

●重点

エライザ法によるナガイモえそモザイク病の診断

平成20～22年（3年間）

中央農業試験場

共同（協力）機関 十勝農業協同組合連合会

Abstract 概要

ヤマノイモえそモザイクウイルスはながいもで最も問題となっているウイルスです。今まで簡易にウイルスを診断できる方法はありませんでした。本ウイルスのエライザ法による検出を目的に大腸菌でウイルス抗原を作成して、抗体の作製を行いました。その結果、良質な抗体が得られ、検定時にサンプルを-15℃以下で6時間以上凍結させ、サンプルの磨砕バッファーに1%スキムミルク、2%Tween20を加えることで、ウイルスを検出できることが明らかとなりました。エライザ法による検定を実施できる機関でウイルスの診断に活用される予定です。

Results 成果

1 大腸菌発現系で抗原を作製

■抗体はウイルスの外側を覆っているタンパク質（CP）をウサギに免疫させて作製します。CPを大量に作製するために、ウイルスのCP遺伝子から大腸菌内で大量に発現させることで作製しました。図1の矢印が発現したCPです。

■これを抗原としてウサギに免疫させ、抗体を作製しました。

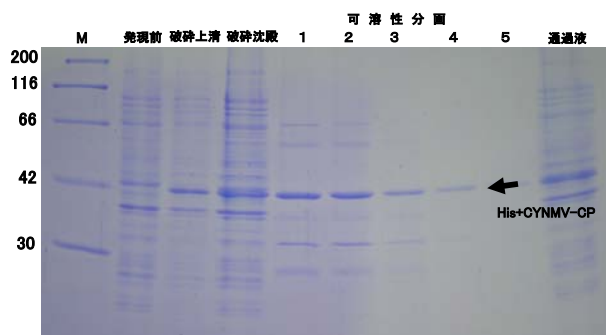


図1 大腸菌破碎液中に発現したウイルスタンパク質

2 簡易な診断法であるエライザ法への適用

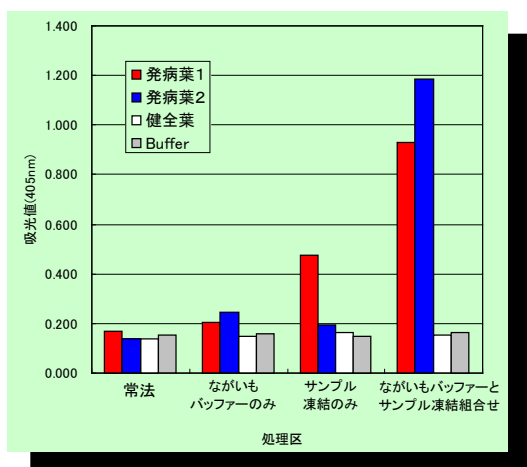


図2 エライザ法の改良による吸光値の上昇

■エライザ法の検定法を検討し、サンプルを事前に6時間以上凍結して用い、通常バッファーに1%スキムミルクと2%Tween20を添加した磨砕バッファーを用いることで、発色は増加し、吸光値(405nm)も上昇しました（図2、3）。

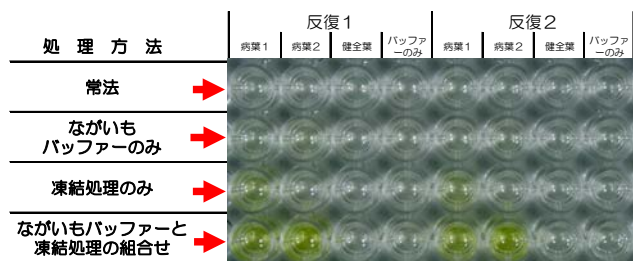


図3 エライザ法の改良による発色の違い

Results 成果

3 エライザ法による検定の検出限界

■ナガイモのウイルス発病葉を希釈して、どの程度まで吸光値が上昇しているかを調べた結果、作製抗体（pMAL, pColdR1）ともに100倍希釈まで吸光値が上昇し、これが希釈限界である（図4）。

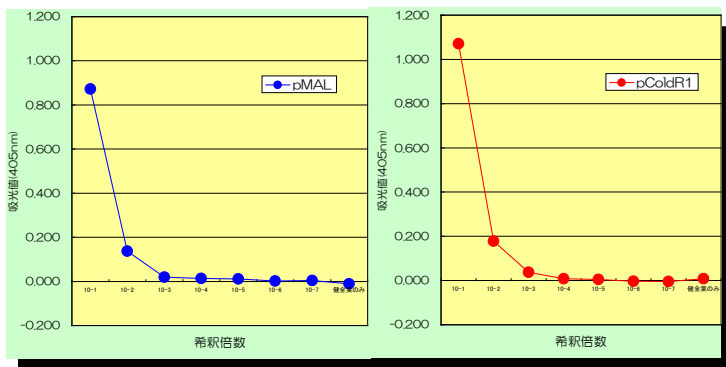


図4 エライザ法におけるサンプルの希釈と吸光値

4 ヤマノイモえそモザイクウイルスのエライザ法による検定マニュアル

■エライザ法によるウイルスの検定法を以下のとおりマニュアル化しました。

①	ながいも下位葉からサンプルを採取
②	サンプル（0.1g）を-15℃以下で6時間以上凍結
③	コーティング液を各ウエルに200μl分注。37℃3時間静置
④	PBS-Tで5回洗浄
⑤	ながいもバッファー（注1）で試料を磨砕（注2）。各ウエルに200μl分注
⑥	マイクロプレートを4℃で一晩静置
⑦	PBS-Tで5回洗浄
⑧	コンジュゲート液を各ウエルに200μl分注。37℃3時間静置
⑨	PBS-Tで5回洗浄
⑩	基質溶液を250μl分注。1時間後に吸光値（405nm）を測定

注1

通常の磨砕液（PBS-T+PVP）に1%スキムミルク、2%ツイーン20を添加

注2

乳鉢に石英砂を入れ、試料0.1g当たり0.9mlのながいもバッファーで磨砕。これを2mlのサンプルチューブに移す。0.9mlで乳鉢を洗浄し、この液も移す（18倍希釈）。4,000rpmで5分遠心分離。

Activities 業績

【研究成果入手先】

道総研農業研究本部の「農業技術情報広場」で、本成果に関する概要（pdf）を公開。

<http://www.agri.hro.or.jp/center/kenkyuseika/iippan23.html>

Dissemination 普及

■作製した抗体はエライザ法によるながいものウイルス診断が実施できる機関（農業団体、普及センター等）で広く活用されます。

■抗体は道総研中央農業試験場における「エライザ検定用抗体キット等の管理および提供要領」に基づき、配布可能です。

Contact 問い合わせ

農業研究本部 中央農業試験場
病虫部 予察診断グループ

【電話】 0123 - 89 - 2001（代表）

【メール】 central-agri@hro.or.jp

【ウェブ】 <http://www.agri.hro.or.jp/chuo/>