

[成果情報名]等温遺伝子増幅法(ICAN 法)を用いたキクわい化病の簡便な検定法

[要約]つまようじを用いて試料を採取し、等温遺伝子増幅法(ICAN 法)の逆転写反応および遺伝子増幅反応に恒温器を用いることで、キクわい化病を簡易な実験設備でも検定することができる。本検定法に要する時間は、10 検体当たりおよそ 1 時間 30 分である。

[キーワード]キクわい化病、ICAN 法、つまようじ、恒温器

[担当]岩手農研・環境部

[連絡先]電話 0197-68-4424

[区分]東北農業・基盤技術(病害)

[分類]技術・参考

[背景・ねらい]

キクわい化病の診断は、病原のキクわい化ウイルス(CSVd)を RT-PCR 法や RT-LAMP 法で検出するため、特別な実験設備を有する試験研究機関等でしか実施できなかった。近年、等温遺伝子増幅法(ICAN 法)によるキクわい化病の検出キットが販売されていることから、これを用いることで普及センター等でも診断できる簡便な検定手順を確立する。

[成果の内容・特徴]

1. 本検定法の特徴は、つまようじを用いて試料を採取すること、試薬の調合数が少なくその取扱いも容易な ICAN 法を用いること、並びに ICAN 法の逆転写反応および遺伝子増幅反応には恒温器が利用可能であり、普及センター等の簡易な実験設備でも本病の検定を実施できることである。
2. 検定に用いるキク葉は新葉を用いる。葉を二つ折りにした後、つまようじを用いて 3 回刺し、その先端に汁液が付着したものを試料とする。汁液の付着したつまようじの先端部を反応液におよそ 30 秒間浸漬する。その後、所定の手順により逆転写反応と遺伝子増幅反応を行い、UV 照射下で保毒の有無を確認する(表 1、図 1、図 2)。
3. わい化症状を呈しているキク葉を供試して、つまようじで採取した試料を ICAN 法に供すると、定法のスピнкаラム抽出法で精製した RNA を RT-PCR 法に供した場合と同等に CSVd を検出することができる(表 2)。
4. 本検定法に要する時間は、10 検体当たりおよそ 1 時間 30 分である(図 1)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本検定法を農業改良普及センターや種苗供給業者が導入することで、速やかな防除指導や健全種苗の供給が可能となる。
2. 検定に必要な設備は、恒温器(45 - 55 に設定できるもの)、マイクロピペット、冷蔵庫、小型簡易遠心器および UV ランプである。
3. 検出キットは、タカラバイオ(株)からカスタム製品(Cycleave ICAN キクわい化病原因ウイルス(CSVd)検出キット)として販売されている。
4. コンタミネーションを避けるため、試料の調製は別の部屋で実施する。また、検出後のサンプルチューブは、蓋を開けずに産業廃棄物として処分する。
5. つまようじによる試料採取法は、「「つまようじ」で採取した RNA によるキクのウイルス、ウイルス病の診断」(平成 17 年度研究成果情報)を参考とした。

[具体的データ]

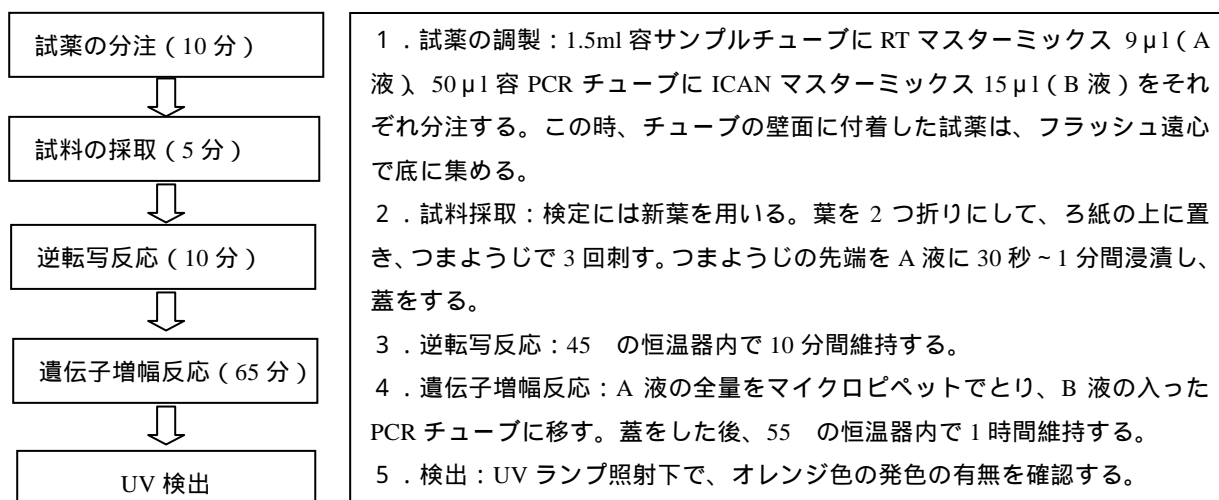


図 1 つまようじ採取試料を用いた ICAN 法による検定手順と 10 検体当たりの所要時間の目安

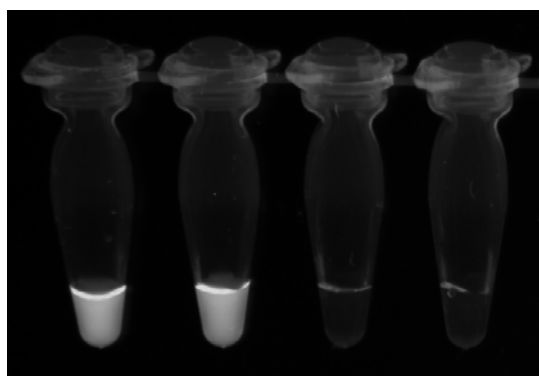


図 2 つまようじ採取試料を用いた ICAN 法による保毒キク葉からの CSVd の検出 UV ランプ照射下でオレンジ色に発色する。

表 1 つまようじによる試料採取におけるキク葉の葉位の影響

葉位置	検出数 / 供試数
上位葉 (新葉)	7/7
下位葉 (古葉)	4/7

方法) 罹病株 (8 月咲き品種) を供試し、9 月下旬にサンプリングし、ICAN 法に供試した。

表 2 ICAN 法に供試した試料の種類と検出頻度

検定方法	試料 ¹⁾	検出数 / 供試数
ICAN 法	つまようじの浸漬	8/8
	茎切片の浸出液 (1 μ l)	4/8
	RNA 抽出液 (1 μ l)	8/8
RT-PCR 法	"	8/8

1) 括弧内はサンプル液量

方法) 罹病株 (9 月咲き品種) を 9 月下旬に台刈りし、その後に伸長した茎葉を 11 月上旬にサンプリングした。

[その他]

研究課題名: 革新技术による病原検出診断手法の開発と実用化

予算区分: 県単

研究期間: 1995 ~ 2008 年度

研究担当者: 猫塚修一、岩館康哉