

[成果情報名]キュウリの3種ウイルス同時検出のための多重 RIPA 法の改良

[要約]RIPA 法の磨砕緩衝液組成を変えることにより、キュウリ3種ウイルス(CMV、MYSV、ZYMV)の検出感度が上がるとともに、多重 RIPA 法により同時検出可能となる。また、着色ラテックス2種の混合により、3種ウイルスの陽性反応の判別が容易になる。

[キーワード]キュウリ、CMV、MYSV、ZYMV、多重 RIPA 法

[研究所名]近中四農研・水田作研究領域

[代表連絡先]電話 0773-42-9912

[区分]近畿中国四国農業・生産環境(病害虫)

[分類]技術・参考

[背景・ねらい]

キュウリのウイルス病には、ミナミキイロアザミウマが媒介する黄化えそ病(病原 MYSV)やアブラムシが媒介するモザイク病(病原 CMV・ZYMV)が知られている。現在、これらの診断には、病原遺伝子の検出による遺伝子診断法が主に用いられている。しかし、高額な機材および試薬が必要であり、またその操作も煩雑である。一方、血清学的診断法の1種である RIPA(迅速免疫ろ紙検定)法は、検体を磨砕しガラス繊維ろ紙のストリップをその磨砕液に浸すという簡便な操作で、数分以内に診断が可能である。さらに、2種以上の抗ウイルス抗体を用いることで複数のウイルスを同時に検出できる(多重 RIPA 法)。しかし、ZYMV等のひも状ウイルス粒子はろ紙中での移動度が低く多重 RIPA 法に向かない。そこで多重 RIPA 法の磨砕緩衝液の組成等を改良し、キュウリのこれら3種ウイルスの同時検出を可能とする。

[成果の内容・特徴]

1. 磨砕緩衝液の牛血清アルブミン(BSA)濃度を0.1%から0.2%に上げることにより、3種ウイルスの RIPA 法での検出感度が2倍~8倍に向上し、より低濃度のウイルスを検出できる(表1)。また、ひも状ウイルスの ZYMV に対する RIPA において、0.1%ではストリップ下端から15mmまでしか陽性バンドが形成されないが、0.2%では ZYMV 粒子のろ紙中での移動度が向上し35mmまで陽性バンドが形成され、ストリップ上部での検出が可能となる(図1)。
2. 磨砕緩衝液の BSA 濃度が0.1%の場合、多重 RIPA 法による CMV、MYSV、ZYMV の同時検出は出来ないが(データ省略)、BSA 濃度を0.2%に上げることにより同時検出が可能となる(図2)。
3. 赤色と青色の着色ラテックスを混合して紫色として使用することにより、3種ウイルスの陽性反応の色による識別が可能となり、判別が容易に行える(図2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 多重 RIPA 法は現場において簡便かつ短時間で診断が行えるので、生産者・普及員等による感染株の診断、またウイルス種の判別が可能であり、その後の対策(媒介虫の防除、感染株の速やかな抜き取り等)が迅速に行える。
2. 本多重 RIPA 法は、ストリップを初めに検体粗汁液に、次いで着色ラテックス液に浸す二段階法で行う(Tsuda et al. 1993 参照)。
3. 本成果はストリップや磨砕緩衝液等の検出キットを作製する者に有益な情報である。

[具体的データ]

表1 磨砕緩衝液の牛血清アルブミン(BSA)濃度上昇によるRIPAの検出感度の改善

RIPA ¹⁾ タイプ	BSA 濃度	抽出粗汁液の希釈倍率 ²⁾									
		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	
CMV	0.1%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	0.2%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
MYSV	0.1%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	0.2%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
ZYMV	0.1%	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	0.2%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

1)白色ラテックス液はそれぞれストリップ下端より15mmの位置に塗布した。

2)それぞれの罹病葉を半分に切除し、それぞれのBSA濃度の抽出緩衝液で磨砕し検定した。

希釈は同一の磨砕緩衝液で行った。+は陽性を、-は陰性を示す。

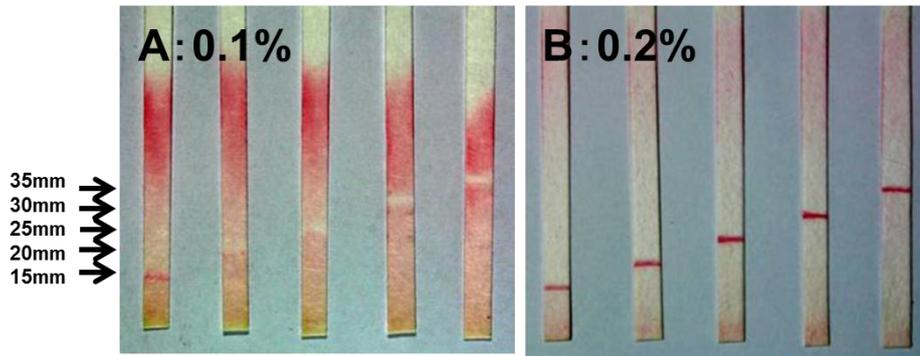


図1 磨砕緩衝液の牛血清アルブミン(BSA)濃度が検出可能位置に及ぼす影響
それぞれ左から、ストリップ下端より15、20、25、30、35mmの位置に白色ラテックス液を塗布しZYMV感染葉の検定を行った。A:磨砕緩衝液中のBSA濃度0.1%、B:同0.2%

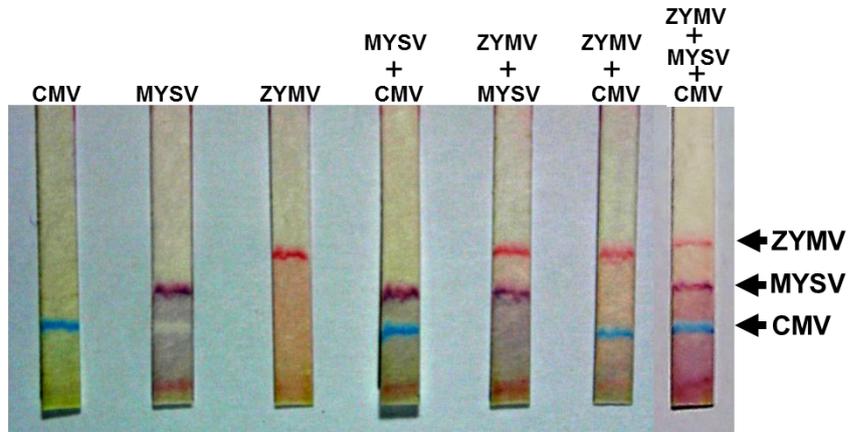


図2 多重RIPA法による単独および重複感染株の検定
上部に感染ウイルスを示す。青色はCMV陽性を、紫色はMYSV陽性を、赤色はZYMV陽性をそれぞれを示す。0.2%BSA含有磨砕緩衝液を用いた。

(大崎秀樹)

[その他]

研究課題名：土壌病虫害診断と耕種的防除技術開発による野菜の環境保全型生産システムの構築

中課題番号：153a2

予算区分：大課題研究費

研究期間：2010～2011年度

研究担当者：大崎秀樹、野見山孝司、石川浩一

発表論文等：Osaki H. et al. (2011) J. Gen. Plant Pathol., 77:307-311.