

<b>ピーマンに感染する複数種ウイルスの同時検出技術の開発</b>			
[要約] ピーマンに感染する8種類のウイルス（INSV、CMV、TRV、PVY、TSWV、PMMoV、CSNV、CaCV）は、マルチプレックス RT-PCR 法により迅速に診断できる。			
農業総合センター 生物工学研究所	平成25年度	成果 区分	技術情報

### 1. 背景・ねらい

茨城県の主要作物であるピーマンは、5属8種のウイルスに感染する（平成26年2月現在）。これらのウイルスは、接触伝染・虫媒伝染など、ウイルス種によって伝染環境が異なるため、伝染経路を遮断し効果的に防除を行うためには、現場で発生しているウイルス種を迅速に同定することが肝要となる。しかし、各々のウイルスによる病徴は互いに類似している場合が多く、目視でのウイルス種の同定は困難である。そこで、遺伝子診断法によって8種のピーマンに感染するウイルスを一括して同定できる迅速な診断法を確立する。

### 2. 成果の内容・特徴

- 1) 本遺伝子診断法には、マルチプレックス RT-PCR（1反応で複数遺伝子を同時に増幅することができる手法）を用いる。
- 2) マルチプレックス RT-PCR で用いるプライマーは表1のとおり。反応液組成は図1に示すとおりで、プライマー混合液は各プライマーを2 $\mu$ Mの濃度になるように調製し、反応液の1/10量を使用する（図1）。
- 3) マルチプレックス RT-PCR によって、インパチェンスネクロティックスポットウイルス（INSV）、キュウリモザイクウイルス（CMV）、タバコ茎えそウイルス（TRV）、ジャガイモYウイルス（PVY）、トマト黄化えそウイルス（TSWV）、トウガラシマイルドモットルウイルス（PMMoV）、キク茎えそウイルス（CSNV）、ピーマン退緑斑紋ウイルス（CaCV）の感染植物から、それぞれ298、446、542、619、720、862、939、1136 bpのウイルス遺伝子が増幅される（図2）。
- 4) このことにより、ピーマンに感染する8種類のウイルス種の検出・同定を一括で行うことができる。
- 5) 従来の遺伝子診断法では、対象となる病害を1種類ずつ検定していたが、本遺伝子診断法は単一の反応系で複数種のウイルスを迅速に診断できる。

### 3. 成果の活用面・留意点

- 1) 遺伝子増幅装置（サーマルサイクラー）を有する機関で診断することができる。
- 2) RT-PCR には、植物から抽出・精製したRNAを鋳型とする。
- 3) 反応緩衝液には Ampdirect Plus を、逆転写酵素および DNA ポリメラーゼには PrimeScript 1 step Enzyme Mix を使用することが推奨される。
- 4) 異なる試薬・酵素類を使用する場合、反応条件等を個別に検討する必要がある。

#### 4. 具体的データ

表1 マルチプレックスRT-PCRに用いる各プライマーの情報

対象	5' プライマー	3' プライマー	増幅長
INSV	CCTAAGAGAACACCCAAGACAC	CCTGCCTATCCTTCCTCAAG	298 bp
CMV	GTTGCTTCCTGATTCAGTCAC	ACTACCAACTCAGCTCCCG	446 bp
TRV	CTGTTGTGTATCACGAGAAGTTG	CTCGAAATCCACTTAGTAGCC	542 bp
PVY	TCACAACATTTCTCAGATCTGG	GCATTCTCATTTTGGACGTGATAG	619 bp
TSWV	TCTTCACCTGATCTTCATTCATT	ACCCTAAGAAACGACGACTGCG	720 bp
PMMoV	ACATTTGGACGACGCTGT	CGAGTTCGCCAATTCTAAC	862 bp
CSNV	GACACACTTTAAATCTTTAACACACC	GAGCGACTGCGGAATACTCT	939 bp
CaCV	CCAATGGTTTGCCTCCGAAG	AGAGCAATCGAGGCGCTAATA	1136 bp

※ PVYのプライマーはChikhら (2008)、TSWVのプライマーは瀬尾ら (2009)、CSNVおよびCaCVのプライマーは奥田 (2007) による。その他のプライマーはMuPlex (Rachlinら、2005) を利用して設計。

<反応液組成>		<反応条件>	
滅菌水	2.8 $\mu$ l	50 $^{\circ}$ C	30分
反応緩衝液 (2 $\times$ Ampdirect Plus)	5.0 $\mu$ l		
プライマー混合液	1.0 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	5分
逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ (PrimeScript 1 step Enzyme Mix)	0.2 $\mu$ l		
精製RNA	1.0 $\mu$ l	95 $^{\circ}$ C	30秒
	10.0 $\mu$ l	60 $^{\circ}$ C	30秒
		72 $^{\circ}$ C	30秒
			40回
		72 $^{\circ}$ C	5分

図1 マルチプレックス RT-PCR の条件

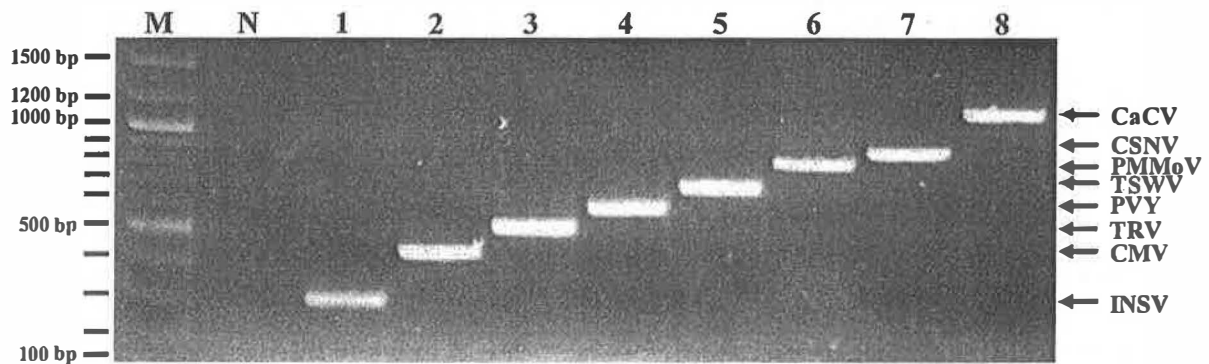


図2 マルチプレックス RT-PCR によるピーマンに感染する各種ウイルスの遺伝子増幅  
M: 100 bp ラダーマーカー、N: 健全葉、1: INSV、2: CMV、3: TRV、4: PVY、5: TSWV、6: PMMoV、7: CSNV、8: CaCV (1.3%アガロースゲル電気泳動図)

#### 5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

リアルタイム PCR を利用した複数ウイルスの一括迅速診断技術の開発・平成 23～平成 25 年度・生工研：生物防除研究室