

カンキツタターリーフウイルス検出のための ELISA の改良

草野成夫・下村克己 (福岡県農業総合試験場果樹苗木分場)

Nario KUSANO and Katsumi SHIMOMURA : Improvement of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Citrus Tatter Leaf Virus

カンキツタターリーフウイルス (citrus tatter leaf virus, CTLV) は、わが国のカンキツ栽培地域や苗木生産地で発生する接ぎ木部異常症の病原として知られている。近年、カンキツ品種の多様化や高接ぎによる品種更新に伴い、その被害は増加傾向にあり、苗木生産時等の採種母樹の保毒の有無の検定が重要となっている。従来、CTLV は接ぎ木接種や汁液接種による検定が行われてきたが、温度等の環境条件や検定植物の生育ステージによって病徴の発現にやや安定性を欠くこと、多量の検定を迅速に処理できない等の問題があった。

1992年に日本植物防疫協会研究所より CTLV の抗血清の配布が開始されたので、ELISA における検出感度向上法について検討したので報告する。

1. 材料及び方法

供試サンプルは、農林水産省門司植物防疫所から導入した CTLV (名称: BD44) 保毒の温州ミカン“興津早生”の新梢を利用した。

抗血清は、日本植物防疫協会研究所より分譲された ELISA 用抗 CTLV 血清を所定の濃度で用いた。

緩衝液の種類は 0.15MNaCl / 加用 0.1Mph7.2リン酸緩衝液 (PBS), 0.1%チオグリコール酸加用 PBS (PBS-T), 0.1Mクエン酸緩衝液 (CB) 及び 0.1%チオグリコール酸加用 CB (CB-T) の 4 種類とした。

サンプル液と酵素結合抗体液の同時分注後の静置温度と時間は、4°C、37°Cの温度条件下で、1~16時間静置した。

検定時のサンプルの状態は、発芽後10日、30日、50日、70日後の葉及び旧葉について、生葉と凍結の状態でウイルス検出を行った。

サンプル磨砕液、酵素結合抗体液の同時分注のためには、サンプル磨砕液をマイクロプレート上で100 μ / ウェルで段階希釈し、その後直ちに酵素結合抗体液を100 μ / ウェル分注した。

サンプルへの細胞壁分解酵素と抽出時間は、セルラーゼ (オノズカ R-10)、マセロザイム (オノズカ R-10)、ペクトリアーゼ (Y-23) を利用し、その各々の添加濃度を無添加、0.5%、1%、2%の4条件とし、それぞれ組合せて従来の磨砕法と比較した。また、酵素抽出時間は、室温条件下 (22~25°C) で 0.5、1.0、2.0 時間とした。

2. 結果及び考察

試験1: 4種類 of 緩衝液では、PBS及びPBS-T に比べてCB及びCB-Tが良く、特にCB-Tでは従来法で2,400倍、サンプル汁と酵素結合抗体液の同時分注

では7,000倍のサンプル希釈まで CTLV の保毒の判定が可能であった。

試験2: 酵素結合抗体液分注後の静置温度、時間について比較検討したところ、37°Cの1~2時間静置では、サンプル液が30倍希釈まで判定可能であったが、4時間以上になると10倍希釈のみ判定可能であった。

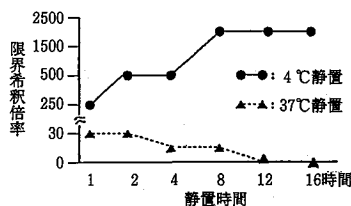
しかし、4°Cの静置では、1時間でサンプル液の限界希釈率270倍、2時間で810倍、4~16時間以上で810~2,430倍となり、4時間以上の静置で最大限の検出感度を引き出すことができた (第1図)。

試験3: サンプルを凍結すると、ウイルスの検出が低下した。そこで、改良法としてサンプル液をウェルの中に分注後、すぐに酵素結合抗体液を重ねる同時分注を検討したところ、各希釈倍率で吸光度が高くなり、サンプルの2,430倍希釈まで検出可能となった。

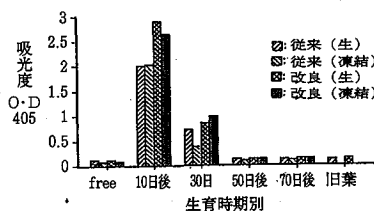
試験4: 生育ステージ別では、発芽後の新梢が若いほどウイルス検出が容易であったが、発芽後50日、70日葉及び旧葉では検出できなかった。

しかし、一度サンプルを凍結した状態で検定を行うと、従来法では、30日目新梢でも検出感度が半分程度に低下する。数千点に及び検定ではサンプルの凍結が必須になるため、同時分注を行うことにより検出感度の低下を防止できると考えられた (第2図)。

試験5: 酵素処理によるウイルス抽出の改良を検討したが、酵素の濃度が高くなるにしたがって、吸光度が低くなった。しかし、凍結サンプルをPBSの緩衝液に投入して、1時間後の抽出するとサンプル希釈率で90~270倍まで判定が可能であった。



第1図 静置温度と静置時間



第2図 発芽後の新梢ステージと吸光度