

核酸増幅と配列決定を同時に行う LCR 法 (Ligase-Chain-Reaction) の 植物検疫への活用



～複数の病原体を一度に遺伝子診断できる方法～

SATテクノロジー・ショーケース2016

■ はじめに

ファイトプラズマは、植物の篩部組織に寄生する病原細菌で、果樹および花きを含む様々な農作物に感染することが報告されています。感染すると葉の黄化、萎縮および叢生、果実の萎縮、品質低下、並びに樹体の枯死等を引き起こします。欧米等において大きな被害をもたらしているリンゴ、ナシ、ブドウおよびモモ等の果樹に感染するファイトプラズマは、日本国内にはまだ侵入しておらず、そのため輸入検疫により対象植物が厳しく検査されています。従来の検出方法は、主に PCR 法によるもので、広範なファイトプラズマを対象としたプライマーセットを用いた PCR 法が報告されていました。しかし、複数の種もしくは病原グループのファイトプラズマが混合感染した場合にはそれぞれを迅速かつ正確に検出することは不可能でした。

これら課題を解決するために、一塩基の違いでターゲットの核酸のみを増幅させることができる DNA リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction: LCR; 以下、「LCR」という) 法を用いた、極めて近縁な種もしくは病原グループが混合感染していても高感度に識別できる方法を開発しました。

■ 活動内容

1. ファイトプラズマ DNA の SNPs の探索

約 300 のファイトプラズマ 16S rDNA 配列をアラインメントすることによって、配列中に種や病原グループを特定できるような一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) の違いを見出しました。そこで、この SNPs を利用した遺伝子診断法として LCR 法を利用することになりました。

2. LCR 法による病原体診断

ターゲットとする病原体の2本鎖DNAに相補的な4つの塩基～100塩基までの1本鎖DNAをオリゴマーセットとして設計しました。鋳型配列にアニールする2本のオリゴマーの繋ぎ目が、鋳型の塩基と完全に相補な場合にのみ、ライゲーション反応が起こり、2本のプライマーは1本のオリ

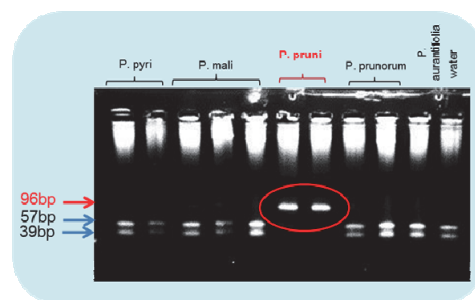
リゴマーに結合されます。この反応をサーマルサイクラーによって繰り返すことで、サンプル中にターゲットの鋳型配列が存在する場合にのみ1本の長鎖配列が合成および増幅され、電気泳動等で判定することができます。

3. 混合感染も一度に識別できる診断

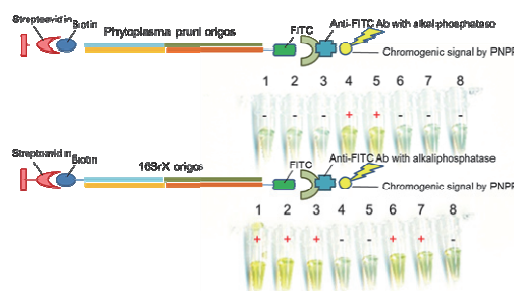
LCR 法は SNP の違いを認識できるため、サンプル中に同じような配列のターゲット DNA があっても、SNP の違いを反映したオリゴマーセットを用いることで、個々の病原体を識別することが可能です。また、各オリゴマーセットに蛍光標識やエピトープ標識等を行うことで化学的・免疫学的に識別することも可能です。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

PCT/JP2015/050158 「2種以上の検出対象生物を同時に検出する方法およびキット」



LCR 法は特定の病原体のみ検出することも可能



オリゴマー末端を標識することで化学的・免疫学的手法による検査も可能

代表発表者 藤川 貴史 (ふじかわ たかし)

所属 農研機構
果樹研究所
品種育成・病害虫研究領域

問合せ先 〒305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1
TEL: 029-838-6544 FAX: 029-838-6541
ftakashi@affrc.go.jp

■キーワード: (1) 病害検出・診断
(2) LCR 法
(3) 混合感染病害の識別