

平成 20 年度 岩手県農業研究センター試験研究成果書

区分	指導	題名	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] キクわい化病の検定法において、つまようじで調製した試料をCycleave ICAN CSVd Detection Kit (ICAN法) に供することで、特別な実験設備を必要とすることなく検定することができる。本法の検出精度は従来の検定法 (RT-PCR法) と同等であり、10検体当たりおよそ1時間30分で検定することができる。					
キーワード	キク	わい化病	ICAN 法	環境部	病理昆虫研究室

1 背景とねらい

キクわい化病は、草丈の伸長抑制や葉の小型化を引き起こす病害であり、芽かき作業等を通じて汁液伝染するため、早期診断に基づき罹病株を抜き取る必要がある。病原ウイルス (CSVd) の検出は、従来の検定法 (RT-PCR 法等) では、特別な実験機器を必要とするため試験研究機関でしか実施できなかったが、等温遺伝子増幅法 (ICAN 法) による診断試薬が販売され (図 1)、普及センター等の実験設備でも実施できると見込まれる。そこで、その実用性を評価するとともに、より簡便な検定手順を検討する。

2 成果の内容

- (1) キクの葉からつまようじでサンプリングした試料を用い (以下、つまようじ法) Cycleave ICAN CSVd Detection Kit (タカラバイオ (株) 製、以下、ICAN 法) に供することで、特別な実験設備を必要とすることなく検定することができる。(図 1、図 2、表 3)
- (2) つまようじ法：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。(表 1)
- (3) つまようじで採取した試料を用いた ICAN 法による検定精度は、RNA 抽出試料を用いた従来の検定法 (RT-PCR 法) と同等である。(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 2、表 3)

3 成果活用上の留意事項

- (1) つまようじを反応液に所定時間以上浸すと反応液が減少するので、浸漬時間に注意する。
- (2) コンタミネーションを避けるため、図 2 の「試料採取」は別の部屋で実施することが望ましい。また、検出後のサンプルチューブは、蓋を開けずにそのまま産業廃棄物として処分する。
- (3) 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、および UV ランプである。
- (4) 検定に要する費用は、100 検体当たり試薬が 55,000 円、資材 (サンプルチューブ、チップ等) が 2,500 円である。

4 成果の活用方法等

- (1) 適用地帯または対象者等
農業改良普及センター、種苗供給業者
- (2) 期待する活用成果
普及センターでは、速やかな防除指導をすることができる。種苗供給業者では、健全種苗の供給が可能となる。

5 当該事項にかかる試験研究課題

(H17-05)革新技術による病原検出診断手法の開発と実用化

6 研究担当者 猫塚修一

7 参考資料・文献

- (1) 磯野ら (2007) 等温遺伝子増幅法 (ICAN 法) を用いたキク矮化ウイルスの発生圃場調査 (講要) 日植病報 73:225
- (2) 愛知総農試 (2005) 「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 年度関東東海北陸農業研究成果情報

8 試験成績の概要

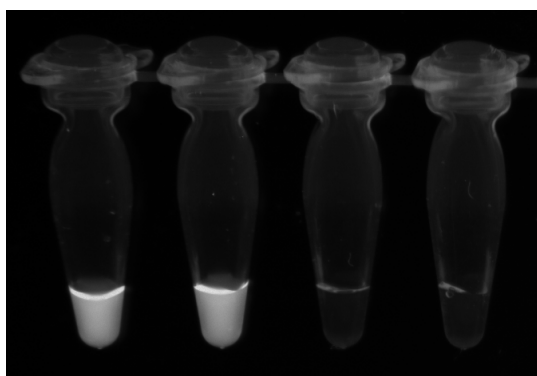


図1 ICAN法による保毒キク葉からのCSVdの検出
UVランプ照射下でオレンジ色に発色する。

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

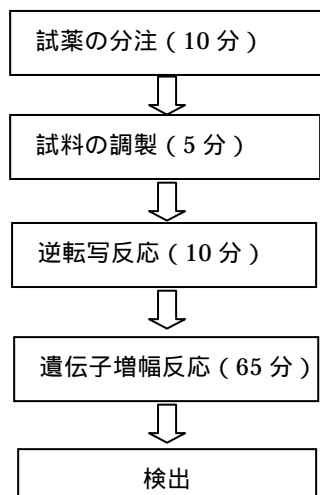
方法) 罹病株 (8月咲き品種) について、9月下旬にサンプリングし、ICAN法に供試した。

表2 ICAN法に供試した試料の種類と検出精度

検定方法	試料	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 (1μl)	4/8
	RNA抽出液 (1μl)	8/8
RT-PCR法	"	8/8

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

摘要) つまようじによる採取試料はRNA抽出試料と同様にICAN法に供することができる。検出精度は従来法 (RT-PCR法) と同等



1. 試薬の調製: 1.5ml容サンプルチューブにRTマスターミックス 9μl (A液)、50μl容PCRチューブにICANマスターミックス 15μl (B液) をそれぞれ分注する。
 2. 試料採取: 検定には新葉を用いる。葉を2つ折りにして、ろ紙の上に置き、つまようじで3回刺す。つまようじの先端をA液に30秒~1分間浸漬し、蓋をする。
 3. 逆転写反応: 45℃の恒温器内で10分間維持する。
 4. 遺伝子増幅反応: A液の全量をマイクロピペットでとり、B液の入ったPCRチューブに移す。蓋をした後、55℃の恒温器内で1時間維持する。
 5. 検出: UVランプ照射下で、オレンジ色の発色の有無を確認する。
- その他 検定は、陽性 (罹病株またはCSVd抽出RNA 1μl) と陰性サンプル (蒸留水 1μl) を含めた対照試験を実施すること。

図2 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

表3 キクわい化病検定におけるICAN法と従来法の比較

項目	ICAN法	従来法	
		RT-PCR法	ハイブリダイゼーション法
10検体の検定に要する時間	1.5時間	6.5時間 ¹⁾	1.5日 ³⁾
大量検定 (コスト)			
検出感度			
概算コスト (1検体、試薬のみ)	550円	300円 ²⁾	42円
特別な実験機器	恒温器 UVランプ	サーマルサイクラー、 電気泳動槽	恒温槽、振とう機、恒温器、 暗室、ポラロイドカメラ等
簡易な実験設備での検定	可	否	否

1) RT-nested PCR (PCRを2回) を実施した場合

2) スピニングによるRNA抽出による場合

3) 普及センターでメンブレン吸着処理し農業研究センターに送付する場合はさらに時間を要する。