
[成果情報名] 温州萎縮ウイルス診断用イムノクロマト・キットのための簡易磨砕容器の使用法

[要約] 簡易磨砕容器に緩衝液を500 μ l、検体の新葉を100mg(4cm²)入れ、簡易磨砕容器を30回指の間で揉むことで、従来の乳鉢磨砕によるエライザ法とほぼ同等の検出感度が得られる。

[キーワード] カンキツウイルス、温州萎縮病、磨砕容器、診断キット

[担当部署] 果樹苗木分場・果樹苗木チーム

[連絡先] 0943-72-2243

[対象作物] 果樹 [専門項目] 病害虫 [成果分類] 新技術

[背景・ねらい]

人気品種への高接ぎ更新で急速に広まったカンキツのウイルス・ウイロイド病の被害が乾燥ストレス栽培等により更に顕在化している。このため、保毒の悪影響が顕著な温州萎縮ウイルスを対象とした簡易で迅速な診断キットを作製した(平成16年度 成果情報)。

しかし、ウイルス診断用の磨砕液作成には従来乳鉢を用いており、ほ場での使用は不向きであった。そこで、ほ場でも使用可能な簡易な磨砕容器を(株)ミズホメディーと共同で開発したので、その使用法について検討する。

[成果の内容・特徴]

1. 磨砕および検定の手順は、本体に0.1Mクエン緩衝液と新葉を入れた後に付属の滴下ノズルを装着する、親指と人差し指の間で揉むようにして磨砕する、滴下口を下にし診断用キットに3滴ほど滴下する(図1)。
2. 検体中のウイルス濃度にはバラツキがあるため、原液の10倍希釈まで検出可能であることを合否基準とすると、簡易磨砕容器に投入する新葉量は100mg(約4cm²)、磨砕回数は30回でよい(表1)。
3. イムノクロマト・キットでの検出感度は、簡易磨砕容器で作成した磨砕液利用より乳鉢がやや優れるが、エライザ法と比較するとほぼ同等である(表2)。

[成果の活用面・留意点]

1. ほ場でも使用可能な簡易な磨砕法として診断キットを利用したウイルス診断法に活用する。
2. 従来のエライザ法でサンプル磨砕時に添加するメルカプト酢酸(チオグリコール酸)は、金コロイド標識抗体が凝集反応を起こすのでイムノクロマト・キット用の簡易磨砕容器では使用しない。
3. 診断に使用する検体は、ウイルス濃度の高い新葉を利用する。

[具体的データ]

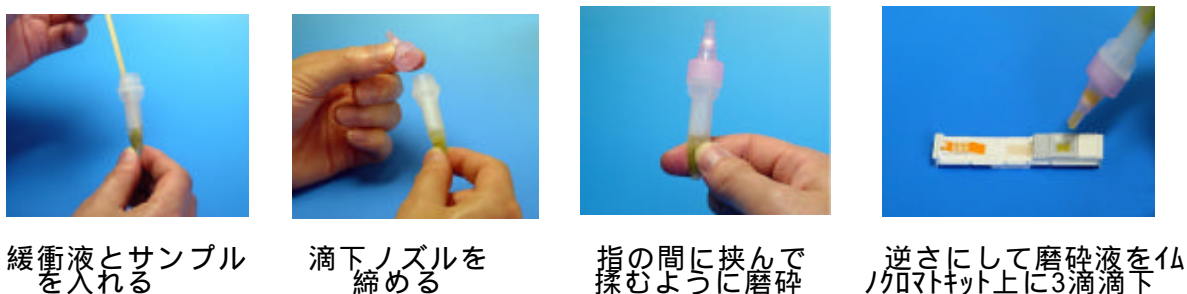


図 1 磨砕の手順

表 1 簡易磨砕容器に用いる検体量および磨砕回数の違いによる検出感度

新葉重	磨砕回数	磨砕液希釈率 (倍)				
		原液	× 8	× 16	× 32	× 64
50mg	10	++	+	±	-	-
	30	++	++	+	±	-
	100	++	++	++	+	+
100	10	++	++	+	±	-
	30	++	++	++	+	±
	100	++	++	++	++	+

1) イムノクロマト反応時間:15分、サンプル採取時期:4月中旬

2) 緩衝液量:500 μl

3) 色調値(イムノクロマト法):陰性(-);1~4,弱陽性(±);4.5~6,陽性(+);6.5~7.5,強陽性;(++)8~8.5

表 2 磨砕法の違いによるイムノクロマト・キットの検出感度

診断法	磨砕法	静置時間	磨砕液希釈率 (倍)				
			原液	× 3	× 9	× 27	× 81
免疫 クロマト法	磨砕容器	15分	++	++	±	-	-
		30分	++	++	±	±	-
免疫 クロマト法	乳鉢	15分	++	++	++	±	-
		30分	++	++	++	+	±
エライザ法	乳鉢	2時間	++	++	+	±	-

1) 色調値(イムノクロマト法):陰性(-);1~4,弱陽性(±);4.5~6,陽性(+);6.5~7.5,強陽性;(++)8~8.5、サンプル採取時期:5月下旬

2) 乳鉢磨砕:原液(10倍希釈)、簡易磨砕容器:原液(5倍希釈)

[その他]

研究課題名:カンキツウイルス病の大量検定法および簡易診断キットの開発

予算区分:国庫受託

研究期間:平成18年度(平成16~18年)

研究担当者:草野成夫、栗原実