

## 簡易診断キットを利用したタバココナジラミバイオタイプQの迅速診断

農業・園芸総合研究所

### 1 取り上げた理由

タバココナジラミは、トマト黄化葉巻病やウリ類黄化症の病原ウイルス（いずれもH23年1月時点県内未確認）を媒介する他、高密度で発生した場合、すす病やトマト果実の着色不良を引き起こす。現在、国内で農業上特に問題となっているタバココナジラミには、バイオタイプBとバイオタイプQの2系統が存在する。これらのバイオタイプ間では、防除に関係する生理・生態として寄生植物や薬剤の効果が異なるが、形態的差異はなく、肉眼や顕微鏡を使った識別ができない。タバココナジラミのバイオタイプの診断方法については、普及に移す技術第83号（普及情報）においてバイオタイプBとQの遺伝子診断方法を取り上げたが、より迅速かつ簡易に診断できるキットが市販され、その有効性が確認されたので、普及情報とする。

### 2 普及情報

- 1) キットの商品名は、タバココナジラミバイオタイプQ検出キット（ニッポン・ジーン）である。
- 2) キットには、Q検査液とB/Q検査液の2種類の検査液があり、それぞれを使用することにより「タバココナジラミバイオタイプQ」、「Q以外のバイオタイプ」、「バイオタイプQおよびB以外（従来系統のタバココナジラミ、オンシツコナジラミ、コナジラミ以外）」の識別ができる（表1）。
- 3) 手順は、サンプルの調整、試薬の調整、反応、判定からなる（図1）。サンプルの調整から判定までの所用時間は、1検体の検査を行う場合、1時間30分程度である。
- 4) 判定は、蛍光発色の有無により行う（図2、表1）。この際、紫外線照射によって鮮明に発色するため、紫外線照射を行わない場合より正確に判定できる。

### 3 利活用の留意点

- 1) キットの価格は12検体分で17,200円（税別、平成23年1月現在）である。キットは、株式会社富士通システムソリューションズが運営する e Genome Order より販売している。製品は、取扱説明書、検査用チューブを除き-20℃で保存し、納品後6ヶ月以内で使用する。
- 2) 本キットの検出の原理はLAMP法である。使用する器具・機器類は、マイクロピペット、マイクロチップ、インキュベーター（60℃に設定ができるもの）等である（図3）。これら器具・機器類は、LAMP法による遺伝子鑑定に共通して使用できる。
- 3) 誤判定の原因となるため、反応温度は60℃、反応時間は1時間を厳守し、反応後は速やかに判定する。
- 4) LAMP法は極めて感度が高い遺伝子検出法である。コンタミネーションを避けるため、DNAサンプルや検査後サンプル等、鋳型となる核酸が手や器具に付着しないように注意するとともに、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋等にまとめて処分する。なお、検査後サンプルは、反応溶液の飛散防止のため、蓋を開けずに処分する。
- 5) 紫外線照射装置を使用する場合には、別途防護用ゴーグル等を装着し、紫外線照射部を直接見ないようにする。また、紫外線照射装置は、波長が240nm～260nmあるいは350nm～370nmの波長を出力する装置を使用する。波長が320nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がある。
- 6) 検査結果が疑わしい場合には、陽性コントロール（キット付属）および陰性コントロール（キット付属の核酸フリー水）による試験を行い、反応結果を確認する。キットを用いた診断で判定ができない場合には、普及に移す技術第83号（普及情報）において取り上げた遺伝子診断法（PCR-RFLP法、所要時間5時間程度）等により、2次診断を行う。

（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

簡易遺伝子鑑定等による病害虫診断法の確立（平成21年～23年度）

##### 2) 参考データ

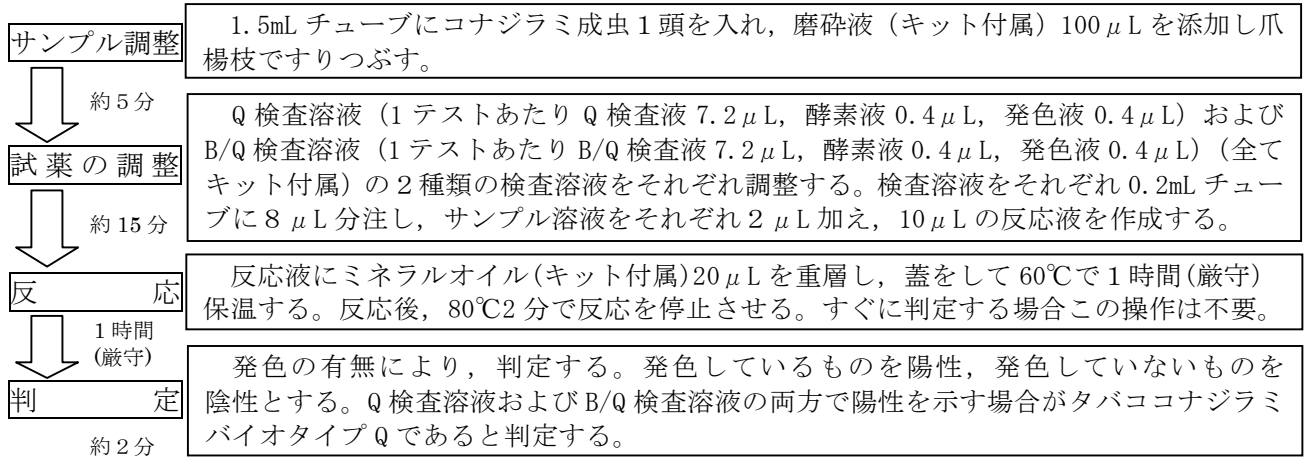


図 1 診断の流れとおよその所要時間

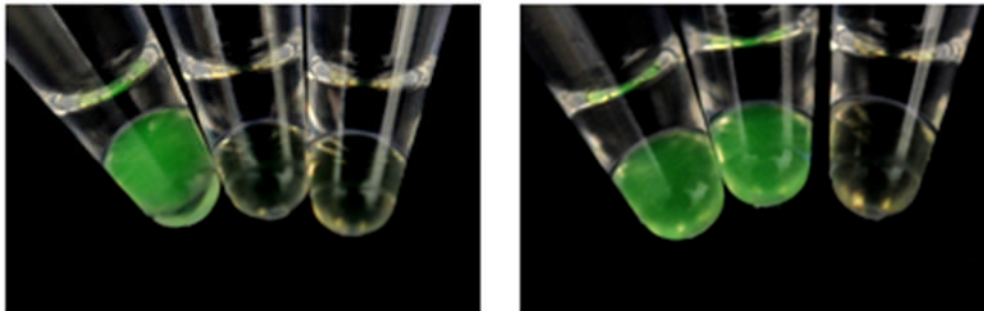


図 2 キットによる検定結果（左図：Q 検査溶液での反応，右図：B/Q 検査溶液での反応）  
サンプルは左から，バイオタイプ Q，バイオタイプ B，滅菌水(陰性コントロール)

表 1 発色パターンによる判定方法

検査溶液	発色パターン			
	I	II	III	IV
Q検査溶液	陽性	陰性	陰性	陽性
B/Q検査溶液	陽性	陽性	陰性	陰性

判定

I：バイオタイプ Q

II：Q 以外のバイオタイプ(バイオタイプ B に分類される可能性がある)

III：バイオタイプ Q および B 以外（従来系統のタバココナジラミ，オンシツコナジラミ，コナジラミ以外）

IV：試薬の再調整または二次診断



図 3 検定に必要な器具類（例）

①ヒートブロック（60°C に設定できるもの）

②小型遠心機（0.2mL チューブ用）

③小型遠心機（1.5mL チューブ用）

④マイクロピペット（～20  $\mu$ L，～200  $\mu$ L）

⑤マイクロピペット用チップ

⑥0.2mL チューブ

⑦1.5mL チューブ

⑧チューブラック（0.2mL チューブ用）

⑨チューブラック（1.5mL チューブ用）

⑩爪楊枝

⑪携帯型紫外線照射装置

⑫温度計

⑬使い捨て手袋

⑭70%エタノール

##### 3) 発表論文等 なし