

DIBA を用いたユリの3種ウイルスの診断法

農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

本県の育成品種をはじめとしたユリの生産安定のためには、無病種苗の供給とともに生産現地でのユリウイルス病の発生状況を把握しておく必要がある。このため、ユリウイルス病を診断する技術として、県内のユリ生産地で発生が確認されているユリモットルウイルス（LMoV）、ユリ潜在ウイルス（LSV）、キュウリモザイクウイルス（CMV）を、特殊な機器を必要としないDIBA（dot immunobinding assay）を用いた方法で検出する血清学的診断法を開発したので、普及技術とする。

2 普及技術

1) DIBAによるウイルス診断の手順，特徴

ユリ葉から採取した試料を図1のフローに従って試料調製，ウイルス抗血清・酵素結合抗体処理し，LMoV，LSV，CMVを検出する。試料調製が簡便なので，多数（150程度までが適当）の試料を一度に診断できる。

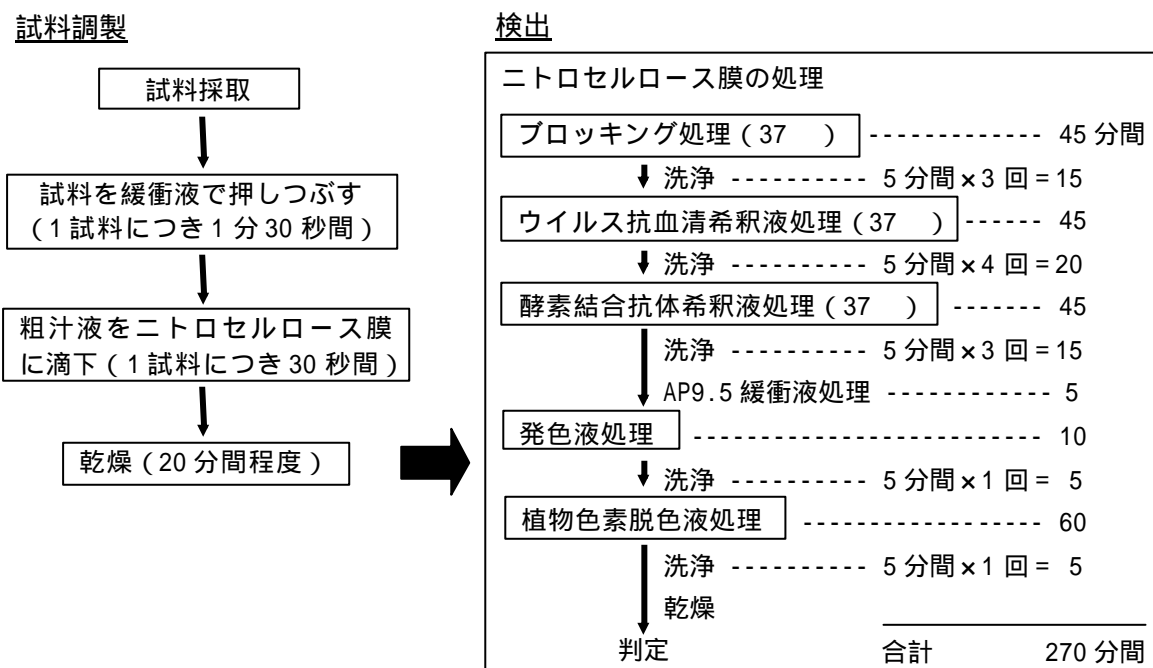


図1 DIBAのフロー

・表示時間は、各作業に必要な処理時間で、1度に100試料を診断する場合は、試料調製に2分間×100試料+20分=220分間、検出は試料数にかかわらず270分間を要する。その他の作業時間を合わせると、全体の作業時間は試料調製に約4時間、検出に約5時間となる。

2) 診断に必要な主な試薬，消耗品，機器類

a 試料調製

ポリ袋（0.1mm厚，7×13cm），TBS + EDTA緩衝液（表1），ニトロセルロース膜（NCM），ガラス管瓶，マイクロピペット

b 検出

プラスチックケースなどの容器（NCMが入る大きさ，100試料の診断の場合は底面10×10cm程度のもの），恒温器（37℃が維持可能なもの），表1の各種溶液

表1 DIBAに用いる溶液の組成

溶液（調製時期，保存温度）	目分量（ml）	組成
TBS + EDTA緩衝液（4℃ 保存）	40	溶液1L中の組成：トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン 12.1g，塩化ナトリウム 8.8g，アジ化ナトリウム 0.5g，EDTA 2Na 3.7g；各試薬を蒸留水で溶解して塩酸でpH7.5に調製
TBST緩衝液（4℃ 保存）	40	溶液1L中の組成：トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン 12.1g，塩化ナトリウム 8.8g，アジ化ナトリウム 0.5g，Tween 20 0.5ml；各試薬を蒸留水で溶解して塩酸でpH7.5に調製
ブロッキング処理液（使用直前に調製）	40	溶液100ml中の組成：スキムミルク 3g，TBSTで溶解
ウイルス抗血清希釈液 （使用2時間前に調製，使用時まで37℃ 静置）	20	溶液20ml中の組成：LMoV抗血清4μl，LSV抗血清2μl，CMV抗血清4μlをユリ健全葉粗汁液で希釈（3種ウイルスを1枚のNCMで同時に検出する場合）
酵素結合抗体希釈液（使用直前に調製）	20	溶液20ml中の組成：酵素結合抗体2μlをTBSTで希釈
AP 9.5緩衝液（4℃ 保存）	40	溶液1L中の組成：トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン 12.1g，塩化ナトリウム5.8g，塩化マグネシウム10g；各試薬を蒸留水で溶解して塩酸でpH7.5に調製
NBT保存液（-20℃ 保存）		溶液10ml中の組成：NBT 1g，ジメチルホルムアミド7ml，蒸留水3ml
BCIP保存液（-20℃ 保存）		溶液10ml中の組成：BCIP 0.5g，ジメチルホルムアミド10ml
発色液（使用直前に調製）	20	溶液10ml中の組成：NBT 保存液35μl，BCIP保存液35μl，AP9.5 10ml
植物色素脱色液（4℃ 保存）	20	溶液1L中の組成：Triton X-100 50g，蒸留水で溶解

注）目分量：100試料の検出（NCM 8×8cm）に底面10×10cmのプラスチックケースを使用した場合の，1処理または洗浄1回ごとに必要な各溶液のおおよその量

3）試料調製

試料数に応じて必要な大きさ（1試料につき0.8cm角）のNCMをはさみで切り取り，0.8cm角のマスを鉛筆などで定規を当てながら引く。100試料の場合は，NCMは8×8cm程度が必要である。NCMはピンセットまたはビニル手袋で扱う。

ユリの植物体中でのウイルス濃度が高い，萌芽期から開花期までの上位葉と下位葉の2カ所から1葉ずつ採取し，それぞれカミソリ等で10×5mm大の葉片1枚，計2枚を切り出す。

試料をポリ袋に入れ，400μlのTBS + EDTA緩衝液を加えて，ガラス管瓶でポリ袋の上から試料を葉片がなくなるまで，こすりながら押しつぶす。所要時間は1試料につきおよそ1分30秒間程度である。

ポリ袋中の植物繊維を含まない透明な部分の粗汁液を2μlとり，NCMのマスの中央に滴下する。1試料につき1マスをを用いる。また，ウイルス陰性の判断基準とするため，健全個体から採取した葉（健全対照）も検定試料と同様に調製する。所要時間は1試料につきおよそ30秒間程度である。全試料の滴下後，NCMを乾燥させる（20分間程度）。

4）検出（以下の処理は温度指定のあるもの以外は室温で行う。処理液量の目安は表1のとおり。）

NCMをプラスチックケースに入れ，ブロッキング処理液を加えて，45分間37℃で静置する。

液を捨て，TBST緩衝液を加えて5分間静置し，NCMを洗浄する。この間に2～3回容器を揺らして溶液を攪拌する。この操作を3回繰り返す。

液を捨て，ウイルス抗血清希釈液を加えて，45分間37℃で静置して反応させる。

液を捨て，と同様のNCM洗浄を4回繰り返す。

液を捨て，酵素結合抗体希釈液を加えて，45分間37℃で静置して反応させる。

液を捨て，と同様のNCM洗浄を3回繰り返す。

液を捨て，AP9.5緩衝液を加えて5分間静置する。この間に2～3回容器を揺らして溶液を攪拌する。

液を捨て，発色液を加えてNCM全体が薄い紫色に発色するまで（最大10分間程度）静置して反応させる。

液を捨て，NCMが浸る程度に蒸留水を加えて5分間静置し，発色を停止させて洗浄する。この間に2～3回容器を揺らして液を攪拌する。

液を捨て、植物色素脱色液を加えて 60 分間静置して処理する。この間に 2~3 回容器を揺らして溶液を撈拌する。

液を捨て、NCM が浸る程度に蒸留水を加えて 5 分間静置して洗淨する。この間に 2~3 回容器を揺らして液を撈拌する。その後、NCM をろ紙等の上に置き、乾燥させる。

5) 判定

診断結果は、健全対照の発色程度を基準として、より明瞭に紫色に発色した試料を陽性と判定する(図2)。

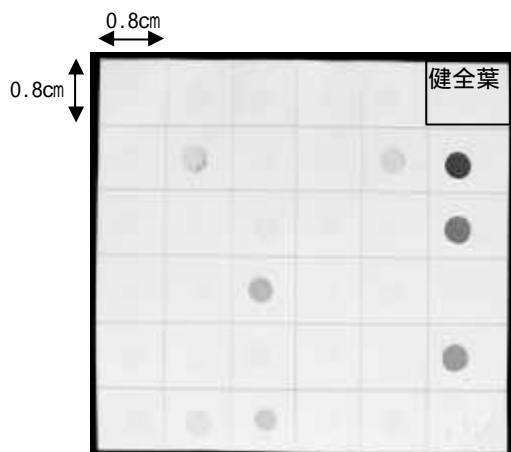


図2 ウイルス検出例

・0.8×0.8cmのマスを引いたニトロセルロース膜に、検定試料の粗汁液(2μl)を1試料につき1マスずつ滴下すると、液が円形に吸収されて粗汁液中のタンパク質などが膜表面に吸着される。検出処理を行うと、健全葉はほとんど発色せず、ウイルス感染個体()のみ発色する。

6) 経費, 作業時間

100試料を診断する場合、消耗品の経費は約3,000円であり、標準的な作業時間は約9時間(試料調製に約4時間、検出に約5時間)である。作業を中断する場合は試料調製後とし、試料粗汁液を滴下したNCMは検出まで4で保存する。

7) ウイルス種の識別検出

1)から6)の方法は、ウイルス抗血清3種を混合して希釈しているため、NCM1枚で3種のウイルスを同時に検出するものであるが、ウイルスの種類を区別することはできない。区別して検出する必要がある場合は、同一の検定試料の粗汁液を滴下したNCMを3枚用意し、ウイルス抗血清ごとに調製した抗血清希釈液を用いて、NCM1枚ずつ別々に検出処理する。この場合、消耗品の経費は約2倍、作業時間は全体で約1.1倍となる。

3 利活用の留意点

- 1) 技術修得のため、1日程度の簡単な研修が必要である。
- 2) コリの植物体中でのウイルス濃度は、生育時期・葉位によって異なるため、球根や萌芽期から開花期以外の生育時期の葉では、DIBAによるウイルス検出が困難な場合がある(図3)。一方、遺伝子診断法(図4; 当研究所で対応可能)は、DIBAより約100倍以上検出感度が高く普遍性があるが、一度に扱うことができる試料数は10程度に限られる。
- 3) 本法によってウイルス陽性と判定された個体については、発色の程度にかかわらず早急に処分する。
- 4) 診断に用いる試薬類(表1)のうち、ウイルス抗血清、コリ健全葉粗汁液は当研究所から配布する。それ以外は理化学用品販売店で購入可能であり、本法を使用する各機関で用意する。
- 5) 奇形、えそやモザイク症状が発生している個体で、DIBAでの結果が陰性の場合には、LMoV、LSV、CMV以外のウイルス感染の可能性があるので、当研究所に診断を依頼する。

(問い合わせ先: 農業・園芸総合研究所バイオテクノロジー開発部 電話022-383-8131)

4 背景となった主要な試験研究

1) 研究課題名及び研究期間

花きのウイルス病防除技術の開発 平成11年度～15年度

2) 参考データ

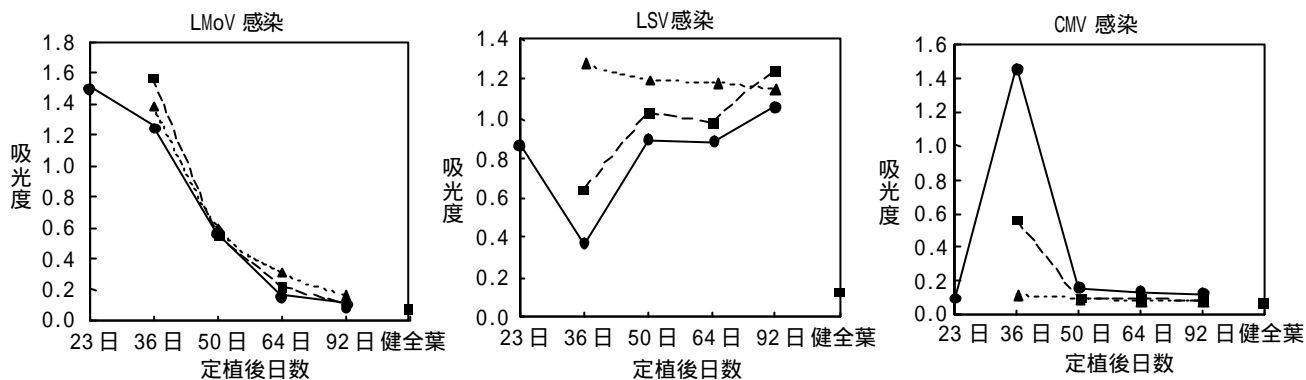


図3 ウイルスに感染した‘杜の乙女’における球根定植後日数に対する葉位別のウイルス濃度（吸光度）の経時変化

注) ○：上位葉，□：中位葉，△：下位葉，●：開花期（定植後約50日）

吸光度値は間接ELISAにより測定，定植後23日は萌芽期直後に相当

耕種概要：平成15年4月定植，網室・ポット栽培

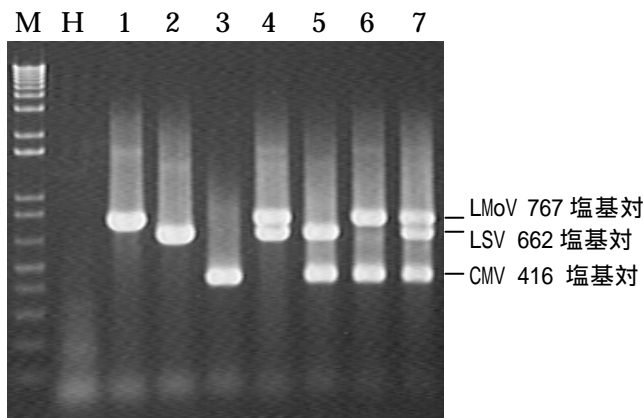


図4 遺伝子診断法によるウイルス検出例

M：分子量マーカー，H：健全葉

1～7：ウイルス感染葉

・検定試料からRNAを抽出し，遺伝子増幅技術でウイルス遺伝子断片を増幅させ，電気泳動により確認する。ウイルスに感染していると，ウイルスの種類に特有な塩基数の遺伝子断片が生じる。

3) 発表論文等

なし