

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-258571
(P2001-258571A)

(43) 公開日 平成13年9月25日 (2001.9.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		1/70	4 B 0 6 3
1/70		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		33/569	L
審査請求 有 請求項の数19 O L (全 31 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-81878(P2000-81878)

(22) 出願日 平成12年3月23日(2000.3.23)

(71) 出願人 591025303

農林水産省果樹試験場長
茨城県つくば市藤本2-1

(72) 発明者 吉田 幸二

岩手県盛岡市北松園2丁目11番9号

(72) 発明者 中原 健二

秋田県南秋田郡大瀧村字西2丁目4番地17

(72) 発明者 伊藤 伝

長崎県南高来郡口之津町乙2311番地 果樹
試験場宿舎

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの検出方法及び検出用プライマー

(57) 【要約】

【解決手段】 被検植物の組織から抽出したRNAを鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第1の部分領域を増幅し得る第1の相同プライマー及び第1の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第1の増幅産物を取得し、次いで前記第1の増幅産物を鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノムRNAの前記第1の部分領域に含まれる第2の部分領域を増幅し得る第2の相同プライマー及び第2の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第2の増幅産物を取得することにより、前記被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出する方法を提供する。

【効果】 本発明により、ACLSVの複数の分離株を同時に検出することが可能となる。従って、本発明によれば、時期を選ばないリンゴ樹の正確なACLSV感染診断が可能となり、これにより、ACLSV未感染のリンゴ苗木を供給することが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (i) 被検植物の組織から抽出した RNA を鋳型として使用し、リングクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 1 の部分領域を増幅し得る第 1 の相同プライマー及び第 1 の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第 1 の増幅産物を取得し；次いで (ii) 前記第 1 の増幅産物を鋳型として使用し、リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノム RNA の前記第 1 の部分領域に含まれる第 2 の部分領域を増幅し得る第 2 の相同プライマー及び第 2 の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第 2 の増幅産物を取得する；ことにより、前記被検植物からリングクロロティックリーフスポットウイルスを検出する方法。

【請求項 2】 リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株が、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、MO31株、MO41株及びB81株である請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 3】 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 1、2 又は 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第 2 の相同プライマーが、(i) 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 2、3 若しくは 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；(ii) 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 3 若しくは 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；又は (iii) 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；である請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 4】 前記第 1 の相補プライマーが配列番号 6、7 又は 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第 2 の相補プライマーが、(iv) 前記第 1 の相補プライマーが配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；(v) 前記第 1 の相補プライマーが配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 5 若しくは 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；又は (vi) 前記第 1 の相補プライマーが配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号 5、6 若しくは 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；である請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 5】 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 2 の相同プライマーが配列番号 4 で表わされ

る塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 1 の相補プライマーが配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第 2 の相補プライマーが配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 6】 前記被検植物が、リンゴ、モモ、スモモ、アウトウ又はアンズである請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 7】 前記組織が花卉、葉又は樹皮である請求項 1 記載のウイルス検出方法。

【請求項 8】 (i) リングクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 1 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；並びに (ii) リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノム RNA の前記第 1 の部分領域に含まれる第 2 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；を含む、被検植物からリングクロロティックリーフスポットウイルスを検出するためのプライマーセット。

【請求項 9】 リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株が、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、MO31株、MO41株及びB81株である請求項 8 記載のプライマーセット。

【請求項 10】 配列番号 1～4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される 2 種類の相同プライマー、及び配列番号 5～8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される 2 種類の相補プライマーを含む請求項 8 記載のプライマーセット。

【請求項 11】 配列番号 3～6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 8 記載のプライマーセット。

【請求項 12】 (i) 被検植物の組織から抽出した RNA を鋳型として使用し、リングクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 1 及び第 2 の部分領域を増幅し得る第 1 及び第 2 の相同プライマー並びに第 1 及び第 2 の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第 1 の増幅産物を取得し；次いで (ii) 第 1 の増幅産物を鋳型として使用し、リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノム RNA の第 3 及び第 4 の部分領域を増幅し得る第 3 及び第 4 の相同プライマー並びに第 3 及び第 4 の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第 2 の増幅産物を取得する；ことにより、前記被検植物からリングクロロティックリーフスポットウイルスを検出する方法。

【請求項 13】 リングクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株が、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5

株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、MO31株、MO41株及びB81株である請求項 1 2 記載のウイルス検出方法。

【請求項 1 4】 前記第 1 の相同プライマーが配列番号 1 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 2 の相同プライマーが配列番号 3 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 3 の相同プライマーが配列番号 2 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 4 の相同プライマーが配列番号 4 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 1 の相補プライマーが配列番号 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 2 の相補プライマーが配列番号 6 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第 3 の相補プライマーが配列番号 7 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第 4 の相補プライマーが配列番号 5 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである請求項 1 2 記載のウイルス検出方法。

【請求項 1 5】 前記被検植物が、リンゴ、モモ、スモモ、オウトウ又はアンズである請求項 1 2 記載のウイルス検出方法。

【請求項 1 6】 前記組織が花卉、葉又は樹皮である請求項 1 2 記載のウイルス検出方法。

【請求項 1 7】 (i) リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 1 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；(ii) リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 2 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；(iii) リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノム RNA の第 3 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；並びに(iv) リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノム RNA の第 4 の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；を含む、被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出するためのプライマーセット。

【請求項 1 8】 リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株が、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、MO31株、MO41株及びB81株である請求項 1 7 記載のプライマーセット。

【請求項 1 9】 配列番号 1 ~ 8 で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む請求項 1 7 記載のプライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物ウイルスの検出方法に関し、より詳細には、リンゴクロロティックリーフスポットウイルス (apple chlorotic leaf spot viru

s、以下「ACLSV」という。)の複数の分離株を同時に検出する方法、及び該方法に用いることのできるオリゴヌクレオチドに関する。

【0002】

【従来の技術】ACLSVは、リンゴ高接病を引き起こす 3 種類の病原ウイルスの一つで、リンゴ台木であるマルバカイドウを衰弱させる。世界にも広く分布し、リンゴの他にモモ、スモモ、オウトウ、アンズを犯す重要病害である。

【0003】ACLSVは、約 2.5×10^3 kDaの一本鎖RNAと22kDaの外皮タンパク質からなるウイルスである。従って、被検植物がACLSVに感染しているかどうかの診断は、指標植物への接ぎ木による生物検定法、外皮タンパク質に対する抗体を用いた免疫検定法、例えば固相酵素免疫検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay、以下「ELISA」という。)、ウイルスゲノムに対する相補的なDNA又はRNAをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法などにより行われていた。

【0004】しかし、生物検定法は感度が高いものの、数ヶ月から数年の検定期間を要し、さらにACLSV潜在系統では病徴が弱いか又は病徴を示さない場合があるため、判定が困難である。また、ELISAやハイブリダイゼーションでは、指標植物においてはACLSVを検出できるものの、ウイルス濃度が低いリンゴ樹から直接検出するには感度が充分でなく、検出できるのは花卉と同時期に採取された若葉だけである (菅野善明・吉川信幸・高橋荘、日本植物病理学会報、第57巻、第278頁)。

【0005】最近、遺伝子の特定の配列を指数関数的に増幅する方法が開発された。一つは、特定のDNA断片を指数関数的に増幅するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法である (Saiki, R.K.ら、Science 239, 487-491 (1988))。もう一つは、特定のRNA断片を指数関数的に増幅する方法で、Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) 法である (Davey and Malek, 1989, European Patent No. EP0329822)。これらの方法はウイルス診断にも応用されている。すなわち、ウイルスゲノムの一部の配列を指数関的に増幅した後に、得られる増幅断片をゲル電気泳動やハイブリダイゼーションで検出することにより、非常に高感度にウイルスを検出することができる。さらに、より高感度にウイルス等を検出する方法として、ネステッドPCRやネステッドNASBA (Kievits, T.ら、J. Virol. Methods 35, 273-286 (1991))が開発されている。

【0006】ACLSVには、マルバカイドウに対して病原性の違う分離株 (潜在系から強毒系)がある。一方、リンゴ、スモモ及びオウトウが保毒するACLSVのゲノムの全塩基配列がそれぞれ決定されており (German, S.ら、Virology, Vol. 179, 104-112 (1990), Sato, K.ら、J. Gen. Virol., Vol. 74, 1927-1931 (1993), German, S.ら、Arch. Virol., Vol. 142, 833-841 (1997))、それ

らの間で塩基配列を比較すると、多くの領域で配列の違いが認められる(相同性: 76~82%)。従って、リンゴ樹の保毒する病原性の違うACLSV分離株間で、ゲノムの塩基配列の違いがある可能性が考えられる。さらに、リンゴ樹が保毒する各ACLSV分離株は複数の塩基配列を含むヘテロな集団であることが判明している(中原ら、日本植物病理学会報、第64巻605頁(1998))。従って、上述の遺伝子増幅法をACLSVの検出に応用する場合、あるACLSVゲノムに対して設計した一種類のプライマーでは、全てのACLSV分離株のゲノム配列を増幅することはできないと考えられる。リンゴ樹が保毒するACLSVの検出方法として遺伝子増幅法を用いた方法は非常に有望であるが、上述のように、従来の方法は、ACLSV分離株全てを診断するには適していない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、複数のACLSV分離株を同時に被検植物から直接検出できる高感度診断法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、病原性の異なる複数のACLSV分離株のゲノムRNAに基づいて設計した複数組のプライマーを用いる遺伝子増幅法により、該複数のACLSV分離株の全てをリンゴ樹から直接検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】すなわち、本発明は、(i)被検植物の組織から抽出したRNAを鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第1の部分領域を増幅し得る第1の相同プライマー及び第1の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第1の増幅産物を取得し；次いで(ii)前記第1の増幅産物を鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノムRNAの前記第1の部分領域に含まれる第2の部分領域を増幅し得る第2の相同プライマー及び第2の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第2の増幅産物を取得する；ことにより、前記被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出する方法を提供する。

【0010】ここで、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株は、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株であることが好ましい。

【0011】前記第1の相同プライマーは配列番号1、2又は3で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第2の相同プライマーは、(i)前記第1の相同プライマーが配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号2、3若しくは4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；(ii)前記第1の相同プライマーが配列

番号2で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号3若しくは4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；又は(iii)前記第1の相同プライマーが配列番号3で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；であることが好ましい。

【0012】また、前記第1の相補プライマーは配列番号6、7又は8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第2の相補プライマーは、(iv)前記第1の相補プライマーが配列番号6で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号5で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；(v)前記第1の相補プライマーが配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号5若しくは6で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；又は(vi)前記第1の相補プライマーが配列番号8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである場合には、配列番号5、6若しくは7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチド；であることが好ましい。

【0013】より好ましくは、前記第1の相同プライマーは配列番号3で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の相同プライマーは配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第1の相補プライマーは配列番号6で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第2の相補プライマーは配列番号5で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである。前記被検植物は、リンゴ、モモ、スモモ、オウトウ又はアンズであることが好ましい。また、前記組織は、花卉、葉又は樹皮であることが好ましい。

【0014】さらに、本発明は、(i)リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第1の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；並びに(ii)リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノムRNAの前記第1の部分領域に含まれる第2の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；を含む、被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出するためのプライマーセットを提供する。

【0015】ここで、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株は、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株であることが好ましい。

【0016】また、上記プライマーセットは、好ましくは、配列番号1~4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される2種類の相同プ

ライマー、及び配列番号5～8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される2種類の相補プライマーを含み、より好ましくは、配列番号3～6で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0017】さらに、本発明は、(i)被検植物の組織から抽出したRNAを鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第1及び第2の部分領域を増幅し得る第1及び第2の相同プライマー並びに第1及び第2の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第1の増幅産物を取得し；次いで(ii)第1の増幅産物を鋳型として使用し、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノムRNAの第3及び第4の部分領域を増幅し得る第3及び第4の相同プライマー並びに第3及び第4の相補プライマーを用いる核酸増幅を行って第2の増幅産物を取得する；ことにより、前記被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出する方法を提供する。

【0018】ここで、前記第1～4の部分領域の相互の位置関係については、第1の部分領域及び第2の部分領域が、それぞれ第3の部分領域及び第4の部分領域を内包することが必要であり、好ましくは、第4の部分領域が第2の部分領域に内包され、第2の部分領域が第3の部分領域に内包され、第3の部分領域が第1の部分領域に内包されるようにする。

【0019】ここで、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株は、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株であることが好ましい。

【0020】前記第1の相同プライマーは配列番号1で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の相同プライマーは配列番号3で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3の相同プライマーは配列番号2で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第4の相同プライマーは配列番号4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第1の相補プライマーは配列番号8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第2の相補プライマーは配列番号6で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、前記第3の相補プライマーは配列番号7で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであり、かつ前記第4の相補プライマーは配列番号5で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

【0021】前記被検植物は、リンゴ、モモ、スモモ、オウトウ又はアンズであることが好ましい。また、前記組織は、花卉、葉又は樹皮であることが好ましい。さらに、本発明は、(i)リンゴクロロティックリーフス

ットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第1の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；(ii)リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第2の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；(iii)リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの複数の分離株のゲノムRNAの第3の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；並びに(iv)リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株のゲノムRNAの第4の部分領域を増幅し得る相同プライマー及び相補プライマー；を含む、被検植物からリンゴクロロティックリーフスポットウイルスを検出するためのプライマーセットを提供する。

【0022】ここで、前記第1～4の部分領域の相互の位置関係については、第1の部分領域及び第2の部分領域が、それぞれ第3の部分領域及び第4の部分領域を内包することが必要であり、好ましくは、第4の部分領域が第2の部分領域に内包され、第2の部分領域が第3の部分領域に内包され、第3の部分領域が第1の部分領域に内包されるようにする。

【0023】ここで、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの前記複数の分離株は、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株であることが好ましい。また、上記プライマーセットは、配列番号1～8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含むことが好ましい。

【0024】

【発明の実施の形態】1. 本発明のウイルス検出方法

本発明のウイルス検出方法は、被検植物からのRNAの抽出、ACLSV検出用合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いる遺伝子増幅反応及び該増幅反応により得られる増幅産物の検出を含む。以下、これらの各工程を詳細に説明する。

【0025】(1)被検植物組織からのRNAの抽出
本発明のウイルス検出方法では、リンゴ樹その他の被検植物組織から全RNAを抽出し、これを増幅のための鋳型として用いる。また、ACLSVのゲノムRNAは宿主植物のmRNAと同様に3'末端にアデニンの連続配列(ポリA)が付加されているため、被検植物組織からmRNAを抽出して鋳型に用いることもできる。さらに、ウイルス粒子を分離後、ウイルスゲノムRNAを抽出して鋳型に用いることもできる。

【0026】上記被検植物は、ACLSVのいずれかの分離株が感染し得る植物であればよく、特に限定されないが、好ましくはリンゴ、モモ、スモモ、オウトウ又はアンズ、より好ましくはリンゴである。また、上記組織は、ACLSVのいずれかの分離株が感染し得る組織であればよく、特に限定されないが、好ましくは花卉、葉又は樹皮である。

【0027】被検植物組織からの全RNAの抽出は、例えば、該組織を液体窒素で凍結後、その細胞組織を磨砕し、グアニジウムチオシアネートやフェノール・クロロフォルム溶液等で全RNAを抽出した後にエタノール沈殿等することにより行うことができる。被検植物組織からのmRNAは、前記全RNA又は組織の磨砕液からオリゴdTセルロース等により精製することができる。具体的な操作方法は、Molecular Cloning (Maniatisら、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)等に記載されている。このような全RNA又はmRNAの抽出・精製は、市販のRNA抽出キットを用いて行うこともできる。被検植物組織からのウイルスゲノムRNAの抽出は、ウイルス粒子に対する抗体により組織磨砕液から簡便に分離して行うイムノキャプチャー法 (Jansenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2867-2871(1990))等、公知の方法をACLSVに適用して行うことができる。

【0028】(2)ACLSV検出用合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いる遺伝子増幅反応
本発明のウイルス検出方法では、上記(1)で得られるRNA試料を鋳型として用い、ACLSV検出用合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いる遺伝子増幅反応を行う。

【0029】遺伝子増幅反応としては、ネステッドPCR法、ネステッドNASBA法等のネステッド(nested)様式の増幅反応を用いる。特に、デュアルネステッドPCR法、デュアルネステッドNASBA法等は有用である。これらの詳細については後述するが、通常のネステッドPCR法又はネステッドNASBA法を用いる場合には少なくとも2種の相同プライマー及び少なくとも2種の相補プライマーが必要となり、デュアルネステッドPCR法又はデュアルネステッドNASBA法を用いる場合には少なくとも4種の相同プライマー及び少なくとも4種の相補プライマーが必要となる。

【0030】本発明のウイルス検出方法において使用するプライマーは、ACLSVの複数の分離株のゲノムRNAの部分領域を増幅し得るものであり、これは、該複数の分離株のゲノムRNAの間で保存性の高い領域(保存領域)に基づいて設計することができる。ここで、上記複数の分離株は本発明のウイルス検出方法によって同時に検出しようとする分離株である。ただし、検出対象となる分離株はプライマーの設計に用いたものに限定されるものではなく、設計されたプライマーにより検出し得る分離株、すなわち、上記保存領域を有する分離株であればいずれも検出対象とすることができる。このようなACLSV分離株は当業者に公知のものであってよく、特に限定されないが、例えば、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株、B81株等が挙げられる。ここに挙げた16種の分離株は、農林水産

省果樹試験場リンゴ支場病害研究室(岩手県盛岡市下厩川字鍋屋敷92)で保存されている、マルバカイドウに対する病原性の異なるACLSV分離株である。

【0031】上記保存領域は、上記複数の分離株のゲノムRNA又はそのcDNAの塩基配列を比較することにより特定することができる。このような塩基配列は、当業者に公知のヌクレオチド配列データベース、例えばGenBank等を検索することにより容易に入手することができる。また、新たに配列決定したものをを用いることもできる。例えば、上記複数の分離株として、P205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株を用いる場合には、これらのゲノムにおける3'末端部分のcDNA塩基配列である配列番号11~42で表わされる塩基配列(これらのcDNA配列中に未決定の領域が存在するため、それぞれ前半と後半に分けて示す。);配列番号11(P205株前半)及び配列番号12(P205株後半);配列番号13(P195株前半)及び配列番号14(P195株後半);配列番号15(P195L株前半)及び配列番号16(P195L株後半);配列番号17(PK32株前半)及び配列番号18(PK32株後半);配列番号19(PK51株前半)及び配列番号20(PK51株後半);配列番号21(P142株前半)及び配列番号22(P142株後半);配列番号23(P143株前半)及び配列番号24(P143株後半);配列番号25(MK8株前半)及び配列番号26(MK8株後半);配列番号27(B81株前半)及び配列番号28(B81株後半);配列番号29(P202株前半)及び配列番号30(P202株後半);配列番号31(PK5株前半)及び配列番号32(PK5株後半);配列番号33(P125株前半)及び配列番号34(P125株後半);配列番号35(MK1株前半)及び配列番号36(MK1株後半);配列番号37(M031株前半)及び配列番号38(M031株後半);配列番号39(M041株前半)及び配列番号40(M041株後半);配列番号41(MK9株前半)及び配列番号42(MK9株後半);を用いることができる。このうち、P205株のcDNA塩基配列についてはGenBankに登録されている(登録番号:D14996)。

【0032】また、配列未知の分離株のゲノム由来のcDNA塩基配列は、上記配列番号11~42を決定した方法と同様の方法を用いて決定することができる。すなわち、まず、既にゲノムRNAの全塩基配列が決定されているリンゴ、スモモ及びオウトウから分離された3つのACLSV分離株において相同な配列を示す部分に基づき、合成オリゴヌクレオチドプライマーをいくつか設計する。次いで、ACLSVの濃度が比較的高い花卉若しくは同時期の若葉をそれぞれの分離株を保毒するリンゴ樹から採取して全RNAを抽出する。この全RNAを鋳型とし、上記の合成オリゴヌクレオチドプライマーにより逆転写及びPCRを行って、良好に増幅された増幅産物を

配列決定の対象とする。

【0033】例えば、ゲノムにおける3'末端部分のcDNA塩基配列を決定するためには、相同プライマー：5'-GAAGATCGCAGAAGGGGATATTC-3'（配列番号9）、及び相補プライマー：5'-GTCTACAGGCTATTTATTATAAG-3'（配列番号10）の組み合わせをプライマーとして用いることができ、これにより、その分離株のゲノムにおける3'末端部分約1800塩基のcDNAを増幅することができる。

【0034】こうして得られるcDNA断片の塩基配列は、はじめに増幅に用いた上記のプライマーで、このcDNA断片を鋳型にシーケンス反応を行うことにより決定することができ、さらに決定した配列に基づいて新たなプライマーを合成し、同様に塩基配列を決定することができる。これを繰り返してcDNA断片の塩基配列のほぼ全てを決定することができる。

【0035】上記保存領域は、以上のようにして得られる塩基配列のアライメントを取るにより特定することができる。複数の配列のアライメントを取るには、当業者に公知の方法を用いることができるが、例えば、市販のソフトウェアを用いることもできる。このようなアライメント（配列比較）に基づいてプライマー設計の基礎となる保存領域を特定するには、特定される保存領域の塩基配列全てが完全に相同である必要はないが、プライマーを設計したときに3'末端となる部分の近辺では保存性が特に高くなるようにする。これは、プライマーと標的ACLSVゲノムとの相補性は非常に重要で、特に、プライマーの塩基配列の3'末端付近が標的と相補的に結合しない場合には、増幅効率が著しく低下してしまうからである。それぞれのプライマーの塩基数は、通常プライマーとして用いられる塩基数であればよく、特に限定されないが、好ましくは16塩基以上、より好ましくは20塩基以上とする。設計されるプライマーによって増幅される断片の塩基数は、通常のDNA断片分離法、例えば電気泳動法によって分離可能な塩基数であればよく、特に限定されないが、好ましくは100塩基～2000塩基、より好ましくは150塩基～1000塩基とする。

【0036】例として、検出対象となる分離株をP205株、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8株、MK9株、M031株、M041株及びB81株とした場合の、これらの配列のアライメントを示す図を図1～5に示す。これらの配列比較図に基づいて保存領域を特定し、全分離株のcDNAが増幅されるように複数の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを設計することができる。設計されるオリゴヌクレオチドの具体的な塩基配列は特に限定されないが、例えば、配列番号1～4で表わされる塩基配列（相同プライマー）及び配列番号5～8で表わされる塩基配列（相補プライマー）を挙げることができ、これらの設計の基となる保存領域を図1～5の比較配列の上部（示

された番号は配列番号に対応する。）に示す。ここで、配列番号1～4はそれぞれACLSVゲノム上の5'上流域から下流域に順に設計された相同プライマーである。また、配列番号5～8は同様にそれぞれ5'上流域から下流域に設計された相補プライマーである。

【0037】以上のようにして設計される相同プライマー及び相補プライマーを常法に従って合成し、これを用いて遺伝子増幅法を行う。この際に鋳型として用いるのは、上記(1)で得られるRNA試料である。

【0038】遺伝子増幅法としては、上述のように、ネステッド様式の遺伝子増幅法として知られるいかなる方法をも用いることができるため、特に限定されないが、好ましくはネステッドPCR法を用いる。このような方法は、通常の遺伝子増幅法よりも検出感度が高いという利点を有するものである。以下、ネステッドPCRを用いた方法を詳述する。

【0039】PCRによりACLSVゲノムRNAの塩基配列を増幅する場合、PCRの前に逆転写酵素によるcDNA合成を行う必要がある。逆転写酵素としては、当業者に公知のものを用いることができ、特に限定されないが、通常はレトロウイルス等の逆転写酵素、例えば、市販のAMV逆転写酵素XL（Life Sciences社）を利用することができる。逆転写反応に用いるプライマーとしては、第1鎖cDNA合成に用いられることが知られているプライマー、例えば、ランダムプライマー等を用いることができるが、後に行うPCRによって増幅しようとする配列に特異的なプライマーを用いることもできる。このような特異的なプライマーとしては、上述のようにして設計される相補プライマー、好ましくは配列番号5～8で表わされる塩基配列を有するプライマーを使うことが可能である。ただし、後に行う2回目のPCRで使用される相補プライマーよりも、ACLSVゲノムにおいて5'側上流域に設計したプライマーは使えない。上記のようなcDNA合成は、通常のRT-PCRにおける第1鎖cDNA合成に用いられる方法により、当業者であれば容易に行うことができる。逆転写とPCRを同一の反応液で行うことのできるキット、例えばRNA PCRキット（Gene Amp EZ rTth RNA PCR kit、パーキンエルマー社）を使うことにより操作を簡素化できる。

【0040】次に、逆転写により合成したcDNAを鋳型にしてネステッドPCRを行う。PCR法は、鋳型（ここでは上記cDNA）への相同プライマーのアニーリング、耐熱性DNAポリメラーゼによる伸長反応によりセンス鎖のDNAを合成し、その後は、反応液の温度を変化させることにより、熱変性、センス鎖及びアンチセンス鎖DNAに対する相補プライマー及び相同プライマーのアニーリング、並びに耐熱性DNAポリメラーゼによる伸長をこの順番で行うサイクル反応を30～50回程度繰り返し、結果として標的配列の2本鎖DNAを指数関数的に(10^5 ～ 10^8 倍程度)増幅する方法である。詳しい原

理については、例えばMolecular Cloning (Maniatisら、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)に記載されている。PCRでは、標的遺伝子配列を増幅するためにその両末端部分の20~30塩基の配列を持つ合成オリゴヌクレオチドのプライマー組を用いる。ネステッドPCRは標的遺伝子配列を増幅するために2回の連続したPCRを行う。その際、2回目のPCRは、1回目のPCR産物を鋳型にして、1回目のPCRに用いた相同プライマーより3'側下流域に設計した相同プライマーと、1回目の相補プライマーより5'側上流域に設計した相補プライマーによって、より短い配列を増幅する。こうすることにより、1回目に非特異的に増幅された配列は2回目には増幅されず、増幅される配列の特異性が向上して、結果として検出感度が向上する。

【0041】本発明においては、ACLSV検出のために、上述のようにして設計した相同プライマー及び相補プライマーを用いてネステッドPCRを行う。該相同プライマーとしては、好ましくは配列番号1~4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いる。該相補プライマーとしては、好ましくは配列番号5~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いる。配列番号1~4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドは、それぞれ上記したようにACLSVゲノム上の5'上流域から下流域に向けて順に設計された相同プライマーである。また、配列番号5~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドは、それぞれ5'上流域から下流域に向けて順に設計された相補プライマーである。従って、例えば、配列番号1~4から2つを選び、配列番号の小さい方を1回目、残りを2回目のPCRに相同プライマーとして用いる。同様に、配列番号5~8から2つを選び、配列番号の大きい方を1回目、残りを2回目のPCRに用いればよい。

【0042】上記の鋳型及びプライマーを用いるネステッドPCRは、公知の方法により、当業者であれば容易に行うことができるが、市販のキットを用いて行うこともできる。例えば、上記の逆転写反応及び1回目のPCRをRNA PCRキット (Gene Amp EZ rTth RNA PCR kit、パーキンエルマー社)を用いて行い、2回目のPCRを耐熱性DNAポリメラーゼ (Takara Ex Taq、宝酒造製)を用いて行うことができる。

【0043】本発明のウイルス検出法において用いる遺伝子増幅法は、上記のような通常のネステッドPCRであってもよいが、本発明者らが開発したデュアルネステッドPCRを用いることもできる。

【0044】一般に、PCRの増幅効率は理論値よりも低い。それはいくつかの要因による制限があるからであり、その要因の1つは使用するプライマーである。すなわち、PCRの増幅効率は、2つのプライマーのうち、標的と正確にアニールする効率の低い方により制限され

ることになる。そこで、本発明者らは、ネステッドPCRの各PCR反応において2組のプライマーペア(計4つのプライマー)を加えて行うことにより、制限要因となっているプライマー側からのDNA合成を別のプライマーからのDNA合成により補うことができ、これにより増幅効率が向上することを見出した。この方法が上述のデュアルネステッドPCRである。

【0045】本発明のウイルス検出法においてデュアルネステッドPCRを利用するには、上述のネステッドPCRにおいて、1回目のPCR及び2回目のPCRにそれぞれ2組ずつのプライマーペアを用いる。この場合には、1回目のPCRに用いる2組のプライマーペアにより増幅されるべき第1の部分領域及び第2の部分領域が、それぞれ2回目のPCRに用いる2組のプライマーペアにより増幅されるべき第3の部分領域及び第4の部分領域を内包することが必要であり、好ましくは、第4の部分領域が第2の部分領域に内包され、第2の部分領域が第3の部分領域に内包され、第3の部分領域が第1の部分領域に内包されるようにする。

【0046】例えば、上記デュアルネステッドPCRにおいて配列番号1~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合には、1回目のPCRを配列番号1、3、6及び8の4つのプライマーを用いて行い、2回目のPCRを配列番号2、4、5及び7の4つのプライマーを用いて行うことができる。これにより、通常のネステッドPCRに比べて増幅効率の安定的な向上が見られる。上記の場合において、1回目のPCRで配列番号1、2、7及び8のプライマー、2回目のPCRで配列番号3、4、5及び6のプライマーを用いてもよいように考えられるが、このように行った場合、逆に増幅効率の低下が見られる。この理由はわからないがDNAポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ活性が原因になっている可能性があると思われる。

【0047】さらに、本発明のウイルス検出法が検出対象とするACLSVはRNAゲノムを有するウイルスであるため、上記のPCRに代えて、NASBA法 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, Davey and Malek, 1989, European Patent No. EP0329822)を用いることができる。NASBA法は、RNAを鋳型として該RNAに相補的なRNA (アンチセンス鎖)を増幅するRNA特異的増幅法であり、その原理は、例えば、以下のようなものである。なお、ここで用いる相補プライマーは、その5'末端にT7 RNAポリメラーゼのプロモータ配列が付加されている。

【0048】(a)相補プライマーを標的RNA (センス鎖)にアニールする。

(b) AMV-RT (逆転写酵素)を用いる伸長反応により、第1鎖cDNAが合成される。

(c)上記(b)により得られる標的RNA / 第1鎖c

DNAハイブリッドの標的RNAはRNaseHにより分解され、第1鎖cDNA(アンチセンス鎖)は1本鎖となる。このとき、1本鎖のRNAは、RNaseHの基質とはならないので、分解されない。

【0049】(d)上記(c)により得られる1本鎖cDNAに相同プライマーがアニールする。

(e)1本鎖cDNAにアニールした相同プライマーはAMV-RTのDNAポリメラーゼ活性によって伸長され、これにより、次のRNA増幅の鋳型とT7RNAポリメラーゼのプロモータが2本鎖DNAとなる。

(f)T7RNAポリメラーゼがこのプロモータ配列を認識し、相同プライマーの5'末端までの、標的RNAのアンチセンス鎖RNAのコピーを多数合成する。

【0050】(g)新たに合成されたアンチセンスRNAに相同プライマーがアニールし、AMV-RTによって第1鎖cDNA(センス鎖)が合成される。これにより生ずるRNA/cDNAハイブリッドのRNAがRNaseHにより分解され、前記第1鎖cDNAが1本鎖となる。この1本鎖cDNAの3'末端に相補プライマーがアニールし、該相補プライマーはAMV-RTにより伸長され、次のRNA増幅の鋳型とT7RNAポリメラーゼのプロモータが2本鎖DNAとなり、多数のRNA(アンチセンス鎖)のコピーの生産が誘導される。このようなステップが一定温度で連続的に起こることにより、標的RNAのアンチセンス鎖が指数関数的に増幅される。

【0051】上記NASBA法は、上記文献及び上記の原理の説明を参照することにより、当業者であれば容易に実施することができる。また、上記NASBA法は、NASBA Amplification Kit(ORGANON TEKNIKA)等の市販のキットを用いることにより、簡便に行うことができる。本発明のウイルス検出法において上記NASBAを用いる場合には、PCRの場合と同様に、ネステッドNASBA法(Kievits, T.ら、J. Virol. Methods 35, 273-286 (1991))又はデュアルネステッドNASBA法を用いる。

【0052】通常のネステッドNASBA法を行う場合には、2回のNASBAを行う。1回目のNASBAは、上記(1)で得られるRNA試料を鋳型とし、上記ネステッドPCRにおける1回目のPCRの場合と同様の相同プライマー及び相補プライマーを用いて行う。これにより、標的RNAの相補鎖に相当するRNAが増幅産物として得られる。次いで、該増幅産物を鋳型とし、上記ネステッドPCRにおける2回目のPCRの場合と同様の相同プライマー及び相補プライマーを用いて、2回目のNASBAを行う。ここで、2回目のNASBAにおける鋳型との関係では、2回目のPCRにおいて相同プライマーとして用いたものが相補プライマーとして使用され、逆に相補プライマーとして用いられたものが相同プライマーとして使用される点に注意すべきである。なお、ここで用いる相補プライマー(これは、2回目のNASBAにおいては、鋳型(アンチセンス鎖)との関係では相補プライマーであ

り、ACLSVのゲノムRNA(センス鎖)との関係では相同プライマーである)はいずれも、その5'末端にT7RNAポリメラーゼのプロモータ配列が付加されている。

【0053】デュアルネステッドNASBA法を行う場合には、1回目及び2回目の各NASBAにおいて、それぞれ2本ずつの相同プライマー及び相補プライマーを用いる点を除き、上記通常のネステッドNASBA法と同様に行うことができる。使用する相同プライマー及び相補プライマーとしては、上記デュアルネステッドPCRについて記載したものを同様に用いることができる。ここで、2回目のNASBAにおける鋳型との関係では、2回目のPCRにおいて相同プライマーとして用いたものが相補プライマーとして使用され、逆に相補プライマーとして用いられたものが相同プライマーとして使用される点に注意すべきである。なお、ここで用いる相補プライマー(これは、2回目のNASBAにおいては、鋳型(アンチセンス鎖)との関係では相補プライマーであり、ACLSVのゲノムRNA(センス鎖)との関係では相同プライマーである)はいずれも、その5'末端にT7RNAポリメラーゼのプロモータ配列が付加されている。

【0054】(3)増幅産物の検出

前記の増幅産物は、増幅反応液をアガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、臭化エチジウム染色等により検出できる。この場合には、電気泳動により予想される増幅断片の分子量からACLSVのゲノム由来の増幅断片であるかどうかを判断することができる。ただし、増幅断片の分子量だけでなく、増幅産物に対するcDNAプローブによるハイブリダイゼーションにより特異性を確認することが好ましい。その方法としては、常法のドットプロットハイブリダイゼーションの他、マイクロプレートハイブリダイゼーションなどが挙げられる。さらに、PCR反応と同時にハイブリダイゼーションによる特異性検定を行うことができるPCR/RT-PCRタックマン法(パーキンエルマー社)が公知の技術として利用できる。

【0055】2. 本発明のプライマーセット

本発明はさらに、上記の本発明のウイルス検出法に使用することのできるプライマーセットに関する。該プライマーセットに含まれる各プライマーは、上述のようにして設計することができる。

【0056】上記プライマーセットは、通常のネステッド様式の増幅方法、例えばネステッドPCR、ネステッドNASBA等に用いるためのものである場合には、2種の相同プライマー及び2種の相補プライマーを含む。このようなプライマーセットは、好ましくは、配列番号1~4で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される2種類の相同プライマー、及び配列番号5~8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドからなる群より選択される2種類の相補プライマーを含み、より好ましくは、配列番号3~6で表わされ

る塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0057】また、上記プライマーセットは、デュアルネステッド様式の増幅方法、例えばデュアルネステッドPCR、デュアルネステッドNASBA等に用いるためのものである場合には、4種の相同プライマー及び4種の相補プライマーを含み、好ましくは、配列番号1～8で表わされる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0058】なお、上記のプライマーセットがNASBAに用いるためのものである場合には、1回目のNASBAに用いるための相補プライマー及び2回目のNASBAに用いるための相同プライマー（これは、2回目のNASBAの鋳型（アンチセンス鎖）との関係では相補プライマーであるが、ACLSVのゲノムRNA（センス鎖）との関係では相同プライマーである）はいずれも、その5'末端にT7RNAポリメラーゼのプロモータ配列が付加されていることが好ましい。

【0059】さらに、本発明のウイルス検出法に使用するプライマー以外の試薬類を本発明のプライマーセットに加えて、ACLSV検出用キットとすることもできる。このような試薬類としては、RNA抽出用試薬、PCR用試薬若しくはNASBA用試薬、電気泳動用試薬などが挙げられるが、これらに限定されない。前記RNA抽出用試薬としては、例えば、粉碎用緩衝液、グアニジンチオシアン酸塩、フェノール、 β -メルカプトエタノール、SDS、クロロホルム等が挙げられる。前記PCR用試薬としては、例えば、Tris-HCl、KCl、MgCl₂、各種dNTP、Taq DNAポリメラーゼ、水等が挙げられる。前記NASBA用試薬としては、例えば、AMV-RT、RNaseH、T7RNAポリメラーゼ、BSA（ウシ血清アルブミン）、ヌクレオチド混合物、DTT、MgCl₂、72%DMSO、2M KCl、水等が挙げられる。前記電気泳動用試薬としては、例えば、アガロース又はポリアクリルアミドゲル、ローディング緩衝液、臭化エチジウム染色用試薬等が挙げられる。

【0060】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

〔調製例1〕リンゴ樹からのRNA試料の調製
ACLSVを保毒するリンゴ樹5株（農林水産省果樹試験場リンゴ支場病害研究室にて保存）の5月の若葉と2月の樹皮を採取して-80℃の冷凍機で保存した。これらの保存試料のそれぞれ100mgを液体窒素で凍結し、RNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）により全RNAを抽出した。得られた抽出液をRNA試料とした。

【0061】〔実施例1〕プライマーの設計及び合成
マルバカイドウに対する病原性の異なるACLSV分離株15株（農林水産省果樹試験場リンゴ支場病害研究室にて保存）、すなわち、P195株、P195L株、PK32株、PK51株、P142株、P143株、P202株、PK5株、P125株、MK1株、MK8

株、MK9株、MO31株、MO41株及びB81株のゲノムRNAの塩基配列を解析した。

【0062】すでにゲノムRNAの全塩基配列が決定されている、リンゴ、スモモ及びオウトウから分離された3つのACLSV分離株において、相同な配列を示す部分はACLSVにおいて保存性が高いと考え、この部分に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーをいくつか設計し、常法に従って合成した。ACLSVの濃度が比較的高い花卉若しくは同時期の若葉をそれぞれの分離株を保毒するリンゴ樹から採取して、調製例1に記載の方法に従って全RNAを抽出した。上記の合成オリゴヌクレオチドプライマーにより逆転写及びPCRを行ったところ、相同プライマー：5'-GAAGATCGCAGAAGGGGATATTC-3'（配列番号9）、及び相補プライマー：5'-GTCTACAGGCTATTTATTATAAG-3'（配列番号10）の組み合わせにおいて全分離株のゲノムにおける3'末端部分約1800塩基のcDNA断片を増幅することができた。

【0063】次いで、このcDNA断片の塩基配列を解析した。はじめに、増幅に用いた上記のプライマーを用いて、このcDNA断片を鋳型としてシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。さらに、決定した配列に基いて新たにプライマーを合成し、上記と同様のシーケンス反応により塩基配列を決定した。これを繰り返して上記cDNA断片の塩基配列のほぼ全てを決定した。これらのcDNA断片の内部に配列未決定の領域が存在するため、各cDNA断片の塩基配列を前半部分と後半部分に分けて、配列番号13（P195株前半）、配列番号14（P195株後半）、配列番号15（P195L株前半）、配列番号16（P195L株後半）、配列番号17（PK32株前半）、配列番号18（PK32株後半）、配列番号19（PK51株前半）、配列番号20（PK51株後半）、配列番号21（P142株前半）、配列番号22（P142株後半）、配列番号23（P143株前半）、配列番号24（P143株後半）、配列番号25（MK8株前半）、配列番号26（MK8株後半）、配列番号27（B81株前半）、配列番号28（B81株後半）、配列番号29（P202株前半）、配列番号30（P202株後半）、配列番号31（PK5株前半）、配列番号32（PK5株後半）、配列番号33（P125株前半）、配列番号34（P125株後半）、配列番号35（MK1株前半）、配列番号36（MK1株後半）、配列番号37（MO31株前半）、配列番号38（MO31株後半）、配列番号39（MO41株前半）、配列番号40（MO41株後半）、配列番号41（MK9株前半）及び配列番号42（MK9株後半）に示す。

【0064】上記15分離株由来cDNA断片の塩基配列、及びP205株由来cDNA断片の塩基配列（前半：配列番号11；後半：配列番号12，GenBank登録番号：D14996）のアライメントをとり、これを図1～5に示した。図1の上段において、各塩基配列の左側に各分離株の名称を示した。これらの図に基き、全分離株のcDNA

Aの増幅に用いることのできる、配列番号1～8で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを設計し、常法に従って合成した。配列番号1～4はそれぞれACLSVゲノム上の5'上流域から下流域に順に設計された相同プライマーである。また、配列番号5～8は同様にそれぞれ5'上流域から下流域に順に設計された相補プライマーである。

【0065】〔実施例2〕ネステイドPCRによる検出調製例1で得られたRNA試料からcDNAを合成し、ネステイドPCRによりcDNAを増幅した。ネステイドPCRは以下のように行った。まず、RNA PCRキット(Gene Amp EZrTth RNA PCR kit、パーキンエルマー社)により逆転写と1回目のPCRを行った。PCR反応液は、5μlの系でRNA試料約50ngを鋳型として添加し、配列番号3及び6で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてそれぞれ終濃度10μMになるよう加えて調製した。その後の反応はキットの説明書に従って行った。増幅反応の温度条件は、60で30分間、94で1分間に続いて、94で15秒間-60で2分間を40サイクル、その後、60で7分間とした。2回目のPCRは、耐熱性DNAポリメラーゼ(TaKaRaEx Taq、宝酒造製)を用いて行った。次に、説明書に従って、配列番号4及び5で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてそれぞれ終濃度10μMになるように加えた反応液95μlを、上記の逆転写及び1回目のPCRを行った溶液に加えて2回目のPCRを常法により行った。増幅反応の温度条件は、94で2分間に続いて、94で30秒間-60で30秒間-72で2分間を35サイクル、その後、72で7分間とした。

【0066】得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動することにより、ACLSVのcDNAの検出を行った(図6、パネルB)。図6のパネルBでは、全ての感染組織からACLSVが検出され、健全(M038)からは検出されず、ACLSVの診断が正確にできることが確認された。

【0067】〔実施例3〕デュアルネステイドPCRによる検出

調製例1で得られたRNA試料からcDNAを合成し、デュアルネステイドPCRによりcDNAを増幅した。デュアルネステイドPCRは以下のように行った。まず、実施例2と同様にして逆転写及びPCRを行った。ただし、配列番号1及び3、並びに6及び8で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーと

して反応液に加えた。次に、2回目のPCRも実施例2と同様に行った。ただし、配列番号2及び4、並びに5及び7で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして反応液に加えた。

【0068】得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動することにより、ACLSVのcDNAの検出を行った(図6、パネルC)。図6のパネルCでは、全ての感染組織からACLSVが検出され、健全(M038)からは検出されず、ACLSVの診断が正確にできることが確認された。また、この結果を実施例2(パネルB)と比較すると、デュアルネステイドPCRではネステイドPCRに比べて臭化エチジウムによるcDNAの染色像の試料間における変動が少なく、安定してcDNAが増幅されていることが考えられた。

【0069】〔比較例1〕通常のPCRによる検出調製例1で得られたRNA試料からcDNAを合成し、通常のPCRによりcDNAを増幅した。通常のPCRを用いる上記増幅は、逆転写とPCRを1つの反応液中で行うことのできるRNA PCRキット(Gene Amp EZ rTth RNA PCR kit、パーキンエルマー社)により行った。PCR反応液は、20μlの系でRNA試料約250ngを鋳型として添加し、配列番号4及び5で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてそれぞれ終濃度10μMになるよう加えて調製した。その後の反応はキットの説明書に従って行った。増幅反応の温度条件は、60で30分間、94で1分間に続いて、94で15秒間-60で2分間を40サイクル、その後、60で7分間とした。

【0070】得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動することにより、ACLSVのcDNAの検出を行った(図6、パネルA)。図6のパネルAでは、比較的ACLSVのリンゴ樹組織中の濃度が高い5月の若葉からは一部検出されるが、2月の樹皮からは全く検出できなかった。

【0071】

【発明の効果】本発明により、ACLSVの複数の分離株を同時に検出することが可能となる。従って、本発明によれば、時期を選ばないリンゴ樹の正確なACLSV感染診断が可能となり、これにより、ACLSV未感染のリンゴ苗木を供給することが可能となる。

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <;110>; Director-General of National Institute of Fruit Tree Science, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
 <;120>; Methods for Detecting Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Primers used therein
 <;130>; P00-0008

<;160>; 42
 <;170>; PatentIn Ver. 2.0
 <;210>; 1
 <;211>; 29
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (18)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (21)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;400>; 1
 tcvaaytcva thwgbgtngc ngtvatggt 29
 <;210>; 2
 <;211>; 24
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (7)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (13)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;400>; 2
 mgaygtnagr gtnggbmaya tgtg 24
 <;210>; 3
 <;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (6)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;400>; 3
 artccnytdh ttcagarggg tcatc 25
 <;210>; 4

<;211>; 25
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (6)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;400>; 4
 thtctncaag rgartttcar ttgdc 25
 <;210>; 5
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;400>; 5
 atcgctatgt tcgcaagat gg 22
 <;210>; 6
 <;211>; 26
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (3)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;220>;
 <;221>; degenerate
 <;222>; (9)
 <;223>; n is a, t, c or g
 <;400>; 6
 ganyybayna cyttykgvtc ctccat 26
 <;210>; 7
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;400>; 7
 gytdatrtty ggrtcyraag adgtagt 27
 <;210>; 8
 <;211>; 26
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;400>; 8

gcytcacava cytgrcggaa rgtcat 26
 <;210>; 9
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;400>; 9
 gaagatcgca gaaggggata ttc 23
 <;210>; 10
 <;211>; 23
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Primer
 <;400>; 10
 gtctacaggc tatttattat aag 23
 <;210>; 11
 <;211>; 433
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 11
 gagagagtac caactacgtg cattggggag cactatcaat atccattgac gcaactgttca 60
 gaaagaatgc cggggtttca ggggtggttt atgtgtacga caacagatgg gaaacttttg 120
 agcaggcgat gctacaaaag ttctcgttca acctggatag tggctcggcc acattgggta 180
 cctcaccgaa tttccagtt tcattggatg atcctggttt gtccaattcg atcagtgtag 240
 cggtagatgt tgagaatctg aactcaagc ttgaaagcta ccctataagt gttagggtag 300
 ggaacatgtg tagattcttc gacagcttct tgagttcgt caagaataaa gtggactcca 360
 actttttgct tgaggccgct aatgcagatc cgcttggcgc ggggtgctttc gggtttgaac 420
 aggacgatca ggt 433
 <;210>; 12
 <;211>; 435
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 12
 ggcaaaggaa aagctggaac tgaatccatt acttcagaag ggtcatcctt cgataacatt 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctagacaa gatcagaagg cgaaggatgg cggcagtgct 120
 gaacctcaa ttaaaagtgg acgcagatct gaaagcgttc ctggccgag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caattctgga acagacactg gaggccatct tcgccaacat 240
 agcgatacag gggacctcgg aacaacaga gttcctggac gtgctggtgg aggtgaaatc 300
 catggaggat cagaagggtg tggggtcatt caatctgaag gaggtagtgc gtttgatcaa 360
 aatattcagg actacatctt cggacccgaa tataagcagc atgaccttcc gccaaagtgtg 420
 tgaggcattt gcccc 435
 <;210>; 13
 <;211>; 434
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;220>;
 <;221>; unsure

<;222>; (11)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (44)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (53)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (381)
 <;400>; 13
 grgaragcac naaytaygtg caytggggrg crytgtcaat atcnatwgay gcnytgtya 60
 graaraaygc wgggrgtbcm gggtggtgyt aygtgtayga yawyagrtgg gagacdtttg 120
 agcargcmat gctrcagaaa ttycgdtcca ayytvgayag tggycrgch acrttggtga 180
 chtcwccaaa ytttccdgtt tcaytrgatg atccaggcyt gtcvaattca atcagygrg 240
 cagtvatggt ygagaaycts aayttcaarc twgagagyta cccaatcagt gtsagrgrg 300
 gbaacatgtg cagrttctty gayagcttct tgagcagtg gaagaayaar gttgattcma 360
 ayttyactry tdgargcygc naaygcdgwy cckytkgghg ydggwgcytt yggatttgag 420
 caggaygacc aggt 434
 <;210>; 14
 <;211>; 435
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 14
 ggaaaaggda argctggamc haaatccvtt rcttcagarg ggtcatcrt kgataacatw 60
 tctscagag artttcagtt tgctmgacar grtmaggmga aggagratgg cagcagtkct 120
 gaaytwcag ctaargtg acgcagatct gaargcgttc ctggccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatcctgga acagacactg gagtccatct tcgccaacat 240
 agratmcag ggaacgtcgg agcagacgga rttcctggay ctrrtsgtgg aggtgaartc 300
 gatggaggay cagaagtca tmggtcctw caatytgaag gaggtgtca ayatgatcaa 360
 agcwttaar actacctt cgatccgaa catcagcaac atgactttcc gccaggtgtg 420
 tgaggctttc gcacc 435
 <;210>; 15
 <;211>; 433
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (11)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (44)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (53)
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (83)
 <;220>;
 <;221>; unsure

<;222>; (398)

<;400>; 15

grgadagcac naaytaygtg cattggggrg cdytgtcaat atcnatwgay gcnytgttya 60
 graaramygc hgggrgtbch ggntggtyt acgtgtayga yaayagrtgg garacktttg 120
 agcargchat gctrcagaaa ttycgdtta ayytsgayag ygytcrbcm acrttgggta 180
 chtchccraa ytttccdgtt tcaytrgayg atccaggcyt gtcvaattcr atyagygtgg 240
 cagtsatggt ygagaayctb aayttcaarc thgagagyta cccaatcagt gtsagrgrtg 300
 gbaacatgtg cagrttctty gayagcttct tgagywgtgt gaagaayaar gttgattcma 360
 ayttthtrct kgargcygcb aatgcagayc cdtgggngc dggmgcytty ggatttgagc 420
 aggaygayca ggt 433

<;210>; 16

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 16

ggmaaaggra argctggamc maartcrrt rmttcagarg ggtcatccdt cgataacatw 60
 tctscagag artttcagtt tgctmgacaa rrtmagmga aggagrattg crgrrttct 120
 gaaytwcag ctaaargtg acgcagatct gaargcrrty ctggccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caaycytga acagacactg gagtccatct tcggaacat 240
 agcratycag ggracrctcg agcaracgga rttcctggay crrrtggg argtgaartc 300
 vatggaggay cagaagtca tvgggtcmta caatygaag gaggtgtca ayatgatcaa 360
 agcattcaar actacctct crgatccgaa catcagarc atgactttcc gycaggtgtg 420
 tgaggcttty gcacc 435

<;210>; 17

<;211>; 433

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (53)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (128)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (146)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (185)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (299)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (302)

<;400>; 17

grgarrgyac saaytaygtg cattggggrg cwytgtcrat atcmattgay gcnytkttya 60

graaraatgc yggdgtbtcw ggntggtyt aygtstayga yaayagrtgg garacdtttg 120
 agcargcnat gytrcaraar ttymgnttca ayytggayag tggbtcrgcc acrttgggta 180
 cytncccraa ytttccdgth tcrytrgatg ayccdgggyt ktcmattcr atyagytrg 240
 cvgtvatgth tgagaayyts aayttyaagc twgaragyta cccmatmagt gtbagrgtng 300
 gnaayatgtg ymgrttctty gayagcttct tgagcagygt cargaayaar gttgaytcca 360
 acttyctgct tgargctgch aatgcwgayc crytggghgc aggggcyttc ggrtttgarc 420
 aggatgayca rgt 433

<;210>; 18

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 18

ggvaaargmr argctggavc haaatccatt dcttcagarg ggtcatccrt kgayaacath 60
 tctscagrg artttcarth tgctmgacaa ratcargmga aggagratgg crgcrgttyt 120
 saayctdcar ctaaargtrg acgcagatyt gaargcrttc ctggccgrg aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatcctgga acagayrctg gagkccatct tcggaacat 240
 agcgattcag ggaacstcag agcagacgga gtttctggay ctavtgggtg aggtgaartc 300
 matggaggab cagaaggtgr tgggtcctw caatctgaag gaggtgttca aywtgrtcaa 360
 rgcctcaag actacmtctt cggayccraa catmagcaac atgacyttcc gccaggtgtg 420
 tgaggccttt ygcac 435

<;210>; 19

<;211>; 433

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (53)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (140)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (146)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (242)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (302)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (380)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (392)

<;400>; 19

grgarrgyac saaytaygtg cattggggrg caytgtcrat atcmattgay gcnytkttya 60

graagaatgc ygggrtytch ggntggtgyt aygtrtayga caacagatgg garacdtttg 120
 arcargcvat gytrcaraan ttycgnttca ayytdgayag yggbtcrgcc acrttggtga 180
 cytcwccraa ytttccdgtb tcrytrgatg ayccdggyyt ktomaaytcr atyagygtrg 240
 cngtratggtt ygagaayctb aayttcaagc twgaragyta ccchatmagt gtbagrtdg 300
 gnaayatgtg yagrttctty gacagytyt tgagyagygt cargaayaar gtkgaytcca 360
 ayttytgct kgargcygn aatgcwgayc cnytgghgc aggdgcttty ggrtttgarc 420
 aggaygayca rgt 433

<;210>; 20

<;211>; 437

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (285)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (323)

<;400>; 20

ggaaaaggca argyggacc aaaatccvtt gcttcagagg ggtcatcrrt ggayaacatm 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctcgacaa gatcaggmga argaggatgg cagcrgttct 120
 saatctacag ctaaargtgg acgcagatct gaaagcgttc ctgcccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caathctgga acagayactg gaggccatct tcggaacat 240
 agcratwcar ggracstyrg arcaramgga gttcctggay ckkrrngtgg argtgaartc 300
 matggaggay cmvaargktg atngggtcmt wcaatctgaa ggaggtggkk caayhtrac 360
 aarrymttca rgactacmtc ttyggayccr aayatmarca rcatgacytt ccgccargtg 420
 tgtgaggcwt tygchcc 437

<;210>; 21

<;211>; 434

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (53)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (200)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (284)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (299)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (302)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (380)

<;400>; 21

grgagrgyac vaaytaygtg cattggggrg cwytgtrcrat atcmattgay gcnytkttya 60
 graaraatgc hgggrgtbcw ggntggtyt aygtrtayga yaacagrtgg garacdtttg 120
 arcargcvat gytrcaraar ttycggttca ayytggayag tggbtcrgcc acrttgggta 180
 cytcwccraa yttccrgtn tcrytrgatg ayccdggyyt ktcmaattcr atyagygrg 240
 cvgtgatggt tgagaaycts aacttcaagc twgaaagyta cccnatmagt gtbagrgtng 300
 gnaayatgtg yagrttctty gacagcttct tgagcagygt caagaayaaa gtkgaytcm 360
 ayttyctgyt ggargcygn aatgcwgayc crytggghgc agggagcttt cggatttgar 420
 caggaygayc argt 434

<;210>; 22

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 22

ggmaaaggma argctggacc haaatccatt rcttcagarg ggtcatccrt kgataacatw 60
 tctgcaagag artttcagtt tgctmgacar raymagmga mgragratgg cagcagttct 120
 gaaytrcar ctaaargtgg acgcagatct gaargcrtyc ctggccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatyctgga acagacactg gagkccatct tcgccaacat 240
 agcgatmcag gggacctcgg agcagacsga gttcctggav ctgatggtgg aggtgaartc 300
 catggaggay cagaaggtka tcgggtcmtw caatctgaag raggtgtca ayatgatcaa 360
 agycttcaag actacmtctt tggayccgaa yattagcaac atgaccttcc gccargtgtg 420
 tgaggsaktc gcacc 435

<;210>; 23

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (53)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (128)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (215)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (284)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (293)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (299)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (302)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (380)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (392)

<;400>; 23

grgarrgyac saaytaygtg cattggggrg cwygttcrat atcmattgay gcnytkttya 60
 graaraaygc hggrrgtbcw ggntggtyt aygtrtayga yaacagrtgg garacdtttg 120
 agcargcnat gytrcaraar ttycgdtta ayctggayag tggbtcrgcc acrttgggta 180
 cbtcwccraa ytttccdgfb tcryrtgatg ayccnggyt gtcvaattcr atyagygrg 240
 cvgtratgtt ygagaayctb aayttyaagc twgaragyta yccnatmagy gtnagrgtng 300
 gnaayatgtg yagrttctty gayagcttyt tgagyagygt cargaayaar gtkgaytcca 360
 ayttytgct dgargcygn aatgcdgayc cnytggtghg caggrtgctt tyggrrttga 420
 rcaggaygay cargt 435

<;210>; 24

<;211>; 436

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 24

ggvaaaggca argctggacc haaatccatt rcttcagagg ggtcatcrrt kgayaacath 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctcgacaa rrtcaggmga aggagratgg crgcagttct 120
 saaytdcar ctaargtgg acgcagatyt gaaagcgttc ctggccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caathctgga acagayaytg gagkccatct tcggaacat 240
 agcratmcar gggacstcr g arcagackga gttcctggay gtgayggtgg aggtcaagtc 300
 aatggaggac cagaaggtga tmggstcwtw caatctgaag gaggtggtcv ayhtratmaa 360
 rrymttcarr gactacmtct tyggayccga ayatharcav catgacyttc cgccargtgt 420
 gtgaggcwtt ygcmtcc 436

<;210>; 25

<;211>; 434

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (53)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (128)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (303)

<;400>; 25

gagarrgyac saaytaygtg cattggggrg cwygttcrat atcmattgay gcnytgtya 60
 graaraaygc hggrrgtbcw ggntggtyt aygtrtayga caacagatgg garacdtttg 120
 agcargcnat gytrcaraar ttycgrrtca aycyggayag yggbtcrgcc acrttgggta 180

cbtcwccraa ytttccdgtb tcdhtrgatg aycmdggyt tgctvaaytc ratyagytr 240
 gcvgtvatgt ttgagaayct saacttcaag ctwgaragyt accchatmag tgtbagrtr 300
 ggnaayatgt gyagrtrtctt ygacagctty ttgagyagtg tcaagaayaa rgttgaytcc 360
 aacttyctgc tkgargctgc haatgcwgay ccryttgghg cdggdgcyyt yggrtttgar 420
 caggatgayc argt 434
 <;210>; 26
 <;211>; 435
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 26
 ggaaaaggca aagctggacc haaatcchtt gmttcagarg ggtcatccgt ggayaacata 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctcgacaa aatcaggaga aggagaatgg cggcagtrct 120
 caatctcag ctaaggtgg acgcagatct gaaagcrttc ctggccgyag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caathctgga acagacactg gaggccatct tcggaacat 240
 agcgatccaa gggacctcgg arcagacgga gtttyctggac ctrayggtgg argtsaagtc 300
 matggaggay cmgaargkva tvggvtcmw caatctgaag gaggrgtca ataratcaa 360
 rrymttcarg actacatctt cggatccgaa yataarcaac atgacyttcc gccargtktg 420
 tgaggctttt gcccc 435
 <;210>; 27
 <;211>; 433
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 27
 gagaaagcac aaattacgtg cactggggag cattgtccat atcaattgac gctcttttca 60
 gaaagaacgc aggagtttcc ggctgggtgct acgtgtatga caacaggtgg gaaactttg 120
 agcaggccat gctgcagaaa ttctgtttca atttagacag tggttcagcc acattggtga 180
 ctctcctaaa ctctctgtt tcaactggatg acccaggtct tcaaatca ataagcgtag 240
 cgtaatgtt cgaaaatctc aatttcaagc ttgagagtta cccaattagt gtgagagtgg 300
 gcaatatgtg cagattcttt gatagtttct tgagttgtgt gaagaataaa gtggactcaa 360
 atttctact tgaggccgcc aacgcagatc ctcttggtgc aggagctttt gggtttgaac 420
 aggatgatca ggt 433
 <;210>; 28
 <;211>; 442
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;220>;
 <;221>; unsure
 <;222>; (64)
 <;400>; 28
 aggaaaagaa aagctggaac cgaatccatt kcttcagagg ggtcatccat cgataacatt 60
 tctncaagag aatttcagtt tgctagacag gatcagaagg cgaaggagga tggcrrcrgt 120
 kctraacytb carytaaarg tggacgcaga tctgaaagcg ttcttgccg cagaaggcag 180
 accccttcat ggaaagacag gggcaatcct ggaacagaya ctggagkcca tcttcgca 240
 catagcgatw carggracst cggagcarac rgagttcytg gacstrstgg trgargtgaa 300
 rtmattggag gatcagaarg tgrtrggtrc stwcaatctg aargaagtgg tcaactta 360
 ratcaagmt attcaagact acatcttcgg ayccgaacat magcaayatg acyttccgyc 420
 aggtgtgtga rgcwttcgw cc 442
 <;210>; 29
 <;211>; 433
 <;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 29

gagagagtac caactacgtg cactggggag cactatcaat atccattgac gcactgttca 60
 gaaagaatgc cggggtttca ggggtggtgt atgtgtacga camcagatgg gaaacttttg 120
 agcaggcgat gctacaaaag tttcggttca acctggatag tggctcggcc acattgggta 180
 cctcaccaaa tttccagtt tcattggatg atcctggttt gtccaattcg atcagtgtas 240
 cggtgatggt tgagaatctg aacttcaagc ttgaaagcta ccctataagt gttagggtag 300
 ggaacatgtg tagattcttc gacagcttct tgagttgcgt caagaataaa gtggactcca 360
 actttttgct tgaggccgct aatgcagatc cgcttggcgc ggggtgctttc gggtttgaac 420
 aggacgatca ggt 433

<;210>; 30

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 30

ggcaaaggaa aagctggaac tgaatccatt acttcagaag ggtcatcctt cgataacatt 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctagacaa gatcagaagg cgaaggatgg cggcagtgct 120
 gaacctcaa ctaaaagtgg acgcagatct gaaagcgttc ctggccgcag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caattctgga acagacactg gaggccatct tcgccaacat 240
 agcgatacag gggacctcgg aacaacaga gttcctggac gtgctggtgg aggtgaaatc 300
 catggaggat cagaaggtgg tggggtcatt caatctgaag gaggtagtcg gtttgatcaa 360
 aatattcagg actacatctt cggacccgaa tataagcagc atgaccttcc gcccaagtgtg 420
 tgaggcattt gcccc 435

<;210>; 31

<;211>; 433

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (164)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (197)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (299)

<;400>; 31

grgagagcac waaytaygtg caytggggrg caytrtcwat atcmatwgay gcdttgttca 60
 graaraatgc wggdgtttcm ggwtggtgyt aygtrtmyga caacagrkgg gagacrtyg 120
 agcargcvat gctrcagaar ttyrwttya ayctkgacag tggntcvgcv acattgkgra 180
 cktcwccaaa ytyccngtt tcattggayg atccaggycy ytcsaattca atyagbgtkg 240
 cwgtsatggt tgagaaycts aayttcaagc tkgaragtta ycchatmagt gtdagggtn 300
 gyaacatgtg caggttctty gayagyttcy tgagyagtgt baagaayarr gtdgattcma 360
 acttyygyt rgaagctgcm aatgcrgacc ctttaggagy aggagctttt gggtttgagc 420
 aggaygatca rgt 433

<;210>; 32

<;211>; 437

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 32

ggsaaaggva argctggamc haaatccvtt rcttcagrgg ggtcatccrt kcgataacat 60
 wtctsaagg agaatttcag ttgctcgac arartmaggv gaargagrat ggcagcgrtw 120
 ctgaaytwc agctaaargt ggacgcagat ctgaaggcrt tcctggccgc agaaggcaga 180
 ccccttcattg gaaagacagg ggcaatcctg gaacagacac tggagkccat cttcgcaaac 240
 atagcgatcc aaggracstc rgagcagacg garttyctgg acctrrtggg ggaggtgaar 300
 tcvatggagg aycagaaggt sataggstcm twcaatctga aggaggtggg caatatgac 360
 aarrymttca agactacmtc ttcggatccg aayatmagca acatgacytt ccgycagggtg 420
 tgtgaggcyt tgcacc 437

<;210>; 33

<;211>; 434

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (11)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (83)

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (84)

<;400>; 33

gggaaagtac naattatgts cattggggag cattgtcgat atccattgac gcdttgttca 60
 ggaaaaatgc tggggatcgc ggnnggtgtt acgtgatga taacaggtgg gagacrtrttg 120
 agcaggccat gctgcaaaaa tttcgattca atttrgacag tggycrgcm ackttgggta 180
 cwtcwccaaa tttccggtg kcattggatg atccagggtt gtccaattca atyagcgtgg 240
 ccgtratgtt tgagaayctc aatttcaagc ttgagagtta ccctataagc gtcaggggtg 300
 ggtaacatgt gyaggttctt tgacagcttc cttagcagtg tgaaaaaca ggttgaytcw 360
 aaytttctgc twgaggctgc aaatgcagac cctttgggag cmggggcttt tggrrttgar 420
 cargatgacc aggt 434

<;210>; 34

<;211>; 437

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;220>;

<;221>; unsure

<;222>; (86)

<;400>; 34

ggaaaaggwa ragctggacc maaaaatccmt tgyttcagar ggvtcaycyr tkgataacat 60
 htctsaaga gartttcagt wtgctngmca wgmwcaggmg aaggaggatg gcagcagkbc 120
 tvaacytgca rctaaaagt gacgcagatc tgaagcgty cctggccgca gaaggcagac 180
 ccccttcattg aaagacagg gcaathctg aacagayact ggagkccatc ttcgcaaca 240
 tagcgatwca rggracstcg garcaracrg arttccstga ybtgvyrvtg gaggtsaart 300
 cmatggagga ycagaaggtg rtvvgstcm wcaatctgaa ggaggrgtc rrywtgatsa 360
 arryhttcar gaactacmtc ttcggayccg aayatmarca rcatgacytt ccgccargtk 420
 tgtgargctt tgcmmcc 437

<;210>; 35

<;211>; 433

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 35

gagagaacac taattacaty cattgggggg ctctttcrat atcaatagat gcattgttca 60
 agaaaaatgc tgggttttcw ggrtggtgyt atgtrtatga caaccggtgg garacttttg 120
 agcargcsag gytrcaaaar titymgttya aytggayag tggwtcmgcc acwttggtga 180
 cytcwccraa cttccctggt tctcttgatg atccwggact ttcaaatcc atttgygttg 240
 crgtcatggt cgagaatctr aayttcaart tggacagcta yccyattagy gtyaggttag 300
 gaactatgtg caggttctty gacagctttc tvagyaahgt taagaayaag agcgattcca 360
 acttccttct agaggcttcr aatgcwgayc cattgggtgc aagcgctttt gggtttgatg 420
 ctgacgatca rgt 433

<;210>; 36

<;211>; 436

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 36

gggaaaggra argctggacc vaagtccatt gcttcagarg ggtcatcckt ggataacatt 60
 tccrcaagag aatttcagtt tgctagacaa agtcaggcga aggaggatgg cggcagttct 120
 aatcttcar ytaaaggtgg acgcagatct gaaagcgttc ctrgccgak aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatcctgga acagacaytt ggagtccttc ttcggaaca 240
 tagcaatcca rggacactcg garcagacgg agttcctgga yrtgayggtg gaagtgaagt 300
 caatggagga tcagaaggtg rtaagttcct acaacctgaa atcggtrgtg gatcttatca 360
 aggattcaa gactacatct tcggaccoga atataaacgg ratgaccttc cgccaggttt 420
 gtgaggcctt tgcycc 436

<;210>; 37

<;211>; 433

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 37

gagaaagcac aaattatgtg cattggggag ctttgtcaat atcaatagat gctttattca 60
 ggaaaaatgc aggggtttcc ggttgggtct atgtatatga caacaggtgg gaaacatttg 120
 agcaggcaat gctmcagaaa tttcgtttca acttggatag tggatcagcc acattggtga 180
 cctcccaaaa ctttctgtc tcgttggacg atccaggcct ctcgattca atcagcgttg 240
 cggtgatggt tgagaatctg aacttcaaat tggaaagtta tccaattagt gtgagagtag 300
 gcaacatgtg caggttcttt gacagcttct tgagcagtggt taagaacaaa gttgattcta 360
 attttctact tgaagccoga aatgcagacc ctctgggagc aggagctttt gggtttgaac 420
 aggatgatca agt 433

<;210>; 38

<;211>; 435

<;212>; DNA

<;213>; Apple chlorotic leaf spot virus

<;400>; 38

ggaaaagga aagctggaac caaatccatt gcttcagagg ggtcatccat tgataacatt 60
 tctccaagag aatttcagtt tgctcgacaa gatcaggcga aggagaatgg cagcagttct 120
 gaatttacag ctaaaagtgg acgcagatct gaaagcgttc ctggcccgag aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatcctgga acagatactg gagtccatct tcggaacat 240
 agcgatwcag ggcacgtcag agcagacaga attcctggat ctartggtgg aggtgaartc 300
 matggaggat cagaaggtaa tgggttctta caacctgaag gagggtgtca acatgatcaa 360
 agchttcaag actacctctt cggatccgaa catcagcaac atgactttcc gycaggtgtg 420
 tgaggcwttt gcmcc 435

<;210>; 39
 <;211>; 435
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 39
 grgagagyac maaytaygtg cactgkgggg agcaytrtcm atatcmattg aygcmctttt 60
 caggaagaat gctggagtgt cgggttggtg ttacgtatac gacaatagat gggaaacttt 120
 cgagcaggcc atgctgcaaa agtttcgttt taatttgac agtggttcag ctacgttgg 180
 gacctccca aattttccag ttcatgtga cgatccagg ctttcaaatt ccataagcgt 240
 ggcggtgatg ttcgagaacc tcaatttcaa gctagagagt tacccaatca gtgtgagggt 300
 gggcaatatg tgcagrttct ttgacagctt cctaagtagt gtgaagaaca aagtggattc 360
 caactttcta cttgaggctg ctaatgcwga tccgcttga gcaggggtct ttggttttga 420
 gcaggacgat caagt 435
 <;210>; 40
 <;211>; 438
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 40
 ggcaagagca agactggagc aaaatccact tcttcagagg ggtcatcctt tgataacatt 60
 tctacaagag agtttcagtt tgctagacaa gatcagaagg cgaaggcatg gcggcagtat 120
 tgaatcttca attaaaggtg gacgcagtat ctgaaggcgt tcctggccgc agaaggcaga 180
 ccccttcatg gaaagacagg ggcaattctg gaacagacac tggaggccat ctthgcgaac 240
 atagcgatac aaggacctc ggagcaaacy gagttcctgg acgtactggt ggagggtgaaa 300
 tccatggagg accagmaggt ggtgggttca ttcaattctg aaggaggtag tcaactgat 360
 caaaatattc aggactactt cttcggacc gaacataagc aatatgacct tccgccaggt 420
 gtgtgaagca ttgctcc 438
 <;210>; 41
 <;211>; 433
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 41
 gagagagtac gaactatgtg cattgggggg ctttatctat atcgattgac gccctttca 60
 ggaaaaatgc tgggtgtct ggttgggtc acgtttatga caataggtg gaaactttg 120
 aacaagctat gttgcagaag ttcaggttca atttggatag cggatccgcg acattgggtca 180
 cttcaccaaa cttccagtg tcattggatg accaggcct ttcaaatca ataagtgtg 240
 ccgtgatgtt cgagaactta aatttcaagc ttgagagcta tccgattagc gttagagtcg 300
 gcaacatgtg ccggttcttt gatagtttct tgagcagtg caagaacagg gtggattcaa 360
 actttctgct ggaggcatca aatgctgaac cccttggggc tggagctttt ggatttgaac 420
 aggacgatca agt 433
 <;210>; 42
 <;211>; 435
 <;212>; DNA
 <;213>; Apple chlorotic leaf spot virus
 <;400>; 42
 ggaaaaggga aagctggacc aaaatccatt acttcagagg ggtcatccgt tgataacatt 60
 tctgcaagag agtttcagtt tgctcgacaa aatcaggcga aggaggatgg cagcagttct 120
 gaatctgcaa ctaaggtag acgcagattt gaaggctttc ctggccgcgg aaggcagacc 180
 ccttcatgga aagacagggg caatcctgga acagatgttg gaggccatct tcggaacat 240
 agcgatacag gggacgtcgg agcaaacgga gttcctggat ctggtggtgg aagtgaagtc 300
 aatggaggac caaaaggtga tccggtcata caacctgagg gaggtgtca atatgatcaa 360

```

ggccttcaag actacatctt cggacccaaa catcagcaac atgactttcc gccagggtgtg 420
tgaggccttc gcacc 435

```

【 0 0 7 3 】

【配列表フリーテキスト】〔配列番号1〕プライマー。第18塩基及び第21塩基のnは、a、t、c、又はgである。

〔配列番号2〕プライマー。第7塩基及び第13塩基のnは、a、t、c、又はgである。

〔配列番号3〕プライマー。第6塩基のnは、a、t、c、又はgである。

【 0 0 7 4 】〔配列番号4〕プライマー。第6塩基のnは、a、t、c、又はgである。

〔配列番号5〕プライマー。

〔配列番号6〕プライマー。第3塩基及び第9塩基のnは、a、t、c、又はgである。

〔配列番号7~10〕プライマー。

【図面の簡単な説明】

【図1】各種ACLSV分離株由来cDNA断片のアライメントを示す図である。

【図2】各種ACLSV分離株由来cDNA断片のアライメントを示す図である。

【図3】各種ACLSV分離株由来cDNA断片のアライメントを示す図である。

【図4】各種ACLSV分離株由来cDNA断片のアライメントを示す図である。

【図5】各種ACLSV分離株由来cDNA断片のアライメントを示す図である。

【図6】通常のPCR、ネステイドPCR及びデュアルネステイドPCRによるACLSVの検出を示す電気泳動写真である。

【図5】

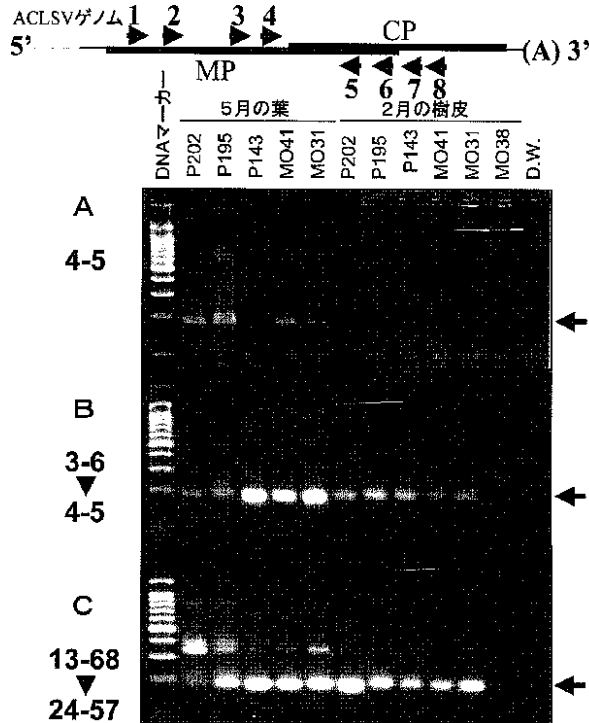
```

          7                               8
ACTACHTCTTYRGAYCCRAAYATHARC  ATGACYTTCGGYCARGTBTGTGARGC
AGG-ACTACATCTTCGGACCCGAATATAAGCAGCATGACCTTCCGCCAAGTGTGTGAGGCATTGCCCC
AAR-ACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCAACATGACTTTCGCCCAGGTGTGTGAGGCCTTCGCACC
AAR-ACTACCTCTTCRGATCCGAACATCAGCARCATGACTTTCGGYCAGGTGTGTGAGGCCTTYGCACC
AAG-ACTACMTCTTCGGAYCCRAACATMAGCAACATGACYTTCGCCCAGGTGTGTGAGGCCTTYGCAC
ARG-ACTACMTCTTYGGAYCCRAAYATMARCARCATGACYTTCGCCCARGTGTGTGAGGCWITYGCHCC
AAG-ACTACMTCTTGGAYCCGAAYATTAGCAACATGACCTTCCGCCARGTGTGTGAGGSAKTCCGACC
RRG-ACTACMTCTTYGGAYCCGAAYATHARCAVCATGACYTTCGCCCARGTGTGTGAGGCWITYGCMCC
ARG-ACTACATCTTCGGATCCGAAYATAARCAACATGACYTTCGCCCARGTKTGTGAGGCCTTTCGCC
AAG-ACTACATCTTCGGAYCCGAACATMAGCAAYATGACYTTCGGYCAGGTGTGTGARGCWITTCGWCC
AGG-ACTACATCTTCGGACCCGAATATAAGCAGCATGACCTTCCGCCAAGTGTGTGAGGCATTGCCCC
AAG-ACTACMTCTTCGGATCCGAAYATMAGCAACATGACYTTCGGYCAGGTGTGTGAGGCYTTCCGCACC
ARGA-ACTACMTCTTCGGAYCCGAAYATMARCARCATGACYTTCGCCCARGTKTGTGARGCCTTTCGMCC
AAG-ACTACATCTTCGGACCCGAATATAAACGGRATGACCTTCCGCCAGGTTTGTGAGGCCTTTCGYCC
AAG-ACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCAACATGACTTTCGGYCAGGTGTGTGAGGCWITYGCMCC
AGG-ACTACTCTTCGGACCCGAACATAAGCAATATGACCTTCCGCCCAGGTGTGTGAGGCATTGCTCC
AAG-ACTACATCTTCGGACCCAAACATCAGCAACATGACTTTCGCCCAGGTGTGTGAGGCCTTCGCACC
7048          7074  7078          7103  7112

```

* cDNAの塩基配列のアライメントにおける下の数字は、ACLSV P205の全長のゲノムにおける位置。上の数字はプライマーで、5-8に関してはプライマーの相補配列をアライメントと一緒に並べた。P205の配列はDNAデータベース (DDBJ、アクセッションNo. D14996) から得た。

【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7	識別記号	F I	テームコード' (参考)
G 0 1 N 33/569		C 1 2 R 1:92)	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A	(C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 R 1:92)		C 1 2 R 1:92)	
(C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:92)		C 1 2 R 1:92)	

(72)発明者 須崎 浩一	F ターム(参考)	4B024 AA07 AA14 CA01 HA14
岩手県盛岡市下厨川字赤平4番地 農試宿		4B063 QA01 QA18 QA19 QQ04 QQ10
舎R C 3棟15号		QQ52 QR32 QR38 QR62 QS14
		QS25