

# 植物ウイルスの 簡易・迅速診断キット

法政大学 生命科学部 応用植物科学科  
専任講師 鍵和田 聡

令和2年 12月 24日

# 概要

## DAS-ELISA法(免疫学的診断法)

ウイルス診断技術において重要な技術  
固相としてマイクロタイタープレートを用いる

時間と手間がかかる点を改善していくことを目標とする

固相としてビーズを用いたDAS-ELISA法を確立

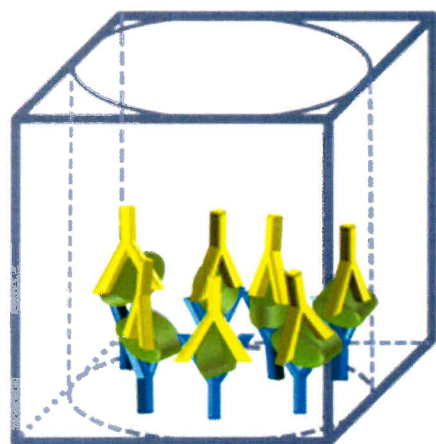
表面積を広く確保することで、インキュベート時間を短縮する

## 研究内容

1. ガラスおよびポリスチレンビーズを用いたDAS-ELISA法の確立
2. ビーズの作製条件、検出条件の検討
3. 感度の検討、従来のDAS-ELISAとの比較
4. 他種ウイルスへの適用

# ビーズを用いたDAS-ELISA法

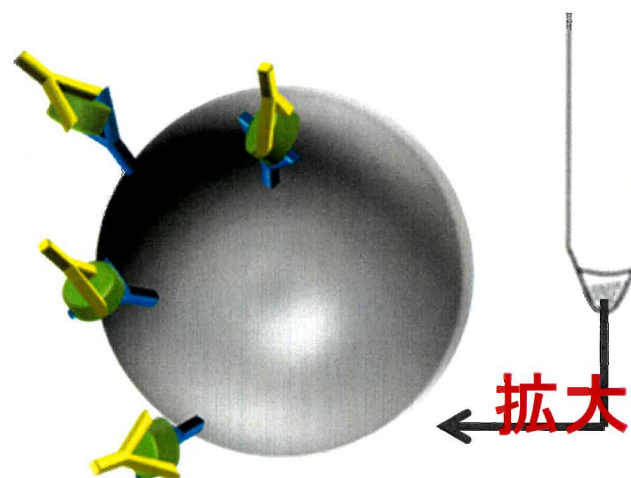
マイクロタイタープレート



診断完了まで**2日**

(インキュベート:4°C・Overnight)

ビーズ



診断完了まで**30分**

(インキュベート:37°C・10分)

表面積を広くすることで検出時間の短縮を目指す

# 抗体付着ビーズの作製

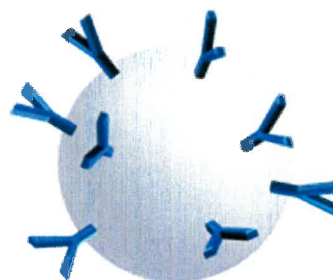


ビーズ粒子径  
ガラスビーズ: 0.05 mm・0.1 mm・0.4 mm  
ポリスチレンビーズ: 2  $\mu$ m・10  $\mu$ m・45  $\mu$ m

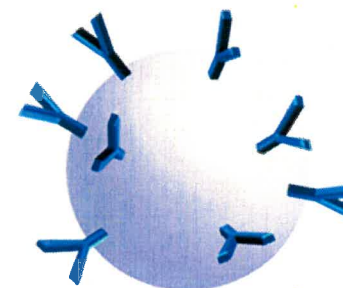
①溶液で表面処理



②抗体付着処理



③ブロッキング

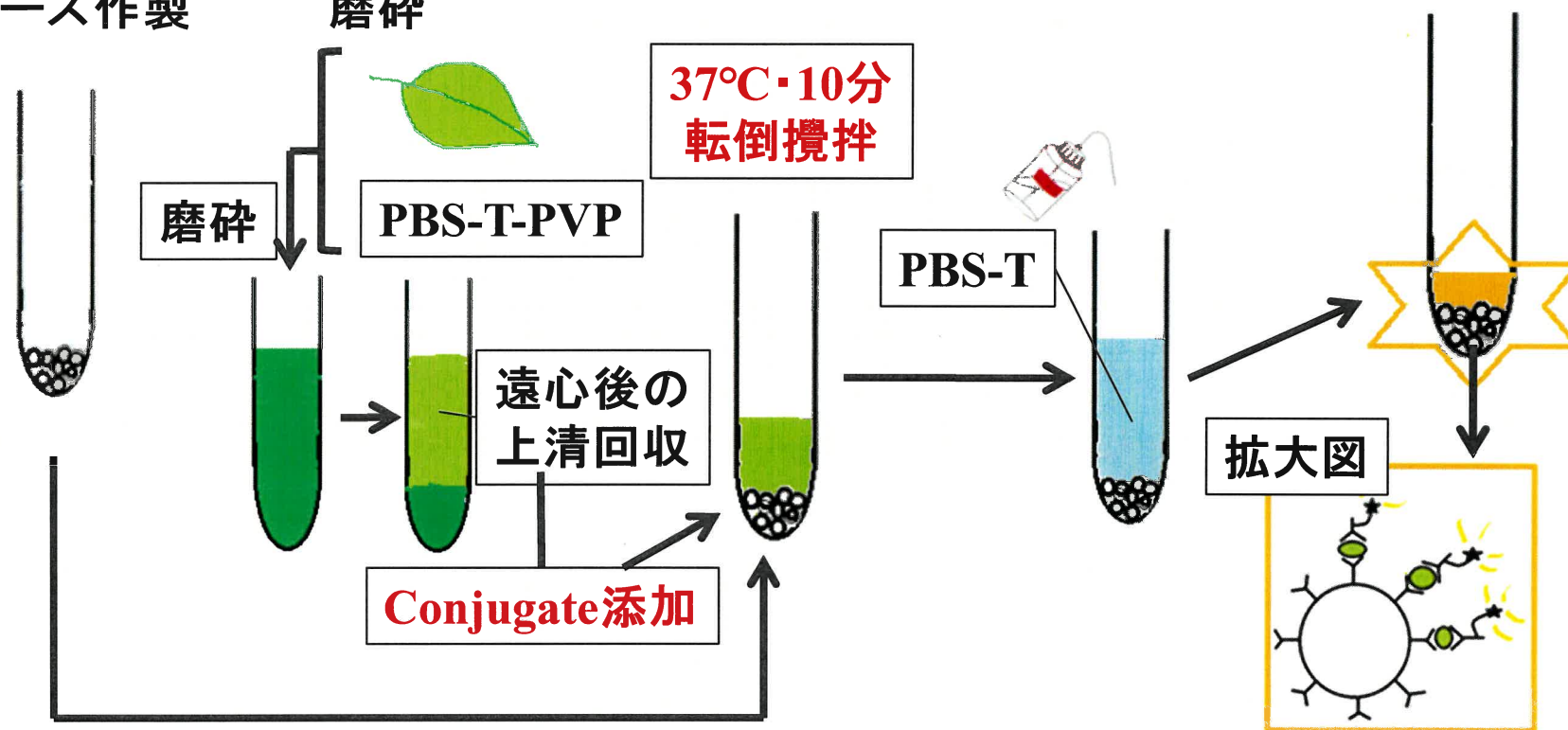


作製したビーズは使用するまで低温保存

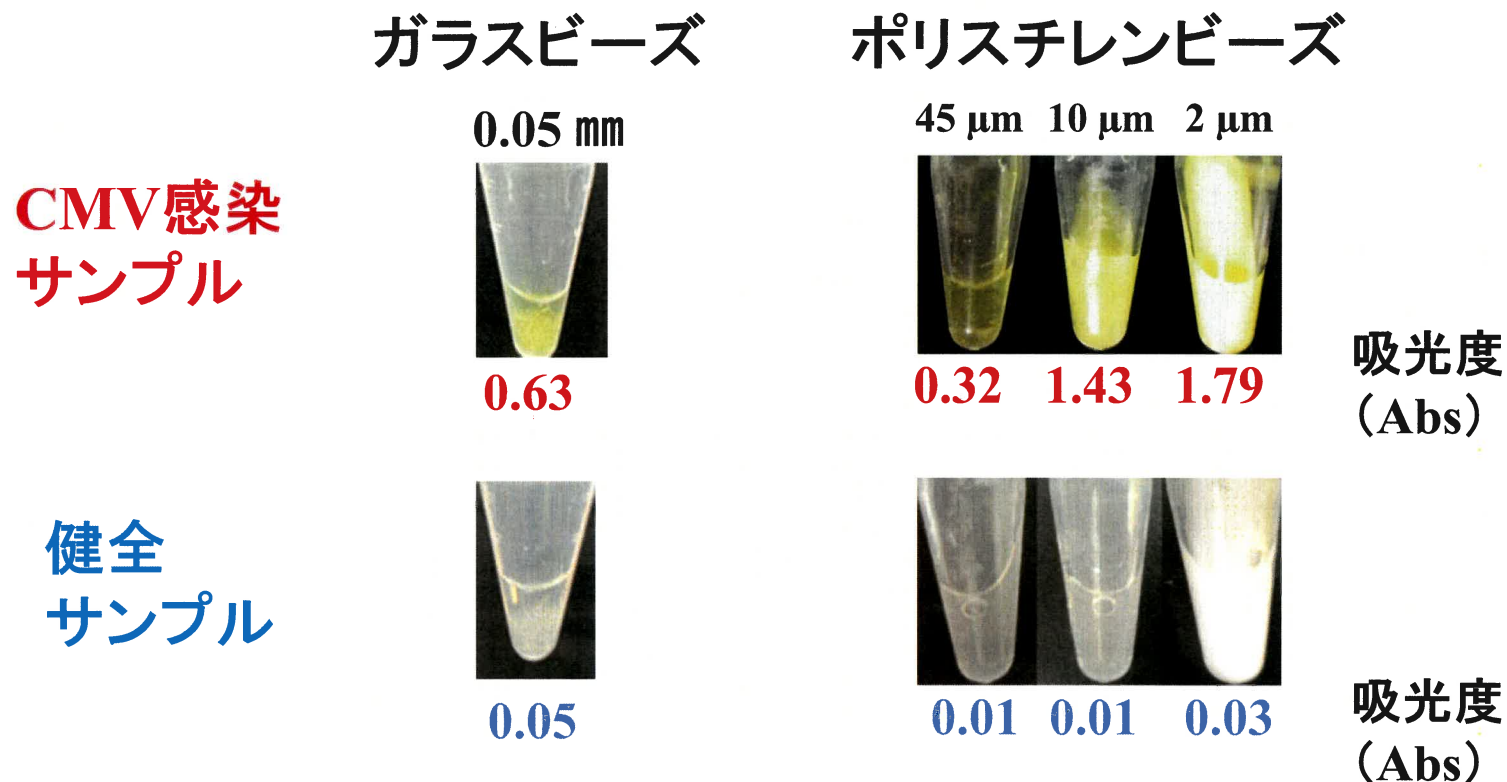
# ビーズを用いたDAS-ELISAによる検出手順

サンプル: CMV(*Cucumber mosaic virus*) 感染キュウリ

- ①抗体付着  
ビーズ作製      ②サンプル  
磨砕      ③インキュベート  
37°C・10分  
転倒攪拌      ④洗浄  
PBS-T      ⑤基質液添加

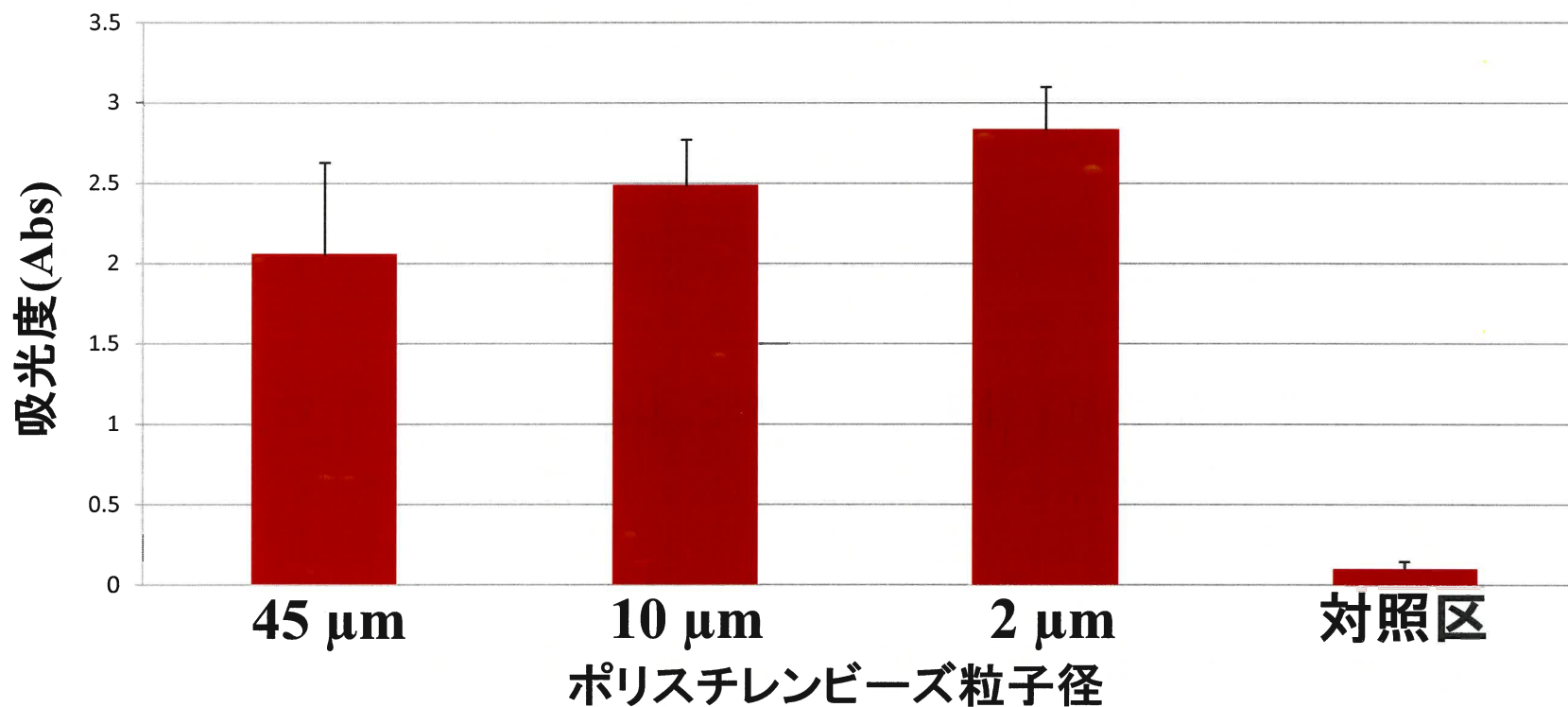


# ビーズELISAの検出結果



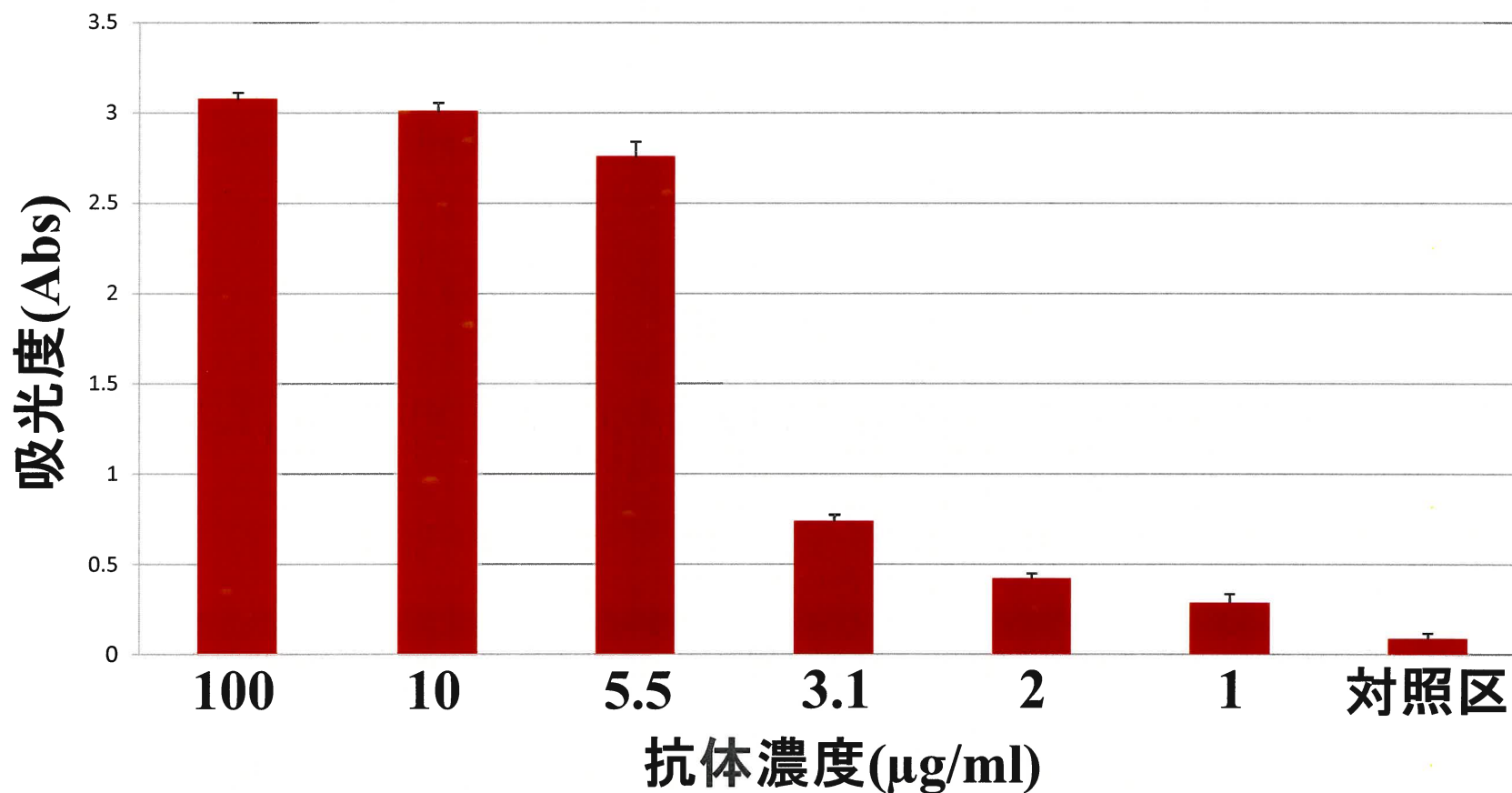
どちらのビーズでもウイルスの検出は可能であるが  
検出感度を考慮し**ポリスチレンビーズ**を採用

# ポリスチレンビーズ粒子径の検討



吸光度及びハンドリングの点から、  
粒子径10 μmが適正であると判断

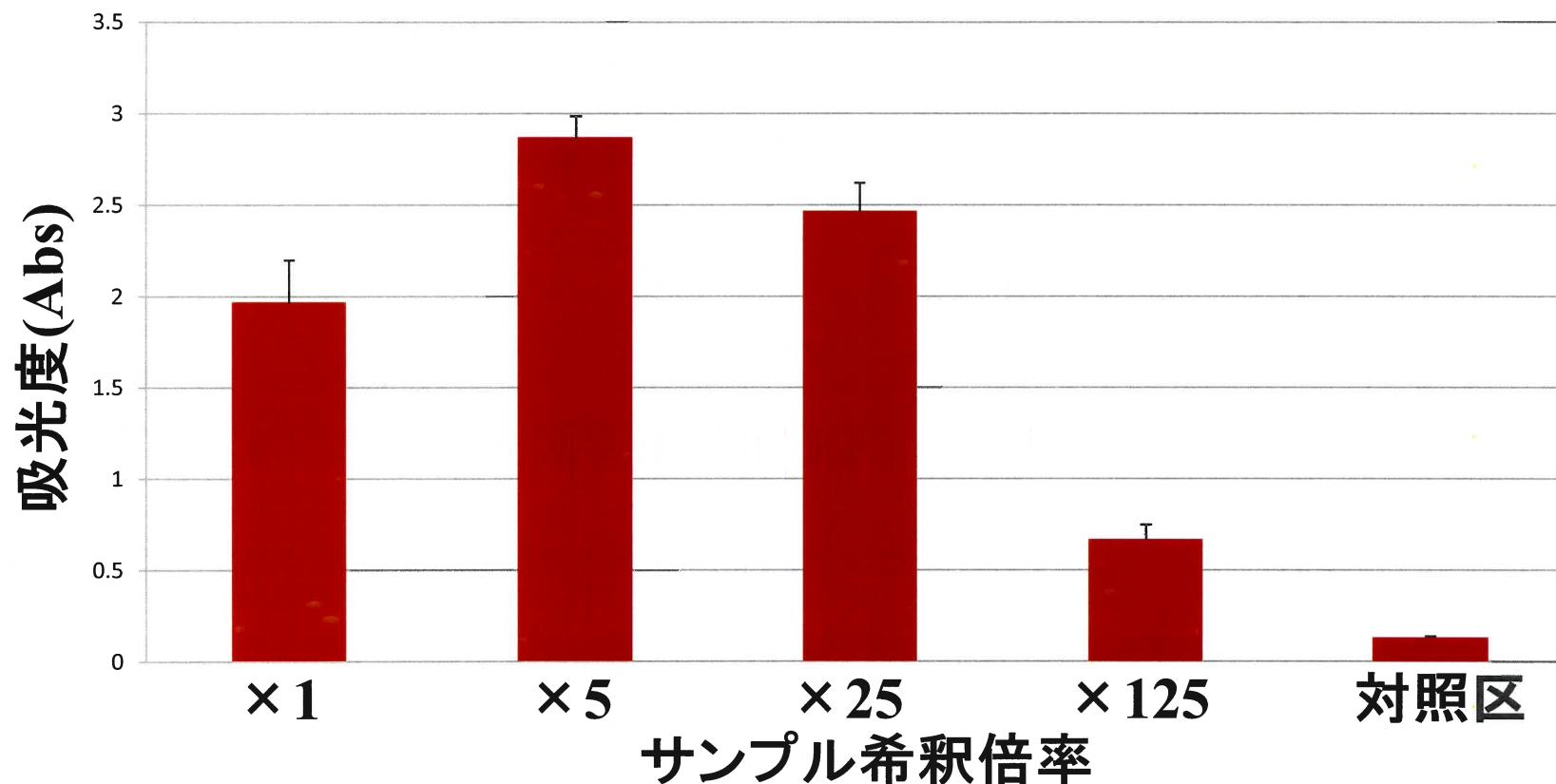
# ビーズに付着させる抗体濃度の検討



5.5 μg/ml (180倍希釈)までは感度を落とさずに検出可能

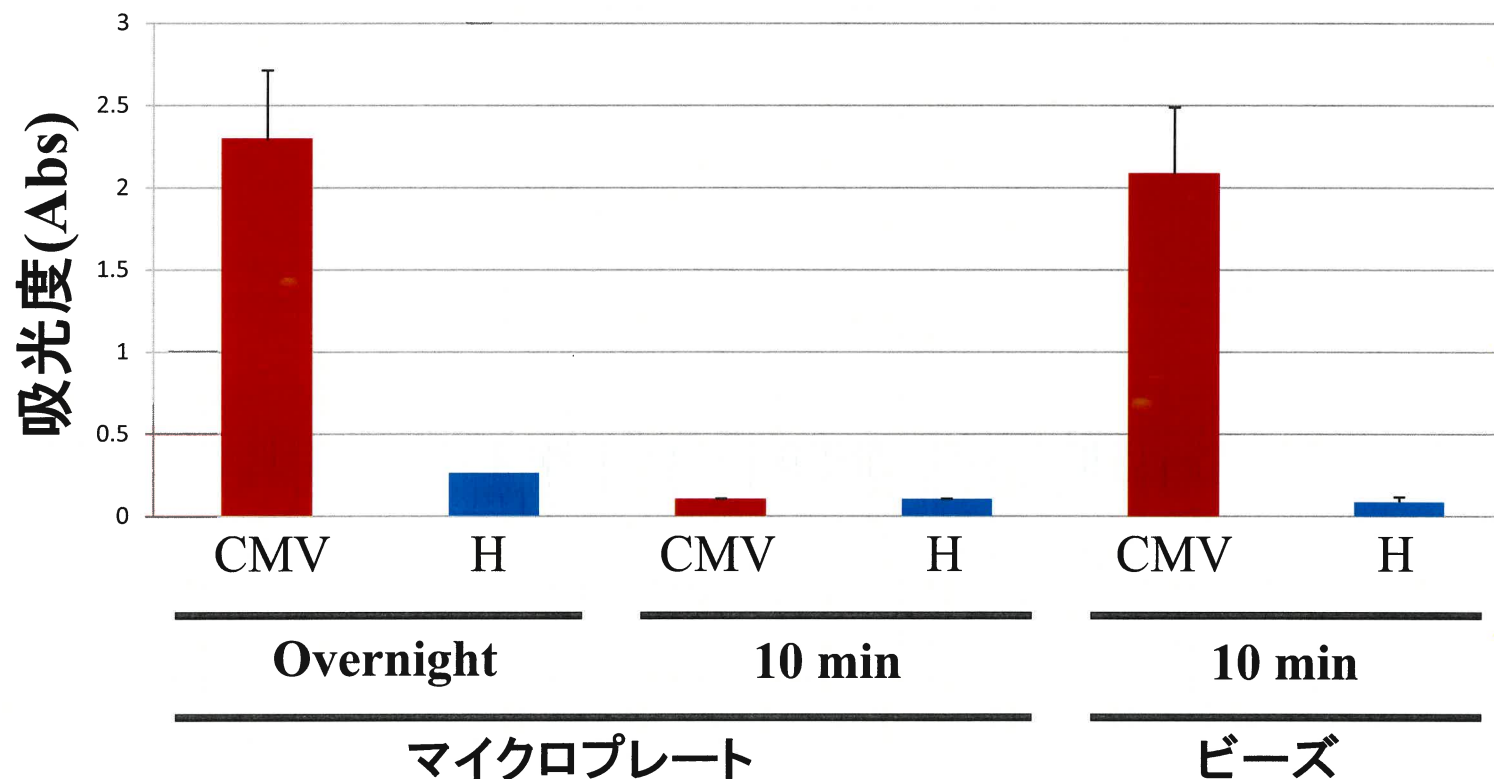


# サンプル希釈による感度の検討



25倍希釈までは原液と同等の感度で検出可能  
125倍希釈でも対照区との差は確認できる

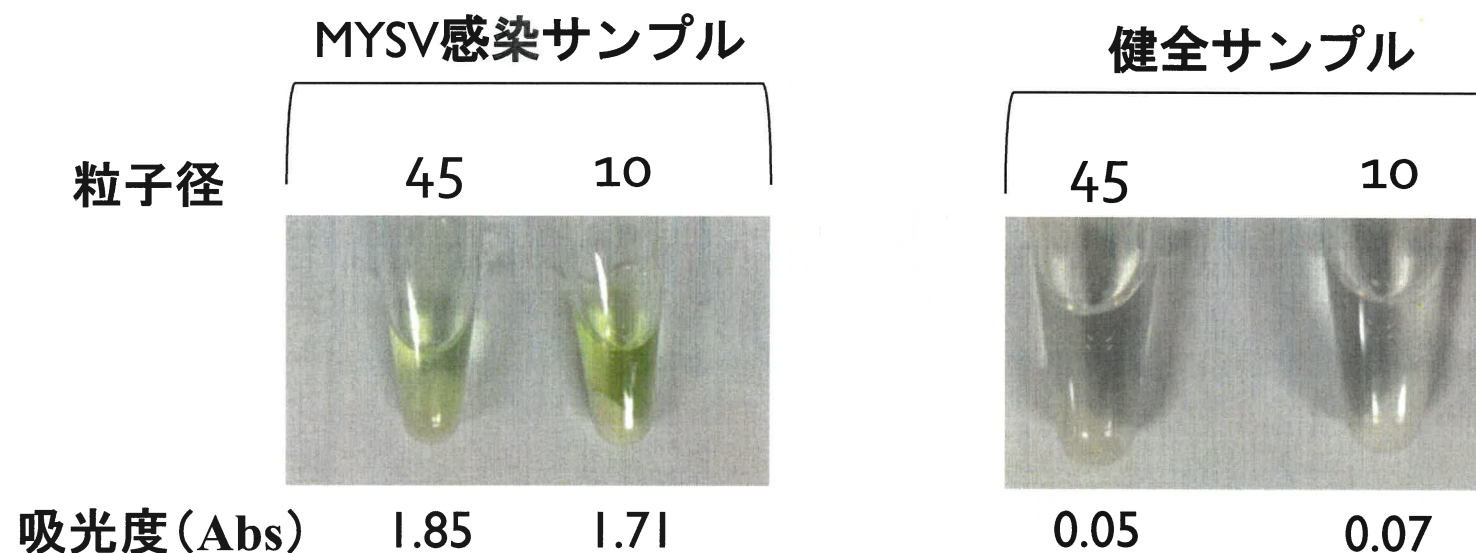
## ビーズとマイクロプレートを用いたDAS-ELISAの比較試験



プレートを用いた従来のDAS-ELISA法と同等の検出が可能  
DAS-ELISAにビーズを用いることで時間短縮が可能

# 他種ウイルスに対する検出

サンプル: MYSV (*Melon yellow spot virus*) 感染キュウリ



CMV検出と同様の手順が他のウイルスにも適用できると判断

## まとめ

固相にガラスビーズ及びポリスチレンビーズを用いたDAS-ELISA法の確立

- 1サンプルあたり**約30分**の迅速な検出が可能
- 他種ウイルスへの適用が可能
- 高価な機器を要しない安価な診断技術

農業生産者の現場での植物ウイルスの検出診断を目指す

作物には複数の植物ウイルスが重複感染している可能性もあるため、今後、実用化に向けて同時検出技術を確立する必要がある

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：植物ウイルスの検出方法と  
植物ウイルス検出キット
- 公開番号：特開2014-224729
- 出願人：学校法人法政大学
- 発明者：川合 昭・鍵和田聡・西尾 健

# お問い合わせ先

法政大学 研究開発センター 小金井事務課  
産学連携コーディネーター

TEL 042-387-6501

FAX 042-387-6335

e-mail: [liaison@adm.hosei.ac.jp](mailto:liaison@adm.hosei.ac.jp)