歧異，不論以單株抗體或多株抗體當試劑，均將是以血清法鑑定或偵測病菌之缺點之一。至於酵連抗體法中，各種變數對反應結果之反應以往亦散見於植物病毒及植物病原細菌之研究報告，各變數中又以抗原萃取液之研究最多，結果顯示，不論在病毒或細菌上，因抗原製備液之成份或處理不同，會造成不同之反應結果 ( 6. 9. 13. 14. )。

*Civerolo* ( 9. ) 曾報告指出，在 *X. campestris pv. citri* 之雙層夾心式酵連抗體法測試中，以 *PBS* 製備抗原細菌，經  $100^{\circ}\text{C}$  處理 30 分鐘，可提高測試靈敏度達 10-100 倍，*Alvarez* 等人 ( 6 ) 則報告，在 *X. campestris pv. campestris* 之變法 *DAS - ELISA* 測試中，*PBS* 之抗原製備液經加熱處理並不能提高靈敏度，僅在以 *PBS* 製備經 *formalin* 處理之抗原細菌而又熱處理後，靈敏度才會略提升，本研究發現，在雙層夾心式酵連抗體法中以 *PBST* (*PBS* 中添加 0.1% *Tween 80*) 再添加 0.125% 之 *glutaraldehyde* 當抗原萃取，不論用於培養菌體或病葉組織中病菌之偵測，反應均較採用植物病毒之標準抗原萃取液 (*PBS* + 2% *FVP* + 0.05% *Tween 20*) 增強甚多，且在測試培養菌體時會大幅降低背景呈色，在偵測病葉組織時，背景呈色亦會降低，但幅度較小；以 *PBST* 或病毒標準抗原萃取液所製備之培養菌液，經加熱處理後測試，靈敏度非但未見提高，反而顯著下降。至於 *glutaraldehyde* 為何有去除背景呈色之效應，原因不明，有待進一步探討。本研究以 *PBSTG* 為抗原細菌之萃取液，經測試後顯示，以 1 微毫克/毫升之 *anti-XC38 r-globulin* 及 1/1000 之 *conjugate* 當試劑時，以雙層夾心式酵連抗體法偵測同源抗原 (*homologous antigen*) 之培養菌體時，靈敏度可達  $3.3 \times 10^4$  *CFU/ml*，肉眼可辨識之反應則約在  $1.3 - 2.6 \times 10^5$  *CFU/ml* 之間，較以往之報告 ( 6 ) 為高。

筆者 ( 1 ) 曾以此方法測定人工污染病菌之種子，僅可測出 0.5-1% 帶菌率之種子，於土壤則只能測到  $2.4 \times 10^5$  *CFU/g* 土壤之菌量，雖然其結果不受雜菌多寡之影響，但靈敏度顯然不及利用選擇性培養基 *SMA* 之直接分離偵測法。因此，僅適於檢測大量或污染嚴重之種子樣品，應用時，種子仍以 *PBST* 洗出種帶病菌 ( 2 )，洗出液經濃縮後加入 0.125% 之 *glutaraldehyde*，如上述方法檢測。此外，本方法也應用於可疑菌落之快速鑑定，以輔助直接分離偵測法，及田間作物與雜草疑似黑腐病之大規模快速診斷。

## 引用文獻

1. 黃穗昌、徐世典 1986 台灣十字花科黑腐病菌血清偵測技術之研究。植保會刊 28:442
2. 黃穗昌、徐世典 1987 利用選擇性培養基由台灣十字花科蔬菜種子及土壤中偵測黑腐病菌之技術。植保會刊 29:217-232。
3. 張瑞璋 1982 馬鈴薯輪腐病菌之特性及血清診斷法。國立中興大學植物病理研究所碩士論文 11 - 12pp.
4. Alvarez, A. M., A. A. Benedict, and C. Y. Mizumoto. 1985. Identification of xanthomonads and grouping of strains of Xanthomonas campestris pv. campestris with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 75:722-728.
5. Alvarez, A. M., and J. J. Cho. 1978. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. *Phytopathology* 68:1456-1459.
6. Alvarez, A. M., and K. Lou. 1985. Rapid identification of Xanthomonas campestris pv. campestris by ELISA. *Plant Dis.* 69:1082-1086.
7. Anderson, H. 1973. A method for detection of Xanthomonas campestris(Pammel) Dowson in Brassica seeds. *Statens Planteti-lsyn* 21:34-38.
8. Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moscovitz, D. E. Purcifull, M. F. Clark, and G. Loebenstein. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
9. Civerolo, E. L., and F. Fan. 1982. Xanthomonas campestris pv. citri detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 66:231-236.
10. Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assay in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:83-106.
11. Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
12. Doman, H. Y., and A. M. Alvarez. 1977. Detection of Xantho-

- monas campestris in soil using a direct immunofluorescent technique. Proc. 4th Conf. Plant Pathog. Bact 1:301-305.
- 13 .Gonsalves, D. and M. Ishii 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70:1028-1032.
  - 14 .Lommel, S. A., H. McCain, and T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *Phytopathology* 72:1018-1022.
  - 15 .Schaad, N. W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence test for identification of Xanthomonas campestris. *Phytopathology* 68:249-252.
  - 16 .Schaad, N. W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17:123-147.
  - 17 .Schaad, N. W. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogen. *Plant Dis.* 66:885-890.
  - 18 .Schaad, N. W., and R. C. Donaldson. 1980. Comparison of two method for detection of Xanthomonas campestris in infected crucifers seeds. *Seed Sci. Technol.* 8:383-391.
  - 19 .Schaad, N. W., and W. C. White. 1974. A selective medium for isolation and enumeration of Xanthomonas campestris. *Phytopathology* 64:876-880.
  - 20 .Schaad, N. W., and W. C. White. 1947. Survival of Xanthomonas campestris in soil. *Phytopathology* 64:1518-1520.
  - 21 .Thaveechai N., and N. W. Schaad. 1984. Comparison of different immunogen preparations for serological identification of Xanthomonas campestris pv. campestris. *Phytopathology* 74:1065-1070.
  - 22 .Thaveechai, N., and N. W. Schaad. 1986. Serological and electrophoretic analysis of a membrane protein extract of Xanthomonas campestris pv. campestris from Thailand. *Phytopathology* 76:139-147.
  - 23 .Thaveechai, N., and N. W. Schaad. 1986. Immunochemical characterization of a subspecies-specific antigenic determinant of a membrane protein complex of Xanthomonas campestris pv. campestris. *Phytopathology* 76:148-153.

- 24 .Williams, P. H. 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifer. *Plant Dis.* 64:736-742.

表一.不同細菌菌株與黑腐病菌 XC38 之抗免疫球蛋白在雙層夾心式及間接式  
 酵連抗體法中之反應。

Table 1. The reaction of bacterial strains with r-globulin  
 against Xanthomonas campestris pv. campestris XC38  
 in double-antibody sandwich ( DAS ) and indirect ( ID )  
 ELISA 1)

Bacterium <sup>2)</sup> tested	No. of strains showing ELISA reaction <sup>3)</sup>								Strain tested (No.)
	+++		++		+		-		
	DAS	ID	DAS	ID	DAS	ID	DAS	ID	
<u>Xanthomonas campestris</u>									
pv. <u>campestris</u>	14	14	5	5	40	40	3	3	62
pv. <u>vesicatoria</u>	1	1							1
pv. <u>citri</u>							1	1	1
pv. <u>pruni</u>							1	1	1
pv. <u>glycines</u>							1	1	1
pv. <u>mangiferaeindicae</u>							1	1	1
pv. <u>oryzae</u>				1			1		1
<u>Pseudomonas solanacearum</u>									
<u>P. avenae</u>							1	1	1
<u>P. andropogonis</u>							1	1	1
<u>Corynebacterium sepeidonicum</u>									
<u>Erwinia carotovora</u>							1	1	1
pv. <u>carotovora</u>							2	2	2
Fluorescent pseudomonads							5		5
Unidentified bacteria									
from seed							7	7	7
for soil						1		6	7

1) The concentration of r-globulin and conjugate used are 1 ug/ml and  
 1:1000 ( dilution ), respectively.

2) Suspended in PBS ( pH = 7.2 ) at A620nm = 0.1.

3) Symbols: +++ = A405nm 10 times higher than that of control.

++ = higher than 5 times but less than 10 times.

+ = higher than 2 times but less than 5 times.

- = less than 2 times.

表二.不同抗原稀釋劑在雙層夾心式酵連抗體法中對偵測黑腐病菌之影響

Table 2. The effect of antigen diluents on the detection of Xanthomonas campestris pv. campestris xc38 in double-antibody sandwich ELISA.

Concentration of xc38 (CFU/ml)	Antigen diluent <sup>1,2)</sup>				
	Distilled water	Saline	PBS	PBST	PBSPT
$5.2 \times 10^6$	◆◆+	◆◆+	◆◆+	◆◆+	1.91+
$5.2 \times 10^5$	1.31+	1.52+	0.47+	1.47+	0.51+
$5.2 \times 10^4$	0.61-	0.42-	0.47-	0.64-	0.14-
$5.2 \times 10^3$	0.38-	0.30-	0.39-	0.53-	0.14-
Control	0.37	0.28	0.28	0.41	0.14

1)PBS = 0.01 M phosphate buffer (pH=7.2), PBST= PBS + 0.1% Tween 80, PBSPT=PBS + 0.05% Tween 20. + 2% PVP.

2)Figures (A405nm) represent means of three replications, two wells per sample ◆◆= A405nm>2.0, +=positive reaction, -=negative reaction.

表三不同抗原稀釋劑在間接式酵連抗體法中對偵測黑腐病菌之影響

Table 3. The effect of antigen diluents on the detection of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 in indirect ELISA

Concentration of XC 38 (CFU/ml)	Antigen diluent <sup>1, 2</sup>					
	Distilled water	Saline	PBS	PBST	PBSP	PBSPT
5.4×10 <sup>6</sup>	1.10+	0.95+	1.06+	0.15-	0.41+	0.27+
5.4×10 <sup>5</sup>	0.31+	0.35+	0.30+	0.13-	0.24+	0.13-
5.4×10 <sup>4</sup>	0.15-	0.14-	0.14-	0.13-	0.14-	0.12-
5.4×10 <sup>3</sup>	0.13-	0.13-	0.13-	0.13-	0.14-	0.12-
Control	0.12	0.13	0.11	0.11	0.11	0.10

1) Saline = 0.85 % NaCl in distilled water, PBS = 0.01 M phosphate buffer + 0.85 % NaCl, PBST = PBS + 0.1 % Tween 80, PBSP = PBS + 2% PVP, PBSPT = PBSP + 0.05 % Tween 20.

2) Figures are A405nm values, += positive reaction, -=negative reaction.

表四.不同抗原處理法在雙層夾心式酵連抗體法中對偵測黑腐病菌之影響。

Table 4. The effect of different antigen treatments on the detection of Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 in double-antibody sandwich ELISA<sup>1)</sup>

Concentration of XC38 (CFU/ml)	Antigen suspended in PBST				Antigen suspended in PBSPT			
	Heat <sup>2)</sup> killing	Formalin <sup>3)</sup> fixation	Glutaraldehyde <sup>4)</sup> fixation	Control	Heat <sup>2)</sup> killing	Formalin <sup>3)</sup> fixation	Glutaraldehyde <sup>4)</sup> fixation	Control
$5.6 \times 10^8$	0.86+	1.63+	1.60 +	1.71 +	1.30+	1.48 +	1.19 +	1.42+
$5.6 \times 10^7$	0.30-	1.39+	1.31 +	1.50 +	0.48+	0.41 +	0.36 +	0.59+
$5.6 \times 10^6$	0.38-	0.82+	0.54 +	0.85 +	0.22-	0.22 +	0.13 +	0.28+
$5.6 \times 10^5$	0.31-	0.35+	0.20 +	0.51 +	0.19-	0.18 +	0.09 -	0.18-
$5.6 \times 10^4$	0.35-	0.26-	0.13 -	0.45 -	0.18-	0.13 -	0.07 -	0.16-
Control	0.30	0.17	0.08	0.25	0.18	0.07	0.06	0.14

1) Figures (A405nm) represent means of three replications, two wells per sample. += positive, -=negative reaction.

2) Heat killing = 100°C for 30 minutes.

3) Concentration of formalin = 0.5 %.

4) Concentration of glutaraldehy = 0.125 %.

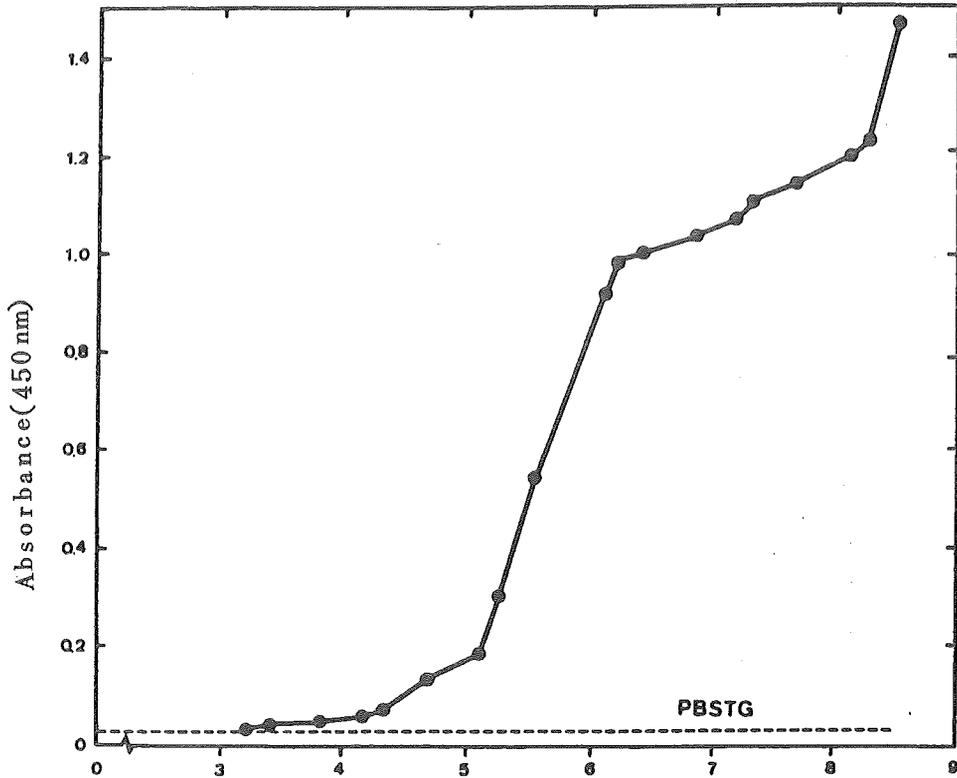
表五在 *PBST* 及 *PBSPT* 中添加聚戊二醛當萃取緩衝液用於檢測罹病花椰菜葉在雙層夾心式酵連抗體法中對吸收值之影響

Table 5. Effect of addition of glutaraldehyde in *PBST* and *PBSPT* as extraction buffer in DAS-ELISA for black rot-diseased cauliflower leaf tissue on the absorbance value (A405nm)

Dilution of <sup>1)</sup> diseased leaf extract	Concentration of glutaraldehyde in <i>PBST</i> (%)			Concentration of glutaraldenyde in <i>PBSPT</i> (%)		
	0.50	0.125	0.00	0.50	0.125	0.00
10 <sup>0</sup>	1.23 <sup>2)</sup>	1.10	1.08	0.76	0.81	0.86
10 <sup>-1</sup>	0.87	0.78	0.80	0.64	0.70	0.78
10 <sup>-2</sup>	0.29	0.34	0.30	0.25	0.25	0.27
10 <sup>-3</sup>	0.09	0.12	0.12	0.09	0.10	0.12
10 <sup>-4</sup>	0.07	0.09	0.10	0.07	0.07	0.10
Control	0.07	0.09	0.10	0.07	0.07	0.10

1) Diseased leaf tissue was extracted with each extraction buffer and diluted with healthy leaf extract prepared by the same extraction buffer at the ratio of leaf:buffer = 1:10(w:v).

2) Figures ( A405nm ) represent mean of three replications, two wells per sample.



Log of number of colony-forming unit

圖一.雙層夾心式酵連抗體法中黑腐病菌 XC38之菌數與吸收值 ( $A_{405nm}$ ) 之關係。

Fig.1. The relation of bacterial number (CFU/ml) and absorbance value ( $A_{405nm}$ ) in double-antibody sandwich ELISA. Xanthomonas campestris pv. campestris XC38 was suspended in PBSTG with twofold dilution and the initial suspension ( $A_{620}=1.0$ ) was serially diluted and spread on NGA medium to determine viable cells. PBSTG =PBST+0.125 % glutaraldehyde.

# Identification and Detection of Xanthomonas campestris pv. campestris in Taiwan by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay<sup>1</sup>

Tze-Chung Huang<sup>2</sup>

## SUMMARY

Double sandwich(DAS), and indirect(ID) ELISA were compared for the assay of Xanthomonas campestris pv. campestris(abbreviated to Xcc)by using an antiserum against strain XC38 of Xcc. Sensitivities of DAS-ELISA and ID-ELISA were similar , but DAS-ELISA was more specific than ID-ELISA . When 32 strains of bacteria other than Xcc were tested in DAS-ELISA, only X. campestris pv. vesicatoria reacted positively, however, 3 out of 62 Xcc strains tested, then failed to react with anti-XC38 r-globulin in DAS-ELISA. An extraction buffer consisting of 0.01 M-phosphate buffer(pH 7.2), 0.1% Tween 80 and 0.125% glutaraldehyde for antigens was found that it increased specific reaction and decreased nonspecific background. Using this procedure, the sensitivity of DAS-ELISA was at  $3.3 \times 10^4$ CFU / ml for pure culture of Xcc when monitored photometrically and was at  $1.3 \times 10^5$ - $2.6 \times 10^5$  CFU / ml when determined visibly. This procedure was also suitable for the detection of Xcc in diseased leaf tissues. Generally, the sensitivity of DAS-ELISA was lower than that of direct isolation with selective medium , but the reaction in DAS-ELISA seldom interferred by other microorganisms existing in samples. It may be used for assay of large-scale seed samples, confirmation of suspected colonies on selective medium, or rapid identification of suspected diseases on cruciferous crops or weeds.

---

1.Part of author's M.S. thesis , Institute of Plant Pathology,NCHU

2.Assistant pathologist , Taitung D.A.I.S.