

<b>メロ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] メロンに感染する9種類のウイルス(WMV、ZYMV、CMV、KGMMV、PRSV、MYSV、CGMMV、BPYV、CCYV)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メロンは、5属9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9種のメロ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表1に示す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、カボチャモザイクウイルス(WMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)、キュウリモザイクウイルス(CMV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス(KGMMV)、パパイヤ輪点ウイルス(PRSV)、メロン黄化えそウイルス(MYSV)、スイカ緑斑モザイクウイルス(CGMMV)、キュウリ黄化ウイルス(BPYV)、ウリ類退緑黄化ウイルス(CCYV)の感染植物から、それぞれ283、410、539、674、768、888、1013、1114、1334 bpのウイルス遺伝子が増幅される(図2A)。
- 4) このことにより、メロンに感染する9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。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。
- 5) なお、茨城県で発生が多いウイルス5種(セット1)とその他のウイルス4種(セット2)に分け、まずはセット1で診断し陰性ならばセット2で診断することで、さらに効率的に診断できる(表1、図2B、C)。

### 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	混合濃度	セット1	セット2
WMV	AGGAATCTGGAATGTT	GGAGTTAAAGAAGTGTGCAAC	283 bp	2 μM	2 μM	—
ZYMV	GGATAAATTGATGAGAGCATT	TGTCAAGTAAGCCGCTATC	410 bp	2 μM	2 μM	—
CMV	GCGGATGCTAACTTTAGAG	TGCTCGATGTCAACATGAA	539 bp	2 μM	2 μM	—
KGMMV	TTTGATTCCTGTTGATTGT	AGGAAGCGAACGAATACC	674 bp	2 μM	—	2 μM
PRSV	GAATGTCCTGAACTTGAATACA	TGGGTGAATGGCAATACA	768 bp	2 μM	—	2 μM
MYSV	CATTCTGTTTGGATGGAAC	TCCTAAGTAAACACCATGTCTAC	888 bp	2 μM	2 μM	—
CGMMV	CGATAAGTTGCTCCCTAAC	CGTAGGATTGCTAGGATCTAC	1013 bp	2 μM	—	2 μM
BPYV	AACTAACGATTCTTATCTCGTC	CCGGAGGCTGATATCACT	1144 bp	6 μM	—	6 μM
CCYV	ATTCGTTCTTGGAACGGTTG	AGCTAGGAAATCGGCTGACA	1334 bp	2 μM	2 μM	—
nad5 (内在コントロール)	AGATCCTTCTCGCTTTCGG	TCCACATACGAGAAAAGGTCA	206 bp	—	2 μM	2 μM

※CCYV, nad5のプライマーはマニュアルで設計。その他のプライマーは奥田ら (2007) による。  
nad5は植物由来の遺伝子で、診断の成否判定に用いている。

<反応液組成>		<反応条件>	
滅菌水	2.8 μl	50°C	— 30分
反応緩衝液 (2×Ampdirect Plus)	5.0 μl	↓	
プライマー混合液	1.0 μl	94°C	— 3分
逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ (PrimeScript 1 step Enzyme Mix)	0.2 μl	↓	
精製RNA	1.0 μl	94°C	— 30秒
	10.0 μl	55°C	— 30秒
		72°C	— 90秒
		↓	} 40回
		72°C	

図1 マルチプレックス RT-PCR の条件

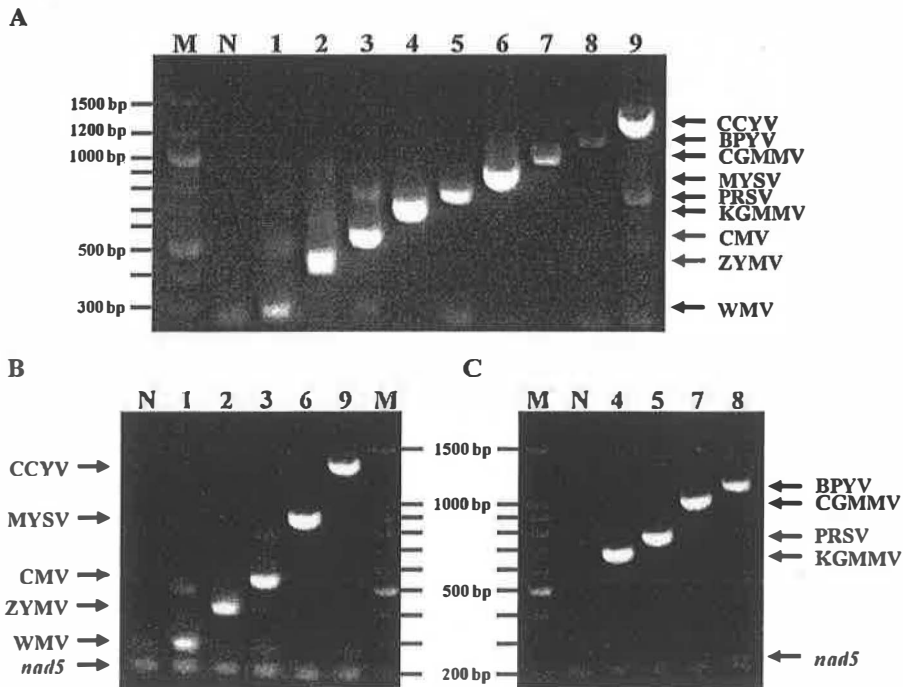


図2 マルチプレックス RT-PCR によるメロンに感染する各種ウイルスの遺伝子増幅

A. 9種マルチプレックス RT-PCR B. 5種マルチプレックス RT-PCR (セット1)

C. 4種マルチプレックス RT-PCR (セット2)

M: 100 bp ラダーマーカー、N: 健全葉、1: WMV、2: ZYMV、3: CMV、4: KGMMV、5: PRSV、6: MYSV、7: CGMMV、8: KGMMV (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