

## Ochrona

# TEST ELISA I JEGO MODYFIKACJE

mgr inż. Bogumiła Zacharzewska, dr Krzysztof Treder  
IHAR-PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie  
e-mail: b.zacharzewska@ihar.edu.pl

**E**LISA, test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) od dłuższego czasu powszechnie stosowany w diagnostyce chorób wirusowych i bakteryjnych, podlega częstym modyfikacjom, które umożliwiają postęp techniczny i technologiczny. Opracowali go w latach 60. XX w. Peter Perlman i Eve Engvall z Uniwersytetu w Sztokholmie (Engvall, Perlman 1971), opierając na wykorzystaniu enzymów do wykrywania reakcji antygenów (którymi są np. wirusy lub bakterie) ze swoistymi przeciwciałami. Początkowo ELISA stosowano jedynie do wykrywania przeciwciał zawartych w surowicy (np. test na HIV). Szybki i czuły, stał się podstawowym testem klinicznym, służącym zarówno do celów diagnostycznych, jak i naukowych. Znalazł ponadto zastosowanie w przemyśle spożywczym przy wykrywaniu alergenów, takich jak jajka, migdały, orzeszki ziemne itp. My zajmujemy się tu zastosowaniem testu ELISA w diagnostyce wirusów porażających ziemniaki.

Infekcje wirusowe powodują znaczne straty plonu ziemniaków, które skutkują wy-

miernymi stratami ekonomicznymi, szczególnie w produkcji sadzeniaków. Sprawcami największych strat są w Polsce: wirus Y ziemniaka (PVY), wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV) oraz wirus M ziemniaka (PVM). Kontrolę materiału pod kątem ich obecności prowadzą laboratoria Wojewódzkich Inspektoratów Państwowej Inspekcji Roślin i Nasiennictwa na terenie całego kraju. W stosowanej obecnie procedurze wykonuje się tzw. próby oczkowe, polegające na wyprowadzaniu roślin z oczek badanych bulw, i przeprowadza się test ELISA na liściach (Clark 1977).

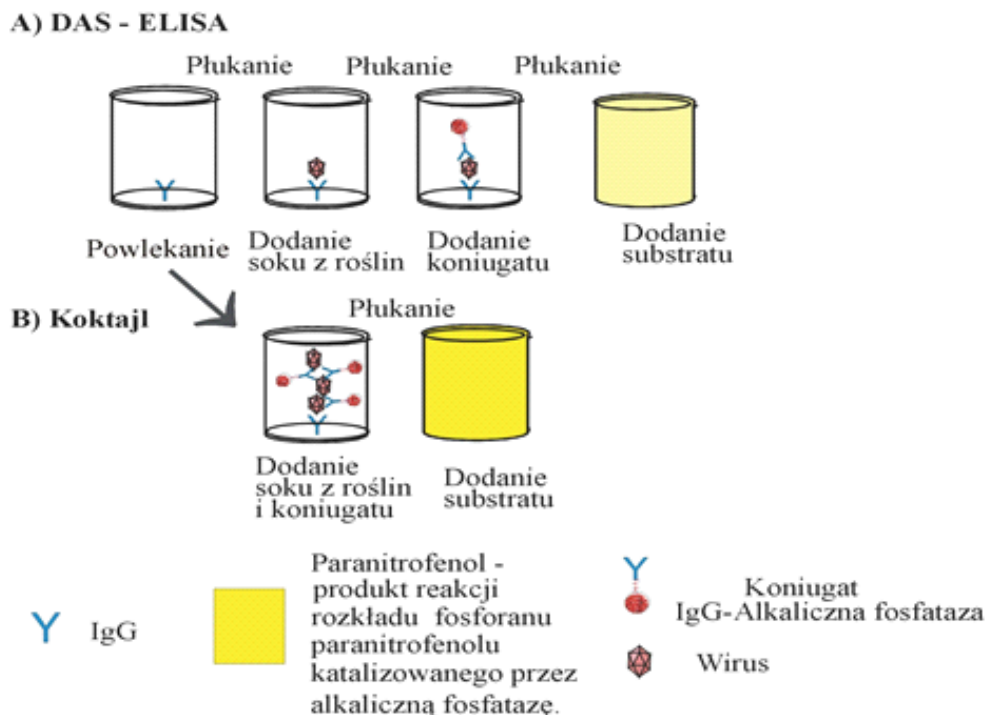
Test ELISA wymaga użycia odpowiedniej surowicy, reagującej specyficznie z wirusem. Pierwszym etapem jej sporządzania jest przygotowanie materiału roślinnego (zakażonego odpowiednim wirusem), z którego pozyskuje się antygen wykorzystywany do szczepienia zwierząt laboratoryjnych. Do tego celu służą najczęściej króliki. Odpowiedź immunologiczna, czyli pojawienie się przeciwciał we krwi zwierzęcia, zależy od antygeny i właściwości osobniczych królika. Po wykonaniu pełnej serii szczepień pobiera

się krew przez nacięcie żyły usznej. Po oddzieleniu krwinek otrzymuje się surowicę do badań, z której pozyskuje się przeciwciała.

Test ELISA może być pośredni lub bezpośredni. Pośredni, typowy test używany w badaniach naukowych, wykorzystuje dwa rodzaje przeciwciał z dwóch gatunków zwierząt. Test bezpośredni natomiast polega na wykrywaniu antygeny za pomocą tylko jednego przeciwciała – od jednego gatunku zwierzęcia.

Testy ELISA standardowo wykonywane są na polistyrenowych lub pleksyglasowych 96-dołkowych płytkach. Dołki, nazywane również studzienkami, są rozmieszczone na płytce w 8 rzędach i 12 kolumnach. Każda z analizowanych prób, rozcieńczona w odpowiedniej proporcji w specjalnym buforze, znajduje się w oddzielnej studzience. Metoda polega na przytwierdzeniu się przeciwciał

do ścianek i dna studzienki. Proces ten nazywany jest opłaszczaniem (również powlekaniami) fazy stałej. Nie przytwierdzone przeciwciała usuwa się wraz z buforem, a płytkę przemywa innym buforem. Następnie do tych samych studzienek wprowadza się antygen (np. wirus znajdujący się w soku badanych roślin, rozcieńczonym w odpowiednim buforze). Część zawartości antygeny wiąże się z przeciwciałami, a nadmiar usuwa się i ponownie przemywa studzienki buforem. W następnej kolejności wprowadza się do studzienek roztwór przeciwciał, które są połączone z odpowiednim enzymem (koniugat). Nadwyżkę przeciwciał usuwa się z płytki i ponownie płucze ją buforem. Ostatnia faza to dodanie substratu enzymu, czyli najczęściej prawie bezbarwnej substancji, którą enzym przetwarza na kolorowy produkt (rys. 1A).



Rys. 1. Schemat wykonywania testów DAS-ELISA (A) i koktajl ELISA (B)

Najczęściej stosowane enzymy to fosfataza alkaliczna (z fosforanem p-nitrofenolu jako substratem daje żółtą barwę), peroksydaza chrzanowa (z czterometylobenzydyną daje niebieskie zabarwienie) i oksydaza glukozowa (daje kolor brązowy). ELISA jest więc metodą kolorymetryczną. Zmiana barwy roztworu mierzona jest spektrofotome-

trycznie, a uzyskany wynik porównuje się z próbami kontrolnymi, przygotowanymi ze zdrowych roślin. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości wirusa w roślinie.

Zalety testu ELISA, do których należy wysoka czułość, możliwość oceny wielu prób w jednym czasie, możliwość badania różnych

części roślin, a przede wszystkim uzyskiwanie wyniku o charakterze ilościowym, sprawiają, że jest on uniwersalny w zastosowaniu, a efekty rekompensują stosunkowo duże koszty wykonania, wynikające z wysokich cen przeciwciał, enzymów i substratu. Wysoka czułość sprawia, że test ELISA pozwala na wykrycie wirusa w ilości zaledwie kilku nanogramów w 1 g porażonej tkanki roślinnej (Hill 1984; Barker, Harrison 1985).

Istnieje wiele modyfikacji ELISA mających szerokie zastosowanie w diagnostyce wirusologicznej ziemniaka. Prowadzą one do większej automatyzacji czy przede wszystkim zwiększenia czułości bądź obniżenia tła reakcji. Prostym zabiegiem umożliwiającym znaczną poprawę czułości testu jest równoczesna inkubacja badanego soku roślinnego i koniugatu w tej samej studzience płytki – test koktajl ELISA (rys. 1B) (Flegg, Clark 1979). Jest on dziesięciokrotnie bardziej czuły niż DAS-ELISA w ocenie koncentracji cząstek PLRV w ekstraktach z liści (van den Heuvel, Peters 1989). Połączenie wstępnej inkubacji ekstraktu z bulw z koktajl-ELISA pozwoliło na adaptację testu do wykrywania wirusów w bulwach. W próbach z bulw wykrywano PLRV, PVM i PVY z większą czułością niż za pomocą DAS-ELISA (Treder i in. 2009).

Ciekawą wersję ELISA stanowi test na krążkach z kielków opracowany dla PLRV przez Syllera (1988). Usprawnia on wykonanie prób oczkowych, ponieważ uzyskanie kielków jest mniej kłopotliwe i znacznie tańsze niż hodowla roślin potomnych, a koncentracja cząstek wirusów jest w nich wyższa niż w bulwach.

Warto poszerzać tematykę badań o nowe aspekty metodyczne. Dzięki prostym zabie-

gom można osiągnąć doskonałe rezultaty przy niewielkim zaangażowaniu finansowym i technicznym. Należy podkreślić, że procedura testu ELISA pozwala na wprowadzanie mechanizacji na różnych etapach testu, włącznie z odczytem wyników. Różnorodne rozwiązania techniczne, takie jak automatyczne myjki do płytek, dozowniki, różnego typu czytniki spektrofotometryczne, programy do współpracy czytnika z komputerem w celu szybkiej analizy danych itp., są już powszechnie stosowane w wielu laboratoriach.

#### Literatura

1. **Barker H., Harrison B. D. 1985.** Restricted multiplication of potato leafroll virus in resistant potato genotypes. – *Ann. Appl. Biol.* 107: 205-212;
2. **Clark M. F., Adams A. N. 1977.** Characteristics of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. – *J. Gen. Virol.* 34: 475-483;
3. **Engvall E., Perlman P. 1971.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. – *Immunochemistry* 8: 871-874;
4. **Flegg C. L., Clark M. F. 1979.** The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). – *Ann. Appl. Biol.* 91: 61-65;
5. **Hill S. 1984.** The ELISA /enzyme-linked immunosorbent assay/ technique for the detection of plant viruses. – *Microbiol. Meth. Environ. Biotech.* 19: 349-363;
6. **Syller J. 1988.** Detection of potato leaf roll virus in intact sprout disks by enzyme-linked immunosorbent assay. – *J. Phytopath.* 121: 58-64;
7. **Treder K., Pilecki T., Łycuś P. 2009.** Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw – porównanie testu ELISA z immuno-captured RT-PCR. – *Progr. Plat. Prot.* 49: 740-745;
8. **Van den Heuvel J. F. J. M., Peters D. 1989.** Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. – *Phytopathology* 79: 963-967