多検体検定時に有効なパパイア輪点ウイルスの簡易検出法

[要約]
パパイア輪点ウイルス（PRSV）の外被タンパク質を大腸菌で発現させて精製した抗原を家兎に免疫して得られた抗体を用い、濾紙または96穴プレート上における抗原抗体反応により、PRSVを簡易に検出することができる。

茨城県農業総合センター　園芸研究所	令和４年度	成果区分	技術情報

１．背景・ねらい

パパイア輪点ウイルス（Papaya ringspot virus；PRSV）によって引き起こされるウリ類のモザイク病は、他のウイルス（CMV, ZYMV, WMV など）によって引き起こされる病徴と類似しており、目視による診断は困難である。また、PRSV はアブラムシ類によって媒介され感染が広がるため、本病の防除には迅速な診断が不可欠であり、PRSV の検出には RT-PCR 法が活用されている。しかし、RT-PCR 法は専用の機器・試薬と技術が必要なため、診断できる場所が限られている。そこで、専用の機器を必要とせず簡易に診断できる技術を開発する。

２．成果の内容・特徴

１）PRSV 茨城県分離株の外被タンパク質（CP）遺伝子を大腸菌発現ベクター（pET）に導入し、大量発現および精製を行うと、組換え PRSV-CP が得られる（図１）。

２）精製した組換えタンパク質を抗原として家兎に免疫を行うと、PRSV-CP に対する抗血清（抗体）が得られる。得られた抗血清は、メロン葉抽出液を96穴イムノプレート上に吸着させ、抗血清を反応させる間接 ELISA 法（PTA-ELISA）により、PRSV 感染葉のみに反応する（図２）。

３）ハンマーで叩いてメロン葉液を転写した濾紙（分析用濾紙 No.7 など）上で、得られた抗血清を用いて抗原抗体反応を行う（ティッシュブロット法）と、PRSV の量が多い部分が明瞭な紫色として検出される（図３）。

３．成果の活用面・留意点

１）濾紙へのメロン葉液の転写は、現地で行うことが可能である。

２）転写した濾紙は、冷蔵により保存が可能である。

３）植物試料は、モザイク等の病徴が明瞭に出ている新葉を用いる。完全に黄化した古い葉を用いると検出できない場合がある。

４）検定葉が大きい場合は、明瞭に病徴が見られる部分を適当な大きさに切り、濾紙へ転写する。

５）濾紙上での検出は、平成27年度主要成果「抗体を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの簡易検出法」で記載された方法で行う。

６）本結果は、園芸研究所内で維持している PRSV 感染メロンの発病葉を用いて得られた結果である。PRSV が感染したキュウリ、カボチャ、スイカ、ズッキーニでも同様の結果が得られている。

７）本課題で得られた成果をもとに、民間企業と PRSV イムノクロマトキットの開発を行った。ただしイムノクロマトキットは高価なため、多検体の検定を要する現地での PRSV の発生実態の調査等には、本成果（ティッシュブロット法）を活用する。その際の試薬等は、園芸研究所で調整したものを使用する。

４．具体的データ

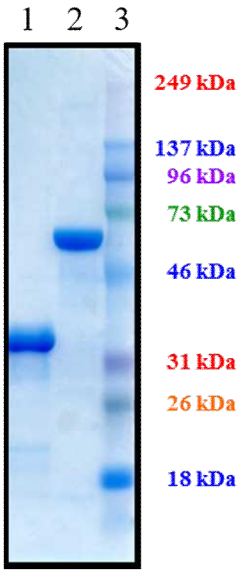

図１　組換え PRSV-CP タンパク質の
SDS ポリアクリルアミド電気泳動像
1. 精製組換え PRSV-CP 4μg
2. 牛血清アルブミン 4μg
3. タンパク質サイズマーカー

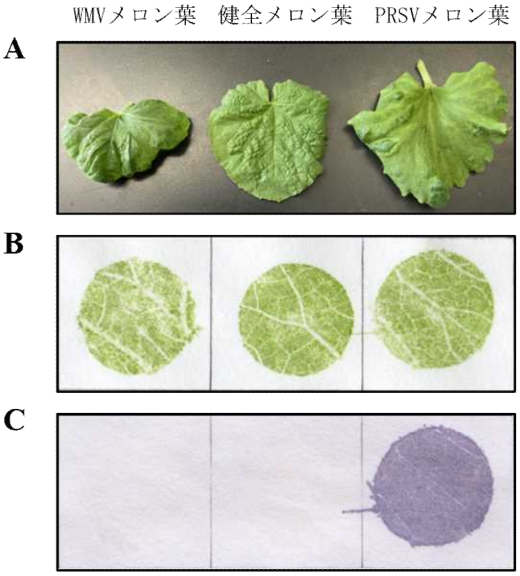

図３　濾紙上における PRSV の検出
（ティッシュブロット法）
A. 検定に用いた PRSV 感染葉と WMV 感染葉、健全葉
B. 濾紙への転写後
C. 抗原抗体反応および発色後
注）紫色の部分が PRSV を示す。

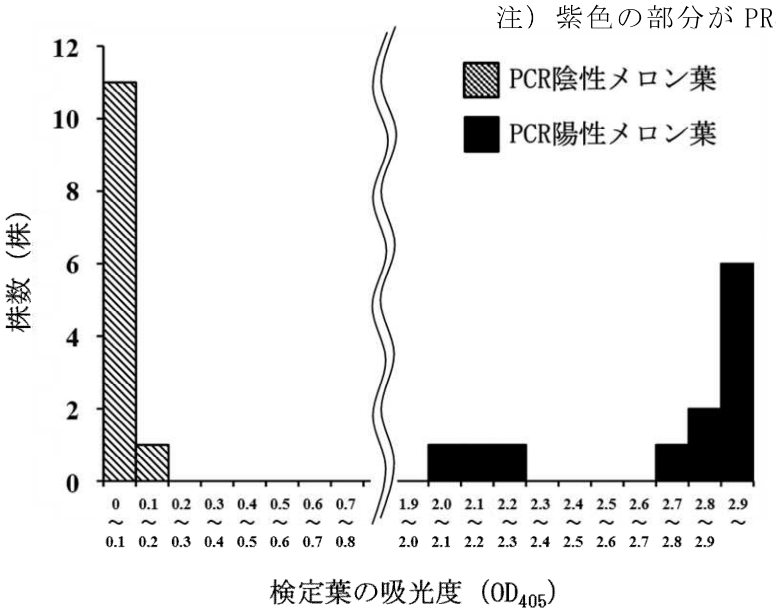

図２　間接 ELISA（PTA-ELISA）による PRSV の検出

注）葉重量の 10 倍量の PBS-T でメロン葉を抽出し、４℃で１晩プレートに吸着させ、PRSV 抗血清を 20,000 倍希釈、AP 結合二次抗体を 10,000 倍希釈で使用した。吸光度が高いほど、黄色く発色していることを示す。

５．試験課題名・試験期間・担当研究室

POCT を目指したウリ類ウイルス病の高精度な簡易検査技術の開発・
令和３～令和６年度・病虫研究室