

指導活用技術
分類名〔病害虫〕

指 14	イライザ法による植物ウイルス由来二本鎖 RNA の検出
------	-----------------------------

宮城県農業・園芸総合研究所

要約

二本鎖 RNA と特異的に反応する抗体を利用して、イライザ法（Enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA）により植物ウイルス由来二本鎖 RNA を検出する。宿主の作物から全 RNA を抽出後、抗原の植物ウイルス由来二本鎖 RNA と抗二本鎖 RNA 抗体の抗原抗体反応によりウイルス感染を診断する。

普及対象：試験研究機関
普及想定地域：－

1 取り上げた理由

植物ウイルス感染の診断については、ウイルスの外被タンパク質を抗原とする血清学診断法（イライザ（エライザ）法、イムノクロマト法）や既知 DNA または RNA 配列と反応する PCR 法を用いている。今回、新たなウイルス検出手法としてイライザ法により植物ウイルス由来二本鎖 RNA の検出を検討したところ、その有効性が確認できたので、指導活用技術とする。

2 指導活用技術

（1）植物ウイルスの多くは、宿主の植物の中で増殖する際に二本鎖 RNA を合成する。イライザ法により①二本鎖 RNA（抗原）をマイクロプレートに吸着、②抗二本鎖 RNA 抗体を含む抗体混合液の添加、③プレートからの余剰抗体の洗浄、④発色、の手順によりウイルス由来二本鎖 RNA の有無が確認できる（図1、2、表1）。

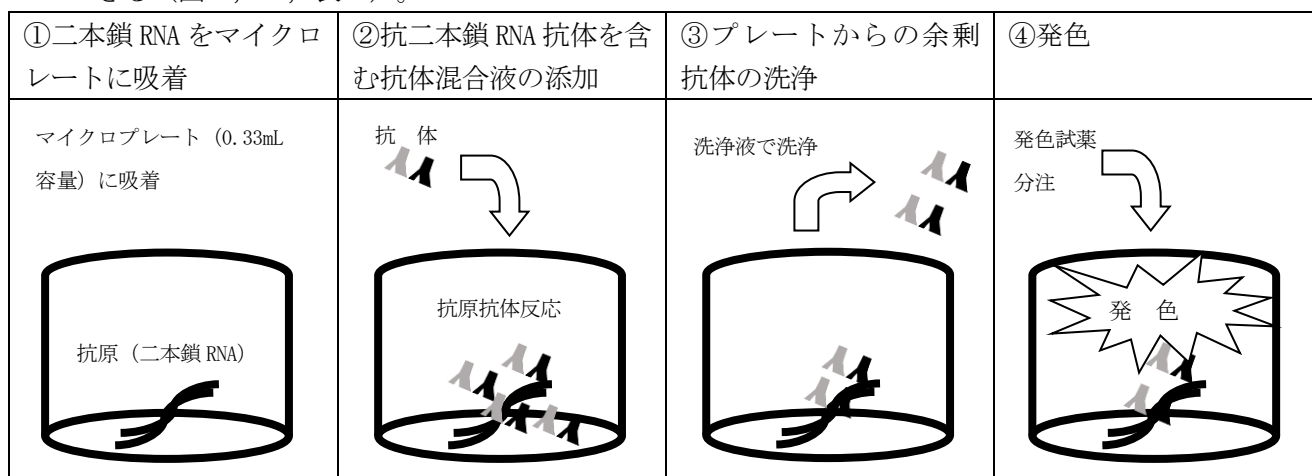


図1 イライザ法による二本鎖 RNA 検出の概略

（2）1回の分析で使用する検体はウイルス感染葉等の生重量約0.1g、分析機器として遠心器と恒温器等を使用する（表1）。分析時間はRNA抽出が約1時間、イライザ法が約3時間である。

3 利活用の留意点

- （1）ウイルス診断の手法のひとつとして活用する。
- （2）陽性反応の場合、その後に塩基配列を解読し種を同定する。
- （3）用いた抗体（表1）は RNA 配列に依らず約100塩基対以上の二本鎖 RNA を抗原とし反応する。

（問い合わせ先：宮城県農業・園芸総合研究所 園芸環境部 電話 022-383-8126）

4 背景となった主要な試験研究の概要

(1) 試験研究課題名及び研究期間

病害診断における遺伝子解析技術の開発と活用（平成 30 年度～令和 4 年度）

(2) 参考データ



吸光度	1.389	0.802	0.653	0.267	0.037	ABS (波長 405nm)
二本鎖 RNA	20	2	0.2	0	空	(ng/ウェル)

図 2 マイクロプレート上面からの発色程度

表 1 検出の操作手順

No. 操作手順	使用する試薬等（製品の詳細はそれぞれの説明書に記載有り）
1 検体（植物試料0.1g）からの全RNA抽出。最終容量50 μ l。	RNイーザープラントミニキット（キアゲン），溶出用RNaseフリー水，遠心器
2 マイクロプレートのウェルに0.1%ポリリジン水溶液100 μ l分注。	ポリ-L-リジン塩酸塩，96穴マイクロプレート0.33ml/ウェル（nunc）
3 1で抽出したRNA水溶液をウェルに1 μ l以上分注。	未知濃度の試料の場合，数段階の濃度で分析
4 マイクロプレート上面に専用シールを張り，37°Cで1時間保温。	恒温器
5 ウェルの液を捨てる。250～300 μ lブロック液をウェルに分注。	ブロック液：1%ウシ血清アルブミン水溶液
6 室温で5分。	
7 ウェルの液を捨てる。抗体混合液を100 μ l分注し，室温で1時間。	抗体混合液：抗dsRNAマウスIgG1(クローン9D5)（フナコ）とヤギ抗マウスIgG(H+L)HRPコンジュゲート（セラケアライフサイエンス）
8 ウェルの液を捨てる。洗浄液で3回ウェルを洗浄。	洗浄液：2mMイミダゾール緩衝生理食塩水+0.02% tween 20
9 発色液を100 μ l分注、発色を肉眼観察、必要に応じ吸光度測定。	発色液：ABTS HRP基質（セラケアライフサイエンス）、プレートリーダー

(3) 発表論文等

イ 関連する普及に移す技術

ろ紙粉末を利用した植物ウイルス由来二本鎖RNAの精製（第94号参考資料）

ロ その他

なし

(4) 共同研究機関

なし