

抗血清に関する Q & A

DAS-ELISA 用セット

Q1 TSWV のエライザ検定を行っていますが、陽性と思われる試料でも反応しません

- A** 検定試料を葉重量の 10~100 倍希釈で使用してみてください。
トータル IgG 中、TSWV と特異的に反応する部位が限られている本 TSWV 抗血清では、抗原(ウイルス)量の僅かな差で反応性が弱くなるので、濃い濃度での使用を試みて下さい。
アザミウマ伝搬性のウイルスに共通する現象なので、INSV、MYSV、IYSV で同じようなことがある場合に有効な手段です。検定試料の濃度を 10~100 倍にして行うことが必要です。
また他の理由として、検定試料とした部位によっては極端にウイルス濃度が低い(検出限界以下)場合があります。例えば壊死しかかった試料等です。また、病徴が明瞭な試料の場合、他のウイルスの関与も疑ってみてください。

Q2 ジャガイモ Y ウイルス用 DAS-ELISA 用セットを使用しています。本試薬は PVY-T、PVY-O ともに反応しますか？

- A** 本試薬に用いた抗体は PVY-T(えそ系)を元に作製しました。この抗体は PVY-T と PVY-O(普通系)ともに反応しますが、反応の程度が異なります。PVY-T を 100% とすると PVY-O の反応性は 50~60%程度です。
このことから、PVY-T と PVY-O の識別は本試薬ではできません。
逆に PVY-O で作製した抗体の中には、PVY-T はほとんど反応しないものがあります。

Q3 LSV(コリ潜在ウイルス)DAS-ELISA 用セットの反応性について教えてください

- A** 本試薬は、当時(西暦 2000 年以前)、沖永良部島のコリ栽培農家で発生し、発生圃場から持ち込まれた試料で抗血清が作製されています。電子顕微鏡および接種試験で確認して、LSV と同定していましたが、後になって LMoV の感染も疑う余地がでてきましたが、ほとんどが LSV なので、LMoV に反応しても極弱い反応で判定に支障をきたすことはないと考えます。LSV 抗血清の早急な作製により、現場の緊急対策に本抗血清が活躍した経緯があります。
上記の経緯から、本試薬は LSV の他に Lily mottle virus(LMoV)に極弱く反応する可能性があります。

Q4 反応してはいけないウェル(穴)またはネガティブコントロールが発色しています

- A 要因として、まずは洗浄不足、不適當なプレート(細胞培養用、表面を特別に加工した吸着性の高いもの、長期保存による表面の劣化)および基質の劣化が考えられます。

次に非特異的な反応を示している場合があります。非特異反応とは反応対象となる抗原にコンジュゲート抗体がつくのではなく、関係ない物質(成分)にコンジュゲート抗体がついてしまうことで、あたかも陽性反応を示しているようにみえるものです。コンジュゲート液の酵素を吸着するような物質を含む検定試料(例えばポリフェノールや多糖類)、酸化しやすい検定試料では磨砕溶液にその作用を軽減するような添加物(例えば 2~4%ポリビニルピロリドン、0.2%メルカプトエタノール、1%アスコルビン酸ナトリウム等)を適宜加える必要があります。また、コーティング処理または試料処理時にスキムミルクや牛アルブミン等を添加し、ブロッキングする方法もあります。但し、ブロッキングすると反応が抑制される場合があるので、適当な添加剤の濃度を探る必要があります。

Q5 アシドボラックスアベナエシトルリィの ELISA 試薬を使用していて、類縁菌に誤反応する可能性はあるのですか？

- A 当協会の *A. avenae* subsp. *citrulli* に対する抗血清は属内の共通抗原である鞭毛(いわゆる H 抗原)はできるだけ取り除き、特異性の高い細菌の細胞壁(いわゆる O 抗原)に対して作製していますが、属内での多少の交差反応は避けられないのが現状です。

ウリ科に発生する細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* および *Xanthosia campestris* pv. *cucurbitae* の反応は陰性として確認し、ウリ科に発生している病斑部位の検定には問題ないとして、配布しています。

(参考：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.)

同属の反応例としては、*A. avenae* subsp. *avenae* の 1 分離株に反応するという事例があります。(植物防疫、2011、65 巻、第 10 号を参照)

PCR による診断が主流になった現在では、抗血清は簡易診断のツールとすることが望ましい。

ラテックス凝集反応法

Q6 ラテックス凝集反応法のイネ罹病葉の作製について。どのくらい薄めたらいいのですか？

- A 罹病葉のウイルスの濃度が高いことに越したことはありませんので、罹病汁液を濃くしがちですが、葉の組織がじゃまをして、凝集塊が観察しにくくなることがよくあります。濃くしたとしても罹病葉重量の100～200倍希釈液が限界です。当協会の予備検定では葉重量の500倍液が最も高濃度です。ユーザーが保管している罹病葉のウイルス濃度によって、適度に凝集反応する濃度を見つけることも検定作業の1つだと考えます。100倍より濃い汁液を扱う場合には植物成分をなくすため、遠心した上澄みを利用します(1時間程度静置して、その上澄みを使うのも良いが、酸化等が進まないように冷蔵環境に置く)。

Q7 ラテックス凝集反応法の保毒虫検定について。どのくらい薄めたらいいのですか？

- A ラテックス凝集反応法は検定対象が虫であっても生理食塩水で磨砕します。虫の検定の場合、直接虫を潰してラテックス液を加えるやり方が主流ですが、ラテックス液と等量の生理食塩水で磨砕して、等量のラテックス液を加えるユーザーもいます。

その他

Q8 購入した試薬を海外に送りたいのですが、何か問題となることがありますか

- A 当協会の試薬は国内需要向けに作製しています。海外に向けて送付した際に品質は保証できません。
また、海外送付用に必要な書類等の事務手続きに対応することが不可能ですので、当協会から直接送付することはできません。

Q9 抗血清試薬を誤って凍結させてしまいました。今後の使用は可能でしょうか

- A 解凍する際にどうしても内容物の結合箇所の問題を生じるため、品質が低下します。品質の低下は反応性の低さを意味するので使用不可能と思われます。但し、解凍の仕方次第ではそれほど品質の低下に至っていない場合もあるので、反応性を確認してみてください。(状況によりご相談ください)

Q10 コンジュゲート試薬の使用濃度を取り扱い説明書よりも薄くして使用することは可能ですか。

- A 当協会の予備検定によって最適な使用濃度を提示しているので、本濃度は守ってください。なお、ユーザーの方の経験値(理解度)の上で、環境条件・発色程度によっては濃度を変えて使用していただくことは可能と考えます。

Q11 購入した抗血清試薬が全部使い切らずに有効期間の 6 ヶ月を過ぎてしまいました。有効期間を過ぎると使用できませんか

- A 品質は保証できませんが、ユーザーの方の判断でご使用ください。ただし、試薬の管理の仕方次第では 6 ヶ月すぎると急速に品質が低下する場合もあるので、ご了承ください。

Q12 販売されている抗血清試薬に SDS はありますか

- A エライザ試薬、ラテックス抗体感作試薬、高比重ラテックス抗体感作試薬はいずれも、SDS 対象物質に該当しません。
唯一、オプション品の 10%ジエタノールアミン溶液は該当するので、ジエタノールアミン原液の購入会社の SDS シートを添付しています。