

抗血清 DAS-ELISA 法（二重抗体サンドイッチ法）

植物ウイルスに対して検定する場合の一般例

1. 準備するもの（材料）

1) 器具

- マイクロタイタープレート（96 穴）
- ポリ洗浄瓶（プレート洗浄用）
- マイクロピペット（20 $\mu$ l～200 $\mu$ l 用）
- マイクロチップ（20 $\mu$ l～200 $\mu$ l 用）
- ラップフィルムおよびポリ容器（プレート乾燥防止用）
- ペーパータオル（洗浄時使用）

2) 緩衝液・試薬および培地

- DAS-ELISA 用コーティング液（IgG）
- DAS-ELISA 用コンジュゲート液（IgG+アルカリフォスファターゼラベル）
- 0.05M カーボネート緩衝液（pH9.6）
- 0.02M リン酸緩衝生理食塩水液(pH7.4) [PBS]
- PBS+Tween 20 [PBS-T]
- 10%ジエタノールアミン溶液(pH9.8)
- P-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム（発色剤、粉末）
- 1N 塩酸（pH 調整用）

3) その他

- マイクロプレートリーダー（吸光値測定用）
- 冷蔵庫（4～10 $^{\circ}$ C、プレート保管用）
- 恒温器（37 $^{\circ}$ C 常温、抗体吸着、インキュベーション用）

## 2. 検定手順

- 1) コーティング液をカーボネート緩衝液で所定濃度に希釈し、マイクロプレートの各穴に 200 $\mu$ l ずつ分注する。(コーティング処理)
- 2) マイクロプレートをラップフィルム等で包み、37 $^{\circ}$ Cで 3 時間あるいは冷温(4 $^{\circ}$ C)で一晩静置する。
- 3) PBS-T を磨砕液として調整した上清を検定試料として、各 2 穴に 200 $\mu$ l ずつ分注する。(試料処理)
- 4) ラップフィルム等で包んだマイクロプレートを 37 $^{\circ}$ Cで 2 時間あるいは冷温(4 $^{\circ}$ C)で一晩静置する。
- 5) コンジュゲート液を PBS-T で所定濃度に希釈し、マイクロプレートの各穴に 200 $\mu$ l ずつ分注する。(コンジュゲート処理)
- 6) ラップフィルム等で包んだマイクロプレートを 37 $^{\circ}$ Cで 3~4 時間静置する。
- 7) マイクロプレートを PBS-T で 4~5 回洗浄する。
- 8) 10%ジエタノールアミン溶液に P-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム(1mg/ml)を溶解する。(基質溶液)
- 9) 基質溶液を 200 $\mu$ l ずつ各穴に分注する。(基質添加)
- 10) 基質添加から 30 分~60 分後に結果判定(※)

※肉眼で発色(黄色)の有無を確認する。その時、ネガティブコントロールが無発色であり、陽性反応液が強く発色していることが条件となる。あるいはマイクロプレートリーダーで吸光度を測定してより正確な判定を行う。

## 公表された主な研究報告（血清診断法）

- 河野敏郎・植草秀敏・津田新哉・高橋義行（2008）：アイリスイエロースポットウイルス（IYSV）の抗体作製と血清診断方法の検討，日植防研報 9：1-9.
- 河野敏郎・高橋幸吉・高橋義行（2005）：旧タバコモザイクウイルス保存株の血清学的な検証，関東病虫研報 52：13-18.
- 河野敏郎・高橋義行（2001）：高比重ラテックス凝集反応法を用いたスイカ果実汚斑細菌病菌の簡易検出，関東病虫研報 48：37-39.
- Takahashi, Y., Hori, H., Furuno, H., Kawano, T., Takahashi, M. and Wada, Y. (1998) Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Rapid and Quantitative Detection of Insecticidal Crystal Proteins of BT Pesticides J. Pesticide Sci. 23：386-391.
- 河野敏郎・高橋義行（1999）：花卉類の ELISA 検定における非特異反応と PVP の効果，日植防研報告 8：7-11.
- 河野敏郎・高橋義行（1997）：高比重ラテックスによる植物ウイルスの簡易検定，日植病報 63（5）：403-405.
- 河野敏郎・小木曾秀紀・高橋義行（1996）：レタス腐敗病 3 種細菌の ELISA 検定，関東病虫研報 43：75-77.
- 河野敏郎・高橋義行・中野正明・津田新哉・高橋幸吉（1994）：RIPA 法によるシンビジウムウイルス検定，関東病虫研報 41：169-170.
- Takahashi, Y. and Shohara, K.(1990)：Practical Detection of Wasabi Strain of Tobacco Mosaic Virus by Using "Cocktail" Monoclonal-Antibodies, Ann. Phytopath. Soc. Japan 56：621-627.
- Takahashi, Y., Kameya-Iwaki, M., Shohara, K. and Toriyama, S.(1989)：Detection of Watermelon Strain of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by Using Monoclonal Antibodies, Ann. Phytopath. Soc. Japan 55：369-372.
- Takahashi, Y., Kameya-Iwaki, M. and Shohara, K.(1989)：Characteristics of Epitopes on the Tomato Strain of Tobacco Mosaic Virus Detected by Monoclonal Antibodies, Ann. Phytopath. Soc. Japan 55：179-186.
- 高橋義行（1988）：ELISA 法—その特徴と実施上の注意点，植物防疫 42（2）：22-26.
- 高橋義行（1988）：凝集反応法—赤血球凝集反応法とラテックス凝集反応法，植物防疫 42（1）：60-62.
- 高橋義行・匠原監一郎・柏崎 哲・土崎常男（1988）：簡易 ELISA 法によるオオムギ縮萎縮ウイルスの検出、関東病虫研報 35：29-30.
- Takahashi, Y., Omura, T., Shohara, K. and Tsuchizaki, T.(1987)：Rapid and Simplified ELISA for Routine Field Inspection of Rice Stripe Virus, Ann. Phytopath. Soc. Japan 53：254-257.
- 高橋義行・匠原監一郎・大島信行・荒木隆男（1986）：抗体感作赤血球の安定性，関東病虫研報 33：40-42.