

MAREK S. SZYNDEL

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego — Akademia Rolnicza w Warszawie

PRZEGLĄD TECHNIK IMMUNOELEKTRONOMIKROSKOPOWYCH STOSOWANYCH W WIRUSOLOGII ROŚLIN

I. OBRAZY REAKCJI SEROLOGICZNEJ W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM; *Tradycyjne techniki immunoelektronomikroskopowe*

Podstawą wszystkich metod serologicznych jest wykrywanie specyficznego kompleksu antygen-przeciwciała, przy czym różne są sposoby wykonywania badań serologicznych i różne techniki obserwacji reakcji serologicznej. Proste metody serologiczne charakteryzują się często zbyt niską czułością w wykrywaniu tworzącego się precipitatu (skąpe precipitaty powstające przy niskiej koncentracji antygeny lub przeciwciała mogą nie być widoczne). Ponadto przy stosowaniu tych metod występuje stosunkowo duże ryzyko błędnych odczytów na skutek częstych reakcji niespecyficznych. Zwiększenie czułości i specyficzności testów serologicznych można uzyskać różnymi drogami. Stosuje się znakowanie przeciwciał enzymami [17, 18, 33, 53, 62, 75], radioizotopami [24, 36, 49] lub fluoresceiną [50, 52, 71, 76]. Reakcja serologiczna jest badana także w testach immunoelektroforetycznych [26, 27, 28, 57], w testach z użyciem kulek lateksu [1, 12, 54] lub w mikroskopie elektronowym. Metody serologiczne z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego określa się mianem immunoelektronomikroskopii — ang. immunoelectron microscopy — IEM [59]. Techniki immunoelektronomikroskopowe [47] umożliwiają obserwowanie reakcji serologicznej antygen-przeciwciała w komórce roślinnej lub, częściej, w innych środowiskach. Do badania wirusów jako antygenów w ultracienkich skrawkach tkanki roślinnej używa się technik immunocytoologicznych [32, 41, 64, 66, 72]. Umożliwiają one lokalizację antygenów, także w ciałach wtrętowych, w komórkach porażonych roślin. Natomiast badanie wirusów poza komórkami roślinnymi; na przykład w soku z porażonych roślin lub w czystych preparatach wirusów, umożliwia bezpośrednią obserwację reakcji serologicznej i kompleksu wirus-przeciwciała w mikroskopie elektronowym.

W zależności od sposobu przygotowania preparatów immunoelektronomikroskopowych można uzyskać trzy różne warianty reakcji sero-

logicznej wynikające ze zjawisk określanych jako zbrylanie (ang. clumping), wyłapywanie (ang. trapping) i dekorowanie (ang. decoration):

1. Znajdujące się w mieszaninie cząstki wirusa i specyficzne przeciwciała poruszają się swobodnie tworząc po okresie inkubacji kompleks serologiczny w postaci zbrylonych, skłębionych, zlepionych przeciwciałami cząstek wirusa. Taki kompleks jest nanoszony na siatkę do mikroskopu [46].

2. Przeciwciała mogą być najpierw adsorbowane do powierzchni błonki podtrzymującej na siatce. Po umieszczeniu takiej „uczulonej” siatki na zawieszynie wirusa następuje zjawisko wyłapywania przez przeciwciała cząstek wirusa z zawieszyny. Liczba cząstek wyłapanych na siatkach pokrytych surowicą homologiczną jest wielokrotnie wyższa niż na siatkach pokrytych surowicą kontrolną [22].

3. Cząstki wirusa można także unieruchamiać przez ich adsorpcję do błonki na siatce. Jeżeli siatkę taką umieścimy na kropli surowicy, to cząstki przeciwciał, które się swobodnie przemieszczają, opłaszczają czyli „dekorują” cząstki wirusa, co widoczne jest w mikroskopie jako ciemne halo wokół cząstek wirusa. Zjawisko to określa się jako dekorację lub opłaszczanie przeciwciałami (ang. decoration, antibody coating) [46].

Wszystkie techniki IEM, zarówno tradycyjne, jak i nowoczesne, wykorzystują jeden z wyżej opisanych wariantów przebiegu reakcji serologicznej, a w zależności od warunków reakcji opisane zjawiska mogą występować oddzielnie lub łącznie [55].

Tradycyjne techniki IEM

Milne i Luisoni [47] podzielili tradycyjne techniki immunoelektronomikroskopowe na 5 grup: techniki klasyczne, agarowe, metoda Derricka, dekoracja oraz technika nazywana po angielsku leaf-dip serology.

Techniki klasyczne, zapoczątkowane pracami Andersona i Stanleya w 1941 roku [3], a rozwinięty przez Lafferty'ego i Oertelisa [34], Almeida i Watersona [2], Ball i Brakke'a [8] oraz Bercksa i wsp. [13], polegają na tym, że miesza się zawieszinę wirusa z surowicą lub wydzielonymi frakcjami przeciwciał, a następnie inkubuje się mieszaninę od jednej do kilku lub kilkunastu godzin w warunkach temperatury pokojowej lub 37°C. Powstały kompleks osadza się przez wirowanie, a następnie sporządza się zawieszinę w wodzie destylowanej dodając kwasu fosfowolframowego (PTA) przed naniesieniem na siatkę mikroskopu i wysuszeniem. Mogą być tutaj stosowane różne modyfikacje, np. pomijanie wirowania, wprowadzanie dializy czy zmiany czasu inkubacji. W efekcie uzyskuje się obraz zbrylonych, a często i udekorowanych przeciwciałami cząstek

wirusa. Przy użyciu technik klasycznych można wykrywać wirusy występujące w bardzo niskich koncentracjach, identyfikować je, a także obserwować reakcje przeciwciał (IgG, IgM czy fragmentów Fab) z cząstkami wirusa lub określonymi miejscami na tych cząstkach. Jednakże technika ta jest pracochłonna i czasochłonna, a np. wirowanie może powodować niespecyficzne zbrylanie się cząstek [47]. Czynniki reakcji serologicznej powinny być wolne od zanieczyszczeń, które mogą utrudniać obserwację w mikroskopie. Próbowano pozbyć się tych zanieczyszczeń używając technik agarowych [31]. Reakcję serologiczną przeprowadzano na powierzchni agaru, a na kroplę mieszaniny surowicy z antygenem nakładano siatkę mikroskopową. Zanieczyszczenia o niskim ciężarze molekularnym i woda wnikały do agaru, a zbrylone cząstki wirusów pozostawały na siatkach. Po osuszeniu siatek preparaty kontrastowano. Czasami agaru używano również jako rezerwuaru przeciwciał [4]. Metody te nie były zbyt popularne, tym bardziej, że Derrick [20] udowodnił, iż zanieczyszczenia można usunąć dużo prościej przez zwykłe spłukiwanie siatek.

W latach 1972—1973 badacz ten opracował technikę immunoelektronomikroskopową polegającą na pokrywaniu surowicą błonek podtrzymujących na siatkach, co umożliwia wyłapanie zwiększonej liczby cząstek z zawiesiny wirusa. Derrick [20, 21] nazwał swoją technikę „serologically specific electron microscopy” i choć nazwa ta nie jest najszcześniejsza, gdyż wszystkie techniki IEM są „serologicznie specyficzne”, część badaczy tej nazwy używa [10, 15, 25, 39, 40, 51, 65, 69, 70]. W literaturze spotyka się także i inne nazwy: technika Derricka [38, 43, 44, 45, 47], „serological trapping — STREM” czyli serologiczne wyłapywanie [48, 56], „serum activated grids” — serologicznie aktywne siatki, „antiserum-coated grids — ACGs” — siatki pokryte surowicą [11, 60, 73] oraz technika zagęszczania [77]. Podczas roboczego sympozjum „Electron Microscope Serology” w Instytucie John Innes w Szkocji w 1981 roku zaproponowano, aby technikę tą określać jako „immunosorbent electron microscopy — ISEM” [59] i nazwa ta jest obecnie powszechnie stosowana [16, 19, 30, 37, 42, 61, 63].

Derrick [20, 21] w pierwszych swoich pracach podał następujący sposób przygotowania preparatów immunoelektronomikroskopowych: Siatki pokryte błoną Parlodionu napyłoną węglem umieszcza się na kropli surowicy rozcieńczonej 1 : 10 0,05 M buforem Tris o pH 7,2. Po 30 minutach siatki płucze się pięciokrotnie tym samym buforem w celu usunięcia niezadsorbowanych przeciwciał i umieszcza się je na kropli soku z badanej rośliny (sok wyciska się w obecności 0,05M buforu Tris o pH 7,2 z dodatkiem 0,9% NaCl). Po godzinnej inkubacji w temperaturze 24°C siatki płucze się trzykrotnie buforem używanym do przygotowania soku oraz wodą destylowaną i po osuszeniu napyła się je platyną z palladem. Za-

miast napyłania można stosować octan uranylu do kontrastowania preparatów [23]. W wyniku zastosowania tej techniki uzyskano około 50-cio-krotny wzrost liczby cząstek wirusa mozaiki tytoniu i 20-stokrotny wzrost liczby cząstek wirusa Y ziemniaka w stosunku do siatek kontrolnych. Stwierdzono także, że liczba wykrytych cząstek była proporcjonalna do koncentracji wirusa tak, że logarytm liczby wyłapanych wirionów zmniejszał się liniowo wraz z rozcieńczeniem wirusa. Podobną zależność znaleziono także dla innych wirusów [10, 38, 48, 51].

Opracowaną przez Brandesa [14] procedurę „leaf-dip” — zanurzania liścia w celu identyfikacji w mikroskopie elektronowym pałeczkowatych wirusów zastosowano w badaniach serologicznych [5, 6, 7, 35, 67] jako technikę zwaną „leaf-dip serology”. Na pokrytej błonką siatce umieszcza się rozcieńczoną surowicę i przez kroplę tę przeciąga się 3—4 razy świeżo przeciętą krawędź blaszki liściowej. Naciętą blaszkę liściową można zanurzać najpierw w kropli wody na siatce, a następnie do tej kropli dopiero dodać surowicy [29]. Preparat taki po 5—15 lub nawet 30—40 minutach suszy się [7] lub tylko odsącza [9, 35] i kontrastuje. Technika ta może służyć do wykrywania i identyfikacji wirusów oraz do badań nad ich pokrewieństwem serologicznym [9, 29, 35], ale czasem, zwłaszcza przy dodatkowym suszeniu siatek przed kontrastowaniem, uzyskany obraz może być nie najlepiej czytelny. Niska jakość obrazu może być także spowodowana obecnością składników soku roślinnego (białka, cukry, sole) bądź surowicy (np. krystalizacja soli fizjologicznej) [5].

W preparatach przygotowywanych techniką klasyczną czy techniką „leaf-dip serology” występuje często zjawisko dekorowania, opłaszczania cząstek czy agregatów cząstek wirusa specyficznymi przeciwciałami. Po raz pierwszy zjawisko dekoracji, jako główny wynik reakcji serologicznej widoczny w mikroskopie elektronowym, wykorzystano w badaniach strukturalnych bakteriofagów [74, 78]. Nanoszono kroplę oczyszczonej zawiesiny faga na błonkę podtrzymującą na siatce, po 30 sekundach wodą destylowaną wmywano fagi niezadsorbowane do błonki, a następnie siatki nakładano na krople specjalnie przygotowanej surowicy i po okresie inkubacji (od 30 minut do 4 godzin w temperaturze 37°C) siatki płukano i preparaty kontrastowano. Badania te umożliwiły lokalizację określonych miejsc i białek w kapsydach bakteriofagów.

Na bazie tradycyjnych technik immunoelektronomikroskopowych opracowano szybkie i nowoczesne techniki IEM, takie jak technika zbrylania cząstek, dekorowania cząstek wirusów, elektronomikroskopowa technika immunosorpcji — ISEM oraz techniki kombinowane [46, 47, 48, 58]. O technikach tych mowa będzie w drugiej części tego opracowania [68].

LITERATURA

1. Abu-Salih H.S., Murat A.F., Daft M.J.: *J. gen. Virol.* 3, 299—302, 1968.
2. Almeida J.D., Waterson A.P.: *Advan. Virus Res.* 15, 307—338, 1969.
3. Anderson F.A., Stanley W.M.: *J. Biol. Chem.* 139, 339—344, 1969.
4. Anderson N., Doane F.W.: *Canad. J. Microbiol.* 19, 585—589, 1973.
5. Ball E.M.: „*Methods in Virology*”, K. Maramorosch, H. Koprowski (red.), Acad. Press 5, 445—450, 1971.
6. Ball E.M.: *Amer. Phytopath. Soc. Monogr.* 31 str., 1974.
7. Ball E.M., Brakke M.K.: *Virology* 36, 152—155, 1968.
8. Ball E.M., Brakke M.K.: *Virology* 39, 746—758, 1969.
9. Barnett O.W., Alper M.: *Phytopathology* 67, 448—454, 1977.
10. Beier H., Shepherd R.J.: *Phytopathology* 68, 533—538, 1978.
11. Bem F., Murant A.F.: *Ann. appl. Biol.* 92, 243—256, 1979.
12. Bercks R., Querfurth G.: *J. gen. Virol.* 12, 25—32, 1971.
13. Bercks R., Querfurth G., Lesemann D.: *Phytopath. Z.* 80, 233—243, 1974.
14. Brandes J.: *Nachrl. Deut. Pflanzenschutz. Braunschweig* 9, 151—152, 1957.
15. Brlansky R.H., Derrick K.S.: *Phytopathology* 69, 96—100, 1979.
16. Chester J.B., Hill S.A., Wright D.M.: *Ann. appl. Biol.* 102, 325—329, 1983.
17. Clark M.F.: *Ann. Rev. Phytopathol.* 19, 83—106, 1981.
18. Clark M.F., Adams A.N.: *J. gen. Virol.* 34, 475—483, 1977.
19. Cohen J., Loebenstein G., Milne R.G.: *J. virol. Meth.* 4, 323—330, 1982.
20. Derrick K.S.: *Phytopathology* 62, 753—754, 1972.
21. Derrick K.S.: *Phytopathology* 63, 444 abstr., 1973.
22. Derrick K.S.: *Virology* 56, 652—653, 1973.
23. Derrick K.S., Brlansky R.H.: *Phytopathology* 66, 815—820, 1976.
24. Ghabrial S.A., Shepherd R.J.: *J. gen. Virol.* 48, 311—317, 1980.
25. Hamilton R.I., Nichols C.: *Phytopathology* 68, 539—543, 1978.
26. Havranek P.: *Phytopath. Z.* 92, 351—358, 1978.
27. Havranek P.: *Phytopath. Z.* 93, 5—11, 1978.
28. Havranek P.: *Phytopath. Z.* 93, 97—104, 1978.
29. Hearon S.S.: *Phytopathology* 72, 838—844, 1982.
30. Huth W., Lesemann D.E., Paul H.L.: *Phytopath. Z.* 111, 37—54, 1984.
31. Kelen A.E., Hathaway A.E., McLeod D.A.: *Can. J. Microbiol.* 17, 993—1000, 1971.
32. Kishida Y. i in.: *J. Cell. Biol.* 64, 331—339, 1975. q
33. Koenig R., Paul H.L.: *J. virol. Meth.* 5, 115—125, 1982.
34. Lafferty K.J., Oertelis S.: *Virology* 21, 91—99, 1963.
35. Langenberg W.G.: *Phytopathology* 64, 128—131, 1974.
36. Langenberg W.G., Schlegel D.E.: *Virology* 32, 167—171, 1967.
37. Lesemann D.E.: *Acta Hort.* 127, 159—173, 1982.
38. Lesemann D.E., Bozarth R. F., Koenig R.: *J. gen. Virol.* 48, 257—264, 1980.
39. Lima J.A.A., Purcifull D.E.: *Fitopat. Brasileira* 4, 299—308, 1979.
40. Lima J.A.A., Purcifull D.E.: *Phytopathology* 70, 142—147, 1980.
41. Lin N.S., Langenberg W.G.: *J. Ultrastruc. Res.* 84, 16—23, 1983.
42. Luisoni E., Milne R.G., Roggero P.: *Pl. Disease* 66, 929—932, 1982.
43. Milne R.G.: *Working guide. 3-rd International Congress of Plant Pathology — München, 16—23, 1978.*

44. Milne R.G.: Acta Hort. 110, 129—135, 1980.
45. Milne R.G., Lesemann D.E.: Virology 90, 299—304, 1978.
46. Milne R.G., Luisoni E.: Virology, 68, 270—274, 1975.
47. Milne R.G., Luisoni E.: „Methods in Virology”, K. Maramorosch, H. Kopprowski (red.), Acad. Press 6, 265—281, 1977.
48. Nicolaieff A., van Regenmortel M.H.V.: Ann. Virol. (Institut Pasteur) 131, 95—110, 1980.
49. O'Donnell I.J., Shukla D.D., Gough K.H.: J. virol. Meth. 4, 19—26, 1982.
50. Otsuki Y., Takebe I.: Virology 38, 497—499, 1969.
51. Paliwal Y.C.: Phytopath. Z. 89, 25—36, 1977.
52. Peters J.H., Coons A.H.: Immunol. and Immunochem. 5, 424—444, 1976.
53. Powell C.A., Derr M.A.: Phytopathology 73, 660—664, 1983.
54. Querfurth G., Paul H.L.: Phytopath. Z. 95, 282—285, 1979.
55. Regenmortel M.H.V. van: „Serology and immunochemistry of plant viruses”. Acad. Press, 302 str., 1982.
56. Regenmortel M.H.V. van, Nicolaieff A., Burckard J.: Acta Hort. 110, 107—115, 1980.
57. Reichenbächer D., Richter J., Schubert L.: Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz 15, 97—102, 1979.
58. Roberts I.M., Harrison B.D.: Ann. appl. Biol. 93, 289—297, 1979.
59. Roberts I.M., Milne R.G., van Regenmortel M.H.V.: Intervirology 18, 147—149, 1982.
60. Roberts I.M. i in.: Rept. Scottish Hort. Res. Inst. 1977, 105—106, 1978.
61. Rose G.D.: Potato Res. 26, 49—62, 1983.
62. Rybicki E.P., von Wechmar M.B.: J. virol. Meth. 5, 267—278, 1982.
63. Sequiera J.C., Harrison B.D.: Ann. appl. Biol. 101, 33—42, 1982.
64. Shalla T.A., Amici A.: Virology 31, 78—91, 1967.
65. Shalla T.A., Petersen L.J., Giunchedi L.: Virology 66, 94—105, 1975.
66. Shepard J.F., Gaard G., Purcifull D.E.: Phytopathology 64, 418—425, 1974.
67. Shikata E., Kojima M.: Ann. Phytopath. Soc. Japan 44, 28—34, 1978.
68. Szyndel M.S.: Post. Nauk Roln. (w druku).
69. Thomas B.J.: Ann. appl. Biol. 94, 91—101, 1980.
70. Thomas B.J.: Micron 12, 175—176, 1981.
71. Thornley W.R., Mumford D.L.: Phytopathology 69, 738—740, 1979.
72. Tomenius K., Clapham D., Oxelfelt P.: J. gen. Virol. 64, 2669—2678, 1983.
73. Torrance L., Jones R.A.C.: Pl. Pathol. 30, 1—24, 1981.
74. Tosi M., Anderson D.L.: J. Virol. 12, 1548—1559, 1973.
75. Voller A. i in.: J. gen. Virol. 33, 165—167, 1976.
76. Weidmann H.L.: Potato Res. 24, 255—266, 1981.
77. Wieczorek M., Kaniewski W.: Prace Nauk. IOR 24, 45—60, 1982.
78. Yanagida M., Ahmad-Zadeh C.: J. Mol. Biol. 51, 411—421, 1970.

Materiały nadesłano do Redakcji w grudniu 1986 r.