

抗体を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの簡易検出法			
[要約] トマト黄化葉巻ウイルスの外被タンパク質を大腸菌で発現させて精製した抗原を家兎に免疫して得られた抗体を用い、濾紙または 96 穴プレート上における抗原抗体反応により、トマト黄化葉巻ウイルスを簡易に検出することができる。			
農業総合センター 園芸研究所	平成27年度	成果区分	普及

1. 背景・ねらい

トマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) による病害の防除には迅速な診断が不可欠であり、TYLCV の検出には PCR 法が活用されている。しかし、PCR 法は専用の機器・試薬と技術が必要なため、診断できる場所が限られている。そこで、専用の機器を必要とせず簡易に診断できる技術を開発する。

2. 成果の内容・特徴

- 1) TYLCV 茨城県分離株の外被タンパク質 (CP) 遺伝子を大腸菌発現ベクター (pET) に導入し、大量発現及び精製を行うと、組換え 6xHis 付加 TYLCV-CP タンパク質が得られる。精製した組換えタンパク質を抗原として家兎に免疫を行うと、TYLCV-CP に対する抗血清 (抗体) が得られる。
- 2) ハンマーで叩いてトマト葉液を転写した濾紙 (分析用濾紙 No. 7 など) 上で、得られた抗血清を用いて抗原抗体反応を行う (図 1) と、TYLCV の量が多い部分が明瞭な紫色の点として検出される (図 2)。無病徴感染したトマト黄化葉巻病耐病性品種においても検出が可能である。
- 3) 抗血清を精製して得られた抗 TYLCV-CP 抗体を用いて、トマト葉抽出液を 96 穴イムノプレート上で反応させる ELISA 法 (DAS-ELISA) により、TYLCV を目視で検出することができる (図 3)。無病徴感染した耐病性品種においても目視で検出が可能である。
- 4) プレートリーダーで吸光度を測定する場合、S/N 比 (検定葉の吸光度/健全葉の吸光度) が 2.5 倍以上のものを TYLCV 陽性と判断する (図 3)。

3. 成果の活用面・留意点

- 1) 濾紙へのトマト葉液の転写は、現地で行うことが可能である。
- 2) 転写した濾紙は、冷蔵により約 6 か月間の保存が可能である。
- 3) 植物試料は、生長点付近の新鮮な葉を用いる。特に耐病性品種では TYLCV 蓄積量が少ないため、古い葉を用いると検出できない場合がある。
- 4) DAS-ELISA で検出する場合、感受性品種では 37°C で 30 分程度発色させると十分に目視で判定可能であるが、耐病性品種の検定で目視で判定する場合は、反応に時間がかかるため 1 晩発色させる。
- 5) TYLCV の系統 (イスラエル系統、マイルド系統) を識別するためには、PCR 法による検定を行う必要がある。
- 6) 本検定は、農業改良普及センターや病害虫防除所等で実施可能であるが、使用する試薬等は園芸研究所で調整したものを使用する。

4. 具体的データ

- ① 濾紙でトマトの葉をはさみ、上からハンマーで叩いてトマト葉液を濾紙に転写する。
- ② 転写後の濾紙を風乾する。風乾した濾紙は冷蔵保存可能（6 か月は保存可能）。
- ③ TBS-TX (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl [pH 7.5], 1% Triton X-100)で緑色の色素が抜けるまで洗浄する。
- ④ 5% スキムミルク入り TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl [pH 7.5])で 5,000 倍に希釈した抗血清と 2 時間反応させる（または、4℃で一晩反応させる）。
- ⑤ TBS-TX で洗浄後、2% スキムミルク入り TBS で 1.2 μg/ml に希釈したアルカリホスファターゼ (ALP) 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体と 1 時間反応させ、TBS-TX で洗浄する。
- ⑥ ALP 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ [pH9.5]) で洗浄し、発色液 (0.033% NBT + 0.017% BCIP 入り ALP 緩衝液) を濾紙上加え、暗所で紫色を呈するまで反応させる。
- ⑦ 水道水により反応を停止し、風乾する。 注) 特に表記がない限り、室温で行う。

図 1 濾紙上における TYLCV の検出方法

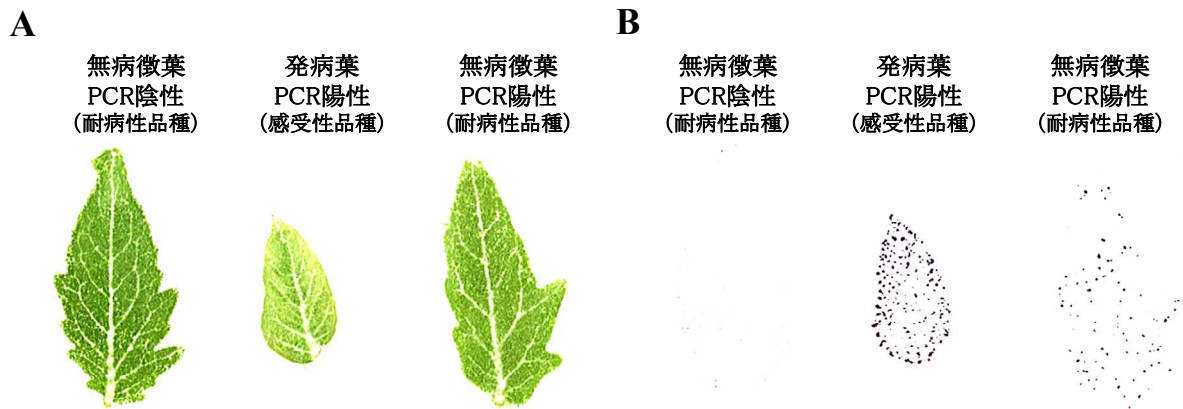


図 2 濾紙上における TYLCV の検出

A. 濾紙への転写後、B. 抗原抗体反応及び発色後 注) 紫色の点が TYLCV を示す。

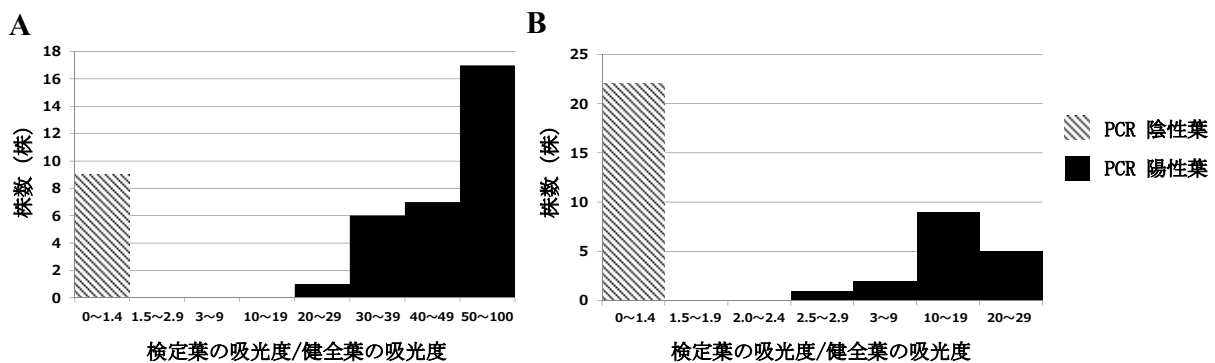


図 3 DAS-ELISA による TYLCV の検出

A. 感受性品種における S/N 比 (検定葉の吸光度/健全葉の吸光度)、B. 耐病性品種における S/N 比 注) 葉重量の 10 倍量の PBS-T でトマト葉を抽出した。

5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

非宿主合成系によるトマトウイルス病の高精度な簡易診断技術の開発・平成 26~29 年度
・病虫研究室