

WYKORZYSTANIE ENZYMATYCZNIE SPRZEŻONEGO TESTU IMMUNOSORBECYJNEGO (ELISA) DO WYKRYWANIA WIRUSÓW ROŚLINNYCH

Barbara Zawadzka

Instytut Sadownictwa, Skierniewice

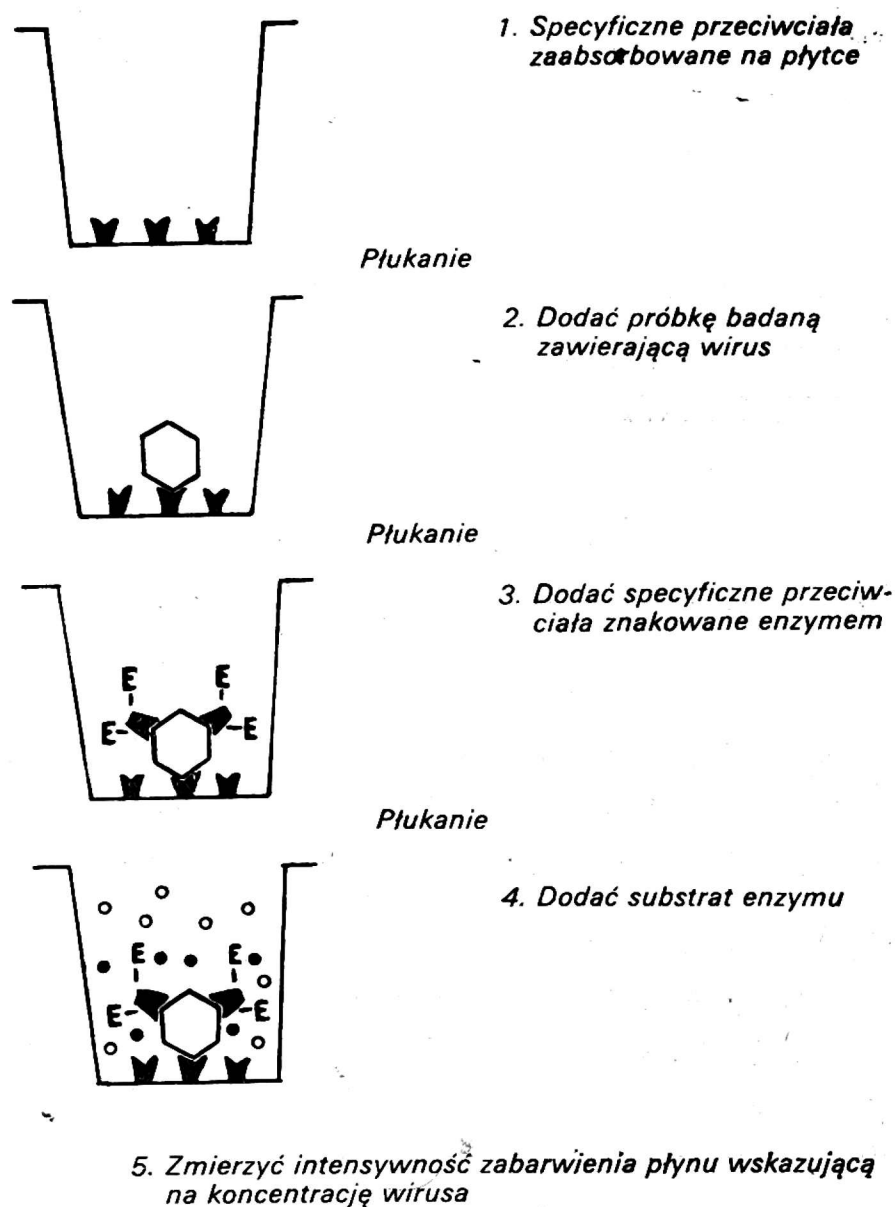
Przeciwciała sprzężone z enzymem znalazły zastosowanie w medycynie do ilościowego oznaczania immunoglobulin we krwi. Badania Vollera i innych [5] wykazały przydatność tego testu, zwanego w skrócie ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) do wykrywania wielu chorób u ludzi, między innymi śpiączki i malarii.

Badania podjęte w Anglii przez Clarka i Vollera nad wykrywaniem wirusów ospowatości śliwy i mozaiki gęsiówki dały pozytywne wyniki i doprowadziły do szczegółowego opracowania nowej, wyjątkowo czulej metody serologicznej także dla wirusologii roślinnej.

METODYKA TESTU

W metodzie ELISA, inaczej niż w innych metodach serologicznych, wirus znajdujący się w badanych próbkach jest selektywnie wychwytywany i unieruchamiany przez specyficzne przeciwciała absorbowane na stałej powierzchni (ryc. 1). Zatrzymany wirus reaguje z kolei z następnym przeciwciałem, uprzednio sprzężonym z enzymem. W ostatniej fazie badane próbki traktuje się odpowiednim substratem enzymatycznym. Wirus wykrywa się pośrednio, poprzez zmianę zabarwienia substratu rozkładanego przez enzym. Wynik pomiaru natężenia zabarwienia substratu (na kolorymetrze) umożliwia ilościowe oznaczenie zawartości wirusa w badanych próbkach.

Spośród kilku przebadanych enzymów najbardziej przydatnym do testów okazała się alkaliczna fosfataza, a jako substrat — fosforan paranitrofenylowy. Testy w metodzie ELISA przeprowadzane są na specjalnych mikropłytkach polistyrenowych, które pozwalają na jednoczesne badanie 30 próbek.



Ryc. 1. Zasady testu ELISA

W pierwszej fazie testu otwory płytki wypełniane są roztworem przeciwciał w buforze węglanowym i poddane inkubacji, w czasie której przeciwciała są absorbowane na powierzchni otworów płytki. Po okresie inkubacji następuje dokładne trzykrotne wypłukanie płytek roztworem buforu fosforanowego z dodatkiem detergentu Tween 20. Następnie do każdego z otworów płytki nanosi się określoną ilość soku roślinnego, zawierającego badany wirus. Płytki poddaje się inkubacji, po czym opróżnia się je, trzykrotnie przemywa oraz napełnia roztworem przeciwciał sprzężonych z enzymem. Po okresie inkubacji płytki ponownie opróżnia się i płucze oraz napełnia otwory substratem enzymatycznym i pozostawia w temperaturze pokojowej. Po upływie około 30 minut reakcję przerywa się dodając do otworów 3 M NaOH po czym przeprowadza się obserwację natężenia zabarwienia substratu wizualnie oraz przez pomiar na kolorymetrze przy długości fali 405 nm.

Przeprowadzone przez Vollera, Clarka, Adamsa i Tresha badania

[2-4, 6] dostarczyły szczegółów, odgrywających istotną rolę, w prawidłowym i skutecznym funkcjonowaniu testu ELISA. Sprawą zasadniczą jest jakość surowicy użytej do testu. Surowice muszą być wysoce specyficzne, wolne od przeciwciał reagujących z białkami roślinnymi i muszą odznaczać się wysokim mianem. Minimalne miano winno wynosić 1 : 400. Do testów musi być używany nie roztwór surowicy, lecz wyizolowane z niej γ -globuliny. Praca Clarka i Adamsa [4] podaje dokładny przepis wytrącania γ -globulin z surowicy jak również na sprzęganie ich z alkaliczną fosfatazą.

Prace wymienionych autorów dostarczyły również danych co do optymalnych stężeń γ -globulin służących do powlekania otworów mikropłytek (coating the plates), płukania płytek jak również natury próbek. Stwierdzono, że wirus mógł być wykrywany zarówno z oczyszczonego preparatu, jak i bezpośrednio z soku roślinnego. W doświadczeniach tych przebadano również wpływ czasów i temperatur, w jakich przebiegała inkubacja, na uzyskiwane wyniki testów.

WIRUSY WYKRYWANE METODĄ ELISA

Pierwszy test ELISA przeprowadzony z pozytywnym wynikiem na wirusach mozaiki gęsiówki (arabis mosaic AMV) i wirusie ospowatości śliwy (plum pox virus PPV) — przedstawicielach wirusów kulistych i nitkowatych zachęcił wirusologów w East Malling do dalszych badań z innymi wirusami. Jednocześnie opublikowanie uzyskanych wyników spowodowało zainteresowanie się metodą ELISA w wielu innych krajach. Jak wynikało z relacji wirusologów zgromadzonych na konferencji w East Malling w czerwcu 1977 r. metoda została wypróbowana do wykrywania dwudziestu wirusów roślinnych: mozaiki gęsiówki, ospowatości śliwy, mozaiki chmielu, nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni, mozaiki jabłoni, karłowatości śliwy, chlorotycznej plamistości liści jabłoni, Y ziemniaka, T ziemniaka, mozaiki soi, mozaiki sałaty, pasiastej mozaiki jęczmienia, plamistości pierścieniowej tytoniu, maliny i ałyczy, mozaiki narcyza, nekrozy wierzchołka narcyza, aspermii zło-cienia, mozaiki grochu oraz nekrotycznej kędzierzawki tytoniu. Z grupy tej nie udało się wykryć tylko wirusa mozaiki grochu i nekrotycznej kędzierzawki tytoniu. W przypadku jednak nekrotycznej kędzierzawki tytoniu wirus można było wykryć wtedy, gdy sok do testowania pobrano z zakażonych uprzednio liści tytoniu. Natomiast wyniki były negatywne gdy testowano bulwy ziemniaka.

Niektóre z badanych wirusów, charakteryzujące się zwłaszcza małą trwałością, wymagały specjalnych dodatków do buforów takich, jak pyrolidonian poliwinylowy lub formaldehyd. Nie bez wpływu na reak-

cję okazała się również roślina, z której wykrywano wirus. I tak ekstrakty z czarnej porzeczki porażonej przez AMV dawały czasem silne reakcje niespecyficzne, których można było jednak uniknąć, gdy test przeprowadzano na większych (1 : 100 a nie 1 : 10) rozcieńczeniach soków.

Pyrolidonian poliwinylu łagodził niespecyficzne reakcje występujące czasem przy ekstraktach z liści drzew z rodzaju *Prunus* [4]. Specjalnego traktowania wymagał również wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni (CLSV), w przypadku którego reakcje pozytywne otrzymywano tylko przy jednoczesnym nanoszeniu na płytki roztworu badanego wirusa zmieszanego z przeciwciałami znakowanymi enzymem.

Jak więc z tego wynika, test ten nie może być stosowany schematycznie, lecz musi być w pewnych granicach modyfikowany w zależności od badanego wirusa jak również od środowiska, w jakim wirus jest poddany testowaniu.

CZUŁOŚĆ TESTU ELISA

Czułość testu była badana [4] dla następujących wirusów: mozaiki gęsiówki, plamistości pierścieniowej maliny, mozaiki jabłoni, ospowatości śliwy, mozaiki chmielu i żłobkowatości pnia jabłoni. Porównywano minimalne wykrywalne ilości wirusa w preparacie oczyszczonym oraz w roztworach soków roślinnych. Czułość testu przedstawiała się następująco:

wirus	preparat oczyszczony (ng/ml)	sok z rośliny
Mozaika gęsiówki	30	10 000 (Ch.q.)
Plamistość pierścieniowa maliny	10	10 000 (N.cl.)
Nekrotyczna plamistość pierścieniowa	—	10 000 (C.s.)
Ospowarość śliwy	1	100 000 (N.cl.)
Mozaika chmielu	10	50 000 (N.cl.)
Żłobkowatość pnia jabłoni	—	1 000 (Ch.q.)

Ch.q. — *Chenopodium quinoa*; N.cl. — *Nicotiana clevelandii*; C.s. — *Cucumis sativus*

Jak z tego widać najwyższą czułość wykazał test w stosunku do wirusa ospowatości śliwy zarówno w oczyszczonym preparacie (1 ng/ml), jak i w soku rośliny wskaźnikowej *Nicotiana clevelandii*, w przypadku którego wykrycie wirusa było możliwe jeszcze przy rozcieńczeniu soku 1 : 100 000.

Oznacza to, jak wynika z dalszych badań przeprowadzonych w East Malling, że ELISA jest wielokrotnie czulsza od metody dyfuzji radialnej [1, 2] i innych metod serologicznych, co obrazuje następujące zestawienie:

metoda	koncentracja wirusa (ng/ml)
ELISA	1
dyfuzja radialna	1000
precipitacja	500
elektronmikroskopia	100
infekcyjność (mniej niż 1 plamka na inokulowany liść <i>Chenopodium foetidum</i>)	100

Reasumując wyniki dotychczasowych doświadczeń można stwierdzić, że test ELISA jest niezwykle użytecznym „narzędziem” do identyfikacji prawie wszystkich grup wirusów i wykrywania ich bezpośrednio w soku rośliny. Należy podkreślić jego szczególne znaczenie przy wykrywaniu wirusów z roślin drzewiastych, w stosunku do których wszystkie wcześniej znane metody serologiczne były zbyt mało czułe i z tego względu nieprzydatne.

LITERATURA

1. Casper R.: Serodiagnosis of plum pox virus. Acta Hort., 1975, t. 67, s. 171-172.
2. Clark M. F., Adams A. N., Tresh J. M., Casper R.: The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Hort., 1976, t. 67, s. 51-58.
3. Clark M. F., Adams A. N., Barbara D. J.: The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Hort., 1976, t. 67, s. 43-50.
4. Clark M. F., Adams A. N.: Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. gen. Virol., 1977, t. 34, s. 475-483.
5. Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ., 1976, t. 53, s. 55-65.
6. Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E., Clark M. F., Adams A. N.: The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. gen. Virol., 1976, t. 33, s. 165-167.

Барбара Завадзка

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОПРЯЖЕННОГО
ИММУНОСОРБЦИОННОГО ТЕСТА (ЭЛИСА)
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ

Резюме

Разработанный в последнее время в East Malling Research Station в Англии серологический тест в сокращении называемый ЭЛИСА (от: enzyme-linked immuno-sorbent assay — энзиматически сопряженный иммуносорбционный тест) оказался необыкновенно чувствительным и пригодным для выявления и идентификации вирусов непосредственно в соке пораженных травянистых и деревянистых растений. Необыкновенно высокая чувствительность теста следует из применения в нем антител сопряженных с энзимом, щелочной фосфатазой. Тест пригоден для количественного определения содержания вирусов в исследуемой пробе. Концентрации вируса определены путем фотометрического измерения окраски субстрата, разложенного энзимом, сопряженным с антителом.

Существенным вопросом для проведения теста является обладание сывороткой с высоким титром, не содержащей антител, реагирующих с соком здорового растения.

Среди двадцати изучаемых до сего времени вирусов, тест оказался пригодным для выявления 18 из них.

Barbara Zawadzka

APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY (ELISA)
FOR THE DETECTION OF PLANT VIRUSES

Summary

A serological test abbreviated ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), recently developed in the East Malling Research Station (England), proved to be extremely sensitive and suitable for the detection and identification of viruses directly in the sap of infected herbaceous plants and trees. The extremely high sensitivity of the test is due to the application of antibodies linked with the enzyme — alkaline phosphatase. The test is suitable for quantitative determination of virus content in the sample. Virus concentrations are determined by photometric measurements of the colour of substrate decomposed by the enzyme linked with antibody.

It is essential to use in the test high-titer serum containing no antibodies reacting with sap of healthy plant. The test proved to be suitable for the detection of 18 out of 20 so far assayed viruses.

Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 2.01.78