

LAMP法を用いたトマト退緑ウイルス（ToCV）の簡易迅速検定法			
[要約] 葉脈を3回つまようじでつつく簡易遺伝子抽出法と合わせ、RT-LAMP法を用いることで、トマト退緑ウイルスの感染の有無を迅速に検定することができる。			
茨城県農業総合センター 園芸研究所	令和2年度	成果区分	技術情報

1. 背景・ねらい

タバココナジラミおよびオンシツコナジラミが媒介するトマト退緑ウイルス（*Tomato chlorosis virus* ; ToCV）による病害（トマト黄化病）の防除には、迅速な診断が不可欠である。現在、ToCVの遺伝子診断にはRT-PCR法が活用されているが、より簡易に短時間で診断できるように、RT-LAMP法による検定法を開発する。

2. 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および等温増幅試薬 Isothermal Master Mix-004、逆転写酵素（C社）を用いて、64℃、30分で行う（表1）。
- 2) 本検定では、検定したいトマト葉の葉脈部分をつまようじで3回程度つついたもの（簡易遺伝子抽出法）をそのまま反応に用いることができる。このため、トマトから煩雑な遺伝子の抽出・精製操作を行う必要がなく簡易である。
- 3) RT-LAMP反応により ToCVの遺伝子が増幅すると、蛍光により30分以内にその増幅が判定でき、増幅産物の会合温度は約86℃である（図1、表2）。

3. 成果の活用面・留意点

- 1) 目視と合わせてToCVの診断が迅速に行えるようになり、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い、反応後のチューブの蓋は開けずに廃棄すること。
- 3) 植物試料は、生長点付近の新鮮な葉を用いる。ToCVはウイルス蓄積量が少ないため、古い葉を用いると検出できない場合がある。
- 4) まれに健全葉でも非特異的な増幅が見られることがあるが、増幅曲線および増幅後の会合温度の解析により、陽性反応とは区別することができる。
- 5) 本検定は、蛍光検出のできる等温遺伝子増幅装置やリアルタイムPCR装置のある場所で行うことができる。C社製の蛍光等温遺伝子増幅装置はバッテリー駆動で持ち運び可能なため、野外でも本検定を行うことができる。
- 6) 本検定を希望する際には、園芸研究所が準備した試薬と装置を使用する。

4. 具体的データ

表1 トマト退緑ウイルス (ToCV) のRT-LAMP反応液の組成

Isothermal Master Mix-004	15 μ l
プライマーセット (F3, B3 5 pmol/ μ l, FIP, BIP 20 pmol/ μ l) 注1)	1 μ l
逆転写酵素	0.25 μ l
滅菌蒸留水	8.75 μ l
計	25 μ l

注1) 県内発生のToCVの外被タンパク質の塩基配列を用いて、PrimerExplorer V5 (Fujitsu Limited) を利用して設計した

注2) RT-LAMP反応は、64°Cで30分で行う

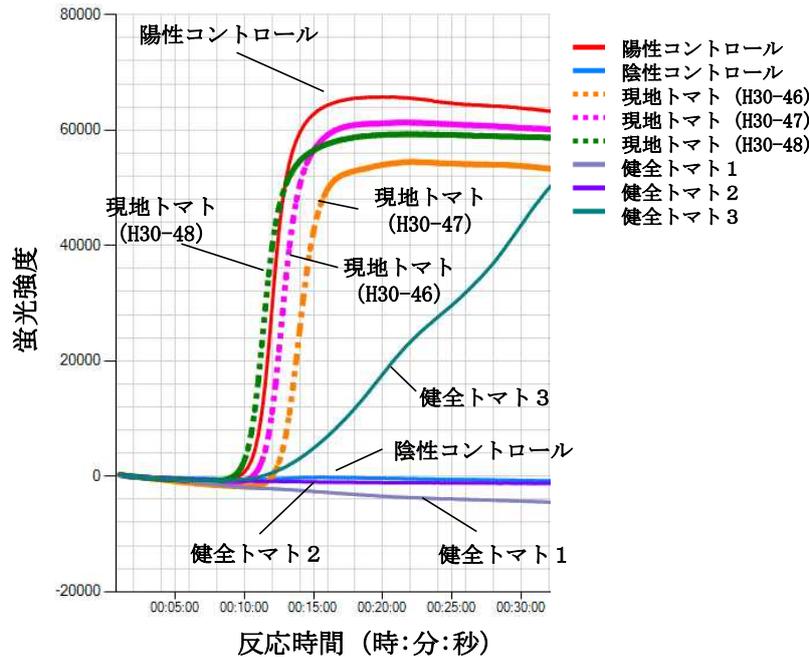


図1 RT-LAMP法による現地診断サンプルからのToCVの検出

陽性コントロール: ToCV感染トマト葉由来精製全RNA 20 ng

陰性コントロール: 健全トマト葉由来精製全RNA 20 ng

現地トマト、健全トマトは検定葉の葉脈部をつまようじで3回つついたもの

表2 RT-LAMP法による現地診断サンプルからのToCVの検出

サンプル		結果 (検出時間 分:秒)	会合温度 (°C)	RT-PCR法による結果
陽性コントロール ¹⁾	RNA	+ (11:45)	86.0	+
陰性コントロール ²⁾	RNA	- (<i>n. d.</i> ⁴⁾)	<i>n. d.</i>	-
現地トマト (H30-46)	葉脈 ³⁾	+ (13:45)	85.7	+
現地トマト (H30-47)	葉脈3	+ (12:30)	85.7	+
現地トマト (H30-48)	葉脈3	+ (11:15)	85.6	+
健全トマト1	葉脈3	- (<i>n. d.</i>)	<i>n. d.</i>	-
健全トマト2	葉脈3	- (<i>n. d.</i>)	<i>n. d.</i>	-
健全トマト3	葉脈3	- (<i>n. d.</i>)	67.6 ⁵⁾	-

注1) ToCV感染トマト葉由来精製全RNA 20 ng

注2) 健全トマト葉由来精製全RNA 20 ng

注3) 葉脈をつまようじで3回つついたものを反応液へ加えた

注4) 検出されなかった

注5) 非特異反応

5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

トマトウイルス診断キットの実用化・平成30~令和2年度・病虫研究室