

Horeseradish Peroxydase 標識抗体を 用いた ELISA の検討

川 合 昭・西 尾 健

横浜植物防疫所

Studies of a Modified ELISA Using Peroxidase-Antibody Conjugate. Akira KAWAI and Takeshi NISHIO (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Prot. Japan* 25: 35-37 (1989).

Abstract: The conditions of a modified ELISA using horseradish peroxidase-antibody conjugate (HRP-ELISA) for detection of citrus tatter leaf virus in citrus leaves were investigated. When citrus leaf extract for incubation in the wells of ELISA plate was diluted more than 1:10 (w/v), significant reduction in the intensity of non-specific reaction was obtained. The incubation of the mixture of the test sample and the conjugate overnight at 4°C was extremely effective for reduction of the non-specific reaction and intensification of the specific reaction in comparison with the incubation of 3 hours at 37°C.

Key words: peroxidase, ELISA, citrus tatter leaf virus, detection

酵素結合抗体法(ELISA)では、アルカリ性ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼなどが標識酵素として用いられている(石川ら, 1982)。植物ウイルスを対象とした ELISA では、アルカリ性ホスファターゼを用いた例が多いが、ELISA の検出感度を高める必要がある場合などで、ペルオキシダーゼ(BABARA and CLARK, 1982)、ウレアーゼ(CHANDLER *et al*, 1982)を用いた報告も散見される。

カンキツの citrus tatter leaf virus (CTLV) の検出を、西洋わさびのペルオキシダーゼ(HRP)を標識した抗体を用いた ELISA (HRP-ELISA) により試みた。その結果、HRP-ELISA は、アルカリ性ホスファターゼを用いた ELISA よりも高感度であるが、操作法、条件により、非特異発色が現れやすい傾向が認められた。そこで、HRP-ELISA における非特異発色の原因及びその抑制について調査した。本調査において終始有益なご助言、ご指導を賜った当所国内課長尾記明課長に厚くお礼申し上げる。

非特異発色の原因

ペルオキシダーゼが分解する基質は過酸化水素であ

る。HRP-ELISA の反応系は試料中の抗原の有無を、 H_2O_2 の分解の有無によって検知する系である。しかし、 H_2O_2 はペルオキシダーゼのみが分解するのではなく、アルカリ、二酸化マンガン等のほか微細な粉末、粗雑な面を持つ固体、塵埃など種々のものが触媒となって容易に分解して酸素を放ち、また、吸熱分解も起こす(玉虫ら, 1971)。HRP-ELISA では、検出すべき抗原の存在によりトラップされたコンジュゲートの酵素のみによって H_2O_2 が分解されるように制御する必要がある。HRP-ELISA において非特異発色の生じる可能性としては、① 試料由来のペルオキシダーゼや H_2O_2 分解の解媒となりうる物質(H_2O_2 分解促進物質)の ELISA の最終段階までの残存、② ELISA プレートへのコンジュゲートの非特異的吸着、③ 基質反応中における光等による H_2O_2 の分解、等が考えられる。

寄主由来の H_2O_2 分解促進物質の影響の調査

CTLV の HRP-ELISA の手順は Fig. 1 (川合ら, 1988) のとおりである。この手順のなかの、試料液とコンジュゲートの混合液を ELISA プレート中で静置する段階で、コンジュゲートを加えず、試料液(カンキツ葉汁液)のみを静置し、ELISA プレートを洗浄後直ちに基質液を投入して、カンキツ葉由来の H_2O_2 分

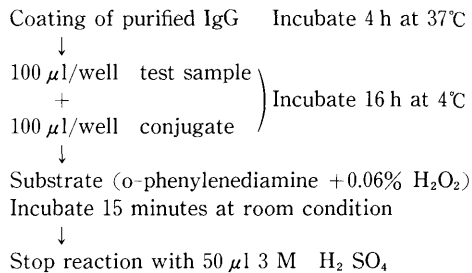


Fig. 1. Procedure for HRP-ELISA for CTLV detection in citrus trees.

解促進物質の影響を調査した。カンキツ葉を1.25倍容量のPBS・T・PVP・A（リン酸緩衝生理食塩水；0.02 M Na-Kリン酸緩衝液，0.15 M 塩化ナトリウム，pH 7.0，にTween-20を0.05%，ポリビニールピロリドン M.W. 40,000を2%，牛血清アルブミンを0.2%添加した溶液）で磨砕し（原液），PBS・T・PVP・Aで段階希釈して抗CTLV-IgG（中国産カンキツ，大紅甜橙，から分離したCTLV，K-1株を家兎に免疫して得た抗血清；力価512倍から純化したもの）をコーティング（2.5 μ l/ml）したELISAプレートに投入して37°C 3時間静置した。静置の後，ELISAプレートをPBS・T（リン酸緩衝生理食塩水にTween-20を0.05%添加した溶液）で洗浄し，直ちに基質液（0.025 M 酢酸ナトリウム液 pH 5.5にortho-phenylenediamineを0.5 g/l，過酸化水素を0.06%添加した溶液）を投入した。室温

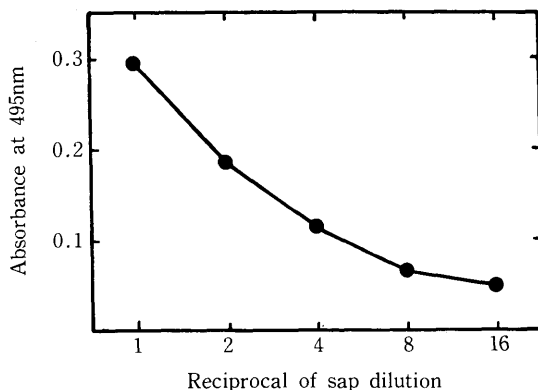


Fig. 2. Effectiveness of sap dilution for the intensity of non-specific reactions. Citrus leaf extract grinded with 1/1.25 (W/V) PBS・T・PVP・A was diluted with the same buffer and incubated 3 hours at 4°C in the wells coated with IgG. The wells treated with leaf extract were filled with the substrate immediately after rinsing.

下で15分間静置後3 M 硫酸を添加して基質の反応を停止させ，基質の発色をELISAリーダー（コロナ社製MTP-32）を用い495 nmの吸光度で測定した。

その結果，カンキツ葉汁液（原液）を8倍以上（葉重量の10倍容量以上）に希釈した場合，基質の発色は肉眼的に検知可能のレベル以下におさえられた（Fig. 2）。

試料液+コンジュゲートの静置条件の調査

CTLVの罹病が確認されているカンキツ葉（り病区）および健全カンキツ葉（健全区）をそれぞれ10倍容量のPBS・T・PVP・Aで磨砕した試料液と，PBS・T・PVP・Aで希釈したコンジュゲートを等量混合して抗CTLV-IgGをコーティング（2.5 μ l/ml）した2枚のELISAプレートに投入し，試料液+コンジュゲートの静置を37°C 3時間行った場合と4°C 16時間行った場合とで比較した。

その結果，4°C 16時間静置した場合は，37°C 3時間の場合に比べ，健全区の発色（非特異発色）が少なく，また，り病区の発色が増大された。

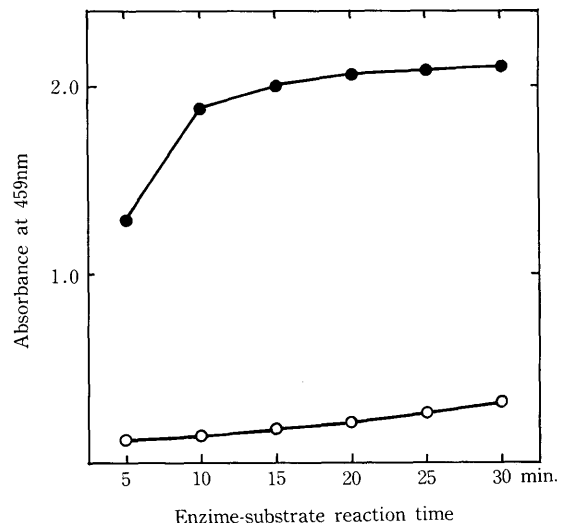
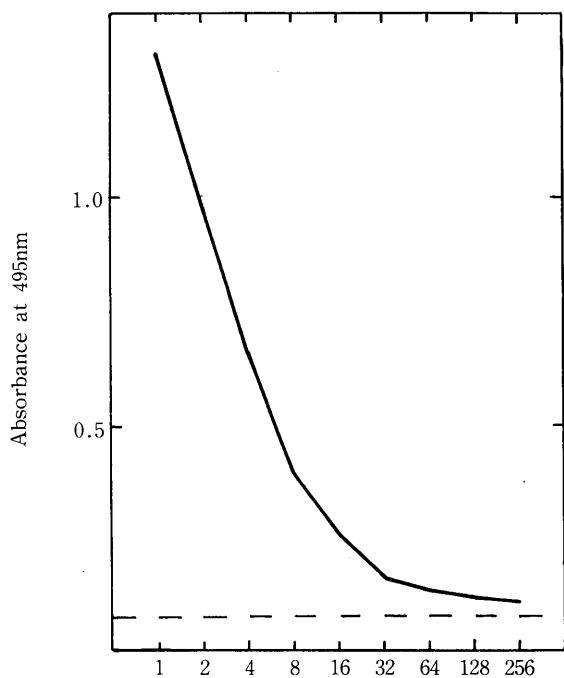


Fig. 3. Changes of absorbance by enzyme-substrate reaction time. The diseased citrus and the healthy citrus were assayed by ELISA and the final substrate reaction were stopped by 3 M H_2SO_4 at 5 minutes intervals. Open circles indicate healthy samples. Solid circles indicate diseased samples.



Reciprocal of diseased leaf extract diluted with healthy leaf extract.

Fig. 4. The sensitivity of modified ELISA using peroxidase-antibody conjugate for detecting CTLV in citrus.

The diseased citrus leaf extracts grinded with 1:10 (W/V) PBS・T・PUP・A were diluted with the healthy leaf extracts treated with same manar as diseased extract. Dotted line indicates absorbance level for healthy leaf extract grinded with 1:10 (W/V) PBS・T・PVP・A.

基質の反応時間

CTLV の罹病が確認されているカンキツ葉（り病区）および健全カンキツ葉（健全区）を供して、Fig. 1 に示す HRP-ELISA を行い、最終工程の基質の反応時間を 5～30 分とした時の発色を調べた。その結果、Fig. 3 のとおり、り病区は 15 分間でほぼ反応が終了し、それ以上反応させても発色が顕著に増加しなかったのに比べ健全区は、反応時間が長いほど発色が増加した。

HRP-ELISA の最適条件

以上の結果から、HRP-ELISA では試料葉の磨砕には葉重の 10 倍容量以上の磨砕液で磨砕し、試料液＋コンジュゲートの静置を 4℃ 16 時間行い、基質の反応時間を 15 分間とした場合、最も非特異発色が少なく、特異発色も顕著になるものと考えられた。そこで、この条件により、HRP-ELISA によるカンキツ葉からの CTLV の検出限界を調査した。葉重量の 10 倍容量の PBS・T・PYP・A を加えて磨砕した CTLV り病葉（K-1 株ウイルスを接ぎ木接種した“Cuban shaddock”）汁液を、同様に調整した健全カンキツ葉汁液で段階希釈して ELISA を行なった。その結果、健全カンキツ葉汁液の示す発色の 2 倍以上を陽性とする、り病葉汁液：健全葉汁液が 1:32（り病葉重量：試料容量では 1:640）まで陽性であった。

以上のとおり、HRP-ELISA では、条件を選択することにより非特異発色の影響を受けることなく、カンキツから CTLV を検出することが可能であることが確認された。このため、カンキツ苗木の CTLV 検定のほか、より簡便な CTLV 純化法の検討、CTLV の疫学的研究などへの HRP-ELISA の利用が考えられる。

また、HRP-ELISA は、アルカリ性ホスファターゼを用いた ELISA に比べ、検出感度が高くなること、酵素、基質の単価が廉価であるなどの経済性等多くの利点があると考えられる。

引用文献

- BARBARA, D.J. and M.F. CLARK (1982) A Simple Indirect ELISA using F (ab')₂ Fragments of Immunoglobulin. J. gen. Virol, 58: 315-322.
- CHANDLER, H.M., J.C. COX, K. HEALEY, A. MACCREGOR, R.R. PREMIER and J.G.R. HURRELL (1982) An Investigation of the Use of Urease-Antibody Conjugates in Enzyme Immunoassays. J. gen. Virol. 53: 187-194.
- 石川榮治・河合 忠・宮井 潔編 (1982) 酵素免疫測定法, 第 2 版, 医学書院, 東京, 471 p.
- 川合 昭・長尾記明・西尾 健 (1988) ELISA による citrus tatter leaf virus の検出について (講要) 日植病報, 54: 78.
- 玉虫文一ら編 (1971) 岩波理化学事典第 3 版, 岩波書店, 東京, 1823 p.