

リンゴステムグルーピングウイルス（ASGV）を高精度で検出できる新しいRT-PCR法の開発

[要約] カンキツからのASGVの検定にワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCR法を利用すると、新梢磨砕液（0.1%トリトン-X液添加）の100万倍希釈まで検出できる。本方法は、イムノキャプチャーRT-PCR時に通常行う熱処理を省略し、1本のPCRチューブ内で全ての反応を行うため、簡易、迅速で高精度にウイルス検定ができる。

| | | | | | |
|------|----------------|------|-----|------|--------------|
| 担当部署 | 果樹苗木分場・果樹苗木チーム | | | 連絡先 | 09437-2-2243 |
| 対象作目 | 果樹 | 専門項目 | 病害虫 | 成果分類 | 新技術 |

[背景・ねらい]

日本のカンキツで接ぎ木部障害を起こす病原であるリンゴステムグルーピングウイルス（ASGV）の検定は、従来、酵素結合抗体法（ELISA）により実施しているが、果樹ウイルスは草本植物（野菜、花等）に比べて樹体内の濃度が低く、サンプル採取時期が新梢発生時に限られている。そこで、ELISAで検出が困難な硬化葉や樹皮からイムノキャプチャーRT-PCRにより検出する技術を確認し既に報告した（下村ら、2002）。しかし、この方法は操作が煩雑でコンタミ等の可能性もあり、更に高感度、簡易、迅速な方法としてワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCR法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. ワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCR法は、1本のPCRチューブ内で全ての反応を行うことで、ピペッターによる蒸留水等の分注操作や熱処理が省略出来るため、コンタミや誤操作が少なくなり、高精度のウイルス検定ができる（図1）。
2. 新しく開発したRT-PCR法によるASGVの検定は、新梢磨砕時に0.1%トリトン-X液を加えることで、磨砕液を100万倍まで希釈して検出できる（図2）。
3. ELISAで検出できない硬化葉でも6千倍希釈まで検出できるため、ELISAで擬陽性サンプル発生時にも本方法を利用できる（データ略）。

[成果の活用面・留意点]

1. 本方法により、年間を通しての周年検定が可能である。

[具体的データ]

- 従来法 -

PCRチューブに
抗体コーティング処理

磨砕上澄み液を分注

一夜静置後PBSで洗い

蒸留水をPCR
チューブに分注

熱処理

RT試薬に熱処理後の
蒸留水分注

RT後の液を
PCR試薬に分注

PCR産物の
泳動・確認

- 新手法 -

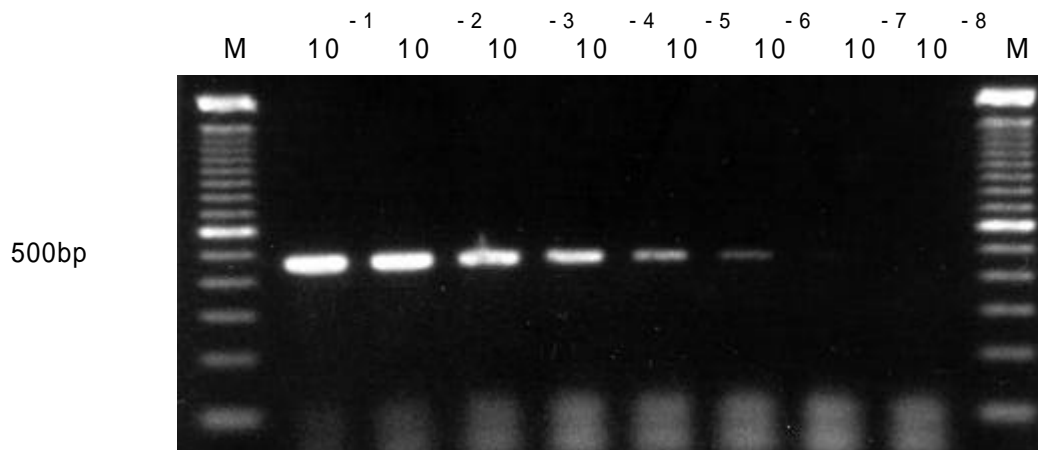
抗体コーティング済み凍結
PCRチューブに磨砕上澄
み液を分注

一夜静置後、PBSで洗い
RT-PCR試薬分注

PCR産物の
泳動・確認

図1 ワンステップ・イムノキャプチャーRT-PCR法(新手法)の手順

注) [---]: 一部省略、 [] : 統合、 [] : 省略



M : 100bpラダー

図2 カンキツ新梢からのワンステップIC・RT-PCRによるASGV検出限界(トリトン-X添加)

[その他]

研究課題名 : カンキツの遺伝子診断

予算区分 : 経常

研究期間 : 平成14年度(平成14~15年)

研究担当者 : 草野成夫、井樋昭宏

発表論文等 : 九州病害虫研究会報49、2003(投稿中)