

カンキツウイルス検定における ELISA 法の簡易化

平島敬太・堀江裕一郎・鶴 丈和 (福岡県農業総合試験場)

Keita HIRASHIMA, Yuichiro HORIE and Takekazu TSURU : Simplification of ELISA Method for Indicating Citrus Viruses

福岡県田主丸町の果樹種苗産地では、ウイルス病汚染防止に対する関心が高く、カンキツウイルスの保毒検定の要望が極めて多い。このため大量検定法として優れているELISA法について、岩崎¹⁾らがキュウリモザイクウイルスの検定に試みた簡易法の、カンキツウイルス (CTV・SDV・CiMV) 保毒検定への適用を検討したのでその概要を報告する。

1. 試験方法

常法によりコーティングを行ったプレートを -75°C で保存し、2週間ごとに取り出して使用した。摩砕サンプル汁を2,000・4,000・8,000rpm/10minで遠心分離して得た上清を段階希釈して使用した。これをプレートへ分注後、直ちに酵素結合抗体液を重ねて分注し、 4°C ・ 30°C ・ 38°C の条件で静置した。これに発色基質を注ぎ、室温 (25°C) と 38°C での吸光度 (405nm) を測定し、反応速度を比較した。抗血清は、市販のCTV・SDV抗血清を使用した。

2. 結果及び考察

1) コーティング済みプレートを凍結保存した場合と、しない場合の比較の結果、吸光値の差は認められず、その後8週間まで、吸光値の低下は認められなかった。

2) 摩砕サンプルの遠心分離と吸光値の関係は、8,000・4,000・2,000rpmの順に高く、また酵素結合抗体液分注後の静置時間が長くなるほど、その差は大きかった。これは、夾雑物の沈澱による抗原のコーティング抗体吸着阻害によると思われる。

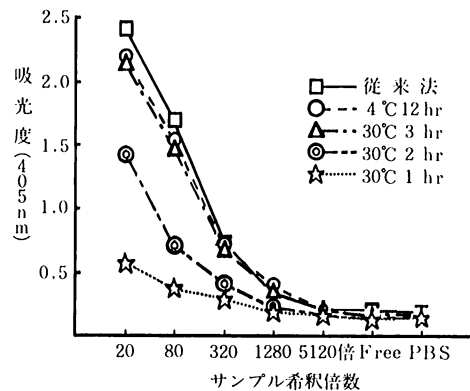
3) サンプル汁と酵素結合抗体液を同時に重ねて分注した場合の静置温度と時間との関係は、 4°C 条件では12時間以上、 30°C の場合は3時間以上静置することで十分な吸光値が得られた (第1図)。 38°C での吸光値は時間に関係なく不十分であった。非特異発色は、温度が高いほど、また時間が長いほど高かった。これは、乾燥により酵素結合抗体がプレート壁面へ固着したためと思われる。

4) 陽性サンプルのリン酸緩衝液希釈による検出限界は、5月上旬採取新梢 (SDV) で分光光度計判定の場合は、2,560倍まで、肉眼判定の場合は1,280倍程度までで、従来法との差は認められなかった (第1図)。

5) 発色基質分注後の温度条件と発色反応の関係は、室温 (25°C) に比較して、 38°C における発色反応の進行が15分ほど早かった。

6) 検定に要する時間を従来法に比較すると、酵素結

合抗体液分注後の静置を 30°C / 3時間の条件で行うと、20時間の短縮が可能であった。また 4°C / 12時間の条件で行うと、11時間の短縮が可能であった (第2図)。



第1図 抗原抗体反応温度時間と希釈限界

従来法	簡易化法
1. 抗体のコーティング	1. サンプルの調整
2. サンプルの調整	2. 保存プレートへのサンプル及び酵素結合抗体の分注 30°C 3hr以上又は 4°C 12hr以上
3. サンプルの分注 4°C 18hr	3. 発色基質分注
4. 酵素結合抗体分注 27°C 4hr	
5. 発色基質分注	
所要時間: 31 hr	所要時間: 11または20 hr

第2図 ELISA 法手順の比較

引用文献

- 1) 岩崎真人・山本孝稀・勝部利弘・稲葉忠興: 簡易化した酵素結合抗体法 (ELISA) によるキュウリモザイク病の診断. 四国植防, 22, 57~62, 1987.