

[成果情報名]コムギ縞萎縮病ウイルスの RT-LAMP 法を用いた高感度な検出

[要約]RT-LAMP 法を用いることで、コムギ縞萎縮病ウイルスを高感度に検出できる。この方法は、DAS-ELISA 法と比較し 1,000 倍検出感度が高い。

[キーワード]コムギ、縞萎縮病、ウイルス検出、RT-LAMP 法

[担当]三重科技セ・農業研究部・循環機能開発研究課

[代表連絡先]電話 0598-42-6354

[区分]関東東海北陸農業・関東東海・病害虫（病害）

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

コムギ縞萎縮病は、土壌微生物媒介性のウイルス病害である。コムギの栽培面積の増加とともに、本病害の発生面積も増加し問題となっている。現在、コムギ縞萎縮病ウイルスの検出には、DAS-ELISA 法や RT-PCR 法による検出法が開発されているが、より簡易に短時間で検出できるように、RT-LAMP 法による検出法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. RT-LAMP 反応は、増幅対象領域をはさむ 6 ヶ所の塩基配列をもとに設計した 4 種類のプライマーセット(表 1)、および RNA 増幅試薬キット（栄研化学株式会社）を用いる。
2. RT-LAMP 法は、コムギ葉 0.04 g (約 20mm×5mm)を、緩衝液(NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄・12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g、DW 1000ml、Tween20 0.5ml、pH7.4)100 μl で磨砕後、緩衝液 700 μl 追加（原体×20）したものをそのまま反応に用いることができるため、コムギから遺伝子の抽出・精製を行う必要がなく PCR 法より簡易である。
3. RT-LAMP 反応により遺伝子が増幅すると、蛍光・目視検出試薬により蛍光発色するので、60 分後にチューブを目視するだけで判定できる（図 1）。
4. RT-LAMP 法の検出感度は、DAS-ELISA 法と比較し 1,000 倍高い（図 2）。
5. 6 葉期から出穂期頃に採取したコムギ葉 95 検体（13 市町、10 品種）の最上位葉から第 2 葉または止め葉を用いて、DAS-ELISA 法と RT-LAMP 法による検出比較を行った結果、DAS-ELISA 法が陽性（43 件）で RT-LAMP 法も陽性になったのは、90.7%(39 件)でほぼ一致する（表 2）。

[成果の活用面・留意点]

1. コムギ縞萎縮病ウイルスを検出することにより、適切な被害軽減対策を講じることができる。
2. RT-LAMP 反応はきわめて検出感度が高いので、試料、反応液の調製に当たってはコンタミネーションの無いように注意する。また、反応液の調製は氷上で行う。
3. RT-LAMP 反応時間は 60 分とする。60 分を超えると非特異反応が起こることがある。
4. RT-LAMP 法を用いた検出を研究目的以外で行う場合は、栄研化学株式会社に対し、RT-LAMP 法に関する特許の実施許諾契約が必要となる。

[具体的データ]

表 1 コムギ縞萎縮病検出用 RT-LAMP プライマーの塩基配列

| プライマー | 塩基配列(5'-3') |
|-------|--|
| F3 | GTACCGCCTCCACTATGGT |
| B3 | CATCATCAACCTTGGTCGCT |
| FIP | ATCGGCTGCCTTCTTGGTGGAGCAGCTGACACACAAACAG |
| BIP | GTCTCCGCAAGGTTGAGGCAGTCATCGCTCGCTTTCTTCA |

プライマーは、コムギ縞萎縮病ウイルスの外被タンパク質遺伝子 (DDBJ accession No. D86634) を基に、RT-LAMP 法プライマー設計支援ソフト「PrimerExplorerVer.4(富士通)」を用いて作製

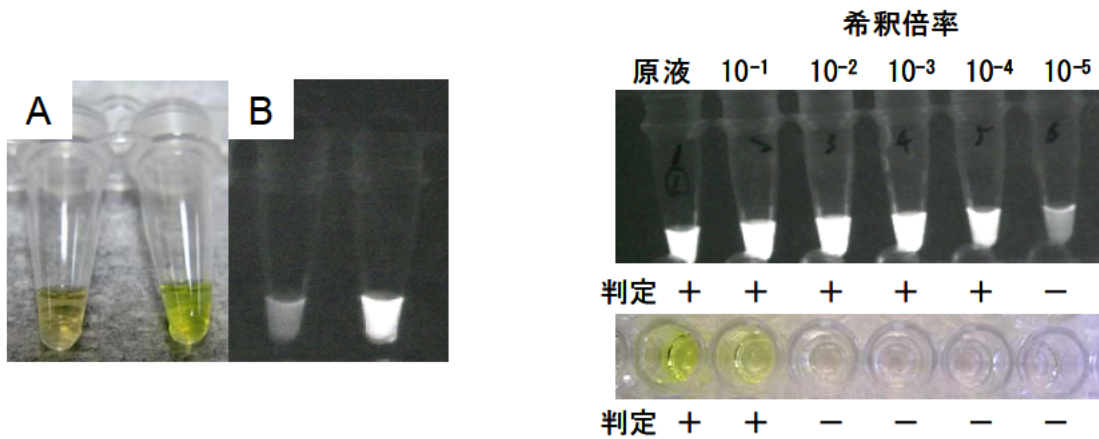


図 1 RT-LAMP 法によるコムギ縞萎縮病ウイルスの検出 (63°C60 分後)

A 可視光下での蛍光発色
B 紫外線下での蛍光発色
いずれも、左が陰性、右が陽性

図 2 RT-LAMP 法と DAS-ELISA 法によるコムギ縞萎縮病ウイルスの検出感度比較

上段は、RT-LAMP 反応物の紫外線下発光
下段は、DAS-ELISA 法による発色反応

表 2 RT-LAMP 法と DAS-ELISA 法によるコムギ縞萎縮病ウイルスの検出比較 (全 95 件)

| DAS-ELISA法 | | RT-LAMP法 | |
|------------|----|----------|----|
| 反応 | 件数 | 反応 | 件数 |
| 陽性 | 43 | 陽性 | 39 |
| | | 陰性 | 4 |
| 陰性 | 52 | 陽性 | 17 |
| | | 陰性 | 35 |

コムギ葉採取時期：2007.2.5～4.19

[その他]

研究課題名：イネ・ムギにおける初中期病害虫の防除対策の確立

予算区分： 県単

研究期間：2005 年～2007 年

研究担当者： 鈴木啓史、黒田克利