植物防疫所調査研究報告（植防研報）
第 61 号：19 ～ 24　　令和 7 年（2025）

資　　料

核酸抽出方法における Spike テストを利用した CTAB 法と PVP- Potassium SDS 法の比較

髙橋　智之[1)]・前川　晃演

神戸植物防疫所業務部

Comparison of CTAB and PVP-Potassium SDS methods using the spike test in nucleic acid extraction methods. Tomoyuki Takahashi[1)] and Akinobu Maekawa (Kobe Plant Protection Station 703 Befu, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 651-2115 Japan [1)]Kansai Airport Sub-Station, Kobe Plant Protection Station 1 Senshukuukou-minami, Sennan, Osaka 549-0021 Japan) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **61**: 19-24 (2025).

Abstract: Total nucleic acid (TNA) extraction plays a vital role in molecular biology as the primary step for many downstream applications. However, the isolation of high-quality TNA from certain plant tissues is often difficult because they are rich in polysaccharides and polyphenols. These substances have an adverse effect on (RT-) PCR efficiency. Here we tried to compare two TNA extraction protocols for post-entry quarantine tests that effectively purify high-quality TNA from plant tissues rich in polysaccharides and polyphenolic compounds, such as fruit trees. The PVP-potassium SDS and CTAB methods were quantitatively compared using real-time RT-PCR assay, by spiking the positive controls into the PCR mixtures or plant samples. As a result, it was suggested that the PVP-potassium SDS method contains more reaction inhibitors than the CTAB method in all 10 plant species used in this study, especially in *Fragaria virginiana*, *Prunus avium*, *Pyrus communis* and *Rubus idaeus*. Thus, it was recommended that the CTAB method is used for post-entry quarantine testing.

Key Words: nucleic acid extraction, post-entry quarantine, real-time RT-PCR, CTAB method

緒言

我が国では、海外から輸入されるブドウ（*Vitis* spp.）などの果樹類やサツマイモ（*Ipomoea batatas*）などの一部の栄養繁殖植物に対して隔離栽培検査を実施し、農業生産に影響を及ぼす可能性のある病原体の侵入を水際で防いでいる。隔離栽培検査では、主に病徴観察・汁液接種・接木接種・血清学的診断・分子生物学的診断などを用いた多角的な検査が行われるが、近年では特に分子生物学的診断が大きな役割を果たしている。

しかし、植物の細胞内にはポリフェノール化合物や多糖類などの成分が多く含まれており、高品質の全核酸（total nucleic acids; TNA）を単離することは難しく、これらの成分は RNA 依存性逆転写酵素や DNA ポリメラーゼの活性を著しく阻害する（Demeke and Adams, 1992; Japelaghi *et al.*, 2011）ことから、TNA 単離において、その残存が問題となる。さらに、植物ウイルスの大半はゲノムを RNA として有しており（Pumplin and Voinnet, 2013）、DNA と比較して不安定な分子であり、細胞や組織から抽出されると半減期が非常に短い（Brooks, 1998; Tan and Yiap, 2009）。そのため、reverse transcription（RT-）polymerase chain reaction（PCR）における偽陰性を防ぐためには、植物種やその部位に応じて適切な核酸抽出法を選定することが重要であるが、隔離栽培検査においては一部の植物を除き、統一した核酸抽出法が確立されていない。

核酸抽出はこれまで多くの手法が報告されており、その変法を含めるとその数は数えきれない。例えば酸性フェノールとグアニジン塩を組み合わせた AGPC（acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction）法（Chomczynski and Sacchi, 1987）は古くから植物からの核酸抽出に用いられており、近年では比較的短時間で抽出可能であるシリカメンブレン法（Padhye *et al.*, 1997）や磁気ビーズ法（Berensmeier, 2006）の人気も高まっている。これらの手法は細かい修正を加えて核酸抽出キットとして発売しているものも多い。しかし、これらのキットとして発売されている手法は従来法と比較して単価が高く、多量の検体を扱う隔離栽培検査には不向きといえる。全国の植物防疫所の隔離検査担当所で核酸抽出法を統一的に行うためには、安価であり、かつ特別な薬品・機器を使用せ

[1)] 神戸植物防疫所関西空港支所

ず、従来植物防疫所で用いている手法と互換性のある手法であることが求められる。植物防疫所の輸入検査においてはカリウム SDS 法（Dellaporta *et al.*, 1983）が採用されることが多く、2024 年現在、トマト、スイカなど、様々な植物で採用されている。また CTAB 法については、ブドウ属の隔離栽培検査において採用されている（髙橋・前川、2024）。

髙橋・前川（2024）は、spike テストを用いることにより、ブドウにおける最適な核酸抽出法について報告した。その結果、ブドウの葉柄及び休眠枝からの核酸抽出においては、CTAB 法のほうが PVP-カリウム SDS 法（勝ら、2017）と比較してリアルタイム RT-PCR（以下、「RT-qPCR」という。）阻害が起こらないことを明らかにした。本調査では、髙橋・前川（2024）の spike テストを利用した核酸抽出法の検討方法を一部改変し、ブドウを除く隔離栽培対象植物またはその検定植物に適用し、各植物種における核酸抽出法を比較した。

材料及び方法

１．供試植物及び試料採取方法

隔離栽培対象植物または隔離栽培で検定植物として用いられる植物種から、Table 1 に示す 10 種の植物を調査対象とした（ミカン属の一種（*Citrus* sp.）、オランダイチゴ属の一種（*Fragaria virginiana*）、サツマイモ属の一種（*Ipomoea setosa*）、ミツバカイドウ（*Malus sieboldii*）、サクランボ（*Prunus avium*）、モモ（*Prunus persica*）、セイヨウナシ（*Pyrus communis*）、クロフサスグリ（*Ribes nigrum*）、ラズベリー（*Rubus idaeus*）、スノキ属の一種（*Vaccinium virgatum*））。これら植物由来の核酸は、以後の調査で陽性コントロールとして用いる grapevine Pinot gris virus（GPGV）の定量用 RT-qPCR に対して非特異的な反応を示さないことを確認した（データ非表示）。

各植物から葉を複数枚採取し、主に葉柄を約 1mm ずつの長さに細断した。葉柄が短い植物については、主脈や茎を合わせて採取し、同じく約 1mm ずつの長さに切断した（Table 1）。細断した試料を無作為に 50mg ずつ 12 本の 2.0ml 容マイクロチューブに 6.0mm ステンレスビーズ 2 個とともに入れ、核酸抽出まで -80℃で保管した。

Table 1. Information of plants and collection sites used in this study.

Scientific names	Cultivar names	Collection sites
Citrus sp.	Rusk Citrange	Petioles
Fragaria virginiana	UC-10	Petioles and stems
Ipomoea setosa	-	Petioles
Malus sieboldii	MO65	Petioles
Prunus avium	Bing	Petioles
Prunus persica	Elberta	Petioles and main veins of leaves
Pyrus communis	Beurre Hardy	Petioles
Ribes nigrum	Baldwin	Petioles
Rubus idaeus	Indian Summer	Petioles
Vaccinium virgatum	Tifblue	Petioles and main veins of leaves

２．陽性コントロールの調整

2-1. 供試ウイルス

農林水産大臣の許可（農林水産省指令 2 神植第 964 号）を得て導入した、GPGV を供試ウイルスとした。本ウイルスはゲノムを ssRNA として有し、ブドウ以外の植物への感染は報告されていない。

2-2. GPGV の核酸抽出、精製及び RT-qPCR

本ウイルスに感染したブドウ苗から採取し、細断した葉柄 2,500mg を数回に分けて、髙橋・前川（2024）の CTAB 法により TNA を抽出した。さらに RT-qPCR 阻害物質を除去するため、キット付属のマニュアルに従い RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて核酸を精製後、得られた核酸の濃度を NanoDrop ONE（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用い吸光度により測定し、陽性コントロールとして以後の試験に用いた。

陽性コントロールを滅菌水で 2 倍ずつ段階希釈（3.5×2^{0} ～ 3.5×2^{-6}ng/μl）し、髙橋・前川（2024）が報告した GPGV 定量用 RT-qPCR（プライマーセット GPGV4F23/89R23）に供試した。得られた Cycle threshold（Ct）値より検量線を求めることで、反応阻害の有無を確認した。

３．核酸抽出法の比較１：TNA が RT-qPCR 反応に与える反応阻害率の調査

調査は、髙橋・前川（2024）の手法に準じて実施した。予め“2. 陽性コントロールの調整”で用意した陽性コントロールを加えた RT-qPCR 反応液に、各核酸抽出法で抽出した植物由来の TNA を添加した試験区と、TNA の代わりに滅菌水を添加した対照区を用意し、GPGV 定量用 RT-qPCR に供試した。試験区の Ct 値と対照区の Ct 値との差を求めることで、各 TNA がもたらす RT-qPCR 阻害率を調査した。

3-1. 核酸抽出

植物及び核酸抽出法毎に 3 サンプルを試験に用いた。1 の試料から CTAB 法を改変した手法（髙橋・前川、2024）及び PVP-カリウム SDS 法（勝ら、2017）によりそれぞれ TNA を抽出した。吸光度を NanoDrop ONE により測定した。各 TNA の原液及び滅菌水で 5 倍希釈したものを GPGV 定量用 RT-qPCR に供試した。

3-2. RT-qPCR

髙橋・前川（2024）に従って GPGV 定量用 RT-qPCR の反応液の調整及び RT-qPCR 反応を行った。1 反応当たり 10μl の反応系とし、1 反応当たり 3.5×2^{-2}ng の陽性コントロールを RT-qPCR 反応液に添加した。試験区として、3-1 で得られた TNA 又はその希釈液を 1 反応あたり 1μl 加え、RT-qPCR 反応を行った。対照区には、TNA の代わりに滅菌水を 1 反応あたり 1μl 加え、RT-qPCR 反応を行った。

各手法による TNA に RT-qPCR 反応阻害物質が残存している場合、Ct 値は上昇（検出感度が低下）する。得られた Ct 値を、滅菌水を添加した対照区の Ct 値で引いた値（以下、「ΔCt 値」という。）が、0 に近いほど RT-qPCR 阻害は低いと判断される。また、GPGV 定量用 RT-qPCR の PCR 効率は 100％に限りなく近かったことから、RT-qPCR 阻害率の予測値は $2^{\Delta Ct値}$倍で求め

られると考えられる（高橋・前川、2024）。試験区と対照区のCt値の差を比較することで、各核酸抽出液がRT-qPCR反応に与える阻害率を調査した。

4．核酸抽出法の比較２：RT-qPCR阻害物質残存及び核酸流失の調査

各植物試料に陽性コントロールを加えた後、各核酸抽出法で抽出したTNAをGPGV定量用RT-qPCRに供試し、Ct値を比較することで、TNA中のRT-qPCR阻害物質の残存及びTNAの流失の有無を比較した。

4-1. 核酸抽出

1で作成した試料入り2.0ml容マイクロチューブ内に、陽性コントロールの核酸量が250ngとなるよう添加した。これら陽性コントロール入り試料を用いて、3-1と同様に抽出・吸光度測定・希釈を行った。

4-2. RT-qPCR

高橋・前川（2024）に従い、GPGV定量用RT-qPCRの反応液の調整及びRT-qPCR反応を行った。1反応当たり10µlの反応系とし、TNAは1反応あたり1µl加えた。1プレートですべてのサンプルが供試できず、植物種によって異なるプレートでRT-qPCR反応を行う必要があったため、Threshold Lineを0.2で固定し、Ct値の解析を行った。なお、プレート毎に同一濃度の陽性コントロールを添加し、すべての反応において得られたCt値が0.5未満であったことから、プレート間でのPT-qPCR効率が同等であることを確認している。

各手法によるTNAにRT-qPCR反応阻害物質が残存している場合、もしくは抽出時に核酸が流失した場合、Ct値は上昇（検出感度が低下）する。また、5倍希釈を行った場合、理論上Ct値は2.32（$=\log_2 5$）上昇する。しかし、夾雑物の多いサンプルの場合、希釈によりRT-qPCR阻害が低減されるため、Ct値の上昇は2.32未満になると想定される。

結果及び考察

1．陽性コントロールの準備

陽性コントロールの段階希釈液をRT-qPCRに供試した結果、Fig. 1に示した検量線が得られた。リアルタイムPCRで定量を行うには、PCR効率が80～120%、検量線の直線性の目安である決定係数が0.98以上である必要があり、これらが基準値に満たない場合には、阻害物質の残存やプライマー性能の問題などが考えられる（北條、2008）。供試した希釈液のうち$3.5 \times 2^0 \sim 3.5 \times 2^6$ng/反応における検量線は、PCR効率は102.9%、決定係数は0.997を示したことから、3.5×2^0ng/反応以下であればRT-qPCR反応阻害が起こらず、プライマー及び陽性コントロールは定量用RT-qPCRとしての性能が十分であることが示された。

2．吸光度の比較

3-1及び4-1で抽出したTNAの吸光度を測定した（Table 2）。純度の高いTNAにおいては、A260/A280の吸光度比は1.8～2.0、A260/A230は1.8～2.2になるとされる（Desjardins and Conklin, 2010）。A260/A280はすべての植物において、CTAB法、PVP-カリウムSDS法ともに良好な数値が得られた。一方、A260/A230においては、PVP-カリウムSDS法ではオランダイチゴ属の一種、ミツバカイドウ、サクランボ、セイヨウナシ、クロフサスグリ、ラズベリー、スノキ属の一種で低い値を示し、特にセイヨウナシ及びクロフサスグリでは1.0を下回った。CTAB法におけるA260/A230では、サクランボ、セイヨウナシ、ラズベリーでやや低い値を示したが、いずれもPVP-カリウムSDS法よりも良好であった。

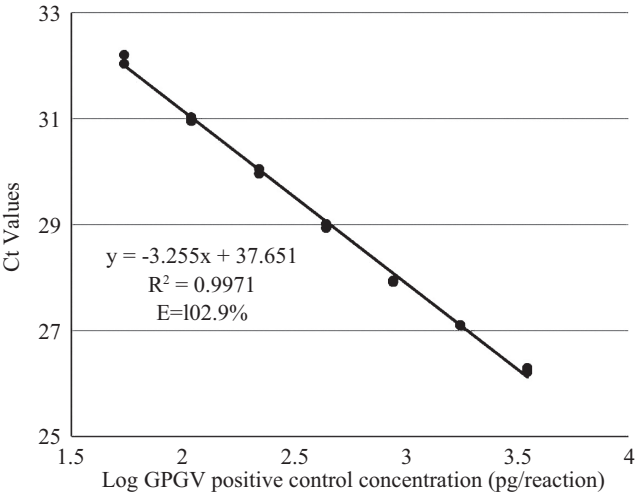

Fig. 1. Standard curves plotted based on cycle threshold (Ct) values obtained from a twofold GPGV positive control dilution series used for real-time RT-PCR assays. The linear relationship between Ct values and log GPGV positive controls was established with regression coefficients (R^2) exceeding 0.99, and the efficiency (E) was calculated at 102.9%.

3．核酸抽出法の比較１：TNAがRT-qPCR反応に与える反応阻害率の調査

オランダイチゴ属及びラズベリーを除く8種植物においては、CTAB及びPVP-カリウムSDS法の原液区のΔCt値の差は0.7（RT-qPCR阻害率は約1.6倍）以下となり、RT-qPCR阻害程度に明確な差は認められず、5倍希釈区においては、両検出法間のCt値の差はさらに小さくなり、概ねRT-qPCR阻害程度に明確な差は認められなくなった。一方、オランダイチゴ属及びラズベリーではCTAB法の方が明確に良好な結果となった（Table 3）。

PVP-カリウムSDS法の原液区では、オランダイチゴ属の一種及びラズベリーにおいて著しいRT-qPCR阻害が認められ、特にオランダイチゴ属の一種ではΔCt値が5.65（RT-qPCR阻害率：50倍）と非常に高い値を示した。5倍希釈区でも、オランダイチゴ属の一種及びラズベリーでは、ΔCt値がそれぞれ1.93、1.35（各RT-qPCR阻害率：3.8、2.5倍）となり、PVP-カリウムSDS法ではRT-qPCR阻害物質が多く残存していることが示唆された。

CTAB法の5倍希釈区では、オランダイチゴ属の一種でΔCt

Table 2. Average of total nucleic acids concentration and A260/A280 and A260/A230 for CTAB method and K-SDS extracts from plant materials.

Plant	Nucleic acid extraction method	TNA (ng/µl)[a]	A260/A280	A260/A230
Citrus sp.	CTAB	354.9 ± 13.9	2.08 ± 0.00	2.29 ± 0.03
	PVP- Potassium SDS	316.6 ± 5.2	2.09 ± 0.01	2.30 ± 0.03
Fragaria virginiana	CTAB	122.5 ± 2.6	2.10 ± 0.01	2.06 ± 0.02
	PVP- Potassium SDS	164.4 ± 5.4	2.03 ± 0.01	1.42 ± 0.06
Ipomoea setosa	CTAB	56.2 ± 2.6	2.15 ± 0.02	2.19 ± 0.07
	PVP- Potassium SDS	44.1 ± 0.9	2.14 ± 0.02	1.98 ± 0.04
Malus sieboldii	CTAB	175.2 ± 4.9	2.05 ± 0.01	1.88 ± 0.02
	PVP- Potassium SDS	182.0 ± 4.7	2.04 ± 0.00	1.63 ± 0.01
Prunus avium	CTAB	231.8 ± 11.7	2.14 ± 0.01	1.73 ± 0.06
	PVP- Potassium SDS	219.8 ± 9.5	2.02 ± 0.03	1.23 ± 0.04
Prunus persica	CTAB	279.2 ± 8.6	2.17 ± 0.01	2.01 ± 0.07
	PVP- Potassium SDS	337.3 ± 11.4	2.15 ± 0.00	2.17 ± 0.02
Pyrus communis	CTAB	232.1 ± 6.3	2.08 ± 0.01	1.50 ± 0.02
	PVP- Potassium SDS	238.5 ± 9.6	1.74 ± 0.03	0.74 ± 0.04
Ribes nigrum	CTAB	123.8 ± 3.7	2.06 ± 0.01	1.81 ± 0.03
	PVP- Potassium SDS	184.8 ± 7.8	1.89 ± 0.02	0.95 ± 0.03
Rubus idaeus	CTAB	118.9 ± 3.9	1.97 ± 0.01	1.76 ± 0.06
	PVP- Potassium SDS	155.7 ± 3.3	1.98 ± 0.01	1.64 ± 0.05
Vaccinium virgatum	CTAB	158.0 ± 5.6	2.02 ± 0.01	2.24 ± 0.02
	PVP- Potassium SDS	129.0 ± 10.6	1.82 ± 0.02	1.14 ± 0.04

a Total nucleic acid concentration
b average ± standard error

Table 3. Comparison of increase of Ct value for spiked positive control by each extraction method.

Plant	Nucleic acid extraction method	ΔCt[a] (average ± standard error)	
		Undiluted	5-fold dilution
Citrus sp.	CTAB	1.71 ± 0.13	0.93 ± 0.04
	PVP- Potassium SDS	1.71 ± 0.09	0.76 ± 0.06
Fragaria virginiana	CTAB	2.01 ± 0.55	1.35 ± 0.41
	PVP- Potassium SDS	5.65 ± 0.37	1.93 ± 0.08
Ipomoea setosa	CTAB	0.52 ± 0.11	0.12 ± 0.04
	PVP- Potassium SDS	0.71 ± 0.02	0.00 ± 0.05
Malus sieboldii	CTAB	1.05 ± 0.11	0.33 ± 0.07
	PVP- Potassium SDS	1.56 ± 0.10	0.49 ± 0.03
Prunus avium	CTAB	1.27 ± 0.10	0.52 ± 0.13
	PVP- Potassium SDS	1.97 ± 0.11	0.73 ± 0.13
Prunus persica	CTAB	1.72 ± 0.10	0.75 ± 0.06
	PVP- Potassium SDS	1.54 ± 0.08	0.83 ± 0.05
Pyrus communis	CTAB	1.75 ± 0.12	0.80 ± 0.12
	PVP- Potassium SDS	1.53 ± 0.10	0.59 ± 0.04
Ribes nigrum	CTAB	1.25 ± 0.06	0.60 ± 0.07
	PVP- Potassium SDS	1.48 ± 0.06	0.56 ± 0.06
Rubus idaeus	CTAB	1.67 ± 0.06	0.63 ± 0.08
	PVP- Potassium SDS	3.23 ± 0.77	1.35 ± 0.13
Vaccinium virgatum	CTAB	1.44 ± 0.10	0.54 ± 0.08
	PVP- Potassium SDS	1.19 ± 0.07	0.65 ± 0.06

a ΔCt = ""Ct value of test group with added positive control and TNA of healthy plant"" - ""Ct value of test group with added positive control and sterilized distilled water"". The closer " Ct is to 0, the less RT-qPCR inhibition.

値が 1.35（RT-qPCR 阻害率：2.5 倍）と高い値を示した。一方、他 9 種植物で ΔCt 値が 1 未満となったことから、RT-qPCR 阻害物質の残存は少ないことが示唆された。

４．核酸抽出法の比較２：RT-qPCR 阻害物質残存及び核酸流失の調査

結果 2 と同様、ミカン属の一種、サツマイモ属の一種、ミツバカイドウ、モモ、クロフサスグリ、スノキ属の一種では 2 法による明確な差は、原液区・5 倍希釈区共に認められなかったことから、2 法間の RT-qPCR 阻害物質残存及び核酸流失の程度に差はないことが示唆された。一方、オランダイチゴ属の一種及びラズベリーの PVP-カリウム SDS 法においては、原液区・5 倍希釈区共に著しい RT-qPCR 阻害が認められた。（Table 4）。

PVP-カリウム SDS 法の原液区と 5 倍希釈区の差を比較すると、最も Ct 値差のあったサツマイモ属の一種であっても 1.27 の差があり、理論上の Ct 値差である 2.32 には及ばなかったことから、原液では RT-qPCR 阻害物質を完全には除去しきれないことが示唆された。さらに、オランダイチゴ属の一種、サクランボ、セイヨウナシ、ラズベリー、スノキ属の一種においては、原液区よりも 5 倍希釈区のほうが低い Ct 値を示したことから、原液には多量の RT-qPCR 阻害物質が残存していると考えられる。特にラズベリーにおいては、5 倍希釈区においてもウイルスを検出できなかったことから、検査に用いることは困難と考えられた。興味深いことに、結果 3 では明確な差は認められなかった PVP-カリウム SDS 法のサクランボ及びセイヨウナシにおいて、CTAB 法よりも PVP-カリウム SDS 法の Ct 値が 2~3 高い値を示し、さらに PVP-カリウム SDS 法の原液区よりも 5 倍希釈区のほうが低い Ct 値を示した。このことは、RT-qPCR 阻害以外に、抽出時に核酸が流失するなど、様々な要因が関与していると考えられたが、本試験においては原因を究明することはできなかった。

CTAB 法の原液区と 5 倍希釈区の差を比較すると、最も Ct 値差のあったサツマイモ属の一種であっても 1.73 の差があり、CTAB 法であっても原液では RT-qPCR 阻害物質を完全には除去しきれないものの、PVP-カリウム SDS 法と比較すると総じて理論値に近かったことから、PVP-カリウム SDS 法よりも検査に用いるのには適していることが示唆された。しかし、オランダイチゴ属の一種においては、5 倍希釈により Ct 値が減少したことから、検査の際には 5 倍希釈液を用いることが推奨された。

結果 3 及び 4 で示した 2 種の spike テストにおいて、ミカン属の一種、サツマイモ属の一種、ミツバカイドウ、モモ、クロフサスグリ、スノキ属の一種では各核酸抽出法による明確な差は認められなかった。しかし、クロフサスグリ、スノキ属の一種においては、PVP-カリウム SDS 法では吸光度の明確な悪化が結果 2 で確認されている。このことから、吸光度比の測定は簡便ではあるものの、それだけで核酸抽出法を評価するには不十分であることが示唆された。正確に核酸抽出法を評価するに

Table 4. Comparison of Ct value for TNA extracted from plant material spiked with positive control by each extraction method.

Plant	Nucleic acid extraction method	Ct[a] (average ± standard error)	
		Undiluted	5-fold dilution
Citrus sp.	CTAB	28.72 ± 0.11	30.06 ± 0.13
	PVP- Potassium SDS	28.63 ± 0.08	29.96 ± 0.13
Fragaria virginiana	CTAB	30.51 ± 0.21	29.97 ± 0.15
	PVP- Potassium SDS	Not detected (35.48 ± 0.88)[b]	31.86 ± 0.17
Ipomoea setosa	CTAB	28.02 ± 0.05	29.75 ± 0.21
	PVP- Potassium SDS	28.11 ± 0.09	29.38 ± 0.15
Malus sieboldii	CTAB	28.55 ± 0.11	29.82 ± 0.14
	PVP- Potassium SDS	28.46 ± 0.05	29.59 ± 0.07
Prunus avium	CTAB	28.98 ± 0.10	30.03 ± 0.12
	PVP- Potassium SDS	32.47 ± 0.46	32.20 ± 0.57
Prunus persica	CTAB	28.73 ± 0.04	29.95 ± 0.10
	PVP- Potassium SDS	28.74 ± 0.09	29.69 ± 0.14
Pyrus communis	CTAB	29.09 ± 0.10	30.36 ± 0.14
	PVP- Potassium SDS	32.92 ± 0.27	32.34 ± 0.44
Ribes nigrum	CTAB	28.53 ± 0.05	30.22 ± 0.21
	PVP- Potassium SDS	28.62 ± 0.06	29.73 ± 0.13
Rubus idaeus	CTAB	29.24 ± 0.16	30.04 ± 0.09
	PVP- Potassium SDS	Not detected [c]	Not detected (33.97 ± 1.47)[b]
Vaccinium virgatum	CTAB	29.65 ± 0.06	30.76 ± 0.10
	PVP- Potassium SDS	30.47 ± 0.26	30.44 ± 0.13

a Ct value when Threshold Lines are 0.2
b Not detected in 1 replicate of 1 sample
c Not detected in all samples

は、spike テストにより RT-qPCR 阻害率を比較する必要があることを裏付ける結果となった。

以上の吸光度及び 2 種の spike テストの結果から、供試した 10 種の植物における核酸抽出では、CTAB 法を用いることで高い検出感度を得られることが示唆された。隔離栽培検査における核酸抽出法を CTAB 法とすることで、分子生物学的診断における偽陰性のリスク軽減や検出感度の向上し、隔離栽培検査の精度向上が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、GPGV 感染ブドウを分譲いただいたカリフォルニア大学デービス校の Maher Al Rwahnih 博士に厚く感謝申し上げる。

引用文献

Berensmeier, S. (2006) Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**: 495-504.

Brooks, G. (1998) *Biotechnology in Healthcare: An Introduction to Biopharmaceuticals*. Pharmaceutical Press, London, UK.

Chomczynski, P., N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. **162**(1): 156-159.

Dellaporta, S.L., J. Wood, J.B. Hicks (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep*. **1**: 19-21

Demeke, T., R.P. Adams (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*. **12**(3): 332-334.

Desjardins, P., D. Conklin (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Visualized Exp*. **45**: 2565.

北條浩彦（2008） 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド. 羊土社 東京 日本：1-189.

Japelaghi, R.H., R. Haddad, G.A. Garoosi (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol. Biotechnol*. **49**: 129-137.

勝幸司・柳澤広宣・神谷昌希・城戸剛（2017） 小果樹類に感染するウイルスの検出に適した試料採取の時期及び部位の調査. 植防研報. **53**：69-74.

Padhye, V.V., C. York, A. Burkiewiez (1997) Nucleic acid purification on silica gel and glass mixture. United States patent US 5658548, Promega Corporation.

Pumplin, N., O. Voinnet (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol*. **11**(11): 745-760.

Tan, S.C., B.C. Yiap (2009) DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Biomed Res Int*. **2009**(1): 574398.

髙橋智之・前川晃演（2024） ブドウに感染する 4 種ウイルスを適切に検出するための試料採取の時期及び部位並びに核酸抽出法の調査. 植防研報. **60**：1-7.