

試験研究成果普及情報

部門	花植木	対象	研究
課題名：遺伝子診断によるキク茎えそウイルスの簡易診断法の開発			
〔要約〕プリントキャプチャーRT-PCR法は、実験操作が非常に簡便で従来法に比較して約3分の1の20分程度でRNA抽出ができる。これにより、病斑部を用いて、キク茎えそウイルス（CSNV）を簡易迅速に遺伝子診断できる。			
キーワード キク、茎えそ病、遺伝子診断、病害診断、プリントキャプチャーRT-PCR法			
実施機関名	主 査 農林総合研究センター生物工学研究室 協力機関 農林総合研究センター病理昆虫研究室、山武農業事務所、 香取農業事務所		
実施期間	2013年度～2015年度		

〔目的及び背景〕

キク、トマト、ピーマン等で発生するCSNVのえそ病斑は傷などの他の原因による変色と区別しにくく、確実な診断法が必要である。遺伝子診断法はウイルスの塩基配列情報等を元に容易に診断体制を整えることが出来、高感度であるという利点がある。しかし、現行の方法は操作が煩雑で時間がかかること、CSNVがRNAウイルスであることからゲノムRNAが分解されやすく操作に特段の注意が必要なこと等が、簡易迅速な診断の障害となっている。そこで、実験操作が簡易なウイルス診断法の開発を行った。

〔成果内容〕

- 1 望月らのプリントキャプチャーRT-PCR法を図1の様に改変し、キクの葉の病斑部を楊枝でつつくことにより、ニトロセルロース膜の小片に汁液を付着させ、市販のRNA抽出試薬に浸漬し加熱することによりRNAを抽出する。得られた液は希釈後すぐにRT-PCR反応に用いることができ、増幅DNA断片を電気泳動により可視化することにより診断できる（図1、表1）。
- 2 キクの病斑組織を用いてプリントキャプチャーRT-PCR法と血清診断法の一つであるDIBA法とのCSNVの検出感度の比較を行ったところ、DIBA法が病斑磨砕液の 10^3 倍希釈まで検出できたのに対して、プリントキャプチャーRT-PCR法では 10^5 倍希釈でも検出でき100倍以上高感度である（表2）。また、現地から採集したキク植物の病斑と考えられる斑点をこれらの方法で調査したところ、プリントキャプチャーRT-PCR法でのみ検出される場合があり、高感度であることが裏付けられた（表3）。
- 3 RNA抽出操作に要する時間は8サンプルの場合には20分程度で終了し、市販のRNA抽出キットを用いる場合の約3分の1に短縮される。RNA抽出に要するコストは1サンプルあたり約40円であり、市販のキットの約600円の1割以下に低減される（表4）。実験操作もキットを用いる場合に比べて単純なため誤操作の危険性が低く、CSNVを簡易迅速に診断できる。

[留意事項]

キュウリ緑斑モザイクウイルスなどの他の RNA ウイルスの検出も可能である。

[普及対象地域]

病害虫診断担当者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

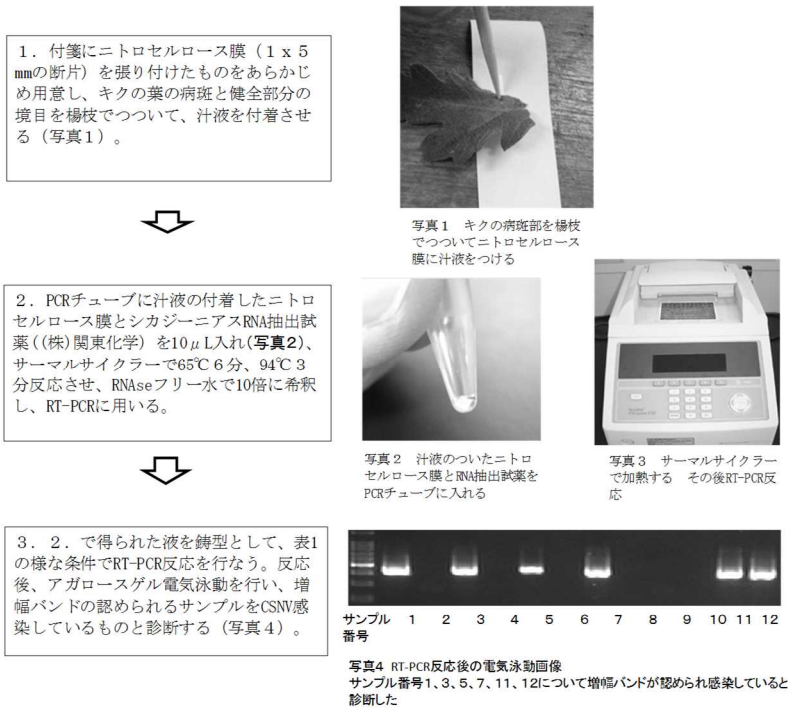


図1 プリントキャプチャーRT-PCR法のフロー図

表1 RT-PCR反応の実験条件

使用プライマー*		反応液の組成**	
名前	塩基配列	添加量 (μ L)	
CSNV538c	GCCTGAACTAGAGGGTGAGA	PrimeScript 1 step Enzyme Mix	0.48
CSNV81v	CGGAATACTCTGCACGACTT	2 x 1 step buffer	6
*Plant disease 91(4): 468		20 μ M CSNV538c プライマー	0.24
		20 μ M CSNV81v プライマー	0.24
サーマルサイクラーとして		RNase Free dH2O	4
GeneAmp PCR system9700 ((株) アプライドバイオシステムズジャパン) を用いた		RNA液	1
		**使用した試薬キットは、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2、(株)タカラバイオ	
反応条件			
step	温度	時間	
1	50°C	30分	
2	94°C	30秒	(ステップ2~4
3	55°C	30秒	を35サイクル)
4	72°C	60秒	

表2 感染キク植物を用いたプリントキャプチャーRT-PCR法によるCSNVの検出とDIBA法との検出感度の比較

	磨砕液希釈倍数 ¹⁾				
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
DIBA法	+	+	+	-	-
プリントキャプチャーRT-PCR法	+	+	+	+	+

注1) 検出反応に用いた病斑磨砕液の希釈した倍数を示した

2) +は陽性反応が認められたことを、-は認められなかったことを示す

表3 キク植物からのDIBA法及びPC-RT-PCR法によるCSNVの検出

	検出病斑数	供試病斑数 [*]	検出率 (%)
DIBA法	46	57	81
プリントキャプチャーRT-PCR法	48	57	84

注^{*}) 現地から採集したキク植物を肉眼観察し、えそ病斑と考えられる斑点を供試した

表4 プリントキャプチャーRT-PCR法、市販キットを用いたRT-PCR法及びDIBA法の作業時間、経費、検出感度の比較

方法	作業時間 ¹⁾		経費(円) ²⁾		検出感度 ³⁾
	RNA抽出	全体	RNA抽出	全体	
プリントキャプチャーRT-PCR法	20分	3.5時間	40	200	
市販キット ⁴⁾	1時間	4時間	600	760	ほぼ同等 ⁵⁾
DIBA法	-	4.5時間	-	20	1/100以下

注1) 8サンプルあたりのおよその作業時間を示した

「RNA抽出」はRNA抽出操作に要する時間、「全体」はRT-PCR及び電気泳動などを含んだ検出に要する全作業時間を示した

2) 1サンプルにかかるおよその経費を示した

「RNA抽出」はRNA抽出操作に要する経費、「全体」はRT-PCRなどを含んだ検出に要する全経費を示した

3) プリントキャプチャーRT-PCR法に対する検出感度

4) (株)キワゲンのRNeasy Plant Mini Kitの場合

5) 植物組織重量当たりの感度で比較した場合

[発表及び関連文献]

- 1 望月知史ら、プリントキャプチャーRT-PCR法によるヤマノイモモザイクウイルスの検出、日植病報 79、2012年
- 2 深見正信ら、プリントキャプチャーRT-PCR法によるキク茎えそウイルス(CSNV)の検出、関東東山病害虫研究会報第61集、2014年
- 3 平成28年度試験研究成果発表会(花植木部門Ⅱ)

[その他]

平成24年度試験研究要望課題(提起機関:山武農業事務所)