

ビオチン・アビジンシステムを用いた ELISA による温州萎縮ウイルス (SDV) およびカンキツタターリーフウイルス (CTLV) の検出

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 :

Detection of Satsuma Dwarf Virus and Citrus Tatter Leaf Virus by ELISA using with the Biotin-Avidin System

福岡県では、健全母樹の確保を目的として、苗木およびカンキツ産地の成木を対象に温州萎縮ウイルス (SDV) およびカンキツタターリーフウイルス (CTLV) の、ELISA による検査を実施している。しかし、検査用のサンプルは、発芽後の柔らかい新梢を持ち込むように指導しているが、すでに葉が硬化したものや採取後持ち込まれるまでの管理が悪いもの等、必ずしも最適でない場合が多い。そこで、ELISA の感度向上のために、ビオチン化抗体およびアルカリフォスファターゼ標識アビジンを利用する方法を検討した。

1. 材料および方法

SDV 抗体は 1989 年に当試験場で作成した抗血清の IgG 画分を、CTLV 抗体は日本植物防疫協会研究所 (日植防) より販売されているコーティング抗体を用いた。また、アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗体の作成方法としては、従来、研究室レベルで使用されているグルタルアルデヒド法およびビオチン標識法を用いた。ビオチン標識抗体作成法は、グレース社のマイクロコン 30 で限外ろ過法により濃縮を行い、N-hydroxysuccinimidobiochin (BNHS) を加えて 1 時間室温で静置した後、PBS 中で 3 回解析し、腐敗防止としてアジ化ナトリウムを添加して標品とした。標識抗体の利用濃度は、段階希釈により各ウイルスを保毒した標準サンプルの検出限界の 1.5 倍濃度を最適濃度とした。

2. 結果および考察

グルタルアルデヒド法による ALP 標識 SDV 抗体は、室内の同一条件下で 6 回作成したが、作成ごとに力価が異なり、検出感度も低かった (第 1 図)。

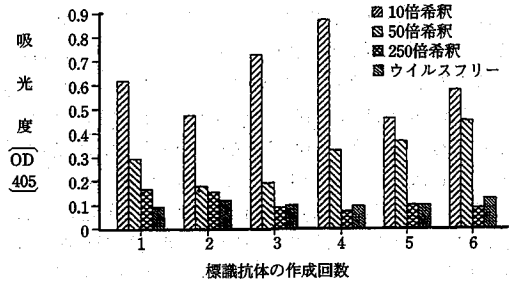
次に、ビオチン標識した抗体では、日植防より市販されている SDV および CTLV 抗体と比較して、発色が強く、検出感度もかなり高かった (第 2, 3 図)。

以上のことから、ビオチン・アビジンシステム利用による検出感度は、CTLV では SDV に比べてやや劣ったものの共に ALP 直接標識抗体利用より高くなった。

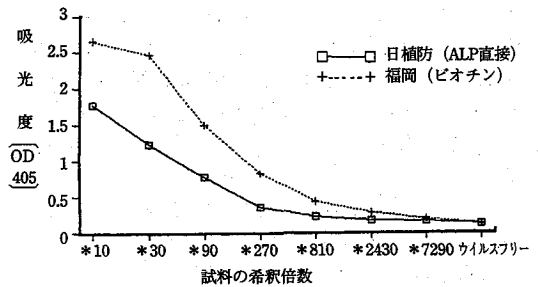
また、従来の ALP を抗体に直接標識する方法と比較して、ロットごとの力価の差は少なくなり、保存性も向上した。ビオチン・アビジンシステム利用による本方法では、ウイルス濃度が低く検定を行うのに不適なサンプルや穂木からも直接検出が可能であり、抗血清の吸取操作も不必要となった。さらに、接ぎ木直前の穂木でのウイルス検査が可能になったことは、保毒穂木を分からないまま苗木まで育成するといった無駄がなくなり、苗木生産上の経済的側面からも有益と考えられる。

引用文献

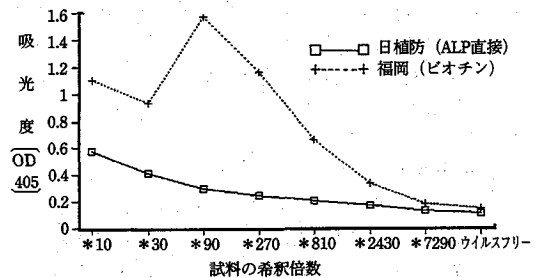
- 1) 脇本 哲: 植物病原性微生物研究法 279 - 280 p. ソフトサイエンス社, 1993.



第 1 図 グルタルアルデヒド法による ALP の標識 SDV 抗体の検出感度



第 2 図 抗体・標識の種類と検出感度 (SDV)



第 3 図 抗体・標識の種類と検出感度 (CTLV)