

多検体検定時に有効なウリ類退緑黄化ウイルスの簡易検出法			
[要約] ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV) 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、CCYV 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5年度	成果区分	技術情報

1. 背景・ねらい

ウリ類退緑黄化ウイルス (Cucurbit chlorotic yellows virus ; CCYV) によって引き起こされるウリ類の退緑黄化病は、その病徴が生理障害と類似しており、目視による診断は困難である。また、CCYV はタバココナジラミによって媒介され急速に感染が広がるため、本病の防除には迅速な診断が不可欠であり、CCYV 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多検体を簡易に診断できる技術を開発する。

2. 成果の内容・特徴

- 1) CCYV 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 CCYV-CP タンパク質が得られる (図 1)。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、CCYV-CP に対する抗血清 (抗体) が得られる。
- 2) 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と、CCYV の量が多い部分が明瞭な紫色の点として検出される (図 2)。
- 3) メロン葉抽出液を 96 穴イムノプレート上に吸着させ、得られた抗血清を反応させる間接 ELISA 法 (PTA-ELISA) により、多数検体からも CCYV を検出できる (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、退緑小斑点等の初期病徴が明瞭に出ている葉を用いる。CCYV はウイルス蓄積量が少ないため、完全に黄化した古い葉や無病徴の展開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) PTA-ELISA で検出する場合、37℃で 3 時間程度発色させると十分に目視で判定可能である。
- 7) 本結果は、園芸研究所内で維持している CCYV 感染メロンの発病葉を用いて得られた結果である。
- 8) いずれの検定も、農業改良普及センターや病虫害防除所等で実施可能であるが、使用する試薬等は園芸研究所で調製したものを使用する。

4. 具体的データ

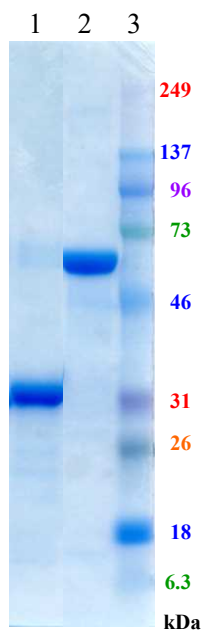


図1 組換え CCYV-CP タンパク質の SDS ポリアクリルアミド電気泳動像
 1. 精製組換え CCYV-CP 4 μg
 2. 牛血清アルブミン 4 μg
 3. タンパク質マーカー

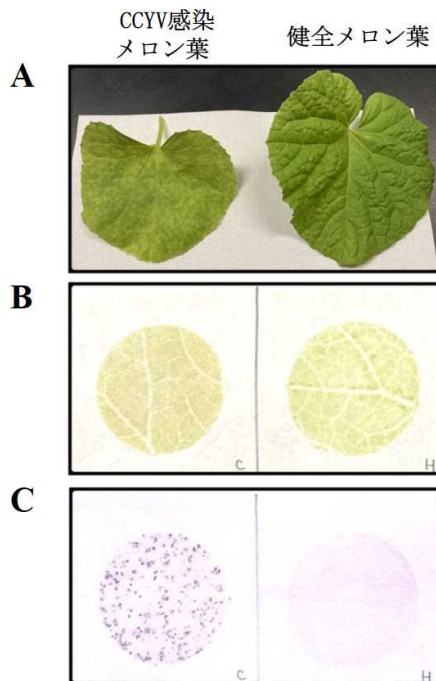


図2 濾紙上における CCYV の検出
 A. 検定に用いた CCYV 感染葉と健全葉
 B. 濾紙への転写後
 C. 抗原抗体反応および発色後
 注) 紫色の点が CCYV を示す。

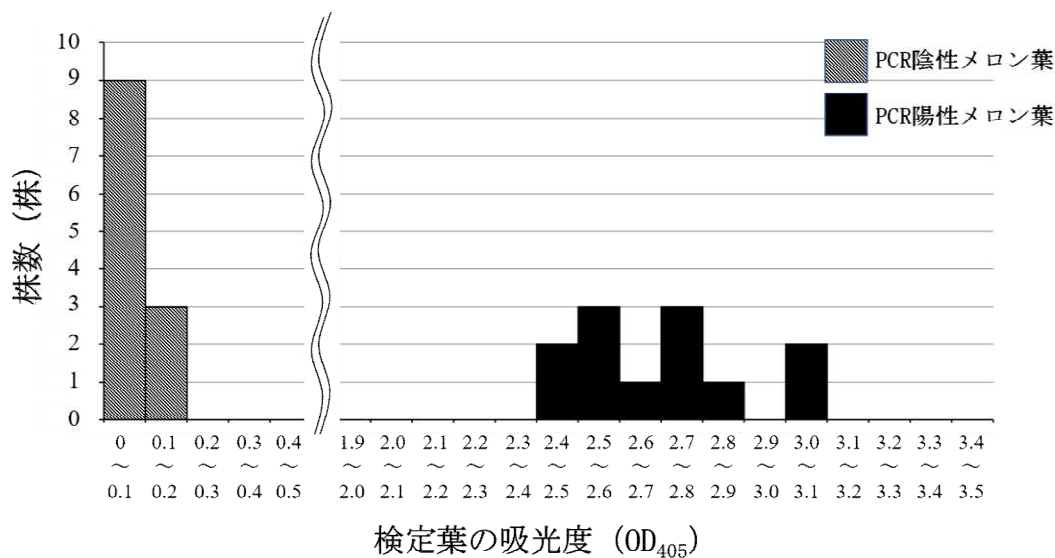


図3 間接 ELISA (PTA-ELISA) による CCYV の検出
 注) 葉重量の 10 倍量の PBS-T でメロン葉を抽出し、4℃で1晩プレートに吸着させ、CCYV 抗血清を 4,000 倍希釈、AP 結合二次抗体を 10,000 倍希釈で使用した。吸光度が高いほど、黄色く発色していることを示す。

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