



Application

植物病原ウイルス同定を目的とするダイレクトPCRの検討

製品名 KAPA3G Plant PCR キット (KK7251, KK7252)

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

製品名 MyTaq™ Plant PCR Kit (BIO-25055, BIO-25056)

メーカー名 Bioline 社

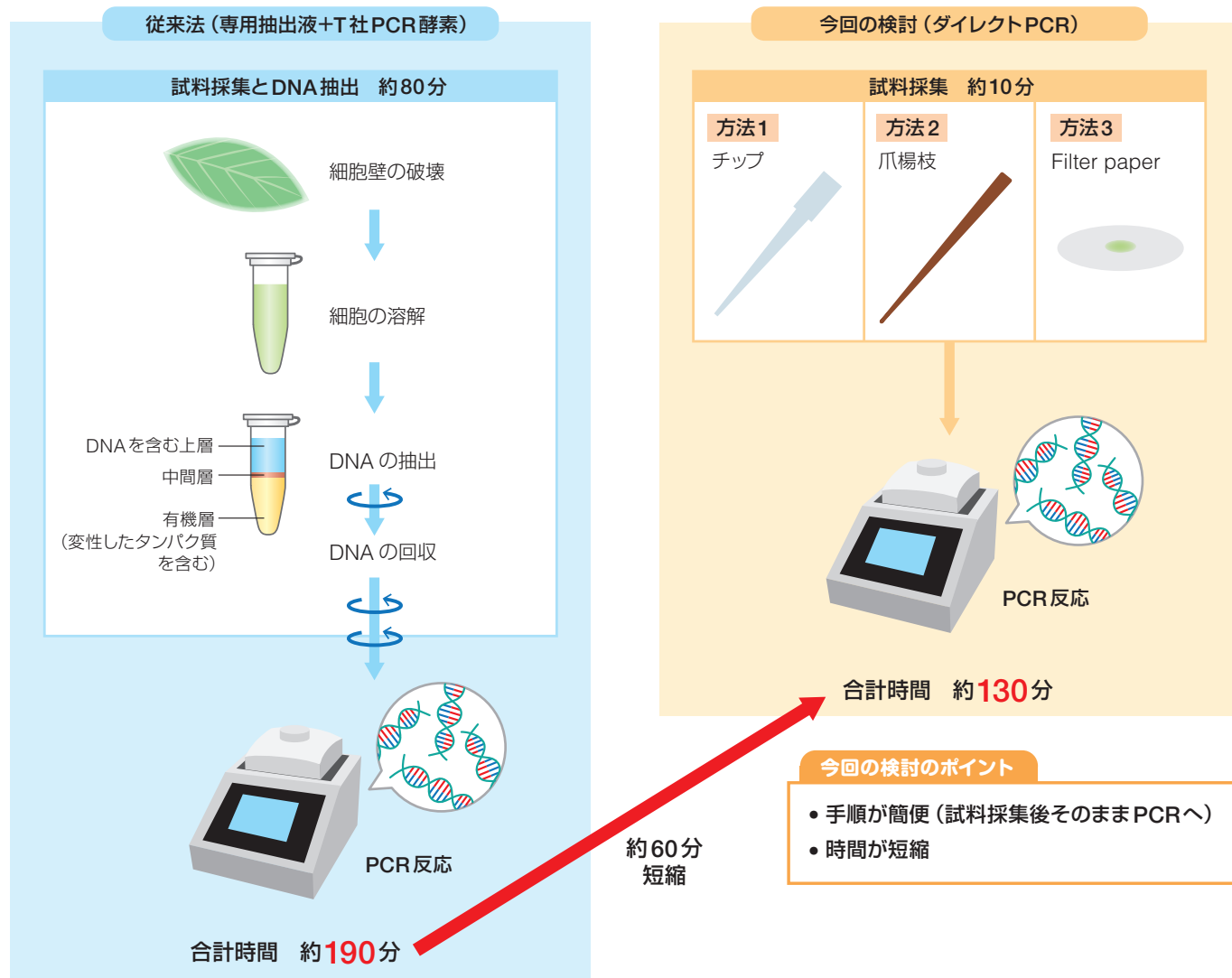
下記のデータは、東京農業大学農学部農学科植物病理学研究室 キム オッキョン 様 佐藤 拓磨 様のご厚意により掲載させて頂きました。

背景

植物ウイルスは作物や果樹などに広く発生し、多大な被害を及ぼすことで農業上問題となっています。さらに、植物ウイルス病に対して即効性のある農薬は未だにないため、発病が見られたら早期かつ正確に診断することが病害の蔓延を防ぐ最善策です。ウイルスゲノムとしてDNAをもつトマト黄化葉巻ウイルスは国内のトマト栽培に問題となっている病原ウイルスです。本ウイルスがトマトに感染・発症すると新しい葉の周辺部が巻き上がり、葉脈間が黄化してしまいます。さらに症状が進むと、葉はちりめん状となり萎縮状態となります。また発病した部位から上は、花が正常に咲かず、実もならないため、生育初期に感染した場合、収穫はほとんど見込めません。

当研究室では、このような感染した植物から病原ウイルスの同定を依頼されることも多く、感染が拡大しないように検査の正確さに加えて、スピード、手順の簡便さが求められています。従来では、植物組織からDNAを抽出してウイルスの同定を行うため、時間を要し、手順も多いので課題となっていました。そこで植物組織を直接PCR反応液に加えるダイレクトPCRにも使用できるPCRキットを検討しました。

ワークフロー



実験条件

従来法 (専用抽出液+T社)

● 試料採集とDNA抽出 約80分

1) 細胞の破壊

凍結させた植物組織を粉末状に破碎

2) 細胞の溶解

← 試薬Iを添加し懸濁

← 試薬IIを添加し転倒混和

65℃、10分間 振とうインキュベーション

氷上、20分間

3) DNAの抽出

氷上から取り出す

← 抽出試薬を添加

室温、10分間 振とう

遠心 1,300×g、10min.

DNAを含む上層を回収

(中間層は樹脂層、下層部は有機溶媒層)

4) DNAの回収

インプロパノール (冷) を同量添加し転倒混和

遠心 4,000×g、5min.

上澄みを除去

沈殿を70%エタノール (冷) で洗浄

遠心 4,000×g、5min.

上澄みを除去

沈殿を10分間、風乾

TEバッファーまたは水にてDNAの溶出

DNA溶出

● PCR条件

反応組成

| | |
|-------------------------------------|---------|
| dH ₂ O | 31.8 μL |
| T社ブレンド酵素 (5 U/μL) | 0.2 μL |
| 10X Buffer (Mg ²⁺ 20 mM) | 5.0 μL |
| dNTP Mixture (2.5 mM each) | 4.0 μL |
| Template | 5.0 μL |
| F Primer (10 μM)* ¹ | 2.0 μL |
| R Primer (10 μM)* ¹ | 2.0 μL |
| total | 50.0 μL |

PCRプログラム

| | | |
|-----|------|-------------|
| 94℃ | 2min | } 34 cycles |
| 94℃ | 1min | |
| 58℃ | 1min | |
| 72℃ | 1min | |
| 72℃ | 2min | |
| 15℃ | Hold | |

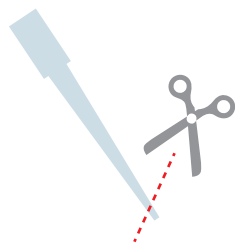
今回の検討 (ダイレクトPCR)

● 試料採集 約10分

方法1

200μl チップによる採集

200μl チップ先を斜めに切ったもので葉の破片を収集



方法2

爪楊枝による採集

試料葉を突いた爪楊枝をチューブの溶液内に解す (壁にかくような感じ)



方法3

Filter paperによる採集

葉の汁液が付いたFilter paperを少し切り取る



● PCR条件

反応組成

① KAPA3G Plant PCR Kit

| | | |
|--------------------------------|---------|---------------------|
| dH ₂ O | 17.6 μL | ← Leaf sample added |
| KAPA Plant PCR Buffer (2X) | 25.0 μL | |
| MgCl ₂ (25mM) | 4.0 μL | |
| F Primer (10 μM)* ¹ | 1.5 μL | |
| R Primer (10 μM)* ¹ | 1.5 μL | |
| KAPA3G Polymerase | 0.4 μL | |
| total | 50.0 μL | |

② MyTaq™ Plant PCR kit

*MyTaq Plant PCR Mixは泡が生じやすいため、試料を加えた後にMyTaqを分注した

| | | |
|--------------------------------|---------|---------------------|
| dH ₂ O | 21.0 μL | ← Leaf sample added |
| MyTaq Plant-PCR Mix (2X) | 25.0 μL | |
| F Primer (10 μM)* ¹ | 2.0 μL | |
| R Primer (10 μM)* ¹ | 2.0 μL | |
| total | 50.0 μL | |

PCRプログラム

| | | |
|-----|------|---------------------------|
| 94℃ | 2min | } 40 cycles* ² |
| 94℃ | 1min | |
| 58℃ | 1min | |
| 72℃ | 1min | |
| 72℃ | 2min | |
| 15℃ | Hold | |

*² プロトコルに書いてある通りに、DNA抽出物からのPCRプログラムよりPCRサイクル数を増やして行った

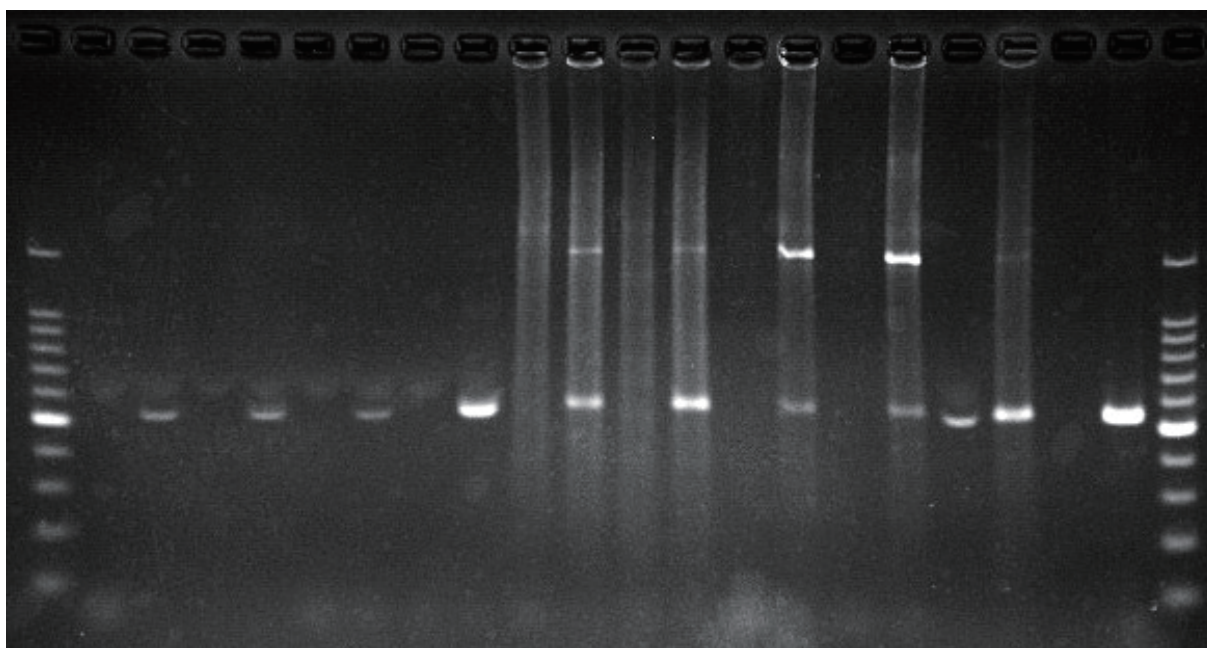
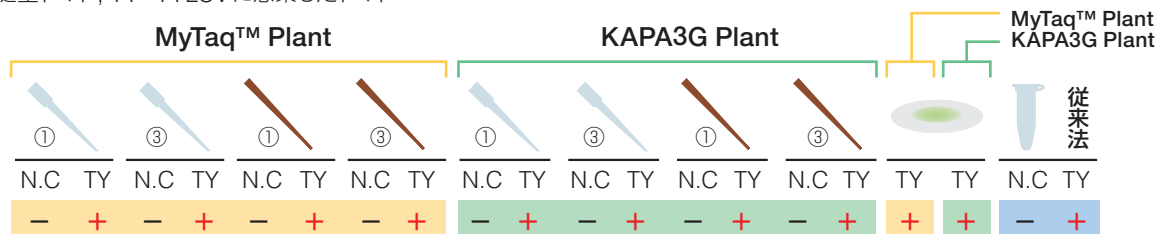
*¹ 配列情報:

Deng *et al.* (1994), Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers

結果


①=1カ所, ③=3カ所

N.C=健全トマト, TY=TYLCVに感染したトマト



- 電気泳動条件
- 1×TAE buffer
- 50V, 40min
- 1µl of 6×loading buffer+5µl of PCR product/lane
- 5µl of 100 bp DNA ladder (TaKaRa社 Cat# 3407A)

予想通りに TYLCV 感染葉からの試料全てで陽性反応が見られた。汁液の付いた Filter paper を入れて DNA 増幅させた結果、MyTaq でも KAPA3G でも陽性反応であったが、MyTaq を使った方はバンドが多少低く位置した。しかしながら、MyTaq で得たバンドを DNA 精製、クローニングシーケンスを行ったところ塩基配列の決定には問題ないことが分かった。

全体的に KAPA3G ではスメアが見られるが、MyTaq では特異的反応のみが検出された。

チップを用いる場合は断片を取って反応液内に入れるのに苦労したが、爪楊枝を使うことでより簡易に核酸を得ることができた。1カ所を突いても病原ウイルスの検出には十分であったが、3カ所を突いた方がより濃いバンドを得ることができた。

これまでは、トマト黄化葉巻ウイルスの感染有無を調べるために DNA を抽出して市販の PCR 試薬で PCR をかけていた。一度に多くの試料を検定するにあたって時間や手間、そしてコストがかかる従来法に比べて、MyTaq™ Plant キットを用いた植物試料からのダイレクト PCR は非常に簡便で安定した結果を得ることができた。

試料採集においては、切断したチップ先を用いて植物葉をパンチする方法、爪楊枝で葉を突いて反応液内に解す方法、そして葉を Filter paper にプロットングすることで汁液が付いたペーパーの破片を使う方法を試してみた。いずれの方法においても罹病葉からのみで陽性反応が見られたが、中でも爪楊枝法で最も簡易に核酸を得ることができた。爪楊枝法と MyTaq™ Plant キットの組み合わせにより、多検体の効率的な検定とともに、病原ウイルスを検定する研究において最も懸念されるコンタミネーションを防ぐこともできる。

今後、他の植物に発生している DNA ウイルスの検定にも有効であるかどうかの検討を進めていきたい。



お客様のコメント