

カンキツグリーニング病診断技術の改良 (1) FTA カードの利用

大貫正俊・河辺邦正・花田 薫¹⁾・Wanphen Sritongchai²⁾
 (国際農林水産業研究センター沖縄支所・¹⁾農業生物資源研究所・²⁾タイ農業局)

Masatoshi Onuki, Kunimasa Kawabe, Kaoru Hanada and Wanphen Sritongchai :
 Improvement for the Diagnosis of Citrus Huanglongbing (1) Utilization of FTA Card

現在、カンキツグリーニング病の診断には主に polymerase chain reaction (PCR) 法が用いられているが、東南アジア等の発生現地では、検定試料からの核酸抽出の手間や PCR に掛かるコスト等が制限要因となり、実施可能機関に限られるなどの問題がある。そこで、特殊なる紙 (FTA カード) 上に検定試料の汁液を滴下して風乾後郵送し、遠隔地において PCR 検定を実施するシステムについて検討した。

1. 材料および方法

1) FTA カードを用いた試料調製：タイ国の複数地域からグリーニング病に感染した黄化カンキツ葉を採集し、中肋を切り取り、10倍量の PBS (0.137M NaCl, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 8.10mM Na₂HPO₄・12H₂O, pH7.4) を加えて乳鉢中で磨砕した。この磨砕汁液50 μ lを FTA カード (ワットマン) に滴下し、風乾後日本に郵送した。試料到着後、FTA カードは4 $^{\circ}$ Cに保存した。試料からの病原検出は PCR により定期的に実施した。試料の載った FTA カードをカミソリ刃で1~2 mm 四方の大きさに切り出し (第1図)、FTA カード洗浄液 (ワットマン) にて2回洗浄し、次いで TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で2回洗浄した。この試料片を1時間風乾し PCR 検定に供試した。

2) PCR : PCR には *Ex Taq* (宝酒造) を用い、塩類濃度は添付の説明書に従った。プライマーは Jagoueix et al.¹⁾ が設計した OI1および OI2C を用い、終濃度を0.4 μ M とした。PCR 反応条件は95 $^{\circ}$ C, 2分間を1サイクル, (95 $^{\circ}$ C, 40秒間 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 1分間 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1分間) を40サイクル, 最後に72 $^{\circ}$ C, 10分間処理し、4 $^{\circ}$ Cに保持した。PCR 反応液25 μ lのうち、8 μ lを1%アガロースゲル電気泳動に掛け、臭化エチジウム染色により特異産物の有無を調べた。

2. 結果および考察

1) PCR 検定：タイ国で調製した7試料を1か月ごとに検定したところ、少なくとも4か月後までは FTA カード上の試料からはほぼ安定して PCR 特異産物が得られた (第2図)。なお、試料⑥は PCR 産物の量が他の試料に比べて少なくなっていたが、この試料はタイの現地において Mild strain と呼ばれているものであり、感染葉中の病原体濃度が低いことが FTA カードの検定結果から推測された。

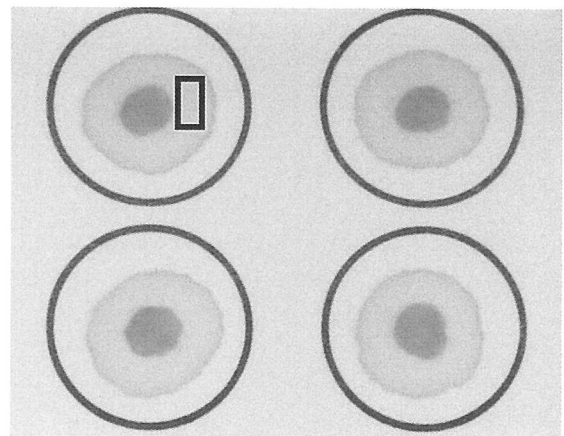
通常の PCR では核酸の抽出操作を必要とするが、FTA カードを用いる場合は、簡単な緩衝液による磨砕汁液が得られれば実験可能である。また、FTA カード上の核酸は乾燥状態であれば長期間安定であるため遠隔地への郵送にも適している。これらの点から FTA カードは遠隔地においてカンキツグリーニング病の検定を実施

する場合の強力な研究ツールになると考えられる。実際の PCR 検定にはカード試料の小片を用いるだけで良いため、同一試料を繰り返して実験できる利点もある。

FTA カードは核酸試料の安定化のため、特殊なる紙を用い、何らかの表面処理が施されていると考えられる。このため、FTA カードおよび専用の洗浄液はやや高価である。より安価に同様な実験結果を得るため、一般に市販されているろ紙を用いる試みも今後検討する価値があると思われる。

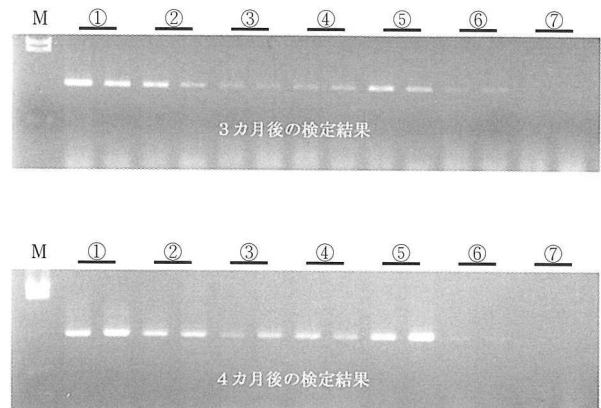
引用文献

- 1) JAGOEIX, S., BOVE, J.-M. and GARNIER, M.,
Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 379-386, 1994.



第1図 FTA カードへの試料滴下

- 注) a) 試料滴下用の黒円の直径は25mm。
 b) 黒四角枠はカード試料片の切り出しを概念的に示したもの。



第2図 FTA カードへの試料滴下後、3か月および4か月経過時点での PCR 検定結果

- 注) M: DNA 分子量マーカー, 試料①~⑥は感染株由来, ⑦は健全株由来。