

酵素結合抗体法 (ELISA法) によるゆうがおからの キユウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) の検出

1 試験のねらい

ゆうがおには従来からウイルス病の発生が多く、その主な病原ウイルスとしてCGMMVが知られている。しかしこのCGMMVの検出には電子顕微鏡によるウイルス粒子の確認や判別植物での病徴観察等の方法があるが、高価な機器を必要としたり結果の判定に日数がかかるなどの欠点がある。

そこでウイルス病の血清学的診断法の中で、ELISA法は抗原抗体反応を酵素反応に置換し、ウイルス感染の場合は明瞭に黄色に発色するため肉眼でも容易に判定でき、しかも多数の試料を同時に処理可能で検出限界も著しく高いことから一般に普及しつつある。本法を用いてゆうがおからのCGMMVの検出を試みたので、その概要を報告する。

2 試験方法

農水省農研センターの栃原博士より分譲された抗CGMMV—スイカ系血清から、Clark & Adamsの方法により γ —グロブリンを精製・分離し、それを材料にコンジュゲート (酵素標識抗体) を調整した。

ELISA法における適正なコーティング γ —グロブリン及びコンジュゲートの濃度を決定するため、種々の濃度の組合せ試験を行なった。また感染葉の粗汁液及び純化ウイルスからの検出限界についても調査した。ELISA法による病原ウイルスの検出は、Clark & Adamsの方法 (1977年) により一連の操作を行なった (第1図)。

3 試験結果及び考察

コーティング γ —グロブリンの濃度が10、5及び2.5 $\mu\text{g/ml}$ の場合、ELISA値はほぼ同じであり1 $\mu\text{g/ml}$ で若干低下し0.1 $\mu\text{g/ml}$ では大きく低下した。コンジュゲートは各希釈段階とも明瞭な発色が認められたが、1,600倍以上では発色が極端に弱くなった。以上からCGMMVの検出には、 γ —グロブリンの濃度1 $\mu\text{g/ml}$ 、コンジュゲートの希釈は800倍液が適正な組合せと考えられた (第2図)。

粗汁液からの検出限界は、感染葉の10～100倍希釈ではELISA値はほとんど変わらず、200倍希釈以上からしだいに低下したが、20,000倍希釈でも特異的な発色が認められた (第3図)。また純化ウイルスからの検出限界は約30 $\mu\text{g/ml}$ であり、検出感度は極めて鋭敏であった (第4図)。

4 成果の要約

ELISA法によりゆうがおからCGMMVの検出を試みた結果、感染葉を20,000倍希釈してもウイルス感染が確認でき、純化ウイルスからの検出限界も高く、現在のウイルス病診断法の中でも最高水準の検出精度であった。今後、他の病原ウイルスの検出にも応用でき、ウイルス病診断の有効な方法になると思われる。

(担当者 病理昆虫部 中山 喜一)

Add 200 μ l purified γ -globulin in coating buffer to each well

Incubate 2 to 6h at 37 C

Wash

Add 200 μ l test sample in PBS-Tween

Incubate overnight at 6 C

Wash

Add 200 μ l enzyme-labelled γ -globulin in PBS-Tween

Incubate 3 to 4h at 37C

Wash

Add 300 μ l p-nitrophenyl phosphate substrate in diethanolamine buffer

Incubate 0.5 to 2h at room temperature

Stop reaction with 50 μ l 3.0 M-NaOH

Visual assessment

Photometric measurement at 405nm

図-1 ELISA法の操作手順 (Clark & Adams, 1977年)

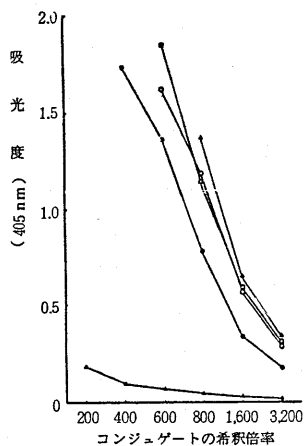


図-2 γ -グロブリン-コンジュゲートの組合せ

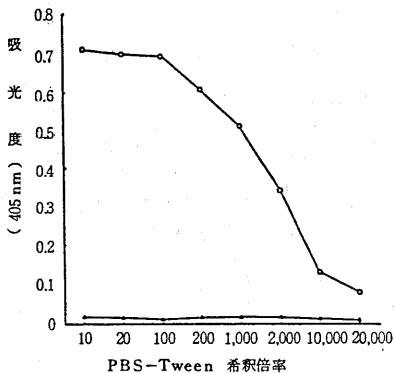


図-3 感染葉からの検出限界

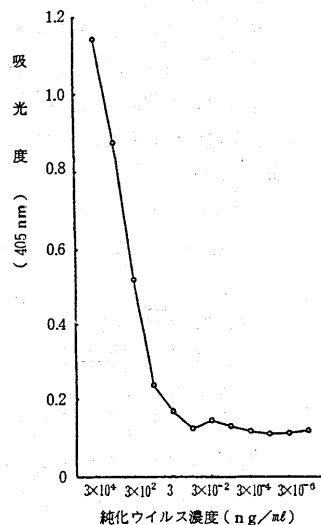


図-4 純化ウイルスからの検出限界

注) 図-2の γ -グロブリン

- : 10 μ g/ml
- ▲—▲ : 5 "
- : 2.5 "
- : 1 "
- △—△ : 0.1 "

図-3の試料

- : L85-1 感染葉
- △—△ : 健全葉

図-4の純化ウイルスは

PBS-Tween 希釈によった。